

Figure 1 AChR で感作後 2 週間より FTY720 を投与した場合の臨床重症度。グラフの上の矢印は投与期間

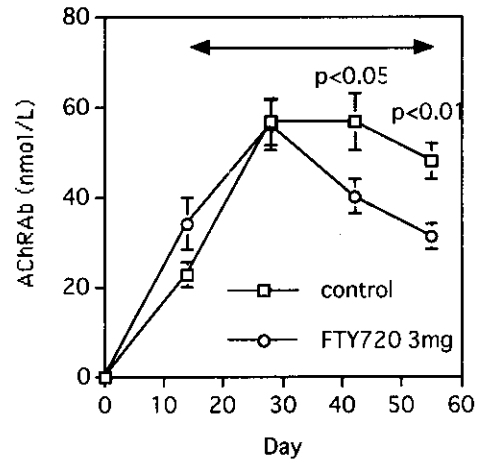


Figure 2 AChR で感作後 2 週間より FTY720 を投与した場合のラット血清 AChRAb 価。グラフの上の矢印は投与期間

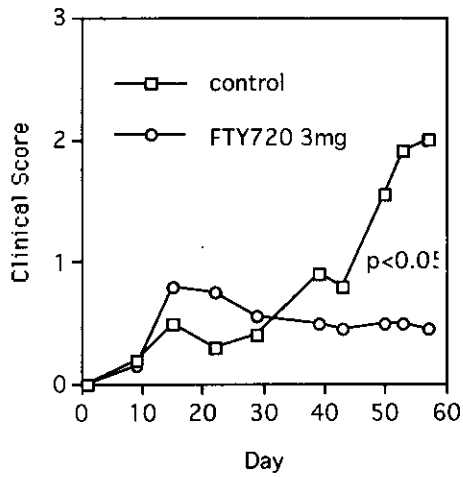


Figure 3 AChR 感作前日に FTY720 を投与した場合の臨床重症度。

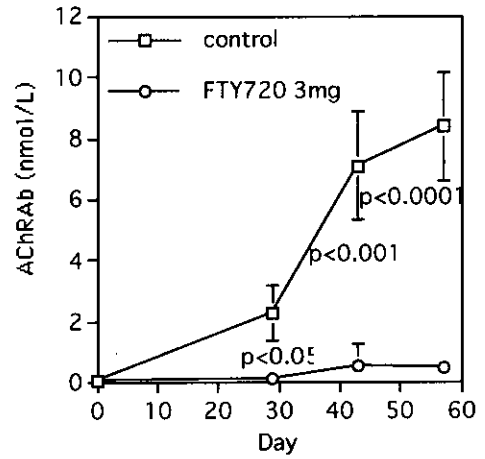


Figure 4 AChR 感作前日に FTY720 を投与した場合のラット血清 AChRAb 価。

胸腺内アセチルコリン受容体 (AChR) の重症筋無力症惹起性

松尾 秀徳¹⁾ 中根 俊成¹⁾ 吉永 恵¹⁾ 澁谷 統寿¹⁾
本村 政勝²⁾ 岡 剛史³⁾

目 的

これまでの重症筋無力症 (MG) 発症における抗原特異的 T細胞と胸腺の役割についての検討から, 自己のアセチルコリン受容体 (AChR) と反応する T細胞は myoid cell など胸腺内の AChR を標的としている可能性が推定される。次の段階として, 胸腺内で B細胞が感作され抗体産生が誘導できるか, さらに胸腺内の AChR はどの細胞にあるかが問題となる。そこで, 今回は AChR 特異的 T細胞が胸腺細胞と反応した場合に胸腺内で抗体産生が誘導されるかについて検討し, さらに, 胸腺内 AChR としての myoid cell の抗原性と抗原提示能について, rat thymic myoid cell line を用いて検討した。

方 法

1) AChR 特異的 T細胞と胸腺細胞の反応

シビレエイ由来 AChR で免疫した Lewis ラットの所属リンパ節細胞浮遊液より, ヒト AChR α -subunit の一部のペプチド H α 128-142 を刺激抗原として用い, マイトマイシン C 処理胸腺細胞を抗原提示細胞とする再刺激と T細胞増殖因子による増殖を繰り返すことにより抗原特異的 T細胞ラインを誘導した。この T細胞ラインが Lewis ラット胸腺細胞と混合培養すると活性化されることは H11 年度の班会議にて報告した。

(1) in vitro での AChR 特異的 T細胞と胸腺細胞による抗体産生の検討: AChR 特異的 T細胞 5×10^5 と Lewis ラット胸腺細胞 5×10^6 を 1ml の培養液で 5% CO₂, 37°C の条件下で培養後, 3 日毎に培養上清採取し, 抗 AChR 抗体価を測定した。

(2) in vivo での AChR 特異的 T細胞と胸腺細胞による抗体産生の検討: AChR 特異的 T細胞をマイトジェンで刺激後 3 日目に同種ラットに passive transfer した。これを 1 週毎に 4 回繰り返し, 最終の passive transfer 後 2 週目に胸腺を摘出し, 胸腺浮遊細胞を作成し, 胸腺細胞 5×10^6 を 1ml の培養液で培養し, 3 日毎に培養上清採取し, 抗 AChR 抗体価を測定した。

2) Rat thymic myoid cell line を用いた検討

Thymic myoid cell line: Fisher rat (F344) 胸腺より樹立した myoid cell line (ST1B) を用いた。この cell line は 5% FCS 添加 DMEM 培養液で容易に増殖・分化し, その表面に AChR を発現することが確認されている。

(1) in vivo における myoid cell line の抗原性の検討: 十分に分化させた ST1B を IFN γ 処理群 (MHC-Class II の誘導) と非処理群に分け, それぞれを $1 \sim 5 \times 10^6$ 個ずつ直視下に Fisher rat の胸腺内に移植し, 抗ラット AChR 抗体産生と胸腺の病理学的検索を行った。

(2) in vitro での myoid cell line の抗原提示能についての検討: Lewis ラットの場合と同様の方法で Fisher rat より Ho128-142 の合成ペプチドに反応する T細胞ライン (AChR 特異的 T細胞ライン) を作成し, myoid cell が内因性の AChR や他の抗原を提示できるかについて検討した。96 穴平底マイクロタイタープレートに myoid cell line を 1×10^4 播種し, さらに AChR 特異的 T細胞 5×10^5 を加えて混合培養し proliferation assay を行った。

結 果

1) AChR 特異的 T細胞と胸腺細胞の反応

AChR 特異的 T細胞と胸腺細胞による抗体産生の検討では in vivo, in vitro のいずれの系でも抗体の産生は確認できなかった (図 1, 2)。passive transfer 後の胸腺細胞の培養では, AChR のペプチドに対する反応は良く保たれており, 抗原特異的 T細胞が胸腺内に存在することは確認できたが, 培養上清中の抗ラット AChR 抗体の産生は確認できなかった。同時に行った病理学的検索では一部のラットで皮質の増大を認めたが, 胚中心の形成は見られなかった。

2) Rat thymic myoid cell line を用いた検討

(1) in vivo における myoid cell line の抗原性の検討: IFN γ 処理群と非処理群に分け, それぞれを 1×10^6 (1M) または 5×10^6 (5M) ずつ直視下に Fisher rat の胸腺内に移植し, 抗ラット AChR 抗体価を測定したが, いずれの群も抗体の上昇はなかった (図

1) 国立療養所川棚病院 2) 長崎大学第一内科 3) 岡山大学第二病理

3). 病理学的検索では移植したラット胸腺内に明瞭に横紋筋に分化した病変が認められたが、周辺の組織には胚中心の形成などの変化は認められなかった。

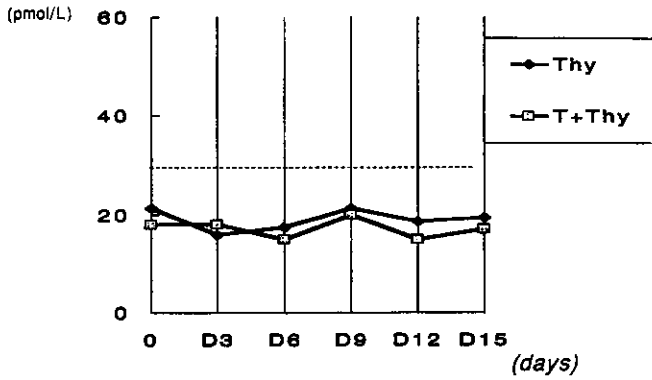


図1. AChR 特異的T細胞と胸腺細胞の混合培養上清中のラット AChR 抗体価。

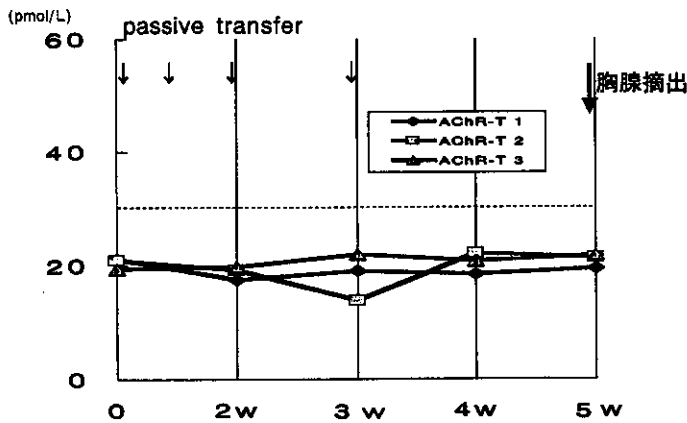


図2. AChR 特異的T細胞ライン passive transfer (4回) 後の血清中抗ラット AChR 抗体価。

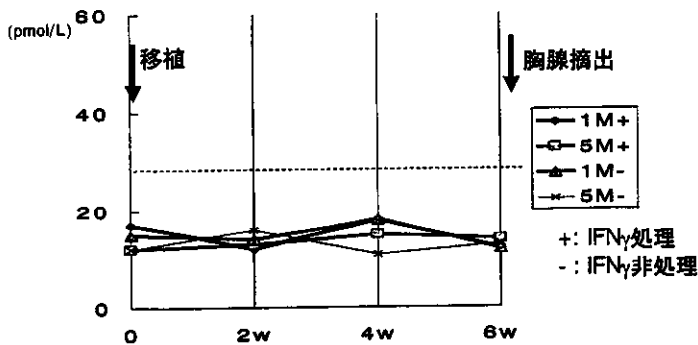


図3. Myoid cell line 移植後のラット血清中抗ラット AChR 抗体価。

(2) in vitro での myoid cell line の抗原提示能についての検討：用いた myoid cell line は IFN- γ 処理の有無に拘わらず H α 128-142 ペプチドを抗原提示し、T細胞を活性化させることが確認された(図4)。しかし、myoid cell line のみではT細胞の活性化は起こらなかった。

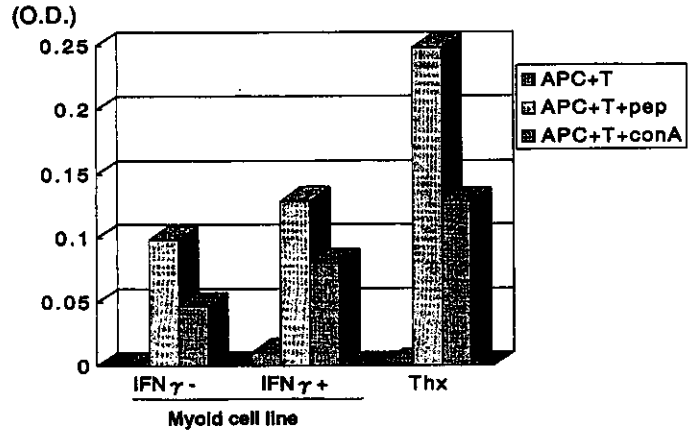


図4. AChR ペプチド特異的T細胞に対する rat thymic myoid cell line の抗原提示。

考 察

胸腺には、T細胞、B細胞、胸腺上皮細胞、dendritic cell、そして myoid cell などが存在し、ヒト、マウス、ラットなどで胸腺内に AChR または AChR 類似の蛋白質が存在することが報告されている。MGの病因における胸腺の役割は抗原となる AChR や感作されたT細胞やB細胞のソースと考えられており、とくに myoid cell などに表出されている AChR が抗原として病因と関連することが推測されている。今回の結果からは自己の胸腺内 AChR に反応するT細胞が胸腺内で増加しても B 細胞の感作が起こらず抗体産生には至らないことが推測された。また、rat thymic myoid cell line を用いた検討では myoid cell が胸腺内で増殖しても重症筋無力症を惹起する抗原とはならない可能性が示唆された。一方、myoid cell は抗原提示細胞として機能し、ペプチド抗原をT細胞に提示し活性化することが示された。この抗原提示は IFN- γ 処理の有無に拘わらず成立し、myoid cell line が class-II 分子や他の co-stimulatory 分子など抗原提示に必要な分子を有していること示唆している。しかし、今回の検討では内因性の AChR を抗原提示していることは確認できなかった。このことは、用いた AChR 特異的T細胞のエピトープを myoid cell が表出できなかった可能性も考えられ、今後、myoid cell における抗原の processing についても検討する必要があると考えられた。

ま と め

胸腺内 AChR は抗原特異的T細胞により認識されるが、抗体産生の誘導は確認できなかった。今回の検討からは myoid cell は重症筋無力症を惹起する抗原としての役割は少ない可能性が示唆された。

文 献

1) Oka T et al: Differentiation of rat thymic myoid progenitor cell line established by coculture with human T-lymphotropic virus type-1-producing human T cells. *Cell Tissue Res* 300:119-127,2000.

2) Baggi F et al: Presentation of endogenous acetylcholine receptor epitope by an MHC classII-transfected human muscle cell line to a specific CD4⁺ T cell clone from a myasthenia gravis patient. *J Neuroimmunol* 46:57-66,1993

3) Goebels N et al: Human myoblast as antigen-presenting cells. *J Immunol* 149:661-667,1992

重症筋無力症における胸腺の意義：ケモカインの重要性

小野寺宏¹⁾、鈴木靖士¹⁾、大内将弘²⁾、義江修³⁾、松島綱治⁴⁾、
田郷英昭¹⁾、永田哲也¹⁾、藤原一男¹⁾、糸山泰人¹⁾

目的

ケモカインは免疫機能制御に不可欠な液性因子であり、Tリンパ球におけるTh1/Th2バランス調節のカギを握っている。ケモカインは免疫疾患の病態にも重要な役割を果たしており、我々は昨年度の本班において多発性硬化症再発時のケモカインシグナル異常を報告した。重症筋無力症(MG)は胸腺腫や過形成などの胸腺異常を高率に合併し、胸腺摘出術が有効な治療法とされている。我々は細胞死関連遺伝子の発現がMG胸腺では著明に変化している事を報告している(1)。しかし胸腺摘出術がMG病態に及ぼす影響は不明のままであり、胸腺摘出術前後でのリンパ球機能変化も十分検討されていない。本研究では、胸腺摘出前後での患者末梢血リンパ球の機能変化をケモカインシグナルの観点から検討した。

対象・方法

MG患者(胸腺摘出術前、術後2週、術後慢性期)および健常者の末梢血リンパ球における各種リンパ球マーカー(CD4, CD8, CD20, CD3)と免疫系ケモカイン受容体

(CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5)の発現をフローサイトメトリーにより検討した。術後慢性期のサンプルは症状の変動や感染症の合併が3ヶ月以上無く、ステロイド剤以外の免疫抑制剤を使用していない患者からのものに限定した。

結果 (図1)

胸腺摘出手術前および後においてもCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD4/CD8比、B細胞数は健常者と有意の差はなかった。CCR4発現率はCD4⁺細胞で、またCXCR4発現率はCD8⁺細胞で高いなど各々のケモカイン受容体の発現レベルはT細胞の間でも異なっていた。胸腺摘出術前のMG患者リンパ球におけるCCR1, CCR5, CXCR4, CXCR5の発現率は健常者と差は無かった。一方、Th1細胞に分布するとされるCXCR3のCD4⁺細胞における発現率は、術前MG患者においては健常者と比較すると著明に減少していた。また、Th2に分布するCCR3のCD4⁺における発現率は、術前患者において著明に増加していた。胸腺摘出2週間後より、CD4⁺T細胞におけるCXCR3とCCR3の発現は健常者の発現率に近づき、胸腺摘出術後慢性期においては健常者と同じ発現レベルになっていた。

¹⁾東北大学神経内科

²⁾国立仙台病院心臓血管外科

³⁾近畿大学細菌学

⁴⁾東京大学社会予防医学

考察

MGの病態にTh1とTh2のどちらがより関与しているかは不明のままであった。近年ケモカインが自己免疫疾患の発症や病態に重要であることが明らかになり、CXCR3とCCR3がTh1細胞に、CCR3とCCR4がTh2細胞に選択的に発現していることが知られている。今回のケモカイン受容体解析では、健常者に比べて未治療（胸腺摘出手術前）MG患者ではTh2マーカーを持つCD4⁺CCR3⁺細胞が増加し、Th1マーカーを持つCD4⁺CXCR3⁺細胞が著明に減少していた。胸腺摘出手術2週間後には、CD4⁺CXCR3⁺細胞は増加してきたが、CD4⁺CCR3⁺細胞数の正常化には数ヶ月以上を要していた。すなわち術後慢性期にTh1/Th2バランスが是正されている事が明らかになった。このことは、胸腺摘出術の治療効果発現には時間を要するという臨床経過をよく反映すると思われる。今後臨床症状の変動とTh1/Th2バランスとの相関について検討が必要である。将来的にはケモカインシグナルの制御によるMG治療も期待される。

まとめ

重症筋無力症における胸腺摘出手術の意義を免疫機能の面からはじめて明らかにした。未治療MG患者の末梢血では（1）T細胞やB細胞のポピュレーションは健常者と変わらないものの相対的にTh1/Th2バランスがTh2優位である事、（2）胸腺摘出手術後これらのケモカイン受容体の発現率が健常者のそれと同等のレベルに回復する事を報告した。胸腺摘出術はT細胞機能の正常化の面でも有用と考えられる。

文献

1) Nagat T, Onodera H, Ohuchi M, Suzuki Y, Tago H, Fujihara K, Ishii N, Sugamura K, Shoji Y, Handa M, Tabayashi K, Itoyama Y. Decreased expression of c-myc family genes in thymuses from myasthenia gravis patients. *Journal of Neuroimmunology* (2001, in press)

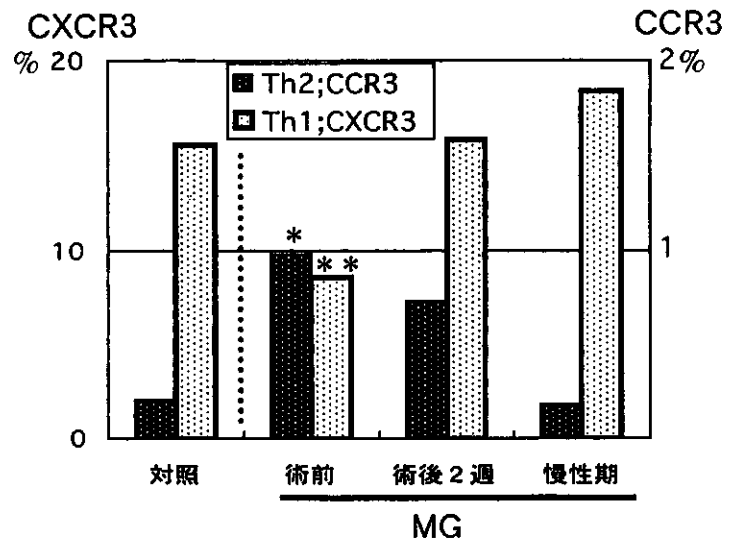


図1

MG患者末梢血CD4 T細胞におけるケモカイン受容体の発現。健常対照者に比べてMG患者ではCCR3陽性細胞が有意に増加し(p<0.05)、CXCR3陽性細胞が有意に減少(p<0.01)していた。胸腺摘出術後の慢性期にはこれらのケモカイン受容体発現率は健常者と同一のレベルになった。

ヒト胸腺細胞における Survivin の発現

藤井義敬 小林昌玄 雪上晴弘

目 的

反応性を獲得したものが positive selection という正の選択を受け分化、成熟をし末梢血へ移行していくが、自己 MHC と強く反応するものは negative selection という負の選択を受け排除される。ここでの 胸腺内における T 細胞は自己 MHC 分子と有効な selection が十分に機能しないと異物抗原を認識する能力のない T 細胞や、自己体の分子を認識して重症筋無力症などの自己免疫疾患の原因になるおそれのある T 細胞が末梢へと移行していくことになる。そこで自己免疫疾患の原因を解明するために、アポトーシス抑制蛋白である Survivin に注目した。Survivin は IAP (inhibitor of apoptosis) ファミリーに共通の BIR ドメインをもち、caspase と結合して抗アポトーシス作用を示す。ヒト胸腺細胞のセレクションにおける Survivin の発現および機能解析について検討した。

方 法

小児開心術の際、インホームド・コンセントを得た上で、胸腺切除が必要となった症例のヒト正常胸腺から胸腺細胞を抽出し解析に用いた。Survivin の発現は RT-PCR、フローサイトメトリー、免疫組織染色を用いて解析した。またアポトーシス時の Survivin の機能を解析する目的で、Dexamethasone(Dex)、Etoposide(Eto)でアポトーシスを誘導し経時的にその発現と caspase3 との関係を解析した。

結 果

RT-PCR による Survivin の発現

11 例中 9 例の胸腺細胞に survivin の発現を認めた (図 1)。



図 1 PCR による Survivin の発現

名古屋市立大学第 2 外科

胸腺内 T 細胞分化過程における Survivin の発現

Survivin の発現をフローサイトメトリーを用い解析した。CD4、CD8 の各分画においてすべての分画で Survivin の発現を認めたが、CD4⁺CD8⁺の double positive (DP) の分画では up-regulate していた (図 2)。

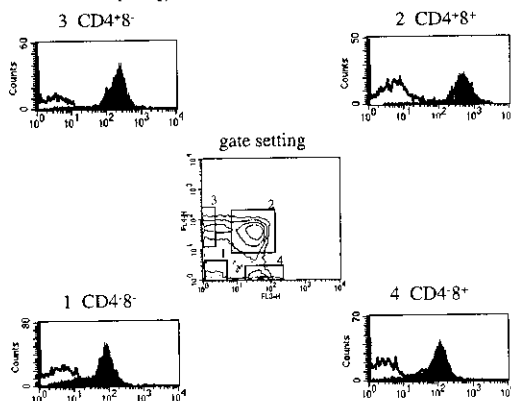


図 2 CD4/CD8 による Survivin の発現

さらに DP 段階で Survivin の発現がどのように変化しているかを TCR (T cell receptor) の発現の強さでみた。Survivin の発現は DP 段階後期の TCR を強く発現する時期 (TCR^{hi}) の胸腺細胞で最も強く発現しており、成熟した CD4⁺、CD8⁺ の single positive 段階では double negative(DN)と同程度まで down-regulate していた (図 3)。

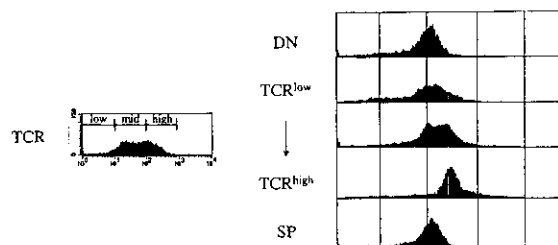


図 3 TCR 発現時期による Survivin の発現

免疫組織染色

胸腺における Survivin の発現を解析する目的で免疫組織染色を行った。Survivin は皮質内、特に皮質-髄質移行部の胸腺細胞で強く染まっていた (図 4)。またストロ

マ細胞の染色は認めなかった。

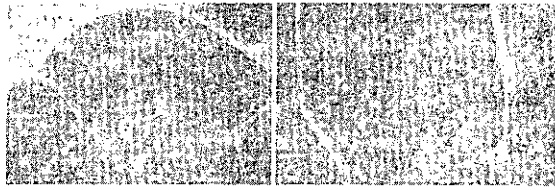


図4 免疫組織学的染色

アポトーシス誘導時の Survivin と Caspase-3 の発現

アポトーシス誘導時における survivin と活性化 caspase-3 の役割を解析するために、Dexamethason(Dex)、Etoposide(Eto)をもちいて胸腺細胞のアポトーシスを誘導し、その時間経過を見た。Survivin の発現は時間の経過とともに減少し、6時間後にはコントロールレベルまで減少していた。一方、活性化 caspase-3 は誘導後3時間で発現が見られた。これは Dex、Eto いずれの刺激によってもみられた (図5)。

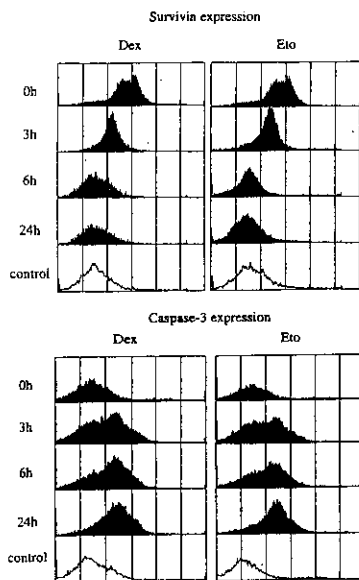


図5 アポトーシス誘導時の Survivin と Caspase-3 の発現

mRNAレベルでの Survivin および他 IAP ファミリーの変化

アポトーシス誘導時において Survivin は mRNA レベルでどのように変化するかを RT-PCR をもちいて解析した。mRNA レベルにおいても3時間後よりその発現の減少が見られ、24時間後には完全にその発現が見られなくなった。また他の IAP ファミリーである、c-IAP1/2、XIAP、さらにそのインヒビターである SMAC の mRNA に変化がみられるかを同様に検討した。XIAP、c-IAP1 は Survivin と同様に down-regulate していたが、c-IAP2、SMAC の発現にはほとんど変化が見られなかった (図6)。

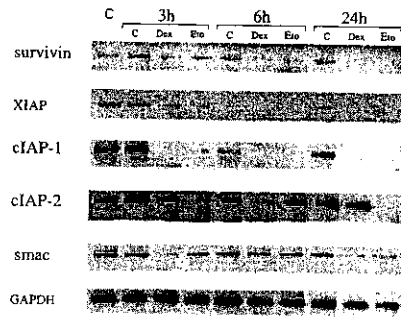


図6 mRNA レベルにおける Survivin および IAP family の発現

考察

今回、我々の実験でヒト胸腺細胞における Survivin の発現が明らかとなった。胸腺内での T 細胞分化の過程における細胞死には Bcl-2 の関与が想定されていた。DN 段階で高発現している Bcl-2 は DP 段階の初期にいったん発現が低下し、DP 段階後期の TCR を高発現する (TCR^{hi}) 頃ふたたび増強する。一方、今回の我々の結果から、Survivin はこの TCR^{hi} の段階で高発現しており、positive selection を受けた細胞は Survivin を強く発現していると考えられた。これは Survivin がアポトーシス抑制蛋白であることから、positive selection を受けた細胞は Survivin を強く発現し、アポトーシスを回避していると考えられた。またアポトーシス誘導時における Survivin の機能を解析すると、時間の経過とともにその発現の down-regulation が in vitro の実験より証明された。これは蛋白レベルだけでなく mRNA レベルにおいてもみられた。このことより胸腺内での selection に Survivin が何らかの働きをしていることが示唆された。今後、MG 症例においても、Survivin などの IAP ファミリーなどのアポトーシス関連遺伝子の観点から解析を進める必要がある。

まとめ

1. ヒト胸腺細胞における Survivin の発現を検討した。
2. Survivin は DP 段階後期の TCR^{hi} の段階で高発現していた。
3. アポトーシス誘導時に Survivin は mRNA、蛋白レベルで減少していた。つまり mRNA レベルでの調節がしなされた。
4. IAP ファミリーでは XIAP、c-IAP1 が Survivin と同様に減少していた。

文献

- 1) Fujii Y. et al: Bcl-2 expression in the thymus and periphery. Cell. Immunol. 151: 335-344, 1994
- 2) 桂 義元, 他: T 細胞分化とアポトーシス. 医学のあゆみ

187 : 393-398, 1998

- 3) Chai J. et al : Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. NATURE. 406: 855-862, 2000
- 4) Yang Y. et al : Ubiquitin Protein Ligase Activity of IAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli. SCIENCE. 288 : 874-877, 2000

眼瞼下垂のみを呈した抗 P/Q 型 VGCC 抗体陽性例の検討 -ocular LEMS の可能性について-

福留隆泰¹⁾ 松尾秀徳¹⁾ 後藤公文¹⁾ 本村政勝²⁾
田尾 修³⁾ 水澤英洋³⁾ 澁谷統壽¹⁾

目的

抗 P/Q 型 VGCC 抗体が強陽性でありながら眼瞼下垂のみを呈する患者の IgG をマウスへ静注し、電気生理学的に神経筋伝達障害の有無やその程度を検討する。神経筋接合部生検を併用して、神経筋伝達障害の機序を検討する。

症例 1 :

眼瞼下垂を主訴とする 58 歳男性。テンシロンテスト陽性で筋電図でも waning を認めた。しかし、易疲労性なく抗 AChR 抗体価 = 0.2 nmol/l であり神経筋接合部生検でも MG は否定的であった。抗 P/Q 型 VGCC 抗体価 = 148.3 pmol/l。

症例 2 :

眼瞼下垂を主訴とする 65 歳男性。眼瞼下垂は日内変動を呈するが易疲労性なし。テンシロンテスト陰性で抗 AChR 抗体も陰性。筋電図でも waning や waxing を認めず。抗 P/Q 型 VGCC 抗体価 > 400 pmol/l。

方法

患者 IgG 10mg または 50mg を BKTO マウスへ静注し、24 ~ 48 時間後に横隔膜神経筋標本を作製し微小電極記録を行った。微小電極法により MEPP と EPP 記録を行った。MEPP 記録は 1 標本あたり 15 ~ 20 の運動終板から、EPP 記録は 10 ~ 15 の運動終板から記録し静止膜電位を -80 mV として振幅を補正した。EPP 記録より variance methods を用いて quantal content (*m*) を求めた。

症例 1 では上腕二頭筋より神経筋接合部生検を施行。運動終板領域の IgG や補体沈着の有無およびアセチルコリンレセプター (AChR) の染色性を検討した。

結果

LEMS 患者 IgG をマウスに passive transfer すると、MEPP は振幅や頻度は変化しないが、EPP で *m* の有意な低下があり高頻度 (40 Hz) 神経連続刺激で early facilitation を認める。症例 1 は 10 mg では healthy control と比べて変化を認めなかったが、50 mg 投与では MEPP 振幅の有意な低下と MEPP 頻度の有意な増加を認めた。*m* は軽度低下したが有意ではなかった。神経筋接合部生検では、終板領域に IgG や補体の沈着はなく、MG は否定的であった。また、AChR 染色性は低下しておらず、AChR 数は保たれていると考えら

れた。症例 2 は 10 mg と 50 mg 投与で共に MEPP 振幅の軽度低下と MEPP 頻度の増加を認めたが *m* は変化なかった。両症例共に early facilitation は認めなかった。

表 1 微小電極記録の結果

	control	LEMS	症例 1		症例 2		
	(IgG 量)	(10mg)	(10mg)	(50mg)	(10mg)	(50mg)	
MEPP							
振幅 (mV)		1.39±0.07	1.36±0.06	1.38±0.08	0.85±0.03	0.94±0.03	1.08±0.05
頻度 (sec ⁻¹)		0.50±0.07	0.49±0.06	0.52±0.04	2.02±0.30	1.56±0.15	0.89±0.07
EPP							
Quantal							
Content		45.5±5.7	28.0±1.9	35.0±2.4	38.3±3.2	45.5±4.8	52.5±4.4
Early							
facilitation		-	+	-	-	-	-

考案

両症例共に LEMS 型の微小電極所見は得られなかった。症例 1 は MEPP 振幅の低下が神経筋伝達障害の原因となっている可能性があった。その原因としては神経筋接合部生検で MG が否定的で AChR 数の減少を認めなかったことから、シナプス小胞内に蓄えられている ACh 量が減少していると考えられた。抗 P/Q 型 VGCC とシナプス小胞内の ACh 量との関連は不明だが、シナプス小胞のリサイクル課程にカルシウムイオンが関わっていることから何らかの関連が予想される。症例 2 も同様の機序が考えられるが、神経筋接合部生検を行い MG の有無や終板 AChR 数の検討をしなければならぬ。また、症例 2 は MEPP 振幅が低下しているもののその程度が軽度であるため神経筋伝達障害を生じていない可能性があり、筋電図で waning を呈していない原因の一つと考えられた。今後の経過観察を要す。

まとめ

抗 P/Q 型 VGCC 抗体が陽性でありながら眼筋型 MG と類似した軽微な眼症状のみを呈する症例が存在する。患者 IgG の passive transfer と神経筋接合部生検を併用することで、神経筋伝達障害の有無とその機序および障害の程度について評価ができた。

¹⁾国立療養所川棚病院神経内科 ²⁾長崎大学第一内科

³⁾東京医科歯科大学神経内科

ω -Agatoxin IVAを用いた抗VGCC抗体検出の試み

丸田 高広¹, 駒井 清暢¹, 山田 正仁¹, 高守 正治², 吉川 弘明³

目 的

Lambert-Eaton筋無力症候群(以下LEMS)の病因には、電位依存性カルシウムチャンネル(以下VGCC)に対する抗体が直接的に関与しており、 ω -コノトキシンMVIIC(以下CmTx)を用いた抗VGCC抗体の検出がなされている¹⁻⁵⁾。しかし、この測定法による抗体価は、必ずしも臨床所見とは一致せず、少数の抗体陰性例も存在している。ここで、CmTxはP型、Q型およびN型VGCCに親和性を持つため、CmTxを用いたVGCC検出法では、これら3型を含んだVGCCが検出される。一方、 ω -アガトキシンIVA(以下ATx)はP型VGCCに強い選択性を有するため、ATxを用いてVGCCを検出した場合、P型VGCCを選択的に検出すると考えられる。運動神経終末でのACh放出に関わるVGCCは、このP型VGCCが主体と考えられている⁶⁾。それ故、ATxを用いて検出される抗P型VGCC抗体は神経筋接合部機能に密接な関わりを持つことが期待される。過去にATxを用いたVGCCの定量、あるいは抗VGCC抗体測定⁷⁾の報告はないが、今回新しく、免疫濾過法を用いて、ATx-sensitive VGCCの検出および、このVGCCに対する抗体の検出を試みた。

対象および方法

I. 対象

VGCC検出には、肝細胞癌のため80才で死亡した女性の剖検小脳を用いた。抗VGCC抗体検出には、CmTxを用いて検出した抗VGCC抗体(結合型)陽性のLEMS患者3例と正常対照3例の血清を用いた。

II. ATx-sensitive VGCC検出

まず、凍結保存していたヒト小脳から遠心分離法でP2画分(粗ミトコンドリア画分)を分離し、リン酸緩衝液(以下PB)を加え、P2画分浮遊液を作製した。次に、異なる量のP2画分浮遊液にBolton Hunter試薬で¹²⁵Iを標識したATx(以下¹²⁵I-ATx)を加え、反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。

また、P2画分浮遊液に、異なる量の非標識ATx、あるいはウシ血清アルブミン(以下BSA)を加えて反応させた。さらに、¹²⁵I-ATxを加え、反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。この時、P2画分を加えずに同様の操作を行った測定値をブランクとして差し引き、非標識ATx、あるいはBSAを加える前の値(前値)に対する、加えた後の値(後値)の割合[(後値/前値)x100(%)]として表示した。

III. 抗P型VGCC抗体測定

まず、P2浮遊液にPBあるいは、異なる量の被検血清を

加えて反応させた。さらに、¹²⁵I-ATxを加え、反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。この時、血清を加える前の値(A)に対する、加えた後の値(B)の割合[(B/A)x100(%)]として表示し、この割合が100%を超えるものは100%とした。

結 果

I. ATx-sensitive VGCC検出(図1, 2)

VGCCの検出実験では、P2画分浮遊液を0 μ l から50 μ l まで増量すると、放射能が容量依存性に上昇した。また、BSAを加えても放射能はほとんど低下しなかったが、非標識ATxを加えると、計数率が容量依存的に低下した。

II. 抗P型VGCC抗体測定(図3)

本実験での6例に限っては、LEMS患者血清と正常対象血清との間に、差を認めなかった。

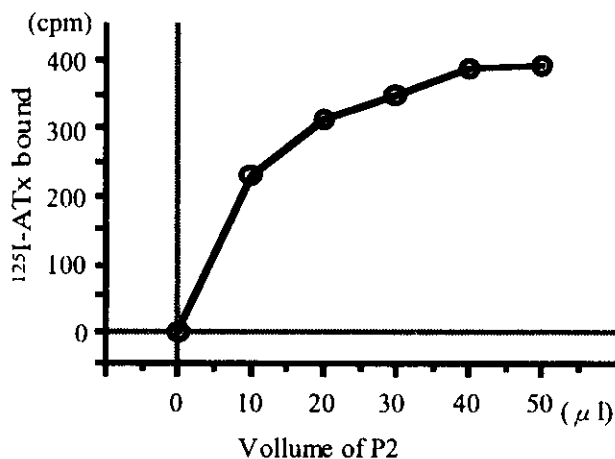


図1. ATx・VGCC結合部位定量実験

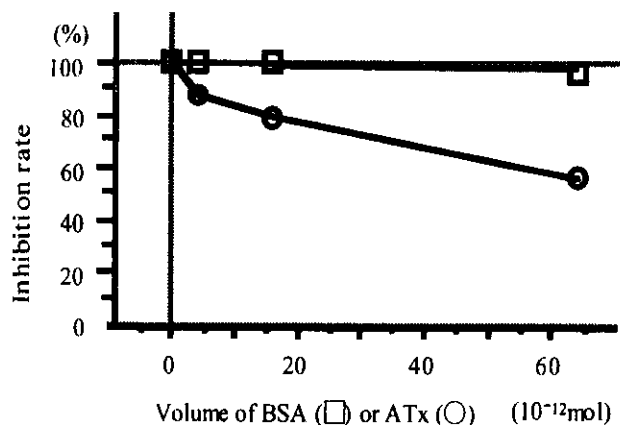


図2. ATx・VGCC結合阻害実験

¹ 金沢大学医学部神経内科

² 金沢西病院脳神経センター

³ 金沢大学保健管理センター

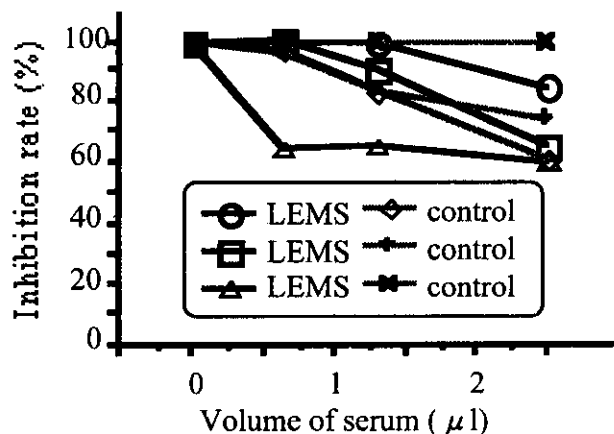


図3. 阻害型抗VGCC抗体

考 察

LEMSにおける, CmTx, ω -conotoxin GVIAを用いた抗VGCC抗体の検出法は既に報告されているが, LEMS患者の5-26%では抗体が検出されず, その抗体価も臨床症状とは一致しない. このような現象を説明するためには, 少なくともカルシウム依存性ACh放出機構に関わり, かつ膜外に露出して病原抗体の標的となりうる蛋白質に対する抗体, すなわち抗シナプトタグミン抗体などの存在や, 現行の方法では検出されない抗VGCC抗体の存在などを想定する必要がある. このため, 現行の方法と異なる新しいVGCC検出法あるいは, 抗VGCC抗体検出法を考案した.

P/Q型VGCCには2種類の亜型, P型とQ型が存在する. P型VGCCとQ型VGCCは, ともに α 1Aサブユニットを有するが, チャネルとしては全く異なる性質を示す. 即ち, 電位依存性不活性化はP型が非常に遅く, Q型はより早い. また, トキシン結合では, P型がATxに強い親和性を持ち, Q型は比較的CmTxに強い親和性を示す. さらに, 小脳内でもP型はプルキニエ細胞層に, Q型は顆粒細胞層に分布する. 現在行われている抗P/Q型VGCC抗体測定では, CmTxが使われているため, Q型VGCCに対する抗体をより反映しているものと考えられる. 実際に, 吉村らは, 現行の抗P/Q型VGCC抗体価は免疫組織学的な抗顆粒細胞抗体と相関すると報告しており, CmTxを使った抗VGCC抗体価が, Q型VGCCに対する抗体を反映することを支持している. ここで, 運動神経終末では, Q型が阻害されない低濃度のATxでACh放出が阻害されることから, 運動神経終末の伝達物質放出に関わるVGCCはP型が主体と考えられている. このため, ATxを用いて検出するP型VGCCあるいは, 抗P型VGCC抗体は神経筋接合部機能に直接関与するものと考えられる.

トキシシンを用いたVGCC検出には, 重症筋無力症において高抗体価結合型抗体を使った免疫沈降法, カラムに吸着する吸着法, フィルターで濾過する濾過法の3通りが報告されている. このなかで免疫沈降法を使った阻害型抗体検出法は, 介在する反応が多く, 複数のヒト血清を同時に使うことで誤差を大きくする可能性が否定できない. 一方, 吸着法と濾過法を使った場合2次抗体の反応がないため, 理論的に誤差が少なく, 被検血清の結合型抗体の影響を受けない. 実際に濾過法でCmTxを用いたVGCCの

定量が可能であることも報告されている. このため, 本研究では濾過法を用い, ATx-sensitive VGCCの検出に成功した. しかし, 血清における抗VGCC抗体検出には至らず, 今後の検討を要すると考えられる.

LEMSでは, 結合型抗VGCC抗体を含め多様な病原抗体が関与する可能性がある. 本研究で考案した新しい抗体測定法はLEMSの臨床のみならずVGCC機能の解析においても重要な意味を持つ可能性があり, 今後更により多数例での検討を加えることが重要である.

ま と め

本研究では新しいVGCC検出法および抗VGCC抗体検出法を考案し, 以下の結論を得た.

- 1) 濾過法により, ATx-sensitive VGCCの検出に成功した.
- 2) 本方法による抗VGCC抗体検出には至らず, 更なる検討が必要である.

文 献

- 1) Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Woppmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 332: 1467-1474, 1995
- 2) Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J. Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Sci* 147: 35-42, 1997
- 3) Suenaga A, Shirabe S, Nakamura T, Motomura M, Tsujihata M, Matsuo H, Kataoka Y, Niwa M, Itoh M, Nagataki S. Specificity of autoantibodies react with omega-conotoxin MVIIC-sensitive calcium channel in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 19: 1166-1168, 1996
- 4) Nakao KY, Motomura M, Suenaga A, Nakamura T, Yoshimura T, Tsujihata M, Mori M, Itoh M, Nagataki S. Specificity of omega-conotoxin MVIIC-binding and -blocking calcium channel antibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol* 246: 38-44, 1999
- 5) Maruta T, Komai K, Takamori M. Antibodies inhibiting toxin binding to voltage-gated calcium channel in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and other neuromuscular diseases. *Neurol* 54(suppl3):A128, 2000
- 6) Protti DA, Uchtel OD. Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuro Report* 5: 333-336, 1993

傍腫瘍性小脳変性症に関連する神経抗原 pcd17 の in vivo における機能の検討

酒井 宏一郎¹⁾ 白川 知泰 廣瀬 源二郎

目 的

傍腫瘍性神経症候群では、生体内で神経組織と腫瘍に共通の抗原性を示す神経腫瘍抗原に対する抗腫瘍免疫が惹起される。この抗腫瘍免疫反応が神経組織に対して交差反応を示すことによって、神経細胞に対して攻撃的に作用し、その結果として神経変性現象が起こる可能性が考えられ、神経腫瘍抗原に対する免疫応答がこの疾患の発症の機序に重要であると推定されている。この仮説を証明するには、傍腫瘍性神経症候群にみられる生体の免疫反応を実験動物に再現する必要があるが、従来試みられてきたアジュバントを用いた能動免疫の手法では、腫瘍の存在によって惹起される免疫反応とは異なり、また、抗体の移入や細胞の移入などといった受動免疫の手法でも、限定された免疫現象をみるにとどまり、実際の起きている免疫応答を反映してはいない。一方、神経腫瘍抗原を強制発現させた同系腫瘍細胞を移入する実験系は実際の生体に起きている環境を反映しているものの、腫瘍細胞が早期に全身臓器や中枢神経系に転移し、長期間の観察や解析は困難であった。

DNA 免疫は、真核細胞発現ベクターに組み込んだ DNA そのものを生体に感作することによって生体内に DNA がコードしている蛋白を発現させ、免疫反応を惹起させる方法であり、主に DNA ワクチンとしての臨床応用を目的として実験動物に対して広く試みられている。この手法では、抗原蛋白が末梢組織に遺伝子レベルから発現されることより、長期に亘って抗原の発現が持続し、液性免疫のみならず、従来の Freund のアジュバントを用いた能動免疫では困難とされた細胞障害性 T 細胞をも効率良く誘導されることが幾つかの抗原では明らかになっている。

今回我々は、実験動物においてヒトの傍腫瘍性神経症候群にみられるような免疫現象を in vivo で誘導することが可能であるかを明らかにする目的で、傍腫瘍性小脳変性症に関連する腫瘍神経抗原 pcd17 をコードする cDNA による DNA 免疫の方法を用いて免疫応答を検討した。

方 法

免疫に用いた DNA は、ヒト pcd17 cDNA 及びヒト ple21 cDNA を CMV プロモーターを含む真核細胞発現プラスミドベクター pQBI25fA3 の *Bam*HI/*Not*I に組み換えて作製した。

上記の DNA を 4 mg/ml の条件で 1 micronm の金粒子に polyvinylpyrrolidone と CaCl₂, spermidine を用いて結合させた後、コーティングチューブにこの DNA を均等に付着して、免疫用の DNA 結合金粒子を調整した。

DNA 結合金粒子を Helium-propelled gene gun を用いて、Balb/c マウス及び C3H マウスについて一頭につき 2 microg の DNA を皮内に免疫した。この免疫は 3 週間の間隔をあけて 2 回行い、最後の免疫の 2 週間後に尾静脈より血液を採取した。さらに初回免疫より 7 ヶ月後に血液を採取し、脾細胞を摘出した。

採取した血液より血清を分離し、ラット脳凍結切片を用いた免疫組織化学と pcd17 組み換え体蛋白、ple21/HuC、HuD、Hel-N1 組み換え体蛋白を用いた Western blotting 法にて検討した。

細胞障害試験は同系マウスの 30 Grey 照射脾細胞と 6 日間抗原ペプチド 0.1 mg/ml の存在下に培養後、同系マウスから調節し、⁵¹Cr にて標識した SP2/O マウス myeloma 細胞 (H-2^d) を標的細胞として、抗原の存在下に Effector:Target 比=12.5:1 で 4 時間培養して遊離する

¹⁾ 金沢医科大学 神経内科

^{51}Cr を測定して検討した。用いたペプチドは BIMAS HLA peptide binding prediction に基づいて決定し、H-2K^kに親和性の高い PCD17₁₇₈₋₁₈₆(YDHFVFAEKI)と H-2K^dに親和性の高い pcd17₂₄₇₋₂₅₅(AYRARALEL)を合成して標的抗原として用いた。

結 果

ヒト pcd17 cDNA と ple21 cDNA に tag として GFP を結合し、*in vitro*において培養動物細胞に対して遺伝子導入したところ、細胞に GFP 融合蛋白の発現を認め、その局在はヒト脳組織神経細胞における抗原蛋白と同様の局在を示し、生理的状态と近い状態で発現し得ることが確認された。

pcd17 cDNA の DNA 免疫により、C3H マウスにおいては、3/6 例のマウスに2回目の免疫の2週間後には、血清中に Purkinje 細胞に対する抗体が検出された。この抗体は western blot により pcd17 蛋白と反応する Yo 抗体(PCA-1)であることが確認された。一方、Balb/c マウスについては、pcd17 cDNA 2 microg の DNA 免疫を繰り返した2週間後の時点では抗体を検出することはできなかったが、初回免疫後7ヶ月後の時点で4/6 例に Yo 抗体(PCAb-1)の存在を確認した。

ple21/HuC cDNA 免疫についても、Balb/c マウスについては pcd17 cDNA 同様に初回免疫より2週間後には抗体の誘導は確認できなかったが、7ヶ月後の時点で2/5 匹のマウスに Hu 抗体 (ANNA-1) の出現が確認された。この抗体については、HuC 抗原 と Hel-N1 抗原、HuD 抗原との反応が確認された。

C3H マウスについて、H-2K^kに高い結合性を示すペプチド pcd17₁₇₈₋₁₈₆ を用いた細胞障害性試験を試みたが、有意な細胞障害反応は検出されなかった。Balb/c マウスについては H-2 K^dに高い結合能をもつ pcd17₂₄₇₋₂₅₅ を用いて解析した結果、ple21 cDNA で免疫されたマウスでは、E:T比=12.5:1 において0.01%であったのに対し、pcd17 cDNA においては同一の E:T比において16%の細胞障害活性を認めた。また Balb/c マウスの脾細胞を用いた H-2K^kに高い結合性を示すペプチド pcd17₁₇₈₋₁₈₆ を用いた細

胞障害性試験では、pcd17cDNA で感作したマウスの脾細胞においても ple21/HuC を用いた脾細胞においても有意な細胞障害活性は観察されなかった。pcd17 で感作した Balb/c マウスについて pcd17₂₄₇₋₂₅₅ に特異的な細胞障害性前駆 T 細胞の頻度を限界希釈法を用いて解析した。抗原ペプチドに対して10%以上の細胞障害活性を示したウェルを陽性として検討した結果、pcd17 cDNA を免疫したマウスにおいて、脾細胞15,000に1個の割合で抗原特異的な細胞障害性前駆 T 細胞が出現していることが明らかになった。

考 察

近年、いくつかの抗原を用いた実験系において、DNA 免疫によって末梢組織に抗原を発現させた場合、抗原の局所の発現が長期にわたって認められ、アジュバント等の影響を排した条件下で感作抗原に対する抗体とやはり感作抗原に特異的な細胞障害性 T 細胞の双方を誘導し得ることが種々の抗原を用いた実験系で報告されている。この DNA 免疫によって生体内局所に提示される抗原は、傍腫瘍性神経症候群の患者の固形腫瘍に発現している腫瘍抗原と類似した発現の状態であると考えられる。このことより、実験動物に対して従来より行われた Freund アジュバントを用いた能動免疫に比べ、傍腫瘍性神経症候群患者に存在する状態により近い免疫応答が誘導されることが期待される。この観点に立脚して、我々が以前にヒト脳 cDNA ライブラリーからクローニングした傍腫瘍性神経症候群に関連する神経抗原蛋白 pcd17 と ple21 をコードする cDNA を用いて、gene gun を用いた DNA 免疫の手法により神経自己抗原に対する免疫誘導について検討した。その結果、DNA 免疫によって、ple21 cDNA 或いは pcd17 cDNA のいずれにおいても、C3H と Balb/c のマウスに対して、効率良く抗原に対する液性免疫を誘導し、血清中に神経細胞抗体を産生させることが可能であることが明らかとなった。また、pcd17 cDNA を用いた DNA 免疫により、コントロールに比して有意に高い細胞障害性 T 細胞活性がみられ、さらに DNA 免疫によって感作されたマウスにおいては、ple21 cDNA で DNA 免疫された同系

マウスでは検出されなかった細胞障害 T 細胞前駆細胞を比較的高頻度に脾細胞中に存在していることが明らかになったことより、従来アジュバントでは困難とされた *in vivo* での細胞障害性 T 細胞の誘導についても、*in vitro* 刺激による naive な脾細胞の細胞障害性 T 細胞の誘導と比べても、DNA 免疫の手法を用いることによって、効率良く神経自己抗原に対する細胞障害性 T 細胞を誘導し得ることが示唆された。しかしながら、免疫誘導の強さ等に関しては問題が残る点もあり、今後、免疫条件の調節や免疫 DNA の修飾によって最適な条件を決定することによって、さらに細胞障害性 T 細胞の発現効率を高め、神経抗原に特異的な細胞障害性 T 細胞によって *in vivo* にヒト疾患と同様の病態を惹起できるかを検証する必要がある。

まとめ

傍腫瘍性神経症候群に関連する腫瘍神経抗原をコードする cDNA を用いた DNA 免疫によって、実験動物に対して神経抗原に対する自己抗体と神経自己抗原に特異的な細胞障害性 T 細胞を効率良く誘導することが可能であることを示した。この DNA 免疫を用いた新たな動物モデルは、傍腫瘍性神経症候群の *in vivo* での免疫現象を解析する上で極めて有用であると考えられる。

文 献

- 1, Sakai K et al. Isolation of a complementary DNA clone encoding an autoantigen recognized by an anti-neuronal cell antibody from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol.* 28:692-698,1990.
- 2, Sakai K et al. Analysis of autoantibody binding to 52-kd paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen expressed in recombinant proteins *Ann Neurol* 33: 373-380, 1993.
- 3, Sakai K et al. A hippocampal protein associated with paraneoplastic neurologic syndrome and small cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1200-1208,1994.

4, Albert ML et al. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 4:1321-1324,1998.

5, Porgador A et al. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp. Med.* 188:1075-1081, 1998.

6, Sakai K et al. Induction of major histocompatibility complex class I molecules on human neuroblastoma line cells by a flavoid antioxidant. *Neurosci Lett* 298:127-130, 2001.

抗 Hu 抗体陽性傍腫瘍性神経症候群での細胞傷害性 T 細胞

田中恵子 1) 田中正美 2) 望月仁志 3) 鎌倉恵子 3)
杉江美穂 4) 丸山佳重 5)

目的

傍腫瘍性神経症候群ではさまざまな抗体が末梢血や脊髄液中で証明される。しかし、受動免疫や対応抗原のリコンビナント蛋白を用いた能動免疫によっても動物モデルの作製には成功しておらず、抗体が神経細胞を傷害するという確かな証拠はない 1)。発症間もない抗 Yo 抗体陽性小脳変性症(PCD)患者では、小脳に CD8 陽性細胞が浸潤している。われわれは PCD の HLA を解析し、全例で HLA A24 を見出した。2) 細胞傷害性 T 細胞は HLA class I 分子に結合した 9-11 個のペプチドを認識する。このペプチドは HLA class I によって特異性があり、特に N 末側から 2 番目と最も C 末側のペプチドがアンカーとなっていて、それぞれの HLA class I 分子には特定のアミノ酸が結合していることが判ってきた(peptide motifs)。そこで、住民の HLA class I の分布を基に、本来は理想的なワクチンをデザインすることを目的と、HLA class I から細胞傷害性 T 細胞が認識するペプチドを類推する方法、reverse immunogenetics により、抗 Yo 抗体陽性 PCD 患者末梢血の細胞傷害性 T 細胞(CTL)が認識するペプチドを同定した 3)。

1) 新潟大学脳研究所神経内科、2) 国療西新潟中央病院神経内科、3) 防衛医大第三内科、4) 県立奈良病院神経内科、5) 国療西新潟中央病院呼吸器科

また、抗 Hu 抗体陽性症候群でも組織に CD8 陽性細胞が浸潤しており、われわれは HLA B7 supertype (B*0702-05, B*1508, B*3501-03, B*51, B*5301, B*5401, B*5501-02, B*5601-02, B*6701, and B*7801)が重要であることを示した 4)。リコンビナント Hu 蛋白を microinjector で挿入した自己線維芽細胞を標的とした CTL 活性が末梢血中に存在していることを証明した 5)。PCD と同様の方法により、1 例の患者で CTL が認識するペプチドを既に見出している 4)。

本研究ではより多くの B7 supertype 結合モチーフを有するペプチドに対する反応性を 3 例で検討し、さらに HLA B7 supertype を有しているが神経症状のない肺小細胞癌 3 例についても Hu 蛋白由来ペプチドに対する CTL 活性を検討した。

対象・方法

HLA は NIH の抗体と補体による microcytotoxicity method で行った 2)。HLA B7 supertype を有する抗 Hu 抗体陽性症候群 3 例、B7 supertype を有し抗 Hu 抗体陰性で、神経症状のない肺小細胞癌患者 3 例を対象とした。抗 Hu 抗体は免疫組織学的方法、リコンビナント Hu 蛋白を抗原としたイムノプロット法で証明した 5)。

まず、対象となるそれぞれの患者の前腕から、局所麻酔薬を皮内注射して、経 4mm の皮膚生検用の Acu Punch (Acuderm inc., Lauderdale, FL, USA)を用いて、膨疹状になった皮膚を円形に真皮まで採取し、細切後フラ

スコ内に付着させて、10%胎児ウシ血清含有 Dulbecco's minimum essential medium にて培養した。概ね1ヶ月で実験に利用できる細胞数まで線維芽細胞は増殖した。

CTL 活性は自己線維芽細胞を標的とし、4 時間培養した後に、上清へ放出されるアイソトープ量を測定する ^{51}Cr 放出試験で施行した。効果細胞は末梢血単核球を各種抗原ペプチドで培養し、24 時間後に IL-2 を含有した HyMedium (ニプロ、東京)を添加して5日間培養し、MACS system (Miltenyi Biotec, Germany)で2回処理をしてほぼ純粋な CD8 陽性細胞を回収して効果細胞とした4)。典型例を示すと、末梢血単核球に占める CD8 陽性細胞が 42.4%であった例では、1 回目の処理で 98.8%まで精製され、2 回目の MACS system 処理で 99.9%まで精製された。線維芽細胞への ^{51}Cr のラベルは、 $1 \times 10^4/200\text{ml/well}$ の線維芽細胞に 37kBq/well の [^{51}Cr] Na ^{229}m (18.5 Mbq/0.5ml; 第一ラジオアイソトープ、東京)を加えて、一晩培養した後、5 回新しい培養液で洗浄して標的細胞とした。

抗原となるペプチドは、HuD 蛋白から HLA B7 supertype のモチーフを有する 5 種類のペプチド、Hu-1 (GPFQAVNNV; HuD protein amino acid position 318-326), Hu-2 (PPSACSPRF; 265-273), Hu-3 (DPKDAEKAI; 96-104), Hu-4 (KPSGATEPI; 198-206)および Hu-5 (SPRFSPITI; 270-278)を合成した(蛋白質研究所)4)。

結果

抗 Hu 抗体陽性症候群 3 例で 5 種類の Hu 蛋白由来ペプチドに対する CTL 活性が認められた。Patient 1 では E/T 比 20:1 で Hu-2 に対して 2.1%、Hu-3, 4, 5 に対してそれぞれ 35.0, 51.4, 47.9%の CTL 活性が認められた。Patient 2 では E/T 比 20:1 で Hu-2 に対して 4.3.1%、Hu-3, 4 に対してそれぞれ 5.1, 10.8%の CTL 活性が認められた。Patient 3 では E/T 比 10:1 で Hu-1 に対して 26.2%、Hu-5 に対して 8.0%の CTL 活性が認められた。以上のよ

うに、CTL が認識するペプチドには、一定のパターンは認められなかった。

また、B7 supertype を有し抗 Hu 抗体陰性で神経症状のない肺小細胞癌患者 3 例では、CTL 活性は認められなかった。

考察

抗 Yo 抗体陽性 PCD で、Yo 蛋白由来ペプチドに対する CTL が患者末梢血中に存在しうることを、私たちは自己線維芽細胞を標的とした系6)と、HLA A*2402 遺伝子を挿入したトランスフェクタントを標的とした系7)とで証明した。

抗 Yo 抗体陽性 PCD では HLA A24 の頻度が高く、15 例中 2 例は陰性であったが、この例でも同じペプチドに対する CTL 活性が認められ、同じモチーフを有する HLA を有することが判った7)。一方、抗 Hu 抗体陽性症候群では、当初、5 例中 4 例が HLA B22 supertype である HLA B54 あるいは B56 を持っていると考えられたが8)、その後 7 例全例が HLA B7 supertype を持っていることが判明した4)。

抗 Hu 抗体陽性症候群でも抗 Yo 抗体陽性 PCD で証明した同じ方法を用いて、患者全員に共通に認められた HLA B7 supertype のモチーフ構造を有する HuD 蛋白由来ペプチドと反応する CTL 前駆細胞が患者末梢血中に存在することを見出した。効果細胞はほぼ 100%に精製された CD8 陽性細胞であり、標的細胞となった自己線維芽細胞には HLA class II はないし、抗 HLA class I 抗体で CTL 活性が消失した4)ことから、この CTL は HLA class I 拘束性 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞と考えられる。

B7 supertype を有し抗 Hu 抗体陰性で神経症状のない肺小細胞癌患者 3 例では、CTL 活性は認められなかったことは、担癌生体ではこのシステムでは検出できないほどに CTL 活性が弱いと考えられた。また、HLA B7 supertype を有する非免疫性神経疾患である、筋萎縮性側索硬化症や Machado-Joseph 病患者でも CTL 活性は認

められなかった4)。それ故、これらのペプチドに対するCTL活性は疾患特異性が高いことが示唆されるが、高力価の抗Hu抗体が存在するなど、免疫応答が活発な抗Hu抗体陽性症候群で、HuD以外由来のペプチドに対してCTL活性が認められる可能性を否定するものではない。HLA B7 supertype に結合しうる peptide motifs を有するペプチドで、中間部のT細胞受容体が認識するアミノ酸が共通だったり、類似性の高いアミノ酸である場合は、交叉反応する可能性は否定できないと思われる。また、HLA B7 supertype を有する健康人を見出すことは容易ではなく、しかも標的細胞として自己線維芽細胞を準備することはきわめて困難であることもCTL活性測定の対象とはしなかった理由の一つでもあるが、MBP特異的CD4陽性T細胞の場合と同様に、自己蛋白と反応するCTLをin vitroでペプチドで刺激しながら誘導することは絶対に不可能とはいえないと思われる。ようは、前駆細胞の頻度の相違と理解される。それ故、今回のシステムでは、ペプチドによる刺激期間は5日間と短く、この間で誘導される細胞のみを検出する系で行い、むしろ感度を抑えて行った。ここで証明したかったことは、患者末梢血において、抗体の対応抗原の蛋白に属するペプチドと反応しうるCTL前駆細胞の存在を証明することであって、存在が証明されたからと言って、直ちに神経細胞変性機序が解明されたことにはならない。これは今後の課題である。

結論

- 1). 抗Hu抗体陽性症候群3例で5種類のHu蛋白由来ペプチドに対するCTL活性が認められた。
- 2). B7 supertype を有し抗Hu抗体陰性で神経症状のない肺小細胞癌患者3例では、CTLは認められなかった。

文献

- 1) Tanaka M, et al. Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. I. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss. Clin. Neurol. Neurosurg. 97:95-100, 1995.
- 2) Tanaka M, et al. HLA A24 in paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. Neurology 47:606-607, 1996.
- 3) 田中正美ら: Paraneoplastic cerebellar degenerationでのHLAクラス結合モチーフから類推したYo蛋白由来ペプチドに反応する細胞傷害性T細胞の同定。第27回日本免疫学会学術集会記録集、1997, p. 360.
- 4) Tanaka M, et al: A peptide with the binding motif for the HLA B7 supertype reacts with CD8-positive cytotoxic T cells in anti-Hu syndrome. Biomed. Res. 21:25-29, 2000.
- 5) Tanaka K, et al. Cytotoxic T lymphocyte-mediated cell death in paraneoplastic sensory neuronopathy with anti-Hu antibody. J. Neurol. Sci. 163:159-162, 1999.
- 6) Tanaka M, et al. Cytotoxic T cells against a peptide of Yo protein in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody. J. Neurol. Sci. 168: 28-31, 1999.
- 7) Tanaka M, et al. Cytotoxic T cell activity against the peptide, AYRARALEL from Yo protein of patients with the HLA A24 or B27 supertype and paraneoplastic cerebellar degeneration. J. Neurol. Sci., in press.
- 8) Tanaka M, et al. Lack of association between human leukocyte antigens and anti-Hu syndrome in patients with small-cell lung cancer. Neurology, 52:431, 1999. [published erratum appears in Neurology, 52:1952, 1999]

抗 VGKC(Voltage-gated K⁺ channel)抗体と臨床症状, 筋電図所見の対比

富満 久教¹⁾ 有村 公良¹⁾ 園田 至人¹⁾ 大塚 麗華¹⁾
長堂 竜維²⁾ 納 光弘²⁾ 亀山 正樹²⁾

目 的

後天性ニューロミオトア(Acquired neuromyotonia, Isaacs' syndrome; 以下 ANM)は筋痙攣, 筋弛緩遅延などの特徴的臨床症状と末梢運動神経興奮性亢進に基づくとされる反復放電を特徴とした筋電図所見で診断される。患者血清中に抗電位依存性カリウムチャネル(voltage-gated K⁺ channel, VGKC)抗体の存在が想定され, 現在まで様々な抗体測定法が試されてきている。これまで我々が報告してきたように, 最も sensitivity, specificity 共に高いのは, VGKCを発現した培養神経細胞を用いて行う patch clamp 法であるが, 測定過程や判定の煩雑さから, さらなる簡便なアッセイ法が求められている。今回我々は従来抗 VGKC 抗体のアッセイ法のひとつとして通常用いられている radio immunoassay(以下 RIA)法と patch clamp 法を, 臨床症状, 筋電図所見と比較することによって, アッセイ法における問題点を検討した。

方 法

- ① 20 歳以上健常者ボランティア血清を用いて RIA 法で抗 VGKC 抗体を測定し, 健常者における抗体陽性頻度を調べる。また, その中の高力価健常者において, patch clamp 法を用いて高力価血清が生理学的に VGKC に対して影響を与えているかを調べる。
- ② patch clamp 法, RIA 法それぞれ陽性の患者とその臨床症状, 筋電図所見を比較し, patch clamp 法, RIA 法における特徴を検討する。

結 果

- ① RIA 法におけるアッセイ系において, 以前からの報告と同様に antibody titer のカットオフ値を 100pM に設定した。20 歳以上の健常者ボランティア血清 381 例において, 33 例

(約 8.7%)で陽性となった。

- ② RIA の結果を年齢別で比べると, 年齢が上がるに従って抗体価陽性率が高くなり, 年齢との相関を認めた。(図1参照)
- ③ 健常者ボランティアの中で高力価であった 2 症例において NB-1 細胞を用いた patch clamp 法で VGKC に対する生理学的影響を検討した結果, 細胞の K⁺電流には何らの影響も及ぼしていないことが明らかになった。
- ④ patch clamp 法, RIA 法においてそれぞれの抗体測定法と, 臨床症状, 筋電図所見を比較したところ, patch clamp 法陽性と, 筋電図における myokymic discharge, neuromyotonic discharge との間には有意差をもって相関を認めたが, 臨床症状としての muscle cramp, 筋電図上の fasciculation potential の間には相関を認めなかった。(表1参照)
- ⑤ RIA 法陽性と臨床神経症状, 筋電図所見には相関は認めなかった。

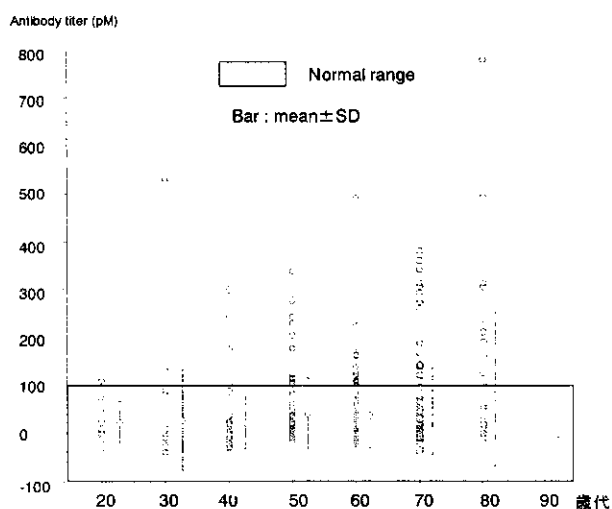


図 1. 抗体価と年代別分布図

¹⁾ 鹿児島大学医学部第三内科

²⁾ 鹿児島大学医学部第二生理

表 1. 抗体陽性者と症状の相関

	Patch clamp陽性	RIA陽性
Myokymic discharge	p<0.001*	N.S.
Neuromyotonic discharge	p=0.010*	N.S.
Fasciculation potential	N.S.	N.S.
Muscle cramp	N.S.	N.S.

考 察

健常者ボランティアの 8.7%に RIA 法陽性者がおり、またその中で高力価症例の patch clamp 法における結果をみると、抗体は生理学的に VGKC に対して影響を与えていないことから、RIA 法陽性者の中には一部 false positive 症例が混入していることが考えられる。この原因として① VGKC の細胞内 epitope に対する抗体、② VGKC との非特異的な結合、③ RIA 法で使用した α -dendrotoxin に対する抗体が存在している、などの可能性が考えられる。

アッセイ系ごとに臨床症状、筋電図所見と比較した結果、Patch clamp 法が RIA 法よりも陽性率が高く、かつ特徴的筋電図所見との関連が認められた。この原因として① RIA 法におけるカットオフ値の設定の問題、②アッセイ法の感度、③患者血清の中には channel そのものに対する抗体ではなく、関連蛋白に対する抗体が存在している可能性、などが考えられた。

RIA 法は簡便で、通常用いられている検査方法ではあるが、ANM を診断することにあたっては慎重に評価せざるを得ないという結果となった。その他のアッセイ系としては免疫組織学的方法や western blotting による方法が現在試されているが、いずれも検査方法が煩雑であったり、条件設定が困難であったりするため、スクリーニングとしては適さない面がある。今後 RIA における条件設定改善の必要性や、より高感度で特異性の高いアッセイ系の開発が必要である。

ま と め

- ① 健常者でも生理学的影響を及ぼさない、RIA 陽性の抗 VGKC 抗体の存在が示唆される。
- ② ANM 患者でありながら RIA 陰性の症例も存在する。
- ③ より高感度で特異性の高い抗 VGKC 抗体測定法の開発が必要である。

文 献

- 1) Newsom-Davis J, Mills KR: Immunological associations of acquired neuromyotonia(Isaacs' syndrome). Brain 1993;116:453-469.
- 2) Sonoda et al: Serum of Isaacs' syndrome suppresses potassium channels in PC-12 cell lines. Muscle Nerve 1996;19:1439-1446
- 3) Kimiyoshi Arimura et al.: Antibodies to potassium channels of PC12 in serum of Isaacs' syndrome: western blot and immunohistochemical studies. Muscle Nerve 1997;20:299-305
- 4) Hart IK, et al : Autoantibodies detected to expressed K channels are implicated in neuromyotonia. Ann Neurol 41 : 238-246, 1997.
- 5) Nagado T, et al : Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. Brain 122 : 2057-2066, 1999.