

Myoid cell を用いた実験的筋無力症ラット作成の試み

分担研究者 松尾 秀徳
(国立療養所川棚病院神経内科)

研究要旨

rat myoid cell line を、同種ラット胸腺に注入し筋無力症モデル作成を試みた。また、myoid cell をアジュヴァントとともに足底に免疫した。さらに、免疫後のリンパ節細胞浮遊液を活性化後同種ラットに 1 週毎に 3 回 passive transfer した。胸腺内に注入した群ではアセチルコリン受容体 (AChR) 抗体は誘導されず、胸腺胚中心形成も認めなかった。一部で移植した myoid cell の上皮細胞へ分化していた。足底部への免疫では、2 回の追加免疫後抗 AChR 抗体の上昇が確認されたが、胸腺胚中心の形成はなかった。感作リンパ球の passive transfer では抗体は誘導されず、胸腺の変化もなかった。myoid cell は抗 AChR 抗体を誘導する抗原性を持つが胸腺での筋無力症惹起性は少ないことが示唆された。

Myoid cell を用いた実験的筋無力症ラット作成の試み

松尾 秀徳 吉永 恵 岡 剛史*
本村 政勝** 澁谷 統寿

目 的

胸腺にはアセチルコリン受容体 (AChR) あるいは類似の蛋白が存在することが報告されている。なかでも胸腺 myoid cell が AChR を発現していることが発見され、この myoid cell を中心に重症筋無力症における autosensitization が起こるとの仮説が提唱されている。本研究では myoid cell が胸腺内 AChR のソースと仮定し、rat thymic myoid cell line を用いて、重症筋無力症と同じような病態を実験動物で作成できるかについて検討した。

方 法

- 1) Thymic myoid cell line : Fisher rat 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。
- 2) 十分に分化を誘導した ST1B (5×10^6) をアジュヴァントとともに 1 回または 2-3 週毎に 3 回足底に免疫した。
- 3) ST1B を IFN γ で処理した群と処理しない群に分け、それぞれ 1×10^6 ずつ直視下に Fisher rat (6 週齢, 雌) 胸腺に注入した。一部の rat では ST1B をマイトマイシン C 処理後に注入した。
- 4) 上記各群において血中の抗 AChR 抗体価および胸腺の病理学的変化を観察した。
- 5) ST1B (5×10^6) をアジュヴァントとともに足底に免疫後 10-14 日目に所属リンパ節を摘出し、リンパ節細胞浮遊液を作成した。この細胞をマイトゲン (concanavalin A) で刺激し、72 時間後に同種ラットに 1×10^7 ずつ passive transfer した。これを 1 週毎に 3 回くり返し、最終の passive transfer 後 4 週目に血中の抗 AChR 抗体価および胸腺の病理学的変化を観察した。

結 果

1) 足底部への免疫では、1 回のみ免疫では抗 AChR 抗体は産生されなかったが、2 回の追加免疫を行った群では抗 AChR 抗体の上昇が確認された(表 1)。胸腺の病理学的検索では、抗体が上昇したラットの胸腺は、正常対照と比較してやや萎縮傾向があり、胚中心の形成は認められなかった。

表 1. Myoid cell 免疫後の抗ラット AChR 抗体

Anti-AchR titer	
Immunization	
Once at foot pads (n=4, 5w)	24.5 ± 1.3 pmol/l
3 times at foot pads (n=5, 3w after the last immunization)	
Rat 1	31.4
Rat 2	40.6
Rat 3	90.2
Rat 4	148.9
Rat 5	153.7
Chronic EAMG pooled serum	621.5
Negative control	< 25

2) ST1B を胸腺内に注入した群では、IFN γ 処理の有無、細胞数、マイトマイシン C 処理の有無などにかかわらず、いずれも抗 AChR 抗体は誘導されず、胚中心の形成も認められなかった(図 1)。しかし、一部で注入した myoid cell が筋細胞に分化した部位 (desmin+, α -smooth muscle actin+, vimentin-, cyokeratine-) の中に、Hassall 小体および上皮細胞に分化した部分 (desmin-, α -smooth muscle actin-, vimentin+, cyokeratine+) が観察された。

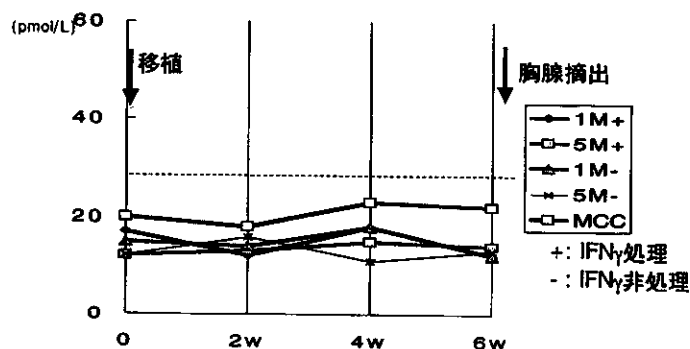


図 1. Myoid cell line 胸腺内注入後のラット血清中の抗 AChR 抗体産生

3) ST1B で感作したリンパ節細胞を活性化した後, passive transfer を繰り返したラットでは抗 AChR 抗体の上昇は確認されなかった(図 2). また, 胸腺では胚中心の形成などの明らかな変化は認められなかった.

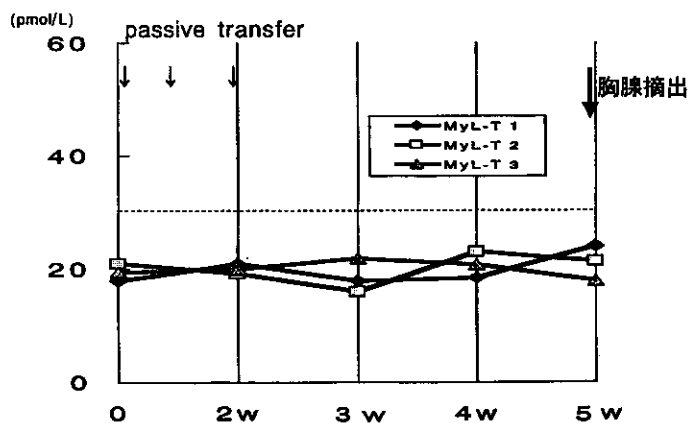


図 2. Myoid cell 感作リンパ球の passive transfer (3 回) 後の血中の抗ラット AChR 抗体産生

考 察

今回の検討により, myoid cell 上の AChR が抗原となり抗 AChR 抗体を誘導できることが明らかとなった. しかし, シピレエイ由来の AChR で免疫した場合に比べて抗体価は低く, 追加免疫が必要であった. このことは myoid cell 上の AChR の量が少ないことと関連していると推測された.

胸腺内に myoid cell を注入した群で抗体の上昇が認められなかったことや胚中心形成などの病理学的変化がなかったことは, 抗原量が少ないことと関連する可能性も考えられる. しかし, 重症筋無力症の患者胸腺では明らかな myoid cell の増生がないことを考えると, myoid cell が胸腺内で抗原のソースとして病因に関与している可能性は少ないと思われる. また, 注入された myoid cell が胸腺内で, 上皮系細胞と筋細胞の 2 つの系の細胞に分化できることが確認されたことは, 胸腺上皮細胞が AChR を発現しているというこれまでの報告と関連している可能性がある.

一方, myoid cell で感作したリンパ球繰り返し passive transfer した場合は, 感作された T, B 細胞が移入されたことになるが, 抗体の産生は誘導されず, 胸腺で明らかな免疫反応は確認できなかった. したがって, 重症筋無力症を惹起する免疫反応が継続し抗体を誘導するには, myoid cell (一部は AChR) に反応するリンパ球が存在するだけでは不十分であり, これらのリンパ球 (T, B 細胞) を活性化する病態が必

要であることが示唆される.

ま と め

myoid cell は抗 AChR 抗体を誘導する抗原性を持つが, 胸腺での筋無力症惹起性は少ないことが示唆された. また, 胸腺内では myoid cell が上皮細胞へも分化する可能性が示唆された.

重症筋無力症のリンパ器官における自己抗体産生能とその継時的変化

分担研究者 吉川 弘明
(金沢大学保健管理センター)

研究要旨

20名の未治療の重症筋無力症(MG)患者から胸腺細胞、骨髄細胞、末梢血単核球(PBMC)を採取、培養下に抗アセチルコリン受容体抗体(AChRAb)、IgGの産生能を観察した。MG患者のPBMCは正常対照に比べて、高いIgG産生能を持っていた。MG患者の胸腺細胞、骨髄細胞、PBMCの中で、PBMCが最も効率良くAChRAbとIgGを産生し、次が骨髄細胞、そして胸腺細胞の順であった。リンパ器官のAChRAb産生能とIgG産生能は、年齢、性別、罹病期間で差はなかった。PBMC、骨髄細胞のAChRAb産生能は血清AChRAb価と有意な正の相関があった。血清AChRAbが陰性の患者の中には、PBMC培養にてAChRAb産生がみられる例があった。PBMCのAChRAb、IgG産生能は、MGの疾患活動性を良く反映し、治療効果判定の良い指標となることが分かった。

重症筋無力症のリンパ器官における自己抗体産生能とその継時的変化

吉川 弘明¹⁾ 安川 善博²⁾ 岩佐 和夫³⁾ 山田 正仁⁴⁾

目 的

重症筋無力症 (MG) は、神経筋接合部の nicotinic acetylcholine receptor (AChR) を標的とした臓器特異的自己免疫疾患である¹⁾。患者の血清抗アセチルコリン受容体抗体 (AChRab) は、MG の主たる病因であるが、なぜ MG 患者では特異的に AChRab が体内で作られるようになるかは未だに明らかになっていない。胸腺は、MG の発症に重要な役割を担っていると思われるが²⁾³⁾、MG に特異的な免疫異常が何であるのかは、はっきりとは分かっていない。胸腺細胞、骨髄細胞、末梢血単核球 (PBMC) が培養下に AChRab を分泌することは、以前にも少数例で報告がある⁴⁾。また、MG 患者胸腺細胞を severe combined immune deficiency (SCID) マウスの腹腔内に注入すると、マウス血中にヒト AChRab が検出されることが報告されている⁵⁾⁶⁾。しかし、胸腺は AChRab を産生する主要リンパ器官でないことは、胸腺摘出術だけでは患者血清中の AChRab が消失しないことより、明らかである⁷⁾。これまで、AChRab が患者体内のどこで、どのくらい作られているかを調べた報告はない。また、血清 AChRab は診断上、重要なマーカーであるが⁸⁾、臨床症状とは相関しないことが知られている。そこで患者の胸腺細胞、骨髄細胞、PBMC の AChRab と IgG の産生能と、病期、臨床症状との関連を検討した。

対象および方法

免疫抑制剤投与前の 20 人の MG 患者 (眼筋型 7 名、全身型 13 名、男性 6 名、女性 14 名) の胸腺細胞、骨髄細胞、PBMC を 1 週間培養し、培養上清中の AChRab を TE671 を抗原に用いた免疫沈降法で、IgG を ELISA により測定した。また患者の臨床症状を評価するとともに、血清 AChRab を測定した。6 例の患者については、さらに胸腺摘出術後、3 ヶ月、9 ヶ月経過した時点においても、PBMC 培養上清中の AChRab と IgG を測定した。

結 果

正常対象の PBMC では有意な AChRab の産生は見られなかった。また MG 患者の PBMC は正常対象の PBMC より

も IgG 産生能が高かった (図 1)。MG 患者の胸腺細胞、骨髄、PBMC において AChRab と IgG の産生能を比較すると、PBMC が最も効率良く AChRab と IgG を産生し、次が骨髄細胞、そして胸腺細胞がもっとも産生能が低かった (図 2A, B)。一方、IgG あたりの AChRab の割合を求めると、胸腺細胞が最も高値となった (図 2C)。これらリンパ器官の AChRab 産生能と IgG 産生能は、年齢、性別、罹病期間による差はなかった。MG の臨床症状が出現して 2 ヶ月以内の短い病期の患者においても、この傾向は変わらなかった。骨髄細胞、PBMC における AChRab 産生能は血清 AChRab 値と有意な正の相関があった (図 3)。胸腺摘出術施行後、3 ヶ月した時点で、PBMC の AChRab ならびに IgG 産生能を評価したが、術前と変化は無かった。術後ステロイドを投与し、9 ヶ月以上経過して寛解に至った時点で、血清 AChRab 値、PBMC の AChRab 産生能、IgG 産生能を評価すると、AChRab 産生能のみが有意に低下した (表 1)。また、症状の増悪時、寛解時の疾患活動性の評価において、PBMC の AChRab 産生能、IgG 産生能の評価が有用であることが明らかとなった (表 2)。Seronegative MG の一部には、PBMC を培養すると AChRab 産生が明らかとなる症例があった。

考 察

今回の結果は、MG 患者の胸腺細胞、骨髄細胞、PBMC のなかで、PBMC が細胞数あたりの AChR ならびに IgG 産生能がもっとも高く、胸腺細胞がもっとも低いことがわかった。これは、PBMC の中に分化した抗体産生細胞が多く存在することを示している。一方、若年成人では 3.9×10^{11} 個のリンパ球を体内に持っているとしており、その分布は末梢血に 2.2%、胸腺と骨髄にそれぞれ 10.9%、リンパ節および扁桃に 41.3%、脾臓に 15.2%、腸管付属リンパ組織に 4.3%、その他のリンパ器官に 15% とされている⁹⁾。これにより、抗体産生量を単純に計算すると、骨髄細胞がもっとも AChRab 産生量が多く、次が胸腺、そしてもっとも少ないのは PBMC となるが、それぞれの比は AChRab では 2 : 1.4 : 1 となり、その産生量自体に大きな隔たりはない。一方、IgG 産生量では、骨髄、PBMC、胸腺の順となり、その比は 11:5.9:1 となる。現在、多くの全身型 MG 患者においては、胸腺摘出術が施行されているが、さらに全身のリンパ器官における AChRab 産生を抑える免疫療法の追加は不可欠であることが確認できた。

MG における胸腺異常の意義として、自己抗原提示の場、自己免疫性 T 細胞産生の場、自己抗体産生の場な

¹⁾金沢大学保健管理センター

²⁾福井県済生会病院神経内科

³⁾金沢若松病院神経内科

⁴⁾金沢大学医学部神経内科

どの可能性が考えられているが、今回の結果からは発症 2 ヶ月以内の患者においても、すでに PBMC がもつとも AChRAb と IgG の産生能が高く、AChRAb は胸腺細胞においてまず産生が始まるのではなく、最初から全身のリンパ球により産生されていることがわかった。また、胸腺摘出術は、施行後 3 ヶ月では PBMC の AChRAb および IgG 産生に影響を与えることなく、9 ヶ月目の評価で初めて低下していることがわかったが、これは単に胸腺摘出術の効果だけではなく、ステロイド投与の影響を考慮しなければならないと考えられた。Gronseth らは、過去の胸腺摘出術に関する治療成績を解析し、胸腺腫を合併しない MG の場合、胸腺摘出術は治療のオプションにすぎないと結論した⁹⁾。FK506¹⁰⁾が保険適用となった現在、MG の治療は見直しが必要な時期に来ていると思われる¹¹⁾。今後、患者の疾患活動性の評価、治療効果の判定に、PBMC の AChRAb、IgG 産生能の評価は有用と思われる¹²⁾¹³⁾。

Seronegative MG 患者の一部において、PBMC 培養により、AChRAb が検出されたが、同様な報告は培養胸腺細胞においても見いだされている⁶⁾。今後、seronegative MG の疾患概念についてもさらに詳細な検討を要するものと思われた。

まとめ

PBMC は MG 患者の AChRAb 産生部位として重要な器官であり、その産生能の評価は自己免疫活動の指標として重要であると考えられた。

文 献

- 1) Drachman DB. : Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 330: 1797-1810, 1994
- 2) Onodera J, Nakamura S, Nagano I et al. Upregulation of Bcl-2 protein in the myasthenic thymus. *Ann Neurol* 39: 521-528, 1996.
- 3) Moulian N, Bidault J, Truffault F et al. Thymocyte Fas expression is dysregulated in myasthenia gravis patients with anti-acetylcholine receptor antibody. *Blood* 89: 3287-3295, 1997
- 4) Fujii Y, Hashimoto J, Monden Y et al. Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. *J Immunol* 136: 887-891, 1986
- 5) Schonbeck S, Padberg F, Hohlfeld R et al. Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. A new model of myasthenia gravis. *J Clin Invest* 90: 245-250, 1992
- 6) Yoshikawa H, Lennon VA. Acetylcholine receptor autoantibody secretion by thymocytes: relationship to myasthenia gravis. *Neurology* 49: 562-567, 1997
- 7) Vincent A, Newsom-Davis J, Newton P et al. Acetylcholine receptor antibody and clinical response to thymectomy in myasthenia gravis. *Neurology* 33: 1276-1282, 1983
- 8) Lennon VA. : Serologic profile of myasthenia gravis and distinction from the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 48 (Suppl 5): S23-S27, 1997
- 8) Trepel F. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift* 52: 511-515, 1974
- 9) Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 55: 7-15, 2000.
- 10) Yoshikawa H, Iwasa K, Satoh K et al. FK506 prevents induction of rat experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 10: 11-16, 1997
- 11) 吉川弘明 重症筋無力症 *Modern Physician* 2002 (印刷中)
- 12) Yoshikawa H, Satoh K, Iwasa K et al. In vitro production of anti-acetylcholine receptor antibody and IgG by peripheral blood lymphocytes of patients with myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 841: 351-354, 1998
- 13) Yoshikawa H, Satoh K, Yasukawa Y et al. Analysis of immunoglobulin secretion by lymph organs with myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand* 103: 53-58, 2001

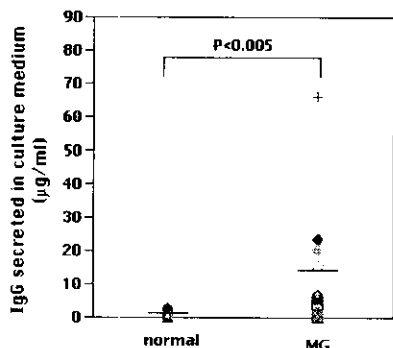


図 1 PBMC の IgG 産生能
MG PBMC は正常対照に比べ、有意に高い IgG 産生能を示した (p<0.005)。

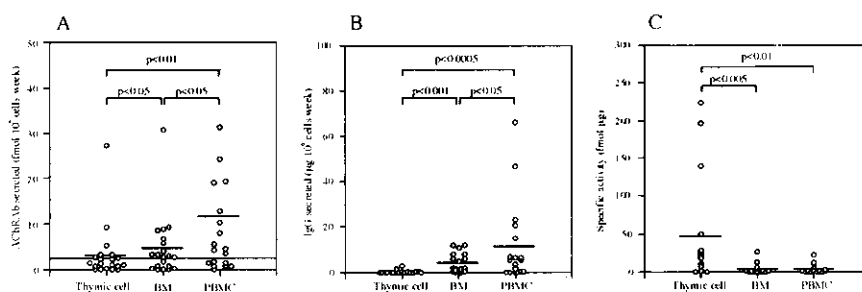


図 2 胸腺細胞、骨髓細胞、PBMC による、(A) AChRab 産生能、(B) IgG 産生能、(C) 特異的抗体産生能 (AChRab 産生能/IgG 産生能)

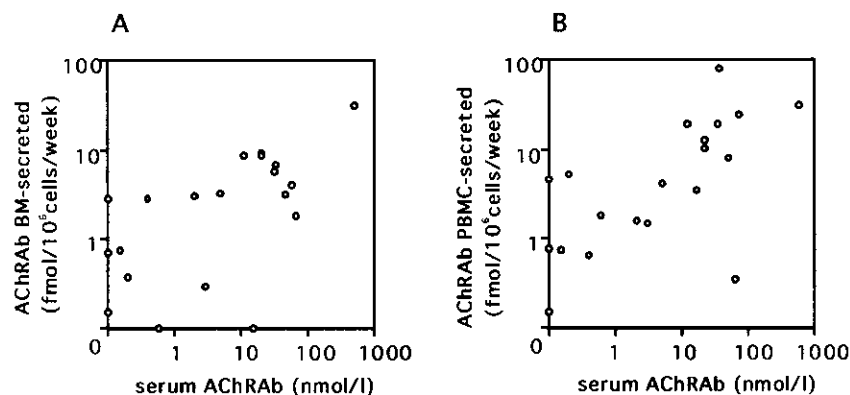


図 3 (A) 患者血清 AChRab 価と骨髓細胞 AChRab 産生能の有意な相関 ($\rho_s = 0.608$; $p < 0.01$; $n = 20$) (B) 患者血清 AChRab 価と PBMC AChRab 産生能の有意な相関 ($\rho_s = 0.630$; $p < 0.01$; $n = 20$)

表 1. Two point analysis of serum AChRab, AChRab secretion and IgG secretion by PBMC

	after thymectomy (within 3 months after thymectomy)	at remission (more than 9 months after thymectomy)
serum AChRab (nmol/l)	15.7 ± 10.8	3.4 ± 2.4
AChRab secretion (fmol/ml)	19.5 ± 10.9	2.5 ± 1.2*
IgG secretion (μg/ml)	10.8 ± 4.8	8.8 ± 6.3

Mean ± SE, The number of patients is six. *significantly different ($p < 0.05$).

表 2 Clinical course and immunological markers of patient # 15

	before and after 1st exacerbation		2nd exacerbation and remission	
months after thymectomy	28	29	43	45
serum AChRab (nmol/l)	12.7	35.1	78.7	65.5
serum IgG (mg/dl)	1870	1790	1170	956
AChRab secretion by PBMC (fmol/ml)	5.9	76.9	9.4	0.4
IgG secretion by PBMC (μg/ml)	1.0	26.1	0.6	0.2
myasthenic symptom	free	severe generalized	severe generalized	moderate generalized
immunosuppressant	free	free	pred 45/0 mg AD	pred 60/40 mg AD Aza 50 mg/day

pred = prednisolone, AD = alternate day, Aza = azathioprine

重症筋無力症胸腺のケモカインシグナル異常

分担研究者 糸山 泰人

(東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野)

研究要旨

重症筋無力症(MG)胸腺(CD4 single positive T細胞)におけるケモカイン系を解析した。Th2 関連ケモカイン受容体の CCR3, CCR4 発現は胸腺過形成症例において著明に上昇していた。Th1 関連ケモカイン受容体の CXCR3 と CCR5 の発現は過形成胸腺及び胸腺腫のいずれも有意に増加していた。CCR6 と CCR7 の発現は両群において著明に上昇していた。MG 胸腺ではセントラルメモリーT細胞が著明に増加していることが明らかになったが、これらの細胞をエフェクターメモリーT細胞となって胸腺を離れる前の段階で除去できればMGの治療においてより効果が得られると期待される。MG 胸腺でのケモカイン伝達系活性化とセントラルメモリーT細胞の増加は、早期の胸腺摘出術の有用性の根拠となるものと考えられる。

重症筋無力症胸腺のケモカインシグナル異常

小野寺宏¹, 糸山泰人¹, 田郷英昭¹, 鈴木靖士², 大内将弘³, 永田哲也⁴, 義江修⁵

¹東北大学神経内科, ²国立仙台病院神経内科,³心臓血管外科,
⁴国立療養所岩手病院神経内科, ⁵近畿大学細菌学

目的

重症筋無力症(MG)は胸腺摘出術が有効とされる唯一の自己免疫疾患である。我々は昨年度の本班においてMGにおけるTh1/Th2バランスをケモカインシグナルの面から検討し、胸腺摘出前のMG患者末梢血リンパ球におけるケモカインシグナルがTh2優位にシフトしているが術後徐々に是正される事を報告した(図1)。しかし、MG胸腺における胸腺細胞の異常や免疫系ケモカインの挙動については不明のままである。そこで、MG胸腺における免疫機能異常をケモカイン系から解析した。尚、胸腺摘出術の効果は過形成胸腺において高い事から、過形成胸腺と胸腺腫とを区別してケモカインシグナルを比較検討した。

対象・方法

MG患者胸腺(過形成10例, 胸腺腫6例)と正常胸腺(8例)を対象とした。胸腺細胞をメッシュ法により分離し、各種表面マーカー、CD4⁺CD8⁻ single positive(SP) T細胞における免疫系ケモカイン受容体発現をフローサイトメトリーにより解析した。ここではステロイド剤や他の免疫抑制剤の影響を除外するため、これらの薬物の未使用症例に限定して解析した。

結果

正常胸腺と比較すると、過形成MG胸腺ではCD4⁺CD8⁻ SP T細胞やCD4⁺CD8⁺ SP T細胞の比率がやや増加し、相対的にCD4⁺CD8⁺ double positive T細胞が減少する傾向にあり、B細胞の比率は有意に増加していた(follicle形成の目立つ例ではB細胞が胸腺細胞のうち10%を超える症例も少なくない)。胸腺腫MGではCD4⁺SP, CD8⁺SP, DPの比率は正常胸腺と同等であり、B細胞の比率は増加傾向にあった。

胸腺細胞のうちCD4⁺CD8⁻ SP T細胞におけるケモカイン受容体発現を過形成症例と胸腺腫症例とで比較した(図2)。Th2関連ケモカイン受容体のCCR3とCCR4の発現レベルは胸腺過形成症例において著明に上昇していた。胸腺腫ではCCR3の発現レベルは増加していたがCCR4では対照胸腺と差が無かった。Th1関連ケモカイン受容体のCXCR3の発現レベルは対照胸腺に比して過形成胸腺および胸腺腫のいずれにおいても有意に増加していたが、過形成群と胸腺腫群の間では差は認められなかった。CCR5はTh0やTh1の一部に発現しているが炎症などの非特異的な免疫機能亢進時にもT細胞における発現レベルが増加することが知られている。CCR5の発現レベルは過形成群、胸腺腫群のいずれにおいても著

明に上昇していた。CCR6 の発現レベルは両群において著明に上昇していた。CCR7 発現レベルは過形成群と胸腺腫群のいずれの CD4+SP T 細胞においても増加が観察された。CCR7 はリンパ球ホーミングに重要であるが、MG 胸腺内 Naive T および central memory T 細胞の増加を反映している。ところで、MG 胸腺では CD4 陽性 T 細胞の大部分が CD45RA 陰性であり、CD45RO 陽性 CD4 single positive T 細胞のポピュレーションは健常者でも MG でも著変は無い。すなわち、MG 胸腺ではセントラルメモリ T 細胞が著明に増加していることが明らかになった。

考察

今回検討したケモカイン受容体の多くが MG 患者胸腺の CD4+SP T 細胞において発現が著明に上昇していた。胸腺の組織型にかかわらず MG では胸腺細胞が活性化されていると考えられる。我々は成熟樹状細胞（活性型）が過形成胸腺において有意に増加している事を観察しているが、樹状細胞によりセレクションを受けた CD4+SP T 細胞におけるケモカインシグナルについては、CCR4 を除けば、過形成と胸腺腫の間には著明な差は認められなかった。ナイーブ T 細胞とセントラルメモリ T 細胞は CCR7 を発現しており、CCR7 のリガンドのリンパ組織血管壁での発現を手がかりとして CCR7 を持つ T 細胞はリンパ節にホーミングする。一方、エフェクタメモリ T 細胞は CCR7 発現が認められなくなり（同時に L-セレクチン発現レベルも著明に低下）リンパ組織を離れて末梢において抗原を監視し

ている。

今回、MG 胸腺（特に過形成胸腺）ではセントラルメモリ T 細胞が著明に増加していることが明らかになった。T 細胞がエフェクタ細胞となって末梢血中に再循環していく前の段階の T 細胞が MG 胸腺では著明に増加している訳である。すなわち、エフェクタメモリ細胞となって胸腺を離れる前の段階でこれらの細胞を除去すれば MG の治療においてより効果がある事を予想させる。MG（特に過形成胸腺）において早期の胸腺摘出術が有効であるという臨床経験の理論的根拠の一つになるものと考えられる。

既に我々は末梢血 CD4+T 細胞では著明な Th1 シグナル系の低下（CXCR3 陽性細胞の減少）と Th2 シグナルの亢進（CCR3 陽性細胞の増加）を観察しているが、意外にも胸腺 CD4+SP T 細胞においては Th1 および Th2 両者に関連するケモカイン系が亢進していることが示唆された。

今後ケモカインシグナルの制御による MG 治療の可能性についての検討が必要である。

結論

MG 胸腺では、その組織型にかかわらずケモカインシグナル伝達系が活性化されている。MG 胸腺では CCR7 陽性のセントラルメモリ T 細胞が増加しており、病初期での胸腺摘出術がより有効と考えられる。

図1 MG患者末梢血におけるTh1ケモカイン受容体CXCR3のCD4 single positive T細胞での発現(健常者での発現を100%として表示). 胸腺摘出前後での比較
 胸腺摘出前ではCXCR3発現CD4+細胞がMG患者で減少しているが, 術後に正常化する.

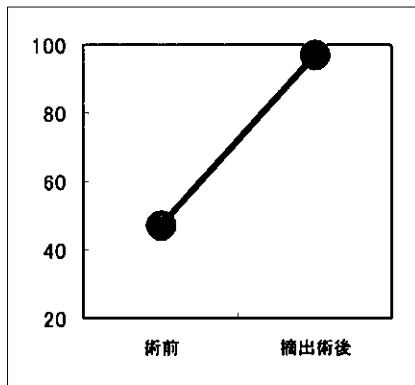
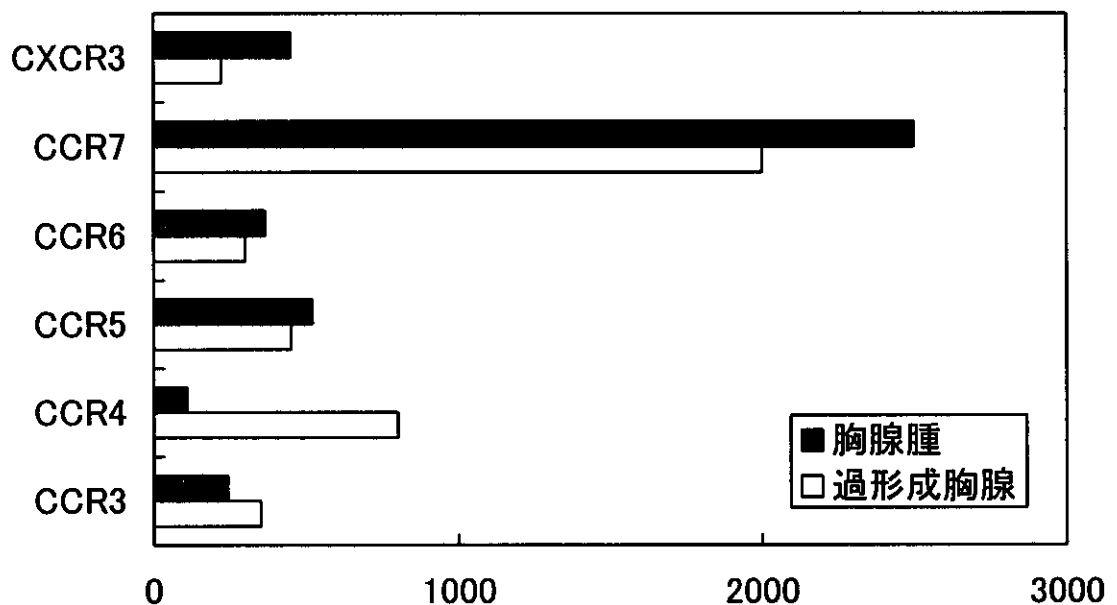


図2 胸腺細胞(CD4+CD8⁻ single positive T細胞)におけるケモカイン受容体の発現 (対照胸腺における発現を100%として表示)



Lambert-Eaton 筋無力症候群における ω -Agatoxin IVA を用いた抗 VGCC 抗体検出の試み

分担研究者 吉川 弘明
(金沢大学保健管理センター)

研究要旨

目的：結合型抗体陰性の Lambert-Eaton 筋無力症候群 (LEMS) 患者血清から、 ω -アガトキシン IVA (ATx) を用いて電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) に対する抗体の検出を試みた。

対象および方法：結合型抗体陽性 LEMS 12 例、同抗体陰性 LEMS 10 例、筋萎縮性側索硬化症 20 例、重症筋無力症 20 例、健常者 20 例を対象とし、 ^{125}I 標識 ATx を用いた免疫濾過法にて阻害型抗 P 型 VGCC 抗体検出を試みた。

結果：結合型抗体陰性 LEMS の 40% が陽性で、CmTx 結合阻害型抗体を合わせて考慮すると、結合型抗体陰性 LEMS の 60% から阻害型抗 VGCC 抗体が検出された。結合型抗体陽性 LEMS、病的対照、正常対照とも全て陰性であった。

考察：運動神経終末の VGCC は P 型が主体である。このため P 型 VGCC に選択性が強い ATx を用いた新しい抗 VGCC 抗体検出法を考案し、検出に成功した。この方法により、結合型抗体陰性 LEMS の 60% から阻害型抗 VGCC 抗体を検出した。

Lambert-Eaton筋無力症候群における 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FVGCC)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、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。しかし、過去にATxを用いた抗VGCC抗体検出の報告はない。そこで昨年我々は、ATxを用いてP型VGCCを特異的に検出出来ることを報告した(図1, 2)。今回、この方法を応用し、実際にLEMS患者血清から(阻害型)抗P型VGCC抗体の検出を試みた。

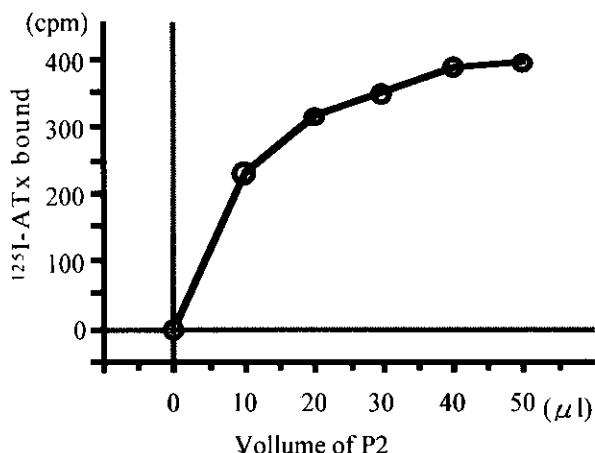


図1. ATx · VGCC結合部位定量実験

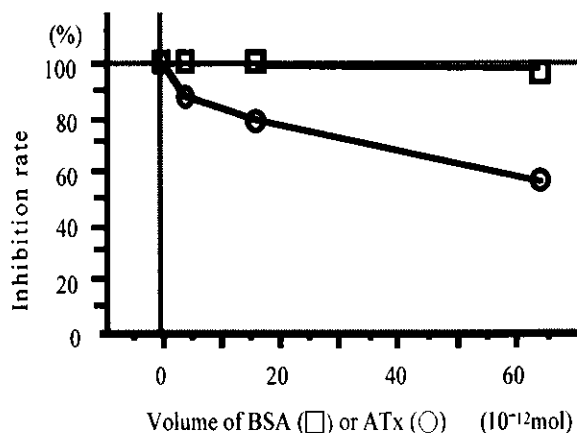


図2. ATx · VGCC結合阻害実験

対象および方法

LEMS患者22例(CmTx結合型抗体陰性10例, 内CmTx結合阻害型抗体陽性2例, CmTx結合型抗体陽性12例), 筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者20例, 重症筋無力症(MG)患者20例および, 健常者(HS)20例の血清について(阻害型)抗P型VGCC抗体測定を試みた。

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。これにPBあるいは被検血清を加えて反応させた。さらに, Bolton Hunter試薬で¹²⁵Iを標識したATx(以下¹²⁵I-ATx)を加えて反応させた。次に, 反応液をガラスフィルターで濾過し, フィルターに残存した放射線を測定した。

抗体価は, 血清を加えていない(PBのみ加えた)系の値(A)に対する, 血清を加えた系の値(B)の割合 $\{(A-B)/A \times 100, (\%) \}$ として表示し, この計算値が負となる場合は0%とした。また, 抗体価が健常者のmean + 3SDを越える者を陽性と定義した。

結 果

健常者のmean + 3SDは5.0であった。これを基に, 結合型抗体陰性LEMS10例中4例で抗P型VGCC抗体が陽性であった。結合型抗体陽性LEMSおよび病的対照, 正常対照は全て陰性であった(図3)。また結合型抗

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

体陰性かつ抗P型抗体陰性LEMS6例中2例はCmTxを用いた阻害型抗体が陽性であった(表1)。

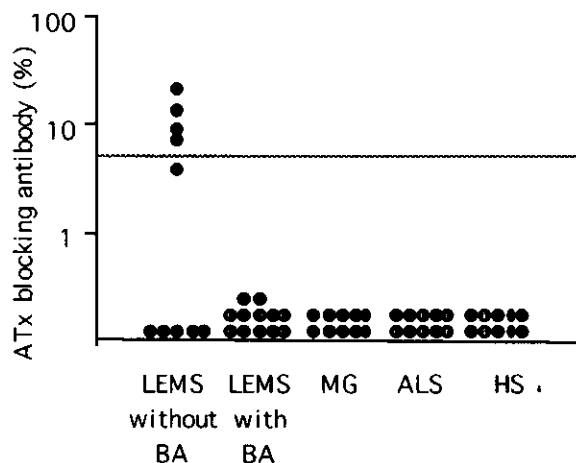


図3. 阻害型抗P型VGCC抗体
BA; binding antibody, HS; healthy subjects.

表1. 阻害型抗VGCC抗体価

	ATx-阻害型抗体 (%)	CmTx-阻害型抗体 (%)
結合型抗体陰性LEMS		
No. 1	18.4*	1.4
No. 2	11.7*	0.0
No. 3	7.9*	0.0
No. 4	6.3*	0.0
No. 5	3.4	0.0
No. 6	0.0	3.7*
No. 7	0.0	2.5*
No. 8	0.0	0.2
No. 9	0.0	0.0
No. 10	0.0	0.0
健常者	<5.0	<1.7

*; positive.

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, チャン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. 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, 阻害型抗P型VGCC抗体の検出に成功した. この方法により, 結合型抗体陰性LEMSの40%にATx結合阻害型抗VGCC抗体があることを見出し, また, CmTx結合阻害型抗体まで考慮すると, 従来の結合型抗体陰性LEMSの60%からトキシン阻害型抗体を検出した.

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

本研究では新しい抗VGCC抗体検出法を考案し, 以下の結論を得た.

- 1) 免疫濾過法により, 阻害型抗P型VGCC抗体の検出に成功した.
- 2) 結合型抗体陰性LEMSでも60%から阻害型抗VGCC抗体を検出した.

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

自己免疫性橋本脳症における抗原検索（続報）

分担研究者 栗山 勝
（福井医大第二内科）

研究要旨

自己免疫性橋本脳症患者血清中に存在する抗神経抗体の標的蛋白を以下の方法で同定した。

① 免疫ブロット：ヒトの灰白質ホモジェネートを用いて二次元電気泳動を行い、ウエスタンブロットを行った後、橋本脳症患者血清に対して反応する蛋白を免疫学的に検出した。その結果、正常コントロールと比較して、48kDa の蛋白が強く反応した。

② 抗原検索：患者血清が反応した蛋白のうち、灰白質における 48 kDa の蛋白を標的蛋白とし抗原検索を行った。ヒトの灰白質ホモジェネートを二次元電気泳動して、標的蛋白を切り出した。複数の蛋白分解酵素で処理した後、蛋白フィンガープリント法にて解析した。その結果、灰白質における 48 kDa の蛋白は、 α -enolase の分子量分布のパターンと一致した。

以上より、橋本脳症患者血清中に存在する抗神経抗体は、 α -enolase を標的蛋白とすることが見い出された。

自己免疫性橋本脳症における抗原検索（続報）

栗山 勝¹⁾ 藤井明弘¹⁾ 米田 誠¹⁾ 鈴木 寛²⁾
伊藤 卓³⁾ 金子清俊³⁾

目 的

自己免疫性甲状腺炎である橋本病では、甲状腺の機能低下により痴呆、精神異常、小脳失調などの種々の精神神経症状を合併することがよく知られている。しかし、甲状腺の機能低下に基づかない自己免疫性脳症が存在し、橋本脳症と呼ばれている。

昨年の本会議で、我々は橋本脳症と考えられる2例の患者血清中に中枢神経組織と特異的に反応する自己抗体が存在することを指摘した。本年は、さらに、橋本脳症患者の病因を明らかにするために、患者血清中に存在する抗神経抗体の標的抗原蛋白の同定を行った。

対象と方法

典型的な臨床像をとる2例の橋本脳症患者（症例1 福井医大症例、症例2 那覇市立病院内科症例）を対象として自己抗体の検索と標的抗原の同定を行った。対象症例の臨床像に関しては既に昨年の本学会議でした。

1) 一次元免疫プロット

ヒトの甲状腺、大脳白質、灰白質、肝臓、骨格筋のホモジェネートを12%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、ウエスタンブロットを行った後、橋本脳症患者血清に対して反応する蛋白を免疫学的に検出した。

2) 二次元免疫プロット

一次元免疫プロットで患者血清と反応したヒト中枢神経組織蛋白の二次元電気泳動（等電点電気泳動および12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動）を行い、ウエスタンブロットを行った後、橋本脳症患者血清に対して反応する蛋白のスポットを免疫学的に検出した。

3) 蛋白フィンガープリント法

患者血清に強く反応した蛋白のスポットを標的蛋白として切り出し、複数の蛋白分解酵素で処理した後、消化

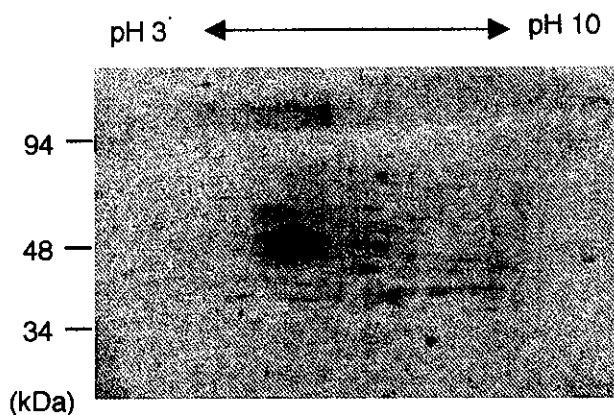


図1. 橋本脳症患者血清を用いた二次元免疫プロット。

蛋白断片をTOF/MSを用いて質量分析し、分子量分布が一致する既存蛋白を検索した。

結 果

1) 一次元免疫プロット

症例1では、正常コントロールと比較して、灰白質において79 kDaと60 kDaの蛋白に反応するバンドが検出された。症例2では、灰白質において60 kDaの蛋白に反応するバンドと大脳白質、灰白質において48 kDaの蛋白に反応するバンドが検出された（昨年学会報告）。

2) 二次元免疫プロット

一次元免疫プロットにおいて症例2の患者血清が反応した48 kDaの蛋白に着目し、患者血清を用いてヒト灰白質蛋白の二次元免疫プロットを行った結果、分子量が一致し、等電点が若干異なる2つのスポットが検出された。

3) 蛋白フィンガープリント法

検出された2つのスポットの蛋白に対して、それぞれ蛋白フィンガープリント法にて標的抗原蛋白を分析した。その結果、この2つのスポットの蛋白は同一のものであり、 α -enolase（解等系酵素）の分子量分布と一致した。等電点が異なる2つのスポットが存在したのは、糖鎖修

¹⁾ 福井医科大学第二内科、²⁾ 福井県立大生物資源学部（分子生物学）、³⁾ 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部

飾等の post-translational modification によるものと考えられた。

また、抗 neuron specific enolase (NSE) 抗体はこのスポットとは反応しないことから、標的蛋白は α -enolase と分子量が近い NSE (γ -enolase) と異なる蛋白であることも確認された。

考 察

橋本脳症患者血清中に存在する抗神経抗体は、 α -enolase を標的蛋白とすることが見い出された。橋本脳症患者血清中の標的蛋白を同定し得た点は、本症の病因や治療における意義は大きい。橋本脳症患者血清中には中枢神経蛋白と反応する多種類の自己抗体が存在するため、他の標的抗原蛋白の同定もさらに進める必要があると考えられる。標的蛋白がすべて同定された後は、受動あるいは能動免疫によるモデル動物を開発し、病態の解明と治療法の開発をめざす必要があると考えられる。

ま と め

α -enolase を橋本脳症患者血清中に存在する自己抗体の標的蛋白候補として同定した。

謝辞：貴重な橋本脳症患者血清を提供していただいた那覇市立病院内科・比嘉秀正先生に深謝します。

文 献

1) 米田 誠, 藤井明弘, 栗山 勝. 橋本脳症—見過ごされている治療可能な疾患—. 臨床検査 2002 (印刷中).

亜急性硬化性全脳炎における抗ウイルス蛋白 MxA 遺伝子の解析

分担研究者 原 寿郎

(九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野・小児科)

研究要旨

抗ウイルス蛋白 MxA は1型インターフェロンに誘導され細胞質に発現し、麻疹ウイルスの転写や翻訳を抑制することが知られている。亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis : SSPE) 患者 40 名において、MxA 遺伝子プロモーター領域の解析を行ったところ、ISRE (interferon-stimulated response element) consensus sequence 上にある-88G/T 多型において SSPE 群では日本人対照群 90 名に比して T アレルの比率が有意に高く ($p=0.008$)、ホモ接合者の割合が有意に高い ($p=0.003$) ことが示された。MxA 遺伝子は SSPE の病態に関わる新たな宿主側の遺伝的要因であり、IL-4 遺伝子、IRF-1 遺伝子と並ぶ SSPE における疾患感受性遺伝子の一つと考えられる。

亜急性硬化性全脳炎における抗ウイルス蛋白 MxA 遺伝子の解析

鳥巢浩幸¹⁾ 吉良龍太郎 楠原浩一 原 寿郎

目 的

亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis: SSPE) は麻疹ウイルスの脳内持続感染による遅発性ウイルス感染症である。SSPE の発症にはウイルス側と宿主側の両方の因子が関与すると考えられるが、SSPE 患者では普遍的な免疫異常は認められず、従来、変異麻疹ウイルスがその病態に関与していると考えられてきた。

これに対し、われわれはSSPEにおける宿主側因子の研究をすすめ、SSPE患者では麻疹ウイルスに対するTh2優位の免疫応答が存在することを示した¹⁾。そして、Th1/Th2バランス関連遺伝子の解析によってTh2反応優位性を誘導するIL-4遺伝子promoter -590Tアレルおよびinterferon regulatory factor-1 (IRF-1) 遺伝子アレル1の頻度がSSPE患者では有意に高いことを示し、SSPEには宿主の遺伝的要因が関与することを明らかにした²⁾。一方、麻疹ウイルスレセプター (CD46およびSLAM) の麻疹ウイルス結合部位の遺伝子解析では変異を認めなかった³⁾。

抗ウイルス蛋白 MxA は1型インターフェロンに誘導され細胞質に発現し、RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスや麻疹ウイルスの転写や翻訳を抑制することが知られている。さらに、ヒトの培養神経細胞でもMxAによる麻疹ウイルス mRNA の合成抑制が報告されており、MxA は脳内持続感染の成立に関与すると考えられている^{4,5)}。

今回、われわれは抗ウイルス蛋白MxAに注目し、SSPE患者においてその遺伝子、とくにプロモーター領域の解析を行った。

対 象

SSPE 青空の会(親の会)の協力で日本人SSPE患者40名および日本人対照群90名に検査を施行した。

方 法

文書による同意を得た後に、末梢血よりゲノムDNAを抽出し、NCBI Nucleotideより得た塩基配列情報

1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

(X55639)をもとに、プライマーを設定し、MxA 遺伝子のプロモーター領域をPCR法で増幅した。Direct sequence法によりその塩基配列上の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)を検索し、そのSNPに対し、制限酵素断片長多型(restriction fragment length polymorphism: RFLP)法を用いて、SSPE群および対照群の遺伝子型を決定した。

結 果

- (1) MxA 遺伝子プロモーター領域には報告のあるSNPに加えて、新たに-123 C/A多型を確認した。
- (2) MxA 遺伝子プロモーター領域における-88 G/T多型においてSSPE群ではTアレルの頻度が対照群に比べて有意に高く(p=0.008)、TTのホモ接合者の割合が有意に高い(p=0.003)ことが示された。(表)
- (3) -123多型と-88多型の間で連鎖不平衡を認めたが、-123 C/A多型の解析では両群の間に有意な差は認められなかった。

考 察

本研究ではMxA 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型解析によって-88 TアレルがSSPEと関連することが示された。

MxA 遺伝子プロモーター領域にはinterferon-stimulated response element (ISRE)と相同性を持つISRE consensus sequenceと呼ばれる領域が存在する。本研究の-88 G/T多型はISRE consensus sequence上にあることから、この多型は1型インターフェロンによるMxA蛋白の誘導、さらに宿主の抗麻疹ウイルス作用に関与することが予想される。

SSPEでは麻疹急性期における不十分な麻疹ウイルスの排除がその一要因と考えられており、多くのSSPE患者が乳幼児期に麻疹に罹患していることから、SSPEの病態には麻疹罹患時の免疫の未熟性が関与すると考えられている。われわれの研究は免疫応答に関する宿主の遺伝的特性がSSPEの病態に関与することを示しており、Th1/Th2バランスもMxAによる抗ウイルス作用も初期の麻疹ウイルス排除において重要であることから、これらも麻疹ウイルスの不十分な排除に関わると予想される。