

考察

最近 Isaacs 症候群に MG の合併が多いことが相次いで報告されている。その中でも thymoma の合併が多いことが特に指摘されている。今回の本邦の検討でも、muscle cramp あるいは myokymia を有する MG では抗 VGKC 抗体の陽性率が高かったが、他の報告と比較して、thymoma の合併は多くなかった。Hart らは MG における抗 VGKC 抗体の意義として、とくに 40 歳以上であれば、thymoma の合併のリスクが高いとしている。このため、初診で胸部 CT 上 thymoma が見られない場合も、経時的な検索が重要であり、さらに今回の seronegative の症例でも thymoma の経時的検索が重要と考えられる。

一方近年、muscle cramp、myokymia を主徴とする症例で、高頻度に抗 VGKC 抗体が陽性であることが明らかになっている。とくに注目すべきは、いわゆる Isaacs 症候群としての特徴的症状が揃わず、muscle cramp あるいは myokymia のみの症例でも抗 VGKC 抗体が陽性であることである。このような症例の蓄積から、もはや Isaacs 症候群、後天性 neuromyotonia という概念ではなく、原因不明の末梢神経過剰興奮（peripheral nerve hyperexcitability）という概念で、抗 VGKC 抗体との関連を検討する必要があると考えられる。

結論

Isaacs 症候群は自己免疫疾患としての側面のみならず、傍腫瘍性神経疾患としても重要であり、とくに胸腺腫、肺癌の検索は必要である。

文献

1. 森豊浩代子. 他 Isaacs 症候群と重症筋無力症の合併した 1 例. 臨床脳波 in press.
2. Hart IK, et al. Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability. Brain 128:1887, 2002.
3. Van Parijs V. et al. neuromyotonia and myasthenia gravis without thymoma. J Neurol Neurosurg Psychiatry 73:344, 2002/12/07.
4. Nagado T, et al. Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. Brain 122:2057, 1999.

健康危険情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

表 1 Muscle cramp を主訴として症例の抗 VGKC 抗体の陽性率

臨床診断	59 例中	抗 VGKC 抗体陽性率
Isaacs 症候群とその関連疾患	27 例	25 例 (92.6%)
MG	7 例	4 例 (57.1%)
その他	25 例	2 例 (8.0%)

表 2 MG7 症例の臨床症状、抗 VGKC 抗体

症例	age	sex	Thymoma	Cramp	Fasciculation	Myokymia	抗体
1	55	M	—	—	+	—	—
2	33	F	—	+	—	+	—
3	44	M	+	—	—	+	+
4	50	M	+	+	—	+	+
5	37	M	—	—	+	—	+
6	55	F	—	+	—	—	+
本例	70	F	—	+	—	—	+

重症筋無力症に対する縦隔鏡下拡大胸腺摘出術の 治療効果と免疫動態の変化

分担研究者 村井弘之¹⁾

共同研究者 梅 風君¹⁾, 吉良潤一¹⁾, 内山明彦²⁾

研究要旨

縦隔鏡下拡大胸腺摘出術は胸骨正中切開拡大胸腺摘出術と比較すると、胸骨切開をせずにすむ侵襲の少ない手術法である。術後の疼痛が軽いこと、美容上も胸部に術創が全く残らない点が特にすぐれている。また、同じ内視鏡的胸腺摘出術である胸腔鏡下胸腺摘出術と比較すると、片肺換気が不要である点、視野が広く取れる点などが長所である。手術手技に習熟するには慣れが必要とされる。

縦隔鏡下拡大胸腺摘出術は、その治療予後においても胸骨正中切開拡大胸腺摘出術と比較しても遜色なく、QMGスコア、抗AChR抗体価とも同程度に低下した。また免疫動態的にもIFN γ /IL-4産生細胞比を高めることが示唆された。今後大規模調査を実施し、術式による治療効果の差をより正確に把握することが必要となるであろう。

研究目的

重症筋無力症(MG)に対する胸腺摘出の術式としては胸骨正中切開拡大胸腺摘出術が一般的であるが、最近より侵襲の少ない内視鏡的胸腺摘出術が注目され始めている。内視鏡的胸腺摘出術には縦隔鏡下拡大胸腺摘出術と胸腔鏡下胸腺摘出術とがある。当院ではMGに対して縦隔鏡下拡大胸腺摘出術を多数施行している。ここでは本法による手術症例の治療予後を検討するとともにその免疫学的動態の変化を明らかにする。

研究方法

当院で縦隔鏡下拡大胸腺摘出術を施行したMG33例のうち1年以上経過観察が可能であった23例(男8人,女15人,平均年齢50.6歳,非胸腺腫例17例,胸腺腫例6例),および胸骨正中切開拡大胸腺摘出術を施行した15例(男8人,女7人,平均年齢48.0歳,非胸腺腫例9例,胸腺腫例6例)を対象とした。Myasthenia Gravis Foundation of Americaの提唱するQMGスコアおよび抗AChR抗体価を手術前,手術後1年の時点で調査した。

また,縦隔鏡下拡大胸腺摘出術を施行したMG8例で手術前および手術後(副腎皮質ステロイド剤使用開始前)のCD4

1) 九州大学医学部神経内科

2) 九州大学医学部臨床・腫瘍外科

陽性 T 細胞分画内の IFN γ /IL-4 産生細胞比をフローサイトメトリー法により測定した。術前・周術期に副腎皮質ステロイド剤などの免疫抑制療法を受けた患者は解析から除外した。

統計学的解析にはいずれも、nonparametric Wilcoxon signed-ranks test を用いた。

研究結果

縦隔鏡下拡大胸腺摘出術を施行した 23 例は、手術後 1 年で QMG スコアは平均 7.5 ± 4.9 から 2.2 ± 3.6 へ低下した ($p=0.0002$)。長期的には肺癌合併例が 1 例死亡した以外は増悪を認めなかった。胸骨正中切開拡大胸腺摘出術を施行した 15 例は、1 年で QMG スコアは平均 6.4 ± 4.4 から 1.5 ± 1.3 へ低下した ($p=0.0006$)。

抗 AChR 抗体価は縦隔鏡下拡大胸腺摘出術で平均 139.1 ± 167.4 nmol/l から 53.0 ± 73.8 nmol/l へ低下し ($p=0.0045$)

(図 1)、胸骨正中切開拡大胸腺摘出術では 150.6 ± 394.4 nmol/l から 55.2 ± 154.2 nmol/l へ低下した ($p=0.0077$)。

また IFN γ /IL-4 比は術前平均 9.26 ± 4.08 から術後平均 11.6 ± 8.01 へと増加傾向であったが有意差には至らなかった ($p=0.26$) (図 2)。

考察

縦隔鏡下拡大胸腺摘出術は胸骨正中切開拡大胸腺摘出術と比較すると、胸骨切

開をせずにすむ点が最大の長所である。すなわち、出血量は少なく、術後の疼痛は軽くてすみ、美容上も胸部に術創が全く残らず、入院期間も短縮できる。一方短所としては、手術時間が長いこと、操作に慣れが必要な点などがあげられる。

同じ内視鏡的胸腺摘出術である胸腔鏡下胸腺摘出術と比較すると、片肺換気が不要である点、視野が広く取れる点などが長所である。胸骨挙上装置が必要である点が短所といえる。

患者への負担がより少なく、メリットの大きい縦隔鏡下拡大胸腺摘出術は、その治療予後においては胸骨正中切開拡大胸腺摘出術と比較しても遜色なく、抗 AChR 抗体価の低下も同程度である。また免疫動態的にも IFN γ /IL-4 産生細胞比を高めることが示唆された。今後大規模調査を実施し、術式による治療効果の差をより正確に把握することが必要となるであろう。

結論

縦隔鏡下拡大胸腺摘出術は MG に対する有効な治療法であり、IFN γ /IL-4 産生細胞比を高めることが示唆された。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

図1：縦隔鏡下胸腺摘出術前後での抗AChR抗体価の変化

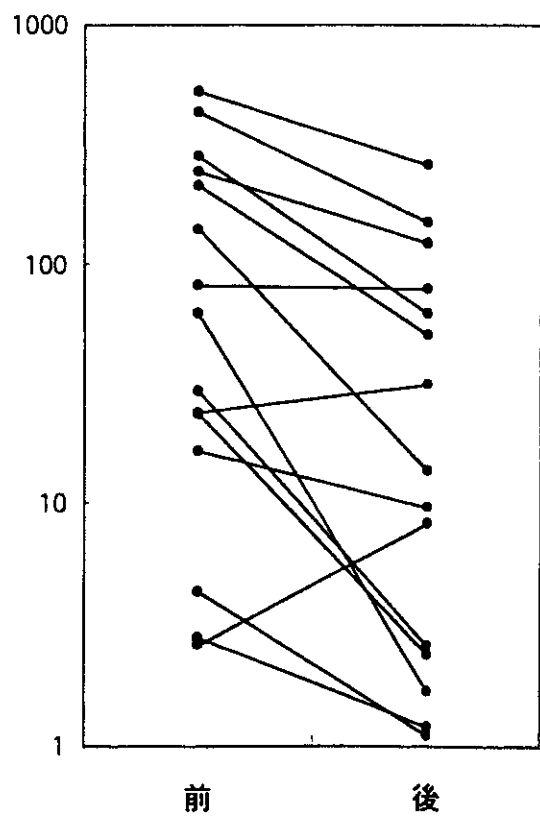
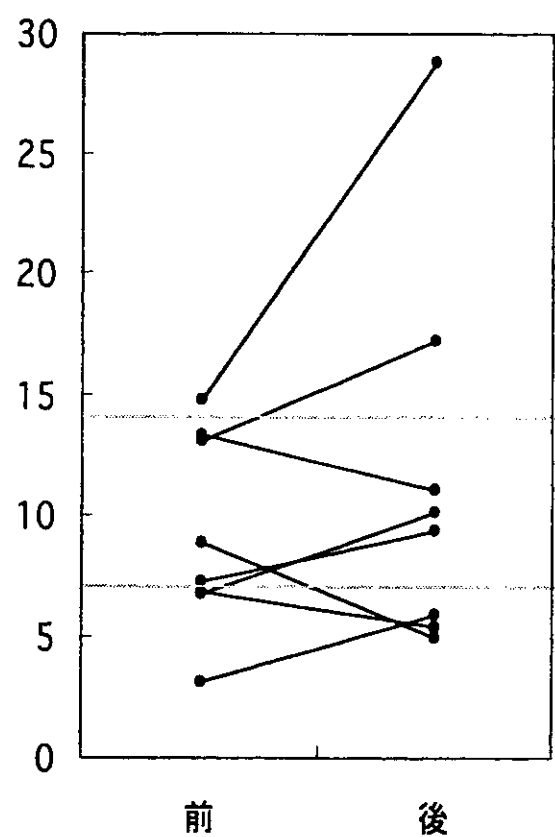


図2：縦隔鏡下胸腺摘出術前後でのIFN γ /IL-4比の変化



(点線は健常対照の平均 \pm 2SD)

重症筋無力症過形成胸腺における特異的胚中心の検出

分担研究者 藤井義敬 名古屋市立大学医学部第二外科

研究要旨：重症筋無力症における過形成胸腺内胚中心の役割を明らかにするために、抗原特異的胚中心をRI標識した Bungarotoxin と Acetylcholine 受容体を用いて組織染色し、抗原特異的胚中心の検出を試みた。

藤井義敬¹⁾, 塩野裕之²⁾, Nick Willcox³⁾

A. 研究目的

重症筋無力症(MG)において、胸腺過形成はおもに若年発症例に特徴的に認められる異常である。過形成胸腺を摘出(拡大胸腺摘出術)することにより、血清抗Acetylcholine receptor (AChR)抗体価が減少することや、症状の改善がみられることがわかっているが、その機序はまだ明らかではない。胸腺細胞の培養上清に抗体を検出できることから、抗体産生細胞が胸腺に含まれることが示唆される。我々は、抗AChR抗体産生に必要な特異的T細胞の選択的活性化の場が、過形成胸腺であり、高親和性抗体産生細胞の誘導にはAChRを発現する筋様細胞が関与していると仮定した。そこで胚中心や抗体産生細胞と筋様細胞との関連を解析するために、特異的plasma cellと特異的胚中心を、MG患者から摘出した胸腺組織切片上に検出することを目的とした。

B. 研究方法

TE671細胞から抽出したヒトAChRを¹²⁵I- α -bungarotoxinで標識した。¹²⁵I標識したAChRあるいは¹²⁵I- α -bungarotoxin単独を、承諾を得たMG患者より摘出した胸腺組織の凍結切片上で培養した。洗浄後autoradiographyにより信号を検出した。B細胞、形質細胞および筋様細胞の同定のため、免疫組織染色を併用した。

C. 研究結果

摘出した過形成胸腺切片上の胚中心内およびT cell areaに陽性細胞を認めた(図1)。一方、同一切片上には陰性の胚中心も認められた。正常胸腺や扁桃腺では陽性細胞は認められなかった。また、¹²⁵I- α -bungarotoxinがdiffuseに結合する胚中心が認められた(図2)。この信号は、AChRの特異的agonistであるcarbamylcholineにより前もって培養することで阻害できた。

D. 考察

標識したAChR抽出液には、¹²⁵I-AChRだけでなく、受容体に未結合の¹²⁵I- α -bungarotoxinも含まれる。前者は、AChR特異的plasmacyteやplasmablastに、後者は、特異的胚中心内のfollicular dendritic cell上に捕捉されたAChR/抗体複合体に結合すると考えられる。その標識パターンは一様ではなく、濾胞の成熟度に依存することが示唆された。すなわち、主にmantle zoneやT cell areaにみられる強陽性細胞は、成熟した形質細胞が、また、主に胚中心内にみられる弱い陽性細胞は、成熟過程のplasmablastが考えられた。

一方、同一切片にも信号陰性の胚中心がみられoligoclonalityが示唆された。

またAChR特異的胚中心の近傍には、信号陰性の胚中心に比して、より多くの筋様細胞が認められ、現在、その関連について定量的解析を行っている。

E. 結論

MG患者過形成胸腺切片上に、AChR特異的抗体産生細胞および胚中心を同定することができた。こ

1)名古屋市立大学医学部第2外科、教授

2)大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科助手

3)Oxford University, UK、教授

の方法は、重症筋無力症における自己抗体産生機序に関する研究に大きく寄与すると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiono H, Willcox N et al. Autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis. Ann NY Acad Sci 2002, in press

Sims GP, Shiono H, Willcox N, et al. Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. J Immunol. 167: 1935-44, 2001.

2. 学会発表

第 31 回日本免疫学会総会（大阪），重症筋無力症過形成胸腺における特異的胚中心の検出
塩野裕之, Nick Willcox

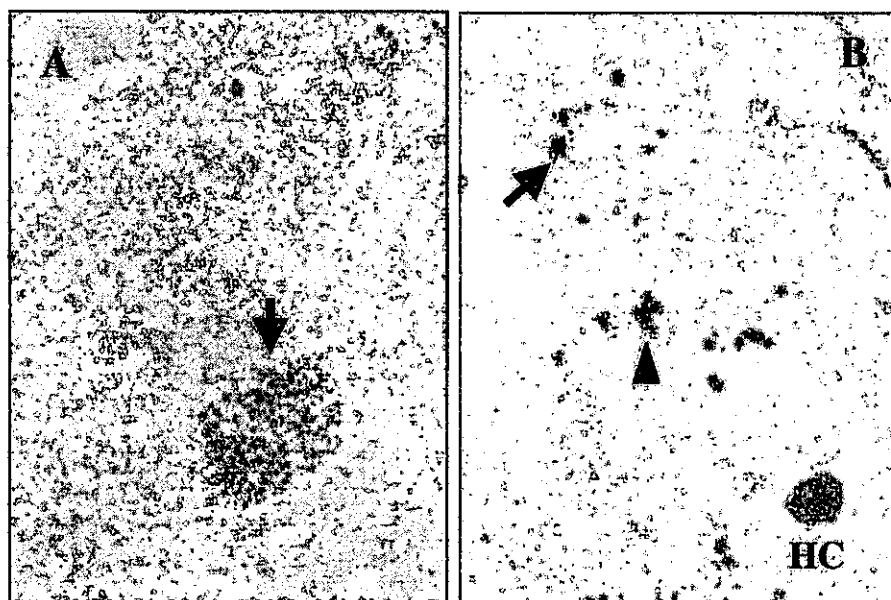


図1. ^{125}I - αBuTx -AChRで標識された細胞を胚中心内(▲)とT cell area内(▲)に認めた. (A) 24歳. MG胸腺. (B) 34歳. MG胸腺切片を抗B細胞抗体で免疫染色したのち ^{125}I - αBuTx -AChRで培養した. ハッサル小体 (HC)は非特異的陽性を示す.

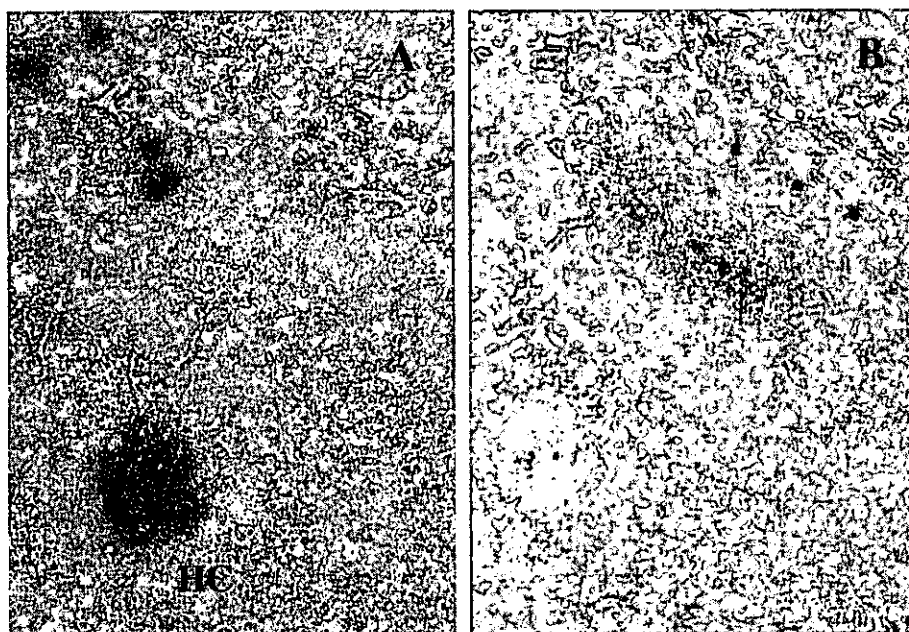


図2. 18歳, MG胸腺の連続切片. (A) ^{125}I - αBuTx -AChRにより特異的胚中心とplasmacyteを検出できた. (B)同一の胚中心が ^{125}I - αBuTx のみの培養でdiffuseな集積パターンを示した.

Interferon- α の実験的筋無力症モデル発症に対する影響

分担研究者 松尾秀徳¹⁾

共同研究者 岡 剛史²⁾, 白石裕一³⁾, 本村政勝³⁾, 後藤公文¹⁾, 神原千晶¹⁾,
澁谷統壽¹⁾

研究要旨: Interferon- α (IFN α) 治療と重症筋無力症発症 (MG) の因果関係を検討するために, myoid cell を抗原として抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体を誘導する動物モデルを用いて IFN α が発症にどのように関与するかについて検討した. 免疫後の抗ラット AChR 抗体価は IFN α 投与群で高い傾向が認められた. この効果は免疫後の初期段階で IFN α が作用することで現れるものと推測された. 一方, 胸腺では MG に特徴的な病理学的変化は誘導されていなかった. Lewis rat の胸腺内に recombinant rat IFN α を注入した系では抗ラット AChR 抗体は誘導されず, IFN α が胸腺内で抗原提示に関与し自己免疫反応を誘導することは証明できなかった.

研究目的

Interferon- α (IFN α) 治療中に重症筋無力症を発症した報告が散見される. われわれは, これまでに myoid cell を抗原として数回の追加免疫を行なうことで抗 AChR 抗体を誘導できることを報告してきた. 今回はこの実験系を用いて IFN α が発症にどのように関与するかについて検討した.

研究方法

(1) Fisher rat 胸腺より樹立した myoid cell line (ST1B) を抗原として筋無力症ラットを誘導した. 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. 十分に分化を誘導した ST1B (1×10^7) を完全フロイント・アジュヴァントとともに

6 週齢雌 Fisher rat 足底に免疫した. 免疫後次の 3 群に分け経過を観察した. (a) 直後より Human IFN α (1×10^5 Unit) を 6 週間連日筋注 ($n=4$), (b) 直後より Human IFN α (1×10^5 Unit) を 7 日間連日筋注 ($n=4$), (c) 対照群: 生理食塩水筋注 ($n=4$). 3 週後に ST1B (1×10^7) を完全フロイント・アジュヴァントとともに足底に追加免疫した. 経時的に採血し上記各群において血中の抗ラット AChR 抗体価を測定し, 免疫後 10 週目に胸腺の病理学的変化を観察した.

(2) Myoid cell line (ST1B: 1×10^7) を CFA とともに 6 週齢雌 Fisher rat 足底に免疫した. 免疫後次の 2 群に分け経過を観察した. (a) 直後より Human IFN α (1×10^5 Unit) を 5 日間筋注 ($n=6$), (b) 対照群: 生理食塩水筋注 ($n=6$). その後, 臨床的観察と経時的に採血を行ない血中の抗ラット AChR 抗体価を測定した.

(3) 5 週齢雌 Lewis rat の胸腺内に recombinant rat IFN α (1000 Unit) を直視

1) 国立療養所川棚病院臨床研究部,

2) 岡山大学大学院医歯学総合研究科病理病態学,

3) 長崎大学大学院神経病態制御学

下に注入した。一部ではさらに Human IFN α (1×10^5 Unit)を 7 日間筋注した。その後、臨床的観察と経時的に採血を行ない血中の抗ラット AChR 抗体価を測定した。

研究結果

(1) 免疫後の観察では明らかな体重減少や筋力低下は認めなかった。3 週、6 週の抗ラット AChR 抗体価は IFN α 投与群で高い傾向が認められた(表 1)。しかし、6 週間連日投与した群と初期の 1 週間のみ投与した群では抗体価に差はなかった。胸腺の病理学的検索では胚中心の形成はなく MG に特徴的な変化は見いだせなかった。

表 1. Myoid cell 免疫後の抗 AChR 抗体価

	3週:追加免疫時	6週
IFN α 6 週連日	24.1(7.1)	101.1 (57.3)
IFN α 7 日連日	18.8(6.5)	110.6 (48.5)
対照群	16.3(3.6)	56.1 (7.8)

pmol/L (SD)

Cut-off value = 30 pmol/L 各群 n = 4

(2) 一回のみ免疫後5日間のみIFN α を投与した群では、対照群に比べて、6週で抗AChR抗体がやや高い傾向が認められたが有意差はなかった(図1)。

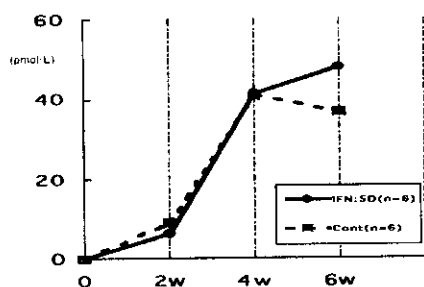


図1. Myoid cell 免疫後のラット血清中の抗AChR抗体産生に対するIFN α の影響: 1回免疫

(3) 胸腺内に IFN α 注入した後の観察では、

IFN α (1×10^5 Unit)を 7 日間追加筋注した群を含めて、体重の減少や筋力低下は認められず、6 週および 8 週の抗ラット AChR 抗体価はいずれの群でもすべて陰性 (< 30 pmol/L) であった。

考案

IFN α 治療中に自己抗体や自己免疫疾患が誘発されることが報告されている。また、IFN α は単球を樹状細胞に分化させ抗原提示に関与する可能性が示唆されている。一方、マウス実験的筋無力症モデルでの治療実験では、追加免疫1週後より週3回5週間の IFN α 投与により発症が抑制されることが報告されている。今回の検討では、免疫直後より IFN α を投与すると、対照群に比して抗体が誘導されやすい傾向が認められた。この効果は免疫後の初期段階で IFN α が作用することで現れるものと推測された。一方、胸腺では MG に特徴的な病理学的変化は誘導されていなかった。

また、Lewis rat の胸腺内に recombinant rat IFN α を注入した系では抗ラット AChR 抗体は誘導されず、IFN α が胸腺内で抗原提示に関与し自己免疫反応を誘導することは証明できなかった。

結論

IFN α は実験的筋無力症モデルにおいて免疫後の初期段階で抗 AChR 抗体誘導を促進する可能性が示された。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

培養骨格筋細胞のアセチルコリン受容体と細胞内カルシウム濃度に及ぼす タクロリムスとプレドニゾロンの作用

分担研究者 吉川弘明¹⁾

共同研究者 枝広茂樹²⁾、橋井美奈子³⁾、岩佐和夫²⁾

研究要旨

骨格筋培養細胞 TE671 に対するタクロリムスとプレドニゾロンの作用を、細胞表面上アセチルコリン受容体(AChR)数、細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)を指標として検討した。タクロリムスは細胞表面上 AChR 数に影響を与えなかったが、プレドニゾロンはこれを減少させた。タクロリムスはアセチルコリン添加によりもたらされる $[Ca^{2+}]_i$ ピークを上昇したが、プレドニゾロンは逆に下降させた。重症筋無力症ではステロイドを含む免疫抑制剤を長期にわたって服用するため、それらの骨格筋におよぼす作用を検討することは重要と思われた。

研究目的

神経難病の治療は疾患の活動性を抑えるだけでなく、如何に患者の Quality of Life (QOL) を高めるかが重要な課題となってきた。わが国では重症筋無力症 (Myasthenia gravis, MG) の治療に、タクロリムス(FK506)¹⁾ が導入され、臨床症状の改善、ステロイド副作用の軽減に注目が集まるようになった。ステロイド治療で十分な効果が得られない患者において、タクロリムスを併用することで臨床症状の改善、ステロイド減量が可能になることは経験されているが、タクロリムス投与後早期から症状が改善する例があり、免疫系を介する作用とは考えにくい²⁾。また、MG 患者はステロイドを始めとする免疫抑制剤を長期にわたって服用する必要があり、免疫系以外の臓器に対する臨床薬理学的作用にも留意する必要がある。そこで、われわれは骨格筋に対するタクロリムスの影響をステロイドと比較検討することにした。骨格筋培養細胞である TE671 を用いて、表面に発現しているアセチルコリン受容体 (Acetylcholine receptor, AChR)、細胞機能の指標である細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対するタクロリムスとステロイド (プレドニゾン) の影響を調べた。

研究方法

1) TE671

横紋筋肉腫由来培養細胞 TE671³⁾ は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。

Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)/5% CBS/1% PC-SM にて 5% CO₂ 下に 37°C で培養した。

2) AChR に対するタクロリムスとプレドニゾロンの効果

TE671 の培養液中にタクロリムスもしくはプレドニゾロンを加え、24 時間培養した。¹²⁵I- α -bungarotoxin で細胞表面上の AChR をパルスラベルし、無添加のコントロール群と比較することにより AChR 数を推定した。タクロリムスとプレドニゾロンの濃度を変えて、比較検討した。

2) $[Ca^{2+}]_i$ に対するタクロリムスとプレドニゾロンの効果

TE671 の培養液中にタクロリムスもしくはプレドニゾロンを加え、24 時間培養した。Fluo-3AM を負荷した後、アセチルコリン (acetylcholine, ACh) 添加により誘導される細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光光度計により連続的に測定した。タクロリムスとプレドニゾロンの濃度を変えて、比較検討した。

研究結果

1) AChR に対するタクロリムスとプレドニゾロンの効果

タクロリムスは、細胞表面上の ACh 数に影響を与えなかった。一方、プレドニゾロンは、濃度依存的に細胞表面の ACh 数を減少させることがわかった。

2) $[Ca^{2+}]_i$ に対するタクロリムスとプレドニゾロンの効果

ACh 添加により、 $[Ca^{2+}]_i$ は素早く上昇し、オシレーションしながら低下した。タクロリムスは、ACh 添加により上昇する $[Ca^{2+}]_i$ のピークを、濃度

¹⁾ 金沢大学保健管理センター

²⁾ 金沢大学医学部神経内科

³⁾ 金沢大学医学部細胞遺伝

依存的に増加させることがわかった。一方、プレドニゾロンは、 $[Ca^{2+}]_i$ のピークを濃度依存的に減少した。

考察

本研究の目的は、骨格筋細胞におけるタクロリムスとプレドニゾロンの作用を調べることにある。骨格筋培養細胞の AChR 数に及ぼすステロイドの影響については、Braun らが AChR を増加すると報告している⁴⁾。しかし、実験系が異なること、デキサメサゾンを使っていることより、われわれの結果とは比較が困難と思われる。

細胞内のカルシウムは主に筋小胞体に蓄積されている。筋小胞体にあるリアノジン受容体 (Ryanodine receptor, RyR) は電位センサーとして働く L-type カルシウムチャンネルと foot structure を介して繋がっている。細胞内の電位変化をとらえ、リアノジンレセプターが開口し、voltage-induced Ca release が起こる⁵⁾。RyR は 4 量体で、その一つ一つに FKBP-12 が結合し、RyR の開口を調節している。タクロリムスは、FKBP-12 に結合し RyR から乖離させ、RyR を開口した状態にし、筋小胞体中の Ca^{2+} 流出を促進する⁶⁾。一方、プレドニゾロンは筋小胞体中の Ca^{2+} ストアを減少させるという報告がある⁷⁾。われわれの結果は、これまでの報告と矛盾しない結果と思われる。MG ではステロイドを含む免疫抑制剤を長期にわたって服用する必要があるため、骨格筋に及ぼす作用も考慮に入れて薬剤の選択をする必要があると思われる。

結論

プレドニゾロンは TE671 表面上の AChR 数を濃度依存的に減少させたが、タクロリムスは影響を与えなかった。 $[Ca^{2+}]_i$ に関しては、タクロリムスが、ACh により誘発されるピークの濃度を上昇させたのに対し、プレドニゾロンは低下させた。今後、免疫抑制剤はその免疫系に対する効果だけでなく、筋細胞の生理機能に対する作用も検討する必要があると思われる。

文献

- 1) Yoshikawa H, Iwasa K, Satoh K, Takamori M. FK506 prevents induction of rat experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimm* 10: 11-16, 1997
- 2) Yoshikawa H, Mabuchi K, Yasukawa Y, Takamori M, Yamada M. Low-dose tacrolimus for intractable myasthenia gravis. *J Clin Neurosci* 9:627-628, 2002
- 3) Stratton MR, Darling J, Pilkington GJ, et al. Characterization of the human cell line TE671. *Carcinogenesis* 10:899-905, 1989
- 4) Braun S, Askanas V, Engel WK, Ibrahim EN. Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle. *J Neurochem* 60:1929-1935, 1993
- 5) Lamb GD. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:216-24, 2000
- 6) Timerman AP, Ogunbumni E, Freund E, et al. The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268:22992-22999, 1993
- 7) Metzinger L, Passaquin AC, Leijendekker WJ, et al. Modulation by prednisolone of calcium handling in skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 116:2811-2816, 1995

健康危機情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

図 1

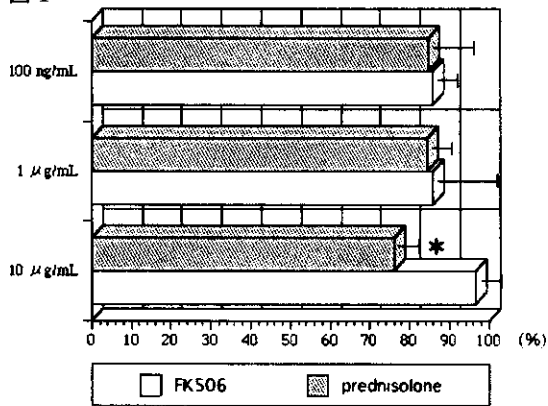


図 1 細胞表面 AChR に及ぼすタクロリムスとプレドニゾロンの効果。コントロール(100%)に対する比率(%)で表示。(Mean ± S.D. n=8) *p<0.001

図 2

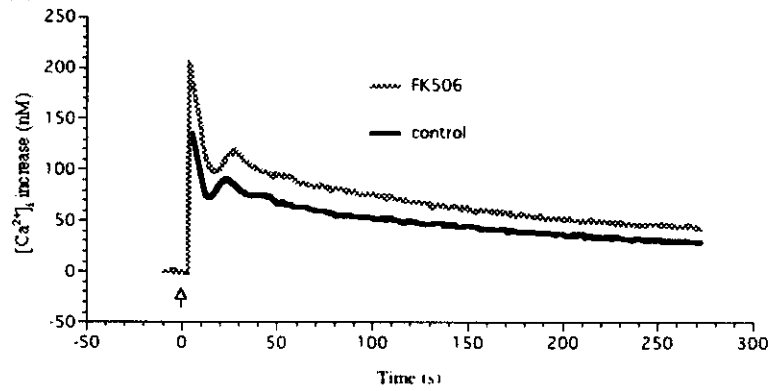


図 2 $[Ca^{2+}]_i$ の ACh ($1 \mu M$) 添加後の継時的変化。Time 0 の矢印で ACh を添加。タクロリムス (FK506) 添加により $[Ca^{2+}]_i$ ピークは有意に上昇 ($p < 0.0001, n = 7$)

図 3

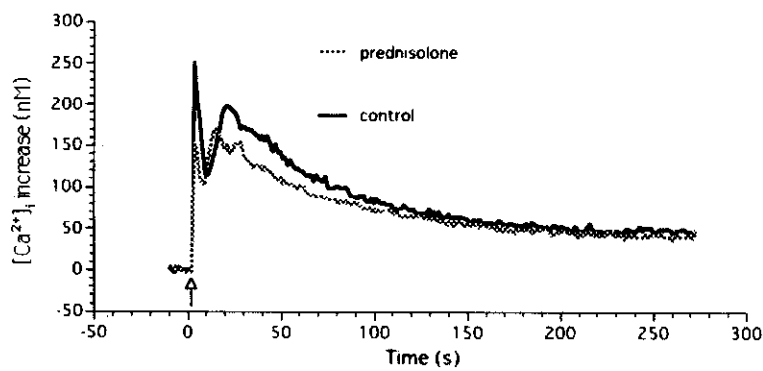


図 3 $[Ca^{2+}]_i$ の ACh ($1 \mu M$) 添加後の継時的変化。Time 0 の矢印で ACh を添加。プレドニゾロン添加により $[Ca^{2+}]_i$ ピークは有意に低下 ($p < 0.0001, n = 7$)

KM マウス™により作成した重症筋無力症のヒト抗アセチルコリンレセプター抗体のアフィニティー解析

分担研究者 荒賀 茂¹⁾

共同研究者 佐久間 研司²⁾、中野 俊也¹⁾、田原 知幸³⁾、中島 健二¹⁾

研究要旨

重症筋無力症 (MG) は、骨格筋の acetylcholine receptor α -subunit (AChR α) に対する自己抗体により発症する。その自己抗体の解析にあたり、よりヒトに近い実験モデルを作成することを目的として、抗原にヒト AChR α を用い、感作動物にヒト抗体産生マウス (KM マウス™) を使った。TE671 細胞から Triton X-100 で膜成分を溶出し、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過法を用い、ヒト AChR α の精製を行った。KM マウス™ に感作後、Sp 2/0 細胞との fusion によりモノクローナル抗体 (mAb) を作成した。Native PAGE, SDS PAGE, IEF による解析から、15 個のクローンのうち、13 個が AChR α に親和性を持つことを確認にした。また mAb による TE671 の組織染色から、細胞膜上に表出する AChR α を認識していることを確認した。今後この mAb のエピトープ解析および MG 惹起性につき検討する予定である。

研究目的

重症筋無力症 (MG) は、骨格筋の AChR α に対する自己抗体により発症する。動物実験より、その自己抗体は AChR α の main immunogenic region (MIR) にそのエピトープを持つことが知られている。しかしいくつかのエピトープが候補として指摘されているにも関わらず、その解析が実際の臨床に結び付いていないのが現状である。つまり、自己抗体の定性、定量は単に AChR α に対する反応性のみ重点が置かれ、病因となる自己抗体の解析、エピトープの解析が行われているとはいいがたい。その理由の一つが、エピトープの解析が免疫性の異なるマウスやラットでの実験に基いているからである。

我々はよりヒトに近い実験モデル作成することを目標として、抗原に TE671 細胞抽出ヒト AChR α を使い、感作動物に鳥取大学とキリンで共同開発されたヒト抗体産生マウス (KM マウス™) を使うことにより、MG での新たな実験系を確立した。

今回我々は、KM マウス™ より得られたモノクローナル抗体 (mAb) についてそのアフィニティー解析を行った。

研究方法

- 1) TE671 細胞の培養：TE671 (金沢大学神経内科より提供) を 10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), Streptomycine (50 U/ml), Penicilline (100 U/ml), Fangizon (2.5 μ g/ml), α -methylprednisolone (1mM) にて 37 度、5% CO₂ incubator で培養した。Confluent になった時点で 0.5% Trypsin で細胞を集め、以下の操作を行った。
- 2) TE671 細胞膜タンパクの可溶化：トリプシン処理済みの TE671 細胞を Buffer A (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.9 mM EDTA, 0.9 mM PMSF, 9 mM IAA) に懸濁し、ポリトロンで破碎後に Triton X-100 を最終濃度 1% になるように加え、4°C で 1 時間攪拌した。この細胞懸濁液を 27,000g 30 分の遠沈操作により、crude な AChR α 溶出液を得た。
- 3) AChR α の精製：上記の crude AChR α を DEAE sepharose FF にアプライし、NaCl による塩勾配により分離を行った。回収した AChR α 分画を Sephacryl S-100 によるゲルろ過分画を行い、さらに精製を行った。AChR α 分画の確認は、¹²⁵I α -Bungarotoxin による binding assay により行った。得られた AChR α は、-80 度で分注保存とした。

-
- 1) 鳥取大学医学部脳神経内科
 - 2) 鳥取大学医学部保健学科生体制御学
 - 3) キリンビール株式会社・医薬カンパニー
医薬探索研究所創薬グループ

- 4) KM マウス™の感作: AChR- α をMPL™+TDM (Corixa)を使い、精製ヒト AChR- α の emulsion を作成した。得られた emulsion を KM マウス™ (10 週令♂) に感作を行った。感作量は 5 μ g /マウスで、皮下に 100 μ l、腹腔内に 100 μ l 投与した。抗体価の推移を見ながら、合計 3 回の感作を行った。
- 5) mAb の作製: 高抗体価を示したマウスに 10 μ g の AChR- α の静注と皮下への IL-6 (5 μ g)の投与を行った。3 日後に摘脾を行い、spleen cell を回収した。spleen cell と Sp2/0 cell を 50% PEG で fusion を行った。Fusion cell は HAT DMEM で培養を行い、1 週間後に positive well の確認を ELISA 法で行った。Positive well の細胞はさらに HT を含む DMEM 培地でさらに limiting dilution を行い、クローン陽性細胞を得た。
- 6) mAb の解析
- ① Histology : Chamber slide で TE671 を培養し、4% パラホルムアルデヒド (pH7.5)で固定後、1 μ g/ml に調整した mAb 培養上清で反応させ、さらに peroxidase labeled anti-human IgG Fab で反応後、diamino 染色を行った。
 - ② Western blotting による解析 : 精製 AChR- α を 10%PAGE で電気泳動後に PVDF 膜に semi-dry blott 装置により転写し、mAb 上清 (1 μ g/ml)で incubation 後に peroxidase labeled anti-human IgG Fab で反応後、特異染色を行った。さらに 10%native PAGE, IEF (pH3.5~7.5)での電気泳動も行い、PVDF 膜に転写後に同様の染色を行った。

研究結果

10%PAGE からの解析より TE671 細胞から得られる AChR が、intact AChR, AChR- α と 2 量体の AChR- α をもつことを確認した。

得られた 15 のクローンのうち、12 のクローンが細胞膜上に表出したレセプターを認識していることを確認した。2 クローンを除きすべてが AChR- α の認識することを確認した。また 2ME による還元により、その affinity が減弱することを確認した (図 1)。

考察

ヒト AChR- α とヒト抗体産生マウス (KM マウス™) を使うことにより、ヒト由来の MG 抗体の作成が可能であった。今回の検討より得られた

mAb が実際に AChR- α に親和性を持つことを確認した。

clone	Histology	Westernblott
1	-	+
2	-	-
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	-	-
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+

図 1. Clone の affinity 解析

結論

得られた mAb の affinity 解析より、MG 患者血清での AChR 抗体と同じく、AChR の立体構造を強く認識することを確認した。今後ヌードマウスを使って、この抗体の MG 惹起性の検討とそのエピトープ解析を行う予定である。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得 : なし

実用新案登録 : なし

抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者 IgG の passive transfer

分担研究者 松尾秀徳¹⁾

共同研究者 福留隆泰¹⁾, 後藤公文¹⁾, 澁谷統壽¹⁾, 本村政勝²⁾, Hoch W³⁾,
Vincent A⁴⁾

研究要旨: 抗 muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK)抗体陽性の重症筋無力症(MG)患者 IgG が神経筋伝達に及ぼす作用について, 患者および正常コントロールの IgG をマウスに静注し, 横隔膜神経筋標本を用いて微小電極法で検討した. プール血清の IgG では抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 IgG は, MEPP 振幅低下させるが quantal content は変化させず, 抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 IgG と同様の神経筋伝達阻害を呈した. 一方, 運動終板に補体や免疫複合体の沈着を認めない抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 1 例の IgG は, MEPP 振幅低下と quantal content の低下を引き起こし, 抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 IgG とは異なる機序で神経筋伝達阻害を呈する可能性が示唆された.

研究目的

抗 muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK)抗体陽性の重症筋無力症(MG)患者 IgG が神経筋伝達に及ぼす作用について検討する.

研究方法

1) 抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 3 名, 抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 3 名, および正常コントロール 3 名のプール血清から IgG を精製した. 8-10 週齢の BKTO マウスに 10mg の IgG を静注し, 24~48 時間後に横隔膜神経筋標本を作成し, 微小電極法を用いて MEPP 及び EPP 記録を行った.

2) 抗 MuSK 抗体陽性全身型 MG 患者 2 名 (MuSK-Ab-positive MG1 および 2)の血清から IgG を精製した. MuSK-Ab-positive

MG2 は運動終板で補体や免疫複合体の沈着を認めたが, MuSK-Ab-positive MG1 では認めなかった. それぞれの IgG を同様に静注し, 微小電極法を用いて MEPP 及び EPP 記録を行った. MEPP は 15~20 の運動終板から, EPP は 10~15 の運動終板から記録した. また EPP 記録にはクラレを用い, 0.5 Hz の連続神経刺激にて quantal content を求めた.

研究結果

(1)正常コントロール IgG 投与マウスに比べ抗 AChR 抗体陽性 MG 患者および抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 IgG 投与マウスでは, 共に有意な MEPP 振幅の低下を認めたが EPP quantal content には有意な変化を認めなかった(表 1).

(2) EPP quantal content は抗 AChR 抗体陽性 MG 患者および MuSK-Ab-positive MG2 の IgG 投与マウスでは有意な変化を認めなかったが, MuSK-Ab-positive MG1 の IgG 投与マウスでは有意に減少していた(表 2).

1)国立療養所川棚病院臨床研究部・神経内科

2)長崎大学大学院神経病態制御学

3)Max-Planck-Institute for Developmental Biology

4)Neurosciences Group, University of Oxford

表 1. 微小電極記録結果

	MEPP amplitude (mV)	EPP quantal content
Control	1.35 ± 0.06	35.5 ± 2.9
AChR-Ab- positive MG	0.84 ± 0.04*	35.7 ± 2.4
MuSK-Ab- positive MG	0.89 ± 0.05*	35.4 ± 1.7

*P<0.01

表 2. 微小電極記録結果

	MEPP amplitude (mV)	EPP quantal content
Control	1.35 ± 0.06	35.5 ± 2.9
AChR-Ab- positive MG	0.74 ± 0.08*	39.9 ± 3.4
MuSK-Ab- positive MG1	0.92 ± 0.06*	24.7±2.3*
MuSK-Ab- positive MG2	0.97 ± 0.06*	35.4 ± 1.7

*P<0.01

考察

プール血清からの IgG での検討では抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 IgG は、抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 IgG と類似した神経筋伝達阻害を呈した。

MG 患者では運動終板に免疫複合体や補体の沈着を認め、抗 AChR 抗体陰性の MG 患者の診断に有用とされている。また、抗 AChR

抗体陽性 MG 患者 IgG 投与マウスの微小電極所見は MEPP 振幅低下が起こるが、quantal content は正常あるいは増加する。今回検討した抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者の 1 例は運動終板に免疫複合体や補体の沈着を認めたが、他の 1 例は認めなかった。運動終板に補体や免疫複合体の沈着を認める MuSK-Ab-positive MG2 の IgG は、抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 IgG と類似した神経筋伝達阻害を呈したが、運動終板に補体や免疫複合体の沈着を認めない MuSK-Ab-positive MG1 の IgG は、MEPP 振幅低下と quantal content の低下を認め、抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 IgG とは異なる神経筋伝達阻害を呈した。このことから、抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者の中には抗 AChR 抗体陽性 MG 患者とは異なった機序の神経筋伝達障害を持つものが存在することが示唆された。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

抗 N 型電位依存性 Ca チャネル抗体によりもたらされるチャネル発現数の変動について

班 員 吉川弘明¹⁾
共同研究者 岩佐和夫²⁾、Bethan Lang³⁾

研究要旨

Lambert-Eaton 筋無力症候群 (LEMS) において認められる抗 P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) 抗体は P/Q 型 VGCC の減少をもたらすが、抗 N 型 VGCC 抗体は N 型 VGCC の減少をもたらすという証明がなされていない。今回培養細胞表面上に存在する N 型 VGCC の発現量を定量することにより、この抗 N 型 VGCC 抗体が病態に関与するものなのか検討した。その結果、抗 N 型 VGCC 抗体は N 型 VGCC の発現量を減少させるのではなく、逆に増加させることが判明した。この増加は N 型 VGCC の合成を増加させるものではなく、既に細胞質内に存在する N 型 VGCC を細胞膜上に発現させるものである可能性が考えられた。

研究目的

LEMS では、抗 P/Q 型 VGCC 抗体により P/Q 型 VGCC の減少がもたらされ病態に関与していることが報告されている¹⁾。一方抗 N 型 VGCC 抗体は、LEMS の約 30% の症例に出現するが、LEMS の病態に関与するか否かについては結論が出ていない。今回、抗 N 型 VGCC 抗体によりもたらされる細胞膜上の N 型 VGCC の発現数の変動について検討し、抗 N 型 VGCC 抗体の機能について考察した。

研究方法

11 例の LEMS 患者の IgG および 6 対象 IgG を用いて検討した。各々の IgG については、二抗体免疫沈降法にて抗 P/Q 型 VGCC 抗体、抗 N 型 VGCC 抗体を測定した。また、抗 N

型 VGCC については、細胞外露呈部位認識抗体を Pinto ら^{1),2)}の方法を用いて測定した。

抗 N 型 VGCC 抗体を発現させた HEK 細胞 (C2D7 細胞) に LEMS 患者の IgG を作用させ、一定時間後に細胞膜上に発現している N 型 VGCC を ¹²⁵I- ω -Conotoxin GVIA を用いて定量した。また BFA や nocodazole を LEMS 患者の IgG と同時に作用させ、同様に細胞膜上に発現している N 型 VGCC を定量した。

研究結果

LEMS 患者 11 例中 10 例で抗 P/Q 型 VGCC 抗体が陽性となった。また LEMS 患者 11 例中 5 例で抗 N 型 VGCC 抗体が陽性となった。さらに LEMS 患者 4 例では細胞外露呈部位を認識する抗 N 型 VGCC 抗体が陽性となった。

LEMS 患者の IgG のうち、N 型 VGCC 細胞

1) 金沢大学保健管理センター

2) 金沢大学神経内科

3) オックスフォード大学

外露呈部位を認識する抗 N 型 VGCC 抗体が高力価で陽性である患者の IgG は、IgG の濃度依存的に細胞膜上の N 型 VGCC の発現量を増加させた。これは BFA により抑制されず、nocodazole により抑制された。

考察

これまでの LEMS における抗 P/Q 型 VGCC 抗体による細胞膜上の P/Q 型 VGCC の発現量の変動について検討した報告では、P/Q 型 VGCC の減少がもたらされることが証明されている¹⁾。一方、抗 N 型 VGCC 抗体によりもたらされる細胞膜上の N 型 VGCC の発現量の変動についての報告では、N 型 VGCC の減少がもたらされているという証明はなされていない¹⁾。今回抗 N 型 VGCC 抗体によりもたらされる細胞膜上の N 型 VGCC の発現量の変動については、減少ではなく増加することが判明した。またこの増加は、BFA による影響をうけず、nocodazole により抑制された。このことは細胞内にて N 型 VGCC の合成が増加したのではなく、既に細胞質内に存在する N 型 VGCC が細胞膜上に発現した可能性を示唆するものと考えられた。N 型 VGCC の合成については mRNA の発現量を定量し検討することが必要であり今後の課題である。また今回の細胞膜上の N 型 VGCC の発現量の増加は、単なる代償機能の一つなのか、特殊な細胞内伝達を介するものなのか検討する必要がある。

結論

抗 N 型 VGCC 抗体により細胞膜上の N 型

VGCC の発現が誘導された。またこの発現は細胞質内に既に存在する N 型 VGCC が細胞膜上に現れた可能性が考えられた。自己抗体の病態への影響を考える際に考慮すべき現象の一つであると考えられた。

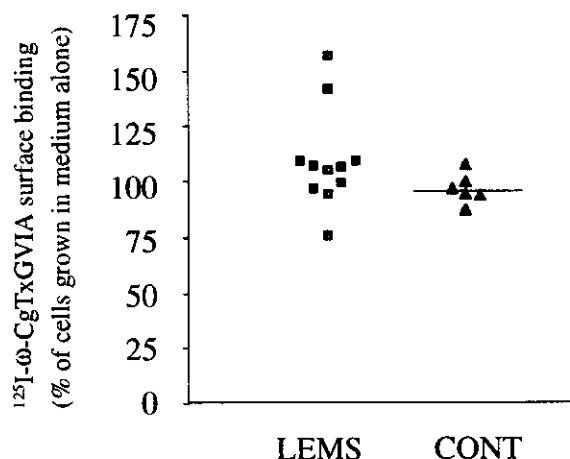


図 LEMS および対照 IgG による細胞表面 N 型 VGCC の発現量の変化
LEMS 9 例および対照の IgG は細胞表面の N 型 VGCC の発現量に変化は与えなかったが、細胞外露呈部位認識抗 N 型 VGCC 抗体が高力価にて陽性の LEMS 2 例の IgG では細胞表面の N 型 VGCC の発現量を増加させた。

文献

- 1) Pinto A, Gillard S, Moss F et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8328-33.
- 2) Pinto A, Iwasa K, Newland C et al. Muscle Nerve. 2002 May;25(5):715-24.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

再発性ギラン・バレー症候群 4 例の臨床的及び免疫学的特徴

分担研究者 齊藤豊和¹⁾

共同研究者 荻野美恵子²⁾、荻野 裕²⁾、入江幸子²⁾、金澤直美²⁾、坂井文彦²⁾

研究要旨

再発性ギラン・バレー症候群 (rGBS) と考えられる症例について、GBS の発症に関与する宿主側の要因を検索するために、臨床的および免疫学的特徴を検討した。過去 10 年間の当院における GBS 連続 110 例中 rGBS は 4 例で 3.6% であり、その臨床的特徴は高率に脳神経症状を伴うこと、重症例が多いこと、再発までの期間は 3 年～20 年と幅があること、先行感染は呼吸器感染が多かったことがあげられた。免疫学的には抗神経抗体に一定の傾向はなく、HLA を調べ得た 3 例に DRB1*1502, DQB1*060 が共通して認められ、何らかの遺伝素因が関与している可能性が考えられた。

研究目的

ギラン・バレー症候群 (以下 GBS) は単相性の経過をとるが、まれに再発性 GBS (以下 rGBS) 症例を経験する。また、GBS の先行感染として知られる感染症に罹患する症例は多数あるが、GBS を発症するのはそのうちの僅かの症例であり、GBS を発症しやすい何らかの宿主側の素因があると考えられる。rGBS 症例を検討することは、GBS を惹起しやすい素因を分析するのに適していると考えられるため、今回我々は当科で経験した rGBS 症例につき検討した。

研究方法・対象

北里大学および北里大学東病院における過去 10 年間連続 110 例の GBS のうち rGBS と考えられた 4 例の臨床的特徴、および血清抗ガングリオシド (GGD) 抗体、HLA タイピングにつき分析した。

症例 1 51 歳女性

(1 回目 28 歳) 1979 年 12 月右顔面神経麻痺、味覚異常、温度感覚低下、他院へ約 10 日間入院。後遺症を残さず治癒。

(2 回目 48 歳) 1999 年 12 月 4 日発熱嘔吐 7 日後に全身痛、複視、四肢脱力出現し入院。翌日には人工呼吸管理となり、眼球運動障害、顔面

神経麻痺、四肢麻痺、感覚障害、腱反射消失を認めた。免疫吸着療法およびステロイドパルス療法を施行され徐々に改善。2002 年 2 月呼吸器離脱、7 月車椅子レベル、8 月には独歩可能。四肢末梢にしびれ感が軽度残存するのみとなる。

(3 回目 51 歳) 2002 年 4 月 3 日咳嗽後全身筋痛と下肢脱力が出現。感覚低下、軽度筋力低下、協調運動障害あり入院。嚥下障害、構語障害、複視、瞳孔不同、腱反射低下、疼痛を伴い、下肢脱力は進行。IVIg およびステロイドパルス療法施行後改善がみられた。16 日経口摂取再開、17 日介助歩行、30 日杖歩行可能、5 月 13 日独歩可能で退院。

症例 2 54 歳男性

(1 回目 37 歳) 1985 年感冒後四肢脱力をきたし歩行できなくなり、近医入院。嚥下障害、構語障害、複視を伴ったが自然経過で回復し、3 ヶ月後に独歩退院。後遺症を残さなかった。

(2 回目 54 歳) 2002 年 9 月 17 日発熱、咳嗽後、23 日に左手指にしびれが出現、その後徐々に上行、下肢のしびれ、脱力を生じ、歩行困難となり 25 日入院。2 回の IVIg を施行するも嚥下障害、顔面神経麻痺、深部感覚障害、四肢脱力は進行し、人工呼吸管理開始。四肢完全麻痺、振動覚 0、表在感覚低下、また胸痛を頻回に認めた。11 月 7 日 3 回目の IVIg 施行後より、徐々に症状改善、2003 年 1 月人工呼吸器離脱、筋力も回復傾向。

1) 北里大学医療衛生学部リハビリテーション科

2) 北里大学医学部内科 (神経内科)