

C. 研究結果

(1)SFEMG: Jitter の異常は seropositive 症例の 89% に認められたが、seronegative 症例では 40% しかみられず、有意に低頻度であった ($p=0.02$)。平均 MCD は seronegative 症例で有意に低値であり ($28\mu s$ vs $76\mu s$, $p=0.0005$)、blocking の程度も軽度であった。MGFA による臨床的重症度は両群で差はみられなかった。すなわち seronegative 群では臨床的重症度は seropositive 群と同様であるにも関わらず SFEMG 異常は有意に軽度であった。

(2)自己抗体: Seronegative 症例 15 名中 4 名で抗 MuSK 抗体が、8 名で抗 RyR 抗体が陽性であった。抗 MuSK 陽性の 4 名中 2 名で軽度の jitter 増大がみられたが、残りの 2 名での jitter は正常であった。抗 RyR 抗体陽性の 8 名中 3 名で軽度の jitter がみられた。

D. 考察

MuSK は神経筋接合部形成時に agrin によるアセチルコリン受容体の clustering に必要とされており、抗 MuSK 抗体陽性例ではシナプス後膜でアセチルコリン受容体の密度が低下し、神経筋伝達の安全因子が低下している可能性が考えられる。今回の検討では抗 MuSK 陽性は 4 名 (27%) しか存在せず、本邦における抗 MuSK 陽性例の頻度は低いことが示唆されたが、症例数が少なく抗 MuSK 陽性例の SFEMG 所見の特徴について結論は得られなかった。しかし抗 MuSK あるいは抗 RyR 陽性例を含めて seronegative 症例の SFEMG 所見は軽度の異常であるか、あるいは全く正常であり、seropositive 症例と比較して臨床的重症度が同様であるにも関わらず、神経筋接合部シナプス伝達の異常は軽度であることが示された。特に RyR は興奮収縮連関の開始に関わる分子であり、この部における障害は電気的なシナプス伝達以降の障害により筋疲労を惹き起こしている可能性が示唆された。

E. 結論

(1)Seronegative MG の中で抗 MuSK 抗体陽性は 27% しか存在しなかった。(2)抗 MuSK 陽性症例を含めて seronegative 症例での jitter、blocking は seropositive 症例と比較して有意に

軽度であった。(3)Seronegative MG の中には、神経筋接合部のシナプス伝達の異常が軽微で、興奮収縮連関の障害を持つ一群が存在する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1: Sung JY, Kuwabara S, Kaji R, Ogawara K, Mori M, Kanai K, Nodera H, Hattori T, Bostock H. Threshold electrotonus in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: correlation with clinical profiles. *Muscle Nerve*. 2004 Jan;29(1):28-37.

2: Kuwabara S, Bostock H, Ogawara K, Sung JY, Kanai K, Mori M, Hattori T, Burke D. The refractory period of transmission is impaired in axonal Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve*. 2003 Dec;28(6):683-9.

3: Hiraga A, Mori M, Ogawara K, Hattori T, Kuwabara S. Differences in patterns of progression in demyelinating and axonal Guillain-Barre syndromes. *Neurology*. 2003 Aug 26;61(4):471-4.

4: Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S. Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barre syndrome. *Brain*. 2003 Oct;126(Pt 10):2279-90.

5: Odaka M, Yuki N, Kokubun N, Hirata K, Kuwabara S. Axonal Guillain-Barre syndrome associated with axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Sci*. 2003 Jul 15;211(1-2):93-7.

6: Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S. Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*. 2003 May 13;60(9):1514-8.

7: Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci*. 2003 Jun 15;210(1-2):41-5.

2) 学会発表

11 件

H. 知的所有権の出願・登録状況
特許取得・実用新案登録: なし

抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者 IgG が神経筋伝達を阻害する機序の解析

分担研究者 松尾秀徳¹⁾

共同研究者 福留隆泰¹⁾、本村政勝²⁾、澁谷統壽¹⁾、Werner Hoch³⁾、Angela Vincent⁴⁾

研究要旨

抗アセチルコリンレセプター抗体 (AChR) が陰性の全身型重症筋無力症 (MG) において、抗 muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) 抗体がその病因の一つとして注目されている。われわれは、昨年度の班会議で抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 IgG をマウスにパッシブトランスファーすることで抗 AChR 抗体陽性 MG 患者と同様の神経筋伝達阻害を呈することを証明した。今年度は症例数を増やした検討とともに、Cobra venom anti-complementary protein を用いて免疫機序に対する補体の関連性について検討した。抗 MuSK 抗体陽性の MG は抗 AChR 抗体陽性の MG とは異なり、EPP quantal content が低下する例がみられた。また、免疫機序に補体の関与が無い可能性が示された。

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. 正常コントロール 3 名、抗 AChR 抗体陽性重症筋無力症 (AChR-MG) 患者 3 名、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症 (MuSK-MG) 患者 4 名の血清から IgG を精製し、8~10 週齢の BKTO マウスへ静注する。36~48 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 と EPP を記録する。
2. AChR-MG 患者 1 例と MuSK-MG 患者 1 例 (MuSK-MG 4) の IgG を用いて、同様の記録を Cobra venom anti-complementary protein (Cobra Venom Factor) を前投与したマウスを用いて行う。

研究結果

抗 MuSK 抗体陽性 MG は全例女性であった。筋病理では運動終板に IgG や補体 (C3) の沈着と接合部膜構造の破壊を認める例が 1 例 (MuSK-MG1) あった (表 1)。

正常コントロール 3 例の平均では MEPP 振幅 (amp)=1.35±0.06mV、EPP quantal content (m)=35.5±2.9、AChR-MG 3 例の平均では amp=0.74±0.08、m=39.9±3.4、MuSK-MG 4 例の平均では amp=0.88±0.05、m=35.2±4.2 であった。

¹⁾国立療養所川棚病院神経内科 ²⁾長崎大学第一内科 ³⁾Max planck Institute ⁴⁾University of Oxford

表 1. 抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 4 名のプロフィール

症例	年齢/性	低頻度 遅延神経刺激	重症度 (MGFA)	抗 AChR 抗体/ 抗 VGCC 抗体	運動終板
MuSK-MG1	46 歳/ 女性	Waining6%	III b	陰性陰性	補体の沈着/ 膜構造の破壊
MuSK-MG2	36 歳/ 女性	Wainingなし	III b	陰性陰性	異常なし
MuSK-MG3	47 歳/ 女性	Waining17%	V	陰性陰性	異常なし
MuSK-MG4	60 歳/ 女性	Waining17%	V	陰性陰性	異常なし

表 2. 抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 4 名微小電極記録の結果

	MEPP 振幅 (mV)	EPP quantal content
Control (n=3)	1.35 ± 0.06	35.5 ± 2.9
抗 AChR 抗体陽性 MG (n=3)	0.74 ± 0.08*	39.9 ± 3.4
抗 MuSK 抗体陽性 MG (n=4)	0.88 ± 0.06*	35.2 ± 3.7
MuSK-MG1	0.97 ± 0.06*	35.4 ± 1.7
MuSK-MG2	0.92 ± 0.06*	24.7 ± 2.3*
MuSK-MG3	0.88 ± 0.04*	40.6 ± 1.7
MuSK-MG4	0.74 ± 0.06*	39.9 ± 3.4

*P<0.01

表 3. Cobra Venom Factor の作用

	MEPP 振幅(mV)	EPP quantal content
Control (n=3)	1.35 ± 0.06	35.5 ± 2.9
AChR-MG (n=1)	0.80 ± 0.04	39.0 ± 1.1
AChR-MG with CVF	0.98 ± 0.06*	38.1 ± 3.0
MuSK-MG (n=1)	0.74 ± 0.08	39.9 ± 3.4
MuSK-MG with CVF	0.73 ± 0.04	35.3 ± 2.5

*P<0.01

controlと比べてAChR-MGとMuSK-MG共にampは有意に低下したが m は差がなかった。しかし、AChR-MGでは3例全てで同様の变化を認めた(結果は未表示)がMuSK-MGの1例(MuSK-MG2)では m が有意に低下していた(表2)。

Cobra Venom Factor (CVF) を前投与すると、AChR-MGでは $\text{amp}=0.98\pm 0.06$ 、 $m=38.1\pm 3.0$ 、MuSK-MGでは $\text{amp}=0.73\pm 0.04$ 、 $m=35.3\pm 2.5$ であった。CVFを前投与したAChR-MGではampが正常コントロールと比べて低下しているものの、非投与と比べて有意に上昇していた。MuSK-MGではCVF前投与による变化を認めなかった(表3)。

考察

MuSK-MGはAChR-MGと同様に自己免疫疾患であるが運動終板の病理像や神経筋伝達を阻害する機序は均一ではない。EPP quantal contentが低下する例があることから、抗MuSK抗体がpre-synapticに作用する可能性も推測された。抗MuSK抗体のサブクラスはIgG2やIgG4と報告されているが、CVF前処置した場合MuSK-MGではpassive transferが抑制されなかったことから神経筋伝達の阻害機序はAChR-MGとは異なっており、補体の関与が無いものと考えられる。今後は症例を増やすとともに、運動終板で補体沈着を認めたMuSK-MG1や m が低下しているMuSK-MG2でCVFの作用を検討する必要がある。

結論

抗MuSK抗体陽性のMGは抗AChR抗体陽性のMGとは異なる機序で神経筋伝達を阻害しているものと考えられる。

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

金沢大学神経内科における重症筋無力症治療のレトロスペクティブ・スタディ — ステロイド減量経過を中心に —

分担研究者 吉川弘明¹⁾

共同研究者 古川 裕²⁾、岩佐和夫²⁾、山田正仁²⁾、高守正治³⁾

研究要旨

重症筋無力症 (MG) の治療に広く使われているステロイドの使用方法、特に減量の仕方については主治医の経験と判断にゆだねられている。我々は、当科での重症筋無力症治療例についてレトロスペクティブに解析し、特に病型、胸腺組織によるステロイドの投与量および投与期間について検討した。また併せて、MG-ADL score の推移についても検討した。その結果、ステロイドの使用量は初期には眼筋型の方が全身型に比べ少なかったが、長期的には両者間で差がなかった。また胸腺腫合併例では、正常胸腺や胸腺過形成合併例に比べ、長期的なステロイドの減量が困難であった。MG-ADL score については、初診時において眼筋型に比し全身型で高かったが、1 年後以降では両者ともに改善し差がなくなった。胸腺組織による MG-ADL score の差はなかった。ステロイド投与量に影響を与える因子として、胸腺腫の合併の有無が重要と思われた。

研究目的

ステロイドは重症筋無力症 (MG) の治療において主要な位置を占める薬剤であるが、その使用方法、特に減量の仕方については主治医の経験と判断にゆだねられることが多く、定まった見解がないのが実状である。我々は当科で経験した MG 治療例についてレトロスペクティブに解析し、病型、胸腺組織によるステロイドの投与量、投与期間について検討を行った。併せて MG-ADL score の推移についても解析し、長期的な

治療予後について検討した。

研究方法

1983 年から 2003 年までに当科で MG の診断・治療を受けた 127 例のうち、当科初診前の治療経過が不明な 17 例を除いた 110 例、平均年齢 46.5 歳 (範囲 6-83 歳) (男性 40 例、平均年齢 47.4 歳 (範囲 6-76 歳)、女性 70 例、平均年齢 46.0 歳 (範囲 6-83 歳)) を対象とした。ステロイド (プレドニゾン) 使用例については開始時より、非使用例については初診時より 3 年間レトロスペクティブに調査した。胸腺摘除術が施行されたものについては、得られた胸腺組織像により正常、過形成、胸腺腫に

1) 金沢大学保健管理センター

2) 金沢大学大学院脳老化神経病態学

3) 金沢西病院脳神経センター

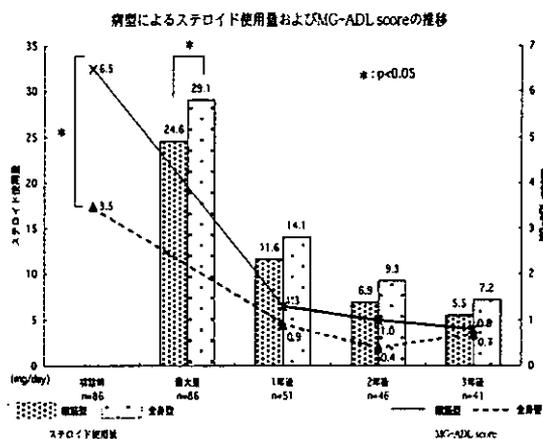
大別した。病型は眼筋型、全身型に大別した。ステロイドが隔日使用されている例では、連日使用量相当に換算して検討した。臨床重症度は、Wolfe らの MG-ADL score を用いた¹⁾。

研究結果

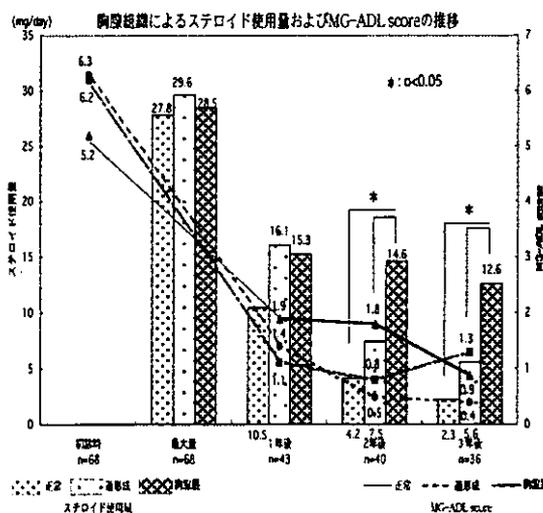
- 1) 患者背景は以下のとおりであった。
 - a) 眼筋型 37 例、全身型 73 例
 - b) 胸腺摘除例 84 例（胸腺組織像 正常 22 例、過形成 32 例、胸腺腫 30 例）、非摘除例 26 例
 - c) ステロイド使用例 86 例（男性 32 例、女性 54 例）平均年齢 44.1 歳（6-83）、ステロイド非使用例 24 例（男性 8 例、女性 16 例）平均年齢 55.0 歳（25-77）平均年齢についてステロイド使用例に比べて非使用例の方が有意に高かった。
- 2) 全身型の 80.8%、眼筋型の 73.0% にステロイドが使用され、その割合に差がなかった。
- 3) ステロイド使用例について、初診時には全身型の方が眼筋型に比べ MG-ADL score が高値であったが 1 年後以降では両者ともに改善し差がなくなった。（図 1）
- 4) 病型別のステロイド使用量は全身型の方が眼筋型に比べ最大量は多かったが、1 年後以降では使用量に差がなくなった。（図 1）
- 5) ステロイド使用量を胸腺組織別で見ると、最大使用時から 1 年後まで差がなかったが、2 年後以降では胸腺腫合併

例の方が正常胸腺例や過形成例に比べて多かった。（図 2）

- 6) MG-ADL score はいずれの時点においても、胸腺組織による差は認めなかった。（図 2）



(図 1)



(図 2)

考察

ステロイド使用例は非使用例に比べて若年者が多く、これは高齢者の方がステロイドの使用を困難とする合併症が多いためと思われた。MG-ADL score は初診時では

全身型の方が高値であったが 1 年後以降では改善を認め両者の差はなくなった。当初は症状が強い全身型においても治療により良好な予後が得られることが推察された。ステロイドの使用量については全身型の方が眼筋型に比べ最大使用量が多かったが、その後の使用量には差がなく、眼筋型ではより少ないステロイドの使用量で治療可能であることが示唆された。胸腺組織別に見ると胸腺腫合併例では他の組織型に比べ長期にわたり大量のステロイドが使用されており、長期的なステロイド投与量に影響を与える因子として胸腺腫合併の有無が重要であると考えられた。azathioprine の併用でステロイド維持量の減量が可能であるとする報告²⁾や、唯一 MG に対して保険適応がある FK506 の有用性についての報告^{3) 4)}もあることから、胸腺腫合併例ではこれらのステロイド以外の免疫抑制薬の併用も治療早期から考慮すべきと思われた。

MG の治療においてはステロイド以外の免疫抑制薬をはじめ、抗コリンエステラーゼ阻害薬や大量ガンマグロブリン療法、血液浄化療法などが重要な役割を果たすが今回の解析ではこれらの影響については検討されていない。今後これらの要素を含めた解析を行い、より適切な MG 治療につき検討をすすめていきたい。

結論

全身型では眼筋型に比べ初診時の MG-ADL score が高かったが、1 年後以降では両者ともに改善し差がなくなった。眼筋型

では全身型に比べ、初期には少ない量のステロイドで治療可能と思われた。胸腺腫合併例は他の組織型に比べ長期にわたるステロイドの使用が必要である可能性が示唆された。

文献

- 1) Wolfe GI et al. Myasthenia gravis activities of daily living profile. *Neurology* 1999; 52: 1487-9
- 2) J. Palace et al. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. *Neurology* 1998; 50: 1778-1783
- 3) Yoshikawa H et al. Low-dose tacrolimus for myasthenia gravis. *J Clin Neurosci.* 2002; 9: 627-628
- 4) Konishi T et al. Clinical study of FK506 in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2003; 28: 570-574

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

胸腺腫に対するステロイドパルス療法のメカニズムの解析

分担研究者 藤井義敬 (名古屋市立大学第2外科)

研究要旨

胸腺腫に対する治療は外科切除が主であるが、正岡 III 期以上の進行した胸腺腫に対し術前ステロイドパルス療法を施行するとほとんどの胸腺腫で腫瘍の縮小を認める。しかし、このメカニズムに関しては詳しく解明されていない。我々はこのメカニズムを解明するためマウスの fetal thymus organ culture の技術をヒトで利用し、さらに 70%O₂ 存在下に正常ヒト小児胸腺および胸腺腫をステロイドと共培養し、腫瘍、リンパ球、上皮細胞への影響を解析した。リンパ球は、フローサイトメトリーで CD4/8 の分画の違いによるアポトーシスの影響、AnnexinV/PI によるアポトーシスの解析を行い、培養した組織は TUNEL 染色を施行した。リンパ球は正常胸腺、胸腺腫ともにステロイドによりアポトーシスに陥っていたが、分画は正常に近いほど崩れていなかった。TUNEL 染色では腫瘍細胞、リンパ球ともに染色され、ステロイドにより腫瘍細胞、リンパ球両者がアポトーシスに陥ることにより、胸腺腫の縮小がみられると考えた。

共同研究者 藤井義敬、小林昌玄、鈴木恵理子

目的

胸腺腫に対する治療は外科切除が主であるが、正岡 III 期以上の進行した胸腺腫に対し術前ステロイドパルス療法を施行するとほとんどの胸腺腫で腫瘍の縮小を認める¹⁾。当教室でも正岡 III 期以上の胸腺腫に対し術前パルス療法を施行し、胸腺腫の縮小をはかってから手術を施行することで良好な結果が得られている。ステロイドパルス療法の効果の 1 例を示す。図 1 に示すのは B1 type thymoma であるが、パルス療法 2クール施行前後の Chest CT 像で腫瘍は明らかに縮小している。しかし、このメカニズムに関しては詳しく解明されていない。本研究はこのメカニズムを解明するために 70%O₂ 存在下に小児正常胸腺と胸腺腫をステロイドと共培養し、検討した。

方法

胸腺組織の培養方法であるが、マウスの fetal thymus organ culture (FTOC) の技術をヒトで

名古屋市立大学 第2外科

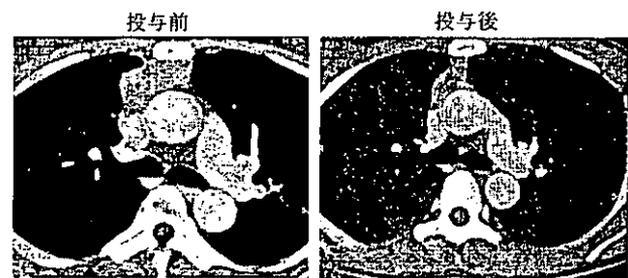


図 1

利用した。通常は摘出した臓器は培養不可能であるが、マウスの胸腺は特別な培養方法を用いれば数週間にわたって培養可能であることに注目し、この方法を用いて胸腺組織をステロイドと共培養すれば in vitro においてステロイドのメカニズムを解析することが可能であると考えた。正常胸腺は小児開心術の際、インフォームド・コンセントの上胸腺を摘出した。摘出された正常小児胸腺組織と胸腺腫組織を各々マウス胸腺と同じ大きさである約 2~3mm 大に細片し、IL-7 の入った培養液に沈め、様々な濃度のステロイド (dexamethasone 1mmol, 10mmol,

100mmoll/ml)を加え、70%の高酸素下で培養した。この方法は high oxygen submersion (HOS) culture といわれる培養法である。この条件下で24 時間培養し、リンパ球はフローサイトメトリーでCD4/8の分画の違いによるアポトーシスの影響、AnnexinV/PI によるアポトーシスの解析を行った。また培養した組織はパラフィンブロックに保存し、TUNEL 染色によりステロイドの影響を解析した。

結果

ステロイドと共培養した正常胸腺、AB type thymoma、B2 type thymoma から抽出したリンパ球の 24 時間後のアポトーシスの影響を AnnexinV を用い検討した(図 2)。いずれから抽出したリンパ球も同じようにアポトーシスに陥っていた。正常胸腺のフローサイトメトリーを示す(図 3)。各分画の細胞は一様に減少し、CD4/8 のパターンに崩れはなかった。AB type thymoma も、CD4/8 パターンに大きな崩れはなかったが(図 4)、B2 type thymoma ではおもに double positive の細胞がアポトーシスに陥っていた(図 5)。

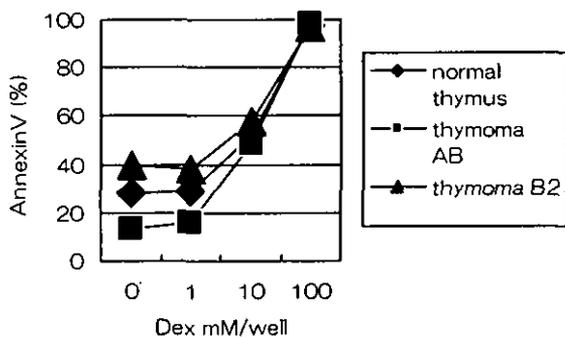


図 2 Apoptotic cells

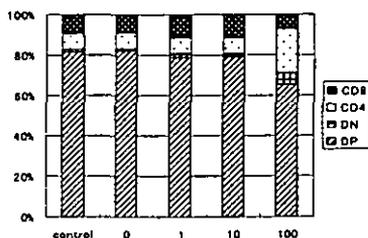


図 3 normal thymocytes subpopulations

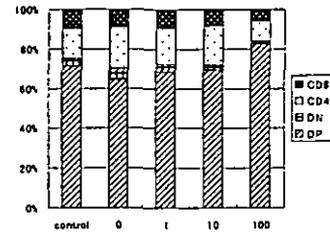


図 4 AB type thymoma subpopulations

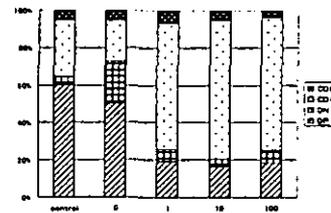


図 5 B2 type thymoma subpopulations

次にステロイドが胸腺支持組織にどのような影響があるかを TUNNEL 染色により解析した。B1 type thymoma の Dexmethazone 10mmol/well での像を示す(図 6)。腫瘍細胞、リンパ球が染色されており、アポトーシスに陥っていることを示す。B2 type thymoma でも同様に(図 7)、腫瘍細胞、リンパ球が強く染色され control での染色はみられなかった。



図 6 B1 type thymoma TUNEL 染色



Control B2 type thymoma

図7 B2 type thymoma TUNEL 染色

考察

FTOC を利用するに当たり、なぜマウス胸腺のみが培養可能なのかは2つの理由が考えられている²⁾。すなわち①マウスの胸腺は非常に小さいので臓器の内部にまで栄養の供給が可能である、②胸腺内の細胞は増殖も活発で活力にみちている、というものである。ただしこの培養も酸素の供給には特別な工夫が必要であり、培養液中に胸腺を沈め 70~80%O₂ の環境で培養する、high oxygen submersion culture とよばれている培養方法を行っている。本研究はこの方法を用いることでヒト胸腺が1週間培養可能であった。正常胸腺と胸腺腫をステロイドと共培養し、腫瘍細胞、リンパ球への影響を解析したところ、リンパ球は正常胸腺、胸腺腫ともにステロイドによりアポトーシスに陥っていたが、分画は正常に近いほど崩れず、腫瘍細胞が多い type ほど分画は崩れていた。TUNEL 染色では腫瘍細胞、リンパ球ともに染色がみられ正常の stromal cell は染色されていなかったことから、腫瘍細胞、リンパ球両者がアポトーシスに陥っていることが確認できた。

文献

1. Noriko Tonomura, Kelly McLaughlin, et.al: Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Thymocytes: Requirement of Proteasome-Dependent Mitochondrial Activity. The Journal of Immunology 170(5): 2469-78, 2003
2. 桂 義元、広川 勝昱: 胸腺と T 細胞: 医学書院

骨格筋培養細胞のアセチルコリンに対する細胞内カルシウム濃度変化と免疫抑制薬の影響

分担研究者 吉川弘明¹⁾

共同研究者 枝広茂樹²⁾、岩佐和夫²⁾、山田正仁²⁾、橋井美奈子³⁾

研究要旨

我が国で抗アセチルコリン受容体抗体 (AChRab) を測定に使われている診断キットは、培養骨格筋細胞 TE671/RD から精製したニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を使用しているが、この培養細胞はムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) も発現しており、アセチルコリン (ACh) 添加後におこる細胞内カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の変化は、m3 type の mAChR を介することがわかった。しかし、ryanodine を加えても ACh 刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ ピークは上昇し、また ryanodine receptor (RyR) に共役している FKBP12 に結合する FK506 を添加しても $[Ca^{2+}]_i$ は上昇したが、cyclosporin A では変化がなかったことより、筋小胞体上の RyR も $[Ca^{2+}]_i$ の変化に関連していることが示された。一方、 $[Ca^{2+}]_i$ に対して prednisolone と azathioprine は抑制的に働いた。今後、 $[Ca^{2+}]_i$ を指標とした細胞機能の解析は、免疫抑制薬の作用機序解明と副作用検討の面から重要であると考えられた。

研究目的

重症筋無力症 (MG) は、神経筋接合部のシナプス後膜上のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を標的とした臓器特異的自己免疫疾患である。直接的病因である抗アセチルコリン受容体抗体 (AChRab) は、神経筋接合部シナプス後膜上の AChR を破壊することにより神経筋伝達の安全域の低下をおこし、筋力低下、易疲労性などの MG に特有な臨床症状をもたらす。MG は、ステロイドを含む免疫抑制薬により寛解導入が可能となったが、初期の大量ステロイド療法が成功しても、多くの場合は長期的な免疫抑制薬による維持療法が必要となる。これらの免疫抑

制薬が、骨格筋や神経筋接合部に対する作用については、これまであまり検討されていなかった。一方、MG の診断には血清 AChRab 価の測定が広く行われており、国内では骨格筋培養細胞 TE671/RD¹⁾ より精製した AChR を抗原とした免疫沈降法によるキットが普及している。この細胞にはムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) が発現しているという報告もある²⁾。我々は、この細胞上の AChR の性質を調べるとともに、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化に及ぼす免疫抑制薬 (FK506、prednisolone、cyclosporin A [CyA]、azathioprine [AZP]) の作用について検討した。

研究方法

ヒト横紋筋肉腫由来細胞 TE671/RD は、

- 1) 金沢大学保健管理センター
- 2) 金沢大学神経内科
- 3) 金沢大学脳細胞遺伝

American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。細胞は、Dulbecco-modified Eagle medium (DMEM)/ 10% calf bovine serum (CBS)/ 1% penicillin-streptomycin (PC-SM) にて 37°C、5% CO₂ 下に継代培養した。細胞は 96-well プラスチックプレートに 5x10³/mL となるよう培養し、[Ca²⁺]_i 測定に供した。7 日後、96-well プラスチックプレートを HEPES-buffered solution (HBS) で 2 回洗浄した後、fluo-3AM を最終濃度 5 μM となるよう添加し、1 時間室温で静置した。さらに HBS で洗浄後、Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finland) を使い、ACh を最終濃度 1 μM で添加して、excitation 485 nm emission wave 538 nm で 1.35sec 間隔にて測定した。

研究結果

1) ACh 添加により [Ca²⁺]_i の上昇が観察され、d-tubocurarine を加えても影響は無かったが、atropine の添加により、その上昇は抑制された。また、ACh の代わりに nicotine を加えても [Ca²⁺]_i に変化は無かったが、muscarine の添加により [Ca²⁺]_i の上昇が見られた。さらに、muscarinic AChR サブタイプのアнтаゴニストである pirenzepine (m1), AF-DX 116 (m2), 4-DAMP (m3), tropicamide (m4) を加えた場合の ACh 添加後 [Ca²⁺]_i 上昇を調べたところ、4-DAMP が反応を完全に抑制することがわかった (図 1 A, B)。以上より、TE671/RD 細胞の ACh 添加後の [Ca²⁺]_i 上昇は、muscarinic AChR m3 を介していることが明らかとなった。

2) Ryanodine は、ACh 添加後の [Ca²⁺]_i 上昇を濃度依存的に増強することがわかった。

3) FK506 は、ACh 添加後の [Ca²⁺]_i 上昇を濃度依存的に増強することがわかった。

4) Prednisolone は、ACh 添加後の [Ca²⁺]_i 上昇を濃度依存的に低下することがわかった。

5) CyA は、ACh 添加後の [Ca²⁺]_i 上昇に影響を与えないことがわかった。

6) AZP は、ACh 添加後の [Ca²⁺]_i 上昇を濃度依存的に低下させることがわかった。

考察

MG の診断には、TE671/RD から精製した AChR を使った血清中の AChRab の測定が最も簡便で有用な方法となっているが、この細胞の ACh 添加による [Ca²⁺]_i 上昇は、m3 type mAChR を介していた。しかし、ryanodine 添加にて [Ca²⁺]_i 上昇は増強され、ryanodine receptor を介した Ca²⁺ release の機構が介在していることを示唆した。この結果は、TE671/RD が平滑筋と横紋筋の両方の性質を持っていることを示しており、今後、さらに解析が必要と思われた。TE671/RD の [Ca²⁺]_i 上昇に及ぼす免疫抑制薬の影響を見たところ、FK506 は濃度依存的にピークを上昇させたが、CyA は変化がなかった。この結果は、FK506 が RyR と結合している FK506-binding protein (FKBP12) と結合したため、RyR が開口状態に維持されたためと考えられた。一方、prednisolone と AZP は濃度依存的にピークを低下させることがわかった。

MG の治療に FK506 が導入され^{3, 4}、投与後、数日のうちに筋力低下の改善を見る例が報告されている⁵。この効果は、免疫抑制効果の発現とは時期的に考えにくく、骨格筋や神経筋接合部に対する直接作用と思われる。今回の結果は、

FK506 の作用の一部を説明する可能性がある。MG は、一部の患者は寛解に至るものの、長期に免疫抑制薬を服用しなければならない慢性疾患である。その治療における免疫抑制薬の選択には、骨格筋への直接作用も考慮に入れて、薬剤の選択を行う必要があると考えられる。

結論

TE671/RD では m3 type mAChR を介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がおこることがわかった。一方、 $[Ca^{2+}]_i$ の動態には RyR・FKBP12 が関連しており、FK506 と CyA はこの系に異なる影響を及ぼすことがわかった。今後、細胞機能に及ぼす薬剤の影響を調べるモデルとして、TE671/RD における $[Ca^{2+}]_i$ 動態の観察は有用なものと考えられた。

文献

1. Schoepfer R, Luther M, Lindstrom J. The human medulloblastoma cell line TE671

expresses a muscle-like acetylcholine receptor. Cloning of the alpha-subunit cDNA. FEBS Lett. 1988;226:235-240

2. Bencherif M, Lukas RJ. Ligand binding and functional characterization of muscarinic acetylcholine receptors on the TE671/RD human cell line. J Pharmacol Exp Ther. 1991;257:946-953
3. Yoshikawa H, Iwasa K, Satoh K, Takamori M. FK506 prevents induction of rat experimental autoimmune myasthenia gravis. J Autoimmun. 1997;10:11-16
4. Konishi T, Yoshiyama Y, Takamori M et al. Clinical study of FK506 in patients with myasthenia gravis. Muscle Nerve. 2003;28:570-574
5. Yoshikawa H, Mabuchi K, Yasukawa Y et al. Low-dose tacrolimus for intractable myasthenia gravis. J Clin Neurosci. 2002;9:627-628

健康危険情報
なし

知的財産権の出願・登録情報

特許取得：なし

実用新案登録：なし

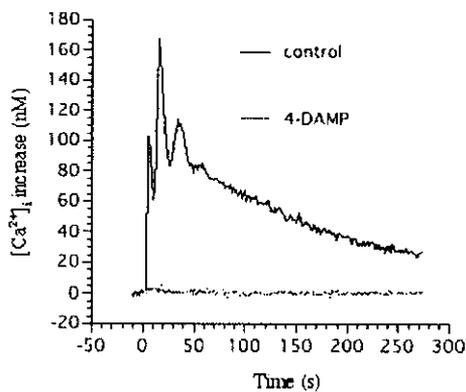


図 1 A 4-DAMP による $[Ca^{2+}]_i$ の抑制

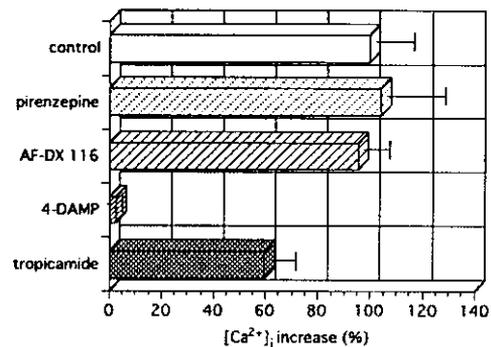


図 1 B muscarinic receptor blocker (m1 pirenzepine, m2 AF-DX 116, m3 4-DAMP, m4 tropicamide) の $[Ca^{2+}]_i$ への効果

重症筋無力症のケモカインシグナル異常

班 員 糸山泰人¹⁾
共同研究者 小野寺宏¹⁾, 田郷英昭¹⁾, 齋藤龍史¹⁾, 松村輔二²⁾, 近藤丘²⁾,
鈴木靖士³⁾, 鈴木博義⁴⁾, 大内将弘⁵⁾, 清水雅行⁵⁾, 義江修⁶⁾

研究要旨

重症筋無力症(MG)の免疫異常における胸腺の関与を明らかにするために、末梢リンパ球におけるケモカイン受容体発現を胸腺摘出前後で比較した。また正常胸腺とMG胸腺におけるケモカイン発現レベルを比較検討した。CD4 T細胞におけるTh1およびTh2型ケモカイン受容体の発現レベルが治療前には健常者と比較して有意の変化を示したが胸腺摘出後慢性期には正常化に向かった。過形成胸腺ではリンパ球ホーミングに必須のケモカインCCL21レベルが正常胸腺の数十倍にも上昇していたが、胸腺腫では有意の変化は認められなかった。これらの結果からMGではケモカインシグナルが末梢血および胸腺で変調していること、過形成胸腺ではケモカインCCL21が発症に極めて重要な役割を演じていることが明らかになった。将来、ケモカインシグナル制御によるMGの治療法開発が期待される。

A.研究目的

重症筋無力症(MG)は胸腺異常を高率に合併し胸腺摘出術は治療のスタンダードとなっている。しかし胸腺がMGの免疫異常にどのように関与しているかは不明のままであり、胸腺摘出術によりMG患者の免疫動態がどのように変化するかについても明らかでない。さらに胸腺摘出術の治療効果と予後は胸腺組織型によって異なる。本研究では末梢血レベルと胸腺レベルでの免疫機能をケモカインシグナルの面から検討した。

B.研究方法

健常者とMG患者の末梢血におけるTリンパ球のケモカイン受容体発現率をFACSにて測定した。MG症例では治療前と胸腺摘出後1ヶ月(亜急性期)と6ヶ月以上(慢性期)とを区別して解析した。MG患者の胸腺におけるホーミング関連ケモカイン(CCL21とCCL19および受容体CCR7)の発現を定量的RTPCRと免疫組織化学にて検討した。ケモカインCCL21に対する胸腺細胞の遊走能をダブルチャンバー法により測定した。

1)東北大学神経内科

2) 呼吸器再建

3)広南病院神経内科

4)国立仙台病院病理

5) 心臓血管外科

6)近畿大学細菌学

C. 研究結果

末梢血

CD4 T 細胞におけるケモカイン受容体発現率は両 MG 群間で異なっており、過形成群では CCR1 (Th1 型) 陽性細胞 (対照群比 $\times 2.1$) と CCR3 (Th2 型) 陽性細胞 ($\times 3.5$) の比率が有意に増加していた。CXCR3 陽性 (Th1 型) CD4 細胞の比率は過形成群では軽度減少にとどまるが ($\times 0.8$) 胸腺腫群では著明に減少していた ($\times 0.6$)。また CXCR5 陽性の follicular helper T 細胞も MG では有意に増加していた。他のケモカイン受容体の発現率は、過形成胸腺群、胸腺腫群ともに対照群と比較して有意の差は無かった。胸腺摘出術後慢性期には上記のケモカイン受容体発現率は正常レベルに近づいて対照群と比較して有意の差は認められなくなった。

胸腺

胸腺における免疫系ケモカイン発現レベルを一斉解析した結果、ケモカイン CCL21 の発現レベルが過形成胸腺症例でのみ選択的に増加 (正常胸腺の 70 倍) していた。一方、胸腺腫では有意の増加はなかった。さらに過形成胸腺から調製した胸腺細胞の CCL21 に対する遊走能は胸腺腫から調製した細胞に比して有意に亢進していた。過形成胸腺では stromal cell において強い CCL21 immunoreactivity が観察されたが、本来 CCL21 を発現する血管内皮では正常胸腺と MG 胸腺とで差が無かった。一方、CCL19 の発現レベルと免疫染色性は正常胸腺と MG 胸腺との間で差は無かった。

D 考察

MG の治療法として胸腺摘出術は重要な位置を占めているが、胸腺除去の免疫系への影響については不明の点が多い。そこで、末梢血リンパ球を材料として免疫機能の調節に重要なケモカインのシグナルが MG 治療前後でどのように変化するかを検討した。CD4 T 細胞において、Th1 型ケモカイン受容体 (CCR1, CXCR3) および Th2 型ケモカイン受容体 (CCR3) のいずれのタイプの受容体の発現も治療前の採血で異常が観察された。B 細胞による抗体産生を活性化する follicular B helper T 細胞はケモカイン受容体 CXCR5 の発現から定量することが可能であるが、follicular B helper T 細胞数も治療前のサンプルでは有意に増加していた。これらのケモカインシグナルは治療開始後は正常化に向かい健常者群と比較して有意の差が認められなくなった。このように MG 治療によりケモカインシグナル異常が是正されることが明らかになった。今後、ケモカインシグナルの変動から MG の病態把握や治療効果判定が可能であるかについて検討する必要がある。

免疫担当細胞 (CCR7 を発現する T 細胞と成熟型樹状細胞) のリンパ組織へのホーミングには CCR7 を介するシグナルが不可欠であり、CCR7 欠損マウスは高度のリンパ組織形成障害と抗体産生障害を示す。CCR7 リガンドのなかで CCL19 は T 細胞のリンパ組織外への移動を、CCL21 はリンパ組織への局在をそれぞれ担うなど役割が異なる。実験的に CCL21 の高発現のみで自己免疫疾患

の作成が可能であり、脾臓で **CCL21** を高発現するマウスでは脾臓でのリンパ組織形成（胚中心も観察される）とラ島破壊がみられるという。従って過形成胸腺では **CCL21** により若い(**CCR7** 陽性)T細胞が胸腺に集積・刺激されていると考えられる。過形成胸腺では活性型樹状細胞(**CCR7 dependent**)も著明に増加しているので、T細胞が **MG** 関連抗原に感作されるチャンスが増大していると考えられる。胸腺摘出術が胸腺腫合併患者よりも過形成胸腺合併患者でより効果がある理由を **CCL21** 高発現から説明できる可能性があり、今後 **CCL21** 発現異常のメカニズムの解明が必要である。

E. 結論

MG 患者の免疫系ではケモカインシグナルが変調しているが、とくに過形成胸腺合併患者では **CCL21** の異常高発現が病態に直結している。

G. 研究発表

1. 論文発表

鈴木靖士、小野寺宏 重症筋無力症における胸腺摘出術の効果と免疫的意義
神経内科、59,265-269,2003

小野寺宏 脳卒中と免疫
神経免疫学、11,173-178,2003

2. 学会発表

田郷英昭、小野寺宏、永田哲也、鈴木靖士、鈴木博義、大内将弘、義江修、糸山泰人、重症筋無力症患者胸腺における **CCR7** リガンドの発現の検討
神経免疫学会 2003H. 知的財産権の出願・登録状況

H. 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

コンプリメンタリーペプチドモノクローナル抗体による重症筋無力症患者血清中の idiotype 抗体の測定

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⁾、楠見 公義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。今回この自己抗体のエピトープ AChR α の 61-76 のコンプリメンタリーペプチドに対するモノクローナル抗体 (KM02, IgG1, κ) を用いて、MG 患者血清中の自己抗体の測定を行った。対象は MG38 例と正常対照群の 37 例である。正常対照群の idiotype 抗体値である $0.22 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ より、 $\text{mean}+3\text{SD}$ ($0.42 \mu\text{g/ml}$) を正常上限値として検討を行った。Seronegative MG8 例では idiotype 抗体はすべて陰性であったが、seropositive MG30 例中 10 例で陽性であった。KM02 により認識される自己抗体は、全 AChR 抗体量の 0.3~6.5% であった。コンプリメンタリーペプチド抗体は、エピトープをターゲットとしたオーダーメイド治療としての有用な手段となりうる。

研究目的

重症筋無力症 (MG) のエピトープ AChR61-76 に対するコンプリメンタリーペプチド感作により得られたラット抗体 (TCM240, IgG1, κ) が、患者血清中の Idiotype 抗体を認識することを報告した。今回、同様の方法でヒト抗体産生マウス (KM マウス TM) を用い、コンプリメンタリーペプチド抗体を作成し、患者血清中の Idiotype 抗体の検出を試みた。

研究方法

1. コンプリメンタリーペプチド抗体の合成: ヒトの α -AChR での 61-76 に対するアミノ酸配列に対するコンプリメンタリーペプチドの N 末に Cystein 残基を加えたペプチドを合成した。そのアミノ酸配列 (RhCA61-76) は、Cys-His-Ile-Val-Val-Lys-Gln-Pro-Ile-Try-Ile-Val-Ile-Ala-Thr-His-Tyr である。これに NHS-Esters-Maleimide crosslinker を用いて、KLH および bovine Albumin (Alb) のカップリングを行った。KLH カップリングペプチドは感作用に、Alb カップリングペプチドは最終ブーストと抗体測定用に用いた。

2. RhCA61-76 感作: MPLTM+TDM

(Corixa) を使い、KLH coupling RhCA61-76 の emulsion を作成した。得られた emulsion で 10 週令オスの KMTM マウスに感作を行った。感作量は $20 \mu\text{g}$ / マウスで、皮下に $100 \mu\text{l}$ 、腹腔内に $100 \mu\text{l}$ 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。十分な抗体が得られた時点で、Alb-RhCA61-76 の $10 \mu\text{g}$ の静注により最終ブーストを行った。

3. mAb 抗体の作成: 最終ブースト後 3 日後に摘脾を行い、脾細胞を回収した。これを Sp2/0 細胞との fusion を PEG で行い、HAT 含有 DMEM 培地で培養を行った。抗体価のスクリーニングには、抗原として Albumin-RhCA61-76 を用い、HAT selection を行った。クローン化陽性細胞は、HT 含有 DMEM で培養処理後に通常 DMEM 培地で培養した。2 つのクローン陽性細胞 (KM01 IgG3 κ ; KM02 IgG1 κ) を得た。

4. mAb 抗体の精製: クローン化した mAb は無血清培地 (Hybridoma-SFM) で培養を行い、培養上清を抗体精製用とした。培養上清は、AKTA での MEP HYPERCEL カラムで精製を行った。

5. mAb のビオチン化: 2mg の mAb を 10mM periodate で酸化後に EZ-LinkTM Biotin-Hydrazide (Pierce) に結合させた。

-
- 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

透析により余分なビオチンを除外した。

6. mAb 抗体による idiotype 抗体の回収：streptavidin (4mg/ml) 100ml を 96well ELISA plate に coating を行い、引き続き同量の biotin-coupling mAb を固相化した。Skin milk で blocking 後に T-PBS(PBS, 0.05%Tween-20)で 10 倍希釈した患者血清 100 μ l を duplicate で 4 $^{\circ}$ C, overnight で反応させた。T-PBS で 10 回洗浄後、200mM Glycine-HCl, pH2.5) 100 μ l、10 分反応させて、idiotype 抗体を溶出させた。
7. ELISA による IgG の定量：溶出した idiotype 抗体は sandwich ELISA 法により IgG の定量を行った。固相部分にヤギ抗ヒト IgG(gamma specific) と反応部に peroxidase labeled ヤギ抗ヒト IgG (Fab') で測定した。測定感度は 1.5 μ g/ml ~ 1.5ng/ml である。
8. MG 患者 38 例 (男性 13 例、女性 25 例、平均年齢 49.4 \pm 14.9) と正常対照群 37 例 (男性 15 例、女性 22 例、平均年齢 42.9 \pm 6.1) を対象とした。MGFA 分類による内訳は、I 型 8 例、IIa 型 24 例、IIb 型 5 例、V 型 1 例で、うち AChR 抗体陽性 30 例、陰性 8 例で検討した。

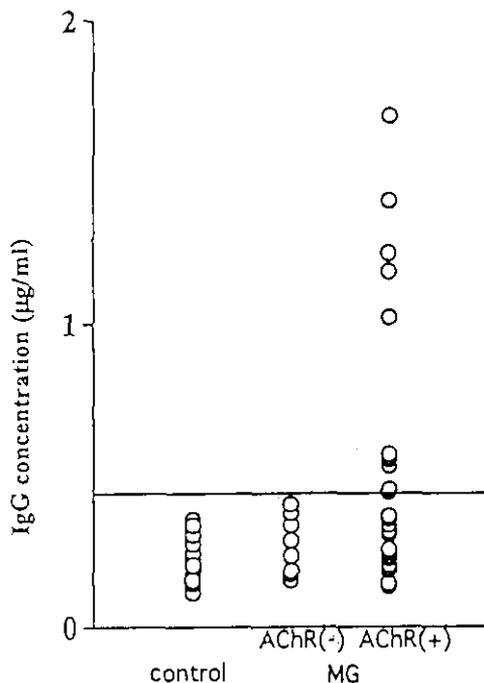


図 1. KM02 で認識される idiotype 抗体

研究結果

1. 正常対照群の IgG 量の平均値+3SD を cutoff とすると、0.41 μ g/ml が正常上限値となった。この正常上限値以上を陽性例と判定した。
2. MG38 例のうち 10 例で陽性であった。AChR 陽性群と陰性群にわけて検討すると、AChR 陰性群ではすべて idiotype 抗体は検出されなかった (図 1)。

考 察

KM02 抗体で検出される抗体は、AChR 抗体陽性例で検出可能で、さらに KM02 抗体で AChR 抗体の一部が吸収可能なことより、idiotype 抗体といえる。

結 論

この抗体を用いることにより、患者血清中の MG の病因となる自己抗体の除去が可能である。コンプリメンタリーペプチド抗体によりスクリーニングにより、taller-made の治療法が可能である。

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

Myoid cell 感作リンパ球を用いた胸腺胚中心形成機序の解析

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⁾

研究要旨 重症筋無力症 (MG) の胸腺における胚中心を伴うリンパ濾胞の増生が起こる機序を明らかにするために, myoid cell で感作したリンパ球と胸腺細胞の相互作用について, *in vitro* および *in vivo* で検討した. Myoid cell 感作リンパ球と胸腺細胞の混合培養では Interferon- γ (IFN γ) による胸腺細胞前処理の有無にかかわらず IFN γ の産生が認められた. しかし, myoid cell 感作リンパ球を活性化後に Cyclosporin A や抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体で免疫系を修飾した rat に passive transfer しても胸腺の胚中心形成は認められなかった. したがって, MG の胸腺異常には末梢で活性化された myoid cell (AChR) 反応性 T 細胞だけでなく, 胸腺内での trigger が必要であることが示唆された.

研究目的

重症筋無力症(MG)の過形成性胸腺では胚中心を伴うリンパ濾胞の増生が特徴的変化である. しかし, このような異常が起こる機序は明らかではない. 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アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体を誘導できることを報告してきた. 今回はこの myoid cell で感作したリンパ球と胸腺細胞の相互作用を *in vitro* および *in vivo* で検討した.

研究方法

(1) Fisher rat 胸腺より樹立した myoid cell line (ST1B) を十分に分化を誘導した後 ST1B (1×10^7) を完全 Freund's adjuvant (CFA) とともに 6 週齢雌 Fisher rat 足底に免疫し, 百日咳菌を追加接種した. 対照として CFA のみで免疫した.

(2) 免疫後 11 日目にそれぞれの所属リンパ節から細胞浮遊液(感作リンパ球)を作成した.

(3) 無処置の 6 週齢雌 Fisher rat 胸腺を摘出し, 細胞浮遊液 (2×10^7 /ml) を作成し, マイトマイシン処理後, 上記の各感作リンパ球 (4×10^6 /ml) と混合培養 (200 μ l) し, 24 時間後の培養上清中の Interferon- γ (IFN γ) の測定を行なった.

(4) 各リンパ節細胞浮遊液の一部を Concanavalin A (ConA; 2.5 μ g/ml) で 72 時間刺激培養し, passive transfer に用いた.

(5) 6 週齢雌 Fisher rat に Cyclosporin A (40mg/kg) を経口で 5 日間投与し, 第 7 日目に上記の活性化したリンパ節細胞 (3×10^7 /rat) を passive transfer した. 一部の rat では同時に抗 AChR 抗体陽性 rat 血清(プール血清)を腹腔内に投与した. 対照として CFA のみで免疫した rat のリンパ節細胞を用いて同様の実験を行った.

(6) 3 週後および 6 週後に胸腺を摘出し, 病理学的検索を行なった.

1) 国立療養所川棚病院臨床研究部

2) 長崎大学大学院神経病態制御学

研究結果

(1) Myoid cell 感作リンパ球と胸腺細胞の混合培養では、IFN γ の産生が認められ何らかの免疫反応が起こっていることが確認された。一方、CFA のみで免疫したリンパ球と胸腺細胞の培養では IFN γ の産生は認められなかった(図.1)。

(2) passive transfer 3 週後および 6 週後の胸腺の病理学的検索ではいずれの群においても胚中心の形成は認められず、MG 胸腺に特徴的な変化は見出せなかった。

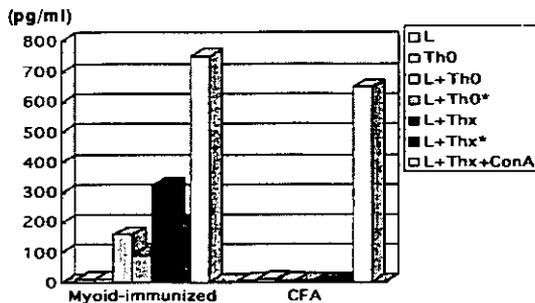


図 1. Myoid cell 感作リンパ球の胸腺細胞に対する in vitro での反応

L: 感作リンパ球, Th0: 未処理の胸腺細胞, Thx: マイトマイシン処理胸腺細胞, *: IFN γ 処理, ConA: Concanavalin A

考案

MG の過形成性胸腺では髄質にリンパ節様の T 細胞領域と前述の胚中心があることが特徴的で、さらに、そこに myoid cell が存在する。この T 細胞は AChR に反応するものが多いが、精製ツベルクリンなど他の抗原に反応するものも含まれている。また、CD44, CD45RO, B7-1, IL-2 などの T 細胞のマーカーが陽性であること、胸腺の血管周囲腔にこのような T 細胞が存在することなどの観察は、

これらが成熟した T 細胞で末梢から入ったものであることを示唆している。今回の実験では、生体内のどこかで AChR に感作された T 細胞が、末梢で活性化された後胸腺にホーミングし、そこに存在する myoid cell または胸腺上皮細胞上の AChR に反応した結果、免疫反応が進行し、B 細胞の活性化、抗体産生、胚中心の形成へと進展するとの仮説に基づき、myoid cell で感作したリンパ節細胞を ConA で活性化し、Cyclosporin A で免疫系を修飾した rat に passive transfer 行なった。しかし、胸腺の病理学的変化は確認できなかった。これらの結果からは、MG の胸腺異常には末梢で活性化された AChR 反応性 T 細胞だけでなく、胸腺内での何らかの trigger が必要であることが示唆された。

結論

MG の胸腺異常には末梢で活性化された myoid cell(AChR)反応性 T 細胞だけでなく、胸腺内での何らかの trigger が必要である。

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

軸索型ギラン・バレー症候群における *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白の意義

主任研究者 村井弘之¹⁾

共同研究者 三野原元澄¹⁾、朴華¹⁾、石津尚明¹⁾、吉良潤一¹⁾

研究要旨

本研究は、ギラン・バレー症候群 (GBS) の先行感染菌である *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) よりクローニングされた DNA-binding protein from starved cells (C-Dps)蛋白の GBS 病態への関与を解明することを目的としている。今回、C-Dps 蛋白の sulfatide への特異的な結合が明らかとなり、ラット神経系への C-Dps 蛋白の結合は、中枢神経系においてはニューロンの胞体に、末梢神経においては髄鞘への結合が示されたことから、C-Dps 蛋白が sulfatide を受容体として神経系に結合していると考えられた。さらに、NGFによりニューロンへ分化誘導された PC12 細胞株に対しては、C-Dps 蛋白は膜表面に結合し、細胞膜を傷害し LDH の遊離を引き起こした。この反応は C-Dps 蛋白の熱処理や抗 C-Dps 抗体により阻害されたことにより、C-Dps 蛋白の直接的な作用と考えられる。以上のことから、C-Dps 蛋白が血液神経関門のない神経終末や、血液神経関門の粗な神経根に作用して、GBS におけるニューロンの傷害に寄与する可能性が考えられた。

目的

本研究は、GBS の先行感染菌である *C. jejuni* よりクローニングされた C-Dps 蛋白の GBS 病態への関与を解明することを目的とする。我々はこれまで、消化器感染後 GBS 患者では抗 C-Dps-IgG 抗体が検出されること、C-Dps 蛋白がニューロンに結合することを報告してきた。C-Dps 蛋白と 41% のアミノ酸一致の認められる *Helicobacter pylori* の Dps 蛋白 (neutrophil activating protein, NAP) は、糖脂質と結合することが知られている。そこで今回、C-Dps 蛋白の受容体の同定と in vitro での C-Dps 蛋白の作用を検討したので報告する。

対照・方法

1) GBS 患者血清における抗 *C. jejuni*-IgG 抗体と抗 C-Dps-IgG 抗体の関連

前回報告した抗 C-Dps-IgG 抗体測定では、GBS 症例を消化器感染後、上気道感染後、発熱のみの群に分類し検討した。今回、抗 *C. jejuni*-IgG 抗体を Virion/Serion 社の kit を用いて測定し、*C. jejuni* 感染確実例での抗 C-Dps-IgG 抗体陽性率、抗体価を検討した。

2) ラット馬尾神経への C-Dps 蛋白の結合

正常 Lewis rat を還流固定後、馬尾神経の凍結切片を作製した。C-Dps 蛋白を 5 μ g/ml、抗 C-Dps モノクローナル抗

体 ($\times 5000$)、FITC 標識抗マウス IgG 抗体の順で各切片にあてた後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3) C-Dps 蛋白と糖脂質との結合

GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b, GT1b, sulfatide, GalCer と C-Dps 蛋白との結合を ELISA 法にて検討した。各糖脂質を 200 ng づつ固相化し、C-Dps 蛋白 (5 μ g/ml)、抗 C-Dps モノクローナル抗体 (5000 倍)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体の後に発色させた。更に、各糖脂質の TLC 展開後に免疫染色にて確認した。

4) C-Dps 蛋白の分化 PC12 に対する作用

NGFにより分化誘導を行った PC12 細胞株に対する C-Dps 蛋白の作用の検討を行った。分化 PC12 細胞株を PFA にて固定後 C-Dps 蛋白、抗 C-Dps モノクローナル抗体、FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて C-Dps 蛋白の結合を検討した。また、分化 PC12 細胞株に対して、C-Dps 蛋白を 0.04, 0.2, 1, 5 μ g/ml にて作用させ、1, 2 時間後に上清に遊離する LDH を測定した。さらに熱処理 (100 $^{\circ}$ C, 30 分)した C-Dps 蛋白、あるいは、抗 C-Dps 抗体による影響を検討した。

結果

1) GBS 患者血清における抗 *C. jejuni*-IgG 抗体と抗 C-Dps-IgG 抗体

¹⁾九州大学医学部神経内科