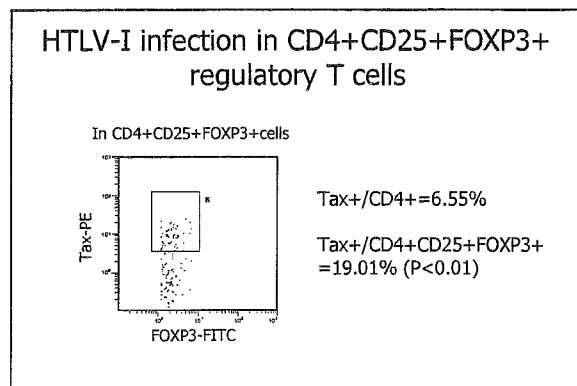


CD27 陰性細胞は 49% から 84% に増加しており、分化度が高い (intermediate stage, late stage) 細胞が多かった。

- 4) ケモカインの検討では、Tax 陽性 CD4 細胞および Tax 陰性 CD4 細胞では CCR7 陰性細胞はそれぞれ 98%、72% であり、CCR4 陽性細胞はそれぞれ 41%、20% であった。染色パターンからほとんどの Tax 陽性細胞が CCR4 陽性側にシフトしており、検出感度をあげればほとんどの細胞が CCR4 陽性となる可能性がある。
- 5) CD4 陽性細胞中の CD25 陽性細胞は 5.2% で FOXP3 陽性細胞は 1.3% であった。CD4+CD25+細胞中の FOXP3 陽性分画は各症例で 12-76% とばらつきを示し、平均 36% であった。
- 6) Tax 陽性 CD4 陽性細胞および Tax 陰性 CD4 陽性細胞中の CD25 陽性細胞はそれぞれ 13.7%、4.6% であり Tax 陽性 CD4 陽性細胞中に約 3 倍 CD25 陽性細胞が増加していた。Tax 陽性細胞中の 2.7% が FOXP3 陽性細胞であり、Tax 陰性細胞中より約 2 倍増加していた。CD4+細胞中の Tax 陽性細胞は 6.6%、CD4+CD25+FOXP3+制御性 T 細胞中の Tax 陽性細胞は 19.0% であり、CD4+CD25+FOXP3+制御性 T 細胞中で約 3 倍高かった。



考察

ヒトの末梢血リンパ球を用いての FOXP3 陽性細胞の同定に関しては、現在まで便宜的に CD4+CD25+陽性細胞あるいは CD4+CD25high 細胞が用いられてきたが、今回 HAM の検討では FOXP3 陽性細胞は CD4+CD25+細胞の 36% にすぎず、また各症例でその比率は大きくばらついていた。以上よりリンパ球が活性化し CD25 発現細胞が増加している炎症性疾患での制御性 T 細胞の評価には CD25 を用いるのは不適切と考えられた。HAM では CD4+CD25+FOXP3+制御性 T 細胞の 19% が HTLV-I 感染細胞であり、優位に感染または増殖している可能性が考えられた。これら制御性 T 細胞への HTLV-I 感染は感染者の免疫全体に影響を及ぼし、免疫異常を誘発する可能性が考えられた。

結論

HAM 患者末梢血中 HTLV-I 感染細胞はその表面抗原解析により、ほとんどが CD4+CD45RA-CCR7-CCR4+ であり、CCR4 が新たな表面マーカーとなる可能性がある。表面抗原を指標とした解析では、97% がエフェクター・メモリー細胞であり、分化度が高い副刺激分子を発現し、末梢組織に移行しやすいケモカイン CCR4 を発現していた。また HTLV-I は CD4+CD25+FOXP3+制御性 T 細胞にも感染しており、HAM の免疫不全に関与している可能性がある。

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

HAM 脊髄における HTLV-I 特異的 CTL の検出

分担研究者 出雲周二¹⁾
共同研究者 松浦英治²⁾、久保田龍二¹⁾、齋藤峰輝²⁾、松崎敏男²⁾、末原雅人³⁾、
有村公良²⁾、納光弘²⁾

研究要旨

HAM の発症に HTLV-1 特異的 CTL が関与しているかよくわかっていないため、HAM 患者の脊髄に HTLV-1 特異的 CTL が浸潤しているかを検討した。HLA-A2 陽性の HAM 患者の剖検脊髄を Tax11-19/HLA-A*02 五量体を用いて免疫染色を行い、陽性細胞は CD8 と二重染色を行った。脊髄内に浸潤している細胞は主に CD8 が陽性であった。Tax11-19 特異的 CTL は高頻度に検出され、同細胞は二重染色で CD8 陽性であった。脊髄内に HTLV-1 特異的 CTL が浸潤することが HAM の発症に深く関与していると考えられた。

研究目的

HAM 患者末梢血中では HTLV-I プロウイルスと HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が増加し、HTLV-I 特異的 CTL は抗原特異的に IFN- γ や TNF- α などのサイトカインを産生することが報告されている。また剖検脊髄では HTLV-I 感染 CD4 陽性 T リンパ球と長期に渡り浸潤し続ける CD8 陽性 T 細胞が認められている。これらのことから HAM の中枢神経系において、HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL の免疫反応が HAM 発症に深く関与していると類推されている。しかしながら、HAM 患者の脊髄において実際に HTLV-I 特異的 CTL が浸潤しているのかは未だ不明である。今回われわれは中枢神経系での HTLV-I 特異的 CTL の HAM 発症への関与を明らかにするために、HAM 剖検脊髄をもちいて免疫組織学的に HTLV-I 特異的 CTL の同定を試みた。

研究方法

HLA-A2 陽性の HAM 患者においては、主要なウイルスエピトープは Tax11-19 (LLFGYPVYV) であることが報告されている。HAM 剖検 9 例の脊髄より DNA を抽出し、PCR にて HLA-A2 を同定した。2 例 HLA-A2 陽性であり、炎症細胞浸潤の強い 1 例の凍結脊髄を用いて検討した。Tax11-19 ペプチド/HLA-A*02 五量体を用いて免疫染色を行い、HTLV-I Tax11-19 特異的 CTL を同定した。陽性細胞は CD8 と二重染色を行った。CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、Tax11-19 特異的 CTL の浸潤細胞数を比較検討した。

研究結果

胸髄に炎症細胞浸潤が強く、脊髄内の血管周囲を中心として CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の浸潤を認めた。脊髄内に Tax11-19 特異的 CTL を多数同定した。同細胞は二重染色で CD8 陽性であった。脊髄内に浸潤している細胞は主に CD8 が陽性であり、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比はおよそ 1 : 6 であった。

1) 鹿児島大学難治ウイルス研
2) 鹿児島大学神経内科・老年病学
3) 沖縄病院神経内科

CD8陽性細胞のうちTax11-19特異的なCTLはおよそ20%であった。

考察

HAM患者においては末梢血中のCTLの解析によりCTLが病態に関わっていることが考えられてきたが、実際に抗原特異的なCTLが中枢神経内に存在するかわかっていなかった。今回の研究でHTLV-I特異的CTLが実際に中枢神経系に浸潤しており、加えてその割合が非常に高いことが明らかとなった。HAMの患者においてHTLV-1特異的CTLが末梢血中に出現する割合はCD8陽性細胞中の約2%であり、今回の結果は、抗原特異的なCTLがHAM患者の中枢神経系に集ぞくしていることを示唆している。以上よりHTLV-I特異的CTLがHAMの病態に強く関わっていると考えられた。

結論

HAM患者脊髄内にHTLV-I特異的CTLが浸潤していることを組織学的に確認した。浸潤しているCD8陽性細胞のうちにしめるHTLV-1特異的CTLが高いことより、HTLV-I特異的CTLがHAMの発症に深く関与していると考えられた。

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：なし

インテグリン阻害による HTLV-I 産生抑制効果 — 各種 HTLV-I 感染 T 細胞株における解析 —

分担研究者 中村龍文¹⁾

共同研究者 福島直美¹⁾, 西浦義博²⁾, 井田弘明²⁾, 山田恭暉³⁾, 江口勝美²⁾

研究要旨

HTLV-I 関連脊髄症(HAM)における high HTLV-I proviral load の原因を HTLV-I の cell to cell spread の効率の角度から検討するために、抗インテグリン・ブロッキング抗体存在下に HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株を培養し、HTLV-I 産生抑制効果を対照 HTLV-I 感染 T 細胞株と比較検討した。その結果、対照 HTLV-I 感染 T 細胞株では抑制効果はほとんどみられなかったにもかかわらず、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株では強い抑制効果がみられた。しかし、HTLV-I tax mRNA 発現には抑制効果を示さなかった。これらの事実は HAM 患者由来 HTLV-I 感染細胞 T 細胞株では、インテグリンとそのリガンドの相互作用によって惹起される HTLV-I の細胞外放出の割合が高いことを示し、HAM 患者末梢血における high HTLV-I proviral load の原因の一つとして、HTLV-I の効率のいい cell to cell spread が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

末梢血における HTLV-I の high proviral load は HTLV-I 関連脊髄症(HAM)発症における最も大きな必要条件であるが、その原因については未だ不明な点が多い。HTLV-I は感染細胞と非感染細胞との接触、すなわち cell to cell spread の感染様式をとることは周知の事実である。その際、細胞接着分子の一つであるインテグリンとそのリガンドによって構成される、いわゆる virologic synapse が重要な役割を果たす。そこで今回、cell to cell spread の効率を間接的に解析するために、抗インテグリン・ブロッキング

抗体を使用し、インテグリンとそのリガンドの相互作用の阻害による HTLV-I 産生抑制を HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株と対照 HTLV-I 感染 T 細胞株で比較検討した。

B. 研究方法

1) 細胞株：HAM患者由来HTLV-I感染T細胞株であるHCT-1, HCT-4およびHCT-5を使用した。対照HTLV-I感染T細胞株としてTL-Su(HTLV-I キャリアー由来), TCL-Kan(正常人由来), MT-2 およびC91/PL(臍帯血由来), LMY1(ATL患者由来)を使用した。

1)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学
2)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学
3)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析診断学

2) HTLV-I 産生能： 2×10^5 /ml の濃度で抗 CD11a/LFA-1 抗体(20 μ g/ml)(clone; HI111)ある

いは抗 $\alpha 4/CD49d$ 抗体(20 $\mu\text{g/ml}$)(clone; 2B4)あるいは両抗体存在下に、あるいは対照抗体(clone; MOPC-21)存在下に 15 時間培養後、培養液中の HTLV-I p19 抗原濃度を ELISA 法にて測定した。また、IFN- γ 産生株である HCT-1, HCT-4, HCT-5 では培養液中の IFN- γ 濃度を ELISA 法にて測定した。また、一部では両者の抗インテグリン・ブロッキング抗体存在下あるいは対照抗体存在下に 3, 6, 15 時間培養し、HTLV-I p19 抗原産生の経時的変化を解析した。

3) HTLV-I tax mRNA 発現能: HCT-1 および HCT-5 では両者の抗インテグリン・ブロッキング抗体あるいは対照抗体存在下に、6 時間または 15 時間培養後、培養細胞を回収し RNA を抽出、Dnase で処理後、cDNA を合成。 β -actin を内部コントロールとし、LightCycler (Roche Diagnostics) にて HTLV-I tax の半定量化 RT-PCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学の倫理規定を遵守して行った。

C. 研究結果

1) 抗インテグリン・ブロッキング抗体による HTLV-I 産生抑制効果: flow cytometry によるそれぞれの細胞株におけるインテグリンおよびそのリガンド発現を検討した結果、TL-Su, TCL-Kan, C91/PL において VLA-4 の発現が弱かった以外、その他の細胞株ではすべて強く発現していた。また、HCT-1 および HCT-5 において、それぞれ単独の抗 CD11a/LFA-1 抗体または抗 $\alpha 4/CD49d$ 抗体存在下の培養に比較して、

両抗体存在下の培養においてより強い HTLV-I 産生の抑制がみられた。これらの基礎データをもとに、以後の解析は両抗体存在下で検討した。その結果、図 1 に示すように、対照 HTLV-I 感染 T 細胞株である TL-Su, TCL-Kan, C91/PL, MT-2 および LMY1 の中では、MT-2 でのみ 20 数%位が HTLV-I 産生が抑制された以外、その他の株では抑制効果は明らかではなかった。しかし、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株においては、3 株すべてにおいて HTLV-I の産生は約 50%から 80%位抑制された(図 2)。MTSassay でみるかぎり、抗インテグリン・ブロッキング抗体は細胞増殖には影響を与えなかった。

2) 抗インテグリン・ブロッキング抗体による HTLV-I 産生抑制の経時的変化: HCT-1 において抗インテグリン・ブロッキング抗体による HTLV-I 産生抑制効果を培養後、3, 6, 15 時間で検討した結果、その抑制効果は既に培養 3 時間後において生じていた(図 3)。

3) 抗インテグリン・ブロッキング抗体の HTLV-I tax mRNA 発現に及ぼす効果: HCT-1 および HCT-5 において培養後、6 時間および 15 時間における抗インテグリン・ブロッキング抗体の HTLV-I tax mRNA 発現に及ぼす影響については、その抑制効果は明らかではなかった(図 4)。

4) 抗インテグリン・ブロッキング抗体の IFN- γ 産生に及ぼす効果: IFN- γ 産生株である HCT-1, HCT-4 および HCT-5 の 3 株すべてにおいて、IFN- γ 産生は抑制されなかった。

D. 考察

本研究において、HAM 患者 HTLV-I 感染 T 細胞株では、対照 HTLV-I 感染 T 細胞株に比較して、HTLV-I の産生あるいは細胞外放出はインテグリンとそのリガンドとの相互作用に負っている割合が大きいということが明らかにされた。通常、HTLV-I が感染する場合、virologic synapse が重要な役割を果たす。すなわち、HTLV-I の感染の効率を考えた場合、インテグリンとそのリガンドとの相互作用の結果惹起される HTLV-I の産生あるいは細胞外放出の割合が高ければ高い程、HTLV-I は効率よく伝播していくことになる。今回の検討では、抗インテグリン・ブロッキング抗体による HTLV-I の産生抑制は既に培養 3 時間後に認められた。このことは常に細胞内に HTLV-I virion が存在している細胞株での HTLV-I の産生抑制は HTLV-I の発現そのものの抑制に起因しているのではないという可能性が考えられたが、なるほど HTLV-I tax の mRNA 検索において HTLV-I 発現の抑制は明らかではなかった。インテグリンやそのリガンドの下流域には HTLV-I の発現を制御できるシグナル伝達系が存在するが、少なくとも今回の我々の実験系では HTLV-I の発現には影響を及ぼさなかった。今回は HTLV-I 感染 T 細胞株における検討ではあるが、HAM 患者 HTLV-I 感染細胞では非感染細胞に対してインテグリンとそのリガンドとの接着によって惹起される相互作用の結果生ずる何らかのシグナル伝達によって効率のいい HTLV-I の cell to cell spread が生じ、そのことが、HAM 患者末梢血における high HTLV-I proviral load の一因になっている可能性が考え

られた。また、今回の検討では IFN- γ 産生においては抑制効果はみられず、HAM 患者における IFN- γ 発現には別のシグナルの関与が考えられた。

E. 結論

HTLV-I の効率のいい cell to cell spread が HAM 患者末梢血で維持されている high HTLV-I proviral load の一因となっている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許取得：なし。

実用新案登録：なし。

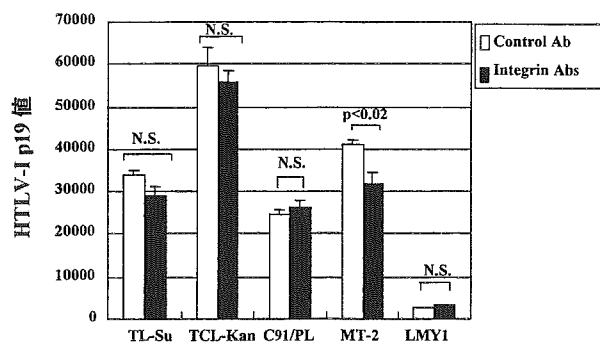


図1. 対照HTLV-I感染T細胞株におけるHTLV-I産生に対する抗インテグリン・ブロッキング抗体による抑制効果

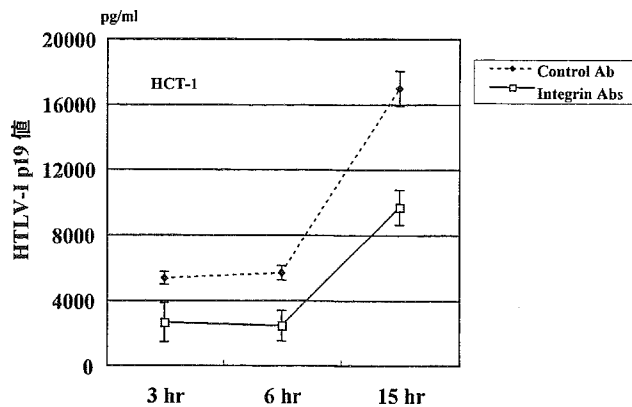


図3. 抗インテグリン・ブロッキング抗体によるHTLV-I産生抑制効果の経時的変化

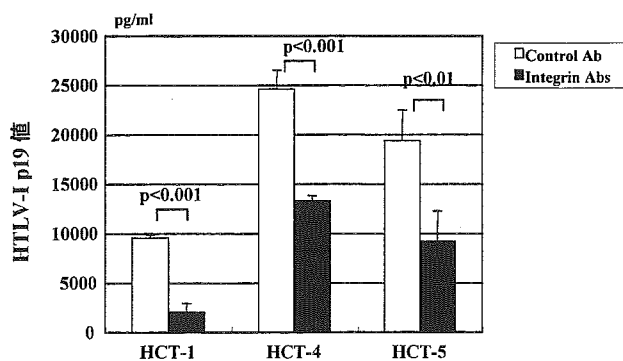


図2. HAM患者由来HTLV-I感染T細胞株におけるHTLV-I産生に対する抗インテグリン・ブロッキング抗体による抑制効果

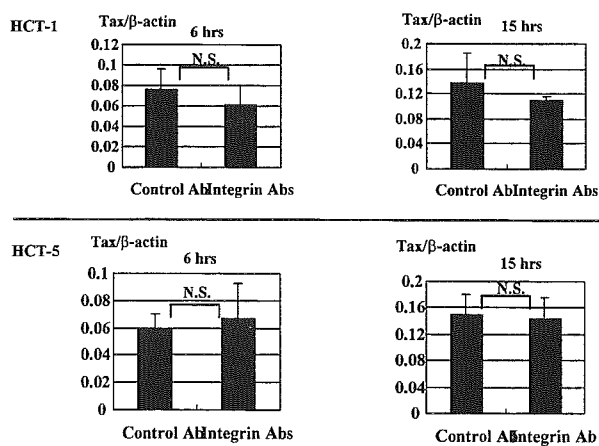


図4. 抗インテグリン・ブロッキング抗体によるHTLV-I tax mRNA発現抑制効果の経時的変化

重症筋無力症におけるホーミング関連分子の重要性

分担研究者	東北大学医学部神経内科	糸山泰人 ¹
共同研究者	国立病院機構西多賀病院神経内科	小野寺宏 ²
	国立病院機構米沢病院神経内科	田郷英昭 ³
	磐城共立病院神経内科	鈴木靖士 ⁴
	国際医療福祉病院神経内科	齋藤龍史 ⁵

研究要旨

重症筋無力症 (MG) は臓器特異的な自己抗体がT細胞依存性に産生されて発病すると考えられている。そのためには、MG発症に関与するT細胞およびB細胞の活性化にくわえてこれらの免疫細胞の抗体産生への局在が必要である。我々は過形成MG胸腺におけるリンパ球機能異常を検討するなかで、リンパ球の局在化シグナルの変調がMG病態に重要であることを見いだした。過形成胸腺ではリンパ球と樹状細胞の遊走に重要なケモカイン受容体CCR7のリガンドであるCCL21の発現が選択的に上昇していることを見いだした。さらに過形成胸腺T細胞においてはCCL21依存性リンパ球遊走能が有意に亢進していることを見いだした。さらにB細胞による抗体産生の正の制御に重要なケモカイン受容体CXCR5を発現するCD4 T細胞がMG患者末梢血において有意に増加していることを明らかにした。さらにMGでのリンパ球局在化シグナル変調が治療後徐々に正常化することを見いだした。MG患者とくに胸腺過形成合併例において、ホーミング関連シグナル解析と制御が将来の有用な診断法と治療法になることが期待される。

目的

MGにおけるT細胞依存性自己抗体産生には、関連するT細胞およびB細胞の活性化・抗体産生への局在が必要である。我々は過形成MG胸腺におけるリンパ球機能異常を検討するなかで、リンパ球の局在化シグナルの変調がMG病態に重要であることを見いだした。本研究ではMGにおけるリンパ球局在化シグナルについて、特に胸腺間質細胞に注目しつつ検討した。

方法

健常者およびMG患者の末梢血と胸腺を解析に供した。リンパ球のケモカイン受容体発現および胸腺組織のケモカイン発現をマイクロアレイ、フローサイトメトリ、免疫組織化学等により検討した。

結果・考察

T細胞のリンパ組織局在・胸腺外移動を制御するケモカインであるCCL21のmRNAレベルが過形成胸腺では正常胸腺の70倍に増加していた。一方CCL21とともに受容体CCR7を共有するCCL19の発現には差がなかった。過形成胸腺でのCCL21免疫活性は胚中心を取り囲む細胞(cytokeratin陰性のstroma cell)に認められたが、胚中心

1)東北大学神経内科
2)国立病院機構西多賀病院神経内科
3)国立病院機構米沢病院神経内科
4)磐城共立病院神経内科
5)国際医療福祉病院神経内科

には認められなかった。

T細胞による抗体産生促進 (B cell help) には follicular helper T細胞が重要な役割を果たしている。follicular helper T細胞とB細胞のB細胞領域移行にはケモカイン受容体 CXCR5を介するシグナルが必要であり、これらの細胞は CXCR5を発現する。MG患者末梢血 CD4 T細胞における CXCR5発現率は健常者に比して有意に増加しており、全身型 MGでは眼筋型に比して有意に CXCR5発現率が高かった(表1)。治療開始後徐々に CXCR5発現率は正常化していった。MGでは他の自己免疫疾患を合併する頻度が高いが、他の自己免疫疾患を合併するMG患者(RA, SLE, thyroiditis等)での CD4 T細胞における CXCR5発現率は合併しない患者に比して有意に高かった。胸腺 single positive CD4 および CD8細胞における CXCR5発現率は、過形成胸腺・胸腺腫ともに正常胸腺と差がなかった。MGは organ specific autoimmune diseaseの典型とされるが、他の自己免疫疾患を合併するMG患者において CXCR5陽性 CD4が著明に増加していたことから、一部のMG患者は systemic autoimmune diseaseの要素を有することが示唆された。

このようにMGでは種々のホーミング関連シグナルが変調していることが明らかになった(文献 1,2,3)。胸腺やリンパ組織内において正常とは異なる部位にリンパ球が局在して活性化されることが自己ペプチドへの反応性獲得に重要であると推測される(myoid cell等)。局在化シグナルの変調によりリンパ球機能は大きく変化するため、MGで観察される Th1/Th2シグナル変調やNK/NKT細胞機能変化の誘因としてホーミングシグナル異常は極めて重要である。

ケモカインシグナルとともにリンパ球の

リンパ組織移行を制御するリン脂質シグナルがMGで変調していることを最近見いだしており、ホーミングシグナルの制御に関連する遺伝子(転写因子)の解析が今後必要である。

結論

我々はリンパ球の局在化シグナルの変調がMG病態に重要であることを見いだした。MG患者とくに胸腺過形成合併例において、ホーミング関連シグナル解析と制御が将来の有用な診断法と治療法になることが期待される。

文献

- 1) Saito R, Onodera H, Tago H, Suzuki Y, Shimizu M, Matsumura Y, Kondo T, Itoyama Y. Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol.* 2005;170:172-8.
- 2) Onodera H. The role of the thymus in the pathogenesis of myasthenia gravis Review. *Tohoku J Exp Med.* 2005;207:87-98.
- 3) Suzuki Y, Onodera H, Tago H, Saito R, Ohuchi M, Shimizu M, Matsumura Y, Kondo K, Yoshie O, Itoyama Y. Altered expression of Th1-type chemokine receptor CXCR3 on CD4+ T cells in myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol (in press).*

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

表 1

The percentage of CXCR5-positive CD4⁺ T cells (follicular B helper T cell) in peripheral blood of MG and control subjects. Data are expressed as percentage of cells in CD4⁺ T cells.

	before therapy	after therapy
control	5.1±5.6	
myasthenia gravis		
hyperplasia	12.2±4.9 ^a	8.8±6.1
thymoma	10.6±3.3 ^b	7.7±4.6

Mean±SD

^{a,b} before treatment vs control (p=0.00011, p=0.00063)

雑誌

Saito R, Onodera H, Tago H, Suzuki Y, Shimizu M, Matsumura Y, Kondo T, Itoyama Y. Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol.* 2005;170:172-8.

Onodera H. The role of the thymus in the pathogenesis of myasthenia gravis Review. *Tohoku J Exp Med.* 2005;207:87-98.

Suzuki Y, Onodera H, Tago H, Saito R, Ohuchi M, Shimizu M, Matsumura Y, Kondo K, Yoshie O, Itoyama Y. Altered expression of Th1-type chemokine receptor CXCR3 on CD4⁺ T cells in myasthenia gravis patients. *J*

ヒト胸腺、末梢血における AIRE の発現について

分担研究者 藤井 義敬

共同研究者 鈴木 恵理子、小林 昌玄

研究要旨

AIRE (Autoimmune regulatory element) とは胸腺髄質の胸腺上皮細胞 (Medullary thymic epithelial cells: TECs) にある transcriptional activator で、胸腺固有の抗原の発現に関わっている central tolerance における key factor である。AIRE の発現低下は negative selection で消去されるべき自己反応性の T 細胞の生存を許すことになる。AIRE 遺伝子の mutation は APECED (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy: 多腺性自己免疫性内分泌不全症) を引き起こし、AIRE 欠損マウスでは自己抗体産生やリンパ球浸潤といった APECED 様の自己免疫症状を呈する。すなわち、TECs に発現される AIRE は central tolerance の成立に必要な不可欠な役割を果たしていると考えられるが、詳細は不明である。

今回我々はヒト胸腺細胞と末梢血における AIRE の発現について検討した。

研究目的

ヒトにおける AIRE の発現は、文献では TECs の他に脾臓、リンパ節などに発現しているとされているが、その詳細な分布は不明であり、さらにヒトにおいてはまだまだあまり検討されていない。今回我々は FACS を用いてヒト胸腺、末梢血における AIRE の分布を明らかにした後、それぞれの細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR により AIRE の発現を検討したので報告する。

研究方法

<検体>

胸腺：開心術の際に摘出される免疫学的に正常な小児胸腺を、十分なインフォームド・コンセントを行い使用した。末梢血：正常な成人末梢血を使用した。

<方法>

胸腺、末梢血からそれぞれリンパ球を抽出し、FACS を施行した。さらにそれぞれのリンパ球からマグネティックビーズを用いて T, B 細胞を分離し mRNA を抽出した。cDNA を作製し、RT-PCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、名古屋市立大学の倫理規定を遵守して行った。患者さんからはインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ研究をおこなった。」

研究結果

1. 胸腺組織での FACS

T 細胞の各分画 (Double negative、Double positive、Single positive) において、わずかに AIRE の発現を認めた。

2. 末梢血での FACS

T 細胞 (Single positive) での AIRE の発

現はほとんどみられなかったが、Double negative な分画とリンパ球より大きな細胞分画で AIRE の発現を認めた。どの細胞集団に AIRE の発現がみられるのかを確認するために、それぞれの細胞に特異的な分子マーカーを用いて FASC を施行した。顆粒球には CD65、単球には CD14、B 細胞には CD19 を用いた。

<CD65>
細胞の大きさ (FSC) と CD65 の関係を図に示したところ、3 つの細胞集団にわかれた。それぞれの細胞集団における AIRE の発現を確認したところ、顆粒球と思われる CD65 強陽性群で AIRE の発現を最も多く認めた。さらに単球と思われる CD65 弱陽性群でも AIRE の発現を確認した (図 1)。

<CD14>
FSC と CD14 の関係を図にすると同様に 3 つの細胞集団にわかれた。顆粒球と思われる CD14 弱陽性群で AIRE の発現が最も多かった。さらに単球と思われる CD14 強陽性群でも AIRE の発現がみられた (図 2)。

<CD19>
FSC と CD19 の関係を図にすると同様に 3 つの細胞集団にわかれた。B 細胞と思われる CD19 強陽性群で AIRE の発現が最も多かった。さらに CD19 陰性の、顆粒球、単球が混在していると思われるやや細胞の大きさが大きい細胞集団でも AIRE の発現がみられた (図 3)。

3. mRNA

T、B 細胞から抽出した mRNA の RT-PCR の結果を図 4 に示す。AIRE 発現量を GAPDH 発現量で補正した。B 細胞で AIRE の発現が多かった (図 4)。

考察

AIRE が胸腺髄質の胸腺上皮細胞に存在し、AIRE 遺伝子の変異が自己免疫疾患 (APECED)

を引き起こすことから、AIRE の negative selection への関与がいられている。しかし、AIRE は TECs の一部にしか存在しないため実験への利用が困難なこともあり特にヒトにおいては研究が進んでいない。今回我々は AIRE に着目し、ヒト胸腺、末梢血での発現を調べた。胸腺 T 細胞では AIRE の発現がわずかであったが、末梢血では明らかに B 細胞で AIRE の発現が増加しており、mRNA でも確認することができた。今後、顆粒球、単球においても mRNA の発現を確認する予定である。

末梢血中における AIRE の機能に関して本研究では検討していないが、恐らく末梢での tolerance に関わっていると思われる。可能であれば今後機能に関しても研究を進めていきたい。

結論

1. 胸腺 T 細胞に AIRE の発現をわずかに認めたが、mRNA レベルでは比較的少量であった。
2. 末梢血では B 細胞、顆粒球、単球に AIRE の発現を認めたが、T 細胞にはほとんど AIRE の発現がみられなかった。
3. T、B 細胞における AIRE の mRNA 量は B 細胞の方が多かった。

文献

1. Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H., Kudoh, J., et al (1997) *Nature Genetics* 17:393-398
2. Heino, M., Peterson, J., Kudoh, J., Nagamine, K., et al (1999) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257:821-825
3. Zuklys, S., Balciunaite, G., Agarwal, A, Fasler-kan, E., et al (2000) *The Journal of Immunology* 165:1976-1983

4. Kogawa, K., Nagafuchi, S., Katsuta, H.,
Kudoh, J., et al (2002) *Immunology
Letters* 80:195-198

5. Cavadini, P., Vermi, W., Facchetti, F.,
Fontana, S., et al (2005) *The Journal of
Clinical Investigation* 115:728-732

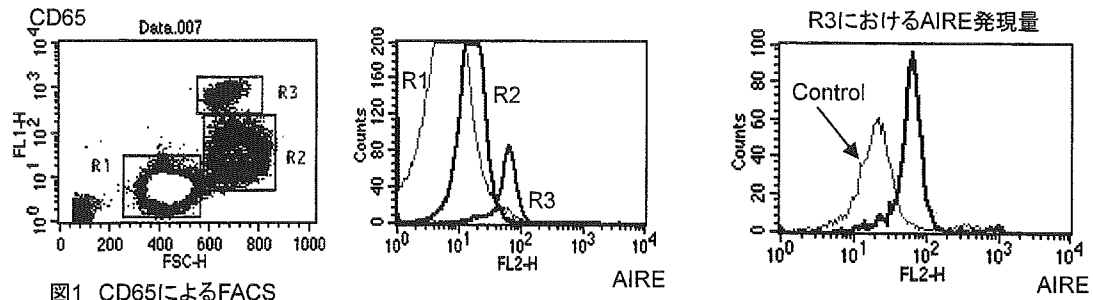


図1 CD65によるFACS

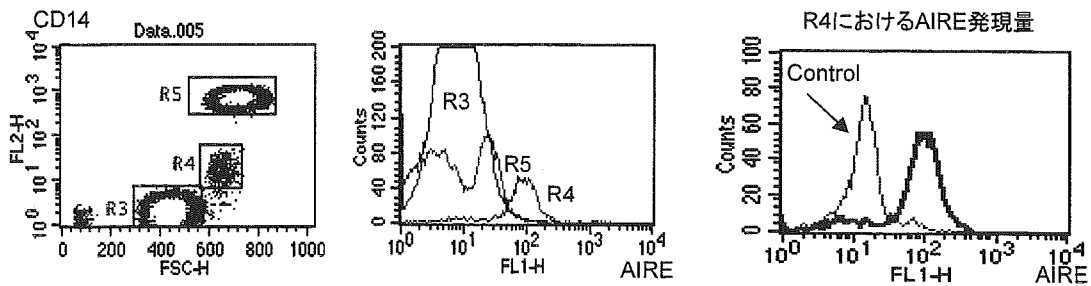


図2 CD14によるFACS

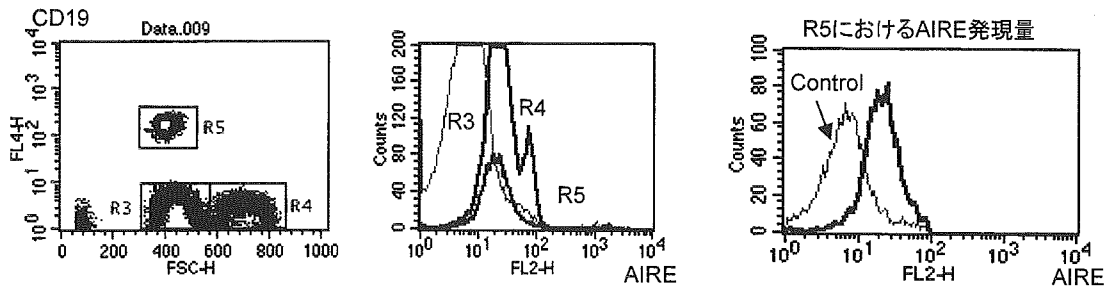


図3 CD19によるFACS

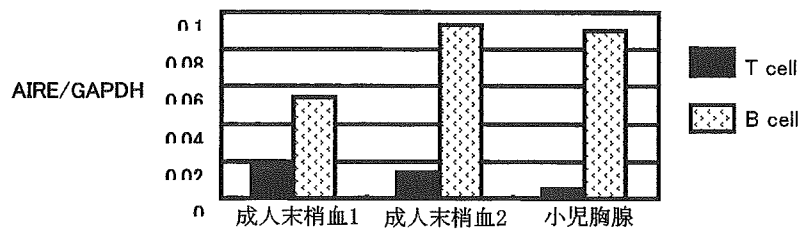


図4 末梢血、胸腺組織中のT,B細胞からのAIRE mRNA発現量

本邦の抗MuSK抗体陽性重症筋無力症70症例の臨床的検討

協力班員 本村政勝¹⁾

共同研究者 白石裕一¹⁾, 江口勝美¹⁾, 吉村俊朗²⁾, 辻畑光宏³⁾, Angela Vincent⁴⁾

研究要旨

血清抗アセチルコリン受容体(acetylcholine receptor: AChR)抗体が検出されない重症筋無力症(seronegative MG)患者の一部に筋特異的チロシンキナーゼ(muscle specific tyrosine kinase: MuSK)に対する抗体が検出される。我々は本邦の seronegative MG 患者血清を用いて RIA 法による抗 MuSK 抗体測定を行い、抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 70 症例を経験した。臨床像を要約すると、1) 男女比は約 1:3 で女性優位。眼症状、球症状が初発症状として多く、頸部筋力低下、呼吸不全が進行する。クリーゼを来しやすい。2) 約 30%に筋萎縮を伴う。3) 胸腺腫を合併しない。4) 治療はステロイド薬が第一選択と考えられる。抗コリンエステラーゼ薬は効果に乏しい症例、fasciculation などの副作用がみられる症例もあり、その投与には慎重を期すべきである。重症、難治例にはステロイドパルス療法、血漿交換療法、タクロリムス投与を考慮する。5) 胸腺摘除術の適応は少ないと考えられる。今後、抗 MuSK 抗体陽性 MG の発症機序が解明され、その病態に対応した治療法の開発が望まれる。

研究目的

全身型重症筋無力症(myasthenia gravis: MG)患者の約 20%では、血清抗アセチルコリン受容体(acetylcholine receptor: AChR)抗体が検出されず、seronegative MG としてその病態機序の解明が進められてきた^{1,2,3)}。2001年 Hochらは全身型 seronegative MG 患者の 70%で筋特異的チロシンキナーゼ(muscle specific tyrosine kinase: MuSK)に対する抗体が検出されたと報告した⁴⁾。その後の報告により、女性優位、顔面筋、頸部筋力低下、球麻痺が主体で、クリーゼになりやすい、胸腺腫が無いなどの臨床的特徴が明らかとなった。我々は本邦の seronegative MG 患者血清を用いて RIA 法による抗 MuSK 抗体測定を行い、抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者 70 症例を経験した。本邦の抗 MuSK 抗体陽性 MG の臨床像、治療効果について報告する。

方法

抗 MuSK 抗体測定法は recombinant rat MuSK を¹²⁵I で標識し、患者血清を加え、RIA 法で測定した。Seronegative MG が疑われた 360 症例(眼筋型 84 例、全身型 276 例)中 70 症例が抗 MuSK 抗体陽性であった。抗 MuSK 抗体 MG 患者について、1) 臨床像、胸腺腫の有無、2) 胸腺摘除術、抗コリンエステラーゼ薬、経口ステロイド薬、ステロイドパルス療法、免疫吸着療法、単純血漿交換療法、二重膜濾過血漿交換法、免疫グロブリン大量静注療法(IVIg)、タクロリムスの治療効果についてアンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学の倫理規定を遵守して行った。患者さんからはインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ研究をおこなった。

結果

発症年齢は 2-75 歳、平均発症年齢は 43 歳、男女比は約 1:3 で女性が多い。初発症状は眼症状、球症状が多く、眼症状(88%)、球麻痺(87%)、頸部筋力低下(71%)、呼吸困難(51%)が主症状で、クリーゼが 31%にみられた。今回、2 歳時に発症したと思

- 1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
病態解析制御学(旧第一内科, 神経内科)
- 2) 長崎大学保健学科
- 3) 長崎北病院
- 4) University of Oxford

われる男性例，眼筋型の若年男性例(約半年の経過)が新たにみつかった。日内変動(84%)，易疲労性(89%)は多くの症例で認められた。エドロフォニウムテストは79%で陽性，decrementは73%にみられ，顔面筋主体に認められた。一方，エドロフォニウムテスト，decrementともに陰性で，ミオパチー，運動ニューロン病様の経過をとる症例もみられた。28%に顔面筋，舌などの筋萎縮を認めた。全例とも胸腺腫の合併はみられなかった。治療は経口ステロイド薬，ステロイドパルス療法，単純血漿交換，二重膜濾過血漿交換が有効であった。抗コリンエステラーゼ薬は効果が不定で，fasciculationなどの副作用も一部の症例にみられた。免疫吸着療法は著効例がある一方で効果のない症例もみられた⁵⁾。胸腺摘除術の効果は少なかった。

考察

抗MuSK抗体陽性MGは眼症状，球麻痺症状が初発症状として多く，頸部筋力低下，呼吸不全が進行する^{6,7)}。

また，ミオパチーや運動ニューロン病様の経過をとり診断に苦慮した症例など，抗AChR抗体陽性MGとは非常に異なる症例もしばしばみられることが今回判明した。Seronegative MGが疑われた場合には，顔面筋まで含めた電気生理学的検査に加え，抗MuSK抗体測定が必要である。

治療については現時点ではステロイドが第一選択と考えられ，重症，難治例には単純血漿交換，二重膜濾過血漿交換，ステロイドパルス療法，タクロリムスなどを考慮する。抗コリンエステラーゼ薬は効果に乏しい症例，fasciculationなどの副作用がみられる症例もあり，その投与には慎重を期すべきである。胸腺腫を合併せず，胸腺摘除術の適応は少ないと考えられる^{6,7)}。今後，抗MuSK抗体の発症機序が解明され，その病態に対応した治療法の開発が望まれる。

謝辞

アンケート調査に御協力いただきました各施設の先生方に深謝致します。

文献

- 1) Mossman S, Vincent A, Newsom-Davis J.: Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity. *Lancet* 1: 116-119, 1986.
- 2) Soliven BC, Lange DJ, Penn AS et al: Seronegative myasthenia gravis. *Neurology* 38: 514-517, 1988.
- 3) Vincent A: Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2: 797-804, 2002.
- 4) Hoch W, McConville J, Helms S et al: Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nature Med* 7: 365-368, 2001.
- 5) 鈴木秀和，本村政勝，吉村俊朗，他：免疫吸着は無効であったが単純血漿交換が著効した抗MuSK抗体陽性重症筋無力症の1例(原著論文)。 *臨床神経学* 45: 510-513, 2005.
- 6) Sanders DB, El-Salem K, Massay JM et al: Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 60: 1978-1980, 2003.
- 7) 本村政勝，白石裕一，吉村俊朗，辻畑光宏：抗MuSK抗体陽性重症筋無力症の診断と治療。 *Annual Review* 276-284, 2006.

自己免疫性 MuSK 抗体陽性重症筋無力症ラット作製の試み

協力班員 本村政勝¹⁾
共同研究者 白石裕一¹⁾, 福田 卓¹⁾, 江口勝美¹⁾, 中野治郎²⁾, 吉村俊朗²⁾, 福留隆泰³⁾,
松尾秀徳³⁾, 辻畑光宏⁴⁾

研究要旨

抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症機序を解明するために、ラットを用いて動物モデル作製を検討した。抗原としては、野生型マウス MuSK の細胞膜貫通領域及び細胞内領域を全て欠損している可溶性マウス MuSK を用いた。MuSK 免疫ラットの抗 MuSK 抗体価は、コントロール免疫群と比較して有意に上昇した。一方、抗 AChR 抗体価は両群間で差はなかった。臨床的には、MuSK 免疫ラットで体重が減少傾向であったが、明らかな筋力低下は観察されなかった。抗 MuSK 抗体陽性ラットの神経筋接合部では、運動終板の AChR・MuSK 量が共に減少しており、運動終板の形態学的異常 (declustering fiber) が高頻度に認められた。このラットモデルの結果は、抗 MuSK 抗体が運動終板に対して病原を有することを示唆する。

研究目的

筋特異的チロシンキナーゼ (MuSK) は筋線維の後シナプス膜上に位置し、アセチルコリン受容体 (AChR) と隣接して存在する [1]。その機能は agrin/rapsyn と共に AChR の clustering を制御し、運動終板の形成・発達に深く関わっている。この MuSK に対する自己抗体の発見により、抗 AChR 抗体陰性の重症筋無力症 (seronegative MG) 患者の一部を容易に診断できるようになった [2]。さらには、抗 AChR 抗体陽性 MG と比較すると、さらに女性優位、クリーゼになりやすい、胸腺腫が無いなどの臨床的特徴が明らかとなった [3]。ところが、この抗 MuSK 抗体がどのようにして筋無力症を引き起こすかは未だ不明である。今回、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症機序を解明するために、ラットを用いて動物モデル作製を検討した。

方法

(1) 可溶性マウス MuSK 蛋白の調整: 抗原として、可溶性マウス MuSK (soluble mouse MuSK; smMuSK)-6xHis を用いた。分泌性組換え体蛋白質である smMuSK-6xHis は、野生型マウス MuSK の細胞膜貫通領域及び細胞内領域を全て欠損しており、代わりに 6 個のヒスチジン残基を C 末端に付加した構造を持つ。

(2) 免疫動物実験プロトコール: 今回の実験は長崎大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

1) 可溶化 MuSK 蛋白の免疫: 雌のルイスラット (n=3) をエーテル吸入によって麻酔し、完全フロイント・アジュバントで調整した可溶化 MuSK 蛋白 (5-50 µg) を皮内に免疫した。同時に百日咳菌トキシンを皮内投与した。コントロール (n=3) としては、リン酸緩衝液で同じ方法で免疫した。

2) 臨床評価: 免疫後、定期的に、体重、筋力などを測定した。

3) 抗 MuSK 抗体測定: 定期的に動物の尾より採血し、以下に述べる方法で抗 MuSK 抗体価を測定した。

4) 抗 MuSK 抗体が陽性になっていることを確認後、微小電極を用いた電気生理学的評価、そして、ラットの神経筋接合部生検を行った。

(3) 抗 MuSK/AChR 抗体測定: 抗 MuSK 抗体測定法は、COS7 由来の rat recombinant MuSK を ¹²⁵I で標識し、患者血清を加え、免疫沈降法にてその放射活性を測定した。抗 AChR 抗体測定は、ラット AChR を ¹²⁵I- α -bungaratoxin で標識し、従来の免疫沈降法で行った。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、動物愛護の観点より、長崎大学の動物実験指針 (動物実験委員会の指針) の範囲内で行われた。

- 1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
病態解析制御学 (旧第一内科, 神経内科)
- 2) 長崎大学医学部保健学科
- 3) 長崎神経医療センター
- 4) 長崎北病院

結果

(1) MuSK免疫ラット (n=3) では、コントロール群 (n=3) と比較すると体重減少が認められたが、明らかな筋力低下症状ははっきりしなかった。(表1)

(2) 抗 MuSK 抗体価は、コントロール免疫群と比較して、有意に上昇した。一方、抗 AChR 抗体価は、両群間で差はなかった(表1)。

(3) 抗 MuSK 抗体陽性ラットの神経筋接合部では、運動終板の AChR・MuSK 量が共に減少しており(図1)、運動終板の形態学的異常 (declustering fiber, 図2) が高頻度に認められた。

考察

この MuSK 免疫ラットでは、抗体価の上昇と共に、体重減少が認められ、運動終板の AChR・MuSK 量が減少し、形態学的変化をもたらした。この結果は、抗 MuSK 抗体が、病原性を有することを支持する。現在、電気生理学的評価と電子顕微鏡による微細構造の評価を検討中である。

結論

このモデルの抗 MuSK 抗体は運動終板に対して病原性を示しており、抗 MuSK 抗体陽性 MG の発症機序を考慮する上で重要である。

文献

1) Hoch W, McConville J, Helms S et al: Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nature Med* 7: 365-368, 2001.

2) Sanders DB, El-Salem K, Massay JM et al: Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 60: 1978-1980, 2003.

Table 1

MuSK-rats 2,3 have a lot of AChR-declustering muscle fibers (extensor digitorum longus > soleus).

	Control-1	Control-2	Control-3	MuSK-1	MuSK-2	MuSK-3
weight	350	294	324	290	274	230
MuSK ab titer(cpm)	107	108	109	1145	6545	12010
AChR	→	→	→	→	↓	↓↓
MuSK	→	→	→	→	↓	↓↓
Frequency of ADF (%) in EDL	0	0	0	0	41	59
Frequency of ADF (%) in SOL	0	0	0	0	16	15

ADF: AChR declustering muscle fiber

Fig.1

Immunofluorescent staining: Down-regulation of AChR and MuSK in MuSK-immunized rat, Bar: 50µm

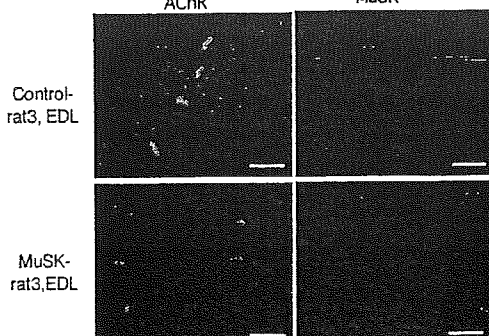
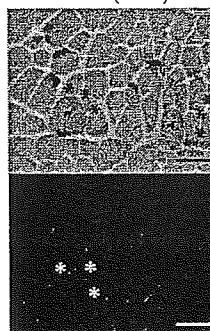


Fig. 2

Characteristics of AChR-declustering muscle fibers (ADF)

- The morphological changes of cholinesterase staining
 - fragmentation(→)
 - elongation(*)
 - appearance inside muscle fiber (↗)
- The AChR and MuSK at the endplates were reduced.
- Here, we define AChR-declustering muscle fibers (ADF) as length of motor endplate / length of total muscle fiber > 0.3 (mean+3SD of controls) and investigated the frequency of ADF.



骨格筋リアノジン受容体抗体の定量法に関する研究

分担研究者 吉川弘明^{1), 2)}

共同研究者 丸田高広^{2), 3)}、古川裕²⁾、岩佐和夫²⁾、山田正仁²⁾

研究要旨

重症筋無力症 (MG) における骨格筋リアノジン受容体 (RyR) 結合抗体を定量するため sandwich ELISA を応用した新たな測定系を考案した。その上で実際に、この新測定法により、MG 患者 80 名、病的対照 34 名、正常対照 23 名の血清中抗 RyR 抗体を定量した。また、正常対象の平均 + 3 標準偏差を超えた検体を同抗体陽性と定義した。その結果、MG 患者 31 名 (39%) は RyR 抗体陽性であった。一方、病的対象あるいは正常対象は全て陰性であった。MG 患者でも胸腺腫合併例や高齢発症例で有意に陽性率が高く、女性や全身型症例に高い傾向がみられた。アセチルコリン受容体抗体陰性 MG 11 名は全て RyR 抗体陰性であったが、両抗体価には相関がみられなかった。本法は、理論上生体蛋白への結合抗体を直接定量できる上、実際に本法で MG 特異的に抗体を検出した。今後、MG 患者の病態把握に重要なマーカーとなるものと期待される。

研究目的

重症筋無力症 (MG) における骨格筋リアノジン受容体 (RyR) 結合抗体を定量するため、sandwich ELISA を応用した新たな測定系を確立することを目的とした。また、そこから得られた RyR 抗体価と臨床像の関連について解析を行い、その臨床的意義について検討した。

研究方法

MG 患者 80 名 (男性 32 名、女性 48 名、胸腺腫合併 27 名、胸腺腫非合併 53 名、全身型 62 名、眼筋型 18 名、平均発症年齢 45.5 才)、病的対照 34 名 (MG 非合併胸腺腫 9 名、筋萎縮性側索硬化症 5 名、ランバート・イートン筋無力症候群 5 名、他の免疫性神経疾患 15 名)、正常対照 23 名を対象とした。

まず、ウサギ骨格筋から RyR を含む蛋白分画溶解液を抽出した。この溶解液を抗原とし、マウス由来抗 RyR モノクローナル抗体を用いた

sandwich ELISA 法により対象血清中の RyR 結合抗体を定量した。正常対象の平均 + 3 標準偏差を超えた検体を同抗体陽性と定義した。

次に本方法で得られた RyR 抗体価と MG 臨床像について解析した。また、RyR 抗体価とアセチルコリン受容体 (AChR) 抗体価の相関についても分析した。

研究結果

(1) MG 患者 31 名 (39%) から RyR 抗体が検出された。一方、病的対象あるいは正常対象では全て RyR 抗体が陰性であった。(特異度 100%, 表)

(2) 胸腺腫合併 MG では 21 名 (74.1%) が同抗体陽性で、胸腺腫非合併 MG 11 名 (20.8%) より有意に高かった。(p<0.01, 表)

(3) 60 才以上発症 MG 22 名中 14 名 (63.6%) が同抗体陽性で、陽性率は 59 才以下発症 MG 57 名中 16 名 (28.1%) より有意に高かった。(p<0.01)

(4) 同抗体陽性率は、女性 (23 名, 46.0%) が男性 (8 名, 26.7%) より、全身型 MG (27 名, 43.5%) が眼筋型 MG (4 名, 22.2%) より高い傾

¹⁾ 金沢大学保健管理センター

²⁾ 金沢大学大学院医科学系専攻
脳老化・神経病態学 (神経内科)

³⁾ 恵寿総合病院神経内科

向にあった。

(5) AChR 抗体陰性 MG 11 名 (MuSK 抗体陽性 MG 1 名を含む) は全て RyR 抗体は陰性であった。AChR 抗体価と RyR 抗体価には有意な相関が見られなかった。

考察

MG 病態には、AChR 抗体の神経筋接合部障害に加え、RyR 抗体の興奮収縮連関障害も関与する可能性がある。この RyR 抗体は胸腺腫合併例や重症例に多く検出され、抗体価は臨床像を反映するとされている。また、タクロリムスは興奮収縮連関への直接作用のため、RyR 抗体陽性 MG に対して治療効果が高いことが予測されており、本抗体は MG の病態把握、治療法選択等で、重要な意味を持つと期待される。

これまで、RyR 抗体の測定は合成蛋白やペプチドを抗原としてされてきており、今後、本法との相関についても検討を進める必要がある。本法は、生体蛋白への結合抗体を定量できる上、抗原入手が容易なため、日常診療に普及できる可能性を持っている。実際に本法で測定した抗体は従来法と同様に、胸腺腫合併 MG や高齢発症 MG で高率に見いだされた点も、信頼性を裏付けるものであると考えている。

結論

Sandwich ELISA 法による RyR 抗体測定系を考案した。実際に本法により MG 特異的に RyR 抗体を検出し、有用な測定法と考えられた。本法は、今後、患者のそれぞれの病態に合わせた治療に向けた重要なマーカーとなるものと期待される。

表 1. 抗 RyR 抗体陽性率

胸腺腫合併 MG (n=27)	74.1%
胸腺腫非合併 MG (n=53)	20.8%
対照 (n=57)	0.0%

文献

なし

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：検討中

実用新案登録：なし

重症筋無力症では筋興奮収縮連関は障害されているか？

分担研究者 桑原 聡¹⁾
共同研究者 中田美保¹⁾、根本有子¹⁾、三澤園子¹⁾、川口直樹¹⁾、森 雅裕¹⁾、
本村政勝²⁾、高守正治³⁾、服部孝道¹⁾

研究要旨

重症筋無力症において筋興奮収縮連関が障害されているかについて生理学的検討を行った。MG 患者 51 名、正常対照 39 名において正中神経手首部を電気刺激し、短母指外転筋の複合筋活動電位とともに母指先端に設置した加速度計により運動誘発波形を同時に記録し、両者の立ち上がり潜時の差を興奮収縮連関時間 (ECCT: E-C coupling time) と定義した。ECCT は正常群 (平均 2.56ms、標準誤差 0.1) と比べて MG 群 (平均 2.91ms、標準誤差 0.1) で有意に延長していた ($p=0.001$)。抗リアノジン受容体抗体陽性例 ($n=18$) および抗 MuSK 抗体陽性例 ($n=5$) では平均 ECCT がそれぞれ 3.03ms、3.14ms とこれらの抗体陰性の MG より延長していたが、有意差には至らなかった。また FK506 服用群 ($n=30$) で平均 ECCT は 2.77ms であり、非服用群の 3.11ms より有意に短縮していた ($p=0.03$)。これらの結果から MG において筋興奮収縮連関は障害されているものと思われた。この障害と特定の自己抗体の明らかな相関はみられなかった。FK506 は MG 患者において興奮収縮連関に促進的に作用していると思われこの薬剤の臨床効果の機序のひとつであることが支持された。

研究目的

重症筋無力症 (MG) において抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体価と臨床的重症度とは明らかな相関がないとされている。このことは、MG の臨床症状が抗 AChR 抗体による神経筋伝導障害以外の要素によっても規定されている可能性を示している。その候補として抗 AChR 抗体以外の自己抗体、興奮収縮連関の障害、二次的な筋の変化などの関与があげられる。

また我々は平成 15 年度の本研究班において seronegative MG では、同程度の臨床症状を有する seropositive MG と比較して単一筋線維筋電図 (SFEMG) における jitter 異常の程度が有意に軽度であることを報告した (Nemoto et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005)。明らかな筋力低下を示す筋において SFEMG に反映される電氣的シナプス伝達の異常がないとすると、興奮収縮連関の障害が臨床症状に関与している可能性はあるものと考えられる。筋興奮収縮連関はシナプス後膜での筋線維の脱分極による活動電位発生以後、T 管の脱分極、dihydropyridine

受容体、ryanodine 受容体を介した筋小胞体からのカルシウムイオンの放出を経て最終的には actin と myosin の滑走による筋収縮に至る過程である。これまでヒトにおける興奮収縮連関の *in vivo* 評価は行われていないが、最近我々は、複合筋活動電位 (CMAP) と加速度計を用いた運動誘発波形の潜時差から、筋活動電位発生から筋収縮開始までの interval を測定するシステムを開発した。この方法を用いて興奮収縮連関の一部を評価できるものと思われ、MG における変化、各種自己抗体 (抗 MuSK 抗体、抗 ryanodine 抗体) との関連、および免疫抑制作用とともに ryanodine 受容体を介した筋小胞体からのカルシウムイオンの放出促進作用を有するとされる FK506 による治療との関連について検討した。

研究方法

(1) 対象 : MG 患者 51 名 (平均年齢 54 歳、平均罹病期間 9 年) を対象とした。このうち、40 名で抗 AChR 抗体陽性、5 名で抗 MuSK 抗体陽性、18 名で抗 ryanodine 受容体抗体陽性であった。正常対照として健常人 39 名 (平均年齢 52 歳)、疾患対照としてニューロ

1) 千葉大学医学部神経内科
2) 千葉大学医学部第一内科
3) 金沢西病院脳神経センター