

も行なった。

(倫理面への配慮)

検査は患者の同意を得て行い、個人情報の取り扱いには十分留意して行った。

【結果】

甲状腺エコー検査で 162 例中 125 例に異常所見を認め、その内訳は結節性病変 72 例、のう胞性病変 74 例、び慢性病変 27 例、石灰化病変 28 例であった。

抗 AChR 抗体の陽性率、胸腺腫の有無、ステロイド剤の使用の有無と結節性病変の有無と頻度の差はなかった。悪性腫瘍が否定できない 29 例に対し吸引細胞診を行った。1 例を除く 28 例が Class II 以上であり、濾胞腺腫が 3 例、結節性病変のうち 6 例が乳頭癌を疑われた。6 例全例、エコー上石灰化の所見を有していた。

乳頭癌合併症例では、男女比 1:1 と母集団より男性の比率が高く、病型は全例、全身型 MG で抗 AChR 抗体も全例陽性、胸腺腫の合併が 6 例中 4 例と高率であった。

甲状腺腫瘍の長径は 4.6~32mm で 1 例が 20mm 以上、2 例が 10~20mm、3 例が 10mm 以下であったが、6 例全例 stage III 以上であった。MG を合併していない甲状腺乳頭癌 25 例のうち長径が 10mm 未満のものは 7 例であった。そのうち半数以上を占める 4 例は stage I にとどまっていた。

【考察】

MG 患者に対する甲状腺エコー検査では 162 例中 125 例の 77.2% に異常所見を認め、結節性病変やのう胞性病変が多かった。162 例中 6 例の 4.8% に乳頭癌が見つかり、検診での発見率や¹²⁾、「がん統計」による罹患率は高く見積もっても 1% に留まり、それに比べて明らかに高率であった。

10mm 以下の微小癌は経過観察で良いとされており、MG 非合併例では Stage I に止まるものが半数であったが、MG に合併した症例では悪性度が高く看過できないものばかりであった。

【結論】

MG に対する甲状腺エコー検査は有所見率が高く、また悪性腫瘍の合併も指摘しうるため、有用な検査である。

文献

1. 那須繁ら 日本人間ドック学会誌；
12(1)：60-64, 1997
2. 志村浩己ら 日本甲状腺学会雑誌
1(2)：109-113, 2010

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

抗アセチルコリン受容体抗体陽性の重症筋無力症患者に生まれた

新生児臍帯血アセチルコリン受容体抗体

研究分担者 藤井義敬

共同研究者 横田圭右、彦坂 雄、森山 悟、佐々木秀文、矢野智紀

研究要旨

重症筋無力症の母親から、約 10~20%の頻度で一過性新生児重症筋無力症が発症する。母体の抗アセチルコリン受容体抗体が胎盤を通じ胎児に移行することで一過性に筋無力症状が出現するが、特定の新生児に発症する機序は不明である。今回我々は、抗アセチルコリン受容体抗体陽性の重症筋無力症患者から出生した新生児の臍帯血抗アセチルコリン受容体抗体値を測定し検討した。6例の母親、7出産、8新生児で検討したところ、全例において新生児臍帯血抗体は検出され、抗体値は 1.7~180nmol/l、平均 34.9nmol/l であった。臍帯血抗体値は、出産前母体抗体値と正の相関を示し、全例で一過性新生児重症筋無力症の発症は認められなかった。また、すべての症例で出産前は母体抗体値は低下し、ほぼ全例で出産後は母体抗体値の上昇を認めた。

研究目的

重症筋無力症の母親から出生した新生児には、一過性新生児重症筋無力症が認められることがある。頻度は 10~20%と報告され、母親の抗アセチルコリン受容体抗体が胎盤を通じて胎児に移行するため、新生児期に一過性に筋無力症状が出現するとされている。

なぜある特定の新生児にのみ発症するのかは明らかではなく、また、新生児筋無力症状の程度は母親の筋無力症の重症度などとは関連がないとされている。

研究方法

{対象} 抗アセチルコリン受容体抗体陽性の重症筋無力症と診断され、当院にて治療を行っている患者で、2004年から2010年に当院にて出産を行った6症例を対象とした。1例は2007年に第1子、2009年に第2子を出産しており、また別の1例は双胎妊娠であった。

{方法} この6症例、7出産、8新生児において、出生時に新生児臍帯血の抗アセチルコリン受容体抗体値を測定し、新生児の筋無力症状や出産前の母体抗体値、出産前後での母体筋無力症状の変化とともに比較検討した。また、出産前後での母体抗アセチルコリン受容体抗体値の推移についても検討した。

名古屋市立大学大学院医学研究科
腫瘍・免疫外科

研究結果

対象とした6症例、7出産、8新生児において、出産時年齢は25～34歳(平均29.9歳)、出産前母体抗体値は7.4～160nmol/l(平均57.6nmol/l)、新生児臍帯血抗体値は1.7～180nmol/l(平均34.9nmol/l)、臍帯血抗体値/出産前母体抗体値比は0.11～1.125(平均0.40)であった。8新生児全例において筋無力症状は認められなかった。出産前に母体筋無力症状の増悪した症例はなかったが、1症例のみ、出産後に母親の筋無力症状の悪化を認め、出産3か月後にステロイドパルス療法を行った。

また全例において出産前の母体抗アセチルコリン受容体抗体値は低下し、出産後においては、出産後抗体値を測定していない1例を除く全例で抗体値の上昇を認めた。

考察

本研究において、測定した新生児臍帯血抗アセチルコリン受容体抗体値は全例において陽性で、抗体値は1.7～180nmol/l、平均34.9nmol/lであり、出産前母体抗体値とは相関係数0.900と正の相関を認めた。また、臍帯血抗体値/出産前母体抗体値比は多くの症例で0.11～0.29と低値を示した。

これまでの報告より、一過性新生児重症筋無力症は10～20%の頻度で発症するとされている。しかし、新生児臍帯血抗体値や出生前母体抗体値とその比率、母体重症筋無力症の重症度にかかわらず、今回検討した8新生児全例において、筋無力症状は認められなかった。

また、出産前後での母体抗アセチルコリン受容体抗体値の推移を検討すると、出産前は全例において抗体値は低下し、筋無力症状の悪化は1例も認められなかった。出産後はほとんどの症例で抗体値は上昇したが、これは、妊娠中母体の免疫が抑制された状態になるため、抗アセチルコリン受容体抗体値も妊娠中は低下したと考えられた。

結論

1. 新生児臍帯血抗アセチルコリン受容体抗体は全例において陽性であったが、一過性新生児重症筋無力症の発症は認められなかった。

2. 母体抗アセチルコリン受容体抗体値は、出産前は全例において低下し、出産後はほとんどの症例で上昇した。

文献

1. Ch. Licht, P. Model, A. Kribs, Transiente neonatale Myasthenia gravis
2. Jose F Tellez-Zenteno, et al. Myasthenia gravis and pregnancy: Clinical implications and neonatal outcome

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

小児重症筋無力症の長期予後に関する研究

研究協力者 野村芳子

共同研究者 八森 啓、長尾ゆり、木村一恵、瀬川昌也

研究要旨

小児 MG の長期予後につき、当クリニックを受診した 18 歳未満発症の MG 318 例の内 10 年以上経過をフォローした患者 85 例につき 臨床的特徴、治療の内容、予後について解析した。

小児 MG は早期の診断、適切な治療により多くの場合完全寛解となる。しかし、小児期にステロイド剤の治療が不十分であった例において、経過の長期化、あるいは成人後の再発例がある。また、他の自己免疫異常の合併にも注意を要する。

小児期発症の MG は長期フォローを要する例も少なくない。成人期まで継続した治療、フォローをすることが必須である。

近年 MG の診断、治療法には著しい進歩があるが、それらは必ずしも広く周知されているとは云い難い。早期の診断、適切な治療により最終 OUTCOME の改善と、寛解までの時間の短縮が期待できる。

研究目的

本邦における重症筋無力症 (MG) は小児期、特に 3 歳以下に発症の大きなピークを有することは 1973 年、1987 年、2006 年と 3 回行われた全国疫学調査で確認された。

我々はこの小児 MG は特定の HLA に規定されていることも示した。これは本邦小児 MG の発症は、素因の関与、また各発症年齢に特異的な免疫系の発達が背景にあることを示唆する。

小児 MG は早期の診断、適切な治療により多くの場合完全寛解となる。しかし、長期フォローを要する例も少なくない。

今回これら小児 MG の長期予後につき、自

験例の解析を行い検討した。また、後方視的に治療についても解析した。

研究方法

当クリニックを受診した 18 歳未満発症の MG、全例で 318 例の内 10 年以上経過をフォローした患者 85 例につき 臨床的特徴、治療の内容、予後につき解析した。

臨床型は純粋眼筋型 (O 型)、潜在性全身型 (LG 型)、全身型 (G 型) の 3 型に分けた。

また発症年齢は (A) 0 - 3 歳未満、(B) 3 - 6 歳未満、(C) 6 - 11 歳未満、(D) 11 - 15 歳未満、(E) 15 - 18 歳未満に分類した。

これらにつき診療内容につきカルテの内容から調べた。

瀬川小児神経学クリニック

(倫理面への配慮)

本研究は瀬川小児神経学クリニックの倫理規定を遵守して行った。患者本人、患者本人が未成年の場合は保護者に説明し、同意を得られた場合のみ研究を行った。個人の情報、プライバシーの保護に十分配慮した。

研究結果

1. 臨床型と発症年齢

対症全例の臨床型は、O型 13例 (A 8名、B 4名、C 1名)、LG型 49例 (A 25名、B 17名、C 4名、D 3名)、G型 23例 (A 14名、B 2名、C 4名、D 2名、E 1名)であった。

この臨床型別発症年齢の分布はこれまで述べてきた小児発症のMG全例の臨床型別発症年齢と同様の分布である。

2. 臨床型と治療

治療は、通常、抗コリンエステラーゼ剤(抗コ剤)で開始するが、LG型、G型では可及的早期にステロイド剤(ス剤)に移行する。ス剤に抵抗またはその副作用を生ずる症例では近年タクロリムス(タ剤)を使用する。G型では胸腺摘除手術(胸摘)を要する場合も少なく無い。

今回の長期フォロー例の臨床型と治療は、次の如くであった。

O型(13) : 抗コ剤 3, ス剤 10

LG型(49) : 抗コ剤 11, ス剤 38, タ剤 7

G型 (23) : 抗コ剤 0, ス剤 23, タ剤 3, 胸摘 6

3. 最終受診日の状態

最終受診日での状態を、①症状消失、②遺残症状あり、のいずれかで検討したところ、

O型 : ①10例, ②3例

LG型 : ①45例, ②4例

G型 : ①11例, ②12例
であった。

4. 経過中の再発の有無

再発はO型 13中4例(30.8%)、LG型 49例中21例(42.9%)、G型 23例中13例(56.5%)にみられた。

5. 他の自己免疫疾患の合併は、O型 13例中1例(7.7%)、LG型 49例中6例(12.2%)、G型 23例中4例(17.4%)であった。

これらは主に甲状腺機能亢進症、橋本病であったが、G型ではクローン病があった。

6. ステロイド剤の投与期間(月数)は、次の如くであった。

O型 : (A)118, (B)87.5, (C)46

LG型 : (A)54.3, (B)105.2, (C)115, (D)124.7

G型 : (A)99.4, (B)158.5, (C)107, (D)120.5, (E)96

又、それぞれの平均投与期間(月数)は、O型 103.2 ± 71.0 、LG型 76.9 ± 71.9 、G型 106.6 ± 98.6 であった。

7. 抗アセチルコリン受容体抗体

抗アセチルコリン受容体抗体値はO型で最も低く、LG、G型と高値を示す傾向であった。

LG型で軽度眼症状の再発を繰り返す例において10歳代後半から20歳頃に異常高値を示す例があった。

8. HLA抗原

本邦小児MGのHLA抗原はDR9/13, DQ6/9を持つことが知られているが、今回対象とした長期フォローした症例では他の抗原を持った症例が比較的多かった。

9. 平均通院期間

平均通院期間はO型 18.3年、LG型 21.2年、

G型 20.4年であった。

即ち、臨床型による差はなかった

考察

当クリニックにて 10 年間以上フォローをした小児発症 MG の長期予後の検討を行った。

臨床型別には、これまでも報告してきたが、O型、LG型、G型と重症化をみる傾向であった。長期フォロー例の臨床型が特に異なっていた。長期フォロー例の臨床型が特に異なっていた。

治療に関しては、多くの場合、適切な治療により安定することが多いが、小児期のス剤の治療が不十分であった例において、経過の長期化、成人後の再発例があった。

通院期間は LG 型と G 型ではほぼ同じであり、背景にある病態の重症度に差はあるが、その病態の持続経過は変わらず、成人期まで長期になることが示唆された。今回 O 型で比較的長期であったことは、O 型は概して軽症例が多く、当クリニックに来院する前の治療が必ずしもなされておらず、当クリニック来院後の

治療期間が長期を要した症例があったためといえる。

又、他の自己免疫疾患の合併にも注意を要する。

結論

近年 MG の診断、治療法には著しい進歩があるが、それらは必ずしも広く周知されているとは言い難い。

早期の診断、適切な治療により最終 OUTCOME の改善と、寛解までの時間の短縮が期待できる。

小児期発症の MG は成人期にまで継続した治療、フォローを要する例が少なくない。

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

重症筋無力症における胸腺摘除術周術期および術後治療の実態調査

研究分担者 松尾秀徳

共同研究者 永石彰子、松屋合敏、白石裕一、中根俊成、福留隆泰

研究要旨

重症筋無力症は自己免疫疾患であり、免疫調節療法の要否・選択は病因のメカニズムを考慮した中・長期的戦略に基づいて行われるべきであると考えられる。今回、われわれは日本神経学会および日本胸腺研究会所属の医師にアンケート調査を行い、抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体陽性の全身型重症筋無力症 (MG) の①胸腺腫非合併・若年発症群、②同・中年発症群、③同・高齢発症群、④胸腺腫合併群の4群に対する胸腺治療。胸腺治療周術期および術直後～3ヵ月の免疫調節治療につき各施設の治療方針の回答を得た。胸腺摘除術は①②群の 92.2-93.4%で、③群の 57.7%で選択され、そのうち鏡視下手術は 18.4-30.0%を占めていた。胸腺摘除術前治療では、経口ステロイドが全4群の 45.9-48.7%で第一選択の治療法とされる一方、「免疫調節療法を行わない」が 36.0-39.1%で選択された。術後治療では経口ステロイドが全4群の 70.1-72.8%で、「免疫調節療法を行わない」が 9.8-10.5%で選択されていた。現在、本邦で AChR 抗体陽性 MG に対し行われている胸腺治療前後の免疫調節療法は施設によって異なっており、標準的治療法を定めるには、各治療の中・長期的予後を追跡する必要がある。

研究目的

本邦で現在行われている、AChR 抗体陽性の全身型 MG に対する胸腺治療、同手術前および術直後～3ヵ月の免疫調節療法の実態を調査する。

対象・方法

2010年9月1日～2011年1月6日の期間に、日本神経学会 (633 施設) および日本胸腺研究会 (364 施設) 所属の医師に調査票を郵送し、医師の所属する医療機関における AChR 抗体陽性全身型 MG の治療方針の回答を得た。

胸腺腫非合併例を発症年齢に応じ①若年群 (発症年齢 10-39 歳)、②中年群 (同 40-69 歳)、③高齢群 (同 70 歳以上) に分け、④胸腺腫合

併群を含めた全4群に関し、それぞれ胸腺治療の有無および手術法、そして術前・術直後～3ヵ月の免疫調節治療について各施設の治療方針の第一選択、第二選択の回答を集計した。

治療方針は選択肢からの選択とした。すなわち胸腺治療については、「正中切開による拡大胸腺摘除術」、「鏡視下手術」、「治療しない」、免疫調節療法については、「高用量 (≥ 1mg/kg/日) プレドニゾロン (PSL)」、「中用量 (10-40mg/日) PSL」、「低用量 (≤ 10mg/日) PSL」、「ステロイドパルス療法」、「免疫抑制剤」、「大量ガンマグロブリン療法 (IVIG)」、「血漿交換療法」、「一定の方針なし」、「治療しない」の中から選択とし、治療方針が各治療法の組み合わせである場合はその組み合わ

国立病院機構長崎川棚医療センター

せを回答する形をとった。免疫抑制剤は「シクロスポリン」、「タクロリムス」、「アザチオプリン」、「その他」、血漿交換療法は「単純血漿交換」、「免疫吸着法」、「二重膜濾過法」から、それぞれ種類について回答を得た。

(倫理面への配慮)

本研究は国立病院機構長崎川棚医療センターの倫理委員会の承認を得て実施した。

研究結果

胸腺摘除術は①②群の 92.2-93.4%で、③群の 57.7%で選択され、そのうち鏡視下手術は 18.4-30.0%を占めていた。④群では正中切開による拡大胸腺摘除術が 82.9%で選択される一方、鏡視下手術を第一選択とする回答が 9.3%に上った。

胸腺摘除術前の免疫調節療法の第一選択では、経口ステロイドが全群の 45.9-48.7%で第一選択の治療法とされる一方、「治療しない」が 36.0-39.1%で選択され、一定の方針なし」は全群で 9.7-10.5%を占めた。経口ステロイドの内訳では、全群で高用量 PSL が 16.7-21.1%、中用量が 22.4-26.2%、低用量は①②で 2.1-2.6%、③④で 4.9-5.0%にのぼった。免疫抑制剤および IVIG を単独で選択するという回答はなかった。胸腺摘除前治療の第二選択では経口ステロイドが全 4 群の 49.7-56.0%で選択され、高用量 PSL は 10.6-13.9%、中用量 PSL は 25.0-29.2%、低用量 PSL は 11.1-15.4%を占めた。主に経口ステロイドあるいは免疫抑制剤を含む各治療の組み合わせは 12.2-14.5%で選択された。

胸腺摘除術直後～3ヵ月後の免疫調節療法の第一選択では、経口ステロイドが全群の 70.1-72.8%、「治療しない」が 9.8-10.5%で選択された。高用量 PSL は①②④の 32.1-33.1%

で選択され、高齢発症の③においても 27.1%にのぼった。中用量 PSL および低用量 PSL はそれぞれ 31.7-35.7%、5.3-7.2%で選択された。免疫抑制剤の単独使用は全群の 0.9-2.6%にとどまった。各治療の組み合わせは 3.9-6.9%で選択された。術後治療の第二選択では、免疫抑制剤の単独使用が全群で 21.1-23.6%を占めた。

免疫抑制剤はタクロリムスが、血漿交換療法は免疫吸着がそれぞれ多数を占めた。

所属学会別では、術前・後とも、胸腺研究会所属の医師では「治療をしない」の選択が多く、ステロイドの選択頻度および用量もそれぞれ小さい傾向にあった。

考察・結論

本邦で行われている AChR 抗体陽性 MG に対する胸腺治療および術前後の免疫調節治療は施設により異なり、標準的治療が確立されているとは言いがたい。標準的治療を定めるには各治療法の中・長期的予後を比較する必要がある。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

重症筋無力症の胸腺組織型・経過と関連する免疫マーカーの検討

研究協力者 小野寺宏 1)

研究要旨

MG 胸腺における免疫変調にはリンパ球の局在化や活性化の異常が関与していると考えられる。過形成胸腺の病態解析には胸腺上皮細胞とリンパ球との相互作用に関連する遺伝子の検討が有用である。そこでこれらの遺伝子に注目して正常胸腺と過形成胸腺における mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにて比較した。上皮・血管系と免疫細胞との相互作用に関連する遺伝子に注目して検討したところ、laminin サブユニット遺伝子や metalloproteinase ファミリー遺伝子の発現が過形成胸腺において著明に増加していた。胸腺上皮細胞の変調が MG 病態に密接に関係していると考えられた。

研究目的

重症筋無力症(MG)は胸腺異常を高率に合併し、なかでも過形成胸腺では胚中心が観察されるなど胸腺が異常免疫応答の場となっている。MG 胸腺における免疫変調にはリンパ球の局在化や活性化の異常が関与していると考えられ、B helper T 細胞(T_{FH})と B 細胞のリンパ組織 B 領域局在化を制御するケモカインシグナルの変化、スフィンゴ脂質シグナルの変調等が観察される。過形成胸腺の病態解析には胸腺上皮細胞とリンパ球との相互作用に関連する遺伝子の検討が有用である。そこでこれらの遺伝子に注目して正常胸腺と過形成胸腺における mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにて比較した。

研究方法

健常者と MG 患者(抗 acetylcholine 受容体抗体陽性の過形成胸腺症例)の胸腺各々 4 サンプルについてマイクロアレイにて解析し、GAPDH との発現比をもって群間比較した。今回は、正常胸腺に比べて過形成胸腺群において 3 倍以上の mRNA 発現レベル上昇を認めた遺伝子について検討した。

研究結果

MG 過形成胸腺はリンパ組織に富むため、年齢をマッチさせた対照胸腺を用いた場合には脂肪組織由来のノイズのために解析が極めて困難になると予想される。そこで今回は循環器疾患手術の際に術野を妨げるため除去された胸腺(未成年)のうち脂肪組織の少ない部分を切り出して対照胸腺とした。CD4 および CD8 の mRNA 発現は正常胸腺/過形成胸腺比がほぼ 1 であり、胸腺組織における mRNA

1)西多賀病院神経内科, JST-CREST

発現レベルの比較上問題の無いマイクロアレイデータと考えた。なお B cell マーカーの CD20 発現比は約 3 であり，過形成 MG 胸腺での germinal center 形成を反映していると思われる。

細胞接着や血管関連分子に注目して解析したところ，過形成胸腺では laminin サブユニット ($\alpha 2,4 \beta 3$ 等) や metalloproteinase ファミリーに属する多くの遺伝子の発現が増加していた。metalloproteinase 19 や epithelial membrane protein1(EMP1)の発現レベルは対照胸腺比 10 倍以上に達していた。VEGF, c-met, ICAM1 など血管新生に関連する増殖因子や接着分子の発現レベルも上昇していた。tissue plasminogen activator は全症例において著明に発現が増加していた。

考察

これまで，過形成胸腺の病態はおもにリンパ球の機能異常の面から検討されてきたが，MG 胸腺リンパ球の機能異常には胸腺上皮細胞の機能変化が大きな役割を果たしているはずである。胸腺髄質に局在するラミニンアイソフォームの発現増

加は，胸腺リンパ球の胸腺上皮細胞への接着性亢進（免疫応答の亢進？）によるアセチルコリン受容体への反応性変化に関連しているかもしれない。胸腺上皮系細胞は単一ではなく，今後はどの細胞がマイクロアレイ解析でピックアップされた遺伝子を発現しているかについて検討していく必要がある。

結論

正常胸腺と過形成胸腺における mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにて比較した。上皮・血管系と免疫細胞との相互作用に関連する遺伝子に注目して検討したところ，laminin サブユニット遺伝子や metalloproteinase ファミリー遺伝子の発現が過形成胸腺において著明に増加していた。

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

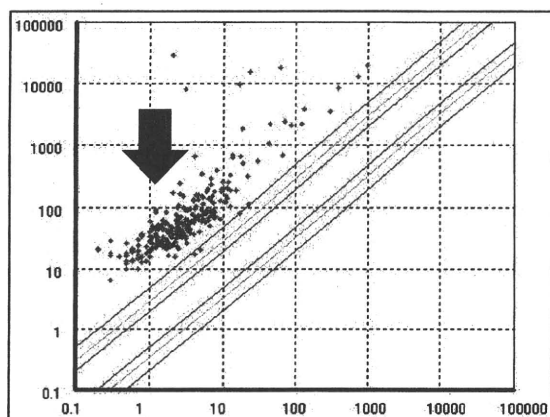


図 縦軸は過形成MG胸腺，横軸は正常胸腺での遺伝子発現。本研究では過形成MG胸腺において3倍以上発現が増加している遺伝子について検討した（矢印）。

胸腺腫および胸腺癌における Kras 変異

研究分担者 藤井義敬

共同研究者 佐々木秀文、横田圭右、彦坂 雄、森山 悟、矢野智紀

研究要旨

我々は肺癌における EGFR キナーゼドメインにおける遺伝子変異を同定し、EGFR を分子標的とする gefitinib 感受性と相関することを報告してきた。また簡便迅速な real time PCR の系を用いて肺癌における EGFR 遺伝子変異やコピー数の増加、Kras 遺伝子変異の同定を試みてきたが、今回は胸腺上皮性腫瘍において Kras 遺伝子変異やコピー数の変化を検索した。Kras 遺伝子変異は胸腺腫では認めなかったが、胸腺癌 18 例中 1 例(IVb 期例)で認めた。Kras コピー数の増加は IVb 期胸腺癌および、進行胸腺腫症例 1 例ずつで認めた。進行胸腺腫瘍において、Kras 遺伝子異常が見られることが示唆されたが、その頻度は低いと思われる。

研究目的

重症筋無力症は胸腺に胚中心や胸腺腫といった異常が見られ、その発症と胸腺、胸腺腫との関わりを示唆される。特に胸腺腫は抗アセチルコリン抗体以外にも多くの自己抗体産生と関わっている。胸腺腫における遺伝子異常の解明は重症筋無力症との関わりを解明する上でも重要である。

胸腺腫においては確立された細胞株もないため、胸腺上皮性腫瘍における遺伝子異常の検索に関する報告は多くなく、Kras 遺伝子異常の報告も、欧米からはなされているが、(Girard ら、Clin Cancer Res 2009)、それによると胸腺腫 38 例中 1 例、胸腺癌 7 例中 1 例に Kras 遺伝子変異を認めたとのことである。また肺癌における Kras 遺伝子異常は欧米で多く、日本人には少ないという人種差も認めることが知られている。

研究方法

今回我々は、胸腺腫および胸腺癌患者における Kras 遺伝子変異について LightCycler を用いた genotyping assay により検討を行った。EGFR 遺伝子の kinase domain 変異に関する検討は過去に当教室の鈴木らが報告しているが、さらに検討を加えた。Kras 遺伝子変異は、当院で手術を施行された胸腺腫 107 例、胸腺癌 18 症例について、Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) を用いて genomic DNA 抽出後、LightCycler を用いた genotyping を施行しコドン 12、13 の変異検索を行った。大部分のサンプルで同様に EGFR 遺伝子変異(エクソン 19 の欠失、エクソン 21 の点変異)の有無を LightCycler を用いて確認した。変異陽性サンプルといくつかの陰性サンプルはダイレクトシーケンスを行って確認した。Kras 遺伝子検索に用いたプライマーは (codon12/13) : forward, 5-GGCCTGCTGAA

AATGACT-3、 reverse, 5-GAATGGTCCTG CACCAGTA-3 であり、genotyping のための senso プローブは (LC Red 640-GCCTA CGCCACCAGC-Phosphate) anchor プローブ (CCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTCT-Fluorescein) を用いた。また real-time PCR 反応の条件は: 1 cycle 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 10 s; 60°C for 10 s; 72°C for 7 s である。Kras の遺伝子コピー数の変化については教室の遠藤らが報告した Applied Biosystem の 7500 real time PCR system を用いて、QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) により一部症例で検討した。

研究結果

胸腺腫症例は、Stage I ; 40 例、Stage II ; 29 例、Stage III ; 20 例、Stage IV ; 18 例であった。胸腺癌症例は、Stage I ; 2 例、Stage II ; 2 例、Stage III ; 7 例、Stage IV ; 7 例であった。男性 15 例、女性 3 例、扁平上皮癌 16 例、腺癌 2 例であった。

Kras 遺伝子変異は胸腺癌 18 例中 1 例に認められた。肺転移を伴う IVb 期胸腺癌症例(非喫煙者、女性、腺癌)でエクソン 1 の 35 番目の塩基が G から T に変化する変異によりグリシンがバリンに変化する (G12V) 変異型であった。胸腺腫症例では Kras 遺伝子変異を認めなかった。105 例の胸腺腫および 11 例の胸腺癌症例で EGFR 遺伝子変異を検索したが、変異は認めなかった。Kras コピー数の変化は胸腺癌 13 例および進行胸腺腫 19 例で検討を行ったが、それぞれに 1 例ずつコピー数の増加例 (> 3) を認めた。IVb 期胸腺癌の Kras コピー数増加症例は、手術後 2 ヶ月で腫瘍死

した。

考察

進行した胸腺癌は aggressive disease として知られている。しかしながら現在、胸腺癌の再発例などに確立された治療方法がなく、prospective な trial もほとんどなされていない。また EGFR キナーゼインヒビターの胸腺上皮性腫瘍に対する効果もほとんどないという報告もなされてきている。我々の Kras および EGFR 遺伝子変異に関する検討データはこれらの報告を支持している。すなわち、Kras 遺伝子変異は抗 EGFR 治療(肺癌における gefitinib や erlotinib、大腸癌における cetuximab) に対する抵抗性予測因子として知られている。これらの知見は、今後の胸腺癌に対する治療方法の選択などに示唆を与えものと考えられる。

結論

進行胸腺腫瘍において、Kras 遺伝子異常が見られることが示唆されたが、その頻度は低いと思われる。

文献

1. Girard N, Shen R, Gue T, et al. Comprehensive genomic analysis reveals clinically relevant molecular distinctions between thymic carcinomas and thymomas. Clin Cancer Res 2009; 15: 6790-6798.
2. Sasaki H, Okuda K, Kawano O, et al. Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler. Oncol Rep 2007; 18: 623-628.

3. Sasaki H, Endo K, Konishi A, et al. EGFR mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler. Clin Cancer Res 2005; 11: 2924-2928.

4. Endo K, Sasaki H, Yano M, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor gene mutation and copy number in non-small cell lung cancer with gefitinib

therapy. Oncol Rep 2006; 16: 533-541.

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

重症筋無力症患者胸腺におけるハッサル小体の役割

分担研究者 梶 龍児¹⁾

共同研究者 松井尚子¹⁾、宮城愛¹⁾、野村芳子²⁾、近藤和也³⁾、
大東いずみ⁴⁾、高浜洋介⁴⁾

研究要旨

重症筋無力症 (Myasthenia Gravis, MG) はアセチルコリン受容体を対応抗原とする自己免疫疾患であるが、発症に関与するとされる胸腺との関わりについては未だ明らかにされていない。そこで MG 患者胸腺において自己寛容がいかんして破綻するのか、ハッサル小体に着眼した。MG のない患者胸腺と MG 患者胸腺を用いて組織解析したところ、MG の過形成胸腺においてハッサル小体の数が増加し、かつその形態は巨大化していた。

これまでの先行研究では過形成胸腺では、高内皮細静脈やリンパ管などで CCL21 が過剰発現し、B 細胞や T 細胞の誘導に関与していると推定されているが、不確定な部分もある。今回我々の見出した巨大ハッサルは過形成のメカニズムに何らか関与している可能性がある。

研究目的

これまで、“重症筋無力症 (Myasthenia Gravis, MG) 患者の胸腺内では、何らかの理由により、自己のアセチルコリン受容体様構造に反応する T 細胞の排除や制御の確立に問題がある”との説が提唱されているが、その病態は十分に解明されていない。

ハッサル小体はヒトの胸腺髄質において、胸腺上皮細胞が同心円状に配列した構造物で、古くからその存在が報告されているものの、その役割については知られていない。近年、ハッサル小体に発現している thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が CD11c+ 樹状細胞を活性化して、CD4+CD25-T 細胞を CD4+CD25+Foxp3+

制御性 T 細胞へ分化誘導する働きをもつことが報告された。また *in vitro* で TSLP が B 細胞を誘導することが報告されている。

そこで我々はヒト胸腺において、ハッサル小体が MG の病態にどのように関与しているか検討を行った。

-
- 1) 徳島大学神経内科
 - 2) 瀬川小児神経学クリニック
 - 3) 徳島大学呼吸器外科
 - 4) 徳島大学疾患ゲノム研究センター遺伝子実験施設

研究方法

対象: 当施設および他施設にて胸腺摘出術を施行された 50 例

<MG 非合併 23 例>

- (1) 小児胸腺 8 例 (平均年齢 1 歳)
- (2) 成人正常胸腺 7 例 (平均年齢 55 歳)
- (3) 成人胸腺腫 8 例 (平均年齢 50 歳)

<MG 合併 27 例>

- (4) 正常胸腺 11 例 (平均年齢 45 歳)
- (5) 過形成 7 例 (平均年齢 31 歳)
- (6) 胸腺腫 9 例 (平均年齢 52 歳)

(3) と (6) については、非腫瘍部分を解析した。

方法：これらの胸腺から得た凍結組織切片について、HE 染色を行い、ハッサル小体の大きさと数を計測し画像的に定量化を行った。次に免疫染色 (TSLP/Foxp3、CD19/CD38) の後、共焦点レーザー顕微鏡にて多重蛍光解析を行った。また胸腺組織を用いて、リアルタイム PCR を行った。TSLP やリンパ球の誘導に関係するサイトカイン (CCL19、CCL21) の発現量を確認し、GAPDH にて補正ののち、各グループ間で比較検討を行った。

研究結果

- 1) ヒト胸腺の髄質内のハッサル小体は新生児では多くみられるが、年齢とともに減少する傾向にあった。過形成胸腺では他のグループと比べ、有意にハッサル小体が大きかった。
- 2) ハッサル小体の胸腺上皮細胞に一致して TSLP の発現を認めた。
- 3) 過形成胸腺において CCL21 の発現が増加していた。
- 4) TSLP は新生児胸腺で発現が最も低いが、各グループ間での差異は認められ

なかった。

考察

過形成胸腺ではハッサル小体が巨大化しており、胚中心の形成に何らかの役割を果たしている可能性がある。また TSLP は過形成胸腺では B 細胞の誘導に関与していない可能性がある。

結論

過形成胸腺ではハッサル小体が巨大化しており、その数も増加していた。

文献

- 1) Berrih-Aknin S, et al. CCL21 overexpressed on lymphatic vessels drives thymic hyperplasia in myasthenia. *Ann Neurol* 2009 (66):521-531.
- 2) Watanabe N, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005 (436):1181-1185.
- 3) Ziegler SF, et al. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol* 2010 (11):289-293.

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

重症筋無力症における小胞体ストレス蛋白 GRP94 に対する自己免疫

協力班員：鈴木則宏¹⁾

共同研究者：鈴木重明¹⁾、檜沢公明²⁾、長根百合子²⁾、岩佐和夫³⁾、吉川弘明⁴⁾

研究要旨

我々は³⁵S-methionine でラベルした RD の細胞抽出液を用いた免疫沈降法を開発し、重症筋無力症(MG)患者血清中の抗 Kv1.4 抗体の測定とその臨床的意義について検討してきた。本法のもう1つの特徴は未知の抗原蛋白をスクリーニングする事が可能な点である。免疫沈降法により MG 患者 336 例中、90-kDa に相当する自己抗原を 24 例 (7.1%) に認めたが、疾患コントロールや健常人 76 例では検出されなかった ($p = 0.01$)。MALDI-TOF 法による質量分析から 90-kDa 自己抗原は小胞体ストレス蛋白 GRP94 と同定され、本抗体陽性群では 71% の症例で自己免疫疾患合併を認めた。

研究目的

MG の臨床像は発症年齢、病型、胸腺異常、自己抗体などの点において多様である¹⁾。さらに MG 患者の約 13% に自己免疫疾患の合併が報告されている。特に胸腺腫関連 MG では、神経、血液、皮膚疾患など多彩な自己免疫疾患が随伴することが報告されている²⁾。しかし、MG においてこれらの自己免疫疾患が発症する免疫学的な機序は不明である。本研究では MG 患者血清における新規自己抗体をスクリーニングする目的で、RD (横紋筋肉腫) 細胞抽出液を抗原とした免疫沈降法を行った。90-kDa の抗原蛋白の解析をおこなった結果、新規自己抗原として小胞体ストレス蛋白 GRP94 を同定した。抗 GRP94 抗体の臨床的特徴について検討をおこなった。

慶應義塾大学神経内科
総合花巻病院神経内科
金沢大学神経内科
金沢大学保健管理センター

研究方法

対象は慶應病院ならびに花巻総合病院を受診した 336 例 (M:F = 118:218) の MG 患者血清。臨床分類は MGFA 分類に従った。胸腺腫関連 MG は 71 例。抗 AChR 抗体陽性例が 226 例、抗 MuSK 抗体は 3 例であった。抗 titin 抗体は ELISA により測定した。電位依存性カルウムチャンネルの α サブユニットの1つである Kv1.4 に対する自己抗体と新規自己抗体のスクリーニングは、³⁵S-methionine でラベルした RD の細胞抽出液を用いた免疫沈降法を用いて行った³⁾。

目標とする自己抗原は MG 患者血清を用いて RD 抽出液より affinity-purification の方法で精製し、MALDI-TOF 法による質量分析を行った。

(倫理面での配慮)

自己抗体測定に関する研究は両施設の倫理委員会で承認され、検体保存や患者情報の管理には十分な注意を払っている。

研究結果

免疫沈降法により MG 患者 336 例中、90-kDa に相当する自己抗原を 24 例 (7.1%) に認めたが、疾患コントロールや健常人 76 例では検出されなかった ($p = 0.01$)。90-kDa 抗原を MALDI-TOF 法で質量分析を行った結果、小胞体ストレス蛋白 GRP94 に高い相同性を認めた。90-kDa 蛋白が GRP94 であることを証明するため、市販の polyclonal anti-GRP94 antibody を用いた immunoblots、RD 細胞を用いた indirect immunofluorescence、GRP リコンビナント蛋白を用いた ELISA 法を施行した。

抗 GRP94 抗体の有無による臨床像を比較した結果、性差、MG の発症年齢、病型については両群で差はなかった。抗 GRP94 抗体陽性群では陰性群に比べ、胸腺腫、抗 titin 抗体、抗 Kv1.4 抗体の頻度が高かった。また注目すべき点として、抗 GRP94 抗体陽性群では陰性群に比べ他の自己免疫疾患合併の頻度が極めて高かった (71% vs 11%, $p < 0.001$)。抗 GRP94 抗体陽性 MG で自己免疫疾患を合併した 17 例の臨床像は多彩であった。

最後に MG の筋肉における GRP94 の発現を免疫組織化学⁴⁾で検討した結果、5 例中 4 例において GRP94 が筋細胞膜を中心に発現するのを確認した。

考察・結論

MG 患者血清には小胞体ストレス蛋白 GRP94 に対する自己抗体が存在し、他の自己免疫疾患と共通の免疫学的な機序である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* 2009;8:475-490.
- 2) Evoli A, Minicuci GM, Vitaliani R, et al. Paraneoplastic diseases associated with thymoma. *J Neurol* 2007;254:756-762.
- 3) Suzuki S, Satoh T, Yasuoka H, et al. Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2005;170:141-149.
- 4) Iwasa K, Kato-Motozaki Y, Furukawa Y, et al. Up-regulation of MHC class I and class II in the skeletal muscles of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2010;225:171-174.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

重症筋無力症骨格筋における小胞体ストレスとミトコンドリア

研究分担者 吉川弘明¹⁾

共同研究者 岩佐和夫²⁾、石田千穂³⁾、本崎裕子³⁾、丸田高広⁴⁾、
古川 裕³⁾、山田正仁²⁾

研究要旨

重症筋無力症(MG)では、神経筋接合部の障害に加え骨格筋にも病態に係わる変化が生じている可能性があると考え我々は研究を進めてきた。昨年度は、MGの骨格筋において小胞体ストレス蛋白の一つであるGRP78 (glucose - regulated protein78) 蛋白が過剰発現していることを報告し、MG骨格筋において小胞体ストレス反応があることを示した。近年、細胞内オルガネラである小胞体とミトコンドリアはお互いに影響し合っていることが明らかにされ、特に小胞体からのCa²⁺の過剰な供与がミトコンドリアの機能や形態変化に関与することが報告された。MGの骨格筋ではミトコンドリアの異常あることが既に報告されている。今回我々は、MG骨格筋におけるミトコンドリア異常と小胞体ストレスとの関連について明らかにするため、ミトコンドリアと小胞体ストレス蛋白であるGRP78蛋白の発現との関連について調べた。その結果、MG骨格筋ではミトコンドリアの状態に変化が認められ、ミトコンドリアの変化を認める筋線維ではGRP78蛋白の発現が亢進していることが確認された。この結果は、MG骨格筋において認めるミトコンドリアの形態異常は、小胞体ストレスにより誘導された可能性を示唆するものであった。

研究目的

重症筋無力症(MG)骨格筋においてはミトコンドリアの集簇などの異常があることが知られている。ミトコンドリアは、小胞体ストレスなどの細胞内環境の変化に応じて反応し、アポトーシスにも関与している。この研究では、MGの骨格筋におけるミトコンドリアの状態を確認するとともに、ミトコンドリアと小胞体ストレス蛋白であるGRP78/BiP蛋白の発現との関連について調べた。

研究方法

MG7例(胸腺腫合併3例、胸腺腫非合併4例)、非筋疾患症例2例より採取した生検筋を

用いて検討を行った。MGでは、胸腺または胸腺腫摘除術の際に大胸筋より生検を行った。非筋疾患症例は診断のために行った筋生検(上腕二頭筋、大腿四頭筋)を用いた。

標本は、液体窒素加冷下のイソペンタンで急速凍結し、-80℃にて保存を行った。厚さ6 μmの切片を作成後、各種染色(Gomori トリクローム法、SDH染色、COX染色)に加え、抗ミトコンドリア抗体および抗GRP78抗体による免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

各症例の筋生検は、同意を得た上でを行った。

研究結果

A) Gomori トリクローム法、SDH染色、COX染色による検討

1. MGでは、一部の筋線維でGomori トリクローム法での濃染が認められ、SDH染色では他

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) 国立病院機構医王病院 神経内科
4) 金沢西病院 神経内科

の筋線維と比して濃染し内部構造の乱れも疑われた。これらの筋線維のCOX染色では、顆粒状に濃染される状態となっていた。

Gomori トリクローム法で異常を認めない筋線維でも、COX染色で顆粒を形成するものを認めた。

2. 非筋疾患症例ではミトコンドリアの異常を示唆する所見は見られず、COX染色はタイプ1線維での濃染を認めた。

B) 抗GRP78抗体および抗ミトコンドリア抗体による免疫二重染色による検討

1. MGでは、一部の筋線維が抗GRP78抗体で染色されており、これらの筋線維における抗ミトコンドリア抗体の染色では、線維状もしくは集塊を形成していた。
2. 非筋疾患症例では抗GRP78抗体では濃染する線維を認めず、抗ミトコンドリア抗体では、僅かに染色された。

考察

MGの骨格筋では、非特異的ではあるがミトコンドリアの形態に異常を来している可能性が示唆された。さらに、ミトコンドリアの形態異常には、小胞体ストレスが関与している可能性が示された。

ミトコンドリアは、直接的なストレス以外に、小胞体からのCa²⁺の過剰な供与をうけ、細胞をアポトーシスに誘導することが報告されている^{5),6)}。さらに、これらの刺激によりミトコンドリアは形態異常を呈したり、細胞内Ca²⁺の調整を行うこともわかっている⁴⁾。

今回、MGにて示唆されたミトコンドリアの形態異常は、小胞体ストレスにより小胞体からの過剰なCa²⁺の細胞内への供給があり、これによりミトコンドリアの形態が変化した可能性が考えられた。

今後、不十分な点についてさらに検討する必要があるが、MGの骨格筋障害を考える際に小胞体やミトコンドリアなどの関与した細胞内反応を考慮する必要があると考えられた。

結論

1. MGの筋線維の一部では非特異的ではあるが形態異常を呈したミトコンドリアが存在すると考えられた。
2. GRP78/BiP蛋白の発現亢進とミトコンドリア形態異常との関連が推定された。

文献

1. Marchiori PE et. al. Mitochondrial dysfunction in myasthenia gravis. Report of a case. *Arq Neuropsiquiatr.* 1989;47:355-358
2. Shichijo K et.al. Involvement of mitochondria in myasthenia gravis complicated with dermatomyositis and rheumatoid arthritis: a case report. *Acta Neuropathol.* 2005;109:539-542
3. Martignago S et.al. Muscle histopathology in myasthenia gravis with antibodies against MuSK and AChR. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2009;35:103-110
4. Giorgi C et. al. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:1817-1827
5. Heath-Engel HM et.al. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 2008;27:6419-6433
6. Wasilewski M et.al. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Cell* 2009;20:287-294

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 GQ1b 抗体の反応特異性と臨床徴候の関連についての検討

研究協力者 近畿大学神経内科 楠 進

共同研究者 近畿大学神経内科 鈴木聖子、桑原基、上田昌美

研究要旨

抗 GQ1b 抗体陽性の Miller Fisher 症候群(MFS)、Guillain-Barré 症候群(GBS)、Bickerstaff 型脳幹脳炎(BBE)において、同じ GQ1b を標的とする抗体が上昇しながらも多様な病型をとる原因が、抗体の微細な反応性の違いにある可能性を検討するため、GQ1b、GT1a、GQ1b+PA(GQ1b とフォスファチジン酸の混合抗原)に対する血中 IgG 抗体の反応特異性と臨床病型との関連を調べた。その結果、GBS では MFS や BBE と比べて GQ1b より GT1a に強く反応する抗体がみられることが多かった。BBE における抗 GQ1b 抗体は、抗原への PA の添加により反応が増強しない例が多かった。また抗 GT1a 抗体と球症状との関与が確認された。さらに外眼筋麻痺および運動失調の有無と、GQ1b+PA に対する抗体価が関連することがわかった。抗 GQ1b 抗体の反応特異性の違いが、臨床症状の多様性に関連するひとつの因子であることが示唆された。

研究目的

Miller Fisher 症候群 (MFS) における抗 GQ1b IgG 抗体の陽性率は 90%以上と高い。一方、Bickerstaff 型脳幹脳炎 (BBE)、眼球運動障害を伴う Guillain-Barré 症候群(GBS) などでも同抗体が高頻度に検出される。抗 GQ1b 抗体陽性血清では、糖鎖末端構造が同じである GT1a にも抗体活性がみられることが多く、それぞれの相対的な反応の強さは症例により異なる。また GQ1b 単独よりも、フォスファチジン酸(PA)の共存下で GQ1b に強く反応する抗体もある。同じ GQ1b を標的とする抗体が上昇しながらも、多様な病型をとる原因が、抗体の微細な反応性の違いにある可能性を検討した。

研究方法

<対象>

2006 年 10 月から 2009 年 7 月までに近畿大学神経内科に検査依頼のあった全ての抗 GQ1b IgG 抗体陽性例 347 例(MFS(n=197)、BBE(n=20)、GBS(n=78)、その他 (n=52))

<方法>

MFS、BBE、GBS の 3 群間で、また臨床症状 (①意識障害、②球麻痺、③外眼筋麻痺、④筋力低下、⑤運動失調) が有る群 (+) と無い群 (-) とで、以下の項目を比較した。

a) GQ1b と GT1a に対する相対的な抗体活性の強さ

b) GQ1b と GQ1b+PA に対する相対的な抗体活性の強さ

c) GQ1b、GT1a、GQ1b+PA に対する抗体価

<診断基準>

MFS…急性の外眼筋麻痺、運動失調、深部腱反射低下～消失の 3 徴を満たし、筋力低下が目立たないもの