

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
神経免疫疾患のエビデンスに基づく診断基準・重症度分類・ガイドラインの妥当性と患者 QOL の検証
分担研究報告書

（課題名）アミノ酸固定化カラムと神経筋接合部に対する病原性自己抗体

研究分担者 本村 政勝¹ ¹長崎総合科学大学工学部工学科医療工学コース教授
共同研究者 赤石 哲也^{2,3}、池 浩司¹、清水 悦郎¹、吉村 俊祐⁴、辻野 彰⁴、
石井 正²、青木 正志³、松尾 秀徳⁵

²東北大学病院 総合診療科、³東北大学大学院 神経内科、⁴長崎大学病院脳神経内科、

⁵国立病院機構長崎病院脳神経内科

研究要旨

20種類のアミノ酸をアガロース担体カラムに固定化し、健常者の血清を用いて、アフィニティークロマトグラフィー法でIgの吸着・溶出実験を行った。その結果、IgG吸着率の平均（n=3）は、高い順に、Protein Gカラム93.6%、Protein Aカラム84.6%、Trpカラム61.3%、Aspカラム16.0%、Pheカラム15.3%、Valカラム11.0%、Thrカラム10.8%、残りのアミノ酸カラムは10%以下であった。対応のある分散分析とANOVA後の事後検定で、Trpカラムと他のアミノ酸カラムとのペアの多くで $p < 0.0001$ の統計的有意性が示された。以上より、Trp固定化カラムの吸着機序は、免疫グロブリンの吸着によることが強く示唆された。

A. 研究目的

我々は、アミノ酸を固定化したアガロース担体カラムを作成し、アミノ酸固定化カラムがどのような機序で免疫グロブリン（Ig）を吸着するかを解明する。今日、20種類のアミノ酸のなかでL-トリプトファン（Trp）固定化カラムである選択的血漿成分吸着器イムソーバ TR350 が、重症筋無力症（MG）（Shibuya et al, 1994）、ギラン・バレー症候群（Haupt et al, 2000）、多発性硬化症（Koziolek et al, 2013）、および、視神経脊髄炎（Faissner et al, 2016）患者の免疫吸着療法に臨床応用されている（Hirano R and Hirata N, 2017）。その作用機序は、Trp が有する疎水性がアセチルコリン受容体（AChR）抗体を選択的に吸着すると報告された（Sato et al, 1983）。しかしながら、in vitro でそれぞれの自己抗体がどのような機序で Trp カラムに吸着・除去されるかの報告は無い。本年度は、20種類のアミノ酸をアガロース担体カラムに固定化し、健常者の血清を用いて、アフィニティークロマトグラフィー法で Ig の吸着・溶出実験を行った。

B. 研究方法

以下に研究方法を簡潔に説明する。

1) アミノ酸固定化カラム作成：20種類のアミノ酸と抗体結合蛋白質である Protein A/G（富

士フィルム和光純薬工業株式会社）をアガロース担体、CNBr-activated sepharose 4B（Cytiva）に固定化させて、そして、容量 1ml のそれぞれのアミノ酸固定化ミニカラムを作成した。

2) アミノ酸固定化カラムの評価：アフィニティークロマトグラフィー法で Ig の吸着・溶出実験を行った、健常者血清 1ml, n=3 (A) をセファロース担体 1ml カラムに通して (B)、その後、洗浄液 1mlx3 回で洗い (C1, C2, C3)、最後に、溶出液 1mlx3 回で溶出した (D1, D2, D3)。それぞれの分画液で免疫グロブリン G/A/M の濃度を免疫比濁法で測定した。それぞれのアミノ酸固定化カラムの吸着率 (%) を $(A-B-C1-C2-C3)/A \times 100$ と定義した。

（倫理面への配慮）本研究は、長崎総合科学大学における倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) Trp の量を (1, 5, 10, 25, 50) mg に振って固定化カラムを作成した。そのカラムに健常者血清を通して IgG 吸着能を評価した。その結果、Trp 1mg で IgG の吸着率 10%、Trp 1~5mg までは用量依存性に増加し、Trp 5mg 以上では 80% 台の吸着率となり飽和状態となった。今回の実験は、アミノ酸 10mg をカラムに固定化した。

2) IgG 吸着率の平均 (n=3) は、高い順に、Protein G カラム 93.6%、Protein A カラム 84.6%、Trp

カラム 61.3%、Asp カラム 16.0%、Phe カラム 15.3%、Val カラム 11.0%、Thr カラム 10.8%、残りのアミノ酸カラムは10%以下であった（図1）。対応のある分散分析（paired ANOVA）で、Trp カラムは IgG/A/M クラスにおいてアミノ酸カラム間で吸着率に差があることが示された。さらに、ANOVA 後の事後検定では Trp カラムと他のアミノ酸カラムとのペアの多くで $p < 0.0001$ の統計的有意性が示された。

D. 考察

1980年代に、ポリビニルアルコールを担体としてアミノ酸固定化カラムが開発され、その性能が評価された(Yamazaki et al, 1982)。Satoらは、AChR抗体陽性検体とTrpカラムを用いたバッチ法で、その吸着能を検討した。その結果、IgGの吸着率（20-40%）がAChR抗体の吸着率（60-80%）より低く、AChR抗体が選択的に吸着されると報告した。その後、臨床では幾つかの自己抗体病で有用性は報告されてきた。今回、我々は、アガロース担体に直接アミノ酸を固定化しミニカラムを作成し、アフィニティークロマトグラフィー法で、健常者血清で評価した。その結果、Protein G > Protein A > Trpカラムの順に健常者血清中のIgを吸着できることを示した。この結果は、これまでの臨床の有用性を支持する結果と思われる。今後は、AChR抗体を始め、各種病原性自己抗体の吸着能を評価すべきである。

E. 結論

Trp 固定化カラムの吸着機序は、免疫グロブリンの吸着によることが強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamasaki H, Futamura N, Funakawa I, Kohara N, Yoshimura S, Motomura M. Two Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome Patients with Ameliorated Activities of Daily Living Due to Cholinesterase Inhibitors. Intern Med. 巻(号) : 頁(未定) 2021 Sep 18.

2)

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他 | 無し |

図1 20種類のアミノ酸固定化カラムと健常者血清(n=3)・免疫グロブリン吸着能力の評価

