

## 重症筋無力症関連自己抗体の測定法

神戸薬科大学教授

太田 光熙



### はじめに

医学的診断は、医師による問診、診察、検査により得られた情報を総合判断してはじめて可能である。中でも検査所見が最も客観性の高いデータを提供しうることから、検査用分析機器が次々と改良、開発されるとともに、臨床検査の種類も増加し、現在では保険収載検査だけでも700をこえる項目があり、さらに多くの未保険収載検査が日常の臨床研究に使われている。検査漬けという批判も一方にはあるものの、臨床検査なしでは診断が全くできないと言っても過言ではない。また診断だけでなく、症状把握、経過観察、治療効果の判定にも臨床検査は医療に多大の貢献をしている。ここでは我々が長年取りくんで自己免疫疾患の1つ重症筋無力症を取り上げ、RI標識生理活性物質を用いた巧妙な自己抗体測定法を紹介することとする。

### 1 ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)

アセチルコリン (ACh) は主要な神経伝達物質のひとつであり、AChによる細胞間情報伝達は膜貫通タンパクであるACh受容体を介して行われる。ACh受容体は、イオンチャンネルを形成するニコチン作動性受容体 (nAChR) と、GTP結合蛋白と共役しているムスカリン作動性受容体 (mAChR) に大別される。nAChRはリガンド依存性イオンチャンネルで主に陽イオンを透過させる。終板の筋型nAChRチャンネルはNa<sup>+</sup>の透過性がCa<sup>2+</sup>に比べ高

く、一方、神経型nAChRチャンネルではCa<sup>2+</sup>透過性が高い<sup>1)</sup>。

nAChRは五量体で構成され(図1)、ヒトでは16種のサブユニットが今までに知られている。各サブユニットは4カ所の膜貫通型領域(M1~M4)を有し(図2)、互いのM2領域が向かい合ってチャンネル孔を形成している。また、ACh結合にはサブユニットのみにみられるM1領域直前のジスルフィド架橋の存在が重要である。

nAChRを形成するサブユニットは筋肉においては胎生期に(1)<sub>2</sub>1で構成され、運動神経による筋の支配後は、サブユニットに替わってサブユニットが発現して、成熟筋型(1)<sub>2</sub>1がシナプス後膜に局在してくる(図1)。台湾アマガサヘビ神経毒-Bungarotoxin(-BuTx)は1サブユニットのN末端領域と強く結合し、nAChRのチャンネル機能を拮抗的に阻害するため、筋型nAChRの特異的標識物質として多用される。-BuTxのアミノ酸配列を図3に示す<sup>2)3)</sup>。

### 2 筋型nAChRに関連した疾患

1) 重症筋無力症 抗nAChR抗体による疾患

重症筋無力症 (myasthenia gravis: MG) は、臨床的に外眼筋、球筋、四肢筋などの易疲労性、筋力低下を呈する神経筋接合部の異常に基づく疾患で、その病型は、外眼筋のみに障害のみられる最も軽症な眼筋型から、

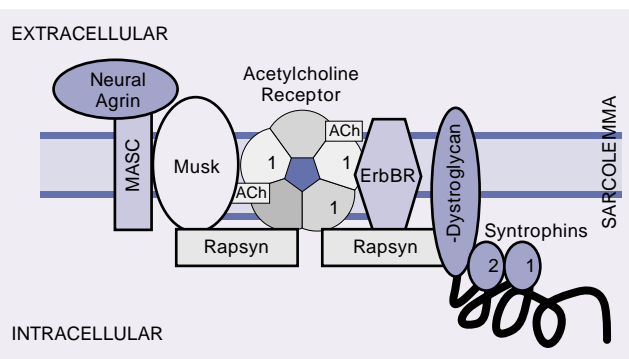


図1 神経筋接合部におけるnAChRとMuSKタンパク nAChRは成熟型では(1)<sub>2</sub>1で存在し、これにMuSKとRapsyn, MASC, AgrinがnAChRの凝集に関与している

#### 著者略歴

1971年 京都大学薬学部 卒業  
 1973年 京都大学薬学研究科修士課程修了  
 1977年 京都大学薬学研究科博士課程修了  
 1977年 国立療養所宇多野病院 厚生技官  
 1992年 国立療養所宇多野病院臨床研究部分子生化学室長  
 2000年 神戸薬科大学臨床化学講座教授  
 専門 脱髄疾患、神経筋疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患領域の分子生化学と免疫化学

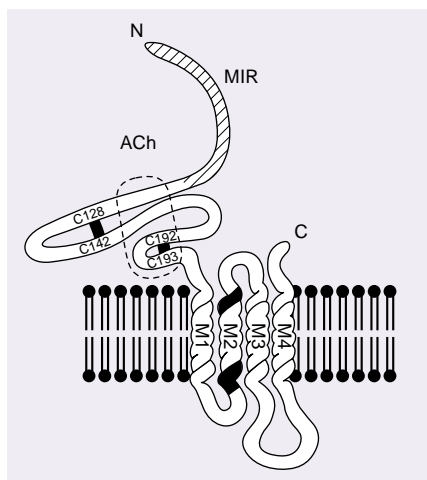


図2 1サブユニットの膜貫通の形式  
他の4つのサブユニットも同様にM1～M4の4箇所  
で貫通し、M2同士でイオンチャンネル孔を形成する。N末  
端領域にMIR (main immunogenic region) とACh  
結合部位がある

きわめて強い四肢脱力や球症状を呈する全身型重症例まで多様である。本症に特異的に抗nAChR抗体が検出されることが明らかにされて以来、抗nAChR抗体の測定は本症の診断のみならず、その成因や病態を追求把握する上で必須な検査となっている<sup>4)</sup>。

抗nAChR抗体によるMGの病態は、1) ACh結合部位に対する抗nAChR抗体によるAChとnAChRの結合障害作用、2) 1サブユニットN末端の細胞外領域main immunogenic region (MIR) に結合する抗体(結合型抗体)による後シナプス膜上のnAChRの崩壊促進作用、3) 結合型抗体による補体介在性シナプス後膜破壊作用の機序が考えられている(図4)<sup>5)</sup>。このような抗nAChR抗体は85%以上のMG症例で検出され、MG発症の主役でもある。残るMGの10～15%ではnAChR抗体が検出されず、seronegative MGと呼ばれてきた。

## 2) 抗nAChR抗体の測定原理<sup>6)7)</sup>

測定法には大別して2種類あり、nAChRとヘビ神経毒(運動神経終末の後シナプス膜nAChRと強固に結合する蛇毒蛋白の1つ  $\alpha$ -BuTx)との結合を阻害する活性として抗nAChR抗

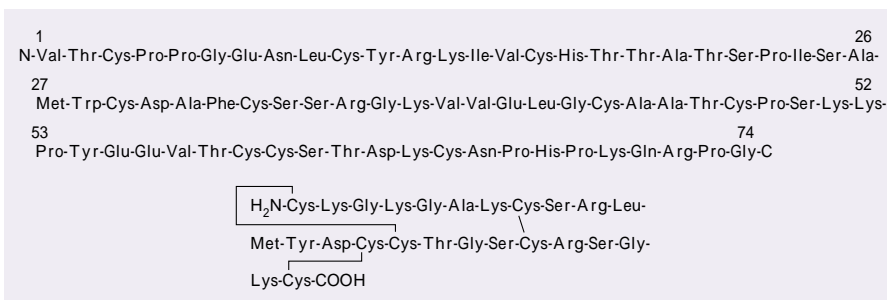


図3 蛇毒  $\alpha$ -Bungarotoxin (上図)と貝毒  $\alpha$ -conotoxin MVII C (下図)のアミノ酸配列  
 $\alpha$ -Bungarotoxinは分子内で<sup>3</sup>Cysと<sup>16</sup>Cys、<sup>19</sup>Cysと<sup>29</sup>Cys、<sup>33</sup>Cysと<sup>44</sup>Cys、<sup>48</sup>Cysと<sup>59</sup>Cys、<sup>60</sup>Cysと<sup>66</sup>Cys同士の5箇所  
で分子内架橋を作る。 $\alpha$ -conotoxin MVII Cは<sup>1</sup>Cysと<sup>16</sup>Cys、<sup>9</sup>Cysと<sup>20</sup>Cys、<sup>15</sup>Cysと<sup>22</sup>Cys同志でS-S架橋を作る

体を検出する方法(阻害型)と、nAChR-神経毒複合物に結合するタイプの抗nAChR抗体を測定する方法(非阻害型)とに分類できる。図5に、著者らの測定法の原理をまとめた。これらのうち、非阻害型抗体の測定法としてはImmunoprecipitation法(IP法;抗ヒトIgG法,図5-a),阻害型測定法としてはConcanavalin A-Sepharose法(Con A法,図5-b)があるが、ルーチン検査としてはIP法が標準法として採用されている<sup>8)</sup>。以下、これらの測定法を述べる。

### (a) <sup>125</sup>I- $\alpha$ -BuTxと抗原の調製

タイワンアマガサヘビ粗毒を陽イオン交換樹脂などを用いて得られる神経毒が  $\alpha$ -BuTxであり(図3)<sup>2)3)</sup>、クロラミンT法により容易にRI標識できる。用いる標識物質の比活性は500cpm/fmol程度である。

一般に筋肉に存在するnAChR量はg当たりピコモルときわめて微量であり、精製抗原として用いることは不可能である。当初はラットの除神経筋(除神経により終板上のnAChR量が数10倍に増加する)由来のnAChR可溶物を抗原とし、これを特異的に<sup>125</sup>I- $\alpha$ -BuTxで

標識して利用していたが、ヒトとラットとの免疫学的交叉反応性を利用しているため、特異性が大きく問題視されるようになり、一時期ヒト骨格筋を利用していたが、その後ヒト横紋筋肉腫TE671培養細胞が活用されている<sup>9)</sup>。

培養ヒト横紋筋肉腫TE671細胞を集め、これをホモゲナイズしたのち、可溶性剤Triton X-100により、1晩攪拌してnAChRを抽出する。これを100000×g、1時間遠心し、上清をnAChR画分として抗体測定用として用いる。IP法では、あらかじめnAChRに4倍量の<sup>125</sup>I- $\alpha$ -BuTxを加えた複合物をゲル濾過法により調製したものを抗原として用いる。

### (b) 測定手順

Immunoprecipitation法(IP法;抗ヒトIgG法)

あらかじめ調製したAChR-<sup>125</sup>I- $\alpha$ -BuTx

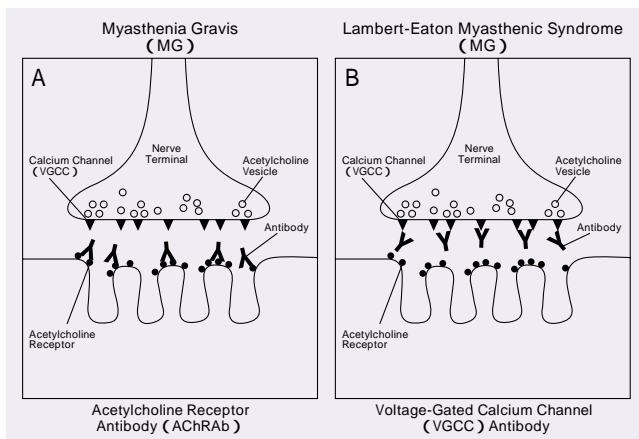


図4 重症筋無力症とイートン・ランバート症候群における神経筋接合部と自己抗体の作用部位。  
A:重症筋無力症 B:イートン・ランバート症候群  
カルシウムチャンネル(VGCC) ACh小胞体 nAChR Y自己抗体

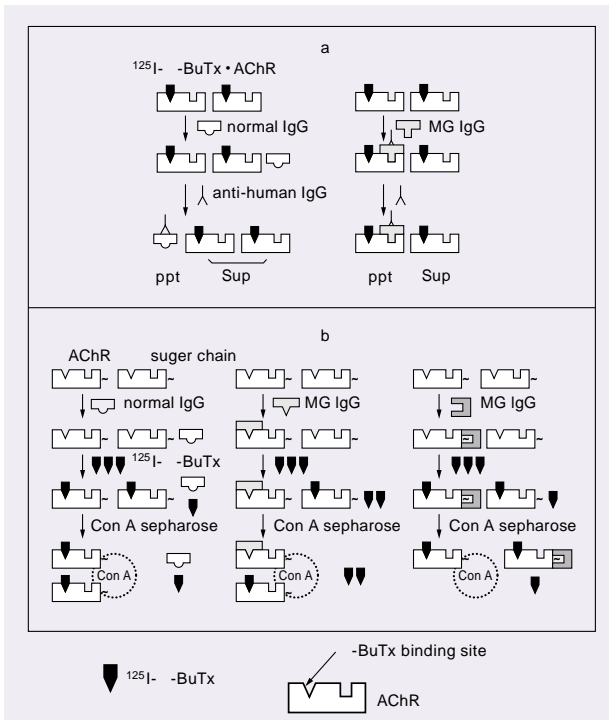


図5 IP法(a)およびCon A法(b)の測定原理を示した模式図

より、眼筋型 (ocular), 全身型軽症群 (mild), 全身型中等症群 (moderate) および全身型重症群 (severe) に分類した。胸腺腫非合併群の眼筋型では、非阻害型、阻害型抗体ともにその多くは正常範囲に分布し、陽性を示すものでも極めて低レベルであったのに対し、同群全身型では、陰性のものから極めて高い抗体価を示すものまで存在した。一方、胸腺腫合併型における阻害型抗体は非合併群と同様の傾向にあった

のに対し、非阻害型抗体は1例の陰性例を除き、すべて高レベルに分布した。

### 3 重症筋無力症 Seronegative 症例と MuSK 抗体

MGのうち、全身型を示すMGの10～15%は抗nAChR抗体陰性であり、Seronegative MGと称されるが、臨床的にも電気生理学的にも抗体陽性MGと区別できないが、重症で難治例が多いのが特徴である<sup>10)</sup>。これらの症例では血漿交換療法が著効を示すことがあり、さらにMG血清による実験動物へのpassive transferが可能であることから、何らかの液性因子の関与が考えられていた。2001年、Hochら<sup>11)</sup>は抗体陰性MGの中に、神経筋接合部に存在するMuSK (muscle specific tyrosine kinase, 図1)に

BuTx複合物100 μL (約50 fmol) に被検血清5 μLを加えて、4℃, 1晩 incubateしたのち、抗ヒトIgG血清を最適添加量を加え、4℃で1晩反応させる。生じた沈殿を洗浄後、沈殿中の<sup>125</sup>I放射活性を測定する。-BuTxの比活性から-BuTxの結合量として抗AChR抗体の量を表示する。なお正常上限値は0.2nM以下である。

#### Con A 法

AChR100 μL (25 fmol) と被検血清25 μLを、4℃, 1晩preincubationしたのち、約4倍量の<sup>125</sup>I -BuTx 50 μLを加え、37℃, 1時間反応させる。次に、Con A-Sepharose懸濁樹脂100 μLを加え、さらに37℃, 1時間incubationする。その後、樹脂を十分洗浄後、樹脂に結合した放射活性を測定する。なお、阻害活性として4%以上減少したものを陽性とする。

#### (c) 検査値の読み方とその解釈

MG 248例について、IP法, Con A法の結果をそれぞれ図6a, bに示した。MG群は全体を胸腺腫合併群, 非合併群に大別したあと、採血時の臨床像に

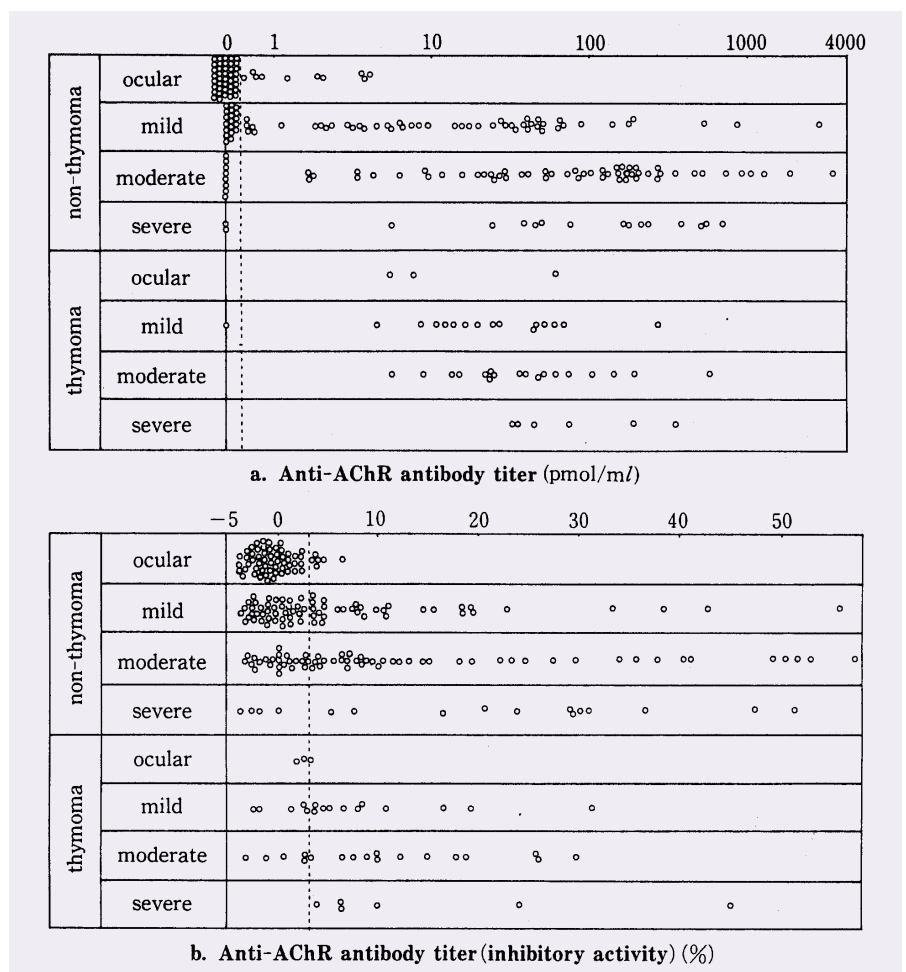


図6 IP法(a)およびCon A法(b)により測定されたMG患者血中抗AChR抗体価と臨床型MG患者を胸腺腫合併の有無で分け、さらにそれぞれを重症度で分類した

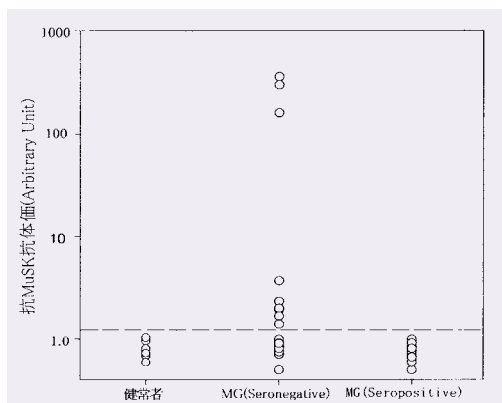


図7 抗AChR抗体陰性症例 (Seronegative) のMGのうち、全身型重症例における抗MuSK抗体価  
図中破線は正常上限を示す

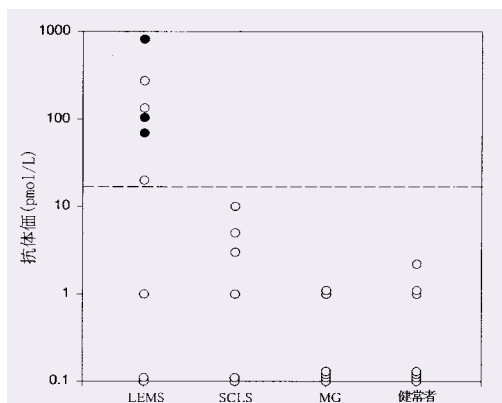


図8  $^{125}\text{I}$ -Conotoxin M Cを利用して測定した抗VGCC抗体価  
LEMS患者のうち肺小細胞癌 (SCLS) を合併するものを黒丸とした。点線は正常上限値 (20 pmol/L) を示す

に対する抗体の存在をはじめ明らかにした。MuSKのN末端に対する抗体は agrin で誘導される nACh 分子のクラスターリングを阻害する作用を示す。

#### 抗MuSK抗体の測定法

神経筋接合部に存在する MuSK の精製はきわめて困難である。そこで、組み換え MuSK を作製し、これを  $^{125}\text{I}$  標識した。これを抗原として血清  $5\ \mu\text{L}$  と反応させ、抗ヒト IgG 抗血清により抗原に結合した IgG を沈殿させ、洗浄後放射活性を測定した。結果を図7に示した。かなり高率に抗 MuSK 抗体が検出されることがわかった<sup>12)</sup>。

#### 4 ランバート・イートン筋無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome : LEMS)

正常の神経筋接合部では、活動電位

が神経終末に達すると電位依存性 Ca チャンネル (VGCC) を通じて終末内に Ca が流入する。次にシナプス小胞内の ACh が終末より放出され、運動終板の nAChR に結合する。その結果、膜が脱分極し、筋収縮へと至る。

LEMS は肺小細胞癌 (small cell lung carcinoma : SCLC) を 60% に合併し、神経終末部での ACh 放出障害が病態の基盤にある神経疾患である<sup>13) 14)</sup>。その発症機序としては、肺小細胞癌に発現している電位依存性 Ca チャンネル (voltage-gated calcium channel : VGCC) に対して産生された抗体が神経筋接合部及び自律神経の神経終末の VGCC と免疫学的交叉性を示すことにより発症するとされている (図4)<sup>15)</sup>。したがって、LEMS の診断においては、神経学的所見と電気生理学的所見とともに、血清中 P/Q 型 VGCC 抗体が臨床上有用であり、約 80% に検出できる<sup>16) 17)</sup>。

#### 1) 抗VGCC抗体の測定法

LEMS の標的抗原は VGCC のうちでも P/Q 型 VGCC が有力である<sup>18)</sup>。Q 型 VGCC を抑制する貝毒  $\alpha$ -conotoxin M C (図3) は P 型も抑制するため、P/Q 型 VGCC 神経毒とよばれ、RI 標識した  $\alpha$ -conotoxin M C を LEMS の診断のための自己抗体の測定法に活用されている<sup>19)</sup>。

ラット小脳抽出液  $10\ \mu\text{L}$  ( $3\text{fmol}$ ) を  $5\text{fmol}$  の  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -conotoxin M C で 1 時間反応させたのち、血清  $5\ \mu\text{L}$  を加え 1 時間反応させた。抗ヒト IgG 血清を加え 1 時間反応させたのち、生じた沈殿を洗浄後、沈殿中の放射活性を測定した。

#### 2) 抗VGCC抗体価

抗体価は過剰量の非標識毒素の存在下

で行った時の値 (非特異結合) を差し引いたのち、 $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -conotoxin の比活性から求めた。結果を図8に示した。抗 P/Q 型 VGCC 抗体がどのような機序で VGCC の数を減少させ、神経終末からの ACh 遊離阻害を生じさせるかは不明であるが、生理学的に P/Q 型 VGCC がヒト神経筋接合部の ACh の放出に深く関与していると考えられている。

#### おわりに

以上、重症筋無力症の発症や神経筋接合部の病態修飾に関連する自己抗体について、天然のタンパク毒素を巧妙に利用した分析法を紹介した。これらの方法は生理活性物質がもつ特定のタンパクにのみ結合する特異性と親和力の強さを活用した方法で、標的抗原を全く精製する必要のない点でとくに優れた分析法である。

#### 文 献

- 1) Lindstrom, J.M., Muscle Nerve, 23 : 453-477 (2000)
- 2) Mebs, D., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 44 : 711-716 (1971)
- 3) Ohta, M., et al., FEBS Lett., 222, 79-82 (1987)
- 4) 太田光昭 他, 日本臨牀, 57 : 509-513 (1999)
- 5) Drachman, D., et al., N. Engl. J. Med., 307 : 796-775 (1982)
- 6) Ohta, M., et al., J. Toxicol. Toxin Reviews, 17 : 337-359 (1998)
- 7) 太田光昭 他, 日本臨牀, 48 : 1290-1295 (1990)
- 8) 太田光昭 他, 臨床検査項辞典 (医歯薬出版) p835-836 (2003)
- 9) 太田光昭 他, ホルモンと臨床, 48 : 89-93 (2000)
- 10) Newsom-Davis, J., et al., Ann NY Acad. Sci., 505 : 12-26 (1987)
- 11) Hoch W., et al., Nat. Med., 7 : 365-368 (2001)
- 12) 投稿準備中
- 13) Waterman, S.A., et al., Ann. Neurol., 42 : 147-156 (1997)
- 14) Houzen, H., et al., Ann Neurol., 43 : 677-680 (1998)
- 15) Benatar, M., et al., J. Neuroimmunol., 113 : 153-162 (2001)
- 16) Lennon, V.A., Mayo Clin. Proc., 64 : 1498-1504 (1989)
- 17) Motomura, M., et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 58 : 85-87 (1995)
- 18) Protti, D.A., et al., Neurology, 46 : 1391-1396 (1996)
- 19) Hillyard D.R., Neuron, 9 : 69-77 (1992)