重症筋無力症患者における末梢血単核球の抗アセチルコリン受容体抗体およびサイトカイン産生能

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 佐藤, 勝明
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9374

金沢大学十全医学会雑誌　第107巻　第5号　382－395（1998）

重症筋無力症患者における末梢血単核球の抗アセチルコリン受容体抗体およびサイトカイン産生能

金沢大学医学部医学科神経内科学講座（主任：高守正治教授）
佐　藤　勝　明

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は，骨格筋アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) に対する自己抗体を病因の主座においた臓器特異的自己免疫疾患のひとつである．MG発症には胸腺異常が強く関係しているとされているが，胸腺中のリンパ球のみの抗体産生で全身の抗AChR抗体量を説明することはできない．本研究では，MG患者の単核球における抗体産生の特徴を明らかにするために細胞培養系を用いて検討し，以下の結論を得た．末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) は，正常対照群と比較し，MG患者では有意な抗AChR抗体およびIgGの産生亢進を示した．また，血清抗AChR抗体陰性（セロネガティブ）MG患者の21例中4例（19％）で有意な抗AChR抗体産生が認められ，培養系による抗体産生能の評価はセロネガティブMG患者の診断に有用と考えられた．MG患者ではPBMCが骨髄や胸腺中の単核球よりも高い抗AChR抗体産生を認めることが示され，PBMCが抗AChR抗体産生の中心となっていることが示唆された．また，重症度と培養系における抗AChR抗体産生能とは明らかな相関は認められなかった．培養系では，抗AChR抗体産生とIgG産生とは有意な相関が認められたためB細胞の多クローン性活性化が推定された．さらに，ポークウィードマイトジェン，フィトヘマグルチニン，インターロイキン (interleukin, IL)-2やスーパー抗原を加えても抗AChR抗体産生に変化はなく，抗原非特異的なリンパ球刺激では自己抗体産生は亢進しないことが示された．MGのPBMCにおけるIL-2，IL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-13，インターフェロン(interferon, IFN)-γ，腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)-αの産生量は正常対照群と比較し有意な上昇は認められなかった．また，これらサイトカイン産生量はいずれも抗AChR抗体産生量とは有意な相関はなかったが，総IgG産生量はIL-6およびIL-10産生量と有意な正の相関を認めた．以上の結果より，IgG産生亢進はIL-6およびIL-10によるB細胞の多クローン性活性化による可能性が示唆された．

Key words　myasthenia gravis, anti-acetylcholine receptor antibody, peripheral blood mononuclear cells, superantigens, cytokines

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は全身の骨格筋の易疲労性を特徴とする自己免疫疾患であり，神経筋接合部シナプス後膜側のニコチン性アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) を標的とする抗AChR抗体が病原因子として重要視されている[1]．また，MGはこのように自己抗体の存在とその対応抗原が分子レベルまで明らかにされており，臨床症状も標的組織の障害により理解可能な特徴をもつ臓器特異的自己免疫疾患でもある．免疫機構の破綻ともいえる自己抗体の産生機序については，多くの自己免疫疾患と同様に，MGでもその全貌は必ずしも明らかではない．MGでは，70％以上に胸腺リンパ過形成，10％に胸腺腫を伴い[2]，胸腺摘出により症状が改善することより，胸腺組織内での異常が発症の引きがねとなっている可能性が指摘され[3]，抗原の供給原として筋様細胞 (myoid cells) の存在[4]や胸腺単核球の抗AChR抗体産生[5)~10)]が証明されてきている．しかし，胸腺内での抗AChR抗体産生量は全身に分布する血清中の全抗体量を説明するには十分ではなく[6)~8)]，他の組織でも自己抗体が産生されていると考えられる．

これまでの研究で，MGの発症には自己抗体産生を誘導するT細胞系の異常，つまりAChR特異的T細胞の役割が重要視されてきている[1)11)12)]．MGでは多数のAChR反応性T細胞クローンがありそれぞれ異なったエピトープを認識するとされるが[13)]，これら自己反応性T細胞クローンの共通する性質や機能については明らかになっていない．さらに，近年，自己免疫疾患の病態形成に，マウスで発見されたサイトカイン産生様式により分類される1型ヘルパーT細胞 (type 1 helper T cells, Th1) と2型ヘルパーT細胞 (type 2 helper T cells, Th2) のバランス概念 (Th1/Th2理論)[14)]がヒトにおいてもあてはまる[15)]と考えられているが，MGの病態への関与については明らかではない．

本研究では，自己抗体産生に寄与する主なリンパ器官を明らかにする目的で，MG患者の末梢血，骨髄，胸腺における単核

平成10年10月16日受付，平成10年11月13日受理

Abbreviations：AChR, acetylcholine receptor; APC, antigen presenting cells; cIg, cytoplasmic Ig; IFN-γ, interferon-γ; IL, interleukin; MG, myasthenia gravis; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PHA, phytohemagglutinin; PWM, pokeweed mitogen; SE, staphylococcal enterotoxin; SAGs,

球の抗AChR抗体およびIgG産生能の定量的評価を細胞培養系を用いて行った．また，各種マイトジェン刺激による抗体産生能の変化や，末梢血T細胞機能を評価する目的で，スーパー抗原 (superantigens, SAGs) に対する細胞増殖反応とSAGs添加による抗体産生能の変化について検討した．さらに，MG患者のTh1/Th2バランスを推定し，サイトカイン産生亢進が自己抗体産生に関与しているかを明らかにする目的で，末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) のサイトカイン産生能を検討した．

対象および方法

I．対　象

1994年4月から1998年6月までに，金沢大学医学部神経内科学講座においてMGと診断され免疫抑制薬の投与を受けていない53例を対象とし，正常対照群は20例について検討した．患者の年齢は11～85歳 (平均47.3歳)，性別は男性15例，女性38例であり，正常対照群の年齢は22～63歳 (平均31.1歳)，性別は男性10例，女性10例であった．重症度はOssermanら[16]の分類にしたがい，Ⅰ型 (眼筋型)，ⅡA型 (軽症全身型)，ⅡB型 (中等症全身型)，Ⅲ型 (急性激症型)，Ⅳ型 (晩期重症型)に分類し検討した．血清抗AChR抗体価は測定キットAChレセプター抗体「コスミック」 (コスミックコーポレーション，東京) で測定した値を使用した．

Ⅱ．方　法

1．検体採取法

十分な説明を行い，研究の主旨に同意を得られた患者の正中肘静脈より末梢血を，上後腸骨棘より骨髄液を採取し，さらに治療目的で胸腺摘出術を受けた患者からは手術時に摘出胸腺組織の一部を無菌的に採取した．いずれの検体も採取後12時間以内に，以下の方法により単核球分離を行った．

2．単核球分離

末梢血と骨髄液は，0.1Mリン酸緩衝塩化ナトリウム液 (phosphate-buffered saline, PBS) で2～3倍に希釈後，Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, USA) を下層し，室温で1500 rpm，30分間遠心し，中間層に形成された単核球 (リンパ球および単球) からなるバンドを回収し，PBSで2回遠心洗浄した．非働化新生仔ウシ血清 (Gibco BRL, Grand Island, USA) が5%になるように添加した培地RPMI 1640 (Gibco BRL) を用いて，沈殿から1×10^6個/mlに調製した細胞浮遊液を作製した．

胸腺組織は，上記培地で十分に赤血球を洗い流し，ハサミで細切した後，金属メッシュを通して培地で浮遊させた．その後，上記と同様にHistopaque-1077を用いて単核球を分離し，同じ培地により1×10^6個/mlに調製した細胞浮遊液を作製した．

3．細胞培養

細胞浮遊液を24穴平底マイクロプレート (岩城硝子，千葉) の1ウェルあたり2 ml播き，CO_2インキュベーター (タバイエスペック，大阪) 内で，5% CO_2，37℃の条件下に培養を行った．培養によりリンパ球が新たに抗体を産生することを確認するために，シクロヘキシミド (Sigma) を100 μg/mlの濃度になるように加えたものを検討した．抗原刺激としては，ポークウィードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) (Gibco BRL) を1/120，フィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) M型 (Gibco BRL) を1/100，インターロイキン (interleukin, IL)-2 (Gibco BRL) を20 U/ml，SAGsとしてはブドウ球菌腸管毒 (staphylococcal enterotoxin, SE) A，SEB，SEE (Toxin Technology, Sarasota, USA) をそれぞれ100 ng/ml，の濃度になるように加えた．培養液の入れ替えは行わず，7日間培養後に上清のみを回収して凍結保存し，抗体測定に用いた．

4．T細胞増殖能の定量

末梢血より分離した単核球の沈殿から，上記と同様に，非働化ウシ胎児血清 (Gibco BRL) が10%になるように添加した培地RPMI 1640 (Gibco BRL) を用いて1×10^6個/mlに調製した細胞浮遊液を作製し，96穴マイクロプレート (Falcon, Franclin Lakes, USA) に1ウェルあたり200 μlずつ播いた．さらに抗原として，SEA，SEB，SEC1，SEC2，SEC3，SEE，毒素性ショック症候群毒素-1 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1) (Toxin Technology) をそれぞれ100 ng/mlの濃度になるように加え，CO_2インキュベーターにて，5% CO_2，37℃の条件下に5日間培養した．その後，^{3}H標識チミジン (9.25 MBq/mmol, Amersham, Buckinghamshire, UK) を各ウェルに0.5 μCiずつ加えさらに9時間培養後，細胞をグラスフィルターに回収し液体シンチレーションカウンター (アロカ，東京) にてチミジン取り込みによる^{3}H放射活性を測定し，細胞増殖能を評価した．

5．抗AChR抗体価測定

Lindstrom[17]の方法を一部変更した免疫沈降法 (immunoprecipitation assay) にて行った．TE671細胞株[18]より精製したAChR (RSR Co., Cardiff, UK) 1 mlに1×10^{-7} mol/lに調製した^{125}I-α-バンガロトキシン (7.2～9.3 TBq/mmol, Amersham) を170 μl加え，室温で1時間，4℃で一晩静置し標識したものを抗原として用いた．培養上清100 μlと4×10^{-14} molの標識AChRとを，室温で1時間静置後，4℃で一晩反応させた．担体として正常ヒト血清5 μlを加え，さらに二次抗体としてヤギ抗ヒトIgG抗体 (H+L) (ICN Pharmaceuticals, Aurora, USA) を過剰量と考えられる100 μl加え，室温で30分反応させた後，20%ポリエチレングリコール (和光，大阪) 20 μlを加え，室温に15分，さらに4℃で60分以上静置し沈降させた．沈殿を2回洗浄後，^{125}I放射活性をガンマカウンター (アロカ) で測定した．標準として4×10^{-14} molの標識AChRの^{125}I放射活性を同時に測定し，その比よりα-バンガロトキシン結合部位のmol数にて抗AChR抗体価を表現した．

6．ELISA

1）IgG値の測定

ヤギ抗ヒト免疫グロブリン (γ, α, μ＋L) (Biosource, Camarillo, USA) を96穴マイクロタイタープレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に固相化し，ヤギ血清 (日本バイオテスト研究所，東京) でブロックした．培養上清を10倍に希釈し，1ウェルに100 μlずつ加え，37℃で2時間，4℃で一晩反応させた．二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (γ) (Biosource) を37℃で1時間反応させた後，基質としてジエタノールアミン緩衝液 (pH9.8) に溶解したp-ニトロフェニルリン酸 (Sigma) を加え，約1時間反応後にマイクロプレートリーダー (島津，京都) を用い405 nmにおける吸光度を測定した．

---

superantigens; sIg, surface Ig; TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1; TNF-α, tumor necrosis factor-α; Th1, type 1 helper T cells; Th2, type 2 helper T cells, セロネガティブ; 抗AChR抗体陰性

2）サイトカインの測定

培養上清中のIL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, インターフェロン (interferon, IFN)-γ，腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)-αの測定には，いずれもELISAキット (Endogen, Woburn, USA) を使用した．各測定法の検出限界は，IL-2が6 pg/ml, IL-4が2 pg/ml, IL-5が2 pg/ml, IL-6が1 pg/ml, IL-10が3 pg/ml, IL-13が10 pg/ml, IFN-γが2 pg/ml, TNF-αが5 pg/mlであった．

7．統計学的検定法

ノンパラメトリック検定を行った測定値は，中央値 (範囲) で表した．対応のない2群の比較にはMann-Whitney のU検定を，2群間の頻度の比較にはFisherの直接確率計算法を，2群間の相関についてはSpearmanの順位相関を，独立した3群以上の比較にはポストホックテストとしてFisherの最小有意差検定を用いた一元配置分散分析 (one-way ANOVA) またはKruskal-Wallisの検定を，二つのカテゴリー変数で分類される多群の比較には二元配置分散分析を用い，いずれも危険率5%未満 ($p < 0.05$) を統計学的有意差ありとした．統計解析ソフトウェアとしてMacintosh版 StatView J-4.5 (ヒューリンクス，東京) を使用した．

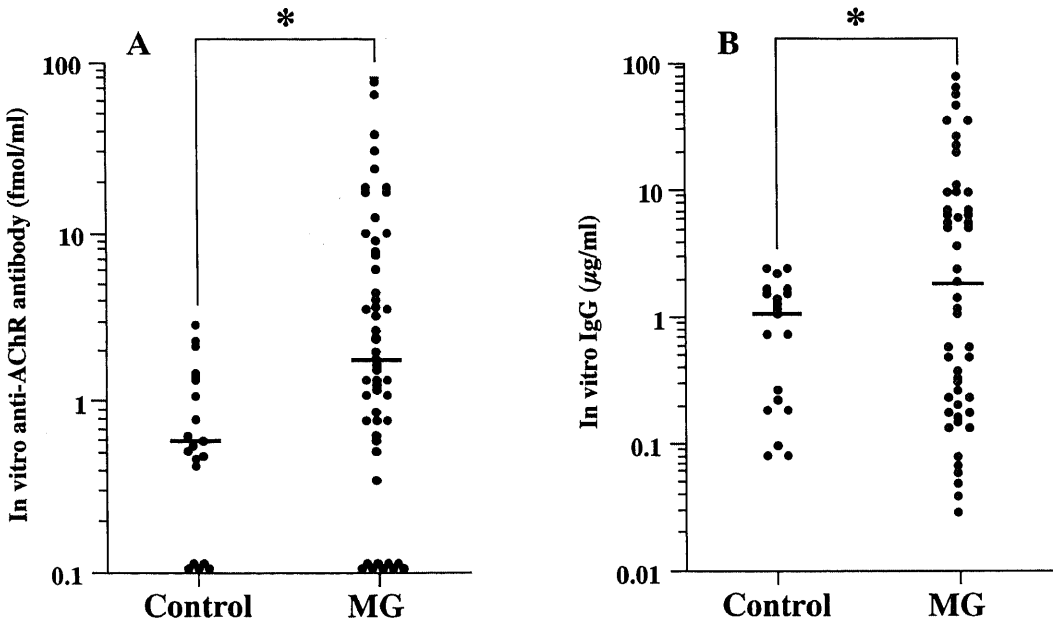

Fig. 1. Anti-AChR antibodies (A) and IgGs (B) synthesized by cultured peripheral blood mononuclear cells from normal controls and patients with myasthenia gravis. Solid lines represent median values for each group. * $p<0.05$.

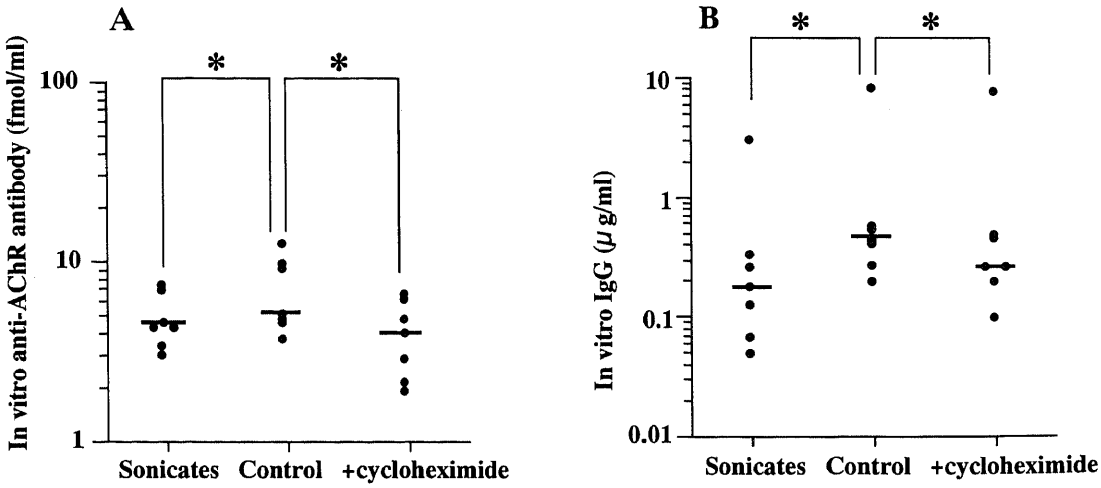

Fig. 2. Anti-AChR antibodies (A) and IgGs (B) synthesized by cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with myasthenia gravis. Solid lines represent median values for each group. Sonicates, sonicated cell suspensions prior to culture; control, supernatant of PBMC cultured without any agents; +cycloheximide, supernatant of PBMC cultured in the presence of cycloheximide. * $p < 0.05$.

成　　績

Ⅰ．培養による単核球の抗体産生の確認

正常対照20例とMG患者53例につき検討を行い，7日間培養後の上清中の抗AChR抗体価 (fmol/ml) は正常対照群で中央値0.63 (0-2.93)，MG群で中央値2.05 (0-84.8)，IgG値 (μg/ml) は正常対照群で中央値1.25 (0.08-2.60)，MG群で中央値1.95 (0-78.4) であった．Mann-WhitneyのU検定により，抗AChR抗体価，IgG値ともにMG群で有意に高値であった (図1)．

正常対照20例での7日間培養後の上清中抗AChR抗体価は，平均値±標準偏差で示すと，0.95±0.84 fmol/ml，IgG値は1.14±0.88 μg/mlであり，それぞれ平均値+2.5SDである3.05 fmol/ml，3.34 μg/mlを正常上限とした．血清抗AChR抗体陰性 (セロネガティブ) MG患者では21例中4例 (19%) で，有意な抗AChR抗体産生を認めた．

MG患者7例のPBMCについて，培養による抗体産生を確認するための検討を行った．培養上清中の抗AChR抗体価 (fmol/ml) とIgG値 (μg/ml) は，細胞浮遊液を超音波破砕した群 (ソニケート群) ではそれぞれ中央値4.2，(2.9-7.0) と中央値0.18 (0.05-3.1) で，7日間培養した群 (コントロール群) では中央値4.9 (3.5-12) と中央値0.45 (0.2-8.3) で，蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した群 (シクロヘキシミド添加群) では中央値3.9 (1.8-6.3) と中央値0.27 (0.1-7.8) であった．抗AChR抗体価 (図2A) とIgG値 (図2B) はともに，ソニケート群およびシクロヘキシミド添加群と比較しコントロール群において有意に高値を示した (Wilcoxonの符号付順位検定)．

Ⅱ．各組織別の単核球抗体産生能の比較

MG患者の末梢血53例，骨髄33例，胸腺組織25例の単核球につき検討を行った．

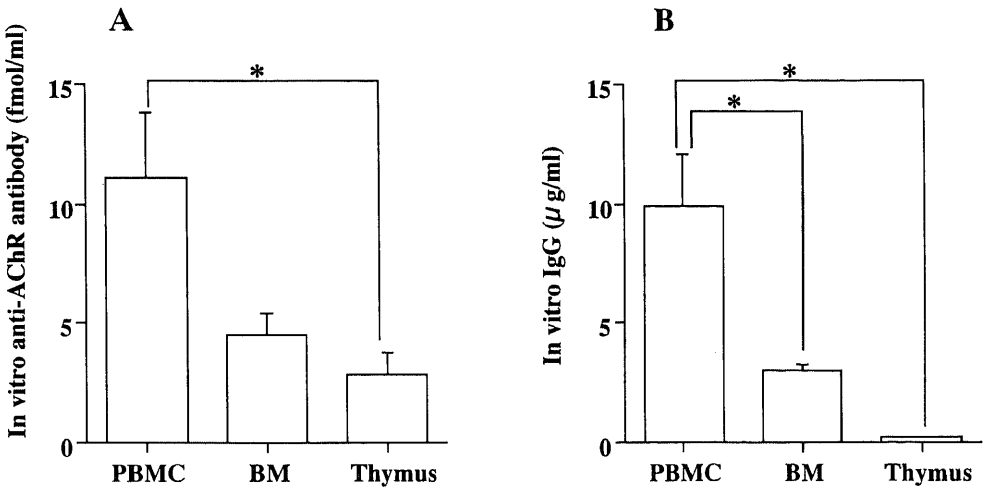

Fig. 3. Anti-AChR antibodies (A) and IgGs (B) in the supernatant of cultured mononuclear cells from lymphoid organs of patients with myasthenia gravis. Results represent $\bar{x}$ ± SEM. PBMC, peripheral blood mononuclear cell; BM, bone marrow. * $p<0.05$.

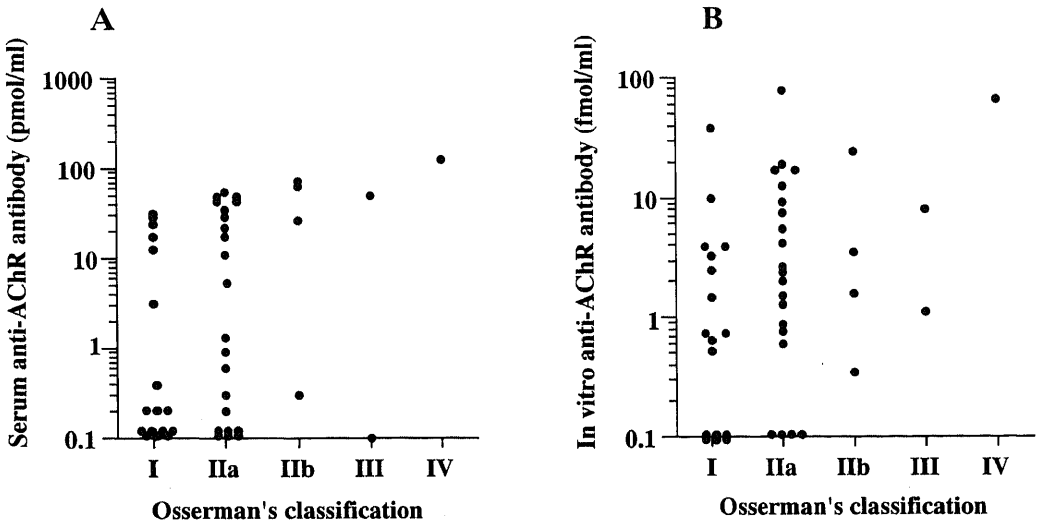

Fig. 4. Anti-AChR antibodies in the serum (A) and those produced in the cultured cells (B) in relation to five grades of clinical severity.

1．抗AChR抗体産生能 (fmol/ml)

平均値±標準偏差で示すと，末梢血では11.1±21.4，骨髄では4.52±6.46，胸腺組織では2.86±5.54であり，末梢血と胸腺組織との間には有意差 (p=0.03) を認めたが，末梢血と骨髄との間 (p=0.058)，骨髄と胸腺組織との間 (p=0.69) には有意差を認めなかった (ポストホックテストとしてFisherの最小有意差検定を用いた一元配置分散分析) (図3A).

2．IgG産生能 (μg/ml)

平均値±標準偏差で示すと，末梢血では9.89±17.8，骨髄では3.02±3.54，胸腺組織では0.26±0.62であり，末梢血と骨髄との間 (p=0.016)，末梢血と胸腺組織との間 (p=0.003) には有意差を認めたが，骨髄と胸腺組織との間 (p=0.42) には有意差を認めなかった (ポストホックテストとしてFisherの最小有意差検定を用いた一元配置分散分析) (図3B).

Ⅲ．PBMCの抗AChR抗体産生能

1．重症度と血清および培養上清抗AChR抗体価との関係

MG患者53例 (男性15例，女性38例) のPBMCについて検討を行い，重症度と血清抗AChR抗体価との間 (図4A)，および重症度と培養上清抗AChR抗体価との間 (図4B) には明らかな比例関係を認めなかった.

2．血清および培養上清の抗AChR抗体価，IgG値との相関

抗AChR抗体価陽性MG患者29例 (男性8例，女性21例) のPBMCについて検討を行った．血清抗AChR抗体価と培養上清抗AChR抗体価との間には有意な正の相関 (ρs=0.50, p=0.01, n=29) を認め (図5A)，培養上清抗AChR抗体価と培養上清IgG値との間にも有意な正の相関 (ρs=0.77, p＜0.001, n=29) を認めた (図5B)．血清抗AChR抗体価と培養上清中のIgG値との間 (p=0.37) (図5C)，および血清抗AChR抗体価と血清IgGとの間 (p=0.78) (図5D)には有意な相関を認めなかった.

Ⅳ．PBMCに対する抗原刺激の影響

1．単核球刺激の影響

MG患者53例 (男性15例，女性38例) について検討した．培養上清中の抗AChR抗体価 (fmol/ml) は，対照群では中央値2.1 (0-84.8)，PWMを加えた群では中央値2.3 (0-84.9)，PHAを加えた群では中央値2.5 (0-85.8)，IL-2を加えた群では中央値2.6 (0-82.5) であった (図6A)．IgG値 (μg/ml) は，対照群では中央値

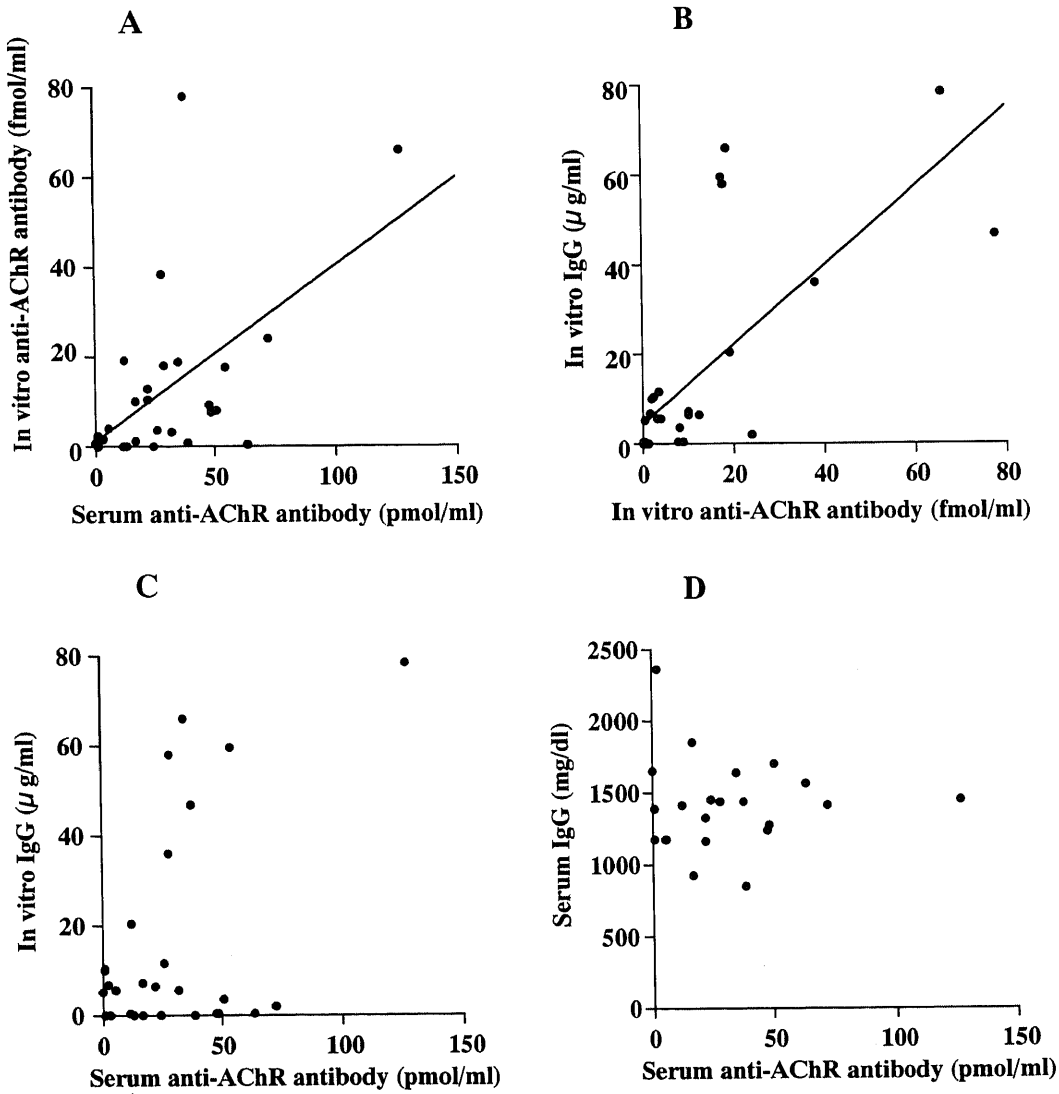

Fig. 5. Correlations between anti-AChR antibodies in the serum and in vitro production (A), in vitro synthesis of anti-AChR antibodies and IgGs (B), serum anti-AChR antibodies and in vitro IgG production (C), anti-AChR antibodies and IgGs in serum (D).

1.2 (0-78.4)，PWMを加えた群では中央値1.6 (0-152)，PHAを加えた群では中央値3.6 (0-58.0)，IL-2を加えた群では中央値0.7 (0-148.0) であった (図6B)．MG患者群について検定し，対照群およびPWM，PHA，IL-2を加えた群のいずれの間にも，抗AChR抗体価 (p=0.94)およびIgG値 (p=0.79) ともに有意差は認められなかった (Kruskal-Wallisの検定)．

2．SAGsによる影響

1）細胞増殖能

SAGsとしては，SEA，SEB，SEC1，SEC2，SEC3，SEE，TSST-1を用い，正常対照5例 (男性4例，女性1例)，MG患者13例 (男性4例，女性9例) について検討した．正常対照およびMG患者ともに，SAGsを加えた群で有意な^{3}H-取り込みの上昇を認めたが ($p < 0.0001$)，各SAGs間では有意差は認めなかった (二元配置分散分析) (図7)．

2）抗体産生能

MG患者14例 (男性6例，女性8例) について，SAGsとしてSEA，SEB，SEEを加え，抗体産生能の変化を検討した．抗AChR抗体価 (fmol/ml) は，対照群では中央値7.3 (0.8-93.9)，SEA群では中央値6.8 (0-85.5)，SEB群では中央値7.1 (0.8-90.0)，SEE群では中央値6.9 (1.0-91.1) であった．IgG値 (μg/ml) は，

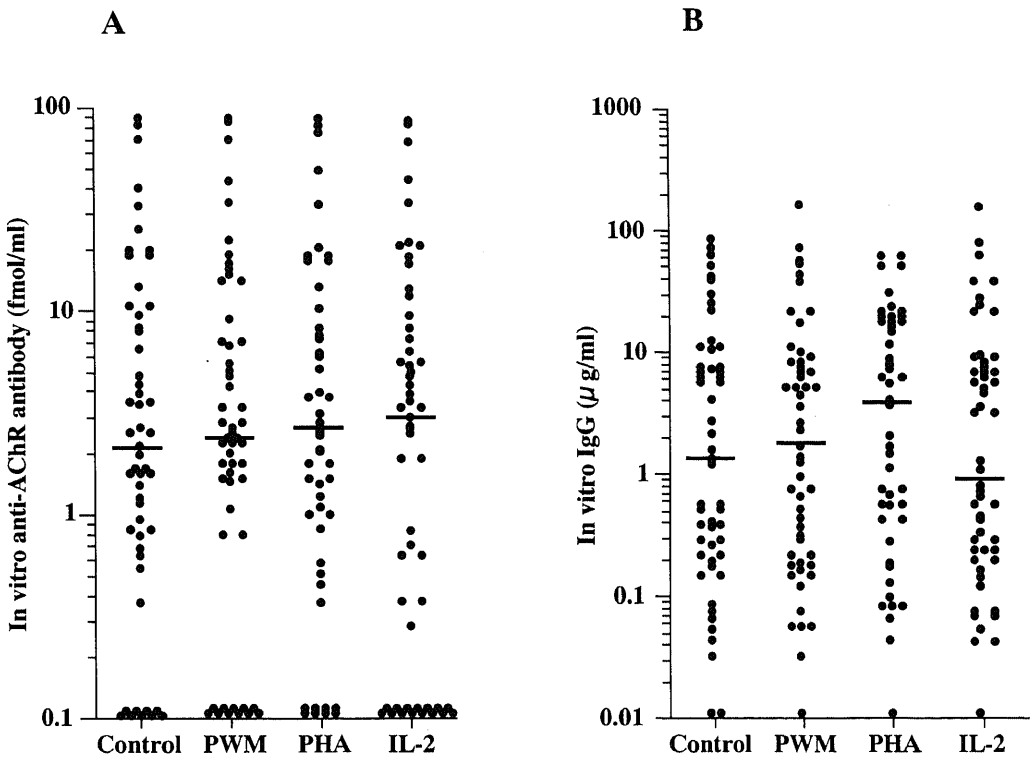

Fig. 6. In vitro synthesis of anti-AChR antibodies (A) and IgGs (B) in the presence of mitogens and exogenous interleukin-2. Solid lines represent median values for each group. PWM, pokeweed mitogen; PHA, phytohemagglutinin; IL-2, interleukin-2.

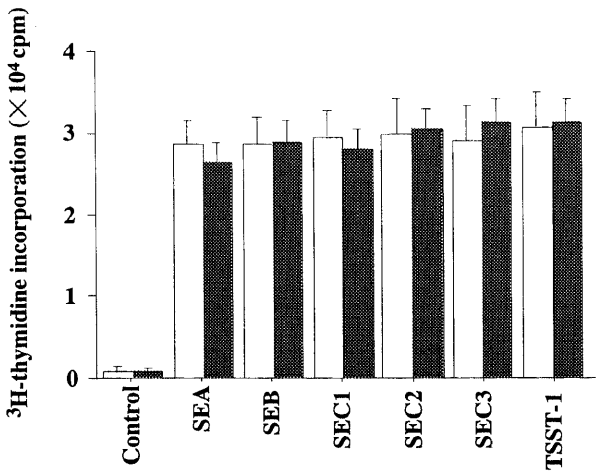

Fig. 7. T cell proliferative response to superantigens. Experiments were done in quadruplicate for ^{3}H-thymidine incorporation. □, normal; ▨, patients with myasthenia gravis. SEA, staphylococcal enterotoxin A; SEB, staphylococcal enterotoxin B; SEC1, staphylococcal enterotoxin C1; SEC2, staphylococcal enterotoxin C2; SEC3, staphylococcal enterotoxin C3; TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1.

対照群では中央値0.6 (0.1-35.0)，SEA群では中央値0.5 (0-37.5)，SEB群では中央値0.6 (0.1-37.6)，SEE群では中央値0.6 (0.1-31.6) であった．抗AChR抗体価，IgG値ともにSAGsを加えない対照群と比較し，いずれのSAGsを加えた群とも有意差を認めなかった (図8)．

Ⅴ．PBMCのサイトカイン産生能

1．IL-2 (pg/ml)

正常対照10例中1例 (10％) に検出されたのに対し，MG患者32例中4例 (13％) に検出され，頻度に有意差はなかった．さらに，IL-2値は正常対照群では中央値＜6 (＜6-24.4)，MG群では中央値＜6 (＜6-41.5) で，有意差はなかった (図9A)．MGの病型別では，眼筋型MG11例中4例 (36％) で検出されたのに対し，全身型MG21例全例で検出されず，有意に眼筋型MGの方が高率であった (p=0.01)．

2．IL-4 (pg/ml)

正常対照10例中3例 (30％) に検出されたのに対し，MG患者32例中6例 (19％) に検出され，頻度に有意差はなかった．さらに，IL-4値は正常対照群では中央値＜2 (＜2-8.3)，MG群では中央値＜2 (＜2-10.2) で，有意差はなかった (図9B)．MGの病型別では，眼筋型MG12例全例で検出されなかったのに対し，全身型MG20例中6例 (30％) で検出され高率であったが，有意差はなかった (p=0.07)．

3．IL-5 (pg/ml)

正常対照10例中5例 (50％) に検出されたのに対し，MG患者32例中14例 (44％) に検出され，頻度に有意差はなかった．さらに，IL-5値は正常対照群では中央値2.4 (＜2-129)，MG群では中央値＜2 (＜2-522) で，有意差はなかった (図9C)．MGの病型別では，眼筋型MG12例中6例 (50％)，全身型MG20例中8例 (40％) に検出され頻度に有意差はなく，また，IL-5値は眼筋型MGでは中央値＜2 (＜2-48)，全身型では中央値2.4 (＜2-522)で有意差はなかった．

4．IL-6 (pg/ml)

正常対照10例中全例およびMG患者32例中全例で検出された．さらに，IL-6値は正常対照群では中央値28.0 (6.4-370)，MG群では中央値18.1 (2.3-452) で有意差はなかった (図9D)．MGの病型別では，IL-6値は眼筋型MGでは中央値18.0 (2.5-447)，全身型では中央値18.2 (2.3-452) で，有意差はなかった．

5．IL-10 (pg/ml)

正常対照10例中全例に検出されたのに対し，MG患者32例中25例 (78％) に検出され，頻度に有意差はなかった．さらに，IL-10値は正常対照群では中央値23.1 (8.1-101)，MG群では中央値18.7 (＜3-209) で有意差はなかった (図9E)．MGの病型別では，眼筋型MG12例中8例 (67％)，全身型MG20例中17例 (85％)に検出され頻度に有意差はなく，また，IL-10値は眼筋型MGでは中央値17.0 (＜3-194)，全身型では中央値24.6 (＜3-209) で有意差はなかった．

6．IL-13 (pg/ml)

正常対照10例中5例 (50％) に検出されたのに対し，MG患者32例中21例 (66％) に検出され，頻度に有意差はなかった．さらに，IL-13値は正常対照群では中央値＜7 (＜7-104)，MG群では中央値8.7 (＜7-535) で，有意差はなかった (図9F)．MGの病型別では，IL-13値は眼筋型MGで中央値9.1 (＜7-20.4)，全身型MGで中央値8.2 (＜7-534) で有意差はなかった．

7．IFN-γ (pg/ml)

正常対照10例中4例 (40％) に検出されたのに対し，MG患者32例中12例 (38％) に検出され，頻度に有意差はなかった．さらに，IFN-γ値は正常対照群では中央値＜2 (＜2-22.4)，MG群では中央値＜2 (＜2-133) で，有意差はなかった (図9G)．MGの病型別では，眼筋型MG12例中5例 (42％)，全身型MG20例中7例 (35％) に検出され頻度に有意差はなく，また，IFN-γ値は眼筋型MGでは中央値＜2 (＜2-26)，全身型MGでは中央値＜2 (＜2-133) で有意差はなかった．

8．TNF-α (pg/ml)

正常対照10例中2例 (20％) に検出されたのに対し，MG患者32例中全例で検出されず，正常対照群で高率であったが有意差は認めなかった (図9H)．

さらに，MG患者を胸腺腫を伴った例と伴わない例とに分けて検討したが，それぞれのサイトカイン産生は，検出された頻度および産生量に有意差は認めなかった．

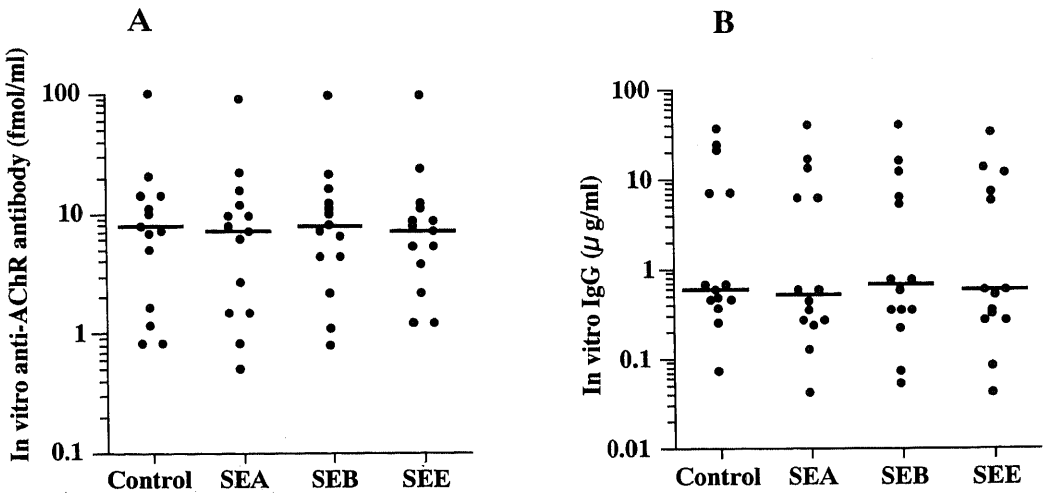

Fig.8. In vitro synthesis of anti-AChR antibodies (A) and IgGs (B) in the presence of superantigens. Solid lines represent median values for each group. SEA, staphylococcal enterotoxin A; SEB, staphylococcal enterotoxin B; SEE, staphylococcal enterotoxin E.

Ⅵ．抗体産生とサイトカイン産生との相関

MG患者でそれぞれのサイトカイン産生が検出された例のみについて検討した．PBMC培養上清中の抗AChR抗体価とIL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-γ, TNF-αの値とは有意な相関は認めなかった．培養上清中IgG値とIL-6（ρs=0.47, p=0.01, n=32），IL-10（ρs=0.46, p=0.03, n=25）の値とは有意な正の相関を示したが，IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ, TNF-αの値とは相関を認めなかった．

考　　察

MGにおける抗AChR抗体産生はT細胞依存性であり[12]，培養系において自己抗体が産生されるためには，抗原，B細胞，

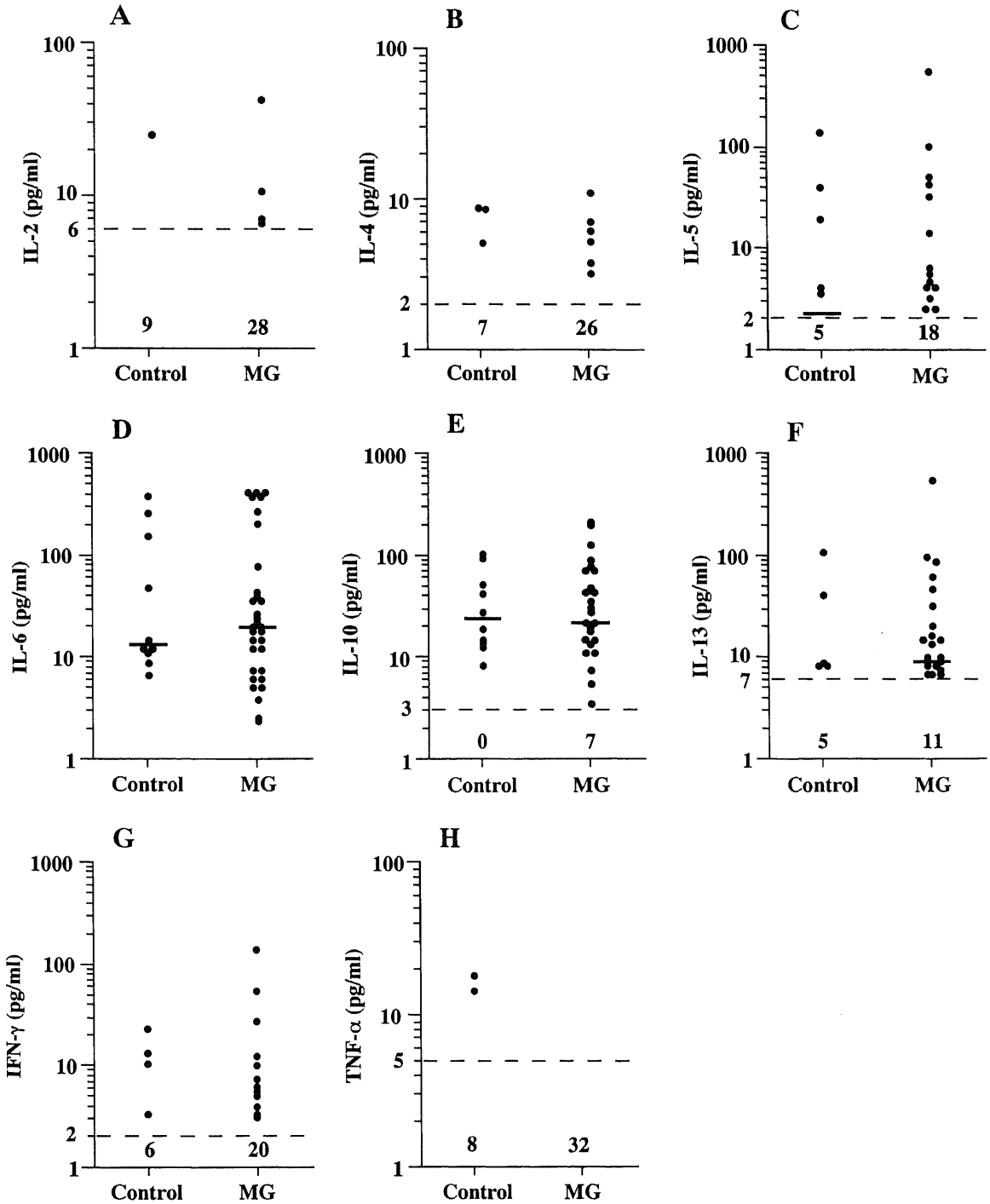

Fig.9. Cytokine levels in the culture supernatant secreted by peripheral blood mononuclear cells from normal controls and patients with myasthenia gravis (MG). The broken lines represent the detection levels for each assay system. The figures below the broken lines show the number of samples with undetectable levels. Solid lines represent median values for each group. (A) interleukin (IL)-2, (B) IL-4, (C) IL-5, (D) IL-6, (E) IL-10, (F) IL-13, (G) interferon (IFN)-γ and (H) tumor necrosis factor (TNF)-α levels in normal controls (n=10) and patients with MG (n=32).

T細胞，抗原提示細胞 (antigen presenting cells, APC) が必要な要素と考えられている．MG患者胸腺には，AChRを発現しているとされる筋様細胞 (myoid cell)[4]，抗AChR抗体産生能を有するB細胞，AChR特異的T細胞[19)20)]，APCとして鉗合樹枝状細胞 (interdigitating dendritic cells) が存在し[3]，それら細胞成分の培養により抗AChR抗体産生が認められることがすでに知られている[5)~10)]．さらにMG患者の末梢血，骨髄，リンパ節中の単核球成分の培養でも抗AChR抗体産生が認められる[9)21)~23)]が，胸腺リンパ球と比較すると細胞あたりの産生能は低いため[22)24)]，胸腺が抗AChR抗体産生に中心的役割をもつと推定されてきた．しかし，胸腺のみの産生では体内の抗AChR抗体量は説明できず[7)8)]，また胸腺摘出術後も血清抗AChR抗体価が低下しない例があるのも事実である．骨髄は成人において最も重要なIg (特にIgGとIgA) 産生器官とされるが[25)26)]，MGにおける自己抗体産生に関する検討は少ない[27)]．本研究の結果では，細胞あたりの抗AChR抗体産生能は，PBMC，骨髄，胸腺における単核球の順に高い．絶対数自体もPBMCが圧倒的に多いことから，抗AChR抗体産生におけるPBMCの役割が最も大きいと考えられた．発症の発端は胸腺内に生じた免疫学的異常であっても[28)]，その病態の持続を担うのはPBMCと推察した．

Fujiiら[23)]によるMG患者PBMCの細胞表面マーカーによる解析では，細胞表面免疫グロブリン (surface Ig, sIg) 陽性B細胞は約16％であり，細胞質内免疫グロブリン (cytoplasmic Ig, cIg) 陽性B細胞は1例で約1％のみ検出され，正常対照群と比較しても有意差はなかったとされる．また，MG患者のPBMC中，sIgM陽性B細胞は約9％に対し，sIgG陽性B細胞は約3％と少数であるとされる[29)]．さらに，抗AChR抗体産生能を有するのは血中B細胞の1/14,085であるという[30)]．したがって，PBMC中のB細胞はほとんどが非活動期にあって抗体産生には関与していないと考えられ，しかもMG患者において積極的に抗体産生を行っているPBMCが増加しているという結果は得られていないので，単純にPBMCが体内を循環中に抗AChR抗体を産生し続けているとは結論できない．

本研究では，培養系を用いて，MG患者のPBMCの抗体産生能を，血清中の抗AChR抗体価との相関や抗原刺激による抗体産生能の変化を指標に評価した．MG患者PBMC中には少数ながらsIgG，cIgGを有するB細胞が存在するため[23)]，培養中にそれらの細胞が死滅し上清中にIgGが放出される可能性を考慮し，まず，培養系においてMG患者PBMCが実際に抗体を新生するかを確認した．培養前のPBMCを上清とともに超音波破砕したもの，および蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドを加えて培養した後の上清，PBMCのみを培養後の上清の三者について比較し，PBMCのみを培養した上清で有意にIgG値，抗AChR抗体価の上昇が認められた．よって，培養系においてPBMCがIgGおよび抗AChR抗体を新たに産生することが確認された．

培養系における抗体産生の時間的推移については，MG患者の胸腺単核球の抗体産生は，生体内ですでに刺激された抗体産生細胞 (約45％の胸腺B細胞がcIgG陽性[31)]) によりT細胞非依存性に24時間以内に始まる成分 (ongoing responses) と，APC存在下でメモリーB細胞によりT細胞依存性に3～5日後より始まる成分 (spontaneous responses) に分かれることが知られている[32)~34)]．PBMCの培養では，4日目までは少量の抗体産生しか認められず，4～9日目に最も抗体産生が多い時期がくるとされる[21)22)]．また，胸腺中のB細胞は抗原刺激がない条件下では培養後10日を過ぎると抗体産生を中止し徐々に死滅していく[31)]ことが知られている．以上より，抗体産生が安定して認められる培養後7日目の上清中の抗体価を，比較，評価の対象として選択した．

症状と抗AChR抗体価とは直接的な関係はなく，症例間では比較できないとされている[35)]．眼筋型MGではセロネガティブMGが約50％と多いのに対して，全身型MGでは約10％と少ない[36)]がその中には重症例もある．また，数年にわたり寛解が得られているが抗AChR抗体価が高値を持続する例がある[37)]ことや，当科でも血清抗AChR抗体価が200 pmol/ml以上と高値にもかかわらず時に易疲労性の訴えがある程度の軽い症状のMG例の経験があることなどからも，臨床重症度と血清抗AChR抗体価は比例しないと考えられる．その理由としては，患者血清中に認められる抗AChR抗体はポリクローナルであり[38)]しかも抗原に対する親和性がそれぞれ異なり，現時点での測定法では最も病因となる抗体のみを測定することは不可能で，親和性の違いも考慮していないことや，抗体検出の感度の問題，抗AChR抗体以外の抗体が関与する病態の存在の可能性[39)]が考えられている．今回の検討で，セロネガティブMG例の19％ (4/21例) でPBMC培養によりその培養上清中に有意な抗AChR抗体の産生を認めており，一部の症例では血清抗体価は測定感度以下のために検出されないが，抗AChR抗体産生能は有していることが示された．また，PBMC自体の抗AChR抗体産生能と重症度は比例しないという我々の結果から，現在の測定法で定量される抗AChR抗体価は病因抗体以外の抗体の影響も多く含んでいる可能性が示唆された．

抗AChR抗体価自体については，PBMC培養上清中と血清中とでは有意な相関が認められ，PBMCの抗AChR抗体産生量が血清抗AChR抗体価に強く反映されることが示された．また，培養上清抗AChR抗体価は培養上清IgG値とも有意な相関が認められ，培養系においてMG患者PBMCは多クローン性に抗体産生を誘導するよう活性化されていると考えられた．さらに，血清抗AChR抗体価と血清IgG値は相関が認められず，循環中のリンパ球のごく少数が抗AChR抗体産生能を有するクローンであると推察された．これは，Levinsonら[40)]のMG患者B細胞は生体内では多クローン性に活性化されており，培養系では活性化を認めないとの結果とは相反した．しかし，彼らの生体内での活性化は循環中のsIg陽性細胞がMG患者で増加を認めたことを根拠としているが，正常対照群と有意差がないとする報告もあり[23)41)]，また，培養系ではPWMの添加により抗AChR抗体産生の増加が認められなかったことを根拠とし多クローン性活性化がないとしているが，これだけで活性化がないとは結論できない．

さらに本研究では，リンパ球刺激による抗体産生能の変化をみるため，マイトジェンであるPWM，PHAとIL-2を培養系に添加した．PWMはT細胞依存性にB細胞を形質細胞に分化させる作用をもつことが知られ[42)]，PHAは主にT細胞を刺激し，IL-2は主にTh1細胞から産生され，T細胞やB細胞のみでなく，単球などの増殖作用をもつとされる．これまでMG患者PBMCのマイトジェンに対する反応については，PWM，PHAに対する細胞増殖反応が低下している[43)]，PWM刺激によりIgG産生は変化しなかった[34)]，PWMにより抗AChR抗体およびIgGの産生を亢進させた[23)44)]，抗AChR抗体産生がPBMC

のみの培養では認められなかったがPWM刺激により認められた例があった[22]，PWM刺激により軽症例では抗AChR抗体産生が増加し重症例では抑制された[45]など様々な報告がある．IL-2に関しては，MG患者PBMC培養上清中の可溶性IL-2受容体は正常対照群と有意差がなく[46][47]，T細胞表面上のIL-2受容体発現の亢進は認めず[47]，IL-2添加により細胞増殖の増加も認めなかった[47][48]との報告がある．我々の検討では，PWM，PHA，IL-2の添加により抗AChR抗体およびIgGの産生の上昇は認められず，これまでの報告からも考えるとMG患者PBMCでは反応は様々であるといえる．したがって，非特異的なB細胞刺激では抗AChR抗体産生が増加する一定の傾向はないと考えられた．

一方，MGの病態形成におけるT細胞の関与については，Yiら[49]によるとMG患者PBMC中のT細胞のうち約1/5000がAChR特異的T細胞と推定されている．しかし，正常対照者[30][50]~[52]や臍帯血中[53]にもAChR抗原に反応するT細胞クローンが見出されており，MG特異的とはいえない．また，すべての自己反応性T細胞クローンが自己抗体産生を促進するわけではなく，一部のクローンのみがそのはたらきをもつとされ治療のターゲットとして有用となる可能性がある．そこで，ごく微量で，しかも短時間のうちに，特定のT細胞レセプターVβエレメントを有するT細胞をMHCの拘束を受けずに活性化することが知られているSAGs[54]を用い，正常者との比較においてMG患者T細胞の機能異常の有無を細胞増殖反応，抗体産生量の変化について検討した．細胞増殖反応については，用いたSAGsは，SEA，SEB，SEC1，SEC2，SEC3，TSST-1であり，これらにより，Vβ1，2，3，5，6，7，9，12，13，14，15，17，20を有するT細胞レパトワが刺激されたことになる．本検討では，SAGs添加により約30倍もの細胞増殖反応がMG患者群と正常対照群との両群に誘導されたが，両群間やそれぞれ各SAGs間にも反応性に有意差は認められなかった．近年，自己免疫疾患動物モデルにおいて，自己抗原を認識するT細胞はあるVβエレメントをもつものに限定されていることが示されてきており，例えばMGの動物モデルである実験的自己免疫性重症筋無力症 (experimental autoimmune MG, EAMG) ではAChRを認識するT細胞はVβ6[55][56]あるいはVβ8[57]の利用頻度が高いとの報告がある．また，ヒトではMG患者PBMCにおいて15例中4例にAChR抗原刺激によりT細胞クローンの異常増殖を認め，その4例中3例にT細胞のVβ12遺伝子の増幅を認めたとの報告がある[58]．しかし，本研究の結果からは，SAGsに対する反応が増大あるいは欠失したT細胞レパトワの存在は指摘されなかった．ただし，本研究では選択的に単一のVβエレメントを有するT細胞を刺激しているのではなく，SAGsによりある広がりをもったT細胞レパトワを刺激しているために，同時に刺激される他のVβエレメントを有するT細胞の増殖が非常に大きいために差として検出できなかった可能性は残される．

SAGs刺激による抗体産生能の変化については，SEA，SEB，SEEを用い検討を行ったが，刺激されたT細胞レパトワは，Vβ1，3，5，6，7，8，9，12，14，15，17，18，20に相当する．これらSAGsを加えても抗AChR抗体価およびIgG産生は亢進を認めず，抗原非特異的にT細胞を刺激し増殖を促進させたのみではB細胞の抗体産生を増大しないことが示された．これには，サプレッサー機能をもつ$CD8^+V\beta^+$T細胞も同時に刺激された影響が考えられるが，今回は表面マーカーによる解析は行っていない．また，自己反応性T細胞はSAGsにより増殖刺激あるいは活性化を受けない可能性や，SAGsと特異抗原による刺激とではT細胞内での反応性が異なる可能性も考えられるが，今後の検討課題である．

このように，MG患者のPBMCの培養系における自己抗体産生は抗原非特異的な外来性のリンパ球刺激では影響を受けないことが示された．そこで，培養系での多クローン性抗体産生の促進を担う局所的な因子としてオートクラインあるいはパラクライン的に分泌されるサイトカインの影響を考え，培養上清中の濃度を測定した．これまでのMG患者でのサイトカイン産生に関する検討では，AChR抗原刺激によるPBMCのmRNA発現が，IL-4，IL-6，IL-10，IL-12，IFN-γ，TNF-α，形質転換成長因子(transforming growth factor, TGF)-βにおいて亢進が認められた[59]~[65]と報告されている．しかしこれらの結果は，大量の抗原刺激の条件下であるため生理的な細胞機能を反映していない可能性があり，mRNAの発現量と蛋白レベルの相関あるいは細胞内の量と細胞外への分泌量との相関が明らかではなく，サイトカインは最終的に細胞外へ分泌されて作用するものであるため，mRNA発現亢進がそのサイトカインの病態への強い関与を示すとは断定できない．また，MG患者血清中では，IL-2，IL-6の濃度は上昇していたが[66][67]，IFN-γ，TNF-αの濃度は上昇していなかった[68]という結果が報告されている．血清中のサイトカイン値は，細胞からの分泌，流血中の受容体との結合，分解を含めた総合的な結果を示しているため，血清中の高値は産生亢進のみを反映していない可能性がある．我々はより生理的状況下でのサイトカイン産生を評価するため，抗原刺激を用いない条件下でMG患者のPBMCを培養し，そのサイトカインの自然分泌量を測定した．Mokhtarianら[69]はMG患者のPBMCのIL-2刺激による培養でIL-2とIFN-γの産生量の上昇を，Vervlietら[70]はPHAあるいはコンカナヴァリンAの刺激による培養でIFN-γの産生低下を，Åhlbergら[46]はIFN-γの自発的産生とコンカナヴァリンA刺激によるIL-2産生は低下し，TNF-αは重症例でより産生が高いと報告している．しかし，本研究の結果からは，正常対照と比較し有意な産生量の上昇を認めたサイトカインは指摘されなかった．また，抗AChR抗体産生量とも相関を示したものもなく，自己抗体産生の亢進に直接関与するサイトカインも指摘されなかった．よって，MGの病態におけるTh1およびTh2の優位性については言及することはできなかった．ヘルパーT細胞は機能の上から，IL-2，IFN-γ，TNF-α/βを分泌し主に細胞性免疫に関与するTh1細胞と，IL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-13を分泌し主に液性免疫に関与するTh2細胞とに分けられている．また，Th2細胞から主に産生されるIL-4[71]，IL-5[71]，IL-6[72]，IL-10[73]，IL-13[74]は，いずれもB細胞の分化と免疫グロブリン産生を亢進させることが知られ自己免疫疾患における自己抗体産生に関係していると推定されている．今回のMG患者における検討では，IL-6とIL-10の分泌量のみが総IgG産生量と有意な正の相関を示し，IL-4，IL-5，IL-13の分泌量とは相関を認めなかった．MG患者では，ヘルパーT細胞のIL-6受容体発現の亢進が示唆され[75]，IL-6に対する反応性が高まっている可能性が考えられる．よって，IL-6産生量は正常対照と差が認められなくても，IL-6に対する感受性の亢進が抗体産生に関与している可能性は十分に考えられる．以上より，本研究からはMG患者のPBMC培養におけるIgG産生量の

亢進にはIL-6およびIL-10によるB細胞の多クローン性活性化が関与している可能性が示唆され，今後，MGの抗AChR抗体産生におけるサイトカインネットワークの影響についてさらに検討を進める必要性があると思われた．

結 論

1．MG患者PBMCは培養系においても抗AChR抗体を産生することが示されたが，マイトジェンやスーパー抗原などの抗原非特異的な刺激では抗体産生は亢進しないと考えられた．

2．MG患者PBMCの培養系における抗AChR抗体産生は血清抗AChR抗体価と有意な正の相関が認められ，さらに胸腺あるいは骨髄中の単核球と比較しPBMCがより高い抗AChR抗体産生能を有していることが示され，PBMCが自己抗体産生に量的に大きな役割を担っていると推察された．

3．セロネガティブMG例の19％ (4/21例) でPBMC培養によりその培養上清中に有意な抗AChR抗体の産生を認めたため，その一部の症例では抗AChR抗体産生能は有しているが現在の測定系では感度以下のために血清抗体価が検出されない可能性が考えられた．

4．PBMC培養ではMG患者において有意なサイトカイン産生の亢進はなく，抗AChR抗体産生を特異的に誘導するサイトカインも指摘されなかったため，Th1およびTh2の優位性については明らかではなかった．しかし，培養系でのMG患者PBMCのIgG産生亢進にIL-6とIL-10によるB細胞の多クローン性活性化が関与する可能性が示唆された．

謝 辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部神経内科学講座高守正治教授に深甚の謝意を表します．また，直接御指導いただいた同講座吉川弘明講師に深謝いたします．さらに，本研究に御協力いただいた同講座岩佐和夫博士，安川善博博士に厚く御礼を申し上げます．

なお，本論文の要旨の一部は，平成7年度厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班会議 (1996年1月，東京)，第38回日本神経学会総会 (1997年5月，新横浜)，第39回日本神経学会総会 (1998年5月，京都)，第16回日本神経治療学会総会 (1998年7月，金沢) において発表した．本研究は厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班平成7，8，9，10年度研究費および平成9，10年度科学研究費補助金の援助を受けたことを付記する．

文 献

1) Drachman DB. Myasthenia gravis. N Engl J Med 330: 1797-1810, 1994

2) Engel AG. Myasthenia gravis and myasthenic syndromes. Ann Neurol 16: 519-534, 1984

3) Müller-Hermelink HK, Schultz WA, Marx A. Characterization of the human thymic microenvironment: lymphoepithelial interaction in normal thymus and thymoma. Arch Histol Cytol 60: 9-28, 1997

4) Schluep M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells *in situ*: an immunohistological study. Ann Neurol 22: 212-222, 1987

5) Vincent A, Scadding GK, Thomas HC, Newsom-Davis J. *In vitro* synthesis of anti-acetylcholine receptor antibody by thymic lymphocytes in myasthenia gravis. Lancet 1: 305-307, 1978

6) Newsom-Davis J, Wilcox N, Calder L. Thymus cells in myasthenia gravis selectively enhance production of anti-acetylcholine-receptor antibody by autologous blood lymphocytes. N Engl J Med 305: 1313-1318, 1981

7) Scadding GK, Vincent A, Newsom-Davis J, Henry K. Acetylcholine recepror antibody synthesis by thymic lymphocytes: correlation with thymic histology. Neurology 31: 935-943, 1981

8) Fujii Y, Monden Y, Nakahara K, Hashimoto J, Kawashima Y. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: production by lymphocytes from thymus or thymoma. Neurology 34: 1182-1186, 1984

9) Fujii Y, Monden Y, Nakahara K, Hashimoto J, Nakahara K, Kawashima Y. Acetylcholine receptor antibody-producing cells in thymus and lymph nodes in myasthenia gravis. Clin Immunol Immunopathol 34: 141-146, 1985

10) Heidenreich F, Vincent A, Wilcox N, Newsom-Davis J. Anti-acetylcholine receptor antibody specificities in serum and in thymic cell culture supernatants from myasthenia gravis patients. Neurology 38: 1784-1788, 1988

11) Hohlfeld R, Kalies I, Kohleisen B, Heininger K, Conti-Tronconi B, Toyka KV. Myasthenia gravis: stimulation of antireceptor autoantibodies by autoreactive T cell lines. Neurology 36: 618-621, 1986

12) Hohlfeld R, Toyka KV, Tzartos SJ, Carson W, Conti-Tronconi BM. Human T-helper lymphocytes in myasthenia gravis recognize the nicotinic α-subunit. Proc Natl Acad Sci USA 84: 5379-5383, 1987

13) Protti MP, Manfredi AA, Straub C, Wu XD, Howard JF, Conti-Tronconi BM. Use of synthetic peptides to establish anti-human acetylcholine receptor $CD4^+$ cell line from myasthenia gravis patients. J Immunol 144: 1711-1720, 1990

14) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition of according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348-2357, 1986

15) Romagnani S. Human T_H1 and T_H2 subsets: doubt no more. Immunol Today 12: 256-257, 1991

16) Osserman KE, Genkins G. Studies in myasthenia gravis: short-term massive corticotropin therapy. JAMA 198: 699-702, 1966

17) Lindstrom J. An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. Clin Immunol Immunopathol 7: 36-43, 1977

18) Somnier FE. Anti-acetylcholine receptor (AChR) antibodies measurement in myasthenia gravis: the use of cell line TE671 as a source of AChR antigen. J Neuroimmunol 51: 63-68, 1994

19) Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I. Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. Nature 310: 244-246, 1984

20) Sommer N, Willcox N, Harcourt GC, Newsom-Davis J. Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells. Ann Neurol 28: 312-319, 1990

21) Newsom-Davis J, Willcox N, Scadding G, Calder L, Vincent A. Anti-acetylcholine receptor antibody synthesis by cultured lymphocytes in myasthenia gravis: thymic and peripheral blood cell interactions. Ann NY Acad Sci 377: 393-402, 1981

22) Lisak RP, Laramore C, Zweiman B, Moskovitz A. *In vitro* synthesis of antibodies to acetylcholine receptor by peripheral blood mononuclear cells of patients with myasthenia gravis. Neurology 33: 604-608, 1983

23) Fujii Y, Hashimoto J, Monden Y, Ito T, Nakahara K, Kawashima Y. Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. J Immunol 136: 887-891, 1986

24) Shinomiya N, Yata J. B and T cell involvement in anti-acetylcholine receptor antibody formation in myasthenia gravis. Clin Exp Immunol 46: 277-285, 1981

25) Benner R, Hijmans W, Haaijman JJ. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. Clin Exp Immunol 46: 1-8, 1981

26) Hibi T, Dosch H-M. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. Eur J Immunol 16: 139-145, 1986

27) Fujii Y, Monden Y, Hashimoto J, Nakahara K, Kawashima Y. Acetylcholine receptor antibody production by bone marrow cells in a patient with myasthenia gravis. Neurology 35: 577-579, 1985

28) Levinson AI, Zweiman B, Lisak RP, Dziarski A, Moskovitz AR. Thymic B-cell activation in myasthenia gravis. Neurology 34: 462-468, 1984

29) Zweiman B, Levinson AI, Lisak RP. Phenotypic characteristics of thymic B lymphocytes in myasthenia gravis. J Clin Immunol 9: 242-247, 1989

30) Link H, Olsson O, Sun J, Wang W, Andersson G, Ekre H, Brenner T, Abramsky O, Olsson T. Acetylcholine receptor-reactive T and B cells in myasthenia gravis and controls. J Clin Invest 87: 2191-2196, 1991

31) Spencer J, Choy M, Hussel T, Papadaki L, Kington JP, Isaacson PG. Properties of human thymic B cells. Immunol 75: 596-600, 1992

32) Willcox HNA, Newsom-Davis J, Calder LR. Greatly increased autoantibody production in myasthenia gravis by thymocyte suspensions prepared with proteolytic enzymes. Clin Exp Immunol 54: 378-386, 1983

33) Willcox HNA, Newsom-Davis J, Calder LR. Cell types required for anti-acetylcholine receptor antibody synthesis by cultured thymocytes and blood lymphocytes in myasthenia gravis. Clin Exp Immunol 58: 97-106, 1984

34) Limburg PC, Hummel-Tappel E, Oosterhuis HJ. *In vitro* T-cell dependent B-cell activity in myasthenia gravis. Clin Exp Immunol 61: 31-38, 1985

35) Roses AD, Olanow W, McAdams MW, Lane RJM. No direct correlation between serum antiacetylcholine receptor antibody levels and clinical state of individual patients with myasthenia gravis. Neurology 31: 220-224, 1981

36) Lewis RA, Selwa JF, Lisak RP. Myasthenia gravis: immunological mechanisms and immunotherapy. Ann Neurol 37 (S1): S51-S62, 1995

37) Kornfeld P, Fox S, Maier K, Mahjoub M. Ten years experience with therapeutic apheresis in a community hospital. J Clin Aphresis 7: 63-68, 1992

38) Lindstrom J, Shelton D, Fujii Y. Myasthenia gravis. Adv Immunol 42: 233-284, 1988

39) Li Z, Forester N, Vincent A. Modulation of acetylcholine receptor function in TE671 (rhabdomyosarcoma) cells by non-AChR ligands: possible relevance to seronegative myasthenia gravis. J Neuroimmunol 64: 179-183, 1996

40) Levinson AI, Dziarski A, Lisak RP, Zweiman, Moskovitz AR, Brenner T, Abramsky O. Polyclonal B-cell activity in myasthenia gravis. Neurology 31: 1198-1201, 1981

41) Skolnik PR, Lisak RP, Zweiman B. Monoclonal antibody analysis of blood T-cell subsets in myasthenia gravis. Ann Neurol 11: 170-176, 1982

42) Keightley RG, Cooper MD, Lawton AR. The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. J Immunol 117: 1538-1544, 1976

43) Kawanami S, Kanaide A, Itoyama Y, Kuroiwa Y. Lymphocyte function in myathenia gravis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 42: 734-740, 1979

44) McLachlan SM, Nicholson LVB, Venables G, Mastalgia FL, Bates D, Smith BR, Hall R. Acetylcholine receptor antibody synthesis in lymphocytes cultures. J Clin Lab Immunol 5: 137-142, 1981

45) Lefvert AK, Holm G, Sundén H, Pirskanen R. Cellular production of antibodies related to the acetylchoine receptor in myasthenia gravis: correlation with clinical stage. Scand J Immunol 25: 265-273, 1987

46) Åhlberg RE, Pirskanen R, Lefvert AK. Defective T lymphocyte function in nonthymectomized patients with myasthenia gravis. Clin Immunol Immunopathol 60: 93-105, 1991

47) Infante AJ, Infante PD, Jackson CE, Barohn RJ, Tami J, Iturriaga E, Talib S, Kraig E, Clarkin KZ, Krolick KA. Evidence against chronic antigen-specific T lymphocyte activation in myasthenia gravis. J Neurosci Res 45: 492-499, 1996

48) Ragheb S, Ferrio MF, Lisak RP. Response of peripheral blood mononuclear cells from myasthenia gravis patients to exogenous interleukin-2. Ann NY Acad Sci 681: 323-324, 1993

49) Yi Q, Pirskanen R, Lefvert AK. Human muscle acetylchoine receptor reactive T and B lymphocytes in the peripheral blood of patients with myasthenia gravis. J Neuroimmunol 42: 215-222, 1993

50) Melms A, Malcherek G, Gern U, Wiethölter H, Müller CA, Schoepfer R, Lindstrom J. T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the α-subunit. Ann Neurol 31: 311-318, 1992

51) Sommer N, Harcourt GC, Willcox N, Beeson D, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. Neurology 41: 1270-1276, 1991

52) Salvetti M, Jung S, Chang S-F, Will H, Schalke BCG, Wekerle H. Acetylcholine receptor-specific T-lymphocyte clones in the normal human immune repertoire: target epitopes, HLA restriction, and membrane phenotypes. Ann Neurol 29: 508-516, 1991

53) Fredrikson S, Sun J-B, Huang W-X, Li B-L, Olsson T, Link H. Cord blood contains high numbers of autoimmune T cells recognizing multiple myelin proteins and acetylcholine receptor. J Immunol 151: 2217-2224, 1993

54) Kotzin BL, Leung DYM, Kappler J, Marrack P. Superantigens and their potential role in human disease. Adv Immunol 54: 99-166, 1993

55) Krco CJ, David CS, Lennon VA. Mouse T lymphocyte response to acetylcholine receptor determined by T cell receptor for antigen Vβ gene products recognizing Mls-1^a. J Immunol 147: 3303-3305, 1991

56) Infante AJ, Levcovitz H, Gordon V, Wall KA, Thompson PA, Krolick KA. Preferential use of a T cell receptor Vβ gene by acetylcholine receptor reactive T cells from myasthenia gravis-susceptible mice. J Immunol 148: 3385-3390, 1992

57) Aimé-Sempé C, Cohen-Kaminsky S, Bruand C, Klingel-Schmitt I, Truffault F, Berrih-Aknin S. *In vivo* preferential usage of TCR Vβ 8 in Torpedo acetylcholine receptor immune response in the murine experimental model of myasthenia gravis. J Neuroimmunol 58: 191-200, 1995

58) Grunewald J, Åhlberg R, Lefbert A-K, Dersimonian H, Wigzell H, Janson CH. Abnormal T-cell expansion and V-gene usage in myasthenia gravis patients. Scand J Immunol 34: 161-168, 1991

59) Zhang G-X, Navikas V, Link H. Cytokines and the pathogenesis of myasthenia gravis. Muscle Nerve 20: 543-551, 1997

60) Matusevicius D, Navikas V, Palasik W, Pirskanen R, Fredrikson S, Link H. Tumor necrosis factor-α, lymphotoxin, interleukin(IL)-6, IL-10, IL-12 and perforin mRNA expression in mononuclear cells in response to acetylcholine receptor is augmented in myasthenia gravis. J Neuroimmunol 71: 191-198, 1996

61) Navikas V, Link J, Palasik W, Söerström M, Fredrikson S, Olsson T, Link H. Increased mRNA expression of IL-10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. Scand J Immunol 41: 171-178, 1995

62) Link J, He B, Navikas V, Palasik W, Fredrikson S, Söderström M, Link H. Transforming growth factor-β 1 supresses autoantigen-induced expression of pro-inflammatory cytokines but not of interleukin-10 in multiple sclerosis and myasthenia gravis. J Neuroimmunol 58: 21-35, 1995

63) Link J, Fredrikson S, Söderström M, Olsson T, Höjeberg B, Ljungdahl Å, Link H. Organ-specific autoantigens induce transforming growth factor-β mRNA expression in mononuclear cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. Ann Neurol 35: 197-203, 1994

64) Link J, Söderström M, Ljungdahl Å, Höjeberg B, Olsson T, Xu Z, Fredrikson S, Wang Z-Y, Link H. Organ-specific autoantigens induce interferon-γ and interleukin-4 mRNA expression in mononuclear cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. Neurology 44: 728-734, 1994

65) Link J, Navikas V, Yu M, Fredrikson S, Osterman P-O, Link H. Augmented interferon-γ, interleukin-4 and transforming growth factor-β mRNA expression in blood mononuclear cells in myasthenia gravis. J Neuroimmunol 51: 185-192, 1994

66) Hartung HP, Reiners K, Schmidt B, Stoll G, Toyka KV. Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison with other neurological diseases of presumed immunopathogenesis. Ann Neurol 30: 48-53, 1991

67) Shimada K, Koh CS, Yanagisawa N. Detection of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuroimmunological diseases. Jpn J Allergol 42: 934-940, 1993

68) Confalonieri P, Antozzi C, Cornelio F, Simoncini O. Immune activation in myasthenia gravis: soluble interleukin-2 receptor, interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in patients' serum. J Neuroimmunol 48: 33-36, 1993

69) Mokhtarian F, Shirazian D, Grob D. Production of interferon gamma and interleukin-2 by peripheral blood lymphocytes of patients with myasthenia gravis and other autoimmune diseases. Ann NY Acad Sci 681: 315-318, 1993

70) Vervliet G, Carton H, Billiau A. Interferon-γ production by peripheral blood leucocytes from patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. Clin Exp Immunol 59: 391-397, 1984

71) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol 7: 145-173, 1989

72) Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol Today 11: 443-449, 1990

73) Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu D-H, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 89: 1890-1893, 1992

74) Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. Immunol Today 15: 19-26, 1994

75) Bongioanni P, Ricciardi R, Romano MR, Murri L, Muratorio A. T-cell interleukin-6 receptor binding in patients with myasthenia gravis. J Neurol Sci 158: 215-220, 1998

In vitro Production of Anti-acetylcholine Receptor Antibodies and Cytokines Induced by Mononuclear Cells from Patients with Myasthenia Gravis

Katsuaki Sato, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640

— J. Juzen Med Soc., 107, 382 — 395 (1998)

Key words myasthenia gravis, anti-acetylcholine receptor antibody, peripheral blood mononuclear cells, superantigens, cytokines

Abstract

Myasthenia gravis (MG) is an organ-specific autoimmune disease that is caused by autoantibodies raised against acetylcholine receptors (AChR) in the muscles. Although it has been clearly established that thymus abnormalities are closely related to the occurrence of MG, synthesis of anti-AChR antibody by mononuclear cells in the thymus is not sufficient in itself to explain the amount of anti-AChR antibodies in the serum of the whole body. In the present study, we used a cell culture system to clarify the characteristics of spontaneous antibody production by mononuclear cells from patients with MG. In the in vitro study, cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) showed significantly elevated levels of anti-AChR antibody and IgG synthesis compared to those of the normal controls. When PBMC from patients with seronegative MG was cultured, 4 of 21 samples revealed significantly detectable levels of anti-AChR antibody in vitro. PBMC culture can thus be considered to be a useful diagnostic tool for seronegative MG. PBMC demonstrated a higher synthesis of anti-AChR antibodies per cell than those from bone marrow and thymus. It is therefore likely that PBMC constitute a principal site for the secretion of anti-AChR antibody in patients with MG. No obvious relationship was found between clinical severity and either in vitro anti-AChR antibody synthesis by PBMC or serum anti-AChR antibody titer in MG patients. Since there was a significant correlation between in vitro anti-AChR antibody synthesis and in vitro IgG production, we assumed the occurrence of polyclonal B cell activation in vitro. In vitro, anti-AChR antibody synthesis was not influenced by mitogens such as pokeweed mitogen, phytohemagglutinin, recombinant IL-2 or superantigens, suggesting that antigen non-specific stimulation of lymphocytes is not implicated in the increase in autoantibody production. The production of cytokines, such as interleukin(IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-γ, TNF-α, was not significantly elevated in the PBMC culture of patients with MG compared to those of the normal controls. The level of anti-AChR antibodies in the culture did not significantly correlate with that of the cytokines, while total IgG levels significantly correlated with the IL-6 and IL-10 levels. These results suggest that the increase in IgG synthesis by PBMC from patients with MG is brought about by polyclonal activation of B cells induced by IL-6 and IL-10.