

# 中野治郎 論文内容の要旨

主 論 文

## Laminin-induced Autoimmune Myositis in Rats

(ラミニン免疫によって生じたラットの筋炎)

中野治郎, 吉村俊朗, 沖田 実, 本村政勝, 亀井慎太郎  
松尾秀徳, 江口勝美

J Neuropathol Exp Neurol 64 巻 9 号 790-796 2005 年

長崎大学大学院医学研究科 内科系 専攻  
(指導教授: 江口勝美 教授)

### 緒 言

多発性筋炎(以下, PM と略す)や皮膚筋炎(以下, DM と略す)は、T細胞が関与する自己免疫疾患の一つであり、その重要な自己抗体としてヒスチジル tRNA 抗体 (Jo-1 抗体) などが挙げられる。しかしながら、それらの自己抗体は検出頻度が低く、筋炎の直接的な原因になっているとは考えられておらず、PM/DM の病因抗原は未だ確定されていない。

一方、PM/DM では骨格筋だけでなく間質性肺炎、血管炎などを合併する。このことは、PM/DM の病因抗原が骨格筋、皮膚、血管、肺に共通に分布する物質である可能性がある。なかでもラミニンは皮膚、骨格筋、肺、血管、腎臓、その他の内臓に広く分布するタンパク質である。そこで今回我々は、PM の病因抗原の一つとしてラミニンを仮説し、ラットラミニンを免疫することによってヒト PM に類似した筋炎が惹起されるかどうかを検討した。

### 対象と方法

#### 1. 実験動物

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雌ラット 23 匹を用い、これを実験群 (18 匹) と対照群 (5 匹) に振り分けた。実験群には、マウス Engelbreth-Holm-Swarm (以下、EHS) 由来ラミニン (1mg/ml, Sigma) とフロイント完全アジュバントの混合液を 3 回 (1 回/2 週) 皮内注射 (0.3ml/回) し、それに併せて百日咳毒を皮内注射 (2 µg/回) した。対照群には PBS を同様に注射した。なお、今回の実験は本学の動物実験倫理委員会の承認を得て、動物実験施設で行った。

#### 2. 実験終了後

最後の免疫注射から 2 週間後、ラットをペントバルビタール腹腔内注射 (40 µg/g) により麻酔し、尾静脈から血液を採取した。採取した血液は試験管内に 1~3 時間置いた後 1500g で遠心分離し、血清とした。次に、ラット右後肢からヒラメ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋

を抽出し、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結させ、保存した。

### 3. ウェスタンブロット法によるラミニン自己抗体の検出

マウスEHS腫瘍由来のラミニンを1%低融点アガロース・2.5%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEした後、PVDF膜へ転写し、一次抗体として採取した血清(500倍希釈)を1時間、次いで、2次抗体抗として抗ラットIgG抗体-HRP標識(1000倍希釈)を30分間反応させ、発色基質溶液(4CN Plus)にて発色させた。

### 4. 組織学的検索および免疫組織化学的解析

凍結筋試料は7 $\mu$ mに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡を用いて検鏡した。定量解析として、筋線維500本あたりの壊死線維数をカウントした。そして、Mann-Whitney U検定を適応し、実験群と対照群の2群間の有意差を危険率5%未満で求めた。加えて、炎症細胞の動態ならびに筋膜の病態を検索する目的に、一次抗体に抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗マクロファージ抗体、抗B細胞抗体、抗パーフォリン抗体、抗メロシン(ラミニン2鎖)抗体、抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。

## 結 果

- 1) 実験群のすべての血清で抗ラミニン抗体が検出された。一方、対照群では抗ラミニン抗体は検出されなかった。
- 2) 実験群の後肢骨格筋群では単核細胞の細胞浸潤、壊死線維が認められ、その程度はヒラメ筋が最も強かった。また、実験群の後肢骨格筋群の壊死線維数は対照群のそれよりも有意に多かった。
- 3) 実験群の後肢骨格筋群を免疫組織化学的解析した結果、筋内膜に多数のCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞が認められ、CD8陽性T細胞はしばしば筋線維内に浸潤していた。また、マクロファージは筋線維内外に多数認められ、B細胞は筋周膜でのみ小数認められた。
- 4) 実験群の後肢骨格筋群の壊死線維は、すべて抗メロシン抗体、抗ジストロフィン抗体が陰性であった。また、貪食作用が認められない非壊死線維であっても、CD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞、パーフォリン陽性細胞が隣接した筋線維は抗メロシン抗体、抗ジストロフィン抗体が陰性であった。

## 考 察

ラミニンは、筋線維基底膜を構成するタンパク質の一つで、ジストログリカン複合体・ジストロフィン、インテグリンという重要なタンパク質と結合し、細胞接着に重要な役割を果たすといわれている。そして今回、ラットラミニンを免疫したところ筋炎が惹起された。

T細胞の動態を免疫組織化学的に解析した結果、筋内膜周囲に多数のCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞が認められ、CD8陽性T細胞はしばしば筋線維内に浸潤していた。この所見はヒトPMと類似しており、主に細胞性免疫による炎症と考えられる。加えて、CD8陽性T細胞やCD4陽性T細胞、ならびにパーフォリン陽性T細胞が隣接している筋線維は、組織学的に壊死所見は認められなくても、免疫組織化学的にはメロシン(ラミニン2)やジストロフィンが陰性であった。この所見から、ラミニンやジストロフィンが筋線維壊死の初段階において変性していると推測でき、ラミニンの変性が筋炎を引き起こす重要な引き金になっていると考えられる。

以上のことから、ラミニンで免疫するとヒトPMに類似した筋炎が惹起された。ラミニンはヒトPM/DMの抗原の一つである可能性を提唱した。