

Isaacs症候群と抗電位依存性カリウムチャネル自己抗体

中村龍文, 本村政勝*, 福田 卓*, 江口勝美*, 吉村俊朗**, 中尾洋子***, 辻畑光宏***,
有村仁志****, 園田至人****, 有村公良****

目 的

Isaacs 症候群は、睡眠時にも持続する筋硬直や筋収縮後の弛緩障害、歩行障害などの運動障害および筋線維性攣縮、発汗過多などの末梢運動神経の持続的過剰興奮を主症状とする疾患である¹⁾。その発症には自己免疫機序が働き、電位依存性カリウムチャネル (voltage-gated K⁺ channel, VGKC) に対する自己抗体が重要な役割を果たしていると考えられている²⁾。本研究では、¹²⁵I- α -dendrotoxinを用いた放射性免疫測定法 (radio-immunoassay, RIA) を用いて、本邦のIsaacs 症候群における抗VGKC 抗体の診断的意義について検討した。

対 象

対象として、臨床症状に加え、電気生理学的に安静自発放電が認められたIsaacs 症候群患者19例の血清を用いた。そのうち17例 (89.4%) の血清IgGにはpatch clamp法でヒト神経芽腫 (NB-1) のVGKCを抑制する自己抗体が証明された³⁾。疾患コントロールとして、Guillain-Barré症候群を中心とする脱髄性末梢神経障害患者19例、重症筋無力症患者53例、Lambert-Eaton 筋無力症候群 (LEMS) 患者54例、健常者27例の合計172例の血清を用いた。

方 法

今回用いた α -dendrotoxinは、ヘビ毒由来の分子量約7000のポリペプチドで、電位依存性カリウムチャネルを阻害すると考えられている。測定法は、VGKC抗原としてラット小脳を2%ジギトニンで可溶化した。次に、可溶化したVGKCを¹²⁵I- α -dendrotoxinで標識し、患者血清を加えた。最後に、抗ヒトIgGを加え沈殿させ、その放射活性を測定した。抗VGKC抗体価は患者血清1Lが沈殿させる特異結合量をpmolで表現した。

長崎大学・院・感染分子病態学, *長崎大学医学部第一内科, **長崎大学医療技術短期大学部, ***春回会長崎北病院, ****鹿児島大学医学部第三内科

結 果

1) 健常者の抗体価の平均+3SD (28.6 pmol/L) を正常上限値とすると、Isaacs 症候群患者の19例中5例 (26.3%) で抗VGKC抗体が陽性であった (図1)。その5例は、すべてpatch clamp法でも陽性であった。

2) 疾患コントロールでは、LEMS患者の54例中4例 (7.4%) に陽性で、それ以外の重症筋無力症などの疾患コントロールではすべて陰性であった。

考 察

現在、Isaacs 症候群患者血清中に存在する抗VGKC抗体を検出する方法としては、

1) patch clamp法を用いた細胞レベルでのpassive transfer⁴⁾,

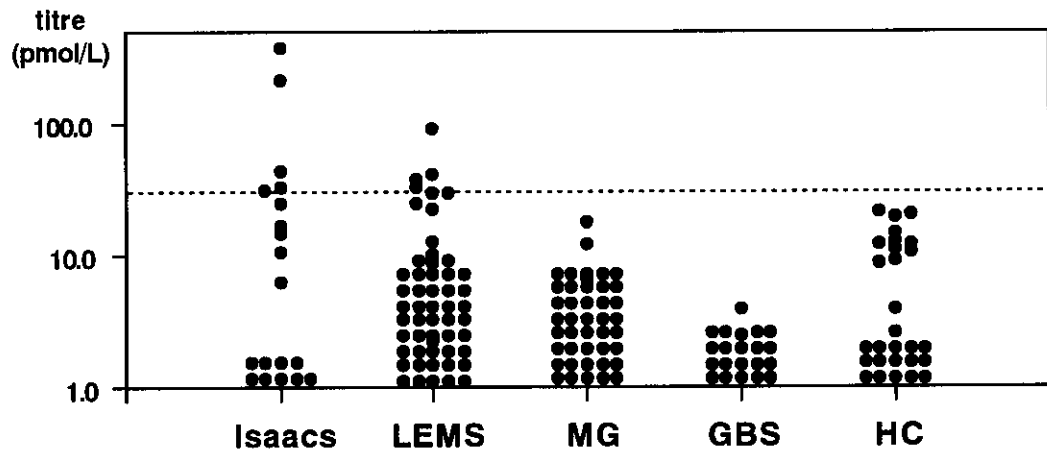
2) ¹²⁵I- α -dendrotoxinを用いたRIA法³⁾,

3) molecular immunohistochemical assay⁵⁾ などがある。

この中で最も感度が高い方法は、molecular immunohistochemical assayである。この方法では、アフリカツメガエルの卵母細胞に単一のVGKCのmRNAを注入し、VGKCを過剰に発現させ、その細胞を抗原として、免疫染色で自己抗体を検出する。Hartらは、このmolecular immunohistochemical assayを用いて、VGKCの中でKCNA6, KCNA2, および、一部のKCNA1aに対するIgG抗体が、Isaacs患者血清中に高頻度に存在することを証明した。一方、patch clamp法は、Isaacs 症候群だけでなく一部のGuillain-Barré症候群患者にも陽性となるという結果が出ており、疾患特異性の問題がある。今回使用した¹²⁵I- α -dendrotoxinの結果は、陽性率が20%台と低く、今後、新しいリガンドを用いた測定法の開発が必要であると考えられた。

Isaacs 症候群には、しばしば自己抗体が存在し、他の自己免疫性疾患である重症筋無力症や橋本病との合併も見られる。また、胸腺腫や肺癌と合併し、いわゆる傍腫瘍性症候群としての発症も散見されている⁶⁾。今回の研究で見つかったLEMSとIsaacs 症候群の合併例は、肺小細胞癌をも合併しており、その発症に傍腫瘍性症候群の関与が強く示唆された。

Fig.1:Anti-VGKC antibody



ま と め

neuromyotonia. Arch Neurol 57(4):527-31, 2000

¹²⁵I- α -dendrotoxinを用いたRIA法は、Isaacs 症候群での陽性率が低く、今後さらなる改良の必要性が示された。また、Isaacs症候群とLEMSとの合併例の存在が示唆された。現時点では、この抗VGKC抗体測定法は一部のIsaacs 症候群患者の血清学的診断に有用であると考えられた。

文 献

- 1) Isaacs H: A syndrome of continous muscle-fibre activity. J Nuerol Neurosurg Psychiatry 24: 319-52, 1961
- 2) Newsom-Davis J, Mills KR: Immunological associations of acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). Report of five cases and literature review. Brain 116 (Pt2):453-69,1993
- 3) Vincent A, et al: Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission. Eur J Biochem 1;267(23):6717-6728, 2000
- 4) Nagado T, et al: Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. Brain 122 (Pt 11):2057-66, 1999
- 5) Shillito P, et al: Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K+ channels of peripheral nerves. Ann Neurol 38(5):714-22, 1995
- 6) Hart IK, et al: Autoantibodies detected to expressed K+ channels are implicated in neuromyotonia. Ann Neurol 41(2):238-46, 1997
- 7) Mygland A, et al: Autoantibodies in thymoma associated myasthenia gravis with myositis or

Guillain-Barré 症候群の全国調査 —第3次調査結果を含めた最終報告—

荻野 美恵子¹⁾、斉藤 豊和¹⁾、有村 公良²⁾、納 光弘²⁾

目 的

免疫性神経疾患に関する調査研究班では日本における Guillain-Barré 症候群 (以下 GBS) の実体の把握をするため、平成 10 年より、GBS の全国調査を行ってきた。一次調査は日本における GBS の頻度や季節、性別などを調査し、二次調査ではさらに年齢、先行感染、重症度、おおまかな検査、治療、予後を調査報告した¹⁾。今回は最終調査としてさらに詳細な臨床症状、検査成績、治療選択および効果を検討するため、三次調査を行った。

対 象

対象として全国の 200 床以上の病床を有し、神経内科や小児科、老年科の診療科のある医療施設 4350 施設に対して一次調査を行った。1764 施設から回答を得、回収率は 40% であり、症例を有すると回答した施設は 547 施設、総数 2987 症例であった。過去 5 年間の平均年間発症数は約 600 例であった。

第二次および第三次調査は一次調査で症例ありと回答のあった 547 施設を対象に行い、二次調査では 345 施設から回答を得、回収率 63%、1752 症例を集計。年間発症率は人口 10 万人に対して 1.15 人と推定された。

調査には重症度分類として Hughes の分類 (grade 0 正常、grade 1 軽微な徴候のみ、grade 2 5m 独歩可能、grade 3 5m 介助歩行可能、grade 4 立位不能、grade 5 人工呼吸器が必要、grade 6 死亡)²⁾を用いた。また、症例の調査回答者に治療方針や治療効果についてアンケートを行った。

結 果

(1) 回収率

三次調査では 153 施設 770 例の回答を得、回収率は 28% (二次調査の 44%) であった。

(2) 一次、二次調査との共通項目

発症年齢は 20 代から 30 代をピークとして数ヶ月齢から 90 歳代までと分布し、男女差は 3:2 で男性に多く、発症時期は冬から春にかけてみられ、これらは一次、二次調査で得られた結果と同様であった。

(3) 臨床病型

三次調査では GBS と Miller-Fisher 症候群 (以下 MFS) と病型別に調査したところ、770 例中 685 例は GBS、76 例は MFS であった。また、回答のあった症状の分布等により検討すると、少数ながら亜型と思われる症例を認めた。このような亜型は今回の調査では漏れてしまっている可能性も大きいとは思うが、咽頭頸部上腕型(PCB)は 2.4%、Bickerstaff 型脳幹脳炎は 0.6%に認め、MFS と回答された内、約 4 分の 1 は三徴のうち 2 徴のみを認めるものであった。

亜型が少数であったこともあり、以下の分析はあくまで GBS と回答された 685 症例について行った。

(4) 前駆症状

前駆症状は、全症例の 73%で認め、約 60%が呼吸器症状であり、消化器症状は 30%にすぎない。特に MFS は約 90%が呼吸器感染で、先行感染の分布に明らかな相違があった。また、前駆症状は約半数で一週間以内に認められ認められ、3 週間以上前と回答したのは 5%以下であった。先行感染の検索は約半数の症例で行われ、先行感染を同定もしくは推測できたのは 66 症例 (18%、Campylobacter jejuni 28 例、CMV13 例他) にすぎず、ほとんどの症例では先行病原体は不明であった。

(5) 重症度別臨床経過

表 1 に示したごとく、grade 2 以下の軽症例は 23%、grade 3 以上の重症例が 77%であった。各 grade で症状がピークに達するまでの期間には差がなく、平均約 10 日であった。快復し始めた日は重症になるにつれて長い傾向にあった。予後については、症状固定時独歩不能 (grade 3

1) 北里大学東病院神経内科 2) 鹿児島大学第 3 内科

表1 重症度と臨床経過

	症例数	ピークに達した日 (第 病日)	回復し始めた日 (第 病日)	症状固定時 独歩不能 (%)
grade 1	52		7.3	15.6
grade 2	103	155	10.8	15.8
grade 3	111		10.3	15.8
grade 4	322	515	10.3	17.3
grade 5	82		9.9	19.9

表2 grade3 治療成績

	症例数	回復し始めた日	独歩可能日	発症1ヶ月後 grade	発症6ヶ月後 grade	症状固定時 の定時の grade
対症療法のみ	28	17	33	1.8	0.3	0.5
その他の治療群	78	15	25	1.6	0.4	0.5
血漿交換療法	42	15	24	1.4	0.3	0.4
ステロイド療法	23	15	26	1.7	0.4	0.6
IVIG療法	4	18	36	1.8	0.3	0.3

表3 grade4&5 治療成績

	症例数	回復し始めた日	独歩可能日	発症1ヶ月後 grade	発症6ヶ月後 grade	症状固定時 の定時の grade
対症療法のみ	56	18	56	2.6	1.1	0.7
その他の治療群	348	18	64	2.9	1.3	1.1
血漿交換療法	190	17	56	2.7	1.3	1.1
ステロイド療法	37	23	65	2.9	1.3	1.1
IVIG療法	26	12	46	2.7	0.9	0.4

注] 対症療法のみ；メチコパールやリハビリなど等。その他の治療群；血漿交換療法やステロイド療法、IVIG療法、またそれらの組み合わせの治療を行った症例のすべてを合計したもの

以上)は grade 3 および 4 では約 1 割、grade 5 では 2 割であった。死亡例 (grade 6) は 2 例であり、一例は GBS とは関係のない原因で死亡、もう一例は重症感染症を合併し、死亡している。

(6) 重症度別入院期間

平均入院期間は grade 1 20 日、grade 2 36 日、grade 3 42 日、grade 4 71 日、grade 5 133 日であった。また、grade 1 は 1 ヶ月以内に 71%が、grade 2,3 は 2 ヶ月以内に 78、75%

が退院しているが、grade 4,5 の半数がそれぞれ 2 ヶ月以上、3 ヶ月以上の入院期間となっている。

(7) 神経症状

脳神経症状は全体として約半数で認められた。特に顔面神経麻痺 (34%) や球症状 (29%) が多くみられ、重症例ほど頻度は高かった。感覚障害は自覚症状のみもあわせて約 2/3 の症例に、疼痛は約 2 割に認めた。失調症状も約 6%でみられ眼球運動障害を伴うものもあり、MFS の症候もあわせもつ症例もみられた。自律神経症状は約 2 割でみられ、重症例に多い傾向にあった。

(8) 筋力低下・筋萎縮

頸部筋力低下は重症例ほどみられ、軽症例ほど筋力低下は上肢または下肢に限局する症例がみられた。筋萎縮は重症例に多く、16%にみられ、軸索障害の存在を思わせた。

(9) 検査実施状況

各検査を症状ピーク前、ピーク時、回復時、固定時と分けて記載。髄液検査はほぼ全例に行われ、約 30%で正常であった。経時的に検査を行っている症例ではピーク時または回復期に異常が多く見られたが、終始正常の症例もみられた。髄液蛋白は重症例ほど高い傾向にあったが、病初期の蛋白量と重症度は相関せず、病初期の蛋白量で予後を予想するのは困難と思われた。その他の検査の実施率 (一回でも異常値を示した陽性率) は針筋電図 34% (73%)、神経伝導検査 93% (89%)、抗糖脂質抗体 41% (47%)、神経生検 3% (78%) であった。

(10) 治療成績

grade 1 および grade 2 ではほとんどの症例が対症療法のみで治療され予後もよいため、grade3 以上で検討した。表 2 および 3 に grade 別の治療効果を示した。回復し始めた日、独歩可能になった日、発症一月後、6ヶ月後、症状固定時の grade で評価した。

対症療法のみと積極的治療をした症例を比較すると独歩可能までの日数はその他の治療群 (積極的治療群) で短い傾向にあったが、長期予後に差はなかった。

各治療を単独で行った症例の比較では、grade 3 では、それぞれ有意な差はなかったが、grade 4&5 では IVIG 療法群が各項目でよい傾向にあった。

(11) 治療方針のアンケート結果

治療開始時期は約半数が grade 3 以上で開始すると答えた。30%は重症度に関係なく積極的に治療すると答えている。第一選択治療法は IVIG 療法が保険適応認可前のこともあり、血漿交換療法が約 6 割、その中でも evidence が無いといわれているなかで半数以上で免疫吸着療法を選択している。実際に使用してみて治療効果を有効であると思うものを一つ選択していただいた結果では、血漿交換療法 6 割、IVIG 療法 2 割でステロイド療法の選択はなかった。血漿交換療法のなかでは単純血漿交換と免疫吸着療法がほぼ同数であった。

考 案

今回の三次調査は多数の質問項目があったにも関わらず、770 例の回答を分析し得た。これは諸外国の大規模研究報告^{2)~3)}に比しても最大のものである。特に、予後や臨床経過、症状の分布等について詳細に頻度を求めることができた。

重症度に関しては軽症例が少ないが、入院していない症例も多いと思われ、本調査からでは実数が把握できていない可能性がある。諸外国に比し発症率がやや低くなっている⁶⁾が、実際の GBS の発症率はもう少し多いと思われる。また、後に重症になる症例ほど速くピークに達するという傾向は認められなかった。

予後の検討では、GBS ではほとんどの症例で改善はみえるが、日常生活に支障を来すような grade 2 以上の後遺症を残す症例が約 2 割にみられ、6%は独歩不能となっている。生命予後はよいが、機能予後は決して良いとはいえない。好発年齢が 30~40 歳代であるため、社会的損失も大きい疾患といえる。

先行感染が同定できた症例においては *Campylobacter jejuni* や CMV が多くみられたが、いずれも先行感染と抗体の関係で注目されたため、積極的に検索を施行した症例が多かったためと思われる。*Campylobacter jejuni* 感染は約 30%にみられるという報告²⁾もあるが、今回の調査では検索されたうち 16%に認めるのみであった。検索方法が施設より異なったことにもよるとと思われる。

また、重症例ほど脳神経症状や自律神経症状を伴う傾向にあった。GBS は運動障害が主ではあるが、多くで (65%) 感覚障害も伴うと考えた方がよい。また、疼痛は約 2 割でみられ、痛みが強いと本当に GBS でよいのかと心配になることもあるが、欧米では 4 割との報告⁷⁾も

あり決して稀な症状ではない。欧米との疼痛の頻度の差は先行感染の違いによる可能性が考えられる。

治療効果に関してはこれまでの prospective study では単純血漿交換療法や IVIG 療法の有効性は確立しているが、本調査で対症療法とそれらの積極的治療で差がなかったのは、retrospective study のためと考えられる。すなわち、重症度によらず、対症療法のみでも速やかに良くなった症例には、それ以上の治療を施行しなかった可能性があり、対症療法のみを対象となった症例に偏りがあると思われる。ステロイド療法群についても同様の傾向があると思われる。しかし、積極的治療の各治療間での比較はできると思われた。その結果では血漿交換療法、ステロイド療法、IVIG 療法で有意な差は認められなかった。

治療効果についてはさらに検討が必要だが、予後の結果からは、少なくとも後遺症を残す可能性がある grade 3 以上では対症療法やステロイド療法以外の積極的な治療が望まれた。

最後になりましたが、アンケートにお答えいただいた先生方に貴重な時間を割いていただいたことを厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 斉藤豊和、他：ギラン・バレー症候群の全国疫学調査結果について—治療に関する予備的報告—*Progress in medicine* 19:2369-2374, 1999
- 2) Jacob, B.C. et al: The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome. A case-control study. *Neurology* 51:1110-1115, 1998
- 3) Plasma exchange/sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial group: Randomised trial of plasma exchange, intravenous immunoglobulin, and combined treatments in Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 349:225-230, 1997
- 4) Guillain-Barre syndrome steroid trial group: Double-blind trial of intravenous methylprednisolone in Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 341:586-590, 1993
- 5) The Guillain-Barre syndrome study group: Plasmapheresis and acute Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 35:1096-1104, 1985
- 6) Alter M: The Epidemiology of Guillain-Barre Syndrome. *Ann Neurol* 27(suppl):S7-S12, 1990
- 7) Moulin D.E. et al: Pain in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 48:328-331, 1997

Guillain-Barré 症候群の血漿交換療法の比較検討

岡宮 聡 荻野 美恵子 荻野 裕 入江 幸子
金澤 直美 坂井 文彦 齋藤 豊和

目 的

Guillain-Barré 症候群 (以下 GBS) の急性期の治療として、現在血漿交換療法が広く行われている。単純血漿交換療法 (PE) は北米¹⁾、フランス²⁾ などのグループにより大規模臨床試験が行われ、有効性が確立された。一方、免疫吸着療法 (IA) や二重膜濾過法 (DFPP) の有効性は確立されていない。IA はアルブミンの損失が少なく、蛋白製剤の補充を必要としない利点を有し、安全性に優れており、本邦では多数の症例に施行されている³⁾。このような状況から、IA の有効性を検証する必要があると考え、自験例をもとに各治療法の有効性について比較検討を行った。

対 象

1986 年から 2000 年までに北里大学病院、同東病院および関連する 6 病院の神経内科で入院加療を行った、NINCDS の診断基準⁴⁾ を満たした GBS 症例について調査した。上記症例のうち、血漿交換療法を施行したのは 46 例であった。観察期間が短かった症例、複数の治療法を行った症例は除外し、単独の治療法を行った分析可能な症例 34 例につき検討した。治療法のうちわけはトリプトファンカラムを用いた免疫吸着療法 (Tr-IA) 20 例、DFPP 11 例、PE 3 例であった。重篤な合併症のために治療を中止した症例はなかった。

効果判定の指標として、発症から治療開始までの日数、Hughes らの重症度分類⁵⁾ (grade 0: 正常, grade 1: 軽微な徴候のみ, grade 2: 5m 独歩可能, grade 3: 5m 介助歩行可能, grade 4: 立位不能, grade 5: 人工呼吸が必要, grade 6: 死亡) に基づく各時期の重症度、1 grade 改善までの日数、人工呼吸器離脱までの日数、5m 独歩可能 (すなわち grade 2) に到達するまでの日数を調べた。統計学的有意性の検討は、Mann-Whitney U 検定を用いて行った。

北里大学東病院神経内科

結 果

全症例の比較では、PE 群の症例数が 3 例と少なく、ばらつきも大きく、有意差を論じることが困難であったため、Tr-IA 群と DFPP 群の 2 群間で比較した。治療効果を比較するために、治療開始前の条件を検証したところ、2 群間では年齢、性別、発症から治療開始までの日数、治療開始前の重症度の各項目に有意差がなく、治療開始前の条件は同等であった。治療効果に関しては、治療後経過で 4 週間後の重症度、24 週間後の重症度、1 grade 改善までの日数、独歩可能となるまでの日数のいずれにも有意差を認めず、両群ともに同程度の臨床症状の改善を示した。

次に、重症度により治療効果に差があるかどうかをみるために、治療開始前の重症度を一致させた群間で比較した。治療前の重症度が Hughes 3 の比較的軽症例と、Hughes 4, 5 の重症例とに分けて検討を加えた (表 1, 表 2)。軽症例、重症例ともに両群間で治療開始前の条件には有意差はなく、治療効果を比較し得るものであった。その結果、Tr-IA 群と DFPP 群では重症度を軽症例、重症例にわけても、治療後経過を示す各指標に有意差がなく、同程度の臨床症状の改善を認めた。さらに重症例を Hughes 4 と Hughes 5 に分けて検討した。Tr-IA 群 9 例のうち、Hughes 5 すなわち呼吸器装着例は 3 例、一方 DFPP 群でも 8 例のうち Hughes 5 は 3 例であり、呼吸器装着例の比率に偏りはなかった。呼吸器離脱までの日数など、治療後

Tr-IA群, DFPP群の比較

表1. 治療開始前の重症度 Hughes 3

	症例数	年齢 (歳)	治療開始までの日数	4週間後の重症度	24週間後の重症度	1 grade改善までの日数	独歩可能までの日数
Tr-IA	11	33±14	6.7±3.5	1.6±0.2	0.3±0.5	16±7	16±7
DFPP	3	43±21	7.0±4.4	2.3±1.5	1.0±1.0	30±26	30±26

表2. 治療開始前の重症度 Hughes 4, 5

	症例数	年齢 (歳)	治療開始までの日数	4週間後の重症度	24週間後の重症度	1 grade改善までの日数	独歩可能までの日数
Tr-IA	9	45±18	8.8±8.7	2.6±1.4	1.1±0.9	24±18	42±37
DFPP	8	43±13	7.6±4.1	3.1±1.6	1.8±1.3	32±30	39±35 (注)

平均±標準偏差。(注) 症状固定時まで独歩不能だった2例を除外した。

経過を示すいずれの指標でも両群間に明らかな差はなかった。

以上の結果の一部を図で示す。まず、独歩可能となるまでの日数を治療開始前の重症度別に図示した(図1)。Hughes 3の症例でTr-IA群の改善が早い傾向がみられた。Hughes 4,5の症例では平均値、中央値ともにほぼ同じ値であった。いずれの重症度でも両群間で有意差を認めなかった。

次に、治療開始前の重症度別に経時変化を示した。Hughes 3の症例(図2)では4週間後および24週間後の重症度について、両群間で有意差を認めなかった。治療開始前Hughes 4,5の症例(図3)でも同様に4週間後お

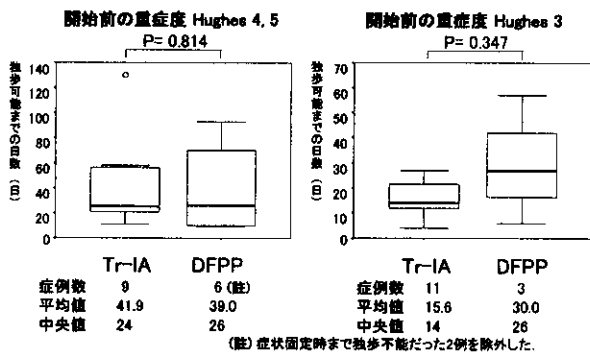


図1. 独歩可能までの日数の比較

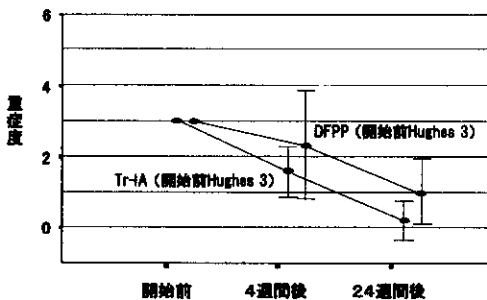


図2. 治療開始前の重症度別の経時変化(1)

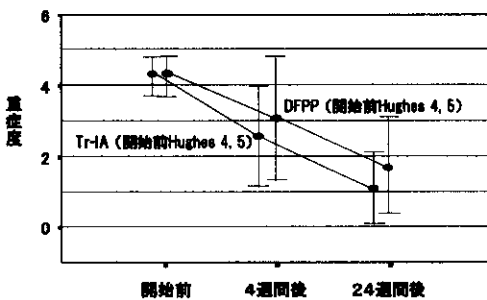


図3. 治療開始前の重症度別の経時変化(2)

よび24週間後の重症度について、両群間で有意差を認めなかった。

以上のように、いずれの指標についてもTr-IA群とDFPP群の2群間に有意差は認めず、Tr-IA群の改善の方が早い傾向を示した指標も存在した。

PE群は、症例数が3例と少なかったため、自験例だけで有意差を論じることが困難であった。そこで、過去に報告された海外での各大規模臨床試験におけるPE群^{1) 2) 6) 7) 8) 9)}と、自験例のTr-IA群との2群間で比較検討を行った(表3)。自験例のうち治療開始前重症度がHughes 4,5の重症例9例を選ぶと、各大規模臨床試験のPE群における治療開始前の条件(エントリー時の平均重症度・年齢・性別、発症から治療開始までの日数)がいずれもほぼ等しくなり、両群間の比較が可能と考えられた。4週間後に1 grade以上改善した症例の割合、4週間後の平均改善重症度、1 grade改善までの日数、独歩可能となるまでの日数、6ヵ月後の独歩不能症例の割合の各指標について、PE群とTr-IA群の間に明らかな差異を認めなかった。

考 察

今回の調査は1986年から2000年までのGBS自験例を対象としたが、我々の施設では最近の症例にはTr-IAを施行することが多かった。そのためTr-IA群とDFPP群の治療開始時期等に差が出る可能性があり、治療開始前の条件を比較する必要があったが、治療開始前の各指標についてTr-IA群とDFPP群の2群間に有意差は認めなかった。その上で、治療後の臨床症状の改善について比較したが、2群間に有意差は認めず、同等の有効性を示した。また、過去に報告された海外での各大規模臨床試験におけるPE群と自験例のTr-IA群で、治療開始前の条件を揃えて行った比較では、臨床症状の改善について明らかな差異を認めなかった。

表3. PE群とTr-IA群の比較

著者(年)	治療法	症例数	エントリー時の平均重症度	治療開始までの日数(日)	改善した症例の割合(%)	4週間後の平均改善重症度	1 grade改善までの日数(日)	独歩可能となるまでの日数(日)	6ヵ月後の独歩不能症例の割合(%)
Greenwood, et al (1984)	PE	14	4.43	13.5	50	0.64	—	—	—
GBS study group (1984)	PE	122	4.3	11.1	59	1.1	19	53	21
French cooperative group (1987)	PE	109	—	6.6	—	—	—	70	—
Van der Meché, et al (1992)	PE	73	3.9	5.6	34	0.4	41	69	—
Bril, et al (1996)	PE	24	4.1	4.7	61	1	16.5	—	—
PE / Sandoglobulin GBS trial group (1997)	PE	121	3.9	6.9	—	0.9	—	49	16.7
自験例	Tr-IA	9	4.3	6.8	67	1.5	19	42	11

Chen WH, et al. (1999) より一部改変。重症度はすべてHughesらの重症度分類。

一方、DFPPとPEの比較は、1999年に台湾のChenらにより報告され¹⁰⁾、16例のDFPP群と、各大規模臨床試験におけるPE群とを比較し、同程度の有効性が示唆されたと結論した。

PEは抗体除去能に最も優れた治療法¹¹⁾であるが、アルブミン喪失に対して蛋白製剤の補充が必要なため合併症が多い。新鮮凍結血漿を置換液として使用した場合に有意に合併症が多く、またアルブミン製剤の使用は経済的にも負担がある。DFPPはPEに比べアルブミンの損失が少ない方法だが、抗体除去能が劣ると報告されており、Chenらの報告はあるものの、現在のところ有効性が確立していない。IAはアルブミンの損失が少なく、蛋白製剤の補充が不要で安全性に優れている³⁾。抗体除去能では劣る¹¹⁾ものの、実際の我々の治療経験では半数以上の症例で、Tr-IAを2回施行後から自覚症状・神経学的所見ともに改善を認め、その後の経過も良好であった。今回の検討でPEやDFPPと同程度の有効性が示唆されたことから、安全性・経済性をも考慮してIAが推奨される。今後自己抗体以外の液性因子を含めたGBSの機序解明や、PEとIAとの大規模比較対照試験の実施が必要である。

ま と め

GBSに対する血漿交換療法について、自験例をもとにretrospectiveに比較検討した。臨床症状の改善においてTr-IAはPEやDFPPと同等の有効性を示した。IAの安全性に関しては過去の報告で確立しており、経済性をも考慮すると、IAが推奨される。

文 献

1) The Guillain-Barré Syndrome Study Group: Plasmapheresis and acute Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 35: 1096-1104, 1985

2) French Cooperative Group on Plasma Exchange in Guillain-Barré Syndrome: Efficiency of plasma exchange in Guillain-Barré syndrome: Role of replacement fluids. *Ann Neurol* 22: 753-761, 1987

3) 渋谷統寿, 他: ギランバレー症候群に対するプラズマフェレーシスの現況: 全国実態調査 (1990). *日医新報* 3499: 28-31, 1991

4) Asbury AK, et al: Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 27(suppl): S21, 1990

5) Hughes RAC, et al: Controlled trial of prednisolone in acute polyneuropathy. *Lancet* 2: 750, 1978

6) Greenwood RJ, et al: Controlled trial of plasma exchange in acute inflammatory polyradiculoneuropathy. *Lancet* 1: 877-879, 1984

7) van der Meché FGA, et al: A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med* 326: 1123-1129, 1992

8) Bril V, et al: Pilot trial of immunoglobulin versus plasma exchange in patients with Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 46: 100-103, 1996

9) Plasma Exchange / Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Groupe: Randomised trial of plasma exchange, intravenous immunoglobulin, and combined treatments in Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 349: 225-230, 1997

10) Chen WH, et al: Experience of double filtration plasmapheresis in the treatment of Guillain-Barré syndrome. *J Clin Apheresis* 14: 126-129, 1999

11) Tagawa Y, et al: Ability to remove immunoglobulins and anti-ganglioside antibodies by plasma exchange, double-filtration plasmapheresis and immunoadsorption. *J Neurol Sciences* 157: 90-95, 1998

ギラン・バレー症候群患者血中の抗ガラクトセレブロシド抗体と マイコプラズマ肺炎

楠 進 椎名盟子 金澤一郎

目 的

ギラン・バレー症候群(GBS)急性期血中には、抗糖脂質抗体の上昇がしばしばみられ、診断に用いられるとともに病態に関わる因子である可能性が考えられている。抗体の反応性は症例ごとに多様であり、その中には特定の臨床病型や先行感染との関連が認められるものがある。ガラクトセレブロシドは中枢神経および末梢神経のミエリンの主要な糖脂質であり、ガラクトセレブロシドで感作することによりウサギで脱髄性ニューロパチーが作成され、抗ガラクトセレブロシド抗体は脱髄を引き起こす因子であることが報告されている(1)。

われわれは GBS 急性期の血中抗糖脂質抗体検査の過程で、一部の症例に抗ガラクトセレブロシド抗体が上昇し、多くはマイコプラズマ肺炎後に発症した症例であることをみいだした(2)。さらにマイコプラズマ肺炎の先行と抗ガラクトセレブロシド抗体の関連は、GBSのみではなくマイコプラズマ感染後の脳炎や脊髄炎でも確認された。

これまでに他の抗糖脂質抗体については、先行感染因子のもつ糖鎖に対する免疫反応が抗体上昇の機序として重要であることが報告されている。例えば 抗 GM1 抗体陽性 GBS の多くの症例や抗 GQ1b 抗体陽性の Fisher 症候群の一部の症例では *Campylobacter jejuni* (C.jejuni) が先行感染となることが知られており、そのような場合に C.jejuni 菌体表面には GM1 や GQ1b 様の糖鎖の存在が示されている(3-6)。また抗 GM2 抗体は Cytomegalovirus (CMV)感染後の GBS に関連することが知られており、CMV 感染細胞により抗 GM2 抗体が吸収されることが報告されている(7)。そこでマイコプラズマ肺炎後の抗 Gal-C 抗体の産生にも同様の機序がはたしているかどうかを検討するために、マイコプラズマ菌体による抗 Gal-C 抗体の吸収をしらべた。

方 法

抗ガラクトセレブロシド抗体陽性のマイコプラズマ肺炎後 GBS 7 例の血清について検討した。7 例のうち 3 例が抗 Gal-C 抗体のみ、4 例は抗 Gal-C 抗体とともに GA1

抗体活性もみられ、うち 1 例では抗 GM1 抗体活性もみられた。

また対照として抗ガラクトセレブロシド抗体以外の抗糖脂質抗体(抗 GM1 抗体、抗 GQ1b 抗体、抗 GalNAc-GD1a 抗体など)陽性の GBS 9 例についても検討した。さらに GM1, GD1b, GA1 に対する高い抗体活性をもち、Gal-GalNAc 基を認識すると考えられる IgM M 蛋白をもつニューロパチー患者血清についてもしらべた。

患者血清(50 倍稀釈)をマイコプラズマ抗原試薬(デンカ生研)あるいはマイコプラズマ菌体を含まない対照試薬と 1:1 で 2 時間混和したあと、ELISA 法にて抗体活性を測定した。マイコプラズマ抗原試薬は *Mycoplasma pneumoniae* の菌体から作成した抗肺炎マイコプラズマ抗体測定用試薬であり、対照試薬はマイコプラズマ菌体を含まない点以外は同様の方法で作成されたものである。抗体活性の吸収率は $[1-O.D.(マイコプラズマ抗原試薬 または対照試薬と混和後) / O.D.(PBS と混和後)]$ により表わした。

マイコプラズマ抗原試薬からクロロフォルム・メタノールにより脂質成分を抽出し、ガラクトセレブロシド特異的ウサギ抗体による薄層クロマトグラム(TLC)免疫染色による解析を行った。

結 果

抗ガラクトセレブロシド抗体は陽性例 7 例全例で、マイコプラズマ抗原試薬により 80%以上の吸収率で吸収された。対照試薬では全く吸収されなかった。抗ガラクトセレブロシド抗体と同時に抗 GA1 抗体が陽性の症例では、抗 GA1 抗体は症例ごとに吸収される場合とされない場合があった(図)。

一方抗 GM1 抗体、抗 GQ1b 抗体、抗 GalNAc-GD1a 抗体などその他の抗糖脂質抗体はマイコプラズマ抗原試薬により吸収されなかった。また Gal-GalNAc-基を認識する IgM M 蛋白も吸収されなかった。

TLC 免疫染色により、マイコプラズマ抗原から抽出した脂質成分中に抗ガラクトセレブロシド抗体が結合する複数の糖脂質成分が認められた。正常ウサギ血中抗体はこれらの糖脂質成分に結合しなかった。

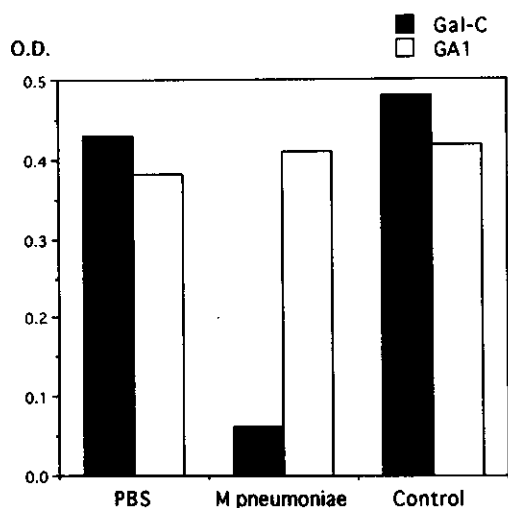


図 IgM 抗ガラクトセブロシド(Gal-C)抗体と抗 GA1 抗体が上昇した一症例の血清についての吸収試験の結果
 マイコプラズマ抗原試薬により抗ガラクトセブロシド抗体活性は吸収されたが、抗 GA1 抗体活性は変化しなかった
 PBS : PBS と混和後
 M pneumoniae : マイコプラズマ抗原試薬と混和後
 Control : 対照試薬と混和後

考 察

マイコプラズマ肺炎後の GBS 急性期血中の抗ガラクトセブロシド抗体活性がマイコプラズマ抗原試薬により特異的に吸収されることが明らかになった。またマイコプラズマ抗原試薬から抽出した脂質画分中に、抗ガラクトセブロシド抗体が特異的に結合する複数の糖脂質成分の存在が示された。すなわち *Mycoplasma pneumoniae* 菌体にガラクトセブロシド様の糖鎖構造が存在すると考えられる。ガラクトセブロシドはガラクトースがβ結合でセラミドに結合するという単純な糖鎖構造をもっている。しかし患者血中抗体は GM1 や GD1b など末端にβガラクトシル基をもつ抗原は認識しないことから、末端にβガラクトシル構造をもつ糖鎖抗原にすべて反応するわけではないことがわかる。抗体の結合にとってβガラクトシル基周囲の立体構造が重要と考えられるが、糖鎖抗原の本態については今後の検討が必要である。

先述のように、*C.jejuni* 菌体には GM1 や GQ1b 様の糖鎖の存在が示され、*C.jejuni* 感染後の抗糖脂質抗体の産生機序として、菌体に対する免疫反応の可能性が示唆されている。また同様のことは Cytomegalovirus 感染と抗 GM2 抗体についても報告されている。今回の結果からマイコプラズマ肺炎後の GBS における抗ガラクトセブロシド抗体の産生についても、同様の機序がはたっていると考えられる。マイコプラズマ肺炎後の GBS では *Mycoplasma pneumoniae* に対する免疫反応によりガラクトセブロシドに反応する抗体が産生され、それが脱髄因子として GBS の病態に関わっている可能性が考えられる。

文 献

1. Saida T, et al. Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. *Science* 1979;204:1103-1106.
2. Kusunoki S, et al. Anti-Gal-C antibody in autoimmune neuropathies subsequent to mycoplasma infection. *Muscle Nerve* 1995;18:409-413.
3. Yuki N, et al. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 1993;178:1771-1775.
4. Oomes PG, et al. Anti-GM1 IgG antibodies and *Campylobacter* bacteria in Guillain-Barré syndrome: evidence of molecular mimicry. *Ann Neurol* 1995;38:170-175.
5. Yuki N, et al. Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome. *Ann Neurol* 1994;36:791-793.
6. Jacobs BC, et al. Serum anti-GQ1b IgG antibodies recognize surface epitopes on *Campylobacter jejuni* from patients with Miller Fisher syndrome. *Ann Neurol* 1995;37:260-264.
7. Irie S, et al. Association of anti-GM2 antibodies in Guillain-Barré syndrome with acute cytomegalovirus infection. *J Neuroimmunol* 1996;68:19-26.

軸索型 Guillain-Barré 症候群における神経伝導 ブロックの病態機序：

Multiple excitability measures による検討

服部 孝道 桑原 聡 Sung Jia-Ying,
溝渕 敬子 小河原 一恵 森 雅裕

目 的

Guillain-Barré 症候群 (GBS) の 10-40% の患者で IgG 抗 GM1 抗体が陽性であり^{1,4}、この抗体を伴う subgroup では一次性運動神経軸索障害を呈し急性運動軸索型ニューロパチー (acute motor axonal neuropathy: AMAN) を呈することが多いとされている。抗 GM1 抗体が AMAN の病態にはたす役割は今だ明確にされていないが、Takigawa ら⁵は in vitro の実験系で抗 GM1 抗体が Na⁺電流を低下させることを報告し、AMAN 患者にみられる運動麻痺が Na⁺チャネルのブロックによりおこるとの仮説を提唱した。その後も多くの動物実験における報告がみられるが、抗 GM1 抗体は軸索の Na⁺電流を抑制するあるいは伝導ブロックを起こすとする報告^{6,7}と、神経伝導に何ら影響を及ぼさないとする報告^{8,9}が混在しており、結論は全く得られていない。

最近臨床応用された threshold tracking 法を用いると非侵襲的にヒト末梢神経軸索における Na⁺、K⁺のコンダクタンスを類推することが可能であるとされている¹⁰。今回この手法を GBS 患者の急性期に施行し、臨床例の末梢神経軸索における Na⁺あるいは K⁺コンダクタンスについて検討を行った。

方 法

(1) 対象: GBS 患者 8 名 (AMAN 4 名、acute inflammatory demyelinating polyneuropathy [AIDP] 4 名) を対象とした。AMAN および AIDP の電気診断には Ho らの診断基準²を用いた。AMAN 4 名中 2 名で IgG 抗 GM1 抗体が陽性、残りの 2 名では IgG 抗 GM1b、抗 GalNAc-GD1a 抗体が陽性であった。

(2) multiple excitability measures: 正中神経手関節部刺激により短母指外転筋から複合筋活動電位を導出し、Hugh Bostock が開発したプログラム (multiple excitability measures; Trondheim; Copyright, Institute of Neurology, London) を用いて threshold tracking 法により recovery cycle と threshold electrotonus の 2 種の検査を行った。それぞれの検査における parameter とそれによって類推される各イオンのコンダクタンスとの関係は以下のようになる¹⁰:

1) 二重刺激による recovery cycle (RC):

Refractoriness: Na⁺ conductance

Supernormality: fast K⁺ conductance

Late subnormality: slow K⁺ conductance

2) threshold electrotonus (TE):

S1 phase: fast K⁺ conductance

S2 phase: slow K⁺ conductance

健常成人 16 名における結果を対照値とした。

結 果

(1) Recovery cycle: refractoriness は正常対照者 16 名では 51 ± 31% (平均 ± SD) であったのに対し、AMAN 患者 4 名ではそれぞれ 168%、220%、230%、70% であり 3 名で明らかな増大が認められた。代表例における所見を図 1 に示す。AIDP 患者 4 名の refractoriness は正常平均 + SD の範囲内にあった。逆に supernormality は AMAN 患者では正常対照者と有意な差はなく、AIDP 患者では減少している傾向が認められた。

(2) Threshold electrotonus: AMAN 患者では正常者と比べて有意の変化は認められなかった。AIDP 患者では脱分極性刺激に対する S1 phase の振幅が低い傾向が認められた。

(4)感覚神経：AMAN 患者4名で正中神経感覚線維において手首部刺激で同様の検査を行ったが、正常対照と差を認めなかった。AIDP 患者では正中神経感覚電位が導出されず、検討できなかった。

考 察

今回の検討では AMAN (あるいは抗ガングリオシド抗体陽性) 患者急性期の運動神経軸索における興奮性変化の特徴は二重刺激 recovery cycle における refractoriness の増大であることが示唆された。軸索の二重刺激において、刺激間隔が 2ms 以下である場合、はじめの電気刺激による脱分極により Na⁺チャンネルが不活性化されるために2発目の反応を誘発するためにより多くの電流を要することが refractoriness のメカニズムとされている¹⁰。AMAN 患者4名中3名における refractoriness は正常者と比較して明らかに増大しており、これは Na⁺チャンネルの機能障害を示唆する所見であるといえる。これらの変化が一次性に生じているか軸索膜上の炎症や補体・炎症性サイトカインの活性化等により二次的に生じているかは明らかではないが、AMAN 患者において Na⁺チャンネルの機能障害が起こっている可能性は高いものと思われ、AMAN 患者に伝導遅延や伝導ブロックが時に認められるという現象^{3,4}を説明できる可能性がある。

Na⁺チャンネルの機能は組織温により大きく影響され、低温下では refractoriness が著明に増大するが、同一検査部位(正中神経手首)における感覚神経軸索の refractoriness は全く正常であったことは、AMAN では臨床症状と一致して運動軸索の Na⁺チャンネルが選択的に障害されている可能性を示している。一方、K⁺チャンネルのコンダクタンスを反映するとされる threshold electrotonus や recovery cycle の supernormality や late subnormality は AMAN 患者では正常者と比較して有意な変化は認められなかった。これらの所見は AMAN において K⁺コンダクタンスは影響されないことを示唆していた。

一方 AIDP における特徴的变化は、recovery cycle における supernormality の低下と threshold electrotonus の脱分

極性刺激に対する S1 phase の低下の2点であった。これら S1 や supernormality の大きさは生理的に fast K⁺ conductance によって制限されている¹¹。Fast K⁺ channels は正常の状態では傍絞輪部において髄鞘に覆われていることを考えると、傍絞輪部脱髄によって fast K⁺ channels が露出することによって上記の変化を説明できる可能性があるものと思われる。

結 論

抗ガングリオシド抗体陽性軸索型 Guillain-Barré 症候群患者の運動神経軸索では Na⁺チャンネルの機能障害が生じている可能性がある。この変化は軸索型 Guillain-Barré 症候群患者においてしばしば認められる伝導ブロックや伝導遅延に関与している可能性がある。

文 献

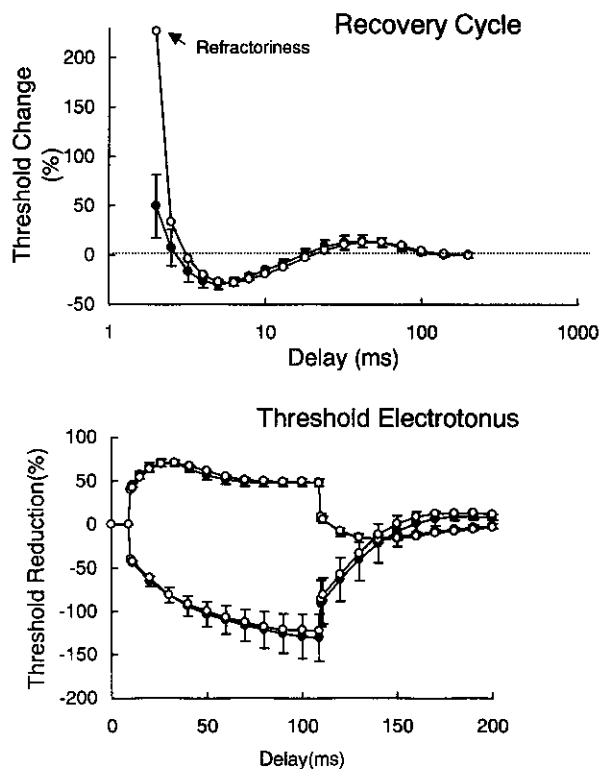
- 1) Vriesendorp FJ, et al. Serum antibodies to GM1, GD1b, peripheral nerve myelin, and *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barré syndrome and controls: correlation and prognosis. *Ann Neurol* 1993;34:130-135.
- 2) Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 1995;118:597-605.
- 3) Kuwabara S, et al. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1998;44:202-208.
- 4) Ogawara K, et al. Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. *Ann Neurol*

2000;48:624-631.

- 5) Takigawa T, et al. Antibodies against GM1 ganglioside affect K and Na currents in isolated rat myelinated nerve fibers. *Ann Neurol* 1995;37:436-442.
- 6) Arasaki K, et al. Acute conduction block in vitro following exposure to antiganglioside sera. *Muscle nerve* 1993;16:587-593.
- 7) Weber F, et al. Anti-GM1 antibodies can block neuronal voltage-gated sodium channels. *Muscle Nerve* 2000;23:1414-1420.
- 8) Harvey GK et al. Failure of anti-GM1 IgG or IgM to induce conduction block following intraneural transfer. *Muscle Nerve* 1995;18:338-394.
- 9) Hirota N, et al. The physiological effects of anti-GM1 antibodies on saltatory conduction and transmembrane currents in single motor axons. *Brain* 1997;120:2159-2169.
- 10) Kiernan M, et al. Multiple excitability measures of axonal excitability: A new approach in clinical testing. *Muscle Nerve* 2000;23:399-409.
- 11) Bostock H, et al. Threshold tracking technique in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve* 1998;21:137-158.

図1. 正常対照者 (●:平均+標準偏差) および AMAN 患者 (○) における recovery cycle と threshold electrotonus の所見を示す。AMAN 患者では recovery cycle の refractoriness が著明に増大している。Threshold electrotonus は正常者と比較して有意な変化はみられない。

AMAN Day 8



軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の樹立：第2報

薄 敬一郎¹⁾ 結城 伸泰¹⁾ 古賀 道明¹⁾ 小鷹 昌明¹⁾ 平田 幸一¹⁾
上田 秀一²⁾ 山田 光則³⁾ 馬場 正之⁴⁾

背景

ギラン・バレー症候群 (GBS) は、急性に四肢筋力低下をきたす神経・筋疾患のうち最も頻度が高い。単純血漿交換や免疫グロブリン大量静注の有効性が確立されているが、8%の患者が急性期も含めて1年以内に死亡するなど、決して予後良好な疾患ではない。さらに、軸索が一次的に傷害され、特に予後不良な軸索型 GBS の存在が広く認知されるに至り、新たな特異的治療の開発が望まれている。そのためには、実験動物モデルの確立が不可欠である。

GBS では、IgG クラスの自己抗体が主要な病因物質と想定されている。約3割を占める *Campylobacter jejuni* 腸炎後 GBS は軸索型を呈することが多く、うち8割で IgG 抗 GM1 抗体が検出される。下痢を前駆症状とした GBS 患者から分離された *C. jejuni* のリポ多糖が、GM1 ガングリオシドと共通する構造を有し、病原体と神経構成成分の分子相同性の存在も明らかにされている。一方、西ヨーロッパや南アメリカを中心に、各種神経疾患の治療のためウシ脳ガングリオシド (BBG) を注射後に GBS が発生したとする報告が相次いだ。BBG 注射後 GBS 患者の血清中に IgG 抗 GM1 抗体が上昇することも知られている。

目的

昨年の本会議にて、BBG または GM1 をウサギに感作することにより軸索型 GBS の動物モデルを樹立したことを報告した¹⁾。今回さらに、投与抗原量の検討や、脱髄型ニューロパチーの実験モデルとの比較を行った。また、電気生理学的、免疫組織化学的検討を加え、末梢神経病変の局在について考察した。

方法

(1) Japanese white rabbit のオスに、*keyhole limpet hemocyanin* 1 mg, Freund 完全アジュバントとともにエマルジョン化した抗原液を、皮下および腹腔内注射により3

週に1回感作を繰り返した。抗原には、イタリアにおいて治療目的でヒトに注射されていた BBG (GM1 21%, GD1a 40%, GD1b 16%, GT1b 19%) を各々0.5, 1, 2.5, 5 mg, Sigma (St. Louis, USA) より購入した GM1 を 0.5 mg, ガラクトセブレロシド (GC) を 1 mg 用いた。ウサギの行動を毎日観察し、神経徴候を評価した。

(2) 週1回耳介静脈から採血した。得られた血漿を用いて、ELISA 法で GM1 と GC に対する抗体を測定した。

(3) 電気生理学的評価を BBG 2.5 mg, GM1, GC 感作群に施行した。塩酸ケタミン筋注による全身麻酔下で、左脛骨神経を足関節部、膝部、坐骨結節部で刺激し、足底筋から複合筋活動電位を記録した。前脛骨筋から安静時針筋電図所見を記録した。同時に膝蓋腱反射も評価した。

(4) 固定液 (3%グルタルアルデヒド, 1%パラフォルムアルデヒド) で灌流固定の後、標本を摘出し、トルイジンブルー染色で神経傷害を評価した。

(5) BBG 感作群は、2%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した後、神経根、馬尾、坐骨神経、脛骨神経を摘出した。ペルオキシンダーゼ標識 protein G で反応させ、IgG 沈着の局在を評価した。

結果

(1) 抗原感作開始後、早い例では5週前後で、体重減少、四肢の麻痺が出現した。BBG 0.5 mg 感作した3羽中、発症したのは1羽のみで、症状はごく軽く、数日で回復した。BBG 1 mg 感作した6羽では、重症3羽、軽症2羽であった。BBG 2.5 mg 感作した6羽は、すべて重度の四肢、頸部麻痺を呈した。BBG 5 mg 感作した3羽では、重症2羽、軽症1羽であった。また、GM1 を感作した8羽のうち、3羽で重症、2羽でごく軽症の麻痺を生じた。GC を感作した8羽では、7羽が明らかな麻痺を呈した。

(2) BBG, GM1 感作群で抗 GM1 抗体を、GC 感作群で GC に対する抗体を検出した。まず IgM 抗体が上昇し、IgG 抗体へクラススイッチした後に麻痺などの症状を呈した。

(3) GC 感作群の電気生理学的評価では、複合筋活動電位振幅の低下、時間的分散、運動神経伝導速度低下など、典型的な脱髄性変化を認めた。それに対し、BBG, GM1 感作群では、急性期には膝蓋腱反射の低下ないし消失を伴う重度の麻痺を呈するにもかかわらず、複合筋活動電

¹⁾ 獨協医科大学神経内科

²⁾ 獨協医科大学解剖学 (組織)

³⁾ 新潟大学脳研究所病理学分野

⁴⁾ 弘前大学医学部脳疾患研究施設神経統御部門

位振幅や運動神経伝導速度には明らかな異常は認めなかった。しかし長期経過を観察できた例で、脱神経電位、複合筋活動電位振幅の低下を観察できた(図1)。また、F波のうち伝導の遅い成分が急性期に消失し、回復期にやや遅い潜時で再度出現した(図2)。

(4) 病理学的検討では、坐骨神経で軽度～中等度の Waller 様変性を認めた。

(5) BBG 感作群の免疫組織化学的検討では、神経根、馬尾の横断切片で軸索が染色される神経線維を認めた。この所見は坐骨神経、脛骨神経では認められなかった。神経根の縦断切片では、軸索が局所的に染色される像のほか、Ranvier 絞輪周囲が染色される像を認めた(図3)。

考 察

GMI より BBG 感作群の方が、発症率が高かった。また BBG の方が抗原の調整が容易で安価でもあるため、抗原として適切と思われる。したがって軸索型 GBS モデル作製のためには、BBG 2.5 mg 感作が最適と考えられた。

軸索型 GBS モデルの急性期には、複合筋活動電位振幅や運動神経伝導速度にはほとんど変化なく、電気生理学的異常は一部の F 波の消失を認めたのみであった。したがって、電気生理学的には、急性期では近位部に伝導障害が存在する可能性が示唆された。ヒトの軸索型 GBS で、急性期における電気生理学的異常が、F 波の消失のみである場合も知られており、その機序として血液神経関門の脆弱な神経根での生理的伝導障害や軸索変性などが考えられている²⁾。さらに、長期経過を観察できた例では、近位部の軸索変性が末梢へ進展したことにより、後に複合筋活動電位振幅低下を認めたものと考えられる。一方、免疫組織学的評価により、軸索への IgG 沈着像は、神経根、馬尾に限局して認められた。これらの所見を併せ、ウサギを用いた軸索型 GBS 実験モデルでは、急性期には血液神経関門が脆弱な神経根に末梢神経病変が局在している可能性が示唆された。

文 献

1) Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Hirata K. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* in press

2) Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi M, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N. Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:191-195

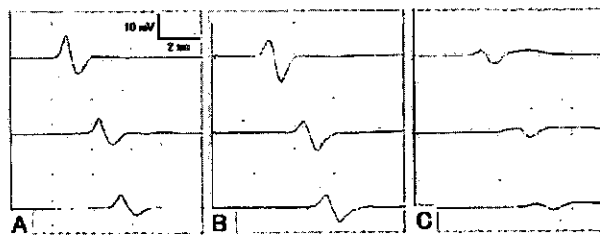


図1. 軸索型 GBS モデル (GMI 0.5 mg 感作) の運動神経伝導検査所見。(A) 感作前。(B) 急性期 (発症後 4 日)。(C) 回復期 (発症後 6 週)。

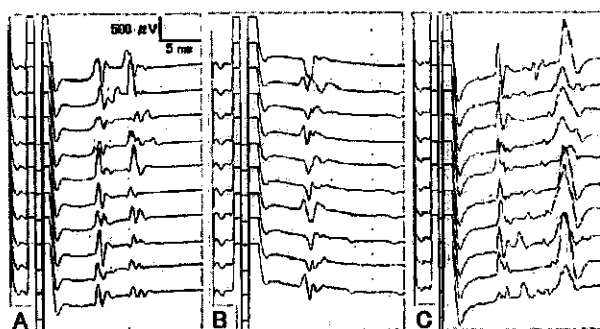


図2. 軸索型 GBS モデル (GMI 0.5 mg 感作) の F 波所見。(A) 感作前。(B) 急性期 (発症後 4 日)。(C) 回復期 (発症後 2 週)。

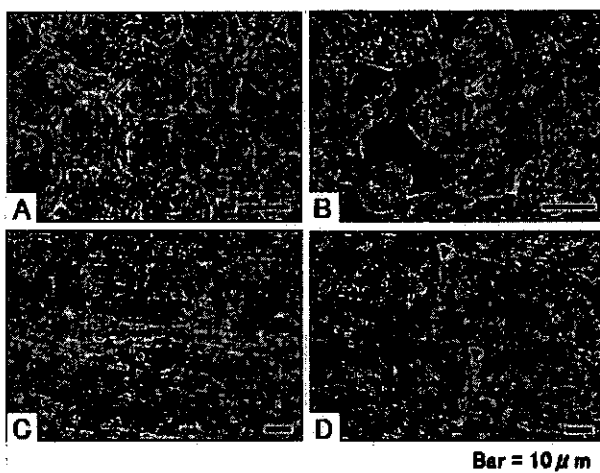


図3. 軸索型 GBS モデル (BBG 5 mg 感作) の免疫組織化学所見。(A) 前根横断面。軸索が染色される線維を認める (矢印)。(B) 馬尾横断面。軸索膜に限局した染色と思われる所見 (矢印)。(C) 馬尾縦断面。A で示した軸索の染色所見。(D) 馬尾縦断面。Ranvier 絞輪が染色されている (矢頭)。

ONO-2506によるEAN抑制作用の検討

野村 恭一¹⁾ 木澤 英樹 柴木 謙次 滝澤 功一 高砂子由佳子
三井 隆男 大貫 学 富岳 亮 大野 良三

目 的

ONO-2506 (2R-プロピルオクタン酸) は、脳梗塞形成抑制、抗脳浮腫作用を有し急性期脳梗塞の治療薬として注目されている¹⁾。その薬理作用として、NGF放出の抑制、GABA受容体の発現抑制作用、iNOS・COX-2の発現抑制作用、GLT-1・GLAST mRNAの発現抑制、さらに、astrocyteのS-100β蛋白の増加抑制作用を有することが示唆されている²⁾。

末梢神経のSchwann細胞は中枢神経のastrocyteと同様にS-100β蛋白を産生し、T細胞に対し抗原提示機能を有し、免疫性神経疾患の病態に重要な役割を担っている³⁾。我々はONO-2506のastrocyte活性化抑制作用に注目し、免疫性末梢神経疾患においても治療効果を有するのではないかと考え、Guillain-Barré症候群の動物モデルである実験的自己免疫性神経炎 (EAN) にONO-2506を投与し、ONO-2506にEANの予防および治療効果があることを報告した⁴⁾。

本研究では、このONO-2506のEAN抑制作用について神経症候学、神経免疫学、病理組織学的に検討した。

対象・方法

①ONO-2506のEAN抑制効果：Lewisラット20匹に末梢神経ミエリンを接種しEANを作製した。EANの神経症候は0～6の7段階の神経スコア (NS) に分けて評価した。ONO-2506 (10mg/kg/日) を予防群 (n=4) は抗原接種日から7日間、初期治療群 (n=4) はEAN発症直後から7日間、活動期治療群 (n=4) は対麻痺出現後から7日間連日腹腔内に投与した。またEAN対照群 (n=8) には生食を投与した。各群の神経症候を観察し、抗原接種後28日目において病理組織学的検討を行った。

②ONO-2506投与による免疫状態：ONO-2506が

EAN動物の免疫系に及ぼす影響を検討するためにリンパ球幼若化反応を施行した。ONO-2506を抗原接種日から7日間連日腹腔内に投与したONO-2506処置群 (n=4)、抗原接種日～7日間PBSを投与したEAN対照群 (n=10) において、接種後15日目にP2蛋白とその合成ペプチド (SP) を抗原としてリンパ球幼若化反応を施行した。

③ONO-2506投与時期の相違によるEAN抑制効果：Lewisラット20匹にEANを作製した。A群は抗原接種後1～4日、B群は5～8日、C群は9～12日、D群は13～16日にONO-2506を投与し、EAN対照群 (各群n=4) と神経症候を比較した。

④ONO-2506投与による病理学的検討：Lewisラット48匹にEANを作製した。抗原接種日から7日間、ONO-2506を連日腹腔内に投与したONO-2506処置群 (n=24) とEAN対照群 (n=24) に分け、接種後3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17日において病理組織学的な検討を行った。

⑤EAN催起性T細胞移注とONO-2506処置：SP53-78を用いてEAN催起性T細胞 (5×10^6 細胞/ml) を得、これをラットの尾静脈より移注し受動的EANを作製した。細胞の移注と同時にONO-2506を7日間、連日投与した受動的EAN-ONO処置群 (n=4)、移注したのみの受動的EAN対照群 (n=4) に分け、神経症候を観察、移注後15日目に病理組織学的検討を行った。

結果・考察

①ONO-2506のEAN抑制効果

予防群、初期治療群、活動期治療群ともにEAN対照群に比べ明らかな神経症候の軽症化、罹病期間の短縮化を認めた。病理組織学的検討では、EAN対照群は高度の線維化、著明な脱髄所見を認めたのに対し、予防群は極く

¹⁾ 埼玉医科大学神経内科

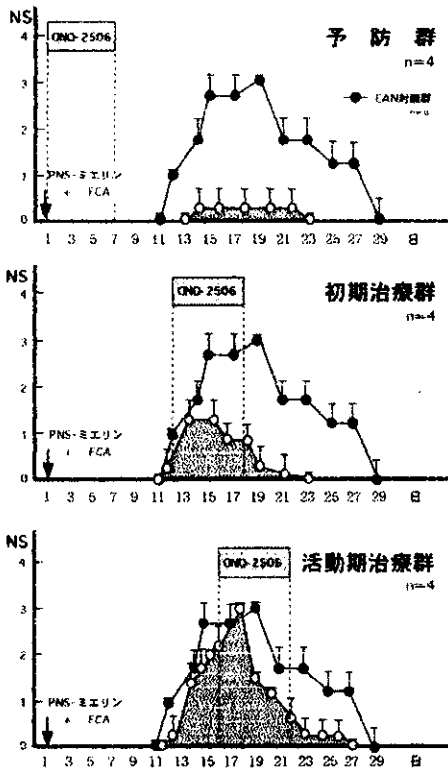


図1 ONO-2506処置群, EAN対照群の神経症候

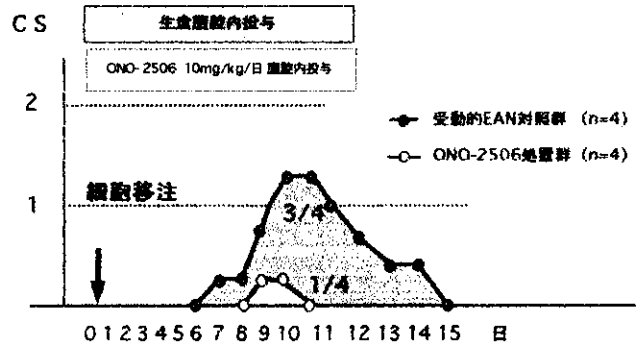
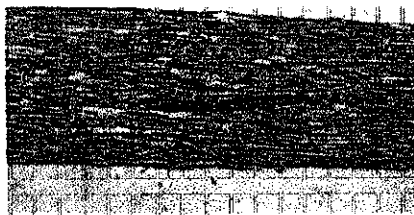


図3 EAN催起性T細胞の移注によるEAN神経症候

受動的EAN対照群では細胞移注後6日目から3/4匹に軽度の神経症候を呈した。一方, ONO-2506処置群では1/4匹に尾の垂れを示すのみであった。

抗原接種後13日目において, EAN対照群では高度の細胞浸潤を認めるにもかかわらず, ONO-2506予防処置群では神経浮腫, 血管内腔に集簇した炎症性細胞を多数認めるも血管外には明らかな細胞浸潤を認めない。



ONO-2506予防処置群

抗原接種後13日目

HE+LFB染色
(×50)



EAN対照群

図2 EAN活動期の病理所見

表1 ONO-2506処置群とEAN対照群の病理所見の比較

経過日数		3		5		7		9		11		13		15		17	
		対照群	ONO群	対照群	ONO群	対照群	ONO群	対照群	ONO群	対照群	ONO群	対照群	ONO群	対照群	ONO群	対照群	ONO群
神経浮腫	1	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±	+	+	±	+	-	±
	2	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±	+	+	±	+	-	±
	3	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±	+	+	±	+	-	±
	4	-	-	-	-	-	-	±	-	++	-	+	+	±	+	-	±
細胞浸潤	1	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+++	+	++	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+++	+	++	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+++	+	++	+	+	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++	-	++	+	+	+
脱髓	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+	++	++
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+	++	++
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±	++	++
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±	++	++
線維化	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	±
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	±

軽度の脱髄所見, 初期治療群は軽度～中等度の脱髄, 細胞浸潤, 活動期治療群は対照群とほぼ同様な病理所見を認めた(図1). ONO-2506にEAN予防および治療効果があること確認した.

②ONO-2506投与による免疫状態

EAN対照群ではP2蛋白, SP53-78, SP60-78に対する感作T細胞を5/5匹(100%)に認めた. ONO-2506処置群においても同様にP2蛋白は4/4匹(100%), SP53-78は3/4匹(75%), SP60-78は4/4匹(100%)に感作T細胞を認めた. ONO-2506処置の有無にかかわらず, いずれの群においても末梢神経ミエリンに対する感作T細胞の出現を認めた.

ONO-2506のEAN抑制効果は, 一次免疫応答の時点には関与せず, EANのエフェクター期において末梢神経の炎症反応に影響を与えているものと推測した.

③ONO-2506投与時期の相違によるEAN抑制効果

EAN神経症候は, B>A>C>D>EAN対照群の順に軽症化を認めた. EANの発症前の5～8日にONO-2506処置を行ったB群において最もEANの抑制効果を認め, EAN発症後に当たる13～16日に処置したD群ではその抑制効果が少なかった.

ONO-2506のEAN抑制効果は, EAN発症前の時期において処置効果が高いものと思われた.

④ONO-2506投与による病理学的検討(表1)

EAN対照群では抗原接種後9日目に神経線維の浮腫を, 11日目に血管周囲の細胞浸潤, 13日目に著明な細胞浸潤に脱髄を認め, 17日目には著明な線維化を認めた. 一方, ONO-2506処置群では接種後13日目において神経浮腫, 軽度の血管周囲の細胞浸潤を, 15日目に軽度の脱髄, 17日目に著明な脱髄と線維化を認めた. 接種後11日目枝においてEAN対照群は高度な神経浮腫, 細胞浸潤を認めているにもかかわらず, ONO-2506処置群では明らかな病理学的異常所見を認めていない. ONO-2506投与群は病理組織学的に明らかな軽症化を示し, EANの進行過程を遅らせているものと考えた.

さらに, 13日目のONO-2506処置群の病理所見では血管内腔に集簇した多数の炎症性細胞を認めるが, 血管外には明らかな細胞浸潤を認めていない(図2). これらの所見からONO-2506は血管神経関門(BNB)の破壊を抑制し, BNBのtight junctionを保護するものと推測した.

⑤ONO-2506投与によるEAN催起性T細胞移注EANに及ぼす影響

受動的EAN対照群では, 細胞移注後6日目から3/4匹に軽度の神経症候を呈した. 一方, 受動的EAN-ONO処置群では1/4匹のみに尾の垂れを呈するのみであった(図3). ONO-2506は受動的EAN動物モデルにおいてもEANの抑制効果を認めた. ONO-2506のEAN抑制効果はBNBを介してのものと思われた.

ま と め

ONO-2506によるEAN抑制作用を検討した. ONO-2506はEAN炎症反応のエフェクター期において効果を示し, 病理組織学的にはEAN発症前における血管周囲へ細胞浸潤を抑制し, また受動的EAN-ONO処置モデルにおいてもEANを抑制した. ONO-2506はBNBを保護することによりEANの予防および治療効果を有するものと推測した.

文 献

- 1) Tateishi N, Kagamiishi Y, Shimoda T et al : Amelioration of brain damage following transient focal ischemia in rats by ONO-2506; relevance of its modulating action on astroglial functions. In Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia III, Defensive Mechanisms Versus Apoptosis Neural Recovery and Protection in Cerebral Infarction (ed Ito U, Fieschi C, Orzi F et al), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1999, p313-314
- 2) Kagamiishi Y, Tateishi N, Shintaku K et al : Ameliorative effects of ONO-2506 on brain damage following the transient ischemia in rats. Soc Neurosci Abs 24:984, 1998
- 3) Wekerle H, Schwab M, Linington C et al : Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. Eur J Immunol 16:1551-1557, 1986
- 4) 木澤英樹, 野村恭一, 島津邦男 : ONO-2506の実験的自己免疫性神経炎に対する予防および治療効果, 神経治療 18, 2001 (印刷中)

免疫性神経疾患におけるBNB破壊の細胞内メカニズム

水澤英洋 神田 隆 大和田潔 入岡 隆 岩崎孝之 山脇正永

はじめに

末梢神経系は中枢神経系と同じく、バリアーシステムによって全身循環系から隔絶されている。従来、血液神経関門(blood-nerve barrier; BNB)は血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)と比較して脆弱であるとされてきたが、最近、BNBはBBBとほぼ同等の機能を持つとの報告があいついでなされている。近年、各種炎症性ニューロパシーにおいて液性免疫の重要性が指摘されているが、免疫グロブリンをはじめとする高分子物質がBNBを通過して末梢神経実質にアプローチするメカニズムについては未だに明らかにされていない。我々はこの問題に対し、BNBの培養モデルを用いて各種炎症性サイトカイン、抗GM1抗体がBNB透過性亢進作用を有することを証明してきた。今回は、これらの物質がいかなる細胞内過程を経てBNB透過性の亢進をひき起こすかについて、NF- κ BおよびNO産生に焦点を当てて解析し、興味ある結果を得たので報告する。

方法

ウシ末梢神経神経内膜微小血管由来内皮細胞(PnMEC)は、成牛馬尾から我々の開発した方法¹⁾²⁾³⁾により分離し、99%以上の純度を持つ細胞を得た。PnMECにおけるNF- κ B活性化を可視化する目的で、NF- κ B結合シークエンスを4箇所有するdEGFP gene (pNF- κ B-dEGFP, CLONTECH Lab.)をlipofection法を用いてPnMECに導入した。このPnMECをtype Iコラーゲンを塗布した24wellにsubconfluentに播種し、TNF α (100 ng/ml)、VEGF (100 ng/ml)、または抗GM1モノクロナル抗体(clone GMB16, 4.0 μ g/ml)を投与、EGFP蛍光を経時的に定性的・定量的に観察した。蛍光の定量的評価にはFluoroscanner Ascent (Labsystems)を用いた。培養液中に放出されたNOの最終産物であるNO₂/NO₃を測定する目的で、TNF α 、VEGF、抗GM1モノクロナル抗体投与後の培養上清を経時的にサンプリング(各80 μ l)し、NO₂/

NO₃アッセイキット(Dojindo)を用いた定量を行った。

結果

(1) NF- κ B activation

TNF α 投与群では60-90分後に蛍光を発する細胞が散在性に観察されるようになり、3時間後には全細胞の1/30-1/60が明らかな蛍光を有していた。これに対し、抗GM1抗体で処理したPnMECは3時間の時点ではごく少

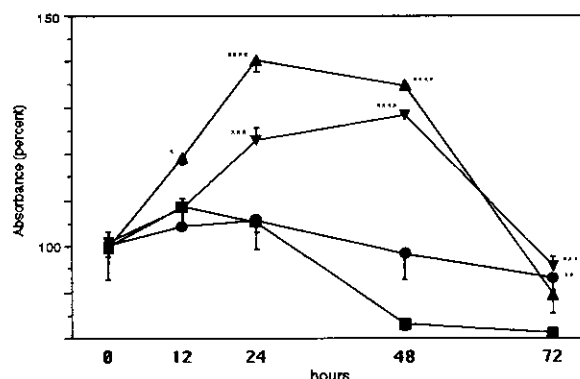


図1 Effects of VEGF (●), TNF α (▲), and anti-GM1 monoclonal antibody (▼) on NF- κ B activation. Each point represents the average value of fluorescence in five to six individual wells. TNF α shows linear increase of fluorescence in the first 24 hrs, followed by the fluorescence increase elicited by anti-GM1 antibody. VEGF does not show any significant effect. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001 vs. control (■).

数の淡い蛍光を有する細胞を認めるのみであったが、24時間後にはTNF α 処理群とほぼ同等の蛍光を認めるようになった。VEGF処理群は明らかな蛍光の増加を示さなかった(図1)。

(2) NO₂/NO₃産生

TNF α 、VEGF、抗GM1抗体のいずれも有意のNO₂/NO₃産生増加を示したが、VEGFがもっとも効果的に培養上清中NO₂/NO₃を上昇させた。抗GM1抗体の効果はここでもTNF α のそれより遅れて発現し、24時間後にはほぼ

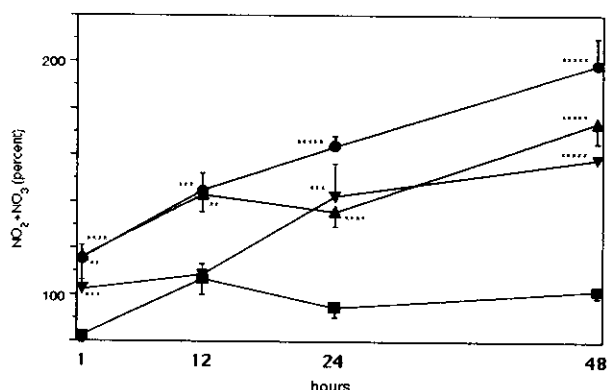


図 2

Effects of VEGF (●), TNF α (▲), and anti-GM1 monoclonal antibody (▼) on the concentration of NO₂+NO₃ in the culture media. Each point represents the average NO₂+NO₃ value of five to six individual wells. Anti-GM1 antibody is as potent as TNF α after 24 hrs of incubation, its effect is delayed and is less effective than that of TNF α at 12 hr. **, p<0.02; ***, p<0.01; ****, p<0.001; *****, p<0.0001 vs. control (■).

同等の値となった (図 2)。

考 察

われわれはBBB/BNBモデルを用いた一連の研究から、①IL-1 β 、TNF α 、VEGFなどにはTEER減少効果と¹⁴C-inulin clearanceの上昇効果があり、これらのサイトカインはBNB破壊性に働くこと⁴⁾⁵⁾、②抗GM1抗体にも同様の効果を認めるが、その他の抗糖脂質抗体、たとえば抗GD1a抗体、抗GD1b抗体、抗GQ1b抗体などにはBNBをmodulateする機能はないこと⁶⁾⁷⁾などを報告してきた。また、抗糖脂質抗体を有する炎症性ニューロパシー患者から得られた生検腓腹神経では、神経内膜内の微小血管にBNB破壊を示唆する所見が有意に多いことを明らかにした⁸⁾。われわれの仮説は、サイトカインによるバリアー破壊と抗GM1抗体によるそれとの間に共通の細胞内過程があるのではないかということであったが、今回の実験により、抗GM1抗体はIL-1 β 、TNF α と同じくPnMECのNF- κ Bを動かす作用を持っていることが明らかとなった。本実験は、抗GM1抗体が細胞内シグナル系を動かし得ることを示した最初のデータである。

抗GM1抗体がいかなる経路を通じてNF- κ Bを活性化させるかは現時点では明らかではない。TNF受容体I、IL-1受容体からNF- κ B活性化に至る系は近年解析が進み、TRAF2/TRAF6 \rightarrow NIK \rightarrow IKKを経る回路がよく知られているが、蛍光光度の時間的推移から推察すると、抗GM1抗体によって惹起されたシグナル経路はこれとは異なるものである可能性が高い。

本実験では、抗GM1モノクロナル抗体の投与がNO₂/NO₃の増加にも寄与しうることが明らかとなった。NOS

の活性化はcyclic GMPの活性化を介してバリアー機能の低下を惹起することが知られており、また、ヒトおよび齧歯類のiNOS geneには複数のNF- κ B結合部位が存在することも最近明らかになっている。抗GM1モノクロナル抗体はNF- κ Bの活性化とそれに引き続くNO活性の上昇を経て、バリアーの破壊に寄与する可能性が強く考えられる。

抗GM1抗体のPnMEC表面への結合がどのようにして細胞内シグナルをtriggerするかについては現時点では不明である。(1)抗体の細胞外糖鎖部分への結合が、GM1の細胞内部分に結合ないし近接したシグナル蛋白を修飾する可能性、(2)抗体結合によってPnMECのラフト構造に変化を来し、これがシグナル伝達の変化を惹起する可能性などが考えられるが、詳細なメカニズムの解析は今後の課題である。

結 論

抗GM1抗体によるBNB破壊の細胞内メカニズムの一部を解明した。抗GM1モノクロナル抗体によるNO₂+NO₃の放出上昇は、NF- κ Bの活性化を介したiNOSのupregulationによるものと考えられるが、NOは細胞内cGMPを上昇させることでバリアーの脆弱化に関与することが知られており、抗GM1モノクロナル抗体は、NF- κ B活性化により惹起されたNO産生増加を介して、各種サイトカインとともにBNBの破壊に寄与する機序が推定された。

文 献

- 1) Kanda T et al.: Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin. *J Neurosci Res*, 49: 769-777, 1997.
- 2) 神田 隆ほか: 末梢神経神経内膜由来内皮細胞培養法の確立とその糖脂質抗原の解析. *神経免疫学* 4: 96-97, 1996.
- 3) Kanda T et al.: Glycosphingolipid antigens in cultured microvascular bovine brain endothelial cells: sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell Biol* 126: 235-246, 1994.
- 4) 岩崎孝之ほか: 末梢神経微小血管内皮細胞の膜電気抵抗に対するサイトカインの影響. *神経免疫学* 6: 66-67, 1998.
- 5) Iwasaki T et al.: Effects of pericytes and various cytokines on integrity of endothelial monolayer originated from blood-nerve barrier: an in vitro study. *J Med Dent Sci* 46: 31-40, 1999.
- 6) Kanda T et al.: Effect of cytokines and anti-glycoconjugate antibodies on the integrity of in vitro blood-