

Guillain-Barré 症候群と Fisher 症候群患者 の初診から治療までの経緯

分担研究者 結城 伸泰
(獨協医科大学神経内科)

研究要旨

目的：Guillain-Barré 症候群(GBS)と Fisher 症候群 (FS) 患者の初診科から治療まで経緯の実状は知られていない。これを明らかにすべく調査した。

対象・方法：2001 年 1 月から 10 月まで抗グングリオシド抗体検索を依頼された GBS 247 例と FS 125 例を対象にアンケートを実施した。

結果：有効回答数は GBS 150 例、FS 72 例であった。GBS の初診科は内科(58%)、整形外科(17%)、脳神経外科(6%)、FS では内科(52%)、眼科(25%)、脳神経外科(15%)、耳鼻科(5%)の順であった。両症候群とも初診科から治療まで 1 診療科を経由する場合が多く、治療は血漿浄化療法から免疫グロブリン大量静注療法(IVIg)に移行していた。保険適応のない FS や歩行可能な GBS にも IVIg が施行されていた。

結論：本調査結果を基に初診患者が多い診療科へ啓蒙を行うことで、診断率向上と治療の遅れを減らすことができる。FS や軽症 GBS に対する IVIg の比較試験が必要である。

Guillain-Barré 症候群と Fisher 症候群患者の初診から治療までの経緯

木元 一仁 西本 幸弘 結城 伸泰 平田 幸一

目的

1993-4 年に行われたイギリスの疫学調査によると、7 割の Guillain-Barré 症候群(GBS)患者が単純血漿交換療法(PE)や免疫グロブリン大量静注療法(IVIg)を受けていた。しかしながら、1 年後の転帰は 8%が死亡、4%は遷延化する筋力低下により寝たきりか、人工呼吸器を必要とし、9%は介助なしでは歩行できなかった¹⁾。1983-4 年に行われたイギリスの疫学調査では GBS 患者の 1 割が PE を受けたに過ぎなかったが、1993-4 年の調査と比較して 1 年後の転帰に差は見られなかった²⁾。この理由として、「国民がかかりつけ医を指定登録しているイギリスでは、かかりつけ医が診断に苦慮し、治療開始が遅れてしまうことがその一因と考えられる。」という意見を Rees 医師より伺った。イギリスと医療体制は異なるが、本邦でも同様な状況が予想される。そこで、GBS 患者の初診科、診断、治療開始までの日数と治療内容について調査した。また、平成 12 年 12 月より IVIg が健康保険の適応を受けたので、その後の治療状況についても調査した。GBS の亜型と考えられる FS についても同様に調査した。

対象と方法

2001 年 1 月から 2001 年 10 月まで、当研究室に抗ガングリオン抗体検索を依頼された GBS 247 例と FS 125 例を対象に横断的調査研究を行った。患者の受診歴や治療法等の情報を得るため各主治医にアンケート調査を実施した(表 1)。神経内科および神経部門を含む内科、高齢科を神経内科と定義した。

表 1. アンケート調査用紙

質問
1. 貴科受診日をお教えてください。
2. 貴科受診時の Hughes の運動機能尺度をお教えてください。
3. 貴科での治療開始日と治療法についてお教えてください。
4. 患者さんは貴科受診前に他医を経由してきましたか。
5. 患者さんの初診科を選択した理由をお教えてください。
質問 4 で「はい」と答えられた方のみ、以下の質問にお答えください。
6. 前医の(1)病院名、(2)診療科名、(3)受診日、(4)診断名、(5)治療内容を經由順にお教えてください。
7. 貴科への受診は自己判断ですか、それとも上記最終病院(医院)からの紹介ですか。

結果

1) GBS 患者

247 例中 150 例(61%)から有効な回答が得られた。初診科は内科(58%; このうち神経内科は 21%)、整形外科(17%)、脳神経外科(6%)の順に多かった(表 2)。5m 歩行不能な症例は初診科から 1 診療科を経由して治療が開始されることが多かった。治療開始までの日数は中央値(範囲)で 5 日(1-34 日)であった。一方、歩行可能な症例も 1 診療科を経由して治療されることが多かったが、治療開始までの日数は 7 日(1-47 日)と歩行不能な症例に比べて遅かった。全体として、2 週間以内に 83%の患者が診断、または治療を開始されていた。初診時の診断は GBS または疑い(42%)、頸椎症(10%)、末梢神経障害(6%)、脳梗塞(6%)の順に多かった。治療の第一選択は IVIg(61%)と血漿浄化療法(22%)が主体であった。歩行可能群でも治療の第一選択は IVIg が 49%を占めていた(表 3)。

2) FS 患者

125 例中 72 例(58%)から有効な回答が得られた。初診科は内科(52%; このうち神経内科は 26%)、眼科(25%)、脳神経外科(15%)の順に多かった(表 2)。GBS と同様に、初診科から 1 診療科を經由して治療が開始される場合が多く、治療開始までの日数は 6 日(1-58 日)であった。全体として、2 週間以内に 86%の患者が診断、または治療を開始されていた。初診時の診断は FS または疑い(30%)、脳梗塞(16%)、外転神経麻痺(7%)、外眼筋麻痺(6%)の順に多かった。治療の第一選択は、IVIg が 51%と最も多かった(表 3)。

表 2. GBS と FS の初診科の内訳

GBS (n=150)	%	FS (n=72)	%
内科	58	内科	52
病院	23	神経内科	26
神経内科	21	病院	13
診療所	14	診療所	13
整形外科	17	眼科	25
脳神経外科	6	脳神経外科	15
その他	19	耳鼻科	4
		その他	4

表 3. GBS と FS の第一治療選択の現状

	GBS 全体 (n=150)	歩行不能群 (n=97)	歩行可能群 (n=53)	FS (n=72)
IVIg	61	67	49	51
血漿浄化	23	25	21	21

(単位は%)

考 察

両症候群ともに 5 割以上の患者が内科を初診していた。この理由として、「まずは、かかりつけ医師に相談する」ことが一番多く、本邦でもイギリスと似た受診様式が背景にあるものと考えられた。受診経緯は 1 診療科を経て治療されることが多く、発症 14 日以内に GBS や FS の 8 割が治療を開始されていた。しかしながら、なかには初診時に脳梗塞と診断され適切な治療が遅れた症例も見られた。初診時に的確な診断がなされる症例は意外と少ないようである。

本調査結果を基に初診患者が多い診療科への啓蒙を行うことで、初診時の診断率向上と治療が遅れる症例を減らすことが期待できる。

当研究室の調べでは GBS に対する IVIg の保険適応前は血漿浄化療法が主体であったが^{3,4)}、保険適応後の治療は IVIg へと移行していた。FS や歩行可能な GBS に対する治療では、健康保険の適応を受けていない IVIg が半分を占めていた。今後、FS や歩行可能な軽症 GBS に対する IVIg の有効性について、大規模無作為化比較試験の必要がある。

結 論

本調査結果を基に患者が初診する診療科に両症候群の啓蒙を行う必要がある。これにより、診断や治療までの日数を減らすことができる。

今後、健康保険適応を受けていない FS や歩行可能な軽症 GBS に対する IVIg の有効性について大規模無作為化比較試験の必要がある。

文 献

1. Rees JH, et al: Epidemiological study of Guillain-Barré syndrome in south east England. J Neurol Neurosurg Psychiatry 64: 74-77, 1998
2. Winer JB, et al: A prospective study of acute idiopathic neuropathy. I. Clinical features and their prognostic value. J Neurol Neurosurg Psychiatry 51: 605-612, 1988
3. 伊藤雅史, 他: Fisher 症候群の治療選択. 神経内科 55: 95-97, 2001
4. 伊藤雅史, 他: Guillain-Barré 症候群治療の現状と将来. 神経治療 18: 159-162, 2001

軸索型 Guillain-Barré 症候群モデル動物に対する 免疫グロブリン大量静注療法

分担研究者 結城 伸泰
(獨協医科大学神経内科)

研究要旨

目的：軸索型 Guillain-Barré 症候群(GBS)モデル動物に免疫グロブリン大量静注療法(IVIg)が有効であるかを検討する。

対象と方法：ウサギ 37 羽にウシ脳グングリオシド 2.5 mg と共に keyhole limpet hemocyanin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 2 mg と Freund 完全アジュバンドを 3 週毎に皮下注した。発症した 30 羽を IVIg 群(n=15; ウサギ IgG 免疫グロブリン 400mg/kg/日×5 日間静注)と生食治療群(n=15; 同容量/日×5 日間静注)に無作為割付し、Gabriel らの論文を参考に作成した臨床スコアを用いて 60 日間評価した。

結果：IVIg 群と生食治療群の間で生存率に差はなかった。経過にともない臨床スコアが 4 点以下に回復する時間は IVIg 群で短く($p = 0.03$)、3 点以下への回復率も IVIg 群が有意に高かった($p = 0.03$)。

結論：軸索型 GBS モデル動物に対する IVIg は病気からの回復速度を促進し、ヒトの大規模無作為化比較試験と同様の結果が得られた。

軸索型 Guillain-Barré 症候群モデル動物に対する

免疫グロブリン大量静注療法

西本 幸弘 結城 伸泰 古賀 道明 平出 幸一

目的

オランダのグループと11カ国38施設が参加して行われた大規模無作為化比較試験より Guillain-Barré 症候群 (GBS) では、免疫グロブリン大量静注療法 (IVIg) の有効性が確立している^{1,2)}。しかし、その作用部位や作用機序については解明されていない。最近、われわれは軸索型 GBS モデル動物の樹立に成功した³⁾。このモデル動物を用いて、①IVIg の作用部位および作用機序を解明すること、②それに基づいた新薬を開発すること、を将来の目標にしている。その基礎実験として、ヒト同様に軸索型 GBS モデル動物でも IVIg が有効であるかを検討した。

方法

疾患モデルの作製: Japanese white rabbit (体重 2.0-2.5 kg) のオス 37 羽を使用した。ウシ脳ガングリオシド 2.5 mg とともに *keyhole limpet hemocyanin* (Sigma, St. Louis, MO, USA) 2 mg と Freund 完全アジュバンドを 3 週毎に皮下注射した。発症するまで最高 8 回まで感作を続けた。

対象と治療方法: 乱数表を用いて発症したウサギを 2 群に無作為割り付けた。ウサギ IgG 免疫グロブリン (Serologicals Proteins, Kankakee, IL, USA) 400mg/kg/日 × 5 日間または同容量の生食 (4ml/kg/日) を 5 日間静脈注射した。

評価方法: Gabriel ら⁴⁾ の論文を参考に臨床スケール (合計 13 点) を作成した。合計 4 点以上を発症と定義した。経過中の死亡は 13 点とし、観察終了まで持続するものとした。発症時より 2 人の担当者が毎日臨床評価を行った。担当者は治療薬を知らされなかった。治療開始 (発症) から 60 日の経過観察

期間を経て実験を終了した。実験終了後、ウサギに苦痛を与えないようペントバルビタールナトリウムを投与し、神経標本採取のため 3% グルタルアルデヒド・1% パラホルムアルデヒドで還流固定した。

この研究において実施された動物実験の内容は、動物の愛護及び管理に関する法律 (第 221 号)、実験動物の飼育及び管理等に関する法律 (第 6 号)、および獨協医科大学動物実験方針に基づいており、獨協医科大学動物実験委員会により承認されたものである (承認番号 00-065 号)。

評価項目: 生存率、治療による臨床スコアの変動量、スコアが 3 点以下に回復する期間と 60 日後に 3 点以下に回復するモデル動物の割合を評価項目とした。

統計処理: 統計解析には 5 日毎の臨床スコアを用いた。免疫回数と発症までの日数、発症時の体重と臨床スコアの比較には Mann-Whitney *U* test (両側) を用いた。生存率と臨床スコアが 3 点以下に回復する時間は Kaplan-Meier 法と logrank test で比較した。IVIg と生食治療による臨床スコアの変動量の差は area under curve 法と *t* 検定 (両側) で比較し、臨床スコアが 3 点以下に回復した割合の差は Fisher's exact test で比較した。*p* 値が 0.05 未満を有意差ありと定義した。

結果

解析対象群: 37 羽に感作し、30 羽 (81%) が発症した。無作為割り付けられた IVIg 群 15 羽と生食治療群 15 羽を解析対象群とした。2 群間の免疫回数や発症までの日数、発症時の体重と臨床スコアに有意差はなかった。

解析: IVIg 群と生食治療群の間で生存率に差はなかった (Fig.1)。また、両治療における臨床スコアの変動量にも

統計学的有意差を認めなかった。一方、経過とともに臨床スコアが3点以下に回復する時間に差はなかったが($p = 0.08$)、4点以下に回復する時間はIVIg群で短く($p = 0.03$; Fig.2)、3点以下への回復率もIVIg群が有意に高かった($p = 0.03$; Table)。

考察

Experimental allergic neuritis (EAN)は脱髄型GBSと類似している。LewisラットにP2蛋白を感作して作製したEANに対してIVIgが行われたが、その効果について意見が分かれている^{4,5,6)}。一方、軸索型GBSモデル動物ではIVIgの効果判定はまだ行われていなかった。

今回の検討で、発症後臨床スコアが4点以下に回復する時間と3点以下への回復率は生食治療群に比べてIVIg群が優っていた。すなわち、ヒト同様に、軸索型GBSモデル動物でもIVIgは病気からの回復を促進する効果があることが示された。

今後、免疫グロブリンのFab部位またはFc部位のどちらに治療効果を有するか検討したい。予想どおりFc部位に効果があれば、さらにその部位を細分化して検討することで、どのアミノ酸配列に薬効があるかが特定できる。このモデル動物を用い、将来、血液製剤によるウイルス感染症の心配がない、新薬の開発につなげたい。

まとめ

軸索型GBSモデル動物に対するIVIgの有効性に関する検討を行い、病気からの回復速度を促進するというヒトの大規模無作為比較試験と同様の結果が得られた。

文献

- 1) Van der Meché FGA, et al: N Engl J Med 326: 1123-1129, 1992
- 2) Plasma Exchange/Sandoglobulin GBS Trial Group: Lancet 349: 225-230, 1997
- 3) Yuki N, et al: Ann Neurol 49: 712-720, 2001
- 4) Gabriel CM, et al: Brain 120: 1533-1540, 1997
- 5) Enders U, et al: J Neuroimmunol 76: 112-116, 1997
- 6) Miyagi F, et al: J Neuroimmunol 78: 127-131, 1997

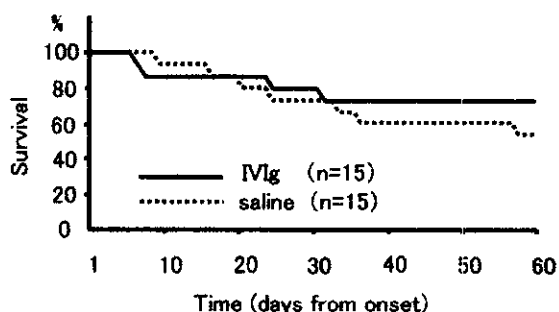


Fig.1 Kaplan-Meier curves indicating the proportion of survival. Animals observed for 60 days from treatment.

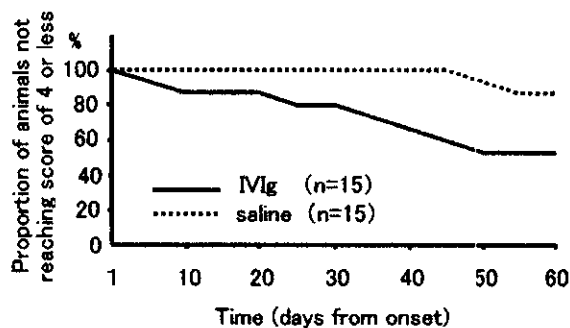


Fig.2 Kaplan-Meier curves indicating the proportion of animals not reaching score of 4 or less.

Table Comparison between IVIg and saline treatment after 60 days

	Effect*	No effect
IVIg	8	7
Saline	2	13

*suppressing clinical score and reaching 3 or less score.

人工呼吸器を要した Guillain-Barre 症候群における 臨床的特徴と抗ガングリオシド抗体に関する解析

分担研究者 楠 進
(東京大学医学部神経内科)

研究要旨

Guillain-Barre 症候群(GBS)における呼吸筋麻痺に関連する因子を調べるため、人工呼吸器を要した GBS(GBS+AV 群)の臨床的特徴を解析し、抗ガングリオシド抗体の出現頻度を検討した。対象とした GBS 329 例のうち GBS+AV 群は 43 例(13%)であった。人工呼吸器を要しなかった GBS 群から任意に抽出された 88 例と比較して、呼吸器感染の先行が多く、脳神経障害を高率に伴っていた。特に外眼筋麻痺、顔面神経麻痺、球麻痺が高頻度にみられたことが特徴的であった。抗ガングリオシド抗体の分析では、IgG 抗 GQ1b 抗体の出現が有意に高頻度であり、人工呼吸器装着と関連していた。IgG 抗 GQ1b 抗体はマウス横隔膜の運動神経終末で伝導障害を生じることが報告されており、同抗体はヒト横隔膜においても運動神経終末に作用し、呼吸筋麻痺をきたす可能性がある。

人工呼吸器を要した Guillain-Barré 症候群における臨床的特徴と抗ガングリオシド抗体に関する解析

海田 賢一¹⁾ 楠 進²⁾ 神崎 真美¹⁾ 鎌倉 恵子¹⁾ 元吉 和夫¹⁾
金澤 一郎²⁾

目 的

Guillain-Barré 症候群(GBS)は单相性の経過をとる予後良好な疾患と考えられているが、症例の 2~12%が死亡し、15~20%に永続的な後遺症を認め、20~30%に人工呼吸器が必要である。人工呼吸器を要する症例は回復が遅延し、機能予後も悪い傾向をもつことが知られており、このような症例を多面的に解析することは、適切な治療法の選択、重症例の機能予後改善、および重症例における病態解明という点において重要であると考えられる。一方、近年の研究から抗ガングリオシド抗体は GBS において症候を規定する因子として臨床的意義をもつことが知られている。そこで本研究において、GBS における呼吸筋麻痺および人工呼吸器装着に相関する因子を調べるため、人工呼吸器を要した GBS 例(GBS+AV 群)の臨床的特徴を多数例を用いて解析し、さらに抗ガングリオシド抗体の出現頻度を検討した。

対 象 ・ 方 法

(1) 対象：1998 年 1 月から 2000 年 9 月の間に東京大学神経内科に抗体測定を依頼された GBS と診断された患者のうち、Asbury らの診断基準を満たす症例を対象とした。

(2) 抗ガングリオシド抗体の測定：これらの症例の急性期血清において、ガングリオシド GM1, GM2, GM3, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b に対する抗体価を

ELISA にて測定した。GBS+AV 群のうち、IgG 抗 GQ1b 抗体陽性例については IgG 抗 GT1a 抗体も測定した。(3) 臨床的特徴の解析：対象 GBS において、先行感染、ピークまでの期間、脳神経障害、運動麻痺の分布、感覚障害、および電気生理所見等について、血清とともに送られてきた紹介状、入院要約をもとに解析した。重症度は Hughes の重症度分類を用いて評価した。電気生理所見を Hadden らの基準に従い、primary demyelinating, primary axonal, inexcitable, normal, equivocal に分類した。(4) 人工呼吸器を要しなかった GBS 例のなかから任意に抽出された 88 例を GBS-AV 群に分類し、対照(control)とした。抗ガングリオシド抗体の出現頻度、臨床的特徴に関して GBS+AV 群と GBS-AV 群とを比較し、統計学的解析を加えた。両側 P 値が 0.05 未満のとき有意差ありと判定した。

結 果

(1) 臨床的特徴：対象例は 329 例であり、そのうち GBS+AV 群は 43 例(13%)であった。GBS+AV 群の平均年齢は 42 歳(95%信頼区間、36-48 歳)で男性 26 例、女性 17 例であった。GBS-AV 群では平均年齢は 42 歳(95%信頼区間、38-45 歳)で男性 58 例、女性 30 例であった。年齢、男女比とも GBS+AV 群と GBS-AV 群間で有意差を認めなかった。GBS-AV 群のピーク時の平均 Hughes grade は 3.2 ± 0.9 (mean \pm SD, n = 79)であった。表 1 に各群の臨床的特徴を示す。先行感染では呼吸器感染(60%)が多く消化器感染(14%)は少ない傾向であったが GBS-AV 群と比較して有意差を認めなかった。脳神経障害は GBS+AV 群に有意に高頻度にみられ、特に

1) 防衛医科大学第三内科

2) 東京大学医学部神経内科

表1 GBS+AV群, GBS-AV群の臨床的特徴

	GBS+AV (n = 43)	GBS-AV (n = 88)
Antecedent infections	n = 42 (%)	n = 81 (%)
RT	25 (60)	46 (57)
GI	6 (14)	24 (30)
Onset to nadir (days)	5.4 ± 2.4 (n=35)	6.8 ± 4.6 (n=73)
(95%CI)	(4.6 - 6.2)	(5.7 - 7.9)
Cranial nerve deficits	n = 40 (%)	n = 83 (%)
positive	35 (88)*	42 (51)
III, IV, VI	18 (45)*	15 (18)
VII	27 (68)*	26 (31)
IX, X	23 (58)*	29 (35)
XI	4 (10)	1 (1.2)
Predominant weakness	n = 39 (%)	n = 78 (%)
distal	2 (5)*	27 (35)
proximal	5 (13)	13 (17)
Sensory disturbances	n = 34 (%)	n = 81 (%)
no	10 (30)	20 (25)
Autonomic dysfunction	n = 19 (%)	n = 52 (%)
+	4 (21)*	40 (77)
Electrophysiology	n = 28 (%)	n = 38 (%)
Primary demyelinating	7 (25)*	22 (58)
Primary axonal	2 (7)	3 (7.9)
Inexcitable	3 (11)	0 (0)
Normal	0 (0)	2 (5.2)
Equivocal	16 (57)*	11 (29)

RT=respiratory tract infection GI=gastro-intestinal infection

CI = confidential interval ns = not significant

* p < 0.05

動眼, 滑車, 外転神経, 顔面神経, および舌咽, 迷走神経の障害が有意に多くみられた。GBS+AV群で自律神経障害は少なかった。感覚障害, 発症からピークまでの期間に両群で有意差を認めなかった。電気生理所見では, 情報のある28例を検討するとequivocalが57%と多いことが目立っていた。(2) 抗ガングリオシド抗体: GBS+AV群において, IgG抗GM1 (9.3%), GD1a (12%), GalNAc-GD1a (7.0%), GD1b (21%), GD3 (4.7%), GT1b (4.7%), GQ1b (26%)抗体を認めた。一方GBS-AV群においては, IgG抗GM1 (22%), GD1a (5.7%), GalNAc-GD1a (15%), GD1b (16%), GD3 (1.1%), GT1b (3.4%), GQ1b (9.1%)抗体を認めた。抗GM2, GM3抗体は両群で陰

性だった。各抗ガングリオシド抗体の出現頻度を両群間で比較すると, IgG抗GQ1b抗体がGBS+AV群で有意に高頻度であった($p = 0.03$)。IgM抗ガングリオシド抗体はIgG抗ガングリオシド抗体より頻度は低く, 両群間に有意差を認めなかった。(3) IgG抗GQ1b抗体と呼吸筋麻痺との相関: 全対象例329例のなかで人工呼吸器を装着した症例は, IgG抗GQ1b抗体陽性39例のうち11例(28%), IgG抗GQ1b抗体陰性290例のうち32例(11%)であった。IgG抗GQ1b抗体陽性群および陰性群間で人工呼吸器装着の頻度を比較すると, 陽性群で有意に高頻度であった($p = 0.01$)。IgG抗GQ1b抗体陽性で人工呼吸器を装着した11例のうち9例はIgG抗GT1a抗体も陽性であった。

考 察

本研究の結果, GBS+AV群では, 呼吸器感染の先行が多く, 脳神経障害を高率に伴い, 特に外眼筋麻痺, 顔面神経麻痺, 球麻痺が有意に高頻度にみられたことが特徴的であった。電気生理的にequivocalに分類された症例が多くみられたが, これは不完全なデータをもつ症例が多かったためと考えられる。自律神経障害, 電気生理所見の結果については, 十分な情報を持つ症例が少なく, さらに症例を集めて検討する必要がある。

人工呼吸器を要するGBSの臨床的特徴の解析, 呼吸不全の予測因子に関しては最近欧米で報告されており, 急速な進行, 球麻痺症状, 顔面神経麻痺, 自律神経障害といった臨床的特徴がみられ¹⁾, 特に予後不良例には電気生理学的にinexcitableを示す症例が多いことが知られている²⁾。本研究では, 臨床的には顔面神経麻痺, 球麻痺が多いことが欧米の報告に一致したが, 球麻痺は欧米の報告(91%)¹⁾ほど高頻度ではなく, 外眼筋麻痺の頻度が高いことが目立っていた。この理由は不明である。先行感染では呼吸器感染が多くみられたが, 呼吸器感染が経過中の呼吸機能の低下に関わっている可能性がある。しかし実際に呼吸器感染の遷延がその後の人工呼吸

器導入に関与していると考えられた症例は1例のみであった。

呼吸筋麻痺に関連する抗ガングリオシド抗体はこれまで報告されていない。今回の研究ではIgG抗GQ1b抗体が人工呼吸器装着との相関を示した。Ropperらは呼吸筋麻痺が、概して肩甲帯、頸部屈筋群の筋力低下と並行することを指摘しており³⁾、Lawnらの報告でも人工呼吸器を要するGBSに球麻痺、上肢の完全麻痺など咽頭-頸部-上腕型GBS(pharyngeal-cervical-brachial variant of GBS, PCB)様の特徴がみられている¹⁾。IgG抗GQ1b, GT1a抗体はPCBで上昇していることや⁴⁾、GBSおよびその類縁疾患における急性球麻痺症状との関連も指摘されている⁵⁾ことから、彼らの症例でも抗GQ1b, GT1a抗体が呼吸筋麻痺に関与していた可能性がある。IgG抗GQ1b抗体の病因的役割に関しては、ヒト動眼、滑車、外転神経における免疫組織化学的検討の結果から、Ranvier絞輪部、傍絞輪部における伝導障害により眼球運動麻痺をきたすことが推測されている⁶⁾。一方、マウス横隔膜の神経筋接合部を用いた実験系で、運動神経終末部における α -latrotoxin様作用により、神経終末においてアセチルコリン放出障害を生じ伝導障害をきたす可能性⁷⁾のほか、補体を介した構造破壊などが運動麻痺をきたす可能性が報告されている⁸⁾。ヒトとマウスとの種の違いはあるが、運動神経終末部における上記のメカニズムが呼吸筋麻痺の発症に関与している可能性がある。ただIgG抗GQ1b抗体が高率に陽性となるFisher症候群では呼吸筋麻痺は少ないことから、抗GQ1b抗体のfine specificityの違いや、抗GQ1b抗体以外の因子に関しても検討する必要がある。

ま と め

人工呼吸器を要したGBSでは呼吸器感染の先行が多く、外眼筋麻痺、顔面神経麻痺、球麻痺を高率に伴うことが特徴であった。IgG抗GQ1b抗体の出現が人工呼吸器装着と関連していた。

1) Lawn ND et al: Anticipating mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. Arch Neurol 58: 893-898, 2001.

2) Fletcher DD et al: Long-term outcome in patients with Guillain-Barré syndrome requiring mechanical ventilation. Neurology 54: 2311-2315, 2000.

3) Ropper AH et al: Guillain-Barré syndrome. p77, FA Davis Company, Philadelphia, 1991.

4) Mizoguchi K et al: Two species of antiganglioside antibodies in a patient with a pharyngeal-cervical-brachial variant of Guillain-Barré syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 57: 1121-1123, 1994.

5) O'Leary CP et al: Acute oropharyngeal palsy is associated with antibodies to GQ1b and GT1a gangliosides. J Neurol Neurosurg Psychiatry 61: 649-651, 1996.

6) Chiba A et al: Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: clinical and immunohistochemical studies. Neurology 43: 1911-1917, 1993.

7) Plomp JJ et al: Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: α -latrotoxin-like effects on motor end plates. Ann Neurol 45: 189-199, 1999.

8) O'Hanlon GM et al: Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement-dependent destruction of the motor nerve terminal. Brain 124: 893-906, 2001.

運動神経特異的な GalNAc-GD1a に関する研究

分担研究者 吉野 英

(国立精神・神経センター国府台病院神経内科)

研究要旨

純粋運動神経麻痺を呈するギランバレー症候群や運動性ニューロパチーの病態を解明するために、運動神経に特異的なガングリオシドの分布を研究した。これまでにヒト、ウシ脊髄前角細胞、前根に GalNAc-GD1a が特異的に存在していることを見出したが、詳細な細胞内分布を今回検索した。灌流固定したラット脊髄、前根に対して、GalNAc-GD1a 特異抗体を有する GBS 患者血清、および GalNAc-GD1a を感作し麻痺を生じた家兎血清を反応させたところ、脊髄前角細胞および運動神経軸索に抗体は反応した。一方モノクローナル GM1 抗体は主としてミエリン外膜に反応し、軸索に対する染色性は乏しかった。これらの所見は、GalNAc-GD1a 抗体を伴うギランバレー症候群は純粋型運動神経麻痺を呈することと関連があると考えられた。

運動神経特異的な GalNAc-GD1a に関する研究

吉野 英¹⁾ 任 進²⁾ 田口恭治²⁾

目 的

N-acetylgalactosaminyl GD1a (GalNAc-GD1a) に対する抗体を有する GBS は、脳神経麻痺を伴うことが少なく、感覚障害はないかあってもわずかであること、四肢遠位筋の障害が優位であることが知られている¹⁾。今まで我々は、GalNAc-GD1a は単離したウシ脊髄運動ニューロンに豊富に認められること、ウシの前根には GalNAc-GD1a が検出されるが後根には検出されないことを報告した。またヒト神経組織においても GalNAc-GD1a 抗体により脊髄前角の大型のニューロン、前根の軸索が染色されたこと、ヒト前根のグングリオシドには GalNAc-GD1a が検出されたが後根にはわずかにしか検出されなかったことを報告した。さらに GalNAc-GD1a の感作により抗体価の上昇に伴い一過性の麻痺を生じた家兎がみられ、GalNAc-GD1a 抗体が運動麻痺に関わっていることが示唆された。

今回さらに詳細に GalNAc-GD1a の神経組織における分布を調べるために、ラット神経組織における分布を検索し、GM1 抗体による反応性と比較した。

方 法

ウイスターラットを麻酔科に 4%パラホルムアルデヒドで還流固定し脊髄、神経根を液体窒素で凍結した。10 μm の凍結横断切片を作成し、PBS で洗浄し 5 分間アセトンで固定した。10%ヤギ血清でインキュベートしブロッキングを行った後、GalNAc-GD1a に特異的に反応する抗体陽性の患者血清を用い 4℃で一晩反応させた。二次抗体は FITC ラベルヤギ抗ヒト IgG あるいは TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) ラベルヤギ抗家兎 IgG を用いた。神経根においては IgM 抗 GM1 抗体 (生化学工業) 及び FITC ラベル抗マウス IgM を用いて二重染色を行った。

結 果

GalNAc-GD1a 抗体により脊髄においては前角の大型ニューロンの胞体が染色された。末梢神経組織においては

前根の軸索が特異的に染色されてが、ミエリンは染色されなかった。後根では少数の神経線維に軸索の染色がみられたが、前根に比べるとわずかであった。またミエリンに染色されなかった。一方 GM1 抗体はミエリンを染色し、とりわけ paranode に強い反応が認められた。

考 察

GalNAc-GD1a 抗体を伴う GBS には純粋運動麻痺を呈する症例が多いが、重症度は多様であり、強い歩行障害の後遺症を残す症例があれば、急速に回復する症例もある。両者とも発病早期から CMAP が著しく低下すると報告されている²⁾。

今回のわれわれのラット神経組織を用いた研究から、ウシ、ヒト同様 GalNAc-GD1a 抗体は脊髄運動ニューロン、運動神経軸索に特異的に染色し、感覚神経、ミエリンは染色しないことが確かめられた。GalNAc-GD1a 抗体が反応するエピトープの分布が運動ニューロンと運動神経軸索に特異的であることは、GM1 抗体が反応するエピトープの分布が paranode を中心としていたことと大きく異なっており、興味深いことと考えられる。すなわち、GalNAc-GD1a 抗体同様、GM1 抗体を伴う GBS においても臨床的には Acute axonal neuropathy を呈する症例が多いことから、これら 2 つの抗体が同じ機序で軸索障害をきたすのか、異なる機序を有するのか、今後さらに研究が必要である。

ま と め

GalNAc-GD1a 抗体は運動神経軸索を特異的に染色した。一方 GM1 抗体はミエリン外膜を主として染色した。

文 献

- 1) Hao Q, Saida T, Yoshino H, Kuroki S, Nukina M, Saida K. Anti-GalNAc-GD1a antibody-associated Guillain-Barré Syndrome with a predominantly distal weakness without cranial nerve impairment and sensory disturbance. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 758-768.
- 2) Kuwabara S, Asahina M, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Two patterns of clinical recovery in Guillain-Barre syndrome with anti-GM1 antibody. *Neurology* 1998; 51: 1656-1660.

1) 国立精神・神経センター国府台病院神経内科

2) 昭和薬科大学薬物治療学

ギラン・バレー症候群患者血中の 抗 GM1 IgG 抗体の反応性の解析

分担研究者 楠 進
(東京大学医学部神経内科)

研究要旨

ギラン・バレー症候群(GBS)急性期血中の”抗 GM1 IgG 抗体”の反応するエピトープを解析した。121 例の GBS 急性期血清のうち 32 例が抗 GM1 IgG 抗体陽性で、陽性血清全てが GM1 と phosphatidic acid(PA)を混合した抗原(GM1/PA)に対しても反応し、抗 GM1/PA 活性は抗 GM1 活性より有意に高かった。個別にみると、抗 GM1 活性が抗 GM1/PA 活性より高かったのは 7 例のみであり、残りの 25 例は抗 GM1/PA 活性がより高い値を示した。さらに抗 GM1 IgG 抗体陰性の 89 例のうち 12 例が抗 GM1/PA IgG 抗体陽性であった。PA のみに反応する抗体は全て陰性。また正常および疾患対照も全て陰性であった。GBS 血中の抗体には GM1 と PA による複合エピトープを認識するものが多い。今後 GBS の診断および病態解明には、ガングリオシドとリン脂質による複合エピトープに対する抗体活性の解析が重要である。

ギラン・バレー症候群患者血中の抗 GM1 IgG 抗体の反応性の解析

楠 進 森田大児 大南伸也 金澤一郎

目 的

ギラン・バレー症候群(GBS)急性期血中には、抗ガングリオシド抗体の上昇がしばしばみられ、診断のマーカーとして用いられるとともに、発症に関わる可能性のある因子として注目されている(1,2)。その中で抗 GM1 IgG 抗体は陽性率の最も高いもののひとつとして知られており、pure motor variant あるいは軸索型との関連が報告されている。またウサギを GM1 で感作することにより、運動麻痺をきたす軸索障害性ニューロパチーが作成されることが報告され、同抗体の発症機序への関与も示唆されている(3)。

一方 IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーにおける IgM M 蛋白は、しばしば糖鎖に反応することが知られ、MAG, SGPG や各種ガングリオシドが抗原となることが報告されている。それらの中で、リン脂質とガングリオシドを混合した抗原に対する抗体活性を示す例の報告がある(4)。その報告によると、リン脂質単独との反応は phosphatidic acid(PA)に弱い反応がみられるのみであった。またガングリオシドあるいは糖脂質単独に対する抗体活性も、弱いものがみられるのみであった。しかし PA と混ぜたものを抗原として用いることにより、多くのガングリオシドに対して非常に強い反応性がみられるようになることがわかり、PA とガングリオシドで形成されるエピトープに強く反応する抗体であると考えられた。そこで GBS における抗ガングリオシド抗体についても同様の可能性を考え、GM1 と PA に対する IgG 抗体活性を検討した。

方 法

GBS 121 例の急性期血清について抗体活性を検討した。30 例の正常血清と 65 例の疾患対照(CIDP、多発性硬化症、膠原病、神経変性疾患など)についても同様に検討した。さらにウサギを GM1 で感作して得た抗 GM1 抗血清(5)も検討の対象とした。

Microtiter plate の各 well に、GM1 200ng、PA 200ng、および GM1 と PA を 100ng ずつ混合させた抗原

(GM1/PA)を装着し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法(6)により抗体活性を測定した。GM1/PA では用いた GM1 は GM1 単独に比べて半分となっている。患者血清は 40 倍希釈で、ウサギ血清は 1600 倍希釈でそれぞれ反応させ、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ヒト IgG 抗体あるいは抗ウサギ IgG 抗体を用い、得られた O.D.値で抗体活性を表した。

結 果

121 例の GBS 急性期血清のうち 32 例が抗 GM1 IgG 抗体陽性であった。そしてそれらの全例が抗 GM1/PA IgG 抗体活性も陽性であった。それら 32 例の抗 GM1 IgG 抗体活性と抗 GM1/PA IgG 抗体活性を比較すると、抗 GM1/PA 活性が抗 GM1 活性に比して有意に高い値を示した。

個々の例についてみると(図)、抗 GM1 活性が抗 GM1/PA 活性より高かったのは 32 例中 7 例のみであり(A 群)、25 例では抗 GM1/PA 活性が抗 GM1 活性よりも高値を示した(B 群)。さらに抗 GM1 IgG 抗体陰性例のうち 12 例でも、抗 GM1/PA IgG 抗体が陽性であった(C 群)。一方 PA のみに対する抗体活性のみられた例はなかった。また正常対照と疾患対照では抗 GM1 IgG 抗体、抗 GM1/PA IgG 抗体ともに全て陰性であった。

一方ウサギ抗 GM1 抗血清では、抗 GM1 IgG 抗体活性が抗 GM1/PA IgG 抗体活性より高値を示した。

考 察

抗 GM1 IgG 抗体陽性の GBS では、GM1 よりも GM1/PA により強い反応性を示す例が多いことが明らかになった。また抗 GM1 IgG 抗体陰性でありながら GM1/PA に反応性を示す例も認められた。今回の抗 GM1/PA 抗体の測定では、用いた GM1 は GM1 単独を抗原として測定する場合に用いる量の半分である。従って GM1 を特異的に認識する抗体の場合には、抗 GM1 活性が抗 GM1/PA 活性より高くなると考えられる。実際に GM1 を免疫することにより得られたウサギ抗体ではそのような結果となっている。

しかし GBS 血清についての今回の結果からは、GBS

抗 GM1 IgG 抗体陽性	32 例	
抗 GM1>抗 GM1/PA	7 例	(A 群)
抗 GM1<抗 GM1/PA	25 例	(B 群)
抗 GM1 IgG 抗体陰性	89 例	
抗 GM1/PA 陽性	12 例	(C 群)

図 121 例の GBS 急性期血中の抗 GM1 および抗 GM1/PA IgG 抗体

急性期には、GM1 単独よりも GM1 と PA により形成されるエピトープを強く認識する抗体の上昇する例が多いことが示された。類似した事例としては、いわゆる抗カルジオリピン抗体があげられる。その場合には、抗体はリン脂質と共存する β 2glycoprotein I を認識すると報告されている(7)。GBS の場合の抗 GM1 抗体についてもリン脂質との複合エピトープを今後検討の対象にする必要があると考えられる。

今回の検討では PA に焦点を当てたが、他の種類のリン脂質にも同様の効果がみられるものがある。細胞膜上ではガングリオシドはリン脂質と共存していることから、ガングリオシドとリン脂質により形成されるエピトープを認識する抗体は、ガングリオシドのみを認識する抗体と比べて生体内でより強い結合性をもつ可能性があり、今後の検討が必要である。また抗 GM1 IgG 抗体以外の抗ガングリオシド抗体についても今回と同様の検討を行う必要がある。

ガングリオシドにリン脂質を加えた抗原を用いることにより、ガングリオシド単独を抗原とする場合よりも GBS 急性期血清の抗体陽性率が上昇する。したがって、この方法により抗体測定を行うことは、GBS 診断のための検査としても有用と考えられる。

文 献

1. Hughes RAC, Hadden RDM, Gregson NA, et al. Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 1999; 100: 74-97.
2. Kusunoki S. Antiglycolipid antibodies in Guillain-Barré syndrome and autoimmune neuropathies. *Am J Med Sci* 2000; 319: 234-239.
3. Yuki N, Yamada M, Koga M, et al. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 2001;49:712-720.
4. Freddo L, Hays AP, Nickerson KG, et al. Monoclonal anti-DNA IgMk in neuropathy binds to myelin and to a conformational epitope formed by phosphatidic acid and gangliosides. *J Immunol* 1986;137:3821-3825.
5. Kusunoki S, Mashiko H, Mochizuki N, et al. Binding of antibodies against GM1 and GD1b in human peripheral nerve. *Muscle Nerve* 1997;20:840-845.
6. Kusunoki S, Chiba A, Kon K, et al. N-acetylgalactosaminyl GD1a is a target molecule for serum antibody in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1994;35:570-576.
7. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, et al. Anticardiolipin antibodies recognize b2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179: 457-462.

ラテックス凝集反応による抗ガングリオシド抗体 迅速検出法の検討

分担研究者 齋藤 豊和
(北里大学東病院神経内科)

研究要旨

血清抗ガングリオシド抗体の検出はギラン・バレー症候群及びフィッシャー症候群の診断に有用である。我々はラテックス凝集反応による迅速検出法について検討した。2.5%0.3 μ m ラテックスビーズに 1mg/ml ガングリオシド GM1, GD1b, GM2 または GQ1b を室温 4 時間、4 $^{\circ}$ C 48 時間反応させ、1%BSA 加 25mM MES buffer (pH 6.1) にて洗浄後保存。スライドガラス上で患者血清及びガングリオシドを吸着させたビーズ各 4 μ l を混和、約 30 秒振とう後鏡検にて凝集を観察し、ELISA による抗体価と比較した。ELISA にて抗 GM1, GD1b, GM2, GQ1b 抗体価が 1:3200 以上の血清で陽性、1:6400 以上の血清では強陽性の凝集がみられた。ラテックス凝集反応により血清抗ガングリオシド抗体を検出した。簡便で迅速な検出法として有用である。

ラテックス凝集反応による抗ガングリオシド抗体迅速検出法の検討

入江 幸子¹⁾ 金澤 直美 齋藤 豊和 坂井 文彦

はじめに

Guillain-Barré症候群 (GBS) 患者血清では *Campylobacter jejuni* 感染後 GBS における抗 GM1, GD1b 抗体, cytomegalovirus 感染後 GBS における抗 GM2 抗体等, 抗ガングリオシド抗体が高頻度に出現する。また, 眼筋麻痺を伴う GBS や, GBS の類縁疾患で眼筋麻痺や小脳失調症を呈する Miller Fisher 症候群 (MFS) および MFS の特徴に加え意識障害等中枢神経症状を呈する Bickerstaff 型脳幹脳炎では高率に血清抗 GQ1b 抗体が出現し, 特に MFS 急性期では 90% 以上の症例で検出される。よって, 血清抗ガングリオシド抗体の検出は GBS およびその類縁疾患である可能性を強く示唆し, 補助診断としての価値は極めて高い。さらに, これらの疾患では早期の血漿交換療法等の免疫学的治療法が経過の短縮や後遺障害の軽減に効を奏するとされており, 血清抗ガングリオシド抗体の測定による早期診断の確立は治療法選択の上でも有益である。

目的

抗ガングリオシド抗体の測定方法としては従来 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ないし thin-layer chromatography による免疫染色が用いられてきた。しかし, これらの方法ではガングリオシドの固相化, 血清の incubation, 二次抗体の incubation, 標識抗体の発色と何段階もの過程があり, 結果を得るまでに最短で 2~3 日を要する。最近, Alaedini らはラテックス凝集反応を用いわずか 2~3 分で施行しうる血清抗 GM1 抗体迅速検出法を報告した^{1), 2)}。今回我々は Alaedini らの方法を一部改変し, 血清抗 GM1, GD1b, GM2, GQ1b 抗体迅速検出法について検討したので報告する。

方法

ガングリオシドは GM1, GD1b, GM2, GQ1b を用いた。2.5% 0.3 μ M ブルーポリスチレンラテックスビーズに, 100 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer (pH 6.1) にて 1 mg/mL に調整したガン

グリオシドを室温 4 時間, 4°C 48 時間反応させ, 受動的に吸着させる。遠心後 1% BSA 加 25 mM MES buffer (pH 6.1) にて 2 度洗浄し同溶液にて 4°C で保存しておく。3-ring glass slide 上に GBS または MFS 患者および正常対照血清を原液にて 4 μ L のせ, ガングリオシドを吸着させたラテックスビーズ 4 μ L を加えて混和し 30~40 秒振とうした後, 凝集を顕微鏡にて観察する。凝集反応は陰性, 陽性, 強陽性と 3 段階に評価する。これらの凝集反応と ELISA^{3), 4)} による血清抗ガングリオシド抗体価を比較する。また, ELISA にて Ig G 抗 GM1 抗体価が 1:51200 の血清を倍々希釈し, 凝集反応の変化を観察する。

結果

GM1, GD1b, GM2 または GQ1b に対する Ig M または Ig G 抗体価が ELISA にて 1:3200 以上の血清では陽性で, 1:6400 以上の血清では強陽性であった (図 1)。ELISA にて Ig G 抗 GM1 抗体価が 1:51200 の血清を倍々希釈したとき, 凝集反応は 16 倍希釈まで陽性, 32 倍以上の希釈では陰性であった (図 2)。

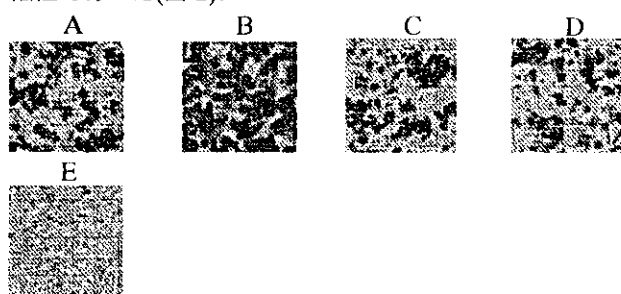


図 1. ガングリオシド吸着ラテックスビーズを用いた凝集反応. A, E: GM1, B: GD1b, C: GQ1b, D: GM2. A, B, C, D では強い凝集反応がみられ, E では陰性であった. ELISA による各抗ガングリオシド抗体の抗体価は 1:51200 (A), 1:25600 (C), 1:6400 (B, D), <1:100 (E)。

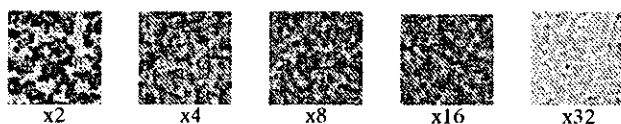


図 2. ELISA にて抗 GM1 抗体価が 1:51200 であった患者血清を倍々希釈したときの GM1 吸着ラテックスビーズによる凝集反応。

¹⁾ 北里大学東病院神経内科

考察

ラテックス凝集反応による抗ガングリオシド抗体検出法ではガングリオシドを吸着させたラテックスビーズを用意しておけば、数分で結果を得ることができる。我々の行っているELISAでは血清1:100希釈にて正常対照の吸光度+5SDをcut-off値とし、cut-off値を越える陽性例（抗体価1:100以上）をスクリーニングし、さらに希釈してcut-off値未満となる直前の希釈倍率を抗体価としている。ラテックス凝集反応による検出法では我々のELISA1:3200以上の血清で陽性で、強い凝集が観察される強陽性は1:6400以上の血清であった。検出感度はELISAに比し低いと考えられた。ELISAにて抗体価の高い強陽性血清を倍々希釈したとき、16倍希釈まで凝集がみられ、32倍希釈では凝集反応が消失した。抗体がある濃度に達すると強い凝集が起こると考えられた。

まとめ

簡便で迅速なラテックス凝集反応を用いた検出法により、血清抗GM1、GD1b、GO1b、GM2抗体を検出することができた。ELISAに比し感度は低いと考えられるが、スクリーニング検査として有用である。

文献

- 1) Alaedini A., Latov N.: Detection of anti-GM1 ganglioside antibodies in patients with neuropathy by a novel latex agglutination assay. *J Immunoassay* 21: 377-386, 2000
- 2) Alaedini A., Wirguin I., Latov N.: Ganglioside agglutination immunoassay for rapid detection of autoantibodies in immune-mediated neuropathy. *J Clin Lab Anal* 15: 96-99, 2001
- 3) Irie S, Saito T, Nakamura K, et al. Association of anti-GM2 antibodies in Guillain-Barré syndrome with acute cytomegalovirus infection. *J Neuroimmunol* 68: 19-26, 1996
- 4) 入江幸子, 糠澤達志, 伊藤博明, 荻野 裕, 金澤直美, 斎藤豊和: 球麻痺症状を伴うGuillain-Barré 症候群における抗ガングリオシド抗体の検討. 厚生省免疫性神経疾患調査研究班平成9年度研究報告書: 65-66, 1998

ヒト末梢神経神経内膜由来内皮細胞培養系の確立

分担研究者 水澤 英洋
(東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学)

研究要旨

ヒト血液神経関門(BNB)の *in vitro* モデルを構成する細胞としてより適当と考えられるヒト末梢神経神経内膜微小血管由来内皮細胞(PnMEC)の純培養法を確立した。剖検、あるいは生検腓腹神経から酵素処理を重ねて得られた本細胞は、ウシ BMEC や PnMEC と同じく細長い fibroblast に類似した形態を示し、時に多角形に近い形を呈するが、培養皿上で confluent となるに従い、明らかな contact inhibition を示す単層を形成した。内皮細胞のマーカーである DiI-Ac-LDL の細胞内取込み能を有し、抗 von Willebrand 抗体を用いた免疫染色でも細胞質内に明らかな陽性顆粒を認めた。より若年の患者から得られた細胞ほど優れた増殖能が得られる傾向があった。電顕的には細胞接着部位に electron dense な tight junction が観察された。このヒト PnMEC の純培養法の確立により、BNB の分子細胞学的研究の可能性が大きく広がることが期待される。

ヒト末梢神経神経内膜由来内皮細胞培養系の確立

水澤英洋 神田 隆 大和田潔 入岡 隆 岡本尚子 山脇正永

はじめに

免疫グロブリンあるいは活性化されたリンパ球、マクロファージなどの末梢神経内への侵入は、Guillain-Barré症候群, multifocal motor neuropathy (MMN), IgM paraproteinemiaに伴うニューロパチーなどの免疫性末梢神経疾患成立の第一歩である。近年、これらの疾患群において、糖脂質を認識する抗体の病因論的意義が論じられているが、免疫グロブリンをはじめとする高分子物質が血液神経関門(blood-nerve barrier; BNB)を越えて末梢神経実質へとaccessする機序については十分に明らかになっていない。我々はウシ培養末梢神経神経内膜微小血管由来内皮細胞(PnMEC)にはGM1をはじめとするガングリオシドが含有されていること¹⁾、同細胞を用いてin vitroで再構成したBNBモデルにおいて、抗GM1モノクロナル抗体がモデルの透過性を亢進させること²⁾を明らかにし、抗糖鎖抗体が補体結合反応を介することなくBNBの透過性に影響を与えること、その背景にはNF- κ Bの活性化とそれに引き続くNOSのup-regulationが関連している可能性があること³⁾を明らかにしてきた。しかしながら、ウシ細胞を用いた分子細胞学的研究には、ヒト細胞構成蛋白を対象とした各種接着因子抗体を用いることができないなど、ヒト末梢神経疾患の克服を最終目的としたin vitroの研究には必ずしも適当でない部分があり、ヒト細胞系の確立は我々の数年来の念願であった。今回、ヒトBNBのin vitroモデルを構成する細胞としてより適当と考えられるヒト末梢神経神経内膜微小血管由来内皮細胞の純培養法の確立に成功し、若干の知見を得たのでここに報告する。

方 法

剖検(坐骨神経)、あるいは生検腓腹神経から神経周膜・神経外膜組織を除いて得られた神経内膜組織を材料とし、我々の開発したウシ末梢神経神経内膜微小血管内皮細胞(PnMEC)分離法¹⁾に基づいて処理を行った。剖検

材料は死後20時間後のものでも培養可能であった。Collagenase type Iおよびdextranによる処理によってmicrovascular fractionを分離し、type I collagenを塗布したplastic dish上に播種した。培養液としてはMCDB131 改変EBM-2培地(BioWhittaker)+FBS2%をベースとし、抗生剤、hydrocortisone、各種成長因子(IGF-1, VEGF, bFGF, EGF)を添加したものをを用いた。10-21日後に純粋なPnMECのみからなるコロニーをクロー



図 1

Human PnMEC at semiconfluent state (in vitro 14 days). Cells were obtained from sciatic nerve of 69-year-old male cadaver. After confluency, the cells became spindle shaped and formed single membrane. Bar = 100 μ m.

ニングし、これからPnMECのmassを得た。得られたcell massの同定には(1)抗ヒトvon Willebrand抗体(Dako)による染色性の把持の確認と(2)DiIでラベルした acetylated LDLの細胞内取込みの二つの方法を用いた。

結 果

三種類のlineが確立できた。分離されたヒトPnMECは