

20030714

厚生労働科学研究研究費補助金
こころの健康科学研究事業

**免疫性神経疾患の発症機構の解明と
治療法の開発に関する研究**

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 楠 進

平成16年(2004年)4月

目 次

I. 総括研究報告

- 免疫性末梢神経障害の病態解明と治療法に関する研究 1
楠 進

II. 分担研究報告

1. ガングリオシド複合抗原を特異的に認識する Guillain-Barré 症候群血中抗体 4
楠 進
2. 肺炎マイコプラズマ菌体脂質成分を接種したウサギ血中抗体の反応性 8
の検討と、その神経症状について
楠 進
3. Guillain-Barré 症候群における GalNAc-GD1a とリン脂質の混合抗原に 12
対する血中 IgG 抗体の検討
楠 進
4. 免疫性ニューロパチーにおける GM1 IgM 抗体の反応性に及ぼす 15
リン脂質の効果
楠 進
5. カンピロバクター・リポオリゴ糖における糖脂質エピトープの多様性と 18
Guillain-Barré 症候群
結 城 伸 泰
6. 有髄神経の跳躍伝導におけるガングリオシドの生理的役割の解明 20
結 城 伸 泰
7. 受動免疫による Guillain-Barré 症候群モデルマウス作製の試み 22
結 城 伸 泰
8. Guillain-Barré 症候群・Fisher 症候群にみられる抗ガングリオシド抗体の 25
病因的意義：発症初期における抗体価の推移の経時変化からの検討
千 葉 厚 郎

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 29

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 33

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

免疫性末梢神経障害の病態解明と治療法に関する研究

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

分担研究者

結城伸泰・独協医科大学助教授

千葉厚郎・杏林大学医学部助教授

A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群(GBS)、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)、多巣性運動ニューロパチー(MMN)などの免疫性末梢神経障害の病態を解明し、治療法を検討することを目的として以下の研究を行った。

楠班員は、GBS において複数のガングリオシドの複合抗原に対する自己抗体の可能性に着目し検討を行い、ガングリオシド複合抗原に対する抗体の存在をはじめて報告した。

また同班員は従来、マイコプラズマ肺炎後の GBS と抗 Gal-C 抗体の関連を報告していたが、今回は、肺炎マイコプラズマ菌体から得た脂質成分をウサギに接種し、抗 Gal-C 抗体上昇の有無をしらべて、同抗体の上昇がマイコプラズマに対する免疫反応によるものかどうかを検討した。

さらに同班員は、GBS 患者血清中の抗 GMI IgG 抗体の反応性が phosphatidic acid (PA)を抗原に混合した際に増強することを報告していたが、本年度は抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体についても PA との混合抗原に対する抗体の反応性を検討した。

また GBS、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) や多巣性運動ニューロパチー (MMN) にみられる抗 GMI IgM 抗体について、

PA を含む各種リン脂質との混合抗原に対する血中抗体の反応性を検討し、昨年度の抗 GMI IgG 抗体の場合と比較した。

結城班員は *Campylobacter jejuni* 腸炎後 GBS における *C.jejuni* 菌体のリポオリゴ糖 (LOS) と抗ガングリオシド抗体について検討してきたが、本年度は GBS 分離 *C.jejuni* の LOS をしらべ、患者血中抗体の反応性と比較した。

同班員はガングリオシドの神経伝導における役割を明らかにするため、GMI などのガングリオシドを欠くマウスの末梢神経伝導機能を検討した。

さらに同班員は、抗 GMI 抗体や、抗 GMI 産生細胞を移入することにより、受動免疫による GBS モデルマウス作成を試みた。

千葉班員はフィッシャー症候群等における抗 GQ1b 抗体価の経時的変化を検討し、抗体上昇機序について「組織障害に関連した二次的な抗体産生」の可能性の有無を検討した。

B. 研究方法

GBS 急性期血清につき、ELISA にて各種ガングリオシド及び GD1a と GD1b を 1:1 の割合で混合した抗原(GD1a/GD1b)に対する抗体活性を検討した。薄層クロマトグラム(TLC)免疫染色による検討も行った。IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体陽性 GBS の臨床像を解析した。

培養肺炎マイコプラズマ(Mac strain)より抽出した脂質成分(M-lipid)を、ウサギに完全フロイントアジュバントとともに接種し、血清中の抗

Gal-C 抗体価を測定した。また M-lipid 中の糖脂質成分につき、TLC 及び TLC 免疫染色により解析した。

GBS 急性期血清について、GalNAc-GD1a 単独および GalNAc-GD1a と PA の混合抗原に対する IgG 抗体活性を比較検討した。

また GBS、CIDP、MMN 患者血中の抗 GM1 IgM 抗体について、各種リン脂質と GM1 の混合抗原に対する抗体活性を GM1 単独に対するものと比較した。

GBS 患者の糞便から分離・培養された *C.jejuni* の LOS についてガングリオシド様構造の有無を検討し、神経症状や患者血中の抗ガングリオシド抗体との関連を検討した。

GM1 などのガングリオシドを欠く GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いて、坐骨神経における運動神経伝導検査を施行した。

3つの方法により、受動免疫を試みた。すなわち、(1)Fc γ R IIb ノックアウトマウスへの GBS 患者抗体静注、(2)ヌードマウスへの抗 GM1 産生ハイブリドーマ腹腔内移植、(3)自己抗原ノックアウトマウスの脾細胞の rag-2 ノックアウトマウスへの移入、を行った。

抗 GQ1b IgG 抗体陽性のフィッシャー症候群および GBS 例において、抗体価の経時的推移を詳細に検討した。

C. 研究結果と D. 考察

GBS100 例中 8 例において、GD1a および GD1b 単独に対しては反応がみられないか弱い反応のみであるのに対し GD1a/GD1b に対しては強い反応を示す抗体が認められた TLC 免疫染色では GD1a と GD1b の混合物を展開したレーンにおいて GD1a と GD1b が重なる箇所の特異的に強い反応を認めた。疾患対照群、

正常対照群では抗 GD1a/GD1b 抗体は陰性であった。IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体陽性例は重症度が高い傾向が認められた。ガングリオシド複合抗原に特異的に強い反応性を持つ抗体の存在を見出したが、このような抗体は GBS 血中に限らずこれまで報告がない。複数のガングリオシドが複合体を形成して生体膜上に存在する箇所が抗ガングリオシド抗体の標的的部位となり、そこに抗体が結合して連結する蛋白を通じて神経細胞の機能障害をきたす可能性も考えられる。また同抗体陽性例は重症度が高い傾向を認め、同抗体が重症 GBS のマーカーになり得ると考えられた。

M-lipid 接種ウサギ 6 羽全てに抗 Gal-C IgM 及び IgG 抗体の上昇が認められ、1 羽は抗体が上昇した時点で横断性脊髄炎を発症し、別の 1 羽では両側前肢の軽度の筋力低下がみられた。また M-lipid についての TLC では複数の糖脂質の存在が認められ、これらは抗 Gal-C 抗体により免疫染色された。これらの結果より、肺炎マイコプラズマ菌体に存在する糖脂質成分に対する免疫反応の結果、抗 Gal-C 抗体が上昇することが確認され、同抗体が脱髓因子となることが示唆された。

抗 GM1 IgG 抗体と同様、抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体についても抗原に PA を加えることで抗体陽性率が上昇することがわかった。この結果は GBS の診断に有用である。

GBS 患者血中の抗 GM1 IgM 抗体活性には、リン脂質との混合抗原を用いることによる増強効果はみられなかった。MMN、CIDP では、GM1 に LPC を加えた混合抗原に対してのみ抗体活性が増強した。一方 SM を加えたときにはほぼ全例で抗体活性が低下した。GBS 患者血清の抗 GM1 抗体の反応性は IgG 抗体と IgM 抗体で大きく異なる。一方 SM 存在下にお

ける抗体活性の低下は免疫性ニューロパチーにみられる抗ガングリオシド抗体に共通するものと思われた。

GBS 患者由来の *C.jejuni* 菌株は GM1 や GD1a エピトープを有する頻度が有意に高く、四肢麻痺や血中 IgG 抗 GM1, GD1a 抗体と密接な関連がみられた。GQ1b/GT1a エピトープは外眼筋麻痺などの脳神経麻痺や運動失調、血中抗 GQ1b 抗体との関連が高かった。以上から、先行感染の病原体となる *C.jejuni* の LOS のもつ糖鎖構造により GBS 患者血中の抗ガングリオシド抗体の特異性が規定され、臨床像に反映されることが示された。

ガングリオシドを欠くマウスでは野生型に比べ運動神経伝導速度が有意に低下していた。また 48 週齢での検討では、複合筋活動電位にも有意の低下がみられた。以上より、ガングリオシドは末梢神経の伝導機能に重要な役割を果たしていることがわかった。

各種のマウスを用いた検討では、受動免疫による、運動麻痺および病理学的変化のいずれもみられなかった。血液神経関門の透過性を亢進させる因子の関与、補体やマクロファージの活性化の程度なども、末梢神経障害をきたす上で重要と考えられる。

抗 GQ1b IgG 抗体陽性症例中、発症後から検討を行った 8 例中 7 例で抗体価は初回採取血清で最高値を示し、経時的に低下した。発症前から検討し得た 1 例では、症状出現前に抗体上昇がみられ、発症の頃に抗体価がピークとなり、その後低下した。以上の結果、とくに発症前の抗体価のデータは、抗 GQ1b IgG 抗体産生が組織障害の結果の二次的なものという可能性に対する強い反証となるものである。

E. 結論

従来報告されていない GD1a, GD1b の複合体に対する抗体を GBS 血清に見出した。同複合体に対する抗体は重症 GBS のマーカーになり得るとともに、新たな病態メカニズム解明の端緒となると考えられる。

マイコプラズマ肺炎後の脱髄性ニューロパチーや脊髄炎においては、マイコプラズマ菌体の糖脂質に対する免疫反応の結果、脱髄因子である抗 Gal-C 抗体が上昇する。

GBS 血中の抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体は抗 GM1 IgG 抗体と同様 PA との混合抗原に単独抗原よりも強く反応する。

抗 GM1 IgM 抗体の反応性に対するリン脂質の効果は IgG 抗体とは異なる。しかし SM との混合抗原に対する反応性の低下は IgG 抗体、IgM 抗体のどちらにもみられ、免疫性ニューロパチーに共通するものと考えられた。

C.jejuni 感染後の GBS では、*C.jejuni* LOS の構造により、患者血中自己抗体の反応特異性が規定され、臨床像に反映される。

GBS 血中抗体の標的分子である GM1 をはじめとする複合型ガングリオシドは、末梢神経伝導において重要な役割を果たしている。

マウスを用いて、受動免疫による免疫性末梢神経障害モデル作成を試みたが、臨床症状および病理学的変化のいずれも認められなかった。

フィッシャー症候群などでみられる抗 GQ1b IgG 抗体は、組織障害の結果二次的に産生されるものではない。先行感染に関連して上昇し発症機序に関与すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

ガングリオシド複合抗原を特異的に認識する Guillain-Barré 症候群血中抗体

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

研究要旨

我々は2つのガングリオシド(GD1aとGD1b)が混在した状態で生じる複合体に対して強い反応性を持つ抗体を Guillain-Barré 症候群(GBS)100例のうち8例の患者血清に見出した。この抗体は、TLC免疫染色でGD1a、GD1b単独には反応しないかきわめて弱い反応しか示さず、GD1aとGD1bを同じレーンに展開した場合に両者の混在した箇所だけに特異的に反応した。ELISAでもGD1aとGD1bを混合した抗原に特異的な反応が確認された。疾患対照119例、正常対照16例において同抗体は陰性であった。陽性GBS8例中3例はGD1aおよびGD1b単独に対する抗体活性はいずれも陰性であった。陽性例では重症度が高い傾向がみられた。生体膜上に存在するガングリオシド複合体がGBSの一部の症例において血中抗体の標的抗原である可能性を示唆している。ガングリオシド複合体に対する抗体の解析は抗ガングリオシド抗体の病因的意義の解明に重要である。

A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群(GBS)の約60%にガングリオシドに対する自己抗体が見出され、発症に関与し、神経症候を規定する因子として重要であると考えられている¹⁾。我々はこれまでGQ1b²⁾、GM1b³⁾、GD1b⁴⁾、GalNAc-GD1a⁵⁻⁶⁾など単一のガングリオシドに対する抗体を検索し、その病的意義を検討してきた。一般にガングリオシドは生体膜上では複合体を形成して存在していると考えられている。しかしながら、その複合体・複合抗原に対する自己抗体はこれまで報告されていない。今回、我々は2種類のガングリオシドの複合体に反応する抗体を一部のGBS症例で見出し、その抗体の特性を解析したので報告する。

B. 研究方法

(1) ガングリオシド複合体に対する抗体を見出すきっかけとなった患者血清における検討:

感冒症状が先行した後、急性弛緩性四肢麻痺を呈し、麻痺の遷延したGBS例(症例1、31歳男性)の血清に関してELISA、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて抗ガングリオシド抗体の存在を検討した。ELISAにてガングリオシドGM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD3、GT1b、GQ1b、GalNAc-GD1aに対する抗体を測定した。TLC免疫染色では、DEAE-Sephadex A-25カラムにアプライした牛脳ガングリオシドを0.1Mおよび0.2M酢酸アンモニウムで抽出した分画、GD1a、GD1b、およびGD1aとGD1bの混合物を抗原とした。

症例1血清において、GD1aとGD1bの混合比(容量比)を変えてELISA法における吸光度(OD値)を検討した。

(2) GBS連続100症例におけるIgG抗GD1a/GD1b抗体の検討:

平成14年2月から同年12月に東大神経内科に血中抗体測定を依頼されたGBS連続

100 症例に対して、上記のように ELISA にて抗
ガングリオシド抗体を測定した。さらに GD1a と
GD1b を 1:1 の割合で混合した抗原
(GD1a/GD1b) に対する反応を検討した。

GD1a/GD1b に対する抗体が陽性の血清の
うち、抗 GD1a 抗体、抗 GD1b 抗体それぞれの
OD 値より抗 GD1a/GD1b 抗体の OD 値が 0.2
以上大きい血清を抗 GD1a/GD1b 抗体陽性と
判定した。抗 GD1a/GD1b 抗体陽性血清につ
いて TLC 免疫染色で同抗体の存在を確認し
た。抗 GD1a/GD1b 抗体を神経疾患対照群
119 例、正常対照群 16 例の血清について
ELISA にて検討した。また IgG 抗 GD1a/GD1b
抗体陽性 GBS の臨床像を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報に関するものでは
なく、血清の反応性を対象としたもので匿名性
を厳守しており、倫理面での問題はないと判
断した。

C. 研究結果

(1) 症例1についての検討

症例1の血清では、それぞれのガングリオシ
ド単独を抗原とした ELISA では反応は陰性で
あった。TLC 免疫染色では牛脳ガングリオシド
0.1M 分画において GD1a 直下に染色を認め
た。また GD1a と GD1b 単独のレーンには反応
はみられなかったが、GD1a と GD1b の混合物
を展開したレーンにおいて GD1a と GD1b が重
なる箇所に反応を認めた。この TLC 免疫染
色の結果を Image analyzer (Luminescent
Image Analyzer, LAS-1000plus, FUJIFILM) で
解析したところ、TLC プレート上において GD1a
と GD1b の分布が重なる箇所に免疫染色のピ
ークがみられた。ELISA にて GD1a と GD1b を

混合した(1:1)抗原を用いると陽性反応が得ら
れた。

GD1a と GD1b の混合比(容量比)と抗体力価
の相関をしらべたところ、GD1a 抗原と GD1b 抗
原の混合比が GD1a:GD1b=5:5~6:4 の間
で OD 値は最大であった。

(2) GBS 連続 100 例および対照例における抗 GD1a/GD1b 抗体

GBS 連続 100 症例のうち IgG 抗

GD1a/GD1b 抗体陽性例は 8 例(8%)であった。
疾患対照群、正常対照群では陰性であった。
IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体陽性例のうち 3 例は
GD1a および GD1b それぞれ単独に対する抗
体は陰性であった。

IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体陽性 GBS 8 例のう
ち情報のある 7 例において、6 例に脳神経障
害を認め、うち 5 例に球麻痺を認めた。また 7
例のうち 6 例はピーク時の重症度が Hughes 分
類で 4 以上、すなわち臥床状態であり、うち 3
例は人工呼吸器管理であった。

D. 考察

(1) ガングリオシド GD1a と GD1b の複合体に
特異的な抗体:我々は GD1a、GD1b 単独では
なく、両方が混在した状態で生じるガングリオ
シド複合抗原に特異性を持つ抗体の存在を
GBS 患者血清中に見出した。抗 GD1a、GD1b
抗体それぞれが陰性でも抗 GD1a/GD1b 抗体
が陽性の場合があり、従来のスクリーニングで
は見逃されてきた可能性がある。このような抗
体の存在は、複数のガングリオシドが複合体を
形成して生体膜上に存在する箇所が抗ガング
リオシド抗体の標的抗原となっている可能性を
示唆している。ガングリオシドを含むスフィンゴ
糖脂質は細胞膜上で cluster を形成していると
考えられており、今後も様々なガングリオシド

複合体、複合エピトープを認識する抗体が見出される可能性がある。

(2) GBS における IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体の意義: 同抗体陽性例において脳神経障害の頻度が高く、重症度が高い傾向を認めたが、臨床的意義を明らかにするには多数例の検討が必要である。

GBS 発症における抗ガングリオシド複合体抗体の病因的役割として、一つには神経細胞膜上のガングリオシドに結合し、補体活性化、antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) などの免疫反応を通じて神経細胞の構造破壊をきたす可能性が考えられる。一方、ガングリオシドは細胞膜上で複合体を形成して他の脂質や蛋白とともに lipid raft の一部を担い、細胞内シグナル伝達に関わっていることが知られるが^{7,8)}、細胞膜上の lipid raft に存在するガングリオシド複合体に抗体が結合し、連結している蛋白を通じて神経細胞の機能障害をきたす可能性も考えられる。このようなガングリオシド複合体に対する抗体の病因的意義を明らかにするには、多数例における抗 GD1a/GD1b 抗体陽性 GBS の臨床的解析、末梢神経上における GD1a, GD1b の複合体の局在および存在様式に関する検討などを行っていくことが必要である。

E. 結論

1. GD1a, GD1b の複合体に対する抗体を GBS 血清に見出した。GBS における頻度は 8%であった。
2. このようなガングリオシド複合体に対する抗体は単一ガングリオシド抗原を標的とした従来のスクリーニングでは見逃されてきた可能性がある。
3. GD1a, GD1b の複合体に対する抗体は

GBS において臨床的、病因的意義をもつ可能性がある。

参考文献

1. Willison HJ and Yuki N. Brain 2002; 125:2591-2625.
2. Chiba A, Kusunoki S, Shimizu T, et al. Ann Neurol 1992;31:677-679.
3. Kusunoki S, Iwamori M, Chiba A, et al. Neurology 1996;47:237-242.
4. Miyazaki T, Kusunoki S, Kaida K, et al. Neurology 2001;56:1227-1229.
5. Kusunoki S, Chiba A, Kon K, et al. Ann Neurol 1994; 35:570-576.
6. Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, et al. Brain 2000;123: 116-124.
7. Simons K and Ikonen E. Nature 1997; 387:569-572.
8. Hakomori S. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:225-232.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, Hitoshi S, Kanazawa I. Binding of IgG antibodies in GBS sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: possible clinical implications. Muscle Nerve 27:302-306, 2003.
- 2) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody. Neurology, 61:465-470, 2003.

- 3) Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 62:821-824, 2004.
- 4) Hirano M, Kusunoki S, Asai H, Tonomura Y, Morita D, Ueno S. A family with *Campylobacter* enteritis: anti-GD1a antibody with/without Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 60:1719-1720, 2003.
- 5) Taguchi Y, Takashima S, Kusunoki S, Asaoka E, Inoue H. Chronic sensory ataxic neuropathy with polyclonal IgM reactivity to a number of disialosyl gangliosides who repeatedly improved after IVIg therapy. *Muscle Nerve* 28:128-129, 2003.
- 6) Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H. Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2. *Intern Med* 42:277-280, 2003.
- 7) Kusunoki S. Diagnosis, pathogenesis and treatment of Miller Fisher syndrome and related disorders: Clinical significance of anti-GQ1b IgG antibody. *Expert Review of Neurotherapeutics* 3:133-140, 2003.
- 8) Kusunoki S. Antiganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome; useful diagnostic markers as well as possible pathogenetic factors. *Intern Med* 42:457-458, 2003.

2. 学会発表

- 1) Kaida K, Kusunoki S, Arita M, Kamakura K, Tsuji S. Fine specificity of anti-GD1b and GQ1b antibodies in Guillain-Barré syndrome and its variants.

Peripheral Nerve Society Meeting, July 26-30, 2003, Banff, Canada (*J Periph Nerv Sys* 8: 27, 2003)

- 2) 海田賢一、楠進、有田政信、鎌倉恵子、辻省次。Guillain-Barre および Fisher 症候群における抗 GD1b、GQ1b 抗体の微細反応性に関する検討。第44回日本神経学会総会(2003年5月15日～5月17日、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

肺炎マイコプラズマ菌体脂質成分を接種した
ウサギ血中抗体の反応性の検討と、その神経症状について

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

研究要旨

マイコプラズマ肺炎後の Guillain-Barré 症候群患者の急性期血清中に galactocerebroside (Gal-C) に対する抗体が上昇することを以前我々は報告した。またそれらの抗 Gal-C 抗体活性は、肺炎マイコプラズマ菌体成分で吸収されることを明らかにし、肺炎マイコプラズマ菌体の糖脂質成分に対する免疫反応として抗 Gal-C 抗体が上昇する可能性を示した。この仮説を検証するため、今回は肺炎マイコプラズマ菌体から得られた脂質成分(M-lipid)をウサギに接種し、抗 Gal-C 抗体上昇の有無、及びその反応性を検討した。その結果、M-lipid 接種ウサギ 6 羽全てに抗 Gal-C IgM 及び IgG 抗体の上昇が認められ、1 羽は抗体が上昇した時点で横断性脊髄炎を発症し、別の 1 羽では両側前肢の軽度の筋力低下がみられた。また M-lipid についての薄層クロマトグラムでは複数の糖脂質の存在が認められ、これらは抗 Gal-C 抗体により免疫染色された。これらの結果より、肺炎マイコプラズマ菌体に存在する糖脂質成分に対する免疫反応の結果、抗 Gal-C 抗体が上昇することが確認された。

A. 研究目的

Galactocerebroside(Gal-C)は、中枢および末梢神経のミエリンの主要な糖脂質として知られる。

Gal-C で感作したウサギは脱髄性ニューロパチーをきたし、抗 Gal-C 抗体が脱髄をきたす因子であることが報告されている(1)。われわれは、マイコプラズマ肺炎後の Guillain-Barré 症候群患者の急性期血清中に、抗 Gal-C 抗体が上昇することを報告した(2)。さらに、それらの抗 Gal-C 抗体活性は、肺炎マイコプラズマ菌体成分で吸収されることを明らかにし、肺炎マイコプラズマ菌体の糖脂質成分に対する免疫反応として抗 Gal-C 抗体が上昇する可能性を示した(3)。

今回は、肺炎マイコプラズマ菌体から得た脂質成分をウサギに接種し、抗 Gal-C 抗体上昇の有無を検討して、上記の仮説を検証することを目的とした。更に経過観察中の神経症状出現の有無を詳細に観察し、また血中抗体の各種糖脂質抗原への反応性についても検討した。

B. 研究方法

培養肺炎マイコプラズマ(Mac strain)よりクロロフォルムとメタノールを用い、脂質成分(M-lipid)を抽出した。

日本白色種のウサギ 6 羽ずつに、M-lipid:3.1mg、あるいは Gal-C:0.5mg を完全フロイントアジュバントとともに、足底および足背に接種した。初回感作の 3 週間後に同量の抗原を背部に皮下接種した。いずれのウサギに対しても、その後 3 から 4 週おきに M-lipid:1.3mg、あるいは Gal-C:0.1mg を背部皮下に接種した。

また、完全フロイントアジュバントのみを同様に日本白色種のウサギ 2 羽に接種し、対照群とした。なお、初回接種後は 14 羽全てのウサギから 1 週間毎に採血し、神経症状を観察しつつ経過を追った。

上記血清中の抗 Gal-C 抗体価を、ELISA 法を用い、吸光度を測定し比較した。また IgG 抗体価がピーク時の血清を用いて、M-lipid との反応性を TLC 免疫染色により検討した。さらに抗 Gal-C

IgG 抗体活性がピーク時の血清を用い、これとガングリオシドを含む他の糖脂質(GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GA1, CDH, CTH)との反応も ELISA 法により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報及び疾患情報に関するものではなく、実験動物を対象にするものである。動物愛護には特段の注意を払った。以上より、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

M-lipid を接種したウサギ 6 羽全て、及び Gal-C を接種した 6 羽中 4 羽において、抗 Gal-C IgM 及び IgG 抗体の上昇がみられた。

M-lipid を接種した 1 羽が横断性脊髄炎を発症し、両後肢の完全運動麻痺、腰から下の痛覚鈍麻、尿便失禁を呈した。また、別の 1 羽では両前肢の軽度の筋力低下を呈し、その後若干の症状改善を認めたものの、その傾向は観察の最後まで残存した。一方 Gal-C を接種したウサギにおいては、明らかな神経症状は 6 羽とも出現しなかった。

他の糖脂質抗原に対する抗体活性については、GA1 に対して M-lipid 接種ウサギ、Gal-C 接種ウサギとも 6 羽中 2 羽に、CDH に対して M-lipid 接種ウサギ 2 羽に、CTH に対して Gal-C 接種ウサギ 1 羽に、それぞれ抗体活性が認められた。なお、GM1 や GD1b などのガングリオシドとの反応は認められなかった。

M-lipid を薄層クロマト上に展開し、オルシノールを用いて発色したところ、複数の糖脂質成分の存在が認められた。M-lipid を接種した、抗 Gal-C IgG 抗体高値のウサギ血清を用いて TLC 免疫染色を行ったところ、Gal-C のみでなく M-lipid 中の複数の糖脂質のバンドが染色された。また、Gal-C 接種ウサギ血清も Gal-C のみでなく

M-lipid 中の複数のバンドに反応した。

[M-lipid 接種ウサギのピーク時の
抗 Gal-C 抗体活性]

番号	(1)	(2)	(3)
IgM	400x	200x	400x
経過週数	4	4	6
IgG	51200x	6400x	800x
経過週数	8	7	10

番号	(4)	(5)	(6)
IgM	200x	200x	400x
経過週数	7	5	7
IgG	1600x	25600x	400x
経過週数	9	7	7

[Gal-C 接種ウサギのピーク時の
抗 Gal-C 抗体活性]

番号	(7)	(8)	(9)
IgM	400x	200x	N.D.
経過週数	7	5	
IgG	6400x	12800x	N.D.
経過週数	5	6	

(N.D. : 抗体陰性)

番号	(10)	(11)	(12)
IgM	400x	N.D.	400x
経過週数	3		3
IgG	1600x	N.D.	25600x
経過週数	10		5

[対照ウサギの抗 Gal-C 抗体活性]

番号	(13)	(14)
IgM	N.D.	N.D.
IgG	N.D.	N.D.

D. 考察

M. lipid による感作で抗 Gal-C 抗体が上昇した。このことから、肺炎マイコプラズマ菌体に存在する糖脂質成分に対する免疫反応の結果、抗 Gal-C 抗体が上昇することが確認された。

横断性脊髄炎を発症したウサギは、抗体活性が上昇傾向を示した時点で症状が出現しており、今回の実験においても抗 Gal-C 抗体と、神経症状の関連が強く示唆された。

また、Gal-C を接種したウサギから得られた抗 Gal-C IgG 抗体高値の血清は、TLC 免疫染色において、Gal-C のみでなく、M-lipid 中の複数の糖脂質に反応することが確認された。これは肺炎マイコプラズマ菌体中に、Gal-C 類似の糖鎖をもつ糖脂質が存在することを意味している。今後はこの糖脂質の糖鎖解析を予定している。

E. 結論

マイコプラズマ肺炎後の脱髄性ニューロパチーや脊髄炎においては、マイコプラズマ菌体の糖脂質に対する免疫反応の結果、脱髄因子である抗 Gal-C 抗体が上昇する。

参考文献

- (1)Saida T, Saida K, Dorfman SH, et al. Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. *Science* 1979;204(8):1103-1106
- (2)Kusunoki S, Chiba A, et al. Anti-Gal-C antibody in autoimmune neuropathies subsequent to mycoplasma infection. *Muscle Nerve* 1995;18:409-413
- (3)Kusunoki S, Shiina M, et al. Anti-Gal-C antibodies in GBS subsequent to mycoplasma infection: Evidence of molecular mimicry. *Neurology* 2001;57

:736-738

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, Hitoshi S, Kanazawa I. Binding of IgG antibodies in GBS sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27:302-306, 2003.
- 2) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody. *Neurology*, 61:465-470, 2003.
- 3) Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 62:821-824, 2004.
- 4) Hirano M, Kusunoki S, Asai H, Tonomura Y, Morita D, Ueno S. A family with Campylobacter enteritis: anti-GD1a antibody with/without Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 60:1719-1720, 2003.
- 5) Taguchi Y, Takashima S, Kusunoki S, Asaoka E, Inoue H. Chronic sensory ataxic neuropathy with polyclonal IgM reactivity to a number of disialosyl gangliosides who repeatedly improved after IVIg therapy. *Muscle Nerve* 28:128-129, 2003.
- 6) Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H. Amyotrophic lateral sclerosis with IgM

antibody against gangliosides GM2 and GD2. Intern Med 42:277-280, 2003.

7) Kusunoki S. Diagnosis, pathogenesis and treatment of Miller Fisher syndrome and related disorders: Clinical significance of anti-GQ1b IgG antibody. Expert Review of Neurotherapeutics 3:133-140, 2003.

8) Kusunoki S. Antiganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome; useful diagnostic markers as well as possible pathogenetic factors. Intern Med 42:457-458, 2003.

2. 学会発表

1) Morita D, Kusunoki S, Hirakawa M, Tsuji S. Correlation between clinical manifestations and IgG antibody activity in sera to a mixture of GQ1b and a phospholipid in Miller Fisher syndrome. Peripheral Nerve Society Meeting,

July 26-30, 2003, Banff, Canada (J Periph Nerv Sys 8: 46, 2003)

2) 森田大児、楠 進、平川美菜子、辻省次。MFSにおける抗GQ1b抗体のリン脂質共存下での反応性の変化と臨床症状の関連。第44回日本神経学会総会（2003年5月15日～5月17日、横浜）

3) 森田大児、平川美菜子、辻省次、楠 進。Guillain-Barré syndrome における GalNAc-GD1a とリン脂質の混合抗原に対する血中 IgG 抗体の検討。第 16 回日本神経免疫学会学術集会（2004 年 1 月 30～31 日、東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

Guillain-Barré 症候群における GalNAc-GD1a とリン脂質の
混合抗原に対する血中 IgG 抗体の検討

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

研究要旨

我々は、Guillain-Barré 症候群(GBS)にみられる抗 GM1 IgG 抗体が GM1 単独より GM1 とリン脂質の 1 つである phosphatidic acid (PA)の混合抗原に、より強く反応するものが多いことを以前報告した(1)。今回は抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体について同様の検討を行なった。その結果、抗 GM1 IgG 抗体における検討と同様に、抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体検査においても抗原に PA を加えることで抗体陽性率が上昇することがわかり、GBS の診断に有用であると考えた。また、抗原に PA を加えることで両者に対する抗体が同時にみられる例が増加した。こうした結果は、抗 GM1 IgG 抗体と抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体陽性例の、先行感染や臨床像の類似性と関連していると考えた。

A. 研究目的

抗ガングリオシド抗体は、ギラン・バレー症候群(GBS)、ミラー・フィッシャー症候群(MFS)、IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーの血中において、しばしば特異的に高力価の上昇がみられ、診断に有用であり、また発症機序に対しても関連が示唆されている。一昨年我々は、GBS 患者の急性期の血清中にみられる抗 GM1 IgG 抗体について、リン脂質のひとつである phosphatidic acid (PA)を抗原に混合した際の反応性を検討し、大多数では反応が増強することを報告した¹⁾。

抗 GM1 IgG 抗体は、純粋運動型あるいは軸索型 GBS との関連が知られるが、抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体も同様の臨床病型に関連している。そこで今回我々は、GalNAc-GD1a と PA の混合抗原に対する、GBS 患者血清中 IgG 抗体の反応性を同様に検討した。

B. 研究方法

東京大学神経内科に測定依頼のあった、GBS121 例の血清を測定対象とした。この 121 例は、一昨年、GM1 と PA の混合抗原について検討したのと同じ患者群である。

抗原は、GalNAc-GD1a のみ(200ng/well)、GalNAc-GD1a と PA の混合抗原(各々 100ng/well)、及び PA のみ(200ng/well)に対する IgG 抗体活性を ELISA 法で測定し、吸光度を比較した。1 次抗体は 40 倍希釈した患者血清、2 次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いた。抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体陽性例中、得られた吸光度が GalNAc-GD1a のみを抗原とした場合より、PA を混合した方が低いものを A 群、高いものを B 群とした。また、両者を混合して初めて抗体価が陽性となるものを C 群とした。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報及び疾患情報に関するものではなく、患者群を対象にするもので匿名

性を厳守しており、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

GBS121 例中、A 群 5 例、B 群 8 例、C 群 9 例であった。抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体陽性で、抗 (GalNAc-GD1a + PA) IgG 抗体陰性となる例はなかった。また、PA のみに対する抗体活性のみられた例もなかった。

今回の結果と、一昨年我々が発表した GM1 と PA の混合抗原に対する IgG 抗体についての結果を合わせて表にして示す。GM1 の検討においても、A, B, C 群の定義は今回の検討と同じである。

		GalNAc-GD1a				計
		A	B	C	-	
GM1	A	0	0	0	7	7
	B	2	6	6	11	25
	C	1	2	3	6	12
	-	2	0	0	75	77
計		5	8	9	99	121

(- : 抗体陰性例)

何らかの形で抗体が陽性であった A+B+C 群のうち、PA により反応の増強効果がみられた例、すなわち B+C 群は、GM1 の検討においては 44 例中 37 例(84%)、今回の GalNAc-GD1a の検討では 22 例中 17 例 (77%)であり、どちらの検討においても A 群より比率が高い結果となった。

また、GalNAc-GD1a の検討において B 群と C 群に属する症例は、全例が GM1 の検討における B 群もしくは C 群に属していた。

両抗体とも陽性の例は、PA 混合前には 8 例であったが、混合後の検討では 20 例となった。

さらに、両方の検討とも C 群に属するものが 3

例認められた。

D. 考察

抗 GM1 IgG 抗体同様、抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体検査においても、抗原に PA を加えることで抗体陽性率が上昇することがわかり、診断に有用であると考えた。また、抗原に PA を加えることにより両者に対する抗体が同時にみられる例が増加した。

抗原に PA を加えることが抗体活性に及ぼす効果については、GM1 と GalNAc-GD1a で類似した結果であった。この結果は、我々が昨年度報告した、PA をはじめとするリン脂質の共存による抗体活性の増強が見られない、という抗 GQ1b IgG 抗体についての結果²⁾と対照的なものであった。

E. 結論

以上のように、抗 GM1 IgG 抗体と抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体が同様の反応性を示したことは、これらの抗体が陽性の GBS 例では、先行感染や臨床像が類似していることと関連していると考えた。こうした抗糖脂質抗体の反応性の解析は、診断・発症機序の解明に有用であり、今後も詳細な検討が必要である。

参考文献

- 1) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, et al. Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barré syndrome sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: Possible clinical implications. *Muscle Nerve* 2003;27:302-306
- 2) Hirakawa M, Kusunoki S, Morita D, Tsuji S. Phospholipids have effects on the activity of antiganglioside antibodies. *J Periph Nerv*

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, Hitoshi S, Kanazawa I. Binding of IgG antibodies in GBS sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27:302-306, 2003.
- 2) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody. *Neurology*, 61:465-470, 2003.
- 3) Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 62:821-824, 2004.
- 4) Hirano M, Kusunoki S, Asai H, Tonomura Y, Morita D, Ueno S. A family with *Campylobacter* enteritis: anti-GD1a antibody with/without Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 60:1719-1720, 2003.
- 5) Taguchi Y, Takashima S, Kusunoki S, Asaoka E, Inoue H. Chronic sensory ataxic neuropathy with polyclonal IgM reactivity to a number of disialosyl gangliosides who repeatedly improved after IVIg therapy. *Muscle Nerve* 28:128-129, 2003.
- 6) Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H. Amyotrophic lateral sclerosis with IgM

antibody against gangliosides GM2 and GD2. *Intern Med* 42:277-280, 2003.

7) Kusunoki S. Diagnosis, pathogenesis and treatment of Miller Fisher syndrome and related disorders: Clinical significance of anti-GQ1b IgG antibody. *Expert Review of Neurotherapeutics* 3:133-140, 2003.

8) Kusunoki S. Antiganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome; useful diagnostic markers as well as possible pathogenetic factors. *Intern Med* 42:457-458, 2003.

2. 学会発表

- 1) Morita D, Kusunoki S, Hirakawa M, Tsuji S. Correlation between clinical manifestations and IgG antibody activity in sera to a mixture of GQ1b and a phospholipid in Miller Fisher syndrome. Peripheral Nerve Society Meeting, July 26-30, 2003, Banff, Canada (*J Periph Nerv Sys* 8: 46, 2003)
- 2) 森田大児、楠 進、平川美菜子、辻省次。MFSにおける抗GQ1b抗体のリン脂質共存下での反応性の変化と臨床症状の関連。第44回日本神経学会総会（2003年5月15日～5月17日、横浜）
- 3) 森田大児、平川美菜子、辻省次、楠 進。Guillain-Barré syndromeにおけるGalNAc-GD1aとリン脂質の混合抗原に対する血中IgG抗体の検討。第16回日本神経免疫学会学術集会（2004年1月30～31日、東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書
免疫性ニューロパチーにおける抗 GM1 IgM 抗体の
反応性に及ぼすリン脂質の効果

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

研究要旨

GBS, CIDP, MMN の患者血清中の抗 GM1 IgM 抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果について検討した。GBS 患者血清では、リン脂質との混合抗原によって抗 GM1 IgM 抗体活性が増強するものは認められなかった。MMN、CIDP では、GM1 に LPC を加えた混合抗原に対してのみ抗体活性が増強した。一方 SM を加えたときにはほぼ全例で抗体活性が低下した。GBS では SM の他に PI, CL を加えたときにも活性の低下が見られた。GBS 患者血清の抗 GM1 IgG 抗体の反応性と IgM 抗体の反応性は大きく異なる。また抗 GM1 IgM 抗体は GBS と MMN、CIDP では反応性が異なり、病態機序の違いを反映している可能性が示唆された。SM 存在下における抗体活性の低下は免疫性ニューロパチーにみられる抗グングリオシド抗体に共通するものと思われた。

A. 研究目的

昨年度我々は Guillain-Barré 症候群(GBS) の患者血清中の抗 GM1 IgG 抗体および Fisher 症候群の患者血清中の抗 GQ1b IgG 抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果について報告した¹⁾²⁾。今回は GBS、chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP)、multifocal motor neuropathy (MMN)の患者血清中の抗 GM1 IgM 抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果について検討した。

B. 研究方法

抗 GM1 IgM 抗体陽性の GBS14 例および MMN13 例、CIDP14 例の血清を対象とした。GM1 抗原に以下に示す様々なリン脂質を各々加えた抗原を用いて抗体活性を ELISA 法で分析した。マイクロタイタープレートの各ウェルに GM1 抗原 100ng およびリン脂質 100ng を加えて固相化し、ブロッキングした後、40 倍希釈の血清を加えペルオキシダーゼ標識二次抗体にて抗原抗体反応をみた。マイクロ

プレートリーダーを用いて吸光度を測定し、GM1 抗原のみ 200ng を各ウェルに加えた時の吸光度と比較検討した。用いたリン脂質は PA：ホスファチジン酸、PI：ホスファチジルイノシトール、PS：ホスファチジルセリン、LPE：リゾホスファチジルエタノールアミン、SM：スフィンゴミエリン、PE：ホスファチジルエタノールアミン、PC：ホスファチジルコリン、LPC：リゾホスファチジルコリン、CL：カルジオリピンの 9 種類である。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報に関するものではなく、血清の反応性を対象としたもので匿名性を厳守しており、倫理面での問題はないと判断した。

C. 研究結果

GBS、MMN、CIDP の患者血清の抗 GM1 IgM 抗体活性は SM を加えたときにほぼ全例で低下した。抗体活性の増強がみられたのは MMN、CIDP において GM1 に LPC を加えたときであった。また GBS 患者血清の抗 GM1 IgM 抗体の

活性が増強するものは認められなかった。一方、GBSではSMの他に、PI、CLを加えたときにも活性の低下が認められた。

D. 考察

GBS患者血清の抗GM1 IgG抗体の反応性は、GM1にPA、PI、PS、LPE、PE、LPC、CLを各々加えたときに抗体活性が増強し、SMを加えたときに活性が低下するという結果であった²⁾。今回の結果では、GBS患者の抗GM1 IgM抗体の反応性に対して明らかな増強効果を持つものは認められず、抗GM1 IgG抗体の場合と大きく異なる結果であった。また、抗GM1 IgM抗体の反応性に対するリン脂質の効果はMMNとCIDPで類似し、GBSと異なる傾向がみられた。

E. 結論

(1) GBSにおける抗GM1 IgG抗体の反応性に対するリン脂質の増強効果は抗GM1 IgM抗体に対してはみられなかった。(2)抗GM1 IgM抗体の反応性について、慢性ニューロパチーであるMMNおよびCIDPとGBSで異なっていた。このことは両者の病態機序の違いを反映している可能性がある。(3)MMNおよびCIDPでのSM存在下における抗体活性の低下はGBSの場合と同様であり、免疫性ニューロパチーにみられる抗ガングリオシド抗体に共通するものと考えられる。

参考文献

1) Kusunoki S, et al. Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barre syndrome sera to a mixture of

GM1 and a phospholipids: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27:302-306, 2003

2) Hirakawa M, et al. Phospholipids have effects on the activity of antiganglioside antibodies. *J Periph Nerv Sys* 8:23, 2003

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, Hitoshi S, Kanazawa I. Binding of IgG antibodies in GBS sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27:302-306, 2003.

2) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody. *Neurology*, 61:465-470, 2003.

3) Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 62:821-824, 2004.

4) Hirano M, Kusunoki S, Asai H, Tonomura Y, Morita D, Ueno S. A family with *Campylobacter enteritis*: anti-GD1a antibody with/without Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 60:1719-1720, 2003.

5) Taguchi Y, Takashima S, Kusunoki S, Asaoka E, Inoue H. Chronic sensory ataxic

neuropathy with polyclonal IgM reactivity to a number of disialosyl gangliosides who repeatedly improved after IVIg therapy.

Muscle Nerve 28:128-129, 2003.

6) Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H.

Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2. Intern Med 42:277-280, 2003.

7) Kusunoki S. Diagnosis, pathogenesis and treatment of Miller Fisher syndrome and related disorders: Clinical significance of anti-GQ1b IgG antibody. Expert Review of Neurotherapeutics 3:133-140, 2003.

8) Kusunoki S. Antiganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome; useful diagnostic markers as well as possible pathogenetic factors. Intern Med 42:457-458, 2003.

2. 学会発表

1) Hirakawa M, Kusunoki S, Morita D, Tsuji S. Phospholipids have effects on the activity of antiganglioside antibodies. Peripheral Nerve Society Meeting, July 26-30, 2003, Banff, Canada (J Periph Nerv Sys 8: 23, 2003)

2) 平川美菜子、楠 進、森田大児、辻省次。GBSとFSにおける血中抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果。第44回日本神経学会総会（2003年5月15日～5月17日横浜）

3) 平川美菜子、森田大児、辻省次、楠 進。免疫性ニューロパチーにおける抗GM1 IgM抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果。第16回日本神経免疫学会学術集会（2004年1月30～31日、東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

分担研究者 結城伸泰 獨協医科大学内科学(神経)助教授

カンピロバクター・リポオリゴ糖における糖脂質エピトープの多様性と Guillain-Barré 症候群

研究要旨

Campylobacter jejuni 腸炎後 Guillain-Barré 症候群 (GBS) の発症機序として、菌体リポオリゴ糖 (LOS) 上に ganglioside 様構造が存在することで、患者血中に ganglioside と反応する自己抗体が誘導され、末梢神経に豊富に発現している ganglioside と結合し末梢神経障害を来すと想定されている。しかし、これまでの研究では、菌体上に ganglioside 様 LOS の存在を証明したにすぎず、本当に ganglioside 様 LOS が GBS 発症に関与するのかが明らかにされていない。今回、GBS 分離 *C. jejuni* 105 株における ganglioside 様 LOS の分布を調べ、GBS 発症におけるその意義を検討した。LOS 上の GM1、GD1a、GT1a/GQ1b エピトープはそれぞれ 60%、49%、21% の菌株で見られ、GM1 と GD1a エピトープを有する菌株は、四肢麻痺や血中 IgG 抗 GM1/GD1a 抗体と密接な関連がみられた。一方、GT1a/GQ1b エピトープは、外眼筋麻痺などの脳神経麻痺や運動失調、血中 IgG 抗 GQ1b 抗体を高頻度に認めた。菌体 LOS と構造が類似する ganglioside が、実際に各症例において血中抗体の標的抗原となっており、菌体と生体組織との分子相同性が GBS 発症に関与していることが多数の菌株で裏付けられた。また、先行感染病原体成分が GBS の臨床像の多様性を規定していることが示された。

A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群 (GBS) は、各種感染症が契機となり発症する自己免疫性末梢神経疾患である。グラム陰性桿菌 *Campylobacter jejuni* は本症の最も高頻度の原因病原体であり、*C. jejuni* 腸炎後 GBS の発症機序として、菌体とヒト末梢神経との間の分子相同性仮説が提唱されている。つまり、菌体リポオリゴ糖 (LOS) 上に ganglioside 様構造が存在することで、患者血中に ganglioside と反応する自己抗体が誘導され、末梢神経に豊富に発現している ganglioside と結合し末梢神経障害を来すと想定されている。しかし、これまでの研究では、菌体上に ganglioside 様 LOS の存在を証明したにすぎず、本当に ganglioside 様 LOS が GBS 発症に関与するのかが明らかにされていない。本研究では、100 を超える菌株における ganglioside 様 LOS の分布を調べ、GBS 患者における血中自己抗体の反応特異性や神経所見との関連を検討することで、ganglioside 様 LOS が GBS 発症に直接関与しているかを検証した。

B. 研究方法

(1) 対象・血清型別

GBS やその関連疾患患者の糞便から分離・培養された *C. jejuni* 105 株を用いた。対照として、腸炎患者由来 *C. jejuni* 65 株を用いた。各主治医の入院要約などにより、各症例の臨床データを収集した。

(2) ガングリオシド様 LOS 測定

Hitchcock と Brown (1983) の方法に倣い粗 LOS を抽出し、モノクローナル抗体やコレラ毒素、患者血清をプローブとして用いたウエスタン・ブロットおよび薄層クロマトグラフィー免疫染色で ganglioside エピトープの分布を測定した。

(3) 血清型別

PHA 法 (デンカ生研、東京) により Penner 血清型別を行った。

(4) 抗ガングリオシド抗体

各ガングリオシド (GM1, GM2, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GD2, GT1b, GQ1b) に対する血中 IgG 抗体を ELISA にて測定した。

(5) 統計学的検討

統計学的関連に関して、 χ^2 検定ないし Fisher の直接確率法を用いて検討した。 p 値が 0.05 未満の場合を有意とした。すべての統計解析は Statcel[®] を用いて行った。

(6) 倫理面への配慮

データ処理を行うにあたり、*C. jejuni* が分離された患者名は匿名化してデータベースを作成した。

C. 研究結果

(1) ガングリオシド様 LOS

GM1、GD1a、GQ1b/GT1a エピトープはそれぞれ、60%、49%、21% の菌株で見られた。腸炎患者由来株 (38%、20%、20%) と比べ GBS 患者株では GM1 や GD1a エピトープを有する頻度が有意に高いことが示された (共に $p < 0.05$)。GM1 と GD1a エピトープは同一菌株上に共存することが多かった。

(2) 血清型、神経所見、抗ガングリオシド抗体との関連

GM1 と GD1a エピトープを有する菌株は、血清型が HS:19 であることが多く、四肢麻痺や血中 IgG 抗 GM1・GD1a 抗体と密接な関連がみられた。GQ1b/GT1a エピト