

ープは HS:2 や HS:4 complex と関連がみられ、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。

#### D. 考察

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。菌体 LOS と構造が類似するガングリオシドが、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裏付けられた。また、腸炎株と比較し GBS 株では GM1、GD1a 様 LOS を有する頻度が高かったことから、ガングリオシド様 LOS が GBS 発症の危険因子である可能性が考えられる。

#### E. 結論

*C. jejuni* 腸炎後 GBS の発症に、菌体とヒト末梢神経との間の分子相同性の存在が重要である。*C. jejuni* LOS の構造により、GBS 患者の自己抗体の反応特異性が決定され、神経所見が規定される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Odaka M, Yuki N. Antibodies to GM2 ganglioside in neurological disorders. *Intern Med* 2003; 42: 220-221.

Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S. Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2003; 60: 1514-1518.

Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K. Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Sci* 2003; 210: 99-103.

Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci* 2003; 210: 41-45.

Odaka M, Yuki N, Kokubun N, Hirata K, Kuwabara S. Axonal Guillain-Barré syndrome associated with axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Sci* 2003; 211: 93-97.

Susuki K, Johkura K, Yuki N, Kuroiwa Y. Clinical deterioration in Bickerstaff's brainstem encephalitis caused by overlapping Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci* 2003; 211: 89-92.

Sekiguchi K, Susuki K, Funakawa I, Jinnai K, Yuki N. Cerebral white matter lesions in acute motor axonal

neuropathy. *Neurology* 2003; 61: 272-273.

Ikuta N, Fukusako T, Yuki N, Morimatsu M, Koga M. Acute oropharyngeal palsy associated with anti-GM1b IgG antibody. *J Neurol* 2003; 250: 881-882.

Odaka M, Yuki N, Hirata K. Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 2003; 250: 913-916.

Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S. Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Brain* 2003; 126: 2279-2290.

Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol* 2003; 54: 383-388.

Koga M, Yuki N, Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y. CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor repertoire in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 112-117.

Yuki N, Saperstein DS. Axonal Guillain-Barré syndrome subtypes: do we need more splitting? *Neurology* 2003; 61: 598-599.

##### 2. 学会発表

Yuki N, Koga M, Susuki K, Hirata K. "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" Peripheral Nerve Society. Banff, Canada. Jul 28, 2003.

Yuki N, Koga M, Susuki K, Hirata K. "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" 12<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Aarhus, Denmark. Sep 7, 2003.

Yuki N. "Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis" 12<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2003. Utsunomiya, Japan. Jun 19, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

## 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

### 研究要旨

Guillain-Barré 症候群は、末梢神経障害を主とする代表的な自己免疫性疾患である。その病因物質として、GM1 などのガングリオシドに対する IgG 抗体が注目されている。IgG 抗ガングリオシド抗体がどのような機序で末梢神経障害をもたらすのかは、まだ明らかにされていない。その作用機序を解明すべく、自己抗体の標的分子であるガングリオシドを欠失している、GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの末梢神経伝導機能を検討した。ガングリオシド欠失マウスでは、野生型に比べ運動神経伝導速度が有意に遅延していた。活動電位振幅は、12 週齢では差がなかったが、48 週齢ではガングリオシド欠失マウスで有意に低下しており、機能している神経線維の減少が加齢に伴って明らかとなった。よって、ガングリオシドは、末梢神経伝導機能ならびにその維持に重要な役割を果た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。GM1 などのガングリオシドに対する IgG 抗体が病因物質として注目されている。IgG 抗 GM1 抗体陽性の軸索型 GBS は、きわめて重症の患者が多い一方で、血漿交換や免疫グロブリン大量静注療法などにより急速に回復する症例もある。このような予後良好例では、抗 GM1 抗体により神経伝導機能のみが障害され、軸索変性には至っていないと考えられる。すなわち GM1 などのガングリオシドは、神経伝導という機能に重要な働きを有していると考えられる。

ガングリオシドは、疎水性のセラミドと親水性の糖鎖からなる、糖脂質である。特に細胞脂質二重膜の外側に位置する糖鎖が、様々な生理活性、抗原性を有する。GM1 をはじめとするガングリオシドは、神経系の機能維持や再生に重要な役割を果たすと考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、有髄神経の跳躍伝導におけるガングリオシドの役割を明らかにし、GBS で抗ガングリオシド抗体が末梢神経障害を引き起こす機序を解明することを目的とする。

### B. 研究方法

#### (1) ガングリオシド欠失マウス

GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた(名古屋大学大学院医学系研究科生物化学古川鋼一教授より供与)。本マウスは、GM1 をはじめとする複合型ガングリオシドを欠失しているが、ほぼ正常に発達する(Takamiya K et al. Proc Natl Acad Sci 1996)。脊髄には潜在的な脱髄や軸索変性がみられ、高週齢になると運動機能が若干低下することが知られている。

#### (2) 電気生理学的検討

インフルレンの吸入により、マウスに十分な全身麻酔を行った。直腸温を持続的にモニタリングし、必要に応じてホットカーペットを用い、36.5～37.5℃に保った。針電

極を用いて、坐骨神経を 2ヶ所(足関節部、坐骨結節部)で電気刺激し、足底筋から複合筋活動電位(CMAP)を導出した。筋電計(Medelec 社、MS-25)を用いて CMAP を記録し、遠位潜時、CMAP 振幅・持続時間、運動神経伝導速度(MCV)を測定した。

#### (3) 統計学的検討

統計学的有意差の有無に関して、student-*t* 検定を用いて検討した。*p* 値が 0.05 未満の場合を有意とした。全ての統計解析は Statcel<sup>®</sup>を用いて行った。

#### (4) 倫理面への配慮

動物実験に際し、苦痛を伴う操作には適切に麻酔を使用するなど、動物愛護には特段に配慮した。

### C. 研究結果

#### (1) 運動神経伝導検査所見(12 週齢)

12 週齢の野生型 14 匹、ガングリオシド欠失マウス 11 匹を対象に検索を行った。MCV が、野生型(40.1±3.5 m/s)に比べ、ガングリオシド欠失マウス(31.7±2.1 m/s)で、有意に遅延していた( $p<0.001$ )。足関節部刺激での CMAP 振幅は、野生型(18.9±5.6 mV)とガングリオシド欠失マウス(17.0±3.9 mV)とで、有意差はなかった。そのほか、遠位潜時、CMAP 持続時間は、両群で差はなかった。明らかな神経伝導ブロックもみられなかった。

#### (2) 加齢に伴う変化

48 週齢の野生型 11 匹、ガングリオシド欠失マウス 10 匹を対象に検索を行った。MCV はやはり、野生型(43.2±5.8 m/s)に比べ、ガングリオシド欠失マウス(36.9±4.4 m/s)で、有意に遅延していた( $p<0.05$ )。一方、CMAP 振幅は、12 週齢では差がなかったが、48 週齢では野生型(17.0±5.2 mV)に比べ、ガングリオシド欠失マウス(10.2±3.8 mV)で、有意に低下していた( $p<0.01$ )。

#### D. 考察

電気生理学的検討により、ガングリオシドが欠失した場合には、末梢神経伝導速度が遅延することが示された。明らかな波形の時間的分散や神経伝導ブロックは見られず、顕著な脱髄性変化を示す所見ではなかった。さらに、高週齢のマウスでは、CMAP 振幅の低下がみられたことから、加齢に伴って機能している神経線維が減少するものと考えられた。

#### E. 結論

GBS の自己抗体の標的分子である複合型ガングリオシドは、末梢神経伝導機能ならびにその維持に重要な役割を果たしている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S. Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2003; 60: 1514-1518.

Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K. Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Sci* 2003; 210: 99-103.

Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci* 2003; 210: 41-45.

Odaka M, Yuki N, Hirata K. Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 2003; 250: 913-916.

Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S. Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Brain* 2003; 126: 2279-2290.

Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol* 2003; 54: 383-388.

Koga M, Yuki N, Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y. CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor repertoire in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 112-117.

##### 2. 学会発表

Yuki N, Koga M, Susuki K, Hirata K. "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" Peripheral Nerve Society, Banff, Canada. Jul 28, 2003.

Yuki N, Koga M, Susuki K, Hirata K. "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" 12<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Aarhus, Denmark. Sep 7, 2003.

Yuki N. "Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis" 12<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of *Macropahges* 2003. Utsunomiya, Japan. Jun 19, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

## 受動免疫による Guillain-Barré 症候群モデルマウス作製の試み

### 研究要旨

【背景】Guillain-Barré 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く、多くの患者で神経症状発現の 1~3 週間前に感冒様症状や下痢などの先行感染症状を認めることから自己免疫的機序による発症が以前から考えられてきた。【目的】発症機序のさらなる解析と治療法の評価を目指している。【方法】軸索が一次的に傷害される軸索型 GBS における標的分子は GM1 であることから、抗 GM1 抗体の受動免疫により、発症および免疫染色による病理組織学的所見の有無を検討した。患者より精製した IgG、抗体産生ハイブリドーマ、感作マウスの脾細胞をそれぞれ異なる免疫機構を有するノックアウトマウスへ移入した。【結果】いずれも、運動麻痺は呈さず、末梢神経の病理組織学的変化もみられなかった。モデルマウス作製にあたって、血中を循環する抗体が末梢神経上の抗原に接するまでには血液神経関門通過という課題が残されている。

### A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群 (GBS) は、急速に発症する四肢筋力下と腱反射低下・消失を主徴とする自己免疫性末梢神経疾患である。末梢神経の髄鞘が障害される脱髄性疾患と信じられてきたが、軸索が一次的に傷害される軸索型 GBS の存在も知られ、この型は欧米に比べて日本に多い。発症前に何らかの先行感染症状が認められることが多く、病原体としては急性下痢症起因菌である *Campylobacter jejuni* が 3 割を占め、最も頻度が高い。

これまでに、患者の血中 IgG 抗体が末梢神経の構成分子のひとつ GM1 ガングリオシドに結合することを見出し、患者から分離された *C. jejuni* のリポオリゴ糖が GM1 の末端糖鎖と共通する構造を有することを明らかにしてきた。分子相同性による抗 GM1 抗体の産生が発症に関わると考えられる。ウサギに GM1 を感作することにより、IgG 抗 GM1 抗体を誘導し弛緩性運動麻痺を出現させ、病理組織学的にもヒトの軸索型 GBS に一致する所見が得られている。また、患者から分離された *C. jejuni* の菌体をウサギに感作することでも同様のモデルが得られている。これらは抗 GM1 抗体の病原性を証明し、分子相同性仮説を支持する結果である。

微生物の病原性を証明するためには Koch の 4 条件を満たす必要があるように、自己免疫性疾患であることの証明には、Witebsky が提案した定義を満たすことが指標として用いられる。自己免疫性疾患としての軸索型 GBS 発症機序として、これまでに 4 つのことが明らかになっている。①患者血中の臓器特異抗体としての抗 GM1 抗体、②抗体に対応する特異抗原としての GM1、③ウサギへの GM1 感作による抗 GM1 抗体産生、④ヒト軸索型 GBS に対応したモデルウサギの運動神経における病理組織学的所見、である。残る項目として、病原抗体や病原抗体産生細胞を健常動物に移入し、発症を呈する受動免疫モデルの樹立が求め

られている。また、治療効果の判定やさらなる精査のためには、種々のノックアウトが存在し、操作の簡便なマウスでのモデル樹立が有用であると考えられる。

### B. 研究方法

今回、3つの方法を用いて、発症の有無、および免疫染色による神経病理組織学的変化を検証した。

#### (1) Fc $\gamma$ R IIb ノックアウトマウスへの GBS 患者抗体静注による試み

Park らの報告 (J Clin Invest 1998) を参考に、Fc $\gamma$ R IIb ノックアウトマウス (B6/129 系) (東北大学加齢医学研究所遺伝子導入研究分野高井俊行教授より供与) を用いて、患者より精製した IgG の移入を行った。Fc $\gamma$ R IIb は免疫抑制性モチーフを持つことから、この受容体をノックアウトすることによりエフェクター機構の活性化が得られる。抗 GM1 抗体として患者抗体を移入し、その抗体へのマウス抗体を産生させることで Fc $\gamma$ R IIb ノックアウトマウスでみられるエフェクター機構の過剰活性化を利用する。

実験日初日にヒト免疫グロブリン製剤をアジュバントとともに感作し、ヒト IgG への抗体を産生させ、実験日第 4 日に GBS 患者の血清から精製した IgG 抗 GM1 抗体を静脈注射し、8 日間の経過を観察した。実験日第 12 日に採血し同日 2%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。血清のヒト IgG 抗 GM1 抗体の抗体価、およびマウス抗ヒト IgG 抗体の抗体価を ELISA 法にて測定した。固定後脊髄神経根・馬尾神経を取り出し、その凍結標本をクリオスタットで 6  $\mu$ m に薄切し、抗マウス抗体および抗ヒト抗体で染色し、神経根に結合する IgG の有無を観察した。

#### (2) ノードマウスへの抗 GM1 抗体産生ハイブリドーマ腹腔内移植による試み

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウス(B6系)(名古屋大学大学院医学系研究科生物化学古川綱一教授より供与)は GBS の標的分子である GM1 を含む複合型ガングリオシドを発現していない。このマウスに complete Freund's adjuvant (CFA)、keyhole limpet hemocyanin (KLH) とともにエマルジョン化した *C. jejuni* のリポオリゴ糖を 2 週に一度感作し、ELISA 法によって抗体価を測定した。抗 GM1 抗体の上昇が見られた個体から脾細胞を取り出し、腫瘍細胞とフュージョンをし、培養したコロニーをクローニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株を樹立した。このハイブリドーマを NK 細胞と胸腺を発現していないヌードマウスの腹腔に接種し、経過を観察し、腹水中および血中の抗体価を ELISA 法にて測定した。ELISA 法はスクリーニングとして一律に、GM1 を固相化し、カゼイン PBS に 500 倍希釈した血清を 4°C にて一晩置き 1000 倍希釈した 2 次抗体を用いて測定した。腹水の産生と腫瘍の増殖による体重増加が実験日初日より 10g を越えた時点で 2% パラホルムアルデヒドで灌流固定した。脊髄神経根・馬尾神経を取り出し、凍結標本をクリオスタットで 6  $\mu$ m に薄切し、protein G で IgG を染色し、神経根に結合する IgG の有無を光学顕微鏡で観察した。

(3) 「自己抗原ノックアウトマウスを用いた自己免疫疾患モデル動物の作製法」による試み

前述の GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスを自己抗原ノックアウトマウスとして用いた。前述の方法でエマルジョン化した *C. jejuni* のリポオリゴ糖を 2 週に一度感作し、抗体価の上昇が得られた個体の脾細胞を取り出し、rag-2 ノックアウトマウスに  $10^7$  の脾細胞を眼窩静脈叢より注射し経過を観察した。スクリーニングとしての血中抗体価は前述の ELISA 法にて測定した。

### C. 研究結果

いずれの実験においても、運動麻痺は見られなかった。これらのマウスの脊髄神経根・馬尾神経からも GBS としての病理組織学的所見すなわち IgG の軸索への沈着、Waller 様変性は見られなかった。

(1) Fc $\gamma$ R IIb ノックアウトマウスへの GBS 患者抗体静脈注射の実験

8 日後の血清から高力価のマウス抗ヒト IgG 抗体ならびに、ヒト抗 GM1 抗体が検出された。抗 GM1 抗体は 8 日間に渡って体内を循環していたにも関わらず、おそらくは血液神経関門を通過せず、神経上の抗原分子まで到達しなかったと考えられる。

(2) ヌードマウスへの抗体産生ハイブリドーマ移植実験

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスの感作により得られたモノクローナル IgG 抗体のサブクラスは IgG2b であった。ハイブリドーマ接種後、ヌードマウスの血清抗体価は 1~2 週で著しく上昇していた。にも関わらず、運動麻痺など GBS と考えられるような神経学的所見はみられず末梢神経の病理組織学的検討においても GBS とみられる変化は認められなかった。

(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実験

動物管理において不足があり、脾細胞の生着の確認まで至らなかった。

### D. 考察

今回行った 3 種の受動免疫方法によって、GBS のマウスモデルは得られなかった。ELISA 法によって血清の抗 GM1 抗体の上昇は充分量確認されたにも関わらず、ウサギモデルで観察されたような神経病理学的変化はみられなかった。このことは、循環血漿中の抗 GM1 抗体の上昇だけでは GBS 発症が導かれない可能性を示唆している。抗体以外に関与するものとしていくつか考えられるが、究極的には血液神経関門の破綻という課題が挙げられる。血液中を循環する抗体が神経系の標的抗原にたどりつくまでには、血液神経関門が存在する。GBS の発症機転には、血液神経関門の破綻が想定されているが、そのメカニズムは明らかではない。患者血清中に見られる IgG 抗 GM1 抗体のサブクラスは IgG1 および IgG3 であり、これにより GBS 病因抗体産生には T 細胞のヘルプを要することが示唆される。T 細胞の動員とともに TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  といったサイトカインの産生が起こり、血液神経関門の透過性を亢進させる可能性も考えられる。

GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスの感作により得られたモノクローナル IgG 抗体のサブクラスは IgG2b であった。これはヒトの IgG2 に相当し、補体結合能、マクローファージ結合能に乏しい。エフェクター機構の有効な活性化も病態再現には必要であると考えられることから、ヒトの IgG1 に相当する IgG2a を得る必要がある。今後、発症に関与する新たな細胞、物質の解析を予定している。

### E. 結論

受動免疫によって、現在までに GBS の発症は導かれていない。血液神経関門の抗体通過が課題である。

### F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

### G. 研究発表

1. 論文発表

Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S. Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2003; 60: 1514-1518.

Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K. Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset

subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Sci* 2003; 210: 99-103.

Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci* 2003; 210: 41-45.

Odaka M, Yuki N, Hirata K. Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. *J Neurol* 2003; 250: 913-916.

Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S. Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Brain* 2003; 126: 2279-2290.

Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol* 2003; 54: 383-388.

Koga M, Yuki N, Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y. CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor

repertoire in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 112-117.

## 2. 学会発表

Yuki N, Koga M, Susuki K, Hirata K. "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" Peripheral Nerve Society. Banff, Canada. Jul 28, 2003.

Yuki N, Koga M, Susuki K, Hirata K. "Ganglioside mimicry of *Campylobacter* lipooligosaccharide induces the development of Guillain-Barré syndrome model" 12<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Aarhus, Denmark. Sep 7, 2003.

Yuki N. "Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis" 12<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macropahges 2003. Utsunomiya, Japan. Jun 19, 2003.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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・Fisher 症候群にみられる抗ガングリオシド抗体の病因的意義：  
発症初期における抗体価の推移の経時変化からの検討

分担研究者 千葉厚郎 杏林大学医学部 第一内科・助教授

研究要旨：Fisher 症候群および外眼筋麻痺を伴う Guillain-Barré 症候群の血清抗 GQ1b 抗体価の発症初期における経時変化と臨床症状の経過からその病因的意義を検討した。外眼筋麻痺発症後 6 日以内に初回の、14 日以内かつ治療開始前に 2 回目の血清を採取しえた Fisher 症候群及び外眼筋麻痺を伴う Guillain-Barré 症候群 9 例の抗体価を ELISA 法で測定した。発症後から検討した 8 例中 7 例で抗体価は初回採取血清で最も高く、経時的に低下した。外眼筋麻痺増悪期の抗体価の推移を検討した 4 例中 3 例で症状増悪期には抗体価は既に低下していく段階にあった。発症前より検討を開始しえた 1 例では、抗体価は外眼筋麻痺出現前に既に上昇しており、外眼筋麻痺発症頃にピークを迎えその後徐々に低下した。以上の結果からは、抗 GQ1b 抗体は組織障害による免疫系への抗原性の提示の結果二次的に産生されるのではなく、先行感染に関連して産生され、組織障害の過程の初期段階における発症因子として病因的役割を担っている可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群 (GBS) および Fisher 症候群 (FS) などその臨床亜型と考えられている病態の約 3 分の 2 の症例において、急性期血清中に何らかのガングリオシドと反応する抗体が検出され、今日その補助診断法として広く利用されるに至っている。中でもガングリオシド GQ1b を認識する IgG 抗体は、FS ならびに外眼筋麻痺を伴う GBS (GBS-OP) をはじめとして、何らかの先行感染後に生ずる経過良好な急性外眼筋麻痺の症例において極めて高率かつ特異的に出現することが明らかとなり、その診断的意義は極めて高い。認識される抗原である GQ1b 糖鎖抗原は、ヒトの外眼筋を支配する脳神経の傍絞輪部に特異的に高密度に局在していることが免疫組織化学的に示されており、これは抗 GQ1b IgG 抗体と外眼筋麻痺との臨床的関連によく相応しており、このことは本抗体が外眼筋麻痺発症と何らかの関わりを持つことを強く示唆するものである<sup>1)</sup>。

抗ガングリオシド抗体の病因的意義については、これまで *in vitro* あるいは *ex vivo* での患者血清やモノクローナル抗体による伝導ブロックの報告、あるいはガングリオシドを免疫することにより作成された動物モデルの検討から、その病因的意義を積極的に示唆するデータが示されてはいるが、依然としてある「組織障害に関連した二次的な抗体の産生」という議論に対して、その積極的な反証となるような臨床データは殆ど示されてはいない。

今回の研究で我々は、実際の FS あるいは GBS-OP の臨床症例における血清抗 GQ1b IgG 抗体価の経時変化を、外眼筋麻痺発症の初期、特に臨床

症状の出現から増悪をきたしている時期に詳細に検討することにより、本抗体の外眼筋麻痺発症のプロセスにおける位置づけについて検討した。

#### B. 研究方法

対象：外眼筋麻痺発症後 6 日以内に初回の、遅くとも 14 日以内に 2 回目の血清を採取しえた患者で、少なくとも 2 回目の血清採取前には副腎皮質ステロイド療法・血漿浄化療法・免疫グロブリン大量静注療法 (IVIg) などの免疫系に影響を与える可能性がある治療が行われなかった、FS 患者 7 例および GBS-OP 患者 2 例の計 9 例。初回血清採取のポイントは、外眼筋麻痺発症 5 日前：1 例、発症 2 日目：3 例、発症 3 日目：3 例、発症 5 日目：1 例、発症 6 日目：1 例であった。内 4 例では、外眼筋麻痺増悪期に血清抗 GQ1b IgG 抗体価の推移と臨床症状の変化を詳細に検討した。

血清抗 GQ1b 抗体価の測定：既報告の方法に従い ELISA 法で測定した。GQ1b 標品をエタノールに溶解し 96-well ELISA プレート (Limbro/Titertec<sup>®</sup>, ICN) に 200 ng/well で分注、エタノールを蒸発し抗原を固相化した。1% BSA/PBS (pH 7.4) で 30 分間ブロッキングを行った後、1% BSA/PBS で 1:40 ないしは 1:80 に希釈した患者血清 50  $\mu$ l を well に分注、室温で 2 時間反応させた。Well を 0.1% BSA/PBS で 3 回洗浄後、1% BSA/PBS で 1:500 に希釈した HRP 標識抗ヒト IgG あるいは IgM 抗体 (Cappel) 50  $\mu$ l を well に分注し 1 時間 30 分室温で反応させた。Well を 0.1% BSA/PBS で 3 回洗浄後、*o*-phenylenediamine を発色基質として呈色反応を行い、8N 硫酸で反応停止後、490 nm で吸光度

を測定した。抗原を固相化した well の吸光度から固相化していない well の吸光度を差し引いた値を抗体価とした。

抗体価の経時変化の検討に当たっては、同一患者からの一連の検体は全て同じプレート上で反応を行った。

### C. 研究結果

(1). 発症後からの検討を行った 8 例のうち 7 例で、抗体価は初回採取血清で最も高く、経時的に低下した。

(2). 外眼筋麻痺増悪期に血清抗 GQ1b IgG 抗体価の推移を観察した 4 例のうち 3 例では、外眼筋麻痺が増悪する時期には抗体価は既に低下していく段階にあった。これら 3 症例はいずれも典型的な FS の患者であった。1 例では症状増悪期に抗体価の上昇を認めたが、この症例は FS として発症後、強い筋力低下と呼吸筋麻痺が出現し、GBS-OP に移行した症例であった。

(3). 発症前より検討を開始しえた FS の 1 例では外眼筋麻痺出現前に既に抗体価の上昇を認め、外眼筋麻痺発症の頃に抗体価はピークに達し、その後症状が増悪していく過程では、血清抗 GQ1b IgG 抗体価は徐々に低下していった。またこの患者では IgG class に比して抗体価は低かったが IgM class の抗 GQ1b 抗体も検出され、その抗体価の推移は IgG class のものと同様であった。

### D. 考察

GBS, FS はその疾患の性質上発症前の抗体を検討する機会は殆どないと考えられるが、今回我々はそれを検討する非常に貴重な機会を得た。今回の結果からは、血清抗 GQ1b IgG 抗体は外眼筋麻痺出現前には既に上昇しており、外眼筋麻痺が増悪する時期には既に低下していく段階にあるということが示唆された。このことは本抗体を組織障害の結果として二次的に産生されたという可能性に対する強い反証となるものであり、また GBS における抗ガングリオシド抗体は先行感染因子が抗体産生の刺激となっていることを示唆するものである。

Kusunoki らはウサギに GD1b を免疫し感覚失調性ニューロパチーの動物モデルを<sup>2)</sup>、また結城らはウサギに GM1 を免疫することにより急性軸索型ニューロパチーの動物モデルを<sup>3)</sup>作成したが、いずれのモデルにおいても対応する血清抗体が発症前より上昇し、抗体価がピークに達した後に神経症状の出現をみている。この経過は今回の我々の臨床症例と一致しており、これらの動物モデルと実際の GBS における抗ガングリオシド抗体の病態に果たす役割の共通性を示唆するものである。こ

のことは、動物モデルの発症プロセスの詳細な検討が GBS 発症機序の解明および治療法の開発につながるという考えを、支持するものである。

臨床症状増悪期に抗体価の推移を検討した 4 例の内 3 例は外眼筋麻痺増悪期にもすでに抗体価は低下傾向を示していたが、これらの症例はすべて FS の症例であった。臨床症状増悪期に抗体価の上昇を示した 1 例は FS として発症したがその後重度の四肢筋力低下が出現し GBS-OP へと進展した症例であった。臨床的には FS として発症した症例が GBS-OP へと移行することは稀ならず経験されるが、FS のまま経過する症例と GBS-OP へと進展する群の間の免疫学的差異を検討した報告はこれまでにない。今回 GBS-OP へと進展した症例で抗体価の推移を詳細に検討し得た症例は 1 例のみで、さらに同様な症例での検討の蓄積を要するが、発症初期の抗体価の推移を詳細に検討することにより、FS として発症した症例に四肢筋力低下が加わり GBS として重症化するのか、それとも FS のまま推移するのかを予測できる可能性があると考えれば、このことは抗 GQ1b IgG 抗体の測定が FS として発症した症例の治療法を選択する上での重要な指標ともなりうることを意味していると考えられる。

### E. 結論

FS および外眼筋麻痺を伴う GBS の急性期血清中に上昇する抗 GQ1b IgG 抗体は、組織障害の結果として二次的に産生されるのではなく、先行感染に関連して上昇し外眼筋麻痺の発症初期のプロセスに関与している可能性が高い。

### (参考文献)

1. Chiba A, Kusunoki S, Obata H, et al. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Gullain-Barré syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 1993;43:1911-1917.
2. Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, et al. Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol* 1996;39:424-431.
3. Yuki N, Yamada M, Koga M, et al. Animal model of axonal Gullain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 2001;49:712-720.

### F. 研究発表

#### 1. 文書発表

Ayumi Uchibori, Atsuro Chiba, Manabu Sakuta, Susumu Kusunoki. Close observation of chronological changes of anti-GQ1b IgG antibody titer in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome with ophthalmoplegia, with special reference to its pathogenic role to ophthalmoplegia. *J Peripheral*



Nervous System. 8:S68, 2003.

Atsuro Chiba, Ayumi Uchibori, Manabu Sakuta, Susumu Kusunoki. Analysis of an anti-nuclear IgM antibody detected in patients with CIDP. J Peripheral Nervous System. 8:S11, 2003.

## 2. 学会発表

内堀 歩, 千葉厚郎, 作田 学, 楠 進. 抗 GQ1b IgG 抗体の病因的意義: 経時変化からの検討. 第 44 回日本神経学会総会, 2003 年 5 月 15-17 日, 横浜.

千葉厚郎, 内堀 歩, 作田 学, 楠 進. CIDP 患者血清中に見いだされた IgM class 抗核抗体についての検討. 第 44 回日本神経学会総会, 2003 年 5 月 15-17 日, 横浜.

Ayumi Uchibori, Atsuro Chiba, Manabu Sakuta, Susumu Kusunoki. Close observation of chronological changes of anti-GQ1b IgG antibody titer in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome with ophthalmoplegia, with special reference to its pathogenic role to ophthalmoplegia, Meeting of the Peripheral Nerve Society, July 26-30, 2003, Banff, Canada.

Atsuro Chiba, Ayumi Uchibori, Manabu Sakuta, Susumu Kusunoki. Analysis of an anti-nuclear IgM antibody detected in patients with CIDP. Meeting of the Peripheral Nerve Society, July 26-30, 2003, Banff, Canada.

## G. 知的所有権の取得状況

該当無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaida K, <u>Kusunoki S</u> , Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I.	Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barre syndrome	Neurology	62	821-824	2004
Kaida K, <u>Kusunoki S</u> , Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I.	GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody.	Neurology	61	465-470	2003
<u>Kusunoki S</u> , 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
<u>Kusunoki S</u> .	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
<u>Kusunoki S</u> .	Antiganglioside antibodies in Guillain- Barre syndrome; useful diagnostic markers as well as possible pathogenetic factors.	Intern Med	42	457-458	2003
Hirano M, <u>Kusunoki S</u> , Asai H, Tonomura Y, Morita D, Ueno S.	A family with Campylobacter enteritis: anti-GD1a antibody with/without Guillain- Barre syndrome.	Neurology	60	1719- 1720	2003
Taguchi Y, Takashima S, <u>Kusunoki S</u> , 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
Mizutani K, Oka N, <u>Kusunoki S</u> , 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
Mochizuki H, Masaki T, Kamakura K, Matsushita S, <u>Kusunoki S</u> , Higuchi S.	Acute axonal polyneuropathy associated with alcoholism.	Eur Neurol	50	183-184	2003

## 発表業績リスト

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
Yuki N, Saperstein DS.	Axonal Guillain-Barré syndrome subtypes: do we need more splitting?	Neurology	61	598-599	2003
Koga M, Yuki N, Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y.	CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor repertoire in Guillain-Barré and Fisher syndromes.	J Neuroimmunol	141	112-117	2003
Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N.	Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons.	Ann Neurol	54	383-388	2003
Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S.	Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome.	Brain	126	2279-2290	2003
Odaka M, Yuki N, Hirata K.	Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome.	J Neurol	250	913-916	2003
Ikuta N, Fukusako T, Yuki N, Morimatsu M, Koga M.	Acute oropharyngeal palsy associated with anti-GM1b IgG antibody.	J Neurol	250	881-882	2003
Sekiguchi K, Susuki K, Funakawa I, Jinnai K, Yuki N.	Cerebral white matter lesions in acute motor axonal neuropathy.	Neurology	61	272-273	2003
Susuki K, Johkura K, Yuki N, Kuroiwa Y.	Clinical deterioration in Bickerstaff's brainstem encephalitis caused by overlapping Guillain-Barré syndrome.	J Neurol Sci	211	89-92	2003
Odaka M, Yuki N, Kokubun N, Hirata K, Kuwabara S.	Axonal Guillain-Barré syndrome associated with axonal Charcot-Marie-Tooth disease.	J Neurol Sci	211	93-97	2003
Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T.	Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and <i>Campylobacter jejuni</i> infection.	J Neurol Sci	210	41-45	2003
Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K.	Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to <i>Campylobacter jejuni</i> enteritis.	J Neurol Sci	210	99-103	2003
Koga M, Yuki N, Hirata K, Morimatsu M, Mori M, Kuwabara S.	Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barré syndrome.	Neurology	60	1514-1518	2003
Odaka M, Yuki N.	Antibodies to GM2 ganglioside in neurological disorders.	Intern Med	42	220-221	2003

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ayumi uchibori, Atsuro Chiba, Manabu Sakuta, Susumu Kusunoki.	Close observation of chronological changes of anti-GQ1b IgG antibody titer in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome with ophthalmoplegia, with special reference to its pathogenic role to ophthalmoplegia.	J Peripheral Nervous System	8	S68	2003
Atsuro Chiba, Ayumi Uchibori, Manabu Sakuta, Susumu Kusunoki.	Analysis of an anti-unclear IgM antibody detected in patients with CIDP.	J Peripheral Nervous System	8	S11	2003
Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, Endo T.	Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: Coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity.	Proc Natl Acad Sci USA	101	500-505	2004

20030714

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。