

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

免疫性末梢神経障害の病態解明と
治療法に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 楠 進

平成17年(2005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. Ganglioside complex に対する抗体をもつ Guillain-Barré 症候群の臨床的解析 4
楠 進
2. 免疫性ニューロパチーにおける血中の抗糖脂質抗体活性に及ぼす 8
リン脂質の効果
楠 進
3. 肺炎マイコプラズマ脂質成分を接種したウサギ血清の脱髄活性の検討 12
対する血中 IgG 抗体の検討
楠 進
4. カンピロバクター・リポオリゴ糖合成酵素の遺伝子多型と 15
ギラン・バレー症候群
結 城 伸 泰
5. 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 18
結 城 伸 泰
6. 感覚性運動失調型ニューロパチーにおけるガングリオシドの機能的役割 21
結 城 伸 泰
7. ヒト外眼筋支配脳神経における GQ1b 糖鎖抗原の subcellular locaization 24
の検討
千 葉 厚 郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 31

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、昨年度 GBS において複数のガングリオシドからなる複合抗原に対する抗体の存在をはじめ報告したが、本年度は同抗体陽性の多数例を対象に、臨床的特徴を解析した。

また同班員は、GBS 患者血清中の抗 GM1 IgG 抗体の反応性が phosphatidic acid (PA)などの酸性リン脂質を抗原に混合した際に増強し、一方 GBS の亜型の Miller Fisher 症候群(MFS)患者血清中の抗 GQ1b IgG 抗体にはそのような増強がみられないことを報告していたが、本年度は抗 GD1b IgG 抗体についてしらべ、増強効果のメカニズムを検討した。

さらに同班員はマイコプラズマ肺炎後の GBS と抗 Gal-C 抗体の関連を見出し、昨年度は抗 Gal-C 抗体上昇が分子相同性メカニズムによることを報告したが、本年度は肺炎マイコプラズマ菌体の脂質を接種し抗 Gal-C 抗体が上昇したウサギ血清における脱髄活性の有無を検討した。

結城班員は GBS の先行感染因子である *Campylobacter jejuni* 菌体のリポオリゴ糖(LOS)合成酵素遺伝子の一つである *cst-II* に着目し、その遺伝子多型(Asn/Thr 51)と患者血中の抗ガングリオシド抗体の反応性の関連を検討した。

また同班員は昨年度 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の末梢神経伝導速度の遅延を報告したが、今年度はその機序を明らかにするため、Ranvier 絞輪周囲のイオンチャネル局在を検討した。

さらに同班員は、ジシアロシル基をもつガングリオシドに対する IgM 抗体の培養後根神経節細胞への作用の検討および抗 GD1b 抗体による後根神経節の免疫染色を行った。

千葉班員はフィッシャー症候群における抗 GQ1b 抗体の病因的意義解析のため、ヒトの眼球運動を支配する脳神経における GQ1b の局在の従来よりもさらに詳細な検討を行った。

B. 研究方法

GBS234 例の急性期血清について、GD1aと GD1b を 1:1 の比で混合した複合抗原(GD1a/GD1b)に対する IgG 抗体活性を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で検討した。各単独抗原に対する抗体も陽性の場合、その O.D.値より複合抗原に対する O.D.値が 0.2 以上大きい場合に複合抗原に対する抗体陽性とした。

マイコプラズマ菌体から得た脂質分画を接種したウサギの血清(全例で脱髄因子である抗 Gal-C 抗体価の上昇がみられる)をラット坐骨神経に注入して病理像を検討した。

抗 GD1b IgG 抗体陽性の GBS30 例の急性期血清について、GD1b 単独を 200ng あるいは GD1b 100ng とリン脂質 100ng を装着したマイクロタイタープレートを用いて抗体活性を ELISA 法で測定し、抗体活性を比較した。また抗 GD1b 抗体を、Gal-GalNAc 結合型とジシアロシル基を含めて認識する型に分けて検討した。

GM1 をはじめとする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について、電位依存性 Na チャネル、K チャネル、Caspr に対する抗体を用い、免疫組織化学的検討を行った。

GBS および関連疾患患者の便より分離培養された *C.jejuni* 菌株の *cst-II* 遺伝子多型 (Asn/Thr 51) をダイレクトシーケンシングで決定した。

ラット後根神経節の初代培養に患者血清を添加して、2 日後に生存率を求めた。またラット後根神経節における GD1b の局在を、免疫組織化学的に検討した。

ヒトの動眼神経または外転神経の凍結切片を抗 GQ1b モノクローナル抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡により観察した。

C. 研究結果と D. 考察

GBS 234 例中 16 例(6.8%)に抗 GD1a/GD1b 抗体が陽性であった。同抗体陽性例と、陰性でかつ十分な臨床情報が得られた 177 例について、重症度を比較すると、同抗体陽性例に人工呼吸器装着例が有意に高頻度にみられ、

またピーク時 F score も有意に高かった。同抗体は GBS 重症化のマーカーおよび重症化メカニズム解明の手がかりとして有用と考えられる。同抗体陽性例について他の複合体に対する抗体の有無も調べたところ、GM1/GD1a, GM1/GT1b, GD1b/GT1b にも抗体活性をもっており、糖鎖末端の Gal-GalNAc 基と NeuAc-Gal-GalNAc 基からなる複合体を認識していると考えられた。

酸性リン脂質を GD1b 抗原に混合した抗原による抗体活性の上昇については、抗 GD1b IgG 抗体は抗 GM1 IgG 抗体と抗 GQ1b IgG 抗体の中間的な結果であった。しかしそのうち Gal-GalNAc 基に反応するタイプの抗体(9 例)とジシアロシル基をも認識する抗体(9 例)を比較すると、前者で PA など酸性リン脂質との混合抗原により強い反応性がみられ、後者では反応の増強はなかった。抗 GQ1b IgG 抗体に有意の増強効果がみられないことと合わせ考えると、negative charge の強いジシアロシル基が反応に関わる場合に増強効果がみられないものと考えられた。一方スフィンゴミエリン(SM)を GD1b に混合させた抗原を用いると抗体活性は低下した。SM による抗体活性の低下は GBS における抗ガングリオシド抗体に共通すると考えられた。

マイコプラズマ菌体の脂質分画を接種して抗 Gal-C 抗体が上昇したウサギ血清をラット坐骨神経に注入したところ、病理学的にラット坐骨神経に脱髄が認められた。マイコプラズマ肺炎後の脱髄性神経障害では、分子相同性機序で産生された抗 Gal-C 抗体が脱髄因子として働く可能性が示唆された。

Thr 型の *cst-II* を有する菌では GM1 や GD1a 様リポオリゴ糖が検出され、患者血中に抗 GM1 抗体や抗 GD1a 抗体がみられ、四肢

麻痺をきたしやすい。一方 Asn 型の *cst-II* をもつ菌では GQ1b リポオリゴ糖が検出され、患者血中に抗 GQ1b 抗体がみられ、眼筋麻痺や失調をきたしやすいことがわかった。先行感染因子の遺伝子の違いにより、患者で産生される抗体の反応性と臨床像が決められることが示された。

GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは、本来イオンチャネルの存在しない傍絞輪部にカリウムチャネルが存在することがわかった。電子顕微鏡による観察で、一部の髄鞘ループの軸索膜からの解離という傍絞輪部の構造異常も認められた。抗ガングリオシド抗体の作用がイオンチャネル異常を引き起こす可能性も考えられ今後の検討が必要である。

ラット後根神経節の初代培養では、GD1b を含むジシアロシル基をもつガングリオシドに対する抗体陽性血清を加えると、細胞の生存率は有意に低下した。また GD1b はラットにおいても大型神経細胞に局在することが明らかになった。これらの結果は、抗 GD1b 抗体が後根神経節の大型神経細胞に結合して、深部感覚障害性失調性ニューロパチーを引き起こすという説を支持するものである。

ヒトの眼球運動を支配する脳神経を、マウスモノクローナル抗 GQ1b 抗体により免疫組織染色し、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡で観察した結果、シュワン細胞の傍絞輪部膜表面に GQ1b が高濃度に存在することが明らかになった。これは従来からの所見と合致し、さらに詳細な GQ1b の分布を解明したものである。

E. 結論

GD1a/GD1b 複合体に対する IgG 抗体は、GBS の重症化の指標となり、かつ重症化メカ

ニズム解明の手がかりとなるものである。

抗 GD1b IgG 抗体についての解析から、negative charge の強いジシアロシル基が抗体認識に関与しない時に酸性リン脂質を抗原に加えると抗体活性が増強することがわかった。抗体アッセイの条件設定および抗体の病態への関わりを考える時に、この結果は有用である。

マイコプラズマ肺炎後の脱髄性神経障害では、菌体のもつ Gal-C 様糖鎖に対する免疫反応の結果産生された抗 Gal-C 抗体が脱髄因子として働くことが示唆された。

C. jejuni 感染後の GBS では、*C. jejuni* の LOS 合成酵素遺伝子の多型により、患者で産生される抗体の反応性と、各症例の臨床像が規定されることが示された。

複合型ガングリオシドを欠くマウスでは、カリウムチャネルの局在異常がみられる。抗ガングリオシド抗体の作用とイオンチャネル異常について今後のさらなる検討が必要である。

抗 GD1b 抗体は後根神経節の大型神経細胞に結合して、深部感覚障害性失調性ニューロパチーをきたすことが示唆された。

ヒトの眼球運動を支配する脳神経では、シュワン細胞の傍絞輪部膜表面に GQ1b が高濃度に存在することが、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を使って確認された。

F. 健康危険情報

なし

Ganglioside complex に対する抗体をもつ Guillain-Barré 症候群の臨床的解析

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

研究要旨

我々は昨年、ガングリオシド複合体 GD1a/GD1b に対する抗体を Guillain-Barré 症候群 (GBS) 患者血清中に初めて見出し、新たな標的抗原として報告した。今回はこの抗 GD1a/GD1b 抗体の GBS における臨床的意義を調べるため、同抗体陽性 GBS の臨床的特徴を多数例で解析した。GBS234例のうち、16例(6.8%)に IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体が陽性であった。抗 GD1a/GD1b 抗体陽性 GBS は、消化器感染の先行、下部脳神経障害、重症度の高い症例が有意に多いことを特徴とし、人工呼吸器の装着と有意に相関していた。抗 GD1a/GD1b 抗体は GBS の重症化および人工呼吸器装着の予測因子として有用である。抗 GD1a/GD1b 抗体は、GM1/GD1a、GM1/GT1b、GD1b/GT1b にも活性をもつことから、糖鎖末端の [Gal β 1-3GalNAc] 基と [NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc] 基からなる複合体を認識していると考えられる。

A. 研究目的

自己免疫性ニューロパチーの一つである Guillain-Barré 症候群(GBS)において約 60%の症例にガングリオシドに対する自己抗体が見出され、発症に関与するのみならず神経症候を規定する因子として重要であることが知られている。これまで GD1b、GM1b、GalNAc-GD1a など単一のガングリオシドに対する抗体が検索されてきたが、我々は昨年、ガングリオシド複合体に対する抗体を GBS 患者血清中に初めて見出し、新たな標的抗原として報告した。今回、我々はこの抗ガングリオシド複合体抗体の GBS における臨床的意義を調べるため、抗ガングリオシド複合体抗体陽性 GBS の臨床的特徴を多数例で解析し、さらに反応特異性との関連を検討した。

B. 研究方法

(1) 対象:2001年9月から2002年12月の間

に東京大学神経内科に送られてきた GBS 患者血清を対象とした。GBS の診断は、血清とともに送られてきた臨床情報をもとに Asbury & Cornblath らの基準を用いて行なった。

(2) ガングリオシド複合体に対する抗体の検討:上記対象血清に対して、9種のガングリオシドに対する抗体を測定した。補正 OD 値が 0.1 以上の場合、陽性と判定した。また GD1a と GD1b を 1:1 の割合で混合した複合体抗原に対する IgG 抗体を測定した。また抗 GD1a/GD1b 複合体抗体陽性例については、GM1、GD1a、GD1b、GT1b のうち 2 種を組み合わせたそれぞれの複合体に対する抗体活性も検討した。抗ガングリオシド複合体抗体について、各単独抗原に対する抗体も陽性の場合、その補正 OD 値より 0.2 以上大きい場合に陽性とした。IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体陽性 GBS を、抗 GD1a/GD1b 抗体陽性群と、抗 GD1a/GD1b 抗体陰性 GBS 群に分け、

それぞれ GD1a/GD1b(+)群、対照群 (control 群)とした。

- (3) 臨床的特徴の解析:上記血清とともに送られてきた臨床情報をもとに解析を行なった。ピーク時の神経学的所見に関する記載のない例は解析の対象から除外し、年齢、性別、先行感染の種類、神経所見、重症度、電気生理学的所見等を2群間で比較した。重症度の評価には Hughes の functional grading scale(F score)を用いた。また3群間で人工呼吸器装着率を比較した。
- (4) 統計学的解析:各項目の頻度の比較に Fisher exact probability、カイ二乗検定、unpaired t-test、あるいは Mann-Whitney 検定を用いた。両側検定で $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

- (1) 対象:対象は GBS234例で、16例(6.8%)に IgG 抗 GD1a/ GD1b 抗体が陽性であった。また全 16例で抗 GM1/GD1a 抗体も陽性であった。そのほか GM1/GT1b に対する活性もみられた。IgG 抗 GD1a/ GD1b 抗体陰性の 218例から臨床情報が不十分である 39例を除いた 179例を対照群とした。
- (2) 臨床的特徴の解析:先行感染では GD1a/GD1b(+)群で消化器感染が有意に高頻度であった(75%, $p < 0.0001$)。脳神経障害では、GD1a/GD1b(+)群で第 9, 10 脳神経障害(67%)、第 11, 12 脳神経障害(40%)が有意に高頻度であった。年齢、性別、ピークまでの期間、四肢筋力低下の分布、感覚障害、電気生理所見には差を認めなかった。
- (3) 重症度および人工呼吸器装着率の比較:ピーク時の重症度について記載のある

193例で検討した。人工呼吸器装着率は GD1a/GD1b(+)群において 38%であり、対照群の 11%と比べ有意に高頻度であった($p=0.018$)。また全人工呼吸器装着例 25例中 6例(24%)、非装着例 168例中 10例(6%)が IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体陽性であり、IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体は人工呼吸器の装着と相関していた($p=0.008$)。また GD1a/GD1b(+)群のピーク時 F score は、対照群と比べて有意に高かった(図) ($p=0.006$)。

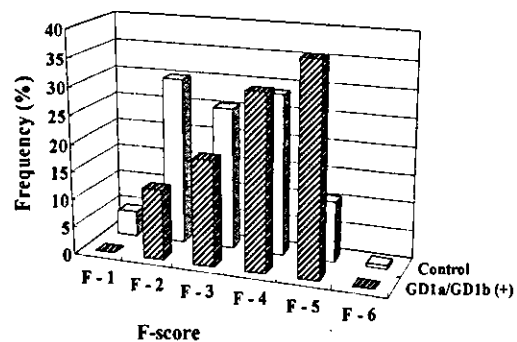


図 ピーク時の重症度の比較

F score (Hughes functional grading scale): F-0 No symptoms, F-1 Minor signs or symptoms, F-2 Able to walk 5m without support but incapable of manual work, F-3 Able to walk 5m only with a cane, appliance, or support, F-4 Bed- or chair-bound, F-5 Requiring assisted ventilation, F-6 Dead. (Lancet, 1978;2:750-775).

D. 考察

前回の報告で抗 GD1a/GD1b 抗体陽性例に重症度の高い例が多かったことから、今回

抗 GD1a/GD1b 抗体に焦点を当てて臨床的解析を行なった。その結果抗 GD1a/GD1b 抗体陽性例は消化器感染の先行、下部脳神経障害、重症化傾向を特徴としていた。特に人工呼吸器装着率が有意に高頻度であり、抗 GD1a/GD1b 抗体は GBS の重症化および人工呼吸器装着の予測因子として有用であると考えられる。

抗ガングリオシド複合体抗体の反応特異性の検討の結果、抗 GD1a/GD1b 抗体は GM1/GD1a、GM1/GT1b、GD1b/GT1b にも活性をもっていた。従って抗 GD1a/GD1b 抗体は、gangliotetraose の基本骨格の糖鎖末端の[Gal β 1-3GalNAc]基と [NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc]基とから生じる複合糖鎖を認識していると考えられる。

E. 結論

1. GBS の 6.8% に IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体を認めた。
2. IgG 抗 GD1a/GD1b 抗体は GBS の重症化および人工呼吸器装着の予測因子として有用である。
3. GD1a/GD1b に対する活性をもつ抗体は糖鎖末端の[Gal β 1-3GalNAc]基と [NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc]基からなる複合体を認識している。

F. 健康危険情報

特になし

参考文献

- 1) Ken-ichi Kaida, Daiji Morita, Mami Kanzaki, Keiko Kamakura, Kazuo Motoyoshi, Minako Hirakawa, Susumu Kusunoki. Ganglioside

complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 2004;56:567-571.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciak C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, and van der Kooy D. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18:1806-1811, 2004.
- 3) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Ganglioside complexes: as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurology* 56:567-571, 2004.
- 4) Kusunoki S, Kaida K, Ashida H. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. (Reply) *Neurology* 63:1985, 2004.
- 5) Nishio M, Fukumoto S, Furukawa K, Ichimura A, Miyazaki H, Kusunoki S, Urano T, Furukawa K. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:33368-33378, 2004.

- 6) Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S. Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. J Neuroimmunol 159:129-132, 2005.
- 7) Kamakura K, Kaida K, Kusunoki S, Miyamoto N, Masaki T, Nakamura R, Motoyoshi K, Fukuda J. Harmful effects of anti-GalNAc-GD1a antibodies and TNF-alpha on rat dorsal root ganglia. J Periph Nerv Sys, in press.

2. 学会発表

- 1) 海田賢一、楠 進、森田大児、神崎真実、平川美菜子、元吉和夫、鎌倉恵子。
Guillain-Barré 症候群の新たな標的抗原としてのガングリオシド複合抗原。第 45 回日本神経学会総会(2004 年 5 月 11 日～14 日、東京)臨床神経学 44:1029, 2004
- 2) 海田賢一、森田大児、神崎真実、鎌倉恵子、元吉和夫、平川美菜子、楠 進。抗 GD1a-GD1b 複合体抗体は Guillain-Barré 症候群の重症化と関連する。第 17 回日本神経免疫学会学術集会(2005 年 3 月 3 日～4 日、福岡) 神経免疫学 13:47, 2005.
- 3) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. GD1a-GD1b complex: new target antigen in Guillain-Barré syndrome. 129th Annual Meeting of the American Neurological Association, Toronto, Canada, October 3-6, 2004.

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血中の抗糖脂質抗体活性に
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

Guillain-Barré 症候群の患者血清抗 GD1b IgG 抗体の反応性に及ぼす様々なリン脂質の効果を検討した。リン脂質との混合抗原に対する抗体価の増強効果は、抗 GM1 IgG 抗体では強く、抗 GQ1b IgG 抗体では少ないという結果をこれまで報告してきたが、今回の検討では抗 GD1b 抗体の場合はその中間的な結果であった。抗 GD1b 抗体のなかでも、GM1, GA1 にも陽性で GalGalNAc 基を認識する抗体の場合にはリン脂質による増強効果があり、ジシアロシル基を含む GD1b 単独に陽性の抗体の場合には増強効果は乏しかった。よって、ジシアロシル基が抗体の認識に関わっている場合には増強効果が乏しいことが示唆された。一方 SM を加えた時には抗体活性は低下し、SM 存在下における抗体活性の低下は GBS および類縁疾患にみられる IgG タイプの抗ガングリオシド抗体に共通すると考えられた。

A. 研究目的

これまで我々は、Guillain-Barré 症候群 (GBS) 血中の抗 GM1 IgG 抗体の活性が、GM1 とホスファチジン酸 (PA) などの酸性リン脂質の混合抗原に対して、より強く反応することを報告した。一方、Fisher 症候群の患者血清中の抗 GQ1b IgG 抗体では、リン脂質による抗体活性の増強効果はほとんど認められなかった。一方、どちらの抗体もスフィンゴミエリン (SM)、ホスファチジルコリン (PC) を抗原に添加すると活性が低下した。

今回我々は、Gal-GalNAc 基を有する点で GM1 に共通し、シアル酸が 2 つ連なっているジシアロシル基を有する点で GQ1b と共通する、GD1b に対する IgG 抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果を検討した。

B. 研究方法

抗 GD1b IgG 抗体陽性の GBS30 例の急性期血清を対象とした。GD1b 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 GD1b 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に 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、GD1b 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、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、SM、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、PC、リゾホスファチジルコリン (LPC)、カルジオリピン (CL) の 9 種類である。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝情報に関するものではなく、また患者群を対象とするものであり、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

抗 GD1b IgG 抗体は PA, CL を加えた時に、軽度の抗体活性の平均値の上昇がみられたが有意差はなく、その他のリン脂質では明らか

な増強効果はみられなかった。一方 SM,PC を加えた場合ほぼ全例で抗体価の低下がみられた。

抗 GD1b IgG 抗体陽性例の中で、IgG 抗体が GD1b 単独に陽性の 9 例と、Gal-GalNAc 基を認識し GD1b,GM1, GA1 に交差反応している 9 例の抗体の反応性を比較した。IgG 抗体の反応性は、GD1b 単独陽性の抗体の場合にリン脂質による増強効果が乏しかったが、GD1b, GM1, GA1 に陽性の IgG 抗体においてはリン脂質による増強効果が認められた。

SM を加えた場合の抗体価の低下は、用いた GD1b 抗原量が各ウェル当り半分(100ng / well)であったためである可能性が考えられたので、GD1b 抗原 200ng に SM200ng を加えた抗原を用いて抗体活性を測定したが、同様に抗体活性は低下傾向をみせた。

D. 考察

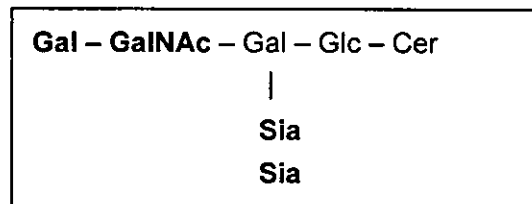
前回の検討では、GBS にみられる抗 GM1 IgG 抗体の反応性は、GM1 に PA, PI, PS, LPE, PE, LPC,CL を各々加えたときに抗体活性が増強するが、抗 GQ1b IgG 抗体活性はリン脂質による増強効果が目立たないという結果であった。今回、抗 GD1b IgG 抗体について、リン脂質による影響を検討したところ、反応性の増強効果は抗 GM1 抗体よりは低く、抗 GQ1b 抗体よりは高いと考えられた。また、抗 GD1b 抗体のなかでも、GD1b に monospecific な抗体ではリン脂質による増強効果は乏しく、Gal-GalNAc 基に対する抗体ではリン脂質による増強効果があった。従って、ジシアロシル基が抗体の認識に関わっている場合には増強効果が乏しいことが示唆された。電荷を持たない Gal-GalNAc 基を認識する抗体は、共存する負電荷のリン脂質の影響を受けて反応性が強まるが、負電荷をもつジシアロシル基を認識する抗体はそうした影響を受けにくいと考えられた。

抗 GM1 IgG 抗体、抗 GQ1b IgG 抗体、抗 GD1b IgG 抗体のいずれにおいても、SM, PC を加えたときに活性が低下するという結果であり、共通する特徴であると思われた。

E. 結論

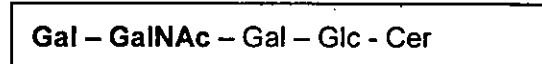
抗ガングリオシド抗体の反応性に対する PA などのリン脂質の増強効果は、抗体との反応にかかわるジシアロシル基の有無に左右される。また、SM 存在下における抗体活性の低下は GBS にみられる IgG タイプの抗ガングリオシド抗体に共通する。

GD1b の構造式

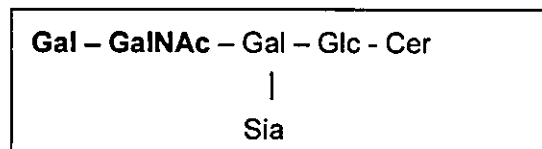


Sia:シアル酸

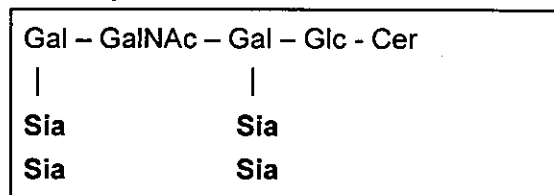
GA1 の構造式



GM1 の構造式



GQ1b の構造式



F. 健康危険情報

特になし

参考文献

- 1) Kusunoki S, et al. Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barré syndrome sera to a mixture of GM1 and a phospholipids: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27:302-306, 2003
- 2) Hirakawa M, et al. Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol*, 159:129-32, 2005

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciak C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, and van der Kooy D. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18:1806-1811, 2004.
- 3) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Ganglioside complexes: as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurology* 56:567-571, 2004.

- 4) Kusunoki S, Kaida K, Ashida H. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. (Reply) *Neurology* 63:1985, 2004.
- 5) Nishio M, Fukumoto S, Furukawa K, Ichimura A, Miyazaki H, Kusunoki S, Urano T, Furukawa K. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:33368-33378, 2004.
- 6) Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S. Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol* 159:129-132, 2005.
- 7) Kamakura K, Kaida K, Kusunoki S, Miyamoto N, Masaki T, Nakamura R, Motoyoshi K, Fukuda J. Harmful effects of anti-GalNAc-GD1a antibodies and TNF- α on rat dorsal root ganglia. *J Periph Nerv Sys*, in press.

2. 学会発表

- 1) 平川美菜子、森田大児、辻省次、楠 進。GBS, CIDP, MMN の抗 GM1 IgM 抗体活性に対するリン脂質の効果。第 45 回日本神経学会総会（2004 年 5 月 11 日～14 日、東京）*臨床神経学* 44:1030, 2004
- 2) 平川美菜子、佐田昌美、森田大児、楠 進。ギランバレー症候群の患者血中抗 GD1b IgG 抗体の活性に及ぼすリン脂質の影響。第 17 回日本神経免疫学会学術集会(2005 年 3 月 3 日～4 日、福岡)*神経免疫学* 13:48, 2005.

- 3) Hirakawa M, Morita D, Tsuji S,
Kusunoki S. Effects of phospholipids
on the activity of anti-GM1 IgM
antibodies in autoimmune
neuropathies. 129th Annual Meeting
of the American Neurological
Association, Toronto, Canada,
October 3-6, 2004.

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脂質成分を接種したウサギ血清の

脱髄活性の検討

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、肺炎マイコプラズマ菌体から得た脂質成分(M-lipid)を接種したウサギ血清は、抗ガラクトセレブロシド(Gal-C)抗体活性を有することを以前に報告した。抗Gal-C抗体は脱髄活性をもつことが報告されている。そこで今年度は同血清の脱髄活性の有無を検討する目的で、M-lipidを接種し高力価の抗Gal-C IgG抗体活性をもつウサギ血清をラットの坐骨神経内に注入して病理学的に検討した。その結果一部の坐骨神経に脱髄所見を認めた。この結果は、肺炎マイコプラズマ感染後の神経障害では、マイコプラズマ菌体に対する免疫反応の結果抗Gal-C抗体が上昇し、脱髄をきたすという機序を強く支持するものである。

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である。

Gal-Cでウサギを感作すると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。われわれは、抗Gal-C抗体が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、高頻度に上昇することを報告した。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から、肺炎マイコプラズマ菌体の糖脂質成分がGal-C様の糖鎖をもち、それに対する免疫反応として抗Gal-C抗体が上昇する可能性が考えられた。

さらに昨年度我々は、肺炎マイコプラズマの菌体から抽出した脂質成分(M-lipid)を接種したウサギの血清には、抗ガラクトセレブロシド(Gal-C)抗体活性が認められることを、報告している。

そこで今回は、同血清をラットの坐骨神経に注

入し、その脱髄活性の有無について検討した。

B. 研究方法

Wistarラットの坐骨神経に、M-lipidを接種し両側後肢の運動感覚障害を来したウサギの血清(A)、同じく両側前肢に一過性に筋力低下を来したウサギの血清(B)の、いずれも抗Gal-C IgG抗体価がピーク時の血清各20 μ lずつを、31ゲージ針とマイクロシリンジを用いて注入した。対照として、抗原接種前のウサギ血清、あるいはアジュバントのみ接種したウサギ血清を注入した。5日後に注入部の坐骨神経を切除し、病理学的に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトの遺伝情報及び疾患情報に関するものではない。また実験動物については適宜麻酔を行い、動物愛護には特段の配慮を行った。以上より倫理面の問題はないと考えられた。

C. 研究結果

(A) を注入した坐骨神経 3 本中 1 本、(B) を注入した 6 本中 2 本に脱髄所見を認めた。一方、対照血清を注入した 12 本には脱髄所見を認めなかった。

D. 考察

前記のように、昨年度我々は、M-lipid を接種したウサギ血清が抗 Gal-C 抗体を有することを報告した。また同時に M-lipid 中には複数の糖脂質成分が存在し、その中の一部のものは精製 Gal-C を接種して得たウサギ抗 Gal-C 抗血清と反応することも示した。そして今回 M-lipid を接種し抗 Gal-C 抗体が上昇した血清が、末梢神経に対し脱髄活性をもつことを明らかにした。

以上の結果から、マイコプラズマ肺炎後の GBS では、肺炎マイコプラズマの菌体糖脂質成分に対する免疫反応により、抗 Gal-C 抗体が上昇し、脱髄性に働くというメカニズムが強く示唆された。

E. 結論

マイコプラズマ菌体の脂質成分の接種により、抗 Gal-C IgG 抗体陽性となったウサギ血清は、ラットの坐骨神経に対して脱髄活性を有することが示された。

参考文献

- 1) Saida K, Saida T, Dorfman SH, et al: Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. *Science* 204: 1103-6, 1979
- 2) Kusunoki S, Shiina M, Kanazawa I. Anti-Gal-C antibodies in GBS subsequent to mycoplasma infection: Evidence of molecular mimicry. *Neurology* 57: 736-738, 2001

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciak C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, and van der Kooy D. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18:1806-1811, 2004.
- 3) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Ganglioside complexes: as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurology* 56:567-571, 2004.
- 4) Kusunoki S, Kaida K, Ashida H. Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. (Reply) *Neurology* 63:1985, 2004.
- 5) Nishio M, Fukumoto S, Furukawa K, Ichimura A, Miyazaki H, Kusunoki S, Urano T, Furukawa K. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:33368-33378, 2004.
- 6) Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S. Effects of phospholipids on

antiganglioside antibody reactivity in GBS. J Neuroimmunol 159:129-132, 2005.

- 7) Kamakura K, Kaida K, Kusunoki S, Miyamoto N, Masaki T, Nakamura R, Motoyoshi K, Fukuda J. Harmful effects of anti-GalNAc-GD1a antibodies and TNF-alpha on rat dorsal root ganglia. J Periph Nerv Sys, in press.

2. 学会発表

- 1) 森田大児、平川美菜子、辻省次、松田和洋、楠 進。肺炎マイコプラズマ菌体脂質成分によるウサギ感作：血中抗体の反応性の検討。第 45 回日本神経学会総会（2004 年 5 月 11 日～14 日、東京）臨床神経学 44:1093, 2004
- 2) 森田大児、松田和洋、清水潤、三方崇嗣、平川美菜子、辻省次、楠 進。マイコプラズマ肺炎後の脱髄性神経障害と抗

galactocerebroside 抗体。第 17 回日本神経免疫学会学術集会(2005 年 3 月 3 日～4 日、福岡) 神経免疫学 13:30, 2005.

- 3) Morita D, Hirakawa M, Tsuji S, Matsuda K, Kusunoki S. Inoculation with lipids from *Mycoplasma pneumoniae* induced production of antibodies against a major myelin glycolipid, galactocerebroside. 129th Annual Meeting of the American Neurological Association, Toronto, Canada, October 3-6, 2004.

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・リポオリゴ糖合成酵素の遺伝子多型と ギラン・バレー症候群

研究要旨

ギラン・バレー症候群の発症機序として、先行感染病原体 *Campylobacter jejuni* のリポオリゴ糖がガングリオシド様構造を有することで、患者血中に自己抗体(抗ガングリオシド抗体)が誘導されて、神経障害をきたすと想定されている。しかしながら、本症では自己抗体の標的となるガングリオシドは GM1 や GD1a、GQ1b など症例により様々で、かつ神経障害パターンも多様であるにも関わらず、臨床像の多様性を規定する因子は同定されていない。本研究では、ガングリオシド様リポオリゴ糖の合成酵素遺伝子の一つである *cst-II* の遺伝子多型(Thr/Asn 51)に注目し、100 症例を超える症例を解析した。その結果、Thr 型の *cst-II* を有する菌においては GM1 や GD1a 様リポオリゴ糖が菌体上に検出され、患者血中に抗 GM1・GD1a 抗体を誘導し、四肢麻痺をきたしやすい一方、Asn 型の *cst-II* を有する菌においては GQ1b 様リポオリゴ糖が菌体上に検出され、患者血中に抗 GQ1b 抗体を誘導し、外眼筋麻痺や運動失調をきたしやすいことがわかった。つまり、感染後性自己免疫疾患であるギラン・バレー症候群の臨床像は、すでに先行感染病原体の遺伝子レベルで規定されていることが明らかとなった。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群(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、原因病原体としてグラム陰性桿菌 *Campylobacter jejuni* が最も高頻度である。*C. jejuni* 腸炎後 GBS の発症機序として、菌体リポオリゴ糖(LOS)上にガングリオシド様構造が存在することで、患者血中に自己抗体(抗ガングリオシド抗体)が誘導され、GBS 発症に至ると想定されている。2000 年、本菌全ゲノムの解析結果が発表され、LOS 合成酵素遺伝子が次々にクローニングされている。ガングリオシド様 LOS 合成酵素遺伝子の一つである *cst-II* は、ガングリオシド様構造を合成するのに不可欠なシリアル酸転移酵素をコードしており、その遺伝子多型(Asn/Thr 51)により基質特異性が決定される。GBS では、神経所見や検出される抗ガングリオシド抗体の反応特異性が症例により様々であることから、*cst-II* 遺伝子多型が GBS の臨床像の多様性に関与していると想定し、検討した。

B. 研究方法

- (1) GBS およびその関連疾患患者の糞便より分離培養された *C. jejuni* 105 株の *cst-II* 遺伝子多型(Asn/Thr 51)をダイレクトシーケンシングにて決定した。対照として、腸炎患者由来 *C. jejuni* 65 株を用いた。
- (2) 菌体から粗 LOS を抽出し、モノクローナル抗体や患者血清、コレラ毒素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ガングリオシド(GM1、GD1a、GQ1b)様 LOS の分布を決定した。
- (3) 各主治医より供与された患者サマリーをもとに、*C. jejuni* 分離患者の神経所見に関するデータを集計した。さらに患者の急性期血清を用いて、各種ガングリオシド

(GM2、GM1、GD1a、GalNAc-GD1a、GD1b、GD2、GT1b、GQ1b)に対する IgG 抗体を ELISA 法により測定した。

(4) *cst-II* 遺伝子多型がガングリオシド様 LOS や血中 IgG 抗ガングリオシド抗体、神経所見と関連がみられるか、Fisher の直接確率法を用いて統計学的に検討した。

(5) 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) GBS 105 株中 89 株(85%)が *cst-II* 遺伝子を有しており、腸炎株(51%)と比べ高頻度であった($P<0.001$)。*cst-II* (Asn 51)株は他の株と比べて高頻度に GQ1b 様 LOS を発現していた(83% vs 3%: $P<0.001$)。さらに、*cst-II* (Asn 51)株が分離された症例は、血中に IgG 抗 GQ1b 抗体を有し(56% vs 8%: $P<0.001$)、外眼筋麻痺(64% vs 13%: $P<0.001$)や運動失調(42% vs 11%: $P=0.001$)をきたしやすいことがわかった。
- (2) *cst-II* (Thr 51)株は他の株と比べて高頻度に GM1(92% vs 21%: $P<0.001$)や GD1a(91% vs 2%: $P<0.001$)様 LOS を発現していた。さらに、*cst-II* (Thr 51)株が分離された症例は、血中に IgG 抗 GM1 抗体(88% vs 35%: $P<0.001$)や IgG 抗 GD1a 抗体(52% vs 24%: $P=0.006$)を有し、ほとんどの症例が四肢脱力を呈していた(98% vs 71%: $P<0.001$)。

D. 考察

GBS の臨床像の多様性が、先行感染病原体の遺伝子レベルで規定されていることが示された。つまり、*C. jejuni* の *cst-II* 遺伝子多型(Asn/Thr 51)により、菌体 LOS 上のガングリオシド様構造にバリエーションが生じ、その結果、GBS の神経所見や自己抗体の反応特異性が規定されていることが示された。この所見は、発症機序の面か

ら *C. jejuni* と GBS とが密接に関連していることを示すだけでなく、先行感染病原体上のガングリオシドエピトープが交叉抗原として GBS 発症に深く関与することを示すものである。

E. 結論

GBS 患者における臨床像（自己抗体や神経所見）の多様性は、先行感染病原体 *C. jejuni* の遺伝子多型により規定されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Koga M, Gilbert M, Li J, Koike S, Takahashi M, Furukawa K, Hirata K, Yuki N.
Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry.
Neurology (in press)

Takahashi M, Koga M, Yokoyama K, Yuki N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni*-isolated Guillain-Barré and Fisher syndromes in Japan.
J Clin Microbiol 2005;43:335-339.

Kuwabara S, Yuki N. Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barré syndrome? Reply.
Neurology 2005;64:766.

Godschalk PCR, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HPH.
The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in the Guillain-Barré syndrome.
J Clin Invest 2004;114:1659-1665.

Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M.
Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome.
Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:11404-11409.

Susuki K, Nishimoto Y, Koga M, Nagashima T, Mori I, Hirata K, Yuki N.
Various immunization protocols for an acute motor axonal neuropathy rabbit model compared.
Neurosci Lett 2004;368:63-67.

Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanesaka T, Hattori T, Yuki N.
Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barré syndrome?
Neurology 2004;63:529-533.

Nishimoto Y, Koga M, Kamijo M, Hirata K, Yuki N.
Immunoglobulin improves a model of acute motor axonal neuropathy by preventing axonal degeneration.
Neurology 2004;62:1939-1944.

Nagashima T, Koga M, Odaka M, Hirata K, Yuki N.
Clinical correlates of serum anti-GT1a IgG antibodies.
J Neurol Sci 2004;219:139-45.

Susuki K, Yuki N.
Effect of methylprednisolone in patients with Guillain-Barré syndrome.
Lancet 2004;363:1236-1237.

Susuki K, Atsumi M, Koga M, Hirata K, Yuki N.
Acute facial diplegia and hyperreflexia: a Guillain-Barré syndrome variant.
Neurology 2004;62:825-827.

Susuki K, Odaka M, Mori M, Hirata K, Yuki N.
Acute motor axonal neuropathy after *Mycoplasma* infection: evidence of molecular mimicry.
Neurology 2004;62:949-956.

Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Yuki N.
Usefulness of anti-GQ1b IgG antibody testing in Fisher syndrome compared with cerebrospinal fluid examination.
J Neuroimmunol 2004;148:200-205.

Galassi G, Susuki K, Quaglini D, Yuki N.
Post-infectious acute ataxia and facial diplegia associated with anti-GD1a IgG antibody.
Eur J Neurol 2004;11:790-791.

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.
Review Series Pediatrics 2004;2:22-23.

Odaka M, Yuki N, Tatsumoto M, Tateno M, Hirata K.
Ataxic Guillain-Barré syndrome associated with anti-GM1b and anti-GalNAc-GD1a antibodies
J Neurol 2004;251:24-29.

Mori I, Koga M, Hirata K, Yuki N.
Hand weakness onset Guillain-Barré syndrome.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:169-170.

Pan CL, Shun CT, Susuki K, Yuki N, Hsieh ST.
Pharyngeal-brachial palsy after cytomegalovirus colitis.
Neurology 2004;62:153-154.

Matsuo M, Odaka M, Koga M, Tsuchiya K, Hamasaki Y, Yuki N.
Bickerstaff's brainstem encephalitis associated with IgM antibodies to GM1b and GalNAc-GD1a.
J Neurol Sci 2004;217:225-228.

2. 学会発表

国内

Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M.
"Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome"
Gordon Research Conferences. Glycolipid & Sphingolipid Biology.
Hyogo, Japan. July 26-29, 2004.

海外

Yuki N. “Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipo-oligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome”
Symposium on Glyco-Neurobiology-Glycolipids,
Glycoproteins and other Glycoforms.
A Satellite Meeting of the Biennial Meeting of the
International and Asia-Pacific Societies for Neurochemistry.
Taipei, Taiwan. February 11, 2004.

Yuki N. “Molecular mimicry and disease model of
Guillain-Barré syndrome” Symposium on Peripheral
Neuropathies and Inflammation. 7th International Congress of
Neuroimmunology.
Venice, Italy. October 1, 2004.

Yuki N. “Carbohydrate mimicry between human ganglioside
GM1 and *Campylobacter jejuni* lipo-oligosaccharide causes
Guillain-Barré syndrome” Session: Glycobiology and Disease
US/Japan Glyco 2004: Joint Meeting of the Society for
Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate
Research.
Honolulu, Hawaii, USA. November 20, 2004.

Yuki N. Keynote lecture “Immunopathogenesis of acute motor
axonal neuropathy and action mechanism of IVIG” IVIG in
Neurological Disease 1st Asia Pacific Symposium.
Singapore. November 25, 2004.

Yuki N. Plenary lecture “Recent ideas on the
immunopathogenesis of axonal GBS”
11th Asian & Oceanic Congress of Neurology . Singapore.
November 28, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

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

有髄神経の隣り合う髄鞘の間には、ランビエ絞輪と呼ばれる間隙があり、その周辺の軸索膜上に局在する電位依存性イオンチャンネルにより、活動電位の速やかな跳躍伝導がなされる。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では、末梢神経伝導速度の遅延が認められる。その神経伝導異常の機序を解明すべく、免疫組織化学的にイオンチャンネルの局在を検索した。軸索と髄鞘とが結合している傍絞輪部には、本来イオンチャンネルは存在しないが、ガングリオシド欠失マウスの坐骨神経で、一部の傍絞輪部にカリウムチャンネルの染色を認めた。この異常は、高週齢になるほど頻度が増加した。電子顕微鏡による観察で、一部の髄鞘ループが軸索膜から解離しているのが確認され、傍絞輪部の構造異常が裏付けられた。坐骨神経組織標本の検索では、髄鞘化の障害や脱髄は認めなかった。ガングリオシドは、軸索と髄鞘との結合、そして電位依存性イオンチャンネルの適切な局在化に働くことで、有髄神経伝導機能の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

軸索型ギラン・バレー症候群は、代表的な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抗体が病因物質とされている。自己抗体の標的分子であるガングリオシドは、神経伝導に重要な働きを有していると考えられているが、その詳細はまだ明らかにされていない。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、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。

有髄神経の隣り合う髄鞘の間には、ランビエ絞輪と呼ばれる間隙があり、その周辺の軸索膜上に局在する電位依存性イオンチャンネルによって、活動電位の速やかな跳躍伝導がなされる。昨年度、複合型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坐骨神経で、運動神経伝導速度が遅延していることを確認した。今年度は、その伝導障害の機序を明らかにすべく、ランビエ絞輪周辺のイオンチャンネル局在に着目し、検索した。

B. 研究方法

(1) 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)。灌流固定の後、坐骨神経を摘出し、凍結切片を作製した。電位依存性ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル、Caspr(傍絞輪部で軸索と髄鞘との結合に関与する蛋白)に対する抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。

(2) 電子顕微鏡で、ガングリオシド欠失マウスの坐骨神経におけるランビエ絞輪部微細構造を観察した(岩手医科大学バイオイメージングセンター遠山稿二郎教授との共同研究)。

(3) 灌流固定を行い、マウスの坐骨神経を摘出した。エポキシ包埋の後、トルイジンブルー染色標本を作製した。

(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) ガングリオシド欠失マウスでは、一部の傍絞輪部にカリウムチャンネルの染色が認められた。傍絞輪部では、軸索と髄鞘とが固く結合しており、本来イオンチャンネルは存在しない。軸索と髄鞘との結合に働くCasprの染色は減衰していた。したがって、これらの所見からは軸索と髄鞘との結合の異常が推測される。傍絞輪部におけるカリウムチャンネル染色の頻度は、12週齢では37%、48週齢では54%と、高週齢になるにしたがって頻度が増加した。また、ナトリウムチャンネルはほぼ正常に染色されたが、その集簇の長さが、野生型($1.26 \pm 0.26 \mu\text{m}$)に比べガングリオシド欠失マウス($1.48 \pm 0.31 \mu\text{m}$)では、有意に延長していた($p < 0.001$)。

(2) 電子顕微鏡で、一部の髄鞘ループが軸索膜から解離しているのが確認され、傍絞輪部の構造異常が裏付けられた。

(3) 坐骨神経組織標本の検索では、髄鞘化の障害や脱髄など、伝導速度遅延をきたす形態異常は認めなかった。

D. 考察

ガングリオシドの欠失により、傍絞輪部における軸索と髄鞘との結合、そして電位依存性イオンチャンネルの集簇に異常を生じ、その結果、神経伝導速度の遅延などの伝導異常を生じるものと考えられる。軸索型ギラン・バレー症候群の急性期には、ガングリオシドに対する自己抗体により、運動神経のランビエ絞輪周辺が傷害され、運動麻痺を生じる。その発症機序を解明するうえで、新たな知見である。

E. 結論

ガングリオシドは、軸索と髄鞘との結合、そして電位依存性イオンチャンネルの適切な局在化に働くことで、有髄神経伝導機能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