

Z00500969A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 楠 進

平成18年(2006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. 抗 GD1b 抗体単独陽性血清を用いた抗ガングリオシド抗体の ..... 4  
ganglioside-complex に対する反応特異性の検討  
楠 進
2. 免疫性ニューロパチー血中抗ガングリオシド抗体の反応性に及ぼす ..... 8  
リン脂質の影響  
楠 進
3. 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 ..... 11  
ギラン・バレー症候群  
結 城 伸 泰
4. 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 ..... 14  
結 城 伸 泰
5. ヒト動眼神経における GQ1b 糖鎖と各種糖脂質糖鎖の ..... 16  
colocalization の検討  
千 葉 厚 郎

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 19

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 25

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、一昨年度および昨年度、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検討を行ったが、本年度はガングリオシドが複合体を形成して新たなエピトープを作っていることを確認するため、抗 GD1b 抗体単独陽性血清のガングリオシド複合体との反応性を検討した。

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することを報告していたが、そのメカニズムとして先行感染時に GM1 とリン脂質が同時に患者の免疫システムに認識されて、GM1 と酸性リン脂質の混合抗原により強く反応する抗体が産生されるという仮説を検証した。

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)合成酵素遺伝子多型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傍絞輪部におけるイオンチャンネル局在の異常を報告していたが、今年度は軸索障害型 GBS のモデルとなるウサギの絞輪部およびその周囲について病理学的に検討した。

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 糖鎖と各種糖脂質糖鎖の colocalization を検討した。

### B. 研究方法

GBS 急性期血清について従来から施行している ELISA 法にて 11 種類の抗糖脂質抗体を測定し、IgG 抗 GD1b 抗体単独陽性の血清を選択した。GD1b と他の 10 種類の糖脂質抗原のうちの 1 種とを混合し、選択した血清におけるそれらに対する IgG 抗体活性を ELISA 法で検討した。

抗 GM1 IgG 抗体陽性 GBS と抗 GQ1b IgG 抗体陽性のフィッシャー症候群について、先行感染と抗体活性におよぼすリン脂質の影響を比較検討した。また GM1 と phosphatidic acid (PA)の混合物をウサギに接種して、得られた抗体が、GM1 よりも GM1 に PA を加えた混合抗原により強く反応するか否かを検討した。

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 LOS 合成関連遺伝子座 (クラス A-F) を、各クラス特異的遺伝子を PCR 法で増幅させることにより決定した。また *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。LOS 上のガングリオシド様エピトープは、各モノクローナル抗体をプローブとして検討した。

軸索型 GBS のモデルとなるウサギについて、電顕を用いて絞輪部およびその周囲の変化を検討した。また免疫組織化学的に IgG や補体の沈着、イオンチャネルや Caspr の局在を検討した。

ヒトの動眼神経の凍結切片を抗 GQ1b モノクローナル抗体、およびその他のガングリオシドに対するモノクローナル抗体により免疫染色し、蛍光二重染色像を観察した。(倫理面への配慮)

各分担報告参照。

### C. 研究結果と D. 考察

IgG 抗 GD1b 抗体単独陽性 GBS20 例の血中抗体の、GD1b に他のガングリオシドを混合した抗原との反応性の解析から、その反応性には少なくとも 5 つのパターンと分類不能の群があることがわかった。5 つのパターンのうち 4 つでは、混合抗原を用いることにより抗体活性のなんらかの低下がみられ、GD1b が他のガングリオシドの糖鎖と interaction することにより、新たなエピトープを形成することが示唆された。また残りの 1 つのパターンは眼球運動麻痺を伴うもので GQ1b や GT1a との混合により反応性が著明に増強するものであり、GQ1b や GT1a と GD1b の複合体に特異性

をもつものであった。抗 GQ1b 抗体陰性でも GQ1b と他のガングリオシドとの複合体を認識して眼球運動麻痺をきたす場合があることに、今後留意する必要がある。

GM1 と PA を混合して完全フロイントアジュバントと共に接種したウサギと、GM1 のみをアジュバントと共に接種したウサギでは、どちらも抗 GM1 抗体が上昇したが、前者の抗体が GM1 単独よりも GM1 と PA の混合抗原により強く反応するということはなかった。この結果は、先行感染時に *C.jejuni* などの菌体のもつリン脂質が GM1 様糖鎖と共に患者免疫系に認識されるために、PA 共存時により強く反応する抗体が産生されるという仮説を支持するものではなかった。昨年報告したように、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。

GBS 株の 68% がクラス A であり、腸炎株と比べて有意に高頻度であった。クラス A の菌株の中でも GBS 株では Penner の血清型で HS:19 の割合が高く、高頻度に GM1/GD1a エピトープを発現していた。昨年度報告のように *cst-II* (Thr51) 型は GM1 や GD1a 様リポオリゴ糖合成を促し、HS:19 型と密接に関連する。クラス A 遺伝子座に加え HS:19 型であることが、抗 GM1 や抗 GD1a 抗体を誘導して GBS 発症のリスクを高めると考えられる。

軸索型 GBS モデルウサギでは、前根に伝導障害が存在することが電気生理学的に示唆され、病理学的には同部に異常に開大した Ranvier 絞輪がみられた。また免疫組織学的に IgG および補体の絞輪部への沈着がみられ、一部傍絞輪部へも拡大していた。

絞輪部 Na チャネルや傍絞輪部 Caspr の染色が減衰していた。絞輪部への抗体の結合により、絞輪部および傍絞輪部の構造が傷害され、ニューロパチーをきたすと考えられた。

抗 GQ1b モノクローナル抗体と抗 GD1b モノクローナル抗体の二重染色により、ヒト動眼神経の傍絞輪部に染色がみられ、それらは colocalize していた。一方、抗 GM3 抗体によっても、同神経の傍絞輪部の染色がみられたが、それは、抗 GQ1b 抗体によるものとの colocalization は認められなかった。前述のようにわれわれは、二つのガングリオシド分子が複合することによる新たな抗原エピトープを標的とする抗体が GBS にみられることを報告しており、GQ1b と GD1b の colocalization はそのような抗体の標的になる可能性があることから、今後さらに詳細な検討を行う必要がある。

#### E. 結論

二つの異なるガングリオシドの糖鎖は、共存することにより新たなエピトープ（ガングリオシド複合体）を形成する。GBS 血中には、そのような複合体に特異的な抗体がみられる一方、単独のガングリオシドに特異的な抗体の活性は複合体の形成により低下する。

リン脂質が GBS の抗ガングリオシド抗体の活性に及ぼす効果は、標的抗原により異なるが、先行感染時の感作のされ方ではなく、抗体の認識するエピトープのもつ電荷の強さにより規定される。

*C.jejuni* のもつガングリオシド様 LOS は、特定の遺伝子座により決定され、LOS の糖

鎖構造により GBS の惹起しやすさが規定される。

軸索障害型 GBS のモデルウサギでは、抗体と補体により絞輪部障害がおこり、傍絞輪部に波及して運動神経伝導障害をきたす。

ヒト動眼神経では傍絞輪部において GQ1b と GD1b が colocalize しており、それとは別に GM3 の局在もみられる。これらの標的抗原としての意義を今後解明する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

抗 GD1b 抗体単独陽性血清を用いた抗ガングリオシド抗体の ganglioside-complex に対する  
反応特異性の検討

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部 神経内科・教授

## 研究要旨

我々はガングリオシド複合体 GD1a/GD1b に対する IgG 抗体を Guillain-Barré 症候群(GBS)患者血清中に初めて見出し、一昨年に新たな標的抗原として報告し、昨年はその臨床的意義を解析した。今回は従来のスクリーニングで抗 GD1b IgG 抗体単独陽性と判定された GBS 血清を用いて様々な GSCs に対する反応特異性を解析した。その結果 IgG 抗 GD1b 抗体が単独陽性であってもその反応特異性は一様ではなく、その抗原抗体反応は GD1b と共存する糖脂質の種類に大きく影響されることがわかった。ガングリオシドは他のガングリオシドとともに生体膜上で全く新しいエピトープを形成し、それが抗原抗体反応を規定していると考えられた。標的抗原への affinity は生体膜上で共存する糖脂質の種類に左右され、それが神経症状の多様性に関わっている可能性がある。

### A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群(GBS)の約 60%の症例にみられる抗ガングリオシド抗体は発症に関与し、その反応性が神経症候を規定していると考えられている。しかし同種の抗体を持っていてもその神経症状は必ずしも一様ではないことがある。これには標的抗原への accessibility および avidity (結合活性)の違いが関与していると考えられる。ガングリオシドは生体膜上で複合体を形成して存在しており、その複合体形成が抗体の標的抗原への avidity を規定している可能性がある。我々は GBS における新たな標的抗原としてガングリオシド複合体(GSCs)を見出し報告した(Kaida et al: Ann Neurol 2004;56:567)。抗ガングリオシド抗体の病因的意義の解明には様々な GSCs のエピトープに対する avidity を解析するこ

とが重要である。今回従来のスクリーニングで抗 GD1b 抗体単独陽性と判定された GBS 血清を用いて様々な GSCs に対する反応特異性を解析した。

### B. 研究方法

1997年11月から2005年11月の間に集められた GBS 急性期血清を用いて、11種の糖脂質抗原(各 200ng)に対する IgG 抗体を測定した。その中から IgG 抗 GD1b 抗体単独陽性の血清を選び対象とした。この対象血清に関して GSCs に対する反応特異性を解析するため、GD1b とその他の 10 種の糖脂質抗原のうち 1 種を混合し、全部で 10 種の複合体抗原を作成した。混合比率は 100ng:100ng とし、各 IgG 抗 GSCs 抗体を測定した。抗原量 100ng で IgG 抗 GD1b 抗体を測定し、その補正 OD 値を基準とし

て各抗 GSCs 抗体の補正 OD 値との比を算出した。また一部の対象血清を用いて、ある GSCs に対する反応を各抗原の混合比率を変化させながら補正 OD 値の変化を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は近畿大学の倫理委員会において承認を受けた。血中抗体測定については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

### C. 研究結果

IgG 抗 GD1b 抗体単独陽性 GBS20 例についてそれぞれ反応性を解析した。各 GSCs 抗原に対する補正 OD 値のパターンから、抗 GD1b 抗体の反応特異性は少なくとも以下の 6 つのタイプに大別された。1) GD1a, GT1a, GT1b, GQ1b との混合で活性がほぼ消失するタイプ (3 例)。2) GM1, GA1 との混合以外は活性が減弱するタイプ (5 例)。3) GD1a, GT1a との混合で活性が強く減弱し、GM1, GD3, GA1 との混合では活性が保たれるタイプ (4 例)。4) GT1a との混合で活性がほぼ消失するが、他の組み合わせでは活性が保たれるタイプ (2 例)。5) GT1a, GQ1b との混合で活性が増強されるタイプ (2 例)。6) それ以外のタイプ (4 例)。タイプ 1) の血清を用いて GD1b/GD1a, GD1b/GM1 に対する反応を GD1a, GM1 の含有量を変えながら補正 OD 値の変化をみたところ、抗 GD1b 抗体活性は GM1 を加えても変わらないが、GD1a を混合するとほぼ消失した。

### D. 考察

今回の結果は、抗 GD1b 抗体が単独陽性であってもその反応特異性は一様ではなく、その抗原抗体反応は GD1b と共存する糖脂質の種類に大きく影響されることを示した。全体として、GD1b に何らかの糖脂質抗原を混ぜることにより抗体活性は低下することが多かったが、このことは GD1b が他の糖脂質抗原の糖鎖と interaction することにより、新たなエピトープを形成することを示唆している。

一方 5) のタイプの抗体は GQ1b と GD1b および GT1a と GD1b の混合で新たに形成されたエピトープを特異的に認識する抗体と考えられる。この 2 例はいずれも眼球運動麻痺を伴っていた。抗 GQ1b 抗体陰性でも、GQ1b と他のガングリオシドとの複合体を認識して眼球運動麻痺をきたす場合があることに、今後留意する必要がある。

抗ガングリオシド抗体の標的抗原への affinity および avidity は生体膜上で共存する糖脂質の種類に左右され、それが神経症状の多様性に関わっている可能性が考えられた。

### E. 結論

GSCs で形成される多様なエピトープが、抗ガングリオシド抗体の標的抗原への affinity に強く影響する。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S. Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol* 159:129-132, 2005.
2. 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* 10:190-201, 2005
3. Mitsui Y, Mitsui M, Urakami R, Kihara M, Takahashi M, Kusunoki S. Behçet disease presenting with neurological complications immediately after conversion from conventional cyclosporin A to microemulsion formulation. *Intern Med* 44:149-152, 2005
4. Uchibori A, Sakuta M, Kusunoki S, Chiba A. Autoantibodies in post-infectious acute cerebellar ataxia. *Neurology* 65:1114-1116, 2005
5. Kuzumoto Y, Shioyama M, Kihara M, Kusunoki S. Abnormal sudomotor axon reflex and antiganglioside antibodies. *Muscle Nerve*, in press.
6. Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press.
2. 学会発表
  - 1) 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。Ganglioside complex に対する抗体をもつ Guillain-Barré 症候群の臨床的解析。第46回日本神経学会総会(2005年5月25日~5月27日、鹿児島)
  - 2) 楠 進。抗ガングリオシド抗体研究の新たな展開。第16回日本末梢神経学会学術集会(2005年7月22日~7月23日、金沢)
  - 3) 海田賢一、神崎真実、平川美菜子、鎌倉恵子、元吉和夫、楠 進。抗ガングリオシド抗体のガングリオシド複合体に対する反応特異性の検討。第18回日本神経免疫学会学術集会(2006年3月2日~3月3日、名古屋)
  - 4) Kaida K-I, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability and mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. 2005 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Tuscany, Italy, July 9-13, 2005.
  - 5) Kaida K-I, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-GD1a/GD1b complex antibody is associated with severe disability and mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. 130th Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, USA, September 25-28, 2005.



#### 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

## 研究要旨

Guillain-Barré 症候群の患者血清抗 GM1 IgG 抗体活性は GM1 単独よりも GM1 と 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し、一方抗 GQ1b IgG 抗体ではそのような増強効果はない。そのような違いを生じる機序として先行感染時の感作のされ方の違いのためである可能性が考えられる。そこで、先行感染因子の違いによりリン脂質の影響が異なるか、GM1 と PA を混合して感作した時に両者の混合抗原に強く反応する抗体ができるかを検討した。その結果、呼吸器感染と消化器感染で抗体の反応性に対するリン脂質の影響に差はなく、GM1 と PA の混合抗原を感作して得た血清中の抗体は GM1 と PA に強く反応することはなかった。以上より、感作のされ方ではなく、昨年度報告したように抗体の認識するガングリオシドのもつエピトープの持つ電荷の多寡が重要と考えられた。

### A. 研究目的

ガングリオシドは生体膜においてリン脂質と共存することから、抗体の作用を考える上で、リン脂質の影響を調べることは必要である。Guillain-Barré 症候群 (GBS) 血中の抗 GM1 IgG 抗体の活性は、GM1 単独よりも GM1 とホスファチジン酸 (PA) などの酸性リン脂質を中心とする複数のリン脂質の混合抗原に対してより強く反応する。一方、Fisher 症候群 (FS) の血中にみられる抗 GQ1b IgG 抗体では、これらの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い。

GM1 と GQ1b のもつシアル酸の数の違いが、上記のリン脂質の効果の違いの原因である可能性が考えられる。昨年度われわれは、GM1 と GQ1b の特徴を合わせ持つ GD1b に対する IgG 抗体活性に及ぼす各種リン脂質の影響を検討した。その結果抗 GD1b IgG 抗体の反応性は、ジシアロシル基が認識に関わる 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、GM1, GD1b, GA1

のいずれにも反応する抗体 (Gal-GalNAc 基を認識する) においてはリン脂質による増強効果が認められ、強い陰性荷電をもつジシアロシル基が抗体の認識に関わるか否かがリン脂質の効果と関連することが示唆された。

もうひとつの可能性として、先行感染の際の感作のされ方の違いがある。抗 GM1 抗体は *C.jejuni* による消化器感染後にみられることが多いが、抗 GQ1b 抗体上昇に先行するのは大部分が呼吸器感染である。そこで、*C.jejuni* 感染の際には、GM1 様エピトープが菌体のもつリン脂質と同時に免疫系に認識され、ある種のリン脂質と GM1 の混合抗原に強く反応する抗体が産生されるが、呼吸器感染の際にはそのようなことがないためリン脂質による増強効果がないという可能性が考えられる。本年度はこの点を明らかにするため、先行感染の病原体の違いによって抗体活性に対するリン脂質の影響が異なるかどうかを検討し、また GM1 または GM1 と PA の混合抗原をウサギに

接種して抗体の反応性をしらべた。

## B. 研究方法

以前に報告した抗 GM1 IgG 抗体陽性の GBS30 例および抗 GQ1b IgG 抗体陽性の FS30 例の先行感染について調査し、抗体の反応性ととの関連を検討した。

GM1 あるいは GM1 と PA の混合物を各々 9 羽の日本白色種ウサギに接種し、得られた抗体の反応性を調べた。GM1 0.5mg もしくは GM1 0.5mg と PA 0.5mg を完全フロイントアジュバントとともに足底、足背に接種し、初回感作の 3 週間後に同量の抗原を背部の皮下に接種した。そのウサギから得られた血清中の抗 GM1 抗体について、GM1 単独およびリン脂質との混合抗原に対する抗体活性を ELISA 法で測定し比較検討した。

用いたリン脂質は PA、PI、PS、LPE、AM、PE、PC、LPC、CL の 9 種類である。(倫理面への配慮)

本研究は近畿大学の倫理委員会において承認を受けた。血中抗体測定については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。動物実験については、動物愛護の観点より、近畿大学の動物実験指針の範囲内で行われた。

## C. 研究結果

抗 GM1 IgG 抗体陽性 30 例の先行感染は、消化器感染 16 例、呼吸器感染 8 例であった。抗体の反応性に及ぼす各リン脂質の効果には、先行感染による有意な違いはみられなかった。抗 GQ1b IgG 抗体陽性の FS30 例の先行感染は、呼吸器感染 17 例、消化器感染が 2 例であった。消化器感染が先行した 2 例においても、抗体活性のリン脂質による増強効果は認

めなかった。

GM1 と PA を感作したウサギにおいて、GM1 単独抗原に比して GM1 と PA の混合抗原により強く反応する抗体は得られなかった。GM1 と PA を接種したウサギ 9 羽のうち、2 羽において筋力低下が認められた。GM1 を接種したウサギ 9 羽では明らかな症状は認められなかった。坐骨神経を病理学的に検討したところ、GM1 と PA を接種したウサギ 5 羽のうち、3 羽(筋力低下をきたしたウサギ 2 羽を含む)に軽度の軸索障害があり、2 羽が正常であった。GM1 接種ウサギは 4 羽のうち 3 羽に軽度の軸索障害を認めた。

## D. 考察

抗 GM1 IgG 抗体および抗 GQ1b IgG 抗体陽性症例における先行感染ごとの抗体活性の検討と、ウサギの感作実験による検討から、「先行感染の病原体のもつガングリオシド様糖鎖とリン脂質が一緒に免疫システムにより認識されて、リン脂質との混合抗原に対して高い活性をもつ抗体が作られる」という仮説は否定的であると考えられた。

## E. 結論

抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果を規定する要因としては、昨年度報告したように抗体の認識するエピトープの持つ電荷の強さが主要なものであると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S. Effects of phospholipids

- on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol* 159:129-132, 2005.
2. 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* 10:190-201, 2005
  3. Mitsui Y, Mitsui M, Urakami R, Kihara M, Takahashi M, Kusunoki S. Behçet disease presenting with neurological complications immediately after conversion from conventional cyclosporin A to microemulsion formulation. *Intern Med* 44:149-152, 2005
  4. Uchibori A, Sakuta M, Kusunoki S, Chiba A. Autoantibodies in post-infectious acute cerebellar ataxia. *Neurology* 65:1114-1116, 2005
  5. Kuzumoto Y, Shioyama M, Kihara M, Kusunoki S. Abnormal sudomotor axon reflex and antiganglioside antibodies. *Muscle Nerve*, in press.
  6. Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press.
- 2) Hirakawa M, Sada M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S. The effects of phospholipids on the activity of antiganglioside antibodies. 2005 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Tuscany, Italy, July 9-13, 2005.

#### 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

#### 2. 学会発表

- 1) 楠 進. 抗ガングリオシド抗体研究の新たな展開。第16回日本末梢神経学会学術集会 (2005年7月22日～7月23日、金沢)

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

目的:ギラン・バレー症候群(GBS)の発症リスクを高める *Campylobacter jejuni* 遺伝子を同定する。方法:GBS や類縁疾患患者の糞便より分離された *C. jejuni* 138 株を用いて、リポオリゴ糖(LOS)合成関連各遺伝子の有無を PCR 法で決定し、遺伝子組成パターンを A から F (Gilbert ら)にクラス分けした。結果:GBS 株の 68%がクラス A で、腸炎株(103 株中 17%)と比べ有意に高頻度であった。クラス A 遺伝子座には GM1/GD1a 様 LOS 合成に必要な糖転移酵素遺伝子が全て含まれ、クラス A 株の多くは GM1 様 LOS (79%)や GD1a 様 LOS (76%)を有し、クラス A 株が分離された患者血中には抗 GM1/GD1a 抗体が高頻度に検出された。ロジスティック回帰分析でも、HS:19 型とクラス A 遺伝子座が GBS 発症の危険因子であることが確認された。考察:*C. jejuni* クラス A 遺伝子座により GM1 や GD1a 様 LOS が合成され、抗ガングリオシド抗体産生、GBS 発症が促される。

### A. 研究目的

*Campylobacter jejuni* 腸炎患者の千人に一人がギラン・バレー症候群(GBS)を続発するが、GBS 発症の規定因子は不明である。本邦では腸炎患者由来株と比べ GBS 由来株は血清型 HS:19 の頻度が高いと報告されている。しかし、その意義は明らかにされていないばかりでなく、欧米諸国では同様の傾向は確認されていない。本菌感染後 GBS の発症に、菌体リポオリゴ糖(LOS)上に存在するガングリオシド様構造が重要と考えられることから、その生合成に関わる酵素遺伝子座の解析がオランダ、ベルギーの GBS 由来株を用いて行われ、GBS 由来株はクラス A 遺伝子座を有する頻度が高いことが報告された(Godschalk et al. *J Clin Invest* 2004)。今回、同様の傾向が本邦でもみられるかを検討し、さらに GBS 発症の細菌側危険因子に関して包括的に解析を行った。

### B. 研究方法

1. 対象:GBS や関連疾患患者の糞便より分離培養された *C. jejuni* 138 株。対照として、腸炎患者由来 *C. jejuni* 103 株を用いた。
2. 菌の分析:各 LOS 合成関連遺伝子座(クラス A-F)に特異的に存在する遺伝子(Gilbert et al. *J Biol Chem* 2002; 277: 327-37)を PCR 法にて増幅させることにより、LOS 遺伝子座のクラスを決定した。遺伝子多型 *cst-II* (Thr/Asn51)はダイレクトシーケンシングで、LOS 上ガングリオシド・エピトープ(GM1, GD1a, GQ1b)の分布はモノクローナル抗体をプローブとして用いた ELISA 法で、Penner 血清型は受身赤血球凝集反応で決定した。
3. 患者血中抗ガングリオシド抗体: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. 統計解析:単変量解析は Fisher の直接確率法、多変量解析はロジスティック回帰分析法で行った。
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. LOS 合成関連遺伝子座: GBS 株の 68%がクラス A であり、腸炎株(17%)と比べ高頻度であった( $P<0.001$ )。
2. ガングリオシド様 LOS: クラス A の菌株は、GM1 と GD1a エピトープの両者を有していることが多く、このような傾向は他のクラスの菌株ではみられなかった(図 1)。
3. 患者血中抗ガングリオシド抗体: クラス A 菌が分離された患者の血中には、IgG 抗 GM1、抗 GD1a 抗体が高頻度に検出された(各 72%、51%)。
4. Penner 血清型: クラス A の菌株の多くは HS:19 であり、クラス A の菌株の中でも GBS 株では腸炎株と比べ HS:19 の割合が高く、より高頻度に GM1/GD1a エピトープを発現していた。
5. GBS の危険因子: 単変量解析では GBS の危険因子として、クラス A 遺伝子座、HS:19、GM1 様 LOS、GD1a 様 LOS、*cst-II* (Thr51)が検出された。これらを変数としてロジスティック回帰分析を行った結果、HS:19 型(オッズ比, 16.5; 95%信頼区間, 4.0-68.8;  $P<0.001$ )とクラス A 遺伝子座(オッズ比, 5.6; 95%信頼区間, 2.1-15.1;  $P=0.001$ )が独立した危険因子として検出された。

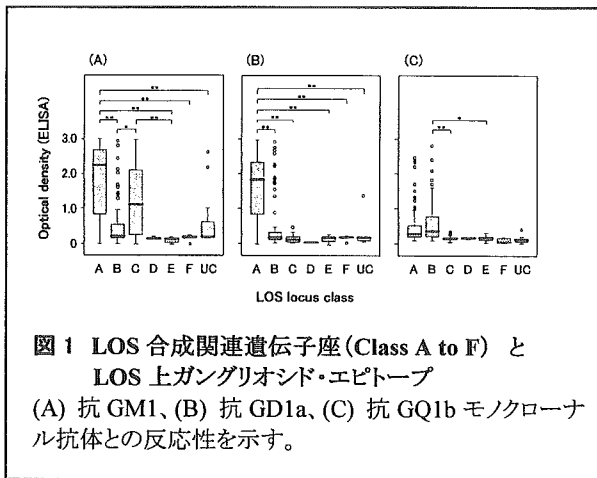


図1 LOS合成関連遺伝子座(Class A to F)とLOS上 ganglioside・エピトープ (A) 抗 GM1、(B) 抗 GD1a、(C) 抗 GQ1b モノクローナル抗体との反応性を示す。

#### D. 考察

今回の検討の結果、欧米と本邦とで共通する GBS 発症危険因子としてクラス A LOS 合成関連遺伝子座が初めて同定された。クラス A 遺伝子座には、ganglioside 様 LOS 合成に必要な糖転移酵素の遺伝子が全て含まれている(図 2)。さらに *cst-II*(Thr51)型は GM1/GD1a エピトープ合成を促す器質特異性を有し、HS:19 型と密接に関連することから、クラス A 遺伝子座に加え HS:19 型であることで、GM1/GD1a 様 LOS の合成が促進され、患者血中に抗 GM1/GD1a 抗体を誘導し、GBS 発症のリスクを高めると考えられる。

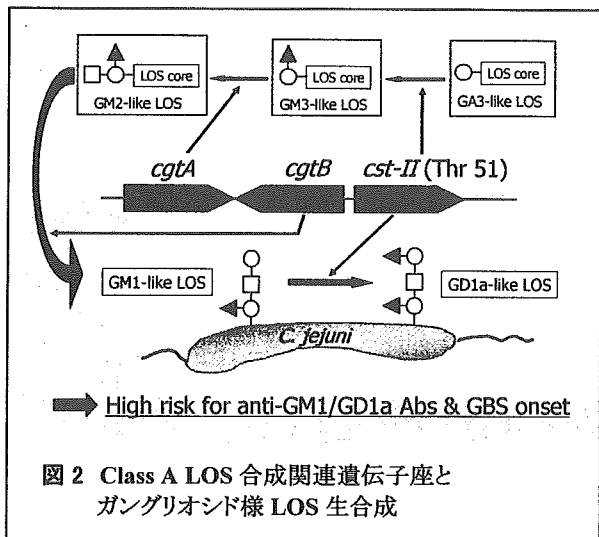


図2 Class A LOS 合成関連遺伝子座と ganglioside 様 LOS 合成

#### E. 結論

特定の遺伝子座を有する *C. jejuni* は、菌体上に ganglioside 様 LOS を発現する結果、GBS を惹起しやすくなることがわかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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

Goodfellow JA, Bowes T, Sheikh K, Odaka M, Halstead SK, Humphreys PD, Wagner ER, Yuki N, Furukawa K, Furukawa K, Plomp JJ, Willison HJ.

Overexpression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody-mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy.

*J Neurosci* 2005;25:1620-1628 (selected for the 'This Week in The Journal' section in the issue)

Kuwabara S, Yuki N.

Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barré syndrome?: reply. *Neurology* 2005;64:767.

Hiraga A, Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Kanesaka T, Koga M, Yuki N, Hattori T, Mori M

Patterns and serial changes in electrodiagnostic abnormalities of axonal Guillain-Barré syndrome.

*Neurology* 2005;64:856-860.

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* 2005;64:1605-1611.

Odaka M, Tatsumoto M, Hoshiyama E, Hirata K, Yuki N.

Side effects of combined therapy of methylprednisolone and intravenous immunoglobulin in Guillain-Barré syndrome.

*Eur Neurol* 2005;53:194-196.

Odaka M, Tatsumoto M, Susuki K, Hirata K, Yuki N.

Intractable chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy treated successfully with ciclosporin.

*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1115-1120.

Yuki N, Odaka M.

Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barré syndrome.

*Curr Opin Neurol* 2005;18:557-561.

Li J, Koga M, Brochu D, Yuki N, Chan K, Gilbert M.

Electrophoresis-assisted open-tubular liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of lipooligosaccharide expressed by *Campylobacter jejuni*.

*Electrophoresis* 2005;26:3360-3368.

Yuki N.

Carbohydrate mimicry: a new paradigm of autoimmune diseases.

*Curr Opin Immunol* 2005;17:577-582.

Pandey JP, Koga M, Yuki N.

Immunoglobulin KM allotypes are associated with the prevalence of autoantibodies to GD1a ganglioside, but not with susceptibility to the disease, in Japanese patients with Guillain-Barre syndrome.

*Neurogenetics* 2005;6:225-228.

Koga M, Takahashi M, Masuda M, Hirata K, Yuki N.

*Campylobacter* gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome.

*Neurology* 2005;65:1376-1381. (selected for the 'Highlights' section in the issue)

Subject of an Editorial A way out of the maze: *Campylobacter jejuni* gene polymorphisms define Guillain-Barré syndrome.

by Wokke JH, van den Berg LH. in the same issue .

(*Neurology*2005;65:1350-1351)

Koga M, Koike S, Hirata K, Yuki N.

Ambiguous value of *Haemophilus influenzae* isolation in Guillain-Barré and Fisher syndromes.

*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1736-1738.

Kamitani T, Kuroiwa Y, Susuki K, Kishida H, Miyazaki Y, Yuki N.

Rhinolalia after diarrhea: a sole motor symptom occurring in postinfectious neuropathy associated with anti-ganglioside antibodies.

*Eur J Neurol*, in press

Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, Yuki N.

Comprehensive analysis of bacterial risk factors for developing Guillain-Barré syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis.

*J Infect Dis*, in press

Tatsumoto M, Odaka M, Hirata K, Yuki N.

Isolated abducens nerve palsy as a regional variant of Guillain-Barré syndrome.

*J Neurol Sci*, in press

## 2.学会発表

Yuki N.

“Carbohydrate mimicry is a cause of autoimmune disease”

Session: Glycoimmunology and Glycoimmunopathology

XVIII International Symposium on Glycoconjugates.

Florence, Italy. September 6, 2005.

Yuki N

“Optimal use of IVIG in GBS”

IVIG in Neurological Disease 2<sup>nd</sup> Asia Pacific Symposium

Katoomba, Australia. November 4, 2005.

Yuki N.

“Guillain-Barré syndrome”

Teaching courses. Recent advance in peripheral nerve diseases.

XIII World Congress of Neurology.

Sydney, Australia. November 5, 2005.

Yuki N.

“Fisher syndrome and Bickerstaff’s brainstem encephalitis” Teaching courses. Acute and chronic demyelinating neuropathy.

XIII World Congress of Neurology.

Sydney, Australia. November 6, 2005.

Yuki N.

“Guillain-Barré syndrome”

Muscle and nerve. Advances in neuromuscular diseases:

Immune-mediated neuromuscular disorders.

XIII World Congress of Neurology.

Sydney, Australia. November 5, 2005.

Susuki K, Baba H, Tohyama K, Furukawa K, Hirata K, Yuki N.

“Gangliosides are important for formation and maintenance of ion channel clusters in myelinated peripheral nerve”

Peripheral Nerve Society.

Tuscany, Italy. July 10, 2005.

Tatsumoto M, Odaka M, Koga M, Hirata K, Kuwabara S, Yuki N.

“The spectrum of neurological disease associated with antibodies to minor gangliosides GM1b and GalNAc-GD1a”

Peripheral Nerve Society.

Tuscany, Italy. July 12, 2005.

Susuki K, Baba H, Tohyama K, Furukawa K, Furukawa K, Hirata K, Yuki N.

“Gangliosides are important for formation and maintenance of ion channel clusters in myelinated nerve fibers”

XVIII International Symposium on Glycoconjugates.

Florence, Italy. September 8, 2005.

Koga M, Takahashi M, Masuda M, Hirata K, Yuki N.

“*Campylobacter* gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome”

Gordon Research Conferences. Glycolipid & Sphingolipid Biology.

Ventura, CA, USA. January 10-12, 2006.

## 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

軸索型ギラン・バレー症候群では、GM1などのガングリオシドに対するIgG抗体により、末梢神経障害を生じる。標的分子のガングリオシドが有髄神経伝導に果たしている役割の解明を、本研究の目的とした。GM1などの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、ランビエ絞輪周辺におけるイオンチャンネル局在の異常を認めた。軸索型ギラン・バレー症候群のモデル動物では、抗GM1抗体による自己免疫反応が末梢神経のランビエ絞輪部に起こり、電位依存性ナトリウムチャンネルの集簇が破壊されていた。ガングリオシドは、ランビエ絞輪周辺のイオンチャンネルの適切な局在化に働くことにより、有髄神経伝導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

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。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。軸索型ギラン・バレー症候群では、このランビエ絞輪が初期に傷害される。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、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した。

### B. 研究方法

#### (1) ガングリオシドを欠失したマウスの解析

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)。このマウスでは、GM1などの複合型ガングリオシドが生成されない。坐骨神経を用い、運動神経伝導検査を行った。坐骨神経のトルイジンブルー染色標本により、神経線維の形態を評価した。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、坐骨神経の免疫組織化学染色を行った。電子顕微鏡で、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)。

#### (2) 軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の解析

ウサギにガングリオシドを感作することにより、IgG抗GM1抗体が誘導され、四肢麻痺を生じた。坐骨神経を用い、運動神経伝導検査を行った。電子顕微鏡で、

ランビエ絞輪部病変を観察した(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)。IgG、補体、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に対する抗体を用い、前根(運動神経)の免疫組織化学染色を行った。

(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) ガングリオシドを欠失したマウスの解析

運動神経伝導速度が、野生型に比べ、ガングリオシド欠失マウスで、有意に遅延していた。複合筋活動電位振幅は、12週齢では差がなかったが、48週齢では野生型に比べ、ガングリオシド欠失マウスで、有意に低下していた。坐骨神経には、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。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。傍絞輪部におけるカリウムチャンネル染色の頻度は、高週齢になるにしたがって頻度が増加した。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。

#### (2) 軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の解析

四肢麻痺発症後急性期のウサギでは、坐骨結節以遠の刺激による複合筋活動電位振幅や伝導速度には異常がない一方、F波の一部消失を認める例があった。これは、運動神経近位部、すなわち前根に伝導障害が存在することを示唆する所見である。電子顕微鏡により、麻痺を生じたウサギの前根において異常に開大したランビエ絞輪を認めた。免疫組織化学的検索により、IgGおよび補体が沈着しているランビエ絞輪が認められた。補体の沈着範囲が傍絞輪部にまで拡大した病変では、絞輪部ナトリウムチャンネルや傍絞輪部Casprの染色が、減衰または消失していた。補体の沈



着範囲がさらに広範囲に拡大したものでは、傍絞輪部に隣接する部位に局在するカリウムチャネルの染色も消失していた。

#### D. 考察

ガングリオシドを欠失したマウスの解析結果からは、ガングリオシドは、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ネルの適正な集簇に働き、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と考えられる。

軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の解析結果からは、IgG抗GM1抗体による自己免疫反応により、ランビエ絞輪部のナトリウムチャネルが障害され、さらに傍絞輪部が破壊されて病変が進展して行くことが示唆される。ガングリオシド欠失マウスの検索で明らかになった知見を、疾患の見地から裏付ける結果である。

#### E. 結論

GM1などのガングリオシドは、軸索と髄鞘との結合、そしてイオンチャ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。GM1に対する自己抗体と補体により、絞輪部ナトリウムチャネル集簇が破壊され、運動神経伝導障害を生じる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

「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」参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

ヒト動眼脳神経における GQ1b 糖鎖と各種糖脂質糖鎖の colocalization 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：ヒトの外眼筋を支配する脳神経のにおいて GQ1b 糖鎖は Schwann 細胞の細胞膜上に lipid raft 様の集積部位を形成して斑状に分布し、特に傍絞輪部ではその集積が高度である。その GQ1b 糖鎖の存在する lipid raft 様の集積部位にどのような他の糖鎖分子が colocalization しているかについて検討した。ヒトの動眼神経の凍結切片をを抗 GQ1b モノクローナル抗体 7F5 と各種ガングリオシド (GM3, GM1, asialo-GM1, GD3, GD2, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GT1a, GT1b) に対するモノクローナル抗体で二重免疫染色を行い、その蛍光染色像の重ね合わせにより検討した。抗 GD1b 抗体との二重染色において、その染色部位は 7F5 による染色部位はほぼ一致していた。抗 GM3 抗体による染色においても形態的には傍絞輪部と思われる部位に強い染色を認めた。しかし 7F5 での染色との蛍光重ね合わせ画像では、両者の染色部位は colocalization していなかった。検討した他の糖脂質糖鎖と GQ1b 糖鎖との傍絞輪部および神経線維外表面上での colocalization を示唆する像は認めなかった。以上より、ヒトの動眼神経において傍絞輪部および神経線維上で GQ1b 糖鎖が GD1b 糖鎖と colocalization していると考えられた。またヒトの動眼神経の傍絞輪部には局在する糖鎖の観点からは GQ1b 糖鎖と GD1b 糖鎖の集積しているものと GM3 糖鎖が集積しているものの 2 種類のもの存在する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

自己抗体によって認識される抗原分子の局在の詳細を明らかにすると共に、さらにそれがその周囲のいかなる分子と相互作用をし生体内における機能を果たしているかを明らかにすることは、自己免疫性疾患における自己抗体の病因的意義と疾病の成立機序を考える上で重要な課題である。このような疾患のプロセスの解明はより効果的かつ合理的治療戦略を考える上で必須の事項である。自己免疫性末梢神経障害における抗糖脂質抗体の病因的意義についても、それを支持する知見が集積されつつあるが、その作用部位と作用機序の詳細についてはまだ解明されていない点が多い。

我々は昨年度の本研究において蛍光免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡による連続断層像の観察、および免疫電顕の手法を用いて、GQ1b 糖鎖が形態的には lipid raft 様の集積部位を形成してヒトの外眼筋を支配する脳神経の Schwann 細胞の細胞膜上に斑状に分布し、特にミエリン二重層構造が消失し Schwann 細胞の細胞膜が絨毛状に重なり合っている傍絞輪部ではその集積が高度であること示した。Fisher 症候群や Guillain-Barre 症候群における外眼筋麻痺発症に対する抗 GQ1b 抗体の病因的意義を解明する上で、更に GQ1b 糖鎖の存在する lipid raft 様の集積部位にどのような他の機能分子が存在するかを明らかにすることが、次のステップとして重要であると考えた。最近 2 つのガングリオシドが複合することにより新たな抗原エпитープを形成することも報告されていることから、今回は糖脂質糖

鎖分子に特に焦点を絞って GQ1b 糖鎖との colocalization について以下の検討を行った。

#### B. 研究方法

剖検にて得られたヒトの動眼神経の凍結切片を、冷アセトン固定し、抗 GQ1b モノクローナル抗体 7F5 (mouse IgG2a) と各種ガングリオシドに対するマウスモノクローナル抗体で二重免疫染色を行った。各種ガングリオシドに対する抗体とそのアイソタイプは次の通りである：抗 GM3 抗体 (GMR6, IgM), 抗 GM1 抗体 (GMB16, IgM), 抗 asialo-GM1 抗体 (AG-1, IgM), 抗 GD3 抗体 (GMR19, IgM), 抗 GD2 抗体 (GMR7, IgM), 抗 GD1a 抗体 (GMR17, IgM), 抗 GalNAc-GD1a 抗体 (2A3D2, IgM), 抗 GD1b 抗体 (GGR12, IgG3), 抗 GT1a 抗体 (GMR11, IgM), 抗 GT1b 抗体 (GMR5, IgM)。また GM1 についてはビオチン標識コレラ毒素 B サブユニットとの二重染色による検討も行った。二次抗体としては 7F5 については Alexa488 標識抗マウス IgG2a を、その他の抗体とコレラ毒素 B については Alexa546 または Texas-red で標識した抗マウス IgM またはアビジン、Rhodamin 標識抗マウス IgG3 を用いて、その蛍光二重染色像、微分干渉像を観察した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、杏林大学の倫理規定および杏林大学医学部附属病院の個人情報保護規定を遵守して行った。人体由来の試料は患者あるいは家族の同意を得たうえで採取し、研究に用いた。個人情報がその個

人を特定出来る形では決して外部に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

### C. 研究結果

抗 GD1b 抗体における染色において、7F5 と極めて類似した染色像を認めた。すなわち傍絞輪部と思われる中央のくびれた円筒形の強い染色部位とそれに続く神経線維の外表面に沿った点状の染色部位の散在を認めた。7F5 での染色との重ね合わせ像で、2つの抗体による染色部位はほぼ一致していた。

抗 GM3 抗体による染色においても、切片内における密度は7F5の場合よりも低いものの同様の中央のくびれた円筒形の強い染色部位を認めた。蛍光重ね合わせ画像では、7F5 による染色部位とは colocalization していなかった。

GM1 糖鎖に関して、抗 GM1 抗体では切片全体に非常に淡い斑状の染色認めたが、その解剖学的局在部位については今回の検討では推定出来なかった。少なくとも 7F5 で染色される部位への GM1 糖鎖の colocalization は証明されなかった。コレラ毒素 B サブユニットとの二重染色では、Ranvier node と考えられる円筒のくびれの部分に 7F5 とコレラ毒素 B サブユニットによる染色性の co-localization を認めた。また 7F5 で染色される傍絞輪部に続くミエリンと考えられる部分に染色を認めた。

抗 GD3 抗体による染色では Schwann 細胞の核周囲の胞体と思われる部分に比較的均一に広がる染色を認めた。7F5 でも Schwann 細胞の核周辺部が極淡くではあるが染色され、その部分では GD3 抗原との colocalization を認めた。

抗 asialo-GM1 抗体による染色では Schwann 細胞の核周囲の胞体内に顆粒状に分布する染色を認めた。その部分では 7F5 でも極淡い染色を認めた。

抗 GD1a 抗体と抗 GT1b 抗体による染色では類似した染色パターンを認めた。神経線維の外表面に沿うような線状の染色を認めたが、7F5 の染色部位との有意な重なりは認めなかった。

抗 GD2 抗体、抗 GalNAc-GD1a 抗体、抗 GT1a 抗体では有意な染色は認められなかった。

### D. 考察

今回の検討でヒトの動眼神経において抗 GQ1b 抗体と抗 GD1b 抗体の染色が colocalization していることを見いだした。今回用いた抗糖脂質抗体について、抗 GQ1b 抗体の 7F5 は GQ1b 以外に GT1a と交叉反応することが知られているが、その他の抗体は主要な糖脂質については monospecific な抗体であることから、抗 GQ1b 抗体と抗 GD1b 抗体の染色性が同一エピトープに対する交叉反応により生じている

ものとは考えにくい。これらの染色性は切片をクロロフォルム-メタノール処理することにより容易に消失することからは、抗原エピトープは有機溶媒への可溶性の高い分子上に存在すると考えられる。また我々が報告したヒトの各種末梢神経組織のガングリオシド組成の生化学的分析結果では、7F5 で特異的に傍絞輪部の染色を認める外眼筋支配脳神経においてはガングリオシド GQ1b の含有比率が他の末梢神経組織より有意に高いこととも考え合わせると、今回見いだされた染色性の colocalization はガングリオシド GQ1b, GD1b 分子の colocalization を反映しているものである可能性が十分に考えられる。抗 GQ1b 抗体と抗 GD1b 抗体の染色の colocalization は傍絞輪部のみではなく神経線維外表面上に点在する染色部位においても認められており、2つの分子が lipid raft 上に共存している可能性が示唆される。最近2つのガングリオシド分子が複合することにより患者血清中の抗体の標的となる新たな抗原エピトープが形成されることが報告されているが、今回見いだした GQ1b 糖鎖と GD1b 糖鎖の colocalization により臨床的に意味を持つ新たな抗原エピトープが形成されるかどうかは今後の検討課題である。

今回の検討で、抗 GM3 抗体により形態的に傍絞輪部と思われる部位の染色が認められた。この部位においてその染色は抗 GQ1b 抗体と抗 GD1b 抗体の染色と colocalization していなかった。このことはすなわちヒトの動眼神経の傍絞輪部には局在する糖鎖の観点からは、GQ1b および GD1b 糖鎖の colocalization するものと、GM3 糖鎖の局在するものの2種類のもが存在する可能性を示唆している。このような傍絞輪部に局在する糖鎖の差異とその機能的意義については今後の検討課題である。

### E. 結論

ヒトの動眼神経において傍絞輪部および神経線維上で GQ1b 糖鎖が GD1b 糖鎖と colocalization していることを見いだした。しかしこれらの部分において他の主要な糖脂質糖鎖との colocalization は証明されなかった。GM3 糖鎖が GQ1b 糖鎖の局在が見られない傍絞輪部に局在していることが見いだされ、ヒトの動眼神経の傍絞輪部には局在する糖鎖の観点からは2種類のもが存在することが示唆された。GQ1b 糖鎖は極僅かにではあるが Schwann 細胞の細胞体にも分布しており、この部位においては GD3 および asialo-GM1 糖鎖と colocalization が認められた。

### F. 研究発表 (学会発表)

千葉厚郎, 内堀歩, 作田学, 楠進: ヒト外眼筋支配  
脳神経における GQ1b/GT1a 糖鎖抗原の subcellular  
localization の検討. 第 46 回日本神経学会総会,  
鹿児島, 平成 17 年 5 月 25-27 日.

G. 知的所有権の取得状況

該当無し