

## ワークショップ4

ヒト外眼筋支配脳神経における GQ1b/GT1a 糖鎖抗原の  
subcellular localization の検討千葉厚郎<sup>1</sup>、内堀 歩<sup>1</sup>、作田 学<sup>1</sup>、楠 進<sup>2</sup><sup>1</sup> 杏林大学神経内科、<sup>2</sup> 近畿大学神経内科

## 目的

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。我々はヒトの外眼筋を支配する脳神経傍絞輪部への GQ1b/GT1a 糖鎖抗原の特異的集積を示したが、さらにその集積部位における局在を subcellular レベルで検討する。

## 方法

剖検にて得られたヒトの動眼神経または外転神経の凍結切片を、アセトンあるいはアセトン-パラフォルムアルデヒド等で固定し、Fisher 症候群患者血清血清抗 GQ1b 抗体と同じ微細反応性を有する抗 GQ1b/GT1a モノクローナル抗体 7F5 で免疫染色し、共焦点顕微鏡・電子顕微鏡により観察した。電子顕微鏡用のサンプルは DAB で発色を行った。

## 結果

共焦点顕微鏡の連続切片画像の3次元再構成では蛍光は絞輪部を頂点として広がる底面のない中空の円錐-楕円筒状の分布を示した。免疫電顕による検討では、ミエリン周囲を取り囲む膜状の構造体に染色を認め、また軸索とミエリンの境界部にも染色を認めた。またミエリンの二重層構造が失われて泡沫様の膜構造物が集簇している部位において、その泡沫状の膜に染色を認めた。その部位での染色される部分の密度はミエリン最外層部でのものよりも高いように思われた。

## 考察

今回観察された免疫電顕像からは傍絞輪部だけではなくミエリン二重層の最外部にある Schwann 細胞の細胞膜にも GQ1b/GT1a 糖鎖抗原が存在すると考えられた。ミエリンの最内層部と軸索の境界部の染色に関しては、その部位がミエリン側の最内層部か軸索膜側かは、今回の観察では識別でき

なかった。ミエリンの層構造が失われて泡沫様の膜構造物が集簇している部位はその位置関係からは恐らく、傍絞輪部においてミエリンの二重層構造が失われて Schwann 細胞の細胞膜が細絨毛状に広がっている部位のではないかと考えられるが、その部位において染色の密度が高く見えるのは、単位面積当たりの Schwann 細胞の細胞膜の密度が高いことによる可能性も考えられる。

7F5 による GQ1b/GT1a 糖鎖抗原性の検出には切片のアセトン処理を要することから電顕による超微形態の評価には限界があるが、今回の検討からは GQ1b/GT1a 糖鎖抗原はヒトの外眼筋を支配する脳神経の Schwann 細胞の細胞膜に局在し、細胞膜の存在密度の高くなる傍絞輪部により集積して存在している可能性が高いと考えられた。

## 運動ニューロン疾患・傍腫瘍性神経症候群（ポスター）

末梢血幹細胞移植により寛解した悪性リンパ腫に伴う  
IgM 抗ジシアロシルガングリオシド抗体陽性ポリニューロパチーの一例内堀 歩<sup>1</sup>、曾根菜穂<sup>1</sup>、西山和利<sup>1</sup>、甫守正史<sup>2</sup>、千葉厚郎<sup>1</sup>、作田 学<sup>1</sup><sup>1</sup>杏林大学神経内科、<sup>2</sup>杏林大学血液内科

## 背景

難治性自己免疫疾患の一つの治療手段として造血幹細胞移植が注目されている。我々は、悪性リンパ腫を基礎疾患に持つIgM抗ジシアロシルガングリオシド抗体陽性ポリニューロパチーにおいて、末梢血幹細胞移植後、神経症状が完全寛解に至った症例を経験したので報告する。

## 症例

58歳、男性。主訴：四肢遠位優位の異常感覚。

現病歴：2003年5月中旬両手指にしびれ感が出現。7月には両足趾にもしびれ感が出現し、徐々に拡大、増悪。9月頃より、歩行が不安定になり、10月には手指の巧緻運動障害が出現したため、11月当科入院となった。

現症：一般身体所見で頸部・右腋窩・両肩胛部に複数のリンパ節を触知。神経学的所見では、四肢遠位優位左右対称の異常感覚・錯感覚があり、痛覚・冷覚は四肢遠位で軽度低下、位置覚は足趾で低下していた。運動系では明らかな筋力低下は認めず、腱反射は全て消失していた。指鼻試験、膝踵試験で測定異常と目標近位での動揺があり、歩行は開脚歩行でつぎ足歩行は不可能であった。

検査所見：血液検査では、LDHは724でLDH1分画優位な上昇を認め、可溶性IL-2受容体が6310と高値であった。免疫グロブリンではIgMとIgAが上昇し、免疫電気泳動では、IgM沈降線の変形を認めたものの、M蛋白はみられなかった。抗Hu抗体、抗MAG抗体は陰性。抗ガングリオシド抗体のうち、ジシアロシル基を有するガングリオシドであるGD3、GD1b、GQ1b、GT1bに対するIgM classの抗体が高力価であった。神経伝導検査では、SNAPの振幅の低下および正中神経CMAPの潜時の軽度遅延を認め、SEPではErb点での伝導遅延があったが、中枢伝導時間は正常であった。筋電図では四肢遠位優位に軽度の神経原性変化を認めた。左腓腹神経生検では、大径・小径線維密度はともに軽度減少し、myelin ovoidが散見された。

経過：入院後、急速にリンパ節腫脹が進行。Gaシンチで両頸部・腋窩・傍大動脈・肩胛部に異常集積を認め、リンパ節生検を施行した。リンパ節では大部分の濾胞構造が失われ、異型リンパ球様細胞のびまん性増殖、浸潤を認め、免疫組織化学の結果とあわせて、非Hodgkinリンパ腫のびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫と診断した。リンパ腫組織内に抗ヒトIgM抗体で染色される細胞を認めた。各種画像検査では、リンパ節腫脹は横隔膜をはさんだ両側に認められるものの、骨髄穿刺・生検で骨髄浸潤は認めず、髄液検査、頭部MRIで中枢神経浸潤も否定的であり、Ann Arbor分類の病期IIIaと考えられた。

リンパ腫の顕在化・進行とともに神経症状も増悪した。R-CHOP療法開始後、感覚性失調症状が増悪し立位・歩行が不可能となったため、IVIgを施行。神経症状は著明に改善し、自立歩行が可能となった。原疾患に対し、R-CHOP療法2クール目及びESHAP療法を施行するも、いずれも再燃したため、超大量免疫抑制療法併用末梢血幹細胞移植を施行した。ESHAP療法施行後より、神経症状が再び増悪し、IVIgを再度施行。幹細胞移植後、リンパ腫は完全寛解に至った。神経症状も徐々に軽快し、臨床症状の改善とともに、末梢神経伝導速度の回復、抗ガングリオシド抗体価の低下が確認された。

## 考察

造血幹細胞移植は、血液系悪性疾患や難治性自己免疫疾患における根治的治療法として近年注目されている。本例では、血液系悪性疾患とおそらく腫瘍細胞が産生していると思われる自己抗体による自己免疫性ニューロパチーを合併しており、幹細胞移植により寛解した。IgMパラプロテイン血症に伴うニューロパチーでは治療法が確立されておらず、幹細胞移植が施行された症例報告はないが、幹細胞移植は、従来の治療法に抵抗する症例において有力な治療の選択肢となる可能性がある。

## 急性小脳性運動失調症における自己抗体の検討

内堀 歩<sup>1</sup>, 千葉厚郎<sup>1</sup>, 作田 学<sup>1</sup>, 楠 進<sup>2</sup><sup>1</sup>杏林大学神経内科, <sup>2</sup>近畿大学神経内科

## 目的

先行感染症状後に、急性の失調性歩行、構音障害、異常眼球運動などを呈し単相性の経過をたどる急性小脳性運動失調症 (Acute cerebellar ataxia : ACA) は、Guillain-Barré syndrome (GBS) との経過の類似性から、病因として自己免疫学的機序の関与が想定されていたが、その免疫学的異常の具体的な実体はいまだ明らかにされていない。今回我々はその病態を明らかにすることを目的として、患者血清中の自己抗体の検索と抗原分子の同定と解析を行った。

## 対象・方法

各種ヒト神経組織 SDS 抽出蛋白を用いたウェスタンブロットにより検討。反応する band について抗原分子の組織および細胞内局在を検討し、二次元電気泳動により抗原蛋白を分離した後、N 末端アミノ酸配列解析を行いそれを同定した。さらに、典型的 ACA 症例での抗体価の推移を ELISA 法で検討。また、ELISA 法で ACA 多数例と健常者、他の神経疾患、自己免疫性疾患の各対照群での抗体価の定量的比較を行った。

## 結果

小脳皮質 SDS 抽出蛋白抗原を用いた典型的 ACA 患者血清のスクリーニングにおいて約 28.0 kDa の蛋白と強く反応する IgM class の band を認めた。各種組織抽出蛋白での検討では認識される抗原は、特に小脳皮質での単位蛋白量当たりの抗原性が強かった。小脳組織を用いた細胞分画における分布の検討では、細胞質を含む分画に最も強く反応を認めた。小脳細胞質分画の二次元電気泳動による解析では、28.0 kDa, pI 7-8 付近に患者血清と反応するスポットが検出された。最も強い反応を示したスポットについて N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、N 末端より 11 個のアミノ酸配列は APSRKFFVGGN と同定され、

トリオースフォスフェートイソメラーゼ (triosephosphate isomerase : TPI) の N 末端アミノ酸配列に完全に一致した。また、ウサギ筋肉から精製された TPI は患者血清と強い反応を示した。

さらに精製 TPI を用い ELISA 法で抗 TPI IgM 抗体価の推移を検討したところ、抗体価は、感染症状が出現して約 2 週間後の小脳性失調症状の出現後最初に採取された血清で最も抗体価が高く、その後漸減した。

ACA 患者多数例の検討では、ウェスタンブロットで 23 例中 8 例で同様の band を認めた。また、ELISA 法による定量的比較では、健常者血清 (n=45) での抗体価の平均 + 3 SD を cut-off 値とした場合、ACA 患者ではウェスタンブロット法で陽性の 8 例が陽性であり、健常対照、他疾患対照と比較し、ACA 患者では有意な抗体価の高値を示した。

## 考察

ACA 患者血清において検出された自己抗体の認識する抗原分子である TPI は解糖系の酵素のひとつであり、ジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸の相互変換を触媒し、248 アミノ酸からなる同一のサブユニットにより構成される二量体 (分子量約 56000) として存在する。今回の検討において、健常対照や他疾患対照と比較し ACA 患者急性期血清において抗 TPI 抗体価の優位な上昇を認めた事、小脳性失調症状の改善に伴い抗 TPI 抗体も経時的に低下を認めた事、また、ウェスタンブロットによる検討で小脳組織において高い抗原性を認めた事からは、本抗体が ACA の病態になんらかの関与をしている可能性が示唆された。

## Autoantibodies in postinfectious acute cerebellar ataxia

**Abstract**—The authors found serum immunoglobulin M (IgM) autoantibody in a patient with typical acute cerebellar ataxia (ACA) and identified the antigen molecule as triosephosphate isomerase (TPI). TPI antigenicity to the patient's antibody was the highest in the cerebellar tissue. Eight of 23 patients with ACA had increased IgM anti-TPI antibody titers vs those of healthy controls. Preceding Epstein-Barr virus infection was confirmed serologically in all 8 patients. Anti-TPI antibody decreased with clinical improvement.

NEUROLOGY 2005;65:1114-1116

Ayumi Uchibori, MD; Manabu Sakuta, MD; Susumu Kusunoki, MD; and Atsuro Chiba, MD

Autoimmunity related to a preceding infection has been posited in the pathogenesis of acute cerebellar ataxia (ACA),<sup>1</sup> and autoantibodies have been reported: anticentrosome antibodies in postvaricella ataxia,<sup>2,3</sup> anticentriole antibodies after *Mycoplasma pneumoniae* infection,<sup>4</sup> and antineuronal antibodies after Epstein-Barr virus (EBV) infection.<sup>5</sup> In the current study, we found serum immunoglobulin M (IgM) antibody against triosephosphate isomerase (TPI) in ACA after acute EBV infection.

**Methods.** We obtained sera from 23 patients with ACA. Patients with ataxia of other known causes or serum immunoglobulin G (IgG) anti-GQ1b antibody were excluded. Control sera were obtained as indicated in figure 1. Recent EBV infection was confirmed serologically by increasing level of IgM antibodies against EBV-viral capsid antigen (VCA).

**Total protein extraction.** Human tissue obtained at autopsy from patients without neurologic disorders was homogenized in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 2% sodium dodecyl sulfate (SDS). After boiling the homogenate for 3 minutes at 100°C, insoluble precipitates were removed by centrifugation for 15 minutes at 21,880g at 4°C. Protein concentrations were determined by the use of BCA reagents (Pierce, Rockford, IL).

**Western blot analysis and N-terminal amino acid sequencing.** SDS-PAGE, 2D-electrophoresis, and electrophoretic protein transfer to membranes were performed by the common procedures with Laemmli's sample buffer system and immobilized pH gradient gel strips according to the manufacturer's instructions attached to the strips (Bio-Rad, Hercules, CA). After incubation with 10% normal goat serum (NGS) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20 (TBST) (blocking solution) for 4 hours at room temperature, membranes were incubated overnight at 4°C with serum samples diluted with the blocking solution. After being washed, the membranes were incubated for 1 hour at room temperature with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG or IgM antibody (ICN, Aurora, OH) diluted 1:10,000. Immunoreactions were detected with enhanced chemilumines-

cence (ECL) reagents (Amersham, Piscataway, NJ). N-terminal amino acid sequences were determined by means of a HP-G1005A Protein Sequencing System (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA).

**ELISA.** Each well of the microtitration plates (ICN) was coated with 200 ng TPI purified from rabbit skeletal muscle (Sigma, St. Louis, MO) in 50  $\mu$ L of 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C. The following procedures were performed as previously reported<sup>6</sup> with modifications: NGS was used instead of bovine serum albumin, and TBST was used instead of phosphate-buffered saline. Antibody titer was assayed at the 1:50 dilution. Antibody titer was expressed as the absorbance ratio of the sample to standard serum. The cutoff level was the mean + 3 SD of the healthy controls. Differences in mean values were compared statistically by Welch's or Student's *t* test. Antibody-positive ratios were compared by the  $\chi^2$  test. A difference was considered significant when the *p* value was less than 0.05.

**Adsorption study.** Each well of the microtitration plates was coated with 1,600 ng of the purified TPI. After nonspecific protein-binding sites had been saturated with the blocking solution, 50  $\mu$ L of the serum sample diluted 1:200 was added to antigen-coated and noncoated wells, and the plates were incubated overnight at 4°C. Antibodies adsorbed to the wells were eluted by 1.0 M glycine-HCl, pH 2.7. After neutralization with 1.0 M Tris-HCl, pH 9.0, the solution was dialyzed against 20 mM Tris-buffered saline, pH 7.4. Residual antibodies after adsorption and eluted ones were assayed by Western blot (WB).

**Results.** In WB screening of a typical ACA patient's serum with the protein extract from human cerebellar cortex, two bands appeared at approximately 23 and 26 kd for IgM (see figure E-1A on the *Neurology* Web site at [www.neurology.org](http://www.neurology.org)), but no significant bands were detected for IgG. Bands with the same mobility also were detected in other nerve and nonnerve tissues, but based on the same amounts of protein, the cerebellar cortex showed the strongest antigenicity of the 26-kd band in the tissues examined (figure E-1B). Of the subcellular fractions, the cytoplasmic fraction had the strongest reaction (data not shown).

In the 2D electrophoretic separation of cerebellar cytoplasmic proteins, five spots were detected between pI 7 and 8 at 26 kd (figure E-1C). The sequence of the 11 N-terminal amino acid residues of the highest pI spot, which showed the strongest reaction, was APSRKFFVGGN, identical to the N-terminal sequence of TPI.

Serum from the ACA patient reacted strongly with the purified TPI from rabbit skeletal muscle for IgM (figure E-2A). Mobility of the upper band in the WB screening was the same as that of the purified TPI in SDS-PAGE. In the adsorption study, the antibodies that reacted with the 23- and 26-kd bands were adsorbed by TPI-coated wells (figure E-2B).

In the ELISA, 8 of 23 patients with ACA had positive antibody titers above the cutoff level. A preceding EBV infection was proven serologically in those eight patients,

Additional material related to this article can be found on the *Neurology* Web site. Go to [www.neurology.org](http://www.neurology.org) and scroll down the Table of Contents for the October 11 issue to find the title link for this article.

From the Department of Neurology (Drs. Uchibori, Sakuta, and Chiba), School of Medicine, Kyorin University, Tokyo; and the Department of Neurology (Dr. Kusunoki), School of Medicine, Kinki University, Osaka, Japan.

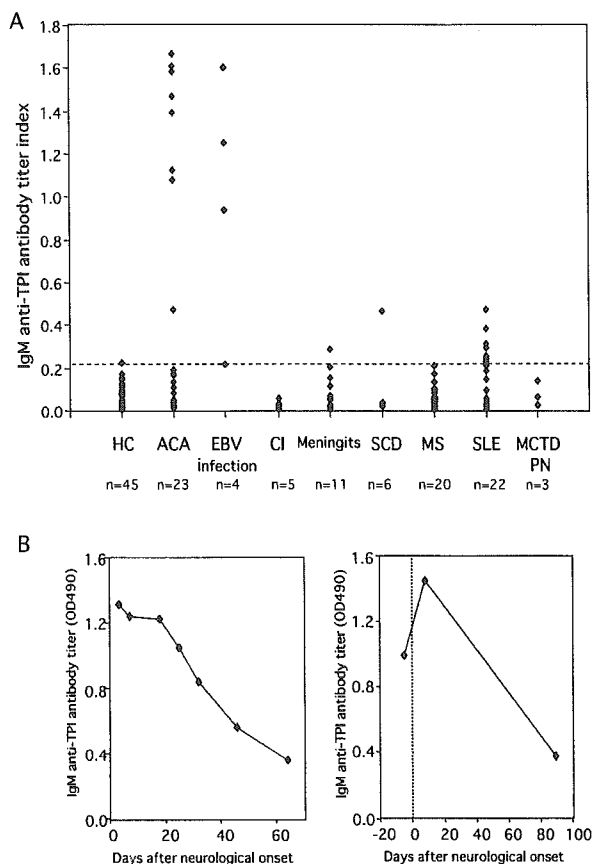
Supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (16590844) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Disclosure: The authors report no conflicts of interest.

Received December 22, 2004. Accepted in final form June 14, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Atsuro Chiba, Department of Neurology, School of Medicine, Kyorin University, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan; e-mail: [achiba-tky@umin.ac.jp](mailto:achiba-tky@umin.ac.jp)

1114 Copyright © 2005 by AAN Enterprises, Inc.



**Figure.** Immunoglobulin M (IgM) anti-triosephosphate isomerase (TPI) antibody titers (A) and their chronological changes in 2 patients with acute cerebellar ataxia (ACA) (B). (A) Eight of 23 patients with ACA had antibody titers above the mean + 3 SD of the healthy controls (cutoff level, dashed line). Three of 4 patients with EBV infection without ataxia had increased titers. Nine of 67 disease controls (1 meningitis, 1 spinocerebellar degeneration [SCD], 7 systemic lupus erythematosus [SLE]) also had titers above the cutoff level, but they were relatively low compared with those of the positive ACA patients. Antibody titers are expressed as a titer index: the absorbance ratio of the sample to a standard serum in ELISA. HC = healthy control; EBV infection = Epstein-Barr virus infection without ataxia; CI = cerebral infarction; MS = multiple sclerosis; MCTD = mixed connective tissue disease; PN = polyarteritis nodosa. (B) In one patient, antibody titer was highest in the first serum sample obtained 3 days after ataxia onset, after which it decreased gradually. In another patient, antibody titer was increased 5 days before ataxia occurred and was increased in the second serum sample obtained 8 days after ataxia onset, after which it decreased during the recovery phase.

but the other ACA patients had negative results. Antibody also was positive in 1 of 45 healthy controls, 3 of 4 patients who had EBV infection without ataxia, and 9 of the other 67 disease controls (1 with meningitis, 1 with spinocerebellar degeneration, and 7 with systemic lupus erythematosus) (figure, A). Differences in the positive ratios of the groups with positive subjects did not reach the significance level, but the mean titer was significantly higher in the

ACA group than in the others, except for the group with EBV infection without ataxia.

In chronological studies of antibody titer in two ACA patients (figure, B), one had the highest antibody titer in the first serum sample, obtained 3 days after ataxia onset, and it gradually decreased with clinical improvement. In the other patient, the first serum sample, obtained 5 days before the appearance of ataxia, already showed increased antibody titer, which was further increased 8 days after neurologic onset.

**Discussion.** This is the first study to identify a target antigen for autoantibody commonly increased in patients who have development of ACA after EBV infection. EBV is an important pathogen of preceding infection found in one-third of adult ACA patients.<sup>7</sup> Anti-TPI antibody has been detected in patients with EBV infection and is reported to be related to hemolysis,<sup>8</sup> but its relationship to ACA has not been uncovered. Recently, IgG anti-TPI antibody was reported to be related to neuropsychiatric lupus, indicative of a possible effect of anti-TPI antibody on the nervous system in autoimmune diseases.<sup>9</sup> Our findings on chronological profiles of antibody titers and the distribution of TPI-antigenicity suggest that anti-TPI antibody is involved in the pathologic process in ACA.

Anti-TPI antibody has been shown to bind to erythrocytes and induce hemolysis *in vitro*.<sup>7</sup> Our observations showed that antibody titer was increased before the appearance of cerebellar ataxia, and its level ran almost parallel to the clinical course of ataxia. This suggests that the antibody is not produced secondarily as a result of nerve tissue damage. The chronological change in anti-TPI antibody titer seems to be consistent with the possibility that antibody production is stimulated by preceding infection and it has a pathogenetic role in cerebellar dysfunction, especially in the early phase.

Triosephosphate isomerase is a ubiquitous protein, which raises the question of how this antibody is related to focal damage, such as hemolysis and ataxia. The immune response against the glycolytic pathway enzyme glucose-6-phosphate isomerase (GPI) is reported to develop arthritis alone. An immunohistochemical study showed GPI located densely along the cartilage surface on the lining of normal articular cavities, which would explain the joint specificity of the anti-GPI antibody.<sup>10</sup> This example shows that ubiquitous proteins can become target antigens in focal diseases by taking a unique localization of antigenicity in certain tissues. As for TPI, the cerebellar tissue specimen had the strongest antigenicity to the ACA patient's serum. Further studies are necessary to clarify its localization pattern in the tissue.

## References

- Connolly AM, Dodson WE, Prensley AL, Rust RS. Course and outcome of acute cerebellar ataxia. *Ann Neurol* 1994;35:673-679.
- Adams C, Diadori P, Schoenroth L, Fritztler M. Autoantibodies in childhood post-varicella acute cerebellar ataxia. *Can J Neurol Sci* 2000;27:316-320.
- Fritztler MJ, Zhang M, Stinton LM, Rattner JB. Spectrum of centrosome

- autoantibodies in childhood varicella and post-varicella acute cerebellar ataxia. *BMC Pediatr* 2003;3:11.
4. Cimolai N, Mah D, Roland E. Anticentriolar autoantibodies in children with central nervous system manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:638-639.
  5. Ito H, Sayama S, Irie S, et al. Antineuronal antibodies in acute cerebellar ataxia following Epstein-Barr virus infection. *Neurology* 1994;44:1506-1507.
  6. Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 1993;43:1911-1917.
  7. Klockgether T, Doller G, Wullner U, Petersen D, Dichgans J. Cerebellar encephalitis in adults. *J Neurol* 1993;240:17-20.
  8. Ritter K, Brestrich H, Nellen B, Kratzin H, Eiffert H, Thomssen R. Autoantibodies against triosephosphate isomerase: a possible clue to pathogenesis of hemolytic anemia in infectious mononucleosis. *J Exp Med* 1990;171:565-570.
  9. Watanabe H, Seino T, Sato Y. Antibodies to triosephosphate isomerase in patients with neuropsychiatric lupus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:949-953.
  10. Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, et al. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 2002;3:360-365.