

2007 30035 A

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

糖鎖の関連するニューロパチーの
分子病態の解析

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 楠 進

平成20年(2008年)4月

目 次

I. 総括研究報告

糖鎖の関連するニューロパチーの分子病態の解析.....	1
楠 進	

II. 分担研究報告

1. Miller Fisher 症候群と Guillain-Barré 症候群における GQ1b を含む ganglioside 複合体に特異性をもつ抗体の解析.....	4
楠 進	
2. Bickerstaff 型脳幹脳炎における抗 GQ1b IgG 抗体の反応性 : Guillain-Barré 症候群および Miller Fisher 症候群との比較	8
楠 進	
3. レプトスピラ感染に伴う神経障害における抗 ganglioside 抗体の役割 に関する研究	12
清水 潤	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	17
-----------------------	----

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

糖鎖の関連するニューロパチーの分子病態の解析

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部教授

研究要旨

我々は近年、二種類のガングリオシドからなるガングリオシド複合体(GSCs)に対する抗体を Guillain-Barré 症候群(GBS)患者血清中に見出した。また抗 GQ1b 抗体の上昇が特徴である Miller Fisher 症候群(MFS)においても、少数例を対象に GQ1b/GM1 や GQ1b/GD1a などの GSCs に対する抗体を報告している。本年度は MFS および眼球運動麻痺を伴う GBS(GBS-OP+)の多数例における抗 GSCs 抗体について検討した。また、同様に抗 GQ1b 抗体上昇がみられる Bickerstaff 型脳幹脳炎(BBE)について、抗 GSCs 抗体を含めて血清学的に MFS や GBS と比較し、中枢神経障害をきたす機序について検討した。その結果、MFS と GBS-OP+は、抗体の反応性にもとづき、(1)GQ1b あるいは GT1a 単独に対する抗体陽性、(2)GQ1b/GM1 のように糖鎖末端のシアル酸が2個となる組み合わせの GSCs に対する抗体陽性、(3)GQ1b/GD1a のように糖鎖末端のシアル酸が3個となる組み合わせの GSCs に対する抗体陽性の3群にわかれることが明らかとなった。BBE では抗 GSCs抗体陽性率が有意に低かった。MFS と GBS-OP+では GQ1b の他に、GQ1b 及び GT1a を含む GSCs も重要な標的抗原であることが示された。また GQ1b そのものに対する特異的な抗体の存在が BBE にみられる中枢神経障害の必要条件であることが示唆された。以上の結果は、抗 GQ1b 抗体関連疾患の病態解明および新規治療法開発にとって有用と考えられる。一方昨年度報告したレプトスピラ感染と血中抗ガングリオシド抗体上昇について、症例数を増やして検討し、レプトスピラ菌体内部に GBS 血清と反応する抗原が存在すること、重症型のレプトスピラ症で高率に抗ガングリオシド抗体が出現することが明らかになった。

分担研究者

清水潤・東京大学医学部講師

A. 研究目的

ニューロパチーの病態にかかわる分子として、糖タンパクや糖脂質などの複合糖質に着目し、とくに糖鎖を標的とする免疫反応を伴う免疫性ニューロパチーについて検討を行った。

楠班員は、抗 GQ1b 抗体が高頻度にみられる疾患である Miller Fisher 症候群(MFS)

および眼球運動麻痺を伴う GBS (GBS-OP+) について、抗ガングリオシド複合体 (GSCs) 抗体に関する検討を多数例を対象として行った。

また同班員は、同じく抗 GQ1b 抗体関連疾患である Bickerstaff 型脳幹脳炎について、MFS や GBS-OP+と異なり中枢神経障害をきたす要因として血清学的に何らかの特徴があるかどうかを検討した。

清水班員は、昨年度レプトスピラ感染と血中抗ガングリオシド抗体について、はじ

めて報告したが、本年度はさらに症例を増やし、レプトスピラ症における抗ガングリオシド抗体上昇について解析した。

B. 研究方法

(1) 近畿大学神経内科に全国の各施設から抗体検査以来のあった血清のうち、64例のMFS、53例のGBS-OP+、53例の眼球運動麻痺を伴わないGBS(GBS-OP-)を対象とした。上記対象血清に対して10種のガングリオシドに対するIgG抗体を測定した。また7種のガングリオシド(GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b)についてはそのうち2種を1:1の割合で混合したGSCsに関してもIgG抗体活性を測定した。

(2) 近畿大学神経内科に抗体検査依頼のあった検体のうち、抗GQ1b IgG抗体が陽性であったBBE25例MFS39例GBS29例を検討の対象とした。単独のガングリオシドに対する抗体測定は、通常の方法で行った。

PAとGQ1bの混合抗原に対する抗体測定を行い、その活性をGQ1b単独抗原に対する抗体活性と比較した。GSCsに対する抗体測定も既法に基づき(Kaida K, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 1043-1046, 2006)行った。

BBE, GBS, MFSの3群間で、抗GQ1b抗体価、他の抗体の陽性率、抗GQ1b抗体と抗GT1a抗体の活性の比較、GQ1b抗原にPA添加した場合の抗体活性の変化、抗GSC抗体の陽性率を比較検討した。

(3) 抗ガングリオシド抗体陽性のGBS血清について、レプトスピラ感染についての血清学的検査を施行した。一方レプトスピラ感染が血清学的に確認された血清について、抗ガングリオシド抗体を測定した。

(倫理面への配慮)

研究は各施設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。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果とD. 考察

(1) MFSおよびGBS-OP+とも47%の症例がGSCsに特異性をもつ抗体を有していた。MFSおよびGBS-OP+は、抗体活性にもとづき、(1)GQ1bあるいはGT1a単独に特異性をもつ抗体陽性、(2)GQ1b/GM1, GQ1b/GD1b, GT1a/GM1, GT1a/GD1bなどの複合体(糖鎖末端のシアル酸が2個となる組み合わせ)に対する抗体陽性、(3)GQ1b/GD1a, GQ1b/GT1b, GT1a/GD1a, GT1a/GT1bなどの複合体(糖鎖末端のシアル酸が3個となる組み合わせ)に対する抗体陽性、の3群に分類することができた。またGQ1b単独には反応しないがGSCsに反応する抗体を有する症例が存在した。MFSの(2)群の症例では、感覚障害の頻度が低く、球麻痺をきたす率が低かった。GBSの(3)群では失調の率が低かった。GBS-OP+の(1)群では深部感覚障害の頻度が高かった。

MFSおよびGBS-OP+は、抗体の反応性にもとづき3群に分類できることが明らかとなった。また抗体の反応特異性が臨床症状とも関連することが示唆された。GQ1bやGT1a、およびそれらを含むGSCsの神経系内分布に違いがある可能性があり、今後の検討が必要である。MFSやGBS-OP+の血清診断にあっても、抗GSCs抗体を測定することで陽性率が上昇し、診断的意義が向上すると考えられる。また新規治療法の開発などにおいても念頭におく必要があると考えられる。

(2) 抗 GQ1b IgG 抗体活性に 3 群間で差はなかった。GBS に比し BBE と MFS では抗 GQ1b 活性が抗 GT1a 活性より高いものが多かった。GBS では GQ1b, GT1a 抗体以外の抗体陽性率は BBE と MFS に比し高かった。BBE では PA 添加での抗体活性の増強がみられる症例の比率が、GBS や MFS と比較して低かった。抗 GSCs 抗体陽性率は、BBE では GBS や MFS に比べて有意に低かった。

抗 GSC 抗体の検討により、BBE では GSCs に対する特異性をもつ抗体のみられる頻度は有意に低かった。このことから BBE における抗 GQ1b 抗体は、他のガングリオシドの共存下に立体構造の変化した抗原には反応が弱く、GQ1b そのものの糖鎖構造に強く反応することがわかる。すなわち、GQ1b の糖鎖に対する特異性がより強い抗体であると考えられた。MFS や GBS でも、同様の抗体は認められることから、こうした反応性をもつ抗体上昇が中枢神経障害をきたす十分条件ではない。また中枢神経障害をきたす要因については、抗体の反応性以外にも様々なメカニズムが考えられる。しかし、抗体の反応性の観点から、中枢神経障害をきたす必要条件が明らかになったことは、BBE の病態解明にとって意義のあることである。

(3) GBS20 例中の 5 例が、レプトスピラ感染診断用マイクロカプセル凝集試験 (MCAT) 法にて陽性であったが、顕微鏡下凝集試験 (MAT) 法では陰性であった。レプトスピラ症 11 例中 6 例で抗ガングリオシド抗体が陽性であった。とくに重症型のワイル病で 4/5 例が陽性であった。

抗ガングリオシド抗体陽性の GBS 血清で MCAT 法で陽性例が多かったことと、レプトスピラ感染で抗ガングリオシド抗体が高率

に検出されたことから、レプトスピラ菌体内部に抗ガングリオシド抗体と交差反応しやすい抗原が存在することが示唆された。

E. 結論

MFS および GBS-OP+ では、GQ1b および GT1a に対する抗体が発症因子として重要であるが、GSCs を抗原として用いることにより、その反応性は 3 群に大別されることがわかった。

GQ1b に対する特異性のきわめて高い抗体の上昇が、BBE の発症には必要であることが示された。

レプトスピラ感染の病態、とくに重症型において、抗ガングリオシド抗体の関与の可能性が考えられ今後の詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担報告参照

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

Miller Fisher 症候群と Guillain-Barré 症候群における
GQ1b を含むガングリオシド複合体に特異性をもつ抗体の解析

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部教授

研究要旨

我々は近年、GD1a/GD1b、GM1/GD1a、GM1/GT1b、GD1b/GT1b など二種類のガングリオシドからなるガングリオシド複合体(GSCs)に対する抗体を Guillain-Barré 症候群(GBS)患者血清に見出した。また抗 GQ1b 抗体の上昇が特徴である Miller Fisher 症候群(MFS)においても、少数例を対象に GQ1b/GM1 や GQ1b/GD1a などの GSCs に対する抗体を報告している。本研究では MFS および GBS の多数例における抗 GSCs 抗体について検討した。対照は 64 例の MFS、53 例の眼球運動麻痺を伴う GBS(GBS-OP+)および 53 例の眼球運動麻痺を伴わない GBS(GBS-OP-)である。その結果、MFS では 47%の 30 例において、GBS-OP+では 47%の 25 例において GQ1b を含む GSCs に対する抗体陽性であったが、GBS-OP-では同抗体は全て陰性であった。MFS と GBS-OP+症例は、抗体の反応性にもとづき、(1)GQ1b あるいは GT1a 単独に対する抗体陽性、(2)GQ1b/GM1 のように糖鎖末端のシアル酸が 2 個となる組み合わせの GSCs に対する抗体陽性、(3)GQ1b/GD1a のように糖鎖末端のシアル酸が 3 個となる組み合わせの GSCs に対する抗体陽性の 3 群にわかれることが明らかとなった。また(2)のタイプの抗体陽性の MFS 例は感覚障害の頻度が低いこともわかった。MFS と GBS-OP+では GQ1b の他に、GQ1b 及び GT1a を含む GSCs も重要な標的抗原であることが示され、病態解明および新規治療法開発にとって有用な知見が得られた。

A. 研究目的

Miller Fisher 症候群(MFS)は外眼筋麻痺、失調、腱反射消失を 3 徴とする Guillain-Barré 症候群(GBS)の亜型である。90%以上の症例に抗 GQ1b 抗体が見出され、重要な発症因子として知られている。近年、我々は GBS における新規標的抗原としてガングリオシド複合体(GSCs)を見出した。さらに MFS において 12 例中 7 例に、GQ1b または GT1a を含む GSCs に特異性をもつ抗体を見出している。今回は MFS および同じく抗 GQ1b 抗体の高頻度の上昇が知られる眼球運動麻痺を伴う GBS (GBS-OP+)について、抗 GSCs 抗体に関する検討を多数例を対象として行った。

B. 研究方法

(1)対象：全国の各施設から当科に抗体検査以来のあった血清のうち、64 例の MFS、53 例の GBS-OP+、53 例の眼球運動麻痺を伴わない GBS (GBS-OP-)を対象とした。
(2)抗 GSCs 抗体の検討：上記対象血清に対して、GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a の 10 種のガングリオシドに対する IgG 抗体を測定した。また 7 種のガングリオシド(GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b)についてはそのうち 2 種を 1:1 の割合で混合した複合体抗原に関しても IgG 抗体活性を測定した。抗 GSCs 抗体に関しては、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。抗 GSCs 抗体陽性血清に関しては薄層クロマトグラム (TLC) 免疫染色を施行した。

(3) 抗 GSCs 抗体の反応特異性: 抗 GSCs 抗体陽性血清に関して、複合した 2 種のガングリオシドのうち、GQ1b 以外のもう一方のガングリオシドの含有量を変えて、抗体活性の変化を検討した。

C. 研究結果

(1) MFS および GBS-OP+ とも 47% の症例が GSCs に特異性をもつ抗体を有していた。GQ1b あるいは GT1a の単独抗原に特異的抗体は、MFS では 50%、GBS-OP+ では 17%、GBS-OP- では 9% であり、MFS に有意に高率に認められた。GBS-OP+ のうち 36% が、GQ1b に対する抗体も GQ1b を含む GSCs に対する抗体ももたなかった。

MFS および GBS-OP+ は、抗体活性にもとづき、(1) GQ1b あるいは GT1a 単独に特異性をもつ抗体陽性、(2) GQ1b/GM1, GQ1b/GD1b, GT1a/GM1, GT1a/GD1b などの複合体 (糖鎖末端のシアル酸が 2 個となる組み合わせ) に対する抗体陽性、(3) GQ1b/GD1a, GQ1b/GT1b, GT1a/GD1a, GT1a/GT1b などの複合体 (糖鎖末端のシアル酸が 3 個となる組み合わせ) に対する抗体陽性、の 3 群に分類することができた。MFS の (2) 群では 3 例、GBS-OP+ の (2) 群では 2 例、GBS-OP+ の (3) 群では 1 例が、GQ1b 単独には反応しないが GSCs に反応する抗体を有していた。

(1) 群の抗体陽性の血清では、GQ1b に GM1 や GD1a を加えることにより GQ1b に対する反応が低下した。(2) 群では、GQ1b に GM1 を加えると抗体活性が増強し添加量を増やすとさらに増強したが、GD1a の添加では減少した。(3) 群では逆に GD1a の添加で増強し添加量を増やすとさらに増強したが、GM1 の添加では減少した。

MFS の (2) 群の症例では、感覚障害の頻度

が低く、球麻痺をきたす率が低かった。GBS の (3) 群では失調の率が低かった。GBS-OP+ の (1) 群では深部感覚障害の頻度が高かった。

D. 考察

MFS および GBS-OP+ では、モノクローナル抗 GQ1b 抗体を用いた GQ1b の局在の検討、神経筋接合部における伝導障害および補体を介した神経傷害の検討などから、GQ1b 単独抗原に対する抗原抗体反応が病態生理学的に重要であると考えられてきた。しかし本研究により、これらの疾患の抗体は、大きく分けて 3 群に分類できることが明らかとなった。

また抗体の反応特異性が臨床症状とも関連することが示唆された。GQ1b や GT1a、およびそれらを含む GSCs の神経系内分布に違いがある可能性があり、今後の検討が必要である。

GQ1b に反応をもつ抗体でも、反応特異性は多様であり、少なくとも 3 群に分かれることが明らかとなったが、このことは今後アフィニティーカラムを用いた治療法の開発などにおいても念頭におく必要があると考えられる。

E. 結論

MFS および GBS-OP+ では、GQ1b および GT1a に対する抗体が発症因子として重要であるが、GSCs を抗原として用いることにより、その反応性は 3 群に大別されることがわかった。今後の病態解明および新規治療法開発において考慮する必要がある重要な知見である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* 182:212-8, 2007.
2. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. *Exp Neurol* 209: 279-283, 2008
3. Kusunoki S, van Doorn P. Predictors of respiratory failure in Guillain-Barré syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 3: 430-431, 2007.
4. Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology*, in press.
5. Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press.
6. Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New

aspects of research. *Bioch Biophys Acta*, in press.

2. 学会発表

1. Kusunoki S, Kaida K. IgG antibody highly specific to GD1b is specifically associated with ataxia in Guillain-Barré syndrome. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007. *J Periph Nerv Syst* 12(Suppl): 47, 2007.
2. Kaida K, Kanzaki M, Sada M, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007. *J Periph Nerv Syst* 12(Suppl): 42, 2007.
3. Kusunoki S, Kaida K. IgG antibodies highly specific to GD1b in Guillain-Barré syndrome with ataxia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007. *Ann Neurol* 62(Suppl): S7, 2007.
4. Kaida K, Kanzaki M, Sada M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia.

132nd Annual Meeting of American
Neurological Association,
Washington DC, USA, October 7-10,
2007. Ann Neurol 62(Suppl): S62,
2007.

5. 楠 進。Fisher症候群および関連疾患の
病態、診断と治療。第45回日本神経眼科
学会総会(2007年12月1日、大阪)

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

Bickerstaff型脳幹脳炎における抗 GQ1b IgG 抗体の

反応性：Guillain-Barré 症候群および Miller Fisher 症候群との比較

主任研究者 楠 進 近畿大学医学部教授

研究要旨

ガングリオシドに対する抗体は自己免疫性末梢神経障害で高頻度に検出される。抗 GQ1b IgG 抗体は Guillain-Barré 症候群 (GBS)、その亜型である Miller Fisher 症候群 (MFS) で認められるが、Bickerstaff 型脳幹脳炎 (BBE) でも高率に陽性となる。中枢病変を伴う BBE と他の 2 疾患では、血中抗体の活性や特異性に違いがある可能性がある。そこで GQ1b と GT1a に対する相対的な抗体活性の比較、他の抗ガングリオシド抗体の陽性頻度、リン脂質添加による抗 GQ1b 抗体活性の影響、他のガングリオシドと GQ1b の形成する複合体に対する抗体活性などについて、MFS、GBS、BBE の三群で比較検討した。結果、BBE と MFS では GQ1b 活性が GT1a 活性より強い症例が多く、BBE では phosphatidic acid 添加により抗 GQ1b 抗体活性の増強をみる率、抗ガングリオシド複合体抗体陽性率が有意に低かった。GQ1b そのものに対する特異的な抗体の存在が BBE にみられる中枢神経障害の必要条件であることが示唆された。

A. 研究目的

抗 GQ1b IgG 抗体は Miller Fisher 症候群 (MFS) における特徴的な上昇が最初に報告され、その後 Guillain-Barré 症候群 (GBS) の部分症状として眼筋麻痺や失調をきたす例にもみられることが明らかになった。一方で同抗体は中枢神経障害をきたす Bickerstaff 型脳幹脳炎 (BBE) でも高率に陽性となる。同じ GQ1b を標的とする抗体の上昇が、なぜ一部の例で中枢神経障害もきたすのかは不明である。本研究では、この問題について血清学的観点から検討を行った。近年 MFS において、GQ1b を含むガングリオシド複合体 (GSC) に特異性をもつ抗体も報告されているため、抗 GSC 抗体の有無も含

めて検討した。

B. 研究方法

1) 対象

当施設に抗体検査依頼のあった検体について、GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b, GT1a の 9 種類のガングリオシドを抗原として抗体活性を ELISA 法で測定した。その結果、抗 GQ1b IgG 抗体が陽性であった BBE25 例 MFS39 例 GBS29 例を検討の対象とした。

2) 抗体測定

単独のガングリオシドに対する抗体測定は、通常の方法で行った。得られた吸光度 (OD) 値を抗体活性の指標とした。

ELISA 用マイクロタイタープレート上に GQ1b と phosphatidic acid (PA) 各 0.1 μ g の混合抗原、および GQ1b 単独抗原 0.2 μ g を固相化し、ELISA 法にて抗体測定して、両者に対する抗体活性を比較した。

GSC に対する抗体測定としては、GQ1b と GM1 および、GQ1b と GD1a を各 0.1 μ g 混合した抗原を固相化し、上記の ELISA 法で抗体活性を測定した。既法に基づき (Kaida K, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 1043-1046, 2006)、混合抗原に対する補正 OD 値が、各単独抗原に対するものより 0.2 以上大きい場合に、その二種類のガングリオシドの形成するエピトープに特異性をもつ抗体が存在すると判定し、抗 GSC 抗体陽性とした。

BBE, GBS, MFS の 3 群間で、抗 GQ1b 抗体価、他の抗体の陽性率、抗 GQ1b 抗体と抗 GT1a 抗体の活性の比較、GQ1b 抗原に PA 添加した場合の抗体活性の変化、抗 GSC 抗体の陽性率を比較検討した。

(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。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

抗 GQ1b IgG 抗体活性に 3 群間で差はなかった ($p=0.07$)。抗 GQ1b 抗体活性が抗 GT1a 抗体活性よりも高い例は BBE25 例中 20 例 80%、GBS29 例中 14 例 48.3%、MFS39 例中

21 例 79.5%で、GBS に比し BBE と MFS では抗 GQ1b 活性が抗 GT1a 活性より高いものが多かった (GBS:BBE $P=0.016$, GBS:MFS $P=0.007$)。

GQ1b と GT1a 以外の抗体の陽性率は、BBE では 25 例中 1 例 4%、GBS29 例中 13 例 44.8%、MFS39 例中 6 例 15.4%であり、GBS では GQ1b, GT1a 抗体以外の抗体陽性率は BBE と MFS に比し高かった (GBS:BBE $P=0.001$, GBS:MFS $P=0.007$)。

PA 添加にて抗 GQ1b 抗体活性が上昇する症例は、BBE では 25 例中 5 例 20%、GBS では 29 例中 15 例 51.7%、MFS では 39 例中 18 例 58.1%で、BBE では PA 添加での抗体活性の増強がみられる症例の比率が低かった (BBE:GBS $P=0.016$, BBE:MFS $P=0.033$)。抗 GSCs 抗体陽性率は、GBS29 例のうち 12 例 41.4%、MFS39 例のうち 14 例 35.8%、BBE では 25 例のうち 1 例 4.0%で、BBE では GBS や MFS に比べて有意に低かった。(BBE:GBS $P=0.001$, BBE:MFS $P=0.003$)

D. 考察

BBE と GBS および MFS の血清学的相違について検討した。その結果、抗 GQ1b 抗体価には 3 群で違いがみられなかった。また同時に上昇することの多い抗 GT1a 抗体活性との比較や、他のガングリオシド抗体の上昇率については、GBS と MFS および BBE の間に違いがみられたが、MFS と BBE には差がみられず、中枢障害の有無との関連は見出せなかった。

一方、抗 GSC 抗体の検討を行うと、BBE

では GSC に対する特異性をもつ抗体のみられる頻度は有意に低かった。このことから BBE における抗 GQ1b 抗体は、他のガングリオシドの共存下に立体構造の変化した抗原には反応が弱く、GQ1b そのものの糖鎖構造に強く反応することがわかる。すなわち、GQ1b の糖鎖に対する特異性がより強い抗体であると考えられる。PA 添加による抗体活性の増強が、MFS や GBS に比べて少ないことも、BBE では GQ1b そのものに対する特異性の強い抗体が上昇していることと合致する所見である。

MFS や GBS でも、GSC に反応の弱い抗体あるいは PA 添加で活性が上昇しない抗体は認められることから、こうした反応性をもつ抗体上昇が中枢神経障害をきたす十分条件ではない。また中枢神経障害をきたす要因については、抗体の反応性以外にも様々なメカニズムが考えられる。しかし、抗体の反応性の観点から、中枢神経障害をきたす必要条件が明らかになったことは、BBE の病態解明にとって意義のあることと考えられる。

E. 結論

GQ1b に対する特異性のきわめて高い抗体の上昇が、BBE の発症には必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* 182:212-8, 2007.
2. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. *Exp Neurol* 209: 279-283, 2008
3. Kusunoki S, van Doorn P. Predictors of respiratory failure in Guillain-Barré syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 3: 430-431, 2007.
4. Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology*, in press.
5. Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press.

6. Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research. Bioch Biophys Acta, in press.
2. 学会発表
1. Kusunoki S, Kaida K. IgG antibody highly specific to GD1b is specifically associated with ataxia in Guillain-Barré syndrome. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007. J Periph Nerv Syst 12(Suppl): 47, 2007.
 2. Kaida K, Kanzaki M, Sada M, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007. J Periph Nerv Syst 12(Suppl): 42, 2007.
 3. Kusunoki S, Kaida K. IgG antibodies highly specific to GD1b in Guillain-Barré syndrome with ataxia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007. Ann Neurol 62(Suppl): S7, 2007.
 4. Kaida K, Kanzaki M, Sada M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007. Ann Neurol 62(Suppl): S62, 2007.
 5. 楠 進. Fisher症候群および関連疾患の病態、診断と治療。第45回日本神経眼科学会総会（2007年12月1日、大阪）
- 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

厚生労働化学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（分担）研究報告書

レプトスピラ感染に伴う神経障害における抗ガングリオシド抗体の役割に関する研究

分担研究者 清水 潤 東京大学医学部附属病院神経内科

研究要旨： レプトスピラ感染と血液中の抗ガングリオシド抗体の上昇の病的意義を明らかにする目的で、ギラン・バレー症候群(GBS)とレプトスピラ症の患者血清に関して、症例数を増やして検討した。GBS20例の血清では、レプトスピラ感染診断用のMCAT法で5例が陽性であったがMAT法では陰性であり、発症にレプトスピラ感染の関与は否定的であった。一方、レプトスピラ症11例の血清では、6例で抗ガングリオシド抗体が陽性で、重症型ワイル病では5例中の4例で陽性であった。レプトスピラ菌体内部にはGBS患者の血清と交叉反応しやすい抗原が存在すること、重症型のレプトスピラ症で高率に血清中に抗ガングリオシド抗体が出現することが明らかになった。

A. 研究目的

昨年度の研究で、レプトスピラ感染に伴い神経症状の出現とともに血液中の抗ガングリオシド抗体の上昇を認めた51歳男性症例を報告し、レプトスピラ感染と抗ガングリオシド抗体上昇との関連を指摘した。本年度は症例を増やし、レプトスピラ感染と抗ガングリオシド抗体上昇の関連と意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

血清中に抗ガングリオシド抗体が検出されたギラン・バレー症候群(GBS)20例の血清について、レプトスピラ感染診断用のマイクロカプセル凝集試験(MCAT法)および顕微鏡下凝集試験(MAT法)で検討した。

また、レプトスピラ感染が血清学的に明らかでない11例の回復期の血清を用いて、抗ガングリオシド抗体の有無を検討した。

本研究においては、東京大学倫理委員会の倫理規定に基づきおこなわれ、患者さまのプライバシーに配慮した。

C. 研究結果

GBS20例中の5例がMCAT法で陽性。MCAT陽性例における血清中の抗ガングリオシド抗体は、IgG型は、GM1、GD1b、GQ1、GalNAc-GD1a、IgM型はGM1、GM2、GQ1bなどさまざまであり、抗ガングリオシド抗体の反応性とMCATの結果には、特定の相関はなかった。また、陽性反応のみられた症例の臨床像には、一定のパターンはなかった(表1)。一方、これらのMCAT陽性例の血清に関して、国内で報告のあるレプトスピラ血清型の15株を用いてMAT法感染の有無を検討したが陰性であった。

レプトスピラ症 11 例の血清の検討では、6 例で抗ガングリオシド抗体が陽性であった (表 2)。IgG 型は抗 GD1b, GD1a がそれぞれ 3/6 例、GM1, GT1b, GQ1b が 2/6 例で出現し、IgM 型は GD1b 3/6 例で出現し、出現した抗ガングリオシド抗体の種類はさまざまであった。菌体の血清型との関連では、重症型のウイルス病で 4/5 例が陽性であり、比較的軽症の思われる患者血清でも 1 例で抗ガングリオシド抗体を認めた。レプトスピラ感染症例の末梢神経障害を含めた神経症状との関連では、特に重症例では筋痛のために神経障害の評価が不十分なものが多く、詳細な検討はできず課題となった。

D. 考察

GBS 症例では、レプトスピラの生菌と血清を反応させる MAT 法では、すべて陰性であり、レプトスピラ症の感染は否定的と考えられた。一方、MCAT 法は破碎菌体抗原と血清との反応をみており、レプトスピラ感染で高率に抗ガングリオシド抗体が検出されたことは、レプトスピラ菌体内部には GBS 患者の血清と交叉反応しやすい抗原が含まれることが考えられた。

レプトスピラ感染に伴う神経症状としては二次性の宿主の免疫反応として無菌性髄膜炎が知られ、少数例であるが GBS の報告も過去にされているが、その病態機序は不明である。本検討の結果、特に重症型ウイルス病の感染後には高率に広範な抗ガングリオシド抗体の出現がみられることが明らかになり、レプトスピラの感染に伴う抗ガングリオシド抗体の関与した免疫反応として神経症状が出現する可能性が示唆された。

E. 結論

レプトスピラ感染、特に重症型のウイルス病後に高率に血清中抗ガングリオシド抗体が出現することが明らかになった。重症型のウイルス病では筋痛のために末梢神経障害を含めた神経障害の評価が不十分なものが多く、神経症状との関連の検討は課題となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 19 回 日本神経免疫学会学術集会 (金沢)「レプトスピラ症に下肢筋力低下と振動覚低下を伴い、抗ガングリオシド抗体陽性を認めた一症例」 東京大学医学部附属病院神経内科

○長谷川路子 橋本明子 杉本泉 清水潤 後藤順 辻省次

同感染症内科 太田康男

国立感染症研究所 小泉信夫

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

表1 MCAT試験陽性 5例のGBS患者の臨牀像

年齢/ 性	先行症状				IgM	GM1	GM2	GD1a	GD1b	GT1b	GQ1b	GA1	GalNac GD1a	GalNac GM2
	上気道 症状	消化器 症状	その他	神経症状										
37男	(-)	下痢	インドに 滞在後	下肢筋力 低下、嚔	IgM IgG	+			+++					
52男	(+)	下痢		四肢筋力 低下	IgM IgG	+			++				+++	
	(+)	(-)		四肢筋力 低下、眼	IgM IgG		+				+		+++	
25女	(-)	下痢	発熱、関 節痛	四肢筋力 低下、上	IgM IgG	+		+						
62男	(+)	(-)		四肢筋力 低下	IgM IgG	++								

表2. レプトスピラ症例の抗ガングリオシド抗体の測定結果

年/性	血清型	症状						IgM	GM1	GM2	GD1a	GD1b	GT1b	GQ1b	GA1	GalNac GD1a	GalNac GM2
		発熱	黄疸	結膜 充血	肝 障害	腎 障害	筋 痛										
51/M	Weil	+	+	+	+	+	+	IgM IgG	+		+	++				++	+
53/F	Weil		+	+	+	+	+	IgM IgG	+	+	+	+	+				
59/M	unknown		+		+	+	+	IgM IgG			+						
62/M	Weil		+		+	+		IgM IgG	+		+	++	+	+			
54/M	Weil	+	+		+	+	+	IgM IgG				+			+		
51/M	秋やみ	+				+	+	IgM IgG				+					
65/M	Weil		+	+	+	+		IgM IgG									
62/M	秋やみ			+				IgM IgG									
34/M	秋やみ		+		+	+		IgM IgG									
54/M	秋やみ	+		+			+	IgM IgG									
74/M	秋やみ	+		+		+	+	IgM IgG									

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Kusunoki S.</u>	Antiglycolipid antibodies in autoimmune neuropathies: new aspects of research.	Broglio PV	Neuroimmunology Research Focus	Nova Science Publishers, Inc.	New York	2007	85-99

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, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, <u>Kusunoki S.</u>	Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS.	J Neuroimmunol	182	212-218	2007
Hamaguchi T, Sakajiri K, Sakai K, Okino S, Sada M, <u>Kusunoki S.</u>	Guillain-Barré syndrome with antibodies to GD1a/GD1b complex.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	78	548-549	2007
Fujita A, Cheng J, Hirakawa M, Furukawa K, <u>Kusunoki S.</u> , Fujimoto T.	Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling.	Mol Biol Cell	18	2112-2122	2007
<u>Kusunoki S.</u> , van Doorn P.	Predictors of respiratory failure in Guillain-Barré syndrome.	Nat Clin Pract Neurol	3	430-431	2007
Takada K, Shimizu J, <u>Kusunoki S.</u>	Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy.	Exp Neurol	209	279-283	2008
<u>Kusunoki S.</u> , Kaida K, Ueda M.	Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research.	Bioch Biophys Acta,		in press.	2008
<u>Kusunoki S.</u>	Molecular mimicry in development of Guillain-Barré syndrome.	Journal Watch Neurology	10	6-7	2008
Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, <u>Kusunoki S.</u>	Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	Glycobiology.		in press.	2008
Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, <u>Kusunoki S.</u>	Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes.	J Neurol Neurosurg Psychiatry		in press.	2008
<u>桶 進.</u>	リピドラフトの自己免疫からみた末梢神経障害: Guillain-Barré 症候群をモデルとして。	Medical Science Digest	34	18-21	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
清水潤	C型肝炎ウイルスと末梢神経障害	柳澤信夫ら、	Annual Review 神経	中外医学社	東京	2008	262-267
橋本明子、 国本雅也、 清水潤、村 山繁雄、横 地正之	胸腺腫に末梢神経障害を合併した後、BO OP, myokymia、てんかんを発症し、抗VGKC抗体の高値を認めた 62歳男性例		Brain and Nerve	医学書院	東京	2007	1395-1405
清水潤	膠原病 (SLE, MCTD, PN) によるミエロパチー		脊椎脊髄ジャーナル	三輪書店	東京	2007	1089-1093
清水潤	脊髄サルコイドーシスを疑う47歳男性例		脊椎脊髄ジャーナル	三輪書店	東京	2008	69-76

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
Matsumoto L, Yamamoto T, Higashihara M, Sugimoto I, Kowa H, Shibahara J, Nakamura K, Shimizu J, Uga wa Y, Goto J, Dalmau J, Tsuj i S.	Severe hypokinesia caused by paraneoplastic anti-Ma2 encephalitis associated with bilateral intratubular germ-cell neoplasm of the testes.	Mov Disord.	22	728-731	2007
Takada K, Shimizu J, Musunoki S	Apoptosis of primary sensory neurons in GDI1-induced sensory ataxic neuropathy	Exp. Neurol.	209	279-283	2008

Chapter III

Antiglycolipid Antibodies in Autoimmune Neuropathies; New Aspects of Research

*Susumu Kusunoki**

Department of Neurology, Kinki University School of Medicine, Japan

ABSTRACT

In autoimmune neuropathies such as Guillain-Barré syndrome (GBS) and IgM paraproteinemic neuropathy, serum antiglycolipid antibodies are frequently elevated in titer. Those antibodies are useful diagnostic markers and some of them may be directly involved in the pathogenetic mechanisms. In GBS, the carbohydrate structures of the microorganisms of the antecedent infections that mimic those of human glycolipids may induce production of the antiglycolipid antibodies. "Molecular mimicry" mechanism has been shown in the production of antiganglioside antibodies after *Campylobacter jejuni* infection and antigalactocerebroside antibodies after *Mycoplasma pneumoniae* infection. The antibodies may specifically bind to the regions where the respective antigens are located (for example, the antibodies against the ganglioside GQ1b may cause ophthalmoplegia by binding to the paranodal regions of the oculomotor, trochlear, and abducens nerves, where GQ1b is densely localized). We have proved this hypothesis by inducing sensory ataxic neuropathy in rabbits sensitized with the ganglioside GD1b, which is localized in the primary sensory neurons conveying deep sensation. We have recently found that the antibodies that specifically recognize a new conformational epitope formed by two gangliosides are sometimes present in the acute-phase sera of GBS patients. In particular, the antibodies against GD1a-GD1b complex are associated with severe GBS requiring artificial ventilation. Gangliosides are preferentially packaged with cholesterol to form lipid rafts, in which the carbohydrate portions of two different gangliosides may form a new conformational epitope. Within the rafts, gangliosides are considered to interact with important receptors or signal transducers. The antibodies

* Corresponding Author: Susumu Kusunoki; 377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan; Tel: +81-72-366-0221; Fax: +81-72-368-4846; e-mail: kusunoki-ky@umin.ac.jp

against ganglioside complex may therefore directly induce nerve conduction failure and severe disability in GBS. More study is needed to elucidate the roles of antiglycolipid antibodies in the pathogenetic mechanisms of autoimmune neuropathies.

INTRODUCTION

In immune-mediated neuropathies such as Guillain-Barré syndrome (GBS) and IgM paraproteinemic neuropathy, antiglycolipid antibodies, which specifically recognize the carbohydrate portion of the glycolipids, are frequently present in the patients' sera. There are diversities in the carbohydrate sequences of the glycolipids (figure 1). Each glycolipid has a unique distribution within the peripheral nervous system. Those antibodies can be used as useful markers for diagnosis. In addition, considering that the glycolipids are localized in the plasma membrane with their carbohydrate portions extended to the extracellular spaces, they may be involved in the pathogenetic process.

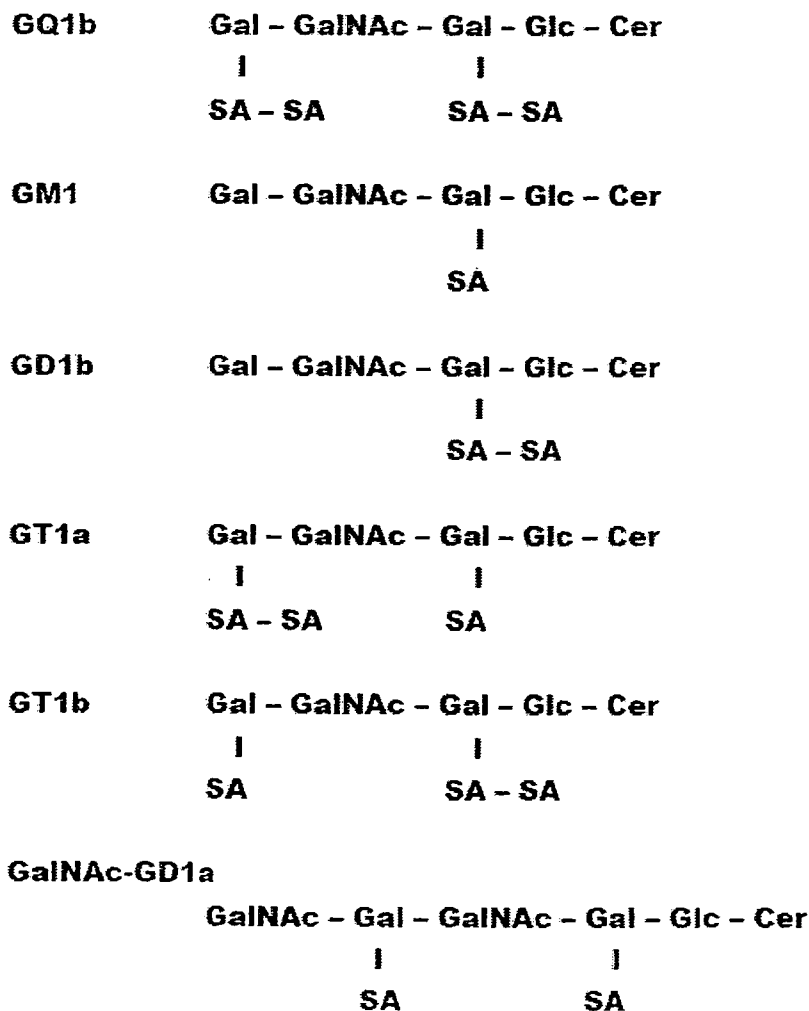


Figure 1. Carbohydrate sequences of gangliosides; Gal: galactose, GalNAc: N-acetylgalactosamine, Glc: glucose; SA: sialic acid, Cer: ceramide, SA-SA: disialosyl residue.