

HAM 発症を抑制、または促進する免疫遺伝学的背景

宇宿 功市郎¹⁾ ジェラルド・サラザール¹⁾ 松岡英二 松元渉 児玉大介 竹之内徳博
 延原康幸 古川良尚 納 光弘²⁾ 出雲周二³⁾ ケイティ・ジェフェリイ¹⁾ チャールズ・バンナム⁴⁾

目 的

HTLV-I-associated myelopathy (HAM)は HTLV-I 感染者の一部に発症する慢性進行性の脊髄疾患であり、痙性脊髄麻痺、膀胱直腸障害を示す。疾患概念確立の当初から HAM 発症に関連する特有の HTLV-I があるのではないかと考えられ、精力的に HTLV-I の sequence の解析が精力的に行われたが、今までのところ HAM に特有の HTLV-I は発見されていない。また HAM では spontaneous proliferative response、HTLV-I 特異的 CTL をはじめとする細胞性免疫、血清・脳脊髄液中の高 HTLV-I 抗体価(液性免疫)など免疫反応が亢進しているにも関わらず、HTLV-I プロウイルス量が HTLV-I キャリアに比し増加しており、何故そうなるか全て解明されているわけではない。加えて HTLV-I プロウイルス量と HAM 発症の相関が報告されており、末梢血リンパ球の1%以上の細胞が HTLV-I に感染するとその発症リスクが飛躍的に上昇することがわかってきている。今回 HAM 発症に関連する免疫遺伝学的背景の検討を鹿児島県在住の集団で行い、さらに他の地域での検討を加えたので報告する。

対 象 と 方 法

鹿児島県在住ならびに他地域の HAM 患者、HTLV-I キャリアよりヘパリン加末梢血を採血し、その末梢血リンパ球より定法により genomic DNA を抽出後、PCR-SSP 法で HLA classI、classII タイピングを行った。また ABI Prism7700™にて HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により計測した。

結 果

HLA classI の解析から HAM 患者では HLA-A*02 を持つものが HTLV-I キャリアに比して低下していることが観察された(表)。これは、英国在住 HAM 患者、カリブ海沿岸

在住 HAM 患者、ブラジル在住 HAM 患者でも同様の傾向が見られた。

また HLA-A*02 保有者と非保有者において HTLV-I ウイルス量に差が見られるかを検討した。この検討では、HTLV-I キャリア集団では HLA-A*02 保有者において HTLV-I プロウイルス量が低いことが観察された(表)。

HLA classII の解析では、HLA-DRB1*0101 保有者の頻度が HAM 群においてキャリア群より有意に増加していることが明らかとなった(表)。この HLA-DRB1*0101 の HAM 発症促進効果は、HLA-A*02 を持たない HAM 患者ではより強くみられた。即ち HTLV-I キャリアからの発症率は HLA-DRB1*0101 を持つ場合には7%増加するが、HLA-A*02-DRB1*0101+の場合には11%増加していた。次に HAM 群、HTLV-I キャリア群において HTLV-I プロウイルス量を定量し、HLA-DRB1*0101 保有、非保有の各2群にわけ、各群の HTLV-I プロウイルス量について検討を加えたところ、HTLV-I キャリア群においては HLA-DRB1*0101 保有、非保有にかかわらず HTLV-I プロウイルス量には差が見られなかったが、HAM 患者群では HLA-DRB1*0101 保有者における HTLV-I プロウイルス量が非保有者群に比し有意に低い(p=0.024)ことが観察された。加えて HTLV-I プロウイルス量から計算される HAM 発症リスクは、HLA-DRB1*0101 保有者において2倍に増加していた。

考 察

これまでの検討から HTLV-I 感染と HTLV-I ウイルス量の増加が HAM 発症に必要なことは明らかとなっていたが、今回の検討で特定の免疫遺伝学的背景を持つ集団に HAM 発症が多くまたは少なく見られることが確かとなった。

HLA-A*02 を保有することで Odds 比は 0.43 即ち約半分になり、Bayes の定理より HTLV-I キャリアからの

1)鹿児島大学医学部医療情報管理学 2)鹿児島大学第三内科 3)鹿児島大学難治ウイルス研 4)インペリアル大学免疫学

HAM 発症を 28%抑制していることが示された。プロウイルス量より計算される HAM 発症リスクは HLA-A*02 保有者と非保有者において変わりはなく、HLA-A*02 の HAM 発症予防効果は HTLV-I キャリアにおいて HTLV-I プロウイルス量を減らすことで生じているものと考えられた。HAM 発症を抑制する場合には、HTLV-I ウイルス量を HTLV-I キャリアにおいて減ずることで達成されており、HAM 発症を促進する場合には、HAM 発症に必要なかつ十分な HTLV-I ウイルス量を少なくすむ状況を作り出すことで達成しているものと考えられた。

HAM 発症のメカニズムは現在のところ HTLV-I ウイルスの増加とそれに対する過剰な免疫応答により発症に至るものと考えられているが、HAM 病変脊髄内での HTLV-I 感染細胞は神経組織固有の細胞には見られておらず、主として CD4 陽性の T 細胞である。従って脊髄内に HTLV-I を運び込む細胞は CD4 陽性 T 細胞であると考えられ、この HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞への免疫応答の強弱、それに引き続く過剰反応の強弱が HAM 発症に重要であると考えられた。HAM 発症抑制に関連する HLA-A*02 の効果は、鹿児島在住の HAM のみならず、英国在住 HAM 患者、カリブ海沿岸在住 HAM 患者、ブラジル在住 HAM 患者でも見られ、HTLV-I キャリア集団で HTLV-I プロウイルス量を減じ、HAM 発症を抑制することが必要かつ可能であることを示しているものと考えている。

表. HAM、HTLV-I キャリアにおける HLA-A*02, DRB1*0101 頻度と HTLV-I ウイルス量

	HAM	HTLV-I* ウイルス量	HTLV-I キャリア	HTLV-I ウイルス量
A*02+	69 ^a	524.8	100	16.8 ^c
A*02-	163	616.6	101	50.1
DRB1*0101+	34 ^b	331.1 ^d	20	49.0
DRB1*0101-	161	602.6	163	34.7

a: HAM vs HTLV-I carrier $\chi^2=17.3$, $p<0.0001$, Odds ratio=0.43

b: HAM vs HTLV-I carrier $\chi^2=2.8$, $p=0.049$, Odds ratio=1.72

c: A*02+ vs A*02- $p=0.014$ d: DRB1*0101+ vs DRB1*0101- $p=0.024$

*:HTLV-I ウイルス量は末梢血リンパ球 10^4 個当りのプロウイルス量である

ま と め

今回 HAM 発症を抑制または促進する免疫遺伝学的背景が明らかとなった。HLA-A*02 が HAM 発症を抑制、HLA-DRB1*0101 が HAM 発症を促進することが示された。

文 献

1. Bangham CR, Hall SE, et al : Genetic control and dynamics of the cellular immune response to the human T-cell leukaemia virus, HTLV-I. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354:691-700, 1999
2. Jeffery KJ, Usuku K, et al : HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3848-53, 1999
3. Saito M, Nakamura N, et al : Increased levels of soluble Fas ligand in CSF of rapidly progressive HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *J Neuroimmunol* 98:221-6 1999
4. Nagai M, Usuku K, et al : Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 4:586-93, 1998
5. Kawahigashi N, Furukawa Y, et al : Predominant expression of Fas ligand mRNA in CD8+ T lymphocytes in patients with HTLV-1 associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 90:199-206, 1998

Lambert-Eaton筋無力症候群におけるトキシン結合阻害型抗電位依存性カルシウムチャンネル抗体の検討

丸田 高広, 駒井 清暢, 吉川 弘明*, 山田 正仁, 高守 正治**

目 的

Lambert-Eaton筋無力症候群 (以下LEMS) の病因には、電位依存性カルシウムチャンネル (以下VGCC) に対する抗体が直接的に関与する。現在行われている抗VGCC抗体測定法は、 ω -コノトキシンMVIC (以下CmTx, トキシン) とVGCCの複合体を標識抗原として、これに結合する抗体 (いわゆる結合型抗体) を2抗体免疫沈降法で検出している¹⁻⁴。しかし、その抗体価は必ずしも臨床所見とは一致せず、少数の抗体陰性例が存在する。一方、VGCCとCmTxの結合を拮抗阻害する抗体 (いわゆる阻害型抗体) は、現行の測定法では検出されない。このため、高力価の結合型抗体を用いた阻害型抗体測定法が考えられている⁵。しかし、この方法は介在する反応が多く、VGCCに特異的な抗体としてヒト由来の血清を使うことによる影響があり得ることや、被検血清の結合型抗体をも2次抗体が検出して誤差を招く可能性がある。そこで、本報告では新しい阻害型抗体測定法を考案し、実際にLEMSおよび対照患者において測定した。

対象および方法

I. 対象

結合型抗体陽性LEMS患者20例, 結合型抗体陰性LEMS患者8例, 正常対照20例, 病的対照として重症筋無力症 (以下MG) 20例, 筋萎縮性側索硬化症 (以下ALS) 19例, パーキンソン病 (以下PD) 3例, 非LEMSの肺小細胞癌 (以下SCLC) 5例の血清で阻害型抗体検出を試みた。

II. 抗原の調整 (抗原中のトキシン結合部位確認)

まず抗原のソースとして、ヒト小脳から遠心分離法でP2画分 (粗ミトコンドリア画分) を分離し、リン酸緩衝液 (以下PB) を加え、P2画分浮遊液を作製した。次に、異なる量のP2画分浮遊液に¹²⁵I標識CmTxを加え、反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。さらにP2画分浮遊液に、異なる量の非標識CmTx, あるいはウシ血清アルブミン (以下BSA) を加えた後、¹²⁵I標識CmTxを加え、反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。

III. 阻害型抗P/Q型VGCC抗体測定

まず、P2浮遊液に、PBあるいは被検血清を加えて反応させた後、¹²⁵I標識CmTxを加え、反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。抗体価はCmTx・VGCC結合の阻害率 (即ち(A-B)/A) で表示し、阻害率が負になるものは0%とした。また、阻害型抗体陽性例と対照で血清量を変えた際の阻害率も測定した。

IV. 統計学的検討

阻害型抗P/Q型VGCC抗体価は対照の平均+3SDを越えるものを陽性と定義し、両抗体価の関連についてはSpearmanの順位相関係数の検定を行った。

結 果

I. VGCC抗原の調整 (図1, 2)

抗原中のトキシン結合部位確認実験では、P2画分浮遊液を0 μ lから30 μ lまで増量すると、放射能がほぼ直線的に上昇したが、P2画分浮遊液を30 μ lから40 μ lまで増量しても、放射活性はほとんど変化しなかった。また、BSAを加えても放射活性は低下しなかったが、非標識CmTxを加えると、用量依存的に計数率が低下した。

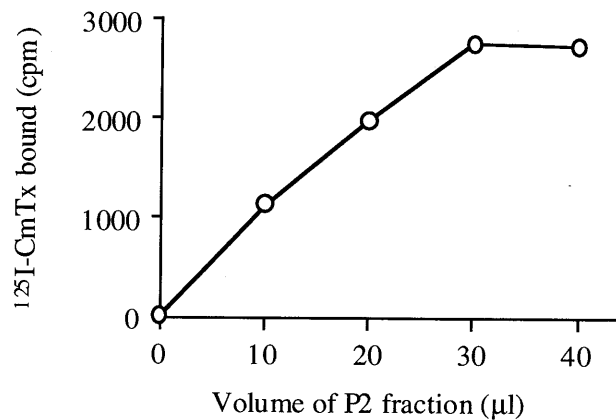


図1. CmTx・VGCC結合部位定量実験

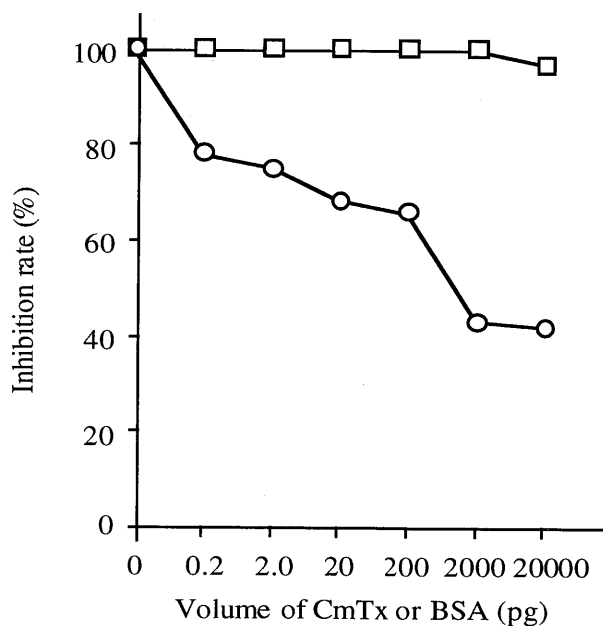


図2. CmTx・VGCC結合阻害実験

金沢大学医学部神経内科

* 金沢大学保健管理センター

** 金沢西病院脳神経センター

II. 阻害型抗P/Q型VGCC抗体測定 (図3, 表1)

正常対象の平均+3SDは1.7%であった。結合型抗体陽性LEMS 20例の内10例では1.7%を越え、陽性を示した。結合型抗体陰性LEMS 8例の内2例でも阻害率が1.7%を越え、陽性を示した。また、病的対照ではALS 1例のみが11.5%の阻害型抗体陽性を示したが、他疾患例は全て陰性であった。なお、阻害型抗体陽性ALS例の結合型抗体は陰性であった。加える血清量を変えた場合、対照の阻害率は変化しなかったが、陽性LEMS患者血清は加えた血清の量に依存して阻害率が上昇した。阻害型と結合型の両抗体陽性例での両抗体価には有意な相関関係を認めなかった。

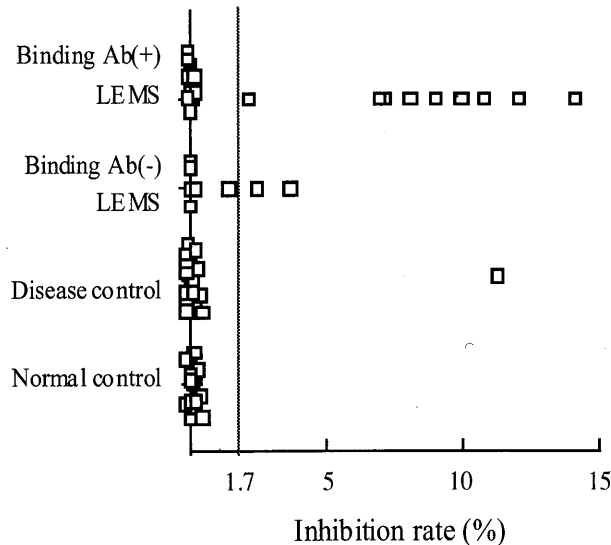


図3. 阻害型抗VGCC抗体

表1. 阻害型抗VGCC抗体陽性率

	陽性率	
結合型抗体陽性LEMS	50.0%	(10/20)
結合型抗体陰性LEMS	25.0%	(2/8)
MG	0.0%	(0/20)
ALS	5.3%	(1/19)
PD	0.0%	(0/3)
健常者	0.0%	(0/20)

考 察

LEMSにおける抗VGCC抗体の検出法は既に報告されているが、LEMS患者の5-26%では抗体が検出されず、その抗体価も臨床症状とは一致しない。このような現象を説明するためには、少なくともカルシウム依存性ACh放出機構に関わり、かつ膜外に露出して病原抗体の標的となりうる蛋白質に対する抗体、すなわち抗シナプトタグミン抗体などの存在や、現行の方法では検出されない抗VGCC抗体の存在などを想定する必要がある。このため、現行の方法と異なる新しい阻害型抗VGCC抗体検出法を考案した。

阻害型抗体検出にはトキシン・蛋白複合体の検出が必要で、この検出法は、重症筋無力症において高抗体価結合型抗体を使った免疫沈降法、カラムに吸着する吸着法、フィルターで濾過する濾過法の3通りが報告されている。このなかで免疫沈降法を使った阻害型抗体検出法は、介在する反応が多く、複数のヒト血清を同時に使うことで誤差を大きくする可能性が否定できない。一方、吸着法と濾過法を使った場合2次抗体の反応がないため、理論的に誤差が少なく、被検血清の結合型抗体の影響を受けない。このため、予備実験により濾過法でCmTx・VGCC結合部位の定量が可能であることを確認した上で、阻害型抗体検出に濾過法を選択した。

この新しい抗体検出法で患者血清の阻害型抗VGCC抗体を測定したところ、50%の結合型抗体陽性LEMS患者血清と25%の結合型抗体陰性LEMS患者血清で阻害型抗体が陽性となった。一方、対照血清はALS1例を除いた全例で阻害型抗VGCC抗体が陰性であった。以前より、ALSで結合型抗VGCC抗体が陽性になる報告が散見されるが、本ALS例での阻害型抗体の意義は今後の検討を要すると考えられる。

LEMSでは、結合型抗VGCC抗体を含め多様な病原抗体が関与する可能性がある。本研究で考案した新しい抗体測定法はLEMSの臨床のみならずVGCC機能の解析においても重要な意味を持つ可能性があり、今後更により多数例での検討を加えることが重要である。

ま と め

本研究では新しい阻害型抗VGCC抗体検出法を考案し、以下の結論を得た。

- 1) P2画分を用いた濾過法によって、VGCCとCmTxの結合を特異的に阻害する、阻害型抗VGCC抗体がLEMSにおいて検出された。
- 2) 本方法により、阻害型抗体のみが陽性になる症例の存在を証明した。

文 献

- 1) Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Wopmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 332: 1467-1474, 1995
- 2) Motomura M, Johnston I, Lang B, Vincent A, Newsom-Davis J. An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 85-87, 1995
- 3) Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J. Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Sci* 147: 35-42, 1997
- 4) Suenaga A, Shirabe S, Nakamura T, Motomura M, Tsujihata M, Matsuo H, Kataoka Y, Niwa M, Itoh M, Nagataki S. Specificity of autoantibodies react with omega-conotoxin MVIIC-sensitive calcium channel in Lambert-Eaton myasthenic syndrome.

Muscle Nerve 19: 1166-1168, 1996

5) Nakao KY, Motomura M, Suenaga A, Nakamura T, Yoshimura T, Tsujihata M, Mori M, Itoh M, Nagataki S. Specificity of omega-conotoxin MVIIC-binding and -blocking calcium channel antibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol* 246: 38-44, 1999

LEMS 患者血清のパッシブトランスファーを用いた抗 P/Q 型 VGCC 抗体の

生理学的機能の検討

福留隆泰¹⁾、本村政勝²⁾、渋谷統壽¹⁾、松尾秀徳¹⁾

目的

Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome (LEMS)の15%では抗 P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネル抗体 (抗 VGCC 抗体) が陰性 (seronegative LEMS) であるが、臨床像は陽性例とほぼ同様である。電気生理学的には、2 倍に満たない waxing 現象を示す症例と2 倍以上の明らかな waxing 現象を示す症例間で抗 VGCC 抗体の陽性率に差はない。本研究では、低頻度連続神経刺激での筋電図所見と抗 VGCC 抗体との関連を検討した。さらに、LEMS 患者血清を用いてマウスへのパッシブトランスファーを行い抗 VGCC 抗体の有無による違いを微小電極法にて検討した。

方法

(1) LEMS 82 症例の低頻度神経連続刺激での CMAP の漸減現象の有無と抗 VGCC 抗体の陽性率について比較した。また漸減パターンを重症筋無力症 (MG) の漸減パターンと比較した。

(2) LEMS 患者及び正常人コントロール (n = 3) の IgG を生成し、20~30g の BK10 マウスの tail vein に 10 mg を注入した。LEMS 患者血清には抗 VGCC 抗体が陽性 (n = 2) のものと陰性 (n = 2) のものを用い、陰性例のうち1例は抗シナプトタグミン抗体が陽性であった。1 検体につき 2~4 匹のマウスにパッシブトランスファーを行った。静注後 1~2 日で横隔膜神経筋標本を作成し、微小電極法にて MEPP と EPP を記録した。MEPP は 15~20 の運動終板から EPP は 10~15 の運動終板から記録した。EPP 記録では 0.5 Hz の連続神経刺激で quantal content を求め、2 Hz、3 Hz、5 Hz および 40 Hz の神経連続刺激で電気生理学的検討を行った。

結果

(1) 筋電図所見では低頻度神経連続刺激で漸減現象を示す例は 82 例中 64 例であったが、その中で抗 VGCC 抗体陰性は 1 例のみであった (抗体陽性率 98%)。一方、漸減現象を示さない例は 18 例であったが、その中で抗 VGCC 抗体陰性は 7 例であった (抗体陽性率 61%)。(表 1)

(2) LEMS が低頻度神経連続刺激筋電図で示す漸減現象は単相性で、1 本の指数関数曲線に当てはまった。(図 1)

(3) 微小電極記録ではコントロール群の MEPP 振幅は 1.36 ± 0.18 mV で quantal content は 45.5 ± 5.7 であった。抗 VGCC 抗体陽性群では MEPP 振幅は 1.43 ± 0.07 、 1.32 ± 0.06 と有意差なかったが、quantal content は 28.6 ± 2.0 、 27.3 ± 1.8 と減少していた。抗 VGCC 抗体陰性群では MEPP 振幅は 1.43 ± 0.06 、 1.42 ± 0.07 と有意差なかったが、quantal content は 26.1 ± 2.1 、 26.0 ± 1.6 と減少していた。また、LEMS 患者血清では抗 VGCC 抗体の有無に関わらず 40 Hz の連続神経刺激で early facilitation を認めた。(図 2)

(4) 2 Hz、3 Hz および 5 Hz での EPP 振幅漸減パターンをみたところ、抗 VGCC 抗体が陽性の例では、そうでない例に比べて漸減が単相性で指数関数曲線に良く当てはまった。(図 3)

表 1. LEMS の低頻度神経連続刺激筋電図所見と抗 VGCC 抗体価

	Initial CMAP amp (mV)	VGCC antibody (pmol/L)
Decrement (+) (64/82例)	1.99 ± 2.3	$1,036 \pm 147$ (陰性: 1例)
Decrement (-) (18/82例)	$2.54 \pm 2.1^*$	$979.9 \pm 205^*$ (陰性: 7例)

values are mean \pm S.D.
*not significant (paired Student's t-test)

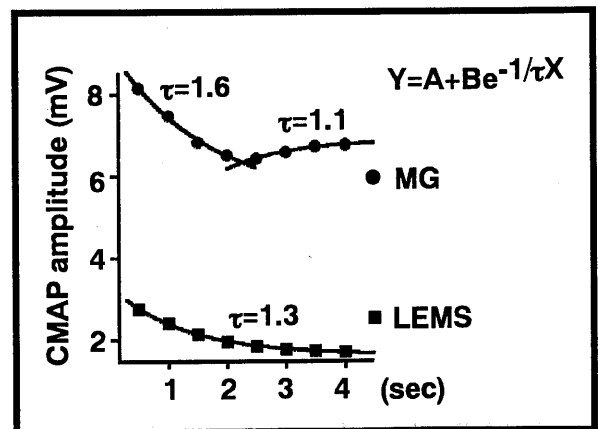


図 1. MG と LEMS の低頻度神経連続刺激における CMAP 振幅の変化

¹⁾ 国立療養所川棚病院, ²⁾ 長崎大学医学部第一内科

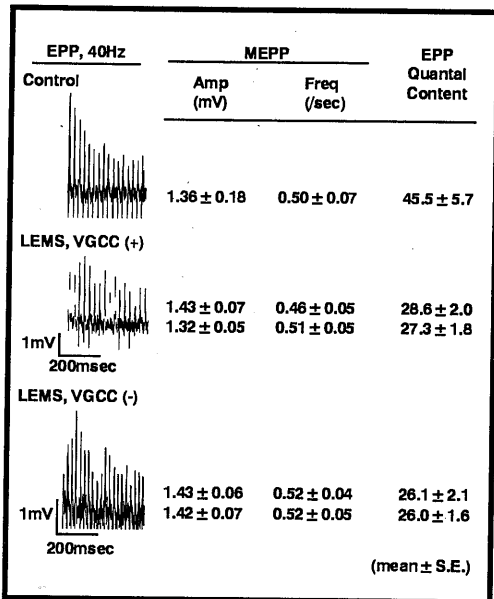


図2. LEMS 患者 IgG をマウスにパッシブトランスファーして得られた微小電極記録結果

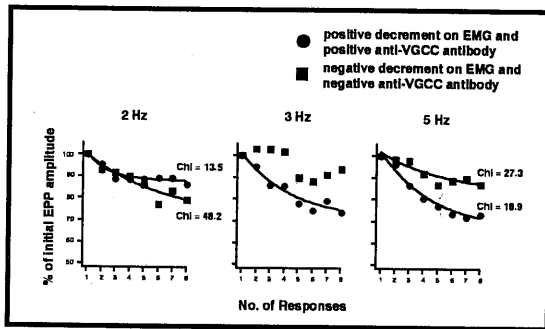


図3. 低頻度神経連続刺激における EPP 振幅の変化

考 察

(1) 抗 P/Q 型 VGCC 抗体が陰性の LEMS 患者では、パッシブトランスファー実験が補助診断として有用と考えられた。

(2) 抗 P/Q 型 VGCC 抗体の生理学的機能として、低頻度神経連続刺激における神経筋伝達障害が考えられた。

(3) LEMS の病原性抗原として VGCC やシナプトタグミンが考えられているが、これに対する抗体の有無に関わらずパッシブトランスファーは成立した。これは抗体測定における偽陰性を考慮しなければならないが、抗 VGCC 抗体の有無では低頻度神経連続刺激に対する反応に違いがあることから、LEMS の病原性抗原の多様性が推測される。

ま と め

(1) LEMS のパッシブトランスファーは抗 VGCC 抗体や抗シナプトタグミン抗体の有無に関わらず成立した。

(2) LEMS の抗 VGCC 抗体陽性率は低頻度連続神経刺激筋電図検査で漸減現象を示す群で高く、示さない群で低かった。その漸減パターンは単相性で一つの指数関数曲線に良く当てはまった。

(3) 2, 3, 5Hz 連続神経刺激における EPP 振幅の漸減パターンをみると、抗 VGCC 抗体陽性例では陰性例に比べて単相性に漸減し指数関数曲線に良く当てはまった。

文 献

中村龍文ほか：Lambert-Eaton 筋無力症候群：本邦 110 症例の臨床的検討。厚生省特定疾患免疫神経疾患調査研究班 平成 10 年度研究報告書,103-105,1999

Lambert-Eaton筋無力症候群を合併する傍腫瘍性小脳変性症の発症機序：剖検小脳のP/Q型カルシウムチャンネル量の検討

中村龍文, 本村政勝, 福田 卓, 一瀬克浩, 江口勝美, 吉村俊朗*, 中尾洋子**, 岩永圭介**, 辻畑光宏**

目 的

Lambert-Eaton筋無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome, LEMS) は, P/Q型電位依存性カルシウムチャンネル (P/Q-type voltage-gated calcium channel, P/Q-VGCC) に対する自己抗体がその発症機序に重要である^{1,2)}. さらに, LEMSの一部には, 傍腫瘍性小脳変性症 (Paraneoplastic cerebellar degeneration, PCD) が合併することも知られている^{3,4)}. 我々の報告では, LEMS61例中6例 (9.8%) にPCD (以下LEMS-PCDと表す) を合併していた⁵⁾. そのLEMS-PCDの特徴は, 全例が血清P/Q-VGCC抗体陽性で, かつ, 肺小細胞癌を合併しており, LEMS単独より, 自己免疫性かつ傍腫瘍性機序の関与が強い疾患と推察される. 本研究では, LEMS-PCDの発症における標的抗原としてP/Q-VGCCの可能性を検索する目的で, 剖検小脳のP/Q-VGCCを定量的に検討した.

対 象

LEMS-PCD 3例 (血清抗P/Q-VGCC抗体価は, 1009.5, 1448.9, 524.4 pmol/Lと高値), および, 疾患コントロール6例 (筋萎縮性側索硬化症2例, 悪性リンパ腫1例, 成人呼吸区促迫症候群1例, 肺癌1例, 脳炎1例) の剖検小脳を用いた.

方 法

1) 小脳P/Q-VGCCの定量: 剖検小脳のP/Q-VGCCの総量を検討するために, 以下のような実験を行った. -70°C で保存された上記の剖検小脳をホモジナイズし, 4%ジギトニンで可溶化し, VGCC抽出液を調製した. 次に, 抽出液に種々の濃度の ^{125}I - ω -conotoxin MVIIC (3000cpm-90000cpm) を加え, GF/F フィルターを用い放射活性を測定した. 非特異的結合として, 100倍量

の ω -conotoxin MVIICを用いた. P/Q型VGCC量は, ジギトニン抽出液の蛋白1mgあたりの特異的な ^{125}I - ω -conotoxin MVIIC結合量をfmolで表現し, スキャッチャード・プロット (図1) を作成した. 理論上飽和された場合のVGCC量に相当するBmax値を計算し, 各小脳におけるP/Q型VGCC量とした.

2) オートラジオグラフィによる解析: P/Q-VGCCの分布および局在を形態学的にとらえるために, 剖検小脳を7mmに薄切し, ^{125}I - ω -conotoxin MVIIC (800,000 cpm) を約6時間インキュベーションした. 非特異的結合として, 100倍量の ω -conotoxin MVIICを用いた. 洗浄・乾燥後に, Hyperfilm- β Maxで1~2日露出させ現像処理を行なった. 最後に, 同標本をHE染色し, 神経病理学的検討を行なった.

結 果

1) 小脳P/Q-VGCCの定量: LEMS-PCD患者3例のBmaxは (患者1; 64.7 fmol/mg, 患者2; 70.5 fmol/mg, 患者3; 53.7 fmol/mg), 6例のコントロール (平均 \pm SD; 297.8 ± 38.9 fmol/mg, $n=6$) と比較し, 有意に減少 ($P<0.01$) していた. 一方, Kd値は, 患者とコントロール間で差は認められなかった (図1).

2) オートラジオグラフィによる解析: コントロール小脳と比較し, LEMS-PCD症例では, 小脳分子層で ^{125}I - ω -conotoxin MVIIC結合量が減少していた (図2, M: 小脳分子層, G: 小脳顆粒層). このP/Q-VGCCの減少の説明として, 顆粒細胞の脱落によるものを考え, LEMS-PCDの顆粒細胞層の細胞を定量した. 3例のLEMS-PCDの顆粒細胞数は, 顆粒細胞層の1mm³中 1.47×10^6 で, コントロールの 1.46×10^6 ($n=6$) と比較して, 差はなかった.

長崎大学医学部第一内科, *長崎大学医療技術短期大学部, **春回会長崎北病院

考 察

PCDを呈する病態は、1) 抗Yo抗体陽性例、2) 抗Hu抗体陽性例、3) 抗Ri抗体陽性例、4) Hodgkin病合併例、そして、5) LEMS合併例などに分類される(3,4)。これらのPCDにおいては、各々特異的とされる抗神経細胞抗体が存在し、それらの抗体がその発症機序に関与していると推測されてきたが、その直接的証拠は未だ得られていない。今回の研究から、LEMS-PCD剖検症例の小脳では、その分子層のP/Q-VGCC量が著明に減少していることが示された。そのことが、LEMS-PCD患者の小脳機能の障害に強く関与していることが推測された。今後は、LEMS-PCD剖検症例の小脳P/Q-VGCC量の減少が、自己抗体によるものか、あるいは、T細胞に起因するかの検討が必要である。

まとめ

中枢神経疾患であるLEMS-PCDにおける免疫的機序やその標的抗原は、現在まで全く不明であった。しかしながら、今回の研究から、LEMSを合併するPCDの発症機序においては、LEMSと同様に、Caチャンネルを標的とする自己免疫反応がその病態に関与している可能性が示唆された。

文献

- 1) Motomura M. et al. An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myathenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:85-87,1995
- 2) Lennon VA. et al. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndrome. *N Engl J Med* 332:1467-74,1995.
- 3) Mason WP. et al. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myathenic syndrome. *Brain* 120:1279-1300,1997
- 4) Clouston PD. et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration. III. Cerebellar degeneration, cancer, and the Lambert-Eaton myathenic syndrome. *Neurology* 42:1944-1950,1992
- 5) Nakao YK. et al. Specificity of ω -conotoxin MVIIC-binding and -blocking calcium channel antibodies in Lambert-Eaton myathenic syndrome. *J Neurol* 246:38-44,1999

図1

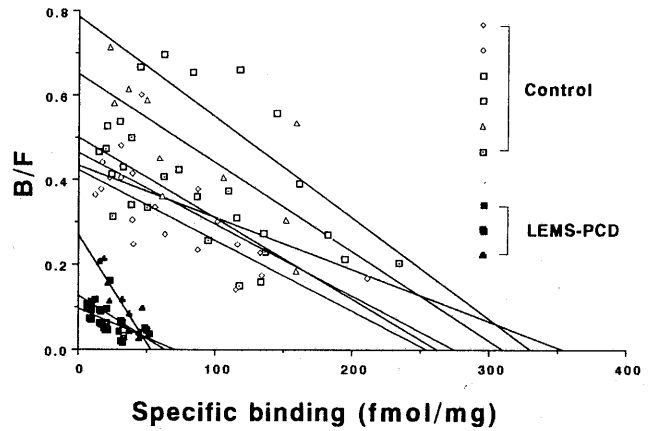
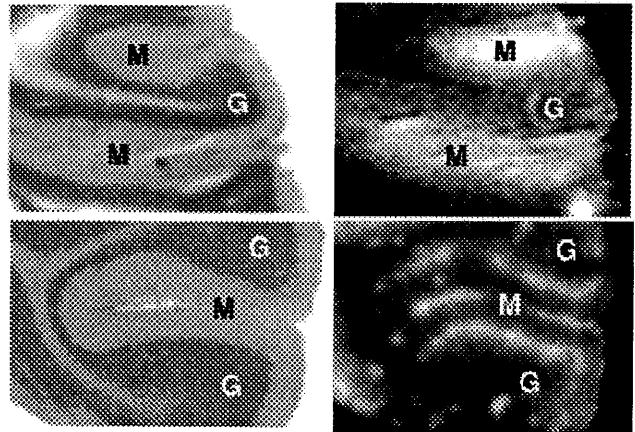


図2



後天性ニューロミオトニア症候群 (Isaacs 症候群) における自己抗体の VGKC 障害の機序に関する研究

有村公良¹⁾、黒野明日嗣、富満久教、渡邊 修、長堂竜維、園田至人、納 光弘

目的

Isaacs 症候群は有痛性筋痙攣、運動および虚血により増強する筋硬直、発汗過多を主徴とする疾患である。これまでの検討で、Isaacs 症候群において抗電位依存性 K チャネル (VGKC) 抗体がその病態に関与していることは明らかとなっている。この抗 VGKC 抗体のアッセイにはこれまで患者血清ないしは IgG を用いた二重免疫沈降法、パッチクランプ法、免疫組織染色法などが用いられている。以前我々は 1 例で IgM が関与している可能性を western blot および免疫組織学的に報告し、抗体のアッセイ法を選択する場合に留意する必要があることを報告した。今年度は(1)抗 VGKC 抗体がどの免疫グロブリン (Ig) 分画に属するか、(2) 血漿交換でどの程度 Ig を除去することにより VGKC の抑制が改善するかについて検討した。

また我々は抗 VGKC 抗体による VGKC 障害機序に関して、これまでの検討からチャネル密度の低下による可能性を指摘してきた。MG ではチャネルの蛋白 degradation に F(ab)₂ fragment が関与することが指摘されている。そこで、今年度は(3) Ig のどの fragment が VGKC 抑制に関連しているかについて検討した。

方法

- (1) 3 例の Isaacs 症候群患者血清からリバノール法で Ig 分画を精製した後、protein G カラムおよびゲル濾過カラム (HiPrep Sephacryl S-300 High resolution) にて IgG 分画を、イオン強度法、ゲル濾過カラムにて IgM 分画を精製し、それぞれの Ig 分画を NB-1 とともに 3 日間培養後、whole cell Clamp 法にて各分画による K 電流の抑制効果を検討した。
- (2) 2 症例で、血漿交換 1 回目の IgG と 3 回目の IgG の濃度を同じ 5ug/ml として NB-1 培養液中に添加し、血漿交換の前後の患者 Ig の VGKC 抑制効果を検討した。その後、同じ症例の IgG 濃度を変化させて、濃度依存性について検討した。
- (3) 4 例の Isaacs 症候群血清から protein G カラムを用いて IgG を精製した後、pepsin ならびに papain を用い

て F(ab)₂、Fab、Fc 各 fragment を分離した後、(1)と同様の方法でどの fragment が K 電流の抑制効果を有するかについて検討した。

結果

- (1) 2 例においては、IgG 分画が K 電流を抑制し IgM 分画にはその抑制効果が見られなかった。しかし 1 例では IgM 分画に K 電流の抑制効果が認められたが、IgG 分画には抑制効果が認められなかった。(図 1)
- (2) 2 症例の血漿交換前後では、同じ IgG 濃度ならば K 電流の抑制効果には差が見られなかった。一方 IgG 濃度を 2.5ug/ml に減少させると、その抑制効果は失われ、血漿交換による抗体除去の有効性が確かめられた。
- (3) Ig にて抑制が見られた 4 例では、2 例の F(ab)₂ 分画のみが有意に K 電流を抑制し、他の 2 例でも有意ではないものの抑制傾向が認められた。しかし Fab、Fc 分画は 4 例すべてで K 電流には何らの影響も与えなかった。(図 2)

考察

Isaacs 症候群は VGKC に対する自己抗体がその発症に関与することが明らかになり、その診断には抗 VGKC 抗体の検出が重要となってきている。抗 VGKC 抗体の測定には α -dendrotoxin を用いた二重免疫沈降法による binding assay、PC12 cell や NB-1 cell を用いた whole cell clamp 法による function assay が主である。前者は沈降に 2 次抗体として抗ヒト IgG 抗体を用いるため、IgM 抗体は見逃される可能性がある。一方とくに NB-1 cell を用いた patch clamp 法ではリバノール法よりも簡便な protein G カラムを用いて免疫グロブリンを精製しており、この方法でも同様に IgM 抗体が見逃される可能性がある。しかし我々は 1 例の Isaacs 症候群症例において、抗 VGKC 抗体が IgM に属することを western blot 法、免疫組織学的方法で明らかにし報告した¹⁾。今回同じ症例で patch clamp 法にて IgM 抗体が機能的にも VGKC を抑制したことは、今後アッセイ系の再検討が必要なことを示している。今後、簡便に IgG、IgM に属するそれぞれの抗体を高い感度・特異性で検出可能な免疫組織学的方法、Immunoblot 法などの新たな抗

¹⁾ 鹿児島大学医学部第三内科

VGKC 抗体測定系の確立が重要と考えられる。

Isaacs 症候群においては、その治療の一つとして血漿交換療法が有効なことは知られているが、今回の検討で予想された通り、抗体による VGKC の抑制は濃度依存性であることが確認された。また先に述べたように一部の症例では、抗体が IgM にある可能性もあり、免疫吸着療法より血漿交換療法の方が望ましいと考えられた。

抗体による VGKC の抑制の機序については、これまでの我々の検討から個々のチャネル機能を変化させるのではなく、チャネルの degradation の促進などでチャネル密度が減少し、発症に影響している事が考えられる 2)。今回

の実験で抗 VGKC 抗体は Fab だけがチャネルに結合しても K 電流には影響あたえず、F(ab)₂ の形で結合した場合のみ抑制する事が新たに明らかとなった。この F(ab)₂ の cross-linking によるチャネル蛋白の degradation rate の促進は MG 血清ですでに報告されている。Isaacs 症候群でも同様の機序により VGKC 密度の低下ひいては再分極を引き起こす外向き K 電流の低下が起こり末梢神経の過剰興奮が起こることが考えられる。今後は抗体の抗原認識部位の決定と、それによる degradation 促進機序との関連について検討する必要があると考えられる。

Peak Currents

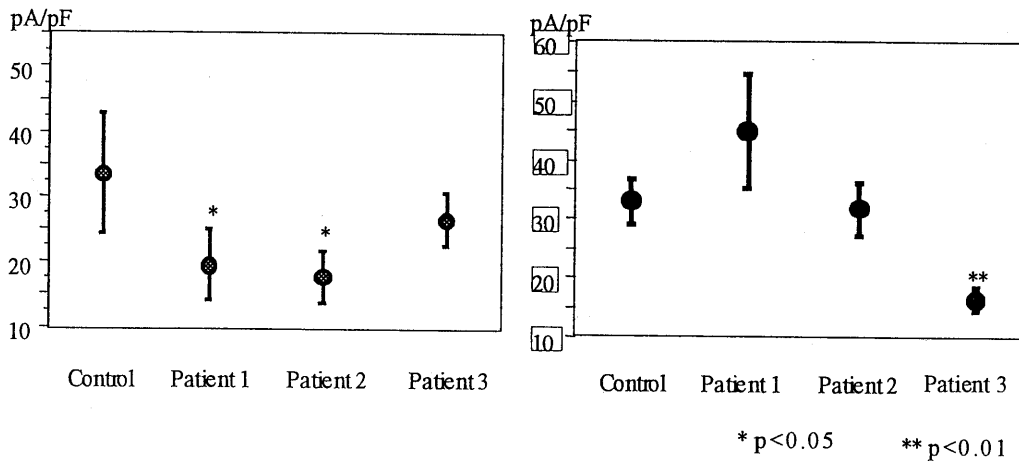


図 1. Isaacs 症候群患者の IgG、IgM 分画による外向き K 電流の抑制

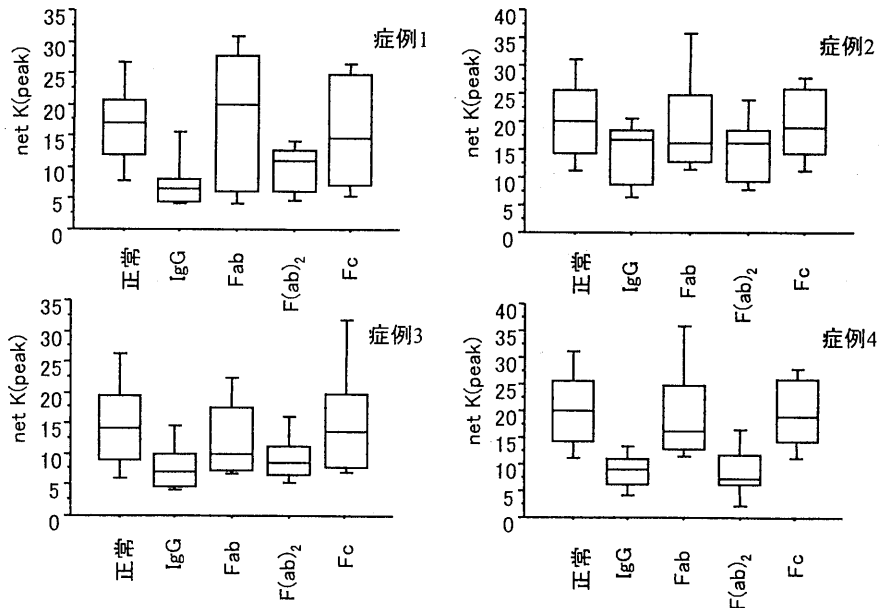


図 2. Isaacs 症候群患者の Ig fragment による外向き K 電流の抑制

参考文献

- 1) Arimura K et al : Antibodies to potassium channels of PC12 in serum of Isaacs' syndrome: western blot and immunohistochemical studies. Muscle Nerve 20:299, 1997
- 2) Nagado T et al.: Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. Brain 122:2057, 1999.

抗Yoあるいは抗Hu抗体陽性傍腫瘍性神経症候群における 細胞傷害性T細胞活性と候補ペプチドの同定

田中恵子¹⁾、田中正美²⁾、辻 省次¹⁾

目 的

傍腫瘍性神経症候群ではさまざまな抗体が末梢血や脊髄液中で証明される。しかし、受動免疫や対応抗原のリコンビナント蛋白を用いた能動免疫によっても動物モデルの作製には成功しておらず、抗体が神経細胞を傷害するという確かな証拠はない¹⁾、²⁾。われわれは抗Yo抗体陽性小脳変性症(PCD)9例のHLAを解析し、全例でHLA A24を見出した³⁾。reverse immuno-geneticsにより、世界で初めて抗Yo抗体陽性PCD患者末梢血の細胞傷害性T細胞(CTL)が認識するペプチドを同定した⁴⁾。その後、米国からHLA A2.1陽性患者で、われわれとは異なるペプチドに対するCTLが報告された⁵⁾。また、抗Hu抗体陽性症候群ではHLA B7 supertype⁶⁾が重要であることを示した⁷⁾。

本研究ではHLA A*2402の遺伝子を組み込んだトランスフェクタントを用いて、我が国で初めて見出された、A24を持たずA2を有する抗Yo抗体陽性PCDも対象に加えてCTL活性を検討した。また、自己線維芽細胞を標的として、抗Hu抗体陽性患者でCTLが認識するペプチドを証明したので合わせて報告する。

対象・方法

HLA A24を有する抗Yo抗体陽性PCD3例、A2を有する抗Yo抗体陽性PCD患者1例、抗Hu抗体陽性患者1例を対象とした。抗Yo抗体は免疫組織学的方法、ウエスタンブロット法およびELISAで、抗Hu抗体は前2者で証明した。CTL活性は⁵¹Cr放出試験で施行した。抗原となるペプチドは、抗Yo抗体陽性PCDでは"AYRARALEL"を合成し⁸⁾、抗Hu抗体陽性患者にはHu蛋白からHLA B22 supertypeのモ

チーフを有するペプチドを選択し合成した。標的細胞はそれぞれの疾患で、HLA A*2402遺伝子を挿入したトランスフェクタント(C1R*2402)あるいは自己線維芽細胞を用いた。

結 果

HLA A*2402を有する抗Yo抗体陽性PCD3例中2例で、ペプチド "AYRARALEL"に対するCTL活性が認められた。HLA A24陰性でA2を有する患者でも、同じペプチドに対して同様にCTL活性が認められた。

一方、抗Hu抗体陽性患者では、2種のうち1種のペプチドに対してCTL活性が認められた(表1)。5例のHLA A24と2例のA2陽性のその他の神経疾患ではCTL活性は認められなかった。

結 論

- 1). トランスフェクタントを用いることで、抗Yo抗体陽性PCDではCTL活性の測定が容易になった。
- 2). HLA A2陽性抗Yo抗体陽性PCD患者末梢血にも、HLA A24陽性患者で認められた同じペプチドと反応するCTLが存在する。どのHLA分子が関与しているかについては、今後の課題である。
- 3). 抗Hu抗体陽性症候群末梢血中で、同様な方法によりCTLと抗原となるペプチドを同定し得た。

¹⁾新潟大学脳研究所神経内科学分野、²⁾国療 西新潟中央病院神経内科・臨床研究部

表 1 3例のHLA A24を有する抗Yo抗体陽性PCD患者(Patient 1-3)と1例のHLA A24を有さない患者(Patient 4)、抗Hu抗体症候群1例(Patient 5)で認められた細胞傷害性T細胞活性

Patients	E/T ratio	
	HLA A24+ Patient 1	23:1 19.5%
Patient 2	11:1 11.7%	4:1 4.2%
Patient 3	20:1 0%	10:1 0%
HLA A2+ Patient 4	15:1 19.4%	3:1 1.9%
HLA B7+Patient 5	20:1 35.0%	10:1 29.2%

文 献

- 1) Tanaka M, et al. Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. 1. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss. Clin. Neurol. Neurosurg. 97:95-100, 1995.
- 2) Tanaka K, et al. Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine- zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration. J. Neurol. Sci. 127:153-8, 1994.
- 3) Tanaka M, et al. HLA A24 in paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. Neurology 47:606-607, 1996.
- 4) 田中正美ら：Paraneoplastic cerebellar degenerationでのHLAクラス結合モチーフから類推したYo蛋白由来ペプチドに反応する細胞傷害性T細胞の同定。第27回日本免疫学会学術集会記録集、1997,p.360.
- 5) Albert ML, et al. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. Nature Medicine 4:1321-1324, 1998.
- 6) Sette A, et al. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. Immunogenetics 50:201-212, 1999.
- 7) Tanaka M, et al. Lack of association between human leukocyte antigens and anti-Hu syndrome in patients with small-cell lung cancer. [published erratum appears in Neurology 52:1952, 1999]. Neurology 52:431, 1999
- 8) Tanaka M, et al. Cytotoxic T cells against a peptide of Yo protein in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody. J. Neurol. Sci. 168:28-31, 1999.

傍腫瘍性神経症候群関連神経抗原の転写調節機能の検討

酒井 宏一郎¹⁾ 白川 知泰

目 的

婦人科領域癌や乳癌を伴う傍腫瘍性小脳変性症の発症機序については不明な点が多い。患者において pcd17 抗原に特異的な抗小脳 Purkinje 細胞質抗体 (Yo 抗体) や細胞障害性 T 細胞が患者に出現することが報告されており、この疾患の病因として想定されている液性免疫及び細胞性免疫の双方におけるこの神経抗原の重要な役割が推定されている。この神経抗原の機能を解明することは、本疾患に想定される抗体や T-細胞による神経変性の機序の解明に重要な情報を提供するものと考えられる。今回我々は傍腫瘍性小脳変性症に関連する神経抗原の転写調節における役割について検討を試みた。

方 法

pBK-pcd17 DNA は、pcd-17 cDNA を pBK プラスミドベクターに組み換えて作製した。fire fly luciferase 遺伝子の 5' 上流に 5x kB あるいは 5xSRE の DNA 結合コンセンサス配列が存在するプラスミドである pNFkB-luc と pSRF-luc を reporter 遺伝子として用いた 5X105 の NB-1 神経芽腫細胞と COS 細胞に対し、それぞれ 500 microg の pBK-pcd-17 cDNA と reporter 遺伝子を liposome 法を用いて transfection を行った。遺伝子導入 40 時間後に細胞よりライセートを調整し、ルミノメーターにより firefly luciferase 活性を測定した。なお、transfection 時に 1/10 量の pRL-TK プラスミドを internal control として用いることによって transfection 効率や細胞の状態の差異を補正した。なお、TNF-alpha の刺激は transfection の 16 時間後に 10 ng/ml の濃度で培地に加え、引き続き 24 時間培養を行った。全ての実験は triplicate にて行い、3 回は同様の実験を繰り返した。Transfection を行った細胞から細胞質画分と核画分を調

整し kappaB 結合配列のオリゴヌクレオチドと反応させた後に electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により検討し、細胞質画分は IkappaB alpha に対する抗体を用いた Western blotting により調べた。これらのデータは digital 化した後に定量し比較検討した。

結 果

酵母細胞を用い、beta-galactosidase を指標とした one-hybrid assay では、pcd-17 cDNA は転写活性化作用を示し、この蛋白が転写調節に関与する蛋白であることが示唆された。転写因子のなかでも免疫反応や炎症反応に対し、重要な役割を果たしている NF-kappaB を取り上げ、pcd-17 の NF-kappaB の転写機能に対する作用について検討した。刺激を加えない状態の NB-1 細胞や COS 細胞では NF-kB の転写活性は上昇している。pcd-17 cDNA を NF-kappaB-Luc 遺伝子と共に NB-1 細胞に導入し、その luciferase 活性をしたところ、内因性の NF-kappaB 活性は pcd-17 により有意に抑制された。この抑制効果は dose-dependent であり、また SRE 活性に対しては有意な作用は認められなかった。さらに、この抑制効果は NB-1 細胞のみでは無く、COS 細胞に対しても同様に有意な抑制を示した。TNF-alpha により活性化された NF-kappaB の転写活性についても pcd-17 cDNA の導入によりやはり有意に抑制された。kappaB 結合コンセンサス配列への pcd-17 蛋白の明らかな結合は認められなかった。次いで、EMSA により、NF-kappaB 蛋白と DNA の核内の結合に対する pcd-17 遺伝子の影響を検討したところ、pcd-17 は TNF alpha 存在下における核内での NF-kappaB 蛋白と DNA の結合を抑制することが明らかになった。この抑制はとりわけ p50/p50 complex について有意な低下が認められた。また、Western blotting により細胞質画分での IkappaB alpha の発現を調べたところ、IkappaB の発現については、pcd-17 は影響を及ぼしていないことが明ら

¹⁾ 金沢医科大学神経内科

かになった。

考 察

傍腫瘍性神経症候群に関連する神経自己抗原 pcd-17 の機能として、転写調節に関与していることが推定されてきたが、その詳細は不明であった。pcd-17 蛋白が転写活性に関わっている蛋白分子であることが明らかになった NF-kappaB の結合エレメントに対する pcd-17 抗原の転写調節機能について検討した結果、NF-kappaB の転写活性を著明に抑制することを見出した。NF-kappaB は免疫担当細胞や神経細胞を始め多くの細胞において炎症に対する反応やアポトーシスから主に細胞を守る働きが知られており、自己免疫疾患や炎症性疾患に大きな役割を果たしていることが推定されている。NF-kappaB に対しては IkappaB は転写活性の repressor の働きを介して、多くの免疫反応や apoptosis を調節していると考えられている。しかしながら最近では、IkappaB を介さない NF-kappaB の転写活性を抑制的に調節する分子が幾つか報告されている。pcd-17 は IkappaB の発現を変化させずに抑制効果を果たしているが、これまでに報告されている膜蛋白の glucocorticoid 受容体や核内蛋白である NRF とは明らかに異なり、pcd-17 は新たな NF-kappa B の repressor 蛋白であると考えられる。NF-kappaB は細胞障害性 T 細胞が抗原を認識する上で重要な HLA class I 抗原の発現を促進する転写活性を示す。Purkinje 細胞を含む神経細胞には通常 HLA class I が発現しておらず、この神経抗原が NF-kappaB の抑制を介して、神経細胞の class I の非発現に関与している可能性がある。pcd-17 に対する抗体がその機能を阻害することによって class I 抗原を発現させ、細胞障害性 T 細胞によって認識され障害する機序も考えられる。また、最近の報告では抗原蛋白が c-Myc と細胞質内で結合し、抗体が結合を阻害することにより apoptosis を惹起する可能性が示唆されている。apoptosis に対して予防的な作用を持つ NF-kappaB を抑制していることによって、この抗原蛋白が発現している細胞は apoptosis に対して脆弱である可能性も考えられる。これらについては更なる実験的検証が必要となるが、今回の我々の結果より pcd-17 蛋白 NF-IkappaB の転写活性

に対して transrepressor の役割をしていることが明らかとなった。この結果は、傍腫瘍性小脳変性症の小脳神経細胞変性の病態を明らかにしていく上で重要な意義を有していると考えられる。

まとめ

傍腫瘍性小脳変性症に関連する神経自己抗原 pcd-17 は、NF-kappaB に対して転写活性抑制作用を示す transrepressor であることを証明した。

文 献

- 1、Sakai K et al. Isolation of a complementary DNA clone encoding an autoantigen recognized by an anti-neuronal cell antibody from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol.* 28:692-698,1990.
- 2、Sakai K et al. The expression of a cerebellar degeneration-associated neural antigen in human tumor line cells. *Neurology* 42:361-366, 1992.
- 3、Sakai K et al. Analysis of autoantibody binding to 52-kd paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen expressed in recombinant proteins *Ann Neurol* 33: 373-380, 1993.
- 4、Sakai K et al. Expression of messenger RNA encoding a paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 197:33-36, 1995.
- 3、Albert ML et al. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 4:1321-1324,1998.
- 4、Okano HJ et al. The cytoplasmic Purkinje onconeural antigen cdr2 down-regulates c-Myc function: implications for neuronal and tumor cell survival. *Gene Dev* 13:2087-2097.

抗 GD1b 抗体による一次感覚ニューロンの軸索変性

楠 進 等誠司 村山繁雄 金澤一郎 海田賢一

目 的

ギラン・バレー症候群や IgM paraproteinemia に伴うニューロパチーなどの自己免疫性ニューロパチー患者中には、しばしば抗ガングリオシド抗体の上昇が認められる。われわれは自己免疫性ニューロパチーの発症機序における抗ガングリオシド抗体の役割を解明するために、後根神経節の一次感覚ニューロンに局在するガングリオシド GD1b をウサギに免疫して、実験的感覚障害性失調性ニューロパチー(GD1b-SAN)を作成することに成功した(1)。これはガングリオシドに対する免疫反応により発症する実験的ニューロパチーとして確立されたはじめてのものである。高い抗体価の抗 GD1b 抗体がみられ、病理学的には脊髄後索へ突起を伸展する一次感覚ニューロンの軸索変性がみられたが、病変部にリンパ球浸潤はみられなかった。したがって抗 GD1b 抗体の GD1b 陽性の一次感覚ニューロンへの結合が、病変分布を規定する上で重要であると考えられた。本研究では、その点をさらに明確にする目的で、抗 GD1b 抗血清を用いた passive transfer 実験を行った。

方 法

GD1b-SAN を発症した 2 羽のウサギから数回に分けて採取した血清をひとつにまとめて実験用血清(血清 A)とした。血清 A のガングリオシドに対する抗体価を測定した。また血清 A から、GM1 カラムを用いた既報告(2)の方法により、GM1 に交差反応する抗体を除いて、GD1b のみに特異的に反応する抗体が存在するかどうかを検討した。

4 羽のウサギ(体重 550-600g)に Freund's complete adjuvant (FCA) と keyhole limpet hemocyanin (KLH) を皮下に接種し、3 週後に再度接種した。初回接種後 14 日目から 43 日目にかけて計 14 回にわたって、毎回 10ml の血液を採取した後で、2 羽には血清 A を 10ml、残りの 2 羽には正常ウサギ血清を 10ml、それぞれ静脈内に投与した。ウサギは抗 GD1b 抗体価を測定しながら経過観察し、アジュバント接種後 51 日目に殺処分して病理

学的検討を行った。

結 果

血清 A の抗体価は抗 GD1b IgM と IgG は 1:6400、抗 GM1 IgM と IgG は 1:1600 であった。血清 A から GM1 カラムを用いて、GM1 に交差反応するものを除いたところ、GD1b のみに特異的に反応する抗体が上昇していることが確認された。

血清 A を静脈内投与した 2 羽のウサギには、明らかな神経症状はみられなかった。抗 GD1b 抗体価は、一羽では IgM および IgG とともに 1:800 まで上昇、もう一羽では IgM が 1:800、IgG が 1:400 まで上昇した(図 1)。正常血清を投与した 2 羽のウサギでは抗体価の上昇も神経症状出現もみられなかった。

病理学的には、血清 A を投与した 2 羽のウサギでは脊髄後索の数本の軸索に空泡化変性とマクロファージの侵入が認められた。正常血清を投与したウサギには病理学的異常は認められなかった。

考 察

抗 GD1b 抗血清の静脈内投与により GD1b-SAN と同様の病理所見が得られることから、GD1b-SAN にみられる特異的な障害分布(後索に突起を伸ばす一次感覚ニューロンの障害)は、GD1b に感作された effector としてのリンパ球ではなく抗 GD1b 抗体により規定されていることが示された。

体重の比較的軽いウサギに高力価の抗血清を投与したが、それでもなお抗体価は GD1b-SAN を発症したウサギと比較して低値であった。低い抗体価しか得られなかったために、臨床症状が認められず病理変化も軽度であったと考えられる。

血清 A の静脈内投与後の IgG 抗体価の上昇は IgM 抗体価と比較して遅かったが、これは IgG の血管外への拡散によると考えられる。一方静脈内投与終了後に IgM 抗体価が IgG 抗体価より低下が早かったことは、IgM の半減期が短いことに関与していると考えられた。

今回はウサギに血清投与の前にアジュバントを前投与した。これは血液神経関門の透過性を亢進させることにより、抗体が標的神経組織に到達しやすくするためであ

る。病理変化は後索においてとらえやすいが、これは障害されたニューロンの軸索がそこに集まるためであり、能動免疫により得られた GD1b-SAN における所見(1)と同様である。

GD1b を免疫したウサギには、GD1b のみを特異的に認識する抗体と末端の Gal-GalNAc 基を認識して GM1 にも交差反応する抗体が上昇するが、GD1b-SAN の発症には前者の型の IgG 抗体が重要であることが示されている(2)。今回用いた血清 A にも GD1b のみを特異的に認識する抗体が上昇しており、その型の抗体の作用が重要な役割を果たしたと考えられる。

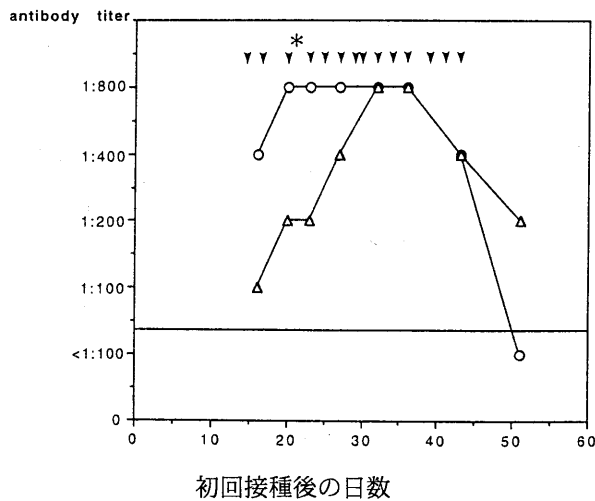
抗 GD1b 抗体の GD1b 陽性一次感覚ニューロンへの結合に引き続き、補体の活性化やマクロファージの侵入がおこり、軸索変性を引き起こすと考えられるが、急性期の後根神経節大型神経細胞の trkC の発現抑制(3)も病態

に関与している可能性がある。抗体結合に引き続く病態メカニズムの解析にはさらに今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Kusunoki S et al. Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol* 39:424-431, 1996.
- 2) Kusunoki S, et al. Monospecific anti-GD1b IgG is required to induce rabbit ataxic neuropathy. *Ann Neurol* 45:400-403, 1999.
- 3) Hitoshi S, et al. Rabbit experimental sensory ataxic neuropathy: anti-GD1b antibody-mediated trkC downregulation of dorsal root ganglia neurons. *Neurosci Lett* 260:157-160, 1999

ウサギ 1



ウサギ 2

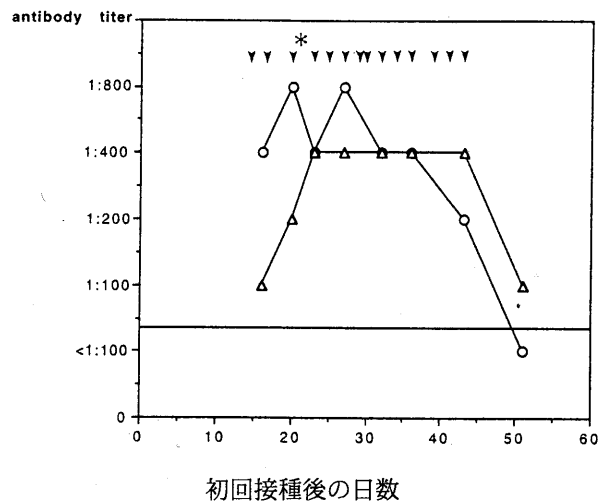


図 1

二羽のウサギ(1 と 2)の抗 GD1b IgM(○)および IgG(△)抗体価の推移。
Arrowhead は血清 A の投与、Asterisk は FCA と KLH の二度目の接種を示す。

IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 Guillain-Barré 症候群の 検討

海田 賢一¹⁾ 楠 進²⁾ 鎌倉 恵子¹⁾ 元吉 和夫¹⁾
金澤 一郎²⁾

目 的

抗ガングリオシド抗体は Guillain-Barré 症候群 (以下 GBS) の発症機序に関与している可能性がある。我々は以前、末梢神経ガングリオシドの微量成分である N-acetylgalactosaminyl GD1a (以下 GalNAc-GD1a) が GBS の一部の症例で血中抗体の標的分子であることを見出した¹⁾。この GalNAc-GD1a に対する IgG 抗体をもつ症例は、1) 遠位優位の筋力低下、2) 脳神経障害に乏しい、3) 感覚障害がない、といった特徴を示し純粋運動型 GBS を呈することが我々を含め 3 つのグループから報告されている^{2,4)}。一方、IgG クラスの抗 GalNAc-GD1a 抗体をもたず IgM クラスの抗体のみ陽性の症例が存在し、それらは脳神経障害、感覚障害が多く、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性例とは臨床像が異なることを我々は指摘した⁴⁾。この IgM 抗体のみ陽性の症例は抗 GM2 抗体活性を高頻度に伴っていることから、GalNAc-GD1a と GM2 に共通のエピトープ (図) を認識する抗体が上昇していると考えられた。そしてこの点が GalNAc-GD1a に特異的な活性を示す IgG 抗体をもつグループとの臨床像の違いを生じていると推測された。本研究では IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体の臨床的意義をさらに検討するため、同抗体の特異性と臨床像との相関を分析した。

対 象 ・ 方 法

IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性で IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体陰性の GBS 29 例 (IgM 抗体群) を対象とし、比較の対照として、以前報告した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 GBS 25 例 (IgG 抗体群) および抗 GalNAc-GD1a 抗体陰性の GBS 72 例 (抗体陰性群⁴⁾) を用いた。12 種の糖脂質抗原に対する血清 IgG, IgM 抗体価を ELISA 法にて測定

した。また以前の報告⁴⁾で、IgM 抗体群にサイトメガロウイルス (CMV) 感染後の GBS と関連するとされる IgM 抗 GM2 抗体が高頻度にみられたため、IgM 抗体群における CMV 感染について血清学的に検索した。そして IgM 抗体群を先行感染の違いにより CMV 群と消化器感染群 (GI 群) に分類した。感覚異常を認めず筋力低下のみ示す GBS を motor GBS と定義した。運動障害度は van der Meché らの functional score⁵⁾ を用いた。発症後 4 週以内の電気生理所見を Hadden らの基準⁶⁾ に基づき、脱髄型、軸索型、導出不能型、正常および分類不能型に分類した。臨床像および電気生理所見を CMV 群、GI 群間で比較し、さらに IgG 抗体群および抗体陰性群とも比較した。IgM 抗体群において、GM2 あるいは GalNAc-GD1a 抗原を用いた吸収試験を行い、吸収率を CMV 群と GI 群間で比較した。また抗糖脂質抗体の出現頻度を CMV 群と GI 群間で比較した。統計学的解析にて両側検定で P 値が 0.05 未満の場合、有意差ありと判定した。

結 果

(1) 1992 年 1 月から 1999 年 10 月までに東京大学神経内科に血清が集められた 672 例の GBS のうち 29 例が IgM 抗体群に属し、そのうち CMV 群が 14 例、GI 群が 12 例、その他 3 例であった。GI 群のうち 5 例は便培養で *Campylobacter jejuni* が陽性であった。(2) 抗糖脂質抗体の出現頻度: GI 群では GalNAc-GD1a 以外の糖脂質に対する IgG 抗体を 12 例中 5 例に認めたが、CMV 群では全て IgM 抗体のみであった。IgM 抗 GM2 抗体は CMV 群全例で陽性であり、GI 群 (50%) に比し有意に高頻度であった。GI 群のうち 5 例は IgM 抗 GM1 および GD1b 抗体を同時に認めた。(3) IgM 抗体群の臨床像: IgM 抗体群のうち十分な臨床情報のある 22 例において臨床像を検討した。CMV 群 (11 例) は発症からピークまでの期間が長く (16 ± 12 日; mean ± SD)、高頻度の脳神経障害 (10 例、91%)、特に顔面神経麻痺 (9 例、82%)、高頻度の感覚障

1) 防衛医科大学第三内科

2) 東京大学医学部神経内科

害(8例, 73%), 脱髄型の電気生理所見(7例, 64%)が特徴であった。Motor GBS はみられなかった。GI群(11例)は発症からピークまでは 7.1 ± 5.2 (日)で、脳神経障害(5例, 45%), 顔面神経麻痺(3例, 27%)は少なく、感覚障害も少なく(2例, 18%), motor GBS は4例(36%)にみられた。このうち発症からピークまでの期間、顔面神経麻痺の頻度、感覚障害の頻度に両群間で有意差を認めた。CMV群の特徴はIgG抗体群と比べるとさらに明瞭となった。また発症年齢についてはCMV群 27 ± 9.9 (歳), GI群 25 ± 8.1 (歳)であり、どちらも抗体陰性群の 43 ± 17 (歳)と比べて有意に低かった。CMV群, GI群とも人工呼吸器を要した患者はなく、ピーク時の運動障害度は各群間で差を認めなかった。(4) 吸収試験(CMV群, GI群): IgM抗GalNAc-GD1a抗体は、GalNAc-GD1aによる吸収ではCMV群, G-I群ともよく吸収された(CMV群 $n = 14$; $94 \pm 13\%$, G-I群 $n = 12$; $88 \pm 13\%$, mean \pm SD, $p = 0.1$)。GM2による吸収ではCMV群で有意に高率に吸収され、G-I群では吸収されにくかった(CMV群 $n = 14$; $78 \pm 26\%$, GI群 $n = 12$; $21 \pm 22\%$, mean \pm SD, $p = 0.0008$)。

考 察

本研究の結果、IgM抗GalNAc-GD1a抗体陽性GBSの多くはCMV感染あるいは*Campylobacter jejuni*腸炎をはじめとする消化器感染を先行感染とすることが判明した。このうちCMV感染群は、脳神経障害、特に顔面神経麻痺を伴うことが多く、高頻度の感覚低下、脱髄型の電気生理所見、高頻度のIgM抗GM2抗体といった、以前に報告したIgM抗体群の特徴を有していた。逆にGI群では、IgM抗GM2抗体を50%に認めたものの、脳神経障害、感覚障害は少なくIgG抗体陽性群に類似する傾向を示した。IgM抗GalNAc-GD1a抗体の特異性に関しては、吸収試験の結果、GI群ではGalNAc-GD1aに親和性が高い抗体であり、CMV群では、GM2によく吸収されることから、GM2とGalNAc-GD1aに共通するエピトープを認識する抗体であると考えられた。この結果は、感覚障害や脳神経障害は少ないという特徴がGalNAc-GD1aに高親和性の抗体活性と関連することを示唆している。一方、GM2とGalNAc-GD1aに共通するエピトープを認識する抗体が、CMV感染群の臨床の特徴、すなわち感覚障害ならびに顔面神経を含む脳神経障害に関与していると考えられた。

ま と め

(1) GBSにおいて、*Campylobacter jejuni*腸炎をはじめとする消化器感染は、GalNAc-GD1aを特異的に認識する抗体の産生に強く関与している。

(2) GalNAc-GD1aを特異的に認識する抗体は、IgG抗体のみでなくIgM抗体も、脳神経障害の少ないpure motor GBSに関連している。

(3) GM2とGalNAc-GD1aに共通するエピトープを認識する抗体はCMV感染に伴って上昇し、顔面神経麻痺、感覚障害に関連している。

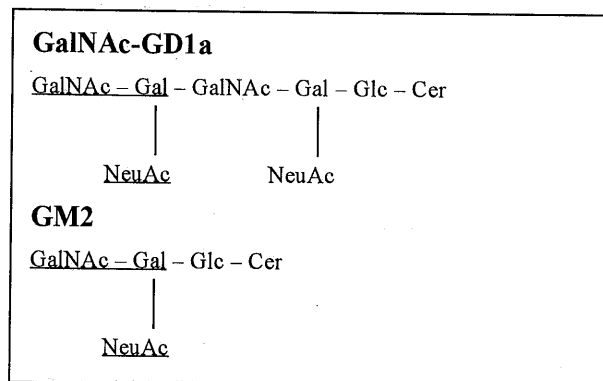


図 ガングリオシド、GalNAc-GD1a、GM2の糖鎖構造
 下線部は両方に共通するエピトープを示す。
 Gal:ガラクトース, Glc: グルコース, Cer: セラミド,
 GalNAc: N-アセチルガラクトサミン, NeuAc: N-アセチルノイラミン酸 (シアル酸)

文 献

- 1) Kusunoki S et al: N-acetylgalactosaminyl GD1a is a target molecule for serum antibody in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 35: 570-576, 1994
- 2) Hao Q et al: Anti-GalNAc-GD1a antibody-associated Guillain-Barré syndrome with a predominantly distal weakness without cranial nerve impairment and sensory disturbance. *Ann Neurol* 45: 758-768, 1999
- 3) Ang CW et al: Rapidly progressive, predominantly motor Guillain-Barré syndrome with anti-GalNAc-GD1a antibodies. *Neurology* 53: 2122-2127, 1999
- 4) Kaida K et al: Guillain-Barré syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a. *Brain* 123: 116-124, 2000
- 5) van der Meché et al: A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain-Barré syndrome. *N Eng J Med* 326: 1123-9, 1992
- 6) Hadden RDM et al: Electrophysiological Classification of Guillain-Barré syndrome: clinical associations and outcome. *Ann Neurol* 44: 780-788, 1998