

ギラン・バレー症候群患者血中抗体による ウサギ末梢神経の免疫組織化学的検討

有田 政信*, 末村 美和子*, 中村 友香*

川名 広子*, 楠 進*

(平成 11 年 9 月 30 日受理)

Immunohistochemical Investigation on Rabbit Peripheral Nerve with Serum Antibodies from Patients with Guillain-Barré Syndrome

Masanobu ARITA, Miwako SUEMURA, Tomoka NAKAMURA,

Hiroko KAWANA and Susumu KUSUNOKI

(Received on September 30, 1999)

緒 言

急性の運動麻痺優位の末梢神経障害であるギラン・バレー症候群 (Guillain-Barré syndrome; GBS) では、多くの場合消化器感染や呼吸器感染が先行する。これらの感染によって免疫システムに対する何らかの刺激が、神経組織に対する自己免疫機序を引き起こし、末梢神経の障害をきたすものと考えられている。細胞性免疫および液性免疫の両方の関与が考えられるが、血漿交換療法の有効性は、末梢神経の構成成分に対する自己抗体を含む液性免疫の重要な役割を示唆している。

GBS の急性期血清中の末梢神経に対する自己抗体については、現在まで多くの検討がなされてきたが、特に細胞膜表面抗原である糖脂質に対する抗体価の上昇は、自己免疫性末梢神経障害に特徴的な所見であり、GBS における抗体陽性率も高いことから最近注目されている^{1,2)}。糖脂質のなかでもシアル酸を糖鎖に含むものであるガングリオシドは、神経系に多く分布しており、GBS 血中抗体の抗原となることが多い^{3,4)}。特に、シアル酸を 4 個含むガングリオシドである GQ1b に対する IgG 抗体は、眼

筋麻痺・失調・腱反射消失を三徴とする GBS の垂型であるフィッシャー症候群に特異的に、しかも 90%以上の陽性率で認められ、有用な診断マーカーとして用いられている^{5,6,7)}。また GQ1b は眼球運動を支配する脳神経である動眼神経・滑車神経・外転神経の刺激伝達によってきわめて重要な部位である傍絞輪部ミエリンに局在していることから、眼筋麻痺の発症に直接関わっていることも推察されている^{6,7)}。この抗 GQ1b IgG 抗体についての結果は、自己免疫性ニューロパシーにおける抗糖脂質抗体を含む自己抗体検討の重要性の一例を示すものである。

これまで、われわれは 11 種類の糖脂質 (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GalNAc-GD1a, GT1b, GQ1b, galactocerebroside, GA1) を抗原として GBS 血中抗体をスクリーニングしてきた。その結果、約 60-70%の急性期 GBS 患者血中に何らかの抗糖脂質抗体の上昇が認められている。一方、残りの症例においても未だ同定されていない何らかの抗原に対する抗体が上昇している可能性が考えられた。

そこで、今回われわれは末梢神経に対する免疫組織化学的検討をおこなって血中抗体の検出を試みることにした。しかしながら、ヒトの抗体でヒトの神経組織を染色することは、非特異的反応が強く評価が難しいため、ウサギ末梢神経を用いて行った。さらに、何らかの抗糖脂

* 栄養学科 食品学第二研究室

* * 東京大学付属病院神経内科

質抗体の上昇がみられた症例では、免疫組織染色の染色性と血中抗糖脂質抗体との関連について検討を行った。

方 法

1) 免疫組織染色

ウサギ後根神経節を液体窒素で急速凍結し、Cryostatを用いて $10\mu\text{m}$ の切片を作成、風乾後アセトンで5分間固定し、再び風乾する。その後、10%ヤギ血清 (goat serum, GS) を含む phosphate-buffered saline (PBS) で30分間処理して非特異的結合をブロックした。PBSで洗浄後、10%GS in PBSで100倍希釈した患者血清と 4°C で一晩反応させた。その後、0.01M PBSで5分間の洗浄を3回繰り返し、二次抗体として 10%GS in PBSで500倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体およびペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体と室温で2時間反応させた。その後 0.01M PBS による5分間の洗浄を繰り返し3回行い、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を 0.5mg/ml 含む PBS に 0.01% となるように H_2O_2 を添加した溶液で発色させた。対照として、25例の正常人血清を同様に反応を行った。

さらに、陽性反応のみられた患者血中抗体の標的抗原については、それが糖蛋白質成分か糖脂質成分かの推定をおこなうため、ウサギ後根神経節組織の凍結切片をアセトンで固定後、メタノールに5分間あるいはクロロフォルム：メタノール (C:M) 1:1 溶液に2分間浸し、その後上記と同様の方法で反応させた。またウサギ後根神経節切片を 10%GS in PBS で10倍希釈した抗 GD1b モノクローナル抗体 (GGR12) および 200倍希釈した抗 SGPG IgM 蛋白を含む患者血清と反応させ、それぞれ500倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体およびペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体を二次抗体として用いて、組織染色を行った。

一部の患者血清については、ウサギ脊髄との反応性についても検討を行った。

2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による抗糖脂質抗体測定

既報告の方法に基づき、患者血中の抗糖脂質抗体の測定を行った^{3,4)}。

GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GalNAc-GD1a, GT1b, GQ1b, GA1, galactocerebroside の11種の糖脂質抗原を用いた。すなわち、96 well の polystyrene microtiter

plate (Linbro) の各 well に糖脂質抗原をそれぞれ 200ng 常法に従って装着させた。その後、1% bovine serum albumin (BSA) in PBS を各 well に $50\mu\text{l}$ ずつ入れて30分間反応させることによって、非特異的結合部位をブロックした。その後反応溶液を除去して PBS で洗浄し、1% BSA in PBS で40倍に希釈した患者血清を一次抗体として各 well に $50\mu\text{l}$ ずつ添加して、1.5時間反応させた。反応後、0.1% BSA in PBS により3回繰り返し洗浄し、次に 1% BSA in PBS で500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体あるいは200倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体を二次抗体として、各 well に $50\mu\text{l}$ ずつのせ、1.5時間反応させる。そして 0.1% BSA in PBS により3回繰り返し洗浄し、 40mg/ml の o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in phosphate-citrate buffer (0.01% H_2O_2 を含む) を基質として発色させ、2分後に 8N の硫酸を加えて反応を停止させた。ELISA Plate リーダーで 492 nm の吸光度で測定し、対照 well の吸光度の値を差し引き、その値が 0.1 を越えたものを陽性と判定した。

なお一部の血清については、SGPG との反応性も検討を行った。

結 果

GBS 急性期の 75 例の患者血清を用いて、ウサギ後根神経節を免疫組織染色を行った結果、多くの例で軸索やシュワン細胞がさまざまな程度に染色された。しかし、正常ヒト血清の場合でも、これらの組織に反応が認められる場合があったため非特異的反応の可能性も考えられ意義づけが困難であった。一方 5 例の GBS 患者血清 IgG では、ミエリンに強い染色が認められた (図1)。

この反応性は正常ヒト血清では認められなかった。また、この 5 例の血清 IgG でウサギ脊髄を免疫染色を行った結果、脊髄内に有意の染色は認められなかった。

陽性反応の認められた患者血清について、メタノールまたは C:M 1:1 で前処理した組織について、同様に反応させたところ、この反応性は保持されていた (図2)。

75 例の GBS 血清中で、47 例に何らかの糖脂質に対する抗体が認められた。上記のミエリンを免疫染色する抗体を有する 5 例のうち 3 例は、抗糖脂質抗体はいずれも陰性であった。残る 2 例では、1 例に抗 GM1 IgM 抗体と抗 GA1 IgM 抗体が、もう 1 例では抗 GM2 IgM 抗体と抗 GalNAc-GD1a IgM 抗体が認められたが、IgG 抗体

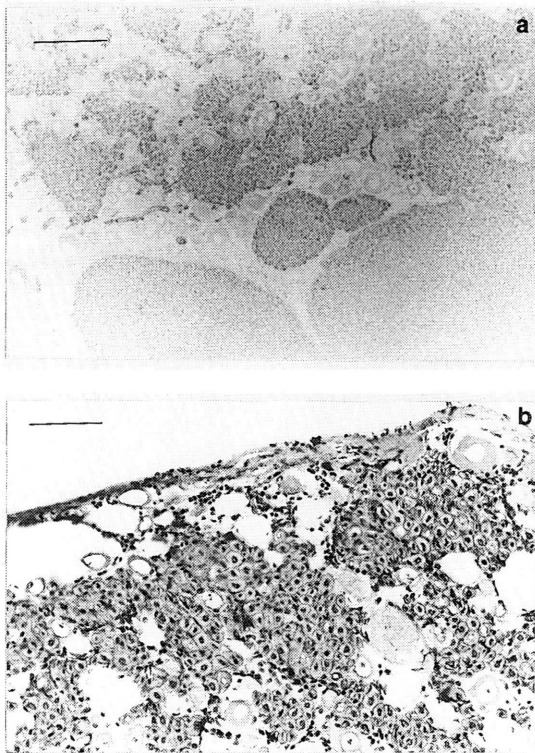


図1 GBS患者血清IgGによるウサギ後根神経節の免疫組織染色
(a) ミエリンの染色がみられる Bar=0.2mm
(b) ヘマトキシリンで対比染色後 Bar=0.1mm

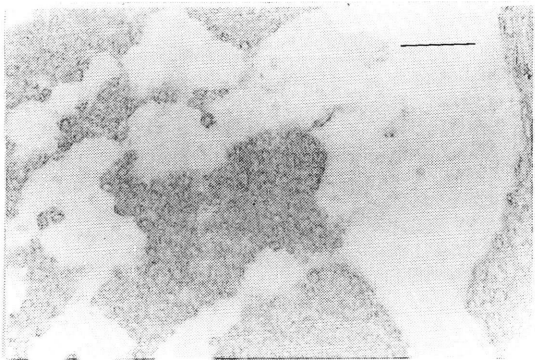


図2 メタノール処理後のウサギ後根神経節のGBS患者血清IgGによる免疫染色
ミエリン部分の染色が保たれている。Bar=0.1mm

はいずれも陰性であった。またSGPGに対する抗体は、5例のいずれにおいても陰性であった。抗GD1b抗体は14例で陽性であったにもかかわらず、それらを用いた免疫組織染色では、後根神経節神経細胞体の染色は認められなかった。

マウスモノクローナル抗GD1b抗体(GGR12)を用いて、ウサギ後根神経節を免疫組織染色した結果、従来の報告と同様に後根神経節の神経細胞体の染色が認められた。(図3)

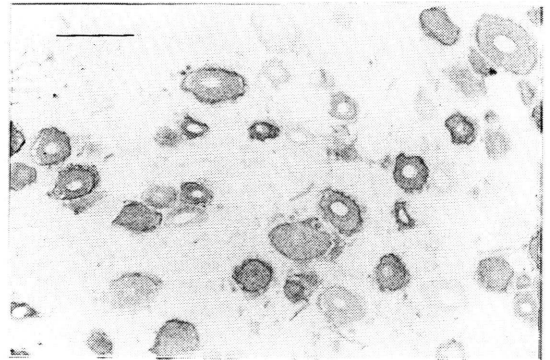


図3 マウスモノクローナル抗GD1b抗体(GGR12)によるウサギ後根神経節の免疫組織染色
神経細胞体の染色がみられる。Bar=0.1mm

一方ニューロパチー患者から得た抗SGPG抗体活性をもつヒト血清IgMをウサギ後根神経節に反応させたが、有意の染色は得られなかった。

考 察

GBS患者血清をウサギ後根神経節と反応させて、血中抗体の組織結合性を検討した結果、75例中5例にウサギ末梢神経ミエリンを染色するIgG抗体活性が認められた。脊髄内には有意の染色がみられないことから、この反応は末梢神経のミエリンに特異的なものであると考えた。これら5例の血清中には、今回検討したガングリオシドやSGPGを認識するIgG抗体の上昇はみられず、この反応性は既知の抗ガングリオシド抗体や抗SGPG抗体によるものではないことが確認された。メタノールあるいはC:M 1:1で処理した後の組織にも、上記ミエリンの染色が保たれていたと考え合わせると、この抗体の標的となる抗原物質は糖脂質成分ではなく糖蛋白質成分であると推定された。

既に報告されているように⁸⁾、抗GD1bモノクローナル抗体(GGR12)によりウサギ後根神経節の神経細胞体が強く染色されたが、GBS患者血清で抗GD1b抗体活性を有するものでは、同様の染色が見られなかった。患者血清から抗GD1b抗体を精製した後に反応させる、あるいはさらに稀釈度を下げて抗体価の高い状態で反応させるなどの検討が将来必要であると考えられた。またヒト抗GD1b抗体はマウスモノクローナル抗GD1b抗体(GGR12)

と fine specificity が異なる可能性も考えられた。

ヒト末梢神経のミエリンは、抗 SGPG 抗体で特異的に染色されることが知られているが、ウサギ末梢神経ではこの染色は認められなかった。SGPG を含めて糖脂質の組織分布には種差が認められていることより、ウサギの末梢神経ミエリンには SGPG が少ないことが示唆された。

今回 GBS 患者血清が反応することが示されたミエリンの抗原を同定することによって、GBS の動物モデルの作成や病態解明と治療法の開発につながることを期待された。

文 献

- 1) Hartung, H.P., Pollard, J.D., Harvey, G.K. et al., *Muscle Nerve*, **18**, 137-153 (1995)
- 2) 楠 進, 日本内科学会雑誌, **88**, 826-831 (1999)
- 3) Kusunoki, S., Chiba, A., Kon, K. et al., *Ann. Neurol.*, **35**, 570-576 (1994)
- 4) Kusunoki, S., Iwamori, M., Chiba, A. et al., *Neurology*, **47**, 237-242 (1996)
- 5) Chiba, A., Kusunoki, S., Shimizu, T. et al., *Ann. Neurol.*, **31**, 677-679 (1992)
- 6) 楠 進, 日本内科学会雑誌, **87**, 617-622 (1998)
- 7) Chiba, A., Kusunoki, S., Obata, H. et al., *Neurology*, **43**, 1911-1917 (1993)
- 8) Kusunoki, S., Shimizu, J., Chiba, A. et al., *Ann. Neurol.*, **39**, 424-431 (1996)

Abstract

To investigate presence of antibody against peripheral nerve in the acute phase sera of Guillain-Barré syndrome (GBS), immunohistochemical study was performed on the rabbit dorsal root ganglia. Serum IgG from 5 out of 75 acute phase GBS patients specifically immunostained peripheral nerve myelin. The staining was not abolished by the prior treatment of the tissue with methanol, or chloroform:methanol 1:1, indicating that the target molecule is not lipid but protein component. Since GBS is primarily a demyelinating disease, those antibodies specific to peripheral nerve myelin may be involved in the pathogenesis of GBS. Future study is needed to identify the target molecule, which may be useful to obtain an animal model of GBS and may be a clue to clarify the pathogenetic mechanism and develop an effective treatment.