

ギランバレー症候群の病態解明のための血清中 抗微量糖脂質抗体の検索と抗原の解析

有田 政信, 有澤 和子, 館 朝子, 楠 進*

(平成5年10月7日受理)

Identification of a Minor Ganglioside Antigen Recognized by Sera from Patients with Guillan-Barré Syndrome

Masanobu ARITA, Kazuko ARISAWA,
Asako TATE, and Susumu KUSUNOKI*

(Received October 7, 1993)

緒 言

末梢神経障害（ニューロパチー）は，病因，臨床経過，障害部位（軸索障害か脱髄か），病理像等により様々に分類されている。そのうち，上気道感染や消化器感染等の先行感染に引き続き急性に発症し，運動障害優位の病像を呈する多発性末梢神経障害をギランバレー症候群（以下 GBS と略す）という。この GBS の約半数は，消化器感染を先行感染とすること，またその症状の重篤性を考えると，その病態の解明は食品化学的見地からも非常に重要であると考えられる。

GBS は，自己免疫的機序による末梢神経系の炎症性脱髄性疾患で，下肢から上行する運動麻痺を主症状としている。人口10万人に対して1年間に1.6人の発生がみられ，神経内科領域では重要な疾患の1つである。初発症状は両下肢遠位部の運動障害，異常感覚を呈することが多く，1～2週間のあいだに下肢全体から上肢，さらに呼吸筋や咽頭筋麻痺まで進行することがある。しかしながら運動麻痺に比べて感覚障害は軽いものである。その他，自律神経障害として高血圧，頻脈，発汗異常を伴うこともある。検査所見として髄液の蛋白細胞解離（蛋白量は増加するが細胞数は増加しない）を特徴としている。GBS の診断は比較的容易であるが，病態機序は未だ完全には解明されていない。

GBS の治療としては，血漿交換療法が有効であることから（1，2），自己抗体を含む何らかの液性因子の病態への関与が推定される。そこで血中の自己抗体の検索がなされてきたが，近年，特に糖脂質に対する自己抗

栄養学科 食品第2研究室，

* 東京大学付属病院神経内科

体が頻度が高く検出されることが報告されている（3-8）。

糖脂質抗原はモノクローナル免疫グロブリン血症を伴う末梢神経障害で，異常免疫グロブリンが結合する抗原としても知られており（9），抗糖脂質抗体の解析は末梢神経障害の病態解明の手がかりとして注目されている。我々は，いままで細胞表面に存在していて，構造の明らかになっている比較的主要な糖脂質を抗原として検索して，GBS の約60%に陽性所見を見てきている。そこで，本研究では，未同定の微量糖脂質抗原に対する抗体の検出とその抗原の生化学的解析を行った。

実験方法

1. 粗ガングリオシドの分画

牛脳粗ガングリオシド（Sigma, St. Louis, USA）50 mg をクロロフォルム：メタノール1：1（C：M=1：1，v/v）5 ml に溶解し，アセチル化した DEAE-Sephadex A-25 カラム（約20ml）にのせ，50ml の C：M=1：1 と50ml のメタノールでカラムを洗浄した。その後，各80ml の0.05M，0.1M，0.2M，0.4M 酢酸アンモニウムメタノール溶液で，ガングリオシドを溶出した。得られた各画分をロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去したのち，蒸留水に再溶解して24時間蒸留水に対して透析を行った。透析終了後，トルエンを添加してロータリーエバポレーターを用いて水を留去して乾固させた。それぞれの画分を3ml の C：M=1：1 に溶解し，シリカゲル薄層クロマトグラフィー（Merck 社製，HPTLC）で C：M：0.2% 塩化カルシウム（50：45：10，v/v/v，以後溶媒 A と略す）溶液を展開溶媒として展開を行った。糖脂質の確認は，オルシノール発色法

によって行った。

2. 薄層クロマト (TLC) 免疫染色

糖脂質をプラスチックプレート (Machery Nagel, Duren, Germany) にプロットして、展開溶媒として溶媒 A を用いて分離を行った。展開後、充分乾燥させ、ポリマー (0.4% Polyisobutyl-methacrylate in hexane) に1分間浸漬した後、30分間室温に放置する。1%牛血清アルブミン (BSA) を含んだ0.1M リン酸緩衝液 (PBS, 緩衝液 A) を薄層の展開面にのせ、30分間室温で非特異的結合部位をブロックした。ブロッキング終了後、リン酸緩衝液で洗って乾燥させた。そして、緩衝液 A で40倍に希釈した患者血清をのせ、90分間反応を行った。反応終了後、リン酸緩衝液で充分洗い、乾燥させた。更に、緩衝液 A で希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM (Cappel, USA, 100倍希釈) または IgG (Cappel, USA, 200倍希釈) をのせて90分間反応させた。反応終了後、リン酸緩衝液で十分に洗浄し、ジアミノベンチジンで発色させた。

HPTLC ガラスプレートで展開したものについても、上記と同様の方法によって免疫染色を行った。

3. シアリダーゼ処理した薄層クロマトの免疫染色

糖脂質を前記と同様にプラスチックプレートを用いて展開、分離を行った後、よく乾燥させ、ポリマーに1分間浸漬し、30分間放置した。この後、*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼ溶液 (0.1単位/ml, 酢酸緩衝液 pH5.0に溶解) を展開面にのせ、37°C, 2時間反応させ、反応終了後リン酸緩衝液で洗浄、乾燥して、緩衝液 A で30分間ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、リン酸緩衝液で、充分洗浄、乾燥した後、緩衝液 A で希釈した患者血清 (1:40) をのせ90分間反応を行った。反応終了後、リン酸緩衝液でよく洗い、乾燥させて、緩衝液 A で希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM (1:100) または IgG (1:200) をのせて90分間反応させる。リン酸緩衝液でよく洗った後、ジアミノベンチジンで発色させた。対照としてシアリダーゼを含まない酢酸緩衝液のみと反応させたものを用いた。

4. 牛脳ガングリオシドのシアリダーゼ処理

クロロフォルム:メタノール 1:1 (C:M=1:1, v/v) 溶液に溶解したガングリオシドは、窒素エバ

ポレーターで溶媒を除去し、*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼ溶液 (0.1単位/ml, 酢酸緩衝液 pH 5.0に溶解) を添加して、溶解後、37°C, 2時間反応させた。反応終了後、蒸留水に対して透析を行って脱塩した。トルエンを添加して減圧・濃縮・乾固して、もとの C:M=1:1 (v/v) 溶液に溶解して用いた。

5. 牛脳ガングリオシドの弱アルカリ処理

ガングリオシド画分を、0.5N NaOH・メタノール溶液に溶解して、37°C, 1時間反応させた。終了後、1M 酢酸・メタノール溶液で中和し、減圧・濃縮・乾固して、蒸留水に溶解後、蒸留水に対して透析を行った。脱塩後、トルエンを添加して減圧・濃縮・乾固して、もとの C:M=1:1 (v/v) 溶液に溶解して用いた。

6. 微量糖脂質抗原の精製

患者血清を用いて免疫染色によって検索された微量糖脂質抗原 (抗原 X) が、ジシアロガングリオシド画分 (0.1M 酢酸アンモニウム-メタノール溶出画分) に検出されたので、構造解析を行うためにこれを精製した。

牛脳粗ガングリオシド画分150mlを15mlの C:M=1:1 (v/v) に溶解し、DEAE-Sephadex A-25 (60ml) カラムにのせ、0.05Mと0.45Mの酢酸アンモニウムを含むメタノール溶液によって、濃度勾配を形成して吸着されたガングリオシドを溶出した。溶出された溶液は、各フラクション10mlずつフラクションコレクターで分取した。

分画された各フラクションをガラス薄層クロマトプレート (Merck社, HPTLC) にプロットして、溶媒 A を展開溶媒として分離し、乾燥後、オルシノール法で発色して各フラクションの確認を行った。同時に TLC 免疫染色にて、陽性血清の IgG 抗体が認識するバンドを含むフラクションを調整しそれを分画した (分画 Y)。得られた分画 Y を前述の方法によってシアリダーゼ処理を行った後、蒸留水に対して透析を行って脱塩後、水を除去して、3.5mlの C:M=1:1 溶液に溶解した。この画分を再度 DEAE-Sephadex A-25カラム (20ml) にのせ、80mlの0.05Mの酢酸アンモニウムを含むメタノール溶液でモノシアロガングリオシド画分を除いて80mlの0.2M 酢酸アンモニウムを含むメタノール溶液で溶出し、メタノールをエバポレーターで除去して蒸留水に溶解し、一晚透析を行った。その後トルエン添加して、ロータリー

エバポレーターで濃縮・乾固し、3.5mlのC:M=1:1に溶解した。この試料溶液をHPTLCガラスプレートにプロットして、展開溶媒として溶媒Aを用いて展開しオルシノール法で発色して確認を行った。確認後、この試料溶液を窒素下で乾固させ、少量のクロロフォルム-メタノール-水(C:M:W=55:45:2, v/v/v)に溶解した。そして、試料溶液を同様の溶媒で平衡化したイアトロビーズ(Iatron)カラムにのせ、C:M:W=55:45:2とC:M:W=30:70:2による濃度勾配をかけて溶出した。溶出液は、各フラクション10mlずつ分取した。分取した画分は、HPTLCガラスプレートで前記と同様に展開し、オルシノール法で発色させた。同時に陽性血清を用いたTLC免疫染色により目的の抗原Xを含む画分を同定した。この画分をロータリーエバポレーターを用いて濃縮・乾固して3mlのC:M=1:1に溶解した。この試料溶液をHPTLCガラスプレートで再び展開して、オルシノール法とレゾルシノール法によって発色させた。更に、TLC免疫染色により、陽性血清との反応も確認した。

7. 精製した微量糖脂質の定量

精製した抗原X溶液のシアル酸濃度をレゾルシノール法によって以下の様に定量を行った。

アシストチューブに標準シアル酸100, 200, 400, 800 ngを含む溶液と精製した画分6 µlを採取し、凍結乾燥を行った。その後、レゾルシノール-塩酸試薬40 µlと蒸留水40 µlを加え100 で30分間加熱し、20 µlの酢酸ブチル-ブタノール(85:15, v/v)を加えて攪拌し、2,000rpm, 4分間遠心分離を行った。その上澄液を15 µlを採取して、超マイクロセル(幅2 mm, 光路長10 mm)を用いて580nmで吸光度を測定した。標準シアル酸溶液の吸光度により作成した検量線を用いて試料溶液中のシアル酸量を測定した。

8. 精製した微量糖脂質の糖鎖構造の解析

精製した抗原Xの糖鎖構造を解析するため、日本電子製 質量分析計HX-100によって分析を行った。得られたマススペクトラムから糖鎖構造を推定した。

結 果

1. 牛脳粗ガングリオシドの分画

分画した牛脳粗ガングリオシドのHPTLCパターンを図1に示した。0.05M酢酸アンモニウム画分ではGM1ガングリオシドが、0.1Mの画分ではGD1aガングリオシドが、0.2Mの画分ではGD1aをはじめGD1b, GT1b等が、0.4Mの画分ではGT1b以下のポリシアロガングリオシドがそれぞれ主成分であることが判明した。(図1)

2. 薄層クロマト(TLC)による免疫染色

分画した牛脳ガングリオシド画分をプラスチック TLCプレート上で患者血清を用いて免疫染色した結果を、図2に示した。50例の急性期GBS血清の中で5例が、0.1M(抗体価の強いものは0.2Mでも検出)酢酸アンモニウムを含むメタノール溶媒で溶出される画分のTLC上でGD1aの直下に位置するバンド(抗原X)と反応するIgG抗体が検出された(図2)。正常対照(16例)と疾患対照(136例)血清では、同抗体は全て陰性であった。

3. 酵素処理後の薄層クロマト(TLC)による免疫染色

*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼで処理を行なったものと、対照として酢酸緩衝液中で同様の処理を行った画分を免疫染色を行い反応性の比較を行ったところ、GD1aガングリオシドの直下に位置するバンド(抗原X)の反応性には変化が無いことが明らかになった(図3)。

4. 牛脳ガングリオシドのシアリダーゼ処理

牛脳ガングリオシドを*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼで処理を行うと、牛脳に多量に存在するGD1aガングリオシドは末端のシアル酸が脱離してGM1ガングリオシドに変化してTLC上で移動度が上昇するが、抗原Xは標準のGD1aガングリオシドの直下の位置に変化しないでそのまま存在し、患者血清との反応性も変化しなかった。このことより抗原Xは、*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼには感受性を持たないことが確認された。しかしながら、抗原Xはレゾルシノール試薬との反応によって発色することから、シアル酸を含有した糖脂質(ガングリオシド)

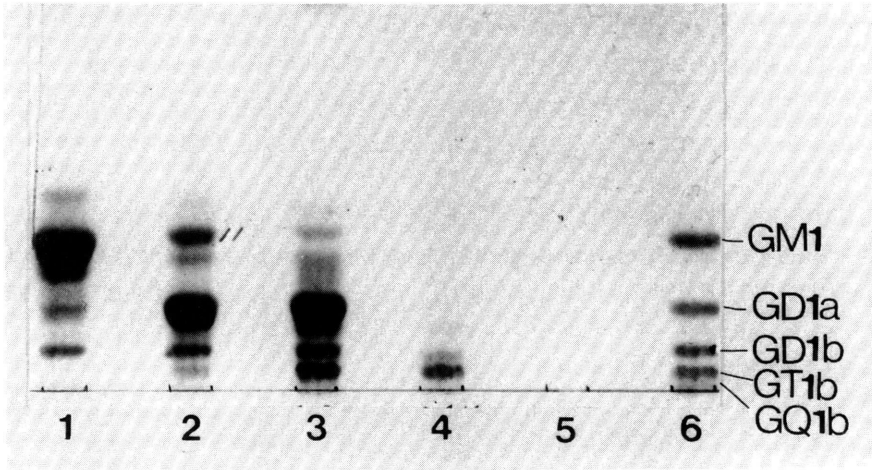


図1 牛脳ガングリオシドの DEAE-Sephadex A-25カラムから溶出された画分の HPTLC パターン (オルシノール発色法)

Lane 1 ; 0.15M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 2 ; 0.1M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 3 ; 0.2M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 4 ; 0.4M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 5 ; 1.0M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 6 ; Standard Ganglioside from Bovine Brain

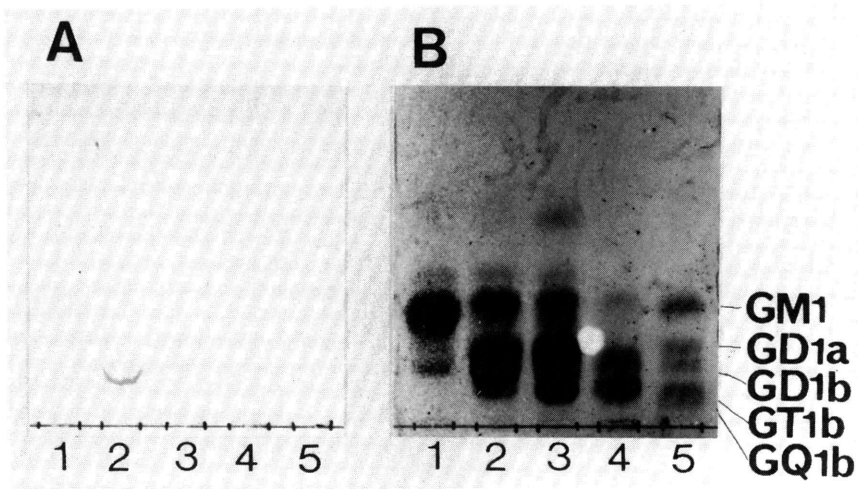


図2 TLC (MACHERRY-NAGEL プラスチックプレート) 上での患者血清による免疫染色

A ; 急性期 GBS 患者血清にて免疫染色
 B ; オルシノール発色
 Lane 1 ; 0.05M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 2 ; 0.1M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 3 ; 0.2M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 4 ; 0.4M Ammonium acetate in Methanol 溶出画分
 Lane 5 ; Standard Ganglioside from Bovine Brain

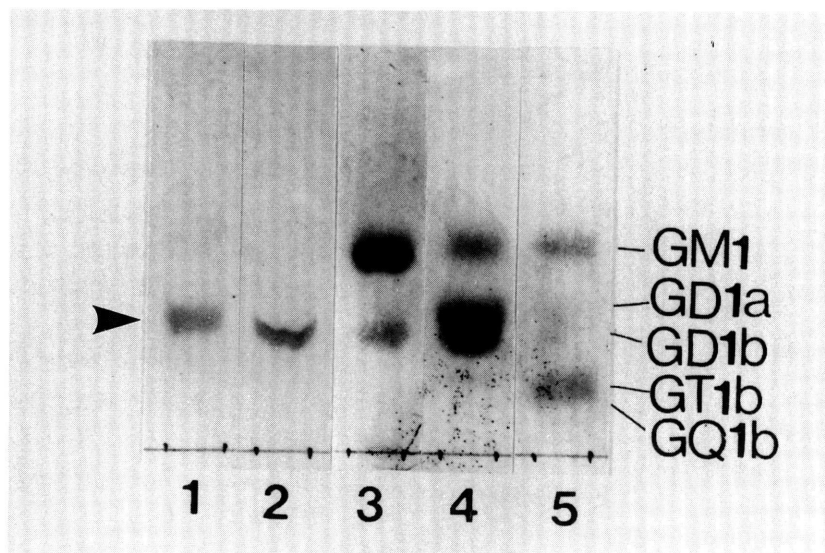


図3 抗原 X を含む画分のシアリダーゼ処理後の TLC (MACHERRY-NAGEL プラスチックプレート) 上での患者血清による免疫染色

Lane 1, 2; 患者血清にて免疫染色
Lane 3, 4, 5; レゾルシノール発色
Lane 1; シアリダーゼ処理
Lane 2; 無処理
Lane 3; シアリダーゼ処理
Lane 4; 無処理
Lane 5; 対照

であることが確認された。(図3)。

グリオシドであることが判明した。

5. 試料の弱アルカリ処理

試料液中に、リン脂質混入の可能性が考えられたため、試料を弱アルカリ処理を行った後、TLC 免疫染色を実施した。その結果、抗原 X のバンドの位置及び患者血清との反応性に変化は認められなかったため、この抗原 X は、リン脂質ではないことが判った。

6. 微量糖脂質抗原の精製

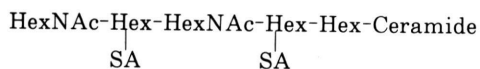
DEAE-Sephadex A-25カラム、イアトロビーズカラムによって調製された抗原 X を、精製された標準の牛脳ガングリオシドと HPTLC によって比較した。図 4 に示すように、抗原 X は HPTLC 上で 1 スポットを示したことにより、2 種類のカラムクロマトによって精製されたことが確認された。更に、標準のガングリオシドと移動度を比較すると、GD1a ガングリオシドより僅か下に位置し、GD1b ガングリオシドより上部に位置することから、標準物質に含有されないタイプのガン

7. 抗原 X 中のシアル酸量の定量

精製した抗原 X のシアル酸量を、標準シアル酸の吸光度より検量線を作成し、抗原 X 溶液のシアル酸量を求めた。その結果、抗原 X 溶液のシアル酸濃度は $0.076 \mu\text{l}/\mu\text{l}$ であり、150mg の牛脳粗ガングリオシドからカラムクロマトによって精製された抗原 X のシアル酸量は、0.507mg であった。

8. 精製した抗原 X の FAB-MS による糖鎖構造の解析

抗原 X を FAB-MS によるマススペクトラムを 図 5 に示した。このマススペクトラム及び標準ガングリオシドのそれと比較しながら抗原 X の糖鎖構造を解析すると、抗原 X の糖鎖構造は次の様に予測された。



(Hex : hexose, HexNAc: N-acetyl-hexosamine, SA: sialic acid)

考 察

GBS 患者の血清50例中6例において薄層クロマト (TLC) 免疫染色で, GD1a ガングリオシドの直下に存在するバンド (抗原 X) が認められた (図 2 - A). このバンドは, レゾルシノール試薬に対しても反応することからシアル酸を含有する糖脂質, 即ちガングリオシドであると考えられた. 更に, 牛脳粗ガングリオシドの DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトによって, この抗原 X が0.1M 酢酸アンモニウムを含むメタノール画分に溶出されることから, 抗原 X は1分子中にシアル酸を2分子含有しているものと考えられた (図 2 - B). 更に, 抗原 X は*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼ処理後における HPTLC のバンドの位置及び免疫染色による反応性に変化が認められなかったことから, ガングリオシド系列の基本糖鎖の末端以外の糖にシアル酸が1分子ずつ結合したジシアロガングリオシドであると考えられた (図 3).

牛脳ガングリオシド画分には, GalNAc-GD1a が存

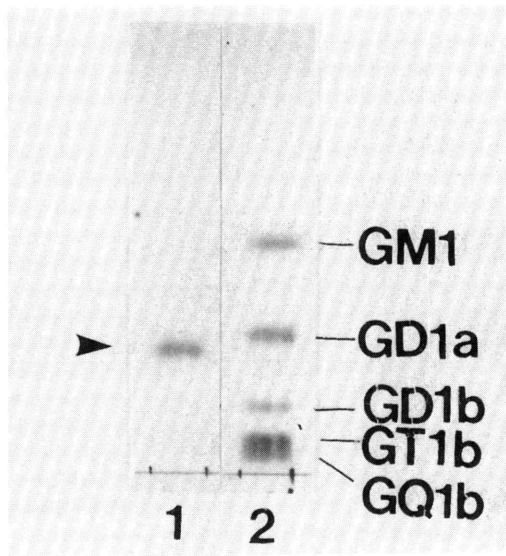


図 4 精製した抗原 X の HPTLC

Lane 1 ; 精製抗原 X
Lane 2 ; 牛脳からの標準ガングリオシド

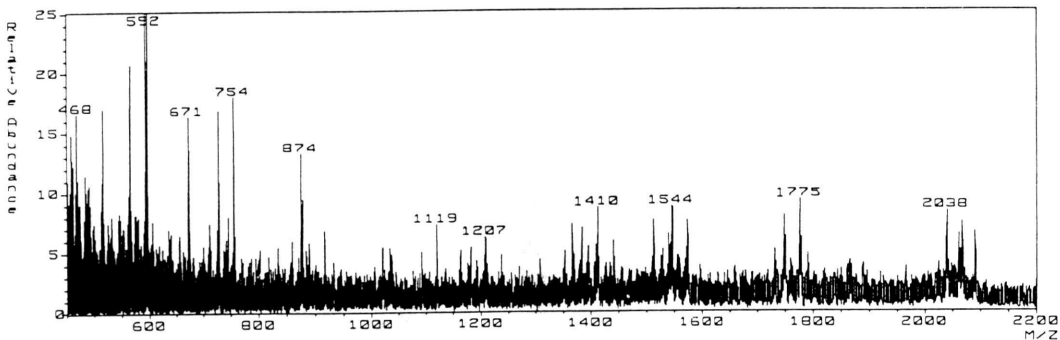
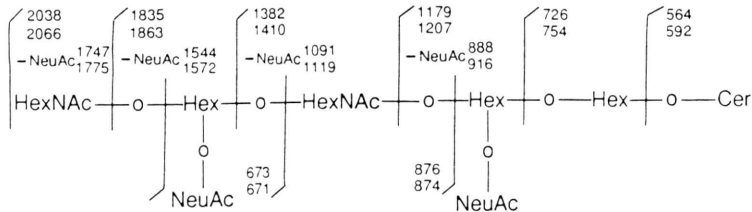


図 5 抗原 X の FAB-MS スペクトラム

在することがすでに報告されており (10), このガングリオシドの TLC 上での位置及びシアル酸結合位置が, 本結果の「シアル酸 2 個が基本糖鎖の末端以外の部位に 1 個ずつ結合したジシアロガングリオシドで GD1a ガングリオシドの直下に移動度を有する」条件と合致していること, 更に抗原 X の FAB-MS スペクトラムによる糖鎖構造の解析の結果, 抗原 X が GalNAc-GD1a の糖鎖構造と同一のフラグメントイオンが認められることから, ここで精製された抗原 X は, GalNAc-GD1a であると結論された。

シアル酸定量結果から, 牛脳粗ガングリオシド 150mg 中の抗原 X (GalNAc-GD1a) の量を換算すると, 約 2.7mg であった。更に, 精製した抗原 X (GalNAc-GD1a) と急性期 GBS 患者血清との反応は, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) においても陽性であることが確認された。

この抗原 X に対する抗体を持つ症例は, 消化器症状を先行感染としており, 電気生理学的にいわゆる軸索障害型のパターンを呈していた。この抗体が神経症状の発症とどのように関わっているかについては, 今後免疫組織学的検討および動物実験などによって検討をすすめる必要があると考えられる。また, GalNAc-GD1a 以外にも微量の未同定の糖脂質で, 患者血清より認識される物も存在することが推定されるため, 更にこれらの点について今後の検討が必要であると思われた。

ギランバレー症候群における抗糖脂質抗体は先行感染時に抗原に感作されて産生するか, あるいは, 病原体の表面の糖鎖抗原に感作されて産生される可能性もあるが, 詳細は未だ不明である。ギランバレー症候群に見られる抗糖脂質抗体の出現は, 消化器感染後に産生されるため食物の関与の可能性も否定できず, 栄養学的にも重要な課題であると考えられる。

参考文献

1. The Guillain-Barre syndrome study group: *Neurology*, 35, 1096-1104 (1985)
2. G. M. McKhann, J. W. Griffin and D. R. Cornblath:

- Ann. Neurol.* 23, 347-353 (1988)
3. A. A. Ilyas, H. J. Willison and R. H. Quarles: *Ann. Neurol.*, 23, 440-447 (1988)
 4. S. Kusunoki, A. Chiba and T. Shimizu: *J. Neurol. Sci.*, 98 (Suppl), 260 (1990)
 5. N. Yuki, H. Yoshino and S. Sato: *Neurology*, 40, 1990-1902 (1990)
 6. F. S. Walsh, M. Cronin and S. Koblar: *J. Neuroimmunol.*, 34, 43-51 (1991)
 7. A. A. Ilyas, F. A. Mithen and M. C. Dalakas: *J. Neurol. Sci.*, 107, 111-121 (1992)
 8. 楠 進: 最新医学, 47, 2359-2362 (1992)
 9. L. Freddo, T. Ariga and M. Saito: *Neurology*, 35, 1420-1424 (1985)
 10. A. A. Ilyas, S. C. Li and D. K. H. Chou: *J. Biol. Chem.*, 263, 4369-4373 (1988)

Abstract

Antibody activity in sera from Guillain-Barré syndrome (GBS) against minor ganglioside antigen was examined. Crude bovine brain ganglioside fraction was fractionated using DEAE Sephadex A-25 column eluted by 0.05M, 0.1M, 0.2M and 0.4M ammonium acetate in methanol. Serum antibody against a minor antigen in the 0.1M fraction migrating just below GD1a on the thin-layer chromatogram was detected in 6 of 50 patients with GBS. The antigen (antigen X) was resistant to sialidase treatment and stained with resorcinol. Antigen X was purified using two gradient columns, DEAE Sephadex A-25 column and Iatrobeads column. From the carbohydrate sequence determined by FAB/MS, antigen X was considered to be ganglioside GalNAc-GD1a. All the patients with anti-GalNAc-GD1a antibody experienced gastrointestinal infection before affected with GBS. Pathophysiologic significance of this antibody activity should be investigated in the future study.