

自己免疫性ニューロパチー患者血中のモノシアロガングリオシド 抗体の検討

有田 政信*, 藤原 淳子*, 吉田 弘子*, 楠 進**

(平成6年10月6日受理)

Serum Antibody against Monosialogangliosides in Patients with Autoimmune Neuropathies

Masanobu ARITA*, Jyunko FUJIWARA*, Hiroko YOSHIDA* and

Susumu KUSUNOKI**

(Received October 6, 1994)

緒 言

糖脂質抗原は神経系の細胞膜表面に存在し、各種のレセプターや接着分子等としての役割、あるいは膜の安定化に寄与する等の役割が考えられているが、その生理学的意義の詳細については現在まで不明な点が多い。糖脂質抗原の中には特定の細胞群に特異的に表現されている分子種が存在し、その細胞群の機能に密接に関与しているものと考えられている。

一方、自己免疫機序による末梢神経障害（ニューロパチー）においては、血中に抗糖脂質抗体が高頻度に検出され、発症に関与する物質として注目されている。なかでも硫酸化グルクロン酸基をもつ糖脂質（SGPGなど）やガングリオシドGM1およびGD1bなどを認識する抗体がしばしば報告されている（1-6）。

われわれは最近、外眼筋麻痺・失調・腱反射低下を三徴とするミラー フィッシャー症候群（Miller Fisher Syndrome, MFS）や、外眼筋麻痺をとまなうギランバレー症候群（Guillain-Barré Syndrome, GBS）で、高頻度にも特異的に血中にガングリオシドGQ1bを認識するIgG抗体が検出されることを見いだした（7, 8）。そして血清抗GQ1b IgG抗体が、極めて有用なミラーフィッシャー症候群やギランバレー症候群の診断マーカーとなりうる可能性を示した。さらに免疫組織化学的には眼球運動に関わる脳神経（動眼神経・滑車神経・外転神経）のランヴィエ絞輪部にGQ1b抗体が特異的に表現されていることを明らかにし（8）、抗GQ1b抗体が眼球運動障害の発症機序に関与している可能性を示した。

* 栄養学科 食品学第二研究室

** 東京大学付属病院神経内科

これらのことから、抗糖脂質抗体のニューロパチー発症における重要性が認識される様になった。

神経系組織におけるモノシアロガングリオシド分子種としては、GM1が最も主要なものとして存在しているが、そのほかに微量なモノシアロガングリオシド分子種が数多く存在していることが明らかになっている。これらに対する血中抗体を検討し、従来検出されなかった抗体活性を検出することは、末梢神経疾患の新たな診断マーカーを見いだすことに繋がるものと考えられる。本研究ではヒト後根神経節の小型神経細胞に局在することが判明しているモノシアロガングリオシド分子種の一つであるフコシルGM1（9）について、モノクローナル抗体を用いて神経線維におけるその局在を検討すると共に、自己免疫性ニューロパチーにおける血中抗フコシルGM1抗体について検討を加えた。また一方でウシ脳より抽出された粗モノシアロガングリオシド画分中の、他の微量モノシアロガングリオシドとの反応についても検討を加えた。これらの二点の検討を通じて、微量モノシアロガングリオシド分子種とそれに対する血中抗体の意義について解析を行った。

実験材料及び方法

1) ヒト末梢神経組織標本の抗フコシルGM1抗体による免疫染色

神経疾患を持たない剖検例6例から得たヒト後根神経節と坐骨神経の厚さ10 μ mの凍結切片を作成した。風乾後アセトンで5分間固定して再び風乾する。10%ヒツジ血清を含むphosphate-buffered saline(PBS)溶液をのせて30分間室温においた後、PBS溶液で5分間、3回洗浄し、10%ヒツジ血清を含むPBS溶液で30倍に希

積した抗フコシルGM1モノクローナル抗体 (CRD37-6) (10) と 4°C で一晚反応させた。その後、再びPBS溶液で5分間、3回充分に洗浄し、ヒツジ抗マウスIgG, M, A (CAPPEL社, Malvern PA, USA, 1:200) と1.5時間反応させた。反応が、ジアミノベンチジン (DAB) 50mg/dl (H₂O₂, 0.01%) を含むPBS溶液で発色させた。

2) 酵素抗体法 (Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA法)) による各末梢神経疾患患者血清のガングリオシドに対する反応性

ギランバレー症候群 (GBS) 63例, 慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy) 12例, 多巣性運動性ニューロパチー (Multifocal Motor Neuropathy, MMN) 9例, 疾患対照99例, 正常コントロール16例, の血清を用い, Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) 法でフコシルGM1との反応を検討した。これらの血清は後述のモノシアロガングリオシド画分についての薄層クロマト (TLC) 免疫染色にも用いた。ELISA法にはLinbroマイクロタイタープレート (96well) を用いた。各wellに200ngのフコシルGM1 (4μg/ml in エタノール) を入れ37°C で加温してエタノールを除いた。対照としてフコシルGM1を入れないwellを用いた。各wellに50μl の1% bovine serum albumin (BSA) を含むPBS溶液を入れ30分放置後, PBS溶液を除去してタンパク質の非特異的結合をブロックした。1% BSAを含むPBS溶液で40倍に希釈した患者血清を, 各50μl ずつフコシルGM1を吸着させたwellと対照のwellに入れて1.5時間反応させた。反応終了後, 0.1% BSAを含むPBS溶液で3回洗浄を行った。1% BSAを含むPBS溶液で200倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgM (CAPPEL社, Malvern PA, USA), 500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG (CAPPEL社, Malvern PA, USA) と1.5時間反応させた。反応終了後, 0.1% BSAを含むPBS溶液で3回洗浄を行った。そのうち40mg/dl の orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) を含む phosphate citrate buffer (pH 5.0) と2分間反応させて, 発色させた。そしてELISA-reader (BioRad社, Hercules, CA) を用いて492nmの吸光度の測定を行った。フコシルGM1吸着wellの値から対照wellの値を引いた値で抗体活性を表し, 正常対照の平均値 + 3 SD を越える値を示した

ものを陽性とした。

陽性例の患者血清については, GM1およびフコシルGA1糖脂質との反応性についても同様の方法で検討を行った。

3) ウシ脳モノシアロガングリオシド画分の薄層クロマト (TLC) 上での末梢神経疾患患者血清による免疫染色

市販の牛脳粗ガングリオシド (Sigma社, St. Louis, USA) 50mg をクロロフォルム : メタノール = 1 : 1, (C : M = 1 : 1, v/v) に溶解して, アセチル化したDEAE-Sephadex A-25 (20ml) カラムに吸着させ, ベッド容量の三倍量の0.05M, 0.2M, 0.4Mの酢酸アンモニウム濃度としたメタノール溶液を用いてステップワイズに溶出を行った。得られた各画分を蒸留水に対して透析して脱塩を行い, トルエンを少量加えてエバポレーターで減圧・濃縮・乾固した。各画分を3mlのC : M = 1 : 1に溶解して以下の実験に用いた。この画分をモノシアロガングリオシド画分溶液6μlをHPTLCガラスプレート (Merck社, Darmstadt, Germany) 上にのせ, クロロフォルム : メタノール : 水 = 50:45:10 (C : M : W = 50:45:10, v/v/v) を展開溶媒として展開した後, 十分に乾燥させ, 0.4% poly(isobutyl) methacrylate を含むヘキサン溶液に1分間浸漬した。このうち30分間乾燥させ, 1% BSAを含むPBS溶液で30分間非特異的吸着部位のブロッキングを行った。そしてPBS溶液で十分洗浄し, 乾燥後, 1% BSAを含むPBS溶液で40倍希釈した患者血清をのせて1.5時間反応させた。反応終了後, PBS溶液で100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgMまたは200倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGをのせて1.5時間反応させた。反応終了後, PBS溶液で洗浄し, ジアミノベンチジンを50mg/dlの濃度で含むPBS (0.01% H₂O₂ 含有) 溶液で発色させた。また, この薄層クロマトは同時にオルシノール - 硫酸試薬溶液によって糖の発色を行った。

4) ウシ脳モノシアロガングリオシド画分の二次元薄層クロマト上での末梢神経疾患患者血清による免疫染色

0.05M酢酸アンモニウムを含むメタノール溶液で溶出した画分をHPTLCガラスプレート (Merck社,

Darmstadt, Germany) 上にスポットして展開溶媒 1 (C : M : W = 50:45:10, v/v/v) を用いて展開を行った。展開後、十分乾燥させ、次に展開溶媒 2 (C : M : W : 2 NNH₄OH = 60:45:5:5, v/v/v/v) を用いて90度回転した方向に展開させた。この後の患者血清との反応による免疫染色は前述 3) と同様の方法で行った。

結果

1) ヒト末梢神経組織標本の抗フコシルGM1抗体による免疫組織染色

抗フコシルGM1マウスモノクローナル抗体によるヒト後根神経節と坐骨神経の組織染色の結果を図1及び図2に示した。その結果、ヒト後根神経節の小型神経細胞(N)とそれを取りまくsatellite cells(arrowhead)が明確に、免疫染色された(図1)。このことはウサギ抗フコシルGM1抗体を用いて行った既報告の実験結果と同様であった(9)。さらにウサギ抗体では、免疫染色の明らかでなかった無髄神経線維の染色も本実験の坐骨神経の組織染色で明らかとなった(図2)。

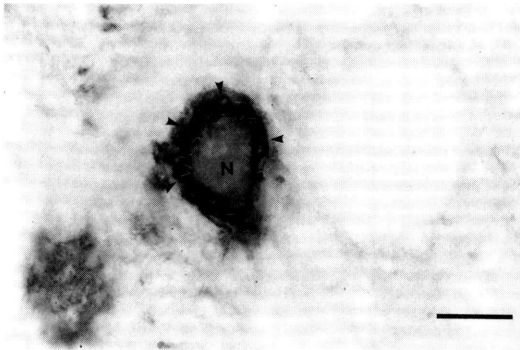


図1 ヒト後根神経節の抗フコシルGM1抗体による免疫組織染色

後根神経節の小型神経細胞(N)とこれを取りまくsatellite cells(矢印)が染色され、Fucosyl-GM1陽性細胞に隣接して大型の陰性細胞を見ることができる。(Bar=0.05mm)

2) ELISA法による各末梢神経疾患患者血清のガングリオシドに対する反応性の検討

GBS患者血清では、63例中3例に抗フコシルGM1抗

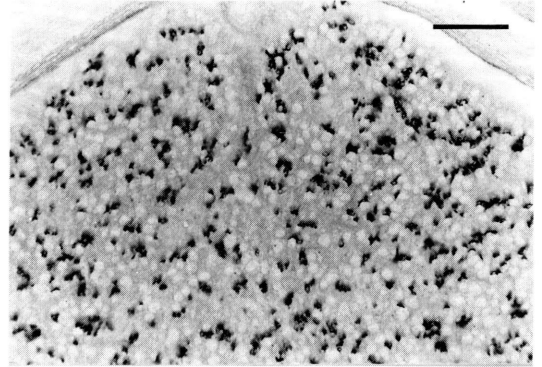


図2 ヒト坐骨神経の横断面の抗フコシルGM1抗体による免疫組織染色

無髄神経線維の染色がみられる。(Bar=0.2mm)

体の有意の上昇が認められた。この3例を免疫グロブリンクラスで見ると、2例はIgG抗体、他の1例はIgM抗体であった。MMN患者血清では、9例中1例に同様に抗フコシルGM1IgM抗体が認められた。しかしながら、その他の疾患対照(99例)および正常対照(19例)では、抗フコシルGM1抗体活性は全て見い出せなかった。

抗フコシルGM1抗体の陽性例について、GM1及びフコシルGA1についての反応性を調べたところ、いずれも同じ抗体クラス(IgMまたはIgG)の抗GM1抗体が同時に認められた。しかしながら抗フコシルGA1抗体は認められなかった。

3) ウシ脳モノシアログングリオシド画分の薄層クロマト(TLC)上での末梢神経疾患患者血清による免疫染色

ウシ脳モノシアログングリオシド画分とGBS患者血清の反応性を検討した結果、14例にGM1の直下に位置する糖脂質抗原を認識する抗体が確認された(IgM3例、IgG11例)(図3)。正常対照および疾患対照では同じ位置に存在する糖脂質抗原に対する陽性バンドは認められなかった。これらの14例について、GM1及びフコシルGA1についての反応性を調べたところ、7例で同じ抗体クラスの抗GM1抗体が認められ、さらに2例はフコシルGM1陽性であった。

考 察

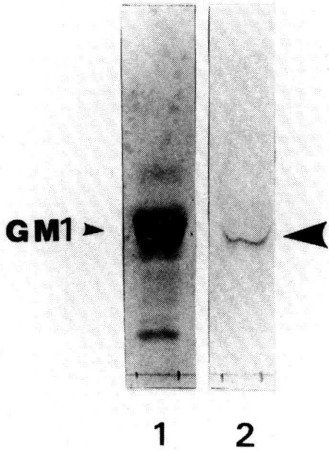


図3 ウシ脳より分画したモノシアロガングリオシド画分の薄層クロマト及びそのGBS患者血清による免疫染色

Lane1 オルシノール試薬によるモノシアロガングリオシド画分の発色
Lane2 患者血清による免疫染色

4) ウシ脳モノシアロガングリオシド画分の二次元薄層クロマト上での末梢神経疾患患者血清による免疫染色

先の一次元薄層クロマト免疫染色で陽性所見の得られた14例の患者血清について、二次元薄層クロマト免疫染色による検討を加えた(図4)。図4-aには、ウシ脳ガングリオシドモノシアロ画分の二次元クロマトをオルシノール-硫酸試薬で発色させた結果を示した。GM1ガングリオシド(矢印)以外のモノシアロガングリオシド分子種が検出された。図4-b, c, dには二次元クロマト後、各症例の患者血清による免疫染色をした結果を示した。その結果、いずれの症例の場合にもGM1ガングリオシドやその他のモノシアロガングリオシドが染色されることが判明した。これらの結果から、末梢神経疾患患者血中抗体の反応する糖脂質抗原は、複数であることが明らかとなった。

抗フコシルGM1モノクローナル抗体(CRD73-6)は、ヒト末梢神経の後根神経節の小型神経細胞とそれを取りまくsatellite cellsを特異的に染色したが、これは抗フコシルGM1ウサギ抗血清を用いた既報告と同様の結果であった(9)。さらにアセトン固定することによって、無髄神経線維も特異的に免疫染色されることが明らかとなった。われわれはフコシルGM1陽性ニューロンとUEA-1レクチンにより染色されるニューロンがおなじサブセットのものであり、UEA-1レクチンが無髄線維を染色することから、フコシルGM1陽性細胞は無髄線維を突起として持つものであろうと推測していたが(11)、今回アセトン固定とマウスモノクローナル抗体CRD73-6を用いることにより、無髄線維にもフコシルGM1が存在することを明らかにする事ができた。

そこで、このような局在を示す、フコシルGM1に対する血中抗体を検索したところ、疾患対照および正常対照ではすべて陰性であったが、GBS患者3例とMMN患者1例に抗体活性を見出すことができた。GBS患者の3例中2例では急性期に強い痛みを訴えており、さらに後根の無髄神経線維は痛覚あるいは温度感覚を司っているとされる為、血中フコシルGM1抗体が無髄線維に結合することが痛覚線維に対して刺激的に作用して疼痛発現に関与している可能性が考えられた。しかし他の1例では強い疼痛はみられず、またMMN患者の1例は運動麻痺主体で知覚障害著明ではなかったことから、抗フコシルGM1抗体の存在が疼痛の発症に関連しているとは結論出来ず、今後のさらなる検討が必要であろうと考えられた。

抗フコシルGM1抗体に対して陽性である例は、全例とも抗GM1抗体活性を同時に示した。一方、抗フコシルGA1抗体活性はいずれの例も陰性であった。このことより、これらの抗体は、フコース残基のみ認識しているものではないことが解った。従ってFucosyl α -1-2 Galactosyl基は血液型H型物質として全身の血管内皮に表現されているため、この残基に対する自己抗体はきわめて出現しにくいものと考えられた。

ウシ脳粗ガングリオシドのモノシアロ画分(酢酸アンモニウム0.05Mを含むメタノール溶液によってDEAE-Sephadex A-25カラムから溶出する画分)に対する血中抗体の検索によって、ギランバレー症候群63例中14

自己免疫性ニューロパチー患者血中のモノシアログングリオシド抗体の検討

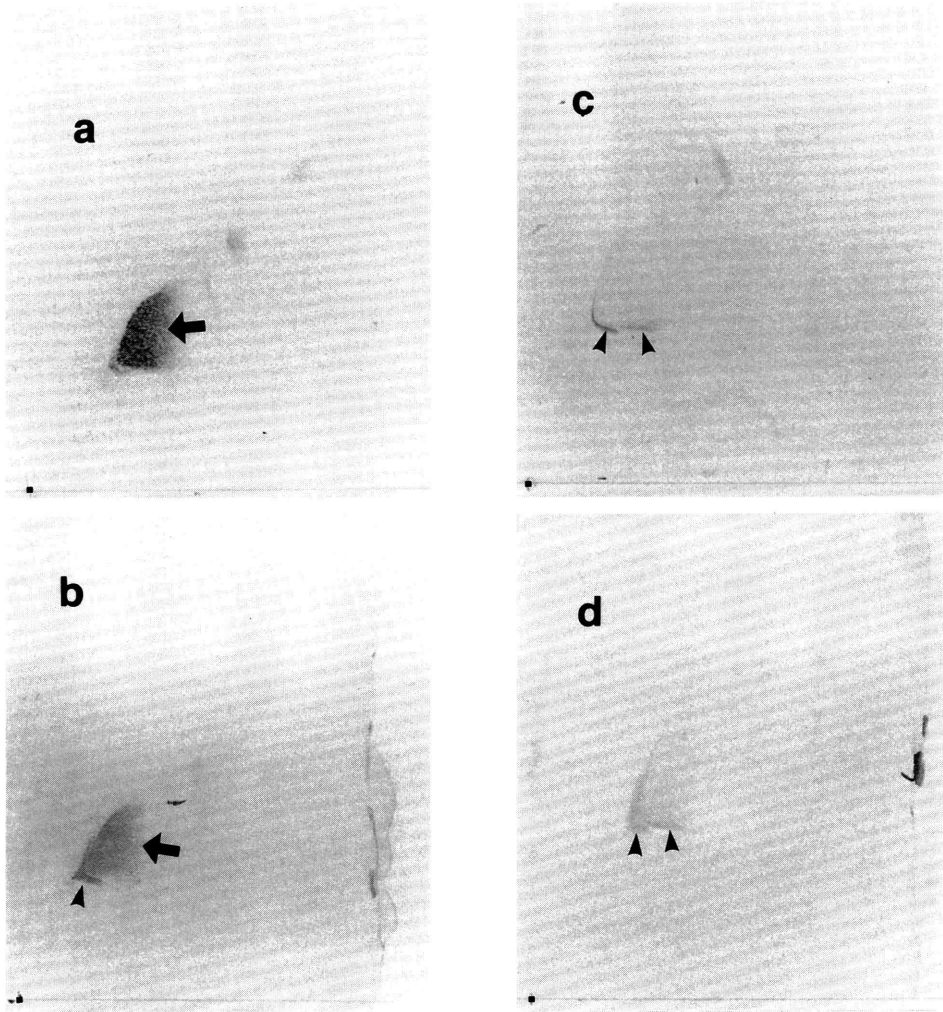


図4 モノシアログングリオシド画分の二次元薄層クロマト及びそのGBS患者血清による免疫染色
展開溶媒1 (C : M : W=50:45:10, v/v/v) により上方向へ,
展開溶媒2 (C : M : W=2NNH₄ OH=60:45:5, v/v/v/v) により右方向へ展開した。
a ; オルシノール試薬による発色. GM1 (矢印) の他に数種の微量成分が存在することが判る。
b, c, d ; それぞれ患者血清による免疫染色
矢印で示す様に複数の抗原が, 各症例の血清により異なったパターンで認識されている。
b ではGM1 (矢印) も同時に認識されている。

例の血中にTLC上でGM1の直下に移動度をもつ比較的微量な糖脂質を認識する抗体がみられることが明らかとなった。我々は、すでにジシアロガングリオシド画分について検討した結果、TLC上GD1aの直下に移動度を持つ微量成分がギランバレー症候群50例中6例の血清で認識されることを見だし、その抗原がGa1NAc-GD1aであることを報告した(12,13)。これらは電気生理学的に最遠位の電動ブロックあるいは軸索障害を伴う症例であった。今回のGM1の直下に移動度を持つ抗原については、二次元TLC免疫染色の結果、複数の抗原の存在が推定されたが、これらの糖鎖構造の解析は、未だ行っていない。しかし2例で抗フコシルGM1抗体陽性であり、フコシルGM1が抗原のひとつである可能性は考えられるが、これら2例ともに複数の他のモノシアロガングリオシド抗原との反応が認められたことより、未同定の抗原が同時に認識されていた。これらのモノシアロガングリオシド抗原の同定と共に、それぞれの抗体活性を持つ症例の臨床的特徴についても、今後検討していく必要が考えられた。

はじめに記したように、糖脂質の生体における役割については不明の点が多い。患者血中の抗糖脂質抗体の検討は、疾患の病態の解析および補助診断法の開発にとって有用であるばかりでなく、未同定の糖脂質の検出および糖脂質の生理学的意義の解明にとっても手がかりとなると考えられ、糖鎖生物学研究のひとつの重要な分野であると思われる。

参考文献

1. L.freddo, T.Ariga, M.Saito, L.C. Macala, R.K.Yu, N. Latov : *Neurology*, **35**, 1420-1424 (1985)
2. A.A. Ilyas, F.A. Mithen, M.C. Dalakas, Z.W. Chen, S.D. Cook : *J. Neurol. Sci.*, **107**, 111-121(1992)
3. S. Kusunoki, A. Chiba, T. Shimizu, H. Yamada, T. Mannen : *J. Neurol. Sci.*, **98**(Suppl), 260(1990)
4. N. Yuki, H. Yoshino, S. Sato, T. Miyatake : *Neurology*, **40**, 1900-1902(1990)
5. F. S. Walsh, M. Cronin, S. Koblar, T. Doherty, J. Winer, A. Leon, Rac. Hughes : *J. Neuroimmunol.*, **34**, 43-51(1991)
6. 楠 進 : *最新医学*, **47**, 2359-2362(1992)
7. A. Chiba, S. Kusunoki, T. Shimizu, I. Kanazawa : *Ann. Neurol.*, **31**, 677-679(1992)
8. A. Chiba, S. Kusunoki, H. Obata, R. Machinami, I. Kanazawa : *Neruology*, **43**, 1911-1917(1993)
9. S. Kusunoki, K. Inoue, M. Iwamori, Y. Nagai, T. Mannen : *Brain Res.*, **494**, 391-395(1989)
10. S. Kusunoki, A. Chiba, T. Shimizu, I. Kanazawa : *Biochim. Biophys. Acta*, **1214**, 17-31(1994)
11. S. Kusunoki, K. Inoue, M. Iwamori, Y. Nagai, T. Mannen : *Neurosci. Lett.*, **126**, 159-162(1991)
12. S. Kusunoki, A. Chiba, K. Kon, S. Ando, K. Arisawa, A. Tate, I. Kanazawa : *Ann. Neurol.*, **35**, 570-576(1994)
13. M. Arita, K. Arisawa, A. Tate, S. Kusunoki : *Bull. Tokyo Kasei Univ.*, **34**, 11-17(1994)

Abstract

Antibodies against monosialogangliosides except GM1 in sera from patients with autoimmune neuropathies were investigated. Anti-fucosyl GM1 antibody was detected in 3 of 63 patients with Guillain-Barré syndrome and in 1 of 9 patients with multifocal motor neuropathy. Fucosyl GM1 was shown to be localized in a subset of small neurons in dorsal root ganglia and unmyelinated sensory fibers using a monoclonal anti-fucosyl GM1 antibody CRD73-6. Anti-fucosyl GM1 antibody might possibly be related with pathogenetic mechanism of dysesthesia. Antibody activity against the other monosialogangliosides were detected in 14 of 63 patients with Guillain-Barré syndrome. Several target antigens were detected using enzyme immunostaining over two-dimensional thin layer chromatogram. Examination of serum antibodies against such minor ganglioside antigens may be important for understanding the pathogenetic mechanism of autoimmune neuropathies.