

GD1b感作ウサギ実験的ニューロパチーの発症因子 としての抗GD1b抗体

有田 政信*, 堤 裕子*, 衛藤美栄子*, 川名 広子*
楠 進**

(平成9年10月2日受理)

Anti-GD1b Antibody as A Pathogenetic Factor of the Experimental Sensory Neuropathy

Masanobu ARITA, Yuko TSUTSUMI, Mieko ETOH, Hiroko KAWANA
and Susumu KUSUNOKI

(Received on October 2, 1997)

緒 言

gangliosideはシアル酸を糖鎖に含む糖脂質であり、神経組織に多量に存在している。近年、ギラン・バレー症候群(Guillain-Barre Syndrome, GBS)やIgM paraproteinemiaを伴うニューロパチーなどの自己免疫機序によるニューロパチー患者の血中に抗ganglioside抗体が上昇することが報告され、診断のための補助検査として用いられている¹⁾。またgangliosideが細胞膜表面抗原であることを考え合わせると、発症機序に直接関与する因子である可能性が十分に考えられる¹⁾。なかでもIgG抗GQ1b抗体は、GBSの亜型で眼筋麻痺・失調・腱反射消失を三徴とするフィッシャー(Fisher)症候群²⁾や眼筋麻痺を伴うGBSのほぼ全例に上昇が見られる^{3, 4)}。一方、眼球運動を支配する脳神経である動眼神経・滑車神経・外転神経中には、他の脳神経よりもGQ1bの占める比率が高く⁵⁾、免疫組織化学的検討結果によると、これら脳神経のRanvier絞輪周囲にGQ1bが局在することから⁴⁾、抗GQ1b抗体上昇が眼筋麻痺の発症機序において重要な役割を果たしていることが示唆される。

このように抗ganglioside抗体は自己免疫性ニューロパチーの病態に深く関わっていると考えられるが、そ

の発症因子としての位置づけはまだ確立していない。その大きな理由の一つとしては、明らかな症状を伴った動物モデルが作成されていなかったことと考えられる。従来ミエリンの主要な糖脂質であるガラクトセレブロシドの免疫による脱髄性ニューロパチー作成の報告はあるが⁶⁾、ヒト患者血中抗体にしばしば見られるgangliosideについては確立した動物モデルは得られていなかった。ヒトと実験動物ではgangliosideの分布には違いがあることが多く、ヒトで神経障害をひき起こす抗体が動物では障害性に働かない可能性が考えられた。

最近、楠らにより、ganglioside GD1b(図1)をウサギに免疫することにより、感覚失調性ニューロパチーが作成されることが報告され⁷⁾、またヒト後根神経節神経細胞にはGD1bが局在する⁸⁾ことが確認された。GD1bのジシアロシル基を認識する抗体は、感覚失調性ニューロパチーに特異的に上昇することから¹⁾、この

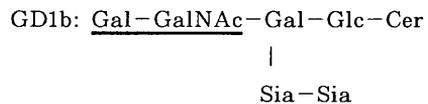


図1 GD1bの糖鎖構造

Gal:ガラクトース, GalNAc:N-アセチルガラクトサミン, Sia:シアル酸, Glc:グルコース, Cer:セラミド
下線部はそれぞれGal-GalNAc基とジシアロシル(Sia-Sia)基を示す。

* 栄養学科 食品学第二研究室

** 東京大学医学部神経内科

タイプの抗体は後根神経節に局在するGD1bを標的として結合し感覚性ニューロパチーをきたす可能性が考えられた。ウサギ後根神経節神経細胞にもGD1bの局在が確認されたので、ウサギにGD1bを免疫することによって感覚神経障害が作成できるのではないかと考え、実験を行って期待した結果が得られたわけである⁷⁾。

そこでこの実験動物モデルを詳細に検討することが自己免疫性ニューロパチーにおける抗ガングリオシド抗体の意義を解明するために重要と考えられた。このためには免疫後の抗体価の推移を詳細に調べることが重要であり、同時に後根神経節におけるGD1b陽性細胞の特徴を検討する必要性も認められる。従って、本研究では免疫後の抗GD1b抗体価をIgMとIgGの各々について検討し、また後根神経節のGD1b陽性細胞と陰性細胞の大きさの比較を行った。

実験材料及び方法

1) ガングリオシドGD1bによるウサギへの免疫方法及び抗体価の測定

体重約1500gのウサギ(雌)を用いて以下の実験を行った。GD1b免疫群(18羽)には、0.5mgのGD1bを完全フロイントアジュバント(Complete Freund Adjuvant, CFA)及びKeyholelimpet Hemocyanin (KLH)とともに皮下に免疫を行った。対照群(10羽)にはCFAとKLHのみを注射した。初回注射の3週後に、それぞれ上記の同じ内容物を再度注射した。この後、1-2週おきに採血を実施して、GD1bに対するIgM及びIgG抗体価をEnzyme-Linked Immuno sorbent Assay 法(ELISA法)⁹⁾によって測定した。

2) 免疫組織染色方法

正常ウサギの後根神経節より凍結切片を作成し、4% Formalin を含むphosphate-buffered saline (PBS)に5分間浸せきし固定化した後、10倍に希釈したGD1bにのみに特異的に反応するマウスモノクローナル抗体(GGR12)と4℃で一晩反応させた。その後、ABC法によって免疫組織染色を行った。対照として、ビオチン化UEA-1(Ulex Europaeus Agglutinin-1)レクチンによる染色も同時に行い、それぞれの染色の陽性細胞と陰性細胞の直径を測定した後、ヒストグラムを用いて表した。

結果

GD1bを免疫した18羽のウサギのうち9羽が、初回免疫の5-10週後に神経症状を発症した(図2,4)。発症したウサギはいずれも四肢を奇妙な方向に向け、うまく動かすことが出来なかった。抗GD1b抗体価の推移を見ると、初回免疫の2-3週後からIgM抗体が上昇をはじめ、4週後にはほぼピークに達した。その後、IgG抗体価が上昇した。発症したウサギ9羽全てにおいてIgG抗体の上昇が見られたが、発症しなかったウサギ9羽の中、2羽ではIgG抗体の上昇が見られなかった。発症の有無とピーク時の抗体価には有意の相関関係は認められなかった(図2,3,4)。

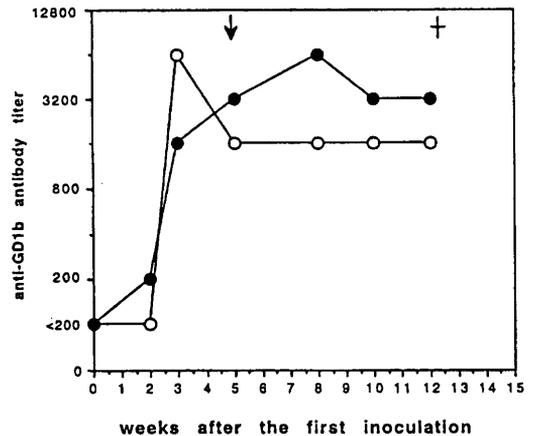
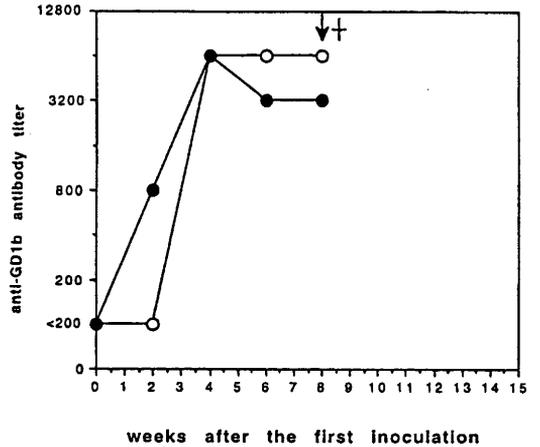


図2 発症した2例のウサギ血中の IgM 及び IgG 抗GD1b抗体価の推移。
 (●)はIgM抗体価, (○)はIgG抗体価の推移を示す。
 矢印は発症時期, 十は殺処分時期を示す。

発症後5カ月間、経過を追跡した一例では、神経症状が一時軽快し、その後再び増悪したが、抗GD1b抗体価(特にIgG抗体価)は症状に対応して低下した後再び上昇した(図4)。

抗GD1b特異的マウスモノクローナル抗体であるGG R12を用いて免疫組織化学的に検討を行った結果、ウサ

ギ後根神経節神経細胞の中、比較的大型の細胞が陽性に染色された(図5)。一方、対照として用いたUEA-1(Ulex Europaeus Agglutinin-1)レクチンによる染色結果は、小型細胞が特異的に染色された(図6)。このことはそれぞれの陽性細胞と陰性細胞の直径のヒストグラムを比較することにより確認された(図7,8)。

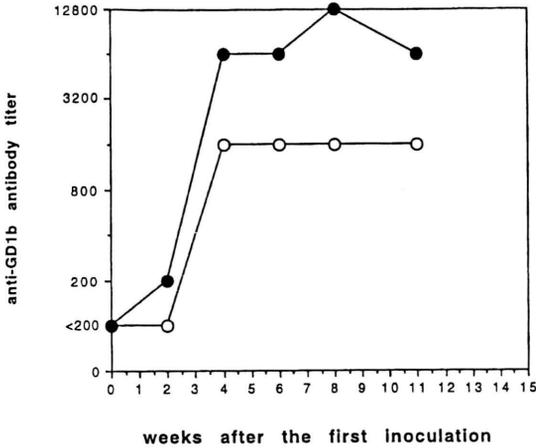


図3 発症しなかったウサギ血中のIgMおよびIgG抗GD1b抗体価の推移。(●)はIgM抗体価, (○)はIgG抗体価の推移を示す。

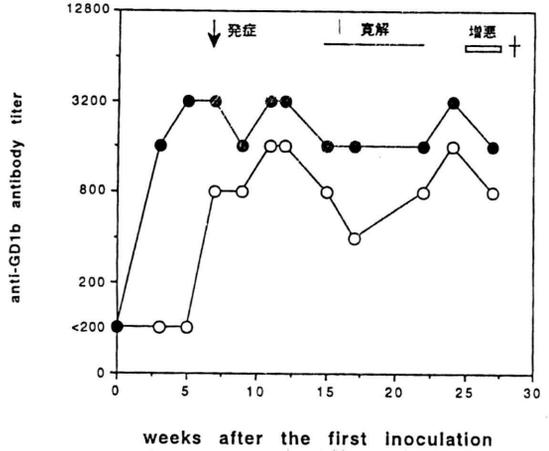


図4 発症後5ヶ月間経過を追跡したウサギの抗体価の推移。(●)はIgM抗体価, (○)はIgG抗体価の推移を示す。矢印は発症時期, 十は殺処分時期を示す。症状の軽快・増悪に対応して抗体価の変動が見られる。

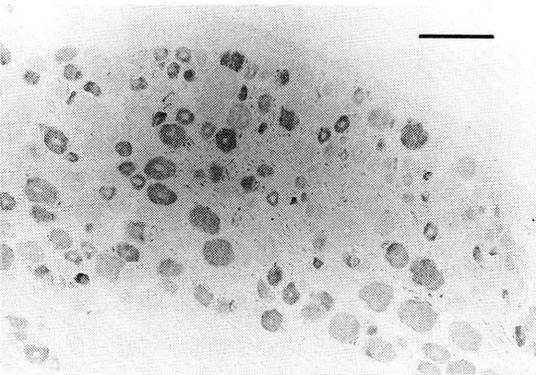


図5 GGR12(マウスモノクローナル抗GD1b抗体)によるウサギ後根神経節の免疫組織染色。比較的大型の細胞が染色されているのが判る。Bar=0.2mm

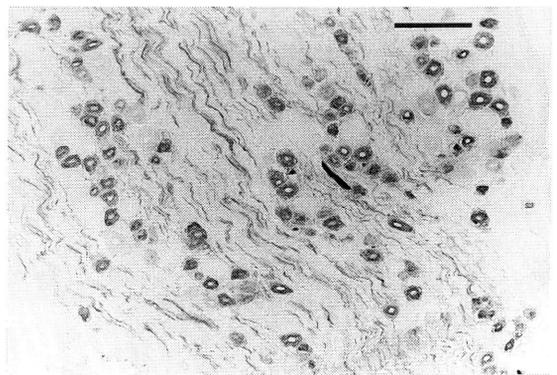


図6 UEA-1(Ulex Europaeus Agglutinin-1)レクチンによるウサギ後根神経節の免疫組織染色。小型細胞が染色されているのが判る。Bar=0.2mm

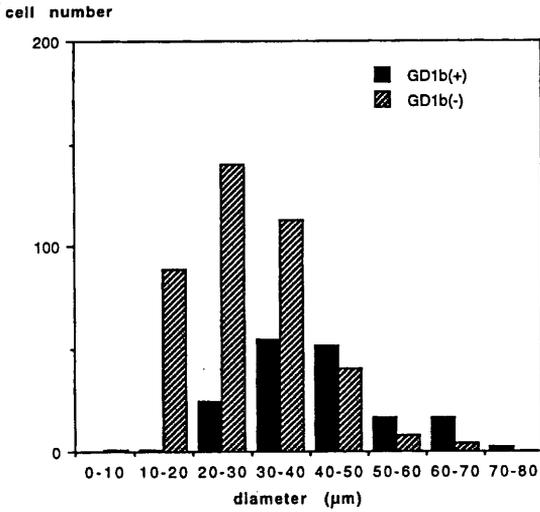


図7 GD1b陽性細胞と陰性細胞の直径のヒストグラム。

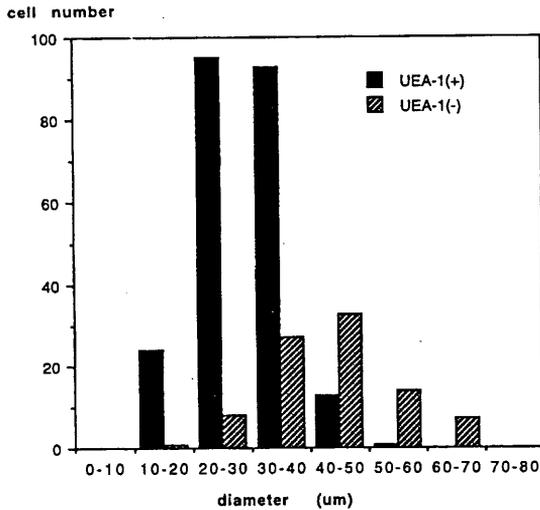


図8 UEA-1陽性細胞と陰性細胞の直径のヒストグラム。

考 察

GD1bを免疫したウサギでは、18羽中9羽で神経症状を発症した。この神経症状は、深部感覚の障害による感覚障害性失調性ニューロパチーであり、病理学的にも後索に突起を伸ばし深部感覚の伝達をつかさどる一次感覚ニューロンの障害であることが確認されている。

病変局所に炎症性リンパ球浸潤が認められないことから、抗GD1b抗体が発症の重要な因子と考えられ、抗体価の推

移を詳細に観察することが極めて重要であると考えられた。抗GD1b抗体の免疫後の推移を検討した結果では、GD1b免疫群全てにおいて、先ずIgM抗体が上昇し、初回免疫の4週後にはほぼピークに達した。その後神経症状発症例では、9羽全てで、また非発症例では9羽中7羽でIgG抗体価が上昇した。発症例では抗体価がピークに達した後数週間してから症状が出現した。発症後5か月間経過を追跡したものは、症状の軽快・増悪と抗体価(特にIgG抗体価)の低下・上昇に対応が認められた。これらの所見からは、抗GD1b抗体(特にIgG抗体)の上昇が深部感覚障害の発症に密接に関与し、極めて重要な因子であることが示唆された。しかし一方では、神経症状を発症しなかったウサギでも高い抗体価を示すものが見られたことから、抗GD1b抗体の上昇のみでは神経障害をきたすのに十分ではないと考えられた。血液神経関門を開くために必要な他の因子の血中レベルや、血液神経関門の個体ごとの厳密さの違いなどの他の要因も、発症機序に影響するものと推測された。

ウサギ後根神経節神経細胞におけるGD1b陽性細胞と陰性細胞の直径のヒストグラムを比較するとGD1b陽性細胞はより大型の細胞であることが明らかとなった。これはUEA-1レクチン染色陽性細胞¹⁰⁾のものと比べると対照的である。後根神経節の大型神経細胞は深部感覚を伝え後索に線維を送ることが知られている。GD1b免疫によるウサギ実験的ニューロパチーは、上記のように深部感覚を司る感覚神経の障害であり、後索の変性所見が著明である¹¹⁾。したがって、抗GD1b抗体がGD1bの局在する大型神経細胞に結合して障害性に働き、深部感覚障害主体のニューロパチーをきたすという機序が考えられた。

抗GD1b抗体のGD1b陽性一次感覚ニューロンへの結合が、どのような機序で神経障害を引き起こすかが未だ不明であり、今後の検討課題として残されている。このGD1b感作による実験的ニューロパチーは、抗ガングリオシド抗体の関与する自己免疫性ニューロパチーの動物モデルとして有用であり、今後さまざまな方面からの詳細な検討により、病態解明および特異的治療法の開発へとつながることが期待される。

Abstract

To elucidate the pathogenetic role of anti-GD1b antibody in the rabbit experimental sensory neuropathy induced by sensitization with GD1b, the titer of IgM and IgG anti-GD1b antibody in the 18 rabbits immunized with GD1b were examined serially. Immunohistochemical study on the rabbit dorsal root ganglion using the mouse monoclonal antibody monospecific to GD1b also was performed. The IgM antibody was raised in all the rabbits immunized with GD1b and reached to the maximum level within 4 weeks after the first immunization. Nine of the 18 rabbits developed sensory neuropathy between 5 and 10 weeks after the first immunization. The elevation of the IgG antibody followed it, although no IgG anti-GD1b antibody was elevated in 2 of 9 rabbits without neurological problems. Anti-GD1b antibody level correlated with the remission and the exacerbation of the rabbits which was followed for 5 months after the neurological onset. The diameters of the GD1b-positive neurons in the rabbit dorsal root ganglia were larger than those of the GD1b-negative neurons. Taken together, anti-GD1b antibody may be essential for developing this experimental neuropathy, by binding to the large sensory neurons in the dorsal root ganglia, although some additional factors may also work in the mechanisms.

文献

- 1) 楠 進:神経研究の進歩 41, 222-230(1997)
- 2) C.M.Fisher:N.Engl.J.Med., 255, 57-65 (1956)
- 3) A.Chiba, S.Kusunoki, T.Shimizu et al.:Ann. Neurol., 31, 677-679(1992)
- 4) A.Chiba, S.Kusunoki, H.Obata et al.:Neurology, 43, 1911-1917(1993)
- 5) A.Chiba, S.Kusunoki, H.Obata et al.: Brain Res., 745, 32-36(1997)
- 6) T.Saida, K.Saida, S.H.Dorfman et al.: Science, 204, 1103-1106(1979)
- 7) S.Kusunoki, J.Shimizu, A.Chiba et al.:Ann. Neurol., 39, 424-431(1996)
- 8) S.Kusunoki, A.Chiba, T.Tai et al.: Muscle Nerve, 16, 752-756(1993)
- 9) S.Kusunoki, A.Chiba, K.Kon et al. Ann. Neurol., 35, 570-576(1994)
- 10) H.P.Hartung, J.D.Pollard, G.K.Harvey et al.: Muscle Nerve, 18, 137-153(1995)
- 11) S.Kusunoki, K.Inoue, M.Iwamori et al.: Neurosci. Res., 15, 74-80(1992)