

ガングリオシドGD1b免疫によるウサギ実験的感覚障害性失調性ニューロパチーの発症因子としての抗GD1b抗体の微細反応性

有田 政信*, 坂本 真弓*, 齋藤 文江*, 谷田部 康子*, 川名 広子*, 楠 進**

(平成10年9月30日受理)

Fine specificity of anti-GD1b antibody as a pathogenetic factor of rabbit experimental sensory ataxic neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b

Masanobu ARITA, Mayumi SAKAMOTO, Fumie SAITO,
Yasuko YATABE, Hiroko KAWANA and Susumu KUSUNOKI

(Received on September 30, 1998)

緒 言

自己免疫による末梢神経障害(ニューロパチー)である, ギラン・バレー症候群^{1~3)}, フィッシャー症候群⁴⁾, IgM paraproteinemia を伴うニューロパチー⁵⁾, 慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチーやその亜型の multifocal motor neuropathy⁶⁾ などでは, しばしば抗ガングリオシド抗体が血中に上昇するため, 抗ガングリオシド抗体検査は診断のための検査として用いられている。一方, ガングリオシドは神経組織の膜構成成分であり, 表面抗原として外界との相互作用に関与したり, 接着分子やホルモンなどのレセプターとしても働くと考えられていることから, 抗ガングリオシド抗体がニューロパチーを引き起こす因子(発症因子)である可能性も指摘されてきた。しかし従来, ガングリオシドを動物に免疫することによる明らかな症状を伴ったニューロパチーの実験モデルは確立されておらず, 抗ガングリオシド抗体の病因的意義については議論となっていた。

最近, 楠らは, GD1b を免疫することによりウサギに実験的感覚障害性ニューロパチーを作成することに成功した⁷⁾。症状の特徴は, 筋力低下はないが, 深部感覚(四肢がどの方向を向いているかなどを識別する感覚)が障害されているため, 四肢が不自然な方向に向き, うまく機能しないことである。病理学的にも, 感覚神経が脊髄に入る後根と, 深部感覚を伝える神経線維が脊髄を

上行する脊髄後索に著明な軸索変性がみられ, 深部感覚優位の感覚障害性ニューロパチーであることが確認された。後根神経節神経細胞には GD1b が局在し, 抗 GD1b 抗体の上昇した患者では感覚障害性失調性ニューロパチーが認められる。GD1b 免疫によるウサギ実験的感覚障害性ニューロパチーは, このタイプのヒトのニューロパチーのモデルとなるものである。特徴的なのは病変部位に炎症性リンパ球浸潤がみられないことであり, 上記のような深部感覚を伝達する感覚神経の特異的な障害を引き起こすのは, 抗GD1b 抗体によると考えられた。

GD1b を免疫したウサギでは, 全てで抗 GD1b 抗体が血中に上昇するが, 感覚障害性失調性ニューロパチーを発症するのは約半数である。抗 GD1b 抗体が上昇しても発症しないウサギがあるのはなぜかは未解決の問題となっていた。ひとつの可能性として, 抗 GD1b 抗体の微細反応特異性が発症例と非発症例で異なることが考えられる。GD1b は末端に galactosyl β 1-3N-acetylgalactosaminyl 基 (Gal-GalNAc 基) をもつが(図1), これはGM1の糖鎖の末端と同じであり, この Gal-GalNAc 基を認識する抗体は GD1b と GM1 の両者を認識する。そして GD1b を免疫したウサギでは, GD1b と GM1 に対する抗体上昇がみられ, GD1b を特異的に認識する抗体と, Gal-GalNAc 基を認識して GM1 にも反応する抗体が上昇することがわかっている⁷⁾。そこで今回の研究ではこの二種類の抗体が発症したウサギと発症しなかったウサギでどのように上昇していたかを検討した。

* 栄養学科 食品学第二研究室

** 東京大学医学部神経内科

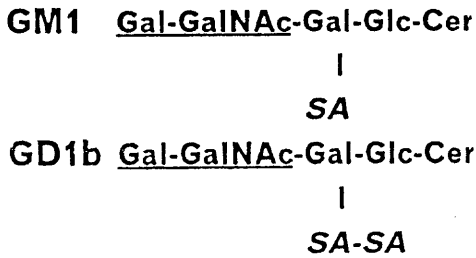


図1 GD1b と GM1 の糖鎖構造

Gal: ガラクトース,
Glc: グルコース, SA: シアル酸, Cer: セラミド,
GalNAc: N-アセチルガラクトサミン.
下線部は Gal-GalNAc 基.

方 法

日本白色種のウサギ(メス, 体重約1500g)22羽に0.5mgのGD1bを完全フロイントアジュバント(Complete Freund Adjuvant, CFA)とKeyholelimpet Hemocyanin (KLH)とともに皮下に免疫した。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、それぞれの群のウサギに同じ内容物を再度注射した。この後、症状を観察しながら1~2週おきに採血して血清を得た。

血中の抗ガングリオシド抗体をELISA法により測定した。用いた抗原はGD1b, GM1, GM2, GM3, GD1a, GD2, GD3, GT1b, GQ1bである。各抗原200ngをマイクロタイタープレートの各ウエルに装着し、ウサギ稀釈血清50mlを入れて反応させ、洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgMおよびIgG抗体を二次抗体として反応させ、さらに洗浄後orthophenylenediamine dihydrochlorideを基質として発色させて、492nmにおける吸光度を測定した。抗原を装着しないで同様の操作を行った対照ウエルと比較して、0.1以上の吸光度の差を示す最大稀釈倍率で抗体価を表した。最大の抗体価を示す血清をピーク血清として、以降のGM1-affinityカラムによる検討に用いた。IgMとIgGで抗体価が最大になる時点が異なる場合は、それぞれのピーク血清について検討を行った。

カラム容積0.5mlのGM1-affinityカラムをHirabayashi et al.⁸⁾の方法に基づいて作成した。GD1bを免疫したウサギから得たピーク血清0.2mlをカラムにのせて1時間反応させた後、0.5mlのphosphate-

buffered saline (PBS)で洗浄し、溶出液を再度カラムに通す。この時点での溶出液(0.5ml)は水中に保存する。カラムは30分室温で放置し、その後1.5mlのPBSで洗浄して、溶出された液を先に保存した液(0.5ml)と合わせて2mlの分画Aを得る。カラムに結合した抗体は2.5mlの3.0M NaSCN in PBSにより溶出し、PBSに対して透析して分画Bを得た。

GD1bを免疫した各ウサギのピーク血清、分画A、分画Bの抗GD1b IgMおよびIgG抗体活性を、それぞれ1:400, 1:8, 1:8に稀釈してELISA法によりしらべた。抗体活性は得られた吸光度により表した。22羽のウサギの検体は全て同じプレート上で反応させ、4回の実験の結果の平均を求めて、発症例と非発症例で抗体活性を比較した。

結 果

GD1bを免疫した22羽のウサギのすべての血中に抗GD1b抗体の上昇がみられた。また同時に抗GM1抗体も上昇していた。しかしそれ以外のガングリオシド(GM2, GM3, GD1a, GD2, GD3, GT1b およびGQ1b)に対する抗体の上昇はみられなかった。IgM抗GD1b抗体は初回免疫の2週後に検出されるようになり、4週後には抗体価は最高レベルに達した。IgG抗GD1b抗体の上昇がそれに続いた。

GD1bを免疫した22羽のうち12羽で感覚障害性失調性ニューロパチーを発症した。発症の時点ではすべてのウサギで抗GD1b IgG抗体の上昇が認められた。

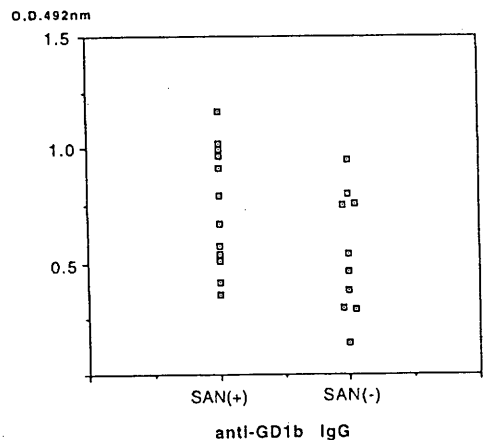


図2 発症ウサギ(SAN(+))と非発症ウサギ(SAN(-))における血中抗GD1b IgG抗体活性の比較。有意の差はみられない。

抗体価が最大となった時点の血清を400倍に希釈して ELISA 法を行い、発症したウサギと非発症ウサギの群間で抗体活性を比較したが、両者に有意の差はみられなかった(図2)。また対照のウサギでは抗体価の上昇も神経症状も全く認められなかった。

GM1 affinity カラムを用いることにより、既報告のように GM1 に交差反応する抗体(分画B)とGD1b のみに反応する抗体(分画A)に分離することができた⁷⁾。分画AとBの GD1b に対する IgM 抗体と IgG 抗体のそれぞれについて、発症群と非発症群での抗体活性の比較を行うと、分画Bの IgM と IgG および分画

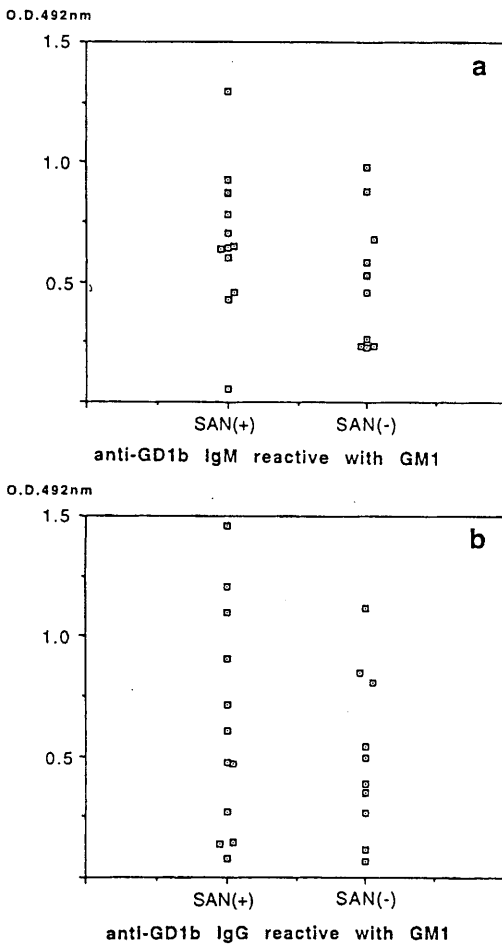


図3 分画Bの抗 GD1b 抗体活性の発症ウサギ (SAN(+))と非発症ウサギ(SAN(-))の比較

- a IgM 抗体
- b IgG 抗体

Aの IgM については両者で有意の差はみられなかったが(図3, 図4 a), 分画Aの IgG については発症群で非発症群に比較して優位に高い抗 GD1b 抗体活性が認められた ($p < 0.001$) (図4 b)。

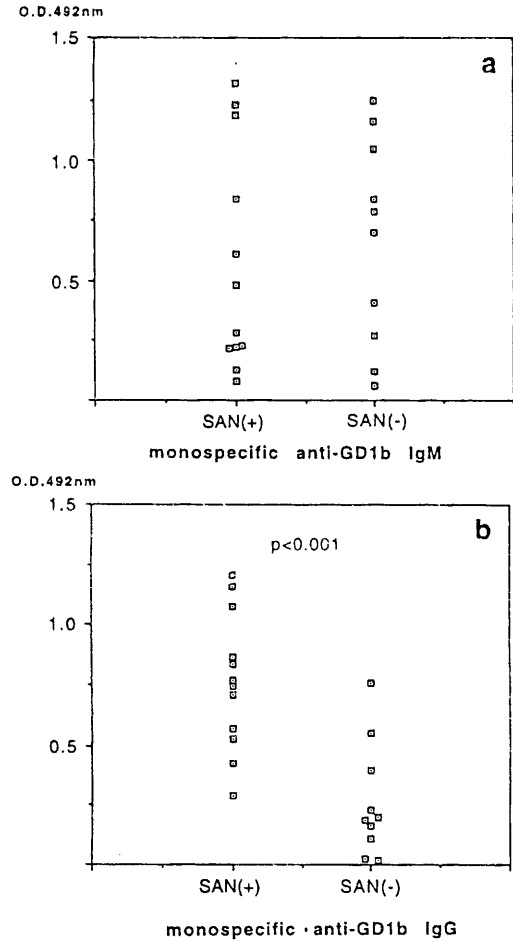


図4 分画Aの抗 GD1b 抗体活性の発症ウサギ (SAN(+))と非発症ウサギ(SAN(-))の比較

- a IgM 抗体
- b IgG 抗体

考 察

本研究では GD1b を免疫したウサギの数を増やして検討し、全てのウサギで抗 GD1b 抗体が上昇し、半数以上のウサギに感覚障害性失調性ニューロパチーが発症することを確認した。またすべての発症例において発症の時点で抗 GD1b IgG 抗体は既上昇していた。病理学的には病変部に炎症性リンパ球浸潤をみとめないこ

とを考え合わせると、抗 GD1b 抗体、とくに IgG 抗体がこの動物モデルの発症因子として重要であると考えられる。しかし、血中抗 GD1b 抗体活性には、発症したウサギと非発症のウサギの群間で有意の差は認められなかった。

血中に上昇した抗 GD1b 抗体を、GM1 に交差反応するか否かで2つの分画に分け、発症ウサギと非発症ウサギの群間で比較した。その結果は、分画B (GM1 に交差反応するタイプ) では IgM と IgG どちらも、発症例と非発症例で差はみられなかったが、分画A (GD1b のみに反応するタイプ) では IgM では差がなかったが、IgG において発症群で非発症群に比較して有意に高い抗体活性が認められた。したがって、GM1 に交差反応せず GD1b のみに反応する IgG 抗体が、本動物モデルの発症因子として重要であると考えられる。一方 GM1 に交差反応する抗体の上昇は、発症機序に大きな役割を果たしていないことが示唆されるが、これは GM1 を免疫して GM1 にも GD1b にも反応する抗体が上昇したウサギでは神経症状を発症しなかったとする他のグループの報告とも合致する所見である⁹⁾。

10羽の非発症ウサギのうち3羽では、発症ウサギと同レベルの抗 GD1b IgG 抗体活性が分画Aに認められた。これらのウサギでは、血液神経関門がより厳密であった可能性が考えられる。また一方では、これら3羽の分画A中の抗体は、GM1 には交差反応しないものの発症したウサギの分画A中の抗体とは微細反応性が若干異なっていた可能性も考えられる。

既報告のように、後根神経節の一次感覚神経細胞のうち GD1b 陽性細胞は陰性細胞と比較して大型である¹⁰⁾。

大型の神経細胞体をもつ一次感覚神経細胞は深部感覚を伝達する。従って本動物モデルでは、GD1b に特異的に反応する IgG 抗体が深部感覚を伝達する一次感覚神経細胞に結合することが、感覚障害性失調性ニューロパチーの発症機序において重要なひとつのステップであると考えられる。

文 献

- 1) Hartung HP, Pollard JD, Harvey GK, et al.: *Muscle Nerve*, **18**, 137-153 (1995)
- 2) Kusunoki S, Chiba A, Kon K, et al.: *Ann Neurol.*, **35**, 570-576 (1994)
- 3) Kusunoki S, Iwamori M, Chiba A, et al.: *Neurology*, **47**, 237-242 (1996)
- 4) Chiba A, Kusunoki S, Shimizu T, et al.: *Ann. Neurol.*, **31**, 677-679 (1992)
- 5) Oga T, Kusunoki S, Fujimura H, et al.: *J. Neurol. Sci.*, **154**, 4-7 (1998)
- 6) Pestronk A.: *Muscle Nerve*, **14**, 927-936 (1991)
- 7) Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, et al.: *Ann. Neurol.*, **39**, 424-431 (1996)
- 8) Hirabayashi Y, Suzuki T, Suzuki Y, et al.: *J. Biochem.*, **94**, 327-330 (1983)
- 9) Thomas FP, Trojaborg W, Nagy C, et al.: *Acta Neuropathol.*, **82**, 378-383 (1991)
- 10) 有田政信, 堤裕子, 衛藤美栄ら: 東京家政大学研究紀要, **38**, 7-11 (1998)

Abstract

Of 22 rabbits sensitized with GD1b, 12 developed experimental sensory ataxic neuropathy. IgM anti-GD1b antibody was elevated in all the rabbits immunized with GD1b. Elevation of IgG anti-GD1b antibody came after that. IgG anti-GD1b antibody had been elevated before neurological onset in all the affected rabbits. Fractionation of the serum antibody by the use of the GM1-affinity column revealed that the anti-GD1b IgG antibody with no cross-reactivity to GM1 was elevated in the affected rabbits in higher titer than in the unaffected ones. The GD1b-positive neuronal cytoplasm of rabbit dorsal root ganglia were larger in diameter than the negative ones. The IgG antibody monospecific to GD1b thus may be an essential factor in this experimental sensory ataxic neuropathy by binding specifically to GD1b-positive large primary sensory neurons which convey deep sensation.