

# 学位論文審査結果の報告書

氏 名 森川 みゆき

生 年 月 日 昭和 62年 1月 28日

本 籍 ( 国 籍 ) 奈良県

学 位 の 種 類 博 士 ( 医 学 )

学 位 記 番 号 医 第 1221 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当  
(博士の学位)

論 文 題 目 Serological study using glycoarray for detecting antibodies

to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies

(グライコアレイを用いた免疫性ニューロパチーにおける糖脂質および糖脂質複合体に対する自己抗体の検討)

## 審 査 委 員

(主 査)

池 上 邦 子



(副主査)

角 田 郁 生



(副主査)

重 吉 辰 史



(副 査)



(副 査)



学位論文受理日 平成 28 年 11 月 15 日

学位論文審査終了日 平成 29 年 2 月 2 日

## 論文内容の要旨

### 【目的】

Guillain-Barré 症候群 (GBS) などの免疫性ニューロパチーでは患者血清中に単独の糖脂質や 2 種類の糖脂質を混合した糖脂質複合体に対する自己抗体が検出されることがある。近年、従来の ELISA に比べて少量のサンプルで多数の糖脂質複合体に対する抗体を同時に検出できるグライコアレイが報告されている。そこで、グライコアレイを用いて GBS, 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP), 多巣性運動ニューロパチー (MMN) における糖脂質および糖脂質複合体に対する抗体を網羅的に解析した。

### 【方法】

スライドガラス上の PVDF 膜に, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b, GalNAc-GD1a, LM1, Gal-C, GA1, sulfatide の単独抗原 10 種類およびそれら 2 つを混合した糖脂質複合体 45 種類 (計 55 種類) を TLC autosampler を用いて格子状にスポットした。ブロッキング後, 患者血清を反応させ, 2 次抗体に Alexa647 (IgM 抗体) および Alexa555 (IgG 抗体) を用いて PVDF 膜上の蛍光シグナルを検出した。患者血清は以前に ELISA で抗体測定した GBS100 例, CIDP100 例, MMN24 例を用いた。

### 【結果】

糖脂質または糖脂質複合体に対する抗体は GBS の 56%, CIDP の 16%, MMN の 58% で検出され, IgG 抗体は GBS, IgM 抗体は MMN と GBS の一部で多くみられた。

GBS では GM1 と sulfatide を混合した複合体に対する IgG 抗体 (抗 GM1/sulfatide IgG 抗体) が 20 例 (20%), 抗 GA1/sulfatide IgG 抗体が 19 例 (19%), 抗 GM1/GD1a IgG 抗体が 17 例 (17%) と多く検出された。GM1 を含む糖脂質複合体に対する抗体陽性例は純粋運動型 GBS で多く ( $p<0.01$ ), GQ1b を含む糖脂質複合体に対する抗体陽性例は外眼筋障害を伴う GBS で多くみられた ( $p<0.01$ )。MMN では抗 GM1 IgM 抗体, 抗 GM1/Gal-C IgM 抗体が各 8 例 (33%) と最も多く検出された。次いで抗 GalNAc-GD1a IgM 抗体が 5 例 (21%) で検出され, GalNAc-GD1a を含む複合体に対する IgM 抗体は 9 例 (38%) でみられた。CIDP では抗体の陽性率は低く, 臨床症状との相関はみられなかった。

### 【考察】

GBS や MMN では糖脂質または糖脂質複合体に対する抗体が多く検出され, 病態に関わっている可能性がある。一方 CIDP では糖脂質および糖脂質複合体に対する抗体との関連は明らかでなかったが, CIDP は不均一な病態を包括する概念であり今後は病型ごとの詳細な検討が必要である。

### 【結論】

グライコアレイは, 多数の検体について糖脂質複合体を網羅的に検討することができ, 免疫性ニューロパチーにおける抗糖脂質複合体抗体の解析に有用である。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2016 年 11 月 日 公 表 (DOI : <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.10.010">http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.10.010</a> )	博士学位論文 Journal of Neuroimmunology  2016 年 11 月 日 online 掲載
	Serological study using glycoarray for detecting antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies	
	全 文	

## 論文審査結果の要旨

### 1) 学位論文の要旨：

【目的】 Guillain-Barré症候群 (GBS) などの免疫性ニューロパチーでは患者血清中に単独の糖脂質や2種類の糖脂質を混合した糖脂質複合体に対する自己抗体が検出されることがある。近年、従来のELISAに比べて少量のサンプルで多数の糖脂質複合体に対する抗体を同時に検出できるグライコアレイが報告されている。そこで、グライコアレイを用いてGBS、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP)、多巣性運動ニューロパチー (MMN) における糖脂質および糖脂質複合体に対する抗体を網羅的に解析した。

【方法】 スライドガラス上のPVDF膜に、GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b, GalNAc-GD1a, LM1, Gal-C, GA1, sulfatideの単独抗原10種類およびそれら2つを混合した糖脂質複合体45種類 (計55種類) をTLC autosamplerを用いて格子状にスポットした。ブロッキング後、患者血清を反応させ、2次抗体にAlexa647 (IgM抗体) およびAlexa555 (IgG抗体) を用いてPVDF膜上の蛍光シグナルを検出した。患者血清は以前にELISAで抗体測定したGBS100例、CIDP100例、MMN24例を用いた。

【結果】 糖脂質または糖脂質複合体に対する抗体はGBSの56%、CIDPの16%、MMNの58%で検出され、IgG抗体はGBS、IgM抗体はMMNとGBSの一部で多くみられた。

GBSではGM1とsulfatideを混合した複合体に対するIgG抗体 (抗GM1/sulfatide IgG抗体) が20例 (20%)、抗GA1/sulfatide IgG抗体が19例 (19%)、抗GM1/GD1a IgG抗体が17例 (17%) と多く検出された。GM1を含む糖脂質複合体に対する抗体陽性例は純粋運動型GBSで多く ( $p < 0.01$ )、GQ1bを含む糖脂質複合体に対する抗体陽性例は外眼筋障害を伴うGBSで多くみられた ( $p < 0.01$ )。MMNでは抗GM1 IgM抗体、抗GM1/Gal-C IgM抗体が各8例 (33%) と最も多く検出された。次いで抗GalNAc-GD1a IgM抗体が5例 (21%) で検出され、GalNAc-GD1aを含む複合体に対するIgM抗体は9例 (38%) でみられた。CIDPでは抗体の陽性率は低く、臨床症状との相関はみられなかった。

【考察】 GBSやMMNでは糖脂質または糖脂質複合体に対する抗体が多く検出され、病態に関わっている可能性がある。一方 CIDPでは糖脂質および糖脂質複合体に対する抗体との関連は明らかでなかったが、CIDPは不均一な病態を包括する概念であり今後は病型ごとの詳細な検討が必要である。

【結論】 グライコアレイは、多数の検体について糖脂質複合体を網羅的に検討することができ、免疫性ニューロパチーにおける抗糖脂質複合体抗体の解析に有用である。

### 2) 論文審査結果の要旨：

本論文にたいする最終試験は、平成29年1月16日の15時から研究棟6階の研究室で実施された。研究対象となった症例のすべてを著者自身が抗体測定し、みずからが解析を行ったものである。最終試験では著者から本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察が発表され、それに対して以下の項目について質疑応答が行われた。

IgG抗体がGBSに特異的に発現するのはなぜか、グライコアレイ法の感度や特異度はELISAと比較するとどうか、グライコアレイとELISAにおいてそれぞれの利点は何か、sulfatideで抗原抗体反応が増強するのはどういった機序か、Naチャネルクラスターが障害される機序はどういったものか、二次抗体についてはH鎖とL鎖を分けたほうがよいのではないか、抗体値について継時的な変化はあったかどうか、2種の糖脂質を結合させるものはなにか、IgMとIgG抗体の蛍光シグナルはどのように判別しているか、今回の実験で新規に判明したことはなにか。

以上の質問に申請者は的確に回答し、学位論文が論文提出者の研究成果であること、学位授与にふさわしい学識をもつことを確認し、最終試験を合格と判定した。

### 3) 最終試験の結果：合格

### 4) 学位授与の可否：可

# 博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 29年 1月 16 日

## 審査委員

主 査

池上信司



副主査

角田 郁生



副主査

重吉 康史



副 査



学位申請者氏名

森川 みゆき

## 論文題目

Serological study using glycoarray for detecting antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies  
(グライコアレイを用いた免疫性ニューロパチーにおける糖脂質および糖脂質複合体に対する自己抗体の検討)

## 要 旨

本研究は免疫性ニューロパチーである Guillain-Barré症候群 (GBS), 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP), 多巣性運動ニューロパチー (MMN) において, グライコアレイ法を用いて GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b, GalNAc-GD1a, LM1, Gal-C, GA1, sulfatide の単独抗原およびそれら2つを組み合わせた糖脂質複合体に対する自己抗体の解析と, 臨床的および電気生理学的意義の検討を目的としたものである。当科で過去にELISA法を用いて抗糖脂質抗体を測定したGBS100例, CIDP100例, MMN24例の患者血清を用いて抗体測定をおこなった。GBSにおいてはGM1とsulfatideの混合抗原 (GM1/sulfatide) に対するIgG抗体が最も高頻度に検出され, GM1を含む糖脂質複合体に対する抗体陽性例は純粋運動型GBSで多くみられた。GQ1bを含む糖脂質複合体に対する抗体陽性例は外眼筋障害を伴うGBSで多くみられ, GQ1b/sulfatideに対するIgG抗体のみを有した症例では全例外眼筋障害を呈していた。さらにGM1/GD1a, GD1a/GA1, GD1a/GD1bに対する特異的なIgG抗体を有する症例が見られ, これらの糖脂質複合体に共通する末端構造を認識する自己抗体の存在を確認した。MMNではGM1に対するIgM抗体と同頻度にGM1/Gal-Cの複合体に対するIgM抗体を検出し, GalNAc-GD1aを含む抗原に対するIgM抗体も高頻度に検出した。CIDPではIgMとIgGのいずれの糖脂質抗体も検出率が低かった。本研究により, GBS, CIDP, MMNの多数例について, これまで未検討であった糖脂質複合体に対する抗体を網羅的に検出することが可能となり, 従来のELISA法との併用により, 抗体測定の意義がさらに向上した。

公聴会では以下の項目について質疑応答が行われた。

IgG抗体がGBSに特異的に発現するのはなぜか, グライコアレイ法の感度や特異度はELISAと比較するとどうか, グライコアレイとELISAにおいてそれぞれの利点は何か, sulfatideで抗原抗体反応が増強するのはどういった機序か, Naチャンネルクラスターが障害される機序はどういったものか, 二次抗体についてはH鎖とL鎖を分けたほうがよいのではないか, 抗体値について継時的な変化はあったかどうか, 2種の糖脂質を結合させるものはなにか, IgMとIgG抗体の蛍光シグナルはどのように判別しているか, 今回の実験で新規に判明したことはなにか,

以上の質問に申請者は的確に回答し, 学位論文が論文提出者の研究成果であること, 学位授与にふさわしい学識をもつことを確認し, 最終試験を合格と判定した。