

Guillain-Barré 症候群における, 抗ガングリオシド抗体の 新たな測定法が陽性率におよぼす効果の検討: フォスファチジン酸添加あるいは, ガングリオシド 複合体を用いた抗体測定法

金田明子

近畿大学医学部内科学教室 (神経内科部門)

抄 録

Guillain-Barré 症候群 (GBS) の急性期には, 約 6 割でガングリオシドに対する抗体の存在を認め, 有用な血清診断として利用されている。近年, 既知の抗体に加え, フォスファチジン酸 (PA) を添加することによる抗体活性の亢進や, 重症化の指標となる, ガングリオシド複合体に対する抗体の存在が報告されている。そこでこれら新たな抗原に対する抗体を測定することにより, 陽性率がどれくらい上昇するかを検討した。その結果, PA 添加により, 一部抗体活性が低下する症例・変化のない症例を認めたものの, 全てのガングリオシドで, 抗体陽性率は上昇し, また, ガングリオシド複合体抗体の測定も陽性率を上昇させた。PA による抗体活性増強のメカニズム・ガングリオシド複合体抗体陽性例での重症化のメカニズムの詳細はまだ不明であり, 今後の検討が必要であるが, これらの測定法により抗体陽性率の上昇が確認され, 今後の GBS 診断に有用な検査法である。

Key words: ガングリオシド, Guillain-Barré 症候群 (GBS), 抗ガングリオシド抗体, フォスファチジン酸 (PA), 抗ガングリオシド複合体抗体

緒 言

Guillain-Barré 症候群は末梢神経を標的とする自己免疫性疾患であり, 急性期には約 6 割でガングリオシドに対する抗体 (特に IgG 抗体) が検出される^{1,2}。ガングリオシドは, 糖鎖構造にシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であり, 神経組織に多く含まれ, 主に細胞膜上に存在する。細胞膜はリン脂質が主体となった脂質二重層からなっており, ガングリオシドなどの糖脂質は, ラフトを形成してその中に浮かぶ形で存在している³。つまり, ガングリオシド分子は周囲をリン脂質に囲まれ, また複数の分子種のガングリオシドが共存する形で存在している。近年, 抗ガングリオシド抗体の活性は, それら共存するリン脂質の影響をうけること^{4,5}, 複数のガングリオシドの糖鎖により形成される新たなエピトープである, ガングリオシド複合体を特異的に認識する抗体

(以下抗 GSCs 抗体)が存在すること⁶, が報告されている。

PA による抗ガングリオシド抗体活性の増強は, Freddo らが IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチー患者において, 血中モノクローナル IgM が, ガングリオシドや PA 単独ではわずかに反応するのみだが, ガングリオシドと PA を混合させると, 反応性が著明に亢進するということを報告したのが最初である⁷。次いで Kusunoki らは GBS の IgG 抗ガングリオシド抗体についても同様の効果があるかを, 抗 GM1 抗体について検討した。その結果, 抗 GM1 IgG 抗体では多くの例で PA 添加により抗体価増強を認め, PA 添加による検査法が, GBS の血清診断に有用である可能性を示唆した⁴。この場合の PA 添加による抗体活性の増強機序としては, (1) GM1 と PA が形成する新たなエピトープに特異性をもつ抗体が存在するという可能性と, (2) PA の添

加により抗体がGM1に結合しやすくなるという可能性の二つが考えられる。PAのみに対しては抗体の反応がないこと、PA以外にもphosphatidylserineなどの酸性リン脂質の添加でも抗体の反応性が上昇すること、などから(1)の可能性は低く、(2)の可能性が高いと考えられている。今回我々は、既に報告されているGM1・GQ1bを含め10種類のガングリオシドについて、PA添加抗原に対するIgG抗体価を測定し、単独のガングリオシドに対するIgG抗体価との比較・陽性率へ与える影響について検討した。

また、抗GSCs抗体の一つである、GD1aとGD1bの混合抗原に対する抗体（以下抗GD1a/GD1b抗体）は、人工呼吸器装着が必要な重症例で陽性になることが多く、重要な抗体である⁹が、このガングリオシド複合体に対する抗体を測定することにより、抗体陽性率にどのような影響を与えるかについても検討した。

材料と方法

1) 血清サンプル

対象は、2007年1月から2008年11月の間に、当科に抗体検査依頼のあった検体のうち、Asbury & Cornblath⁹らの診断基準の必要条件である、①2肢以上の進行性筋力低下②腱反射の消失または低下を満たす急性期血清、400例とした。また、対照として、正常血清16例、GBS以外の神経疾患47例：慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー 16例、多巣性運動ニューロパチー 10例、筋萎縮性側索硬化症 5例、パーキンソン病 3例、多発性硬化症 6例、重症筋無力症 4例、その他 3例、も対象とした。

検体について、GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a, GT1aの10種類の糖脂質抗原を用いて、IgMクラスとIgGクラスの抗体活性をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。IgG抗体については、PAとの混合抗原に対する抗体活性、およびGD1a/GD1bガングリオシド複合体に対する抗体も測定した。

ELISA法は従来の方法に従って施行した¹⁰。すなわち、ガングリオシド0.2μgをELISAプレートに固相化し、1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む-PBS (phosphate buffered saline) 溶液を加えて非特異的反応をブロックした。室温で30分静置し洗浄後、1% BSA-PBS溶液にて1:40で希釈した患者血清を加えて1.5時間反応させた。0.1% BSA-PBSで3回洗浄してその後ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体を添加し、1.5時間室温で反応させた。同様

に3回洗浄後o-phenylenediamine溶液を加えて発色させ、4N硫酸を加えて反応をとめた。492nmにおける吸光度 (optical density: OD値) を測定し、対照とするガングリオシドを固相化していないウェルのOD値を減じて修正OD値を算出した。既報及び今回の検討において、正常血清及び疾患コントロールにおける各抗ガングリオシド抗体価が0.1未満 (結果7) であったことより、修正OD値0.1以上を抗体陽性と判断した。

2) 混合抗原を用いたELISA法

PA添加抗原に対する抗体測定：ELISA用マイクロプレート上に各ガングリオシド0.1μgにPA 0.1μgを添加した抗原、及び各ガングリオシド単独抗原0.2μgを固相化し、ELISA法にてIgG抗体測定をし、そのOD値を測定した⁵。

PA添加による反応性の変化は以下の基準で分類した。正常及び疾患コントロールでは、PA添加による抗体価増強が0.1未満であったことより (結果7)、PA添加抗原に対する各抗体のOD値が、単独抗原に対する各IgG抗体のOD値より0.1以上高い場合を反応性上昇とし、0.1以上低い場合を反応性低下、それ以外を不変とした。

ガングリオシド複合体に対する抗体測定：GD1aとGD1bを各0.1μg混合した抗原 (以下GD1a/GD1b抗原) を固相化し、上記のELISA法でIgG抗体活性を測定し、GD1a・GD1b単独抗原0.2μgに対する抗体活性と、OD値で比較した。GD1aおよびGD1bのいずれにも反応がみられない場合は、GD1a/GD1b抗原に対する修正OD値が0.1以上の場合に陽性とした。GD1aあるいはGD1bに対する抗体活性がみられたときには、Kaidaらの基準に従い、混合抗原に対する補正OD値が各単独抗原に対するものより0.2以上大きい場合に、2種類のガングリオシド (GD1aとGD1b) の形成する新たなエpiteープに特異性をもつ抗体が存在すると判断した⁶。

単独抗原のみに対する抗体陽性率、PA添加した場合の抗体活性の変化及び抗体陽性率、抗GSCs抗体の陽性率を算出し、これら新たな測定法の、抗体陽性率に及ぼす影響を検討した。

結果

1) 患者背景

診断基準の必要条件を満たす、GBS及びGBS疑い患者400人の急性期血清を集めた。

患者の平均年齢は45歳 (1歳~89歳) で、男女比は1.7:1であった。先行感染を約8割の患者に認めた (図1)。

2) 各単独ガングリオシドに対する抗体陽性率

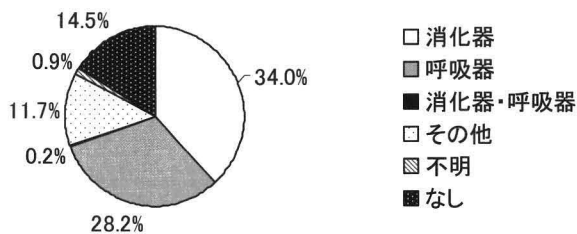


図1 先行感染の内訳
約8割に先行感染を認めた

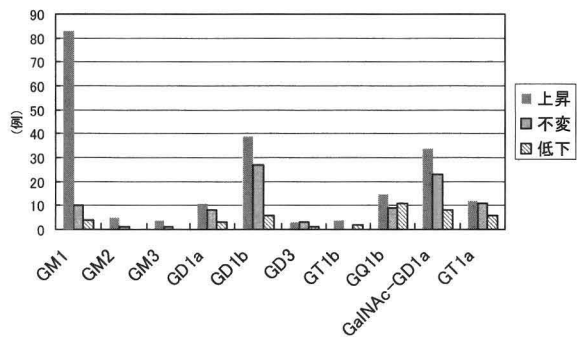


図2 PA添加による抗体反応性変化
全ての抗ガングリオシド抗体は、混合抗原の方が強い反応性を示す傾向であった。特に抗GM1抗体で、反応性の上昇は著明であった。

各ガングリオシドに対する抗体陽性率を(図3)に示している。最も陽性率が高いのは、抗GM1抗体で、14.7%であった。次いで、抗GD1b抗体10%、抗GalNAc-GD1a抗体9.7%であった。最も陽性率が低かったのは抗GM2抗体で0.2%であった。

3) PA添加による抗体活性の変化

抗GM1抗体価はほぼ全例で、PA添加による抗体価上昇がみられた。その他9種類の抗体に関しても、抗体価の上昇する例を多数認めた(図2)が、一方で、抗体価に変化のない例・低下する例も認めた。

4) PA添加による各抗ガングリオシド抗体陽性率変化

抗ガングリオシド抗体の抗体価は、PAを抗原に添加することにより一般に上昇する例が多かったが、抗原ごとにその程度は様々であった(図3)。最も陽性率が向上したのは抗GM1抗体で、単独抗原に対する抗体陽性率14.7%から、PA添加抗原に対する抗体陽性率23.5%に上昇した。その他GD1bやGalNAc-GD1aに対する抗体でも、PA添加により抗体価が上昇する例が多かったが、GQ1bに対する抗体ではPA添加により活性の増強する例は減弱する例をわずかに上回る程度であった。

全体での陽性率は、単独抗原に対する抗体のみの測定では陽性率40.8%であったが、PA添加抗原に対する抗体測定により陽性率は45.3%に上昇した

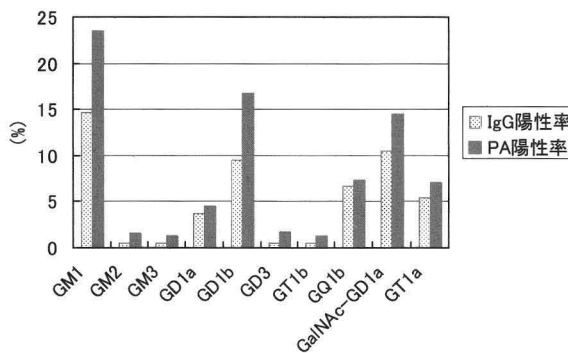


図3 PA添加による各ガングリオシド抗体陽性率
全ての抗ガングリオシド抗体で、混合抗原に対する抗体測定により、陽性率は上昇した。

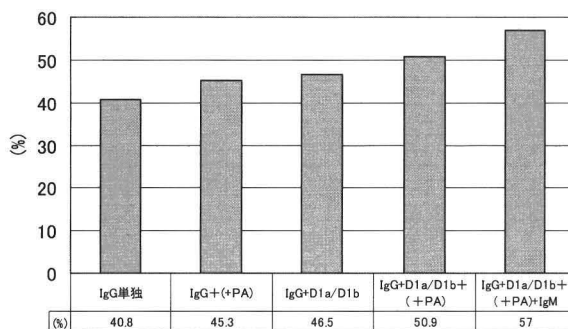


図4 各抗体測定追加による陽性率変化
IgG単独抗原に対する抗体陽性率は40.8%、混合抗原に対する抗体測定追加により陽性率は45.3%に上昇し、複合体抗体測定追加では陽性率は46.5%であった。これら3者の測定では陽性率は50.9%であった。これら3者に加えて、IgM単独抗原に対する抗体測定を追加することにより、陽性率は57%にまで上昇した。

(図4)。

5) 抗GSCs抗体

GBS及びGBS疑い症例400例中、GD1a/GD1b抗体陽性例は38例9.5%であった。そのうち、GD1a/GD1b抗体単独陽性例は23例5.7%であった。ガングリオシド単独抗原に対するIgG抗体陽性率は40.8%であり、GD1a/GD1b抗体測定により、抗体陽性率は46.5%に上昇した(図4)

6) 各測定法追加による抗体陽性率変化

上述の通り、PA添加抗原に対する抗体測定・GD1a/GD1b抗体測定を施行することにより、単独のガングリオシドに対する抗体測定と比較し、いずれも陽性率は上昇し、これら3者すべてを測定すると、陽性率は50.9%であった。さらにIgM抗体測定を追加すると、陽性率は57%となった。(図4)

7) 正常血清及び疾患コントロール

正常血清及びGBS以外の神経疾患について、単独のガングリオシド・PA添加抗原に対する抗体価

識に関っている場合には増強効果が乏しく、電荷をもたない Gal-GalNAc 基を認識する抗体の場合は、負電荷の PA の影響をうけて反応が強まることが示されたわけである¹¹。

PA 添加による抗体価上昇の程度に差はあるものの、一般的には陽性率が上昇し、正常血清や疾患コントロールでは PA 添加による抗体価増強がみられなかったことから、PA 添加による抗体測定は、特異度を下げることなく、GBS 診断における抗体測定の感度を向上させる検査法であるといえる。一方で、PA 添加による抗体測定により抗体価の減弱する例もあることから、PA 添加抗原に対する抗体だけでなく、単独抗原に対する抗体も併せて測定することが必要である。

また、近年、重症化の指標とされている、ガングリオシド複合体抗体の一つである GD1a/GD1b 複合体抗体の存在は、Kaida らにより報告され、臨床的に重要な抗体である⁶。複合体抗体は、単独のガングリオシドにはほとんどあるいはまったく反応しないが、2種のガングリオシドを1つの ELISA 用プレート上のウェル内で混合させた場合に初めて強い反応を示す抗体である⁶。この反応特性は精製前の粗ガングリオシド分画を用いた薄層クロマトグラム (TLC) 免疫染色にても確認された。すなわち、TLC に GD1a や GD1b 単独をそれぞれ別のレーンに展開して血清を反応させても反応はみられないが、両者を同じレーンに展開して免疫染色すると、両者の重なった部分のみに強い反応がみられた。このことから、この抗体の標的は、2つのガングリオシドの糖鎖が相互作用して形成する新たなエピトープであると考えられる。そこで、GBS において、この抗 GD1a/GD1b 複合体抗体陽性例に特徴的な臨床像があるかを検討したところ、特に人工呼吸器を装着するような重症例で陽性になりやすいという結果であった⁸。この結果をふまえて、当科では GBS では GD1a/GD1b に対する抗体をルーチンに測定することとしている。今回はこの抗 GD1a/GD1b 抗体測定により、陽性率がどのように変化したかを検討した。その結果、単独抗原に対する抗体測定では陽性率が 40.8%であったものが、抗 GD1a/GD1b 抗体のみ陽性である症例が22例5.7%あり、この測定により陽性率は46.5%へと上昇した。従って、単独のガングリオシドに対する抗体測定のみでは抗体陽性とならなかった症例を、抗 GD1a/GD1b 抗体測定により検出できる、すなわち偽陰性例を減少させることができ、複合体抗体測定は、臨床的な指標になるのみならず、抗体検出率をあげる上でも意義のある検査であることがわかった。GBS では、今回検討した GD1a/

GD1b 複合体に対する抗体以外にも、GM1/GD1a や GD1b/GT1b に対する抗体も報告されている⁸。これらは、いずれも末端の糖鎖が Gal-GalNAc 基のものと sialosyl-galactosyl 基のものの組み合わせであり、この組み合わせが抗体の認識に重要であることが示唆される。

抗 GD1a/GD1b 抗体陽性例全例で重症化するわけではなく、この抗体のみが重症化の原因であるのか、その他の現象があわさった時に重症化するのか、など、その理由については、まだ判明していない。GSCs は単独ガングリオシドよりも細胞内シグナル伝達機能に強い影響を与える可能性があるが¹²、細胞膜上の糖鎖を介した様々な反応について、今後検討を重ねる必要がある。今回検討した抗 GD1a/GD1b 抗体以外の複合体抗体についても、今後さらに症例を蓄積し、臨床的意義や、陽性率への影響を検討し、GBS における血清診断の有用性を高めていく必要があると考える。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導ならびに御稿いただいた近畿大学医学部神経内科学教室楠進教授、三井良之准教授に深謝申し上げます。また、終始ご協力いただきました神経内科学教室員各位に感謝申し上げます

文 献

1. Kusunoki S (2000) Antiglycoliid antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Am J Med Sci* 319: 234-239
2. Willison H J, Yuki N (2002) Peripheral neuropathies and antiglycolipid antibodies. *Brain* 125: 2591-2625
3. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572
4. Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, Hitoshi S, Kanazawa I (2003) Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barré syndrome sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27: 302-306
5. Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S (2005) Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol* 159: 129-132
6. Kaida K, Morita D, Kanzaki K, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S (2004) Ganglioside complex as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 56: 567-571
7. Freddo L, Hays A, Nickerson G, Spatz L Mc, Linda S, Mcginnis S, Liberson R, Vedelar A, Shy E, Gambetti L, Grauss C, Petito F, Chess L, Latov N (1986) Monoclonal anti-DNA IgM κ in neuropathy binds to myelin and to a conformational epitope formed by phosphatidic acid and gangliosides. *J Immunol* 137: 3821-3828
8. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S (2007) Antiganglioside complex antibodies associated with severe dis-

- ability in GBS. *J Neurol* 182: 212-218
9. Asbury AK, Cornblath DR (1990) Assessment of current diagnostic for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 27: S21-S24
10. Kusunoki S, Chiba A, Kon K, Ando S, Arisawa K, Tate A, Kanazawa I (1994) N-acetylgalactosaminyl GD1a is a target molecule for serum antibody in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 35: 570-576
11. 楠 進, 平川美菜子, 佐田昌美, 森田大児. 免疫性ニューロパチーにおける血中の抗糖脂質抗体活性に及ぼすリン脂質の影響. (免疫性神経疾患に関する調査研究班, 平成16年度班会議 2005年1月26日-27日, 東京) 免疫性神経疾患に関する調査研究 (H14-難治-16) 平成16年度 総括・分担研究報告書 pp 163-164; 2005
12. Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI (2008) Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1925-1930