

博士論文

ギラン・バレー症候群で上昇する抗 GalNAc-GD1a 抗体の
運動神経・筋接合部における免疫組織化学的及び
電気生理学的研究

平成25年度

長岡 匠

目 次

	頁
序論-----	1
本論	
第一章 神経組織における GalNAc-GD1a の局在性に関する検討	
緒言-----	8
方法-----	13
結果-----	24
考察-----	32
第二章 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が VDCCs 電流に及ぼす影響	
緒言-----	36
方法-----	38
結果-----	45
考察-----	49
結論-----	52
謝辞-----	55
引用文献-----	56
学位論文で雑誌に投稿した論文-----	67

序 論

ギラン・バレー症候群（Guillain-Barré syndrome : GBS）は、急性の四肢筋力低下と腱反射低下～消失を主徴とする自己免疫性の末梢神経疾患である¹⁾。1859 年 Landry により「急性上行性麻痺」として最初に記載され²⁾、1916 年に Guillain、Barré、Strohl らにより「Sur un syndrome de radiculo-névrite avec hyperalbuminose de liquid céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux : 細胞増加がなく髄液蛋白増加をきたす根神経炎の一症候群について—腱反射の臨床的ならびに筋電図的な特徴についての考察」として報告された³⁾。年間発症率は、人口 10 万人に対して 1～2 人と推定されており^{4,5)}、日本でも 1.15 人と推定され⁶⁾、急性に四肢筋力低下をきたす神経・筋疾患の中でも最も頻度が高い。予後は比較的良好であり、多くは 6 か月以内に自然治癒するとされていたが、英国で行われた調査結果では、発症 1 年後において患者の 8% は死亡、9% は神経症候が遷延化して介助なしで歩行不能であり、走ることができるまでに回復した症例は 62% にとどまっている⁷⁾。

GBS は、欧米においては脱髄性変化を主体とする症例が多いことから、急性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（acute inflammatory demyelinating polyneuropathy : AIDP）ともよばれてきた⁸⁾が、現在では軸索が一次性に障害される軸索型 GBS の存在も知られている⁹⁻¹¹⁾。軸索型 GBS は電気生理学的所見や病理学的所見により、運動神経の軸索のみが障害される急性運動性軸索型ニューロパチー（acute motor axonal neuropathy : AMAN）と、運動神経に加えて感覚神経の軸索も障害される急性運動感覚性軸索型ニューロパチー（acute motor-sensory axonal neuropathy : AMSAN）に分類される¹¹⁻¹⁴⁾。

AIDP と AMAN の頻度には地域・国別の差があり、欧米の GBS は 90% が AIDP であるのに対し^{15,16)}、中国北部では 65% が AMAN と報告されている¹⁷⁾。日本では AIDP と AMAN の割合は同程度と報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。

GBS 患者の約 2/3 の症例では、感冒様症状や下痢などといった感染症状の 1～3 週間後に神経症状が認められることから、GBS は各種ウイルスや細菌による感染が引き金となり、最終的に自己免疫的機序を介して発症すると考えられている²¹⁾。GBS の先行感染病原体のうち最も多いのが *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*) であり、約 3 割を占める²²⁾。その他にも、*Haemophilus influenzae*、Cytomegalovirus、*Mycoplasma pneumoniae* などが GBS の先行感染病原体として報告されている²²⁻²⁴⁾。これら先行感染病原体に存在するエピトープの解析により、細胞表面のリポオリゴ糖が、脳神経系に特異的に発現しているガングリオシドの末端の糖鎖と共通する構造を有していることが明らかになった^{10,25)}。また、GBS を発症した直後の患者血清では、約 60% において IgG 抗ガングリオシド抗体が陽性となっている²⁶⁾ことから、先行感染病原体に対して産生された IgG 抗リポオリゴ糖抗体が、患者の運動神経のランビエ絞輪部軸索膜上のガングリオシドに交叉反応することにより、神経伝導障害を引き起こすという分子相同仮説が提唱されている (図. 1)^{1,27)}。このことは、IgG 抗ガングリオシド抗体による GBS 様の運動障害が、ウサギを用いた検討においても確認されている²⁷⁻²⁹⁾こと、GBS の神経症状の進展は発症から 4 週間以内に停止し、その後徐々に改善されるが、それに伴い抗ガングリオシド抗体も低下～消失する³⁰⁾ことから支持され、抗ガングリオシド抗体は GBS の発症機序において一定の役割を果たしていると考えられている²⁶⁾。

抗ガングリオシド抗体は、1988 年に GBS において IgG 抗 GD1b 抗体が初め

て報告³¹⁾されてから、これまでに 10 種類以上が報告されている³²⁾。抗ガングリオシド抗体の神経障害作用は、その反応特異性や標的ガングリオシド抗原の末梢神経系における分布や局在に規定され、抗体の種類に応じた症状を発症させる³³⁾。軸索型 GBS と有意な相関をもつ抗ガングリオシド抗体として抗 GM1 抗体、抗 *N*-acetylgalactosaminyl-GD1a (GalNAc-GD1a、図. 2) 抗体、抗 GD1a 抗体および抗 GM1b 抗体が知られている³⁴⁻⁴⁰⁾が、この中で、軸索型 GBS 患者からは抗 GM1 抗体が最も高頻度で検出される^{19,41)}ため、抗 GM1 抗体と GBS の関連性については様々な報告がなされている。一例として、GM1 は傍絞輪部の脂質ラフト画分に豊富に存在し、傍絞輪部の構造と絞輪部における電位依存性ナトリウムチャネルの集簇性の維持に重要な働きをしている⁴²⁾が、GM1 を含むウシ脳ガングリオシドを投与した AMAN 動物モデルにおいては、IgG 抗 GM1 抗体が運動神経のランビエ絞輪部軸索膜上に存在する GM1 に結合し、補体活性化を介してナトリウムチャネルを破壊することにより、神経の伝導を障害することが示唆されている⁴³⁾。さらに、マウス横隔膜においては GM1 が運動神経終末に存在し、抗 GM1 抗体による補体非依存的な神経伝達物質の放出阻害作用が報告されている⁴⁴⁾ことから、運動神経終末におけるシナプス前軸索膜も IgG 抗 GM1 抗体の標的部位となる可能性が推測されている⁴⁴⁾。このように、GBS における GM1 の局在性、および抗 GM1 抗体とナトリウムチャネルを中心としたイオンチャネルとの関連性については、その詳細が徐々に判明しつつある。

その一方で、GBS における GM1 以外のガングリオシドの寄与については、依然として不明な点が多い。本研究では、GBS の発症に関与するガングリオシドとして GalNAc-GD1a に注目した。抗 GalNAc-GD1a 抗体は、抗 GM1 抗体

と同様に運動神経優位な障害作用を示し、軸索型 GBS の発症に関与することが報告されている^{36,37)}が、GalNAc-GD1a の神経系における分布様式や、抗 GalNAc-GD1a 抗体がイオンチャネル機能に及ぼす影響については、現時点ではほとんど研究がなされていない。そこで本研究では、GBS に対する GalNAc-GD1a の役割を推定、評価することを目的として IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を作製し、GalNAc-GD1a の脊髄、運動神経あるいは神経・筋接合部における局在性について免疫組織学的に検討した。また、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体がイオンチャネルに及ぼす影響について、電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent calcium channels : VDCCs) を対象として評価した。

近年、電気生理学的手法を用いたイオンチャネルの解析が盛んに行われており、イオンチャネルの機能不全が発症に寄与する疾患が、数多く知られるようになった。反復発作性失調症 1 型はカリウムチャネルの異常、嚢胞性線維症はクロライドチャネルの異常によりそれぞれ引き起こされる遺伝疾患である^{45,46)}。また、GBS と同様に筋力の低下が認められるランバート・イートン症候群では、VDCCs に対する自己抗体の関与が明らかとなっている^{47,48)}。VDCCs は筋肉や神経細胞に多数存在し、カルシウムイオンを選択的に透過することにより筋肉の収縮やホルモン分泌、細胞の成長や死など多岐に渡って生体機能を調節している。末梢運動神経においては、VDCCs は神経・筋接合部のシナプス前膜に存在し、細胞内へのカルシウムイオンの流入を介してアセチルコリン (ACh) を放出させ、筋収縮を惹起する。従って、四肢筋力の低下を主徴とする GBS の運動障害において、VDCCs や筋活動電位に及ぼす抗ガングリオシド抗体の影響を評価することは、病態の解明に有用な指標となると考えられる。

本研究では、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が運動神経・筋接合部における筋活

動電位、および VDCCs 電流に及ぼす影響について電気生理学的に検討した。
神経組織におけるガングリオシドの局在性や、イオンチャネルに及ぼす抗ガングリオシド抗体の影響を検討することは、GBS の発症機序の解明および効果的な治療法、治療薬の開発、診断の確定に大きく寄与すると考えられる。

C.jejuni などに感染し、下痢や感冒用症状などを示す

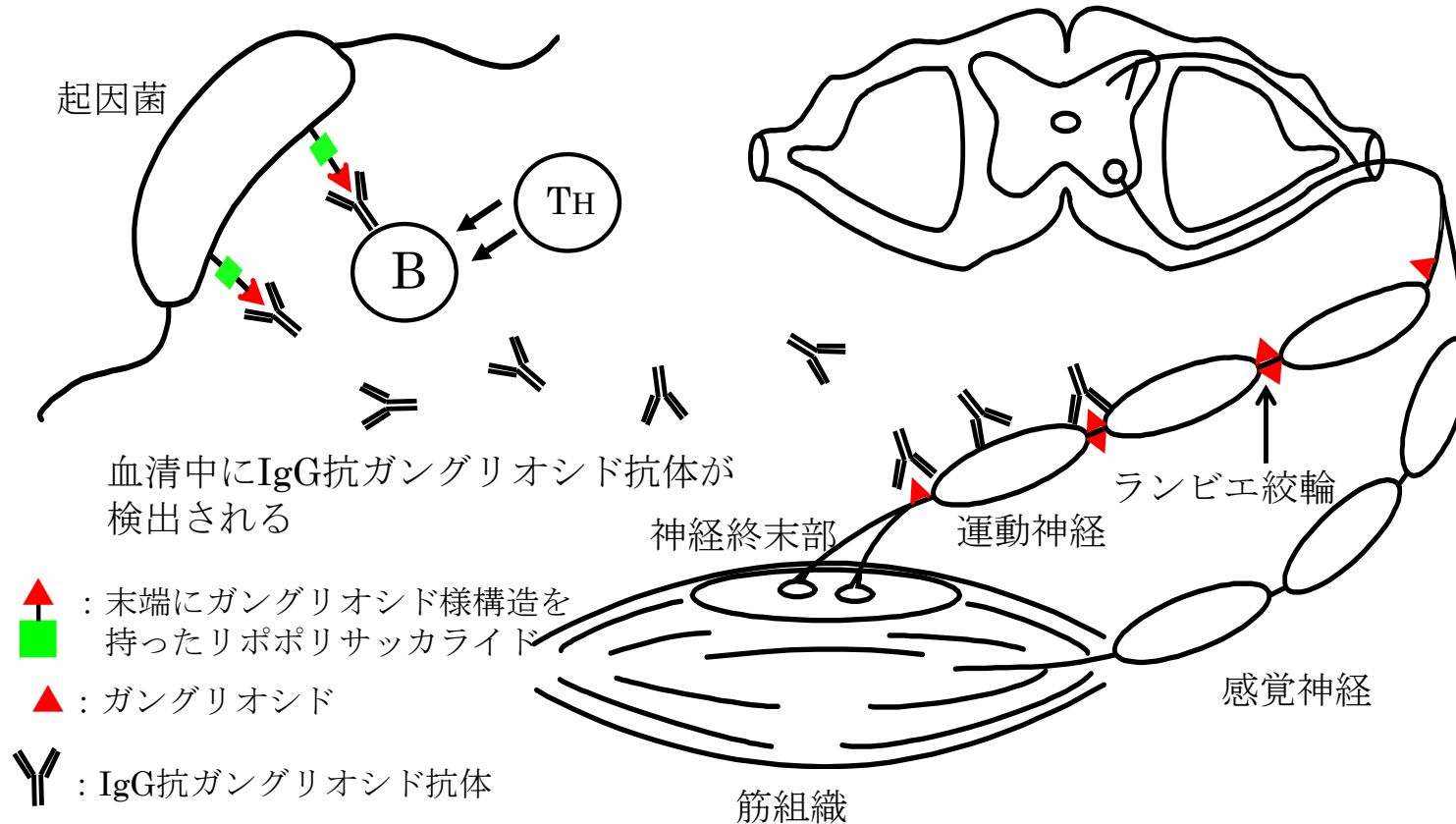


図.1 GBS における分子相同仮説

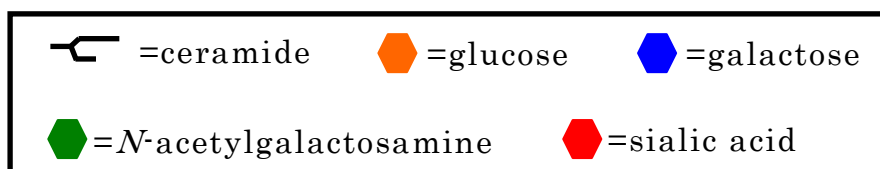
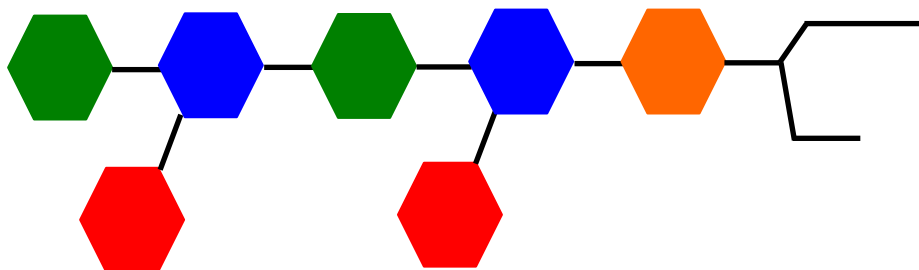
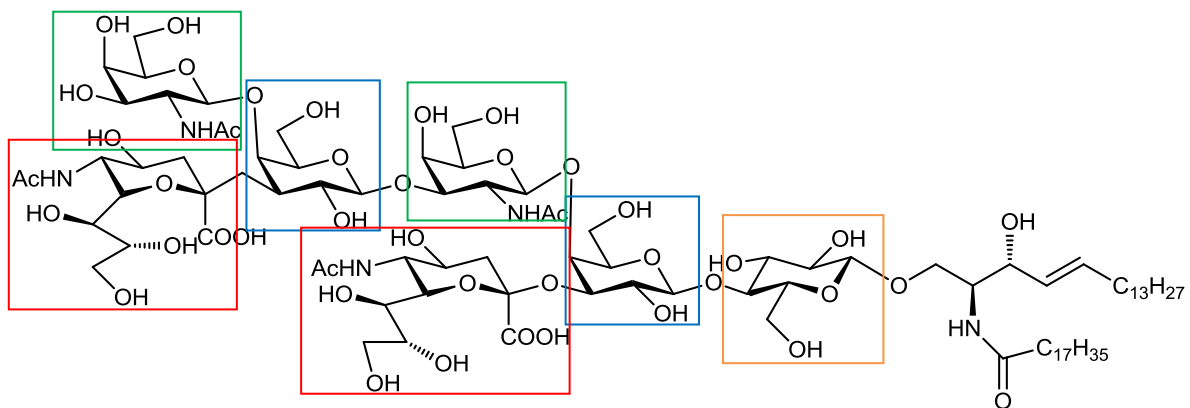


図.2 GalNAc-GD1a の構造式・模式図

第 1 章 神経組織における GalNAc-GD1a の 局在性に関する検討

緒 言

糖脂質や糖タンパク質などの複合糖質は細胞膜表面に存在し、細胞間相互作用や細胞接着、神経分化の制御、ホルモンや毒素の受容体など多くの生理機能を果たしている。シアル酸を有する糖鎖部分とセラミドからなる糖脂質の一種であるガングリオシドは、特に神経組織に豊富に存在しており、神経細胞の種類によって発現する分子種が異なっている。また、ガングリオシドは神経組織において糖鎖を細胞膜脂質二重層の外部に漂わせた状態で存在しており、生体膜上のタンパク分子との相互作用を介して細胞接着、細胞内シグナル伝達、ミエリン軸索間相互作用などに関与していることが明らかとなりつつある⁴⁹⁾。

ガングリオシドは 1935 年に発見されて以来、数多くのシアル酸含有糖脂質構造が同定されており、特定の抗ガングリオシド抗体と臨床像との密接な関連が知られている³³⁾。ガングリオシドは、自己免疫神経疾患である GBS でも標的抗原となっており、発症の急性期には、患者の約 60% において血清中の IgG 抗ガングリオシド抗体価の上昇がみられる²⁶⁾。GBS における標的ガングリオシドには、GM1、GM1b、GM2、GD1a、GalNAc-GD1a、GD1b、GT1a、GQ1b などが知られている^{33,50,51)} (図. 3)。また、抗ガングリオシド抗体による神経障害作用は、抗体の反応特異性や標的ガングリオシドの末梢神経における分布の特異性に影響され、抗体の種類に応じた症状を生じる (表. 1)^{32,33)}。臨床的、電気生理学的に感覚神経異常がみられない症例は純粋運動型 GBS と呼ばれ、有意な相関をもつ抗ガングリオシド抗体として抗 GM1 抗体、抗 GM1b 抗体、抗 GD1a 抗体および抗 GalNAc-GD1a 抗体が知られている³⁴⁻⁴⁰⁾。純粋運

動型 GBS では、特に抗 GM1 抗体の発現が高頻度で認められていることから^{19,41)}、抗 GM1 抗体と GBS の関連性について様々な研究がなされてきたが、一致した見解は得られていない。一例として、抗 GM1 抗体が陽性の GBS モデルウサギでは、GM1 の発現部位は運動神経のランビエ絞輪部における軸索膜上に限局していた²⁷⁻²⁹⁾が、ヒトでは運動神経および感覚神経のいずれにも存在すると報告されており^{52,53)}、運動神経優位となる神経障害の発症原因については依然として不明である。

一方、GalNAc-GD1a はヒト運動神経のランビエ絞輪部、傍絞輪部の軸索膜上あるいはミエリン最内側部に局在することが報告されている⁵⁴⁾。しかし、GalNAc-GD1a の感覚神経における発現や分布の相違、含有量などについては検討されていない。また、GBS の初期における神経伝導障害は、血液神経関門の脆弱な神経根や神経終末部などに限局して生じる⁵⁵⁾が、運動神経終末部における GalNAc-GD1a の局在性についても未検討である。

そこで本研究では、GalNAc-GD1a をウサギに感作することにより IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を作製し、ウシ脊髄における GalNAc-GD1a の発現を免疫学的手法により検討した。また、ウシ脊髄より抽出・精製したガングリオシドにおける GalNAc-GD1a の含有量について、定量的に評価した。さらに、ラットから脊髄あるいは横隔神経を含む横隔膜を採取し、神経線維および神経終末の神経・筋接合部における GalNAc-GD1a の局在性について、免疫組織化学的に検討した。運動神経終末では、カルシウムイオンが VDCCs を通して細胞内に流入することにより、神経伝達物質である ACh が遊離される。神経伝達において VDCCs は重要な役割を果たしていることから、VDCCs 機能の抑制は運動神経障害の原因となる可能性も推測される。そこで、GalNAc-GD1a と VDCCs

の関連性について知見を得るため、本研究では両者の共局在性についても併せて検討した。

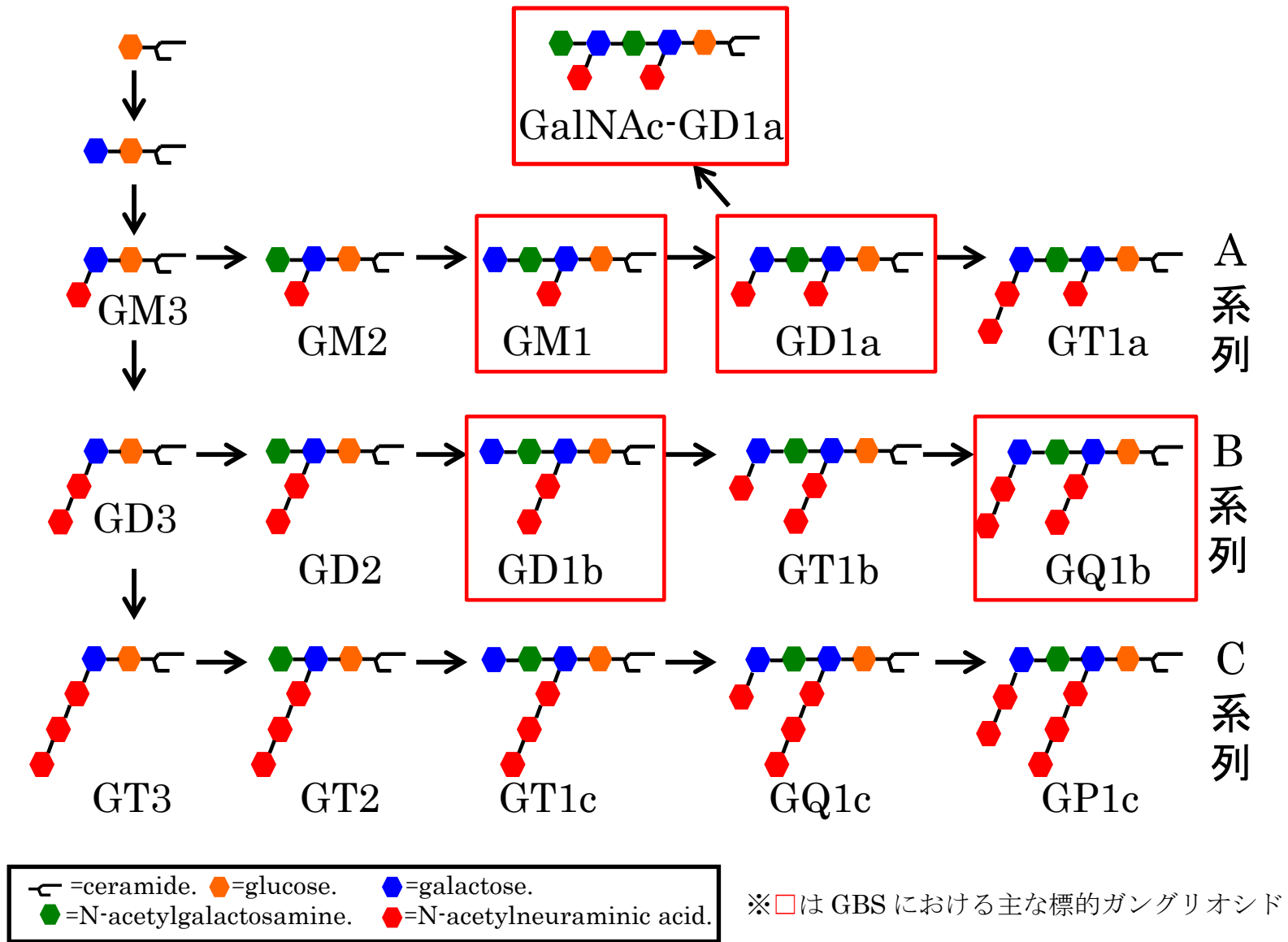


図. 3 ガングリオシドの合成経路

抗ガングリオシド抗体	Ig クラス	神経症状	末梢神経における標的抗原の局在
抗 GM1 抗体	IgG	AMAN	ランビエ絞輪、傍絞輪部軸索膜（ウサギ）
抗 GM1b 抗体	IgG	AMAN	不明
抗 GD1a 抗体	IgG	AMAN	不明
抗 GalNAc-GD1a 抗体	IgG	AMAN	運動神経ランビエ絞輪、傍絞輪部軸索膜、 腓腹神経小径線維
抗 GM2 抗体	IgM	脱髄、顔面神経麻痺、感覚障害	不明
抗 GD1b 抗体	IgG	感覚障害、失調、脱髄型	後根神経節大細胞、傍絞輪部ミエリン
抗 GT1a 抗体	IgG	嚥下障害	不明
抗 GQ1b 抗体	IgG	外眼筋麻痺、失調	外眼筋支配神経の傍絞輪部ミエリン、 後根神経節細胞、前シナプス軸索膜
抗 LM1 抗体	IgG	AIDP	末梢神経ミエリン

AMAN : acute motor axonal neuropathy AIDP : acute inflammatory demyelinating polyneuropathy

GalNAc-GD1a : *N*-acetylgalactosaminyl-GD1a

表. 1 抗ガングリオシド抗体の種類と関連する神経症状、標的抗原の局在

方 法

1. ウシ脊髄神経における GalNAc-GD1a の発現に関する検討

1.1. 実験材料

実験には以下の試薬・器具を使用した。また、以下に記載のない汎用試薬については、すべて和光純薬製の試薬特級品を使用した。

keyhole limpet hemocyanin (KLH、Calbiochem)

phosphate buffered saline (PBS(-)、日水製薬)

complete Freund adjuvant (CFA、SIGMA)

ImmunoAssist MG-PP (関東化学)

HPTLC aluminium sheet (MERCK)

ガングリオシド標準品 (GM2、GM1、GD1a、GD1b、GT1b : SIGMA)

ガングリオシド標準品 (GQ1b : Advanced Immunochemical)

ガングリオシド標準品 (GA1、GalNAc-GD1a、GD3、LM1 : 有賀博士より提供)

isobutyl methacrylate (Aldrich Chemical Company)

bovine serum albumin (BSA、SIGMA)

horseradish peroxidase (HRP) conjugate anti-rabbit IgG antibody (SIGMA)

Konica immunostaining HRP-1000 (Konica)

DEAE Sephadex A25 (SIGMA)

Iatrobeads (Iatron Laboratories)

Lipophilic Sephadex LH20 (SIGMA)

o-フェニレンジアミン試薬 (OPD 試薬、SIGMA)

1.2. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の作製

有賀博士より提供された GalNAc-GD1a を、雄性日本白色種ウサギに感作することにより抗体を作製した。GalNAc-GD1a 2 mg および KLH 2 mg を PBS 2 mL に溶解し、CFA 2 mL と混和することにより乳化した。乳化液 0.5 mL を雄性ウサギの背部に皮下注射し、追加免疫感作を 2 週間間隔で 2 回行った。最終感作 1 週間後に、後肢に脱力が認められたウサギの耳介静脈より 5 mL 採血し、血清を得た。

1.3. IgG 分画の精製

ImmunoAssist MG-PP を Buffer 1 (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ に 10 mM K_2HPO_4 を加えて pH 6.9 に調整) と静かに混和した後、ウサギ血清 100 μL を Buffer 1 で 5 倍希釈し、カラムに注入した。Buffer 1 を用いてアルブミンを溶出させた後、Buffer 2 (300 mM NaCl + 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ に、300 mM NaCl + 10 mM K_2HPO_4 を加え pH 6.9 に調整) を用いて溶出し、IgG 画分を得た。

1.4. 高性能薄層プレート (HPTLC) を用いた IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の反応性に関する確認試験

HPTLC aluminium sheet に、chloroform (C) : methanol (M) = 1 : 1 混液に溶解した標準品のガングリオシド (GA1、GM2、GM1、GalNAc-GD1a、GD1b および GQ1b : 各 0.5 μg)、あるいは GD1a (1 μg) をスポットした。C : M : 0.2% CaCl_2 = 55 : 45 : 10 混液を展開液としてスポット位置より 7 cm 展開し、20 分間乾燥後、プレートをオルシノール発色用および免疫染色用に分

割して切断した。オルシノール発色用のプレートについては 0.2% オルシノール / H_2SO_4 溶液を噴霧して、ホットプレート上で 103°C に加熱し、ガングリオシドの糖鎖がバンドとして検出されるまで発色させた。

免疫染色用のプレートについては、コーティングのため 0.1% polymer (isobutyl methacrylate) / hexane 溶液に 75 秒間浸漬後、20 分間乾燥させた。プレート周囲のシリカゲルを 2~3 mm 幅で切削し、さらにその周囲を 1% polymer / hexane 溶液でコーティングした。次に、プレートを 1% BSA / PBS 溶液に 15 分間浸漬してブロッキングし、10 分間乾燥後、0.5% casein / PBS 溶液にて希釈した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体 (1:1000) をゆっくり振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。プレートを PBS に 4 回浸漬させることにより洗浄後、1% BSA / PBS 溶液で 10 分間ブロッキングを行い、10 分間乾燥させた。続いて、二次抗体として HRP conjugate anti-rabbit IgG antibody (1:1000) とゆっくり振とうさせながら室温で 45 分間反応させた。PBS で 4 回洗浄後、Konica immunostaining HRP-1000 で発色させ、さらに PBS で洗浄し、乾燥させた。

1.5. ウシ運動神経および感覚神経からのガングリオシド抽出・精製

屠殺場から得られたウシの脊髄より前根（運動神経）および後根（感覚神経）を約 200 mg 採取した。神経組織をハサミで細切後、精製水を加えて全量を約 1 mL とし、テーパー型ホモジナイザー（WHEATON）によりホモジナイズした。ホモジナイズした神経組織に C : M = 1 : 2 混液を 4.5 mL 加えて超音波処理（B1510J-MT、BRANSON）し、 4°C 、2000 rpm で 10 分間遠心分離（KUBOTA 2700、久保田製作所）した。上清を 2 mL の DEAE Sephadex

A25 を充填したカラムに注入し、5 mL の Solvent.A (C : M : 精製水 (W) = 30 : 60 : 8 混液) を用いて中性脂質画分を溶出した。次に、15 mL の Solvent.B (C : M : 0.8 M 酢酸ナトリウム = 30 : 60 : 8 混液) 15 mL を用いて酸性糖脂質画分を溶出し、窒素ガスで蒸発乾固させた。

酸性糖脂質画分の乾固残分に精製水 3 mL を添加して超音波処理後、Sep Pak C18 カラム処理により酸性糖脂質を吸着させた。その後、精製水 15 mL による溶出で酢酸ナトリウムを除去した後、C : M = 2 : 1 混液 7 mL により酸性糖脂質画分を溶出し、窒素ガスで再度蒸発乾固させた。

得られた乾固残分を C : M = 85 : 15 混液に溶解し、Iatrobeads 0.25 g を充填したカラムに注入した。C : M = 3 : 1 混液 5 mL でスルファチド画分を、C : M : W = 3 : 7 : 0.5 混液 5 mL でガングリオシド画分を溶出し、得られたガングリオシド画分について窒素ガスによる蒸発乾固を実施した。

乾固残分に 0.4 M NaOH 水溶液 0.3 mL を加え、37°C で 1 時間インキュベートすることにより、低分子物質をアルカリ水解した。水解後の溶液を Lipophilic Sephadex LH20 カラムに注入し、Solvent.A を用いて溶出した。回収の際は、最初の 2.5 mL は回収せず、続いて流出する 3.5 mL を回収した。溶出画分を窒素ガスで蒸発乾固させ、乾固残分を C : M = 1 : 1 混液 40 μ L で溶解したものを、精製ガングリオシド溶液とした。

1.6. HPTLC を用いたウシ脊髄における GalNAc-GD1a の局在性に関する検討

1.6.1. オルシノール発色による検討

C : M = 1 : 1 混液に溶解した標準品のガングリオシド (GM2、GM1、GalNAc-GD1a、GD1b : 各 0.5 μ g)、LM1、GD1a (1 μ g)、GT1b (4 μ g)、

GD3 (16 μ g) を HPTLC aluminium sheet の Lane 1、2 に、運動神経あるいは感覚神経より作製した精製ガングリオシド溶液 (5 μ L) をそれぞれ Lane 3～6、Lane 7～10 にスポットした。C : M : 0.2% CaCl_2 = 55 : 45 : 10 混液を展開液としてスポット位置より 7 cm 展開し、20 分間乾燥した。その後、0.2% オルシノール / H_2SO_4 溶液を噴霧し、ホットプレート上で 103°C に加熱することによりバンドを発色させた。

1.6.2. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を用いた検討

C : M = 1 : 1 混液に溶解した標準品のガングリオシド (GA1、GM2、GM1、GalNAc-GD1a、GD1b : 各 0.5 μ g)、LM1、GD1a (1 μ g)、GT1b (4 μ g)、GD3 (16 μ g) を HPTLC aluminium sheet の Lane 1、2 (オルシノール発色用) に、運動神経あるいは感覚神経より作製した精製ガングリオシド溶液 (5 μ L) を免疫染色用のプレート (それぞれ Lane 3～6、Lane 7～10) にスポットした。以降の操作は 1.4. の項目に準じて行い、標準品をスポットした Lane 1、2 ではオルシノール / H_2SO_4 溶液を、免疫染色用プレート (Lane 3～10) では基質として OPD 試薬を用いて発色させた。

1.6.3. 精製ガングリオシド溶液における GalNAc-GD1a の定量

1.6.2 の HPTLC aluminium sheet 上 (Lane 11～14) に、C : M = 1 : 1 混液に溶解した既知量の GalNAc-GD1a 標準品 (0.125～0.75 μ g) をスポットし、同時進行で操作を行った。精製ガングリオシド溶液における GalNAc-GD1a 量は、GalNAc-GD1a 標準品から得られたバンドの濃さを画像解析ソフト (NIH Image) を用いて数値化し、作成した検量線から算出した。実験には 4 検体を

使用し、抽出に使用した脊髄湿重量に対する GalNAc-GD1a 含量を平均値±標準誤差 (mean±SE) として表現した。

2. ラット神経細胞における GalNAc-GD1a の発現に関する検討

2.1. 実験材料

実験には以下の試薬・器具を使用した。また、以下に記載のない汎用試薬については、すべて和光純薬製の試薬特級品を使用した。

Block ace (大日本製薬)

normal goat serum (NGS、Vector Labs)

アンモニア水 (関東化学)

Fluorescein isothiocyanate (FITC) -anti rabbit IgG antibody (SIGMA)

Rhodamine conjugate Peanut Agglutinin (Rho-PNA、Vector Labs)

Aqua Poly/Mount (Polysciences)

O.C.T.コンパウンド (サクラファインテックジャパン)

anti-Neurofilament 200kDa antibody (anti-NF200、CHEMICON)

anti-Syntaxin antibody (anti-Syntaxin、SIGMA)

anti-S-100 protein antibody (anti-S100、SIGMA)

Cy5 conjugate anti-mouse IgG antibody (CHEMICON)

Rhodamine conjugate α -Bungarotoxin (α -BuTx、Molecular Probes)

collagenase Type II (和光純薬)

mouse monoclonal IgM anti-GalNAc-GD1a antibody (IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体、生化学工業)

FITC conjugate anti-mouse IgM antibody (SIGMA)

anti-Cav2.1 antibody (anti- α_{1A} 、Alomone Labs)

anti-Cav2.2 antibody (anti- α_{1B} 、Alomone Labs)

anti-Cav1.2 antibody (anti- α_{1C} 、Alomone Labs)

Cy5 conjugate anti-rabbit IgG antibody (CHEMICON)

2.2. 試薬の調製

0.1M phosphate buffer (PB)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.35 g と $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.65 g を精製水 500 mL に溶解し、1 M NaOH で pH 7.4 に調整した。

0.01 M phosphate buffered saline (PBS)

NaCl 8.5 g を精製水 900 mL に溶解し、0.1 M PB 100 mL を添加後、1 M NaOH で pH 7.4 に調整した。

4% paraformaldehyde (PFA)

PFA 20 g に 0.1 M PB 500 mL を加え、60～70℃で攪拌して溶解後、濾紙を用いて濾過した。

2% PFA

4% PFA と 0.01 M PBS を 1 : 1 の割合で混和した。

Blocking 液

Block ace と NGS を 9 : 1 の割合で混和した。

希釈液 (working buffer)

0.01 M PBS、Block ace および NGS を 8 : 1 : 1 の割合で混和した。

アルブミンコーティングスライドガラス

Micro slide glass (松浪硝子工業) を 75% ethanol に浸漬して脱脂した後、

風乾した。ビーカーに市販の卵 1 個分の卵白と精製水 500 mL およびアンモニア水 1 mL を加えて 10 分間攪拌した後、10 枚重ねたガーゼを用いてろ過し、アルブミン溶液とした。脱脂したスライドガラスをアルブミン溶液に 1 分間浸漬し、60℃のオーブンで一晩静置した。

2.3. ラット脊髄における GalNAc-GD1a の局在性に関する検討

2.3.1 ラット脊髄からの前根および後根の採取

Diethyl ether で深麻酔した雄性 Wistar 系ラット（8 週齢）を開腹開胸した後、下大静脈を切断し左心室より 0.01 M PBS および 2% PFA をそれぞれ 100 mL 注入することにより灌流固定を行った。背中側より脊椎を切開して脊髄を摘出し、実体顕微鏡下において前根と後根とを個別に採取した。

2.3.2 teased fibre を用いた免疫組織化学的二重染色による検討

採取した神経組織は、氷冷した 4% PFA 中で 30 分間後固定した後、0.01 M PBS を用いて 5 分間、3 回洗浄した。さらに、1 mg/mL collagenase 溶液中にて 37℃、18 分間インキュベート後、0.01M PBS で 5 分間、3 回洗浄した。神経組織を 2~3 mm の長さに切断し、実体顕微鏡下、アルブミンコーティングしたスライドガラス上で、個々の神経線維が観察できる程度まで 27 G の注射針を用いて単離したものを teased fibre とした。teased fibre に Blocking 液を適用し、室温下、30 分間インキュベートした後、working buffer にて希釈した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体（1:100）を用いて 4℃、5 時間インキュベートした。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄し、二次抗体として FITC conjugate anti-rabbit IgG antibody（1:100）を用いて 4℃、1 時間インキュベートした。0.01

M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、Rho-PNA (1:100) を用いて 4℃、5 時間インキュベートし、さらに 0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、Aqua Poly/Mount を用いて封入した。teased fibre は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW BX50 Olympus) により、FITC は励起 488 nm、発色 522 nm の波長で緑色に、Rho-PNA は励起 543 nm、発色 568 nm の波長で赤色に発色させ、観察した。

2.4. ラット横隔膜標本における GalNAc-GD1a の局在性に関する検討

2.4.1 ラット横隔膜の採取およびブロックの作製

2.3.1 の方法に準じて、ラットの灌流固定を行った。左右の横隔神経と横隔膜をまとめて採取し、適量の 0.01M PBS で洗浄後、O.C.T Compound を用いて包埋皿 (Tissue - Tek クリオモルド 3 号、サクラファインテックジャパン) に包埋し、液体窒素を用いて凍結した。

2.4.2 免疫組織化学的三重染色による検討

凍結ブロックをクリオスタット (Cold tome、SAKURA) で 10 μ m 厚の薄切切片とし、アルブミンコーティングしたスライドガラスに貼り付け、室温で約 3 分間乾燥させた。その後、4℃の acetone に 3 分間浸漬して固定処理を行い、0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄した。切片は室温下、Blocking 液で 30 分間処理した後、working buffer にて希釈した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体 (1:100) を用いて 4℃で終夜インキュベートした。なお、以下の操作における抗体の希釈は、すべて working buffer を用いた。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、二次抗体として FITC conjugate anti-rabbit IgG antibody (1:100) を用いて 4℃、1 時間インキュベートした。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、

anti-NF200 (1:1000)、anti-Syntaxin (1:1000) あるいは anti-S100 (1:1000) を適用し、4°Cで終夜インキュベートした。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、二次抗体として Cy5 conjugate anti-mouse IgG antibody (1:100) を用いて 4°C、1 時間インキュベートした。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄し、さらに α -BuTx (1:300) を適用して 4°C、1 時間インキュベートした。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗した後、切片を Aqua Poly/Mount を用いて封入した。標本は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV300; Olympus) により、FITC は励起 488 nm、発色 522 nm の波長で緑色に、Cy5 は励起 650 nm、発色 667 nm の波長で青色に、 α -BuTx (Rhodamine conjugate) は励起 543 nm、発色 568 nm の波長で赤色に発色させ、観察した。

2.4.3 糖脂質除去標本を用いた検討

横隔膜切片を 4°C の acetone に 3 分間浸漬して固定し、0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、C : M = 1 : 1 混液に 10 分間浸漬した。0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄後、2.4.2 の項目に準じて IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、anti-NF200 および α -BuTx の反応性を検討した。

2.4.4 神経線維除去標本を用いた検討

横隔膜切片を 0.01 M PBS で調製した collagenase Type II 溶液 (1 mg/mL) に浸漬し、37°C で 40 分間インキュベートした。2% PFA で 20 分間処理した後は、2.4.2 の項目に準じて IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、anti-NF200 および α -BuTx の反応性を検討した。

2.5 カルシウムチャネルとの共局在性に関する検討

ラット横隔膜標本の採取、切片の作製および免疫染色の操作は、2.4 の項目に準じて行った。その際、GalNAc-GD1a に対する抗体として IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体 (1:300)、二次抗体として FITC conjugate anti-mouse IgM antibody (1:20) を使用した。またカルシウムチャネルに対する抗体としては、anti- α_{1A} (1:1000)、anti- α_{1B} (1:1000) および anti- α_{1C} (1:1000) を使用し、二次抗体として Cy5 conjugate anti-rabbit IgG antibody (1:100) を用いて発色させた。その他に α -BuTx (Rhodamine conjugate、1:300) を用いて免疫三重染色を行い、各蛍光色素の発色を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

1. ウシ脊髄神経における GalNAc-GD1a の局在性に関する検討

1) HPTLC を用いた IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の反応性確認試験

HPTLC 上に展開した各種標準品についてオルシノールを用いて発色させた結果、それぞれ独立したバンドが検出された (図. 4)。一方、血清より精製した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を用い、GalNAc-GD1a を免疫学的に検出したところ、オルシノール発色した標準品の GalNAc-GD1a と同じ高さにバンドが検出されたが、他のガングリオシドに対する反応性はみられなかった (図. 4)。従って、今回作製した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体は、他のガングリオシドとは交叉反応を示さず、特異性の高いものであることが確認された。

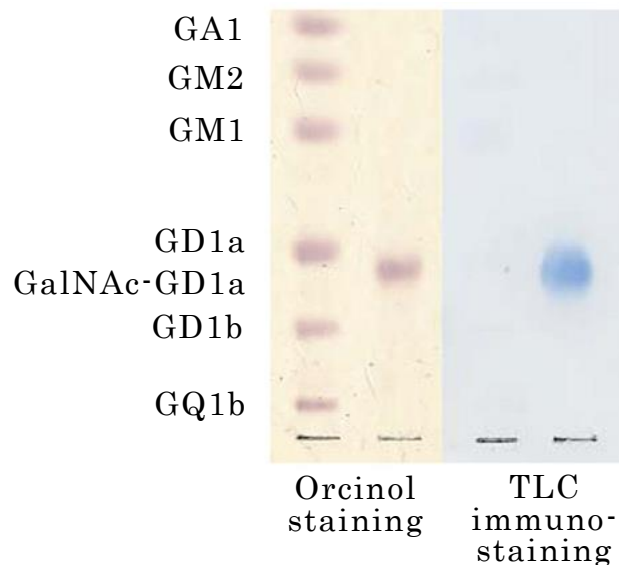


図. 4 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の GalNAc-GD1a への結合性

2) HPTLC を用いたウシ神経における GalNAc-GD1a の局在性

精製ガングリオシド溶液を HPTLC 上に展開し、オルシノールを用いて発色した結果、反応したガングリオシドの種類に関して運動神経 (Lane 3-6) と感覚神経 (Lane 7-10) 間に明確な相違は認められなかった (図. 5)。一方、IgG

抗 GalNAc-GD1a 抗体を用い、GalNAc-GD1a を免疫学的に検出した場合においては、運動神経（Lane 3-6）ではオルシノール発色した標準品の GalNAc-GD1a と同じ高さにバンドが検出されたが、感覚神経（Lane 7-10）ではバンドは検出されなかった（図. 6）。

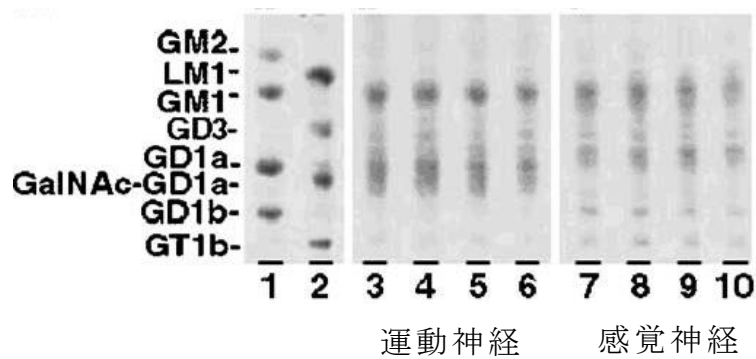


図. 5 運動・感覚神経より精製したガングリオシドのオルシノール発色

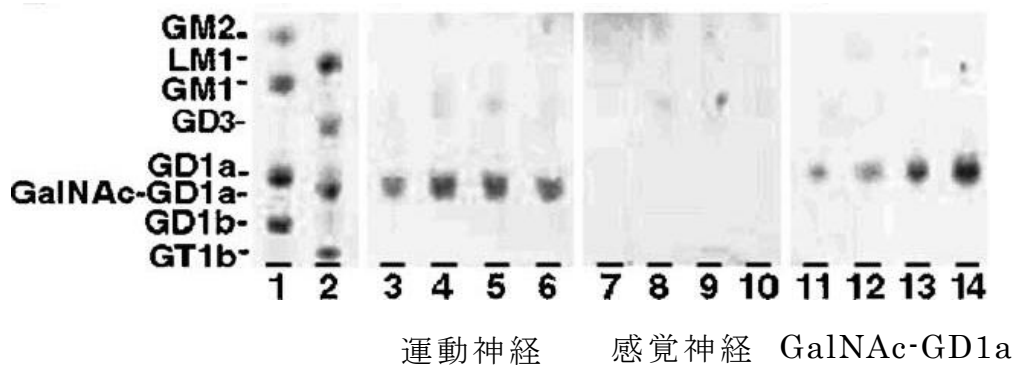


図. 6 精製ガングリオシドにおける IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を用いた検出

3) 精製ガングリオシド溶液における GalNAc-GD1a の含有量

GalNAc-GD1a 標準品の 0.125、0.25、0.5、0.75 μg をスポットし、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体により免疫学的に検出したバンド（図. 6、Lane 11-14）を数値化して検量線を作成した（図. 7）。作成した検量線より精製ガングリオシドにおける GalNAc-GD1a の含有量を算出したところ、湿重量 $198.8 \pm 1.08 \text{ mg}$ の前根から $3.56 \pm 0.36 \text{ } \mu\text{g}$ の GalNAc-GD1a が得られ、湿重量あたりの含有量

は $17.89 \pm 1.75 \mu\text{g/g}$ ($9.42 \pm 0.72 \text{ nmol/g}$) であった。

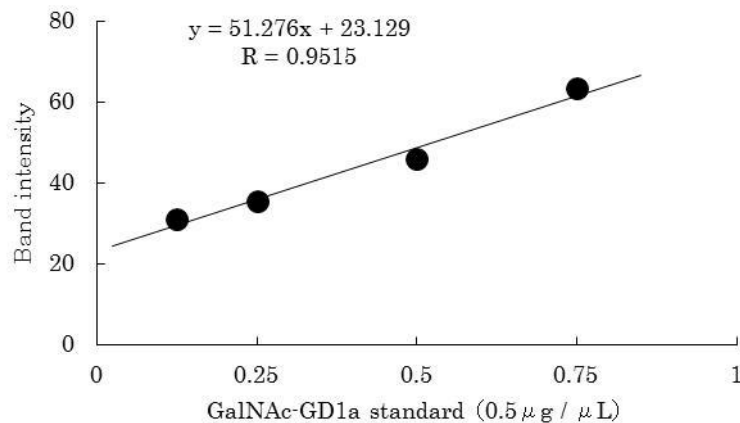


図. 7 GalNAc-GD1a 標準品による検量線

2. ラット神経細胞を用いた GalNAc-GD1a の局在性に関する検討

2.1. 脊髄 teased fibre における GalNAc-GD1a の局在性

運動神経において、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位はランビエの絞輪に局限せず、その周辺の軸索にまで広がって確認された (図. 8A)。また、PNA の結合もランビエの絞輪およびその周辺部の軸索に確認され (図. 8B)、これらの染色部位は一致していた (図. 8C)。しかし、感覚神経における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体ならびに PNA の結合部位は、いずれもランビエの絞輪部に局限しており、運動神経のような軸索にかけての染色像はみられなかった (図. 8D~F)。

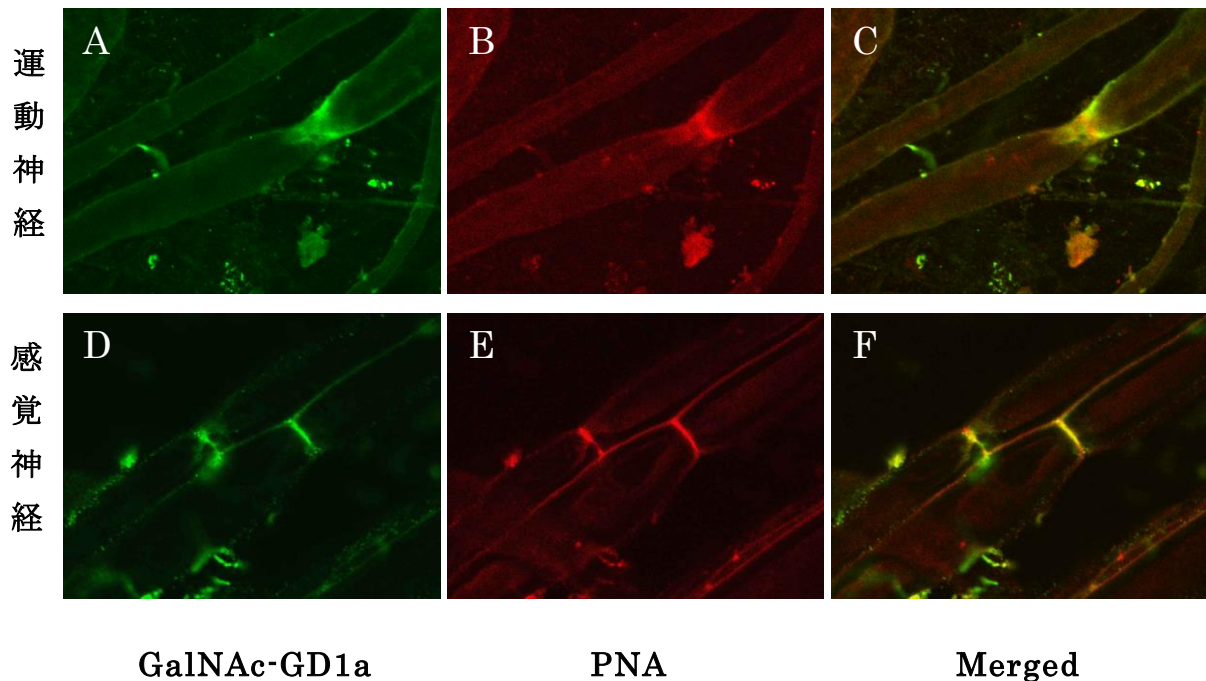


図. 8 ラット脊髄神経における GalNAc-GD1a の発現部位

2.2. 横隔膜の神経・筋接合部における GalNAc-GD1a の局在性

1) α -BuTx および anti-NF200 との共局在性

横隔膜の神経・筋接合部における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位（図. 9A）は、 α -BuTx（図. 9B）の結合部位とは大部分が、anti-NF200（図. 9C）の結合部位とは一部が重なって検出された（図. 9D）。

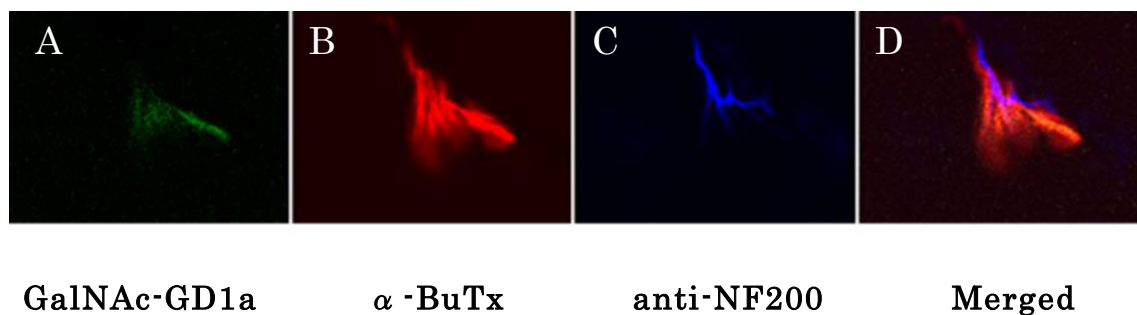


図. 9 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、 α -BuTx および anti-NF200 による三重染色

2) anti-Syntaxin との共局在性

横隔膜の神経・筋接合部における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位（図. 10A）は、 α -BuTx（図. 10B）の結合部位とは大部分が、anti-Syntaxin（図. 10C）とは一部が重なって検出された（図. 10D）。

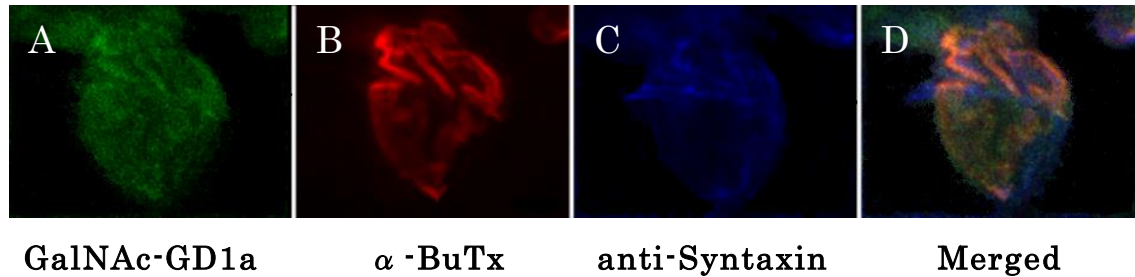


図. 10 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、 α -BuTx および anti-Syntaxin による三重染色

3) IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体と α -BuTx および anti-S100 による染色

IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位（図. 11A）は、 α -BuTx（図. 11B）および anti-S100（図. 11C）の発現部位とほぼ一致した（図. 11D）。

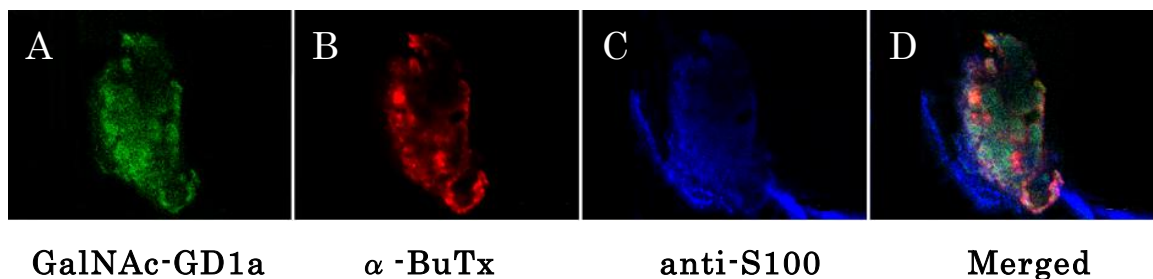


図. 11 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、 α -BuTx および anti-S100 による三重染色

4) 糖脂質除去標本を用いた検討

chloroform : methanol = 1 : 1 混液の処理により、神経組織の糖脂質を除去した横隔膜標本を用いて検討した結果、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による反応性は消失した（図. 12A）。一方、 α -BuTx ならびに anti-NF200 の結合部位は消失せず、それぞれ染色性が確認された（図. 12B～D）。

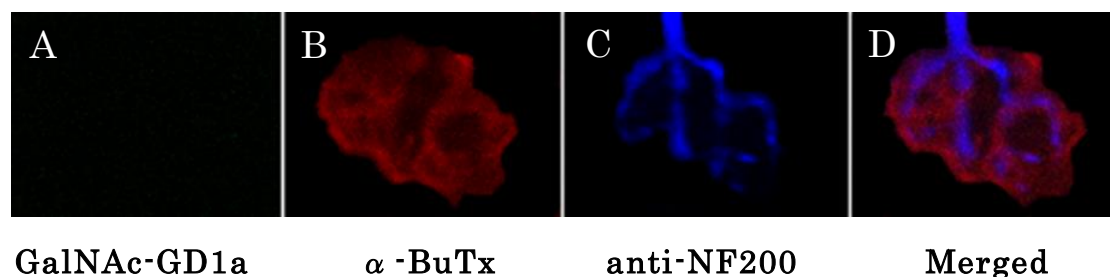


図. 12 糖脂質除去後の IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、 α -BuTx および anti-NF200 による染色性の変化

5) 神経線維除去標本を用いた検討

横隔膜組織を collagenase 処理し、運動神経終末の前シナプスにおける神経線維を除去した横隔膜標本を用いた染色では、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体（図. 13A）および anti-NF200（図. 13C）による反応性はほぼ消失した。しかし、 α -BuTx による染色は確認された（図. 13B）。

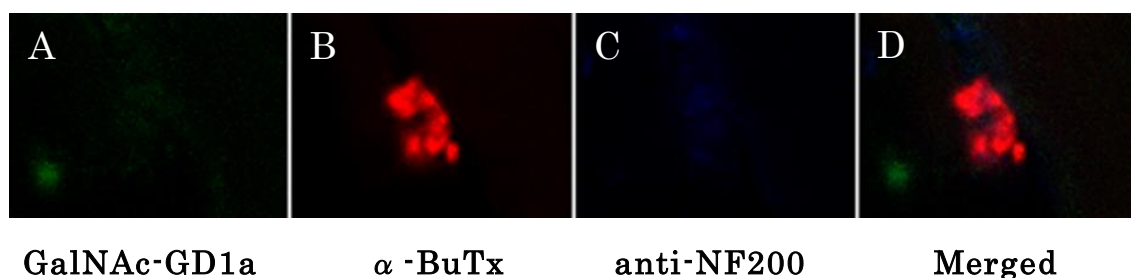


図. 13 神経線維除去後の IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体、 α -BuTx および anti-NF200 による染色性の変化

2.3. GalNAc-GD1a と電位依存性カルシウムチャネルの共局在性

1) GalNAc-GD1a と P/Q 型カルシウムチャネル

横隔膜の神経・筋接合部における IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位（図. 14A）は、P/Q 型カルシウムチャネルを認識する anti- α_{1A} の結合部位（図. 14C）と合致して検出された（図. 14D）。

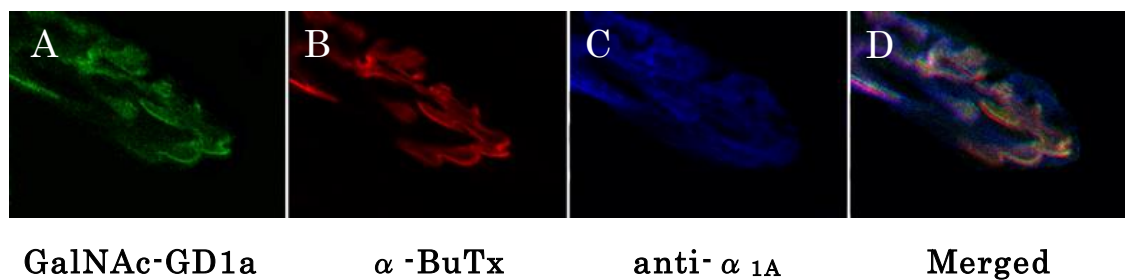


図. 14 GalNAc-GD1a と P/Q 型カルシウムチャネルの染色部位

2) GalNAc-GD1a と N 型カルシウムチャネル

IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位（図. 15A）は、N 型カルシウムチャネルを認識する anti- α_{1B} （図. 15C）の結合部位と合致して検出された（図. 15D）。

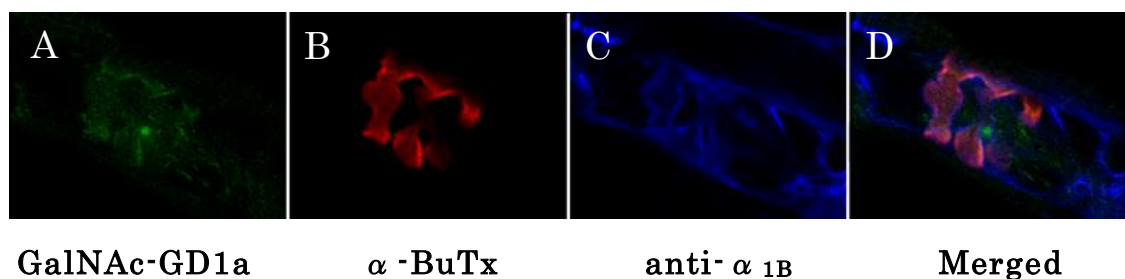


図. 15 GalNAc-GD1a と N 型カルシウムチャネルの染色部位

3) GalNAc-GD1a と L 型カルシウムチャネル

IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体（図. 16A）と α -BuTx（図. 16B）の結合部位は、L 型カルシウムチャネルを認識する anti- α_{1C} （図. 16C）に取り囲まれるように染色されていた。IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体と anti- α_{1C} の染色像が重複したのは一部のみであり、P/Q 型あるいは N 型カルシウムチャネルとの重複よりも狭い範囲であった（図. 16D）。

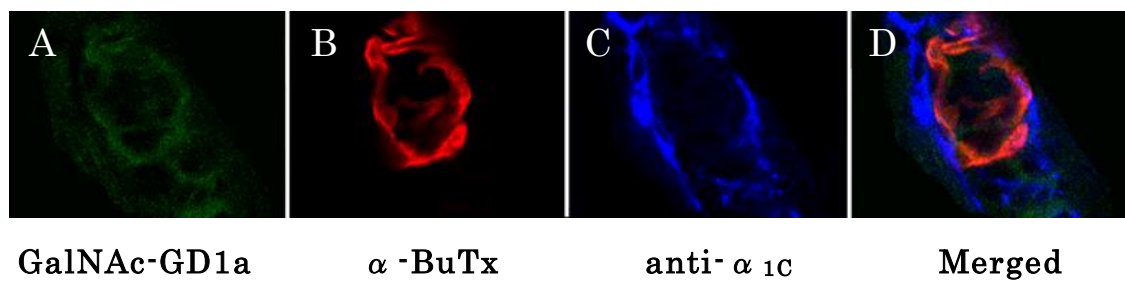


図. 16 GalNAc-GD1a と L 型カルシウムチャネルの染色部位

考 察

本章では、作製した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を用いて、神経組織における GalNAc-GD1a の局在性について検討した。

今回の研究において作製した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体は、HPTLC を用いた検討の結果から、GalNAc-GD1a にのみ反応し、他のガングリオシドとは交叉反応を示さない特異性の高いものであることが確認された。従って、この抗体を用いて得られた実験結果は、GalNAc-GD1a の局在性を正しく反映しているものと推測される。

ウシ神経組織より抽出した精製ガングリオシドを、HPTLC に展開してオルシノール発色した結果、運動神経および感覚神経由来のバンドに明確な相違は生じなかった。しかし、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を用いて免疫学的に検出したところ、運動神経にのみ GalNAc-GD1a のバンドが出現した。このことより、ウシ脊髄における GalNAc-GD1a は、感覚神経には存在せず、運動神経にのみ発現していることが明らかとなった。また、その湿重量あたりの含有量 $17.89 \pm 1.75 \mu\text{g/g}$ ($9.42 \pm 0.72 \text{ nmol/g}$) は、Svennerholm らが報告したヒト運動神経における GM1 や GD1a の含有量 (GM1 : 34 nmol/g 、GD1a : 24 nmol/g)⁵³⁾と比較して低いものであった。しかし、Svennerholm らの報告では、GM1 や GD1a は運動神経および感覚神経の両方に、同程度の含量で発現していた⁵³⁾。一方、低含量ながら、GalNAc-GD1a の発現は運動神経に局限していたことから、軸索型 GBS における自己抗体の標的分子候補のひとつとして、GalNAc-GD1a の重要性は高まるものと考えられる。

ラット脊髄の teased fibre を用いた IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による免疫組織学的検討では、感覚神経における GalNAc-GD1a の発現はランビエ絞輪に限

局していたが、運動神経ではランビエ絞輪に限局せず、その周辺の軸索にまで広がっていた。これは、末梢神経線維においてランビエ絞輪、軸索およびシュワン細胞の表面に結合することが知られている PNA⁵⁶⁾の染色部位と一致していた。また、ヒト運動神経を免疫組織学的に検討した報告においても、本研究と同様に、GalNAc-GD1a の発現部位はランビエ絞輪およびその周辺の軸索に及ぶものであった⁵⁴⁾。本研究や前述の報告で観察された運動神経軸索における染色像は、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体がランビエ絞輪より侵入して軸索と髄鞘の間の空間へと拡散し、軸索膜上に発現している GalNAc-GD1a に結合した結果と考えられる。従って運動神経では、抗体がランビエ絞輪から軸索へと容易に侵入する経路や機序が存在する可能性があり、結果として GalNAc-GD1a の発現部位がランビエ絞輪とその周辺の軸索の広い範囲に及んでいることは、軸索型 GBS における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の関与を支持するものであると推測される。

ラット横隔膜の神経・筋接合部における免疫組織学的検討では、GalNAc-GD1a の発現部位は、シナプス後膜のニコチン性アセチルコリン受容体を認識する α -BuTx、あるいは運動神経終末のシュワン細胞を認識する anti-S100 の結合部位とほぼ一致した。また、前シナプスにおける運動神経軸索の構成要素で線維タンパクのひとつである neurofilament を認識する anti-NF200、運動神経終末の前シナプスにおけるシナプス小胞の膜タンパクを認識する anti-Syntaxin の結合部位とも一部重なって検出されたことより、GalNAc-GD1a は、ラット横隔膜の神経・筋接合部においては、前シナプスおよび後シナプスのいずれにも発現していることが明らかとなった。また、神経・筋接合部を chloroform / methanol 処理することにより糖脂質であるガングリオシドが⁵⁴⁾、

collagenase 処理することにより前シナプスが消失することが知られている⁵⁷⁾。chloroform / methanol 処理によりガングリオシドを除去した横隔膜切片では、 α -BuTx ならびに anti-NF200 の結合部位は消失せずに染色性が確認されたが、GalNAc-GD1a の発現は消失した。これは、本研究で使用した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が、糖脂質であるガングリオシドの GalNAc-GD1a を認識しており、糖タンパクなどとは交叉反応していない証拠となる。また、collagenase 処理した横隔膜切片を用いた検討より、 α -BuTx の染色性は確認されたが、GalNAc-GD1a の発現および anti-NF200 による反応性はほぼ消失した。これは、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が前シナプ스에結合すること、すなわち GalNAc-GD1a の前シナプスにおける発現を示唆するものである。このことは、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体価の上昇がみられる GBS 患者血清を用いた神経・筋接合部における免疫組織学的検討において、GBS 患者血清が前シナプスに反応を示し、神経線維除去により反応性が消失したという報告⁵⁸⁾と一致している。

神経・筋接合部における GalNAc-GD1a と VDCCs の共局在性を免疫組織学的に検討したところ、GalNAc-GD1a の発現は P/Q 型カルシウムチャネルを認識する anti- α_{1A} 、N 型カルシウムチャネルを認識する anti- α_{1B} の結合部位と合致して検出された。しかし、L 型カルシウムチャネルを認識する anti- α_{1C} の結合部位は、GalNAc-GD の発現部位と α -BuTx の結合部位を取り囲むように分布し、一部分が符合していたのみであった。P/Q 型と N 型カルシウムチャネルは脳や神経に広く分布し、L 型カルシウムチャネルは心筋や骨格筋に分布するという相違がある⁵⁹⁾。上述の結果より、ラット横隔膜の神経・筋接合部においては、GalNAc-GD1a は運動神経に多く発現していることが判明したが、その発現様式は、神経組織に多く分布する P/Q 型および N 型カルシウムチャネル

との共局在であることが明らかとなった。このことより、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体は運動神経終末において、VDCCs と共局在する GalNAc-GD1a に結合し、カルシウムイオンの流入を阻害することにより ACh の遊離抑制を介して運動神経障害を惹起する可能性が推測される。

第 2 章 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が VDCCs 電流に及ぼす影響

緒 言

GBS は障害される部位により、髄鞘が障害される AIDP と、軸索が障害される AMAN の 2 種類に大別される^{8,9)}。AMAN の発症に有意な相関をもつ抗グングリオシド抗体として、抗 GM1 抗体、抗 GM1b 抗体、抗 GD1a 抗体、抗 GalNAc-GD1a 抗体があり³⁴⁻⁴⁰⁾、この中で抗 GM1 抗体が最も高頻度で検出される^{19,41)}。

AMAN では、血液神経関門の脆弱な神経根へ侵入した抗 GM1 抗体がランビエ絞輪部に発現している GM1 に結合し、補体系の活性化を介して細胞膜を傷害することにより、細胞膜上の電位依存性ナトリウムチャネルが消失して電気伝導が障害され、運動麻痺が惹起されるという機序が推測されている⁴³⁾。また、抗 GM1 抗体が神経終末からの神経伝達物質の放出を阻害すること⁴⁴⁾や、運動神経・筋共培養系に抗 GM1 抗体を適用することで細胞の自発発火、終板電位や筋の自動収縮が抑制されたという報告もある⁶⁰⁾。このように、抗 GM1 抗体による神経伝導の阻害に対するナトリウムチャネルの関与については多数報告されているが、神経終末において神経伝達物質の遊離を担う VDCCs と、抗グングリオシド抗体の関連性について検討した報告は非常に少ないのが現状である。

VDCCs は 6 回膜貫通部 (S1-S6) を基本とした α_1 サブユニットを 1 つの単位とした 4 量体として構成される。この膜貫通部の S5 と S6 の細胞外リンカー領域には P 領域と呼ばれるイオン選択フィルターが存在し、カルシウムイオンを選択的に通過させる⁶¹⁾。これに加え、 β サブユニット、 α_2/δ サブユニット、

γ サブユニットが α サブユニットの近傍にあってカルシウムイオンの流入やチャネルの開閉確率の調節を担っている。

VDCCs には、いくつかのサブタイプの存在が明らかになっており、 α サブユニットの遺伝子型の相違により L- type、N- type、P/Q- type、R- type、T- type の 5 種類に大別される。これらのチャネルは、そのサブタイプにより発現分布が異なり、L- type、T- type は骨格筋や心筋に、N- type、P/Q- type、R- type は脳や神経に広く分布する⁵⁹⁾。骨格筋の T 管に多量に存在する L- type は、電位を感知するセンサーとして脱分極を感知し、骨格筋の収縮を起こす。N- type は主に神経細胞のシナプス前膜部に局在し、ACh の遊離に必須なカルシウムイオンの流入経路となっている。P/Q- type は主に神経細胞のシナプス前膜部に N- type より多量に存在し、ACh の遊離に中心的役割を果たしていると考えられている⁵⁹⁾。

本研究では、ラット胎児の細胞から作製した神経・筋接合部モデルを用いて、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が筋活動電位に及ぼす影響を検討した。また、神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) により神経様細胞に分化させた PC12 細胞を用いて、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が VDCCs 電流に及ぼす影響をパッチクランプ法で検討した。

方 法

1. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体がラット培養神経・筋接合部モデルの自発性筋活動電位に及ぼす影響

1.1 実験材料

実験には以下の試薬・器具を使用した。また、以下に記載のない汎用試薬については、すべて和光純薬製の試薬特級品を使用した。

NaH₂PO₄・H₂O (MERCK)

Penicillin (明治製菓)

Streptomycin (明治製菓)

0.2 μ m メンブランフィルター (Minisart Sartorius)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、GIBCO)

Medium199 (GIBCO)

Fetal Calf Serum (FCS、SIGMA)

Fibroblast Growth Factor acidic (FGF、SIGMA)

Insulin (SIGMA)

塩化ベンザルコニウム溶液 (武田薬品工業)

芯入りガラス管 (GD - 1、NARISIGE)

1.2 試薬の調製

Tyrode 液

NaCl 8 g、KCl 0.2 g、CaCl₂ 0.2 g、MgCl₂・6H₂O 0.1 g、NaH₂PO₄・H₂O 0.05 g、NaHCO₃ 1.0 g、D(+)-Glucose 1.0 g、Penicillin 0.1 g および Streptomycin 0.1 g を精製水に溶解して全量 1 L とし、0.2 μ m メンブラン

フィルターを用いて濾過滅菌した。

Ca²⁺, Mg²⁺ Free (CMF)-Tyrode 液

Tyrode 液の組成から CaCl₂ および MgCl₂·6H₂O を除き、0.2 μm メンブランフィルターを用いて無菌的に調製した。

培養液

DMEM、Medium199 および FCS を 67 : 23 : 10 の割合で混和し、FGF、Insulin をそれぞれ 0.25 ng/mL、10 mg/mL となるように加え、無菌的に調製した。

外用液

培養液より 10% FCS、10% FGF および Insulin を除き、無菌的に調製した。

1.3 神経・筋接合部モデルの作製

雌性 Wistar 系ラット（妊娠 17 日齢）を diethylether で深麻酔し、0.1% 塩化ベンザルコニウム溶液で消毒した。クリーンベンチ内で無菌的に開腹して胎児を子宮袋ごと摘出し、Tyrode 液を満たしたシャーレに移した。実体顕微鏡下で胎児の皮膚を取り除き、四肢の大腿筋を採取した。次に、同じ胎児の内臓を除去し、脊髄を摘出した。

脊髄を顕微鏡下で冠状に切断し、CMF-Tyrode 液で洗浄した。また、大腿筋はシャーレ内で細切し、脊髄と同様に CMF-Tyrode 液で洗浄した。これらの組織は個別に 4°C、1500 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去後、0.1% collagenase / CMF-Tyrode 溶液 4 mL を添加し、温浴内で 37°C、23 分間振とうしながらインキュベートした。再び CMF-Tyrode 液で遠心洗浄し、ピペッテ

イングを行った後、セルストレーナーを用いて濾過精製した。得られた筋細胞と脊髄切片を培養液の入った collagen coated シャーレ（ ϕ 35 mm）に移し、CO₂ インキュベーター（37℃、95%O₂、5%CO₂）で約 1 週間共培養した。培養液は 1 日おきに交換した。

1.4 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が自発性活動電位に及ぼす影響に関する検討

記録用電極は、芯入りガラス管を用いて、微小電極作製機（PN - 30、NARISIGE）により作製した。電極は、先端内径が 1 μ m 以下のものを使用した。

筋活動電位の測定は、微小電極法で行った。実験開始時にシャーレ内の培養液を、95%O₂ + 5%CO₂ で飽和した外用液で灌流、置換した。筋活動電位は、自発的に動いている筋肉内に電極を刺入して、3 M KCl を満たした微小ガラス管電極内に挿入した白金線を介して Microelectrode Amplifier（MEZ - 8301、日本光電）で増幅し、Memory Oscilloscope（VC - 11、日本光電）により記録した。また、データ収集および解析は専用ソフト（pCLAMP6、Axon Instruments、Inc）を用いて行い、測定時のシャーレは Microwarm Plate により 34 \pm 1℃に保温した。安定した収縮が得られた神経・筋培養細胞に、マイクロピペットで IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体（1:200）1 mL を適用した。活動電位の測定終了後は、95%O₂ + 5%CO₂ で飽和した外用液で 5 分間シャーレ内を灌流することにより、抗体を洗浄除去した。また、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用 90 秒後において、95%O₂ + 5%CO₂ で飽和した外用液で 5 分間シャーレ内を灌流し、抗体を洗浄除去することによる活動電位の変化についても測定を実施した。

2. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が PC12 細胞の VDCCs に及ぼす影響

2.1 実験材料

実験には以下の試薬・器具を使用した。また、以下に記載のない汎用試薬については、すべて和光純薬製の試薬特級品を使用した。

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、GIBCO)

Horse Serum (BIOSOURCE)

Fetal Calf Serum (FCS、SIGMA)

50 U・5 µg/mL penicillin-streptomycin (SIGMA)

collagen type I coated cover glass (IWAKI)

Nerve Growth Factor (NGF、SIGMA)

芯入ガラス管 (GD-1.5、NARISIGE)

2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES、同仁化学研究所)

O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetra acetic acid (EGTA、同仁化学研究所)

Glycine (SIGMA)

Rhodamine conjugate anti-rabbit IgG antibody (SIGMA)

2.2 試薬の調製

培養液

DMEM、Horse Serum および FCS を 85 : 10 : 5 の割合で混和し、penicillin-streptomycin が 50 U・5 µg/mL となるように添加して、無菌的に調製した。

記録用パッチ電極内容液

120 mM CsCl、20 mM Tetraethylammonium Chloride (TEA-Cl)、1 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、11 mM EGTA を 10 mM HEPES に溶解し、1 mol/L の CsOH で pH 7.35 に調整後、0.2 μ m メンブランフィルターを用いて無菌的に調製した。

記録用細胞外溶液

115 mM NaCl、20 mM TEA-Cl、10 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、10 mM Glucose、200 nM tetrodotoxin (TTX) を 20 mM HEPES に溶解し、1 mol/L の NaOH で pH 7.35 に調整後、0.2 μ m メンブランフィルターを用いて無菌的に調製した。

2.3 細胞培養

PC12 細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク）は、1 週間ごとに継代培養を行った。実験の際には、破碎した collagen type I coated cover glass を敷き詰めた培養シャーレを準備し、NGF を終濃度が 100 ng/mL となるように添加した培養液で分化誘導させた細胞を使用した。培養液は 2 日毎に NGF と共に全量を交換し、実験には NGF の適用開始後 3～6 日目までの細胞を用いた。

2.4 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が PC12 細胞の VDCCs に及ぼす影響

パッチ電極は borosilicate 製の芯入ガラス管から、微小電極作製装置（PP-830、NARISIGE）を用いて作製した。なお、電極は先端部をマイクロフォージ（MF-830、NARISIGE）を用いてヒートポリッシュしたもので、かつ抵抗が 4.0～9.0 M Ω となったものを使用した。

VDCCs 電流の測定は室温下で行い、測定用アンプに Axopatch 1D patch clamp amplifier (Axon Instruments) および MultiClamp 700A patch clamp amplifier (Axon Instruments) を使い、測定・記録・解析用ソフトウェアとして、それぞれ pCLAMP 6.02 (Axon Instruments) および PCLAMP 8.2 (Axon Instruments) を使用した。VDCCs 電流測定時におけるサンプリング周波数は 2 kHz に設定し、高周波ノイズを除去するためのローパスフィルターのカットオフ周波数は 1 kHz (-3 db) とした。測定はガラス電極先端を細胞膜表面に近づけ、ギガオームシール形成後、注射筒により陰圧をかけて whole cell を形成した。VDCCs 電流の記録時は、保持電位を -80 mV とし、-80 mV から +60 mV まで 10 mV ずつステップ状に 150 msec 脱分極させた時に生じるイオンチャネル電流を測定した。

IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体適用前における測定は 1 分間隔で実施したが、抗体適用直後のみ 30 秒後に 1 回測定し、その後は再び 1 分間隔で測定した。抗体 (1:100、1 mL) はピペットマンを用いて直接チャンバー内に適用し、抗体による作用がプラトーに達したことを確認後、5 分間洗浄操作を実施した。

実験は 4 回実施し、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用前および適用後における電流密度 (pA/pF) の最大値 (ピーク電流) の平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) を算出した。有意差検定は、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用前および適用後の各処置において F 検定により分散を検定し、等分散の場合は Student、不等分散の場合は Aspin-Welch の t-test を実施した。有意水準は 5% 未満とした。

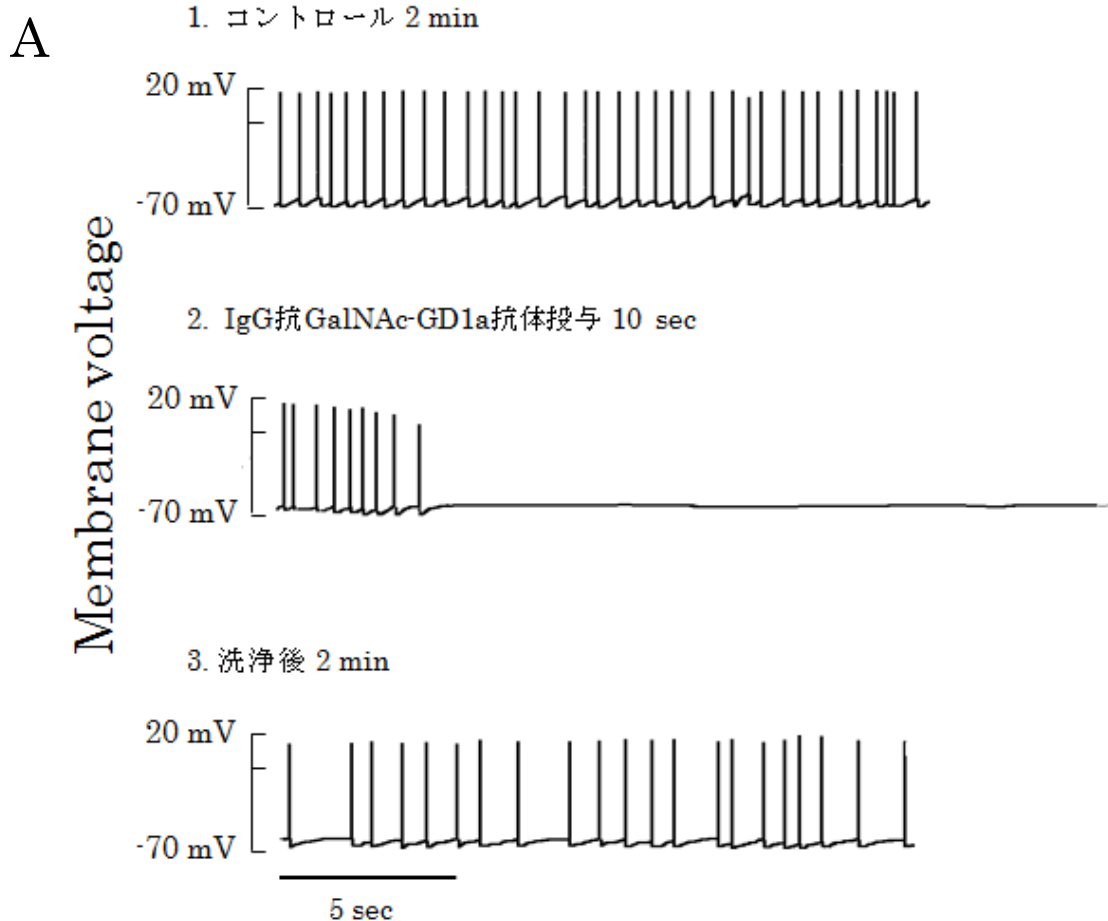
2.5 PC12 細胞における GalNAc-GD1a の分布に関する免疫組織化学的検討

細胞を 4% PFA (2.2 参照) で固定し、Blocking 液 (2.2 参照) で室温下、30 分間インキュベートした。0.01 M PBS で 3 回洗浄した後、50 mM glycine を含む 0.01 M PBS で室温下、30 分間インキュベートした。0.01 M PBS で 3 回洗浄した後、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体 (1:100) を室温下、1 時間反応させた。0.01 M PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体として Rhodamine conjugate anti-rabbit IgG antibody (1:200) を室温で 1 時間反応させた。0.01 M PBS で 3 回洗浄した後、Aqua Poly/Mount (2.1 参照) を用いて封入し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (2.4.2 参照) で観察した。

結 果

1. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体がラット培養神経・筋接合モデルの自発性筋活動電位に及ぼす影響

IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用前（コントロール）におけるラット培養神経・筋接合モデルの自発性筋活動電位は、静止電位は約 -70 mV であり、発火頻度は 5 秒間あたり 10～15 回であった（図. 17A）。この自発性筋活動電位に対して IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体（1 : 200）を適用すると、直後より自発発火頻度は速やかに減少し、適用 15 秒後には完全に消失した。抗体適用 1 分後に標本を洗浄し、抗体を除去することによって、その約 1 分後から筋活動電位の回復傾向が認められたが、発火頻度は 5 秒間あたり 4～9 回であり、コントロール値までは回復しなかった（図. 17A,B）。



B

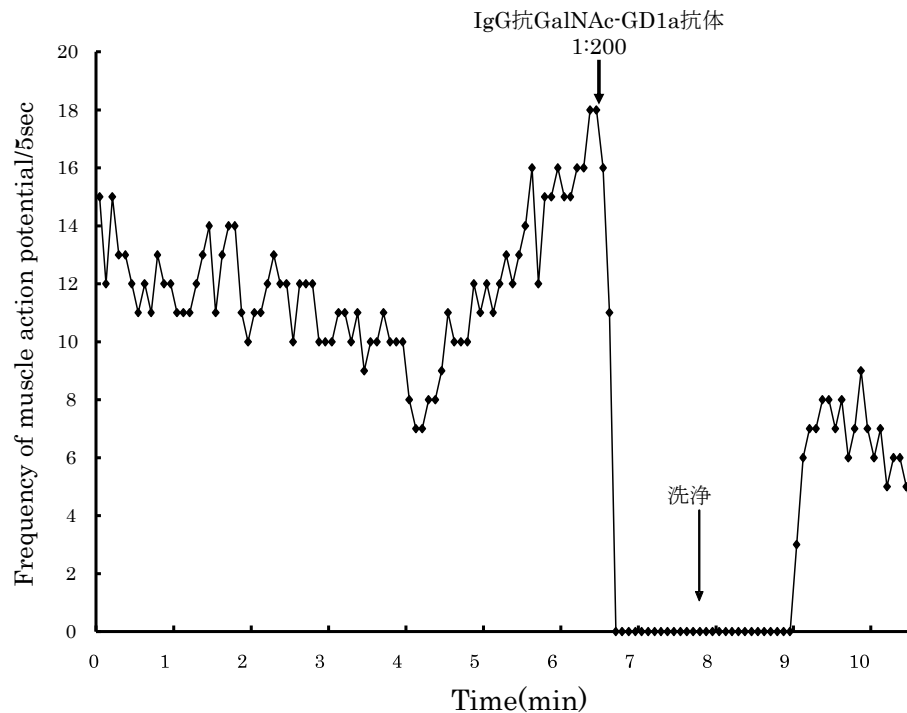


図. 17 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が自発性筋活動電位に及ぼす影響

2. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が PC12 細胞の VDCCs に及ぼす影響

1) PC12 細胞の VDCCs 電流に及ぼす影響

PC12 細胞への IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体 (1:100) の適用により、VDCCs 電流の抑制および洗浄による回復が確認された (図. 18)。IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が VDCCs 電流に及ぼす影響について経時的に観察したところ、適用直後から速やかな抑制が認められ、電流量はコントロール群の約 70%の値で推移した。適用 2 分 30 秒後における抗体の洗浄除去により、この抑制は回復傾向を示し、洗浄から 4~5 分後には抗体の適用前値にまで復帰した (図. 19)。また、コントロール群におけるピーク電流値 (-11.97 ± 2.73 pA) は、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用により -8.18 ± 1.81 pA となり、 $30.6 \pm 2.5\%$ の有意な抑制がみられた (図. 20)。

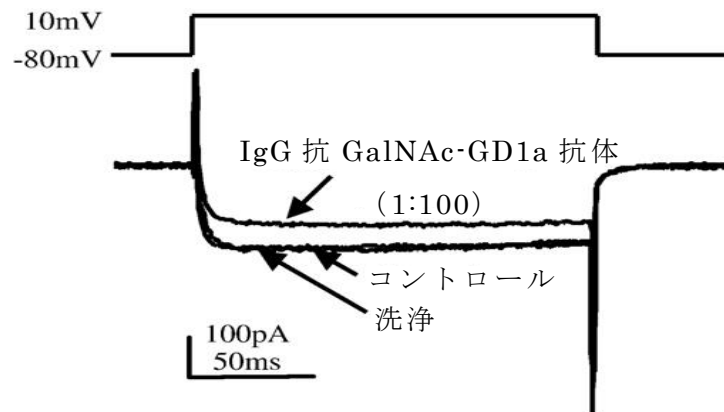


図. 18 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体投与後の VDCCs 電流

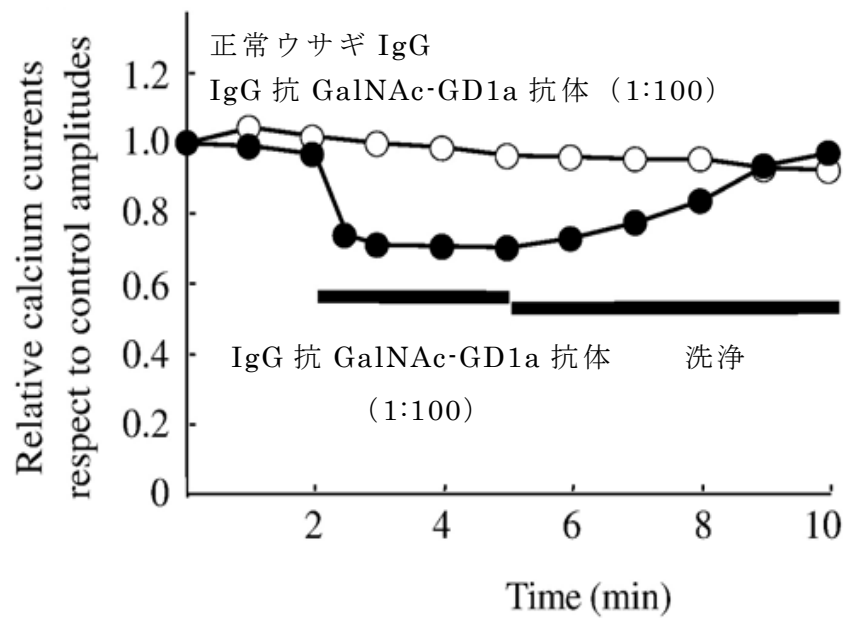


図. 19 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体投与時の VDCCs 電流の経時的変化

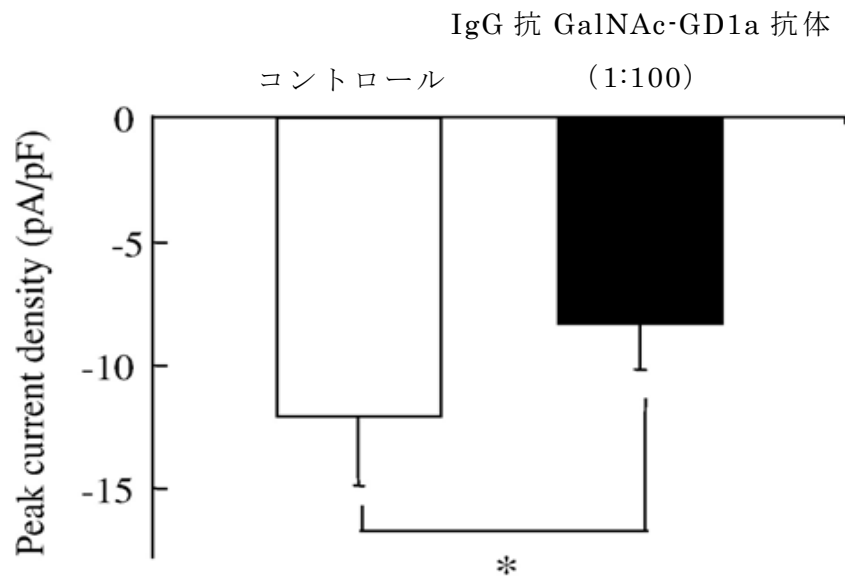


図. 20 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体によるピーク電流値の変化

2) IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による PC12 細胞の染色

PC12 細胞における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合部位 (図. 21A) は、微分干渉で観察した細胞体像 (図. 21B) と一致して発現した (図. 21C)。

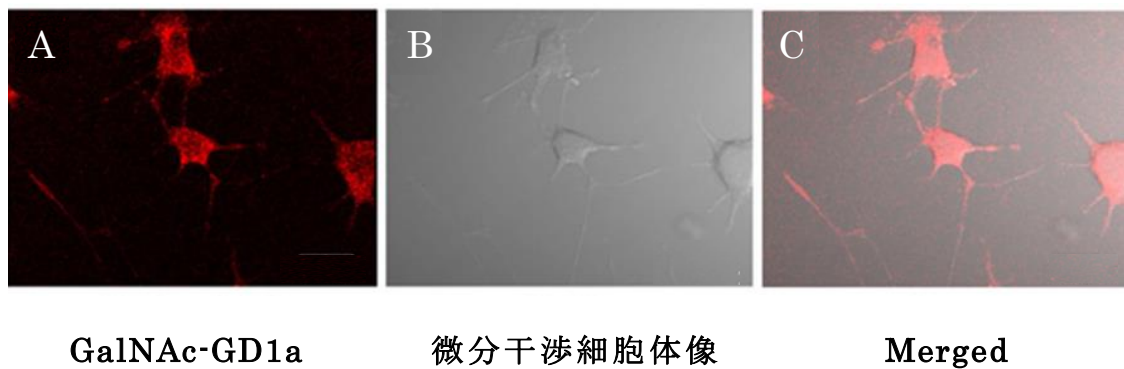


図. 21 IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による PC12 細胞の染色

考 察

本章では、作製した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が筋活動電位、あるいは VDCCs 電流に及ぼす影響について、電気生理学的に検討した。

抗体の適用前におけるラット培養神経・筋接合モデルの自発性筋活動電位は、静止電位が約 -70 mV、自発発火頻度が 5 秒間あたり 10~15 回であった。この自発性筋活動電位に対する IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用により、自発発火の速やかな消失と、抗体の洗浄・除去による自発発火の回復性が認められた。従って、本検討結果から、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体はラット神経・筋接合モデルの自発性筋活動電位を抑制することが明らかとなった。また、ラット神経・筋接合部における GalNAc-GD1a の発現は、主に前シナプスの運動神経にみられたことから、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による自発性筋活動電位の抑制は、筋肉や運動終板側への作用ではなく、運動神経に作用したことによる神経伝達の障害が原因であると考えられる。末梢神経には、中枢神経系に存在する血液脳関門と同様の防御機構である血液神経関門が存在するが、構造的には強固でなく、アルブミン、IgG といった分子量の大きなタンパクでも神経内膜部まで侵入可能である^{62,63)}。運動神経終末の神経・筋接合部も血液神経関門が脆弱なため、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の作用を受けやすいことが推測される。従って、本研究でみられた自発性筋活動電位の抑制は、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が神経内膜部へ侵入し、前シナプスに発現している GalNAc-GD1a に結合した結果として生じたものと考えられる。

PC12 細胞はラット副腎髄質クロム親和性褐色細胞腫 (pheochromocytoma) に由来し、NGF の適用により神経様細胞に分化して VDCCs を発現するという特徴を有する⁶⁴⁾。本章では、この細胞を用いて IgG 抗 GalNAc-GD1a

抗体が VDCCs 電流に及ぼす影響について、パッチクランプ法を用いて検討した。パッチクランプ法は、イオンチャネル分子の動きを、それを通過するイオン電流として計測する方法であり、目的に応じてセルアタッチ法やインサイダーアウト法など複数の手法が知られている。今回の研究では、全細胞膜を流れるイオン電流を記録するホールセル・パッチクランプ法を用いた。

PC12 細胞へ IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を適用することにより、VDCCs 電流の速やかな抑制と、抗体の洗浄・除去による回復が認められた。また、PC12 細胞に対して IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体を用いて免疫組織学的検討を行ったところ、PC12 細胞の細胞体全域に GalNAc-GD1a の発現が認められた。このことより、PC12 細胞における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による VDCCs 電流の抑制は、細胞表面の GalNAc-GD1a との抗原抗体反応により発現したものと考えられる。VDCCs は神経・筋接合部のシナプス前膜にも存在し、細胞内へのカルシウムイオンの流入を介して ACh を放出させ、筋肉を収縮させる。従って、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による VDCCs の抑制は、カルシウムイオンの流入阻害に起因した ACh の遊離抑制を惹起し、最終的に GBS における筋力低下や運動障害の原因となることが推測される。このことは、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体価が上昇した GBS 患者血清を神経・筋接合部に適用した電気生理学的検討において、筋活動電位が抑制された⁵⁸⁾ことから支持される。また、抗 GM1 および抗 GD1a モノクローナル抗体を用いた研究においては、抗体が補体非依存性にカルシウムチャネルを阻害することが確認されている⁴⁴⁾。これらの報告は、種々の抗ガングリオシド抗体が VDCCs の阻害により筋収縮を抑制する可能性を示したものであるが、本章の研究結果から、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体はこの機序により、ACh の遊離抑制を介して GBS の発症に関与していること

が推測される。

結 論

1. 神経組織を用いた GalNAc-GD1a の局在性に関する検討において、GalNAc-GD1a は、ウシ脊髄では運動神経に局限して発現していた。ラット脊髄では運動神経および感覚神経のいずれにも発現が認められたが、感覚神経での発現はランビエ絞輪に局限していたのに対し、運動神経ではランビエ絞輪およびその付近の軸索にまで広がって発現していた。また、ラットの神経・筋接合部においては主に前シナプスである運動神経に発現しており、P/Q 型および N 型 VDCCs と共局在していることが明らかとなった。
2. IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が自発性筋活動電位ならびに VDCCs 電流に及ぼす影響に関する検討では、ラット培養神経・筋接合モデルにおける自発性筋活動電位は、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の適用によって顕著に抑制された。また IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体は、PC12 細胞表面に存在する GalNAc-GD1a と結合することにより VDCCs 電流を有意に抑制した。従って、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体による自発性筋活動電位の抑制作用には、VDCCs 電流の抑制による ACh の遊離阻害が関与していることが示唆される。

IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が関与する GBS において、抗体の神経内膜部への侵入・結合は、GalNAc-GD1a が広範囲に発現している運動神経を中心に展開されることが、発症要因として関与している可能性が考えられる。また運動神経終末部において、GalNAc-GD1a は P/Q 型、N 型 VDCCs と共局在していたこと、および IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体が VDCCs 電流の抑制作用を示したこ

とから、GalNAc-GD1a と IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の抗原抗体反応が、共局在する VDCCs に対して器質的あるいは機能的な影響を及ぼすことによりカルシウムイオンの流入を阻害し、結果として ACh の遊離抑制を介した四肢筋力低下などの運動神経障害を惹起する可能性がある。

しかし、運動神経終末における標的ガングリオシド抗原と VDCCs との関連性については、不明な点も多い。本研究で明らかとなった運動神経終末における IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体によるカルシウムチャネルの阻害は、運動神経障害を主徴とする GBS の病態の一部を形成していると推測されるが、実際の AMAN 症例では、現時点において神経・筋接合部の伝導・伝達障害を示す電気生理学的所見は確認されていない⁶⁵⁾。従って、抗ガングリオシド抗体、カルシウムチャネル機能および GBS の発症機序の関連性についてより詳細な知見を得るためには、GBS 患者における神経・筋接合部の電気生理学的検討を中心とした臨床症例の評価・研究が必要である。

最近の知見として、2 種類の異なったガングリオシド抗原を質量比 1 : 1 の割合で混合して作製したガングリオシド複合体に特異的に反応する抗体が、GBS およびフィッシャー症候群において検出されている^{66,67)}。一例として、単独の GM1 あるいは GalNAc-GD1a には反応せず、GM1 と GalNAc-GD1a の複合抗原にのみ特異的に反応を示す抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体の存在が、GBS 患者の一部に検出されている⁶⁸⁾。また、ガングリオシドと抗ガングリオシド抗体の反応性は、ホスファチジン酸などのリン脂質をガングリオシドに混合することで抗体活性が増強する場合があることが報告されている⁶⁹⁾。従って、単独のガングリオシドに対しては陰性反応である GBS 患者血清でも、この混合処置により陽性反応に転じることがある⁶⁹⁾。逆にリン脂質の中でもスフィンゴミエリン

との混合抗原では、抗体活性が減弱することが報告されている⁷⁰⁾。これらのことから、抗ガングリオシド抗体が陰性と判定された GBS 症例についても、その発症における抗体の関与は安易に否定できないことから、再度詳細な検討が必要な症例も存在することが推測される。

このように、GBS における抗ガングリオシド抗体と神経障害作用の関連性は明らかになりつつある。しかし、前述のように、ガングリオシドと抗ガングリオシド抗体の反応性は各種リン脂質の存在により影響を受けるため、これまでに確認されていない未知の抗ガングリオシド抗体が存在する可能性がある。新しい抗ガングリオシド抗体の発見・同定は、GBS 診断マーカーのスペクトラムを広げる非常に有効な手段となる。また、ガングリオシドの生体内での局在や役割、イオンチャネルとの関係を明らかにすることは、抗ガングリオシド抗体が神経障害を引き起こす原因解明に重要であり、今後の継続的な検討が必要と考えられる。

謝 辞

本論文の主査を御願ひ致しました薬剤学研究室・渡邊善照教授、副査を御願ひ致しました薬品分析化学研究室・知久馬敏幸教授、薬品作用学教育堀口研究室・堀口よし江教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に際し、終始丁寧な御指導、ご鞭撻を賜り、本論文の御校閲を賜りました、薬品作用学教育田口研究室・田口恭治教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、多大な御協力頂きました奥羽大学薬理学研究室・阿部賢志講師、がん研有明病院薬剤部・川上和宜先生、薬品作用学教育田口研究室研究生・堀田紗綾子先生、ガングリオシドを提供して頂いた有賀敏夫先生に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Yuki N, Kuwabara S; Axonal Guillain-Barré syndrome: carbohydrate mimicry and pathophysiology. *J Peripher Nerv Syst*, **12**, 238-249 (2007)
- 2) Landry O; Note sur la paralysie ascendante aiguë. *Gaz Hebdom Méd Chir*, **6**, 472-474, 486-488 (1859)
- 3) Guillain G, Barré J-A, Strohl A; Sur un syndrome de radiculo-névrite avec hyperalbuminose de liquid céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux. *Bull Mém Soc Méd Hôp Paris*, **40**, 1462-1470 (1916)
- 4) Hughes RA, Cornblath DR; Guillain-Barré syndrome. *Lancet*, **366**, 1653-1666 (2005)
- 5) van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC; Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol*, **7**, 939-950 (2008)
- 6) 荻野美恵子, 斎藤豊和, 有村公良, 納光弘; 厚生労働省特定疾患対策研究事業、免疫性神経疾患に関する調査研究班. 平成 12 年度研究報告書, 99-101 (2001)
- 7) Rees JH, Thompson RD, Smeeton NC, Hughes RA; Epidemiological study of Guillain-Barré syndrome in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **64**, 74-77 (1998)
- 8) Asbury AK, Arnason BG, Adams RD; The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine*, **48**, 173-215 (1969)
- 9) Feasby TE, Gilbert JJ, Brown WF, Bolton CF, Hahn AF, Koopman WF,

Zochodne DW; An acute axonal form of Guillain-Barré polyneuropathy.
Brain, **109**, 1115-1126 (1986)

10) Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T; Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis.
Neurology, **40**, 1900-1902 (1990)

11) McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, Zhaori G, Liu Y, Jou LP, Liu TC, Gao CY, Mao JY, Blaser MJ, Mishu B, Asbury AK; Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol*, **33**, 333-342 (1993)

12) McKhann GM, Cornblath DR, Ho T, Griffin JW, Li CY, Bai AY, Wu HS, Yei QF, Zhang WC, Zhaori Z, Jiang Z, Asbury AK; Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. *Lancet*, **338**, 593-597 (1991)

13) Griffin JW, Li CY, Ho TW, Xue P, Macko C, Gao CY, Yang C, Tian M, Mishu B, Cornblath DR; Guillain-Barré syndrome in northern China. The spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases.
Brain, **118**, 577-595 (1995)

14) Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR, Macko C, McKhann GM, Asbury AK; Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, **39**, 17-28 (1996)

15) Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RA, Zielasek J, Hartung HP, Toyka KV, Swan AV; Electrophysiological classification of Guillain-Barré syndrome: clinical associations and outcome. Plasma

Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group. *Ann Neurol*, **44**, 780-788 (1998)

- 16) Rees JH, Gregson NA, Hughes RA; Anti-ganglioside GM1 antibodies in Guillain-Barré syndrome and their relationship to Campylobacter jejuni infection. *Ann Neurol*, **38**, 809-816 (1995)
- 17) Ho TW, Mishu B, Li CY, Gao CY, Cornblath DR, Griffin JW, Asbury AK, Blaser MJ, McKhann GM; Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to Campylobacter jejuni infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, **118**, 597-605 (1995)
- 18) Kuwabara S, Yuki N, Koga M, Hattori T, Matsuura D, Miyake M, Noda M; IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, **44**, 202-208 (1998)
- 19) Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, Hattori T, Koga M, Yuki N; Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and Campylobacter jejuni infection in Japan. *Ann Neurol*, **48**, 624-631 (2000)
- 20) Sekiguchi Y, Uncini A, Yuki N, Misawa S, Notturmo F, Nasu S, Kanai K, Noto Y, Fujimaki Y, Shibuya K, Ohmori S, Sato Y, Kuwabara S; Antiganglioside antibodies are associated with axonal Guillain-Barré syndrome: a Japanese-Italian collaborative study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **83**, 23-28 (2012)
- 21) Irie S, Saito T, Kanazawa N, Nukazawa T, Ito H, Ogino M, Kowa H; Relationships between anti-ganglioside antibodies and clinical

characteristics of Guillain-Barré syndrome. *Intern Med*, **36**, 607-612 (1997)

22) Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FG, Herbrink P, Schmitz PI, de Klerk MA, van Doorn PA; The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. *Neurology*, **51**, 1110-1115 (1998)

23) Mori M, Kuwabara S, Miyake M, Dezawa M, Adachi-Usami E, Kuroki H, Noda M, Hattori T; Haemophilus influenzae has a GM1 ganglioside-like structure and elicits Guillain-Barré syndrome. *Neurology*, **52**, 1282-1284 (1999)

24) Susuki K, Odaka M, Mori M, Hirata K, Yuki N; Acute motor axonal neuropathy after Mycoplasma infection: Evidence of molecular mimicry. *Neurology*, **62**, 949-956 (2004)

25) Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T; A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med*, **178**, 1771-1775 (1993)

26) Kusunoki S, Kaida K, Ueda M; Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: new aspects of research. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 441-444 (2008)

27) Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M; Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and Campylobacter jejuni

lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11404-11409 (2004)

- 28) Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Kamijo M, Hirata K; Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol*, **49**, 712-720 (2001)
- 29) Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N; Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol*, **54**, 383-388 (2003)
- 30) Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K; Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Sci*, **210**, 99-103 (2003)
- 31) Ilyas AA, Willison HJ, Quarles RH, Jungalwala FB, Cornblath DR, Trapp BD, Griffin DE, Griffin JW, McKhann GM; Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, **23**, 440-447 (1988)
- 32) Kaida K, Kusunoki S; Immune-mediated neuropathy and anti-glycolipid antibodies. *Brain Nerve*, **65**, 413-423 (2013)
- 33) Willison HJ, Yuki N; Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, **125**, 2591-2625 (2002)
- 34) Gregson NA, Jones D, Thomas PK, Willison HJ; Acute motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *J Neurol*, **238**, 447-451 (1991)
- 35) Visser LH, Van der Meché FG, Van Doorn PA, Meulstee J, Jacobs BC,

Oomes PG, Kleyweg RP, Meulstee J; Guillain-Barré syndrome without sensory loss (acute motor neuropathy). A subgroup with specific clinical, electrodiagnostic and laboratory features. Dutch Guillain-Barré Study Group. *Brain*, **118**, 841-847 (1995)

36) Kusunoki S, Chiba A, Kon K, Ando S, Arisawa K, Tate A, Kanazawa I; N-acetylgalactosaminyl GD1a is a target molecule for serum antibody in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, **35**, 570-576 (1994)

37) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I; Guillain-Barré syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a. *Brain*, **123**, 116-124 (2000)

38) Ho TW, Willison HJ, Nachamkin I, Li CY, Veitch J, Ung H, Wang GR, Liu RC, Cornblath DR, Asbury AK, Griffin JW, McKhann GM; Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, **45**, 168-173 (1999)

39) Kusunoki S, Iwamori M, Chiba A, Hitoshi S, Arita M, Kanazawa I; GM1b is a new member of antigen for serum antibody in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*, **47**, 237-242 (1996)

40) Yuki N, Ang CW, Koga M, Jacobs BC, van Doorn PA, Hirata K, van der Meché FG; Clinical features and response to treatment in Guillain-Barré syndrome associated with antibodies to GM1b ganglioside. *Ann Neurol*, **47**, 314-321 (2000)

41) Lardone RD, Yuki N, Odaka M, Daniotti JL, Irazoqui FJ, Norez GA; Anti-GM1 IgG antibodies in Guillain-Barré syndrome: fine specificity is

associated with disease severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **81**, 629-633 (2010)

- 42) Susuki K, Baba H, Tohyama K, Kanai K, Kuwabara S, Hirata K, Furukawa K, Furukawa K, Rasband MN, Yuki N; Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia*, **55**, 746-757 (2007)
- 43) Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, Baba H, Yuki N; Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci*, **27**, 3956-3967 (2007)
- 44) Buchwald B, Zhang G, Vogt-Eisele AK, Zhang W, Ahangari R, Griffin JW, Hatt H, Toyka KV, Sheikh KA; Anti-ganglioside antibodies alter presynaptic release and calcium influx. *Neurobiol Dis*, **28**, 113-121 (2007)
- 45) Browne DL, Ganchar ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M; Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet*, **8**, 136-140 (1994)
- 46) Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL; Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-1073 (1989)
- 47) Kim YI; Lambert-Eaton myasthenic syndrome: evidence for calcium

channel blockade. *Ann N Y Acad Sci*, **505**, 377-379 (1987)

- 48) Kim YI, Neher E; IgG from patients with Lambert-Eaton syndrome blocks voltage-dependent calcium channels. *Science*, **239**, 405-408 (1988)
- 49) Lopez PH, Schnaar RL; Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*, **19**, 549-557 (2009)
- 50) Kaida K, Ariga T, Yu RK; Antiganglioside antibodies and their pathophysiological effects on Guillain-Barré syndrome and related disorders a review. *Glycobiology*, **19**, 676-692 (2009)
- 51) Kaida K, Kusunoki S; Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: mini-review. *J Neuroimmunol*, **223**, 5-12 (2010)
- 52) Ogawa-Goto K, Funamoto N, Ohta Y, Abe T, Nagashima K; Myelin gangliosides of human peripheral nervous system: an enrichment of GM1 in the motor nerve myelin isolated from cauda equina. *J Neurochem*, **59**, 1844-1849 (1992)
- 53) Svennerholm L, Boström K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Månsson JE, Rynmark BM; Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta*, **1214**, 115-123 (1994)
- 54) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I; GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody. *Neurology*, **61**, 465-470 (2003)
- 55) Brown WF, Snow R; Patterns and severity of conduction abnormalities

in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **54**, 768-774 (1991)

56) Sheikh KA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Griffin JW; The distribution of ganglioside-like moieties in peripheral nerves. *Brain*, **122**, 449-460 (1999)

57) Lanuza MA, Garcia N, González CM, Santafé MM, Nelson PG, Tomas J; Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *J Neurosci Res*, **73**, 10-21 (2003)

58) Taguchi K, Ren J, Utsunomiya I, Aoyagi H, Fujita N, Ariga T, Miyatake T, Yoshino H; Neurophysiological and immunohistochemical studies on Guillain-Barré syndrome with IgG anti-GalNAc-GD1a antibodies-effects on neuromuscular transmission. *J Neurol Sci*, **225**, 91-98 (2004)

59) 赤羽 悟美, 中瀬 古寛子; 高閾値活性化型電位依存性 Ca^{2+} チャネル-L, P/Q, N, R 型 Ca^{2+} チャネル. 医学のあゆみ別冊, 49-63 (2005)

60) Kobayashi T, et al, *Can J Neurol Sci*, **20** (Suppl 4), S134 (1993)

61) Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S; Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, **328**, 313-318 (1987)

62) Arvidson B; Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta Neuropathol*, **37**, 35-41 (1977)

63) Mato M, Ookawara S, Sugamata M, Aikawa E; Evidence for the possible

function of the fluorescent granular perithelial cells in brain as scavengers of high-molecular-weight waste products. *Experientia*, **40**, 399-402 (1984)

64) Streit J, Lux HD; Voltage dependent calcium currents in PC12 growth cones and cells during NGF-induced cell growth. *Pflugers Arch*, **408**, 634-641 (1987)

65) Kuwabara S, Kokubun N, Misawa S, Kanai K, Iose S, Shibuya K, Noto Y, Mori M, Sekiguchi Y, Nasu S, Fujimaki Y, Hirata K, Yuki N; Neuromuscular transmission is not impaired in axonal Guillain Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **82**, 1174-1177 (2011)

66) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S; Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, **56**, 567-571 (2004)

67) Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S; Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **77**, 1043-1046 (2006)

68) Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, Kamakura K, Ueda-Sada M, Arita M, Motoyoshi K, Kusunoki S; GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome. *Neurology*, **71**, 1683-1690 (2008)

69) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, Hitoshi S, Kanazawa I; 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 (2003)

- 70) Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, Kusunoki S; Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol*, **159**, 129-132 (2005)

上記の内容は、以下の雑誌に投稿した。

- 1) Nagaoka T, Hotta S, Chiba T, Utsunomiya I, Abe K, Yoshino H, Koshikawa C, Taguchi K; IgG anti- GalNAc-GD1a antibodies bind to neuromuscular junctions of rat hemi-diaphragm. *Muscle Nerve*, **46**, 705-710 (2012)
- 2) Nakatani Y, Nagaoka T, Hotta S, Utsunomiya I, Yoshino H, Miyatake T, Hoshi K, Taguchi K; IgG anti- GalNAc-GD1a antibody inhibits the voltage-dependent calcium currents in PC12 pheochromocytoma cells. *Exp Neurol*, **204**, 380-386 (2007)