

Guillain-Barré 症候群、Fisher 症候群における 抗 GM1、抗 GQ1b 抗体の臨床的有用性

Clinical utility of anti-GM1 and anti-GQ1b antibodies in
Guillain-Barré and Fisher syndromes

お だか まさ あき あき やま ま ゆみ ゆう き のぶ ひろ
小 鷹 昌 明¹⁾: 秋 山 真 弓²⁾: 結 城 伸 泰³⁾
Masaaki ODAKA Mayumi AKIYAMA Nobuhiro YUKI

要 旨

抗グングリオシド抗体は、Guillain-Barré 症候群 (GBS) や Fisher 症候群 (FS) の補助診断マーカーとして一部の施設や商業検査機関で測定され、その結果が臨床の現場で活用されている。しかしながら、国内では検査用のキットがなく、一部の施設でしか検査できず、迅速かつ簡便に抗体を調べられなかった。GBS と FS の診断補助用に抗 GM1 抗体、抗 GQ1b 抗体の検出キットを開発し、その有用性について検討した。IgG 抗 GM1 抗体の陽性率は GBS (n=95) で 49%、対照群で 5% 以下であった。IgG 抗 GQ1b 抗体は FS (n=55) の 85% が陽性で、対照群全例が陰性であった。発症 1 週以内の抗体陽性率は GBS (58%)、FS (89%) とともに、髄液蛋白細胞解離 (GBS 32%、FS 20%) と比べて高かった。本キットを用いることによって、GBS や FS の診断の補助に有用な抗グングリオシド抗体測定が、多くの施設で測定できるようになった。

はじめに

Guillain-Barré 症候群 (GBS) は急性に発症する四肢筋力低下と腱反射消失を主徴とする自己免疫性末梢神経疾患である。未治療でも自然軽快する予後良好の疾患と考えられていたが、1990 年代に行われたイギリスの調査では、GBS 発症 1 年後に 8% の患者が死亡、30% が何らかの後遺症を認め、走ることができるまでに回復した例はわずか 62% であった¹⁾。2001 年に行われた日本の調査においても、63% の患

者が発症前と比較して仕事や家庭生活、余暇活動のいずれかに支障を感じ、急性期を過ぎても長期間にわたって社会生活に制限を受けていた²⁾。発症 1 週以内の治療が有効であり³⁾、不幸な転帰を招かないためにも、早期に診断し適切な治療を行うことが望まれている。

GBS やその類縁疾患である Fisher 症候群 (FS) の急性期血清中において、各種グングリオシドと反応する自己抗体が検出されることがわかってきた。抗グングリオシド抗体は、先行感染病原体の構成分子と交叉反応性を有することや、検出される抗体の種類と神経の病変分布とが関連していることから、発症や病態に関わる物質として注目されてきている⁴⁾。抗グングリオシド抗体は、GBS や FS の発症時に最も抗体力価が高く、補助診断マーカーとして一部の施設や商業検査機関で測定されているが、一般の施設で迅速かつ簡便に検査できるキットはなかった。そこで、血清中の GM1 および GQ1b に対する IgG クラスの自己抗体を検出できるキットを新規に開発し、自己免疫性末梢神経疾患における有用性を検討する目的で臨床性能試験を行った⁵⁾。本稿では、キット開発の経緯を述べたうえで、実際の臨床的有用性について具体例を用いて紹介する。

I. IgG 抗 GM1、抗 GQ1b 抗体検出 キットの開発

1. 対象と方法

1) 対象

2002 年 11 月から 2004 年 7 月の間に、全国の医療

1) 獨協医科大学神経内科
〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
2) 株式会社シノテスト研究開発部
〒229-0011 神奈川県相模原市大野台 2-29-14
3) GBS ラボ
〒145-0064 東京都大田区上池台 3-9-5

1) Department of Neurology, Dokkyo Medical University
(Kitakobayashi 880, Mibu, Shimotsuga, Tochigi)
2) Shino-Test Corporation
(Oonodai 2-29-14, Sagamihara, Kanagawa)
2) GBS Laboratory
(3-9-5, Kami-ikedai, Ota, Tokyo)

機関から獨協医科大学神経内科および国立精神・神経センター国府台病院神経内科へ抗ガングリオシド抗体測定を依頼された症例の中で、本試験参加に関して書面による同意が得られた191例を対象とした。診断の内訳は、GBS 95例（男性49例、女性46例、1～83歳、中央値36歳）、FS 55例（男性34例、女性21例、7～80歳、中央値39歳）、疾患対照41例（慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー15例、筋萎縮性側索硬化症5例、その他の神経疾患21例）（男性24例、女性17例、16～82歳、中央値60歳）であった。正常対照として健康者105例（男性62例、女性43例、21～61歳、中央値36歳）の血清を用いた。GBSおよびFSの診断は、AsburyとCornblath⁶⁾およびOdakaら⁷⁾の基準に基づいて行った。GBSおよびFSは、神経症状出現から4週以内に血清が採取された症例のみを対象とした。

2) 抗ガングリオシド抗体検出キットの構成

新規に開発したキットは、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によりGM1またはGQ1bを抗原とし、血清中のIgG抗GM1抗体またはIgG抗GQ1b抗体を検出する定性試薬である。本キットは、抗原固相化プレート、前処理液（0.01% Tween20を含む10mMリン酸緩衝液、pH 7.4）、陽性対照、検体希釈液（10%ウマ血清、1%ウシ血清アルブミンを含む10mMリン酸緩衝液、pH 7.4）、酵素標識抗体（ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGポリクローナル抗体）、発色液（0.0225% 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、2.5mM過酸化水素）、反応停止液（0.7N硫酸）、洗浄液（0.05% Tween20を含む20mMトリス塩酸緩衝液、pH 7.6）により構成されている。抗原固相化プレートは、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルにGM1 10ngまたはGQ1b 50ngを固相化させた抗原固相化ウェルと、抗原を固相化させていない対照ウェルよりなる。

3) 抗ガングリオシド抗体の検出

前処理液を抗原固相化プレートの各ウェルに200μL分注し、室温で20分静置してプレートの前処理を行った。検体希釈液で1,000倍に希釈した血清と陽性対照を各ウェルに100μL分注し、4℃で一晩静置した。洗浄液で5回洗浄したのち酵素標識抗体を各ウェルに100μL分注し、37℃で3時間静置した。洗浄液で5回洗浄したのち発色液を各ウェルに100μL分注し、室温で30分間反応させた。反応

停止液を加えて発色反応を止めたのち、マイクロプレートリーダー（モデル680マイクロプレートリーダー、日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、日本）で波長450nmにおける吸光度を測定した。

抗原固相化ウェルと対照ウェルの吸光度差（ ΔOD ）を算出し、同時に測定した陽性対照の結果（ ΔOD_0 ）より下記式を用いてカットオフインデックス（COI）を算出した。COIとは本キットの判定に用いる単位である。陽性対照は事前にCOI表示値を設定しており、陽性対照を基準にして各血清のCOIを算出することで測定結果を標準化した。算出したCOIが1.0以上を陽性、0.4未満を陰性とし、0.4以上1.0未満を判定保留とした。

[計算式]

$$COI = \Delta OD \times (\text{陽性対照のCOI表示値}) / \Delta OD_0$$

4) 統計解析

統計学的処理はSPSS12.0J（エス・ピー・エス・エス株式会社、日本）を用い、抗ガングリオシド抗体陽性率と髄液蛋白細胞解離の頻度の比較には χ^2 検定を用いた。

2. 結果

1) 再現性

抗体力価の異なる2種の検体を用いてキットの再現性を検討した。同一アッセイ日で9回測定して同時再現性を、また異なる測定日で5回測定して日差再現性を求めた。IgG抗GM1抗体検出キット、IgG抗GQ1b抗体検出キットともに、同時再現性、日差再現性の変動係数が5%以下であった。

2) 臨床性能試験成績

IgG抗GM1抗体検出キットにより、GBS 95例中47例（49%）が陽性と判定された（表1）。疾患対照41例中2例（5%）で陽性と判定されたが、うち1例（運動ニューロン疾患）には30年前にGBS様症状があった。慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー15例、筋萎縮性側索硬化症5例では、全例が陰性と判定された。正常対照105例中103例（98%）が陰性と判定され、2例は判定保留であった。IgG抗GQ1b抗体検出キットにより、FS 55例中47例（85%）が陽性と判定された。疾患対照41例、正常対照105例では、全例が陰性と判定された。

3) 他のガングリオシドに対する抗体との比較

IgG抗GM1抗体検出キットの試験成績と他のガン

表1 抗ガングリオシド抗体検出結果⁵⁾

	GBS (n=95)	FS (n=55)	疾患対照 (n=41)	正常対照 (n=105)
IgG 抗 GM1 抗体				
陽性	47 (49%)	5 (9%)	2 (5%)	0
判定保留	3 (3%)	2 (4%)	0	2 (2%)
陰性	45 (47%)	48 (87%)	39 (95%)	103 (98%)
IgG 抗 GQ1b 抗体				
陽性	8 (8%)	47 (85%)	0	0
判定保留	0	0	0	0
陰性	87 (92%)	8 (15%)	41 (100%)	105 (100%)

GBS, Guillain-Barré 症候群 ; FS, Fisher 症候群

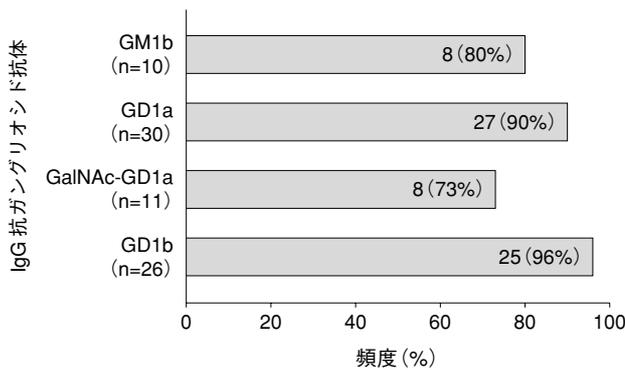


図1 他の抗ガングリオシド抗体陽性例における本キットでのIgG抗GM1抗体陽性率⁵⁾

グリオシド (GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GQ1b) に対する IgG クラスの抗体の測定結果を比較した。他の抗ガングリオシド抗体の測定は既報の方法⁸⁾で行った。本キットで IgG 抗 GM1 抗体が陰性で、かつ他の IgG 抗体が検出された GBS 症例が 8 例 (8%) あり、検出された抗体の内訳は抗 GQ1b 抗体 (4 例)、抗 GD1a 抗体、抗 GalNAc-GD1a 抗体 (ともに 3 例) などであった。特に、IgG 抗 GQ1b 抗体が検出された 4 例全例で眼筋麻痺を伴っていた。一方、他の抗ガングリオシド抗体陽性例における本キットでの IgG 抗 GM1 抗体陽性率は、IgG 抗 GM1b 抗体陽性中 80% (10 例中 8 例)、IgG 抗 GD1a 抗体陽性中 90% (30 例中 27 例)、IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性中 73% (11 例中 8 例)、IgG 抗 GD1b 抗体陽性中 96% (26 例中 25 例) といずれも高率であった (図 1)。

4) 脳脊髄液検査との比較

発症 1 週以内に血清、脳脊髄液を採取した GBS 60 例、FS 35 例において、抗ガングリオシド抗体陽性率と髄液蛋白細胞解離の頻度を比較した。GBS における IgG 抗 GM1 抗体陽性率は 58% であり、蛋白細胞解離 (32%) と比べて高頻度であった ($p < 0.01$)

表2 発症 1 週以内における抗ガングリオシド抗体陽性率と髄液蛋白細胞解離出現率との比較⁵⁾

	GBS (n=60)	FS (n=35)
IgG 抗ガングリオシド抗体		
GM1	35 (58%)*	4 (11%)
GQ1b	4 (7%)	31 (89%)**
髄液蛋白細胞解離	19 (32%)	7 (20%)

GBS, Guillain-Barré 症候群 ; FS, Fisher 症候群
*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$ (対 髄液蛋白細胞解離)

(表 2)。蛋白細胞解離がみられた GBS 19 例中、IgG 抗 GM1 抗体は 10 例 (53%) で陽性と判定されていた。また、発症 1 週以内の脳脊髄液検査では蛋白細胞解離を認めなかったものの発症 2 週以降に蛋白細胞解離が確認された症例が 12 例あり、そのうち 11 例 (92%) が IgG 抗 GM1 抗体陽性であった。FS における IgG 抗 GQ1b 抗体陽性率 (89%) は、蛋白細胞解離 (20%) と比べて高頻度であり ($p < 0.001$)、発症 1 週以内に蛋白細胞解離がみられた 7 例中 6 例 (86%) が IgG 抗 GQ1b 抗体陽性と判定されていた。発症 1 週以内の脳脊髄液検査では蛋白細胞解離を認めなかったものの発症 2 週以降に蛋白細胞解離が確認された症例が 7 例あり、全例が IgG 抗 GQ1b 抗体陽性であった。

II. IgG 抗 GM1、抗 GQ1b 抗体測定 キットの有用性

本キットは、血清中の IgG 抗 GM1 抗体または IgG 抗 GQ1b 抗体を検出する定性試薬であり、ピペットやマイクロプレートリーダーなどの機器以外の測定に必要な試薬が付いている。キットに付属している陽性対照で吸光度を補正する (COI を算出する) ことによって、測定毎のばらつきをなくし、安

定した測定結果を得ることができる。本臨床性能試験ではIgG抗GM1抗体検出キットにてGBSの49%が陽性と判定され、疾患対照および正常対照の95%以上が保留または陰性と判定された。GBSの陽性率は5割に満たないが、これまでもGBSにおけるIgG抗GM1抗体の陽性率は3割⁹⁾と報告されている。また、疾患対照の陽性率が5%と本キットのGBSに対する疾患特異性は高く、特に鑑別疾患である慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの全例で陰性と判定されており、鑑別診断において十分な有用性を持つと考えられた。IgG抗GQ1b抗体検出キットではFSの85%が陽性、疾患対照および正常対照の全例が陰性と判定され、FSに対する特異性が高かった。

FS例で検出される抗ガングリオシド抗体のほとんどはGT1aに交差反応するIgG抗GQ1b抗体であるのに対し、GBSでは様々な抗体パターンがみられる⁴⁾。したがって、GBSにおいては複数のガングリオシドに対する抗体を同時に測定することが臨床的に、より有効であることには違いない。実際に、本キットでIgG抗GM1抗体が陰性と判定されたにもかかわらず、他のIgG抗体が検出されたGBSが8例(8%)存在した。しかしながら、その半数では外眼筋麻痺を伴いIgG抗GQ1b抗体が陽性であったことから、外眼筋麻痺を伴うGBS疑い例においてはIgG抗GM1抗体に加え、IgG抗GQ1b抗体を測定することが重要と考えられる。さらに、GM1以外のガングリオシドに対するIgG抗体が検出されたGBS 55例中47例(85%)がIgG抗GM1抗体検出キットにて陽性と判定されており、IgGクラスの抗ガングリオシド抗体陽性GBSの大部分を本キットで検出できると考えられた。

脳脊髄液蛋白細胞解離は、GBSおよびFSの検査所見として有名であるが、発症2週以降に出現することが多い。それに対し、抗ガングリオシド抗体は発症時に最も力価が高く、経過とともに抗体価は低下する。抗ガングリオシド抗体と蛋白細胞解離との頻度を検討した報告によると、GBS例における蛋白細胞解離の出現率が発症1週目の検査で47%、発症2週目で60%であったのに対し、抗ガングリオシド抗体は発症1週目で61%に検出された¹⁰⁾。本検討においても、発症1週以内に蛋白細胞解離を認めたGBS例が4割に満たなかったのに対し、6割の症例

でIgG抗GM1抗体が検出された。さらに、発症後2週以降に蛋白細胞解離が出現したGBS例の9割が、1週以内の血清で抗GM1抗体が陽性と判定されており、抗ガングリオシド抗体測定は発症早期においてより有用であると考えられた。

Ⅲ. 抗ガングリオシド抗体測定が診断に役に立った症例

1. 腱反射の保たれた広義のGBS

62歳、男性。発熱に続く水様性下痢の5日後に、四肢筋力低下が出現した。症状は急性に進み、3日後に歩行できなくなった。腱反射は亢進していたが、病的反射は陰性であった。脳神経系、感覚系、自律神経系に異常はなかった。血清IgG抗*Campylobacter jejuni*抗体が陽性であった。末梢神経伝導検査では、複合筋活動電位振幅が低下し、軸索障害の所見であった。本症例のように、GBSの特徴を備えているながら、腱反射が正常もしくは亢進している例に遭遇することがある。GBSの診断基準の必須条件に腱反射低下もしくは消失が挙げられているため、厳密にはこのような症例をGBSとは診断できないが、治療の見地から広義のGBSと捉えるべきであろう¹¹⁾。抗ガングリオシド抗体検索においてIgG抗GM1抗体が陽性を示し、臨床診断を支持した。免疫グロブリン大量静注療法により、症状は発症後10日をピークに回復した。

2. Bickerstaff 脳幹脳炎

39歳、男性。発熱と咳の5日後より複視と呂律緩慢、歩行時のふらつきが現れた。起立が不安定となり意識が混濁したため第3病日に入院した。傾眠状態と両側全眼筋麻痺、構音・嚥下障害を認めたが、四肢の筋力は保たれていた。腱反射は軽度亢進し、両側Babinski徴候が陽性であった。動揺のため坐位は保持できなかった。脳波では徐波がみられ、脳MRI T₂強調画像において、左小脳脚に高信号域を認めた。脳幹脳炎と診断され対症療法を受けていたが、鑑別疾患としてBickerstaff脳幹脳炎も疑い、血清抗ガングリオシド抗体を検索した。IgG抗GQ1b抗体が陽性であった。急性に発症・進行し、4週以内に極期に達する比較的左右対称性の両側眼筋麻痺

と運動失調に加えて、意識障害を認めた例は Bickerstaff 脳幹脳炎と診断するが、Bickerstaff 脳幹脳炎は、中枢神経障害を伴う FS としても捉えられる。GBS では通常意識は保たれるため、意識障害を呈した場合には Bickerstaff 脳幹脳炎とのオーバーラップと捉えた方が病状を想起しやすい¹²⁾。

おわりに

「抗ガングリオシド抗体検出キット」が、2006 年厚生労働省で医薬品として認可され、2007 年 8 月に保険適用が承認された。2008 年 1 月から「シノテスト サイエンス・ラボ」で受託検査が始まっている (<http://www.shino-test.co.jp/index.htm>)。新規に開発した抗ガングリオシド抗体検出キットは、GBS や FS、およびその関連疾患の鑑別診断または早期診断補助において臨床的に有用であり、本キットにより多くの施設で迅速かつ簡便な抗体測定が可能となった。

文 献

- 1) 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.
- 2) 永島隆秀, 西本幸弘, 平田幸一, 結城伸泰 : Guillain-Barré 症候群の転帰 : 運動機能評価尺度と生活の変化との対比. *臨床神経* **44** : 50-53, 2004.
- 3) The Guillain-Barré syndrome Study Group : Plasmapheresis and acute Guillain-Barré syndrome. *Neurology* **35** : 1096-1104, 1985.
- 4) Yuki N : Ganglioside mimicry and peripheral nerve disease. *Muscle Nerve* **35** : 691-711, 2007.
- 5) 秋山真弓, 古賀道明, 吉野 英, 浜岡 章, 野口保彦, 平田幸一, 結城伸泰 : 抗ガングリオシド抗体検出キットの開発 : Guillain-Barré 症候群、Fisher 症候群における臨床的有用性の検討. *Brain Nerve* **58** : 477-481, 2006.
- 6) Asbury AK, Cornblath DR : Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* **27** : S21-S24, 1990.
- 7) Odaka M, Yuki N, Hirata K : Anti-GQ1b IgG antibody syndrome : clinical and immunological range. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70** : 50-55, 2001.
- 8) 辰元宗人, 小鷹昌明, 古賀道明, 平田幸一, 結城伸泰 : 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性自己免疫性ニューロパチー患者の臨床像. *臨床神経* **44** : 508-512, 2004.
- 9) 古賀道明, 結城伸泰 : 神経疾患と分子相同性. *臨床免疫* **38** : 446-452, 2002.
- 10) Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Yuki N : Usefulness of anti-GQ1b IgG antibody testing in Fisher syndrome compared with cerebrospinal fluid examination. *J Neuroimmunol* **148** : 200-205, 2004.
- 11) Kuwabara S, Ogawara K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N : Hyperreflexia in Guillain-Barré syndrome : relation with acute motor axonal neuropathy and anti-GM1 antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67** : 180-184, 1999.
- 12) Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S : Bickerstaff's brainstem encephalitis : clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Brain* **126** : 2279-2290, 2003.