● 原 著

酵素抗体法による各種神経疾患の脳髄液中の α_2 -マクログロブリンの定量

広 畑 俊 成・伊 藤 幸 治

Jpn. J. Clin. Immun., 15 (1) : 45~50, 1992.

Quantitative determination of α_2 -macroglobulin in cerebrospinal fluids from various neurological diseases by enzymeimmunoassay

Shunsei Hirohata and Koji Ito

*Department of Medicine and Physical Therapy,
University of Tokyo School of Medicine*

【Summary】

Paired serum and cerebrospinal fluid (CSF) specimens from 83 patients with various neurological diseases were studied for CSF-serum α_2 -macroglobulin (α_2 M) quotient (Q_{α_2M}), using a sensitive enzymeimmunoassay. The concentrations of CSF α_2 M in 18 control patients were $2.55 \pm 0.92 \mu\text{g/ml}$ (Mean $\pm$ SD), and were significantly correlated with those of serum α_2 M ($r=0.65$). Q_{α_2M} was significantly correlated with CSF-serum albumin quotient (Q albumin) in 61 patients with noninflammatory neurological diseases (control, spinal spondylosis, cerebrovascular disease, degenerative diseases) as well as in 22 patients with inflammatory neurological diseases (multiple sclerosis, infectious meningoencephalitis) ($r=0.73$ and $r=0.91$, respectively). The ratio of Q_{α_2M}/Q albumin in control patients was 0.26 ± 0.08 (Mean $\pm$ SD). There was no significant difference in the ratio of Q_{α_2M}/Q albumin among various neurological diseases. However, the ratio of Q_{α_2M}/Q albumin was significantly decreased in 4 patients with infectious meningoencephalitis when they recovered from the manifestations after treatment. These results indicate that Q_{α_2M} is one of the successful tools for the evaluation of the blood-brain barrier function. Moreover, the data suggest that Q_{α_2M} might reflect the damage of blood-brain barrier in a more sensitive fashion than Q albumin.

Key words : cerebrospinal fluid,
 α_2 -macroglobulin,
blood-brain barrier,
enzymeimmunoassay

【概 要】

高分子蛋白である α_2 -macroglobulin (α_2 M) の種々の神経疾患 83 例の髄液・血清中の濃度比 (Q_{α_2M}) を固相酵素抗体法を用いて定量した。非器質性疾患 (対照群) 18 例の髄液 α_2 M 濃度は $2.55 \pm 0.92 \mu\text{g/ml}$ (Mean $\pm$ SD) で、血清 α_2 M 濃度との間に有意の相関 ($r=0.65$) を認めた。非炎症性神経疾患 (変形性脊椎症・脳血管障害・変性性疾患) および非器質性疾患の 61 例 ($r=0.73$)、炎症性神経疾患 (多発性硬化症・感染症) の 22 例 ($r=0.91$) のいずれにおいても、 Q albumin (髄液/血清 albumin 比 $\times 10^3$) と Q_{α_2M} (髄液/血清 α_2 M 比 $\times 10^3$) との間に有意の相関が認められた。 Q_{α_2M}/Q albumin 比は、対照群で 0.26 ± 0.08 (Mean $\pm$ SD) であったが、特に各種疾患群では、感染症でやや高値を示す傾向はみられたが、有意の差はなかった。しかし、感染症では症状の軽快とともに Q_{α_2M}/Q albumin 比は有意に低下する傾向を示した。以上より、 Q_{α_2M} は脳血液関門の指標として有用であるとともに Q albumin では判別できない脳血液関門の障害を反映しうることが示唆された。

I. 結 言

種々の神経疾患においては、時として脳血液関門の障害を伴うことがある¹⁾。これは、一般脳脊髄液検査では総蛋白濃度の上昇として反映されるが、髄液には種々の蛋白が混在すること、および蛋白の中には中枢神経内で産生されるものが存在することから、脳血液関門の機能の評価としては必ずしも最善の方法ではない¹⁾。現在まで脳血液関門の機能の評価にあたっては Q albumin 値 ([髄液アルブミン/血清アルブミン] $\times 10^3$) が汎用されてきている²⁾。アルブミンは分子量 6.7 万と比較的小さく、髄液内に最も大量に存在する蛋白である。一方、 α_2 -マクログロブリンは分子量 72.5 万の高分子蛋白であり、髄液中にはごく微量しか存在せず、その測定にあたっては感度の鋭敏な方法が必須である³⁾。 α_2 -マクログロブリンもその大部分が肝で合成されると考えられていることより、脳血液関門の評価には適していると考えられている⁴⁾。脳血液関門には大きさの異なる蛋白に対する selectivity が存在し、この selectivity の変化によって脳血液関門の障害には多様性が形成されることが指摘されている⁵⁾。したがって、分子量の異なる 2 つの蛋白によって脳血液関門の機能の評価を行った場合、疾患によっては重大な差異を生ずる可能性がある。しかし、各種神経疾患において、アルブミンあるいは α_2 -マクログロブリンの定量による脳血液関門の評価を比較した報告は数少ない。本研究においてわれわれは、髄液中の α_2 -マクログロブリンを酵素抗体法にて定量し、 Q_{α_2M} を求めることにより各種神経疾患での脳血液関門の機能の評価し、 Q albumin を用いた評価と比較検討した。

II. 対象と方法

1. 患 者

対象としては非炎症性神経疾患 61 例 (対照群として偏頭痛・ヒステリーなどの非特異的症状を示す非器質性疾患 18 例; 変形性脊椎症 23 例; 脳血管障害 12 例; 変性性疾患 8 例)、炎症性神経疾患 22 例 (多発性硬化症 13 例; 細菌性あるいはウイルス性髄膜炎 9 例) より同じ日に採取した髄液・血清を用いた。

2. 髄液中および血清中の α_2 -マクログロブリンの定量

髄液中および血清中の α_2 -マクログロブリンの定量にあたって固相酵素抗体法 (サンドイッチ法) を確立した。96 穴マイクロタイタープレート (Dynatech 社) にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.2) で希釈した $F(ab')_2$ ヤギ抗ヒト α_2 -マクログロブリン (Cappel 社) $50 \mu\text{l}/\text{well}$ を入れ、 4°C で overnight 放置し固相化する。その後 PBS で 3 回洗浄した後、1% ウシ血清アルブミン (BSA) (Miles 社) を含む PBS (PBS-BSA) $100 \mu\text{l}/\text{well}$ を入れ、室温で 2 時間放置し after coat する。その後、PBS-BSA で適当に希釈した髄液・血清 (ほとんどの場合、髄液は 40 倍、血清は 4,000 倍希釈) あるいはヒト α_2 -マクログロブリン (Cappel 社) $50 \mu\text{l}/\text{well}$ を入れ、 37°C で 1 時間 incubate し、PBS で 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識 $F(ab')_2$ ヤギ抗ヒト α_2 -マクログロブリン (PBS-BSA で 1:4,000 倍に希釈) を $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 入れ、 4°C で overnight incubate する。 $F(ab')_2$ ヤギ抗ヒト α_2 -マクログロブリンのペルオキシダーゼ標識は Nakane の方法により行った⁶⁾。別に血清中の α_2 -

マクログロブリンを single radial immunodiffusion 法 (LC-Partigen α_2 -macroglobulin, ヘキスト社) によって定量し, 酵素抗体法による結果と比較検討した。

3. 脳血液関門の機能の評価

脳血液関門の機能の評価は Q albumin ([髄液アルブミン (mg/dl)/血清アルブミン (mg/dl)] $\times 10^3$) および Q_{α_2M} ([髄液 α_2 -マクログロブリン (mg/l)/血清 α_2 -マクログロブリン (mg/l)] $\times 10^3$)²⁾ によって行った。髄液および血清中のアルブミンは single radial immunodiffusion 法 (LC-Partigen Albumin, ヘキスト社) によって定量した。

4. 統計学的処理

対照群と各疾患群の Q_{α_2M}/Q albumin 比の差異については, Bonferroni により提唱された多重比較により検定を行った⁷⁾。 Q_{α_2M} と Q albumin の相関については一次回帰分析により検討した。感染症患者での治療による Q_{α_2M}/Q albumin 比の変化の検定は Paired sample t test にて行った。

III. 結 果

1. 固相酵素抗体法による α_2 -マクログロブリンの定量

図 1 に精製 α_2 -マクログロブリンを用いて作成した標準曲線を示す。本法での検出限界は 3.0 ng/ml と鋭敏で, アルブミン・IgM・IgG など他の蛋白との交叉性は認められない。図 2 に示すように, single radial immunodiffusion 法と固相酵素抗体法を用いて定量した血清 α_2 -マクログロブリン値はお互いによく相関した。約 80 ng/ml の α_2 -マクログロブリンを含む脳脊

図 1 標準曲線

髄液を用いて測定した本法の intraassay variance の CV 値は 7.5% (n=9), interassay variance の CV 値は 7.1% (n=9) と再現性にも優れていた。

2. 各種神経疾患脳脊髄液中の α_2 -マクログロブリン濃度

表 1 に各種神経疾患脳脊髄液中の α_2 -マクログロブリンの濃度を示す。対照群 18 例の髄液中の α_2 -マクログロブリン濃度は, $2.55 \pm 0.92 \mu\text{g/ml}$ (Mean $\pm$ SD) で, 諸家の報告と大体一致していた。図 3 に示すように対照群 18 例では髄液・血清中の α_2 -マクログロブリン値はお互いに有意な相関を示した。

次に, 各種神経疾患における脳血液関門の機能の評価するために Q albumin と Q_{α_2M} を算出した。図 4・図 5 に示すように, 非炎症性神経疾患 61 例においても, 炎症性神経疾患 22 例においても, Q albumin と

図 2 酵素抗体法 (ELISA) と single radial immunodiffusion 法 (SRID) による血清 α_2 -マクログロブリンの定量

表 1 各種神経疾患における髄液・血清中 α_2 -マクログロブリン

		α_2 -マクログロブリン	
疾 患	例数	髄液 ($\mu\text{g/ml}$)	血清 (mg/ml)
Mean $\pm$ SD			
対照群	18	2.55 $\pm$ 0.92	1.94 $\pm$ 0.85
変形性脊椎症	23	2.42 $\pm$ 0.92	2.04 $\pm$ 0.72
脳血管障害	12	2.85 $\pm$ 1.43	1.60 $\pm$ 0.50
多発性硬化症	13	2.19 $\pm$ 1.04	1.46 $\pm$ 0.45
感染性髄膜炎	9	7.05 $\pm$ 4.46	1.79 $\pm$ 1.23

図3 対照群における髄液・血清中の α_2 -マクログロブリン値

図5 炎症性神経疾患における髄液・血清中の $Q\alpha_2M$ 値と Q albumin値の対比

$Q\alpha_2M$ は有意の相関を示した。多発性硬化症では脳血液関門の障害が比較的軽度なのに対して、感染症ではほとんどの例でより強い障害が認められた。次に、各種神経疾患において $Q\alpha_2M/Q$ albumin比を算出し比較検討した。図6に示すように、各種神経疾患の間で有意差は認められなかったが、感染症でやや高い値を示す傾向がみられた。そこで感染性髄膜脳炎の患者4例につき、治療により症状の軽快した時期に $Q\alpha_2M/Q$ albumin比がいかに変化するかを検討した。図7に示

図4 非炎症性神経疾患における髄液・血清中の $Q\alpha_2M$ 値と Q albumin値の対比

図6 各種神経疾患における $Q\alpha_2M/Q$ albumin比

SS:変形性脊椎症, CVD:脳血管障害

MS:多発性硬化症, Infect:感染性髄膜脳炎

図7 感染性髄膜脳炎における $Q\alpha_2M/Q$ albumin比の治療による変化

Significant at $p < 0.05$ by paired sample t-test.

のように、 Q_{α_2M}/Q albumin 比は治療により有意に低下する傾向を示した。

IV. 考 察

本研究においてわれわれは、固相酵素抗体法を確立し、髄液中および血清中の α_2 -マクログロブリンを測定した。本法は再現性・特異性に優れ、またサンドイッチ法を基礎としているため検出感度も 3 ng/ml と鋭敏である。このため従来の方式では正確な測定が困難とされている髄液中の α_2 -マクログロブリンも、希釈した髄液を用いて測定できるという大きな利点がある。また、本法によって定量した対照群の髄液中 α_2 -マクログロブリン濃度も $2.55 \pm 0.92\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Mean $\pm$ SD) と諸家の報告とも大体一致していた^{3,8)}。

非炎症性神経疾患・炎症性神経疾患のいずれにおいても Q_{α_2M} と Q albumin は有意の相関を示した。Livrea らは非炎症性疾患の対照群においては、 Q_{α_2M} と Q albumin の相関は Q IgG と Q albumin の相関よりも有意に劣ると報告している⁹⁾。これは対照群では脳血液関門の透過性が正常に保たれており、それゆえ髄液中にはごく微量しか存在しない α_2 -マクログロブリンの定量そのものが彼らの用いた Leser Nephrometer では精度に欠けるためではないかと考えられる。もっとも、彼らは Leser Nephrometer による α_2 -マクログロブリンの検出感度を記載していないが、IgA・IgM などの測定と同じであるとする、われわれの確立した酵素抗体法よりも劣っていることは確実である。

各種神経疾患群の間で Q_{α_2M}/Q albumin 比は有意の差を認めなかったが、感染性髄膜脳炎においてやや高

値を示す傾向があった。しかも、感染性髄膜脳炎患者 4 例においては、臨床症状の改善とともに Q_{α_2M}/Q albumin 比は有意の減少を示している。これは感染性髄膜脳炎における脳血液関門の障害の質と程度が異なることを示すのか、あるいは感染性髄膜脳炎の中枢神経内で α_2 -マクログロブリンが産生されているのかいづれかの可能性を示唆する。最近、末梢血単球、特に B リンパ球のあるサブセットも α_2 -マクログロブリンを産生するとの報告があり^{9,10)}、感染性髄膜脳炎のように中枢神経内での免疫グロブリン産生の亢進した状態では α_2 -マクログロブリンも産生されている可能性があると考えられる。しかし、同じく中枢神経内での免疫グロブリン産生の亢進していると考えられる多発性硬化症においては Q_{α_2M}/Q albumin 比の上昇はみられていない。また、感染性髄膜脳炎においては回復期にも中枢神経内での IgG 産生の亢進が認められる(広畑, unpublished observation)。すなわち、中枢神経内での免疫グロブリン産生の亢進は Q_{α_2M}/Q albumin 比の上昇とは必ずしも平行しない。一方、Schliep らは腰椎椎間板ヘルニアや脳軟化症などの非炎症性神経疾患において、髄液蛋白が正常でも α_2 -マクログロブリンの上昇している例が存在することを示している³⁾。これらを総合すると、感染性髄膜脳炎における Q_{α_2M}/Q albumin の上昇は脳血液関門の障害の質あるいは程度と関係するものと考えられる。したがって、 Q_{α_2M} による脳血液関門の評価は、 Q albumin による評価では示されない脳血液関門の障害(恐らく脳血液関門の分子量の異なる蛋白に対する選択性的変化)を反映する点で Q albumin よりも優っていると考えられる。

文 献

- 1) Hirohata, S., Kamoshita, H., Taketani, T.: Blood-brain barrier function and intrathecal immunoglobulin synthesis in various neurological diseases. *J. Transportation Med.*, 40: 71~75, 1986.
- 2) Tibbling, G., Link, H., Ohman, S.: Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 37: 385~390, 1977.
- 3) Schliep, G., Felgenhauer, K.: The α_2 -macroglobulin level in cerebrospinal fluid; a parameter for the condition of the blood-CSF barrier. *J. Neurol.*, 207: 171~181, 1974.
- 4) Andus, T., Castell, J.V., Heinrich, P.C.: IL6 と急性期反応. *実験医学*, 7: 37~43, 1989.
- 5) Livrea, P., Trojano, M., Simone, I.L. et al.: Heterogeneous models for blood-cerebrospinal fluid barrier permeability to serum proteins in normal and abnormal cere-

- brospinal fluid/serum protein concentration gradients. J. Neurol. Sci., 64 : 245~258, 1984.
- 6) Nakane, P.K., Kawaoi, A. : Peroxidase-labeled antibody—A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22 : 1084~1091, 1974.
- 7) Wallenstein, S., Zucker, C.L., Fleiss, J.L. : Some statistical methods useful in circulation reseach. Circ. Res., 47 : 1~9, 1980.
- 8) 春原経彦：神経疾患における髄液蛋白成分に関する研究—免疫グロブリンを含む14種類の髄液蛋白の検討—。臨床神経, 18 : 321~331, 1978.
- 9) Hovi, T., Mosher, D., Vaheri, A. : Cultured human monocytes synthesize and secrete α_2 -macroglobulin. J. Exp. Med., 145 : 1580~1589, 1977.
- 10) Tunstall, A.M., James, K. : Preliminary studies on the synthesis of α_2 -macroglobulin by human lymphocytes *in vitro*. Clin. Exp. Immunol., 17 : 697~701, 1974.
-