

Lambert-Eaton筋無力症候群におけるトキシン結合 阻害型抗電位依存性カルシウムチャネル抗体

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9390

Lambert-Eaton筋無力症候群におけるトキシン結合阻害型 抗電位依存性カルシウムチャネル抗体

金沢大学医学部医学科神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

丸 田 高 広

Lambert-Eaton筋無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome, LEMS) は神経筋接合部の神経伝達における自己免疫疾患であり, 運動神経終末のアセチルコリン量子性遊離量の減少を特徴とする. このLEMSでは ω -コノトキシン MVIIC (ω -conotoxin MVIIC, CmTx) で標識されるP/Q型電位依存性カルシウムチャネル (voltage-gated calcium channel, VGCC) を認識する抗体が主役を演ずるとされている. 今回, LEMSにおける抗VGCC抗体の多様性を明らかにするために, VGCCのCmTx結合部位を認識しうる抗体を検出する新しい免疫濾過法を確立した. 従来の免疫沈降法ではVGCCのトキシン結合部以外の部位を認識する抗体 (結合型抗体) を検出する一方, 新しい免疫濾過法はVGCCのCmTx結合を特異的に阻害する抗体 (阻害型抗体) を識別することができる. 本研究では, 臨床的, 電気生理学的に診断したLEMS 20例と対照 20例について, 阻害型抗体検出のための免疫濾過法による測定と, 結合型抗体検出のための免疫沈降法による測定を行った. 抗体価は対照の $\bar{X} + 3SD$ 以上を陽性と定義すると, LEMSの9例 (45%) で阻害型抗体が陽性, LEMS全例で結合型抗体が陽性であった. 対照 (20例) は両抗体価とも陰性であった. 両抗体価には相関を認めなかった. 本報はLEMSの阻害型抗体の検出法を初めて開発したものである.

Key words Lambert-Eaton myasthenic syndrome, voltage-gated calcium channel, ω -conotoxin MVIIC, blocking antibody, binding antibody

Lambert-Eaton筋無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome, LEMS) は運動神経終末のアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 量子性遊離量が減少するため, 全身の筋力低下を起す疾患である^{1)~3)}. その病因としては, 約50%に肺小細胞癌 (small cell lung cancer, SCLC) を合併する点⁴⁾, SCLCに電位依存性カルシウムチャネル (voltage-gated calcium channel, VGCC) が発現する点⁵⁾, 患者血清がSCLCの電位依存性カルシウム流入を阻害する点^{6),7)}, 患者の神経終末でVGCCに相当する活性帯顆粒 (active zone particle) が減少する点⁸⁾, 患者血清で動物へ疾患移送が可能なる点^{9),10)}, VGCCの合成ペプチド免疫で動物に疾患誘導が可能なる点¹²⁾等より, 少なくともSCLC合併LEMSでは, SCLCに発現したVGCCに対する抗体が神経終末のVGCCをも障害することが直接的に関わっていると考えられている¹³⁾.

VGCCはL型, N型, P/Q型, R型, T型の5型に分類され^{14)~16)}, 運動神経終末のACh放出の調節はP/Q型による^{17)~20)}. このため, LEMSの生化学的指標として抗P/Q型VGCC抗体測定法が開発されているが, その抗体価は必ずしも臨床所見とは一致せ

ず, LEMS患者の5-26%は抗体が陰性である^{21)~24)}. 現行の測定法は, P/Q型VGCCに特異的に結合する ω -コノトキシン MVIIC (ω -conotoxin MVIIC, CmTx) とVGCCを豊富に含む小脳組織抽出物の複合体を抗原とし, CmTx-VGCC複合体に結合する抗体 (結合型抗体) を2抗体免疫沈降法で検出している. ここで, VGCCのCmTx結合部位を抗原認識部位とし, VGCCとCmTxの結合を拮抗阻害する抗体 (阻害型抗体) がLEMSにおいて存在していると仮定した場合, 阻害型抗体はCmTx-VGCC複合体を抗原にした現行の測定法では, 抗原結合部位に先にCmTxが結合しているため, VGCCに結合できず, 抗VGCC抗体として検出されない. これは, 既存の抗VGCC抗体検出法には限界があることを意味し, 従って阻害型抗体の存在を証明し, さらにその臨床的意義を議論するためにも, 阻害型抗体を検出する新しい測定法が必要である.

本報では, LEMSにおける阻害型抗体検出のための新しい測定法を考案した. また, その測定結果と結合型抗体の抗体価とを比較することにより, LEMSの病態について若干の考察を加えたとともに, 本方法の有用性を検討した.

平成10年11月11日受付, 平成10年12月21日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, acetylcholine receptor; BSA, bovine serum albumin; BuTx, α -bungarotoxin; CmTx, ω -conotoxin MVIIC; ¹²⁵I-CTx, ¹²⁵I labeled ω -conotoxin MVIIC; LEMS, Lambert-Eaton myasthenic syndrome; MG, myasthenia gravis; PB, phosphate buffer; SCLC, small cell lung cancer; VGCC, voltage-gated calcium channel

対象および方法

I. 対象 (表 1)

金沢大学附属病院神経内科および関連病院に入院し、臨床症状および電気生理学的に診断した20例 (41才-76才, 女性4例, 男性16例, SCLC合併11例, 悪性腫瘍非合併9例) のLEMS患者と、対照20例の血清を対象とした。

II. 抗原の調整

1. P2画分 (粗ミトコンドリア画分) 分離²⁵⁾

肝細胞癌で死亡した80才の女性から小脳を得、使用まで -70°C で凍結保存した。小脳皮質の湿重量を測定し、9倍容の等張シヨ糖液を加え、壺型テフロン・ガラスホモジェナイザーで均質化した。これを冷却遠心機でまず $1000 \times \text{g}$, 10分間遠心し、得られた上清を $15,000 \times \text{g}$, 30分間遠心した。さらに、沈渣を等張シヨ糖液で2回洗浄してP2画分を分離した。すべての操作は 4°C で行った。

2. P2画分中のトキシン結合部位確認

P2画分に小脳皮質1gあたり10mlの0.05Mリン酸緩衝液 (phosphate buffer, PB) (pH 7.0) を加え懸濁して、P2画分浮遊液を作製した。異なった量のP2画分浮遊液 (0-40 μl) に ^{125}I 標識 CmTx (^{125}I -labeled CmTx, ^{125}I -CmTx) (Amersham Inc, Birminghamshire, UK) (74 TBq/mmol) を4.5-6 fmol (15000-20000 cpm) 加え、2時間反応させた。次に、反応液をグラスフィルター (Whatman grade GF/F, Whatman International Ltd, Kent, UK) で濾過し、グラスフィルターの放射線を測定した (A)。同時に ^{125}I -CmTxとグラスフィルターとの非特異的結合は、P2画分を含まない0.05M PBに ^{125}I -CmTxを加えて反応させ、濾過した後にフィルターの放射線を測定した (B)。各P2画分中の CmTx結合量を (A-B) として表現した。

さらにP2画分浮遊液20 μl に、標識していない CmTx (Peptide Institute Inc, 大阪) 0-20000 pg, あるいはウシ血清アルブミン (bovine serum albumine, BSA) を加えて2時間反応させた後、 ^{125}I -CmTxを4.5-6 fmol (15000-20000 cpm) 加え、2時間反応させた。反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。実際に測定された計数率からP2画分を加えていないブランクの計数率を差し引いて、測定値とした。それぞれの測定は試験管4本の平均を測定値とし、すべての操作は 4°C で行った。なお、放射線測定器はオートウェルガンマシステムARC-1000N (アロカ社, 東京) (検出効率75%) を使用した。

III. 阻害型抗P/Q型VGCC抗体測定

P2画分浮遊液20 μl に、PBあるいは被検血清1 μl を加えて2時間反応させた後、 ^{125}I -CmTxを4.5-6 fmol (15000-20000 cpm) 加え、2時間反応させた。反応液をグラスフィルターで濾過し、フィルターの放射線を測定した。実際に測定された計数率からP2画分を加えていないブランクの計数率を差し引いて、測定値とした。阻害型抗P/Q型VGCC抗体価は、最初に加えた ^{125}I -CmTx結合部位量に対する、血清を加えて阻害された ^{125}I -CmTx結合部位量の割合 (阻害率) として表示した。なお、阻害率が負になる場合は0%とした。また、ヒト対照および陽性例の内4例では血清を0.5 μl , 1 μl , 2 μl づつ加えた際の阻害率も測定した。それぞれの測定は試験管4本の平均を測定値とし、すべ

ての操作は 4°C で行った。なお、放射線測定器はオートウェルガンマシステムARC-1000N (アロカ社, 東京) (検出効率75%) を使用した。

IV. 結合型抗P/Q型VGCC抗体測定²³⁾

P2画分に小脳皮質1gあたり10mlの0.32Mシヨ糖, 1 μM ペスタチン, 2 μM ロイペプチン, 0.1mM 硫化フッ化フェニルメチルと20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 大豆トリプシン阻害剤を含む2%ジギトニン加25mMTris / 5mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) を加え、懸濁した後、60分間振盪し、VGCCを含む膜成分を可溶化した。さらに、 $15,000 \times \text{g}$, 30分間で遠心し、上清20 μl にPBか100nM CmTxを加え、2時間反応させた。この後、 ^{125}I -CmTxを4.5-6 fmol (15000-20000 cpm) 加え、2時間反応させ、 ^{125}I -CmTx-VGCC複合体を形成させた。これに、被検血清を5 μl 加え、一晚反応させた。さらに、ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Organon Teknika Corp, Durham, USA) を250 μg 加え、2時間静置した。次に、3000 rpmで10分間遠心し、沈渣を0.2%トライトンX加0.05 M PBで2回洗浄後、放射線を測定した。抗体価は各々の計数率から充分量の非標識 CmTxで ^{125}I -CmTx-VGCC複合体形成を阻害したブランクの計数率を差し引き、血清1 Lが沈殿させうる ^{125}I -CmTx結合部位量をpmolで算出した。なお、抗体価が負になる場合は0 pmol/lとした。それぞれの測定は試験管3本の平均を測定値とし、すべての操作は 4°C で行った。また、放射線測定器はオートウェルガンマシステムARC-1000N (アロカ社, 東京) (検出効率75%) を使用した。

V. 統計学的検討

阻害型抗P/Q型VGCC抗体, 結合型抗P/Q型VGCC抗体とも抗体価は対照の $\bar{X} + 3\text{SD}$ を越えるものを陽性と定義し、両抗体価の関連についてはSpearmanの順位相関係数の検定を行った。

成 績

I. VGCC抗原の調整

P2画分中のトキシン結合部位確認実験では、P2画分浮遊液を0 μl から30 μl まで増量すると、計数率がほぼ直線的に上昇したが、P2画分浮遊液を30 μl から40 μl まで増量しても、計数

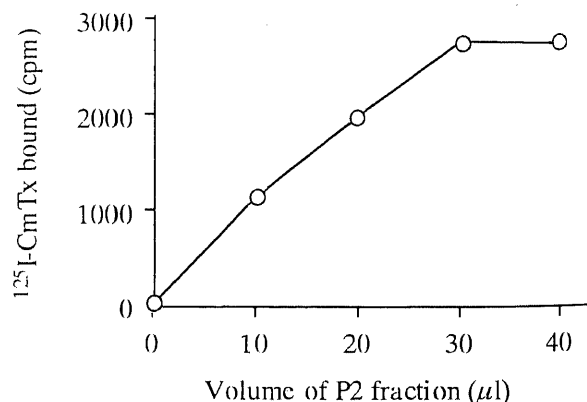


Fig. 1. Effect of volume of P2 fraction on ^{125}I -CmTx binding. The ^{125}I -CmTx-VGCC complex trapped by glassfilter increase in proportion to the volume of P2 fraction. ^{125}I -CmTx, ^{125}I labelled ω -conotoxin MVIIIC; VGCC, voltage-gated calcium channel.

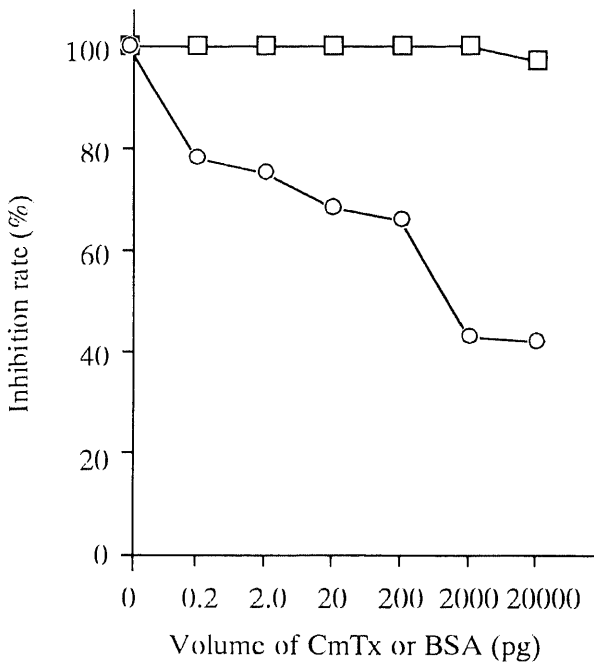


Fig. 2. Inhibition activity of cold CmTx and BSA against ^{125}I -CmTx-VGCC binding. BSA, bovin serum albumin; CmTx, ω -conotoxin MVIIC; ^{125}I -CmTx; ^{125}I labelled CTx; VGCC, voltage-gated calcium channel. \circ , inhibition rate of cold CmTx. \square , inhibition rate of BSA.

率はほとんど変化しなかった (図1). また, BSAを加えても計数率は低下しなかったが, 非標識CmTxを0 pgから20000 pgまで加えると, 計数率が42%まで低下した (図2).

II. 阻害型抗P/Q型VGCC抗体測定 (表1)

対照血清では阻害型抗P/Q型VGCC抗体の $\bar{X} + 3\text{SD}$ が5.6%

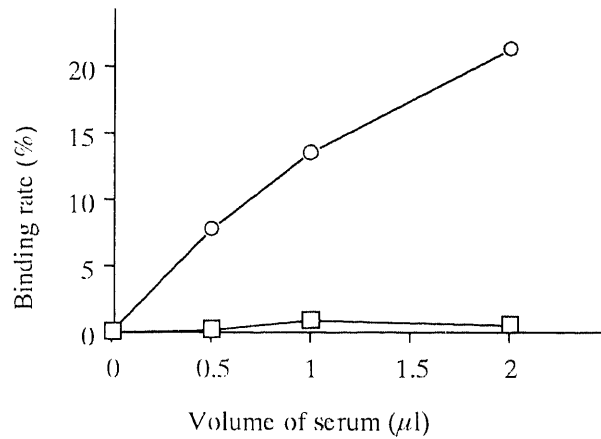


Fig. 3. Inhibition activity of sera from LEMS and control subjects against ^{125}I -CmTx-VGCC binding. ^{125}I -CmTx, ^{125}I labelled ω -conotoxin MVIIC; LEMS, Lambert-Eaton myasthenic syndrome; VGCC, voltage-gated calcium channel. \circ , inhibition rate of LEMS sera ($n=4$); \square , inhibition rate of control sera ($n=20$).

Table 1. Anti-P/Q type VGCC antibody titers of LEMS

Patient NO.	Patient profile			Anti-P/Q type VGCC antibody	
	Age (year)	Sex	Malignancy	Blocking type (%)	Binding type (pmol/l)
1	68	M	SCLC	14.2	940
2	41	M	SCLC	12.1	236
3	58	M	None	10.8	782
4	72	M	SCLC	10.0	894
5	43	F	None	10.0	656
6	63	M	SCLC	9.1	2531
7	51	F	None	8.1	2266
8	48	M	SCLC	7.2	910
9	69	M	None	7.0	49
10	76	F	None	2.2	214
11	68	M	SCLC	0.1	381
12	67	M	None	0.0	1216
13	66	M	None	0.0	1010
14	52	M	SCLC	0.0	499
15	57	M	SCLC	0.0	256
16	74	M	SCLC	0.0	138
17	62	M	None	0.0	136
18	42	F	None	0.0	96
19	71	M	SCLC	0.0	82
20	68	M	SCLC	0.0	43
Control				<5.6 ^{a)}	<20.0 ^{a)}

M, male; F, female; LEMS, Lambert-Eaton myasthenic syndrome; SCLC, small cell lung cancer; VGCC, voltage-gated calcium channel.

^{a)} Control values for antibody titers are the $\bar{X} \pm 3\text{SD}$ ($n=20$).

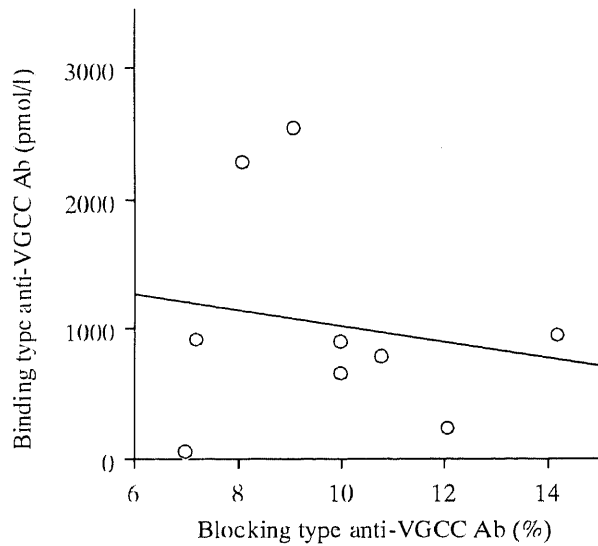


Fig. 4. Correlation between blocking and binding antibodies to anti-P/Q type VGCC: VGCC, voltage-gated calcium channel.

であったが、LEMS患者20例の内9例では5.6%を越える陽性を示した。対照は全例陰性であった。また、加えた血清量を変えても対照の阻害率は変化しなかったが、陽性LEMS患者血清は加えた血清量に依存して阻害率が上昇した(図3)。

Ⅲ. 結合型抗P/Q型VGCC抗体測定(表1)

対照血清では結合型抗P/Q型VGCC抗体の $\bar{X} + 3SD$ が20.0 pmol/lであったが、LEMS患者では全例が20.0 pmol/lを越える陽性を呈した。対照は全例陰性であった。また両抗体陽性の9例では両抗体価の相関係数は-0.170で、正の相関関係を認めなかった(図4)。

考 察

LEMSにおける抗VGCC抗体の検出法は既に報告されているが、LEMS患者の5-26%では抗体が検出されず、その抗体価も臨床症状とは一致しない^{21)~24)}。このような現象を説明するためには、少なくともカルシウム依存性ACh放出機構に関わり、かつ膜外に露出して病原抗体の標的となりうる蛋白質に対する抗体、すなわち抗シナプトタグミン抗体²⁶⁾などの存在や、現行の方法では検出されない抗VGCC抗体の存在などを想定する必要がある。このため本研究ではトキシン結合阻害型抗体の存在を仮定し、阻害型抗P/Q型VGCC抗体検出法を考案し、実際にLEMS患者血清中に阻害型抗体が存在することを明らかにした。

これまでLEMSではVGCCとCmTxの結合を阻害する抗体検出法の報告はなく、本研究が最初である。しかし重症筋無力症(myasthenia gravis, MG)ではトキシンと蛋白質の結合阻害型抗体検出法として α -ブングアロトキシン(α -bungarotoxin, BuTx)とACh受容体(acetylcholine receptor, AChR)との結合阻害型抗体の検出法が報告されている^{27)~29)}。これは、蛋白質と被検血清

の反応によりトキシン・蛋白質複合体量が減少する割合を阻害率として算出したものである。このトキシン・蛋白質複合体量の測定法には、結合型抗体を利用した免疫沈降法による方法(免疫沈降法)、トキシン・蛋白質複合体をカラムに吸着する方法(吸着法)、トキシン・蛋白質複合体をグラスフィルターで濾過する方法(濾過法)の3種類がある。この中で免疫沈降法は、蛋白質の可溶化、被検血清と蛋白質の結合、トキシンと蛋白質の結合、トキシン・蛋白質複合体とMG血清の反応、MG血清と抗ヒトIgG抗体の反応、と多くの反応が介在するため、誤差が大きく、可溶化に伴う蛋白質のロスを生じる欠点がある。これに対し、吸着法は2次抗体の反応がないため、理論的に誤差が少ないと考えられる。濾過法では吸着法と同様に2次抗体を用いる必要がなく、免疫沈降法と吸着法に必要な蛋白質の可溶化もいらぬため、理論的にはより誤差が少なく、可溶化によるロスも生じない。このため、本研究で阻害型抗P/Q型VGCC抗体を検出するにあたり、濾過法を応用してCmTx・P/Q型VGCC複合体量の測定法を考案した。

ここで、濾過される内容と量は、濾過する蛋白質の種類やフィルターの選択によって左右される。このため、本実験を行うに当たり、まず抗原精製の粗さやフィルターを選択するための予備実験を繰り返し、抗原にヒト小脳のP2画分を、フィルターに粒子保持能が0.7 μ mのグラスフィルターを選択した。小脳はP/Q型VGCCに富んでおり³⁰⁾、実際にヒト小脳は結合型抗P/Q型VGCC抗体検出法の抗原として利用されている^{21)~24)}。また、P2画分は神経終末のみでなく、ミトコンドリアやミエリンを含む粗い画分であるため³¹⁾、神経終末のみの画分よりもフィルターに保持されやすい。グラスフィルターの選択でも、BuTx・AChR複合体の検出で用いるグラスフィルター(Whatman grade GF/C, Whatman, Kent, UK)の粒子保持能が1.2 μ mであるのに対し²⁹⁾、本研究で用いたグラスフィルターは粒子保持能が0.7 μ mであるため、より細かい粒子までフィルターに保持される。事実、今回選択した抗原とフィルターを使った実験で、一定量の標識CmTxに対して加えたP2画分量に依存して、フィルター上に保持される放射活性がほぼ直線的に増加し(図1)、本方法によってトキシン結合部位を定量的に検出できることを示した。また、このフィルター上の放射活性がP2画分と標識CmTxの複合体であることは、非標識CmTxを予め加えることで、放射活性の非標識CmTx量に依存した減少が観察できることから(図2)証明した。

このCmTx・P/Q型VGCC複合体量測定法を基に、阻害型抗P/Q型VGCC抗体測定法を考案した。まず、P2画分と被検血清の量と反応時間を選択する予備実験から、P2画分浮遊液を20 μ l、被検血清を1 μ l、反応時間を2時間とした。特に陽性被検血清では血清量を増やすと、CmTxとP/Q型VGCCとの結合阻害率も増加したことより、この方法で血清によるCmTxとP/Q型VGCCとの結合を阻害する割合の提示が可能であることを示した(図3)。この結果を基に、実際にLEMS患者血清において阻害型抗P/Q型VGCC抗体を測定したところ、45%のLEMS患者血清で阻害型抗体が陽性であった。一方、対照血清は全例で阻害型抗P/Q型VGCC抗体が陰性であった。以上より、本方法によるLEMSにおける阻害型抗P/Q型VGCC抗体測定の測定感度は45%、特異度は100%で、特異度が高く、LEMSの診断確定に有用な検査となりうると思われる。

次に結合型抗P/Q型VGCC抗体を測定し、阻害型抗P/Q型

VGCC抗体との相関を調べたが、両抗体価には正の相関を認めなかった(図4)。これは高い結合型抗P/Q型VGCC抗体価あるいはVGCCに極めて親和性の強い抗体の存在に影響を受け二次的に阻害型抗体として検出されているものではなく、結合型抗体価が低値でも阻害型抗体が検出されることから、結合型抗体の存在に依存せず、阻害型抗体が産生されうることを示すものと思われた。しかし、本研究では臨床的・電気生理学的に確定診断された結合型抗体陰性症例での検定が行えなかったため、阻害型抗体のみが陽性になる症例の存在を確認できなかった。

この阻害型抗体がチャンネル機能に与える作用に関しては、チャンネルに対するトキシンの作用を考慮する必要がある。VGCCにおけるCmTxの作用機序は未だ明らかにされていないが、本来CmTxはP/Q型VGCCを阻害するトキシンとして発見されたものである³²⁾。このCmTx 40 μ gをマウスに注入すると2分後には激しい呼吸障害をきたすことが報告されており³²⁾、その即効性からCmTxの作用はチャンネル蛋白の崩壊を介した間接的なチャンネル機能障害ではなく、直接的にチャンネル機能に影響することが推察される。これまでLEMSでは血漿交換による即効性³³⁾や、患者血清による動物への疾患移送の即日性が報告されていることから³⁴⁾、チャンネル蛋白の崩壊を介さず、直接的にチャンネル機能に影響する抗体の存在が予測されていた。今回検出した阻害型抗体のチャンネル機能に与える作用は、未だ明らかでなく今後の研究を待たねばならないが、CmTxと競合することから、トキシン結合部位ないしはその近傍に結合する可能性、あるいは他の部位に結合してチャンネル蛋白の立体構造変化を介してトキシン結合を阻害する可能性があると思われる、これに伴い直接的にチャンネル機能に影響する可能性があると考えられた。

LEMSでは、結合型抗P/Q型VGCC抗体を含め多様な病原抗体が関与している。本研究では阻害型抗P/Q型VGCC抗体検出法を考案することにより、LEMSにおいて阻害型抗体が存在することを明らかにした。この新しい抗体および抗体検出法は、LEMSの病態解明、診断、治療法確立、あるいはVGCC機能の解析において重要な意味を持つ、有用な測定法になりうると考えられる。

結 論

抗VGCC抗体はLEMSの病態に主要な役割を演じているが、従来の測定法では検出不可能な阻害型抗VGCC抗体検出法を考案し、以下の結論を得た。

- 1) 可溶化しないP2分画を用いた濾過法によって、VGCCとCmTxの結合を特異的に阻害する、阻害型抗VGCC抗体が検出可能である。
- 2) 従来法によって検出される結合型抗VGCC抗体陽性LEMSでの検討から、本方法による阻害型抗VGCC抗体検出感度は45%、特異性は100%である。
- 3) 阻害型抗VGCC抗体の検討はLEMSの診断に有用であるだけでなく、VGCCの機能とLEMS病態解明にも貢献することが期待できる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始直接の御指導いただきました駒井清暢講師に深謝致します。最後に本研究中多大なる御援助を賜りました金沢大学医学部神経内科の諸先生方に感謝の意を表します。

なお本論文の要旨の一部は第27回日本脳波筋電図学会(1997年、福岡)、1997年度厚生省神経免疫班会議(1998年、東京)、第39回日本神経学会総会(1998年、京都)において発表した。

文 献

- 1) Lambert EH, Eaton LM, Rooke ED. Defect of neuromuscular conduction associated with malignant neoplasma. *Am J Physiol* 187: 612-613, 1956
- 2) Elmqvist D, Lambert EH. Detailed analysis of neuromuscular transmission in a patient with the myasthenic syndrome sometimes associated with bronchogenic carcinoma. *Mayo Clin Proc* 43: 689-713, 1968
- 3) Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray NMF. Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet* 2: 224-226, 1981
- 4) O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. *Brain* 111: 577-596, 1988
- 5) McCann FV, Pettengill OS, Cole JJ, Russel JAG, Sorenson GD. Calcium spike electrogenesis and other electrical activity in continuously cultured small cell carcinoma of the lung. *Science* 212: 1155-1157, 1981
- 6) De Aizpurua HJ, Lambert EH, Griesmann GE, Olvera BM, Lennon VA. Antagonism of voltage-gated calcium channels in small cell carcinomas of patients with and without Lambert-Eaton myasthenic syndrome by autoantibodies omega-conotoxin and adenosin. *Cancer Res* 48: 4719-4724, 1988
- 7) Roberts A, Perera S, Lang B, Vincent A, Newsom-Davis J. Paraneoplastic myasthenic syndrome IgG inhibits 45Ca^{2+} flux in a human small cell carcinoma line. *Nature* 317: 737-739, 1985
- 8) Fukunaga H, Engel AG, Osame M and Lambert EH: Paucity and disorganization of presynaptic membrane active zones in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 5: 686-697, 1982
- 9) Lang B, Newsom-Davis J, Prior C, Wray D. Antibodies to motor nerve terminals: an electrophysiological study of a human myasthenic syndrome transferred to mouse. *J Physiol* 344: 335-345, 1983
- 10) Kim YI. Passively transferred Lambert-Eaton syndrome in mice receiving purified IgG. *Muscle Nerve* 9: 523-530, 1986
- 11) Fukunaga H, Engel AG, Lang B, Newsom-Davis J, Vincent A. Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with IgG from man to mouse depletes the presynaptic membrane active zones. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7630-7640, 1983
- 12) 駒井清暢, 岩佐和夫, 高守正治. 傍腫瘍性神経症候群 2. Lambert-Eaton筋無力症候群 1) カルシウムチャンネル分子構造と免疫. *日本内科学会雑誌* 87: 678-684, 1998
- 13) Vincent A, Lang B, Newsom-Davis J. Autoimmunity to the voltage-gated calcium channel underlies the Lambert-Eaton myasthenic syndrome, a paraneoplastic disorder. *Trends Neurosci* 12: 496-502, 1989
- 14) Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Tsien RW. The naming of voltage gated calcium channels.

Neuron 13: 505-506, 1994

- 15) Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18: 89-98, 1995
- 16) Varadi G, Mori Y, Mikala G, Schwartz A. Molecular determinants of Ca^{2+} channel function and drug action. *Trends Pharmacol Sci* 16: 43-49, 1995
- 17) Protti DA, Uchtel OD. Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport* 5: 333-336, 1993
- 18) Hong SJ, Chang CC. Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. *J Physiol* 482: 283-290, 1995
- 19) Sugiura Y, Woppmann, Miljanich GP, Ko CP. A novel ω -conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol* 24: 15-27, 1995
- 20) Bowersox SS, Miljanich GP, Sugiura Y, Nadasdi L, Hoffman BB, Ramachandran J, Ko CP. Differential blockade of voltage-sensitive calcium channel at the mouse neuromuscular junction by novel omega-cono peptides and Aga IVA. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 248-256, 1995
- 21) Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Woppmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 332: 1467-1474, 1995
- 22) Motomura M, Johnston I, Lang B, Vincent A, Newsom-Davis J. An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 85-87, 1995
- 23) Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J. Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Sci* 147: 35-42, 1997
- 24) Suenaga A, Shirabe S, Nakamura T, Motomura M, Tsujihata M, Matsuo H, Kataoka Y, Niwa M, Itoh M, Nagataki S. Specificity of autoantibodies react with omega-conotoxin MVIIC-sensitive calcium channel in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 19: 1166-1168, 1996
- 25) Hebb CO, Whittaker VP. Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J Physiol* 142: 187-196, 1958
- 26) Leveque C, Hoshino T, David P, Shoji-Kasai Y, Leys K, Omori A, Lang B, El Far O, Sato K, Martin-Moutot N et al. The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3625-9, 1992
- 27) Almon RR, Andrew CG, Appel SH. Serum globulin in myasthenia gravis: Inhibition of α -bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science* 186: 55-57, 1974
- 28) Almon RR, Appel SH. Interaction of myasthenic serum globulin with the acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 393: 66-77, 1975
- 29) Mittag T, Kornfeld P, Tormay A, Woo C. Detection of anti-acetylcholine receptor factors in serum and thymus from patients with myasthenia gravis. *N Engl J Med* 294: 691-694, 1976
- 30) Starr TVB, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5621-5625, 1991
- 31) Gray EG, Whittaker VP. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96: 79-88, 1962
- 32) Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, Imperial JS, Olivera BM. A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca^{2+} channels. *Neuron* 9: 69-77, 1992
- 33) Newsom-Davis J, Murray NMF. Plasma exchange and immunosuppressive drug treatment in the Lambert-eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 34: 480-485, 1984
- 34) Lambert EH, Lennon VA. Selected IgG rapidly induces Lambert-Eaton myasthenic syndrome in mice: complement independence and EMG abnormalities. *Muscle Nerve* 11: 1133-1145, 1988

Detection of Antibodies that Inhibit Toxin Binding to the Voltage-Gated Calcium Channel in Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome Takahiro Maruta, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107**, 547 — 553 (1998)

Key words Lambert-Eaton myasthenic syndrome, voltage-gated calcium channel, ω -conotoxin MVIIC, blocking antibody, binding antibody

Abstract

The Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS) is an autoimmune neuromuscular transmission disorder and is characterized by reduced quantal release of acetylcholine from the motor nerve terminals. Antibodies against the P/Q type voltage-gated calcium channel (VGCC), to which ω -conotoxin MVIIC (CmTx) bind, play an essential role in the pathophysiology of LEMS. To elucidate the diversity of anti-VGCC antibodies in LEMS, a novel immunofiltration assay for detecting the antibodies that possibly recognize the CmTx binding site of VGCC has been established. While the conventional immunoprecipitate assay detects antibodies to VGCC sites other than the toxin binding site (binding Ab), the new immunofiltration method can identify those antibodies that specifically inhibit the CmTx binding to VGCC (blocking Ab). Twenty serum samples from patients with clinical and electrophysiologically definite LEMS and 20 control samples were tested using both the new assay method to detect blocking Ab and the immunoprecipitate assay to detect binding Ab. Nine of 20 LEMS serum (45%) tested positive for blocking Ab and all of LEMS serum tested positive for binding Ab, defined as a titer > 3SD above the mean for the controls. All of the 20 control samples tested negative for both antibody subtypes. There was no relationship between the titers of binding Ab and blocking Ab. This is the first report of an assay to detect the blocking Ab in LEMS.