

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

免疫性神経疾患の発症機構の解明と
治療法の開発に関する研究

(抗ガングリオシド抗体を伴う免疫性ニューロパチーの研究)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 楠 進

平成13(2001)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 免疫性神経疾患の発症機構の解明と治療法の開発に関する研究……………1
(抗ガングリオシド抗体を伴う免疫性ニューロパチーの研究)

楠 進

II. 分担研究報告

1. ギラン・バレー症候群患者血中の抗 GD1b IgG 抗体の意義に関する研究…3

楠 進

2. GalNAc-GD1a のヒト末梢神経組織における局在に関する研究……………6

鎌倉 恵子

3. 軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の樹立：第2報……………9

結城 伸泰

4. 免疫性神経疾患及び ALS における髄液中 nitrotyrosine に関する研究……………11

吉野 英

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………13

IV. 研究成果の刊行物・別冊 分冊とする

免疫性神経疾患の発症機構の解明と治療法の開発に関する研究
(抗ガングリオシド抗体を伴う免疫性ニューロパチーの研究)

主任研究者 楠 進 東京大学医学部附属病院神経内科講師

A. 研究目的

免疫性神経疾患、なかでもギラン・バレー症候群をはじめとする免疫性ニューロパチーでは、近年の研究により抗ガングリオシド抗体がしばしば血中に上昇することが明らかになり、診断マーカーとして、さらに病態に関わる可能性のある因子として注目されている。ガングリオシドには数多くの分子種があるが、とくにギラン・バレー症候群では症例ごとにさまざまなガングリオシドに対する抗体が上昇することが知られる。本研究班では、この抗ガングリオシド抗体に焦点を当てて、それぞれの抗体の診断的意義、および病態に果たす役割を明らかにし、それらの知見に基づいて最適の治療法を開発することを目的としている。

楠班員は後根神経節の一次感覚ニューロンにガングリオシド GD1b が局在すること、GD1b のジシアロシル基を認識する抗体は感覚障害性失調性ニューロパチーに特異的に関連することなどの知見に基づいて、ウサギを GD1b で感作し、感覚障害性失調性ニューロパチーの動物モデルを作成して、さらに他のガングリオシドに交差反応しない抗 GD1b IgG 抗体が発症に重要であることを指摘していた。本年度は抗 GD1b IgG 抗体のみが陽性で他の抗ガングリオシド抗体を伴わないギラン・バレー症候群の臨床的特徴を解析した。

鎌倉班員は従来から楠班員との共同研究によりギラン・バレー症候群における抗 GalNAc-GD1a 抗体の意義の検討を行っており、抗 GalNAc-GD1a IgG 抗体は、脳神経障

害を伴わない純粋運動型ギラン・バレー症候群に関連することを明らかにしていた。本年度は抗 GalNAc-GD1a 抗体の病因的意義を検討する目的で、GalNAc-GD1a の分布を検討した。

結城班員はウシ脳の粗ガングリオシドおよび GM1 ガングリオシドをウサギに免疫することにより、軸索障害型ギラン・バレー症候群の動物モデルの作成を報告していた。本年度はモデル作成のための抗原の最適投与量を検討し、また同モデルの電気生理学的・免疫組織化学的検討を行った。

吉野班員は免疫性神経疾患において酸化ストレスが関与しているかを検討するため、髄液中の 3-nitrotyrosine (3-NT) を測定した。

B. 研究方法

東京大学神経内科に抗体検査依頼のあった 694 例の急性期ギラン・バレー症候群血清について、GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GalNAc-GD1a, GT1b, GQ1b, GA1, Gal-C の 11 種類の糖脂質に対する抗体を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。その中から GD1b に反応する IgG 抗体のみをもつ症例について、臨床的特徴を検討した。

GalNAc-GD1a をウサギに免疫して得た、高力価の抗 GalNAc-GD1a 抗血清から、アフィニティーカラムを用いて抗 GalNAc-GD1a 抗体を精製した。この抗体を用いてヒト末梢神経について免疫組織化学的検討を行った。抗ニューロフィラメント抗体による染色を軸索の、抗

HNK-1 抗体による染色をミエリンのマーカーとした。

ウサギのオスにアジュバントとともに、ウシ粗ガングリオシド 0.5, 1, 2.5, 5 mg、GM1 0.5mg、ガラクトセレブロシド 1mg をそれぞれ抗原として感作し、発症率・重症度を検討した。また全身麻酔下に電気生理学的評価を行った。さらに免疫組織化学的に IgG の沈着について検討を加えた。

ギラン・バレー症候群 15 例を含む 77 例の神経疾患患者の髄液中 3-nitrotyrosine(3-NT)を定量した。

C. 研究結果と D. 考察

抗 GD1b IgG 抗体単独陽性のギラン・バレー症候群患者では、先行感染は大多数が呼吸器感染であり、全例に感覚障害がみられ、特に深部感覚障害を呈する症例が有意に多かった。また電気生理学的には脱髄型が多く軸索障害型はなかった。GD1b はヒトでは一次感覚ニューロンに加えて末梢神経の Ranvier 絞輪周囲のミエリンにも局在する。抗 GD1b IgG 抗体はこれらの部位に結合して、感覚障害や脱髄の発症機序に関与している可能性が考えられる。

抗 GalNAc-GD1a 抗体を用いてヒト末梢神経系の免疫組織化学的検討を行った結果、脊髄前根の傍絞輪部、後根の一部の小径線維、後根神経節細胞周囲の一部の神経線維、および筋内神経線維の軸索周囲が染色され、また筋内神経では軸索内部にも染色がみられた。抗 GalNAc-GD1a 抗体を伴う純粋運動型ギラン・バレー症候群では、前根や筋内神経における GalNAc-GD1a 局在部位への抗体の結合が発症に関与している可能性がある。

粗ガングリオシドと GM1 の投与量を検討した結果、軸索障害型ギラン・バレー症候群のモデル作成にはウシ脳粗ガングリオシド 2.5mg を抗原とするのが最適であるとの結論を得た。電気生理学的に急性期には複合筋活動電位振幅や運動神経伝導速度にほとんど変化なく、一

部の F 波の消失を認めたのみであったことから、急性期には近位部に伝導障害をきたしている可能性が示唆された。また長期経過観察例では複合筋活動電位振幅の低下がみられた。免疫組織化学的には、神経根と馬尾の軸索に IgG の沈着がみられた。以上からこの動物モデルでは、急性期には血液神経関門が脆弱な神経根に病変をきたしている可能性が考えられた。

髄液中の 3-NT を測定した結果、ギラン・バレー症候群の一部で 3-NT 高値例の存在が明らかになった。3-NT 高値のギラン・バレー症候群はいずれも後遺症を残す症例であり、3-NT が機能予後を推定する新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

E. 結論

GD1b を特異的に認識する IgG 抗体は、ギラン・バレー症候群における感覚障害(特に深部感覚障害)や脱髄に関連し、それらのマーカーとなり得る。さらに GD1b 局在部位であるヒト末梢神経系の後根神経節神経細胞と傍絞輪部ミエリンに結合し、感覚障害や脱髄の病態に関連している可能性が考えられる。

GalNAc-GD1a はヒト末梢神経の脊髄前根の傍絞輪部、後根の一部の小径線維、後根神経節細胞周囲の一部の神経線維、および筋内神経線維の軸索周囲に局在する。とくに前根や筋内神経の GalNAc-GD1a は純粋運動型ギラン・バレー症候群の血中抗体の標的となっている可能性がある。

ウシ脳粗ガングリオシド 2.5mg がウサギにおける軸索型ギラン・バレー症候群モデルの最適抗原量である。このモデルでは神経根が急性期の病変部位と考えられる。

3-NT 高値のギラン・バレー症候群はいずれも後遺症を残す症例であることから、3-NT が機能予後を推定する新たなマーカーとなる可能性が考えられた。

研究要旨

ガングリオシド GD1b はウサギ末梢神経では後根神経節神経細胞に局在し、GD1b でウサギを感作すると感覚障害性失調性ニューロパチー動物モデルを作成できる。ヒト末梢神経では GD1b は後根神経節神経細胞と Ranvier 絞輪周囲のミエリンに局在する。他の抗ガングリオシド抗体を伴わず抗 GD1b IgG 抗体単独陽性のギラン・バレー症候群(GBS)の臨床的特徴を検討したところ、大多数で呼吸器感染が先行し、全例で感覚障害がみられ、特に深部感覚障害を呈する症例が有意に多かった。電気生理学的には脱髄型が多く軸索障害型はなかった。以上より、GD1b を特異的に認識する IgG 抗体は上記の GD1b 局在部位に結合し感覚障害や脱髄の発症機序に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群(GBS)急性期血中には、約 50-60%に抗ガングリオシド抗体の上昇がみられ、診断および病態解明の手がかりとして注目されている。抗ガングリオシド抗体の病態機序における役割を解明するには、それぞれのヒト末梢神経における局在を知ることが重要であるが、不明な点が多い。その中でガングリオシド GD1b については、免疫組織染色により後根神経節神経細胞と Ranvier 絞輪周囲のミエリンに局在することが明らかとなっている。

ウサギにおいては、後根神経節神経細胞にヒトと同様に GD1b の局在がみられるが、Ranvier 絞輪周囲のミエリンにはみられない。われわれはウサギを GD1b で感作することにより、感覚障害性失調性ニューロパチーの作成に成功し、GD1b のみを認識して類似の末端糖鎖構造(Ⅹ)をもつ GM1 には反応しない

IgG 抗体の上昇が発症に重要であることを報告した。

一方 GBS ではしばしば抗 GD1b 抗体の上昇がみられるが、GM1 をはじめとして他の抗ガングリオシド抗体が同時にみられることが多い。今回は、多数のガングリオシドとの反応をしらべたうえで、GD1b に対する IgG 抗体のみがみられた症例を集めて、その臨床的特徴を検討した。

B. 研究方法

当科に抗体測定依頼のあった 694 例の急性期 GBS 血清について、GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GalNAc-GD1a, GT1b, GQ1b, GA1, Gal-C の 11 種の糖脂質に対する抗体を ELISA 法により測定した。その中から GD1b に反応する IgG 抗体のみをもつ症例について、臨床的特徴を検討した。臨床に関する情報は検体に添付された紹介状の内

容、および臨床経過・臨床症状・電気生理学的検査の内容をアンケートの形で問い合わせたものを用いた。重症度は Hughes の基準を、また電気生理学的検査は Hadden らの基準を用いた。記録ファイルの番号が 5 の倍数の症例についてアンケートを依頼し、回答の得られたものを対照 GBS とした。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報に関するものではなく、患者群を対象とするものであり、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

694 例中 15 例(2.2%)が、抗 GD1b IgG 抗体のみ陽性であり、15 例中 12 例で臨床情報が得られた(GD1b 群)。また対照 GBS として 51 例の情報が得られた(対照群)。

先行感染は GD1b 群では 12 例中 10 例が呼吸器感染であり、対照群との間に有意差を認めた。臨床的重症度は両群間に差を認めなかった。GD1b 群は全例に何らかの感覚障害(表在覚低下、深部覚低下、異常感覚)を認めた。GD1b 群では 12 例中 6 例に深部感覚障害がみられ、対照群に比し有意に高頻度であった。また GD1b 群では 2 例に、筋力低下や深部覚障害が軽度であるにもかかわらず著明な失調を認め、小脳性失調があると考えられた。電気生理学的には GD1b 群では 12 例中 7 例が脱髄型であり、軸索障害型は認められなかった。

D. 考察

GBS 急性期には、約 20%の症例で抗 GD1b 抗体活性がみられる。GD1b の糖鎖構造は図に示す通りであり、Gal-GalNAc 基とジシアロシル基が存在する。Gal-GalNAc 基を認識する抗体は GM1 にも交差反応する。GBS では Gal-GalNAc 基を認識すると考えられる抗

体のみられることが多い。ジシアロシル基を認識する抗体は同じくジシアロシル基をもつ GD3、GT1b、GQ1b などにも広く交差反応する。このタイプの抗体は、特異的に感覚障害性失調性ニューロパチーに伴うことが知られるが、GBS でみられることはまれである。一方 GD1b を特異的に認識する抗体を有する症例については、感覚障害性失調を特徴とする 1 例と小脳性失調を特徴とする 2 症例との症例報告があるが、多数例の検討はまだない。今回は GD1b を特異的に認識する IgG 抗体の臨床的意義を明らかにするために、他のガングリオシドに対する抗体活性がなく GD1b にのみ IgG 抗体活性のみみられる 12 症例について、その臨床的特徴を解析した。

その結果、ほとんどの症例で呼吸器感染が先行することがわかった。また感覚障害が全例でみられ、特に深部感覚障害を呈する症例が優位に多かった。電気生理学的には脱髄型が多く軸索障害型はみられなかった。これらは消化器感染の先行が多く、運動麻痺や軸索障害と関連するという特徴をもつ GM1, GD1a, GalNAc-GD1a などに対する IgG 抗体陽性例と対照的である。また 2 例では小脳性と考えられる失調症状がみられた。

E. 結論

GD1b を特異的に認識する IgG 抗体は GD1b 局在部位であるヒト末梢神経系の後根神経節神経細胞と傍絞輪部ミエリンに結合し、感覚障害や脱髄の病態に関連している可能性が考えられる。一方小脳性失調のみみられる症例が少数だが存在することも特徴的である。後根神経節の GD1b 陽性細胞の中に小脳への入力系に関与するものがある可能性があり、今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki T, Kusunoki S, Kaida K, Shiina M, Kanazawa I. Guillain-Barré syndrome associated with IgG monospecific to ganglioside GD1b. *Neurology*, in press
- 2) Kusunoki S. Antiglycolipid antibodies in GBS and autoimmune neuropathies. *American Journal of Medical Science* 319:234-239, 2000
- 3) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Guillain-Barre syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a. *Brain*

123:116-124, 2000.

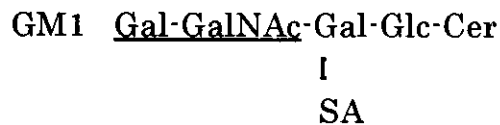
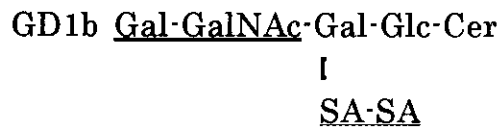
- 4) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Guillain-Barré syndrome with IgM antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a. *J Neuroimmunol*, 113:260-267, 2001.

2. 学会発表

- 1) 楠 進, 宮崎泰, 金澤一郎. 抗 GD1b IgG 抗体単独陽性のギラン・バレー症候群の臨床的特徴. 第13回日本神経免疫学会, 2001年2月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



☒ GD1b と GM1 の糖鎖構造
Gal: galactose, GalNAc: N-acetylgalactosamine
Glc: glucose, SA: sialic acid, Cer: ceramide
Gal-GalNAc: Gal-GalNAc 基
SA-SA: ジシアロシル基

厚生科学研究費補助金（脳研究事業）
総括研究報告書

GalNAc-GD1a のヒト末梢神経組織における局在に関する研究

主任研究者 楠 進 東京大学医学部 神経内科講師

研究要旨 GalNAc-GD1a 感作家兎血清より得た GalNAc-GD1a 特異的ウサギ IgG 抗体を用いて、ヒト前根、後根、後根神経節、筋内神経を免疫組織化学的に検討した。同抗体は、前根の神経線維の傍絞輪部、後根の一部の小径線維、後根神経節細胞周囲の一部の神経線維、および筋内神経線維において軸索の周囲を染色した。また筋内神経では軸索内部にも染色がみられた。IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体は遠位優位の脱力を示す純粋運動型 Guillain-Barré 症候群と関連するが、前根および筋内神経での染色はこれに矛盾しないと考えられた。後根神経節、後根小径線維での染色の意義は今後の検討が必要である。

分担研究者 鎌倉恵子
防衛医科大学第三内科
助教授

A. 研究目的

抗ガングリオシド抗体は Guillain-Barré 症候群 (GBS) の症例の約 60% にみられ、発症に関与していると考えられている。我々は、末梢神経の微量ガングリオシド、N-acetylgalactosaminyl-GD1a (GalNAc-GD1a) が一部の GBS において標的抗原となることを見出した。そして IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体は、脳神経障害を伴わない純粋運動型 GBS の診断マーカーとなり、症候を規定する因子として臨床的意義をもつことを明らかにした。今回、抗 GalNAc-GD1a 抗体の病因的意義を調べる目的で、ヒト末梢神経系における GalNAc-GD1a の分布を免疫組織学的に検討した。これまでも GQ1b の外眼筋支配神経の Ranvier 絞輪部における局在、GD1b の後根神経節大型神経細胞、および神経線維の傍絞輪部における局在など、一部のガングリオシドの分布が報告されているが GalNAc-GD1a に関してはまだ確認されていなかった。

B. 研究方法

(1) 抗 GalNAc-GD1a 抗体の作成：抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性血清を得るため、牛脳より精製した GalNAc-GD1a を日本白ウサギに免疫した。第 0、3 週に GalNAc-GD1a を 0.5 mg ずつ皮内接種し、第 6 週に静注した。抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性家兎血清を、GalNAc-GD1a を結合させた Octylsepharose-4B gel に流し、抗 GalNAc-GD1a 抗体を吸着させた後、3 M NaSCN にて抗体を抽出回収した。回収抽出液の抗体価を GalNAc-GD1a, GM1, GD1a, GM2, GM1b に関して ELISA で測定した。さらに同抽出液のウサギ IgG に関し定量を行なった。(2) 免疫組織化学：ヒト前根、後根、後根神経節、筋内神経（上腕二頭筋）を剖検組織（5 例）、筋生検組織（1 例）より得た。これらの組織から凍結切片を作成した。この凍結切片において一次抗体に方法（1）で精製した抗 GalNAc-GD1a 抗体（20 倍希釈）、抗 neurofilament マウスモノクローナル抗体（40 倍）、抗 HNK-1 マウスモノクローナル抗体（10 倍）を用いた。二次抗体にビオチン化抗ウサギ IgG 抗体、テキサスレッド標識抗マウス免疫グロブリン抗

体を用い、さらに蛍光色素標識ストレプトアビジンを用いて二重染色を行なった。標識後の切片を蛍光顕微鏡にて観察、撮影した。対照として一次抗体にウサギ IgG、マウス IgG、IgM を用いた。

C. 研究結果

(1) 抗 GalNAc-GD1a 抗体: GalNAc-GD1a 接種後の IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体価は最高 102400 倍を示した。神経症状の発症はみられなかった。GalNAc-GD1a 感作ウサギの血清から精製した IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体の抗体価は ELISA にて 800 倍であった。その他の抗ガングリオシド抗体は IgG 抗 GM1 抗体の 10 倍を除き、すべて陰性であった。(2) 免疫組織化学的検討: 前根において、一部の神経線維の軸索周囲に抗 GalNAc-GD1a 抗体の結合を認めた。抗 neurofilament 抗体との二重染色では、軸索表面において染色の重複がみられた。縦断像では軸索表面に結合が認められ、特に傍絞輪部、絞輪部に強い結合がみられた。後根では、小径線維に選択的に抗 GalNAc-GD1a 抗体による染色を認めた。抗 neurofilament 抗体との二重染色では、小径線維の軸索表面における染色の重複が目立っていた。後根神経節における検討で後根神経節細胞周囲の一部の神経線維に結合を認め、抗 neurofilament 抗体との二重染色では、軸索表面に染色の重複を認めた。筋内神経においては、神経線維の軸索および軸索周囲に抗 GalNAc-GD1a 抗体による染色を認めた。抗 neurofilament 抗体との二重染色では軸索表面における染色の重複所見が優位であったが、軸索内部における染色の重複もみられた。抗 HNK-1 抗体との二重染色では、抗 HNK-1 抗体による染色の主に内側で染色の重複がみられた。ウサギ IgG、マウス IgG、およびマウス IgM を用いた検討では有意な染色はみられなかった。また chloroform/methanol=1/1 溶液で処理した切片においては、上記の抗 GalNAc-GD1a 抗体による染色はみられな

かった。

D. 考察

本研究の結果から、運動神経線維において GalNAc-GD1a は軸索膜、あるいは軸索に近い髄鞘の内側部分に分布している可能性がある。また横断面での染色部位の散在と、縦断面での検討から絞輪、傍絞輪部に密に分布していると考えられた。IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 GBS においては、電気生理学的に軸索障害型優位か、脱髄型を示すのか未だ議論がある。本結果からは抗 GalNAc-GD1a 抗体は脱髄、軸索障害のどちらにも関連しうると考えられた。さらに局在を明らかにするには、電顕による解析、生化学的分析も必要と考えられる。IgG 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 GBS は感覚障害のない純粋運動型 GBS を呈するが、前根、筋内神経での染色所見はこれに矛盾しないと考えられた。本検討では感覚線維にも GalNAc-GD1a の存在を認めたが、小径線維が中心であり、抗 GalNAc-GD1a 抗体による障害が存在しても電気生理学的に検出されにくい可能性がある。感覚線維での染色の意義は、後根神経節における神経節周囲の神経線維における染色とともに今後さらに検討する必要がある。HNK-1 エピトープはミエリン関連糖蛋白(MAG)、P0 蛋白など髄鞘に主に存在することから、筋内神経において GalNAc-GD1a は軸索膜、あるいは軸索に近い髄鞘の内側部分に分布し、一部軸索内部にも分布していると考えられる。また筋内神経における GalNAc-GD1a の存在は、抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 GBS において、神経終末に近い同部位の障害で筋力低下をきたす可能性を示唆している。

神経線維の軸索膜、あるいは軸索に近い髄鞘の内側部分における GalNAc-GD1a の分布から、GalNAc-GD1a が何らかの軸索およびミエリン蛋白と関連し、軸索-ミエリン間の相互作用に関わっている可能性もあると考えられ、さらに検討をすすめていく予定である。

E. 結論

免疫組織化学的に、GalNAc-GD1a はヒト前根の傍絞輪部、後根小径線維、後根神経節細胞周囲の一部の神経線維、および筋内神経線維において、軸索膜あるいは軸索周囲の髄鞘に分布していることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2) K Kaida, S Kusunoki, K Kamakura, K Motoyoshi, and I Kanazawa. Guillain-Barré syndrome with IgM antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a. *J Neuroimmunol.* 113(2), 260-267, 2001.

2. 学会発表

1) 海田賢一, 楠 進, 鎌倉恵子, 元吉和夫, 金澤一郎. IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 Guillain-Barré 症候群における臨床像と抗体の特異性との相関. 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 5 月 24~26 日, 2000 年.

2) K Kaida, S Kusunoki, K Kamakura, K Motoyoshi, I Kanazawa. Guillain-Barré syndrome with IgM antibody to a ganglioside, GalNAc-GD1a. 125th American Neurological Association Annual Meeting, Boston, 10.15~18, 2000.

3) 海田賢一, 楠 進, 鎌倉恵子, 元吉和夫, 金澤一郎. ヒト末梢神経組織における GalNAc-GD1a の分布の免疫組織化学的検討. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 5 月 11~13 日, 2001 年 (予定).

4) K Kaida, S Kusunoki, K Kamakura, K Motoyoshi, I Kanazawa. Localization of a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a on human peripheral nervous tissue.

Peripheral nerve society meeting in Tyrol, Austria, September 8~12, 2001(予定).

軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の樹立：第2報

分担研究者 結城 伸泰 獨協医科大学神経内科助教授

軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の病態を詳細に検討した。ウシ脳ガングリオシド、GM1をウサギに感作し、神経症状観察、抗体検索の他、電気生理、免疫組織学的検討を行った。またガラクトセレブロシド感作による脱髄性ニューロパチーモデルと比較した。ガングリオシド投与量に依存して発症率が増加し、2.5 mg感作群で全例が重度の麻痺を呈した。よって本モデルでは、ウシ脳ガングリオシド 2.5 mg感作が適切と考えられた。電気生理学的検討では、ガラクトセレブロシド感作群では急性期より脱髄所見を呈した。それに対し、軸索型ギラン・バレー症候群モデルでは、急性期は一部のF波消失を認めるのみで、複合筋活動電位振幅や伝導速度は異常なかった。免疫組織学的検討では、神経根、馬尾に限局して軸索にIgG沈着を認めた。したがって本モデルでは、血液神経関門が脆弱な神経根に限局して軸索障害が起こることが示唆された。

A. 背景

ギラン・バレー症候群 (GBS) は、急性に四肢筋力低下をきたす神経・筋疾患のうち最も頻度が高い。単純血漿交換や免疫グロブリン大量静注の有効性が確立されているが、8%の患者が急性期も含めて1年以内に死亡するなど、決して予後良好な疾患ではない。さらに、軸索が一次的に傷害され、特に予後不良な軸索型 GBS の存在が広く認知されるに至り、新たな特異的治療の開発が望まれている。そのためには、実験動物モデルの確立が不可欠である。

GBS では、IgG クラスの自己抗体が主要な病因物質と想定されている。約3割を占める *Campylobacter jejuni* 腸炎後 GBS は軸索型を呈することが多く、うち8割でIgG抗GM1抗体が検出される。下痢を前駆症状とした GBS 患者から分離された *C. jejuni* のリポ多糖が、GM1 ガングリオシドと共通する構造を有し、病原体と神経構成成分の分子相同性の存在も明らかにされている。一方、西ヨーロッパや南アメリカを中心に、各種神経疾患の治療のためウシ脳ガングリオシド (BBG) を注射後に GBS が発生したとする報告が相次いだ。BBG 注射後 GBS 患者の血清中に IgG 抗 GM1 抗体が上昇することも知られている。

B. 研究目的

軸索型 GBS の動物モデルにおいて、投与抗原量の検討や、脱髄型ニューロパチーの実験モデルとの比較を行った。また、電気生理学的、免疫組織化学的検討を加え、末梢神経病変の局在について考察した。

C. 方法

(1) Japanese white rabbit のオスに、*keyhole limpet hemocyanin* 1 mg、 Freund 完全アジュバントとともにエマルジョン化した抗原液を、皮下および腹腔内注射により3週に1回感作を繰り返した。抗原には、イタリアにおいて治療目的でヒトに注射されていた BBG (GM1 21%、

GD1a 40%、GD1b 16%、GT1b 19%) を各々0.5, 1, 2.5, 5 mg, Sigma (St. Louis, USA) より購入した GM1 を 0.5 mg、ガラクトセレブロシド (GC) を 1 mg 用いた。ウサギの行動を毎日観察し、神経徴候を評価した。

(2) 週1回耳介静脈から採血した。得られた血漿を用いて、ELISA 法で GM1 と GC に対する抗体を測定した。

(3) 電気生理学的評価を BBG 2.5 mg、GM1、GC 感作群に施行した。塩酸ケタミン筋注による全身麻酔下で、左脛骨神経を足関節部、膝部、坐骨結節部で刺激し、足底筋から複合筋活動電位を記録した。前脛骨筋から安静時針筋電図所見を記録した。同時に膝蓋腱反射も評価した。

(4) 固定液 (3%グルタルアルデヒド、1%パラフォルムアルデヒド) で灌流固定の後、標本を摘出し、トルイジンブルー染色で神経傷害を評価した。

(5) BBG 感作群は、2%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した後、神経根、馬尾、坐骨神経、脛骨神経を摘出した。ペルオキシダーゼ標識 protein G で反応させ、IgG 沈着の局在を評価した。

(倫理面への配慮)

実験に際しては、十分な麻酔を行うなど、実験動物の苦痛除去に配慮した。

D. 研究結果

(1) 抗原感作開始後、早い例では5週前後で、体重減少、四肢の麻痺が出現した。BBG 0.5 mg 感作した3羽中、発症したのは1羽のみで、症状はごく軽く、数日で回復した。BBG 1 mg 感作した6羽では、重症3羽、軽症2羽であった。BBG 2.5 mg 感作した6羽は、すべて重度の四肢、頸部麻痺を呈した。BBG 5 mg 感作した3羽では、重症2羽、軽症1羽であった。また、GM1 を感作した8羽のうち、3羽で重症、2羽でごく軽症の麻痺を生じた。GC を感作した8羽では、7羽が明らかな麻痺を呈した。

(2) BBG、GM1 感作群で抗 GM1 抗体を、GC 感作群で GC に対する抗体を検出した。まず IgM 抗体が上昇し、IgG

抗体へクラススイッチした後に麻痺などの症状を呈した。
(3) GC 感作群の電気生理学的評価では、複合筋活動電位振幅の低下、時間的分散、運動神経伝導速度低下など、典型的な脱髄性変化を認めた。それに対し、BBG, GM1 感作群では、急性期には膝蓋腱反射の低下ないし消失を伴う重度の麻痺を呈するにもかかわらず、複合筋活動電位振幅や運動神経伝導速度には明らかな異常は認めなかった。しかし長期経過を観察できた例で、脱神経電位、複合筋活動電位振幅の低下を観察できた。また、F波のうち伝導の遅い成分が急性期に消失し、回復期にやや遅い潜時で再度出現した。

(4) 病理学的検討では、坐骨神経で軽度～中等度の Waller 様変性を認めた。

(5) BBG 感作群の免疫組織化学的検討では、神経根、馬尾の横断切片で軸索が染色される神経線維を認めた。この所見は坐骨神経、脛骨神経では認められなかった。神経根の縦断切片では、軸索が局所的に染色される像のほか、Ranvier 絞輪周囲が染色される像を認めた。

E. 考察

GM1 より BBG 感作群の方が、発症率が高かった。また BBG の方が抗原の調整が容易で安価でもあるため、抗原として適切と思われる。したがって軸索型 GBS モデル作製のためには、BBG 2.5 mg 感作が最適と考えられた。

軸索型 GBS モデルの急性期には、複合筋活動電位振幅や運動神経伝導速度にはほとんど変化なく、電気生理学的異常は一部の F 波の消失を認めたのみであった。したがって、電気生理学的には、急性期では近位部に伝導障害が存在する可能性が示唆された。ヒトの軸索型 GBS で、急性期における電気生理学的異常が、F 波の消失のみである場合も知られており、その機序として血液神経関門の脆弱な神経根での生理的伝導障害や軸索変性などが考えられている。さらに、長期経過を観察できた例では、近位部の軸索変性が末梢へ進展したことにより、後に複合筋活動電位振幅低下を認めたものと考えられる。一方、免疫組織学的評価により、軸索への IgG 沈着像は、神経根、馬尾に限局して認められた。これらの所見を併せ、ウサギを用いた軸索型 GBS 実験モデルでは、急性期には血液神経関門が脆弱な神経根に末梢神経病変が局在している可能性が示唆された。

F. 研究発表

Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Hirata K. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol in press*

免疫性神経疾患及び ALS における髄液中 nitrotyrosine に関する研究

分担研究者 吉野 英 国立精神・神経センター国府台病院 神経内科医長

研究要旨 ALS をはじめとする神経変性疾患の成因に酸化ストレスが関わっていることが知られている。今回免疫性神経疾患において酸化ストレスが関与しているか、髄液中 3-nitrotyrosine (3NT) を測定することにより検討した。その結果、ギランバレー症候群の中で、後遺症を残存した症例および慢性の感覚障害優位の多発神経炎に 3NT 高値例が多い傾向であった。免疫性神経疾患の一部に酸化ストレスが病態に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

近年 ALS をはじめとする神経変性疾患において、酸化ストレスによる神経障害が大きな役割を果たしていることが知られてきた。NO と superoxide の反応物の peroxynitrite は、チロシン残基に結合し 3-nitrotyrosine (3-NT) を生成するが、ニューロフィラメントの L 鎖に結合しリン酸化を阻害し、ニューロフィラメントの assembly を障害することにより、神経変性をもたらす可能性が考えられている。本研究では、3-NT の臨床的意義を探索的に評価するために、ALS および免疫性神経疾患における髄液中 3-NT を測定した。

B. 対象及び方法

対象は ALS 21 例、GBS 15 例、CIDP 16 例、Fisher 症候群 12 例、その他の疾患 13 例である。方法は、Cyman 社キットによる Competitive EIA 法を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究において測定する 3-NT は疾患のプロセスで生じる生化学的マーカーと考えられ、個人の遺伝情報を含まず、本研究は倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

GBS では $3.5 \pm 9.3 \text{ ng/ml}$ であったが、上昇群 (N=5) と非上昇群 (N=10) を比較したところ、上昇群では発病後平均 6 ヶ月を経過した時点でも全例において筋力低下の後遺症を有しており通院中であることがわかった。非上昇群の 10 例のうち、2 例は後遺症を呈していたが、他の 8 例は治癒したものと既に外来通院していないものことがわかった。CIDP では感覚障害優位型は、運動障害優位型よりも有意に 3-NT 値が高かった。フィッシャー症候群での 3-NT 値はほとんどの例で低値であった。ALS では $1.6 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ であったが、上昇群 (N=10) と非上昇群 (N=11) に分かれた。その他の疾患の中では少数例であるが、アルツハイマー病で 3-NT が高値であった。

D. 考察

今回の研究で ALS のみならず、GBS の一部や感覚神経障害優位の CIDP などの免疫性神経疾患や、アルツハ

イマー病でも 3-NT 高値を示す症例が存在したことがわかった。このことは免疫性神経疾患を含む多くの神経疾患で神経細胞障害過程において peroxynitrite による酸化ストレスが重要な役割を演じていることが示唆される。

GBS の大部分の症例は予後良好と考えられているが、約 1/4 に後遺症を呈する一群が存在することから、機能的予後を予測する診断法の開発が重要である。今回 3NT 上昇した GBS 患者は機能障害が残存する例が多かったことから、3NT が機能予後を予測するマーカーとなる可能性がある。今後さらに症例数を蓄積し、臨床的に詳細な比較検討を行い、長期予後における意義を解明する必要があるであろう。

E. 結論

ALS の約半数の症例、及び GBS の一群と感覚障害優位の免疫性神経疾患や、少数例であるがアルツハイマー病でも 3-NT 高値を示す症例が存在した。3-NT 高値を示した GBS 5 例はすべて後遺症を残存しており、3-NT が機能的予後を予測する新たな診断マーカーとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Yoshino H, Harukawa H, Asano A: IgG antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome with bulbar palsy. J. Neuroimmunol 105:195-201, 2000.
- 2) Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H, Sato T: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. Neurology 55:718-721, 2000.

学会発表

- 1) 吉野英. 正常人および ALS における IgM 抗 GM1、GalNAc-GD1a、SGPG 抗体. 第 41 回日本神経学会総会 (2000 年 5 月, 松本)

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Brain 123:116-124, Guillain-Barre syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a.	2000年		Kaida K, <u>Kusunoki S</u> , Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I.
Muscle Nerve 23:702-706, Chronic motor axonal neuropathy associated with antibodies monospecific for N-acetylgalactosaminyl GD1a.	2000年		Kaji R, <u>Kusunoki S</u> , Mizutani K, Oka N, Kojima Y, Kohara N, Kimura J.
J Neurol 247:566-567, Elevation in anti-GQ1b, anti-GT1a, and anti-GT1b IgG antibodies in postinfectious acute ataxic neuropathy with oropharyngeal palsy but without ophthalmoplegia.	2000年		Kamakura K, Kaida K, <u>Kusunoki S</u> , Miyamoto N, Fukuda J, Motoyoshi K.
Eur J Neurol 7:227-230, Ataxic form of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP).	2000年		Yato M, Ohkoshi N, Sato A, Shoji S, <u>Kusunoki S</u> .
Am J Med Sci 319:234-239, Antiglycolipid antibodies in GBS and autoimmune neuropathies.	2000年		<u>Kusunoki S</u> .
J Neuroimmunol, 113:260-267. Guillain-Barré syndrome with IgM antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a.	2001年		Kaida K, <u>Kusunoki S</u> , Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I.
Neurology, in press. Guillain-Barré syndrome associated with IgG monospecific to ganglioside GD1b.			Miyazaki T, <u>Kusunoki S</u> , Kaida K, Shiina M, Kanazawa I.
J Neuroimmunol, in press. Variability in immunohistochemistries of IgM M-proteins binding to sulfated glucuronyl paragloboside.			Shiina M, <u>Kusunoki S</u> , Miyazaki T, Kanazawa I
Neurology, in press. Anti-Gal-C antibodies in GBS subsequent to mycoplasma infection: evidence of molecular mimicry.			<u>Kusunoki S</u> , Shiina M, Kanazawa I.

Modern Rheumatology, in press. Guillain-Barré syndrome following herpes zoster in a patient with systemic sclerosis.			Yamaguchi M, Chiba A, Yanagawa T, Mato T, Hirai K, Inoue T, Oya Y, <u>Kusunoki S</u> , Ito K, Yamamoto K.
広島市民病院医誌 16:71-74, 高度な球麻痺症状と眼球運動障害を伴 った Guillain-Barré 症候群の 1 例。	2000 年		今村貴樹、好永順二、佐々 木高伸、中村靖、佐藤創 一郎、吉村靖司、宮坂国 光、引地明義、 <u>楠 進</u> 。
臨床神経学 40:979-985 ギラン・バレー症候群のトリプトファン カラムによる免疫吸着療法の検討ー抗 ガングリオシド抗体の検討も含めてー	2000 年		荒木俊彦、中田悠皓、 <u>楠 進</u> 、新井裕至、 片山泰朗
脳と神経 53:275-278 抗 GT1a 抗体価が高値で、咽頭筋麻痺を 初発症状とした Miller Fisher 症候群の 1 例	2001 年		田口芳治、高嶋修太郎、 井上博、 <u>楠 進</u> 。
運動障害 10:19-24 視神経周囲炎を伴った Bickerstaff 型脳 幹脳炎の 1 例 ーMRI 画像と電気生理 学的検査ー	2000 年		小寺力、望月仁志、宮本 憲一、海田賢一、 <u>楠 進</u> 、 元吉和夫、鎌倉恵子。
東京都医師会雑誌 53:88-90 過去 5 年間に当院に入院した Guillain-Barré 症候群患者の臨床的特 徴 ーC.jejuni 感染、抗 GalNAc-GD1a 抗体についてー	2000 年		神崎真実、海田賢一、 宮本憲一、中村良司、 真先敏弘、元吉和夫、 鎌倉恵子、 <u>楠 進</u> 。
内科 85:745-760, 免疫性神経疾患治療の最前線（座談会）	2000 年		<u>楠 進</u> 、太田宏平、錫村 明生、神田隆
内科 85:602-603, 2000. Editorial 免疫性神経疾患とは何か	2000 年		<u>楠 進</u>
Clinical Neuroscience 18: 520-521, 顔面麻痺の原因と病態 Guillain-Barré 症候群	2000 年		海田賢一、 <u>楠 進</u>
臨床医 26:824-825, 2000. 内科治療のグローバルスタンダード、 Guillain-Barré 症候群。	2000 年		椎名盟子、 <u>楠 進</u>
現代医療 32:2275-2280, ガングリオシドと神経疾患。	2000 年		<u>楠 進</u>
医学のあゆみ 195:749-753, 抗糖鎖抗体の関連するニューロパチー。	2000 年		<u>楠 進</u> 。

BIO Clinica 15:942-946, 免疫性ニューロパチーの病態と治療。	2000年		楠 進。
神経治療学 17: 331-333, 特集/神経疾患治療の進歩、末梢神経障 害。	2000年		楠 進。
Clinical Neuroscience 19:75-88, ニューロパチーをめぐる (座談会)。	2000年		祖父江元、池田修一、長 谷川修、楠 進。
RA & セラピー7:26-33 RA における多発性神経障害と多発性 単神経障害。	2001年		三方崇嗣、楠 進。

研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
脱髄性疾患の生物マーカー。Annual Review 神経 2000。(後藤文男他編) pp235-241, 2000	2000年	中外医学社	海田賢一、楠 進。
フィッシャー症候群。難病の最新情報疫学から臨床・ケアまで(大野良之他編) p202	2000年	南山堂	楠 進。

1. 論文発表

- 1) K Kaida, S Kusunoki, K Kamakura, K Motoyoshi, and I Kanazawa.
Guillain-Barré syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a. Brain 123: 116-124, 2000.
- 2) K Kaida, S Kusunoki, K Kamakura, K Motoyoshi, and I Kanazawa.
Guillain-Barré syndrome with IgM antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a. J Neuroimmunol (in press).
- 3) Tanaka M, Tanaka K, Miyamoto N, Kamakura K. A peptide with the binding motif for the HLA B7 supertype reacts with CD8-positive cytotoxic T cells in anti-Hu syndrome. Biomedical Research 21: 25-29, 2000
- 4) Kamakura K, Kaida K, Kusunoki S, Miyamoto N, Fukuda J, Motoyoshi K.
Elevation in anti-GQ1b, anti-GT1a, and anti-GT1b IgG antibodies in postinfectious acute ataxic neuropathy with oropharyngeal palsy but without ophthalmoplegia. J Neurol 247:566-567, 2000,
- 5) 西井貴誠、平田彰、真先敏弘、海田賢一、中村良司、元吉和夫、鎌倉恵子
多発性硬化症患者における被殻、視床の MRI T2 画像低信号化所見の検討—日本と欧米との比較—
臨床神経学 2000, 40: 677-682
- 6) 小寺力、望月仁志、宮本憲一、海田賢一、楠進、元吉和夫、鎌倉恵子
視神経周囲炎を伴った Bickerstaff 型脳幹脳炎の一例—MRI 画像と電気生理学的検査— 運動障害 10:19-24, 2000
- 7) 神崎真実、海田賢一、宮本憲一、中村良司、真先敏弘、元吉和夫、鎌倉恵子、楠進
過去 5 年間に当院に入院した Guillain-Barre 症候群患者の臨床的特徴 東京都医師会雑誌 53: 354-356, 2000

2. 学会発表

- 1) 海田賢一、鎌倉恵子、元吉和夫、楠進、金澤一郎
IgM 抗 GalNAc-GD1a 抗体陽性 Guillain-Barre 症候群における臨床像と抗体の特異性との関連. 第 41 回日本神経学会総会、松本、2000
- 2) 西井貴誠、平田彰、海田賢一、真先敏弘、中村良司、元吉和夫、鎌倉恵子
多発性硬化症患者における被殻、視床の MRI T2 短縮効果—日本と欧米との比較— 第 41 回日本神経学会総会、松本、2000

- 3) Kaida K, Kamakura K, Motoyoshi K, Kusunoki S, Kanazawa I
Guillain-Bare syndrome with IgM antibody to a ganglioside, GalNAc-GD1a.
The American Neurological Association Boston 2000, October
- 4) 海田賢一, 鎌倉恵子, 元吉和夫, 金澤一郎, 楠 進. ヒト末梢神経組織におけるガングリオシド, GalNAc-GD1a の分布の免疫組織化学的検討. 免疫性神経疾患に関する調査研究班平成12年度班会議. 1月30,31日, 2001年, 東京.
- 5) 西田隆, 鎌倉恵子, 宮本憲一, 中村良司, 元吉和夫. 過去10年間の当院での重症筋無力症患者のメチルプレドニゾロンパルス療法と内服療法の比較. 第97回日本内科学会講演会. 2000 京都. (日本内科学会誌 j89: 162)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tagawa Y, <u>Yuki N</u>	Bickerstaff's brainstem encephalitis associated with shingles.	J Neurol	247巻	218-219	2000年
Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, <u>Yuki N</u>	Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	68巻	191-195	2000年
Yamamoto T, <u>Yuki N</u>	No cytomegalovirus DNA in sera from patients with anti-MAG/SGPG antibody-associated neuropathy: reply.	Ann Neurol	47巻	274-275	2000年
<u>Yuki N</u> , Hirata K	Distinctions between critical illness polyneuropathy and axonal Guillain-Barré syndrome.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	68巻	398	2000年
<u>Yuki N</u> , Ang CW, Koga M, Jacobs BC, van Doorn PA, Hirata K, van der Meché FGA	Clinical features and response to treatment in Guillain-Barré syndrome associated with antibodies to GM1b ganglioside.	Ann Neurol	47巻	314-321	2000年
<u>Yuki N</u> , Odaka M, Hirata K	Bickerstaff's brainstem encephalitis subsequent to <i>Campylobacter jejuni</i> enteritis.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	68巻	680-681	2000年
<u>Yuki N</u>	Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: Guillain-Barré syndrome.	Cell Mol Life Sci	57巻	527-533	2000年
<u>Yuki N</u> , Susuki K, Hirata K	Ataxic Guillain-Barré syndrome with anti-GQ1b antibody: relation to Miller Fisher syndrome.	Neurology	54巻	1851-1853	2000年
Tagawa Y, <u>Yuki N</u> , Hirata K	Anti-SGPG antibody in CIDP: nosological position of IgM anti-MAG/SGPG-associated neuropathy.	Muscle Nerve	23巻	895-899	2000年
Odaka M, <u>Yuki N</u> , Nobile-Orazio E, Carpo M, Hirata K	Antibodies to GM1(NeuGc) in Guillain-Barré syndrome after ganglioside therapy.	J Neurol Sci	175巻	96-106	2000年
<u>Yuki N</u> , Susuki K, Hirata K	Ataxic form of Guillain-Barré syndrome associated with anti-GD1b IgG antibody.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	69巻	136-137	2000年
<u>Yuki N</u> , Koga M, Hirata K	Is <i>Campylobacter</i> lipopolysaccharide bearing a GD3 epitope essential for the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome?	Acta Neurol Scand	102巻	132-134	2000年
Susuki K, <u>Yuki N</u> , Muramatsu M, Hirata K	Unilateral ophthalmoparesis and limb ataxia associated with anti-GQ1b IgG antibody.	J Neurol	247巻	652-653	2000年
Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, Hattori T, <u>Koga M</u> , <u>Yuki N</u>	Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and <i>Campylobacter jejuni</i> infection in Japan.	Ann Neurol	48巻	624-631	2000年
Saito T, Miyai I, Matsumura T, Nozaki S, Kang J, Fujita H, Sugimoto N, <u>Yuki N</u>	A case of Bickerstaff's brainstem encephalitis mimicking tetanus.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	69巻	695-696	2000年