

4. 多発性硬化症の微生物学的原因究明に関する研究

分担研究者 高橋 和郎 福島県立医大微生物学講座助教授

研究要旨 多発性硬化症（MS）の発症に HHV-6 あるいは *C.pneumoniae* が関与するという既報の研究結果を迫試したが、その関連はほとんど認められなかった。1 例の初発若年発症例では *C.pneumoniae* に対する IgM 抗体が検出されたが、MS との関連については多数の初発例での検索が必要である。患者髄液の上清中の RNA に由来する遺伝子を検索したがヒトあるいは非ヒト由来遺伝子のみが検出された。

A. 目的

多発性硬化症（MS）の発症に微生物感染が関与するとの作業仮説のもとに、その起因微生物を同定することを目的とする。今回は、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) と *C.pneumoniae* との関連を検索すること、および初発若年 MS 患者の髄液中の遺伝子の検索、同定を目的とした。

B. 研究方法

1. 検体

MS 患者 7 例の髄液および血液（福島医大神経内科、山本悌二教授および東北大学医学部神経内科、糸山泰人教授より分与）、MS 患者 2 例の死後の凍結胸髄病変部組織（新潟大学、脳研、高橋均教授より分与）、非 MS 患者 2 例の死後の同部位（拡張型心筋症、心筋梗塞、北大病理 長嶋和郎教授より分与）

（倫理面への配慮）

生存患者検体の採取にあたっては十分な説明による同意を得た。検体採取は通常の検査時に行い、本研究のための新たな採取は行わず、不利益や危険性は増さない。死後の胸髄の検体採取にあたっては遺族から十分な説明による同意を得た。

2. 方法

- (1) MS 患者髄液と脊髄における HHV-6 と *C.pneumoniae* DNA の存在を nested PCR 法により検索した。
- (2) MS 患者髄液と血清における HHV-6 と

C.pneumoniae に対する抗体価を、それぞれ蛍光抗体法、ELISA 法で行った。

- (3) 髄液からの *C.pneumoniae* の分離を Hep-2 細胞を用いて行った。髄液 0.2ml を Hep-2 細胞に 2 時間感染させ、48 時間後に細胞を剥がし新たに Hep-2 細胞へ感染させ 48 時間後細胞を固定し Chlamydia 特異蛍光抗体を用いて染色し、抗原の出現の有無を確認した。
- (4) 初発若年発症患者の髄液 RNA より cDNA を合成し、PCR で増幅後 pGEM-T vector にクローニングし、その遺伝子を同定することを試みた。

C. 研究結果

MS 患者における HHV-6 と *C.pneumoniae* の感染状況についての結果を表 1 に提示する。

1. HHV-6 と *C.pneumoniae* の nested PCR の感度はそれぞれ 10、100 を常時検出できるものであった。
2. HHV-6 DNA は患者髄液 6 検体、脊髄 2 検体からは検出されなかった。（検出限界 10 コピー）。血清 HHV-6 抗体価は健常人と比較しても高値ではなく、また特異 IgM 抗体は検出

されなかった。髄液 HHV-6 抗体は陰性であった。

3. C.pneumoniae DNA は患者髄液 6 検体、脊髄 2 検体から検出されなかった。(検出限界 100 コピー)。また、髄液から C.pneumoniae は分離されなかった(継代は 2 代)。血清 C.pneumoniae 抗体は 7 例中 5 例が感染既往を示し、2 例は陰性であった。既感染を示した 5 例中 1 例(初発若年発症例)では C.pneumoniae IgM 抗体が陽性であった。髄液中の抗体はすべて陰性であった。
4. 髄液の遠心上清中の RNA から作製された cDNA を PCR 法で 2 回増幅すると、少なくとも 8 本のバンドを含む 200-3000bp のスメア状のバンドが認められた。これらのバンドを切り出し pGEM-T vector に挿入し、それぞれ約 30-100 クローンを得た。総数 78 クローンの塩基配列を決定したが、ヒトゲノム由来の遺伝子およびサルやトリの遺伝子に相同な遺伝子が検出されるのみであり、特定の微生物遺伝子は検出されなかった。

(下表)

検出された遺伝子	個数
Homo sapiens genomic DNA	46
Non-human genomes	4
Unknown	28

D. 考察

1. 過去に報告されたような MS と HHV-6 との関連はほとんど認められない。
2. MS 患者髄液より C.pneumoniae が高率に分離され、また DNA が高率に検出される事実は確認できなかった。初発若年発症例では IgM 抗体が検出されたが、これは、最近 6 ヶ月以内の初感染を意味する。MS との関連は不明であるが、多数の初発例での検索が必要である。
3. 患者髄液の上清中の RNA に由来する遺伝子を検索したがヒト由来遺伝子のみが検出される。これらの遺伝子をサブトラクトできる多種の遺伝子を含む Driver を作製することが break-through となると考えられる。また、髄液の上清中の DNA についても同様なアプローチを行う予定である。

E. 結論

既報にあるような MS と HHV-6 あるいは C.pneumoniae との関連はほとんど認められない。初発若年発症例では C.pneumoniae に対する IgM 抗体が検出されたが、MS との関連については多数の初発例での検索が必要である。患者髄液の上清中の RNA に由来する遺伝子を検索したがヒトあるいは非ヒト由来遺伝子のみが検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura, K., Mori, S., Tomita, K., Ohno, K., Takahashi, K., Shigeta, S., and Terada, M. Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 47: 41-51. 2000.
2. Takahashi, K., Matsuda, M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Okutani, K., Abe, Y., Mori, S., Sato, N., and Shigeta, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* (2001, in press)
3. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., and Shigeta, S. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors. *J. Clin. Microbiol.* (2001, in press)

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 MS患者における *C.pneumoniae* と *HHV-6* の感染状況

患者番号	年齢	性	検体	<i>C.pneumoniae</i>									<i>HHV-6</i>	
				DNA PCR	分離	IgA		IgG		IgM		DNA PCR	IgG	
						INDEX	判定	INDEX	判定	INDEX	判定			
MS-1(S)	48	F	血清			0.29	-	0.42	-	1.01	±		320	
MS-2(S)	11	F	血清			1.88	+	1.69	+	2.15	+		160	
MS-3(S)	46	F	血清			2.82	+	2.17	+	0.66	-		160	
MS-4(S)	41	F	血清			1.18	+	0.71	-	1.02	±		80	
MS-5(S)	36	F	血清			0.88	-	1.54	+	0.90	-		160	
MS-6(S)	37	F	血清			0.40	-	0.59	-	0.61	-		80	
MS-7(S)	24	F	血清			1.15	+	1.54	+	0.91	±		80	
MS-2	11	F	髄液	-	-	0.00	-	0.00	-	0.20	-	-	<10	
MS-3	46	F	髄液	-	-	0.01	-	0.01	-	0.20	-	-	<10	
MS-4	41	F	髄液	-	-	0.00	-	0.00	-	0.23	-	-	<10	
MS-5	36	F	髄液	-	-	0.00	-	0.00	-	0.20	-	-	<10	
MS-6	37	F	髄液	-	-	0.00	-	0.00	-	0.23	-	-	<10	
MS-7	24	F	髄液	-	-	0.00	-	0.00	-	0.23	-	-	<10	
MS-8	77	M	脊髄	-								-		
MS-9	67	F	脊髄	-								-		
C-1	64	M	脊髄	-								-		
C-2	57	F	脊髄	-								-		

5. 神経変性疾患におけるウイルス感染の検索

分担研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長
研究協力者 大原 義郎 金沢医科大学微生物学講座教授
西藤 岳彦 国立感染症研究所ウイルス第1部呼吸器系ウイルス室

研究要旨 特定疾患対策に指定されている神経変性疾患であるパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の原因の解明を微生物学的立場から検討し、病因となるウイルスの検索と、感染実験モデルを作成し発症の機序の解明を進めた。パーキンソン病についてはインフルエンザウイルス、筋萎縮性側索硬化症についてはエンテロウイルスの関与を検討しているが、現段階では関連性を示唆する成績は得られていない。

A. 研究目的

神経変性疾患とは明らかな原因が掴めないまま、神経細胞を中心として種々の退行性の変化をきたすものであり、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)は代表的な神経変性疾患である。1919-1919年のスペイン風邪の流行後、およそ10年に渡る期間において、Post-encephalitic parkinsonismの増加が有意に認められたとして、パーキンソン病とインフルエンザ感染の関与が提唱されてから久しい。そこで本研究の目的の一つとして、インフルエンザ関連脳炎で死亡した患者から分離されたインフルエンザウイルスを用いて、ハムスターの感染実験によってパーキンソン病またはインフルエンザ脳炎を実験的に再現できるか否かの検討をした。一方、最近 Woodall ら(Br Med J 308: 1541-1543, 1994) および Berger ら(Neurology 54: 20-25, 2000)は、RT-PCRによりALS患者剖検ホルマリン固定組織から高率にエンテロウイルス遺伝子を検出している。しかしこれに関して否定的な報告もあり(J Gen Virol 77: 1469-1476, 1996)、まだ一定の結論は得られていない。本研究の目的はALS患者は有意にエンテロウイルスに感染しているのか、そして感染したエンテロウイルスは中枢神経に到達してALSを発症させる可能性があるかどうかを検討することである。

B. 研究方法

1. 臨床分離インフルエンザ株によるハムスターの実験感染
急性脳症により死亡した3歳の女兒から分離されたH3N2型インフルエンザウイルスを、7週令雄のシリアンハムスターに経鼻的に接種し、経時的に肺内でのウイルス増殖と体温上昇を調べた。さらに、ウイルス感染4日後の脳内の腕のウイルス増殖を検索した。また、ウイルス感染時に、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-1などの同時投与が、感染の進行および感染動物の臨床症状に与える影響等について検討した。
2. 血清およびウイルス抗体価
ALS患者13例、疾患コントロールとしてのパーキンソン病患者49例、および健常者30例に協力をいただいた。採血後、遠心分離して血清を採取した。なお患者の検体採取に際しては、研究の目的を説明した上で患者の了承を得ている。
3. 固定液および固定条件
固定液として10%ホルマリン(ホルムアルデヒド3.7%、メタノール1%、pH3.7)、10%中性緩衝ホルマリン(ホルムアルデヒド3.7%、メタノール1%、リン酸一ナトリウム26mM、

リン酸二ナトリウム 46mM、pH7.4)、Canoy 液(エタノール 60%、クロロホルム 30%、氷酢酸 10%、pH2.6)、Bouin 液(ピクリン酸飽和水溶液 71%、ホルムアルデヒド 8.8%、メタノール 2.4%、氷酢酸 0.5%、pH1.2)を用いた。正常脾臓組織(約 7x9x3mm³)を上記固定液で、室温(25℃)および 4℃で経時的に 10 日間まで固定した。

4. Polymerase Chain Reaction (PCR)
ヒト α -tubulin の塩基配列、5'-GAC AGA ATT CCA GAC CAA CC-3' (756-775bp) および 5'-GCA CCA ATC CAC AAA CTG GA-3' (1041-1022 bp) をプライマーとして用いた。またエンテロウイルス遺伝子を検出できたという報告に基づき、エンテロウイルス 5' 非翻訳領域の塩基配列 5'-CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG-3' (164-184 nt) と 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3' (584-603 nt) を first pair に、そして 5'-CTT GCG CGT TAC GAC-3' (516-530 nt) を用いて semi-nested PCR を行った。最終ターゲット遺伝子の長さは 362 bp であった。またエンテロウイルス遺伝子を検出できなかったという報告に基づき、同じく 5' 非翻訳領域 5'-GGT GCG AAG AGT CTA TTG AG-3' (417-436 bp) と 5'-CAC CGG ATG GCC AAT CCA-3' (628-645 nt) を first pair に、5'-CCC CTG AAT GCG GCT AAT-3' (456-473nt) と 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3' (583-602 nt) を second pair として nested PCR を行った。最終ターゲット遺伝子は 148 bp であった。
PCR は DNA 変性 95℃、45 秒、アニーリング 55℃、45 秒、DNA 伸長 72℃、1 分を 1 サイクルとして 30 回行った。nested PCR および semi-nested PCR の場合はさらに 30 回行った。RT-PCR の場合は型通り逆転写酵素により cDNA を作製し、PCR に供した。

5. PCR の感度
DNA または RNA の 10 倍階段希釈溶液を作製し、上記 PCR により標的遺伝子の増幅可能な最終希釈濃度の比較、または最終希釈溶液に含まれる遺伝子コピー数を検討した。

C. 研究結果

1. ALS 患者の血清抗体価
ALS 患者、パーキンソン病患者の抗コクサッキー B4 型 CF 抗体価はそれぞれ 1 例のみ 4 倍、8 倍であったが、他はすべて 4 倍以下であった。また健常者についても 2 例で 4 倍、1 例で 8 倍を示したにすぎなかった。抗エコー 7 型 HI 抗体価については ALS 患者の 1 例で 128 倍、パーキンソン病患者の 1 例で 8 倍、健常者の 3 例で 32 倍、1 例で 16 倍、2 例で 8 倍であったが、他はすべて 8 倍以下であった。
2. 固定による PCR の感度に対する影響
検討した全ての固定液において室温(25℃)固定ではかなりの感度の低下が認められた。比較的感度が保たれた Canoy 液でも室温 10 日間固定でも 1/10 近くの感度の低下が認められた。Bouin 液では著しい感度の低下が認められ、固定 1 日でも有意な増幅は認められなかった。10%ホルマリン液および 10%中性緩衝ホルマリン液においても 10 日間室温固定では 1/100 近くの感度低下が認められた。しかしながら 4℃固定においては室温固定に比較して、かなり感度が保たれていた。すなわち Canoy 液ではほとんど感度の低下は認められず、10%ホルマリン液および 10%中性緩衝ホルマリン液においては室温と比べて 10 倍近い感度の上昇が認められた。
3. エンテロウイルス遺伝子検出報告と非検出報告における RT-PCR 感度の比較
エンテロウイルス遺伝子検出報告と非検出報告においては当然のことながら、プライマーの設定を含めて RT-PCR の条件は異なっている。従ってより感度の良い条件で今後検討していく必要があるので、両報告におけるプライマー設定がどれだけ RT-PCR の感度に影響を及ぼすかを検討した。対象はコクサッキー B4 型ウイルスとした。検出報告の nested PCR ではコクサッキー B4 型ウイルス遺伝子が 100 コピーまで増幅できたが、非検出報告の nested PCR においては 1000 コピーまでしか増幅できなかった。
4. 臨床分離インフルエンザウイルスを用いたハムスター実験感染系

ハムスターをインフルエンザウイルスに経鼻感染させた後、IL-1, IL-6, IFN-gamma を腹腔内投与し、感染の増強作用を検討した。いずれのサイトカイン投与によっても感染の増強、増悪。また、感染に伴う著明な臨床症状の変化は認められなかった。

D. 考察

今回血清学的データからは、ALS 患者が有意にコクサッキーB4 型ウイルスおよびエコー7 型ウイルスに感染している確証は得られなかった。今後さらに症例数を増やして検討を続ける予定である。また組織の固定により、PCR の検出感度にかなりの影響がでることが明らかにされた。人体組織の固定は厳密な固定液の選択、温度管理が行われているとは考えにくく、固定の影響を十分に考慮した上で、データを解釈する必要があると考えられる。実際には tubulin などの普遍的に存在する遺伝子を内部マーカーとして、当該切片における感度の低下を算出した上で、ターゲット遺伝子の検索を行うべきであろう。最後に ALS 患者脊髄組織中にエンテロウイルス遺伝子を検出できた報告と検出できなかった報告では RT-PCR の感度が異なることが分かった。検出できた報告のターゲット遺伝子の長さは 362 bp、検出できなかった報告のターゲット遺伝子の長さは 148 bp であったが、予想に反してターゲット遺伝子の長さが長い設定の報告の RT-PCR の検出感度が 10 倍優れていた。これは増幅領域の遺伝子の特異性と考えられ、今後検出報告の設定プライマーで検索を行った方がよいと考えられた。

E. 結論

現在のところ、ALS 患者が有意にエンテロウイルスに感染しているとは考えにくい。ホルマリン固定脊髄標本に関しては、固定の影響を加味して RT-PCR の条件設定を行い、検索していく必要がある。

また、臨床分離インフルエンザウイルスを用いた、ハムスター実験感染によっては、これまでのところハーキンソン病用の症状を引き起こすことは出来なかった。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 発表業績

1. 論文発表

1. Reickert, T., Sugaya, N., Fedson, D., William, G., Simonen, L., Tashiro, M.: Experience in Japan of the vaccination of schoolchildren against influenza. *New Engl. J. Med.* 2001 (in press)
2. Okada, H., Sato, A. T., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., and Tashiro, M. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch. Virol.* (in press)
3. Kato, A., Ohnishi, Y., Kohase, M., Saito, S., Tashiro, M., and Nagai, Y.: The smallest Y2 of Sendai virus C proteins is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J. Virol.* 76 2001(in press)
4. Umino, Y., Tashiro, M.: Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. *Vaccine* 19: 1369-1372, 2001
5. Takeuchi, K., Miyajima N., Kobune, F., and Tashiro, M.: Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95 a cell-isolated and Vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* 20: 253-257 2000
6. Okada, H., Kobune, F., Sato, T.A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tshuchiya, T. and Tashiro, M.: Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch. Virol.* 145: 905-920 2000
7. Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Koabune, F., Arni, Y., Nagata, N., Suzuki, Y., Nagai, Y. and Tashiro, M.: Recovery of pathogenic measles virus from cloned

- cDNA. *J. Virol.* 74: 6643-6647 2000
8. Hasan, M.K., Kato, A., Muranaka, M., Yamaguchi, R., Sakai, Y., Hatano, I., Tashiro, M. and Nagai, Y.: Versability of the accessory C protein of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74: 5619-5628 2000
 9. Nishimura, H., Itamura, S., Iwasaki, T., Kurata, T., and Tashiro, M.: Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J. Gen. Virol.* 81: 2503-2510 2000
 10. Yamamoto, A., Nakayama, M., Tashiro, M., Ogawa, T., and Kurane, I.: Hydroapatite-coated nylon beads as a new reagent to develop a particle agglutination assay for detecting Japanese encephalitis virus-specific antibodies. *J. Clin. Virol.* 19: 195-204, 2000
 11. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., and Shigeta, S.: Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J. Infect. Dis.* 39: (in press)
 12. T. Saito, M. Tashiro: Vaccines and therapeutics against Influenza. *Pediatrics International* 42 2, 2000
 13. Obuchi M, Uddin MN, Odagiri T, Yamamoto J, Iizuka H and Ohara Y, A: Small out-of-frame protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is required for virus growth in a murine macrophage-like cell line. *J Virol* 74: 4898-4901, 2000.
 14. Ohara Y and Obuchi M.: Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV): molecular aspects of its persistence. In: *Recent Research Development in Virology* (Pandalai S.G. ed), Vol. 1, Part II, Transworld Research Network, pp 897-918, 1999.
 15. Ohara Y. : Multiple sclerosis and measles virus. *Jap J Infec Dis* 52: 198-200, 1999.
 16. Obuchi M and Ohara Y. : Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV): the role of a small out-of-frame protein in viral persistence and demyelination. *Jap J Infec Dis* 52: 228-233, 1999.
 17. Obuchi M, Odagiri T, Iizuka H and Ohara Y. Expression of lymphotoxin gene inserted into Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Microbiol Immunol* 43: 83-86, 1999.
 18. Obuchi M, Yamamoto J, Odagiri T, Iizuka H and Ohara Y.: Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) subgroup strain-specific infection in neural and non-neural cell lines. *Microbiol Immunol* 43: 885-892, 1999.
 19. Odagiri T, Hong J and Ohara Y.: The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *J Gen Virol* 80: 2573-2581, 1999.
 20. Yasuaki Hiromoto, Takehiko Saito, Stephen E. Lindstrom, Yixing Li, Reiko Nerome, Shigeo Sugita, Masayoshi Shinjoh and Kuniaki Nerome: Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of Influenza B virus. *Journal of General Virology*;81(4):929-37
 21. Yasuaki Hiromoto, Yoshinao Yamazaki, Tatsunobu Fukushima, Takehiko Saito, Stephen E. Lindstrom, Kutsunori Omoe, Reiko Nerome, Wilina Lim, Shigeo Sugita and Kuniaki Nerome: Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *Journal of General Virology* 2000 81: 1293-1303
 22. Takehiko Saito and Isao Yamaguchi: Effect of Glycosylation and Glucose Trimming Inhibitors on the Influenza A Virus Glycoproteins. *Journal of Veterinary Medical Science* 62 (6): 575-581
 23. Takehiko Saito and Masato Tashiro: Vaccine and therapeutics against influenza virus. *Pediatric International* 42 (2) 219-225
 24. Yasuaki Hiromoto, Takehiko Saito,

Stephen Lindstrom, Kuniaki Nerome: Characterization of Low Virulent Strains of Highly Pathogenic A/Hong Kong/156/97 (H5N1) Virus in Mice after Passage in Embryonated Hens' Eggs. *Virology* 272 (2): 429-437

25. 田代真人 遺伝子改変ウイルスによるワクチン開発: トリ H5N1 型インフルエンザウイルスの弱毒化 19 1: 58-64 2000
26. 田代真人 インフルエンザの問題点と対策 治療学 34 1: 5-9 2000
27. 田代真人 インフルエンザ: 前進するインフルエンザ対策: 新型インフルエンザをめぐって 看護学雑誌 64 1: 79-83 2000
28. 田代真人 最大級の流行病インフルエンザ 総合臨床 49 2: 221-223 2000

2. 学会発表

1. S. E. Lindstrom, Y. Hiromoto, N. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, K. Nerome: Comparative analysis of the evolutionary patterns of the HA and six internal genes of human influenza B virus. *Options for the control of influenza IV* 2000年9月 ギリシア クレタ
2. Y. Horomoto, T. Saito, S. Lindstrom, K. Nerome: Isolation and characterization of low virulent variants of highly pathogenic A/Hong Kong/156/97 (H5N1) virus in mice following passage in embryonated hen's eggs. *Options for the control of influenza IV* 2000年9月 ギリシア クレタ
3. S. Itamura, H. Nishimura, E. Emani, K. Enami, A. Takada, H. Ozaki, H. Tanaka, K. Okazaki, H. Kida, T. Iwasaki, T. Kurata, H. Aizaki, Y. Matsuura, T. Miyamura, K. Takeuchi, K. Tanabayashi, T. Saito, K. Omoe, K. Nerome, S. Yamasaki, M. Tashiro.: Genetically engineered influenza A virus as a vaccine strain for highly virulent H5N1 viruses isolated from human. *Options for the control of influenza IV* 2000年9月 ギリシア クレタ
4. Takehiko Saito, Wilina Lim, Hiroshi Kida, Masato Tashiro: Characterization of a human H9N2 virus isolated in Hong Kong in 1999. *Options for the control*

of influenza IV 2000年9月 ギリシア クレタ

5. 板村繁之・西村秀一・西藤岳彦・田代真人・堀内清 新型インフルエンザ(A/H5N1)に対するワクチンの試験製造と安全性評価 第48回日本ウイルス学会総会 2000年(平成12年)10月 三重県
6. 西藤岳彦・喜田宏・田代真人 1999年に香港で人から分離された H9N2 型インフルエンザウイルスの性状 第48回日本ウイルス学会総会 2000年(平成12年)10月 三重県

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

6. 本邦と欧州における *Campylobacter jejuni* 腸炎後 Guillain-Barré 症候群の比率

分担研究者 結城 伸泰 獨協医科大学神経内科助教授

研究要旨 ギラン・バレー症候群（GBS）における *Campylobacter jejuni* 感染の先行頻度について血清学的検討結果が各国から報告されている。それらによると、アジア諸国では欧米諸国における頻度より高く報告されている。しかしながら、これらの報告ではそれぞれ異なった検査系が用いられており、その結果をもって *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を各国間で比較することはできない。本研究では本邦における *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度がオランダと比べ高いか否かにつき検討した。本邦でルーチンに用いている検査系で抗 *C. jejuni* 抗体陽性と判定されたのは、本邦の GBS 19%、オランダの GBS 16%であり、二群間で有意差を認めなかった ($p=0.51$)。オランダでルーチンに用いている検査系で抗 *C. jejuni* 抗体陽性頻度はオランダの GBS 群で 34%であり、本邦の GBS 23%と比較して高い傾向を示したが、有意差を示すには至らなかった ($p=0.07$)。今回の検討で少なくとも本邦とオランダの GBS 患者間で *C. jejuni* 感染の先行頻度に差がないことが明らかとなった。また、本邦とオランダの抗体測定系の陽性率に大きな解離があり、抗体測定系を標準化する術のない現段階では、単一の研究室で抗 *C. jejuni* 抗体測定を行うことで、世界各国の *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を比較検討する必要がある。

A. 研究目的

グラム陰性桿菌である *Campylobacter jejuni* は、ヒトの急性下痢症や食中毒の主要な起炎菌のひとつで、小児の下痢患者からは 20%弱の頻度、成人でも 5%強の頻度で糞便から検出される。*C. jejuni* 腸炎の罹患中や罹患後に、神経疾患や関節炎、腎症などの全身性疾患を招くことが知られている。特に *C. jejuni* 腸炎後に発症する Guillain-Barré 症候群（GBS）は重症化しやすく後遺症をきたしやすいことから、早期の病態解明が望まれている。

GBS は四肢筋力低下を主徴とする自己免疫性末梢神経疾患である。GBS における *C. jejuni* 感染の先行頻度について血清学的検討結果が各国から報告されている。その頻度は報告により大きく異なっており、本邦では 45%、中国北部では 66%と、欧米諸国における頻度（アメリカ [17%, 36%]、イギリス [26%]、オランダ

ダ [32%]、ドイツ [39%]、オーストラリア [38%]）より高く報告されている。このことから、アジアでは欧米と比べ *C. jejuni* 感染後 GBS の比率が高いと考えられている。しかしながら、これらの報告ではそれぞれ異なった *C. jejuni* 検査系が用いられており、その結果をもって *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を各国間で比較することはできない。

本報告では、本邦およびオランダにおける *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を比較することを目的に、獨協医科大学と Erasmus 大学との間で進められた共同研究の結果を報告する。本邦およびオランダにおける GBS 患者から急性期血清を採取し、抗 *C. jejuni* 抗体陽性頻度に二国間で有意差があるかどうかについて、二施設で独立して検討を進めた。さらに、二施設で用いられている抗 *C. jejuni* 抗体測定系の相関についても検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

本邦およびオランダにおける GBS 患者より治療前の急性期血清を採取した。すべての患者は Asbury と Cornblath により提唱されている GBS の診断基準を満たしていた。本邦の GBS 群は、日本全国の大学病院や総合病院などから抗ガングリオシド抗体測定を目的に獨協医科大学神経免疫研究室に紹介のあった連続 88 症例である。オランダの GBS 群として、Dutch GBS trial に参加した 147 例中 15 例では適切な血清が得られなかったため、残りの 132 例を対象とした。対照として、他の神経疾患患者（本邦 27 例、オランダ 42 例）と健常者（本邦 56 例、オランダ 30 例）の血清を用いた。本邦およびオランダの GBS 群、神経疾患対照群、健常対照群の年齢・性別に有意差のないことが確認された。

(2) 抗 *C. jejuni* 抗体

C. jejuni 感染の先行につき、二施設（獨協医科大学、Erasmus 大学）で enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて血清学的に検討を行った。獨協医科大学における抗体測定系 (Japanese ELISA) では、既存の報告通り IgG 抗 *C. jejuni* 抗体価が 2000 倍以上を陽性と判定した。このカットオフ値は、*C. jejuni* 分離 GBS 17 例と健常者対照 46 例における結果に基づき設定されており、感度 82%、特異度 88% であることが確認されている。本邦の患者血清を用いてまず、Japanese ELISA で抗 *C. jejuni* 抗体を測定し、測定終了後速やかに血清を -80℃ に凍結・保存し、十分な量のドライアイスと共に血清をオランダに空輸した。オランダの患者血清は逆の順序で検討した。Erasmus 大学における抗体測定系

(Netherlands ELISA) では既存の報告に従い抗 *C. jejuni* 抗体のうち、IgM、IgA クラスのいずれかの抗体上昇を認めた場合に陽性と判定した。

(3) 統計学的検討

Japanese ELISA と Netherlands ELISA での結果の相関、および陽性率の差につき、それぞれ Spearman の順位相関係数の検定と Mantel-Haenszel 法を用いて統計学的検討を行った。それ以外の検定は χ^2 検定ないし Fisher の直接

確率法を用いて検討した。p 値が 0.05 未満の場合を有意とした。すべての統計解析は Statcel[®]を用いて行った。

(4) 倫理面への配慮

研究目的の血清使用に関し、患者より了承の得られた症例を対象とした。

C. 研究結果

(1) Japanese ELISA

抗 *C. jejuni* 抗体陽性と判定されたのは、本邦の GBS 88 例中 17 例 (19%)、オランダの GBS 132 例中 21 例 (16%) であり、二群間で有意差を認めなかった ($p=0.51$)。神経疾患対照 (本邦 4%、オランダ 3%) や健常対照 (本邦 0%、オランダ 3%) においても本邦とオランダとの間で有意差はなかった。本邦およびオランダいずれの GBS 群も神経疾患対照や健常対照と比較して抗 *C. jejuni* 抗体陽性頻度が高かったが、本邦の GBS 群と健常対照群の間のみで有意差を認めた ($p=0.0001$)。

(2) Netherlands ELISA

抗 *C. jejuni* 抗体陽性頻度はオランダの GBS 群で 34% (132 例中 45 例) であり、本邦の GBS (23%、88 例中 20 例) と比較して高い傾向を示したが、有意差を示すには至らなかった ($p=0.07$)。神経疾患対照群 (本邦 15%、オランダ 5%) や健常対照群 (本邦 18%、オランダ 10%) においても本邦とオランダとの間で有意差はなかった。オランダの GBS 群は神経疾患対照群や健常対照群と比べ有意に高頻度に抗 *C. jejuni* 抗体が陽性であった ($p=0.0002$, $p=0.009$)。一方、本邦の GBS 群、神経疾患対照群、健常対照群の三群間では抗 *C. jejuni* 抗体陽性率はほぼ同様であり、有意差を認めなかった。

(3) 抗 *C. jejuni* 抗体測定系の比較

Japanese ELISA と Netherlands ELISA との間で、抗 *C. jejuni* 抗体測定結果は密接に相関していた (日本人: $p<0.0001$, $rs=0.77$) (オランダ人: $p<0.0001$, $rs=0.76$)。両測定系で異なる結果が得られたのは、全症例 375 例中 64 例 (17%) であり、それらの症例の多くは Japanese ELISA で陰性かつ Netherlands

ELISA で陽性であった。Japanese ELISA と比較し Netherlands ELISA では抗 *C. jejuni* 抗体陽性率が高いことが統計学的にも示された ($p=0.00003$)。

D. 考察

C. jejuni の診断は厳密には病原体の分離をもって行うべきである。しかしながら GBS では先行感染の 1-3 週後に神経症状を示すため、先行感染の原因菌の分離培養は一般に困難である。一方、ELISA などの血清学的検査は高い感度を安定して得られるため、今回の検討のような *C. jejuni* 感染の先行頻度の国際比較などを行うのに適している。さらに今回の検討では、二施設で独立して比較検討を行うことで、結果の再現性を確認するよう試みた。その結果、真の *C. jejuni* 腸炎先行頻度は依然として不明であるものの、少なくとも本邦とオランダの GBS 患者間で *C. jejuni* 感染の先行頻度に差がないことが明らかとなった。

Japanese ELISA と Netherlands ELISA の結果は互いに密接に相関していたが、Netherlands ELISA では Japanese ELISA と比べ有意に抗 *C. jejuni* 抗体陽性率が高いことも確認された。特にオランダの GBS 患者の抗 *C. jejuni* 抗体陽性率では、Netherlands ELISA で 34% であるのに対し Japanese ELISA では 16% と大きな解離があった。このことは、用いる抗 *C. jejuni* 抗体測定系の感度により抗 *C. jejuni* 抗体陽性率が大きく左右されることを示唆している。つまり、*C. jejuni* 感染後 GBS の頻度に関するこれまでの報告では、それぞれ異なった *C. jejuni* 検査系を用いていることから、その結果をもとに *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を各国間で比較することはできないことが確認された。抗 *C. jejuni* 抗体測定系を標準化する術のない現段階では、単一の研究室で抗 *C. jejuni* 抗体測定を行うことで、世界各国の *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を比較検討する必要がある。

E. 結論

本邦とオランダの GBS 患者間で、*C. jejuni* 感染の先行頻度に差がないことが明らかとなった。今後は単一の研究室で抗 *C. jejuni* 抗体測

定を行うことで、世界各国の *C. jejuni* 感染後 GBS の頻度を比較する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
 - Tagawa Y, Yuki N: Bickerstaff's brainstem encephalitis associated with shingles. *J Neurol* 2000;247:218-219.
 - Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N: Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:191-195.
 - Yamamoto T, Yuki N: No cytomegalovirus DNA in sera from patients with anti-MAG/SGPG antibody-associated neuropathy: reply. *Ann Neurol* 2000;47:274-275.
 - Yuki N, Hirata K: Distinctions between critical illness polyneuropathy and axonal Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:398.
 - Yuki N, 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* 2000;47:314-321.
 - Yuki N, Odaka M, Hirata K: Bickerstaff's brainstem encephalitis subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:680-681
 - Yuki N: Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease:

- Guillain-Barré syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:527-533
8. Yuki N, Susuki K, Hirata K: Ataxic Guillain-Barré syndrome with anti-GQ1b antibody: relation to Miller Fisher syndrome. *Neurology* 2000;54:1851-1853.
 9. Tagawa Y, Yuki N, Hirata K: Anti-SGPG antibody in CIDP: nosological position of IgM anti-MAG/SGPG-associated neuropathy. *Muscle Nerve* 2000;23:895-899.
 10. Odaka M, Yuki N, Nobile-Orazio E, Carpo M, Hirata K: Antibodies to GM1(NeuGc) in Guillain-Barré syndrome after ganglioside therapy. *J Neurol Sci* 2000;175:96-106.
 11. Yuki N, Susuki K, Hirata K: Ataxic form of Guillain-Barré syndrome associated with anti-GD1b IgG antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:136-137.
 12. Yuki N, Koga M, Hirata K. Is *Campylobacter* lipopolysaccharide bearing a GD3 epitope essential for the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome? *Acta Neurol Scand* 2000;102:132-134.
 13. Susuki K, Yuki N, Muramatsu M, Hirata K. Unilateral ophthalmoparesis and limb ataxia associated with anti-GQ1b IgG antibody. *J Neurol* 2000;247:652-653.
 14. 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* 2000;48:624-631.
 15. Saito T, Miyai I, Matsumura T, Nozaki S, Kang J, Fujita H, Sugimoto N, Yuki N: A case of Bickerstaff's brainstem encephalitis mimicking tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:695-696.
 16. Yuki N: Guillain-Barré, Fisher, and Bickerstaff syndromes: nature versus well established ideas: reply. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:703-704.
 17. Koga M, Yuki N, Hirata K: Pain in Miller Fisher syndrome. *J Neurol* 2000;247:720-721.
 18. Yuki N: Ataxic Guillain-Barré syndrome with anti-GQ1b antibody: relation to Miller Fisher syndrome: reply. *Neurology* 2000;55:1419-1420.
 19. Yuki N: Immunopathogenesis of neurological disorders subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Adv Clin Neurosci* 2000;10:155-172.
 20. Koga M, Yuki N: Pharyngeal-cervical-brachial Guillain-Barré syndrome. *Adv Clin Neurosci* 2000;10:173-186.
 21. Odaka M, Yuki N: Bickerstaff's brainstem encephalitis: diagnostic criteria and immunopathogenesis. *Adv Clin Neurosci* 2000;10:207-221.
 22. Odaka M, Yuki N, Hirata K: Anti-GQ1b IgG antibody syndrome: clinical and immunological range. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:50-55.
 23. Yuki N, Odaka M, Hirata K: Acute Ophthalmoparesis (without Ataxia) Associated with Anti-GQ1b IgG Antibody: Clinical Features. *Ophthalmology* 2001;108:196-200.
 24. Susuki K, Yuki N, Hirata K: Features of sensory ataxic neuropathy associated with anti-GD1b IgM antibody. *J Neuroimmunol* 2001;112:181-187.
 25. Koga M, Ang CW, Yuki N, Jacobs BC, van der Meché FGA, Herbrink P, Hirata K, van Doorn PA: Comparative study on preceding *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barré syndrome between Japan and The Netherlands. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (in press)
 26. 今井雅子, 田川由美, 大川洋一, 矢田純一, 神田隆, 結城伸泰。多彩な臨床像を示した骨髄移植後 Guillain-Barré 症候群の一例。小児科 2000;41:501 - 505.
 27. 伊澤直樹, 小鷹昌明, 結城伸泰, 新井美緒, 平田幸一。再発・寛解を繰り返す脳幹脳炎の1例。脳神経 2000;52:745-

- 751.
28. 伊澤直樹、小鷹昌明、結城伸泰、平田幸一。後下小脳動脈解離により発症した若年性小脳梗塞。脳神経 2000;53:170-172.
 29. 西本幸弘、結城伸泰、小鷹昌明、平田幸一。小児におけるギラン・バレー症候群、フィッシャー症候群の治療選択：アンケート調査。日本医事新報 2000;3997:8-12.

2. 学会発表

1. Koga M, Ang CW, Yuki N, Jacobs BC van der Meché FGA Herbrink P, Hirata K, van Doorn PA: Comparative Study on Preceding *Campylobacter jejuni* Infection in Guillain-Barré Syndrome between Japan and the Netherlands. European Neurological Society 10th Meeting, Jerusalem, Israel. June 18-22. 2000
2. 結城伸泰 古賀道明 小鷹昌明 田川由美 平田幸一。軸索型ギラン・バレー症候群動物モデルの樹立。第41回日本神経学会総会。2000年5月24-26日、松本。
3. 古賀道明 結城伸泰 平田幸一。*Haemophilus influenzae* 感染と Fisher 症候群。第41回日本神経学会総会。2000年5月24-26日、松本。
4. 古賀道明 結城伸泰 平田幸一 CW Ang BC Jacobs FGA van der Meché PA van Doorn P Herbrink。本邦と欧州におけるカンピロバクター感染後 Guillain-Barré 症候群の比率。第13回日本神経免疫学会。2001年2月1-2日、東京。
5. 小河原一恵 桑原聡 森雅裕 服部孝道 結城伸泰。抗 GM1b 抗体陽性、抗 GM1 抗体陰性 Guillain-Barré 症候群の特徴。第13回日本神経免疫学会。2001年2月1-2日、東京。
6. 西本幸弘 小鷹昌明 結城伸泰 平田幸一。Guillain-Barré 症候群、Fisher 症候群における抗ガングリオシド抗体測定の有用性 -髄液検査との比較-。第13回日本神経免疫学会。2001年2月1-2日、東京。

7. 薄敬一郎 結城伸泰 平田幸一 桑原聡。Guillain-Barré 症候群における抗 LM1 抗体の fine specificity。第13回日本神経免疫学会。2001年2月1-2日、東京。
8. 松本陽 池映欣 小鷹昌明 結城伸泰。ギラン・バレー症候群における T 細胞レセプターβ鎖レパトアの特異性解析。第13回日本神経免疫学会。2001年2月1-2日、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし

7. ギラン・バレー症候群と *Haemophilus influenzae* 感染

—症例対照試験—

分担研究者 結城 伸泰 獨協医科大学神経内科助教授

研究要旨 ギラン・バレー症候群（GBS）は各種感染症が契機となって発症する自己免疫性末梢神経疾患である。本症患者の6-7割で、神経症状出現の1-3週間前に呼吸器感染症状の先行を認めるにも関わらず、その原因病原体の多くは同定されていない。グラム陰性桿菌 *Haemophilus influenzae* はヒト呼吸器感染症の主要な起炎菌の一つである。本菌ワクチン接種後に発症した GBS 例が報告されており、また本菌が GBS の主要な先行感染因子であるとの報告が近年なされたことから、本菌と GBS との関連を慎重に検討するため、症例対照試験を行った。GBS 52 例および病院対照（同性かつ年齢差 5 歳以内）52 例の血清中における抗 *H. influenzae* 抗体（IgG/IgM/IgA）を測定した。IgG、IgM、IgA クラスの抗 *H. influenzae* 抗体陽性率はいずれも、GBS 群と病院対照群との間で有意差を認めなかった。2 クラス以上の抗体が陽性と判定されたのは、GBS 2 例（4%）、病院対照 1 例（2%）と GBS 群でやや高率であったが、統計学的有意差は証明されなかった。抗体測定系に用いる抗原として、病原性の最も高い b 型 *H. influenzae* 菌や呼吸器感染症の主要な病原体である nontypable 菌を用いても、本菌感染頻度は同様であった。*H. influenzae* 感染後に発症する GBS 症例が存在する可能性は残されているものの、本菌が呼吸器感染後に発症する GBS の主要な先行感染因子であるとは考えにくい。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群（GBS）の先行感染病原体として、急性腸炎の起炎菌 *Campylobacter jejuni* が最も高頻度であり、*C. jejuni* 感染後 GBS は本症の約 3 割を占めると考えられている。しかしながら、6-7 割の GBS 症例では呼吸器感染症状が先行し、その大部分の症例では病原体が同定されていない。

呼吸器感染症の起炎菌 *Haemophilus influenzae* が、GBS の亜型フィッシャー症候群の発症と密接に関連する可能性を昨年の本班会議で報告した。一方、GBS と本菌との関連について、オランダで行われた症例対照試験では否定的な結果が得られている。しかし、本邦から近年、13%の GBS が *H. influenzae* 感染後であるとの報告がなされた（Mori et al. Brain 2000; 123: 2171-8）。今回は、本菌が呼吸器感染後

に発症する GBS の主要な先行感染因子であるか否かにつき、症例対照試験で血清学的に検討した。

B. 研究方法

- 1) GBS 患者の抗ガングリオシド抗体測定を全国諸施設から依頼された際、年齢（±5 歳）・性別を一致させた病院対照血清の送付を各主治医に依頼した。その結果、2000 年 2 月から 12 月までに GBS 52 例について病院対照血清（疾患対照 39 例、健常者 13 例）が得られたため、今回これらを対象にした。
- 2) b 型 *H. influenzae* 基準株（デンカ生研より供与）より抽出した外膜蛋白を抗原に用いた ELISA にて抗 *H. influenzae* 抗体（IgG / IgM / IgA）の吸光度を測定した。対照血清

における平均値 $\pm 3SD$ 以上を陽性とした。同様の方法で抗 *C. jejuni* 抗体 (IgG / IgM / IgA) も測定した。

- 3) GBS 群と病院対照群で、各抗体の陽性率に差があるか否かにつき、 χ^2 検定ないし Fisher の直接確率法を用いて統計学的に検討した。
- 4) 倫理面への配慮：研究目的の血清使用に関し、患者より了承の得られた症例を対象とした。

C. 研究結果

- 1) IgG、IgM、IgA クラスの抗 *H. influenzae* 抗体陽性率はいずれも、GBS 群と病院対照群との間で有意差を認めなかった (IgG; 10% vs 2%, $p=0.10$) (IgM; 4% vs 4%, $p=0.69$) (IgA; 6% vs 4%, $p=0.50$)。
- 2) 2 クラス以上の抗体が陽性と判定されたのは、GBS 2 例(4%)、病院対照 1 例(2%)と GBS 群で高率であったが、統計学的有意差は証明されなかった。GBS 2 例中 1 例で経時血清が得られ、経時的な抗体価の減少が確認された。
- 3) 同様に nontypable *H. influenzae* 菌 (呼吸器感染分離、長崎大永武先生より供与) から抽出した外膜蛋白を抗原に用いて同様に検討を行ったが、IgG、IgM、IgA クラスの抗 *H. influenzae* 抗体陽性率はいずれも、GBS 群と病院対照群との間で有意差を認めなかった (IgG; 10% vs 2%, $p=0.10$) (IgM; 10% vs 4%, $p=0.22$) (IgA; 4% vs 2%, $p=0.50$)。
- 4) 抗 *C. jejuni* 抗体は IgG、IgM、IgA クラスいずれも、GBS 群で有意に陽性率が有意に高かった (IgG; 38% vs 4%, $p=0.00002$) (IgM; 19% vs 2%, $p=0.004$) (IgA; 38% vs 4%, $p=0.00002$)。2 クラス以上の抗体が陽性と判定されたのは、GBS 群で 35%であったのに対し、病院対照群では 0%であった。

D. 考察

ヒトに感染症を惹起する主な *H. influenzae* として、最も病原性が強く小児の髄膜炎の起炎菌となる b 型菌と、成人の慢性呼吸器感染症の起炎菌として重要な nontypable 菌が知られてい

る。今回の検討では、b 型菌と nontypable 菌の両者を抗原に用いて検討した結果、*H. influenzae* 感染後に発症する GBS 症例が存在する可能性は残されているものの、本菌が呼吸器感染後に発症する GBS の主要な先行感染因子であるとは考えられなかった。一方、*C. jejuni* 感染は GBS の発症と密接に関連していることが、今回の症例対照試験でも確認された。

E. 結論

H. influenzae 感染後に発症する GBS 症例が存在する可能性は残されているものの、本菌が呼吸器感染後に発症する GBS の主要な先行感染因子であるとは考えにくい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Tagawa Y, Yuki N: Bickerstaff's brainstem encephalitis associated with shingles. *J Neurol* 2000;247:218-219.
 - 2) Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N: Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:191-195.
 - 3) Yamamoto T, Yuki N: No cytomegalovirus DNA in sera from patients with anti-MAG/SGPG antibody-associated neuropathy: reply. *Ann Neurol* 2000;47:274-275.
 - 4) Yuki N, Hirata K: Distinctions between critical illness polyneuropathy and axonal Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:398.

- 5) Yuki N, 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* 2000;47:314-321.
- 6) Yuki N, Odaka M, Hirata K: Bickerstaff's brainstem encephalitis subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:680-681
- 7) Yuki N: Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: Guillain-Barré syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:527-533
- 8) Yuki N, Susuki K, Hirata K: Ataxic Guillain-Barré syndrome with anti-GQ1b antibody: relation to Miller Fisher syndrome. *Neurology* 2000;54:1851-1853.
- 9) Tagawa Y, Yuki N, Hirata K: Anti-SGPG antibody in CIDP: nosological position of IgM anti-MAG/SGPG-associated neuropathy. *Muscle Nerve* 2000;23:895-899.
- 10) Odaka M, Yuki N, Nobile-Orazio E, Carpo M, Hirata K: Antibodies to GM1(NeuGc) in Guillain-Barré syndrome after ganglioside therapy. *J Neurol Sci* 2000;175:96-106.
- 11) Yuki N, Susuki K, Hirata K: Ataxic form of Guillain-Barré syndrome associated with anti-GD1b IgG antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:136-137.
- 12) Yuki N, Koga M, Hirata K. Is *Campylobacter* lipopolysaccharide bearing a GD3 epitope essential for the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome? *Acta Neurol Scand* 2000;102:132-134.
- 13) Susuki K, Yuki N, Muramatsu M, Hirata K. Unilateral ophthalmoparesis and limb ataxia associated with anti-GQ1b IgG antibody. *J Neurol* 2000;247:652-653.
- 14) 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* 2000;48:624-631.
- 15) Saito T, Miyai I, Matsumura T, Nozaki S, Kang J, Fujita H, Sugimoto N, Yuki N: A case of Bickerstaff's brainstem encephalitis mimicking tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:695-696.
- 16) Yuki N: Guillain-Barré, Fisher, and Bickerstaff syndromes: nature versus well established ideas: reply. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:703-704.
- 17) Koga M, Yuki N, Hirata K: Pain in Miller Fisher syndrome. *J Neurol* 2000;247:720-721.
- 18) Yuki N: Ataxic Guillain-Barré syndrome with anti-GQ1b antibody: relation to Miller Fisher syndrome: reply. *Neurology* 2000;55:1419-1420.
- 19) Yuki N: Immunopathogenesis of neurological disorders subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Adv Clin Neurosci* 2000;10:155-172.
- 20) Koga M, Yuki N: Pharyngeal-cervical-brachial Guillain-Barré syndrome. *Adv Clin Neurosci* 2000;10:173-186.
- 21) Odaka M, Yuki N: Bickerstaff's brainstem encephalitis: diagnostic criteria and immunopathogenesis. *Adv Clin Neurosci* 2000;10:207-221.
- 22) Odaka M, Yuki N, Hirata K: Anti-GQ1b IgG antibody syndrome: clinical and immunological range. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:50-55.
- 23) Yuki N, Odaka M, Hirata K: Acute Ophthalmoparesis (without Ataxia) Associated with Anti-GQ1b IgG Antibody: Clinical Features. *Ophthalmology* 2001;108:196-200.
- 24) Susuki K, Yuki N, Hirata K: Features of sensory ataxic neuropathy associated with anti-GD1b IgM antibody. *J Neuroimmunol* 2001;112:181-187.
- 25) Koga M, Ang CW, Yuki N, Jacobs BC, van der Meché FGA, Herbrink P, Hirata K, van Doorn PA: Comparative study on

preceding *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barré syndrome between Japan and The Netherlands. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (in press)

- 26) 今井雅子, 田川由美, 大川洋一, 矢田純一, 神田隆, 結城伸泰。多彩な臨床像を示した骨髄移植後 Guillain-Barré 症候群の一例。小児科 2000;41:501 - 505.
- 27) 伊澤直樹, 小鷹昌明, 結城伸泰, 新井美緒, 平田幸一。再発・寛解を繰り返す脳幹脳炎の1例。脳神経 2000;52:745-751.
- 28) 伊澤直樹, 小鷹昌明, 結城伸泰, 平田幸一。後下小脳動脈解離により発症した若年性小脳梗塞。脳神経 2000;53:170-172.
- 29) 西本幸弘, 結城伸泰, 小鷹昌明, 平田幸一。小児におけるギラン・バレー症候群、フィッシャー症候群の治療選択：アンケート調査。日本医事新報 2000;3997:8-12.

2. 学会発表

- 1) Koga M, Ang CW, Yuki N, Jacobs BC van der Meché FGA Herbrink P, Hirata K, van Doorn PA: Comparative Study on Preceding *Campylobacter jejuni* Infection in Guillain-Barré Syndrome between Japan and the Netherlands. European Neurological Society 10th Meeting, Jerusalem, Israel. June 18-22. 2000
- 2) 結城伸泰 古賀 道明 小鷹 昌明 田川由美 平田 幸一。軸索型ギラン・バレー症候群動物モデルの樹立。第 41 回日本神経学会総会。2000 年 5 月 24-26 日、松本。
- 3) 古賀 道明 結城伸泰 平田 幸一。*Haemophilus influenzae* 感染と Fisher 症候群。第 41 回日本神経学会総会。2000 年 5 月 24-26 日、松本。
- 4) 古賀 道明 結城伸泰 平田 幸一 CW Ang BC Jacobs FGA van der Meché PA van Doorn P
- 5) Herbrink。本邦と欧州におけるカンピロバクター感染後 Guillain-Barré 症候群の比率。第 13 回日本神経免疫学会。2001 年 2 月 1-2 日、東京。
- 6) 小河原 一恵 桑原 聡 森 雅裕 服部 孝道 結城伸泰。抗 GM1b 抗体陽性、抗 GM1 抗体陰性 Guillain-Barré 症候群の特徴。第 13 回日本神経免疫学会。2001 年 2 月 1-2 日、東京。
- 7) 西本 幸弘 小鷹 昌明 結城伸泰 平田 幸一。Guillain-Barré 症候群、Fisher 症候群における抗ガングリオシド抗体測定の有用性 -髄液検査との比較-。第 13 回日本神経免疫学会。2001 年 2 月 1-2 日、東京。
- 8) 薄 敬一郎 結城伸泰 平田 幸一 桑原 聡。Guillain-Barré 症候群における抗 LM1 抗体の fine specificity。第 13 回日本神経免疫学会。2001 年 2 月 1-2 日、東京。
- 9) 松本 陽 池 映欣 小鷹 昌明 結城伸泰。ギラン・バレー症候群における T 細胞レセプターβ鎖レパトアの特性解析。第 13 回日本神経免疫学会。2001 年 2 月 1-2 日、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし

8. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明とその制御に関する研究

分担研究者：高 昌星 信州大学医学部第三内科助教授

研究協力者： 二階堂敏夫 信州大学大学院・臓器発生制御医学

野村恭一 埼玉医科大学・神経内科

研究要旨 ギラン・バレー症候群（GBS）は先行感染の後1～2週間後に免疫学的機序により発症する炎症性末梢神経炎であるが、その詳細な発症機序は不明である。GBSの発症に反応性酸素や窒素が関与していることが明らかにされており、酸化ストレスが関与していることが知られている。同一の感染を受けながら発症する者と発症しない者が存在し、これらは感染因子に対する免疫応答の違いから来るものと考えられ、それには感染因子のみならずストレスや複数の遺伝子と環境因子との複雑な関わり合いによって発症すると考えられる。本研究ではGBSにおける感染因子の役割を細胞内ストレスの観点から検討し、ミトコンドリアDNA上にある酸化ストレスに関与する酵素であるNADHデヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子5178塩基の遺伝子多型を融解分析を行い解析した。GBS患者ではミトコンドリアDNA上にあるNADHデヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子5178塩基はMt5178Aが33%であり、Mt5178Cが67%と健常集団（45%）に比してMt5178Cが多かった。GBS患者ではMt5178Cを有する者が多く、Mt5178Cを有する者はGBSに対し疾患感受性が高いことが示唆された。Mt5178Cは酸化ストレスに関与する遺伝子であり、GBSの疾患感受性に酸化ストレスが関与していることが示唆される。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群（GBS）は先行感染の後1～2週間後に免疫学的機序により発症する炎症性末梢神経炎であるが、その発症は複数の遺伝子と感染因子との複雑な関わり合いによって起ると考えられる。GBSの発症の引き金に感染性因子である病原微生物が関与していることは指摘されているが、同一の感染を受けながら発症する者と発症しない者が存在し、これらは感染因子に対する免疫応答の違いから来るものと考えられ、それには感染因子のみならず宿主側のストレスや複数の遺伝子と環境因子との複雑な関わり合いによって発症すると考えられる。そこで本研究ではGBSにおける感染因子の役割を細胞内酸化ストレスの観点からこれを捕らえ、GBSの発症機序を宿主側の酸化ストレス酵素の遺伝子多型を分子レベルで明かにすることにより、発

症予知に役立たせるとともに、病態にあったオーダーメイド治療法を確立することに役立たせる。

B. 研究方法

健常者およびGBS患者の同意を得た上で、厚生省「ヒト遺伝子解析」に関するガイドラインに従い、健常者およびGBS患者血液から自動DNA抽出装置を用いてDNAの抽出を行い、ミトコンドリアDNA上にあるNADHデヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子5178塩基の遺伝子多型を融解分析を行い解析した。GBS患者から得られたDNA 50ngを鋳型としてNADHデヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子の配列より作成したプライマーを用い、PCRで増幅し、5178塩基付近のフルオレセインの標識したプライマーとLCRed640で標識したプライマーを用い、

PCR を 40 サイクル行い, 融解曲線分析を行うこと
によって遺伝子の多型を解析した.

C. 研究結果

250 名の健常対照者および 22 名の GBS 患者
におけるミトコンドリア DNA 上にある NADH
デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178
塩基の遺伝子多型を融解分析を行い解析した. ミ
トコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲ
ナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基 A から
C への転換はアミノ酸レベルではメチオニンか
らロイシン置換を引き起こす. GBS 患者ではミ
トコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲ
ナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基は
Mt5178A が 33% であり, Mt5178C が 67% と
健常集団 (45%) に比して Mt5178C が多かつ
た.

D. 考察

ミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロ
ゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基 A から
C への転換はアミノ酸レベルではメチオニン
からロイシン置換を引き起こす. GBS 患者では
Mt5178C を有する者が多く, Mt5178C を有す
る者は GBS に対し疾患感受性が高いことが示唆
された. Mt5178C は酸化ストレスに関与する遺
伝子であり, GBS の疾患感受性に酸化ストレス
が関与していることが示唆される. 今後, 酸化
ストレス酵素の遺伝子多型とギラン・バレー症候
群との関連性を解析し, 病態を鑑別し, 発症予知
に役立たせるとともに, 病態にあったオーダーメ
イド治療法を確立することが可能となると考え
られる.

E. 結論

GBS 患者では Mt5178C を有する者が多く,
Mt5178C を有する者は GBS に対し疾患感受性
が高いことが示唆された. Mt5178C は酸化スト
レスに関与する遺伝子であり, GBS の疾患感受
性に酸化ストレスが関与していることが示唆さ
れる.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekiguchi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M,
*Koh C-S, : Brain derived gangliosides
suppress the chronic relapsing-remitting
experimental autoimmune
encephalomyelitis in NOD mice induced
with myelin oligodendrocyte
glycoprotein peptide. J Neuroimmunol
(in press)
2. Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M,
Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S,
Komiya A, *Koh C-S, : Plasma
thrombin-antithrombin III complex is
associated with the severity of
experimental autoimmune
encephalomyelitis. J Neurol Sci (in press)
3. Kim BS, Palma JP, Inoue A, Koh C-S :
Pathogenetic immunity in Theiler's
virus-induced demyelinating disease: a
viral model for multiple sclerosis.
Archivum Immunologiae et Therapiae
Experimentalis (in press)
4. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A,
*Koh C-S, Ohshima H, Yagita H, Mizuno
Y, Okumura K: Amelioration of
experimental auto-immune
encephalomyelitis with anti-OX40 ligand
monoclonal antibody: A critical role for
OX40 ligand in migration, but not
development, of pathogenic T cells. J
Immunol 166: 2108-2115, 2001
5. Ichikawa M, *Koh C-S, Inoue A,
Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y,
Sekiguchi Y, Itoh M, Yagita H, Komiya
A: Anti-IL-12 antibody prevents the
development and progression of
multiple sclerosis like de-myelinating
disease in NOD mice induced with myelin
oligodendrocyte glycoprotein peptide. J
Neuroimmunol 102: 56-66, 2000
6. *Koh C-S, Inoue A, Yamazaki M, Kim BS:
High-dose mouse immunoglobulin G

administration supresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. J Neuroimmunol, 108: 22-28, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし