

図2 各分離株間の類似性の比較

表1 細菌培養対象患者背景および切除部位

Organ	Disease	No. of cases	Gender (M/F)	Mean age (years, range)	Location			
					LUL* ¹	LLL* ²	RUL* ³	RLL* ⁴
Lung	Primary Lung Cancer	12	8/4	62 (34 – 80)	2	2	5	3
	Adenocarcinoma							
	Squamous cell carcinoma	6	5/1	69 (59 – 83)	1	0	3	2
	Metastatic lung tumor							
	Embryonal carcinoma	1	1/0	34	0	0	1	0
	Chondrosarcoma	1	1/0	63	1	0	0	0
	Transitional cell carcinoma	1	0/1	67	0	1	0	0
	Thymic cancer	1	0/1	67	0	0	1	0
	Emphysematous bullae	16	9/7	42 (19 – 70)		3	8	2
	Interstitial pneumonitis	5	2/3	64 (59 – 73)	1	2	2	1
Lymph node	Tuberculosis	2	0/2	54 (42 – 65)	1	1	0	0
	Lung Cancer	11	8/3	62 (22 – 83)				
	Gastric cancer	20	14/6	63 (39 – 80)				
	Colorectal cancer	13	7/6	59 (52 – 78)				

*¹ Left upper lobe, *² Left lower lobe, *³ Right upper lobe, *⁴ Right lower lobe.

表2 末梢肺組織および各所属リンパ節からの細菌分離培養結果

Tissue	n	<i>P. acnes</i>		range (log ₁₀ CFU/g)	Other bacteria (Isolation, Range)
		Isolation	<i>P. acnes</i> only		
Lung	45	25/45 (56%)	24/45 (53%)	<2 - 4	<i>S. epidermidis</i> (1/45, 2)
Lung LN	11	8/11 (73%)	7/11 (64%)	<2 - 2	<i>S. epidermidis</i> (1/11, 2), CNS (1/11, 3)
Stomach LN	20	10/20 (50%)	6/20 (30%)	<2 - 2	<i>Streptococcus</i> sp. (8/20, 2-5), <i>Enterococcus</i> sp. (2/20, 3), <i>Pseudomonas</i> sp. (2/20, <2-2), <i>S. epidermidis</i> (2/20, 2), <i>Candida</i> sp. (1/20, 3), <i>Flavobacterium</i> sp (1/20, 2), <i>Neisseria</i> sp. (1/20, 3), <i>Acinetobacter</i> sp. (1/30, 3), <i>Morganella</i> sp. (1/20, 2), <i>Citrobacter</i> sp. (1/20, 3), <i>Corynebacterium</i> sp. (2/20, 2-3), NFR (1/20, 3),
Colon LN	13	3/13 (23%)	1/13 (8%)	<2 - 2	<i>E. coli</i> (4/13, 3-5), <i>Bacteroides</i> sp. (2/13, 5-8), <i>Pseudomonas</i> sp. (3/13, 2-5), <i>Streptococcus</i> sp. (5/13, 3-5), <i>Klebsiella</i> sp. (3/13, 2-5), <i>Enterococcus</i> sp. (4/13, 4-5), <i>Staphylococcus</i> sp. (1/13, 4), <i>Schewanella</i> sp. 2/13, 2-5), <i>Citrobacter</i> sp. (2/13, 4-5), <i>Proteus</i> sp. (1/13, 5)

11. サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討 ～データマイニングによる培養成績の解析～

分担研究者 渡邊邦友 (岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設教授)

研究協力者 田中香お里(同施設助手)、横山茂樹(高電工業(株))
松岡喜美子(大阪府立病院検査科)

研究要旨 著者らが開発した選択性の高い *Propionibacterium* 選択培地を用いて実施した Sarcoidosis 患者 65 名の糞便からの *Propionibacterium spp.* の分離培養成績を整理し、患者の臨床的情報とともにデータファイルを作成した。そのデータファイルを対象として、Data Mining Program “Icons Miner” (高電工業(株)) をデータマイニングツールとして使用し、決定木解析を主体としたデータマイニングを実施した。その結果、罹患年数(発症からの月数)と糞便から *Propionibacterium* 分離の有無との間に有意な関係、すなわち罹患年数 1-2 年の患者に糞便から *Propionibacterium* が有意に分離されるという仮説が得られた。

A. 研究目的

Propionibacterium spp. はサルコイドーシスへの関与が現在もっとも疑われている細菌である。サルコイドーシスの成因は今だ明確にはなっておらず、患者さんの病巣から高頻度に分離される *Propionibacterium spp.* の由来についても不明である。本菌群は主に皮膚や結膜のうに常在するが、腸管内にも少ないながら常在すると言われている。サルコイドーシスにおける *Propionibacterium* の侵入門戸は腸管であるとする意見もあるが、未だこの点は確かめられてはいない。この点を明確にするためには、本症患者の腸管における本菌群の存在の有無、そしてその優位性、あるいは患者から分離された本菌群と患者以外の腸管から分離された本菌群との異同の検討がされなければならない。しかしながら、本菌群は腸管においては劣勢な菌種であり、これまで使用されてきた選択性の弱い選択培地の使用では、糞便からの本菌群の分離は不可能に近い。そこで本研究では糞便からの *Propionibacterium* の分離を容易にするための選択培地を新規に作製し、それを用いて糞便中の *Propionibacterium* の分布を解析した。

今回は、昨年度の研究で得られた成績をファイルとしてまとめ、そのファイルを使用し、データマイニングによる解析を実施した。

B. 研究方法

I. 対象としたデータファイル

Sarcoidosis 患者 65 名および健常人 74 名の糞便からの *Propionibacterium* 培養成績と健常人では性別年齢、Sarcoidosis 患者では性別年齢、病態に関する情報が含まれている。

II. Data Mining Program

“ICONS Miner” (高電工業(株)) を用いた。Sarcoidosis 患者の集団における糞便中からの *Propionibacterium* 分離培養結果を目的変数として、また患者の病態に関する情報を説明変数として、 χ^2 二乗検定、調整化残差の算出を加えた決定木解析を用いたデータマイニングを実施した。なお、解析にあたり、p 値が 0.05 未満のルールを有意とし、クロス集計表を作製し、算出した調整化残差の絶対値が 2 以上の時を特徴的な箇所と判定した。

C. 研究結果

データマイニングの結果、Sarcoidosis 患者の集団と健常人の集団における糞便中から *Propionibacterium* 分離率には有意な差異は認められなかった。

決定木解析により、Sarcoidosis 患者における糞便からの *Propionibacterium* 培養成績の特徴として得られたルールは、Sarcoidosis 患者の糞便からは *P. acnes* は検出されず、*P. acnes* 以外の *Propionibacterium* が分離され、その菌量が 120/g より多く分離される。あるいは、Sarcoidosis 患者の糞便からは、*P. acnes* が検出されるが、その菌量が 10/g より少ないという解析結果であった。また、同様に決定木解析により、健康人糞便の培養成績の特徴は、健康人糞便からは *P. acnes* が分離され、菌量が 400/g より大であるという解析結果であった。

罹患月数と *P. acnes*、*P. granulosum* の検出の有無、*P. acnes*、*P. granulosum* の菌量分類、そして *Propionibacterium spp.* の菌量についての決定木解析では有意な決定木はえられなかった。

しかし、罹患年（月）数と糞便からの *Propionibacterium* 分離の有無との決定木解析と調整化残差の算出の結果では、表 2、表 3 からわかるように、罹患年数 1-2 年の患者糞便から、有意に高率に *Propionibacterium* が分離されるという解析結果を得た。

表 1 罹患年数別菌検出のまとめ

罹患年数	菌検出無	菌検出有	合計	%	累積%
1	11	9	20	30.8	30.8
2	3	10	13	20.0	50.8
3	7	3	10	15.4	66.2
4	7	0	7	10.8	76.9
5	7	1	8	12.3	89.2
6	1	0	1	1.5	90.8
7	1	0	1	1.5	92.3
9	1	1	2	3.1	95.4
10	0	1	1	1.5	97.0
11	1	0	1	1.5	98.5
20	1	0	1	1.5	100
合計	40	25	65	1.5	
%	61.5	38.5			

D. 考察

データマイニングを用いた解析結果から、より正確な解析結果を得るためには、著者らが Sarcoidosis 患者から分離した *Propionibacterium* で、市販の同定キットでは菌種の決定が困難であった一部の菌株は、菌種レベルでの同定を控えて、*Propionibacterium sp.* とした点が問題となった。菌株のより正確な解析が必要である。現在、遺伝子レベルでの菌種の確定を行っている。

今回のデータマイニングによる解析の結果から興味ある成績は、罹患年数 1-2 年の患者糞便からは、有意に高率に *Propionibacterium* が分離されるとの仮説を得ることができた点である。今後、この仮説の検証が求められる。検証のための実験を計画、開始した。

表 2 罹患年数と菌検出のクロス集計表

罹患年数〔年〕	菌検出無	菌検出有	合計
1	11	9	20
2	3	10	13
3	7	3	10
4	7	0	7
>5	12	3	21
合計	40	25	65
%	61.54	38.76	
p 値=	0.004075	<0.01	

表 3 クロス集計表 2 の調整化残差の算出

罹患年数〔年〕	菌検出無	菌検出有
1	-0.72236	0.722361
2	-3.18689	3.186887
3	0.597913	-0.59791
4	2.214276	-2.21428
>5	1.675709	-1.67571

E. 結論

Sarcoidosis 患者の糞便からの *Propionibacteriu* の分離培養成績のデータマイニングによる解析結果から、Sarcoidosis 罹患年数 1~2 年の患者糞便から、有意に高率に *Propionibacterium* が分離されるとの仮説を得ることができた。

附表1 罹患月数が2年以内の患者33名の培養成績〔*Propionibacterium*の検出〕

年齢性	罹患月数	検出	年齢性	罹患月数	検出
20M	24		57F	12	
23F	3		59F	24	+
27M	12	+	61M	24	+
28M	12	+	62F	24	
29F	12	+	63F	12	+
29F	12		64F	12	
31F	12	+	64F	24	+
38F	1		66F	12	+
38F	12	+	66F	24	+
38F	24	+	67F	24	+
39F	12		69F	12	
42M	18	+	70F	8	
51F	12		71F	12	
53F	3		71F	12	
53M	24	+	75F	18	
54F	12	+	75M	24	+
54M	18				

附表2 罹患月数が2年を超える患者32名の培養成績〔*Propionibacterium*の検出〕

	罹患月数	検出	年齢性	罹患月数	検出
28F	48		56F	36	
30M	48		57F	39	
32M	120	+	56F	60	+
39F	60		57F	60	
40M	108	+	59F	40	
43F	60		60F	36	
45F	29	+	62F	48	
45M	30		63M	36	
47F	60		63F	108	
48M	60		64M	36	
52F	30	+	65M	36	
53F	56	+	65F	132	
54F	36		66F	240	
54F	36		70F	36	+
54M	48		70F	48	
56F	60		76F	48	

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

12. 抗 GM1 抗体を伴うマイコプラズマ感染後軸索型 ギラン・バレー症候群

分担研究者 結城伸泰 (獨協医科大学神経内科助教授)

共同研究者 薄 敬一郎、平田幸一 (獨協医科大学神経内科)

研究要旨 目的: マイコプラズマ感染後ギラン・バレー症候群 (GBS) では、抗ガラクトセレブロシド (GalC) 抗体が報告され、脱髄型 GBS との関連が示唆されている。それに対し、我々は抗 GM1 抗体を有するマイコプラズマ感染後軸索型 GBS 例を経験した。その発症機序に関して考察する。対象・方法: ELISA、薄層クロマトグラム (TLC) 免疫染色で患者血清中の抗糖脂質抗体を検討した。結果: ELISA で患者血清中に GM1 と GalC に対する IgG および IgM 抗体が検出された。吸収試験の結果、これらは互いに交叉反応することが示された。TLC 免疫染色では、患者血清は GalC にはほとんど反応しなかったのに対し、GM1 には強く反応した。さらにマイコプラズマ菌体成分中にコレラ毒素により染色されるバンドを認めた。結論: GM1 エピトープを持つマイコプラズマに感染後、抗 GM1 抗体が産生され、軸索型 GBS を発症したものと考えられ、分子相同仮説に基づく発症機序が示唆された。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群 (GBS) 患者の 5% でマイコプラズマ感染が先行する。マイコプラズマ感染後 GBS では、抗ガラクトセレブロシド (GalC) 抗体との関連が報告されている。GalC は末梢神経の髄鞘に豊富に存在する。マイコプラズマ菌体成分と GalC との間に分子相同性が示され、脱髄型 GBS との関連が示唆されている。しかし、マイコプラズマ感染後 GBS の電気診断や自己抗体に関しては、まだ十分に明らかではない。今回われわれは、マイコプラズマ感染後の軸索型 GBS 例を経験した。血清学的検討を詳細に加え、報告する。

B. 症例

29 歳、男性。2 週間にわたり 39℃ 台の発熱、乾性咳漱が続いた後、右下肢、両手指の脱力感を自覚した。入院時、四肢筋力低下、深部腱反射減弱を認めた。感覚系、自律神経系は

正常であった。血清抗マイコプラズマ抗体価 (PA 法) 640 倍、寒冷凝集反応 2048 倍と高値であった。髄液細胞数は $12/\text{mm}^3$ 、蛋白は 69 mg/dl であった。末梢神経伝導検査で複合筋活動電位振幅の著しい低下を認め、軸索型 GBS と診断した。免疫グロブリン大量療法により筋力は回復した。

C. 研究方法

1. ELISA で各種糖脂質 (GalC, GM1, GM1b, GM2, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GD2, GT1a, GT1b, GQ1b, SPG, SLPG) に対する抗体を測定した。490 nm における吸光度が 0.1 以上を示す最大血清希釈倍率を抗体価と定義し、500 倍以上を陽性とした。

2. 吸収試験で抗 GM1 抗体、抗 GalC 抗体の交叉反応性を調べた。GM1、GalC、GQ1b を固相化したウェルに、490 nm における吸光度が 0.5 から 2.5 になるように希釈した血清を

入れ、4℃で一晩反応させた。次に、上清を一次抗体として通常の ELISA で GM1 ならびに GalC に対する反応を測定した。

3. 薄層クロマトグラム (TLC) 免疫染色により、糖脂質に対する抗体を検討した。対照として、GalC を感作することにより脱髄性ニューロパチーを発症したウサギ血清を用いた。
4. コレラ毒素を用いた TLC 免疫染色により、マイコプラズマ菌体成分中の GM1 様構造の有無を調べた。

D. 研究結果

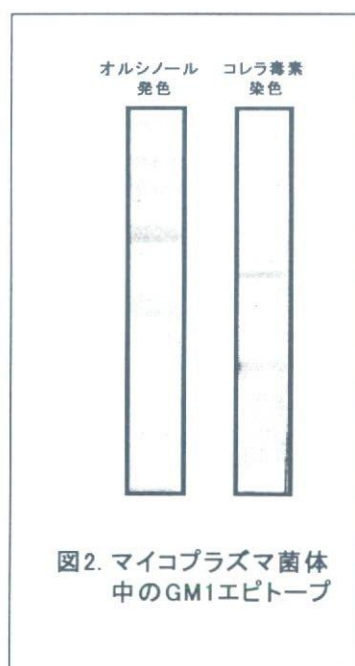
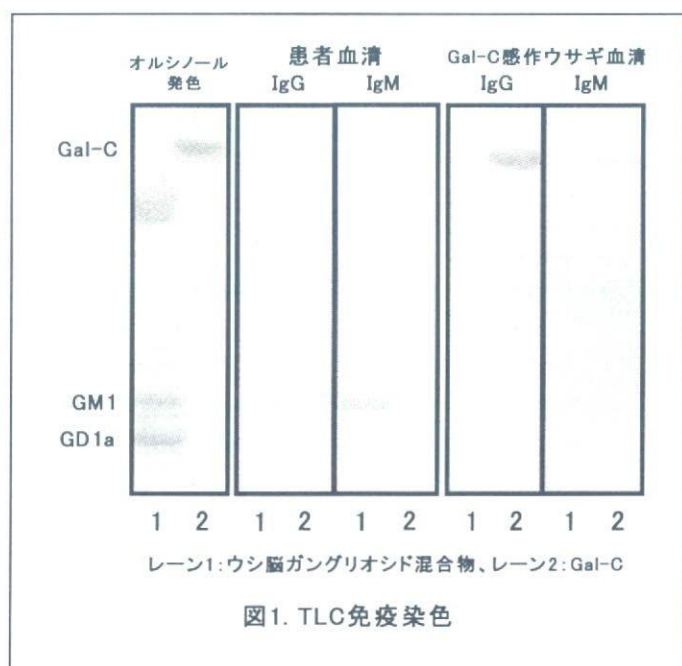
1. 急性期血清中には、GM1 に対する IgM、IgG 抗体 (抗体価はいずれも 4000 倍)、GalC に対する IgM、IgG 抗体 (抗体価はいずれも 8000 倍) を検出した。
2. 吸収試験の結果、抗 GM1 抗体は IgM、IgG クラスとも GalC により吸収され、逆に抗 GalC 抗体は IgM、IgG とも GM1 により吸収された。

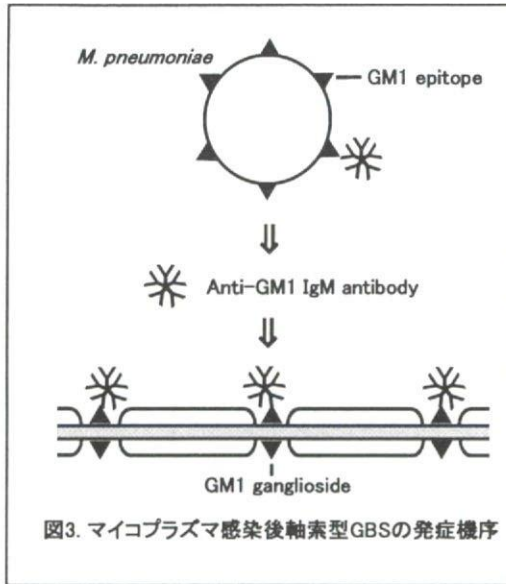
3. TLC 免疫染色では、患者血清を反応させた場合、IgM 抗体は GM1 に強く結合したが、GalC に対しては、IgM、IgG ともほとんど結合しなかった (図 1)。対照として用いた GalC 感作ウサギ血清では、IgG 抗体が GalC に強く結合した。

4. マイコプラズマ菌体成分中に、コレラ毒素に結合するバンドを認めた (図 2)。

E. 考察

GalC と GM1 との間には、平面構造で見るとかぎり共通構造はないが、本症例ではこれらに対する抗体は交叉反応していることが吸収試験の結果より証明された。さらに、TLC 免疫染色では、特に IgM 抗 GM1 抗体が強く検出され、脱髄性ニューロパチーを発症した GalC 感作ウサギの染色パターンとは明らかに異なっていた。さらに、マイコプラズマ菌体成分中に、GM1 様構造の存在が示された。本症例では、GM1 エピトープを持つマイコプラズマに感染後、抗 GM1 抗体が産生され、軸索型 GBS を発症したものと考えられた (図 3)。





F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

2. 学会発表

1. Susuki K, Yuki N, Hirata K.
Axonal Guillain-Barré syndrome
subsequent to *Mycoplasma* infection.
European Neurological Society Berlin,
German. 24th June 2002
J Neurol 2002; 249(Suppl. 1):123
2. 薄 敬一郎, 結城伸泰, 平田幸一.
マイコプラズマ感染後軸索型ギラン・バ
レー症候群 -分子相同性仮説に基づく発
症機序-.
第43回 日本神経学会総会 札幌
2002年5月31日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

13. *Campylobacter jejuni*・*Haemophilus influenzae* 感染後 ギラン・バレー症候群における T 細胞受容体レパトア

分担研究者 結城伸泰 (獨協医科大学神経内科助教授)

共同研究者 古賀道明、平田幸一 (獨協医科大学神経内科)
塚田有希子、松本 陽 (東京都神経研分子神経病理)

研究要旨 ギラン・バレー症候群 (GBS) の患者血中には自己抗体 (抗ガングリオシド抗体) が検出され、治療として血漿交換が有効であることから、その発症に液性免疫が関与していることは明白である。一方、GBS 急性期には T 細胞が活性化していることも知られているが、どのような特性をもった T 細胞が発症に関与するのは明らかにされていない。本研究では、自己免疫疾患の動物モデルや多発性硬化症の T 細胞レパトアの分析に有用であった CDR3 領域スペクトラタイピングを用いて、特に *Campylobacter jejuni* や *Haemophilus influenzae* による感染を契機として発症したギラン・バレー症候群患者の末梢血 T 細胞の検索を行った。ギラン・バレー症候群やその亜型であるフィッシャー症候群 (FS) では健常者と比し、 $V\beta \cdot V\delta$ スペクトラタイプ増幅が高頻度にみられた。しかしながら、*C. jejuni* 感染後 GBS・FS と関連のあるスペクトラタイプはなかった。一方、*H. influenzae* 感染後 GBS・FS 8 例中 4 例 (50%) で $V\beta 5.2$ 遺伝子利用がみられ、健常者 7% と比較し高頻度であったが、有意差には至らなかった (補正 $p=0.32$)。抗ガングリオシド抗体の有無と増幅スペクトラタイプの間にも関連を見出せなかった。GBS・FS では何らかの $V\beta \cdot V\delta$ スペクトラタイプの増幅があり、対応する T 細胞受容体を発現している T 細胞が活性化していることが推測された。しかしながら、疾患に共通して特定の遺伝子が使用されるわけではないことが明らかとなった。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群 (GBS) の発症に T 細胞が関与すると想定されているが、その詳細は明らかでない。発症に関与する T 細胞を明らかにできれば、DNA ワクチン療法などの新たな治療法の開発に取り組むことが可能となる。今回われわれは、どのような特性をもった T 細胞が GBS の発症に関与しているかを検討するために、T 細胞による抗原認識に重要な T 細胞受容体の解析を行った。また、GBS は様々な感染症が契機となって発症するなど不均一な疾患である。今回の検討では、先行感染病原体 (*Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*) や自己抗体 (抗ガングリオシド抗体)、神経所見 (四肢脱力を主徴とする典型的な GBS と、

眼球運動障害を主症状とする GBS 亜型のフィッシャー症候群[FS])などを基に GBS 症例を細分化しての解析も行った。

B. 研究方法

(1) 対象

GBS 83 例と FS 36 例を対象とした。対照には健常人 29 名を用いた。

(2) T 細胞受容体解析

発症 1 カ月以内、および可能な場合には発症 6 カ月以降に末梢血リンパ球を採取し RNA を抽出した。CDR3 領域スペクトラタイピング法を用いて、 $V\beta 1-24$ と $V\delta 1-5$ 各遺伝子の増幅を測定した。

(3) 血清学的検討

急性期血清を用いて、各種ガングリオシド (GM2, GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b) に対する IgG 抗体を測定した。また、*C. jejuni* と *H. influenzae* による先行感染の有無を血清学的に検討した。

(4) 統計解析

χ^2 乗検定または Fisher の直接確率法を用いて患者群と健常群との増幅頻度を統計学的に比較した。相関の有意性を判定するために今回検索した遺伝子数 ($V\beta$ は 25, $V\delta$ は 5) を基に補正 p 値を算出し、補正 p 値 0.05 未満を有意とした。

(5) 倫理面への配慮

研究目的のサンプル使用に関し、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) GBS および FS 症例

$V\beta$ スペクトラタイプ増幅が 1 つ以上みられた症例は、GBS で 77%、FS で 75% であり、いずれも健常者の 59% を上回ったが有意差には至らなかった ($p=0.055$, $p=0.16$) (表 1)。 $V\delta$ 領域では GBS で 53%、FS で 65% であり、健常者の 38% と比べ FS で有意に高かった ($p=0.04$)。GBS・FS 患者群と $V\beta$ ・ $V\delta$ 各スペクトラタイプ増幅との有意な関連はみられなかった (表 2)。

(2) *C. jejuni*・*H. influenzae* 感染、抗ガングリオシド抗体との関連

C. jejuni 感染後の症例や IgG 抗ガングリオシド抗体陽性例では特定の $V\beta$ ・ $V\delta$ 各遺伝子増幅はなかった。一方、*H. influenzae* 感染後 GBS・FS 8 例中 4 例 (50%) で $V\beta 5.2$ 遺伝子利用がみられ、健常者 7% と比較し高頻度であったが、有意差には至らなかった (補正 $p=0.32$)。

(3) 経時変化

急性期に $V\beta$ スペクトラタイプの増幅がみられた 15 症例中 8 例で発症 6 カ月以降に増幅は消失ないし減少していた。

D. & E. 考察および結論

GBS・FS では何らかの $V\beta$ ・ $V\delta$ スペクトラタイプの増幅があり、対応する T 細胞受容体を発現している T 細胞が活性化していることが推測された。しかしながら、疾患に共通して特定の遺伝子が使用されるわけではないことが明らかとなった。また、 $V\beta$ ・ $V\delta$ は先行感染因子や抗ガングリオシド抗体などとも関連を見出せなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koga M, Yuki N, Tsukada Y, Hirata K, Matsumoto Y. CDR3 spectratyping analysis of the T cell receptor in Guillain-Barré and Fisher syndromes. (投稿準備中)

2. 学会発表

1. 古賀道明、結城伸泰、塚田有希子、平田幸一、松本 陽. Guillain-Barré 症候群・Fisher 症候群における T 細胞受容体レパトア. 第 15 回日本神経免疫学会学術集会、2003 年 3 月 12-14 日、長崎 (発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 Vβと Vδ スペクトラタイプの増幅頻度

	Vβ expansion		Vδ expansion	
	Frequency (%)	p value (Compared with healthy subjects)	Frequency (%)	p value (Compared with healthy subjects)
Healthy subjects	59	-	38	-
GBS and FS	76	0.052	57	0.09
GBS	77	0.055	53	0.2
FS	75	0.16	65	0.04
<i>C jejuni</i> -related GBS and FS	78	0.08	50	0.33
<i>H. influenzae</i> -related GBS and FS	75	0.34	75	0.08
Anti-ganglioside IgG-positive GBS and FS	78	0.04	60	0.054

表2 GBS・FS患者における各スペクトラタイプの増幅頻度

	GBS and FS	Healthy	Uncorrected p	Corrected p
Vβ	% (n=119)	% (n=29)		
1	8	0	0.1	
2	5	10	0.9	
3	12	10	0.6	
4	3	0	0.4	
5.1	3	3	0.7	
5.2	18	7	0.1	
6	11	14	0.8	
7	13	0	0.02	0.61
8	7	7	0.7	
9	12	17	0.9	
10	4	7	0.9	
11	4	3	0.7	
12	7	7	0.7	
13	5	0	0.3	
14	11	7	0.4	
15	8	3	0.4	
16	5	10	0.9	
17	1	0	0.8	
18	2	3	0.9	
19	3	0	0.4	
20	1	3	0.4	
21	3	3	0.7	
22	4	10	1.0	
23	10	3	0.2	
24	10	3	0.2	
Vδ	% (n=113)	% (n=24)		
1	18	8	0.2	
2	19	4	0.054	
3	34	25	0.4	
4	3	0	0.6	
5	3	0	0.6	

14. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明と その予防に関する研究

分担研究者 高 昌星 (信州大学医学部保健学科教授)

共同研究者 植田秀穂、小穴こず枝、川上由行、市川元基、武富 保、
川岸久太郎 (信州大学医学部第二解剖)

研究要旨 *Campylobacter jejuni* (*C.j*)によるギラン・バレー症候群 (GBS) の病因を解明するため、GM1 ガングリオシド様構造を有するとされる *C.j* および末梢神経における GM1 の局在を免疫組織学的および免疫電顕を用いて検討した。GM1 の局在を検討するために、コレラトキシンサブユニット(CTB)を用いた免疫組織化学を行った。軸索を同定するためにニューロフィラメントヘビーチェーン(NF-H)を使用した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、末梢神経における GM1 の局在は専ら髄鞘に限局しており、軸索にはみられなかった。免疫電顕では *C.j* への CTB の結合はみられず、GM1 の局在は観察出来なかった。このことは軸索型 GBS であるとされる急性軸索型運動ニューロパチー(AMAN)における抗 GM1 抗体の病因説に疑問が残り、その他の機序により AMAN も発症する可能性が示唆された。末梢神経における GM1 の局在は専ら髄鞘にあり、軸索にはみられず、GBS における抗 GM1 抗体による軸索障害説に関しては、他の機序をも十分に検討する必要がある。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群 (GBS) の 10-30% に *Campylobacter jejuni* (*C.j*) の先行感染があり、現在 Penner の血清型で、1, 2, 4, 5, 7, 10, 16, 19, 23, 37, 44, 64 などが報告されており、特に急性軸索型ニューロパチー (AMAN) との関連が注目されている。本症の発症に抗 GM1 ガングリオシド抗体が関与していることが報告されているが、GM1 は生体に広く分布しているにもかかわらず末梢神経のみを障害しうるのか、また高い抗体価でも発症しない例があるなど、その病因的意義については不明である。今回、我々は *C.j* による GBS の病因を解明するため、GM1 様構造を有するとされる *C.j* および末梢神経における GM1 の局在を検討した。

B. 研究方法

蛍光免疫組織化学：末梢神経における GM1 の局在を検討するために、コレラトキシン サブユニット(CTB)を用いた免疫組織化学を行った。軸索を同定するためにニューロフィラメントヘビーチェーン(NF-H)を使用した。成熟した ddy マウスを 4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で灌流固定し、坐骨神経を取り出し OTC コンパウンドに包埋した後クライオスタットで 10 μm に薄切した。切片をピオチン化した CTB で浸漬し、ストレプトアビジン結合 Alexa488 で蛍光標識した。一方軸索の同定では、切片をヤギ血清でブロッキングした後、NF-H 抗体で浸漬後、ピオチン化ラビット IgG 抗体、ストレプトアビジン結合 Alexa594 で蛍光標識した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (ライカ) を使用した。

透過型電子顕微鏡：寒天ゲルに培養した *C.j* を低融点アガロースゲルに包埋した後、2.5%グ

ルタールアルデヒド(GA)、1%四酸化オスミウム(Os)で固定し、続いて一連のエタノール脱水の後エポキシに包埋する。80nm の超薄切片をウランと鉛で2重染色し、カーボンコーティングした後透過型電子顕微鏡で観察した。

走査型電子顕微鏡: 透過型電子顕微鏡試料の作製と同じように、低融点アガロースゲルに包埋した *C.j* を、2.5%GA、1%Os で固定し、酢酸イソアミルで置換した後臨海点乾燥を施行しオスミウムコーティングを行う。最後に試料を走査型電子顕微鏡にて観察した。

免疫電顕: 低融点アガロースゲルに包埋した *C.j* を PFA で固定し、PBS 洗浄後ビオチン化 CTB で浸漬した。ストレプトアビジン結合コロイド金粒子でもう一晚(4度)浸漬した後、2.5%GA で再固定した。Os 処理は省き、エタノール脱水の後エポキシに包埋した。80nm の超薄切片をウランと鉛で2重染色し、カーボンコーティングした後透過型電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

(1) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、末梢神経における GM1 ガングリオシドの局在は専ら髄鞘に限局しており、軸索にはみられなかった(図1、2、3)。

(2) 免疫電顕では *C.j* への CTB の結合はみられず、GM1 の局在は観察出来なかった(図4)。

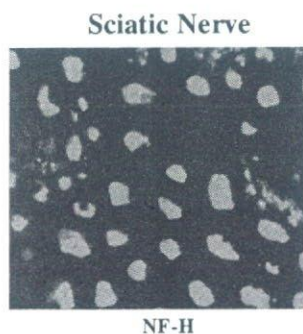


図1: ニューロフィラメントヘビーチェーン(NF-H)

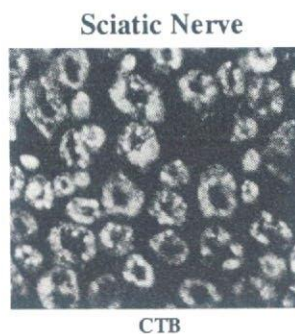


図2: コレラトキシン サブユニット(CTB)

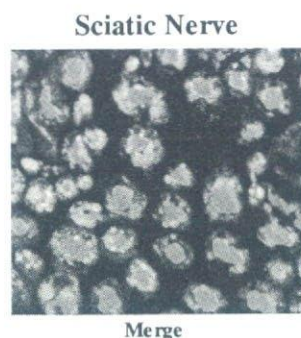


図3: NF-HとCTBの二重染色

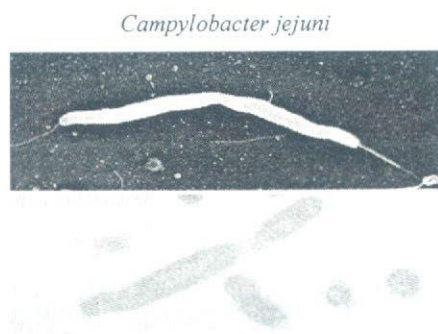


図4: 免疫電顕

D. 考察

(1) 末梢神経における GM1 の局在は軸索ではなく、髄鞘にあることが明らかとなった。このことは軸索型 GBS であるとされる AMAN における抗 GM1 抗体の病因説に疑問が残り、その他の機序により急性軸索型運動ニューロパチー(AMAN)も発症する可能性が示唆された。

(2) *C.j* の免疫電顕による観察では CTB の結合がみられず、*C.j* における GM1 局在に関しては今後ともさらに検討を要すと考えられる。

E. 結論

末梢神経における GM1 の局在は専ら髄鞘にあり、軸索にはみられず、GBS における抗 GM1 抗体による軸索障害説に関しては、他の機序をも十分に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shin T, Ahn M, Moon C, Jee Y, Wie MB, Shin YG, and Koh C-S: An inhibitor of both cyclooxygenases and 5-lipoxygenase ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. *Mult Scler* (in press)
2. Inoue A, Koh C-S, Yamazaki M, Palma JP, Yagita H, Kim BS: Treatment with anti-Fas L antibody aggravates Theiler 1 s murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease. *Mult Scler* (in press)
3. Kim BS, Fuller AC, Koh C-S: Cytokines, chemokines and adhesion molecules in TMEV-IDD. Chapter 7, pp 1-13, "Multiple Sclerosis" 2002
4. Okumura N, Terasawa F, Fujita K, Fujihawa N, Tozuka M, Koh C-S: Evidence that heterodimers exist in the fibrinogen Matsumoto II (g308 → K) proband and participate in fibrin fiber formation. *Thromb Res*, 107: 157-162, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Odaka M, Yuki N	Variants and differential diagnosis of Guillain-Barré syndrome.	Expert Rev Neurotherapeutics			in press
Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kmeoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K	Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice	Free Radical Research			in press
Okuda B, Koga M, Katsuta T, Okamoto K, Yuki N	Fulminant Guillain-Barré syndrome after <i>Campylobacter jejuni</i> enteritis and anti-GT1a IgG antibody lacking cross-reactivity with GQ1b.	Intern Med			in press
Okamoto M, Kamitani W, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Nakamura Y, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K, Taniyama H	Detection of Borna Disease virus (BDV) in brain and placenta of equine fetuses and mothers positive for serum BDV-antibodies and BDV RNAs in PBMCs	J Clin Microbiol			In press
Sugita A, Yanagisawa T, Kamo T, Takahashi Y, Yuki N	Internal ophthalmoplegia with anti-GQ1b IgG antibody.	J Neurol			in press
Shin T, Ahn M, Moon C, Jee Y, Wie MB, Shin YG, Koh C-S	An inhibitor of both cyclooxygenases and 5-lipoxygenase ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes.	Mult Scler			in press
Inoue A, Koh C-S, Yamazaki M, Palma JP, Yagita H, Kim BS	Treatment with anti-Fas L antibody aggravates Theiler's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease.	Mult Scler			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawara K, Kuwabara S, Yuki N	Fisher syndrome or Bickerstaff's brainstem encephalitis? IgG anti-GQ1b antibody syndrome involving both the peripheral and central nervous system.	Muscle Nerve			in press
Ito M, Oda Y, Yamagoe S, Suzuki K, Tanokura, M	Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds	Protein Expression Purif			in press
Watanabe M, Lee BJ, Yamashita M, Kamitani W, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K	Borna disease virus induces acute fatal neurological disorders in neonatal gerbils without virus- and immune-mediated cell destructions	Virology			In press
Yamaryo T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T	T. Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages.	Antimicrob Agents Chemother	47	48-53	2003
Mishima Y, Momma K, Hashimoto W, Mikami B, Murata K	Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule (alginate)-binding protein of <i>Sphingomonas</i> sp. A1, complexed with an alginate tetrasaccharide at 1.6 Å resolution.	J Biol Chem		in press	2003
Hashimoto W, Nankai H, Mikami B, Murata K	Crystal structure of <i>Bacillus</i> sp. GL1 xanthan lyase that acts on side chains of xanthan.	J Biol Chem		in press	2003
Shimamura H, Miura H, Iwaki Y, Kubodera T, Matsuoka T, Yuki N, Koga M	Clinical, electrophysiological, and serological overlap between Miller Fisher syndrome and acute sensory ataxic neuropathy.	Acta Neurol Scand	105	411-413	2002
Osaki Y, Koga M, Matsubayashi K, Yuki N	Asymmetric pharyngeal-cervical-brachial weakness associated with anti-GT1a IgG antibody.	Acta Neurol Scand	106	234-235	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakayama K, Jia YX, Hirai H, Shinkawa M, Yamaya M, Sekizawa K, Sasaki H	Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells.	Am J Respir Cell Mol Biol	26	105-113	2002
Wang HD, Yamaya M, Okinaga S, Jia YX, Kamanaka M, Takahashi H, Guo LY, Ohrui T, Sasaki H	Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.	Am J Respir Crit care Med	165	406-411	2002
Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yoshino A, Yasuda H, Takahashi H, Nishimura H, Sasaki H	Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells.	Am J Respir Crit Care Med	165	1113-1118	2002
Yuki N, Mori I, Susuki K	Rabbit model of Guillain-Barré syndrome: reply.	Ann Neurol	52	128-129	2002
Kuwabara S, Ogawara K, Sung J-Y, Mori M, Kanai K, Hattori T, Yuki N, Lin C S-Y, Burke D, Bostock H	Differences in membrane properties of axonal and demyelinating Guillain-Barré syndromes.	Ann Neurol	52	180-187	2002
Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Kamijo M	Myelin-derived glycolipids and animal models of Guillain-Barré syndrome: reply.	Ann Neurol	52	532-533	2002
Tsuchihashi Y, Oishi K, Yoshimine H, Suzuki S, Kumatori A, Sunazuka T, Omura S, Matsushima K, Nagatake T	Fourteen-member macrolide suppress interleukin-8 production but not promote apoptosis of activated neutrophils.	Antimicrob Agents Chemother	46	1101-1104	2002
Nankai H, Hashimoto W, Murata K	Molecular identification of family 38 α -mannosidase of <i>Bacillus</i> sp. strain GL1 responsible for complete depolymerization of xanthan.	Appl Environ Microbiol	68	2731-2736	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mishima Y, Momma K, Miyake O, Hashimoto W, Mikami B, Murata K	Super-channel in bacteria: macromolecule uptake and depolymerization systems of <i>Sphingomonas</i> sp. A1 with special cell surface structure.	Biotechnol Gen Eng Rev	19	105-119	2002
Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S	High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients.	Blood	100	2005-2011	2002
Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H, Sawada A, Kim JY, Sashihara J, Amou K, Miyagawa H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S	Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	29	595-598	2002
Nagatake T, Ahmed K, Oishi K	Prevention of respiratory infections by povidone-iodine gargle.	Dermatology	204 (Supp)	32-36	2002
Tanaka H, Nishimura T, Hakui M, Sugimoto H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K	Human herpesvirus 6-associated hemophagocytic syndrome in a healthy adult.	Emerg Infect Dis	8	87-88	2002
Arai M, Odaka M, Yuki N, Hirata K	A patient with overlapping Bickerstaff's brainstem encephalitis, Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome.	Eur J Neurol	9	115-116	2002
Miura Y, Susuki K, Yuki N, Ayabe M, Shoji H	Guillain-Barré syndrome presenting pharyngeal-cervical-brachial weakness in the recovery phase.	Eur Neurol	48	53-54	2002
Tagawa Y, Yuki N, Hirata K	High anti-GM1 and anti-GD1a IgG antibody titers are detected in Guillain-Barré syndrome but not in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.	Eur Neurol	48	118-119	2002