

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法

の開発に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 吉良 潤一

平成 17 年 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法
の開発に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 吉良 潤一

平成 17 年 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法の開発に関する研究	----- 1
吉良潤一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
III. 研究成果の刊行物・別冊	----- 14

分担研究者

西村泰治 熊本大学大学院医学研究
科・免疫識別学・教授

鍋倉淳一 岡崎国立共同研究機構生
理学研究所・発達生理学研究室・生
体恒常機能発達機構部門・教授

水之江義充 九州大学大学院医学研
究院・細菌学・助教授

平田和穂 九州大学大学院医学研究
院・形態解析学・講師

三野原元澄 九州大学病院・神経内
科学・医員

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群 (GBS) は末梢神経の脱髄性疾患では最も頻度の高い神経難病である。なかでも、我が国や中国では *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 感染後に起こる軸索傷害型 GBS の頻度が高く、重篤な後遺症を残すことが知られている。本症の軸索傷害は、*C. jejuni* の lipopolysaccharide (LPS) との交差反応性により抗 GM1 抗体が誘導され軸索を傷害するという立場での研究が主流となっている。しかしながら、抗 GM1 抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者全例で認められるわけではなく、また、抗 GM1 抗体は末梢神経障害のない患者でも認められる。また、抗 GM1 抗体は In vitro において、伝導ブロックを誘導しないことが報告されている。これらのことは、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態形成が抗 GM1 抗体のみで説明することが不可能であることを示しており、他の因子の関与が考えられる。

近年、我々の研究グループでは *C. jejuni* の産生する DNA-binding protein from

starved cells (C-Dps 蛋白) を初めてクローニングした。我々は本蛋白質と GBS 病態との関連を検討し、以下の結果を報告してきた。1) 本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者においては約 50% の陽性率で認められるが、呼吸器感染後 GBS 患者や他の炎症性神経疾患では認められず、また、*C. jejuni* 腸炎患者においては 10% の陽性率で、*C. jejuni* 感染後 GBS では、有意に陽性率が高い。2) C-Dps 蛋白はラット神経系に対し、中枢神経系では神経細胞の胞体、末梢神経では髄鞘に結合する。3) C-Dps 蛋白は sulfatide と結合する。4) NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、膜障害を誘導する。以上のことは C-Dps 蛋白が GBS 病態と関連すること、In vitro において直接的な神経傷害活性を持つこと示している。このことから、本年度は In vivo での末梢神経に対する C-Dps 蛋白の作用の検討を行った。

B. 研究方法

I. C-Dps 蛋白のラット坐骨神経への作用の検討

7~8 週齢のメスの Lewis rat を深麻酔下で台座に固定し、背側より両側坐骨神経を露出した。近位部刺激点 (SP) に目印をつけ、そこから 2cm 遠位の遠位部刺激点 (SD) に目印を付けた。SP と SD に電気刺激を加え、腓腹筋の収縮が認められることを確認し記録電極を挿入した。刺激強度は最大上刺激にて行い、刺激間隔は 500msec とした。

C-Dps 蛋白は SP と SD の中間点にマイクロシリンジを用いて注入を行った。C-Dps 蛋白は His-tag の結合したリコンビナント蛋白で、ニッケルカラムを用いて精製を行っ

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法の開発に関する研究

主任研究者 吉良 潤一 九州大学医学研究院・神経内科・教授

研究要旨

近年、我々の研究グループでは、ギラン・バレー症候群（GBS）の先行感染病原体である *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) より、ストレス蛋白の一つである DNA-binding protein from starved cells (C-Dps 蛋白) を初めてクローニングした。我々は GBS 病態と C-Dps 蛋白との関連を検討し、これまでに以下の結果を得ている。1) 本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者でのみ約 50% の陽性率であり、呼吸器感染後 GBS 患者では認められない、2) C-Dps 蛋白はラットの脊髄前角の運動ニューロンと末梢神経の髄鞘に結合する、3) C-Dps 蛋白は sulfatide と特異的に結合する、4) C-Dps 蛋白は、NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、濃度依存性に細胞膜を障害する。これらの *in vitro* での結果は、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して神経細胞に結合し、直接的に神経細胞を傷害しうることを示しており、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態への C-Dps 蛋白の関与が示唆された。

本年度は、C-Dps 蛋白の *in vivo* における作用を検討するため、ラット坐骨神経に C-Dps 蛋白を注入し電気生理学的検討を行った。その結果、C-Dps 蛋白を注入したラット坐骨神経においては、伝導速度は 10 分値で一過性の低下が認められたがその後回復し、一方で複合筋活動電位 (cMAP) は注入後 10 分より有意な低下が認められた。コントロールとして、同量の PBS、あるいは熱処理後 (100℃、30 分間) C-Dps 蛋白を注入した坐骨神経では、伝導速度の 10 分値での一過性の低下は認められたが、cMAP の低下は認められなかった。また、C-Dps 蛋白を注入した坐骨神経を抗 C-Dps モノクローナル抗体で免疫染色した場合、髄鞘やランピエ絞輪部への C-Dps 蛋白の沈着が認められた。以上のことから、C-Dps 蛋白は、*in vivo* においてラット坐骨神経に対し伝導ブロックを誘導し、その作用点としてランピエ絞輪部での傷害が示唆された。ランピエ絞輪の軸索表面にはナトリウムチャンネルが存在し、paranode 部位には caspr、更に juxtaparanode 部位にはカリウムチャンネルが局在している。sulfatide を欠損するマウスではこれらランピエ絞輪周辺のイオンチャンネルの局在に異常を来すことが知られている。C-Dps 蛋白は sulfatide を受容体として結合することから、同蛋白による伝導ブロックはイオンチャンネルの異常に起因している可能性が考えられ、現在各種イオンチャンネルの評価を行っている。

た。精製後の C-Dps 蛋白には endotoxin が含まれており、ポリミキシン B アガロース (Sigma) を用いて除去を行った。Endotoxin の測定には、Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 (Bio Whittaker) を使用した。コントロールとして PBS、あるいは同濃度の熱処理した C-Dps 蛋白溶液を用いた (熱処理: 100°C、30 分)。坐骨神経への注入は、C-Dps 蛋白 (n=5) は 30 μ l (0.5mg/ml) で行い、PBS (n=5) と同濃度の熱処理後 C-Dps 蛋白 (n=5) も共に 30 μ l 注入した。

電気生理学的検討は、C-Dps 蛋白の注入前、注入後 10 分、60 分、180 分、300 分で行った。伝導速度 (MCV) は、S1 と S2 刺激での潜時を測定し算出した。また、SP と SD 刺激時のそれぞれの複合筋活動電位 (cMAP) を測定し、近位部と遠位部刺激での振幅の比 (近位刺激振幅/遠位刺激振幅: P/D 比) を算出した。

C-Dps 蛋白群、PBS 群、熱処理 C-Dps 群の 3 群において、注入前の MCV、P/D 比と注入後のそれぞれの時間での変化を Wilcoxon 符号順位和にて検定した。

II. C-Dps 蛋白の末梢神経への沈着; 7~8 週齢のメスの Lewis rat を深麻酔下で台座に固定し、背側より両側の坐骨神経を露出した。坐骨神経へ C-Dps 蛋白を 30 μ l (0.5mg/ml) 注入し、創部を閉じ、7 時間後に灌流固定し坐骨神経を摘出した。コントロールとして同量の PBS 注入を行った。それぞれの坐骨神経で凍結切片を作り、免疫染色に用いた。一次抗体として抗 C-Dps モノクローナル抗体 (25G) を 5000 倍希釈にて用い、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を 200 倍希釈で用いた。軸索の染色のために、

一次抗体として抗ニューロフィラメント H 鎖抗体 (Chemicon) を 400 倍希釈で用い、二次抗体として Rhodamine-red 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes) を 400 倍希釈にて使用した。染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

I. C-Dps 蛋白のラット坐骨神経への作用の検討

注入前の平均 MCV は、PBS 群では 37.2 m/sec、熱処理 C-Dps 群では 45.0m/sec、C-Dps 群では 42.4 m/sec であった。注入直後はそれぞれ 25.4、29.6、28.7m/sec と一過性の低下が認められたが、注入後 60 分には改善し、その後は変化は認められなかった。このような一過性の MCV の低下は、坐骨神経への 30 μ l の注入による圧迫負荷が関与すると考えられた。注入前値と比べ注入後 60 分以降のいずれの時間においても、各群とも有意な MCV の低下は認められなかった (図 1)。

一方、cMAP の平均 P/D 比においては、PBS 群では注入前値 1.06、10 分値 1.04、60 分値 1.01、180 分値 0.97、300 分値 0.93 であり、注入前値と比べ注入後のいずれの時間においても有意な低下は認められなかった。熱処理 C-Dps 群においても注入前値 1.02、10 分値 1.04、60 分値 0.97、180 分値 1.03、300 分値 1.01 であり、注入前値と比べ注入後のいずれの時間においても有意な低下は認められなかった。一方で、C-Dps 注入群においては、注入前値 1.04、10 分値 0.88、60 分値 0.82、180 分値 0.83、300 分値 0.75、420 分値 0.69 であり (図 2)、注入後 10 分

から以降、有意な P/D 比の低下が認められた (p 値: 10 分; 0.016, 60 分; 0.016, 180 分; 0.026, 300 分; 0.005, 420 分; 0.006)。

II. C-Dps 蛋白の末梢神経への沈着

C-Dps 蛋白を注入した坐骨神経においては、髄鞘、並びにランビエ絞輪部への C-Dps 蛋白の沈着が認められた (図 3)。

D. 考察

近年、我々の研究グループにおいて *C. jejuni* の産生する DNA-binding protein from starved cells (C-Dps 蛋白) を初めてクローニングした。Dps 蛋白は、大腸菌などの微生物の産生するストレス蛋白の一つであり、微生物が酸化的ストレスや飢餓ストレスに曝された時に多量に産生される。10 数 kDa の蛋白質が 12 量体を形成しており、鉄結合能、DNA 結合能を持ち、ストレス条件下で DNA を保護する作用を持っている。*C. jejuni* と近縁の菌種である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の Dps 蛋白は、好中球を活性化することが知られており、Neutrophil activation protein (HP-NAP) と呼ばれている。HP-NAP は鉄結合能はもつが、他の Dps 蛋白とは異なり DNA 結合能は無い。また、 ganglioside と結合することが報告されている。C-Dps 蛋白は、この NAP と 41% のアミノ酸一致 (大腸菌の Dps 蛋白とは 24%) があり、鉄結合能はあるが DNA 結合能は無く、より NAP に性質が類似している。我々は GBS 病態と C-Dps 蛋白との関連を検討し、これまでに以下の結果を得ている。1) 本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者でのみ約 50% の陽性率であり、呼吸器

感染後 GBS 患者では認められない、2) C-Dps 蛋白はラットの脊髓前角の運動ニューロンと末梢神経の髄鞘に結合する、3) C-Dps 蛋白は sulfatide と特異的に結合する、4) C-Dps 蛋白は、NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、濃度依存性に細胞膜を障害する。これらの *in vitro* での結果は、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して神経細胞に結合し、直接的に神経細胞を傷害しうることを示しており、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態への C-Dps 蛋白の関与が示唆された。

このため本年度は、*In vivo* における C-Dps 蛋白の作用を検討した。これにより C-Dps 蛋白はラット坐骨神経に対し、伝導速度の低下は来さないが、伝導ブロックを誘導することが示された。C-Dps 蛋白により誘導される伝導ブロックは、コントロールとしての同量の PBS や熱処理後の C-Dps 蛋白の注入では認められないことから、C-Dps 蛋白特異的な反応と考えられる。また、C-Dps 蛋白注入後の坐骨神経では、C-Dps 蛋白の沈着が髄鞘、並びにランビエ絞輪部に認められた。つまり、C-Dps 蛋白により誘導される軸索傷害はランビエ絞輪部での傷害によることが推察された。C-Dps 蛋白の生体内における受容体である sulfatide は、末梢神経での局在では髄鞘、特にランビエ絞輪部での発現が高い。また、GalCer から sulfatide を誘導する酵素であるセレプロシドスルフォトランスフェラーゼ (CST) を欠損するマウスでは、ランビエ絞輪 paranode 部位におけるミエリン膜側方ループの軸索膜への接着に異常が見られ、node 周囲での Na チャネルや K チャネルの集積に異常を来すことが知られている。つまり、C-Dps 蛋白により誘導される伝導ブロックは、ランビエ絞輪

部におけるイオンチャンネルの局在に異常を来す可能性が考えられ、現在免疫染色などを行い、検討を進めている。

E. 結論

C-Dps 蛋白は、in vivo において、ラット坐骨神経のランビエ絞輪部に作用し、伝導ブロックを誘導することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokunaga H, Osoegawa M, Murai H, Ochi H, Minohara M, Taniwaki T, Kira J. Anterior horn cell involvement in myelitis with atopic diathesis (atopic myelitis). *Fukuoka Acta Medica* 95: 36-43, 2004.
- 2) Osoegawa M, Niino M, Ochi H, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, Minohara M, Tashiro K, Kira J. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism and its activity in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 150: 150-156, 2004.
- 3) Ochi H, Osoegawa M, Murai H, Wu X-M, Taniwaki T, Kira J. Presence of IgE antibodies to bacterial superantigens and increased IL-13-producing T cells in myelitis with atopic diathesis. *Int Arch Allergy Immunol* 134: 41-48, 2004.
- 4) Ochi H, Mei F-J, Osoegawa M, Minohara M, Murai H, Taniwaki T, Kira J. Time-dependent cytokine deviation toward the Th2 side in Japanese multiple sclerosis patients with interferon beta-1b. *J Neurol Sci* 222: 65-73, 2004.
- 5) Murai H, Osoegawa M, Ochi H, Kira J. High frequency of allergic conjunctivitis in myasthenia gravis without thymoma. *J Neurol Sci* 225: 27-31, 2004.
- 6) Murai H, Arahata H, Osoegawa M, Ochi H, Minohara M, Taniwaki T, Tobimatsu S, Mihara F, Tsuruta Y, Inaba S, Kira J. Effect of immunotherapy in myelitis with atopic diathesis. *J Neurol Sci* 227: 39-47, 2004.
- 7) Osoegawa M, Ochi H, Mei F-J, Minohara M, Murai H, Taniwaki T, Kira J. Th2 shift in juvenile muscular atrophy of distal upper extremity: a combined allergological and flow cytometric analysis. *J Neurol Sci* 228: 87-92, 2005
- 8) Mei F-J, Ishizu T, Murai H, Osoegawa M, Minohara M, Zhang K-N, Kira J. Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF. *J Neurol Sci* 228: 75-85, 2005.
- 9) Ishizu T, Osoegawa M, Mei F-J, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F,

Taniwaki T, Kira J. Intrathecal activation of the IL-7/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain* 128: 988-1002, 2005.

- 10) Osoegawa M, Miyagishi R, Ochi H, Nakamura I, Niino M, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, Minohara M, Tashiro K, Kira J. Platelet-activating factor receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005 (inpress).

2. 学会発表

- 1) 小副川学、越智博文、中村一太、村井広之、三野原元澄、吉良潤一；多発性硬化症における血小板活性化因子受容体遺伝子多型についての検討：第 16 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2004, 1 月
- 2) 朴華、三野原元澄、石川崇彦、森田大児、石津尚明、小副川学、村井弘之、楠進、水之江義充、吉良潤一；Campylobacter jejuni 由来 Dps 蛋白と sulfatide との結合：第 16 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2004, 1 月
- 3) 梅風君、村井弘之、越智博文、小副川学、三野原元澄、吉良潤一；慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIMP) における髄液 CD4 陽性 T 細胞内サイトカインの解析：第 16 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2004, 1 月
- 4) 三野原元澄、川尻真和、孫曉嘉、石津尚明、小副川学、村井弘之、吉良潤一；Subcortico-optico-myelitis with anti-neuronal autoantibody：第 16 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2004, 1 月
- 5) 孫曉嘉、荒木令江、三野原元澄、高倉由佳、村井弘之、佐谷秀行、吉良潤一；慢性進行性大脳皮質炎症例の脳自己抗原の二次元免疫プロッティング法による解析：第 16 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2004, 1 月
- 6) 朴華、三野原元澄、水之江義充、森田大児、楠進、吉良潤一；Campylobacter jejuni 由来 Dps 蛋白のレセプター同定と神経障害作用：第 45 回日本神経学会総会（東京）2004, 5 月
- 7) 梅風君、村井弘之、三野原元澄、小副川学、吉良潤一；多発性硬化症の髄液 CD4 陽性 T 細胞内 TNF α 、IL-2 の測定：第 45 回日本神経学会総会（東京）2004, 5 月
- 8) 孫曉嘉、三野原元澄、荒木令江、吉良潤一；大脳皮質と皮質下直下を侵す炎症性神経疾患の抗神経抗体の解析：第 45 回日本神経学会総会（東京）2004, 5 月
- 9) 小副川学、越智博文、中村一太、村井弘之、三野原元澄、吉良潤一；多発性硬化症における血小板活性化因子受容体遺伝子多型についての検討：第 45 回日本神経学会総会（東京）2004, 5 月
- 10) 三野原元澄、朴華、石津尚明、西村泰治、吉良潤一；EAE における hsp105 蛋白に対する免疫応答の解析：第 45 回日本神経学会総会（東京）2004, 5 月
- 11) 石津尚明、村井弘之、小副川学、梅風君、三野原元澄、吉良潤一；多発性硬化症再発期の髄液サイトカイン高感度多項目同時解析：第 45 回日本神経学会総会（東京）2004, 5 月
- 12) T. Ishizu, M. Osoegawa M, M.

- Minohara, H. Murai, J. Kira : Simultaneous measurement of sixteen cytokines and chemokines in CSF from Japanese multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease : 7th International Congress of Neuroimmunology (Venice, Italy) 2004, September
- 13) M. Minohara, H. Piao, M. Mizunoe, H. Osoegawa, H. Murai, J. Kira : The role of Dps protein from *Campylobacter jejuni* in Guillain-Barre syndrome : 7th International Congress of Neuroimmunology (Venice, Italy) 2004, September
- 14) 朴華、三野原元澄、李巍、水之江義充、吉良潤一 : *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白による神経細胞傷害 : グリア研究会 (福岡) 2004, 11 月
- 15) 李巍、三野原元澄、小副川学、石津尚明、村井弘之、吉良潤一 ; 日本人多発性硬化症における *Helicobacter pylori* 感染の意義 : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月
- 16) 小副川学、宮岸隆司、越智博文、新野正明、中村一太、菊地誠志、村井弘之、深澤俊行、三野原元澄、田代邦雄、吉良潤一 ; 多発性硬化症の病型と血漿型 PAF-AH/PAF 受容体遺伝子多型についての検討 : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月
- 17) 朴華、三野原元澄、石津尚明、小副川学、村井弘之、水之江義充、吉良潤一 ; *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白による末梢神経伝導傷害 : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月
- 18) 孫曉嘉、三野原元澄、田中正人、石津尚明、小副川学、村井弘之、下川博明、吉良潤一 ; Rho kinase inhibitor による実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療 : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月
- 19) 蘇真真、小副川学、田中正人、三野原元澄、石津尚明、村井弘之、吉良潤一 ; 多発性硬化症における血管関連因子の関与 : VEGF は脊髄病巣の大きさと精巢関する : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月
- 20) 三野原元澄、石津尚明、市山高志、吉良龍太郎、田中正人、小副川学、原寿郎、古川漸、吉良潤一 ; 急性散在性脳脊髄炎の髄液サイトカイン・ケモカインプロファイル : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月
- 21) 梅風君、小副川学、越智博文、三野原元澄、村井弘之、吉良潤一 ; 多発性硬化症における長期間 IFN β -1b 投与に伴う末梢血 T 細胞内サイトカインの変動の意義 : 第 17 回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3 月

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

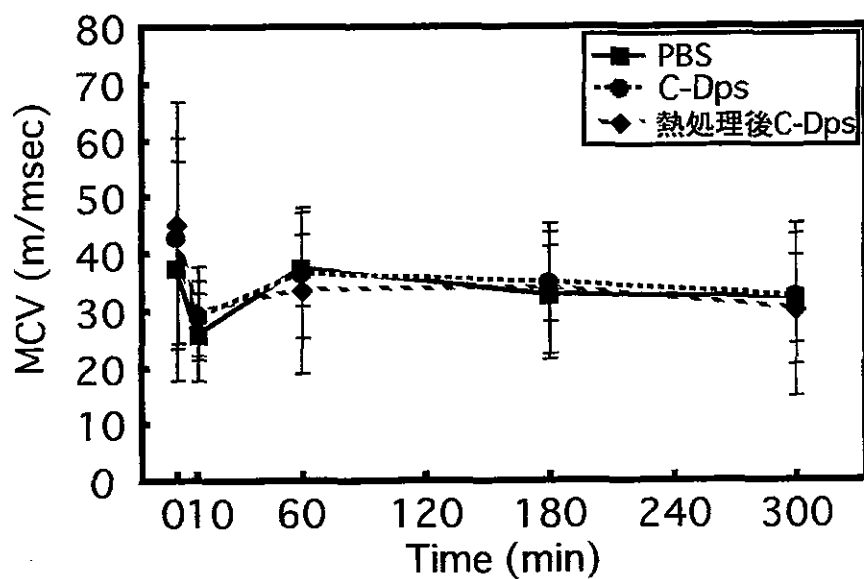


図1 C-Dps蛋白によるMCVの変化

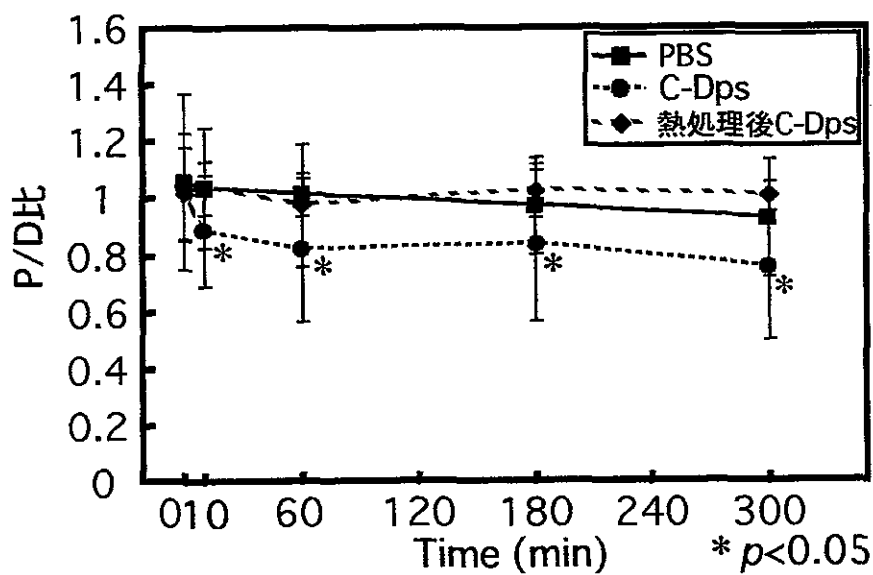


図2 C-Dps蛋白によるP/D比の変化

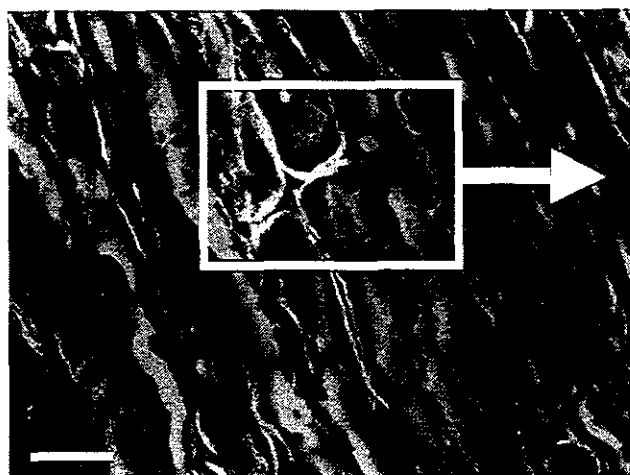
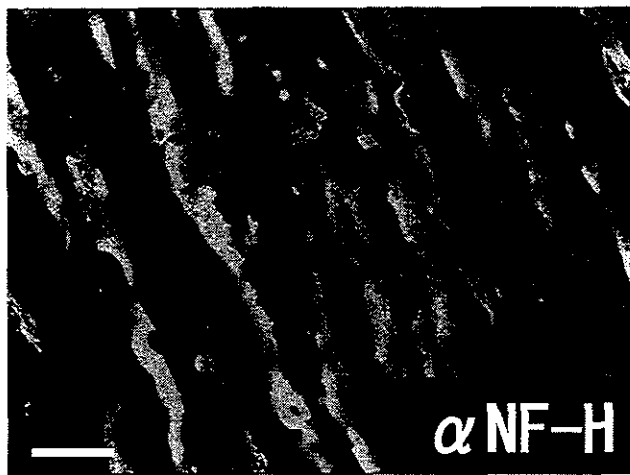
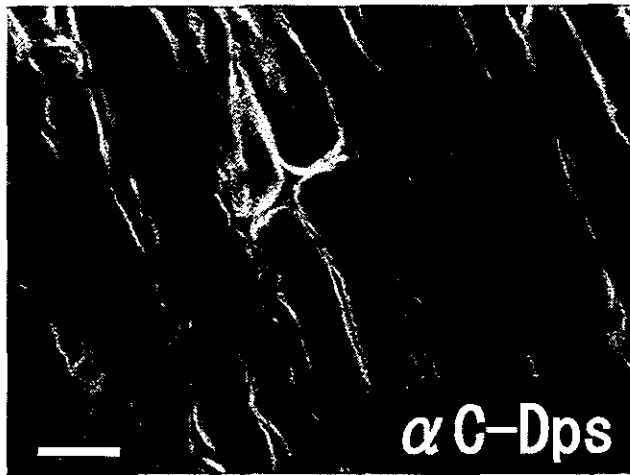


図3 C-Dps蛋白の末梢神経への沈着

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Tokunaga H, Osoegawa M, Murai H, Ochi H, <u>Minohara M</u> , Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Anterior horn cell involvement in myelitis with atopic diathesis (atopic myelitis).	Fukuoka Acta Media	95	36-43	2004
Osoegawa M, Niino M, Ochi H, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, <u>Minohara M</u> , Tashiro K, <u>Kira J</u>	Platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism and its activity in Japanese patients with multiple sclerosis.	J Neuroimmunol	150	150-156	2004
Ochi H, Osoegawa M, Murai H, Wu X-M, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Presence of IgE antibodies to bacterial superantigens and increased IL-13-producing T cells in myelitis with atopic diathesis.	Int Arch Allergy Immunol	134	41-48	2004
Ochi H, Mei F-J, Osoegawa M, <u>Minohara M</u> , Murai H, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Time-dependent cytokine deviation toward the Th2 side in Japanese multiple sclerosis patients with interferon beta-1b.	J Neurol Sci	222	65-73	2004
Murai H, Osoegawa M, Ochi H, <u>Kira J</u> .	High frequency of allergic conjunctivitis in myasthenia gravis without thymoma.	J Neurol Sci	225	27-31	2004
Murai H, Arahata H, Osoegawa M, Ochi H, <u>Minohara M</u> , Taniwaki T, Tobimatsu S, Mihara F, Tsuruta Y, Inaba S, <u>Kira J</u>	Effect of immunotherapy in myelitis with atopic diathesis.	J Neurol Sci	227	39-47	2004
Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, Yoshitake Y, Uemura Y, <u>Nishimura Y</u>	Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein; application to antitumor vaccination.	J Immunol	172	776-786	2004
Tsukamoto H, Irie A, <u>Nishimura Y</u>	B-Raf contributes to sustained extracellular signal regulated kinase activation associated with interleukin-2 production stimulated through the T cell receptor.	J Biol Chem	279	48457-48465	2004

Nakatsura T, Komori H, Kubo T, Yoshitake Y, Senju S, Katagiri T, Furukawa Y, Oagawa M, Nakamura Y, Nishimura Y	Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, Glypican-3, evokes T cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice.	Clin Cancer Res	10	8630-8640	2004
Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, Senju S, Ono T, Nishimura Y	Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma.	Clin Cancer Res	10	6612-6621	2004
Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, Senju S, Matsuyoshi H, Tsukamoto H, Hosaka S, Komori H, Fukuma D, Ikuta Y, Katagiri T, Furukawa Y, Ito H, Shinohara M, Nakamura Y, Nishimura Y	Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis.	Clin Cancer Res	10	6437-6448	2004
Monji M, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Sawatsubashi M, Shinohara M, Kageshita T, Ono T, Inokuchi A, Nishimura Y	Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses.	Clin Cancer Res	10	6047-6057	2004
Nishimura Y, Chen Y-Z, Uemura Y, Tanaka Y, Tsukamoto H, Kanai T, Yokomizo H, Yun C, Matsuoka T, Irie A, Matsushita S	Review, Degenerate recognition and response of human CD4 ⁺ Th cell clones: implications for basic and applied immunology.	Mol Immunol	40	1089-1094	2004
Ohkura T, Taniguchi S, Yamada K, Nishio N, Okamura T, Yoshida A, Kamijou K, Fukata S, Kuma K, Inoue Y, Hisatome I, Senju S, Nishimura Y, Shigemasa C	Detection of the novel autoantibody (anti-UACA antibody) in patients with Graves' disease.	Biochem Biophys Res Comm	321	432-440	2004
Tanaka T, Soejima H, Hirai N, Sakamoto T, Yoshimura M, Kaji I, Miyao Y, Fujimoto K, Miyagi H, Irie A, Nishimura Y, Ogawa H	Comparison of frequency of interferon-gamma-positive CD4 ⁺ T cells before and after percutaneous coronary intervention and the effect of statin therapy in patients with stable angina pectoris.	Am J Cardiol	93	1547-1549	2004
Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Harada M, Yoshida S	<i>Legionella dumoffii</i> D1A, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth.	Infect Immun	72	3592-3603	2004

Maeyama R, <u>Mizunoe Y</u> , Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T	Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed <i>Escherichia coli</i> and fluoro-stained exopolysaccharide.	J Biomed Mater Res	70A	274-282	2004
<u>Nabekura J</u> , Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A & Ishibashi H	Developmental Switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals.	Nature Neuroscience	7	17-23	2004
Shibata S, Kakazu Y, Okabe A, Fukuda A, <u>Nabekura J</u>	Experience-dependent changes in intracellular Cl ⁻ regulation in developing auditory neurons.	Neurosci Res	48	211-220	2004
Suzuki H, Kadowaki T, Maeda M, Sasaki H, <u>Nabekura J</u> , Sakaguchi M, Mihara K	Membrane-embedded C-terminal segment of rat mitochondrial TOM40 constitutes protein-conducting pore with enriched b-structure.	J Biol Chem	279	50619-50629	2004
Yasuoka K, <u>Hirata K</u> , Kuraoka A, He J, Kawabuchi M	Expression of amyloid precursor protein-like molecule in astroglial cells of the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult rat forebrain.	J Anat	205	135-146	2004
<u>Hirata K</u> , Masuda, K Morikawa W, He J, Kuraoka A, Kuwano M, Kawabuchi M	N-myc downstream-regulated gene 1 expression in injured sciatic nerves.	Glia	47	325-334	2004
Wang S, Kawabuchi M, Zhou CJ, <u>Hirata K</u> , Tan H, Kuraoka A	The spatiotemporal characterization of endplate reoccupation, with special reference to the superposition patterns of the presynaptic elements and the postsynaptic receptor regions during muscle reinnervation.	J Peripher Nerv Syst	9	144-157	2004
Osoegawa M, Ochi H, Mei F-J, <u>Minohara M</u> , Murai H, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Th2 shift in juvenile muscular atrophy of distal upper extremity: a combined allergological and flow cytometric analysis.	J Neurol Sci	228	87-92	2005
Mei F-J, Ishizu T, Murai H, Osoegawa M, <u>Minohara M</u> , Zhang K-N, <u>Kira J</u> .	Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF.	J Neurol Sci	228	75-85	2005

Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y	Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1.	J Immunol	174	1888-1897	2005
Hirata M, Hirata K, Hara T, Kawabuchi M, Fukuma T	Expression of TGF-beta-like molecules in the life cycle of <i>Schistosoma japonicum</i> .	Parasitology Research	online	1432-1955	2005
Liu W, Hirata K, Kawabuchi K	Occurrence of nitric oxide synthase-containing axonal baskets surrounding large neurons in rat dorsal root ganglia after sciatic nerve ligation.	Arch Histol Cytol	68	29-40	2005
Ishizu T, Osoegawa M, Mei F-J, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J	Intrathecal activation of the IL-7/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis.	Brain	128	988-1002	2005
Osoegawa M, Miyagishi R, Ochi H, Nakamura I, Niino M, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, Minohara M, Tashiro K, Kira J	Platelet-activating factor receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis.	J Neuroimmunol			2005
Tosukhowong A, Nakayama J, Mizunoe Y, Sugimoto S, Fukuda D, Sonomoto K	Reconstitution and function of <i>Tetragenococcus halophila</i> chaperonin 60 tetradecamer.	J Biosci Bioeng			2005
Mizunoe Y, Wai SN	Survival and Death in Bacteria: Biofilm formation and entry into viable but nonculturable (VBNC) state, In Yamada M. (eds.) Survival strategy under stress conditions.	Research Signpost, Kerala			2005
Maeyama R, Kwon K, Mizunoe Y, Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T	Novel bactericidal surface: catechin-loaded surface-erodable polymer prevents biofilm formation.	J Biomed Mater Res			2005
Koga H, Ishibashi H, Shimada Y, Nishitani T, Nabekura J	Activation of presynaptic GABAA receptors increases spontaneous glutamate release on to noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus.				2005
Matsumoto K, Morisaki T, Kuroki H, Kubo M, Onishi H, Nakamura K, Nakahara C, Kuga H, Baba E, Nakamura M, Hirata K, Tanaka M, Katano M	Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naive CD4+ T cell survival through NF-kB activation.	Cellular Immunology			2005

研究成果の刊行物

原 著

Anterior Horn Cell Involvement in Myelitis with Atopic Diathesis (Atopic Myelitis)

Hideaki TOKUNAGA, Manabu OSOEGAWA, Hiroyuki MURAI, Hirofumi OCHI,
Motozumi MINOHARA, Takayuki TANIWAKI and Jun-ichi KIRA

*Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of
Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan*

Abstract To clarify the involvement of anterior horn cells in myelitis with atopic diathesis (atopic myelitis), 20 patients with atopic myelitis were subjected to neurological evaluation, concentric needle electromyography (EMG), spinal cord magnetic resonance imaging (MRI) and motor and somatosensory evoked potentials. Apparent muscle atrophy was present only 1 of 20 patients (5 %) and the rests clinically showed no lower motor neuron sign. On needle EMG, 12 patients (60 %) showed varying degrees of lower motor neuron involvement. On-going denervation potentials, such as fasciculation potentials, fibrillation potentials and positive sharp waves, were seen in 5 patients and chronic neurogenic patterns, such as giant and polyphasic motor unit potentials with reduced recruitment patterns, in 12 patients. In 4 patients, the segments of lower motor neuron involvement on needle EMG were beyond those of the spinal cord lesions shown by MRI. In 2 patients showing on-going denervation potentials, such immunotherapies as plasma exchange and intravenous immunoglobulins, were applied and effective clinically as well as electrophysiologically. Therefore, varying degrees of subclinical anterior horn cell involvement seems to be common in atopic myelitis and reversible by immunotherapy.

Key words : anterior horn cell ; myelitis ; atopy ; mite ; electromyography

Introduction

We reported occurrences of myelitis accompanied with atopic disorders in Japanese for the first time and proposed to name it atopic myelitis (AM)¹⁾²⁾³⁾. Following our reports, several similar cases have also been reported in the Japanese literatures⁴⁾⁵⁾⁶⁾ and the recent nationwide survey in Japan disclosed the presence of many patients with myelitis and atopic diathesis⁷⁾. Thus, atopic diathesis appears to be one of risk factors for developing spinal cord inflammation.

On the other hand, an acute poliomyelitis-like illness following asthma attacks is well

known as asthmatic amyotrophy (Hopkins syndrome)⁸⁾. Although the previously reported cases were confined to children, we reported occurrences of Hopkins syndrome in adults⁹⁾. We also reported an association between airway allergy and juvenile muscular atrophy of distal upper extremity (JMADUE) (Hirayama's disease)¹⁰⁾, in which anterior horn cells in the lower cervical cord were preferentially involved. In addition, we recently found a significant association of lower motor neuron disease (LMND) with asthma by a prospective study on the past and present history of common allergic disorders in patients with neurologic diseases¹¹⁾. These observations suggest a link

between allergy and anterior horn cell damage. In agreement with our clinical observations, mediators of allergic inflammation, such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E2 (PGE2), have recently been reported to be increased in the spinal cord¹²⁾ as well as in the cerebrospinal fluid (CSF) of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients¹³⁾.

The results of these studies prompted us to examine needle electromyography (EMG) in a series of such patients with AM, in order to classify lower motor neuron involvement in this condition. We found that subclinical anterior horn cell involvement was common in this condition, which further strengthens the link between allergic tendency and anterior horn cell damage.

Materials and methods

Materials

The materials consisted of 20 patients with AM. AM was defined as myelitis of unknown cause with either¹⁾ hyper-IgEaemia and allergen-specific IgE positivity or²⁾ coexistent atopic diseases¹⁾²⁾³⁾.

The demographic characteristics of these patients are summarized in Table 1. Eight had atopic dermatitis (AD), 7 had allergic rhinitis (AR), 2 had bronchial asthma (BA) and 13 had others (food allergy, metal allergy, allergic conjunctivitis, drug allergy and urticaria) and five had hyperIgEaemia and allergen-specific IgE (atopic diathesis) without any atopic disorders. All AM patients had abnormalities indicating the spinal cord lesions by spinal cord MRI and / or evoked potentials such as motor evoked potentials (MEPs), somatosensory evoked potentials (SEPs). AM patients were 13 men and 7 women, whose age at examination was 37.6 ± 12.3 years (mean \pm SD), and age at onset was 35.9 ± 12.4 years (mean \pm SD). Duration of the disease at needle electromyography (EMG) evaluation was 26.5 ± 38.3 months (mean \pm SD). All patients had allergen-specific IgE (either mite antigen or cedar pollen-specific IgE) and all but one patient showed hyperIgEaemia at the time of evaluation. Severity of the disease was graded by Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS)¹⁴⁾, and the

Table 1 Clinicolaboratory findings of patients with myelitis and atopic diathesis

No.	Age	Sex	Coexistent atopic dis.				Serum IgE (U/ml)	Allergen-specific IgE			Clinically determined lesions	MRI	MEP	SEP	Age at onset	Disease duration to EMG (months)	EDSS score
			AD	AR	BA	others		<i>D.pteronyssinus</i>	<i>D.farinae</i>	cedar pollen							
1	42	M	-	+	-	+	314	+	+	+	C	C5-6	A	N	40	48	3.5
2	38	M	-	-	-	-	782	+	+	+	C	C1-3	N	A	37	7	2.5
3	42	M	+	-	-	-	1726	+	+	+	C	C3-7	N	A	42	2	2
4	36	M	-	-	-	+	1517	+	+	+	C	C6	A	A	34	24	2.5
5	27	M	+	+	-	+	712	+	+	+	C	C1-7	N	N	27	60	3
6	36	M	-	-	-	+	256	+	-	-	C	C6	N	N	36	1	3.5
7	20	M	+	-	+	+	1170	+	+	-	C	C3-5	N	A	20	1	3
8	61	M	+	-	-	+	530	-	-	+	C-Th	C2-4	A	A	54	120	7
9	47	M	-	-	-	+	292	+	+	-	Th	N	A	N	47	14	6
10	42	F	-	-	-	+	3361	+	+	+	C	C1-7	ND	ND	41	6	2
11	58	F	-	-	-	-	314	+	+	+	C	C3	A	A	57	5	4.5
12	53	F	-	+	-	+	1810	+	+	+	Th	C3-7	A	A	53	2	6.5
13	38	F	+	-	-	+	4400	+	+	+	C	N	A	N	38	1	2.5
14	16	M	-	-	-	-	1810	+	+	+	C-Th	N	N	A	12	48	2.5
15	50	M	+	+	+	+	1206	+	+	-	C	N	N	A	49	10	3
16	31	M	+	+	-	+	124	+	+	+	C	N	N	A	30	17	3.5
17	33	M	-	-	-	-	493	+	+	+	C	C2-3	A	A	22	132	3.5
18	34	F	+	+	-	-	1020	+	+	+	Th	Th4-11	A	A	32	24	2.5
19	22	F	-	-	-	-	257	+	+	-	C	C3-4	ND	A	21	6	2
20	25	F	-	+	-	+	287	+	+	+	C-Th	C6	N	A	25	1	3

atopic dis.=atopic diseases, AD=atopic dermatitis, AR=allergic rhinitis, BA=bronchial asthma, *D. pteronyssinus*=*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*=*Dermatophagoides farinae*. M=male, F=female, C=Cervical cord, Th=Thoracic cord, A=abnormal, N=normal, ND=not determined. HyperIgEaemia was defined as serum IgE level higher than 250 U/ml. Cut off value of allergen-specific IgE was 0.34 IU/ml. The EDSS scores before treatment are shown.

mean EDSS score before treatment was 3.4 ± 1.5 (mean \pm SD).

Electrophysiological studies

Concentric needle EMG was performed on at least one upper and one lower limb muscles (biceps, triceps, first dorsal interossei (FDI), vastus lateralis (VL), gastrocnemius, tibialis anterior (TA) at rest, at weak voluntary contraction and at maximum voluntary contraction in all patients. We checked 6 findings such as fasciculation potentials, fibrillation potentials, positive sharp waves (PSW), high amplitude ($\geq 5000 \mu\text{V}$) motor unit potentials (MUPs), polyphasic (≥ 3 phases) MUPs. SEPs and MEPs in upper and lower limbs were recorded as described previously¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. In brief, the peak latencies of N9 (Erb's point), N13 (C7 cervical spine) and N20 (C3 or C4) were measured for the median SEPs. For the tibial SEPs, the peak latencies of N20 (Th12 thoracic spine) and P37 (Cz') were measured. The upper limb (UL) MEPs were recorded from the abductor pollicis brevis muscle by stimulating the hand motor area, cervical roots and Erb's point with a figure 8-shaped magnetic coil. The lower limb (LL) MEPs were recorded from the abductor hallucis muscle by stimulating leg motor area and lumbar roots. EPs were classified as abnormal if the latencies and the central conduction time exceeded more than 3 SDs above the means of the controls or if any component was absent.

Immunotherapy

Two patients (cases 5 and 12 in Table 1) showing on-going denervation potentials on needle EMG were subjected to plasma exchange (PE) and/or intravenous immunoglobulin (IVIG). Each patient received three PEs using Spectra (COBE) at three-to eight-day intervals. The entire procedure was carried out in a closed cir-

cuit. Briefly, the patient's blood was obtained from a forearm vein and delivered to a single-stage channel where centrifugation separated blood into plasma and blood cells. Blood cells were returned to the patient's vein together with the replacement solution, which consisted of 2.3 % albumin, Na 119 mEq/L, K 3.6 mEq/L, Ca 2.5 mEq/L and lactate 25.2 mEq/L. Approximately 2.0 L (40 ml/kg) of plasma was replaced in each procedure. In case 5, immunoglobulin (Glovenin-I, Nihonseiyaku) was infused into the patient in dosages of 0.4 gm/kg/day in one infusion over several hours for 5 days.

Results

Clinical findings

Only 1 of 20 (5 %) patients showed definite muscle atrophy (left biceps brachii muscle in case 7), and none had fasciculation.

EMG findings

On needle EMG, 12 of 20 patients (60 %) had definite neurogenic patterns (Table 2). On-going denervation potentials were observed in 5 patients (25 %), such as fasciculation potentials in 1 (case 5), fibrillation potentials in 5 (cases 2, 5, 8, 10 and 12) and, PSW in 3 (cases 2, 5 and 8) (Table 2). Chronic neurogenic patterns with reduced recruitment were found in 12 patients (60 %), such as giant MUPs in 9 patients (cases 1, 2, 4, 5 and 8-12) and polyphasic MUPs in 9 patients (cases 1, 3, 5-10 and 12). In case 13, equivocal neurogenic patterns (giant MUPs without reduced recruitment) were observed. Among 11 patients who had both MRI lesions and neurogenic patterns, 4 patients (36 %) had lower motor neuron involvement on needle EMG beyond the segments of the spinal cord lesions demonstrated by MRI (right vastus lateralis in case 2, right tibialis anterior in case 5,