

る。GD 1 b はウサギでもヒトと同様に後根神経節の大型の一次感覚ニューロンに局在するが、GD 1 b をウサギに免疫することにより失調性感覚障害性ニューロパチーが惹起され、病理学的には後索に突起を伸ばす一次感覚ニューロンの変性が確認されたことからこの仮説が証明された⁶⁾。一方 GD 1 b 単独を認識する IgG 抗体は、軸索障害型に少なく脱髄型に多いが、このことは GD 1 b の末梢神経傍絞輪部ミエリンにおける局在と関連する可能性がある。

3) 抗 GM 1 抗体

抗 GM 1 抗体は GBS 患者の 20~30% でみられ、特に *C. jejuni* 感染後に多く、純粋運動型、脱髄型より軸索障害型であることが比較的多いとされている。GM 1 は末端に Gal-GalNAc 基を持っているため、抗 GM 1 抗体は GM 1 だけでなく GA 1 や GD 1 b などの Gal-GalNAc 基を持つ ganglioside を同時に認識することがある。GM 1 は広く神経組織に分布するが、ヒトの神経組織における局在の詳細ははっきりしない。ミエリン分画には GM 1 があるにもかかわらず、GM 1 を認識するコレラトキシン、Gal-GalNAc 基を認識する PNA レクチン、抗 GM 1 モノクローナル抗体などを用いた検討ではミエリンは染色されることが多い⁷⁾。これまで抗 GM 1 抗体が予後不良因子かどうか議論されてきたが、現在のところ必ずしも抗 GM 1 IgG 抗体の陽性例で重症となるわけではないと考えられている。軸索型もあれば脱髄型もあり、軸索型と電気生理学的に診断されたなかでも早期に回復する例もある。また、*H. influenzae* 感染後 GBS も抗 GM 1 抗体との関連が言われているが、*C. jejuni* 感染と比較して回復が早いと報告されており、先行感染の違いにより病態が異なる可能性がある。

4) 抗 GalNAc-GD 1 a 抗体

抗 GalNAc-GD 1 a IgG 抗体は純粋運動型、軸索型 GBS との関連が言われており、*C. jejuni* の先行感染、遠位筋優位の障害、脳神経麻痺や感覚障害を伴いにくいといった特徴がある。一方、抗

GalNAc-GD 1 a IgM 抗体陽性症例について調べると、半数は GalNAc-GD 1 a に特異的反応を示し上記と同様の特徴を示したが、残りの半数は GM 2 にも交差反応し先行感染はサイトメガロウイルス (CMV) であり、電気生理学的には脱髄型がメインで顔面神経麻痺や感覚障害をきたす頻度が高かった⁸⁾。以前より、CMV 感染後 GBS は抗 GM 2 抗体との関連が言われていたが、抗 GalNAc-GD 1 a 抗体も同時に上昇する例があることがわかったわけである。GM 2 と GalNAc-GD 1 a は末端の糖鎖構造が一致することから、その部分を認識する抗体が両者に反応するものと考えられる。GD 1 b のところでも述べたが、同じ ganglioside に反応する抗体でも、認識するエピトープの違いによって臨床症状も異なってくることを示す例である。

GalNAc-GD 1 a は免疫組織学的に運動神経の軸索周囲膜に局在が認められたが、これは IgG タイプの抗 GalNAc-GD 1 a 抗体の臨床症状と対応するものである。一方、小径の感覚神経にも局在するが、この部分は GM 2 に交差反応する IgM 抗体の標的となっている可能性がある。

5) 新規の抗原に対する抗体の可能性

抗原として体内に微量に含まれるような ganglioside がこれまで次々に発見されてきているが、未知の抗原はまだ存在すると思われる。

筆者らは最近ある種のリン脂質を ganglioside に混合した抗原を用いることで抗体活性が増強あるいは減弱し、増強する場合は ganglioside 単独に対しては陰性の場合でも陽性反応が得られる場合があることを報告した。リン脂質の共存による影響のされ方は、ganglioside によって異なり、またリン脂質の種類によっても異なっていた⁹⁾。増強する組み合わせを用いることで、抗体の反応性、陽性率が上がることから、GBS の診断マーカーとしての抗体の利用を考えるうえで重要な所見である。

さらに単独の ganglioside ではなく 2 種類の ganglioside を混合した抗原を用いることによ

り、初めて抗体活性が検出できる場合や抗体活性が増強する場合があることも報告された¹⁰⁾。このうち GD1a/GD1b 複合抗原に対する抗体のみられる GBS 症例は重症で脳神経症状を伴う傾向がみられた。

ガングリオシドは細胞膜上でリン脂質と一緒に存在しており、細胞膜のラフトにおいては複数のガングリオシドが complex を形成していると考えられる。今後は、ガングリオシドの局在や存在様式、抗体の微細反応性を考え、複数の抗原からなる混合抗原にも対象を広げて検討していくことが必要と考えられる。

3. 抗ガングリオシド抗体と分子相同性仮説

多くの GBS 症例で神経症状発現の 1~3 週前に感冒様症状や下痢などの先行感染を認めており、そのウイルスや細菌による感染が引き金となり自己免疫的機序を介して GBS を発症すると考えられている。GBS の先行感染病原体として最も多いのが、下痢の起炎菌である *Campylobacter jejuni* である。*C. jejuni* 腸炎後の GBS の多くは軸索障害型の電気生理所見を呈し、GM1 などのガングリオシドに対する IgG 抗体が陽性である。下痢が前駆症状であった GBS 患者から分離された *C. jejuni* のリポ多糖が GM1 末端の糖鎖と共通する構造を有していた¹¹⁾。そしてウサギに GM1 を感作することにより、軸索障害型の運動ニューロパチーの作成が報告されている。このようなことから、抗ガングリオシドの産生機序として分子相同性仮説 (molecular mimicry hypothesis) が提唱されている。すなわち、先行感染の病原体である細菌のリポ多糖と末梢神経表面上のガングリオシドに共通するエピトープが存在し、細菌に対して産生された抗体がヒトの神経組織のガングリオシドを標的として攻撃することにより GBS を引き起こすという機序である。

4. 先行感染病原体と抗ガングリオシド抗体

GBS の先行感染の病原体としては、*C. jejuni*, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus*

influenzae などが知られているが、これらの病原体と検出される抗ガングリオシド抗体との間には関連がある (表 1)。このような病原体に対する抗体が、ガングリオシドに交差反応することで神経組織の障害を引き起こすと示唆される例は、*C. jejuni* と GM1 以外にも指摘されている。

H. influenzae 感染後の GBS 患者では、抗 GM1 IgG 抗体を認めることが多く、軸索型 GBS を引き起こす可能性が示唆されているが、*H. influenzae* のリポ多糖は GM1 エピトープを有している。抗 GQ1b 抗体上昇例 (Fisher 症候群や外眼筋麻痺を伴う GBS) では大部分が呼吸器感染を先行感染としているが消化器感染の場合もあり、消化器感染後の Fisher 症候群患者の便培養から検出された *C. jejuni* 菌体表面に GQ1b 様の糖鎖構造があることが報告されている。*M. pneumoniae* 感染後 GBS では galactocerebroside (Gal-C) に対する抗体が認められるが、*M. pneumoniae* 菌体成分には Gal-C エピトープの存在が示されている。そして Gal-C でウサギを感作すると脱髄性ニューロパチーを生じる。CMV 感染後 GBS では抗 GM2 IgM 抗体との関連が言われており、CMV を感染させた線維芽細胞に GM2 エピトープの発現がみられている。

5. 抗ガングリオシド抗体の作用機序

抗体の作用が対応するガングリオシドの存在する神経組織への特異的結合によると考えられているにもかかわらず、抗体の病態生理学的な意義は不明な点が多い。

筋力低下の原因は、伝導ブロックと軸索変性によると考えられており、伝導ブロックは通常脱髄によるとされている。一般に軸索変性を生じた末梢神経障害の回復は時間がかかる上に完全な回復が難しい。しかし、AMAN と診断された症例には、重症で回復が遅延する場合と急速に回復する場合もあることが分かってきた。急速な改善をきたす原因が、再髄鞘化、軸索再生によるものとは考え難く、他の機序が様々に推測されており、例えば Ranvier 絞輪部の軸索膜障害による機能的

表 1. 抗糖脂質抗体と関連する先行感染および臨床的特徴

	先行感染	臨床的特徴
抗 GM 2 抗体	Cytomegalovirus	脳神経障害・感覚障害が多い, 若年
抗 GM 1 抗体	<i>C. jejuni</i> , <i>H. influenzae</i> など	純粹運動型, 軸索障害型
抗 GD 1 a 抗体	<i>C. jejuni</i>	純粹運動型, 軸索障害型
抗 GalNAc-GD 1 a 抗体	<i>C. jejuni</i>	純粹運動型, 軸索障害型
抗 GD 1 b 抗体	呼吸器感染>消化器感染	感覚障害性失調性, もしくは脱髄型
抗 GQ 1 b 抗体	呼吸器感染>消化器感染	Fisher 症候群, 外眼筋麻痺 Bickerstaff 型脳幹脳炎
抗 Galactocerebroside 抗体	<i>M. pneumoniae</i>	脱髄型
抗 GT 1 a 抗体	呼吸器感染>消化器感染	Fisher 症候群, 咽頭-頸部-上腕型
抗 LM 1 抗体	呼吸器感染>消化器感染	脱髄型

な早期可逆性伝導障害による可能性が指摘されている。血清抗 GM 1 抗体をラットの末梢神経内へ注入することによって、また *in vitro* で血清抗 GM 1 抗体をラットの坐骨神経に投与することによって伝導ブロックが生じるが、その機序の詳細は不明である。ラット坐骨神経を用いて、抗 GM 1 抗体が補体存在下で Na チャネルをブロックすると報告された。Ranvier 絞輪部には Na チャネルが集積していることから、抗 GM 1 抗体が絞輪部に結合し Na チャネルを阻害することでブロックする可能性が示唆されるものの、GM 1 と Na チャネルの局在部位が同一であると明らかにはなっていない。しかし、イオンチャネルは障害部位の可能性として有力なもの1つである。

神経筋接合部も抗体の作用部位の1つとして考えられている。神経筋接合部はグングリオシドを多く含み、血液神経関門の外にあり、その他の抗体関連の自己免疫疾患で重要な場所だからである。抗 GM 1 抗体や、抗 GQ 1 b 抗体を含む GBS 患者血清でシナプス伝達が阻害されることが報告されている。例えば、抗 GQ 1 b 抗体がマウスの神経筋接合部に結合し、神経終末から大量にアセチルコリンを放出して神経伝達を阻害し(α -lactorotoxin 類似作用)、この過程が神経終末を破壊する可能性があることが報告されている¹²⁾。この作用には補体の活性化が必要であるが、神経筋接合部に補体の沈着がみられている。前述したように GBS で呼吸筋障害をきたした例では抗 GQ 1 b-IgG 抗

体の陽性率が高いが、同抗体の神経筋接合部への作用が、呼吸筋麻痺の発症に関与している可能性がある⁴⁾。

また抗体には、神経伝達に対する直接的な作用だけでなく、血液神経関門の透過性を亢進させる作用が報告され、免疫グロブリンなどの大きい分子が神経血液関門を通過して障害を引き起こす可能性が示されている¹³⁾。

6. その他の免疫学的マーカー

ここまで述べてきたのは主に抗グングリオシド抗体による GBS の発症機序であるが、その他にも液性免疫および細胞性免疫の変動する因子の関与が考えられる。T 細胞の活性化を示唆する所見としてインターロイキン 2 (IL-2)、インターロイキン 2 レセプター (IL-2 R) の上昇などが報告されており、活性化された T 細胞により B 細胞系が刺激されて自己抗体産生が亢進すると考えられる。炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF- α)、インターフェロン γ (IFN- γ)、IL-6 が GBS 患者血清で上昇しており、血中 TNF 濃度が電気生理学的な異常と平行に推移していたという報告がある¹⁴⁾。IFN- γ 、TNF- α は Schwann 細胞や髄鞘に対して障害性に作用することが示されている。マクロファージを活性化させるサイトカインである Macrophage colony-stimulating factor、IL-1 β 、IL-6 は GBS 患者髄液中で増加している。また髄液中における C 3 a、C 5 a の上昇も報告されており、補体の関与も示さ

れている。髄液中の炎症性伝達物質が髄液中で産生されるというエビデンスはなく、むしろ血中濃度が上昇して神経血液関門を受動的に通過するのだろうと考えられている。

7. Host 側の疾患感受性について

他の自己免疫性疾患では HLA タイピングなどで患者側の疾患感受性が言われている。欧米とアジアで軸索型と脱髄型の GBS の比率が異なるなど、人種差による疾患の病態像が異なる可能性がある。しかし、*C. jejuni* 後の GBS 患者の HLA タイプを調べたものがいくつか報告されているが、未だ定説はなく、抗 GQ1b 抗体陽性例の HLA を調べたものでは特定の相関は認められず、現在明らかなものはない。

発症機序からみた

リハビリテーションへの提言

GBS は急性单相性の経過をとる疾患である。4 週間以内にピークを迎えプラトーに達した後、回復期に入る。急性期には人工呼吸管理が必要になるなど臥床を余儀なくされる場合もあり、血漿交換やIVIg といった治療と全身管理とともに、関節拘縮をきたさないように受動的な関節運動といったリハビリテーションが必要となる。一方、急性期を離脱した回復期には自己免疫的機序は鎮静化しており、治療はリハビリテーションがメインとなる。一般には予後良好と言われるものの、何らかの後遺症は約 40% の GBS 患者に認めており、リハビリテーションは極めて重要である。しかし一方で、過度な運動は健常人においても筋の浮腫や筋力低下をきたすことが知られており、AIDP の回復期においても過度なリハビリテーションは再発を招いたり、筋力低下や機能低下を引き起こす可能性がある¹⁵⁾。適切な時期に、患者の状態に応じた適切なリハビリテーションが必要である。

文 献

- 1) Hafer-Macko C, et al : Immune attack on the schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*, 39 : 625-635, 1996.
- 2) Hafer-Macko C, et al : Acute motor axonal neuropathy : an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol*, 40 : 635-644, 1996.
- 3) Chiba A, et al : Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome : Clinical and immunohistochemical studies. *Neurology*, 43 : 1911-1917, 1993.
〈Summary〉 抗 GQ1b 抗体は Fisher 症候群、外眼筋麻痺を伴う GBS に特異的にしかも極めて高率にみられる。ヒトの III, IV, VI 脳神経の傍絞輪部に GQ1b が局在する。
- 4) Kaida K, et al : Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, 62 : 821-824, 2004.
- 5) Kusunoki S, et al : Localization of GM1 and GD1b antigens in the peripheral nervous system. *Muscle Nerve*, 16 : 752-756, 1993.
- 6) Kusunoki S, et al : Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol*, 39 : 424-431, 1996.
〈Summary〉 GD1b でウサギを感作して、失調性ニューロパチーを作成し、抗ガングリオシド抗体の発症機序への関与を初めて証明した。
- 7) Gang Y, et al : Localization of major gangliosides in the PNS : implications for immune neuropathies. *Brain*, 125(pt 11) : 2491-2506, 2002.
- 8) Kaida K, et al : Guillain-Barré syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a. *Brain*, 123(pt 1) : 116-124, 2000.
- 9) Hirakawa M, et al : Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol*, 159(1-2) : 129-132, 2005.
〈Summary〉 GBS にみられる抗ガングリオシド抗体は、リン脂質の共存により活性が増強あるいは減弱する。
- 10) Kaida K, et al : Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome.

Ann Neurol, 56 : 567-571, 2004.

〈Summary〉 抗ガングリオシド抗体には、2種類のガングリオシドが複合して形成されるエピトープを特異的に認識するものがある。

- 11) Yuki N, et al : A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM 1 ganglioside-like structure. *J Exp Med*, 178(5) : 1771-1775, 1993.

〈Summary〉 GBS患者から分離した *Campylobacter jejuni* のリポ多糖に GM 1 の糖鎖構造を認め、神経組織と病原体の分子相同性を確認した。

- 12) Plomp JJ, et al : Miller Fisher anti-GQ 1 b antibodies : α -latrotoxin-line effects on motor

endplates. *Ann Neurol*, 45 : 189-199, 1999.

- 13) Kanda T, et al : Glycosphingolipid antibodies and blood-nerve barrier in autoimmune demyelinating neuropathy. *Neurology*, 54 : 1459-1464, 2000.

- 14) Sharif MK, et al : Circulating tumor necrosis factor- α correlates with electrodiagnostic abnormalities in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 42 : 68-73, 1997.

- 15) Agre J, et al : Neuromuscular rehabilitation and electrodiagnosis. 4. Specialized neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil*, 81 : S 27-S 31, 2000.

末梢神経の治療の進歩*

高田 和男** 楠 進**

Key Words : CIDP, Guillain-Barré syndrome, IVIg, diabetic neuropathy

はじめに

末梢神経障害の治療については、各種免疫療法をはじめとして近年あらたな方法が導入され、かなりの成果をあげているが未だ問題点も多い。本稿では、Guillain-Barré症候群（GBS）や慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIDP）などの免疫性ニューロパチー、糖尿病性ニューロパチー、遺伝性ニューロパチーなどの治療に関する、2004年に発表された主な論文をピックアップして紹介する。

I. 免疫介在性ニューロパチー

歩行不能なGBS 233症例に対して、発症後14日以内に免疫グロブリン大量療法（IVIg, 0.4g/kg body weight/day）を5日間行い、IVIg投与から48時間以内にmethylprednisolone（500mg/day；116症例）、またはplacebo（117症例）のいずれかの点滴投与を5日間受けるように割り当てたdouble-blind, placebo-controlled, multi-centre, randomised study¹⁾が実施された。その結果、4週後にmethylprednisolone投与群の68%、対照群の56%でdisability scoresの1ポイント以上の改善が得られた。この結果は、オッズ比1.68, 95%信頼区間0.97~2.88；p=0.06であり、両群で統計学的に有意な差を認めることはできなかった。エントリー時の年齢や障害程度を調

整すれば、治療効果はオッズ比1.89（95%信頼区間1.07~3.35；p=0.03）となる。この結果からは、有意差の有無はさておき、IVIg単独に比較してIVIgとmethylprednisoloneの併用の方が症状の改善が早くなる傾向はあるように思われる。Hughesら²⁾はこれに対して、IVIgとsteroidの相乗作用についてrisk/benefitは明らかになっておらず、evidenceや症例背景まで考慮した慎重な検討が必要であるとしている。また、この治療法の効果をGBSのサブグループごとに解析する必要性も指摘されている³⁾。

GBSではしばしば抗ガングリオシド抗体が血中で上昇することが知られ、補助診断検査として利用されている。従来は単独のガングリオシドに対する抗体が測定されていたが、二種類のガングリオシド（GD1aとGD1b）からなるエピトープを特異的に認識する抗体の上昇する例があることが報告された⁴⁾。この抗体陽性例は呼吸筋麻痺をきたす率が高いことが示唆されており、治療法決定や全身管理の上で重要な指標となると考えられる。

治療抵抗性のCIDP 7症例（男性6症例、女性1症例；平均年齢38.9±19.2（22~53歳））にcyclosporin A（CyA）の経口投与を行うclinical trialが実施された⁵⁾。CyAのmicroemulsionであるNeoral[®]が12時間ごとに経口投与された。ト

* Review/Advances in Neurological Therapeutics (2004). Neuropathy.

** 近畿大学医学部神経内科 Kazuo TAKADA, Susumu KUSUNOKI : Department of Neurology, Kinki University School of Medicine

ラフ値は100から150ng/mlを保つように調節されている。その結果、投与開始後2~4週で、全症例で症状の自覚的な改善がみられ、3ヵ月後には modified rankin score, inflammatory neuropathy cause and treatment (INCAT) disability scoreや握力などに有意な改善が認められた。また、脳脊髄液の総蛋白量も有意な減少を示した。抗SGPG-IgM抗体が検出された1症例は徐々に臨床効果が減弱したが、それ以外の症例では良好な経過であったと報告されている。

間欠的なIVIgの維持療法(1~1.2g/kg over 2~3days, 初回治療時は2g/kg over 4~5days)で効果があったMMN 10症例の臨床経過が報告された⁹⁾。症状の悪化時に繰り返しIVIgを投与しており、観察期間は平均8.2年間(5~12年)である。効果が持続した症例は2症例で、8症例は効果が減弱した。この減弱は、治療後3~7年後(平均4.8年)に発生しており、compound muscle action potential amplitude (cMAP)の減少と有意に相関することが示された。

Lewis-Sumner症候群(LSS)は、多巣性運動ニューロパチー(multifocal motor neuropathy, MMN)との異同が議論となっているが、Viala Kら⁷⁾はLSSを明確な伝導ブロックを伴う非対称性の感覚あるいは感覚運動ニューロパチーと定義して、その臨床経過や治療成績を報告した。MMNとは多巣性伝導ブロックを伴い、上肢遠位部優位の非対称性の障害を示す点などが類似するが、感覚障害があること、抗GM1抗体がみられないこと、などが異なるという。対象としたLSS 23症例(男性17, 女性6, 発症年齢平均44歳(22~72歳))のうち治療を受けた15例についての治療反応性の検討では、11症例(73%)で治療に反応し、その3分の1では観察期間内での再燃はなかったが、残りの3分の2では再燃を認め、再治療を行っている。治療法ごとの検討では、IVIg治療では54%, ステロイド治療では33%において有効であったという。ステロイド治療の有効例があることもMMNとの違いである。

II. 糖尿病性ニューロパチー

Pregabalinは、中枢神経系、脊髄後角にあるvoltage-gated calcium channelの $\alpha 2$ - δ リガンド

に選択的に結合し、鎮痛作用、抗不安作用、抗痙攣作用を有する。このpregabalinのpainful diabetic neuropathy (PDN)における疼痛緩和への有効性について5週間にわたる、double-blind, multicenter, placebo-controlled studyが報告された⁸⁾。1型/2型糖尿病で1~5年間の多発性ニューロパチーの罹病期間がある18歳以上の337症例(男性202, 女性135, 平均年齢59.9歳)が、pregabalin 75, 300, 600mg/day, もしくはplaceboを服用した4群に振り分けられ検討されている。疼痛改善度は、pregabalin 300mg投与群で46%, 600mg投与群で48%となり、placebo投与群(18%)と比較して有意であった($p=0.0001$)。また、sodium valproateを用いたshort-term studyの続報としてrandomized double-blind placebo-controlled study(48症例)が報告された⁹⁾。Sodium valproate(500mg/day)投与期間は3ヵ月間で、評価しえたPDN39症例(投与群21例, placebo群18例)は電気生理学的検査では有意な変化はなかったが、short form McGill pain questionnaire (SF-MPQ), visual analogue score (VAS)などの臨床症状評価では有意に改善していた。明らかな有害事象もなく、sodium valproateは忍容性が高く、有益であると結論づけている。

ヘルペス後神経痛の治療としてFDAから承認されている5% lidocaine patchを、PDNに対して用いたopen-label, flexible-dosing, clinical trialが報告された¹⁰⁾。PDN 54例を対象として、3週間の観察期間(最大使用量1日4枚, 最大使用時間1日18時間)で検討したところ、疼痛とQOLに有意な改善が認められた。さらに5週間の追加投与を行ったグループでも改善は持続し、また併用薬が漸減できた例もあった。今後randomized controlled trialによる確認が必要である。

Oyiboらは、PDNの対症治療として薬物の副作用を軽減する目的で経皮的電気刺激療法を検討した¹¹⁾。靴下電極を用いた微量電流パルス(pulsed electric current of 50 micro amps)を使用して、double blind, controlled crossover studyで行われている。症例は14例(57.5 \pm 10.5歳, HbA1c: 8.3 \pm 1.4%, 平均糖尿病罹病期間14.5

年, diabetic neuropathy罹病期間4年)で, 治療前後の疼痛と睡眠障害を評価したが, 結果は対照群との間に明らかな有意差は得られなかった. 一方, Zinmanらは, diabetic sensorimotor polyneuropathyの疼痛緩和のためにlow-intensity laser therapy (LILT)の効果を検討した¹²⁾. 症例は50例(男性34, 女性16)で, 2週間のsham therapyのあとに, LILTもしくはsham therapyを行い, VASを用いて疼痛改善度を評価した. 結果として, sham therapy群とLILT群の双方ともに疼痛は改善しその有意差はなかったと報告している. また, 糖尿病性末梢神経障害における疼痛や感覚異常の改善を目的とした, 近赤外医療器具(890nm発光ダイオードによるanodyne therapy system (ATS))を用いたclinical trialの続報として, Leonardらはsham-controlled, double-blind studyを報告した¹³⁾. 治療群では無治療群と比較して有意に感覚低下範囲が減少し, VASを用いた疼痛評価でも, 有意な改善が得られている.

III. その他のニューロパチー

Hilzらは, Fabry病22症例(27.9±8.0歳)で, 遺伝子組換えヒトalpha-galactosidase Aを用いたenzyme replacement therapy (ERT)の前後での, ニューロパチーの改善について検討した¹⁴⁾. その結果, 振動覚(15.5±3.5 vs 14.3±4.1; p>0.05), 冷覚(22.3±6.7 vs 19.4±1.3; p>0.01), や温痛覚(27.3±5.6 vs 22.5±2.3; p<0.01)の改善が認められた. 改善が見られなかった一部の症例は不可逆的な神経障害によるものと考えられ, 発症初期でのERTが必要であろうとしている.

HIV関連感覚ニューロパチーの疼痛緩和に対するgabapentinの治療効果を検討したmulti-

center, prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled studyが報告された¹⁵⁾. 26症例(投与症例15, placebo 11)を対象として, 観察期1週間, double-blind 4週間, open treatment 2週間で行われている. Gabapentinは400mg/dayで開始し, 2週間で1,200mg/dayにまで漸増, 必要に応じて最大3,600mg/dayまで投与し, 疼痛と睡眠障害をVASで評価した. その結果placebo群では有意な改善はなかったが, gabapentin投与群では疼痛が44.1%, 睡眠障害が48.9%と改善し, 有意な改善が認められた.

Charcot-Marie-Tooth病(CMT)の中で最も高頻度に見られる型であるCMT-1Aのマウスモデルに対して, 髄鞘形成のプロモーターであるアスコルビン酸を投与したところ, CMT-1Aの表現型の改善が認められた¹⁶⁾. CMT1Aの臨床例への応用が期待される結果である.

文 献

- 1) van Koningsveld R et al: Lancet 363:192-196
- 2) Hughes RA: Lancet 363:181-182
- 3) Susuki K et al: Lancet 363:1236-1237
- 4) Kaida K et al: Ann Neurol 56:567-571
- 5) Matsuda M et al: J Neurol Sci. 224:29-35
- 6) Terenghi F et al: Neurology 62:666-668
- 7) Viala K et al: Brain 127:2010-2017
- 8) Lesser H et al: Neurology 63:2104-2110
- 9) Kochar DK et al: QJM 97:33-38
- 10) Barbano RL et al: Arch Neurol 61:914-918
- 11) Oyibo SO et al: Diabet Med 21:940-944
- 12) Zinman LH et al: Diabetes Care 27:921-924
- 13) Leonard DR et al: Diabetes Care 27:168-172
- 14) Hilz MJ et al: Neurology 62:1066-1072
- 15) Hahn K et al: J Neurol 251:1260-1266
- 16) Passage E et al: Nat Med 10:396-401

Review/Advances in Neurological Therapeutics (2004) Neuropathy

Kazuo TAKADA, Susumu KUSUNOKI

Department of Neurology, Kinki University School of Medicine

Randomised trial for Guillain-Barré syndrome showed no significant difference between treatment with methylprednisolone and IVIg and IVIg alone. The potential importance of combination treatment with the drug and IVIg, however, warrants further investigation. The effectiveness of cyclosporin A for refractory cases with CIDP was suggested. The effectiveness of IVIg in multifocal motor neuropathy (MMN) often declines after several years possibly associated with the development of axonal degeneration. "Lewis-Sumner syndrome" may be distinguished from MMN by the presence of sensory involvement, the absence of serum anti-GM1 antibodies

and a possible positive response to steroids. In patients with diabetic peripheral neuropathy, pregabalin demonstrated early and sustained improvement in pain and a beneficial effect on sleep. The effect of sodium valproate and that of 5% lidocaine patch for painful diabetic polyneuropathy were reported. Enzyme replacement therapy with recombinant human α -galactosidase A significantly improves function of C-, A δ -, and A β -nerve fibers and intradermal vibration receptors in Fabry neuropathy. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Carcot-Marie-Tooth disease.

抗ガングリオシド抗体研究の新たな展開*

楠 進

Key Words: ganglioside, Guillain-Barré syndrome, antibody, phospholipid, raft

末梢神経 2005; 16(2): 50-54

(1) はじめに

Guillain-Barré症候群は、末梢神経を標的とする自己免疫疾患であるが、近年自己抗体の標的抗原の解析がすすみ、とくにガングリオシドをはじめとする糖脂質が重要な標的分子として注目されるようになってきている。われわれは、これまでに Guillain-Barré 症候群 (GBS) における抗ガングリオシド抗体について、以下のようなことを報告してきた。すなわち、1) GBS の急性期血中に抗ガングリオシド IgG 抗体が約 60% の頻度で上昇し、GBS の診断に有用である¹⁾、2) 抗ガングリオシド抗体は、標的抗原の局在部位に特異的に結合して、障害部位を規定する²⁾⁻⁶⁾、3) 抗ガングリオシド抗体は先行感染因子のもつ糖鎖に対する免疫反応の結果産生されることが多い⁷⁾、などである。2) については表 1 に具体的内容を示す。

一方、細胞膜はリン脂質が主体となった脂質二重層からなっており、ガングリオシドなどの糖脂質はラフトを形成してその中に浮かぶ形で存在している。すなわちガングリオシド分子の周囲はリン脂質に囲まれ、また複数の分子種のガングリオシドが共存する形で存在するわけである。したがって、GBS などにおける抗ガングリオシド抗体の細胞膜への反応を研究する際に、リン脂質や他のガングリオシドとの関連も

考慮する必要がある。

最近になり、単独のガングリオシドに対する抗体活性だけでなく、リン脂質とガングリオシドや複数のガングリオシドの混合抗原を対象として抗体活性を測定することにより、抗ガングリオシド抗体の反応性はガングリオシドと共存するリン脂質により影響をうけること、また単独のガングリオシドではなく複数のガングリオシドの糖鎖からなるエピトープを認識する抗体が存在すること、などが明らかになってきた。本稿では、これらの新しい知見について紹介することとする。

(2) 抗ガングリオシド抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果

① 抗ガングリオシド抗体の反応性は共存するリン脂質の影響をうける

Freddo らは、IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーにおいて、リン脂質とガングリオシドからなるエピトープを認識する IgM M 蛋白がみられたことを報告した⁸⁾。その症例の IgM M 蛋白はリン脂質単独に対する抗体活性としては phosphatidic acid (PA) に対して弱い活性があるのみで、ガングリオシドに対しても単独では数種類のものに弱い反応があるのみであるが、PA とまぜることにより複数の分

* New aspect of research on antiganglioside antibodies

Susumu KUSUNOKI, M.D.: 近畿大学医学部神経内科 [〒589-8511 大阪狭山市大野東 377-2]; Department of Neurology, Kinki University School of Medicine, Osaka

表1 GBSのガングリオシドおよびガラクトセレブロシドに対する抗体と臨床的特徴の関連および抗原の局在

抗体	クラス	臨床的特徴	ヒト末梢神経における抗原の局在部位（想定される障害部位）
抗GQ1b抗体	IgG	眼球運動麻痺 失調	脳神経ⅢⅣⅥの傍絞輪部ミエリン 一部の一次感覚ニューロン
抗GD1b抗体 (GM1と交差反応のないもの)	IgG	感覚障害 脱髄型	一次感覚ニューロン（大径優位） 傍絞輪部ミエリン
抗ガラクトセレブロシド抗体	IgG, IgM	脱髄型	ミエリン
抗LM1抗体	IgG	脱髄型	ミエリン
抗GalNAc-GD1a抗体 (GM2と交差反応のないもの)	IgG, IgM	純粹運動型 軸索障害型	軸索周囲膜
抗GM1抗体	IgG	純粹運動型 軸索障害型	不明
抗GM1b抗体	IgG	純粹運動型 軸索障害型	不明
抗GM2抗体	IgG, IgM	感覚障害 脳神経障害（特にⅦ）	不明
抗GD1a抗体	IgG	軸索障害型	不明

子種のガングリオシドに対する抗体活性が著明に亢進することが示された。そこでGBSの抗ガングリオシド抗体についても同様の効果があるかどうかを検討した。

まず抗GM1 IgG抗体とPAについて検討した。ガングリオシドとリン脂質の混合抗原については、抗原量の増加による非特異的な結合の増加を防ぐため、混合抗原に用いるそれぞれの抗原量は通常の半分とした（通常ガングリオシドは1ウェルあたり200ng用いているが、混合抗原の場合はガングリオシド100ngとリン脂質100ngとした）。その他は通常のELISA法と同様の条件で測定した。

その結果、121例のGBSのうち32例で抗GM1 IgG抗体が陽性であったが、そのうち5例では、混合抗原の方が反応が弱くなった。これはGM1の量が半分になっているためと考えられた。一方大多数の25例ではGM1の量は半分になっているにもかかわらず混合抗原の方が強い反応が得られた。また残りの抗GM1抗体陰性例のうち12例では、混合抗原を用いることにより陽性反応が得られるようになった。PAのみに対する抗体活性はみられなかった。また対照

例では混合抗原に対する抗体活性はみられなかった。したがって、GBSの診断のための抗ガングリオシド抗体測定にあたっては、PAを混ぜた抗原を用いることで陽性率を向上させることができるわけである⁹⁾。

そこで次に、抗GM1 IgG抗体に対するPA以外のリン脂質の効果を検討した。この場合は抗GM1抗体陽性症例のみを対象とした。その結果、PA以外でもphosphatidyl inositolやphosphatidyl serineなど酸性リン脂質で抗体活性の増強がみられることがわかった。一方sphingomyelin (SM) やphosphatidyl cholineなどでは増強はみられず、SMではむしろ反応は減弱した。一方フィッシャー症候群でみられる抗GQ1b IgG抗体について同様の検討を行ったところ、酸性リン脂質の効果はみられなかったが、SMによる抗体活性の減弱は同じように認められた¹⁰⁾。

② 酸性リン脂質による増強効果とそのメカニズムの検討

そこで、まず酸性リン脂質による抗体活性への影響についてであるが、抗GM1 IgG抗体では酸性リン脂質による抗体活性の増強がみら

GM1	Gal β 1-3	GalNAc β 1-4	Gal β 1-4	Glc β 1-1'	Cer
			3		
			α 2		
			NeuAc		
GD1a	Gal β 1-3	GalNAc β 1-4	Gal β 1-4	Glc β 1-1'	Cer
	3		3		
	α 2		α 2		
	NeuAc		NeuAc		
GD1b	Gal β 1-3	GalNAc β 1-4	Gal β 1-4	Glc β 1-1'	Cer
			3		
			α 2		
			<u>NeuAc8-2αNeuAc</u>		
GQ1b	Gal β 1-3	GalNAc β 1-4	Gal β 1-4	Glc β 1-1'	Cer
	3		3		
	α 2		α 2		
	<u>NeuAc8-2αNeuAc</u>		<u>NeuAc8-2αNeuAc</u>		

Gal:ガラクトース、Glc:グルコース、GalNAc:*N*-アセチルガラクトサミン、NeuAc:*N*-アセチルノイラミン酸(シアル酸)、Cer:セラミド

*下線部はジシアロシル基

図1 主なガングリオシドの糖鎖構造

れ、抗GQ1b IgG抗体ではみられないという理由について、現時点で考えられる可能性は2つある。

ひとつの可能性は先行感染の違いによるものである。抗GM1 IgG抗体陽性例の多くのもものでは *Campylobacter jejuni* による消化器感染が先行する。一方、抗GQ1b IgG抗体陽性例では、*C. jejuni* 感染後のものもあるが多くの場合は呼吸器感染が先行する。そこでたとえば *C. jejuni* のもつガングリオシド様糖鎖構造が何らかの酸性リン脂質が共存する状態でヒトの免疫系に認識されているのであれば、酸性リン脂質が共存する条件でより強く反応する抗体が産生され、そうではない抗GQ1b IgG抗体ではそのような現象がみられないのではないかという可能性が考えられる。しかし、*C. jejuni* 感染ではなく呼吸器感染後のGBSにおける抗GM1 IgG抗体でもPAなどによる増強効果がみられた

り、*C. jejuni* 感染後の症例の抗GQ1b IgG抗体でもPAなどの増強効果がみられなかったりすることから、まだ完全に否定できるわけではないが、この可能性は低いと考えられる。

もうひとつの可能性は、GM1とGQ1bでは陰性荷電をもつシアル酸の数が異なるため違いが生ずるといものである。陰性荷電は抗体の反応性の強さに関連すると考えられる。GM1はシアル酸を一個しかもたないが、GQ1bはシアル酸の二個つながったジシアロシル基を二個、計四個もっている。そこで構造的にGal-GalNAc基を有する点でGM1とまたジシアロシル基を有する点でGQ1bと共通するGD1bに対するIgG抗体の反応性に及ぼすリン脂質の効果を検討した。その結果は、抗GD1b抗体を全体でみた時には酸性リン脂質による増強効果はみられず、SMによる減弱は同じように認められるというものであった。抗GD1b抗体にはGal-GalNAc基を認識してGD1b、GM1、GA1全てに反応する抗体と、GD1b単独に反応性をもつ抗体がある。後者の場合、抗体の反応にはジシアロシル基が関わっていると考えられる。そこでこれら二つの抗体についての、リン脂質による効果を比較した。その結果GD1b単独陽性の抗体の場合にはリン脂質による増強効果は乏しく、Gal-GalNAc基を認識してGD1b以外にもGM1やGA1にも反応する抗体では増強効果が認められた。すなわちジシアロシル基が抗体の認識に関わっている場合には酸性リン脂質による増強効果が乏しく、関わっていない場合には増強効果があることが示唆された。電荷を持たないGal-GalNAc基を認識する抗体は、負電荷をもつ酸性リン脂質の影響をうけて反応性が強まるが、負電荷の強いジシアロシル基が抗体の認識にもともと関わっている場合はそうした影響を受けにくいと考えられる。

③ スフィンゴミエリン (SM) による反応性の減弱

SM存在下における抗体活性の低下はGBSおよび類縁疾患にみられるIgGタイプの抗ガン

リオシド抗体に共通して認められる。その機序は不明だが、このことは抗ガングリオシド抗体がどのように神経障害をきたすかを考える上で興味深い。ガングリオシドは広範に分布するが、抗ガングリオシド抗体は特定部位に作用することが知られている。細胞外膜のSMの存在により、患者血中の抗ガングリオシド抗体の作用は、高濃度にガングリオシドが局在する部位に限られ、その結果として特定の部位を障害することになるという可能性が考えられる。例えば、GQ1bはどの脳神経にも、また脊髄前根後根のいずれにも存在するが、抗GQ1b抗体は眼球運動麻痺にとくに強く関連する。これについては、通常密度で存在しているGQ1bには、抗体はSMの作用により結合しにくい、免疫組織学的に示されたようにGQ1bがとくに豊富に局在している（眼球運動を支配する）脳神経ⅢⅣⅥの傍紋輪部²⁾には結合して、高頻度に眼球運動麻痺をきたすという可能性が考えられる。

(3) ガングリオシド複合体に対する抗体の検討

精製前の粗ガングリオシド分画を薄層クロマトグラム (TLC) 上に展開し、血清を用いて免疫染色すると、GD1a の下付近に強い反応がみられるが、そのあたりに移動度をもつ精製ガングリオシド (GD1a、GD1b、GalNAc-GD1a など) にはまったく反応がみられないという GBS 症例があった。当初は未同定の微量ガングリオシドに対する抗体と考えて抗原の精製を行ったがうまくいかなかった。そこで二つのガングリオシドを混ぜてはじめて反応がみられる例もあるかもしれないと考え、GD1a と GD1b を混ぜて ELISA で反応をみたところ、予想どおり GD1a や GD1b 単独ではまったく反応のみられなかった血清が両者を混合した抗原には強い反応を示すということがわかった。ELISA 上のみでなく、TLC 上でも同様で、GD1a や GD1b 単独にはまったく反応がみられないが、両者の重なった部分にのみ強い反応がみとめられた¹⁾。

そこで 100 例の GBS についてしらべたところ、GD1a および GD1b 単独に対しては反応がないか、弱い反応しかないのに、組み合わせた抗原に対しては強い反応を示す例が 8 例あり、それらは重症度の高い例であった。

さらに症例を増やし、他のガングリオシドの組み合わせについても検討を加えたところ、GD1a/GD1b のみでなく、GM1/GD1a、GM1/GT1b、GD1b/GT1b に対しても反応する例や、GD1a/GD1b に反応しないが GM1/GD1a と GM1/GT1b など他の組み合わせに反応する例などもあることがわかった。そして概して末端の糖鎖が Gal-GalNAc と sialosyl-galactosyl 基の組み合わせに対して反応する例が多かった。

その中でも GD1a/GD1b の組み合わせに対する抗体活性をもつものは、人工呼吸器装着の率が有意に高いこと、重症度も高いことがわかった。したがって抗 GD1a/GD1b IgG 抗体は GBS の重症化および人工呼吸器装着を予測する因子として有用と考えられた。

(4) まとめ

抗ガングリオシド抗体は GBS および類縁疾患の補助診断検査として有用であるが、単独のガングリオシドのみでなく、リン脂質とガングリオシドの混合抗原や複数のガングリオシドからなる複合体についても標的抗原として検討することにより、陽性率が上がり診断マーカーとしての意義が向上する。また抗ガングリオシド抗体の病理学的作用を考える上で、膜上に共存するリン脂質の影響や、ラフト上の複数のガングリオシドからなる複合体に対する反応性についても検討をすすめることが重要である。

文 献

- 1) Kusunoki S: Antiglycolipid antibodies in Guillain-Barré syndrome and autoimmune neuropathies. *Am J Med Sci* 319: 234-239, 2000.
- 2) Chiba A, Kusunoki S, Obata H, *et al.*: Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with oph-

- thalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: Clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 43: 1911-1917, 1993.
- 3) Kusunoki S, Chiba A, Kanazawa I: Anti-GQ1b IgG antibody is associated with ataxia as well as ophthalmoplegia. *Muscle Nerve* 22: 1071-1074, 1999.
 - 4) Miyazaki T, Kusunoki S, Kaida K, *et al.*: Guillain-Barré syndrome associated with IgG monospecific to ganglioside GD1b. *Neurology* 56: 1227-1229, 2001.
 - 5) Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, *et al.*: GalNAc-GD1a in human peripheral nerve; Target sites of anti-ganglioside antibody. *Neurology* 61: 465-470, 2003.
 - 6) Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, *et al.*: Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurology* 39: 424-431, 1996.
 - 7) Kusunoki S, Shiina M, Kanazawa I: Anti-Gal-C antibodies in GBS subsequent to mycoplasma infection: evidence of molecular mimicry. *Neurology* 57: 736-738, 2001.
 - 8) Freddo L, Hays AP, Nickerson KG, *et al.*: Monoclonal anti-DNA IgM κ in neuropathy binds to myelin and to a conformational epitope formed by phosphatidic acid and gangliosides. *J Immunol* 137: 3821-3825, 1986.
 - 9) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, *et al.*: Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barré syndrome sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: possible clinical implications. *Muscle Nerve* 27: 302-306, 2003.
 - 10) Hirakawa M, Morita D, Tsuji S, *et al.*: Effects of phospholipids on antiganglioside antibody reactivity in GBS. *J Neuroimmunol* 159: 129-132, 2005.
 - 11) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, *et al.*: Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 56: 567-571, 2004.

Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barré and Fisher Syndromes in Japan

Masaki Takahashi,¹ Michiaki Koga,² Keiko Yokoyama,¹ and Nobuhiro Yuki^{2*}

Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo,¹ and Department of Neurology, Dokkyo University School of Medicine, Tochigi,² Japan

Received 7 May 2004/Returned for modification 17 August 2004/Accepted 8 September 2004

Campylobacter jejuni isolation is the standard for the diagnosis of this type of bacterial infection, but there have been no epidemiological studies of a large number of *C. jejuni* isolates from patients with Guillain-Barré syndrome (GBS) and Fisher syndrome (FS). For 13 years, stool specimens from GBS/FS patients have been sent from 378 hospitals throughout Japan to the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health. A total of 113 strains (11%) were isolated from the stool specimens from 1,049 patients. The isolation rate did not differ by region. The rates were 22% for 449 patients with a history of diarrhea and 2% for the others. An additional 18 isolates were provided by various hospitals. There was no noticeable seasonal distribution in the onset of *C. jejuni* isolated from patients with GBS/FS. The male/female ratios were 1.7:1 for GBS and 2.2:1 for FS. The patient age range showed a peak in 10- to 30-year-old subjects who had GBS and in 10- to 20-year-old subjects who had FS. The predominance of young adults and male patients who had *C. jejuni*-associated GBS/FS may be related to the preponderance of young adults and male patients who had *C. jejuni* enteritis. The median interval from diarrhea onset to neurologic symptom onset was 10 days for GBS/FS. Penner's *C. jejuni* serotype HS:19 was more frequently present in GBS (67%) than in enteritis (6%) patients. HS:2 was more frequent in FS (41%) than in enteritis (14%) patients. These findings suggest that certain *C. jejuni* strains specifically trigger GBS and that others specifically trigger FS.

Guillain-Barré syndrome (GBS), the prototype of postinfectious autoimmune diseases, is characterized by acute onset of limb weakness and loss of tendon reflexes. Since the near elimination of poliomyelitis worldwide, GBS is the most frequent cause of acute flaccid paralysis, the mean annual incidence being 1.3 cases per 100,000 population (11). Fisher syndrome (FS) is characterized by acute onset of ophthalmoplegia, ataxia, and areflexia. It is considered a variant of GBS because some who present with FS progress to GBS. The annual incidence rate is estimated as 0.09 per 100,000 population (4). Of the identified microorganisms, the gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*, a leading cause of acute gastroenteritis, is the most frequent antecedent pathogen in GBS/FS (12). A comprehensive Japanese study showed 31% of 201 patients with GBS and 18% of 65 with FS seropositive for recent *C. jejuni* infection (16).

Serological studies are important for understanding the epidemiology of *C. jejuni*-associated GBS/FS, but there are no recommended methodologies as to the antigens to be used or the standards of judgment. A comparative study made in Japan and The Netherlands on the presence of anti-*C. jejuni* antibody in GBS showed that serological assay systems vary considerably between laboratories (15). *C. jejuni* isolation is the standard diagnosis for bacterial infection and should be used to assess the epidemiology of *C. jejuni*-associated GBS/FS. The latent period between preceding intestinal infection and the onset of GBS/FS, however, often exceeds the excretion period of viable *C. jejuni* cells in stools. Consequently, there have been no epidemiological studies done on a large number of *C. jejuni* iso-

lates from patients. We analyzed the epidemiological features of more than 100 patients with GBS/FS from whom *C. jejuni* had been isolated and investigated the presence of Penner's serotypes in the isolates.

MATERIALS AND METHODS

Stools of GBS and FS patients. Stool specimens were sent from 378 hospitals throughout Japan to the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health for *C. jejuni* isolation between December 1990 and November 2003. There was only one stool sampling per patient. The stools were collected in transport medium (SEEDSWAB no.1; Eiken, Tokyo Japan) immediately after patient admission. In addition to these isolates, 18 isolates from GBS ($n = 15$) and FS ($n = 3$) patients that had been provided by other hospitals were analyzed simultaneously. One of the authors (M.K.) reviewed the following information obtained from each primary physician: antecedent illness, initial symptoms, neurological signs during the illness, and clinical course. Radiagnoses were made based on the clinical criteria for GBS and FS (1, 23).

Bacterial strains. GBS/FS-related strains that had been isolated by one of the authors (M.T.) or provided by other hospitals were used. A total of 554 strains isolated from other patients with enteritis with no neurological complications in Tokyo Metropolitan Hospitals (Komagome and Bokutoh) were the controls to test whether particular serotypes were increased in GBS/FS-related strains.

Stool culture for *C. jejuni*. Each stool specimen was plated on three plates of solid selective media (i.e., CCDA, CM739, and SR155E; Oxoid, Ltd., Basingstoke, United Kingdom) without enrichment culture. The CCDA medium was incubated at 37°C for 72 h under microaerophilic conditions (5% O₂, 7.5% CO₂, 7.5% H₂, and 80% N₂) in an TE-HER CAMPYLO-INCUBATOR (Hirasawa, Tokyo, Japan). Suspicious colonies initially received a morphological check with a phase-contrast microscope. If an organism showed the typical curved, spiral morphology of *Campylobacter*, it was regarded as a type of *C. jejuni* or *C. coli* and replated on blood agar to obtain pure cultures. The identity of *C. jejuni* was confirmed by both biochemical tests and multiplex PCR techniques for assay for *C. jejuni* and *C. coli*. The biochemical tests used oxidase, hippurate hydrolysis, indoxyl acetate hydrolysis, and susceptibility to disks containing cephalothin (30 µg) and nalidixic acid (30 µg). Species-specific multiplex PCR were done with combined *C. jejuni*- and *C. coli*-specific primer sets (18, 29).

Serotyping. Penner serotyping of *C. jejuni* was carried out by using a *Campylobacter* antisera Seiken Set (Denka Seiken, Tokyo Japan) according to the manufacturer's protocol. The antisera in the commercial set were composed of

* Corresponding author. Mailing address: Department of Neurology, Dokkyo University School of Medicine, Kitakobayashi 880, Mibu, Shimotsuga, Tochigi 321-0293, Japan. E-mail: yuki@dokkyomed.ac.jp.

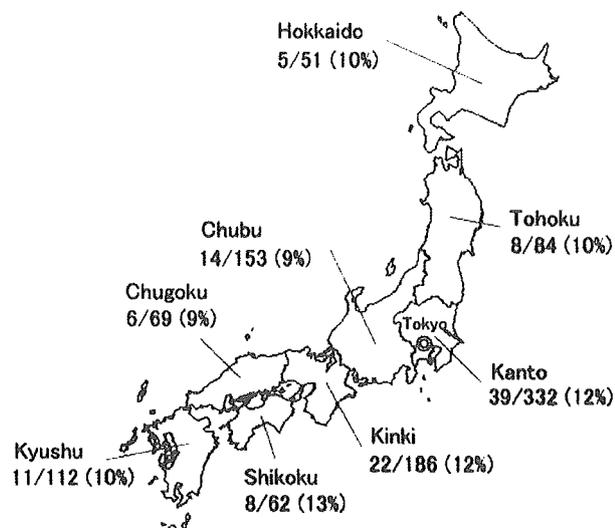


FIG. 1. Isolation rate of *C. jejuni* by district in Japan.

25 groups of antisera as follows: group A, HS:1/44; group B, HS:2; group C, HS:3; group D, HS:4/13/16/43/50; group E, HS:5; group F, HS:6/7; group G, HS:8; group I, HS:10; group J, HS:11; group K, HS:12; group L, HS:15; group N, HS:18; group O, HS:19; group P, HS:21; group R, HS:23/36/53; group S, HS:27; group U, HS:31; group V, HS:32; group Y, HS:37; group Z, HS:38; group Z₁, HS:41; group Z₄, HS:45; group Z₅, HS:52; group Z₆, HS:55; and group Z₇, HS:57.

Anti-ganglioside antibody assay. Serum samples obtained during the first 4 weeks after onset, before immune treatment, were frozen and stored at -80°C until used. An enzyme-linked immunosorbent assay, performed as reported elsewhere (33), was used to measure immunoglobulin G (IgG) antibodies to GM1, GD1a, and GQ1b in serum. Serum was considered positive when the titer was ≥ 500 .

Statistics. Differences in frequency between groups were compared by using the Fisher exact test with SPSS 12.0J software (SPSS Inc., Chicago, Ill.). A difference was considered significant when the two-sided *P* value was < 0.05 .

RESULTS

Culture results. We obtained stool specimens from 1,049 patients with GBS ($n = 763$) or FS ($n = 286$). The median interval between neuropathy onset and stool sampling was 13 days (range, 1 to 150 days). Gastrointestinal symptoms occurred in 449 (43%) patients; upper respiratory symptoms occurred in 503 (48%) patients. A total of 113 *C. jejuni* strains (GBS, 87; FS, 26) (11%) were isolated from the 1,049 patients, although at least 11 patients had been treated with antibiotics. The combined isolation rate, 11% (GBS, 11%; FS, 9%), did not differ by region (Fig. 1). The rate was 22% for the 449 patients with a history of diarrhea and 2% for the remaining patients (Table 1). Most *C. jejuni*-positive specimens were obtained within 2 weeks of neuropathy onset, some more than 1 month later (Fig. 2). Except for the of two siblings with GBS reported elsewhere (35), all cases were sporadic. *C. coli* ($n = 2$), *C. curvus* ($n = 2$), *Campylobacter* spp. ($n = 12$), and *Arcobacter* sp. ($n = 1$) were isolated from the *C. jejuni*-negative patients.

Characteristics of *C. jejuni*-positive patients. The seasonal distribution (Fig. 3) is lower in October and November. *C. jejuni*-associated GBS showed a peak in 10- to 30-year-olds (Fig. 4). *C. jejuni*-associated FS demonstrated a peak in 10- to 20-year-olds. Males predominated for both GBS (male/female ratio, 1.7:1) and FS (2.2:1).

Antecedent symptoms in culture-positive patients were re-

ported in 95% of 102 GBS patients and in 93% of 29 FS patients. The median latent period between antecedent symptoms and neuropathy onset was 10 days for both groups; within 2 weeks in most cases (Fig. 5). Gastrointestinal symptoms were most frequent in cases of GBS (90%) and FS (79%), often being accompanied by fever. Six (5%) patients with GBS/FS had a history of upper respiratory tract infectious symptoms only, and three (2%) had experienced only preceding fever. Anti-ganglioside IgG antibodies in serum were tested during the acute phase of illness in 120 of 131 patients (Table 2). Most patients had some antibodies; anti-GM1 and anti-GD1a IgG antibodies were frequent in GBS and anti-GQ1b IgG antibody in FS.

Serogroups of *C. jejuni* isolates. HS:19 was more frequently isolated from GBS patients than from enteritis patients. The HS:2 and HS:4 complexes were isolated more frequently from FS patients than from enteritis patients. None of the GBS and FS isolates were HS:41.

DISCUSSION

Assessing the frequency of *C. jejuni* infection in GBS/FS patients is difficult since it depends on such varied factors as antecedent symptoms, the duration of convalescent excretion of the bacterium, and the kinds of antibiotics administered. Thus, few surveillance studies have included large numbers of patients. Kuroki et al. (17) reported that 30% of 46 GBS patients in the Kinki district of Japan had positive stool cultures. In a subsequent study, these authors isolated 13 strains (17%) of *C. jejuni* from 76 patients (9). In contrast, 8% of 103 patients had positive cultures in England (25), and 9% of 138 patients had positive cultures in The Netherlands (28). The isolation rate was 11% in the present study, which does not differ significantly from European values.

The latent period between intestinal infection and the onset of GBS/FS often exceeds the duration of convalescence excretion of the bacterium. GBS/FS patients therefore frequently have negative stool cultures. Kuroki's group (9) reported that all 13 positive stool specimens were obtained within 10 days after onset of GBS symptoms, and 9 of the 13 specimens were obtained within 5 days. We could isolate *C. jejuni* from stool specimens obtained more than 1 month after the onset of GBS (the 35th day) or FS (the 40th day). This finding is not excep-

TABLE 1. Isolation rate of *C. jejuni* and antecedent illness in patients with GBS and FS

Antecedent symptoms ^a	No. of stool specimens (%) from patients with:			
	GBS		FS	
	Total	<i>C. jejuni</i> positive	Total	<i>C. jejuni</i> positive
GI only	255	62 (24)	49	17 (35)
GI plus URTI	107	16 (15)	38	4 (11)
URT I only	209	2 (1)	149	4 (3)
Fever only	42	3 (7)	10	0
Others	25	0	5	0
None	121	3 (2)	31	1 (3)
Total ^b	759	86 (11)	282	26 (9)

^a GI, gastrointestinal infection; URTI, upper respiratory tract infection.

^b Eight cases were excluded because detailed information was not available.

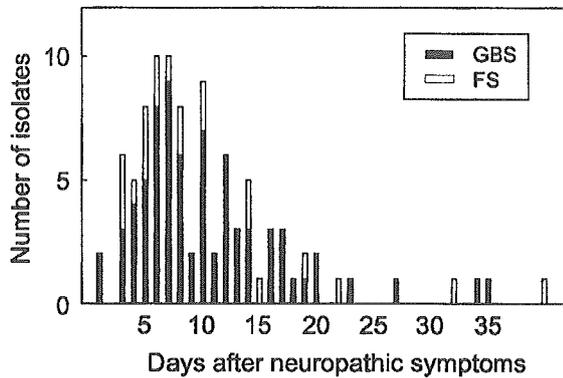


FIG. 2. Interval from the onset of neuropathic symptoms to the day stool specimens were obtained from *C. jejuni*-positive patients. Bars: ■, GBS; □, FS.

tional because in some cases the excretion of *C. jejuni* in stools has continued for 6 to 9 weeks (14, 30).

There is no clear seasonal distribution of GBS in Western countries (11), whereas in northern China GBS peaks in late summer, which may be due to the high frequency of *C. jejuni* infection (10). In a previous study done in the Kinki district of Japan, the seasonal distribution of *C. jejuni*-associated GBS peaked in March, an autumn occurrence was relatively infrequent, and there was no seasonal difference found for the group of GBS patients without *C. jejuni* infection (9). We also detected no seasonal predominance. Autumn occurrences were relatively infrequent. Although the seasonality of *C. jejuni* enteritis in Japan is less pronounced than in other developed countries, which show a seasonal distribution with a well-defined summer peak (26), the incidence of *C. jejuni* enteritis tends to be higher from April to July (21).

In North America and Europe, a bimodal age distribution has been reported for GBS, with peaks at 20 to 40 years and 60 to 70 years (2, 13). Males are more commonly affected by GBS than females (~1.25:1) (11). In England the male/female ratio was 3.5:1 in the *C. jejuni*-seropositive group, whereas it was 1.5:1 in the *C. jejuni*-seronegative group (25). *C. jejuni*-associated GBS in northern China occurs mainly among children and

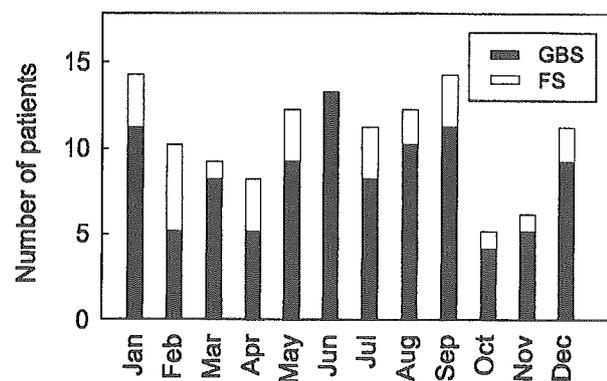


FIG. 3. Seasonal distributions of *C. jejuni* isolates in GBS and FS patients. Bars: ■, GBS; □, FS.

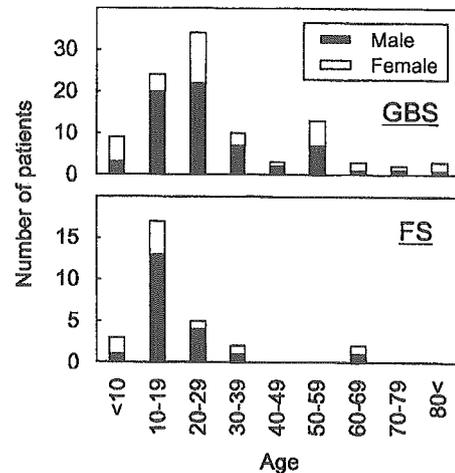


FIG. 4. Age distribution of *C. jejuni*-positive GBS and FS patients. Bars: ■, males; □, females.

young adults (10), the male/female ratio being 1.2:1 in *C. jejuni*-seropositive GBS patients and 0.8:1 in *C. jejuni*-seronegative patients. In the Kinki district of Japan, the age distribution showed a peak between 10 and 30 years (9). The male/female ratio was 2.4:1 for GBS patients who had had *C. jejuni* infection and 2.2:1 for the other GBS patients. In the present study, the age distribution showed a peak between 10 and 30 years for GBS and between 10 and 20 years for FS. A majority of male patients had both GBS and FS, the respective male/female ratios being 1.7:1 and 2.2:1. In English patients suffering from gastrointestinal symptoms, the highest *C. jejuni* isolation rates were for young adults, males predominating in the 15 to 24 years (1.7:1) and 45 to 54 years (1.6:1) age groups (26). The dominance of young adult and male patients among those with *C. jejuni* infection may therefore partly explain the findings for *C. jejuni*-associated GBS/FS. In England, the median interval between the onset of diarrhea and neuropathic symptoms was 9 days (range, 2 to 20) for 19 GBS patients (25). In our study, the median interval was 10 days (range, 1 to 24) for 115 GBS/FS patients.

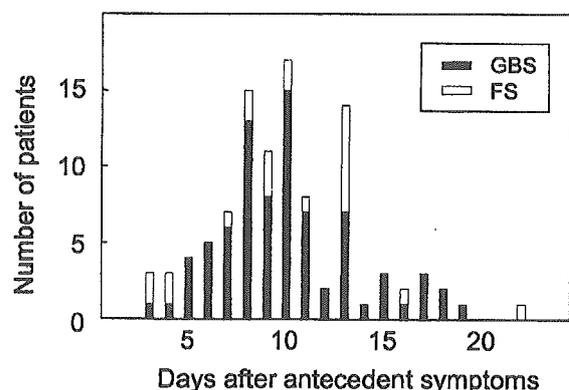


FIG. 5. Interval from diarrhea onset to the onset of neuropathic symptoms. Bars: ■, GBS; □, FS.

TABLE 2. Anti-ganglioside antibodies in patients with GBS and FS from whom *C. jejuni* was isolated

IgG antibody	No. of patients (%) with:	
	GBS (n = 92)	FS (n = 28)
Anti-GM1	68 (74)	4 (14)
Anti-GD1a	45 (49)	5 (18)
Anti-GQ1b	3 (3)	23 (82)

Penner's serotyping system is a useful phenotyping technique for *C. jejuni* and *C. coli* (24). The system can divide *C. jejuni* and *C. coli* into about 60 types. *C. jejuni* has been isolated from patients' stools at GBS onset. A large number of Penner serotypes have been reported in the literature: HS:1, HS:2, HS:4, HS:5, HS:10, HS:13/65, HS:16, HS:19, HS:23, HS:35, HS:37, HS:41, HS:44, and HS:64 (5), but Kuroki's group showed that 75% of 16 isolates from GBS patients were HS:19 and that 1 of 2 isolates from FS patients was HS:2 (22). Elsewhere we reported that in Japan HS:19 strains are significantly over-represented in GBS patients, accounting for 52% of 31 isolates from GBS patients but only 5% of 215 control isolates (34). HS:2 was found to be over-represented in FS patients (present in 71% of the patients versus 38% of the controls), but only 7 isolates from FS patients were studied. In South Africa, 6 of 9 GBS isolates were HS:41; this serotype accounts for only 0.1% of enteritis strains (8). In contrast, in The Netherlands and Belgium only two isolates from 12 GBS patients were HS:19, and none were HS:41 (5). Only one isolate from four FS patients was HS:2 (5). Our study confirms that GBS is significantly associated with HS:19 and that statistically FS is associated with HS:2. None of our *C. jejuni* isolates from GBS patients were HS:41. These findings are a strong indication that certain *C. jejuni* strains trigger the development of GBS, others the development of FS.

HS:19 strains, whether isolated from GBS patients or enteritis patients without neurological involvement, were related

clonally (7, 19, 22), whereas clonality was lacking for other serotypes associated with GBS (5, 6). The hypothesis that a "bad bug causes GBS/FS" cannot be dismissed. The methods used may simply lack the power to detect particular *C. jejuni* strain determinants related to GBS/FS. There is cumulative evidence of molecular mimicry between human gangliosides and that the *C. jejuni* lipo-oligosaccharide (LOS) causes GBS/FS (31). Anti-GM1 and anti-GD1a IgG antibodies have been detected in patients who developed GBS subsequent to *C. jejuni* enteritis. Sensitization with a GM1-like LOS, as well as with GM1 ganglioside, has produced an animal model of GBS (32, 36). Analysis of the genes involved in the synthesis of ganglioside-like LOS may be of great importance for clarifying which *C. jejuni* strains involved in the pathogenesis of GBS/FS. The presence of LOS synthesis genes (*cst-II*, *cgtA*, and *cgtB*) is associated statistically with GBS-related isolates (20). GQ1b ganglioside is a target molecule for IgG antibody in FS (3), and all *C. jejuni* strains studied that bore the GQ1b epitope had *cst-II*, an essential gene for production of GQ1b-like LOS (27). Whether these genes are present in our GBS/FS isolates needs to be investigated, as well as whether their presence is more frequent than in the enteritis controls.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by grants-in-aid from the Ichiro Kanehara Foundation, by the Kanoe Foundation for Life & Socio-Medical Science, by the Japan Intractable Diseases Research Foundation, by a grant for Scientific Research (B) (KAKENHI 14370210) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, by a Research Grant for Neuroimmunological Diseases from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan, by a Health Sciences Research Grant (Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health) from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan, and by a grant from the Human Frontier Science Program (RGP 38/2003).

We thank the Divisions of Clinical Microbiology of the Tokyo Metropolitan Hospitals (Komagome and Bokutoh) for the isolation of the sporadic enteritis strains.

REFERENCES

- Asbury, A. K., and D. R. Cornblath. 1990. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.* 27(Suppl.):S21-S24.
- Boucq, D., C. J. M. Sindic, M. Lamy, M. Delmée, J. P. Tomasi, and E. C. Laterre. 1991. Clinical and serological studies in a series of 45 patients with Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Sci.* 104:56-63.
- Chiba, A., S. Kusunoki, T. Shimizu, and I. Kanazawa. 1992. Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Ann. Neurol.* 31:677-679.
- Emilia-Romagna Study Group on Clinical and Epidemiological Problems in Neurology. 1998. Guillain-Barré syndrome variants in Emilia-Romagna, Italy, 1992-3: incidence, clinical features, and prognosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65:218-224.
- Endtz, H. P., C. W. Ang, N. van Den Braak, B. Duim, A. Rigter, L. J. Price, D. L. Woodward, F. G. Rodgers, W. M. Johnson, J. A. Wagenaar, B. C. Jacobs, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum. 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré and Miller-Fisher syndrome [sic]. *J. Clin. Microbiol.* 38:2297-2301.
- Engberg, J., I. Nachamkin, V. Fussing, G. M. McKhann, J. W. Griffin, J. C. Piffaretti, E. M. Nielsen, and P. Gerner-Smidt. 2001. Absence of clonality of *Campylobacter jejuni* in serotypes other than HS:19 associated with Guillain-Barré syndrome and gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 184:215-220.
- Fujimoto, S., B. M. Allos, N. Misawa, C. M. Patton, and M. J. Blaser. 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis and random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from patients with Guillain-Barré syndrome. *J. Infect. Dis.* 176:1105-1108.
- Goddard, E. A., A. J. Lastovica, and A. C. Argent. 1997. *Campylobacter* O:4:1 isolation in Guillain-Barré syndrome. *Arch. Dis. Child.* 76:526-528.
- Hao, Q., T. Saida, S. Kuroki, M. Nishimura, M. Nukina, H. Obayashi, and K. Saida. 1998. Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barré syndrome with preceding *Campylobacter jejuni* [sic] and other identified infections. *J. Neuroimmunol.* 81:116-126.

TABLE 3. Penner serogroup of isolates from GBS and FS and uncomplicated enteritis

Penner serogroup	Serotype(s)	No. of <i>C. jejuni</i> isolates (%) from:		
		GBS (n = 102) ^a	FS (n = 29)	Enteritis (n = 554)
A	1, 44	5 (5)	0	37 (7)
B	2	6 (6)	12 (41) ^c	80 (14)
C	3	1 (1)	1 (3)	21 (4)
D	4, 13, 16, 43, 50	8 (8)	11 (38) ^d	69 (12)
E	5	2 (2)	0	6 (1)
F	6, 7	1 (1)	1 (3)	10 (2)
G	8	3 (3)	0	21 (4)
O	19	68 (67) ^b	1 (3)	34 (6)
U	31	0	1 (3)	1 (0.2)
Y	37	3 (3)	0	33 (6)
Z	38	0	1 (3)	2 (0.4)
Untypeable		8 (8)	1 (3)	141 (25)

^a Two strains were serotyped as A/G or O/Y serogroups.

^b $P < 0.001$ (compared to the enteritis isolates; odds ratio [OR], 30.6; 95% confidence interval [CI], 17.9 to 52.4).

^c $P < 0.001$ (compared to the enteritis isolates; OR, 4.2; 95% CI, 1.9 to 9.1).

^d $P < 0.001$ (compared to the enteritis isolates; OR, 4.3; 95% CI, 1.9 to 9.5).

10. Ho, T. W., B. Mishu, C. Y. Li, C. Y. Gao, D. R. Cornblath, J. W. Griffin, A. K. Asbury, M. J. Blaser, and G. M. McKhann. 1995. Guillain-Barré syndrome in northern China: relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 118:597-605.
11. Hughes, R. A. C., and J. H. Rees. 1997. Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barré syndrome. *J. Infect. Dis.* 176(Suppl. 2):S92-S98.
12. Jacobs, B. C., P. H. Rothbarth, F. G. A. van der Meché, P. Herbrink, P. I. M. Schmitz, M. A. de Klerk, and P. A. van Doorn. 1998. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. *Neurology* 51:1110-1115.
13. Kaplan, J. E., L. B. Schonberger, E. S. Hurwitz, and P. Katona. 1983. Guillain-Barré syndrome in the United States, 1978-1981: additional observations from the national surveillance system. *Neurology* 33:633-637.
14. Kapperud, G., J. Lassen, S. M. Ostroff, and S. Aasen. 1992. Clinical features of sporadic *Campylobacter* infections in Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 24: 741-749.
15. Koga, M., C. W. Ang, N. Yuki, B. C. Jacobs, P. Herbrink, F. G. A. van der Meché, K. Hirata, and P. A. van Doorn. 2001. Comparative study of preceding *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barré syndrome in Japan and The Netherlands. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70:693-695.
16. Koga, M., N. Yuki, M. Takahashi, K. Saito, and K. Hirata. 1998. Close association of IgA anti-ganglioside with antecedent *Campylobacter jejuni* in Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.* 81:138-143.
17. Kuroki, S., T. Saida, M. Nukina, T. Haruta, M. Yoshioka, Y. Kobayashi, and H. Nakanishi. 1993. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain β -N-acetylglucosamine residues. *Ann. Neurol.* 33:243-247.
18. Linton, D., A. J. Lawson, R. J. Owen, and J. Stanley. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2568-2572.
19. Nachamkin, I., J. Engberg, M. Gutacker, R. J. Meinersman, C. Y. Li, P. Arzate, E. Teeple, V. Fussing, T. W. Ho, A. K. Asbury, J. W. Griffin, G. M. McKhann, and J. C. Piffaretti. 2001. Molecular population genetic analysis of *Campylobacter jejuni* HS:19 associated with Guillain-Barré syndrome and gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 184:221-226.
20. Nachamkin, I., J. Liu, M. Li, H. Ung, A. P. Moran, M. M. Prendergast, and K. Shelkh. 2002. *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré syndrome preferentially expresses a GD_{1a}-like epitope. *Infect. Immun.* 70: 5299-5303.
21. National Institute of Infectious Diseases and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health and Welfare of Japan. 1999. *Campylobacter* enteritis 1995-1998. *Infect. Agents Surv. Rep.* 20:107-108. (In Japanese.)
22. Nishimura, M., M. Nukina, S. Kuroki, H. Obayashi, M. Ohta, J. J. Ma, T. Saida, and T. Uchiyama. 1997. Characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Sci.* 153:91-99.
23. Odaka, M., N. Yuki, and K. Hirata. 2001. Anti-GO1b IgG antibody syndrome: clinical and immunological range. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70:50-55.
24. Penner, J. L., and J. N. Hennessy. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 12:732-737.
25. Rees, J. H., S. E. Soudain, N. A. Gregson, and R. A. C. Hughes. 1995. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333:1374-1379.
26. Skirrow, M. B. 1987. A demographic survey of campylobacter, salmonella, and shigella infections in England: a public health laboratory service survey. *Epidemiol. Infect.* 99:647-657.
27. van Belkum, A., N. van den Brak, P. Godschalk, W. Ang, B. Jacobs, M. Gilbert, W. Wakarchuk, H. Verbrugh, and H. Endtz. 2001. A *Campylobacter jejuni* gene associated with immune-mediated neuropathy. *Nat. Med.* 7:752-753.
28. van Koningsveld, R., P. A. van Doorn, P. I. M. Schmitz, C. W. Ang, and F. G. A. van der Meché. 2000. Mild forms of Guillain-Barré syndrome in an epidemiologic survey in The Netherlands. *Neurology* 54:620-625.
29. Winter, D. K., A. E. O'Leary, and M. F. Slavik. 1997. Rapid PCR with nested primers for direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. *Mol. Cell. Probes* 11:267-271.
30. Wright, E.P. 1982. Duration of excretion period of *Campylobacter jejuni* in human subjects, p. 294-298. In D. G. Newell (ed.), *Campylobacter*. MTP Press, Lancaster, United Kingdom.
31. Yuki, N. 2001. Infectious origins of, and molecular mimicry in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 1:29-37.
32. Yuki, N., K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, and M. Yamada. 2004. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11404-11409.
33. Yuki, N., Y. Tagawa, F. Irie, Y. Hirabayashi, and S. Handa. 1997. Close association of Guillain-Barré syndrome with antibodies to minor monosialogangliosides GM1b and GM1c. *J. Neuroimmunol.* 74:30-34.
34. Yuki, N., M. Takahashi, Y. Tagawa, K. Kashiwase, K. Tadokoro, and K. Saito. 1997. Association of *Campylobacter jejuni* serotype with antiganglioside antibody in Guillain-Barré syndrome and Fisher's syndrome. *Ann. Neurol.* 42:28-33.
35. Yuki, N., and Y. Tsujino. 1995. Familial Guillain-Barré syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Pediatr.* 126:162.
36. Yuki, N., M. Yamada, M. Koga, M. Odaka, K. Susuki, Y. Tagawa, S. Ueda, T. Kasama, A. Ohnishi, S. Hayashi, H. Takahashi, M. Kamijo, and K. Hirata. 2001. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann. Neurol.* 49:712-720.

Overexpression of GD1a Ganglioside Sensitizes Motor Nerve Terminals to Anti-GD1a Antibody-Mediated Injury in a Model of Acute Motor Axonal Neuropathy

John A. Goodfellow,¹ Tyrone Bowes,^{1,2} Kazim Sheikh,³ Masaaki Odaka,^{1,4} Susan K. Halstead,¹ Peter D. Humphreys,¹ Eric R. Wagner,¹ Nobuhiro Yuki,⁴ Koichi Furukawa,⁵ Keiko Furukawa,⁵ Jaap J. Plomp,^{6,7} and Hugh J. Willison¹

¹Division of Clinical Neurosciences, Institute of Neurological Sciences, Southern General Hospital, Glasgow G51 4TF, United Kingdom, ²Department of Biological Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, United Kingdom, ³Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205, ⁴Department of Neurology, Dokkyo University School of Medicine, Tochigi 321-0293, Japan, ⁵Department of Biochemistry II, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466-0065, Japan, and Departments of ⁶Neurology and ⁷Neurophysiology, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, The Netherlands

Anti-GD1a ganglioside antibodies (Abs) are the serological hallmark of the acute motor axonal form of the post-infectious paralysis, Guillain-Barré syndrome. Development of a disease model in mice has been impeded by the weak immunogenicity of gangliosides and the apparent resistance of GD1a-containing neural membranes to anti-GD1a antibody-mediated injury. Here we used mice with altered ganglioside biosynthesis to generate such a model at motor nerve terminals. First, we bypassed immunological tolerance by immunizing GD1a-deficient, β -1,4-*N*-acetylgalactosaminyl transferase knock-out mice with GD1a ganglioside-mimicking antigens from *Campylobacter jejuni* and generated high-titer anti-GD1a antisera and complement fixing monoclonal Abs (mAbs). Next, we exposed *ex vivo* nerve-muscle preparations from GD1a-overexpressing, GD3 synthase knock-out mice to the anti-GD1a mAbs in the presence of a source of complement and investigated morphological and electrophysiological damage. Dense antibody and complement deposits were observed only over presynaptic motor axons, accompanied by severe ultrastructural damage and electrophysiological blockade of motor nerve terminal function. Perisynaptic Schwann cells and postsynaptic membranes were unaffected. In contrast, normal mice were not only unresponsive to immunization with GD1a but also resistant to neural injury during anti-GD1a Ab exposure, demonstrating the central role of membrane antigen density in modulating both immune tolerance to GD1a and axonal susceptibility to anti-GD1a Ab-mediated injury. Identical paralyzing effects were observed when testing mouse and human anti-GD1a-positive sera. These data indicate that anti-GD1a Abs arise via molecular mimicry and are likely to be clinically relevant in injuring peripheral nerve axonal membranes containing sufficiently high levels of GD1a.

Key words: neuromuscular; denervation; axon terminal; end plate; MEPP; ganglioside; glycosyltransferase; autoimmunity; neuropathy

Introduction

Guillain-Barré syndrome (GBS) is a post-infectious autoimmune polyneuropathy and the most common cause of acute neuromuscular paralysis worldwide (Hughes and Rees, 1997; Hughes et al., 1999). The acute motor axonal neuropathy (AMAN) variant, in which only motor axons are affected, is characterized by the presence of serum anti-GD1a ganglioside antibodies (Abs) (Lugaresi et al., 1997; Ho et al., 1999; Ogawara et al., 2000; Ilyas et al., 2001). Clinical and pathological evidence indicates multiple locations as potential sites of injury, including the nodes of Ran-

vier (Griffin et al., 1996), ventral roots and distal nerves (Feasby et al., 1986), and motor nerve terminals (Ho et al., 1997; Kuwabara et al., 2003). The selective injury to motor axons at these sites is presumed to be attributable to Ab binding to axonal membranes relatively enriched in GD1a, although this has never been demonstrated (Ogawa-Goto et al., 1992; De Angelis et al., 2001; Gong et al., 2002).

Anti-GD1a Abs arise in AMAN cases after gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni* strains that contain GD1a-like antigens on their surface lipo-oligosaccharide (LOS) (Aspinall et al., 1994, 1995). This suggests that molecular mimicry is a mechanism for anti-GD1a Ab induction (Sheikh et al., 1998; Willison and Yuki, 2002).

Gangliosides are sialylated glycosphingolipids involved in development, function, and maintenance of the nervous system (Hansson et al., 1977; Ledeen, 1978; Simons and Ikonen, 1997; Vyas et al., 2002). They are widely distributed and particularly enriched at the neuromuscular junctions (NMJs), along with a diverse range of glycosylated proteins (Martin, 2003). In addition

Received Oct. 14, 2004; revised Dec. 23, 2004; accepted Dec. 25, 2004.

This work was supported by The Wellcome Trust Grants 051930, 060349, and 065261 (H.J.W.), the Guillain-Barré Syndrome Support Group, United Kingdom (J.A.G., H.J.W.), and National Institutes of Health Grant NS42888 (K.S.). We thank Prof. John Griffin for critical comments and discussion.

Correspondence should be addressed to Prof. Hugh J. Willison, Division of Clinical Neurosciences, Department of Neurology, University of Glasgow, Ground Floor Neurology Block, Southern General Hospital, Glasgow G51 4TF, UK. E-mail: h.j.willison@clinmed.gla.ac.uk.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4279-04.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/251620-09\$15.00/0