

E. 結論

GBS と同様に BBE でも感染症が発症に関与しているが、原因となる病原体は GBS と大きく異なっている。

2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Koga M, Takahashi T, Kawai M, Fujihara K, Kanda T. A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica. J Neurol Sci 2011; 300: 19-22
- Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Hirata K, Kanda T, Yuki N. GQ1b-seronegative Fisher syndrome: Clinical features and new serological markers. J Neurol (in press)

2. 学会発表

- 古賀道明, 山城知恵美, 高橋正樹, 神田隆. サルモネラ属菌によるギラン・バレー症候群発症への関与. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日, 仙台.
- 古賀道明, 川井元晴, 高橋利幸, 尾本雅俊, 小笠原淳一, 根来 清, 神田 隆. Neuromyelitis optica 発症における感染症の関与. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20-22日, 東京.
- 古賀道明, 高橋正樹, 結城伸泰, 神田隆. ギラン・バレー症候群発症におけるカンピロバクター・シアル化の意義. 第52回日本神経学会学術大会. 2011年5月18-20日, 名古屋.
- Koga M, Kanda T, Yuki N: GQ1b-seronegative Fisher syndrome: serological study. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society Potomac, Maryland, USA. June 25-29, 2011.
- 古賀道明, 上田昌美, 楠 進, 神田隆. ビッカースタッフ型脳幹脳炎における感染症の関与:ギラン・バレー症候群との差異. 第23回日本神経免疫学会学術集会. 2011年9月15-17日, 東京.

G. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
楠 進	GBS とガングリオシド 複合体抗体 ー最近の知見ー	鈴木則宏 他	Annual Review 神経 2011	中外医学 社	東京	2011	293-299

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
<u>Koga M</u> , Gilbert M, Takahashi M, Li J, Hirata K, <u>Kanda T</u> , Yuki N.	GQ1b-seronegative Fisher syndrome: clinical features and new serological markers.	<i>J Neurol</i>	(in press)		2012
Kawai M, Shimizu F, Omoto M, Ogasawara J, Takahashi T, <u>Kanda T</u>	Neuromyelitis optica shows marked hypermetabolism in 18F-FDG positron emission tomography.	<i>Clin Exp Neuroimmunol</i>	(in press)		2012
Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, <u>Koga M</u> , <u>Kanda T</u> .	Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier.	<i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i>	83	288-297	2012
Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe MA, Maeda T, Haruki H, <u>Kanda T</u> .	Pericyte-derived Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Increase the Expression of Claudin-5 in the Blood-brain Barrier and the Blood-nerve Barrier	<i>Neurochem Res</i>	37	401-409	2012
Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Kawai M, <u>Kanda T</u> .	Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5.	<i>Neurochem Res</i>	36	849-855	2011
<u>Koga M</u> , Takahashi T, Kawai M, Fujihara K, <u>Kanda T</u> .	A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica.	<i>J Neurol Sci</i>	300	19-22	2011
Shimizu F, Sano Y, Haruki H, <u>Kanda T</u> .	Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes.	<i>Diabetologia</i>	54	1517-1526	2011

Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, <u>Kanda T.</u>	Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors.	<i>J Cell Physiol</i>	226	255-266	2011
Sano Y, Shimizu F, Kawai M, Omoto M, Negoro K, Kurokawa T, Fujisawa H, Suzuki M, Okayama N, Suehiro Y, Hinoda Y, <u>Kanda T.</u>	p.Arg332Cys mutation of NOTCH3 gene in two unrelated Japanese families with CADASIL.	<i>Intern Med</i>	50	2833-2838	2011
Sakushima K, Tsuboi S, Yabe I, Hida K, Terae S, <u>Uehara R</u> , Nakano I, Sasaki H.	Nationwide survey on the epidemiology of syringomyelia in Japan.	<i>J Neurol Sci</i>	313	147-152	2012
西原秀昭, 小笠原淳一, <u>古賀道明</u> , 尾本雅俊, 川井元晴, 神田 隆:	IgG4関連自己免疫性膵炎による膵腫大を呈したPOEMS症候群	<i>臨床神経</i>	51	417-421	2011
竹下幸男, <u>古賀道明</u> , 尾本雅俊, 小笠原淳一, 川井元晴, 神田 隆	感覚障害を主徴とし, 免疫グロブリン静注療法により速やかに改善した遠位型慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの46歳男性例	<i>臨床神経</i>	51	478-481	2011
Moriguchi K, Miyamoto K, Takada K, <u>Kusunoki S.</u>	Four cases of anti-ganglioside antibody-positive neuralgic amyotrophy with good response to intravenous immunoglobulin infusion therapy.	<i>J Neuroimmunol</i>	238	107-109	2011
Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, <u>Kusunoki S.</u>	Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.	<i>J Neuroimmunol</i>	239	87-90	2011

Mauri L, Casellato R, Ciampa MG, Uekusa Y, Kato K, Kaida K, Motoyama M, <u>Kusunoki S</u> , Sonnino S.	Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer of GM1-GD1a.	<i>Glycobiology</i>	22	352-360	2012
Zitman FMP, Greenshields KN, Kuijf ML, Ueda M, Kaida K, Broos LAM, Tio-Gillen AP, Jacobs BC, <u>Kusunoki S</u> , Willison HJ, Plomp JJ.	Neuropathophysiological potential of Guillain-Barré syndrome anti-ganglioside-complex antibodies at mouse motor nerve terminals.	<i>Clin Exp Neuroimmunol</i>	2	59-67	2011
<u>Kusunoki S</u> , Kaida K.	Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders.	<i>J Neurochem</i>	116	828-832	2011
Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, <u>Yamamura T</u> .	Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>	108	3701-6	2011
千原典夫, <u>山村 隆</u> :	ここまでわかった自己免疫疾患-多発性硬化症・視神経脊髄炎	<i>臨床検査</i>	55	1241-1248	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Annual Review 神経 2011

2011年1月25日発行

中外医学社

GBS とガングリオシド複合体抗体—最近の知見

近畿大学医学部神経内科教授 楠 進

key words Guillain-Barré syndrome, Fisher syndrome, autoimmune neuropathy, ganglioside, ganglioside complex

要 旨

末梢神経の自己免疫疾患である Guillain-Barré 症候群 (GBS) では、抗ガングリオシド抗体が高頻度に上昇し、診断マーカーおよび発症因子として注目されている。近年二つのガングリオシドの糖鎖の相互作用で生ずるエピトープであるガングリオシド複合体に対する抗体が見出された。最初に報告された GD1a/GD1b 複合体に対する抗体は、人工呼吸器使用の必要な重症例に高頻度に見られる。GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体は純粋運動型 GBS にみられ、運動神経幹中間部に病初期から伝導ブロックが見られるのが特徴である。また Fisher 症候群では GQ1b 抗体が 90% 以上にみられるが、GQ1b と GM1 あるいは GD1a などの複合体により強く反応する抗体があることもわかった。神経障害の機序として、抗体の結合に続く補体やマクロファージによる細胞膜の傷害の他に、ラフトへの結合を介した細胞機能障害やアポトーシスの可能性も考えられ、今後の詳細な検討が必要である。

動 向

Guillain-Barré 症候群 (GBS) は末梢神経を標的とする自己免疫疾患であり、自己抗体を中心と

する液性免疫と細胞性免疫の両面から数多くの解析が行われてきた。とくに治療として血漿交換が有効であることから、自己抗体をはじめとする液性因子の病態への関与が重要と考えられた。その中で、特異性と陽性率の高いものとして、ガングリオシドの糖鎖を認識する抗ガングリオシド抗体が見出され注目されている。ガングリオシドは糖鎖構造にもとづいて多くの分子種があり、抗体の反応するガングリオシドの種類も症例ごとにさまざまである¹⁻³⁾。

高い抗体価の IgG タイプの抗ガングリオシド抗体は、GBS および関連疾患の患者血中にしばしばみられるが、他の自己免疫疾患や神経疾患では通常みられない。したがって IgG 抗ガングリオシド抗体の上昇は、GBS に特徴的なことである。発症直後の検体で抗体価がピークとなり、経過とともに低下・消失するという経過から、抗体の上昇は神経障害の結果ではなく病態と密接に関連するものと考えられる。GBS における抗ガングリオシド抗体産生のメカニズムとしては、先行感染の病原因子がガングリオシド類似の糖鎖構造をもつという「分子相同性機序」が提唱されている。

GBS ではさまざまな抗ガングリオシド抗体がみられ、それぞれの抗体は特有の臨床病型と対応

している。その対応は標的抗原の局在により説明できる例が多い^{2,3)}。したがって抗体は、標的となるガングリオシドに結合することで、そのガングリオシドが分布する部位を特異的に障害するという可能性が考えられる。その対応が最も明確なのが、GBSの亜型であるFisher症候群 (FS) の急性期血清で90%以上の高頻度にみられる抗GQ1b IgG抗体であり、眼球運動を支配する脳神経である動眼神経・滑車神経・外転神経のRanvier絞輪部周囲 (傍絞輪部) ミエリンに高濃度に局在するGQ1bに結合して眼球運動麻痺をきたすことが示唆されている⁴⁾。

ガングリオシドは神経組織に多く含まれ、細胞膜の構成成分であり糖鎖を細胞外に向ける形で存在している。上記のように多くの分子種があり、それぞれが神経組織内で独特の分布を示す。近年、ガングリオシドなどのスフィンゴ脂質は、リン脂質の膜の中に集簇して存在しラフト (いかに) を形成すると考えられている。こうした構造はリポドラフトあるいは脂質マイクロドメインと呼ばれ、そこにはシグナル伝達、突起伸展、シナプス形成、接着などの神経細胞にとって重要な過程に関与するさまざまなタンパク分子が局在することが明らかになってきている^{5,6)}。

A. GBSにおけるガングリオシド複合体に対する抗体

最近我々は2種類のガングリオシドを混合し作製した複合抗原に対する抗体をGBSの急性期血清に見出した⁷⁾。これは単独のガングリオシド抗原にはほとんど反応しないが、2種のガングリオシドを混合した抗原に強く反応するものである。この抗体は二つの抗原が形成する新たな複合エピトープを特異的に認識していると考えられる。我々はこの複合抗原をガングリオシド複合体 ganglioside complex (GSC) と名付け、GBSお

よびその亜型において抗GSC抗体の意義を調べている。

1. GD1a/GD1b複合体抗体

ガングリオシド複合体に対する抗体として最初に見出されたのは、GD1aとGD1bの複合体 (GD1a/GD1b) に対する抗体である⁷⁾。ある重症のGBS患者血清IgGが、ルーチンで行っている11種類の抗原に対していずれも反応を示さず、未精製のウシ脳ガングリオシドに薄層クロマトグラム免疫染色で強い反応を示した。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、その抗原をカラム操作により精製することを試みた。従来GalNAc-GD1aやGM1bをGBSの標的抗原として見出したときと同様に考えたわけである。しかし、何度か試みたがそのたびに、精製前には非常に強かった反応は精製の最終段階に入ると弱いものになっていった。ある時、その抗原の移動度がGD1aとGD1bに近いものであったことから、その2つからなる抗原を認識しているのではないかと考えるに至った。そこでELISA法にて両者をひとつのウェルに入れて反応させると非常に強い反応を示した (図1)。この反応は、薄層クロマトグラム上の免疫染色にても確認され、GD1a、GD1b単独をそれぞれ別のレーンに展開して血清IgGを反応させても反応はみられないが、両者を同じレーンに展開するとGD1aの下端とGD1bの上端のオーバーラップした部分のみ強い反応が認められた。異なる展開溶媒を用いて、GD1aとGD1bを完全に分離する条件で薄層クロマトグラムを行うと、反応はみられなくなった。したがってこの抗体はGD1aとGD1bの両者により形成されるエピトープを認識すると考えられた。その後、他のGBS血清でも同様の反応 (GD1aとGD1b単独には反応しないかきわめて弱い反応しか示さないが両者の複合体に強く反応する) を示すものがあり、重症例が多い傾向がみられた。

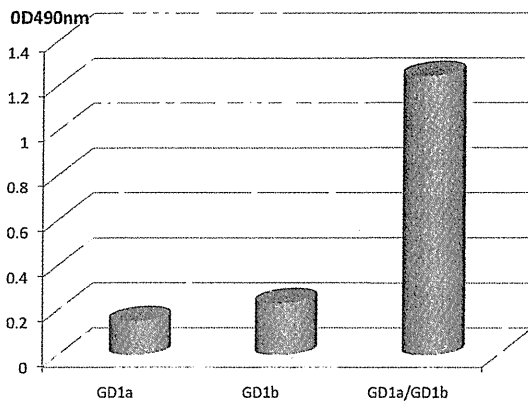


図1 ELISA法で測定したGD1a/GD1b複合体に対するIgG抗体

GD1aとGD1b単独に対しては反応がきわめて弱い⁸⁾が、GD1aとGD1bの混合抗原 (GD1a/GD1b) に対しては強い反応を示す (文献7のPatient 1のデータを用いて作成)。

さらにGD1a/GD1b以外の複合体、すなわちGM1/GD1a, GD1b/GT1b, GM1/GT1bなどに対する抗体も認められることがわかった。

そこで多数例 (234例) のGBS血清について、抗原としてGM1, GD1a, GD1b, GT1bを用い、そのうちの2つの組み合わせの混合抗原 (6種類) に対する抗体活性をみたところ、39例 (17%) にいずれかの複合体に対する抗体がみられた。そのうち、GD1a/GD1b (およびGD1b/GT1b) に対する抗体は、呼吸筋麻痺をきたす重症GBSにみられる頻度が有意に高いことがわかった⁸⁾。抗GD1a/GD1b複合体抗体のELISA法の結果を図1に示す。

2. GM1/GalNAc-GD1a複合体抗体

GM1およびGalNAc-GD1aはいずれも軸索障害型のGBSにおける血中抗体の標的抗原として知られる。GM1とGalNAc-GD1aの混合抗原に対するGBS急性期血中抗体を検討したところ、GM1やGalNAc-GD1aそれぞれについては抗体

活性がみられないかきわめて低いが、両者の混合抗原に強い反応がみられ、GM1/GalNAcGD1a複合体抗体陽性と判断される例が数%あることがわかった⁹⁾。抗GM1/GalNAc-GD1a抗体陽性GBS10例の検討では、ほとんどが純粋運動型GBSであり、生理的圧迫部位ではなく運動神経幹中間部に、病初期から伝導ブロックが10例中5例に見られた。Haddenらの判定基準¹⁰⁾では、10例中4例が脱髄型で2例が軸索型、Hoらの基準¹¹⁾では4例が脱髄型で3例が軸索型であった。ただ、この抗体陽性例の伝導ブロックは治療後早期に回復し、経過を通じて再髄鞘化を示す所見に乏しいことからRanvier絞輪部における軸索機能障害による可逆性伝導障害の可能性が考えられる。運動神経Ranvier絞輪部軸索膜に集簇して存在するGM1, GalNAc-GD1aが複合体を形成し純粋運動型GBSの標的抗原となっている可能性がある。

CapassoらはGBSのひとつの型としてacute motor conduction block neuropathy (AMCBN) という概念を提唱し¹²⁾、GM1などのガングリオンド抗体との関連も述べているが、GM1抗体陽性の多くは軸索障害型でAMCBNの病型を示す例は少数である。したがってGM1/GalNAc-GD1a抗体はAMCBNの病型により強く関連する抗体と考えられる。

3. GQ1bを構成要素に含む複合体に対する抗体

FSでは前述のようにGQ1bに対する抗体が90%以上の頻度で見られる。そしてGQ1bと同じ糖鎖末端をもつGT1aにも交差反応を示すことが多い。しかし、GBSにおけるガングリオンド複合体抗体の存在を考え、GQ1bあるいはGT1aに他のガングリオンドを混合した抗原と血清との反応を検討したところ、GQ1bあるいはGT1aを含むGSCに対する反応がGQ1bやGT1aそのも

のよりも強い（すなわち GSC に対して特異性をもつ）抗体が約半数に認められることがわかった¹³⁾。そして多数例の検討から FS や眼球運動麻痺を伴う GBS における抗ガングリオシド抗体は反応特異性の点から、(1) GQ1b や GT1a に特異的な抗体、(2) GQ1b/GM1 あるいはそれと同様に末端糖鎖がジシアロシル基と Gal-GalNAc 基の組み合わせとなる GSC (GQ1b/GM1, GQ1b/GD1b, GT1a/GM1, GT1a/GD1b) 特異的抗体、(3) GQ1b/GD1a あるいはそれと同様に末端糖鎖がジシアロシル基とシアロシル Gal-GalNAc 基の組み合わせとなる GSC (GQ1b/GD1a, GT1a/GD1a, GQ1b/GT1b, GT1a/GT1b) 特異的抗体の3つに分類されることが明らかとなった (図 2)¹⁴⁾。また GQ1b/GA1 を認識する抗体も報告されている¹⁵⁾。

FS では GQ1b が重要な標的抗原であることは間違いないが、症例によっては血中抗体が細胞膜上で GQ1b と GM1 あるいは GD1a が形成した GSC をより強く認識する場合があるわけである。臨床症状をみると、抗 GQ1b/GM1 抗体陽性例では感覚障害の少ない傾向が見られるが^{13,14)}、抗体の反応性の違いがどのような臨床的意義をもつかは今後の検討が必要である。

B. ガングリオシド複合体抗体の産生機序

GBS および関連疾患におけるガングリオシド抗体の産生機序としては、先行感染の病原因子のもつ糖鎖がガングリオシドに類似しており、先行感染因子に対する免疫反応の結果抗ガングリオシド抗体が産生されるという「分子相同性機序」が提唱されている。Kuijff らは、GM1/GD1a 抗体や GQ1b/GD1a 抗体が、先行感染の原因となった *Campylobacter jejuni* のリポオリゴ糖と交差反応したことを報告した¹⁶⁾。このことは、GSC に対する抗体もガングリオシド抗体と同様の機序で

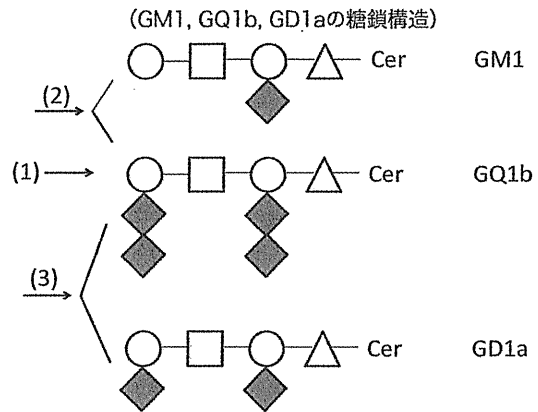


図2 Fisher 症候群 (FS) の血中抗体の反応特異性
FS の血中抗体は (1) GQ1b に特異的に反応する抗体、(2) GQ1b と GM1 の形成する複合体により強く反応する抗体、(3) GQ1b と GD1a の形成する複合体により強く反応する抗体、の3種類に大別される。
○: ガラクトース, □: N-アセチルガラクトサミン, △: グルコース, ◆: シアル酸, Cer: セラミド

産生されることを示唆しているが、直接的な証明は今後の課題である。

C. 他のニューロパチーにおけるガングリオシド複合体抗体

Nobile-Orazio らは、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP)、多巣性運動ニューロパチー、IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチー (PN-IgM)、などの慢性ニューロパチーにおけるガングリオシド複合体に対する抗体を検討した。その結果、34 例の CIDP 中 1 例において GT1b/GM1 および GT1b/GM2 に対する IgM 抗体を、23 例の PN-IgM 中 1 例に GM2/GD1b に対する IgM 抗体をそれぞれ検出したと報告している¹⁷⁾。陽性率は低いが、GBS 以外の免疫性ニューロパチーにおいてもガングリオシド複合体が標的となり得ることが示されたわけである。

D. 単独のガングリオシドに特異的な抗体と複合体の反応

異なる2つのガングリオシドが相互作用で新たなエピトープを作っていることは、あるガングリオシド特異的抗体の反応が当該ガングリオシドと他のガングリオシドが形成したGSCに対して弱くなることから支持される。

ルーチンの抗体測定でGD1bに対するIgG抗体のみがみられたGBS血清について、GD1bに他のガングリオシドを加えた混合抗原に対する反応をみたところ、GM1を加えても反応の強さは変わらなかったが、GD1a, GT1a, GalNAc-GD1aなどを加えると反応が著明に減弱した¹⁸⁾。したがってGD1bの糖鎖はそれらのガングリオシドの糖鎖と相互作用してコンフォメーションを変化させやすいと考えられる。

GD1b抗体は従来から運動失調との関連が報告されているが¹⁹⁾、同抗体陽性例全例が運動失調を伴うわけではなく、その理由は不明であった。前記のGD1b抗体の反応性の減弱の程度を、運動失調を伴う例と伴わない例で比較したところ、伴う例では有意に減弱の程度が強かった¹⁸⁾。運動

失調を伴うGBSでみられるGD1b抗体は、GD1bに対する特異性がきわめて高く、GD1bのわずかな三次元的コンフォメーションの変化によって反応できなくなったと考えられ、この特異性の違いが運動失調を伴うか伴わないかに関連することが示唆された。

単独のガングリオシドに対する抗体の反応が、他のガングリオシドが共存することにより減弱することは、上記のGQ1b抗体についてもみられており¹⁴⁾、またGM1抗体について他のグループからも報告されている²⁰⁾。

E. 今後の検討課題

GSCに対する反応性の検証を行うことにより、ガングリオシド抗体の診断マーカーとしての有用性は向上する。GBSでこれまでに報告された代表的なGSCs抗体を表1に示す。GSC抗体の発見以来、我々の研究室では重症例と関連するGD1a/GD1b抗体をGBSではルーチンに測定し、その他のGSCに対する抗体も適宜測定している。今後さらに新たなGSCが見出される可能性がある。それらを含めて、GSCの神経系における局

表1 GBSおよび関連疾患における代表的ガングリオシド複合体抗体

抗原	疾患	頻度 (%)	臨床病型
GD1a/GD1b	GBS	7	重症 GBS
GD1b/GT1b	GBS	6	重症 GBS
GM1/GalNAc-GD1a	GBS	4	純粹運動型 GBS AMCBN
GQ1b/GM1 および 関連する GSCs	FS	41	感覚障害が少ない
GQ1b/GD1a および 関連する GSCs	GBS with OP	28	
	FS	6	
	GBS with OP	19	

GSC: ganglioside complex, GBS: Guillain-Barré syndrome, FS: Fisher syndrome

AMCBN: acute motor conduction block neuropathy

OP: ophthalmoplegia

GQ1b/GM1 および関連する GSCs: GQ1b/GM1, GQ1b/GD1b, GT1a/GM1, GT1a/GD1b

GQ1b/GD1a および関連する GSCs: GQ1b/GD1a, GT1a/GD1a, GQ1b/GT1b, GT1a/GT1b

在の解明やGSCs抗体による神経障害の動物モデル作成も必要であろう。

また最近の研究でGSCは単独グングリオシドよりも細胞内情報伝達に強い影響を及ぼす可能性が指摘されている²¹⁾。したがってGSC抗体による神経障害については、補体活性化を介する傷害だけではなく、神経細胞機能の直接的障害やアポトーシス²²⁾などのメカニズムも今後検討する必要があるであろう。

文献

- 1) Van Doorn P, Ruts L, Jacobs B. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol.* 2008; 7: 939-50.
- 2) Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1780: 441-4.
- 3) Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: mini-review. *J Neuroimmunol.* 2010; 223: 5-12.
- 4) Chiba A, Kusunoki S, Obata H, et al. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: Clinical and immunohistochemical studies. *Neurology.* 1993; 43: 1911-7.
- 5) Hakomori S. The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 225-32.
- 6) Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997; 387: 569-72.
- 7) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, et al. Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol.* 2004; 56: 567-71.
- 8) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, et al. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol.* 2007; 182: 212-8.
- 9) Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, et al. GM1/GalNAc-GD1a complex: A target for pure motor Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 2008; 71: 1683-90.
- 10) Hadden RDM, Cornblath DR, Hughes RA, et al. Electrophysiological classification of Guillain-Barré syndrome: clinical associations and outcome: Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group. *Ann Neurol.* 1998; 44: 780-8.
- 11) Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain.* 1995; 118: 597-605.
- 12) Capasso M, Caporale CM, Pomilio F, et al. Acute motor conduction block neuropathy: another Guillain-Barré syndrome variant. *Neurology.* 2003; 61: 617-22.
- 13) Kaida K, Kanzaki M, Morita D, et al. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77: 1043-6.
- 14) Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, et al. Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79: 1148-52.
- 15) Ogawa G, Kaida K, Kusunoki S, et al. Antibodies to ganglioside complexes consisting of asialo-GM1 and GQ1b or GT1a in Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neuroimmunol.* 2009; 214: 125-7.
- 16) Kuijf, ML, Godschalk, PC, Gilbert, M, et al. Origin of ganglioside complex antibodies in Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol.* 2007; 188: 69-73.
- 17) Nobile-Orazio E, Giannotta C, Briani C. Anti-ganglioside complex IgM antibodies in multifocal motor neuropathy and chronic immune-mediated neuropathies. *J Neuroimmunol.* 2009; 219: 119-22.
- 18) Kaida, K, Kamakura, K, Ogawa, G, et al. GD1b-specific antibody induces ataxia in Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 2008; 71: 196-201.
- 19) Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, et al. Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol.* 1996; 39: 424-31.
- 20) Greenshields KN, Halstead SK, Zitman FM, et al. The neuropathic potential of anti-GM1 autoantibodies is required by the local glycolipid environment in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119:

- 595-610.
- 21) Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, et al. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 1925-30.
- 22) Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. Exp Neurol. 2008; 209: 279-83.

GQ1b-seronegative Fisher syndrome: clinical features and new serological markers

Michiaki Koga · Michel Gilbert · Masaki Takahashi ·
Jianjun Li · Koichi Hirata · Takashi Kanda ·
Nobuhiro Yuki

Received: 26 September 2011 / Revised: 5 December 2011 / Accepted: 8 December 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract IgG anti-GQ1b antibodies are a powerful serological marker for the diagnosis of Fisher syndrome (FS), but little is known regarding serological markers in FS patients that do not have the autoantibodies. The authors analyzed IgG antibodies against gangliosides other than GQ1b, ganglioside complexes, and ganglioside-like lipo-oligosaccharide (LOS) of *Campylobacter jejuni* isolates from FS patients. We identified 24 (12%) patients with GQ1b-seronegative FS among 207 FS patients who had been referred to our laboratory for anti-ganglioside antibody testing. Patients with GQ1b-seronegative FS were male and had a history of antecedent gastrointestinal illness

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00415-011-6360-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Koga (✉) · T. Kanda
Department of Neurology and Clinical Neuroscience,
Yamaguchi University Graduate School of Medicine,
Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan
e-mail: kogamrk@yamaguchi-u.ac.jp

M. Koga · K. Hirata · N. Yuki
Department of Neurology, Dokkyo Medical University,
Tochigi, Japan

M. Gilbert · J. Li
Institute for Biological Sciences, National Research
Council Canada, Ottawa, ON, Canada

M. Takahashi
Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan
Institute of Public Health, Tokyo, Japan

N. Yuki (✉)
Departments of Microbiology and Medicine,
National University of Singapore, Science Drive 2,
Block MD4A, Level 5, Singapore 17597, Singapore
e-mail: miccyuki@nus.edu.sg

more frequently than FS patients with IgG anti-GQ1b antibodies. Other clinical features during the illness were not distinguishing for GQ1b-seronegative FS. Four (17%) of 24 patients with GQ1b-seronegative FS had IgG antibodies against single gangliosides such as GM1b, GD1a, or GT1a. Antibodies against GM1 and GT1a complex were detected in four GQ1b-seronegative FS patients, three of whom did not have antibodies against single gangliosides. Mass spectrometry analysis showed that *C. jejuni* isolates from FS patients had GD1c-, GalNAc-GM1b-, or GalNAc-GD1c-like LOS, and not GQ1b-like LOS, highlighting the utility of examining serum antibodies against these ganglioside mimics in GQ1b-seronegative FS patients. Seven (29%) had IgG antibodies against the LOS from *C. jejuni* strains expressing GD1c-, GalNAc-GM1b-, or GalNAc-GD1c-like LOS. These findings suggest that IgG antibodies against GM1b, GD1c, GalNAc-GM1b, and ganglioside complexes are serological markers for GQ1b-seronegative Fisher syndrome.

Keywords Fisher syndrome · Anti-GQ1b antibody · *Campylobacter jejuni* · Ganglioside complex · Lipo-oligosaccharide

Introduction

Fisher syndrome (FS) is the most common clinical variant of Guillain-Barré syndrome (GBS) characterized by acute onset of ophthalmoplegia, ataxia, and areflexia. A landmark study identified IgG autoantibodies against GQ1b ganglioside as a serological marker in FS [1], and subsequent studies estimated the highly frequent detection of the antibodies between 83 and 100% of FS patients [2–4]. From a serological point of view, FS is much more uniform

than the axonal subtype of GBS associated with IgG autoantibodies to GM1, GM1b, GD1a, or GalNAc-GD1a [5, 6]. It has been found that a mixture of two gangliosides (ganglioside complex) can generate new epitopes that differ from those of the constituents and may be targeted by serum autoantibodies from FS patients [7]. However, little effort has been made to identify novel autoantibodies in the minority of FS patients that are negative for anti-GQ1b antibodies.

Our prospective case–control study has shown that *Campylobacter jejuni* is the most frequently identified antecedent agent in FS [8]. A GQ1b-mimicking structure on the bacteria is hypothesized to be the key trigger for the generation of anti-GQ1b antibodies in *C. jejuni*-related FS. Unexpectedly, however, several *C. jejuni* isolates from FS patients did not express GQ1b-like lipo-oligosaccharide (LOS), and instead expressed GT1a-, GD3-, or GD1c-like LOS (Fig. 1) [8–11]. These findings led us to hypothesize that ganglioside-like LOS other than GQ1b-like LOS could trigger the production of unidentified pathogenic autoantibodies in GQ1b-seronegative patients and induce the development of FS.

In the present study, we retrospectively selected FS patients negative for IgG anti-GQ1b antibodies and investigated their clinical features. We analyzed IgG antibodies against other single gangliosides, ganglioside complexes, and ganglioside-like LOS of several *C. jejuni* isolates from FS patients in order to identify serological markers for anti-GQ1b antibody-negative FS patients.

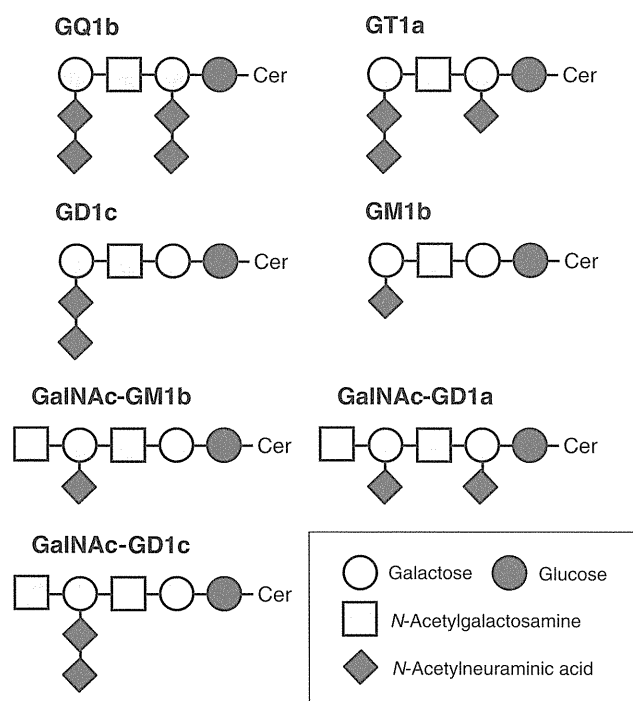


Fig. 1 Carbohydrate sequence of the gangliosides, Cer ceramide

Methods

Patients

We received requests to test serum anti-ganglioside antibodies from 207 patients presenting with FS from February 2000 to July 2002. All patients fulfilled the clinical criteria, which included (1) progressive, relatively symmetric ophthalmoplegia and ataxia for 4 weeks, (2) hyporeflexia or areflexia, (3) preserved limb strength (five or four on the Medical Research Council scale), and (4) features that rule out the other diagnoses such as vascular disease involving the brainstem, Wernicke encephalopathy, botulism, myasthenia gravis, brainstem tumor, pituitary apoplexy, acute disseminated encephalomyelitis, multiple sclerosis, neuro-Behçet disease, vasculitis, lymphoma, and Creutzfeldt–Jakob disease [4]. One of the authors (M.K.) reviewed the patients' medical records to ascertain diagnoses and neurological findings. Pretreatment serum samples were obtained during the acute phase of the illness. Sera from 40 healthy individuals were used as healthy controls (HC) and sera from 34 patients with neurodegenerative, metabolic, or vertebral diseases as disease controls (DC). Informed consent was provided by all participants for serological analyses. The study protocol was approved by the local Ethic Committee at Dokkyo Medical University.

Anti-ganglioside antibody testing and infectious serology

Serum IgG antibodies against isolated gangliosides (GM2, GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, or GQ1b; 10 pmol/well) were measured by ELISA as previously described [12]. Sera were considered positive if the optical density (OD) was 0.5 or more at a serum dilution of 1:500. IgG antibodies to GM1 and GT1a complex (GM1/GT1a) were similarly tested using a mixture of GM1 and GT1a (each 5 pmol/well) as the target antigen. Anti-GM1/GT1a antibodies were judged positive if the OD of anti-GM1/GT1a antibodies was 0.5 greater than the sum of ODs of GM1 and GT1a assayed individually. Antibodies against other combinations of gangliosides (GM1/GD1a, GM1/GQ1b, GD1a/GT1a, GD1a/GQ1b, or GT1a/GQ1b) were similarly analyzed. By these criteria, none of the sera from 40 HC and 34 DC were positive for anti-ganglioside complex antibodies. Antecedent *C. jejuni* and *Haemophilus influenzae* infections were serologically examined as described [8].

Mass spectrometry analysis of *C. jejuni* isolates

Four *C. jejuni* strains (GC033, GC068, GC149, and GC219) isolated from patients with FS with or without

overlapping GBS were used for LOS antibody analysis. Three patients were positive for IgG anti-GQ1b antibodies, and one (with strain GC149) was negative. These strains were used for anti-LOS antibody testing because they have defined ganglioside mimics in their LOS outer cores. All of these strains were included in our previous study [13], and the LOS outer core structures have been reported for two of them: GC149 [14–16] and GC033 [10, 17, 18]. The LOS outer core structures of GC068 and GC219 were determined in this work. Overnight growth of the strains on an agar plate was done as described [19], except that we used 60 µg/ml proteinase K, 200 µg/ml RNase A, and 100 µg/ml DNase I. The *O*-deacylated LOS sample was analyzed by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry (CE–ESI–MS), as described [20]. Classification of the LOS biosynthesis gene locus and *cst-II* genotype (Thr/Asn 51) were performed as described [13, 15].

Anti-*C. jejuni* LOS antibody testing

Serum IgG antibodies against *C. jejuni* LOS were examined by ELISA using crude LOS fractions [21]. Briefly, *C. jejuni* was grown at 37°C for 48 h on blood agar plates in a 5% oxygen, 10% carbon dioxide atmosphere. The bacterium then was suspended in sterile PBS and adjusted to an OD of 0.4 at 650 nm. A 1.5 ml aliquot of the suspension was centrifuged at 14,000 *g* for 1.5 min, and the pellets were resuspended in 300 µl of distilled water. This suspension was boiled for 10 min, cooled, 100 µg of proteinase K (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) was added, and the suspension was incubated at 60°C for 60 min. Thereafter, 0.5 µl of this lysate was mixed with 50 µl methanol and then dried in a microtiter plate. Patient sera were diluted 1:500 with PBS containing 0.5% casein then added to the wells, after which the plate was incubated overnight at 4°C. After washing (0.05% Tween 20 in PBS), peroxidase-conjugated anti-human IgG (Dako, Glostrup, Denmark; 1:1,000) was added. Plates were kept at 20°C for 2 h prior to developing. Serum was considered positive when antibody OD was 1.0 or more.

Statistical analyses

Differences in frequency between the groups were analyzed using the Fisher exact test. Differences in medians were examined by the Mann–Whitney *U* test. Differences were considered significant for two-sided *P* values < 0.05. Statistical calculations were made with SPSS 19 software (IBM Japan Ltd, Tokyo, Japan).

Results

FS patients negative for anti-GQ1b IgG antibodies

Among the 207 FS patients, 24 (12%) were negative for IgG anti-GQ1b antibodies [GQ1b-seronegative FS; median age, 56 years (range, 6–74); male/female, 22/2] (Table 1). None of the 24 patients had IgM anti-GQ1b antibodies. Twenty-three (96%) patients reported antecedent infectious symptoms indicative of respiratory tract infection [$N = 15$ (63%)] or gastroenteritis [$N = 7$ (29%)]. Serological evidence of recent *C. jejuni* infection was found in three (13%) GQ1b-seronegative FS patients, and none had evidence of *H. influenzae* infection. The most frequent initial symptom was diplopia ($N = 13$ [54%]), followed by gait disturbance [$N = 8$ (33%)]. As in typical FS with anti-GQ1b antibodies, external ophthalmoparesis was abduction-predominate [9/20 (45%)], and frequently accompanied neurological deficits seen during the acute phase of illness were objective sensory disturbance [13/23 (54%)], mydriasis [6/14 (43%)], bulbar palsy [7/23 (29%)], and facial palsy [6/24 (25%)]. CSF albuminocytological dissociation was seen in 70% (14/20) of the GQ1b-seronegative FS patients.

Due to the difficulty of retroactively obtaining data from the patients included in this study, clinical features of the patients with GQ1b-seronegative FS were compared to those of GQ1b-positive FS patients included in our previous study [22]. Statistical analysis showed that patients with GQ1b-seronegative FS more frequently were male [$P = 0.002$, odds ratio (OR) 7.3, 95% confidence interval (CI) 2.0–27] and had a history of antecedent gastrointestinal symptoms ($P = 0.02$, OR 3.7, 95% CI 1.3–10.3) (Table 1). A history of antecedent upper respiratory infectious symptoms ($P = 0.02$, OR 0.26, 95% CI 0.10–0.71) and the onset of diplopia ($P = 0.046$, OR 0.38, 95% CI 0.15–0.96) were rarer in GQ1b-seronegative FS, but the frequencies of neurological features during the illness did not differ between the groups.

Ganglioside mimics of FS-related *C. jejuni* LOS

As mentioned above, GT1a-, GD3-, or GD1c-like LOS have been identified in *C. jejuni* isolates from FS patients (Fig. 1) [8–11], whereas GQ1b-like LOS has not been identified. We used four FS-related *C. jejuni* strains with defined LOS outer core structures for the serological analyses described below. *C. jejuni* GC033 was reported to display a GD1c mimic [10]. *C. jejuni* GC149 was shown to express a mixture of ganglioside mimics through phase variation [16], and GC149 can display mimics of GD3, GT3, GQ3, GT1a, and Gal-GM1a in its LOS outer core

Table 1 Comparison of clinical features between Fisher syndrome patients with and without IgG anti-GQ1b antibodies

	IgG anti-GQ1b antibodies		Two-sided <i>P</i> value
	Negative <i>N</i> = 24	Positive <i>N</i> = 110 ^a	
Age: median (range)	56 (6–74)	41 (2–78)	NS
Sex: male/female	22/2	66/44	0.002
Prior symptoms			
Any	23/24 (96%)	–	–
URTI	15/24 (63%)	95/110 (86%)	0.02
GI	7/24 (29%)	11/110 (10%)	0.02
Initial symptoms			
Diplopia	13/24 (54%)	83/110 (75%)	0.046
Gait disturbance	8/24 (33%)	36/110 (32%)	NS
Dysarthria	2/24 (8.3%)	4/110 (3.6%)	NS
Blepharoptosis	1/24 (4.2%)	3/110 (2.7%)	NS
Neurological features during the illness			
Abduction-predominance of EOP	9/20 (45%)	ND	–
IOP	6/14 (43%)	41/110 (37%)	NS
Nystagmus	4/10 (40%)	16/110 (16%)	NS
Facial palsy	6/24 (25%)	25/110 (23%)	NS
Bulbar palsy	7/24 (29%)	20/100 (20%)	NS
Sensory disturbance	13/23 (54%)	55/99 (56%)	NS
Autonomic disturbance	1/23 (4.3%)	ND	–
<i>Campylobacter jejuni</i> serology	3/24 (13%)	ND	–
<i>Haemophilus influenzae</i> serology	0/24	ND	–
Albuminocytologic dissociation in CSF	14/20 (70%)	62/94 (66%)	NS

NS not significant, URTI upper respiratory tract infectious symptoms, GI gastrointestinal infectious symptoms, EOP external ophthalmoparesis, ND not described, IOP internal ophthalmoparesis, CSF cerebrospinal fluid

^a Reported previously [22]

(Table 2). Mass spectrometric analysis of *O*-deacylated samples was used to propose LOS outer core structures for strains GC068 and GC219 (Table 2). The mass species observed for strain GC068 are consistent with mixed GD1c-, GalNAc-GM1b-, and GalNAc-GD1c-like structures in the LOS outer core (Supplemental Table 1). The mass species observed for strain GC219 are consistent with an LOS outer core displaying a GalNAc-GM1b-like structure (Supplemental Table 1). LOS from these four FS-related *C. jejuni* strains (GC033, GC068, GC149, and GC219) were used as antigens for the following serological analyses of GQ1b-seronegative FS patients and control groups.

Serological analyses

IgG antibodies against single gangliosides other than GQ1b were detected in 4 (17%) of the 24 patients with GQ1b-seronegative FS (Table 3). Anti-GT1a and anti-GM1b antibodies were detected in two patients, each one of whom showed isolated elevation of the antibodies (Nos. 3 and 4 in Table 4). Antibodies against ganglioside complexes were

positive in four (17%) of the GQ1b-seronegative FS patients, three of whom were negative for antibodies against all single gangliosides examined. Among anti-ganglioside complex antibodies, anti-GM1/GT1a antibodies were detected in all four patients positive for anti-ganglioside complex antibodies.

IgG antibodies against *C. jejuni* LOS from the four strains with defined structures were positive in seven (29%) of the 24 GQ1b-seronegative FS patients, and slightly above that of HC (5/40 [13%]; $P = 0.11$) (Table 3). Three of the seven patients with anti-LOS antibodies were negative for antibodies against all single gangliosides and ganglioside complexes. Patient IgG reacted with a variety of GalNAc-GM1b-like structures (six [25%] of 24 patients with GQ1b-seronegative FS versus 5/40 [13%] in HCs; $P = 0.30$), mixed GD1c- and GalNAc-GM1b-like structures (four [17%] versus two [5%]; $P = 0.19$), mixed GD3-, GT1a-, GT3-, GQ3-, Gal-GM1a-like structures (four [17%] versus zero [0%]; $P = 0.02$; OR, 17.8; 95% CI, 2.1–147), and GD1c-like structures (three [13%] versus one [2.5%]; $P = 0.14$). Four (12%) DC sera were scored

Table 2 Lipo-polysaccharide structures of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with Fisher syndrome with or without overlapping Guillain–Barré syndrome

<i>C. jejuni</i>	Serogroup (serotype)	LOS biosynthesis class ^a	<i>cst-II</i> genotype	Ganglioside-mimic of LOS	Patient's diagnosis	IgG anti-ganglioside Ab titers ^b in patients	
						GQ1b	Others
GC033	D ^c	A	Asn51	GD1c	FS	32,000	GT1a (32,000)
GC219	HS:2	B	Asn51	GalNAc-GM1b	FS	8,000	GT1a (16,000)
GC068	HS:2	Unclassified	–	GD1c, GalNAc-GM1b, and GalNAc-GD1c	FS/GBS	32,000	GD1a/GT1a/GT1b (8,000)
Gc149	HS:1	R	Asn51	GD3, GT3, GT1a, GQ3, and Gal-GM1a	FS	(–)	(–)

LOS lipo-oligosaccharide, Ab antibody, FS Fisher syndrome; GBS Guillain–Barré syndrome; NT not tested

^a Classified based on the organization of gene content in LOS biosynthesis locus

^b Tested antigens were GM2, GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GT1a, and GT1b gangliosides (cut-off < titer less than 500)

^c HS:4, HS:13, HS:16, HS:43, HS:50

Table 3 Summary of serological findings

IgG antibodies against	Fisher syndrome IgG anti-GQ1b antibodies		DC <i>N</i> = 34	HC <i>N</i> = 40	Two-sided <i>P</i> value	
	Negative <i>N</i> = 24	Positive <i>N</i> = 30 ^d			GQ1b-seronegative vs DC	GQ1b-seronegative vs HC
Isolated ganglioside (non-GQ1b) ^a	4 (17%)	29 (97%)	0	0	0.03 ^e	0.02 ^h
Ganglioside complex ^b	4 (17%)	15 (50%)	0	0	0.03 ^f	0.02 ⁱ
<i>Campylobacter</i> lipo-oligosaccharide ^c	7 (29%)	29 (97%)	4 (12%)	5 (13%)	NS	NS
Any	10 (42%)	30 (100%)	4 (12%)	5 (13%)	0.01 ^g	0.01 ^j

DC disease control, HC healthy control, NS not significant

^a Tested antigens were GM2, GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GT1a, and GT1b gangliosides

^b Tested antigens were GM1/GD1a, GM1/GT1a, GM1/GQ1b, GD1a/GT1a, GD1a/GQ1b, and GT1a/GQ1b complexes

^c Tested antigens were GD1c-, GalNAc-GM1b-, mixed GD1c/GalNAc-GM1b-, and mixed GD3/GT1a/GT3/GQ3-mimicking lipo-oligosaccharides of *Campylobacter jejuni* isolates (GC033, GC219, GC068, and GC149, respectively) from patients with Fisher syndrome with or without overlapping Guillain–Barré syndrome

^d Selected at random from 183 patients with GQ1b-seropositive Fisher syndrome

^e Odds ratio (OR) 15.1, 95% confidence interval (CI) 1.7–130.3

^f OR 15.1, 95% CI 1.7–130.3

^g OR 5.4, 95% CI 1.4–20.0

^h OR 17.8, 95% CI 2.1–147.7

ⁱ OR 17.8, 95% CI 2.1–147.7

^j OR 5.0, 95% CI 1.4–17.3

positive for antibodies against GC068 LOS [mixed-GD1c/GalNAc-GM1b/GalNAc-GD1c-mimics], and none of the DC sera for the other LOS.

Clinical features of FS patients negative for IgG antibodies to GQ1b, but positive for antibodies against other gangliosides and *C. jejuni* LOS

All seven GQ1b-seronegative but anti-ganglioside (single ganglioside or ganglioside complex) IgG-positive patients

were male, although other clinical features, including antecedent infectious symptoms and neurological deficits, were unremarkable (Tables 4 and 5). Similar unremarkable clinical findings were common in the GQ1b-seronegative, *C. jejuni* ganglioside-like LOS-seropositive FS patients. These findings suggest that clinical features are not helpful in identifying GQ1b-seronegative FS patients with other anti-ganglioside antibodies. It is noteworthy that histories of antecedent gastrointestinal symptoms were available for only two of seven ganglioside-like

Table 4 Patients with GQ1b-seronegative Fisher syndrome who showed seropositive results for other antibodies

No	Age/ sex	Accident symptom	Infectious serology	IgG antibodies against		
				Isolated ganglioside	Ganglioside complex	Ganglioside-like LOS ^c
1	19/M	GI	(-)	GT1a, GM1b	(-)	GC033, GC068, and GC149
2	28/M	(-)	<i>C. jejuni</i>	GD1a, GalNAc-GD1a	(-)	GC033, GC219, GC068 and GC149
3	60/M	Fever	(-)	GT1a	GM1/GT1a, GM1/GQ1b	GC219, and GC149
4	63/M	Chill	(-)	GM1b	(-)	(-)
5	15/M	GI, URTI, fever	<i>C. jejuni</i>	(-)	GM1/GT1a, GM1/GQ1b	(-)
6	24/M	GI, URTI, fever	(-)	(-)	GM1/GT1a, GM1/GQ1b	GC219
7	54/M	URTI, fever	(-)	(-)	GM1/GT1a	(-)
8	22/M	URTI, fever	<i>C. jejuni</i>	(-)	(-)	GC033, GC219, and GC149
9	48/F	Fever, joint pain	(-)	(-)	(-)	GC219, GC068
10	28/M	URTI	(-)	(-)	(-)	GC068

GI gastrointestinal infection, URTI upper respiratory tract infection, LOS lipo-oligosaccharide

^a Tested antigens were GM2, GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GT1a, and GT1b gangliosides

^b Tested antigens were GM1/GD1a, GM1/GT1a, GM1/GQ1b, GD1a/GT1a, GD1a/GQ1b, and GT1a/GQ1b complexes

^c Tested antigens were LOSs from *Campylobacter jejuni* isolates GC033 (GD1c-like), GC219 (GalNAc-GM1b-like), GC068 (mixed GD1c/GalNAc-GM1b/GalNAc-GD1c-like), and GC149 (mixed GD3/GT1a/GT3/GQ3/Gal-GM1a-like) from patients with Fisher syndrome with or without overlapping Guillain-Barré syndrome

Table 5 Neurological features of the patients described in Table 4

No	Initial symptom	Ophthalmoparesis		Ptosis	FP	BP	Sensory disturbance	Ataxia	Others
		External	Internal						
1	Nasal voice	Only abduction disturbance	(+)	ND	(-)	(+)	Vibration↓	Truncal	-
2	Gait disturbance	Only abduction disturbance	ND	ND	(-)	(-)	(-)	Truncal	Good recover (without treatment)
3	Double vision	Total	(-)	(+)	(+)	(+)	Vibration↓	Unknown in detail	Neurological onset after lung cancer operation
4	Double vision	Abduction and upgaze disturbance	ND	ND	(-)	(-)	(-)	Limb, truncal	-
5	Double vision, Gait disturbance	Abduction-dominant	(+)	ND	(-)	(+)	(-)	Limb, truncal	Good recovery after IAT
6	Double vision	Only abduction disturbance	ND	ND	(-)	(-)	Distal dysesthesia	Unknown in detail	Relapse (first onset, 14 years old), good recovery after IVIg
7	Double vision	Unknown in detail	ND	ND	(-)	(-)	(-)	Truncal	-
8	Gait disturbance	Abduction-dominant	(-)	ND	(-)	(+)	Distal hypesthesia	Truncal	-
9	Ptosis, Gait disturbance	Unknown in detail	(+)	(+)	(+)	(-)	Distal hypesthesia	Truncal	Good recovery (without treatment)
10	Gait disturbance	Abduction-dominant	ND	ND	(-)	(-)	Distal paresthesia	Truncal	-

FP facial palsy, BP bulbar palsy, ND not described, IAT immunoadsorption therapy, IVIg intravenous immunoglobulin

LOS-reactive patients, and that serological evidence of recent *C. jejuni* infection was also shown in other two patients. This indicates that detecting anti-*C. jejuni* LOS

antibodies was not due to cross-reaction with *C. jejuni* protein, which was used as antigen in serological assays for this infection, and that GD1c and GalNAc-GM1b-like