

ギラン・バレー症候群を惹起するインフルエンザ桿菌  
の外膜糖質構造の特徴

(課題番号 13670631)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

千葉大学附属図書館

平成 15 年 3 月



20003814405

研究代表者 服部孝道

(千葉大学大学院医学研究院教授)

## はしがき

ギラン・バレー症候群は 20 世紀初頭の Guillain と Barré による疾患概念の確立以来、先行感染の存在、髄液の蛋白細胞解離や髄液中オリゴクローナルバンドの存在、免疫性治療の有効性などから自己免疫疾患であることが徐々に明らかになってきていたが、その詳細な発症機序は長年不明であった。

一方、従来、末梢神経の脱髄性疾患とされてきたギラン・バレー症候群に、軸索障害を主体とする軸索型ギラン・バレー症候群が存在することが明らかになったのは 1986 年の Feasby らの報告以降である。当初、異論の多かったこの軸索型ギラン・バレー症候群は Griffin らによる中国における精力的な病理学的検討によりその存在は確固たるものとなり、ギラン・バレー症候群は従来どおり、脱髄を主体とする acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP) と acute motor axonal polyneuropathy (AMAN) に大別されることがわかってきた。

この AMAN に関しては主として本邦の研究者たちによりここ十数年で、その病態機序の解明が飛躍的に進んだ。特に Yuki らによる先行感染因子の一つであるキャンピロバクター・ジェジュニ菌に関する研究はギラン・バレー症候群のみならず免疫性疾患全体の解明に大きな足跡を残した。それまでにギラン・バレー症候群の先行感染因子の一つとして、特に先行する胃腸炎の原因の一つに、キャンピロバクター・ジェジュニ菌があることは知られていた。また、一部のギラン・バレー症候群の急性期患者血清中に糖脂質の一つである GM1 に対する抗体が存在することは明らかになっていた。彼はキャンピロバクター・ジェジュニ菌感染後で、抗 GM1 抗体を有する軸索型ギラン・バレー症候群の

症例を経験し、それを契機として、キャンピロバクター菌感染と抗 GM1 抗体、軸索型ギラン・バレー症候群患者の発症の相関関係を以下のようにして証明していった。まず、キャンピロバクター菌体から抽出したリポ多糖を薄層クロマトグラフィーを用いて展開し、GM1 に特異的に反応するコレラ毒素と反応させることにより、菌体表面上に GM1 様構造があることを示した。さらに核磁気共鳴をもちいた微細構造の解析により確かに菌体表面に GM1 様構造があることを確認し、以下のような仮説を立てた。すなわち、患者がキャンピロバクター菌に感染することにより体内でキャンピロバクターに対する抗体が産生されるが、キャンピロバクター表面上 GM1 様構造に対して抗体が産生されると、神経軸索上の特に神経血液関門が脆弱なランビエ絞輪部にも GM1 が比較的多く存在するため、その GM1 抗体が自己の神経軸索を抗原として働く結果、軸索障害を引き起こし軸索型ギラン・バレー症候群が発症するという説である。これは後に「分子相同性仮説」と呼ばれるようになった。この「分子相同性仮説」はギラン・バレー症候群のみならず糖尿病などでも同じようなメカニズムが想定されている。

このように胃腸炎後、軸索型ギラン・バレー症候群（AMAN）に関してはその発症メカニズムがかなり解明されたが、いくつかの点については謎として残された。代表的なものとして、「（軸索型ギラン・バレー症候群の半数以上は腸炎後でなく呼吸器感染後に発症するのだが）呼吸器感染後軸索型ギラン・バレー症候群の感染因子は何か？」、「その感染因子はキャンピロバクター菌同様に糖脂質様構造を有し、同じように交叉免疫により発症するのか？」といった未解明の問題があった。

我々は呼吸器感染症のうち、リポ多糖を有するグラム陰性桿菌に注

目し、多数のギラン・バレー症候群患者に接することにより、特に成人呼吸器感染を引き起こすインフルエンザ桿菌にたどり着き、1) インフルエンザ桿菌はギラン・バレー症候群の先行感染因子か?、2) とすればインフルエンザ桿菌感染後ギラン・バレー症候群の臨床的・神経生理学的特徴は何か?、3) インフルエンザ桿菌上にも GM1 様構造があるのか、といった諸点に注目し本研究を行った。

今後ともギラン・バレー症候群と発症の引き金となる感染因子とそれによる発症メカニズムに注目し、研究を進める予定である。これらの結果はギラン・バレー症候群のみならず多くの免疫性疾患について病態解明の礎になることが期待される。

この冊子には本研究の成果だけでなく、それに関連した研究の成果も含めることにした。あらためて平成13年度～14年度の科学研究費補助金の助成に対し感謝の意を表したい。また、本研究にあっては千葉大学大学院の病原分子制御学の諸先生方、千葉大学付属病院細菌検査部の皆様には全面的なご協力を頂き、この場を借りて感謝の意を表したい。

## 研究組織

研究代表者：服部 孝道（千葉大学・大学院医学研究院・教授）

研究分担者：森 雅裕（千葉大学・大学院医学研究院・医員）

研究分担者：桑原 聡（千葉大学付属病院・講師）

研究分担者：野田 公俊（千葉大学・大学院医学研究院・教授）

研究分担者：関 宏子（千葉大学・分析センター・助手）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	2,700	0	2,700
平成 14 年度	900	0	900
総計	3,600	0	3,600

## 研究発表

### 1. 学会誌等

#### 英文原著論文

Kuwabara S, Yuki N. (2001) Electrophysiology in Guillain-Barré syndrome associated with anti-ganglioside antibodies: axonal degeneration and reversible physiologic conduction failure. *Advanced in Clinical Neurosciences* 11, 363-378.

Misawa S, Kuwabara S, Mori M, Kawaguchi N, Yoshiyama Y, Hatori T. (2001) Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 56, 666-669.

Mori M, Kuwabara S, Fukutake T, Hatori T. (2001) Natural course and prognosis of Miller Fisher syndrome. *Neurology* 56, 1104-1106.

Kuwabara S, Cappelen-Smith C, Lin S.-Y. C, Mogyoros I, Burke D. (2001) Differences in accommodative properties of median and peroneal motor axons. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70, 372-376.

Kuwabara S, Mori M, Ogawara K, Hattori T, Yuki N. (2001) Indicator of rapid clinical recovery in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg*

Psychiatry 70, 560-562.

Lin CS, Mogyoros I, Kuwabara S, Cappelen-Smith C, Burke D. (2001)  
Differences in responses of cutaneous afferents in the human median and  
sural nerves to ischemia. Muscle Nerve 24, 1503-1509.

Cappelen-Smith C, Kuwabara S, Lin C, Mogyoros I, Burke D. (2001)  
Membrane properties in chronic inflammatory demyelinating  
polyneuropathy. Brain 124, 2439-2447.

Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Mori M, , Hattori T. (2002)  
Distribution patterns of demyelination correlate with clinical profiles in  
chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. J Neurol Neurosurg  
Psychiatry. 72, 37-45.

Kuwabara S, Cappelen-Smith S, Lin C, Mogyoros I, Burke D. (2002) The  
effects of voluntary contraction on peroneal motor axons. Muscle Nerve 25,  
176-184.

Asahina M, Kuwabara S, Suzuki A, Hattori T. (2002) Autonomic function in  
demyelinating and axonal subtypes of Guillain-Barrè syndrome. Acta  
Neurol Scand 105, 44-50.

Sakakibara Y, Mori M, Kuwabara S, Katayama K, Koga M, Yuki N. Hattori  
T. (2002) Unilateral multiple cranial nerve involvement in axonal

Guilain-Barré syndrome. *Muscle Nerve* 25, 297-299.

Lin C, Kuwabara S, Cappelen-Smith C, Burke D. (2002) Responses of human sensory and motor axons to the release of ischaemia and to hyperpolarizing currents. *J Physiol (Lond)* 541, 1025-1039.

Mizobuchi K, Kuwabara S, Toma S, Nakajima Y, Hattori T. (2002) Properties of the human skin mechanoreceptors in peripheral neuropathy. *Clin Neurophysiol* 118, 310-315.

Mori M, Kuwabara S, Fukutake T, Hattori T. (2002) Plasmapheresis and Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72, 680.

Susuki K, Yuki N, Hirata K, Kuwabara S. (2002) Fine specificity of anti-LM1 antibodies in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci* 195, 145-148

Kuwabara S, Kanai K, Ogawara K, Sung J-Y, Hattori T. (2002) Axonal hyperpolarization during acute hypoklema: Multiple excitability measurements as indicators of membrane potential in human axons. *Muscle Nerve* 26, 283-287.

Cappelen-Smith C, Lin C, Kuwabara S, Burke D. (2002) Conduction block during and post ischemia in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 125, 1850-1858.



Kuwabara S, Nakata M, Sung J-Y, Mori M, Hattori T, Koga M, Yuki N. (2002) Hyperreflexia in Guillain-Barrè syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. J Neurol Sci 199,89-92.

Kuwabara S, Ogawara K, Sung J-Y, Mori M, Kanai K, Hattori T, Yuki N, Lin C, Bostock H, Burke D. (2002) Differences in excitability properties of axonal and demyelinating Guillain-Barrè syndromes. Ann Neurol 52, 180-187

Ogawara K, Kuwabara S, Katayama K, Hattori T, Yuki N. (2002) Fisher syndrome or Bickerstaff's brainstem encephalitis? Anti-GQ1b IgG antibody syndrome involving both the peripheral and central nervous systems. Muscle Nerve 26, 845-849.

Mori M, Kuwabara S, Kanesaka M, Hattori T. (2002) Successful immune-treatment for non-paraneoplastic limbic encephalitis. J Neurol Sci. 201,85-88.

Cappelen-Smith C, Kuwabara S, Lin C, Burke D. (2002) Abnormalities of axonal excitability are not generalized in early multifocal motor neuropathy. Muscle Nerve 26, 769-776.

Onodera M, Mori M, Kuwabara S, Koga M, Kamitsukasa I, Hattori T, Yuki N. (2003) Acute isolated bulbar palsy with anti-GT1a antibody subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. J Neurol Sci 205, 83-84.

Kanai K, Kuwabara S, Mori M, Arai K, Yamamoto T, Hattori T. (2003)  
Leucocytoclastic-vasculitic neuropathy associated with chronic Epstein-Barr  
virus infection. *Muscle Nerve* 27, 113-116.

Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, Koga M, Yuki N, Hattori T. (2003)  
Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy  
and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci*

Kanai K, Kuwabara S, Ogawara K, Sung J-Y, Hattori T. (2003) Muscle  
cramp in Machado-Joseph disease: altered axonal excitability properties and  
mexiletine treatment. *Brain* 126, 965-973.

Koga M, Yuki N, Hirata K, Mori M, Kuwabara S. (2003) IgG subclass of  
anti-GM1 antibody: a predictor of recovery in Guillain-Barrè syndrome.  
*Neurology* (in press)

## 2. 口頭発表

### シンポジウム

桑原聡、森雅裕、小河原一恵（2001）Guillain-Barré 症候群の電気生理と病型．第 42 回日本神経学会サテライトシンポジウム

桑原聡、森雅裕、小河原一恵（2001）軸索型 Guillain-Barré 症候群の電気生理．第 11 回日本末梢神経学会（末梢神経 11、35-39）

桑原聡（2002）脱髄性ニューロパチーの電気診断．脱髄における軸索特性の変化．第 35 回日本臨床神経生理学学会（臨床神経生理）

桑原聡、小河原一恵（2002）問題症例の神経伝導・筋電図：Miller Fisher 症候群か Bickerstaff 型脳幹脳炎か？ 第 35 回日本臨床神経生理学学会（臨床神経生理）

### 一般発表

桑原聡、三澤園子、森雅裕、小河原一恵、服部孝道（2001）CIDP において脱髄病変の分布パターンは臨床像・治療反応性と相関する．第 13 回日本神経免疫学会（神経免疫 9、140-141、2001）

三澤園子、桑原聡、川口直樹、森雅裕、吉山容正、服部孝道（2001）CIDP の急性増悪期には血清 tumor necrosis factor- $\alpha$  が上昇する．第 13 回日本

神経免疫学会(神経免疫 9、142-143、2001)

森雅裕、桑原聡、小河原一恵、服部孝道(2001) Enterovirus と脱髄型 Guillain-Barrè 症候群. 第 13 回日本神経免疫学会(神経免疫 9、142-143、2001)

小河原一恵、桑原聡、森雅裕、服部孝道、結城伸泰(2001) 抗 GM1b 陽性、抗 GM1 陰性 Guillain-Barrè 症候群の特徴. 第 13 回日本神経免疫学会(神経免疫 9、116-117、2001)

薄敬一郎、結城伸泰、平田幸一、桑原聡(2001) Guillain-Barrè 症候群における抗 SPG 抗体の fine specificity. 第 13 回日本神経免疫学会(神経免疫 9、124-125、2001)

桑原聡、Sung Jia-Ying、小河原一恵、溝渕敬子、服部孝道(2001) 抗 GM1-陽性 Guillain-Barrè 症候群における神経伝導ブロックの病態機序. 第 42 回日本神経学会総会(臨床神経 )

森雅裕、桑原聡、小河原一恵、服部孝道(2001) Enterovirus と Guillain-Barrè 症候群. 第 42 回日本神経学会総会(臨床神経 )

小河原一恵、桑原聡、森雅裕、服部孝道、結城伸泰(2001) 抗 GM1b 陽性 Guillain-Barrè 症候群の臨床的特徴. 第 42 回日本神経学会総会(臨床神経 )

Sung Jia-Ying、桑原聡、小河原一恵、溝渕敬子、服部孝道(2001) 末梢神経 Na-K ATPase 活性の in vivo 測定. 第 42 回日本神経学会総会(臨床神経 )

朝比奈正人、吉川由利子、鈴木敦也、桑原聡、服部孝道(2001) 慢性および急性炎症性脱髄性ニューロパチーの自律神経障害: 第 42 回日本神経学会総会(臨床神経 )

桑原聡、森雅裕、小河原一恵、服部孝道、結城伸泰(2001) 抗 GM1 抗体陽性軸索型 Guillain-Barré 症候群に対する免疫グロブリン静注療法. 第 19 回日本神経治療学会総会(神経治療 18, 492, 2001)

中田美保、桑原聡、加藤直子、服部孝道、結城伸泰(2001) 腱反射亢進を呈したギラン・バレー症候群. 第 157 回日本神経学会関東地方会(臨床神経 9, 339, 2001)

桑原聡、森雅裕、小河原一恵、服部孝道、結城伸泰(2001) 抗 GM1 陽性 Guillain-Barré 症候群に対する免疫グロブリン治療. 第 19 回日本神経治療学会 (神経治療 )

桑原聡、小河原一恵、森雅裕、服部孝道 (2002) 軸索型 Guillain-Barré 症候群における回復のメカニズム. 第 14 回日本神経免疫学会 (神経免疫 10, 162-163, 2002)

小河原一恵、桑原聡、森雅裕、古賀道明、結城伸泰、服部孝道 (2002)

Campylobacter 感染は脱髄型 Guillain-Barrè 症候群を惹起し得るか? 第 14 回日本神経免疫学会(神経免疫 10、144-145、2002)

森雅裕、桑原聡、小河原一恵、服部孝道 (2002) ヘルペスウイルス属感染後 Guillain-Barrè 症候群の特徴. 第 14 回日本神経免疫学会 (神経免疫 10、148-149、2002)

古賀道明、結城伸泰、森松、桑原聡 (2002) Guillain-Barrè 症候群における抗 GM1 抗体の subclass と予後. 第 14 回日本神経免疫学会 (神経免疫 10、160-161、2002)

桑原聡、小河原一恵、Sung Jia-Ying、金井数明、森雅裕、服部孝道(2002) 軸索型 Guillain-Barrè 症候群における伝導ブロックの病態機序. 第 43 回日本神経学会総会 (臨床神経 )

小河原一恵、桑原聡、森雅裕、古賀道明、結城伸泰、服部孝道 (2002) Campylobacter jejuni 感染後 Guillain-Barrè 症候群にみられる神経伝導遅延の機序. 第 43 回日本神経学会総会(臨床神経 )

森雅裕、桑原聡、小河原一恵、服部孝道 (2002) Herpesvirus と Guillain-Barrè 症候群. 第 43 回日本神経学会総会(臨床神経 )

平賀陽之、森雅裕、桑原聡、小河原一恵、服部孝道 (2002) Guillain-Barrè 症候群の初診時における臨床経過の予測因子. 第 20 回日本神経治療学会 (神経治療 )

Sung Jia-Ying、桑原聡、小河原一恵、北野由紀子、服部孝道（2002）脱髄性ニューロパチーにおける軸索特性．第 32 回日本臨床神経生理学会（臨床神経生理 ）

桑原聡、小河原一恵、Sung Jia-Ying、北野由紀子、服部孝道（2002）遠位部神経終末の軸索特性評価法の開発．第 32 回日本臨床神経生理学会（臨床神経生理 ）

## 研究成果

# ギラン・バレー症候群を惹起するインフルエンザ桿菌 の外膜糖質構造の特徴

千葉大学大学院医学研究院神経機能病態学

服部 孝道、森 雅裕、桑原 聡

千葉大学大学院医学研究院病原分子制御学

野田 公俊

千葉大学分析センター

関 宏子



## 1. はじめに

ギラン・バレー症候群は急性経過で完成する炎症性機転で生じる運動神経優位の多発ニューロパチーであり<sup>1</sup>、3分の2の症例では神経症状発現前に何らかの先行感染を有することが以前より知られていた。先行感染は30-45%が呼吸器感染であり、15-20%が胃腸炎である<sup>2,3</sup>。これまでにさまざまな先行感染因子がギラン・バレー症候群との関連で述べられてきたが<sup>2,4</sup>、その先行感染による末梢神経障害の発現機序については明らかになってはいなかった。

キャンピロバクターは近年、ギラン・バレー症候群の最も多い先行感染因子の一つとして認知され<sup>2,5,6,7</sup>、運動神経の軸索変性<sup>8,9,10</sup>や血清中抗GM1抗体の存在<sup>9,11</sup>と関連することが明らかになってきた。特に神経組織にあるGM1とキャンピロバクターのリポ多糖上のGM1様構造の分子相同性により、ギラン・バレー症候群が発症するとの分子相同仮説が提唱され、その証拠が蓄積されつつある<sup>12,13,14</sup>。ただし、ギラン・バレー症候群の大多数は呼吸器感染後の発症であり、キャンピロバクター感染後とは考えられない。サイトメガロウイルスやEBウイルス、マイコプラズマなどギラン・バレー症候群に先行し、かつ呼吸器感染を引き起こす感染因子も知られているが、それらの頻度はすべて合わせてもギラン・バレー症候群全体の15%以下でしかない<sup>2,3,15,16</sup>。我々はインフルエンザ桿菌感染後にギラン・バレー症候群を発症した症例を経験した<sup>17</sup>。このため、インフルエンザ桿菌感染が先行するギラン・バレー症候群の頻度や臨床的特徴を把握しつつ、その菌体のリポ多糖上にキャンピロバクター同様にGM1様構造があるのかを本研究において検討した。

## 2. 方法

### 1) 患者

連続 46 症例のギラン・バレー症候群の患者を千葉大学付属病院およびその関連病院で 1989 年から 1998 年に診察した。全員ギラン・バレー症候群の臨床的診断基準を満たし、3 ヶ月間はフォローした。臨床的重症度の判定には Hughes の機能評価スコア<sup>18</sup> を用い、血清は神経症候の発症から 1 ヶ月以内に採取した。可能であれば喀痰および便培養が各患者より採取した。

### 2) 抗インフルエンザ抗体測定

血清中の抗インフルエンザ抗体価は過去の報告で述べたのと同様の方法で<sup>19,20</sup> ELISA 法により測定した。ギラン・バレー症候群患者の喀痰から採取した nontypable のインフルエンザ桿菌<sup>17</sup> をチョコレート寒天培地で 37 度、5% CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養し、1%ホルムアルデヒドで不活化し洗浄し、抗原として使用した。ELISA プレートにバッファー (50mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 50mmol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH9.6) に溶解した 100 μl の抗原を静置し、溶液 A (20mmol/l tris buffer, pH7.4, 100mmol/l NaCl, 0.5% skim milk, 0.05% Tween20) で洗浄した。その後、溶液 B (20mmol/l tris buffer, pH7.4, 100mmol/l NaCl, 3% skim milk, 0.05% Tween20) で一晩ブロッキングを行った。その後 ELISA プレートに溶液 B で 1000 倍に希釈した患者血清 100 μl を入れ静置。洗浄後、溶液 A で 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG、IgM、IgA 抗体を入れ、室温で 90 分静置。洗浄し、基質液 (0.1M citrate buffer に溶解した ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を入れ反応させ 405nm で吸光度を測定。抗原を引いていないプレートの値を引いた。49 人の正常者血清から得られた平均 + 標準偏差

×3を超えるものをインフルエンザ抗体陽性とした。インフルエンザ抗体陽性の血清は1000倍希釈から順次希釈し、各々吸光度を測定し0.1以上の最大希釈倍率を抗体価とした。また、IgG、IgM、IgAのうち2つ以上でインフルエンザ抗体陽性の場合、インフルエンザ感染後とした。

### 3) ウエスタンブロット

インフルエンザ桿菌のリポ多糖は過去の報告と同様な方法で<sup>21</sup>、ELISAで用いられたのと同じ nontypable のインフルエンザ菌から精製した。大腸菌の LPS は Difco Laboratories から購入した。SDS-PAGE は過去の報告と同様な方法で<sup>22</sup>、15%アクリルアミドと2Mの尿素を含む分離ゲルを用いて行った。その後、polyvinylidene difluoride sheet に転写され、未反応の部分は3%スキムミルクを含むPBSでブロッキングした。さらに洗浄液で200倍に希釈した患者血清に室温で2時間静置。洗浄後、洗浄液に1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体内に室温で2時間静置。最後に化学発光基質に反応させフィルムに露光した。

### 4) 抗ガングリオシド抗体測定

IgG及びIgMクラスの抗GM2、GM1、GM1b、GD1a、GalNac-GD1a、GD1b、GQ1b、GT1bはELISA法によって他の報告同様な方法で測定した<sup>23</sup>。492nmで測定した吸光度が0.1以上を示す最大希釈倍率を抗体価とした。500倍以上の場合を陽性とした。

### 5) 抗キャンピロバクター・ジェジュニ抗体価、抗サイトメガロウイ

ルス抗体価、抗 EB ウイルス抗体価、抗マイコプラズマ・ニューモニア抗体価測定

IgG 抗キャンピロバクター・ジェジュニ抗体価は以前の報告と同様の方法により ELISA 法で測定した。IgM 抗サイトメガロウイルス抗体価も ELISA 法により測定した。IgM 抗 EB ウイルス-VCA 抗体価は IFA 法で、抗マイコプラズマ・ニューモニア抗体価は、PA 及び CF 法により測定した。IgM 抗サイトメガロウイルス抗体はサンプルの吸光度/正常平均の吸光度が 1.2 以上を、IgM 抗 EB ウイルス-VCA 抗体は 1:10 以上を、マイコプラズマ抗体(PA/CF)は 1:160/1:4 以上を陽性とした。

#### 6) 電気生理学的検査

神経伝導検査は通常の方法で神経症状の発症から 3 週以内に施行し、急性運動軸索ニューロパチー(AMAN、軸索型ギラン・バレー症候群)と急性炎症性脱髄性ニューロパチー(AIDP、脱髄型ギラン・バレー症候群)に Ho らの分類により分類した<sup>24</sup>。

#### 7) ELISA 吸収試験

血清抗 GM1 抗体の菌体への結合は、他の報告同様に<sup>25</sup>さまざまな濃度の全菌をコートしたプレートに血清を前もって静置し吸収させ、血清抗 GM1 抗体価の抑制率を見る方法で行った。インフルエンザ桿菌はインフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群患者の喀痰から採取された菌体で、増菌し 1%フォルムアルデヒドで不活化し洗浄したものを利用した。血清はインフルエンザ桿菌とともに 4℃、2 時間静置後、10 分間、1 万 g で遠心し、上清について ELISA 法で抗 GM1 抗体価を測定した。抑制率は以下のように計算した。抑制率 = (菌体なしのプ

プレートに静置した血清での吸光度－菌体ありのプレートに静置した血清での吸光度) /菌体なしのプレートに静置した血清での吸光度×100

#### 8) 菌体の免疫染色

インフルエンザ桿菌を他の報告同様の方法で染色した。<sup>26</sup> すなわちスミアをスライド上で空気乾燥し、1%牛血清アルブミン添加PBSで4℃、2時間ブロッキング後、蛍光標識された0.1μg/ml コレラ毒素βサブユニット 30μlをのせ、2時間、室温で静置。洗浄しマウントする。

#### 9) インフルエンザ菌体リポ多糖の薄層クロマトグラフィー

ウエスタンブロッティングで使用した、ギラン・バレー症候群喀痰から培養されたインフルエンザ桿菌リポ多糖をさらに精製した上で適量のメタノールに溶解し、薄層上に10μL滴下し乾燥させ、展開溶媒（n-プロパノール：水：アンモニア=6：5：1）で展開し乾燥後、オルシノールの化学染色をし、100℃、10分加熱し乾燥した。

#### 10) GM1 の NMR 解析

菌体 LPS の GM1 様構造解析の前段階として GM1 製品（SIGMA）を DMSO に溶解し 500MHz 核磁気共鳴装置（日本電子 JNM-LA500）を用いて解析した。

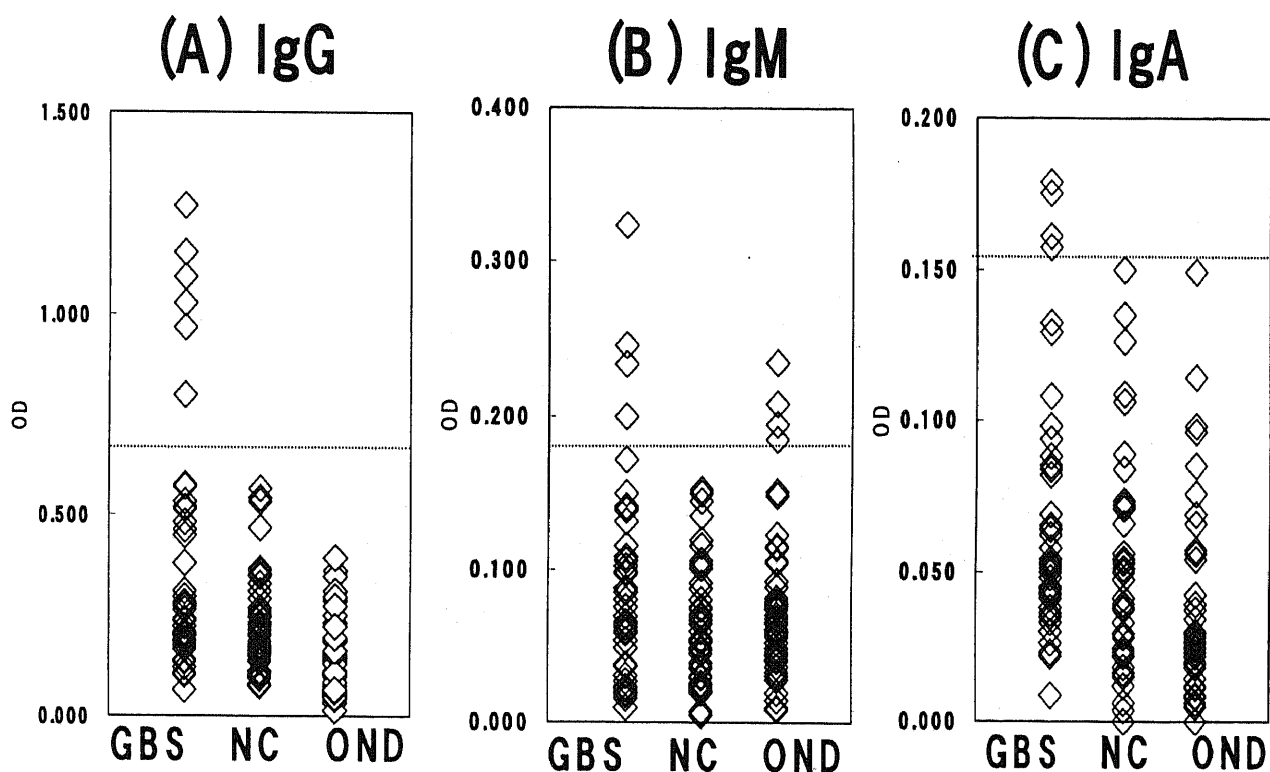
### 3. 結果

#### 1) 抗インフルエンザ抗体測定

IgG、IgM 及び IgA 抗 GM1 抗体測定の結果を図 1 に示す。

図 1 各サブクラスにおける抗インフルエンザ抗体価

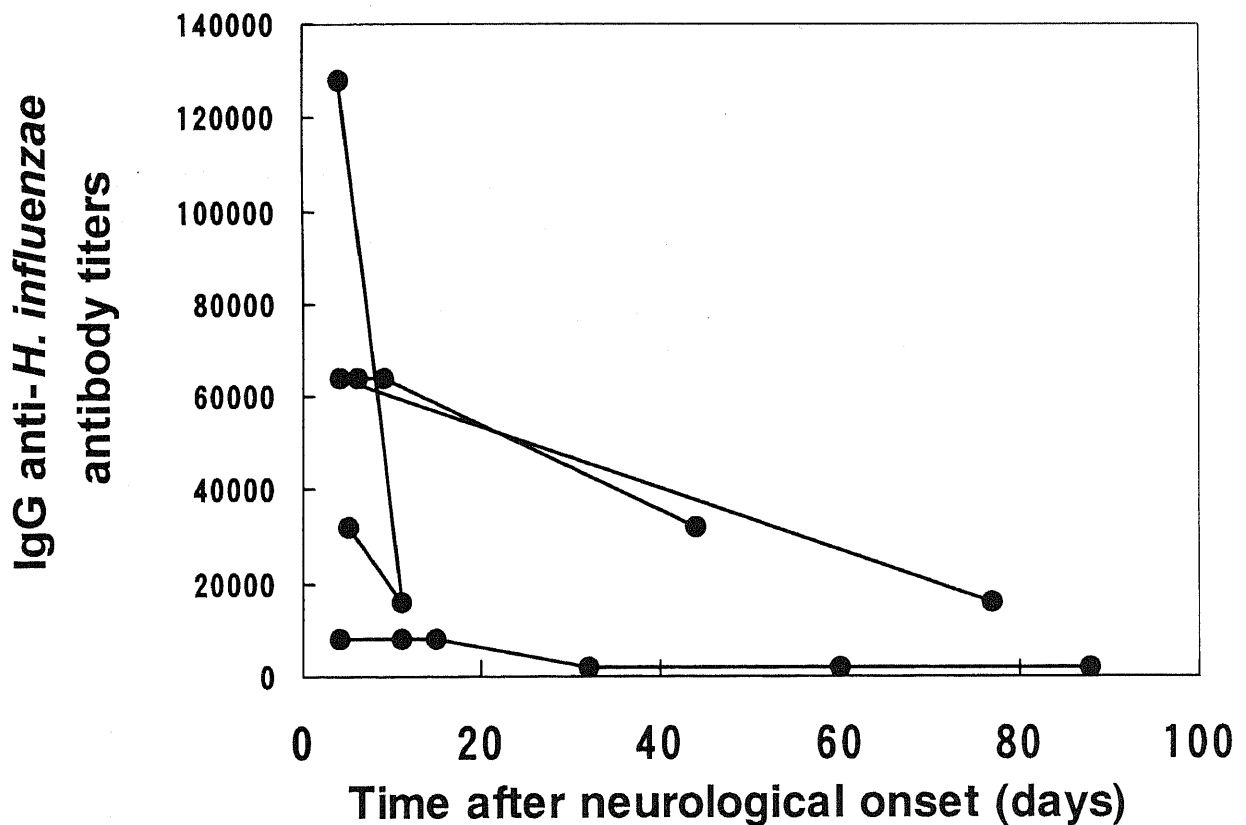
GBS：ギラン・バレー症候群 NC：正常対照 OND：疾患コントロール（多発性硬化症および筋萎縮性側索硬化症） 点線はカットオフ



抗インフルエンザ抗体はギラン・バレー症候群患者のうち 6 名(13%)で 2 つ以上のクラスで陽性であったが、正常対照群および疾患コントロール群では 2 つ以上のクラスで陽性になる者はいなかった。ギラン・バレー症候群患者で陽性となった抗体のうちわけは IgG が 6 名、IgM が 4 名、IgA が 4 名で、IgG と IgM 両者同時が 4 名、IgG と IgA 同時が 2 名であった。IgM と IgA が同時に陽性であったものはいなか

った。正常対照群および疾患コントロール群で陽性になったのは IgM クラスのみで4名であった（1人は多発性硬化症で、3人は筋萎縮性側索硬化症）。インフルエンザ抗体価陽性者は正常群および疾患コントロール群に比し有意にギラン・バレー症候群患者群で多かった(p=0.01、0.009)。IgG 抗インフルエンザ抗体陽性も同様にギラン・バレー症候群患者群で正常群および疾患コントロール群に比し有意に多かった(p=0.02、0.02)。IgM 及び IgA 抗インフルエンザ抗体については3群間で有意差はなかった。図2に IgG 抗インフルエンザ抗体価の経時的推移を示す。

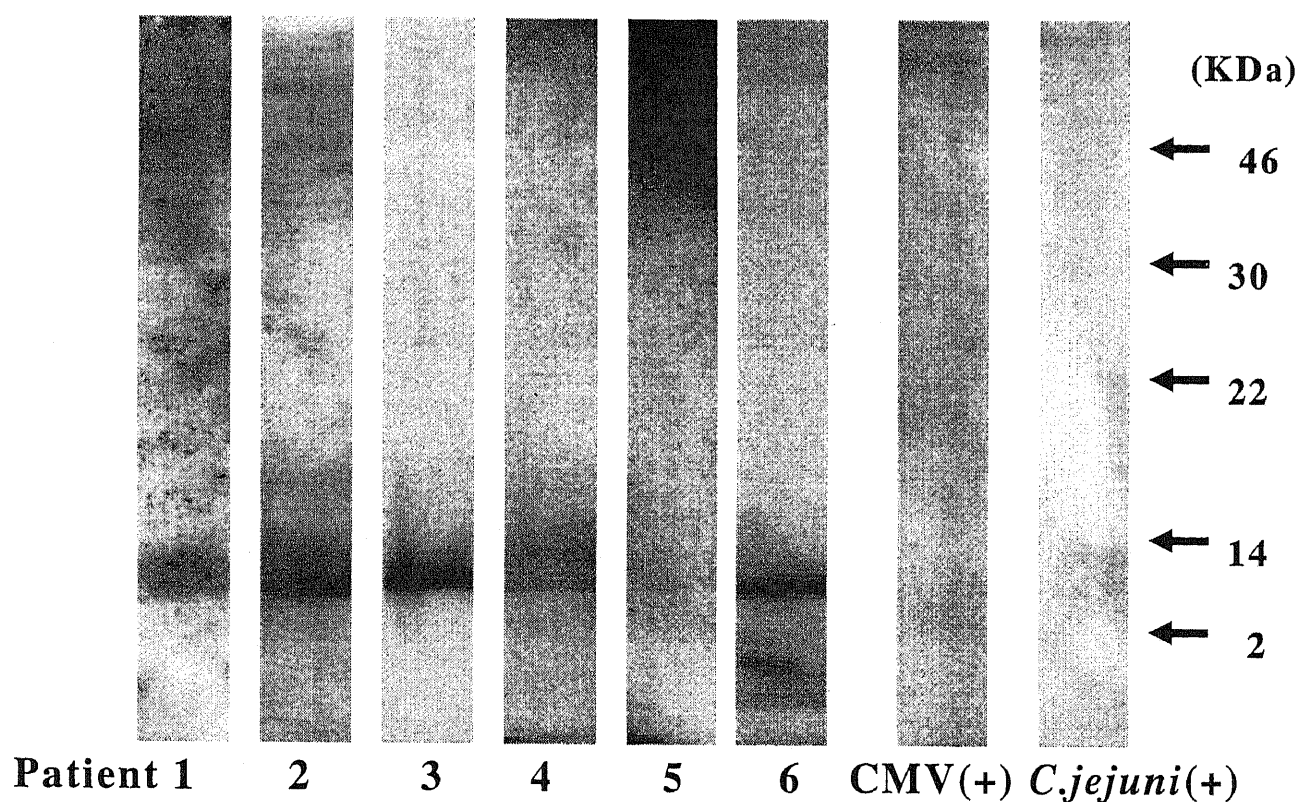
図2 経時的な IgG 抗インフルエンザ抗体価の推移



IgG、IgA、IgM クラスの全てのクラスで病気の経過に伴い、抗体価はゆっくり減少した。

ウエスタンブロットでの解析ではインフルエンザ桿菌から精製したリポ多糖はおよそ分子量 10kd にバンドを形作った (図 3)。

図 3 インフルエンザ桿菌精製 LPS に対する抗インフルエンザ抗体陽性患者血清の反応



この 6 名の抗インフルエンザ抗体陽性患者の血清は大腸菌の LPS にはいずれも反応しなかった。

2) 抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群患者の臨床的特徴



表 1. 抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群の臨床的特徴

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Age/Sex	23/F	33/F	41/F	30/M	25/F	80/F
Predromal symptoms	co, sp	co, sp	co, so	fe, so, sp	fe, sp, so, rh	co, sp, rh
Cranial nerve involvement	No	No	No	No	right abducens	bulbar
Sensory loss	No	No	No	No	all modalities	No
Treatment	IVIg	PP	PP	none	IVIg	PP
Disability: Hughes grade* at peak	3	3	3	2	3	4
	at 4 weeks	0	2	2	1	2
	at 3 months	1	1	1	1	1
Time until nadir (days)	4	5	3	4	3	5

co= cough; fe= fever; sp= sputum; so= sore throat; rh= rhinorrhea

\* Hughes grade: 0=healthy; 1= minor signs and symptoms; 2= able to walk 5 meters independently; 3=able to walk 5 meters with aid;

4= bed-bound; 5= assisted respiration required; 6=dead

表2. 抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群の検査上の特徴

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Spitum culture	not done	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus</i> species**	<i>Haemophilus influenzae</i> negative	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
IgG/IgM/IgA						
anti- <i>H. influenzae</i> antibody titer	32000/2000/(-)	32000/2000/(-)	64000/(-)/1000	64000/2000/(-)	8000/2000/(-)	128000/(-)/1000
Electrophysiologic diagnosis	AMAN	AMAN	Isolated F wave absence	AMAN	Isolated F wave absence	AMAN
Anti ganglioside antibody: IgG (titer)	G <sub>M1</sub> (2000)	G <sub>M1</sub> (4000) G <sub>M1b</sub> (1000) G <sub>D1a</sub> (2000) GalNAc-G <sub>D1a</sub> (4000) G <sub>D1b</sub> (4000)	G <sub>D1a</sub> (500) G <sub>D1b</sub> (500)	G <sub>M1</sub> (8000) G <sub>M1b</sub> (32000) G <sub>D1b</sub> (1000)	G <sub>M1</sub> (500) G <sub>D1a</sub> (500) G <sub>D1b</sub> (2000) G <sub>Q1b</sub> (64000)	G <sub>M1</sub> (32000) G <sub>M1b</sub> (512000) G <sub>D1a</sub> (128000) G <sub>D1b</sub> (8000)
IgM (titer)				G <sub>M1b</sub> (500)	G <sub>M1</sub> (1000) G <sub>D1b</sub> (500) G <sub>Q1b</sub> (4000)	

\*\* not classified; IVIg= intravenous immunoglobulin therapy PP= plasma pheresis AMAN= acute motor axonal neuropathy

抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群患者 6 名の臨床的、電気生理学的特徴を表 1、表 2 に示す。呼吸器感染がギラン・バレー症候群の症状の 4 から 12 日前に先行してあり、臨床的には脳神経・感覚障害が少なく、症状進行は 6 日以内にピークを迎えた。臨床的回復はかなりよく、4 週以内に全員が介助無し歩行が可能となり、3 ヶ月以内に走ることが可能となった。喀痰は 6 人の抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群の患者のうち 5 人から採取され、ヘモフィルス属が 4 例で検出された。このうち二例は *Haemophilus influenzae* で、いずれも血清分類は nontypable（莢膜なし）であった。

電気生理学的検査では 4 人（67%）が AMAN パターン、すなわち運動神経の複合活動電位が低振幅で、潜時の延長や速度の低下が見られないパターンを示した。この 4 人中 3 人で筋電図が施行され、fibrillation を認められた。感覚神経は全例で正常であった。AMAN パターンでない残りの二人は F 波が消失する以外は正常なパターンを示した。6 人全例の血清で何らかの抗ガングリオシド抗体が陽性であった。IgG クラスでは抗 GM1 抗体が 5 人、抗 GM1b 抗体が 3 人、抗 GD1a 抗体が 4 人、抗 GalNac-GD1a 抗体が 1 人、抗 GD1b 抗体が 5 人、抗 Q1b 抗体が 1 人の血清で陽性であった。一方、IgM クラスでは抗 GM1 抗体が 1 人、抗 GM1b 抗体が 1 人、抗 GD1a 抗体が 4 人、抗 GD1b 抗体が 1 人、抗 Q1b 抗体が 1 人の血清で陽性であった。抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群患者 6 人全てが他の病原体に対する抗体検査によりキャンピロバクター・ジェジュニ、サイトメガロウイルス、EB ウイルス、マイコプラズマ・ニューモニアへの最近の感染を示す結果を認めなかった。

### 3) 抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群と軸索型ギラン・バレー症候群および抗ガングリオシド抗体との関連

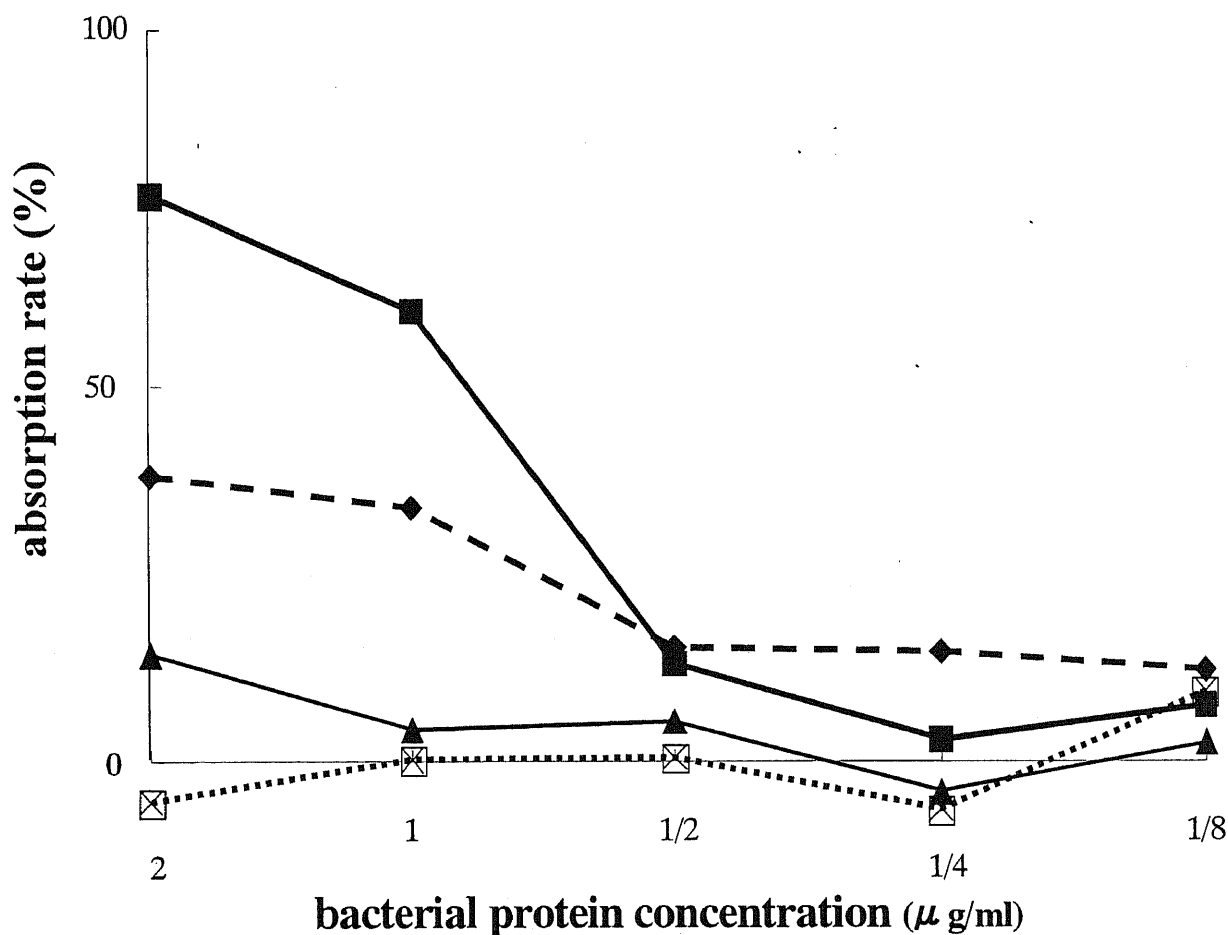
末梢神経伝導検査より 46 人のギラン・バレー症候群のうち AIDP が 18 人、AMAN が 21 人、分類不能が 7 人であった。21 人の AMAN のうち 4 人 (19%) が抗インフルエンザ抗体陽性であった。

46 人のギラン・バレー症候群患者のうち 35 人が IgG または IgM に対する血清抗ガングリオシド抗体が陽性であった。それらの内訳は IgG クラスでは抗 GM1 抗体が 20 人、抗 GM1b 抗体が 17 人、抗 GD1a 抗体が 14 人、抗 GalNac-GD1a 抗体が 8 人、抗 GD1b 抗体が 12 人、抗 GQ1b 抗体が 5 人で、IgM クラスでは抗 GM1 抗体が 6 人、抗 GM1b 抗体が 3 人、抗 GD1b 抗体が 1 人、抗 GQ1b 抗体が 1 人であった。IgG または IgM クラスの抗ガングリオシド抗体陽性者の 17% で、IgG 抗 GM1 抗体陽性者の 25% で IgG 抗 GD1a 抗体陽性者の 42% で、IgG 抗 GD1a 抗体陽性者の 29% で抗インフルエンザ抗体が陽性であった。

### 4) ELISA 抑制試験

ギラン・バレー症候群患者血清中の抗 GM1 抗体価は患者から採取されたインフルエンザ桿菌と反応させることにより濃度依存的に抑制された (図 4)。その他の菌 (*Salmonella typhimurium* 及び大腸菌) と反応させても、抗 GM1 抗体価の抑制は認められなかったが、ギラン・バレー症候群を呈さなかった気管支肺炎患者から採取されたインフルエンザ桿菌とギラン・バレー症候群患者血清中抗 GM1 抗体を反応させると弱いながらも同様の濃度依存的な抗 GM1 抗体価の抑制が認められた。

図4 菌体の蛋白濃度と抗 GM1 抗体価の抑制率との関連



■: *H. influenzae* from GBS patient, ◆: *H. influenzae* from sinobronchitis patient without GBS, ●: *Escherichia coli*, □: *Salmonella typhimurium*.

#### 5) 菌体の免疫染色

ギラン・バレー症候群患者から採取されたインフルエンザ桿菌は FITC ラベルされたコレラ毒素により染色された (図 5)。ギラン・バレー症候群を呈さなかった気管支肺炎患者から採取されたインフルエン

ザ桿菌では弱い染色が認められたが、他の菌 (*Salmonella typhimurium* 及び大腸菌) では染色は認められなかった。

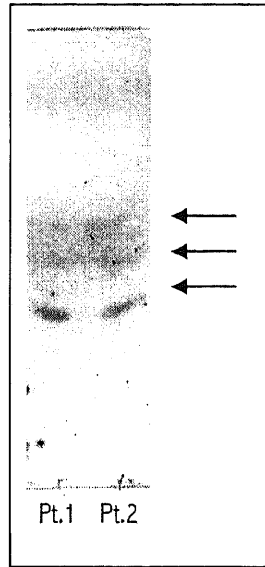
図5 ギラン・バレー症候群患者から採取されたインフルエンザ桿菌のコレラ毒素による免疫染色



6) ギラン・バレー症候群患者から採取されたインフルエンザ桿菌の精製リポ多糖のオルシノール染色

図6に示すように2人のギラン・バレー症候群から採取されたインフルエンザ桿菌2菌の精製リポ多糖をそれぞれオルシノール染色した結果、両者ほぼ同じ位置に、複数のバンドが認められた。

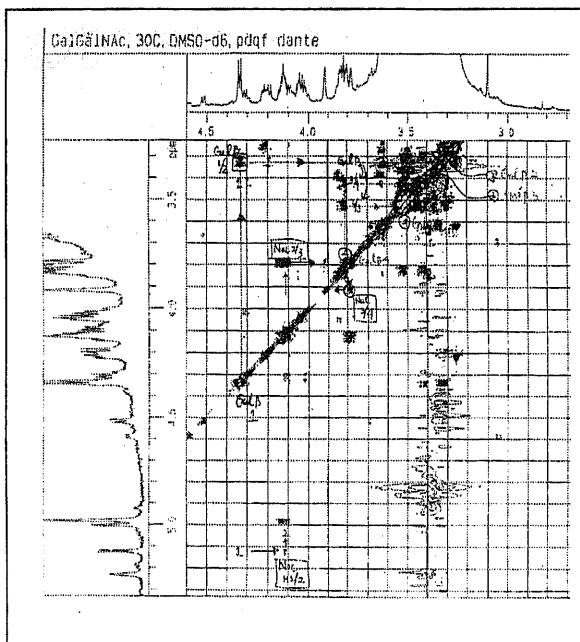
図6 ギラン・バレー症候群から採取されたインフルエンザ桿菌の精製リポ多糖のオルシノール染色



7) GM1 製品の NMR 解析

GM1 製品の NMR 解析を行ったところ図7のように Gal $\beta$ 1-3GalNac 構造の存在を示す結果が確かに得られた。

図7 GM1 製品の NMR 解析



#### 4. 考察

まず、インフルエンザ感染とギラン・バレー症候群の関連、およびインフルエンザ感染後ギラン・バレー症候群の特徴がケースコントロール研究を用いて明らかとなった。少なくとも日本においてはインフルエンザ桿菌による呼吸器感染後のギラン・バレー症候群がサブグループを形成しているものと考えられた。インフルエンザ感染後ギラン・バレー症候群は呼吸器感染が先行する、脳神経・感覚神経障害が少ない、予後が良いといった特徴を有する。さらに運動神経の一次的な軸索障害を有し、血清中に抗ガングリオシド抗体が見られ、これらの特徴はキャンピロバクター・ジェジュニ感染後ギラン・バレー症候群の特徴によく一致している<sup>9,10,11</sup>。抗インフルエンザ抗体陽性と抗 GM1 抗体との相関が認められ、インフルエンザ桿菌が GM1 様構造を有することを強く支持している。

インフルエンザ桿菌はグラム陰性桿菌で、その外膜にリポ多糖を含んでいる。また、インフルエンザ桿菌は2種類の亜型、すなわち莢膜ありと莢膜なしの2型に大別される<sup>27</sup>。本研究では後者の莢膜のないインフルエンザ桿菌を対象に行った。今までにギラン・バレー症候群とインフルエンザ桿菌に関しては、type b (莢膜あり) のインフルエンザ桿菌から精製した、莢膜抗原をワクチンとしたものとギラン・バレー症候群の関連を述べたものがあるが<sup>28,29</sup>、その後の検討では必ずしもこの関連は明らかではない<sup>30</sup>。一方、今回使用した nontypable のインフルエンザ桿菌は成人市中肺炎の重要な原因菌の一つであり、ギラン・バレー症候群との関連は今までに検討されていない。

Jacobs らは 154 人のギラン・バレー症候群のたった 1% で抗インフルエンザ抗体が陽性で、他の神経疾患も含んだ対照と比較し有意差が



ないと報告している<sup>16</sup>。彼らの報告と本研究において結果の違いをきたした理由はいくつか考えられる。彼らは ELISA で抗原として使用した菌体に関し、莢膜ありか、なしか、ギラン・バレー症候群患者から採取されたものか、そうでないのかなど、詳細について述べていない。本研究でギラン・バレー症候群から採取されたインフルエンザ桿菌の血清型はいずれも成人の呼吸器感染の原因菌のうちかなりの部分を占める nontypable のものであったことから、インフルエンザ桿菌のうち nontypable のみがギラン・バレー症候群の先行感染因子となるのではないかと推測される。ギラン・バレー症候群患者から採取された nontypable のインフルエンザ桿菌を抗原に使用したことが高率に陽性者がでた一因と考えられる。さらに、対象のギラン・バレー症候群患者群の差が影響している可能性がある。Jacobs らは 10m 独歩できない者を対象としているが、本研究では重症度とは無関係にギラン・バレー症候群患者全てを対象としている。最後に地理的条件の差の関与が考えられる。欧米と日本での HLA などの免疫学的背景の差異がキャンピロバクター・ジエジュニ同様<sup>31</sup>、その感受性に影響している可能性がある。また、日本では欧米に比し AMAN や抗 GM1 抗体陽性ギラン・バレー症候群患者の割合が高いことが報告されており<sup>7,9,11,32,33</sup>、このことも影響していると考えられる。

インフルエンザ桿菌は正常細菌叢の一部で偽陽性である可能性や、他に主要なウイルス感染があり、インフルエンザ桿菌は同時に存在しただけの可能性や、他の感染因子に対する交叉反応である可能性は否定しきれない。しかし、本研究で使用した ELISA 法は肺炎の起炎菌の診断において特異的とされる確立した方法であり<sup>36</sup>、インフルエンザ桿菌が抗体陽性者のうち 2 人の膿性痰から実際に検出され、他のギラ

ン・バレー症候群の主要な感染因子の最近の感染を思わせる抗体価の上昇を認めなかったことから、その可能性は低いものと思われる。

ギラン・バレー症候群患者血清中に認められた抗インフルエンザ抗体は、陽性者全員で IgG クラスが認められたものの、IgM や IgA は全例では認められなかった。ギラン・バレー症候群は先行感染に 1-3 週遅れて発症するため、IgM や IgA 抗体価はギラン・バレー症候群発症までに低下してしまっただ可能性がある。事実、キャンピロバクター・ジェジュニでは IgM クラスより IgG クラスのほうが感染関連ギラン・バレー症候群の検索にはより高感度であることが報告されている<sup>23</sup>。IgG クラスの抗体こそがギラン・バレー症候群の発症に関わっているのかもしれない。

インフルエンザ桿菌リポ多糖構造の過去の研究でいくつかのインフルエンザ桿菌でガングリオシド様構造があることが証明されている<sup>37,38,39</sup>。GM1 は今までに認められていないが、リポ多糖の構造は菌種により異なることが知られており、本研究での ELISA の抑制試験及びコレラ毒素での免疫染色からは GM1 様構造の存在を示す結果が得られた。さらに本研究において抗インフルエンザ抗体陽性ギラン・バレー症候群患者のほとんど全てが血清 IgG 抗 GM1 抗体を有しており、インフルエンザ桿菌のリポ多糖に対する抗体をウエスタンブロット法で示したことから、ある種のインフルエンザ桿菌はギラン・バレー症候群を引き起こし、キャンピロバクター・ジェジュニ同様、GM1 様構造をそのリポ多糖に有しているため、この菌体上の GM1 様構造と神経上にある GM1 との分子相同性により免疫応答が生じ、神経障害を来すことが想定された。キャンピロバクター・ジェジュニ感染後ギラン・バレー症候群とインフルエンザ桿菌感染後ギラン・バレー症候群が臨

床的に類似しているのは、この発症メカニズムの類似性によるのかもしれない。インフルエンザ感染は人口全体から見ると比較的高率に発生しているのに比し、ギラン・バレー症候群の発症はかなり稀であるが、ある特定のインフルエンザ桿菌がギラン・バレー症候群の発症に関わっているとすれば説明可能かもしれない。

本研究では全てのインフルエンザ桿菌感染後ギラン・バレー症候群患者は4週以内に独歩可能で、3日月以内に走ることが可能であった。さらにカンピロバクター・ジェジュニ関連ギラン・バレー症候群で言われているより、より予後が良好であった<sup>9,10,11</sup>。ギラン・バレー症候群の患者群で、抗GM1抗体陽性者と抗カンピロバクター・ジェジュニ抗体陽性者や、抗GM1抗体陽性者と予後不良の者との関連を認めない報告がある<sup>33,40</sup>。また、今回、抗GM1抗体陽性ギラン・バレー症候群患者と抗インフルエンザ桿菌抗体陽性ギラン・バレー症候群患者には有意な関連が見られなかったが、これらは抗GM1抗体陽性ギラン・バレー症候群患者群が、少なくとも二つのサブグループ、つまりインフルエンザ桿菌感染後で予後良好なグループとカンピロバクター・ジェジュニ菌感染後で予後不良なグループから成り立っていることによるのかもしれない<sup>41</sup>。

## 5. おわりに

本研究により、軸索型ギラン・バレー症候群を引き起こす起因菌はカンピロバクター・ジェジュニ以外にもあり、それがカンピロバクター・ジェジュニ同様、GM1様構造を有するために生じる交差免疫で発症することが強く示唆された。微細構造のさらなる研究が望まれる。また、同様にして他の菌体についても同様の起因菌がないか検討を要

する。また、今回、主題にならなかった脱髄型ギラン・バレー症候群の発症メカニズムは全く解明されておらず、この点についても検討の余地がある。

## 引用文献

1. Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillan-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1990;27(suppl):S21-24.
2. Winer JB, Hughes RAC, Anderson MJ, Jones DM, Kangro H, Watkins RPF. A prospective study of acute idiopathic neuropathy. □. Antecedent events. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:613-618.
3. Boucquey D, Sindic CJM, Lamy M, Delmée M, Tomasi JP, Laterre EC. Clinical and serological studies in a series of 45 patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci* 1991;104:56-63.
4. Ropper AH, Wijdicks EFM, Truax BT. Guillain-Barré syndrome. Philadelphia: FA Davis Company, 1991,57-72.
5. Kaldor J, Speed BR. Guillan-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni*: a serological study. *Br Med J* 1984;288:1867-1870.
6. Mishu B, Blaser MJ. Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in the initiation of Guillan-Barré syndrome. *Clin Infect Dis* 1993;17:104-108.
7. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RAC. *Campylobacter jejuni* and Guillan-Barré syndrome. *N Eng J Med* 1995;333:1374-1379.

8. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology* 1990;40:1900-1902.
9. Rees JH, Gregson NA, Hughes RAC. Anti-ganglioside antibodies in Guillan-Barré syndrome and their relationship to *Campylobacter jejuni* infection. *Ann Neurol* 1995;38:809-816.
10. Visser LH, van der Meché FGA, van Doorn PA, et al. (Dutch Guillan-Barré trial group.) Guillan-Barré syndrome without sensory loss (acute motor neuropathy). A subgroup with specific clinical, electrodiagnostic and laboratory features. *Brain* 1995;118:841-847.
11. Jacobs BC, van Doorn PA, Schmitz PIM, et al. *Campylobacter jejuni* infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1996;40:181-187.
12. Yuki N, Handa N, Taki T, et al. Cross-reactive antigen between nervous tissue and a bacterium elicits Guillain-Barré syndrome: molecular mimicry between ganglioside GM1 and lipopolysaccharide from Penner's serotype 19 of *Campylobacter jejuni*. *Biomed Res* 1992;13:451-453.
13. Yuki N, Taki T, Inagaki F, et al. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 1993;178:1771-1775.
14. Oomes PG, Jacobs BC, Hazenberg MPH, Bänffer JRJ, van der Meché FGA. Anti-GM1 IgG antibodies and *Campylobacter* bacteria in Guillain-Barré syndrome: evidence of molecular mimicry. *Ann Neurol* 1995;38:170-175.

15. Hao Q, Saida T, Kuroki S et al. Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barré syndrome with preceding *Campylobacter jejuni* and other identified infections. *J Neuroimmunol* 1998;81:116-126.
16. Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FGA, et al. The spectrum of antecedent infections in Guillan-Barré syndrome. A case-control study. *Neurology* 1998;51:1110-1115.
17. Mori M, Kuwabara S, Miyake M, et al. *Haemophilus influenzae* has a GM1 ganglioside-like structure and elicits Guillan-Barré syndrome. *Neurology* 1999; 52: 1282-1284.
18. Hughes RAC, Newsom-Davis JM, Perkin GD, Pierce JM. Controlled trial of predonisolone in acute polyneuropathy. *Lancet* 1978;7:750-753.
19. Kurtti P, Isoaho R, von Hertzen L, Keistinen T, Kivela SL, Leinonen M. Influence of age, gender and smoking on *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* antibody titers in an elderly population. *Scand J Infect Dis* 1997;29:485-489.
20. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Shinozawa K, Miyatake T. Severe acute axonal form of Guillain-Barré syndrome associated with IgG anti-GD1a antibodies. *Muscle Nerve* 1992;15:899-903.
21. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further application of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1965;5:83-91.
22. Laemmli UK. Cleavage of the structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

23. Koga M, Yuki N, Takahashi M, Saito K, Hirata K. Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barré and Fisher's syndromes. J Neuroimmunol 1988;81:138-143.
24. Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* and anti-glycolipid antibodies. Brain 1995;118:597-605.
25. Jacobs BC, Endtz HPh, van der Meché FGA, Hazenberg M, Achtereekte HAM, van Doorn PA. Serum anti-GQ1b IgG antibodies recognize surface epitopes on *Campylobacter jejuni* from patients with Miller Fisher syndrome. Ann Neurol 1995;37:260-264.
26. Moody MD, Goldman M, Thomason BM. Staining bacterial smears with fluorescent antibody. I. General methods for *Malleomyces pseudomallei*. J Bacteriol;72:357-361.
27. Apicella MA. Infections due to *Haemophilus influenzae*, HACEK group, *Capnocytophaga*, and *H. Ducreyi*. In: Isserbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kaper DL, eds. Harrison's principles of internal medicine. 13th edn. New-York: McGraw-Hill, 1994:652-654.
28. D'Cruz OF, Shapiro ED, Spiegelman KN, et al. Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome) after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. J Pediatrics 1989;115:743-746.
29. Gervaix A, Caflisch M, Suter S, Haenggeli Ch-A. Guillain-Barré syndrome following immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. Eur J Pediatr 1993;152:613-614.

30. Gross TP, Hayes SW. *Haemophilus conjugate vaccine and Guillain-Barré syndrome*. J Pediatr 1991;118:161.
31. Koga M, Yuki N, Kashiwase K, Tadokoro K, Juji T, Hirata K. Guillain-Barré and Fisher's syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis are associated with HLA-B54 and Cw1 independent of anti-ganglioside antibodies. J Neuroimmunol 1998;88:62-66.
32. Kuwabara S, Yuki N, Koga M, et al. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol 1998;44:202-208.
33. Vrisendorp FJ, Mishu B, Blaser MJ, Koski CL. Serum antibodies to GM1, GD1b, peripheral nerve myelin, and *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barré syndrome and controls: correlation and prognosis. Ann Neurol 1993;34:130-135.
34. Murphy TF, Apicella MA. Nontypable *Haemophilus influenzae*: A review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. Rev Infect Dis 1987;9:1-15.
35. Loosmore SM, Yang YP, Coleman DC, Shortreed JM, England DM, Klein MH. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect Immun 1997;65:3702-3707.
36. Kerttula Y, Leinonen M, Koskela M, Mäkelä PH. The aetiology of pneumonia. Application of bacterial serology and basic laboratory methods. J Infect 1987;14:1421-1430.



37. Mandrell RE, McLaughlin R, Kwaik YA, et al. Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated. *Infect Immun* 1992;60:1322-1328.
38. Gibson BW, Melaugh W, Phillips NJ, Apicella MA, Campagnari AA, Grffiss JM. Investigation of structural heterogeneity lipooligosaccharides from pathogenic *Haemophilus* and *Neisseia* species and of R-type lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurium* by electrospray mass spectrometry. *J Bacteriol* 1993;175:2702-2712.
39. Risberg A, Schweda EKH, Jansson PE. Structural studies of the cell-envelope oligosaccharide from the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain RM.118-28. *Eur J Biochem* 1997;243:701-707.
40. Enders U, Karch H, Toyka KV, et al. The spectrum of immune responses to *Campylobacter jejuni* and glycoconjugates in Guillain-Barré syndrome and in other neuroimmunological disorders. *Ann Neurol* 1993;34:136-144.
41. Kuwabara S, Asahina M, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Two patterns of clinical recovery in Guillain-Barré syndrome with IgG anti-GM1 antibody. *Neurology* 1998;51:1656-16.