

平成27年度奨励研究

「実験的免疫性ニューロパチーの治療モデルにおける免疫学的検討」

附属病院神経内科 講師 小林 正樹

1. 研究目的

本研究の目的は、実験的免疫性ニューロパチー（experimental autoimmune neuritis = EAN）の治療介入を通してヒト免疫性ニューロパチー（おもにGuillain-Barre症候群 = GBS）との類似性から、GBS予後予測因子の免疫学的背景を推測することである。

GBSでは免疫グロブリン大量療法（IVIG）前後の血清IgGの変動（ Δ IgG）が予後に相関していることが示されているが、その病態との関連や免疫学的背景は不明であり、EANによる動物モデルで検討した。EANは、ミエリン関連蛋白の注入によりラットに生じる免疫性ニューロパチーで、GBSの動物モデルとされている。ヒトIgGを用いたIVIG治療モデルで臨床症状、病理所見が改善したとする報告はいくつかあるが、そのメカニズムは十分明らかになっていない。動物モデルでは内因性のIgGと外因性（治療による）IgGの増加が分けて解析できるため、 Δ IgGの増加が治療に与える影響の考察が可能である。また、過去にTNF α ノックアウトマウスにおけるEANの検討でM1/M2マクロファージの優位性が重症度に関連する（M1優位でEANが重症化する）こと、などが知られているため、これをもとに免疫組織学的にEANにおけるIVIGの作用機序についても考察を試みた。

2. 研究方法

1) EANの誘導

Lewisラット（メス、7週齢、体重130-160g）をコントロール群とEAN群にわけ、EAN群ではイソフルランの吸入麻酔下でウシ合成ミエリンP2蛋白（53-78）200 μ gを完全フロイドアジュバントと共に後肢足底に皮下注射し、EANを誘導した。

2) 神経症状の評価・治療介入

免疫後14日の神経症状を修正したEANスケール（尾：0＝正常、0.5＝軽度の下垂、1＝下垂、肢：0＝正常、1＝軽度の麻痺、2＝中等度の麻痺、3＝完全麻痺、中間 $\pm$ 0.5点として尾＋四肢の総和＝最大13点）を用いて評価を行った。発症を確認し、末梢血を採取し凍結保存した。EAN群はその後、ヒト免疫グロブリン大量療法（200mg/4ml、静脈内投与）を行うIVIG群と生理食塩水（normal saline = NS）投与（4ml、静脈内投与）を行うNS群にわけ、治療後14日（免疫後28日）の神経学的評価、および末梢血を採取した。

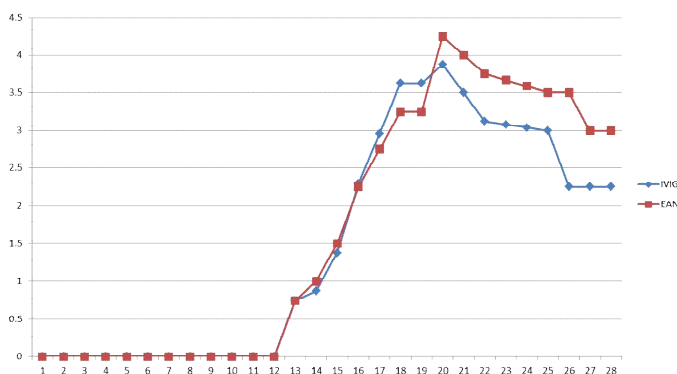
3) ELISA・免疫組織学的検討

凍結していた末梢血を解凍し、ELISAキットでラット血清IgGの変動を測定した。また坐骨神経を採取し、凍結切片を作成した。マクロファージ関連抗体（CD68、CD163）で染色し、3群間でM1/M2マクロファージ細胞比を半定量的に検討した。

3. 研究結果

1) 神経学的評価：IVIG群ではNS群とピークの重症度に大きな差はないが、回復が早い傾向がみられた。

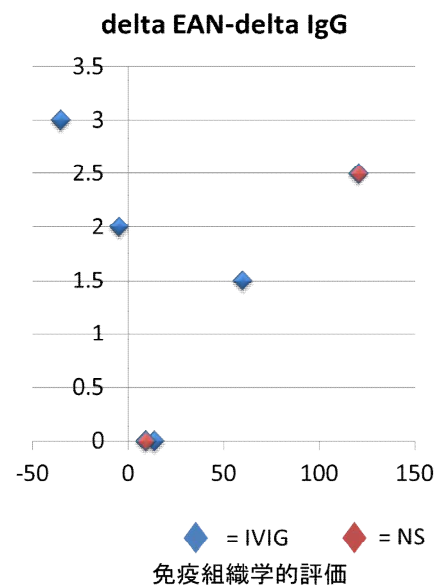
EANスコアの経時的变化



2) ELISA (ラット血清IgG測定) : ラット血清IgGの変化量 (Δ IgG) はIVIG群でNS群より低値であった。ただし、臨床症状との関連は明らかではなかった。

ラットおよびヒトIgGの変化

	Rat IgG		Delta (rat) IgG
	Pre treatment	Post treatment	
All cases	¹⁾ 75.0 $\pm$ 17.7	²⁾ 109 $\pm$ 41.6	³⁾ 34.5 $\pm$ 46.6
All IVig (5)	⁴⁾ 75.7 $\pm$ 21.7	84.9 $\pm$ 35.1	⁵⁾ 9.38 $\pm$ 34.5
All NS (3)	77.0 $\pm$ 21.9	141 $\pm$ 34.1	63.8 $\pm$ 55.7
EAN			
IVIG (4)	⁶⁾ 69.2 $\pm$ 21.4	79.2 $\pm$ 37.8	⁷⁾ 8.55 $\pm$ 39.8
NS (2)	78.4 $\pm$ 30.8	143 $\pm$ 47.9	64.8 $\pm$ 78.7



3) 免疫組織学的検討 : EAN誘導後28日のEANではM2マクロファージが優位であった。NS群のうち、1例ではM1マクロファージがやや優位な印象であった。

4. 考察 (結論)

EANに対するヒトIgG大量療法の有効性は、EANの誘導法、IgGの投与方法などの違いはあるものの、これまでもいくつかの報告がある。今回は、ミエリン抗原を高用量投与とし、より神経症状が遷延するプロトコールとなっている。

種の異なるIgGの投与が本当に効果を発現するのか、という疑問に関しては、ラットFcRnを発現する細胞にヒトIgGを投与した際には親和性が確認され、一方、ヒトFcRnを発現する細胞にラットIgGは結合しないと報告されている。ヒトにおけるIVIGの作用として、抗イディオタイプ抗体作用、抗体産生の抑制、IgG代謝の促進などがある。したがって、今回、ラット Δ IgGはIVIG群で低値を示し、産生抑制またはIgG代謝が促進されたことを示唆している。ただし、臨床的改善との関連は薄く、さらなる病態解明のためにはEANの誘導法やIgGの投与方法などプロトコールの再検討が必要と思われる。

IVIGのマクロファージに与える影響では、Fc受容体を介したエフェクター細胞制御機能が知られている。過去の報告でM1マクロファージ増加はEANの重症度と相関があるとされており、今回我々はCD68 (汎マクロファージ)、CD163 (M2マクロファージ) の発現を検討し、IVIG群では3/4例でM2シフト、NS群ではM1優位、M2優位が1例ずつみられたが、例数の不足もあり明らかな傾向を示せなかった。補助所見として血清サイトカインIL-10、IL-12の測定を検討していたが、リソース不足によりできなかった。

EANに対するヒトIgG投与はラットIgGの増加を抑える作用があるが、その臨床的効果・発現機序に関してはさらなる検討を要する。

5. 成果の発表 (学会・論文等、予定を含む)

第27回日本末梢神経学会での発表を検討している

6. 参考文献

- 1) Kuitwaard K et al. Ann Neurol 2009
- 2) Soliven B J Peripheral Nerv Sys 2012
- 3) Yun W et al. J Neuroimmunol 2007
- 4) Zhang HL et al. PLoS one 2012
- 5) Lin HH et al. J Neurol Sci 2007
- 6) Lin HH et al. J Neuroimmunol 2007

免疫組織学的評価

	CD163/CD68	dominancy
①IVIG	2+/1+	M2
⑦IVIG	1+/1+	M2
⑧IVIG	2+/2+	M2
⑪IVIG	+/-+	N
③NS	2+/3+	M1
⑩NS	2+/2+	M2
②EAN fail	+/-+	-
⑤control	1+/+-	N