

## 実験的アレルギー性神経炎における免疫複合体の 病因的意義に関する研究

中 野 武  
信州大学医学部第3内科学教室  
(主任: 柳沢信夫教授)

### A Study of Immune Complexes in Experimental Allergic Neuritis

Takeshi NAKANO

Department of Medicine (Neurology), Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Nobuo YANAGISAWA)

Immune complexes in experimental allergic neuritis were studied. Experimental allergic neuritis (EAN) was induced in inbred Lewis rats by immunization with two different neuritogenic antigens, porcine peripheral nerve myelin and P<sub>2</sub> protein of bovine peripheral nerve myelin with complete Freund adjuvant. Circulating immune complexes in the sera of the rats were measured by Raji cell immunoassay. The results revealed elevated levels of circulating immune complexes in all the animals. Histological study showed perivascular cell cuffing and demyelination. The animals showed deposition of immune complexes, which were detected by FITC-conjugated anti-rat IgG, IgM and C<sub>3</sub>-complement, in the vessels of the peripheral nervous system. In tracer study perivascular leakage of tracer (Evans blue-BSA complexes) was observed in the intraneural blood vessels in the animals with EAN. A parallel relationship among the severity of clinical symptoms, histological changes (inflammatory vascular lesion, segmental demyelination, axonal degeneration and perivascular leakage of tracer), and elevation of serum immune complexes was found.

These findings suggest that immune complexes may contribute to the immunopathogenesis of EAN. *Shinshu Med. J.*, 34: 346-361, 1986

(Received for publication March 13, 1986)

---

**Key words:** experimental allergic neuritis, immune complexes

実験的アレルギー性神経炎, 免疫複合体

---

#### 緒 言

Guillain-Barré 症候群は末梢神経の炎症性変化と脱髄を主病変とする疾患で、その病因として免疫異常の関与が推測され、細胞性免疫、液性免疫の双方からのアプローチがなされているが、その詳細はなお解明されていない。

近年本症の患者血清中に免疫複合体が高率に検出されること<sup>1)-3)</sup>、腎病変の合併が多いこと<sup>4)-6)</sup>、さらに本症の末梢神経<sup>7)</sup>や腎の生検材料に免疫複合体が証明されたこと<sup>6)</sup>などから免疫複合体が本症の病因に重要な役割をはたす可能性が考えられるようになった。一方血管炎が本症におけるもっとも重要な病変であるとする考え (vasculomyelinopathy)<sup>8)9)</sup>があり、血管

病変の発現についても免疫複合体との関連が注目される。

本研究では Guillain-Barré 症候群の動物実験モデルと考えられている 実験的アレルギー性神経炎 Experimental allergic neuritis (EAN) において血中および組織における免疫複合体について検討し, EAN の病変形成への関与を明らかにすることを目的とした。

#### 実験動物および方法

1 実験動物は体重100~150 g, オスの純系ルイスラットを使用し40匹を EAN 作製群, 20匹を対照群とした。EAN 作製のための抗原は末梢神経ミエリン, 末梢神経ミエリン P<sub>2</sub> 蛋白 (以下 P<sub>2</sub> 蛋白) の2種類で, 対照群に用いた抗原は半数のラットには complete Freund adjuvant (CFA), もう半数にはウシ血清アルブミン (BSA) に CFA を加えた乳剤を使用した。

2 抗原の作製: 末梢神経としてブタ馬尾神経を使用した。ブタ馬尾神経は採取後ただちに氷室内で周囲結合組織および脊髄から分離, 細切したのちテフロン・ホモゲナイザーにて乳剤化し, Uyemura ら<sup>10)</sup>の方法で末梢神経ミエリンに分離した。すなわち末梢神経乳剤をショ糖勾配法にて末梢神経ミエリン分画に分離したのち混入する軸索成分を低浸透圧ショックを加え

除去した (Table 1)。P<sub>2</sub> 蛋白は埼玉医大第1生理植村教授より恵与されたウシ P<sub>2</sub> 蛋白を使用した。

3 動物の感作: EAN 作製群は Lampert <sup>11)</sup>の方法に準じ百日咳死菌 10×10<sup>9</sup> 個をふくむ百日咳ワクチン (千葉血清研究所) 0.5ml を腹腔内に注射し, その4日後に蛋白量として0.2mgをふくむ抗原 (末梢神経ミエリン, P<sub>2</sub> 蛋白) をそれぞれ同量の CFA (0.25mgの結核死菌をふくむ) を加えホモゲナイズしたのちルイスラットの後肢足掌に接種感作した。

対照群20匹は EAN 作製群と同様に百日咳ワクチンで前処置し, その4日後に半数10匹は生理食塩水 0.5 ml に同量の CFA を加えたものを, また残り半数には BSA (蛋白量として0.2mg) に CFA を加えたものを接種した。

それぞれの抗原の蛋白量は Lowry 法<sup>12)</sup>にて定量した。

4 血中免疫複合体価の測定: Theofilopoulos らの方法<sup>13)14)</sup>を改良した Raji 細胞イムノアッセイ法 (蛍光抗体法)<sup>15)16)</sup>を用いて IgG を抗体成分とする免疫複合体について測定した。Raji 細胞は胎児ウシ血清10%をふくむ RPMI 1640 培養液を用い CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 37°C) 内で継代培養をおこない, 3日毎に培養液を交換した。血中免疫複合

Table 1 末梢神経ミエリンの分離・作製

#### PREPARATION OF PERIPHERAL NERVE MYELIN

FRESH TISSUE (SWINE CAUDA EQUINA)

HOMOGENIZATION IN 0.8M-SUCROSE  
FILTRATION WITH 3 LAYERS GAUZE

HOMOGENATE COVERED WITH 0.32M-SUCROSE

CENTRIFUGATION AT 65,000g FOR 60 MIN.

INTERPHASE LAYER RESUSPENDED IN 0.8M-SUCROSE

HOMOGENIZATION

HOMOGENATE COVERED WITH 0.32M-SUCROSE

CENTRIFUGATION AT 65,000g FOR 60 MIN.

INTERPHASE LAYER RESUSPENDED IN 0.24M-SUCROSE

CENTRIFUGATION AT 10,000g FOR 10 MIN.

PELLET

HOMOGENIZATION IN WATER 0°C FOR 10 MIN.

CENTRIFUGATION AT 10,000g FOR 10 MIN.

MYELIN FRACTION

Uyemura et al. 1972

体価の測定にはもっとも生存細胞数の多い培養液交換後3日目の Raji 細胞を使用し、トリパンブルー超生体染色で生存細胞が95%以上あることを確認したのち測定に供した。

被検血清はリン酸加緩衝液 (PBS) による2段階希釈系列を作製し、 $5 \times 10^5$  個に調整した Raji 細胞と希釈被検血清 0.05ml を4°C 氷室内で1時間反応させたのち PBS で2回洗浄し fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ラット IgG 抗体液 0.05ml と反応させた。判定には蛍光顕微鏡で観察し、細胞表面に顆粒状に蛍光を発する細胞を陽性とし、全生存細胞中の比率を求め陽性率が50%以下となる前段階の血清希釈倍数をもって被検血清の血中免疫複合体価とした。

5 組織学的検索: ルイスラットを屠殺後ただちに坐骨神経、脳、脊髓、腎を採取し、一部はホルマリン固定後パラフィン標本を作成し Hematoxylin-Eosin (H・E) 染色、Luxol fast blue 染色をおこない検鏡した。また採取された坐骨神経の一部は3% glutaraldehyde 磷酸緩衝液で1時間固定後、cacodylate 緩衝液にて洗浄し1% osmium 酸で1時間固定したのち型のごとくアルコール脱水、Epon 包埋をほどこし薄切切片 (2 $\mu$ m) を toluidine blue 染色にて観察した。

組織病変の程度を定量化する目的で、血管病変については坐骨神経の H・E 染色標本にて光学顕微鏡下に100個の神経鞘内血管を数え明らかな血管周囲性細胞浸潤を呈する血管の占める割合を算出、また脱髄病変および軸索変性の程度を評価する目的で坐骨神経のときはぐし線維法 (Teased-fiber study) を実施した。ときはぐし線維法は坐骨神経を1% osmium 酸で3時間固定したのち実体顕微鏡下で100本の神経線維を分離し Dyck ら<sup>17)</sup>の方法で線維分析を実施した。すなわち各々の神経線維をA群 (正常)、B群 (ほぼ正常)、C群 (節性脱髄)、D群 (節性脱髄と再生像)、E群 (軸索変性)、F群 (再生像) に分類し、各群の頻度を算出した。

6 免疫組織学的観察: ルイスラット屠殺後ただちに採取した坐骨神経を-70°C のイソペンタン液中で凍結した。この組織片をクリオスタットで4 $\mu$ m に薄切しアセトンで固定したのち FITC 標識抗ラット IgG、IgM、C<sub>3</sub> およびアルブミン抗体液と湿室内で37°C、1時間反応させ PBS で3回洗浄しグリセリン液で封入し、ニコン落射式蛍光顕微鏡 (APOPHOT. Filter module D) で観察した。

酵素抗体法は凍結薄切切片に Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラット IgG、IgM、C<sub>3</sub> 抗体液を反応させ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) にて発色後観察した。内因性ペルオキシダーゼ阻止には過硫酸・NaBH<sub>4</sub> 法<sup>18)</sup>を用いた。

これら免疫染色では対照として抗原対照、抗体対照をおき特異性について検討した。FITC 標識抗ラット抗体液および HRP 標識抗ラット抗体液は Miles Laboratories 社製のものを使用し、それぞれ PBS で16倍に希釈して使用した。

7 血液神経関門のトレーサー実験: 上記実験とは別にトレーサーを用いて EAN 発症ラットでの神経鞘内血管の血管透過性について検討した。トレーサーの調整は Hahn ら<sup>19)</sup>の方法に準じて BSA 500mg とエバンスブルー (EB) 30mg を混合し、EB-BSA 複合体を作製し PBS 30ml を加え希釈し、4°C で24時間静置したのちトレーサーとした。EB と BSA との結合は分光光度法<sup>20)</sup>にて確認した。

EAN 作製ラット20匹では発症後臨床症状が最大となる4日目に屠殺することとし、屠殺1時間前に大腿静脈からトレーサー (EB-BSA複合体) を0.1ml 静注した。また同様に EAN を作製した18匹では抗原の接種後8日目、10日目、12日目、14日目、16日目、18日目にそれぞれ3匹ずつトレーサーを0.1ml 静注し1時間後に屠殺した。屠殺後採取された坐骨神経は5%ホルマリンに24時間固定したのち-70°C イソペンタン液中で凍結した。この凍結切片をクリオスタットにて4 $\mu$ m に薄切し、グリセリン液にて封入し、ニコン落射式蛍光顕微鏡 (APOPHOT, Filter module F) にて観察した。

対照群10匹は EAN 作製の操作をおこなわずに屠殺1時間前にトレーサーのみを静注した。

血液神経関門の破綻による血管透過性亢進の程度を検討するために、蛍光顕微鏡下で50個以上の血管を観察し、血管周囲に明らかなトレーサー漏出を認める血管の占める割合を算出した。

## 結 果

1 発症日および発症率: 経時的な観察では EAN 作製群は感作後14~16日にかけて以下の症状の発現が観察された。すなわち10%前後の体重減少、活動性の低下のほか四肢脱力を認め、四肢脱力は後肢につく種々の程度の麻痺を示した。感作した抗原別の発症日数

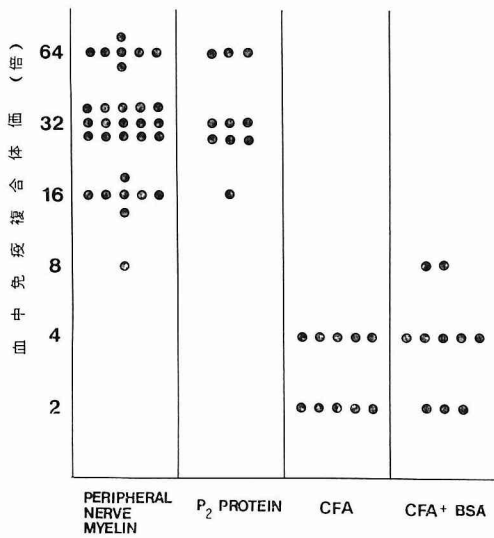


Fig. 1 接種抗原別の血中免疫複合体価

は末梢神経ミエリン投与群15.2日、P<sub>2</sub>蛋白投与群15.8日で有意差を認めなかった。

EAN 作製群では全例に上記の何らかの臨床症状を認め、臨床的な発症率は末梢神経ミエリン投与群、P<sub>2</sub>蛋白投与群ともに100%と考えられた。重症例では四肢の完全麻痺、努力性呼吸などを呈したが死亡例はなかった。なお麻痺の程度は Kadlubowski ら<sup>21)</sup>の EAN

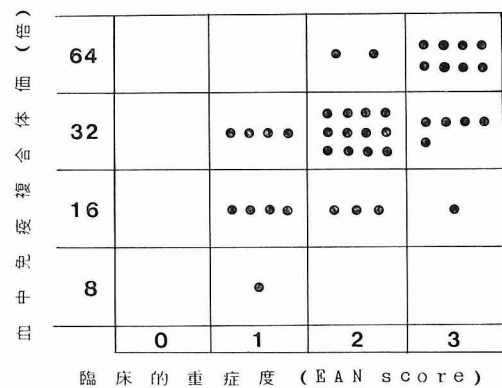


Fig. 2 臨床的重症度 (EAN スコア) と血中免疫複合体価との対比

Spearman's rank correlation coefficient  
 $\rho = 0.584$   $N = 40$   $p < 0.01$

EAN スコアと血中免疫複合体価とは正の相関を有する

スコアを用いて評価し 0 : 正常, 1 : 軽度であるが明らかに脱力を示すもの, 2 : 中等度, 3 : 重症で1肢以上の完全麻痺を示すものの4段階に評価した。

対照群では CFA 単独投与群, CFA+BSA 投与群ともに特記すべき異常は認められなかった。

屠殺は EAN 作製群では臨床症状が最大となる発症後4日目におこない対照群では感作後20日目に全例屠

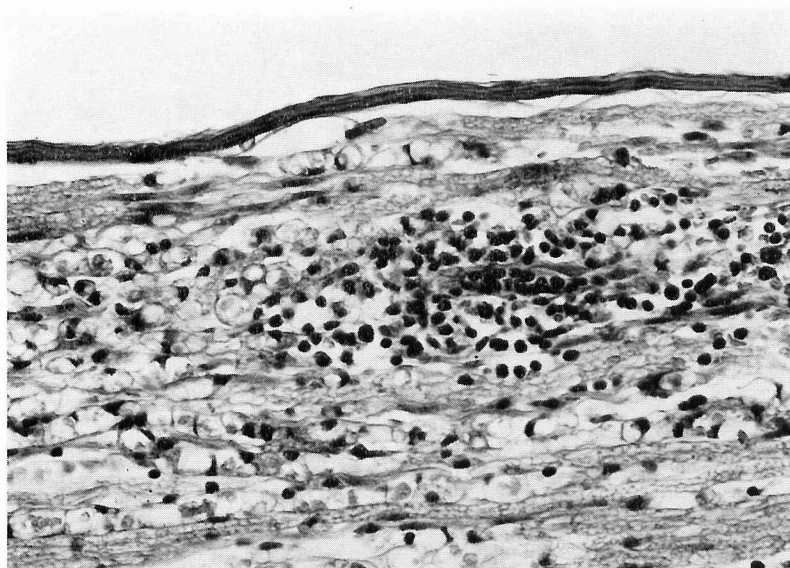


Fig. 3 EAN 発症ラット 坐骨神経 (パラフィン包埋 H・E 染色 ×400) 血管周囲性細胞浸潤を認める

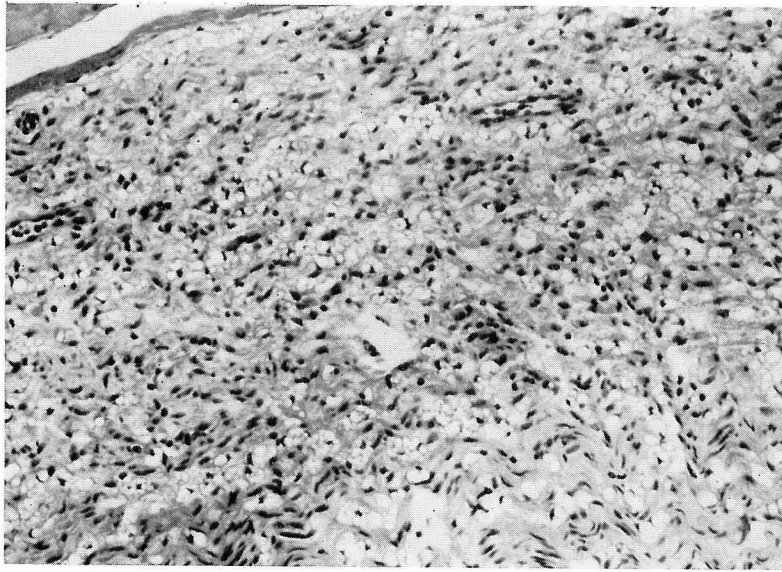


Fig. 4 EAN発症ラット 坐骨神経 (パラフィン包埋 H・E 染色 ×200)  
神経鞘内のびまん性細胞浸潤と神経線維の変性を認める。

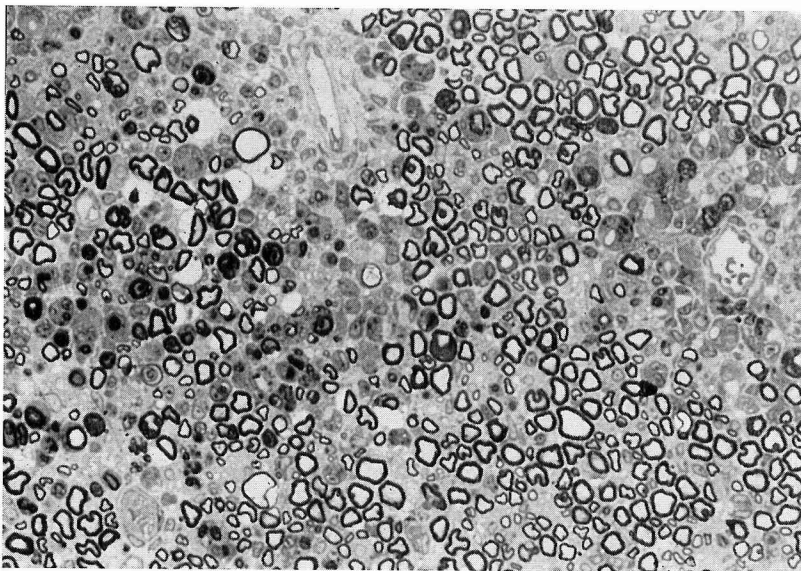


Fig. 5 EAN 発症ラット 坐骨神経 (エポン包埋トルイジンブルー染色 ×270)  
血管周囲を中心とした脱髄と軸索変性および細胞浸潤を認める。

殺した。

2 血中免疫複合体価：屠殺時心腔採血した血清にて測定した。EAN 作製群の多くで血中免疫複合体が検出され、その titer は16倍から64倍と上昇を示した。感作した抗原別の titer は末梢神経ミエリン、P<sub>2</sub>蛋白

で差は認められなかった。これに対し CFA 単独投与群、CFA+BSA 投与群の双方とも2倍から8倍程度であった (Fig. 1)。

次に EAN 作製群において屠殺時の血中免疫複合体価と臨床症状の程度を EAN スコアにて対比した。

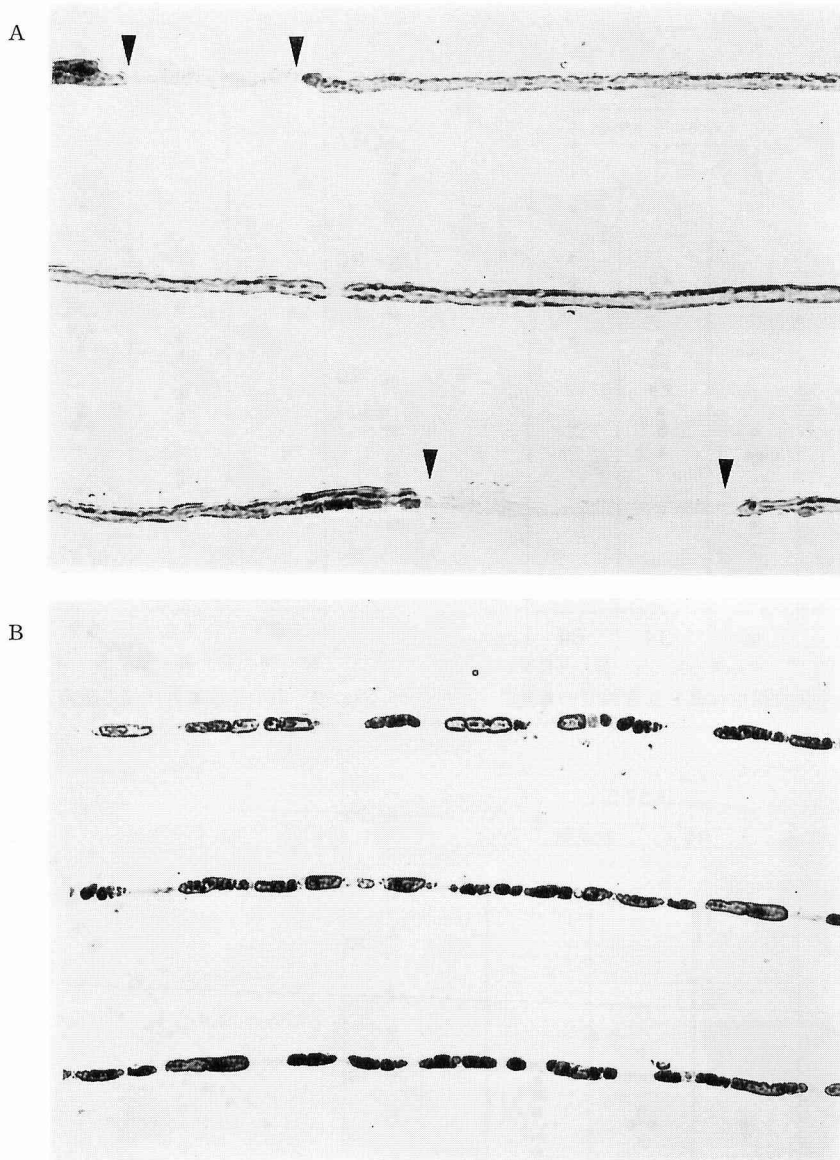


Fig. 6 EAN発症ラット 坐骨神経 (×250)

ときほぐし線維法による線維分析

A. C群線維 (▼—▼: 節性脱髄) B. E群線維

EAN スコアと血中免疫複合体価とは正の相関 ( $\rho = 0.584$   $p < 0.01$ ) を認めた (Fig. 2)。また感作後の日数と血中免疫複合体価との対比では一定の傾向は得られなかった。

3 組織学的検討: 通常のH・E染色ではEAN作製群の全例に種々の程度の末梢神経病変を認め、組織学的な発症率は末梢神経ミエリン, P<sub>2</sub>蛋白投与群とも

に100%と考えられた。組織病変の内容は神経鞘内の血管周囲へのリンパ球, 単球, マクロファージの浸潤を主体とし, 一部に多核白血球の浸潤を認め, これらの所見は perivascular cuffing と呼ばれる所見と一致した (Fig. 3)。これら血管病変の分布は比較的均一であったが, 病変の程度は血管により種々であった。また神経鞘内の血管周囲性細胞浸潤のみならず神経鞘内

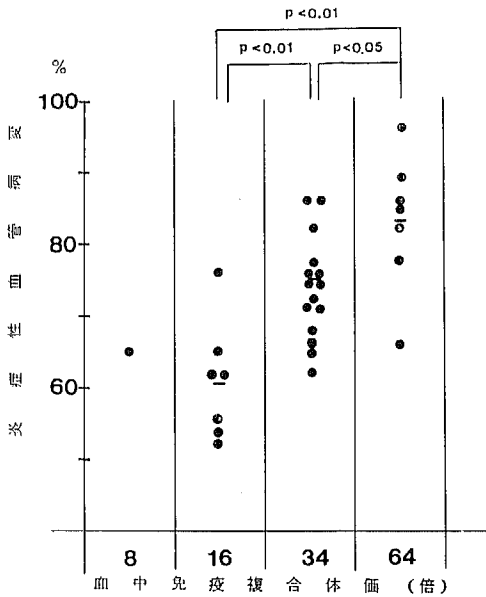


Fig. 7 血中免疫複合体価と血管病変の対比

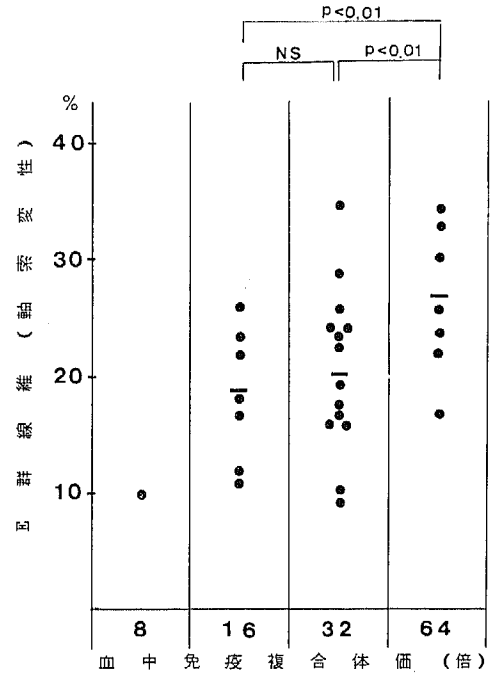


Fig. 9 血中免疫複合体価と軸索変性の対比

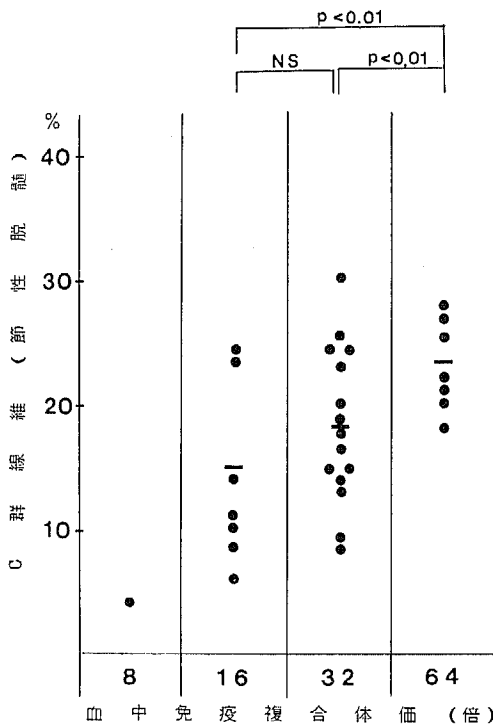


Fig. 8 血中免疫複合体価と節性脱髄の対比

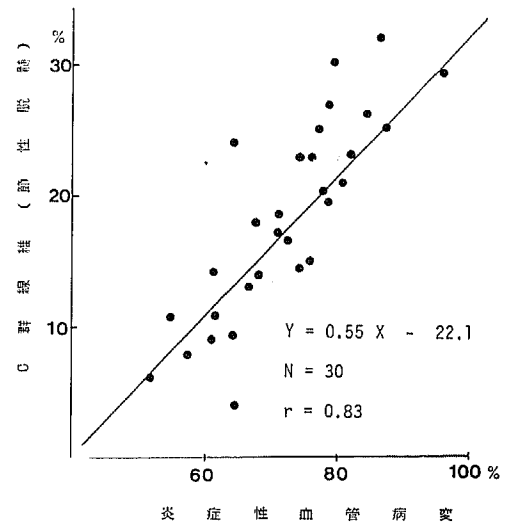


Fig. 10 血管病変と節性脱髄との対比

のびまん性細胞浸潤も観察された (Fig. 4)。さらに神経鞘内の毛細血管、小静脈のうっ血・充血などの循環障害があり、一部の血管で血栓形成を認めたが類線維壊死などの破壊性変化はみられなかった。Epon 包埋 toluidine blue 染色標本でもほぼ同様の所見を認めた (Fig. 5)。



Fig. 11 EAN 発症ラット 坐骨神経 (FITC 標識抗ラット IgG 蛍光染色  $\times 800$ )  
血管壁への IgG の沈着および周辺の神経線維に沿って IgG の沈着を認める



Fig. 12 EAN ラット 坐骨神経 (FITC 標識抗ラット  $C_3$  蛍光染色  $\times 800$ )  
血管壁への  $C_3$  の沈着を認める

髄鞘染色 (Luxol fast blue 染色) では髄鞘の変化が強く、一次的な脱髄病変と考えられたが、軸索の変化も種々の程度に認めた。

ときほぐし線維法を用いた検討では節性脱髄を示す C 群線維 (Fig. 6A) の増加があり、これとともに軸索変性を示す E 群線維 (Fig. 6B) の増加も観察された。

しかし節性脱髄や軸索変性からの再生を示す F 群線維や D 群線維の増加はみられなかった。

次に感作した抗原別の末梢神経病変の性状、程度、分布についての検討では、血管周囲性細胞浸潤および神経鞘内へのびまん性細胞浸潤、脱髄の程度・分布には末梢神経ミエリン投与群、 $P_2$  蛋白投与群で本質的



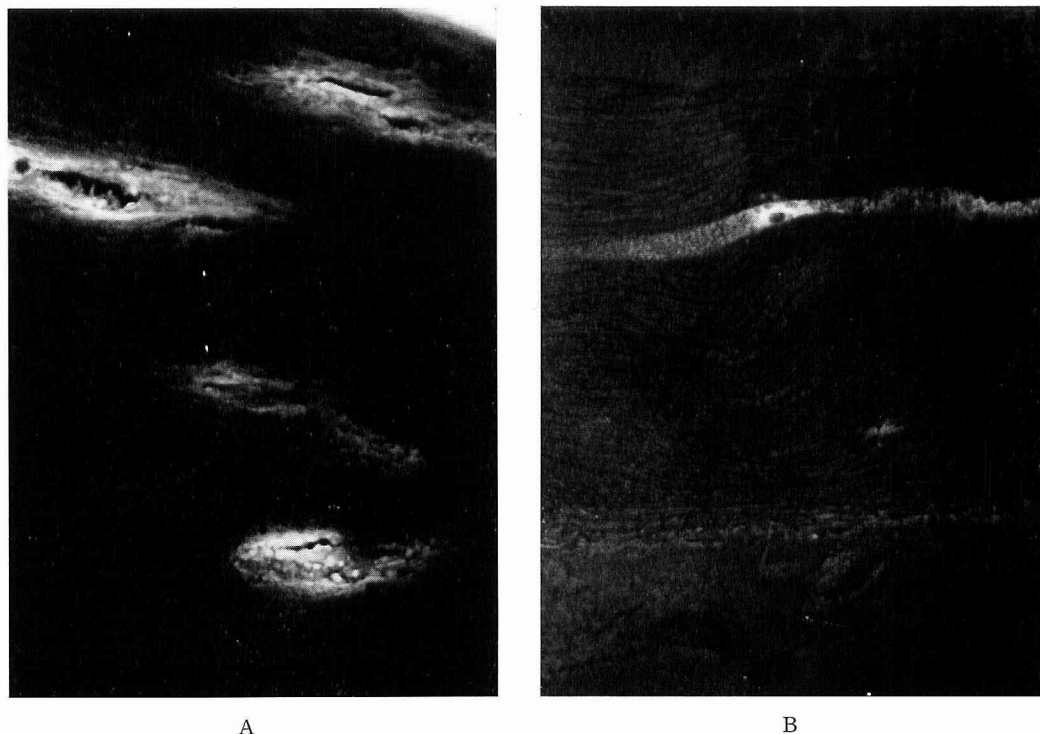


Fig. 13 エバンスブルー・BSA 複合体の静注  
 A. EAN 発症ラット 坐骨神経 (凍結切片, 蛍光顕微鏡下観察 ×400)  
 血管周囲へのトレーサーの漏出を認める。  
 B. 対照ラット 坐骨神経 (凍結切片, 蛍光顕微鏡下観察 ×400)  
 トレーサーは血管内にわずかに認められる。血管外への漏出は認められない。

な差異は認められなかった。

EAN 作製群では屠殺時の血中免疫複合体価と組織病変の程度とを対比した。組織病変のうち血管の炎症性病変については方法でのべた血管周囲性細胞浸潤を伴う血管の割合と血中免疫複合体価との間に相関を認め、血中免疫複合体価の高いものでは血管の炎症性病変が強い傾向を認めた (Fig. 7)。また脱髄および軸索変性の程度を定量化するため実施したときほぐし線維法ではC群線維 (節性脱髄), E群線維 (軸索変性) の占める割合は、血中免疫複合体価の高いものに多い傾向を認めた (Fig. 8, 9)。神経線維変性と血管病変との対比では、炎症性血管病変の強い部位に節性脱髄と軸索変性が多い傾向があり、ときほぐし線維法による検討では血管周囲性細胞浸潤を伴う血管の割合と節性脱髄の程度とは正の相関 ( $r=0.83$ ) を認めたが (Fig. 10)、軸索変性については有意な相関は得られなかった。

末梢神経ミエリン投与群,  $P_2$  蛋白投与群ともに脳、脊髄には血管病変などの組織学的異常は認められなかった。腎臓では EAN 作製群の一部で糸球体メサンギウム細胞の増加, 尿細管や静脈周囲間質の軽度リンパ球浸潤を認めた。

対照群では CFA 単独投与群, CFA+BSA 投与群ともに末梢神経, 中枢神経系に異常所見なく腎糸球体にも有意な変化は認めなかった。

#### 4 免疫組織学的検討:

EAN 作製群では感作した抗原にかかわらず病変のみられた神経鞘内小血管周囲に IgG, IgM,  $C_3$  の顆粒状沈着が FITC 標識蛍光抗体法, HRP 標識酵素抗体法の双方で観察された (Fig. 11, 12)。また抗ラット・アルブミン抗体を用いた蛍光抗体法では血管周囲への細胞浸潤に伴い血管周囲へのアルブミンの漏出を認めた。

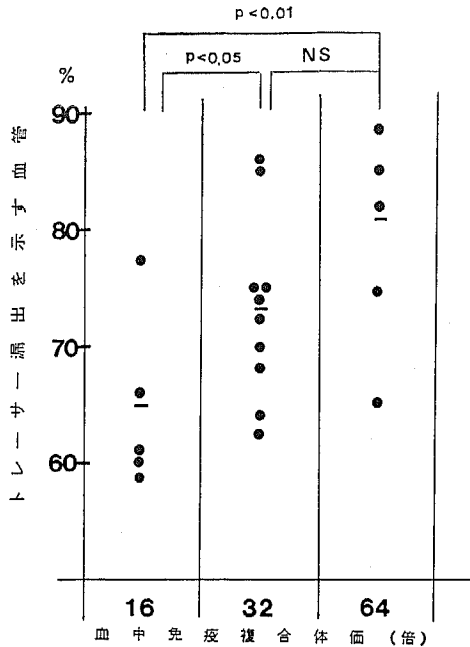


Fig. 14 血中免疫複合体価と血管外へのトレーサー漏出を示す血管の割合を対比

血管周囲性細胞浸潤などの血管病変の程度と血管へのIgG, IgM, C<sub>3</sub>の沈着の時期, 程度とはほぼ一致したが, 一方では組織学的に明らかな変化のない部位の血管壁にも, これら免疫グロブリン, 補体の沈着を認める場合も観察された。

また細胞浸潤, 脱髄病変の著明な部位では神経線維に沿ったIgG, C<sub>3</sub>の沈着も観察されたが, IgMについては明らかではなかった。

対照群では免疫組織学的に有意な所見は得られなかった。

5 トレーサーを用いた血液神経関門の破壊による神経鞘内血管の透過性についての検討: 経時的な検討では, トレーサーの血管外漏出 (Fig. 13A) は抗原接種感作後12日目のものから観察され, これは血中免疫複合体価の上昇の時期にほぼ一致したが臨床症状の発現および血管周囲を中心とした組織病変の出現は, これに遅れて14日目の標本から観察された。

また通常の方法でEANを作製し発症後4日目に屠殺し, トレーサーの漏出と血中免疫複合体価との関係をみた検討では, 血中免疫複合体価の高いものほど血管外へのトレーサー漏出を伴う血管が多い傾向を認めた (Fig. 14)。

これら経時的な検討をおこなったグループおよび通常のEAN作製をおこなったグループに対して, 対照群ではトレーサーは血管内に限局し, 血管外への漏出は認められなかった (Fig. 13B)。

## 考 察

Guillain-Barré 症候群は1916年 Guillain ら<sup>22)23)</sup>により記載された臨床的概念であり, 四肢遠位部および近位部, 体幹をおかす多発根神経炎 polyradiculoneuritis で, 急性経過ののち自然回復すること, 髄液の蛋白細胞解離を伴うなどの特徴を有する。

現在なお本症の病因は不明であるが, ウィルス感染やワクチン接種に続発して発症する症例の存在から, これらとの関連が注目され, また, 次のべる実験的アレルギー性神経炎 (Experimental allergic neuritis: EAN) での知見から末梢神経ミエリンに対する遅延型アレルギー反応の関与も推測されている<sup>24)</sup>が, ウィルス感染, ワクチン接種などに引き続く免疫異常の過程で末梢神経ミエリンに対する遅延型アレルギー反応がいかに獲得されるかなど詳細な機序については今日なお不明である。

今回検討した実験的アレルギー性神経炎 (EAN) は臨床症状や組織所見が類似することから Guillain-Barré 症候群の動物実験モデルと考えられている。歴史的には1965年 Waksman と Adams が末梢神経をCFAとともに実験動物に接種感作することにより単相性の臨床経過を示す末梢神経炎の作製に成功し, Guillain-Barré 症候群同様に髄液の蛋白細胞解離を示し, 病理学的にもリンパ球, 単球, マクロファージ, 多核白血球の浸潤と一次的な脱髄病変を認め, Guillain-Barré 症候群の動物実験モデルと目される様になり<sup>25)27)</sup>, 今日までに広汎な研究がなされている。現在までにEANで検討された内容の主なもののひとつは末梢神経ミエリンを構成する成分のうち神経炎惹起物質についての検討であり, もう1つはEANの発症, 病変形成についての詳細な解析である。前者については近年末梢神経ミエリンの主要構成成分のひとつで塩基性蛋白であるP<sub>2</sub>蛋白が, EAN惹起抗原である可能性が注目されており, 人およびウシの末梢神経から抽出されたP<sub>2</sub>蛋白はルイス系ラットにEAN病変を惹起すること<sup>28)31)</sup>, また組織学的に全ミエリンで作製したEAN病変と本質的に同一であることが知られている<sup>32)</sup>。本研究でも末梢神経ミエリン投与群とP<sub>2</sub>蛋白投与群とでは炎症性病変, 脱髄病変の分布・性状

および程度に本質的な差異は認めておらず、これは従来の知見に一致するものである。

次に EAN の発症・病変形成機序についての検討では、従来細胞性免疫についての検討が主体であり、その知見を総括すれば次のように要約される。すなわち EAN 発症動物の感作リンパ球系細胞によって他の個体に EAN 病変を移入、発症せしめ得ること<sup>33)</sup>、また *in vitro* の実験系として EAN 発症動物からの感作リンパ球系細胞は培養末梢神経細胞の脱髄を惹起せしめ得ること<sup>34)35)</sup>、さらに感作リンパ球系細胞の産生物質は同様に培養末梢神経細胞の脱髄を惹起しうること<sup>36)</sup>などの知見が得られており、臨床的に EAN 発症動物では末梢神経ミエリンに対する皮内反応が成立することなどとも考え合わせ、EAN の発症、病変形成機序に遅延型アレルギーに基づく細胞性免疫反応が深く関与する可能性が推測されている。

しかし一方で抗体・補体といった液性因子からのアプローチもおこなわれ、実験的に *in vitro* の培養末梢神経細胞において EAN 発症動物の血清はランビエール絞輪付近のミエリンの変性、シュワン細胞内のミエリンの泡沫状崩壊などの変化を惹起すること<sup>37)38)</sup>、さらに Saidra らは EAN 発症動物の血清を直接末梢神経鞘内に注入する方法 (intraneural injection) にて脱髄病変を惹起させ得ることを *in vivo* においても証明している<sup>39)40)</sup>。これらの知見は EAN 発症動物の血清中に存在する抗体・補体さらに免疫複合体などの液性因子が脱髄を惹起する可能性を示唆している。

このように EAN の発症、病変形成について細胞性免疫、液性免疫の双方から研究がなされ、一見対立するような知見が得られているが、実際には EAN は細胞性免疫、液性免疫の双方を軸に多くの過程が関与した複雑なアレルギー過程と推測される。

本研究では EAN における血中および組織の免疫複合体について検討し、EAN 発症例では末梢神経ミエリン投与群、P<sub>2</sub> 蛋白投与群とも血中免疫複合体価の上昇を認め、臨床症状、組織病変 (血管の炎症性変化、脱髄および軸索変性) の程度と相関すること、また病変部位の血管への抗体・補体の沈着を認め免疫複合体のこの部への沈着が推測されること、さらにトレーサーを用いた神経鞘内血管の血管透過性との検討では、血中免疫複合体の出現時期と血管透過性亢進の時期および発症の時期とがほぼ一致すること、また血中免疫複合体価と血管透過性の程度とが相関することを明らかにした。

免疫複合体は細胞性免疫・液性免疫の双方の機序に関与することが知られており、血管壁に沈着した免疫複合体は血管透過性を亢進させ種々の炎症細胞や免疫担当細胞のほか、抗体や補体といった液性因子の組織内への浸入、漏出を惹起し、一方では血小板凝集、血管活性アミン放出を介し局所の循環障害を惹起する<sup>41)42)</sup>。本研究での知見は EAN の病変形成においてもこのような免疫複合体による血管透過性亢進や循環障害などの機序がおこっている可能性を示唆する。また免疫複合体は細胞性免疫にも関与する<sup>43)</sup>ことから、リンホカイン産生や標的細胞障害機序を介し EAN の病巣部位へのリンパ球、マクロファージの集簇やミエリンに対する直接障害作用を惹起させる可能性も推測される。以上より免疫複合体は EAN の病変形成において重要な役割をはたす可能性が示唆される。

免疫複合体の生物学的活性の性質、程度はその大きさ、抗原・抗体の性状および抗原・抗体の量的関係に依存し、障害をうける組織、臓器への親和性についても免疫複合体を構成する抗原が、その組織・臓器に対して特異的であるか非特異的であることにより差異を認めると考えられている<sup>44)46)</sup>。本研究では腎糸球体病変を認めたものの血管病変や免疫複合体沈着が末梢神経の神経鞘内血管に優位であったことは通常の水清病型反応とは異なる。本研究で使用した抗原は末梢神経に対して特異的なものであり、免疫複合体を構成する抗原による組織障害の臓器特異性・選択性の存在も推測されるが、今回の知見からはこれについては不明であり今後の問題と考えられる。

免疫組織学的に一部の標本で観察された神経鞘内の神経線維に沿った抗体の存在については、ミエリン・軸索に対する特異抗体の可能性のほか、同時に補体も存在することから免疫複合体を形成している可能性もある。このことは免疫複合体がミエリンや軸索に対して直接に作用している可能性も示唆する。Luijten ら<sup>7)</sup>は Guillain-Barré 症候群の生検末梢神経においてミエリンに沿った抗体・補体の沈着を観察し脱髄における免疫複合体の直接作用を推測しており、また末梢神経ミエリン表面には腎糸球体などと同様に補体 (C<sub>3b</sub>) に対するレセプターの存在が知られており<sup>47)</sup>、免疫複合体がその構成成分である補体を介してミエリンに対し何らかの組織障害作用をひきおこす可能性は十分に考えられるところである。

Guillain-Barré 症候群における免疫複合体の病因的意義については、本症が免疫複合体病である血清病

に伴ない発症する場合があること<sup>48)49)</sup>, 関節痛, 筋肉痛, 発熱, 皮疹など免疫複合体病としての一般的な臨床症状を呈すること<sup>50)51)</sup>, 腎病変の合併が多く<sup>4)-6)</sup> 腎生検組織所見では免疫複合体沈着に伴う腎病変が推測されること<sup>6)</sup>, 患者血清で高率に血中免疫複合体が検出されること<sup>1)-3)</sup>, 本症の生検末梢神経組織で病変部位に一致して免疫複合体の沈着が証明されること<sup>7)</sup>, さらに治療上血漿交換療法が有効であること<sup>52)</sup>などの知見が得られており, 免疫複合体が Guillain-Barré 症候群の病因機序に重要な役割をはたしている可能性が注目されている。これに対し EAN における免疫複合体の病因的意義についての研究はきわめて少なく全ミエリンで感作作製した EAN 発症ラットにて血中および末梢神経・腎における免疫複合体の存在を指摘した Koh ら<sup>53)</sup>の研究をみるに過ぎない。

従来 Guillain-Barré 症候群を代表とする免疫性脱髄疾患における直接的な脱髄形成機序として血管の炎症性病変を重視する立場があり, これは炎症性血管病変が一次的に生じて, その結果として脱髄が惹起されるとする概念(vasculomyelinopathy)である。この概念は1969年 Guillain-Barré 症候群の臨床像, 病理所見に関するそれまでの報告例を広くかつ詳細に検討した Poser<sup>8)</sup>により提唱され, 炎症性血管病変を重視する根拠として, 本症の急性期では病変形成が常に血管周囲性に進行すること, また血管病変が脱髄に先駆して観察されることが指摘された。この概念は先にのべたミエリンを直接の攻撃目標とする細胞性または液性免疫機序からのアプローチと並ぶもう1つの重要な視点として広く受け入れられた。その後 Poser と Behan<sup>9)</sup>はワクチン接種後の Guillain-Barré 症候群発症例についての臨床的検討から, この vasculomyelinopathy における血管病変の惹起因子として細胞性因子よりも液性因子とくに免疫複合体の役割を重視した。

また一方で従来から中枢および末梢神経系の免疫性炎症反応における免疫複合体の重要性が注目されており<sup>54)55)</sup>, 近年 Tsukada らにより B 型肝炎症例にみられた末梢神経障害の機序として B 型肝炎ウィルスを抗原とする免疫複合体の沈着による神経栄養血管の血管炎の関与が指摘され<sup>56)</sup>, さらに実験的にミエリンの構成成分である galactocerebroside にて作製した免疫複合体は白色家兎に末梢神経病変を惹起し, その機序として免疫複合体による血管障害の関与が指摘されている<sup>57)</sup>。これら Poser と Behan<sup>8)9)</sup>, Tsukada<sup>56)57)</sup>らによる最近の知見から vasculomyelinopathy と

いう視点が今日なお重要であること, また免疫複合体との関連すなわち vasculomyelinopathy における血管病変の惹起因子としての免疫複合体の役割が重要視されるところである。

さてこの点に関し本研究で血中免疫複合体価と血管の炎症性病変との間に相関を認めたことは EAN の病因機序においても免疫複合体が主役をなす vasculomyelinopathy が関与する可能性を強く示唆する。

末梢神経系には中枢神経系における血液脳関門と同様に血液神経関門の存在が知られている<sup>58)</sup>。この関門の存在は末梢神経系の内部環境の恒常性を維持し, 血液中の種々の物質が周囲の神経組織内へ無制限に拡散するのを防ぐ上で重要であり, 神経鞘膜上皮や神経内膜の血管内皮細胞などが, この機能を有すると考えられている<sup>59)60)</sup>。神経鞘内における血管透過性亢進はこの機能の低下ないし破綻であり, 種々の病的状態で血液神経関門の機能が検討されており, EAN においても病変形成機序を考える上で重要である。これまでのところ EAN の病変分布・程度および動物種差による EAN 発症率などが血液神経関門の脆弱性に依存すること<sup>61)62)</sup>, EAN の初期病変において血清成分の神経実質内への漏出を認め血液神経関門の破綻が推測されること<sup>63)64)</sup>が知られており, さらに Hahn ら<sup>19)</sup>はエバンスブルーをトレーサーとした検討で EAN の臨床的, 組織学的発症に先駆して血液神経関門の破綻がおこることを指摘している。今回の検討では血中免疫複合体価の上昇と EAN の発症および神経鞘内血管透過性亢進とが時期的にはほぼ一致し, 血中免疫複合体価と血管透過性亢進の程度とに相関を認めたことは, EAN の病変形成機序において血中免疫複合体が血液神経関門の破綻を惹起する可能性を示唆し, また vasculomyelinopathy の概念との関連においても重要な知見である。

今後免疫複合体および炎症性血管病変, 血液神経関門の機能などに注目した検討は EAN および Guillain-Barré 症候群の病因解明のうえできわめて重要と考えられる。

## 結 語

実験的アレルギー性神経炎 (Experimental allergic neuritis: EAN) において免疫複合体の病因的意義を検討し以下の知見を得た。

1 EAN 発症ラットでは末梢神経ミエリン接種群, P<sub>2</sub> 蛋白接種群ともに, 血中免疫複合体価の上昇を認

めた。

2 血中免疫複合体価と臨床症状、組織病変（炎症性血管病変およびときほし線維法における脱髄、軸索変化）の程度とは良い相関を認めた。

3 EAN 発症例では病変部位の血管を中心に、また一部では神経線維に沿った抗体・補体の沈着を認めこれらの部位への免疫複合体の沈着が推測された。

4 トレーサーを用いた神経鞘内血管透過性の検討では血中免疫複合体価上昇と血管透過性亢進および臨床的・組織学的な発症とが時期的にほぼ一致し、また血中免疫複合体価と血管透過性亢進の程度に相関を認めた。このことは EAN 発症ラットでは血中免疫複合体が血液神経関門の破綻に関与している可能性を示唆した。

5 以上から EAN の病変形成に免疫複合体が重要

な役割をはたしており、その機序のひとつとして血液神経関門の破綻が推測された。

## 謝 辞

御指導、御校閲いただきました信州大学柳沢信夫教授に深謝します。また研究に助言、協力して頂いた当教室塚田直敬講師、高昌星博士に深謝します。本研究に貴重な助言を頂き抗原の作製に協力して頂きました本学脂質生化学武富保教授、岡野照先生に深謝します。本研究に貴重な助言を頂きました本学病理学重松秀一教授に深謝します。またウシ P<sub>2</sub> 蛋白を恵与下さいました埼玉医大生理学植村慶一教授に深謝します。

本研究の要旨は第23回日本神経学会総会（1982年5月、東京）および第25回同総会（1984年5月、札幌）にて発表した。

## 文 献

- 1) Dowling, P. and Cook, S. : Circulating complexes in neurologic disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 31 : 161, 1972
- 2) Tachovsky, T.G., Lisak, R.P., Koprowski, H., Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J. : Circulating immune complexes in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet*, II : 997-999, 1976
- 3) Goust, J.M., Chenais, F., Carnes, J.E., Hames, C.G., Fudenberg, H.H. and Hogan, E.L. : Abnormal T cell subpopulations and circulating immune complexes in the Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. *Neurology (Minneapolis)*, 28 : 421-425, 1978
- 4) Behan, P.O., Lowenstein, L.M., Stilmant, M. and Sax, D.S. : Landry-Guillain-Barré-Strohl syndrome and immune complex nephritis. *Lancet*, I : 850-854, 1973
- 5) Whitaker, J.N., Dowling, P.C. and Cook, S.D. : Immunofluorescent studies of the kidney in human neurologic disorders. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30 : 129-130, 1971
- 6) Rodríguez-Iturbe, B., García, R., Rubio, L., Zabala, J., Moros, G. and Torres, R. : Acute glomerulonephritis in the Guillain-Barré-Strohl syndrome. *Ann Intern Med*, 78 : 391-395, 1973
- 7) Luijten, J.A.F.M. and Baart, E.H. : The occurrence of IgM and complement factors along myelin sheaths of peripheral nerves - an immunohistochemical study of the Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci*, 15 : 219-224, 1972
- 8) Poser, C.M. : Disseminated vasculomyelinopathy - a review of the clinical and pathologic reactions of the nervous system in hyperergic diseases. *Acta Neurol Scand [Suppl]*, 45 : 1-44, 1969
- 9) Poser, C.M. and Behan, P.O. : Late onset of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol*, 3 : 27-41, 1982
- 10) Uyemura, K., Tobari, C., Hirano, S. and Tsukada, Y. : Comparative studies on the myelin proteins of bovine peripheral nerve and spinal cord. *J Neurochem*, 19 : 2607-2614, 1972
- 11) Lampert, P.W. : Mechanism of demyelination in experimental allergic neuritis-electron microscopic studies. *Lab Invest*, 20 : 127-138, 1969
- 12) 菅原 潔, 副島正美 : 蛋白質の定量法. 2版, pp.95-132, 学会出版センター, 東京, 1981
- 13) Theofilopoulos, A.N., Dixon, F.J. and Bokisch, V.A. : Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. I. Characterization of receptors for IgG Fc and complement

- and description of the binding mechanism. *J Exp Med*, 140 : 877-894, 1974
- 14) Theofilopoulos, A.N., Wilson, C.B., Bokisch, V.A. and Dixon, F.J. : Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II. Use of Raji cells to detect circulating immune complexes in animal and human sera. *J Exp Med*, 140 : 1230-1244, 1974
- 15) 矢田純一, 沢 文博 : 培養株 Raji 細胞を用いた免疫複合体の検出法. 免疫実験操作法 VI, pp.1753-1756, 日本免疫学会, 1977
- 16) 矢田純一, 沢 文博 : Raji 細胞を用いた血清免疫複合体の検出法. 臨床免疫, 9 : 1001-1006, 1977
- 17) Dyck, P.J., Gutrecht, J.A., Baston, J.A., Karnes, W.E. and Dale, A.J.D. : Histologic and teased-fiber measurements of sural nerve in disorders of lower motor and primary sensory neurons. *Mayo Clin Proc*, 43 : 81-123, 1968
- 18) Nakane, P.K., 高橋 勲 : 酵素抗体法, 組織細胞化学, 1981, pp.9-16, 日本組織細胞化学会, 1981
- 19) Hahn, A.F., Feasby, T.E. and Gilbert, J.J. : Blood-nerve barrier studies in experimental allergic neuritis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 68 : 101-109, 1985
- 20) Wolman, M., Klatzo, I., Chui, E., Wilmes, F., Nishimoto, K., Fujiwara, K. and Spatz, M. : Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)*, 54 : 55-61, 1981
- 21) Kadlubowski, M. and Hughes, R.A.C. : The neuritogenicity and encephalitogenicity of P<sub>2</sub> in the rat, guinea-pig and rabbit. *J Neurol Sci*, 48 : 171-178, 1980
- 22) Guillain, G., Barré, J. and Strohl, A. : Sur un syndrom de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux. *Bull Mem Soc Méd Hôp Paris*, 40 : 1462-1470, 1916
- 23) Guillain, G. : Radiculoneuritis with acellular hyperalbuminosis of the cerebrospinal fluid. *Arch Neurol Psychiat*, 36 : 975-990, 1936
- 24) Arnason, B.G.W. : Inflammatory polyradiculoneuropathies. In : Dyck, P.J., Thomas, P.K. and Lambert, E.H. (ed.), *Peripheral neuropathy*, pp.1110-1148, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1975
- 25) Waksman, B.H. and Adams, R.D. : Allergic neuritis : an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nerve tissue and adjuvants. *J Exp Med*, 102 : 213-236, 1955
- 26) Asbury, A.K., Arnason, B.G. and Adams, R.D. : The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis - its role in pathogenesis. *Medicine (Baltimore)*, 48 : 173-215, 1969
- 27) Lampert, P.W. : Autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. *Am J Pathol*, 91 : 175-208, 1978
- 28) Kadlubowski, M. and Hughes, R.A.C. : Identification of the neuritogen for experimental allergic neuritis. *Nature*, 277 : 140-141, 1979
- 29) Suzuki, M., Kitamura, K., Uyemura, K., Ogawa, Y., Ishihara, Y. and Matsuyama, H. : Neuritogenic activity of peripheral nerve myelin proteins in Lewis rats. *Neurosci Lett*, 19 : 353-358, 1980
- 30) Weise, M.J., Hsieh, D., Hoffman, P.M., Powers, J.M. and Brostoff, S.W. : Bovine peripheral nervous system myelin P<sub>2</sub> protein : Chemical and immunological characterization of the cyanogen bromide peptides. *J Neurochem*, 35 : 393-399, 1980
- 31) Uyemura, K., Suzuki, M., Kitamura, K., Horie, K., Ogawa, Y., Matsuyama, H., Nozaki, S. and Muramatsu, I. : Neuritogenic determinant of bovine P<sub>2</sub> protein in peripheral nerve myelin. *J Neurochem*, 39 : 895-898, 1982
- 32) Rostani, A., Brown, M.J., Lisak, R.P., Sumner, A.J., Zweiman, B. and Pleasure, D.E. : The role of myelin P<sub>2</sub> protein in the production of experimental allergic neuritis. *Ann Neurol*, 16 : 680-685, 1984

- 33) Åström, K.E. and Waksman, B.H. : The passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis and neuritis with living lymphoid cells. J Pathol Bact, 83 : 89-106, 1962
- 34) Winkler, G.F. : *In vitro* demyelination of peripheral nerve induced with sensitized cells. Ann NY Acad Sci, 122 : 287-296, 1965
- 35) Yonezawa, T., Ishihara, Y. and Matsuyama, H. : Studies on experimental allergic peripheral neuritis. (I). Demyelinating patterns studies *in vitro*. J Neuropathol Exp Neurol, 27 : 453-463, 1968
- 36) Ishihara, Y., Matsuyama, H. and Watanabe, R. : Demyelinating activity of lymphocytes and the products of lymphoid cell culture from rabbits with experimental allergic neuritis (EAN) examined in organotypic culture of mammalian peripheral nervous tissue. J Neuropathol Exp Neurol, 37 : 634, 1978
- 37) Raine, C.S. and Bornstein, M.B. : Experimental allergic neuritis : ultrastructure of serum-induced myelin aberrations in peripheral nervous system cultures. Lab Invest, 40 : 423-432, 1979
- 38) 米沢 猛, 石原好弘, 斉田孝彦, 長谷川通規, 岡部英俊, 加藤元一, 中野 瞭 : *In vitro* でのEAN脱髄について—Time lapse cinematography による検索—. 神経進歩, 20 : 354-361, 1976
- 39) Saida, K., Saida, T. and Brown, M.J. Silberberg D.H. and Asbury A.K. : Antiserum-mediated demyelination *in vivo* : a sequential study using intraneural injection of experimental allergic neuritis. Lab Invest, 39 : 449-462, 1978
- 40) Saida, T., Saida, K., Silberberg, D.H. and Brown M.J. : Transfer of demyelination by intraneural injection of experimental allergic serum. Nature, 272 : 639-641, 1978
- 41) 狩野恭一 : 医学免疫学, p.69, 東京大学出版会, 東京, 1979
- 42) 谷本潔昭 : 血管炎と Immune complex. 免疫と疾患, 3 : 25-30, 1982
- 43) Theofilopoulos, A.N. : Evaluation and clinical significance of circulating immune complexes. Prog Clin Immunol, 4 : 63-106, 1980
- 44) 粕川礼司 : 免疫複合体病, pp.30-67, 医歯薬出版, 東京, 1982
- 45) Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J. : Detection of immune complexes : techniques and implications. In : Dixon, F.J. and Fisher, D.W. (ed.), The biology of immunologic disease, pp.309-318, A Hospital Practice Book, Massachusetts, 1983
- 46) 塚田直敬, 高 昌星, 柳沢信夫 : 免疫複合体と神経疾患. 免疫と疾患, 2 : 279-284, 1981
- 47) Nyland, H., Matre, R. and Tönder, O. : Complement receptors in human peripheral nerve tissue. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C], 87 : 7-10, 1979
- 48) Csermely, H. : Demyelinating encephalomyelitis following use of antitetanus serum. Arch Neurol Psychiat, 64 : 676-684, 1950
- 49) Miller, H.G. and Stanson, J.B. : Neurological sequela of prophylactic inoculation. Q J Med, 23 : 1-27, 1954
- 50) Clarke, E.C. and Bailey, A.A. : Neurological and psychiatric signs associated with systemic lupus erythematosus. J Am Med Assoc, 160 : 455-457, 1956
- 51) Garvey, P.H., Jones, N. and Warren, S.L. : Polyradiculoneuritis (Guillain-Barré syndrome) following the use of sulfanilimide and fever therapy. J Am Med Assoc, 115 : 1955-1959, 1940
- 52) Durward, W.F., Burnett, A.K., Watkins, R. and Reid, J.M. : Plasma exchange in the Guillain-Barré syndrome. Br Med J, 283 : 794, 1981
- 53) Koh, C.S., Nakano, T., Tsukada, N., Yanagisawa, N., Okano, A. and Taketomi, T. : Detection of immune complexes in experimental allergic neuritis. J Neurol Sci, 63 : 229-239, 1984
- 54) 塚田直敬, 高 昌星, 塚越 広 : Immune complex による神経組織障害の研究. アレルギー, 29 : 882-889, 1980
- 55) Tsukada, N., Koh, C.S., Yanagisawa, N. and Tsukagoshi, H. : Nervous tissue injury induced by immune complexes. Acta Neuropathol (Berl), 56 : 279-284, 1982

- 56) Tsukada, N., Koh, C.S., Owa, M. and Yanagisawa, N. : Chronic neuropathy associated with immune complexes of hepatitis B virus. *J Neurol Sci*, 61 : 193-211, 1983
- 57) Tsukada, N., Koh, C.S., Yanagisawa, N., Taketomi, T. and Behan, P.O. : Peripheral nervous tissue injury induced by galactocerebroside and galactocerebroside immune complexes. *Acta Neuropathol (Berl)*, 66 : 274-282, 1985
- 58) 福原信義 : 血液—神経関門. *神経進歩*, 23 : 152-169, 1979
- 59) Olsson, Y. : Studies on vascular permeability in the peripheral nerves. I. Distribution of circulating fluorescent serum albumin in normal, crushed and sectioned peripheral nerve. *Acta Neuropathol (Berl)*, 7 : 1-15, 1966
- 60) Waksman, B.H. : Experimental study of diphtheritic polyneuritis in the rabbit and guinea pig. III. The blood-nerve barrier in the rabbit. *J Neuropathol Exp Neurol*, 20 : 35-77, 1961
- 61) Waksman, B.H. and Adams, R.D. : A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig and mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*, 15 : 293-333, 1956
- 62) Olsson, Y. : Studies on vascular permeability in peripheral nerves. IV. Distribution of intravenously injected protein tracers in the peripheral nervous system of various species. *Acta Neuropathol (Berl)*, 17 : 114-126, 1971
- 63) Åström, K.E., Webster, H. and Arnason, B.G. : The initial lesion in experimental allergic neuritis. A phase and electron microscopic study. *J Exp Med*, 128 : 469-495, 1968
- 64) 田淵保則, 入江秀樹, 神庭 誠, 日笠親績, 高橋和郎 : EAN における blood nerve barrier と末梢神経障害. *臨床神経*, 22 : 616-620, 1982

(61. 3. 13 受稿)