

イヌの免疫介在性血小板減少症に対する ヒト IgG 大量静注療法の検討

*Study of intra-venous human immunoglobulin therapy in dogs
with immune-mediated thrombocytopenia*

土屋 亮¹, 久末正晴², 山田隆紹¹

¹麻布大学大学院獣医学研究科

²麻布大学獣医学部

Ryo Tsuchiya¹, Masaharu Hisasue², Takatsugu Yamada¹

¹Graduate School of Veterinary Science, Azabu University,

²School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract: Human intravenous Ig has been used successfully in the treatment of immune-mediated diseases including thrombocytopenia and anemia in dogs. The inhibitive effect of human immunoglobulinG (h-IgG) on the binding of heat-aggregated IgG to canine granulocytes was investigated. Co-incubation with a 50-fold excess of h-IgG inhibited binding and the greatest effect was obtained at 100 μ g/120 μ l of h-IgG and 2 μ g of heat-aggregated IgG. The results obtained support the therapeutic rationale of administration of h-IgG intravenous infusion to dogs with immune-mediated diseases by demonstrating blockage of the IgG Fc receptor on cells which possess the same IgG Fc receptor as cells of the mononuclear phagocyte system.

目 的

免疫介在性血小板減少症 (IMT) は、血小板表面の何らかの物質に対する抗体が結合し、細網内皮系のFcリセプターがこれをとらえて血小板を破壊する疾患である。この他、結合抗体に補体やリンパ球が介在して血小板を破壊する機序も考えられている。イヌのIMTはほとんどが、血小板に対する自己抗体が作用する原発性IMTと考えられている [2]。

イヌの本疾患に対する治療法としては先ず副腎皮質ホルモンなどによる免疫抑制療法が用いられるが、難治性のものが少なからず存在し、またいずれの免疫抑制剤も即効性に乏しいために治療が間に合わないことがある。その他の治療法として、脾臓摘出や

血小板輸血なども挙げられるが、リスクが高い割に効果は乏しく、必ずしも実用的ではない。

ヒトでは古くから本症に対して免疫グロブリンG (Ig) 製剤を大量に静脈注射する治療法が行われている [3]。その効果発現機序は、主として血小板に結合した自己抗体 (主にIgG) を網内系FcRが捕らえる反応を、投与されたIgGが競合的にブロックするという説が有力である。

動物においてこのような同種の血液製剤を大量に入手することは困難であり、この治療法は人医領域に限られたものであった。しかし近年、イヌの原発性IMPや免疫介在性溶血性貧血症例に対してヒトのIgG製剤の投与が試みられ、劇的な効果が得られている [4]。

Table 1 125I-canine HAIgG binding to canine granulocytes with and without h-IgG coincubation (CPM)

HAIgG (μg)	Total CPM	Incubation time		Co-incubation with 50 fold excess of h-IgG		Back- ground
		1hr	3hr	1hr	3hr	
0.5	303463	1204	1849	325	429	163
1	568041	2250	2760	616	842	496
2	1190476	3269	4412	1480	1277	1148
4	2236967	5981	6828	3434	2820	2329

HAIgG: canine heat-aggregated IgG
Granulocyte $1.2 \times 10^6/120 \mu\text{l}$

この治療法は既にイヌに広く応用されているが、まだいくつか明らかにしておくべきことが残されている。おそらく IMT 罹患犬に対してヒトの IgG 製剤を投与した場合も、上で述べたヒトと同様の機序で効果を発揮することが予想されるが、この点は明らかにされていない。この効果機序が明らかになれば、投与後の効果持続時間などを検討することも困難である。

そこで筆者らは、ヒト IgG によるイヌの Fc リセプターブロック効果について *in vitro* で検討した。

方 法

1) 人為的免疫複合体の作製と ^{125}I ラベリング

抗体の結合した血小板は、巨大な免疫複合体と捉えることができる。Fc リセプターは免疫複合体の IgG Fc 部分に結合して、結果的に血小板を破壊するものである。前述したヒト Ig 製剤による Fc リセプターのブロック効果を調べるためには、IgG 免疫複合体が必要である。そこで、人為的なイヌ IgG 免疫複合体として、熱凝集 IgG (HAIgG) を作製した [5]。

イヌ IgG は、健康なイヌの血清から Staphyrococcus Protein A 結合セファロース 4B アフィニティーカラムを用いて粗精製後、Sephadex S300 カラムを用いてゲル濾過により IgG 分画を精製した。次いで精製 IgG を 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.3) で 2 昼夜透析した後、ミリポア社のセントリカットを用いて 27.5 mg/ml に濃縮した。この濃縮 IgG を 57℃ 12 分間加熱して熱凝集 IgG とした。最後に 30% イヌ血清アルブミン液を 1/10 量加え、HAIgG 最終濃度を 25 mg/ml に調製した。

HAIgG は Fraker ら [1] の方法により ^{125}I でラベルし、結合試験に用いた。

2) 顆粒球の分離

EDTA-2Na 処理イヌ全血を 2,000G・15 分間遠心し、形成されたバフィーコート層を回収した。回収したバフィーコート層の赤血球を除去するため、0.2% NaCl 液 (低張液) で 20 秒間溶血させ、ただちに等量の 1.6% NaCl 液を加えて等張に戻した。溶血操作後、フィコールに重層して、2000G・10 分間遠心し、管底の顆粒球を分離後、3% 牛血清アルブミン加 PBS (pH7.1) に $3 \times 10^4/\mu\text{l}$ になるように再浮遊させた。

3) 顆粒球 Fc リセプターと HAIgG の結合及びヒト Ig による阻害効果

上記顆粒球浮遊液 40 μl (細胞数 1.2×10^6 個) と 0.5, 1, 2 及び 4 $\mu\text{g}/40 \mu\text{l}$ の ^{125}I ラベル HAIgG を混和し、これに PBS を加え総量 120 μl として 1 時間反応させた。

ヒト Ig による結合阻害試験としてはまず、顆粒球浮遊液 40 μl に、上記と同じ 4 段階濃度 HAIgG の 5 倍濃度に当たるヒト IgG を 40 μl 加え、次いで 4 段階 HAIgG 40 μl をそれぞれ加えて反応させた。結合阻害試験はそれぞれの濃度の HAIgG について 2 系統ずつ準備し、反応時間を 1 時間と 3 時間設定した。

以上の反応の後、サンプルを 20% 蔗糖液 500 μl を容れた 1.5 ml マイクロチューブに静かに重層し、3,200G・4 分間遠心の後に、血小板の沈降した管底部分を切り離して、ガンマカウンター (アロカ ARC-305 II) で放射活性を計測した。なお測定はすべて 2 重測定とし、それぞれの平均を求めて測定値とした。

結果及び考察

Table1 に、顆粒球に結合した ^{125}I ラベル HAIgG の放射活性 (CPM) を示した。HAIgG は1時間の反応で顆粒球に濃度依存的に結合し、反応時間を3時間に延長することで、さらに若干の結合量増加が認められた。

これに対して50倍量のヒトIgGを同時に作用させると、HAIgGはいずれの濃度においても結合が阻害され、その阻害効果は反応が1時間より3時間で顕著であった。またこの阻害効果はHAIgG濃度が2 μg 、ヒトIgGが100 μg (総液量120 μl) において最も顕著で、バックグラウンドを差し引くと3時間反応では96%強の阻害が認められた。

以上の結果から、IMTを発症したイヌに対するヒトIgGの効果機序として、食細胞による自己抗体結合血小板の貪食を競合的に阻害することが示唆された。臨床的にイヌに対するヒトIgG製剤投与量は0.5～1.0 g/kgとされている。この量を投与した直後のヒトIgG血漿中濃度は、イヌの体重当たりの血漿量(50ml/kg)から単純に換算すると10～20 mg/mlに相当し、今回のin vitro実験で効果が確認された濃度(100 $\mu\text{g}/120 \mu\text{l}$)をはるかに超えることになる。したがってIgG製剤の投与量を基準より減らしても、おそらく当面の効果は十分に得られることが予想される。今後ヒトIgG製剤の適当な投与量や効果持続時間を推定し、また本治療法の副作用についても、特に血栓症発現の可能性や、異種動物のタンパク質を

投与することに対する免疫学的な反応の面から検討したい。

要 約

近年、イヌの原発性IMPや免疫介在性溶血性貧血症例に対してヒトのIgG製剤の投与が試みられ、劇的な効果が得られている。この効果機序を調べるために、熱凝集イヌIgG(HAIgG)の顆粒球への結合に対する、ヒトIgG製剤の阻害効果を検討した。0.5 μg から4 μg のHAIgGの結合に対して、それぞれ50倍濃度のヒトIgGを作用させたところ、HAIgG濃度2 μg 、ヒトIgG100 $\mu\text{g}/120 \mu\text{l}$ において最も強い阻害効果が認められた。

以上の結果から、イヌの免疫介在性血小板減少症に対して用いられているヒトIgG大量静注療法の効果が、IgG Fcリセプターを介した網内系食細胞による血小板貪食の競合的阻害によることが示唆された。

引用文献

- 1) Fraker PJ and Speck JC. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 80: 849-857, 1978.
- 2) Grindem, C. B., Breitschwerdt, E. B., Corbett, W. T. et al. *Vet. Clin. Pathol.* 20: 38-43, 1991.
- 3) Imbach P., Barandus S., d'Apuzzo V. et al. *Lancet* 1 (8232): 1228-1231, 1981.
- 4) Scott-Moncrieff JCR., Reagan Wj., Snyder PW. et al. *JAVMA* 210: 1623-1627, 1997.
- 5) Yousaf N., Howard JC., and Williams BD. *Clin. Exp. Immunol.* 78: 278-284, 1989.