

# 学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	乙 三重大学医学部（耳鼻咽喉科学）	氏 名	にしだ こうへい 西田 幸平
-----	-------------------	-----	-------------------

## 主論文の題名

High-dose IgG suppresses local inflammation and facilitates functional recovery after olfactory system injury

## 主論文の要旨

外傷性嗅覚障害は嗅覚障害の原因疾患としては慢性副鼻腔炎、感冒について3番目に多く、その障害機序は嗅粘膜や篩板における嗅神経軸索の損傷、嗅球、嗅索、眼窩前頭野の挫傷が知られている。

外傷性嗅覚障害の問題点は改善率が低いことである。本来、嗅神経は他の脳神経と比べて損傷後の著明な神経再生と回復能力を持っている。慢性鼻副鼻腔炎とアレルギー性鼻炎に伴う嗅覚障害患者では改善率は68-86%と報告されている。しかし、頭部外傷患者の嗅覚機能障害の臨床的改善率はわずか10-38%にとどまっている。

そこで、我々は外傷性嗅覚機能障害の治療方法の開発研究を、外傷性嗅覚障害モデルマウスを用いて行ってきた。その中で、傷害急性期のステロイド薬や炎症性サイトカインの各種阻害薬投与で、傷害部のマクロファージなどの炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成が抑制され、嗅神経の再生促進および嗅覚機能回復することを明らかにしてきた。しかし、実臨床において、脊髄損傷のない頭部外傷急性期のステロイド薬投与は、感染や他の副作用への懸念を理由に治療ガイドライン上推奨されていない。また、抗IL-6R抗体、TNF- $\alpha$ 阻害薬のような抗炎症作用を持つ薬物は、低頻度であるものの、過剰な免疫抑制による重症感染症発症の惹起し、抗High mobility group box 1 (HMGB1)抗体のようにヒト用製剤が実臨床で使用できないなど、現段階では、外傷性嗅覚障害に対して安全に使用できる有効性が確認された薬物はない。今回、多くの難治性炎症に使用されており、高用量IgGが炎症性サイトカインとケモカインを減少させることで神経保護の役割を果たし、外傷性脳および脊髄損傷の動物モデルにおける中枢神経系の機能的および構造的回復に寄与したという報告があったことから、外傷性嗅覚障害モデル動物での有効性を検討した。

嗅神経線維の変性および再生、嗅神経の再生、グリア瘢痕形成の確認、評価には、嗅神経の観察が容易な遺伝子組み換えマウスであるOMP-tau-lacZマウスを用いた。OMPはすべての成熟した嗅覚ニューロンで発現し、tau-lacZレポーター遺伝子で置き換えることにより、嗅神経線維と嗅球系球体へのそれらの投射を視覚化することができる。マウスにペントバルビタールを腹腔内注射して全身麻酔し、前頭開頭で嗅球を露出させ、嗅球と篩板の間に弯曲した硬いステンレス製カッターを挿入して、嗅神経を切断し、外傷性嗅覚障害モデルマウスを作製した。神経切断手術は組織学的実験では左側のみ実施し、右側（嗅球と神経）は無傷のままで、内部の組織学的コントロールとした。行動学的実験では両側とも行った。嗅神経切断術の直後にIgG溶液を腹腔内注射した。IgGの低用量（200 mg / kg）と高用量（400 mg / kg）および対照として生理食塩水（35ml/kg）の3群を設定し、それぞれ4つの回復時点（5, 14, 42, 100日目）で6匹ずつのマウス（合計72匹）よりデータ

を収集した。

組織標本作成は 4%パラホルムアルデヒドで心臓内灌流固定、頭部をさらに後固定、脱灰処理後、30%スクロースで 2 日間凍結保護した。次に OCT 包埋後、急速冷凍した。クリオスタットで、30  $\mu$ m 厚の鼻腔および鼻背に沿った嗅球を通る連続水平切片を作成した。各種染色を行い、CCD カメラでデジタル画像化し、嗅神経の再生、グリア瘢痕形成、マクロファージの局所浸潤などの程度を定量化して測定、高用量 IgG の効果を調べるとともに、用量依存的であるかも確認した。

嗅神経は X-gal 染色で青色に発色する嗅神経線維が糸球体に再投射する程度で評価し、局所に造成した炎症組織と共に Image J を用いた画像解析で定量した。嗅球傷害程度のマーカーとして、グリア瘢痕内の活性化星状膠細胞を抗 GFAP 抗体で、炎症反応のマーカーとしてマクロファージなどの組織球を抗 CD68 抗体で確認し、5 カ所の 0.01mm<sup>2</sup> のサンプリング領域の GFAP および CD68 陽性細胞の平均数を計算した。嗅神経の再生は、100 日目には IgG を注射したマウスで用量依存的に有意に高いレベルの神経回復が見られた。神経切断側のグリア瘢痕の量は 5 日目に増加し、14 日目以降に徐々に減少し、低用量および高用量の IgG 投与群で対照群よりも有意に少なかった。GFAP 陽性細胞と CD68 陽性細胞はどちらも 5 日目に嗅球の神経切断側で増加し、14 日目以降徐々に減少し、対照群と比べて有意に、且つ用量依存的に少なくなった。

嗅覚機能評価は、行動学的実験で行った。ナラマイシン（シクロヘキシミド）に対する嗅覚嫌悪学習が成立したマウスに対して、両側の嗅神経切断を施行した。高用量の IgG を注射したマウスでは、対照群よりも有意に多くの嗅覚回復例が認められた。

以上の結果より、外傷後急性期の高用量 IgG 投与は嗅神経切断後の嗅神経再生促進と嗅覚機能回復に有効であり、この臨床応用は外傷性嗅覚障害の予後成績向上に貢献するものと考えられた。