実験的コラーゲン起因性関節炎

九州大学整形外科

香月 一朗・貝原 信紘

仏淵 孝夫・植田 尊善

九州中央病院整形外科

柴田 堅一郎

Experimental Collagen Induced Arthritis

by

I. Katsuki, N. Kaibara, T. Hotokebuchi, T. Ueda

Department of Oathopaedic Surgery, Faculty of
Medicine, Kyushu University

K. Shibata

Department of Orthopaedic Surgery, Kyushu Chūō Hospital

We tried to make an experimental arthritis by means of intra-articular injection of type II collagen derived from human, bovine and pig cartilage. Forty-eight rabbits with a weight of 2.5-3.0 kg, immunized with human, bovine or pig type II collagen, received 1 intra-articular injection of the same antigen in the right knee and PBS or 0.1 M acetic acid in the left knee.

The grading of the inflammation was examined by clinical and histological investigations. Histological investigations of synovial membrane of joints showed distinct signs of chronic synovitis, such as hypertrophy and hyperplasia of synovial lining cells infiltration of mononuclear cells.

In another experiment, a group of rabbits was immunized with bovine type II collagen and had a subsequent intraarticular injection of pig type II collagen in the left knee. These animals showed mild inflammatory reactions, in the left knees. It was suggested that there was a cross reactivity between pig and bovine type II collagen.

はじめに

家兎における慢性非特異性関節炎作製実験は1962年 Dumonde, Glynn らにより始められた抗原起因性関節炎が多く用いられている。抗原としてコラーゲンをを用いた実験は、ラットでは Trentham, Stuart, Morgan らの報告がみられるが、家兎では Steffen らのヒト硬膜より抽出し、ハイドロキシラミン処理したコラーゲンをを用いた報告のみである。今回、われわれはヒト、牛、豚の関節軟骨より抽出した native コラーゲンをを用い、同様の実験を行なった。

方 法

実験対象は 2.5~3.0 kg の家兎 48 羽で原則として右膝関節を実験側、左膝関節を対照側とした。

抗原として使用したペプシン可溶性コラーゲンはヒト切断肢、牛、豚の関節軟骨より Trentham らの方法に従い抽出した。抽出したコラーゲンは 2 mg/ml となるように 0.1 M 酢酸で溶解した。

感作方法は抽出したコラーゲン溶液と完全フロインドアジュバントを 1:1 の容積でエマルジョンを作製し、家兎後肢足蹠皮内に各 1 ml ずつ注入した。感作

後2週目で皮膚反応を施行し、4時間後、24時間後に判定した。遅延型皮膚反応陽性である事を確認した後、右膝関節にペプシン可溶性コラーゲン 1 ml (2 mg/ml) を、左膝関節に PBS あるいは 0.1 M 酢酸/ml を膝蓋腱外側より関節内注入した。なお、感作後2週目で追加免疫としてペプシン可溶性コラーゲン 5 mg を腹腔内注入した群では、追加免疫後2週目で皮膚反応、関節内注入を施行した。また一部では左膝関節に感作コラーゲンとは異なる種より抽出したコラーゲンを抽入した。関節内注入後、1, 2, 3, 6 週および3カ月でト殺し、両膝関節を採取し、組織学的に検索した。

結 果

皮膚反応は表1に示すように、20倍稀釈のペプシン可溶性コラーゲン、20倍稀釈の 0.1 M 酢酸、PBS につき施行した。ペプシン可溶性コラーゲンに対しては牛コラーゲンで感作した群で反応の弱い例が認められたが、全例遅延型皮膚反応陽性であった。0.1 M 酢酸に対しては若干の過敏反応が認められたが PBS に対しては陰性であった。

組織学的所見

採取した膝関節を組織学的に検索すると程度の差は認められるものの全例に滑膜炎が認められた。Phillips らの報告に従い Grading を試みた。

Grade 1 滑膜増殖を認めるが、リンパ球・形質球の浸潤が乏しい。

Grade 2 リンパ球・形質球の浸潤が認められる。

Grade 3 リンパ球・形質球の著明な浸潤を認め、リンパ濾胞様の細胞集合像を認める。

図1 滑膜像(3カ月)
滑膜の肥厚増殖を認める

表2 Grade of Arthritis

	Grade		
	I	II	III
1 W	0/3	3/3	0/3
2 W	1/6	4/6	1/6
3 W	1/10	5/10	4/10
6 W	1/7	3/7	3/7
3 M	0/1	1/1	0/1
acute	2		

表2に示すごとく1週群では2例に急性像を混在する所見が認められた。肉眼的には関節液貯留、広範な出血を認め、組織学的にはリンパ球・形質球の浸潤と共に、多核白血球の浸潤が認められた。2, 3週群では滑膜細胞の肥厚増殖、リンパ球・形質球の浸潤が著明で Grade 2, 3 に属する所見であった。6週群では2, 3週群に比し、関節液貯留を呈する頻度は減少したが、組織学的には典型的な慢性炎症像を示していた。3カ月経過した1羽でも図1のごとく滑膜細胞

表1 Skin Test

	immunized with	skin tested with				PBS
		Type II collagen			0.1 M Acetic A	
		Human	Bovine	Pig		
Human type II collagen	4 hours 24	5.7× 5.6 11.1×10.6			2.0× 2.0 1.7× 1.7	(-) (-)
Bovine type II collagen	4 24		6.6× 7.1 9.7× 9.9	5.1× 5.1 8.3× 9.0	1.6× 1.7 1.2× 1.3	(-) (-)
Pig type II collagen	4 24		5.3× 5.3 11.2×11.2	4.6× 4.6 10.4×10.2	1.7× 1.7 2.5× 2.5	(-) (-)

図2 滑膜像

CFA+牛軟骨抽出コラーゲンで感作
(A) 左膝—豚軟骨抽出コラーゲン注入
(B) 右膝—牛軟骨抽出コラーゲン注入

は数層に増殖し、細胞浸潤と共に血管新生像を認め、慢性滑膜炎が存続していた。

また牛抽出コラーゲンで感作し、右膝関節に感作コラーゲンを左膝関節に豚抽出コラーゲンを関節内注入した群はいまだ3週しか経過していないが、図2に示すような滑膜炎を認めた。

考 案

Trentham かが異種あるいは同種のⅡ型コラーゲンを不完全フロイドアジュバントと共にラット背部皮内あるいは足趾皮内に注入することにより40~50%に多発性関節炎が発症すると報告している。一方Ⅰ型、Ⅲ型コラーゲンでは関節炎の発症をみていない。家兎におけるコラーゲンをを用いた報告は Steffen らによりなされている。彼らはヒト硬膜より抽出し、ハイドロキシラミン処理した後、完全フロイドアジュ

バントと共に足趾皮内に注入した後、同一コラーゲンを関節内注入する事により関節炎の発症をみたとしている。しかし、native なⅡ型コラーゲンをを用いた報告はない。そこでわれわれは関節軟骨より抽出したペプシン可溶性コラーゲンをを用い、関節炎作製を試みた。その結果全例に慢性関節炎の発症が認められた。また牛抽出コラーゲンで感作した群で豚抽出コラーゲンを注入した関節でも関節炎の発症が認められ、両コラーゲンには非特異的抗原性が存在する可能性が示唆された。

ま と め

1. ヒト、ウシ、ブタ関節軟骨より抽出したペプシン可溶性コラーゲンをを用い、慢性非特異性関節炎作製を試みた。
2. 全例に慢性関節炎の発症を認めた。
3. 遅延型皮膚反応陽性で、細胞性免疫の関与が考えられた。
4. ウシ、ブタ関節軟骨より抽出したコラーゲンに種非特異性抗原が存在する可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Dumonde, D. C., et al.: Brit. J. Exp. Path. 43: 373-383, 1962.
- 2) Morgan, R. B., et al.: Ann. Rheum. Dis. 39: 285-290, 1980.
- 3) Phillips, J. M.: Ann. Rheum. Dis. 25: 165-174, 1966.
- 4) Steffen, C., et al.: Z. Immun. Forsch. 139: 219-227, 1970.
- 5) Steffen, C., et al.: Z. Immun. Forsch. 150: 432-446, 1975.
- 6) Steffen, C., et al.: Immunology, 32: 161-169, 1977.
- 7) Sreffen, C., et al.: Z. Rheumatol. 37: 275-285, 1978.
- 8) Stuart, J. M., et al.: Arthritis Rheum. 22: 347-352, 1979.
- 9) Stuart, J. M., et al.: Arthritis Rheum. 22: 1344-1351, 1979.
- 10) Trentham, D. E., et al.: J. exp. med. 146: 857-868, 1977.