コ ラ ー ゲ ン 関 節 炎

—II型コラーゲンに対して免疫学的寛容が成立したラットへの血清移入—

総合せき損センタ —整形外科

森 永 政 博

九州大学 整形外科

貝 原 信 紘・佛 淵 孝 夫

高 岸 憲 二

浜の町病院 整形外科

有 田 親 史

Serum Transfer of Collagen Arthritis to Cyclosporin-Treated, Type II Collagen Tolerant Rats

by

Masahiro Morinaga,

Department of Orthopedic Surgery, Spinal Injuries Center

Nobuhiro Kaibara, Takao Hotokebuchi and Kenji Takagishi

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka

Chikafumi Arita

Department of Orthopedic Surgery, Hamanomachi Hospital, Fukuoka

The present experiments were aimed to investigate the pathogenesis of collagen arthritis more fully using the passive transfer system.

In this work, we intended to dissect some of the immunopathologic reactions by producing collagen arthritis by passive transfer of a serum concentrate from immunized donors to the rats in that antigen-specific suppression was achieved by pharmacologic manipulation. We provide evidence that collagen arthritis can be passively transferred with a serum concentrate to immunologically naive recipients as well as cyclosporin-treated, type II collagen tolerant rats. In addition, significant enhancement and a longer duration of the passively transferred arthritis are induced if cyclosporin is being given continuously. The results of the present experiments indicate that collagen arthritis can be inducible by humoral immunity alone.

The results also suggest that a cellular suppressor system, sensitive to cyclosporin, might participate in the regulation of arthritis, once initiated.

は じ め に

コラーゲン関節炎の発症メカニズムに関しては、いまだ不明な点が多い。Stuart らによると、コラーゲン関節炎は、免疫グロブリン濃縮血清にて、serum transfer が可能であり、関節炎発症早期にはII型コラーゲ

ンに対する抗体が重要な役割を果しているものと考えている。我々もまた、これまでにコラーゲン関節炎の発症メカニズムに対する種々な実験を行ってきて、コラーゲン関節炎の発症早期には、液性免疫が極めて重要な役割を果しているものと考えている。そこで、今回、我々は、コラーゲン関節炎の発症メカニズムを、

さらに明らかにすることを目的として、コラーゲン関節炎を発症させたラット血清を用いて、正常ラット及び helper T-cell の特異的阻害剤である Cyclosporin A 投与により II 型コラーゲンに対して特異的な免疫学的寛容が成立したラットへの血清移入実験を行い、検討を加えたので報告する。

材料及び方法

1) ラット：6 週令の雌性 Sprague-Dawley rat (130~160) を用いた。

2) コラーゲン関節炎作製法：

コラーゲン関節炎は、既報のごとく、牛関節軟骨より抽出した II 型コラーゲンを 0.1 M 酢酸に溶解し、等量の incomplete Freund's adjuvant (ICFA) と共に、1.5 mg/ml の emulsion を作り、SD ラットの背部及び尾根部に皮内注射して作製した。

3) Cyclosporin 投与法

Cyclosporin は、オリーブ油で溶解し、25 mg/ml の濃度にした。

II 型コラーゲンに対して、免疫学的寛容が成立したラットは、II 型コラーゲンで免疫する前日より 15 日間あるいは 32 日間 Cyclosporin を連続経口投与して作製した。

4) 移入用血清の作製

II 型コラーゲンで免疫後、28 日目に心臓採血により採取した血清を、まず、関節炎 (+) 群と関節炎 (-) 群に分けた。さらに、硫酸による塩析を行い、グロブリン分画を得て、1/2 量に濃縮して移入用血清とした。

5) 関節炎の評価

関節炎の強さの評価については、従来より用いている評価法に従い、0~4 点までの 5 段階で表わし、合計 16 点として評価した。

6) DTH Skin Testing 及び IgG Antibody levels

細胞性免疫については、最後に II 型コラーゲンで免疫してから 25 日目に、II 型コラーゲンに対する遅延型皮膚反応 (DTH Skin Testing) を用い測定した。II 型コラーゲンに対する抗体は、enzyme-linked immunoassay (ELISA) 法を用いて測定した。

結 果

II 型コラーゲンで免疫後 28 日目に採取した移入用血清の IgG 量は、関節炎 (+) 群で 284 mg/dl であり、関節炎 (-) 群では 30 mg/dl であった、8~9 週令の

正常 SD ラットに血清移入を行った結果、Table I で示すように、関節炎の発症は、関節炎 (+) 群の濃縮血清 3 ml を移入したものでは 14/15 (93%) に、2 ml 移入したもので 12/15 (80%) に、1 ml 移入したものでは 6/13 (46%) の発症をみた。また、関節炎 (-) 群の濃縮血清 3 ml 移入したもののでも、1/6 (17%) に関節炎が発症した。血清移入後の関節炎の発症は急速で recipients の半数は、24 時間以内に発症した。残りも 24 時間から 72 時間以内に関節炎の発症をみた。しかし、発症した関節炎の大部分は一過性のものであった。

Table I Passive Transfer of Collagen Arthritis with a Serum Concentrate to Naive Recipients

	Incidence of arthritis	Arthritic index	Duration of arthritis
Arthritic 3 ml	14/15 (93%)	5.1 ± 0.4	12.4 ± 2.2
2 ml	12/15 (80%)	4.9 ± 0.4	7.9 ± 1.2
1 ml	6/13 (46%)	4.3 ± 0.7	9.8 ± 2.4
Nonarthritic 3 ml	1/6 (17%)	4	5

recipient における、抗コラーゲン抗体価は、Fig. 1 で示されるように、移入された濃縮血清の量に dependent であった。

Fig. 1.

- : 3 ml of a serum concentrate from arthritic donors
- : 2 ml of a serum concentrate from arthritic donors
- : 1 ml of a serum concentrate from arthritic donors
- : 3 ml of a serum concentrate from nonarthritic donors

Table II Immunologic Tolerance Mediated by Cyclosporin

	Type II collagen (day 0)				Olive oil (days -1 to 13)
	Cyclosporin (days -1 to 13)		Cyclosporin (days -1 to 30)		
	(-)	Type II collagen (day 17)	(-)	Type II collagen (day 17)	
Incidence of arthritis	0/8 (0%)*	2/8 (25%)*	0/8 (0%)*	0/9 (0%)*	52/60 (87%)
Arthritic index	—	3.5±0.5	—	—	6.3±0.3
Antibody level	0.8±0.7*	17.0±6.0*	0*	0.1±0.1*	101.0±6.3
DTH skin reaction	1.3±1.0*	4.2±0.7**	2.3±0.8*	2.4±0.8*	5.3±0.2

*P<0.001 vs. the oil group.

**P<0.05 vs. the oil group.

Table III Passive Transfer of Collagen Arthritis to Cyclosporin-treated, Type II Collagen Tolerant Rats

	Type II collagen (day 0)			
	Cyclosporin (days -1 to 13)		Cyclosporin (days -1 to 30)	
	Serum concentrate (day 17)		Serum concentrate (day 17)	
	3 ml	1 ml	3 ml	1 ml
Incidence of arthritis	13/14 (93%)	6/7 (86%)	12/14 (86%)	2/7 (29%)
Arthritic index	4.5±0.5	3.3±0.4	7.8±0.5*	3.0±1.0
Duration of arthritis	9.1±1.4	6.7±0.7	23.0±2.3#	13.0±7.0
Antibody level				
Day 17	88.9±2.7(5)	32.4±1.5(5)	90.7±4.7(4)	30.8±0.7(3)
Day 18	37.8±1.6(5)	15.2±1.5(5)	32.4±2.9(4)	16.7±1.3(3)
Day 24	16.8±1.6(5)	5.8±0.3(5)	11.5±0.4(4)	3.1±1.1(3)
Day 31	7.6±0.4(5)	4.8±0.6(5)	5.5±0.5(4)	1.7±0.8(3)

*P<0.001 vs. the naive recipients in Table I.

#P<0.005 vs. the naive recipients in Table I.

Table II は、Cyclosporin を II 型コラーゲンで免疫する前日より 15 日間あるいは 32 日間連続経口投与し、それぞれの群の半数に対し 17 日目に、II 型コラーゲンで再免疫を行ったことを表わしている。また対象のオリーブ油を 14 日連続経口投与したものに対して、17 日目に II 型コラーゲンで免疫を行ったことを表わしている。その結果、我々がこれまでに報告してきたように、II 型コラーゲンで免疫し、Cyclosporin 投与を行ったものでは、完全な関節炎の発症の抑制がみられた。また、II 型コラーゲンで免疫し、Cyclosporin を投与したものに対し、17 日目に II 型コラーゲンで再免疫を行っても、関節炎の発症は抑制された。これは、II 型コラーゲンで免疫し、Cyclosporin 投与したラットは、II 型コラーゲンに対して免疫学的寛容が成立したと思われる。このように免疫学的寛容が成立したラットを recipient として、serum transfer を行った。

Table III は、II 型コラーゲンで免疫し、Cyclosporin を 15 日間投与したラットに、17 日目で血清移入を

行った結果を示しており、3 ml 移入群では、93 % に関節炎が発症した。II 型コラーゲンで免疫し、Cyclosporin を 32 日間投与したラットに、17 日目で血清移入を行ったところ、3 ml 移入群で 86 % に関節炎が発症し、この群での関節炎は他の群に比し、有意に強く、また長期間持続した。(Fig. 2) しかし、これらのラットにおける抗 II 型コラーゲン抗体価は、Table I の naive recipients の抗体価と明らかな相違は認められなかった。

次に免疫をしていないラットに対し、関節炎 (+) の濃縮血清を移入して、Cyclosporin を血清移入前日より 15 日間連続経口抗と行った結果を Table IV に示す。この結果、血清移入を行い、Cyclosporin を投与したラットではコントロールの recipient と同程度の関節炎を認めた。関節炎の発症及び強さ、そして関節炎の持続期間も、コントロールの recipient と明らかな差は認めなかった。

Fig. 2.

- : cyclosporin-treated (days -1 to 30), type II collagen tolerant rats
- : cyclosporin-treated (days -1 to 13), type II collagen tolerant rats
- : naive recipients

Table IV Effect of Cyclosporin on the Passively Transferred Arthritis

	Cyclosporin (days- 1 to 13)	
	Serum concentrate (day 0)	
	3 ml	1 ml
Incidence of arthritis	8/8 (100%)	4/8 (50%)
Arthritic Index i	4.0±1.0	3.5±1.0
Duration of arthritis	10.0±2.7	9.8±4.1

考 察

Cyclosporin は, in vivo および in vitro の研究の結果から, T-cell レベルで顕著な効果を発揮するといわれている新しい有力な免疫抑制剤である。我々は,すでに Cyclosporin 投与で, コラーゲン関節炎の発症が抑制されるばかりでなく, II型コラーゲンに対する液性免疫および細胞性免疫が抑制されることを報告した。最近の報告で, 我々は, II型コラーゲンあるいは完全フロイントアジュバントでおのおの感作して, Cyclosporin 投与を行ったラットは, 同一抗原で再感作すると, 関節炎の発症は抑制され, それ以外の抗原刺激に対しては, 通常の免疫反応を示すことを報告した。これらのことは, Cyclosporin 投与で抗原特異的

な免疫学的寛容が成立しているということを意味するものである。すなわち, II型コラーゲンで免疫し, Cyclosporin の投与を受けたラットは, II型コラーゲンに対して, 免疫学的寛容が成立していると考えられる。Cyclosporin が特異的な免疫学的寛容を確立する機序は明らかではないが, Cyclosporin は, helper T-cell を特異的に抑制し, 一般的には suppressor T-cell には, 影響を与えないものと考えられている。

今回の実験の目的は, ラットにおけるコラーゲン関節炎の発症メカニズムをより詳細に明らかにすることであり, recipient として Cyclosporin を投与し, II型コラーゲンに対し, 免疫学的寛容が成立しているラットを用いた。これらのラットにII型コラーゲンで再免疫を行っても関節炎が発症しなかったが, 濃縮血清を移入すると naive recipient と同様に関節炎が発症した。このことは, コラーゲン関節炎の発症にはコラーゲン抗体が重要な役割を果していることを意味し, II型コラーゲンに対する細胞性免疫は, 関節炎発症には必ずしも必要ないものと考えられた。しかし, II型コラーゲンは, T-dependent な抗原であるためコラーゲン抗体産生のために作用する helper T-cell の重要性は除外できない。

血清移入により発症する関節炎は, 通常, 一過性のものであるが, Cyclosporin 投与により, II型コラーゲンに対して免疫学的寛容が成立したラットへの血清移入で発症した関節炎は, naive recipient にみられた関節炎よりも強く, また, 長期にわたって持続した。しかし, 両者において血清抗コラーゲン抗体価に有意の差は認められなかった。このことから, Cyclosporin 投与で, suppressor T-cell が一部抑制され, これが関節炎を増強し, また長期間持続させた可能性が考えられる。

以上, 今回の実験結果から, コラーゲン関節炎は, 抗コラーゲン抗体のみにて誘導できることが明らかとなった。さらに, Cyclosporin に感受性を有す suppressor T-cell が, 関節炎の強さおよび持続をコントロールしている可能性が考えられた。

ま と め

コラーゲン関節炎の発症メカニズムを, 明らかにすることを目的として, Cyclosporin 投与により, II型コラーゲンに対して免疫学的寛容が成立したラットへの血清移入実験を行った結果, コラーゲン関節炎は,

抗コラーゲン抗体のみにて誘導できることが明らかになった。

References

- 1) Kaibara, N. et al.: Paradoxical effects of cyclosporin A on collagen arthritis in rats. *J. Exp. Med.* 158: 2007, 1983.
- 2) Stuarts, J. M. et al.: Type II collagen-induced arthritis in rats: passive transfer with serum and evidence that IgG antibodies can cause arthritis. *J. Exp. Med.* 155: 1, 1982.
- 3) Stuarts, J. M. et al.: Serum transfer of collagen-induced arthritis. II. Identification and localization of autoantibody to type II collagen in donor and recipient rats. *Arthritis Rheum.* 26: 1237, 1983.
- 4) Stuarts, J. M. et al.: Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* 158: 378, 1983.
- 5) Wang, B. S. et al.: Evidence for the presence of suppressor T lymphocytes in animals treated with cyclosporin A. *J. Immunol.* 128: 1382, 1982.

~~~~~