血清移入によるヌードラットのコラーゲン関節炎

九州大学整形外科

高 岸 憲 二・貝 原 信 紘
有 田 親 史・佛 淵 孝 夫
森 永 政 博Serum Transfer of Collagen Arthritis in nude Rats
—a preliminary study—

by

Kenji Takagishi, Nobuhiro Kaibara, Chikafumi Arita
Takao Hotokebuchi and Masahiro Morinaga

Department of Orthopedic Surgery Faculty of Medicine, Kyushu University

We have studied the role of cellular immunity in collagen arthritis using athymic nude rats and their littermates. Immunization with type II collagen induced polyarthritis and definite immunity to type II collagen in normal rats, whereas nude rats did not develop arthritis nor immunity to collagen. An additional study demonstrated that collagen arthritis could be passively transferred with a serum concentrate from Sprague-Dawley rats to naive nude rats as well as their littermates. Despite no difference in clearance of anti-type II collagen antibody after transfer between nude rats and normal rats, the passively transferred arthritis in nude rats was significantly enhanced and prolonged as compared with that in normal rats. These results indicate that arthritis can be inducible by humoral immunity in the absence of functional T cells, and also suggest that anti-type II collagen antibody is not the sole regulatory factor and that suppressor cell system might play a role in regulation of the clinical course of the disease.

ラットのコラーゲン関節炎は関節軟骨より抽出した II 型コラーゲンを免疫することにより惹起される多発性関節炎であり、慢性関節リウマチの実験モデルと考えられている¹⁵⁾¹⁶⁾。この関節炎発症のメカニズムには、II 型コラーゲンに対する液性免疫が強く関与していると考えられるが、細胞性免疫の関与については議論の多いところである⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。

今回、われわれは成熟 T 細胞をほぼ完全に欠損しているヌードラットおよび成熟 T 細胞を持つそのヘテロ型を用いて血清移入もしくは II 型コラーゲンによる免疫を行ない、関節炎発症における細胞性免疫の役割を検討したので報告する。

材料および方法

使用せる動物は、両実験共に 6 週令の雌性ヌード

ラット (rnu/rnu) あるいはそのヘテロ型 (rnu/+), それぞれ 6 匹ずつである。

II 型コラーゲンによる免疫は、ヌードラットおよびそのヘテロ型を既報の如く 1.5 mg の牛 II 型コラーゲンをオイルエマルジョンとし、皮内注射した⁴⁾。

血清移入は、5 週令の雌性 SD ラットを同様に免疫し、4 週目に全血を採取して関節炎群の血清から硫酸による塩析を用いグロブリン分画を抽出した後、PBS にて 2 倍濃縮血清を作製してヌードラットおよびそのヘテロ型に 2.5 ml ずつ静注した¹¹⁾。濃縮血清中の抗 II 型コラーゲン IgG 抗体は 269 mg/100 ml であった。

細胞性免疫は、Griffiths らの方法に従って II 型コラーゲンに対する遅延型皮膚反応で測定し、抗 II 型コラーゲン IgG 抗体は ELISA 法にて測定した²⁾⁵⁾。

結 果

1) II型コラーゲンによる免疫

II型コラーゲンによる免疫にて、ヌードラットは関節炎が発症せず、そのヘテロ型は免疫後11日目から14日目までに6匹中全て関節炎が発症した(表1)。

表1 II型コラーゲンによる免疫

	ヌードラット	ヘテロ型	P value
発症率	0 / 6	6 / 6	$P < 0.004$
関節炎指数	—	9.4 ± 2.3	
発症II	—	11.6 ± 1.3	
抗体価 (mg/100ml)	0.0016 ± 0.0004	10.6 ± 1.3	$P < 0.001$
遅延型皮膚反応	0	5.4 ± 1.2	$P < 0.001$

免疫後30日目に測定した抗II型コラーゲンIgG抗体は、ヌードラットには微量もしくは全く存在せず、そのヘテロ型には10.6 mg/100 mlとヌードラットに比較して有意に高く存在した。

II型コラーゲンに対する遅延型皮膚反応は免疫後33日目に測定したが、ヌードラットは陰性で、そのヘテロ型は明らかな高値を示した。

2) 血清移入

血清移入にてヌードラットおよびヘテロ型すべてに移入後24~96時間以内に関節炎が発症した。

関節炎を発症したヌードラットの組織像では、滑膜の肥厚・炎症細胞の滲潤・関節軟骨の erosion などが認められ、そのヘテロ型の血清移入による関節炎およびII型コラーゲンによる免疫による関節炎の組織像と似ていた(図1)。

図1 血清移入によるヌードラットの関節炎の組織像。滑膜の肥厚および細胞滲潤が認められる。(×140)

図2 血清移入後の臨床経過。

ヌードラット(実線)・そのヘテロ型(破線)それぞれ5匹ずつの平均および標準誤差。

ヌードラットおよびヘテロ型の関節炎の臨床経過を図2に示すが、ヌードラットはそのヘテロ型に比較して強く長期にわたった。しかし、血清中抗コラーゲンIgG抗体価の推移は、両群間に差は認められなかった。

考 察

ラットをII型コラーゲンで免疫すると関節炎およびII型コラーゲンに対する細胞性および液性免疫が惹起される¹⁶⁾。関節炎発症ラットより採取した濃縮血清の移入によりラットおよびマウスに関節炎が惹起されることからこの関節炎の発症機序には、II型コラーゲンに対する液性免疫が主に関与していると考えられている⁶⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾。しかし、今までの実験はすべてT細胞が存在する動物でなされており、必ずしも細胞性免疫の関与は否定できなかった。

今回の実験において成熟T細胞をほぼ完全に欠損しているヌードラットに血清移入すると成熟T細胞を持つヘテロ型と同様に関節炎が発症したことより、関節炎の発症にはII型コラーゲンに対する液性免疫が存在すれば細胞性免疫は必ずしも必要ないことを示唆している。

II型コラーゲンに対する細胞性免疫は、II型コラーゲン免疫ラットの脾臓およびリンパ節細胞を同系のラットに移入すると関節炎が惹起されることから関節炎発症になんらかの役割があると考えられてきた¹⁴⁾。しかし、細胞移入を受けたラットにII型コラーゲンに対する細胞性および液性免疫は認められず、関節炎発症にTおよびB細胞のうちいずれが主体をなすか不明である。また、コラーゲン関節炎を発症したラットより分離したT cell lineの移入により関節炎が惹起さ

れなかったと Holoshitz らは報告している³⁾。同様に Shoen らは、II型コラーゲンと結合させた脾細胞の皮下投与により、II型コラーゲンに対する細胞性免疫は認められたが、抗II型コラーゲン抗体および関節炎は認められなかったと報告している¹⁰⁾。以上より、細胞性免疫のみで関節炎が発症するとは考え難いが、ヌードラットを免疫して関節炎・細胞性および液性免疫いずれも認められなかったことは、II型コラーゲンが T dependent antigen であり、抗II型コラーゲン抗体産生のため、細胞性免疫の存在が必要であることを示唆している⁷⁾。

興味あることには血清移入するとヌードラットはそのヘテロ型に比較して関節炎が強く長期に持続した。そのメカニズムは明確でないが、1) 抗II型コラーゲン IgG 抗体が長く存在すること、2) 補体系が亢進していること、3) suppressor T 細胞が欠除していることなどが考えられる。抗II型コラーゲン IgG 抗体が長く存在することは、血清中抗体価の推移がヌードラットおよびそのヘテロ型で差がないことより否定される。補体系の亢進はヌードラットでは認められていない。suppressor T 細胞の欠除は、ヌードラットにおいて helper T 細胞の欠除と同様に認められており¹⁾、一番可能性がある。これは、先にわれわれが提唱したコラーゲン関節炎の経過にII型コラーゲンに対する細胞性免疫が関与しているとの仮説と一致している⁴⁾。

ま と め

1. コラーゲン関節炎発症における細胞性免疫の役割を検計する目的でヌードラットおよびそのヘテロ型を用いて血清移入もしくはII型コラーゲンによる免疫を行なった。

2. II型コラーゲンによる免疫にてヌードラットは、関節炎が発症せず、そのヘテロ型は、関節炎が発症した。II型コラーゲンに対する細胞性および液性免疫は、ヌードラットでは両者とも非常に低値を示すかもしくは認められなかったが、そのヘテロ型では両者ともに明らかな高値を示した。

3. 血清移入にてヌードラットおよびそのヘテロ型ともに関節炎が発症した。

4. ニードラットの関節炎は、そのヘテロに比較して強く長期間持続した。

5. 関節炎は抗コラーゲン抗体が存在することで発症し、細胞性免疫は必ずしも必要ないと考えられた。

6. 関節炎の臨床経過に細胞性免疫特に suppressor T 細胞が関節炎の臨床症状をコントロールしていると推察された。

参 考 文 献

- 1) Brooks, C. G., Webb, P. J., Robins, R. A., Robinson, G., Baldwin, R. W. and Festing, M. F. W.: Studies on the immunobiology of rnu/rnu "nude" rats with congenital aplasia of the thymus. *Eur. J. Immunol.*, 10: 58-63, 1980.
- 2) Griffiths, M. M., Eichwald, E. J., Martin, J. H., Smith, C. B. and Dewitt, C. W.: Immunogenetic control of experimental type II collagen-induced arthritis. I. Susceptibility and resistance among inbred strains of rats. *Arthritis Rheum.*, 24: 781-789, 1981.
- 3) Holoshitz, J., Naparstek, Y., Ben-Nun, A., and Cohen, I. R.: Lines of T lymphocytes induce and vaccinate against autoimmune arthritis. *Science*, 219: 56-58, 1983.
- 4) Kaibara, N., Hotokebuchi, T., Takagishi, K., Katsuki, I.: Paradoxical effects of cyclosporin A on collagen arthritis in rats. *J. Exp. Med.*, 158: 2007-2015, 1983.
- 5) Kaibara, N., Hotokebuchi, T., Takagishi, K., Katsuki, I., Morinaga, M., Arita, C., Jingushi, S.: Pathogenetic difference between collagen arthritis and adjuvant arthritis. *J. Exp. Med.*, 159: 1388-1396, 1984.
- 6) Kerwer, S. S., Englert, M. E., McReynolds, R. A., Landes, M. J., Lloyd, J. M., Oronsky, A. L. and Wilson, F. J.: Type II collagen-induced arthritis: studies with purified anticollagen immunoglobulin. *Arthritis Rheum.*, 26: 1120-1131, 1983.
- 7) Klareskog, L., Holmdahl, R., Larrson, E. and Wigzell, H.: Role of T lymphocytes in collagen II induced arthritis in rats. *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 117-125, 1983.
- 8) Morgan, K., Clague, R. B., Shaw, M. J. and Holt, P. J. L.: Native type II collagen-induced arthritis in the rat. I. Incidence and humoral response to collagen. *Ann. Rheum. Dis.*, 39: 285-290, 1980.
- 9) Morgan, K., Clague, R. B., Shaw, M. J., Firth, S. A., Twose, T. M. and Holt, P. J. L.: Native type II collagen-induced arthritis in the rat: the effect of complement depletion by cobra venom factor. *Arthritis Rheum.*, 24: 1356-1361, 1981.
- 10) Schoen, R. T., Mehlman, H., Trentham, D. E., Perry, L., Greene, M. I., David, J. R.: Autoimmunity induced by type II collagen-coupled spleen cells. *J. Immunol.*, 127: 2275-2279, 1981.
- 11) Stuart, J. M., Cremer, M. A., Townes, A. S., and

- Kang, A. H.: Type II collagen-induced arthritis in rats: passive transfer with serum and evidence that IgG antibodies can cause arthritis. *J. Exp. Med.*, 155: 1-16, 1982.
- 12) Stuart, J. M., Tomoda, K., Yoo, T. J., Townes, A. S., and Kang, A. H.: 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.
- 13) Stuart, J. M. and Dixon, F. J.: Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.*, 158: 378-392, 1983.
- 14) Trentham, D. E., Dynesius, R. A., and David, J. R.: Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rat. *J. Clin. Invest.*, 62: 359-366, 1976.
- 15) Trentham, D. E., Townes, A. S., and Kang, A. H.: Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.*, 146: 857-867, 1977.
- 16) Trentham, D. E.: Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis: evidence pro and con. *Arthritis Rheum.*, 25: 911-916, 1982.

質 問 大分医科大学 中村 道利

① 移入血清の量、回数と関節炎の強さ、持続との間に相関がありますでしょうか。

解 答 九州大学 佛淵 孝夫

移入する血清量を増量すれば dose dependent に発症率が増加するが、関節炎の強さおよび持続には影響を与えなかった。血清移入の回数をふやせば関節炎の持続が長びくかについては詳しくは検討していないが関節炎が持続している間に次の血清移入を行なえば長びくかもしれない。