コラーゲン関節炎 血清および関節組織における抗コラーゲン抗 体の subclass 分析

九州大学医学部 整形外科

新井 堅・貝原 信 紘
高岸 憲二・佛淵 孝 夫
有田 親 史

Collagen-Induced Arthritis in Rats Analysis of Anticollagen IgG Subclasses in Serum and Paw Tissue

by

Ken Arai, Nobuhiro Kaibara, Kenji Takagishi
Takao Hotokebuchi and Chikafumi Arita

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, Japan

Immunization of rats with native bovine type II collagen results in a polyarthritis in approximately 90% of the rats. Using an enzyme-linked immunosorbent assay, IgG antibodies to type II collagen in serum and paw tissue were measured as total IgG and as its subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c) in arthritic and non-arthritic rats. Anticollagen IgG subclass analysis revealed that the major subclass was IgG2a in both the serum and paw extract, with minor amounts of IgG2b, IgG2c and IgG1. Serum levels of anticollagen IgG2a in arthritic rats were significantly higher than those of non-arthritic animals. The significance of these results and their possible relevance to human disease are discussed.

はじめに

コラーゲン関節炎は、II型コラーゲンに対する自己免疫機序により発症する多発性関節炎であり、ヒトの慢性関節リウマチの新しい動物実験モデルとして脚光をあびている。

過去我々は、II型コラーゲンで免疫することにより約90%のラットに関節炎が惹起され、その血清中には抗II型コラーゲン抗体が証明されること、さらに関節炎発症ラットより作成した濃縮血清の移入によりヌードラットおよび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に関節炎が惹起されることから、関節炎の発症に液性免疫が重要な役割を果していることを報告した。

今回我々は、従来の血清中の抗体価の測定に加えて、その subclass 分析、さらにラットの四肢の関節組織から抗II型コラーゲン抗体の抽出を行ない、それらの抗体価と subclass 分析を行なったので、その結果について報告する。

材料および方法

1) 実験動物、コラーゲン関節炎の作成：6週令、雌性SDラット66頭を1.5mg牛II型コラーゲンで免疫した。

2) 関節炎の評価、血清中の抗体価の測定

免疫後28日間毎日ラットを観察し関節炎の有無、強さを記録した。関節炎の強さは従来の方法により1肢につき0～4点、最大値16点とした。また、免疫後10、

14, 21, 28日目に採血し血清中の抗Ⅱ型コラーゲン抗体を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。

3) 血清 IgG subclass の分析: rat IgG 1, IgG 2a, IgG 2b, IgG 2c に対する抗血清を rat IgG-Sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィにて精製し, それぞれの anti-rat IgG subclass をグルタルアルデヒド処理することにより alkaline phosphatase conjugate を作成した。これらを ELISA における second antibody として subclass の分析を行った。

4) 関節組織中の抗コラーゲン抗体の抽出と分析: 28日目にト殺したラットの四肢を細切, ホモジェネートした後 PBS で 5 回洗浄, 遠沈を繰返し最後に 0.1M glycine HCl buffer PH2.5 で抗体の抽出を行った。ELISA 法を用いてこれらサンプル中の抗Ⅱ型コラーゲン抗体とその subclass 分析を行った。

結 果

1) 66頭のラットをⅡ型コラーゲン1.5mg で免疫し59頭 (89%) に関節炎が惹起された。発症群では発症日は9~12日で, その後観察期間の28日目まで関節炎が持続するものと, 途中で消退する一過性のものとがあり前者を慢性群, 後者を急性群として以下の比較検討をおこなった。table I に示したように, 両者の間には arthritic index で明らかな違いがみられた。

Table I Incidence of arthritis

	Incidence	Arthritic index	Duration
Non arthritic	7/66 (10.6%)	0	—
Acute arthritic	16/66 (24.2%)	2~6	<14
Chronic arthritic	43/66 (65.2%)	4~14	>14

66 rats were immunized with 1.5 mg of type II collagen

2) 血清中の抗Ⅱ型コラーゲン抗体の time-course を table II に示した。28日目まではどの群も経過とともに抗体価の増加がみられるが, 慢性群で著しく, また他の2群に比べ明らかな高値を呈した。非発症群と急性群では有意差はみられなかった。

3) 21日目の血清 IgG の subclass 分析を table III に示した。各群とも分布は同様であり IgG 2a が最も多く, 次に IgG 2b が続いた。IgG 1, IgG 2c はともに低

Table II Time course of anticollagen IgG in serum

	Days after immunization, mg/dl			
	10	14	21	28
Non arthritic (n=7)	4.2±4.2	14.8±17.5	26.9±37.1	46.6±60.5
Acute arthritic (n=16)	4.6±4.5	18.6±15.6	36.1±37.9	55.5±68.3
Chronic arthritic (n=41)	13.1±8.8*	46.5±25.8***	104.1±62.8**	111.5±61.2*

*P<0.05 VS. non arthritic rats

**P<0.005 VS. non arthritic rats

***P<0.001 VS. non arthritic rats

Table III Analysis of anticollagen IgG subclasses in serum

	Day 21 Serum, mg/dl			
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
Non arthritic	2.5±3.4	11.7±16.3	8.4±11.6	2.8±3.9
Acute arthritic	3.0±2.9	15.7±16.1	10.6±11.9	5.1±6.3
Chronic arthritic	8.2±6.0*	47.1±30.6***	23.2±14.4**	10.1±7.1**

*P<0.05 VS. non arthritic rats

**P<0.02 VS. non arthritic rats

***P<0.01 VS. non arthritic rats

値であった。各群との比較では非発症群と急性群では有意差はなく慢性群で各 subclass とも有意差をもって高値を示し特に IgG 2a の増加が顕著であった。

4) 関節組織中の抗体とその subclass 分析を table IV に示した。関節組織中の Total IgG は慢性群で明らかな高 titer を示した。非発症群と急性群では有意差はみられなかった。subclass 分析では血清中と同様 IgG 2a が高値を示した。

Table IV Analysis of anticollagen IgG in paw tissue

	Paw tissue, µg/rat				
	IgG(Total)	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
Non arthritic (n=7)	0.3±0.1	ND	ND	ND	ND
Acute arthritic (n=13)	0.9±1.5	0.4±0.2	1.8±1.0	1.1±0.7	0.5±0.2
Chronic arthritic (n=29)	6.4±4.7*	0.6±0.5	3.6±2.4	1.8±1.3	0.8±0.5

ND=not detectable

*P<0.001 VS. non arthritic rats

考 察

関節炎発症群の血清中抗コラーゲン抗体価は非発症群のそれと比べ有意に高値を示し, 関節炎の発症に抗

体が重要な役割を果たしていることを報告してきた。しかし免疫されたラットの中には抗体価が十分に高いかかわらず発症しないものもあり、その理由として effector mechanism (例えば補体の関与) の他に subclass の分布に差があることや抗体が自己の関節軟骨に cross-react しないなどの可能性も考えられている。今回我々は血清および関節組織中の抗コラーゲン抗体の subclass の分析を行い、発症に関与しているのは主として IgG 2a 次いで IgG 2b であるという結果が得られた。

次に関節組織中の抗コラーゲン抗体はその抽出過程において可溶成分を十分洗浄、除去したことから組織に結合している抗体と考えられ、また最近の知見から抗コラーゲン抗体は関節組織の中でも特にⅡ型コラーゲンが局在する関節軟骨の表面に結合していることが蛍光抗体法を用いた実験で証明されており、これらの結果から今回測定した関節組織中の抗コラーゲン抗体はその大部分は関節軟骨の表面に結合していた抗体と推定される。慢性群でその抗体価が有意に高かったことは、ラットを牛Ⅱ型コラーゲンで免疫することにより作られた抗体が自己のⅡ型コラーゲンに cross-react し、関節軟骨の表面に免疫複合体を形成していたことを示している。

関節炎発症においてこの免疫複合体がさらに補体の活性化を促すことにより発症の引き金になることも他の実験で証明されており、関節組織中に局在する免疫複合体がコラーゲン関節炎の病因により密接に関与しているものと考えられる。さらに、これらの実験がヒトの慢性関節リウマチの発症のメカニズムの解明に1つの手がかりとなる可能性もあり今後の検討を要するものと思われた。

ま と め

血清および関節組織における抗コラーゲン抗体の測定と subclass 分析を行い

- 1) 血清中の抗体価は免疫後28日目までは経過とともに増加し、慢性群では有意に高値を呈した。
- 2) 血清 IgG の subclass 分析では IgG 2a が最も多く、次に IgG 2b が続いた。慢性群では IgG 2a が明らかな高値を示した。
- 3) 関節組織では慢性群で有意な抗体価の上昇がみられた。subclass 分析では血清中と同様 IgG 2a が高値を示した。

文 献

- 1) Firth, S. A. et al.: IgG subclasses in collagen-induced arthritis in the rat. *Immunol. Lett.*, 7 : 243-247, 1984
- 2) Kaibara, N. et al.: Paradoxical effects of cyclosporin A on collagen arthritis in rats. *J. Exp. Med.*, 158 : 2007-2015, 1983
- 3) Kaibara, N. et al.: Pathogenetic difference between collagen arthritis and adjuvant arthritis. *J. Exp. Med.*, 159 : 1388-1396, 1984
- 4) Kaibara, N. et al.: Serum transfer of collagen arthritis to cyclosporin-treated type II collagen tolerant rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 35 : 252-260, 1985
- 5) Kerwar, S. S. et al.: Type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 26 : 1120-1131, 1983
- 6) Morgan, K. et al.: Native type II collagen-induced arthritis in the rat. Incidence and humoral response to collagen. *Ann. Rheum. Dis.*, 39 : 285-290, 1979
- 7) Takagishi, K. et al.: Serum transfer of collagen arthritis in congenitally athymic nude rats. *J. Immunol.*, 134 : 3864-3867, 1985