ラットのコラーゲン関節炎

—— FK506 により誘導される関節炎抵抗性とその血清移入について ——

九州大学整形外科

佛淵孝夫・有田親史

新井堅・宮原寿明

杉岡洋一

北里大学整形外科

高岸憲二

貝原整形外科医院

貝原信紘

Collagen Arthritis in Rats

—— Induction of Unresponsiveness Mediated by FK-506 and
Its Passive Transfer with Serum ——

by

Takao Hotokebuchi, Chikafumi Arita, Ken Arai,
Hisaaki Miyahara and Yoichi Sugioka

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University

Kenji Takagishi

Department of Orthopedic Surgery, Kitasato University

Nobuhiro Kaibara

Kaibara Clinic

The effect of the immunosuppressive agent FK-506 (FK) on collagen arthritis in Sprague-Dawley rats is investigated. A 14-d course of FK treatment at a dose of 1.0 mg/kg per day, begun on the same day as type 11 collagen immunization, suppressed completely the development of a arthritis as well as humoral and delayed-type hyper-sensitivity (DTH) skin test response to type 11 collagen. To study whether the immunologic unresponsiveness can be produced by FK, we rechallenged the FK-protected rats with type 11 collagen after discontinuation of FK treatment. Type 11 collagen-immunized, FK-protected rats did not develop arthritis in response to reimmunized with type 11 collagen.

Furthermore, to study whether FK-mediated unresponsiveness can be transeferred passively with serum, we immunized with type 11 collagen the naive recipient rats, which were transferred with the serum from FK-treated, type 11 collagen tolerant donor rats on the same day of immunization. Serum-transferred recipient rats showed a suppressed arthritogenic reaction in response to immunization with type 11 collagen.

These results indicate that immunologic unresponsiveness can be induced by FK in the experimental model of polyarthritis, collagen arthritis, and that its unresponsiveness can be transferred passively with serum. The results further indicate that humoral properties may, at rest in part, participate in the immunosuppressive mechanism of FK nad the regulation of the clinical course in

the experimental model of polyarthritis in rats.

はじめに

ラットのコラーゲン関節炎はII型コラーゲン(IIC)を免疫することにより惹起される多発性関節炎であり、ヒトの慢性関節リウマチのモデルとされている。このコラーゲン関節炎においては抗原特異的な抵抗性が、各種薬剤、低量の抗原あるいは抗II型コラーゲン抗体などの投与により導入可能なことが報告されている⁷⁾。今回われわれは新しい免疫抑制剤 FK506 (FK) により関節炎抵抗性が得られるか否か、さらにこの抵抗性が血清により受身移入できるか否かについて検討したので報告する。

材料および方法

1. ラット

7週令の雌性 Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。

2. コラーゲン関節炎の作製法

コラーゲン関節炎は、既報のごとく牛関節軟骨より抽出精製した IIC 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 oil emulsion とし、これをラットの背部および尾根部に 1 ml 皮内注射して作製した。この条件での発症率は約 90 % である。

3. の投与法

FK (藤沢薬品工業の御好意により提供) は生理食塩水に懸濁液として筋肉内投与した。Table 1 に示す予備実験より FK の 1.0 mg/kg/day 14 日間連続投与により完全な発症の抑制と IIC に対する液性および細胞性免疫反応の著明な抑制が認められた。したがって以下の実験は FK の 1.0 mg/kg/day の 14 日間連続投与の

条件とした。

4. 関節炎抵抗性発現に関する実験

前述の IIC 1.5 mg/rat, FK 1.0 mg/kg/day 14 日間連続投与後、28 日目に同様に IIC にて免疫した。対照として ICFA と FK を投与した群、ならびに ICFA と生食を投与した群を作製した。

5. 受身移入実験

前述の IIC 1.5 mg/rat, FK 1.0 mg/kg/day 14 日間連続投与したラットより、28 日目に心臓穿刺により血清を得た。この血清に含まれる抗 IIC 抗体は 0.1 mg/dl であった。この血清を 45 % 飽和硫酸にて塩析した後 2 倍濃縮し、これを被験血清とした。対照血清は FK のみを投与した群より同様にして作製した。受身移入実験は IIC を免疫した日に被験血清 2 ml あるいは 1 ml 静注投与し、対照として対照血清 2 ml 投与群ならびに Phosphate Buffered Salt (PBS) 2 ml 投与群を作製し、関節炎の発症に対する検討を行った。

6. 評価

関節炎の評価として発症率、発症日、関節炎の強さ(四肢それぞれ 0～4 点、合計最高 16 点)、21 日目および 28 日目の ELISA 法による抗 IIC 抗体価、25 日目の Delayed Type Hypersensitivity (DTH) skin test の測定を行った。

結 果

1. 関節炎抵抗性の発現について

Table 2 に結果を示す。FK の投与により関節炎の発症が抑制された群では 2 つの対照群と比較して発症率、発症日、関節炎の強さ、抗 IIC 抗体とも有意に抑制されたが、DTH はむしろ増強された。また ICFA と FK を前投与した群では ICFA と生食を前投与した群に比較

Table 1 Effect of FK Treatment (Days 0 to 13) on the Development of Collagen Arthritis in Rats

	FK dose (mg/kg)				Saline
	1.0	0.5	0.2	0.1	
Incidence of Arthritis	0/15 [§]	2/11 [§]	6/10	10/10	14/15
Arthritic index	0±0 [§]	0.7±0.5 [§]	4.1±1.3	6.6±0.7	6.7±0.8
Day of onset	—	12.5±0.5	10.2±0.2	10.4±0.4	10.1±0.4
Antibody level (day 21, mg/dl)	0.1±0.0 [§]	2.0±0.4 [§]	43.4±19.3 [§]	102.9±13.4	114.6±8.9
DTH skin reaction (day 25)	0.5±0.2 [§]	2.9±0.8 [§]	3.8±1.1	4.7±0.5	5.4±0.6

* p < 0.05, § p < 0.01, § p < 0.001 When compared to Saline-treated Controls. (Data ; mean ± SEM)

Table 2 Induction of Unresponsiveness Mediated by FK

(days -28 to -15) (day -28) (day 0)	FK 1.0 mg/kg		Saline
	Type II	ICFA	ICFA
	Type II	Type II	Type II
Incidence of arthritis	3/9 (44%)*	11/13 (85%)	14/15 (93%)
Arthritic index	1.6±0.7 [§]	5.3±1.2	6.9±0.7
Day of onset	16.5±1.0 [§]	13.6±1.5 [§]	9.8±0.2
Antibody level day 14	4.6±1.2 [§]	29.0±5.8	44.6±7.1
day 21	9.0±3.2 [§]	68.6±11.0 [§]	121.2±10.2
DTH skin reaction (day 25)	6.8±0.3 [§]	3.4±1.3	5.1±0.4

* $p < 0.05$, $^{\S} p < 0.01$, $^{\S} p < 0.001$ When compared to Saline, ICFA-treated Controls.
(Data; mean±SEM)

Table 3 Effect of Serum from FK-Treated, Type II Collagen Tolerant Rats on the Development of Collagen Arthritis in Rats

(day 0)	Type II collagen (day 0)			
	Serum		Control Serum	PBS
	2 ml	1 ml	2 ml	2 ml
Incidence of arthritis	11/20 (55%)*	15/22 (68%)	11/13 (85%)	18/20 (90%)
Arthritic index	2.9±0.9 [§]	3.6±0.6 [§]	5.2±1.0	6.9±0.7
Day of onset	14.9±0.2 [§]	13.4±0.5 [§]	10.2±0.4	9.8±0.2
Antibody level day 14	8.1±1.8 [§]	28.4±4.9	51.6±11.0	41.1±6.3
day 21	28.5±6.0 [§]	50.0±5.6 [§]	68.2±10.7 [§]	129.2±4.7
DTH skin reaction (day 25)	2.1±0.5 [§]	1.5±0.4 [§]	4.2±0.6	5.1±0.4

* $p < 0.05$, $^{\S} p < 0.01$, $^{\S} p < 0.001$ When compared to PBS-treated Controls. (Data; mean±SEM)

して発症率、関節炎の強さ、には有意差ないものの、発症日の遅延、抗 IIC 抗体価の低値が認められた。

2. 関節炎抵抗性の受身移入について

Table 3 に結果を示す。被験血清 2 ml の投与により発症率、発症日、関節炎の強さ、抗 IIC 抗体、DTH とも有意に抑制された。さらに 1 ml の投与でも発症率以外は有意に抑制され、この血清により dose dependent な関節炎の抑制が認められた。また対照血清の投与により 21 日目の抗 IIC 抗体価の低下が認められた。

考 察

抗原特異的な不応性 (Unresponsiveness or Tolerance) 発現のメカニズムについては禁止クローン説、サプレッサー細胞説、抗イデオタイプ抗体説などが提唱されてきたが今だ不明な点が多い。われわれはこれまでにラットのコラーゲン関節炎において免疫抑制剤あるいは抗 IIC 抗体や IIC の投与により発現した不応性が抗原特異的であるか、あるいは他の免疫抑制剤などの投与によりどのような修飾を受けるかについて検討

してきた^{1)3)~5)}。

Eugui ら²⁾ はアジュバント関節炎を用いた実験において抗原特異的な免疫学的不応性が細胞による受身移入は可能であるが、血清による移入はできなかったと報告している。今回のわれわれの実験では FK の投与により誘導された関節炎抵抗性が血清により受身移入可能なことが明かとなった。

一方、肝臓移植の実験において Kamada ら⁶⁾ は生着したラットの血清を移入することによって生着の延長効果が得られたと報告している。この報告は今回のわれわれの結果と類似している。

以上の結果より FK により特異的あるいは非特異的な suppressor factor ないしは anti-idiotypic antibody などを誘導した可能性、さらには液性の抗関節炎因子を誘導した可能性が示唆されるが、その詳細なメカニズムは不明である。しかしながら、今回のわれわれの実験結果は FK の作用機序解明の一助となるばかりでなく RA などの自己免疫疾患や移植時の拒絶反応に対する新しい治療法の開発に利用できる可能性がある

るものと考えられた。

結 語

1. ラットのコラーゲン関節炎に対して新しい免疫抑制剤 FK506 による関節炎抵抗性の発現と、その抵抗性の血清移入について検討した。

2. FK 1.0 mg/kg/day 14 日間連続投与により関節炎抵抗性が導入され、この抵抗性は血清により受身移入されることが確認された。

3. 以上の結果についての詳細なメカニズムは不明であるが、なんらかの液性の因子が関与していることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Arai, K., et al.: Reversal of antigen-induced resistance to collagen arthritis by cyclophosphamide. Clin. Immunol. Immunopathol. 43: 325-332, 1987.
- 2) Eugui, E. M. and Houssay, R. H.: Passive transfer of unresponsiveness by lymph node cells. Studies on adjuvant disease. Immunology, 28: 703-710, 1975.
- 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 11 collagen-tolerant rats. Clin. Immunol. Immunopathol. 35: 252-260, 1985.
- 5) Kaibara, N., et al.: Treatment with cyclophosphamide reverses acquired resistance to collagen arthritis subsequent to recovery from passive arthritis. Cell. Immunol. 101: 643-650, 1986.
- 6) Kamada, N., et al.: Immunosuppressive activity of serum from livergrafted rats. Passive enhancement of fully allogeneic heart grafts and induction of systemic tolerance. Transplantation, 42: 581-587,

1986.

- 7) Staines, N. A., et al.: Collagen-induced arthritis in the rat: modification of the immune and arthritis response by free collagen and immune anti-collagen antiserum. Immunology 44: 737-744, 1981.

質 問

産業医科大学 伊地知正光

① FK を直接投与しなくても、FK で作った血清が有効ということでしょうか。

② DTH に関して、皮膚の反応だけつよいことに関してのお考えをお教え下さい。

解 答

九州大学 佛淵 孝夫

① FK を用いて Type II collagen に対して tolerance ができたラットの血清が有効であったということです。

② Table 2 で、DTH が増強した理由については明確な解答を持っておりません。

質 問

国立湯田温泉病院 田中 浩

① II型コラーゲン少量投与により成立した免疫寛容と、FK により成立したものの程度の差は？

② 血清移入により成立した抵抗性の理由としての、抗イデオタイプ抗体に関する考えと、それに対する実験はなされたか？

解 答

九州大学 佛淵 孝夫

① 厳密な比較検討をしておりませんので、差については申し上げられません。

② 直接的なデータを持ちませんので、抗イデオタイプ抗体もその一因ではないかと推論しているにすぎません。