Rat 骨組織における MHC 抗原の発現性について

～免疫組織化学を用いて～

山口大学 整形外科

重 富 充 則・土 井 一 輝
酒 井 和 裕・田 丸 幸 一
秋 野 龍 明・国 司 善 彦
河 合 伸 也

山口大学 第一解剖

福 本 哲 夫

Expression of MHC Antigens on Rat Bone Tissue:
Detect with Monoclonal Antibodies by Immunohistochemistry

by

Mitsunori Shigetomi, Kazuteru Doi, Kazuhiro Sakai,
Kouichi Tamaru, Tatsuaki Akino, Yoshihiko Kunisi,
and Shinya KawaiDepartment of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
Yamaguchi University

Tetsuo Fukumoto

First Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan

Cellular components, collagen and proteoglycan of bone tissue were reported to have immunogenicity. But immunogenicity of collagen and proteoglycan are weak. Cellular components of bone tissue which express MHC antigen play key role of graft rejection in fresh bone all-transplantation.

The purpose of this study was to detect MHC antigen expressing cells in bone tissue using immunohistochemistry.

Following conclusions were obtained through this study.

- (1) Expression of MHC class I antigen was found in osteocyte and osteoblast.
- (2) Expression of MHC class I antigen in osteocyte and osteoblast showed diversity.
- (3) Canal containing cells of vessels in cortical bone express MHC class I and class II antigens.
- (4) The expression of MHC antigens on bone tissue may be influenced by allo-antigen stimulation.
- (5) The expression of MHC antigens in osteocyte and osteoblast could be detected after decalcification of the bone tissue.

は じ め に

同種骨の同種間における抗原性に関する研究は数多く行われ, in vitro による方法や in vivo による方法

で新鮮同種骨の抗原性は一般に認められている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾.
しかし骨組織のどの部に移植抗原が存在するかという点については明確にされておらず今回この点につき研究する目的で, ラットの MHC に対するモノクローナ

ル抗体を用いて免疫組織化学的にラット骨組織のMHC抗原の発現性につき検討したので、脱灰操作の骨組織のMHC抗原の発現性に及ぼす影響も含めて報告する。

材料及び方法

材料としては、脱灰用にDA rat脛骨を、非脱灰新鮮凍結切片用にDA rat肋骨を用いた。またAllo. 刺激による影響を見るために、Fisher rat腹くう内に遊離移植後4日目のDA rat肋骨を用いた。

方法としては、脱灰群では6時間のPLP固定後、約1週間のギ酸・クエン酸法による脱灰を行い凍結切片を作製した。

非脱灰群では直ちに凍結切片を作製後、95%冷メタノールにて10分間固定した。

免疫組織化学染色は、1次抗体に抗ラットMHC Class I抗体であるOX 18と、抗ラットMHC Class II抗体であるOX 6を、controlとしてPBSを用いた。

2次抗体としてHRP標識またはFITC標識のやぎのマウスのIgGに対するaffinity精製された抗体のF(ab')₂分画を用い、前者はDABで発色後光学顕微鏡にて、後者は蛍光顕微鏡にてそれぞれ観察した。

結 果

DA rat脛骨脱灰群では、抗Class I抗体であるOX 18陽性のosteocyteの存在が認められた。しかし全部のosteocyteに発現しているわけではなく、また発現細胞間でも強弱を認めた(図1)。

また髄腔側骨表面に単層に配列するosteoblastと思われる細胞にも同様にMHC Class I抗原の発現と、その発現性の多様性を認めた(図2)。

蛍光抗体法でもosteocyte, osteoblastにMHC Class I抗原の発現と、その発現性の多様性を認めた。

また骨皮質内にみられる微小血管の内皮細胞にMHC Class I, Class IIの発現を認めた(図3)。

次にosteocyte, osteoblastのMHC Class I, Class II抗原発現性の各細胞による差異が脱灰操作による影響であるかどうかを検討する目的で、非脱灰にて凍結切片作製可能な肋骨を用いて同様の実験を行ったが、この実験系においてもosteocyte, osteoblastはMHC Class I抗原の発現に関しては脱灰群と同様に多様性を認めた。

DA rat肋骨をAllo. 刺激の目的でFisher rat腹腔

図1 脱灰群 (DA rat脛骨)
骨細胞でのMHC Class I抗原の発現。

図2 脱灰群 (DA rat脛骨)
骨芽細胞でのMHC Class I抗原の発現。

図3 脱灰群 (DA rat脛骨)
血管内皮細胞でのMHC Class I,
Class II抗原の発現。

内に 4 日間遊離骨移植後摘出した実験系では、リンパ球の浸潤等の拒絶反応の所見は認めなかったが、MHC Class I 抗原を発現している osteocyte, osteoblast の増加と発現性の増強と思われる所見を認めた。

考 察

骨組織における免疫原性に関係すると思われる構成成分は細胞成分、コラーゲン、それ以外の基質が上げられる。

しかしコラーゲン⁷⁾、プロテオグリカン⁸⁾等の免疫原性は弱く実際の同種骨移植において問題となるのは移植関連抗原である MHC 抗原を発現している細胞成分と考えられる。事実、血管柄付同種骨移植の実験において MHC の適合性が移植成績に影響を及ぼすという報告が多く⁸⁾、骨組織においてどのような細胞がどのような MHC 抗原を発現しているかという点は重要であると考えられる。

しかし今までこの点につき考察した報告は少なく今回免疫組織化学的手法を用いて検討した。

今回の実験で、Allo. 刺激を受けていない骨組織においてすべてでなく一部の osteocyte や osteoblast にのみ Class I 抗原の発現が認められたが、この所見より我々は osteocyte や osteoblast は各細胞によりその MHC Class I 抗原の発現性が異なっているのではないかと、すなわち MHC Class I 抗原の発現に多様性があるのではないかと考えている。

さて腎移植や心臓移植において移植後組織に MHC Class I 抗原が強く発現することが報告されている⁶⁾。このように Allo. 刺激により MHC 抗原の発現が増強されることより、骨組織についても Allo. 刺激後の発現性の変化について検討したところ MHC Class I 抗原を発現している osteocyte, osteoblast の増加と発現性の増強と思われる所見を認め、骨組織においても他臓器と同様 Allo. 刺激にて MHC 抗原の発現が増強するのではないかと考えられた。

これらのことより、骨髓細胞、血管内皮細胞や骨膜に含まれるマクロファージが抗原提示にはたす役割も無視できないが、osteocyte, osteoblast が抗原提示に重要な役割を果たしている可能性も示唆された。また

血管柄付同種骨移植においては骨癒合遅延の原因の一つとして、osteoblast に対する免疫反応による仮骨形成不全の可能性もあるのではないかと推測された。

ま と め

1. Rat 骨組織における MHC 抗原発現性につき免疫組織化学的に検討した。
2. osteocyte, osteoblast に MHC Class I 抗原の発現を認めた。
3. osteocyte, osteoblast の MHC Class I 抗原の発現性に多様性を認めた。
4. 骨内の血管内皮細胞に MHC Class I, Class II 抗原の発現を認めた。
5. 骨組織においても同種抗原刺激により MHC 抗原の発現性が増強するのではないかと考えられた。
6. 脱灰操作後でも MHC 抗原の発現性を確認できた。

参 考 文 献

- 1) Czitrom, A. A., Axelrod, T. and Fernandes, B.: Antigen Presenting Cells and Bone Allograft Transplantation. Clin. Orthop. Related Research, 197: 27-31, 1985.
- 2) Friedlaender, G. E.: Immune Responses to Osteochondral Allografts. Clin. Orthop. Related Research, 174: 58-68, 1983.
- 3) 糸満盛憲, 他: 同種骨の抗原性. 整形・災害外科, 27: 355-360, 1984.
- 4) Muscolo, D. L., Kawai, S. and Ray, R. D.: In Vitro Studies of Transplantation Antigens Present on Bone Cells in Rat. J. B. J. S., 59-B: 342-348, 1977.
- 5) Poole, A. R. et al.: Transact. Orthop. Res. Soc., 4: 55, 1979.
- 6) Steiniger, B. et al.: Expression of Class I and Class II Major Histocompatibility Complex Antigens During Heart Allograft Rejection in the Rat. Transplant. Proc., 17: 1907-1910, 1985.
- 7) Trentham, D. E. et al.: J. Clin. Invest., 61: 89-96, 1978.
- 8) Yaremchuk, M. J., Weiland, A. J. et al.: Vascularized Bone Allograft Transplantation in a Genetically Defined Rat Model. Plast. Reconstr. Surgery., 75: 355-362, 1985.