

マウス抗原誘導関節炎の発症と進展におけるアレルギー反応の役割

野々垣常正・永松潔和・生田耕司・青木重久*

Role of allergic reactions on outbreak and development of antigen-induced arthritis in mice
Antigen-induced arthritis (AIA) is produced by intra-articular injection of antigen in previously immunized animals. To study the role of allergic reactions of chronic synovitis in rheumatoid arthritis (RA), AIA was induced in mice using heat-killed *E. coli* 0:14 (*E. coli* group) and egg albumin antigen (ovalbumin group), and immunological comparative studies between both groups were undertaken using mouse monoclonal antibodies including anti-macrophage (Mac-1), anti-Lyt-1, and anti-Lyt-2. Within 1 day after challenging injection in both groups immunological tissue damages by immune complex had occurred and exudative inflammations were observed suggesting Arthus reaction. At three days after challenging injection a local delayed hypersensitivity reaction recognized by the method of macrophage migration test and immunohistological examinations, and subsequent proliferative synovitis was observed in only *E. coli* group but not seen in ovalbumin group. Thereafter, persisting chronic synovitis with pannus formation was seen. These studies suggest that cytokines play an important role for establishment of persistent chronic arthritis like RA.

Tsunemasa Nonogaki・Kiyokazu Nagamatsu・Koji Ikuta・Shigehisa Aoki*

* Second Department of Pathology, Aichi Medical University

key words: antigen-induced arthritis, mouse monoclonal antibodies, immune complex, lymphokine, chronic arthritis

抗原誘導関節炎 (antigen-induced arthritis, AIA) は、感作された動物の関節腔内へ抗原惹起注射を行って発生させるアレルギー性関節炎で、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) の疾患モデルの一つとされている。RA は、非化膿性炎症が、関節を場として寛解と悪化を繰り返しながら慢性に経過する難治性疾患である。その滑膜病変部には、滑膜組織の増生とリンパ濾胞形成が認められ、この炎症が持続して軟骨・骨破壊へと進展し、全身の関節に線維性強直や関節の変形をきたす。RA の要因として、遺伝的素因、感染因子、代謝異常、自己免疫異常などが考えられているが、いずれもまだ確立されていない¹⁻³⁾。

しかし、免疫学のいちじるしい進歩とともに、RA についての免疫学的知見が集積され、この慢性炎症の進展に免疫反応が複雑に絡みあっていると考えられている。そして、このような炎症を初発させる因子として、感染説が有力視されている^{4,5)}。そこで RA の慢性炎症における免疫機構の役割を研究する目的で、リンパ球 subsets の解析が可能なマウスを使って大腸菌抗原と、対照としての卵白アルブミンによる AIA を発生させ、その発症と進展におけるアレルギー反応の役割を免疫病理学的に検討した。

材料と方法

実験動物は、C57BL/6N(H-2^b haplotype) 系、8 週齢、雌マウスを使用した。以下、用いた感作抗原の種類により、大腸菌群と卵白群の 2 群にわけて実験を行った。

感作抗原として、大腸菌群では腸内細菌共通抗原(CA)を豊富に有する大腸菌 0:14 株⁶⁾ を寒天培地にて colony をつくり、特異抗血清で凝集した colony を増菌した。100°C 2 時間加熱処理後窒素定量を行って、1,000 µg/1.0 ml に生理食塩水(生食水)にて調整し、感作に 0.2 ml/匹腹腔内注射した。卵白群では、ovalbumin (albumin, chicken egg) (crystallized and lyophilized, grade V, Sigma, USA) を 1,000 µg/1.0 ml に生食水にて調整し、感作に 0.2 ml を腹腔内注射した。

AIA の作製は、Dumonde-Glynn の方法⁷⁾に従った。大腸菌群では、大腸菌 0:14 株加熱死菌で 133 匹の C57BL/6N マウスに腹腔内感作を週 1 回の割合で連続注射し、感作月数ごとに、抗体価の上昇を確認後、両膝関節腔内にそれぞれ 100 µg/0.01 ml の抗原を惹起注射した。

卵白群では、卵白アルブミンで 72 匹の同マウスに、大腸菌群と同様に腹腔内感作を行い、抗体価の上昇を確認後、両膝関節腔内にそれぞれ 100 µg/0.01 ml の抗原を注射した。

両群の感作動物は、いずれも抗原惹起注射後、8 時間、1, 3, 5 日、1, 3, 5, 8 週目に屠殺し、両膝関節を

* 愛知医科大学第二病理学教室

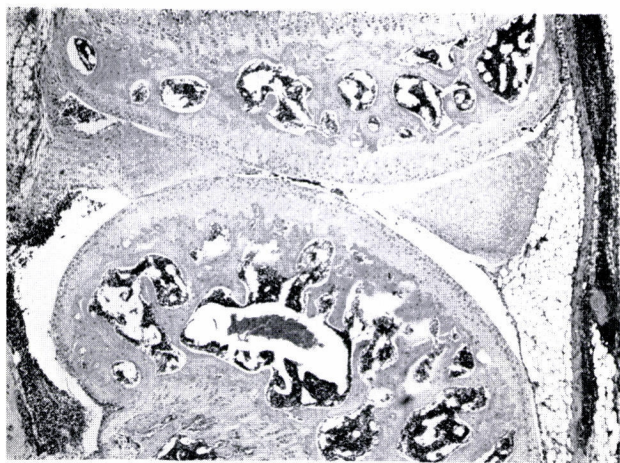


図1 大腸菌群(8時間)

関節腔内から滑膜組織および関節周囲組織に強い好中球浸潤がみられる。(HE 染色, ×10)

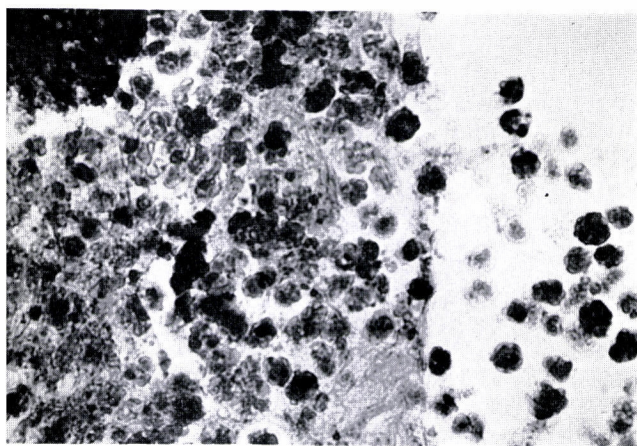


図2 大腸菌群(同滑膜組織)

組織内に IgG の沈着と好中球の IgG 貪食がみられる。(酵素抗体染色, ×200)

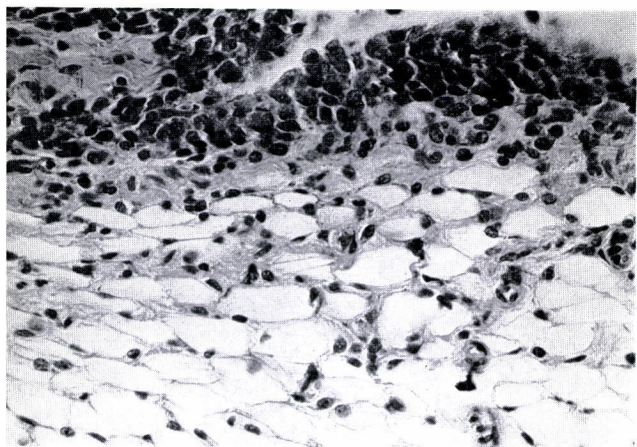


図3 大腸菌群(5日目, 滑膜組織)

滑膜細胞の増殖と表層下組織内のリンパ球, Mφ 浸潤(HE 染色, ×100)

採取した。採取組織は、10%緩衝ホルマリン、95%冷アルコール、PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde)⁸⁾ にそれぞれ固定し、パラフィン切片と凍結切片を作製した。免疫組織学的検索では、モノクローナル抗体(MoAb)を使った酵素抗体法を利用し、抗マクロファージ (Mφ) 抗体(Mac-1)、抗 Lyt-1 抗体、抗 Lyt-2 抗体を用い、さらに、IgG と補体の局在も検討した。また、関節組織は脱灰し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行って、経時的に病理組織学的に観察した。Mφ 遊走阻止試験(MIT)は、AIA の惹起注射後3日目の関節液および脾臓リンパ球培養上清について行った。

成績

大腸菌群において、抗原惹起注射後1日以内では、関節腔内から滑膜組織および関節周囲組織に強い好中球浸潤がびまん性にみられ、急性滲出性炎症像を呈した(図1)。その滑膜下組織の強拡大像では、細血管を中心にフィブリノイド変性と強い好中球浸潤がみられた。免疫組織学的検索により、細血管壁に IgG と C3 の局在がそれぞれ陽性に染色された。また、滑膜組織内に IgG の沈着と IgG を貪食した好中球が観察され(図2)、C3 も同様に認められた。

また、1日目の関節軟骨表層に補体が陽性に認められ、IgG も同様に観察された。惹起注射後3～5日目では、増殖性炎症反応を呈し、滑膜表層細胞は数層に増え、表層下組織では、リンパ球と Mφ の浸潤がみられた(図3)。5日目の滑膜組織を免疫組織学的に検討すると、滑膜表層下組織に Mac-1 陽性細胞が多数みられた(図4)。Tリンパ球亜群(T亜群)では、Lyt-1 陽性リンパ球が多数認められた(図5)が、Lyt-2 陽性リンパ球はごく少数であった。

3日目の MIT を行ったところ、図6のように、右の control にくらべ、左の大腸菌群でマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の産生がみられた。3週目では、リンパ球浸潤に加えて、形質細胞が多数出現し、慢性炎症が成立した(図7)。この時期では、形質細胞の胞体内や間質組織内に IgG の局在が観察され、そのときの T 亜群では、形質細胞に混じって、Lyt-1 が散在してみられ、Lyt-2 はほとんど認められなかった。

5週目では、滑膜組織の絨毛様増殖と滑膜表層細胞増殖がめだち、滑膜表層下組織では、リンパ球集簇を伴った慢性増殖性炎症像を呈し、pannus 形成による軟骨破壊の所見を認めた(図8)。8週目も、5週目とほぼ同様の慢性炎症所見であり、パンヌス形成から線維化への進展過程が観察された。

一方、卵白群では、惹起注射後1日目に、細血管のフィブリノイド壊死とその周囲にかけて好中球浸潤がみられ(図9)、細血管壁に C3 が細顆粒状に陽性であり(図

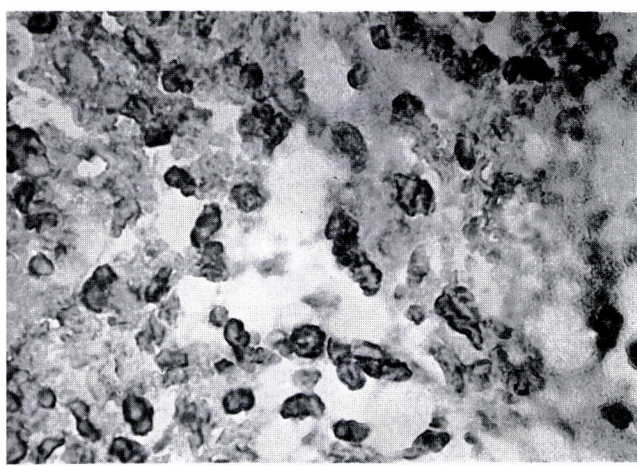


図4 大腸菌群(5日目, 滑膜表層下組織)
抗 Mφ 陽性細胞が多数みられる。(酵素抗体染色, ×200)

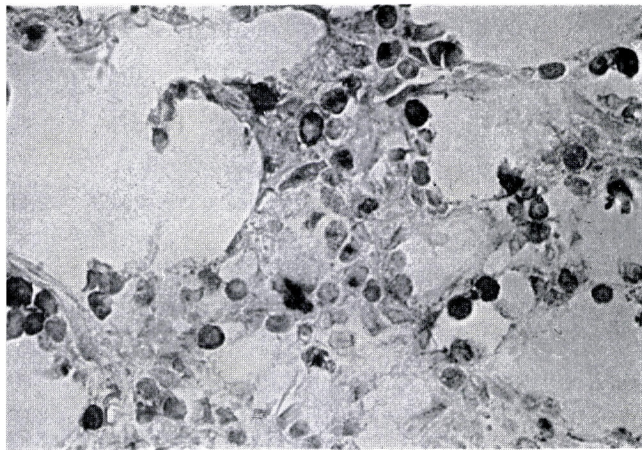


図5 大腸菌群(図4と同組織)
リンパ球 subset では, Lyt-1 陽性のリンパ球が多くみられる。(酵素抗体染色, ×200)

10), IgG も同様に認められた。3日目でもフィブリン沈着が滑膜表層部になお認められ, 滲出性炎症像を呈した。注射後3週目でも, 滑膜表層部にフィブリン沈着がわずかにみられ, 軽度の好中球浸潤を伴っていた。5週目では, 炎症所見がほとんど認められなかった。

考 察

AIA は, 1962年, Dumonde-Glynn が, フィブリンを抗原として完全アジュバントとの emulsion を作製し, これで免疫したウサギの膝関節腔内に抗原を注射して, 持続性の関節炎を発症させる方法で, 以来, RA の疾患誘発モデルの一つとして病因解明の研究に使用されてきた。

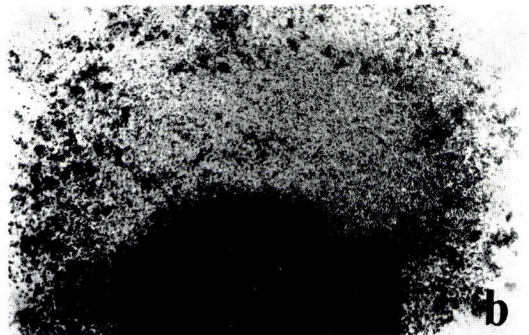


図6 大腸菌群(3日目)

マクロファージ遊走阻止試験, control に対しマクロファージ遊走が強く阻止されている。
a: *E. coli* 0:14. b: control

この実験モデルは, 免疫的機序を背景にして関節炎が惹起され, 関節炎は, 慢性化して病理組織像が RA と類似している。特に, 関節炎が慢性化する機序について種々研究されてきた⁹⁻¹⁴⁾。一般に, RA の滑膜組織において, 多核白血球の浸潤はほとんど認められず, リンパ球の濾胞様浸潤がみられることから, RA の発症と進展過程に免疫反応が関与すると考えられている¹⁵⁾。しかし, 従来の AIA は, ウサギを使用したため, リンパ球の解析が進展しなかった。そこで, リンパ球重群の解析が可能なマウスを使用し, 大腸菌 0:14 株加熱死菌を用いた青木ら¹⁶⁾の方法に従って, AIA を発生させ, その発症と進展におけるアレルギー反応の役割を中心に検索した。

関節炎の変化を経時的に追求した結果, 抗原惹起注射後1日以内に, 血管を中心としたフィブリノイド変性と好中球浸潤がみられ, 細血管壁, 好中球内, 軟骨表層に IgG や補体が陽性であった。このことから, AIA の早期に抗原抗体結合物(immune complex, IC)による血管を中心とした反応, すなわち, 即時型過敏症反応(Arthus 型組織反応)が生じていると考えられる。この成績は, 大野ら¹³⁾, Cooke ら¹⁴⁾, 清水¹⁷⁾のウサギを用いた実験結果と同様である。

一方, Cooke ら^{18,19)}は, 関節軟骨, 半月体, 靱帯などに IC の沈着を認め, これが関節炎の慢性化を起こすと考えた。

筆者らも, 関節軟骨表層に IgG と補体の局在を観察し, IC の形で関節腔内の硬組織に結合した抗原が, 炎

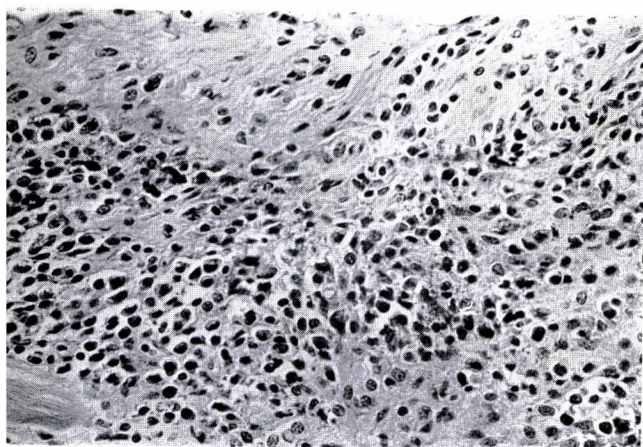


図7 大腸菌群(3週目, 滑膜組織)

リンパ球浸潤に加え, 形質細胞が多数出現し, 慢性炎症がみられる。(HE 染色, $\times 100$)

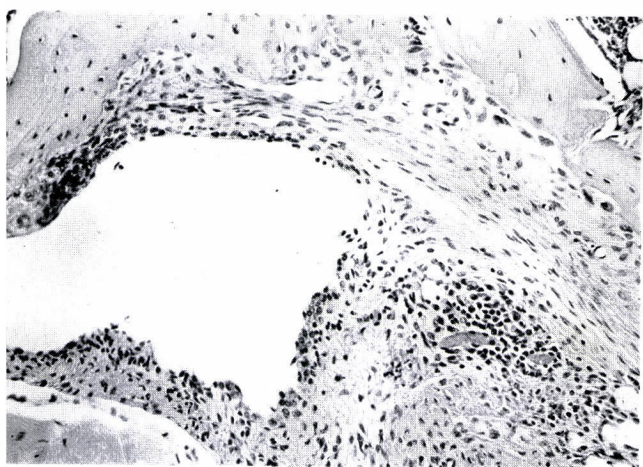


図8 大腸菌群(5週目, 膝関節)

小円形細胞集簇がみられ, pannus 形成が認められる。(HE 染色, $\times 10$)

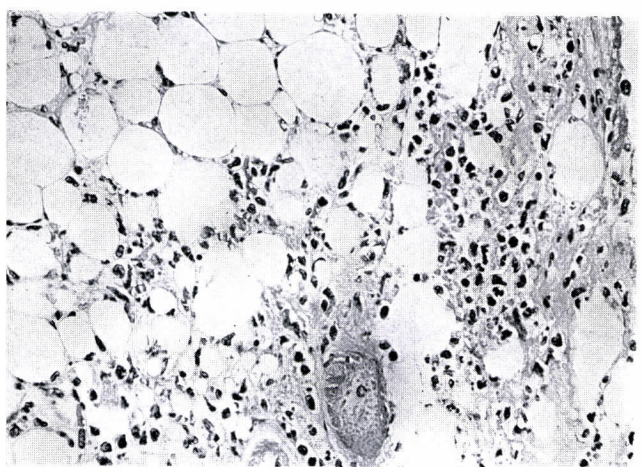


図9 卵白群(1日目, 滑膜組織)

細血管のフィブリノイド壊死と周囲に好中球浸潤がみられる。(HE 染色, $\times 100$)

症に対して持続的な刺激を与えるものと考えられる。大腸菌群の3日目の滑膜組織では, リンパ球の浸潤と $M\phi$ の出現が顕著となり, MIT は陽性であった。これは, 滑膜組織の感作リンパ球が, 注入された抗原と反応することにより, リンフォカインの放出が起こったと考えられる。3~5日目の滑膜組織の浸潤リンパ球は, $Lyt-1$ が主体で, $Lyt-2$ はごく少数であった。この $Lyt-1$ は, 同じ時期に MIF が陽性であることから, 遅延型過敏反応にかかわる T リンパ球 (T_D 細胞) と考えられる。3週目では, リンパ球浸潤に加えて, 形質細胞が多数出現し, 慢性炎症が成立した。この時期の $Lyt-1$ は, 多数の IgG 陽性形質細胞を認めたことより, 抗体産生を促す T リンパ球 (T_H 細胞) と考えられた。さらに, 5週目では炎症の持続が観察され, pannus の形成と軟骨の破壊がみられ, RA によく類似していた。

一方, 対照としての卵白群では, 惹起注射後1日目では, 大腸菌群と同様の Arthus 型炎症反応がみられたが, 3日目では MIT が陰性であり, 慢性炎症はみられず, 5週目では, 炎症がほとんど消退して, 大腸菌群との明らかな差異を示した。

したがって, 卵白群では, IV 型反応を欠き, 炎症は持続しなかったことから, RA 類似の慢性炎でパニヌス形成から線維化への進展には, IC による Arthus 型 III 型反応に加えて, T リンパ球と $M\phi$ の関与する遅延型 IV 型アレルギーの関与が重要であることを示唆している。

組織が免疫学的機序による障害を受けた場合, 免疫活性物質は, 線維芽細胞の走化性と増殖およびコラーゲンの合成を促進あるいは抑制するが, そのほとんどは, T リンパ球と $M\phi$ 由来のもので, 線維化過程にサイトカイン(モノカイン, リンフォカイン)が重要な役割を演じている²⁰⁾。たとえば, 抗原依存性の線維化の動物モデルを用いた研究として, 溶連菌細胞壁を感受性のあるラットに注射して, 肝肉芽腫から肝線維化を起こさせている²¹⁾が, 胸腺を欠如したヌードラットを用いたとき²²⁾や, T 細胞増殖とサイトカイン産生を抑制する cyclosporin A で処理した場合²¹⁾には, 肉芽腫形成とその線維化が防御されている。

RA 滑膜の早期では, 血管周囲性にリンパ球(helper/inducer が優位)と活性化 $M\phi$ (HLA-DR 陽性)が集簇している²³⁾。炎症性滑膜組織におけるリンパ球や $M\phi$ は, fibroblast activating factor を含む免疫活性物質を分泌し²⁴⁾, 滑液中にはインターロイキン(IL-1)活性が同定されている²⁵⁾。

このような活性化された $M\phi$ やリンパ球によるサイトカインの放出は, 線維芽細胞の増殖を誘起する。そして, 線維芽細胞はパニヌスを構成し, これから放出される酵素(コラゲナーゼなど)や活性酸素, プロスタグランジンなどにより, 軟骨・骨破壊がもたらされると考えら

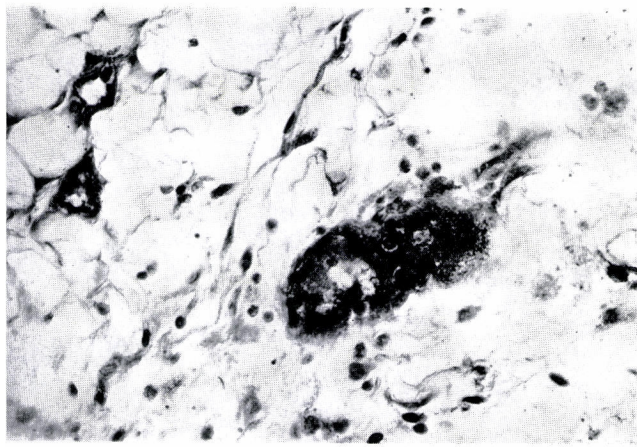


図 10 卵白群(1日目, 滑膜組織)
細血管壁に C3 陽性である。(酵素抗体染色, $\times 200$)

れている²⁶⁾。

マウス AIA の研究から, 抗原惹起注射 1 日以内に IC による免疫学的組織障害が起こり, 滲出性炎症がもたらされる。ついで, 3 日目には大腸菌抗原を用いた場合のように, 遅延型アレルギー反応が誘導されると, T リンパ球と $M\phi$ が出現し, 増殖性炎症がみられる。そして, この慢性炎症が持続し, パンヌス形成から線維化に至るが, その際, リンフォカインやモノカインなどの液性因子が重要な役割を演じていると考えられる。

結 語

モノクローナル抗体によりリンパ球や $M\phi$ の解析が可能なマウスを用いて, 大腸菌抗原による AIA を発症させ, 卵白抗原による場合と比較検討した。

抗原惹起注射後 1 日以内に IC による免疫学的組織障害が起こり, 滲出性炎症がもたらされた。ついで, 3 日目には大腸菌抗原を用いた場合のみに, 遅延型アレルギー反応が発現し, 増殖性炎症がみられた。そして, この慢性炎症が持続し, パンヌス形成から線維化に至ったが, その際, サイトカインが重要な役割を演じていると考えられる。

文 献

- 1) Zvaifler, W.J.: Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. in *Arthritis and allied condition*. (ed. Hollander, J.L.), Lea and Febiger, Philadelphia, 1984, p 557-570.
- 2) 塩川優一: 4. 膠原病の原因と治療の現況(1)慢性関節リウマチ. 免疫異常と免疫療法. ライフ・サイエンス, 1986, p 30-39.
- 3) 松多邦雄: 疾患の成り立ちと最近の捉えかた. RA の再発・増悪をきたす環境因子. *Medical practice* 3: 42-44, 1986.
- 4) 青木重久: 再び脚光をあびる RA と感染. *medicina* 10: 22-23, 1973.

- 5) 石田名香雄, 森田盛大: RA の発症過程機序をめぐって—感染の立場から—. *臨床医* 1: 26-28, 1975.
- 6) Aoki, S., Merkel, M., McCabe, W.R.: Immunofluorescent demonstration of the common enterobacterial antigen. *Proc. Soc. Exp. Med.* 121: 230-234, 1966.
- 7) Dumonde, D.C., Glynn, L.E.: The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br. J. Exp. Pathol.* 43: 373-383, 1962.
- 8) Mclean, I.W., Nakane, P.K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1077-1083, 1974.
- 9) Glynn, L.E.: The role of bacterial adjuvant in experimental arthritis. *Rheumatology* 6: 283-287, 1975.
- 10) 青木重久, 生田耕司, 野々垣常正, 伊藤美武: 腸内細菌による antigen-induced arthritis の経時的形態的分析. *東海リウマチ* 10: 75-79, 1979.
- 11) Brackertz, D., Mitchell, G.F., Mackay, I.R.: Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* 20: 841-850, 1977.
- 12) Rawson, A.J., Torralba, T.P.: Induction of proliferative synovitis in rabbits by intra-articular injection of immune complexes. *Arthritis Rheum.* 10: 44-52, 1967.
- 13) 大野 修, 内藤二郎, 坂田敏郎, 川井和夫, 石川 齊, 広畑和志: 抗原誘導関節炎. *リウマチ* 25: 428-430, 1985.
- 14) Elliott, S., Cooke, T.D.V.: Scanning electron microscopy of antigen induced arthritic joints. I. Inflammatory cell interactions at synovial-menisal surfaces during the arthus response. *J. Rheumatol.* 13: 401-407, 1986.
- 15) Christian, C.L.: The possible significance of the rheumatoid factor. *Arthritis Rheum.* 4: 86-88, 1961.
- 16) Aoki, S., Ikuta, K., Aoyama, G.: Induction of chronic polyarthritis in rabbits. *Nature* 237: 168-169, 1972.
- 17) 清水正賀: 腸内細菌による実験的関節炎の電子顕微鏡的研究. *愛知医大誌* 5: 229-272, 1977.
- 18) Cooke, T.D., Richer, S.M.: Pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. III. influence of immune state and local inflammatory response on early localization of antigen to articular collagenous tissues. *J. Rheumatol.* 1: 143-152, 1974.
- 19) Cooke, T.D., Hurd, E.R., Bienenstock, J., Ziff, M.: The immunofluorescent identification of immunoglobulins and complement in rheumatoid articular collagenous tissue. *Arthritis Rheum.* 15: 433-434, 1972.
- 20) 青木重久: 線維化と免疫活性物質—その臨床応用への基礎的考察—. *最新医学* 42: 1897-1902, 1987.

- 21) Wahl, S.M., Hunt, D.A., Allen, J.B., Wilder, R.L., Paglia, L., Hand, A.R.: Bacterial cell wall induced hepatic granulomas. An in vivo model of T cell dependent fibrosis. *J. Exp. Med.* 163: 884-902, 1986.
- 22) Allen, J.B., Malone, D.G., Wahl, S.M., Calandra, G.B., Wilder, R.I.: Roll of the thymus in streptococcal cell wall induced arthritis and hepatic granuloma formation: comparative studies of pathology and cell wall distribution in a thymic and euthymic rats. *J. Clin. Invest.* 76: 1042-1056, 1985.
- 23) Janossy, G., Duke, P., Pulter, L.W., Panayi, G., Bofill, M., Goldstein, G.: Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 2: 839-842, 1984.
- 24) Wahl, S.M., Malone, D.G., Wilder, R.L.: Spontaneous production of fibroblast activating factor(s) by synovial inflammatory cells. A potential mechanism for enhanced tissue destruction. *J. Exp. Med.* 161: 210-222, 1984.
- 25) Wood, D.D., Ihrie, E.J., Dinerello, C.A., Cohen, P.L.: Isolation of an interleukin 1-like factor from human joint effusions. *Arthritis Rheum.* 26: 975-983, 1983.
- 26) 京極方久：慢性関節リウマチ関節炎の発症と関節破壊のメカニズム. *最新医学* 41: 2004-2013, 1986.