

光受容体間レチノイド結合蛋白で惹起される実験的
自己免疫性ぶどう膜炎の抗イディオタイプ
モノクローナル抗体による抑制

高木 武司, 阿部 徹, 玉田 浩郁, 山木邦比古, 櫻木 章三

秋田大学医学部眼科学教室

要 約

ルイス系ラットを用いた光受容体間レチノイド結合蛋白(IRBP)で惹起される実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)において抗イディオタイプモノクローナル抗体(TRD3)の前投与により発症が抑制された。TRD3投与群では抗IRBP抗体価, イディオタイプ抗体価は対照群と比較して低値を示し, 抗イディオタイプ抗体価は逆に高値を示した。IRBPに対する皮内反応(DTH)もTRD3投与群で抑制されていた。網膜の病理組織像では, 対照群で外顆粒層の破壊, 外節の消失, リンパ球浸潤が見られたが, TRD3投与群では炎症所見は, ほぼ欠如していた。イディオタイプ抑制のメカニズムについては, イディオタイプ特異的ないしイディオタイプに関連したサプレッサーT細胞が誘導されるものと推定した。(日眼会誌 96:606-612, 1992)

キーワード: IRBP・EAU, 抗イディオタイプモノクローナル抗体, イディオタイプ抑制, ラット

Suppression of Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP)-induced
Experimental Autoimmune Uveitis
by Pretreatment with Anti-Idiotypic Monoclonal Antibody

Takeshi Takagi, Tohru Abe, Hirofumi Tamada,

Kunihiko Yamaki and Shozo Sakuragi

Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine

Abstract

In an experimental model of interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)-induced experimental autoimmune uveitis (EAU) in Lewis rats, EAU onset was suppressed by pretreatment with anti-idiotypic antibody (TRD3). In the pretreated group, the titers of anti-IRBP antibody and idiotypic antibody were lower and the titer of anti-idiotypic antibody was higher than in the control group, and the skin test (DTH) against IRBP was also suppressed. Histopathological findings of the control group showed destruction of retinal outer granular layer, loss of the outer segment and lymphocytic infiltration, although no definite inflammatory signs appeared in the pretreated group. We suppose that the mechanism of idiotypic suppression is via induction of idio-type-specific or idio-type-related suppressor T cells. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 96:606-612, 1992)

Key words: IRBP・EAU, Anti-idiotypic monoclonal antibody, Idiotypic suppression, Rat

別刷請求先: 010 秋田市本道1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 高木 武司

(平成3年8月19日受付, 平成3年12月11日改訂受理)

Reprint requests to: Takeshi Takagi, M.D. Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010, Japan

(Received August 19, 1991 and accepted in revised form December 11, 1991)

I 緒言

免疫グロブリンの可変部内の特有の抗原構造は、イディオタイプ(以下 Id と略)と呼ばれ、Jerne¹⁾によると、生体内では Id に相補的な抗 Id 抗体が産生され、Id-抗 Id の間でネットワークを形成し免疫応答の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。

既に抗 Id モノクローナル抗体を用いて、ループス腎炎や筋無力症のモデルで、抑制実験が報告されている²⁾³⁾。

我々⁴⁾は抗光受容体間レチノイド結合蛋白(以下 IRBP と略)モノクローナル抗体(TRA 4, 以下 A 4 と略)に対する抗 Id モノクローナル抗体(TRDi)を確立し、IRBP と A 4 の結合が TRDi により阻害されることを報告した。今回はこの抗 Id 抗体のうちの 1 クローンである TRD 3(isotype; IgG₂a, 以下 D 3 と略)が、IRBP により惹起される EAU の経過に及ぼす影響を検討した。

II 実験方法

1. IRBP の精製

藤野ら⁵⁾の方法に準じて行った。すなわちウシ網膜抽出液をセファクリル S-300(ファルマシア社)でゲル濾過し、enzyme linked immunosorbent assay(以下 ELISA 法と略)で抗 IRBP モノクローナル抗体 A 4 と反応する分面を集め、ConA セファロースカラムに吸着させた後、0.2 M methyl- α -D-mannopyranoside で溶出し、精製した。

2. 抗イディオタイプモノクローナル抗体 D 3 の精製

D 3 産生ハイブリドーマを無血清培地で培養し、その上清を等量の飽和硫酸アンモニウム溶液で塩析し、遠心後、沈澱を 0.02 M PBS に溶解し、protein assay kit (BioRad 社)で吸光度を測定して蛋白濃度を調整した。

3. 免疫条件(表 1)

4 週齢の Lewis 系ラットを 5 匹ずつ用い、IRBP を

免疫する 3 週間前に D 3 を 1 匹あたり 300 μ g, 2 週間前に 200 μ g を等量のフロイント不完全アジュバント(ヤトロン社)と共に腹腔内に注射した。対照群として D 3 の代わりに、rat myeloma IgG₂a (EIA 社)を D 3 と同量注射した。IRBP はラット 1 匹あたり 100 μ g を結核死菌量を 2 mg/ml に調整したフロイント完全アジュバント(ヤトロン社)と共に後足蹠(片足)に免疫した。

4. 臨床経過の観察

IRBP 免疫 5 日後から毎日、細隙灯顕微鏡で前眼部の観察を行った。

5. 採血と各抗体価の測定

IRBP 免疫 14 日後に尾部静脈から、免疫 28 日後に心臓から採血し遠心し血清を得た。各抗体価の測定は ELISA 法を用いた。

1) 抗 IRBP 抗体価の測定; ELISA 用 96 ウェルプレート(Costar 社)に IRBP を 10 μ g ずつコーティングし、2%ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、血清を 3 倍ずつ稀釈させて反応させ、次いで 2 次抗体として、5,000 倍希釈ビオチン化抗ラット IgG(Zymed 社)を反応させ、2.5 μ g/ml HRP アビジン(Vector 社)、0.005%過酸化水素を含む 1 mg/ml ABTS(和光純薬)で発色させ、ELISA reader (Model 2550, BioRad 社)で 414 nm の検出光で吸光度を測定した。

2) Id 抗体価の測定; ウェルに IRBP をコーティングし、ブロッキングした後、血清を反応させ、2 次抗体としてビオチン化 D 3 を反応させ、同様に発色させ吸光度を測定した。

3) 抗 Id 抗体価の測定; ウェルを A 4 でコーティングしブロッキングした後、血清を反応させ、2 次抗体としてビオチン化 A 4 を反応させ、同様に発色させた。尚、モノクローナル抗体のビオチン化は、橋本ら⁶⁾の方法に準じて行った。

6. 皮内反応

IRBP 免疫 14 日後に、剃毛した側腹部皮下に IRBP 溶液 100 μ g/0.1 ml を注射し、24 時間後に紅斑の直径、即ち DTH を測定した。

表 1 実験手順

3 週前	2 週前	0	2 週後	4 週後
TRD 3+FIA 300 μ g/rat (腹腔内注射)	TRD 3+FIA 200 μ g/rat (腹腔内注射)	IRBP+FCA 100 μ g/rat (後足蹠に免疫)	右眼球摘出 採血(→ ELISA) 皮内反応(DTH)	左眼球摘出 採血(→ ELISA)
《5 日後から観察》				

FIA: フロイント不完全アジュバント FCA: フロイント完全アジュバント

7. 病理組織学的検索

IRBP 免疫 14 日後に右眼を摘出し、免疫 28 日後に左眼と松果体を摘出した。摘出した組織は 2.5% グルタルアルデヒドで固定後、 O_3O_4 で後固定したアルコール系列で脱水し、エポンに包埋した。厚さ $1\mu\text{m}$ の切片を作成しトルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

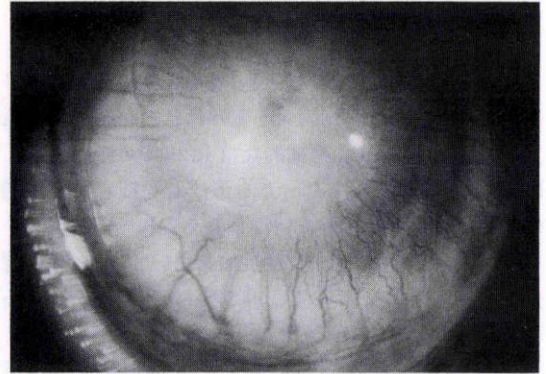
1. 臨床経過 (表 2)

前房に初めて滲出物が出現した日を発症日とした場合、対照群では IRBP 免疫平均 10.2 日後に発症したのに対し、D3 投与群では、平均 13.3 日後に発症しており、D3 投与群で発症の遅延が認められた ($p < 0.02$, t 検定)。

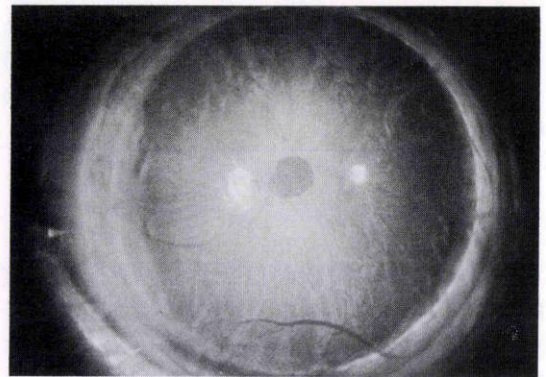
EAU 発症率は対照群が全例発症したのに対し、D3 投与群では 5 例 10 眼中、3 例 5 眼の発症に留まった。臨床的重症度は、対照群が全例瞳孔閉鎖と虹彩後面及び後房への滲出物の貯留 (我々は後房蓄膿と呼ぶ) がみられたのに対し、D3 投与群では、発症した 3 例のうち後房蓄膿は 1 例 2 眼にのみ認められ、残りの 2 例 3 眼は、輪部及び虹彩の充血と虹彩表面に結節状の滲出

表 2 臨床経過

	発症日	発症率	重症度 (後房蓄膿)
TRD3 投与群	13.3 ± 1.7 (日)	3(5)/5(10)	1(2)/5(10)
対照群	10.2 ± 1.2 (日)	5(10)/5(10)	5(10)/5(10)

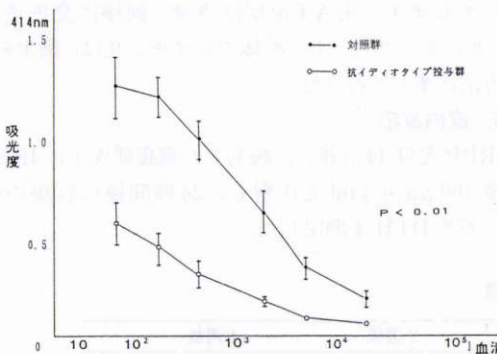


(a)



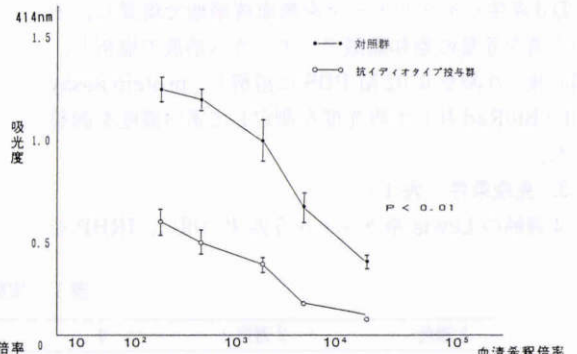
(b)

図 1 (a), (b). IRBP 免疫 11 日後の前眼部写真: 対照例(a)では強い虹彩充血, 前房への滲出物, 後房蓄膿 (本文参照) がみられるのに対し, D3 投与例(b)では, 軽度の虹彩充血のみである。



抗 IRBP 抗体価 (14 日後)

(a)



抗 IRBP 抗体価 (28 日後)

(b)

図 2 (a), (b). 抗 IRBP 抗体価は IRBP 免疫 14 日後, 28 日後とも D3 投与群が対照群と比較して, 有意に低値を示している。バーは平均値 ± 標準偏差を示す。

物が現れただけであった (図 1)。

2. 液性免疫

図 2 ~ 図 4 のグラフは縦軸が吸光度、横軸が反応させた血清の希釈倍率を示している。IRBP 免疫 14 日後、28 日後とも抗 IRBP 抗体価、抗 Id 抗体価は対照群と比較して D3 投与群で有意に低値を示した ($p < 0.01 \sim 0.05$, t 検定)。

抗 Id 抗体価は免疫 14 日後、28 日後とも対照群と比較して D3 投与群で有意に高値を示した ($p < 0.05$, t 検定)。

3. 皮内反応 (図 5)

紅斑の直径は対照群が平均 26.1 mm, D3 投与群が

平均 18.2 mm で IRBP に対する DTH は D3 投与群で抑制されていた ($p < 0.05$, t 検定)。

4. 病理組織学的所見

1) 網膜病変 (図 6, 図 7): 対照群では免疫 14 日後に、全例、外節の消失、外顆粒層の破壊、リンパ球を中心とした炎症性細胞浸潤が認められた。免疫 28 日後には外顆粒層の消失がみられたが、急性期にみられた細胞浸潤は消退していた。これに対して D3 投与群では、免疫 14 日後には 1 例を除いて外節、外顆粒層を含め全く炎症所見は見られなかった。免疫 28 日後でも炎症所見は欠如していた。

2) 松果体病変 (図 8): 対照群では小葉内にリンパ

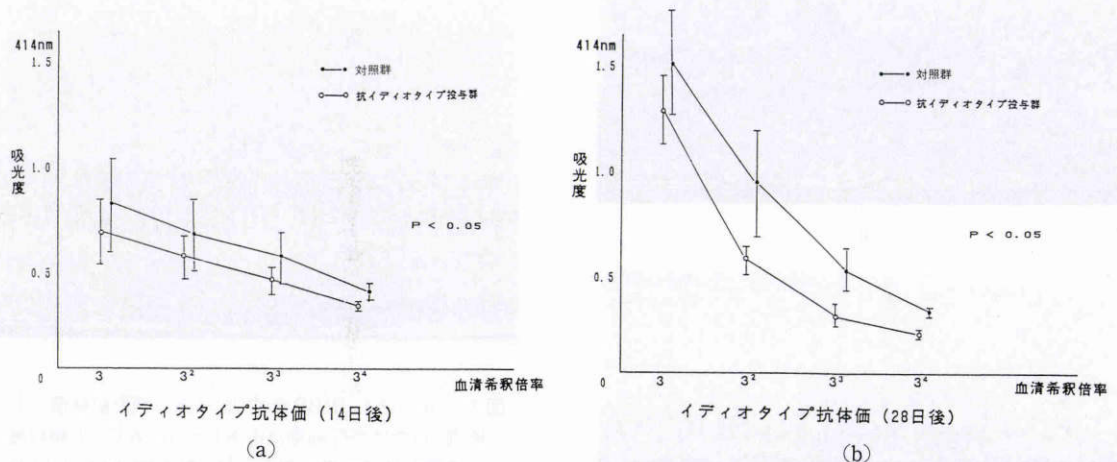


図 3 (a), (b). イディオタイプ抗体価は IRBP 免疫 14 日後、28 日後とも D3 投与群が対照群と比較して、有意に低値を示している。バーは平均値 ± 標準偏差を示す。

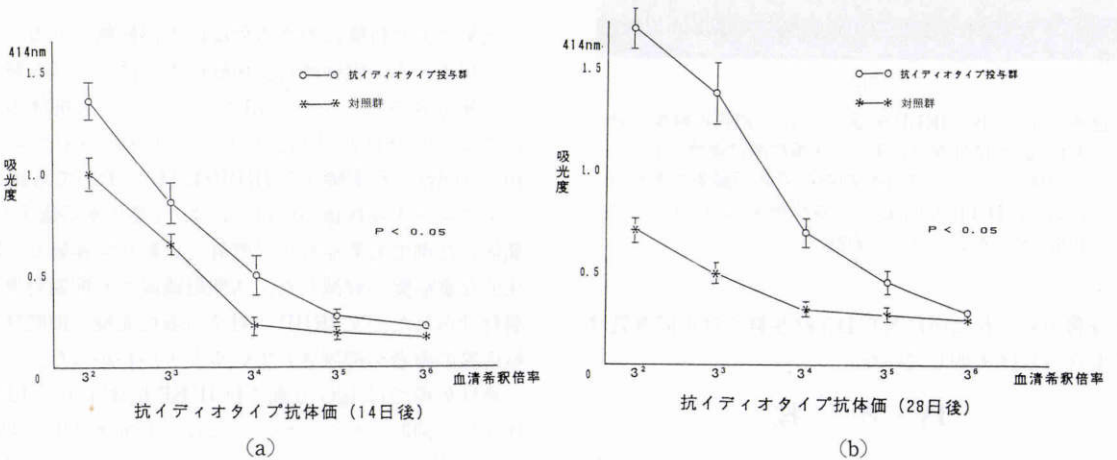


図 4 (a), (b). 抗イディオタイプ抗体価は IRBP 免疫 14 日後、28 日後とも D3 投与群が対照群と比較して、有意に高値を示している。バーは平均値 ± 標準偏差を示す。

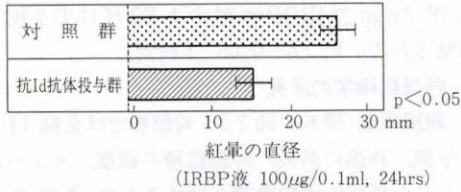
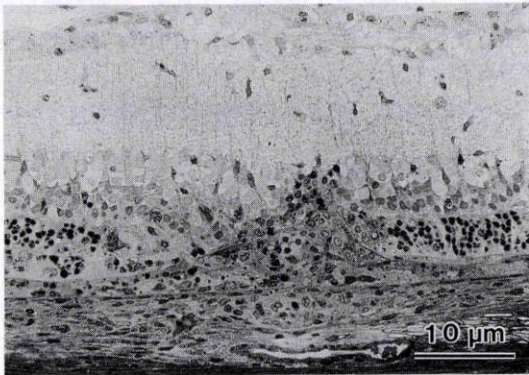
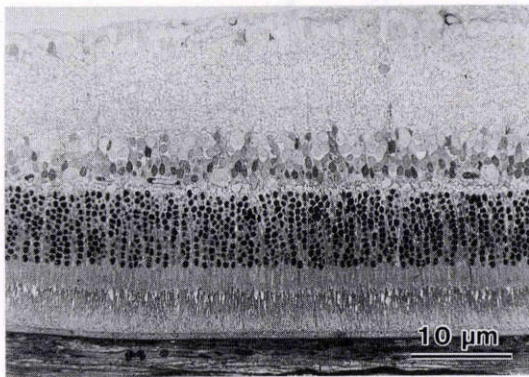


図5 皮内反応：D3投与群でDTHの抑制がみられる。バーは平均値±標準偏差を示す。



(a)



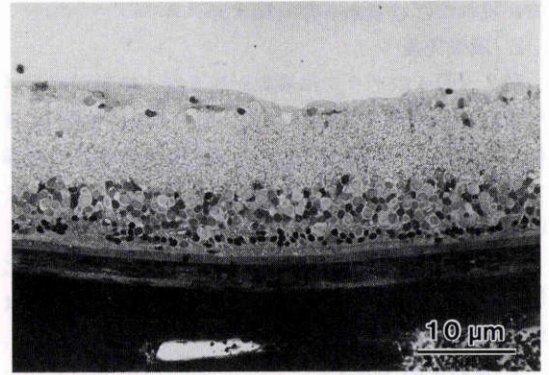
(b)

図6 (a), (b). IRBP免疫14日後の網膜組織像：対照例(a)では外節は消失し、外顆粒層は破壊され、リンパ球を中心とした炎症細胞の浸潤が顕著であるのに対し、D3投与例(b)では炎症所見に乏しい。(×135, トルイジンブルー染色)

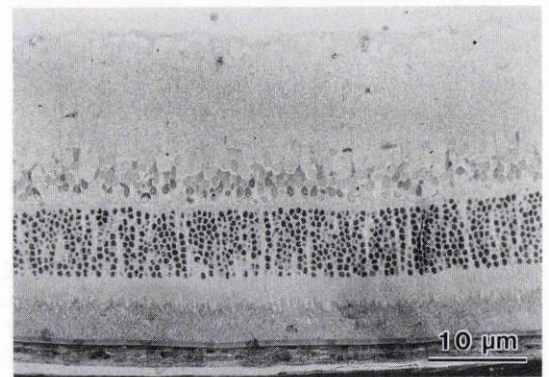
球浸潤がみられたのに対しD3投与群では炎症所見は軽度ないしは欠如していた。

IV 考 按

抗Id抗体は抗原エピトープのmirror imageをもつため、抗原を免疫する前に投与しておく、ワクチ



(a)



(b)

図7 (a), (b). IRBP免疫28日後の網膜組織像：対照例(a)では炎症細胞は消退したが、外節、外顆粒層の破壊が目立つのに対し、D3投与例(b)では14日後と同様に炎症所見に乏しい。(×135, トルイジンブルー染色)

ン効果により抗原に対する免疫応答が修飾されることが予想される。実験的自己免疫疾患ではループス腎炎や筋無力症のモデルで抗Idモノクローナル抗体の前投与により発症が抑制されることが報告されているが、今回行った実験からIRBP・EAUにおいても抗Idモノクローナル抗体の前投与により、発症率が低下し、発症した例でも発症日が対照群と比較して遅延し、臨床的な重症度が軽減した。病理組織像でも抑制効果が裏付けられた。又IRBPに対する液性免疫、細胞性免疫応答の両者が抑制されていることがわかった。

液性免疫ではIgG分画の抗IRBP抗体産生とId抗体産生が抑制されていたが、これらの抗体産生の抑制がId特異的なものかどうかは、先に作成した抗IRBPモノクローナル抗体TRA4とTRA5が、同じエピ

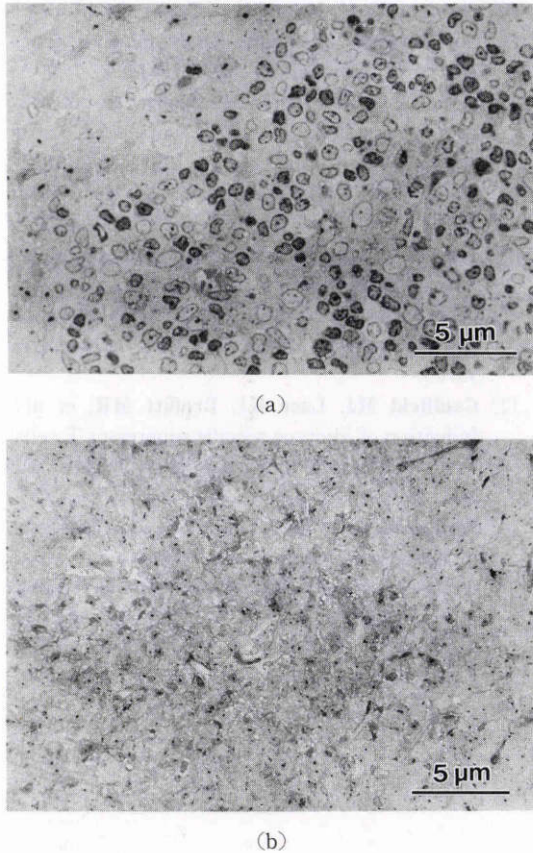


図8 (a), (b). IRBP 免疫 28 日後の松果体組織像：対照例(a)ではリンパ球の浸潤がみられるのに対し、D3 投与例(b)では炎症所見は欠如している。(×270, トルイジンブルー染色)

トープを認識しているため⁷⁾に検討はできていない。抗 Id 抗体価は、逆に D3 投与群で有意に高値を示していたが、この理由が D3 を外部から投与した為なのか、あるいは Id ネットワークを介して抗 Id 抗体が産生された為なのかは定量的な検討を行っていないので不明である。しかし、ラットに外部からモノクローナル IgG_{2a} を投与した場合、その血中半減期は 4.4 日といわれている⁸⁾ので、生体内で抗 Id 抗体が産生された可能性が強い。

Id 抑制は今までの報告によれば⁹⁾¹⁰⁾、投与する Id 抗体のサブタイプの違いや、抗原と Id 抗体の結合に競合するか否か、つまり抗 Id 抗体が抗原の内部イメージをもつか否かには依存せず、投与量に依存すると言われている。即ち ng レベルでは Id 亢進現象が起り μg レベルでは Id 抑制が起こることである。先に引

用した実験モデルでも抗 Id 抗体の投与量は 70~100 μg であった。我々もこれを参考にして投与量を決めたが、投与量の違いやアイソタイプの違いによる差の有無は検討していない。

Id 抑制のメカニズムについては詳細はわかっていないものの次の 2 つが考えられている。一つは抗 Id 抗体が Id 陽性前駆 B 細胞に直接的に働き、抗原刺激に伴う分化、成熟を阻害するという考え方¹¹⁾で、もう一つは抗 Id 抗体によりサブレッサー T 細胞が誘導されるという考え方である¹²⁾。しかしサブレッサー T 細胞が誘導される機序も明らかではなく、Caulfield ら¹³⁾は抗 Id 抗体で修飾されたイデオトープにより、Id 特異的調節細胞が誘導されると考えているが、抗 Id 抗体が T 細胞の表面レセプターに直接働いて刺激するという証拠は現在のところ出されていない。今回行った実験では、IRBP に対する液性免疫及び細胞性免疫応答の両者が抑制されたことから、Id 特異的ないしは Id と関連したサブレッサー T 細胞が誘導されるものと推定した。この考えを裏付けるには、抗 Id 抗体により抑制された動物のリンパ球を移入することで、抑制が伝達されるかどうかを検討する必要がある。

用いる抗 Id 抗体が抗原の pathogenic site の mirror image をもつか否かで Id 抑制に差が生じるのであろうか。現在 IRBP の uveitopathogenic site が、合成ペプチドを用いた実験でいくつか判明している¹⁴⁾ので、今回用いた抗 Id モノクローナル抗体 D3 が、uveitopathogenic site の mirror image をもつかどうか、即ち抗 IRBP モノクローナル抗体 A4 が uveitopathogenic site を認識しているかどうかを調べるのは、興味深いことだと思われる。

B 細胞の認識する抗原エピトープと T 細胞の抗原認識部位が同一とは限らないので、IRBP の代わりに上述の合成ペプチドを免疫した場合、抗 Id 抗体により、細胞性免疫、液性免疫の両者がどのように左右されるかも、今後検討したいと考えている。

文 献

- 1) Jerne NK: Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* 125C: 373-389, 1974.
- 2) Hahn HH, Ebling FM: Suppression of murine lupus nephritis by administration of anti-idiotypic antibody to anti-DNA. *J Immunol* 134: 187-190, 1984.
- 3) Agius MA, Richman DP: Suppression of development of experimental autoimmune

- myasthenia gravis with isogenic monoclonal anti-idiotopic antibody. *J Immunol* 137: 2195—2198, 1986.
- 4) **Abe T, Yamaki K, Sakuragi S**: Establishment of anti-idiotypic monoclonal antibodies against anti-interphotoreceptor retinoid binding protein monoclonal antibody. *Jpn J Ophthalmol* 33: 482—489, 1989.
 - 5) 藤野雄次郎, 川島秀俊, 奥村敦司, 他: 実験的自己免疫性ぶどう膜炎(その1). 網膜抗原の分離精製法と病原性について. *日眼会誌* 91: 498—508, 1987.
 - 6) 橋本 昇, 高津聖志, 浜岡利之, 他: ビオチン化抗体によるアビジンリジンA鎖複合体による特異的細胞障害法. 日本免疫学会編: 免疫実験操作法 XI. 金沢, 日本免疫学会, 3539—3549, 1982.
 - 7) 阿部 徹, 大坂幸英, 山木邦比古, 他: 網膜抗原の研究(第1報). *日眼会誌* 92: 541—548, 1988.
 - 8) **Peppard JV, Orlans E**: The biological half-lives of four rat immunoglobulin isotypes. *Immunology* 40: 683—686, 1980.
 - 9) 坂戸信夫: イディオタイプ研究概観. *臨床免疫* 17: 358—365, 1985.
 - 10) **Yamamoto H, Katz DH**: Biological effect of anti-idiotypic antibodies on lymphocyte function. *Cell Immunol* 50: 369—378, 1980.
 - 11) **Bona C, Lieberman R, House S, et al**: Immune response to levan II. T independence of suppression of cross-reactive idio-type by anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 122: 1614—1619, 1979.
 - 12) **Kim BS**: Mechanism of idio-type suppression I. In vitro generation of idio-type-specific suppressor T cells by anti-idio-type antibodies and specific antigen. *J Exp Med* 149: 1371—1378, 1979.
 - 13) **Caulfield MJ, Luce KJ, Proffitt MR, et al**: Induction of idio-type specific suppressor T cells with antigen/antibody complexes. *J Exp Med* 157: 1713—1725, 1983.
 - 14) **Kotake S, Smet DE, Sanui S, et al**: Analysis of the immunodominant and highly uveitogenic epitope of interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP), in Usui M, Ohno S, Aoki K (eds): *Ocular Immunology Today*, Amsterdam, Excerpta Medica, 281—284, 1990.