実験的自己免疫性ぶどう膜炎の発症における non-major histocompatibility complex gene の役割

吉川　浩二，広瀬　茂人，笹本　洋一，小竹　聡，松田　英彦
北海道大学医学部眼科学教室

要　約

実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）の発症感受性における non-major histocompatibility complex (MHC) gene の関与を検索するために，EAU 感受性の LEW (RT 1^l)，EAU 抵抗性の WKAH (RT 1^k) ラットおよびこれらより作製した (LEW×WKAH) F_1，(LEW×WKAH) F_2 ラットに S 抗原を免疫し，EAU 発症の有無および程度を検討した．その結果，LEW ラットは 2 週以内に全例に強い EAU の発症を認め，WKAH ラットは 6 週後でも全く発症を認めなかった．F_1 ラットの実験では，性差に関係なく 2 週以内では発症せず，ほぼ全例が 3 週目以降に軽度の炎症を生じた．F_2 ラットの実験では，1/4 が LEW 同様 2 週以内に，1/2 が F_1 同様 3 ～ 6 週後に EAU を発症し，残り 1/4 が WKAH 同様 6 週後でも炎症を認めなかった．以上より，EAU 発症に主要効果をもつ non-MHC gene は常染色体性で対立遺伝子の間に優劣がなく，単一の遺伝子領域に存在していると考えられた．（日眼会誌　97：169—174，1993）

キーワード：実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU），S 抗原，ラット，主要組織適合抗原系（MHC），非主要組織適合抗原系（non-MHC）

Participation of Non-Major Histocompatibility Complex Gene in Experimental Autoimmune Uveitis

Koji Yoshikawa, Sigeto Hirose, Yoichi Sasamoto, Satoshi Kotake and Hidehiko Matsuda
Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

It is known that the susceptibility of experimental autoimmune uveitis (EAU) is controlled by both major histocompatibility antigen complex (MHC) and non-MHC genes. In this report, we studied the role of non-MHC gene in the induction of EAU. LEW, WKAH, (LEW×WKAH) F_1 and (LEW×WKAH) F_2 rats were examined for their incidence and severity to develop EAU by immunization with bovine S-antigen (S-Ag). We found that all LEW rats developed severe EAU within 2 weeks after immunization, but no WKAH rat did. Most F_1 rats developed mild inflammation in 3～4 weeks after immunization. A quarter of F_2 rats developed EAU within 2 weeks, half of them developed it in 3～6 weeks after immunization, and the others did not. These findings suggest that only one non-MHC gene controls the susceptibility to S-Ag induced EAU in rats. (J Jpn Ophthalmol Soc 97 : 169—174, 1993)

Key words: Experimental autoimmune uveitis (EAU), S-antigen (S-Ag), Rats, Major histocompatibility complex (MHC), Non-major histocompatibility complex (Non-MHC)

別刷請求先：060　札幌市北区北15条西7丁目　北海道大学医学部眼科学教室　吉川　浩二
（平成4年5月27日受付，平成4年7月13日改訂受理）
Reprint requests to: Koji Yoshikawa, M.D.　Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine. Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060, Japan
(Received May 27, 1992 and accepted in revised form July 13, 1992)

I 緒　言

実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）は網膜可溶性抗原（S抗原）[1]や interphotoreceptor retinoid-binding protein（IRBP）[2]などの網膜抗原を完全アジュバントと共に全身的に免疫することにより実験動物にぶどう膜炎を惹き起こす臓器特異的自己免疫疾患モデルである．EAUは網膜抗原に対する遅延型過敏反応であり[3)4)]，EAU発症感受性の差が網膜抗原に対する免疫応答遺伝子の効果である可能性が考えられている．Caspiら[5]はマウスにEAUを発症させ，EAU発症における主要組織適合抗原系（MHC）の関与を示唆する報告を行っている．一方，ラットではS抗原を用いた場合，EAU発症にLEWラットはhigh responder，Brown Norwayラットはlow responder，LeRラットはno responderと系統差が認められるが[6)7)]，遺伝学的発症機序については十分に解明されていなかった．我々[8]はこれまでにコンジェニックラットを用いた実験より，EAU発症にはMHC class II geneとnon-MHC geneがともに関与すること，ウシのS抗原のアミノ酸配列番号303～320にあたるペプタイドMを免疫抗原とした場合はEAU感受性はMHC class IIによって拘束されること，また多数の抗原決定基をもつと考えられるS抗原を免疫抗原とした場合には，MHC geneによる拘束は観察されずnon-MHC geneのみが発症に関与することを明らかにしてきた．今回は，S抗原によるEAU発症感受性に関与するnon-MHC geneの遺伝形式を検討した．

II 実験方法

1. 実験動物

北海道大学医学部附属動物実験施設で維持されている生後12週のラット127匹を用いた．内訳は，EAU感受性であるLEWラット20匹とEAU抵抗性であるWAKHラット20匹，およびこれらのinbred strainより作製した（LEW×WKAH）F_1ラット35匹，（LEW×WKAH）F_2ラット52匹であった．

2. 抗原の作成

S抗原は，Doreyら[9]の方法によりウシ網膜から抽出した．即ち，低張緩衝液（0.01Mリン酸緩衝液，pH 7.6）により抽出し，50%硫酸アンモニウムによる蛋白沈降，ゲル濾過法（Ultrogen AcA 34）と吸着クロマトグラフィー法（Ultrogel HA）により精製した．

表1　EAU眼内炎症の程度分類

程度	視細胞層障害	細胞浸潤			網膜血管炎
		脈絡膜	網膜	硝子体	
0	—	—	—	—	—
1	短縮	1＋	1＋	1＋	＜10%
2	部分的脱落	2＋	2＋	2＋	10%—20%
3	視細胞外節の消失	3＋	3＋	3＋	20%—50%
4	視細胞層全体の破壊消失	4＋	4＋	4＋	50%＜

計：最大20

3. 免疫方法

S抗原をリン酸緩衝液にとかし，2.5 mg/mlの*Mycobacterium tuberculosis* H 37 Raを含む完全Freund's adjuvantに1：1に乳化しラットの足蹠に0.1 ml（抗原量は50 μg）注入した．*Bordetella pertussis*（BP，和光純薬）をさらに用いるときは0.1 ml（10^{10}個）を腹腔内注射した．

4. EAUの評価

免疫後毎日，細隙灯顕微鏡を用いて前眼部の炎症所見を観察し，発症日を確認するとともに，2週後，3週後，4週後および6週後に眼球を摘出した．摘出眼球は24時間2.5%グルタールアルデヒド緩衝液で固定，さらに10%中性ホルマリンにて固定，パラフィンに包埋した後，その切片にヘマトキシリン-エオジン染色を行い，組織学的にEAU発症の有無を検討した．組織学的な眼内炎症の程度は表1に示すように，視細胞層の破壊，細胞浸潤（ぶどう膜，網膜，硝子体），網膜血管炎の各項目につき0から4の5段階に分類し，その合計をスコア化して示した．

III 結　果

LEW，WKAHラットをS抗原で免疫した結果を表2に示した．LEWラットはBPを投与しなくても10匹中10匹が2週間以内，平均12.3日でEAUを発症した．これらは全例，図1に示したように視細胞外節は消失し多数の炎症細胞浸潤，血管炎および網膜剝離がみられ非常に強い炎症であった．BPを投与すると平均10.3日で発症した．これに対して，WKAHラットではBPを投与しないと6週間たっても1例も臨床的にも組織学的にも眼炎症を認めなかった．しかし，BPを投与すると平均10.8日でLEWラットと同程度の炎症を起こした．

F_1ラットでは表3に示したごとく，EAU発症頻度

表2　LEW, WKAH ラットにおける EAU 発症頻度

	免疫抗原	B.P.‡	発症数(匹)	発症日
LEW	S抗原	(−)	10/10(100%)	12.3±0.9*
	S抗原	(+)	10/10(100%)	10.3±0.5
WKAH	S抗原	(−)	0/10(0 %)	— †
	S抗原	(+)	10/10(100%)	10.8±0.6

*平均値±標準偏差
†6週後にても組織学的に発症を認めない
‡ *Bordetella pertussis*

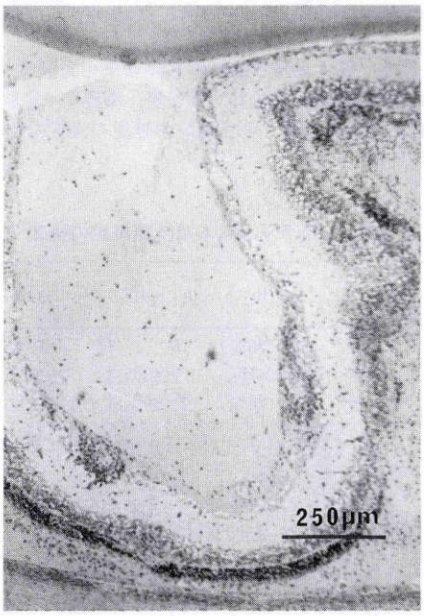

図1　LEW ラットの免疫2週後の光顕像.
視細胞外節は消失し，多数の炎症細胞浸潤，強い血管炎および網膜剝離が認められた（HE染色，×65）.

は BP を投与しなかった場合，2週では10匹中1匹10%，3週では11匹中5匹45%，4週では6匹中5匹83%であった．これらの発症例を図2に示した．視細胞外節は消失し，外顆粒層および内顆粒層に炎症細胞が浸潤しているが，LEW ラットと比較すると炎症の程度は軽度であった．BP 投与例では2週で8匹中8匹100%が発症し，全例 LEW ラットと同じ強い炎症を示した．

次に F_2 ラットの実験結果を表4に示した．実験は，片眼ずつ時期を変えて眼球を摘出したため2回に分けて行った．1回目の実験では2週では25匹中6匹，6週では25匹中20匹に発症した．2回目の実験では4週では27匹中16匹，6週では26匹中17匹に発症した．合計すると2週では25匹中6匹24%，4週では27匹中16匹59%，6週では51匹中37匹73%に EAU 発症を認めた．F_2 ラットのうち免疫2週後に発症したものは約1/4であったが，これらの例は全例 LEW 同様，網膜剝離および網膜全層への著明な細胞浸潤を認める強い炎症が見られた(図3)．免疫3週目以降に発症したと考えられるラットでは炎症が非常に軽度のものから中等度のものまでみられた．図4は4週後に眼球摘出を行い非常に弱い炎症のみられた例で，軽度の炎症細胞浸潤と限局性の網膜層構造の破壊が認められ

表3　(LEW×WKAH) F_1 ラットにおける EAU 発症頻度

免疫抗原	B.P.*	発症数(匹)		
		2週	3週	4週
S抗原	(−)	1/10(10%)	5/11(45%)	5/6(83%)
S抗原	(+)	8/ 8(100%)	—	—

Bordetella pertussis

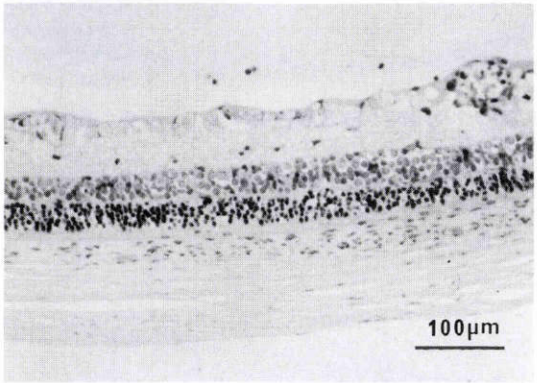

図2　(LEW×WKAH) F_1 ラットの免疫4週後の光顕像.
視細胞外節は破壊され，外顆粒層および内顆粒層に炎症細胞が浸潤しており，中等度の炎症所見を示した（HE染色，×160）.

表4　(LEW×WKAH) F_2 ラットにおける EAU 発症頻度

免疫抗原	B.P.*	発症数(眼)		
		2週	4週	6週
S抗原	(−)	6/25(24%)	—	20/25(80%)
S抗原	(−)	—	16/27(59%)	17/26(65%)
計		6/25(24%)	16/27(59%)	37/51(73%)

Bordetella pertussis

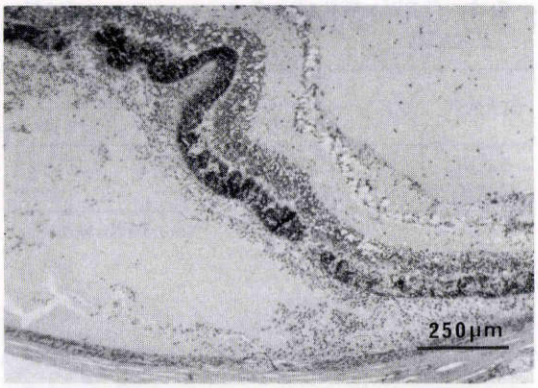

図3　(LEW×WKAH) F_2ラットの免疫2週後の光顕像.
網膜剝離，網膜全層への著明な細胞浸潤がみられ，LEWラット同様の強い炎症が認められた（HE染色，×65）.

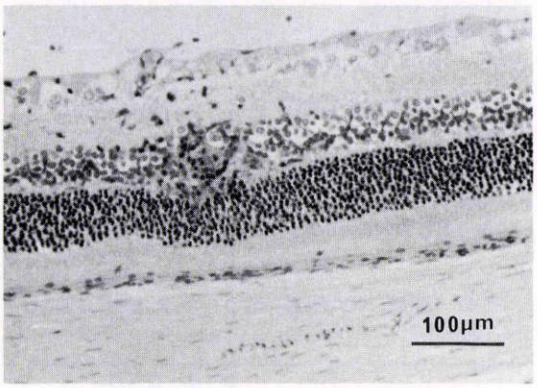

図4　F_2ラットの免疫4週後の光顕像.
軽度の炎症細胞浸潤と限局性の網膜層構造の不整が認められ，非常に軽度の炎症であった(HE染色，×160).

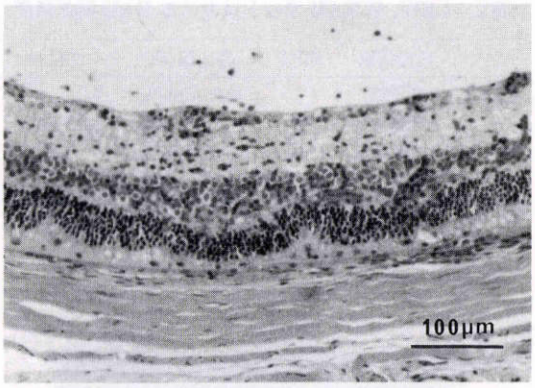

図5　図4と同じ条件のF_2ラットの光顕像.
一部視細胞外節は消失し，血管炎，瀰漫性の細胞浸潤を認め，図4に比べやや強い中等度の炎症を示した（HE染色，×160）.

表5　F_2ラットにおける眼炎症の程度

スコア / 免疫	0	<10	≧10
2週後	19*(76%)	0 †‡	6(24%)†‡
4週後	11 (41%)	9(33%)†	7(26%)†
6週後	14 (28%)	25(49%)‡	12(24%)‡

*眼数　†$p<0.02$　‡$p<0.003$（χ^2検定）

た．図5も4週後に摘出した眼球であるが図4に比べやや強い炎症がみられ，視細胞外節は消失し，血管炎，瀰漫性の細胞浸潤を認めた．

このように4週あるいは6週後に認められた眼内炎症は，2週後にみられた炎症と比較すると明らかに軽度であった．そこで，これらのF_2ラットでの炎症の程度を組織学的に定量的に分類し，その結果を表5に示した．スコアを0，10未満，10以上に分けたところ，免疫2週後に発症した6眼全例にスコア10以上の強い炎症が認められた．4週後には発症した16眼中7眼26%がスコア10以上の炎症で，9眼33%がスコア10未満の炎症を示した．また，6週後に発症した37眼のうち12眼24%にスコア10以上の炎症を認め，25眼49%にスコア10未満の炎症を示した．

なお，F_1, F_2ラットでのEAU発症に関する性差は認められなかった．

IV　考　　按

内因性ぶどう膜炎の原因はいまだ不明の点が多いが，宿主要因（内因）と環境要因（外因）という2つの因子が複雑に関与していると考えられている．内因としては遺伝的素因であるMHCが注目され，疾患発症に免疫応答異常あるいは自己免疫機序の成立が示唆されている．MHCはT細胞が外来抗原を認識する際の拘束分子として働いており，抗原決定基(epitope)の少ない比較的簡単な抗原に対する抗体応答(B細胞)や遅延型過敏反応（T細胞）にはよく相関している．これに反し多種多様なepitopeが存在する抗原に対する免疫応答では個々のepitopeに対する総和として応答が出現するためMHCが関与していない場合が多い[10]．

同様のことがラットのEAUにおいても，証明され

ている．即ち，LEW，WKAHおよびWKAH.1L（MHC geneはLEW同様1/1で，non-MHC geneはWKAHと同じk/k）ラットの実験より，EAUの発症にはMHCとnon-MHCが共に関与していた．ウシのS抗原の303～320に相当する18個のアミノ酸の合成ペプタイドであるpeptide Mを免疫抗原とし，様々な系統のラットに免疫した場合，MHCがEAU感受性を拘束していた．しかし，このMHCによる拘束は多数の抗原決定基を持つと考えられるS抗原を免疫抗原とした場合には観察されず，最終的なEAU発症は，non-MHCにより支配されていた[8]．そこで今回は，S抗原によるEAU発症においてnon-MHC geneがどのような遺伝型式を示すのかを検討した．

今回のLEW，WKAHラットの実験より，LEWのようにnon-MHCの遺伝子型が1/1の場合には全例免疫後2週間以内にEAUを発症し強い眼炎症を呈し，EAU高感受性であった．WKAHのように遺伝子型がk/kの場合には6週間後にてもまったくEAU発症を認めず，EAU抵抗性であった．しかし，このEAU抵抗性もBPを同時投与することにより消失した．BPは遅延型皮内反応の増強作用を有しているが[11]，EAUも基本的には遅延型過敏反応と考えられており，WKAHも条件さえ整えばEAU発症の可能性は有していることになる．

F_1ラットの実験より，遺伝子型が1/kの場合には2週間以内ではほとんど発症せず，3週目以降で発症例がみられはじめ，6週目ではほとんどの例が発症していた．しかし，2週以内で発症したLEWラットに比較すると炎症の程度は明らかに軽度であり，F_1はEAU発症に対し比較的弱い感受性を有していた．すなわち，S抗原によるEAU発症に主要効果をもつ遺伝子は常染色体性で対立遺伝子の間に優劣がないことが示された．

F_1ラットの遺伝子型はすべて1/kになるが，F_2ラットでは各染色体につき1/1，1/k，k/kという3種類の遺伝子型が誕生し，その発生頻度は1：2：1になる．ここでEAU発症に関与する主要な発症感受性遺伝子が1つだとすると，F_2で1つの遺伝子座が1/1あるいはk/kのホモになる確立はそれぞれ1/4であるから，F_2の1/4がLEWラット同様に2週間以内に発症し，1/4がWKAH同様6週間たっても発症しないことになる．残り1/2が1/kであり，F_1同様3～6週に発症し弱い眼炎症を生じると考えられる．今回のF_2ラットの実験より，2週間以内にEAUを発症したものは24%約1/4で，3週目以降に発症したものが49%約1/2で，6週でも発症しなかったものは27%約1/4であった．また，F_2ラットにおける眼炎症のスコア分類において，スコア10以上の強い炎症がみられたものが，免疫2週後では24%，4週後では26%，6週後では24%といずれも約1/4を占めており，これらはすべて遺伝子型1/1のラットと考えられた．6週後に10未満の炎症を示したものは49%約1/2であり，これらは主に遺伝子型1/kのラットと推察された．以上の結果より，S抗原によるEAU発症に主要効果をもつnon-MHC geneは常染色体上に存在している単一の遺伝子領域と考えられた．

EAUは自己免疫疾患のモデルであり，ヒトの内因性ぶどう膜炎と共通点が認められる．たとえば，サルにおけるEAUの病理組織学的所見において，網膜炎とともに脈絡膜への著明な炎症細胞の浸潤やダーレン・フックス結節に似た肉芽腫性病変が認められるなど，ヒトのぶどう膜炎，特に原田病や交感性眼炎との類似が報告されている[12]．ヒトでもMHC geneであるHLAとぶどう膜炎の関連は調べられている．すなわち，ベーチェット病ではHLA-B 51陽性者が人種差をこえて多く[13][14]，原田病ではHLA-DR 4，DRw 53，DQw 4の陽性率がわが国では高く[15]，急性前部ぶどう膜炎ではHLA-B 27との高い相関が認められる[16]．しかし，non-MHC geneの解析はむずかしく，ほとんどおこなわれていない．ラットのEAUでのこれがひとつのgeneであり，さらにこのnon-MHC geneによる拘束がBPの投与により解除されることが今回の実験で明かとなり，この解明が次のステップと考えられる．EAUは内因性ぶどう膜炎の発症機序や病態を説明する上できわめて有用なモデルであり，この実験系を用いて内因性ぶどう膜炎の遺伝子レベルでの遺伝的発症機構の研究および分子生物学的な免疫機序の解明が期待される．

文　献

1) **Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA Jr, Organiscial DT**: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. J Immunol 119: 1949—1958, 1977.

2) **Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP**, et al: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding

protein. Invest Ophthalmol Vis Sci 27 : 1296—1300, 1986.

3) **Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, Nussenblatt RB, Gery I** : Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 26 : 1—9, 1985.

4) **Caspi RR, Roberge GF, McAllister CG, El-Saied M, Kuwabara T, Gery I**, et al : T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. J Immunol 136 : 928—933, 1986.

5) **Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA**, et al : A new model of autoimmune disease : Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. J Immunol 140 : 1490—1495, 1988.

6) **Gery I, Robison WG Jr, Shichi H, El-Saied M, Mochizuki M, Nussenblatt RB**, et al : Differences in susceptibility to experimental autoimmune uveitis among rats of various strains. In : JW Chader, et al (Eds) : In Proceedings of the Third International Symposium on Immunology and Immunopathology of the Eye. Masson Publishing, New York, 242—245, 1984.

7) **Mochizuki M, Kuwabara T, Chan CC, Nussenblatt RB, Metcalfe DD, Gery I** : An association between susceptibility to experimental autoimmune uveitis and choroidal mast cell numbers. J Immunol 133 : 1699—1701, 1984.

8) **Hirose S, Ogasawara K, Natori T, Sasamoto Y, Ohno S, Matsuda H**, et al : Regulation of experimental autoimmune uveitis in rats—Separation of MHC and non-MHC gene effects. Clin Exp Immunol 86 : 419—425, 1991.

9) **Dorey C, Cozette J, Faure P** : A simple and rapid method for isolation of retinal s antigen. Ophthalmic Res 14 : 249—255, 1982.

10) **石川博通**：細胞間相互作用における MHC の役割（概説）. 臨床免疫 21 : 1343—1351, 1989.

11) **Sewell WA, Munoz JJ, Vadas MA** : Enhancement of the intensity, persistence, and passive transfer of delayed-type hypersensitivity lesions by pertussigen in mice. J Exp Med 157 : 2087—2096, 1983.

12) **Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, Wiggert B, Redmond TM, Gery I** : Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. Arch Ophthalmol 104 : 1698—1702, 1986.

13) **Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M** : Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. Arch Ophthalmol 100 : 1455—1458, 1982.

14) **大野重昭, 広瀬茂人, 吉田 篤, 一林泰彦, 市石昭, 小熊淑記**, 他：ベーチェット病における疾患感受性および疾患抵抗性因子の検索. 日眼会誌 90 : 767—770, 1986.

15) **Yamamoto M, Yano A** : Requirement of Ia-positive accesory cells in the MLR response against class II antigen on human B cell tumor line. J Immunol 135 : 3887—3896, 1985.

16) **小竹 聡, 大野重昭, 麻生伸一, 吉田 篤, 樋口真琴, 松田英彦**：HLA-B27 陽性のぶどう膜炎の臨床像. 臨眼 40 : 589—592, 1986.