

コンジェニックマウスを用いた実験的自己免疫性 ぶどう膜網膜炎発症における因子の検討

山川 直之¹⁾, 田中 孝男¹⁾, 土方 聡¹⁾, 此枝 義記²⁾, 臼井 正彦¹⁾

¹⁾東京医科大学眼科学教室, ²⁾財団法人実験動物中央研究所実験移植センター

要 約

従来マウスでは, S 抗原や光受容体間レチノイド結合蛋白 (IRBP) をフロインドの完全アジュバントとともに接種しても実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) が容易に惹起されないことが知られている. 本報告では, C 57 BL/10 (B 10) 由来で, 第 17 番染色体に位置する H-2 のみ異なる数種のコンジェニックマウス (B 10, B 10 A, B 10 BR, B 10 D 2) を用いて IRBP とフロインドの完全アジュバント接種および百日咳菌の腹腔内投与を併用投与することで, B 10 A (38.5%) と, B 10 BR (12.5%) に EAU を惹起せしめることができた. その結果から, マ

ウス主要組織適合遺伝子複合体の H-2 領域の K, I-A, I-E の遺伝子に k を持つ B 10 A と B 10 BR に EAU 発症が確認された. B 10 由来のコンジェニックマウスに EAU を惹起する際には K, I-A, I-E 領域の遺伝子 k が EAU 発症機序に関与すると考えられた. (日眼会誌 98: 760-764, 1994)

キーワード: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎, 光受容体間レチノイド結合蛋白, マウス, 主要組織適合遺伝子複合体

An Investigation of Factors in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EAU) in Congenic Mice

Naoyuki Yamakawa¹⁾, Takao Tanaka¹⁾, Satoshi Hijikata¹⁾,
Yoshiaki Konoeda²⁾ and Masahiko Usui¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College

²⁾Division of Experimental Transplantation, Central Institute for Experimental Animals

Abstract

S-antigen or interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), when injected with Freund's complete adjuvant into mice, does not easily cause experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). In this report, we describe the results of injecting IRBP with Freund's complete adjuvant, together with the intraperitoneal administration of Bordetella pertussis, into several types of congenic mice (B10, B10A, B10BR, B10D2). These congenic mice, of C57BL/10 (B10) origin, differ at the H-2 locus on chromosome 17. We were able to produce EAU in 38.5% of B10A mice, and 12.5% of B10BR mice, confirming that

EAU can develop in these mice that carry the k genotype at the K, I-A, and I-E regions of the major histocompatibility complex (MHC) H-2 locus. We believe that the k genotype of the K, I-A, and I-E regions is important as a factor in the pathogenesis of EAU in congenic B10 mice. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 760-764, 1994)

Key words: Experimental autoimmune uveoretinitis, Interphotoreceptor retinoid-binding protein, Mouse, Major histocompatibility complex

I 緒 言

S 抗原や光受容体間レチノイド結合蛋白(以下, IRBP)

を種々の動物に接種することによって惹起される実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(以下, EAU)は, ヒトぶどう膜網膜炎発症機序解明に役立つのではないかとの立場

別刷請求先: 160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 山川 直之
(平成 5 年 11 月 9 日受付, 平成 6 年 4 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Naoyuki Yamakawa, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received November, 1993 and accepted in revised form April 11, 1994)

から、発症にまつわる因子の検討がなされてきた。従来 BALB/C¹⁾などのマウスに、S 抗原や IRBP を接種しても他の動物に比べて EAU を発症し難いとされたが、近年マウスにおいても種々の系を用い強力な免疫賦活剤や免疫抑制剤と併用することで EAU を発症することが報告されてきた^{1)~3)}。マウスの主要組織適合遺伝子複合体(以下、MHC)である H-2 の関与は免疫応答の点から重要である。我々は C 57 BL/10 由来で、第 17 番染色体に位置する H-2 のみ異なる数種のコンジェニックマウスに対し IRBP を接種して、H-2 ハプロタイプの違いによる EAU 発現性について検討を行った。

II 方 法

1. 動 物

約 12 週齢、体重約 20~30 g で雄の C 57 BL/10(以下、B 10) (5 匹)と B 10 A (13 匹), B 10 BR (8 匹), B 10 D 2 (8 匹)の 4 種類のコンジェニックマウスおよび A マウス (5 匹) (日本 SLC 株式会社, 浜松市)を用いた。

2. 抗原作製

既報^{4)~6)}に準じて、IRBP を精製した。すなわち、牛眼 100 個から網膜を採取し、100 ml の 0.03 M-リン酸緩衝液 (pH 7.6) を加え、ホモジナイズを行った後、30 分間、12,000 rpm (15,000 g) で遠心分離を行って上清液を得た。得られた網膜抽出液を sephacryl S-300 (Pharmacia 社, Sweden) を用いてゲル濾過を行い、既存の抗ウシ IRBP ウサギ血清と反応する分画を抽出したのちに、さらに、Con-A sepharose ゲル (Pharmacia 社, Sweden) アフィニティークロマトグラフを行って分離精製した。

3. 接種実験

IRBP の接種: IRBP 50 μ g を PBS で 0.1 ml に調製

し、等量の完全アジュバント (DIFCO 社, USA) とともに混和し、マウスの背部皮下に接種した。さらに、不活化百日咳菌混濁液 (和光純薬工業) の菌体 10^{10} 個を生理食塩水で 1 ml に調製し腹腔内注射した。

4. EAU の観察

EAU の発症は全例接種日から数えて 4 週間後 (28 日目) に眼球を摘出し、組織学的検索によって検討を行った。

5. 組織学的検索

眼球は、エーテル麻酔下で摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、光学顕微鏡 (光顕) 用切片を作成した。組織像はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

6. 免疫応答

IRBP に対する細胞性免疫能は以下の方法で検索した。リンパ球増殖能: IRBP の接種から 28 日後に、エーテル麻酔下で開腹し脾臓を摘出した。摘出された脾臓は 10% 牛胎児血清加 RPMI 1640 液 (GIBCO 社, USA) 内でホモジナイズし、リンホライト-M (CEDARLANE 社, CANADA) を用いて遠沈し、分離されたリンパ球を主体

表 1 H-2(マウス主要組織適合遺伝子複合体)ハプロタイプと EAU の発症率

| マウス | K | I-A | I-E | S | D | EAU 発症率 (%) |
|----------|---|-----|-----|---|---|-------------|
| B 10 | b | b | b | b | b | 0/5(0%) |
| B 10 A | k | k | k | d | d | 5/13(38.5%) |
| B 10 BR | k | k | k | k | k | 1/8(12.5%) |
| B 10 D 2 | d | d | d | d | d | 0/8(0%) |
| A | k | k | k | d | d | 0/5(0%) |

EAU: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎

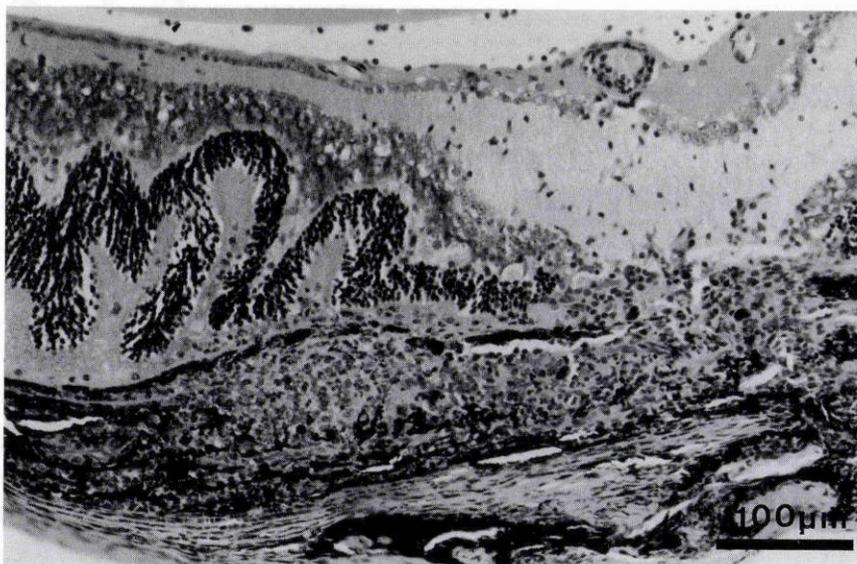


図 1 光受容体間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 免疫 4 週間後の B 10 A マウスぶどう膜網膜炎組織像。硝子体, 網膜血管壁, 網膜視細胞層および脈絡膜に小円型細胞を主体とする細胞浸潤が観察される。網膜には正常構築の破壊と滲出性の剥離も見られる。HE 染色。

とする分画に IRBP を添加して培養した。培養プレートは 96 穴 (CORNING 社, USA) を使用し, 細胞は 1 穴につき 1.5×10^5 個を $200 \mu\text{l}$ の 10% 牛胎児血清加 RPMI 1640 液 (GIBCO 社, USA) に浮遊させ, 浮遊液に IRBP が $40 \mu\text{g/ml}$ の濃度に添加されているものを実験群とし, 抗原の含まれないものを対照群とした。5.2% CO_2 37°C で, 72 時間培養を行い, 6-carboxy-fluorescein diacetate (以下 6-CFDA) (CALBIOCHEM 社, USA) を加え, 細胞内核酸への取り込みにより発する蛍光量を自動免疫反応測定装置 PATIMED® (LEITZ 社, Germany) で測定した。測定条件は既報⁷⁾に準じた。すなわち, 72 時間培養を終えた培養プレートを遠心後, 培養プレートの各ウェルに 6-CFDA 染色液を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え 37°C で 15 分間インキュベートした後, L2 フィルターを介してリンパ球細胞核から発する蛍光量を測定した。

III 結 果

1. EAU の発症

コンジュニックマウスにおける EAU の発症率は, B 10 A の 13 匹中 5 匹の 38.5% と B 10 BR の 8 匹中 1 匹の 12.5% であった。発症例では全例両眼性であった。また, B 10, B 10 D 2 および A マウスでは EAU の発症は認められなかった (表 1)。

2. 病理組織所見

IRBP 接種により EAU を発症した B 10 A マウスの眼組織所見は, リンパ球を主とする細胞浸潤が角膜輪部, 虹彩, 毛様体に認められた。また, 前後房, 硝子体にも強い浸潤がみられた。網膜ではその血管内外と, 視細胞層を中心に炎症細胞が多数観察され, 部分的に滲出性網膜剝離も認められた (図 1, 2)。また, B 10 BR では, 組織への炎症細胞浸潤は軽度であったが, B 10 A と同様に網膜血管炎が認められた (図 3)。

3. 免疫応答

リンパ球の IRBP $40 \mu\text{g/ml}$ に対する細胞性免疫応答

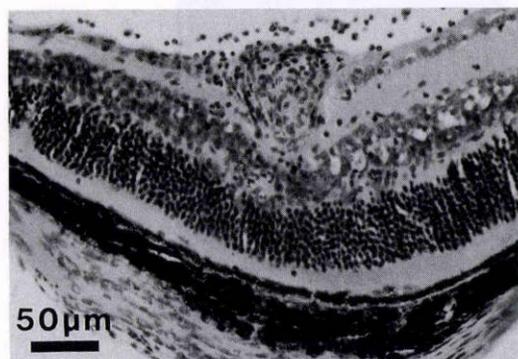


図 2 IRBP 免疫 4 週間後の B 10 A マウスぶどう膜網膜炎組織像。網膜血管周囲に小円型細胞の浸潤が見られ, 網膜血管炎が観察される。HE 染色。

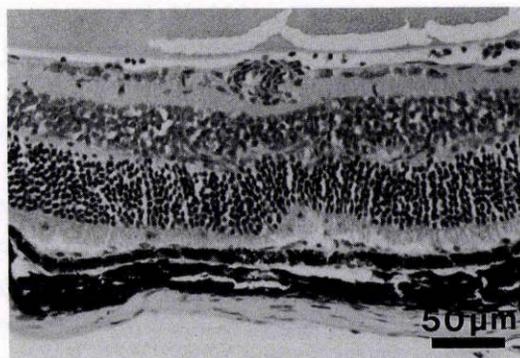


図 3 IRBP 免疫 4 週間後の B 10 BR マウスぶどう膜網膜炎組織像。

中等度の網膜血管炎が観察される。網膜, 脈絡膜における炎症細胞浸潤は軽度である。HE 染色。

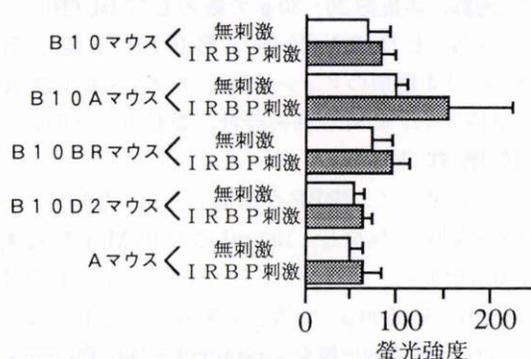


図 4 IRBP に対する細胞性免疫能。

IRBP 刺激をした B 10 A に最も強い免疫応答が認められ, B 10 BR がそれに続く免疫応答を認めた。

を検索した結果, 平均値は B 10 A が最も高値を示した。B 10 BR はそれに続く結果を示した (図 4)。

IV 考 按

EAU について様々な発症にまつわる因子の検討がなされている。抗原接種により安定した発症率が得られる Lewis ラットは最も頻繁に使用されている。現在接種方法は, フロインドの完全アジュバンドと抗原を乳化混和し足遮部に接種し, さらに百日咳菌の投与を併用する方法⁹⁾¹⁰⁾が標準的となっている。マウスの場合, ラットの発症しやすさに比較し, 同様の方法で接種しても EAU を発症し難いとされていた。ところが, 近年 cyclophosphamide¹²⁾の追加投与や百日咳菌の代わりに, さらに強力な免疫賦活作用を有する klebsiella 菌³⁾を投与することで, マウスでも EAU が発症することが報告されてきた。

今回著者らは, マウスに対して標準的方法で EAU の発症を導くことが可能であることを確認した。発症が容易なラットであってもすべての系で EAU が惹起されるのではなく, 系の違いにより感受性の高いラットや, 非感受性ラットの報告¹⁰⁾¹¹⁾もあるが, マウスの場合, 前述の報告¹²⁾により B 10 A が感受性の高い系として報告され

ていることに注目した。すなわち、B 10 A が B 10 由来のマウスで H-2 領域のみ A マウスの H-2 ハプロタイプを有することから、B 10 由来の種々のコンジュニクマウスに IRBP を接種し発症を検討した。その結果、B 10 A と B 10 BR が IRBP に対し他の系よりも感受性が高い結果であった。このことは、H-2 領域の違いによって発症の有無が左右されたと考えられ、実際 B 10 A と B 10 BR では K, I-A, I-E 領域に遺伝子型 k を共有することから、この遺伝子は EAU 発症機序における一つの因子と考えられた。一方、H-2 ハプロタイプ d は疾患に対し抵抗性を示していると考えられ、事実、BALB/C マウスは、EAU を発症し難いマウス¹⁾で、今回実験に用いた B 10 D 2 においても、EAU は惹起されなかった。さらに、H-2 ハプロタイプ b を持つ B 10 においても EAU が惹起されなかったことから、マウスの EAU 発症に MHC (マウス H-2) の関与が認められた。しかし、B 10 A と同一の H-2 ハプロタイプを有するものの、H-2 以外の遺伝子は異なる A マウスでは全く EAU の発症は認められなかった。つまり K, I-A, I-E 領域に遺伝子型 k を持つことは EAU 発症に重要ではあるが、H-2 のみならず他の遺伝子 (non-MHC) にも関与を受けて EAU が発症したと考えられる。

実際、ラット MHC である RT 1 ハプロタイプに注目して検討した結果¹⁰⁾によれば、抗原とアジュバントのみの接種では Lewis ラットのみ EAU が惹起されることが確認されたが、抗原アジュバントおよび百日咳菌を加えた場合は Lewis ラットのみならず、Lewis RT 1 ハプロタイプを有するコンジュニクラット (WKAH 1: RT 1¹⁾) や同ラットの由来する WKAH (RT 1^k) ラットにも EAU が惹起されている。このことは、百日咳菌のもつ強力な免疫賦活作用¹²⁾に由来するものであり、MHC のみならず、non-MHC を介した働きによるものと考えられる。一方、抗原に対する感受性の他に動物の種や系による眼球組織、特に血管内皮の構造や色素上皮細胞層におけるバリアーの強度、さらに Ia 抗原発現性の有無といった網膜血液層の性質の違いについても EAU 発症にまつわる因子として検討がなされるべきであると考えた。

MHC の関与は臨床的にパーチェット病で HLA-B 51, DR 52, 原田病や交感性眼炎では DR 4, DR 53, 急性前部ぶどう膜炎では B 27 にそれぞれ相関が認められており¹³⁾⁻¹⁵⁾、クラス I, II 遺伝子の関与が報告されている。今回、マウスでは特定のクラス I 遺伝子型、クラス II 遺伝子型に k を持つことが EAU の発症に関与することが明らかとなったが、IRBP を Lewis ラットに接種し発症機序を病期別に眼内浸潤細胞の様子を検討した報告¹⁶⁾によれば、クラス II 遺伝子に支配される Ia 抗原陽性細胞の浸潤に続き CD 4 陽性細胞の活性によって眼内炎が発症すると考えられている。仮に同様の機序でマウスにも

EAU が発症するのであれば、クラス II 遺伝子に属する I-A, I-E 領域の遺伝子型 k は EAU の発症に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、B 10 A と B 10 BR の間の違いはクラス I, III 遺伝子の d と k 遺伝子の違いである。今回の検索では例数が少なく有意差は認められなかったが、B 10 A と B 10 BR の間に発症率で差があったことから、EAU 発症に関わる遺伝子として Ia 抗原だけでなく、S, D 領域にも存在する可能性が考えられ、ヒトぶどう膜炎でもクラス I, II 遺伝子の関与が認められたことから、マウスにおいてもクラス I, III 遺伝子の関与は否定できない。今後マウス H-2 領域の遺伝子型をさらに解析することは、こうした疾患の実験モデルとして今後有用になると考えている。

文 献

- 1) 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.
- 2) Caspi RR, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Nussenblatt RB: Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the mouse model. In: Usui M, et al (Eds): *Ocular Immunology Today, Excerpta Medica, Amsterdam* 127-130, 1990.
- 3) Iwase K, Minami M, Nakashima I, Fujii Y, Kato N, Mochizuki M: Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the mouse: H-2 restriction of EAU induction. In: Usui M, et al (Eds): *Ocular immunology Today, Excerpta Medica, Amsterdam* 123-126, 1990.
- 4) Redmond TM, Wiggert B, Robey FA, Nguyen NY, Lewis MS, Lee L, et al: Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid-binding protein, a unique extra-cellular matrix component of the retina. *Biochemistry* 24: 787-793, 1985.
- 5) 藤野雄次郎, 川島秀俊, 奥村敦司, 望月 學: 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) 高野 繁: S 抗原以外の網膜可溶性特異抗原について. *眼紀* 33: 968-975, 1982.
- 7) 小寺良尚, 大沢圭子, 村瀬卓平, 奥村雅男, 山田博豊, 南 三郎, 他: 螢光色素を用いたリンパ球幼若化反応ならびにリンパ球による標的細胞傷害反応の迅速測定法. *移植* 21: 54-59, 1986.
- 8) 門脇修一郎, 狩野光代: Propidium iodide (PI) 螢光測定によるリンパ球 mitogen 反応の assay. *臨床免疫* 20: 854-860, 1988.
- 9) 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.

- 10) **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.
- 11) **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: Chader JW, et al (Eds): *Proceedings of the Third International Symposium on Immunology and Immunopathology of the Eye*. Masson Publishing, New York, 242-245, 1985.
- 12) **Vistica BR, McAllister CG, Sekura RD, Ihle JN, Gery I**: Dual effects of pertussis toxin on lymphoid cells in culture. *Cell Immunol* 101: 232-241, 1986.
- 13) **Ohno S**: HLA and endogenous uveitis. In: Belfort R Jr, et al (Eds): *World Uveitis Symposium*, Livraia Roca Ltda, São Paulo 117-127, 1989.
- 14) **Arocker-Mettinger E, Mayr WR, Grabner G**: HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, antigen frequencies in anterior and intermediate uveitis. In: Belfort R Jr, et al (Eds): *World Uveitis Symposium*, Livraia Roca Ltda, São Paulo, 129-134, 1989.
- 15) **脇坂明美**: 難病とHLA, 日本の現況. *臨床免疫* 14(Suppl 4): 2-16, 1982.
- 16) **白井正彦**: 免疫と眼. 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の発症機序について. *日眼会誌* 96: 1580-1607, 1992.