



Title	ラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎発症における免疫遺伝学的研究
Author(s)	広瀬, 茂人; Hirose, Shigeto
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第3832号
Issue Date	1990-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3051984
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49565
Type	doctoral thesis
File Information	000000236669.pdf



主論文

ラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎発症における
免疫遺伝学的研究

広瀬 茂人

北海道大学医学部眼科学教室

①

ラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎発症に
おける免疫遺伝学的研究

広瀬 茂人

北海道大学医学部眼科

緒言

実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (Experimental autoimmune uveitis, EAU) は網膜特異抗原で、全身感作を行なうことにより眼炎症を惹き起こす臓器特異的自己免疫疾患モデルである。網膜抗原のなかでも最もよく研究されているのは retinal soluble antigen (S-Ag)¹⁾ である。これは分子量約 48 kDa の蛋白であり、また光刺激伝導に重要な役割を果たしていること²⁾ が報告されている。EAU は、基本的には、この S-Ag に対する遅延型過敏反応である。このことは、感作された動物の helper-T cell³⁾ 或は cell-line⁴⁾ を adoptive transfer すると native の動物に EAU が発症することにより示されている。また、抗体は、もし関与しているとしても、あくまでも二次的な役割をしているものと考えられる。EAU では単核細胞の網膜・ぶどう膜への浸潤^{5, 6)}、特に霊長類では肉芽性網脈絡膜炎を認める⁷⁾

ことから、ヒトのぶどう膜炎との類似性が報告されている。さらに、ぶどう膜炎患者において網膜特異抗原に対する細胞性免疫反応が認められており^{8,9)}、本抗原自体がヒトのぶどう膜炎に関与している可能性が考えられる。

近年、ウシ^{10,11)}およびヒト¹²⁾のS-Agのアミノ酸配列が決定され、ウシのS-Ag 303-320番に相当する18個のアミノ酸の合成ペプチド、peptide MがLEWラット¹³⁾、Hartleyモルモット¹⁴⁾、Stumptailモンキー¹⁵⁾においてEAUを惹き起こすことが報告されている。また、このpeptide Mに相当するアミノ酸配列はヒトにおいてもウシと同一である¹²⁾こと、peptide Mに対するリンパ球増殖反応がぶどう膜炎患者においても認められている¹⁶⁾ことから、このペプチドの持つ抗原決定基はヒトにおいてもS-Agの病原性抗原決定基の一つと考えられる。

ヒトのぶどう膜炎と主要組織適合性遺伝子

複合体 (Major histocompatibility antigen complex、MHC) の特定のハプロタイプとの相関¹⁷⁻²¹⁾はよく研究されている。また、Caspiら²²⁾はマウスにEAUを作成することに成功し、EAU発症におけるMHCの関与を示唆する報告を行なっている。しかし、一般的に自己免疫疾患に感受性が高い多くのマウス系統種、たとえばCBA、C3H、SJL/JやPL/Jは、遺伝的な網膜変性症を持つためEAU実験には適さない。AKR (H-2^k)と(SJL/J x AKR)F₁ (H-2^{s/k})マウスのみが Bordetella pertussis (BP) 投与による数回のS-Ag免疫でEAUを発症する²²⁾。また、マウスでのS-Agの病原性抗原決定基は同定されていない。以上のことからマウスでのMHCとnon-MHC遺伝子のEAU発症における役割は未だ明らかではないと思われる。一方、種々のラット系統でのEAU発症感受性の相違が報告^{23, 24)}されているが、免疫遺伝学的研究は行なわれていない。本研

究では、MHC と non-MHC 遺伝子の EAU 発症における役割を明らかにすることを目的として、EAU 感受性である LEW、抵抗性である WKAH、LEW の MHC をもち background は WKAH である WKAH.1L RT1 congenic strain およびその他、計 12 種の inbred strain ラットを S-Ag あるいは peptide M で免疫することにより EAU 発症の有無を検索した。

材料と方法

動物：10-14 週令の雄を用いた。これらは、北海道大学動物実験施設で維持されているものであった。

抗原：S-Ag は Dorey らの方法²⁵⁾によりウシ網膜より抽出した。この方法は、低張緩衝液 (0.01M リン酸緩衝液、pH 7.6) による抽出、その後、50% 硫酸アンモニウムによる蛋白沈降、ゲル濾過法 (Ultrogel AcA34) と吸着クロマトグラフィー法 (Ultrogel HA) による精製である。

Peptide M は、PAM レジンでの固相法により自動ペプタイド合成機を用いて小笠原らの方法²⁶⁾により合成した(430A, Applied Biosystems, Inc., Foster city, CA)。ペプタイドは、PAM-レジンと trifluoromethane sulfonic acid により分離し、逆相高速液体クロマトグラフ(Waters Japan, Tokyo, Japan)により精製した。アミノ酸配列は、アミノ酸分析機 835 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)により確認した。

免疫方法：50 μ g の S-Ag あるいは 100 μ g の peptide M を、2.5 mg/ml の Mycobacterium tuberculosis H37Ra を含む完全 Freund's adjuvant に 1:1 に乳化しラットの足蹠に注入した。一部のラットでは、BP (和光純薬) 死菌 10^{10} 個を免疫と同時に静注した。免疫後、毎日、眼内炎症の有無を肉眼的に観察した。

組織：免疫 28 日後にラットを殺し、眼

球を摘出した。摘出眼球は24時間2.5%グル
タ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
-エオジン染色をおこない光学顕微鏡で観察
した。

リンパ球増殖反応：免疫3週後に膝窩リ
ンパ節を摘出、これより単核細胞を得、 ^3H
-TdR uptake を既報²⁷⁾のごとく行なった。
簡単には、単核細胞を2度洗いした後、
 2×10^5 個の細胞を RPMI 1640 に penicillin
(100U/ml)、streptomycin (100mg/ml)、
L-glutamine (2mM) と5%非働化牛血清を加え
た培養液 0.2ml に抗原と共に浮遊させて96穴
プレート (Coaster, Cambridge, Mass.)
で培養した。72時間培養後、 ^3H -TdR
(New England Nuclear; 2Ci/mole, 0.5mCi
/ 10 μ l/well) を加えてさらに16時間培養し
た。 ^3H -TdR uptake は液体シンチレーション
カウンタ-にて計測した。増殖反応の結

果は、S.I. (Stimulation Index) にて示した。

抗体価測定：血清は免疫3週後のラットを心腔内穿刺して得た血液より分離した。抗体価測定はELISA法²⁸⁾にて行った。簡単には、96穴のpolyvinylchloride plate (Dynatech Lab. Inc., Alexandria, VA) を100ng/50 μ l/wellのS-Agでcoatし、1% gelatineにてblockした。1:33から1:8,100まで希釈した血清を各wellに加え1時間後、50 μ l/wellのperoxidase conjugated goat anti-rat IgG F(ab')₂ fragment (Jackson Immuno Res. Lab. Inc., Avondale, PV) を加えた。2時間後、2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) 50 μ l/wellを反応させ、405nmでの吸光度をMicroelisa autoreader (Dynatech Instruments) にて計測した。

遅延型皮内反応：免疫19日後にラット腹壁を剃毛し、100 μ g/0.1mlのS-Agを皮内

注射した。48時間後に腹壁の硬結径を計測した。

結果

1. LEW、WKAHおよびWKAH.1LラットでのS-AgによるEAU発症

LEW、WKAHおよびWKAH.1LラットをS-Agにより免疫した結果、BP投与を行なわなかった群では、LEWラットは12匹全てが 12.3 ± 0.9 (Mean \pm SD)日にEAUを発症したが、WKAHおよびWKAH.1Lラットでは、28日目でも臨床的にも組織学的にも全く眼炎症は認められなかった。一方、BP投与を行なった群では、12匹のLEW、12匹のWKAH、また10匹のWKAH.1Lラット全てがEAUを発症した (Table 1)。発症日はそれぞれ 10.3 ± 0.5 、 10.8 ± 0.6 、 10.8 ± 0.8 日であり、炎症の強さもほぼ同程度であった。またBP投与下でのLEWラットのEAU病変は、非投与下での変化と比べると、より強い炎症変

化を示した。

2. BP非投与ラットにおけるS-Agに対する免疫応答

Figure 1は、免疫3週後のBP非投与ラットでのS-Agに対する ^3H -thymidine uptakeをmean \pm SE (n)で示している。LEW、WKAHおよびWKAH.1Lラット群のS.I.は、それぞれ 4.6 ± 0.7 (8)、 3.2 ± 0.5 (6)、 3.9 ± 0.6 (4)であり、3系統すべてに陽性反応が認められた。各群間に有意差は認められなかった。S-Agに対するIgG抗体価は、Figure 2に示した。液性免疫も3系統すべてに成立しており、各群間に有意差を認めなかった。一方、S-Agに対する遅延型皮内反応は、LEWラットでは 10.1 ± 0.9 (4) mmの硬結を認めたのに対し、WKAHおよびWKAH.1Lラットでは 2.1 ± 0.9 mm (4)と 1.9 ± 0.6 mm (4)であり、LEWラットと他の2系統の間に有意差を認めた ($P < 0.01$, two-tailed t-test)。

3. LEW、WKAH および WKAH.1L ラット
での peptide M による EAU 発症
LEW、WKAH および WKAH.1L ラットを
peptide M で免疫すると共に BP を静注した。
RT1 ハプロタイプ l を持つ、LEW と
WKAH.1L ラットでは、免疫された全ての 10
匹の LEW と 8 匹の WKAH.1L ラットが EAU を発
症した。しかし、RT1 ハプロタイプ k を
持つ WKAH ラットでは、0/10 匹と全く発症を
認めなかった (Table 2)。これらの所見は、
peptide M で惹き起こされる EAU は RT1^k ハ
プロタイプと相関していることを示唆してい
る。Peptide M による EAU 炎症は、S-Ag
によるものより明らかに軽度で主に眼球後部
に局限していたが、組織学的には網膜視細
胞層の破壊、多数の単核球と多核白血球の
網膜と硝子体への浸潤、静脈周囲炎、網
膜および脈絡膜での肉芽性病変、さらには
液性の網膜剥離など S-Ag による EAU と同一の
変化を認めた。

4. 種々の RT1 ハプロタイプをもつラットでの peptide M あるいは S-Ag による EAU 発症。先の実験により認められた MHC 遺伝子による EAU 発症における拘束をさらに明らかにするため、inter MHC recombinant を含む 11 種の RT1 ハプロタイプをもつラットを peptide M あるいは S-Ag で免疫、BP を同時に投与して EAU 発症を調べた。結果は Table 3 に示した。Peptide M 免疫により EAU 発症を認めたものは、LEW、F344 (RT1^{1v1}) および NIG-III (RT1^g) ラットの 3 系統のみであった。これらの系統は全て、ラット MHC class II 遺伝子座である RT1-B および D 座に 1 特異性を持つ²⁹⁾ (Table 4)。これら以外の系統種は、いずれも RT1-B および D 座に 1 特異性を持たず、全く EAU 発症を認めなかった。Peptide M により発症した F344 および NIG-III ラットでの病変は、LEW ラットに認められたものより軽度であったが、EAU に典型的な所見を示した。一

方、S-Ag免疫とBP投与では、全ての検査したラットACI (RT1^{a v 1})、BUF (RT1^b)、LEJ (RT1^j)、W (RT1^k)、WKAH、LEW、F344 (RT1^{l v 1})、BN (RT1ⁿ)、NIG-III (RT1^o)、TO (RT1^t)、SDJ (RT1^u)にEAU発症を認めた (Table 3)。

考案

今回の実験より、ラットEAU発症にはMHCおよびnon-MHC遺伝子が共に関与していることが認められた。Non-MHC遺伝子のEAU発症に対する効果は、EAU高感受性であるLEWラットと同一のMHCを持っているWKAH.1Lラットに全くEAU発症が認められなかったことにより示されている (Table 1)。このnon-MHC遺伝子のEAU発症に関する抑制効果は、Table 1及び3に示すように、BPの同時投与により観察されなくなった。BPによる遅延型皮内反応の増強作用³⁰⁾はよく知られているが、我々も、BPの投与に

より WKAH および WKAH. 1L ラットでの S-Ag に対する遅延型皮内反応が著しく亢進することを見いだしている（未発表）。また、中枢神経系における自己免疫疾患モデルで、myeline basic protein (MBP) に対する遅延型過敏反応である experimental allergic encephalomyelitis (EAE) では、BP が高感受性ラットの炎症反応を強くする³¹⁾こと、またマウスの EAE 発症には欠かせない³²⁾ことが報告されている。BP による遅延型皮内反応の増強及び自己免疫疾患発症促進のメカニズムは解明されていないが、血管作動性アミンに対する血管反応性の亢進作用³³⁾が一つの重要な因子であると考えられる。実際、Linthicum ら³⁴⁾は、BP の投与により中枢神経系における血管透過性の亢進が認められることを EAE モデルで報告している。

遅延型過敏反応による自己免疫疾患モデルは、抗原によるリンパ球の感作、所属リンパ節での増殖・分化、さらにはこれらの

細胞の標的臓器への集族という一連の反応と
考えられる。ほとんどの組織において、
リンパ球は血管内皮細胞と相互作用を行なう
ことによりこれを透過して炎症の場に到達す
る³⁵⁾。したがって、BPを投与されてい
ないEAU抵抗性ラットでは、網膜組織への
リンパ球の集族を惹き起こすためのリンパ球
と血管内皮細胞の相互作用が良好に行なわれ
ていない可能性が示唆される。また、こ
のリンパ球の集族を惹き起こす相互作用は、
少なくともある程度は、non-MHC遺伝子に
より規定されていると考えられる。我々の
実験で、1) BP非投与下では、EAU発症
が認められなかったWKAHとWKAH.1Lラットで
も、LEWラットと同程度にS-Agに対するリ
ンパ球増殖反応および液性免疫が認められた
こと、2) 遅延型皮内反応ではLEWラット
のみが有意に強い反応を示したこと、3)
BPの投与によりWKAHとWKAH.1Lラットにも
EAU発症を認めたことは、上記の仮説を支

持するものと考えられる。

EAU は交感性眼炎や Vogt-Koyanagi-Harada 病 (VKH) のモデル⁶⁻⁸⁾と考えられている。

これらの疾患は、臨床的には melanocyte を標的抗原とする臓器特異的自己免疫疾患^{36,}

³⁷⁾と考えられており、HLA-DR53 や DQw4

(= DQWa) 抗原との高い相関^{20, 21)}が認められている。しかし、眼炎症実験モデルにお

ける免疫遺伝学は殆ど研究されていない。

実際の病変形成における MHC 遺伝子の効果を示すためには、

non-MHC 遺伝子の影響を分離する必要がある。また、ウシ S-Ag は

404 個のアミノ酸より成る^{11, 12)}ことから、

明らかに多数の抗原決定基をもつと考えられる。

この S-Ag を用いた実験では MHC の EAU

発症に関する拘束が覆い隠されてしまった可能性

がある。このため、18 個のアミノ酸

である peptide M を用い、BP を同時に投与

することにより EAU 発症における MHC 遺伝子

の影響を検索した。調べた 12 系統種のラッ

トのうち EAU 発症を認めたものは、いずれも RT1 の class II 亜領域である B および D 遺伝子座に 1 特異性をもつラットであった。一方、peptide M で EAU 発症を認めなかったラットでも、全ての系統が BP の同時投与による S-Ag 免疫により EAU 発症を認めた。これらの所見は、peptide M による EAU 発症が MHC class II 分子により拘束されていること、また、異なった MHC を持つラット系統ではそれぞれ異なった S-Ag の抗原決定基が EAU 発症を規定していることを示唆している。今回の結果と同様に、異なった MHC をもつ系統種が同一抗原の異なる部分を認識して疾患を発症することはマウス EAE モデルを用いた実験で Fritz ら³⁸⁾により示されている。

細胞性免疫による自己免疫疾患では、自己抗原を T 細胞が認識する必要がある。抗原認識において、class II 抗原と結合できる抗原のみが T 細胞に抗原提示されること

が報告^{26, 39)}されている。したがって、
peptide M による EAU 発症の MHC 拘束は、
peptide M が有する抗原決定基と MHC class
II 抗原の結合性による可能性が考えられる。
しかし、対応する T 細胞レパートリーの
違い、あるいは抗原提示細胞の抗原 process
の相違などによる可能性も否定できず、検討
を要すると思われる。

抗原は、in situ においては whole
protein として、つまり複数の抗原決定基
を持つ抗原として存在し、small peptide
(単一の抗原決定基)として存在するわけ
はない。したがって、今回の我々の実験
で S-Ag で免疫した場合と同様に、大多数の
MHC 遺伝子は、標的抗原を認識できるはずで
ある。とすれば、VKH のようなヒトの臓
器特異的自己免疫疾患と HLA class II 抗原の
相関は、どのような機序で説明できるのだ
ろうか？ Singh ら⁴⁰⁾は、Escherichia
coli 蛋白と peptide M が 6 個の連続した同一

のアミノ酸配列をもつことを見出し、この同一の部分を含む Escherichia coli 由来の合成ペプチドを LEW ラットに免疫することにより EAU の発症を認めている。つまり、眼組織と交叉抗原性をもつ病原菌の感染により免疫応答が起これば、眼炎症が惹き起こされる可能性が示されたわけである。実際にヒトにおいてこのような機序により疾病が起これば、異種の蛋白が連続した同一のアミノ酸配列をもつ可能性は同一の部分の長いほど少なくなるため、交叉反応性は短いアミノ酸配列で起これると考えられる。したがって、免疫応答は、peptide M で免疫したラットの場合と同様に MHC class II 分子の強い拘束を受ける。つまり、このような機序で起こる疾患患者は、特定の抗原決定基を認識できる特定の HLA class II 分子を持つことになる。今回の実験における class II 抗原の拘束は、HLA class II 分子と疾患との関連のメカニズムの一つとし

て、臓器特異的自己免疫疾患での molecular mimicry theory を支持するものと考えられる。

結語

ラット EAU 発症における免疫遺伝学的研究を行ない以下の結果を得た。

EAU 発症には、MHC・non-MHC 遺伝子が共に関与していた。MHC class II (RT1^d) 分子は、peptide M による 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-Ag を免疫源とした場合には観察されなかった。最終的な EAU 発症は、non-MHC 遺伝子により支配されていた。この non-MHC 遺伝子の影響は、BP を同時投与した場合には認められなかった。

謝 辞

稿を終わるにあたり、ご指導と御校閲を
うけたまわりました松田英彦教授に深謝いた
します。また、ご指導、御助言頂いた
小野江和則教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Wacker, W.B., Donoso, L.A., Kalsow, C.M., Yankeelov, J.A. Jr, and Organisciak, D.T.: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. J. Immunol., 119: 1949, 1977.
- 2) Pfister, C., Chabre, M., Pluet, J., Van Tuyen, V., de Kozak, Y. and Faure J.P.: Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. Science, 228: 891, 1985.
- 3) Mochizuki, M., Kuwabara, T., McAllister, C., Nussenblatt, R.B. and Gery, I.: Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.

- 26: 1985, 1985.
- 4) Caspi, R.R., Roberge, F.G.,
McAllister, C.G., El-Saied, M.,
Kuwabara, T., Gery, I., Hanna, E.
and Nussenblatt, R.B.: T cell lines
mediating experimental autoimmune
uveoretinitis (EAU) in the rat. J.
Immunol. 136: 928, 1986.
- 5) Marak, G.E.: Recent advances in
sympathetic ophthalmia. Surv.
Ophthalmol. 24:141, 1979.
- 6) Faure, J.P., Fhuc, L.H., Takano, S.,
Sterkers, M., Thillaye, B., and de
Kozak, Y.: Uveoretinite experimentale
induite par l'antigen S retinen
chez le singe: Induction, histo-
pathologie. J. Fr. Ophthalmol. 4:
465, 1981.
- 7) Hirose, S., Kuwabara, T., Nussenblatt
R.B., Wiggert, B., Redmond, T.M., and

- Gery, I.: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. Arch. Ophthalmol. 104: 1698, 1986.
- 8) Nussenblatt, R.B., Gery, I., Balinitine, E.J. and Wacker, W.B.: Cellular immune responsiveness of uveitis patients to retinal S-antigen. Am. J. Ophthalmol. 89: 173, 1980.
- 9) Hirose, S., Tanaka, T., Nussenblatt, R.B., Palestine, A.G., Wiggert, B., Redmond, T.M., Chader, G.J. and Gery, I.: Lymphocyte responses to retinal-specific antigens in uveitis patients and healthy subjects. Curr. Eye Res. 7: 393, 1988.
- 10) Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., and Tao, R.: Primary and secondary structure

- of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6975, 1987.
- 11) Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S., and Matsubara, K.: Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. Biochem. Biophys. Res. Commun. 142: 904, 1987.
- 12) Yamaki, K., Tsuda, M. and Shinohara, T.: The sequence of human retinal S-antigen reveals similarities with α -transducin. FEBS Lett. 234: 39, 1988.
- 13) Donoso, L.A., Merryman, C.F., Sery, T.W., Shinohara, T., Dietzschold, B., Smith, A., and Kalsow, C.M.: S-antigen: characterization of a pathogenic epitope which mediates experimental autoimmune uveitis and pinealitis in Lewis rats. Curr. Eye.

- Res. 6:1151, 1987.
- 14) Singh, V.K., Yamaki, K., Donoso, L.A., and Shinohara, T.: S-antigen: experimental autoimmune uveitis induced in guinea pigs with two synthetic peptides. Curr. Eye. Res. 7: 87, 1988.
- 15) Hirose, S., Singh, V.K., Donoso, L.A., Shinohara, T., Kotake, S., Kuwabara, T., Yamaki, K., Gery, I., and Nussenblatt, R.B.: An 18-mer peptide derived from the retinal S antigen induces uveitis and pinealitis in primates. Clin. Exp. Immunol. 77: 106, 1989.
- 16) Hirose, S., Donoso, L.A., Shinohara, T., Palestine, A.G., Nussenblatt, R.B. and Gery, I.: Lymphocyte responses to an 18-mer peptide derived from the retinal S antigen in

- uveitis patients. Jpn. J. Ophthalmol. 1990, in press.
- 17) Ohno, S.: The association of the HLA system with ocular diseases. Jpn. J. Ophthalmol. 23:355, 1979.
- 18) Ohno, S., Ohguchi, M., Hirose, S., Matsuda, H., Wakisaka, A. and Aizawa, M.: Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease. Arch. Ophthalmol. 100: 1455, 1982.
- 19) Hirose, S., Ohno, S. and Matsuda, H.: HLA-Bw54 and glaucomatocyclitic crisis. Arch. Ophthalmol. 103: 1837, 1985.
- 20) Moriuchi, J., Katagiri, K., Wakisaka, A., Ikeda, H., Maruyama, N., Tagawa, Y., Aizawa, M., and Itakura, K.: Association of B' cell alloantigenic determinant, Hon 7, with Harada's disease.

Immunogenetics 9: 487, 1979.

- 21) Kunikane, H., Ishikawa, N., Nakayama, T., Fukasawa, Y., Kojima, H., Hawkin, S., Tajima, Y., Misonou, J., Wakisaka, A. and Aizawa, M.: HLA-DQWα antigen - Ethnic polymorphism among Japanese and Caucasian population and association with Harada's disease - In HLA in ASIA - Oceania. Aizawa, M., ed. Hokkaido University Press, Sapporo, p.830, 1986.
- 22) Caspi, R.R., Roberge, F.G., Chan, C.C., Wiggert, B., Chader, G.J., Rozenszajn, L.A., Lando, Z. and Nussenblatt, R.B.: A new model of autoimmune disease: experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. J. Immunol. 140: 1490,

- 1988.
- 23) Gery, I., Robison, W.G. Jr., Shichi, H., El-Saied, M., Mochizuki, M., Nussenblatt, R.B., and Williams, R.M.: Differences in susceptibility to experimental autoimmune uveitis among rats of various strains. In Proceedings of the Third International Symposium on immunology and immunopathology of the eye. J.W. Chader and G.R. O'Connor, eds. Masson Publishing, New York. p.242, 1984.
- 24) Mochizuki, M., Kuwabara, T., Chan, C.C., Nussenblatt, R.B., Detcalfe, D.D., and Gery, I.: An association between susceptibility to experimental autoimmune uveitis and choroidal mast cell numbers. J. Immunol. 133: 1699, 1984.

- 25) Dorey, C., Cozette, J., de Kozak, Y., and Faure, J.P.: A simple and rapid method for isolation of retinal S-antigen. *Ophthalmologic Res.* 14: 249, 1982.
- 26) Ogasawara, K., Wambua, P.P., Gotohda, T. and Onoe, K.: Modification of the T cell responsiveness to synthetic peptides by substituting amino acids on a retopes. *International Immunol.* 1990, in press.
- 27) Hirose, S., Wiggert, B., Redmond, T.M., Kuwabara, T., Nussenblatt, R.B., Chader, G. and Gery, I.: Uveitis induced in primates by IRBP: humoral and cellular immune responses. *Exp. Eye Res.* 45: 695, 1987.
- 28) Fujita, H., Mizuno, Y. and Shiokawa, H.: Purification and properties

- of porcine testis acylphosphatase.
J. Biochem. 102: 1405, 1987.
- 29) Gill III, T.J., Kunz, H.W., Misra,
D.N. and Cortese Hassett, A.L.: The
major histocompatibility complex of
the rat. Transplantation 43: 773,
1987.
- 30) Swell, W.A., Munoz, J.J., and Vadas,
M.A.: Enhancement of the intensity,
persistence, and passive transfer of
delayed-type hypersensitivity
lesions by pertussigen in mice. J.
Exp. Med. 157: 2087, 1983.
- 31) Lennon, V.A., Westall, F.C.,
Thompson, M. and Ward, E.: Antigen,
host and adjuvant requirements for
induction of hyperacute experimental
autoimmune encephalomyelitis. Eur.
J. Immunol. 6: 805, 1976.
- 32) Munoz, J.J., Bernard, C.C.A. and

- Mackay, I. R.: Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of Pertussigen. Cell. Immunol. 83: 92, 1984.
- 33) Bergmann, R. K. and Munoz, J. J.: Action of histamine sensitising factor from Bordetella pertussis on inbred and random bred strains of mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 34: 331, 1968.
- 34) Linthicum, D. S., Munoz, J. J., and Blaskett, A.: Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. Cell. Immunol. 73: 299, 1982.

- 35) Duijvestijn, A. and Hamann, A.:
Mechanisms and regulation of lympho-
cyte migration. Immunol. Today 10:
23, 1989.
- 36) 松田 英彦 : Vogt-小柳-原田症候群及
び交感性眼炎における Melanocyte の電子
顕微鏡的研究。日眼会誌 : 1107, 1970.
- 37) Sugiura, S.: Vogt-Koyanagi-Harada
disease. Jpn. J. Ophthalmol. 22: 9,
1978.
- 38) Fritz, R.B., C.H. Jen Chou, and D.E.
McFarlin. Induction of experimental
allergic encephalomyelitis in PL/J
and (SJL/JxPL/J)F₁ mice by myelin
basic protein and its peptides.
Localization of a second enceph-
alitogenic determinants. J. Immunol.
130: 191, 1983.
- 39) Marrack, P.: New insights into
antigen recognition. Science 235:

1311, 1987.

- 40) Singh, V.K., Yamaki, K., Abe, T.
and Shinohara, T.: Molecular mimicry
between uveitopathogenic site of
retinal S-antigen and Escherichia
coli protein: induction of
experimental autoimmune uveitis and
lymphocyte cross-reaction. Cell.
Immunol. 122: 262, 1989.

図表の説明

Figure 1. Proliferative responses against S-Ag of lymph node cells from the rats immunized with 50 μ g of S-Ag in CFA without BP. Each point represents the S.I. of each rat. Bars represent the mean \pm SE of each strains.

Figure 2. IgG antibody titers against S-Ag in the rats immunized with 50 μ g of S-Ag in CFA without BP. Each point represents the mean absorbance \pm SE of each strain.

Figure 3. Delayed-type hypersensitivity skin reaction against S-Ag in the rats immunized with 50 μ g of S-Ag in CFA without BP. Each column represents the mean induration \pm SD of each strain

(n = 4). Only LEW rats showed substantial responses against S-Ag and significant differences of the response between the LEW and other two strains (WKAH and WKAH.1L) were observed (P < 0.01; two tailed t-test).

Table 1. Induction of S-Ag EAU in LEW, WKAH, WKAH.1L rats*

* Rats were immunized with 50 μ g of S-Ag in CFA. + 10^{10} cells of Bordetella pertussis (BP) were injected intravenously (i.v.) as an additional adjuvant.

Table 2. Induction of EAU with peptide M *

* Rats were immunized with 100 μ g of peptide M in CFA. An additional adjuvant, Bordetella pertussis, was

injected i.v. (10^{10} bacteria/rat).

Table 3. Induction of EAU in different strains of rats *

* Rats were immunized with 100 μ g of peptide M or 50 μ g of S-Ag in CFA. An additional adjuvant, Bordetella pertussis was injected i.v. (10^{10} bacteria/rat).

Table 4. Composition of RT1 region in the rats developed EAU with peptide M

* RT1 A and E are class I MHC loci.

RT1 H, B, and D are class II MHC loci.

RT1 G is similar to TL antigen in the mouse. † (-) No reactivity when tested.

‡ Variant 1 haplotype.

玄瀬

Table 1

Strain	Genetic background	RT1 Haplotype	No. of Rat(Diseased/total)	
			<i>BP</i> (-)	<i>BP</i> (+) [†]
LEW	LEW	<i>l</i>	12 / 12	12 / 12
WKAH	WKAH	<i>k</i>	0 / 12	12 / 12
WKAH. 1L	WKAH	<i>l</i>	0 / 10	10 / 10

Table 2

宏瀬

Strain	Genetic background	RT1 Haplotype	No. of Rat Diseased/total
LEW	LEW	<i>l</i>	10 / 10
WKAH	WKAH	<i>k</i>	0 / 8
WKAH. 1L	WKAH	<i>l</i>	8 / 8

Table 3

宏瀬

Strain	RT1 Haplotype	No. of Rat Diseased/total	
		peptide M	S-Ag
ACI	<i>av1</i>	0/4	4/4
BUF	<i>b</i>	0/4	4/4
LEJ	<i>j</i>	0/4	4/4
W	<i>k</i>	0/4	4/4
WKAH	<i>k</i>	0/4	4/4
LEW	<i>l</i>	4/4	4/4
F344	<i>lv1</i>	4/4	4/4
BN	<i>n</i>	0/4	4/4
NIG-III	<i>q</i>	4/4	4/4
TO	<i>t</i>	0/4	4/4
SDJ	<i>u</i>	0/4	4/4

玄瀬

Table 4

Strain	RT1 Haplotype	RT1 allele*					
		A	H	B	D	E	G
LEW	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	— [†]	<i>a</i>
F344	<i>lv1</i> [‡]	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	—	—
NIG- III	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>l</i>	<i>l</i>	—	—

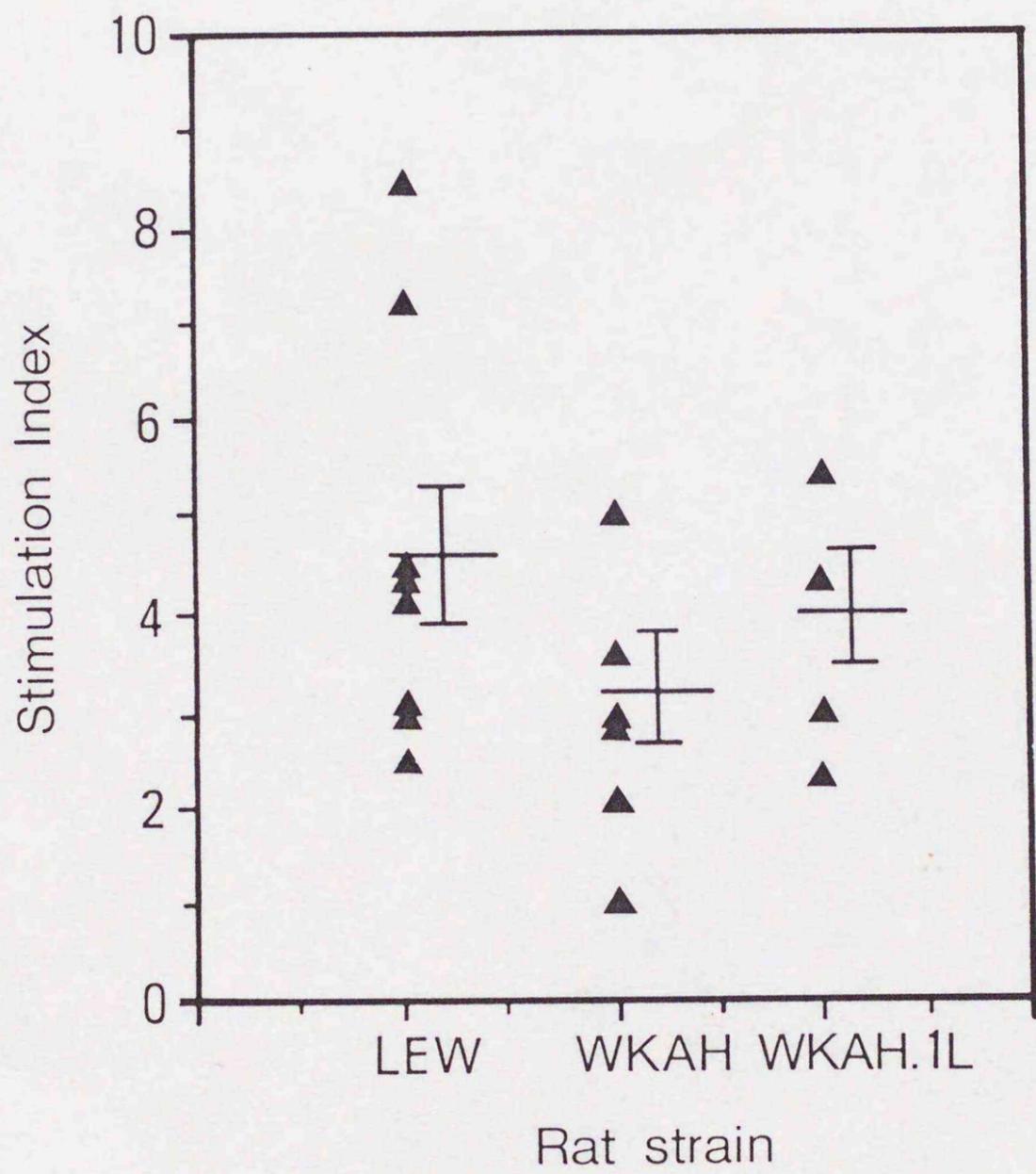


Figure 1.

広瀬

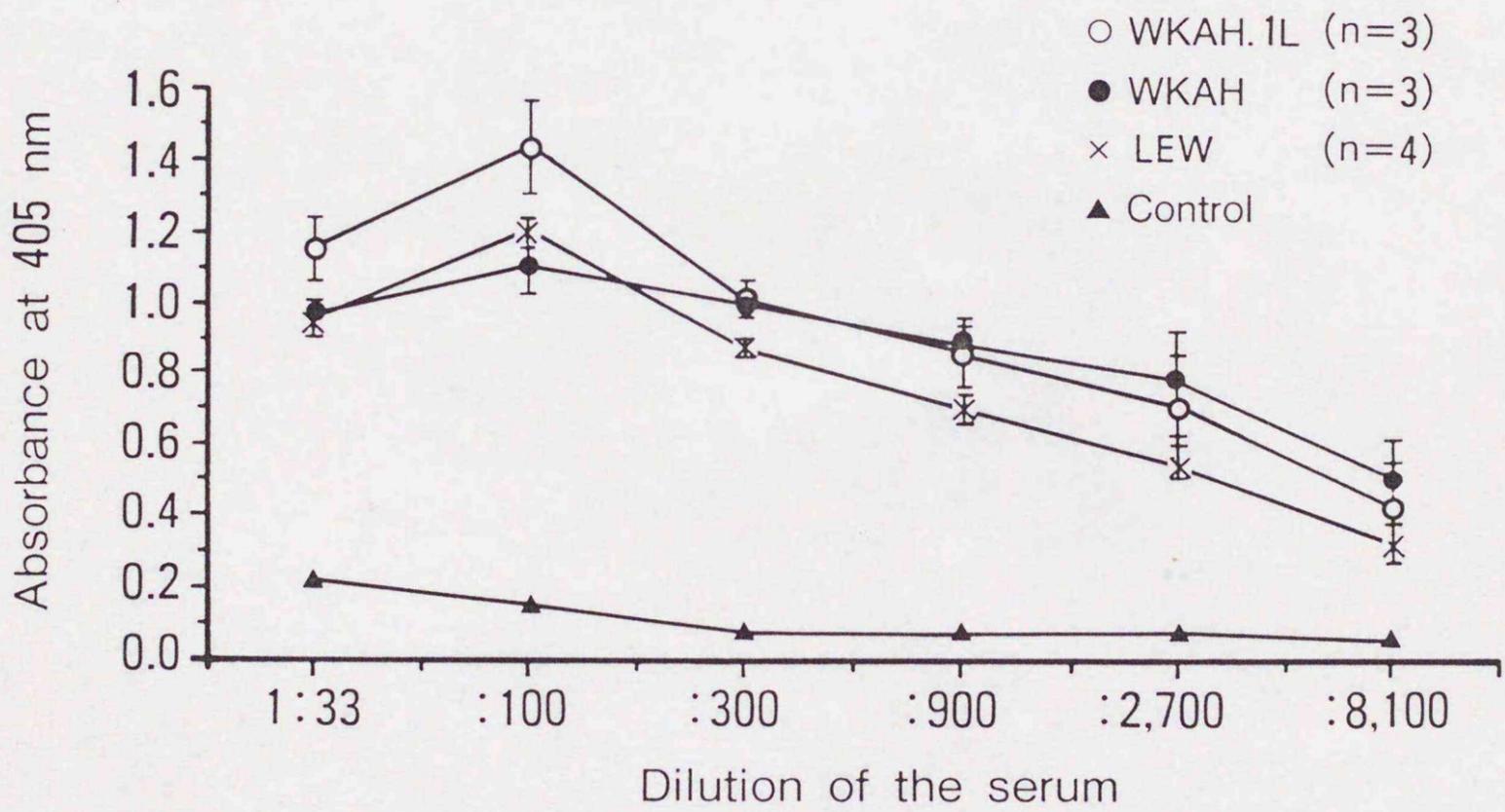


Figure 2. 宏瀬

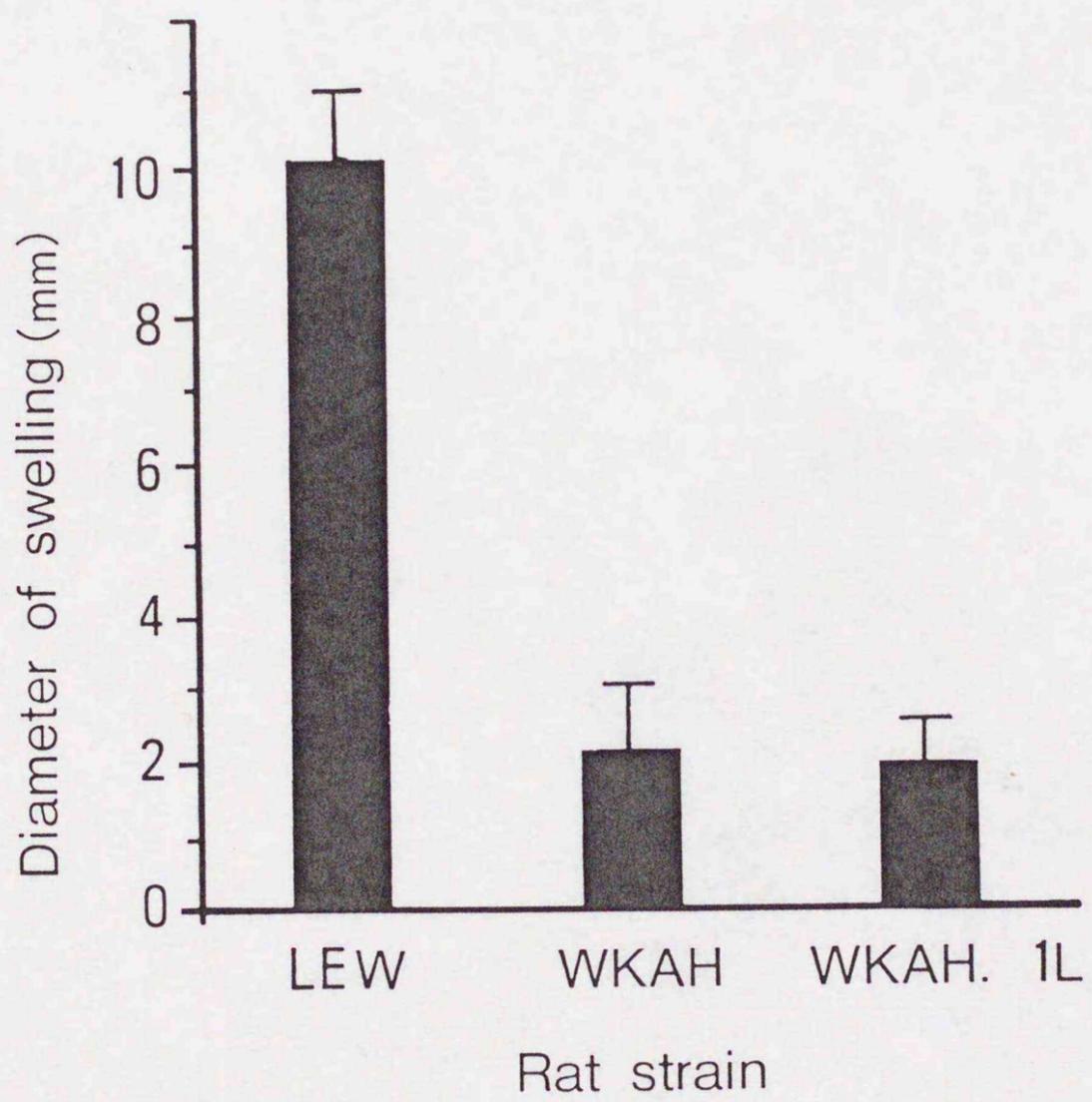


Figure 3 宏瀬

Genetic Control of Experimental
Autoimmune Uveitis in Rats

Shigeto Hirose

Department of Ophthalmology,
Hokkaido University School of Medicine,
Sapporo 060, Japan

Differences in susceptibility to experimental autoimmune uveitis (EAU) among rats of various strains have been reported. The present study was aimed at separating the effects of the major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes on the development of EAU. EAU-susceptible LEW, EAU-resistant WKAH, WKAH.1L MHC congenic strain rats representing MHC of LEW on WKAH genetic background, and other nine inbred strains of rats were examined for their ability to develop EAU by immunization with bovine S-Ag or peptide M, a synthetic polypeptide corresponding to position 303 to 320 in bovine S-Ag. We found that only LEW rats developed S-Ag induced-EAU, where WKAH.1L congenic and other rats did not. However, when an additional injection of Bordetella

pertussis (BP) was given, all rat strains developed S-Ag induced-EAU. In contrast, only LEW, WKAH.1L, F344, and NIG-III rats, which have haplotype 1 at RT1 class II subregions developed EAU by immunization with peptide M and BP.

The present findings showed that the susceptibility to EAU in rats was controlled by both MHC and non-MHC genes. Eventual development of EAU in rats was governed by non-MHC gene(s). However, this effect of non-MHC gene(s) could no longer be observed when an additional injection of BP was administered. MHC class II (RT1¹) restricted the susceptibility to peptide M induced-EAU. However, this MHC restriction was not observed when multideterminant S-Ag was used as an immunogen.

Key words:

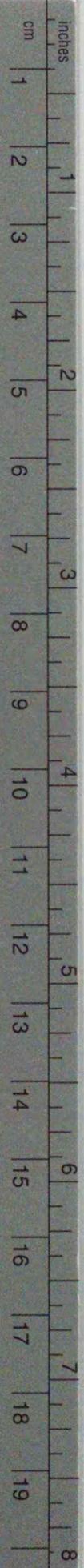
Bordetella pertussis, congenic rat,
experimental autoimmune uveitis,
major histocompatibility complex,
peptide M, retinal soluble antigen

種々のラット系統での実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) に対する感受性の相違が報告されている。本研究では、EAU 発症における主要組織適合抗原複合体 (MHC) と non-MHC 遺伝子の役割を明らかにすることを目的として、EAU 高感受性である LEW、EAU 抵抗性である WKAH、LEW ラットと同一の MHC と WKAH の non-MHC 遺伝子とを持つ WKAH. 1L RT1 congenic rat、他 9 種類の純系ラットをウシ S-Ag あるいは、ウシ S-Ag のアミノ酸配列 303 から 320 番を合成したペプチドである、peptide M で免疫することにより EAU 発症の有無を検索した。その結果、S-Ag で免疫し、Bordetella pertussis (BP) 投与を行わなかった場合では、LEW ラットは EAU を発症したが、WKAH および WKAH. 1L ラットでは全く眼炎症が認められなかった。一方、BP 同時投与を行なった場合では、全てのラットが S-Ag による EAU を発症した。しかし、BP 同時投与を行なっ

ても、peptide M で免疫した場合には、LEW、WKAH.1L、F344、及びNIG-III ラットの RT1 class II に 1 ハプロタイプをもつラットのみがEAUを発症した。

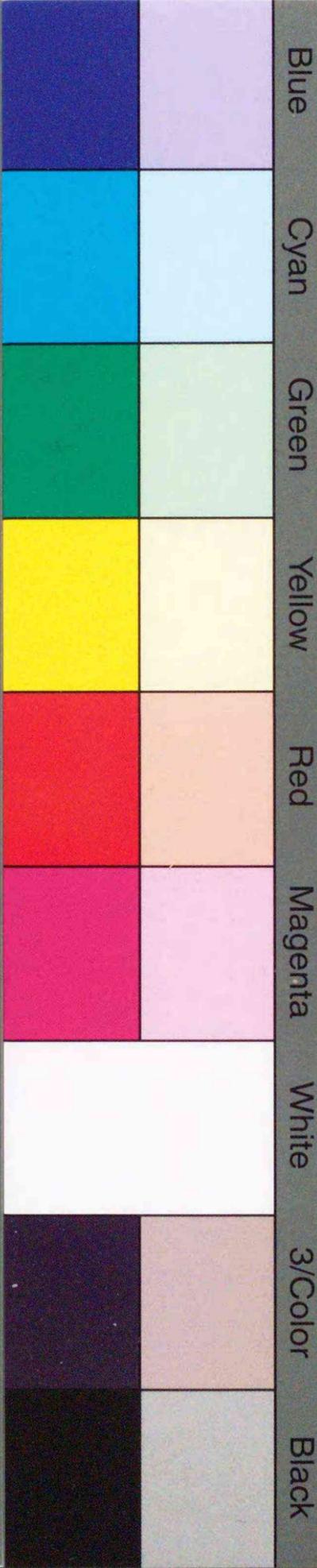
以上の結果よりラットEAU発症には、MHC・non-MHC 遺伝子が共に関与していることが示された。最終的なEAU発症は、non-MHC 遺伝子により支配されていた。しかし、このnon-MHC 遺伝子の影響は、BPを同時投与した場合には認められなかった。

MHC class II (RT1^d) は、peptide M による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-Agを免疫源とした場合には観察されなかった。



Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

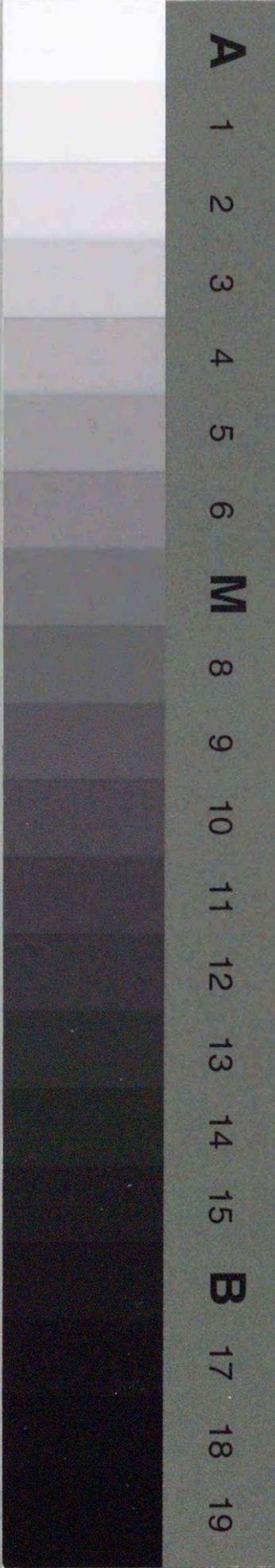


Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak



A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19