



Pathogenesis of chronic inflammation in experimental ferritin-induced arthritis. V. electron microscopic localization of specific antibodies in the synovial membrane

坂田, 敏郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-02-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0999

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000999>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	さか　　た　　とし　　ろう 坂　　田　　敏　　郎　　(兵庫県)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	医博ろ第867号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和61年2月12日
学位論文題目	Pathogenesis of Chronic Inflammation in Experimental Ferritin-Induced Arthritis. V. Electron Microscopic Localization of Specific Antibodies in the Synovial Membrane (実験的フェリチン誘導関節炎における慢性炎症の病因 —関節滑膜における特異的抗体の局在について—)
審　査　委　員	主査 教授　廣　畑　和　志 教授　杉　山　武　敏　教授　伊　東　　宏

論　文　内　容　の　要　旨

1. 緒　　言

種々の免疫反応が関与するとされる慢性関節リウマチ（以下RAと略す）の病態を検索するために、多数の動物モデルが考察されてきた。なかでも、1962年Dumonde と Glynn による、Antigen-Induced Arthritis（抗原誘発関節炎）は、その代表である。このモデルは、あらかじめ免疫した家兎の膝関節に同抗原を注入することによりRA類似の慢性炎症を誘発するものである。

我々は、電子顕微鏡で追跡可能なFerritin（以下フェリチン）を抗原に使用して本法を追試し、その滑膜薄切標本をフェリチンと incubation することにより抗フェリチン抗体を標識し、関節局所での特異的抗体の産生を電顕的に証明しようとした。

2. 材料、及び方法

成熟ニュージーランド白色家兎15羽を用い、フェリチン（馬脾臓より精製）10mg及びComplete Freund's Adjuvant 1 ml を加えた懸濁液にて免疫した。Ouchterlony test 及び皮内反応を用い体液性並びに細胞性免疫が獲得されたのを確認後、家兎の片側膝関節内に清潔操作下でフェリチン 5 mg（生理食塩水 1 ml に溶解）、および対側には対照とし生理食塩水 1 ml をそれぞれ注入（Challenge）した。又、正常家兎の膝関節内にフェリチン 5 mg を注入し対照とした。関節内に抗原を注入後、2 週目に家兎を屠殺し、膝関節滑膜を採取した。滑膜は通常のホルマリン固定による光顕標本の作製以外に、抗体の局在を調べるためにPLP液（2% paraformaldehyde, 0.075M lysine, 0.01M sodium-m-periodate）にて固定後－80℃で凍結し10－20umの厚さの切片をクライオスタットで作製し、スライド

ガラス上で抗原フェリチン (3.75mg/ml) と室温下に incubation した。対照として、同様の抗原性を有するが電子線不透過の鉄を含有しないApo-Ferritin(以下アポフェリチン) 1 mg/mlでブロックした後、再びフェリチンと incubation した。以下通常のエボン包埋ブロックを作製し、光学顕微鏡、及び、日立H-300型電子顕微鏡にて観察した。

3. 結 果

光顕的観察では、Challenge 後2週目の滑膜は表層細胞の多層化、フィブリンの沈着がみられ、表層下の毛細血管周囲では、リンパ球集族化や形質細胞の著しい浸潤が観察された。フェリチンと incubation した滑膜を電顕的に観察すると形質細胞の粗面小胞体内に直径約50Åの均一で、電子密度の高いフェリチン顆粒がみられ、又一方細胞核の周囲にも散在性に同様の顆粒が観察された。細胞間質や膠原線維の局在に一致して凝集した状態のフェリチンが認められた。毛細血管周囲の基底膜にもこれに付着する様に带状にフェリチンが存在し、一部血管腔内にも認められた。先にアポフェリチンでブロックした対照群においては、フェリチン顆粒は認められなかった。フェリチンは抗フェリチン抗体と結合していると考えられ、フェリチンの分布は関節滑膜中での抗フェリチン特異的抗体の局在を示すものである。

4. 考 察

抗原誘発関節炎の病態は、RAの免疫学的側面を研究する上で広く利用され、近年関節内膠原線維組織中に局在する免疫複合体が炎症の慢性化に関与するとされている。今回確認された特異抗体（免疫に使われた抗原に対する抗体）がChallenge を受けた関節で産生されることは抗原誘発関節炎においては、関節局所でもリンパ節等と同様の機能をもって特異的抗体の産生を営むことを物語っている。しかもアポフェリチンによりブロックされることにより、特異的な抗フェリチン抗体と考えられる。この特異的抗体産生のメカニズムとしては、家兎を免疫することにより、全身の細網系で抗体が産生されており、関節局所へ同じ抗原を注入することにより、マクロファージやリンフォカインによる活性化を受けたB-リンパ球が関節局所に動員され、その成熟化と共に抗体産生を営むようになると考えられる。RA滑膜においても、リウマトイド因子を含む免疫グロブリン産生が、血管周囲・形質細胞で証明されている。しかし基質中においては明らかではない。本法の様に抗原と抗体を直接結合させる方法は感受性が高く、しかも分子量の大きな抗原と結合したため膠原線維間に取り込まれる様に観察されたものと考えられる。この所見はRA軟骨表層の膠原線維間に認められる免疫複合体と類似した形態である。

抗原誘発関節炎とRAは類似した病態を示し、関節局所での抗体産生が炎症の慢性化に関与する因子であり、今回その特異的抗体の局在を証明した。さらに、RA滑膜において体内又は体外由来の抗原刺激が存在すれば、関節局所での抗体産生により、慢性炎症が起こるメカニズムが推測される。

ま と め

1. フェリチン誘発関節炎の関節滑膜において抗フェリチン特異的抗体が形質細胞の小胞体内・核周囲・血管基底膜周囲及び基質膠原線維間に証明された。これはRA滑膜の免疫グロブリンの局在に相当するものと考えられる。

2. この実験モデルでは、関節局所で産生された、いわゆる特異的抗体が関節内線維組織内に残存する抗原と共に、関節炎の慢性化に関与する重要な因子と考えられる。

論文審査の結果の要旨

慢性関節リウマチ（以下RAと略す）の原因を追求し、その炎症の仕組みを明らかにするため、アジュバント関節炎をはじめ多くの実験モデルが開発されてきた。DumondeとGlynn によって家兔に発症させた antigen induced arthritis もその一つである。これらをRAのモデルとして利用する場合その実験的関節炎が人のRAの関節局所に見られるような免疫複合体の産生とそれによる炎症の慢性化の病態にどの程度類似しているか免疫学的アプローチからの検討が必要となる。

そこで研究者は超微形態学的に細胞内で追跡の可能なフェリチンを抗原に選び抗フェリチン抗体を標識しておきこの antigen induced arthritis の関節局所において特異抗体が産生されるか否かを検索した。

材料と方法：成熟家兔15羽に馬脾臓より精製したフェリチン10mg及びComplete Freund's Adjuvant 1 ccを加えて免疫した。Ouchterlony テストと皮内反応で液性及び細胞性免疫が得られたことを確認してから家兔の片側膝関節内にフェリチン 5 mgを含む生理的食塩水 1 ccを注入した。反対側は対照として生理的食塩水のみを注入していわゆるchallenge を終えた。その他免疫しない正常家兔の膝関節内にフェリチン 5 mgを注入して対照とした。

前述の抗原を関節内に注入して2週間後に膝関節の滑膜組織を採取し、ホルマリン固定標本の他に抗体の局在を観察するためPLP液固定後に凍結切片標本作製して抗原フェリチンと incubation を行なった。対照として同様の抗原性を有しながら電子線不透過の鉄を含まないアポフェリチンでブロックして再びフェリチンと incubation を行なった。その後は通常のEpon包埋ブロックを作製して光顕と電顕で観察した。

結果と考察：Challenge 後2週目で関節滑膜は表層細胞の増殖、フィブリン沈着、リンパ濾胞の形成、著しい形質細胞の浸潤が現れた。フェリチンと incubation した滑膜の形質細胞の粗面小胞体、核周辺の細胞質に直径50Åの dense なフェリチン粒子が存在した。細胞間質や膠原線維間に凝集したフェリチンが観察され、毛細管周囲のbasal lamina にも帯状にフェリチンが沈着し一部は血管腔内にも認められた。ところがアポフェリチンでブロックした対照群ではフェリチン粒子は見られなかった。これらのフェリチンは抗フェリチン抗体と考えられるもので、関節滑膜中での抗フェリチン特異的抗体の局在を示したものである。このように免疫に使われた抗原に対する抗体即ち特異抗体がChallenge を受けた関節で産生されていることが明らかとなった。即ち、antigen induced arthritis の関節局所でもリンパ節などと同じく特異抗体を産生し得ることが証明されたのである。その上アポフェリチンでブロックされるので特異的な抗フェリチン抗体と考えられる。この抗体の産生機序については家兔を免疫することによりマクロファージやリンホカインにより活性化されたβ-リンパ球が

関節滑膜中に動員されてやがて形質細胞に機能分化した結果といえる。今回の antigen induced arthritis における特異抗体の出現はRA滑膜におけるリウマトイド因子を含む免疫グロブリン産生に極めてよく類似している。たゞ本実験系では抗原と抗体を直接結合させるので感受性が高く、分子量の大きい抗原と結合するため膠原線維間など基質にも認められたのである。この所見はRA軟骨における免疫複合体の沈着に似ている。以上の如く antigen induced arthritis はRAの免疫異常とその側面を研究する上で有用な実験モデルと云える。

本研究では実験的関節炎についてその発症機序と関節滑膜内の特異抗体の局在部位を免疫病理学的に明確にしたものである。これは従来ほとんど行われなかったフェリチンを用いた超微形態学的研究について重要な知見を得たものとして価値ある集積であるといえる。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。