

のところ予想している訳ですね。

小玉 それも近々やってみるつもりなのですが。

司会 何かありませんでしょうか。……一言言いますと、動物の疾患モデルを作る時、色々な操作をしますので、ヒトの場合と違う面はあると言えます。齋藤先生の場合には CD4<sup>+</sup> 細胞で GVH 反応を起こす系を用いていますし、小玉先生の場合は抗原とフロイド完全アジュバントとを一緒に免疫するという人為的な操作を加えています。その結果最終的にはヒトの病気と非常に似

ている病像が出来る事がはっきり出てきた。ヒトの場合には triggering factor が全く解らないと言っていると思うのですが、動物モデルはそういうところをはっきりさせている訳です。動物モデルでの操作の過程がヒトの場合にも何かの役割をしているだろうと逆に推論できるのではないかと考えられる訳です。……何かありませんでしょうか。もしありませんでしたら、どうも有難うございました。では4番目のエリテマトーデスの治療モデルということで伊藤先生お願いします。

#### 4) エリテマトーデスの治療モデル

新潟大学医学部医動物学教室 伊藤 聡・藤原 道夫  
同 第二内科学教室 荒川 正昭

#### The Therapeutic Model of Systemic Lupus Erythematosus

Satoshi ITO\*, Michio FUJIWARA\* and Masaaki ARAKAWA\*\*

*Department of Immunology\* and Medicine (II)\*\*  
Niigata University School of Medicine*

The therapeutic effect of 15-deoxyspergualin (DSP), a newly developed immunosuppressive agent, on the development of spontaneously occurring lupus glomerulonephritis in MRL/lpr and male BXSB mice was examined. Administration of the drug was begun from the age of 13 weeks, when polyclonal B cell activation and lupus nephropathy were apparent. Treatment with DSP up to 20 weeks of age at a dose of 2mg/kg twice a day, 5mg/kg daily or 20mg/kg three times a week strongly suppressed the increment of IgG-producing cell numbers in the spleen, and decreased serum levels of immune complexes and anti-DNA antibodies. Glomerular histological score by light microscopy and IgG and C3 deposition estimated by immunofluorescence were remarkably improved. In MRL/lpr mice, DSP reduced the swelling of lymph node and the numbers of Thy-1<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> cell population in lymphoid organs. Responsiveness to Con A and IL-2 production of spleen cells were improved by the treatment.

Thus, DSP was shown to suppress the progression of polyclonal B cell activation and lupus nephropathy in MRL/lpr and male BXSB mice. These results suggest that DSP might be used as a therapeutic agent for human erythematosus.

Reprint requests to: Satoshi ITO,  
Department of Immunology Niigata  
University School of Medicine,  
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部医動物学教室  
伊藤 聡

Key words: Murine Lupus, MRL/lpr mice, Male BXSB mice, Polyclonal B cell activation, Immunosuppressant

ループスモデルマウス, MRL/lpr マウス, BXSB 雄マウス, 多クローン性 B 細胞活性化, 免疫抑制剤

## はじめに

ヒトの全身性エリテマトーデス (SLE), 特にループス腎炎に類似の疾患を自然発症するマウスとして, (NZB×NZW) F1 が1960年代より用いられてきた。しかし, このマウスは, 疾患の進行が遅いこと, 病変が polygene によって起こされているため, 他の系統のマウスとの交配実験の結果が複雑となることなどから, 最近では単一遺伝子によって病変の引き起こされる MRL/lpr と BXSB 雄による解析が進められている。BXSB は, Y染色体に連鎖した自己免疫疾患促進遺伝子を持ち, 雄にのみループス腎炎を発症する<sup>1)</sup>。MRL/lpr は, 常染色体劣性遺伝子の lpr によりループスを発症する系<sup>1)</sup>, 多発性関節炎もきたし, 慢性関節リウマチのモデルとしても使用されている<sup>2)</sup>。全身の著明なリンパ節腫脹をきたすが, 同系マウスに移植しても宿主で増殖しないため, malignant lymphoma とは区別されている。また, MRL/lpr では, 全身の各臓器の血管周囲に, 形質細胞を含むリンパ球浸潤を認め, 血管炎のモデルともされている<sup>3)</sup>。MRL/lpr では, lpr 遺伝子を持たず, ループスを発症しない congenic mouse, MRL/n も確立されており, 病変解析の際の対照としては使用されている。

現在 SLE の治療には, 副腎皮質ステロイド薬, その他の各種免疫抑制薬が用いられているが, いずれもその効果が不十分であること, 長期投与による副作用が強いことなどから, 新しい治療薬の開発が望まれている。我々は, 15-デオキシスパーガリン, (DSP) を用い, 自然発症のループスモデルマウスの治療実験を行った。

## 対象と方法

マウスは, MRL/lpr と BXSB 雄を用い, DSP は, polyclonal B cell activation, lupus glomerulonephritis が既に顕著となっている生後13週より腹腔内投与を開始し, 19週で治療を終了, 20週に sacrifice した。2mg/kg を連日投与する群 (1), 2mg/kg 1日2回 (2) あるいは 5mg/kg (3) を2週間連日投与し, 次の2週間は休業し, 再度2週間投与する群, さらに, パスル療法とし

て, 20mg/kg を週に1度 (4), あるいは3度 (5) 投与する群を設けた。

BXSB 群では, (1) から (3) までの群で検索した。

病変の評価は, 腹腔リンパ節重量 (MRL/lpr), protein A を結合した羊赤血球を用い, reverse plaque forming assay で測定した, 脾臓での免疫グロブリン産生細胞数 (IgPC), ELISA で測定した血中の Circulating immune complexes, 抗 DNA 抗体価, 腎の光顕並びに蛍光抗体法所見にて行った。光顕所見は, 糸球体病変, 血管周囲細胞浸潤, 間質尿細管病変について grading を行い, 評価した。蛍光抗体法は, 糸球体内の IgG と C3 の沈着を観察し, 0-4 の5段階に grading した。さらに MRL/lpr では, リンパ球表面マーカー, T細胞マイトーゲンであるコンカナバリン A (Con A) に対する脾細胞の反応性についても検索した。IL-2 産生能は, Con A 刺激上清中の IL-2 活性を, IL-2 dependent cell line, HT-2 を用いて測定した。

## 結 果

腹腔リンパ節重量, IgPC: 連日投与群では, MRL/lpr, BXSB 雄ともに, dose dependent にリンパ節腫脹を抑制し, IgPC を減少させた。MRL/lpr の 20mg 週3回投与は有効であったが, 週1回投与群は無効であった。

抗 DNA 抗体価, Circulating immune complexes: MRL/lpr においては, DSP 2mg/kg の1日2回投与群で, 治療前, 治療後の末梢血の抗 DNA 抗体価, Circulating immune complexes を測定した。未治療群では著明な増加を示したが, 治療群では有意な増加は認められなかった (図 1)。

また, MRL/lpr, BXSB 群ともに, 屠殺時の抗 DNA 抗体価, Circulating immune complexes 量は, 未治療群に比し, 治療群で低値を示した。

腎の光顕所見 (図 2): 糸球体病変は, 各治療群とも未治療群に比し軽度であり, 特に, MRL/lpr 未治療群で顕著であった cellular crescent や糸球体硬化は, 治療群では減少していた。MRL/lpr において認められる血管周囲細胞浸潤, 間質尿細管病変も, 治療群では軽減

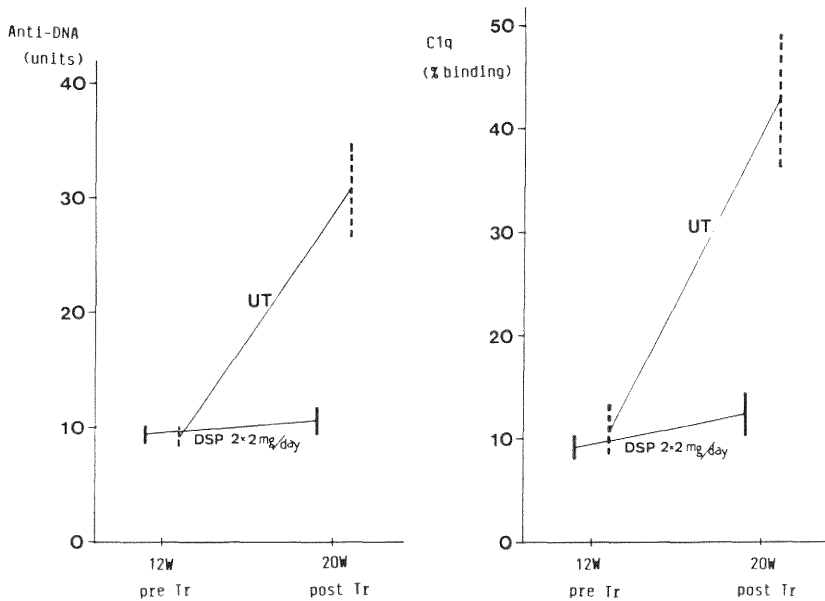


図1 MRL/lpr マウスにおける, 抗 DNA 抗体価, Circulating immune-complexes の変動. : 未治療群, DSP 治療群 (2mg/kg 一日2回投与) の比較.

していた.

腎の蛍光抗体法所見: 各治療群とも, IgG, C3 の沈着は軽減していた.

リンパ球表面マーカー (MRL/lpr): DSP 2mg/kg 1日2回投与により, Thy1<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup> の細胞群が減少し, また, Thy1, B220 double positive の細胞群は, B220 陰性の方へシフトした. 減少した, Thy1<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup> の細胞群は, surface Ig をもっておらず, B細胞ではないと考えられた.

Con A 反応性, IL-2 産生能: DSP 2mg/kg 投与では未治療のマウスと大差ないが, 5mg/kg 投与では, 両者とも, MRL/n マウスのレベルには達しないものの, かなり改善していた.

## 考 察

DSP は1981年, 栃木県大平山にて発見された土壌菌 Bacillus laterosporus の菌抽出物より単離された物質で, グラム陽性, 陰性菌の増殖抑制作用, マウス白血病系腫瘍 L-1210 や, リンフォーマ EL-4 に対して強い抗腫瘍効果をもっている<sup>4)</sup>. また, 最近の研究で, 抗腫瘍作用のみならず, (1) T細胞依存性抗原, T細胞非依存性抗原に対するB細胞の抗体産生をいずれも抑制する<sup>5)</sup>.

(2) 遅延型過敏反応を抑制する. (3) 移植時の GVH 反応を抑制し, (4) また, graft のサバイバルを延長する<sup>6)</sup>. (5) しかし, サイクロスポリンAなどと異なり, IL-2 産生には影響を与えない. (6) ループモデルマウスの発症を予防すること<sup>7)</sup> など, 種々の免疫抑制作用を持つことが明らかとなっている.

大久保らは, 6週例 Balb/c に, DSP を3ヶ月間, 0.5~5mg 連日皮下投与し, マウスにおける亜急性毒性試験を行っている<sup>8)</sup>. 2.5mg 投与群にて, 進行性体重減少, 白血球減少, 脾重量の低下, 腸管の粘膜表層細胞の変性, 脱落, 炎症細胞浸潤が認められたが, 病理組織学的には心, 肺, 肝, 腎には変化を認めなかった. このことは, 重篤な腎障害をひきおこすサイクロスポリンA に比して有利な点であると思われる. また, 白血球減少については, 好中球/リンパ球比には変化を認めなかった. DSP は, 骨髄細胞培養時の CFU-C (colony forming unit in culture) の産生を抑制しないこと<sup>9)</sup>, 骨髄細胞の CSF 反応性も非投与マウスよりも増強していること<sup>10)</sup> なども報告されており, 骨髄抑制は比較的軽度であると考えられる.

今回の我々の治療実験では, MRL/lpr, BXSb 雄の両方の strain で, すでに lupus 腎炎が顕著となる時

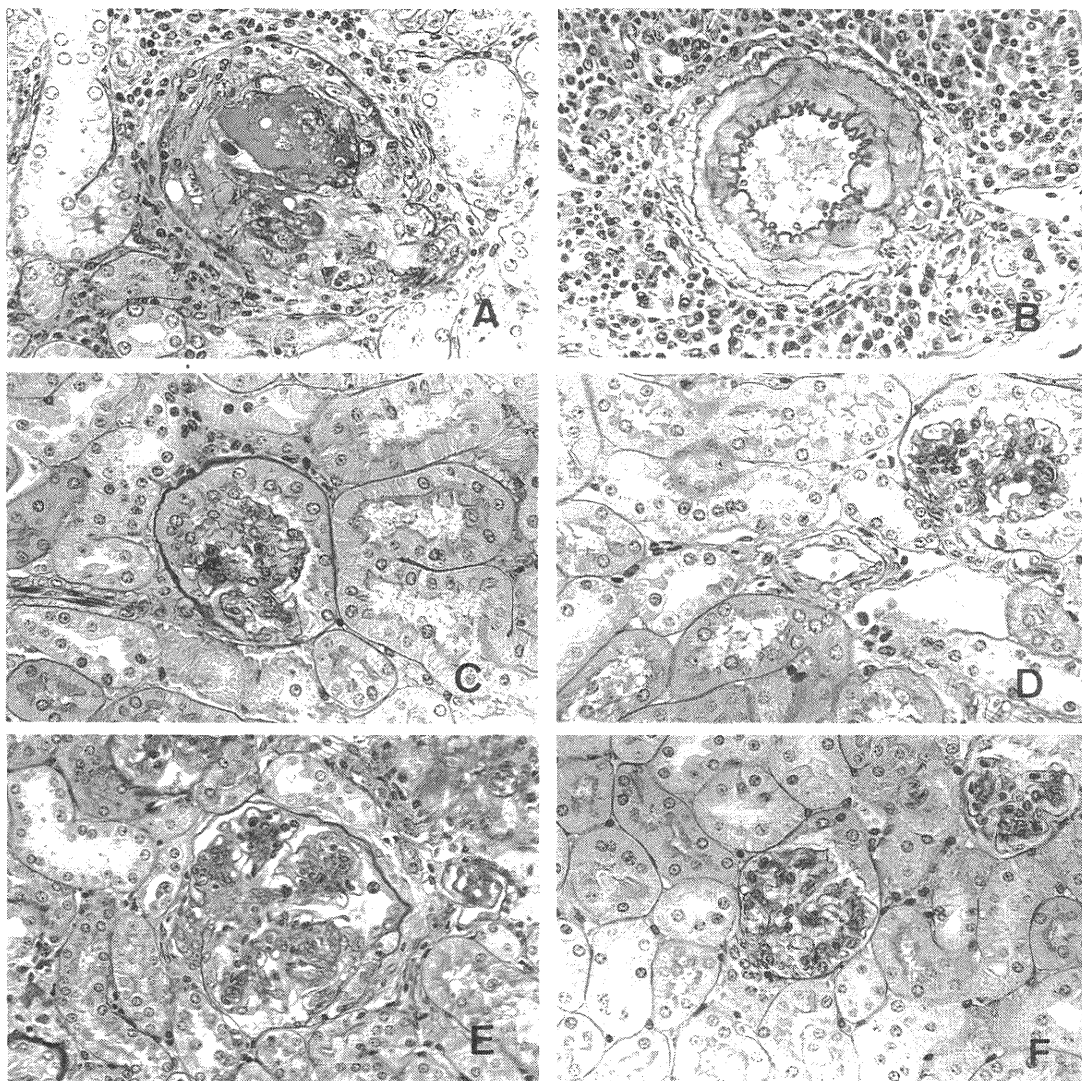


図2 腎の光顕所見

- A: MRL/lpr マウス未治療群の糸球体:糸球体硬化, 半月体形成, 糸球体周囲の単核球浸潤等を認める.  
 B: MRL/lpr マウス未治療群の小動脈:中膜の肥厚, 血管周囲の単核球浸潤を認める.  
 C: MRL/lpr マウス DSP 5mg/kg 一日一回投与群の糸球体:  
 D: MRL/lpr マウス DSP 5mg/kg 一日一回投与群の小動脈: C, Dともに病変は軽度である.  
 E: BXSb ♂ マウス未治療群の糸球体: 増殖性病変を認める.  
 F: BXSb ♂ マウス DSP 5mg/kg 一日一回投与群の糸球体:病変は軽度である.

期から DSP を投与したが, 有効であることが示された.

これまでに, MRL/lpr のリンパ節腫脹の主体をなす細胞は, Thy-1<sup>+</sup>, L3T4<sup>-</sup>, Lyt2<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup> の, 異常な

T細胞であること, つまり, helper/inducer と suppressor/killer ともつかず, T細胞でありながらB細胞マーカーの B220 をもった細胞が増殖していることが知られている<sup>11)</sup>. この異常なT細胞は, IL-2 産生

能が低下しており、B細胞増殖因子を分泌している。今回の実験系で、DSP は、MRL/lpr において、Thy-1, B220 double positive の異常なTリンパ球を減少させ、リンパ球機能を改善させることにより、ループスを改善させている可能性が示唆された。また、B細胞の異常によりループスを発症する BXSB 雄においても有効であった。

以上のように、DSP は、ループスマデルマウスにおいて、すでに病変の発現している時期から投与しても、有効であることが示され、ヒト SLE での応用が期待される。他の薬剤との比較実験、副作用の詳しい検索等、今後もさらに研究が必要と思われる。

### 参 考 文 献

- 1) **Murphy, E.D. and Roths, J.B.:** Autoimmunity and lymphoproliferation induction by mutant gene lpr, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB. In Genetic control of autoimmune disease. (edited by Rose, N.R, Bigazzi, P.E. and Warner, N.L.), Elsevier North-Holl and Inc., Amsterdam, p.207 ~221, 1978.
- 2) **Hang, L., Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J.:** A spontaneous rheumatoid arthritis like disease in MRL/1 mice. J. Exp. Med., **155:** 1690~1701, 1982.
- 3) **Alexander, E.L., Moyer, C., Travlos, G.S., Roths, J.B. and Murphy E.D.:** Two histopathologic types of inflammatory vascular disease in MRL/Mp autoimmune mice. Model for human vasculitis in connective tissue disease. Arthritis Rheum, **28:** 1146~1155, 1985.
- 4) **Takeuchi, T., Iinuma, H., Kunimoto, S., Masuda, T., Ishizuka, M., Hamada, M., Naganawa, H., Kondor, S. and Umezawa, H.:** A newly antitumor antibodies, spergualin: isolation and antitumor activity. J. Antibiotics, **34:** 1622~1624, 1981.
- 5) **Masahiko Makino., Michio Fujiwara., Hisami Watanabe., Takaaki Aoyagi. and Hamao Umezawa:** Imunosuppressive activities of deoxyspergualin. II. The effect on the antibody responses. Immunopharmacology, **14:** 115~122, 1987.
- 6) **Masuda, T., Mizutani, S., Iijima, M., Odai, H., Suda, H. and Ishizuka, M.:** Immunosuppressive activity of 15-deoxyspergualin and its effect on skin allografts in rats. J. Antibiotics, **40:** 1612~1618, 1987.
- 7) **Masahiko Makino., Michio Fujiwara., Takaaki Aoyagi and Hamao Umezawa.:** Imunosuppressive activities of deoxyspergualin. I. Effect of the long-term administration of the drug on the development of murine lupus. Immunopharmacology, **14:** 107~114, 1987.
- 8) 大久保充人, 鎌田貢寿, 佐藤直之, 真崎義彦, 梅谷直樹, 井上慶一, 張 恵銘: 微生物二次代謝産物の免疫抑制作用, 特に腎症発症および進展の抑制について. 自己免疫疾患治療薬の開発研究—微生物二次代謝産物を中心として—厚生省新薬開発研究費 青柳班昭和62年度報告書, 115~123, 1988.
- 9) **Hamao Umezawa., Masaaki Ishizuka. and Tomio Takeuchi.:** Suppression of tissue graft rejection by spergualin. J. Antibiotics, **38:** 283~284. 1985.
- 10) 徳永 徹, 西村恵子: 15-Deoxyspergualin の免疫抑制活性発現の機序に関する研究. 自己免疫疾患治療薬の開発研究—微生物二次代謝産物を中心として—厚生省新薬開発研究費 青柳班昭和62年度報告書, 75~82, 1988.
- 11) **Morse III H.C., Davidson, W.F., Yetter, R.A., et al.:** Abnormalities induced by the mutant gene lpr: Expansion of a unique Lymphocyte subset. J. Immunol, **129:** 2612~2615, 1982.

司会 それではディスカッション, あるいはコメントをお願いします。

清水 糸球体間の差みたいなものはどうですか。

伊藤 差ですね, はい。やはりヒトループスと同じようにかなりバラエティーがあるとは思いましたが, やはり疾患の進んでいる病状の重いマウスは, だいたいどの糸球体もやられているという感じを持ちました。

清水 例えば光顕だと, 低倍での所見を見たいと思います。プラスのやつだけ, わーっと糸球体が3つ4つ出ているけれど, negative の方のやつは1つだけぼんやりというのが多かったような気がするんです。何かそういう印象があるのですが, 客観的評価はなかなか難しいと思うのです。

伊藤 糸球体の光顕所見の病変は, 糸球体を20個, 1つずつ計算してその平均値をとって出しているのですが,

ちょっと提示の仕方です。そういう印象を出しましたのでしょうか。

清水 ブラインドか何か、やっておやりなのですか。

伊藤 それが、見ているのが私なので、ダブルブラインドでやっていないんです。なるべく投与系路などを知らない様に見る様にしているんですが、本当はやはりそこはダブルブラインドでやらないとだめだと思います。

清水 それからもう1つだけ。私もそういう薬の検索に携ったことがありますけれど、この薬剤は大変よく効いているという印象があるんです。結構づくめの話みたいな結果ですが、何か言われている様な副作用というのは、今解っているところであるのでしょうか。

伊藤 副作用については、ぼくらの実験ではまずやはり体重減少があります。それから他の免疫抑制剤と同じように、……我々の系ではだいたい体重減少くらいなんですが、他、例えば EAE とか、実験性の筋無力症とか、色々な所でやられているのですが、やはり脱毛とか消化管の細胞の脱落とか、いわゆる一般的な免疫抑制剤と同じような報告はあります。しかし大分軽度である……特に骨髄抑制があるにはあるのですが、軽度であるという報告がある様です。骨髄抑制は起こるのですが、リンパと granulo の比は変わらないとか、CFU-C は落ちないとか、あるいは granulocyte stimulating factor ですか、それに対する反応性はむしろ細胞が少なくなった時には上昇するとか、という様な報告がありますが、cyclophosphamide などに比べれば骨髄抑制は非常に少いのではないかと考えられます。あとは腎、肝の副作用はほとんど皆無である事から一応今後とも期待できるのではないかと考えております。

司会 他にありませんでしょうか。

永井 このマウスには肺病変もあると思うのですがこれはやはり治りますか。

伊藤 肺病変については実は見ていないのですが、やはり同様に治るのではないかと予想しています。

永井 間質性肺炎があると思うのですが是非見ていただきたいと思います。それからもう1つ speculation でけっこうあれですが、リンパ節に集まっている double negative の細胞、文献的には何か *myc family* だとか *myb* だとかいった oncogene の異常発現があるということがあるのですが、そういうものまで元に戻すようなことは考えられますでしょうか。

伊藤 それはちょっと解らないですね。

司会 そうですね、cyclophosphamide だとそういうものを元に戻すというか、少なくさせるというデータは出されています。伊藤先生が話された様に、異常な T細胞が非常に減っていますので恐らく発現も抑制されたのではないかと思います。speculation の段階ですが…他にありませんでしょうか。これまでに3題、2、3、4と基礎と臨床との接点ということで、臨床の問題を十分考慮しながら基礎的な所でやるということでも話して頂きました。4番目に特に治療を入れたのは、モデル動物を使った時には、そのメカニズムの解析というのは非常に重要な問題ではあるのですが、やはりヒトの病気を治すモデルも重要と考えて加えた訳です。治療もこういうモデル動物を使って非常に有効な検定が出来るのではないかとということで、1つの良い例ではなかったかと思えます。どうも有難うございました。それでは時間もありますので次の5番の、ラットにおける自己免疫性腎障害、清水先生お願いします。