

## 6) アレルギー性脳脊髄炎

新潟大学医学部医動物学教室 松本 陽

## Experimental Allergic Encephalomyelitis

Yoh MATSUMOTO

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is a T-cell mediated autoimmune disease inducible by immunization with brain specific antigens such as myelin basic protein (MBP) in complete Freund's adjuvant (CFA). Using EAE as an experimental model for human autoimmune disorders, we show here several experimental approaches and the results obtained by these approaches. They include 1) immunohistochemical examination of the lesions of EAE, 2) double immunofluorescent staining of the tissue in order to identify the nature of cells of interest, 3) passive EAE which facilitates the examination of developing lesions of EAE, and 4) radiation bone marrow chimeras which were prepared for the detection of bone marrow-derived cells in the central nervous system. We also introduced limiting dilution analysis of MBP-reactive T cells and thymus-grafted chimeras.

Key words: Experimental allergic encephalomyelitis, EAE, Immunohistochemistry, Limiting dilution analysis, Bone marrow chimera  
アレルギー性脳脊髄炎, EAE, 免疫組織化学, 限界稀釈法, 骨髄キメラ

アレルギー性脳脊髄炎 (Experimental allergic encephalomyelitis, EAE) は中枢神経系を構成する成分, たとえばミエリン塩基性蛋白 (Myelin basic protein, MBP) を完全フロイド・アジュバント (Complete Freund's adjuvant, CFA) と共に免疫すると発症する自己免疫疾患である。後肢麻痺を主徴とし, 免疫動物のT細胞を正常動物に移入することでも症状の誘発が可能である。本シンポジウムでは, この疾患モデルを用いてどのようなアプローチを行えば, どのような結果を得ることができるかについて述べた。

1. 免疫組織化学<sup>1)2)</sup>

著者らは実験動物としてラットを用いるが, ラットのT細胞, 及びそのサブセット, 主要組織適合抗原 (Major histocompatibility complex, MHC) に対するモノクロー

ナル抗体が多数市販されている。市販抗体を用いて誰でも簡単に免疫組織学的検索が行える。EAE の系では既に多数の報告が行われているので, 検索対象となる疾患モデルがよほど面白いが, 対象中のこれまであまり注目されていなかった現象や細胞に的をしぼって検索する必要があることを強調した。

2. 二重染色<sup>1)2)5)</sup>

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いて二重染色を行う場合, それぞれの抗体を産生した動物, 即ち抗原を免疫した動物が異なることが多いので (前者はマウス, 後者はウサギをよく用いる), 二次抗体として, 別々の蛍光色素を標識した抗マウス免疫グロブリン (Ig), 抗ウサギ抗 Ig を用いればよい。又, モノクローナル抗体同志でも, IgG サブクラスが異れば, 蛍光標識抗Ig

Reprint requests to: Yoh MATSUMOTO,  
Dep. Immunol., Niigata Univ. School of  
Medicine, Niigata 951, JAPAN.

別刷請求: 〒951 新潟市旭町1番町町  
新潟大学医学部医動物学教室

松本 陽

G サブクラス抗体を用いることによって特別の標識操作なしに三重染色を行うことが可能である。この系での三重染色では1つの細胞上に2つの抗原が存在するかいなかを判定することが多いので、酵素抗体による三重染色はさけた方がよい。

### 3. 受身 EAE<sup>3)5)6)7)</sup>

抗原を免疫した動物より一定期間後脾細胞又はリンパ節細胞を取り出し、3日間抗原と培養したのち、同系の正常動物に静注する。このタイプの EAE は静注後、各動物がほぼ一斉に発症し、重症度にばらつきが少ない。この特徴を生かして我々は、発症以前の超早期の病変形成についての検索を行った<sup>3)</sup>。又、T細胞が死滅するため抗原免疫では発症しない大量放射線照射動物に EAE を作ることも可能である<sup>6)</sup>。静注する細胞は定期的に抗原存在下で培養して株化した細胞でもよい<sup>7)</sup>。移入細胞が均一なためより詳細な解析が可能となる反面、細胞の維持には経験を要する。

### 4. 骨髄キメラ<sup>4)5)7)9)</sup>

致死量の放射線を照射したラットに半異系、異系、又は MHC の極一部が異なる動物の骨髄細胞を移入して作製する。最もストレートな利用法としては注目している臓器のある細胞（ここでは中枢神経のミクログリア）が骨髄由来であるかどうかを検索することが可能となる<sup>4)</sup>。受身 EAE を発症したラットの病変において、ある炎症細胞が静注したのか、あるいはレシピエントに由来するのかを判定をするにも用いた<sup>5)</sup>。抗原免疫で EAE を発症しにくい系のラットに高感受性ラットの骨髄を補って、全体としては EAE 感受性して検索する実験も行った<sup>9)</sup>。

### 5. その他<sup>8)9)</sup>

現在、著者らは EAE の感受性を統御する免疫学的因子の解析を重点的に行っているが、そのアプローチの方法として次の2つを紹介した。その1つは限界希釈法による抗原反応性T細胞頻度の算出である。感受性の異なる数種のラットに抗原を免疫して、所属リンパ節細胞をとり出し、その内に何個に1個抗原反応性T細胞が存在するのかを算出するもので、感受性の程度を定量的に解析することが可能となる<sup>8)</sup>。いま1つは胸腺移植キメラで、これは骨髄キメラの変形ともいえる。よく知られているように、T細胞は骨髄由来だが胸腺においてある種の教育を受け、各個体で（実験動物では各近交系）独自の反応性を示す集団を形成する（T細胞レパトリーの形成）。胸腺キメラにおいては、同一条件下に胸腺のみ異なる、したがってT細胞レパトリーのみ異なるラッ

トが出来ることになる。このキメラの EAE 感受性を検索することで、T細胞レパトリーの容容が EAE 感受性に与える影響を調べることが可能となる<sup>9)</sup>。

以上紹介した EAE は臓器特異抗原を免疫して発症する臓器炎の一形で、他にぶどう膜炎、甲状腺炎、肝炎、心筋炎、腎炎、睪丸炎などほゞすべての臓器炎が実験的に作製できる。EAE の研究は歴史も古く、この中では最も検索された臓器炎と言える。他の臓器炎についてはむしろ調べられていないことの方が多く、ここに紹介した各種のアプローチ法が参考になれば、幸いである。

## 参 考 文 献

- 1) **Matsumoto, Y., Hara, N., Tanaka, R. and Fujiwara, M.:** Immunohistochemical analysis of the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis, with special reference to Ia-positive cells with dendritic morphology, *J. Immunol.*, **136**: 3668~3676, 1986.
- 2) **Matsumoto, Y. and Fujiwara, M.:** In situ detection of class I and II major histocompatibility complex antigens in the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. An immunohistochemical study, *J. Neuroimmunol.*, **12**: 265~277, 1986.
- 3) **Matsumoto, Y. and Fujiwara, M.:** The immunopathology of adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. Part 1. Immunohistochemical examination of developing lesions of EAE, *J. Neurol. Sci.*, **77**: 35~47, 1987.
- 4) **Matsumoto, Y. and Fujiwara, M.:** Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen-bearing microglia in the rat central nervous system of radiation bone marrow chimeras, *J. Neuroimmunol.*, **17**: 71~82, 1987.
- 5) **Matsumoto, Y. and Fujiwara, M.:** Adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis in chimeric rats: identification of transferred cells in the lesions of the central nervous system. *Immunology*, **65**: 23~29, 1988.
- 6) **Matsumoto, Y., Kawai, K. and Fujiwara, M.:** Hemorrhagic autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of activated semiallogeneic spleen cells into irradiated rats, *Am. J.*

Pathol., 133: 306~315, 1988.

- 7) **Matsumoto, Y., Kawai, K. and Fujiwara, M.:** In situ Ia expression on brain cells in the rat: autoimmune encephalomyelitis-resistant strain (BN) and susceptible strain (Lewis) compared, *Immunology*, 66: 621~627, 1989.
- 8) **Matsumoto, Y., Kawai, K., Tomita, Y. and Fujiwara, M.:** Limiting dilution analysis of the frequency of myelin basic protein-reactive T cells in Lewis, PVG/c or BN rats-Implication for susceptibility to autoimmune encephalomyelitis, *Immunology*, in press.
- 9) **Matsumoto, Y., Kawai, K., and Fujiwara, M.:** Thymus-related and thymus-unrelated immune responses regulating susceptibility to autoimmune encephalomyelitis in rats, the manuscript submitted for publication.

**司会** それでは質問なりあるいはコメントお願いしたいのですが、何かありませんでしょうか。……ぼくの知っている限りでは実験的アレルギー性脳脊髄炎は、自己免疫の中でも動物モデルとして最も解析が進んでいるのではないかと考えております。この疾患はT細胞に依存している。それがクローンとしてもう既にとられています。それから相手の反応する抗原特異性ということから見ますと、ミエリン塩基性タンパク質の一部のペプチドに反応するT細胞が起こすという事も解っています。ただT細胞とマクロファージの interaction の点は発症とのからみでどうでしょうか。

**松本** 基礎的な免疫の知識から、例えば抗原を免疫した後は当然マクロファージによって抗原が process されて、それで Ia 抗原と共にまず提示されてそれがT細胞に認識されるという所からまずスタートする訳です。ですからマクロファージの関与も特に EAE を起こす

T細胞が出現するまでの所に非常に重要な役割を果たしています。例えば、少し古い実験ですけど、免疫をして非常に早期に、シリカのようなマクロファージに傷害性を持つような薬物を投与しますと、EAE が非常に発症し難くなるという事が報告されています。ですから病期の initiation のところは正に普通の免疫現象と全く同じ事が起きていると理解されます。

**司会** そうすると resistant であるとか、susceptible であるということを決めているのはマクロファージのレベルで決まってくるのではないかと、ということですか。

**松本** そうですね、はい。最後の部分で申し上げたのはその事です。まだデータはこれからというところなのですが、そのマクロファージの機能の中でも、さっき申し上げた process する機能とそれから、もちろん Ia 抗原の違いによってさっき幾つかお示したペプチドが、Ia と結合できたりできなかったりする訳で、その差もある訳ですが、どちらかはまだ断定できません。しかし私の印象では MHC とは直接関係の無い、何かマクロファージの機能が EAE の感受性をかなり左右しているのではないかと、現在は考えております。

**司会** それも非常に面白い点ですよ。基礎免疫の正に Ir gene の expression というところからも色々な攻め方が出来てきた訳ですが、EAE というのはそういう点でも非常に面白い1つのモデルとなって、あらゆる免疫の知識を動員して今、全貌が解ってきつつあるのではないかと印象を非常に強く持っています。何か質問ありませんでしょうか。もしありませんでしたら時間も超過しましたので、どうも有難うございました。これでシンポジウムを、ちょっと時間がオーバーしましたが、終わらせて頂きます。それで特にまとめるということもありませんで、個々の問題を提示しておいてその場で色々な問題点を言ったりしてきましたので、あまり余計な事を言わずにこれで終了させて頂きたいと思います。では、長時間有難うございました。