

実験的甲状腺炎における自己反応細胞

I. Plaque Forming Cell の検索

京都大学結核胸部疾患研究所 細菌血清部門

桂 義元, 上坂 一郎

京都大学医学部 第二内科

桜美 武彦

異物に対する反応性と、自己物質に対する非反応性が動的に維持されている免疫機構の調節機能を実験的にしらべる道すじは少くとも二通りある。一つは、異物をあたかも自己物質のように認識させる過程をしらべる実験、すなわち immunological tolerance の研究であり、他の一つは、自己物質をあたかも異物のように認識させる過程をしらべる自己免疫の実験である。ここで述べるのは後者、すなわち実験的甲状腺炎を使って進めている仕事についてである。

Witebsky ら¹⁾が、ウサギの自己 thyroid extract を用いて実験的甲状腺炎を起こさせることに成功して以来、甲状腺炎は自己免疫病のモデルとして、その発症の mechanism の解明のために多くの努力がはらわれた。特に、thyroglobulin に対する抗体と Cell-mediated immunity の役割に関しては多くの研究の蓄積がある。Rose ら²⁾は甲状腺の炎症と skin test における delayed hypersensitivity (DH) の強さの相関を示した。ところが Rose ら³⁾はその後、6-メルカプトプリンによって DH 反応を抑制しても甲状腺炎が起こることを報告した。一方、抗体の役割に関しては、甲状腺の炎症の強さと抗体価の相関性が弱いことから、発症における役割に対して否定的な考えが強い⁴⁾が、Nakamura ら⁵⁾の注意深い実験によって、「初期抗体」が重要な働きをしている事が示された。このように、甲状腺炎の発症には、Cell-mediated immunity も血清抗体も、共に何ら

かの役割をになっていると考えられるが、そのいずれの役割も単純ではなく、多くの要因が合わさって発症に至るものと考えられる。

我々の興味は、自己免疫の最初の段階にしばられてきた。すなわち、単純化しすぎることをおそれずに述べれば、自己物質に対する反応性を持った細胞のクローンが出現し（新らしくできたのか、inactivate されて存在していたものがアジュバント等によって活性化されたものかは明らかでないにしても）、それが tolerance にされる前に実験的に与えられた免疫原に反応して、免疫反応性を持って増殖することによって自己免疫が始まると考えられるが、その細胞は T-cell (thymus-dependent cell) であろうか、B-cell (non-thymus-dependent cell) であろうか、あるいは両方出現する必要があるのであろうか。そのようなことを知る目的のためには、従来のように抗体は血清抗体を、cell-mediated immunity は主に DH 反応を測定するいわば間接的な方法では不十分で、両者共、直接細胞レベルで測定されることが望ましい。その第一段階として、我々は thyroglobulin に対する抗体産生細胞を検索したので報告する。

材料と方法

guinea pig: 体重 400~500g の Hartray 系 guinea pig を使用した。

thyroid extract: guinea pig より得た甲状腺に適量の saline を加えて、グラスホモジナイ

ザーで磨砕し、氷室に1昼夜放置した後、3,000 RPM, 15分間遠心し、その上清を甲状腺粗抽出液として免疫注射に使用した。抗体の測定等の検出には、上の抽出液をさらに、40,000 RPM, 1時間超遠心した上清 (TG) を使用した。

Immunization: thyroid extract をカリミョウバンの沈澱に吸着させて (AP-TG), Freund's Complete Adjuvant と共に (FCA-TG), あるいは Freund's Incomplete Adjuvant と共に (FIA-TG) 注射した。これらの免疫原の調整の仕方は、BSA を抗原とした以前の方法と同様である⁶⁾。Primary immunization は、すべての場合に、footpads に行ったが、challenge は他の route で行った場合もある。抗原量は1回に5mg/guinea pig になるように注射した。

Antibody titration: ヒツジ赤血球をホルマリンで固定し⁷⁾, タンニン酸処理して、TG を coat した⁸⁾ ものをを用いて passive haemagglutination test を行った。micro titration plate を用いる方法は、前述の通りである⁶⁾。

skin test: 10 μ g の TG を側腹部の皮内に注射し、3時間目及び24時間目に観察した。

plaque formation: 基本的には、ヒト thyroglobulin を用いた場合⁹⁾ と同じである。guinea pig TG の場合、ヒツジ赤血球を coat する抗原

のタンパク濃度が0.5mg/ml が最も良い事が確かめられたので、その濃度で coat して行った。

Histology: 甲状腺組織は、10%ホルマリンで固定しパラフィン包埋切片とし、ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色を行って観察した。

結 果

1. 免疫原投与方法による反応のちがひ。

AP-TG, FIA-TG, FCA-TG, あるいは比較のために FCA のみを footpads に注射して1ヶ月後に観察した結果を比較してみると、甲状腺組織へのリンパ系細胞の浸潤は、FCA-TG グループの全例において強く、他のグループでは FIA-TG グループの1例で、ある程度の細胞浸潤が見られた以外はほとんど正常に近かった。血清抗体価も皮内反応も、FCA-TG グループ以外のグループでは、negative か、あるいはほとんど negative に近い値であり、以後の実験では FCA-TG で免疫して実験するのが適当であると考えられた。

2. FCA-TG 注射後の反応。

FCA-TG を footpads に注射し、日を追って皮内反応、血清抗体価、及び組織反応の程度をしらべた。3時間目の皮内反応は全例で negative であったので、24時間目の皮内反応と血清抗体

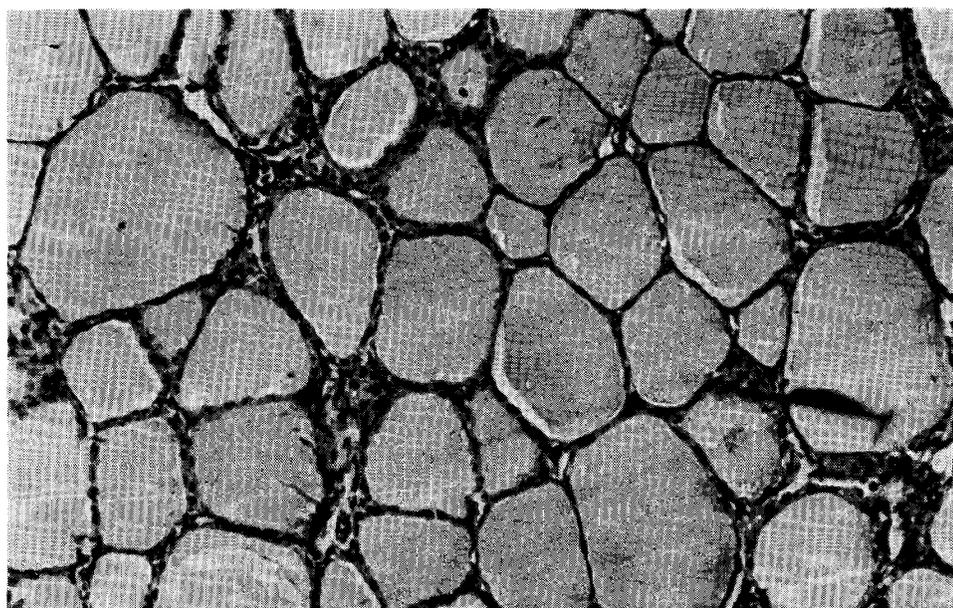


図1 Section of thyroid gland taken 2 weeks after sensitizing injection. Almost intact tissue. H-E stain. $\times 150$.

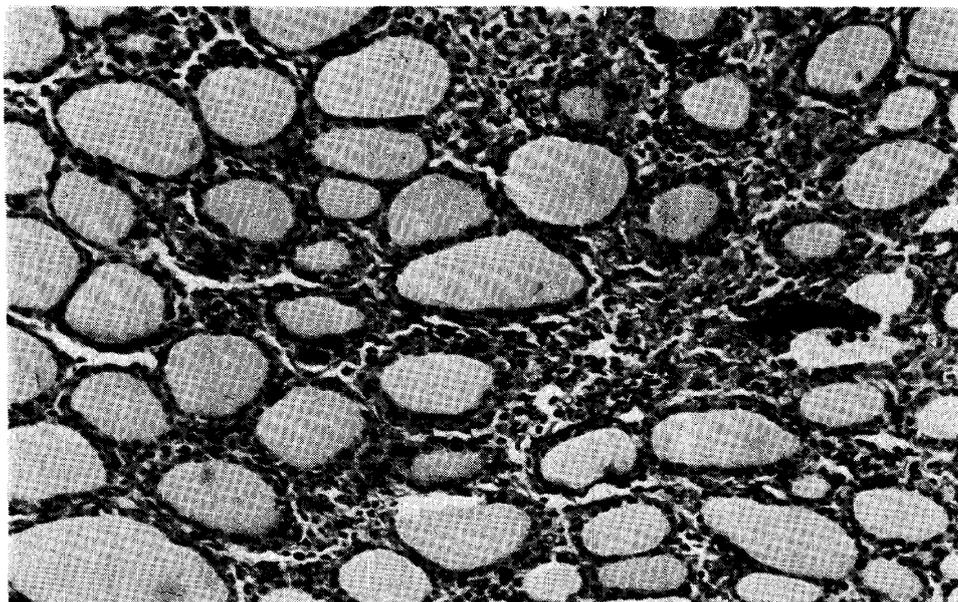


図2 Section of thyroid gland taken 3 weeks after sensitizing injection. Lesion characterized by increase in connective tissues and diffuse infiltration of mononuclear cells. H-E stain $\times 150$

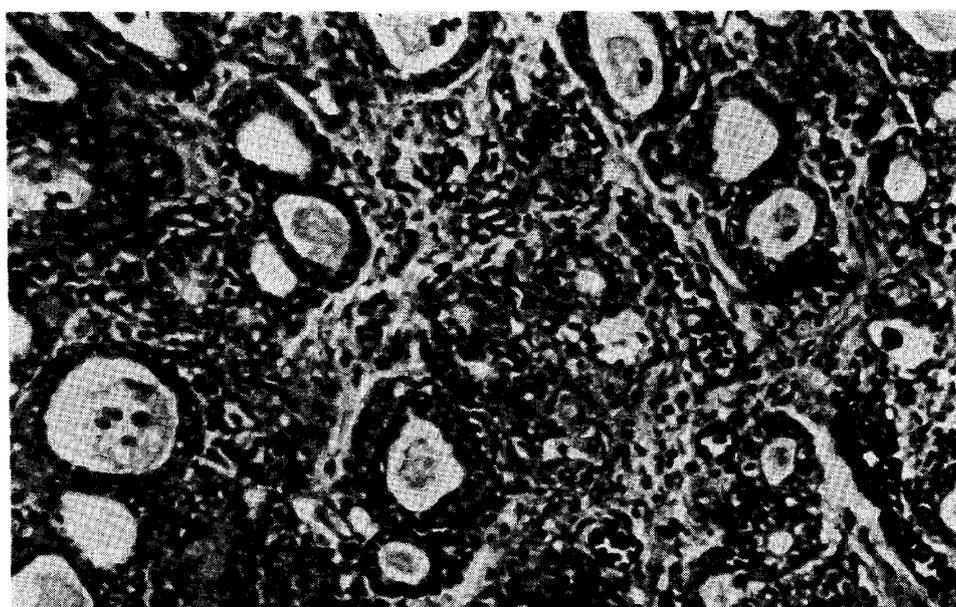


図3 Section of thyroid gland taken 4 weeks after sensitizing injection. Lesion characterized by intensive infiltration of mononuclear cells. H-E stain. $\times 150$

価を表1に示している。組織像は、代表的なものを図1～3、にあげている。

注射後第2週においては(図1)、甲状腺組織の上皮細胞間質の一部にリンパ系の細胞浸潤を認めたが、大部分は対照群と同様に健常な状態であった。第3週では(図2)、甲状腺濾胞の一部変性崩壊及び上皮細胞の肥厚、変性像が認め

られ、間質の増加があり、リンパ系の細胞浸潤が著明である。第4週においては(図3)、上記の像は更に著明となり、場所によっては濾胞はとんど認められず、浸潤したリンパ系細胞でおおわれ、リンパ濾胞の形成も認められるようになり、最も活動的な像を呈するに至った。8週以後では、次第に細胞浸潤もへり、濾胞及び上

表1 Haemagglutination antibody and skin reaction to native thyroglobulin following sensitizing injection (Days)

G.P. No.	14 (Days)		21		28		56	
	Titre (log 2)	S.R. (mm)	Titre	S.R.	Titre	S.R.	Titre	S.R.
1	3 (—)	21×11	8 (8)	20×13	11 (10)	9× 9	3 (3)	13× 7
2	— (—)	17×10	— (3)	28×17	6 (4)	13×10	8 (4)	25×12
3	4 (3)	8× 6	3 (3)	10× 8	— (3)	20×15	2 (3)	12× 8
4	2 (3)	6× 6						
5	4 (4)	9× 7						
6	3 (3)	15×13						

S.R.: Skin reaction at 24 hr.

Titre: Passive haemagglutination titres, numbers in parentheses indicate the 2-ME resistant titres.

—: negative value.

皮細胞も修復し、不完全ながら正常組織に近い部分も認められるようになった。

表1に示すように、皮内反応は第2週で十分強いので、この時期にすでに現れてくる強い反応性を持った細胞が組織を次第に侵してゆくように見える。一方抗体は、ほとんど2-メルカプトエタノール (2-ME) resistant であったが、titre は2週目までは低く、3週目以後には高い個体も見られ、組織の変性破壊の程度とは何ら明らかな相関性は見られなかった。

一部の実験で、FCA-TG 注射後2ヶ月目に AP-TG あるいは FCA-TG で腹腔内あるいは footpads に challenge を行った。この場合 FCA-TG を footpads に注射したグループに

おいてのみ明らかな組織変化の増強が認められ、他のグループでは challenge の効果は明らかではなかった。

3. Plaque forming cell (PFC) の検索

血清抗体価と甲状腺炎との関連性は低いように見えるが、抗体産生細胞自体が何らかの働きをしている可能性が考えられるという事が、この実験を行った理由である。FCA-TG を footpads に注射し、21日目に FCA-TG を皮下及び腹腔内に注射して、その8日後に皮内テストを行ない次の日に採血すると共に PFC の検索を行った。結果は表2にまとめているように、皮内テストは陽性で抗体価もある程度高い個体もあるが、PFC は spleen, lymph node あるいは

表2 Immunological data obtained in guinea-pigs with thyroiditis induced by adjuvant method.

Guinea Pig No.	Passive haemagglutination titres (log ₂)			No. of plaque forming cells			Skin reaction at 24 hr. (mm)
	Untreated	2 ME	Treated	Spleen	Lymph nodes	Thyroid	
1	4	—	—	<150	<50	<5	8× 8
2	9	—	8	<150	<50	<5	13× 9
3	4	—	—	150	<50	<5	10×10
4	2	—	—	<150	<50	<5	12×12

は thyroid gland 中のいずれにもほとんど全く見られなかった。この実験の他に、2度目の注射は14日目に FCA-TG を footpads に行い、その6日後に PFC を検索した場合も結果は同様であった。

考 察

guinea pig で甲状腺炎を起させるためには FCA と共に TG を与える必要がある事は過去の多くの研究で示された通り¹⁰⁾である。Rose ら²⁾によって示されたように、我々の実験でも血清中の抗体価と炎症の程度が平行しないという、成績が得られたが、この事をもってただちに抗体は無関係であると言うことはできない。すなわち、抗体には生物活性のことになったいくつかの種類のものがあり、それらのうちのあるものが、少量で有効な働きをしている事が考えられるからである。Nakamura らの実験⁵⁾はその可能性を示唆している。

今度の実験で血清抗体価が²⁹の guinea pig でも PFC を検出することができなかった事に関しては、実験条件等を考察しておく必要がある。①、guinea pig TG を注射したマウスの spleen では、上述の方法で plaque が検出された。②、guinea pig にウシ血清アルブミン (BSA) を注射した場合、spleen 中に抗-BSA 抗体産生 plaque を検出することができた。③、マウスにおける抗-BSA PFC の経験から、titre^{27~28}では、spleen 中にほとんど PFC を認めないことがある。④、甲状腺炎以外では自己抗体産生 plaque が検出されたという報告がある^{11,12)}。以上のことを考慮してみれば、方法を今少し改良し、免疫注射後 plaque 検索の時期を検討すれば PFC が検出される可能性は残っている。

plaque 法で検出される抗体産生細胞が B-cell であることは今や常識であるが、guinea pig の自己免疫的甲状腺炎において、この細胞のはたす役割は大きくはないと考えられる結果をえ

た。T-cell の機能を単一細胞レベルで検出することは、現在はできないが、できるだけ細胞レベルで測定できる方法で、T-cell の役割をしらべるために、現在いくつかの方法を検討中である。

結 論

Hartray 系の guinea pig に同系の guinea pig からとった甲状腺抽出液を Freund's Complete Adjuvant と共に footpads に注射することにより、実験的甲状腺炎を起させた。

甲状腺内の組織変化がおこるより前（注射後2週目）より、強い delayed skin reaction が見られるが、血清抗体は組織変化が強い頃（注射後4週目）になってようやく高くなる傾向が見られた。

組織変化の強い時期に spleen, lymph node, thyroid gland 内の plaque forming cell を検索したが、これらのいずれにも plaque は検出されなかった。

文 献

- 1) Witebsky, E. et al., J. Immunol. 76; 408, 1956.
- 2) Rose, N. R. et al., In P. Graber and P. A. Miescher (Eds), Mechanisms of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions. Basel: Schwabe, 1962, p. 161.
- 3) Rose, N. R. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 124; 201, 1965.
- 4) Miescher, P. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107; 12, 1961.
- 5) Nakamura, R. M. et al., J. Exp. Med. 130; 263, 1969.
- 6) Katsura, Y. Japan. J. Microbiol. 16.; 223, 1972.
- 7) Daniel, T. M. et al., J. Immunol. 90; 741, 1963.
- 8) Staritsky, A. B. J. Immunol. 72; 360, 1954.
- 9) 桜美ら, 医学のあゆみ, 第83巻3号, p 148(昭47年)
- 10) Rose, N. R. et al., In M. Samter (Eds) Immunological Disease (Second Edition) Boston: Little, Brown and Company, 1971. p. 1179.
- 11) Wilson, J. D. et al. Nature New Biol. 233; 80, 1971.
- 12) Lennon, U. et al. Int. Arch. Allergy 42: 627, 1972.