

インスリン依存型糖尿病モデル動物（NOD マウス）に
観察された胸腺リンパ濾胞の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

（指導：猿田享男教授）

わた なべ けん じ
渡 辺 賢 治

インスリン依存型糖尿病モデル動物 (NOD マウス) に 観察された胸腺リンパ濾胞の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導: 猿田享男教授)

わた なべ けん じ
渡 辺 賢 治

(平成3年6月14日受付)

Key Word: insulin dependent diabetes mellitus, thymus, lymphoid follicle, B lymphocyte, non-obese diabetic (NOD) mouse

インスリン依存型糖尿病 (IDDM) は、膵島へのリンパ球浸潤 (膵島炎) がみられること、膵島細胞およびインスリンに対する自己抗体が検出されること、膵島細胞に対する免疫学的細胞障害機構が見られること、主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス II に連鎖した遺伝的素因を持つこと、などから自己免疫疾患として研究が進められている¹⁾。non-obese diabetic (NOD) マウスはこれらの特徴を備えた自然発症の IDDM のモデル動物であり、日本人により確立され、現在では IDDM の研究に世界中で用いられている²⁾。このモデルマウスにはいくつかの遺伝学的特徴が明らかにされている。第1は MHC のクラス II 分子のうち I-E は E α 遺伝子発現が mRNA レベルで欠失しているため、細胞表面に発現されていない³⁾。第2はもう1つの MHC クラス II 分子である I-A の異常である。単離された NOD マウス I-A 遺伝子の塩基配列から、I-A 分子を形成する α , β 鎖のうち、 α 鎖は d ハプロタイプであるが、 β 鎖は一部が d ハプロタイプと異なるアミノ酸の存在することが明らかになっている。すなわち、第56、

57番目のアミノ酸配列が他のマウスではプロリン、アスパラギン酸となっているのに対し、NOD マウスではヒスチジン、セリンとなっていることが明らかにされている⁴⁾。免疫反応を支配する遺伝子群の産物である I-E および I-A 分子発現の異常が、IDDM の発症に密接に関連することは、NOD マウスに正常マウスの I-E α^d 遺伝子を組み込んで、I-E を発現させた NOD トランスジェニックマウス⁵⁾には、膵島炎も糖尿病も発症しないことから強く示唆される。また、I-A α^k 遺伝子導入の NOD トランスジェニックマウスと I-A β^k 遺伝子導入の NOD トランスジェニックマウスを交配して確立した I-A α^k NOD トランスジェニックマウス (第56, 57番目のアミノ酸配列はプロリン、アスパラギン酸) では、膵島炎は出現するが糖尿病は発症しない⁵⁾。

著者は、NOD マウスの胸腺に糖尿病発症の時期と相前後して、通常では存在しえないが、自己免疫疾患にしばしば見出されるリンパ濾胞が出現することを見出した。そこで本研究では IDDM 発症機序解明を目的として、胸腺リンパ濾胞の性状およびその発現と糖尿病発症、膵島炎の関連性を NOD マウスと上述の I-E 発現 NOD トランスジェニックマウス、および I-A α^k NOD トランスジェニックマウスで比較検討した。

Thymic lymphoid follicles in the model mouse of insulin dependent diabetes mellitus (NOD mouse)
Kenji Watanabe, M.D.
Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

対象および方法

1. 動物

NOD マウス, NOD 発生の背景となった ICR マウスおよび BALB/c マウス, C57BL/6 マウスは日本クレア (東京) より購入し, specific pathogen free (SPF) 状態で飼育した. I-E 発現 NOD トランスジェニックマウス⁵⁾および I-A^k NOD トランスジェニックマウス⁵⁾は熊本大学医学部の山村研一博士, 宮崎純一博士より御供与いただいた.

2. NOD マウス胸腺, 膵臓の組織学的検討

5 週齢から22週齢の雌性および雄性 NOD マウスおよび18週齢の I-E 発現 NOD トランスジェニックマウスと I-A^k NOD トランスジェニックマウスから膵臓, 胸腺を摘出し, 10%ホルマリンで固定したのち, パラフィン包埋した. 膵臓はヘマトキシリン・エオジン (HE) で, 胸腺は HE およびピロニンにて染色し, 顕微鏡下で組織学的変化を観察した. 胸腺の一部は免疫組織化学に用いるため, ドライアイス・アセトンにて急速に凍結したのち, -80℃に保存した.

3. 糖尿病発症の判定

3 時間以上の空腹マウスの尿糖をテストテープ (Eli Lilly 社, 米国) にて調べ, 尿糖陽性の場合, 眼窩下静脈叢より採血し, 酵素法にてレフロラックス II (Boehringer Mannheim 社, ドイツ) で血糖を測定し, 250mg/dl 以上のものを糖尿病と判定した.

4. 免疫組織化学

凍結した NOD マウス胸腺はクリオスタット (Miles 社, 米国) にて4μm の厚さに薄切し, アルブミンスライドに貼布したのち30分間風乾した. 冷アセトンに10分間固定した後, 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて5分間ずつ3回洗浄した. 0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペロオキシダーゼのブロックをした後, PBS にて3回洗浄した. B 細胞系リンパ球の染色には50倍希釈(20

μg/ml) ビオチン化モノクローナル抗体 (mAb) B220 (東海大学垣生園子博士より供与) を切片上に滴下し, モイストチェンバー内で乾燥しないように1時間反応させた. PBS にて3回洗浄後, 100倍希釈の horse radish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジン (Amersham, 英国) とモイストチェンバー内で30分間反応させた. PBS にて3回洗浄した後, 3,3'-ジアミノベンチジン4 HC1 (DAB) 20mg を100ml の0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0に溶解し, 30%過酸化水素水17μl を加えた発色液 (DAB-H₂O₂) にて反応した. 免疫グロブリンの染色には, 200倍の HRP 標識ウサギ抗免疫グロブリン抗体 (Amersham 社) を同様に反応させ, DAB-H₂O₂ にて発色した. 核染は, メチルグリーンにて施行した.

5. 胸腺細胞のフローサイトメトリー

NOD マウスとコントロールの C57BL/6, BALB/c マウスの胸腺を摘出し, 遊離細胞に単離した. PBS にて洗浄後, 1 × 10⁶個の細胞に蛍光標識した抗体を加え, 4℃にて20分間反応させ, 洗浄後, フローサイトメーター (FAC Scan, Becton Dickinson 社, 米国) にて生細胞表面の蛍光強度を測定した. 抗体を加えずにフローサイトメーターで解析した蛍光強度を陰性, それ以上の蛍光強度を陽性とし, 陽性率は陽性細胞数を全細胞数で除して算出した. 生細胞染色には FITC 標識 B220 とビオチン化 IgM, ビオチン化 IgD, ビオチン化 IgG_{2a} (Pharmingen 社, 米国), ビオチン化 Ly-1 (Becton-Dickinson 社) のモノクローナル抗体を用い, streptavidin-phycoerythrin (PE) (Amersham 社) を結合させて, 測定に供した.

6. 胸腺 B リンパ球のマイトージェンおよびサイトカインに対する反応性の検討

18週齢の NOD マウスおよび同週齢の C57BL/6 マウスの胸腺を無菌的に摘出し, 細胞を単離した. 培養液としては RPMI-1640 (Gibco 社, 米国) に10%仔牛胎児血清 (Cell Culture Laboratories 社, 米国), L-グルタミン2mmol/l (和光純薬, 大阪), ビルビン酸1mmol/l (Sigma 社, 米国), ス

トレプトマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (明治製菓, 東京), ペニシリン G $200\text{U}/\text{ml}$ (明治製菓) を加えたものを用いた, RPMI-1640培養液中の単離浮遊細胞は $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整し, 24穴培養プレート (Costar 社, 米国) に各穴 2×10^7 ずつ入れ, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のリポポリサッカライド (LPS: *Salmonella* Enteritidis, L-6011, Sigma 社), $100\text{U}/\text{ml}$ のインターロイキン 4 (IL-4: 東京大学鳥山一博士より供与), $100\text{U}/\text{ml}$ の IL-5 (熊本大学高津聖志博士より供与), $100\text{U}/\text{ml}$ の IL-6 (大阪大学平野俊夫博士より供与), あるいは無添加の群に分け, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 存在下で培養した. 培養 4 日, 10 日, 15 日後に, 細胞の $1/10$ を 96 穴培養プレート (Costar 社) に移し, ^3H サイミジン (日本アイソトープ協会, 東京) と共に, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 存在下でさらに 4 時間培養し, 放射活性を測定した.

7. 胸腺 B リンパ球の抗体産生能の測定

18週齢の NOD マウスより胸腺細胞を単離し, RPMI-1640培養液中で, 胸腺細胞を $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整し, 24穴培養プレートに 2×10^7 ずつ入れ, 以下のような群に分け 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 存在下で培養した. 1 週間後に培養上清を回収し, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 法にて免疫グロブリン濃度を測定した.

- a. 無刺激群
- b. IL5刺激群 (IL5 $100\text{U}/\text{ml}$)
- c. IL6刺激群 (IL6 $100\text{U}/\text{ml}$)
- d. LPS+IL6刺激群 (LPS $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え, 2 日後に IL6 $100\text{U}/\text{ml}$ を加える.)
- e. IL5+IL6刺激群 (IL5 $100\text{u}/\text{ml}$ で培養し, 2 日後に IL6 $100\text{U}/\text{ml}$ を加える.)

ELISA 用マルチプレート (住友ベークライト, 東京) はあらかじめ 20mM の重曹で $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整した抗マウス免疫グロブリン抗体と 2 時間反応させてコートし, $0.05\% \text{Tween } 20$ 加 PBS による (T-PBS) 洗浄後, 3% 牛血清アルブミン, 0.1% アザイドを含む PBS で非特異的付着阻止の処理をした. これら抗体でコートしたプレートに 10 倍, 100 倍, $1,000$ 倍に希釈した培養上清を $100\mu\text{l}$ ずつ加え 37°C にて 1 時間反応した. T-PBS に

て 4 回洗浄したのち, 第 2 抗体として $1,000$ 倍希釈した HRP 標識羊抗マウス免疫グロブリン抗体 (Amersham 社) を $100\mu\text{l}$ 加え, T-PBS にて洗浄後, *o*-phenylen diamine (Sigma 社) を溶解したクエン酸緩衝液 (クエン酸 1.02mg , Na_2HPO_4 3.68g) に過酸化水素 $10\mu\text{l}$ を加えた反応液で 10 分程度反応させた. 2N の硫酸にて反応を停止し, 405nm における吸光度は MTP-12, コロナ 2 波長マイクロプレート光度計 (コロナ電気, 茨城) にて測定し, あらかじめ対照血清に作成した標準曲線と対比して培養上清の免疫グロブリン濃度を決定した.

8. 胸腺リンパ濾胞形成 B リンパ球のクロナリティ

NOD マウス胸腺に形成されたリンパ濾胞は特定の B リンパ球クローンが増殖したものか, 多クローンが増殖したものかを調べるために胸腺細胞より DNA を抽出し, 免疫グロブリン遺伝子の再構成を J_H に対するプローブを用いたサザンブロットにより検討した. サンプルには 5 週齢, 8 週齢, 18 週齢雌性 NOD マウス胸腺, 18 週齢雌性 I-E 発現トランスジェニックマウス, および 18 週齢雌性 I-A^k NOD トランスジェニックマウスから得た胸腺を用いた. さらに NOD マウス胸腺細胞から自動細胞分離装置 (FACStar, Becton Dickinson 社) により B220 陽性細胞を除いた細胞分画を用いた. コントロールとして 18 週齢雌性 ICR マウス肝細胞を供した.

9. DNA の抽出

マウスの胸腺の単離浮遊細胞を PBS にて洗浄した細胞分画に溶解バッファー (0.14M NaCl, 1.5mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% NP40, 10mM Vanadyl-RC) を加え, 良く混合したのち上記バッファーに 24% の Sucrose と 1% NP-40 を加えた溶液に重層し, 4°C にて $10,000$ 回転で 20 分間遠心した. 下層に沈着した DNA 分画のみ取り出し, これを溶解用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 20mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 1% ラウリル硫酸ナトリウム

(SDS), pH 8.0) にて溶解したのちに proteinase K (Boehringer Mannheim 社, ドイツ) を加え, 50°C, 12時間反応させた。その後水飽和フェノールを加え, 除蛋白処理をした。このフェノール抽出操作を3回繰り返したのち, クロロフォルムを等量加え, 転倒混和の後ただちに1,500rpm, 5分間室温で遠心, 上層のDNA層を回収した。1/10量の酢酸カリウムと2倍量の100%エタノールを加え, 沈澱したDNAを回収し, 70%エタノールを加え10,000回転, 5分間, 4°Cで遠心し, 沈澱物であるDNAをTE溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)に溶解した。

10. サザンブロット

制限酵素 EcoRI (東洋紡, 大阪) 20単位を加え, 37°C, 12時間処理したDNA 10 μ g に0.05%プロムフェノールを加え, 0.7%アガロースゲル(13.5 \times 13.5cm)の穴に移し, TBE泳動緩衝液(89mM Tris, 89mM ほう酸, 2mM EDTA)中で60V, 15時間電気泳動し, DNA断片を分画した。Hind III 処理 λ ファージDNA断片およびEcoRI, Hind III 処理 λ ファージDNA断片(東洋紡)をサイズマーカーとして同時に泳動した。

11. DNA ブロット

泳動したゲルは, 酸つづいてアルカリ変性させた後, 0.5M TrisCl, 1.5M NaCl にて中和した。トランスファーメンブレンとしてPALL Biodyne Transfer Membrane(日本ジェネティク社, 東京)を用い, 転写した。転写後PALLのメンブレンはUV Stratalinker(日本ジェネティク社)にてUV linkした。cDNA J_Hプローブ(バイオマテリアル研究所, 熊谷善博博士より供与)は, マルチプライムDNAラベリングシステム(Amersham 社)で標識した。DNAを転写したメンブレンはハイブリダイゼーションバッファー(0.2%Denhart, 0.1%SDS, 5 \times SSPE, 100 μ g/ml さけ精子DNA(Sigma 社)中で68°C, 4時間前処置し, 熱変性させた³²P標識cDNAと熱変性さけ精子DNAをハイブリダイゼーションバッファー中に加え, 68°C, 16時間反応させた。

反応後, メンブレンは2 \times SSPE, 0.1%SDS 中で室温にて5分間ずつ3回洗浄した後, 1 \times SSPE, 0.1%SDS 中で68°Cにて1時間ずつ2回洗浄した。メンブレン上のプローブと反応するDNA断片はオートラジオグラフィーで検出した。

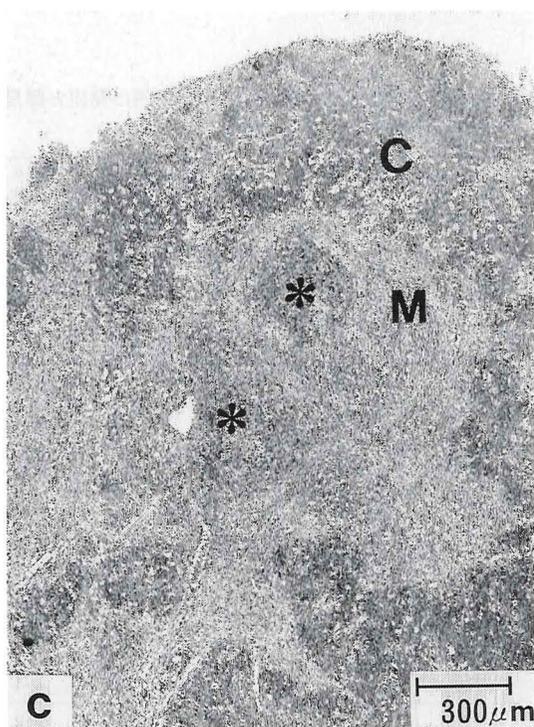
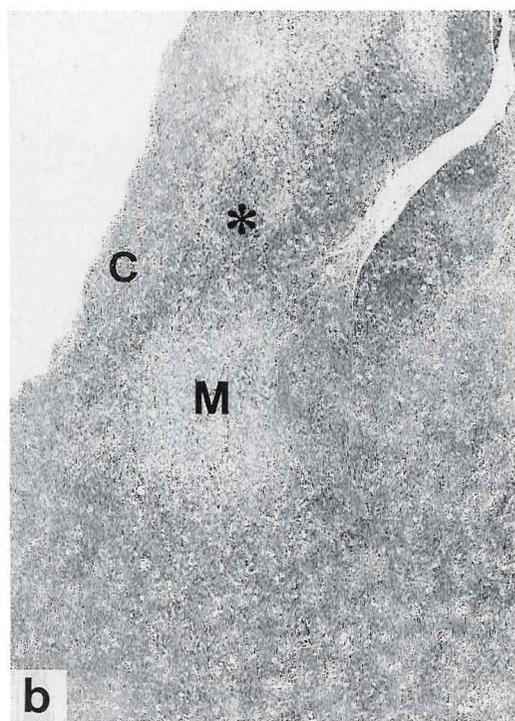
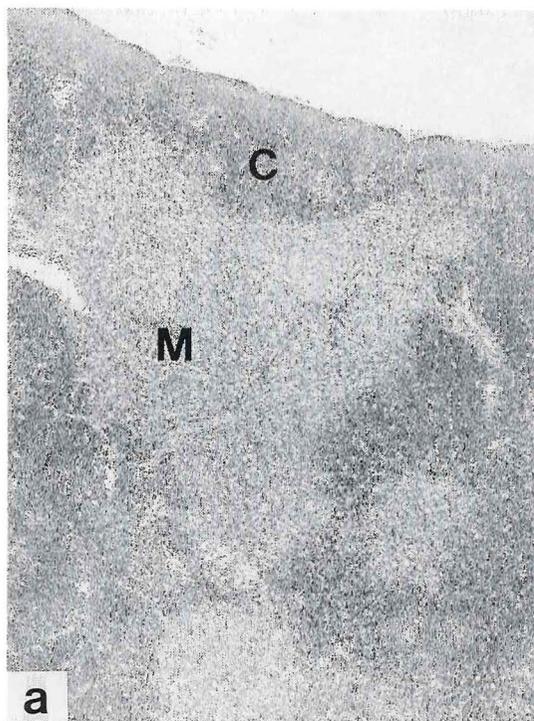
研究成績

1. NOD マウス胸腺の組織学的検討

6~22週齢のNODマウス胸腺の組織像をHE染色した切片でリンパ濾胞構造の存在について検討した(第1図)。10週齢以下のマウスの胸腺では胸腺のリンパ濾胞構造ははっきりしないが, 12週齢のマウスでは小さなリンパ球集簇が観察され始める。16週齢ではリンパ球の集簇は胸腺髄質との識別が明瞭な構造となり, 18週齢では同週齢の他系統のマウスに比し胸腺は著明に大きく, リンパ濾胞の数, 大きさ, 構造とも最も顕著なる。20週齢になると好酸球, 好中球, マクロファージなどの種々の炎症細胞が浸潤し, リンパ濾胞構造は不明瞭となり崩壊してゆく。リンパ濾胞は胸腺髄質の皮質よりのところにリンパ球の密な集簇として認められ, 比較的細胞分布が疎な髄質とは境界が明瞭である。細胞はリンパ濾胞の外側ほど規則正しく同心円状に配列しているが, 暗殻や胚中心の存在ははっきりしなかった。

リンパ濾胞の出現頻度は1葉につき, 1つの切片で平均3~5個観察された。リンパ濾胞構成細胞は静止リンパ球に比し, 核が大きくて細胞質に富み, 活性化されたリンパ芽球様の様相を呈していた。頻度は多くないが形質細胞を認め, これらの細胞はピロニン染色で赤色に染まった。しかしほとんどの濾胞形成細胞は細胞質が小さく, 好塩基性に乏しく, ピロニン染色に染まらず, 典型的に形質細胞ではなかった。

これらリンパ濾胞構成細胞のリンパ球サブセットを決定するために, プレBリンパ球から成熟汎Bリンパ球と反応するモノクローナル抗体B220と抗免疫グロブリン抗体を用いて酵素抗体法による免疫組織化学を施行した。その結果, 濾胞構成細胞は細胞表面がB220, および抗免疫グロブリン

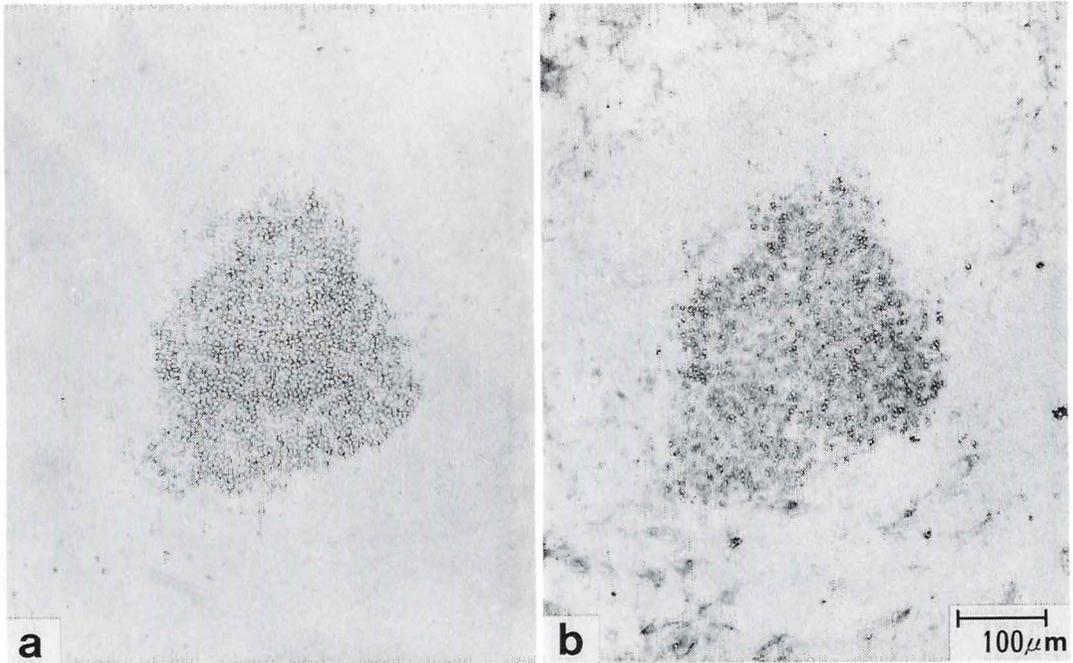


第1図 NOD マウス胸腺の HE 染色像

a: 雌性 NOD マウス 5 週齢の胸腺(48倍). 皮質, 髄質の境界は明瞭でリンパ濾胞の形成は認めない. C; 皮質, M; 髄質

b: 雌性 NOD マウス 12 週齢の胸腺(48倍), 皮質は菲薄化し, 髄質の皮質よりのところに小さなリンパ濾胞の形成を見る. *: リンパ濾胞

c: 雌性 NOD マウス 18 週齢の胸腺(48倍), 胸腺内のリンパ濾胞は髄質に密な細胞の集団として観察され周囲の髄質組織とは明瞭な境界を呈する. この時期リンパ濾胞は数, 大きさとも最大となる.



第2図 胸腺リンパ濾胞の免疫組織化学. a: B220染色(150倍), b: 抗免疫グロブリン染色(150倍), 18週齢雌性 NOD マウスの胸腺を用いた免疫組織化学では胸腺内リンパ濾胞構成細胞は B220陽性, 免疫グロブリン陽性の B リンパ球であることが確認された.

でも染色され(第2図), B細胞系リンパ球であることが確認された. なお, この濾胞構成細胞は T リンパ球の表面マーカーである Thy-1.2, Lyt-2, L3T4 に対する抗体では染色されなかった.

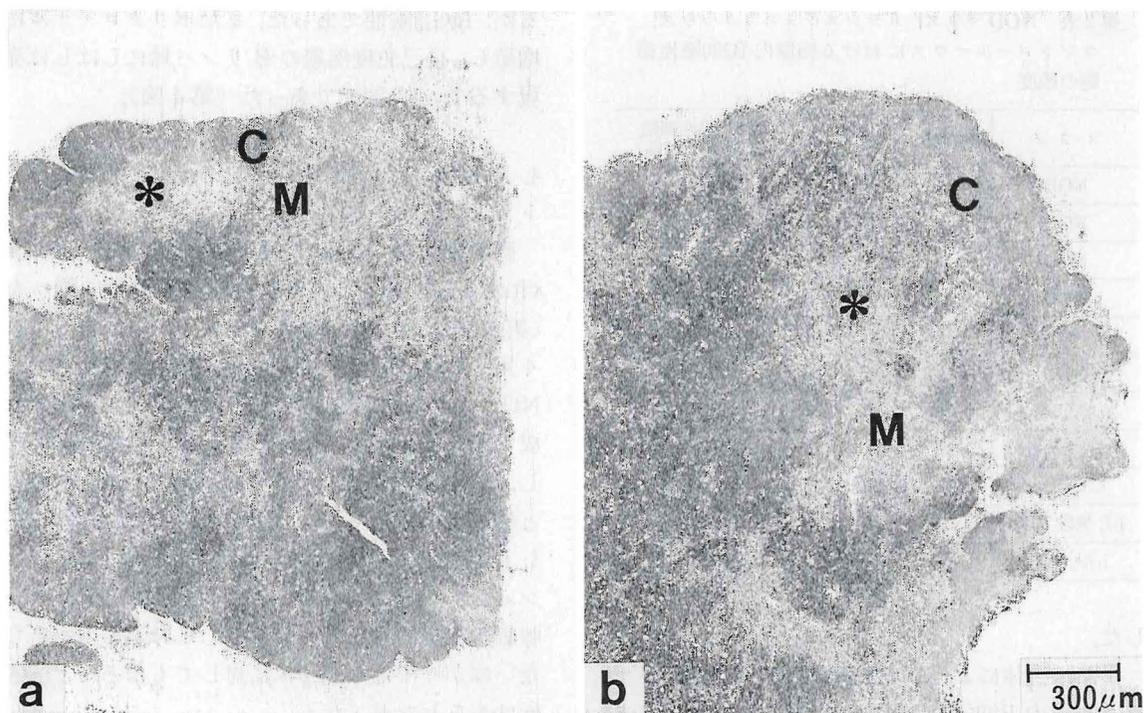
2. NOD マウス胸腺リンパ濾胞と糖尿病, 膵島炎出現の相関関係(第1表)

NOD マウスの膵島炎の出現を HE 染色した組織切片で週齢を追って調べると, 従来いわれている通り, 5週齢ではリンパ球の浸潤の程度は軽く, 膵島を取り囲むように出現していた. 8週齢では雌雄ともに程度の差こそあれ, すべてのマウスに膵島炎の所見が認められた. 一方, 糖尿病発症は膵島炎ほど早期には見られず, 雌性マウスでは16週齢より糖尿病発症が観察された. 一方, 胸腺リンパ濾胞の構造は, 雌雄ともに16週齢でははっきりとしており, しかも出現頻度に雌雄差はない. しかし, 胸腺の大きさ, リンパ濾胞の数, 大きさは, 糖尿病好発の雌性マウスの方が顕著であった.

第1表 NOD マウスにおける糖尿病の発症と膵島炎, 胸腺リンパ濾胞の関係

週齢数	性別	n	膵島炎	糖尿病	胸腺リンパ濾胞
5	F	3	1/3	0/3	0/3
8	F	3	3/3	0/3	0/3
10	F	3	3/3	0/3	0/3
12	F	4	4/4	0/4	2/4
16	F	4	4/4	1/4	4/4
18	F	8	8/8	2/8	8/8
20	F	6	6/6	1/6	6/6
22	F	2	2/2	1/2	2/2
24	F	2	2/2	1/2	2/2
8	M	2	2/2	0/2	0/2
12	M	2	2/2	0/2	1/2
16	M	3	3/3	0/3	3/3
18	M	4	4/4	0/4	4/4
22	M	2	2/2	0/2	2/2

M: 雄性, F: 雌性, n: 匹数



第3図 トランスジェニックマウスの胸腺のHE染色像。a：I-E発現NODトランスジェニックマウスの胸腺（48倍）。第1図と等倍率であるが、胸腺全体の大きさがNODマウスの胸腺に比し、小さい。リンパ濾胞は髄質の皮質より存在するが、あまり発達していない。b：I-A^kNODトランスジェニックマウスの胸腺（48倍）。やはり胸腺全体が小さく、リンパ濾胞も小さい。

また、対照として観察した18週齢I-E発現NODトランスジェニックマウスは3匹とも糖尿病の発症、膵島炎はなかったが、胸腺にはリンパ濾胞が観察された(第3図)。18週齢I-A^kNODトランスジェニックマウスは2匹とも糖尿病の発症はなかったが、膵島には軽度のリンパ球浸潤が観察された。このI-A^kNODトランスジェニックマウスにもリンパ濾胞が観察された(第3図)。しかし、これらトランスジェニックマウスでは胸腺自体がNODマウスより小さく、リンパ濾胞もNODマウスに比し、数は少なく、大きさも小さいものであった。

3. 胸腺内Bリンパ球の出現頻度

B220陽性細胞を指標として雌性NODマウス胸腺内Bリンパ球の頻度をフローサイトメトリーで解析した。12週齢まではB220陽性細胞は

1%以下であるが、16週齢では1%以上となり、18週齢では最も多く平均3.9%で多いものでは7.2%を占めるものまでであった。しかし、B220陽性細胞は20週齢および22週齢では減少し、2%以下であった。一方、BALB/cマウスやC57BL/6マウスの自己免疫病のないコントロールマウスでは、胸腺のB220陽性細胞は18週齢で1%以下であった(第2表)。18週齢のI-E発現NODトランスジェニックマウスおよびI-A^kNODトランスジェニックマウスではB220陽性細胞は1%以上であった。この割合は、胸腺にリンパ濾胞を持たないBALB/cマウスやC57BL/6マウスに比較すれば多く、NODマウスに近かったが、総胸腺細胞数がNODマウスの1/3~1/4程度しかないことを考慮にいと、両トランスジェニックマウス胸腺のB220陽性細胞の絶対数は増加しているとはいえない。この結果は免疫組織化学の結果と一致

第2表 NOD マウス, トランスジェニックマウス, コントロールマウスにおける胸腺内 B220陽性細胞の頻度

マウス	週齢数	性	n	B220陽性細胞 平均±2SD(%)
NOD	5	F	3	0.5±0.2
NOD	8	F	3	0.7±0.3
NOD	12	F	5	0.7±0.2
NOD	16	F	5	1.8±0.6
NOD	18	F	11	3.9±1.9
NOD	20	F	6	1.7±0.9
NOD	22	F	4	1.8±0.6
BALB/c	18	F	3	0.5±0.1
C57BL/6	18	F	5	0.7±0.3
I-E発現 NOD	18	F	3	2.2±0.4
I-A* NOD	18	F	2	1.5±0.2

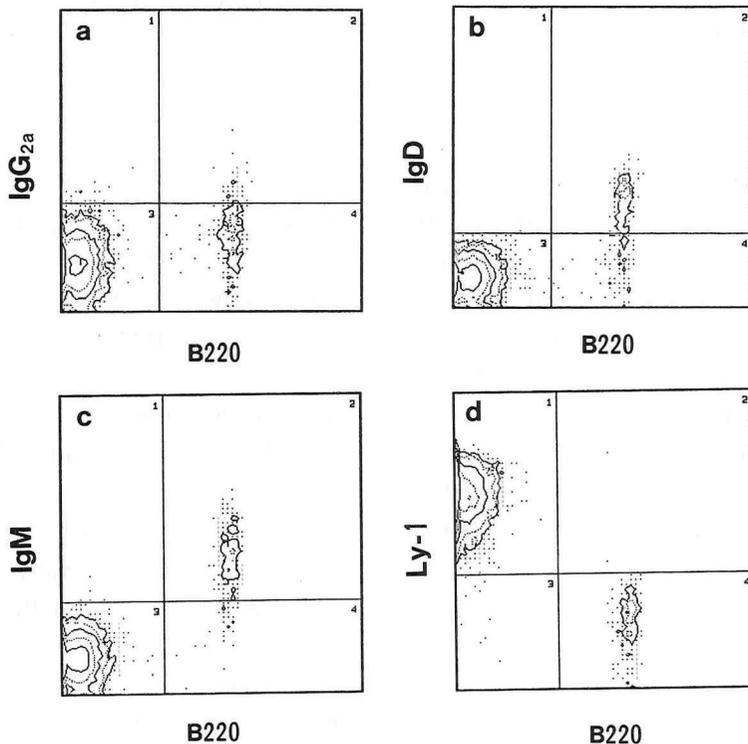
した。

また, 抗体による二重染色の解析では NOD マウス胸腺内 B220陽性細胞は IgM, IgD 陽性であ

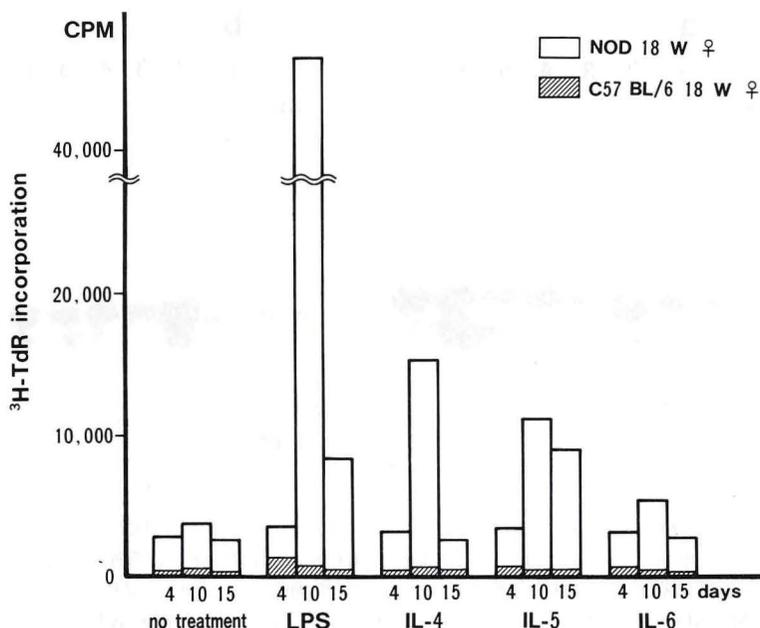
るが, IgG_{2a}陰性であった。またポリクローナルに増殖し, 自己免疫疾患の B リンパ球にしばしば発現する Ly-1は陰性であった (第4図)。

4. 胸腺 B リンパ球のマイトージェンおよびサイトカインに対する反応性

胸腺内 B リンパ球の機能を検討するため, *in vitro* の系で種々の刺激に対する反応性を調べた (第5図)。B リンパ球のマイトージェンとして広く用いられている LPS (50 μ g/ml) を加えると, NOD マウス胸腺細胞は著明に反応して DNA 合成を示した。IL-4, IL-5を加えても非添加群に比し, 増殖性が見られたがその程度は LPS 刺激ほど顕著ではなかった。IL-6に対する応答性は IL-4, IL-5に対する応答性に比し低かった。一方 B リンパ球がほとんど存在しない C57BL/6 マウス胸腺細胞では IL-4, 5, 6 に対してほとんど反応しないばかりでなく, LPS に対してもほとんど応答性はみられなかった。



第4図 NOD マウス胸腺細胞の二重染色によるフローサイトメトリー解析。B220陽性細胞は表面 IgM, IgD が陽性であり, IgG_{2a}, Ly-1が陰性であった。



第5図 18週齢 NOD マウス胸腺細胞のマイトーゼン, サイトカインに対する応答性. 無刺激, LPS 50 μ g/ml, IL-4 100U/ml, IL-5 100U/ml, IL-4 100U/ml に対する反応性を 2×10^6 個の細胞に対する³H サイミジンの取り込みを指標として測定した.

5. 胸腺 B リンパ球の抗体産生能

NOD マウス胸腺 B リンパ球の抗体産生能の有無をサイトカイン存在下および非存在下で7日間培養した胸腺細胞の培養上清を用いて, ELISA 法にて調べた(第3表). サイトカイン非存在下の胸腺細胞培養上清にはほとんど免疫グロブリンは認められず, C57BL/6マウス胸腺細胞と差がなかった. またサイトカインの中で, IL-5との混合培養ではほとんど免疫グロブリンの産生は促進されなかったが, IL-6との混合培養では210ng/ml 検出された. これに比し, はじめに LPS 存在下で培養した後 IL6で刺激した培養上清では免疫グロブリンの濃度は8,600ng/ml と著明に増加した. しかし IL5で刺激してから IL6で刺激しても免疫グロブリンの産生はあまり増加しなかった.

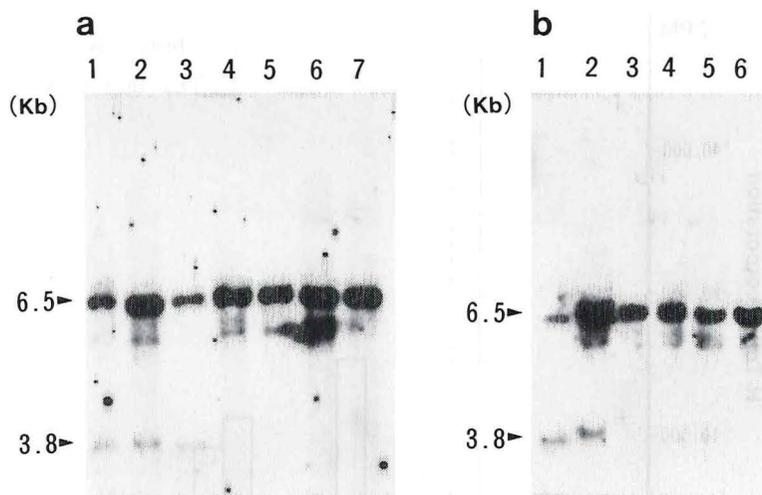
6. 胸腺リンパ濾胞形成 B リンパ球のクロナリティ

NOD 胸腺内で増殖した B リンパ球が, 特定のクローン増殖か, それともポリクローンの集合で

第3表 NOD マウス胸腺 B リンパ球の抗体産生能

マウス	週年齢	性	刺激源	免疫グロブリン濃度 (ng/ml)
NOD	18	F	—	41
NOD	18	F	IL-5	45
NOD	18	F	IL-6	210
NOD	18	F	LPS → IL-6	8,600
NOD	18	F	IL-5 → IL-6	180
C57BL/6	18	F	—	82

あるのかは, 免疫グロブリン遺伝子の再構成バンドが単一か多数であるかをサザンプロットのパターンから判定することができる. 第6図に示すように, 18週齢の NOD マウスには, 肝を含むすべての臓器に出現する6.5Kbの胚細胞遺伝子バンドの他に, 3.8Kbの明確な単一バンドが検出された. しかし, 若齢 NOD や非 NOD マウス胸腺 DNA には, 同サイズの単一バンドは認められず, 多数のバンドのスメアリングの結果明らかなバンドは認められない. 3.8Kbの単一バンドは自動細



第6図 NOD マウスおよびトランスジェニックマウスの胸腺抽出 DNA のサザンブロット解析。a: レーン1~3, 18週齢 NOD マウス胸腺, 4, 18週齢, NOD マウス胸腺細胞より自動細胞分離装置にて B220陽性細胞をとり除いた細胞分画, 5, 5週齢 NOD マウス胸腺, 6, 8週齢, NOD マウス胸腺, 7, 18週齢 ICR マウス肝。b: レーン1~2, 18週齢 NOD マウス胸腺, 3~4, 18週齢 I-E 発現 NOD トランスジェニックマウス胸腺, 5, 18週齢 I-A^k NOD トランスジェニックマウス, 6, 18週齢 ICR マウス肝。18週齢 NOD マウスの胸腺には3.8Kbの位置に J_Hプロープにて検出可能な免疫グロブリンの再構成バンドが観察される。若齢 NOD マウスやトランスジェニックマウスの胸腺には観察されない。18週齢 NOD マウスでは個体が違っても再構成バンドは同じ位置に観察された。

胞分離装置により B220陽性細胞を除いた細胞群では消失しているので, B リンパ球由来と考えられた。以上の結果は, 胸腺のリンパ濾胞構成 B リンパ球はモノクローナル, もしくは少なくともオリゴクローナルであることを強く示唆した。I-E 発現トランスジェニックマウス, I-A^k NOD トランスジェニックマウスには3.8Kbの単一バンドはみられなかった。なお, 肝以外の臓器に認められる5Kb 前後のサイズのバンドは, T リンパ球内の免疫グロブリン遺伝子が D 領域と J 領域のみ結合した結果検出されると報告されている⁹⁾。

考 案

胸腺内胚中心もしくはリンパ濾胞の出現は, 重症筋無力症における胸腺病変の特徴の一つとしてよく知られているが⁷⁾, その他バセドウ病, 橋本病, 潰瘍性大腸炎などの自己免疫疾患患者^{8,9)}にも

高率に認められる。しかし, 死戦期の長かった病死例の剖検胸腺にはほとんど認められない¹⁰⁾。

Burnet は胸腺内胚中心はリンパ球の abnormal clone の増殖部位であり, 自己免疫疾患発症と関係すると述べているが¹¹⁾, 自己免疫疾患の胸腺にみられるこれら病変が, 自己抗体産生につながるのか, また一次的なものであるか二次的変化であるかについては結論が得られていない。

NOD マウスにおける胸腺リンパ濾胞はヒトの自己免疫疾患にみられるリンパ濾胞に形態学的に類似している。髄質の皮質よりも, リンパ球の密な集簇として認められ, 数, 大きさ共に12週齢頃より週齢とともに増大し, 18週齢頃にピークとなる。この時期は糖尿病の発症が見られ始める時期に一致する。これらの細胞は酵素抗体法で B220 と抗免疫グロブリン抗体に染まることから, B 細胞系リンパ球であることが判明した。しかし, 細胞質内の mRNA を染めるピロニンで染まらなかつ

たことより形質細胞までの分化はしていないものと考えられた。

フローサイトメトリーによる胸腺内 B リンパ球解析は、酵素抗体法の結果とほぼ一致し、16週齢 NOD マウスでは 1% を超え、18週齢がピークで、多いものでは 7.2% におよぶ。コントロールの C57BL/6 マウス、BALB/c マウスや 12週齢以下の若年 NOD マウスの胸腺 B リンパ球は 1% 未満である。

胸腺は T リンパ球の分化の場としてよく知られている臓器であるが、その胸腺に正常の状態でも少数の B リンパ球の存在することは Miller らが 1967 年に見出しており¹²⁾、Thymic B lymphocyte (TBL) としてその存在意義が議論されている。この TBL は胸腺発生のごく初期から見られること¹³⁾、および産生される抗体のアイソタイプが末梢と異なること¹⁴⁾、成熟 B 細胞とは異なり、Ly-1 陽性であること¹⁵⁾より、再循環している B 細胞ではなく、胸腺において独自に分化したものではないかと考えられている。しかもこれら TBL は週齢を問わず常に胸腺内に 0.1~1.0% 存在する。16週齢以降の NOD マウスにみられる B220 陽性細胞はほとんど Ly-1 陰性であり、NOD マウスの胸腺に観察されるリンパ濾胞は通常の TBL とは根源が異なる B リンパ球より成ると考えられた。Ly-1 は本来汎 T リンパ球の表面マーカーであるが、TBL のほか自己免疫性溶血性貧血のモデル動物である NZB マウスや汎発性紅斑性狼瘡 (SLE) のモデル動物である MRL/lpr マウスなどの腹腔内、脾臓の B リンパ球にも出現することが知られている。これらの自己免疫疾患に出現する Ly-1 陽性 B リンパ球は抗 ssDNA 抗体などの自己抗体を含む IgM を分泌しており、これらマウスの病像、発症に密接な関連があると考えられている^{16,17)}。しかし、これら Ly-1 陽性 B リンパ球はポリクローナルに増殖したもので、そのターゲットは不明である¹⁸⁾。自己免疫疾患のモデル動物である NOD マウスの胸腺にも同様に Ly-1 陽性 B リンパ球が増殖していることが予想されたが、実際に胸腺内に増殖していた B リンパ球は Ly-1 陰性であった。この結果は、後述する胸腺 B

リンパ球のクロナリティーと矛盾しない。

胸腺内 B リンパ球分化段階は、細胞表面の免疫グロブリンクラスの発現を指標にしてフローサイトメトリーにより解析したところ、胸腺内 B リンパ球のほとんどは IgD, IgM が陽性であり、IgG_{2a} が陰性であった。重症筋無力症の胸腺を免疫組織化学的方法により細胞表面の免疫グロブリンを染色した報告があるが、やはりリンパ濾胞構成 B リンパ球は IgD, IgM が陽性であり¹⁶⁾、分化段階の中途であることが示されており、我々の報告と一致した。

胸腺 B リンパ球の活性化状態および分化段階を知る目的で、T リンパ球より産生されるサイトカインに対する反応を *in vitro* の系で検索した。一般に IL-4 は主に B リンパ球の初期段階で活性化に関与し、IL-5 は活性化 B リンパ球の増殖に、IL-6 は B リンパ球の抗体産生細胞への最終段階の分化を誘導する過程に関わるとされる¹⁹⁾。もし NOD マウス胸腺 B リンパ球が胸腺内で IL-4 や IL-5 の刺激を受け、すでに活性化、増殖しているならば、主に IL-6 に反応して、あまり IL-4 や IL-5 は応答しないと推測される。しかし、結果は IL-6 に対する応答性は低く、むしろ IL-4 や IL-5 に反応していた。このことからリンパ濾胞構成 B リンパ球は、初期段階にある B リンパ球であると推察された。

IDDM では糖尿病に際し、もしくはそれに先行して自己抗体が検出される^{20~22)}。同様に NOD マウスでも膵島細胞と反応する islet cell antibodies (ICA)²³⁾、islet cell surface antibodies (ICSA)²⁴⁾、インスリンと反応する insulin autoantibodies (IAA)^{25,26)} が検出される。NOD マウス胸腺のリンパ濾胞構成 B リンパ球がこれら自己抗体を産生している可能性は細胞表面に発現された免疫グロブリンのクラスおよびサイトカインに対する反応性から少ない。また、ピロニン染色の結果からもリンパ濾胞構成 B リンパ球が形質細胞の段階まで分化している可能性は極めて少ないと結論した。しかし、NOD マウス胸腺細胞を培養し、上清中の免疫グロブリンの存在を検出した ELISA の結果は、NOD マウス胸腺のリンパ濾

胞構成 B リンパ球は自発的に産生している免疫グロブリン量は極めて少ないが、液性因子の刺激により抗体を産生しえることを示した。LPS, IL-6 の刺激で産生された免疫グロブリンの中に ICA, ICSA, IAA などの自己抗体が含まれているかどうかの検討を従来の方法²³⁻²⁵⁾にておこなったが、残念ながら培養上清を濃縮しても総免疫グロブリン濃度が少なすぎるため、十分な測定が行われず、今後の課題と考えられる。

NOD マウスの胸腺リンパ濾胞構成 B リンパ球の増殖が疾患特異的自己抗原との関連で、単クローン性か、Ly-1陽性 B リンパ球のように自己免疫疾患共通の多クローン性かに関してはいまだに報告がない。この点を明らかにすることは、臓器特異的自己抗体出現の機構を理解する上に有用と考え、サザンプロット法を用いて遺伝子レベルで解析した。もし胸腺リンパ濾胞形成 B リンパ球が特定のクローンが拡大したものであるならば、免疫グロブリン遺伝子の J_H フラグメントをプローブとしたサザンプロットで単一の免疫グロブリン遺伝子の再構成バンドが観察される。一方、リンパ濾胞が多クローン B リンパ球の集合であるならば、多数のサイズの異なった再構成遺伝子が存在するため、明瞭なバンドとして検出されない。サザンプロットの結果は NOD マウスの胸腺にのみ、3.8Kb の位置に明らかな単一バンドが観察され、リンパ濾胞構成 B リンパ球の増殖はモノクローナル、もしくは少なくともオリゴクローナルに増殖したものであると考えられた。またこのバンドは個体が異なっても同じサイズの単一バンドを示すことより、胸腺内で増殖する B リンパ球クローンは NOD マウスに共通な特定クローンであることが強く示唆された。一方、膵島炎も糖尿病も発症しない I-E 発現 NOD トランスジェニックマウス、あるいは軽度の膵島炎はあるが、糖尿病の発症のない I-A^k NOD トランスジェニックマウスではこの3.8キロベースの遺伝子再構成バンドは検出できず、NOD マウス胸腺に観察される免疫グロブリン遺伝子の特定な V 領域を使う B リンパ球クローンの増殖は、I-E の発現欠如もしくは異常 I-A 発現と密接に関連していることが

示唆された。

最後に胸腺リンパ濾胞を形成する特定 B リンパ球クローンの増殖と、糖尿病の発症や膵島炎の発症との関連について考察する。I-E および I-A 発現以外は NOD と同じ遺伝子背景をもつ I-E 発現、NOD トランスジェニックマウスや I-A^k NOD トランスジェニックマウスには特定 B リンパ球クローン増殖は胸腺にみられない。I-E 発現 NOD トランスジェニックマウスでは糖尿病も膵島炎も発症しないが、I-A^k NOD トランスジェニックマウスでは糖尿病の発症はないが膵島炎は認められる。従って、NOD マウス胸腺内のある特定 B リンパ球クローンの増殖は、糖尿病の発症と密接に関連したものであるが膵島炎とは関連性がないことが示唆された。

形態学的にも18週齢の NOD マウスの胸腺は、他の系統やトランスジェニックマウスに比し、著明に大きいのが特徴である。さらに、リンパ濾胞はトランスジェニックマウスでも少ないながら存在するが、NOD マウス胸腺にみられるリンパ濾胞は、それよりはるかに発達している。この時期は糖尿病の好発時期であり、膵臓では膵島のベータ細胞が破壊されている時期に相当する。これに呼応して刺激を受けた特定の B リンパ球クローンが胸腺において増殖したのが、今回サザンプロットの結果、胸腺に見出されたクローンであろう。この B リンパ球クローンが何に反応して増殖したかを解明することが、NOD マウスの糖尿病発症、しいては IDDM の病因解明につながると考えられ、現在ハイブリドーマ作製によりその同定を進めている。

総 括

インスリン依存型糖尿病モデル動物 (NOD マウス) 胸腺内に、週齢に規定され、本来胸腺内にはみられないリンパ濾胞が存在することに着目し、リンパ濾胞構成細胞につき、特に膵島炎、糖尿病の発症とどう関係しているかを検討し、以下の成績を得た。

1. NOD マウスにおけるリンパ濾胞の出現は

文 献

12週齢頃より観察されはじめ、以後週齢とともに増大し、18週齢で数、大きさとも最大となり、20週齢以降、炎症細胞の浸潤をともなって崩壊していく。

2. リンパ濾胞構成細胞はB220陽性でIgM, IgDを細胞表面に発現しているがIgG_{2a}は発現していないBリンパ球であった。

3. このBリンパ球は自己免疫性溶血性貧血やSLEのモデル動物であるNZBマウスやMRL/lprマウスに出現するLy-1陽性Bリンパ球と異なり、Ly-1は陰性であった。

4. これらのBリンパ球はLPS, IL-4, IL-5の刺激により増殖した。

5. これらのB細胞は形質細胞まで分化していない未熟細胞であり、自発的には抗体を産生していないが、LPS, IL-6の刺激により、免疫グロブリンを産生した。

6. 免疫グロブリン遺伝子の再構成をJ_Hに対するプローブを用いたサザンブロットにて観察したところ、このB細胞はモノクローナルに増殖した可能性が強く示唆された。

7. これらの成績をI-E発現NODトランスジェニックマウス、I-A^kNODトランスジェニックマウスと比較検討し、この特殊なB細胞クローンの増殖は糖尿病の発症、すなわち膵β細胞の破壊と密接に関連して増殖したクローンであると考えられ、今後このクローンを解析することが、IDDMの発症機序解明に有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授、片岡邦三講師、丸山博講師、東海大学医学部免疫学教室垣生園子教授に深謝いたします。また直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室武井泉博士、社会保険埼玉中央病院内科丸山太郎博士に深謝いたします。

本論文の趣旨は第33回日本糖尿病学会総会、第20回日本免疫学会総会、第50回アメリカ糖尿病学会総会にて発表した。

- 1) Rossini, A.A. et al.: Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 289-320, 1985
- 2) Makino, S. et al.: Breeding of a nonobese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim.*, 29: 1-13, 1980
- 3) Hattori, M. et al.: The NOD mouse: Recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science*, 231: 733-735, 1986
- 4) Acha-Orbea, H. and McDevitt, H.O.: The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A β chain is unique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2435-2439, 1987
- 5) Uehira, M. et al.: Development of autoimmune insulinitis is prevented in E α^d but not in A β^k NOD transgenic mice. *Int. Immunol.*, 1: 209-212, 1989
- 6) Kurosawa, Y. et al.: Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature*, 565-570, 1981
- 7) Castleman, B. and Norris, E.H.: The pathology of the thymus gland in myasthenia gravis. A study of 35 cases. *Medicine*, 28: 27-58, 1949
- 8) Habu, S. et al.: Thymic lymphoid follicles in autoimmune diseases I: Quantitative studies with special reference to myasthenia gravis. *Keio J. Med.*, 20: 45-56, 1971
- 9) 玉置憲一, 渡辺 裕: 自己免疫疾患の胸腺—とくに胸腺におけるリンパ濾胞の形成について—。 *臨床病理*, 15: 490-496, 1967
- 10) Okabe H.: Thymic lymph follicles: a histopathological study of 1,356 autopsy cases. *Acta Pathol. Jpn.* 16: 109-130, 1966
- 11) Burnet, F.M. and Mackay, I.R.: Lympho-epithelial structures and autoimmune disease, *Lancet*, 2: 1030, 1962
- 12) Miller, J.F.A.P. and Osoba, D.: Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol. Rev.*, 47: 437-520, 1967
- 13) Jotereau, F. et al.: Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration. *J. Immunol.*, 138: 1026-1030, 1987
- 14) Marcos, M.A.R. et al.: Physiological significance of thymic B lymphocytes: An appraisal. *Res. Immunol.*, 140: 275-279, 1989
- 15) Inaba, M. et al.: Functional analysis of thymic CD5⁺ B cells: Responsiveness to major

histocompatibility complex class II-restricted T blasts but not to lipopolysaccharide or anti-IgM plus interleukin 4. *J. Exp. Med.*, 171: 321-326, 1990

- 16) Hayakawa, K. et al.: The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal, immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.*, 157: 202-218, 1983
- 17) Hayakawa, A. et al.: Ly-1 B cells: Functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2494-2498, 1984
- 18) Izui, S. et al.: Increased spontaneous polyclonal activation of B lymphocytes in mice with spontaneous autoimmune disease. *J. Immunol.*, 121: 2213-2219, 1978
- 19) 岸本忠三: Bリンパ球分化の制御, インターロイキンとコロニー刺激因子, 多田富雄編, デー・エム・ベー・ジャパン社, 東京, p.23-38, 1989
- 20) Bottazzo, G.F. et al.: Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2: 1279-1282, 1974
- 21) Lernmark, A. et al.: Islet cell surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 299: 375-380, 1978
- 22) Palmer, J.P. et al.: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 222: 1337-1339, 1983
- 23) Toyota, T. et al.: Islet-cell antibody and immunologic aspects of NOD mice. In: Mimura, G., Baba, S., Goto, Y., Kobberling, J. (eds) *Clinico-genetic genesis of diabetes mellitus*. *Excerpta Med.*, p.185-192, 1982
- 24) 武井 泉: ¹²⁵I-Protein A法による膵島細胞膜抗体の定量的測定とその臨床的意義, 慶應医学, 61: 549-560, 1984
- 25) Maruyama, T. et al.: Insulin autoantibodies in mouse models of insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res.*, 11: 61-65, 1989
- 26) Ziegler, A.G. et al.: Radioassay determination of insulin autoantibodies in NOD mice: Correlation with increased risk of progression to overt diabetes. *Diabetes*, 38: 358-363, 1989

ABSTRACT

Thymic lymphoid follicles in the model mouse of insulin dependent diabetes mellitus (NOD mouse)

Kenji Watanabe, M.D.

Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Keio University

The non-obese diabetic (NOD) mouse spontaneously develops immunologically mediated insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) which has been proposed as a model of human type I diabetes.

In the NOD mouse, lymphoid follicles appeared in the thymus at 12 weeks and became larger and more numerous with age. These follicles were mainly located in the medulla near the cortico-medullary junction. The follicle forming cells were demonstrated to be positive for both B220 and surface immunoglobulins (sIgs) by immuno-histochemical staining. FACSscan analysis of the lymphocytes obtained from the thymuses of 18w NOD mice showed that 3.9±1.9% cells were B220 positive. In contrast, in younger NOD mice (5-12w), less than 1% of thymocytes were B220⁺. Two-color analysis showed that B220⁺ cells expressed sIgM and/or sIgD but neither sIgG₂, nor Ly-1. These B lymphocytes were activated by lipopolysaccharide (LPS), IL-4 and IL-5, and weakly activated by IL-6. They didn't secrete immunoglobulins spontaneously but they could do so when stimulated by a combination of LPS and IL-6. Southern blot analysis of the NOD thymus showed a distinct rearranged band at 3.8 Kb, when extracted DNA were hybridized with mouse J_H probe. Such a rearranged band, however, did not appear in I-E expressing NOD transgenic mice which are protected from developing insulinitis or diabetes, or I-A^K NOD transgenic mice which develop insulinitis but not diabetes. These results suggest that monoclonal expansion of thymic B cells in the NOD mouse occurs in association with the pathogenesis of IDDM.