

Vol.17 No.2

Sep 2008

The logo for CRJ LETTERS. It features a large, stylized 'C' composed of two concentric circles, the outer one in bright blue and the inner one in a lighter blue. To the right of the 'C' is the 'RJ' in a black, outlined, sans-serif font. Below 'RJ' is the word 'LETTERS' in a larger, black, outlined, sans-serif font. A thin black line extends from the bottom right of the 'S' in 'LETTERS' and continues diagonally towards the bottom right corner of the page.

—— 卷頭論文 ——

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)

日本チャールス・リバー株式会社

実験的自己免疫性脳脊髄炎

国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部 三宅 幸子, 山村 隆

はじめに

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis:EAE) は、中枢神経組織由来の蛋白質抗原やペプチドを免疫することによって誘導される自己免疫モデルである。多発性硬化症 (Multiple Sclerosis:MS) と多くの病態を共有することから、MS の病態研究、治療法開発において使用されている。またアジュバントと百日咳毒 (Pertussis Toxin:PT) を使用することにより EAE の誘導が容易になったこと、一度の免疫で 10 ～ 14 日といった比較的短時間で麻痺などの神経症状が出現すること、多くの遺伝子改変動物が利用可能な C57BL/6J マウスでの誘導が可能なることから、T 細胞活性化に与える影響を *in vivo* で検討するといった免疫学的解析の一環としても頻繁に用いられている。

EAE の歴史

EAE 研究の歴史は古く、パスツールが狂犬病ワクチンを開発していた時代まで遡る 1)。パスツールらは、ラビットを用いてウイルスを継代し、その中枢神経組織から分離した弱毒ウイルスをワクチンとして使用していた。しかし、ワクチンに中枢神経組織の混入があったために、ワクチン摂取後に狂犬病とは症状も病理所見も異なる脳炎を起こす症例があることが報告された。この現象から中枢神経組織を免疫することで脳炎が起こったのではないかと考えた Rivers らは、ラビットやサルに中枢神経組織を繰り返し免疫することで脳炎が発症することを実験的に示した。その後、Freund による結核死菌を含んだアジュバントの考案により、1 ～ 数回の中枢神経組織の免疫により脳炎が惹起されるようになり、現在用いられている EAE の原型となった。

EAE の病態

EAE は、ごく初期には中枢神経系組織を免疫することによって誘導されたが、現在では中枢神経に存在する蛋白由来のペプチドを免疫原として使用することが多い。また、これらの中枢神経蛋白反応性の CD4 + T 細胞を移入することにより受動的に EAE を誘導することも可能である。その発症機序

は、末梢で活性化された中枢神経蛋白反応性 T 細胞が中枢神経系に浸潤し、局所で活性化され、様々なケモカインやサイトカイン産生を介して、マクロファージやミクログリアの活性化によって、脱髄や神経傷害などの組織傷害を惹起すると考えられている。従来は、IFN- γ などを産生する Th1 細胞が病態を引き起こすと考えられていたが、最近では IL-17 を産生する Th17 細胞がより強い病原性をもつことが注目されている。

EAE の病態を規定する因子

EAE は、マウスやウサギやモルモットでも誘導可能だが、マウスやラットがよく使用されている。様々な遺伝子改変動物や抗体などの解析ツールが豊富であることから最近ではマウスが汎用されているため、主にマウスを用いたモデル系について解説する。

EAE の病態に影響を与える因子としては、使用するマウスの系統、週齢、性別、飼育環境 (清浄度など)、抗原の種類などがあげられる。また、誘導に使用するペプチドの純度や、エマルジョンの良否などに加え、免疫操作などの技術的な要素も関与する。冬には軽症化し、春から夏にかけて重症化しやすいなどの季節による変動もみられることがある。

中枢神経組織を免疫して EAE を誘導できる系統は、これまでの報告では表 1 のように数多くある 2)。中枢神経組織ではなく、EAE 惹起性の抗原として初めに用いられたのは、ミエリン塩基性蛋白 (Myeline Basic Protein:MBP) である。その後プロテオリピッド蛋白 (Proteolipid Protein:PLP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (Myelin Oligodendrocyte Glycolipid:MOG) などが用いられるようになり、現在ではむしろ PLP や MOG が汎用されている。また、EAE 誘導にはペプチドを用いることが多く、マウス系統別に脳炎惹起性ペプチドが報告されているので主なものを示す (表 2) 3,4)。

EAE にはいくつかの病型が存在し、マウス系統や感作抗原の種類によって、急性单相性、慢性再発性、慢性持続性などがある。EAE の症状は、上行性麻痺を特徴とするものが代表的だが、頭部を一方

向に傾け、まっすぐ歩行ができない、連続的に一方
向に回転を続けるなどの症状を呈することもある
3)。

以下、現在最も汎用されている C57BL/6J マウス

に MOG ペプチドを感作して誘導される慢性持続性
EAE と、SJL/JOrlCrIcrlj マウスに PLP ペプチドを
感作して誘導される慢性再発性 EAE について、具
体的な誘導法とその評価法を述べる。

表 1 中枢神経組織の免疫により誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に感
受性のあるマウス系統 (文献 2) より引用改変)

マウス系統	ハプロタイプ	マウス系統	ハプロタイプ
129/J	b	B10.D2	d
C57BL/6	b	B10.D2 /nSn	d
C57BL/10J	b	BALB/cAnN	d
C57L	b	BALB/cByJ	d
C57L /J	b	BALB/cKa	d
A.SW	s	BALB/cORNld	
A.SW /Sn	s	BALB/cPt	d
B10.S	s	BALB/cWt	d
RICXJ4	s	RICXJ1	d
RICXJ6	s	RICXJ8	d
SJL/J	s	RICXJ11	d
B10.K	k	DBA/1J	q
C3H/He	k	SWR	q
C3H/HeJ	k	SWR /J	q
C3H/JSf	k	B10.PL	u
CBA/caHWehi	k	PL/J	u
B10.RIII	r		

中枢神経組織の免疫によりEAEが誘導されるマウス系統の一部を抜粋し紹介する。
中枢神経組織蛋白由来のペプチドによるEAEの感受性は異なる可能性がある。

表 2 脳炎惹起性ペプチド

抗原	アミノ酸配列	マウス系統	ハプロタイプ
MBP 1-9	Ace-ASQKRPSQR	PL/J	u
MBP 67-76	THYGSLPQKS	B10.PL	u
MBP 89-101	VHFFKNIVTPRTP	C57BL/6	b
		SJL/J	s
		SWR	q
		129/J	b
		B10.RIII	r
PLP 43-63	EKLIETYFSKNYQDYEYLINVI	PL/J	u
		NOD	g7
PLP 56-70	DYEYLINVIHAFQYV	SJL/J	s
		Biozzi	dq1
PLP 103-116	YKTTICGKGLSATV	SWR	q
PLP 104-117	KTTICGKGLSATVT	SJL/J	s
PLP 139-151	HCLGKWLGHDPKF	SJL/J	s
PLP 178-191	NTWTTCCQSLAFPSK	SJL/J	s
		BALB/c	d
		AKR/J	k
		129/J	b
PLP 190-209	SKTSASIGSLCADARMYGVL	CBA/J	k
		C3H/HeJ	k
PLP 215-232	PGKVCGSNLLSICKTAEF	C3H	k
MOG 8-22	PGYPIRALVGDEQED	Biozzi	dq1
MOG 35-55	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	C57BL/6	b
		NOD	g7
MOG 92-106	DEGGYTCFFRDHSYQ	SJL/J	s

C57BL/6J マウスにおける MOG₃₅₋₅₅

免疫による能動的 (active) EAE

JAX® mice C57BL/6J マウス (6-12 週齢、雌 日本チャールス・リバー(株)) に MOG₃₅₋₅₅ 残基に相当するペプチド MOG₃₅₋₅₅ 100 ~ 200 μ g とフロイト不完全アジュバントに M.TuberculosisH37 Ra 死菌 (Difco) をくわえたものを等量混和しエマルジョンを作成する。ペプチドは、95 % 以上の純度が高いものが望ましい。エマルジョン作成は、用手で行うことも可能であるが、ホモジナイザーやソニケーターを用いてもよい。エマルジョン化したペプチドを、背部に 1 ~ 2 か所皮下注射する。PT は感作当日と 2 日後の 2 回 200ng/PBS 200 μ l/匹投与する。経静脈的に投与すると、発症時期が均一で症状が強くおこる印象があるが、手技的に安定しない場合は腹腔内投与でよい。また、臨床症状が強くおこりすぎるときには、投与を免疫当日一回とすることも可能である。

臨床スコアは尾のトーンス低下から始まり、上行性に麻痺が進行するため、以下のように記載している。(0:正常、1:尾のトーンス低下、2:尾の完全下垂、3:歩行異常、4:後肢の完全脱力、5:前肢麻痺を含む後肢の完全脱力、6:死亡)。客観的評価が可能であることから、最大臨床スコアは尾の完全下垂以上になることが望ましい (図 1)。臨床症状は、抗原感作後 10-14 日程度から明らかとなり、その後数日から一週間程度で最大スコアに達し、そのまま慢性化することが多い。発症率は 80 ~ 100 % であり、臨床症状が比較的軽度であるときは、回復することもある。発症時期、最大臨床スコアは、実験ごとに多

図 1 EAE でみられる尾の完全下垂

少のばらつきがみられるが、当研究室での典型的な臨床経過例を図 2 に示す。

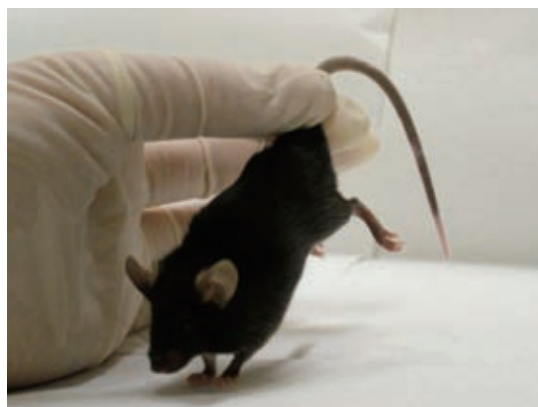
病理所見は、脊髄を中心に細胞浸潤と、脱髄がみられる。前者は Hematoxylin and eosin 染色で、後者は Luxol fast blue 染色で評価することが多い。

典型的な病理所見を図 3 に示す。

免疫学的解析では、T 細胞のリコール反応や MOG 特異的抗体測定などをおこなっている。



正常



尾の完全下垂

図2 C57BL/6J マウスに MOG₃₅₋₅₅ を用いて誘導した EAE の臨床症状

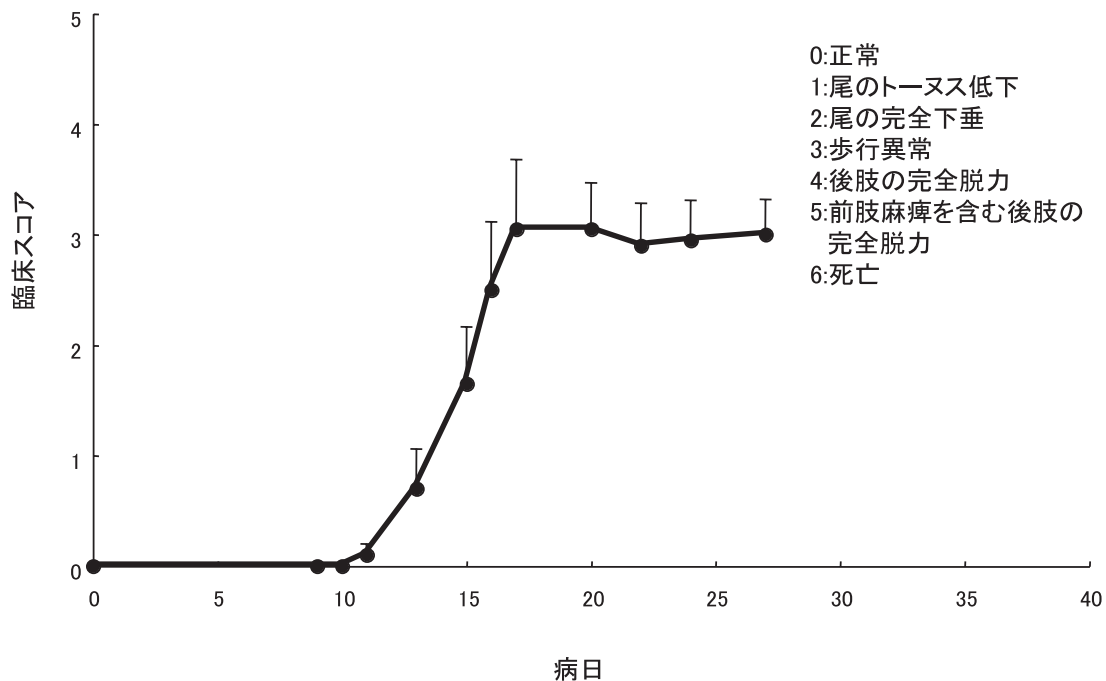
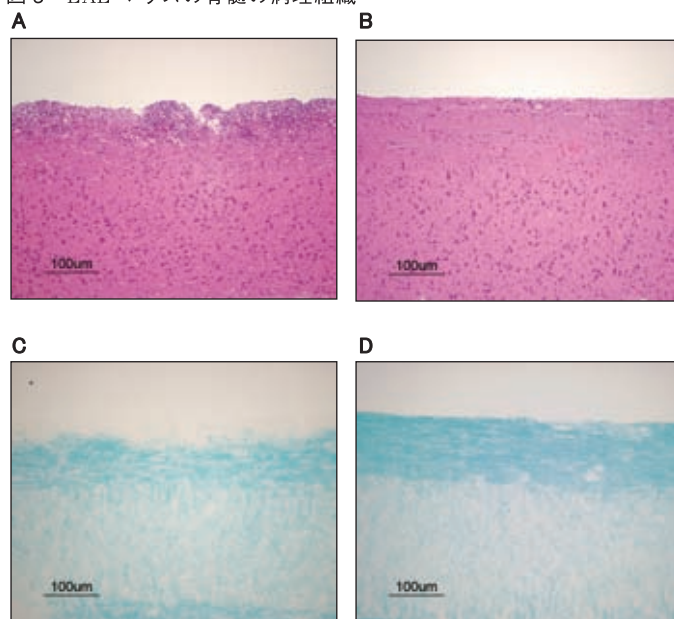


図3 EAE マウスの脊髄の病理組織



A,C: EAE誘導15日めの脊髄縦断像

B,D: 正常マウス脊髄縦断像

A,B: HE染色

C,D: Luxol fast blue染色

SJL/JOrlCrIcrlj マウスにおける EAE

SJL/JOrlCrIcrlj マウス (6-12 週齢、雌 日本チャールス・リバー(株)) に PLP₁₃₉₋₁₅₁ 残基に相当するペプチド 100 ~ 200 μ g とフロイト不完全アジュバントに *M. Tuberculosis* H37Ra 死菌をくわえたものを等量混和しエマルジョンを作成する。エマルジョン化したペプチドを、背部に 1 ~ 2 か所皮下注射する。PT は感作当日と 2 日後の 2 回 200ng/PBS 200 μ l/匹を投与する。PT の投与に関しては、C57BL/6J に MOG を免疫して誘導する場合とほぼ同様であるが、SJL/JOrlCrIcrlj では時に PT を投与しなくても臨床症状がみられることがある。投与経路、投与回数などは、臨床症状をみながら判断してプロトコールを作成することが現実的である。

臨床スコアは C57BL/6J と同様に尾のトーンス低下から始まり、上行性に麻痺が進行するが、発症後の症状の進展が早く、以下のように記載している。(0:正常、1:尾の完全下垂、2:歩行異常、3:後肢の完全脱力、4:体幹部の麻痺、5:前肢麻痺を含む後肢の完全脱力、6:死亡)。臨床症状は、抗原感作後 10-14 日程度から明らかとなり、その後数日で最大スコアに達する。その経過は C57BL/6J に MOG を感作し

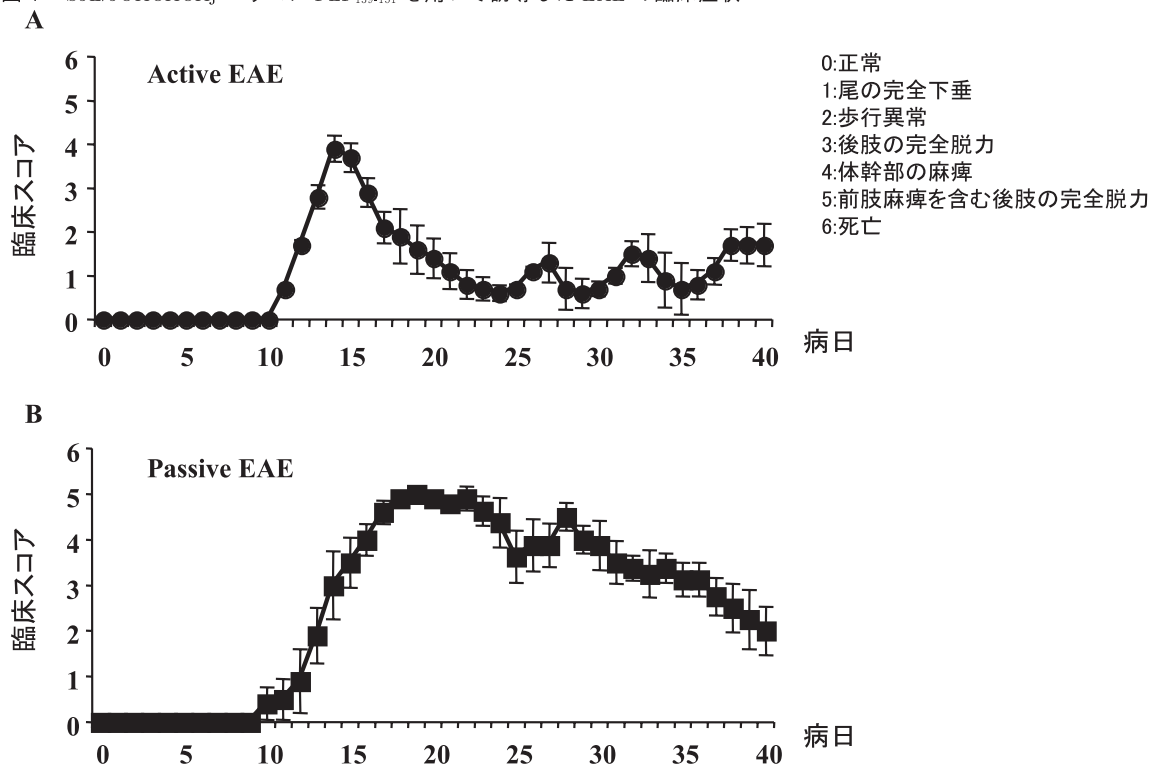
た場合よりも早いので、より注意深い観察が必要である。症状は、抗原感作 2 週間後にピークに達し、その後軽減する。発症率はほぼ 100 % である。2 ~ 3 週で症状が軽快したのち、30 ~ 40 % のマウスで再び症状が出現し、その後緩解と再発を繰り返す。当研究室での典型的な臨床経過例を図 4 に示す。

SJL/JOrlCrIcrlj マウスでは、抗原感作後に所属リンパ節細胞を移入して誘導する受動的 (passive) EAE も容易におこるので、汎用されている。EAE 誘導時と同様に PLP₁₃₉₋₁₅₁ を免疫するが、PT は投与しない。10 ~ 14 日後に所属リンパ節、脾臓から細胞を分離し、PLP₁₃₉₋₁₅₁ (30 μ g/ml) を加えて培養する。3 ~ 4 日後に細胞を回収し、プラスト化した細胞 (1×10^7 /マウス) を、300rad X 線照射したマウスに腹腔内投与する。

細胞投与日と 2 日後に、200ng/PBS 200 μ l/匹を投与する。

PT 投与に関しては、能動的に EAE を誘導する場合と同様に、重症度にあわせて投与回数や投与経路を変更する。当研究室での典型的な臨床経過例を図 4 に示す。

図 4 SJL/JOrlCrIcrlj マウスに PLP₁₃₉₋₁₅₁ を用いて誘導した EAE の臨床症状



EAE 誘導が上手くいかない場合のトラブルシューティングについて

他施設に EAE の誘導プロトコルを提供しても、EAE が上手くおこなえないという問い合わせをいただくことがあります。その際にチェックしていただくポイントをいくつか紹介する。

1) 飼育環境は SPF か？

EAE は、清浄度の高い飼育環境でないと起こりにくいとされている。したがって、SPF 環境下で飼育、実験を行うことが原則である。

2) マウスのサブストレインは？

マウスは同じ系統でも、サブストレインやコロニーの違いによって EAE の感受性が異なることが知られているので、注意が必要である。

3) マウスへのストレス軽減の配慮

マウスに強いストレスが加わると、EAE はおこりにくくなることが知られているので、十分な配慮が必要である。

a) マウス搬入直後に実験を行っていないか？マウスの搬入などに伴う輸送・移動があった場合、搬入後 1 週間は実験を行わない。移動に伴うストレスで胸腺が萎縮し、EAE の誘導も成功しない。

b) 飼育環境は快適か？

飼育スタッフと協力し、良好な飼育環境で過大なストレスが加わらないように配慮することも大切である。

c) 実験は手際よく行われているか？

抗原感作などの実験操作で、過度のストレスが加わると EAE がおこりにくくなる。したがって、なるべく短時間に手際よく実験を行えるように努力する。

4) ペプチドの純度は高いか？

感作に使用するペプチドは、純度が高いことが望ましい。当研究室では、95 % 以上の純度のものを使用している。

このように、EAE の病態は様々な環境因子の影響を受けやすいので、施設によって病型がかわりやすい。しかし、原則を理解していれば誘導は比較的容易であり、大変有効な動物モデルである。

文献

- 1) Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat.Rev. Immunol.* 7:904-12, 2007
- 2) Encinas JA, Weiner HL, Kuchroo VK. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci.Res.* 45:655-69, 1996
- 3) Greer JM, Sobel RA, Sette A, Southwood S, Lees MB, Kuchroo VK. Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. *J.Immunol.* 156:371-9, 1996
- 4) 山村隆. 実験的自己免疫性脳脊髄炎. *最新医学* 52:59-64, 1997
- 5) Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat.Protocol.* 1(4):1810-1819, 2006
- 6) Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat.Protocol.* 1(4):1952-1960, 2006

著者プロフィール

みやけ さちこ
三宅 幸子



学歴及び職歴

1987 年 3 月 東京医科歯科大学医学部卒業
1987 年 6 月 順天堂大学医学部付属順天堂医院 内科 臨床研修医
1994 年 3 月 順天堂大学にて医学博士の学位授与
1994 年 3 月 順天堂大学医学部内科系大学院卒業
1995 年 6 月 米国ハーバード大学リウマチ免疫アレルギー科博士研究員
1997 年 6 月 米国ハーバード大学リウマチ免疫アレルギー科指導研究員
1999 年 9 月 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長（現職）
順天堂大学医学部膠原病内科学教室非常勤講師
2005 年 9 月 早稲田大学理工学部客員助教授

主たる論文 5 編

Miyake S, Lupher ML, Druker B and Band H. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet derived growth factor receptor α . Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 95(14): 7927-32, 1998

Miyake S*, Miyamoto K* and Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 of natural killer T cells. Nature 413(6855): 531-4, 2001

*Equal contribution.

Oki S, Chiba A, Yamamura T and Miyake S*. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. J.Clin.Invest. 113(11): 1631-40, 2004 *corresponding author

Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant Va19Ja33 T cells inhibit autoimmune inflammation. Nat. Immunol. 7(9):987-94, 2006

Miyamoto K, Miyake S*, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. Brain 129:1984-92, 2006 * corresponding author

日本チャールス・リバーのホームページが新しくなりました！



さらに使いやすく、見やすくなった新ホームページで、最新情報を是非、ご覧ください。
日本チャールス・リバーがお届けする、各種試験サービスがご覧いただけます。
実験動物の検査報告書もダウンロードできます。

日本チャールス・リバー株式会社

チャールス・リバー・ラボラトリーズ・サービス株式会社

本 社 〒222-0033 横浜市港北区新横浜3-17-6 イノテックビル11F TEL. 045(474)9340 FAX. 045(474)9341

受注センター 東日本営業部 西日本営業部 厚木飼育センター 日野飼育センター 筑波飼育センター
横浜SASセンター 大阪SASセンター 技術センター 試験サービスセンター

<http://www.crj.co.jp>

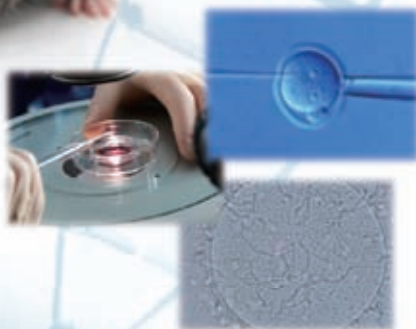
Worldwideに使用される 米国ジャクソン研究所のC57BL/6J ～創薬分野から遺伝子改変動物まで～

遺伝子改変動物の背景系統として多用されています。
また、循環器病学、糖尿病学、肥満、および免疫学などの
広い分野で活用されています。



JAX® MICE Stock Number :000664

日本チャールス・リバー（株）から生産・供給されて
おりますJAX® MICEは、米国ジャクソン研究所の
JAX® MICEです。遺伝学的に分岐した亜系統では
ありません。



ジャクソン研究所

米国ジャクソン研究所について
非営利組織の研究所として、人類の健康増進研究を目的とし、
マウスを使用した哺乳類の遺伝子研究に注力しています。
ジャクソン研究所の3つの使命

- 遺伝子研究
- 遺伝子研究資源の供給
- 研究教育

お問い合わせは

東日本営業部 TEL 045(474)9340 FAX 045(474)9341
西日本営業部 TEL 06(6307)2850 FAX 06(6307)2851

CRJ LETTERS この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行日：平成20年9月

発行所：日本チャールス・リバー株式会社

〒222-0033 横浜市港北区新横浜3-17-6イノテックビル11階
電話045(474)9340

企画・編集：日本チャールス・リバー株式会社 制作：株式会社 オービック O.A
Copyright (C) 2008 Charles River Laboratories Japan Inc. All Rights Reserved.

『本書の無断複写複製および転載は、特定の場合を除き、著作者、出版社の権利侵害になります。』

日本チャールス・リバー株式会社

・ 弊社の英文社名は Charles River Laboratories Japan, Inc. です

お問合せ、ご注文は下記にて承ります。

国内飼育動物	受注センター	☎045(474)9350	FAX 045(474)9351
輸入動物	開発営業 Gr	☎045(474)9340	FAX 045(474)9341
受託サービス他	リサーチモデルサービス部	☎045(474)9340	FAX 045(474)9341

<http://www.crj.co.jp>