

平成 25 年度 学位論文

Capillaria hepatica 実験感染マウスにおける
II型クリオグロブリン血症の病理発生機序の解明

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

動物疾病制御学 生体疾病制御学 獣医病理学

DV1001 相原 尚之

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 <i>Capillaria hepatica</i> 実験感染による II 型クリオグロブリン血症マウスモデルの確立	6
2-1. 序論	6
2-2. 材料および方法	6
2-3. 結果	9
2-4. 考察	11
図表	14
第 3 章 クリオグロブリン血症発症初期段階における B リンパ球の選択的増殖のメカニズムの解明	23
3-1. 序論	23
3-2. 材料および方法	24
3-3. 結果	29
3-4. 考察	34
図表	38
第 4 章 増殖後の B-1a 細胞における B 細胞活性化抑制因子 Stra13 の発現の解析	47
4-1. 序論	47
4-2. 材料および方法	48
4-3. 結果	49
4-4. 考察	50
図表	52
第 5 章 総括	55
引用文献	58
要旨	65
英文要旨	69
謝辞	73

第 1 章 緒言

本論文の対象は、*Capillaria hepatica* に感染したマウスで発症する混合型クリオグロブリン血症である。*C. hepatica* 実験感染によるクリオグロブリン血症のマウスモデルを確立し、その病理発生機序を解明することを目的としている。

1. クリオグロブリン血症の定義と分類について

クリオグロブリンは、体温（37°C）より低い温度で沈殿し、37°Cに加熱することで再溶解する免疫グロブリンと定義されている（Lospalluto et al., 1962）。クリオグロブリンによる病態はクリオグロブリン血症と呼ばれ、クリオグロブリンを構成する免疫グロブリンの性状から、3型（I型、II型、III型）に分類され、単一の免疫グロブリンからなる単クローン性クリオグロブリン血症（I型）と、複数の免疫グロブリンからなり、一つ以上の因子がリウマトイド因子陽性である混合型クリオグロブリン血症（II型およびIII型）に大別される（Brouet et al., 1974）。混合型クリオグロブリン血症の多くは、hepatitis C virus (HCV), hepatitis B virus (HBV), Epstein-Barr virus (EBV)などの病原体感染に随伴して起こる（Ferri, 2008）。

2. 病原体感染に起因したリンパ球増殖性疾患としての混合型クリオグロブリン血症

感染に随伴して発症する混合型クリオグロブリン血症は、病原体による抗原駆動性（antigen-driven）に単クローン性（II型）または、少クローン性（III型）のIgM RF産生Bリンパ球の増殖性が起こることが発症の原因になる。特定のIgM RF産生Bリンパ球が選択的に増殖する機序は、クリオグロブリン血症の病理発生を明らかにするうえで重要な機序であるのにもかかわらず、いまだ不明な点が多い。選択的増殖が起こるメカニズムは、特定の抗原を認識するBリンパ球が、適当な条件下で、抗原刺激を受けクローナルに増殖することが想定されるが、IgM RFを産生する細胞の性状や引き金となる特異抗原については、様々な報告があり、いまだ確定的なものではない。また、選択的増殖が進行するうえで適当な宿主免疫状態の解析は、解析の困難さから、ほとんど行なわれていないのが現状である。

2-1. 選択的Bリンパ球の増殖の引き金となる特異抗原について

混合型クリオグロブリン血症は、その最大の病因因子である HCV の感染患者の臨床検体で最もよく研究がなされている。HCV 慢性感染は、混合型クリオグロブリン血症や Non-Hodgkin Lymphoma といったリンパ球増殖性疾患を引き起こす(Forghieri et al., 2012)。増殖した B リンパ球の多くは、V_H1-69 によりコードされた高度に制限された免疫グロブリン可変領域を発現している。そして、この V_H1-69 によりコードされた B リンパ球の可変領域の塩基配列は、HCV 構造タンパク E2 に対する中和抗体の可変領域の塩基配列と高い相同性を持つことが示された (De Re et al., 2000; Chan et al., 2001)。選択的 B リンパ球増殖への HCV E2 の直接的な関与は証明されていないが、この知見は、特異抗原による B リンパ球の刺激が、クリオグロブリン血症進行の重要な因子であることが示唆するものである。しかしながら、その他の感染随伴性クリオグロブリン血症において、特異抗原同定の報告はない。特異抗原が B リンパ球の選択的増殖の引き金としてどのように機能するかを解明するためには、複数の特異抗原を同定し、その抗原構造の共通性を比較解析することが、その解明の助けになると考えられる。

2-2. クリオグロブリン血症の進行に関わる宿主 Th1/Th2 免疫応答について

混合型クリオグロブリン血症の発症機序への特異抗原の重要性が示唆される一方で、クリオグロブリン血症の病態は、それだけでは説明できない。感染に起因したリンパ球増殖疾患は、多段階を経て発症すると想定されている (Sautto et al., 2012; Damoiseaux and Cohen Tervaert, 2013)。このメカニズムは、ポリクローナルに活性化した B リンパ球のうち、ある条件下で、少数クローン (オリゴクローナル) の B リンパ球が選択的に増殖し、さらに何らかのメカニズムで単一のクローンが活性化すれば、モノクローナルに B リンパ球が増殖するという、多段階的な選択を経てモノクローナルな増殖に至ると説明される。この仮説を証明するためには、それぞれの選択段階に進むために必要な好適条件を明らかにする必要がある、そのためには、それぞれの段階の時点での宿主免疫状態を評価しなければならない。HCV 関連クリオグロブリン血症では、Th1 に偏向した宿主免疫状態が病態進行に促進的に働くことを示唆されている (Loffreda et al., 2003; Saadoun et al., 2004; Falasca et al., 2007; Fallahi et al., 2012)。し

かし、これら研究の対象は、慢性化したクリオグロブリン血症患者から採取したサンプルであり、病態の増悪化やクリオグロブリンの沈着による血管炎に誘起に関与する免疫状態は評価できても、初期に起こる選択的な増殖が起こる段階での宿主 Th1/Th2 状態を正確に評価しているとはいえない。慢性感染症に随伴して発生する病態であり、臨床検体で病態の初期を評価することは困難である。初期メカニズムを解明するためには、病原体感染に起因した選択的な B リンパ球の増殖を評価できる動物モデルが必要である。

2-3. クリオグロブリン血症で増殖する CD5+ B リンパ球について

HCV 感染によるクリオグロブリン血症患者において、CD5+ B リンパ球がクローナルに増殖することが報告され (Monteverde et al., 1997)、CD5+ B リンパ球が IgM RF 産生細胞であることと示唆される一方で、それに矛盾する結果も報告され (Sautto et al., 2012)、IgM RF 産生細胞の性状は十分に分かっていない。CD5+ B リンパ球は、マウスにおける B-1a 細胞に相当する細胞であり、その増殖、活性化には、Interleukin 5 (IL-5) が必須であるとされる (Takatsu et al., 2009)。Mizuochi らは、HCV 関連クリオグロブリン血症患者血漿中の IL-5 濃度を測定したが、健常者と有意な差がなかったことを報告しており (Mizuochi et al., 2009)、IL-5 の病態への関与は不明である。

3. クリオグロブリン血症の動物モデル

Damoiseaux らの Review (2013) にあるように、クリオグロブリン血症の動物モデルは少なく、3 つの動物モデルが報告されるのみである。1 つ目は、thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を過剰発現したトランスジェニックマウスであり、ポリクローナルなリンパ球の増殖が起こり、Ⅲ型クリオグロブリン血症を発症する (Taneda et al., 2001)。2 つ目のモデルは、クリオグロブリン産生能を持つハイブリドーマ細胞を移植したマウスであり、1 型クリオグロブリン血症を発症する (Gyotoku et al., 1987)。上記 2 つの動物モデルは、主に、クリオグロブリンが沈着したことで誘発される炎症反応の進行メカニズムを解明するために利用されている。これら動物モデルは、Ⅱ型クリオグロブリン血症とはクリオグロブリンを構成する免疫グロブリンの性状が異なり、また、クリオグロブリン血症の発症までに、特異抗原の感作や B リンパ球の選択的増殖の過程を持たない。そのため、上述した

クリオグロブリン血症の初期に起こる B リンパ球の増殖メカニズムの解析に用いることができない。3 つ目の動物モデルは、本研究の第 2 章で確立した *C. hepatica* 感染クリオグロブリン血症マウスモデルである (Aihara et al., 2011)。このモデルの特徴は、感染した全個体において、個体間で発症時期にばらつきがなく II 型クリオグロブリン血症を発症することである。これにより、感染から発症に至るまでの過程を、段階的に分けて評価することが初めて可能になった。臨床検体やこれまでの動物モデルでは、解析することが困難であったクリオグロブリン血症の初期段階を解析するのに適している点が、このモデルを利用する最大の利点である。

4. *Capillaria hepatica* (*C. hepatica*) について

C. hepatica は、げっ歯類を宿主とする線虫で、世界中に分布する。幅広い哺乳類に感染することも報告されている (Redrobe and Patterson-Kane, 2005; Stidworthy et al., 2009; Li et al., 2010)。*C. hepatica* の生活環は独特である。成虫は肝臓に寄生し、肝臓で産卵する。成虫は感染後 20 から 30 日で死亡するが、虫卵は未成熟な状態で肝臓内に留まる。宿主が死亡し、外界に虫卵が放出されると、虫卵の成熟が始まる。外界でおよそ 30 日間かけて幼虫形成卵になると、虫卵は感染可能な状態であり、この幼虫形成卵が経口的にげっ歯類に摂取されることで、感染が成立する。*C. hepatica* の感染実験により、マウスおよびラットの肝臓では、虫体寄生による肝細胞の壊死と線維化が見られるが (Maria De Souza et al., 2006)、クリオグロブリン血症を含めたその他病変の報告はこれまでにない。

5. 本論文の目的

著者は、*C. hepatica* の実験感染マウスでクリオグロブリン血症が発症することを発見し、病原体感染によるクリオグロブリン血症の実験モデルとしての有用性に着目した。本研究の目的は、*C. hepatica* 実験感染によるクリオグロブリン血症のマウスモデルを確立し、その病理発生機序を解明することである。第 2 章では、*C. hepatica* 感染によるクリオグロブリン血症マウスモデルを確立し、その病態解析を行った。第 3 章では、このモデルの利点を生かして、クリオグロブリン血症の発症初期段階におけるリンパ球増殖とクリオグロブリン産生の機序を解明することを目的とした。第 4 章では、急速に増殖した IgM RF 産

生 B リンパ球が速やかに機能的に不活性化していくことに着目し、B 細胞の活性化抑制因子 Stra13 の発現を解析した。

第 2 章 *Capillaria hepatica* 実験感染による II 型クリオグロブリン血症マウスモデルの確立

2-1. 序論

第 2 章は、*C. hepatica* 感染によるクリオグロブリン血症マウスモデルを確立することを目的とし、クリオグロブリンの性状を解析することで、クリオグロブリン血症の分類を行った。

C. hepatica 虫卵は、感染動物の肝臓から分離した段階では未成熟卵であるため、実験室内で幼虫形成卵まで培養する必要がある。品質的に安定した幼虫形成卵を培養し、確実に感染させるための手技を事前に予備検討し、条件を決定した。

虫卵接種後 10,20,30 日における病態を解析することで、クリオグロブリン血症の発症までの病態進行を段階的に評価した。その結果、発症時期、発症程度はマウス個体間で共通しており、接種後 20 日からクリオグロブリンの形成が始まり、接種後 30 日には高度なクリオグロブリン血症を発症することが分かった。

形成されたクリオグロブリンの性状を解析し、クリオグロブリン血症の分類を行なった。脾臓における IgM 陽性細胞数を調べ、IgM と κ および λ 鎖を二重染色することで、増加する B 細胞の性状を調べた。糸球体病変を蛍光免疫染色および透過型電子顕微鏡を用いて病変を詳細に解析し、HCV 感染クリオグロブリン血症による病態と比較を行なった。

2-2. 材料および方法

2-2-1. *C. hepatica* 虫卵の分離、培養

C. hepatica に自然感染した野ネズミの肝臓から虫卵を分離、培養し、感染実験に使用した。感染した肝臓を細切し、金属メッシュ（目開き 500 μ m）を通した後、蒸留水を用いた洗浄、遠心沈降を複数回行った。沈渣を 0.5%ホルマリン添加 PBS で懸濁し、30 $^{\circ}$ C 下で 30 日間培養し、幼虫形成卵を得た。Percoll を用いた密度勾配遠心法により、幼虫形成卵を精製し、顕微鏡明視野下で幼虫形成卵数を計数した。

2-2-2. 実験感染

感染実験には、日本 SLC（浜松、日本）から購入した 8 週齢、雌の ICR マウスを使用した。1 匹当たり幼虫形成卵 8000 個を経口接種し、

接種後日数 (day post inoculation (DPI)) 10、20、30 日後に、5 匹ずつ安楽殺し、以下の解析を行った。陰性対照群には、PBS を経口接種し、30DPI に安楽殺した。

2-2-3. 血清、尿中の腎機能、肝機能マーカーの測定

血清は、Spotchem EZ SP-4430 autoanalyzer (Arkray、京都、日本) を用い、腎機能および肝機能のマーカーの 6 項目 ; Total bilirubin, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), Total protein, albumin, serum creatinine を測定した。安楽殺の前日から 24 時間採尿を行い、尿サンプルを得た。尿は、Bio-rad protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA) により、タンパク質濃度を測定した。

2-2-4. 組織学的検索

剖検時、腎臓、肝臓、および脾臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン中で 24 時間固定した。固定した組織は、常法に従ってパラフィン包埋して、4 μ m 切片を作製した。切片は、hematoxylin and eosin (HE) 染色、periodic acid-Schiff (PAS) 反応、acid fuchsin orange G (AFOG) 染色を行った。

2-2-5. 免疫蛍光染色

腎臓の凍結標本および脾臓のパラフィン標本について、免疫蛍光染色を行った。Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA、希釈 1:500)、ヤギ抗マウス α chain 抗体 (Cappel, Aurora, OH, USA、希釈 1:200)、FITC 標識ヤギ抗マウス μ chain 抗体 (Cappel、希釈 1:400)、ヤギ抗マウス k light chain 抗体 (Bethyl, Montgomery, TX, USA、希釈 1:200)、ヤギ抗マウス λ light chain 抗体 (Bethyl、希釈 1:200)、FITC 標識ラット抗マウス C3 抗体 (Cedarlane, Ontario, Canada、希釈 1:100) を一次抗体として用いた。希釈は、1% 牛血清アルブミン (BSA) 添加 PBS で行った。非標識抗体 (抗マウス α chain, κ light chain, λ light chain 抗体) の可視化は、Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (Invitrogen、希釈 1:1000) または Alexa Fluor 568 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Invitrogen、希釈 1:1000) を二次抗体として用いて行った。標本観察は、蛍光顕微鏡 (FSX100, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて行った。

2-2-6. 透過型電子顕微鏡的検索

腎臓皮質から約 1mm 立方の小片を作り、2.5%グルタルアルデヒド溶液で前固定、1%四酸化オスミウム溶液で後固定を行い、エポン樹脂に包埋した。超薄標本は、酢酸ウラニル、クエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡（H-300, Hitachi, Tokyo, Japan）で観察した。

2-2-7. 血清クリオグロブリンのウエスタンブロット解析

血液は、37°Cに加熱したシリンジを用いて心採血により採取し、37°C下で凝血させ、血清を採取した。血清サンプルの半量を用いて、クリオグロブリン形成試験を行った。既報の方法（Winfield, 1983）に従って、血清を 4°C下で 1 週間保存し、寒冷沈降物の有無を観察した。遠心後、寒冷沈降物を冷 PBS で 3 回洗浄し、100 μ l の 0.1%SDS 溶液に再可溶化し、ウエスタンブロット解析の試料とした。試料を等量の Laemmli サンプルバッファーと混合し、5-20%ポリアクリルアミドゲル（e-Pagel, Atto, Tokyo, Japan）で電気泳動した。ゲルを PDVF メンブレンに転写し、免疫蛍光染色と同様の抗体（抗マウス IgG, α chain, μ chain, κ light chain, and λ light chain）を一次抗体として用い、4°C下で一晩反応させた。抗体の希釈は、5%スキムミルク添加 PBS で行い、それぞれ、1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:2000, 1:2000 の希釈倍率で行った。その後、二次抗体に 5%Skim milk 添加 PBS で 1:2000 に希釈した HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体（Dako, Glostrup, Denmark）を使用し、室温で 1 時間静置した。バンドは ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で可視化した。

2-2-8. ELISA による血清 IgM rheumatoid factor 値の測定

血清中の IgM rheumatoid factor 濃度は、市販の ELISA キット（mouse IgM rheumatoid factor ELISA kit, Shibayagi, Gunma, Japan）で測定した。

2-2-9. 統計処理

すべての結果は、平均値 \pm SD で示した。2 群間の平均値の比較は、Student's t-test により行なった。多群間の平均値の比較は、one way ANOVA を行った後、Tukey's test を行った（ $P<0.05$ ）。

2-3. 結果

2-3-1. *C. hepatica* 感染マウスの臨床的特徴

血清における AST 値および ALT 値は、10、20DPI の群で著しく上昇していた。一方、血清クレアチニン値は、実験期間を通じて変化がなかった (Table 2-1)。また、10、20 および 30DPI のすべての群で、タンパク尿は観察されなかった。

2-3-2. クリオグロブリンの検出および性状解析

4°C 下で 1 週間静置した血清サンプルでは、感染マウスの 30DPI の血清においてのみ、寒冷沈降物の形成を可視的に確認した (Figure 2-1)。

次に、寒冷沈降物のウエスタンブロット解析を行なった。20DPI のサンプルでは、 α , μ heavy chain と κ light chain が検出された (Figure 2-2)。30DPI のサンプルでは、 α , μ heavy chain と κ light chain が同様に検出され、 γ heavy chain と λ light chain がわずかに検出された。陰性対照群のサンプルでは、 μ heavy chain と κ light chain がわずかに検出され、10DPI のサンプルでは、 κ light chain のみわずかに検出された。

2-3-3. 血清中 IgM rheumatoid factor の測定

血清 IgM rheumatoid factor 値を、ELISA で測定した。30DPI における血清 IgM rheumatoid factor 値は、陰性対照群の値の 10 倍以上に上昇した (Figure 2-3)。一方、10、20DPI における血清 IgM rheumatoid factor の値は、陰性対照群の値と比較し、有意な差は認められなかった。

2-3-4. 脾臓で増加する B 細胞の性状解析

感染マウスの脾臓で増加する B 細胞の性状を明らかにするため、脾臓切片を用いて、 μ heavy chain と κ light chain または μ heavy chain と λ light chain による二重蛍光免疫染色を行なった。感染マウスの脾臓では、 μ heavy chain と κ light chain に二重陽性を示す細胞 (IgM+ κ +細胞) が著しく増加していた (Figure 2-4A)。脾臓における IgM+ κ +細胞数は、20DPI において、陰性対照群での細胞数に比べ有意に増加しており、30DPI において、その細胞数は減少した (Figure 2-4B)。 μ heavy chain と λ light chain に二重陽性を示す細胞 (IgM+ λ +細胞) は、陰性対照群、および 10DPI の脾臓ではほとんど観察されなかった。

20DPI および 30DPI の脾臓においてはわずかに増加していたが、その細胞数は、IgM+ κ +細胞数と比較してごく少数であった (Figure 2-4B)。

2-3-5. 肝臓の組織学的解析

C. hepatica の肝臓への寄生は、幼虫形成卵を接種した全てのマウスで、同程度に確認された。10DPI の肝臓では、少数の *C. hepatica* 虫体が確認でき、虫体周囲に、好酸球浸潤を伴う肝細胞の巣状壊死病変が観察された。20DPI の肝臓では、10DPI の肝臓に比べ、観察される *C. hepatica* 虫体数が増加し、肝細胞の壊死領域が拡大し、炎症反応が高度化していた。虫体周囲では、マクロファージおよび多核巨細胞からなる肉芽腫性病変が観察された。30DPI の肝臓では、高度な肝細胞の壊死が観察され、病変の一部は結合組織に置換されていた (Figure 2-5A-D)。虫体数は 20DPI と同程度かやや少なく、それに加え、多量の虫卵が観察された (Figure 2-5A-D)。

2-3-6. 腎臓の組織学的解析

20DPI および 30DPI の腎臓では、びまん性に糸球体が腫大しており、糸球体への PAS 陽性物質の沈着が観察された (Figure 2-5E)。10DPI および陰性対照群の腎臓では、糸球体に著変は見られなかった。20DPI では、糸球体への PAS 陽性物質の沈着は、糸球壁に分節性に観察されるのみであった。30DPI では、糸球体への PAS 陽性物質の沈着は、糸球壁に全節性に高度に沈着し、一部で毛細血管内腔に塞栓する像も観察された (Figure 2-5F)。基質沈着により、糸球壁は著しく肥厚していた。基質の塞栓、および糸球壁の肥厚により、血管腔は狭窄していた (Figure 2-5F)。30DPI の腎臓の AFOG 染色により、フクシン陽性基質の沈着が糸球壁および血管腔内に観察された (Figure 2-5G)。PAS 陽性基質とフクシン陽性基質の沈着部位は一致していた。

10、20、30DPI の全てのマウスで、糸球体への炎症細胞の浸潤や、糸球体のボウマン嚢への癒着といった糸球体病変は観察されなかった。尿細管間質には、炎症や線維化といった異常を認めなかった。

次に、メサングウム細胞数および糸球体径の変化を経時的に測定した。メサングウム細胞数は、30DPI の糸球体で、陰性対照群に比べ有意に増加していた (Figure 2-5H)。糸球体径は、経時的に増加し、30DPI における径は、陰性対照群の 1.4 倍に増加した (Figure 2-5I)。

2-3-7. 糸球体への免疫グロブリンおよび補体 C3 の沈着

糸球体への免疫グロブリン (α , γ and μ heavy chain, κ , λ light chain) および補体 C3 の沈着を、免疫蛍光染色により評価した。全ての免疫グロブリンおよび C3 は、陰性対照群の糸球体に、ごくわずかに沈着しており、その沈着は、10、20DPI の糸球体では増加していた。30DPI の糸球体では、 α および μ heavy chain が著しく沈着していたが、 γ heavy chain の沈着は軽度であった (Figure 2-6ABC)。 κ light chain の沈着が高度である一方、 λ light chain の沈着は軽度であった (Figure 2-6DE)。この染色態度から、沈着する免疫グロブリンが、血清クリオグロブリンと同じ構成であることが示唆された。これら免疫グロブリンの沈着は、糸球壁および血管内腔であり、顕微鏡下で観察された PAS 陽性、フクシン陽性物質の沈着様式と一致していた。

30DPI の糸球体では、糸球壁への C3 沈着が軽度にみられた (Figure 2-6F)。

2-3-8. 糸球体の電子顕微鏡学的解析

30DPI の糸球体について、超微形態学的解析を行なった。いくつかの毛細血管腔は、高電子密度の基質により塞栓していた (Figure 2-7A)。同様の基質は糸球壁内皮下にも沈着しており、糸球壁は肥厚していた。これら基質は、メサンギウム領域では観察されなかった。高倍率で、この基質は、細繊維物 (13.8-34.5nm) が層板状の構造をとっていた (Figure 2-7B)。足細胞に異常はみられず、足突起およびスリット膜は保存されていた。

2-4. 考察

第 2 章では、ICR マウスに *C. hepatica* を感染させることにより、感染した全マウスで II 型クリオグロブリン血症が発症することを示した。発症時期、発症程度は、個体間で共通しており、感染による病態と連動して、クリオグロブリン血症の病態が進行していたことから、感染に起因して起こる II 型クリオグロブリン血症のマウスモデルを初めて確立したと結論づけた。これまでに報告のあるクリオグロブリン血症動物モデル (Gyotoku et al., 1987; Taneda et al., 2001) との最大の違いは、病原体感染に起因して発症する点である。動物におけるクリオグロブリン血症は、イヌ (Braund et al., 1979)、ネコ (Hickford et al., 2000)、そしてウマ (Sabnis et al., 1984; Maede et al., 1991)

で報告があるが、病原体感染に起因することが証明された例はない。本章の結果から、*C. hepatica* は、感染したマウスに高率にクリオグロブリン血症を発症させる寄生虫であると示された。従来、実験動物において感染した宿主に高率にクリオグロブリン血症を発症させる病原体はなく、*C. hepatica* 実験感染マウスモデルは、クリオグロブリン血症の病態解析を行うための重要な実験モデルになりうる。

このモデルでは、接種後 20 日の脾臓で IgM+k+細胞が増加し、接種後 20 日から 30 日の間で、クリオグロブリン形成が進行している。よって、接種後 20 日前後に IgM RF 産生細胞の増殖が起こり、その後短期間のうちに病態は進行すると考えられる。HCV 感染患者の臨床検体の解析、既存の動物モデルを使った解析では評価することができなかった課題は、クリオグロブリン血症の初期段階で起こる IgM RF 産生細胞の選択的増殖のメカニズムの解明である。このモデルの最大の利点は、クリオグロブリン血症の初期段階における病態を解析できることである。

感染マウスで形成されたクリオグロブリンは、 μ heavy chain、 α heavy chain および κ light chain で形成されており、 λ light chain はほとんど含まれていなかった。血清中で IgM RF 濃度が上昇していたことを総合して判断すると、クリオグロブリンは、リウマトイド活性を持つモノクローナルな IgM と IgA から構成されていたと考えられる。このことから、本モデルにおけるクリオグロブリン血症は、II 型に分類でき、HCV 感染をはじめとする、感染症に随伴して発症するクリオグロブリン血症と類似の性状を持つクリオグロブリンによる病態であることが示された。

クリオグロブリンの性状から、クリオグロブリン産生細胞は、IgM+k+ B リンパ球であることが想定される。感染マウスでは、脾臓の著しい腫大が見られ、IgM+k+ B リンパ球の増殖が見られたことから、本モデルにおける IgM RF 産生細胞は、脾臓で増殖している IgM+k+ B リンパ球であると考えられた。第 3 章において、さらに詳細に IgM RF 産生 B リンパ球の性状を解析することとした。

感染マウスの糸球体に対する免疫蛍光染色の結果から、糸球体に沈着した免疫グロブリンは、血清中クリオグロブリンと同様の組成を持つことが示された。また、感染マウスの糸球体の沈着物は、超微形態学的に細線維の層板状構造として観察された。これは、クリオグロブリン血症患者の糸球体病変の代表的な超微形態学的所見と一致する

(Su et al., 2002)。これら所見から、糸球体病変をクリオグロブリン糸球体腎症と診断した。この病理像は、HCV 関連クリオグロブリン血症での病理像と類似している。

興味深いことに、感染マウスでは、機能的に腎機能に障害はなく、形態学的に足細胞の障害も認められなかった。さらに、補体 C3 の沈着や炎症細胞の浸潤もなかったことから、クリオグロブリンの沈着があるにもかかわらず、それに引き続いた炎症反応が誘起されなかったことが示唆される。クリオグロブリン血症患者の多く場合では、クリオグロブリンの沈着は血管炎を誘起し、膜性増殖性糸球体腎炎に進行する (Scott et al., 1982; Ferri et al., 2004)。本モデルにおいて、クリオグロブリンの沈着があるにもかかわらず炎症反応が誘起されないことは、このモデル特有の性質であると考えられるが、今回の解析では、その理由を明らかにすることはできなかった。

本章の内容は、以下に公表した。

AIHARA, N., CHAMBERS, J.K., HOSONO, K., KAMIIE, J. and SHIROTA, K., 2011. An experimental type II mixed cryoglobulinemia with renal glomerulopathy in ICR mice triggered by *Capillaria hepatica* infection. *Histology and Histopathology*, **26**(12), pp. 1519-1529.

图表

Table 2-1 Serum tests in the infected mice.

	Reference	Day 10	Day 20	Day 30
Total bilirubin (mg/dl)	0.6	0.3±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
AST (IU/L)	57.4	672.0±294.5	849.5±248.8	216.3±470.1
ALT (IU/L)	27.1	367.3±190.0	707.0±275.5	146.0±293.0
Total protein (g/dl)	4.1	5.3±0.2	5.3±0.4	5.8±1.5
Alubmin (g/dl)	1.9	2.6±0.2	2.5±0.1	2.9±0.;8
Creatinine (mg/dl)	0.2	0.5±0.1	0.4±0.1	0.5±0.2

Data are expressed as means ± SD of results obtained from 3 to 4 mice in each group.

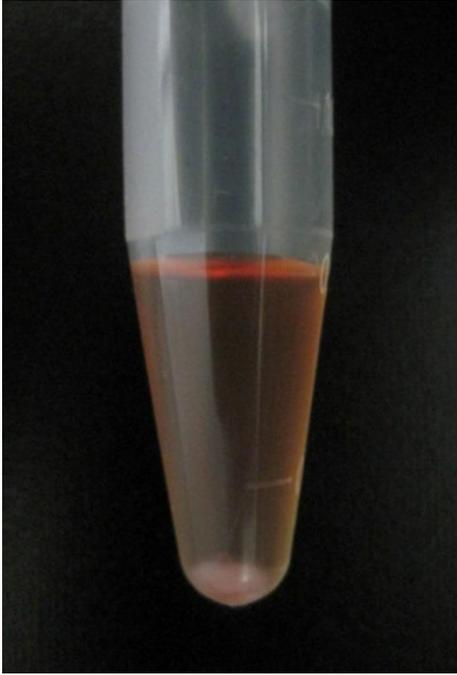


Figure 2-1. Serum cryoprecipitate in the serum sample collected at 30DPI.

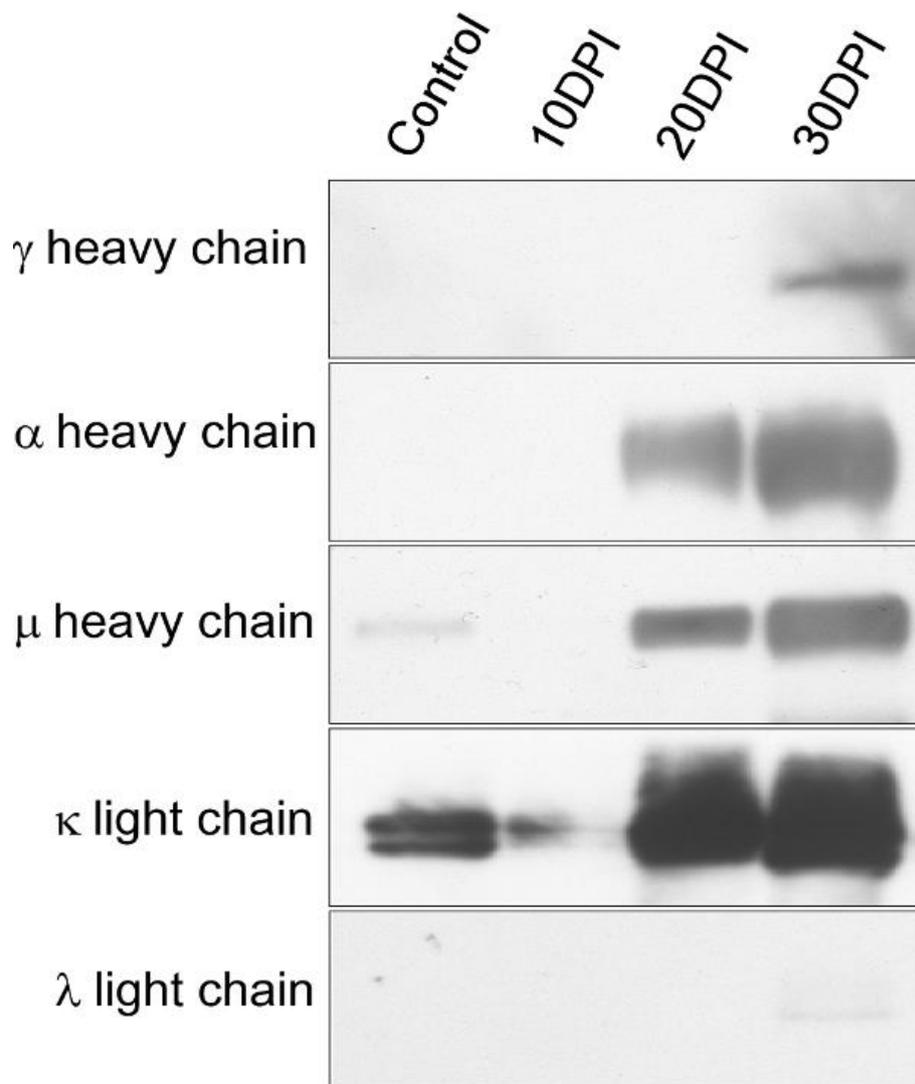


Figure 2-2. Serum cryoprecipitates of immunoglobulins (Igs) from the infected mice. Western blotting analysis revealed that the cryoprecipitates of α and μ heavy chains, as well as κ light chains in serum, significantly increased at 20 and 30 days post injection (DPI).

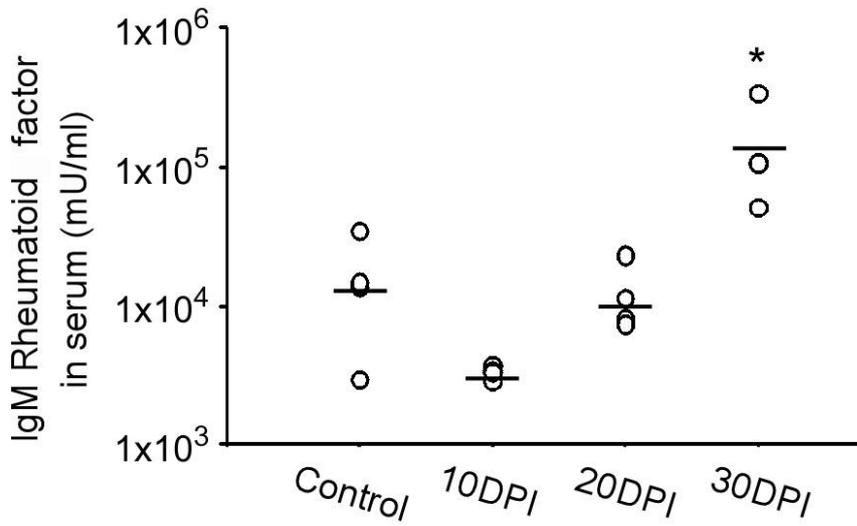


Figure 2-3. Serum levels of IgM rheumatoid factor increased in the infected mice. Quantitative analysis of IgM rheumatoid factor by ELISA showed a significant increase at 30 DPI. (* $P < 0.05$ the experimental group vs. the control group; $n = 3-4$).

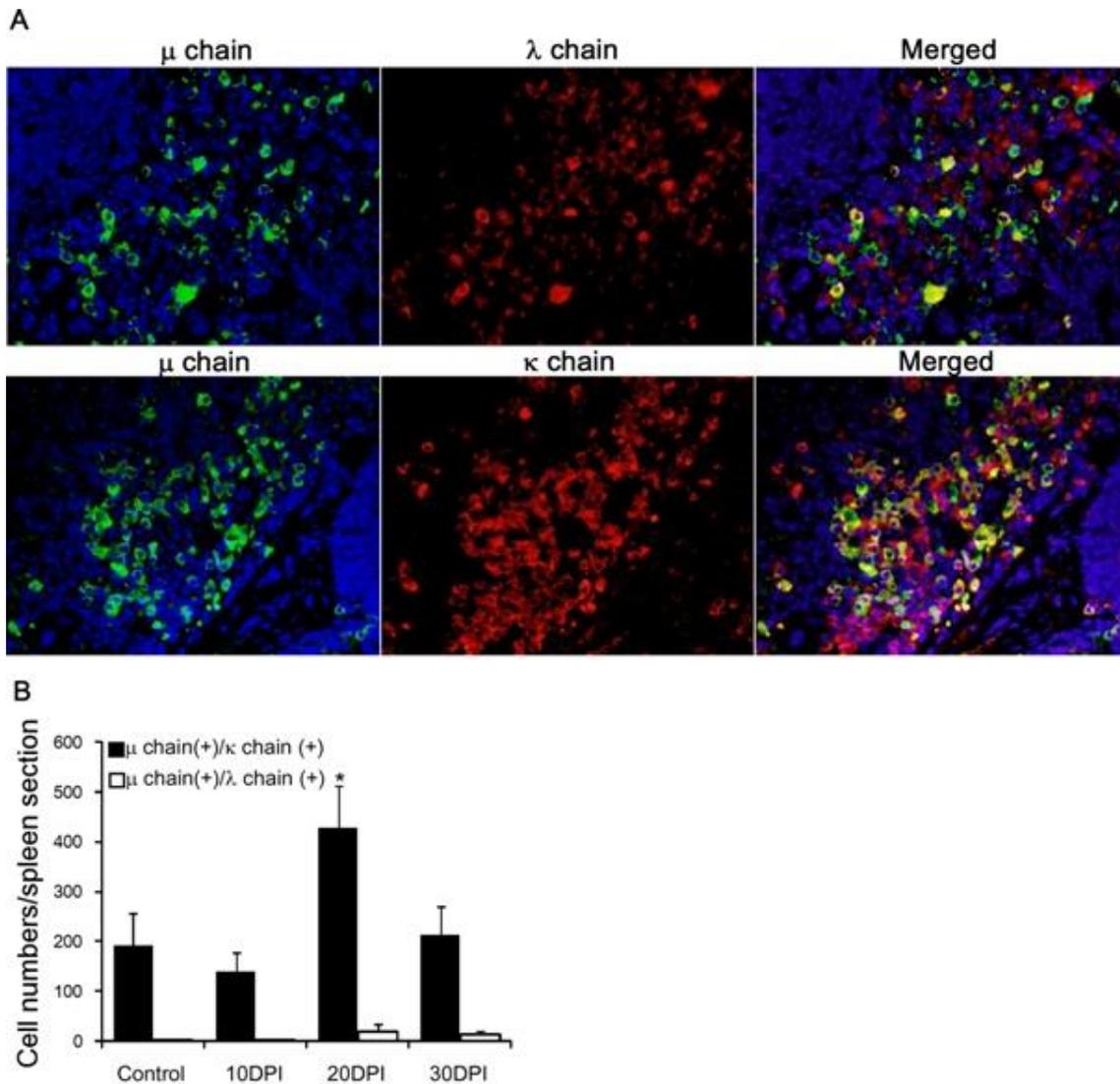


Figure 2-4. The number of IgM κ B cells increased in the spleens of the infected mice. A: Immunofluorescence staining showed numerous double-positive cells for μ heavy (FITC) and κ light chains (Alexa fluor 568) in the spleen at 20 DPI, but a small number of double-positive cells for μ heavy and λ light chains (Alexa fluor 568) in the same section. DAPI was used to identify the nuclei. B: The number of double-positive cells for μ heavy and κ light chains significantly increased at 20 DPI (* $P < 0.01$, the experimental group vs. the control group; $n = 8$). The number of double-positive cells for μ heavy and λ light chains slightly increased at 20 and 30 DPI.

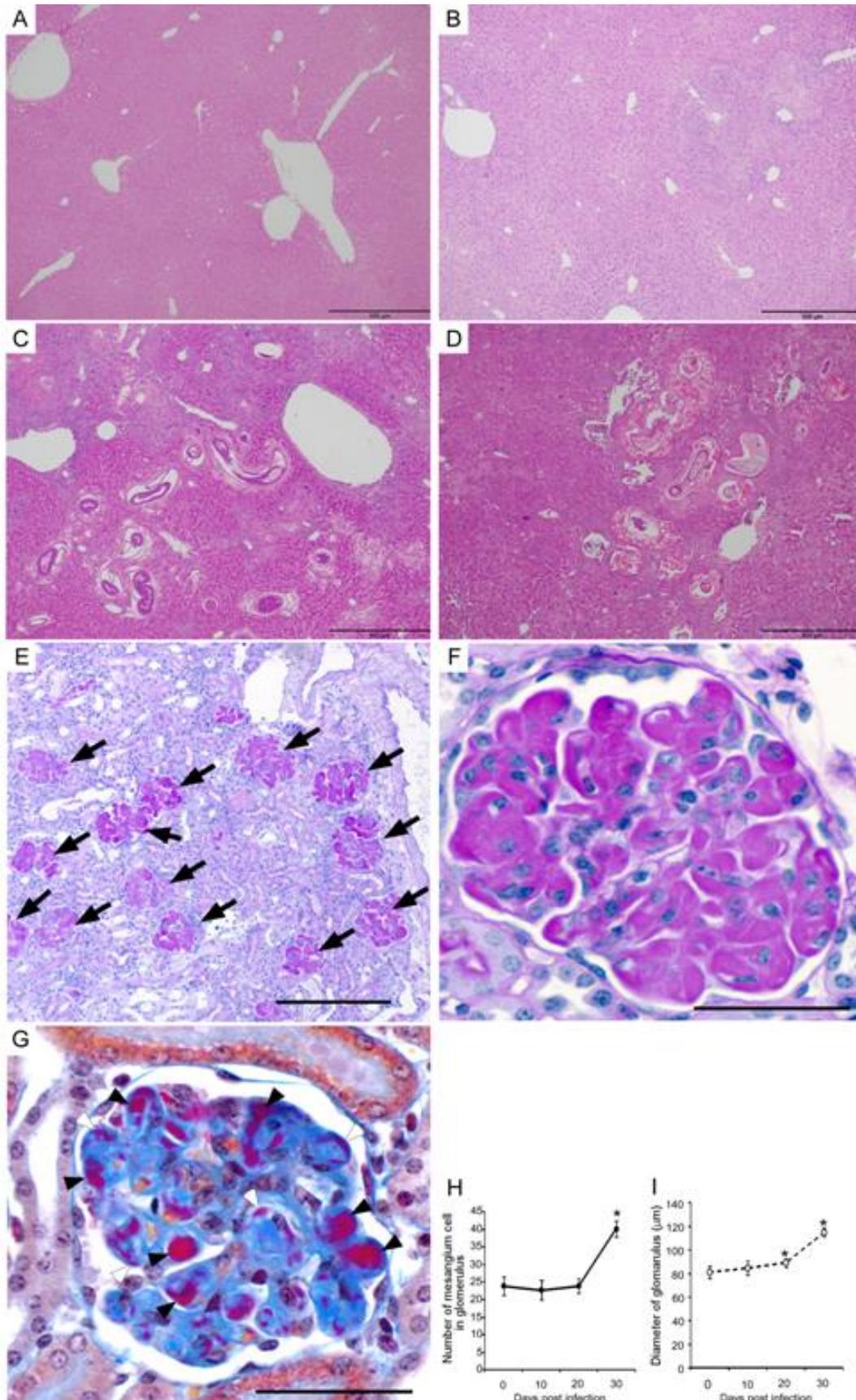


Figure 2-5. Histological examination revealed *C. hepatica* infection in the liver and glomerulonephritis. A-D: HE-stained liver section from an uninfected mouse (A) and an infected mouse at 10 DPI (B), 20DPI (C), and 30 DPI (D). Adult worms are apparent at 20DPI and a large accumulation of eggs are apparent at 30DPI (scale bar, 500 μm). E and F: PAS reaction in a kidney section from an infected mouse at 30 DPI. Diffuse and marked glomerular expansion was observed (arrows). PAS-reactive materials were deposited in the capillary walls and filled the lumina (scale bar, 200 μm , 50 μm). G: AFOG-stained kidney section from an infected mouse at 30 DPI. Fuchsin-stained materials were observed as granular deposits in the capillary walls (black arrow heads) and intracapillary emboli (white arrow heads) (scale bar, 50 μm). H: The number of glomerular mesangial cells was counted in the PAS-reactive sections prepared from the infected mice. Mesangial cells significantly increased at 30 DPI (* $P < 0.01$, the experimental group vs. the control group; $n = 40$). I: Glomerular diameter was measured in the PAS-reactive sections prepared from the infected mice. The diameter increased gradually from day 20. (* $P < 0.01$, the experimental group vs. the control group; $n = 40$).

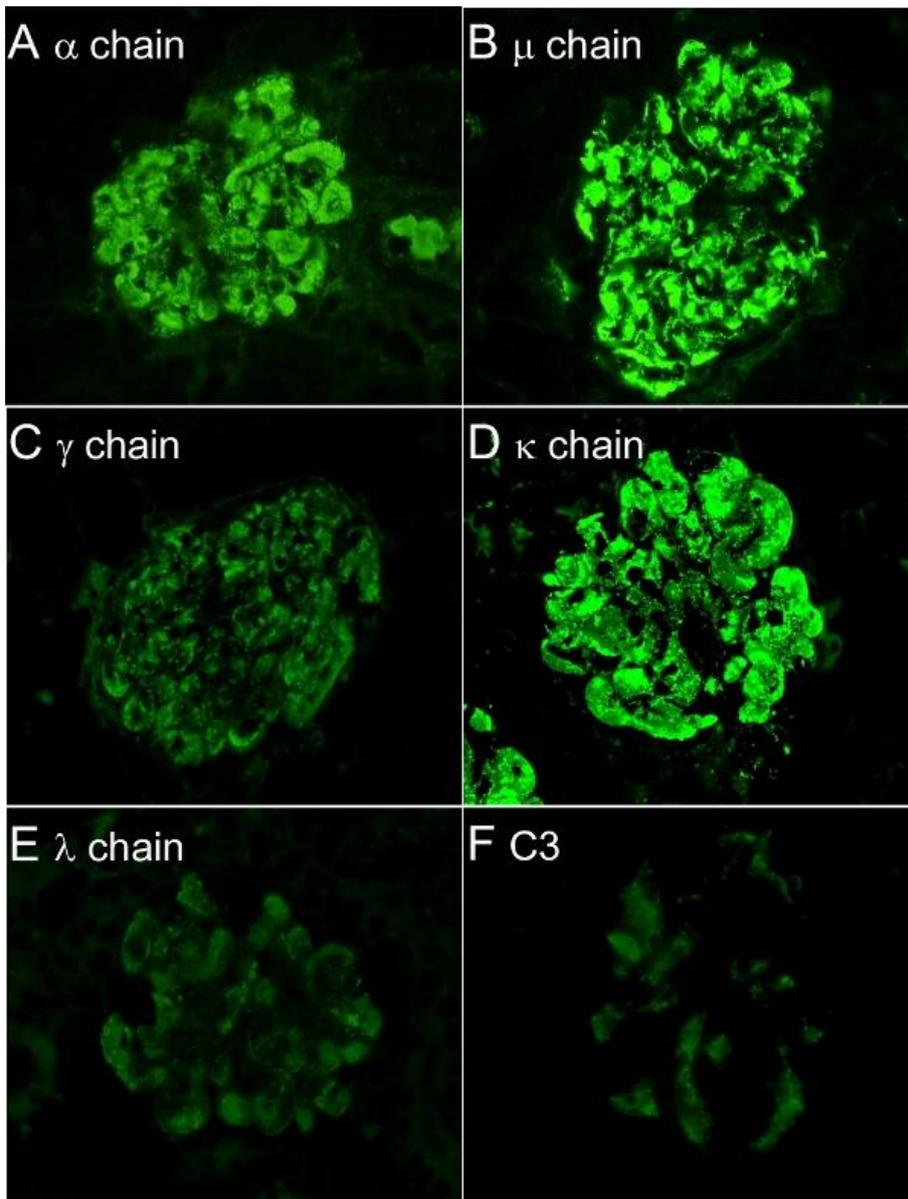


Figure 2-6. Immunofluorescence staining revealed marked glomerular deposition of Igs in the infected mice at 30 DPI. A, B and C: Immunofluorescence staining of Ig heavy chains (α , μ , and γ) revealed dominant glomerular deposition of α and μ chains. D and E: Glomerular deposition of Ig light chains was detected by immunofluorescence staining. Dominant deposition of κ light chains relative to λ light chains was observed. F: Immunofluorescence staining showed a small number of reactive signals for C3 in the glomerulus.

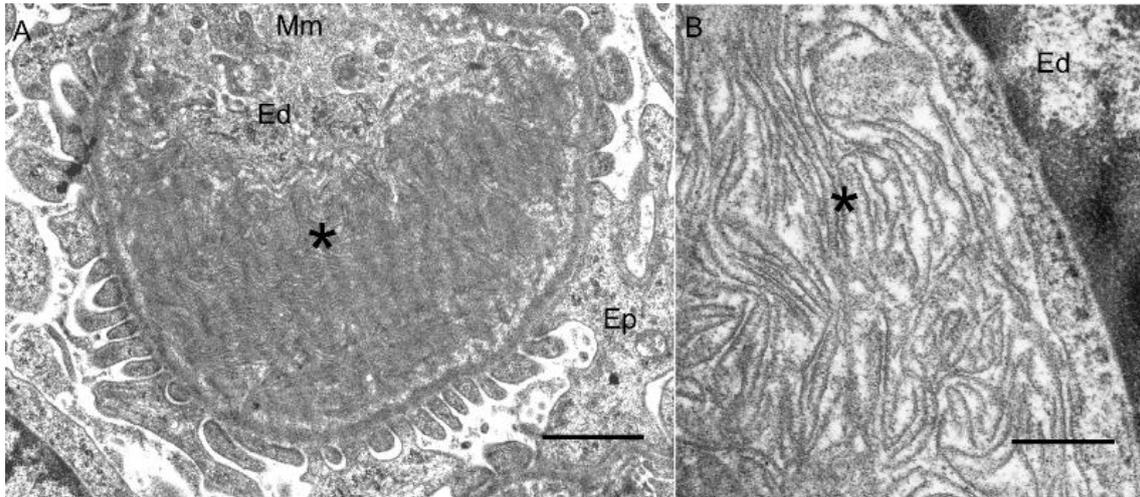


Figure 2-7. Electron microscopy showed ultrastructural changes in the glomeruli of the infected mice at 30 DPI. A: The capillary lumen was occluded by emboli of the electron dense materials (asterisk) (Scale bar, 1 μ m). B: At high magnification, the materials in the capillary lumen consisted of stacks of twisted microtubular structures (13.8–34.5 nm in diameter) (scale bar, 200 nm). Mm, Mesangial matrix; Ed, endothelial cell; Ep, epithelial cell.

第3章 クリオグロブリン血症発症初期段階におけるBリンパ球の選択的増殖のメカニズムの解明

3-1. 序論

第2章では、*C. hepatica* 感染によるクリオグロブリン血症マウスモデルを確立した。感染マウスでは、個体間でばらつきが少なく、感染後20日からクリオグロブリン血症の病態が急速に進行する。第3章では、この利点に着目して、クリオグロブリン血症初期段階における病態の解明を目的とした。

第1章緒言で述べたとおり、クリオグロブリン血症の病態機序において、初期段階におけるメカニズムは、最も不明な点が多い部分であり、特異抗原の存在、IgM RF 産生細胞の性状、病態進行に必要な好適条件は、十分に検討されているとはいえない。

最初に、クリオグロブリンを構成するIgMが認識する*C. hepatica* 抗原を解析することにより、特異抗原の存在を調べた。

IgM RF 産生Bリンパ球の性状解析を行なう際には、HCV感染クリオグロブリン血症患者のIgM RF 産生細胞におけるCD5発現の有無について矛盾する報告があることに着目した (Sautto et al., 2012)。CD5およびB220/CD45Rの発現程度により、脾臓で増殖するIgM+ κ +Bリンパ球をB-1a, B-1b, B-2細胞の3集団に分類した。感染マウス脾臓では、IgM+ κ +B-1a細胞が増殖していることが示されたため、単離した脾臓B-1a細胞を用いた*in vitro*試験を行なうことで、IgM RF 産生細胞の性状を明らかにした。

次に、宿主Th1/Th2応答がクリオグロブリン血症の病態に与える影響を評価するために、クリオグロブリン血症が急速に進行している時期である接種後24日の宿主Th1/Th2状態を調べた。そして、*C. hepatica* 感染によるTh1/Th2応答性が異なることが明らかとなった2系統のマウス (BALB/c および C57BL/6) で、感染実験を行ない、病態を比較した。

最後に、B-1a細胞の増殖、活性化因子であり、感染マウスの病態解析からも関与が示唆されたサイトカインであるIL-5に注目した。異なる系統での血清中のIL-5濃度を測定し、クリオグロブリン血症の病態程度との関連を調べた。さらに、野生型では、*C. hepatica* 感染ではIL-5上昇の見られなかったC57BL/6マウスを遺伝的背景に持つIL-5過剰発現トランスジェニックマウスを使った感染実験を行い、IL-5が

添加されることによるクリオグロブリン血症の病態の変化を解析した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. *C. hepatica* 虫卵の分離、培養

C. hepatica は、Fischer 344 ラットに感染させることで、継代、維持を行った。第 2 章の方法に従い感染ラットの肝臓から虫卵を分離、培養し、幼虫形成卵を得た。幼虫形成卵を精製し、顕微鏡明視野下で幼虫形成卵を計数した。

3-2-2. 動物

8 週齢、雌の BALB/c マウス、C57BL/6 マウスを、日本 SLC (浜松、日本) から購入した。また、遺伝的背景に C57BL/6 をもち、マウス IL-5 遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウス (IL-5tgC57BL/6, Tominaga et al., 1991) を理研バイオリソースセンター (筑波、日本) から購入した。

3-2-3. 使用抗体

mouse CD5 (53-7.3, APC-conjugated), CD45R/B220 (RA3-6B2, Alexa Fluor 700-conjugated), k light chain (187. 1, PE-Cy7-conjugated), IL-5 receptor (IL-5R) (T21, PE-conjugated), CD4 (RM4-5, PE-Cy5-conjugated), IFN- γ (XMG1.2, FITC-conjugated), IL4 (11B11, PE-conjugated) に対するモノクローナル抗体を BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) から購入した。mouse CD5 (53-7.3, FITC-conjugated), CD45R/B220 (RA3-6B2, PE-conjugated) に対するモノクローナル抗体を eBioscience (San Diego, CA, USA) から購入した。抗 mouse MARCO (ED31) モノクローナル抗体 AbD Serotec (Oxford, UK) から購入した。ヤギ抗マウス μ chain 抗体 (FITC-conjugated) を Cappel から購入した。ヤギ抗マウス k light chain 抗体およびヤギ抗マウス λ light chain 抗体を Betyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA) から購入した。Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG、Alexa Fluor 568-conjugated rabbit anti-goat IgG および Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rat IgG を life technologies (Gaithersburg, Maryland, USA) から購入した。HRP-conjugated rabbit anti-goat

antibody を Dako (Glostrup, Denmark) から購入した。

3-2-4. *C. hepatica* 感染

8 週齢、雌のマウス (BALB/c, C57BL/6, IL-5tgC57BL/6) に、幼虫形成卵 1000 個または 5000 個を経口接種した。末梢血中の好酸球数カウントは、5000 個接種マウスから採取した血液を用いた。その他試験には、1000 個接種マウスから得たサンプルを用いた。陰性対照群には、0.2ml の PBS を経口接種した。12, 16, 20, 24DPI で解剖し、血液、腎臓、肝臓、脾臓を採材した。

3-2-5. クリオグロブリン形成試験

第 2 章と同様の方法により、クリオグロブリン形成試験を行なった。寒冷沈降物を 100 μ l の 0.1%SDS 溶液に再可溶化し、クリオグロブリン溶液とした。タンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit を用いて測定した。

3-2-6. *C. hepatica* 虫体の分離、回収

肝臓からの *C. hepatica* 虫体の分離は、既報の方法を参考に、酵素を用いた消化法で行なった (Taira et al., 2003; Taira et al., 2013)。24DPI のマウスおよびラットの肝臓を、37 $^{\circ}$ C に加温した HCl-pepsin 溶液 [0.37% HCl, 1% pepsin (1:10000) in distilled water] 中で攪拌した。15 分毎に 1 分間静置し、肝臓から遊離した虫体を含む上清を金属メッシュ (目開き 250 μ m) に通し、遊離してきた虫体を回収した。回収した虫体は、蒸留水で複数回洗浄し、肝臓残渣を除去した (Figure3-1)。

3-2-7. *C. hepatica* 可溶性画分 (*C. hepatica* soluble fraction (ChSF)) の調整

3-2-6 で分離した虫体を、冷 PBS 中で計 10 分間、超音波処理し、4 $^{\circ}$ C 下、15000g で 15 分間遠心した。上清を 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを、*C. hepatica* 可溶性画分 (*C. hepatica* soluble fraction (ChSF)) とした。可溶性画分のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit を用いて測定した。

3-2-8. 組織学的検索

剖検時、腎臓、肝臓、脾臓および骨髄を採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋標本(FFPE)および凍結標本を作製した。パラフィン包埋した試料から 4 μ m 切片を作製し、hematoxylin and eosin (HE)染色、periodic acid-Schiff (PAS)反応、Congo red 染色を行った。

3-2-9. 免疫蛍光染色

血清およびクリオグロブリン中 IgM の虫体に対する反応性の解析は、24DPI のラット肝臓の FFPE 切片を用いた免疫蛍光染色で行なった。一次抗体として血清サンプルまたはクリオグロブリン溶液を用い、一次抗体中 IgM の結合部位の可視化は、二次抗体にヤギ 抗マウス μ chain 抗体(FITC-conjugated)を用いることで行なった。糸球体への IgM 沈着量の評価は、腎臓の FFPE 標本にヤギ 抗マウス μ chain 抗体(FITC-conjugated)を反応させることで行なった。脾臓の免疫蛍光染色解析には、凍結切片を用いた。蛍光の検出には、蛍光顕微鏡 (FSX100, Olympus, Tokyo, Japan) または共焦点顕微鏡 (Leica SP5, Leica Microsystems, Weltzar, Germany) を使用した。

3-2-10. 脾臓リンパ球のフローサイトメトリー (FCM) 解析

脾臓を、10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培地 (以下、FCS 添加 RPMI1640 培地) 中で、細切り、ナイロンメッシュ (目開き 70 μ m) を通した。溶血処理後、Percollを用いた密度勾配遠心法(25 $^{\circ}$ C下、300g、30分)で脾臓リンパ球を回収した。1サンプルあたり、 1×10^6 cell を使い、上記の抗体で染色し、パラホルムアルデヒド固定後、フローサイトメーター (EC800 Cell Analyzer, SONY, Tokyo, Japan) で測定した。細胞は、forward scatter (FSC)および side scatter (SSC)でリンパ球をゲーティングした。

3-2-11. B-1a 細胞の単離

陰性対照群または 24DPI の BALB/c マウス脾臓から B-1a 細胞を単離した。3-2-10 フローサイトメトリー解析と同様の方法で、脾臓リンパ球を分離し、CD19 標識磁気ビーズ (Miltenyi biotec, Auburn, CA, USA) を用いて、CD19+細胞を濃縮した。その後、回収した CD19+細胞を FITC 標識 CD5 抗体、PE 標識 CD45R/B220 抗体で染色した。CD5 および CD45R/B220 の両方に陽性である B-1a 細胞集団をセルソーター (BD FACSAria III, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) で

単離した。B-1a 細胞集団を、*In vitro* 試験系および RT-PCR のサンプルとして用いた。

3-2-12. *In vitro* における B-1a 細胞刺激試験

3-2-11 で単離した B-1a 細胞を 5 μ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen) で蛍光標識し、*In vitro* 試験に用いた。CFSE 標識した B-1a 細胞は、1 well あたり 2×10^5 cell/200 μ l の細胞密度になるように FCS 添加 RPMI1640 培地で調整し、96 well プレートで培養した。培養開始直後には、各 well に *C. hepatica* 可溶性画分をそれぞれ 0, 1, 10, 100 μ g/ml の濃度で添加し、その後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件で、1 日から 3 日間培養した。培養後、遠心分離し、培養上清は、上清中のマウス IgM を検出するため、ウエスタンブロット解析を行なった。回収した B-1a 細胞の半数は、IgM 可変領域 mRNA を評価するため、RT-PCR 解析に使用し、残りの半数は、細胞増殖の評価のために、CFSE 蛍光をフローサイトメトリーで検出した。

3-2-13. ウエスタンブロット解析

クリオグロブリン溶液中 IgM と *C. hepatica* 虫体抗原との反応性の解析は、電気泳動サンプルに *C. hepatica* 可溶性画分、一次抗体にクリオグロブリン溶液、二次抗体に抗マウス μ heavy chain 抗体を用いたウエスタンブロット解析により行なった。*C. hepatica* 可溶性画分を 1 レーンあたり 10 μ g 泳動し、第 2 章 2-2-7 と同様の手技で、反応を検出した。

3-2-12 の *In vitro* 試験における細胞培養上清中の産生 IgM の検出は、1 サンプルあたり 10 μ l の培養上清を電気泳動サンプルとし、抗マウス μ heavy chain 抗体を用いたウエスタンブロット解析により行なった。

3-2-14. μ heavy chain 可変領域 (V_HDJ_H-C μ) の RT-PCR 解析

分離直後の脾臓リンパ球または 3-2-12 の *In vitro* 試験で得た B-1a 細胞サンプルから、Total RNA を RNeasy Plus Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) で抽出した。Oligo dT primers (Promega, Madison, WI, USA) と Sensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen) を使用し cDNA を作製した。PCR は、TaKaRa EX Taq (TaKaRa BIO, Shiga, Japan) を使用し、94 $^{\circ}$ C 10 分、94 $^{\circ}$ C 1 分、55 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1.5 分、72 $^{\circ}$ C 10 分、40 サイクルとした。Sense mouse IgM variable region primer

(Vh FR1) として 5'-SARGTNMAGCTGSAGSAGTC-3'、 Antisense mouse IgM variable region primer (Cmu) として 5'-CTTATCAGACAGGGGGCTCT-3' を用いた (Wang et al., 2000; Casey et al., 2011)。 Sense mouse GAPDH primer として 5'-TGTTCCCTACCCCAATGTGT-3' を、 Antisense mouse GAPDH primer をして 5'- TGGGTGCAGCGAACTTTATT -3' を用いた (Kusakabe et al., 2007)。

3-2-15. 感染時、非感染時の Th1/Th2 バランスの評価

BALB/c マウス、C57BL/6 マウスについて、脾臓における Th1、Th2 細胞集団をフローサイトメトリー解析により評価した。陰性対照群または 24DPI のマウス脾臓から、脾臓リンパ球を 3-2-10 と同様の方法で分離し、50 µg/ml PHA-M (Cosmo Bio Co. LTD., Tokyo, Japan) を添加した RPMI1640 培地で 12 時間培養した。その後、5 µg/ml brefeldin A (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加し、その 6 時間後、細胞を回収した。細胞内のサイトカインを検出するため、回収した細胞を、PE-Cy5 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 IL-4 抗体、FITC 標識 IFN-γ 抗体で染色し、フローサイトメトリー (EC800 Cell Analyzer) で解析した。リンパ球を FSC および SSC でゲーティングし、IFN-γ+CD4+ 細胞を Th1 細胞、IL4+CD4+ 細胞を Th2 細胞と定義した。

3-2-16. 末梢血における好酸球数の計測

末梢血中の総白血球数は、血球計算板を用いて算出した。血液塗抹をギムザ染色し、白血球百分率を算出した。これらから、末梢血 1µl あたりの好酸球数を算出した。

3-2-17. IgM rheumatoid factor および IL-5 の ELISA

血清中 IgM rheumatoid factor 濃度および IL-5 濃度を、mouse IgM rheumatoid factor ELISA kit (Shibayagi, Gunma, Japan) および mouse IL-5 ELISA Ready-SET-Go kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) を使用して測定した。

3-2-18. *C. hepatica* 可溶性画分のマウス腹腔内への接種試験

実験計画は、Figure 3-8A に示した。IL-5tgC57BL/6 マウス (12 匹、12 週齢、雌) および BALB/c マウス (12 匹、8 週齢、雌) のそれぞれ

を4群（無処置群、可溶性画分 3 μ g 接種群、30 μ g 接種群、300 μ g 接種群）に分けた。それぞれの接種群は、0, 3, 6 日目の計3回、1, 10, 100 μ g/匹の用量で可溶性画分を腹腔内に接種し、接種開始 10 日後に解剖し、クリオグロブリンの形成を評価した。

3-2-19. 統計処理

すべての結果は、平均値 \pm SD で示した。2 群間の平均値の比較は、Student's t-test により行なった。多群間の平均値の比較は、one way ANOVA を行った後、Tukey's test を行った (P<0.05)。

3-3. 結果

3-3-1. *C. hepatica* 感染 BALB/c マウスにおけるクリオグロブリンの性状解析

陰性対照群および 24DPI の BALB/c マウスの血清で、クリオグロブリン形成試験を行なうと、24DPI の血清でのみ、寒冷沈降物を目視で確認できた (Figure 3-2A)。血清 IgM RF 濃度は、感染後経時的に上昇し、24DPI で著しく上昇した (Figure 3-2B)。クリオグロブリンを構成する IgM の *C. hepatica* 虫体への反応性を評価するため、24DPI のラット肝臓切片を用い、一次抗体として感染マウス血清またはクリオグロブリン溶液を反応させ、二次抗体に抗マウス mu heavy chain 抗体を使うことで、IgM 結合部位を可視化した。*C. hepatica* 感染マウス血清中 IgM は、虫体全体に強く結合するのに対し、クリオグロブリン溶液中 IgM は、虫体の消化管とのみ結合した (Figure 3-2C)。陰性対照群マウス血清を用いた場合、陽性部位は観察されなかった (Figure 3-2C)。次に、ウエスタンブロット解析により、クリオグロブリンと虫体抗原との結合性を評価した。*C. hepatica* 可溶性画分を電気泳動サンプルとして用い、血清またはクリオグロブリンを一次抗体として反応させ、結合した IgM を検出することで、IgM が結合する抗原を検出した。*C. hepatica* 可溶性画分は、虫体分離過程でのマウスまたはラット由来の IgM の混入の有無を評価するため、電気泳動後に、一次抗体を省略し、二次抗体のみを反応させた。このレーンに有意なシグナルは確認されず、作製した *C. hepatica* 可溶性画分中にマウス由来の IgM の混入は認められなかった (Figure 3-2D)。感染マウス血清中の IgM は、泳動した可溶性画分のレーン全体を認識したが、陰性対照群血清中の IgM は、可溶性画分に結合しなかった (Figure 3-2E)。

別々の感染マウスから作製したクリオグロブリン溶液は、ともに 75kDa の抗原に結合した (Figure 3-2F)。

以上の結果から、クリオグロブリンを形成する IgM が、虫体の消化管と結合し、また可溶性画分の 75kDa の抗原に、特異的に結合する性質を持つことが示された。

3-3-2. 感染マウスの脾臓で増加する B 細胞の性状解析

24DPI のマウスでは、著しい脾腫を認めた (Figure 3-3A)。24DPI のマウスの脾臓対体重比は、陰性対照群マウスのそれに比べ、5 倍以上に増加していた ($P < 0.0005$)。組織学的に、24DPI の脾臓では、リンパ球が白脾髄領域、赤脾髄領域の両方で増加しており、白脾髄ではリンパ濾胞の発達が目立ち、赤脾髄では、形質細胞や PAS 陽性顆粒をもつ mott cell が多数出現していた (Figure 3-3B)。

第 2 章で示したとおり、*C. hepatica* 感染マウスにおけるクリオグロブリンは、主に IgM で形成されていることから、クリオグロブリンを産生する IgM 陽性細胞の増殖が考えられる。そこで、リンパ濾胞辺縁帯を特異的に染める MARCO 抗体と μ heavy chain の二重染色を行い、IgM+ B リンパ球の増殖部位を調べた。24DPI の脾臓では、陰性対照群に比べ、赤脾髄領域で IgM+B リンパ球が顕著に増加していた (Figure 3-3C)。赤脾髄領域の IgM+B リンパ球について、 κ , λ light chain との 2 重染色を行なうと、大部分が IgM+ κ +B リンパ球であった (Figure 3-3D)。

感染マウス脾臓における IgM+ κ +B リンパ球の性状解析のため、IgM+ κ +B リンパ球を CD5 および CD45R/B220 の発現程度により 3 つの細胞集団 (B-1a 細胞, B-1b 細胞, B2 細胞) に細分類した (Figure 3-3E)。IgM+ κ +B リンパ球のうち、CD5 +CD45R/B220+ である細胞を B-1a 細胞、CD5 -CD45R/B220- である細胞を B-1b 細胞、CD5 -CD45R/B220+ である細胞を B-2 細胞と定義した。24DPI の脾臓では、陰性対照群のマウス脾臓に比べ、B-1a 細胞の比率が有意に増加していた ($P < 0.005$, Figure 3-3F)。

これらの所見は、感染マウスの脾臓では、IgM+ κ + B-1a 細胞が赤脾髄領域で増加することを示唆する。感染マウスのクリオグロブリンが μ heavy chain と κ light chain から構成されることを考慮し、脾臓で増殖する B-1a 細胞がクリオグロブリン産生細胞であると仮定した。そこで、*C. hepatica* 可溶性画分が感染マウス脾臓 B-1a 細胞に

与える影響について、細胞増殖、IgM 産生の観点から評価することとした。

3-3-3. 感染マウス脾臓から単離した B-1a 細胞を用いた *C. hepatica* 可溶性画分刺激試験

次に、*In vitro* 系において、感染マウスの脾臓 B-1a 細胞を用いた *In vitro* 試験系により、*C. hepatica* 可溶性画分が IgM 産生、細胞増殖に与える影響を評価した。培養上清中に産生された IgM 量は、添加した *C. hepatica* 可溶性画分の濃度依存的に増加した (Figure 3-4A)。産生された IgM は、電気泳動サンプルとして可溶性画分を使用したウエスタンブロット解析により、クリオグロブリン中の IgM と同様に、可溶性画分中の 75kDa の抗原に特異的に結合した (Figure 3-4B)。細胞増殖は、無刺激サンプルに比べ、可溶性画分添加サンプルで有意に増加していた (Figure 3-4C)。次に、IgM 可変領域の mRNA の RT-PCR を行い、産生された IgM のクローナリティーを評価した。*In vitro* 試験において、24DPI のマウス脾臓から単離した直後の B-1a 細胞では、複数のバンドが検出されるのに対して、可溶性画分を添加し 2 日間培養したサンプルでは、およそ 1100bp の単一のバンドが検出された (Figure 3-4D)。陰性対照群のマウスの脾臓から単離した B-1a 細胞では、単離直後は、シグナルは弱いものの複数のバンドが検出され、可溶性画分を添加し 2 日間培養したサンプルでは、シグナルはほとんど検出されなかった。複数匹の 24DPI マウスから脾臓リンパ球を分離し、IgM 可変領域の RT-PCR を行ったところ、すべてのマウスに共通して、およそ 1100bp の IgM 可変領域 mRNA が検出された (Figure 3-4E)。陰性対照群のマウスから分離した脾臓リンパ球では、この 1100bp の IgM 可変領域 mRNA のバンドは、検出できなかった。

これらの所見は、脾臓 B-1a 細胞がクリオグロブリン産生細胞であり、キャピラリア可溶性画分による刺激により、B-1a 細胞の選択的な増殖が *In vitro* および *In vivo* で起こっていることを示唆した。

3-3-4. BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスにおける感染時の Th1/Th2 応答性

クリオグロブリン血症の進行に宿主の Th1/Th2 応答性の違いが関与しているという仮説を検討するためには、*C. hepatica* 感染に対して異なる Th1/Th2 応答性を示すマウス系統において、感染実験を行う必要

がある。そこで、BALB/c および C57BL/6 の 2 系統のマウスについて、感染時の Th1/Th2 応答を評価した。Th1/Th2 応答の評価は、3-2-15 に記載した通り、脾臓リンパ球を用いたフローサイトメトリー解析で行った。24DPI の BALB/c マウスでは、非感染時と比べ、Th 細胞に占める Th2 細胞の比率が著しく上昇し、Th2 に偏向した免疫応答が起っていた。一方で、24DPI の C57BL/6 マウスでは、Th1 および Th2 のどちらへも有意な変動は認められなかった (Figure 3-5A)。脾臓、肝臓、骨髄における組織学的検索から、24DPI の BALB/c マウスでは、好酸球の高度な浸潤が見られ、24DPI の C57BL/6 マウスでは、軽度であった (Figure 3-5B)。末梢血中の好酸球数は、24DPI の BALB/c マウスで、陰性対照群の BALB/c マウスや 24DPI の C57BL/6 マウスと比較し、有意に増加していた (Figure 3-5C)。

以上の所見から、*C. hepatica* 感染に対する Th1/Th2 応答性が BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスでは異なり、BALB/c マウスは、感染により Th2 に偏向した免疫応答が起こることが示された。さらに、BALB/c マウスでは、感染により、全身で好酸球数が増加していた。このことから、Th2 サイトカインであり、好酸球および B-1 細胞の増殖、活性化因子である IL-5 に注目し、血清中 IL-5 濃度の変動を測定することとした。

3-3-5. 感染時の血清中 IL-5 濃度の変動

BALB/c、C57BL/6 マウスにおける血清中の IL-5 濃度を、非感染時、20DPI、24DPI の時点で測定した。BALB/c マウスでは、IL-5 濃度は、非感染時には検出限界以下であり、20DPI において著しい上昇がみられ、24DPI では低下した (Figure 3-6)。C57BL/6 マウスの IL-5 濃度は、非感染時には検出限界以下であり、感染時にも顕著な上昇は認められなかった。そこで、C57BL/6 マウスを遺伝的背景にもつ IL-5 過剰発現マウスである IL-5tgC57BL/6 マウスを用いて、同様に感染時の IL-5 濃度を測定した。IL-5tgC57BL/6 マウスでは、非感染時においても 40pg/ml の IL-5 が存在し、20DPI および 24DPI において、著しい上昇がみられた。

3-3-6. BALB/c、C57BL/6、IL-5tgC57BL/6 マウスにおけるクリオグロブリン血症の病態比較

3-3-4 において、感染時の免疫応答性が異なることが示された

BALB/c と C57BL/6 に加え、C57BL/6 の遺伝的背景を持つものの IL-5 発現が亢進している IL-5tgC57BL/6 について、感染時のクリオグロブリン血症の病態を比較した。クリオグロブリン形成試験の結果、BALB/c と IL-5tgC57BL/6 の感染マウス血清で、寒冷沈降物が目視で確認できたが、C57BL/6 の感染マウスでは、確認できなかった (Figure 3-7A)。24DPI における糸球体への IgM 沈着を評価したところ、BALB/c マウスでは、高度であり、C57BL/6 マウスでは、軽度であった。IL-5tgC57BL/6 では、C57BL/6 に比べて著しく高度に IgM 沈着がみられた (Figure 3-7B)。感染時の血清中 IgM rheumatoid factor 濃度は、BALB/c マウスで顕著に上昇するが、C57BL/6 マウスでは上昇が軽度であった。IL-5tgC57BL/6 マウスでは、BALB/c と同程度まで上昇した (Figure 3-7C)。BALB/c と IL-5tgC57BL/6 では、脾臓は著しく腫大し、脾臓対体重比は、感染時の C57BL/6 に比べ有意に大きかった (Figure 3-7D)。

以上の所見から、BALB/c マウスは、C57BL/6 マウスに比べ、高度なクリオグロブリン血症を発症し、Th2 優位の免疫状態でクリオグロブリン血症の病態が促進されることが示された。IL-5 トランスジェニックマウスを使った感染実験により、IL-5 の過剰発現により C57BL/6 マウスにおけるクリオグロブリン血症の病態が高度になったことから、IL-5 がクリオグロブリン血症の病態促進因子であることが示された。

3-3-7. *C. hepatica* 可溶性画分の腹腔内接種試験

In vivo において、*C. hepatica* 可溶性画分および IL-5 がクリオグロブリン血症の病態進行に関与することを確認するため、BALB/c および IL-5tgC57BL/6 マウスに、*C. hepatica* 可溶性画分を腹腔内接種し、クリオグロブリン形成の有無を調べた。血清中 IL-5 濃度は、IL-5tgC57BL/6 マウスでおよそ 40pg/ml であり、BALB/c マウスでは、検出限界以下 (<4pg/ml) である。可溶性画分の接種では、IL-5 の濃度に大きな変動はなく (Figure 3-8B)、肝臓、脾臓、腎臓のいずれの組織にも炎症反応は誘起されなかった。

クリオグロブリン形成試験では、可溶性画分を 300 μ g 接種した IL-5tgC57BL/6 においてのみ、目視で寒冷沈降物が確認できた (Figure 3-8C)。クリオグロブリン溶液の SDS-PAGE により、沈降物の大部分が分子量約 75kDa の物質から構成されていることが示された (Figure 3-8D)。ウエスタンブロット解析により、 μ chain であることを証明

した。mu chain のバンドは、IL-5tgC57BL/6 では、無処置群では検出できず、可溶性画分の接種量依存的に増加した。BALB/c マウスでは、300 μ g 接種群で、ごくわずかに mu chain のバンドが検出された。糸球体への IgM 沈着は、可溶性画分を 300 μ g 接種した IL-5tgC57BL/6 においてのみ高度に見られた (Figure 3-8E)。

以上の所見から、IL-5 存在下で、*C. hepatica* 可溶性画分を接種することで、クリオグロブリン血症が発症することが示された。

3-4. 考察

第 3 章では、クリオグロブリン血症発症初期段階の病態機序を明らかにすることを目的とし、IgM RF 産生 B リンパ球の増殖機序に着目して実験を進めた。その結果、クリオグロブリン血症の発症には、3 つの因子が必須であること明らかになった。1 つ目は IgM RF 産生細胞としての脾臓 B-1a 細胞であり、2 つ目は B-1a 細胞の増殖および IgM 産生の引き金となる *C. hepatica* 特異抗原、3 つ目はクリオグロブリン血症初期の病態進行に必須なサイトカインである IL-5 の存在である。本章で得られた知見から示唆される本モデルのクリオグロブリン血症メカニズムを Figure 3-9 に示す。*C. hepatica* 感染により、宿主免疫が Th2 に偏向することで、IL-5 産生が亢進し、血中 IL-5 濃度が上昇する。IL-5 の刺激により、B-1a 細胞がポリクローナルに増殖、活性化した状態になる。それと同時に、肝臓に寄生した虫体からは、IgM RF 産生 B-1a 細胞に特異的に結合する抗原を含んだ可溶性抗原が血中に放出されている。IgM RF 産生 B-1a 細胞は、IL-5 存在下で、この特異抗原による刺激を受け、クローナルに増殖し、多量の IgM RF を産生することで、クリオグロブリン血症が発症していると考えた。

3-4-1. 脾臓における IgM RF 産生 B-1a 細胞のクローナルな増殖について

マウスにおいて、B 細胞は B-1 細胞と B-2 細胞の 2 つに大別され、B-1 細胞は、CD5 の発現の有無により、CD5⁺ の B-1a 細胞と CD5⁻ の B-1b 細胞に分けられる (Duan and Morel, 2006)。B-1a 細胞は、低親和性の自然抗体の主な産生細胞として知られるが (Hardy et al., 1987; Mantovani et al., 1993)、その一方で、近年、病原体感染時に、抗原に特異的な抗体を産生する B-1a 細胞が出現することも明らかになった (Cole et al., 2009; Yang et al., 2012A; Yang et al., 2012B)。*C.*

hepatica 感染マウスにおける IgM RF 産生 B-1a 細胞は、抗原特異的 IgM 産生 B-1a 細胞に分類されると考えられる。

本モデルにおける IgM RF 産生 B-1a 細胞の選択的増殖には、B-1a 細胞自体が持つ性質に起因した機序が想定され、それは、様々な抗原駆動性 (antigen-driven) リンパ球増殖疾患で共通する機序かもしれない。感染早期の自然免疫応答に関与する B 細胞である B-1 細胞や Marginal zone (MZ) B 細胞は、B-2 細胞と比べ、本質的にクローナルに増殖しやすい性質を持つことが知られている (Stall et al., 1988; LeMaoult et al., 1999; Morse et al., 2001)。B-1 細胞と MZ 細胞は、表現抗原の発現は一部異なっているが、機能的に類似していることが知られている (Baumgarth, 2011)。

ヒトにおいては、CD5+ B リンパ球が、マウスにおける B-1a 細胞に相当すると細胞である。HCV 感染に関連した混合型クリオグロブリン血症や Non-Hodgkin Lymphoma 以外にも、*Helicobacter pylori*-associated mucosa-associated tissue (MALT)-lymphomas (Mueller et al., 2005; Yamanishi et al., 2006) や fungal antigen β -(1, 6)-glucan associated B cell chronic lymphocytic leukemia (Hoogeboom et al., 2013) などが、病原体抗原に起因する CD5+ B リンパ球の増殖疾患として報告されている。本マウスモデルにおける B-1a 細胞の増殖とヒトにおける CD5+ B リンパ球増殖性疾患には、増殖細胞の性質に起因する共通の増殖メカニズムがある可能性があり、また、増殖の引き金となる特異抗原の構造にも類似性がある可能性がある。本マウスモデルの病理機序の解明は、これらヒトにおける CD5+B リンパ球増殖のメカニズムの解明の一助になるかもしれない。

3-4-2. クリオグロブリン血症の引き金となる特異抗原について

本モデルにおいて、IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖、IgM 産生の引き金となる特異抗原の存在が明らかにされた。特異抗原を同定することはできなかったが、約 75kDa の可溶性抗原であり、*C. hepatica* 虫体の消化管に局在することが示された。*In vivo*, *In vitro* 系における抗原接種により、IgM RF 産生細胞が選択的に増殖していくことを証明した報告は、これまでにない。特異抗原を同定することは、本モデルで次に取り組むべき課題であり、抗原の同定は、本モデルのみならず、病原体感染に起因するクリオグロブリン血症の病態解明に貢献することが期待される。

クリオグロブリン血症が発症する接種後 20 日前後は、肝臓における成熟虫体寄生が最も高度になる時期と一致している。特異抗原は虫体の腸管に局在する可溶性抗原と考えられ、抗原は血中に容易に放出される状態にあることが推察される。クリオグロブリン血症には、持続的な特異抗原の暴露が関与していると考えられる。

B-1a 細胞は、その大部分が腹腔内に存在しており、一部は脾臓に存在している (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012)。また、腹腔内で抗原刺激を受けた B-1a 細胞が速やかに脾臓へ移動し脾臓において増殖することも報告されている (Itakura et al., 2005; Baumgarth, 2011)。感染マウスの脾臓で増加する IgM RF 産生 B-1a 細胞は、脾臓において脾臓 B-1a 細胞が特異抗原の感作を受けて増殖したものか、腹腔において感作を受けた B-1a 細胞が脾臓に移動して増殖したものであるか、その二通り考えられるが、本研究で明らかにすることはできなかった。

3-4-3. クリオグロブリン血症の促進因子としての IL-5 について

IL-5 過剰発現トランスジェニックマウス (IL-5tgC57BL/6 マウス) は、遺伝的背景に C57BL/6 マウスを持つ。C57BL/6 マウスが感染後も IL-5 の上昇が見られず、クリオグロブリン形成も軽度であったのに対し、IL-5tgC57BL/6 マウスで、感染後著しい IL-5 の産生と高度のクリオグロブリン形成が見られたことは、IL-5 が本モデルのクリオグロブリン血症の進行に必須の因子である事を示す所見である。興味深いことは、感染 BALB/c マウスの血清 IL-5 濃度が接種後 20 日に一過性に上昇するだけにも関わらず、クリオグロブリン血症の病態は、C57BL/6 マウスに比べて、極めて高度なことである。従って、IL-5 はクリオグロブリン血症メカニズムの限られたポイントでのみ関与している可能性がある。そして、病態進行に必須の因子を解析する際には、病態をステージごとに分け、ステージごとに必須の因子を同定することの重要性を示唆している。

HCV 感染クリオグロブリン血症の病態機序に、IL-5 が関与するかは現段階では不明である。患者血清中 IL-5 濃度は、健常者と差がなかったという報告があるが (Mizouchi et al., 2009)、IL-5 濃度の上昇が一過性である可能性を考慮すると、IL-5 の病態への関与を評価するにはデータが不足している。また、IgM RF 産生細胞における IL-5 受容体発現の評価も行う必要があると考えられる。

感染マウスで IL-5 が上昇するためには、Th2 に偏向した免疫応答が起こる必要があり、本モデルにおける IL-5 産生細胞は、Th2 細胞であることが想定される。このことは、BALB/c マウスは、感染によってクリオグロブリン血症を発症しうるが、可溶性画分の腹腔内接種では、発症しないことを説明できる。感染により誘起される Th2 型の免疫応答は、IL-5 の産生を促進させるために必須であり、IL-5 の非存在下で抗原に感作されても、IgM RF 産生 B-1a 細胞の選択的増殖は起こらない。一方、IL-5 トランスジェニックマウスで、可溶性画分の接種のみでクリオグロブリン血症が発症したことは、Th2 型免疫応答は、IL-5 を上昇させるという点で必要であることを示している。

本章の内容は、以下に公表した。

AIHARA, N., KAMIIE, J., YAMADA, M. and SHIROTA, K., 2015. The Development of Mixed Cryoglobulinemia in *Capillaria hepatica*-Infected Mice Is Associated with the *Capillaria* Antigen-Induced Selective Proliferation of Splenic B-1a Cells in Response to Interleukin-5 Stimulation. *The American Journal of Pathology*, **185**(1), pp. 172-184.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.09.017>

图表



Figure 3-1. Isolated *C. hepatica* worms.

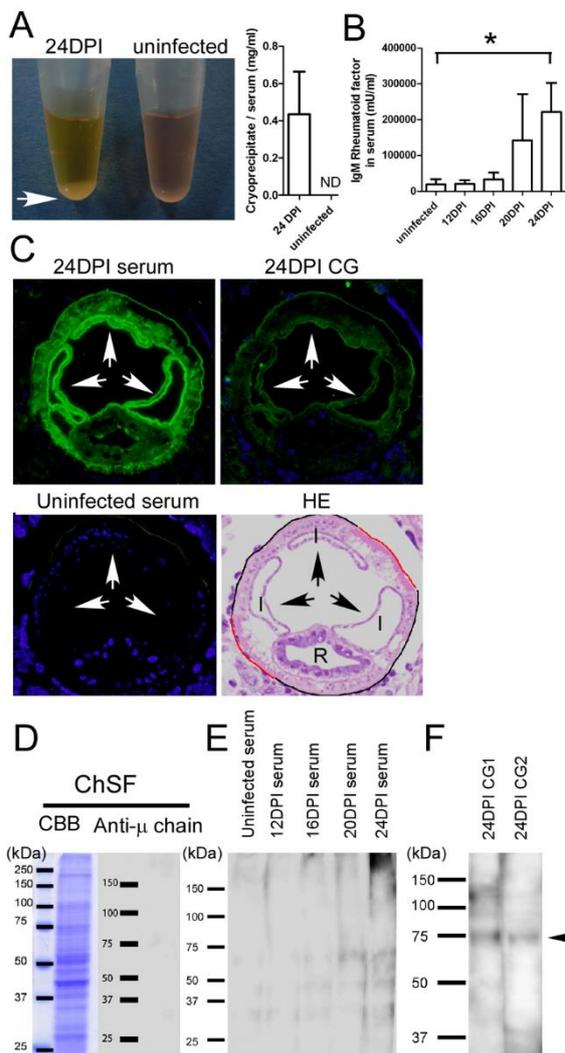


Figure 3-2. Cryoglobulin and IgM-RF in the sera of *C. hepatica*-infected mice. **A:** After cold incubation, a visible precipitate formed in the sera of infected mice at 24 DPI (arrow). ND: not detectable. **B:** Quantitative analysis of IgM-RF by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) shows a significant increase at 24 days post infection (DPI). * $P < 0.05$. **C:** Immunofluorescence analysis of the reaction to *C. hepatica* worms. The IgM of 24 DPI mice sera reacted with the whole worm, whereas the IgM of the cryoglobulin solution only reacted with the *C. hepatica*

digestive tract (arrows). I: Intestine; R: Reproductive duct; Black line: muscle layer; Red line; Bacillary band. **D:** Electrophoretic patterns of ChSF sample was presented by staining with CBB (left column). Western blot analysis showed no signal against μ chain in ChSF sample (right column). **E:** The IgM of infected mice sera reacted with various *C. hepatica* antigens. **F:** The IgM in cryoglobulin solutions reacted with an antigen of approximately 75 kDa (arrow).

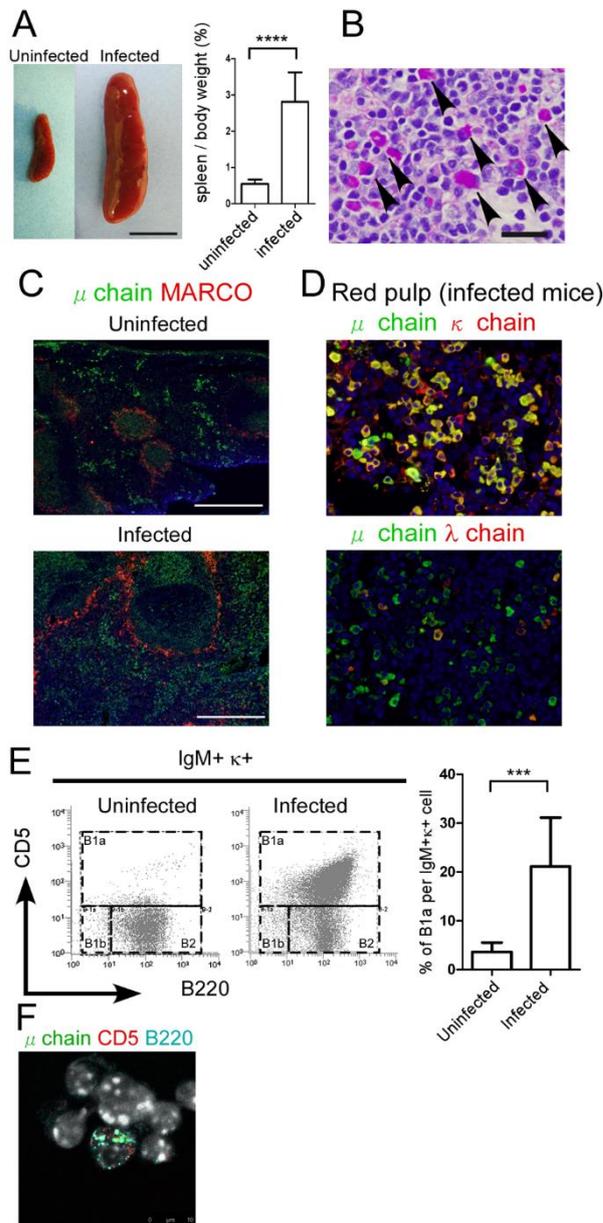


Figure 3-3.
Characterization of proliferating B-cells in the spleens of *C. hepatica*-infected mice. **A:** Representative appearance of spleens. The spleen was significantly enlarged at 24 days post infection (DPI). Spleen/body weight ratios of infected mice were significantly larger than those of uninfected mice. **** $P < 0.0005$. **B:** Periodic acid-Schiff-positive Mott cells increased in the splenic red pulp of 24 DPI mice (arrowhead). Scale bar: 20 μ m. **C:** Immunofluorescence staining shows numerous μ chain (FITC)-positive cells in the splenic red pulp of infected mice at 24 DPI. Scale bar: 500 μ m. **D:** The majority of μ chain (FITC)-positive cells in the

splenic red pulp of infected mice were κ light chain positive, instead of λ light chain positive. **E:** Flow cytometric (FCM) analysis of splenic B cells. IgM+ κ + cells were classified into three groups according to CD5 and CD45R/B220 expression. B-1a cells significantly increased in 24 DPI mice. *** $P < 0.005$. **F:** B-1a cells (IgM+CD5+B220+ cells) were observed in the FCM sample by immunofluorescence analysis.

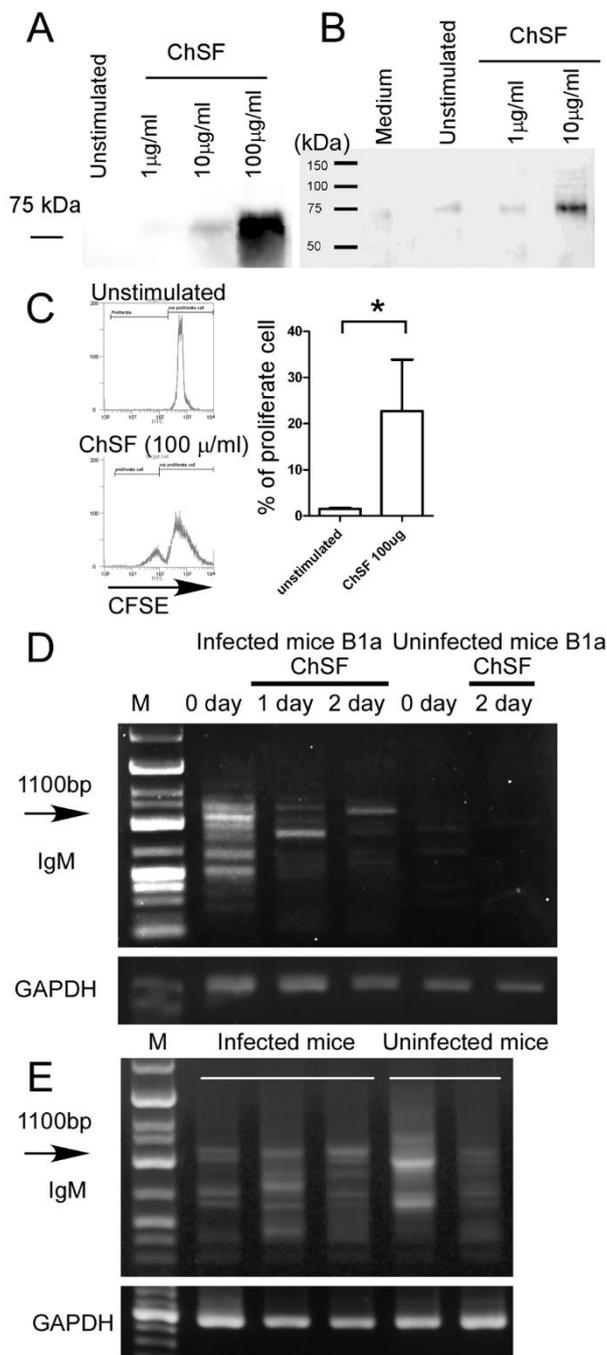


Figure 3-4. Stimulation of splenic B-1a cells from infected mice by *C. hepatica* soluble fraction (ChSF). **A:** IgM production was increased by ChSF stimulation in a dose-dependent manner. **B:** The produced IgM in the medium reacted with the 75 kDa antigen in the ChSF. **C:** ChSF stimulation significantly promoted cell proliferation. * P < 0.05. **D:** Amplification of IgM variable region (V_HDJ_H -C μ) transcripts using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. A single band of approximately 1,100 bp was observed in ChSF-stimulated samples incubated for 2 days. **E:** The common band of 1,100 bp was detected in splenic lymphocytes from infected mice, but not in those from uninfected mice.

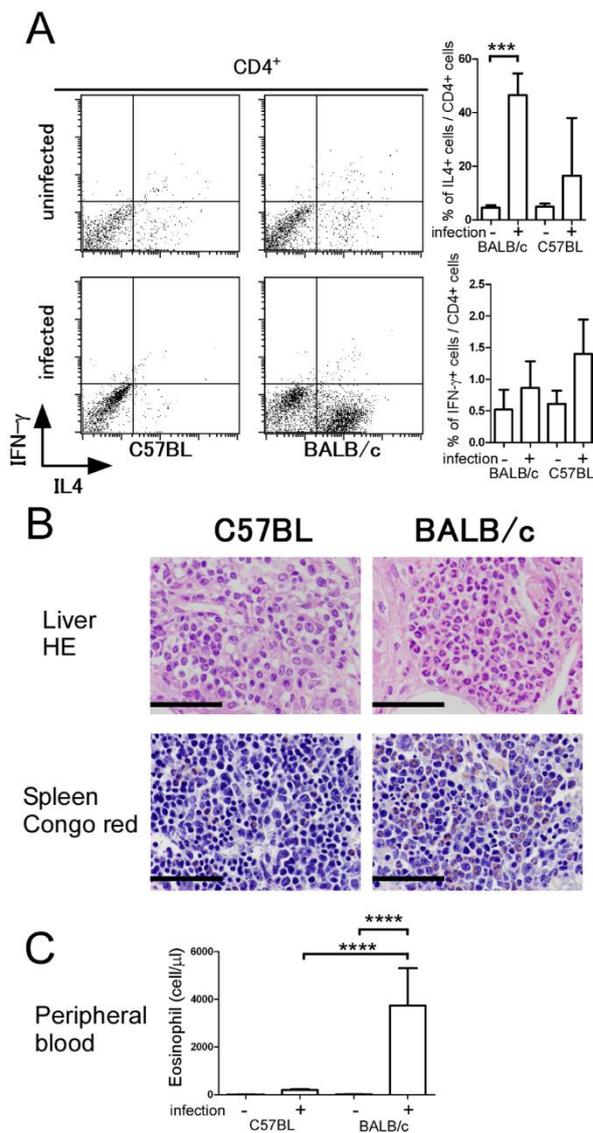


Figure 3-5. Th1/Th2 immune response after infection in BALB/c and C57BL mice. **A:** Subtyping of Th1/Th2 subsets was performed using flow cytometric analysis. The percentage of IL-4+CD4+ (Th2) cells was significantly increased in infected BALB/c mice. **B:** Eosinophil infiltration was severe in infected BALB/c mice. Hematoxylin eosin and Congo red staining are shown. **C:** The number of eosinophils in the peripheral blood was significantly increased in infected BALB/c mice (** $P < 0.005$, **** $P < 0.0005$).

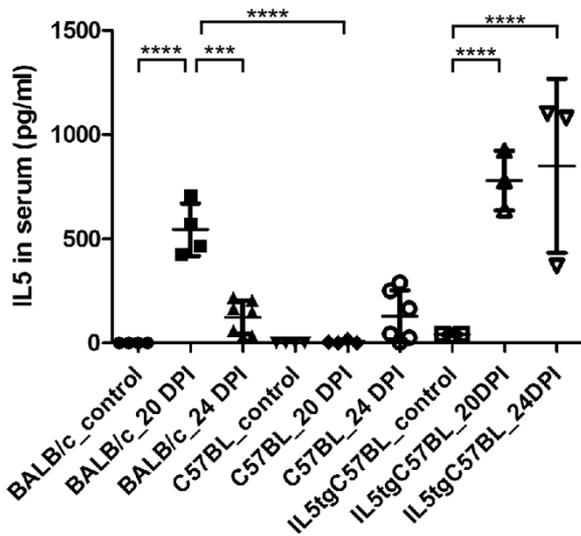


Figure 3-6. Serum IL-5 in BALB/c, C57BL, and IL-5tgC57BL mice. Quantitative analysis of IL-5 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed a significant increase at 20 days post infection in BALB/c mice. C57BL mice did not show a significant elevation of serum IL-5 levels. The level of serum IL-5 in uninfected IL-5tgC57BL mice was 40.5 pg/ml and was significantly increased by the infection (**P < 0.005, **** P < 0.0005).

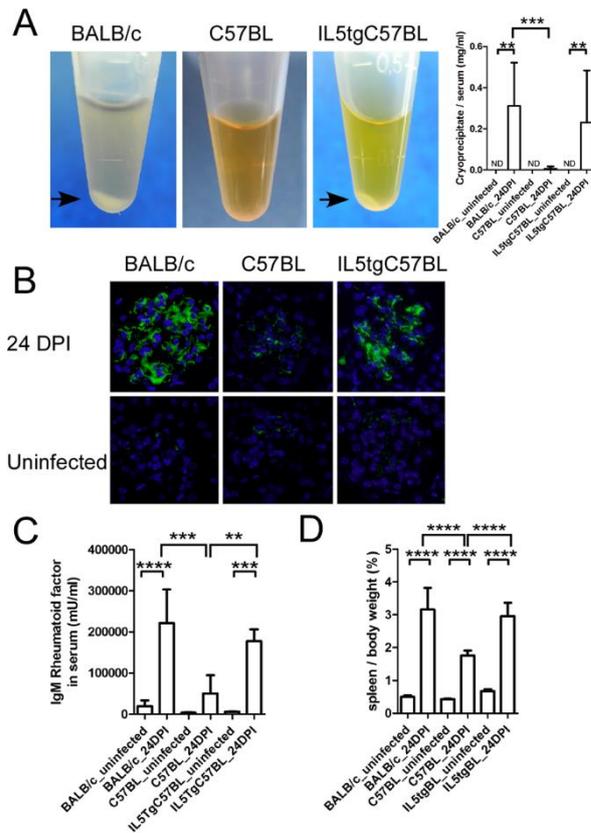


Figure 3-7.

Cryoglobulinemia in BALB/c, C57BL, and IL-5tgC57BL mice. **A:** A visible cryoprecipitate (arrows) formed in the serum samples from infected BALB/c and IL-5tgC57BL mice. **B:** IgM deposition in the glomerulus was severe in BALB/c and IL-5tgC57BL mice, and mild in C57BL mice. **C:** Quantitative analysis of IgM rheumatoid factor by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed

significantly high values in BALB/c and IL-5tgC57BL mice compared with C57BL mice. **D:** The spleen/body weight ratios of BALB/c and IL-5tgC57BL mice were significantly higher than that of C57BL mice. (**P < 0.05, ***P < 0.005, ****P < 0.0005. ND: not detectable)

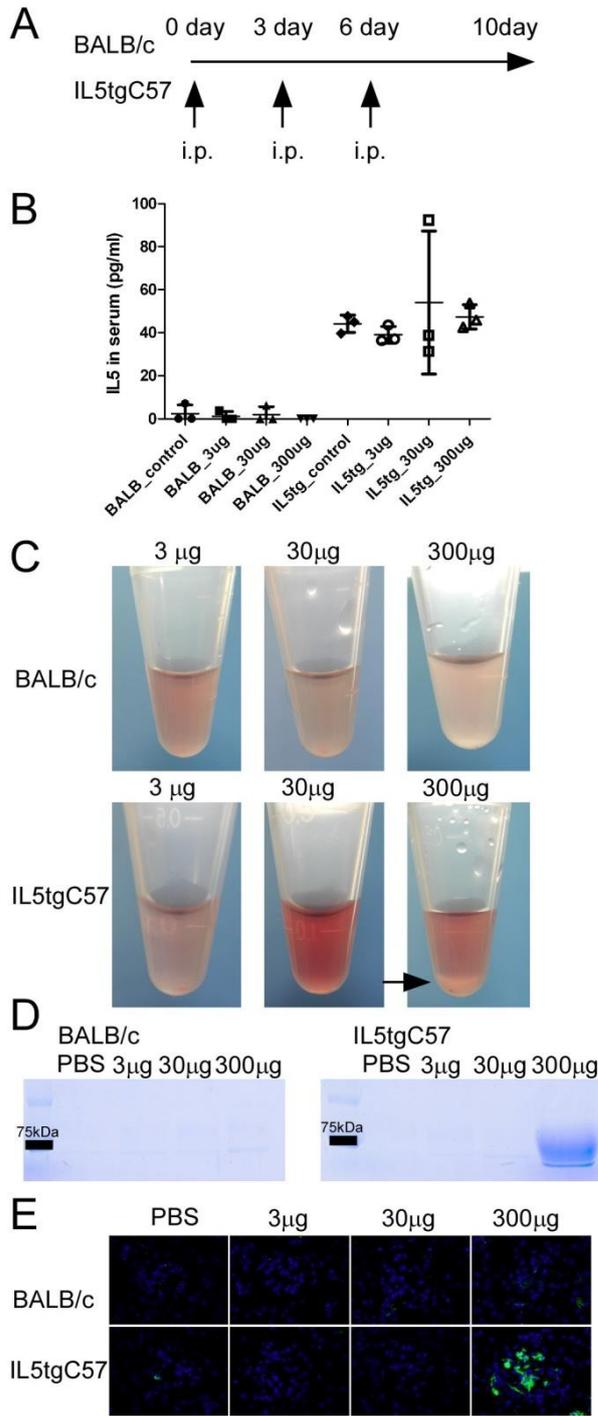


Figure 3-8. Intraperitoneal injection of *C. hepatica* soluble fraction (ChSF) in BALB/c and IL-5tgC57BL mice. **A:** The study design of the intraperitoneal injection test. **B:** Serum IL-5 levels in BALB/c and IL-5tgC57BL mice were not affected by injection of ChSF. **C:** A visible cryoprecipitate formed only in the serum samples from IL-5tgC57BL mice injected with 300 µg ChSF (arrow). ND: not detectable. **D:** SDS-PAGE of cryoprecipitate solutions from each group. The cryoprecipitate was mainly composed of μ heavy chain (75 kDa). **E:** IgM deposition in the glomerulus was detected only in IL-5tgC57BL mice injected with 300 µg ChSF

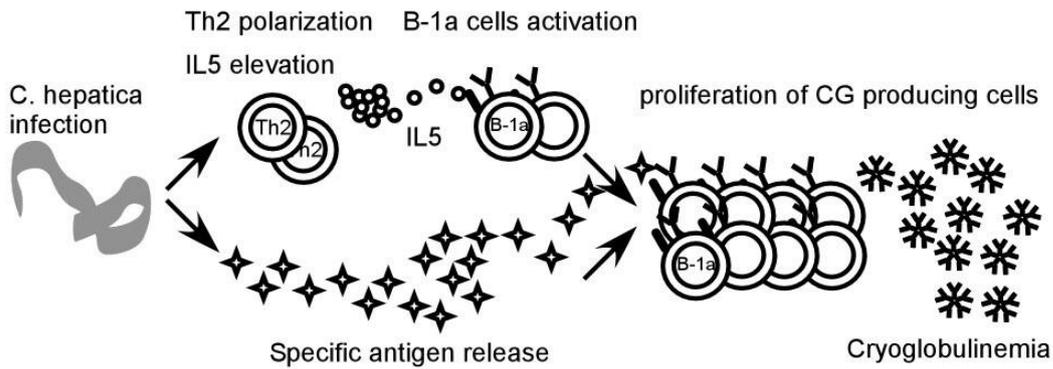


Figure 3-9. Schematic illustration of the pathogenesis of cryoglobulinemia in the *C. hepatica* mouse model. If *C. hepatica* infection causes a Th2-biased immunoresponse, it will increase serum IL-5 levels. Coincidentally, *C. hepatica* worms parasitizing the liver release several soluble antigens, including a specific antigen. In response to co-stimulation with the specific antigen and IL-5, splenic B-1a cell clones reacting to the specific antigen may selectively proliferate and produce IgM-RF, resulting in the induction of cryoglobulinemia.

第4章 増殖後の B-1a 細胞における B 細胞活性化抑制因子 Stra13 の発現の解析

4-1. 序論

感染マウスのクリオグロブリン血症の病態は、接種後 24 日から 30 日をピークにして、経日的に軽減していくことが予備実験の結果から示唆された。第 4 章では、感染マウスにおいて、クリオグロブリン血症が発症後にどのように軽減していくかを解析した。最初に、肝臓の寄生虫性病変とクリオグロブリン血症の病態を経日的に調べ、次に、クリオグロブリン血症の病態がピークである接種後 24 日目の脾臓 B-1a 細胞の状態を評価した。

B-1a 細胞の状態の評価は、HCV 感染クリオグロブリン血症において B 細胞増殖抑制因子として報告された Stra13 に着目した。HCV 感染クリオグロブリン血症では、増加した IgM+ B リンパ球の一部の集団は、病態発症期に、すでに機能的に不活性化しており (Charles et al., 2011; Terrier et al., 2011)、不活性化している B 細胞には、強力な B 細胞増殖抑制因子である Stra13 が発現していることが報告された (Visentini et al., 2012)。さらに、抗ウイルス療法で肝炎、ウイルス量が減少すると、クリオグロブリン血症の病態が軽減することが知られている (Dammacco and Sansonno, 2013)。そこで、モノクローナルに増殖したクリオグロブリン産生 B リンパ球は、抗原感作の欠如、もしくは、好適な免疫条件からの逸脱が起こることで、速やかに不活化状態になるメカニズムが存在しているという仮説を立てた。

本章では、感染マウスのクリオグロブリン血症が、接種後 30 日にかけて急速に発達するが、その後、肝炎の治癒や肝臓に寄生した虫体の死滅に伴い、経日的に軽減していくことを明らかにした。さらに、接種後 24 日の BLBL/c マウスから単離した B-1a 細胞は、可溶性画分の添加には反応し、細胞増殖、IgM 産生が亢進する一方で、増殖、活性化因子であるはずの LPS や IL-5 添加には反応を示さず、機能的には不活性化していることが示唆された。接種後 24 日の B-1a 細胞は、Stra13 転写物が過剰発現しており、*in vitro* では、ChSF 刺激により可逆的に Stra13 発現が低減し、再活性化したことから、*C. hepatica* から放出される抗原量が、病態の発達、減退に影響していることを示唆する結果を得た。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 肝臓病変およびクリオグロブリン血症の経日的解析

8週齢雌のICRマウスに幼虫形成卵4000個を接種し、接種後20日、30日、70日、110日に安楽殺し、肝臓、腎臓、脾臓を採材、病理組織標本を作製した。すべての切片でHE染色を行うとともに、腎臓および脾臓の切片は抗マウス μ chain抗体を用いた蛍光染色を行った。

4-2-2. B-1a細胞の単離

8週齢雌のBALB/cマウスに幼虫形成卵1000個を経口接種した。陰性対照群には、PBSを経口接種した。24DPIおよび非感染のBALB/cマウスから、脾臓B-1a細胞を単離し、実験に用いた。3-2-11と同様に、CD5+B220/CD45R+陽性細胞をセルソーターで単離した。

4-2-3. 単離したB-1a細胞を用いた *In vitro* 試験

3-2-12と同様の手技により、単離したB-1a細胞を5 μ M CFSE (Invitrogen)で蛍光標識し、*in vitro*試験に用いた。CFSE標識したB-1a細胞は、1wellあたり 2×10^5 cell/200 μ lの細胞密度になるようにFCS添加RPMI1640培地で調整し、96wellプレートで培養した。培養開始直後には、各wellにLPS(50 μ g/ml)またはIL-5(1ng/mlまたは10ng/ml)または*C. hepatica*可溶性画分(10 μ g/mlまたは100 μ g/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件で、1日から3日間培養した。培養後、遠心分離し、培養上清は、上清中のマウスIgMを検出するため、ウエスタンブロット解析を行なった。回収した細胞の半数は、RT-PCR解析に使用し、残りの半数は、細胞増殖の評価のために、フローサイトメトリーでCFSE蛍光を検出した。

4-2-4. RNAの抽出およびRT-PCR

3-2-14と同様に、Total RNAをRNeasy Plus Micro kit (Qiagen)で抽出した。Oligo dT primers (Promega)とSensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen)を使用しcDNAを作製した。PCRは、TaKaRa EX Taq (TaKaRa BIO)を使用し、94 $^{\circ}$ C 10分、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 10分、30サイクルとした。Sense mouse Stra13 primerとして5'-CAGGCGGGGAATAAAACGGA-3'、Antisense mouse Stra13 primerとして5'-GGGCACAAGTCTGGAAACCT-3'を用いた。

Stra13 の PCR 産物は、335bp である。Sense mouse GAPDH primer として 5'- TGTTCCCTACCCCAATGTGT-3' を、Antisense mouse GAPDH primer をして 5'- TGGGTGCAGCGAACTTTATT -3' を用いた (Kusakab et al, 2007)。GAPDH PCR 産物は、488bp である。

4-3. 結果

4-3-1. 感染後の肝臓病変、糸球体への IgM 沈着、脾臓赤脾髄領域における IgM+ B 細胞の変化

肝臓における壊死性肝炎、炎症細胞浸潤は、20DPI および 30DPI で最も高度になった (Figure 4-1A)。肝臓に寄生する虫体は、20DPI で最も多く、30DPI でも多数認めたが、30DPI では、一部の虫体は死滅しており、また、虫卵の形成も見られた。70DPI、110DPI では、炎症反応は軽度になり、死亡虫体、虫卵は結合組織で被覆されて、限局的な病変として観察された。

糸球体における IgM 沈着は、20DPI から始まり、30DPI で最も高度になった。70DPI、110DPI では、沈着が減少した (Figure 4-1B)。

20DPI および 30DPI の脾臓では、赤脾髄領域の増加が顕著であり、赤脾髄領域での IgM+ B 細胞の増加が見られた。70DPI、110DPI では、赤脾髄領域は陰性対照群と同程度まで縮小し、IgM+ B 細胞数は減少した (Figure 4-1C)。

4-3-2. *C. hepatica* 可溶性画分、LPS および IL-5 刺激による B-1a 細胞の増殖、IgM 産生の評価

培養後の細胞増殖を CFSE 試験で評価すると、可溶性画分添加サンプルでは、顕著な細胞増殖が観察されるが、LPS 添加サンプル、IL-5 添加サンプルでは、無添加サンプルと同様、細胞増殖はごく少数であった (Figure 4-2A)。

培養後の IgM 産生をウエスタンブロット解析で評価すると、可溶性画分添加サンプルでは、著しい IgM 産生が見られるが、LPS 添加サンプル、IL-5 添加サンプルでは、IgM は検出できなかった (Figure 4-2B)。

以上の所見から、24 DPI のマウスから単離した脾臓 B-1a 細胞は、*C. hepatica* 可溶性画分には反応するものの、LPS や IL-5 刺激には反応しないことが示され、機能的に不活性化状態にあることが示唆された。

4-3-2. Stra13 の発現解析

24DPI マウスおよび非感染マウスの B-1a 細胞および脾臓リンパ球から抽出した RNA を用いて、Stra13 の RT-PCR を行った。24DPI の B-1a 細胞では、Stra13 発現が見られたが、非感染マウスの B-1a 細胞には、Stra13 は発現していなかった (Figure 4-3A)。24DPI マウスの B1a 細胞では Stra13 発現を認めるが、脾臓単離リンパ球をサンプルにした場合、Stra13 発現を確認できなかった (Figure 4-3 A)。24DPI マウスから単離した B-1a 細胞を可溶性画分添加培地で培養した場合、Stra13 発現が低下した (Figure 4-3B)。IL-5 添加培地で培養した場合は、Stra13 の発現低下は見られなかったが、LPS 添加培地で培養した場合、Stra13 発現は低下した (Figure 4-3C)。

4-4. 考察

第 4 章では、感染後のクリオグロブリン血症の病態について、経時的に評価し、30DPI にピークを迎えた後、減退していくことが示された。HCV 感染クリオグロブリン血症においても、ウイルス増殖を伴う肝炎の活性化とともに病態が悪化し、抗ウイルス療法により、肝炎、ウイルス量が低減するのと連動して、病態が軽減することが知られている (Damoiseaux and Cohen Tervaert, 2013)。これらの知見から、モノクローナルに増殖したクリオグロブリン産生 B リンパ球は、抗原感作の欠如、もしくは、好適な免疫条件からの逸脱が起こることで、速やかに不活性化状態になるメカニズムが存在しているという仮説を立てた。

感染マウスにおいて、接種後 24 日は、クリオグロブリン血症の病態がピークとなる時期であるが、この時には、B-1a 細胞は、すでに B 細胞増殖抑制因子 Stra13 を強く発現し、IL-5 および LPS に不応答であったことから、機能的に不活性化状態に移行していることが示唆された。クリオグロブリン血症の病態は、*C. hepatica* 感染に関連して速やかに進行するが、その後、肝炎の治癒、虫体死亡の時期と一致して、IgM RF 産生 B-1a 細胞は速やかに不活性化状態に移行することが示された。

24DPI のマウスから単離した B-1a 細胞は、*C. hepatica* 可溶性画分による刺激で、Stra13 発現が低減し、細胞増殖、IgM 産生が亢進した。このことから、可溶性画分が Stra13 発現に抑制的に働いており、Stra13 による不活性化は、可溶性画分で解除可能な可逆的な状態であ

ることが示唆される。同様に、HCV感染クリオグロブリン血症患者の末梢血中Bリンパ球の一集団は、Stra13を発現し、機能的に不活性化状態にある(Visentini et al., 2012)。この不活性化状態のBリンパ球は、TLR9およびBCRのリガンドによる刺激には不応答であるが、IL-2およびIL-10の存在下では、TLR9およびBCRのリガンドによる刺激で細胞増殖が亢進することから、可逆的な抑制状態であると考えられる。クリオグロブリン産生Bリンパ球は、周囲環境(抗原および各種サイトカインの刺激)により、可逆的に活性化状態、不活性化状態に移行する性質があるかもしれない。可溶性画分中の特異抗原は、虫体の腸管に局在する可溶性抗原であることが想定される。接種後24日のB-1a細胞にすでにStra13が発現していることは、20DPIから30DPIにかけて、肝臓に寄生した虫体が死滅して、腸管からの特異抗原の放出が減少することに関連している可能性があり、生体内での特異抗原量の減少と、B-1a細胞の不活性化には関連がある可能性がある。

LPS添加サンプルでは、Stra13発現が低減したにも関わらず、細胞増殖、IgM産生が起こらなかったことから、B-1a細胞の機能的に不活性化には、Stra13以外の抑制因子による不活性化メカニズムも別に存在することが考えられた。

クリオグロブリン血症の病態は、病態進行に必須の因子がそろっている場合には、急速に病態が進行する一方で、必須因子が欠如した状態になれば、速やかに軽症化する性質を持っていると言える。この病態の軽症化の機序には、クリオグロブリン産生細胞であるIgM RF産生B-1a細胞が、B細胞増殖抑制因子Stra13を過剰発現し不活性化していく機構が関与しているものと考えられる。Stra13発現の一因として、虫体から放出される特異抗原量の減少が関与している可能性がある。クリオグロブリン産生細胞の不活性化機構には、Stra13以外の抑制因子の関与も示唆されたことから、今後、その他の因子も解析していく必要がある。

图 表

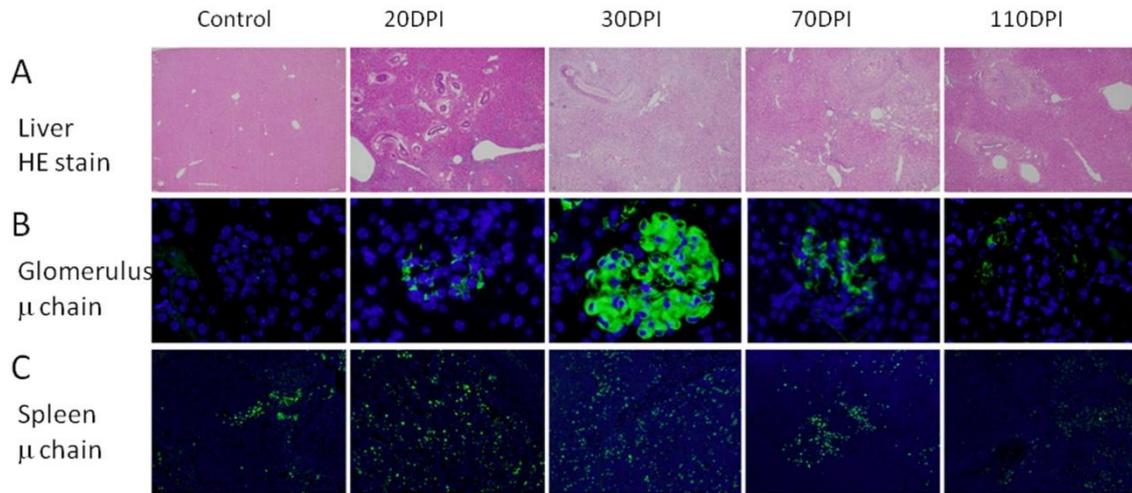


Figure 4-1. A. Necrotic hepatitis and inflammation in the liver were most severe at 20 to 30DPI, and the inflammation response gradually became mild at 70DPI and 110DPI. The worms began to die at 30DPI.

B. IgM deposition in glomerulus was most severe at 30DPI, and the deposition gradually became mild at 70DPI, and 110DPI.

C. IgM+ B cell in splenic red pulp significantly increased at 20 to 30 DPI, and gradually decreased at 70DPI and 110DPI.

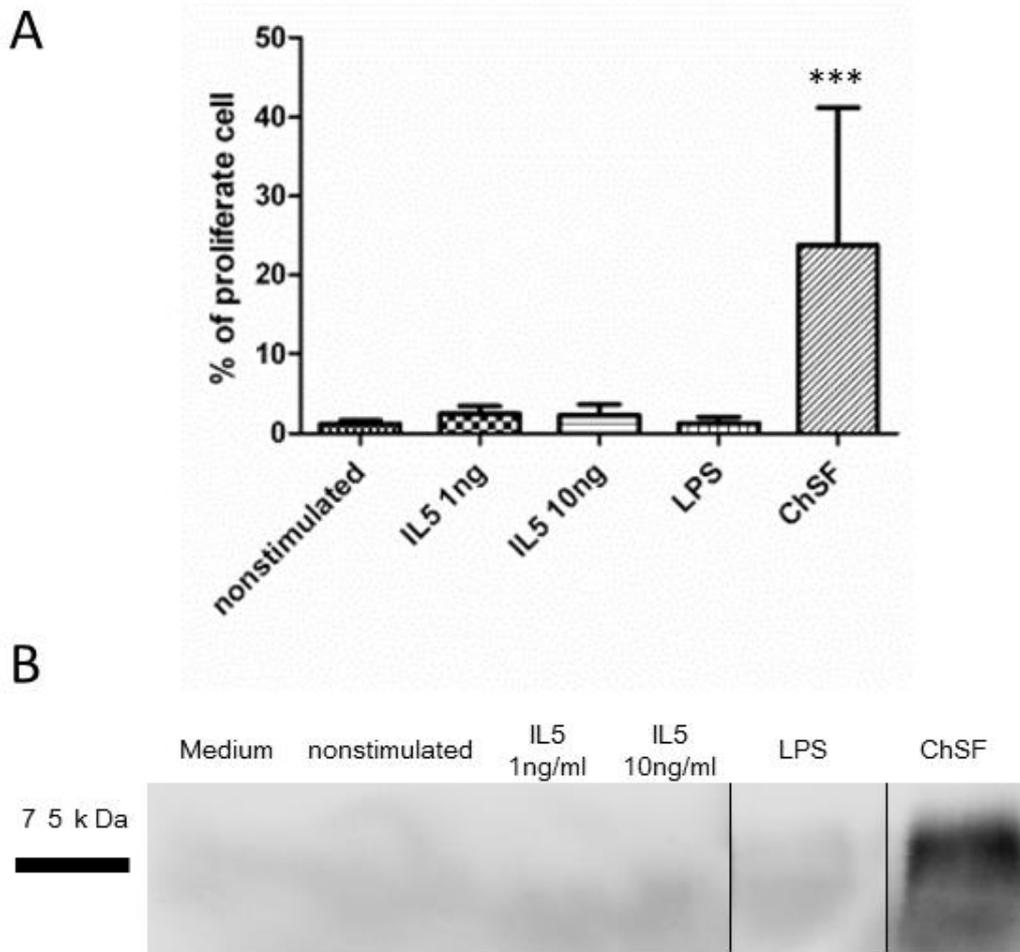


Figure 4-2. Evaluation of cell proliferation and IgM production by the stimulation of ChSF, IL-5, LPS. A: Cell proliferation was promoted by the stimulation of ChSF, and not by the IL-5 or LPS stimulation. (***) $P < 0.0005$, the experimental group vs. the other groups.) B: Detection of IgM in culture media. IgM production was promoted by the stimulation of ChSF, and not by IL-5 or LPS stimulation.

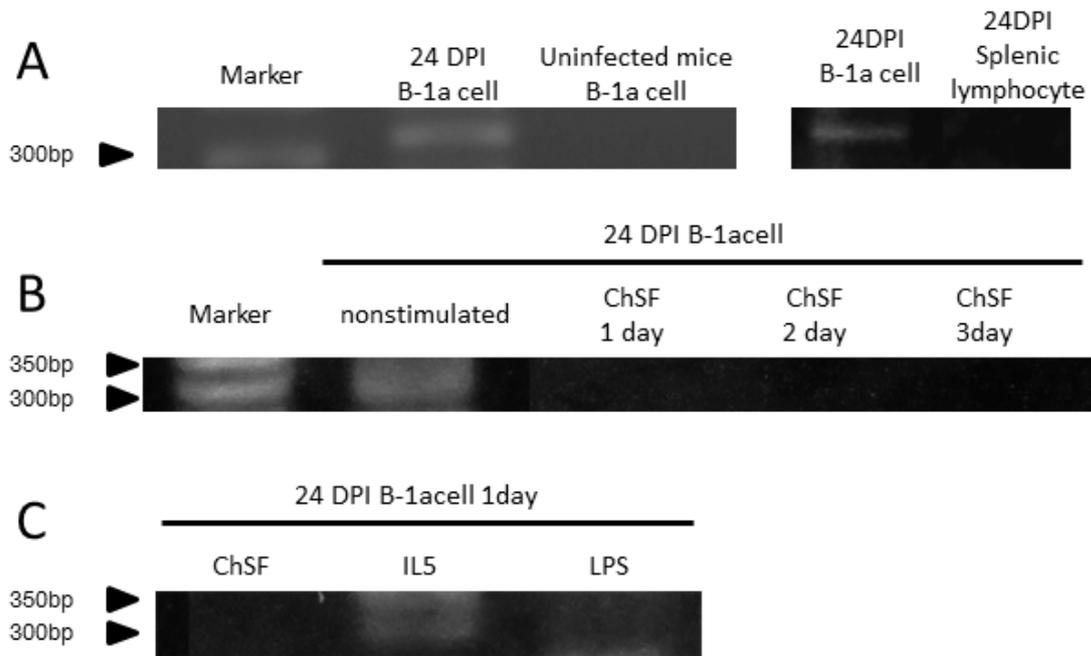


Figure 4-3. Expression of Stra13. A: Stra13 expressed in B-1a cells from infected mice at 24DPI, and did not in B-1a cells from uninfected mice. Expression of Stra13 was detected in the sample of B-1a cells, and not in the sample of splenic lymphocyte in infected mice from 24DPI. B: Stra13 expression was down-regulated by the stimulation of ChSF. C: Stra 13 expression was down-regulated by the stimulation of ChSF and LPS, but not by the stimulation of IL-5.

第 5 章 総括

本研究は、*C. hepatica* 実験感染マウスにおける II 型クリオグロブリン血症の病理発生機序の解明を目的とした。第 2 章では、クリオグロブリン血症の病態解析モデルとして、*C. hepatica* 感染マウスモデルを確立した。第 3 章では、感染からクリオグロブリン血症が発症するまでの、病態初期段階におけるメカニズムを解析した。第 4 章では、クリオグロブリン血症発症後の IgM RF 産生 B 細胞が不活性化状態に進行する過程を評価した。

5-1. *C. hepatica* 実験感染 II 型クリオグロブリン血症マウスモデルについて

C. hepatica 感染マウスで形成されるクリオグロブリンは、リウマトイド活性を持つモノクローナルな IgM と IgA から構成され、II 型クリオグロブリン血症に分類される。本モデルの特徴は、1. 病原体感染に起因したモデルであること、2. II 型クリオグロブリン血症のモデルであること、3. HCV 感染患者のクリオグロブリン血症と類似の病態を示すこと、が挙げられる。

病原体感染に起因するクリオグロブリン血症の病態解明にあたり、本モデルを使う最大の利点は、感染から発症までを段階を追って解析できることである。発症にいたるまでの初期段階は、臨床検体の解析や既存の実験動物モデルでの解析では解析が難しく、不明な点が多く残されている部分である。特に、クリオグロブリンを産生する B リンパ球がモノクローナルに増殖するメカニズムは、病態の本質的な部分であるにもかかわらず、そのメカニズムは分かっていない。本モデルは、この課題に取り組むための好適条件がそろっている。第一に、感染した全ての個体でクリオグロブリン血症が発症すること、第二に、感染から発症までの時間に個体間でばらつきがないため、病態ステージごとの解析がしやすいこと、第三に、マウス系統を変えてもクリオグロブリン血症を発症するため、宿主要因の解析ができること、などが挙げられる。

(Aihara, N., *et al. Histology and Histopathology* 26:1519-1529. 2011)

5-2. 感染からクリオグロブリン血症発症までのメカニズムについて

第3章では、*C. hepatica* 感染からクリオグロブリン血症発症までの病態を解析した。発症には、1. 脾臓 B-1a 細胞 (IgM RF 産生細胞として)、2. 特異抗原 (IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖、IgM 産生のトリガーとして)、3. IL-5 (クリオグロブリン血症の促進因子として) の3つの因子が必須であることが明らかになった。IgM RF 産生 B リンパ球のモノクローナルな増殖には、ポリクローナルな増殖からオリゴクローナルな増殖へ、さらにモノクローナルな増殖へと、多段階の選択的増殖を経る必要があると考えられている。本モデルにおいても、上記3因子の存在下で、選択的な増殖が起こり、クリオグロブリン血症を発症していることが示された。マウスへの可溶性画分接種試験の結果から、感染やそれに伴う肝炎が起こらなくても、抗原および IL-5 が存在すれば、クリオグロブリン血症が発症することが示された。感染による物理的な影響は、Th2 免疫応答を誘起し IL-5 濃度を上昇させることに寄与していることが示唆された。また、感染 BALB/c マウスの血清 IL-5 濃度は、感染後 20 日でのみ一過性に上昇していたが、IL-5 濃度に変化の見られなかった C57BL/6 マウスに比べ、顕著なクリオグロブリン血症を発症したことから、IL-5 が必須因子として働く作用点は、病態メカニズムの中で限定されている可能性がある。

本モデルにおける病理発生メカニズムが、人におけるクリオグロブリン血症のメカニズムとどの程度共通性を持つかは、不明である。しかし、IgM RF 産生細胞の性状の類似性、病態の類似性から、共通のメカニズムの存在が期待できる。IL-5 の寄与も、今後の調査が必要であるが、必須因子の上昇は、一過性である可能性があること、作用するステージは限定的である可能性があることを考慮すべきと考える。今後の最優先課題は、特異抗原の同定と IgM RF 産生 B-1a 細胞の可変領域の解析であると考えている。本モデルにおける抗原、可変領域の結果を HCV 感染クリオグロブリン血症での結果と比較解析することで、新たな知見が期待される。

(Aihara, N., *et al. The American Journal of Pathology*, 185:172-184. 2015)

5-3. IgM RF 産生細胞の機能的不活性可能の獲得について

本モデルにおいて、感染後 24 日は、クリオグロブリン血症の病態が最も高度になる時期であるが、その時点で既に、IgM RF 産生 B-1a 細胞には B 細胞増殖抑制因子である Stra13 が過剰に発現し、機能的に

不活性化状態にあることが示された。可溶性画分による刺激によって、Stra13 発現は低下し、細胞増殖、IgM 産生が促進されることから、この不活性化状態が可逆的なものであることが示唆される。一方、LPS 刺激は、Stra13 発現を低下させるものの、細胞増殖、IgM 産生は誘起しなかったことから、機能的不活性化は、Stra13 発現以外の因子による抑制メカニズムが別に存在することが示唆された。

HCV 感染クリオグロブリン血症患者においても、増殖した細胞中には、不活性化状態の細胞集団があることが報告されている。そして、クリオグロブリン血症の病態は、肝炎の程度、HCV 抗原量と関連していることが知られている。クリオグロブリン産生細胞は、モノクローナルに増殖し、多量のクリオグロブリンを産生する性質を持つ一方で、抗原刺激または増殖の必須因子が欠如した条件下では、速やかに不活性化する側面を持っている可能性がある。

5-4. まとめ

C. hepatica の実験感染により、高い再現性を持つ II 型クリオグロブリン血症マウスモデルを確立した。クリオグロブリン血症発症の初期段階には、IgM RF 産生 B-1a 細胞の選択的増殖の過程があり、発症には、1. 脾臓 B-1a 細胞 (IgM RF 産生細胞として)、2. 特異抗原 (IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖、IgM 産生のトリガーとして)、3. IL-5 (クリオグロブリン血症の促進因子として) の 3 つの因子が必須であることが示された。急速に増殖した IgM RF 産生細胞は、速やかに B 細胞増殖抑制因子 Stra13 が発現することが示され、増殖に適した条件から逸脱した場合には、速やかに不活性化状態になることが示唆された。本モデルは、クリオグロブリン血症において、病態解析が困難であった発症初期の解析が可能である有用な動物モデルであり、本モデルで得られた知見は、病原体感染に起因するクリオグロブリン血症の病態解明につながることを期待される。

引用文献

Aihara N., Chambers J.K., Hosono K., Kamiie J. and Shirota K. (2011). An experimental type II mixed cryoglobulinemia with renal glomerulopathy in ICR mice triggered by *Capillaria hepatica* infection. *Histol. Histopathol.* 26, 1519-1529.

Baumgarth N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 34-46.

Braund K.G., Everett R.M., Bartels J.E. and DeBuysscher E. (1979). Neurologic complications of IgA multiple myeloma associated with cryoglobulinemia in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 1321-1325.

Brouet J.C., Clauvel J.P., Danon F., Klein M. and Seligmann M. (1974). Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am. J. Med.* 57, 775-788.

Casey S.C., Nelson E.L., Turco G.M., Janes M.R., Fruman D.A. and Blumberg B. (2011). B-1 cell lymphoma in mice lacking the steroid and xenobiotic receptor, SXR. *Mol. Endocrinol.* 25, 933-943.

Chan C.H., Hadlock K.G., Fong S.K. and Levy S. (2001). V(H)1-69 gene is preferentially used by hepatitis C virus-associated B cell lymphomas and by normal B cells responding to the E2 viral antigen. *Blood* 97, 1023-1026.

Charles E.D., Brunetti C., Marukian S., Ritola K.D., Talal A.H., Marks K., Jacobson I.M., Rice C.M. and Dustin L.B. (2011). Clonal B cells in patients with hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia contain an expanded anergic CD21^{low} B-cell subset. *Blood* 117, 5425-5437.

Cole L.E., Yang Y., Elkins K.L., Fernandez E.T., Qureshi N., Shlomchik M.J., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. and Vogel S.N. (2009). Antigen-specific B-1a antibodies induced by *Francisella tularensis* LPS provide long-term protection against *F. tularensis* LVS challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

106, 4343-4348.

Dammacco F. and Sansonno D. (2013). Therapy for hepatitis C virus-related cryoglobulinemic vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 369, 1035-1045.

Damoiseaux J. and Cohen Tervaert J.W. (2013). Diagnostics and Treatment of Cryoglobulinaemia: It Takes Two to Tango. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* [Epub ahead of print]

De Re V., De Vita S., Marzotto A., Rupolo M., Gloghini A., Pivetta B., Gasparotto D., Carbone A. and Boiocchi M. (2000). Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas suggests that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor-producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia. *Blood* 96, 3578-3584.

Duan B. and Morel L. (2006). Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5, 403-408.

Falasca K., Mancino P., Ucciferri C., Dalessandro M., Zingariello P., Lattanzio F.M., Petrarca C., Martinotti S., Pizzigallo E., Conti P. and Vecchiet J. (2007). Inflammatory cytokines and S-100b protein in patients with hepatitis C infection and cryoglobulinemias. *Clin. Invest. Med.* 30, 167-176.

Fallahi P., Ferri C., Ferrari S.M., Corrado A., Sansonno D. and Antonelli A. (2012). Cytokines and HCV-related disorders. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 468107.

Ferri C., Sebastiani M., Giuggioli D., Cazzato M., Longombardo G., Antonelli A., Puccini R., Michelassi C. and Zignego A.L. (2004). Mixed cryoglobulinemia: demographic, clinical, and serologic features and survival in 231 patients. *Semin. Arthritis Rheum.* 33, 355-374.

Ferri C. (2008). Mixed cryoglobulinemia. *Orphanet J. Rare Dis.* 3, 25.

Forghieri F., Luppi M., Barozzi P., Maffei R., Potenza L., Narni F. and Marasca R. (2012). Pathogenetic mechanisms of hepatitis C virus-induced B-cell lymphomagenesis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 807351.

Gyotoku Y., Abdelmoula M., Spertini F., Izui S. and Lambert P.H. (1987). Cryoglobulinemia induced by monoclonal immunoglobulin G rheumatoid factors derived from autoimmune MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 138, 3785-3792.

Hardy R.R., Hayakawa K., Shimizu M., Yamasaki K. and Kishimoto T. (1987). Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science* 236, 81-83.

Hickford F.H., Stokol T., vanGessel Y.A., Randolph J.F. and Schermerhorn T. (2000). Monoclonal immunoglobulin G cryoglobulinemia and multiple myeloma in a domestic shorthair cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1029-1033.

Hoogeboom R., van Kessel K.P., Hochstenbach F., Wormhoudt T.A., Reinten R.J., Wagner K., Kater A.P., Guikema J.E., Bende R.J. and van Noesel C.J. (2013). A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J. Exp. Med.* 210, 59-70.

Itakura A., Szczepanik M., Campos R.A., Paliwal V., Majewska M., Matsuda H., Takatsu K. and Askenase P.W. (2005). An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J. Immunol.* 175, 7170-7178.

Kusakabe K., Morishima S., Nakamuta N., Li Z.L. and Otsuki Y. (2007). Effect of danazol on NK cells and cytokines in the mouse uterus. *J. Reprod. Dev.* 53, 87-94.

LeMaoult J., Manavalan J.S., Dyllal R., Szabo P., Nikolic-Zugic J. and Weksler M.E. (1999). Cellular basis of B cell clonal populations in old mice. *J. Immunol.* 162, 6384-6391.

Li C.D., Yang H.L. and Wang Y. (2010). *Capillaria hepatica* in China. *World J. Gastroenterol.* 16, 698-702.

Loffreda S., Muratori P., Muratori L., Mele L., Bianchi F.B. and Lenzi M. (2003). Enhanced monocyte Th1 cytokine production in HCV-infected cryoglobulinemic patients. *J. Hepatol.* 38, 230-236.

Lospaluto J., Dorward B., Miller W., Jr and Ziff M. (1962). Cryoglobulinemia based on interaction between a gamma macroglobulin and 7S gamma globulin. *Am. J. Med.* 32, 142-147.

Maede Y., Inaba M., Amano Y., Murase T., Goto I. and Itakura C. (1991). Cryoglobulinemia in a horse. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 379-383.

Mantovani L., Wilder R.L. and Casali P. (1993). Human rheumatoid B-1a (CD5+ B) cells make somatically hypermutated high affinity IgM rheumatoid factors. *J. Immunol.* 151, 473-488.

Maria De Souza M., Tolentino M., Jr, Assis B.C., Cristina De Oliveira Gonzalez A., Maria Correia Silva T. and Andrade Z.A. (2006). Pathogenesis of septal fibrosis of the liver. (An experimental study with a new model.). *Pathol. Res. Pract.* 202, 883-889.

Mizuochi T., Ito M., Takai K. and Yamaguchi K. (2009). Differential susceptibility of peripheral blood CD5+ and CD5- B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 512-515.

Montecino-Rodriguez E. and Dorshkind K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36, 13-21.

Monteverde A., Ballare M. and Pileri S. (1997). Hepatic lymphoid aggregates in chronic hepatitis C and mixed cryoglobulinemia. *Springer Semin. Immunopathol.* 19, 99-110.

Morse H.C., 3rd, Kearney J.F., Isaacson P.G., Carroll M., Fredrickson T.N. and Jaffe E.S. (2001). Cells of the marginal zone-origins, function and

neoplasia. *Leuk. Res.* 25, 169-178.

Mueller A., O'rourke J., Chu P., Chu A., Dixon M.F., Bouley D.M., Lee A. and Falkow S. (2005). The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma *Am. J. Pathol.* 167, 797-812.

Redrobe S.P. and Patterson-Kane J.C. (2005). *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) in captive rodents in a zoological garden. *J. Comp. Pathol.* 133, 73-76.

Saadoun D., Boyer O., Trebeden-Negre H., Limal N., Bon-Durand V., Andreu M., Klatzmann D., Piette J.C. and Cacoub P. (2004). Predominance of type 1 (Th1) cytokine production in the liver of patients with HCV-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis *J. Hepatol.* 41, 1031-1037.

Sabnis S.G., Gunson D.E. and Antonovych T.T. (1984). Some unusual features of mesangioproliferative glomerulonephritis in horses. *Vet. Pathol.* 21, 574-581.

Sautto G., Mancini N., Solforosi L., Diotti R.A., Clementi M. and Burioni R. (2012). HCV proteins and immunoglobulin variable gene (IgV) subfamilies in HCV-induced type II mixed cryoglobulinemia: a concurrent pathogenetic role. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 705013.

Scott D.G., Bacon P.A., Elliott P.J., Tribe C.R. and Wallington T.B. (1982). Systemic vasculitis in a district general hospital 1972-1980: clinical and laboratory features, classification and prognosis of 80 cases. *Q. J. Med.* 51, 292-311.

Stall A.M., Farinas M.C., Tarlinton D.M., Lalor P.A., Herzenberg L.A., Strober S. and Herzenberg L.A. (1988). Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7312-7316.

Stidworthy M.F., Lewis J.C., Masters N.J., Boardman S.I., Hopper J.S., de Linan F.J., Redrobe S.P. and Sayers G. (2009). *Capillaria hepatica* in primates in zoological collections in the British Isles. *Vet. Rec.* 164, 66.

Su C.F., Chen H.H., Yeh J.C., Chen S.C., Liu C.C. and Tzen C.Y. (2002). Ultrastructural 'fingerprint' in cryoprecipitates and glomerular deposits: a clinicopathologic analysis of fingerprint deposits. *Nephron* 90, 37-42.

Taira K., Saeed I., Lind P., Murrell K.D. and Kapel C.M. (2003). Population dynamics of *Toxocara canis* in pigs receiving a single or multiple infection. *Parasitology* 127, 593-602.

Taira K., Yanagida T., Akazawa N. and Saitoh Y. (2013). High infectivity of *Toxocara cati* larvae from muscles of experimentally infected rats. *Vet. Parasitol.* 196, 397-400.

Takatsu K., Kouro T. and Nagai Y. (2009). Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv. Immunol.* 101, 191-236.

Taneda S., Segerer S., Hudkins K.L., Cui Y., Wen M., Segerer M., Wener M.H., Khairallah C.G., Farr A.G. and Alpers C.E. (2001). Cryoglobulinemic glomerulonephritis in thymic stromal lymphopoietin transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 159, 2355-2369.

Terrier B., Joly F., Vazquez T., Benech P., Rosenzweig M., Carpentier W., Garrido M., Ghillani-Dalbin P., Klatzmann D., Cacoub P. and Saadoun D. (2011). Expansion of functionally anergic CD21⁻/low marginal zone-like B cell clones in hepatitis C virus infection-related autoimmunity. *J. Immunol.* 187, 6550-6563.

Tominaga A., Takaki S., Koyama N., Katoh S., Matsumoto R., Migita M., Hitoshi Y., Hosoya Y., Yamauchi S. and Kanai Y. (1991). Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production *J. Exp. Med.* 173, 429-437.

Visentini M., Cagliuso M., Conti V., Carbonari M., Cibati M., Siciliano G.,

Cristofolletti C., Russo G., Casato M. and Fiorilli M. (2012). Clonal B cells of HCV-associated mixed cryoglobulinemia patients contain exhausted marginal zone-like and CD21 low cells overexpressing Stra13. *Eur. J. Immunol.* 42, 1468-1476.

Wang Z., Raifu M., Howard M., Smith L., Hansen D., Goldsby R. and Ratner D. (2000). Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J. Immunol. Methods* 233, 167-177.

Winfield J.B. (1983). Cryoglobulinemia. *Hum. Pathol.* 14, 350-354.

Yamanishi S., Iizumi T., Watanabe E., Shimizu M., Kamiya S., Nagata K., Kumagai Y., Fukunaga Y. and Takahashi H. (2006). Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by Helicobacter pylori urease. *Infect. Immun.* 74, 248-256.

Yang Y., Ghosn E.E., Cole L.E., Obukhanych T.V., Sadate-Ngatchou P., Vogel S.N., Herzenberg L.A. and Herzenberg L.A. (2012A). Antigen-specific memory in B-1a and its relationship to natural immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5388-5393.

Yang Y., Ghosn E.E., Cole L.E., Obukhanych T.V., Sadate-Ngatchou P., Vogel S.N., Herzenberg L.A. and Herzenberg L.A. (2012B). Antigen-specific antibody responses in B-1a and their relationship to natural immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5382-5387.

要旨

第1章 緒言

クリオグロブリン (CG) 血症は、低温下で沈殿する血清中の免疫グロブリンの産生を特徴とし、多くは特定の感染症に関連して発症する。ヒトにおける CG 血症は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に伴った II 型 CG 血症が最も多い。しかし、病原体感染に関連した CG 血症の実験動物モデルは確立されておらず、研究対象が発症後の患者検体の限られていることから、感染に起因する CG 血症の病理発生機序は、未だ解明されていない。

著者らは、げっ歯類を宿主とする線虫である *Capillaria hepatica* (*C. hepatica*) の感染により、マウスが CG 血症を高率に発症することを見出した。本研究は、*C. hepatica* 実験感染 CG 血症マウスモデルを確立し、本モデルにおける CG 血症発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

第2章 *C. hepatica* 実験感染 CG 血症マウスモデルの確立

C. hepatica の幼虫形成卵を ICR マウスに経口接種すると、全個体 (15/15 匹) において肝臓実質に虫体の感染が確認された。接種後 20 日の脾臓では、IgM κ 陽性 B リンパ球が増加し、接種後 20 日からは血清中に IgA および IgM κ からなる CG が全例で認められた。さらに、接種後 30 日の血清では、IgM 型 RF が有意に上昇していた。接種後 30 日の腎臓では糸球体がび慢性に腫大し、毛細血管腔を塞栓する IgM を含む硝子様物が観察された。以上の所見から、本病態がモノクローナルな IgM 型 RF とポリクローナルな IgA から構成される II 型 CG 血症であることが示された。従来、実験動物において感染した宿主に高率に CG 血症を発症させる病原体はなく、本モデルは、感染に起因して発症する II 型 CG 血症の初のモデルである。HCV 感染患者や既報の動物モデルにおいて解明することができなかった重要な課題は、病態の初期段階で起こる CG 産生細胞の選択的増殖のメカニズムであり、本モデルは、感染から CG 血症が発症するまでの過程を解析できることに最大の利点があると考えた。そこで、第 3 章では本モデルを使い、CG 血症発症初期段階における B リンパ球の選択的増殖過程を評価することとした。

(Aihara, N., *et al. Histology and Histopathology* 26:1519-1529. 2011)

第3章 クリオグロブリン血症発症初期段階における B リンパ球の選択的増殖のメカニズムの解明

本章では、*C. hepatica* 感染から CG 血症の発症までの病態において、1. CG を形成する IgM が認識する虫体特異抗原、2. IgM RF 産生細胞の性状、3. 病態進行の促進因子の解析を目的とし、以下の実験を行った。

3-1. CG を形成する IgM が認識する抗原の解析

CG を構成する IgM が認識する *C. hepatica* 抗原を明らかにするため、*C. hepatica* 虫体可溶性画分 (ChSF) を試料とし、感染マウス血清、CG 可溶化物を一次抗体として用いてウエスタンブロッティングを行った。また、血清および CG の虫体への反応性を蛍光免疫染色により検出した。接種後 24 日の CG 中 IgM は、約 75kDa の虫体抗原に特異的に反応した。また、免疫染色で CG 中の IgM は、虫体の消化管に特異的に結合した。以上の結果から、本モデルの CG は、虫体特異抗原に対して特異的に結合する IgM で構成されることが示唆された。

3-2. IgM RF 産生細胞の性状解析

次に、IgM RF を産生する細胞の同定および性状解析を行った。CG 血症発症マウスの脾臓赤脾髄領域では、IgM κ 陽性細胞が優位に増加しており、フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡による解析から、増加する B 細胞は、 μ 鎖+ κ 鎖+CD45R/B220+CD5+ の B-1a 細胞であることが明らかとなった。CG が IgM κ から構成されることから、脾臓で増加するこの IgM+ κ + B-1a 細胞が IgM RF 産生細胞であると仮定した。そこで、ChSF が感染マウス脾臓 B-1a 細胞に与える影響を *in vitro* において評価した。

接種後 24 日の感染マウスから単離した脾臓 B-1a 細胞を ChSF で刺激すると、細胞増殖および IgM 産生が亢進した。産生された IgM は CG と同様に約 75kDa の虫体抗原に特異的に結合した。また、IgM 可変領域の RT-PCR では、ChSF 刺激により、約 1,100bp の可変領域 mRNA 発現が上昇した。発症マウス個体間で共通して、約 1,100bp の可変領域 mRNA 発現を認めた。

以上の結果から、ChSF による刺激で、B-1a 細胞の選択的な増殖が促進されており、この IgM+ κ + B-1a 細胞が CG 産生細胞であると考えられた。

3-3. 病態進行の促進因子の解析

CG 血症の進行には、宿主 Th1/Th2 応答性の違いが関与しているという仮説を立て、異なるマウス系統を用いて感染実験を行った。その結果、感染時の Th1/Th2 応答性は、BALB/c と C57BL/6 では異なっており、Th2 に偏向した免疫応答が BALB/c では起こり、C57BL/6 では起こらなかった。また、感染した BALB/c マウスでは、全身性の好酸球増多症が起こっていた。このことから、CG 産生細胞である B-1a 細胞と好酸球の両方に対する増殖・活性化因子である IL-5 に着目した。血清中 IL-5 濃度は、BALB/c マウスで感染後 20 日に一過性に高度に上昇したが、C57BL/6 では顕著な上昇は見られなかった。また、

C57BL/6 を遺伝的背景に持ち IL-5 を過剰発現する、IL-5tgC57BL/6 マウスを用い感染実験を行ったところ、IL-5 の血中濃度は感染前から高値であり、感染後はさらに著しく上昇していた。次に、これら 3 系統の CG 血症の病態を比較した。BALB/c マウスでは、接種後 24 日に、CG の形成、血清中 IgM RF 濃度の上昇、糸球体への IgM の沈着を認めたが、C57BL/6 マウスではいずれも軽度であった。一方、IL-5tgC57BL/6 マウスでは、BALB/c マウスに匹敵する CG 血症が惹起された。このことから、Th2 に偏向した免疫状態下で CG 血症の病態は促進され、それには IL-5 が関与していることが示唆された。

感染により高度な CG 血症を発症した BALB/c マウスおよび IL-5tgC57BL/6 マウスに ChSF を腹腔内投与したところ、IL-5tgC57BL/6 マウスでのみ CG 血症が惹起された。ChSF 投与では、炎症反応は誘起されず、IL-5 濃度に変化はなかった。このことから、感染による Th2 免疫応答は、IL-5 を上昇させるために重要であり、CG 血症の進行に必須の因子は IL-5 であることが示された。

以上の結果から、本モデルにおける CG 血症発症には、1. 脾臓 B-1a 細胞 (IgM RF 産生細胞として)、2. 特異抗原 (IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖、IgM 産生のトリガーとして)、3. IL-5 (CG 血症の促進因子として) の 3 つの因子が必須であることが明らかになった。

(Aihara, N., *et al. The American Journal of Pathology*, 185:172-184. 2015)

第 4 章 IgM RF 産生 B-1a 細胞における増殖抑制因子 Stra13 発現解析

接種後 24 日は CG 血症の病態がピークの時期であるが、接種後 24 日で脾臓から単離した B1a 細胞を ChSF、IL-5 および LPS で刺激すると、ChSF 刺激でのみ細胞増殖および IgM 産生が亢進し、IL-5 および LPS 刺激には反応しなかった。この結果から、CG 血症の病態がピークに達する時期には、CG 産生細胞はすでに機能的に抑制状態にあると推察された。そこで、関与が示唆される B 細胞抑制因子 Stra13 発現を RT-PCR により調べた。その結果、非感染マウスの B-1a 細胞には Stra13 は発現していなかったが、接種後 24 日の B-1a 細胞には強い発現が認められた。脾臓単離リンパ球からは Stra13 の発現は検出されず、Stra13 発現が B-1a 細胞に限定していることが示唆された。ChSF 刺激により B-1a 細胞における Stra13 発現が低下し、細胞増殖、IgM 産生が亢進することから、この抑制機序が可逆的であることが示唆され、ChSF 中の特異抗原が Stra13 発現制御に関与していることが考えられた。また、B-1a 細胞は LPS 刺激により Stra13 発現が低下したものの、細胞増殖や IgM 産生が起こらないことから、Stra13 以外の抑制機序が存在することが示唆された。

第 5 章 総括

C. hepatica の実験感染により、高い再現性を持つ II 型 CG 血症マウスモデルを確立した。CG 血症発症の初期段階には、IgM RF 産生 B-1a 細胞の選択的増殖の過程があり、発症には、1. IgM RF 産生細胞として脾臓 B-1a 細胞、2. IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖および IgM 産生のトリガーとしての特異抗原、3. CG 血症の促進因子として IL-5 の、3 つの因子が必須であることが示された。急速に増殖した IgM RF 産生細胞には、速やかに B 細胞増殖抑制因子 Stra13 が発現することが示され、増殖に適した条件から逸脱した場合には、それらの細胞は速やかに不活性化状態になることが示唆された。本モデルは、CG 血症において病態解析が困難であった発症初期の解析が可能である有用な動物モデルであり、本モデルで得られた知見は、病原体感染に起因する CG 血症の病態解明につながることを期待される。

英文要旨

The study on the mechanism of development of mixed cryoglobulinemia in *Capillaria hepatica*-infected mice

Chapter 1: Introduction

Chronic infection by pathogens such as the hepatitis C virus (HCV) induces monoclonal or oligoclonal proliferation of B-cells, which produce IgM rheumatoid factor (RF) leading to the development of mixed cryoglobulinemia (MC). Pathogenesis of MC has not yet been completely clarified because of the lack of an experimental animal model. In the present study, the author established an animal model of MC that is induced by experimental infection with *Capillaria hepatica* (*C. hepatica*) in mice and examined the mechanism of the development of MC in *C. hepatica*-infected mice.

Chapter 2: MC mouse model induced by *C. hepatica*-infection

In this chapter, the author established a MC mouse model induced by *C. hepatica*-infection. ICR mice experimentally infected with *C. hepatica* eggs developed cryoglobulinemia at 20 and 30 days post injection (DPI). Using immunological analysis, cryoglobulinemia of the infected mice was classified as type II MC by detection of monoclonal IgM rheumatoid factor and IgA in the cryoprecipitate of serum. Using immunofluorescence, we observed an increase in the number of double-positive cells for μ heavy and κ light chains of immunoglobulin in the spleens of infected mice. Histopathologically, this model was characterized by glomerulopathy associated with intense deposition of IgM and IgA filling in capillary lumina. Ultrastructural analysis showed that glomerular deposits consisted of stacks of twisted microtubular structures. These serological and histological features resembled those of type II mixed cryoglobulinemia in human. This is the first experimental animal model of type II mixed cryoglobulinemia that will enable detailed studies on the pathogenesis of cryoglobulinemia. To date, the mechanism of selective lymphoproliferation during the early stage of MC has not been defined because of the difficulty associated with the collection of samples from early stage MC patients. The *C. hepatica*-induced MC model allows the analysis of selective lymphoproliferation during the early stage of MC. Therefore, the author examined the mechanism of selective

lymphoproliferation in the following chapter.

Chapter 3: Selective proliferation of splenic B cells during the early stage of MC

To clarify the mechanism of selective lymphoproliferation, the following points are important: identification of the antigen triggering the process, the phenotype of IgM-RF-secreting cells, and the immune status supporting MC progression.

3.1. Characterization of serum cryoglobulin in *C. hepatica*-infected mice

To examine the reactivity of cryoglobulin to *C. hepatica* antigens, the author performed immunofluorescence analysis using serum samples or the cryoglobulin solution samples from BALB/c mice as primary antibody against the section of rat liver collected at 24 DPI, and western blot analysis using *C. hepatica* soluble fraction (ChSF) as loading sample. As a result, the specific binding of IgM in cryoglobulin to the digestive tract of the *C. hepatica* adult worm and to a 75 kDa antigen in the ChSF was confirmed in all infected mice. Therefore, the cryoglobulin might be composed of the monoclonal or oligoclonal IgM raised against the specific worm antigen in the ChSF.

3.2. Characterization of the IgM-RF-secreting cells

At 24 DPI, *C. hepatica*-infected BALB/c mice showed significant splenomegaly, and a large number of IgM⁺κ⁺ B cells were observed in the splenic red pulp. To characterize the IgM⁺κ⁺ B cells, we divided the IgM⁺κ⁺ B cells into three groups (B-2, B-1a, and B-1b) according to the expression of CD5 and CD45R/B220 using flow cytometric analysis. CD5-positive B-1a cells were rare in the spleen of uninfected mice and significantly increased in the spleen of *C. hepatica*-infected mice. The author postulated that the B-1a cells that proliferated in the spleen might produce cryoglobulin; therefore, the response of splenic B-1a cells from infected mice against ChSF was analyzed by assessing cell proliferation and IgM production.

In vitro assays using B-1a cells from infected mice showed that stimulation by ChSF promoted the proliferation of B-1a cells and secretion of IgM. The produced IgM bound to the 75 kDa antigen similar to cryoglobulin, and B-1a cells expressing a restricted repertoire of μ chain variable regions

selectively proliferated. These results suggested that the antigen-specific splenic B-1a clone was of cryoglobulin-secreting cells.

3.3. Study on the immune status supporting MC progression

To verify the hypothesis that the Th1/Th2 immune response plays a role in the development of cryoglobulinemia, the author used two mouse strains with different Th responses. As a result, *C. hepatica*-infection induced Th2 polarization accompanied by systemic eosinophilia in BALB/c mice, but not in C57BL/6 mice.

Eosinophil proliferation and activation are mediated by IL-5, which is a Th2 type cytokine. IL-5 is also known as a critical growth factor for B-1 cells. Therefore, the author postulated that IL-5 might be the essential promoting factor of cryoglobulinemia, and evaluated the serum IL-5 level in BALB/c, C57BL/6, and IL-5 transgenic mice with the C57BL/c background (IL-5tg-C57) showing IL-5 over expression. Serum IL-5 levels at 20 DPI were significantly higher in BALB/c mice than in uninfected BALB/c mice and infected C57BL/6 mice. The serum IL-5 level in uninfected IL-5tgC57BL/6 mice was 40.5 pg/ml and significantly increased in response to infection at 20 and 24 DPI.

Next, the author examined the development of cryoglobulinemia in 3 strains. At 24 DPI, cryoprecipitate was observed in BALB/c and IL-5tgC57BL/6 mice. The severity of MC was correlated with the increase in serum IL-5 levels in the infected mice. These findings showed that cryoglobulinemia was exacerbated in the Th2 biased immune condition, and that IL-5 was a critical promoting factor of cryoglobulinemia. Furthermore, intraperitoneal injection of ChSF caused MC without an inflammatory response in IL-5tgC57BL/6 mice, indicating that cryoglobulinemia could be induced by co-stimulation ChSF and IL-5 without infection in vivo.

In this chapter, the author identified the following three factors essential for the pathogenesis of cryoglobulinemia following selective lymphoproliferation: 1) splenic B-1a cells as IgM-RF-secreting cells, 2) *C. hepatica*-specific antigens as a trigger of B-1a cell proliferation and IgM production, and 3) IL-5 as an essential promoting factor of the selective lymphoproliferative stage of MC.

Chapter 4: Rapid acquisition of an exhausted phenotype during the

remission stage of MC

The progression of MC was associated with necrotic hepatitis caused by *C. hepatica* worms; rapid progression of MC is associated with exacerbation of hepatitis during 20 to 30 DPI, and remission of MC is associated with cure of hepatitis and death of worms in the liver during 30 to 110 DPI. The author postulated that there might be a mechanism of rapid acquisition of exhausted phenotype during the remission stage of MC. To verify the hypothesis, the author examined the expression of Stra13 transcripts, a powerful negative regulator of B cell activation, in B-1a cells from uninfected and infected BALB/c mice at 24 DPI. As a result, the B-1a cells from infected mice at 24 DPI expressed abundant transcript of Stra13. On the other hand, B-1a cells from uninfected mice did not express Stra13 transcript. In addition, Stra13 mRNA expression on B-1a cells from infected mice at 24 DPI was down-regulated by ChSF stimulation, and the stimulation by ChSF promoted the proliferation of B-1a cells and secretion of IgM. The Stra13 expression in the B-1a cells from infected mice at 24 DPI suggests that these cells may have already acquired a functionally exhausted phenotype though IgM-RF in the serum and IgM deposition in the glomeruli peaked at 24 to 30 DPI, and that the functional defect may be overcome by ChSF stimulation.

Chapter 5: Conclusions

MC mouse model induced by *C. hepatica*-infection is the novel experimental animal model of MC induced by infection. In the present study, the author identified the following three factors essential for the pathogenesis of cryoglobulinemia following selective lymphoproliferation: 1) splenic B-1a cells as IgM-RF-secreting cells, 2) *C. hepatica*-specific antigens as a trigger of B-1a cell proliferation and IgM production, and 3) IL-5 as an essential promoting factor of the selective lymphoproliferative stage of MC. In addition, the proliferated splenic B-1a cells rapidly acquired exhausted phenotype by overexpressed Stra13 transcript, a powerful negative regulator of B cell activation, during the remission stage of MC. This mouse model allows the analysis of selective lymphoproliferation during the early stage of MC, and will provide new insights for the pathogenesis of MC induced by infection.

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました麻布大学獣医学部 病理学研究室 教授 代田 欣二 先生、ならびに同准教授 上家 潤一 先生に深く御礼申し上げます。

本学位論文の審査にあたり、貴重なご助言を賜りました麻布大学獣医学部 微生物学第一研究室 教授 阪口 雅弘 先生、ならびに同基礎教育研究室・生物学 教授 佐原 弘益 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の全般に渡り、貴重なご助言を賜りました麻布大学獣医学部 病理学研究室 教授 宇根 有美 先生、同比較毒性学研究室 教授 代田 真理子 先生、同獣医免疫学研究室 講師 岡本 まり子 先生、ならびに同微生物学第一研究室 特任助教 岡本 憲明 先生に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行に不可欠な技術について、ご指導およびご協力を賜りました麻布大学獣医学部 寄生虫学研究室 講師 平 健介 先生、ならびに同栄養学研究室 講師 鈴木 武人 先生に謹んで感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、ご協力頂きました麻布大学獣医学部 病理学研究室の卒業生ならびに在籍生 各位に厚く御礼申し上げます。

平成 26 年 3 月
相原 尚之