

実験的自己免疫性脳脊髄炎に合併する虹彩炎における ストレス応答蛋白質 60 の発現

—免疫組織化学的研究—

隈上 武志¹⁾, 加藤 信介²⁾, 大浜 栄作²⁾

¹⁾鳥取大学医学部眼科学教室, ²⁾鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経病理学教室

要 約

ぶどう膜炎は様々な全身疾患に合併することが知られているが, その病因は未だ不明である。今回我々は, 多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) に合併する虹彩炎に発現するストレス応答蛋白質 (stress-response protein, srp) について, 免疫組織化学的に検討した。EAE は Lewis ラットに, モルモット脊髄と完全 Freund アジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA) の乳化物を感作して作成した (EAE 群)。対照には, CFA のみで感作したラット (CFA 群) と無処置ラット (正常対照群) を用いた。CFA 群では, 虹彩炎は発症せず, その虹彩には srp である ubiquitin, α B-crystallin, srp 27, srp 60, srp 72 の発現をすべてみな

かった。それに対し EAE 群では, すべてのラットに虹彩炎が発症し, その虹彩炎ピーク時の虹彩上皮に srp 60 が 22 眼中 20 眼 (90.9%) に発現していた。また, ubiquitin と α B-crystallin は, それぞれ 22 眼中 4 眼 (18.2%) および 3 眼 (13.6%) に発現していた。正常対照群の虹彩上皮では, ubiquitin の発現が 6 眼中 1 眼 (16.7%) にみられた。以上から, EAE に合併する虹彩炎の発症に分子量 60 kDa の srp 60 が関与していることが示唆された。(日眼会誌 101: 299—304, 1997)

キーワード: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE), 虹彩炎, ストレス応答蛋白質 (srp), 多発性硬化症 (MS), 免疫組織化学

Expression of the Stress-response Protein 60 in Iritis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis —An Immunohistochemical Study—

Takeshi Kumagami¹⁾, Shinsuke Kato²⁾ and Eisaku Ohama²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University

²⁾Division of Neuropathology, Institute of Neurological Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University

Abstract

Uveitis of unknown etiology is known to occur in association with various systemic disorders. We did an immunohistochemical study on the expression of stress-response proteins (srp's) in iritis associated with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is regarded as a model of multiple sclerosis. EAE was induced in Lewis rats by sensitization with homogenized spinal cord of guinea pig in complete Freund's adjuvant (CFA) (Group EAE). For controls, we used rats sensitized with CFA only (Group CFA) and untreated rats (normal controls). All rats developed iritis in Group EAE. In Group CFA, no rats developed iritis. No expression of ubiquitin, α B-crystallin, srp 27, srp 60, or srp 72 was seen in the epithelium of the iris of the rats in Group

CFA. In the rats in Group EAE, srp 60 was expressed in the epithelium of the iris in 20/22 (90.9%) of the eyes examined, ubiquitin in 4/22 (18.2%), and α B-crystallin in 3/22 (13.6%). In the untreated rats, only ubiquitin was expressed in the epithelium of the iris in 1/6 (16.7%) of the eyes examined. These results suggest that srp 60, 60 kDa srp, plays an important role in the occurrence of iritis associated with EAE. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 299—304, 1997)

Key words: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), Iritis, Stress-response protein (srp), Multiple sclerosis (MS), Immunohistochemistry

別刷請求先: 683 鳥取県米子市西町 86 鳥取大学医学部眼科学教室 隈上 武志
(平成8年7月15日受付, 平成8年11月15日改訂受理)

Reprint requests to: Takeshi Kumagami, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago-shi, Tottori-ken 683, Japan

(Received July 15, 1996 and accepted in revised form November 15, 1996)

I 緒 言

ぶどう膜炎は、多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)^{1)~5)}や糖尿病, リウマチ性疾患, サルコイドーシス, 炎症性腸疾患など, 様々な疾患に合併することが知られている⁶⁾. その発生機序は未だ明らかではないが, 自己免疫機序の関与が示唆されている. MSは中枢神経系の白質に脱髄病巣の多発する疾患であり, その動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)においても, 家兎⁷⁾⁸⁾やサル⁹⁾, ラット¹⁰⁾¹¹⁾などを用いた実験で, 前部ぶどう膜炎の一つである虹彩炎が合併することが報告されている.

一方, ストレス応答蛋白質(stress-response protein, srp), heat shock proteinと同義であるが, 本稿では srpを用いる)は, 有害なストレスに対面した細胞が, 普遍的な防御反応として急速に産生する一群の蛋白質である^{12)~14)}. srpは原核細胞から哺乳類に至るまでアミノ酸配列の相同性がよく保存され, 特に分子量 60 kDaのもの(以下, srp 60)はそれ自体の抗原性が強く, MS¹⁵⁾¹⁶⁾, 若年性関節リウマチ¹⁷⁾, Behçet病¹⁸⁾, 自己免疫性肝炎¹⁹⁾などの自己免疫疾患の発症に関与していることが注目されている²⁰⁾²¹⁾.

今回我々は, EAEに合併する虹彩炎の発生機序を解明する目的で, 主病変の存在する虹彩組織を対象に各種 srpの発現を免疫組織化学的に検討した.

II 方 法

1. EAEの作成

実験動物は8週齢の雌 Lewis ラットを用い, 取り扱い は総理府「実験動物の飼養および保管等に関する基準」(昭和55年3月)に基づく「鳥取大学医学部実験動物指針」(昭和63年12月)に従った. EAEの作成方法は Feurerら²²⁾の方法を一部改変した²³⁾. すなわち, 感作抗原としてモルモット脊髄 1g 当たり 0.01 M リン酸緩衝加生理食塩液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4) 1 ml を加え均質化したものに, 加熱結核死菌(H 37 Ra) 20 mg/ml を含む完全 Freund アジュバント(complete Freund's adjuvant: CFA, Difco Laboratories, Detroit, MI) 2 ml を混和して総量 6 ml の乳化液を作成し, 27匹のラットの後肢足底部に各 0.2 ml 接種した

(EAE群). 対照には, PBS 1 ml 当たり CFA 1 ml を混和したものを各 0.2 ml 接種したラット 10 匹(CFA群)と無処置ラット 3 匹(正常対照群)を用いた.

2. 動物実験における症状の評価

EAEの脊髄症状は Katoら²⁴⁾の方法に従い評価した. すなわち, 0度:無症状, 1度:尾下垂, 2度:軽度後肢麻痺あるいは軽度失調, 3度:中等度後肢麻痺あるいは重度失調, 4度:失禁を伴う重度後肢麻痺, 5度:重度四肢麻痺あるいは瀕死状態の6段階にスコア化した. 眼症状は以下のごとく評価した. すなわち, 0度:無症状, 1度:虹彩血管拡張, 2度:局所の虹彩前面の白色膜様物(フィブリンなど)出現, 3度:虹彩前面の白色膜様物が増加し, 浸潤部分が虹彩面積の1/4以下にみられるもの, 4度:同所見が虹彩面積の1/2以下にみられるもの, 5度:同所見が虹彩面積の1/2以上にみられるものとした.

3. 組織学および免疫組織化学的検索

後述する実験動物の症状の経過から, EAE群の病期を虹彩炎期, 初回脊髄発作期, 1回目寛解期, 再発脊髄発作期, 2回目寛解期に分類できたので, これら各病期(虹彩炎期および初回ならびに再発の脊髄発作期は各ピーク時, 脊髄寛解期はその開始数日後)における眼球を検索した. すなわち, 各病期ごとに動物をペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®) 50 mg/kg 腹腔内注射による全身麻酔後に4%緩衝パラホルムアルデヒドで経心的に灌流固定し, その後摘出された眼球はパラフィンに包埋した. 6 μm 切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学的検索に供した.

組織学的検索は, 虹彩実質の炎症細胞浸潤の程度(ⅠからⅢの4段階)と, 前房内へのフィブリン析出の有無をもって評価した. 免疫組織化学的検索では, 一次抗体として表1に示す抗体²⁵⁾²⁶⁾を用い, アビジン-ビオチン複合体法(Vectastain ABCキット®, Vector Laboratories, Burlingame, CA)で反応させた後, ジアミノベンジンで発色させた.

III 結 果

1. 実験動物における症状

EAE群の脊髄症状および眼症状の経過を図1に示す. 脊髄症状は, 以前の報告²³⁾とほぼ同様, 感作後平均13日

表1 使用した一次抗体

抗 体	クローン	希釈倍率	入手元(参考文献)
srp 60	M	1:800	Clone LK-2, StressGen, Canada
ubiquitin	P	1:800	Yen S-HC ²⁵⁾
αB-crystallin	P	1:500	Goldman JE ²⁶⁾
srp 27	M	希釈調整済み	Clone G 3.1, Biogenex, USA
srp 72	M	1:500	Code 3 B 6, Affinity BioReagents, USA

srp: ストレス応答蛋白質, M: モノクローナル, P: ポリクローナルを示す.

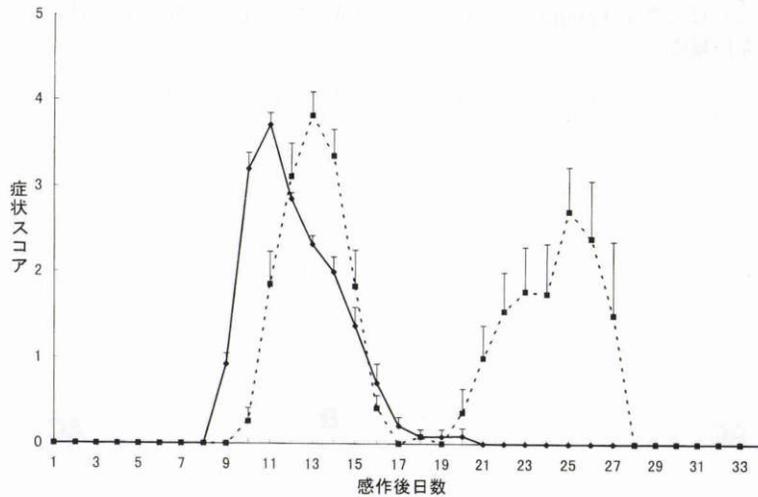


図1 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)ラットの症状経過。

■：脊髄症状(被検匹数：27～2)，◆：眼症状(被検眼数：54～4)，値は平均値±標準誤差を示す。



図2 虹彩炎ピーク時の前眼部写真。

虹彩前面に白色の膜様物(フィブリンなど)を認める。

2. 組織学的所見

EAE群では、主な眼病変の存在する虹彩を検索した。EAE群の各病期における虹彩の組織学的所見を表2に示す。虹彩炎期では、検索した11匹22眼すべてに高度の虹彩炎を認めた。すなわち、無処置ラット虹彩(図3a)と比較し、虹彩実質に高度の単核細胞浸潤を認め、前房側にはフィブリン析出と単核細胞浸潤がみられた(図3b)。初回脊髄炎発作期以降では、虹彩に中等度または軽度の単核細胞浸潤を残すものが数例みられるのみであった。CFA群では組織学的にも虹彩炎を示す所見を認めなかった。

3. 免疫組織化学的所見

EAE群の各病期ならびにCFA群および正常対照群の虹彩上皮における各srpの発現頻度を表3に示す。srp 27, srp 72の発現は、いずれの群においてもみられなかった。Ubiquitin, αB-crystallinは正常対照群で前者のみごく軽度発現していたが、EAE群では両者が虹彩炎期にごく少数みられるのみであった。これらに対し、srp 60は正常対照群(図4a)およびCFA群では発現していなかった。しかし、EAE群では虹彩炎ピーク時(図4b)に高度、かつ高率に発現していた。

目(平均症状スコア；3.8)および25日目(平均症状スコア；2.7)に症状のピークを持つ二峰性の経過をとった。眼症状は、27匹中27匹(100%)に虹彩炎(図2)が発症し、感作後平均11日目(平均症状スコア；3.7)に症状のピークを持ち、以後徐々に軽快していく一峰性の経過をとった。CFA群では、脊髄症状も虹彩炎も発症しなかった。

表2 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)群虹彩の組織学的検索結果

	虹彩炎期 (n=22)	初回発作期 (n=10)	1回目寛解期 (n=4)	再発作期 (n=10)	2回目寛解期 (n=8)
単核細胞浸潤					
+++	22(100)				
++		3(30.0)			
+		4(40.0)	2(50.0)	3(30.0)	2(25.0)
-		3(30.0)	2(50.0)	7(70.0)	6(75.0)
フィブリン析出					
+	22(100)				
-		10(100)	4(100)	10(100)	8(100)

n=検索眼数, 括弧内は%.

表3 EAEの各病期ならびに完全 Freund アジュバント(CFA)群および正常対照群の虹彩上皮におけるストレス応答蛋白質(srp)の発現頻度

	CFA* (n=20)	正常** (n=6)	虹彩炎期 (n=22)	初回発作期 (n=10)	一回目寛解期 (n=4)	再発作期 (n=10)	2回目寛解期 (n=8)
srp 60	0(0)	0(0)	20(90.9)	6(60.0)	1(25.0)	2(20.0)	1(12.5)
ubiquitin	0(0)	1(16.7)	4(18.2)	1(10.0)	0(0)	0(0)	0(0)
α B-crystallin	0(0)	0(0)	3(13.6)	1(10.0)	0(0)	1(10.0)	0(0)
srp 27	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
srp 72	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

*: CFA 群の虹彩上皮, **: 正常対照群の虹彩上皮, n=検索眼数, 括弧内は%.

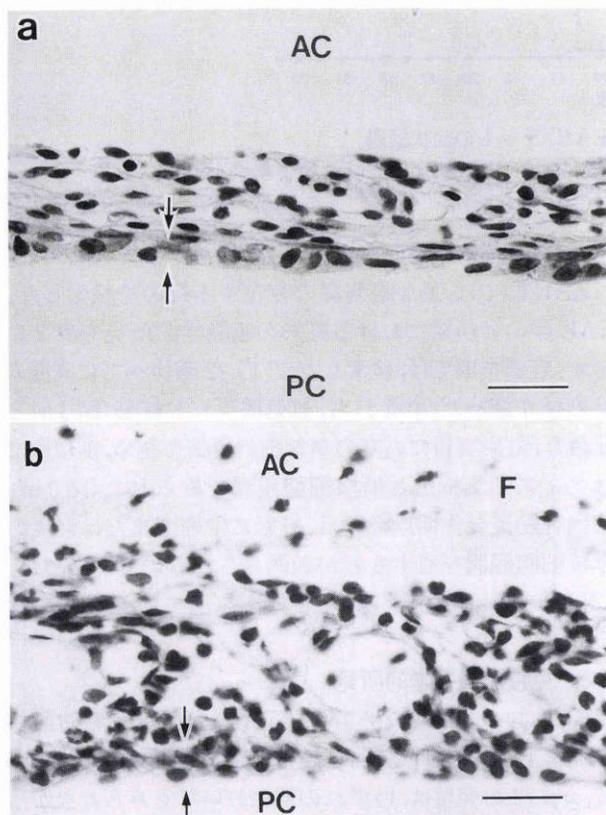


図3 ラット虹彩のヘマトキシリン・エオジン染色像。
a: 無処置ラット, b: EAE ラット虹彩炎ピーク時。
bでは虹彩実質に高度の単核細胞浸潤と前房内フィブリン析出(F)を認める。AC: 前房, PC: 後房, 矢印: 虹彩上皮を示す。バーは20 μ m

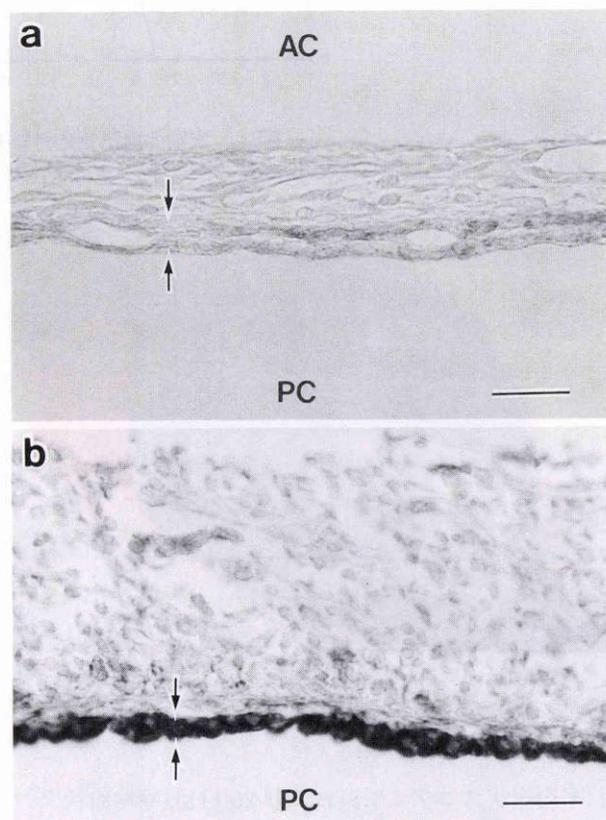


図4 ラット虹彩のストレス応答蛋白質60kDa(srp 60)による免疫染色。

a: 無処置ラット, b: EAE ラット虹彩炎ピーク時。
aでは虹彩上皮(矢印)にsrp 60の発現はみられないが, bでは虹彩上皮(矢印)にsrp 60の発現が著明である。AC: 前房, PC: 後房を示す。バーは20 μ m

虹彩上皮以外の虹彩組織や炎症細胞にはsrpの発現はみられなかった。

IV 考 按

EAEに虹彩炎を合併するという報告は散見されるが, その発生機序については様々な説がある。Verhagenら¹¹⁾はミエリン塩基性蛋白質(myelin basic protein, MBP)に特異的に反応するT細胞クローンによって虹彩炎を惹起させることに成功し, 虹彩の有髄神経が中枢神経系におけると同様, MBP特異的T細胞の標的になり得ることを示唆している。しかしながら, Shikishimaら¹⁰⁾はLewisラットを用いたEAEの虹彩炎において,

虹彩の有髄神経は障害されていないことを電子顕微鏡的観察で報告した。さらに彼ら¹⁰⁾は, 虹彩炎の発症には, リンパ組織で認められる特殊な構造を有する血管内皮細胞(high endothelial venules, HEV)に類似し, リンパ組織以外での炎症組織におけるリンパ球集簇に関与している血管内皮細胞, すなわちhigh endothelial-like venules (HELV)が関与していることを示唆している。今回の我々の実験において, 虹彩の有髄神経や血管内皮細胞にsrpの発現はみられなかった。以上のように, EAEに合併する虹彩炎の発生機序は複雑で, 未だ不明であるといわざるを得ない。

Stanfordら²⁷⁾は mycobacterial srp 65 および、それと相同のヒト srp 60 由来の特定の合成ペプチドを Lewis ラットに投与することにより、ぶどう膜炎を惹起することに成功している。今回我々の実験において、srp 60 は正常対照群および CFA 群の虹彩上皮では確認できず、EAE 群の虹彩炎のピーク時に高率に発現し、徐々に消退していく傾向にあった。特に、炎症細胞浸潤が持続している場合には、srp 60 の発現も持続する傾向がみられた。このことから、EAE 群の虹彩上皮における srp 60 の発現は、虹彩炎の発生と遷延化に関与していることが示唆される。すなわち、EAE では虹彩上皮に何らかの機序によって srp 60 が発現し、これをターゲットにした単核細胞浸潤が起きる可能性が考えられる。また、虹彩炎ピーク時には srp 60 のみならず、ubiquitin および α B-crystallin も各々 18.2% および 13.6% と低率ではあるが発現していた。これら 2 種の srp のうち、ubiquitin は無処置ラットにも 16.7% に発現していたことから、必ずしも虹彩炎に伴って発現したものではなく、実験環境下でのストレスに対する防御反応によって発現したものと考えられる。 α B-crystallin については、srp 27 のアミノ酸配列と高い相同性を有し、蛋白質の高次構造を維持、修復する分子シャペロンとしての機能を持っている²⁸⁾ことから、炎症細胞の攻撃に対する防御反応のために発現した可能性が考えられる。

EAE の脊髄病巣では、srp 60 は急性期には炎症細胞に、慢性期にはグリア細胞に発現していることが報告²⁹⁾されている。これは、EAE に伴う虹彩炎における srp 60 の発現が、病期を問わず常に虹彩上皮に限局していることと異なっている。この違いが脊髄症状と眼症状の発症様式の相違、すなわち眼症状は脊髄症状に先行し、かつ再発しないということに関与していると思われる。

CFA をラットに注射することにより惹起されるアジュバント関節炎 (adjuvant arthritis, AA) は、ヒトのリウマチ性関節炎の動物モデルとして考えられている。AA においてもぶどう膜炎が合併するという報告があり、その合併率は、Waksman ら³⁰⁾による Sprague-Dawley ラットにおいては 13.5%、Petty ら³¹⁾による Lewis ラットでは 24.4% である。しかしながら、今回の我々の実験の CFA 群ではぶどう膜炎の所見は認められなかった。この相違は、ラットの系や CFA に含まれる *Mycobacterium* の種類や量、感作方法の違いによるものと考えられる。AA は、mycobacterial srp 65 と関節軟骨のプロテオグリカンとの間の分子相同により惹起されると考えられており³²⁾³³⁾、AA の関節滑膜における mycobacterial srp 65 related antigen の発現も報告³⁴⁾されたが、mycobacterial srp 65 そのものには関節炎惹起能はないことが後に報告³⁵⁾されている。これに対して、前述のように mycobacterial srp 65 および、それと相同のヒト srp 60 合成ペプチドにはぶどう膜炎惹起能があ

る²⁷⁾。したがって、関節炎とぶどう膜炎の発生機序における srp 60 ファミリーの役割は異なることが示唆される。さらに、EAE と AA における AU 発症率の相違、すなわち EAE では高率 (今回の実験では 100%) で、AA では低率 (13.5~24.4%)³⁰⁾³¹⁾であることは、虹彩上皮における srp 60 の発現頻度の差に起因する可能性を示唆しており、脊髄抗原と CFA の相乗作用が、虹彩上皮により高率に srp 60 を発現させる可能性が考えられる。

今回の我々の実験から、各種自己免疫疾患の発症に関与していることが知られている srp 60 は、EAE に合併する虹彩炎の発症にも密接に関与していることが示唆される。今後、srp 60 がどのような機序で虹彩上皮に発現し、炎症を引き起こすのかを解明する必要がある。

御助言、御校閲を賜りました本学眼科学教室の玉井嗣彦教授および技術的補助をいただいた同脳神経病理部門の田村邦彦先生、抗 ubiquitin 抗体を供与いただいた Albert Einstein 医科大学病理学教室の Dr S-HC Yen、抗 α B-crystallin 抗体を供与頂いた Columbia 大学病理学教室の Dr JE Goldman に深謝いたします。

本稿の要旨は、第 100 回日本眼科学会総会 (1996 年、京都) において報告した。

文 献

- 1) Breger BC, Leopold IH: The incidence of uveitis in multiple sclerosis. Am J Ophthalmol 62: 540-545, 1966.
- 2) Giles CL: Peripheral uveitis in patients with multiple sclerosis. Am J Ophthalmol 70: 17-19, 1970.
- 3) Porter R: Uveitis in association with multiple sclerosis. Br J Ophthalmol 56: 478-481, 1972.
- 4) Bamford CR, Ganley JP, Sibley WA, Laguna JF: Uveitis, perivenous sheathing and multiple sclerosis. Neurology 28: 119-124, 1978.
- 5) Bachman DM, Rosenthal AR, Beckingsale AB: Granulomatous uveitis in neurological disease. Br J Ophthalmol 69: 192-196, 1985.
- 6) Rothova A, Buitenhuis HJ, Meenken C, Brinkman CJ, Linssen A, Alberts C, et al: Uveitis and systemic disease. Br J Ophthalmol 76: 137-141, 1992.
- 7) Bullington SJ, Waksman BH: Uveitis in rabbits with experimental allergic encephalomyelitis. Arch Ophthalmol 59: 435-445, 1958.
- 8) Wray SH, Cogan DG, Arnason BGW: Experimental allergic encephalomyelitis. Passive transfer by the intraocular injection of sensitized cells. Arch Neurol 33: 183-185, 1976.
- 9) Hayreh SS: Experimental allergic encephalomyelitis. II: Retinal and other ocular manifestations. Invest Ophthalmol Vis Sci 21: 270-281, 1981.
- 10) Shikishima K, Lee WR, Behan WMH, Foulds WS: Uveitis and retinal vasculitis in acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat: An ultrastructural study. Exp Eye Res

- 56: 167—175, 1993.
- 11) **Verhagen C, Mor F, Cohen IR**: T cell immunity to myelin basic protein induces anterior uveitis. *J Neuroimmunol* 53: 65—71, 1994.
 - 12) **Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM**: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389—398, 1974.
 - 13) **Collins PL, Hightower LE**: Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J Virol* 44: 703—707, 1982.
 - 14) **Lanks KW**: Modulators of the eukaryotic heat shock response. *Exp Cell Res* 165: 1—10, 1986.
 - 15) **Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS**: Colocalization of lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T-cell receptor and heat shock protein hsp 65⁺ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6452—6456, 1991.
 - 16) **Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS**: Expression of heat shock protein-65 by oligodendrocytes *in vivo* and *in vitro*: Implications for multiple sclerosis. *Neurology* 42: 795—800, 1992.
 - 17) **Boog CJP, de Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, van der Zee R, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJS, et al**: Two monoclonal antibodies generated against human hsp 60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J Exp Med* 175: 1805—1810, 1992.
 - 18) **Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T**: Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the responding antibodies in Behçet's syndrome. *Infect Immun* 59: 1434—1441, 1991.
 - 19) **Lohse AW, Dienes HP, Herkel J, Hermann E, van Eden W, zum Büschenfelde K-HM**: Expression of the 60 kDa heat shock protein in normal and inflamed liver. *J Hepatol* 19: 159—166, 1993.
 - 20) **Haregewoin A, Gopalan S, Hom RC, Finberg RW**: Human $\gamma\delta^+$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* 340: 309—312, 1989.
 - 21) **Haregewoin A, Singh B, Gupta RS, Finberg RW**: A mycobacterial heat-shock protein-responsive $\gamma\delta$ T cell clone also responds to the homologous human heat-shock protein: A possible link between infection and autoimmunity. *J Infect Dis* 163: 156—160, 1991.
 - 22) **Feurer C, Prentice DE, Cammisuli S**: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 10: 159—166, 1985.
 - 23) **Hosoda Y, Kato S, Ohama E**: Suppression of relapsing experimental allergic encephalomyelitis by mizoribine: Clinical, histological and immunohistochemical studies. *Neuropathology* 16: 15—20, 1996.
 - 24) **Kato S, Nakamura H**: Suppression of acute experimental allergic encephalomyelitis by synthetic serum thymic factor: Clinical, histopathological, and immunohistochemical studies. *Acta Neuropathol* 75: 337—344, 1988.
 - 25) **Lee S, Park YD, Yen S-HC, Ksiezak-Reding H, Goldman JE, Dickson DW**: A study of infantile motor neuron disease with neurofilament and ubiquitin immunocytochemistry. *Neuropediatrics* 20: 107—111, 1989.
 - 26) **Iwaki T, Kume-Iwaki A, Goldman JE**: Cellular distribution of α B-crystallin in non-lenticular tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 31—39, 1990.
 - 27) **Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T, et al**: Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 97: 226—231, 1994.
 - 28) **Horwitz J**: α -Crystallin can function as molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10449—10453, 1992.
 - 29) **Gao YL, Brosnan CF, Raine CS**: Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J Immunol* 154: 3548—3556, 1995.
 - 30) **Waksman BH, Bullington SJ**: Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. III: Lesions of the eye. *Arch Ophthalmol* 64: 751—762, 1960.
 - 31) **Petty RE, Hunt DWC, Mathers DM, McCormick AQ, Barker H, Southwood TR, et al**: Experimental arthritis and uveitis in rats associated with *Mycobacterium butyricum*. *J Rheumatol* 21: 1491—1496, 1994.
 - 32) **van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR**: Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5117—5120, 1985.
 - 33) **van Eden W, Thole JER, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JDA, Hensen EJ, et al**: Cloning of mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331: 171—173, 1988.
 - 34) **de Graeff-Meeder ER, Voorhorst M, van Eden W, Schuurman HJ, Huber J, Barkley D, et al**: Antibodies to the mycobacterial 65-kD heat-shock protein are reactive with synovial tissue of adjuvant arthritic rats and patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Am J Pathol* 137: 1013—1017, 1990.
 - 35) **Billingham MEJ, Carney S, Butler R, Colston MJ**: A mycobacterial 65-kD heat-shock protein induces antigen-specific suppression of adjuvant arthritis, but is not itself arthritogenic. *J Exp Med* 171: 339—344, 1990.