

角膜実質炎動物モデルにおける角膜の免疫組織化学的検討

菅原 麻紀, 岩崎 隆, 稲田 紀子, 庄司 純, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

要 約

目 的: Ovalbumin (OA) を抗原とする角膜実質炎動物モデルを作製し, 角膜実質炎の経時変化を組織学的に検討する。

対象と方法: 実験に用いた白色家兎は, OA 溶液 (5 μ g/ml) と等量のフロイント完全アジュバントの乳化混合液を背側皮下 (0.4 ml) および足底部 (0.2 ml) に接種, 1 週後に背側皮下へ混合液 (0.5 ml) を接種して感作した。4 週後に背側皮下へ混合液 (0.5 ml) を接種して免疫賦活し, その 1 週後に OA 溶液 (0.05 ml) を角膜実質内に注入した。角膜処置後 1, 2, 3, 7, 10 日の角膜を観察し, 3, 10 日の角膜についてヘマトキシリン・エオジン染色, メチルグリーンピロニン染色, 抗 CD 4 抗体, 抗 CD 8 抗体, 抗 OA 抗体を一次抗体とする酵素抗体法, 蛍光抗原法, 透過型電子顕微鏡による観察を行った。

結 果: 角膜処置後 1 日に角膜に浮腫・混濁が生じ, 3 日をピークとして免疫輪が観察され, 7 日以降に新生

血管が生じた。組織学的には角膜処置後 3 日に角膜輪部と免疫輪の部分に好中球が集簇し, 10 日に, 実質内浅層, 中層に形質細胞が多数浸潤していた。CD 4 陽性細胞は 3, 10 日では輪部, 実質内に散在し, CD 8 陽性細胞は 10 日に輪部に少数あった。OA 陽性所見は免疫輪を境に角膜中央側にあった。蛍光抗原法では 3, 10 日の角膜輪部, 10 日の実質内に存在する形質細胞に陽性所見があった。

結 論: 本角膜実質炎モデルは角膜処置後 3 日に免疫輪, 7 日以降に角膜新生血管が生じる実質炎モデルであった。本モデルの病態には抗原抗体反応が関与していたが, 新生血管が生じることで特異抗体を保有する形質細胞が実質内に浸潤し, 炎症の病態が変化すると考えられた。(日眼会誌 104: 779—785, 2000)

キーワード: 角膜実質炎, 免疫輪, 新生血管, 形質細胞, 抗原抗体反応

Immunohistochemical Study of Interstitial Keratitis in an Animal Model

Maki Sugahara, Yutaka Iwasaki, Noriko Inada, Jun Shoji and Mitsuru Sawa

Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

Abstract

Purpose: We performed an immunohistochemical study on the development of interstitial keratitis in a rabbit model sensitized by ovalbumin (OA).

Methods: A mixture of OA (5 μ g/ml) and Freund's complete adjuvant was initially injected subcutaneously (0.4 ml) into the rabbits' back and footpad (0.2 ml). After a week, the rabbits were sensitized by an injection of the same solution into the back (0.5 ml) again. After 4 weeks the rabbits underwent the same treatment as a booster shot. Then a week later OA solution (0.05 ml) was injected into the corneal stroma. We observed the cornea on days 1~3, 7, and 10 after the corneal treatment. Corneas on days 3 and 10 were examined by immunohistological methods using hematoxylin-eosin stain, methylgreen pyronin stain, and by immunohistochemical methods with anti-CD 4, anti-CD 8, and anti-OA antibodies. The localization of specific antibodies was identified by fluorescent-antigen method. Electron-microscopic observation was also done.

Results: Rabbits developed corneal opacity and edema on day 1, corneas had on immune ring with a

peak intensity on day 3, and vascularization on day 7 after corneal treatment. Microscopic examination revealed infiltration of neutrophils in to the area of the immune ring on day 3 and many plasma cells at the limbus and stroma on day 10. CD 4 positive cells were found at the limbus and stroma on days 3 and 10. CD 8 positive cells were found at the limbus and stroma only on day 10. OA positive findings were observed at the immune ring and its inner area. In the fluorescent-antigen method, specific antibodies were found in plasma cells at the limbus on days 3 and 10.

Conclusions: In our experimental model of interstitial keratitis with immune ring and vascularization, the Arthus reaction was dominant. Infiltration of antigen specific plasma cells in the stroma with vascularization caused a modification of pathologic reaction in keratitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 779—785, 2000)

Key words: Interstitial keratitis, Immune ring, Vascularization, Plasma cell, Arthus reaction

別刷請求先: 173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 菅原 麻紀
(平成 11 年 11 月 30 日受付, 平成 12 年 5 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Maki Sugahara, M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine,
30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received November 30, 1999 and accepted in revised form May 10, 2000)

I 緒 言

角膜における免疫反応の研究は、1911年に Wessely¹⁾ が家兎角膜にウマ血清を投与して生じた輪状の沈降輪を Wessely phenomenon として報告したことに初まる。Morawiecki²⁾ や Meyers ら³⁾ は実験動物の角膜の対極に抗原と抗体を注入して免疫輪を観察し、免疫輪が角膜に生じる沈降線であることを示し、角膜組織は血管がないにも拘わらず、そのゲル構造により免疫反応が生じやすいことを示した。その後、角膜実質炎は主に感染性抗原である角膜ヘルペスを用いた動物実験モデルでの検討がなされている。Meyers ら⁴⁾ は単純ヘルペス (herpes simplex virus, HSV) による角膜炎で生じた免疫輪において多核白血球を主体にリンパ球、HSV 抗原、HSV 抗体、補体などを観察し、その病態への抗原抗体複合体 (アルサス反応) の関与を報告した。しかし、近年、角膜ヘルペスでは細胞性免疫が優位に関与している⁵⁾ とされ、感染性抗原の場合、宿主の免疫反応に加えて抗原自身の特性が複雑な病態を示しているとされる。今回、我々は非感染性抗原である ovalbumin (OA) を用いた実験的角膜実質炎動物モデルを作製し、実質炎の組織反応を組織学的に検討した。

II 実験方法

1. 角膜実質炎モデルの作製

実験動物には体重 2.0~3.0 kg の日本白色家兎 25 匹 25 眼を使用し、22 匹 22 眼に対し以下の処置を行った。抗原には OA (Sigma) を用い、OA 溶液 (5 mg/ml) と等量のフロイント完全アジュバント (Freund's complete adjuvant, FCA) (Sigma) との乳化混合液を作製して背側皮下に 0.4 ml、足底部に 0.2 ml 接種し、さらに 1 週後に同乳化混合液を背側皮下に 0.5 ml 接種して感作した。4 週後、背側皮下に同乳化混合液を 0.5 ml 接種して免疫賦活を行い、さらに 1 週後、ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®]) による静脈麻酔、0.4% 塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール[®]) 点眼麻酔後、顕微鏡下で OA 溶液 (約 0.05 ml) を角膜中央部実質内へ 27 G 針を用いて注入した。対照には未感作白色家兎 3 匹 3 眼に同様の方法・用量で OA 溶液を角膜内へ注入した。

2. 前眼部所見の観察

角膜処置後 1, 2, 3, 7, 10 日に細隙灯顕微鏡で結膜所見、角膜浮腫・混濁所見および免疫輪の有無、新生血管の有無と前房内所見を観察した。

3. 光学顕微鏡による組織学的観察

角膜処置後 3, 10 日に、ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®]) を静脈内へ過量投与して白色家兎を安楽致死させた。眼球摘出後に強角膜片を作製し、以下の方法で染色を行い、光学顕微鏡 (BH-2, OLYMPUS) で観察した。

1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

強角膜片を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、上昇アルコール系列で脱水、Technovit[®] 7100 (Heraeus) に包埋し、約 5 μ m の薄切切片を作製後、HE 染色⁶⁾ を施行した。

2) メチルグリーン・ピロニン染色

強角膜片を 2% periodate lysine paraformaldehyde (P-LP) 溶液で固定後、ドライアイス-イソペンタンで OCT compound (Tissue Tec[®], Miles) に凍結包埋し、約 7 μ m の薄切切片を作製した。凍結切片を水洗後、メチルグリーン・ピロニン液 (武藤化学薬品) で染色し、n-ブタノールで分別、脱水後キシレンで透徹した。

3) 酵素抗体法

酵素抗体法に用いた切片はメチルグリーン・ピロニン染色の場合と同様の方法で凍結切片を作製し、特に CD 4 と CD 8 は連続凍結切片を用いて検討した。一次抗体としては抗ウサギ CD 4 モノクローナル抗体 (Serotec), 抗ウサギ CD 8 モノクローナル抗体 (Serotec), 抗卵白アルブミンモノクローナル抗体 (Sigma) を使用し、陰性対照としては一次抗体の代わりに 0.01% リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS, pH = 7.2) を用いた。VECTASTAIN[®] ABC kit (Vector) を使用し、間接酵素抗体法 (avidin-biotin-peroxidase-complex, ABC 法)⁷⁾ を施行した。発色には Graham-Karnovsky 法⁸⁾ を用い、核染色はメチルグリーン染色を行った。

4) 蛍光抗原法

ビオチン化キット (ECL protein biotinylation module[®], Amersham pharmacia biotech) により作製したビオチン化 OA 抗原液 (50 μ g/ml) を使用した。凍結切片は OA 抗原液に 37°C で 90 分浸漬し、PBS で洗浄後、FITC 標識ストレプトアビジンで 37°C で 60 分反応させた後、落射型蛍光顕微鏡 (BX 60, OLYMPUS) による観察を行った。陰性対照としてビオチン化 OA 抗原液の代わりに PBS を用いた。

4. 透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM)

強角膜片を 2.5% グルタルアルデヒド (0.15 M カコジル酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4) で 24 時間固定した後、1% オスミニウム酸で後固定し、上昇アルコール系列で脱水、プロピレンオキサイドで置換後、エポキシ樹脂 (EPON 812[®], 応研商事) に包埋した。ミクロトームで超薄切片を作製、ウラニールアセテートおよびクエン酸鉛の二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (JEM 1200 Ex, 日本電子) で観察を行った。

III 結 果

1. 前眼部所見

感作した家兎は角膜処置後 3 日までに、22 匹 22 眼全眼で結膜の充血腫脹、角膜のびまん性浮腫、混濁が観察された。前房内には前房蓄膿、フィブリン析出を伴う強い虹

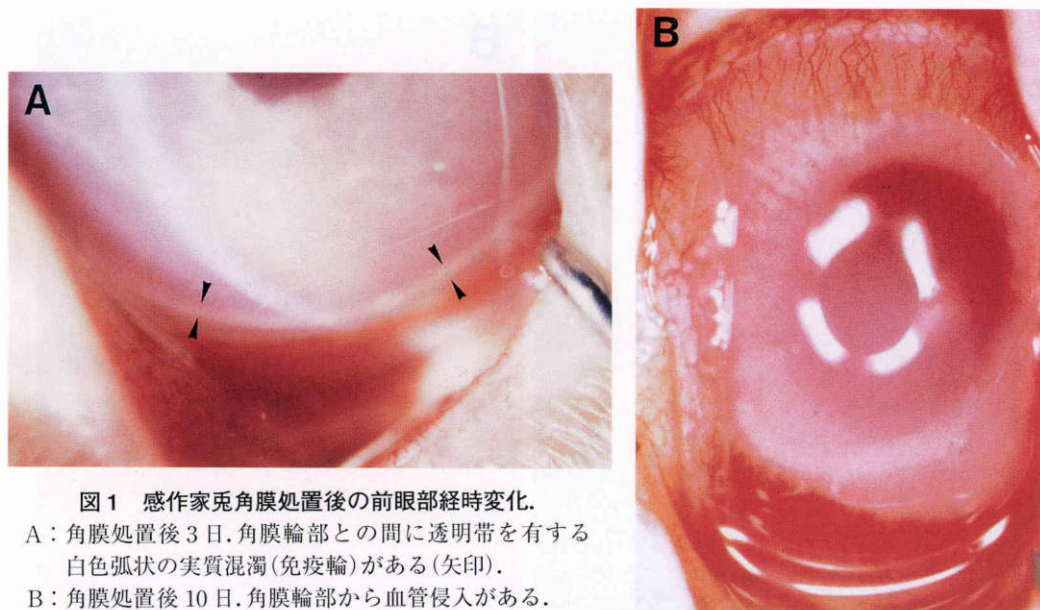


図1 感作家兎角膜処置後の前眼部経時変化。
A: 角膜処置後3日, 角膜輪部との間に透明帯を有する白色弧状の実質混濁(免疫輪)がある(矢印).
B: 角膜処置後10日, 角膜輪部から血管侵入がある.

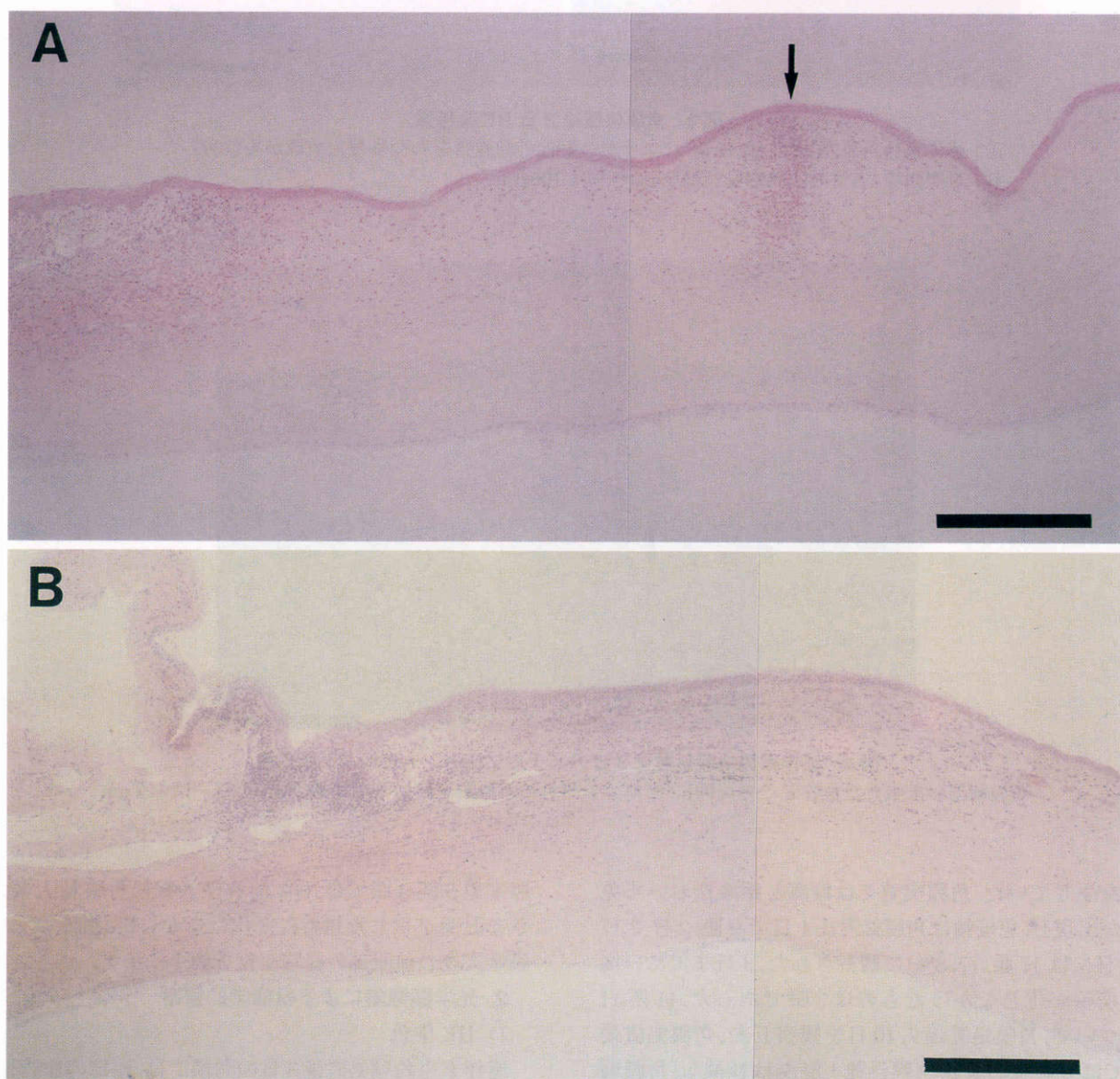


図2 感作家兎角膜ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色像。
A: 角膜処置後3日, 角膜は浮腫により肥厚し, 輪部から少し距離をおいて実質内に炎症細胞の集簇(免疫輪)がある(矢印).
B: 角膜処置後10日, 角膜実質内の浅層から中層に新生血管がある. バーは500 μ m

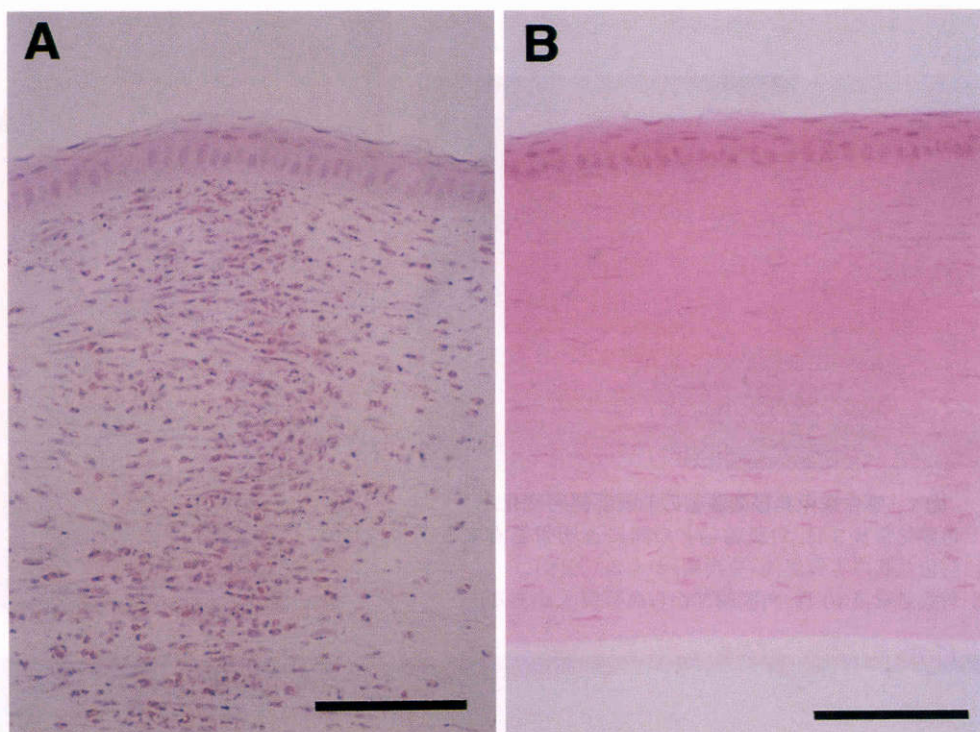


図3 角膜処置後3日 HE 染色像.

A: 感作家兎角膜, 実質内(免疫輪)にエオジン好性の細胞質をもつ多核白血球が多数あった.

B: 対照角膜, 実質内に細胞浸潤はない. パーは 100 μ m

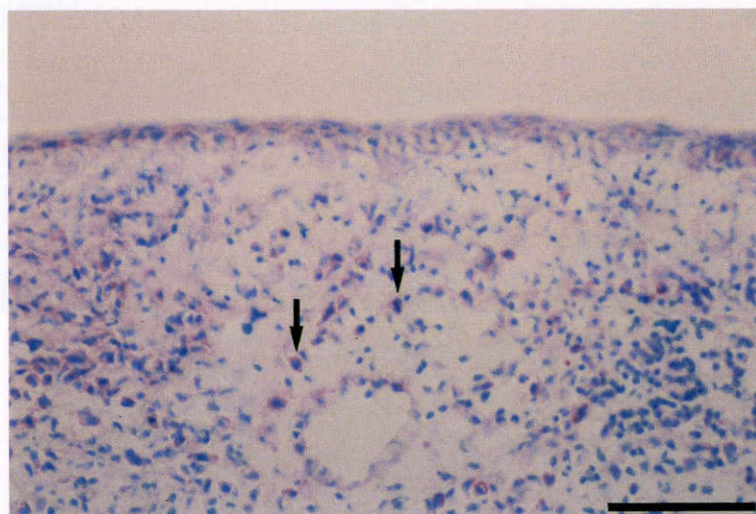


図4 感作家兎角膜処置後3日のメチルグリーン・ピロニン染色像.

角膜輪部の拡張した血管とその周囲に, ピロニン好性の細胞質を持つ形質細胞がある. パーは 100 μ m

彩炎を生じていた. 角膜実質では輪部と距離を置いて免疫輪が出現し, 免疫輪は角膜処置後1日で9眼, 2日で17眼, 3日には17眼(77.3%)に観察された. 3日までに一度も免疫輪が生じなかったものは3眼であった. 11匹11眼について, 角膜処置後7, 10日を観察した. 角膜処置後7日では虹彩炎および角膜浮腫・混濁は軽減し, 角膜輪部から中央へ向かう新生血管があった. 角膜処置後10日には程度に差はあるものの, 新生血管は全例にあった. 対

照家兎3匹3眼では, OA溶液注入後に角膜刺入部に小さな混濁が生じた以外に変化はなかった. 感作家兎の角膜処置後の前眼部の経時変化を図1に示す.

2. 光学顕微鏡による組織学的観察

1) HE 染色

感作家兎角膜処置後3日の角膜では, 輪部の血管拡張, 輪部血管周囲および実質内に多数の炎症細胞の浸潤があり, 免疫輪の部分には上皮下から中層の実質内に細胞集

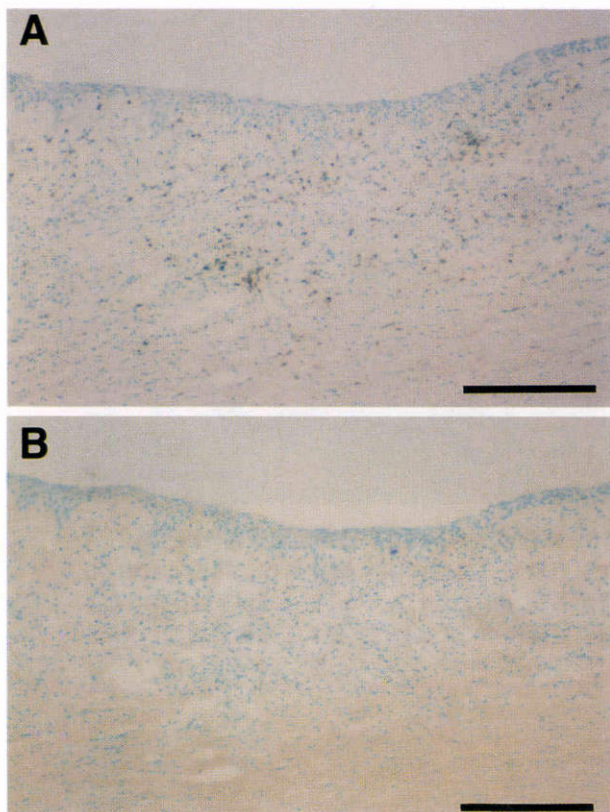


図5 酵素抗体法の連続切片組織像(感作家兎角膜処置後3日, 角膜輪部).

A: CD 4 染色. 多数の陽性細胞が角膜輪部の上皮下にある.

B: CD 8 染色. 陽性細胞はない. バーは 200 μm

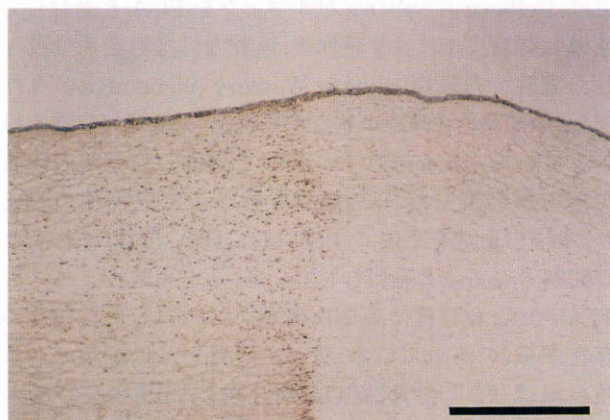


図6 感作家兎角膜実質内の酵素抗体法による ovalbumin(OA)分布像(角膜処置後3日).

免疫輪から角膜中央(写真左側)には OA 陽性所見があるが, 免疫輪を境に輪部側には陽性所見はない. バーは 500 μm

簇像が存在した(図2). 炎症細胞は多核白血球が主体であった. 免疫輪が生じなかった感作家兎角膜でも, 実質内への炎症細胞浸潤, 浮腫, 輪部の血管拡張, 輪部血管周囲への細胞浸潤は存在した. 角膜処置後10日では, 輪部の血管は拡張し, 浅層から中層の実質内に血管侵入があっ

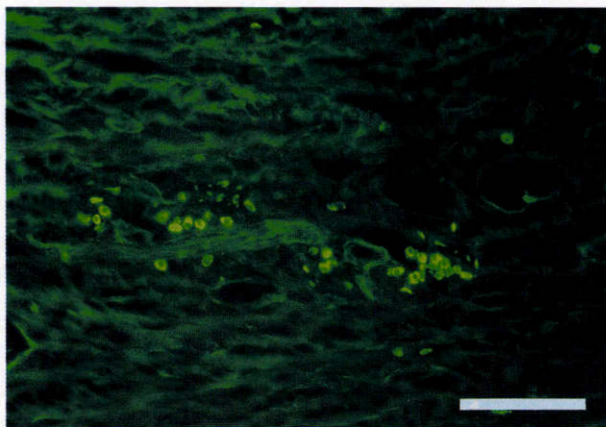


図7 角膜処置後10日の蛍光抗原法染色像.

感作家兎の角膜実質内に観察された形質細胞. 細胞質が陽性所見を示している. バーは 500 μm

た. 輪部と実質内の血管周囲には形質細胞を主体とする細胞浸潤があった. 対照家兎角膜では, 輪部の血管拡張, 輪部と実質内の炎症細胞浸潤, 実質浮腫はなかった(図3).

2) メチルグリーン・ピロニン染色

感作家兎の角膜処置後3日では, 細胞質がピロニン好性を呈する形質細胞が輪部血管周囲にあった(図4)が, 免疫輪および実質内にはなかった. 角膜処置後10日では, 角膜輪部血管, 実質内新生血管の周囲に多数の形質細胞があり, 実質内層間にも浸潤していた.

3) 酵素抗体法

感作家兎角膜処置後3日において CD 4 陽性細胞は輪部の上皮下・血管周囲組織にあり, 実質内にも少数あったのに対し, CD 8 陽性細胞は輪部および実質内にはなかった(図5). 角膜処置後10日では, CD 4 陽性細胞は3日の所見と同様, 輪部の上皮下・血管周囲組織に, また実質内にも少数あり, CD 8 陽性細胞は角膜輪部血管周囲に少数あった. しかし, CD 4 陽性細胞, CD 8 陽性細胞ともに, 免疫輪と新生血管周囲への集簇はなかった. OA に対する陽性所見は角膜処置後3日の角膜中央部側から免疫輪までの実質内にあったが, その周辺の実質および輪部にはなかった(図6). 角膜処置後10日では, OA に対する陽性所見は角膜輪部, 角膜実質内新生血管周囲に僅かにあるのみであった.

4) 蛍光抗原法

角膜処置後3日の角膜輪部の一部の形質細胞の細胞質内には陽性所見があった. 角膜処置後10日では, 角膜輪部, 実質内に多数存在した形質細胞の細胞質内に陽性所見があった(図7).

3. 透過型電子顕微鏡所見

角膜処置後3日の免疫輪を構成する多核白血球は, 細胞質内に多数の顆粒と空胞を有する変形の強い好中球であり, 他にケラトサイト, マクロファージがあった. 角膜

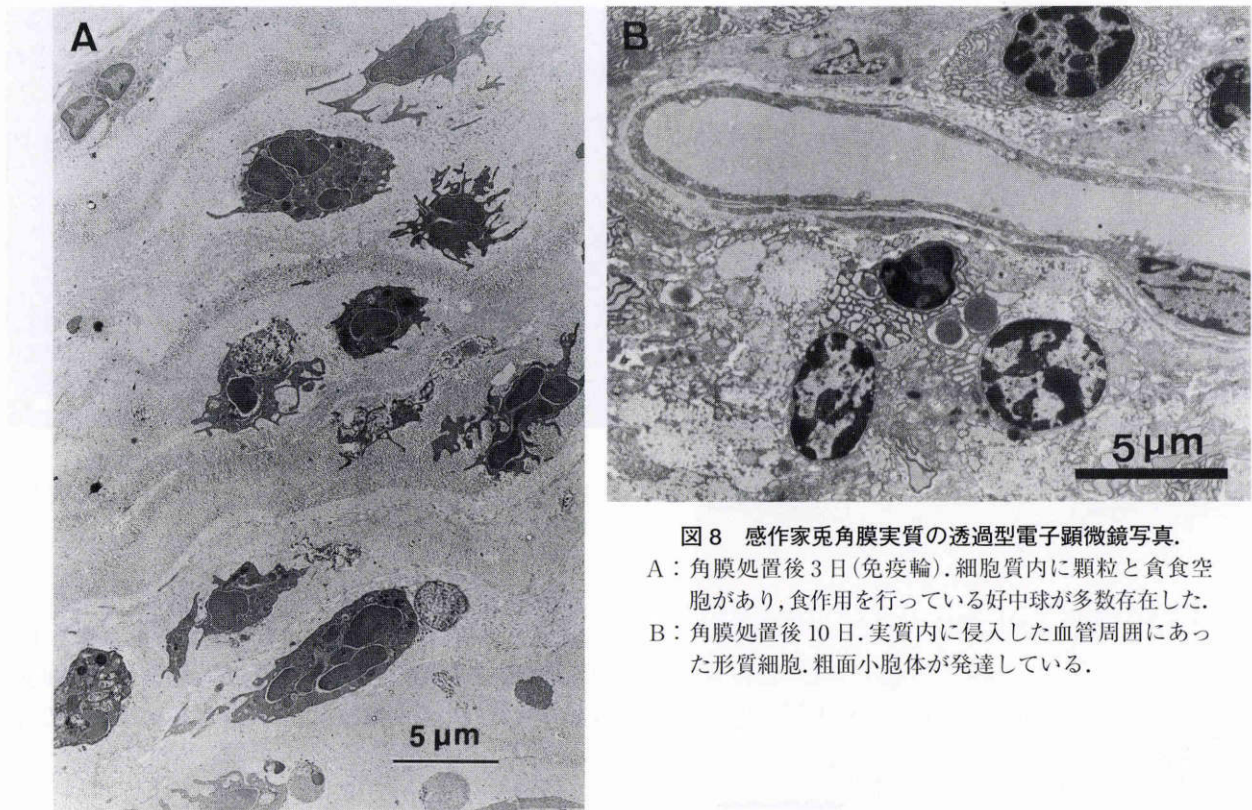


図8 感作家兎角膜実質の透過型電子顕微鏡写真.

- A: 角膜処置後3日(免疫輪). 細胞質内に顆粒と貪食空胞があり, 食作用を行っている好中球が多数存在した.
B: 角膜処置後10日. 実質内に侵入した血管周囲にあった形質細胞, 粗面小胞体が発達している.

処置後10日では, 角膜輪部と実質内の血管周囲および実質内層間に, 発達した粗面小胞体をもつ形質細胞が多数存在した(図8).

IV 考 按

角膜実質は無血管でラメラ構造の膠原細胞層間をムコ多糖類が埋める構造であるため, 抗原が実質内に長く滞留し免疫反応が生じて遷延化しやすいと考えられている⁹⁾. 角膜実質炎は抗原抗体反応と遅延型過敏反応とが関与しているといわれ, どちらが関与しているかで角膜実質炎の所見が異なり, 逆に実質浮腫, 細胞浸潤や血管侵入などの所見から病型が推測されている. また, ウイルスや微生物による角膜実質炎では, それらの直接の角膜侵襲と宿主の免疫反応による侵襲とが存在し, 病態は複雑化している. Mondino ら¹⁰⁾はブドウ球菌の菌体成分をFCAと混じ家兎に皮下投与して感作後, 菌体成分を投与して角膜周辺部疾患を発生させた実験で, 菌体成分の違いによりカタル性角膜潰瘍(抗原抗体反応)と角膜フリクテン(遅延型過敏反応)が生じると報告している.

今回, 我々は非感染性外来蛋白で抗原性の強いOAを抗原として, 角膜実質炎を実験的に発生させ, その経時の変化について組織学的に検討した. 感作にはOAをFCAと乳化混合して皮下投与して感作する方法を用いた. 抗原OAをFCAと混じて全身免疫し免疫疾患を誘導する方法は, 他科ではリウマチ関節炎の家兎モデルとして用いられており, FCAを用いた場合には抗原抗体反応と遅

延型過敏反応の両者が成立し, 炎症が重症化すると報告¹¹⁾されている. 今回我々が作製した動物モデルは角膜処置後3日に免疫輪が発症し, 7日以降の角膜に新生血管が観察されたモデルであった. 免疫輪の組織像については, Felberg ら¹²⁾がウシアルブミンをFCAと混合して家兎の背側皮下に投与感作後, 腹腔内に抗原を大量投与した実験で角膜輪(reverse Wessery phenomenon)を作製し, 単球系白血球や未熟な形質細胞, 組織球の存在を報告している. Meyers ら³⁾はHSVで感作した家兎の角膜実質中に精製したHSV抗原を投与して免疫輪を形成し, 多核白血球を主体に, HSV抗原, HSV抗体, 補体などが観察されることを報告している. ヒト角膜ヘルペスのTEMでも, 免疫輪に多核白血球, リンパ球, 形質細胞の存在が報告⁴⁾されている. 我々が作製した免疫輪でも多核白血球(好中球), 抗原OAが存在し, 既報の免疫輪の組織学的検討結果と一致する結果であった.

今回の実験で免疫輪が輪部と距離において存在したが, 臨床的にも角膜周辺病変で透明帯を有することがあり, その理由については輪部血管網からの補体, 抗体の濃度勾配が考えられている¹³⁾¹⁴⁾. 免疫複合体は補体の古典的経路を活性化し, 好中球遊走を惹き起こすが, この経路の最初の補体成分であるC1補体の分子量が大きく, 角膜周辺と中央での勾配に差が生じるため, 補体・抗体拡散の濃度勾配に応じた抗原抗体反応を生じ, そこに集積した好中球が輪部と平行に走る線状の免疫輪を形成すると考えられる.

感作家兎角膜処置後 3 日では、観察された細胞の多くが好中球であり、非特異的な反応であることも否定できないが、対照家兎角膜では検眼鏡的、組織学的にも炎症所見はなく、3 日で観察された炎症反応は感作による免疫誘導の結果生じたと考えられる。角膜処置後 10 日では、角膜輪部の血管周囲、実質内の新生血管周囲に形質細胞が多数確認され、稲田ら¹⁵⁾が報告した酵素抗原法の変法である蛍光抗原法を用いて検討した結果、細胞質内に OA 抗体の存在が観察された。また、TEM で形質細胞の細胞質内に発達した粗面小胞体が観察され、抗体産生が可能な状態にまで分化していると考えられた。これらの所見から本動物実験モデルにおける実質炎は、抗原抗体反応が関与していると考えられた。新生血管の発生により特異抗体を有する形質細胞の分布が輪部から角膜実質内に拡大し、炎症反応の場が角膜輪部から角膜中央へ移行すると考えられ、新生血管を伴う場合と、伴わない場合とでは実質炎の病態が変化している可能性が考えられる。一方、CD 4、CD 8 を一次抗体とする酵素抗体法で T 細胞系リンパ球の観察を行ったが、免疫輪部分への集簇、新生血管周囲への浸潤所見はなく、免疫輪、新生血管における細胞性免疫の関与を考えさせる所見は得られなかった。しかし、CD 4 陽性細胞が角膜処置後 3、10 日ともに角膜輪部と実質内に存在し、TEM でも免疫輪にマクロファージが存在したことから、本角膜実質炎モデルにおいて細胞性免疫が抗原抗体反応と重複して関与している可能性も否定できない。

本角膜実質炎モデルは角膜処置後 3 日に免疫輪、7 日以降に実質内への新生血管が観察されるモデルであり、実質内に OA 抗原と特異抗体が存在し、抗原抗体反応が関与していた。3 日に好中球を主体とする炎症反応が生じ、さらに 10 日に新生血管に伴って特異抗体を保有する形質細胞が実質内に浸潤することで、実質炎の病態が変化すると考えられた。

文 献

- 1) Wessely K : Ueber anaphylaktische Erscheinungen an der Hornhaut (Experimentelle Erzeugung einer parenchymatösen Keratitis durch artfremdes Serum). Münchener Med Woch 58 : 1713—1714, 1911.
- 2) Morawiecki J : Präzipitationserscheinungen in der lebenden Hornhaut bei Antigen—Antikörperreaktionen. Ophthalmologica 132 : 236—243, 1956.
- 3) Meyers RL, Pettit TH : The pathogenesis of corneal inflammation due to herpes simplex virus. I. Corneal hypersensitivity in the rabbit. J Immunol 111 : 1031—1042, 1973.
- 4) Meyers RL, Pettit TH, Maxwell WA : Viral antigens in the immune ring of herpes simplex stromal keratitis. Arch Ophthalmol 98 : 897—904, 1980.
- 5) 宮本和久 : 角膜ヘルペス. 白井正彦(編) : 眼科診療プラクティス 31 眼の免疫のしくみ. 文光堂, 東京, 45—49, 1997.
- 6) 齊藤 誠 : ヘマトキシリン・エオジン染色. Medical Technology 別冊 染色法のすべて. 医歯薬出版, 東京, 2—7, 1988.
- 7) Hsu SM, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29 : 577—580, 1981.
- 8) Graham RC, Karnovsky MJ : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14 : 291—302, 1966.
- 9) 大橋裕一 : 角膜実質炎. あたらしい眼科 4 : 43—49, 1988.
- 10) Mondino BJ, Cruz TA, Kowalski RP : Immune responses in rabbits with phlyctenules and catarahal infiltrates. Arch Ophthalmol 101 : 1275—1277, 1983.
- 11) 青木重久, 生田耕司 : リウマトイド因子と動脈炎. 医学のあゆみ 123 : M 62—73, 1982.
- 12) Felberg NT, Sery TW : The reverse Wessely phenomenon : Immune corneal rings following systemic immunisation. Br J Ophthalmol 62 : 831—835, 1978.
- 13) Mondino BJ : Inflammatory disease of peripheral cornea. Ophthalmology 95 : 463—472, 1988.
- 14) Mondino BJ, Brandy KJ : Distribution of hemolytic complement in the normal cornea. Arch Ophthalmol 99 : 1430—1433, 1981.
- 15) 稲田紀子, 庄司 純, 葛西 浩, 石井康雄, 北野周作 : Ocular surface の局所免疫機構. 日眼会誌 96 : 817—822, 1992.