

網膜A抗原による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) について (図10, 表3)

田中 孝男・高野 繁・関 文治
後藤 浩・頼 徳治・臼井 正彦 (東京医科大学眼科学教室)

Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by retinal A-antigen.

Takao Tanaka, Shigeru Takano, Fumiharu Seki,
Hiroshi Goto, Tokuji Rai and Masahiko Usui

Dpt. of Ophthalmology, Tokyo Medical College

要 約

網膜A抗原をラットに接種することによってEAUの発症が確認された。Lewisラットでは抗原接種後約10日目前後で両眼性に、急性に発現し、 $5\mu\text{g}$ 以上の抗原量で100%の発症が確認された。そのEAUの特徴は強い虹彩毛様体炎と網膜血管炎を主病像とするもので、同時に松果体炎も併発していた。Wistarラットでは14眼中5眼にしか発症が認められず、ラットの系においても発現に相違がみられた。Hartley系モルモットでは肉眼的EAUの発症はみられなかった。(日眼 91:145—150, 1987)

キーワード：実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU), 網膜抗原, A 抗原, 松果体炎

Abstract

Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) was induced by retinal A-antigen (A-antigen) in rats. The EAU showed hyperacute inflammation in 100% of Lewis rats in the anterior portion, and appeared in both eye at 10 days after immunization of at least $5\mu\text{g}$ of A-antigen. Iridocyclitis and retinal vasculitis were seen in ocular lesions with H-E staining through a light microscope. Concerning effect on systemic organs was observed inflammation only in pineal glands at the same time as EAU in onset. On the other hand, EAU occurred in 36% with Wistar rats following immunization with $30\mu\text{g}$ A-antigen. The inflammatory ocular lesion and pineal gland in Wistar rats showed the same clinical and pathological changes as in the case of Lewis rats. Hartley guinea pigs were all negative following immunization with $30\mu\text{g}$ A-antigen for EAU. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 145—150, 1987)

Key words: Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), Retinal antigen, A-antigen, Pinealitis

I 緒 言

網膜抽出液より網膜S抗原(以下S抗原)をゲル濾過法にて精製する際に、S抗原とは異なる分画に可溶性の網膜A抗原(以下A抗原)が存在することを1980

年 Faure¹⁾が報告した。その後高野ら²⁾によって、このA抗原の純化、精製法が確立されたが、S抗原で実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(Experimental Autoimmune Uveo-retinitis: EAU)を惹起することの出来る動物として頻繁に用いられていた Hartley 系モル

別刷請求先: 160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 田中 孝男

Reprint requests to: Takao Tanaka, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tokyo Medical College

6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(昭和61年8月29日受付) (Accepted August 29, 1986.)

モットにA抗原を接種しても、肉眼的なEAUが発症しなかったと報告された、それ故に、現在までEAUについての研究はS抗原によるものが主であった。しかし、最近このA抗原がInterphotoreceptor Retinoid-Binding Protein; IRBP³⁾と免疫学的に同一であることが著者ら⁴⁾によって証明され、またラットにIRBPを接種する事によってEAUが発症することも報告⁵⁾された、今回、我々はA抗原を用いてラットにEAUを誘発せしめることができたので、その特徴などについて報告する。

II 材料および方法

1. 抗原の精製

A抗原は高野の方法²⁾に準じて精製した。すなわち牛眼100個から採取した網膜78.6gに0.3Mのリン酸緩衝液(pH 7.6) 100ml(1眼あたり1ml)を加え、ホモジュナイズを行った後、その懸濁液を高速遠心(12,000rpm, 30分)した。その後、上清液についてSephacryl, S-300を用いたゲル濾過を行い、既存の抗ブタA抗原ウサギ血清と免疫二重拡散法で沈降線を形成した分子量150,000前後の分画を採取した。更に純化A抗原を得る為にゲル濾過分画A抗原を分取用PAGディスク電気泳動(直径2cm, 5%polyacrylamide gel, 1.5mA/本, 4℃, 6時間泳動)にかけ、ゲルを5mm間隔に細切し生理的食塩水3ml内にて24時間含有抗原を抽出した。抽出液の一部を更に抗ブタA抗原ウサギ血清と免疫二重拡散法で反応させ、沈降線の認められた抽出液を採取し純化A抗原を得た。これを300μg/mlに調整したのち分注し、-80℃にて保存した。

2. 接種実験

接種動物は7週齢雄のLewisラット31匹、及び7週齢雄のWistarラット7匹と、体重200~300gのHart-

ley系モルモット5匹を用いた。

接種量はLewisラットについては、1~60μgの抗原量を接種し、30μg接種群を代表例とした。Wistarラット及び、Hartley系モルモットについては一匹あたり30μgの抗原量を接種した。また対照としてLewisラットにリン酸緩衝生理的食塩水0.1mlを接種した。

接種方法はすべて、抗原液0.1mlに等量のFreund完全アジュバント(FCA)を混和し動物の両足蹠部に接種した。

3. EAUの観察

接種後、経時的に細隙灯顕微鏡により眼炎症所見を観察し、接種量による発症様式、30μg接種群を代表とする炎症経過について検索した。

4. 眼球及び、全身諸臓器に対する病理学的検索

抗原接種後、経時的に眼球を摘出した。また全身諸臓器については、脳、松果体、口腔粘膜、甲状腺、顎下リンパ節、肺、心筋、肝、腎、小腸、腸間膜、精巣を接種後各時期に摘出した。摘出組織は2.5%ホルマリン加2%グルタルアルデヒド液にて固定した後、Hematoxylin Eosin染色し、光学顕微鏡での観察を行った。

III 結 果

1. A抗原の収量：

網膜約76.8g(牛眼100個)より最終的に、純化A抗原として11.1mgが得られた。

2. 抗原量とEAU発症：(表1)

Lewisラット群では、5μg以上の抗原量でEAUが100%に両眼性に発現し、急性発症した。発病は接種後約10日前後であった。1μgの接種群では10眼中6眼に炎症が確認された。また7匹のWistarラットでは2匹4眼、1匹1眼に炎症が認められた。これらは接種

表1 A抗原によるEAUの発症様式

種	接種量 (μ g)	発症眼数	罹患眼	前眼部所見	発症に要した日数 平均値 $\pm$ 標準偏差値
Lewis ラット	60	6/6	両 眼 性	急 性 発 症	9.0
	30	16/16			10.0 $\pm$ 0.5
	20	10/10			9.6 $\pm$ 0.7
	10	10/10			9.8 $\pm$ 0.8
	5	10/10			10.4 $\pm$ 1.0
	1	6/10			15.0 $\pm$ 0.7
Wistar ラット	30	5/14	片眼性 1 両眼性 2	症	12.4 $\pm$ 0.9
Hartley モルモット	30	0/10	—		—

表2 A抗原30 μ g接種群の発症経過

Lewis ラット		接 種 後 日 数							
No.	眼	←..... 7日間.....→							
		9	10	11	13	15	17	19	21
1	R	—	#	#	#	+	±	—	—
	L	—	#	#	#	+	±	±	—
2	R	—	#	#	#	+	±	—	—
	L	—	#	#	#	+	±	—	—
3	R	—	—	±	#	#	+	—	—
	L	—	—	#	#	#	±	—	—
4	R	—	—	#	#	#	+	—	—
	L	—	+	#	#	#	+	±	—
5	R	—	#	#	#	+	—	—	—
	L	#	#	#	#	#	±	—	—

#；超高度（蓄膿，フィブリン，前房出血）
#；高度（フィブリン，細胞多数）
+；中等度（細胞軽度）
±；軽度（充血）

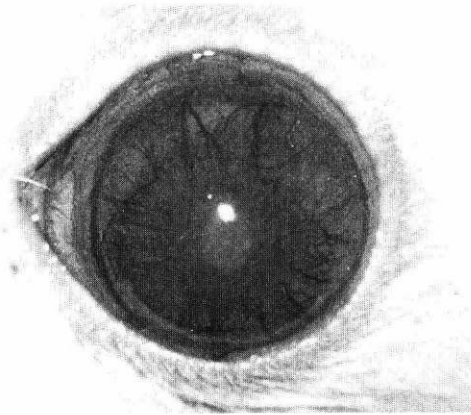


図1 EAU発症眼の前眼部所見（発症期）。虹彩血管は拡張並びに蛇行し、虹彩後面に蓄膿が観察された。

後約14日目に発症した。Hartley系モルモット及び、对照には発症は認められなかった。

3. 30 μ g接種 Lewis ラットの発症経過：（表2）

接種後約10日目に球結膜充血，虹彩血管の拡張，蛇行，前房のフィブリン析出をもって急性発症し，約1ないしは2日目で極期に達した。発症極期（図1）では虹彩の充血，血管拡張，および蛇行を示し，瞳孔領にはフィブリン析出による膜形成が認められた。また虹彩後面の後房には蓄膿が観察された。この蓄膿は体位変換によって易移動性を示す事が特徴であった。尚眼底の変化は，強い前眼部症状の為，透見が困難であっ

た。
4. 病理学的検索
30 μ g接種，Lewis ラットの病理所見は下記のごとくであった。

1) EAU 発症眼

i) 前房所見（図2）

EAU 発症初期より極期にかけて前房には，多数の細胞が浸潤しフィブリン析出を伴う極めて強い変化が

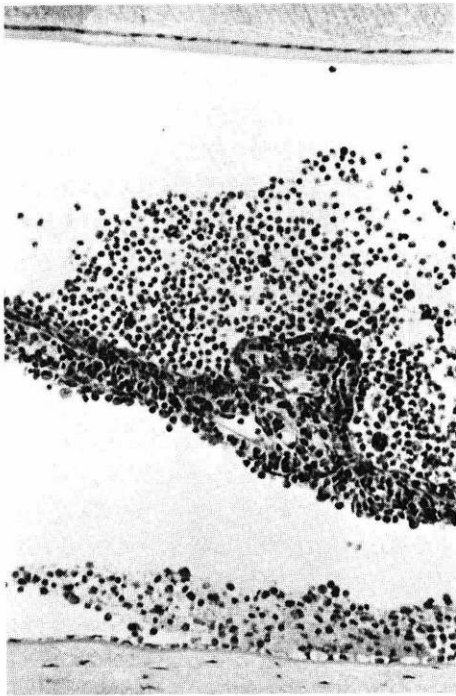


図2 虹彩の組織像（発症期）。単核球が主体をなし，多数の多核白血球の浸潤も認めた。HE 染色×160

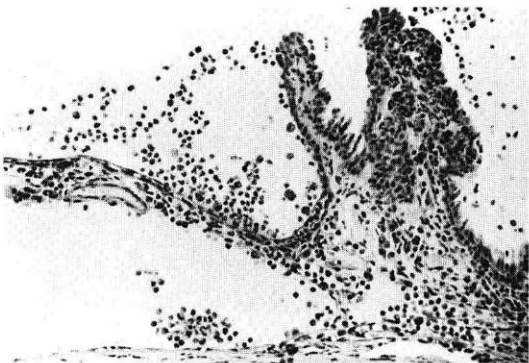


図3 毛様体，隅角部の組織像（発症期）。HE 染色×160

認められた。時には虹彩側の血管破綻に伴う前房出血も見られた。また角膜内皮には細胞や、色素の沈着が認められた。

ii) 虹彩毛様体所見 (図3)

虹彩毛様体では血管を中心として著明な細胞浸潤が炎症早期より認められた。浸潤細胞はリンパ球などの単核球が主体を成し、同時に多数の多核白血球を伴っていた。さらにマクロファージ、形質細胞、少数の好酸球も混在していた。

iii) 網膜脈絡膜所見

EAU 発症時網膜では、網膜血管炎としての所見が主であった(図4)。すなわち血管周囲に細胞浸潤が著明で、浸潤細胞の主体は虹彩毛様体と同様、単核球と多数の多核白血球で占められていた。また発症期より極期にかけては、外顆粒層まで及ぶ著明な浮腫をとも

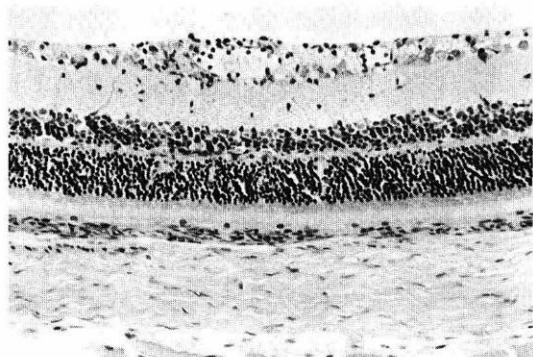


図4 網膜組織像(発症期)。網膜血管周囲炎が著明に認められた。視細胞外節の構造はこの時期には保たれていることが特徴であった。HE 染色×160

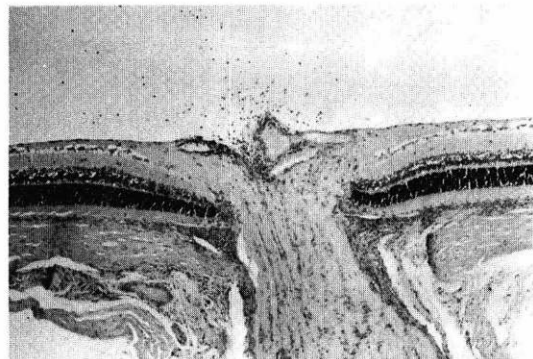


図5 視神経乳頭部組織像(発症期)。視神経乳頭部の動静脈周囲より硝子体腔にむけて著明な細胞浸潤を認めた。視神経組織への浸潤は軽度であった。HE 染色×63

なう炎症性変化を認めたが、視細胞外節層の構造は良く保たれていた。発症期の視神経乳頭部(図5)には、強い網膜中心動静脈血管炎が認められ、炎症細胞は視神経乳頭から硝子体腔中に浸潤していた。しかし視神経組織には軽度の細胞浸潤しか見られなかった。発症より約一週間後では(図6)浸潤細胞は急激に減少した。そして単核球が主体を成し、多核白血球はごく軽度にしに認められなくなった。一方、細胞浸潤による視細胞外節の破壊はこの時期に散見されたが、外節層の変化をほとんど伴わずに炎症が消退していく症例も多く観察された。

また網膜血管では周囲炎が進行し、肉眼的にも白鞘化が観察され(図7)、白鞘化した部位の組織像(図8)は閉塞性血管炎の像を呈していた。

2) 全身諸臓器について

全身の諸臓器のうち、免疫学的交叉性が認められた松果体⁴⁾に炎症像が認められたが他の組織には特異

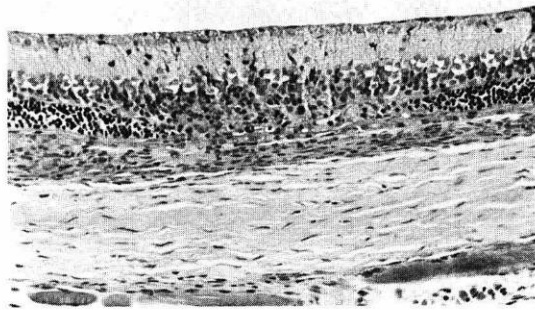


図6 網膜組織像(発症後、約1週間)。この時期に視細胞外節の破壊が認められた。HE 染色×160

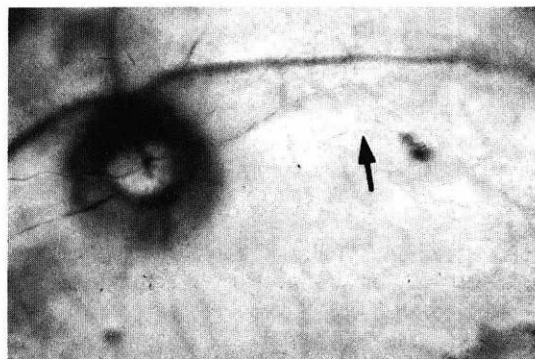


図7 眼球剖面所見(発症後、約1週間)。血管周囲に白鞘化を認めた。(矢印)

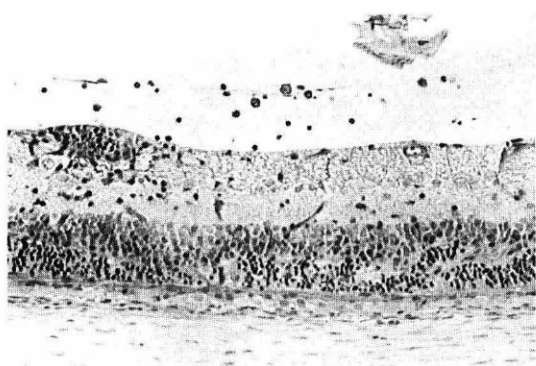


図8 白鞘化した血管周囲の組織像，網膜血管は閉塞性血管炎の像を呈した，HE染色×160

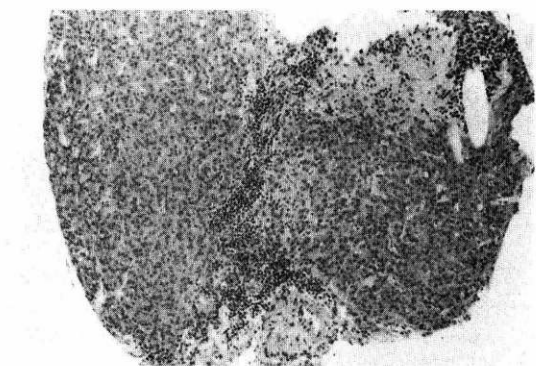


図9 松果体の組織像，炎症は接種後約10日目，EAU発症と同時に認められた，松果体実質の血管に沿った細胞浸潤が著明であった，HE染色×63

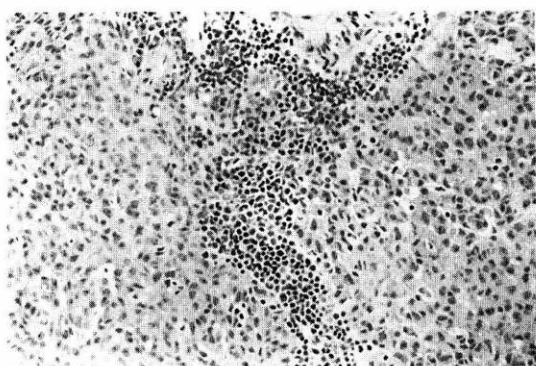


図10 松果体の組織像，浸潤細胞の主体は眼球同様単核球で，多数の多核白血球も認められた，HE染色×160

的变化は観察されなかった，すなわち松果体では（図9，図10）EAU発症と同時に松果体実質の血管に沿って炎症細胞が浸潤していた，眼球の所見と同様に浸潤

細胞はリンパ球を主とした単核球で，多核白血球，マクロファージ，形質細胞も多数認められた，また炎症後期，発症後約7日目にはこれらの浸潤細胞は減少する一方，松果体細胞は変性していた，

尚，EAU並びに松果体炎が誘発されたWistarラットでは臨床的にも病理組織学的にもLewisラットの所見と同様であった，

IV 考 按

A抗原は網膜抽出液に含まれる可溶性臓器特異抗原であり，分子量は約150,000，等電点はpH 5.0を示し，電気的移動度はアルブミン1.0に対して0.9であり，免疫二重拡散法でsingle lineを形成する事が知られている²⁾，またA抗原は網膜の視細胞外節の先端部から網膜色素上皮の絨毛突起部にかけて局在し，外節のshedding機構に関与するものではないかと報告⁶⁾されている，一方，眼内Retinol代謝の点から，Retinoidと特異的に結合する機能を持ち，しかも網膜視細胞外節と網膜色素上皮層間（Interphotoreceptor Space；IPS）にのみ存在する蛋白をChader³⁾，Wiggertら⁷⁾が注目し，この物質をIRBPとして報告している，最近Gery⁵⁾はこのIRBPを用いてFCAと百日咳菌を混合し，Lewisラットに接種したところEAUの発症をみたと報告している，このIRBPとA抗原が最近，免疫学的に同一の抗原性を示し，生化学的にも極めて近似していることが報告されたが⁴⁾，今回の接種実験の結果もGeryら⁵⁾の報告と極めて類似していた，

また今回，Lewisラットのほか，Wistarラット，Hartley系モルモットについても接種を行ったが，Wistarラットでは約36%に発症が認められ，Hartley系モルモットには発症が肉眼的に全く確認できなかった，Broekhuysenら⁷⁾はIRBPをWistarラットに接種したところEAUは発症しなかったと報告しており，WistarラットではIRBPでもA抗原でも発症しにくい事は一致する，一方，Visticaら⁸⁾はIRBPをHartley系モルモットに接種したところ，我々の結果と同様に発症は認められなかったと報告している，したがって，Hartley系モルモットにおいても，A抗原とIRBPに対する感受性が低いという点で一致した，従って以上のことから，A抗原とIRBPはEAU発現性においても，ほぼ同一の性格を有するものと考えられた，

A抗原によるEAUと，従来より数多く報告されているS抗原によるEAUとの相違を30μg接種した場

表3 A抗原とS抗原によるEAUの相違

		抗原接種量 30μg	
		A-EAU	S-EAU
Lewis ラット	発症日 (接種後日数)	10	14
	病理学的所見 網膜血管炎 視細胞外節変化	Ⅲ (-)~+	+~Ⅲ Ⅲ
種による発現性			
Lewis ラット		Ⅲ	Ⅲ
Wistar ラット		(-)~Ⅲ	(-)
Hartley 系モルモット		(-)	Ⅲ

合を例にとって調べてみると(表3), 抗原接種後発症に要した日数はA抗原によるEAUの方が2~3日短かった。また病理学的所見ではA抗原によるEAUでは発症時より強い網膜血管炎が生じるのに対し, S抗原によるEAUでは発症時より著明な視細胞外節への細胞浸潤や破壊が全例に見られることが, 主な相違点となっていると思われた。またA抗原によるEAUでも視細胞外節層の破壊は炎症後期に至ってみられるが, 症例によっては極めて軽度の障害しか受けないものもあり, 外節の破壊を主とするS抗原によるEAUとは明らかに異なった所見であった。この両EAUにみられる外節の変化はS抗原が視細胞外節の膜に存在するのに対し, A抗原は視細胞外節間隙に存在するという解剖学的な局在の相違が発症機転や障害にも関与しているのではないかと思われた。

他臓器における変化としては, S抗原をモルモット¹⁰⁾やラット¹¹⁾に接種すると松果体炎を生じることが確認されている。A抗原によってもラットで松果体炎が確認され, またGeryら⁵⁾によってIRBPでも確かめられている。眼の臓器特異性抗原と交叉性を有する松果体にEAUと同様に自己免疫性炎症を誘発することを確認した事は, 光伝達機構としての松果体の役割をA抗原やIRBPを用いて探求する点からも今後解明されるべき問題を多く含んでいると考えた。

本論文の要旨は, 第90回日本眼科学会総会(昭和61年5月23日四日市市)にて発表した。

稿を終えるにあたり御指導, 御校閲賜りました松尾治互

教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) **Faure JP**: Autoimmunity and the retina. Current Topics in Eye Research, vol. 2: 215—302, Academic Press, New York, 1980.
- 2) **高野 繁**: S抗原以外の網膜可溶性特異抗原について. 眼紀 33: 968—975, 1982.
- 3) **Chader GJ**: Retinoids in ocular Tissues: Binding Proteins, Transport, and Mechanism of Action. In: Cell Biology of the Eye, 373—433, Academic Press, New York, 1982.
- 4) **高村健太郎, 田中孝男, 坂井潤一, 野中茂久, 臼井正彦**: 網膜A抗原とIRBP (Interphotoreceptor Retinoid-binding protein) との同一性について. 日眼 90(臨時増刊号): 110, 1986.
- 5) **Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, Chader GJ**: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1296—1300, 1986.
- 6) **臼井正彦, 高野 繁, 山田 真, 高村健太郎**: 網膜A抗原の局在部位とその意義について. 日眼 88: 698—708, 1984.
- 7) **Chader GJ, Wigerdt B**: Interphotoreceptor retinoid-binding protein, characteristics in bovine and monkey retina. Vision Res 24: 1605—1614, 1984.
- 8) **Broekhuysse RM, Winkens HJ, Kuhlmann ED**: Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. Curr Eye Res 5: 231—240, 1986.
- 9) **Vistica B, Usui M, Kuwabara T, Wiggert B, Remond TM, Chader GJ, Gery I**: Retinal IRBP is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. Curr Eye Res in press.
- 10) **Kalsow CM, Waker WB**: The pineal gland in experimental allergic uveitis. Immunology and Immunopathology of the Eye. 113—120, Masson Publishing USA, New York, 1979.
- 11) **Mochizuki M, Charly J, Kuwabara T, Nussenblatt RB, Gery I**: Involvement of pineal gland in rats with experimental autoimmune uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1333—1338, 1983.

(第90回日眼総会原著)