

免疫電顕による脈絡膜におけるS抗原の局在 (図16)

長谷見通子 (東京医科大学眼科学教室)

The Localization of Retinal S-antigen in the Choroid

Michiko Hasemi

Department of Ophthalmology Tokyo Medical College

要 約

酵素抗体直接法を用い、正常 Lewis ラットに3種類の光条件(暗順応直後、光刺激1.5時間、光刺激30時間)を与え、脈絡膜におけるS抗原の局在を電子顕微鏡観察した。その結果、1. Choriocapillaris の内皮細胞および Bruch's 膜に陽性の反応産物を認めた。この傾向は30時間の光刺激を与えた群で顕著に観察された。2. 脈絡膜実質の血管内皮細胞には、陽性の反応産物が観察されなかった。(日眼 91:260—269, 1987)

キーワード：S抗原、脈絡膜、免疫電顕、明暗順応

Abstract

The localization of S-antigen in the choroid of the rat eye was studied by using enzyme-labeled antibody method observed by electron microscope under three conditions of adaptation: A) 24-hours dark adaptation, B) 24-hours dark adaptation and 1.5-hours light adaptation and C) light adaptation for 30-hours. The Fab fraction of rabbit IgG against the bovine S-antigen was labeled with horseradish peroxidase (HRP), and chorioretinal tissue of the rat eye was stained by this marking antibody. The results are as follows: 1. The marked reaction products were found on the Bruch's membrane and the endothelial cells of choriocapillaris in group C, but a fair amount of the reaction products were seen in the same portions in group A. There was no reaction in the control group stained by Fab fraction of IgG of normal rabbit serum, nor was there any reaction in the block test. 2. The positive reaction for anti-S antibody labeled HRP could not be observed in the endothelium of the vessels of the choroidal stroma. From these results the S-antigen was noted to be located mainly in the endothelium of the choriocapillaris and it appears to be influenced by light adaptation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 260—269, 1987)

Key words: S-antigen, Choroid, Electron microscopy, Enzyme-labeled antibody method, Light and dark adaptation

I 緒 言

実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (Experimental Autoimmune Uveoretinitis, EAU) を誘発する網膜可溶性抗原 (S抗原) の局在の研究は、光学顕微鏡による検索^{1)~3)}もさることながら、電子顕微鏡的レベルにおいても進み、視細胞特に外節平板膜に存在し、また

外節を shedding する網膜色素上皮細胞内においても、ある種の光刺激のもとで存在することが報告された⁴⁾⁵⁾。しかしこのS抗原が網膜内だけにとどまるのか、あるいは網膜色素上皮細胞 (RPE) にとりこまれ、脈絡膜との間の blood retinal barrier を超えて脈絡膜にも存在するのかわについてはいまだ不明である。

今回、標識抗体として Fab 分画を用いた酵素抗体直

接法による電子顕微鏡観察⁶⁾を手段とし、外節の shedding との関係を見るために、光条件に変化を与えて実験を行ない、脈絡膜における S 抗原の存在を検索したところ、対照との間には明らかな相違が認められ、S 抗原の脈絡膜における存在が確認された。このことは EAU の発症機構を考える上で極めて重要な点であると思われたので報告する。

II 実験方法

1. 実験対照

12時間毎の明暗周期（8：00点灯～20：00消灯）の人工照明下で飼育された正常 Lewis ラット（8週齢）を次の光条件を与えたグループに分けて実験に用いた。

A 群は24時間の暗順応直後のもの、B 群は24時間の暗順応後、通常の人工照明下で1.5時間の明順応のもの、C 群は通常の人工照明下で30時間の明順応のもので、これらのラットをエーテル麻酔後、眼球摘出し、割面を入れ、0.01M NaIO₄—0.075M リジン—0.0375M リン酸緩衝液—3%パラホルムアルデヒド (PLP) 固定液に4℃ 15時間の浸漬固定を行なった。その後10%、15%、20%のショ糖を加えたリン酸緩衝食塩水 (PBS) で4℃計30時間、さらに5%グリセリンを加えた20%ショ糖加 PBS で30時間洗浄し、眼球ごと O.C. T. Compound 中に凍結包埋し、-80℃に保存した。

2. 抗体の作製

高野らの方法⁷⁾で得られた純化されたウシ S 抗原を、ウサギ背部皮下及び足蹠部に完全フロイドアジュバンドと共に1回1mgのタンパク量で、2週間隔で3回接種し、抗 S 抗体価の上昇、並びに特異性を確認したのち、全採血した。得られた抗血清を40%飽和硫酸で塩析後、Sephadex G-100を用いてゲル濾過し、IgG 分画を得た。この IgG を0.05M 酢酸緩衝液 pH 4.5 で透析し、2%ペプシンを加え、37℃ 18時間反応させた。さらに0.5M Na₂HPO₄を加え、pH 7.2とし、終濃度0.1M の2-メルカプトエタノールを加え、次に終濃度0.12M のヨードアセトアミドを加え、各々4℃ 1時間攪拌反応させた。これを Sephadex G-100 でゲル濾過し、Fab 分画を得た。

3. 標識抗体の作製

Wilson と Nakane の方法⁸⁾に準じて、得られた Fab に Horseradish peroxidase (HRP) (TOYOBO, RZ=3.6) を標識した。

HRP 4mg を蒸留水1ml に溶解し、0.1M NaIO₄を

0.2ml 加え、室温で20分間反応させた後、1mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 中に一晚透析した。この HRP 溶液に0.2M 炭酸ナトリウム液20 μ l 加え、pH 9.5に調整し、ただちに Fab 溶液6mg/ml, 1ml に加え、2時間室温にて攪拌した。これに4mg/ml NaBH₄溶液を0.1ml 加えて4℃ 2時間攪拌後、0.01M PBS (pH 7.2) 中で一晚透析した。さらに Sephadex G-100 でゲル濾過し、OD. 280nm と OD. 403nm のピークに一致した分画を濃縮し、HRP 標識抗ウシ S 抗原ウサギ IgG Fab (タンパク量0.5mg/ml) を得た。

4. 電顕酵素抗体法

クリオスタットで10 μ m に薄切した各ラット眼球試料をアルブミンスライドガラスにのせ、風乾後、冷10%ショ糖加 PBS で5分間3回洗浄し、10%正常ウサギ血清を滴下し、10分後軽く洗浄後、標識抗体を滴下し、湿潤箱中にて4℃ 18時間反応させた。これを冷ショ糖加 PBS で10分間3回洗浄し、冷2%グルタルアルデヒドで4℃ 5分間固定し、冷 PBS で5分間5回の洗浄後、1%DMSO を含む0.2% 3, 3'-ジアミノベンジン4HCl-0.05M トリス塩酸緩衝液 (DAB) 溶液に30分間、DAB-0.005% H₂O₂ 溶液に5分間、室温で反応させた。さらに冷 PBS で洗浄し、2%四酸化オスミウムで1時間の後固定を行ない、エタノール系列で脱水後、QY-1による置換の後、エポキシ樹脂 (Quetol-812) にカプセル包埋した。樹脂重合後、マイクロームにて網膜、脈絡膜の部位を超薄切し、得られた切片を電子染色せずに、電子顕微鏡 (HITACHI H-300) 観察した⁶⁾。

5. 対照試験

1) 正常ウサギ血清を用いて、3の方法で HRP 標識正常ウサギ IgG Fab を得たのち、4の方法で観察した。

2) Block test, 抗ウシ S 抗原ウサギ IgG (タンパク量1mg/ml) でブロックさせた後、標識抗体で反応させた。

3) HRP 溶液 (0.5mg/ml) のみの反応。

以上3つの対照試験を行ない、本試験と比較検討した。

III 結果

1. HRP 標識抗ウシ S 抗原ウサギ IgG Fab による染色

1) 視細胞における観察

A, B, C 群とも外節部に強い反応産物がみられた (図

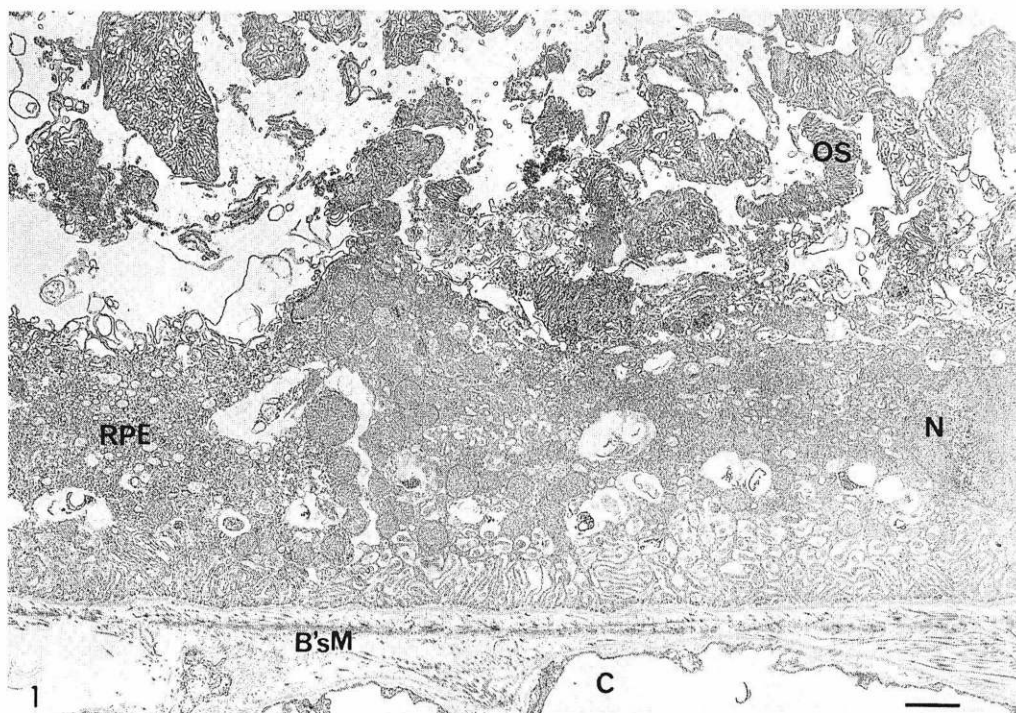


図1 C群, HRP-抗S IgG Fabによる観察, 視細胞外節, RPEに強い反応産物が見られる。(—; 1 μ)

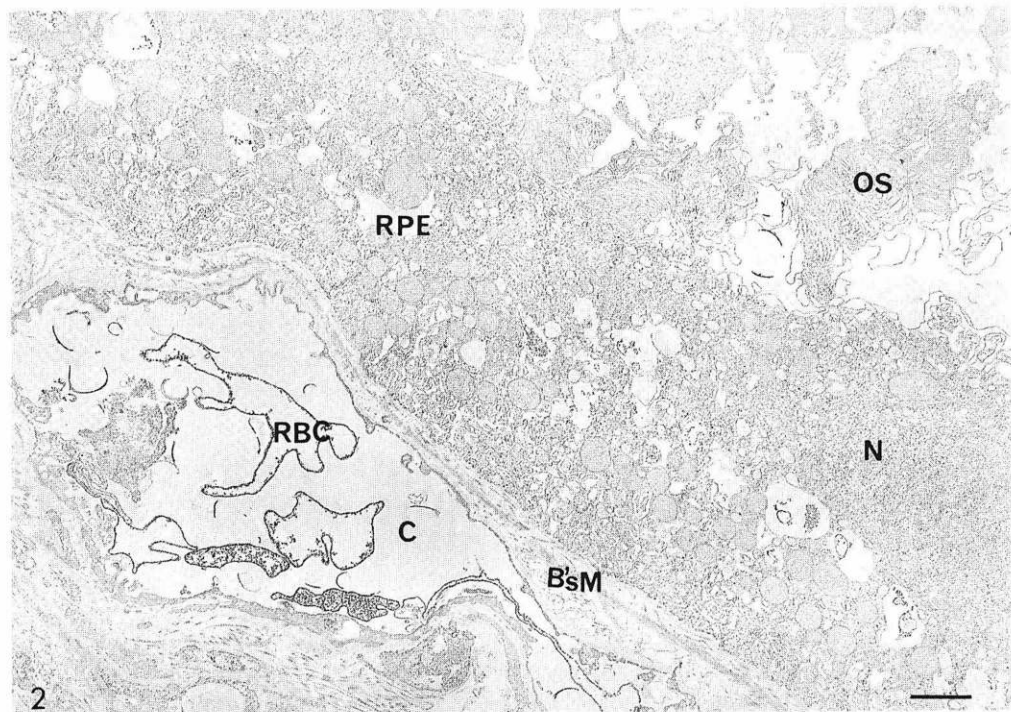


図2 C群, Control. HRP-正常ウサギ IgG Fabによる観察, 赤血球細胞のみが高電子密度である。

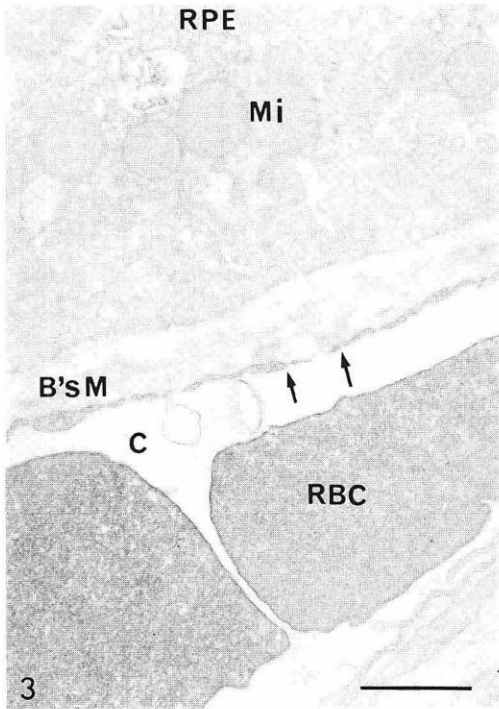


図3 A群, choriocapillarisの内皮細胞, RBCに陽性の反応を認める.

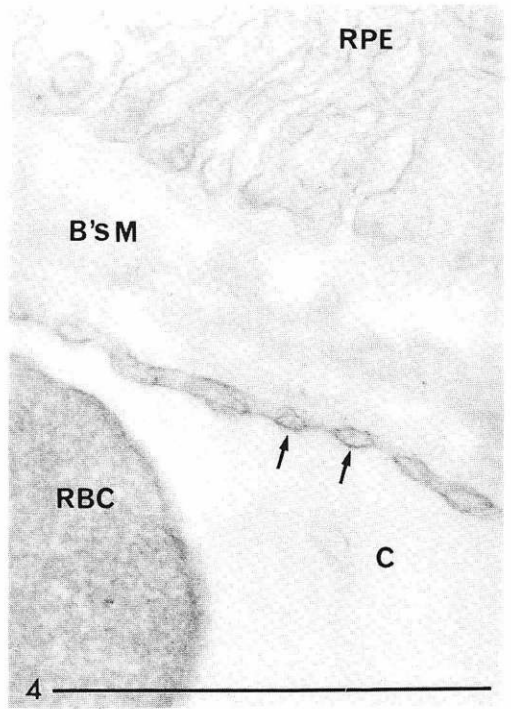


図4 図3の拡大写真, choriocapillarisの内皮細胞膜に反応産物がみられる.

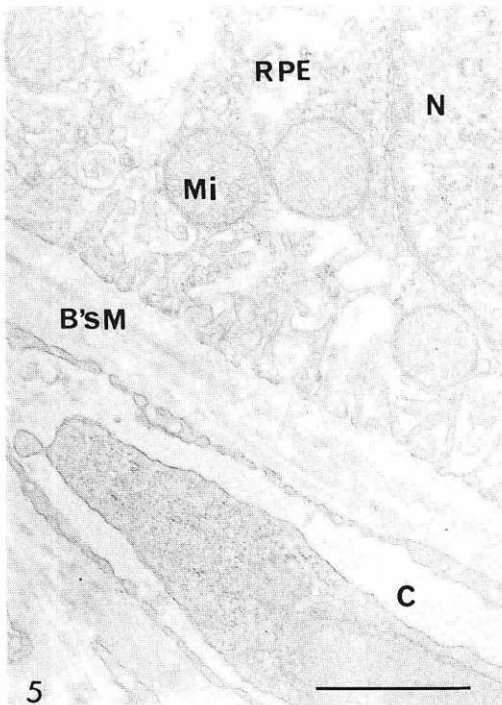


図5 A群, Control 1). 全体的に低い電子密度を示す.

記号の説明

OS: Outer segment, RPE: Retinal pigment epithelium, N: Nucleus, B's M: Bruch's membrane, C: Choriocapillaris, RBC: Red blood cell, V: Vessel, Mi: Mitochondria

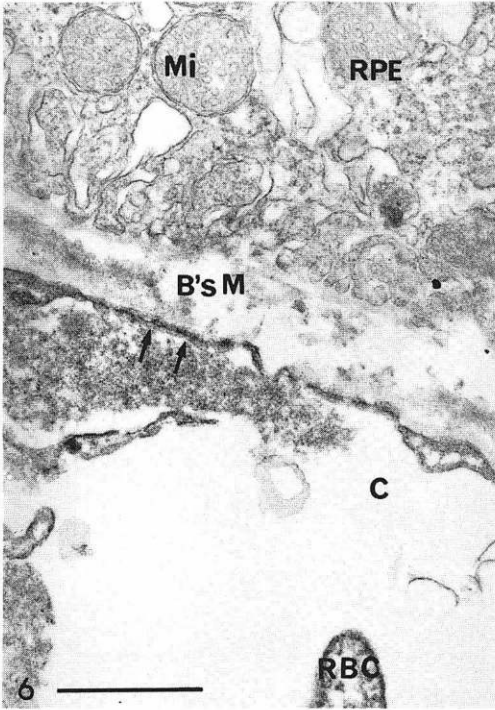


図6 B群. RPE, Bruch's 膜の一部, choriocapillaris の内皮細胞に反応産物を認める.

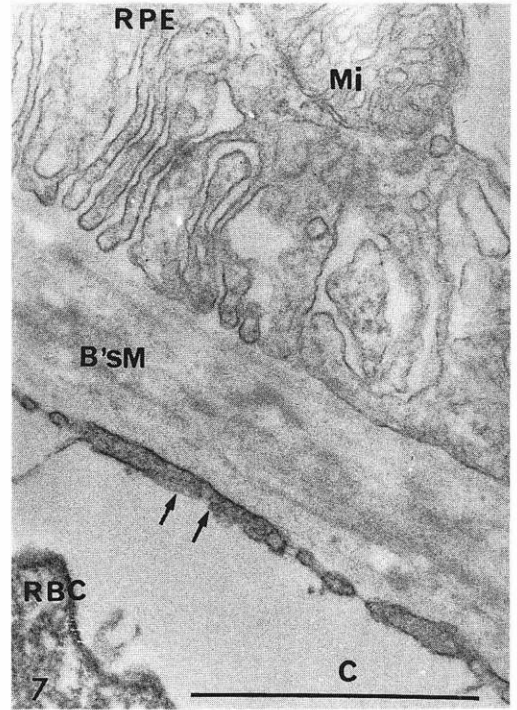


図7 図6の拡大写真. choriocapillaris の内皮細胞に反応産物がみられる.

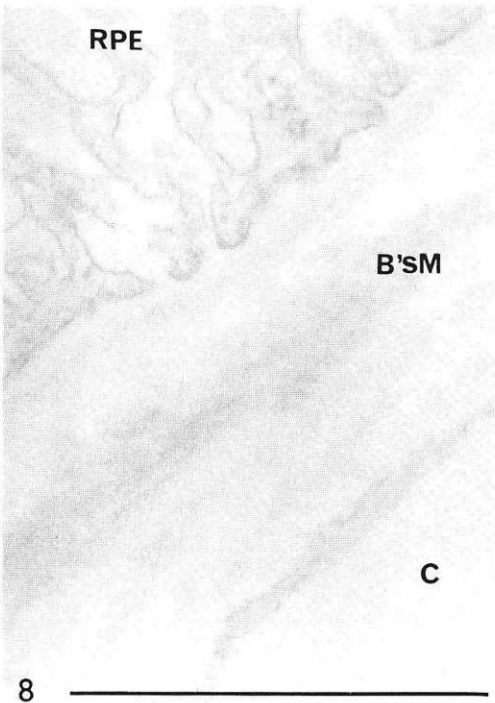


図8 B群. Control 1). 全体的に低い電子密度である.

光環境

A群: 24時間の暗順応直後, B群: 24時間の暗順応後, 1.5時間の明順応, C群: 30時間の明順応.

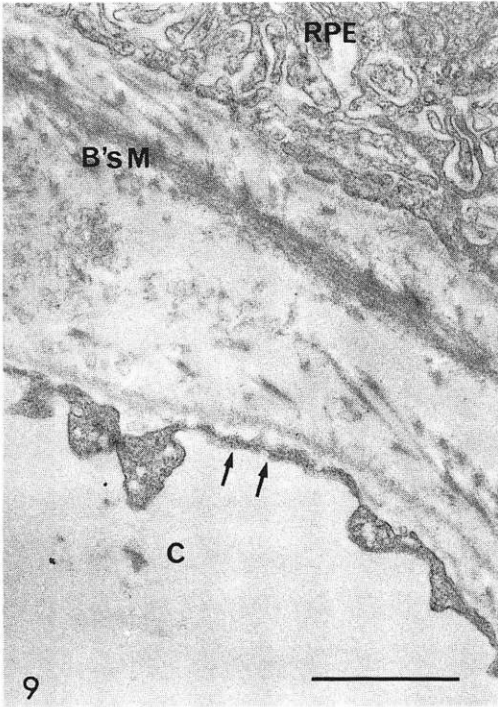


図9 C群. RPE, Bruch's膜, choriocapillarisの内皮細胞に反応産物を認める.

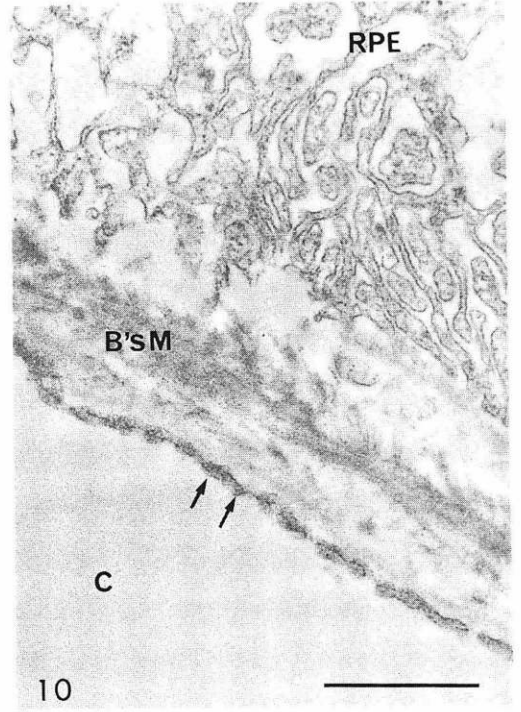


図10 図9の拡大写真. 全体的に強い反応産物がみられる.

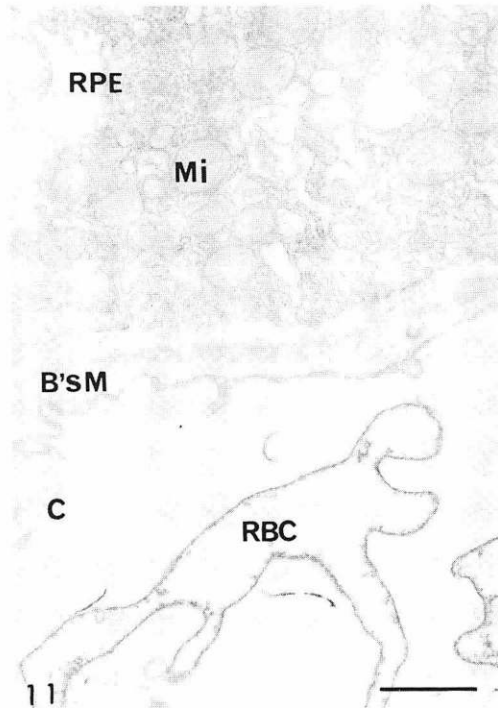


図11 C群 Control 1). 赤血球細胞を除いて, 全体的に電子密度は低い.

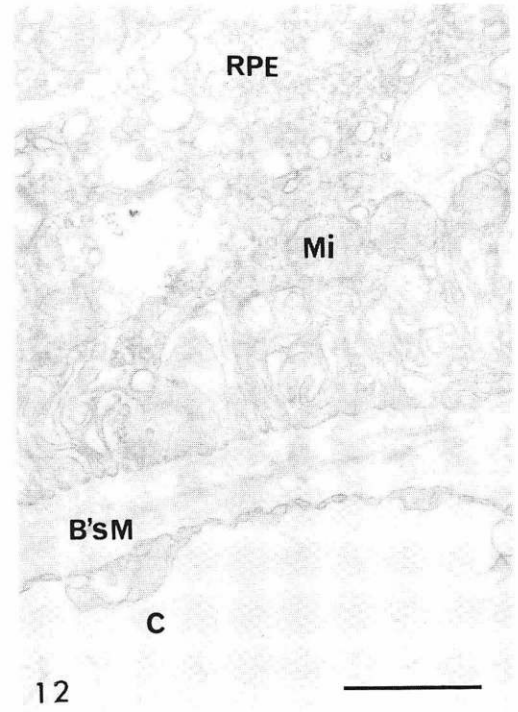
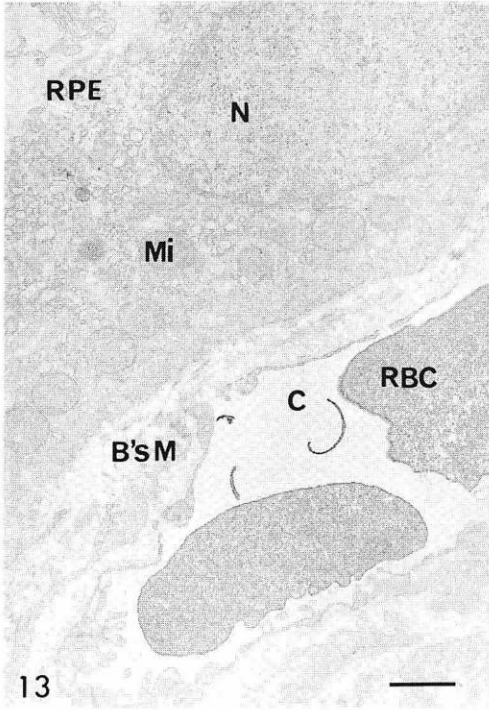


図12 C群 Control 2). 全体的に低い電子密度である. 反応はブロックされている.



Control
 Control 1) : HRP-正常ウサギ IgG Fab, Control 2) :
 Block test, Control 3) : 0.5mg/ml HRP 溶液

図13 C群 Control 3). 赤血球細胞のみが、高電子密度である。

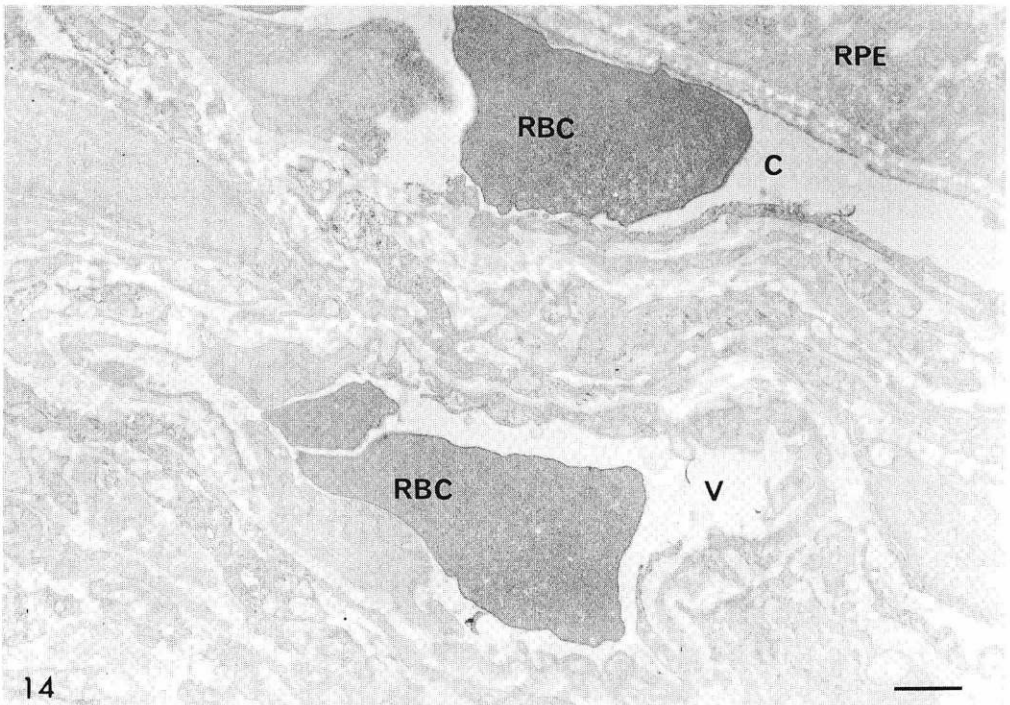
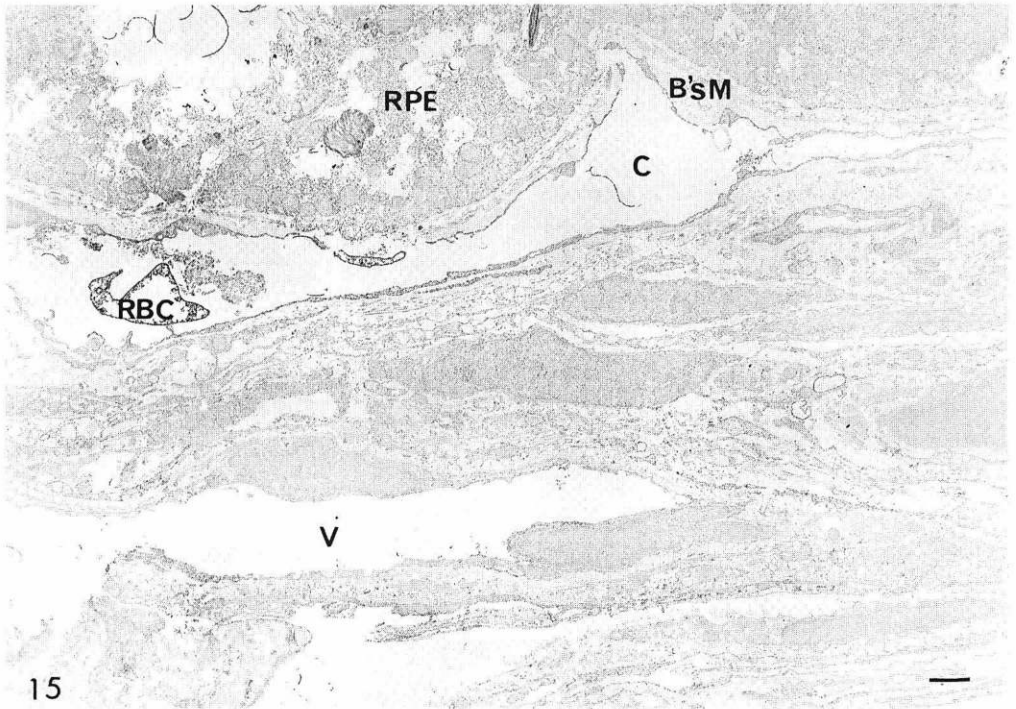
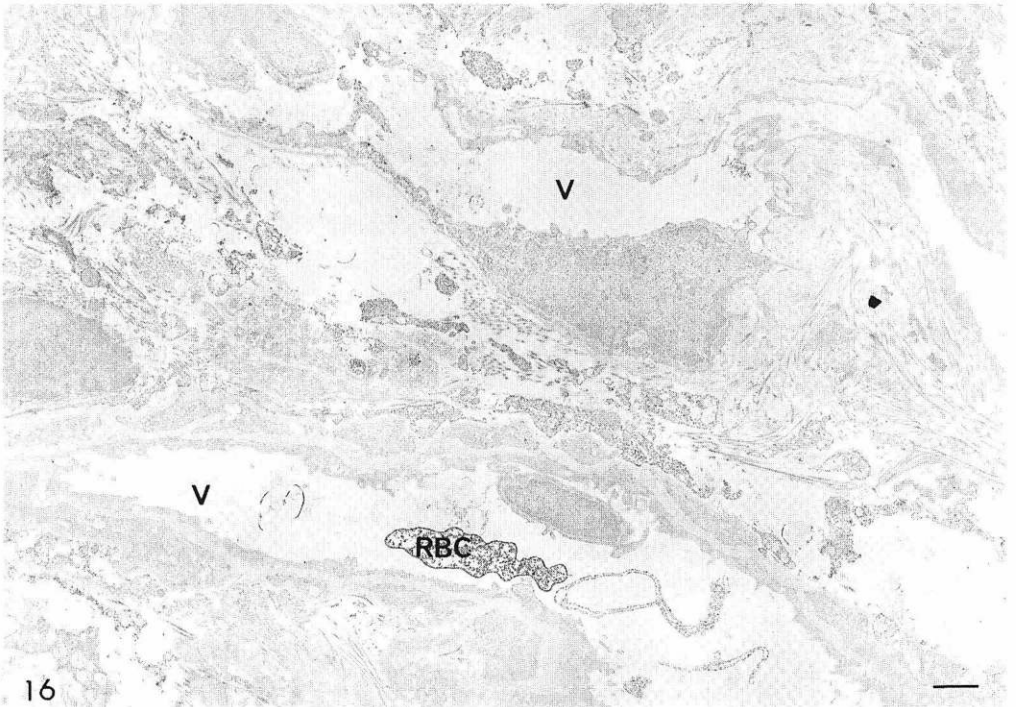


図14 A群, 脈絡膜実質の血管内皮細胞には choriocapillaris の内皮細胞に比べ、陽性の反応産物は認められない。



15

図15 B群, choriocapillaris の内皮細胞と比較して, 脈絡膜実質の血管内皮細胞に反応産物はみられない.



16

図16 C群. 脈絡膜実質の血管像. 赤血球細胞に陽性の反応産物がみられるが, 血管内皮細胞に反応産物は観察されない.

1), RPEにも対照(図2)に比較して, microvilli, 細胞質に反応産物が認められた。

2) RPE と脈絡膜における観察

i) A 群, 暗順応24時間直後

RPE, Bruch's 膜に反応産物は観察されないが, choriocapillaris の内皮細胞にわずかに認められた(図3)。高倍率の写真(図4)で検索すると choriocapillaris の内皮細胞の細胞膜に存在していることが, 対照(図5)に比較して観察された。また脈絡膜実質の血管内皮細胞(図14)に反応産物はみられなかった。

ii) B 群, 暗順応24時間後, 通常的人工照明下に1.5時間の明順応

対照(図8)に比較して, RPE の細胞質の一部と basal infolding の一部の末端に弱い反応産物を認めた(図6)。Bruch's 膜の一部にもわずかに反応産物が観察された。choriocapillaris の内皮細胞では, A 群のものと比較し, やや強めの反応産物がみられた(図6, 7)。さらに脈絡膜実質の血管内皮細胞(図15)には, 反応産物は認められなかった。

iii) C 群, 通常的人工照明下に30時間の明順応

RPE の核, ミトコンドリアを除く細胞質, basal infolding に多くの顆粒状の反応産物が観察された。Bruch's 膜にも強くみられた(図9)。choriocapillaris の内皮細胞には, 全体的に強い反応産物が対照(図11, 12, 13)に比較して認められた(図10)。脈絡膜実質の血管内皮細胞に, 反応産物は特に認められなかった(図16)。

2. 対照実験

いずれの対照実験にも, 視細胞に反応産物はみられなかった。また RPE, Bruch's 膜, choriocapillaris の内皮血管に反応産物の沈着はなかった。しかし choriocapillaris の赤血球には HRP 陽性の反応産物が認められた。

IV 考 按

実験対象に Lewis ラットを用い, 3種類の光条件を与え, 抗ウシ S 抗原ウサギ IgG Fab に HRP を標識して, 電顕酵素抗体法で実験を行なった。実験動物にラットを用いた理由は, 眼球ごと凍結包埋できるために, 実験操作過程での脈絡膜の破壊や, それによって生じる artifact を最小限に押さえたかったためである。3種類の光条件については, すでに矢島がこれらの光条件を用いて, ウサギの視細胞外節や, RPE における S 抗原の局在を観察し, 明順応の経過に従って,

shedding された外節部の S 抗原は, RPE 内へ移行し, 消化分解され, さらに脈絡膜へ移動するだろうと述べている⁵⁾。この光条件が, 脈絡膜の S 抗原の存在にも変化をもたらすものと考え, 実験の条件に加えた。その結果, 脈絡膜特に choriocapillaris の内皮細胞における S 抗原の存在は, 3種類の光条件を反映したものとなり, 明順応の経過に従って HRP の陽性反応産物が確かめられた。この所見は対照試験と比較し明らかに相違があり, 矢島の PBS だけの対照試験と異なり, より一層 S 抗原の choriocapillaris における存在を裏付けるものとなった。また RPE の basal infolding, Bruch's 膜の反応産物の存在の変化は, 分子量約5万のタンパク質である S 抗原が容易に RPE を通過できるか否かの問題の残る点ではあるが, 視細胞外節の shedding の活発化に伴ない, RPE 内における S 抗原の増加, さらに choriocapillaris へ移動して行く途中を捕えたものと推察され, ラットでもウサギでも同じ結果が得られた。

一方, choriocapillaris の内皮細胞に S 抗原の存在が確認されたが, 脈絡膜実質の血管内皮細胞には反応産物が観察されなかった。これは S 抗原が choriocapillaris の内皮細胞よりすみやかに血中に流れ込んで, 肝や腎などの臓器で分解, 排泄されるためではないかと思われた。

このように主として視細胞外節に存在し, 一種の隔絶抗原と考えられていた S 抗原が, わずかではあるが, 脈絡膜に存在しているので, EAU においては, S 抗原の全身感作に引き続き, 全身と血行によって直結している脈絡膜が眼内における最初の免疫反応の場となり, 免疫に関与する細胞が浸潤¹⁾してくることも容易に理解できる。しかし, S 抗原が正常ラットの脈絡膜に存在していても, EAU が自然発症しないのは, S 抗原が免疫学的に low zone tolerance の状態にあるためと推察された。

尚, 脈絡膜実質に lamera 状にみられた沈着物は, 実際の反応物か artifact かの判定が難しく, 今回は観察の対象からはずした。

稿を終るにあたり, 御鞭撻, 御校閲頂きました松尾治巨教授に深謝いたします。また直接御指導頂きました臼井正彦助教授に深く感謝いたします。また御援助頂きました当教室ぶどう膜班の諸先生に感謝いたします。そして高村健太郎氏の御協力に対し深く感謝いたします。

文 献

- 1) Wacker WB, Dosono LA, Kalsow CM, et al:

- Experimental allergic uveitis, isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 119: 1949—1958, 1977.
- 2) **Kalsow CM, Wacker WB:** Localization of a uveitogenic soluble retinal antigen in the normal guinea pig eye by an indirect fluorescent antibody technique. *Int Arch Allergy* 44: 11—20, 1973.
 - 3) **Kalsow CM, Wacker WB:** Use of immunofluorescent localization in the normal guinea pig eye to differentiate three auto antisera. *Int Archs Allergy Appl Immun* 48: 287—293, 1975.
 - 4) 矢島信悟, 白井正彦, 高村健太郎他: 酵素抗体法によるS抗原の局在—正常白色ウサギ眼での検討—, *日眼* 86: 1558—1566, 1982.
 - 5) 矢島信悟: 酵素抗体法によるS抗原の局在—特に網膜色素上皮細胞での存在とその変化について—, *日眼* 88: 121—132, 1984.
 - 6) 渡辺慶一: 酵素抗体法—理論・手技解説とその応用—, 学際企画.
 - 7) 高野 繁, 関 文治, 三橋正忠他: 網膜S抗原の新しい分析精製法について, *眼紀* 32: 491—496, 1981.
 - 8) **Wilson MB, Nakane PK:** Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, 215—224, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
 - 9) **Kozak Y, Sante-Laudy J, Benveniste, et al:** Evidence for immediate hypersensitivity phenomena in experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol* 11: 612—617, 1981.
-