

実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎

(その1) 網膜抗原の分離精製法と病原性について (図12, 表3)

藤野雄次郎 (関東中央病院眼科)

川島秀俊・奥村敦司 (東京大学医学部眼科学教室)

望月 學 (東京大学医学部分院眼科学教室)

Purification and Uveogenicity of Retinal Antigens

Yhujiro Fujino

Department of Ophthalmology, Kanto Chuo Hospital

Hidetoshi Kawashima and Atsushi Okumura

Department of Ophthalmology Univ. of Tokyo School of Medicine

Manabu Mochizuki

Department of Ophthalmology, Branch Hospital University of Tokyo School of Medicine

要 約

IRBP と S 抗原を同一の網膜材料から一連の分離操作で精製する方法を開発し、その得られた両抗原の性状並びに抗原性について調べた。S 抗原は網膜抽出液をゲルクロマトグラフィとハイドロキシアパタイトゲルを経ることにより、また、IRBP はゲルクロマトグラフィと ConA セファロースカラムを経ることにより精製分離した。牛眼100個から S 抗原は約13mg、IRBP は約7mg 得られた。この方法で得られた両抗原は免疫 2 重拡散法で交差反応を示さず、SDS-PAGE により、それぞれの分子量は IRBP は約140K、S 抗原は約50K で、両抗原の混入はなかった。各抗原で免疫したラットの脾細胞は免疫に用いた抗原刺激にたいしてのみ増殖反応を示した。IRBP で免疫したラットの眼病変は S 抗原のそれに比べ、発症が早く、速やかに消退する特徴があり、炎症の程度は弱かった。松果体病変は IRBP のほうが顕著であった。(日眼 91 : 498—508, 1987)

キーワード : Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), 網膜可溶性抗原 (S 抗原), 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎, 松果体炎, ラット

Abstract

It has been suggested that some uveitogenic antigens are present in the retina. Recently, interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) was found to have uveitogenic activity similar to S-antigen (S-Ag). The present paper reports our purification method by which both IRBP and S-Ag were obtained in one process. Extract from bovine retinas was applied to gel chromatography (AcA 34 Ultrogel) and fractions positive to anti-IRBP serum or anti-S-Ag serum were collected by double-diffusion-immuno-method. The IRBP-positive fractions were treated with ConA sepharose affinity chromatography and the S-Ag-positive fractions were treated with hydroxyapatite chromatography. Then after each fraction was tested by the double-diffusion-immuno-method using anti-IRBP serum or anti-S-Ag serum, only fractions with positive reactions were collected and used for IRBP or S-Ag, respectively. Two antigens obtained by this procedure were shown to have no cross reactivities by the double-diffusion-immuno-method. SDS-PAGE showed that molecular weights of IRBP and S-Ag were

別刷請求先 : 113 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 藤野雄次郎

Reprint requests to: Yhujiro Fujino, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Univ. of Tokyo 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(昭和61年12月27日受付)(Accepted December 27, 1986.)

approximately 140K and 50K, respectively. Both IRBP and S-Ag caused experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis in Lewis rats, but IRBP was shown to be more potent than S-Ag by its earlier onset and higher frequency. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 498-508, 1987)

Key words: Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), S-antigen (S-Ag), Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), Pinealitis, Rats

I 緒言

内因性ぶどう膜炎の発生機序は不明の点が多いが、発生機構の一部に免疫異常あるいは自己免疫機序の関与が古くより示唆されている。Elshnigらは交感性眼炎の原因として、ぶどう膜メラニン色素に対する自己免疫説を唱え¹⁾、その後、ぶどう膜炎を惹起する眼の自己抗原を求めて、様々な眼内組織が抗原として試みられて来た。Wackerらは初めて網膜抽出液中に強い病原性をもつ抗原が存在することを見出し²⁾、その後、彼らは単一のタンパク質として網膜可溶性抗原(S抗原)の分離精製に成功した³⁾。S抗原は主として網膜の視細胞層と第3の眼といわれる松果体に局在し^{3,4)}、完全フロイドアジュバント(CFA)に emulsify して全身的に免疫するとモルモット^{3,5)}、ラット^{6,7)}、サル^{8,9)}等の種々の実験動物の眼と松果体に強い炎症を惹起する。S抗原により惹起される実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)の免疫病理機序には、細胞性免疫および体液性免疫の両者が関与していると考えられるが、胸腺欠如ヌードラットにS抗原を免疫してもEAUが発症しない事¹⁰⁾、S抗原感作Tリンパ球によりEAUが同種同系の動物に移入できる事¹¹⁾、Tリンパ球を選択的に抑制するシクロスポリンによりEAUの発症が完全に抑制される事¹²⁾などの実験結果より、EAUの発症にはTリンパ球が必要不可欠であると考えられている。この様に、実験動物におけるEAUの免疫病理機序は多くの点が解明されてきたが、一方、人のぶどう膜炎との関係については不明の点が多い。一部の動物にS抗原免疫で惹起されるEAUと、人のある種のぶどう膜炎の病理像が類似している事^{5,8,9)}、および、一部のぶどう膜炎患者の末梢血リンパ球がS抗原に感作されている事¹³⁾など、S抗原が人のぶどう膜炎に関与していることを示唆する報告があるが、人のぶどう膜炎を自己免疫機序の観点から理解するには不充分である。この点を明らかにするには、更に多くの研究がなされなければならないが、そのひとつとして、S抗原の他にも、病原性のある抗原をさがす必要がある。こ

く最近、Geryらは、網膜視細胞のmatrixに存在するInterphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)がラットにEAUを惹起することを報告した¹⁴⁾、IRBPは元来、視細胞のPhototransductionを解明する過程で1970年代半ばに分離精製され、Vitamin A (retinol)の網膜外節と網膜色素上皮間の輸送をmediateする分子量144,000の糖蛋白質であるが、主として生化学の研究の対象として興味をもたれており^{15,16)}、ごく最近まで免疫学的研究はなされていなかった。我々はIRBPとS抗原がゲルクロマトグラフィーで異なったフラクションに分離されること、および、IRBPは糖タンパクでS抗原はほとんど糖を含まないのでコンカナバリンAクロマトグラフィーにより分離が可能なこと、に注目して、この2つの網膜抗原を同一の網膜材料から一連の分離操作で効率よく精製する方法を開発したので、ここに、我々の分離精製法および、この方法で得たIRBPとS抗原の免疫学的特性、実験動物に対する病原性等について報告する。

II 実験方法

1. 網膜抗原の分離精製方法

ウシ網膜よりS抗原およびIRBPを分離精製する一連の過程をFig. 1に示す。ウシ網膜は、新鮮なウシ

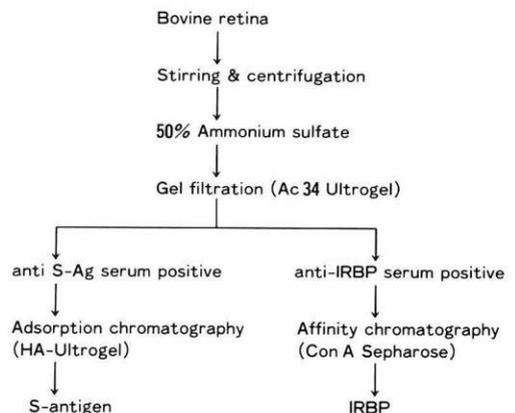


Fig. 1 Purification method of S-Ag and IRBP.

眼球を入手し(芝浦臓器, 品川, 東京), 即日, 網膜を分離して -80°C に凍結保存したものをを用いた, 100個のウシ網膜に, 0.01M リン酸緩衝液, pH 7.6 (緩衝液A) を150ml 加え, 4°C でスターラーで30分間攪拌し, 懸濁液を遠心し(48,000g, 10分間), 上清を採取した. 上清に同量の飽和硫酸アンモニウムをゆっくり加えた後に, 48,000gで10分間遠心し, その沈渣を回収した. 沈渣を10~20mlの緩衝液Aで溶解し, これを超遠心(220,000g, 60分)し, その上清を採取した. 超遠心後の上清を Ultrogel AcA34 (LKB, Villeneuve-la-Garenne-France, $2.6 \times 100\text{cm}$) カラムを用いてゲル濾過し分離した. 溶出には緩衝液Aを用い, UV モニター(吸収波長280nm)でモニターしながら, 5ml ずつの分画で集めた. 溶出した各分画を抗ウシS抗原ウサギ血清と抗ウシIRBPウサギ血清を用いて免疫2重拡散法を行ない, 各々の抗血清に対し沈降線を作る fractionを集め, それぞれをS抗原分画およびIRBP分画とした.

S抗原の精製はさらにDoreyらの方法¹⁷⁾に従い, Ultrogel HA (LKB, $1.5 \times 30\text{cm}$) カラムを用いた吸着クロマトグラフィー法にて精製した. 即ち, S抗原分画を上記カラムに流し, 緩衝液A 500ml で洗った後, リン酸緩衝液の0.01M から0.12M を135ml ずつ用いて連続濃度勾配による溶出を行ないながら5ml ずつの分画で集めた. 溶出した各分画は再度, 抗ウシS抗原ウサギ血清を用いて免疫2重拡散法を行ない, 反応する分画を集め, 35%polyethyleneglycol (分子量20,000, Sigma, ST Louis, MO, USA) 溶液中で濃縮し, 最終的に1mg/mlの蛋白濃度に調整してS抗原として使用した.

IRBPの精製は, Ultrogel AcA34ゲル後のIRBP陽性分画を, まず, 0.15M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 を含有する0.05M Tris HCl 緩衝液(pH 7.6, 緩衝液B)で一晩透析し, その後, ConA-Sepharose (pharmacia, Uppsala, Sweden, $1.0 \times 20\text{cm}$) カラムに applyした. ConA-Sepharose に吸着しない蛋白をまず緩衝液Bで溶出した後に, 0.2M methyl- α -D-mannopyranoside を含む緩衝液Bをカラムに流して, ConA sepharose カラムに吸着した糖蛋白質を溶出回収した. 回収した各分画は再度, 抗ウシIRBPウサギ血清を用いて免疫2重拡散法を行ない, 反応する分画を集め, 35%polyethyleneglycol (分子量20,000, Sigma)溶液中で濃縮し, 最終的に1mg/mlの蛋白濃度に調整してIRBPとして使用した.

2. 実験動物

8~14週齢, 雄性近こう系リスラット(日本チャールスリバー, 厚木, 神奈川)を用いた.

3. 免疫2重拡散法

Agar noble (Difco, Detroit, Michigan, USA) を0.9%含有するリン酸緩衝液をガラス板上に流し厚さ約1mmのゲルを作製し, ゲル・パンチャーにて直径2mmの小穴をあけた. 中央の穴に抗ウシIRBPウサギ血清または抗ウシS抗原ウサギ血清を $7\mu\text{l}$ いれ, 周囲の穴に試料を同量いれて, 室温で24時間放置後の沈降線を調べた.

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

分離ゲル(0.375M Tris-HCl, 0.1%SDS, 12% Acrylamide-Bis, 0.05% ammonium persulfate, 0.05%TEMED)の上方に濃縮ゲル(0.125M Tris-HCl, 0.1%SDS, 4%Acrylamide-Bis, 0.05% ammonium persulfate, 0.1TEMED)を加え, 厚さ1.5mmの不連続ゲルを作製し, コームにより作った濃縮ゲルの溝に, サンプル・バッファー(0.0625M Tris-HCl, 2% SDS, glycerol 微量, 5% 2β -mercaptoethanol)に溶解したS抗原, IRBPあるいは分子量の定まった標準蛋白質(Molecular Weight Protein Standards, Bio Rad, Richmond, CA, USA)を applyした. この不連続ゲルを垂直型スラブゲル電気泳動装置(プロティアンII スラブセル, Bio-Rad)の所定の位置にセットし, 泳動バッファー(0.3%Tris base, 1.5%glycine, 0.1% SDS)をセルに加えて, 10°C , 35mA で5時間泳動した. 泳動後, 分離ゲルを酢酸メタノール溶液で固定し, 0.1%クマシーブルーで染色を行ない, 酢酸メタノール溶液で脱染色した.

5. 免疫方法および疾患の評価法

不完全フロイド・アジュバント(Difco)に Mycobacterium Tuberculosis H37Ra を2mg/mlの濃度で溶解して作製した完全フロイド・アジュバント(CFA)と抗原を同容量にまぜ, emulsion とし, ラットの足跡に0.1ml/ラットの量で免疫した. 用いた抗原はS抗原あるいはIRBPであり, その用量はラット1匹あたり0.3, 1, 3, 7.5, 15, 30 μg であった. 免疫後, 概ね毎日, 眼内炎症の有無を肉眼的に観察し, さらに最終的にはドライアイス中にてラットを殺し, 松果体と眼球を摘出して組織学的に検討を加えた. 摘出眼球および松果体を含む中枢神経標本を2.5%グルタル・アルデヒド2%ホルマリンにて固定しパラフィンに包埋

した後、厚さ $3\mu\text{m}$ の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびPAS染色をおこなって光学顕微鏡で観察した。EAUおよび松果体炎の有無の判定および炎症病変の強さの評価は全て病理組織学的検査に基づいて行なった。即ち、EAUでは、0：炎症は全くない、+1：虹彩毛様体炎あるいはその近くの周辺部網膜に炎症細胞が見られる、+2：網膜視細胞内外節が主に炎症細胞により浸潤されている、+3：炎症細胞が外顆粒層およびそれより内層まで浸潤している、+4：炎症細胞が眼内組織全体に浸潤し組織障害が著しい、一方、松果体炎はリンパ球浸潤が、0：全くない、+1：被膜に接する松果体辺縁部にわずかに認められる、+2：松果体のやや内側まで浸潤している、+3：松果体の中心部近くまで浸潤している、に分類した。

6. 網膜抗原に対する免疫反応

1) リンパ球増殖能

S抗原またはIRBPを $30\mu\text{g}$ の量で免疫したルイスラットを眼内炎症発症直後（免疫後14日目）に殺し、摘出した脾臓から脾細胞を分離した。脾臓を2%非働化Fetal Calf Serum (FCS, Behringer-Mannheim, West-Germany)を含むRPMI-1640溶液(GIBCO, Grand Island, NY, USA)に浮遊させ、ステンレスメッシュ上でteasingを行ない、濾過させ、単離細胞にした。赤血球を除去するため、一度洗浄しベレットとした後に、 $\text{Tris-NH}_4\text{Cl}$ を加え2分間室温で放置し、その後3回洗浄した。脾細胞を5%FCS、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-Mercapto-ethanol (2-ME), 100U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, S抗原またはIRBP $5\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むRPMI-1640溶液中で、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、5% CO_2 , 37°C で培養を行なった。培養は4日間行ない、培養終了16時間前に $1.0\mu\text{Ci}$ の ^3H でラベルされたサイミ

ジンを加え、培養終了後、cell harvestarで細胞をガラスメッシュに吸着し乾燥させた後に、液体シンチレーションカウンターで放射能活性を測定した。測定はtriplicateで行ない、その平均値と標準偏差をcpmで表示した。

2) 皮内反応

眼内炎症発症直後（免疫後14日目）の各々のラットの腹壁の毛を剃り落とし、 $100\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ のS抗原またはIRBPを皮内に注射し、4時間の皮内反応（アルサス型）と24時間後のそれ（遅延型）を測定し、皮内反応の直径（mm）を測定した。

III 結 果

1. 網膜抗原の精製

AcA34カラムでゲル濾過を行なった結果の1例をFig. 2に示す。溶出した各分画のうち、免疫二重拡散法で、抗ウシ網膜IRBPウサギ血清とはNo. 58からNo. 68が、抗ウシS抗原ウサギ血清とはNo. 78からNo. 98の分画が沈降線を形成し、両抗原はこの段階で分離可能であった。

更に精製を進めるために、AcA34カラム後のS抗原分画をUltrogel HAカラムに通した結果の1例をFig. 3に示す。S抗原はリン酸緩衝液 0.07M から 0.106M の間、即ち、No. 41からNo. 61の分画に認められた。これらの分画のみを濃縮してS抗原として実験に用いた。

AcA34カラム後のIRBP分画をConA Sepharoseにapplyして緩衝液Bで溶出すると、Fig. 4に示すごとく、最初、大量の蛋白質が溶出された（フラクション1~30）。これはConA Sepharoseに吸着しなかった蛋白質が溶出されてきたもので、この後、フラクションの溶出曲線は基線に戻り平坦となった。これを確認

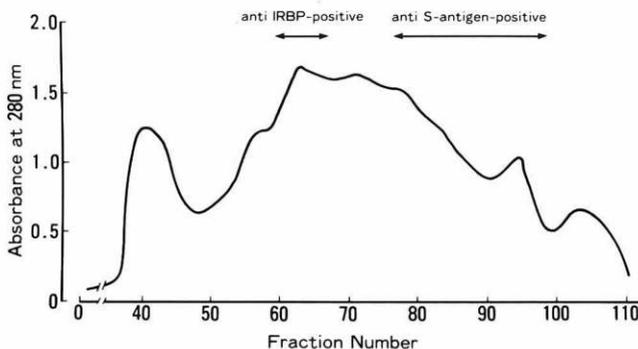


Fig. 2 Elution pattern of AcA34 gel chromatography.

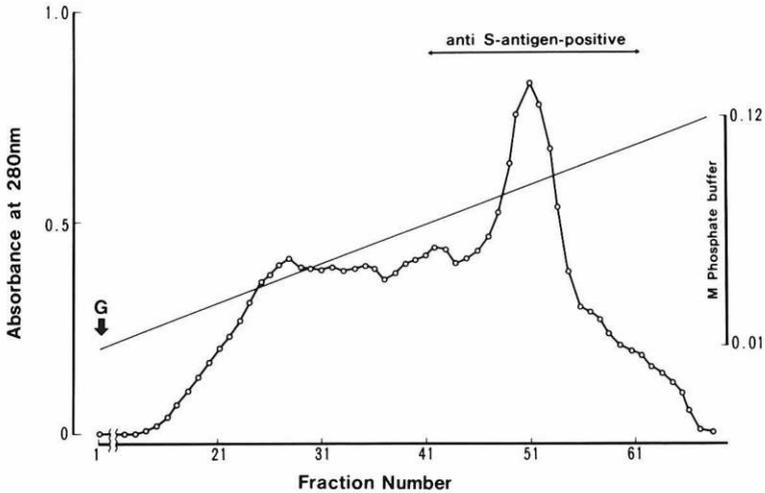


Fig. 3 Elution pattern of HA ultragel chromatography. Anti-S-Ag positive fractions obtained from AcA34 gel chromatography (Fig. 2) were applied to HA ultragel. Fraction No. 41~61 had positive reaction to Anti-S-Ag serum.

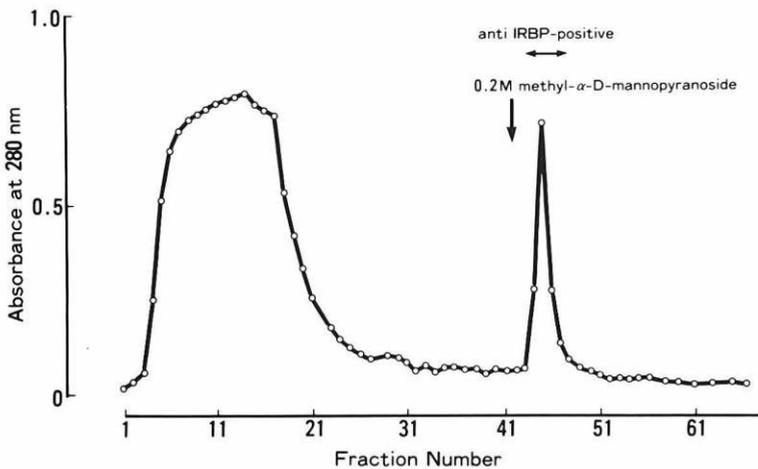


Fig. 4 Elution pattern of ConA sepharose chromatography. Anti-IRBP positive fractions obtained from AcA34 gel chromatography (Fig. 2) were applied to ConA sepharose chromatography. Anti-IRBP positive fractions were found just after loading buffer containing 0.2M methyl- α -D-mannopyranoside.

した後に、緩衝液Bに0.2M methyl- α -D-mannopyranosideを加えた溶液をカラムに流すと、その直後に、シャープなピークがみられ、ConA Sepharoseに吸着した糖蛋白質が溶出され、これを回収した。Fig. 4のごとく、このピークに一致するフラクションのみが、抗ウシ IRBP ウサギ血清と沈降線を形成した。このフラクションを集め濃縮し、IRBPとして実験に用いた。S抗原は100個の牛網膜から約13mg精製された。IRBPは約7mg精製された。

2. IRBP および S 抗原の性状

1) 免疫二重拡散法

免疫二重拡散法の結果を Fig. 5 に示す。IRBP 抗原は抗ウシ網膜 IRBP ウサギ血清と一本の沈降線を形成したが、抗ウシ S 抗原ウサギ血清とは全く反応しなかった。また、S 抗原は抗ウシ IRBP ウサギ血清とは反応せず、抗ウシ S 抗原ウサギ血清と一本の沈降線を形成した (Fig. 5)。即ち、両者は免疫学的に交差せず異なる抗原性を有すると考えられた。

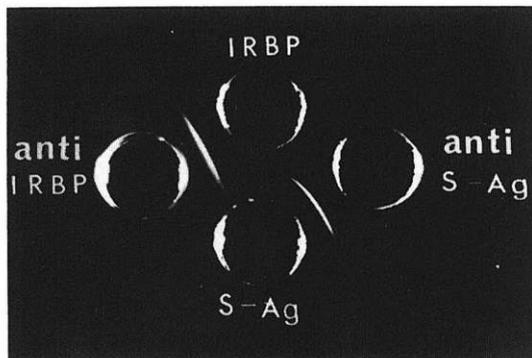


Fig. 5 Immuno-double-diffusion plate showing no cross reactivity between S-Ag and IRBP.

2) SDS-PAGE

Fig. 6に精製した両抗原のSDS-PAGEの結果を示す。S抗原 (lane 1) は約50kに、IRBP (lane 2) は約140kの所に主なラインを形成していた。両抗原とも、主なラインの前後にうすいラインの形成は認められたが、しかしS抗原サンプルにIRBPの、また、IRBPサンプルにS抗原の混入を示すラインは全くなかった。

3. 網膜抗原による眼病変および松果体炎

IRBPとS抗原の種々の用量による、ルイスラットにおける眼病変と松果体炎の発症率および炎症の程度についての実験結果をTable 1にまとめた。

1) 眼病変：S抗原は30 μ gの用量で免疫した5匹10眼全てに平均12.3日目にEAUが発症し、病理組織検

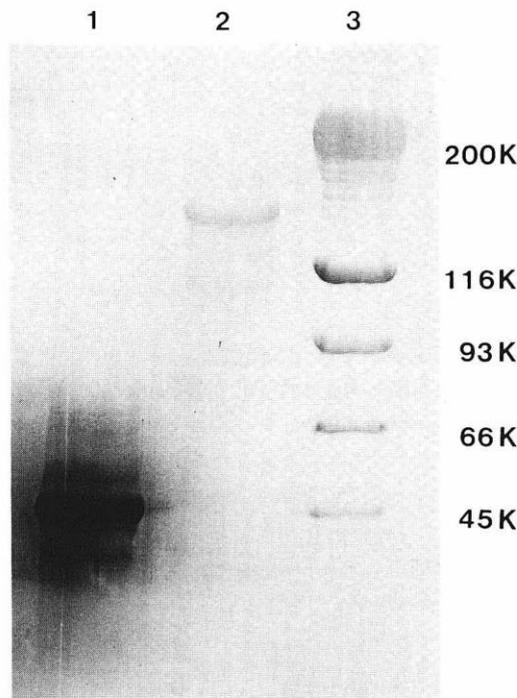


Fig. 6 SDS-PAGE gel of S-Ag and IRBP (Coomassie-blue-staining). Lane 1: S-Ag, Lane 2: IRBP, Lane 3: Molecular Weight Protein Standards.

査でも炎症の程度は極めて強かった。15 μ g, 7.5 μ gでも各々8眼中7眼に極めて強いEAUを惹起した。3.0

Table 1 EAU and Pinealitis induced by S-Ag and IRBP.

Retinal Dose antigen (μ g/rat)	EAU			Pinealitis	
	Eyes with EAU/Total	Intensity ^a	Onset ^b	Rats with Pinealitis	Intensity ^c
S-antigen 30	10/10	3.6 \pm 0.7	12.3 \pm 1.2	3/5	0.6 \pm 0.5
15	7/ 8	3.3 \pm 1.3	12.5 \pm 2.1	2/4	0.9 \pm 1.0
7.5	7/ 8	3.1 \pm 1.3	15.3 \pm 2.5	3/4	0.8 \pm 0.4
3.0	6/ 8	2.1 \pm 1.5	13.6 \pm 1.3	1/4	0.8 \pm 1.3
1.0	4/ 8	1.3 \pm 1.5	17.3 \pm 0.9	1/4	0.3 \pm 0.4
0.3	3/ 8	1.0	N.D. ^d	0/4	—
IRBP 30	10/10	2.0 \pm 0.6	9.3 \pm 0.4	5/5	2.0 \pm 0.6
15	8/ 8	1.8 \pm 0.4	9.5 \pm 0.5	4/4	2.5 \pm 0.5
7.5	8/ 8	1.8 \pm 0.4	10.8 \pm 0.4	4/4	2.8 \pm 0.4
3.0	8/ 8	1.8 \pm 0.4	10.5 \pm 0.5	4/4	3.0 \pm 0
1.0	8/ 8	2.5 \pm 0.7	12.3 \pm 0.8	4/4	2.0 \pm 1.0
0.3	0/ 8	—	—	0/4	—

^a intensity of EAU was evaluated by histological examination (see text).

^b onset of EAU was evaluated by clinical examination.

^c intensity of pinealitis was evaluated by histological examination (see text).

^d ocular inflammation was not detected by macroscopically, but some changes found by histological examination.

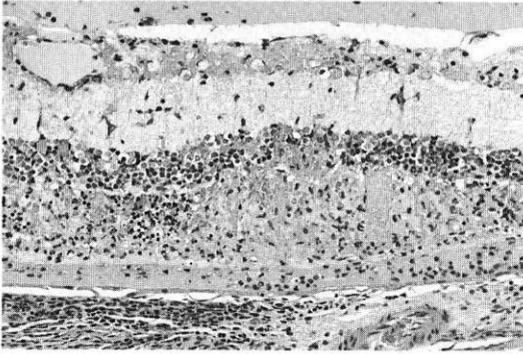


Fig. 7 S-Ag-induced EAU, 3days after the clinical onset of the disease.

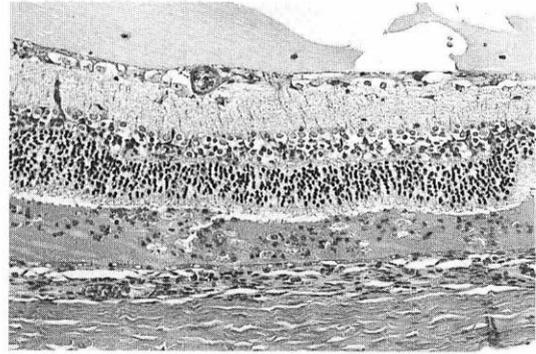


Fig. 9 IRBP-induced EAU, 3days after the clinical onset of the disease.

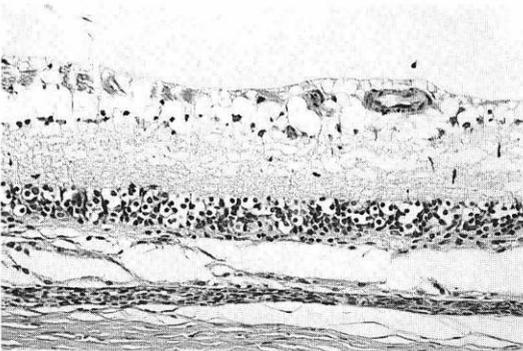


Fig. 8 S-Ag-induced EAU, 10days after the clinical onset of the disease.

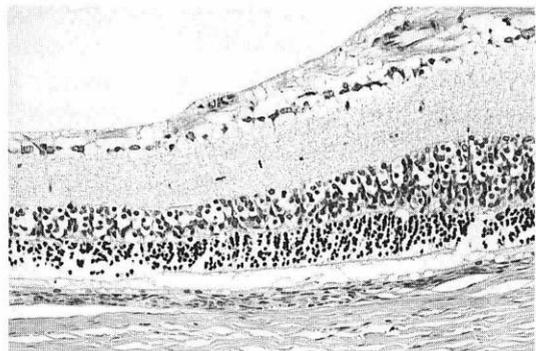


Fig. 10 IRBP-induced EAU, 10days after the clinical onset of the disease.

μg では 8 眼中 6 眼, $1.0\mu\text{g}$ では 8 眼中 4 眼に炎症が見られたが, 炎症の発症日が少し遅延し, また, 炎症の病理変化の程度も高用量の時のそれに比べ軽度であった. Fig. 7 に $7.5\mu\text{g}$ の S 抗原免疫で惹起された EAU の発症 3 日目の病理組織像を示す. 浸潤細胞は好中球が主体で, その他, 単核球が少数認められ, このような浸潤細胞が網膜の視細胞内外節層の他に, 視細胞の核層 (外顆粒層) あるいはそれより内層側にも認められ, 視細胞全体が激しい障害を受けている. Fig. 8 には, 同じく $7.5\mu\text{g}$ の S 抗原で惹起された EAU の発症後 10 日目のそれを示す. 視細胞の内外節層および核層全てが消失している. 一方, 視細胞以外の網膜組織および脈絡膜は比較的きれいに保たれている. $0.3\mu\text{g}$ では臨床的には全ての眼球に炎症所見を認めなかったが, 病理検査により 8 眼中 3 眼に軽度の EAU の所見を認めた.

IRBP は $30\mu\text{g}$ から $1.0\mu\text{g}$ まで, いずれの用量でも全ての眼球に EAU を惹起した. 発症日は同用量の S 抗

原に比べ, 常に 3 ~ 5 日早く発症し, 臨床的に炎症の消退もすみやかであった. 病理組織学的検査での組織障害の程度は, S 抗原のそれに比べて常に軽度であり, また, 以下に述べるような特徴があった. 即ち, IRBP 免疫で惹起された網膜病変は, 炎症細胞の浸潤が主に視細胞内節層に局限しており, S 抗原の時のそのような外顆粒層への浸潤はあまり見られない (Fig. 9). 発症して日数の経たものでも, S 抗原の場合は視細胞全体が消失していたのに対し, IRBP では, 視細胞の核層が比較的多く残存している (Fig. 10). 浸潤細胞の種類は, 基本的には S 抗原の場合と同じであるが, 単核球の割合がやや多い傾向があった. $0.3\mu\text{g}$ の IRBP では眼病変は生じなかった.

2) 松果体病変: S 抗原免疫による松果体病変は, 松果体被膜に接する松果体の辺縁部に少数のリンパ球浸潤を伴う松果体炎で (Fig. 11), その発症頻度は高用量 ($7.5\sim 30\mu\text{g}$) でも 50 ~ 75% であり, 低用量 ($1.0\sim 3.0\mu\text{g}$) では全体の 1/4 であった. これに比べて, IRBP 免

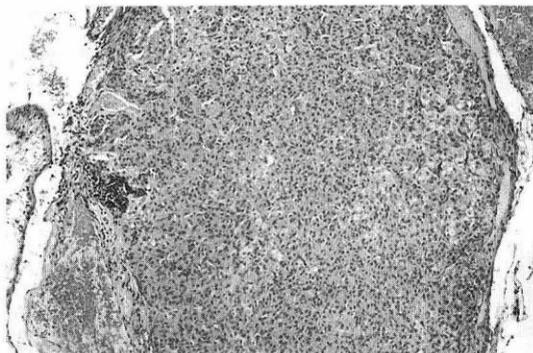


Fig. 11 S-Ag-induced pinealitis.

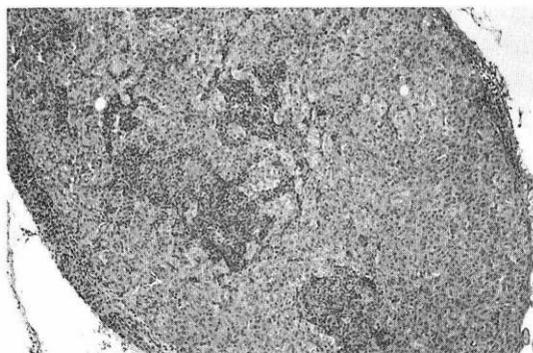


Fig. 12 IRBP-induced pinealitis.

疫では、30 μ g から1.0 μ g までの用量すべてにおいて、全例に松果体炎を認めた。浸潤細胞はやはりリンパ球であったが、Fig. 12に示すごとく、リンパ球の浸潤が松果体の中心部近くまでみられ、浸潤病巣の数も多かった。

4. EAU ラットの免疫反応

IRBP あるいはS抗原で免疫後、眼内炎症をおこしたラットの、リンパ球増殖反応を、Table 2に示す。

Table 2 Mitotic responses of spleen cells to retinal antigens.

Immunizing Antigens	Stimulants in culture		
	—	IRBP	S-Ag
IRBP	1,535 \pm 127*	6,482 \pm 268 (4.2)**	1,935 \pm 94 (1.3)
S-Ag	1,442 \pm 175	1,575 \pm 222 (1.1)	10,366 \pm 784 (7.2)

*Values are mean cpm of incorporated ³H thymidine \pm S.D.
**S.I.=stimulation index

IRBP で免疫されたラットの脾細胞は特異抗原刺激のない状態で³H サイミジンの取込みは1,535 \pm 127cpm であり、IRBP を培養液に加えて刺激するとその取込みは6,482 \pm 268cpm で Stimulation Index (S.I.)が4.2 と著明な増殖反応を示したが、免疫に用いなかったS抗原刺激では1,935 \pm 94cpm でS.I.は1.3で増殖反応は見られなかった。一方、S抗原で免疫されたラットでは無刺激の脾細胞の³H サイミジンの取込みは1,442 \pm 175cpm だったが、S抗原刺激では10,366 \pm 784cpm, SI 7.2と著しい増殖反応を示し、IRBP 刺激では増殖反応を示さなかった (1,575 \pm 222cpm, S.I. 1.1)。

眼内炎症をおこした両ラットの両抗原に対する皮内反応を Table 3に示す。S抗原免疫ラットとIRBP 免疫ラットとも両抗原に対しアルサス型過敏性反応を認めたが、遅延型過敏性反応は、S抗原免疫ラットはS抗原のみに強い反応を、IRBP 免疫ラットはIRBP とのみ反応を認めた。

IV 考 按

Ultrogel AcA34, HA Ultrogel, そして ConA Sepharose を組合わせた今回の我々の方法で分離精製されたS抗原とIRBP は、免疫二重拡散法で各々の抗血

Table 3 Skin responses of rats to retinal antigens.

Immunizing Antigens	No. of rats	Skin responses*					
		Arthus			DTH		
		IRBP	S-Ag	saline	IRBP	S-Ag	saline
S-Ag	1	9	23	0	0	20	0
	2	10	20	0	0	20	0
	3	7	25	0	0	23	0
IRBP	4	15	8	0	15	0	0
	5	15	7	0	12	0	0
	6	16	8	0	22	0	0
	7	14	5	0	24	0	0

*Diameter of edema, in mm.

清とのみ沈降線を形成し、相互の免疫学的交差反応は認められず、クマシブルー染色をした SDS-PAGE では、S 抗原は分子量約 50,000 の位置に、また、IRBP は 140,000 の位置に main band が形成され、相互の混入は全く認められなかった。即ち、我々の方法で分離精製された 2 つの蛋白質は、免疫学的抗原性および分子量が互いに異なる全く別個の蛋白質と考えられ、また、各々の分子量は従来報告されている S 抗原および IRBP の分子量とほぼ同一であった。従来の網膜抗原の分離精製法に関する報告は、S 抗原については網膜材料から 2 種類のカラム操作で S 抗原のみを分離し¹⁷⁾、また、IRBP については網膜から視細胞外節を分離した後高速液体クロマトグラフィーか ConA セファロースを用いて IRBP のみを精製^{18)~20)}、あるいは IRBP と同一の物質と考えられる A 抗原^{21)~23)}についても、SDS-PAGE のゲルを切断分離して抽出する方法²⁴⁾がとられ、いずれも、網膜材料から 1 つの網膜抗原のみを回収する方法であった。今回の我々の方法は、このような従来の方法と異なり、同一の網膜材料から、S 抗原と IRBP の 2 つの網膜抗原を一連の操作で同時に効率よく簡便に分離精製できる特徴がある。その回収率は 100 個の牛網膜から S 抗原が 12~15mg、IRBP が 5~7mg であり、全過程が 10 日間~2 週間で終了する。実験動物に EAU を惹起する病原性が S 抗原だけでなく IRBP にもある事が判明した現在、ぶどう膜炎の自己免疫機序に関する基礎的臨床的研究には、S 抗原と IRBP の両抗原が不可欠であり、従って、これら 2 つの網膜抗原を簡便にかつ効率よく分離精製する方法が望まれるが、今回の我々の方法は、このような必要性に応えるものと考えられる。

今回の方法で精製された S 抗原と IRBP をルイスラットに免疫したところ、いずれの網膜抗原も、眼内炎症と松果体炎を惹起したが、2 つの網膜抗原の間で病原性の強さが異なり、また、惹起された炎症の病理組織像にも差異のある事が判明した。IRBP により惹起される EAU は、S 抗原のそれに比べ、(1) より低い用量、即ち 1 μ g/ラットという低用量でも EAU を全例に生じる、(2) 発症日が早く、また、肉眼的な EAU の臨床症状の消退するのも早い、(3) しかし、眼内炎症症状は臨床的にも病理組織学的にも軽度である、などの特徴がみられた。特に、IRBP による EAU と S 抗原による EAU の病理組織像の相違は興味深い。即ち、S 抗原の場合は、炎症が生じれば、そのほとんどの例がたとえ低用量の抗原量であっても、眼内組織全体が著

しく浸され、特に視細胞は内外節層のみならず、その核層(外顆粒層)も炎症細胞により浸潤され、更に、発症後、日数を経ると視細胞全体が変性消失してしまった。一方、IRBP の場合は、30 μ g/ラットの高用量であっても、一部の例外的なケースを除いて、その大多数においては、炎症細胞の浸潤は前眼部および網膜の視細胞内外節層に限られ、S 抗原の場合のように網膜外顆粒層が強く浸されることはなく、日数を経たものでも、網膜外顆粒層は比較的よく保存されていた。一方、松果体に対する両抗原の病原性も対照的で、IRBP は 1 μ g/ラットという低用量でも全例に松果体の中心部にまでおよびリンパ球浸潤を生じたのに対して、S 抗原では、高用量であっても常に一部のラットに、しかも松果体被膜に接するごく表在性のリンパ球浸潤が見られたのみであった。2 つの網膜抗原にこのような病原性の差異がある理由は現在のところ不明であるが、視細胞あるいは松果体におけるこれらの 2 つの網膜抗原の分布が異なっている可能性が考えられる。即ち、S 抗原は視細胞の内外節層のみならず外顆粒層にも多く局在し、IRBP は主に視細胞内外節層に分布していると示唆される。一方、松果体においては、IRBP の方が S 抗原よりも多く分布している可能性がある。この点に関しては現在、免疫組織学的研究により検討をおこなっているところである。また、IRBP で惹起される EAU の発症日が、高用量のものでは免疫後 8~10 日であったが、これは通常の能動免疫により惹起される他の自己免疫疾患と比較して非常に早い。この原因についても不明であるが、(1) IRBP がリンパ球を感作する過程が早い(2) IRBP 感作リンパ球が血液眼関門を通過しやすいような特殊な構造を持つ、(3) 網膜中や松果体中の IRBP の総量が多く、感作リンパ球を抗原局在部位に遊走しやすい、などのいくつかの可能性が考えられる。これらの点については、今後、感作リンパ球を用いた移入実験等により解明していく予定である。

S 抗原あるいは IRBP の免疫を受け、EAU を発症したラットにおける両抗原に対する免疫反応について言及する。S 抗原免疫ラットは遅延型皮内反応およびリンパ球増殖反応のいずれも S 抗原に対してのみ陽性反応を示し、IRBP に対しては反応性を示さなかった。同様に、IRBP 免疫ラットは、IRBP に対してのみ遅延型皮内反応およびリンパ球増殖反応を示した。即ち、S 抗原あるいは IRBP 免疫ラットは各々の網膜抗原に選択的な細胞性免疫反応を呈した。このことは、2

つの網膜抗原の分離がよく行なわれ両者の混入がないこと、および *in vivo* の免疫反応系に対する抗原性も完全に異なっていることを示すものと考えられる。しかしながら、アルサス型皮内反応は、S抗原免疫ラットで IRBP に対する弱い反応が、また、IRBP 免疫ラットでは S 抗原に対する弱い反応が見られた。どのような理由でこのアルサス型皮内反応において両者の交叉反応が生じたかは現在のところ不明である。

最後に、これらの網膜抗原の生理作用について言及したい。網膜に光が当たると網膜視細胞層に存在するロドプシンがレチノールの形で網膜色素上皮に運ばれ、エステル化されて貯蔵され²⁵⁾、暗所では逆の現象がおきるとされる。free のレチノールは不溶性で毒性が強いために担体蛋白質について輸送されるが、その担体蛋白質として血漿中の serum retinol-binding protein, 細胞内の cellular retinol-binding protein などがある。IRBP は、視細胞層の外境界膜と網膜色素上皮層の間の intraphotoreceptor matrix²⁶⁾内に存在し retinol の輸送をつかさどると考えられ、カエル、ウサギ¹⁸⁾、ウシ¹⁹⁾²¹⁾²⁷⁾、サル²⁶⁾、ヒト²⁸⁾でその存在が報告されている。一方、S 抗原も視細胞において光刺激によるロドプシンの生化学反応に関与する“48K 蛋白”と同一物質であることが最近になり判明した²⁹⁾。このように、視細胞に存在し、phototransduction に重要な生理的役割を果たす IRBP と S 抗原が、いずれも、完全フロイトアジュバントと共に免疫すると実験動物に EAU を惹起し、ぶどう膜網膜炎の自己免疫機序に深くかかわっていることは、自然の摂理に反するようであるが、大変に興味深いことと考える。phototransduction にかかわっている蛋白質は、視細胞の中にこの他にも数多くあり、従って、それらの中にはこの2つの網膜抗原と同様に病原性を有するものが存在する可能性は大きく、今後のこの方面の研究の成果が期待される。

本研究は昭和60年度文部省一般研究(A)60440079および昭和61年度一般研究(C)61570841の援助を受けた。抗ウシ IRBP ウサギ血清の提供を受けた米国国立眼科研究所の B. Wiggert 博士および G.J. Chader 博士に、また、抗ウシ S 抗原ウサギ血清の提供を受けた米国国立眼科研究所の I. Gery 博士に感謝致します。病理組織標本作製に御協力いただいた石井康男氏、実験動物の管理に御協力いただいた小松京子氏並びに東京大学動物実験施設の方々に謝意を表します。また、放射性物質の使用に御協力いただいた東京大学附属病院 RI 中央研究室の方々に深謝致します。

文 献

- 1) **Elschnig**: Studien zur sympathischen ophthalmis. Die antigene Wirkung des augen pigments. Albrecht von Ophthalmic Res 14: 249—255, 1910.
- 2) **Wacker WB, Lipton MM**: Experimental allergic uveitis. Homologous retina as uveitogenic antigen. Nature (Lond) 206: 253—254, 1965.
- 3) **Wacker WB, Donoso 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.
- 4) **Kalsow CM, Wacker WB**: Pineal reactivity of anti-retina sera. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 181—184, 1977.
- 5) **Rao NA, Wacker WB, Marak GE Jr**: Experimental allergic uveitis. Clinicopathologic features associated with varying dose of S-antigen. Arch Ophthalmol 97: 1954—1958, 1979.
- 6) **de Kozak Y, Sakai J, Thillaye B, et al**: S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. Curr Eye Res 1: 327—337, 1981.
- 7) **Gery I, Robinson WG Jr, Shichi H, et al**: Differences in susceptibility to experimental autoimmune uveitis among rats of various strains. Advances in Immunology and Immunopathology of the Eye. Eds. O'connor GR, Chandler JW, 242—245, 1982, Year Book Medical Publishers, Chicago.
- 8) **Nussenblatt RB, Kuwabara T, de Monasterio FM, et al**: S-antigen uveitis in primate. A new model for human disease. Arch Ophthalmol 99: 1090—1092, 1981.
- 9) **Faure JP, Hoang Phuc LE, Takano S, et al**: Uveo-retinite experimentale induite par 1 antigene S retinien chez le singe. Induction, Histopathologie. J Fr Ophthalmol 4: 6—7, 1981.
- 10) **Salinas-Carmona MC, Nussenblatt RB, Gery I**: Experimental autoimmune uveitis in the athymic nude rat. Eur J Immunol 12: 480—484, 1982.
- 11) **Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, et al**: Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 1—9, 1985.
- 12) **Nussenblatt RB, Rodrigues MM, Wacker WB, et al**: Cyclosporin A. Inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. J Clin Invest 67: 1228—1231, 1981.

- 13) **Nussenblatt RB, Gery I, Ballantine EJ**, et al: Cellular immune responsiveness of uveitis patients to retinal S-antigen. *Am J Ophthalmol* 89: 173—179, 1980.
 - 14) **Gery I, Wiggert B, Redmond MT**, et al: IRBP-induced uveoretinitis: New experimental autoimmune disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(Suppl) 77, 1985.
 - 15) **Lai YL, Wiggert B, Liu YP**, et al: Interphotoreceptor retinol-binding protein: Possible transport vehicles between compartments of the retina. *Nature* 298: 848—849, 1982.
 - 16) **Adler AJ, Martin KJ**: Retinol-binding proteins in bovine interphotoreceptor matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 1601—1608, 1982.
 - 17) **Dorey C, Cozette J, Faure JP**: A simple and rapid method for isolation of retinal S-antigen. *Ophthalmol Res* 14: 249—255, 1982.
 - 18) **Fong S, Liou GI, Landers RA**, et al: Purification and characterization of a retinol-binding glycoprotein synthesized and secreted by bovine neural retina. *J Bio Chem* 259: 6534—6542, 1984.
 - 19) **Saari JC, Teller DC, Crabb JW**, et al: Properties of an interphotoreceptor retinoid-binding protein from bovine retina. *J Biol Chem* 260: 195—201, 1985.
 - 20) **Redmond TM, Wiggert B, Robey FA**, et al: Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. *Biochem* 24: 787—793, 1985.
 - 21) **Faure JP**: Autoimmunity and the retina. *Current Topics in Eye Research Vol 2*, 215—302, Academic Press, New York, 1980.
 - 22) 白井正彦, 高野 繁, 山田 真他: 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.
 - 23) **Vistica P, Usui M, Kuwabara T**, et al: Interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(Suppl) 112, 1986.
 - 24) 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.
 - 25) **Dowling JE**: Chemistry of visual adaptation in the rat. *Nature* 168: 114—118, 1960.
 - 26) **Feeney L**: The interphotoreceptor space. II. Histochemistry of the matrix. *Dev Biol* 32: 101—114, 1973.
 - 27) **Adler AJ, Evans CD, Stafford WF III**: Molecular properties of bovine interphotoreceptor retinol-binding protein. *J Bio Chem* 260: 4850—4855, 1985.
 - 28) **Fong S, Liou GI, Landers RA**, et al: Characterization, localization, and biosynthesis of an interstitial retinol-binding glycoprotein in the human eye. *J Neurochem* 42: 1667—1676, 1984.
 - 29) **Pfister C, Dorey C, Vadot R**, et al: Identite de la proteine dite "48K" qui interagit avec la rhodopsine illuminee dans les batonnets retiniens et de l' "antigenes S retinien" inducteur de l'uveo-retinite autoimmune experimentale. *C R Acad Sci Paris* 299: 261—265, 1984
-