

末梢血液中の抗レンズクリスタリン抗体

その3 白内障と無水晶体症 (図4, 表6)

栗本 康夫¹・砂川 光子^{1,4} (三菱京都病院眼科¹, 塚口病院眼科²)
吉田 晴子^{2,4}・喜多美穂里³ (北野病院眼科³, 京都大学眼科⁴)Anti-Lens Crystallin Antibodies in Human Sera in Cases
of Cataract and AphakiaYasuo Kurimoto¹, Mitsuko Sunakawa^{1,2}, Haruko Yoshida^{2,3}
and Mihori Kita⁴

1 Department of Ophthalmology, Mitsubishi-Kyoto Hospital

2 Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

3 Department of Ophthalmology, Tsukaguchi Hospital

4 Department of Ophthalmology, Kitano Hospital

要 約

年齢30~89歳の白内障群37名, 白内障術後の両眼無水晶体症群26名, 眼疾患及びアレルギー性疾患の無いコントロール群60名について, 血清中の抗水晶体蛋白, 抗 α , β , γ 各クリスタリン抗体の出現頻度を検討した。また, 白内障群20名, 無水晶体症群24名, コントロール群34名について, 末梢血中のリンパ球サブセットの変動を検討した。白内障群では, 抗水晶体蛋白, 抗 β クリスタリン抗体の出現頻度がコントロールより高く, 抗 γ クリスタリン抗体の出現頻度はコントロールより低かった。無水晶体症群では, 抗水晶体蛋白, 抗 β クリスタリン, 抗 γ クリスタリン抗体が若年時から高い出現頻度を示した。また, リンパ球サブセットでは, 白内障群, 無水晶体症群共に, B細胞, 活性化T細胞などを表すOKIa1⁺細胞の割合が有意に高かった。(日眼 92: 115-120, 1988)

キーワード: 白内障, 免疫, 抗レンズクリスタリン抗体, リンパ球サブセット

Abstract

Frequencies of serum antibodies to lens protein, α -crystallin, β -crystallin and γ -crystallin from 37 patients with cataract, 26 with aphakia and 60 controls were examined. Peripheral blood lymphocyte subsets (OKT3⁺, OKT4⁺, OKT8⁺ and OKIa1⁺ cells) from 20 patients with cataract, 24 with aphakia and 34 controls were also examined. In the aphakic group, the frequencies of antibodies to lens protein, β -crystallin and γ -crystallin were higher than in controls ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.20$). Although in the cataract group the frequencies of antibodies to lens protein and β -crystallin were higher than in controls ($p < 0.01$, $p < 0.20$), the frequency of antibody to γ -crystallin was lower than in controls ($p < 0.20$). In aphakic and cataract groups, percentages of OKIa1⁺ cells were significantly higher than in controls ($p < 0.01$). (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 115-120, 1988)

Key words: Cataract, Immunology, Anti-lenscrystallin antibody, Lymphocyte subsets

別刷請求先: 615 京都市西京区桂御所町1番地 三菱京都病院眼科 栗本 康夫 (昭和62年7月20日受付)

Reprint requests to: Yasuo Kurimoto, M.D. Department of Ophthalmology, Mitsubishi-Kyoto Hospital,
1 Katsura-gosho cho Nishikyo-ku, Kyoto 615, Japan

(Accepted July 20, 1987)

I 緒 言

水晶体蛋白は、水溶性クリスタリンと非水溶性分画とに分けられるが、このうちクリスタリンは正常人の前房水中にも漏出し¹⁾、血清中に抗レンズクリスタリン抗体が出現してくることが近年明らかになった²⁾。先にわれわれは、血清抗レンズクリスタリン抗体の出現について加齢との関係を検討し³⁾、また、ぶどう膜炎患者の血清抗レンズクリスタリン抗体の出現の特徴について報告した⁴⁾。今回は、両眼成熟白内障患者と、白内障のう内摘術後一年以上経た両眼無水晶体症患者について、抗レンズクリスタリン抗体の出現頻度と末梢血液中のリンパ球サブセットの変動について比較検討した。

II 実験方法

被検血清

三菱京都病院および北野病院眼科受診の両眼成熟白内障患者、30歳から89歳(平均65歳)、男17名女20名、計37名(白内障群)、両眼無水晶体症患者、40歳から89歳(平均72歳)、男6名女20名、計26名(無水晶体症群)、コントロールとして眼症状、アレルギー性疾患の認められない30歳から89歳(平均59歳)、男31名女29名、計60名(コントロール群)、の血清を用い抗水晶体蛋白、抗 α 、 β 、 γ 各クリスタリン抗体の出現頻度を測定した(表1)。また、白内障群として38歳から86歳(平均72歳)、男4名女16名、計20名、無水晶体症群として33歳から84歳(平均69歳)、男3名女21名、計24名、コントロール群として60歳から79歳(平均70歳)、男17名女17名、計34名、の末梢血液中のリンパ球サブセットをOKシリーズのモノクローナル抗体を用いて検討した(表2)。

ただし両眼無水晶体症患者は、両眼成熟白内障に対しう内摘術を受け一年以上経過した者に限った。

抗体価の測定

血清；補体を非動化後、ヒツジ赤血球(SRBC)で吸収し、チッ化ナトリウム(NaN_3)を加え4°Cで保存した。

クリスタリンの分離；老人性白内障で、何等の合併症なく白内障のう内摘術で得られた比較的混濁の少ないヒト水晶体に、蒸留水を加え、テフロンホモゲナイザーでホモゲナイズし、その後4°Cで、20,000rpmで30分間遠心し、その上清を水晶体蛋白溶液とした。 α 、 β 、 γ クリスタリンの分離はVan Kleefらの方法⁵⁾

表1 血清抗レンズクリスタリン抗体価の測定対象

	年 齢	性比 ♂:♀ (人)
白 内 障 群	30~89歳 (平均65歳)	17:20
無水晶体症群	40~89歳 (平均72歳)	6:20
コントロール群	30~89歳 (平均59歳)	31:29

表2 末梢血リンパ球サブセットの測定対象

	年 齢	性比 ♂:♀ (人)
白 内 障 群	38~86歳 (平均72歳)	4:16
無水晶体症群	33~84歳 (平均69歳)	3:21
コントロール群	60~79歳 (平均70歳)	17:17

により、Bio-Gel A-5m カラム (2.5×100cm) を用い行った。

ヒツジ赤血球(SRBC)の感作；生理食塩水3.8mlに、生理食塩水で3回洗浄した packed SRBC 0.1ml, 1mg/mlの塩化クロム ($\text{CrCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.1ml, 0.1mg/mlの水晶体蛋白、 α 、 β 、 γ クリスタリンを0.1ml 各々の試験管に加え、攪拌後37°Cで1時間反応させた。その後、生理食塩水で3回洗浄後、0.25%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝液(PBS)に1%浮遊液として用意した。

受身赤血球凝集反応；マイクロタイター法を用いて、前述した血清を、0.25%BSAを含むPBSで倍々希釈した。それに、当量の前述した1%感作SRBC浮遊液を加え攪拌した。これを、37°Cで1時間反応させ、室温に静置し、翌日判定した。

リンパ球サブセットの測定

被検者からヘパリン加シリンジで末梢血を採取し、OKT3⁺細胞、OKT4⁺細胞、OKT8⁺細胞は直接蛍光抗体法で、OKTIa1⁺細胞は間接蛍光抗体法で測定した。

直接法；上記の方法で採取した全血100 μ lに至適濃度に希釈したFITC標準モノクローナル抗体(OKT3, OKT4, OKT8, (Ortho))を10 μ l, コントロールにはモノクローナル抗体の代わりにPBSを10 μ l加え、4°Cで30分間放置する。次に塩化アンモニウム2mlを加えて強く攪拌して約5分間室温に放置し赤血球を破壊する。このサンプルをOrtho Spectrum III Laser Flow Cytometry Systemで測定し、各サブセットをリンパ球に対する割合で求めた。

間接法；同様の方法で採取した全血100 μ lに至適濃度に希釈したモノクローナル抗体(OKIa1 (Ortho))を10 μ l, コントロールにはモノクローナル抗体の代わ

りにPBSを10 μ l加え、4℃で30分間放置する。PBSで3回洗浄後、FITC標準抗マウスIgG(TAGO)を至適濃度に希釈し100 μ l加え、4℃で30分間放置し、再びPBSで3回洗浄する。次に塩化アンモニウム2mlを加えて強く攪拌して約5分間室温に放置し赤血球を破壊する。このサンプルを同様にLaser Flow Cytometry Systemで測定して、OKIa1⁺細胞をリンパ球に対する割合で求めた。直接法、間接法ともにコントロールとして行った検体で検出された非特異的蛍光陽性細胞のリンパ球に対する比率は5%以下であった。

また統計処理は、抗体価についてはt検定を、リンパ球サブセットについては χ^2 検定を用いて行った。

III 結 果

白内障群、無水晶体症群、コントロール群各々の、抗水晶体蛋白、抗 α クリスタリン、抗 β クリスタリン、抗 γ クリスタリン抗体の出現頻度を表3、4、5に示した。白内障群では、抗水晶体蛋白抗体が31名、84%

で検出され、また、各クリスタリン別では、抗 β クリスタリン抗体の出現頻度が一番高く26名、70%、次いで抗 γ クリスタリン抗体が20名、54%、抗 α クリスタリン抗体が18名、49%、で検出された。無水晶体症群では、抗水晶体蛋白抗体が24名、92%で検出され、各クリスタリン別では、やはり抗 β クリスタリン抗体の出現頻度が23名、88%と一番高く、次いで抗 γ クリスタリン抗体が22名、85%、抗 α クリスタリン抗体が12名、46%、で検出された。これに対しコントロール群では、抗水晶体蛋白抗体の出現頻度は35名、58%で、各クリスタリン別では抗 γ クリスタリン抗体が一番高く、40名、67%、次いで抗 β クリスタリン抗体が33名、55%、抗 α クリスタリン抗体が28名、47%で検出された。

この結果を各抗体別に検討してみると、図1に示したように抗水晶体蛋白抗体は、白内障群と無水晶体症群共にコントロール群よりも危険率 $p < 0.01$ の有意差で高い出現頻度を示した。図2に示したように抗 α ク

表3 白内障群における血清抗レンズクリスタリン抗体の年齢別出現頻度

年齢分布		30~39歳	40~49歳	50~59歳	60~69歳	70~79歳	80~89歳
人数	37名	4	4	3	6	13	7
抗水晶体蛋白抗体	31 (84%) ↑※	3 (75%)	2 (50%)	2 (67%)	6 (100%)	12 (92%)	6 (86%)
抗 α クリスタリン抗体	18 (49)	1 (25)	0 (0)	1 (33)	4 (67)	9 (69)	3 (43)
抗 β クリスタリン抗体	26 (70)	3 (75)	2 (50)	2 (67)	5 (83)	10 (77)	4 (57)
抗 γ クリスタリン抗体	20 (54)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	4 (67)	9 (69)	5 (71)

※コントロール群に対して χ^2 検定にて $p < 0.01$ の危険率で有意差を認めた。

表4 無水晶体症群における血清抗レンズクリスタリン抗体の年齢別出現頻度

年齢分布		40~49歳	50~59歳	60~69歳	70~79歳	80~89歳
人数	26名	1	2	5	12	6
抗水晶体蛋白抗体	24 (92%) ↑※	1 (100%)	2 (100%)	4 (80%)	12 (100%)	5 (83%)
抗 α クリスタリン抗体	12 (46)	0 (0)	1 (50)	4 (80)	4 (33)	3 (50)
抗 β クリスタリン抗体	23 (88) ↑※	1 (100)	2 (100)	5 (100)	10 (83)	5 (83)
抗 γ クリスタリン抗体	22 (85)	1 (100)	2 (100)	4 (80)	9 (75)	6 (100)

※コントロール群に対して χ^2 検定にて $p < 0.01$ の危険率で有意差を認めた。

表5 コントロール群における血清抗レンズクリスタリン抗体の年齢別出現頻度

年齢分布		30~39歳	40~49歳	50~59歳	60~69歳	70~79歳	80~89歳
人数	60名	10	10	10	10	10	10
抗水晶体蛋白抗体	35 (58%)	4 (40%)	4 (40%)	7 (70%)	5 (50%)	7 (70%)	8 (80%)
抗 α クリスタリン抗体	28 (47)	3 (30)	1 (10)	6 (60)	6 (60)	4 (40)	8 (80)
抗 β クリスタリン抗体	33 (55)	5 (50)	1 (10)	5 (50)	5 (50)	8 (80)	9 (90)
抗 γ クリスタリン抗体	40 (67)	6 (60)	4 (40)	5 (50)	8 (80)	9 (90)	8 (80)

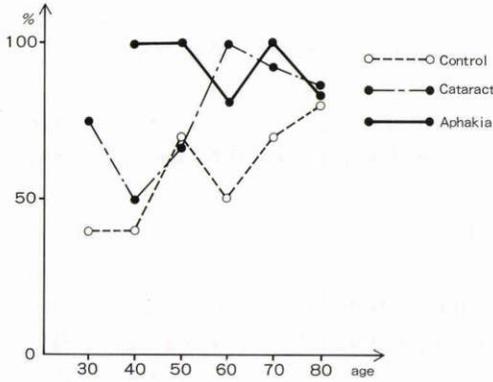


図1 抗水晶体蛋白抗体の年齢別出現頻度. 白内障群, 無水晶体症群共にコントロール群より出現頻度が高い.

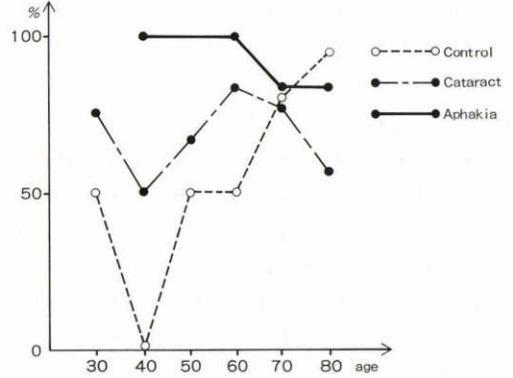


図3 抗βクリスタリン抗体の年齢別出現頻度. 白内障群, 無水晶体症群共にコントロール群より出現頻度が高い.

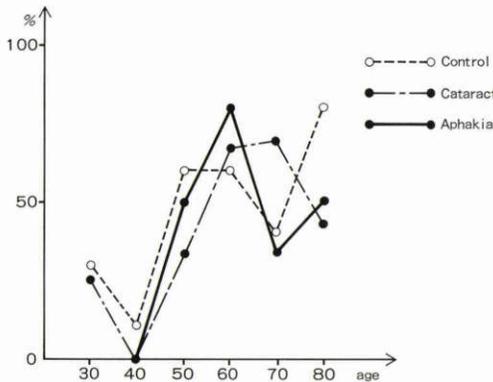


図2 抗αクリスタリン抗体の年齢別出現頻度. 3群の間に差はない.

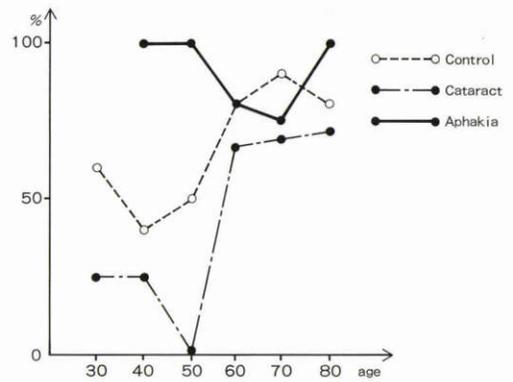


図4 抗γクリスタリン抗体の年齢別出現頻度. 白内障群はコントロール群より出現頻度が低く, 無水晶体症群はコントロール群より出現頻度が高い.

リスタリン抗体については, 各群の間に有意差は無かった. 図3に示したように抗βクリスタリン抗体についてはコントロール群に比べ, 無水晶体症群では危険率 $p < 0.01$ の有意差で高い出現頻度を示し, 白内障群では出現頻度は高い傾向を示したものの有意差は認められなかった. 図4に示したように抗γクリスタリン抗体については, 白内障群ではコントロール群より

低い出現頻度を示し, 無水晶体症群では逆に高い出現頻度を示したが, 何れも有意差は認められなかった.

リンパ球サブセットについては, 表6に示したように, OKT3⁺細胞の割合, OKT4⁺細胞の割合, OKT8⁺細胞の割合, およびOKT4⁺/OKT8⁺比では, 3群の間に有意差は認められなかった. しかしOKIa1⁺細胞の割合については, 白内障群, 無水晶体症群共に, コン

表6 リンパ球サブセットの割合

	人数	OKT3 ⁺	OKT4 ⁺	OKT8 ⁺	OKT4 ⁺ /8 ⁺	OKIa1 ⁺
コントロール群	34	60±10%	40±9%	25±8%	1.8±0.9%	18±5.3%
白内障群	20	61±13	39±12	22±10	2.5±2.3	24±8.5 ↑※
無水晶体症群	24	61±10	37±7	25±6	1.6±0.5	26±15 ↑※

結果は平均値±標準偏差で示した.

※コントロール群に対してt検定にて $p < 0.01$ の危険率で有意差を認めた.

コントロール群よりも危険率 $p < 0.01$ の有意差で高い値をとった。

IV 考 按

白内障群、無水晶体症群、コントロール群の3群について、血清抗レンズクリスタリン抗体の出現頻度について年齢別に検討し、また3群における末梢血中のリンパ球サブセットの変動についても検討した。

正常人において血清中に抗レンズクリスタリン抗体が約50%の頻度で出現すると報告されている²⁾⁶⁾。先に我々は、加齢に伴いその出現頻度が上昇すると報告し、加齢に伴う免疫異常が関係するのではないかと考えた³⁾。今回の検討にて、白内障患者においても、やはり加齢に伴い血清抗レンズクリスタリン抗体の出現頻度が上昇することが示された。しかし無水晶体症患者においては、抗 α クリスタリン抗体についてはコントロール群との間に差が無いものの、抗水晶体蛋白、抗 β クリスタリン、抗 γ クリスタリン抗体は、年齢に関わらず若年時より高い出現頻度を示し、コントロール群に対してはもとより白内障群に対しても、より高い出現頻度を示した。

無水晶体症患者においては既に、抗体を産生せしめべき抗原となる水晶体蛋白は消失しているはずであり、実際、両眼白内障摘出術施行2週間後の両眼無水晶体症患者では、血清抗水晶体蛋白抗体は術前と比べて不変ないしは減少していた⁷⁾。にもかかわらず、何故、術後1年以上を経た今回の無水晶体症群では高い抗体出現頻度を示したのであろうか。前房は免疫学的特権部位であり、ここに非自家組織を移植しても拒絶が起こりにくいと報告されている⁸⁾。前房に対しては水晶体が免疫学的なバリアとして機能しており、無水晶体症患者においては、このバリアが取り払われた為に、免疫系に異常が生じて抗水晶体蛋白抗体の産生が亢進し、水晶体摘出後1年を経て血清抗水晶体蛋白抗体の出現頻度が高くなっているのではないだろうか。リンパ球サブセットの検討においても、無水晶体症群では、B細胞、活性化T細胞などを表すと言われていたOKIa1⁺細胞⁹⁾¹⁰⁾の割合が高くなっており、抗体産生能力が活性化していることも示唆された。

前述したように、白内障群においてはコントロール群と同様に加齢にともない血清抗水晶体蛋白抗体の出現頻度が高くなっているが、これを各クリスタリン別に検討してみると、抗 α クリスタリン抗体については無水晶体症群と同様にコントロール群との間に差はな

く、抗 β クリスタリン抗体では出現頻度の上昇傾向、抗 γ クリスタリン抗体では逆に出現頻度の低下傾向が認められた。抗 β クリスタリン抗体の出現頻度上昇については、白内障の水晶体では β クリスタリンが漏出しやすくなっていることを示すものと考えた。また、白内障の水晶体においては、分子量の低い γ クリスタリンが減少していると言われており¹¹⁾、その機序としては、水晶体外への漏出¹²⁾、非水溶性蛋白への変化¹³⁾、高分子蛋白への交差結合¹⁴⁾、などが考えられている。しかし今回の結果から、白内障群では血清抗 γ クリスタリン抗体の出現頻度がコントロール群よりも減少していた。水溶性水晶体蛋白の構成成分である、 α 、 β 、 γ クリスタリンの中で、抗原性が一番強いと報告されているのは α クリスタリンで^{15)~17)}比較的均一であるが、 γ クリスタリンは均一蛋白ではなく分子量も幅が広い¹⁸⁾。正常水晶体と白内障の水晶体で、水晶体外へ漏出する γ クリスタリンの抗原性に差があるのではないだろうか。つまり、正常水晶体から漏出する γ クリスタリンのほうが、白内障の水晶体から漏出する γ クリスタリンよりも抗原性が強いのかも知れない。同様に、抗水晶体蛋白抗体を除く、3つのクリスタリンに対する抗体の出現頻度は、80歳代でコントロール群のほうが白内障群より高かった。この事は、80歳代というコントロール群の中に、自覚症状の少ない白内障患者が含まれていたからかもしれない。実際、80歳代の全例に白内障が認められるとも報告されている¹⁹⁾。この事は、抗原となるクリスタリンに差があるのか、あるいは、抗体を産生する生体側に差があるのかを検討してみた。80歳代のコントロール群は初期白内障患者群と考えられるが、初期白内障患者と成熟白内障患者で α 、 β クリスタリンに関して、抗原性に差があるとの報告もなく、抗原性に差があるとは考えにくい。また、白内障群では、コントロール群より末梢血のリンパ球サブセットのOKIa1⁺細胞の割合が有意に増加し無水晶体症群と同じ傾向を示した。しかし、白内障群での抗体出現頻度は、無水晶体症群より低く、白内障群のOKIa1⁺細胞の割合の増加は、無水晶体症群のそれと同じ意味をなすのではなく、抗体産生能力の低下を補うためのものではなかろうか。

今後、更に検討を加えていく予定である。

文 献

- 1) Sandberg HO: The alpha-crystallin content of aqueous humor in cortical, nuclear and complicated cataracts. *Exp Eye Res* 22: 75—84,

- 1976.
- 2) **Hackett E, Thompson A**: Antilens antibody in human sera. *Lancet* 2: 663—666, 1964.
 - 3) 砂川光子, 吉田晴子: 末梢血液中の抗レンズクリスタリン抗体. その1. 加齢に伴う変動. *日眼* 90: 1361—1365, 1986.
 - 4) 砂川光子, 吉田晴子, 新井一樹, 沖波 聡: 末梢血液中の抗レンズクリスタリン抗体. その2. ぶどう膜炎. *日眼* 91: 699—703, 1987.
 - 5) **Van Kleef SFM, Hoenders HJ**: Population character and variety in subunit structure of high-molecular-weight proteins from the bovine eye lens. *Eur J Biochem* 40: 549—554, 1973.
 - 6) **Nissen SH, Andersen P, Andersen HMK**: Antibodies to lens antigens in cataracta and after cataracta surgery. *Br J Ophthalmol* 65: 63—66, 1981.
 - 7) 砂川光子: 白内障手術による血清抗水晶体蛋白抗体への影響. *日眼* 89: 1258—1260, 1985.
 - 8) **Barker CF, Billingham RE**: Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25: 3—8, 1977.
 - 9) **Reinherz EL, Schlossmann SF**: The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19: 821—827, 1980.
 - 10) **Reinherz EL, Schlossmann SF**: Characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. *Immunol Today* 2: 67—74, 1981.
 - 11) **Harding JJ, Dille KJ**: Structural proteins of the mammalian lens: A review with emphasis on changes in development, aging and cataract. *Exp Eye Res* 22: 1—73, 1976.
 - 12) **Sandberg HO, Closs O**: The alpha and gamma crystallin content in aqueous humor of eyes with clear lenses and with cataracts. *Exp Eye Res* 28: 601—610, 1979.
 - 13) **Sheridan EJ, Zigmans S**: Fate of human lens soluble protein during cataractogenesis. *Exp Eye Res* 12: 33—38, 1971.
 - 14) **Harding JJ**: The nature and origin of the urea-insoluble protein of human lens. *Exp Eye Res* 13: 33—40, 1972.
 - 15) 砂川光子, 瀬戸 昭, 伊藤洋平: 水晶体蛋白により誘発される自己免疫性ぶどう膜炎の研究. *日眼* 86: 1567—1573, 1982.
 - 16) 砂川光子, 塚原 勇: 水晶体蛋白により感作された家兎の眼局所免疫反応. *日眼* 87: 627—632, 1983.
 - 17) **Sunakawa M, Seto A, Ito Y, et al**: Effects of anti-idiotypic immunizations on autoimmune uveitis induced with isologous lens proteins. *Int Arch Allergy Appl Immun* 73: 71—76, 1984.
 - 18) **Duke-Elder S, Perkins ES**: System of Ophthalmology, Vol 4, Duke-Elder S, Ed, pp366—368, Kimpton, London, 1966.
 - 19) 佐々木一之, 狩野宏成, 滝沢洋子他: 地域住民を対象とした白内障の疫学的調査. *臨眼* 41: 763—767, 1987.