

網膜色素変性症患者における末梢血インターフェロン γ の 産生能について (図3, 表1)

森本 厚子*・小森 雅彦*・明尾 庸子* (*順天堂大学医学部眼科学教室)
藤本 慶子*・金井 淳*・中島 章* (**国立予防衛生研究所)
名取 克郎**・山崎 修道**

Interferon- γ Production in Vitro by Peripheral Lymphocytes
from Patients with Retinitis Pigmentosa

Atsuko Morimoto, Masahiko Komori, Yoko Akeo,
Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Akira Nakajima,
Katsuro Natori*, and Shudo Yamazaki*

Department of Ophthalmology, Juntendo University

**Central Virus Diagnostic Laboratory, National Institute of Health*

要 約

網膜色素変性症 (RP) 患者の末梢血リンパ球のインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生能を, Concanavalin A による刺激と Cytopathic Effect (CPE) 抑制法を用いて検討した。患者群 (常染色体劣性遺伝型 6 名, 常染色体優性遺伝型 1 名, 孤発例 2 名, いとこ発症例 1 名においては, 正常対照群とほぼ類似の IFN- γ 産生パターンを示し, 培養72時間後に IFN- γ 値が最高値に達するものが多かった。患者群の IFN- γ の平均値は, 培養72時間後で比較すると $683.6 \pm 682.0 \text{ IU/ml}$ と, 正常対照群の平均値 $171.2 \pm 161.1 \text{ IU/ml}$ に比べて有意の高値を示し ($p < 0.05$), RP 患者における免疫学的異常の一面を示していると思われた。患者群において遺伝形式に基づく差は, 明らかではなかった。(日眼 92: 1161—1165, 1988)

キーワード: 網膜色素変性症, インターフェロン- γ , 免疫異常, 遺伝形式, Cytopathic Effect 抑制法

Abstract

Some immunological aberrations have frequently been reported in patients with retinitis pigmentosa (RP), including depressed production of interferon- γ (IFN- γ) in RP patients. In this study, 10 Japanese patients with RP (six autosomal recessive, one autosomal dominant, two sporadic, and one patient whose cousin has RP) were investigated to determine whether the production of Concanavalin A (Con A) induced IFN- γ from peripheral lymphocytes were depressed or not, by using the viral cytopathic effect inhibition assay. The titers of IFN in RP, at 24 and 48 hours after incubation with Con A was not significantly low, compared to that of 10 healthy controls. Rather, the titers after 72 hours were high compared to those of controls. This tendency in our patients was not dependent on the mode of inheritance. Our results showed no significant defect in IFN- γ production in RP patients contrary to the previously reported data. Because of the relatively higher titers at the last incubation time in RP patients, there remains the possibility that RP patients have some factors which may

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷 3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 森本 厚子
(昭和63年 2月29日受付)

Reprint requests to: Atsuko Morimoto, M.D. Dept. of Ophthalmol., Juntendo Univ. School of Med.
3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Accepted for publication February 29, 1988)

influence the ability of peripheral lymphocytes to produce IFN- γ . (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1161-1165, 1988)

Key words: Retinitis pigmentosa, Interferon- γ , Immunological response, Hereditary disease, Cytopathic effect inhibition assay

I 緒 言

網膜色素変性症(RP)の病因は、背景に遺伝的要素が存在することは確かであるが、その本質についてはいまだに明確にはされていない。しかし RP において何らかの免疫学的機能異常が存在することを示唆する報告は Fessel (1962) 以降幾つかなされてきた¹⁾。インターフェロン- γ (IFN- γ)はリンパ球を感作抗原やマイトジェンで刺激した場合に産生されるリンホカインのひとつであり、その抗原性や pH2 に対する安定性において IFN- α や IFN- β と区別されている。IFN- γ の生物学的作用はまだ十分に理解されているとはいいがたいが、免疫調整因子、抗腫瘍因子としての役割が大きいと考えられている。今回我々はこの IFN- γ に注目し、RP の成因における免疫異常の関与を究明するために、本邦における RP 患者の IFN- γ 産生能を測定し、遺伝形式と併せて検討したので報告する。

II 対象及び方法

順天堂大学眼科外来通院中の RP 患者、28歳~60歳(平均43歳)、男性3名、女性7名の計10名を対象とした。患者の遺伝形式は、常染色体劣性遺伝型6名、常染色体優性遺伝型1名、孤発例2名、いとこ発症例1名で、遺伝形式は家族歴の詳細な問診と、必要な場合は家族の眼科的診察を行なうことにより判定した。対象者の視力は、0.1以下の者1名、0.3-0.7の者6名、0.8以上の者3名で、全身状態は皆良好であった。またキサントフィルパルミテートの暗順能改善剤やビタミン剤等を服用中の者は2名、内服剤を使用していない者は8名であった。対照群として19歳~50歳(平均28歳)、男性4名、女性6名、計10名の健常成人を用いた。患者群及び対照群の各人よりヘパリン加末梢血を採取し、BSS (Balanced Salt Solution) にて2倍希釈後、Ficall-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, New Jersey) に重層し1500rpm で30分間遠沈後、リンパ球層を採取した。そして、RPMI 1640 (日水製薬) で1回洗浄後、10% Fetal Calf Serum (GIBCO, Grand Island, N.Y.) 及び100IU/ml ペニシリン加 RPMI 1640 に再浮

遊し、細胞数を 1×10^6 個/ml に調整した培養液に Concanavalin A (Con A) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) を加え、37℃、5% CO₂ 培養器にて培養後遠心し、その上清を採取し IFN サンプルとして測定時まで-80℃で凍結保存した。

IFN- γ 測定は Viral Cytopathic Effect (CPE) 抑制法にて行なった²⁾。FL 細胞 5×10^6 個/ml を 0.1ml ずつ 96穴マイクロプレートのウェルに接種し、24時間5% CO₂、37℃にて培養の後、各ウェルに倍々希釈した IFN サンプルを加えさらに同様の条件で24時間培養した。上清を除去した後、Sindbis virus (10^6 PFU/ml) 100 μ l を加え CPE を観察した。

50% CPE を抑制した最高希釈濃度を IFN 値とした。毎回 NIH 標準 IFN (National Institute of Health, Bethesda, U.S.A.) を同時測定して国際 IFN 単位 (IU/ml) に換算して表わした。

III 結 果

1. Con A 濃度による IFN- γ 産生能の変化

健常人3名の末梢血を用いて、Con A 10, 30, 60 μ g/ml の各濃度でリンパ球を刺激し、IFN- γ 産生の経時的变化を観察した(図1)。Con A 濃度が10 μ g/ml の条件下では、1例において充分な反応が得られず、全体として他の濃度のものより個体差によるバラツキが認められた。また、Con A 60 μ g/ml 濃度で刺激した場合は、48時間後に最高値を示したのに比べ、30 μ g/ml の濃度では72時間後に最高値を示すことが多く、IFN- γ の産生値は Con A 濃度30 μ g/ml のほうが60 μ g/ml の時より高値を示した。従って、今回の実験では Con A の至適濃度として30 μ g/ml の濃度を用いた。

2. IFN- γ 産生能の経時的变化

図2に、RP 患者群および健常群のリンパ球を Con A 30 μ g/ml で刺激して、24, 48, 72, 96時間培養後の IFN- γ の値を示した。培養後72時間で最高値に達するものが多く、これは従来の IFN- γ 測定に関する報告と合致するものである。よって今回の実験では72時間後を至適培養時間として用いた。

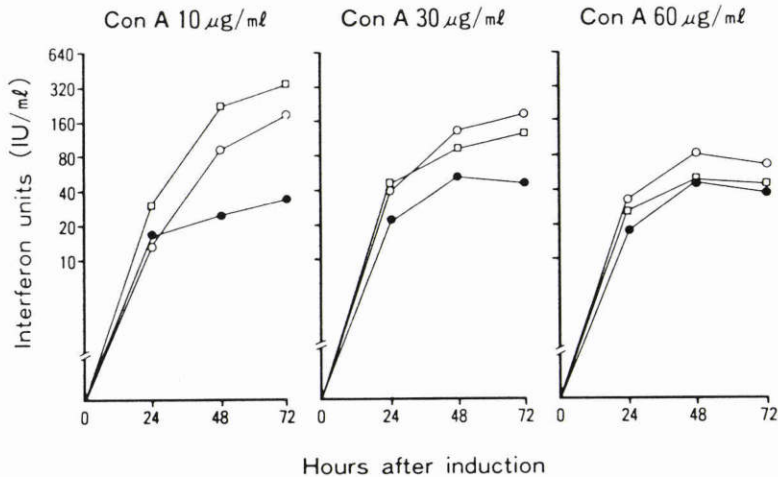


図1 健康人3名 (case 1 □—□, case 2 ○—○, case 3 ●—●) の末梢血リンパ球を Con A で刺激した場合の IFN- γ 産生能の経時的変化

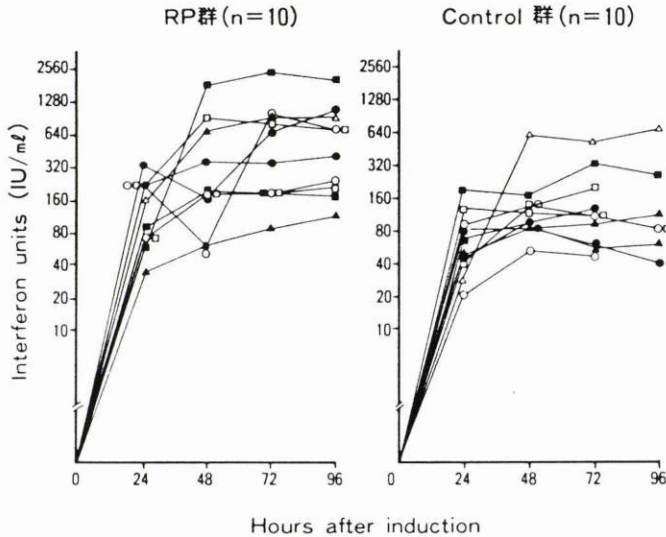


図2 RP 患者の末梢血リンパ球を Con A 30 μ g/ml で刺激した場合の IFN- γ 産生能の経時的変化

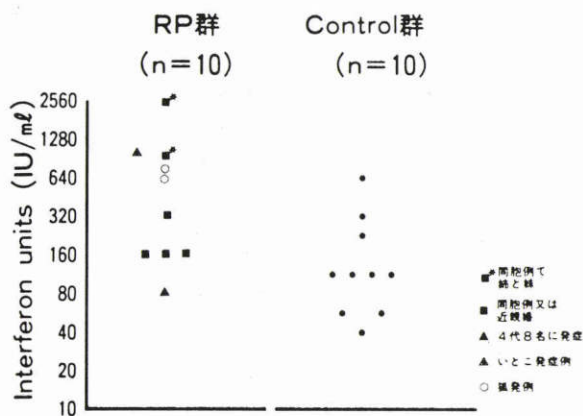
3. RP 患者群と健康人群における IFN- γ 産生能の比較

図2のごとく、患者群と対照群ではほぼ同様の IFN- γ 産生のパターンを示した。患者群の2例において48時間後に24時間後より低い値を示した以外は、培養後徐々に IFN- γ 値が上昇し、72時間後に最高値に達する傾向を示した。表1に RP 患者群と対照群の IFN- γ 測定値の平均値を各培養時間毎に示した。すべての培養時間において、RP 患者の IFN- γ 測定値は対照群より高値を示した。培養72時間後における RP 患

表1 RP 患者の末梢血リンパ球を Con A 30 μ g/ml で刺激した場合の IFN- γ 測定値の比較

time(hr)	RP (n=10)	Control (n=10)	p
24	155.4 $\pm$ 104.0*	81.7 $\pm$ 61.2*	>0.05
48	469.1 $\pm$ 561.0	162.8 $\pm$ 165.9	>0.1
72	683.6 $\pm$ 682.0	171.2 $\pm$ 161.1	<0.05
96	641.5 $\pm$ 551.2	189.6 $\pm$ 223.0	<0.05

*The values are expressed as the mean $\pm$ SD (IU/ml)



* Con A 30 µg/ml にて72時間誘発

図3 Con A 30µg/mlで72時間刺激した場合の IFN-γ 測定値と RP 患者の遺伝形式

者の IFN-γ 値は、87~2348IU/ml で、平均値は 683.6 ± 682.0 IU/ml、対照群では 48~575IU/ml、平均値 171.2 ± 161.1 IU/ml であり、統計学的有意差を示した ($p < 0.05$)。24時間後と48時間後においては患者群と対照群で有意差は認められなかった。

図3に、Con A 30µg/mlで72時間培養後の IFN-γ の値と遺伝形式を示した。今回の結果では各遺伝形式間における特別な傾向は特には認められなかった。

IV 考 案

今回の検索では RP 患者における末梢血 IFN-γ 値は健常対照群に比べ高値を示す傾向にあったが、1983 年 Hooks らは我々と同様の方法を用いて RP 患者の末梢血 IFN-γ 産生能の低下を報告し、RP 患者の細胞性免疫能の低下を示唆するものとしており³⁾、一方 Benezra らも同様の方法を用いて実験し、RP 患者群と対照群で IFN-γ 産生能に差がみられなかったと報告している⁴⁾。これらの結果の差をもたらした原因は種々考えられるが、ひとつには IFN-γ 測定のアッセイ系において使用したウイルスと細胞の違いがあると思われる。また IFN-γ は pH2 や熱に対して不安定であり、抗 IFN-γ 抗体で吸収されるといった性質により他の IFN と区別されている。しかし、その産生については T 細胞とマクロファージの関与が重要であるとされているが詳細は不明であり、分子量についても報告により 30K-70K と大きなひらきがあるなど、産生された IFN-γ が、すべて同一の物質かどうかは不明な点が

多い。よって、種々のサンプルにおける IFN 測定値の厳密な比較は同一源の IFN の基準標本に照し合した場合にのみ出来るものと思われるので、我々の実験ではすべてのサンプルは同一条件下において測定され、常に NIH 標準 IFN を同時測定し国際単位に換算した後に比較検討した。その他の原因としては人種差、採血時の患者の全身状態、服用薬剤などの影響も考えられる。また、すべての症例が厳密な RP の遺伝形式を調べた上で実験されたかどうかとも考慮すべきであろう。特に RP は遺伝形式によって、発症年齢や進行状態に大きな差が認められるので、遺伝形式との関係を検討することは重要と思われる。Galbraith らは、RP 患者で、末梢血中 T 細胞数の減少、T 細胞の機能低下、血清中のヒト IgG に対する抗体の存在などを報告しているが、それらは患者群の一部の者にのみ認められ、必ずしも患者の遺伝形式とは関係ないとしている⁵⁾。今回の研究でも、IFN-γ 値と各遺伝形式間において特別な傾向はとらえられなかったが、しかし、症例数が少ないこともあり、この点については今後さらに検討すべきであると思われる。

IFN-γ 産生能の異常については、すでにいくつかのウイルス感染症や、SLE 等の自己免疫疾患など種々の疾患で報告されている⁶⁾。眼疾患においては、パーチェット病の血中 IFN-γ の上昇が報告されており、大野らは、パーチェット病患者の末梢血リンパ球は刺激されなくても IFN-γ を産生するとの実験結果より、患者の血中 IFN-γ の上昇は末梢血リンパ球によっておこなわれている可能性があるとして報告している⁷⁾。IFN-γ の上昇がどのような意味を持つのかは現在では IFN-γ そのものの産生機構や生物学的活性が明確でないために不明であるが、IFN-γ は Natural Killer (NK) 細胞の細胞障害活性や細胞障害 T 細胞の誘導を増強するなど、T 細胞の働きを調整していることが知られている。RP 患者においても、NK 細胞の増加や細胞障害活性の増強が報告されている⁸⁾⁹⁾。さらに PR 患者の、IgM を含む自己抗体の出現¹⁰⁾¹¹⁾、血中 T 細胞の減少や T 細胞 subset の正常範囲からの逸脱¹²⁾¹³⁾、マイトジェンや網膜抗原に対する反応の異常^{14)~17)}などがこれまでに報告されている。しかし、これらの結果が、各々関連を持っているものなのかどうか、また RP の成因とどのように関わっている現象であるのかは明らかにされておらず、今後さらに検討が必要と思われる。

文 献

- 1) **Fessel WJ**: Serum protein disturbance in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 53: 640—642, 1962.
- 2) **橋本 修**: インフルエンザウイルスによるインターフェロン産生, 免疫インターフェロン産生における抗原特異性. *日大医誌* 40(8): 1—16, 1981.
- 3) **Hooks JJ, Detrick-Hooks B, Geis S, et al**: Retinitis pigmentosa associated with a defect in the production of interferon-gamma. *Am J Ophthalmol* 96: 755—758, 1983.
- 4) **Benezra D, Gery I, Chan C, et al**: Cellular and humoral immune parameters among patients with retinitis pigmentosa and other retinal disorders. *Ophthalmic Pediatr Genet* 4: 193—197, 1984.
- 5) **Galbraith GAP, Fudenberg HH**: One subset of patient with retinitis pigmentosa has immunologic defects. *Clin Immunol Immunopath* 31: 254—260, 1984.
- 6) **Hooks JJ, Detrick-Hooks B**: Interferon in autoimmune diseases and other immunoregulatory disorders, Vilcek J, De Maeyer E: Interferon and the Immune System. NY, Academic Press, 161—170, 1984.
- 7) **Ohno S, Kato F, Matsuda H, et al**: Detection of gamma interferon in the sera of patients with Behcet's disease. *Infection Immunity* 36: 202—208, 1982.
- 8) **Char DH, Bergsma DR, Rabson AS, et al**: Cell-mediated immunity to retinal antigens in patients with pigmentary retinal degenerations. *Invest Ophthalmol* 13: 198—203, 1974.
- 9) **Hendricks RL, Fishman GA**: Lymphocyte subpopulations and S-antigen reactivity in retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 103: 61—65, 1985.
- 10) **Rahi AHS**: Autoimmunity and the retina. II. Raised serum IgM levels in retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 57: 904—909, 1973.
- 11) **Spalton DJ, Rahi AHS, Bird AC**: Immunological studies in retinitis pigmentosa associated with retinal vascular leakage. *Br J Ophthalmol* 62: 183—187, 1978.
- 12) **Heredia CD, Huguet J, Cols N, et al**: Immune complexes in retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 68: 811—814, 1984.
- 13) **Heredia CD, Vich JM, Huguet J, et al**: Altered cellular immunity and suppressor cell activity in patient with primary retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 65: 850—854, 1981.
- 14) **Rocha H, Antunes L**: Primary retinitis pigmentosa—Autoimmunity? *Metabolic Ophthalmol* 1: 153—156, 1977.
- 15) **Brinkman CJJ, Pinckers AJLG, Broekhuysen RM**: Immune reactivity to different retinal antigens in patients suffering from retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 743—750, 1980.
- 16) **Kumar M, Gupta RM, Fica MAAA, et al**: Role of autoimmunity in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 15: 838—840, 1983.
- 17) **Chant SM, Heckenlively J, Meyers-Elliott RH**: Autoimmunity in hereditary retinal degeneration. I. Basic studies. *Br J Ophthalmol* 69: 19—24, 1985.