

# 第96回 日本眼科学会総会 宿題報告

## 免疫と眼

### 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の発症機序について

#### —Interphotoreceptor retinoid-binding protein

を抗原とした実験モデルを中心に—

白井正彦

東京医科大学眼科学教室

共同研究者

田口 修, 安藤 祥司, 池田 洋, 奥村 康, 坂井 潤一  
 後藤 浩, 田中 孝男, 頼 徳治, 市側 稔博, 井上 博  
 薄井 紀夫, 藤田 浩司, 上原 麗子, 高橋 知子, 竹内 大  
 土方 聡, 栗原 千哉, 松浦 岳司, 長谷見通子, 山川 直之  
 毛塚 剛司, 箕田 宏, 高野 繁

要 約

**Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)** を完全アジュバントとともにルイスラットに免疫すると実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) が発症する。また、胎齢15日のラット胸腺原基をBALB/cヌードマウスに移植 (TGヌードマウス) すると、IRBPを対応抗原とするぶどう膜網膜炎が自然発症する。そこで、これらのモデルを用いてIRBP惹起ぶどう膜網膜炎の発症機序を検討した。EAUは局所リンパ節でのIRBP反応性Tリンパ球の活性化から始まるが、この活性化は抗原提示細胞上の主要組織適合抗原複合体 (MHC) 分子に結合した抗原ペプチドをTリンパ球がT細胞レセプター (TCR) を介して認識することにより生じる。EAUの場合、IRBPのアミノ酸配列のうちp1182~1191の10個の抗原ペプチドでも十分なリンパ球活性化能が認められた。ルイスラットでは1182位W(トリプトファン)、1185位G(グリシン)、1186位V(バリン) および1188位P(プロリン) がエピトープ (抗原決定基) もしくはアグレトープ (MHC分子との結合部位) としてEAUの発症に関与していると考えられた。さらに、マウスでは1182位Wと1194位Pをアグレトープとして、その間に含まれるアミノ酸のいくつかをエピトープとしてTリンパ球に提示されることが分かった。また、p1182~1194特異的T細胞株を用いて、そのTCRの可変域を検索したところ、その96%がVβ6遺伝子を利用しており、非常に限定されたレセプターで抗原ペプチドとMHC分子の複合体を認識していると考えられた。抗原認識—リンパ球の活性化の過程にはintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) やlymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) などの接着分子も補助因子として重要であることも分かった。この様にして活性化したTリンパ球が眼に到達し、眼局所でも免疫反応が生じ、その結果ぶどう

別刷請求先: 〒160 新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学眼科学教室 白井 正彦

(平成4年8月21日受付, 受理)

Reprint requests to: Masahiko Usui, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College.

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

(Received and accepted August 21, 1992)

膜網膜炎が惹起されると思われるが、そのリンパ球の組織浸潤においても ICAM-1 や LFA-1 などの接着分子が関与していることが明らかとなった。すなわち、血液眼関門を構成する組織に ICAM-1、浸潤細胞に LFA-1 が発現していることを免疫組織染色で認めた。最後に、内在性の IRBP 自体が寛容原となることも証明し、その自己寛容が破綻した結果 EAU が発症すると推測した。(日眼会誌 96:1580-1607, 1992)

キーワード: EAU, IRBP, 3分子複合体, 接着分子, 寛容

## The Onset Mechanism of Experimental Autoimmune Uveoretinitis Induced by Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein

Masahiko Usui

*Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College*

### Abstract

In order to analyze the onset mechanism of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), two experimental models were used; one was EAU induced by one injection of purified bovine interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) with complete Freund's adjuvant in Lewis rat, and the other was an IRBP-induced autoimmune uveoretinitis that occurred spontaneously in nude (nu/nu) mice at 4 weeks of age reconstituted by the grafting of rat embryonic thymus (TG nude mouse). EAU develops when the IRBP-reactive lymphocytes in the regional lymph-nodes are activated. Activation begins when the T lymphocyte recognizes the peptide for the epitope bound to a major histocompatibility complex (MHC) molecule in the antigen-presenting cell by way of the T-cell receptor (TCR). In EAU, ten peptide residues p1182-1191 of the IRBP amino acid sequence, were revealed to be sufficiently capable of lymphocyte activation for EAU, and it was also shown that amino acid positions 1182W (tryptophane), 1185G (glycine), 1186V (valine) and 1188P (proline) of IRBP play important roles as the epitopes or agretopes in developing EAU. On the other hand, two amino acids of IRBP, amino acid positions 1182W (tryptophane) and 1194P (proline) were shown to be the agretopes inducing autoimmune uveoretinitis in the TG nude mouse. A study of the variable region of the TCR with a residual p1182-1194 specific T-cell line from the TG nude mouse revealed that as many as 96% utilized the T-cell receptor  $V\beta 6$  gene and that the peptide-MHC molecule complex was recognized by restricted receptors. Adhesion molecules such as ICAM-1 and LFA-1 were also found to play an important role as cofactors in activation of lymphocytes in the antigen-recognition process of EAU. Uveoretinitis seemed to result from an immune reaction in the eye occurring when the T lymphocyte arrives there, activating the immunological process. ICAM-1 and LFA-1 were also found to be involved in the infiltration process of inflammatory cells: our immunohistological examination revealed that ICAM-1 was present in the retinal pigment epithelium and epithelium of the ciliary body composing the blood-ocular barrier. In contrast, LFA-1 was expressed in the infiltrating cells. Finally, the tolerance of IRBP was discussed and it was experimentally demonstrated that the absence of IRBP-induced uveoretinitis in human beings and certain experimental animals resulted from endogenous IRBP serving as a tolerogen; we assumed that the breakdown of this self-tolerance would induce EAU due to thymic dysfunction or IRBP antigen injection. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 96:1580-1607, 1992)

Key words: EAU (experimental autoimmune uveoretinitis), IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein), Tri-molecular complex, Adhesion molecule, Tolerance

## I 緒 言

交感性眼炎が穿孔性眼外傷に伴って遊離された抗原物質に対する自己免疫によって発症することを Elschmig<sup>1)</sup>が提唱して以来、ぶどう膜炎の発症機序における免疫反応との関わりが研究され続けてきた。その成果として、原田病がメラノサイトに対する自己免疫によって発症することが明らかとなり<sup>2)</sup>、他のぶどう膜炎の病像形成にも免疫現象が何らかの形で関与していることを示すデータが発表されている。シクロスポリンや FK 506 などの免疫抑制剤がぶどう膜炎の治療に用いられ、その効果が確認されているという事実<sup>3)4)</sup>もぶどう膜炎と免疫の関わりを深さを示唆するものである。

疾患の発症機序や治療法を研究するには、従来よりモデル動物の確立が不可欠であり、ぶどう膜炎においても古くから実験的ぶどう膜炎の作製が試みられてきた。全身の免疫応答の結果として臓器特異的にぶどう膜炎を発現させることに初めて成功した報告は、1949年に Collins<sup>5)</sup>によってなされたが、それはぶどう膜抗原の全身接種による実験的ぶどう膜炎であった。当初、ぶどう膜抗原を対応抗原とする研究が行われたのは当然の成り行きであったが、発症頻度に問題があった。1965年に Wacker ら<sup>6)</sup>が網膜抗原に強いぶどう膜網膜炎惹起能があることを報告し、ぶどう膜抗原による実験モデルは混入した網膜抗原による反応であることが示された。以来、網膜抗原による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の研究が進み、網膜抗原として網膜可溶性抗原 (S 抗原) と光受容体間レチノイド結合蛋白 (IRBP) が分離・精製された。さらに、これらの抗原のアミノ酸配列が相次いで決定されるに至り<sup>7)8)</sup>、分子レベルでの研究へと発展して来た。

本報告では、近年急速に進歩した分子生物学や免疫

学の知識に基づいて、T リンパ球が網膜自己抗原によってどの様に活性化されるのか、眼局所での免疫応答がいかなる過程で生じるのかなどについて合成ペプチドやモノクローナル抗体を用いて行った研究の成果を示し、EAU の発症機序を考察してみたい。また、正常な個体では網膜の自己抗原に対する免疫寛容がいかなる機序で成立しているのかについても検討したので合わせて報告する。

## II 網膜抗原

網膜抽出液をゲル濾過すると EAU 惹起能を有する二つの分画が得られる。その各々の分画に S 抗原および IRBP が含まれているが、S 抗原は吸着カラム、IRBP は Con A カラムでさらに精製される。この様に精製された S 抗原と IRBP の間に免疫学的な交叉反応はない。S 抗原は視細胞外節形質膜と松果体に局在する分子量 48 kilodalton (kDa) の蛋白質で、光エネルギーの情報交換に関与するとされている<sup>9)</sup>。一方、IRBP は視細胞内節で生成され、視細胞、網膜色素上皮 (RPE) および外境界膜に囲まれた interphotoreceptor matrix (IPM) に存在し、RPE と視細胞外節の間でのレチノイドの移動における担体としての機能をもつ分子量 140~145 kDa の糖蛋白質であることが知られている<sup>10)</sup> (表 1)。S 抗原と同様に松果体にも IRBP は存在している (図 1, 2)。

ラットの眼球切片を間接蛍光抗体法で染色した結果 (図 3) から明らかな様に、発生的には S 抗原と IRBP の眼球内での出現時期が異なる。すなわち、IRBP は出生前から出現するのに対し、S 抗原は生後 3 日目より初めて出現する。なお、S 抗原以外の網膜抗原として高野ら<sup>11)</sup>が報告した A 抗原は IRBP と同一のものであることがすでに判明している<sup>12)</sup>。

S 抗原や IRBP を完全 Freund アジュバント (com-

表 1 EAU の抗原の特徴

抗原名	IRBP	S 抗原
分子量	140-145 kDa	48 kDa
局 在	視細胞間基質 松果体	視細胞外節 松果体
出 現	胎生 17 日目	生後 3 日
機 能	Interphotoreceptor retinoid-binding protein	Light-induced binding protein
EAU の発現 50 $\mu$ g + CFA	10 $\pm$ 0.5 日	13 $\pm$ 1.0 日
EAU の種による発症	モルモットで起きにくい	モルモットでも起き易い

plete Freund's adjuvant; CFA) と共にルイスラットに接種すると再現性の高い激しいEAUが発症する(図4)。しかし、モルモットでもS抗原によるEAUが容易に発症するのに対し、IRBPではEAUが発症し

難い<sup>12)</sup>。

網膜抗原のこれらの特徴を踏まえて以下の実験を行った。なお、後述するようにマウス自然発症モデルの対応抗原がIRBPである関係から、接種実験においてもIRBPを用いたEAUモデルを作製し、必要に応じてS抗原と比較しながらその発症機序を考察した。

### III EAUの発症機序

#### 1. 動物モデル

種々の臓器特異抗原に高感受性であるルイスラットは、IRBPによるEAUも発症しやすい。EAUの発症機序をより詳細に検討するためには免疫学および遺伝子学的解析の進んだマウスのモデルが不可欠であるが、抗原をCFAと共に接種する通常の方法ではマウスにEAUが発症しにくい。田口ら<sup>13)</sup>の開発した異種胸腺移植ヌードマウスにIRBPを対応抗原とし、慢性

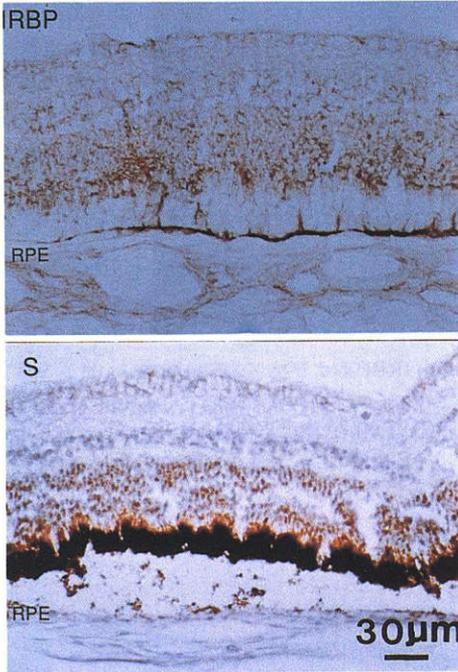


図1 網膜におけるIRBPとS抗原の局在。免疫酵素抗体直接法。抗ウシIRBPウサギ血清と抗ウシS抗原ウサギ血清のIgG Fabフラグメントにhorseradish peroxidaseを標識し、ウサギ網膜と反応させた。上段に示すごとく抗IRBP抗体による反応産物がRPEと視細胞外節間隙、外節間隙、内節部に認められた。一方、S抗原は視細胞層特に外節部に著しく局在していた。

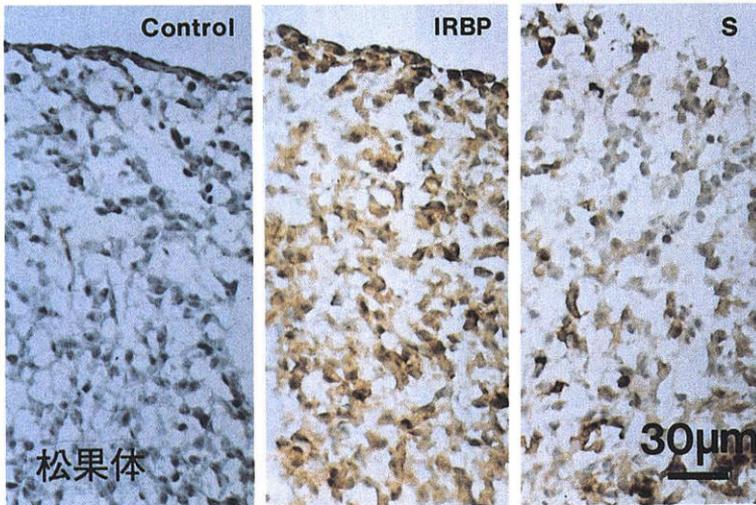


図2 松果体におけるIRBP、S抗原の局在。免疫酵素抗体直接法。抗IRBPおよび抗S血清と反応する産物が松果体の細胞膜および細胞内に認められた。

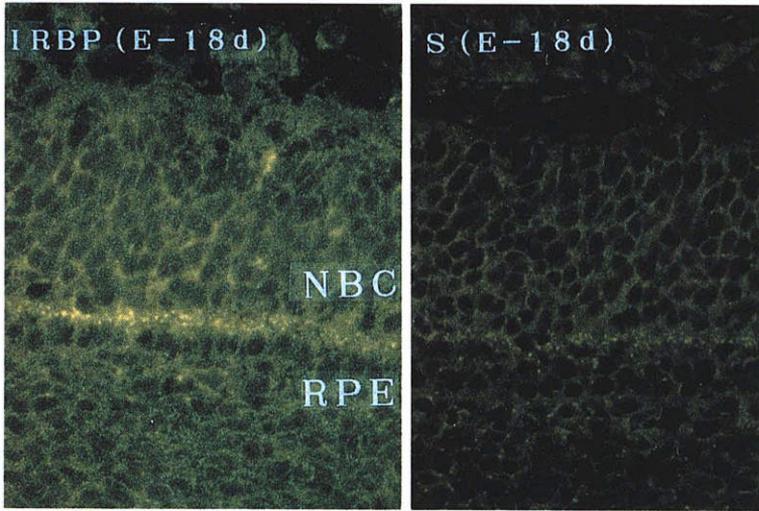


図3 ラット胎仔18日目(E-18 d)の網膜切片に抗ウシIRBPおよび抗ウシS抗原ウサギ血清を反応させた免疫蛍光抗体間接法。IRBPは胎生18日目ですでに神経芽上皮細胞(NBC)と網膜色素上皮細胞(RPE)の間に帯状の特異蛍光像として認められた。一方、抗S血清ではごく僅かな陽性所見しか認められない。

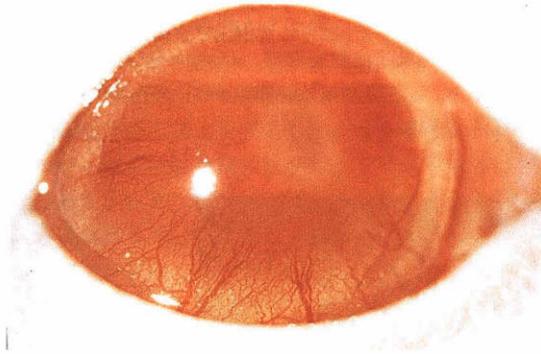


図4 EAUの前眼部所見。

IRBP 50  $\mu\text{g}$  をCFAとともにルイスラット足趾部に1回接種すると、10日目に毛様充血、瞳孔縁のフィブリン析出、後房蓄膿を伴うEAUが発症した。

の経過をとるぶどう膜網膜炎が自然発症することを筆者らは見出した<sup>14)</sup>。このモデルを用いた研究はEAUの発症機序の解明に有用であるばかりではなく、生体の免疫系の異常によりぶどう膜網膜炎が発症することからヒトぶどう膜炎の発症機構解明にも繋がるものと思われる。そこで、上記の様なラットとマウスのモデルを作製しその発症機序の解析を試みた。

#### 1) 強化免疫によるモデル

IRBP 50  $\mu\text{g}$  をCFAと共にルイスラットの足趾部に一回接種すると、接種後約10日目(平均 $10 \pm 0.5$ 日)に100%EAUが発症した。すなわち、細隙灯顕微鏡所見では、接種後約10日目から両眼の毛様充血、トロピカミド点眼による散瞳不良が生じ、その翌日には前房内フィブリン析出、後房蓄膿を伴う急性虹彩毛様体炎を認めた。前眼部炎症所見は発症後約7日から10日で自然軽快した。病理組織学的には、発症時の虹彩毛様体には多核白血球や単核球の浸潤が認められるものの、網膜にはほとんど異常所見がない。しかし、その翌日になると虹彩毛様体の細胞浸潤が増強すると共に、網膜血管炎や脈絡膜の細胞浸潤が認められるようになる。視細胞層には単核球および多核白血球が散見されるが、この時点では網膜色素上皮に異常がなく、視細胞外節の構築も乱れていない。発症後3~5日経つと虹彩毛様体に多核白血球とともにマクロファージの浸潤が目立つようになり、視細胞外節にも多数の細胞浸潤が認められる。そして、網膜色素上皮を含む網膜全層でその構築の破壊が見られるとともに網膜剝離もしばしば観察される。一方、松果体においても小円形細胞がびまん性に浸潤し、特に血管の周囲に強い浸潤がみられた。発症6~8日後には、網膜ぶどう膜炎

は消滅し、視細胞層は限局性あるいはびまん性に萎縮あるいは消失しているが、マクロファージ浸潤は比較の後期まで見られる(図5~8)。

以上のような病理組織所見から分かったことは、i) 眼炎症はまず虹彩毛様体から始まり、続いて網膜血管炎や脈絡膜炎が生じ、その後、最終的な標的組織である視細胞層の破壊が始まること、ii) また、浸潤細胞の動態から細胞性免疫と体液性免疫が混在した組織反応であることが想像できること、iii) さらに、標的となる網膜における浸潤細胞の由来は、発症初期では網膜血管であり、中期以降では網膜色素上皮層の破綻に伴う脈絡膜血管由来の炎症細胞がそれに加わるとされることである。これらの病理所見は、EAUの発症機構の解明における基礎となるもので、以下の実験においても常にその所見を念頭に置いて検討した。

2) ラット胎仔胸腺移植ヌードマウス(thymus-grafted nude mouse; TGヌードマウス)

胎齢15日のF344ラットから採取した胸腺原基を、4週齢の雌BALB/c-*nu/nu*(ヌード)マウスの左側腎

皮膜下に2葉移植しTGヌードマウスを作製した(図9)。移植された胸腺原基は正常な構築を保持して発育し、胸腺上皮細胞のみがドナーラット由来で、リンパ球、マクロファージさらに樹状細胞はすべてホストマウス由来となる<sup>15)</sup>(図10)。TGヌードマウスはT細胞免疫能を獲得し、感染症に陥ることなく長期の生存が可能となる。このTGヌードマウスには甲状腺や唾液腺などに多発性の臓器特異的自己免疫病が自然発症する(図11)が、眼球においても胸腺移植後3か月以降に、約70%のマウスでぶどう膜網膜炎が自然発症した。このぶどう膜網膜炎の病理組織像は網膜血管炎や虹彩毛様体、脈絡膜および網膜への単核球の浸潤、それに伴う視細胞層の破壊、消失が特徴的で、IRBPを強化免疫したラットのEAUの組織像と似ていた。しかし、TGヌードマウスでは肉芽腫の形成も観察され、慢性炎症としての所見も呈していた(図12, 13)。この相違は動物種の違い、アジュバントの使用の有無、抗原感作の持続性が影響していると思われるが、標的組織を視細胞層とした自己免疫性ぶどう膜網膜炎である点

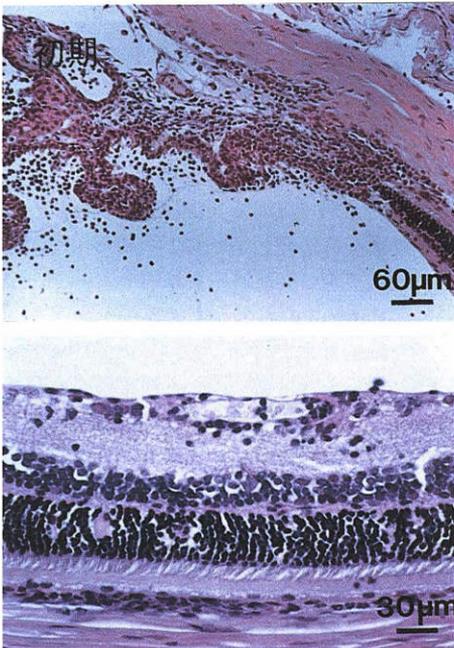


図5 EAU炎症初期。

虹彩、毛様体(上図)に多核白血球、単核球を中心とする細胞浸潤が認められた。網膜(下図)では血管炎、外顆粒層の滲出性変化と脈絡膜の炎症細胞による部分的な肥厚がみられた。

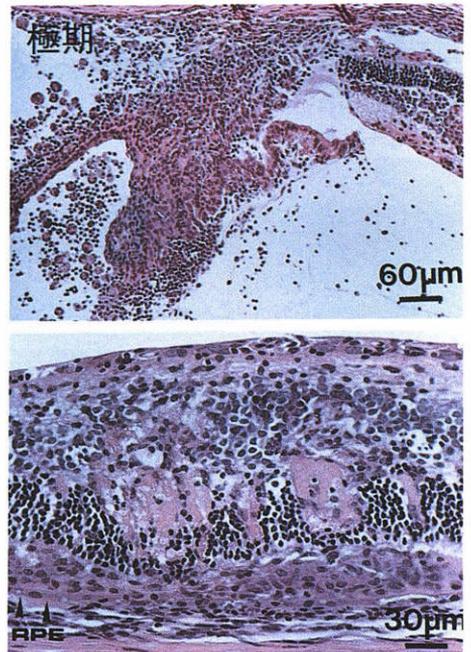


図6 EAU炎症極期。

上図：好中球、単核球、マクロファージを主とする強い浸潤が虹彩毛様体に認められた。下図：網膜には更に強い滲出性変化と細胞浸潤により視細胞層の破壊がみられた。

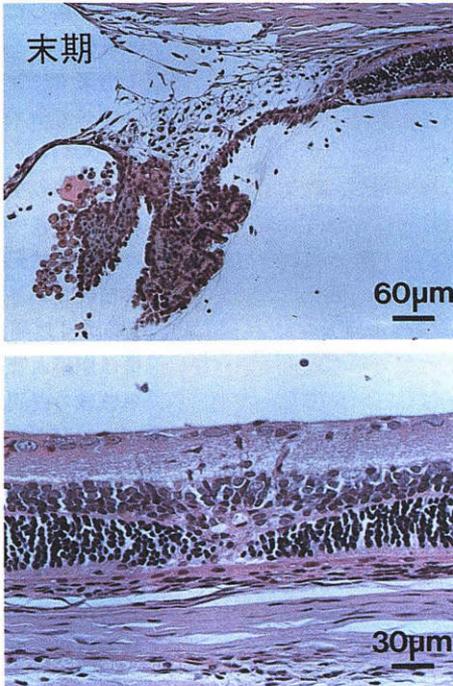


図7 EAU炎症末期.

虹彩, 毛様体にマクロファージなどの炎症細胞が散見され(上図), 網膜の外節層は部分的に消失し, 一部はグリオーシスをきたしていた(下図).

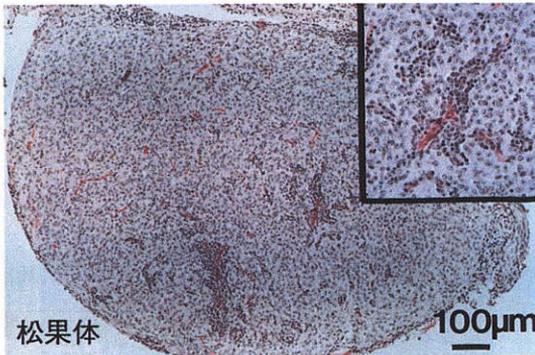


図8 EAU発症時の松果体炎.

小円形細胞が血管周囲に特に強く浸潤していた.

では同一であると思われた.

TGヌードマウスは何を対応抗原としてぶどう膜網膜炎を自然発症するのかを知るために, ぶどう膜網膜炎を発症したマウスの血清を用いて間接蛍光抗体法, ウェスタンブロッティング法およびELISAを行った. その結果, 正常マウスの眼球凍結切片を用いた間

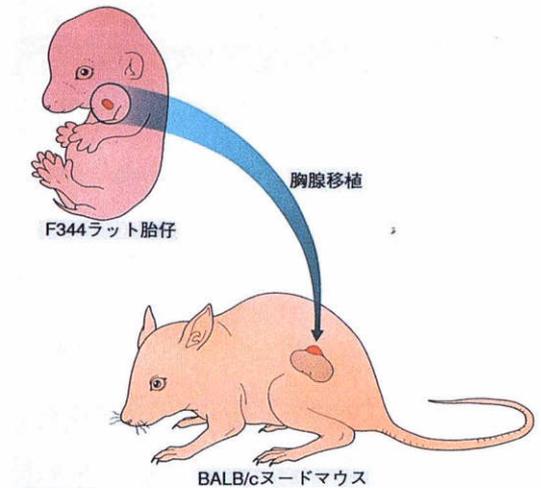


図9 ラット胎仔胸腺移植ヌードマウス(TGヌードマウス)の作製.

胎齢15日のF344ラット胎仔から胸腺原基を採取し, 4週齢のBALB/cヌードマウスの左側腎皮膜下に2葉移植する.

接蛍光抗体法で視細胞外節部に特異蛍光が認められ, ウェスタンブロッティング法およびELISAで, その自己抗体はIRBPに対する抗体であることを既に報告した<sup>14)</sup>(図14, 15). また, あらかじめ眼球と松果体を摘出して作製したTGヌードマウスでは特異抗体は検出されなかった(図16). したがって, TGヌードマウスでは内在性のIRBPを臓器特異抗原としたぶどう膜網膜炎が自然発症することが明らかになった. 次に, このモデルの発症機序を検討した.

TGヌードマウスのぶどう膜網膜炎を発症させるエフェクター細胞を同定するために adoptive transfer (養子免疫伝達)を行った. ぶどう膜網膜炎を発症しているTGヌードマウスの脾リンパ球 $2 \times 10^7$ 個を無処置ヌードマウス腹腔内に移入するとぶどう膜網膜炎が発症した. さらに, 脾リンパ球をモノクローナル抗体を用いた細胞傷害試験によりサブポピュレーションに分画して移入したところ, 抗Thy1, 2抗体あるいは抗CD4抗体で処理したリンパ球では病変の移入はできなかったが, 抗CD8抗体で処理したリンパ球では病変の移入が可能であった. したがってCD4陽性細胞がエフェクター細胞となっていることが明らかとなった(表2). 一方, TGヌードマウスに正常BALB/cマウスの脾リンパ球を移入しておくと発病が完全に予防され, その能力はCD4陽性のリンパ球分画にあるこ

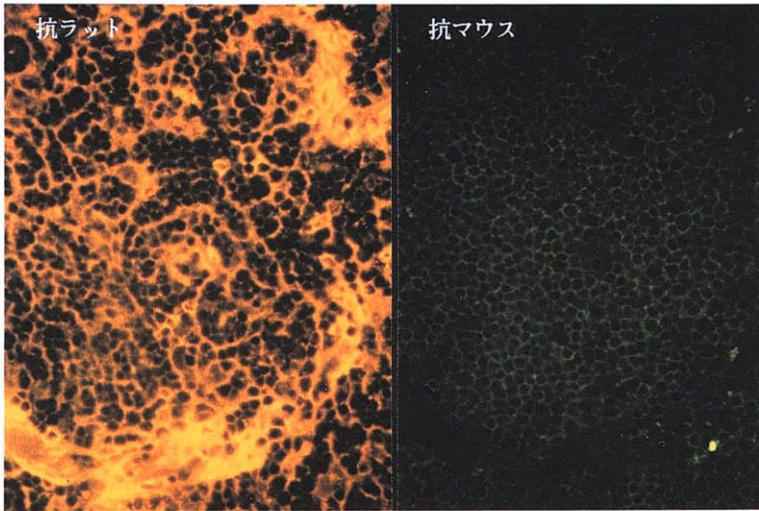


図 10 TG ノードマウス移植胸腺の蛍光抗体二重染色所見.

移植された胸腺をラットの抗原に特異的な抗体とマウスの T リンパ球に特異的な抗 thy 1.2 抗体で二重染色した所見である。胸腺上皮細胞のみが抗ラット抗原抗体にて染色され(左図)ラット由来であることを, リンパ球, マクロファージさらに樹状細胞はすべて抗 thy 1.2 抗体で染色されマウス由来であることを示している(右図)。

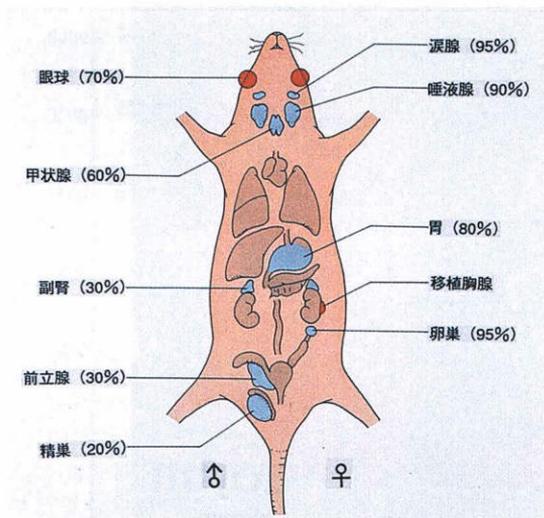


図 11 TG ノードマウスに認められる多発性臓器特異的自己免疫病とその発症率。  
眼球には約 70% の頻度でぶどう膜網膜炎が発生する。

ともわかった。すなわち、正常マウスが保有する CD 4 陽性サブレッサー T リンパ球が TG ノードマウスでは欠如しているために慢性的な自己免疫が発症するものと思われた(表 3)。

以上の様に、ラットでは正常な個体に強化免疫することによって EAU が発症し、一方、TG ノードマウスでは生体免疫系の変化、特に免疫の中核である胸腺の異常によりぶどう膜網膜炎が自然発症するという違いはあるものの、末梢に存在する IRBP 反応性 T リンパ球クローンが活性化し、ぶどう膜網膜炎が発症するという臓器特異的自己免疫病としての基本的パターンは同一である。すなわち、IRBP 反応性 T リンパ球が IRBP を認識し、活性化することからこれらのモデルでの免疫応答が開始する(図 17)。そこで、抗原認識、T リンパ球活性化、眼内免疫応答の順で EAU の発症機序について、以下の如く検討を加えた。

## 2. 抗原認識

T リンパ球はその細胞膜表面にある T 細胞レセプター (TCR) を介して抗原を認識する。この際、大部分の抗原は抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) に取り込まれ、蛋白質分解酵素によって処理 (processing) され、アミノ酸 10 数個程度のペプチド抗原として APC の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) 分子とともに APC 表面に提示される必要がある。この様に MHC 分子、抗原ペプチド、TCR の 3 分子複合体が形成され、その結果として T リンパ球が活性化する<sup>16)</sup>。また、最

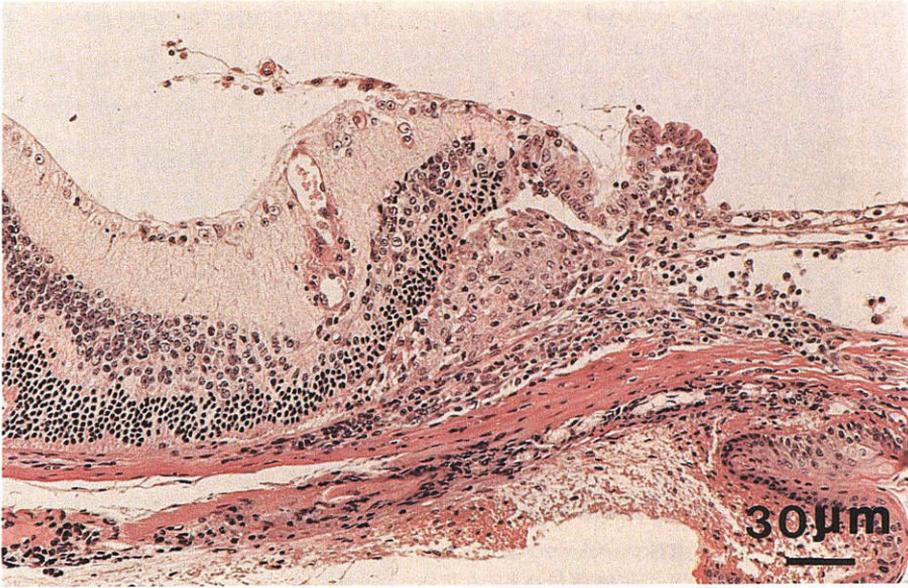


図12 胸腺移植後4か月のTGヌードマウス眼組織像。  
虹彩毛様体部および周辺網膜部に単核球の浸潤と網膜下に肉芽腫形成がみられた。



図13 胸腺移植後4か月のTGヌードマウス眼組織像。  
網膜血管周囲に小円形の単核球の浸潤がみられ、外顆粒層は不規則となり網膜下には小肉芽腫形成がみられた。脈絡膜にも細胞浸潤による肥厚が認められた。

近の知見ではAPCとTリンパ球の結合に接着分子も不可欠であり、この接着分子を介したシグナルもTリンパ球の活性化に重要である<sup>17)</sup>(図18)。そこで、EAU

において、これらがどの様に関与しているかを研究した。

1) 抗原決定基(エピトープ)

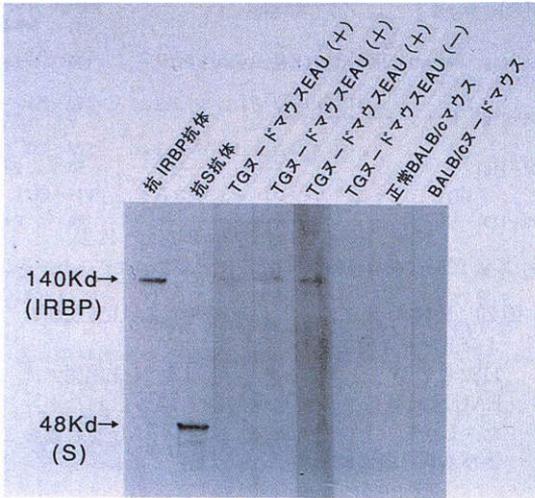


図 14 ぶどう膜網膜炎発症 TG ヌードマウスにおける対応抗原の検索。  
ウエスタンブロッティング法を施行した結果、TG ヌードマウスの血清は抗IRBP抗体と同じ140kDaの位置にバンドを形成した。

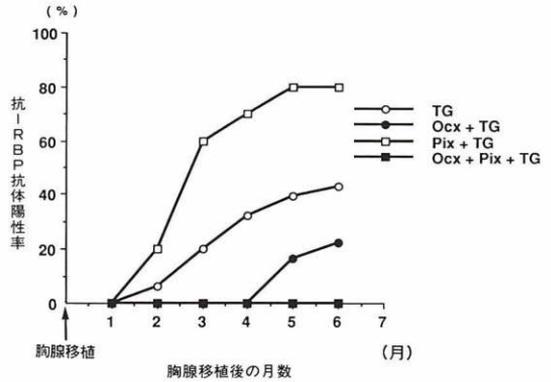


図 16 胸腺移植後1か月から6か月のTG ヌードマウスにおける抗IRBP抗体陽性率の推移。  
TG群は無処置のTG ヌードマウスを、Ocx+TG群は両眼球摘出後に胸腺を移植したTG ヌードマウスを、Pix+TG群は松果体摘出後に胸腺を移植したTG ヌードマウスを、Ocx+Pix+TG群は両眼球および松果体摘出後に胸腺を移植したTG ヌードマウスをそれぞれ表わしている。Ocx+Pix+TG群以外のTG ヌードマウスには抗IRBP抗体が認められた。

表 2 Adoptive Transfer によるぶどう膜網膜炎の発症率

移入リンパ球	ぶどう膜網膜炎発症率
未処理リンパ球群	8/10
Thy-1.2 陽性リンパ球除去群	0/10
CD4 陽性リンパ球除去群	0/10
CD8 陽性リンパ球除去群	8/10

表 3 正常マウス脾リンパ球によるTG ヌードマウス EAU 発症の予防

移入リンパ球	ぶどう膜網膜炎発症率
未処理リンパ球群	0/8
CD4 陽性リンパ球除去群	4/7
CD8 陽性リンパ球除去群	0/8

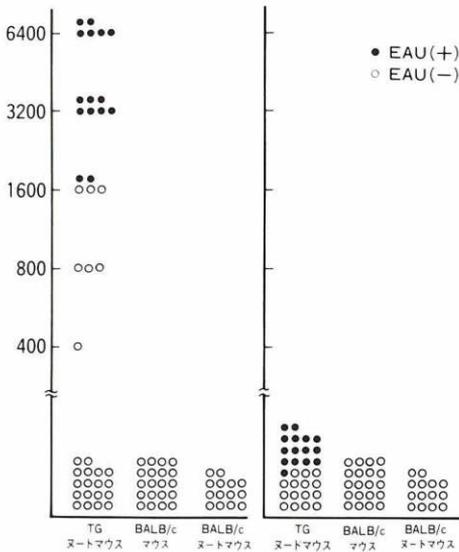


図 15 ぶどう膜網膜炎発症 TG ヌードマウスにおける対応抗原の検索。  
ELISA では、ぶどう膜網膜炎発症 TG ヌードマウスの血清はIRBPに対して1,600倍以上の抗体価を示した。対照の正常BALB/cマウスおよびBALB/c ヌードマウスの血清にはIRBPに対する抗体は検出されなかった(左図)。また、S抗原に対する抗体も検出されなかった(右図)。

3分子複合体を形成する場合、抗原がTCRと結合する部位をエピトープ、MHC分子と結合する部位をアグレトープと呼ぶ。ウシIRBPは1,264個のアミノ酸からなり、発生学的に約300個のアミノ酸の複製による蛋白で形成されている(4 fold repeat structure)<sup>8)</sup>。第4の領域に含まれるR14と呼ばれる1169位から1191位のアミノ酸配列は強いEAU惹起能を持つペプチドであることがすでに知られている<sup>18)</sup>

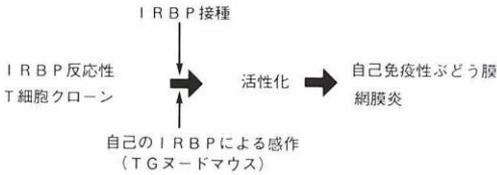


図 17 自己免疫性ぶどう膜網膜炎発症機序の概略。

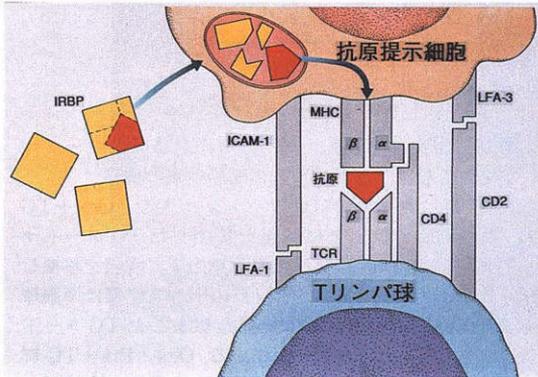


図 18 抗原ペプチド、MHC 分子、TCR の 3 分子複合体と接着分子の関係を示す模式図。

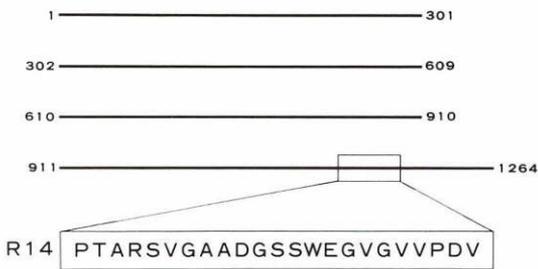


図 19 ウシ IRBP 内における R14 の存在部位とそのアミノ酸配列。

(図 19)。そこで、そのアミノ酸配列のうちどの部分がエピトープやアグレートープとなっているかを合成ペプチドを用いて検索した。

R14 のアミノ酸配列の中には Rothbard ら<sup>19)</sup>が推測するとエピトープになりやすいアミノ酸配列が 2 か所存在する。すなわち、1175 位から 1178 位の GAAD、1186 位から 1190 位の GVVPD である。そこで、1182 位の W の部分で R14 を 2 分したペプチドを合成し、その 50 nmol を CFA と共にルイスラットに接種したところ、1175 位から 1178 位の GAAD を含む合成ペプチド (p1169~1182) では EAU は発症せず、1186 位から 1190 位の GVVPD を含む合成ペプチド

ペプチド	アミノ酸配列	発症率 (%)	リンパ球増殖能
1161-1191 (R14)	<sup>1169</sup> PTARSVGAADGSSWEGVGVVPDV	100	2+
1169-1182	————— —————	0	—
1182-1191	————— —————	50	2+
1179-1191	————— —————	100	2+
1182-1194	————— ————— AVP	100	2+

図 20 R14 の N 末端側と C 末端側の EAU 惹起能およびリンパ球増殖能。

1182 位の W (トリプトファン) より N 末端側では EAU 惹起能もリンパ球増殖能も認められなかった。しかし、その C 末端側では強い EAU 惹起能およびリンパ球増殖能が認められた。

(p1182~1191) では 50% に EAU が発症した。また、p1169~1182 は *in vitro* でも IRBP 反応性 T リンパ球に対する刺激能を欠き、GAAD は IRBP-EAU の系ではエピトープになっていないと考えられた。IRBP 反応性 T リンパ球に対する刺激能は、IRBP をルイスラットに接種し、その 14 日目の脾リンパ球を用いたリンパ球増殖試験で検討し、さらにその脾リンパ球を当該抗原とともに 3 日間培養したのち正常ルイスラットに adoptive transfer を行い確認した。一方、p1182~1191 の N 末端、C 末端で各 3 個ずつアミノ酸を伸ばすと EAU 発症率が 100% になった。これは、3 個アミノ酸を伸ばしたことによりペプチドに安定性ができ、MHC-抗原間の親和性が高まったためと想像できる。そこで、以下の実験はこの p1179~1191 あるいは p1182~1194 を用いて行った (図 20)。

IRBP は 4 fold repeat structure を形成しているが、図 21 の如く他の領域にも p1179~1191 に相当するアミノ酸配列があり、そのすべてのリピートペプチドで EAU 惹起能が認められた。しかし、これらのリピートペプチドのすべてのアミノ酸が共通なわけではなく、全く共通なのは W, G, V, P の 4 つの残基だけであり、この 4 つが EAU を惹起するうえで重要なアミノ酸であることが推察された。そこで、共通する 4 つのアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したところ、EAU 発症率、IRBP 反応性 T リンパ球に対する *in vitro* での刺激能が著明に抑制された (図 22)。したがって、ルイスラットでは少なくとも p1182~1191 中の 1182 位 W、1186 位 G、1187 位 V および 1189 位 P がエピトープもしくはアグレートープになっていることが示され

ペプチド	アミノ酸配列	発症率 (%)
271-283	<sup>271</sup> S Q T <b>W</b> E G S <b>G V</b> L <b>P</b> C <sup>283</sup> V	100
579-591	<sup>579</sup> G E C <b>W</b> L G G <b>G V</b> V <b>P</b> D <sup>591</sup> A	40
880-892	<sup>880</sup> G E A <b>W</b> D L A <b>G V</b> E <b>P</b> D <sup>892</sup> I	75
1179-1191	<sup>1179</sup> G S S <b>W</b> E G V <b>G V</b> V <b>P</b> D <sup>1191</sup> V	100

図 21 p 1179~1191 とその繰返し配列.

相同性の高い p 271~283, p 579~591, p 880~892 および p 1179~1191 のアミノ酸配列を示し, それぞれをルイスラットに免疫し EAU 惹起能を検索したものである. 免疫はペプチド 50 μmol と等量の CFA に行った. 四角で囲んだアミノ酸残基は 4 つのペプチドにおいて共通する残基である. これらの 4 つのペプチドすべてにおいて EAU 惹起能が認められた.

ペプチド	アミノ酸配列	発症率 (%)	リンパ球増殖能
1182-1194	<sup>1182</sup> <b>W</b> E G V <b>G V</b> V <b>P</b> D V A V P <sup>1194</sup>	100	2+
G(1182)	<b>G</b> -----	0	0
L(1186)	---- <b>L</b> -----	40	0
G(1187)	----- <b>G</b> -----	0	0
G(1189)	----- <b>G</b> -----	0	0

W: トリプトファン G: グリシン V: バリン P: プロリン  
E: グルタミン酸 D: アスパラギン酸 A: アラニン

図 22 強い EAU 惹起能が認められた p 1182~1194 の主要アミノ酸残基を置換したペプチドとその置換ペプチドにおける EAU 発症率およびリンパ球増殖能. すべての置換ペプチドにおいて EAU 発症率およびリンパ球増殖能が著明に抑制された.

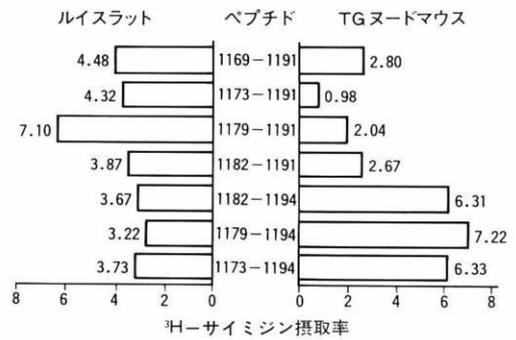


図 23 IRBP 内の免疫活性領域を中心に合成した数種のペプチドに対するルイスラットおよび TG ヌードマウスのリンパ球増殖反応.

<sup>3</sup>H-サイミジン摂取率は, ペプチド刺激培養における<sup>3</sup>H-サイミジン摂取量/ペプチド刺激のない培養における<sup>3</sup>H-サイミジン摂取量を表す. ラットでは, N 末端側を伸ばしたペプチドにおいてより強い反応が認められたのに対して, マウスでは C 末端側を 1194 位まで伸ばしたペプチドにおいてより強い反応が認められた.

抗原のラット MHC との親和性が高まり, p 1182~1191 の C 末端を伸ばすことによりマウス MHC との親和性が高まったと推測できる. そこで, 1192 位 A, 1193 位 V あるいは 1194 位 P を他のアミノ酸に置換した p 1182~1194 アナログを用いてその推測を確認したところ, 3 つのアナログペプチドでもラットの EAU 発症率は 100% で, 置換による影響を受けなかったのに対し, マウス T リンパ球の反応性は 1194 位 P の置換で著明に低下した (図 24). 同時に行った 1182 位 W の置換では, ラットに EAU が発症しなかっただけではなく (図 22), マウス T リンパ球の反応性も低下した.

以上の結果をカセットセオリーに当てはめ, また, Kotake ら<sup>20)</sup>が同じくアナログペプチドを用いて行った結果を参考にして考察すると, ラットでは 1182 位 W と 1190 位 D がアグレトープで, 1186 位 G, 1187 位 V および 1189 位 P がエピトープであり (図 25), 一方, マウスではエピトープは同様で, 1182 位 W, 1194 位 P がアグレトープであると思われた (図 26). しかし, この結論を確実にするには, p 1179~1194 を構成するすべてのアミノ酸の置換実験と競合抑制試験を p 1179~1194 特異的 T 細胞クローンおよびアナログペプチド特異的 T 細胞クローンを用いて行う必要が

た.

次に, ぶどう膜網膜炎発症 TG ヌードマウスと EAU 発症ルイスラットの脾リンパ球を用いて合成ペプチドに対する反応性を比較したところ, 図 23 の如く IRBP 反応性ラット T リンパ球が反応を示したペプチドの多くにマウス T リンパ球も反応を示した. しかし, 次の 2 点でラットとマウスでは差異があった. すなわち, p 1173~1191 や p 1179~1191 の様な p 1182~1191 の N 末端を伸ばしたペプチドはラットが高い反応性を示したのに対し, マウスの反応は低く, 特に p 1173~1191 では全く反応しなかった. ところが, p 1173~1191 の C 末端を 3 個伸ばした p 1173~1194 ではその反応性は回復し, 1192 位 A, 1193 位 V, 1194 位 P を加えた他のペプチドでもマウス T リンパ球の反応性が高まった. この結果から, p 1182~1191 の N 末端を伸ばすことによりペプチド

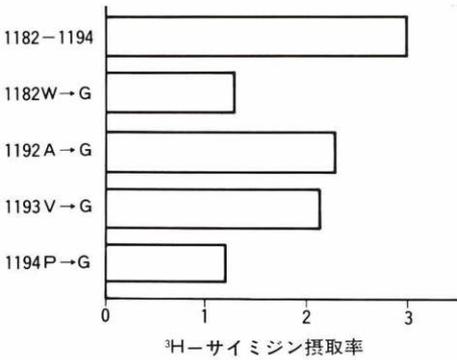


図 24 TG ヌードマウスにおいて強いリンパ球増殖能が認められた p 1182~1194 の置換ペプチドに対する TG ヌードマウスのリンパ球増殖反応。<sup>3</sup>H-サイミジン摂取率は、ペプチド刺激培養における<sup>3</sup>H-サイミジン摂取量/ペプチド刺激のない培養における<sup>3</sup>H-サイミジン摂取量を表す。1182 W → G は 1182 位の W (トリプトファン) を G (グリシン) に置換したペプチドであり、1192 A → G は 1192 位の A (アラニン) を G に、1193 V → G は 1193 位の V (バリン) を G に、そして 1194 P → G は 1194 位の P (プロリン) を G に置換したペプチドである。1182 位の W および 1194 位の P を G に置換することにより P 1182~1194 のリンパ球増殖能は著明に低下した。

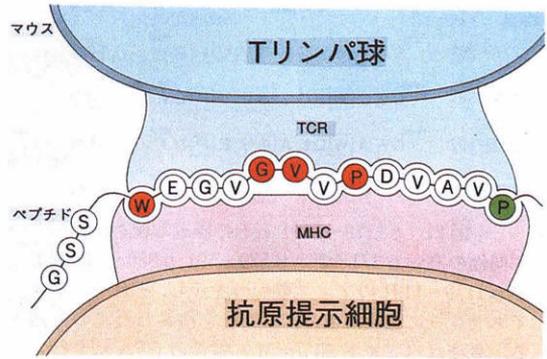


図 26 TG ヌードマウスにおける免疫活性ペプチド p 1182~1194 の主要アミノ酸残基の役割。1182 位の W と 1194 位の P がアグレットープで、エピトープは 1186 位の G、1187 位の V および 1189 位の P であると考えられる。

p 1182~1194 とその 1182 位 W あるいは 1194 位 P アナログペプチドを用いた p 1182~1194 特異的 T 細胞株に対する競合抑制試験でアナログペプチドに反応阻害能がなかったことから確認できた(図 27)。実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) では対応抗原のエピトープが動物の種や系により異なっている<sup>21)</sup>のに対し、EAU では、少なくともラットとマウスが同じエピトープにより発症しているとすれば、マラリア<sup>22)</sup>などの外来抗原と同様に IRBP の様な自己抗原でも、特定の抗原と反応する TCR が種間を越えて保存されていることとなり興味深い。

また、R 14 およびそのリピートペプチドのアミノ酸配列とは全く別の部分すなわち Donoso ら<sup>23)</sup>がヒト IRBP で病原性が高いと報告したアミノ酸配列に極めて相同性が高いウシ IRBP の p 518~529 をルイスラットに接種したところ、R 14 と同等の EAU (発症率 100%) が発症し、TG ヌードマウスの T リンパ球に対する刺激能も高値 (<sup>3</sup>H-サイミジン摂取率 SI=4.8) を示した。ところが、このペプチドはラット IRBP 反応性 T リンパ球に対する刺激能を欠き、そのリンパ球での adoptive transfer も成功しなかった。このことは、EAU 惹起能を有するエピトープが R 14 関連部位以外にも存在するものの、ラットを IRBP で免疫した場合、抗原提示細胞によって処理され、MHC 分子とともに提示されるペプチドの大部分は R 14 関連ペプチドであることを意味する。一方、TG ヌードマウスでは、少なくとも異なる 2 つのエピトープに対する活性化

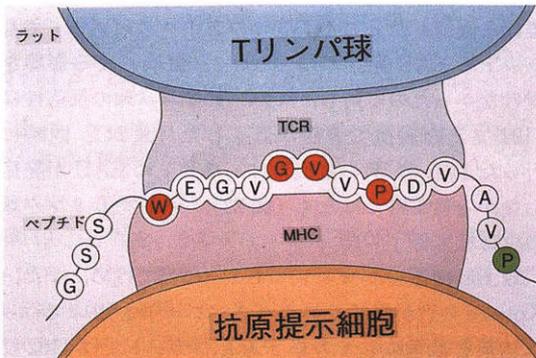


図 25 ルイスラットにおける免疫活性ペプチド p 1182~1194 の主要アミノ酸残基の役割。1182 位の W、1186 位の G、1187 位の V および 1189 位の P が EAU を起こすためのエピトープもしくはアグレットープとして重要であると考えられる。

あろう。少なくとも、マウス MHC のアグレットープであると結論した 1182 位 W と 1194 位 P に関しては、

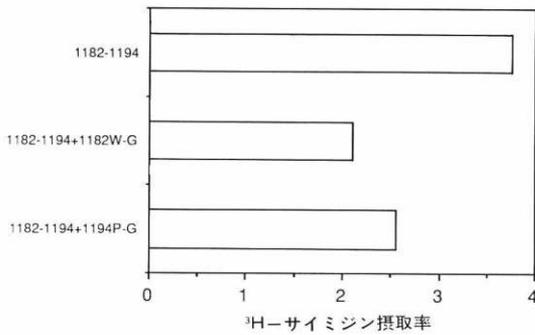


図27 p 1182~1194 反応性 T リンパ球株を用いた p 1182~1194 とその置換ペプチド 1182 W → G および 1194 P → G とのリンパ球競合試験。

<sup>3</sup>H-サイミジン摂取率は、ペプチド刺激培養における<sup>3</sup>H-サイミジン摂取量/ペプチド刺激のない培養における<sup>3</sup>H-サイミジン摂取量を表す。ペプチドの濃度は 1 μM にて、置換ペプチドのみによる 1 時間の前培養後、p 1182~1194 を加え 90 時間培養を行った。T リンパ球株の有意な反応が 1182 W → G および 1194 P → G のペプチドの前培養においても認められ、p 1182~1194 によるリンパ球刺激能は阻害されなかった。

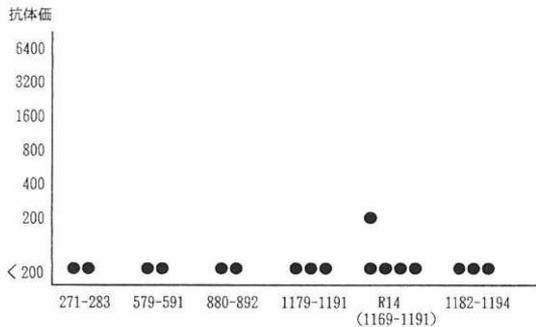


図28 合成ペプチドに対する抗体価 (ELISA)。

各ペプチドをルイスラットに CFA と共に接種し、2~4 週後の血清を用いて接種ペプチドに対する IgG 抗体価を測定した。R 14 で僅かに抗体産生が認められた。

T 細胞クローンが存在していることが示された。

今回合成したペプチドに対する抗体価を ELISA で測定したところ、どのペプチドを免疫しても抗体産生を殆ど認めなかった(図 28)。さらに、これらのペプチドはポリクローナルな抗 IRBP 抗体とも反応しなかった(図 29)。すなわち、細胞性免疫に関与する T リンパ球と体液性免疫に関与する B リンパ球は IRBP ペプチドの異なる領域を認識しており、今回の合成ペ

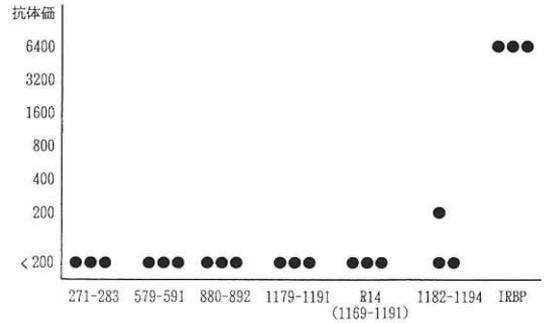


図29 合成ペプチドの抗 IRBP 抗体に対する反応性 (ELISA)。

合成ペプチドを抗原として、IRBP 接種後 5~8 週の抗 IRBP IgG 抗体に対する反応を ELISA で測定した。p 1182~1194 で僅かに反応が認められた。

プチドには抗体産生を促すエпитープは含まれていないと考えられた。

## 2) 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子

APC と T リンパ球およびリンパ球相互間には MHC 拘束があり、免疫応答は MHC によって規定されている。先に述べたように、抗原は MHC と結合した形で APC 表面に提示され、抗原認識の過程でも MHC が重要である。そこで、EAU と MHC の関連を調べた。

実験には B 10 系 congenic マウスを用い、IRBP 50 μg と CFA を一回接種し、同時に百日咳死菌を腹腔内に注射した。EAU 発症の有無を接種後 1 か月目の病理組織所見で確認するとともに、脾リンパ球を用いたリンパ球増殖試験を行った。その結果、マウスの MHC である H-2 ハプロタイプのうち、表 4 の如く I-A、と I-E 亜領域に k という遺伝子をもつ B 10 A マウスおよび B 10 BR マウスにそれぞれ 38.5%、12.5% の EAU を認めた。しかし、A マウスは H-2 ハプロタイプが B 10 A マウスと同一であるにも拘らず EAU が発症しなかった。A マウスと 10 A マウスは congenic ではないので MHC 以外の遺伝子が全く共通であるわけではなく、このことが EAU 発症に影響したと思われる。なお、リンパ球増殖試験の結果も EAU 発症率と相関し、B 10 A マウスで高い増殖能が示された。

以上のことより、マウス EAU の疾患感受性は I-A、I-E 亜領域の k という遺伝子で規定されている可能性があるが、MHC 以外の遺伝子 (non-MHC gene) も強く関与し、いわば、polygene の支配を受けていると思われる。

表4 マウス MHC ハプロタイプと EAU 発症率

	Class I	Class II	Class II	Class III	Class I	
マウス	K	I-A	I-E	S	D	EAU%
B 10	b	b	b	b	b	0%
B 10 A	k	k	k	d	d	38.5%
B 10 BR	k	k	k	k	k	12.5%
B 10 D2	d	d	d	d	d	0%
A	k	k	k	d	d	0%

H-2 (マウス MHC) にはK, I (I-A, I-E), S, D領域が存在しており, それぞれの遺伝子型としてb, d, kなどがある.

I-A, I-E 亜領域にkという遺伝子をもつマウス (B 10 A, B 10 BR) ではEAUが発症する. しかし, B 10 Aと同じH-2 ハプロタイプを持つAマウスではEAUが発症しない.

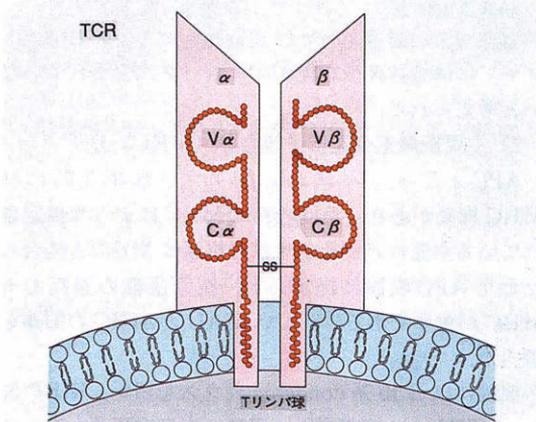


図30 T細胞レセプター (TCR) の構造の模式図. 2種類のポリペプチド鎖α, β鎖からなるヘテロダイマーで, 各鎖は可変部 (V) と定常部 (C) からなる.

3) T細胞レセプター (TCR)

TCRβ鎖遺伝子は, その可変部 (V), 多様部 (D) および接合部 (J) 領域遺伝子の at random な再構成により実に 10<sup>15</sup>にも及ぶ多様性を有し<sup>24)</sup>, 数多くの抗原に対応できるようになっている (図30). では, EAUの場合いかなる TCRβ鎖を用いて免疫反応が生じているのであろうか.

まず, ぶどう膜網膜炎発症 TG ヌードマウスの脾リンパ球をウシ IRBP で選択し, インターロイキン 2 (interleukin 2 ; IL-2)にて維持することにより Tリンパ球株を樹立し, fluorescence activated cell sorter (FACS) によりその TCR を解析した. 樹立された Tリンパ球株はその 94.5%が CD4 陽性細胞であり, マウス β鎖 V領域遺伝子に対する 11種類のモノクロー

ナル抗体による結果では, その TCR の 30.2%は Vβ6 を, 24.9%は Vβ8 を利用していた (図31), さらに, p 1182~1194 特異的 Tリンパ球株を樹立し, 同様に FACS にかけたところ, Vβ6 を利用している TCR が 96.3%で, Vβ8 は陰性であった (図32).

以上のことより, IRBP 特異的 Tリンパ球株には Vβ6あるいはVβ8を利用する少なくとも2つのクローンが存在し, p 1182~1194 特異的 T細胞株は Vβ6のみを利用しているクローンよりなっている可能性が高い. このことは, T細胞株を limiting dilution によってクローン化し, さらに多種類のモノクローナル抗体を用いて検討する必要があるが, IRBP によって選択された TG ヌードマウスの Tリンパ球株が2つの限定された TCRをもつことは, 先にエピトープの項で述べた2つのエピトープに対する活性化 T細胞クローンが存在する結果と呼応し興味深い. なお, EAEを始めとする多くの自己免疫病でも非常に限定された V遺伝子を使用していることが知られている<sup>25)</sup>.

4) 接着分子

抗原認識の場において接着分子が関与しているかどうかをEAUモデルを用いて検討した.

図33の如く, IRBP 50 μgとCFAを接種したルイスラットの実験系を用いて, 接着分子である lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) と intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)のそれぞれに対するモノクローナル抗体を投与しEAUの抑制を試みた. すなわち, 抗原接種1日前から接種後12日目まで2種類のモノクローナル抗体をそれぞれ 1 mg/kg/day 連日一回投与したところ, EAUの発症が対照に比べて遷延し, 一部のラットではEAUは発

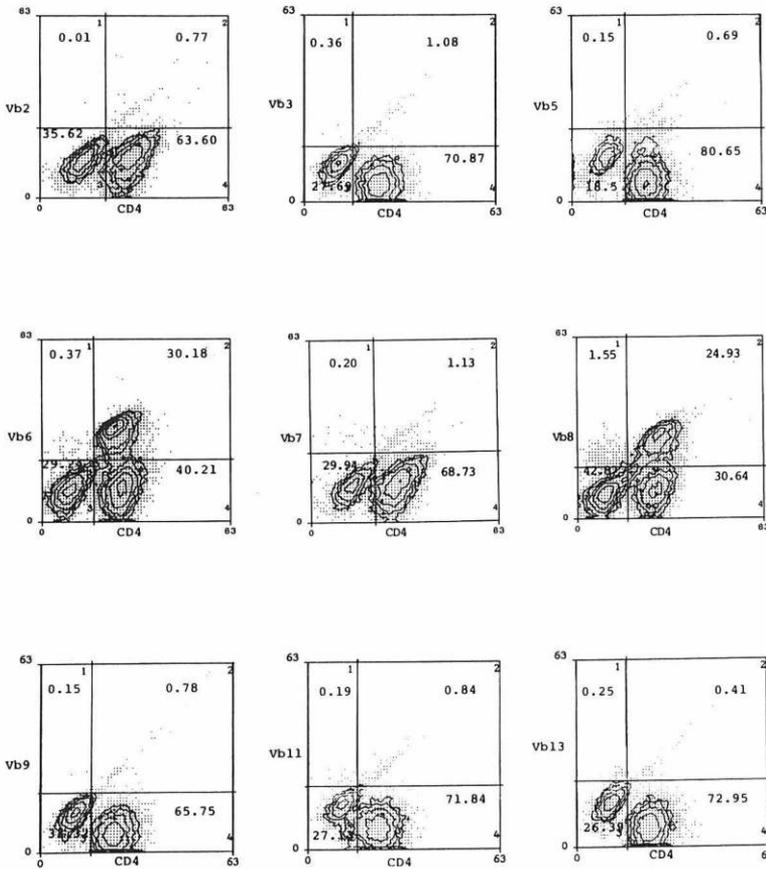


図 31 ぶどう膜網膜炎発症 TG ノードマウスより樹立した IRBP 反応性 T リンパ球株の TCR における Vβ 遺伝子表現型の検索。

TCR の Vβ 鎖に対する 11 種類の抗 Vβ 抗体を用いて染色し、FACS にて解析を行った。第 1 分画は CD4 (-)・Vβ (+) を、第 2 分画は CD4 (+)・Vβ (+) を、第 3 分画は CD4 (-)・Vβ (-) を、第 4 分画は CD4 (+)・Vβ (-) を示す。樹立した IRBP 反応性 T リンパ球株は CD4 陽性のリンパ球であることは既にわかっている。そしてその T リンパ球の TCR は Vβ 6 を 30.2%、Vβ 8 を 24.9% 利用していることが判明した。

症しなかった。しかし、抗体の投与を抗原接種 1 日前から接種後 6 日目までとした群あるいは抗原接種後 7 日目から 13 日目までとした群では EAU の抑制は認められなかった。

以上のことより、これらの抗体による EAU 抑制の作用機転はその effector phase にあるのではなく、induction phase にあると思われる。しかし、抗体の投与を抗原接種 1 日前から接種後 6 日目までとした群で無効だったのは、CFA で乳濁液にした抗原の場合、その抗原が長期にわたって放出されるからと思われる、抑制のためには長期間の抗体投与が必要であった。なお、

その抑制が本当に抗原認識の過程で行われているかどうかについては、この実験結果だけからでは不明である。また、予備実験で抗体の単独投与も試みたが無効であり、それは接着分子相互のレセプター・リガンドの関係は 1 : 1 の対応ではなく、例えば LFA-1 のリガンドには ICAM-1 以外にも数種類ある<sup>20)</sup>ことに起因すると思われる。

### 3. T リンパ球の活性化

3 分子複合体および接着分子を介したシグナルにより T リンパ球が活性化し、一連の免疫応答が始まる。すなわち、静止状態にあった T リンパ球がクローン増

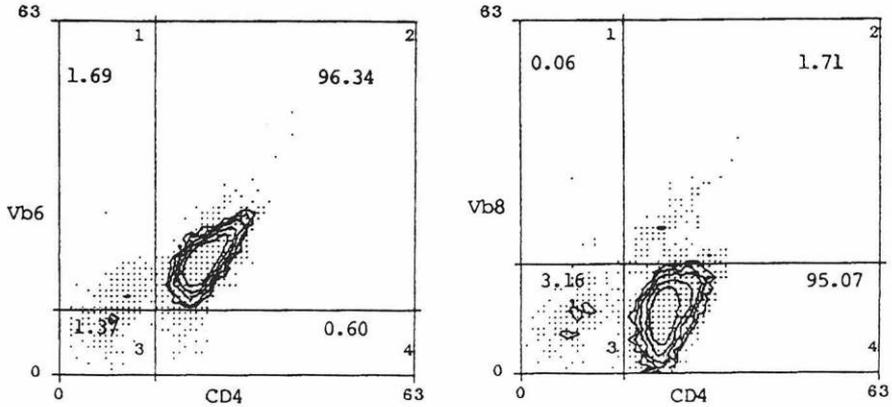


図 32 ぶどう膜網膜炎発症 TG ノードマウスより樹立した p 1182~1194 反応性 T リンパ球株の TCR における Vβ 遺伝子表現型の検索。  
Vβ 8 は陰性となり、96.3%の TCR が Vβ 6 を有しており、ごく限られた TCR を利用していることが判明した。

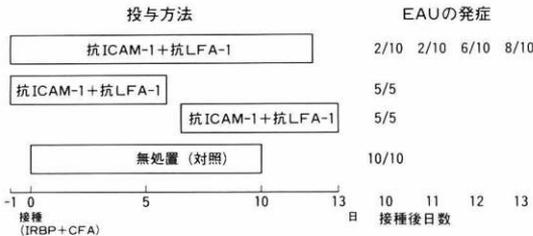


図 33 抗 ICAM-1, 抗 LFA-1 モノクローナル抗体による EAU 抑制実験。

対照(下段)に比べて両モノクローナル抗体を IRBP 接種 1 日前から接種 12 日目まで連続投与した群(上段)で EAU の発症が著しく抑制された。接着分子が抗原認識過程において重要な役割を果たしていると考えられる。

殖し、その際産生されるリンホカインが標的細胞障害に関わるエフェクター細胞の作用を調節する。また、B 細胞が抗体産生するのを補助する。T リンパ球が活性化するとその細胞表面に様々な分子が発現し、その機能に関する。その分子として、インターロイキン 2 レセプター (IL-2 R), トランスフェリンレセプター (TfR) などがあり、逆に、これらの分子の発現の有無により、T リンパ球の活性化状態を知ることができる<sup>27)</sup>。EAU においても、IRBP 接種後の末梢 T リンパ球がクローン増殖し、IL-2 R や TfR を発現しているかどうかを自動免疫測定装置で調べた。

ルイスラットに IRBP 50 μg と CFA を接種し、14 日後に脾リンパ球を採取した。リンパ球を IRBP 添加

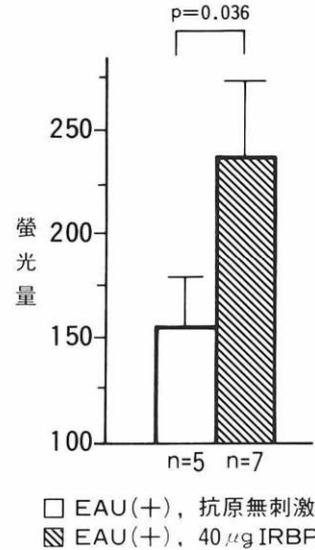


図 34 EAU ラットにおけるリンパ球増殖試験 (自動免疫測定装置)。  
IRBP 反応性 T リンパ球が増殖している。

あるいは無添加培養液でそれぞれ 3 日間培養し、培養終了時に carboxyl-fluorescein-diacetate (CFDA) を添加した。生細胞内に取り込まれた CFDA が代謝され carboxyl-fluorescein (CF) となることを利用し、その蛍光発色の強さを自動免疫測定装置で測定することによりリンパ球増殖能を検討した。その結果、図 34 の如く IRBP の刺激で有意の増加を認め、抗原特異的 T リ

ンパ球の増殖が示された。

次に、IRBP 接種後 14 日目のルイスラットと無処置ルイスラットの脾リンパ球を IRBP 添加培養液でそれぞれ 3 日間培養後、抗ラット IL-2 R モノクローナル抗体あるいは抗ラット Tfr モノクローナル抗体をウサギ補体とともに加えた(細胞障害試験)。その後、死細胞を蛍光染色させる propidium iodide (PI) を加え、その蛍光発色の強さを自動免疫測定装置で測定した。その結果、EAU が発症していたラットのリンパ球では蛍光発色が増加していた(図 35)。以上のことより、抗原接種後、IRBP 特異的 T リンパ球がクローナルな増殖を示し、IL-2 R あるいは Tfr 分子を発現した活性化リンパ球が存在することが判明した。EAE において、エフェクター T リンパ球が血液脳関門を通過して標的組織に浸潤するには活性化されていなければならないという報告<sup>28)</sup>もあり、T リンパ球の活性化は後述

の EAU の組織障害に関しても必須の条件となるものと思える。

#### 4. 眼局所での免疫応答

臓器特異的自己免疫病である EAU が視細胞層を標的組織とした病変を生じるには、末梢で活性化した T リンパ球が血液眼関門 (blood-ocular-barrier) を越えて標的組織に至らなければいけない。そして、眼局所での免疫応答が生じ、その結果として眼組織の破壊が起こる。その際、どんな免疫担当細胞が、いかなる経路と機序で眼内に浸潤して免疫反応を起こすのかを知る目的で、免疫組織染色を行った。

##### 1) 眼内浸潤細胞の種類と機能

ルイスラットに IRBP 50 μg と CFA を接種後、経時的に採取した眼球から凍結切片を作製した。一次抗体として、抗ラットモノクローナル抗体である OX 6(抗 Ia), W 3/25(抗 CD 4), OX 8(抗 CD 8), RLN-9 D 3(抗 B 細胞表面抗原), ED 2 あるいは ED 3 (抗マクロファージ表面抗原), 1 A 29 (抗 ICAM-1) および WT 1(抗 LFA-1 α 鎖)を用い、avidin-biotin complex (ABC) 法で免疫組織染色を行った。

眼球各組織における陽性細胞を EAU の病期に分けて検討した結果を表 5 に示した。Ia 抗原陽性細胞および CD 4 陽性細胞が臨床的な EAU 発症前の虹彩毛様体にまず認められ(図 36)、その後 EAU の進展とともに虹彩毛様体の陽性細胞が増加し、網膜や脈絡膜にも多くの陽性細胞が認められるようになった(図 37, 38)。その Ia 抗原陽性細胞の一部はマクロファージであり、また、リンパ球だけでなく浸潤した好中球の多くは LFA-1 陽性細胞で、ICAM-1 をもつリンパ球もあった(図 39, 40)。視細胞層の破壊、消失と共に EAU は消炎に向かい (EAU 後期)、眼球各組織における CD 4 陽性細胞、LFA-1 陽性細胞および ICAM-1 陽性細胞すなわちリンパ球や好中球の数は減少したが、虹彩毛様体や網膜、特に網膜下のマクロファージはむしろ増加していた(図 41)。しかし、すべての組織でどの

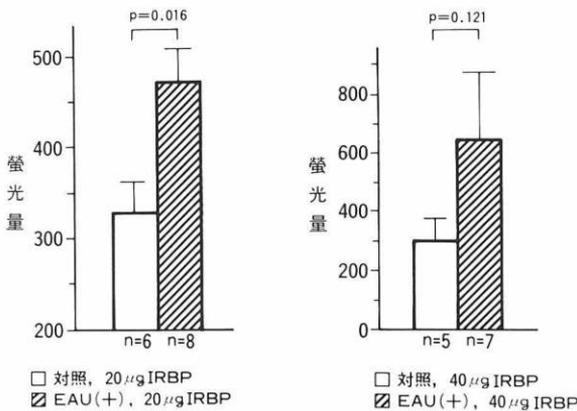


図 35 細胞障害試験 (自動免疫測定装置)。

左図は抗ラット IL-2 レセプター抗体による、また、右図は抗ラットトランスフェリンレセプター抗体による細胞障害試験の結果で、死細胞が発色する蛍光量で表わした。EAU ラットの IRBP 反応性 T リンパ球においては IL-2 レセプターおよびトランスフェリンレセプターが発現しており、活性化が認められた。

表 5 ルイスラット EAU における眼内浸潤細胞の推移

部位	虹彩毛様体						網膜						脈絡膜					
	Ia*	Mφ*	CD4*	CD8*	ICAM-1	LFA-1	Ia*	Mφ*	CD4*	CD8*	ICAM-1	LFA-1	Ia*	Mφ*	CD4*	CD8*	ICAM-1	LFA-1
発症 2 日前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-
発症 1 日前	+	±	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	±	+	-	-	±	+
炎症初期	++	±	++	±	++	++	±	-	+	-	±	±	+	+	+	±	+	+
炎症極期	+++	++	+++	+	++	+++	++	+	++	±	++	+	+++	++	++	+	++	++
炎症末期	++	++	+	±	+	+	+	++	+	-	±	±	++	+	++	-	+	+

注：200 倍 1 視野中細胞数 0：-，～10：±，～50：+，～150：++，それ以上：+++

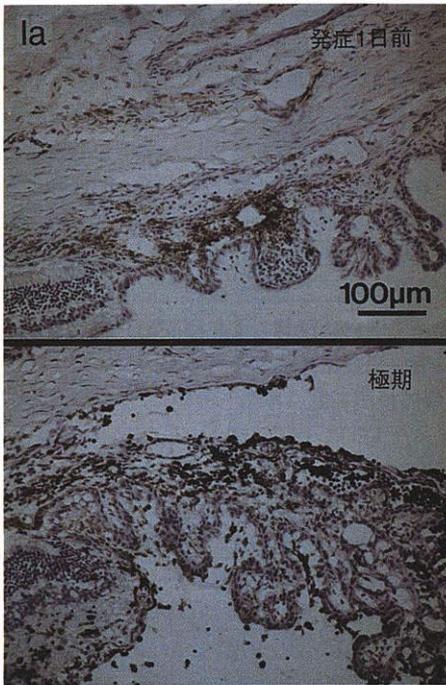


図36 虹彩毛様体におけるIa抗原陽性細胞。EAU発症1日前より(上段)毛様体にIa抗原陽性細胞が認められ次第に増加し、EAUの極期(下段)では虹彩、毛様体、網膜にIa抗原陽性細胞が著明に認められた。

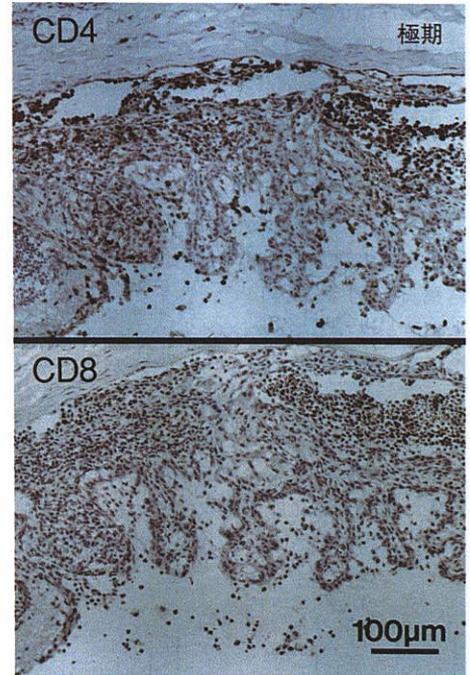


図37 EAU極期における虹彩毛様体のCD4陽性細胞とCD8陽性細胞。CD4陽性細胞は前房、虹彩、毛様体、網膜の浸潤細胞に圧倒的に多く認められた。しかし、CD8陽性細胞は全体に少なく、軽度であった。

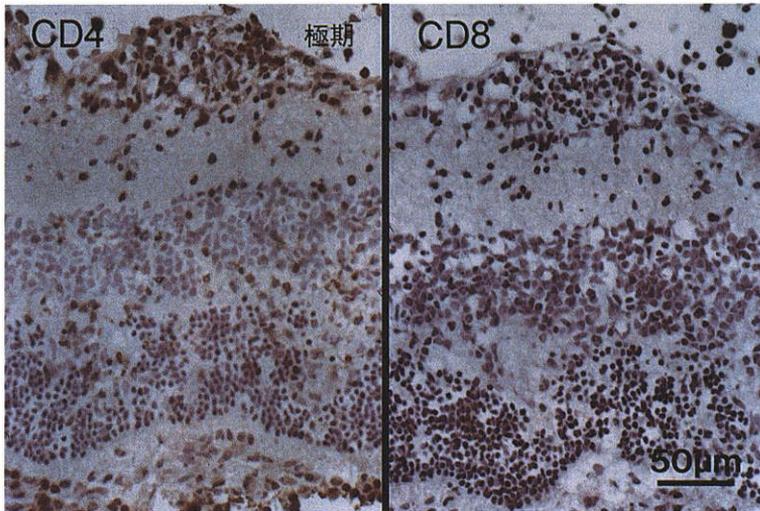


図38 EAU極期における網膜のCD4およびCD8陽性細胞。CD4陽性細胞の浸潤が網膜、特に網膜血管周囲や視細胞層に多く認められた。一方、CD8陽性細胞は網膜血管周囲のみにごく僅かに認められた。

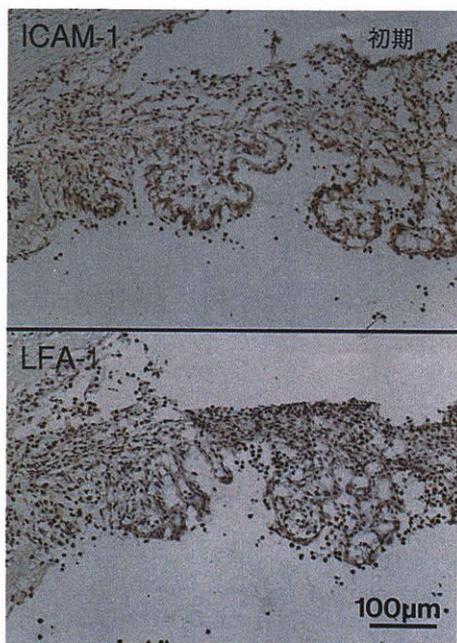


図39 EAU初期の虹彩毛様体におけるICAM-1陽性細胞(上段)、LFA-1陽性細胞(下段)。浸潤細胞の多くに両モノクローナル抗体と反応する陽性細胞が認められた。

病期においてもCD8陽性細胞は極めて少なかった(図37, 38)。

以上のことより、虹彩毛様体でのIa抗原陽性細胞による抗原提示とCD4陽性細胞による抗原認識から眼局所での免疫応答がまずはじまるものと思われる。そして、リンパ球は増殖し、活性化したリンパ球やマクロファージから放出されるサイトカインが好中球などの炎症細胞の遊走、作用の調節に関わる。そして、この場で起こる細胞相互間の情報伝達にもLFA-1やICAM-1などの接着分子が関与している。CD8陽性の細胞傷害性Tリンパ球が網膜の破壊に働いている可能性は少ない。また、EAUの後期に増加するマクロファージは免疫応答のdown regulationに関与していると思われる。

## 2) 免疫担当細胞や炎症細胞の眼内浸潤機構

リンパ球や好中球がどの様に血液眼関門を通過するかについては、いくつかの可能性がある。その可能性の大前提になるのはIRBPの厳密な局在、すなわちtarget findingがいかに行われているかであろう。しかし、この点に関しては確実な情報はまだない。Wiggertら<sup>29)</sup>がIRBPの分布について調べたところ、サルではIPMに最も多く、次いで硝子体、前房にも多く認められた。さらに、ラットやマウスの網膜脈絡膜にも分布していることを報告した。筆者らがHRP標識抗IRBP抗体のFabフラグメントを用いて行ったラッ

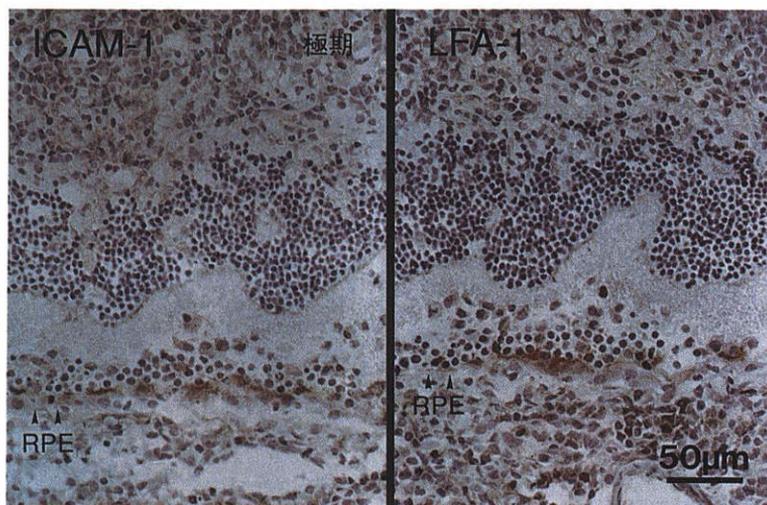


図40 EAU極期の網膜と脈絡膜におけるICAM-1およびLFA-1陽性細胞。脈絡膜と網膜外節層の浸潤細胞の一部と網膜色素上皮細胞に両接着分子の発現が認められた。

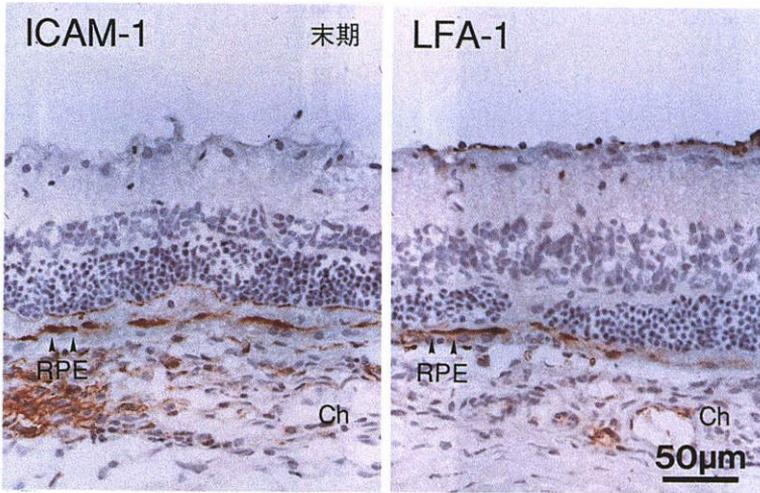


図41 EAU末期の脈絡膜と網膜における接着分子。  
 抗ICAM-1抗体に反応する陽性所見が脈絡膜(Ch)の浸潤細胞と網膜色素上皮層(RPE)に著明である。一方、抗LFA-1抗体による陽性所見は主に網膜色素上皮層に認められた。

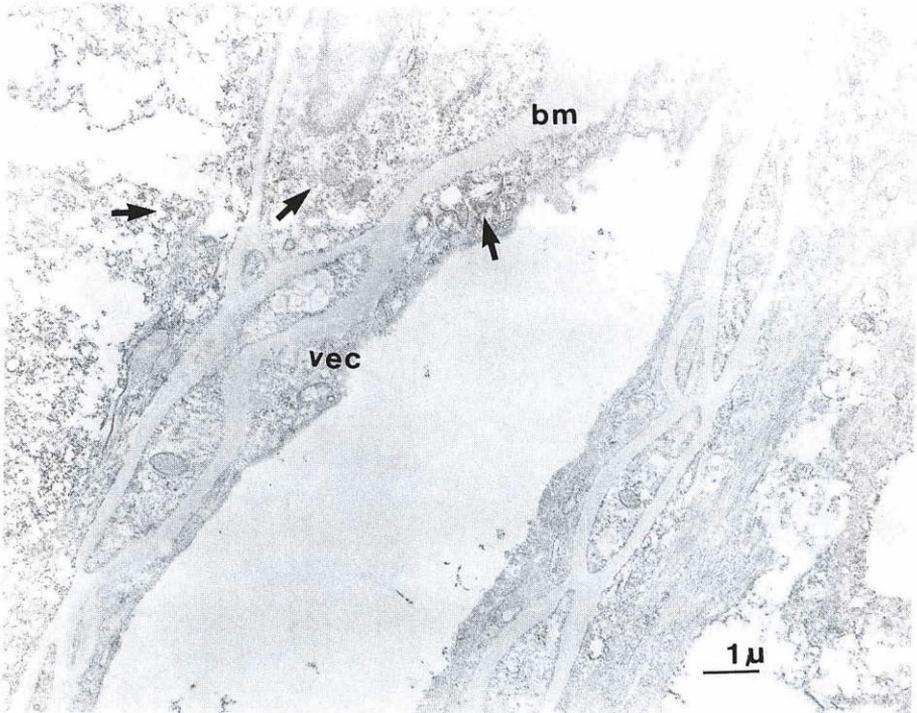


図42 ルイスラット網膜血管におけるIRBPの局在。  
 抗ウシIRBPウサギ血清のIgG Fabフラグメントにhorseradish peroxidaseを標識し、酵素抗体直接法による免疫電顕にて検索した。抗IRBP抗体による反応産物(矢印)が血管内皮細胞(vec)の一部と基底膜(bm)周囲に認められた。

ト網膜の免疫電顕の結果では、視細胞層以外に網膜血管周囲にも IRBP 抗原の存在を示唆する所見が得られた(図 42)。しかし、S 抗原で認められたような脈絡膜毛細血管板における局在<sup>30)</sup>は IRBP については見られなかった。この事実に一致するかのよう、S 抗原による EAU での血液網膜関門 (blood-retinal-barrier) の破綻に重要である脈絡膜肥満細胞の脱顆粒現象<sup>31)</sup>は、IRBP による EAU では一義的な意味を持たない。すなわち、EAU 発症前での脈絡膜肥満細胞の増加や脱顆粒は見られず、発症 2 日後に恐らく二次的な現象であると思える脱顆粒が僅かに認められたのみである(図 43)。

また、免疫組織染色で眼の resident cell が Ia 抗原を発現している所見は得られなかった。したがって、血液網膜関門を構成している細胞が抗原提示とともに T リンパ球の活性化と細胞浸潤を促すという S 抗原による EAU での仮説<sup>32)</sup>も成り立たない。

一方、発症初期の毛様体上皮層では 2 層の上皮細胞の間隙に LFA-1 および ICAM-1 の帯状の陽性所見が免疫組織染色で認められ(図 44)、極期以降では毛様体上皮層だけでなく網膜色素上皮層にも LFA-1 および ICAM-1 の陽性所見が得られた(図 40, 41)。また、虹彩、脈絡膜および網膜の血管内皮にも ICAM-1 の陽性所見が得られた(図 45)。これらすべては血液眼関門を構成している細胞であり、その細胞で発現した接着分

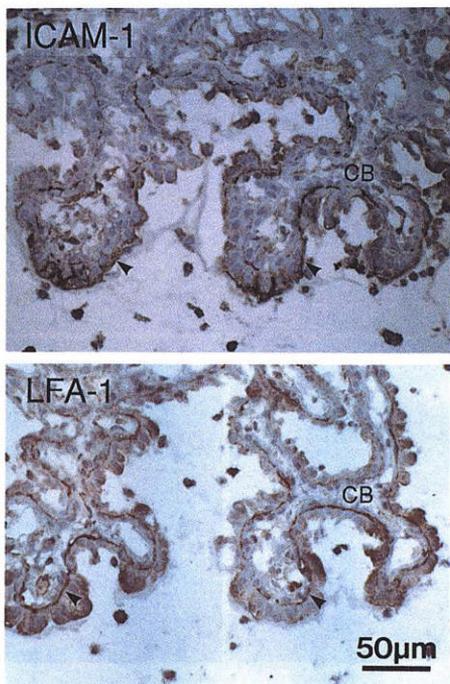


図 44 EAU 極期の毛様体 (CB) における ICAM-1 および LFA-1 陽性細胞。毛様体における浸潤細胞と毛様体上皮層に両接着分子の陽性所見が認められた。

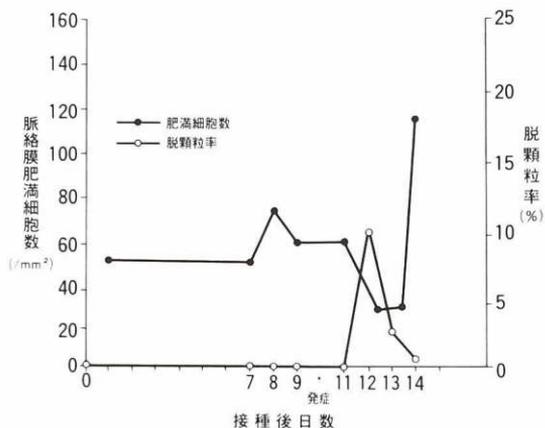


図 43 ラット脈絡膜肥満細胞数と脱顆粒現象。

ルイスラットに IRBP を CFA および百日咳菌と共に接種した後、経時的に脈絡膜伸展標本を作成し、トルイジンブルー染色によって肥満細胞数とその脱顆粒を起こしている細胞の割合を計測した。EAU 発症前に肥満細胞数の有意な増加や脱顆粒はみられない。

子が免疫担当細胞や炎症細胞の眼内浸潤に関与している可能性が考えられる。しかし、LFA-1 は白血球に発現する接着分子であり、非血液系細胞での発現は一般には認められていない。そこで、EAU の発症した眼において異所性発現しているかどうかを確認するため、凍結組織切片を EDTA 4 Na カリウム緩衝生理食塩水で前処理したところ、ICAM-1 の陽性所見に差異はなかったが、毛様体上皮層と網膜色素上皮層における LFA-1 の染色は消失ないし減弱した(図 46, 47)。なお、浸潤細胞の LFA-1 陽性所見には変化がなかった。すなわち、毛様体上皮層と網膜色素上皮層における LFA-1 の染色はそのリガンドである ICAM-1 に結合した結果であり、二価金属イオン依存性である<sup>25)</sup>この結合がキレート剤である EDTA 4 Na による処理で外れたものと解釈できる。したがって、LFA-1 はリンパ球や好中球の様な浸潤細胞の膜に発現しているが、血液眼関門を構成している細胞には発現していないことがわかった。他方、ICAM-1 は血液眼関門の構成細胞に発現しており、この場で確かに ICAM-1 と LFA-1 を

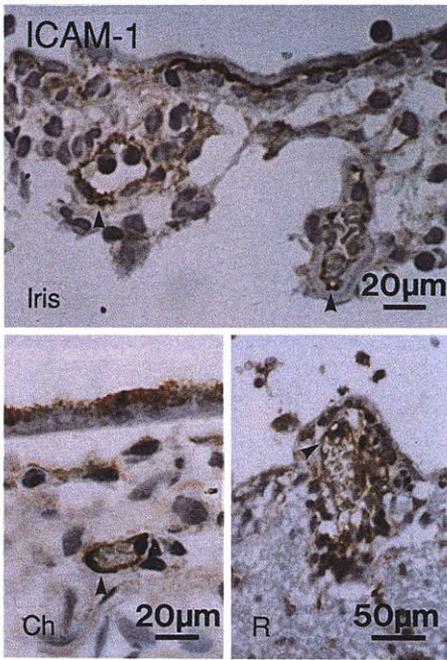


図45 EAU発症ラットの虹彩(上図), 脈絡膜(下左図)ならびに網膜(下右図)の血管内皮細胞に発現したICAM-1接着分子, 抗ICAM-1抗体と反応する陽性所見が各血管内皮細胞に認められた。

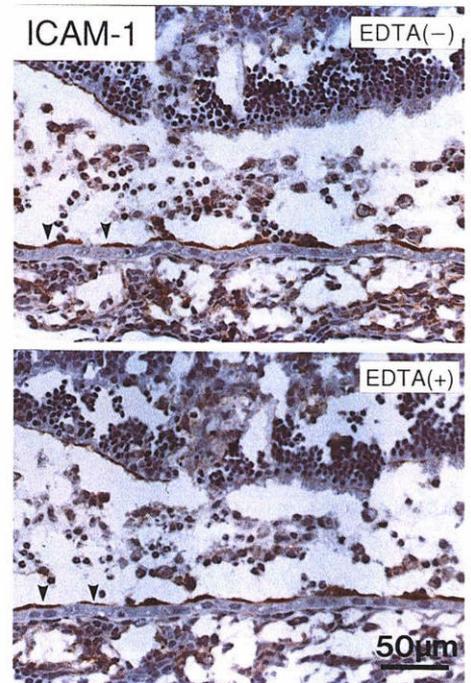


図46 EAU極期の網膜におけるICAM-1の発現とEDTA処理標本における変化. 網膜色素上皮層に認められる抗ICAM-1抗体による反応産物は, EDTA処理切片においても影響を受けず認められた. 色素上皮細胞から発現したことを示す.

介した細胞間の接着が生じていることが推測できた。

以上のことより, 免疫担当細胞や炎症細胞の眼内浸潤機構には接着分子が最も重要な働きをしていると考える. すなわち, ぶどう膜に至った活性化Tリンパ球がtarget findingによりサイトカインを放出し, 血液眼関門の構成細胞が活性化されICAM-1などの接着分子が発現する. そして, 活性化によりリガンドへの親和性が高まったLFA-1などの分子をもつリンパ球がICAM-1を介して血液眼関門の構成細胞に接着し, その結果barrierを越えてリンパ球が眼内へ浸潤すると考えられる. そして, この現象はまず毛様体でおこるものと思える. さらに, 浸潤したリンパ球は眼内で抗原提示細胞(おそらくマクロファージ)を認識し免疫反応が生じ, 産生されたサイトカインにより好中球などの炎症細胞が眼内へ遊走し, さらに活性化され炎症が拡大すると考えられる. なお, この好中球の浸潤にも接着分子が関与しているとされている<sup>33)</sup>.

## 5. 組織障害

網膜, ぶどう膜の組織障害に関与する因子として,

細胞傷害性Tリンパ球, natural killer細胞, マクロファージ, 好中球, およびサイトカイン(リンパ球やマクロファージ由来)や抗体などが想定され, おそらくそれらが相互に関連しあって炎症性組織破壊を来すものと思われる. EAUの組織障害において, その重要性が確認されている因子として好中球があり, S抗原によるEAUが抗好中球モノクローナル抗体により著明に抑制された<sup>34)</sup>. IRBPによるEAUでもその組織像から好中球の関与は十分推測される. また, 液性抗体に関してもS抗原によるEAUで, その病像形成に関与しているとの報告がある<sup>35)</sup>. IRBPによるEAUでも抗IRBP抗体が産生されており(図48), 抗IgG抗体や抗C3抗体を用いた蛍光組織染色で標的組織である視細胞層に特異蛍光を認めた. したがって, 抗体も組織障害に関与している可能性がある. しかし, III.2.の項で述べた合成ペプチドで発症するEAUでは抗体が産生されていないにも拘らず, 純化精製したIRBP

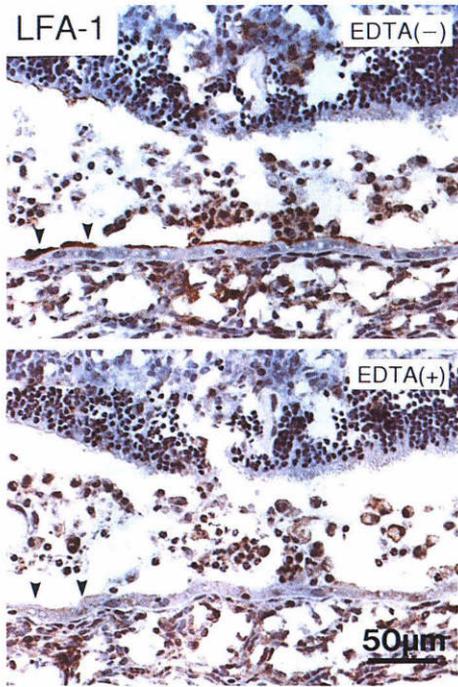


図 47 EAU 極期の網膜における LFA-1 の発現と EDTA 処理標本における変化。

網膜色素上皮層に認められる抗 LFA-1 抗体陽性所見は EDTA 処理標本において消失しており、リガンドである ICAM-1 に結合していたものであることを示している。

全分子 (whole IRBP) を接種した場合と同程度の病変が発症し、抗 IgG 抗体や抗 C 3 抗体を用いた蛍光組織染色でも視細胞層に特異蛍光を認めた。このことは、IRBP による EAU の組織障害には抗体は必須でなく、蛍光組織染色での特異蛍光も IRBP に対する特異抗体が沈着したものではないと思われる。

さらに、サイトカインにより活性化された好中球から放出されるフリーラジカルについても検討が加えられており<sup>36)</sup>、今回筆者らが行った実験でも、EAU 発症早期の網膜で過酸化脂質の有意な上昇が示された (図 49)。つまり、活性化好中球由来のフリーラジカルが過酸化脂質反応のトリガーとなり、EAU における組織障害に関与していることが示唆された。サイトカインと EAU の組織障害の関連をさらに検討するには、EAU が発症している網膜からサイトカイン (あるいはその遺伝子) 自体を同定する必要がある。

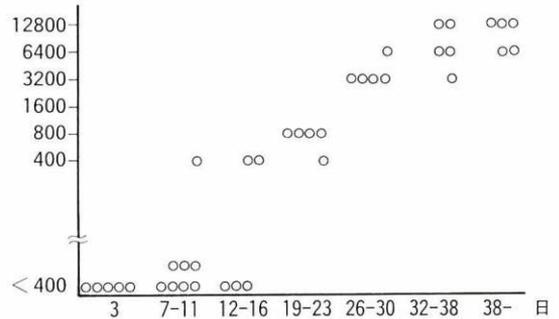
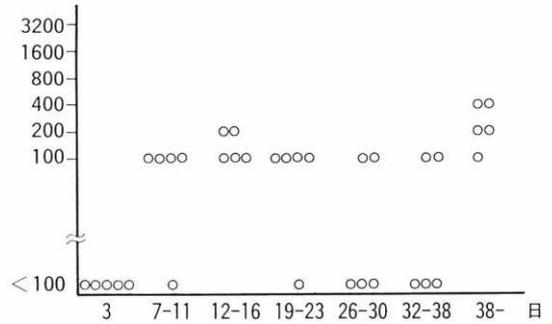


図 48 抗 IRBP 抗体の推移 (ELISA)。

横軸に IRBP 接種後日数を、縦軸に抗 IRBP 抗体価を示す。抗 IRBP IgG 抗体価 (下図) は EAU 発症 (接種後 10 日) 後しばらくして上昇してくる。IgM 抗体 (上図) は IgG 抗体に先行して上昇している。

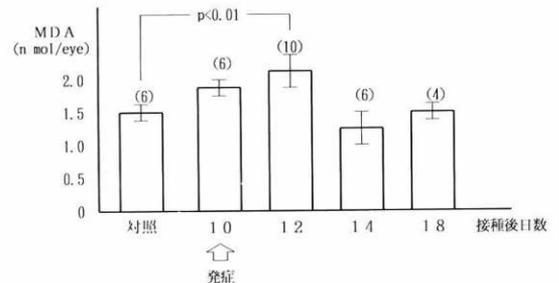


図 49 EAU 発症ラットの網膜における過酸化脂質の検索。

過酸化脂質の測定には TBA 法を用い、マロンジアルデヒド (MDA) 量に換算して表わした。対照網膜に比して EAU 発症早期の網膜では過酸化脂質の有意な上昇が認められた。

## IV 免疫寛容

強い病原性を持つ IRBP が正常個体では通常病的な免疫反応を引き起こさないのは、この抗原に対する免疫寛容が成立しているからであろう。一般的に寛容の機序として、1) clonal deletion, 2) clonal anergy および、3) active suppression が知られている<sup>37)</sup>。そこで、IRBP の寛容がいかなる機序で成立しているかを検討するために次のような実験を行った。免疫能の欠如している BALB/c ヌードマウスの眼球と松果体を摘出することにより体内の IRBP を全て除去し、その4週後に同系マウス胎仔胸腺を腎皮膜下に移植して内在性の IRBP に感作されたことのない免疫系を持つマウスを作製した(図 50)。すなわち、このマウスの T リンパ球系は胸腺内での分化・成熟過程や末梢において IRBP に接触したことがない状況になる。そして、このマウスを用いて胸腺移植後 12 週で IRBP を刺激抗原とする脾リンパ球増殖試験を施行したところ、IRBP 除去マウスでは高い反応性を示したが、対照とした正常 BALB/c マウスの脾リンパ球では反応を示さなかった(図 51)。なお、IRBP 除去マウスにおける T リンパ球の TCR $\alpha\beta$  および 11 種類の V $\beta$  陽性細胞の構成比は、各種抗体と FACS を用いて検討したところ正常マウスと差がなかった。したがって、この実験結果から正常マウスでは、そのリンパ球が内在性の IRBP と接触することによりその不応答性が獲得されることが分かった。しかし、上記の3つの機序のうちどれが主に働いたのかについては推論の域を脱しないが、正常のルイスラットや B 10 A マウスに IRBP と CFA を接種することにより EAU が発症する事実は、正常状態でも IRBP 反応性 T リンパ球クローンが末

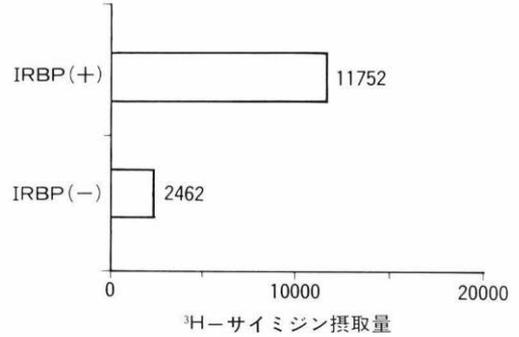


図 51 内在性 IRBP 除去マウスにおけるリンパ球増殖試験。  
IRBP に対する強い増殖反応が脾細胞に認められた。

梢に存在することを意味し、少なくとも胸腺で完全に deletion を受けているわけではない様である。さらに、TG ヌードマウスでは臓器特異的な自己免疫病が高率に多発することから、かなりの臓器特異抗原反応性の T リンパ球は deletion を免れていると考えられる。これらのことから末梢トレランス、すなわち clonal anergy か suppressor T リンパ球が不応答性の主体である公算が強い。事実、前述したように TG ヌードマウスに正常マウスの T リンパ球を移入すると、自己免疫病の発症が予防されることは suppressor T リンパ球説を支持している(表 3)。一方、臓器特異抗原であっても胸腺に至ればリンパ球に提示され、positive あるいは negative selection をうけるとする考え<sup>38)</sup>もあり、寛容導入には deletion も重要な役割を果たしているかも知れない。Wiggert ら<sup>29)</sup>は前房水中に IRBP が存在することを報告しているが、このことは微量の IRBP が胸腺に到達し、deletion を受ける可能性を示している。今回の実験結果から IRBP に対する寛容の成立とその破綻について仮説を立てると図 52 の如くなる。

## V まとめ

種々の実験結果より EAU の発症機序を推定するとその概略は以下の如くである。

正常のルイスラットに IRBP と CFA を接種すると、clonal anergy もしくは suppressor T リンパ球により不応答になっている IRBP 反応性 T リンパ球クローンがその抗原刺激によって活性化する。TG ヌードマウスでは IRBP 特異的 suppressor T リンパ球が

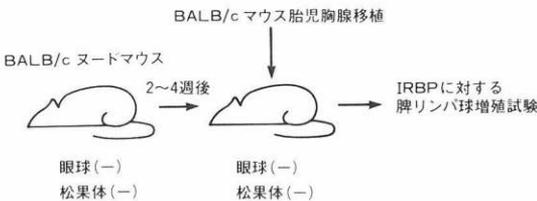


図 50 内在性 IRBP 除去後、同系マウス胎仔胸腺移植マウスの作成。

ヌードマウスの眼と松果体の摘出により、自己抗原となる IRBP を除去し、同系胎仔胸腺を移植することにより移植胸腺内で T リンパ球の分化誘導をはかる。

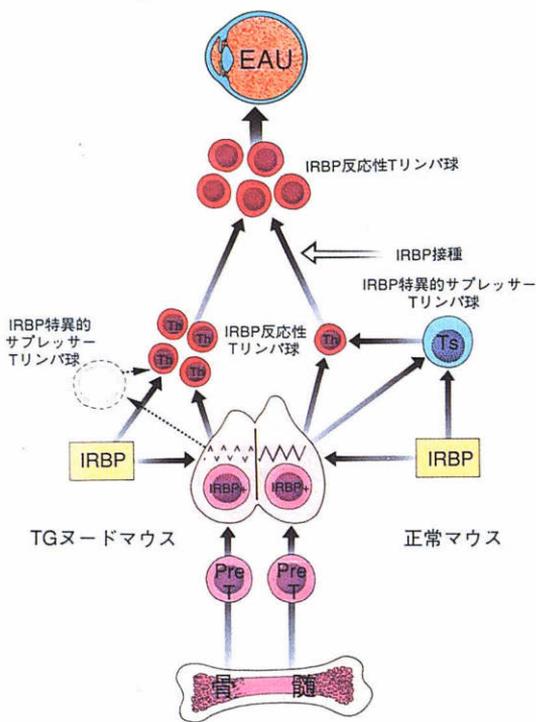


図52 IRBPに対する寛容の成立と破綻(仮説).

正常マウスにおいては、骨髄を出た Pre T リンパ球の多くは、胸腺に入り、成熟して T リンパ球となり、末梢へ出ていく。その過程で、IRBP などの自己抗原と反応する T リンパ球の多くは、削除される。一部は末梢に出てくるが、その数は少なく、サブレッサー T リンパ球などによる抑制機構により寛容は保たれている。しかし、TG ヌードマウスでは、胸腺機能が不完全であるため、胸腺での自己反応性 T リンパ球の削除がうまく行えず、また末梢でのサブレッサー T リンパ球による抑制機構も認められないため、IRBP に対する自己免疫病が発症すると考えられる。

欠如しているために、胸腺での deletion を免れた IRBP 反応性 T リンパ球クローンが内在性 IRBP の持続的な刺激により活性化する。リンパ球活性化の第 1 のステップとして、リンパ球による抗原認識があり、APC 上に提示された抗原ペプチドと MHC 分子複合体が TCR とともに三分子複合体を形成する。IRBP においてもそのアミノ酸配列の特定の部分が EAU 惹起能を持つ抗原ペプチドとして提示され、非常に限定された V 遺伝子を使用した TCR で対応する。また、MHC 分子は動物の種や系の違いによる疾患感受性の差異を遺伝的に規定する因子の一つとしても重要であ

る。さらに、T リンパ球と APC が結合し活性化シグナルが送られるためには、抗原非特異的な接着分子が機能しなければならない。こうして活性化した T リンパ球は、恐らく毛様体に微量に存在すると思われる IRBP に対してまず target finding を起こし眼(と松果体)に限定した組織障害を起こす。そして、免疫担当細胞が血液眼関門を越えて標的組織である視細胞層へ向けて浸潤する過程にも接着分子が重要となる。こうして浸潤した T リンパ球は Ia 抗原陽性細胞によって提示された IRBP 抗原を認識し、眼内でも免疫応答が起こる。その結果として産生されたサイトカインなどが EAU の組織障害を惹き起こすものと考えられる。

今回の結果をもとに、より一層 EAU の発症機序の本質に迫ることができれば、ヒト難治性ぶどう膜網膜炎に対する新しい治療法の開発への道を開くものと確信する。

文 献

- 1) **Elschnig A** : Studien zur sympathischen Ophthalmia. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 76 : 509—546, 1910.
- 2) **杉浦清治** : Vogt-小柳-原田病. 臨眼 33 : 411—424, 1979.
- 3) **Masuda K, Nakajima A, Urayama A, Nakae K, Kogure M, Inaba G** : Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behçet's disease. Lancet II : 1093—1095, 1989.
- 4) **Mochizuki M, Masuda K, Sakane T, Inaba G, Ito K, Kogure M, et al** : A multicenter clinical open trial of FK506 in refractory uveitis, including Behçet's disease. Transplantation Proceedings 23 : 3343—3346, 1991.
- 5) **Collins RC** : Experimental studies on sympathetic ophthalmia. Am J Ophthalmol 32 : 1687—1699, 1949.
- 6) **Wacker WB, lipton MM** : Experimental allergic uveitis: Homologous retina as uveitogenic antigen. Nature 206 : 253—254, 1965.
- 7) **Shinohara T, Dietzschold B, Craft CM, Wis-tow G, Early JJ, Donoso LA, et al** : Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-KDa protein). Proc Natl Acad Sci USA 84 : 6975—6979, 1987.
- 8) **Borst DE, Redmond M, Elser JE, Gonda MA, Wiggert B, Chader GJ, et al** : Interphotoreceptor retinoid-binding protein. J Biol Chem 264 : 1115—1123, 1989.

- 9) Pfister C, Chabre M, Plouet J, Tuyen VV, de Kozak Y, Faure JP, et al: Retinal S-antigen identified as the 48 K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228: 891—893, 1985.
- 10) Chader GJ, Wiggert B, Lai YL, Lee L, Fletcher RT: Interphotoreceptor retinoid-binding protein. A possible role in retinoid transport to the retina. In: Osborn NN, et al (Eds): *Progress in Retinal Research vol 2*. Pergamon Press, Oxford, 163—189, 1983.
- 11) 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.
- 12) Vistica BP, Usui M, Kuwabara T, Wiggert B, Lee L, Redmond TM, et al: IRBP from bovine retina is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. *Curr Eye Res* 6: 409—417, 1987.
- 13) Taguchi O, Takahashi T, Seto M, Namikawa R, Matsuyama M, Nishizuka Y: Development of multiple organ-localized autoimmune diseases in nude mice after reconstitution of T cell function by rat fetal thymus graft. *J Exp Med* 164: 60—71, 1986.
- 14) Ichikawa T, Taguchi O, Takahashi T, Ikeda H, Takeuchi M, Tanaka T, et al: Spontaneous development of autoimmune uveoretinitis in nude mice following reconstitution with embryonic rat thymus. *Clin Exp Immunol* 86: 112—117, 1991.
- 15) 田口 修: 異種胸腺移植と自己免疫. *免疫薬理* 7: 425—431, 1989.
- 16) Schwartz RH: T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 3: 237—250, 1985.
- 17) 永井由美子, 菊地浩吉, 上出利光: 抗原提示細胞とT細胞の相互作用における接着分子. *臨床免疫* 23: 422—430, 1991.
- 18) Sanui H, Redmond TM, Hu LH, Kuwabara T, Margalit H, Cornette JL, et al: Synthetic peptides derived from IRBP induce EAU and EAP in Lewis rats. *Curr Eye Res* 7: 727—735, 1988.
- 19) Rothbard JB, Taylor WR: A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J* 7: 93—100, 1988.
- 20) Kotake S, de Smet MD, Wiggert B, Redmond M, Chader GJ, Gery I: Analysis of the pivotal residues of the immunodominant and highly uveitogenic determinant of interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* 146: 2995—3001, 1991.
- 21) 佐藤準一: 実験的アレルギー性脳脊髄炎—発症機構に関する最近の知見. *臨床免疫* 23: 968—980, 1991.
- 22) Sinigaglia F, Guttinger M, Kilgus J, Doran DM, Matile H, Etlinger H, et al: A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature* 336: 778—780, 1988.
- 23) Donoso LA, Merryman CF, Sery T, Sanders R, Vrabec T, Fong SL: Human interstitial retinoid binding protein, A potent uveitopathogenic agent for the induction of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 143: 79—83, 1989.
- 24) Davis MM, Bjorkman DJ: T-cell antigen receptor and T-cell recognition. *Nature* 334: 395—402, 1988.
- 25) Kumar V, Kono DH, Urban JL, Hood L: The T-cell receptor repertoire and autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol* 7: 657—682, 1989.
- 26) 八木田秀雄: 構造的にみた接着分子の分類. 宮坂昌之(編): *接着分子*. メジカルビュー社, 東京, 8—22, 1991.
- 27) 谷口良久, 淀井淳司: T細胞の活性化マーカー. *日本臨牀(増刊号)臨床免疫(上巻)* 48: 102—107, 1990.
- 28) Cross AH, Cannella B, Brosnan CF, Raine CS: Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. I. Localization of <sup>14</sup>C-labeled cells during acute, chronic, and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 63: 162—170, 1990.
- 29) Wiggert B, Lee L, Rodrigues M, Hess H, Redmond TM, Chader GJ: Immunochemical distribution of interphotoreceptor retinoid-binding protein in selected species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1041—1049, 1986.
- 30) 長谷見通子: 免疫電顕による脈絡膜におけるS抗原の局在. *日眼会誌* 91: 260—269, 1987.
- 31) de Kozak Y, Sainte-Laudy j, Sakai J, Benveniste J, Faure JP: Immediate hypersensitivity in experimental retinal autoimmunity. In: O'Connor GR, et al (Eds): *Advances in Immunology and Immunopathology of the Eye*. Masson, Chicago, 125—130, 1985.
- 32) Fujikawa LS, Reay C, Morin ME: Class II antigens on retinal vascular endothelium, pericytes, macrophages, and lymphocytes of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 66—73, 1989.
- 33) 玉谷卓也, 宮坂昌之: 好中球, マクロファージ, リ

- ンパ球の血管外遊出と接着分子, 臨床免疫 23: 431-440, 1991.
- 34) **Usui M, Utsui T, Sakai J, Takeuchi M, Hijikata S, Sando F:** Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by intraperitoneal injection of anti-neutrophil monoclonal antibody (RP-3). In: Usui M, et al (Eds): *Ocular Immunology Today*. Excerpta Medica, Amsterdam, 339-343, 1990.
- 35) 坂井潤一: 実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) における免疫複合体 (IC). 日眼会誌 87: 1288-1299, 1983.
- 36) 後藤 浩: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎における網膜組織障害と過酸化脂質. 日眼会誌 95: 455-461, 1991.
- 37) 藤原道夫: 免疫寛容. 日本臨牀(増刊号)臨床免疫(上巻) 48: 51-55, 1990.
- 38) **Posselt AM, Barker CF, Friedman AL, Najj A:** Prevention of autoimmune diabetes in the BB rat by intrathymic islet transplantation at birth. *Science* 256: 1321-1324, 1992.
-