

網膜光凝固および冷凍凝固後の interphotoreceptor-retinoid-binding-protein (IRBP) の局在変化

谷口 有子

東京医科大学眼科学教室

要 約

Interphotoreceptor-retinoid-binding-protein (IRBP) の網膜光凝固および冷凍凝固後における局在変化と推移について免疫酵素抗体法間接法を用いて検索した。正常有色モルモットに網膜光凝固または冷凍凝固を行い、経時的に眼球摘出し、固定後、一次抗体として抗牛 IRBP 家兔血清、二次抗体として horseradish-peroxidase 標識抗家兔 IgG 山羊 IgG Fab' 分画を反応させ光学顕微鏡にて観察した。その結果、光凝固後では凝固直後から IRBP に対する陽性反応は消失することなく、7日目まで認められた。一方冷凍凝固後では、凝固直後に凝固局所で拡散する IRBP に対する陽性反応が認められたが、網膜の萎縮に伴い局所から消失した。IRBP は視細胞外節間に存在する細胞外構成物質であることから視細胞が外的侵襲を受けても、初期では局所の網膜に存在する傾向があるが、視細胞が崩壊、消失すると網膜から認められなくなることが示された。(日眼会誌 97:698-702, 1993)

キーワード: IRBP, 網膜抗原, 光凝固, 冷凍凝固, モルモット

Change in Interphotoreceptor-retinoid-binding-protein (IRBP) after Retinal Photocoagulation and Cryopexy

Yuko Taniguchi

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical Collage

Abstract

Effects of retinal photocoagulation and cryopexy on the interphotoreceptor-retinoid-binding-protein (IRBP) were studied using the indirect enzyme-labeled antibody technique. Following photocoagulation or cryopexy of eyes of normal guinea pigs, the eyes were fixed and frozen sections were reacted with rabbit anti-bovine IRBP serum as a primary antibody and with horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat IgG Fab' fragment as a secondary antibody. A positive reaction for IRBP was noted up until 7 days after photocoagulation. However, although IRBP was also noted in almost all layers of the retina immediately following cryopexy, it disappeared with time as the retina atrophied. We postulate that, because IRBP is an extracellular substance produced by the visual cell, it tended to remain in the photoreceptor layer following milder destruction with photocoagulation, but disappeared completely with atrophy of visual cells following cryopexy. (Jpn Ophthalmol Soc 97:698-702, 1993)

Key words: IRBP, Retinal antigen, Photocoagulation, Cryopexy, Guinea pig

別刷請求先: 160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 谷口 有子

(平成 3 年 7 月 17 日受付, 平成 5 年 1 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Yuko Taniguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical Collage
6-7-1 Nisisinjuku, Sinjuku-ku 160, Japan

(Received July 17, 1991 and accepted in revised form January 25, 1993)

I 緒 言

Interphotoreceptor-retinoid-binding-protein (IRBP)は、視紅サイクルで retinol と結合する糖蛋白質である。視細胞層の細胞間隙に存在し、これを完全アジュバンドと共に実験動物に接種すると、実験的自己免疫性ぶどう膜炎を引き起こすことが知られている^{1)~4)}。また IRBP は、その局在および生化学的性質が近似していることから、網膜可溶性抗原の1つである網膜 A 抗原と同一のものとされている⁵⁾。臨床においては、IRBP に対する自己免疫が深く関係すると考えられるぶどう膜網膜炎も報告⁶⁾⁷⁾されており、個体にもともと存在するこの網膜抗原が、何らかの外的もしくは内的要因に反応し、自己免疫反応を引き起こすことも考えられている。以前我々は、外的侵襲として、臨床的にも多く用いられる網膜光凝固および冷凍凝固を行った後に、網膜可溶性抗原であり、視細胞外節膜上に存在する網膜 S 抗原がどのように局在変化するかについて、免疫酵素抗体法間接法を用いて検索した。そして、凝固直後より S 抗原は速やかに減少し、漸次消失することを報告した⁸⁾⁹⁾。そして、この機序は組織凝固という外的侵襲による細胞膜の変化により S 抗原が遊離、消失したものと推察した。そこで、今回は IRBP について同様の実験を行い、その局在の変化と推移について検索し、S 抗原の場合と比較したので報告する。

II 実験材料と方法

1. 実験動物

眼底に異常のない体重 500 g 前後の正常有色モット 16 匹を用いた。

2. 凝固方法

Pentobarbital sodium (ネブタール®) 腹腔麻酔後、それぞれ 8 匹ずつ二群に分け、一群に汎網膜光凝固を、他群に経強膜的網膜冷凍凝固を行った。光凝固は、アルゴンレーザー光凝固装置 (Coherent 社) を用い、馬嶋式未熟児用二面鏡コンタクトレンズを使用して経瞳孔的に行った。凝固条件は、時間は 0.02 sec、直径 100 μm 、出力 0.05 W で、200 から 673 発照射した。冷凍凝固は、白内障用冷凍凝固装置 (Kelman 社 Mark II) を用い、輪部結膜を切開剝離し露出させた強膜上にチップを置き施行した。凝固時間は 1~2 sec で、網膜周辺部に 4~5 か所凝固斑を作った。

3. 免疫酵素抗体法

凝固直後、1日目、3日目、7日目にネブタール®の大量投与により安楽死させ、眼球を摘出した。直ちに摘出眼球を peridate-lysine-kalaformaldehyde (PLP) 液にて固定し、 -80°C で凍結包埋した。

凍結試料は Cryostat にて 8 μm に薄切し、スライドガラス上固定した後、10 mM 過ヨウ素酸水溶液、および 3 mM, NaBH_4 水溶液に反応させ内因性ペルオキシターゼ除去後、一次抗体として高野¹⁰⁾の方法に準じて作製した抗牛 IRBP 家兔血清 (1:40) を 40 分間、二次抗体として horseradish-peroxidase の標識抗家兔 IgG 山羊 IgG Fab' 分画 (1:50) を 40 分間、 37°C で浸透させて免疫酵素抗体法間接法を行った。水洗後、基質反応には 3-amino-9-ethylcalbazole (AEC) を使用し、ヘマトキシリンで染色した後、光学顕微鏡にて観察した。

対照として、一次抗体のかわりに正常家兔血清 (1:40) を用い同様の反応を行った。

III 結 果

1. 正常網膜

視細胞層に赤染する IRBP の陽性像が認められた (図 1)。

2. 光凝固術後

凝固直後では、外顆粒層は所々粗となり軽度の核の濃縮傾向が認められたが、網膜各層の細胞配列の乱れは認められなかった。IRBP の陽性像は正常網膜に類似していたが、外節部には空隙構造がみられ、抗 IRBP 抗体による染色性に濃淡があった。しかし、凝固部の外節部先端部では濃染する IRBP の陽性像が観察された (図 2 a)。

凝固後 1 日目では、凝固部の外顆粒層に網膜の構築の乱れが強く認められた。IRBP の陽性像は凝固部の色素上皮層に接した外節部に強く認められた (図 2 b)。

凝固後 3 日目では、1 日目と同様に、凝固部の色素上皮層に接した外節部に IRBP の陽性像が認められた (図 2 c)。

凝固後 7 日目では、凝固部の内外顆粒層の核構造は減少していた。IRBP の陽性像は 3 日目と同様に凝固部に対応する外節部に認められた。しかし、染色性は減少する傾向がみられた (図 2 d)。

3. 冷凍凝固術後

冷凍凝固直後では、視細胞層は一部破壊していた。

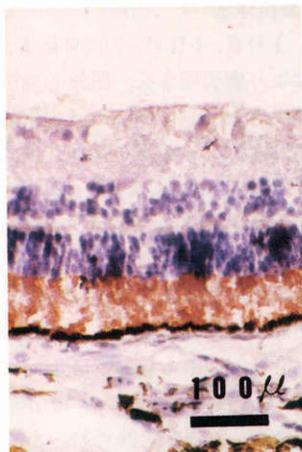


図1 免疫酵素抗体法間接法による正常網膜所見。視細胞層に IRBP を示す赤色の陽性像を認める。

IRBP の陽性像は、非凝固部では正常と同様の染色性がみられたが、凝固部における陽性像は著しく減少していた (図 3 a, b)。

凝固後 1 日目では、凝固部の網膜は全層が極めて強く破壊されていた。IRBP の陽性像は散在的に認められたが、その部位を同定することはできなかった (図 3 c)。

凝固後 3 日目では、凝固部の網膜では所々に円形の細胞核が認められるが、内外顆粒層が消失し、ほぼ無構造となっていた。IRBP 陽性像は凝固変性部と非凝固部網膜との境界部にごく軽度に認められた (図 3 d)。

凝固後 7 日目では、凝固部網膜層は萎縮し、非薄化した網膜には色素に富む大型の細胞も認められた。IRBP の陽性像は萎縮網膜には認められなかった。しかし、周囲の健全網膜部には認められた (図 3 e)。

4. 対照

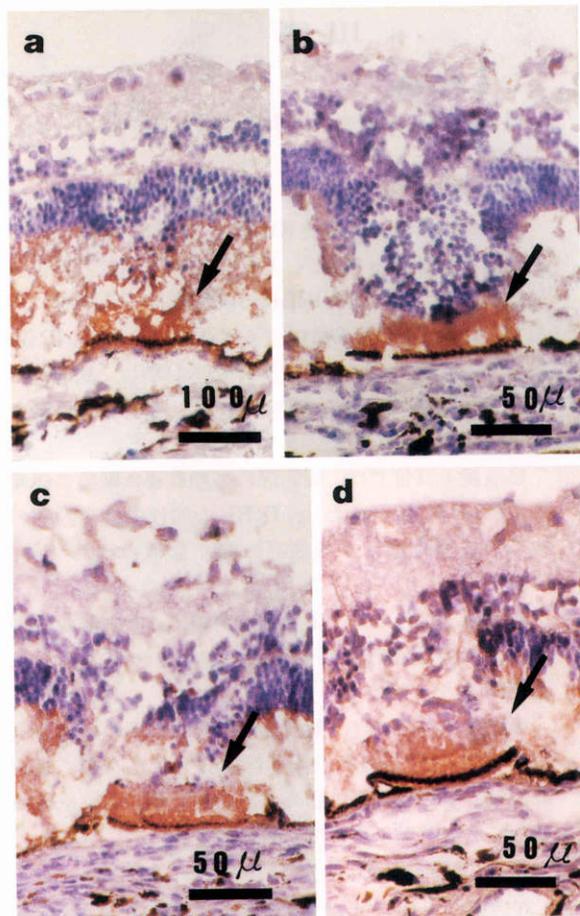
正常家兎血清を反応させた標本においては、光凝固ならびに冷凍凝固を施した網膜、また非凝固部の正常網膜ともに IRBP の陽性像は認められなかった。

IV 考 按

網膜視細胞間に存在する IRBP は、光凝固によってはその局在が変化することなく、凝固直後から 7 日経過しても認められた。一方冷凍凝固を行うと、凝固直後から視細胞の破壊に伴って、IRBP と対応する陽性像が減少しており、3 日以降では細胞の消失とともに全く認められなくなった。これらの結果を S 抗原の場合と比較してみると、次のような異同がみられた。すなわち、冷凍凝固後では S 抗原でも IRBP でも陽性反応は凝固直後から著しく減少し、あまり差異は認められなかったものの、光凝固後では S 抗原の陽性反応が直ちに消失したのに対して、IRBP では術後 7 日経過しても残存していた。この差異は S 抗原が視細胞および外節膜上に存在するのに対し、IRBP が視細胞間隙

図2 光凝固後の網膜所見。

a: 光凝固直後の網膜。視細胞外節部には陽性像と空隙構造が観察される (矢印)。b: 光凝固後 1 日目、光凝固された外節部に IRBP の陽性像が著しい (矢印)。c: 光凝固後 3 日目。光凝固 1 日目に比較して外顆粒層の障害が著しい。色素上皮層に接して IRBP の陽性像が認められる (矢印)。d: 光凝固後 7 日目。外顆粒層の消失は著しいが IRBP の陽性像は色素上皮層に接した外節部に認められる (矢印)。



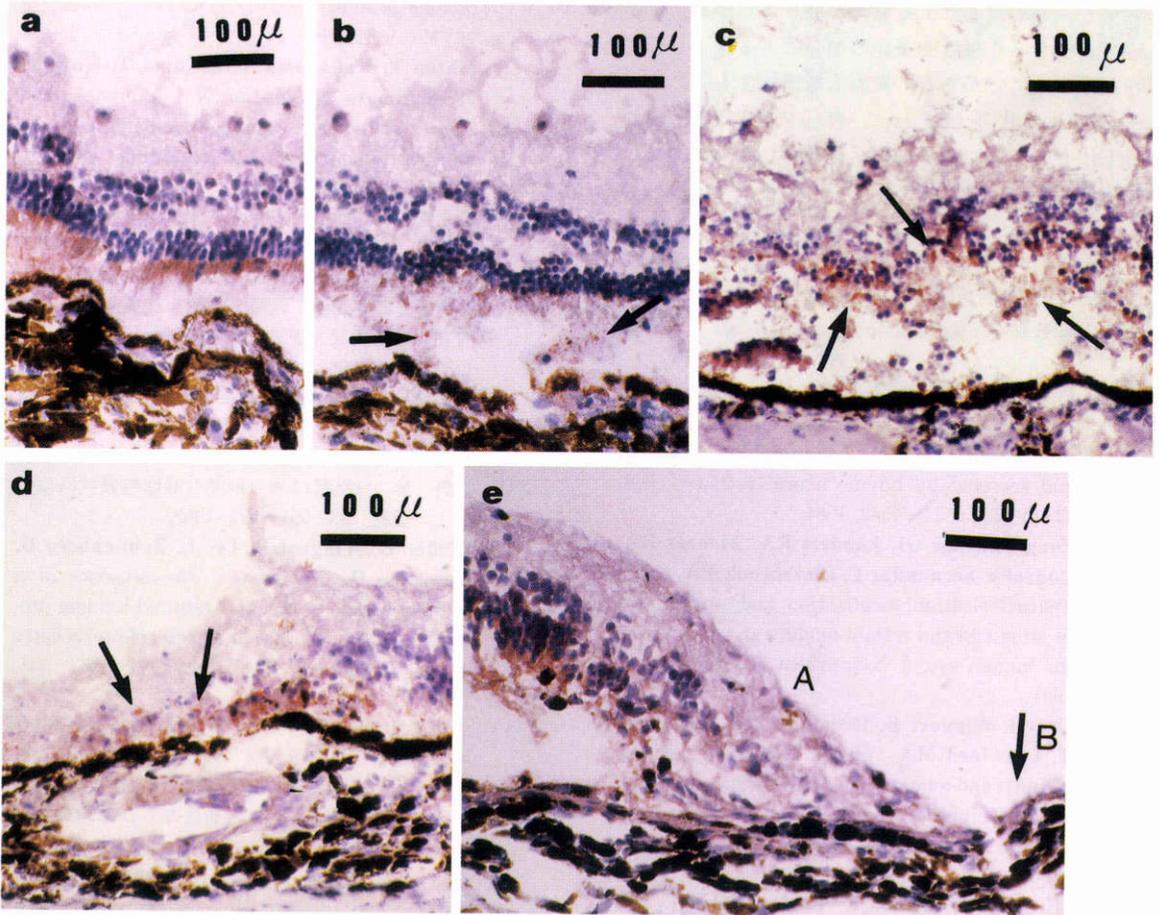


図 3 冷凍凝固後の網膜所見.

a: 冷凍凝固直後の網膜, 正常構造部(左)から凝固部(右)にかけての移行部, b: 冷凍凝固直後の網膜(凝固中心部), 冷凍凝固部は正常部に比較して網膜全層の障害が著しい. IRBP の陽性像は, 移行部では錐体杆体層の走行に沿ったようにハケ状に認められるが, 凝固部に向かって陽性像は減少し, 傷害の著しい中心部では陽性像自体も著しく低下している(矢印). c: 冷凍凝固後 1 日目, 内顆粒層から外節部にかけての構造は著しく破壊されており, IRBP の陽性像はわずかに散在するのみである. d: 冷凍凝固後 3 日目, 凝固境界部の外節と思われる部分の陽性像は極めて少ない. e: 冷凍凝固後 7 日目, (A: 辺縁部, B: 萎縮部) 冷凍凝固を施行した網膜は正常構造を欠き菲薄化し, 萎縮像を呈す. この部位では陽性像は認められない(矢印)が, 萎縮辺縁部の視細胞層では陽性像が認められる.

に存在する細胞外構成成分であることに起因するのではないかと考えられる. すなわち, 外的侵襲が加えられ細胞膜表面に何らかの変化が生じた場合, 視細胞膜に存在する S 抗原は視細胞の破壊により速やかに細胞膜から遊離し, 消失もしくはその抗原活性を失うが, IRBP は細胞膜と関連せず存在しているため, 凝固初期にはその影響を受けにくく, 細胞間隙にとどまるのではないかと考えられた. そして凝固を受けた局所で,

その生産母体である視細胞²¹⁾¹¹⁾が消失するに従い, 細胞間隙から IRBP も次第に消失するものと考えられた. また, 今回の光凝固と冷凍凝固後の結果の違いは, 色素上皮細胞を中心とする周囲網膜組織に熱凝固を起こす光凝固¹²⁾¹³⁾に対し, 網膜を構成する細胞全体を崩壊させる可能性のある冷凍凝固¹⁴⁾¹⁵⁾では, 網膜に対する傷害がそれだけ強く, 凝固直後から視細胞の消失とそれに伴って IRBP の消失が起こったと考えられた.

従来から過剰凝固による弊害が取りざたされ、過剰凝固に起因する術後眼内炎症の増強による種々の合併症を経験することがある。凝固術を施行する際には、網膜に対する影響とともに、自己抗体になりやすい IRBP や S 抗原に対する影響も考慮しなくてはならないと思われた。

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました東京医科大学白井正彦教授に深謝申し上げます。本研究の要旨は第 93 回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Fong SL, Liou GI, Landers RA, Alvarez RA, Bridge D: Purification and characterization of a retinol-binding glycoprotein synthesized and secreted by bovine neural retina. *J Biol Chem* 259: 6534-6542, 1984.
- 2) Fong SL, Liou GI, Landers RA, Alvarez RA, Gonzalez-Fernandez F, Glazebrook PA, et al: Characterization, localization, and biosynthesis of an interstitial retinol-binding glycoprotein in the human eye. *J Neurochem* 42: 1667-1676, 1984.
- 3) Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, et al: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1296-1300, 1986.
- 4) Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, Wiggert B, Redmond TM, Gery I: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* 104: 1698-1702, 1986.
- 5) 高村健太郎, 田中孝雄, 坂井潤一, 白井正彦: 網膜 A 抗原と IRBP (Interphotoreceptor retinoid binding protein) との同一性について. *日眼会誌* 91: 827-832, 1987.
- 6) Matuo T, Nakayama T, Koyama T, Koyama M, Fujimoto S, Motuo N: Immunological studies of uveitis 3 cell-mediated immunity to interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Jpn J Ophthalmol* 30: 487-494, 1986.
- 7) 松尾俊彦: 網膜抗原に対するぶどう膜炎患者のリンパ球幼若化反応. *日眼会誌* 91: 845-852, 1987.
- 8) 岩崎啄也, 野中茂久, 高村健太郎, 長谷見通子, 宇野有子, 白井正彦: 網膜 S 抗原の光凝固による眼内変化—照射後早期における変化—, *眼紀* 38: 1733-1739, 1987.
- 9) 谷口有子, 高村健太郎, 長谷見通子, 白井正彦: 冷凍凝固後の網膜 S 抗原の局在変化. *あたらしい眼科* 7: 1551-1554, 1990.
- 10) 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.
- 11) Pfeffer B, Wiggert B, Lee L, Zonnenberg B, Newsome D, Chader G: The presence of a soluble interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) in the retinal interphotoreceptor space. *J Cellular Physiology* 117: 333-341, 1983.
- 12) 大熊正人: 光凝固による網膜色素上皮細胞間結合の破壊と修復. *日眼会誌* 79: 258-268, 1975.
- 13) 土井治道, 三木弘彦: 強度光凝固(過剰凝固)による網膜変化についての蛍光眼底ならびに組織的研究. *眼紀* 31: 1329-1334, 1980.
- 14) Lincoff H, Kreissig I: The mechanism of the cryosurgical adhesion IV, Electron microscopy. *Am J Ophthalmol* 71: 674-689, 1971.
- 15) 加藤美代子, 後藤 治, 安藤文隆: 網膜冷凍凝固による血液網膜柵傷害の Vitreous Fluorometry による研究. *眼紀* 33: 2392-2399, 1982.