

# ぶどう膜網膜炎自然発症マウスにおける眼球および 松果体の単独あるいは併合摘出による効果

竹内 大<sup>1)</sup>, 田口 修<sup>2)</sup>, 市側 稔博<sup>1)</sup>, 坂井 潤一<sup>1)</sup>, 臼井 正彦<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>愛知県がんセンター病理部

## 要 約

BALB/c ノードマウスに F344 ラット 胎仔胸腺を移植し, 免疫能を獲得させると (TG ノードマウス), 眼球および松果体に局在する interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) を標的抗原としたぶどう膜網膜炎, 松果体炎が自然発症し, その血中には抗 IRBP 抗体が認められる. 今回我々は, その眼球および松果体に存在する IRBP の病変発症への関与について検討するために, 眼球および松果体の単独あるいは併合摘出した TG ノードマウスを作製し, その抗 IRBP 抗体を測定した. その結果, 眼球および松果体の IRBP はともに惹起

抗原として働いていること, そして眼の IRBP の方が松果体の IRBP より免疫原性および発病性が高いことが明らかとなった. また TG ノードマウスにおいて, 松果体を摘出することにより, 免疫系への影響なしにぶどう膜網膜炎の発症率が増加することを認めた. (日眼会誌 98: 234—239, 1994)

キーワード: ぶどう膜網膜炎, IRBP, 抗 IRBP 抗体価, 松果体炎, TG ノードマウス

## The Effect of Ocular and/or Pineal Body Removal in Mice with Spontaneously Developing Uveoretinitis

Masaru Takeuchi<sup>1)</sup>, Osamu Taguchi<sup>2)</sup>, Toshihiro Ichikawa<sup>1)</sup>  
Junichi Sakai<sup>1)</sup> and Masahiko Usui<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Tokyo Medical college

<sup>2)</sup>Department of Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute

## Abstract

Autoimmune uveoretinitis and pinealitis have been shown to develop spontaneously in BALB/c nude mice after their T cell function has been reconstituted by embryonic F344 rat thymus grafting (TG nude mice). Because anti-IRBP antibodies were detected in these mice, it was concluded that IRBP was the target antigen. In this study, we removed the eyes and/or the pineal body from TG nude mice, and examined anti-IRBP antibodies in their sera. It appeared that IRBP originating from the eyes and the pineal body were the immunogenic antigens in

the TG nude mice, but the IRBP from the eyes was found to be more immunogenic and pathogenic than that from the pineal body. We also found that the incidence of uveoretinitis increases with pinealectomy in TG nude mice, even though the immune system is not affected. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 234—239, 1994)

Key words: TG nude mice, Uveoretinitis, Pinealitis, IRBP, Anti-IRBP antibody

## I 緒 言

ラット胎仔胸腺移植ノードマウス(以下, TG ノードマウスと略す)には<sup>1)</sup>, 涙腺, 甲状腺, 胃などの内分泌臓器

における臓器特異的自己免疫病に加えて, 自己免疫性ぶどう膜網膜炎が自然発症する. 移植されたラット胎仔胸腺では TG ノードマウス内で正常な発育を示し, ラット, マウスに対する特異抗体で染色したところ, 胸腺上

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 竹内 大  
(平成 5 年 6 月 14 日受付, 平成 5 年 10 月 21 日改訂受理)

Reprint requests to: Masaru Takeuchi, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College. 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku Tokyo, 160, Japan

(Received June 14, 1993 and accepted in revised form October 21, 1993)

皮のみラット由来であり、髄質の樹状細胞、マクロファージ、リンパ球はすべてマウス由来であった。これにより胸腺内でのTリンパ球の分化成熟が正常に行われず、機能異常なTリンパ球が多く出現したため、またはサブレッサーT細胞が成熟できなかったため、自己免疫病が発症したと考えられている<sup>11)</sup>。しかし、このようなTリンパ球の異常による自己免疫病であるにもかかわらず、その血中には自己免疫病の発症とともに自己抗体が検出されることが明らかとなり、ぶどう膜網膜炎を発症しているTGヌードマウスの血清中にはIRBP (interphoto-receptor retinoid-binding protein)<sup>3)~5)</sup>と反応する自己抗体が存在することが確認された<sup>2)</sup>。IRBPはS抗原とともに、眼に存在する自己抗原とされており、完全フロインドアジュバンドとともにマウス<sup>6)</sup>、ラット<sup>7)</sup>、ウサギ<sup>8)</sup>、サル<sup>9)</sup>などの動物に免疫するとぶどう膜網膜炎を引き起こすことが知られている。近年、IRBPと同様のタンパクが松果体にも存在することが報告され、IRBPの免疫を行ったLewisラットにおいては、ぶどう膜網膜炎の他に松果体炎も発症していることが明らかとなった<sup>10)11)</sup>。TGヌードマウスにおいても、ぶどう膜網膜炎を発症しているマウスの一部には松果体炎も発症していたため、網膜および松果体に存在するIRBPがともにTGヌードマウスに認められるぶどう膜網膜炎および松果体炎の惹起抗原となっているかどうかについて検討を行った。さらに、松果体の機能には、日周期における神経内分泌系の調節<sup>12)</sup>などの他、神経内分泌による免疫系の調節にも関与していることが知られている。松果体を摘出したTGヌードマウスにおける抗IRBP抗体およびぶどう膜網膜炎の変化が、松果体内のIRBP除去によるものであるのか、松果体摘出による免疫系の変化によるものであるのか、またはその両方によるものであるのかを明らかにするために、TGヌードマウスと松果体摘出を行ったTGヌードマウスの免疫能を比較検討したので、惹起抗原の検索と合わせて報告する。

## II 実験方法

### 1. 動物

Chales River Japan から購入した1~2か月齢のBALB/cヌードマウスを用い、移植胸腺に用いたラット胎仔胸腺はF344ラットの14~15日齢胎仔の胸腺を用いた。そして、以下の方法で表1に示す5群を作製した。

#### 1) 眼球摘出

ピンセットで眼球を引き出し、はさみで視神経、眼動静脈を切断した後、綿球および軟膏で圧迫止血を行った。そして、眼球摘出をOcxで表した。

#### 2) 松果体摘出

頭部皮膚を切開剝離し、頭蓋骨を露出させ、大泉門を中心に頭蓋骨を三角形にカミソリ刃で切り出した。大泉門下の松果体をピンセットで摘出し、摘出後は切り出し

た頭蓋骨で覆い、皮膚を縫合した。そして、松果体摘出をPixで表した。

### 3) ラット胎仔胸腺移植

左側腹部の皮膚および腹膜を切開し、左腎臓を露出させ、腎皮膜に小切開を加えて、ラット胎仔から取り出した胸腺を2葉腎皮膜下に移植した。そして、胸腺移植をTGと表した。

手術はすべてペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) 0.001 ml/g の腹腔投与の麻酔下にて行われ、眼球、松果体の摘出術は胸腺を移植する2週間前に行った。

### 2. 抗IRBP抗体

胸腺移植群のマウスに対しては、胸腺移植後1か月目から6か月目まで1か月間隔にて採血を行った。そして無処置のヌードマウス群であるI群に対しても同時期に6回採血を行った。各血液中の抗IRBP抗体価は、牛の眼球から精製したIRBPを抗原として用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて判定した。すなわち、牛IRBPを96穴のmicro-plateに2 µg/ml, 200 ml/wellの条件にて吸着させ、5% fetal cows serum (FCS) によりブロッキングさせた後、被検血清を200~12,800倍まで希釈し、3穴洞一条件にて反応させた。そして、ペルオキシダーゼをラベルした抗マウスIgGヒツジ抗体を4,000倍希釈にて反応させ、分光光度計にて測定した。結果は3穴同一条件の492 nmにおける吸光度の平均が、同時期同希釈倍率のI群のマウス血清の平均より3倍以上高いときを陽性とした。

### 3. 組織学的検索

動物はすべて7~8か月齢で屠殺した。眼球および松果体を摘出し、パラフィンにて包埋後、切片をヘマトキシリンとエオジンで染色した。そして、組織学的検索を行った。

### 4. リンパ球増殖反応

胸腺移植後2~3か月经過したTG群、Pix+TG群のマウスを用いて、Tリンパ球の増殖因子であるconcanavalin A (Con A) およびBリンパ球の増殖因子であるlipopolysaccharide (LPS) に対するリンパ球増殖反応を行った。すなわち、それぞれのマウスの脾臓を取り出し、スリガラスを用いて細胞懸濁液とした後、ナイロンメッシュを通し、トリス塩化アンモニウムで溶血を行った。RPMI 1640にて3回洗浄後、培養液としてはRPMI 1640に2 mMのL-グルタミン、0.1 mMの非必須アミノ酸、100 µg/mlのストレプトマイシン、 $5 \times 10^{-5}$  Mの2-MEを加え、さらに牛胎仔血清を10%になるように加えたものを用いた。細胞を96穴のマイクロプレートに $5 \times 10^5/200 \mu\text{l/well}$ ずつ入れ、Con Aは2 µg/ml, LPSは20 µg/mlの濃度で刺激した。3穴同一条件にて72時間培養し、培養終了6時間前に $^3\text{H-TdR}$  (0.5 µCi/10 µl/well)を加え、シンチレーションカウンターで測定した。そして結果は、stimulation index (SI: 抗原添加群

における cpm の平均/抗原非添加群における cpm の平均) で表した。

### III 結 果

#### 1. 各群における血液中の抗 IRBP 抗体価陽性率

ELISA にて解析を行った各群の胸腺移植後 6 か月目における抗 IRBP 抗体陽性率は表 2 のごとくであった。眼球と松果体の両方を摘出した Ocx+Pix+TG 群のマウスには抗 IRBP 抗体は認められなかったが、眼球のみを摘出した Ocx+TG 群および松果体のみを摘出した Pix+TG 群のマウスにおいては、抗 IRBP 抗体が認められた。次に、胸腺移植後のその抗体陽性率の推移をみたのが図 1 である。Ocx+TG 群のマウスにおける抗 IRBP 抗体の出現時期は胸腺移植後 5 か月目と遅く、また 6 か月目の抗 IRBP 抗体陽性率も 20% と低かった(図

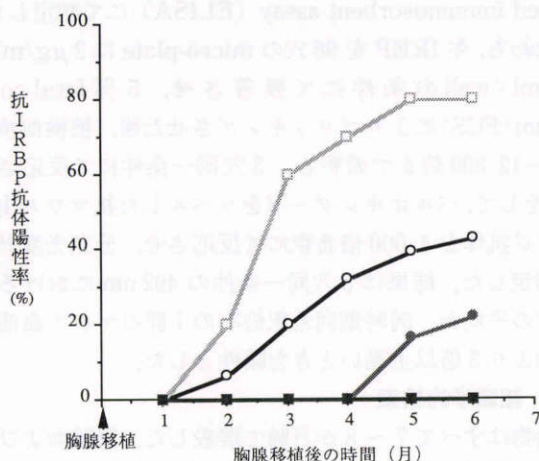


図 1 ラット胎仔胸腺移植マウス群における抗 IRBP 抗体陽性率の推移。

ラット胎仔胸腺を移植しただけのヌードマウス (TG 群) における抗 IRBP 抗体は、胸腺移植後 2 か月目から出現しはじめ、6 か月目においては 43.8% のマウスに認められている。眼球摘出後にラット胎仔胸腺を移植したヌードマウス (Ocx+TG 群)、および松果体摘出後にラット胎仔胸腺を移植したヌードマウス (Pix+TG 群) においても抗 IRBP 抗体が認められているが、眼球および松果体摘出後にラット胎仔胸腺を移植したヌードマウス (Ocx+Pix+TG 群) においては認められていない。

白丸：TG 群，黒丸：Ocx+TG 群，白四角：Pix+TG 群，黒四角：Ocx+Pix+TG 群

表 1 各マウス群およびその匹数

| 群          | 匹数 |
|------------|----|
| I          | 7  |
| TG         | 32 |
| Ocx+TG     | 18 |
| Pix+TG     | 10 |
| Ocx+Pix+TG | 8  |

表 2 各群における胸腺移植後 6 か月目の抗 IRBP 抗体陽性率

| 群          | 抗体陽性マウス/各群マウス (%) |
|------------|-------------------|
| TG         | 14/32(43.8)       |
| Ocx+TG     | 4/18(22.2)        |
| Pix+TG     | 8/10(80.0*)       |
| Ocx+Pix+TG | 0/8(0)            |

\*TG 群に認められた抗 IRBP 抗体陽性率と比較して、t 検定により  $p < 0.05$  で有意に上昇していた。

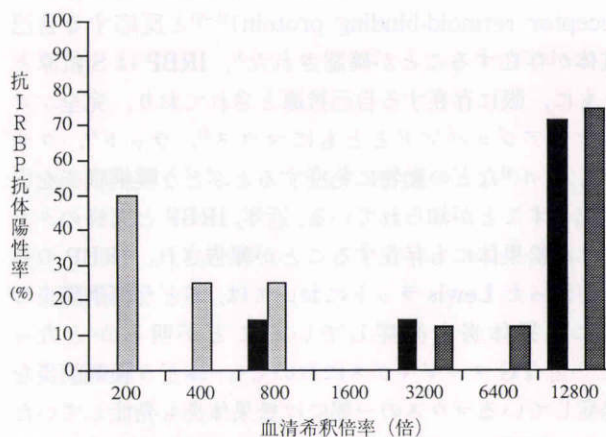


図 2 抗 IRBP 抗体陽性マウス群における各抗 IRBP 抗体価陽性率。

ラット胎仔胸腺を移植しただけのヌードマウス (TG 群)、および松果体摘出後にラット胎仔胸腺を移植したヌードマウス (Pix+TG 群) における抗 IRBP 抗体価は、高抗体価であるにもかかわらず、眼球摘出後にラット胎仔胸腺を移植したヌードマウス (Ocx+TG 群) におけるその抗体価は低抗体価である。

黒：TG 群，薄網：Ocx+TG 群，濃網：Pix+TG 群

1, 表 2)。しかし、Pix+TG 群のマウスにおける抗 IRBP 抗体は、胸腺移植後早期から急激な上昇を示し(図 1)，胸腺移植後 6 か月目のその抗体陽性率は 80% と TG 群のマウスに比べてかえって高い傾向 ( $p < 0.05$ ) を示した(図 1, 表 2)。そして、胸腺移植後 6 か月目における各群の抗 IRBP 抗体陽性マウスの抗 IRBP 抗体価を示したのが図 2 である。Ocx+TG 群のマウスにおける抗 IRBP 抗体価は、200~800 倍と抗体価自体も低い傾向を示したが、Pix+TG 群のマウスにおける抗 IRBP 抗体価は、TG 群のマウスと同様に 10,000 倍以上の高抗体価を示すマウスが 80% 近くに認められた。

#### 2. TG ヌードマウスに認められるぶどう膜網膜炎および松果体炎と各群におけるその病変発症率

胸腺移植後 6 か月目の TG ヌードマウスに認められたぶどう膜網膜炎を図 3a に、そして松果体炎を図 3b に示す。ぶどう膜網膜炎は、網膜からぶどう膜にかけてのリンパ球を主とした細胞浸潤、網膜血管周囲炎、網膜剝離、脈絡膜の肥厚などの多彩な病変を呈していたが(図

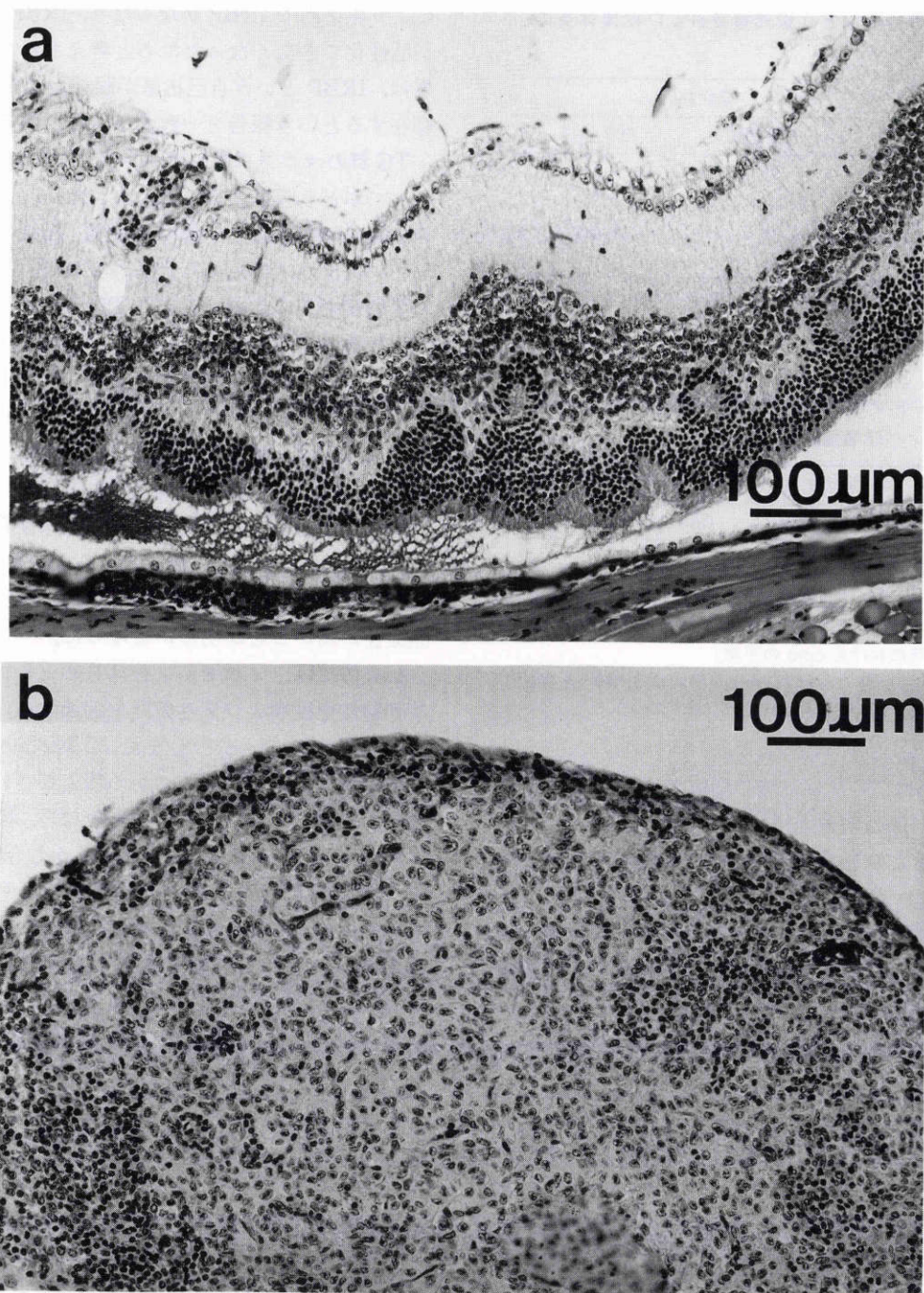


図3 TG ヌードマウスにおける胸腺移植 6 か月目のぶどう膜網膜炎および松果体炎の組織像 (H-E 染色).  
a: ぶどう膜網膜炎の光学顕微鏡像. 網膜からぶどう膜炎にかけての広汎なリンパ球を主とした浸潤, 網膜血管周囲炎, 網膜剝離, 脈絡膜の肥厚などが認められる. b: 松果体炎の光学顕微鏡像. 局所的なリンパ球浸潤のみが認められる.

3 a), 松果体炎は局所のリンパ球浸潤に局限していた(図 3 b). 各群におけるぶどう膜網膜炎および松果体炎の発症率を表 3 に示す. TG 群においては, 血中抗 IRBP 抗体陽性マウスのすべてにぶどう膜網膜炎が認められ, ぶどう膜網膜炎陽性率は抗 IRBP 抗体陽性率と一致していた. そして, そのうちの 11.2%には松果体炎も合併していた. しかし, ぶどう膜網膜炎がなく松果体炎のみを発症していたマウスは認められなかった.

Pix+TG 群においてはぶどう膜網膜炎が, Ocx+TG 群においては松果体炎とともに抗 IRBP 抗体陽性率に一致して認められ, その組織像も図 3 a, b に類似したものであった. また, Pix+TG 群におけるぶどう膜網膜炎発症率も, 抗 IRBP 抗体陽性率に一致して TG 群より高値であった.

### 3. 松果体摘出による免疫系への影響

松果体摘出による TG ヌードマウスの免疫系への影

表3 各群におけるぶどう膜網膜炎および松果体炎の発症率

| 群      | 発症数(%)  |       |
|--------|---------|-------|
|        | ぶどう膜網膜炎 | 松果体炎  |
| I      | 0       | 0     |
| TG     | 14(43)  | 4(12) |
| Ocx+TG | —       | 4(22) |
| Pix+TG | 8(80*)  | —     |

\*TG群に認められたぶどう膜網膜炎発症率と比較して、t検定により  $p < 0.05$  で有意に上昇していた。

表4 TGヌードマウスおよびPix+TGヌードマウスにおけるリンパ球増殖反応(SI)

|     | TGヌードマウス   |           | Pix+TGヌードマウス |           |
|-----|------------|-----------|--------------|-----------|
|     | Con A      | LPS       | Con A        | LPS       |
| 実験1 | 30.1±2.38* | 15.4±1.28 | 28.4±3.12    | 17.2±1.42 |
| 実験2 | 25.5±1.66  | 13.6±1.12 | 26.3±2.01    | 14.3±1.31 |

\*：平均値±標準偏差 (SI：抗原添加群におけるcpmの平均/抗原非添加群におけるcpmの平均)

各実験の抗原非添加群におけるcpmの平均は3,000～4,000であった。

響を調べるために、Tリンパ球の増殖因子であるCon AおよびBリンパ球の増殖因子であるLPSを用いて、TGヌードマウスおよび松果体摘出後に胸腺移植を行ったTGヌードマウス(Pix+TGヌードマウス)のリンパ球について増殖試験を行った。その結果を表4に示す。結果は両マウスともに強く増殖因子に反応を示し、両増殖因子に対する反応には有意差は認められなかった。

#### IV 考 按

TGヌードマウスに認められる自己抗体は、自己免疫病を惹起する自己反応性T細胞が各種臓器の標的抗原を認識し、その活性化に伴うサイトカインの分泌からB細胞も活性化され、産生される。したがって、抗IRBP抗体はIRBP反応性T細胞の活性化を反映していると考えられる。今回、この抗IRBP抗体が、眼球を摘出した後に胸腺を移植したTGヌードマウス(Ocx+TG群)および松果体を摘出した後に胸腺を移植したTGヌードマウス(Pix+TG群)においても認められ、また抗IRBP抗体陽性率に一致してOcx+TG群のマウスには松果体炎が、そしてPix+TG群のマウスにはぶどう膜網膜炎が認められた(表3)。これらのことから、抗IRBP抗体はぶどう膜網膜炎および松果体炎の発症を反映しており、また眼のIRBPはぶどう膜網膜炎における、松果体のIRBPは松果体炎における惹起抗原となっていることが明らかとなった。一方、眼球および松果体の両方を摘出した後に胸腺を移植したTGヌードマウス(Ocx+Pix+TG群)において抗IRBP抗体が認められなかったのは(表2)、眼球および松果体の両方を摘出したこと

により生体内のIRBPがなくなり、IRBP反応性T細胞が活性化できなくなったためと考えられた。またこの結果は、IRBPという自己抗原が眼球および松果体のみに存在するという報告と一致するものである。

TG群のマウスにおいては、抗IRBP抗体陽性率と一致してぶどう膜網膜炎は認められたが、松果体炎はその約1/4のマウスにしか認められず、松果体炎のみを発症していたマウスは認められなかった(表3)。また、ぶどう膜網膜炎のみが認められるPix+TG群のマウスの方が、松果体炎のみが認められるOcx+TG群のマウスに比べて、表2、図2に示すように、抗IRBP抗体の陽性率、抗体価ともに高い傾向を示した。そして組織像においても(図3)、眼病変は網膜から脈絡膜にかけての広汎なリンパ球浸潤を呈していたのに対して、松果体病変は血管炎を中心とした局所的なリンパ球浸潤に留まっていた。この原因に関しては今後のさらなる検討を要するが、眼のIRBPの方が松果体のIRBPより免疫原性および発症性が高いことが明らかとなった。

松果体には、メラトニンをはじめとしたホルモンにより細胞性免疫および液性免疫を調節する作用があるという報告がされている<sup>13)14)</sup>。また、松果体摘出による免疫系への影響についてもいくつかの報告がされているが、免疫能を亢進するというものもあれば<sup>15)</sup>、抑制するというものもあり<sup>16)</sup>、さまざまである。しかし今回、TGヌードマウスと松果体を摘出した後に胸腺を移植したPix+TGヌードマウスの免疫能を比較検討したところ、T細胞増殖能およびB細胞増殖能に差異は認められなかった(表4)。また、結果には示さなかったが、TGヌードマウスにおける甲状腺炎、胃炎、卵巣炎などの他臓器における自己免疫病の発症率も、TGヌードマウスとPix+TGヌードマウスとの間で有意差は認められなかった。これらのことから、松果体を摘出したPix+TG群における抗IRBP抗体陽性率ならびにぶどう膜網膜炎の発症率がTG群に比べて明らかに高かったのは(表3)、松果体摘出による免疫系の変化を除外した何らかの因子による可能性が高いことが示唆された。

今回の研究により、眼球および松果体のIRBPはどちらも惹起抗原として働いていること、眼球のIRBPの方が松果体のIRBPより免疫原性および発症性が高いことが明らかとなった。また、TGヌードマウスにおいては、松果体を摘出することによっても、免疫系への影響を起こすことなくぶどう膜網膜炎の発症率が増加することを認めた。

#### 文 献

- 1) 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 165: 60-71, 1986.

- 2) **Ichikawa T, Taguchi O, Takahashi T, Ikeka H, Takeuchi M, Tanaka T, et al:** Spontaneous development of autoimmune uveoretinitis in nude mice following reconstitution with embryonic rattymus. *Clin Exp Immunol* 86: 112—117, 1991.
- 3) **Takano S, Yajima S, Matsushima T, Takamura K, Usui M:** Specific nature of retinal A-antigen and its localization. *Advances in Immunology and immunopathology of the Eye*. In: GR O'Connor et al (Eds): 237—241, 1985.
- 4) **Chader GJ, Wiggert B:** Interphotoreceptor retinoid-binding protein. Characteristics in bovine and monkey retina. *Vision Res* 24: 1605—1614, 1984.
- 5) **Chader GJ:** Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): A model prote in for molecular biological and clinically relevant studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 7—22, 1989.
- 6) **Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader BJ, Rozensajn LA, et al:** A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140: 1490—1495, 1988.
- 7) **Gery I, Mochizuki M, Nussenblatt RB:** Retinal specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. *Prog Retinal Res* 5: 75—102, 1986.
- 8) **Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Saari JC:** Uveoretinitis in rabbits following immunization with IRBP. *Exp Eye Res* 44: 425—438, 1987.
- 9) **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.
- 10) **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.
- 11) **Broekhuysse RM, Winkens HJ, Kuhlman ED:** Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Curr Eye Res* 5: 231—240, 1986.
- 12) **Brown GM, Niles LP:** Studies on melatonin and other pineal factors. In: GM Besser et al (Eds): *Clinical Neuroendocrinology*, Vol. 2, Academic Press New York, 205—253, 1982.
- 13) **Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W:** Role of the pineal gland in immunity: II Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol* 68: 384—391, 1987.
- 14) **Maestroni GJ, Conti A:** The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1+ cells to release opioid agonist with immunoenhancing and anti-stress properties. *J Neuroimmunol* 28: 167—176, 1990.
- 15) **Rella W, Lapin V:** Immunocompetence of pinealectomized and simultaneously pinealectomized and thymectomized rats. *Oncology* 33: 3—6, 1976.
- 16) **Gobbo, V, Libri V, Villani N, Calio R, Nistico G:** Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmac* 11(5): 567—573, 1989.