

## 原田病における自己免疫性物質の研究

近藤 功, 山形 和正, 山木邦比古, 櫻木 章三

秋田大学医学部眼科学教室

### 要 約

培養ヒトメラノーマ細胞を用いて、原田病を惹起する自己免疫性物質の解析を行った。初めに培養ヒトメラノーマ細胞から抽出した可溶性蛋白をゲル濾過し、分子量ごとに分画した抗原を作成し、原田病患者リンパ球と増殖試験を施行した。次に、この可溶性蛋白を液体等電点電気泳動によって分離し、等電点別の抗原を作成し、患者リンパ球と増殖試験を施行した。その後、反応の見た等電点の分画をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、さらに、ゲルから電気泳動的に単一の蛋白を抽出して、患者リンパ球と増殖試験を施行した。その結

果、培養ヒトメラノーマ細胞 G-361 蛋白の中の等電点約 6.0、分子量約 75 kDa のペプチドに対して原田病患者リンパ球の増殖が見られた。以上から、このペプチドが原田病に特異的な抗原性物質と推測された。(日眼会誌 98:596-603, 1994)

キーワード：原田病, 培養ヒトメラノーマ細胞, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動, 液体等電点電気泳動, 自己免疫性物質

## Analysis of the Candidate Antigen for Harada's Disease

Isao Kondo, Kazumasa Yamagata, Kunihiko Yamaki and Shozo Sakuragi

Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine

### Abstract

The candidate antigen for Vogt-Koyanagi-Harada's (VKH) disease was isolated from cultured human melanoma cells (G-361). First, the soluble protein from the melanoma cells was separated into several fractions according to the molecular weight by gel filtration. In each fraction, the antigenicity was analysed by lymphocyte proliferation assay using peripheral blood lymphocytes (PBLs) from VKH disease patients. Then the positive fractions were further separated by liquid isoelectrofocusing followed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In the liquid isoelectrofocusing fractions, the fraction at about pH 6.0 contained the antigenic protein. The

protein from the 75 kDa band on the SDS-PAGE of this fraction was able to cause proliferation of the PBLs from the VKH disease patients. Thus, it appears that the 75 kDa protein of pH 6.0 isoelectrofocusing point was the specific autoimmune antigen for VKH disease. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:596-603, 1994)

Key words: Vogt-Koyanagi-Harada's disease, Cultured human melanoma cells, SDS-PAGE, Liquid isoelectrofocusing, Autoimmune antigen

## I 緒 言

原田病は脈絡膜および全身のメラノサイトに対する細胞性免疫を主体とした自己免疫性疾患と考えられているが<sup>1)</sup>、その起因为物質、すなわち抗原物質の解析は未だ全く行われていない。原田病だけでなく自己免疫疾患を研究するうえで、これを惹起する抗原の解析は極めて重要な

位置を占めている。以上の目的から、原田病を惹起する抗原物質の解析を培養ヒトメラノーマ細胞を用いて行ったので報告する。

別刷請求先：010 秋田県秋田市本道1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 近藤 功

(平成5年8月26日受付, 平成6年1月19日改訂受理)

Reprint requests to: Isao Kondo, M.D. Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita-shi, Akita-ken 010, Japan.

(Received August 26, 1993 and accepted in revised form January 19, 1994)

## II 方 法

### 1. 培養ヒトメラノーマ細胞における抗原性物質の存在

#### 1) 対 象

秋田大学医学部眼科を受診し、臨床的に本症の診断を受けた男性7例、女性3例の計10例(平均51.1歳)を対象とした(表1)。全例ステロイド剤の全身投与前に採血した。また、正常対照群として健康人5例を用いた。

#### 2) 抗原性物質の作成

培養ヒトメラノーマ細胞はG-361とWM-115を用い、それぞれ10%ウシ胎児血清(Hyclone社, USA)加McCoy 5A培地(Flow Laboratories社, USA), 10%ウシ胎児血清加Eag1 MEM培地(日水製薬)で37°C, 5.0% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。回収した1.0~2.0×10<sup>8</sup>個の細胞を0.15 M NaCl-0.01 M トリス緩衝液(TBS, pH 7.4)で洗浄し、細胞浮遊液を作成した。この浮遊液を数回凍結、融解を繰り返した後、超音波破碎装置で細胞を破壊し、得られた懸濁液を18,000 rpmで90分間遠心し、その上清を採取した。上清をSephacryl S-300(Pharmacia社, Sweden)カラムでゲル濾過し、各分画を分子量ごとに集め濃縮して、G-361, WM-115それぞれの分子量分画抗原とした。

#### 3) リンパ球の分離

原田病患者および健康人から採血したヘパリン加静脈血からFicoll-Conray比重遠心法(Ficoll-Paque, Pharmacia社, Sweden)<sup>2)</sup>でリンパ球を分離し、15%ウシ胎児血清加RPMI 1640培地(日水製薬)に浮遊させ、半量はリンパ球増殖試験に直ちに使用した。残りは、ヒトインターロイキン-2(IL-2, Collaborative Research社, USA)を加えた培地で2週間培養した後、リンパ球増殖試験に用いた。IL-2の添加は、24ウェルプレート(Coster社, USA)の各ウェルにリンパ球が1.0×10<sup>6</sup>個/ml培地となるように調整したのち、初回刺激量として1ウェルあたり300 U加え、3日後に維持量として30 U/ml培地となるようにした培地に交換し、以後同様の操作を繰り返す方法で行った。

表1 対象患者

症例	年齢	性	病型	HLA
1	33	男	遷延例	DR 4
2	32	男	新鮮例	DR 4, DR 9
3	46	男	再発例	DR 4
4	57	男	新鮮例	DR 4, DR 2
5	70	男	遷延例	DR 4
6	69	女	遷延例	DR 4
7	42	男	新鮮例	DR 4
8	64	女	新鮮例	DR 2, DR 9
9	41	男	再発例	DRw 9
10	57	女	新鮮例	DR 4, DRw 6

#### 4) リンパ球増殖試験

リンパ球と抗原を96ウェルマイクロプレート(Falcon社, USA)に分注し、37°C, 5.0% CO<sub>2</sub>の条件下で4日間培養した。各ウェルにリンパ球は1.0~3.0×10<sup>5</sup>個、抗原は30~50 μgとなるようにし、培養終了24時間前に<sup>3</sup>H-チミジンを1 μCiずつ添加した。培養終了後、cell harvester(Labo Mash社, USA)を用いてリンパ球をガラスファイバーフィルター上に採取し、シンチレーションカウンターで<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを測定した<sup>3)</sup>。各症例ともtriplicateで測定し、その平均値で判定した。

### 2. 培養ヒトメラノーマ細胞G-361における抗原性物質の解析

#### 1) G-361のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動

G-361蛋白のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)と二次元電気泳動を行った。SDS-PAGEは、sodium dodecyl sulfate(SDS)を含む10%ゲル(サイズ160×160×1 mm)で行った。二次元電気泳動はO'Farrelの方法<sup>4)</sup>に従い、一次元目は直径2.5 mmのガラス管を用いて2%アンフォライン(pH 5/7:pH 3/10=4:1, Pharmacia社, Sweden)を含む4%ゲルでisoelectric focusingを行い、二次元目にはSDS-PAGE(サイズ160×160×2 mm)を行った。

#### 2) 抗原性物質の等電点

G-361(約1.0×10<sup>9</sup>個)をTBSで洗浄し、前述の方法でホモゲナイズし、上清を採取した。さらに、純水30 mlを加え、総量約50 mlとした(蛋白量200 mg)。これにBio-Lyte ampholytes pH 3/10(BIO-RAD社, USA)を2.5 ml加え、ロトフォア(BIO-RAD社, USA)を用いて液体等電点電気泳動を行った。陽極に0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を、陰極に0.1 M NaOHを電極液として用い、12 W定電力で電圧がプラトーに達するまで行った。泳動終了後、付属の分取装置で20本の試験管に回収し、各分画の蛋白量およびそれぞれのpHを測定した。次に、この20分画についてSDS-PAGEを行い、SDS-PAGEパターンに従い、できる限り同じ成分が同一の分画中に含まれるように、上記の20分画を8分画(No. 1~8)へ再分画した。こうして得られた8分画を濃縮した後、ampholytesを除去するため、始めに1 M NaClで、次にTBSで数回液を交換しながら透析し、G-361の等電点別抗原とした。この抗原とIL-2刺激を行ったリンパ球を用い、増殖試験を行った。

#### 3) 抗原性物質の分子量

2)の実験で反応の見られた等電点別抗原から、分子量50~70 kDa近傍のバンドをゲルから抽出するために以下の操作を行った。反応が得られた等電点別抗原の全量についてSDS-PAGE(10%ゲル, サイズ160×160×2 mm)を施行し、泳動終了後、0.25%クマシーブルーで10分間染色、50%エタノールで脱色してバンドを検出し

た。ゲルを蒸留水で洗浄し、バンドを切り出し、同一のバンドを採取して、electrophoretic sample concentrator (model 1750, ISCO 社, USA) を用いてゲルからバンドを電気泳動的に抽出した。抽出は3W定電力で6~8時間行い、電極液にはSDS-PAGEと同じ電極液を使用した。また、各バンドが抽出されていることを確認するため、抽出された溶液についてSDS-PAGEを行った。溶出された各バンドについてSDSを除去するため、セントリコン-30 (Amicon 社, USA) を用いてTBSを加えながらバッファー交換と濃縮操作を行い、その後TBSに対して透析を行って、G-361の単一ペプチドごとの抗原とした。この抗原とIL-2刺激を行った患者

リンパ球を用いて増殖試験を施行した。

### III 結果

#### 1. 培養ヒトメラノーマ細胞における抗原性物質の存在

IL-2刺激を行わなかった患者リンパ球のG-361の分子量分画抗原、WM-115の分子量分画抗原に対するstimulation index (以下、SIと略す)を表2、3に示した。前者では6例、後者では4例で施行したが、いずれの抗原に対してもSIの有意な上昇は認められなかった。また、正常対照群においてもSIの上昇は見られなかった(表4、5)。なお、陽性対照としてPHA(15 µg/

表2 G-361分子量分画抗原とIL-2刺激を行わない患者リンパ球でのproliferation assay

症例	G-361分子量分画抗原 分子量(10 kDa)								PHA	ConA
	30~20	20~15	15~10	10~8	8~6	6~4	4~2	2~		
1	0.85	0.73	0.91	1.18	0.47	0.67	0.71	0.93	10.1	13.7
2	0.67	0.68	0.46	0.62	0.65	0.66	0.43	0.66	15.7	21.2
3	0.51	0.53	0.48	0.52	0.62	0.55	0.53	0.71	7.5	9.2
4	0.73	0.76	0.73	0.58	0.54	0.61	0.65	0.59	21.5	17.3
5	0.67	0.96	0.73	0.96	0.71	1.15	0.58	0.80	58.7	39.7
6	0.71	0.87	1.03	0.90	1.21	1.11	1.02	0.85	19.5	21.9
9	0.89	1.28	1.16	1.02	1.25	1.10	1.26	0.92	19.0	11.5

表3 WM-115分子量分画抗原とIL-2刺激を行わない患者リンパ球でのproliferation assay

症例	WM-115分子量分画抗原 分子量(10 kDa)						PHA	ConA
	30~20	20~9	9~6	6~4	4~3	3~		
1	0.94	0.73	0.78	0.65	0.93	0.59	10.1	17.2
3	0.70	0.93	0.79	0.58	0.55	0.54	8.5	11.9
4	0.87	1.11	1.05	0.94	0.72	0.85	9.3	10.5
9	0.88	1.03	0.89	1.06	0.80	0.79	6.8	8.8

表4 G-361分子量分画抗原とIL-2刺激を行わない健常人リンパ球でのproliferation assay

健常人	G-361分子量分画抗原 分子量(10 kDa)								PHA	ConA
	30~20	20~15	15~10	10~8	8~6	6~4	4~2	2~		
1	1.11	0.75	0.98	0.67	0.62	0.69	0.86	0.73	31.5	28.7
2	1.15	0.59	0.93	0.77	0.81	0.64	0.57	0.66	27.9	19.7
3	1.05	1.41	1.28	1.36	0.75	0.93	0.98	0.80	49.1	50.1
4	1.18	0.91	1.27	0.67	0.79	0.66	1.31	0.63	44.5	32.9
5	1.22	1.25	1.18	0.88	0.68	0.75	0.85	0.64	69.3	33.9

表5 WM-115分子量分画抗原とIL-2刺激を行わない健常人リンパ球でのproliferation assay

健常人	WM-115分子量分画抗原 分子量(10 kDa)						PHA	ConA
	30~20	20~9	9~6	6~4	4~3	3~		
1	1.16	1.11	0.64	1.09	0.77	0.80	52.6	33.9
2	1.19	0.67	0.57	1.14	0.63	0.67	54.8	29.9
3	1.11	1.50	0.63	1.28	0.98	1.19	46.6	18.9
4	1.14	1.57	1.20	1.37	1.36	1.05	39.5	27.7
5	1.12	1.34	1.24	1.34	0.99	0.71	66.5	18.0

表 6 G-361 分子量分画抗原と IL-2 刺激を行った患者リンパ球での proliferation assay

症例	G-361 分子量分画抗原 分子量(10 kDa)						PHA	ConA
	30~20	20~9	9~7	7~5	5~3	3~		
1	1.25	1.70	1.05	<u>2.27</u>	1.01	1.02	75.3	51.5
2	0.90	1.07	1.46	<u>2.50</u>	1.67	1.20	36.3	20.5
3	1.12	1.08	1.09	<u>3.01</u>	1.22	1.21	75.5	53.7
4	0.70	1.10	0.68	<u>2.83</u>	1.23	1.33	87.6	46.9
5	0.61	0.80	0.79	<u>2.85</u>	0.69	1.23	52.7	60.4
6	1.14	1.71	0.94	1.88	0.90	1.51	27.7	17.2
9	1.08	1.49	1.39	1.11	1.44	0.86	42.1	35.4

表 7 WM-115 分子量分画抗原と IL-2 刺激を行った患者リンパ球での proliferation assay

症例	WM-115 分子量分画抗原 分子量(10 kDa)						PHA	ConA
	30~10	10~8	8~6	6~4	4~3	3~		
1	1.50	1.02	1.40	0.94	0.89	1.21	95.4	73.9
2	1.26	1.46	1.17	<u>2.97</u>	1.19	1.63	50.2	39.9
3	1.23	1.16	1.12	0.98	0.96	1.19	53.2	62.1
4	1.11	1.51	<u>2.52</u>	1.90	0.88	1.40	93.7	47.0
5	0.84	1.43	1.32	1.02	0.94	1.08	87.3	83.7
6	0.85	0.96	0.67	<u>2.60</u>	1.24	1.31	42.5	50.2
9	0.74	1.18	0.73	1.05	0.85	1.01	61.9	47.2

表 8 G-361 分子量分画抗原と IL-2 刺激を行った健常人リンパ球での proliferation assay

健常人	G-361 分子量分画抗原 分子量(10 kDa)						PHA	ConA
	30~20	20~9	9~7	7~5	5~3	3~		
1	0.89	0.61	0.69	0.91	0.77	1.33	34.9	18.9
2	1.51	1.03	0.88	1.34	0.75	1.45	50.1	46.8
3	0.99	0.59	0.79	0.81	1.23	0.81	61.0	21.5
4	1.25	1.21	1.09	1.56	0.91	0.88	63.3	54.3
5	1.41	1.00	0.95	0.86	0.77	0.94	49.1	48.3

表 9 WM-115 分子量分画抗原と IL-2 刺激を行った健常人リンパ球での proliferation assay

健常人	WM-115 分子量分画抗原 分子量(10 kDa)						PHA	ConA
	30~10	10~8	8~6	6~4	4~3	3~		
1	1.01	1.34	1.52	1.80	0.99	1.31	68.9	56.3
2	1.52	1.36	1.37	1.09	1.01	1.33	55.0	49.3
3	1.33	0.96	0.92	0.98	0.99	1.39	63.2	61.9
4	1.21	1.51	0.71	0.85	0.83	0.69	35.5	30.9
5	0.94	1.33	1.21	0.92	0.84	0.98	71.2	60.9

ml), ConA (50  $\mu$ g/ml) 添加時の SI を示したが, ともに著明な上昇が見られた.

一方, IL-2 刺激を行ったリンパ球では, G-361 の分子量分画抗原に対して, 患者 7 例中 5 例において, いずれも分子量 50~70 kDa の分画でリンパ球の増殖が見られ, SI は 2.0 以上であった(表 6). 5 例の内訳は, 新鮮例が 2 例, 再発例が 1 例, 遷延例が 2 例で病型による差は認められなかった. WM-115 の分子量分画抗原についても

患者 7 例で検討したが, 1 例が分子量 60~80 kDa の分画で, 2 例が分子量 40~60 kDa の分画で反応を示した(表 7). また, 正常対照群では, G-361, WM-115 のいずれの分子量分画に対しても反応は認められなかった(表 8, 9).

## 2. 培養ヒトメラノーマ細胞 G-361 における抗原性物質の解析

### 1) G-361 の電気泳動パターン

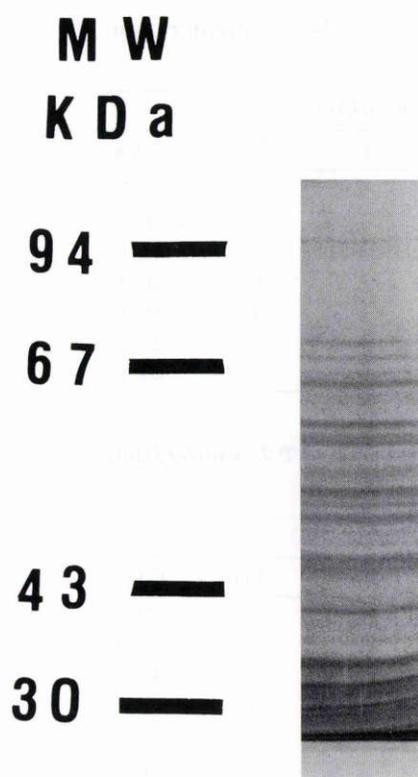


図1 G-361から抽出した蛋白質の可溶性成分の SDS-PAGE パターン.

G-361 蛋白の SDS-PAGE と二次元電気泳動パターンを図1, 2に示した. G-361 蛋白は酸性域からアルカリ域まではほぼ均一に分布していた.

### 2) 抗原性物質の等電点

液体等電点電気泳動によって得られた分画の等電点と SDS-PAGE パターンを図3に示した. 各分画の蛋白量は 1.0~10.0 mg/ml であった. 再分画した No. 1~8 の SDS-PAGE パターンを図4に示した. IL-2 刺激を行った患者リンパ球での増殖試験の結果, 7例中4例において, No. 4 と No. 5 の両方の等電点別抗原に対してリン

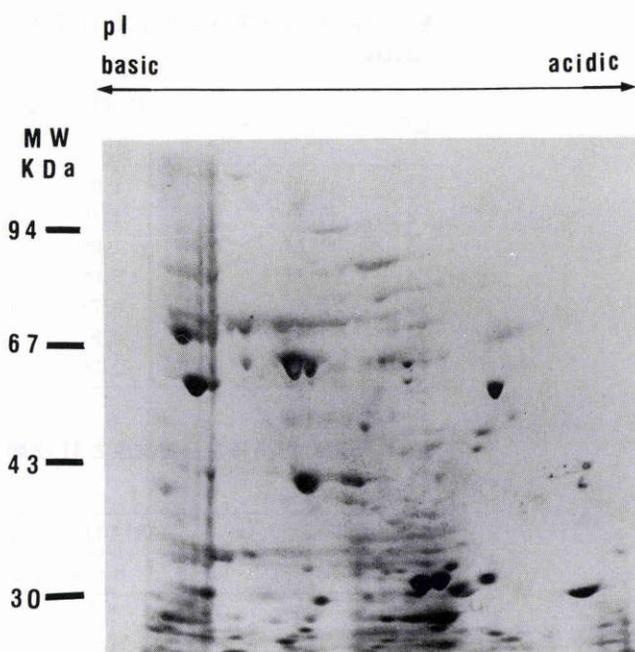


図2 G-361から抽出した蛋白質の可溶性成分の二次元電気泳動パターン.

パ球的増殖が認められ, さらに, 1例が No. 4 の分画に対して反応を示し, その SI は 2.0 以上であった(表10). 等電点別抗原 No. 4 と No. 5 の pH はそれぞれ 5.5, 6.4 であったことから, 等電点は 6.0 付近と推測された. また, 正常対照群では, いずれの分画に対しても有意の上昇を示さなかった(表11).

### 3) 抗原性物質の分子量

等電点別抗原 No. 4 と No. 5 においては, 分子量 50~70 kDa 近傍には 9 個のバンドが存在することを確認した(図5). それぞれ a~i とし, これらのバンドをゲルから抽出した. 各バンドの蛋白の回収量には差があり, それぞれ 30~100  $\mu$ g/ml であったため, 増殖試験に必要

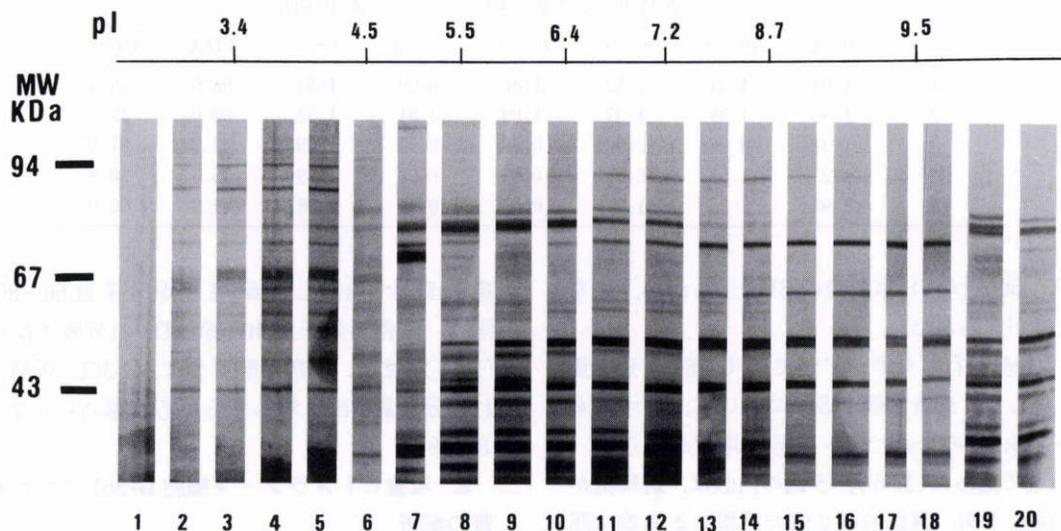


図3 液体等電点電気泳動によって分離された各分画の SDS-PAGE パターン.

表 10 等電点別抗原と IL-2 刺激を行った患者リンパ球での proliferation assay

症例	G-361 等電点別抗原								PHA	ConA
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8		
1	0.79	0.78	0.85	<u>2.32</u>	<u>2.33</u>	1.34	1.16	0.94	79.1	32.3
2	1.41	1.06	1.09	<u>2.41</u>	0.71	0.75	0.94	0.79	141.0	53.2
3	0.95	1.01	1.06	<u>2.03</u>	<u>2.60</u>	0.89	0.86	0.63	43.5	21.2
4	0.74	0.76	0.81	0.89	0.73	0.91	0.94	0.69	49.1	17.3
5	0.91	0.80	0.89	<u>2.64</u>	<u>2.55</u>	1.08	0.96	0.71	150.0	49.2
7	0.91	0.92	0.87	0.92	0.87	0.74	0.69	0.78	32.1	20.5
10	0.79	0.84	0.81	<u>2.42</u>	<u>2.47</u>	1.04	1.15	0.83	41.3	20.5

表 11 等電点別抗原と IL-2 刺激を行った健常人リンパ球での proliferation assay

健常人	G-361 等電点別抗原								PHA	ConA
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8		
1	0.89	0.74	0.91	1.24	1.07	0.94	0.95	0.89	55.3	39.1
2	0.92	0.79	0.98	1.34	1.25	1.18	1.16	1.07	71.9	59.9
3	0.89	0.88	0.65	1.20	0.93	1.14	0.91	0.76	79.9	46.7
4	0.94	0.86	0.99	0.87	0.76	0.79	0.84	0.97	64.0	20.9
5	1.05	1.21	1.26	0.83	0.86	0.89	0.76	0.73	35.4	27.1

表 12 G-361 分子量別抗原と IL-2 刺激を行った患者リンパ球での proliferation assay

症例	G-361 分子量別抗原									PHA	ConA
	a	b	c	d	e	f	g	h	i		
1	0.85	0.94	0.98	1.09	1.24	0.67	0.81	0.74	0.78	71.4	28.5
2	<u>2.64</u>	1.01	0.87	0.99	0.93	0.97	0.79	0.87	0.80	94.9	18.5
3	<u>2.30</u>	1.01	0.95	0.99	1.03	1.11	0.72	0.79	0.81	45.2	30.3
5	<u>2.21</u>	1.42	1.23	1.05	0.74	0.89	0.99	0.85	0.69	57.5	21.6
10	1.24	1.15	0.81	0.94	0.89	0.87	0.84	0.93	0.99	39.9	17.9

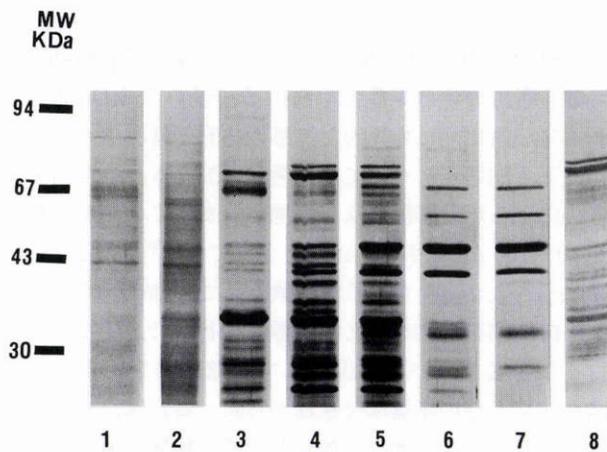


図 4 再分画された等電点別抗原の SDS-PAGE パターン。  
(No. 1 は分画 2～5 に, No. 2 は分画 6 に, No. 3 は 7 分画に, No. 4 は分画 8～9 に, No. 5 は分画 10～12 に, No. 6 は分画 13～15 に, No. 7 は分画 16～18 に, No. 8 は分画 19～20 に相当する)

な量を得るため同様の操作を数回繰り返し行った。また、各バンドが単一バンドとして抽出されたことを SDS-PAGE で確認した(図 6)。等電点別抗原で反応が見られ

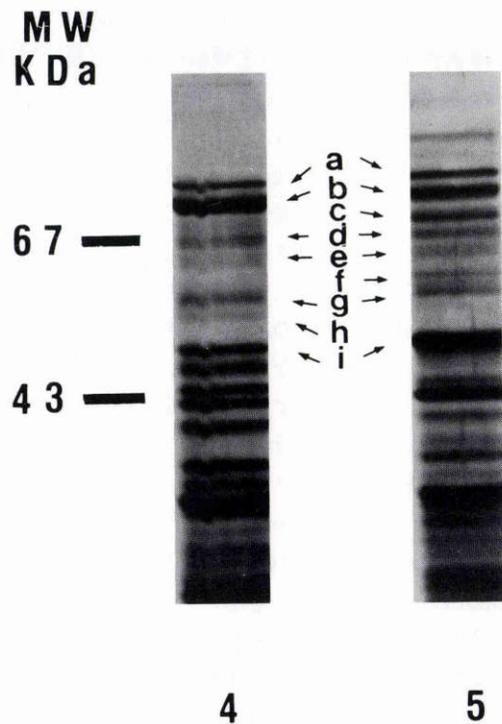


図 5 等電点別抗原 No. 4 と No. 5 に存在する分子量約 70～50 kDa 近傍のバンド 9 個 (a～i)。

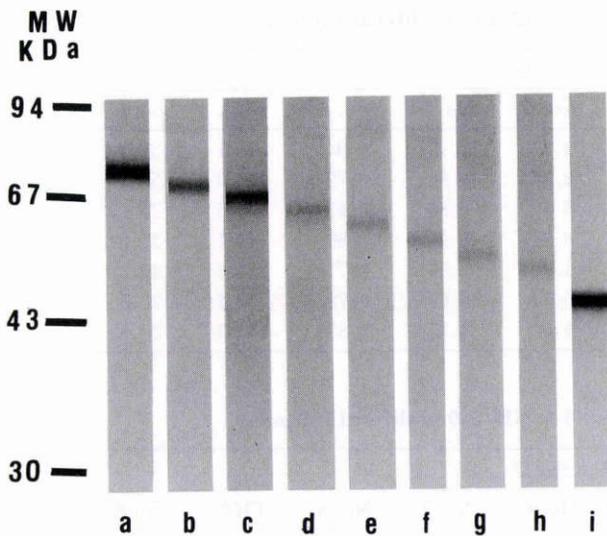


図6 単一バンドとして抽出されたG-361の分子量別抗原 (a~i).

た患者5例を選び、増殖試験を施行した結果、5例中3例がバンド(a)に対してのみ反応を示し、SIは2.0以上であった(表12)。SDS-PAGEパターンからバンド(a)の分子量を推定すると約75 kDaであった。

#### IV 考 按

原田病は細胞性免疫を主体とするメラノサイト特異的自己免疫疾患と考えられており<sup>1)</sup>、原田病患者リンパ球によるヒト脈絡膜メラノサイトおよび培養ヒトメラノーマ細胞への直接的な細胞障害活性が示されている<sup>5)6)</sup>。原田病の病因および発症機序に関しては、患者のリンパ球サブセットの検討<sup>7)</sup>、各種リンホカインの測定<sup>8)</sup>、メラノサイト障害性実験<sup>9)</sup>、患者の主要組織適合抗原(MHC)の詳細なタイピング<sup>10)11)</sup>など多方面からの研究が進められているが、その起因物質、すなわち抗原物質の解析は未だ行われていない。最近の分子生物学的手法の進歩により抗原物質、主要組織適合抗原、Tリンパ球間の相互作用が分子レベルで解明されようとしており、自己免疫性疾患の研究を進めるうえで、抗原物質のクローニング、抗原部位の決定およびその構造の解析は、その基礎を成すものである。このような目的から、今回最初のステップとして、原田病を惹起する抗原物質の分析を培養ヒトメラノーマ細胞を用いて行った。

初めに、培養ヒトメラノーマ細胞中に原田病に特異的な抗原性物質が存在するか否かについて検討した。この実験では、メラノーマ細胞G-361、WM-115の可溶性成分をSephacryl S-300カラムを用いてゲル濾過し、分子量ごとに分画し、これを抗原として原田病患者リンパ球と増殖試験を行った。Sephacryl S-300カラム単一での分離であるため、完全に分子量ごとに分画されているとはみなし難いが、抗原性物質の有無およびそのおおよその分子量を解析することができると考えられた。IL-2刺激

を行わなかった患者リンパ球では、G-361、WM-115いずれの分子量分画抗原に対してもリンパ球の増殖は認められなかったが、それは末梢血中に活性化されたリンパ球の比率が少ないためと考えられたので、リンパ球を分離後、T細胞増殖因子であるIL-2を添加した培地で2週間培養してから反応を行った。その結果、表6のようにG-361の分子量分画抗原では、7例中5例において分子量50~70 kDaの分画に対してリンパ球の増殖が見られ、SIは2.0以上であった。WM-115の分子量分画抗原では、一部の症例が分子量60 kDa付近で反応を示したが、有意な変化とは考え難かった。IL-2でリンパ球を刺激しているため、非特異的な抗原による反応との区別が必要となるが、健康人5例のIL-2刺激を行ったリンパ球では全く変化が見られなかったため、非特異的な反応の可能性は低いものと思われた。したがって、G-361の分子量分画抗原では、分子量50~70 kDaの分画に原田病に特異的な抗原物質が存在するものと推測された。

次に、G-361の可溶性蛋白から特異的な抗原性物質の単離を行った。ロトフォアによる液体等電点電気泳動では、比較的大量のサンプルが使用でき、また再現性も高いので十分な量の等電点別抗原の作成が可能であった。等電点別抗原では表10に示すようにNo. 4とNo. 5においてリンパ球の増殖が見られ、SIが2.0以上という結果が得られた。次いで、反応の見られた等電点別抗原No. 4とNo. 5についてSDS-PAGEを行い、ゲルから分子量50~70 kDa近傍のそれぞれのバンドを抽出し、IL-2で刺激を行った患者リンパ球(等電点別抗原と反応した症例)と増殖試験を施行した。その結果、表12に示したようにバンド(a)に対してのみリンパ球の増殖が認められ、SIは2.0以上であった。以上の結果から、G-361の可溶性蛋白の中の等電点約6.0、分子量約75 kDaのペプチドが原田病に特異的な抗原性物質と推測された。

以下、問題点について順次考察を加える。今回行った方法による増殖試験では、培地に含まれている特異抗原が10~100  $\mu\text{g}/1$  ウェル必要とされている<sup>3)</sup>。方法、結果には示さなかったが、予備実験としてG-361から抽出した蛋白に精製操作を加えず粗標品の状態で、IL-2刺激を行った患者リンパ球に添加して増殖試験を行った系では、リンパ球の増殖は起きなかった。これは、粗標品の蛋白をそのまま培地に添加したのでは特異抗原の濃度が上記に達せず、反応が生じなかったものと考えられた。次に、分子量別に分画し同様の反応を行ったところ、陽性の結果が得られた。さらに、等電点ごとの分画、単一ペプチドへと精製が進むに従い、少量の蛋白質(ペプチド)の添加で陽性の反応が得られた。このことは、粗標品の状態から段階的にある特定の蛋白が精製されてきたことを示している。次に、特異的な抗原性物質と反応しているのではなく、抗原性物質として強いと考えられるHLAを認識して反応が生じているのではないかと

いう点である。HLA class I 抗原は、分子量 45 kDa の  $\alpha$  鎖と分子量 12 kDa の  $\beta_2$  ミクログロブリンが非共有結合で会合した膜抗原であり、また、HLA class II 抗原は分子量 33~35 kDa の  $\alpha$  鎖と分子量 27~29 kDa の  $\beta$  鎖が非共有結合した膜抗原である<sup>11)</sup>。ゲル濾過した抗原での実験で得られた抗原性物質の分子量 50~70 kDa という値は、HLA class I および class II 抗原の分子量と近似しており、その可能性が考えられた。しかし、SDS-PAGE によって確認された分子量も 75 kDa であって、HLA 抗原は SDS-PAGE によりそれぞれ  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、 $\beta_2$  ミクログロブリンに分離され、分子量の小さなバンドとして検出されるので、この点は否定できる。

今回の研究では、培養ヒトメラノーマ細胞 G-361 において原田病に特異的な抗原物質と考えられるペプチドの等電点、分子量が示されたわけであるが、これを原田病を惹起する自己免疫性物質であると断定するには、さらに検討すべき課題が残されている。第一に、さらに多数の症例での増殖試験による検討が望まれるが、それには今回得られたペプチドが大量に必要であり、分子生物学的な手法によりこの特定の蛋白質を純粋に大量に得る方法を考えなければならない。第二に、この蛋白の患者（および健常人）のぶどう膜組織における局在について検討することである。

最近、原田病患者の脈絡膜毛細血管と脈絡膜メラノサイトに MHC class II 複合体が発現されていることが免疫組織化学的に示された<sup>12)</sup>。通常は class II 抗原が発現されていない脈絡膜メラノサイトにおいて、何らかの作用によりその発現が誘導され抗原提示能を有するようになったということは、ぶどう膜組織で class II 抗原、抗原物質、T リンパ球の三者による MHC 拘束性の細胞免疫性反応が起きているものと考えられ、今回行った抗原性物質の解明の意義は大きいものと思われる。

本論文の要旨は第 97 回日本眼科学会総会において発表した。

本研究は文部省科学研究費補助金の補助を受けた。

#### 文 献

- 1) 杉浦清治：Vogt-小柳-原田病。臨眼 33:411-424, 1979.
- 2) 西川 潔：リンパ球単離法。日本生化学会編：分子免疫学 I。東京化学同人，東京，3-5, 1989.
- 3) 山下優毅，矢野明彦：Proliferative Response による抗原特異的 T 細胞機能の測定法。右田俊介(編)：免疫実験操作法 C。日本免疫学会，金沢，2176-2183, 1974.
- 4) O'Farrel PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021, 1975.
- 5) 湯浅武之助：Vogt-小柳-原田病症候群における細胞性免疫。眼紀 27: 992-998, 1976.
- 6) 杉浦清治：わが国の葡萄膜炎について。日眼会誌 80: 1285-1326, 1976.
- 7) 三木 聡，田内芳人，大谷知子，山口景子，三村康男：各種ぶどう膜炎患者末梢血および髄液中リンパ球の Two-color flow cytometry による分析。臨眼 44: 621-624, 1990.
- 8) Ohno S: Vogt-koyanagi-Harada's disease. Uveitis Update: 401-405, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1984.
- 9) 野呂瀬一美，矢野明彦，瀬川雄三：Vogt-Koyanagi-Harada 病における髄液中白血球のメラノサイト障害活性とモノクローナル抗体による表面マーカー解析。臨眼 42: 242-246, 1988.
- 10) 大野重昭，市石 昭：眼疾患と HLA。眼科 31: 1131-1137, 1989.
- 11) 水木信久，大野重昭：ぶどう膜炎と HLA。眼科 34: 111-126, 1992.
- 12) Sakamoto T, Murata T, Inomata H: Class II major histocompatibility complex on melanocyte of Vogt-Koyanagi-Harada disease. Arch Ophthalmol 109: 1270-1274, 1991.