

自己水晶体で誘発された水晶体起因性ぶどう膜炎と
前囊付着蛋白に関する研究

小野 啓

自己水晶体で誘発された水晶体起因性ぶどう膜炎と前囊付着蛋白に関する研究

小野 啓

目 次

I 章 緒言	1
II 章 イヌの白内障および水晶体前方脱臼の手術症例 11 眼における 摘出水晶体前囊の観察	6
1. はじめに	6
2. 材料と方法	7
1) 供試動物	7
2) 術前検査	7
3) 手術の術式	7
4) 走査電子顕微鏡による前囊表面の観察と前囊の厚さの測定	7
3. 成績	8
1) 初診時の眼検査所見	8
2) 初診から手術時までのぶどう膜炎の治療と眼検査所見	8
3) 走査電子顕微鏡による前囊表面の観察	9
4) 前囊付着蛋白の程度と毛様充血の程度	9
5) 走査電子顕微鏡による前囊の厚さの測定	10
4. 考察	10
5. 小活	15
III 章 自己水晶体で誘発されたウサギのぶどう膜炎と前囊付着蛋白の発現	17
1. はじめに	17
2. 材料と方法	20
1) 供試動物	20
2) ウサギ水晶体の摘出方法	21
3) 水晶体可溶性蛋白の作成	21
4) ドットブロッキング	22
5) ウサギ水晶体可溶性蛋白の免疫	22
6) カラムクロマトグラフィー	23
7) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	24
8) ウェスタンブロット法	24
9) ELISA 法	25
10) 形態学的観察	25
11) 房水蛋白濃度測定	25
3. 成績	26

1) ドットブロッティング法	26
2) カラムクロマトグラフィー	26
3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	27
4) 免疫原性 (ウエスタンブロット法)	27
5) ELISA 法	27
6) 走査電子顕微鏡による水晶体前囊表面の観察	28
7) 眼球組織の H. E. 染色による組織所見	29
8) 房水蛋白濃度測定	33
4. 考察	33
5. 小活	43
IV 章 総括	45
謝辞	48
引用文献	49
要旨	64
Abstract	70
表 1～10	
図 1～12	

I 章 緒 言

近年、イヌの白内障治療は、開眼や屈折矯正を目的とした外科的処置が定着しており、囊外摘出術や超音波乳化吸引術が用いられている[15, 48, 86]。これらの術式は水晶体前囊を切開後、水晶体皮質および核を除去する方法であり、前囊切開が白内障手術において重要な操作となっている[48]。水晶体皮質および核を摘出後、水晶体前囊を摘出するが、水晶体前囊の硬さ、色調（部分的な白濁）ならびに形状（歪み）などが症例により異なるため、前囊切開時に網膜剥離、硝子体ヘルニアを併発することがあり、手技の上で難しいものである。また、イヌの白内障手術は手術中の突発的な縮瞳や前房フィブリン析出、術後の虹彩癒着など術中、術後の合併症の問題が存在し、この機序として白内障に起因したぶどう膜炎の関与[80]が推察されている。白内障手術の成功率は、水晶体起因性ぶどう膜炎の既往歴が存在しても、手術時の水晶体起因性ぶどう膜炎罹患の有無で差があり、手術時に罹患しているものは罹患していない場合に比べ術後2ヵ月で91%、術後6ヵ月で55%に低下するとの報告がある[80]。そのため、手術前の水晶体起因性ぶどう膜炎の有無が白内障手術の成功率に影響を与えていると考えられている。

ぶどう膜は虹彩、毛様体、脈絡膜からなり、眼球壁の中膜を形成し血管を多く含む組織である。血管が多く分

布するためぶどう膜炎が起こりやすい[77]。ぶどう膜炎時の病態として、毛様体に存在する血液房水関門の破壊が起こり、毛様体偏平部からフィブリンおよび白血球が房水中に漏出する。その結果、房水蛋白濃度が上昇し房水の組成が変化する[4, 10, 46, 73]。

水晶体囊は水晶体皮質および核を覆う膜で、水晶体の代謝はこの水晶体囊を通じて眼房水および硝子体との間で行われるため、囊の機能と形態的恒常性により水晶体の透明性が維持されている[29, 44]。水晶体前囊は水晶体囊の前房側に位置し、ぶどう膜炎で房水に変化が起こるため、症例により摘出水晶体前囊の形状、硬さおよび色調が異なることは、白内障ならびにそれに起因する水晶体起因性ぶどう膜炎によるものと推察される。これらの根拠にもとづき、まず、イヌの白内障手術によって摘出した水晶体前囊の観察を行い、水晶体疾患時にみられるぶどう膜炎との関連を調べた。

ぶどう膜炎には、眼表面の損傷後に三叉神経の反射によって起こる反射性ぶどう膜炎、感染性ぶどう膜炎、新生物性ぶどう膜炎、外傷性ぶどう膜炎等があり、他に免疫疾患に随伴するものや原因不明のぶどう膜炎も存在する[20]。その中で、水晶体起因性ぶどう膜炎は、自己の水晶体物質が抗原性を示すことにより引き起こされる炎症であり、その成立過程は、(1)水晶体囊により胎生早期に隔離された水晶体蛋白が、白内障の発症などを契機

に異物として免疫系に暴露されることで抗水晶体抗体が産生され起こるとする説[2, 6, 72, 79]、(2)水晶体蛋白に対して特異的に成立している免疫寛容が細菌感染などで破綻するという説[62]、(3)水晶体成分そのものが起因物質となる説[81]が報告されており、その成因は様々である。白内障時における前囊の変化との関連性を調べるためには、水晶体起因性ぶどう膜炎の病態把握が必要である。これまでイヌの水晶体起因性ぶどう膜炎の病態については解析がなされているが、症例の背景に存在する品種、年齢、白内障の程度など様々な要因[80, 85]がその発症に関与しているため、症例から病態を把握することは困難である。そのため、水晶体起因性ぶどう膜炎モデル動物を作出してその病態を解明することとした。モデル動物による実験は、系統や年齢を統一でき、再現性があるため病態把握に適するものと考えられた。これまでぶどう膜炎モデルの作出は多種の動物および起炎物質についてなされてきている[1, 16, 27, 38, 51, 52, 54, 71]。今回の実験目的は、水晶体起因性ぶどう膜炎の病態把握であることから、起炎物質として自己の水晶体を用いることとした。しかし、これまでの水晶体を用いたぶどう膜炎モデルの作出は、水晶体抗原の投与方法が様々であり、発生したぶどう膜炎の程度も異なるものである[1, 16, 17, 21, 36, 38, 51, 54, 70, 71, 79]。そこで今回の実験では、まず抗原の投与方法が異なる実験群を設定して、

ぶどう膜炎の病態把握を行った。モデル動物はラット、マウス、ウサギなどの報告があるが、今回の実験ではウサギを用いた。その理由として、ウサギは実験動物として長い歴史を持ち、眼科領域での実験も多数なされてきたこと、眼球は大きく水晶体も大きいためモデル作出時の眼内操作が容易であること、身体は比較的小さく性質が従順であるため処置が容易であることなどがあげられる[13]。しかし、ウサギの眼はヒト、イヌ、ネコをはじめその他の動物とも異なる解剖学的ならびに生理学的特徴を持っている。すなわち、隅角が非常に発達し、毛様体はピント調節の必要性がなく退化していること、長後毛様体動脈が強膜の表層近くを走行しており、短後毛様体動脈は存在しないこと、有髄神経線維の帯が視神経乳頭から鼻側と耳側の両方に向かって3〜4乳頭径分、水平方向に伸びていること、有髄神経線維の帯の表面に限って網膜血管が存在する部分網膜血管を有すること、視神経乳頭が生理的に陥凹していること、タペタム領域を有しないこと、アルビノ個体ではブドウ膜、網膜色素上皮などに色素を有しないことなどがある[22]。過去にウサギを水晶体起因性ぶどう膜炎の病態解明に用いた報告がある[38,50,51]ことから、ウサギを用いたモデル動物の作出は可能と考えた。

以上のことから、ウサギを用いて自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルを作出し、水晶体起因性ぶどう膜炎と水

晶体前囊付着蛋白の関連性およびその発現機序について
免疫学的および病理学的に検討した。

Ⅱ 章 イヌの白内障および水晶体前方脱臼の手術症例

11 眼における摘出水晶体前囊の観察

1 はじめに

イヌの白内障手術では囊外手術または超音波乳化吸引術の術式が最もよく用いられている[15, 48, 86]。いずれの術式も水晶体物質の除去前に水晶体前囊切開を行わなければならない。水晶体の前囊切開は前囊切開剪刀、チストトームなどによって行い、水晶体の娩出または粉碎に重要な操作である[48]。この前囊切開時において、水晶体を支持している水晶体小体と毛様体に負荷をかけ、毛様体および虹彩からの出血、縮瞳、フィブリンの析出を生じ、重度の場合は水晶体脱臼、網膜剥離、硝子体ヘルニアを併発するなど白内障手術の術中、術後に影響をおよぼしている。さらに症例ごとに前囊の硬さ、色調（部分的な白濁）ならびに形状（歪み）が異なることから、前囊切開時に注意が必要とされている。そこで前囊切開手技による術中・術後の合併症を防止するには、白内障の水晶体前囊表面および厚さを把握する必要があると考えた。摘出水晶体前囊の厚さ、表面および形状を走査電子顕微鏡によって形態学的観察を行い、健常犬のそれと比較した。またそれら症例の走査電子顕微鏡による観察像について手術前の臨床所見と併せて検討した。

2 材料と方法

1) 供試動物

白内障症例 8 頭と水晶体脱臼症例 3 頭を供試した（表 1）。また対照として健常ビーグル犬（3 歳齢）3 頭 5 眼を供試した。

2) 術前検査

術前検査として一般身体検査、眼の外貌検査（眼漏、充血）、瞳孔の対光反射試験、細隙灯生体顕微鏡検査等の眼科検査を行った。術前の毛様充血の評価は以下の 4 段階の基準を設けて行った。すなわち、N：毛様充血がみられない、±：角膜輪部隣接部がわずかにピンク色を呈する、+：輪部隣接部がピンク色を呈する、++：輪部隣接部が鮮紅色を呈するもの、とした。

3) 手術の術式

手術の術式として、白内障症例では超音波乳化吸引術を、水晶体脱臼症例では囊内摘出術を実施した。

4) 走査電子顕微鏡による前囊表面の観察と前囊の厚さの測定

摘出水晶体または摘出前囊は摘出後直ちに 2.5% グルタルアルデヒド液で固定し、タンニン・オスミウム変法にて導電染色を行い、次いで凍結乾燥法で観察試料を作製した。水晶体前囊中央部において前囊表面の観察および水晶体前囊の厚さの測定は JSM-5400LV 走査電子顕微鏡（日本電子データム社製）を用いて行った。前囊の厚

さの統計処理は単回帰分析、分散分析法（t検定）を用いて行った。

3 成績

1) 初診時の眼検査所見

初診時の診断と眼検査所見を表2に示した。白内障症例8例のうち両側性白内障が7例で、片側性白内障が1例であった。前部ぶどう膜炎を伴う白内障は症例1、4、7、8の4例でみられた。これら4例は片側または両側性の毛様充血を認めた他に、虹彩の肥厚や虹彩縁の不整などがみられた。他の白内障3例と水晶体脱臼3例でも毛様充血がみられた。眼圧上昇は症例のすべてで認められなかった。

2) 初診から手術時までのぶどう膜炎の治療と眼検査所見

前房内構造物を調べたところ、虹彩炎を伴った症例1で水晶体前囊に付着した蛋白塊が認められた（図1-A、B）。また症例4の成熟白内障眼では水晶体前囊上に蛋白塊が付着し、それらは徹照像の微細陰影像や細隙灯による前囊上突出物として認められた（図1-C、D）。しかし、症例すべてで前房内蛋白が観察されるものではなかった。房水フレアは全症例で観察されなかった。手術前の治療内容と手術直前の毛様充血を比較した（表3）。初診から白内障手術時まで、ぶどう膜炎の抗炎症治療として、フ

ルオロメトロン（フルメトロン：参天製薬）やリン酸ベ
タメタゾンナトリウム（リンデロン A：塩野義製薬）の
点眼やプレドニゾロン（プレドニゾロン：塩野義製薬）
の内服といったステロイド薬の処方を行い、また前房内
フィブリンの吸収促進を促すストレプトキナーゼ・スト
レプトドルナーゼ配合（バリダーゼ・オーラル：日本レ
ダリー）を処方した。そのため、手術眼に関して、初診
時に毛様充血を示した 9 症例（症例 2、3、5－11）のう
ち、5 症例（症例 2、3、7、8、11）で毛様充血の改善が
みられた。しかし、症例 5、6、9、10 の 4 症例では手術
までに毛様充血の改善がみられなかった。

3) 走査電子顕微鏡による前囊表面の観察

前囊の走査電顕観察所見を表 4 に示した。500 倍での
観察像では、白内障および水晶体脱臼の症例すべてで前
囊に付着蛋白が観察された。前囊付着蛋白の程度は＋が
4 症例、＋＋が 2 症例、＋＋＋が 5 症例であった。また
付着蛋白の所見は、糸状の蛋白付着が前囊に散在してみ
られるもの、網状の蛋白付着が前囊にみられるものや網
状の蛋白付着が前囊に重層してみられるものがあつた

（図 2-A、B、C）。これらの蛋白付着は健常犬では全く認
めない所見（図 2-D）であり、今回初めて観察された。
また強拡大（5000 倍）ではさらに微細な線状または網状
の蛋白塊として観察された。

4) 前囊付着蛋白の程度と毛様充血の程度

前囊蛋白付着の程度と初診時の毛様充血の程度との関連を調べたところ、毛様充血＋および＋＋を示した6症例（症例3、7-11）はいずれも前囊の蛋白付着程度が＋＋または＋＋＋であった（表2、4）。前囊付着蛋白の程度が多い症例は、初診時の毛様充血の程度が強いことが認められた。

蛋白付着程度と手術直前の毛様充血の程度との関係を調べたところ、初診時から毛様充血の改善がみられた5症例（症例2、3、7、8、11）の前囊付着蛋白は、＋が1症例で＋＋＋が4症例であった。毛様充血の改善と付着蛋白の程度は関連しないものであった。

5) 走査電子顕微鏡による前囊の厚さの測定

摘出した白内障および水晶体脱臼症例の前囊中央部の厚さは $90.46 \pm 22.69 \mu\text{m}$ であった。3歳の健常犬5眼の前囊中央部の厚さは $40.12 \pm 4.46 \mu\text{m}$ であり、また、症例のほぼ同一年齢（3および4歳齢）の3症例（症例1、2、3）の前囊中央部の厚さは $68.16 \pm 2.55 \mu\text{m}$ であった。3および4歳齢の白内障における前囊中央部の厚さは3歳齢の健常犬に比べ、有意に厚さの増加がみられた

（ $p < 0.01$ ）。さらに白内障および水晶体脱臼症例において、前囊中央部の厚さと手術時の年齢との間に、有意な正の相関がみられた（図3、相関係数 $r = 0.886$ ）。

4 考 察

イヌの白内障に起因した水晶体起因性ぶどう膜炎（以下、LIU と略す）の存在は古くから知られている [55, 64, 80]。LIU の好発犬種はトイまたはミニチュア・プードルとアメリカン・コッカー・スパニエルとされ、前者は 9 歳齢で、後者は 5.1 歳齢で高発症する [55]。今回の成績でも両者の犬種は含まれており、アメリカン・コッカー・スパニエルは 1 歳齢と 3 歳齢の若年性であり、トイ・プードルは 10 歳齢と老年性であった（表 1）。LIU を自然放置すると、虹彩外転、虹彩癒着、緑内障、眼球癆を発症することが知られ、これらは白内障治療に際し留意しなければならないことである [80]。また、白内障手術の成功率は、LIU の既往歴が存在しても、手術時の LIU 罹患の有無で差があり、手術時に罹患しているものは罹患していない場合に比べ術後 2 ヶ月で 91%、術後 6 ヶ月で 55% に低下するとの報告がある [80]。そのため、手術前の LIU の有無が白内障手術の成功率に影響を与えていると考えられている。そのため、白内障時の LIU の有無は白内障手術の成功率に影響をおよぼすものと推察されるため白内障治療では LIU の評価が重要となる。LIU の評価として、前房混濁、房水フレアがあげられる。一般にぶどう膜炎時での前房混濁または房水フレア [4] はよく知られており、最近ではイヌにおいて非侵襲的に房水中の細胞数および蛋白濃度を測定する試みがなされている [31]。この方法により、イヌの白内障症例でも房水

中の高蛋白濃度が観察され、LIUによる前房混濁や房水フレアが存在することが示されている[31]。LIUによる前房蛋白濃度の上昇は前嚢に蛋白が付着することに関連するものと考えられる。今回の成績では、細隙灯検査によって術前に房水フレアは認められなかったが、症例10右眼のように角膜混濁を認め、毛様充血がみられた症例では、前房混濁の可能性があった。

今回の成績では、水晶体前嚢付着蛋白はすべての症例でみられた。この蛋白付着程度は3歳齢の健常犬のそれとは明らかに異なるものであった。症例で、術前に前房フレアや混濁がみられなかったものの、前嚢付着蛋白量は初診時の毛様充血の程度に比例する関係がみられたことは、LIUによる前房蛋白濃度の上昇が前嚢付着蛋白の発現に関連するものと考えられた。しかし内科的治療を受けた手術直前の毛様充血の程度と前嚢付着蛋白量には比例する傾向がみられなかった。蛋白分解酵素のストレプトキナーゼ・ストレプトドルナーゼ配合が術前に11症例中10症例に対して処方されているため、この薬理作用により、前房内フィブリン量は手術直後に低下することが予測された。しかし、採取された前嚢付着蛋白量は+が1症例、+++が4症例であり、前嚢付着蛋白量と蛋白分解酵素の投与期間および投与量との間に関係がないように推察された。このことから毛様充血の有無が前房内蛋白の存在の有無を決定するものでないと考えられ

た。今回、LIUの評価の1つである毛様充血を炎症の指標としたが、白内障や水晶体脱臼の手術に際して、毛様充血がない場合でも、LIUを念頭においた対応が必要と考えた。

房水の検査はぶどう膜炎の診断に用いられる[4,46]。しかし、イヌの房水蛋白濃度におよぼす消炎酵素の効果に関する報告では、前房穿刺するとその90分後には穿刺前の蛋白濃度の3.7倍に増加し、穿刺前のインドメタシンの点眼で抑制されるという[65]。房水を採取して行うぶどう膜炎の診断には慎重な対応が必要と思われた。今回は房水の分析は行わなかったが、今後、前囊付着蛋白の本態を解明する場合には、房水成分の解析も必要と考えられた。

イヌの水晶体物質がぶどう膜炎を誘起することは実験的に証明されている[8]。この炎症はヒトでみられる傍水晶体部位における肉芽性炎症とは異なるが、ロイコトリエンB4の産生を誘導するため、非ステロイド系抗炎症薬の処方によって軽減されるといわれる。しかしながら、これまでのイヌの実験的LIUについては短期的な観察のみであり、長期間に及ぶ実験成績はいまだ明らかにされていない。

今回、前囊付着蛋白と術前の臨床所見との関連を調べたが、術後の臨床所見との関連は追及できなかった。白内障手術後の合併症として後発白内障、緑内障の発生が

報告されているため[33, 64, 80]、今後、前囊付着蛋白と術後との関連性を、検討する必要がある。いっぽう、手術の術式による違いが術後緑内障を誘発するのではなくむしろ術後の緑内障は犬種に依存している[33]という報告もあり、いまだ術後緑内障の明解な発症機序は得られていない。

今回、白内障および水晶体脱臼と健常犬の前囊の厚さの比較を行ったが、健常犬において年齢が3歳齢と偏っていた。これは、各年齢にわたる健常犬の入手が困難であることから、動物の有効利用を考慮し実習で使用した動物について検討したためである。

水晶体囊は水晶体上皮細胞の基底膜であり、この上皮細胞により合成され続ける[13, 37]。そのため、水晶体囊は加齢とともに厚さが増加する[13, 75]。またヒト老年性白内障でも水晶体前囊の厚さの増加がみられている。今回、症例で水晶体前囊の厚さが増加し、なおかつ年齢との間に相関がみられたことは、加齢による変化と、疾患によることが考えられた。前囊を基底膜とする水晶体上皮細胞は、増殖、移動、分化して水晶体皮質を構築するものであり、白内障時には、浮腫、核の崩壊、細胞質中の空胞形成などが認められ、白内障の発症に関与すると報告されている[13, 37, 75, 89]。また、白内障手術後に発生する後発白内障は術後に動員される線維芽細胞と水晶体上皮細胞の増殖に起因する[14]といわれている。今

回、症例の前囊の厚さが増加したことは白内障の病態発生に水晶体上皮細胞の関与を示唆する興味ある所見であった。

今回の成績は、LIU ならびに白内障手術における留意点や術後経過を推察する上で重要であると考えられた。

5 小 括

イヌの白内障症例 8 頭、水晶体脱臼症例 3 頭の手術症例を用いて、摘出した水晶体前囊表面の観察と厚さの測定を走査電子顕微鏡で行い、健常ビーグル犬（3 歳齢）3 頭 5 眼の水晶体前囊と比較した。併せて白内障および水晶体前方脱臼症例に関しては、手術前の臨床所見と摘出前囊の観察所見を関連づけて検討した。

症例の初診時における臨床所見では、白内障症例 7 症例と、水晶体前方脱臼症例 3 症例で毛様充血が認められた。前房内構造物の観察では、2 症例で水晶体前囊に蛋白塊の付着がみとめられた。手術眼に関して、初診時に毛様充血が認められた 9 症例のうち、消炎、酵素剤の内服により手術までに毛様充血が改善されたものは 5 症例であった。

走査電子顕微鏡による白内障症例および水晶体前方脱臼症例の前囊表面の観察像では、全ての症例で前囊付着蛋白が観察された。500 倍所見で糸状の蛋白付着が前囊に散在してみられるもの、網状の蛋白付着が前囊にみら

れるものや網状の蛋白付着が前嚢に重層してみられるものがあつた。5000倍所見ではさらに微細な線状または網状の蛋白塊として観察された。これらの蛋白付着は3歳齢の健常犬では全く認めない所見であつた。前嚢付着蛋白量は初診時の毛様充血の程度に比例する傾向がみられた。手術直前の毛様充血の程度と前嚢付着蛋白の程度には比例する傾向はみられなかった。これは手術前の毛様充血の有無と、前房内の蛋白の有無は関連がないことを示し、白内障や水晶体脱臼の手術に際して、毛様充血がない場合でも、水晶体起因性ぶどう膜炎を念頭にいた対応が必要と思われた。

3歳の健常犬5眼の前嚢中央部の厚さは $40.19 \pm 4.46 \mu\text{m}$ であり、また、症例のほぼ同一年齢（3および4歳齢）の3症例（症例1、2、3）の前嚢中央部の厚さは $68.16 \pm 2.55 \mu\text{m}$ であつた。3および4歳齢の症例の前嚢中央部の厚さは3歳齢の健常犬に比べ、有意に厚さの増加がみられた（ $p < 0.01$ ）。症例の前嚢中央部の厚さと手術時の年齢との間に、有意な正の相関がみられた（相関係数 $r = 0.886$ ）。

以上の成績は、LIUならびに白内障手術における留意点や、術後経過を推察する上で重要であると考えられた。

Ⅲ 章 自 己 水 晶 体 で 誘 発 さ れ た ウ サ ギ の ぶ ど う 膜 炎 と 前 囊 付 着 蛋 白 の 発 現

1 はじめに

前章で述べたように、イヌの白内障と水晶体前方脱臼症例から摘出した水晶体前囊表面を走査電子顕微鏡で観察したところ、健常犬の前囊表面像とは異なり、すべての症例で蛋白沈着物の存在が観察された。また、初診時で毛様充血が強い症例では、前囊の付着蛋白も重度であり、イヌにおけるLIUとの関連が示唆されるものであった。しかし、これまで前囊付着蛋白の発現にぶどう膜炎が関与することは報告されていない。そこで今回、ウサギを用いてLIUモデルを作出し、LIUと水晶体前囊付着蛋白の発現機序について免疫学的小および病理学的に検討した。

ぶどう膜炎モデルの作出は、水晶体蛋白を抗原として用いて作出する方法と、異種組織を抗原として用いて作出する方法により行われてきた。水晶体蛋白を抗原として作出する方法は、(1) 同種水晶体蛋白をフロイント完全アジュバントとともに皮下もしくは筋肉内に注射して感作後、前囊切開をして眼内に水晶体蛋白を暴露させる方法[1, 21, 36, 38, 54, 79]、(2) 同種水晶体蛋白をフロイント完全アジュバントとともに皮下もしくは筋肉内に注射して感作後、水晶体蛋白を硝子体内に注射する方法

[1, 51]、(3) 異種水晶体蛋白をフロイント完全アジュバントとともに皮下もしくは筋肉内に注射して感作した後、前囊切開をして眼内に水晶体蛋白を暴露させる方法[27, 50, 52, 53, 73]、(4) 自己の水晶体の前囊を切開することで眼内に水晶体蛋白を暴露する方法[16, 17]、(5) 水晶体蛋白の構成成分である、同種 α -クリスタリン分画蛋白をフロイント完全アジュバントとともに筋肉内に注射して全身に免疫する方法[70, 71]に分類される。異種組織を抗原として作出する方法は、抗原に(1) ウシ血清アルブミン[11, 24, 40, 43, 58, 60, 61, 63, 88]、(2) ウマ血清[47]、(3) 10% 卵アルブミン[63, 66]、(4) 牛網膜S抗原[30, 40, 58, 63, 90]、(5) 網膜A抗原[76]、(6) 同種網膜[63]、(7) 視細胞間レチノイド結合蛋白[26, 30, 58]、(8) 水晶体蛋白を感作させたリンパ球[32]、(9) 網膜S抗原を感作させたTリンパ球[49]、(10) *E. coli* 由来のエンドトキシン[12]、(11) *Salmonella typhimurium* 由来のエンドトキシン[74]、(12) ウシ角膜上皮[5]、(13) リポ多糖体[41, 83]などが用いられている。

LIU は、水晶体蛋白が白内障の発症などを契機に免疫系に暴露されることで、抗水晶体抗体が産生され発症することがいわれている[2, 6, 38, 51, 79]。このことから、今回の実験モデルの作出は、白内障によって誘発されるLIUで観察される前囊付着蛋白の病態解明を目的とする

ことより、抗原として自己水晶体蛋白を用いることとした。

次に水晶体蛋白の投与方法の検討を行った。従来のLIUぶどう膜炎モデルの作出を抗原の投与方法により分類すると、(1)水晶体蛋白を皮下および筋肉内に注射して感作後、再度水晶体蛋白を硝子体内に注射もしくは水晶体前囊を切開して眼内に感作する方法、(2)水晶体前囊を切開することで水晶体蛋白を眼内に感作する方法、(3)水晶体蛋白を皮下および筋肉内に注射して感作する方法の3つであった。これらの方法についてぶどう膜炎の程度を比較したところ、(1)では眼内に細胞浸潤を伴う重度のぶどう膜炎[1, 21, 36, 38, 51]、(2)では細胞浸潤を伴うが炎症程度は様々であるぶどう膜炎[16, 17]、(3)では細胞浸潤を伴わない軽度の虹彩炎[70, 71]を発症するものであり、水晶体蛋白の投与方法により炎症程度が異なることが報告されている。そこで今回の実験モデルはこの3つの方法により水晶体蛋白を投与する群を設定した。水晶体蛋白を眼内に投与する方法には、水晶体蛋白を前眼房もしくは硝子体内に注射する方法と水晶体前囊を切開する方法とがある。今回の実験は水晶体前囊表面の観察を目的とすることから、眼内への投与は水晶体蛋白を注射するものとした。

白内障時に水晶体蛋白成分であるクリスタリン蛋白濃度が前房水中で上昇することが報告されている

[28, 34, 57, 82]ため、水晶体蛋白を前眼房に注射して LIU を誘発することが実際の病因と一致すると考えられた。しかし、水晶体蛋白の前房注射による前囊付着蛋白への影響を勘案して、今回の実験では自己水晶体可溶性蛋白を硝子体内へ注射して眼内へ免疫することとした。

今回の実験は各群とも、右眼水晶体を摘出しそれを抗原として使用し、左眼を本実験に供した。摘出水晶体は、ホモゲナイズした後、自己水晶体可溶性蛋白液として実験に供した。そのため今回の方法で作成した水晶体可溶性蛋白液がウサギで認識されるかをまず、ドットブロッキング法を用いて同種水晶体蛋白に対する体液性免疫の成立を調べた。ドットブロッキング法で体液性免疫の成立を確認後、各実験群で LIU と水晶体前囊付着蛋白の発現機序について免疫学的および病理学的検討を行った。免疫学的検討は、水晶体可溶性蛋白液をカラムクロマトグラフィーで各クリスタリン分画蛋白に分離した後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ウェスタンブロット法および ELISA 法により行った。病理学的検討では、走査電子顕微鏡による水晶体前囊表面の観察および眼球組織の H.E. 染色による組織検査を行った。ぶどう膜炎の炎症程度の評価として房水蛋白濃度の測定を行った。

2 材料と方法

1) 供試動物

供試動物はウサギ（日本白色種、J l a : J W）、雌、10 週齢、体重 1.9～2.0kg を用いた。

2) ウサギ水晶体の摘出方法

ウサギ右眼水晶体を囊外摘出法で摘出した。術前に 1.0% 硫酸アトロピン点眼液（日点アトロピン点眼液 1%：日本点眼薬研究所）およびトロピカミド、塩酸フェニレフリン混合点眼液（ミドリリン P：参天製薬）を点眼して散瞳処置を行った。十分な散瞳を確認後、塩酸メデトミジン（ドミトール注射液：明治製菓）0.3mg/kg、塩酸ケタミン（動物用ケタラール 50、筋注用：三共）0.4mg/kg、ジアゼパム（ホリゾン注射液、筋、静注用：山之内製薬）0.2mg/kg を皮下に注射して全身麻酔を行った。動物が全身麻酔下であることを確認後、頭部の固定、洗眼、眼球の固定を行った。術式はまず 12 時～9 時方向に 180 度角膜半層切開を行った。次いで 12 時方向の角膜を全層切開し、サーキュラーにて前囊切開を行った。さらに 3 時～9 時方向に 180 度角膜全層切開を加えた後、ハイドロダイゼクションにより水晶体囊と水晶体皮質の分離を行い、水晶体皮質および核を摘出した。9-0 ナイロン糸により角膜を縫合して手術を終了とした。術後は、アチパメゾール（アンチセダン注射液：明治製菓）を 0.3mg/kg を筋肉内注射して覚醒させた。

3) 水晶体可溶性蛋白の作成

摘出した右眼水晶体は P B S （－）液でホモゲナイズ

した後、4℃、15,000rpm、15分で溶液を冷却遠心し、その上清を自己水晶体可溶性蛋白液とした。水晶体可溶性蛋白濃度の測定はMicro-BCA法(Micro BCA Protein Assay Kit、PIECE)で測定した。

4) ドットブロッティング

ドットブロッティング法でウサギ同種水晶体蛋白に対する体液性免疫の成立を調べた。ドットブロッティング法は、ウサギ水晶体可溶性蛋白液(16mg/ml)の1、2、4、8、16倍希釈液10 μ lをニトロセルロース膜に塗布して固相させ、次いで同種水晶体可溶性蛋白免疫前と、免疫後2週の血清を固相ニトロセルロース膜に反応させた。また、コントロールとして正常ウサギ血清、正常イヌ血清をニトロセルロース膜に固相した。ニトロセルロース膜結合IgGをアルカリフォスファターゼを標識した抗ウサギIgG抗体(SIGMA)を用い、3,3'-ジアミノベンチジンテトラヒドロ塩化物(Sigma D-5905)で発色させた。

5) ウサギ水晶体可溶性蛋白の免疫

今回の実験群は、自己水晶体可溶性蛋白を皮下に注射して感作した後、水晶体蛋白を硝子体に注射する群(以下、自己水晶体起因性ぶどう膜炎群とする)、自己水晶体可溶性蛋白を皮下に注射して感作する群(以下、自己水晶体免疫群とする)、自己水晶体可溶性蛋白を硝子体に注射する群(以下、自己水晶体硝子体内注射群とする)お

よび対照群とした。自己水晶体可溶性蛋白を抗原として皮下に注射して感作した後、水晶体蛋白を硝子体に注射する群は、この作成方法によるぶどう膜炎モデルの報告が多いことから自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群とした。

自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群は、右眼水晶体摘出2週後に自己水晶体可溶性蛋白 10 m g とフロイント完全アジュバンド 1.0 m l をウサギの四肢末端および膝下リンパ節近傍の皮下に注射し、その注射2週後に自己水晶体可溶性蛋白 1.0 m g を左眼硝子体内に注射して作出した。自己水晶体免疫群は、右眼水晶体摘出2週後に自己水晶体可溶性蛋白 10 m g とフロイント完全アジュバンド 1.0 m l をウサギの四肢末端および膝下リンパ節近傍の皮下に注射し、その2週後に生理食塩液 0.05 m l を左眼硝子体に注射して作出した。自己水晶体硝子体内注射群は、右眼水晶体摘出4週後に自己水晶体可溶性蛋白 1 m g を左眼硝子体内に注射して作出した。対照群は、右眼水晶体摘出4週後に、生理食塩液 0.05 m l を左眼硝子体内に注射して作出した。

6) カラムクロマトグラフィー

正常ウサギより摘出した水晶体を水晶体可溶性蛋白とし、カラムクロマトグラフィーで溶出した分画についてその特性を調べた。トリス塩酸溶液にセファロース (Sephacrose CL-6B, Pharmacia) を膨潤させカラムにつ

めた後、カラム（420mm×25mm）容積の2倍以上のトリス塩酸溶液を流し安定させ使用した。ペリスタポンプの流速を7.94ml/h～9.64ml/h（1滴/14～17秒）とし、フラクションコレクターによる分画は試験管1本につき48滴（約1.8ml）とした。各試験管の吸光度を波長280nmで測定した。

7) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて、ウサギ水晶体可溶性蛋白、 α 、 β_H 、 β_L 、 γ -クリスタリン分画蛋白の電気泳動を行った。泳動装置としてミニプロテイン-II（BIO-RAD）を使用した。水晶体可溶性蛋白は β -メルカプトエタノールとドデシル硫酸ナトリウム（SDS）で処理し、100V、20分で電気泳動（CONSTA POWER, SJ-1065、アトー株式会社製）を行った。泳動終了後、クマシーブリリアントブルーで染色し、メタノールと酢酸混合溶液で脱染色をした。

8) ウエスタンブロット法

同種水晶体可溶性蛋白液および α 、 β_H 、 β_L および γ -クリスタリン分画液を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画した後、ニトロセルロース膜にブロッティングし、この膜に自己水晶体可溶性蛋白を免疫した後3週目の血漿を反応させた。二次抗体はアルカリフォスファターゼを標識した抗ウサギIgG（SIGMA）を用い、過ホウ酸ナトリウムカプセル入りリン酸塩-クエン酸塩

緩衝剤で発色させた。

9) ELISA 法

96 穴 ELA2 PLATE (MULTI WELL PLATE、S B MEDICAL) に同種ウサギ水晶体可溶性蛋白を固相後、3% スキムミルクでブロッキングし、各群の血漿を反応させた。二次抗体として、アルカリフォスファターゼを標識した抗ウサギ IgG 抗体 (SIGMA) を用い、パラニトロフェニルリン酸 (SIGMA) で発色させ、405 nm の波長で吸光度を測定した。統計処理は分散分析法 (t 検定) を用いて行った。

10) 形態学的観察

硝子体内注射 1 週後に水晶体摘出時と同様の麻醉方法による全身麻醉下で、10% 中性緩衝ホルマリンによる灌流固定を行った後、左眼眼球を摘出した。眼球は H.E. 染色による組織学的検索を行い、摘出水晶体は走査電子顕微鏡で前囊表面の観察を行った。走査電子顕微鏡標本は 2.5% グルタルアルデヒドで固定後、1% 四酸化オスミウム固定液と 1% タンニン酸で導電染色し、エタノールで脱水処理した後、t-ブチルアルコールで凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、イオンスパッタ法で導電処理し、走査電子顕微鏡 (JSM-5400LV, 日本データム) で水晶体前囊表面を観察した。

11) 房水蛋白濃度測定

各群における実験前および硝子体内注射 1 週後の左眼房水蛋白濃度を測定した。眼房水の採取方法は、水晶体

摘出時と同様の麻酔方法による全身麻酔下で行った。25Gの注射針を左眼角膜輪部より前眼房へ刺入して眼房水を0.1～0.2ml採取した。房水蛋白濃度の測定はMicro-BCA法（Micro BCA Protein Assay Kit, PIECE）で測定した。統計処理は分散分析法（t検定）を用いて行った。

3 成績

1) ドットブロッキング

今回の実験方法で作成した水晶体可溶性蛋白液がウサギで認識されるかをドットブロッキング法を用いて同種水晶体蛋白に対する体液性免疫の成立を調べた。ドットブロッキング法を行った結果、投与前血清では水晶体可溶性蛋白質の希釈系列部位に発色が見られなかったのに対して、同種水晶体可溶性蛋白感作2週後の血清では希釈系列の濃度に比例して発色が見られ、ウサギの同種水晶体蛋白に対する特異抗体の産生が確認された（図4）。

2) カラムクロマトグラフィー

ウサギの自己水晶体可溶性蛋白に対する免疫原性を調べる目的で、水晶体可溶性蛋白液をカラムクロマトグラフィーで各クリスタリン分画蛋白に分離した。その結果、フラクションNo. 63、72、83、98の4点を中心とする吸光度のピークが得られ、 α -クリスタリン、 β_H -クリスタリン、 β_L -クリスタリンおよび γ -クリスタリ

ンの 4 分画蛋白に分離できた（図 5）。

3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

ウサギ水晶体可溶性蛋白と、 α 、 β_{II} 、 β_L 、 γ －クリスタリン分画蛋白の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法における電気泳動パターンを図 6 に示した。その結果、 α －クリスタリン分画蛋白は 24.9 および 28.3 kDa の分子量であり、 αA 、 αB －クリスタリンの 2 分画蛋白が確認された。 β_{II} －クリスタリン分画蛋白は 31.6、34.5、36.2、38.7 kDa の分子量で、 β_L －クリスタリン分画蛋白は 30.8、34.3、35.7、38.7、44.1 kDa の分子量であった。 γ －クリスタリン分画蛋白は 25.9 kDa の分子量であった。

4) 免疫原性（ウエスタンブロット法）

抗体価の上昇がみられた自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群の、自己水晶体可溶性蛋白の皮下注射 3 週間後のウサギ血清を用いて、ウエスタンブロッティングを行った結果を図 7 に示した。抗原にウサギ同種水晶体可溶性蛋白を用いると、 αA －クリスタリンの分子量 24.9 kDa、 β_{II} －クリスタリンの分子量 38.7 kDa、 γ －クリスタリンの分子量 25.9 kDa の位置にバンドが検出された。

5) ELISA 法

これまで、水晶体起因性ぶどう膜炎モデルの作出方法の違いにより、その炎症程度が異なることから、自己水晶体蛋白が抗原として成立するには、抗原の投与方法に

より抗体産生も異なるのではないかと考えられた。このため今回の実験では、自己水晶体可溶性蛋白の投与方法による抗原性の違いについて ELISA 法を用いて調べた。自己水晶体可溶性蛋白に対する抗体価は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群および自己水晶体免疫群で、自己水晶体可溶性蛋白の皮下注射 2 週後より上昇を始めた。自己水晶体硝子体内注射群および対照群では抗体価の上昇がみられなかった（図 8）。また、抗体価の上昇がみられた自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群と、自己水晶体免疫群の間で、自己水晶体可溶性蛋白の皮下注射後、硝子体注入時（ $p=0.456$ ）と剖検時（ $p=0.300$ ）の抗体価に有意な違いはなかった。

6) 走査電子顕微鏡による水晶体前囊表面の観察

走査電子顕微鏡による水晶体前囊表面像および表面所見を図 9 および表 5 に示した。水晶体前囊表面の評価として、500 倍所見で付着蛋白の程度を評価した。水晶体前囊表面に付着蛋白がみられないものを－、少量の点状もしくは糸状の蛋白が散在して沈着したものを＋、糸状または網状蛋白が散在して沈着したものを++、糸状または網状の蛋白が重層して沈着したものを+++として評価した。自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群の前囊付着蛋白の程度は、5 検体とも+++であった。5000 倍所見では、5 検体中 2 検体で点状の蛋白が集塊として付着し、5 検体中 3 検体で網状の蛋白が集塊として前囊表

面に付着して観察された。自己水晶体免疫群の前囊付着蛋白の程度は、4検体とも－であった。5000倍所見でも、4検体とも前囊表面の付着蛋白は観察されなかった。自己水晶体硝子体内注射群の前囊付着蛋白の程度は、4検体中2検体で＋、残りの2検体で＋＋であった。5000倍所見では、4検体中2検体で点状の蛋白が付着し、残りの2検体で網状の蛋白が前囊表面に付着して観察された。対照群の前囊付着蛋白の程度は、3検体とも－であった。5000倍所見でも、3検体とも前囊表面の付着蛋白は観察されなかった。

自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群と自己水晶体硝子体内注射群で、前囊付着蛋白が観察され、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群で多く観察された。

7) 眼球組織のH.E.染色による組織所見

眼球組織のH.E.染色による組織所見を図10、11および表6～10に示した。結膜の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では、7検体中6検体で結膜下組織に細胞浸潤がみられた。その内容は、リンパ球、マクロファージの細胞浸潤が主体であり、少量の偽好酸球の浸潤が限局的にみられた。自己水晶体免疫群では、6検体中2検体で結膜の肥厚と、少数の偽好酸球やマクロファージの細胞浸潤がみられた。自己水晶体硝子体内注射群では、9検体中4検体で少数のマクロファージ、リンパ球、偽好酸球の浸潤がみられた。対照群では、4検体

中 1 検体で結膜下織に限局的な浮腫がみられた。

角膜の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では、7 検体中 6 検体で角膜内皮の軽度な浮腫が認められた。しかし全検体において角膜上皮細胞の配列は均一で、角膜実質内に血管新生像や細胞浸潤はみられなかった。自己水晶体免疫群、自己水晶体硝子体内注射群および対照群においては、角膜上皮細胞、内皮細胞とも配列は均一なものであり、角膜実質内に浮腫や細胞浸潤および血管新生像はなく正常角膜様の所見であった。

虹彩の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では、支質の中程度の肥厚が 7 検体中 6 検体でみられ、支質内は線維芽細胞が増殖し、結合組織が増生し、配列は不整であった。支質内への細胞浸潤は 6 検体でみられ、リンパ球、マクロファージの浸潤が主体であり、1 検体においてのみ少数の偽好酸球の浸潤が観察された。また、支質内の血管新生像は全検体でみられた。自己水晶体硝子体内注射群では、支質が軽度に肥厚しているものが 9 検体中 6 検体でみられた。支質の結合組織の配列はほぼ規則正しいものであった。細胞浸潤としては 1 検体でのみ、少数のマクロファージの浸潤がみられる程度であった。自己水晶体免疫群および対照群においては、血管新生像、細胞浸潤もなく結合組織の配列も規則正しく正常虹彩様の所見であった。

毛様体の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モ

デル群では、毛様体上皮の結合は緊密であったが、7 検体中 5 検体で実質に軽度～中程度の浮腫がみられた。また 2 検体で実質内にリンパ球、マクロファージの細胞浸潤、1 検体で偽好酸球の細胞浸潤がみられた。自己水晶体免疫群、自己水晶体硝子体内注射群および対照群においては、毛様体上皮間の配列は緊密で、実質内に浮腫、血管新生像、細胞浸潤はみられなく正常毛様体様の所見であった。

脈絡膜の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群で細胞浸潤が 7 検体すべてでみられた。その成分は、マクロファージ、偽好酸球が主体でリンパ球も伴っていたが、いずれも軽度な浸潤であった。自己水晶体免疫群では 6 検体中 1 検体で、少数の偽好酸球の浸潤がみられた。自己水晶体硝子体内注射群では、9 検体中 1 検体で、少数の偽好酸球の浸潤がみられた。また 1 検体で軽度の血管新生像がみられた。対照群では全検体において、脈絡膜の血管の配列は規則正しいもので細胞浸潤はみられなかった。

網膜の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルでは、7 検体とも網膜全体の菲薄化と神経節細胞数の減少がみられた。神経線維層の密度は疎で、内顆粒層および外顆粒層の細胞核の減少が顕著であり、層内に空胞が目立った。また 6 検体で、内境界膜に接した硝子体中にフィブリンと共に偽好酸球、リンパ球およびマクロフ

マクロファージの細胞浸潤がみられた。自己水晶体硝子体内注射群では、6検体で網膜の菲薄化がみられた。その内容は内顆粒層の細胞核の減少が9検体中3検体でみられ、外顆粒層の細胞核の減少が3検体でみられた。神経節細胞数の減少は5検体でわずかにみられ、3検体で明瞭にみられた。これら網膜の病理所見は、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群に比べ軽度であった。自己水晶体免疫群および対照群においては、全検体で網膜の菲薄化や細胞浸潤がみられなかった。

以上をまとめると、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では炎症所見が他の群に比べ強くみられた。その炎症所見は前眼部と後眼部で異なるものであった。前眼部に位置する結膜、角膜、虹彩、毛様体ではマクロファージとリンパ球を主体とした細胞浸潤が観察された。また虹彩では血管新生像と結合組織の増生が観察された。後眼部に位置する脈絡膜、網膜の細胞浸潤は偽好酸球、リンパ球、マクロファージを主体とするものであった。自己水晶体硝子体内注射群において、虹彩の血管新生、網膜の神経節細胞数の減少、内顆粒層および外顆粒層の減少がみられたが、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群に比べ軽度であった。細胞浸潤としては結膜下組織で少量のマクロファージとリンパ球が観察された。自己水晶体免疫群および対照群の組織所見では特に変化は観察されず、ほぼ正常眼様の所見であった。

8) 房水蛋白濃度測定

ぶどう膜炎の炎症評価を行う目的で、硝子体内注射 1 週後の房水蛋白濃度を測定し図 12 に示した。硝子体内注射 1 週後の房水蛋白濃度は、各群間で有意な差はみられなかった。また、各群における実験前と硝子体注射時の房水蛋白濃度にも有意な差はみられなかった。

4 考察

今回のウサギを用いた実験で、まず、ウサギの水晶体を囊外摘出術で摘出しそれを可溶性蛋白液として皮下注射した後で、抗体が産生されるかをドットブロッキング法で調べた。その結果、ウサギに同種水晶体可溶性蛋白を抗原として皮下に注射すると、注射 2 週後で同種水晶体蛋白に対する特異抗体の産生が確認された。これは、今回の水晶体可溶性蛋白液の作成方法と、投与方法で水晶体可溶性蛋白が抗原となることが確認できた。そこで自己水晶体蛋白を用いて LIU と水晶体前囊表面に関する研究を行った。

自己水晶体可溶性蛋白を抗原とした抗体の産生およびその特性について、ウエスタンブロット法を用いて自己水晶体可溶性蛋白の皮下注射 2 週後の血漿で調べた。その結果、水晶体分画蛋白である α -、 β_{II} -、 β_{L} -、 γ -クリスタリン分画蛋白のうち、 α -、 β_{II} の一部と γ -クリスタリン分画蛋白に対して自己抗体が産生された。 α -

クリスタリン分画蛋白に対する抗体は α A-と α B-クリスタリン分画蛋白のうち、 α A-クリスタリン分画蛋白のみ產生された。過去の実験モデルで同種水晶体の眼内への注入および水晶体破囊による眼内への水晶体蛋白の免疫では、 α -クリスタリンのみもしくは α 、 β -クリスタリンの2分画蛋白に対して抗体產生が報告され、 γ -クリスタリン分画蛋白に対する抗体產生は報告されていない[16, 17, 38]。クリスタリン蛋白は分子生物学的に α -と β - γ -スーパーファミリーに大別されることが知られ、今回の抗体は異なったファミリーに由来するクリスタリンに対して產生されたものであった。この理由は明らかでないが、 γ -クリスタリン分画蛋白が抗原物質としてウサギで認識されることが、今回初めて確認できた。

これまで報告されているLIUモデルの作出は、水晶体抗原の投与方法も異なり、発症させたぶどう膜炎の程度も異なるものであった。同種水晶体蛋白に対する抗体は、同種水晶体蛋白の皮下注射後に產生されるとの報告がある[1]。また、同種 α -クリスタリン分画蛋白の筋肉内注射による感作で、抗体が產生されたとの報告[70, 71]もあり、いずれもLIUモデルで水晶体蛋白を皮下もしくは筋肉内に注射する方法で感作することで抗体が產生されると報告されている。しかし、眼内に注射して抗体が產生されたという報告はない。この水晶体蛋白の投与方法による抗体產生の違いが、過去の水晶体起因性ぶどう膜炎

モデルの作出方法と炎症程度の違いに関連があると考えた。そこで、次に自己水晶体可溶性蛋白の投与方法による抗体の産生状況について ELISA 法を用いて調べた。

その結果、自己水晶体可溶性蛋白を皮下に注射した自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群および自己水晶体免疫群で、皮下注射 2 週後より抗体価の上昇がみられた。しかし、自己水晶体可溶性蛋白を硝子体に注射した自己水晶体硝子体内注射群では抗体価の上昇はみられなかった。今回の実験により、自己水晶体可溶性蛋白を皮下注射して感作すると抗原として認識され、眼内への注射では抗原として認識されないものであり、自己水晶体可溶性蛋白の抗体の成立は免疫部位により異なることが示された。このことは水晶体起因性ぶどう膜炎の発症機序の解明に役立つものと考えられる。

走査電子顕微鏡所見では、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群の水晶体前囊表面への付着蛋白は、前囊表面全体を覆うように点状もしくは網状に重層して観察された。また自己水晶体硝子体内注射群でも、水晶体前囊表面への付着蛋白が観察されたが、点状もしくは網状に散在し、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群に比べ軽度であった。また自己水晶体免疫群および対照群では前囊表面への付着蛋白は観察されなかった。ヒト白内障の水晶体前囊表面の走査電子顕微鏡による観察では、前囊表面の変化を認めていない[25, 35]。ヒトの偽落屑症候群に

合併した両眼水晶体亜脱臼で、前囊表面に羽毛だった構造物を認めているが、これは偽落屑物であり、今回のウサギの結果とは異なる沈着物である[39]。今回の実験的に発症させたLIUの結果より、モデルの作出方法により前囊付着蛋白の程度が異なることが初めて観察された。

実験群の眼球組織所見を検討した。硝子体注射1週後に眼球を摘出し、摘出眼球を光学顕微鏡下で、H.E.染色法により染色した組織標本の観察を行った。ウサギは偽好酸球という独特な特徴をもった白血球が存在し、他の動物の好中球に相当するもので、核は多形性で細胞質に大型の赤色顆粒と小型の好酸性顆粒を持つ[59]。このことをふまえて組織所見の検討を行った。

本来、自己組織である水晶体蛋白を抗原として注射することによりぶどう膜炎の発症がみられた。LIUの成立過程については、水晶体囊により胎生早期に隔離された水晶体蛋白が、白内障の発症などを契機に異物として免疫系に暴露されることで水晶体抗体が産生され炎症が起こるとする説[2, 6, 72, 79]、水晶体蛋白に対して成立している特殊な免疫寛容が細菌感染などで破綻するという説[62]、水晶体成分そのものが毒性を示すとする説がある[81]。今回の実験で発症したぶどう膜炎は、これらのことが関与し、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群でぶどう膜炎が発症したと考えられた。しかし、自己水晶体免疫群では炎症はみられず、また自己水晶体硝子体内

注射群では軽度のぶどう膜炎が発症し、自己水晶体蛋白の投与方法により炎症程度が異なる結果が得られた。このことから、水晶体起因性ぶどう膜炎の成立には眼内の特殊な免疫系の関与が推察された。そこで次に、自己水晶体蛋白の投与方法による組織所見の検討を行った。

自己水晶体可溶性蛋白の皮下注射による感作で、自己水晶体蛋白に対する抗体価が上昇した自己水晶体免疫群と自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群の組織所見を比較した。自己水晶体免疫群ではぶどう膜炎は認められず、水晶体起因性ぶどう膜炎群ではぶどう膜炎を発症した。これまでの実験モデルでも同種水晶体蛋白の皮下注射後に、同種水晶体蛋白を静脈血管に再度抗原として注入しても、ぶどう膜炎を発症しないとの報告がある[1]。このことは自己水晶体蛋白に対する抗体が産生された状態下でも眼内へ水晶体蛋白が暴露されなければ、ぶどう膜炎の発症はないと考えられる。自己水晶体免疫群でぶどう膜炎の発症がみられなかったことは、水晶体囊により水晶体蛋白が眼内より隔離されており、眼内へ水晶体蛋白が暴露されなかったためと考えられた。このことから、水晶体囊の機能および形状的变化が、水晶体起因性ぶどう膜炎の病態に関与していることが考えられる。

次に、自己水晶体可溶性蛋白を硝子体内に注射した自己水晶体硝子体内注射群と自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群の組織所見を比較した。自己水晶体硝子体内注

射群の組織所見に比べ、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では、細胞浸潤を伴ったぶどう膜炎がみられた。このことは水晶体起因性ぶどう膜炎の成立には、自己水晶体蛋白に対する抗体が産生された状態で眼内へ水晶体蛋白が暴露されると強く発症することが示された。しかし、自己水晶体硝子体内注射群で、細胞浸潤を伴わないが軽度のぶどう膜炎がみられたのは、自己水晶体蛋白が眼内に注入されたことと、眼内の特殊な免疫機構の関与が考えられた。この特殊な免疫機構は、前房関連性免疫偏位 (Anterior chamber associated immune deviation: ACAID) といわれ、眼内で暴露された抗原に対して遅延型過敏反応は抑制されるが、抗体産生などの抗原特異的 T 細胞の感作は保たれるという機序である。眼内に抗原が侵入すると、前房関連性免疫偏位を誘発させるシグナルが静脈、心臓を経て脾臓へと送られる。脾臓でさらに修飾を受けたシグナルは眼内および全身に送られ、眼内の遅延型過敏反応を抑制するといわれる [3, 40, 78, 84]。これまでのぶどう膜炎モデルの報告においても、Mizuno らは可溶性抗原として、実験的ぶどう膜炎を誘導するのに用いられている、ウシ血清アルブミンと網膜から抽出した S 抗原を使用して前房免疫反応を調べ、可溶性抗原の眼内注射では、前房関連性免疫偏位により眼内で遅延型過敏反応が抑制され、ぶどう膜炎が発症されないと報告している [40]。このことから自己水晶体硝子体内注射群

では眼内の炎症は細胞浸潤を伴わない軽度のぶどう膜炎であったと考えられる。しかし、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では、眼内に抗原を注入させたことにより、前房関連性免疫偏位が成立していたと推測されたにもかかわらず細胞浸潤を伴う炎症がみられた。これはあらかじめ抗原を皮下に注射して感作すると、抗原提示細胞により抗原提示を受けた抗原特異的なT細胞が眼内に侵入し、眼内で再び抗原刺激を受けて活性化し、この活性化T細胞が種々のリンホカインを産生することにより、リンパ球、マクロファージ、多核白血球などが遊走して多様な眼内炎が成立するといわれる[30]。そのため前房関連性免疫偏位の成立下でも抗原特異的T細胞が抑制されないことによりぶどう膜炎が発症した可能性も考えられた。これまでのLIUの報告においても、同種水晶体蛋白を皮下に感作した後、同種水晶体蛋白を硝子体に注射することにより、肉芽腫性眼内炎を発症する[1,51]ことと、同種水晶体蛋白を皮下に注射した後、水晶体前嚢を切開することで、眼内炎を誘発できる[1,38]ことが報告されている。今回の自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルにおいても同様の機序により、ぶどう膜炎が発症したものと考えられた。以上より、自己水晶体起因性ぶどう膜炎の成立には、自己水晶体と眼内の特殊な免疫系である前房関連性免疫偏位が関与していると考えられた。そのため自己水晶体可溶性蛋白の投与方法によってLIUの炎

症程度が異なることが考えられた。

摘出前囊表面の走査電子顕微鏡所見より、前囊付着蛋白は自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群で最も多く付着し、自己水晶体硝子体内注射群で少なく、自己水晶体免疫群および対照群で認められず、これは眼組織所見で認められる炎症の程度と比例することから、前囊付着蛋白はLIUの炎症程度に関連して発現することが明らかになった。

LIUモデル群では、前眼部と後眼部の炎症所見が異なるものであった。前眼部の結膜、虹彩、毛様体に浸潤した細胞はマクロファージとリンパ球の浸潤が主体であり、また虹彩では、血管新生像、結合組織の増生が観察され、組織の増殖反応[42]がみられる慢性炎症所見であった。後眼部の脈絡膜、網膜へ浸潤した細胞はマクロファージ、リンパ球に加え、多くの偽好酸球が観察される急性炎症所見であった。ラットの静脈内に網膜特異的蛋白質であるS抗原を感作させたTリンパ球を注入することにより実験的ぶどう膜炎を発症させた研究でも、前眼部の炎症が後眼部の炎症に先立つという結果を得ている[49]。ウサギは前眼部の血液分布が後眼部に比べ密であること、また前眼部には硝子体などの障壁が存在しないことから、前部ぶどう膜炎は後部ぶどう膜炎の10倍の頻度で発症しやすいとの報告もある[23]。またウサギのぶどう膜炎モデルでは、同種水晶体蛋白を皮下に注射後、水晶体蛋

白を硝子体に注射してぶどう膜炎を発症させたモデルでは、注射後4日の組織所見で虹彩および毛様体へ偽好酸球の浸潤を認めるが脈絡膜には認められないことが報告されている[1]。これはウサギの水晶体起因性ぶどう膜炎においても急性炎症時には虹彩および毛様体に偽好酸球の浸潤があることを示している。これらのことから、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群で自己水晶体可溶性蛋白の硝子体内注射1週後の前眼部は慢性炎症期であり、後眼部は急性炎症期であった。前眼部と後眼部では炎症時期に差があり、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群では、前眼部の炎症が先行するものであった。

ぶどう膜炎の炎症の評価として、実験前と硝子体注射1週後の眼房水を採取し、房水蛋白濃度を測定した。今回の実験では各群において実験前と硝子体注射1週後の房水蛋白濃度に有意な差はみられなかった。また、硝子体注射1週後の房水蛋白濃度も各群間で有意な差はみられなかった。ウサギの前眼部への血液供給は、長後毛様体動脈の供給を受ける毛様体扁平部であり、前眼部には血液房水関門が存在している[13, 22]。眼内の炎症により血液房水関門の破壊[9]が起これば、毛様体扁平部よりフィブリンおよび白血球が後房へ漏出し、水晶体と毛様体皺壁部との間を抜けて瞳孔から前眼房中に流出する[10]。このため、ぶどう膜炎では毛様体扁平部より漏出したフィブリンと白血球により房水蛋白濃度の上昇がみられる

[10]。実験的ぶどう膜炎時の房水蛋白濃度については、小河らが10%牛血清アルブミンを抗原とした実験モデルで、注射1日後で房水蛋白濃度は最も高くなり、その後減少することを報告している[43]。また、高橋らは *Salmonella typhimurium* 由来のエンドトキシンを抗原とした実験モデルにおける房水蛋白濃度は、静脈注射後1～1.5時間で前房蛋白濃度の上昇が始まり、3～6時間後にピークに達し、24時間後には、注射前の房水蛋白濃度に戻ると報告している[74]。実験的ぶどう膜炎時の房水蛋白濃度はぶどう膜炎発症後、一過性の上昇であると報告されている[7]。

組織所見で前眼部の炎症がみられた自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群および硝子体注射群では、硝子体注射1週間後の房水蛋白濃度と、実験前の房水蛋白濃度と有意な差がみられないことより、この時点での前眼部の炎症は軽度であると考えられた。房水蛋白濃度の上昇がなく、組織所見で前眼部の炎症が急性期でないことより、今回の実験で作出した自己水晶体起因性ぶどう膜炎は、一過性の炎症であったことが推察された。今回の実験で、房水の蛋白濃度に変化はみられなかった。しかし、眼房水には眼組織を炎症や免疫応答から守る多種の免疫抑制物質を含み、前房関連性免疫変位に関与するといわれている[18, 19, 40, 45, 67, 68, 69, 87]。よって、今後、眼内の特殊な免疫を調べるためには、今回作出したモデル動物

で房水蛋白濃度の経時的な測定と、房水組成の解析が必要であると考えられた。

前囊付着蛋白は、自己水晶体蛋白と眼の特殊な免疫機構により誘発された一過性の水晶体起因性ぶどう膜炎により発現したものと考えられた。

5 小 括

ウサギを用いて自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルを作出し、水晶体起因性ぶどう膜炎と水晶体前囊付着蛋白の発現機序について免疫学的および病理学的に検討した。免疫学的検討として、水晶体可溶性蛋白液をカラムクロマトグラフィーで各クリスタリン分画蛋白に分離した後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ウェスタンブロット法および ELISA 法で行った。病理学的検討として、走査電子顕微鏡による水晶体前囊表面の観察および眼球組織の H.E. 染色による組織検査を行った。ぶどう膜炎の炎症評価として房水蛋白濃度の測定を行った。

ウサギで同種水晶体可溶性蛋白に対する抗体が抗原の皮下注射 2 週後で産生されたのをドットブロッキング法で確認した後、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルを作出した。

ウサギで自己水晶体可溶性蛋白を抗原として皮下に注射することで注射 2 週後より抗体が産生され、それは α A、 β II、 γ - クリスタリン分画蛋白に対するものであった。

しかし眼内に水晶体可溶性蛋白を注射しても抗体は產生されないことから、眼内には特殊な免疫機構が存在するものであった。走査電子顕微鏡所見では、水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群は他の群に比べ多くの前囊付着蛋白が観察され、組織所見でぶどう膜炎がみられたことから、前囊付着蛋白はぶどう膜炎により発現したものと考えられた。しかし組織所見は、前眼部と後眼部では炎症時期に差があり、前眼部は慢性炎症期であり、そのときの房水蛋白濃度は実験前と有意な差はみられなかった。よって、前眼部は一過性の炎症であったことが推察された。

以上より、前囊付着蛋白は、自己水晶体蛋白と眼の特殊な免疫機構により誘発された一過性の水晶体起因性ぶどう膜炎により発現したものと考えられた。

IV 章 総 括

イヌの白内障手術は、水晶体起因性ぶどう膜炎の存在により、術後の経過が異なり手術の成功率に影響を与えるものである[80]。白内障手術は水晶体前嚢を切開した後に、水晶体皮質および核を除去する方法であり、前嚢切開は白内障手術で重要な操作である[48]。イヌの白内障手術において、摘出した前嚢は症例ごとに硬さや、形状が異なるものであり、また術前から術後にみられるぶどう膜炎も症例ごとに異なることから、前嚢の変化はぶどう膜炎に関連するものと推察した。そこで水晶体起因性ぶどう膜炎の病態把握を目的として、手術時に摘出した水晶体前嚢を観察した。走査電子顕微鏡による白内障症例および水晶体前方脱臼症例の前嚢表面の観察像では、全ての症例で前嚢付着蛋白が観察された。これは健常犬では観察されないものであり、これまで報告はなく、初めて観察されたものであった。また前嚢付着蛋白の程度は、初診時の毛様充血の程度に比例する傾向がみられた。しかし初診時に毛様充血がみられた症例では、白内障手術前までぶどう膜炎の治療を行ったものの、手術直前の毛様充血の程度と前嚢付着蛋白の程度には比例する傾向はみられなかった。このことは白内障や水晶体脱臼の手術に際して、毛様充血がない場合でも、水晶体起因性ぶどう膜炎を考慮した対応が必要と考えられた。ほぼ同一年齢による症例と健常犬の前嚢中央部の厚さは白内障お

よび水晶体前方脱臼症例で、有意に前囊の厚さの増加がみられた。また症例すべての前囊中央部の厚さと手術時の年齢との間に、有意な正の相関がみられた。白内障および水晶体前方脱臼症例で前囊の厚さは増加するものであった。

以上から、水晶体前囊付着蛋白は初診時の毛様充血が重度であるにつれて増加し、前部ぶどう膜炎の程度を示す一指標と思われた。

ウサギの自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルの作出を行い、水晶体起因性ぶどう膜炎と前囊表面付着蛋白の関連について検討した。水晶体可溶性蛋白に対する抗体価の推移を ELISA 法で調べたところ、自己水晶体可溶性蛋白に対する抗体価は自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群および自己水晶体免疫群で、感作 2 週後より上昇した。自己水晶体硝子体内注射群および対照群では抗体価の上昇がみられなかった。産生抗体の特性では、水晶体可溶性蛋白を Sepharose CL-6B でクリスタリン蛋白を溶出精製し、各クリスタリンを SDS - PAGE で泳動した後、免疫ブロッティング法で抗体の特性を調べたところ、水晶体に対する抗体は α A、 β II、 γ - クリスタリン分画蛋白に対するものであった。これらの抗体に対する抗原はそれぞれ α A - クリスタリンの分子量 24.9 kDa、 β II - クリスタリンの分子量 38.7 kDa、 γ - クリスタリンの分子量 25.9 kDa の蛋白で検出された。

水晶体起因性ぶどう膜炎モデルの前囊表面を走査電子顕微鏡で観察すると、多くの付着蛋白が重層して存在し、イヌの症例でみられたものと類似した所見であった。組織所見では、前眼部と後眼部の炎症像は異なるものであった。前眼部ではマクロファージとリンパ球の細胞浸潤を主体とするものであり、後眼部ではマクロファージとリンパ球に加え、偽好酸球の浸潤が多く観察され、前眼部の炎症は慢性炎症期であった。また、この時点での房水蛋白濃度は実験前と変化がないものであり、前眼部の炎症は軽度であったことから、自己水晶体を抗原とした水晶体起因性ぶどう膜炎は一過性の炎症であることが示された。しかし、前眼部の炎症が軽度であっても、前囊表面付着蛋白は多いものであることから、付着蛋白量は水晶体起因性ぶどう膜炎が存在したことを証明するものであると考えられた。

以上のことから、白内障症例でみられる水晶体前囊付着蛋白は水晶体起因性ぶどう膜炎に起因して発現することが示された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました麻布大学獣医学部内科学第三研究室、和田恭則教授、印牧信行助教授に深く甚大なる感謝の意を表します。また御懇切な御校閲をいただきました、麻布大学獣医学部外科学第二研究室、鈴木立雄教授、内科学第二研究室、山田隆紹教授に深く感謝の意を表します。さらに、本研究の遂行に際し、御協力御援助頂きました麻布大学獣医学部獣医学科6年次、臼井慶氏、三浦健氏ならびに内科学第三研究室内の学生諸氏に感謝の意を表します。

引用文献

- [1] Ahuja, O. P., Kothalkar, M. S. and Shulka, B. R. 1972. Experimental lens-induced uveitis. 1. Systemic sensitization. *Indian J. Ophthalmol.* 20(2): 70-76.
- [2] Angunawela, I. I. 1987. The role of autoimmune phenomena in the pathogenesis of cataract. *Immunol.* 61(3): 363-368.
- [3] Benson, J. L. and Niederkorn, J. Y. 1992. Immune privilege in the anterior chamber of the eye: alloantigens and tumour-specific antigens presented into the anterior chamber simultaneously induce suppression and activation of delayed hypersensitivity to the respective antigens. *Immunol.* 77(2): 189-195.
- [4] Blogg, J. R. and Coles, E. H. 1971. Clinicopathological Aspects of Canine Aqueous Humour Proteins. *Res. Vet. Sci.* 12: 95-100.
- [5] Brinkman, C. J., Winkens, H. J. and Broekhuysse, R. M. 1979. Experimental uveitis in isolated humoral and cellular immunity. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 210(1): 19-30.
- [6] Charukamnoetkanok, P., Fukushima, A., Whitcup, S. M. Gery, I. and Egwuagu, C. E. 1998. Expression of ocular autoantigens in the mouse thymus. *Curr. Eye Res.*

17(8): 788-792.

[7] Chen, J., Fujino, Y. and Takahashi, T. 1999. Experimental uveitis induced by intravitreal or intravenous lipoteichoic acid in rabbits. *Jpn. J. Ophthalmol.* 43(5): 368-374.

[8] Dziezyc, J., Millichamp, N. J., Rohde, B. H., Baker, J. S. and Chiou, G. C. Y. 1989. Effects of lipooxygenase inhibitors in a model of lens-induced uveitis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50(11): 1877-1882.

[9] Fredde, T. F. and Sacks-Wilner, R. 1989. Interendothelial junctions of the rabbit iris vasculature in anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 6:1104-1111.

[10] Fredde, T. F., Bartels, S. P., Barsotti, M. F. and Kamm, R. D. 1990. The source of proteins in the aqueous humor of the normal rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1: 125-137.

[11] 藤田善史, 福宿宏英, 三村康男, 小川剛史. 1986. 実験的ぶどう膜炎における角膜後面沈着物の観察. あたらしい眼科 3(4): 563-567.

[12] 藤原久子, 片山寿夫, 亀田泰, 五島紳一郎. 1988. 眼内炎と房水中のアナフィラトキシン. あたらしい眼科 5(3): 468-470.

[13] Gelatt, K. N. 1991. *Veterinary Ophthalmology*,

Second edition. pp. 75-87, 656-679. Lea and Febiger, Pennsylvania.

[14] Gerardi, J. G., Colitz, C. M. H, Dubielzig, R. R. and Davidson, M. G. 1999. Immunohistochemical analysis of lens epithelial-derived membranes following cataract extraction in the dog. *Vet. Ophthalmol.* 2: 163-168.

[15] Glover, T. D. and Constantinescu, G. M. 1997. SUEGERY FOR CATARACTS. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 27(5): 1143-1173.

[16] Goldschmidt, L., Goldbaum, M., Walker, S. M. and Weigle, W. O. 1982. The immune response to homologous lens crystallin. I. Antibody production after lens injury. *J. Immunol.* 129(4):1652-1657.

[17] Goldschmidt, L., Goldbaum, M., Walker, S. M. and Weigle, W. O. 1982. The immune response to homologous lens crystallin. II. Amodel of Ocular Inflammation Involving Eye Injuries at Separate. *J. Immunol.* 129(4): 1658-1662.

[18] Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M. Green, D. R. and Ferguson, T. A. 1995. Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270(5239): 1189-1192.

[19] Griffith, T. S., Yu, X., Herndon, J. M. Green,

D. R. and Ferguson, T. A. 1996. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5(1): 7-16.

[20] Howes, E. L. Jr., Cole, P. W., Adair, T. M. Cruse, V. K. and Pollycove, M. 1994. Cellular and vascular responses in acute experimental ocular inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 12: 4031-4038.

[21] 井上透. 1987. 実験の水晶体起因性眼内炎. 病理組織学のおよび免疫組織化学的研究. 日本眼科学会雑誌 91(3): 397-408.

[22] Jack, H. P., Charles, D. D., Irma, E. and Gordon, L. R. 1960. Anatomy and histology of the eye and orbit in domestic animals. pp. 260-297. Charles C Thomas publisher, Illinois.

[23] Jerzy, G. 1976. Course and dynamics of immunologic iridocyclitis in the rabbit. *Arch. Immunol. E. T. Therapiae Experimentalis*, 24: 401-406.

[24] Kaplan, H. J., Diamond, J. G. and Brown, S. A. (1979): Vitrectomy in experimental uveitis. II. Method in eyes with protein-induced uveitis. *Arch. Ophthalmol.* 97(2): 336-339.

[25] 河合憲司, 塩谷滝雄, 恩田恵. 1996. 走査電子顕微鏡によるアトピー白内障の前囊下混濁の観察. 臨床眼科 50(9): 1567-1570.

- [26] 毛塚剛司, 坂井潤一, 横井秀俊, 深井徹, 臼井正彦. 1997. Transforming growth factor- β 1 による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制機構の解析. 日本眼科学会雑誌 101(11): 847-852.
- [27] Koch, F. H., Augustin, A. J., Grus, F. H. and Spitznas, M. 1996. Effects of different antioxidants on lens-induced uveitis. *Ger. J. Ophthalmol.* 5: 185-188.
- [28] 児玉俊夫. 1991. 前房水中に漏出する水晶体クリスタリンと老人性白内障の関連について. 日本眼科学会雑誌 95: 1065-1070.
- [29] 小島正美. 1996. 水晶体の組成(イオン・蛋白質). pp. 180-183. *In*: 眼科診療プラクティス 22 やさしい眼の細胞・分子生物学. (本田孔子編), 株式会社文光堂, 東京.
- [30] 小竹聡. 1991. ぶどう膜炎と感染症 実験的ぶどう膜炎. あたらしい眼科 8(4): 551-555.
- [31] Krohne, S. G., Reagan, W. J. and Welch, P. M. 1998. Use of laser flare-cell photometry to count anterior chamber canine leukocytes and latex beads in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 59(10): 1221-1226.
- [32] Lai, J. C., Lobanoff, M. C., Fukushima, A. Wawrousek, E. F., Chan, C. C., Whitcup, S. M. and Gery I. 1999. Uveitis induced by lymphocytes sensitized

against a transgenically expressed lens protein.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40(11): 2735-2739.

[33] Lannek, E. B. and Miller, P. E. 2001. Development of glaucoma after phacoemulsification for removal of cataracts in dogs: 22 cases(1987-1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218(1): 70-76.

[34] Linklater, H. A., Dzialoszynski, T., Mcleod, H. L. and Stanford, S. E. 1990. Modelling cortical cataractogenesis. XI. Vitamin C reduces γ - crystallin leakage from lenses in diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 51: 241-247.

[35] Los, L. I., Jongebloed, W. L. and Worst, J. G. 1989. Lens-capsule material of human and animal origin, studied by SEM. *Doc. Ophthalmol.* 72(3-4): 357-365.

[36] Marak, G. E., Font, R. L., Czawlytko, L. N. and Alepa, F. P. 1974. Experimental lens-induced granulomatous endophthalmitis: Preliminary histopathologic observations. *Exp. Eye Res.* 19: 311-316.

[37] 松岡里佳, 渡辺牧夫, 高橋徹. 1995. 水晶体囊真性落屑の3例4眼. あたらしい眼科, 12(11):1773-1777.

[38] Misra, R. N., Rahi, A. H. and Morgan, G. 1977. Immunopathology of the lens. II. Humoral and cellular

immune responses to homologous lens antigens and their roles in ocular inflammation. *Br. J. Ophthalmol.* 61(4): 285-296.

[39] 宮村紀毅, 宮華青, 大庭啓介, 雨宮次生. 1999. 偽落屑症候群に合併した両眼水晶体亜脱臼の臨床像と電子顕微鏡的観察. *臨床眼科* 53(3): 365-369.

[40] Mizuno, K., Clark, A. F. and Streilein, J. W. 1989. Anterior chamber-associated immune deviation induced by soluble antigens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30(6) 1112-1119.

[41] Nagaki, Y., Hayasaka, S., Kadoi, C., Nakamura, N. and Hayasaka, Y. 2001. Effects of scutellariae radix extract and its components (baicalein, baicalin, and wogonin) on the experimental elevation of aqueous flare in pigmented rabbits. *Jpn. J. Ophthalmol.* 45(3): 216-220.

[42] 名倉宏, 宮澤正顕. 2000. 炎症・免疫・アレルギー・感染症. pp. 63-116. *In: エッセンシャル病理学*. 第5版(澤井高志、内藤眞、名倉宏、八木橋操六編), 医歯薬出版株式会社, 東京.

[43] 小河貴裕, 小笠原朗子. 1988. 家兎実験的ぶどう膜炎における非ステロイド性抗炎症剤 Pranoprofen 点眼液の抗炎症効果. *あたらしい眼科* 5(9): 1335-1342.

[44] 小原喜隆. 1996. 水晶体の透明性維持(正常代謝).

- pp. 184-188. 眼科診療プラクティス 22 やさしい眼の細胞・分子生物学(本田孔子偏), 株式会社文光堂, 東京.
- [45] Ohta, K., Wiggert, B., Yamagami, S., Taylor, A. W. and Streilein, J. W. 2000. Analysis of immunomodulatory activities of aqueous humor from eyes of mice with experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.* 164(3): 1185-1192.
- [46] Olin, D. D. 1977. Examination of the Aqueous Humor as a Diagnosis Aid in Anterior Uveitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171(6): 557-559.
- [47] Pankowska, B. and Boj, E. 1990. Acute experimental uveitis caused by a single administration of heterologous blood protein to the vitreous body of rabbits. *Klin. Oczna.* 92(3-4): 41-43.
- [48] Peiffer, R. L. Jr. and Gaiddon, J. 1991. Posterior Chamber Intraocular Lens Implantation in the Dog: Results of 65 Implants in 61 Patients. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 27: 453-462.
- [49] Prendergast, R. A., Iliff, C. E., Coskuncan, N. M., Caspi, R. R., Sartani, G., Tarrant, T. K., Lutty, G.A. and McLeod, D.S. 1998. T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 5:

754-762.

[50] Rahi, A. H., Misra, R. N. and Morgan, G. 1977. Immunopathology of the lens. I. Humoral and cellular immune responses to heterologous lens antigens and their roles in ocular inflammation. *Br. J. Ophthalmol.* 61(3): 164-176.

[51] Rahi, A. H., Misra, R. N. and Morgan, G. 1977. Immunopathology of the lens. III. Humoral and cellular immune responses to autologous lens antigens and their roles in ocular inflammation. *Br. J. Ophthalmol.* 61(6): 371-379.

[52] Rao, N. A., Romero, J. L., Sevanian, A. Fernandez, M. A., Wong, C., Ward, P. A. and Marak, G. E. Jr. 1988. Anti-inflammatory effect of glutathione peroxidase on experimental lens-induced uveitis. *Ophthalmic Res.* 20(4): 213-219.

[53] Rao, N. A., Fernandez, M. A., Sevanian, A., Romero, J. L., Till, G. O. and Marak, G. E. 1988. Treatment of experimental lens-induced uveitis by dimethyl thiourea. *Ophthalmic Res.* 20(2): 106-111.

[54] Rocha, G., Duclos, A., Chalifour, L. E., Baines, M. G., Anteck, E. and Deschênes, J. 1996. Analysis of gene expression during experimental uveitis in the rabbit. *Can. J. Ophthalmol.* 31(5): 228-233.

- [55] Rubin, L. F. and Gelatt, K. N. 1968. Spontaneous Resorption of the Cataractous Lens in Dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 152(2): 139-153.
- [56] 西信元嗣. 1992. 第VI章 調節・屈折と分子生物学のかかわり. pp. 200-222. *In*: 眼光学の基礎, 金原出版株式会社, 東京.
- [57] Sandberg, H. O. and Closs, O. 1979. The alfa and gamma crystallins content in aqueous humor of eyes with clear lenses and with cataracts. *Exp. Eye Res.* 28: 601-610.
- [58] Sasamoto, Y., Hirose, S., Ohno, S., Ono, K. and Matsuda, H. 1991. Topical application of ciclosporin ophthalmic solution containing alpha-cyclodextrin in experimental uveitis. *Ophthalmologica.* 203(3): 118-125.
- [59] Schalm, O. W., Jain, N. C. and Carroll, E. J. 1979. 実験動物, 毛皮動物, 各種動物園動物と野生動物における血液の正常値. pp. 252-261. *In*: 獣医血液学 I (其田三夫, 一条茂訳), 医歯薬出版株式会社, 東京.
- [60] Segawa, K. and Smelser, G. K. 1969. Electron microscopy of experimental uveitis. *Invest. Ophthalmol.* 8(5): 497-520.
- [61] Segawa, K. 1971. Electron microscopy of experimental uveitis. Mononuclear cell response.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 75: 364-371.

[62] Semel, J., Bowe, B., Guo, A., Lee, L., Rife, L., Polikoff, D., Summanen, P., Pararajasegaram, G., Finegold, S. M., Rao, N., et al. 1992. *Propionibacterium acnes*-enhanced lens-induced granulomatous uveitis in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33(5): 1766-1770.

[63] 神力祐子. 1991. 実験的ぶどう膜炎におけるロイコトリエン(LT)特に LTB₄ の基礎的研究. 東京女子医科大学雑誌, 61(6): 451-456.

[64] Smith, P. J., Brooks, D. E., Lazarus, J. A., Kubilis, P. S. and Gelatt, K. N. 1996. Ocular hypertension following cataract surgery in dogs: 139 cases (1992-1993). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209(1): 105-111.

[65] Spiess, B. M., Mathis, G. A., Franson, K. L. and Leber, A. 1991. Kinetics of uptake and effects of topical indmethacin application on protein concentration in the aqueous humor of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 52(7): 1159-1163.

[66] Stainer, G. A., Peyman, G. A., Berkowitz, R. and Tessler, H. H. 1976. Intraocular lysozyme in experimental uveitis in rabbits: aqueous and vitreous assay. *Invest. Ophthalmol.* 15(4), 312-315.

- [67] Steilein, J. W., Ksander, B. R. and Taylor, A. W. 1997. Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J. Immunol.* 158: 3557-3560.
- [68] Stuart, P. M., Griffith, T. S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X., and Thomas, T. A. 1997. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J. Clin. Invest.* 99: 396-402.
- [69] 杉田直, 望月學, 中澤伸子, 渡邊俊樹. 2000. 前房水中の免疫抑制物質. 日本眼科紀要 51: 363-366.
- [70] 砂川光子, 瀬戸昭, 伊藤洋平. 1982. 水晶体蛋白により誘発される自己免疫性ぶどう膜炎の研究. 日本眼科学会雑誌 86: 1567-1573.
- [71] 砂川光子, 塚原勇. 1983. 水晶体蛋白により感作された家兎の眼局所免疫反応. 日本眼科学会雑誌 87: 627-633.
- [72] 砂川光子, 吉田晴子. 1986. 抹消血中の抗レンズクリスタリン抗体. その 1. 加齢に伴う変動. 日本眼科学会雑誌 90: 1361-1365.
- [73] 高木武司, 中島亜子, 沢田有, 櫻木章三. 1995. 実験的水晶体起因性ぶどう膜炎の発症初期の病理組織所見と細胞接着分子(ICAM-1)の発現. あたらしい眼科 12(4): 693-696.
- [74] 高橋貞, 稲用和也. 1990. レーザーフレア・セル測定 動物実験 薬物効果の測定および実験的ぶどう膜炎へ

の応用．眼科 MOOK 42: 195-209.

[75] 竹鼻眞．1996．水晶体の加齢変化．pp. 194-197.

In: 眼科診療プラクティス 22 やさしい眼の細胞・分子生物学 (本田孔子編), 株式会社文光堂, 東京.

[76] 田中孝男, 高野繁, 関文治, 後藤浩, 頼徳治, 臼井正彦．1987．網膜 A 抗原による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎．日本眼科学会雑誌 91(1): 145-150.

[77] 所敬, 金井淳．1999．ぶどう膜疾患．pp. 147-178.

In: 現代の眼科学, 金原出版株式会社, 東京.

[78] Tompsett, E., Abi-Hanna, D. and Wakefield, D. 1990. Immunological privilege in the eye: a review. *Curr. Eye Res.* 9(12): 1141-1145.

[79] Uusitalo, H., Uusitalo, R. and Palkama, A. 1984. Decreased ecto-5'-nucleotidase activity in rabbit lymphocytes during experimental lens-induced uveitis. *Curr. Eye Res.* 3(3): 407-415.

[80] van der Woerdt, A., Nasisse, M. P. and Davidson, M. G. 1992. Lens-induced uveitis in dogs: 151 cases (1985-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201(6): 921-926.

[81] van Der Woerdt, A. 2000. Lens-induced uveitis. *Vet. Ophthalmol.* 4:227-234.

[82] Watanabe, H. and Shearer, T. R. 1989. Lens crystallins in aqueous and vitreous humor in selenite overdose cataract. *Curr. Eye. Res.* 8: 479-486.

- [83] Watanabe, K., Hayasaka, S., Hiraki, S., Matsumoto, M., Kadoi, C. and Nagaki, Y. 2001. Effects of alpha(2)adrenergic agonists on lipopolysaccharide induced aqueous flare elevation in pigmented rabbits. *Jpn. J. Ophthalmol.* 45(3): 221-226.
- [84] Wilbanks, G. A. and Streilein, J. W. 1991. Studies on the induction of anterior chamber associated immune deviation (ACAID). 1. Evidence that an antigen specific, ACAID-inducing, cell associated signal exists in the peripheral blood. *J. Immunol.* 146(8): 2610-2617.
- [85] Wilcock, B. P. and Peiffer, R. L. 1987. The pathology of lens-induced uveitis in dogs. *Vet. Pathol.* 24: 549-553.
- [86] Williams, D. L., Boydell, I. P. and Long, R. D. 1996. Current concept in the management of canine cataract: a survey of techniques used by surgeons in Britain, Europe and the USA and a review of recent literature. *Vet. Rec.* 138: 347-353.
- [87] Williams, R. N. and Paterson, C. A. 1984. PMN accumulation in aqueous humor and iris-ciliary body during intraocular inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1: 105-108.
- [88] Xiao, J., Wu, S., Wang, Y., Li, J. and Zhang, S.

1993. Inhibitory effects of tetrandrine on bovine serum albumin-induced uveitis in rabbits. *J. Ocul. Pharmacol.* 9(2): 151-156.

[89] 矢島保道. 1991. 老人性白内障. pp. 248-249. *In*: 図説眼組織病理学(沖坂重邦編), 金原出版株式会社, 東京.

[90] 山本邦比古. 1991. 実験的ぶどう膜炎. あたらしい眼科 8(8): 1233-1243.

要 旨

イヌの白内障手術では囊外手術または超音波乳化吸引術の術式が最もよく用いられている。いずれの術式も水晶体物質の除去前に水晶体前囊切開を行わなければならない。水晶体の前囊切開は前囊切開剪刀、チストームなどによって行われ、水晶体の娩出または粉碎にとって重要な操作である。前囊切開時における網膜剥離、硝子体ヘルニアやぶどう膜炎などの合併症を防止するには、白内障手術に関連する水晶体前囊を把握する必要があると考えられた。またイヌの白内障手術のほとんどは視覚障害を伴う重度の白内障で実施されることから、白内障に起因したぶどう膜炎によって前房に遊出された蛋白が摘出水晶体前囊に付着するものと考えられた。しかし、こういった水晶体前囊付着蛋白に関する報告はほとんどみられない。

本論文は、白内障に関連する水晶体前囊付着蛋白の発生とその機序を検討する目的で、イヌの白内障および水晶体脱臼の手術症例における水晶体前囊の観察と臨床所見との関連について調べ、ついでウサギを用いて白内障に起因したぶどう膜炎と水晶体前囊付着蛋白との関連について調べた。

1. イヌの白内障症例および水晶体脱臼症例における水晶体前囊と臨床所見

イヌの白内障と水晶体前方脱臼の手術症例眼 11 眼を用いて摘出した水晶体前囊の表面および厚さを走査電子顕微鏡を用いて観察した。また対照として健常ビーグル犬（3 歳齢）3 頭 5 眼を供試した。術前検査として一般身体検査のほか、瞳孔の対光反射試験、細隙灯生体顕微鏡検査等の眼科検査を行った。手術の術式として、白内障では超音波乳化吸引術を、水晶体脱臼では囊内摘出術を実施した。

初診時の眼検査所見では、白内障症例のうち両側性白内障が 7 例で片側白内障が 1 例であった。前部ぶどう膜炎を伴う白内障症例は 4 症例でみられた。これらの 4 症例は片側または両側性の毛様充血を認めた他に、虹彩の肥厚や虹彩縁の不整などがみられた。他の白内障症例 3 例と水晶体脱臼症例 3 例でも毛様充血がみられた。眼圧上昇は症例すべてでみられなかった。

前房内構造物を調べたところ、房水フレアは全症例で観察されなかった。また初診から白内障手術時まで、フルオロメトロンやリン酸ベタメタゾンナトリウムの点眼やプレドニゾロンの内服とストレプトキナーゼ・ストレプトドルナーゼ製剤が処方された。そのため、手術眼に関して、初診時に毛様充血を示した 9 症例のうち 5 症例で改善がみられた。しかし、手術までに毛様充血の改善がみられなかった症例は 4 例あった。

前囊の走査電顕観察所見では、蛋白付着は全 11 例でみられた。500 倍での観察像では、糸状の蛋白付着が前囊に散在してみられるもの、網状の蛋白付着が前囊にみられるものや網状の蛋白付着が前囊に重層してみられるものがあった。これらの蛋白付着は健常犬では全く認めない所見であった。蛋白付着程度と初診時の毛様充血の程度との関係を調べたところ、中等度または重度の毛様充血を示した 6 例はいずれも前囊の蛋白付着程度が重度であった。

採取した前囊中央部の厚さと手術時の年齢との間に、有意な正の相関がみられた（相関係数 $r = 0.886$ ）。しかし、この相関関係は 3 歳の健常犬 5 眼の前囊中央部の厚さ（ $40.94 \pm 2.33 \mu\text{m}$ ）と明らかに異なる分布を示した。

以上から、水晶体前囊付着蛋白は初診時の毛様充血が重度であるにつれて増加し、前部ぶどう膜炎の程度を示す一指標と思われた。

2. ウサギ自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルを用いた水晶体前囊付着蛋白の発現機序について

自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルは、水晶体囊により胎生早期に隔離された水晶体蛋白が白内障の発症などを契機に異物として免疫系に暴露されることで起こるぶどう膜炎とする説に基づきモデルを作成した。すなわち、10 週齢の雌ウサギ（日本白色種、J1a:JW）を用いて、ま

ず右眼の自己水晶体を摘出して水晶体可溶性蛋白を調製し、その蛋白の一部（10mg）をフロイント完全アジュバンドと共に指掌または足掌に注射し感作を行い、ついでその2週後に調製蛋白の一部（1mg）をさらに硝子体に注入してぶどう膜炎を誘発させた（水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群、n=5）。対照として、自己水晶体可溶性蛋白を感作し、その2週後に生理食塩水 0.05ml を左眼硝子体に注射した群を自己水晶体免疫群（n=4）、右眼水晶体摘出4週後に自己水晶体可溶性蛋白 1mg を左眼硝子体に注射した群を自己水晶体硝子体内注射群（n=9）、右眼水晶体摘出4週後に、生理食塩水 0.05ml を左眼硝子体に注射した群を対照群（n=4）とした。

2-1. 水晶体可溶性蛋白に対する抗体価の推移

水晶体可溶性蛋白に対する抗体価の推移をELISA法で調べたところ、自己水晶体可溶性蛋白に対する抗体価は自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群および自己水晶体免疫群で、免疫2週後より上昇した。自己水晶体硝子体内注射群および対照群では抗体価の上昇がみられなかった。

2-2. 水晶体可溶性蛋白に対する抗体の特性

産生抗体の特性では、水晶体可溶性蛋白をセファロース CL-6B でクリスタリン蛋白を溶出精製し、各クリスタリンを SDS-PAGE で泳動した後、免疫ブロッティング法で抗体の特性を調べたところ、水晶体に対する抗体は αA 、

β_{II} 、 γ -クリスタリン分画蛋白に対するものであった。これらの抗体に対する抗原はそれぞれ αA -クリスタリンの分子量 24.9kDa、 β_{II} -クリスタリンの分子量 38.7kDa、 γ -クリスタリンの分子量 25.9kDa の蛋白で検出された。

2-3. 眼球の組織学的検索と房水蛋白濃度

硝子体注入 1 週後に剖検を実施し、左眼における HE 染色標本による組織学的検索を行った。また剖検時の房水蛋白濃度は Micro-BCA 法で測定した。水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群は、他の群に比べて、虹彩の肥厚や網膜での神経節細胞の消失と内顆粒層の減少が認められ、眼内炎症の痕跡が強く疑われた。房水蛋白濃度における群間の違いはみられなかった。

2-4. 走査電子顕微鏡による前囊付着蛋白の観察

自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群における水晶体前囊表面の沈着物の程度は全個体で重度でみられ、沈着物は網状に重層して観察された。自己水晶体硝子体内注射群では沈着物の程度は軽度でみられ、沈着物は網状および糸状に観察された。自己水晶体免疫群および対照群では水晶体前囊表面に沈着物は観察されなかった。

以上から、水晶体前囊付着蛋白は一側眼から得た自己水晶体可溶性蛋白で免疫し、かつ硝子体に注入した自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルで顕著に観察された。免疫時に産生された抗体は αA -、 β_{II} 及び γ -クリスタリ

ンに対する抗体であった。

本研究は、イヌの白内障および水晶体脱臼症例における水晶体前囊表面を走査電子顕微鏡で観察した最初の報告であり、症例の初診時での毛様充血の程度に比例して水晶体前囊付着蛋白量の増加が示された。この前囊付着蛋白は前部ぶどう膜炎に起因することが強く示唆された。さらにこの炎症と水晶体可溶性蛋白との関係について、ウサギを用いた水晶体前囊表面の観察で調べたところ、前囊付着蛋白は自己水晶体可溶性蛋白で誘発されたぶどう膜炎で顕著に観察された。以上のことから、白内障症例でみられる水晶体前囊付着蛋白は水晶体起因性ぶどう膜炎に起因して発現することが示された。

Abstract

In this study the relation of lens induced uveitis and change of the anterior lens capsules were examined.

The first experiment:

The surface conditions and thickness of anterior lens capsules in eleven surgical cases of canine cataracts or lens dislocations were examined by a scan electron microscope.

Protein deposits on the lens capsules of all cases were observed, but no deposit was done in the healthy dogs. There were a lot of deposits on the lens capsules in three of eight cataract cases and in two of three lens dislocation cases. The morphological appearance of protein deposits was seen like threads, points, or networks. The ciliary injection was clear at the first medical examination in six cases, and a lot of protein deposits on the lens capsules was observed in those cases too. The cases of cataracts and lens locations showed significant positive corelationship between the thickness of anterior lens capsules and the age when they had a surgery.

Therefore, this results strongly suggested possibility of relation to the lens-induced uveitis.

The second experiment:

To evaluate the correlation of lens induced uveitis and

deposit on anterior lens capsule , I investigated the rabbit uveitis morphologically and immunologically.

Rabbit lens was extracted and made lens soluble protein. I compared self lens induced uveitis group that was immunized by lens soluble proteins in subcutaneous injection and vitreous injection and other groups. I analyzed lens immunogenicity, anti-lens antibody and protein levels of aqueous humor. The anterior lens capsule were examined by scanning electron microscopy(SEM) and the tissue was examined in the hematoxylin eosin(H.E.) stain.

Anti self lens antibody expressed against α 、 β H、 γ -crystallin in immunized rabbit. Uveitis and anterior lens capsule covered by the network shape deposit was observed self lens induced uveitis group, but protein levels of aqueous humor wasn't significant compare to other groups.

Expression of self lens induced uveitis and anterior lens capsule covered by the network shape deposit was temporary, and it might be caused by the participation of lens protein which is a not-self and immunological privilege site in rabbit eye.

Conclusion:

The protein deposits on the lens capsules show lens induced uveitis. The observation of the lens capsules become one method of understanding for the cataract and

lens induced uveitis in dogs. The treatment with the existence of lens induced uveitis in mind is considered to be necessary in the case of cataract surgeries for dogs.

表1 症例のプロフィール

症例	品種	性	年齢(歳)	体重(kg)	主訴
白内障症例					
1	ゴールデン・レトリバー	雄	1	38	4日前からよく瞬きをし、階段を昇らなくなった。
2	マルチーズ	雌	3	2.6	6日前から物にぶつかるとようになった。
3	アメリカン・コッカー	雌	3	11	15日前より眼が白くなり、進行しているようにみえた。
4	・スパニエル トイ・プードル	雌	10	5.1	2ヶ月前から右眼の白濁が始まり、 徐々に拡大してみえた。
5	ポメラニアン	雌	7	3.5	半年前より両眼が白くなり、物にぶつかるとようになった。
6	ポメラニアン	雄	10	3.6	10ヶ月前から左眼が白濁し、4ヶ月前から 右眼が白濁しはじめた。
7	トイ・プードル	避妊雌	10	5.45	アジソン病、1ヶ月前に両眼の白内障に気づいた。
8	アメリカン・コッカー ・スパニエル	雌	1	8.4	3ヶ月前に右眼の白濁に気づいた。
水晶体脱臼症例					
9	ポメラニアン	雄	7	3.3	1年前から左眼が白濁し、8ヶ月前から 右眼が白濁した。
10	柴雑種	雄	13	11.7	来院2週間前に鈍性外傷を負った。
11	日本スピッツ雑種	避妊雌	11	9.7	6年前から両眼の白濁に気づいていた。

表2 初診時の診断とおもな眼検査所見

症例	診断	瞳孔の対光反射試験						毛様充血	前房フシア	結膜充血	眼漏
		右眼			左眼						
		直接	間接	反応	直接	間接	反応				
白内障症例											
1	成熟白内障(両眼)、前部ぶどう膜炎(右眼)	±	±	+	+	+	+	+	—	—	—
2	未熟白内障(右眼)、成熟白内障(左眼)	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
3	成熟白内障(両眼)	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
4	成熟白内障・水晶体亜脱臼・前部ぶどう膜炎(右眼)、未熟白内障(左眼)	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
5	成熟白内障(両眼)	±	—	+	±	—	+	+	—	—	—
6	未熟白内障・網膜変性(右眼)、成熟白内障(左眼)	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
7	成熟白内障・前部ぶどう膜炎(両眼)	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
8	成熟白内障・部分的虹彩後癒着を伴う前部ぶどう膜炎(右眼)	+	±	+	±	+	±	+	—	—	—
水晶体脱臼症例											
9	成熟白内障(右眼)、水晶体前方脱臼(左眼)	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—
10	水晶体後方脱臼(両眼)、角膜内皮損傷による実質性角膜混濁(右眼)、網膜変性(左眼)	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
11	水晶体後方脱臼・前部ぶどう膜炎(右眼)	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

表3 手術前の治療内容と手術直前の毛様充血

症例	初診から 手術まで の日数	手術前の治療内容						その他の処方	
		点眼療法			全身投与		フルオロ メトロン		
		フルオロ	抗菌薬	ストレプトキ	プレドニ				
		メトロン	または	ナーゼ・スト	ゾン				
			抗生物質 <td>レプトドル<td>ナーゼ製剤<td></td><td></td><td></td><td></td></td></td>	レプトドル <td>ナーゼ製剤<td></td><td></td><td></td><td></td></td>	ナーゼ製剤 <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>				
白内障									
1	3年	○	○	○	○	○	○	○	ジソフェノールの皮下注射 一時的なアトロピン点眼
2	32日	○	○	○	○	○	○	○	
3	148日	○	○	○	○	○	○	○	
4	105日	○	○	○	○	○	○	○	
5	32日	○	○	○	○	○	○	○	
6	24日								ジソフェノールの皮下注射 ベタメタゾン点眼
7	91日	○	○	○	○	○	○	○	
8	74日	○	○	○	○	○	○	○	
水晶体前方脱臼									
9	3日	○	○	○	○	○	○	○	
10	213日	○	○	○	○	○	○	○	
11	18日	○	○	○	○	○	○	○	

表4 走査電子顕微鏡による水晶体前囊の観察所見

症例	前囊付着蛋白の程度*	前囊の厚さ(μm)	5000倍の前囊表面所見
白内障			
1	+	70.4	線状蛋白の散在
2	+	65.4	網状蛋白の集塊付着
3	++	68.8	網状蛋白の付着付着
4	+	89.1	微細な網状蛋白の散在
5	++	104.3	糸状および微細な網状蛋白の付着
6	+	98.4	点状蛋白と線状蛋白の付着
7	+++	110.8	網状蛋白の付着
8	+++	59.8	網状蛋白の付着
水晶体前方脱臼			
9	++	86.1	網状蛋白の付着
10	+++	112.9	網状蛋白の付着
11	+++	129.3	網状蛋白の集塊付着付着

*:500倍所見での評価

- +:点状もしくは糸状蛋白が少量散在して沈着したもの.
- ++:糸状または網状蛋白が散在して沈着したもの.
- +++ :糸状または網状の蛋白が重層して沈着したもの.

表5 走査電子顕微鏡による水晶体前囊表面の観察所見

検体	前囊付着蛋白の程度※	5000倍の前囊表面所見
自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群		
013	++	網状蛋白の集塊
014	+++	点状蛋白の集塊
015	+++	点状蛋白の集塊
016	+++	網状蛋白の集塊
020	++	網状蛋白の集塊
自己水晶体免疫群		
017	—	付着なし
018	—	付着なし
019	—	付着なし
021	—	付着なし
自己水晶体硝子体内注射群		
009	+	網状蛋白
010	++	点状蛋白の散在
011	+	点状蛋白
012	++	網状蛋白
対照群		
022	—	付着なし
023	—	付着なし
024	—	付着なし

※:500倍所見での評価

—:蛋白の付着がみられないもの

+:点状もしくは糸状蛋白が少量散在して沈着したもの.

++:糸状または網状蛋白が散在して沈着したもの.

+++ :糸状または網状の蛋白が重層して沈着したもの.

表6 結膜・角膜の病理組織所見

検体	結膜下組織		角膜内皮	
	浮腫※	細胞浸潤※	浮腫※	細胞付着※
自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群				
013	—	＋:マクロファージ、リンパ球	±	—
014	＋	±:偽好酸球	—	—
015	±	—	±	—
016	±	±:リンパ球、偽好酸球	＋	—
020	—	＋:マクロファージ	＋	—
031	—	＋:マクロファージ、リンパ球	＋	—
034	—	＋:マクロファージ、リンパ球、偽好酸球	＋	＋:フィブリン、偽好酸球、リンパ球
自己水晶体免疫群				
017	±	±:マクロファージ	—	—
018	—	—	—	—
019	±	±:マクロファージ、偽好酸球	—	—
021	—	—	—	—
032	—	—	—	—
033	—	—	—	—
自己水晶体硝子体内注射群				
001	—	±:マクロファージ、リンパ球	—	—
005	—	—	—	—
006	—	±:マクロファージ	—	—
007	—	—	—	—
008	±	—	—	—
009	—	—	—	—
010	—	±:マクロファージ、偽好酸球	—	—
011	—	—	—	—
012	—	±:マクロファージ、偽好酸球	—	—
対照群				
004	—	—	—	—
022	—	—	—	—
023	—	—	—	—
024	±	—	—	—

※:—:なし ±:限局的でわずかに認められる ＋:組織全体にわたり明瞭に認められる

表7 虹彩・毛様体の病理組織所見

検体	虹彩支質		毛様体実質	
	肥厚※	血管新生※	浮腫※	血管新生※
自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群				
013	+	+	+	+
014	+	+	+	+
015	+	+	±	+
016	+	+	±	+
020	±	+	+	+
031	+	+	+	+
034	+	+	+	+
自己水晶体免疫群				
017	-	-	-	-
018	-	-	-	-
019	-	-	-	-
021	-	-	-	-
032	-	-	-	-
033	-	-	-	-
自己水晶体硝子体内注射群				
001	±	-	-	-
005	±	-	-	-
006	±	-	-	-
007	-	+	-	-
008	-	+	-	-
009	-	+	-	-
010	±	-	±	-
011	±	-	-	-
012	±	-	-	-
対照群				
004	-	-	-	-
022	-	-	-	-
023	-	-	-	-
024	-	-	-	-

※：-：なし ±：限局的でわずかに認められる +：組織全体にわたり明瞭に認められる

表8 脈絡膜血管叢の病理組織所見

検体	脈絡膜血管叢		
	肥厚※	血管新生※	血管配列の乱れ※
自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群			
013	—	—	—
014	—	—	—
015	—	—	—
016	—	—	+
020	—	—	—
031	+	—	—
034	+	—	—
自己水晶体免疫疫群			
017	—	—	—
018	—	—	—
019	—	—	—
021	—	—	—
032	—	—	—
033	—	—	—
自己水晶体硝子体内注射群			
001	—	—	—
005	—	—	—
006	—	—	—
007	—	—	—
008	—	—	—
009	—	—	—
010	—	—	—
011	—	—	—
012	—	±	—
対照群			
004	—	—	—
022	—	—	—
023	—	—	—
024	—	—	—

※：—：なし ±：限局的でわずかに認められる +：組織全体にわたり明瞭に認められる

表9 網膜の病理組織所見(1)

検体	内境界膜		神経節細胞層	
	細胞浸潤※		細胞浸潤※	神経節細胞数の減少※
自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群				
013	—		—	±
014	+	±:フィブリン、マクロファージ、リンパ球	—	+
015	+	±:フィブリン、マクロファージ、リンパ球、偽好酸球	—	+
016	+	±:フィブリン	—	+
020	±	±:フィブリン	—	+
031	+	±:フィブリン、偽好酸球	—	+
034	+	±:フィブリン、リンパ球、偽好酸球	+	+
自己水晶体免疫群				
017	—		—	—
018	—		—	—
019	—		—	—
021	—		—	—
032	—		—	—
033	—		—	—
自己水晶体硝子体内注射群				
001	—		—	±
005	—		—	±
006	—		—	±
007	—		—	±
008	—		—	—
009	±	±:フィブリン、リンパ球	—	±
010	—		—	+
011	±	±:フィブリン	—	+
012	—		—	+
対照群				
004	—		—	—
022	—		—	—
023	—		—	—
024	—		—	—

※:—:なし ±:限局的でわずかに認められる +:組織全体にわたり明瞭に認められる

表10 網膜の病理組織所見(2)

検体	内顆粒層		外顆粒層	
	細胞浸潤※	厚さ(層)	細胞浸潤※	厚さ(層)
自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群				
013	—	3	—	7~8
014	—	2~3	—	6~7
015	—	1~2	—	4~5
016	—	2	—	6
020	—	3	—	7
031	—	1~2	—	5~6
034	—	1~2	—	5~6
自己水晶体免疫群				
017	—	4~5	—	11
018	—	5~6	—	8~9
019	—	4~5	—	8~9
021	—	4~5	—	9~10
032	—	4	—	8
033	—	4	—	10
自己水晶体硝子体内注射群				
001	—	4~5	—	8~9
005	—	3~4	—	6~7
006	—	2~3	—	6~7
007	—	3~4	—	7~8
008	—	4~5	—	11
009	—	3~4	—	5~6
010	—	2~3	—	7~8
011	—	2~3	—	8~9
012	—	3~4	—	7~8
対照群				
004	—	3~4	—	7~8
022	—	5~6	—	9~10
023	—	4	—	8~9
024	—	5~6	—	9~10

※:—:なし ±:限局的でわずかに認められる +:組織全体にわたり明瞭に認められる

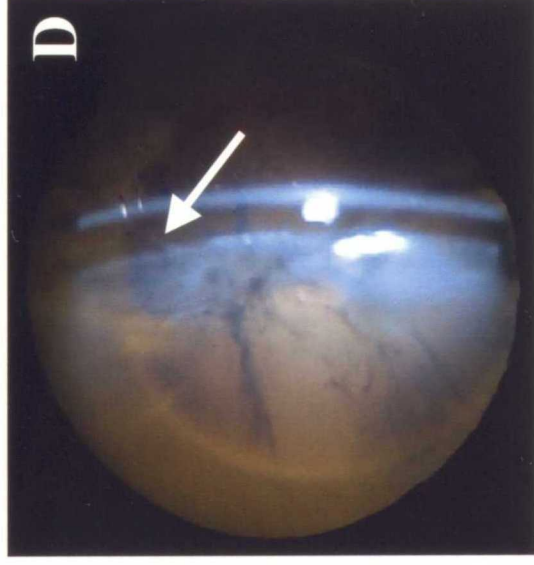
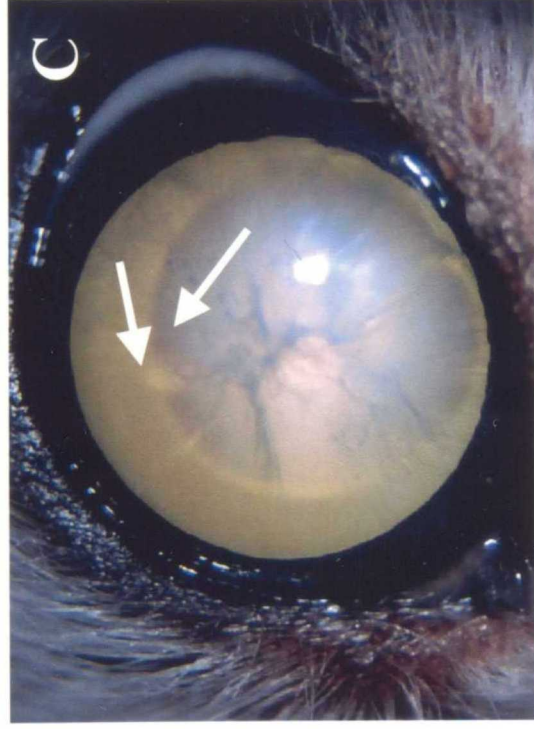
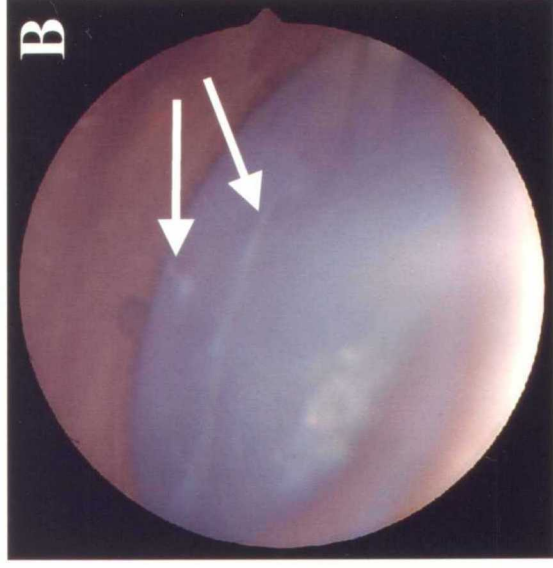
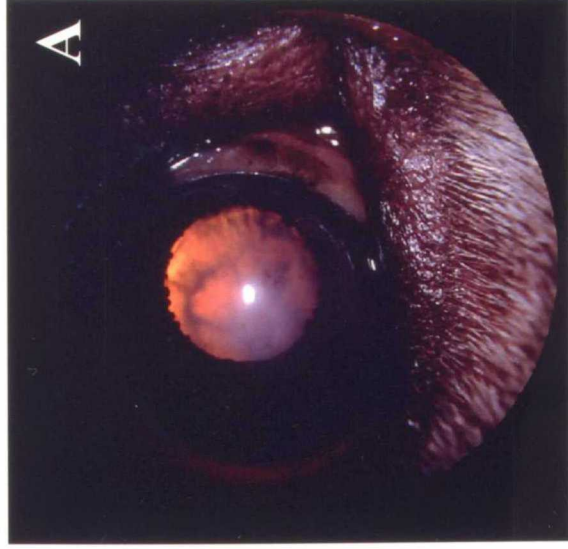


図1 症例における前眼部の観察写真

A: 不整な虹彩縁が観察された前眼部所見 (症例1右眼、第67病日). B: 水晶体前囊に付着した蛋白塊 (矢印) が観察された隅角鏡所見 (Aと同様症例眼、同病日). C: 微細な線状白斑 (矢印) が瞳孔領にみられた前眼部所見 (症例4左眼、第83病日). D: 水晶体前囊から突出した蛋白塊 (矢印) が観察された細隙灯所見 (Cと同様症例眼、同病日).

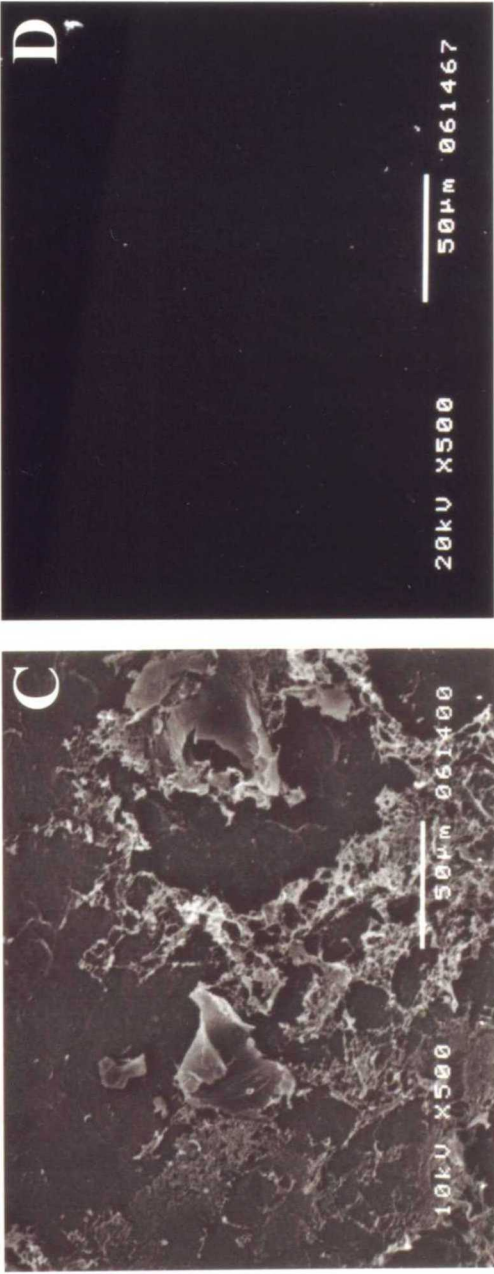
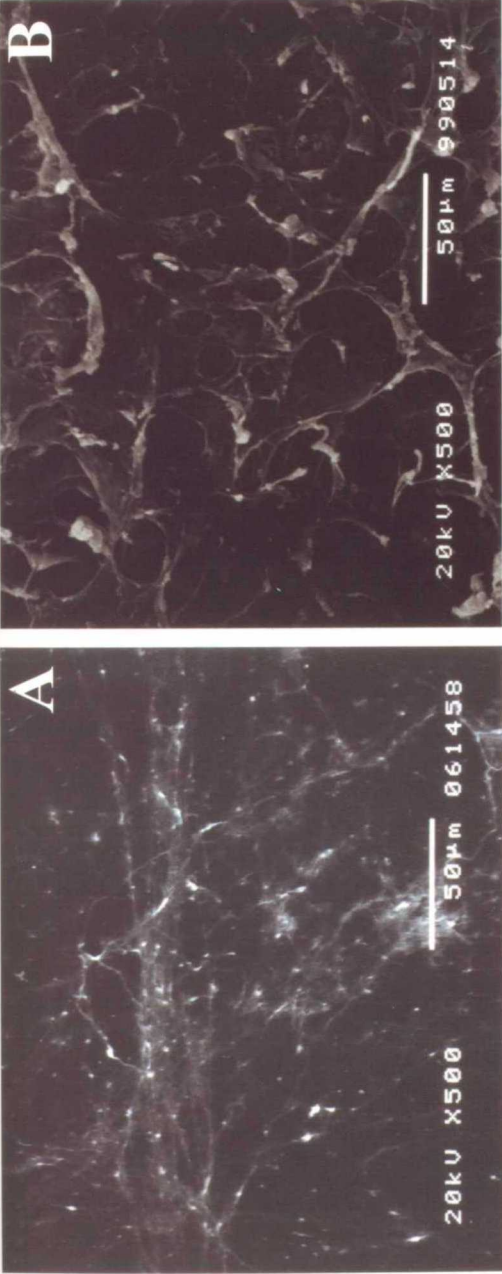


図2 水晶体前嚢表面の走査電子顕微鏡像

- A: 糸状の蛋白が散在して水晶体前嚢に付着したもの(症例2、蛋白付着程度: +).
- B: 網状の蛋白が前嚢に付着したもの(症例5、蛋白付着程度: ++).
- C: 網状の蛋白が重層して前嚢に付着したもの(症例10、蛋白付着程度: +++).
- D: 健康ビーグル犬、3歳齢.(蛋白付着程度: -)

*: 蛋白付着程度の評価は表4の基準に従った.

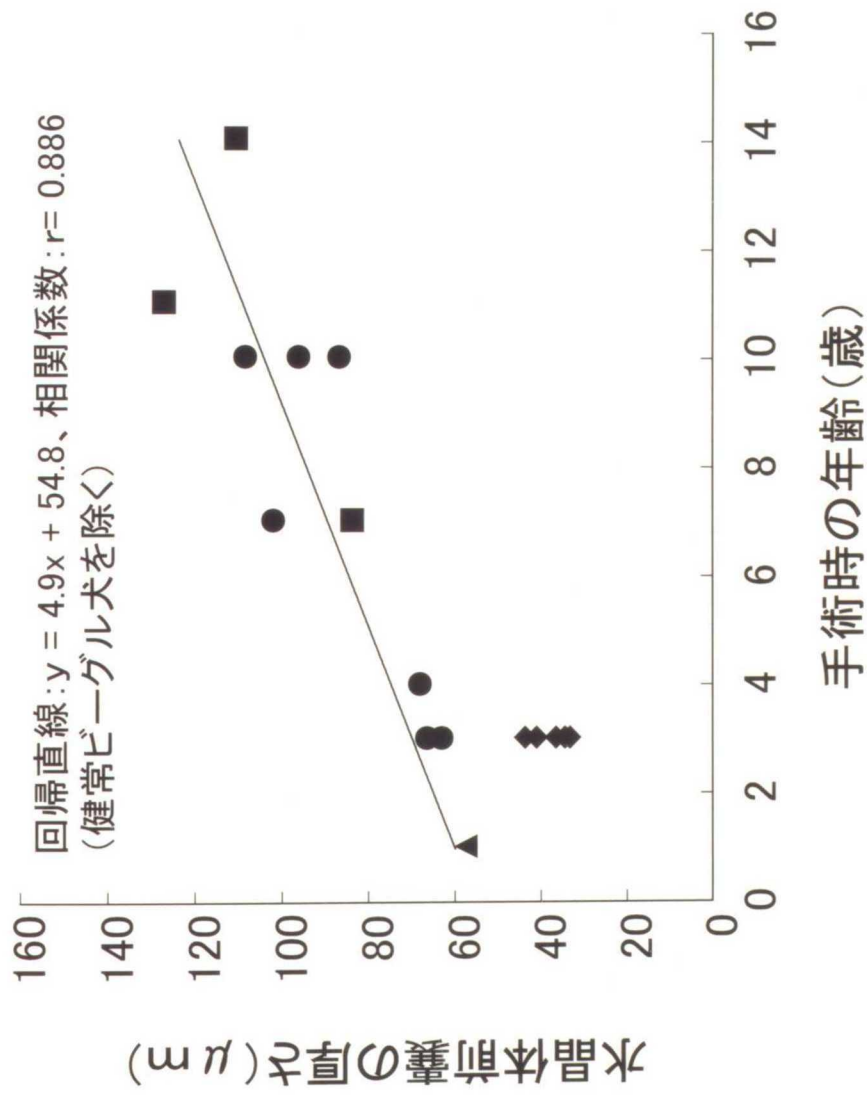
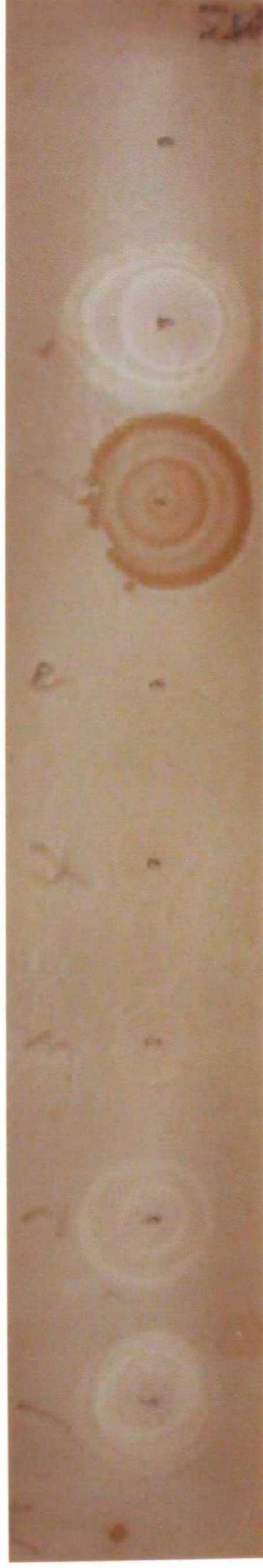


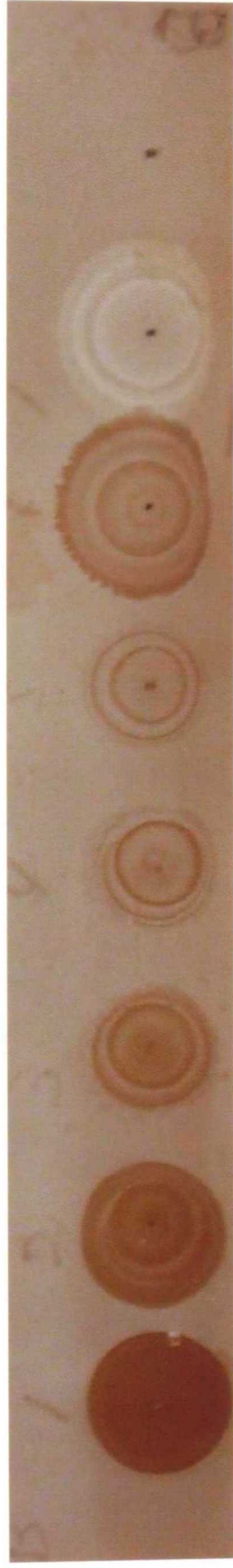
図3 摘出水晶体前囊の厚さと手術時の年齢

●: 成熟白内障症例 (n=7)、▲: 過熟白内障症例 (n=1)、■: 水晶体脱臼症例 (n=3)、◆: 健常ビーグル犬、3歳齢 (n=5).

1 2 3 4 5 6 7 8



A



B

図4 ドットブロッキングによるウサギ血清中の特異水晶体抗体の発現
ウサギ同種水晶体可溶性蛋白質の免疫2週後の血清(B)で、特異水晶体抗体の産生が確認された。
A: 水晶体可溶性蛋白質投与前血清、B: 水晶体可溶性蛋白質注射2週後の血清
1~5: ウサギ水晶体可溶性蛋白質希釈液(原液、2、4、8、16倍)、6: 正常ウサギ血清、
7: 正常イヌ血清、8: コントロール

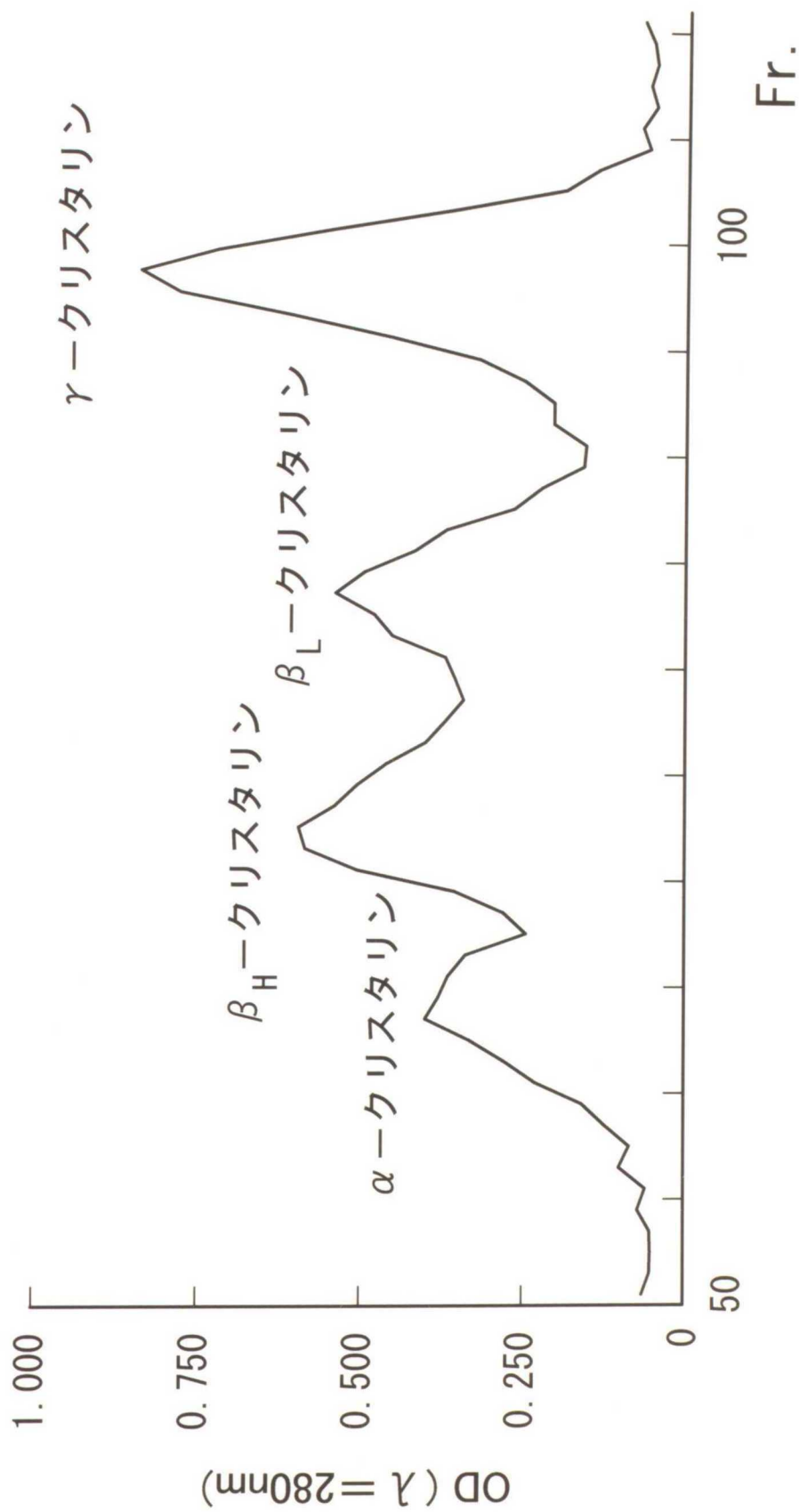


図5 セファロースCL-6Bで分離したウサギ水溶性蛋白の溶出パターン
 トリス-塩酸溶液に20%エタノール入りセファロース (Sephacrose CL-6B Pharmacia製) を混合した後、カラムに
 流し安定させ使用した。ペリスタポンプの流速を7.94ml/h~9.64ml/hとし、フラクションコレクターは試験管1本に
 つき48滴 (約1.8ml) とした。

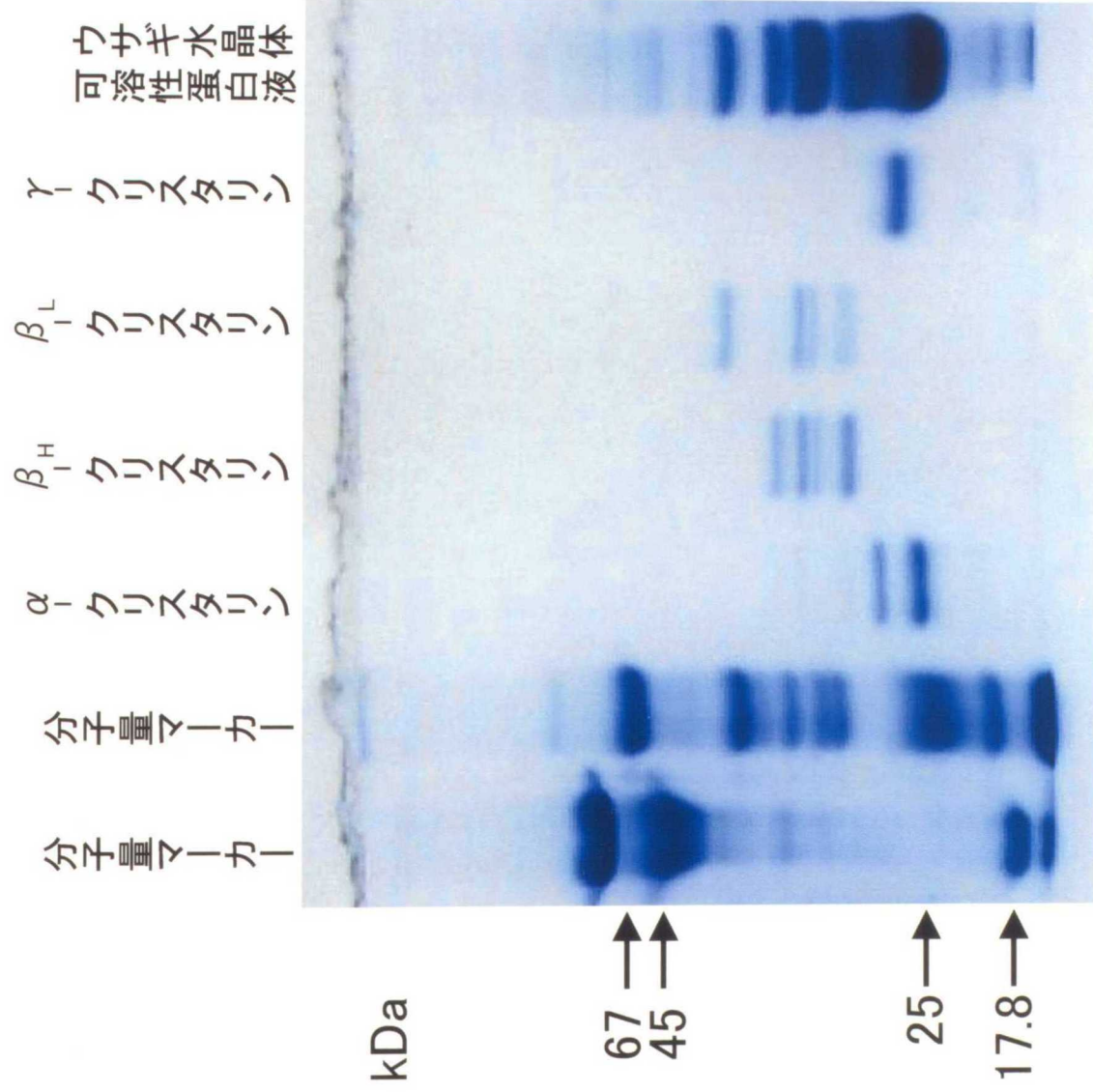


図6 ウサギ水晶体可溶性蛋白と各クリスタリン分画蛋白のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

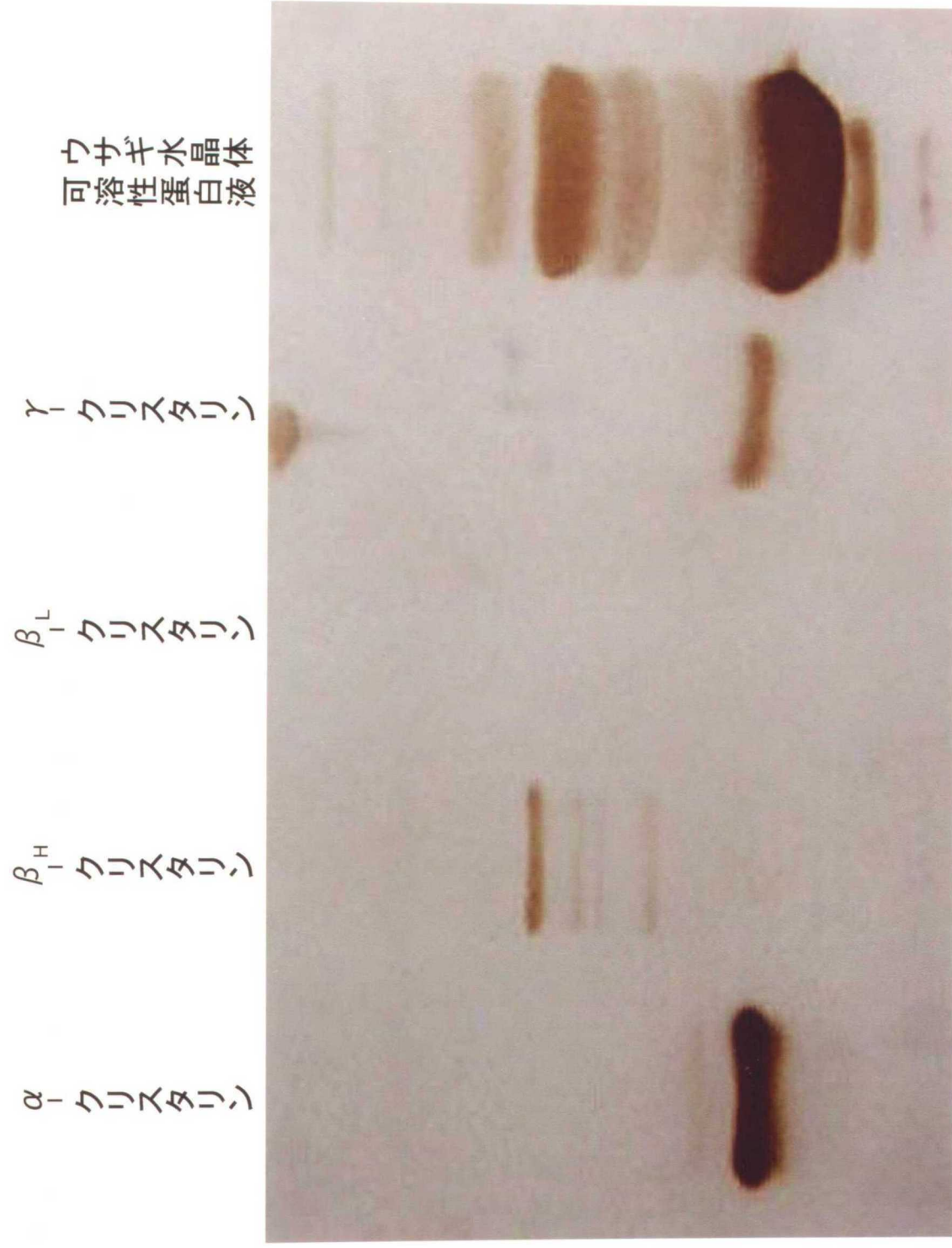


図7 ウエスタンブロット法を用いた自己免疫血漿に対する免疫染色パターン
 抗原にウサギ自己水晶体可溶性蛋白液免疫3週後の血漿を用いたウエスタンブロット法。
 α A、 β _H、 γ -クリスタリン分画の特異的バンドが認められる。

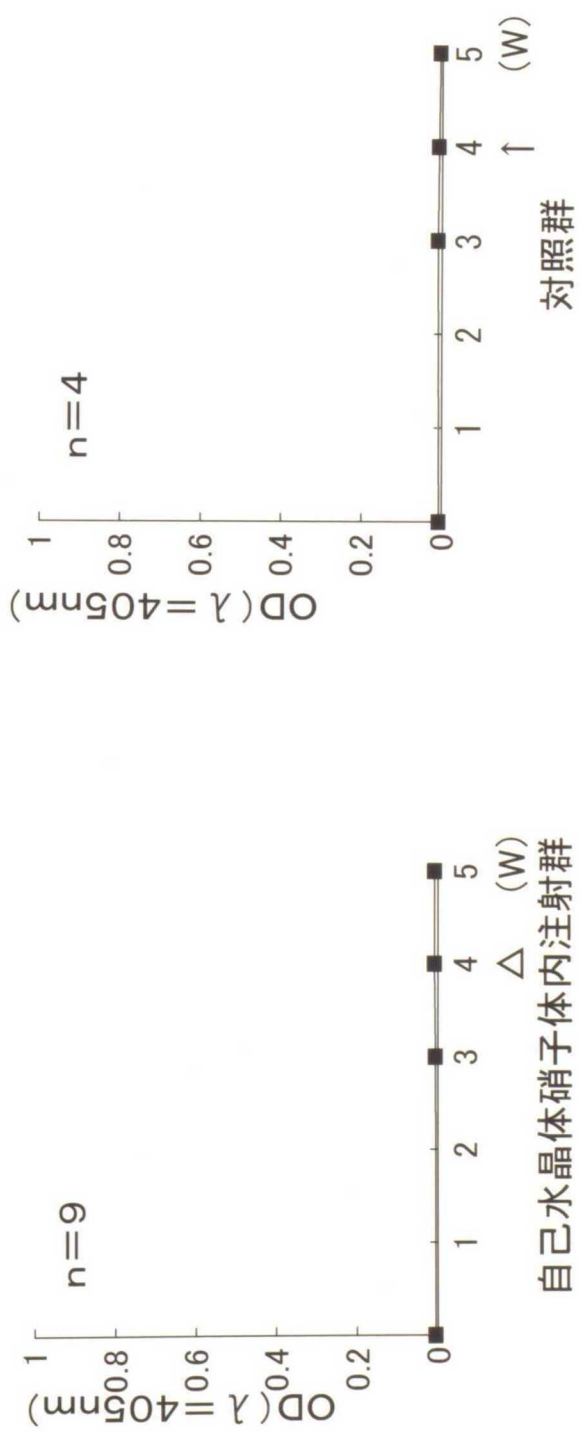
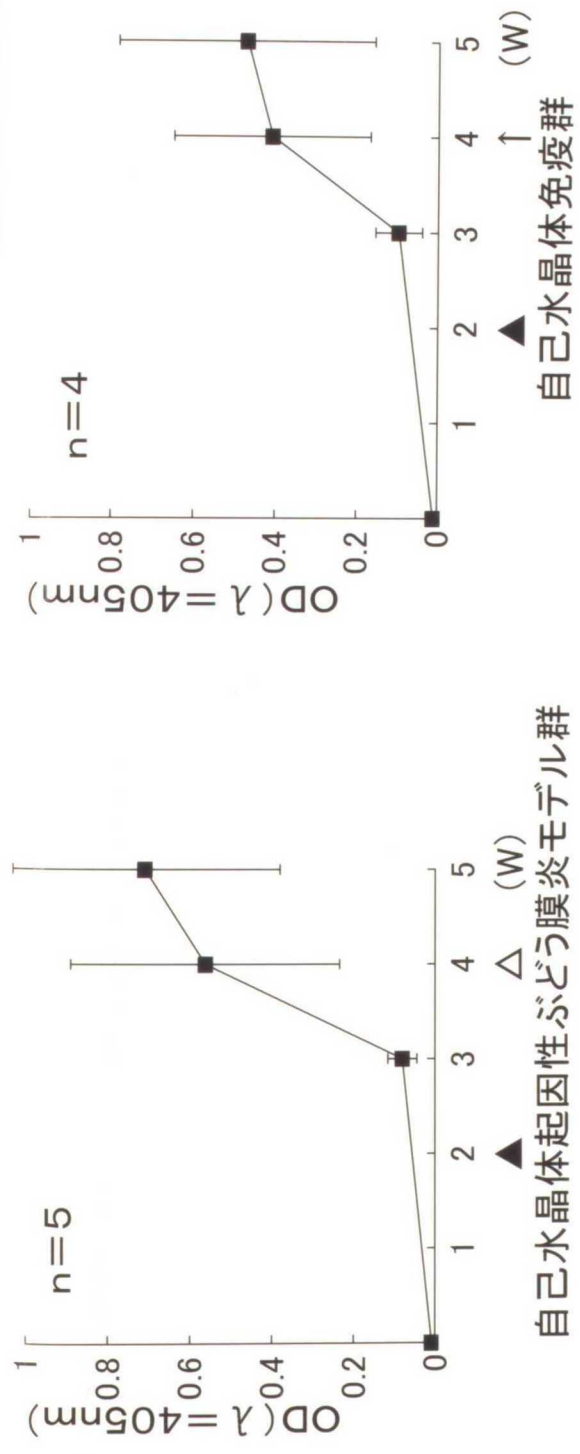


図8 ウサギ血漿中の抗自己水晶体可溶性蛋白抗体産生の推移
 自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群および自己水晶体免疫群において、ウサギ血漿中の抗自己水晶体可溶性蛋白抗体は、免疫2週後より上昇した。
 ▲: 自己水晶体可溶性蛋白の免疫、△: 自己水晶体蛋白可溶性蛋白の硝子体内注射、
 ↑: 生理食塩液の硝子体内注射、W: 週

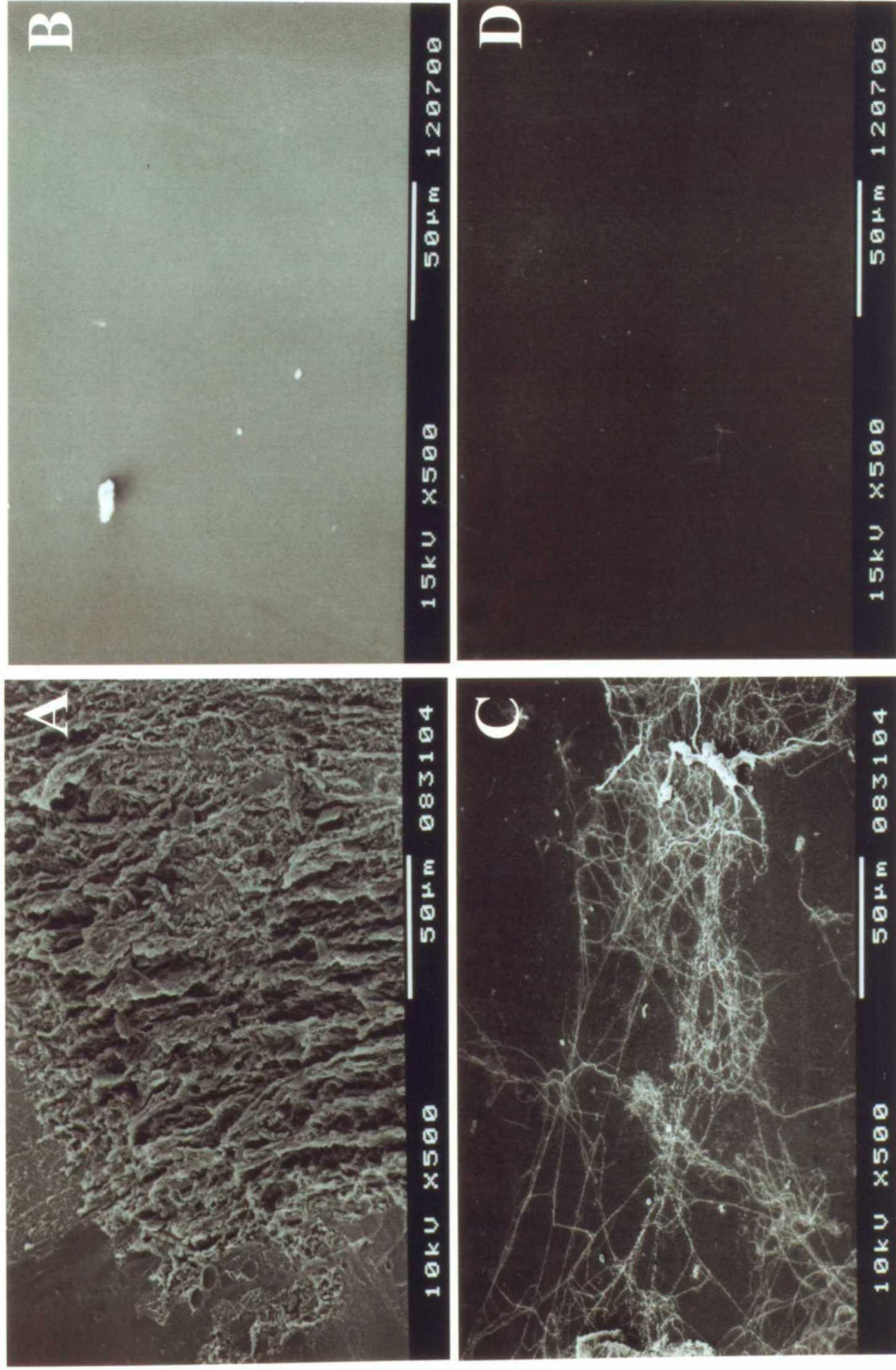


図9 水晶体前囊表面の走査電顕所見

A: 自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群. 水晶体前囊表面に網状の沈着物が重層してみられる.

B: 自己水晶体免疫群.

C: 自己水晶体硝子体内注射群. 水晶体前囊表面に網状の沈着物がみられる。

D: 対照群.

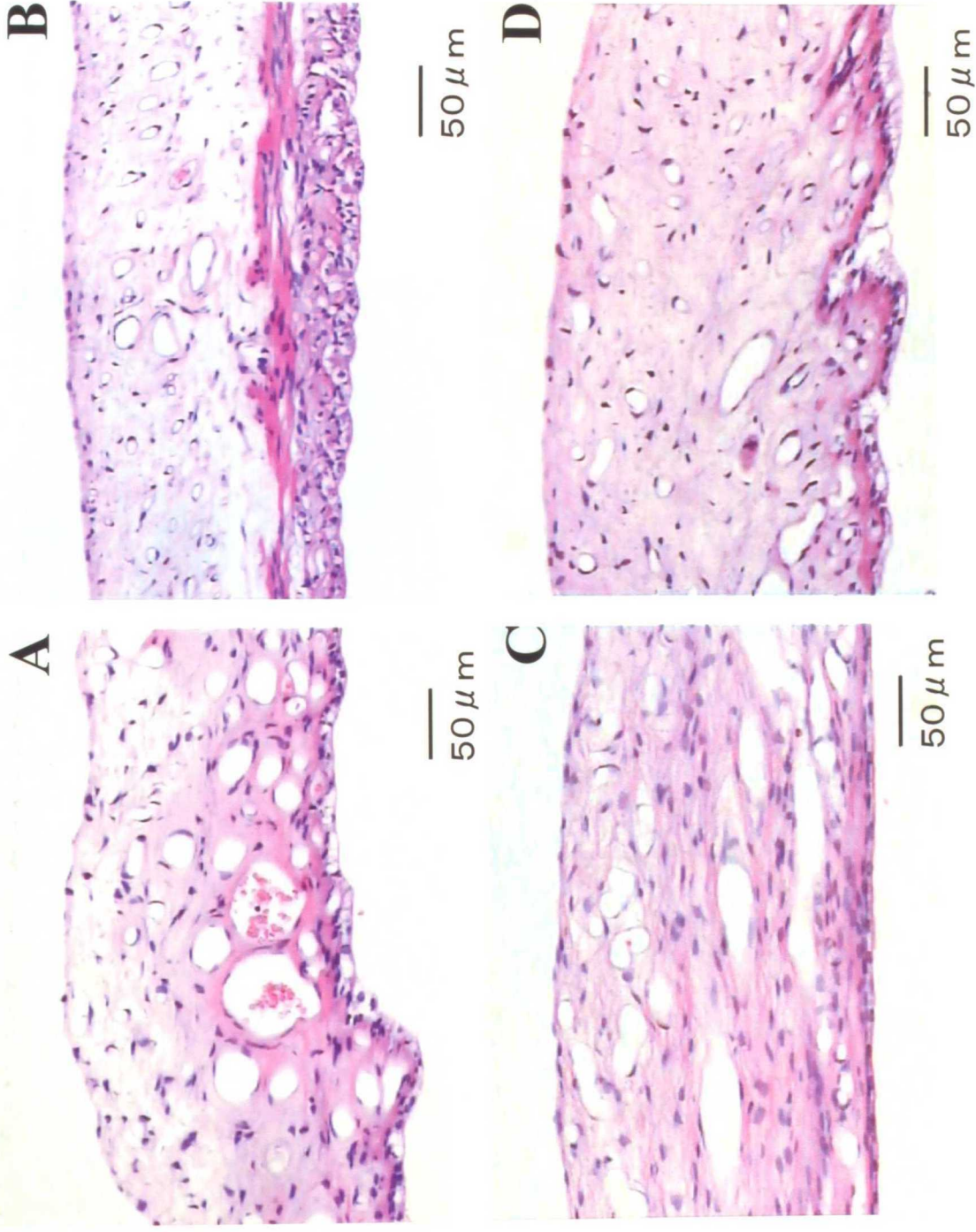


図10 虹彩の組織像(H.E.染色)

- A: 自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群. 線維芽細胞の増生、多数の血管新生像がみられる.
 B: 自己水晶体免疫群.
 C: 自己水晶体硝子体内注射群. 軽度の血管新生像がみられる.
 D: 対照群.

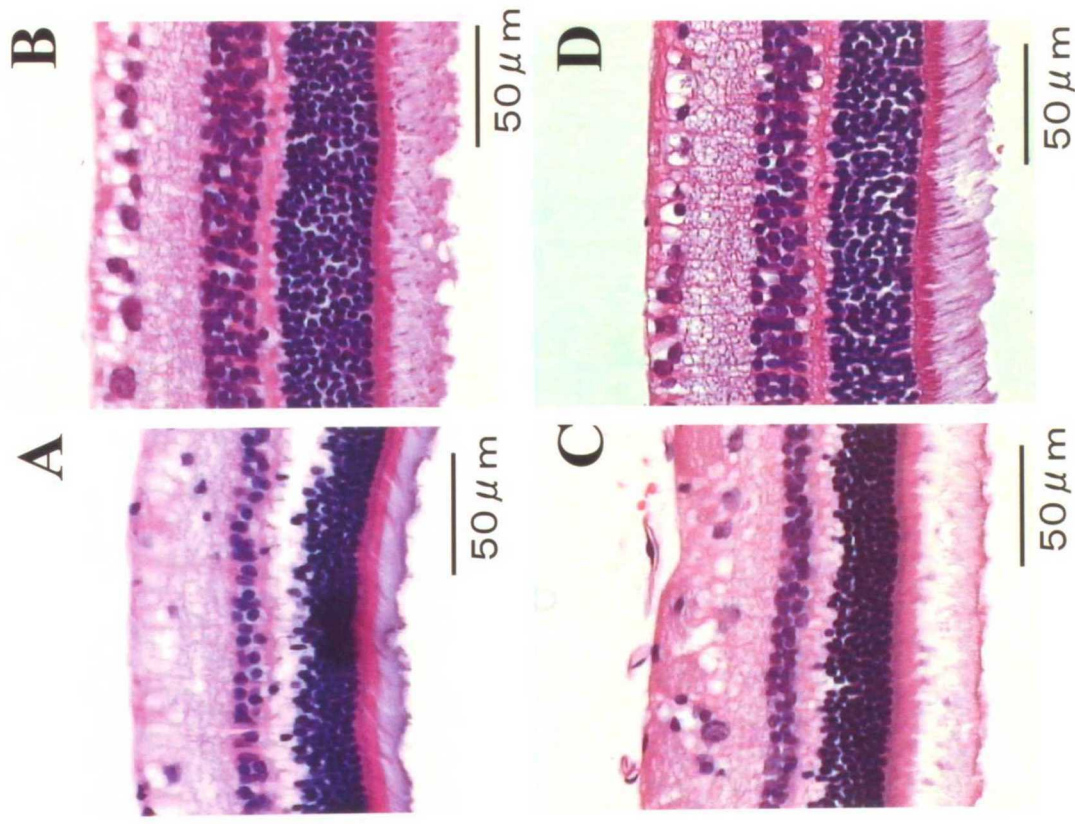


図11 網膜の組織像(H.E.染色)

- A: 自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデル群. 神経節細胞数は減少し、内顆粒層および外顆粒層の減少がみられる.
 B: 自己水晶体免疫群.
 C: 自己水晶体硝子体内注射群. 神経節細胞数は減少し、内顆粒層および外顆粒層の減少がみられる.
 D: 対照群.

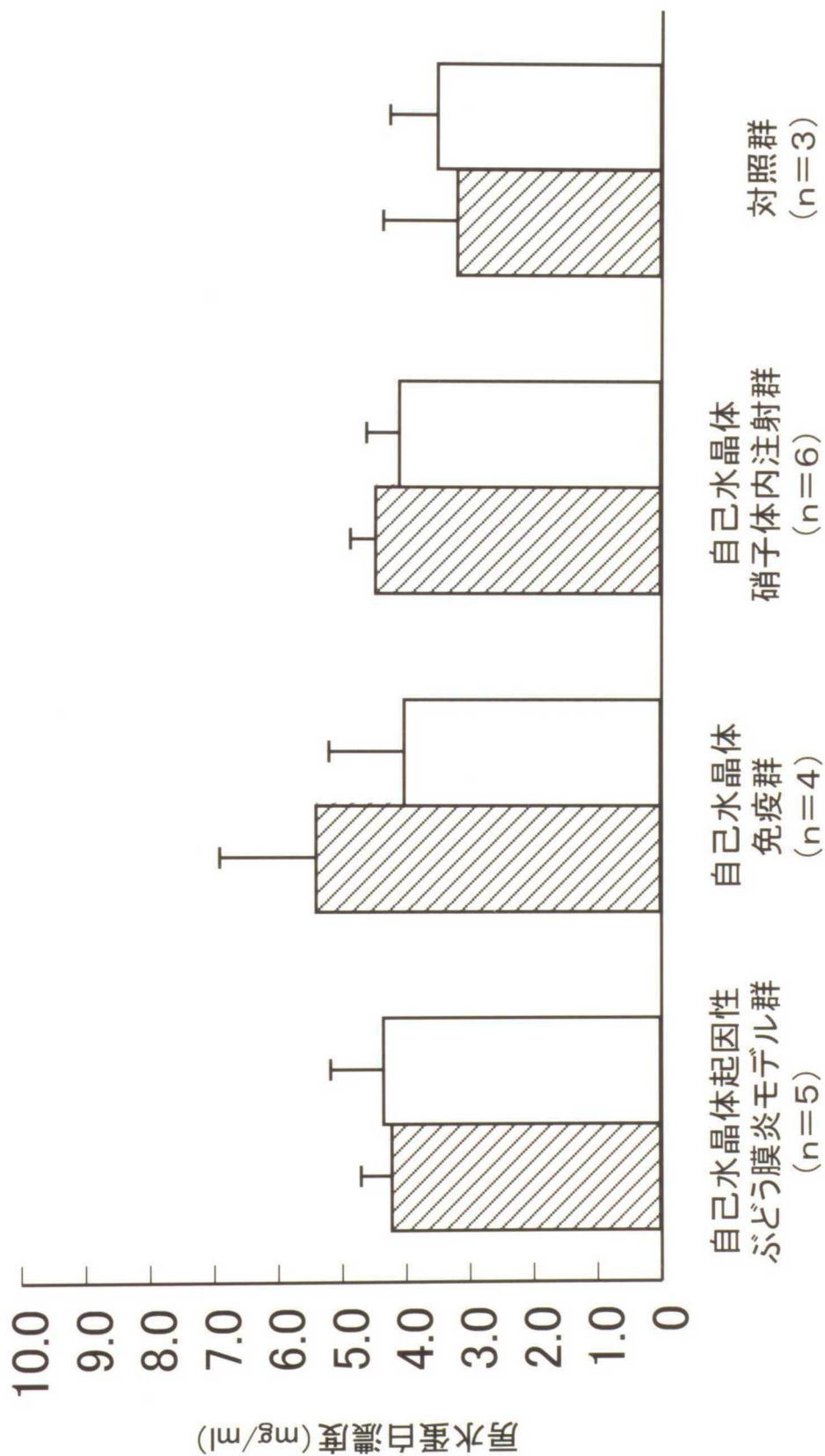


図12 房水蛋白濃度の変化
各群の実験前と硝子体内注射1週後の房水蛋白濃度に有意な差はみられなかった。
▨: 実験前、□: 硝子体内注射1週後