

氏 名 (本籍)	小 野 啓 (静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	甲第93号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 名	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
論文審査委員	(主査) 和 田 恭 則 (副査) 鈴 木 立 雄 山 田 隆 紹 印 牧 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

犬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。また犬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蛋白の発生とその機序を検討する目的で、犬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. 犬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

犬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例であった。

前囊の走査電子顕微鏡観察所見では、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（相関関数 $r=0.886$ ）。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免疫系に異物として曝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、Jla: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全身感作を行い、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（水晶体起因性の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免疫し、その2週間後に生理食塩水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週間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週間後に、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、免疫後2週間より上昇した。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Sephacrose 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 H、 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24.9kDa、 β H-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課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付着蛋白の程度は全個体で重度にみられ、付着蛋白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付着蛋白の程度が軽度で、付着蛋白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付着蛋白が観察されなかった。

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役し、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 α A、 β H及び γ -クリスタリンに対する抗体であった。

本研究は、犬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程度の増加が示された。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。

論文審査の結果の要旨

獣医療における水晶体疾患では、犬の白内障と水晶体脱臼に遭遇することが多い。これらの疾患の臨床的問題点は飼い主による他覚的判断に基づく所が大きく、重症例が多いことである。従来から白内障の治療は外科的治療に勝るものはないといわれ、囊外手術または超音波乳化吸引術が適応されている。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。そのために、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の防止は、手術の成功に必要な不可欠である。このような合併症を防止するには、白内障における水晶体前囊の状態を把握する必要があると考えられる。しかし、こういった時の水晶体前囊に関する報告は少ない。

本論文は、犬の白内障および水晶体脱臼症例における摘出した水晶体前囊を観察し、その表面を走

走査電子顕微鏡を用い付着蛋白の存在を観察した最初の報告であり、犬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を検討している。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、自己水晶体起因性ぶどう膜炎モデルを作出して調べている。

1. 犬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

犬の白内障症例8頭と水晶体脱臼症例3頭の計11眼を用いて摘出水晶体前囊を走査電子顕微鏡にて観察した。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。対照として健常ビーグル犬3頭5眼を用いた。

初診時の眼検査所見では、白内障症例8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症例であった。他の白内障症例3例と水晶体脱臼症例3例でも毛様充血をみた。しかし房水フレア、眼圧上昇は全症例でみられなかった。

すべての症例は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、初診時に毛様充実を示した9症例のうち5症例で改善をみたが、4症例は手術までに毛様充血の改善をみなかった。

水晶体前囊の走査電子顕微鏡観察所見では、蛋白付着が全症例でみられた。500倍での観察像では、糸状付着蛋白の散在、網状付着蛋白や重層した網状付着蛋白をみたが、健常犬ではみられなかった。このような蛋白付着程度と初診時の毛様充実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。しかし、初診から消炎、酵素剤などの投薬を行い、手術直前で毛様充血の程度を観察し、前囊の蛋白付着程度との関係をみたが、一定の傾向をみなかった。

摘出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。

以上の検討結果は、白内障症例および水晶体脱臼症例でみられた水晶体前囊付着蛋白の程度が初診時の毛様充血の程度と関わり合いのあることを症例で示し、初診から手術までの薬物による治療では付着蛋白の減少効果のないことも示した。水晶体前囊付着蛋白は初診時の前部ぶどう膜炎を示し、手術までの治療による毛様充血の軽減が必ずしも水晶体前囊付着蛋白の軽減になっていないことを示した。

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

従来から水晶体起因性ぶどう膜炎の成立過程については、(1) 水晶体囊により胎生早期に隔離され

た異物である水晶体蛋白が白内障の発症などを契機に免疫系に曝露されることで起こるとする説と、(2) 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がある。本研究では前者の説に基づいて水晶体起因性ぶどう膜炎モデルを作成した。すなわち、10週齢の雌ウサギ（日本白色種、Jla: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全身感作を行い、ついでその2週後に調製蛋白の一部（1mg）を硝子体に注入してぶどう膜炎を誘発させた（自己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免疫し、その2週間後に生理食塩水0.05mlを左眼硝子体に注射した自己水晶体免疫群（ $n=4$ ）、右眼水晶体摘出4週間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週間後に、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をELISA法で調べたところ、その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、免疫後2週間から上昇した。しかし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なかった。

2-2. 水晶体可溶性蛋白に対する抗体の特性

水晶体可溶性蛋白をSephacrose 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。水晶体に対する抗体は α A-クリスタリンの分子量24.9kDa、 β H-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の蛋白に対する抗体を検出した。

2-3. 眼球の組織学的検索と房水蛋白濃度

左眼におけるHE染色標本による組織学的検索を硝子体注入1週後に剖検して行った。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をみ、眼内炎症の痕跡を強く疑った。房水蛋白濃度は各群間に差をみなかった。

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付着物の程度は全個体で網状に重層していた。自己水晶体硝子体内注射群では付着物は網状および糸状であった。自己水晶体免疫群および対照群では水晶体前囊表面に付着物をみなかった。

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であったが、前囊付着蛋白量は房水蛋白濃度との関係のないことを示した。免疫時に産生された抗体は α A、 β H及び γ -クリスタリンに対する抗体であることを示した。

本研究は、犬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程度の増加を示し、前囊付着蛋白が水晶体起因性ぶどう膜炎の存在を示唆した。従来から眼内は特殊な免疫機構の存在が知られ、眼内異種蛋白に対する体液性免疫が成立するものの細胞性免疫が完全には機能していないといわれている。さらに本研究は犬での知見を解明する目的で、ウサギの一側眼から自己水晶体可溶性蛋白を調製して、その蛋白を抗原物質として全身感作と対側眼の硝子体注入を行い自己水晶体起因性ぶどう膜炎を作出させた。このモデルでも顕著な水晶体前囊付着蛋白を観察した。これらから、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を示した。以上から、本論文は今後の犬白内障手術時における予後に際して貴重な知見を与えるものであり、博士（獣医学）を授与するにふさわしいものと判断される。