

光受容体間レチノイド結合蛋白による
マウス実験的自己免疫性ぶどう膜炎の
誘発と治療に関する研究

安藤一彦

光受容体間レチノイド結合蛋白による
マウス実験的自己免疫性ぶどう膜炎の
誘発と治療に関する研究

安藤一彦

緒言

実験的自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis : EAU)は、網膜特異抗原をアジュバントとともに免疫することにより各種の実験動物の眼内に惹起される網脈絡膜炎である¹。EAUは、原田病、交感性眼炎、散弾様網脈絡膜炎などのヒトぶどう膜炎との病理所見の類似性が指摘されている^{2,3}。また、パーチェット病などの内因性ぶどう膜炎患者のリンパ球は、網膜特異抗原に対する増殖反応をしめすことが報告されており^{4,5}、網膜抗原を標的とする免疫反応がその病態形成に強くかかわっていると考えられている。これらの事実をもとに、EAUはヒトのぶどう膜炎の動物モデルとして、これまでその発症機序についての研究が精力的になされ、また各種免疫抑制剤のぶどう膜炎に対する治療効果の解析などに用いられている。

EAUはラット、ウサギ、モルモット、サルでは、完全フロイントアジュバント(complete Freund's adjuvant : CFA)に網膜特異抗原を乳化混合して免疫することで、容易に惹起されていたが、マウスにEAUを起こすことは困難であった⁶。近年、Caspiらは、シクロホスファミド前処置後にアジュバントとしてCFAと百日咳死菌を用いて、網膜可溶性抗原を強化免疫することにより、マウスにEAUを惹起することに成功した^{6,7}。また当教室の岩瀬らは、*Klebsiella pneumoniae* O3 lipopolysaccharide (K03-LPS)をアジュバントに用いて、マウスにEAUを惹起する方法を報告した^{8,9}。当教室で用いたK03-LPSは強いアジュバント作用を有し^{10,11}、甲状腺炎¹²、睪炎¹³、肝炎¹⁴、精巣炎¹⁵など、多くの臓器特異的炎症性疾患の動物モデルに利用されている。岩瀬らは網膜特異抗原としてS抗原を用い、抗原を複数回免疫してEAUモデルを作成した。

EAUを惹起しうる網膜抗原として網膜可溶性成分から最初に単離されたS抗原は、404のアミノ酸で構成される分子量約48000の蛋白で^{16,17}、機能的には、光刺激をうけてリン酸化をうけたロドプシンに結合し、サイクリックGMPホスホジエステラーゼの作用を抑制することにより、光刺激伝達を調節していると考えられている¹⁸。一方、S抗原の他にEAUを惹起しうる網膜抗原として、光受容体間レチノイド結合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein: IRBP)がある¹。IRBPは分子量約140000の蛋白で、約300のアミノ酸からなるドメインが4つ連続してつながった構造を有し、機能的には視細胞層の外境界膜と網膜色素上皮間のレチノイドの輸送をつかさどると考えられている¹⁹。IRBPとS抗原は、免疫学的に交差反応をしめさず、異なる抗原性を有するにもかかわらず²⁰、それぞれの抗原により誘発されるEAUは、ラットでは、眼症状、眼球の病理所見ともに類似した所見がみられる²¹。

マウスにおいてS抗原により誘発されるEAUは、発症率がやや低く、また、4週間おき4回の免疫が必要であるため観察期間が長いなどの難点がある⁸。IRBPにより誘発されるEAUは、ラットでは、S抗原により誘発されるEAUに比べ、より少ない抗原量で発症しうる、炎症の持続時間が短いなどの相違が

みられることから²¹、マウスにおいてもIRBPを用いた場合は観察期間がより短く発症率の高いEAUモデルを作成できる可能性があった。

今回、われわれはIRBPとK03-LPSにより惹起されるマウスEAUを新たに作成し、その病態を観察したのち、発症機構を明らかにする目的で疾患感受性因子を検討し、さらにこのモデルを用いて免疫療法を試みた。すなわち、1)手術用顕微鏡を応用した眼底検査によるEAUの経時的変化の観察および炎症の再燃性の検討、2)B10系マウスを中心に各種近交系マウスを用い、IRBP免疫によるEAUの疾患感受性遺伝子の検討、3)抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗Ia抗体、抗lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)抗体、抗intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)抗体による抗原特異的リンパ球増殖反応に対する抑制効果の検討、4)3)と同じ抗体のin vivo投与によるEAU発症抑制効果の検討を行なった。

方法

動物

5種類のB10系マウス(B10.BR, B10.A, B10.A(4R), B10.A(5R), C57BL/10)と、AKR/Jマウスを用いた。B10.BR, C57BL/10は日本SLCより購入した。B10.A, AKR/Jは埼玉実験動物より購入した。B10.A(4R), B10.A(5R)は国立遺伝研究所遺伝実験生物保存研究センター森脇和郎教授より供与をうけた。使用したマウスのH-2ハプロタイプを表1に示した。ハプロタイプbでは遺伝子欠損のためE α 鎖は発現しない²²。モノクローナル抗体を作製するために、BALB/cヌードマウスを用いた。BALB/cヌードマウスは日本クレアより購入した。

表1 マウスのH-2ハプロタイプ

近交系マウス	H-2ハプロタイプ						
	K	A α	A β	E β	E α	S	D
B10.BR	k	k	k	k	k	k	k
B10.A	k	k	k	k	k	d	d
B10.A(4R)	k	k	k	k	(-)	b	b
B10.A(5R)	b	b	b	b	k	d	d
C57BL/10	b	b	b	b	(-)	b	b
AKR/J	k	k	k	k	k	k	k

(-): ハプロタイプbのマウスではE α 鎖は発現しない

抗原

IRBP は、藤野らの方法²¹により新鮮ウシ網膜より抽出精製した。すなわち、新鮮ウシ網膜に0.01 M リン酸緩衝液(PBS)を加え、かくはんした後、採取した上清に飽和硫酸アンモニウムを加えた。遠心後に回収した沈澱に0.01 M PBSを加えて溶解し、超遠心後上清を採取した。えられた上清をUltrogel AcA34 (LKB, Villeneuve-la-Garenne, France)カラムを用いてゲルろ過し、分離した。抗ウシIRBPウサギ血清を用いて免疫二重拡散法により沈降線のみられる分画を集め、0.15M塩化ナトリウム、1mM塩化カルシウム、1mM塩化マンガン含有する0.05Mトリス塩酸緩衝液で透析後、コンカナバリンA-セファロース(Pharmacia, Uppsala, Sweden)カラムに流した。コンカナバリンA-セファロースに吸着しない蛋白を0.05Mトリス塩酸緩衝液で溶出後、0.2M methyl- α -D-mannopyranosideを含む0.05Mトリス塩酸緩衝液を流し、カラムに吸着したIRBPを溶出した。抗ウシIRBPウサギ血清を用いた免疫二重拡散法により、IRBPを含む分画を集め、0.01 M PBSで透析後、1 mg/mlの蛋白濃度に調整した。

アジュバント

アジュバントにはK03-LPSを用いた。K03-LPSは、*Klebsiella pneumoniae* LEN-1 strainの培養液から抽出精製されたリポ多糖体²²で、名古屋大学微生物学教室加藤延夫教授より供与を受けた。

免疫方法

IRBPおよびK03-LPSを0.01 M PBS 0.2 mlに溶解し、マウス鼠径部皮下に注射を行った。複数回免疫する場合は、同一の部位に繰り返し注射した。

眼底検査によるEAUの経時的变化の観察実験では、免疫するIRBPおよびK03-LPSの投与量と免疫回数を変えて、B10.BRマウスを6つのグループに分けた。1回の投与量をIRBP 100 μ gとK03-LPS 100 μ g(A群)、およびIRBP 50 μ gとK03-LPS 50 μ g(B群)の2種類とした。免疫回数は、1回、2週間おきに2回、2週間おきに3回の3種類とした。

EAUの疾患感受性遺伝子を検討する実験では、IRBP 100 μ gとK03-LPS 100 μ gを2週間おきに3回免疫し、最終免疫後2週目に静脈血、脾臓、眼球を採取した。

各種モノクローナル抗体の抗原特異的リンパ球増殖反応に及ぼす作用を検討する実験では、B10.BRマウスをIRBP 100 μ gとK03-LPS 100 μ gで2週間おきに2回免疫し、最終免疫後2週目に鼠径部のリンパ節を摘出した。

各種モノクローナル抗体のin vivo投与実験では、B10.BRマウスをIRBP 100 μ gとK03-LPS 100 μ gで2週間おきに2回免疫した。

モノクローナル抗体

GK1.5²⁴、53-6.7²⁵、YN1/1.7²⁶のハイブリドーマは、横浜市立大学医学部寄生虫学教室南陸彦教授より供与を受けた。10-2.16²⁷、34-5-3²⁸、FD441.8²⁹のハイブリドーマは、東京大学免疫学教室中山俊憲先生より供与を受けた。

BALB/cヌードマウスの腹腔内にブリスチン(2,6,10,14-tetramethylpentadecane) 0.5 mlを注射し、1週間後に10⁷個前後の上記ハイブリドーマを腹腔内に注入し、数日後腹水を採取した。腹水と同量の飽和硫酸アンモニウムを徐々に加え、析出した沈澱を遠心してペレットとしたのち、0.01 M PBSに溶解した。同じ操作を3回繰り返したのち、0.01 M PBSで透析を行った。0.01 M PBSを加えてタンパク濃度を調整したのち、凍結保存した。使用したモノクローナル抗体のIgGサブクラスおよびその反応特異性については表2にまとめた。

表2 使用したモノクローナル抗体

モノクローナル抗体	IgGサブクラス	反応特異性
GK1.5	ラットIgG2b	マウスL3T4
53-6.7	ラットIgG2a	マウスLyt2
10-2.16	マウスIgG2a	マウスIa ^{f, j, k, r, s, u}
34-5-3	マウスIgG2a	マウスIa ^{b, d, p, q}
FD441.8	ラットIgG2b	マウスLFA-1
YN1/1.7	ラットIgG2a	マウスICAM-1

マウスの眼底所見の観察

眼底検査は、5 μ g/mlのベントバルビタールナトリウム(0.15-0.2 ml 腹腔内投与)による麻酔下で行った。0.5%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリンの混合液を1滴点眼し、十分に散瞳させたのち、眼科手術用顕微鏡(OLYMPUS OME, オリンパス光学工業、東京)下で、マウス角膜表面に病理標本作成用のカバーガラスをのせて眼底を観察した。眼底検査は初回免疫時より、毎週1回行った。

眼球の病理組織学的検査

EAUの発症の有無と、炎症強度の強さを病理組織学的に検討した。採取した眼球を2.5%グルタルアルデヒド、2%ホルムアルデヒド溶液で固定したのち、パラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。作製した標本は、光学顕微鏡で観察した。炎症の程度を以下の基準により病理所見を点数化し評価した。0: 炎症所見なし、1: 網膜血管周囲あるいは脈絡膜に細胞浸潤をみとめるが、網膜層状構造の破壊は見られない、2: 1と3の中間、3: 炎症細胞の浸潤により網膜が破壊され、網膜の正常な層状構造が確認できない部位が複数カ所みられる。

IRBPに対する血清抗体価の測定

酵素標識免疫吸着測定法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)により、600倍、1200倍、2400倍に希釈した血清中の抗IRBP抗体価を測定した。96穴ポリビニルクロライド製プレート(Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA)の各wellに1/15 MPBSに溶解したIRBP(50 ng/well)を吸着させた。1時間室温で暗所に静置したのち、1/15 MPBSで5回洗浄を繰り返した。次に、10%ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS, Cell Culture Laboratories, Cleveland, OH, USA)を含む1/15 MPBSで各wellを被覆して、1時間室温で暗所に静置した。1/15 MPBSで2回洗浄したのち、10% FBSを含む1/15 MPBSで希釈した血清100 μ lで各wellを被覆して、1時間室温で暗所に静置した。1/15 MPBSで5回洗浄したのち、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGウサギIgG(第一化学薬品、東京)を1/15 MPBSで1000倍に希釈した溶液100 μ lで各wellを被覆して、1時間室温で暗所に静置した。1/15 MPBSで洗浄したのち、O-フェニレンジアミン(Sigma, St. Louis, MO, USA)を含む基質100 μ lを各wellに加えた。基質は、0.2 Mリン酸二ナトリウムと0.2 Mクエン酸を1:1に混合した溶液にO-フェニレンジアミンを0.4 mg/mlの割合で溶解し、さらに最終濃度0.012%の割合で過酸化水素(H₂O₂)を加えて調整した。10分後4N硫酸50 μ lを各wellに加え、反応を止めたのち、2-wavelength microplate photometer (Corona Electric, 東京)を用いて、490 nmにおける吸光度を測定した。

IRBPに対する抗原特異的リンパ球増殖反応の測定

摘出した脾臓をすりつぶし、脾細胞浮遊液を得た。培養液は、グルタミン2 mM、ペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml、2%ヒト血清(日本フローラボラトリー株式会社、東京)を含むRPMI-1640(GIBCO, Grand Island, NY, USA)を用いた。トリス緩衝液と塩化アンモニウムの混合液を用いて溶血後、培養液で細胞浮遊液を洗浄した。平底のマイクロプレート(Costar, Cambridge, MA, USA)の各wellに 5×10^5 個の細胞を入れ、IRBP 2あるいは20 μ g/mlを加え、5日間培養した。細胞回収16時間前に1 μ Ci/wellの³H-thymidineを加え(New England Nuclear, Boston, MA, USA)、細胞回収後、液体シンチレーションカウンター(Aloka Model LSC-900, 東京)を用いて³H-thymidineの取り込みを測定した。結果は、抗原添加群と抗原非添加群の取り込みの比であるStimulation Index (S.I.)で表した。

各種モノクローナル抗体の抗原特異的リンパ球増殖反応に及ぼす作用

リンパ球浮遊液の培養液に各モノクローナル抗体(0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml)を加え、前述の脾細胞と同じ条件下で、IRBP 20 μ g/mlに対するリンパ球の増殖反応を調べた。抗CD4抗体(GK1.5)、抗CD8抗体(53-6.7)、抗Ia^b抗体(10-2.16)、抗Ia^d抗体(34-5-3)、抗LFA-1抗体(FD441.8)、抗ICAM-1抗体(YN1/1.7)の6種類のモノクローナル抗体について実験を行った。培養液にモ

ノクローナル抗体を加えないで測定した S.I. を control S.I. として、結果を percent suppression : $(100 \times (1 - S.I./\text{control S.I.}))$ で表した。

各種モノクローナル抗体の in vivo 投与実験

初回免疫前日より、0.01 M PBS で希釈した各種モノクローナル抗体を腹腔内に投与した。投与量および投与回数は表3にまとめた。

初回免疫時より、毎週眼底検査を行なった。最終免疫後2週目に眼球を採取し、病理組織学的検討を行った。

コントロール(0.01 M PBS 投与)群、抗CD4抗体(GK1.5)投与群(総投与量800 μ g)、抗CD8抗体(53-6.7)投与群(総投与量800 μ g)については、最終免疫後2週目に静脈血、脾臓を採取し、IRBP に対する血清抗体価の測定、脾細胞のIRBP に対する増殖反応の測定を行った。さらに、脾細胞をフィコエリスリン標識抗CD4 (L3T4) 抗体とFITC標識抗CD8(Lyt2) 抗体(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) で染色し、フローサイトメーター (スペクトラム3, Ortho Diagnostic System, 東京) により、リンパ球サブセットの測定を行った。

また、抗CD4抗体の投与量による抑制効果への影響をみる目的で、抗CD4抗体の1回投与量を100 μ g/mouse あるいは50 μ g/mouse に減らし、他の条件は同じにして免疫療法を行なった。最終免疫後2週目に眼球、脾臓を採取し、眼球の組織病理所見の検討、フローサイトメーターによるリンパ球サブセットの測定(CD4/CD8比)を行なった。

表3 各種モノクローナル抗体によるマウスEAU発症抑制実験

モノクローナル抗体	投与量 (μ g)	投与頻度 (回/週)
	1回量/総量	
抗CD4 (GK1.5)	50/200	1
	100/400	1
	200/800	1
抗CD8 (53-6.7)	200/800	1
	1000/4000	1
抗Ia ^k (10-2.16)	1000/4000	1
抗Ia ^d (34-5-3)	1000/4000	1
抗LFA-1 (FD441.8)	500/4500	2
抗ICAM-1 (YN1/1.7)	500/4500	2
抗LFA-1+抗ICAM-1	250+250/2250+2250	2

結果

マウスの眼底所見の観察

IRBP免疫後のB10.BRマウスの眼底病変を、手術用顕微鏡を応用して経時的に観察し、EAUの発症時期、炎症の程度と免疫方法との関係を検討した。また、長期の観察により、炎症の再発についても検討した。網脈絡膜炎の発症時期は、最も早くて初回免疫後2週目であり、免疫後1週間以内では眼底に変化を認めなかった。網脈絡膜炎は視神経乳頭の浮腫および視神経乳頭周囲の血管炎(図1)で始まり、周辺部網膜に拡大していった。炎症の程度が強くと、血管炎の範囲が広い場合には、広範囲な網膜剥離を伴った。血管周囲の網膜出血(図2)、硝子体混濁が数例にみられた。炎症が軽快すると、視神経乳頭は蒼白となり、網膜の浮腫は脱色素斑を残して消失した。炎症の程度が強かった眼球では、血管が白線化し、血行の途絶が疑われる場合もあった。

眼底所見に基づいたEAU発症率を表4に示す。免疫抗原とアジュバントの量が $100\mu\text{g}$ の群の発症率は、1回免疫50%、2回免疫90%、3回免疫100%で、抗原とアジュバントの量が $50\mu\text{g}$ の群における結果30%、60%、90%よりも高い発症率となった。また、両群ともに免疫回数が多いほど、発症率が高くなった。最も高頻度でみられた眼底病変は、視神経乳頭の浮腫および視神経乳頭周囲の血管炎で、EAUを発症した眼球ではどちらかの所見がかならず観察された。免疫抗原とアジュバントの量が $100\mu\text{g}$ の群では、EAUを発症した場合に、強い炎症を起こす頻度は、1回免疫60%、2回免疫39%、3回免疫70%で、抗原とアジュバントの量が少ない群での0%、50%、44%に比べ、頻度が高い傾向があった。

免疫回数が3回ときの検眼鏡的観察により調べた発症率の経時的変化をグラフに示す(図3)。IRBP $50\mu\text{g}$ 、K03-LPS $50\mu\text{g}$ で免疫した場合(B群)、IRBP $100\mu\text{g}$ 、K03-LPS $100\mu\text{g}$ で免疫した場合(A群)にくらべ、炎症の持続時間が短い傾向があった。また、IRBP $100\mu\text{g}$ 、K03-LPS $100\mu\text{g}$ で免疫した場合(A群)に、初回免疫後9週以降に炎症の再発がみられた。炎症の再発は、IRBP $100\mu\text{g}$ 、K03-LPS $100\mu\text{g}$ で免疫した場合は、1回免疫で2/20眼、2回免疫で3/20眼、3回免疫で6/20眼にみられた。

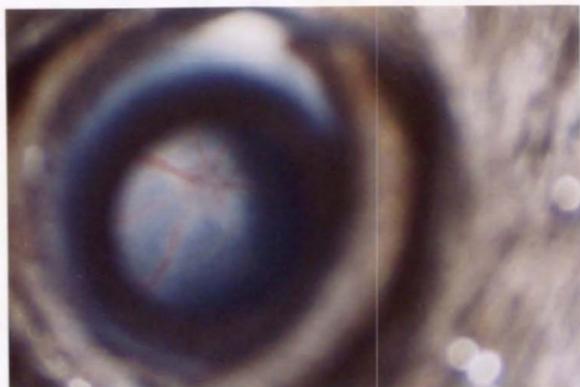


図1.EAU 発症時のB10.BR マウス眼底所見。IRBP $100\mu\text{g}$ および K03-LPS $100\mu\text{g}$ を2週間おき2回免疫し、最終免疫1週後に撮影した。視神経乳頭浮腫と網膜血管の白鞘化を認める。

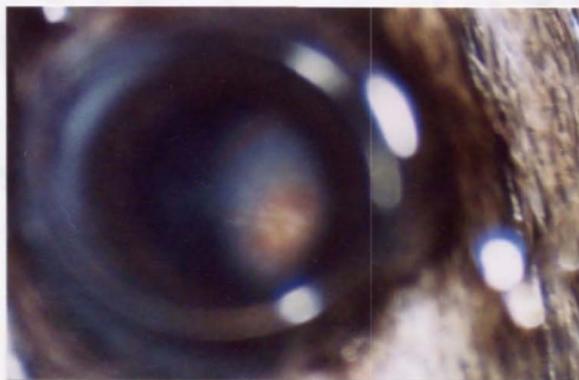


図2.EAU 発症時のB10.BR マウス眼底所見。IRBP $100\mu\text{g}$ および K03-LPS $100\mu\text{g}$ を2週間おき2回免疫し、最終免疫1週後に撮影した。網膜血管周囲に出血を認める。

表 4 EAUの眼底所見(B10.BRマウス)

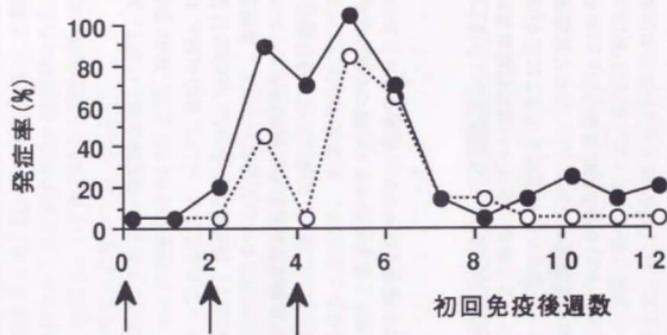
IRBP K03-LPS (μ g)	免疫回数 (μ g)	EAU発症率 ^a	眼底病変の種類と出現頻度 ^b			
			視神経乳頭 の浮腫	網膜血管炎	広範囲な網膜剥離を 伴う強い網膜血管炎	
50	50	1	3/10	2/3 (67%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)
		2	6/10	6/6 (100%)	5/6 (83%)	3/6 (50%)
		3	9/10	9/9 (100%)	7/9 (78%)	4/9 (44%)
100	100	1	10/20	9/10 (90%)	9/10 (90%)	6/10 (60%)
		2	18/20	17/18 (94%)	14/18 (78%)	7/18 (39%)
		3	20/20	20/20 (100%)	20/20 (100%)	14/20 (70%)

^a発症した眼数/免疫されたマウスの総眼数

^b該当する眼数/発症した眼数

B10.BRマウスをIRBPとK03-LPSで免疫し、初回免疫時より12週間、毎週1回眼底検査を行なった。抗原およびアジュバントの投与量が多いほど、また、免疫回数が多いほどEAU発症率が高くなった。最も高頻度に観察された眼底病変は、視神経乳頭浮腫と網膜血管炎であった。網膜剥離を伴う強い炎症を起こす頻度は、抗原およびアジュバントの投与量が多い群で頻度が高い傾向があった。

図3 眼底所見からみたEAU発症率
の経時的变化(3回免疫)



抗原およびアジュバント量

●—● A群: IRBP100 μ g + K03-LPS100 μ g
○- -○ B群: IRBP 50 μ g + K03-LPS 50 μ g

B10.BRマウスを2週間おきに3回免疫した(矢印)。初回免疫時より毎週1回眼底検査を行なった。

A群では初回免疫後2週から、B群では初回免疫後3週から発症がみられた。B群ではA群より炎症の持続時間が短かった。A群では初回免疫後9週からEAUの再発がみられたが、B群では再発はみられなかった。

疾患感受性とMHC

IRBPおよびK03-LPSを2週おきに3回免疫し、その2週後の病理所見を観察した。眼底検査の経過(図3)からみて、炎症の極期での観察と考えられる。眼底検査での所見と同様、前眼部には炎症所見はみられなかった。強い炎症反応を起こした眼球では、網膜層を中心としたリンパ球と推測される単核炎症細胞の浸潤と、網膜の層状構造の破壊が散在性に認められた(図4)。網膜剥離、網膜下出血がみられる眼球もあった。弱い炎症反応を起こした眼球では、網膜血管周囲にリンパ球と推測される単核炎症細胞の浸潤がみられたが、網膜の層状構造は維持されていた(図5)。いずれの場合も炎症局所への多核白血球の浸潤は全くみられないかごくわずかであった。

眼病理組織検査における各種マウスのEAU発症率を表5に示す。B10.BR、B10.A、B10.A(4R)の3つのstrainの発症率は90%以上で、IRBP免疫によるEAUにたいして高感受性マウスであると考えられた。B10.A(5R)、C57BL/10の発症率はそれぞれ12.5%、10%で、低感受性であった。AKR/Jは発症率54.5%で、高感受性群と低感受性群の中間の反応がみられた。高感受性マウスでは、強い炎症反応(図4)が高頻度でみられた。低感受性マウスでは、発症した場合でも、炎症の程度は非常に弱く、網膜の正常な層状構造がみられなくなるほどの変化はみられなかった(図5)。血清抗体価は、すべてのマウスで高値となり、高感受性マウスと低感受性マウスの間での差は見られなかった(図6)。脾細胞の増殖反応でも高感受性マウスと低感受性マウスの間での差は見られなかった(図7)。

各種モノクローナル抗体の抗原特異的リンパ球増殖反応に及ぼす作用

IRBPで免疫したB10.BRマウスより採取したリンパ球の抗原特異的増殖反応に対する、各種モノクローナル抗体の抑制効果をグラフに示す(図8)。抗CD4抗体(GK1.5)は $0.1 \mu\text{g/ml}$ の低濃度でも70%以上、さらに高濃度では80%以上の抑制がみられた。抗CD8抗体(53-6.7)の抑制効果は $10 \mu\text{g/ml}$ の高濃度でも25%以下で、増殖反応への影響は軽度であった。抗Ia^b抗体(10-2.16)は $10 \mu\text{g/ml}$ で40%以上の抑制を示した。抗Ia^d抗体(34-5-3)は抑制効果20%以下で、増殖反応への影響は軽度であった。抗LFA-1抗体(FD441.8)は、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で70%以上の抑制効果を示した。抗ICAM-1抗体(YN1/1.7)は、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で40%以上の抑制を示した。抗LFA-1抗体と抗ICAM-1抗体の両者を半量ずつ同時に添加した場合は、抗LFA-1抗体よりも強い抑制効果がみられた。

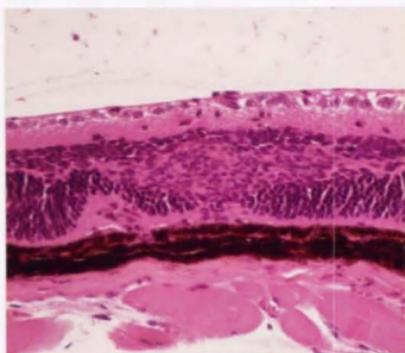


図4.B10.BR マウス眼球の組織病理所見。IRBP $100\mu\text{g}$ および K03-LPS $100\mu\text{g}$ を2週間おき3回免疫し、最終免疫2週後に眼球を採取、固定した。内顆粒層から外顆粒層にかけてリンパ球と推測される単核炎症細胞が浸潤し、網膜の層状構造が破壊されている。脈絡膜および硝子体へも軽度細胞浸潤がみられ、部分的に網膜が剥離している。多核白血球はほとんど認められない。(スコア3)。X 200



図5.C57BL/10マウス眼球の組織病理所見。IRBP $100\mu\text{g}$ および K03-LPS $100\mu\text{g}$ を2週間おき3回免疫し、最終免疫2週後に眼球を採取、固定した。網膜血管周囲にリンパ球と推測される単核炎症細胞の浸潤がみられるが、網膜層の構造は維持されている。多核白血球は認められない(スコア1)。 X 100

表5 各種近交系マウスにおける
EAU発症率と炎症の強さ(病理所見)

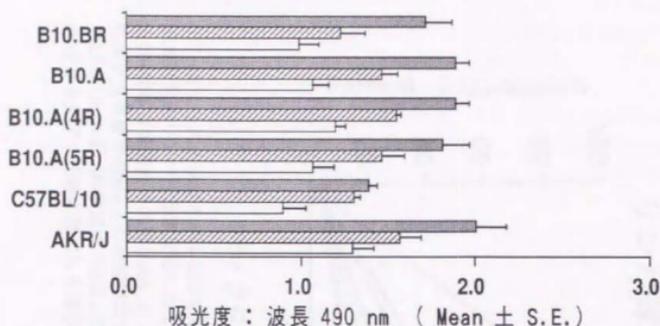
近交系 マウス	EAU 発症率 ^a	炎症病変スコア別のEAU出現頻度 ^b		
		1 ^c	2	3
B10.BR	20/22	4/20(20%)	12/20(60%)	4/20(20%)
B10.A	9/10	1/9(11%)	4/9(44%)	4/9(44%)
B10.A(4R)	26/26	4/26(15%)	12/26(46%)	10/26(39%)
B10.A(5R)	2/16	2/2(100%)	0/2(0%)	0/2(0%)
C57BL/10	1/10	1/1(100%)	0/1(0%)	0/1(0%)
AKR/J	12/22	4/12(33%)	7/12(58%)	1/12(8%)

^a発症した眼数/免疫されたマウスの総眼数 ^b該当する眼数/発症した眼数 ^c炎症病変スコア

各種近交系マウスをIRBP100 μ gとK03-LPS100 μ gで2週間おきに3回免疫した。最終免疫後2週目に眼球を採取し、EAUの発症の有無と炎症の強さを病理組織学的に検討した。

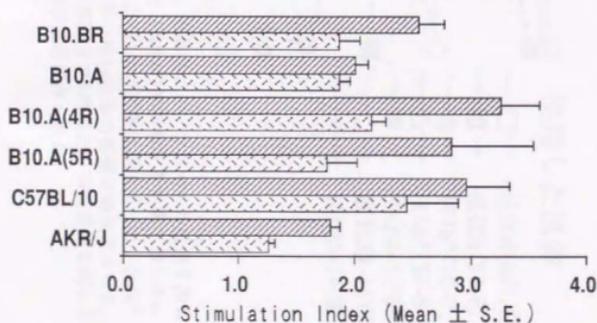
B10.BR、B10.A、B10.A(4R)は高感受性マウスであり、B10.A(5R)、C57BL/10は低感受性マウスであると考えられた。AKRマウスは両者の中間の反応がみられた。

図6 IRBPに対する血清抗体価



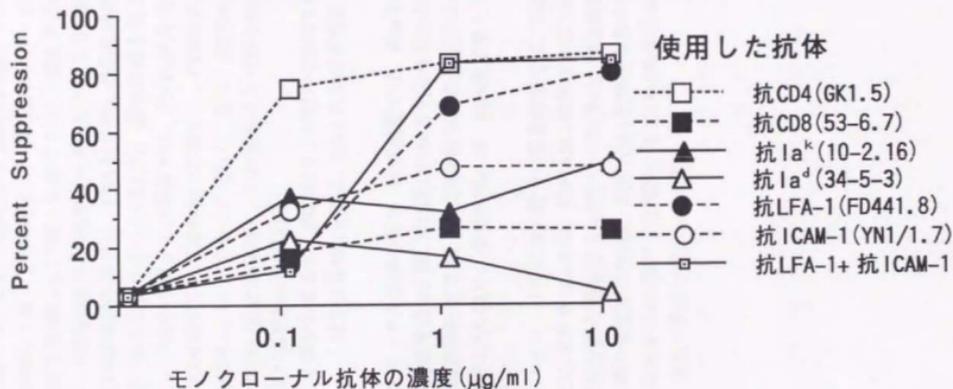
血清希釈倍率 ■ x 600 ▨ x 1200 □ x 2400
 IRBP100 μ gとK03-LPS100 μ gで2週おきに3回免疫後、静脈血を採取し、ELISAによりIRBPに対する血清抗体価を測定した。
 高感受性マウスと低感受性マウスの間で抗体価に明らかな差をみとめなかった。

図7 IRBPに対するリンパ球増殖反応



培養時に加えたIRBP濃度 ▨ 20 μ g/ml □ 2 μ g/ml
 IRBP100 μ gとK03-LPS100 μ gで2週おきに3回免疫後、脾臓を採取し、IRBPに対する抗原特異的リンパ球増殖反応を測定した。
 高感受性マウスと低感受性マウスの間で増殖反応に明らかな差をみとめなかった。

図8 各種モノクローナル抗体の抗原特異的
リンパ球増殖反応に及ぼす作用



B10.BRマウスをIRBPとK03-LPSで免疫後に頸部リンパ節を採取した。培養液にモノクローナル抗体を加え、抗原特異的リンパ球増殖反応に対する抑制作用を調べた。Stimulation Indexの抑制率を百分率で示した。抗CD4抗体は低濃度で増殖反応に対して強い抑制効果を示したが、抗CD8抗体の影響は軽度だった。抗Ia^k抗体は高濃度で40%以上の抑制効果を示したが、haplotype kに反応しない抗Ia抗体の影響は軽度であった。抗LFA-1抗体は、高濃度で70%以上の抑制効果を示し、抗ICAM-1抗体は高濃度で40%以上の抑制効果を示した。両者を半量ずつ同時に添加した場合は、抗LFA-1抗体単独よりも強い抑制効果がみられた。

各種モノクローナル抗体の in vivo 投与実験

CD4 あるいは CD8 抗原に対するモノクローナル抗体の投与: 抗CD4抗体 (GK1.5) 投与群(総投与量800 μ g)では、眼底検査および眼球の病理所見で、眼内の炎症反応は全く認められなかった(表6,7)。血清抗体価、リンパ球増殖反応も PBS 投与群と比較して著しく抑制されていた(図9,10)。一方、抗CD8抗体(53-6.7)投与群(総投与量800 μ g)では、全例でEAUの発症が認められ(表6,7)、血清抗体価、リンパ球増殖反応も PBS 投与群と明らかな差を認めなかった(図9,10)。また、抗CD8抗体投与群では、PBS 投与群との発症時期のずれ、あるいは炎症強度の違いはみられなかった(表6,7)。抗体治療を受けたマウスの脾細胞を用いたリンパ球サブセットの解析では、抗CD4抗体投与群は PBS 投与群と比較し、CD4陽性リンパ球の割合が減少し、CD8陽性リンパ球の割合が増加し、CD4/CD8 比は0.57であった(図11)。逆に、抗CD8抗体投与群では、CD4陽性リンパ球の割合の増加と、CD8陽性リンパ球の割合の減少がみられCD4/CD8 比は7.16であった(図11)。

抗CD4抗体の投与量を減少させると、脾細胞リンパ球のCD4/CD8 比は、投与量依存性に増加し、1回投与量50 μ gでは、EAUの発症を抑制できなくなった(表8)。

MHC に対するモノクローナル抗体の投与: 眼底検査では、抗Ia^b抗体 (10-2.16)投与群のEAU発症率は4/6眼、抗Ia^d抗体(34-5-3)投与群の発症率は5/6眼だった(表6)。病理組織検査では、抗Ia^b抗体投与群の発症率は4/6眼、抗Ia^d抗体投与群の発症率は5/6眼で、炎症強度には、PBS投与群との差はなかった(表7)。

接着分子に対するモノクローナル抗体の投与: 眼底検査では、抗LFA-1抗体(FD441.8)投与群のEAU発症率は4/6眼、抗ICAM-1抗体(YN1/1.7)投与群の発症率は6/6眼、両者投与群の発症率は4/6群だった(表6)。病理組織検査では、抗LFA-1抗体投与群の発症率は5/6眼、抗ICAM-1抗体投与群の発症率は6/6眼、両者投与群の発症率は4/6眼だった(表7)。抗LFA-1抗体投与群では、PBS投与群と比較し、炎症の強度が弱かった(表7)。

表6 マウス EAU に対する抗体治療
発症率の経時的変化(眼底所見)

治療に用いた抗体	総投与量(μg)	発症率 ^a の経時的変化				
		0 ^b	1	2	3	4
PBS		0/12	0/12	2/12	9/12	12/12
抗CD4 (GK1.5)	800	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
抗CD8 (53-6.7)	800	0/10	0/10	2/10	8/10	10/10
抗Ia ^k (10-2.16)	4000	0/6	0/6	0/6	3/6	4/6
抗Ia ^d (34-5-3)	4000	0/6	0/6	0/6	1/6	5/6
抗LFA-1 (FD441.8)	4500	0/6	0/6	0/6	3/6	4/6
抗ICAM-1 (YN1/1.7)	4500	0/6	0/6	4/6	4/6	6/6
抗LFA-1+抗ICAM-1	2250+2250	0/6	0/6	0/6	4/6	4/6

^a発症した眼数/免疫されたマウスの眼数

^b初回免疫後週数

B10.BRマウスをIRBP100μgとK03-LPS100μgで免疫し、初回免疫前日からモノクローナル抗体を *in vivo*投与した。初回免疫時より毎週1回眼底検査を行なった。抗CD4抗体投与によりEAU発症が完全に抑制されたが、他の抗体ではEAU発症を抑制する作用はみられなかった。

表7 マウス EAU に対する抗体治療
発症率と炎症の強さ(病理所見)

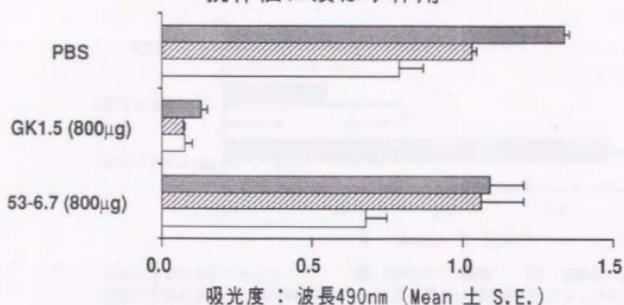
治療に用いた抗体	総投与量(μg)	EAU 発症率 ^a	炎症病変スコア別のEAU出現頻度 ^b		
			1	2	3
PBS		12/12	7/12	3/12	2/12
抗CD4 (GK1.5)	800	0/10	0/0	0/0	0/0
抗CD8 (53-6.7)	800	10/10	5/10	2/10	3/10
抗Ia ^k (10-2.16)	4000	4/6	2/4	1/4	1/4
抗Ia ^d (34-5-3)	4000	5/6	2/5	1/5	2/5
抗LFA-1 (FD441.8)	4500	5/6	1/5	4/5	0/5
抗ICAM-1 (YN1/1.7)	4500	6/6	2/6	2/6	2/6
抗LFA-1+抗ICAM-1	2250+2250	4/6	0/4	1/4	3/4

^a発症した眼数/免疫されたマウスの総眼数

^b該当する眼数/発症した眼数

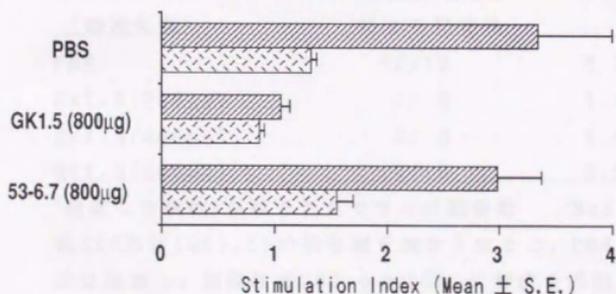
B10.BRマウスをIRBP100μgとK03-LPS100μgで免疫し、初回免疫前日からモノクローナル抗体を *in vivo*投与した。最終免疫後2週目に眼球を採取し、EAU発症の有無と炎症の強さを病理組織学的に検討した。眼底検査の結果と同様に、抗CD4抗体投与によりEAU発症が抑制されが、他の抗体では発症を抑制する作用はみられなかった。抗LFA-1抗体投与群は、炎症強度がやや弱かった。

図9 抗体治療の血清抗IRBP
抗体価に及ぼす作用



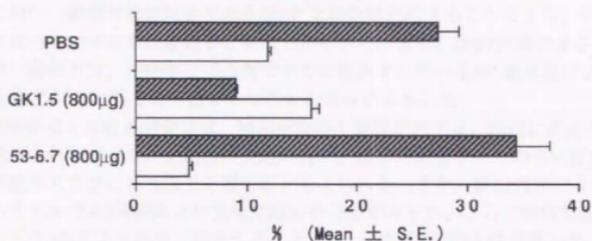
血清希釈倍率 ■ X 600 ▨ X 1200 □ X 2400
 PBS投与群と比較し、抗CD4抗体(GK1.5)投与群では著しく抗体価が抑制されたが、抗CD8抗体(53-6.7)投与群では明らかな差をみとめなかった。

図10 抗体治療の抗原特異的リンパ球
増殖反応に及ぼす作用



培養時に加えたIRBP濃度 ▨ 20µg/ml □ 2µg/ml
 PBS投与群と比較し、抗CD4抗体(GK1.5)投与群では著しく増殖反応が抑制されたが、抗CD8抗体(53-6.7)投与群では明らかな差をみとめなかった。

図11 抗体治療のリンパ球 CD4およびCD8サブセットに及ぼす作用



CD4およびCD8サブセット CD4 (L3T4) 陽性 CD8 (Lyt2) 陽性
 PBS投与群と比較し、抗CD4抗体 (GK1.5) 投与群ではCD4陽性サブセットの著しい減少とCD8陽性サブセットの微増が認められた。抗CD8抗体 (53-6.7) 投与群では、CD8陽性サブセットの著しい減少と、CD4陽性サブセットの微増が認められた。

表8 マウス EAU に対する抗体治療
抗CD4抗体投与量の影響

投与した抗体 (総投与量)	組織病理検査 による発症率	CD4/CD8比 ^b
PBS	12/12	2.30±0.12
GK1.5 (200µg)	4/6	1.46±0.10
GK1.5 (400µg)	0/6	1.07±0.08
GK1.5 (800µg)	0/10	0.58±0.04

^a発症した眼数/免疫されたマウスの総眼数 ^bMean±S.E.

抗CD4抗体 (GK1.5) の投与量を減少させると、CD4/CD8比は増加し、総投与量200µgではEAUの発症を抑制できなかった。

考案

Klebsiella pneumoniae 変異株の培養液から抽出された K03-LPS²³ をアジュバントに用い、網膜可溶性抗原である IRBP¹ を複数回免疫することにより、マウスに眼内炎症が高率に惹起させることができた。また、IRBP 免疫による EAU は、免疫方法、発症率などの点ですでに報告されている S 抗原免疫による EAU モデル⁸ とは異なる特徴をもつことが明らかとなった。

眼底検査による経過観察では、初回免疫後 1 週間以内では、眼内に炎症反応は認められなかった。未刺激の炎症細胞が、抗原刺激をうけたのちに眼球内に移動するまでに 7 日以上を要すると考えられる。また、IRBP 免疫による EAU モデルでは 2 週間おきの免疫で EAU の発症がみられ、さらに免疫回数については 2 回以上で高率に発症することから、S 抗原と K03-LPS を用いた EAU モデル⁸ よりも短期間で発症することがわかった。免疫抗原とアジュバントの量が多い群では、発症率は高くなり、炎症の程度が強くなる傾向がみられた。また、免疫回数が多いほど、発症率は高くなり、炎症の程度も強くなった。発症時の眼底所見の変化としては、視神経乳頭周囲を中心に炎症が広がる傾向がみられ、眼底の周辺部が最初に炎症所見を呈することはなかった。炎症の再発は、一部のマウスで観察されたが、再発の時期は一定していなかった。われわれのモデルでは、免疫抗原量が比較的多い場合でも再発がみられ、低用量でのみ再発の見られたとする CFA をもちいたマウス EAU モデル⁷ とは異なる結果となった。

マウスの MHC のハプロタイプの相違により明らかに EAU 発症率に差がみられた。発症率の高いマウスは炎症の程度も強く、また、発症率の低いマウスでは発症してもその炎症の程度が弱く、高感受性マウスと低感受性マウスが存在することが明らかになった。高感受性マウスすなわち B10.BR, B10.A, B10.A(4R) と低感受性マウスすなわち B10.A(5R), C57BL/10 の MHC を検討すると、高感受性マウスでは MHC 内の I-A および I-E subregion のハプロタイプが k であり、これが疾患感受性遺伝子の一つであると考えられた。しかし、Ia^b を発現する AKR/J の EAU 発症率は、高感受性マウスと低感受性マウスの中間であり、高感受性とは言えず、MHC 以外にも EAU に対する感受性に影響を与える因子があることが推測された。CFA を用いたマウス EAU モデルでも、Ia^b が疾患感受性に影響する可能性のあることが報告されているが、このモデルでは、AKR マウスで EAU の発症が認められていない⁷。組織特異抗原を利用した動物モデルの一つである実験的脳脊髄炎 (experimental allergic encephalomyelitis: EAE) では、H-2 ハプロタイプは疾患感受性に影響を与えないという報告がある一方³⁰、H-2 ハプロタイプとヒスタミン感受性因子の両者が疾患感受性に影響するという報告がされている³¹。EAU においても、MHC と MHC 以外のなんらかの因子が複合的に疾患感受性に影響をあたえ

ている可能性も考えられた。

S抗原免疫によるマウス EAU⁹と今回のIRBPによるマウス EAUの発症率を比較すると、C57BL/10を除く5種のマウスでIRBPで免疫した場合の方が発症率が高く、S抗原に比較してIRBPの方が病原性が強いと考えられた。CFAをアジュバントに用いたEAUモデルにおいても、S抗原を免疫した場合よりIRBPを免疫した場合のほうがEAUの発症率が高いことが報告されている⁶。この原因は不明であるが、IRBPが細胞外に存在し、S抗原が細胞内に存在することから、感作された炎症細胞が標的となる網膜局所の抗原と反応する過程で、IRBPの方がS抗原よりも接触が容易なのかもしれない。

表9 EAU発症率の比較

近交系マウス	EAU発症率 ^a	
	IRBP	S抗原 ^b
B10.BR	20/22(90.9%)	20/24(83.3%)
B10.A	9/10(90.0%)	14/20(70.0%)
B10.A(4R)	26/26(100%)	14/22(63.6%)
B10.A(5R)	2/16(12.5%)	0/22(0%)
C57BL/10	1/10(10.0%)	^c ND
AKR/J	12/22(54.5%)	4/12(33.3%)

^a発症した眼数/総眼数

^b文献(9)

^cND = not determined

IRBPで免疫したマウスのリンパ節細胞をIRBP感作リンパ球として、in vitroでの抗原刺激によるリンパ球増殖反応に対する種々のモノクローナル抗体の抑制効果を調べると、抗CD4抗体(GK1.5)は低濃度でリンパ球増殖反応を強く抑制したが、抗CD8抗体(53-6.7)は増殖反応への抑制効果はわずかであった。このことから、抗原に反応する細胞は、ほとんどがCD4陽性T細胞であると推測された。リンパ球の増殖反応は、抗Ia^d抗体である10-2.16により抑制されたが、Ia^kに反応しない抗Ia^d抗体(34-5-3)は増殖反応に影響をあたえなかった。抗Ia抗体により、MHC class II依存性の抗原提示が阻害されたと考えられるが、高濃度の添加によっても、その効果は抗CD4抗体に比較して非常に弱かった。抗LFA-1抗体(FD441.8)、抗ICAM-1抗体(YNI1/1.7)は、

それぞれ単独でリンパ球増殖反応を抑制したが、その効果は抗LFA-1抗体の方が強かった。両者半量ずつを同時に培養液に加えた場合は、抗LFA-1抗体単独より強い抑制効果がみられた。両者とも、CD4陽性T細胞と抗原提示細胞との細胞接着を阻害することにより、抗原特異的T細胞増殖反応を抑制したと考えられる。抗LFA-1抗体の効果が抗ICAM-1抗体よりも強い理由として、抗LFA-1抗体により、negative signalがT細胞に伝達されている可能性がある³²。また、抗ICAM-1抗体によりICAM-1分子とLFA-1分子の反応が阻害された場合では、LFA-1分子が別のリガンドと反応する可能性も考えられる³³。

これらの各種モノクローナル抗体を全身投与してEAUの発症を抑制できるか否かを検討した結果、抗CD4抗体の投与のみがEAUを強く抑制した。組織特異抗原で惹起した自己免疫疾患の動物モデルに対する抗CD4抗体による免疫療法は、EAE^{34,35}、コラーゲン関節炎（type II collagen-induced arthritis: CIA）³⁶、実験的重症筋無力症（experimental autoimmune myasthenia gravis: EAMG）³⁷などで、その発症が抑制されることが報告されている。EAUにおいても、CFAを用いたラット、マウスのモデルにおいて、抗CD4抗体の全身投与が眼内炎を抑制することが報告されており^{38,39}、EAU発症に関しても、CD4陽性T細胞が中心的役割を果たしていると考えられる。全身投与された抗CD4抗体と反応したCD4陽性T細胞は網内系にとりこまれ貪食除去されると考えられている⁴⁰。EAEの実験では抗CD4抗体の投与によりEAEの発症が抑制されるが^{34,35}、その機序としてCD4陽性T細胞が除去される必要があることがキメラ抗体を用いた実験で報告されている⁴¹。われわれの実験でフローサイトメーターを用いた測定結果では、CD4陽性T細胞の全リンパ球に対する割合が激減すると同時に、CD8陽性T細胞の割合が相対的に増加しており、CD4陽性T細胞の絶対数の減少がEAUの発症を抑制した原因の一つと考えられる。またペプシン処理をしてF(ab')₂断片化した抗CD4抗体を用いた実験では、CD4陽性T細胞が除去されなくとも、充分な量のCD4分子と抗体の反応があれば、免疫された抗原に対する抗体産生が抑制されることが報告されており⁴²、残存したCD4陽性T細胞の機能抑制もEAU発症を抑制する原因となった可能性がある。CFAとIRBPを用いたマウスEAUモデルでは、眼球の免疫組織染色の結果、発症時には眼内に浸潤する細胞はCD4陽性T細胞とマクロファージが大部分を占めるが、CD8陽性T細胞、B細胞は全過程を通じて非常に少ないことが報告されている⁴³。一方、CFAとS抗原を用いたラットEAUモデルでは、眼内に浸潤する細胞は、発症初期にはCD4陽性T細胞が優位だが、時間の経過とともにCD8陽性T細胞が次第に多くなり、同時にEAUも消退することから、CD8陽性T細胞が炎症を軽減させる可能性が示唆されている⁴⁴。EAEと病理所見の類似する脱髄を起こすTheiler's virus起因性マウス脳脊髄炎モデルでは、抗CD8抗体の全身投与により、髄膜炎および脱髄が軽減されることが報告されている⁴⁵。一方、マウスEAEのモデルで、抗CD8抗体を全身投与すると、発症の抑制はみられず、むしろ投与

量によっては、臨床症状が強くなり死亡率が高くなる場合があると報告されている⁴⁶。今回のわれわれの実験では、抗CD8抗体の投与によっても発症時期にずれが起きたり、炎症強度に変化が生じることはなかったことから、マウスEAUの発症の段階では、CD8陽性T細胞は関与していないと考えられた。

抗Ia^b抗体の全身投与は、EAUの発症を抑制することはできなかった。ラットEAUでも、抗Ia抗体全身投与のEAU抑制効果は低く、発症時期の遅延と軽度の炎症抑制効果が見られるのみであった⁴⁷。また他の自己免疫疾患モデルに対する抗Ia抗体による免疫療法は、EAE⁴⁸、EAMG⁴⁹などで報告されているが、いずれもその効果は弱く、臨床症状が軽減される程度である。リンパ球の培養液に抗Ia^b抗体を加えて増殖反応に対する抑制効果を検討したin vitroの実験では、抑制効果はみとめられたものの、その作用は弱かった(図8)。

組織特異抗原を用いた動物モデルにおいて、接着分子に対する抗体を用いた免疫療法としては、マウスCIAモデルで、抗LFA-1抗体、抗ICAM-1抗体それぞれ単独投与により、発症率が低下することが報告されている⁵⁰。今回の実験では病理所見の上で、抗LFA-1抗体を投与した場合に、炎症強度がやや弱くなるという結果がえられた。抗LFA-1抗体の作用としては、CD4陽性T細胞と抗原提示細胞との細胞接着の阻害、炎症局所での白血球の血管内皮細胞への接着および血管外移動の阻害が考えられるが^{51,52}、今回の実験では、EAUの発症を完全に抑制することはできなかった。抗ICAM-1抗体もEAU発症に抑制的に働くと推測されたが、その全身投与は、EAU発症に影響を与えなかった。

本研究で作成したマウスEAUモデルは、病理所見はS抗原とK03-LPSを用いたマウスEAUモデル⁸と類似した所見がえられたが、より短期間で、より高率に発症するという性質の違いがみられた。ヒト内因性ぶどう膜炎の原因はいまだ不明であるが、患者の抹消血リンパ球が網膜特異抗原に対して感作されていることが報告されており、その病態形成に網膜特異抗原が関与していると考えられる。本研究で作成したIRBPとK03-LPSによるマウスEAUモデルは、眼内炎症の動物実験モデルとして、その免疫学的機序の解析、治療方法の開発などに有用であると考えられた。

結論

K03-LPSをアジュバントに用いて、網膜特異抗原の一つであるIRBPの複数回抗原刺激によるマウスEAUモデルを新たに作成した。マウスの眼底検査により、眼内炎症の経時的变化を観察した。EAU発症時の眼底変化は、視神経乳頭の浮腫、視神経乳頭周囲の血管炎で始まり、周辺部網膜に病変が拡大した。マウスMHC(H-2ハプロタイプ)と疾患感受性の関連性を調べた結果、Ia^kが疾患感受性遺伝子の一つであると考えられた。しかし、Ia^kを発現するAKR/JマウスのEAUに対する感受性は、高感受性群と低感受性群の中間の反応がみられ、高感受性ではなかったことから、MHC以外にもEAU疾患感受性に影響を与える遺伝子があると推測された。高感受性マウスに対する、モノクローナル抗体を用いた抗体治療の結果、われわれのモデルでは、EAU発症の段階では、CD4陽性T細胞が中心的役割を果たしており、CD8陽性T細胞は関与していないと考えられた。IRBPとK03-LPSによるわれわれのマウスEAUモデルは、病理所見に関してはS抗原とK03-LPSを用いたマウスEAUモデルと類似した所見がえられたが、より短期間で、より高率に発症するという性質の違いがみられた。

発表論文

K.Ando, J.H.Yamamoto, Y.Fujino, N.Kato, M.Mochizuki :
Murine experimental autoimmune uveoretinitis induced by
interphotoreceptor retinoid-binding protein and *Klebsiella*
pneumoniae 03 lipopolysaccharide (K03-LPS) : a relation
between H-2 haplotype and EAU induction.

Graefe's Archive of Clinical and Experimental
Ophthalmology 232:127-131,1994

文献

- 1) Gery,I.,Mochizuki,M., Nussenblatt,R.B.(1986):Retinal specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. Progress in Retinal Research pp75-109 Pergmon Press Oxford and New York
- 2) Rao,N.A., Wacker,W.B., Marak,G.E.(1979) Experimental allergic uveitis. Clinicopathologic features associated with varying doses of S antigen. Arch.Ophthalmol. 97:1954-1958
- 3) Nussenblatt,R.B., Mittal,K.M., Ryan,S., Green,W.R., Maumenee,A.E.(1982) Birdshot retinochoroidopathy associated with HLA-A29 antigen and immune responsiveness to retinal S-antigen. Amer.J.Ophthalmol. 94:147-158
- 4) Nussenblatt,R.B., Gery,I., Ballintine,E.J., Wacker,W.B.(1980) Cellular immune responsiveness of uveitis patients to retinal S-antigen. Amer.J.Ophthalmol. 89:173-179
- 5) Yamamoto,J.H., Minami,M., Inaba,G., Masuda,K., Mochizuki,M.(1993) Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behçet's disease. Brit.J.Ophthalmol.77:584-589
- 6) Caspi,R.R., Roberge,F.G., Chan,C.C., Wiggert,B., Chader,G.J., Rozenszain,L.A., Lando,Z, Nussenblatt,R.B.(1988): A new model of autoimmune diseases : experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. J.Immunol. 140:1490-1495
- 7) Caspi,R.R., Chan,C.C., Wiggert,B., Chader,G.J.(1990): The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis(EAU). Curr.Eye Res. 9 Suppl.:169-174
- 8) Iwase,K., Fujii,Y., Nakashima,I., Kato,N., Fujino,Y., Kawashima,H., Mochizuki,M.(1990) A new method for induction of experimental autoimmune uveoretinitis(EAU) in mice. Curr. Eye Res. 9:207-215
- 9) Iwase,K., Minami,M., Nakashima,I., Fujii,Y., Kato,N., Mochizuki,M.(1990) Experimental autoimmune uveitis(EAU) in the mouse : H-2 restriction of EAU induction. Ocular Immunology Today pp123-126 Elsevier Science Publishers

- 10) Kato,N., Ohta,H., Kido,N., Naito,S., Nakashima,I., Nagase,F., Yokochi,T.(1985): Strong adjuvanticity of bacterial lipopolysaccharides possessing the homopolysaccharides consisting of mannose as the O-specific polysaccharide chains. *Med.Microbiol.Immunol.*174:1-14
- 11) Kido,N., Ohta,M., Ito,H., Naito,S., Nagase,F., Nakashima,I., Kato,N. (1985): Potent adjuvant action of lipopolysaccharides possessing the O-specific polysaccharide moieties consisting of mannans in antibody response against protein antigen. *Cell.Immunol.*91:52-59
- 12) Yokochi,T., Nakashima,I., Kato,N., Asai,J.(1978) Microbial adjuvant and autoimmunity. III.Histologic studies of development of experimental autoimmune thyroiditis in mice immunized with syngeneic thyroid extract together with the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol.Immunol.*22:619-630
- 13) Yamaki,K., Ohta,M., Nakashima,I., Noda,A., Asai,J., Kato,N.(1980) Microbial adjuvant and autoimmunity. IV.Production of lesions in the exocrine pancreas of mice by repeated injection of syngeneic pancreatic extract together with the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* 24:945-956
- 14) Kuriki,J., Murakami,H., Kakumu,S., Sakamoto,N., Yokochi,T., Nakashima,I., Kato,N.(1983) Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Gastroenterology* 84:596-603
- 15) 藤井康彰、中島泉、加藤延夫(1985) *Klebsiella* 03 LPS アジュバントを用いて誘導される実験的率丸炎 臨床免疫 17(Suppl.9):104-113
- 16) Wacker,W.B., Donoso,L.A., Kalsow,C.M., Yankeelov,Jr.J.A., Organisciak,D.T. (1977)Experimental allergic uveitis. Isolation,characterization,and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J.Immunol.* 119:1949-1958
- 17) Shinohara,T., Dietzschold,B., Craft,C.M., Wistow,G., Early,J.J., Donoso,L.A., Horwitz,J., Tao,R.(1987)Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc.Natl.Achad.Sci.USA* 84:6975-6979

18) Phister,C., Chabre,M., Plouet,J., Tuyen,V.V., De Kozak,Y., Faure,J.P., Kuhn,H.(1985) Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. Science 228:891-893

19) Fong,S.L.and Bridges,C.D.B.(1988) Internal quadruplication in the structure of human interstitial retinol-binding protein deduced from its cloned cDNA. J.Biol.Chem. 263:15330-15334

20) 藤野雄次郎、川島秀俊、奥村敦司、望月學 (1987) 実験的自己免疫性網脈絡炎 (その1) 網膜抗原の分離精製法と病原性について 日本眼科学会雑誌 91(4):498-508

21) Gery,I., Wiggert,B., Redmond,T.M., Kuwabara,T., Crawford,B.P., Vistica,B.P., Chader,G.J.(1986)Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 27:1296-1300

22) Mathis,D.J., Benoist,C., Williams II,V.E., Kanter,M., McDevitt,H.O.(1983) Several mechanism can account for defective E α gene expression in different mouse haplotypes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:273-277

23) Ohta,M., Mori,M., Hasegawa,T., Nagase,F., Nakashima,I., Naito,S., Kato,N.(1981) Further studies of the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* possessing strong adjuvanticity. I.Production of the adjuvant polysaccharide by noncapsulated mutant. Microbiol.Immunol. 25:939-948

24) Dialynas,D.P., Wilde,D.B., Marrack,P., Pierres,A., Wall,K.A., Havran,W.,Otten,G., Loken,M.R., Pierres,M., Kappler,J., Fitch,F.W.(1983) Characterization of the murine antigenic determinant,designated L3T4a,recognized by monoclonal antibody GK1.5 : expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. Immunol.Rev. 74:29-56

25) Ledbetter,J.A. and Herzenberg,L.A.(1979) Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol. Rev. 47:63-90

26) Takei,F.(1985)Inhibition of mixed lymphocyte response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen(MALA-2) J.Immunol. 134:1403-1407

27) Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1978) Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 81:115-129

28) Ozato, K., Mayer, N.M., Sachs, D.H. (1982) Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. *Transplantation* 34:113-119

29) Sarmiento, M., Dialynas, D.P., Lancki, D.W., Wall, K.A., Lorber, M.I., Loken, M.R., Fitch, F.W. (1982) Cloned T lymphocytes and monoclonal antibodies as probes for cell surface molecules active in T cell-mediated cytotoxicity. *Immunol.Rev.* 68:135-169

30) Montgomery, I.N. and Rauch, H.C. (1982) Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice : primary control of EAE susceptibility is outside the H-2 complex. *J.Immunol.* 128:421-425

31) Linthicum, D.S., Frelinger, J.A. (1982) Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *J.Exp.Med.* 155:31-40

32) van Noesel, C., Miedema, F., Brouwer, M., de Rie, M.A., Aarden, L.A., van Lier, R.A.W. (1988) Regulatory properties of LFA-1 and chains in human T-lymphocyte activation. *Nature* 333:850-852

33) Springer, T.A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434

34) Waldor, M.K., Sriram, S., Hardy, R., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., Lanier, L., Lim, M., Steinman, L. (1985) Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with monoclonal antibody to a T-cell subset marker. *Science* 227:415-417

35) Sriram, S., Roberts, C.A. (1986) Treatment of established chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis with anti-L3T4 antibodies. *J.Immunol.* 136:4464-4469

36) Ranges, G.E., Sriram, S., Cooper, S.M. (1985) Prevention of type II collagen-induced arthritis by *in vivo* treatment with anti-L3T4. *J.Exp.Med.* 162:1105-1110

- 37) Christadoss,P., Dauphinee,M.(1986) Immunotherapy for myasthenia gravis:a murine model. *J.Immunol.* 136:2437-2440
- 38) Atalla,L., Linker-Israeli,M., Steinman,L., Rao,N.A.(1990) Inhibition of autoimmune uveitis by anti-CD4 antibody. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 31:1264-1270
- 39) Atalla,L., Linker-Israeli,M., Rao,N.A.(1990)Immunotherapy of murine autoimmune uveitis by anti-L3T4 antibody. *Ocular Immunology Today* pp475-478 Elsevier Science Publishers
- 40) Frank,M.M., Lawley,T.J., Hamburger,M.I., Brown,E.J.(1983) Immunoglobulin G Fc receptor-mediated clearance in autoimmune diseases. *Ann.Intern.Med.*98:206-218
- 41) Alters,S.N., Sakai,K., Steinman,L., Oi,V.T.(1990) Mechanisms of anti-CD4-mediated depletion and immunotherapy. *J.Immunol.*144:4587-4592
- 42) Gutstein,N.L., Wofsy,D.(1986) Administration of F(ab')₂ fragments of monoclonal antibody to L3T4 inhibits humoral immunity in mice without depleting L3T4+ cells. *J.Immunol.* 137:3414-3419
- 43) Chan,C.C., Caspi,R.R., Ni,M., Leake,W.C., Wiggert,B., Chader,G.J., Nussenblatt,R.B.(1990) Pathology of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J.Autoimmunity.* 3:247-255
- 44) Chan,C.C., Mochizuki,M., Nussenblatt,R.B., Palestine,A.G., McAllister,C., Gery,I., BenEzra D.(1985) T-lymphocyte subsets in experimental autoimmune uveitis. *Clin.Immunol.Immunopathol.*3:103-110
- 45) Rodriguez,M. and Sriram,S.(1988) Successful therapy of Theiler's virus-induced demyelination with monoclonal anti-Lyt2 antibody. *J.Immunol.* 140:2950-2955
- 46) Kennedy,M.K., Clatch,R.J., Dal Canto,M.C., Trotter,J.L., Miller,S.D. (1987) Monoclonal antibody-induced inhibition of relapsing EAE in SJL/J mice correlates with inhibition of neuroantigen-specific cell-mediated immune responses. *J.Neuroimmunol.* 16:345-364

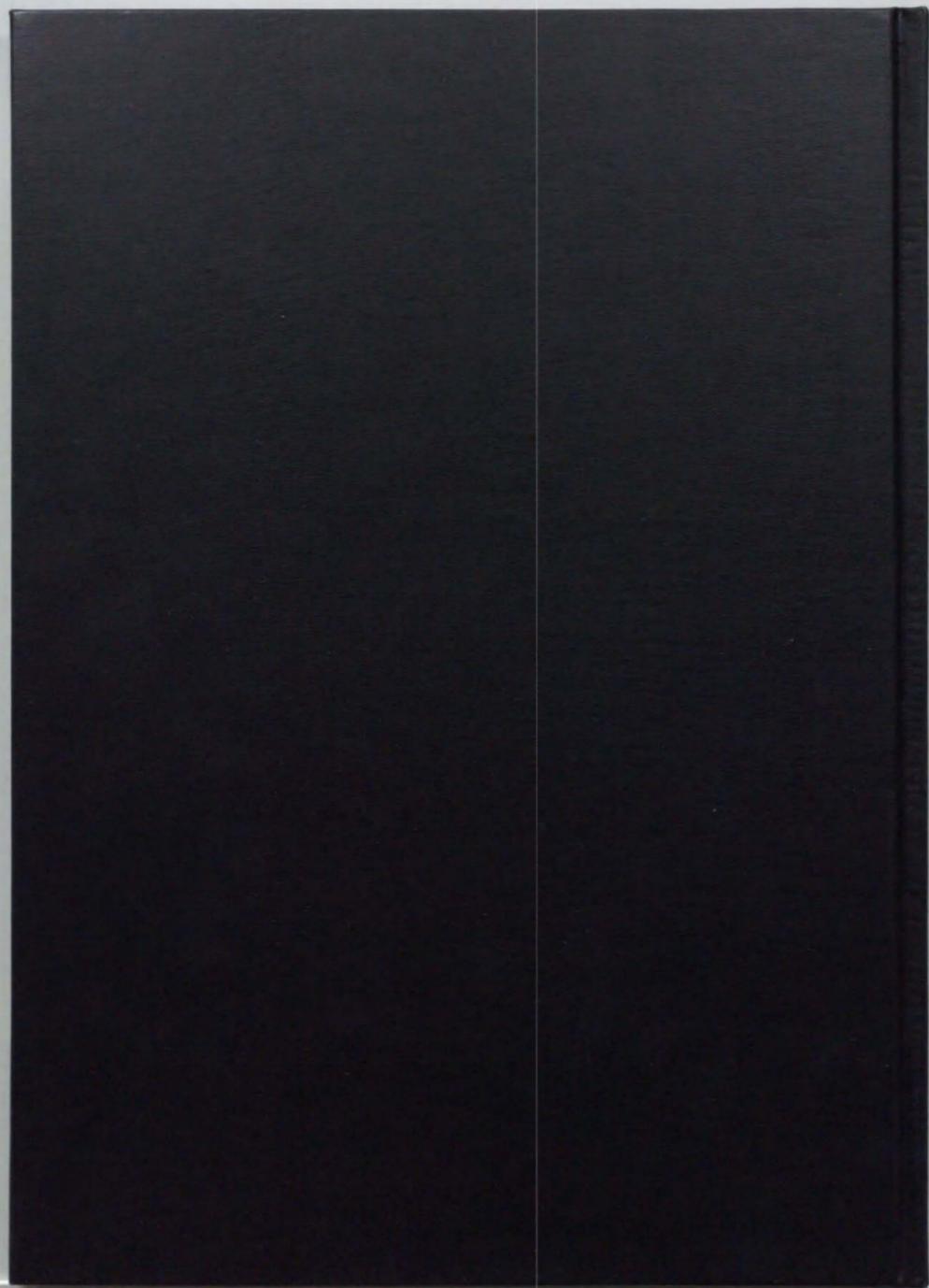
47) Wetzig,R., Hooks,J.J., Percopo,C.M., Nussenblatt,R.B., Chan,C.C., Detrick,B.(1988) Anti-Ia antibody diminishes ocular inflammation in experimental autoimmune uveitis. *Curr.Eye Res.* 7:809-818

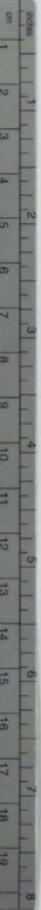
48) Steinman,L., Rosenbaum,J.T., Sriram,S., McDevitt,H.O.(1981) *In vivo* effects of antibodies to immune response gene products : prevention of experimental allergic encephalitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:7111-7114

49) Waldor,M.K., Sriram,S., McDevitt,H.O., Steinman,L.(1983) *In vivo* therapy with monoclonal anti I-A antibody suppresses immune responses to acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:2713-2717

50) Kakimoto,K., Nakamura,T., Ishii,K., Takashi,T., Iiguro,H., Yagita,H., Okumura,K., Onoue,K.(1992) The effect of anti-adhesion molecule antibody on the development of collagen-induced arthritis. *Cell.Immunol.* 142:326-337

51) Wawryk,S.O., Novotny,J.R., Wicks,I.P., Wilkinson,D., Maher,D., Salvaris,E., Welch,K., Fecondo,J., Boyd,A.W.(1989) The role of the LFA-1/ICAM-1 interaction in human leukocyte homing and adhesion.*Immunol.Rev.* 108:135-161





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

