網膜不溶分画中の網膜特異抗原

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北川, 和子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9082

網膜不溶分画中の網膜特異抗原

金沢大学がん研究所病態生理部（主任：倉田自章教授）
北　川　和　子

(昭和58年7月18日受付)

本論文の内容の1部は，第5回ぶどう膜炎研究会（1979，東京）において発表した．

ウシ網膜より不溶性リポ蛋白分画を抽出し，デオキシコール酸塩で可溶化して得た蛋白分画からaffinity chromatographyによって混在する血清蛋白や非特異抗原を除去することにより網膜特異性のある抗原分画を得た．この抗原は免疫電気泳動上β_1の泳動度を示し，分子量は約62,000－63,000である．免疫螢光法によると抗原は視細胞の細胞膜に存在し，双極細胞の細胞膜にもその存在が認められる．なお異種動物網膜にはこの抗原に類似する抗原が存在する．S抗原が網膜可溶性分画中の組織特異抗原であるのに対して，本抗原は不溶性分画すなわちP抗原分画中に存在する組織特異抗原と考えられる．

Key words　ウシ網膜，網膜特異抗原，P抗原

交感性眼炎の動物実験モデルとしてぶどう膜を抗原とする実験的アレルギー性ぶどう膜炎（experimental allergic uveitis,以下EAUと略）の研究が古くからすすめられている[1)~3)]．しかし，Wackerら[4)]がぶどう膜より網膜を抗原とした場合にEAUの発症率がより高いことを指摘して以来，EAUの抗原として網膜がより注目されるようになり，その分析・精製に関する研究が活発に行われるようになった．Wackerら[5)]は網膜抗原を可溶性抗原（soluble antigen,以下S抗原と略）と不溶性抗原（particulate antigen,以下P抗原と略）に分け，S抗原に強いぶどう膜炎発現作用のあることを示した．ついで彼等はS抗原の精製に成功し，その性質を明らかにしている[6)]．

その後，S抗原に関する研究は極めて活発に行われてきたが[7)]，P抗原に関してはほとんど研究が行われず，わずかにホモジネートの沈査を用いたWackerら[5)8)9)]の研究や表面活性剤を使用して沈査を可溶化して分析したGregersonら[10)]の研究があるのみで，その性状はほとんど解明されていない．

そこで，著者は網膜より不溶性分画を抽出し，デオキシコール酸塩で可溶化した分画について免疫学的な分析を行ったところ，特異性の高い1抗原の存在を見いだした．同抗原の精製方法ならびにその性状と既知抗原との関連について知見を得たので報告する．

材料および方法

Ⅰ．抗原の作製

屠場より氷冷して運んだウシ眼球より網膜を採取した．角膜輪部より5mm後方で全周切開してopen skyとし，眼杯に硝子体が残らないように注意しながら，水晶体と硝子体を除去した．眼杯中の網膜を色素上皮層より注意深く剝離し，用時まで－80°Cで保存した．

不溶性リポ蛋白分画の作製を倉田・岡田の方法[11)12)]に準じて行った．すなわち，網膜の約2倍量の“Solution Ⅰ”[13)]を加え，氷冷しながらワーリングブレンダーに約10分間かけてホモジネートを作り，10,000×G30分間遠心した．その沈査に再び2倍量のSolution Ⅰを加えてテフロンホモジェナイザーによりhomogenizeしたのち，同様に遠心して沈査を得た．以後は，“Solution Ⅱ”[13)]によるhomogenizingと遠心を8回くりかえした．最後の沈査（insoluble lipoprotein，以下LPと略）に0.2%デオキシコール酸ソーダ（以下DOCと

A Retina-Specific Antigen in the Insoluble Extract of the Retina. **Kazuko Kitagawa,** Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

略）を5倍量加えてホモジネートとし，ついで4℃－8℃で1夜攪拌した．10,000×G20分間遠心して得た上清に10倍量の冷アセトンを加え，－20℃に1夜おいて生じた沈澱を遠心して集めた．この沈澱を少量の蒸留水に溶かし，冷室内でSepharose 4B(Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)のカラムでゲル濾過を行った．溶出には蒸留水を使用した．280 nmの吸収を測定すると，void volumeにおけるピークと低分子量のピークが認められるが，後者の低分子量分画（low-molecular-weight protein fraction,以下Pfrと略）をプールし，必要に応じて濃縮して抗原とした．可溶性抗原の蛋白量はLowryらの方法[14]で測定した．

別に，ウシ網膜・角膜・水晶体その他の各臓器5g（湿量）に，0.01Mリン酸バッファー生食水，pH7.4（以下PBSと略）を20 ml加え氷冷下ホモジェナイザーにかけ，20%（W/V）ホモジネートを作成した．

対照抗原として，S抗原をWackerら[6]の方法に従って作製した．すなわち，ウシ網膜ホモジネートの80,000×G遠心上清から硫酸アンモニウム50%飽和による沈澱をとり，Sephadex G-150（Pharmacia）カラムによるゲル濾過で“FII”分画を集め，DEAE Bio-Gel A（Bio-Rad Laboratories, USA）によるイオン交換クロマトグラフィーで，塩化ナトリウム0.02－0.03 Mで溶出する“D3”分画をプールして，S抗原とした．抗原活性の存在は，抗網膜ホモジネート抗血清（後述）を用い，Gregersonら[10]の方法によるenzyme-linked immunosorbent assayを行って確認した．

II．抗血清の作製

体重約400 gのモルモット2匹に，1匹あたりウシ網膜Pfr液0.5 ml（蛋白量2 mg）を同量のFreund's complete adjuvant（以下FCAと略）で乳化して，肩甲骨下腔・背部筋肉および足蹠に分割注射した．2週間隔で4回同様の注射を行い，最終注射後7日目に全採血し，その血清を少量に分け使用時まで－20℃に保存した．この抗血清を“A-Pfr”と名付けた．

モルモット2匹に1匹1回あたりウシ網膜ホモジネート0.5 mlを同量のFCAで乳化して，上記同様分割注射した．1週間隔4回，つづいて2週間隔3回注射し，最終注射後7日目に全採血した．この抗血清を“A-hg”と名付けた．

なお，モルモットに同じスケジュールでPBSをFCAで乳化して注射を行い，アジバントコントロール血清を作製した．

III．抗血清の吸収

A-PfrあるいはA-hg 1 mlにつき，ウシの肝・腎・脾・肺の組織片各々100 mg（湿量）を加えてhomogenizeし，室温1時間放置後，1夜4－8℃でローターによる極低速回転を行った後，10,000×G20分間遠心した．得られた上清をそれぞれA-Pfr-abs, A-hg-absと名付け寒天内二重拡散法に使用した．

免疫螢光法にはA-Pfr-absをS抗原分画で吸収したものを使用した．A-Pfr-abs 200 μlにS抗原液（1 mg/ml）800 μlとPBS 600 μl加えて，室温1時間放置後，4－8℃で1夜低速回転し，その10,000×G20分間遠心後の上清に800 μlのS抗原液を再度加えて同様に吸収を行い，10,000×G遠心上清にPBSを加えて3.2 ml(1：16)として使用した．またA-Pfr-abs 1 mlあたり1 g（湿量）のウシ網膜あるいは角膜を加えて作ったホモジネートを室温1時間静置後，4－8℃1夜低速回転し，遠心して得た吸収抗血清も作製した．

IV．抗原の精製

精製の第1段階としてPfr中に混在するアルブミンを除去するために，Blue Sepharose CL-6B(Pharmacia)のカラムを通した．溶出液として，0.1 M KClを含む0.01 Mトリス塩酸バッファー（pH 7.0）を用いた．280 nm吸収のピークを集め，0.1 M炭酸バッファー(pH8.5)で透析後，セロファンチューブに入れ，冷室内で風乾にて濃縮した．

つづいてaffinity chromatographyによるreverse immunoabsorptionを以下のように行った．吸収用抗血清（後述）から硫酸アンモニウム33%飽和によって分離したグロブリン分画をPBSで1夜透析し，その180 mgをCambiasoら[15]に従って2 gのAH-Sepharose 4B（Pharmacia）を膨潤させたものに結合させ，1.5×4 cmのカラムとした．脱アルブミン処理をしたPfr約20 mgを負荷し，室温に1時間おいたのち，0.1 M炭酸バッファー(pH 8.5)により溶出を行った。280 nm吸収によるピーク部分を集め，ついでProtein A-Sepharose CL-4B（Pharmacia）のカラム（1.5×4 cm）を0.1 Mリン酸バッファー（pH7.4）を溶出液として通し，混在するグロブリンを除去した．280 nm吸収のピークをプールし，PD-10（Amicon, USA)により脱塩・濃縮を行った．この分画を精製Pfrとした．

吸収用抗血清は以下のように作製した．ウシ血清0.5 ml，ウシ肝・肺の20%(W/V)ホモジネート各0.5 mlをまぜ，同量のFCAで乳化し，ウサギの肩甲骨下腔・背筋内に2週毎4回注射した．最終注射の1週間後に全採血し，使用時まで－20℃で保存した．

V．免疫学的分析法

寒天内二重拡散法(Ouchterlony法)を1%Agarose LE（Miles Laboratories, Inc., USA）の寒天板を用い，抗原・抗体孔の直径を3 mm，間隔を5 mmとし

で行い，4℃，湿潤状態で反応させた．

免疫電気泳動法は，1％ Agarose HE (Miles) のプレートを用い，バルビタールバッファー (pH8.6, μ=0.05) を溶媒として，Pfr を 12.5 V/cm で 2 時間泳動後，抗体槽を作り A-Pfr-abs を加え，4℃ 湿潤状態で反応させた．

免疫螢光法は間接法により行った．瞬間凍結後 −80℃ に保存したウシ網膜および O. C. T. Compound (Division Miles Laboratories, Inc., USA) に包埋して −40℃ に保存したウシの各組織から cryostat 切片 (厚さ 5 μ) を作製した．16 倍希釈の吸収済抗血清を室温 1 時間反応させた後洗浄し，24 倍希釈の Fluorescein 標識ウサギ抗モルモット IgG (MBL 社，名古屋) を室温 30 分反応させた．洗浄後バッファー・グリセリンで封入し，オリンパス螢光顕微鏡 BH-RFL-B で観察・撮影した．生体膜免疫螢光法は以下のように行った．新鮮なウシ網膜をウシ胎児血清 20％含有 Medium 199 中で細片にし，30×G で 3 分間遠心した．沈査約 50 μl に S 抗原吸収済の A-Pfr-abs (1：16) を 200 μl 加えて攪拌し，0℃ で 1 時間おいた．上記の Medium で 2 回洗ったのち Fluorescein 標識ウサギ抗モルモット IgG (MBL) (1：5) を 200 μl 加えて 0℃ 30 分反応させ，2 回洗浄後バッファー・グリセリンで封入し，観察を行った．

VI. 化学的分析法

酵素・化学分解試験は，ウシ網膜の未固定乾燥切片 (厚さ 5 μ) に以下の (1) − (4) の酵素または過ヨウ素酸塩溶液を 37℃ 30 分反応させ，PBS で 20 分洗浄したのち間接螢光抗体法を行った．(1) トリプシン (Type III, Sigma Chemical Company, USA)，0.85％の塩化ナトリウムを含むトリス塩酸バッファー (pH 7.4) に 0.0025％に溶解．(2) ノイラミニダーゼ (Sigma)，0.1 M クエン酸バッファー (pH 5.0) に 2 mg／ml に溶解．(3) β-グルコシダーゼ (Sigma)，還元グルタチオン (Sigma) を 2 mg/ml に含む 0.1 M クエン酸バッファー (pH 5.0) に 2 mg/ml に溶解．(4) メタ過ヨウ素酸ナトリウムの PBS による 0.01 M 溶液．

分析用ディスク電気泳動はポリアクリルアミドゲル (7.5％) を使用して行った．分離ゲルにはトリス塩酸バッファー (pH 8.9)，濃縮ゲルには同バッファー (pH 6.7) を使用して，4 mA/tube で 1 時間泳動後，Coomasie Brilliant Blue R- 250 (Sigma) で染色した．

スラブ電気泳動はミニスラブ・ディスク電気泳動装置 (SJ-1060 MSD, Atto 社，東京) を用い，7.5％ポリアクリルアミドゲルプレート (88×55×2 mm) を作製して行った．染色には Silver Staining (Bio-Rad) を用いた．

分子量測定には Polyacrylamide Gradient Gels PAA 4/30 (75×75×2.7 mm, Pharmacia) による電気泳動を用いた．試料に同量の試料バッファー (0.0125 M トリス塩酸バッファー，(pH6.8，30％グリセリン，1％ドデシル硫酸ソーダ：以下 SDS と略，0.004％ブロモフェノールブルー) を加え 100℃ 3 分間加熱後ゲルに負荷し，125 V で 2 時間泳動した．泳動バッファーには 0.04 M トリスアミノメタン，0.02 M 酢酸ソーダ，0.2％SDS，pH 7.4 の溶液を用いた．分子量マーカーにはチトクローム系の MW-Marker Proteins, SDS 用 (オリエンタル酵母社，大阪) を用い，ゲルの染色は Coomasie Brilliant Blue R-250 によった．

成　　績

I．抗原の抽出

ウシ網膜の不溶分画“LP”を DOC で可溶化して Sepharose 4B でゲル濾過を行うと Fig. 1 のようなパターンが得られる．低分子蛋白ピーク“Pfr”をプールして以後の実験に使用した．ウシ網膜 100 g (湿量) から約 45 mg の Pfr が得られた．DOC 可溶化処理で残った残査を再度 0.2％DOC で処理すると再び Pfr が得

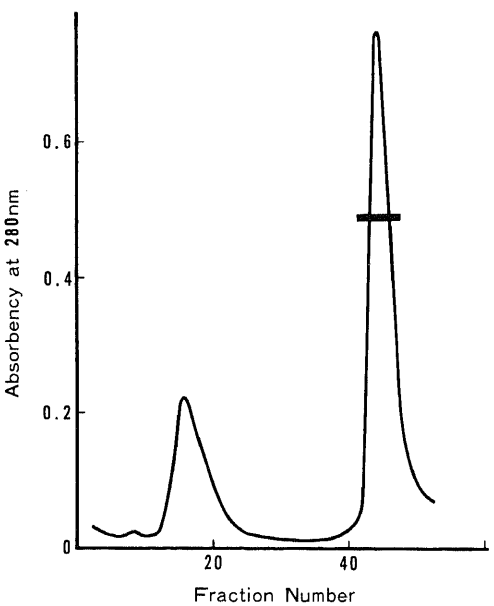

Fig. 1. Gel filtration chromatography of the desoxycholate-solubilized fraction from insoluble extract of the bovine retina. Column size, 2.5×45cm; flow rate, 8ml/hr; eluent, distilled water; fraction size, 5ml. The low-molecular-weight fractions (bar, termed Pfr) were collected.

られるが，本実験ではそれらは使用しなかった．

抗原精製にはウシ網膜 Pfr 溶液を Blue Sepharose CL-6B カラムを通して脱アルブミン後，AH-Sepharose 4B による affinity chromatography で混在する抗原を除去し，さらに Protein A-Sepharose CL-4B を通して脱グロブリンを行ったが，20 mg のウシ網膜 Pfr から約 5 mg の精製 Pfr が得られた．

II．ゲル内二重拡散法

ウシ網膜 Pfr は A-hg に対して 3 本，A-Pfr に対しても複数の沈降線を生じるが，吸収抗血清 A-Pfr-abs および A-hg-abs に対して 1 本の沈降線のみを生じ，両沈降線は完全一致を示した．このことはウシ網膜 Pfr は，網膜ホモジネートと少なくとも 1 つの成分を共有することを示し，両吸収抗血清はゲル内拡散法の感度内でウシ網膜 Pfr の 1 成分のみを認識する monospecific な抗血清であることを意味している．ウシ網膜の精製 Pfr は両吸収抗血清に対してはもとより，未吸収 A-Pfr および A-hg に対しても 1 本の沈降線を示す均一な抗原となっている（Fig. 2）．

A-Pfr-abs を使用し，ウシの網膜，ぶどう膜，角膜，水晶体，肝，脾，腎，肺，副腎，脳，睾丸の各ホモジネートおよび血清に対してゲル拡散を行ってみると，網膜が 1 本の強い沈降線を生じ，ぶどう膜はかすかな 1 本の沈降線を生じたが，他臓器や血清はいずれも沈降線を生じなかった（Fig. 3）．ぶどう膜との沈降線は同標品に混入した網膜成分によるものと推定される．従って網膜特異な 1 抗原が網膜ホモジネートおよび Pfr に存在すると考えられる．なお，同一個体の網膜と脾のホモジネートを反応させた場合，前者のみが沈降線を示したので，この網膜特異抗原と組織適合抗原の関連は一応否定される．

ウシ網膜に対する A-Pfr-abs と異種動物の網膜ホモジネートとの反応では，ウサギ・ブタ・ヒト網膜のホモジネートはいずれも 1 本の沈降線を生じたが，ウシ網膜による沈降線とは完全一致像を示さなかった（Fig. 4）．

なお，ここで注目されることは A-Pfr が網膜 S 抗原に対する抗体を含有すること，すなわち，ウシ網膜 Pfr に S 抗原が多少とも混在することである．Fig. 5 に示すように，未吸収のウシ網膜 Pfr は S 抗原に対して 1 本の沈降線を生じたが，それは同血清が Pfr に対して生じる沈降線とは無関係である．したがって Pfr 中の網膜特異抗原は S 抗原とは無関係な抗原と見なしえるが，免疫螢光法に際しては A-Pfr に混在する抗 S 抗原抗体を吸収除去する必要のあることがこれから明らかである．

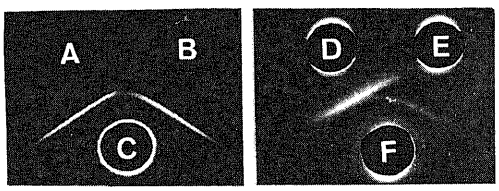

Fig. 2. Double gel diffusion demonstrating the reactions between retinal antigens and anti-Pfr antisera. A & D, bovine retinal homogenate; B & E, purified Pfr; C, absorbed anti-Pfr antiserum; F, unabsorbed anti-Pfr antiserum.

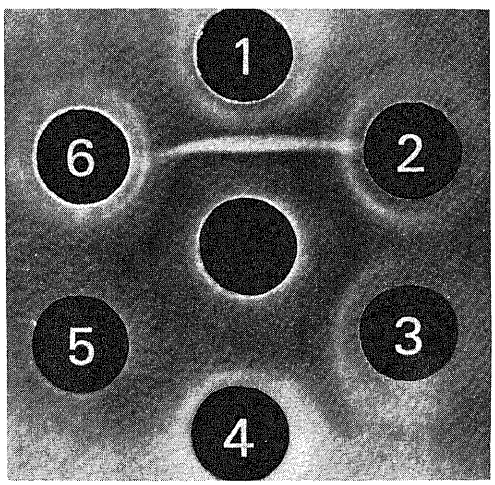

Fig. 3. Double gel diffusion demonstrating the reaction between various bovine tissues and absorbed anti-Pfr antiserum. 1, retina; 2, brain; 3, adrenal gland; 4, cornea; 5, lense; 6, uvea. Uvea also produced a faint line which seemed to be due to contamination of retinal tissues.

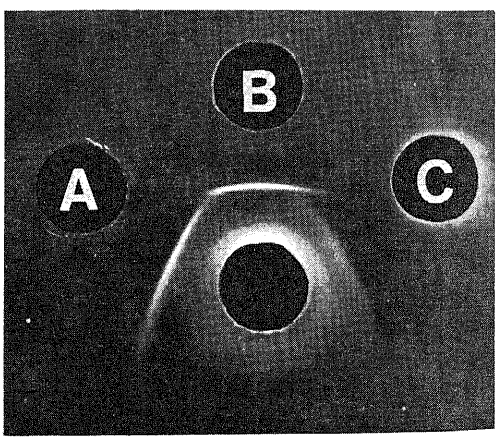

Fig. 4. Double gel diffusion showing the existence of cross-reacting antigens in the retina of other species. A, rabbit; B, bovine; C, pig.

免疫電気泳動では，ウシ網膜 Pfr は β_1-グロブリンの泳動度に一致する１本のアークを形成した(Fig. 6)．

Ⅲ．免疫螢光法

ウシ網膜の未固定cryostat切片は色素上皮層に強い黄色の自発螢光を示し，アジバントコントロール血清を第一次抗体として間接螢光抗体法を行っても上記の自発螢光以外に網膜に螢光染色は認められない．A-hg-absや A-Pfr-absで染色を行うと，いずれも網膜外層すなわち外顆粒層や内・外節部が最もよく染まり，内顆粒層は同様，あるいはやや弱く，それより内層ではびまん性で弱い螢光がみられた．外顆粒層は細胞膜の染色が顕著で，細胞質はほとんど染色されず核は陰性であった．S 抗原で十分吸収した A-Pfr-abs を用いた場合も染色結果は上記とほとんどかわらず，内・外顆粒層や内・外節部の細胞膜が特異螢光を示した (Fig. 7)．以上のような網膜染色は抗血清を網膜ホモジネートで吸収することで消失した．なお，これらの吸収抗血清では脈絡膜・毛様体・虹彩・水晶体・視神経や肝・腎・脾・肺・脳は陰性であった．時に角膜の上皮・内皮が軽度に染色されることがあったが，抗血清を角膜ホモジネートで吸収したもので染色を行ってみると，角膜は陰性化し，網膜の染色には全く変化が起こらなかった．

生細胞膜免疫螢光法では，酵素処理や強いプレスを加えてウシ網膜の遊離細胞浮遊液を作る試みが不成功

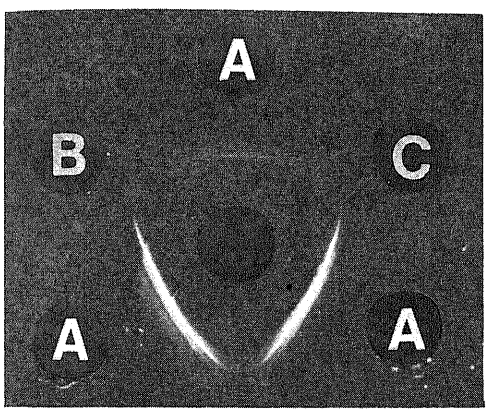

Fig. 5. Double gel diffusion showing a non-identical reaction between Pfr (A) and S antigen (B). Center well, unabsorbed anti-Pfr antiserum ; C, the insoluble retinal fraction.

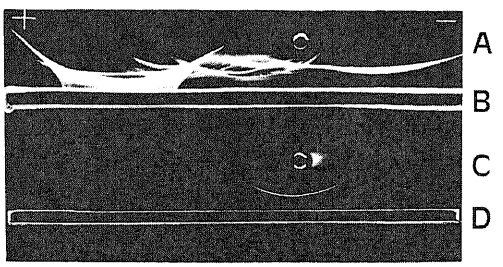

Fig. 6. Immunoelectrophoresis of Pfr. A, normal human serum ; B, anti-normal human serum antiserum ; C, Pfr ; D, absorbed anti-Pfr antiserum. Pfr showed an arc which was consistent with β_1-globulin.

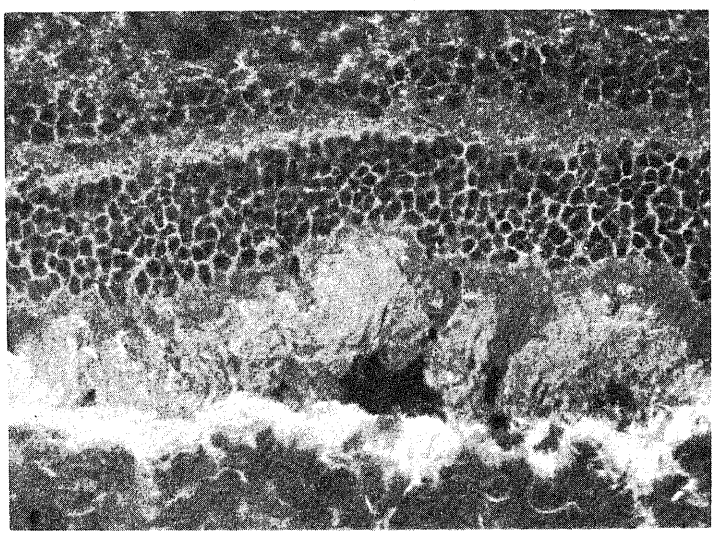

Fig. 7. Indirect immunofluorescence of a frozen section of the bovine retina. Specific staining in all layers of the retina is seen. The staining is distinctive in the outer portion of the retina. ×600.

であったので，組織細片のまま染色を行った．一次抗血清にはS抗原で吸収したA-Pfr-absを用いた．視細胞の垂直断面において杆体や錐体の細胞膜が染色され（Fig. 8），膜面からの観察においても錐体（直径約4－8 μ），杆体（直径1.5 μ 以下）の細胞膜のリング状染色が認められた（Fig. 9）．稀に遊離した双極細胞が認められたが，同細胞は均一または点状のやや弱い細胞膜染色と思われる染色性を示した（Fig. 10）．なお，アジバントコントロール血清では上記陽性染色は全く認められなかった．

IV．抗原の化学的性質

ウシ網膜の切片にトリプシン処理をしたものは以後の螢光抗体法で陰性となったが，ノイラミニダーゼ，β-グルコシダーゼ，過ヨウ素酸処理では陰性化は起こらなかった．なおそれぞれに用いたバッファーのみで切片を染色した場合には陽性所見に変化はなかった．ポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動では，ウシ網膜のホモジネート，DOC可溶化LP，Pfrと精製の段階がすすむにつれて蛋白のバンドは減少していったが，しかしなおPfrでも数本のバンドが存在し

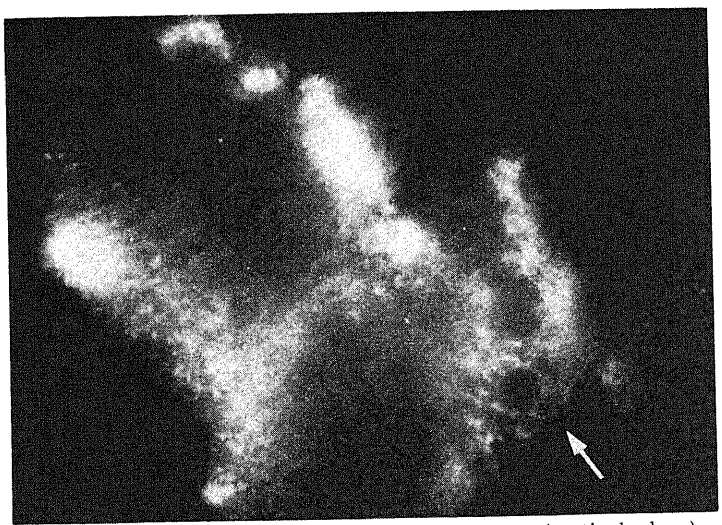

Fig. 8. Living cell membrane immunofluorescence (vertical plane). Membrane staining is seen in photoreceptor cells. The outer granular layer is seen at the right (arrow). ×800.

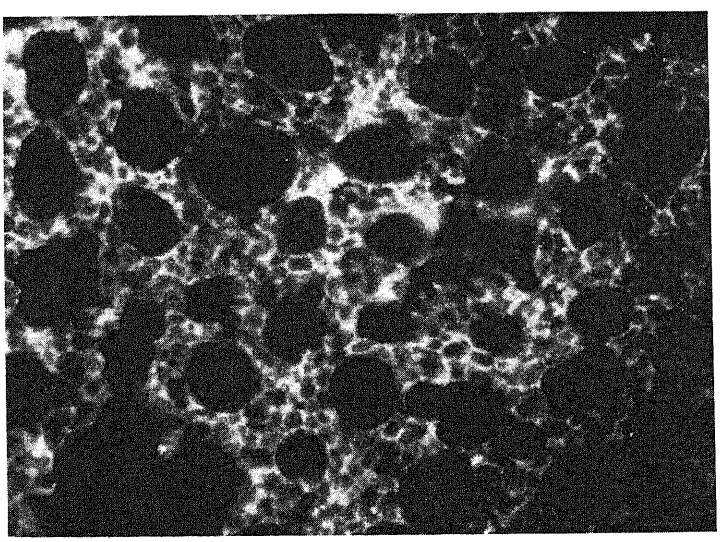

Fig. 9. Living cell membrane immunofluorescence (transeverse plane). Large cells (cone) and small cells (rod) are seen. ×1,600.

Fig. 10. Living cell membrane immunofluorescence. A weakly stained bipolar cell is observed. ×1,600.

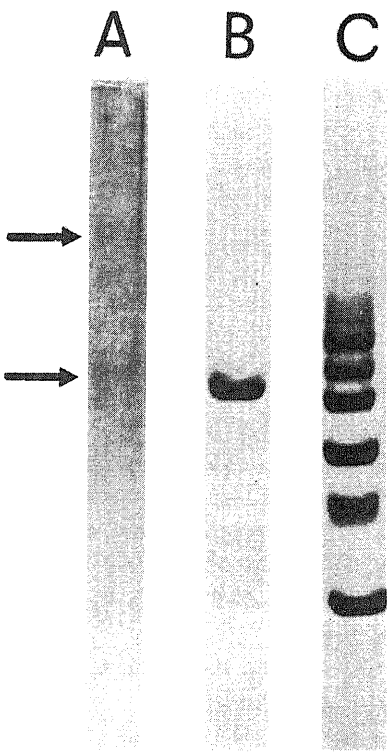

Fig. 11. Gradient gel electrophoresis. A, purified Pfr; B, S antigen; C, molecular weight markers. The molecular weight of Pfr was 62,000-63,000 (lower arrow). Heavy protein (upper arrow), which seemed to be a dimer of Pfr, was sometimes observed. The molecular weight of S antigen was 51,000.

た．Pfr の一層の純化は affinity chromatography による非特異的物質の除去によって行われ，泳動上1本のバンドを示すのみの精製抗原分画が得られた．しかし濃縮によって抗原の凝集がおこり，泳動上濃厚なバンドを得ることが困難であった．

Gradient Gel PAA 4/30 による分子量測定では，精製 Pfr の分子量は約 62,000−63,000 であった．測定は数回行ったが，分子量 12 万前後にもバンドの出現することがあった．これは恐らくこの抗原の dimer であろうと推測される．なお比較のため同時に泳動した S 抗原の分子量は約 51,000 の値を示した（Fig. 11）．

考　　按

ウシ網膜の不溶性沈査を DOC で可溶化した分画には，ゲル内拡散法で網膜特異と思われる蛋白性抗原の存在が認められた．その抗原には種族特異性があるが，他の哺乳類網膜にも交叉反応性の類似抗原が存在する．免疫螢光法によると，抗血清の吸収が適当な場合，網膜外層部特に視細胞膜がよく染色され，眼球内の他組織や他臓器には陽性染色は見られなかった．生細胞膜免疫螢光法でも網膜の錐体・杆体の細胞膜染色が認められ，双極細胞膜にもやや弱いながら陽性所見が得られた．

このような網膜抗原と既知の網膜抗原との関係が問題であるが，この抗原が網膜の不溶性沈査から得られていることより，まず Wacker ら[5]の P 抗原との関係が注目される．これまで Gregerson ら[10]が P 抗原を表面活性剤で可溶化して分析しているが，その可溶化部

分は著しく不均質であり，それぞれの成分の分離や分析は不十分で筆者の抗原との関係は不明である．筆者の抗原は恐らく不溶性成分に含まれる唯一の網膜特異抗原ではないかと思われるが，その検討は今後の問題である．

つぎにS抗原との関係であるが，筆者の抗原の分布はS抗原のそれに多少とも類似しており，また使用した抗血清に抗S抗体の含まれていることがゲル内拡散法で認められたため，それとの鑑別はとくに重要である．そこで充分量のS抗原で吸収した抗血清により免疫螢光法を行ったところ，抗原分布が視細胞に限られない点でS抗原とは異なっていた．ついで本抗原分画から非特異的抗原を吸収除去して得たほぼ均質な標品を用いスラブゲル電気泳動を行ってみると，S抗原とはわずかながら泳動上に差があり，SDS存在下のgradient gelによる電気泳動では62,000－63,000の分子量を示した．S抗原標品ではWackerら[6]や原田[16]の得た値に近い51,000の値が得られたため，両抗原は分子量の上でも差が明らかである．免疫電気泳動ではS抗原は高野ら[17]によるとα位であるが，この抗原はβ位であった．S抗原は視細胞膜や視細胞質の一部に分布し[8][18][19]，rhodopsin kinase活性を持つ膜蛋白[20]と考えられているが，その可溶性の性質からみて，膜蛋白であるとしても膜のperipheral protein[21]であろうと推定できる．それに対して筆者の抗原は不溶あるいは難溶性であり，同様な抽出法を用いた他臓器抗原についての実験成績[22]からみても細胞膜のintegral protein[21]である可能性が高い．

筆者の抗原にはS抗原のような強いuveitogenic activityはないが（未発表），長期大量免疫を行えば徐々にぶどう膜炎が起きる可能性がある．精製抗原を大量に得ることの困難さからその実証は難しいが，そのような成績がウシ腎臓の場合に認められている[22]．S抗原に近い抗原分布をもつ細胞膜抗原でありながら強い起炎性を持たないことの原因は，この抗原性の弱さ，その量的な少なさ，その膜内位置などにあるかもしれない．ただし，そのような抗原でもウイルス感染による抗原の異種化のような現象が起きるとしたら，病因的意義が生まれる可能性がある．各種の眼疾患におけるこの抗原の役割の検討はこれからの問題である．

結　　論

ウシ網膜の不溶性沈査をデオキシコール酸塩で可溶化し，Sepharose 4Bでゲル濾過をして得た低分子蛋白分画を免疫抗原として作製した異種抗血清を利用し，免疫学的分析を行って以下の結論をえた．

1）抗血清をウシ肝・腎・脾・肺の組織片で吸収するとfunctionally monospecificな抗血清が得られ，ゲル内拡散法で網膜抽出物またはホモジネートに対して1本の沈降線を生じるが，他臓器組織のホモジネートにたいして全く沈降線を生じなかった．

2）本抗原には種族特異性があるが，他の哺乳類(ヒト，ウサギ，ブタ）の網膜には交叉反応性抗原が存在した．

3）本抗原はβ_1の泳動度をもち，分子量はgradient gel電気泳動で，SDS存在下約62,000－63,000を示した．抗原活性はトリプシン感受性があるが，糖分解処理に抵抗した．

4）螢光抗体法によると，抗原の所在は網膜外層部とくに視細胞の細胞膜が主であったが，双極細胞にも存在した．

5）粗抗原液を脱アルブミン後，抗ウシ肝・肺・血清抗血清の免疫グロブリンを結合させたAH-Sepharose 4Bのカラムを通し，さらにProtein A-Sepharose CL-4Bを通すと，ほぼ均一な抗原標品が得られた．

以上，本抗原は既知のS抗原とは異なる抗原で，視細胞を主とする網膜外層部細胞の細胞膜内蛋白の1つと考えられるが，uveitogenic activityは明らかでなく，アレルギー性ぶどう膜炎成立に対する関与は今後検討の必要がある．

終わりに御指導・御校閲を頂いた倉田自章教授，御協力を頂いた岡田収司助教授ならびに教室員各位に深く感謝いたします．また本研究の機会をお与え下さいました金沢医科大学眼科故倉知與志教授ならびに佐々木一之教授に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1） **Elschnig, A.**: Studien zur sympatischen Ophthalmie. Graefes Arch. Ophthalmol., **75**, 459-473 (1910).

2） **Collins, R. C.** : Experimental studies on sympathetic ophthalmia. Am. J. Ophthalmol., **32**, 1687-1699 (1949).

3） **Aronson, S. B., Hogan, M. J., & Zweigart, P.** : Homoimmune uveitis in the guinea pig. III. Histopathological manifestations of the disease. Arch. Ophthalmol., **69**, 208-219 (1963).

4） **Wacker, W. B. & Lipton, M. M.** : Experimental allergic uveitis. : homologous retina as uveitogenic antigen. Nature, **206**, 253-254 (1965).

5） **Wacker, W. B. & Lipton, M. M.** : Experimental allergic uveitis. II. Serologic and hyper-

sensitive response of the guinea pig following immunization with homologous retina. J. Immunol., **101**, 157-165 (1968).

6) **Wacker, W. B., Donoso, L. A., Kalsow, C. M., Yankeelov, J. A., & Organisciak, D. T.** : Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. J. Immunol., **119**, 1949-1958 (1977).

7) **Faure, J. P.** : Soluble retinal antigen. Curr. Top. Eye Res., **2**, 255-262 (1980).

8) **Kalsow, C. M. & Wacker, W. B.** : Use of immuofluorescent localization in the normal guinea pig eye to differentiate three autoantisera. Int. Arch. Allergy appl. Immununol., **48**, 287-293 (1975).

9) **Wacker, W. B. & Kalsow, C. M.** : The role of uveal and retinal antigens in experimental autoimmune ocular pathology. Mod. Probl. Ophthal., **16**, 12-20 (1976).

10) **Gregerson, D. S., Abrahams, I. W., & Thirkill, C. E.** : Serum antibody levels of uveitis patient to bovine retinal antigens. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **21**, 669-680 (1981).

11) **倉田自章・岡田収司**：免疫実験操作法A（日本免疫学会編），第4版，p390-393 (1979)，日本免疫学会，金沢.

12) **Kurata, Y. & Okada, S.**: Immunological studies of insoluble lipoproteins. Int. Arch. Allergy, **29**, 495-509 (1966).

13) **Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J., & Thomas, L. E.**: Cellular lipoproteins. I. The insoluble lipoprotein of whole liver cells. Exp. Cell Res., **13**, 96-102 (1957).

14) **Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R.J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

15) **Cambiaso, C. L., Goffinet, A., Vaerman, J.-P.,& Heremans, J. F.**: Glutaraldehyde-activated aminohexyl-derivative of Sepharose 4B as a new versatile immunoadsorbent. Immunochemistry, **12**, 273-278 (1975).

16) **原田景子**：網膜可溶性抗原の特性について，1．新しい精製法．日眼会誌，**86**, 1962-1969 (1982).

17) **高野 繁・関 文治・三橋正忠・臼井正彦・松尾治亘**：網膜S抗原の新しい分析精製法について．眼紀，**32**, 491-496 (1981).

18) **横山公章・谷口重雄・河井克仁・深道義尚**：正常網膜組織における可溶性抗原の局在について．日眼会誌，**86**, 1550-1557 (1982).

19) **矢島信悟・臼井正彦・高村健太郎・長谷見通子**：酵素抗体法によるS抗原の局在－正常白色ウサギ眼での検討－．日眼会誌，**86**, 1558-1566 (1982).

20) **Shichi, H.** : Possible identity of experimental uveitogenic antigen (S antigen) with rhodopsin kinase. Jpn. J. Ophthalmol., **25**, 306-311 (1981).

21) **Singer, S. J.**: Molecular biology of cellular membranes with applications to immunology. Adv. Immunol. (ed. Dixon, F. J., & Kunkel, H. G.), vol. 19. p1-16 (1974), Acad. Press, N. Y. & London.

22) **本郷忠彦**：腎尿細管の1特異抗原とその精製．十全医会誌，**91**, 341-351 (1982).

A Retina-Specific Antigen in the Insoluble Extract of the Retina Kazuko Kitagawa, Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **92**, 575－584 (1983)

Key words: the bovine retina, retina-specific antigen, P antigen.

Abstract

A retina-specific antigen in the insoluble extract of bovine retina was partially purified by the solubilization of retinal sediment with desoxycholate and the gel filtration. Further purification of this antigen was carried out with removal of serum proteins and other non-specific antigens in the fraction by means of affinity chromatography. This purified antigen had a molecular weight of approximately 62,000-63,000 according to gradient gel electrophoresis and had β_1-mobility according to immunoelectrophoresis. Immunofluorescence showed that the antigen was located on the plasma membranes of both photoreceptor cells and bipolar cells. There were similar but

non-identical antigens in retinas of other species, which also reacted with the antiserum of this antigen. S antigen was a retina-specific antigen in the soluble retinal extract, whereas this antigen was thought to be a retina-specific antigen in the insoluble retinal extract, P antigen fraction.