



# Study on vitreous fibrosis induced by blood cells

片上, 千加子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-01-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1377

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001377>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	かた かみ ち か こ (兵庫県) 片 上 千 加 子
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1129号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成2年1月24日
学位論文題目	Study on Vitreous Fibrosis Induced by Blood Cells (血液細胞により惹起された硝子体内線維増殖に関する研究)

審査委員	主査 教授 山 本 節 教授 高 井 義 美 教授 西 塚 泰 美
------	--------------------------------------

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 言

硝子体内線維増殖は穿孔性眼外傷，増殖性糖尿病性網膜症等に見られ，しばしば牽引性網膜剥離を惹起する難治の病態である。増殖性硝子体網膜症はまた網膜剥離や網膜剥離術後の重篤な合併症でもある。しかし，その発症機序については不明の点が多い。硝子体出血に起因して硝子体内に線維性増殖組織が形成されることは臨床的にも観察され，血液が増殖組織発生の一因子であることが推察される。今回，著者は各血液細胞が硝子体内線維増殖の発生にどのような役割を果たすかを調べる目的で，家兎血液より単球，リンパ球，赤血球を分離し，各々を家兎硝子体中に注入し，硝子体内線維増殖発生の有無，重症度を注入後3週間目まで観察した。

また，正常硝子体は主として細胞マトリックスより成り，Ⅱ型コラーゲン，ヒアルロン酸，糖蛋白などを含むが，線維性増殖組織の形成された硝子体では，構成成分の変化が推察される。そこで，血液細胞の注入により増殖組織を発生させた硝子体におけるグリコサミノグリカン生成の変化についても調べた。

### 方 法

家兎血液よりFicoll-Isopaque techniqueにより単球＋リンパ球を分離し，MEMに浮遊させて各種濃度に調整した。単球，リンパ球の分離には単球＋リンパ球のMEM浮遊液を $5 \times 10^6$  cells/mlの濃度にし，ペトリ皿で37℃，90分間，インキュベートした。単球はプラスチック表面に付着し，リンパ球は浮遊液中にとどまることで分離可能であった。単球，リンパ球を除いた後の細胞沈査のME

M浮遊液に0.4%デキストランを加え、37°Cで90分間静置した後、下方1/3の赤血球をMEMに再浮遊させた。得られた単球+リンパ球、単球、リンパ球、赤血球のMEM浮遊液を家兎硝子体中に、角膜輪部より0.8mm後方より27ゲージ針を用いて注入した。11羽22眼には単球+リンパ球を、7羽14眼には単球またはリンパ球を、5羽10眼には赤血球を注入した。対照として3羽6眼には凍結融解をくりかえして細胞を死滅させた単球+リンパ球を注入した。注入後3週間目まで1週間毎に倒像眼底鏡にて硝子体内線維増殖の発生、程度を観察し0~IV度に分類した。

単球+リンパ球、赤血球、凍結融解後の単球+リンパ球を注入した後3週間目に摘出した硝子体および正常硝子体を<sup>3</sup>H-グルコサミンで37°C、24時間標識した後、4 M Gu-HClでグリコサミノグリカンを抽出し、エタノール沈澱、プロナーゼ処理の後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した。カラムの放射能活性のピークを凍結乾燥した後、特異的酵素（ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼAC）を反応させ、再度ゲル濾過カラムにかけた。コンドロイチナーゼABC処理後のdisaccharidesはさらに薄層クロマトグラフィーによる分析をおこなった。

## 結 果

単球+リンパ球を注入した22眼中、 $6.2 \times 10^6$ 細胞数以上を注入した8眼すべてに、牽引性網膜剥離を伴った硝子体内線維増殖を生じた。残り14眼は $0.5 \times 10^6 \sim 4.2 \times 10^6$ 細胞が注入されたものであるが、牽引性網膜剥離を伴わない線維増殖を生じた。リンパ球を注入した8眼すべてに硝子体内線維増殖が生じたが、そのうち $1.4 \times 10^6$ 以上の細胞が注入された6眼は牽引性網膜剥離を伴った。単球を注入した6眼はすべて牽引性網膜剥離を伴わない線維増殖を生じた。赤血球を注入した10眼すべてに硝子体内線維増殖が生じ、そのうち8眼に牽引性網膜剥離を伴った。凍結融解した単球+リンパ球を注入した6眼には線維増殖は生じなかった。

正常硝子体の生成するグリコサミノグリカンは91%がヒアルロン酸であり、コンドロイチナーゼABC処理後の薄層クロマトグラフィーでは $\Delta$ di-HAのみが検出された。一方、線維増殖の生じた硝子体では、ヒアルロン酸の生成が約30%に減少し、かわってコンドロイチン硫酸が47~59%生成され、コンドロイチン硫酸の比率は線維増殖の程度に比例した。対照として凍結融解した単球+リンパ球を注入した硝子体には線維増殖を生じなかったにもかかわらず、ヒアルロン酸の生成が約70%に減少し、コンドロイチン硫酸が12%生成された。コンドロイチナーゼABC処理後の薄層クロマトグラフィーによる分析では線維増殖の生じた硝子体は $\Delta$ di-6 S、 $\Delta$ di-4 S、 $\Delta$ di-0 S、 $\Delta$ di-HAを含み、対照の凍結融解後の単球+リンパ球を注入した硝子体は $\Delta$ di-6 S、 $\Delta$ di-HAを含んでいた。

## 考 按

硝子体出血に起因して硝子体内線維増殖が生じ牽引性網膜剥離が惹起されることは臨床的にも観察され、血液が線維増殖発生の一因子であることが推察される。実験的にも、全血、ヘモグロビン、白血球、血小板を硝子体中に注入すると線維増殖が発生することが報告されている。しかし、各血液細胞の線維増殖発生に果たす役割については不明である。本研究では、各血液細胞を分離し、家兎硝子

体中に注入して線維増殖を惹起するか否かについて検討した。その結果、単球+リンパ球、単球、リンパ球、赤血球の硝子体内注入が線維増殖を惹起し、増殖の程度は単球、リンパ球を注入したものは注入細胞数に比例した。また、線維増殖発生にはリンパ球の方が単球より強力な因子であった。単球、リンパ球が硝子体内線維増殖を惹起する機序については、いくつかの可能性が考えられる。硝子体中に注入された単球がマクロファージに分化し、あるいは反応性にマクロファージが周囲の組織より浸潤し、マクロファージの分泌するchemotactic factorや細胞増殖因子に反応して周囲組織より浸潤した細胞が線維芽細胞に転換し増殖する。一方、リンパ球の分泌するlymphokineもまた線維芽細胞の浸潤や増殖を促すことが知られている。赤血球が線維増殖を惹起する機序についても不明であるが、ヘモグロビンとその分解産物の網膜細胞に対する毒性についての報告があり、おそらく硝子体中に注入された赤血球よりヘモグロビンが放出され、その反応としてマクロファージの侵入を招き、上述したように線維芽細胞の増殖を生じた可能性が考えられる。線維芽細胞の起源として硝子体細胞（ヒアロサイト）自身が反応性に線維芽細胞に転換した可能性も考えられる。

本研究においてはまた、単球+リンパ球、赤血球の硝子体注入により線維増殖の生じた硝子体、対照として凍結融解後の単球+リンパ球を注入した硝子体および正常硝子体の生成するグリコサミノグリカン进行分析した。正常硝子体の生成するグリコサミノグリカンは91%がヒアルロン酸であるのに対し、線維増殖の生じた硝子体ではヒアルロン酸の生成が減少し、かわってコンドロイチン硫酸が47～59%生成された。コンドロイチン硫酸の比率は線維増殖の程度に比例した。血液の注入により惹起された硝子体内線維性増殖組織のコラーゲン線維の周囲に線維芽細胞類似の細胞が認められたという報告や、そのような線維性増殖組織の主要コラーゲンが、線維芽細胞の生成産物であるI型コラーゲンであるという報告があり、また線維芽細胞はコンドロイチン硫酸を産生し得ることより、線維増殖の生じた硝子体においてコンドロイチン硫酸の生成に与る細胞としては、線維芽細胞である可能性が推察された。対照として凍結融解をくりかえし細胞を死滅させた単球+リンパ球を注入した硝子体では、線維増殖を生じなかったにもかかわらず、ヒアルロン酸の生成が軽度減少しコンドロイチン硫酸が少量生成された。このことは死滅した単球+リンパ球の注入でも軽度の宿主の炎症あるいは免疫反応を惹起して線維芽細胞の浸潤を招いたものと考えられた。

## 結 語

家兎血液より各血液細胞を分離して家兎硝子体中に注入し、硝子体内線維増殖発生の有無、程度について観察した。単球+リンパ球、単球、リンパ球、赤血球の硝子体内注入は硝子体内線維増殖を惹起し、その程度は、単球、リンパ球を注入したものでは、注入細胞数に比例した。線維増殖発生にはリンパ球の方が単球より強力な因子であった。単球+リンパ球、赤血球の注入により線維増殖を発生させた硝子体、対照として凍結融解により細胞を死滅させた単球+リンパ球を注入した硝子体、および正常硝子体の生成するグリコサミノグリカンについて分析した結果、正常硝子体では91%がヒアルロン酸であったのに対し、線維増殖の生じた硝子体ではヒアルロン酸の生成が減少し、かわってコンドロイチン硫酸が生成された。コンドロイチン硫酸の比率は線維増殖の程度に比例した。細胞を死滅

させた単球+リンパ球を注入した硝子体では、線維増殖を生じなかったにもかかわらず、ヒアルロン酸の生成が軽度減少しコンドロイチン硫酸が少量生成された。これらの結果より、単球、リンパ球、赤血球の硝子体内注入が線維芽細胞の浸潤を惹起、あるいは、硝子体細胞の線維芽細胞への転換を惹起し、それらの線維芽細胞がコンドロイチン硫酸の生成に与ることが推察された。

## 論文審査の結果の要旨

硝子体内線維増殖は穿孔性眼外傷、増殖性糖尿病性網膜症等にみられ、しばしば牽引性網膜剥離を惹起する難治の病態である。しかし、その発症機序については不明の点が多い。硝子体出血に起因して硝子体内に線維性増殖組織が形成されることは臨床的にも観察され、血液が増殖組織発生の一因子であることが推察される。そこで本研究者は各血液細胞が硝子体内線維増殖の発生にどのような役割を果たすかを調べる目的で、家兎血液より分離した単球、リンパ球、赤血球を家兎硝子体中に注入し、硝子体内線維増殖発生の有無、重症度を注入後3週間目まで観察した。また、線維性増殖組織の形成された硝子体では、構成成分の変化が推察される。そこで、血液細胞の注入により増殖組織を発生させた硝子体におけるグリコサミノグリカン生成の変化についても検討したものである。

### 方法

家兎血液より Ficoll-Isopaque techniqueにより単球+リンパ球、単球、リンパ球、赤血球を分離し、各々を家兎硝子体中に注入した。11羽22眼には単球+リンパ球を、7羽14眼には単球またはリンパ球を、5羽10眼には赤血球を注入した。対照として3羽6眼には凍結融解をくりかえして細胞を死滅させた単球+リンパ球を注入した。注入後3週間目まで1週間毎に倒像眼底鏡にて硝子体内線維増殖の発生、程度を観察し0～IV度に分類した。

単球+リンパ球、赤血球、凍結融解後の単球+リンパ球を注入した後3週間目に摘出した硝子体および正常硝子体を<sup>3</sup>H-グルコサミンで37℃、24時間標識した後、4 M Gu-HClでグリコサミノグリカンを抽出し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、特異的酵素（ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼAC）処理、さらに薄層クロマトグラフィーにより分析した。

### 結果

単球+リンパ球、リンパ球、単球を注入した36眼すべてに硝子体内線維増殖を生じ、その程度は注入した細胞数に比例した。単球+リンパ球を注入した22眼中8眼に、リンパ球を注入した8眼中6眼に、牽引性網膜剥離を伴ったが、単球のみを注入した6眼はすべて牽引性網膜剥離を伴わなかった。赤血球を注入した10眼すべてに線維増殖が生じ、そのうち8眼に牽引性網膜剥離を伴った。凍結融解した単球+リンパ球を注入した6眼には線維増殖は生じなかった。

正常硝子体の生成するグリコサミノグリカンは91%がヒアルロン酸であったが、線維増殖の生じた硝子体では、ヒアルロン酸の生成が約30%に減少し、かわってコンドロイチン硫酸が47～59%生成され、コンドロイチン硫酸の比率は線維増殖の程度に比例した。対照として凍結融解した単球+リン

パ球を注入した硝子体には線維増殖を生じなかったにもかかわらず、ヒアルロン酸の生成が約70%に減少し、コンドロイチン硫酸が12%生成された。

従来、実験的に、全血、ヘモグロビン、白血球、血小板を硝子体中に注入すると線維増殖が発生することが報告されている。しかし、各血液細胞の線維増殖発生に果たす役割については不明である。本研究者は、各血液細胞を分離し、家兎硝子体中に注入して線維増殖を惹起するか否かについて検討した結果、単球+リンパ球、単球、リンパ球、赤血球の硝子体内注入が線維増殖を惹起し、増殖の程度は単球、リンパ球を注入したものでは注入細胞数に比例すること、また、線維増殖発生にはリンパ球の方が単球より強力な因子であることを明らかにした。また、正常硝子体の生成するグリコサミノグリカンは91%がヒアルロン酸であるのに対し、線維増殖の生じた硝子体ではヒアルロン酸の生成が減少し、かわってコンドロイチン硫酸が47~59%生成され、コンドロイチン硫酸の比率は線維増殖の程度に比例することを示した。これらの結果より単球、リンパ球、赤血球の硝子体内注入がchemotactic factorや細胞増殖因子の関与を介して周囲組織より線維芽細胞の浸潤、増殖を惹起、あるいは、硝子体細胞の線維芽細胞への転換を惹起し、それらの線維芽細胞がコンドロイチン硫酸の生成に与る可能性が示唆された。以上、本研究は他に類をみない独創的な研究であり、硝子体内線維増殖の発症機序の解明につながる重要な知見を得たものとして、価値ある研究と認める。よって、本研究は、医学博士の学位を得る資格があると認める。