Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-04

家兎前眼部血管透過性に対する硝子体腔内投与サイトカインの影響

塚原，康友

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1999-03-03
(Date of Publication)
2014-01-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2322
(JaLCDOI)
https://doi.org/10.11501/3156472
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002322

※ 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。

家兎前眼部血管透過性に対する
硝子体腔内投与サイトカインの影響

神戸大学医学部眼科学教室（指導　山本　節教授）

塚原　康友

キーワード：前房フレア、サイトカイン、インターロイキン、
血管内皮増殖因子、プロスタグランディン合成阻害剤

要約

有色家兎眼の硝子体腔内にインターロイキン１β（ＩＬ－１β）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、血管内皮増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）を注入し、前眼部血管透過性亢進の程度をレーザーフレアセルメーターを用いて経時的に測定した。また、それらがプロスタグランディン合成阻害剤であるジクロフェナックナトリウムの点眼(DS点)により抑制されるか否かも検討した。1ngのＩＬ－１βを硝子体内に注入することにより前房フレア値は上昇し、１２時間後に極値に達した。以後は徐々に減少し、６日目で正常化した。DS点によりフレア値の上昇は抑制された。100ngのＩＬ－６では硝子体腔内注入後２日目に前房フレア値は極値に達し、７日間でほぼ正常に復した。ＩＬ－６においてもDS点によりフレア値の上昇は抑制された。VEGFによるフレア値の上昇はＩＬ－１β、ＩＬ－６にくらべれば軽度であり、DS点によるフレア値の抑制は明らかではなかった。b-FGFに至ってはフレア値の上昇はほとんど見られなかった。本検討により糖尿病網膜症などをはじめとする眼底病変で増加しているＩＬ－１β、ＩＬ－６及びVEGFは前房内フレアの上昇に関与していると考えられた。また、ＩＬ－１β、ＩＬ－６の作用はアラキドン酸カスケードを介する部分が大きく、プロスタグランディン合成阻害剤は前房フレア値の上昇を抑制する。

キーワード：前房フレア、サイトカイン、インターロイキン、血管内皮増殖因子、プロスタグランディン合成阻害剤

緒言

前房フレアー値の上昇は、虹彩炎などにおける血液房水柵の破綻のみならず増殖糖尿病網膜症などの眼底病変においても認められ、またその際には種々のサイトカインが房水中、あるいは硝子体中に増加する事が報告されている[1, 2]。サイトカインは人体においてさまざまな働きをなし、それらが炎症反応に関わっている可能性は高いと思われ、前述した疾患等において眼底由来のサイトカインが直接的に前房フレアー値の上昇、すなわち虹彩、毛様体血管の透過性亢進に関与している可能性がある。また、この様な反応はアラキドン酸カスケードを介する事が考えられるが、その詳細については明らかでない。この点を解明することも臨床的にプロスタグランディン合成阻害剤の使用の是非等を考える上で重要と考えられる。

今回、サイトカインの虹彩、毛様体血管の透過性亢進に関する影響を明らかにするため、家兎硝子体腔内に炎症起因性の疑われる種々のサイトカインを注入し、レーザーフレアセルメーターを用いフレアー値の経時的変化を見た。またそれらの反応におけるプロスタグランディンの関与を知るためプロスタグランディン合成阻害剤の投与による影響もあわせて検討した。

方法

対象：実験には体重１．５～２．５ｋｇの有色家兎を雌雄の別なく使用した。

実験１：下記の薬剤を生理食塩水に溶解し総量１００μlとし、有色家兎を0.04%オ

キシブプロカインにて点眼麻酔後２７G針を用い硝子体腔内に注入、眼底検査により硝子体出血等の変化を生じていないのを確認したうえレーザーフレアセルメーター（ＦＣ－１０００、興和、東京）により前房フレア値の測定を経時的に行った。

実験に用いた薬剤は以下の通りである。

リコンビナントヒトＩＬ－１β(Genzyme, Cambrigde, MA, USA)

リコンビナントヒトＩＬ－６(Genzyme, Cambrigde, MA, USA)

リコンビナントヒトVEGF(Genzyme, Cambrigde, MA, USA)

リコンビナントヒトb-FGF(Genzyme, Cambrigde, MA, USA)

コントロール（生理食塩水）

なお薬物の投与量についてはＩＬ－１βは既報に準じ1ngとし、他については１ng～１μg程度投与し適当と考えられる濃度で実験２を施行した。

実験２：０．１％ジクロフェナックナトリウム点眼（以後DS、わかもと製薬、東京）を上記薬物注入１時間、３０分前、および投与後１日４回行いつつ実験１と同様の処置を行った眼に対し、経過を観察した。

結果

１）ＩＬ－１β注入群では前房フレアー値は処置後１２時間で最高に達した。その後急速に減少し、投与２日目には極値の半分以下になり６日目にほぼ正常に復した。DS点は処置群では２日目までの前房フレアー値の上昇を抑制したが、２日目以降については非点眼群と差は見られなかった（図１）。

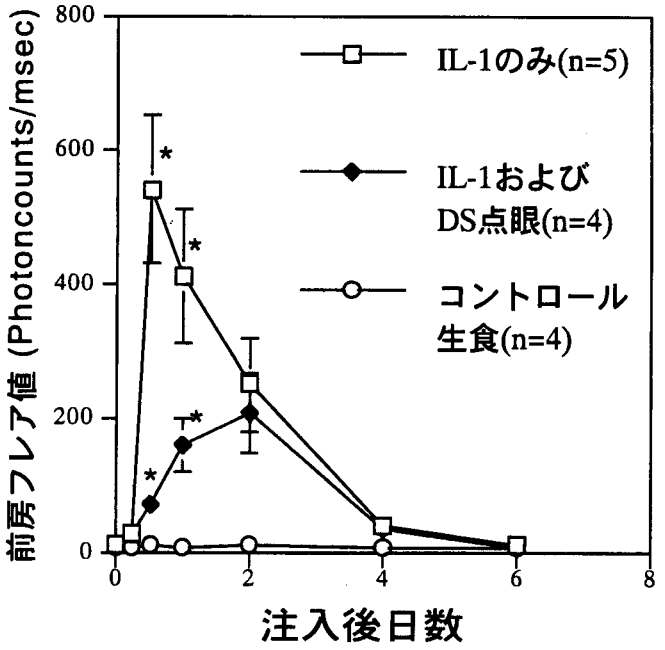

図１：インターロイキン1-β（10ng）硝子体腔内注入後の前房フレア値、ジクロフェナックナトリウム投与の有無による比較（＊ Mann-Whitney U test, P<0. 05）

２）ＩＬ－６は１００ng以上の投与量で前房フレアー値が上昇した（図２）。その極値は処置後１～２日目で、以後７日目まで漸減した。DS点は処置翌日～２日目の上昇を抑制したが、以後の変化については。非点眼群と差は見られなかった（図３）。

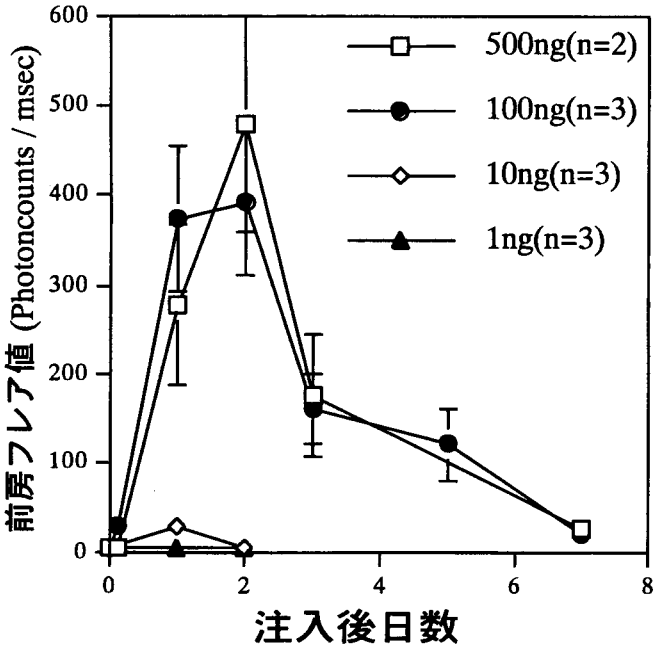

図２：インターロイキン６(1，10，100，500ng)
硝子体腔内注入後の前房フレア値

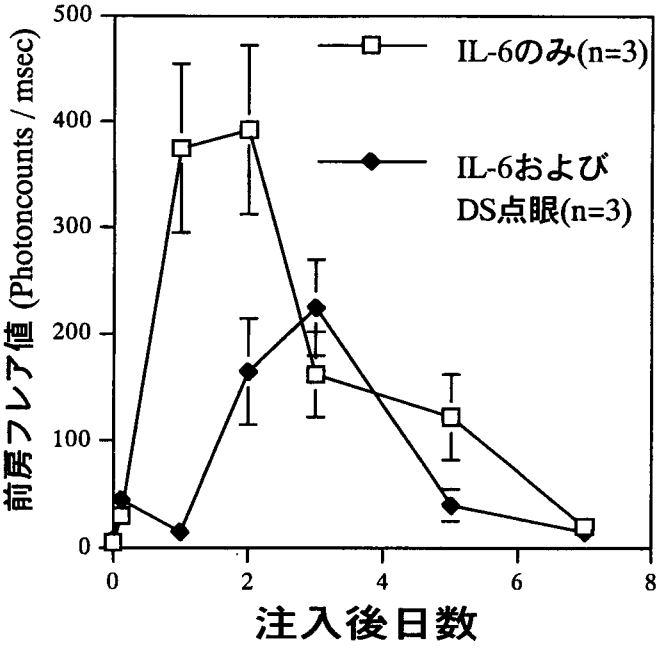

図３：インターロイキン６（100ng）硝子体腔内
注入後の前房フレア値、ジクロフェナックナトリウム
投与の有無による比較

3）VEGFの投与により前房フレアー値の上昇が認められたが、最高でもＩＬ－１β、ＩＬ－６の際の約２０分の１と軽度であった（図４）。極値は注入後４時間で得られ、約１日でほぼ正常に復した。DS点により処置後２～４時間の極値はやや減少したが、その後は大差なく、影響は明らかではなかった（図５）。

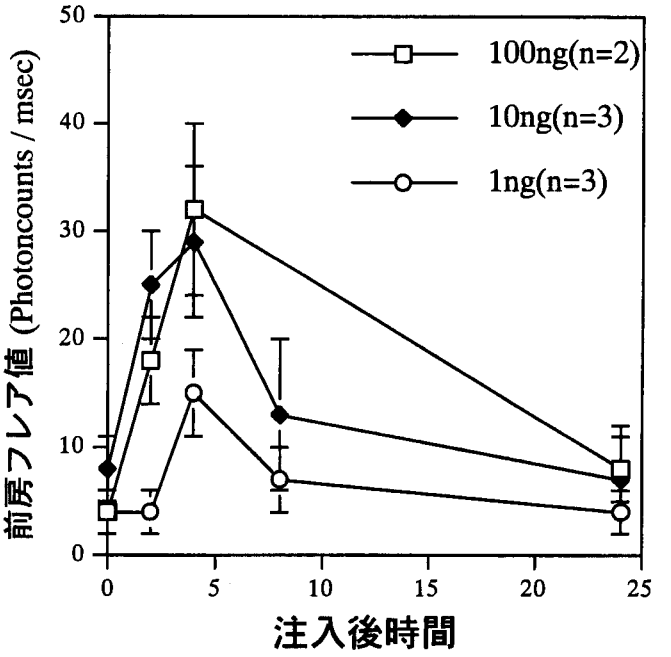

図４：血管内皮細胞増殖因子(1，10，100ng)
注入後の前房フレア値

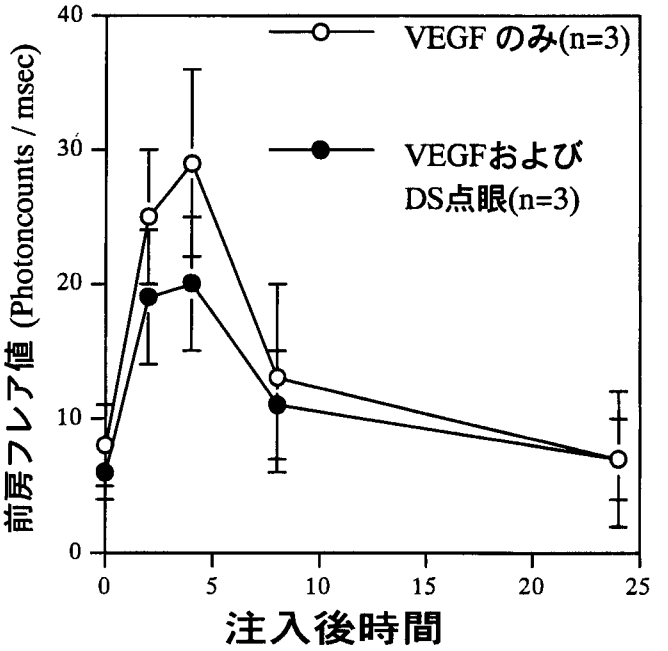

図５：血管内皮細胞増殖因子（10ng）注入後の前房フレア値、
ジクロフェナックナトリウム投与の有無による比較

4）b-FGFでは１μgの投与量でもフレアー値の明らかな上昇はみられなかった（図６）。

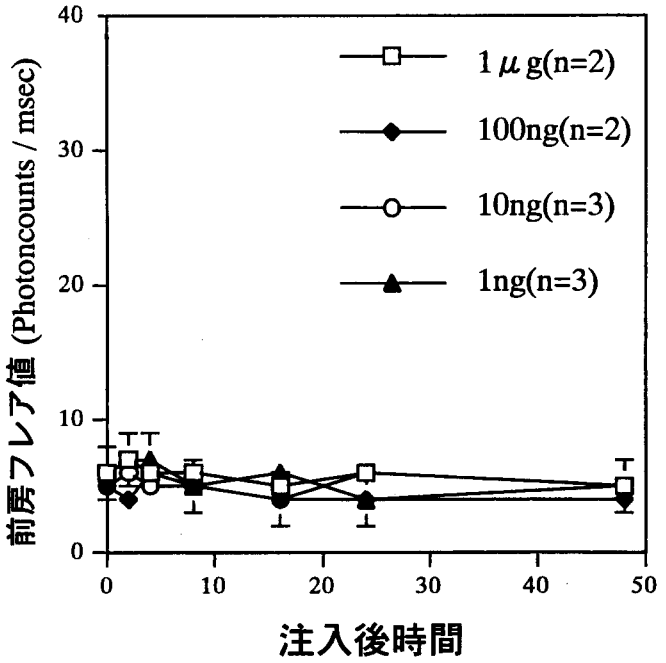

図６：塩基性線維芽細胞増殖因子(1，10，100ng，1μg)
注入後の前房フレア値

考按

ＩＬ－１β，ＩＬ－６，ＶＥＧＦ，ｂ－ＥＧＦなどのサイトカインは炎症性疾患や増殖性疾患の際、眼内より検出されており[2]、また、その逆にそれらの物質を眼内に注入することにより炎症を生じることから[3~6]、眼内における炎症に大きな影響を持ち、病的状態において炎症反応を何らかの形で介在するものであることはほぼ疑いのないところである。しかし、その実態、作用機序は案外知られていない。我々はすでに糖尿病網膜症などの主として後眼部に生じる疾患の際にも前眼部のフレア値が上昇することを報告した[7]が、さきに述べた様にこのような疾患群ではサイトカインが眼内に増加していることから後眼部病変により生じたサイトカインが前眼部のフレア値に影響を及ぼしている可能性がある。今回レーザーフレアセルメーターを用い、炎症を虹彩毛様体の血管透過性の程度を表わすフレア値の変化として捉えることにより、硝子体内に注入したサイトカインの前眼部血管透過性への影響を検討した。また、この検査法は非侵襲的なため、経過観察中にサンプルの採取等の外的な変動を与える要因をなくし同一眼において経時的変化を観察できる従来の報告には見られない利点を持つ[7]。

ＩＬ－１βの起炎症作用の全貌は明らかではないが、ＰＧ、Platelet Activating Factor（ＰＡＦ）、ＩＬ－６等を介在する可能性が示唆されている[3~5、8、9]。今回の検討においてＩＬ－１βは硝子体内注入後１２時間で前房内フレアは極値となり、またそれはＰＧ合成阻害剤であるＤＳにより抑制された。ＰＡＦ拮抗剤によるＩＬ－１β眼

内炎の抑制についての報告もあるが[10]、ＰＧ合成阻害剤よりも抑制の程度は弱い。フレア値の抑制の程度から考えるとＩＬ－１βの起炎症作用の主たるものは、アラキドン酸カスケードを介し、ＰＧ合成に関わるものであると考えられる。なお、ＩＬ－１βの硝子体内注入後２日目以降のフレア値は抑制されていない。ＩＬ－１βの生体内半減期等を考えると少なくとも２日目以降のフレア値の上昇はＩＬ－１βによる直接作用でなくそれにより誘導された他の因子によるもので、しかも発現が緩やかであり長時間持続するものと思われるが、現在のところ明らかでなく、今後の研究が待たれる所である。

ＩＬ－６は白内障術後[11]、増殖性硝子体網膜症[12]などで眼内に増加することが報告され、また一方眼内に注入することで炎症を生じることから[6]最近では炎症に関与するchemical mediatorとして注目されている。しかしＩＬ－６がどのようにして炎症を起こすかは明らかでない。in vitroの実験において培養血管内皮細胞の透過性を亢進させるとの報告があり[13]、これが炎症反応の一因であることが示唆されていた。今回の検討においてＩＬ－６注入後フレア値は上昇し、ＰＧ合成阻害剤で炎症が抑制されたことよりＩＬ－６による眼内炎においてもＰＧが大きく関与することが明らかになった。なお、ＩＬ－６はＩＬ－１により誘導されることが一般に知られているが、一方ＩＬ－６とＩＬ－１が相反する作用を持つとの考えもある[14]。今回の検討においてＩＬ－１βおよびＩＬ－６の起炎状態、ＰＧ合成阻害剤に対する反応の類似性が高かった。この結果のみからＩＬ－１βとＩＬ－６の相互関係に言及するのは困難であるとしても、それらの関係が相反するとはやや考えにくい様に思われる。ただし、近年ＩＬ－６は抗炎症作用を有するとの報告も見られ[15、16]さらに検討が必要である。

VEGFは、糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患において増加しており[17、18]、眼内血管新生に影響を与えると考えられている。一方、元来VEGFはvascular permeability factorとして発見されており、血管透過性亢進をきたす。しかし今回の検討では硝子体内注入によるフレア値の上昇はＩＬ－１β、ＩＬ－６に比し軽度であった。血管透過性を検討した報告においてはその指標を色素の血管外漏出においており[19]、前房フレアの上昇の原因となる蛋白などの漏出については今回の検討のごとくあまり強くなかった可能性がある。他に考えられる原因としては生体内半減期が極めて短いこと、眼内における反応の特殊性、ＩＬ群のように他の因子を介在したカスケード反応的作用を示さないことなどがある。いずれにしてもVEGFは眼内においては血管新生を生じ、それにより長期的に前房フレア値を上昇させることはほぼ疑いのないところである。一方、糖尿病の初期からすでに網膜のVEGFが増加していることから、単純糖尿病網膜症患者に見られた軽度の前房フレア値の上昇[7]は、今回実験結果で見られた様に網膜からのVEGFによる可能性がある。

b－FGFも糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患の際に眼内で増加しており[20]、そのような症例で前房フレアの上昇に関与している可能性が考えられた。しかし直接硝子体腔内に投与しても前房フレア値に変化は見られなかったため、前眼部の血管透過性には直接関わらず増殖性変化を促すのみであると思われた。

以上の如く、硝子体内に注入したサイトカインのうちで、ＩＬ－１β、ＩＬ－６、VEGFは直接前房フレア値の上昇を起こし、またＩＬ－１β、ＩＬ－６の作用の主要な

部分にアラキドン酸カスケードが関与していることが明らかになった。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜わりました山本節教授に深謝すると共に、直接ご指導頂きました井上正則助教授に心から感謝いたします。

文献

1) Kijlstra A:The role of cytokines in ocular inflammation. Br J Ophthalmol 78:885—887, 1994.

2) 井上正則：糖尿病性眼病変とサイトカイン. 現代医療 26:111—118, 1994.

3) Kulkarni PS, Mancino M:Studies on intraocular inflammation produced by intravitreal human interleukins in rabbits. Exp eye Res 56:275—279, 1993.

4) Rosenbaum JT, Samples JR, Hefeneider SH, and Howes EL:Ocular inflammatory effects of intravitreal interleukins—1. Arch Ophthalmol 105:1117—1120, 1987.

5) Tilden ME, Boney RS, Goldenberg MM and Rosenbaum JT:The effects of topical S(+)—ibuprofen an interleukin—1—induced ocular inflammation in a rabbit model. J Ocul Pharmacol 6:131—135, 1990.

6) Hoekzema R, Murray PI, Haren MA, Helle M, and Kijlstra A:Analysis of interleukin—6 in endotoxin—induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 32:88—95, 1991.

7) Inoue M, Azumi A, Shirabe H, Tsukahara Y, and Yamamoto M:Laser flare intensity in diabetics:correlation with retinopathy and aqueous protein concentration. Brit J Ophthalmol 78:694—697, 1994.

8) Rubin RM and Rosenbaum JT:A platelet—activating factor antagonist inhibits interleukin—1—induced inflammation. Biochem Biophys Res Commun 154:429—436, 1988.

9) 西佳代、西起史、大本安一：人眼水晶体上皮細胞によるサイトカインの産生ーインターロイキン1(IL—1)、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン6(IL—6)、上皮細胞成長因子(EGF)についてー. 日眼会誌96：715—720, 1992.

10) 片岡寿夫：インターロイキン1による眼内炎症の作用について. 日眼会誌95：635—643, 1991.

11) Malecaze F, Chollet P, Cavrois E, Vita N, Arne JL, and Ferrara P:Role of interleukin 6 in the inflammatory response after cataract surgery. Arch Ophthalmol 109:1681—1683, 1991.

12) Kauffmann DJ, Meurs JC, Mertens DA, PeperkampE, Master c, and Gerritsen ME:Cytokines in vitreous humor: Interleukin—6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:900—906,

1994.
13) 丸尾直子、森田育男、室田誠逸：インターロイキン6(IL−6)の血管内皮細胞に及ぼす影響．血管 15:237−241，1992.
14) 岡野明、鈴木智子、秋山由紀雄：サイトカイン研究手法の実際と問題点−IL−6−．Biotherapy 8:909−918，1994.
15) Karkar AM, Tam FWK, and Proudfoot AE:Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by interleukin-6. Kidney Int 44:967-973, 1993.
16) Barton BE, and Jackson JV:Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. Infect Immun 61:1496-1499, 1993.
17) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Iwamoto HT, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, and King GL:Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N Engl J Med 331:1480-1487, 1994.
18) Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, and Yeo KT:Increased vascular endothelial growth facto r levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 118:445-450, 1994.
19) Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, and Siegel N:Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J Biol Chem 269:20017-20024, 1989.
20) Sivalingam A, Kenney J, and Brown GC:Basic fibloblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 108:869-873, 1990.

The Effect of Intravitreal Injection of Cytokines on Anterior Segment Vascular Permeability in Pigmented Rabbit Eyes

Yasutomo Tsukahara
Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine

Abstract

We investigated the role of cytokines in the anterior chamber inflammation in pigmented rabbit eyes using laser flare-cell meter. After intravitreal injection of 1ng of intreleukin-1β(IL-1β) aqueous flare intensity increased with a peak at 12 hours and returned to the normal level 6 days after the injection. The effect was suppressed with topical dicrofenac sodium, prostaglandin synthetase inhibitor. 100ng of interleukin-6 (IL-6) acted similarly as IL-1β, and the effect was also suppressed with dicrofenac sodium. Intravitreal administration of vascular endothelial growth factor(VEGF) resulted in slight elevation of aqueous flare intensity, and any quantity of basic fibroblast growth factor did not change aqueous flare intensity. These results suggest that IL-1β, IL-6 and VEGF increase vascular permeability in the anterior segment of pigmented rabbit eyes, and IL-1β and IL-6 mediate the reaction through arachidonic acid pathway.

Key words

Aqueous flare intensity, Cytokines, Interleukin, Vascular endothelial growth factor, Prostagrandin synthetase inhibitor