

インターロイキン 1 β による実験的眼内炎における硝子体変化引地 泰一¹⁾, 上野 則夫²⁾, Chakrabarti B³⁾, Trempe CL³⁾, 吉田 晃敏¹⁾¹⁾旭川医科大学眼科学教室, ²⁾大阪大学医学部眼科学教室, ³⁾ハーバード大学医学部眼科

要 約

実験的眼内炎における硝子体変化のメカニズムを解明するために、インターロイキン 1 β (1,000 units) を家兎硝子体中に注入し眼内炎を作製し、硝子体の変化を検討した。その結果、眼内炎は硝子体の液化と硝子体ゲルの収縮を促進させた。さらに、電気泳動サンプルバッファーに不溶性な硝子体コラーゲンの増加およびコラーゲン分子の高分子量成分である β -および γ -成分の増加がみら

れ、これらは硝子体コラーゲンが架橋形成したためと考えられた。眼内炎の硝子体ではコラーゲンの架橋形成が起こり、これが硝子体の液化、収縮を引き起こすと推測された。(日眼会誌 100: 853-857, 1996)

キーワード: インターロイキン 1 β , 架橋形成, 眼内炎, 硝子体コラーゲン

Vitreous Changes During Ocular Inflammation
Induced by Interleukin 1 β Taiichi Hikichi¹⁾, Norio Ueno²⁾, Chakrabarti B³⁾,
Trempe CL³⁾ and Akitoshi Yoshida¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College²⁾Department of Ophthalmology, Osaka University, Faculty of Medicine³⁾Department of Ophthalmology, Harvard Medical School

Abstract

To investigate the molecular mechanisms of vitreous changes during ocular inflammation, we studied vitreous changes in an experimental ocular inflammation induced by intravitreal injection of interleukin 1 β in rabbits. Ocular inflammation caused gel contraction, liquefaction, and increases in the amount of insoluble material and high-molecular-weight components of vitreous collagen, presumably

resulting from extensive cross-links of the collagen molecules. The cross-links of vitreous collagen may induce vitreous gel contraction and liquefaction. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 853-857, 1996)

Key words: Interleukin 1 β , Cross-link formation, Ocular inflammation, Vitreous collagen

I 緒 言

眼球内で最大の容量を占める硝子体は、大量の水を含有するゲルである。重量の 99% は水であり、残りの 1% はコラーゲンやヒアルロン酸などの固形成分である¹⁾。硝子体のゲル構造は、コラーゲン線維の三次元的格子構築の間に多量の水を保有したヒアルロン酸が充満していると考えられている¹⁾⁻³⁾。

眼内炎を有する眼では、硝子体の液化、収縮が促進され、後部硝子体剝離が高頻度に認められる⁴⁾⁵⁾。硝子体変化のメカニズムに関する研究は少なく、未だ解明されて

いない。炎症による網膜血管柵の障害や炎症細胞から放出される各種の酵素が硝子体変化に関与していると推測されている⁶⁾⁷⁾。

本研究では、眼内炎の実験モデルとして広く用いられているインターロイキンの硝子体注入によって誘発された眼内炎モデル⁸⁾⁻¹⁰⁾を用いて、眼内炎における硝子体の変化を、特に硝子体コラーゲンの変化に着目し検討した。炎症眼における硝子体変化のメカニズムの解明は、硝子体変化に伴って生じる牽引性網膜剝離などの視力予後に重大な影響を与える病態の治療、予防に貢献すると思われる。

別刷請求先: 078 北海道旭川市西神楽 4-5 旭川医科大学眼科学教室 引地 泰一

(平成8年3月26日受付, 平成8年6月27日改訂受理)

Reprint requests to: Taiichi Hikichi, M.D. Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, 4-5 Nishikagura, Asahikawa-shi, Hokkaido 078, Japan

(Received March 26, 1996 and accepted in revised form June 27, 1996)

II 方 法

1. インターロイキン1 β による眼内炎の作製

白色家兎5匹(体重2~2.5 kg)を「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に従い取り扱った。塩酸ケタミン(ケタラール®)(20 mg/kg)とペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)(25 mg/kg)の筋注、および0.5%キシロカイン点眼による麻酔後、30ゲージ針を硝子体中央に挿入し、右眼(炎症眼)にはHuman recombinant インターロイキン1 β (IL-1 β)/0.1%ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液(Sigma, St Louis, MO)を20 μ l(1,000 units)注入し、左眼(対照眼)には0.1%ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液を20 μ l注入した。薬剤注入部からの液漏出はなかった。硝子体注入3日後、過剰ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の静脈内注射によって屠殺し、直ちに眼球を摘出し氷上に移した。

2. 前房水蛋白濃度の測定

1 ml注射器の付いた27ゲージ針を角膜輪部から前房に挿入し、前房水を採取した。BCA法(Pierce, Rockford, IL)¹¹⁾を用いて、前房水中の蛋白濃度を測定し、眼内炎の強さの指標とした。吸光度の測定にはDU-70 Spectrometer(Beckman, Fullerton, CA)を用いた。

3. 硝子体液化度の判定

摘出眼球の角膜輪部から5 mm後方の強膜を剪刀で輪状に切開し、強膜、脈絡膜、網膜を取り除いた後、硝子体を水晶体後面から鈍的に剝離した。以下の手法¹²⁾に従い、硝子体全重量に占める硝子体ゲル重量の比率を算出した。取り出した硝子体を円形の濾紙(Fisher no. 1, 10 $\times$ 16 cm; Fisher, Pittsburg, PA)とプラスチックで被覆されたガラス線維網(網孔約1.5 mm)の上に載せ、ゲル硝子体から液化硝子体を分離した。液化した硝子体は速やかに濾紙に吸収された後、下のシャーレに滴下した。この分離を室温で30秒間行った後、濾紙に吸収された液体とシャーレに滴下した液体の重量を測定した。この両者の合計を液化硝子体の重量とした。ゲル硝子体と液化硝子体の重量の和を本来の硝子体の重量と考え、次式によって硝子体液化率を算出した。

硝子体液化率(%) =

$$\frac{\text{液化硝子体の重量(g)}}{\text{ゲル硝子体の重量(g)} + \text{液化硝子体の重量(g)}} \times 100$$

4. 硝子体コラーゲンの抽出

Burk¹³⁾の方法に基づき硝子体コラーゲンを抽出した。採取した硝子体にprotease inhibitors(0.5 mg/L leupeptin, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid disodium, 0.7 mg/L pepstatin, 0.2 mmol/L phenylmethane sulfonyl fluoride)を混ぜ、氷上でホモジナイズした。超高速遠心分離(100,000 $\times$ g, 45分)を行い、沈殿物を0.5 mol/L酢酸に溶解し、沈殿物10 mgにつき1 mg

のpepsin(Sigma)を混ぜ、4 $^{\circ}$ Cで一晩攪拌した。超高速遠心分離(110,000 $\times$ g, 30分)を行った後、上澄みをpH 7.2に中和し、0.01 mol/Lリン酸水素ナトリウムおよび蒸留水の外液に対し、それぞれ4 $^{\circ}$ Cで一晩透析した。さらに、凍結乾燥した。一眼につき約0.5 mgの硝子体コラーゲンが抽出された。

5. 硝子体コラーゲン分子量の測定

抽出したコラーゲンを0.5 mol/L酢酸に溶解し、これに電気泳動サンプルバッファー[2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.0625 mol/L Tris-HCL, pH 6.8, 10% glycerol, 5% 2-mercaptomethanol, 0.025% bromophenol blue]を混ぜ¹⁴⁾、5分間加熱した。試量20 μ lポリアクリルアミド電気泳動ゲル(Bio-Rad, Richmond, CA)に注入し、定電圧下(200 mV/gel)で約45分間、電気泳動を行った。電気泳動ランニングバッファーとして、0.124 mol/L Tris, 0.959 mol/L glycine, 0.5% SDSを用いた。電気泳動ゲルをcoomassie blue(Diversified Biotech, Newton, MA)で染色し¹⁵⁾、乾燥後、吸光度計(DU-70 Spectrometer)でスキャンした。コラーゲンペプチドの分子量は、ポリアクリルアミド電気泳動ゲル上の移動距離から算出した。分子量既知のウシ皮膚 type I コラーゲン(VITROGEN 100, 3.0 mg/ml, Celtrix Laboratories, Palo Alto, CA)を分子量の基準として用いた¹⁶⁾。

免疫ブロット法を用いて、硝子体から抽出した蛋白がタイプIIコラーゲンであることを同定した¹⁷⁾¹⁸⁾。

6. データ解析

データの解析には、ノンパラメトリック検定法(Mann-Whitney U test)を用い、有意水準が5%未満のものを統計学的に有意とした。

III 結 果

1. 細隙灯顕微鏡による観察

硝子体注入6時間後、IL-1 β を1,000 units注入した右眼では、著明な結膜充血、虹彩充血、前房混濁および前部硝子体混濁を認めた。この炎症所見は注入24時間に最も顕著となり、注入3日後においても持続していた。一方、0.1%ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液のみを注入した左眼(対照眼)では、投与24時間後にごく軽度の

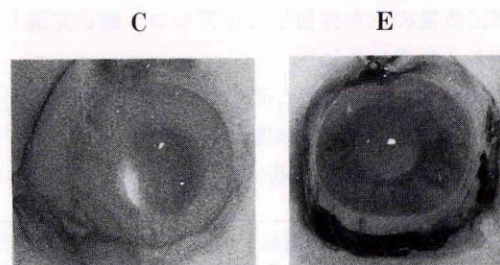


図1 摘出眼球の前眼部写真。

炎症眼(E)では対照眼(C)と比べ、虹彩の充血が著しい。

結膜充血,虹彩充血,および前房中にわずかなフレアを認めるのみであった(図1)。

図2は,摘出眼球の強膜,脈絡膜,網膜を取り除き,硝子体を水晶体後面から鈍的に剝離後,直ちに眼を吊り下げ,硝子体を観察した写真で,炎症眼から摘出した硝子体は対照眼のそれと比べ明らかに混濁しており,固く弾力性がなくなっていた。

2. 前房水蛋白濃度

硝子体注入3日後における前房水蛋白濃度の中央値は,対照眼では3.9 mg/mLで,炎症眼では48.7 mg/mLであり,炎症眼では対照眼と比べ有意に高値であった(表1, $p < 0.05$)。

3. 硝子体液化率

硝子体注入3日後における硝子体液化率の中央値は,対照眼では22%で,炎症眼では47%であった。炎症眼における硝子体液化率は対照眼のそれと比べ有意に高率であった(表2, $p < 0.05$)。

4. 硝子体コラーゲンの変化

図3は,抽出した硝子体コラーゲンを電気泳動サンプルバッファーに溶解したところで,炎症眼からのサンプルには沈殿物が認められ,電気泳動サンプルバッファーに不溶性のコラーゲンが増加していた。

硝子体コラーゲンの電気泳動の結果を図4に示す。レーン1は対照眼,レーン2は炎症眼で,いずれも典型的

なコラーゲンのパターンを示した^{19)~21)}。電気泳動ゲル上の硝子体コラーゲン α -鎖の濃度は炎症眼と対照眼との間に明らかな差を認めないが,炎症眼の β -および γ -成分の濃度は対照眼のそれらと比べ増加していた。 α -鎖に対する β -成分の濃度比は,炎症眼では0.122であり,対照眼の0.106と比べ有意に高率であった(表3, $p < 0.05$)。

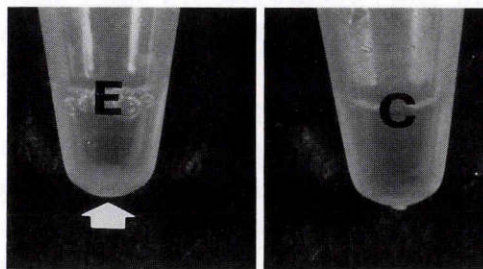


図3 抽出した硝子体コラーゲンを電気泳動サンプルバッファーに溶解したところ。

炎症眼(E)からのサンプルには沈殿物(矢印)が認められ,電気泳動サンプルバッファーに不溶性のコラーゲンが増加している。Cは対照眼からのサンプル。

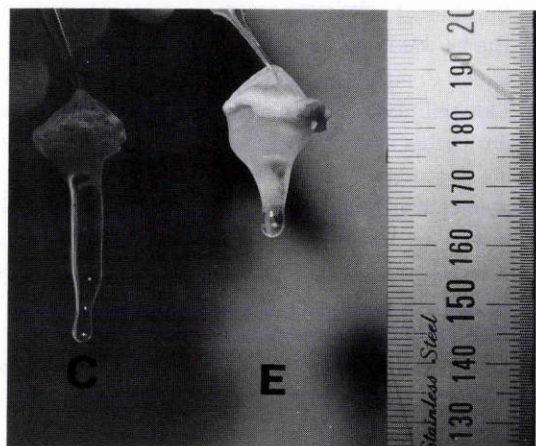


図2 強膜,脈絡膜および網膜を取り除き,硝子体を露出させた眼を吊り下げたところ。

インターロイキン1 β を硝子体注入後3日目の硝子体(E)は弾性に乏しく,対照眼の硝子体(C)と比べ下垂距離が短い。

表1 前房水蛋白濃度 (mg/mL)

対照眼	2.5	3.3	3.9	4.6	5.1
炎症眼	38.8	42.5	48.7	50.1	56.4

表2 硝子体液化率 (%)

対照眼	20	21	22	23	25
炎症眼	45	46	47	53	54

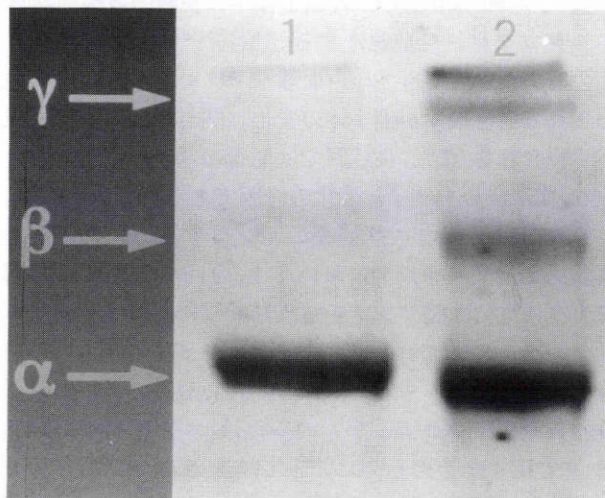


図4 家兎硝子体コラーゲンの sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

レーン1は対照眼から抽出した家兎硝子体コラーゲン。レーン2はインターロイキン1 β を硝子体注入3日後の眼球から抽出した家兎硝子体コラーゲン。矢印の α , β および γ はそれぞれ硝子体コラーゲン α -鎖, β -および γ -成分を示す。硝子体コラーゲン α -鎖の濃度は炎症眼と対照眼との間に明らかな差を認めないが,炎症眼の β -および γ -成分の濃度は対照眼のそれらと比べ増加している。

表3 電気泳動ゲル上の硝子体コラーゲン α -鎖に対する β -成分の濃度比

対照眼	0.103	0.105	0.106	0.108	0.109
炎症眼	0.118	0.118	0.122	0.123	0.126

IV 考 按

実験的眼内炎では硝子体の液化およびゲルの収縮が起こっていた。臨床的にも炎症眼の硝子体ではこれらの変化が認められる。したがって、実験的眼内炎はヒト炎症眼における硝子体変化のモデルとしても有用であると思われる。

炎症眼で認められた α -鎖に対する β -成分の濃度比の増加は、 α -鎖同士が架橋を形成し、 α -鎖の二重合体である β -成分が増加したと推測される。また、電気泳動サンプルバッファーに不溶性なコラーゲンの増加も、コラーゲンの架橋形成に伴い、不溶性タンパクが増加したと考えられる。硝子体のゲル構造は、コラーゲン線維の三次元的格子状構築の間に大量の水を保持したヒアルロン酸が充満して維持されていると考えられており^{1)~3)}、コラーゲンの架橋形成はコラーゲン線維の三次元的格子状構築を崩壊させ、その結果、硝子体ゲルは水を保持できなくなり、硝子体の液化が生じたと推測される。

活性酸素や血清成分が硝子体の液化や硝子体コラーゲンの架橋形成を促すことが報告^{19)~21)}されている。炎症の初期では、多核白血球やマクロファージから放出される活性酸素が組織の障害に最も強く関与していると考えられる²²⁾。実験的眼内炎では、硝子体中に多数の多核白血球やマクロファージが遊走すると報告²³⁾²⁴⁾されており、今回の実験においても多核白血球やマクロファージから放出される活性酸素が硝子体の変化に関与している可能性が示唆される。また、炎症眼では血管の透過性が亢進しており、血清成分も硝子体変化の一因であると推測される。

以前、我々が行った大腸菌のエンドトキシンを用いた実験的眼内炎モデル¹⁸⁾においても、今回の研究結果と同じように電気泳動サンプルバッファーに不溶性な硝子体コラーゲンの増加およびコラーゲン分子における高分子量成分の増加がみられた。したがって、双方の実験結果にみられた硝子体コラーゲンの変化は、エンドトキシンあるいは IL-1 β そのものによって誘発された変化ではなく、眼内の炎症によって誘発された変化であることが裏付けられた。

眼内炎における硝子体変化のメカニズムの解明にはさらなる研究が必要であるものの、本研究から、硝子体コラーゲンの架橋形成が硝子体のレオロジカルな変化に影響を与えることが明らかとなった。

なお、本論文と類似内容の英語論文が Japanese Journal of Ophthalmology に掲載予定となっております。

文 献

- 1) Balazs EA, Denlinger JL: The vitreous. In: Davson H (Ed): The Eye. Academic Press, London, 553—589, 1984.
- 2) Swann D: Chemistry and biology of the vitreous body. Int Rev Exp Pathol 22: 1—64, 1980.
- 3) Sebag J: The Vitreous; Structure, Function,

and Pathobiology. Springer-Verlag, New York, 17—58, 1989.

- 4) Schepens CL: Retinal Detachment and Allied Diseases. WB Saunders, Philadelphia, 672—682, 1983.
- 5) Michels RG, Wilkinson CP, Rice TA: Retinal Detachment. CV Mosby St Louis, 221—224, 1990.
- 6) Hirokawa H, Takahashi M, Trempe CL: Vitreous changes in peripheral uveitis. Arch Ophthalmol 103: 1704—1707, 1985.
- 7) Hikichi T, Trempe CL: Role of the vitreous in the prognosis of peripheral uveitis. Am J Ophthalmol 116: 401—405, 1993.
- 8) Rosenbaum JT, Samples JR, Hefeneider SH, Howes EL Jr: Ocular inflammatory effects of intravitreal interleukin 1. Arch Ophthalmol 105: 1117—1120, 1987.
- 9) Rosenbaum JT, Boney RS: Activity of an interleukin 1 receptor antagonist in rabbit models of uveitis. Arch Ophthalmol 110: 547—549, 1992.
- 10) Bhattacharjee P, Henderson B: Inflammatory responses to intraocularly injected interleukin 1. Curr Eye Res 6: 929—934, 1987.
- 11) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, et al: Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76—85, 1985.
- 12) Ueno N, Sabag J, Hirokawa H, Chakrabarti B: Effects of visible light irradiation on vitreous structure in the presence of photosensitizer. Exp Eye Res 44: 863—870, 1987.
- 13) Burke JM: An analysis of rabbit vitreous collagen. Connect Tissue Res 8: 49—52, 1980.
- 14) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680—685, 1970.
- 15) Armendriz-Borunda J, Rojkind M: A sample quantitative method for collagen typing in tissue samples. Its application to human liver with schistosomiasis. Collagen Rel Res 4: 35—47, 1984.
- 16) Kuhn K: Type classical collagens: Type I, II, and III. In: Mayne R, et al (Eds): Structure and Function of Collagen Types. Academic Press, Orlando, 1—42, 1987.
- 17) Kyhse-Andersen J: Electrophoretic transfer of multiple gels: A sample apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10: 203—209, 1984.
- 18) Hikichi T, Ueno N, Chakrabarti B, Trempe CL, Yoshida A: Evidence of cross-link formation of vitreous collagen during experimental ocular inflammation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234: 47—54, 1996.
- 19) Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B: Molecular mechanisms of posterior vitreous detachment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231: 408—412, 1993.

- 20) **Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B:** Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Res* 13: 505—512, 1994.
 - 21) **Kakehashi A, Ueno N, Chakrabarti B:** Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. *Ophthalmic Res* 26: 51—59, 1994.
 - 22) **Rao NA:** Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 138: 787—850, 1990.
 - 23) **Bhattacharjee P, Williams RN, Eakins KE:** An evaluation of ocular inflammation following the injection of bacterial endotoxin into the rat foot pad. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 196—202, 1983.
 - 24) **Csukas S, Paterson CA, Brown K, Bhattacharjee P:** Time course of rabbit ocular inflammatory response and mediator release after intravitreal endotoxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 382—387, 1990.
-