

網膜剝離眼の硝子体液と網膜下液における vascular endothelial growth factor 濃度

諸見里安史, 林 英之, 加藤 整, 尾崎 弘明, 大島 健司

福岡大学医学部眼科学教室

要 約

網膜剝離眼における血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)の産生, 放出を検討した。裂孔原性網膜剝離眼から採取した網膜下液 11 検体, および増殖性硝子体網膜症眼から採取した硝子体液 9 検体の VEGF 濃度を酵素免疫測定法で定量した。一方, 増殖糖尿病網膜症眼から得られた硝子体液 6 検体の VEGF 濃度を同様に定量して, 比較検討した。VEGF 濃度は, 網膜剝離眼の網膜下液では 1.2 ± 1.2 ng/ml (平均値 \pm 標準偏差), 増殖性硝子体網膜症の硝子体液では 0.5 ± 1.1 ng/ml であり, 増殖糖尿病網膜症の硝子体液 5.0 ± 2.8 ng/ml に比べ, 両者とも有意に低かった。網膜

剝離眼には少ないながらも VEGF が存在することがわかった。このことは, 網膜神経上皮層の虚血が VEGF の発現を促す可能性を示唆すると思われた。網膜剝離眼には血管新生は認められなかったが, この理由として, 生物学的な血管新生発症の閾値よりも VEGF 濃度が低いことや血管新生抑制因子の関与が疑われた。(日眼会誌 101: 498—502, 1997)

キーワード: 血管内皮増殖因子(VEGF), 網膜下液, 裂孔原性網膜剝離, 血管新生抑制因子, 酵素免疫測定法

Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor within the Subretinal Space and Vitreous Fluid in Rhegmatogenous Retinal Detachment

Yasufumi Moromizato, Hideyuki Hayashi, Hitoshi Kato,
Hiroaki Ozaki and Kenji Oshima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University

Abstract

To determine the increased production and release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from the retina in the eye with non-angiogenic retinal detachment in which relative blood supply disturbance may be present, the concentration of VEGF in subretinal fluid and vitreous fluid collected from the eyes was investigated by enzyme linked immunospecific assay. The average concentration of VEGF was 0.5 ± 1.1 ng/ml (mean \pm standard deviation) in nine samples of vitreous fluid collected from proliferative retinal detachment, and was 1.2 ± 1.2 ng/ml in eleven samples of subretinal fluid from rhegmatogenous retinal detachment. The concentration of VEGF in six samples of vitreous fluid from angiogenic diabetic eyes (5.0 ± 2.8 ng/ml) was significantly higher than in the samples from eyes with

retinal detachment. The results suggest that the relative ischemic insult to the detached retina increases the release of VEGF into the vitreous cavity and subretinal space. The increased concentration of VEGF does not induce remarkable angiogenesis since the concentration is lower than the biological threshold, or the effect is modulated by inhibitors. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 498—502, 1997)

Key words: Vascular endothelial growth factor (VEGF), Subretinal fluid, Rhegmatogenous retinal detachment, Angiogenesis inhibitor, Enzyme linked immunospecific assay (ELISA)

別刷請求先: 814-80 福岡県福岡市城南区七隈 7-45-1 福岡大学医学部眼科学教室 諸見里安史
(平成 8 年 7 月 15 日受付, 平成 9 年 1 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Yasufumi Moromizato, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma, Jyounan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 814-80, Japan

(Received July 15, 1996 and accepted in revised form January 27, 1997)

I 緒 言

血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: 以下, VEGF)は,血管新生のすべての過程を促進し^{1)~3)},血管内皮を特異的に増殖させる作用がある⁴⁾⁵⁾. Acidic-fibroblast growth factor や basic-fibroblast growth factor⁶⁾⁷⁾, platelet-derived endothelial cell growth factor⁸⁾⁹⁾などの増殖因子とは異なり, VEGF はシグナル配列をもつため,細胞から分泌される形で局所に発現すると考えられる¹⁰⁾. 加えて,その受容体は血管内皮細胞にほぼ限局するため¹¹⁾¹²⁾,主要な血管新生因子として近年注目されている¹³⁾. また, VEGF は,細胞の低酸素状態,あるいは組織の虚血によって産生,放出が増加することが知られ⁴⁾¹⁴⁾¹⁵⁾,増殖糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症などの血管閉塞病変による網膜の虚血で,網膜血管新生や虹彩血管新生を起こしている眼の眼内液には VEGF が高濃度に認められている^{16)~18)}. 一方で,網膜血管閉塞病変を伴わない眼病変においても,網膜剥離眼の眼内には VEGF の増加が確認され¹⁶⁾,様々な虚血の程度で VEGF が発現する可能性が示唆される. しかし,網膜剥離の VEGF に関する詳細な報告はなく,さらなる検討が必要と思われる. そこで,今回我々は,網膜血管閉塞病変を伴わない網膜剥離眼の硝子体腔,網膜下腔の各 compartment における眼内液の VEGF 濃度を検索した.

II 対象と方法

1. 対 象

裂孔原性網膜剥離 11 例から強膜内陷術,網膜下液排出術施行時に採取した網膜下液 11 検体,および増殖性硝子体網膜症(proliferative vitreoretinopathy, PVR)を伴った裂孔原性網膜剥離 9 例から硝子体手術施行時に採取した硝子体液 9 検体を対象とした(表 1~3). 裂孔原性網膜剥離はいずれも初回手術で,内訳は男性 6 例,女性 5 例,年齢 15~71 歳(平均年齢 52.8 歳),剥離範囲は 1~4 象限,剥離期間は眼科医による診断を受けるか,もしくは視野欠損を自覚してから手術日までの期間とした場合,2 週~9 か月であった. PVR は男性 5 例,女性 4 例,年齢 16~74 歳(平均年齢 49.1 歳),剥離範囲は 1~4 象限,剥離期間は 6 日~6 か月であった. 一方,網膜血管閉塞病変と比較するために,増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy, PDR) 6 例から硝子体手術施行時に採取した硝子体液 6 検体を検討した. PDR の全例が非インスリン依存型糖尿病で,男性 4 例,女性 2 例,年齢 38~61 歳(平均年齢 49.6 歳),検体を採取した眼は,全例に網膜新生血管,増殖組織,牽引性網膜剥離を発症していた(福田分類 B VI).

2. 方 法

1) 採取方法

網膜下液は,網膜剥離手術の際に強膜に十分な止血を

表 1 裂孔原性網膜剥離群の臨床的特徴と VEGF 濃度

症例	性	年齢(歳)	剥離期間	剥離範囲(象限)	VEGF 濃度 (ng/ml)
1	男	47	3 週	2	1.8
2	男	56	4~6 週	2	測定限界以下
3	女	67	9 か月	3	2.0
4	男	63	3~4 週	2	2.3
5	女	49	5 か月	1	0.53
6	女	66	2 週	3	1.4
7	女	71	18 日	2	1.4
8	男	66	2 週	2	測定限界以下
9	女	63	2 週	4	測定限界以下
10	男	15	20 日	2	測定限界以下
11	男	18	2 週	1	3.5

VEGF: Vascular endothelial growth factor

表 2 増殖性硝子体網膜症群の臨床的特徴と VEGF 濃度

症例	性	年齢(歳)	剥離期間	剥離範囲(象限)	VEGF 濃度 (ng/ml)
1	男	74	2 週	2	測定限界以下
2	女	63	3 週	4	0.44
3	女	67	6 か月	3	測定限界以下
4	男	56	2 か月	1	測定限界以下
5	女	63	4 か月	2	測定限界以下
6	男	16	2 週	4	3.4
7	男	64	4 週	2	測定限界以下
8	女	21	9 日	4	0.23
9	男	18	6 日	4	0.72

表 3 増殖糖尿病網膜症群の臨床的特徴と VEGF 濃度

症例	性	年齢(歳)	虹彩血管新生	VEGF 濃度 (ng/ml)
1	女	40	-	2.9
2	男	43	+	7.6
3	男	57	-	3.2
4	男	61	-	2.6
5	男	59	-	4.2
6	女	38	-	9.3

加えた後,強膜を切開し,露出した脈絡膜を穿刺して排液した網膜下液を無菌的,かつ人工涙液および出血の混入を避けるよう注意しつつ,ヒーロン針を装着した注射筒により採取した.硝子体液については,通常硝子体手術を行う際,毛様体扁平部に 3 ポートを作製した後,眼内灌流を行う前に注射筒に装着した 23 ゲージ針をポートから眼内に挿入し,眼内灌流液の混入を避け,液化硝子体を採取した.採取した検体は速やかに冷凍し,測定直前まで -20°C で保存した.

2) VEGF 測定

R & D SYSTEMS 社製 Quantikine® を使用して,各検体中の VEGF 濃度を酵素免疫測定法(最小測定限界値 5.0 pg/ml)で定量し検討した.抗 VEGF モノクローナル抗体を固相化したポリスチレン製のマイクロタイタープレートに各ウェルに検体およびキャリブレーターをそれ

それぞれ 200 μ l ずつ二重に注入し、室温で 2 時間抗原抗体反応を行い、結合しなかった抗原を洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼを標識した。固相に用いた抗体と異なるエピトープを認識する抗 VEGF ポリクローナル抗体を加え、固相上の抗 VEGF モノクローナル抗体に結合してプレートに残った VEGF と室温で 2 時間反応させた後、余分な抗体を洗浄、酵素反応基質液で発色させ、各ウェルの吸光度を測定（いずれも二重測定）して二重測定の平均値を算出、キャリブレーションの測定値から検量線を作成し、各検体の VEGF 濃度を検量した。

3) 統計学的検討

統計解析は、Student の unpaired-t 検定、および 3 群以上の比較には分散分析を行った後、Post-hock test として Fisher の PLSD 法を用いた。

III 結果

各検体の測定結果を表 1～3 および図 1 に示す。裂孔原性網膜剥離では、採取した網膜下液の 11 検体中 7 検体に VEGF が検出され、値は測定限界以下から最大 3.5 ng/ml、平均濃度は 1.2 ± 1.2 ng/ml (平均値 \pm 標準偏差) であった。網膜剥離眼の硝子体液では、9 検体中 4 検体に VEGF が検出され、値は測定限界以下から最大 3.4 ng/ml、平均濃度は 0.5 ± 1.1 ng/ml であった。PDR では、測定した硝子体液 6 検体中すべてに VEGF が検出され、値は 2.6 ng/ml から最大 9.3 ng/ml、平均濃度は 5.0 ± 2.8 ng/ml であった。虹彩新生血管を認めた症例 2 は 7.6 ng/ml と高値を示し、また、9.3 ng/ml と最も濃度の高かった症例 6 は、硝子体手術後に虹彩新生血管を発症した例であった。3 群を比較すると、網膜剥離眼の硝子体液と網膜下液の VEGF 濃度は、PDR 眼の VEGF 濃度よりも有意に低かった。剥離範囲や剥離期間の違いと VEGF 濃度との間には統計学的な関連はみられなかった。

IV 考 按

組織が虚血に陥ると VEGF の発現がみられる⁴⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。PDR、網膜静脈閉塞症、未熟児網膜症などの網膜血管病変^{16)~18)}では、眼内 VEGF 濃度が増加し、血管新生の発症に大きな役割を果たしていると考えられている。また、眼内の VEGF の増加は程度の差こそあれ、網膜血管閉塞がない疾患でもみられる。既に、Aiello ら¹⁶⁾は網膜剥離において VEGF が高濃度に存在していることを報告している。しかし、網膜剥離眼の眼内に生じる網膜下腔と硝子体腔の 2 つの compartment における VEGF の差異や、これらの compartment が交通している裂孔原性網膜剥離と交通していない非裂孔原性網膜剥離のそれぞれの場合や、PVR の合併の有無が眼内 VEGF 濃度にどのような影響を及ぼすか未だ明白ではない。今回、裂孔原性網膜剥離眼の網膜下液と硝子体液について検討したところ、両

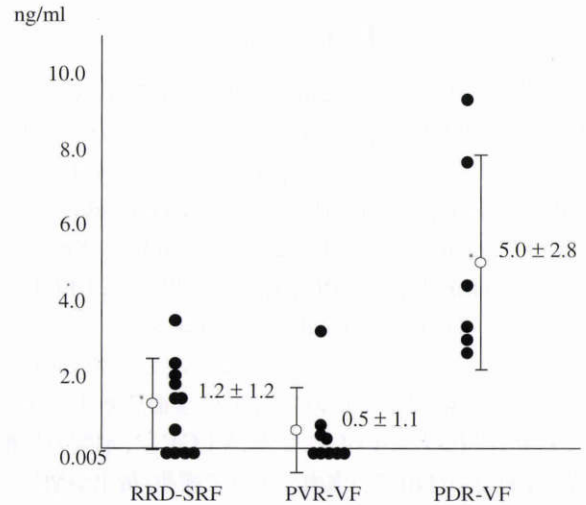


図1 各検体の vascular endothelial growth factor 濃度。

数字は平均値 \pm 標準偏差 (ng/ml)。比較には分散分析を行った後、Post-hock test として Fisher の PLSD 法を用いた。*: $P = 0.0002$

RRD-SRF: 裂孔原性網膜剥離網膜下液, PVR-VF: 増殖性硝子体網膜症硝子体液, PDR-VF: 増殖糖尿病網膜症硝子体液。

群とも同程度に VEGF が存在していることが確認された。PVR の発症は、血液網膜柵が破壊され、血液中の増殖因子や網膜色素上皮細胞が眼内に移行すると、線維性変化が誘発されることが考えられる。条件の異なる両群の比較は難しいが、PVR の重症例であっても VEGF 濃度に大きな差がなかったことは、VEGF が局所での産生を主体とし、血液内にはほとんど存在しないことに矛盾していない。

網膜虚血実験モデルでは、虚血部網膜にのみ VEGF メッセンジャー RNA (mRNA) の強い発現がみられ¹⁹⁾²⁰⁾、このことから眼内の VEGF は虚血網膜に由来すると推定される。網膜剥離眼の眼内 VEGF の起源は明白ではないが、一つの可能性として、脈絡膜循環を受ける網膜神経上皮層の虚血に起因すると考えられる。おそらく視細胞の関与が疑われるが、Pe'er ら²¹⁾の剥離網膜の外顆粒層に VEGF mRNA の発現を認めた報告はこれを裏付け、網膜剥離によって生じる網膜の代謝の変化と VEGF には密接な関係が示唆される。また、網膜色素上皮細胞は *in vitro* の実験で VEGF を産生することが知られているが、網膜剥離によって神経網膜の覆いなくなり、眼内腔へ曝された網膜色素上皮細胞や、遊走増殖した網膜色素上皮細胞が VEGF を放出している可能性は十分に考えられる。

Aiello ら¹⁶⁾の報告では、剥離期間が 3 週を超える網膜剥離の眼内 VEGF 濃度がそれ未満の群に比べ有意に高い値であり、時間の経過によって眼内 VEGF が増加していくことが推測される。しかし、我々の結果では剥離期間と VEGF 濃度に相関は得られなかった。測定値には網膜

下腔の体積や剥離した網膜の面積など、他の要素が関与している可能性がある。今回の結果では、剥離した範囲と VEGF の値に相関は得られていないが、網膜下腔の体積が測定値へ影響を及ぼしている可能性は否定できない。

それでは、この網膜剥離眼の VEGF は何らかの働きをしているのであろうか。腫瘍やリウマチ様関節炎、様々な眼内血管新生病変で VEGF と血管新生は密接な関係が認められているが¹³⁾、今回眼内液を採取した網膜剥離眼では、VEGF の存在にもかかわらず、いずれの症例にも血管新生は認められなかった。網膜下液の VEGF 濃度 1.2 ± 1.2 ng/ml は、PDR 眼の VEGF 濃度 5.0 ± 2.8 ng/ml に比較して統計学的に有意に低く ($P=0.0002$)、*in vivo* における眼内血管新生を発症させる VEGF の閾値は、これを超えるものと考えべきであろう。ところが、今回測定した網膜下液の VEGF 濃度は、*in vitro* では血管内皮に対し十分に増殖能を示す値である¹⁶⁾。だとすると、網膜剥離眼に血管新生がみられないのは、VEGF 濃度が単に生物学的な活性を示すに至っていないわけではなく、眼内に platelet factor-4²²⁾ や thrombospondin²³⁾ などの血管新生抑制因子²⁴⁾ が優位に存在している可能性を示唆するものである。臨床的に血管新生の治療を考える場合、VEGF を中和抗体などで直接標的にする²⁵⁾²⁶⁾ ことのみならず、網膜剥離眼に存在すると考えられる血管新生抑制因子の探索は深い意義をもつと思われる。生理的な血管新生抑制因子は未だはっきりわかっておらず²⁴⁾、網膜下液の検索によって血管新生抑制機構のより一層の解明ができることを期待したい。

本論文の要旨は、第 100 回日本眼科学会総会(京都)で発表した。

文 献

- 1) **Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 902-906, 1991.
- 2) **Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, et al:** Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 152: 4149-4156, 1994.
- 3) **Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J:** Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69: 508-517, 1993.
- 4) **Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Leung DW:** Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocro Rev* 13: 18-32, 1992.
- 5) **Senger DR, Van De Walter L, Brown LF, Nagy JA, Yeo K-T, Yeo T-K, et al:** Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12: 303-324, 1993.
- 6) **Abrahams JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, et al:** Human nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233: 545-548, 1986.
- 7) **Abrahams JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, et al:** Human basic fibroblast growth factor: Nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J* 5: 2523-2528, 1986.
- 8) **Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu I-M, Ravera MW, et al:** Human endothelial cell growth factor: Cloning, nucleotide sequence and chromosome localization. *Science* 233: 541-545, 1986.
- 9) **Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, et al:** Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338: 557-562, 1989.
- 10) **Leung DW, Cachianes G, Kaung WJ, Goeddel KV, Ferrara N:** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989.
- 11) **Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR:** A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9026-9030, 1991.
- 12) **Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N:** Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89: 244, 1992.
- 13) **Ferrara N:** Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 3: 244-250, 1993.
- 14) **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E:** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845, 1992.
- 15) **Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J:** Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *Lab Invest* 71: 374-379, 1994.
- 16) **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al:** Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487, 1994.
- 17) **Adams AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al:** Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450, 1994.
- 18) 尾崎弘明, 林 英之, 大島健司, 今永至親, 黒木政秀, 荒川文子, 他: 増殖性糖尿病網膜症眼の硝子体内に

- における血管内皮増殖因子の検出. 日眼会誌 100: 208—212, 1996.
- 19) **Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al:** Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 145: 574—584, 1994.
- 20) **Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH:** Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 905—909, 1995.
- 21) **Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H, Keshet E:** Hypoxia-induced expression of Vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest* 72: 638—645, 1995.
- 22) **Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, et al:** Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247: 77—79, 1990.
- 23) **Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP:** Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56: 345—355, 1989.
- 24) **林 英之:** 血管新生促進因子・抑制因子. 石橋達郎(編): 眼科 New Nnsight 3, 眼内血管新生疾患, メデカルビュー, 東京, 21—29, 1994.
- 25) **Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, et al:** Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114: 66—71, 1996.
- 26) **Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al:** Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10457—10461, 1995.