

第 107 回 日本眼科学会総会 宿題報告IV

硝子体の病態生理

硝子体の細胞反応：ヒアロサイトについて

坂本 泰二

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科視覚疾患学

共同研究者

園田 康平, 畑 快右, 江内田 寛, 久富 智朗, 野田 佳宏, 喬 紅, 宮崎 美穂
 松本 博善, 上野 暁史, 中村多賀雄, 山中 一郎, 石橋 達朗(九州大学大学院医学研究院視覚病態学)
 山下 高明, 木村 勝哲, 山切 啓太, 内野 英輔, 土居 範仁, 中尾久美子
 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科視覚疾患学)

上村 昭典(鹿児島市立病院眼科)

向野 利寛(福岡大学筑紫病院眼科)

要 約

硝子体には、ヒアロサイトと呼ばれる細胞が存在するが、生物学的特性、生体反応における役割は解明されていない。そこで、ヒアロサイトの細胞学的性質、ヒアロサイトを介した免疫反応、ヒアロサイトに注目した治療法について検討した。ラットのヒアロサイトを免疫組織化学的に染色すると、90%以上がED1抗体に陰性でED2抗体に陽性であるので、ヒアロサイトは硝子体で分化した組織マクロファージであることがわかった。Green fluorescent protein (GFP)-マウス骨髄を移植した野生型マウス(キメラマウス)の硝子体を観察すると、数か月の単位でヒアロサイトは骨髄細胞と入れ替わるので、ヒアロサイトは骨髄由来であることがわかった。培養ウシヒアロサイトは、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF-2)により増殖が促進され、トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)により増殖が抑制された。特に、PDGF-BBは濃度依存性に培養ヒアロサイトの増殖能を亢進し、この効果は、MEK1を介した細胞内シグナル伝達経路を介した作用であった。一方、PDGFは濃度依存性にヒアロサイトの遊走を刺激したが、それには、PI3Kやp38 MAPKを介した経路が重要であった。眼内増殖性病変の増悪過程に、硝子体ゲル収縮による続発性網膜剝離が大きな要因となっ

ている。コラーゲンゲル中に細胞を包埋培養すると、ゲルは収縮する。同モデルを用いてヒアロサイトのゲル収縮能を定量すると、PDGF、TGF- β が有意にゲル収縮を促進した。その作用は、網膜グリア細胞、網膜色素上皮細胞より強く、Rho kinase, p44/42 MAPK, PKCが重要な働きをしていた。次にヒアロサイトの生体反応について調べた。眼球には炎症を抑える仕組みがあり、免疫学的に特殊な臓器である。我々は硝子体による免疫偏位をvitreous cavity-associated immune deviation (VCAID)と命名した。B6マウスの硝子体内に抗原を投与し、7日後に同抗原をアジュバンドとともに皮下投与して遅延型過敏反応を惹起する。その後、抗原を耳朶に投与して、その腫脹を測定することで全身遅延型過敏反応を評価した。その結果、硝子体内に抗原が暴露されると、その抗原に対する細胞性免疫が特異的に抑制される現象(VCAID)が存在することがわかった。VCAIDは、実験的自己免疫性ぶどう膜炎などの硝子体内の炎症が強い状態では、誘導が停止された。VCAIDの誘導には抗原提示細胞の作用が重要であり、抗原注入時の所見から、ヒアロサイトが抗原提示細胞であることがわかった。最後にヒアロサイトに関わる疾患として、糖尿病黄斑症について検討した。硝子体手術の際に、triamcinolone acetonide (TA)を用いて観察すると、薄い硝

別刷請求先：890-8582 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科視覚疾患学 坂本 泰二
 (平成15年7月7日受付、平成15年9月17日改訂受理)

Reprint requests to: Taiji Sakamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences. 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8582, Japan

(Received July 7, 2003 and accepted in revised form September 17, 2003)

硝子体皮質が網膜面状に残留しているのが観察され、その中には多数のヒアロサイトが存在していた。このヒアロサイトは VEGF などを分泌して網膜病変を増悪させるので、TA を用いて硝子体皮質とヒアロサイトを除去する手術(硝子体皮質除去術)を、糖尿病黄斑症眼に対して行った。予備的な結果では、好成績が得られており現在も続行中である。ヒアロサイトは眼内の環境維持に重要

な働きをしており、ヒアロサイト研究は新たな治療や病態の解明への道を拓くものである。(日眼会誌 107 : 866—883, 2003)

キーワード：ヒアロサイト, 硝子体, 硝子体関連免疫偏位, VCAID, 増殖硝子体網膜症

A Review

Cell Biology of Hyalocytes

Taiji Sakamoto

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Abstract

There is a group of cells, called hyalocytes, in the cortical vitreous. Although hyalocytes were discovered more than a hundred years ago, the molecular and cellular biological characteristics of hyalocytes have yet to be elucidated. In this study, we investigated various aspects of hyalocytes and, also performed triamcinolone acetonide (TA)-assisted vitrectomy to remove the hyalocytes for diabetic macular edema. Immunohistochemical analysis of rat eyes showed that 90% of hyalocytes were negative for ED1 but positive for ED2, indicating that hyalocyte is a tissue macrophage. Chimeric mice were created by transplanting bone marrow from green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice into irradiated wild-type mice, showing the origin of hyalocyte to be bone marrow cells. Bovine hyalocytes were cultured successfully. The proliferation of hyalocytes was significantly enhanced by hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and fibroblast growth factor (FGF-2) and inhibited by transforming growth factor (TGF)- β . Among these, PDGF-BB stimulated the proliferation most potently through the MEK1 pathway. Hyalocyte migration assessed by double chamber assay was also stimulated by PDGF-BB and it was mediated by the PI3K and p38 MAPK pathways. Cellular contraction of hyalocyte was significantly enhanced by PDGF-BB and TGF- β through Rho kinase, p44/42 MAPK, and protein kinase C pathways, as measured by collagen gel contraction

assay. Next, the relationship between the vitreous cavity (VC) and the immune system was studied after intravitreal inoculation with ovalbumin (OVA). Injection of OVA into the VC of C57BL/6 mice resulted in suppressed systemic cell-mediated immunity to OVA as determined by the ear swelling assay. This aberrant immune responsiveness following VC injection of OVA was termed VC-associated immune deviation or VCAID. The phenomenon of VCAID was mediated by intravitreal antigen-presenting cells. The histological study of chimeric mice showed these cells to be intravitreal residential cells, namely hyalocytes. VCAID was abolished by intravitreal inflammation such as experimental autoimmune uveitis. Finally, TA-assisted vitrectomy for diabetic macular edema was performed to remove cortical vitreous, because it contained many hyalocytes which could secrete inflammatory cytokines including VEGF. Although the number of treated eyes was limited, the surgical results have been favorable so far. The investigation of hyalocytes would open a new avenue for better understanding and development of treatment for various vitreo-retinal diseases. (J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 866—883, 2003)

Key words : Hyalocyte, Vitreous body, Vitreous cavity-associated immune deviation, VCAID, Proliferative vitreoretinopathy

I 緒 言

手術・薬物療法の進歩により多くの網膜硝子体疾患が克服されてきたが、増殖硝子体網膜症や増殖糖尿病網膜

症などの眼内増殖性疾患は現在でも治療が困難であり、患者の視力回復は容易ではない。それら疾患の硝子体中には、網膜色素上皮細胞、網膜グリア細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどが存在しており、それぞれの病

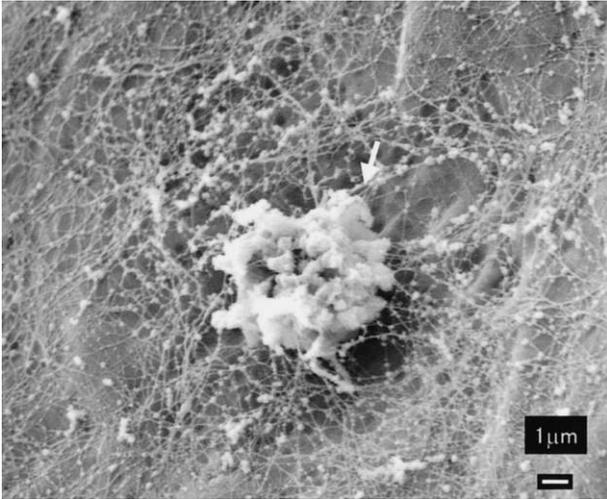


図 1 ラット硝子体の走査電子顕微鏡写真。細胞突起をもつ細胞が網膜表面にみられる(矢印)。ヒアロサイトと思われる。

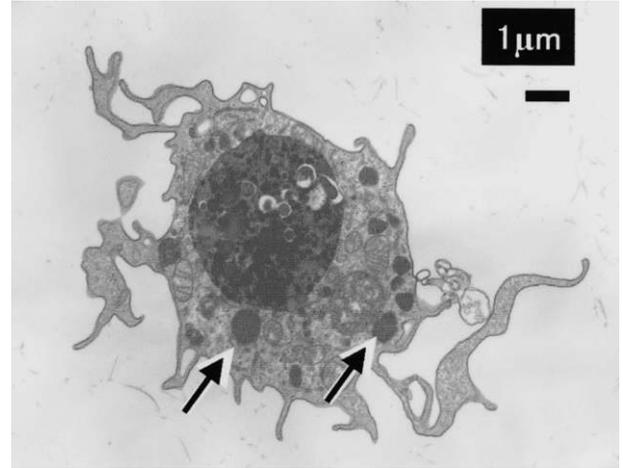


図 2 ウシの硝子体の透過電子顕微鏡写真。多数の細胞突起をもちライソゾーム顆粒(矢印)を細胞質に多数含む細胞(ヒアロサイト)が存在する。

態形成に重要な役割を果たしていると考えられてきた。しかし、生理的状态の硝子体中には極めてわずかな細胞しか存在しない。この細胞は、網膜と硝子体境界部の硝子体皮質といわれる部に特に多く集まっており、ヒアロサイト(hyalocyte)と命名されている¹⁾²⁾。網膜に比べると硝子体のヒアロサイトが患者視力に及ぼす影響は小さいと考えられていたためか、ヒアロサイトについては眼内の他の細胞と比べてあまり研究がされておらず、その性格・役割などは現在でも確定されていない。そこで、本稿ではヒアロサイトの分布、免疫学的性格、生物学的役割について述べる。また、ヒアロサイトが豊富に存在する硝子体皮質を除去する手術(硝子体皮質除去手術)についても述べる。

II ヒアロサイトについて

1. ヒアロサイトの存在と分布

硝子体はコラーゲンゲルと水分で構成される空間であり、生理的状态では細胞はほとんど存在しない。成人の硝子体に関する記述としては、これはあながち誤ったものとはいえない。発生段階では、硝子体腔に硝子体細胞といわれる沢山の細胞があり、発生後期にはこれらの細胞が中心になって硝子体を作り出す³⁾。しかし、次第にその数を減少させて行き、さらに成人になると硝子体皮質といわれる網膜あるいは毛様体付近の硝子体にしか存在しなくなる。この細胞については、単一核と多数の細胞突起を持ち紡錘形、扁平から卵型までの様々な形態を取り得る細胞として古くから報告されており、最近では硝子体を形成するのみならず、硝子体動脈の消失や網膜の発達に重要であると考えられている^{4)~9)}。この細胞は Balazs²⁾により始めてヒアロサイト(hyalocyte)として命名された。このヒアロサイトは、ヒトを含む多くの動

物の硝子体にもみられる¹⁰⁾¹¹⁾。ラットの硝子体を機械的に取り去り、硝子体側から走査電子顕微鏡で観察すると、残存硝子体と思われるメッシュ構造の中に扁平から円形で多数の細胞突起をもつヒアロサイトと思われる細胞がみられる(図1)。一方、ウシの硝子体を位相差顕微鏡で観察すると、周辺に細胞が集まっている。この細胞を透過電子顕微鏡で観察すると、細胞突起をもちライソゾーム顆粒を細胞質に多数含むヒアロサイトが存在する(図2)。

このヒアロサイトは硝子体の中に均一に分布しているわけではなく、主に周辺の硝子体に集まっている。そこで、その分布状態をラット、ブタ、ウシの眼球について調べた。それぞれ、毛様体周辺、赤道部、後極部の網膜を含む光学顕微鏡切片を作製し、ウシ、ブタでは、1切片当たりのヒアロサイト数を、ラットでは眼球当たりのヒアロサイト数を1眼につき6切片以上計測して平均を算出した。その結果、ラットとブタではやや毛様体付近に多く分布しているものの、赤道部、後極部にも一定数のヒアロサイトが分布していることがわかった(図3)。これは、以前に報告されたもののほぼ同様の結果である⁴⁾。人眼の検索は行っていないが、眼球の構造および遺伝子の類似性から、ヒトでもほぼ同様に分布していることが推測される。

2. ヒアロサイトの性格

先に述べたように、発生段階には多数存在する硝子体細胞が、成長するにつれ著しく数を減少させることから、ヒアロサイトは発生段階では硝子体成分を産生する作用があると推測されてきた。このことは Newsome³⁾により証明されたが、成体でも同様に硝子体産生作用があるか否かはわかっていない。細胞の生体下における機能を直接証明することは困難であるが、最近では細胞マーカーを調べることで、細胞の性格・役割をおおまか

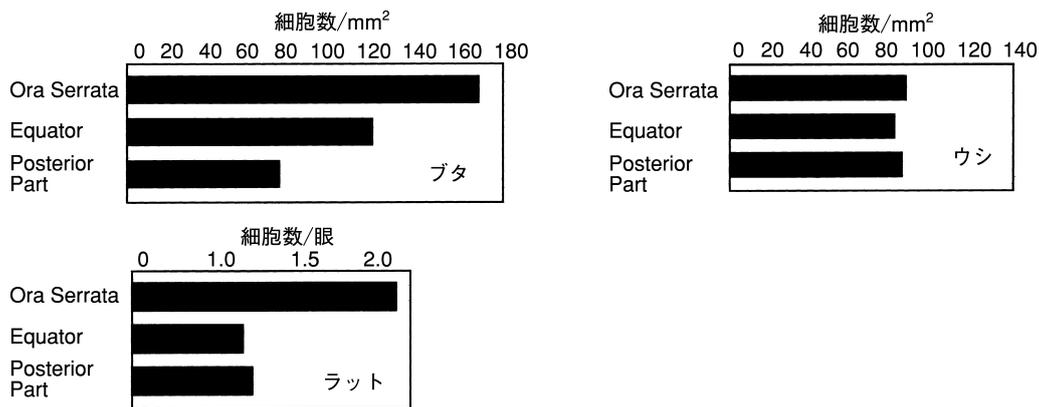


図 3 ヒアロサイトの硝子体中の分布.

ラット、ブタ、ウシの硝子体について、毛様体周辺、赤道部、後極部の網膜を含む光学顕微鏡切片を作製し、ウシ、ブタでは、1切片当たりのヒアロサイト数を、ラットでは1眼当たりのヒアロサイト数を1眼につき6切片以上計測して平均を算出した。その結果、ラットとブタではやや毛様体付近に多く分布しているものの、赤道部、後極部にも一定数のヒアロサイトが分布していることがわかった

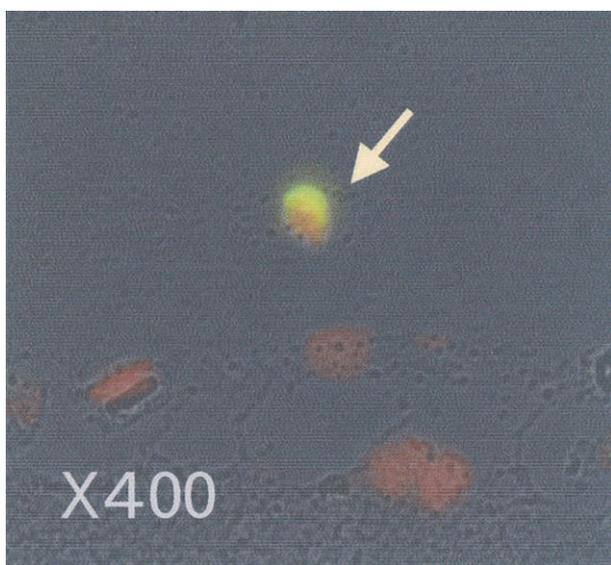


図 4 ラット眼球の免疫組織化学光学顕微鏡写真(ED 1).
ヒアロサイトのほとんどは ED 1 陰性であるが、ごく一部に陽性のものもみられた(矢印).

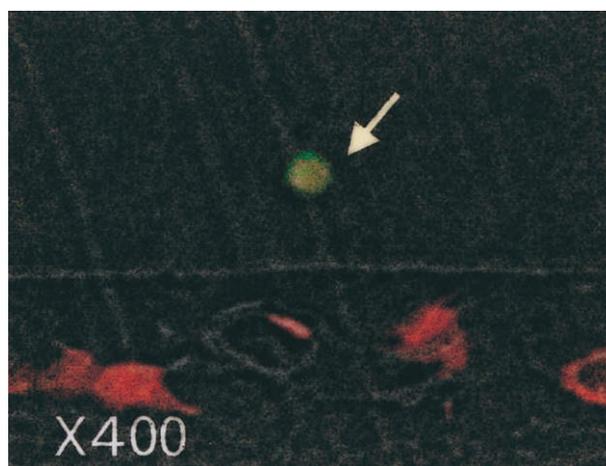


図 5 ラット眼球の免疫組織化学光学顕微鏡写真(ED 2).
ヒアロサイトの 90% 以上は ED 2 陰性である(矢印).

に推測することが可能になってきた。ヒアロサイトは形態学的特徴から、マクロファージに関連する細胞あるいはグリア細胞であることは古くから推測されてきたし、最近の Lazarus らの研究でも monocyte/macrophage lineage に属することは示されてきた⁷⁻¹¹⁾。そこで、ED 1, ED 2, glial fibrillary acidic protein(GFAP) に対する抗体を用いてラットのヒアロサイトを免疫組織化学的に検索した。その結果、ヒアロサイトの 90% 以上は ED 1 陰性であるが、ED 2 陽性、しかも GFAP は陰性であった(図 4, 5)。GFAP はグリア細胞、ED 1 は未分化マクロファージ系細胞、ED 2 は分化が進んだマクロファージ系細胞のマーカーであるので、ヒアロサイトは分化が進んだ硝子体特有のマクロファージである

ことがわかった¹⁴⁾¹⁵⁾。ヒトのヒアロサイトについての研究は極めて限られているが、その中で Grabner ら¹²⁾はヒアロサイトはエステラーゼ染色の結果が血中の単球とは明らかに異なるので、分化が極めて進んだ単球の一部であろうと結論している。今回の結果は、その結果とも矛盾しないことから、「ヒアロサイトは硝子体あるいは眼内で高度に分化した組織マクロファージである」と結論してもよさそうである。

3. ヒアロサイトの起源

ヒアロサイトの性格がわかっていなかったように、ヒアロサイトの起源についても詳細はわかっていなかった。古くは、ヒアロサイトが硝子体動脈の周りに多いという理由から、胎生期の残留血管組織由来であるとされたり、硝子体の周りは大部分が neurodermal 由来の組織で被われているので、microglia 由来ではないかと推測されたりした⁴⁾。先述したように、ヒアロサイトは

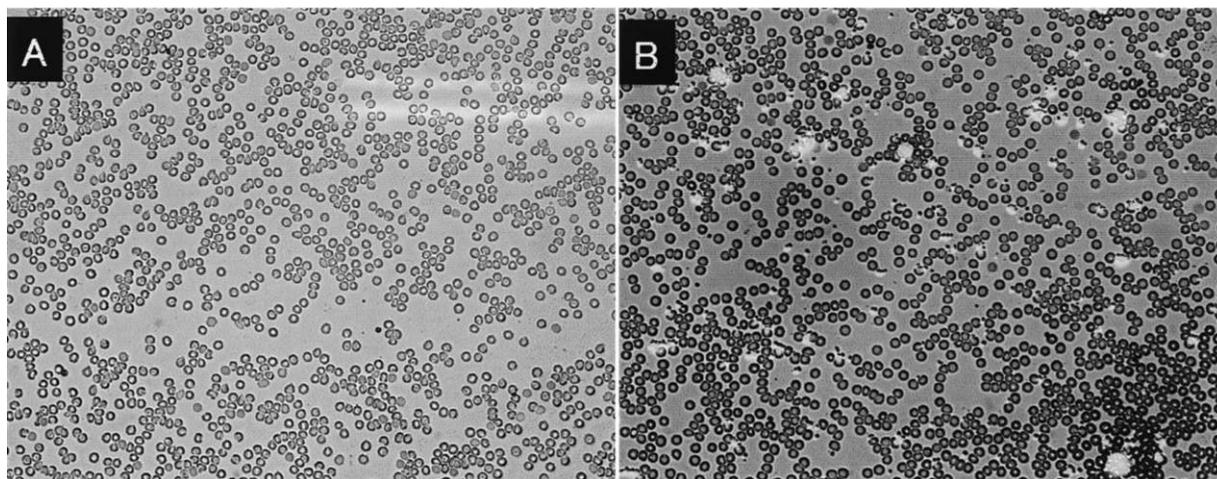


図 6 マウスの抹消血液塗沫写真。

A：野生型マウス，B：green fluorescent protein(GFP)-キメラマウス．野生型マウスには蛍光を発する細胞はない(A)が，GFP-キメラマウスの有核細胞はすべて蛍光を発する(B)ことから，これらの細胞は骨髄細胞由来であることがわかる．

表 1 GFP-キメラマウスの硝子体細胞

GFP-キメラマウス作製後の期間(月)	0	3	6
(GFP 陽性/全体) 硝子体細胞の割合			
野生型マウス	0%	0%	0%
GFP-キメラマウス	0%	62.5%	85%
GFP-トランスジェニックマウス	100%	100%	100%

GFP：green fluorescent protein

monocyte/macrophage lineage に属する．そこで，今回はキメラマウスを作製することで，この問題の解決を試みた．

野生型のマウスに 9 Gy の放射線を照射する(眼球は放射線から防護する)．するとマウスの主に骨髄が障害を受け，短期間にマウスは死んでしまう．しかし，放射線照射直後に他のマウスからの骨髄を移植すると，マウスは長期間生存することが可能となる．ドナーマウスを green fluorescent protein(GFP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(GFP-mouse, C57BL/6 Cr Tg 14(act-EGFP)OsbY 01, 大阪大学・岡部教授から分与)にして，キメラマウスを作製すると，キメラマウスで蛍光を発する(つまり GFP が発現する)組織や細胞はすべてドナー骨髄細胞由来ということになり，それらの起源が骨髄細胞であることが証明できる(図 6)¹⁶⁾．この GFP-キメラマウス眼球を経時的に蛍光光学顕微鏡で観察すると，角膜には作製後 2 週間から蛍光を発する細胞が現れるが，網膜や硝子体には 1 か月後でも明らかな蛍光を持つ細胞は現れない．しかし，時間が経つに従って硝子体中の細胞(ヒアロサイト)の中に蛍光を発するものが増加して行き，6 か月後には約 85% のヒアロサイトが蛍光を発するようになる(図 9)．しかし，網膜(神経網膜および網膜色素上皮)には 1 年後にも，蛍光を持つ

細胞は現れなかった(表 1)．このことから，ヒアロサイトは骨髄細胞由来であり，これは数か月の単位でターンオーバーしていることがわかった．「ヒアロサイトとは，発生期に眼内に現れた幹細胞が生涯に渡って分化して行く細胞である」という考え方は，少なくとも今回の結果からは否定的である．ただし，1 年後にも蛍光を発しない硝子体細胞がごく一部にみられたが，これがヒアロサイトであるか，あるいはヒアロサイトの中に極めて長い寿命を持つ細胞群があり，それがこの細胞に当たるのかは不明である．

III ヒアロサイトの機能(part 1)

ヒアロサイトは，全身投与された色素を取り込むことからスカベンジャーとして働くことはわかっていた⁴⁾．また，培養ヒアロサイトを用いた実験により，ヒアロサイトは網膜色素上皮細胞や血管内皮細胞の増殖を抑制する物質を分泌していることも報告^{17)~19)}されていた．しかし，その他の機能についてはほとんどわかっていない．そこで，ウシのヒアロサイトを培養して様々な機能を検索した．ウシ摘出眼球から硝子体を取り出し細切して培養すると，約 1 週間で細胞のコロニーを形成する(図 7)．この硝子体をフィブロネクチンでコートした培養皿の上で培養すると，硝子体からヒアロサイトが遊走してきて培養皿上での培養が可能となる．これは免疫組織学的に S-100 蛋白陽性，GFAP 陽性，サイトケラチン陰性であること，および形態学的特徴からヒアロサイトであると同定可能であった¹³⁾．

1. 細胞増殖能

増殖硝子体網膜症などの眼内増殖性疾患の硝子体中では，様々なサイトカイン濃度が増加している²⁰⁾²¹⁾．そこで，過去に報告があったサイトカインのうち，特にトラ

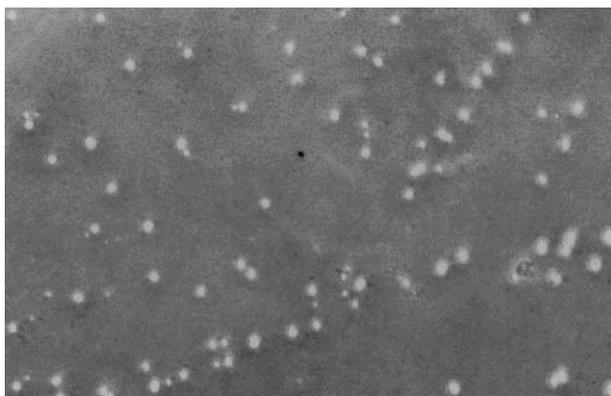


図 7 培養ウシヒアロサイトの硝子体中での位相差顕微鏡写真。

硝子体を培養皿上で培養した当日、硝子体中でバラバラに増殖していたヒアロサイトは、時間とともにコロニーを形成し、培養皿の表面に移動して行く。原拡大 20 倍

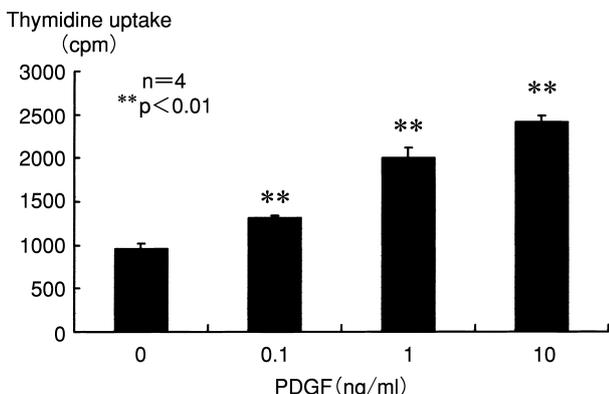


図 8 培養ウシヒアロサイトの増殖能が血小板由来増殖因子 (PDGF)-BB から受ける影響。

濃度依存性に thymidine 取込みを向上させるので、PDGF-BB は特異的にヒアロサイトの増殖を亢進させることがわかる。

表 2 培養ヒアロサイトの各種刺激因子による増殖活性

刺激因子	thymidine uptake (cpm)
Control	4850 +/- 1110
PDGF-BB	30120 +/- 3240**
TGF-β	580 +/- 120**
TNF-α	15210 +/- 1860**
HGF	16780 +/- 1690**
VEGF	5620 +/- 850

** : Control との比較 p < 0.01

ンスフォーミング増殖因子 (TGF-β), 肝細胞増殖因子 (HGF), 血小板由来増殖因子 (PDGF), 血管内皮増殖因子 (VEGF), 線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) について細胞増殖刺激効果を調べた。その結果、TGF-β により増殖抑制作用がみられたものの、HGF, PDGF, FGF-2

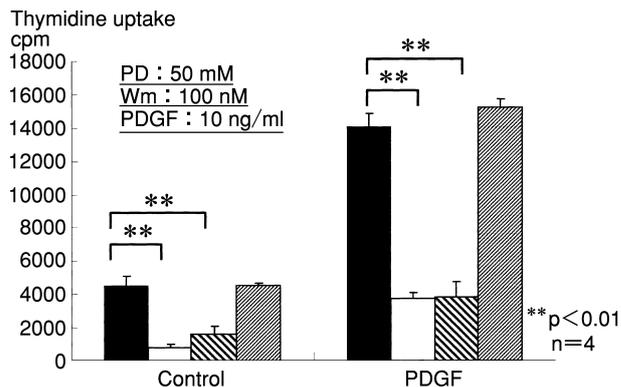


図 9 培養ウシヒアロサイトが PDGF-BB から増殖刺激を受ける際の細胞内シグナル抑制剤の影響。

対照群、PDGF 刺激群ともに MEK 1 (MAP kinase kinase) 阻害剤により増殖が抑制されるが、PI 3-kinase 阻害剤から影響を受けない。このことから、ヒアロサイトの PDGF による増殖刺激細胞内シグナルに MEK 1 が重要であることがわかる。(一) : 抑制剤なし、PD : MEK 1 阻害薬 PD 98059, Wm : PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3'-kinase) 阻害薬 Wortmannin でそれぞれ前処置したことを表す。

■ : (-) □ : PD+Wm □ : PD ▨ : Wm

はヒアロサイトの増殖促進作用がみられた。VEGF にはそのような作用は明らかではなかった(表 2)。とりわけ、PDGF により増殖促進作用が強くみられたので、PDGF-BB がヒアロサイトの細胞反応にどのような影響を及ぼすかを調べた。それによると、PDGF-BB は濃度依存性に培養ヒアロサイトの増殖能を亢進した(図 8)。さらに、この作用が PDGF に特異的な受容体を介した作用であるか否かを、PDGF の α 受容体と β 受容体のリン酸化を調べることで検証したところ、PDGF の α 受容体と β 受容体はともに速やかにリン酸化された(結果不提示)。PDGF のヒアロサイト細胞増殖促進作用が細胞内のどの経路を通じて伝達されるかを調べるため、MEK 1 (MAP kinase kinase) 阻害薬 PD 98059, PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3'-kinase) 阻害薬 Wortmannin による細胞増殖阻害効果を調べた。その結果、無刺激(対照)群の場合でも、MEK 1 阻害薬は細胞増殖抑制効果を示したが、特に PDGF で刺激した場合に強く細胞増殖を抑制した。一方、PI 3-kinase 阻害薬ではそのような作用はみられなかった(図 9)。このことから、PDGF によるヒアロサイトの細胞刺激効果は、MEK 1 を介した細胞内シグナル伝達経路を介した作用であることがわかった。

2. 細胞遊走能

眼内増殖性疾患の形成過程に、細胞の遊走作用が重要であることは知られている。そこで、ヒアロサイトの遊走作用をダブル・チェンバーを用いた方法で検索した。略述すると、内側の培養チェンバーにヒアロサイトを入

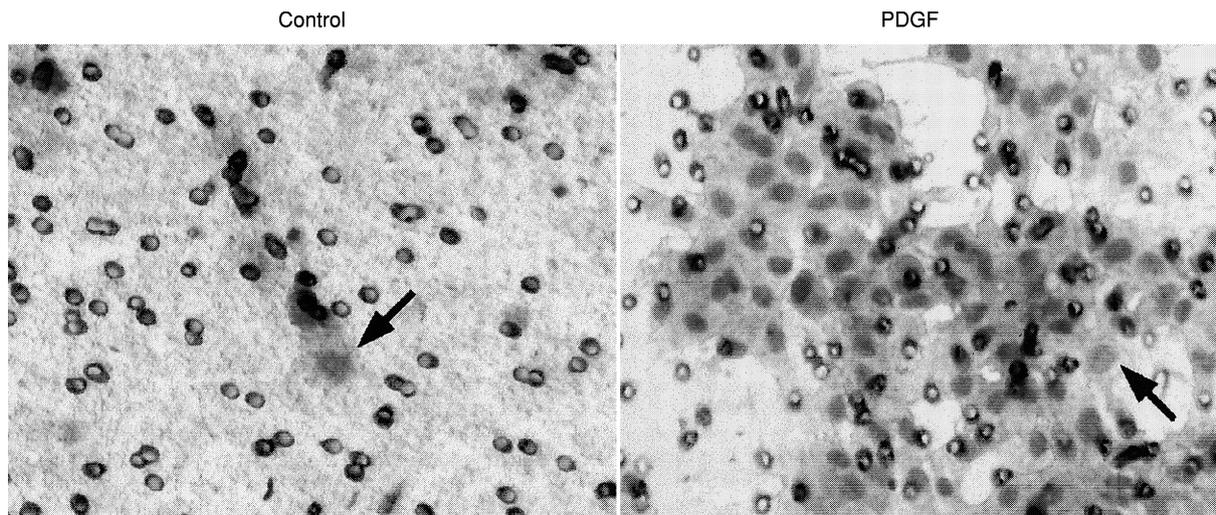


図 10 培養ウシヒアロサイトの遊走実験結果(膜を越えて遊走したヒアロサイトの光学顕微鏡写真). PDGF で刺激したものの方に多くのヒアロサイト(矢印)がみられる. ヘマトキシリン染色, 原拡大 40 倍

れ, 外側の培養チェンバーに調べたい物質を含む培養液を入れる. そして, 内側の培養チェンバーから一定時間に外側の培養チェンバーに移動したヒアロサイトを数えることで, ヒアロサイトの遊走能を定量化するという方法である(図 10). その結果, PDGF は濃度依存性にヒアロサイトの遊走を刺激した. さらに, その場合のシグナル伝達経路を調べるために, 1 項と同様に MEK 1 阻害薬 PD 98059, PI 3-kinase 阻害薬 Wortmannin および LY 294002, p 38 MAPK 阻害剤 SB 203580 の影響を調べた. その結果, ヒアロサイトの遊走は PI 3 K 阻害剤や p 38 MAPK 阻害剤により有意に抑制されたことから, PI 3 K や p 38 MAPK を介した経路が重要であることがわかった(図 11).

3. 線 溶 能

組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)やウロキナーゼ(uPA)は, セリンプロテアーゼであり, 凝固したフィブリンを溶解する作用の中心となる酵素であるばかりでなく, 炎症制御や血管新生などの広範な作用を持つ. そして, これらの酵素は組織が傷害された時には活発に産生され, 傷害を受けた組織除去作用・再生組織の構築作用になくてはならない酵素であるといえる. 眼内増殖性疾患は, この組織修復・再生作用が, 不適切かつ過剰に行われた状態ともいえるので, ヒアロサイトが産生する tPA や uPA を調べることは, 眼内創傷治療に関わるヒアロサイトの作用を間接的に調べることになる. そこで, PDGF-BB がヒアロサイトの線溶活性に及ぼす作用を, フィブリンザイモグラフィ法を用いて調べた. フィブリンザイモグラフィは既報の方法で行い, 培養ヒアロサイトを対照と PDGF-BB で刺激したものを使用した²²⁾. その結果, ヒアロサイトは主に tPA と uPA (uPA 優位) とインヒビター活性(おそらくプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1)を持つ蛋白を分泌し

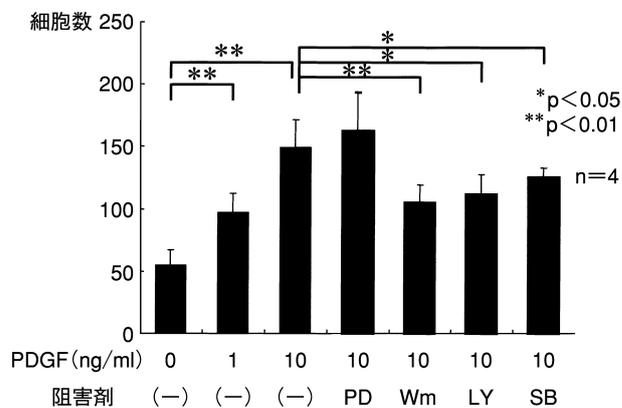


図 11 培養ウシヒアロサイトの遊走実験結果.

膜をこえて遊走する細胞数は PDGF により濃度依存性に増加する. この作用は MEK 1 抑制剤により影響を受けないが, PI 3 K 阻害薬, p 38 MAPK 抑制剤に影響を受けるので, PDGF による遊走刺激細胞内シグナルに PI 3 K や p 38 MAPK が重要であることがわかる. (-): 抑制剤なし, PD: PD 98059, Wm: Wortmannin, LY: LY 294002, SB: SB 203580 でそれぞれ前処置したことを表す.

ているが, PDGF-BB の刺激により, uPA の活性が特異的に高まることがわかった(結果不提示). このことから, 硝子体内の出血などが起こった際には, ヒアロサイトは出血の除去・吸収に積極的に関与していることが推測された.

4. ゲル収縮能

眼内増殖性病変の増悪過程に, 硝子体ゲルの収縮による続発性網膜剝離が大きな要因となっている. 硝子体を構成するコラーゲンは, それ自身では収縮することはないが, その中に細胞が含まれるとゲルが収縮する. このことは, 培養実験系で網膜色素上皮細胞, 線維芽細胞, 網膜グリア細胞では詳しく研究されているが, ヒアロサ

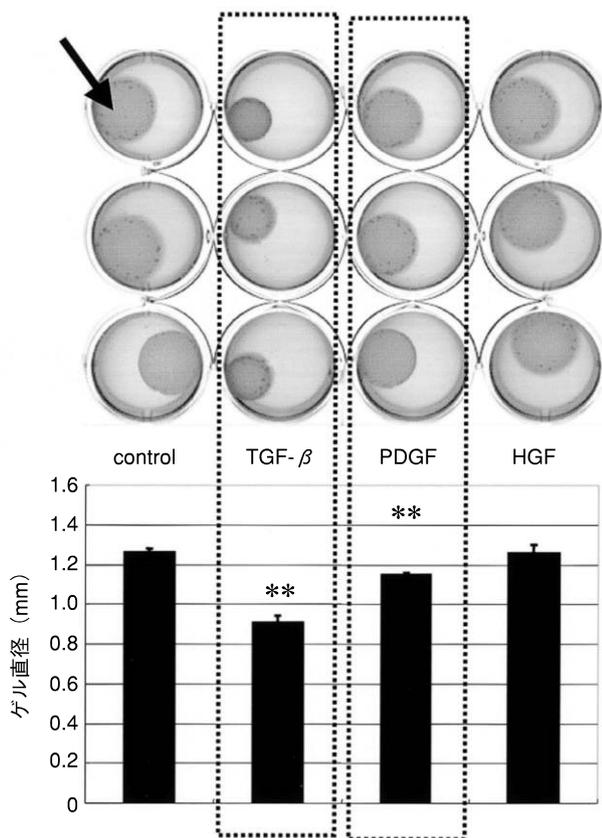


図 12 ゲルの収縮を定量した実験例。

培養皿の中にヒアロサイトを含むゲルが見える(矢印)。この直径を測り、ゲル収縮量を定量化した。対照群に比べ、トランスフォーミング増殖因子(TGF-β)や PDGF は強くゲルを収縮させた。(**: p<0.01)。肝細胞増殖因子(HGF)には明らかな収縮刺激作用はなかった。

表 3 各種条件下におけるヒアロサイトを含むコラーゲンゲルの収縮

条件	ゲルの直径(mm)
無刺激	1.40±0.02
PDGFのみ	1.28±0.03
PDGF+HF	1.38±0.02*
PDGF+Dex	1.24±0.01
PDGF+PD	1.26±0.03
PDGF+WM	1.37±0.02**
PDGF+GFX	1.41±0.02**
PDGF+SB	1.31±0.04*

*: p<0.01, **: p<0.05, HF: Rho kinase 抑制剤, Dex: dexamethasone, PD: PD 98059(p 44/42 MAPK kinase 抑制剤), WM: Wortmaninn, GFX: GF 109203 X (PKC 抑制剤), SB: SB 203580(p 38 MAPK 抑制剤)で処置した事を示す。

イトにおいては研究されていない²³⁾。そこで、培養ウシヒアロサイトを用いて検討した。I型コラーゲンゲル中にヒアロサイトを包埋して培養すると、コラーゲンゲル

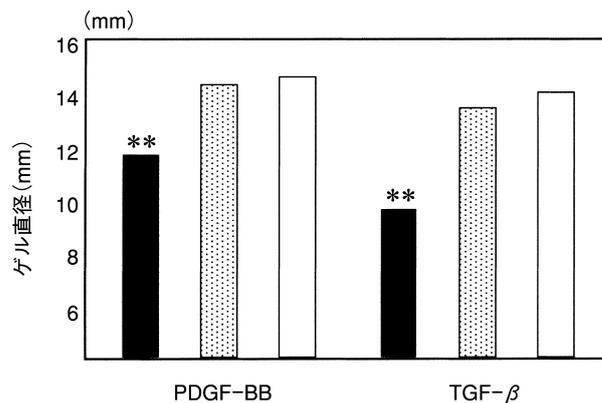


図 13 各種細胞を含むコラーゲンゲル収縮を定量した実験結果。

PDGF, TGF-βのいずれもがコラーゲンゲル収縮を促進するが、ヒアロサイトは他の2種類の細胞に比べ有意に強い収縮作用を示す。*: p<0.01

■: ヒアロサイト □: 網膜グリア細胞 □: 網膜色素上皮細胞

眼の炎症抑制メカニズム

1: 受動的メカニズム
解剖学的バリアーの存在: blood-retinal barrier

2: 能動的メカニズム

a. 眼局所炎症抑制システム
前房水, 硝子体: 炎症抑制物質の宝庫
角膜内皮, 毛様体上皮, 網膜: FASL+

b. 全身の細胞性免疫反応の抑制: ACAID

図 14 眼球の炎症を押さえるメカニズムのまとめ。

ACAID: anterior chamber-associated immune deviation

は収縮して行く。そこで、その直径を測定することで包埋した細胞のゲル収縮能を定量化することができる(図12)。その結果、PDGF, TGF-βが有意にゲルの収縮を促進することがわかった。そこで、ゲル収縮における細胞内シグナル伝達を調べるために、様々な抑制剤を使った実験を行った。使用した薬剤は Rho kinase 抑制剤, dexamethasone, p 44/42 MAPK kinase 抑制剤, PI 3 kinase 抑制剤, PKC 抑制剤, p 38 MAPK 抑制剤である。それによると、Rho kinase 抑制剤, p 44/42 MAPK 抑制剤, PKC 抑制剤, p38 MAPK 抑制剤により同作用が抑制されたので、ヒアロサイトによる PDGF 刺激—ゲル収縮作用には、細胞内の Rho kinase, p 44/42 MAPK, PKC が重要な働きをしていることがわかった(表3)。これとは対照的に、炎症時に多く分泌されるとされる TNF-α ではゲル収縮刺激作用はみられず、細胞内伝達抑制剤の影響も現れなかった(結果不提示)。

そこでこの作用は、ヒアロサイト特有のものかどうかを調べるために、硝子体内の他の細胞との比較を行った。培養ウシ色素上皮細胞ならびにグリア細胞は既報の方法で得て、前記の方法を用いた²⁴⁾²⁵⁾。その結果、ヒア

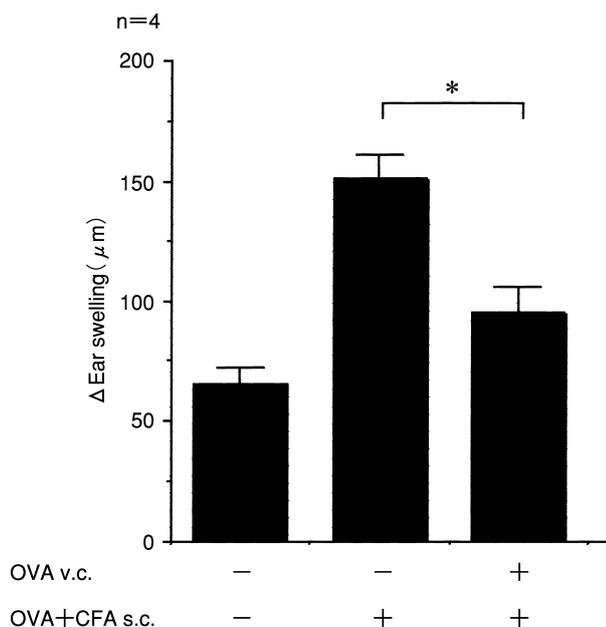


図 15 Vitreous cavity-associated immune deviation (VCAID) の存在を証明する実験結果。

マウスの硝子体(v. c.)に抗原(OVA)を入れ、7日後に皮下(s. c.)に再度投与する。さらに7日後に以前に投与した抗原に暴露した抗原提示細胞を耳朶に投与する。細胞性免疫が活性化されると耳朶の厚さが増すのでその厚さを指標として細胞性免疫の活動性を定量化する。硝子体内に抗原が暴露されると、その抗原に対する細胞性免疫が特異的に抑制されるため耳朶の腫脹が軽度である。

*: $p < 0.05$, CFA: アジュバンド

ロサイトは他の細胞に比べて、TGF- β 刺激、PDGF 刺激のいずれの場合においても、有意に強いゲル収縮作用を示した(図 13)。このことは、ヒアロサイトは眼内増殖性疾患が進行して続発性網膜剝離を起こす場合の、有力な原因細胞になり得ることを示すものである。

IV ヒアロサイトの機能 [part 2. vitreous cavity-associated immune deviation (VCAID) について]

眼疾患の際に、仮に異物や病原微生物を排除するためとはいえ過剰な炎症反応が眼内で起こると、眼球自体も障害を受ける。眼球は極めて精緻な構造をしているため、いったん組織が障害されると機能回復は極めて困難である。そこで、眼球にはできるだけ炎症を抑えようとする仕組みが備わっており、眼球は免疫学的に極めて特殊な臓器であるといえる。それを図 14 にまとめる。ここで、特にユニークなのは anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) という仕組みである。これは Streilein ら²⁶⁾によって発見された現象であり、前房内に抗原が暴露されると、その抗原に対する細胞性免疫が特異的に抑制されるというものである。ACAID のメカニズムは詳しく研究されているが、眼球内の不要な

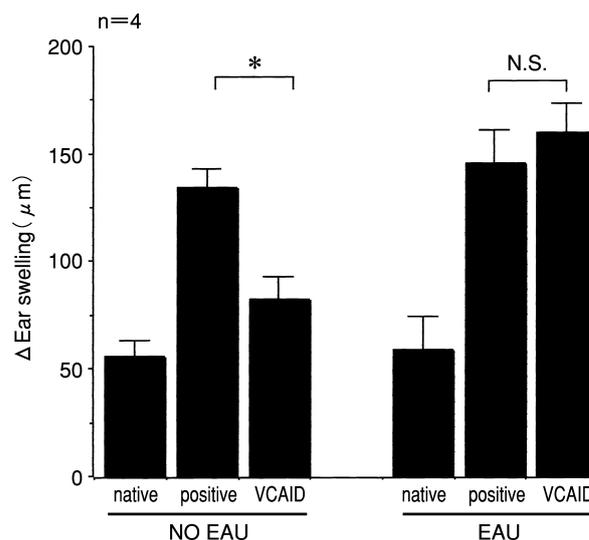


図 16 実験的自己免疫性ぶどう膜炎により VCAID が停止することを示す実験結果。

実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を起こした状態で VCAID を誘導すると、VCAID を誘導することができない。N. S.: 有意差なし, * : $p < 0.05$

炎症を抑えるためには、極めて効果的な仕組みであることが証明されている²⁷⁾²⁸⁾。

硝子体は前房と隣接しており、細胞成分が少なく光が透過するために極めて透明性が高い(あるいは高い必要がある)という共通の特徴がある。そのためには、似たような仕組みが備わっていることが容易に想像できるが、現在までそのことを詳細に調べた報告はない。そこで、我々は硝子体による免疫偏位があると仮定して、それを vitreous cavity-associated immune deviation (VCAID) と命名した。

1. VCAID の存在について

VCAID は、ACAID と似たメカニズムで発生すると思われるので、VCAID の存在の証明には ACAID の存在を証明する標準的な実験法を一部改変して用いた²⁸⁾。略述すると、マウス硝子体に抗原を入れ、7日後に皮下に再度投与する。さらに、7日後に以前に投与した抗原に暴露した抗原提示細胞を耳朶に投与する。細胞性免疫が活性化されると耳朶の厚さが増加するので、その厚さを指標として細胞性免疫の活動性を定量化するというものである。その結果、ACAID と同様に、硝子体内に抗原が暴露されると、その抗原に対する細胞性免疫が特異的に抑制されるという VCAID が存在することがわかった(図 15)。

2. VCAID の特徴

1) VCAID の停止について

ACAID が存在するおかげで、角膜移植された角膜が拒絶されずに生着する。しかし、強い前房の炎症や、前眼部の外傷が起こると ACAID が働かなくなる。これは、角膜移植の管理を行う際の重要な特徴である。そこ

で、同様な特徴が存在するかどうかについて検討した。VCAID の存在の有無は、前述の方法を用いた。眼内炎症は、実験的自己免疫性ぶどう膜炎を用いた。このぶどう膜炎の経過は詳しく解析されており、炎症は抗原注射後 10~14 日で最高の強さになるものの以後は自然におさまり、28 日後にはほぼ平常状態にもどることがわかっている²⁹⁾。さらに、この方法は眼球に直接接触せずに、硝子体に炎症を起こすことができるので、眼球操作

によるアーチファクトを排除することが可能である。そこで、炎症を起こした状態で VCAID を誘導すると、炎症が最も強い 10~17 日目は VCAID を誘導することができなかったが、炎症が軽度である 3, 7, 24 日目には VCAID を誘導することができた(図 16)。また、インターロイキン(IL-6)の硝子体注入による硝子体炎の際にも VCAID は誘導されなかった(結果不提示)。このことから、VCAID も ACAID と同様に、炎症が強い状態では誘導が停止されるという特徴を持つことがわかった。

2) 抗原提示細胞の役割について

ACAID においては、抗原を前房内で認識する抗原提示細胞が重要である。前房の抗原提示細胞は、前房中の免疫抑制性サイトカインにより、あらかじめ性質が炎症抑制型に変換されている。これが抗原を認識した状態で抗原血流を介して脾臓へ到達し、抗原特異的なサブレッサーT細胞を誘導することにより、全身の細胞性免疫が抑制される。VCAID の場合も同様の機序が想定されたので、その確認のための実験を行った。抗原を直接硝子体内に投与する代わりに、あらかじめ抗原に暴露させたマクロファージを硝子体内に投与しておいて、VCAID の誘導を調べると、抗原を硝子体に入れないにもかかわらず VCAID は誘導可能であった(図 17)。また、この現象は抗原提示細胞を、血管内あるいは結膜下に投与した場合には起こらなかった。以上の結果から、VCAID の誘導は抗原提示細胞を介したもので、かつ抗原提示細胞が正常硝子体環境下に暴露され炎症抑制型に変換される必要があることがわかった。

3) 抗原提示細胞とヒアロサイトについて

前述のように、VCAID の誘導には硝子体内で抗原提示細胞が抗原を認識する必要がある。それでは、その抗

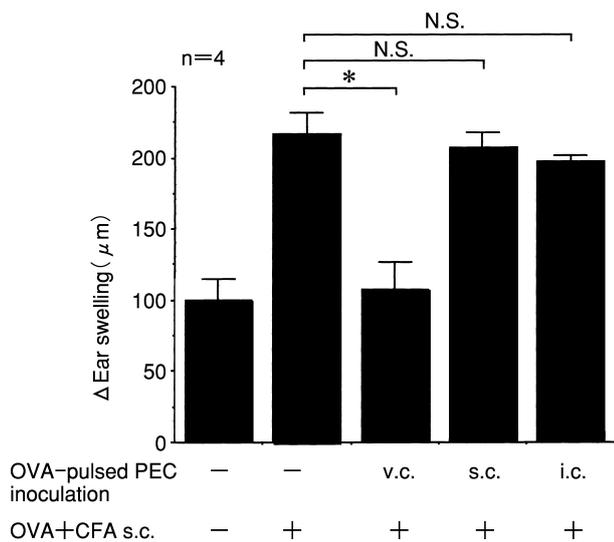


図 17 抗原提示細胞が VCAID に重要であることを示す実験結果。

抗原に暴露させたマクロファージを硝子体内に投与して、VCAID の誘導を調べると、抗原を硝子体に入れないにも関わらず VCAID は誘導可能である(vitreous)。抗原提示細胞を、結膜下(s.c)あるいは血管内(i.v.)投与では誘導されない。

N.S.: 有意差なし, *: p<0.05

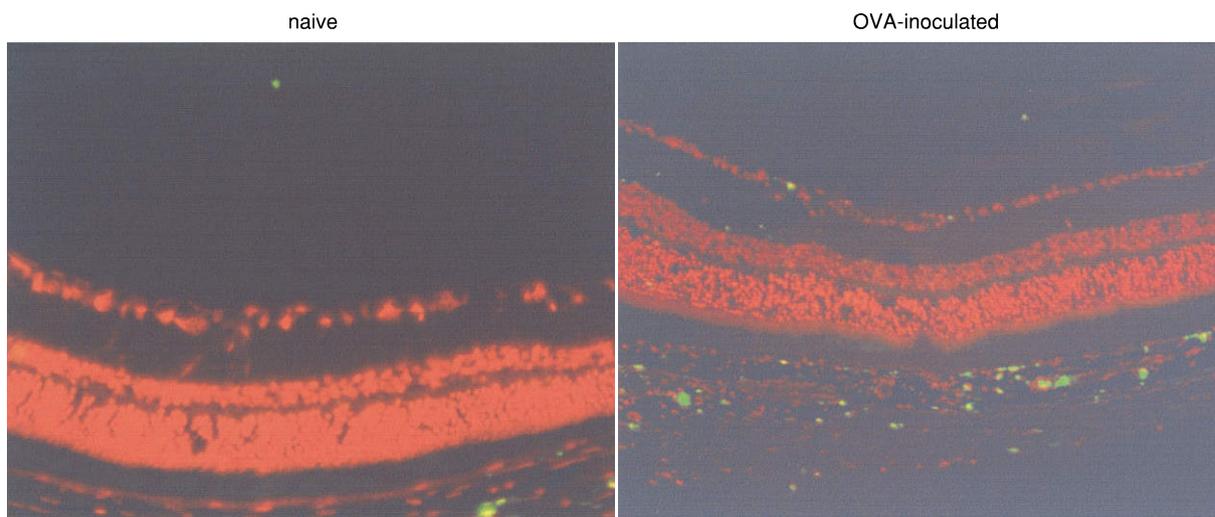
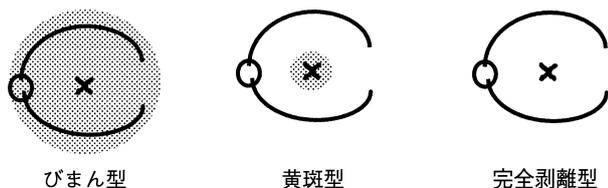


図 18 抗原を GFP-キメラマウス硝子体内に投与した際の光学顕微鏡写真。

Naive: 未処置眼, ovalbumin(OVA)-inoculated: 抗原を硝子体内に投与した眼。抗原を硝子体内に投与しても、流血中から硝子体内に細胞は入らない。網膜色素上皮細胞や網膜のグリア細胞が硝子体内に流入しない。原倍率×100



びまん型 黄斑型 完全剥離型
 図 19 網膜面上に残った硝子体皮質の分布パターン。人工の後部硝子体剥離後に網膜面上に残った硝子体皮質の分布パターンにより、びまん型、黄斑型、完全剥離型に分けた場合の模式図。

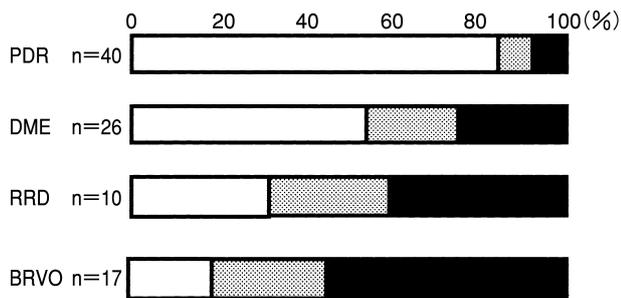


図 20 各疾患における網膜面上に残った硝子体皮質の分布パターン。

びまん型が糖尿病網膜症眼に明らかに多かった。

□: びまん型 ▨: 黄斑型 ■: 完全剥離型

原提示細胞は何であろうか。抗原提示細胞の候補としては、①全身循環をしている血管内のマクロファージなど、②硝子体内に固有に存在する細胞、③それ以外の細胞。そこで、キメラマウスに抗原を投与した際の、硝子体の細胞の動向を調べた。その結果、抗原を硝子体内に投与しても、強い炎症がなければ、流血中から硝子体内に細胞が入ることはなかった。また、網膜色素上皮細胞や網膜のグリア細胞が硝子体内に流入して行く所見もなかった(図 18)。このことから、硝子体内の抗原認識は硝子体内の固有の細胞により行われていることがわかった。硝子体内の固有の細胞が広義のヒアロサイトであることは、先に述べた通りであり、ヒアロサイトの重要な機能の一つとして VCAID における抗原認識および抗原提示があることが考えられた。

V ヒアロサイトと網膜硝子体疾患

死体眼を用いた研究で、人間にもヒアロサイトが存在することはわかっていたものの、ヒアロサイトがヒトの網膜硝子体疾患の病態形成あるいは治療にどのように関わるかについては、ほとんど研究されていなかった。そこで、まず実際の網膜硝子体疾患の際にヒアロサイトが存在するかを調べた。

1. 硝子体皮質/ヒアロサイトの存在

硝子体手術を行う際に、後部硝子体剥離が起こっていない眼では、人工的に後部硝子体剥離を起こす必要があ

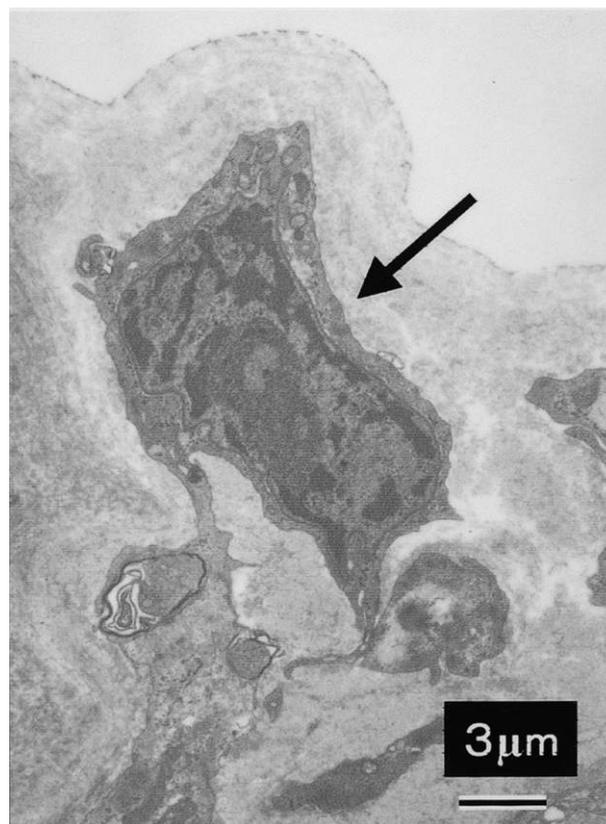


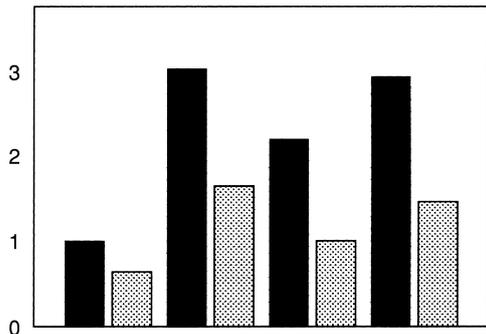
図 21 糖尿病黄斑症の摘出硝子体皮質の透過電子顕微鏡写真。

硝子体皮質の中に、マクロファージ様の形をした、細胞突起を多数持ちライソゾームが細胞質内に存在する細胞(矢印)があった。

る。TA を用いてそれを観察すると、人工の後部硝子体を起こした後の眼でも、薄い硝子体皮質が網膜面状にしばしば観察される³²⁾。そこで、網膜面上に残った硝子体皮質の分布パターンを3つに分けて、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病黄斑症、網膜静脈分枝閉塞症、裂孔原性網膜剥離のそれぞれの疾患間で差があるかどうかを調べた(図 19)。その結果、後極部網膜面にびまん性に硝子体皮質が残存するものが、糖尿病網膜症の場合にのみ明らかに多かった^{31)~36)}(図 20)。そこで、次にこの硝子体皮質を採取して、走査電子顕微鏡で観察したところ、糖尿病眼には細胞成分が多く、それは大部分はマクロファージ様の形をした、細胞突起を多数持ちライソゾームが細胞質内に存在する細胞であった(図 21)。これらはヒアロサイトであると考えられた。培養ヒアロサイトを用いた実験で、低酸素や PDGF 添加などの糖尿病や増殖性疾患を想定した負荷を加えると、ヒアロサイトは VEGF の産生を亢進させるので、これらの細胞は残存硝子体皮質中に存在して、網膜病変を修飾する作用があると考えられた(図 22)。

2. 硝子体皮質除去術について

前述のように、糖尿病眼における網膜面上の硝子体皮



DEX(100 nm): (-) (+) (-) (+) (-) (+) (-) (+)
control Hypoxia PDGF bFGF

図 22 培養ウシヒアロサイトの VEGF 産生。
血管内皮増殖因子(VEGF)の産生はノザンプロットで定量化した mRNA 量で評価した。低酸素や PDGF 添加, bFGF などの負荷を加えると, ヒアロサイトは VEGF の産生を亢進した。縦軸は VEGF mRNA 量を対照との比で表したものである。DEX: デキサメサゾン添加。

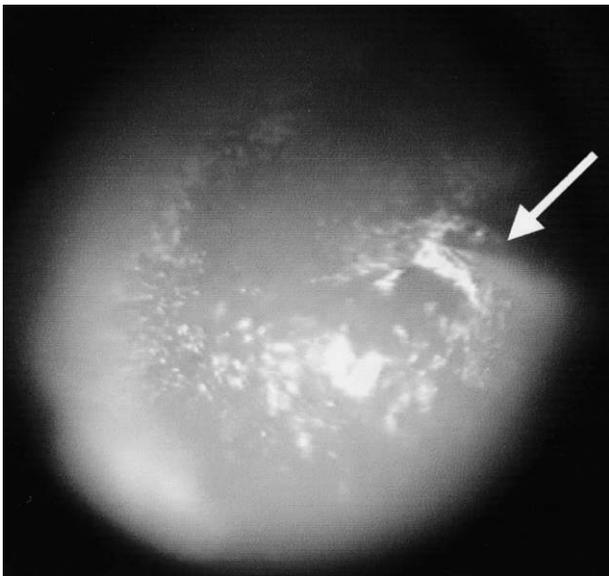


図 23 硝子体皮質除去術の術中写真。

後部硝子体剝離を起こした後, triamcinolone acetate (TA) 懸濁液を網膜面上に吹き付けると, 残存硝子体皮質に TA 顆粒がまとわりつくため, その部分が白く染色される。その部分をピンセット(矢印)やバックフラッシュニードルを用いて除去する。

質には細胞が含まれる。また, 残存硝子体自身も, 網膜を牽引することで網膜浮腫を遷延させるとされる。そこで, 糖尿病黄斑症の硝子体手術において, TA を用いて, 網膜面上に残存した硝子体皮質を除去する手術法を「硝子体皮質除去術」として, その効果を検討した。略述すると, 通常法で後部硝子体剝離を起こした後, 調整した TA 懸濁液を網膜面上に吹き付ける。すると, 残存硝子体皮質に TA 顆粒がまとわりつくため, その部分が白く染色される。その部分をピンセットやバックフラッ

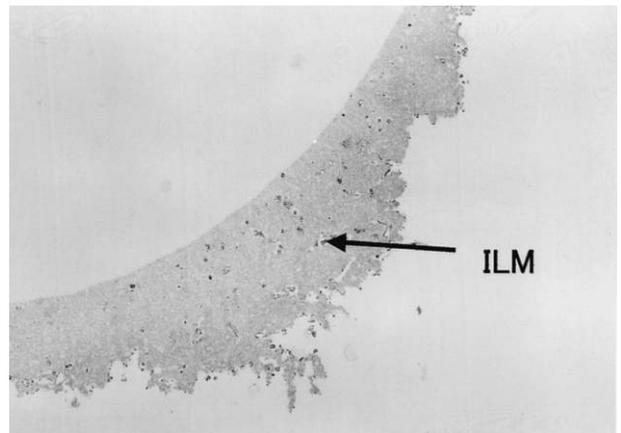


図 24 硝子体皮質除去術で除かれた内境界膜を含む組織の透過電子顕微鏡写真。

内境界膜(ILM)のみがみられる。原倍率×4000

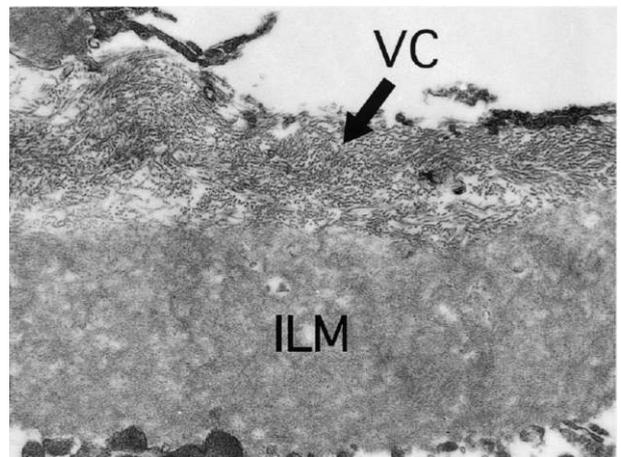


図 25 硝子体皮質除去術で除かれた内境界膜を含む組織の透過電子顕微鏡写真。

内境界膜(ILM)+硝子体皮質(VC)がみられる。原倍率×4800

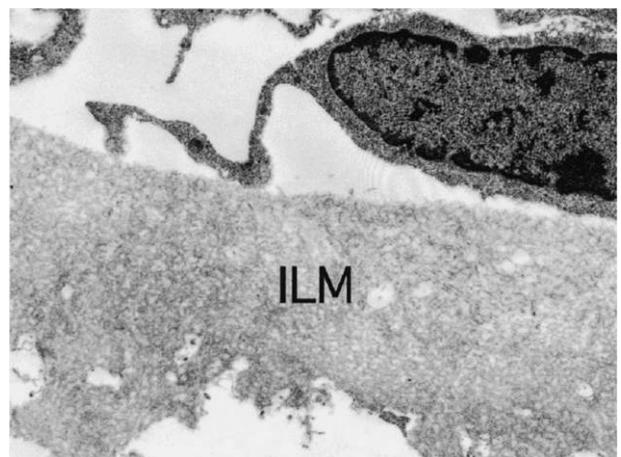


図 26 硝子体皮質除去術で除かれた内境界膜を含む組織の透過電子顕微鏡写真。

内境界膜(ILM)+細胞成分がみられる。原倍率×4000

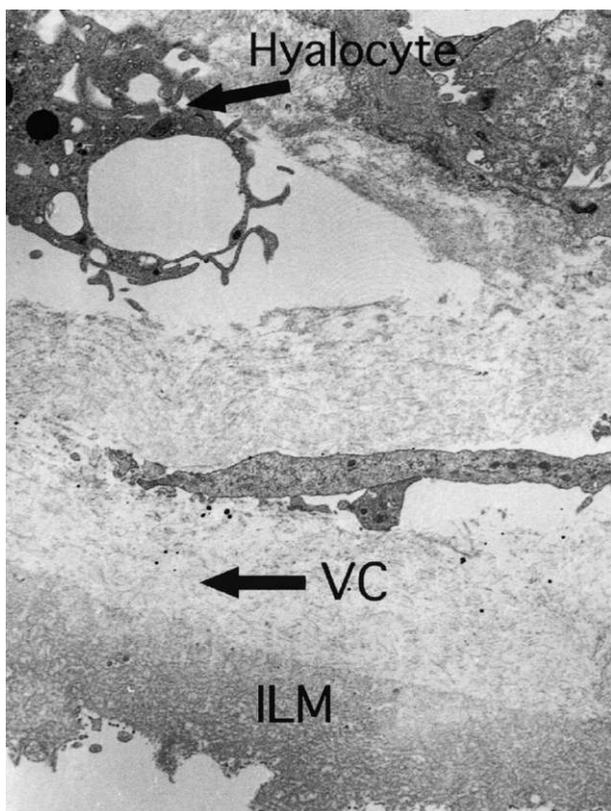


図 27 硝子体皮質除去術で除かれた内境界膜を含む組織の透過電子顕微鏡写真。ILM+細胞成分(hyalocyte)+VCがみられる。原倍率×1800

シュニードルを用いて除去するというものである(図23)。

3. 硝子体皮質除去術で除かれる成分

従来の糖尿病黄斑症に対する硝子体手術は、後部硝子体剝離を起こすことが手術の主な目的であった。それにより、硝子体内に貯留した原因物質(VEGFなど)を除くのみでなく、網膜面上の硝子体を除去して網膜浮腫を起こしている硝子体の牽引を解除するという考え方である^{36)~38)}。今回の硝子体皮質除去術では、人工的後部硝子体剝離を起こした後にさらに網膜面上の硝子体皮質を除くものであるが、実際にどれだけ硝子体皮質が除去されたかはわからない。そこで、従来法による網膜面上の残存組織と、硝子体皮質除去術を行った後の残存組織を糖尿病黄斑症の患者について比較した。それぞれの処置を行った後、内境界膜を剝離・摘出して透過電子顕微鏡で観察すると、その構成成分により以下の4群に分けられた。すなわち、1群：内境界膜のみ、2群：内境界膜+細胞成分、3群：内境界膜+硝子体皮質、4群：内境界膜+細胞成分+硝子体皮質である(図24~27)。1群から4群に進むに従って、硝子体除去が不完全になるという分け方である。その結果、通常法(後部硝子体剝離群)では1群は30%にすぎず、40%を4群が占めていたのに比べ、硝子体皮質除去術を行った場合は、1群の割合が60%に増加し4群の割合が20%に減少した(図28)。このことは、従来行われている人工的後部硝子体剝離では、十分に網膜面上の硝子体成分や細胞成分を剝離できないことを示すものである。また、今回の硝子体皮質除去術を用いることで、従来法より効果的にこれらの成分を除去できることがわかった。

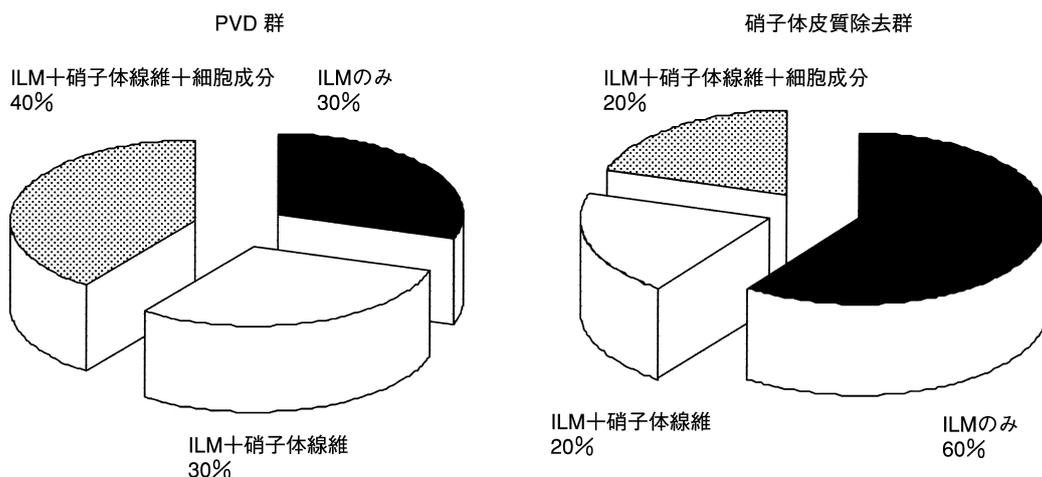


図 28 内境界膜を剝離・摘出して透過電子顕微鏡で観察した所見の構成比を後部硝子体剝離(PVD)群と硝子体皮質除去術群に分けて解析した結果。

PVD群では内境界膜だけのものは20%にすぎず、60%を内境界膜+硝子体皮質+細胞成分で構成されるものが占めていたのに比べ、硝子体皮質除去術群では内境界膜の割合が40%に増加し、内境界膜+硝子体皮質+細胞成分で構成されるものの割合が30%に減少した。このことは、硝子体皮質除去術により、効果的に網膜上の皮質等を除去できることを示す。

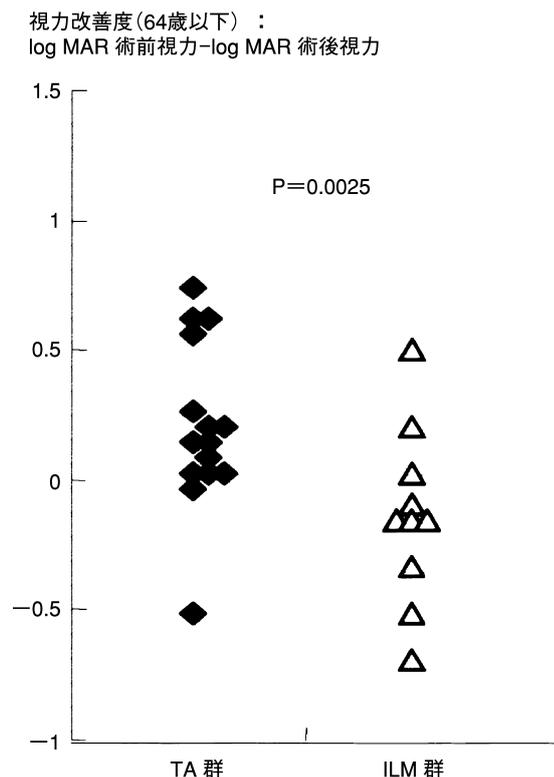


図 29 糖尿病黄斑症患者の術後視力に及ぼす影響。
65 歳以上の患者の視力改善度について TA 群(◆)と ILM 群(△)を比較すると、65 歳未満の群では、TA 群の方が視力改善度が高かった。

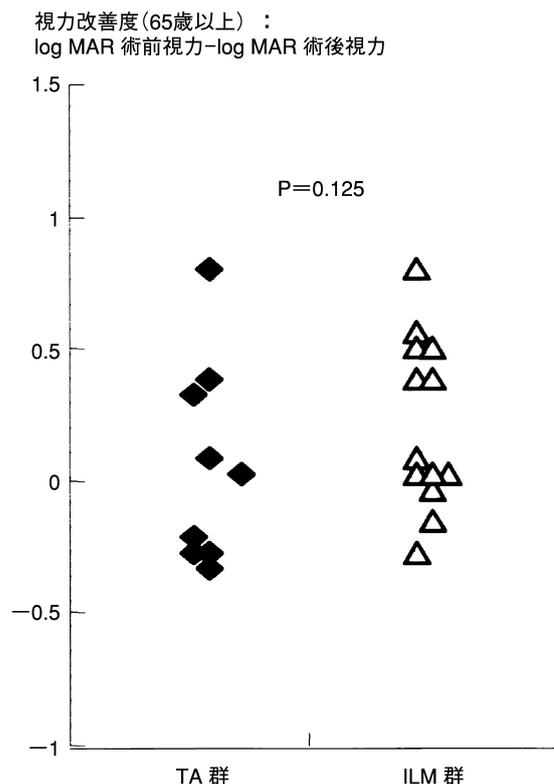


図 30 糖尿病黄斑症患者の術後視力に及ぼす影響。
65 歳以上の患者の視力改善度について TA 群(◆)と ILM 群(△)を比較すると、65 歳以上では有意差はなかった。

表 4 糖尿病黄斑症に対する硝子体手術の術式別視力変化

	PVD 群	TA 群	ILM 群
改善 (%)	38.5	37.5	30.4
不変 (%)	30.8	16.7	21.7
悪化 (%)	30.8	45.8	47.8
術前平均視力	0.1	0.13	0.18
術後平均視力	0.11	0.18	0.2

PVD 群：後部硝子体剥離のみ。TA 群：硝子体皮質除去まで行ったもの。

ILM 群：内境界膜剥離まで行ったもの。

4. 硝子体皮質除去術が術後視力に及ぼす影響

これまでの我々の研究によると、硝子体皮質除去術を用いると、効果的に網膜面上の硝子体皮質が除去可能であり、TA を用いた硝子体手術では、術後の炎症が軽減されることがわかった²⁹⁾³⁰⁾。また、今までのところ術後の合併症が増えてはいない³⁷⁾。そこで、この手術を糖尿病黄斑症に用いることは可能であると考え、手術成績について調べた。従来法である人工的後部硝子体剥離のみを行ったもの、硝子体皮質除去術を行ったもの、内境界膜剥離まで行ったものの 3 群に分けた。それぞれの群間に、手術前の平均視力、平均年齢、男女構成では差はなかった。その結果、いずれの群でも手術後の平均視力は

手術前よりも改善したが、統計学的に有意な差はなかった(表 4)。そこで、手術前の the logarithm of the minimal of resolution(log MAR)視力から手術後の log MAR 視力を引いた値(手術による視力改善)と年齢について、相関を調べたところ、内境界膜を剥離したものは年齢と正の相関があるが、硝子体皮質除去術では年齢と負の相関があった。そこで、それぞれの相関直線が交差する 65 歳を基準にして、それより若い患者について視力改善の度合いを、硝子体皮質除去群と内境界膜剥離群について比較すると、内境界膜剥離群の方が有意に視力改善が不良であった(図 29, 30)。65 歳以上で同じ解析を行った場合は有意差がなかった。このことは、若年の糖尿病黄斑症患者の硝子体手術では、内境界膜剥離を行わない方が良いことを意味しているかもしれない。しかし、十分な症例を集めた前向き調査ではないので、最終的な結論を出すことはできない。

VI 硝子体の細胞反応についての考察

本稿では、硝子体の細胞反応というテーマについてヒアロサイトを中心に我々の研究結果を紹介した。硝子体は生理的状态では、細胞がほとんど存在しないと考えられているが、これはある意味では真実である。マウス、モルモット、ブタ、ウシ、そしてヒトの硝子体にはヒア

ロサイトと思われる細胞が存在するが、その数は限られている。特に網膜や角膜の細胞数と比較すると、その少なさは際立っている。ただし、だからといって、生体内でほとんど重要な役割を果たしていないとはいえない。

ラットおよびマウスを用いた実験結果から、ヒアロサイトは、硝子体で分化した組織マクロファージであることがわかった。眼内の炎症などで硝子体中に現れるマクロファージは単球由来の滲出マクロファージであるので、それとは異なるマクロファージが常に硝子体皮質に存在していることになる。また、ウシ培養細胞を用いた実験により、この組織マクロファージ、すなわちヒアロサイトは炎症性刺激により増殖すること、および低酸素や PDGF といった糖尿病網膜症に伴う因子の負荷により、VEGF の産生を亢進させることがわかった。また、何よりもゲルを強く収縮させる働きがあることもわかった。これらは、眼内増殖性疾患を増悪させる方向に導くものである。通常はヒアロサイトは少数個が存在するにすぎないが、このような細胞が網膜のすぐ近くに存在し、しかも病気の時に活発に活動するという事は、網膜硝子体の微少環境を炎症に導く強力な作用があるといえる。網膜グリア細胞は、炎症状態に陥った場合、autocrine 的に次々に炎症を増悪させて行く働きがあることから、ヒアロサイトが網膜の増殖性変化や炎症を増悪させる引き金になることは容易に想像できる⁴⁰⁾⁴¹⁾。

しかしその反面、ヒアロサイトは眼内の炎症を抑える仕組みである VCAID を誘導するという重要な役割も果たしている。VCAID における抗原提示細胞は、蛋白を貪食かつ認識する必要があるが、一般に組織マクロファージはこの両方の作用を有するので、ヒアロサイトが抗原提示細胞であるとしても矛盾はない。ヒアロサイトの厳密な定義がない現在、ヒアロサイトを「硝子体に固有に存在する細胞」と定義するならば、ヒアロサイト=VCAID における抗原提示細胞であることは確実である。細胞(ヒアロサイト)が常に硝子体に存在して、炎症が起きないように「眼を光らせている」ことは、網膜硝子体の機能・構造を保つためには、極めて合目的である。

それでは、この作用は臨床ではどのように表現されるのであろうか？ 一般に増殖性変化を起こした眼は、手術をしてもなかなか増殖性変化を止められないといわれている。いい換えれば、増殖性硝子体網膜症自身が重症増殖性硝子体網膜症の危険因子であるということであろうか⁴²⁾。以前は、硝子体手術を行うことこそが、増殖性変化を起こすスイッチであるとされ、硝子体手術の適応は現在よりも限られていた。しかし、昨今の侵襲の少ない硝子体手術を経験すると、硝子体手術自身が増殖性変化の引き金を引くとは考えにくい。そこには、何か隠れた生物学的現象があるはずである。我々は、その一つの候補として、VCAID を挙げる。生理的条件下では、

VCAID が働いて眼内の炎症を抑えようとしている。しかし、侵襲の強い手術がなされたり強い炎症が起こった眼では、今回の実験で示されたように VCAID は停止される。そして、ヒアロサイトはむしろ炎症を増悪させるように暴走してしまうと考えられる。ヒアロサイトを介した、この VCAID の停止こそが、眼内環境を増殖性へ変化させるスイッチであるかもしれない。

次に、ヒアロサイトと治療の関係について考察した。ヒアロサイトは、糖尿病網膜症などの際は網膜面上に残留した硝子体皮質に多数存在していた。活性化したヒアロサイトは VEGF や macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) を盛んに分泌するので、隣接する網膜に影響を与えていることは容易に想像できる。現在行われている糖尿病網膜症に対する硝子体手術は、後部硝子体剝離を起こすので、この細胞も硝子体皮質ごと除去されると考えられていた。しかし、我々の研究では、人工の後部硝子体剝離を行っただけでは、後極部網膜面上の硝子体皮質を十分に剝離できないことがわかった。網膜面上の残存硝子体を剝離するには、内境界膜を剝離すれば良いが、内境界膜剝離術とりわけ手術中に用いるインドシアニングリーンの毒性が懸念される現時点では、積極的には行えない⁴³⁾⁴⁴⁾。そこで、我々は TA を用いて残存硝子体皮質を可及的に除去して、あえて内境界膜は除去しない手術法を行っている。限られた症例による結果ではあるが一定の治療効果はあるようである。

VII 最後 に

硝子体は、光を網膜まで導く路であり、眼球の形態・機能を保持するため重要な働きをしている。従来は透明性を保つために硝子体が積極的な働きをしているというより、細胞成分が少ないことなどにより受動的に透明性を保っているという考え方が主流であった。しかし、本研究で明らかになったように、硝子体は透明性を保つために積極的に活動しており、そのためには局所だけでなく全身的にもコントロールしている。そして、ある状況下ではそれが破壊されることにより、硝子体内の病変を増悪させるという複雑な反応をする。この精緻なメカニズムを成り立たせている中心細胞がヒアロサイトである。今後、このヒアロサイトの役割が詳しく解明されることで、より正確な網膜硝子体疾患の病態の理解ならびに効果的な治療法の開発が進むことを期待する。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与您て下さいました日本眼科学会評議員各位、本研究をご支援いただいた鹿児島大学医学部眼科学教室、九州大学医学部眼科学教室、九州大学眼科同門会各位、ご指導いただきました九州大学名誉教授猪俣 孟先生、九州大学大学院教授居石克夫先生に心から感謝いたします。

さらに、本研究は日田市讃井浩喜先生、春日市上原雅夫先生、太宰府市吉富文昭先生、宮崎市鳥井秀雄先生、木村眼科

病院横山光伸先生、福島県立医科大学石龍鉄樹先生のご支援をいただきました。GFP-mouse は大阪大学遺伝情報実験センター・岡部 勝教授から分与いただきました。深謝申し上げます。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金、臨床医学研究基金、財団法人中村治四郎育英会「中村奨励金」などにより行われたことを付記して謝意を表します。

文 献

- 1) **Hannovor A** : In Müller's Archi., 1840. Cited by Hamburg A : Some investigations on the cells of the vitreous body. *Ophthalmologica* 138 : 81, 1959.
- 2) **Balazs EA** : The structures and function of the so called "hyaloid membrane". In Acta XVIII Concilium Ophthalmologicum. vol 2, p 1296, Brussels, 1958, 1959.
- 3) **Newsome DA, Linsenmayer TF, Trelstad R** : Vitreous body collagen. Evidence for a dual origin from the neural retina and hyalocytes. *J Cell Biol* 71 : 59—67, 1976.
- 4) **Hamburg A** : Some investigations on the cells of the vitreous. *Ophthalmologica* 138 : 81—107, 1959.
- 5) **Bloom GD, Balazs EA** : An electron microscopy study of hyalocytes. *Exp Eye Res* 4 : 237—249, 1965.
- 6) **Freeman MI, Jacobson B, Toth LZ, Balazs EA** : Lysosomal enzymes associated with vitreous hyalocyte granules. 1. Intracellular distribution patterns of enzymes. *Exp Eye Res* 7 : 113—120, 1968.
- 7) **Lang RA, Bishop JM** : Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* 74 : 453—462, 1993.
- 8) **Jack RL** : Regression of the hyaloid vascular system. An ultrastructural analysis. *Am J Ophthalmol* 72 : 261—272, 1972.
- 9) **Zhu M, Provis JM, Penfold PL** : The human hyaloid system : Cellular phenotypes and interrelationships. *Exp Eye Res* 68 : 553—563, 1999.
- 10) **Ogawa K** : Scanning electron microscopic study of hyalocytes in the guinea pig eye. *Arch Histol Cytol* 65 : 263—268, 2002.
- 11) **Haddad A, Andre JC** : Hyalocyte-like cells are more numerous in the posterior chamber than they are in the vitreous of the rabbit eye. *Exp Eye Res* 66 : 709—718, 1998.
- 12) **Grabner G, Boltz G, Forster O** : Macrophage-like properties of human hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 333—340, 1980.
- 13) **Lazarus HS, Hageman GS** : In situ characterization of the human hyalocyte. *Arch Ophthalmol* 112 : 1356—1362, 1994.
- 14) **Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G** : The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : Distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED 1, ED 2 and ED 3. *Immunology* 54 : 589—599, 1985.
- 15) **van Rees EP, Dopp EA, Dijkstra CD, Sminia T** : The postnatal development of cell populations in the rat popliteal lymph node. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 242 : 391—398, 1985.
- 16) **Kawakami N, Sakane N, Nishizawa F, Iwao M, Fukada SI, Tsujikawa K, et al** : Green fluorescent protein-transgenic mice : Immune functions and their application to studies of lymphocyte development. *Immunol Lett* 70 : 165—171, 1999.
- 17) **Zhu M, Penfold PL, Madigan MC, Billson FA** : Effect of human vitreous and hyalocyte-derived factors on vascular endothelial cell growth. *Aust N Z J Ophthalmol* 25 : (Suppl 1) : S 57—60, 1997.
- 18) **Schonfeld CL** : Hyalocytes inhibit retinal pigment epithelium cell proliferation *in vitro*. *Ger J Ophthalmol* 5 : 224—228, 1996.
- 19) **Lazarus HS, Schoenfeld CL, Fekrat S, Cohen S, Carol A, Hageman GS, et al** : Hyalocytes synthesize and secrete inhibitors of retinal pigment epithelial cell proliferation *in vitro*. *Arch Ophthalmol* 114 : 731—736, 1996.
- 20) **Glaser BM, Cardin A, Biscoe B** : Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction. *Ophthalmology* 94 : 327—332, 1987.
- 21) **Ryan SJ** : Traction retinal detachment. XLIX Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 115 : 1—20, 1993.
- 22) **Noda Y, Hata Y, Hisatomi T, Nakamura Y, Hirayama K, Miura M, et al** : Functional properties of hyalocytes under PDGF-rich conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press)
- 23) **Sakamoto T, Hinton DR, Sakamoto H, Oganessian A, Kohen L, Gopalakrishna R, et al** : Collagen gel contraction induced by retinal pigment epithelial cells and choroidal fibroblasts involves the protein kinase C pathway. *Curr Eye Res* 13 : 451—459, 1994.
- 24) **Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H, Sueishi K** : Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes *in vitro* angiogenesis. *Virchows Arch* 426 : 479—486, 1995.
- 25) **Sakamoto T, Sakamoto H, Murphy TL, Spee C, Soriano D, Ishibashi T, et al** : Vessel formation by choroidal endothelial cells *in vitro* is modulated by retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 113 : 512—520, 1995.
- 26) **Streilein JW, Niederkorn JY** : Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med* 153 : 1058—1067, 1981.
- 27) **Stein-Streilein J, Streilein JW** : Anterior cham-

- ber associated immune deviation(ACAID) : Regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol* 21 : 123—152, 2002.
- 28) **Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J** : CD 1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 190 : 1215—1226, 1999.
- 29) **Sakamoto T, Takahira K, Sanui H, Kohno T, Inomata H** : Intercellular adhesion molecule-1 on rat corneal endothelium in experimental uveitis. *Exp Eye Res* 56 : 241—246, 1993.
- 30) **Sakamoto T, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura T**, et al : Triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy improves the surgical procedures and decreases the post-operative blood-ocular barrier breakdown. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240 : 423—429, 2002.
- 31) **Sonoda KH, Sakamoto T, Enaida H, Miyazaki M, Noda Y, Nakamura T**, et al : Residual vitreous cortex after surgical posterior vitreous separation visualized by intravitreal triamcinolone acetonide. *Ophthalmology* (in press)
- 32) **Sakamoto T, Koga H, Noda Y, Ishibashi T** : Optic disk cup filled with triamcinolone. *Retina* 22 : 516—518, 2002.
- 33) **Enaida H, Sakamoto T, Ueno A, Nakamura T, Noda Y, Maruoka K**, et al : Submacular deposition of triamcinolone acetonide after triamcinolone-assisted vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 135 : 243—246, 2003.
- 34) **Ueno A, Enaida H, Hata Y, Hisatomi T, Nakamura T, Matsumoto H, Sakamoto T**, et al : Posterior hyaloid membrane visualized by triamcinolone in retinal detachment from highly myopic macular hole. *Br J Ophthalmol* (in press).
- 35) **Enaida H, Hata Y, Ueno A, Nakamura T, Hisatomi T, Miyazaki M**, et al : Possible benefits of triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy for retinal diseases *Retina* (in press)
- 36) **Sonoda KH, Enaida H, Ueno A, Nakamura T, Kawano YI, Sakamoto T**, et al : Pars plana vitrectomy assisted by triamcinolone-acetonide for refractory uveitis : A case series study. *Br J Ophthalmol* 87 : 1010—1014, 2003.
- 37) **Lewis H, Abrams GW, Blumenkranz MS, Campo RV** : Vitrectomy for diabetic macular traction and edema associated with posterior hyaloidal traction. *Ophthalmology* 99 : 753—759, 1992.
- 38) **Tachi N, Ogino N** : Vitrectomy for diffuse macular edema in cases of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 122 : 258—260, 1996.
- 39) **Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Mimura T, Shimizu E, Hori S** : Relation of diabetic macular edema to cytokines and posterior vitreous detachment. *Am J Ophthalmol* 135 : 321—327, 2003.
- 40) **Vinore SA, Henderer JD, Mahlow J, Chiu C, Derevjanik NL, Larochelle W**, et al : Isoforms of platelet-derived growth factor and its receptors in epiretinal membranes : Immunolocalization to retinal pigmented epithelial cells. *Exp Eye Res* 6 : 607—619, 1995.
- 41) **Laterra J, Indurri RR, Goldstein GW** : Regulation of *in vitro* glia-induced microvessel morphogenesis by urokinase. *J Cell Physiol* 158 : 317—324, 1994.
- 42) **Bonnet M, Guenoun S** : Surgical risk factors for severe postoperative proliferative vitreoretinopathy (PVR) in retinal detachment with grade B PVR. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233 : 789—791, 1995.
- 43) **Enaida H, Sakamoto T, Hisatomi T, Goto Y, Ishibashi T** : Morphological and functional damage of the retina caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240 : 209—213, 2002.
- 44) **Sippy BD, Engelbrecht NE, Hubbard GB, Moriarty SE, Jiang S, Aaberg TM Jr**, et al : Indocyanine green effect on cultured human retinal pigment epithelial cells : Implication for macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 132 : 433—435, 2001.
-

Comment : 猪俣 孟

坂本泰二教授の宿題報告「硝子体の細胞：ヒアロサイトについて」は、網膜硝子体の病態解明への道を拓く、きわめて意義深い画期的な研究成果である。

生物の身体は基本的に上皮性細胞の組織と間質(基質ともいう)から成り、分化した組織はそれぞれ特有な形態と機能を有している。組織は、近接する間質から分化と機能維持に不可欠な情報を受取り、また逆に間質に組織の情報を提供して、恒常性を維持している。このように、組織と間質は表裏一体の関係にあり、それぞれが全く独立に働いているのではない。

眼球を構成する組織で最も重要なのが網膜であり、硝子体はその間質である。網膜に関する研究は近年目覚ましく進歩発展した。しかし、未解決の問題点も多い。網膜と硝子体は表裏一体の関係にあるので、解決できていない網膜の問題点は、硝子体側から攻略するのも一つの手である。

もともと硝子体細胞(ヒアロサイト)は、起源が不明で同定が困難であること、数が少ないこと、組織学的な取り扱いが難しいことなどの理由で、取っつきにくく、十分な研究が行われてきたとはいえない。しかし、むしろそのような細胞であるからこそ、問題解決の鍵が隠されている可能性は高い。その意味で、硝子体は現代における格好の研究材料であり、宿題報告に相応しいテーマでもある。

坂本教授は、骨髄移植キメラマウスを用いた実験で、ヒアロサイトが骨髄細胞由来のマクロファージであることの証拠を得た。そしてヒアロサイトの同定法を確立した上で、培養ヒアロサイトを用いて、細胞の増殖能、遊走能など多くの細胞生物学的特性を明らかにした。さらに硝子体には、前房内と同様に、細胞性免疫抑制機能があることを発見して、この機能を前房関連免疫偏位 anterior chamber-associated immune deviation(ACAID)に因んで、硝子体関連免疫偏位 vitreous cavity-associated immune deviation(VCAID)と命名した。

網膜の間質としての硝子体で、これらの新発見を得たことの意義は大きい。その理由は、これを足がかりに、網膜硝子体研究の新局面が拓かれるからである。坂本教授が示すように、ヒアロサイトの働きと VCAID が増殖硝子体網膜症の発症と病態の消長に密接に関係しているということも、その成果の一端である。

今後、網膜硝子体研究がますます発展することを期待する。