

前眼部虚血後に発生する角膜新生血管とプロスタグランディンの 関係 (その1) (図8, 表1)

山根 淳志・戸倉 敬雄 (関西医科大学眼科学教室)
佐野 貴之・三木 弘彦

The Relationship of Prostaglandin to the Occurrence of Corneal Edema and Development of New Vessels in the Anterior Segmental Ischemia of Rabbits' Eyes

Atsushi Yamane, Takao Tokura, Takayuki Sano
and Hirohiko Miki

Department of Ophthalmology Kansai Medical University

要 約

白色家兔の両側長後毛様動脈を閉塞して前眼部虚血にした後に、無治療のまま観察する群とPG合成阻害剤(0.1%フルルビプロフェン水溶性点眼液)で治療しつつ観察する群の2つに分け、角膜新生血管の発生と房水中のPG濃度の変化について実験観察した。処置後無治療の群は3日目に輪部血管より角膜内に向かう新生血管が発生し、7日目に更に進展、増殖した。房水中のPGE、PGF_{2α}の濃度は3日目に急激に上昇し(平均でPGE 78,975pg/ml, PGF_{2α} 8,323pg/ml)、7日目には低下した。治療群は処置後の角膜浮腫は軽度で増強せず、角膜新生血管の発生も非常に軽度であった。房水中のPGはPGF_{2α}が3日目に軽度上昇しただけで(1,815pg/ml)、PGEの有意の上昇は抑制された。以上、房水中のPG濃度の上昇と共に角膜新生血管が発生進展し、PG濃度の上昇が抑制されると新生血管の発生も抑制され、PGが血管新生に関与している事が明らかとなった。(日眼 91:993—999, 1987)

キーワード：前眼部虚血、角膜新生血管、プロスタグランジンE、プロスタグランジンF_{2α}、PG合成阻害剤

Abstract

Participation of prostaglandins (PGs) in the development of new corneal vessels was investigated in albino rabbits. Following an anterior uveal ischemic procedure by occlusion of the bilateral long posterior ciliary arteries, the eyes were divided into two groups of 22 eyes either non-treated or treated with a PG synthesis inhibitor, 0.1% flurbiprofen ophthalmic solution. The anterior chamber was tapped for assay of PGE and PGF_{2α} and total protein in the aqueous humor at 30 minutes and 3 and 7 days after surgery. The results obtained were as follows: In the non-treated group, mild diffuse edematous swelling of the cornea was observed on the 1st day. On the 3rd day, new corneal vessels were recognized from the entire limbal vessels and the developed further until the 7th day. The levels of PGE and PGF_{2α} in the aqueous humor increased markedly on the 3rd day but decreased on the 7th day. In the treated group, corneal edema was slight and the development of new vessels was also very slight. The level of PGF_{2α} increased only slightly on the 3rd day while that of PGE remained suppressed. In conclusion, corneal edema and the development of new vessels occurred with the

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 山根 淳志

Reprint requests to: Atsushi Yamane, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.

1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(昭和62年4月24日受付) (Accepted April 24, 1987)

increase of PGs in the aqueous humor, suggesting that PGs may participate in the development of new vessels after anterior segmental ischemia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 993-999, 1987)

Key words: Anterior segment ischemia, Corneal neovascularization, Prostaglandin E, Prostaglandin $F_{2\alpha}$, Prostaglandin inhibitor

I 緒 言

角膜に外傷や薬物で直接的障害を加えると、角膜周辺に存在している血管網より、障害部位の角膜に向かって新生血管が侵入して来る事はよく知られている^{1)~4)}、ところが、家兎眼の角膜に何ら直接的障害を加える事なく、内外両側の長後毛様動脈を閉塞させて、強い前眼部虚血を発生させると、処置後4日目頃から1~2週間目にかけて角膜全周より新生血管が発生する事を、著者らは見つけて既に報告した⁵⁾。

この前眼部虚血による角膜新生血管の発生に、プロスタグランジン(PG)が関与しているのではないかと推察した。すなわち、正常の虹彩毛様体組織にはPGE₂とPGF_{2 α} を主体としたイリンと呼ばれる脂肪酸の活性物質が存在している事から^{6)~9)}、前眼部虚血によって虹彩毛様体組織が障害を受けると、それらからイリンが房水中に放出され、角膜内に達して角膜新生血管の発生を誘発する様に働いたのではないかと考えて、今回の実験を行なった。

II 実験材料と方法

(1) 実験動物には成熟白色家兎(体重、1.5~2.0kg) 22羽44眼を用いた。

(2) 家兎を次の2群に分けて実験し、その結果を比較した。1群：処置後は無治療で経過を観察する群、2群：処置後はPG合成阻害剤(フルルビプロフェン0.1%水溶液、科研製薬)を1日4回点眼して治療し、経過を観察する群とした。

(3) 前眼部虚血を作成する方法は、先ず、ペントバルビタール(ネンプタール®)約1mlを耳静脈に注入して全身麻酔をかけた後、左眼眼球の耳側と鼻側の球結膜を輪部に沿って切開し、内側及び外側の直筋を露出して切断し、その直下の強膜表面にある長後毛様動脈を露出した。そして、手持ちパクレン(Optemp, アルコン社)を用いて、角膜輪部より約5mmの処にある長後毛様動脈の強膜貫入部位より前方約3mmにわたり焼灼して血管を凝固閉塞させ、続いて、その血管の中央を切断して、虹彩大動脈輪への血流が完全に遮断さ

れた事を確認した。

右眼は無処置で対照眼とした。

(4) 臨床経過は、毎日、細隙灯顕微鏡で前眼部を観察した。前報の様に角膜新生血管は処置後4日目頃より出現して、1~2週間まで増殖したので、新生血管が出現する直前の3日目と、新生血管がほぼ完成される時期の7日目に、前眼部写真撮影(Medical Nikol)と前眼部蛍光造影を施行した。

(5) 前眼部虚血作成後、30分目、3日目、7日目に房水を採取した。方法は、角膜の12時の位置で輪部より2mm内側の処で、27ゲージの針の注射筒を用いて前房穿刺し、一次房水を可能な限り全量採取して、直ちに0.1モルpH7.4のリン酸緩衝液で10倍に希釈して-120℃のディープフリーザーに冷凍保存した。

(6) 採取した房水は、1) PGE, 2) PGF_{2 α} , 3) 総蛋白濃度の3項目について測定した。PGについては、CollinsとHennanの方法¹⁰⁾でPG物質を抽出し、ラジオイミュノアッセイ法(日本トラベノール社、³H)プロスタグランジンF_{2 α} ラジオイミュノアッセイキットCAT. No. CA-503)で定量し、総蛋白濃度については、Lowry法¹¹⁾で定量した。

III 結 果

(1) 1群の無治療で経過を観察した群の臨床経過は前報と同様であった。すなわち、前眼部虚血作成当日は、虹彩大動脈輪の虚血と長後毛様神経の障害の強さの程度により種々の程度の散瞳を示した。細隙灯検査では角膜に何ら変化を認めなかった。処置翌日には、結膜は混合充血を示し、角膜は軽度の浮腫性混濁を示し、前房は浅くなった。これらの所見は日毎に増強して行き、3日目には角膜の浮腫性混濁は著明となり、角膜輪部の全周の血管網が拡張蛇行して、そこから新生血管が発生して角膜内へと侵入し始めた(図1)。7日目には、更に発育進展して角膜全周に密度の高い角膜新生血管となった(図2)。前眼部蛍光造影を行なうと角膜の新生血管は、互いに細網を形成し合って全角膜周辺部より増殖しているのが確認された(図3)。

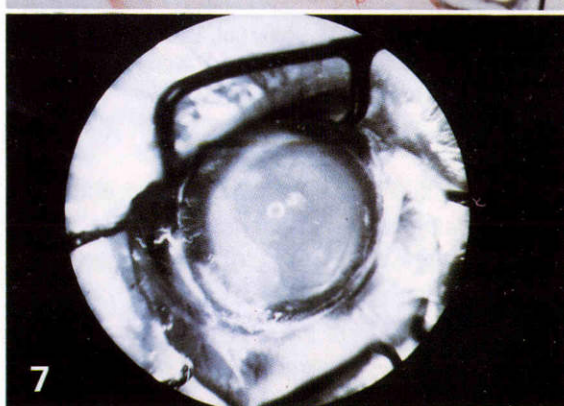
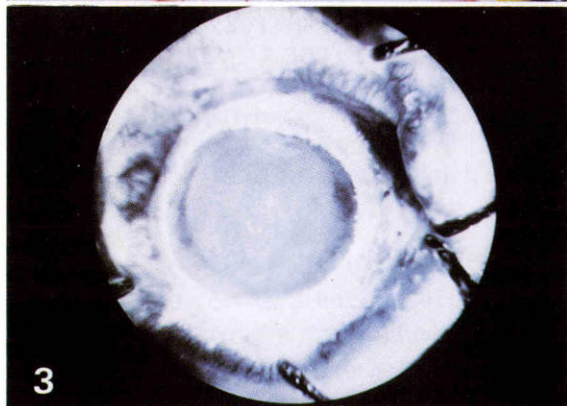
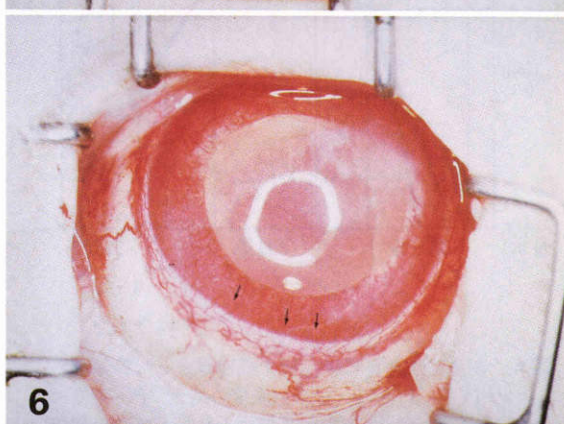
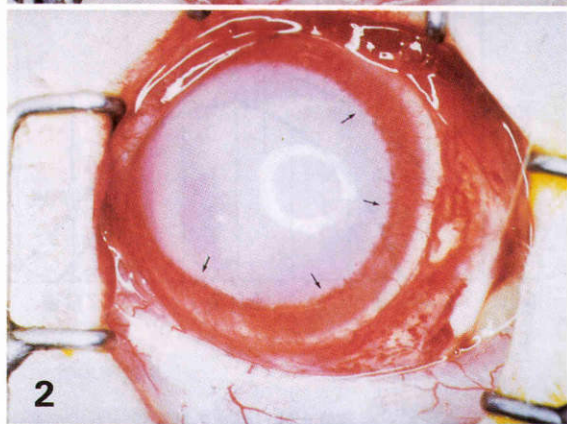
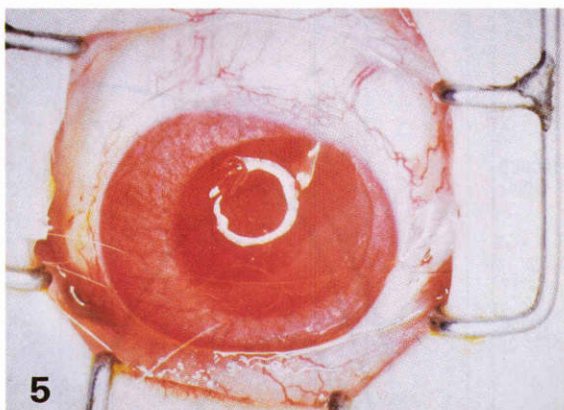
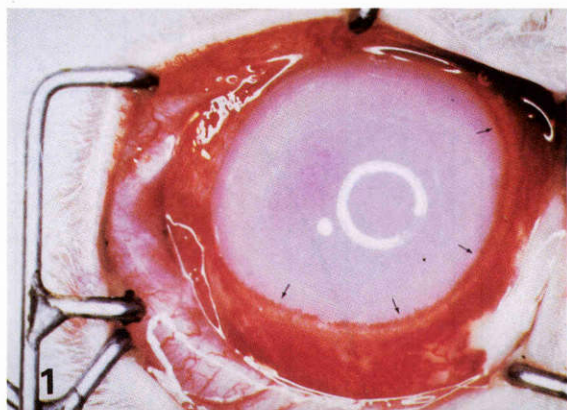


図1, 2, 3 前眼部虚血作成後, 無治療のまま経過観察した群.

図1 処置後3日目の前眼部写真, 結膜の強い混合性充血と角膜の浮腫性混濁を認めた, 全周性に拡張蛇行した角膜輪部血管から角膜内に向かって新生血管が侵入し始めていた(矢印).

図2 処置後7日目の前眼部写真, 角膜の浮腫性混濁は高度で, 角膜新生血管は更に角膜中央に向かって増殖侵入していた(矢印).

図3 処置後7日目の前眼部蛍光造影写真, 角膜混濁のために虹彩毛様体の状態は不明だが, 角膜新生血管は互いに吻合して細網を形成しつつ全周性に増殖

していた.

図5, 6, 7 前眼部虚血作成後, PG合成阻害剤(フルビプロフェン0.1%水溶液の1日4回点眼)で治療しつつ経過観察した群.

図5 処置後3日目の前眼部写真, 結膜の充血と角膜の浮腫は軽度で, 前房と虹彩の観察が容易であった.

図6 処置後7日目の前眼部写真, 角膜輪部の血管の拡張や角膜浮腫の増強は認めないが, 疎らな角膜新生血管の発生を認めた(矢印).

図7 処置後7日目の前眼部蛍光造影写真, 虹彩毛様体組織に蛍光色素が流入していない事が確認された. 一部に角膜新生血管の侵入を認めた.

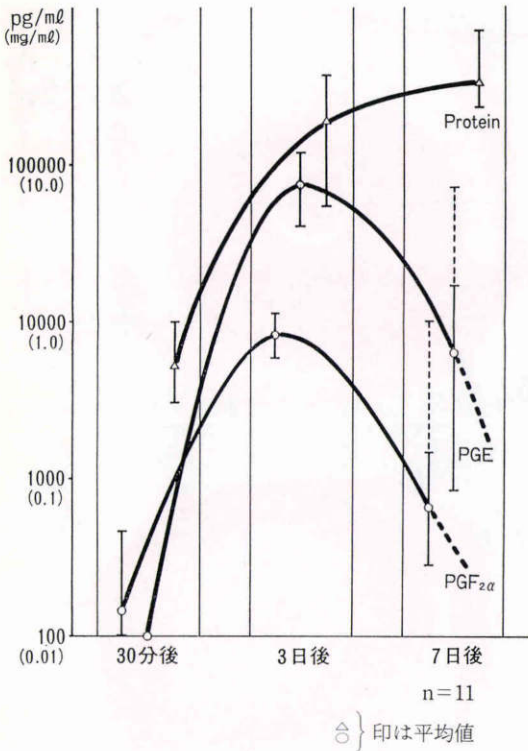


図4 前眼部虚血後に無治療で経過観察した群の房水中のPGE, PGF_{2α}, 総蛋白濃度の変化。PG濃度はいずれも処置後3日目に急激に上昇して非常に高値となり(平均でPGE 78,975pg/ml, PGF_{2α} 8,323pg/ml), 7日目には低濃度となった。総蛋白濃度は処置後3日目以後は高濃度を持続した。

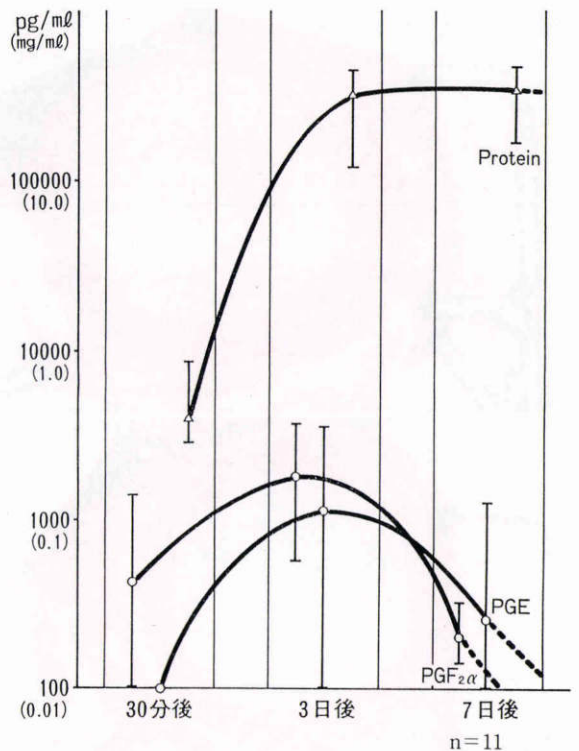


図8 前眼部虚血後にPG合成阻害剤で治療しつつ経過観察した群の房水中のPGE, PGF_{2α}, 総蛋白濃度の変化。処置後のPGE濃度の上昇は強力に抑制されて有意の上昇を示さず, PGF_{2α}濃度は処置後3日目に僅かに上昇し(平均で1,815pg/ml), 7日目には低下した。総蛋白濃度は無治療の群と同様に処置後3日目以後は高値を維持した。

(2) 正常家兎眼では、前房穿刺により一次房水は約0.15~0.20ml採取されたが、前眼部虚血後では、角膜浮腫による角膜の厚みの増加と毛様体組織の障害による房水産生低下のためか、房水は約0.1mlしか採取されなかった。採取した房水中のPGE, PGF_{2α}, 総蛋白量を測定した濃度の平均値は次に示す(図4, n=11)。

処置眼では、処置後30分では房水中のPG濃度はPGE, PGF_{2α}共に100pg/ml前後とわずかに増加を示した。3日目には、PGE78,975pg/ml, PGF_{2α} 8,323pg/mlと共に急激な上昇を示した。7日目にはPGE 6,021pg/ml, PGF_{2α} 655pg/mlと低下した。総蛋白濃度は、処置後30分目に0.52mg/mlと軽度に増加し、3日目には19.24mg/mlと急激に上昇し、7日目も低下する事なく、33.56mg/mlと高濃度を維持していた。

対照眼では、経過中のPG濃度はPGEもPGF_{2α}も39~11pg/ml以下のため測定できず、有意の上昇をみ

なかった。総蛋白量は前房穿刺毎に少しずつ上昇して、7日目には0.42mg/mlとなった。

(3) 2群のPG合成阻害剤の点眼にて治療を行なった経過観察した群では、前眼部虚血を作成した翌日には、1群と同様な結膜の混合充血と角膜の軽度の浮腫性混濁が出現したが、その後は増強せず、3日目になっても角膜輪部周辺の血管の拡張は軽度で(図5)、7日目には極く少数の疎らで短い角膜新生血管を認める程度であった。(図6)。7日目の前眼部蛍光造影では、虹彩毛様体の前部ぶどう膜には蛍光色素が流入せずそこへの血流が途絶している事が確認されたが、角膜新生血管は一部のみに極く軽度のものを認めたに過ぎなかった(図7)。

(4) PG合成阻害剤による治療群の房水の測定結果

の平均値を以下に示す(図8, n=11)。

処置眼の PGE 濃度は処置後3日目に約1,000pg/mlを示したが, 30分目と7日目はいずれも低濃度を示した。PGF_{2α}濃度は処置後30分目に600pg/mlと軽度上昇し, 3日目には1,815pg/mlと更に上昇したが, 7日目には低下した。総蛋白濃度は無治療で経過観察した1群と大差はなく, ほぼ同様の値(30分目0.62mg/ml, 3日目22.57mg/ml, 7日目28.63mg/ml)を示した。

IV 考 按

今回の実験をまとめると次の様になった。

(1) 前眼部虚血を作成した後, 無治療で経過観察した群では前報⁹⁾と同様に処置後4日目頃に角膜の浮腫性混濁は高度となり, 角膜輪部全周より角膜内に向かう新生血管の発生をみた。角膜新生血管の発現時期に一致した3日目の房水中の PGE と PGF_{2α} とが高値を示した。角膜新生血管が十分に発達して増殖侵入し完成した7日目には房水中の PG 濃度は低下傾向を示した。すなわち, 角膜新生血管の発生する時期, 及び増殖中の時期では房水中の PG は高値を示し, 新生血管の増殖が止まり安定する頃には PG の濃度は低値を示していた。

(2) 前眼部虚血の作成前より PG 合成系の脂肪酸シクロオキシゲナーゼの阻害剤であるフルビプロフェン0.1%水溶液を点眼して治療したものでは, 房水中への PG, 特に PGE の放出が強力に抑制されて (p<0.05), 角膜の浮腫性混濁は軽度となり, 角膜の新生血管の発生も抑制されて軽度となった。

(3) 前眼部虚血後の房水中の総蛋白量の上昇は, PG 合成阻害剤にて治療した群では, 房水中の PG 濃度の上昇が抑制されているにも拘らず, 無治療で経過観察した群と同様の高値を示した(有意差なし)。

以上の実験結果を表1にまとめた。今回の実験結果より, 前眼部虚血後に角膜新生血管の発生を促す機序を次の様に推察した。

まず第1番目として, 虹彩毛様体組織が虚血性変化により崩壊し, 組織内に含まれていた大量の PG が房水中に放出され, 房水中に増量した PG が角膜を障害したため強い浮腫性混濁が引き起こされたものと考えた。それは, 房水中の PG の増加が抑制されると角膜浮腫が軽度となった事からも伺われる。特に角膜内皮が高度に障害されるとバリアー機構の障害だけでなく, 角膜実質内の水分調節や電解質の能動的な房水中への輸送といったポンプ作用も障害され, 角膜実質の浮腫

表1 前眼部虚血後の無治療群と治療群の臨床所見と房水の測定結果の比較

| | 無治療群 | 治療群 |
|---------------------|-------|-------|
| 角膜浮腫 | ++~# | + |
| 輪部充血 | ++~# | +~# |
| 新生血管 | ++~# | ±~+ |
| 密度 | ++~# | ±~+ |
| 長さ(輪部から) | 3~4mm | 0~3mm |
| 散 瞳 | ++~# | ++~# |
| 白 内 障 | + | +~# |
| 房 水 | | |
| PGE 濃度 | 高 値 | 低 値 |
| PGF _{2α} " | 高 値 | 低 値 |
| 総蛋白 " | 高 値 | 高 値 |

※ # 重 度
 + 中 等 度
 ± 軽 度
 ± 微 小

を助長して新生血管の侵入を促したものと思われた。

第2番目として, 房水中の PG 濃度の上昇が抑制されると角膜輪部の血管の拡張や新生血管の発生が軽度となった事から, PG は角膜輪部の血管網の内皮細胞を刺激して幼若化させ増殖を誘発させる作用や角膜内に向かって血管内皮細胞を遊走させる作用とも何らかの関連性を有していると思われた。Ausprunk¹²⁾や Fromer と Klintworth¹³⁾が提唱している様に, 角膜周辺の毛細血管が何らかの刺激で幼若化されると, それは多核白血球の出す化学物質によって誘導されて角膜内に遊走し, 更にその遊走内皮細胞と既存の毛細血管との間を埋める様に血管内皮細胞が mitose を繰り返し新生血管が形成されていったのではないかと考えられ, 多核白血球への活性作用にも PG が関与している可能性がある。

第3番目として, Pfister¹⁴⁾が, 長後毛様動脈をジアテルミー凝固した後の房水中のグルコースの低下を報告しており, 又, Green と大島¹⁵⁾が角膜切片の膨化は溶液中にグルコースを添加すれば抑制できたと報告しており, 前眼部虚血後の房水中のグルコースの低下が角膜の代謝を低下させ, 角膜浮腫を助長したものと思われた。

第4番目として, 早坂らの報告¹⁶⁾¹⁷⁾にある様に, 虹彩毛様体組織の障害時には, PG 物質以外にも色々なライソゾーム内の酵素が房水中に放出され, ぶどう膜炎を発生および助長させ, その時に動員された多核白血球やマクロファージなどの免疫担当細胞からも PG 物

質が放出されたり、PGの作用を助長させた可能性がある。この様に新生血管を誘発させる要因は1つだけではなく、種々の要因が絡み合わされて互に関係し合って発生するものと思われた。

以上、今回の実験では房水中のPGの測定項目をイリンの主成分であるPGEとPGF_{2α}との2つにしぼったが、他にもPGD₂やトロンボキサンB₂などが含まれており、これらの房水中の変化や角膜浮腫への関連性については不明である。又、治療に使用した薬物はシクロオキシゲナーゼ酵素の阻害剤であり、この酵素はPG合成系ではアラキドン酸に作用してPGG₂に変化させる酵素なのでPG合成系全体が抑制され、無治療群と治療群の比較だけでは、具体的にどのPGが血管新生に関与しているのかを特定できない。しかし、今回の実験結果及び、PGが血管新生因子として作用するとしたBen Ezraの報告¹⁸⁾¹⁹⁾から、十分にPGが血管新生に関与しているものと思われる。各PGの作用の比較検討については第2報で報告予定である。

PG合成阻害剤であるフルルビプロフェンを点眼して角膜新生血管の発生を抑制できたという今回の実験結果は、Cooperらの報告²⁰⁾と同様であり、フルルビプロフェンが眼組織でのPGの産生を抑制し、角膜新生血管の発生を抑制し得たと考えられるので、臨床方面で、角膜新生血管を発生させる疾患、例えば、角膜移植直後の血管新生を抑制したり、コンタクトレンズ装用による角膜新生血管の発生の防止などに有用であるかも知れない。ところで、前房穿刺による房水中の蛋白質量の測定にはartifactsが加わり易い。これは、前房穿刺が刺激となって房水中にPGが放出され、それが血液房水柵を破綻させ、血管から蛋白成分が漏出して来るため、その事は既に、矢田²¹⁾、甲田²²⁾、沖坂²³⁾、井沢²⁴⁾や増永²⁵⁾が報告している。しかし、今回の実験では、前眼部虚血により虹彩毛様体への血流は途絶している事から、今回測定された房水中の高濃度の蛋白は血液由来ではなく、虚血によって虹彩毛様体組織が崩壊して房水中に遊出して来た組織蛋白が主体を成しているものと考えた。したがって、PG合成阻害剤を点眼して房水中のPG濃度の上昇を抑制しても、前眼部虚血後に房水中に蛋白が増加する事を抑制し得ず、治療群、無治療群共に同様に高濃度になったものと考えた。

稿を終えるにあたり、宇山昌延教授の御指導並びに御校閲に深く感謝致します。

本論文は第89回日本眼科学会総会で山根が発表した。

文 献

- 1) **Maurice DM, Zauberman H, Michaelson IC:** The stimulus to neovascularization in rabbits. *Am J Ophthalmol* 5: 168—184, 1966
- 2) **Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK:** Corneal neovascularization as studied by scanning electron microscopy of vascular cast. *Lab Invest* 48: 169—180, 1983.
- 3) **Schanzlin DJ, Richard JC, Friedlaender MH:** Histopathology of corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 101: 472—474, 1983.
- 4) **Sholley MH, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD:** Mechanisms of neovascularization-vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest* 51: 624—634, 1984.
- 5) **岡田寿夫, 佐野貴之, 米田宗道, 三木弘彦:** 前部ぶどう膜虚血による角膜新生血管の発生. *日眼会誌* 87: 1175—1186, 1983.
- 6) **Ambache N:** Properties of irin, a physiological constituent of the rabbits' iris. *J Physiol* 135: 114—132, 1957.
- 7) **Ambache N:** Effect of mechanical stimulation on rabbits' eyes. Release of active substance in anterior chamber perfusates. *J Physiol* 176: 378—408, 1965.
- 8) **Kass MA, Holmberg NJ:** Prostaglandin and thromboxane synthesis by microsome of rabbit ocular tissues. *Visual Sci* 18: 166—171, 1979.
- 9) **Bhattacharjee P, Kulkarni PS, Eakins KE:** Metabolism of arachidonic acid in rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 18: 172—178, 1979.
- 10) **Collins WP, Hennan JF:** The measurement of local hormone and metabolites. *Rec Method Mol Asp Med* 1: 114—121, 1976.
- 11) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 12) **Ausprunk DH, Folkman J:** Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53—56, 1977.
- 13) **Fromer CH, Klintworth GK:** An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. III. Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Am J Pathol* 82: 157—170, 1976.
- 14) **Pfister RR, Friend J, Dohlman CH:** Anterior segment necrosis in rabbits. *Arch Ophthalmol*

- 86: 301-307, 1971.
- 15) **Green K, Otori T**: Studies on corneal physiology in vitro. *Exptl Eye Res* 9: 268-280, 1970.
 - 16) **早坂征次, 増田寛次郎**: 眼刺激と房水ライソゾーム酵素(その1. 前房穿刺後の房水ライソゾーム酵素活性と抗炎症剤の影響). *眼紀* 31: 1264-1268, 1980.
 - 17) **早坂征次, 増田寛次郎**: 眼刺激と房水ライソゾーム酵素(その2. 各種眼刺激による酵素活性の変動). *眼紀* 31: 1269-1272, 1980.
 - 18) **BenEzra D**: Neovascularogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am J Ophthalmol* 86: 455-461, 1978.
 - 19) **BenEzra D**: Current research: Neovascularogenesis, triggering factor and possible mechanisms. *Surv Ophthalmol* 24: 167-176, 1979.
 - 20) **Cooper CA, Bergmini MVW, Leopold IL**: Use of flurbiprofen to inhibit corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 98: 1102-1105, 1980.
 - 21) **矢田清身**: 家兎眼血液房水柵の微細構造と前房穿刺後の変化. *眼紀* 29: 1288-1295, 1978.
 - 22) **甲田尚也, 塚原重雄**: 1. プロスタグランディンの眼内柵におよぼす影響について. 第1報. 血液房水柵. *日眼会誌* 80: 429-435, 1976.
 - 23) **沖坂重邦**: プロスタグランディンの房水動態に及ぼす影響に関する形態学的研究—プロスタグランジンE₁結膜下注射及び前房穿刺による猿の血液房水柵破壊の局在について—. *日眼会誌* 80: 436-447, 1976.
 - 24) **井沢保穂, 増田寛次郎**: 機械的刺激に対する血液房水柵破壊とプロスタグランジンズ. *日眼会誌* 80: 448-451, 1976.
 - 25) **増永純子**: Prostaglandinの血液眼組織柵に及ぼす影響に関する電子顕微鏡的研究. 第1報. 血液房水柵に及ぼす影響. *日眼会誌* 84: 427-437, 1980.
(第89回日眼総会原著)