

家兎角膜損傷後の二次房水中の 免疫及び炎症に關与する活性 (図7)

清 野 雅 子 (岩手医科大学眼科学講座, 細菌学講座)

Activities Related to Immunological and Inflammatory Responses in Secondary Aqueous Humor After Injury of the Rabbit Cornea

Masako Seino

*Department of Ophthalmology, Department of Bacteriology, School of Medicine,
Iwate Medical University*

要 約

家兎角膜に機械的刺激を加えた後に採取した二次房水中の、免疫及び炎症に關与する活性について検討した。二次房水は、角膜の内皮及び実質の一部に損傷を与えた場合(損傷二次房水)と、前房穿刺のみ行った場合(穿刺二次房水)に30分、60分、120分後に採取し、それぞれの家兎の血清も同時に採取した。1) PHAの脾細胞増殖作用に対する抑制活性: 損傷二次房水の高速液体クロマトグラフィーのゲル濾過による分画で、穿刺二次房水や血清とは異なる抑制活性が見いだされた。2) 角膜内皮細胞の増殖促進活性: 損傷二次房水のゲル濾過による分画で穿刺二次房水や血清とは異なる増殖促進活性が認められた。3) 多核白血球に対する化学遊走活性: いずれの房水及び血清にも化学遊走活性が認められたが、同一蛋白量で比較すると損傷二次房水中の活性が最も強かった。以上のように、角膜の内皮及び実質の損傷後の二次房水に、血液—房水柵の破綻による血液由来の物質とは別の活性物質の出現を確認した。(日眼 92: 987—995, 1988)

キーワード: 角膜損傷, 二次房水, 免疫抑制活性, 内皮細胞増殖促進活性, 化学遊走活性

Abstract

Prominent activities related to immunological and inflammatory responses were found in secondary aqueous humor (AH) of the rabbit obtained after inflammation induced by mechanical injury of the cornea. The secondary AH (scratch-AH) was collected 30, 60 and 120min after scratching of the rabbit corneal endothelium and stroma with 26-gauge needle inserted into the anterior chamber. Secondary AH (para-AH) was also collected after sham operation, i.e. only paracentesis by the needle but not scratching the cornea. Blood sera collected from the rabbits were used as controls. Protein contents in both scratch- and para-AH increased to almost 30mg/ml at 30min after the injury. This suggested that the blood-aqueous barrier was broken even by the sham operation. A specific fraction of the scratch-AH fractionated by gel filtration chromatography showed suppressive effect on PHA-induced uptake of ^3H -thymidine by cultured rabbit spleen cells. The pattern of this suppressive effect was different from those obtained in para-AH and the sera. The scratch- and para-AH showed markedly enhanced activities for the growth of primarily cultured endothelial cells of the rabbit cornea. These activities were found in ultrafiltrated fractions of more than 10,000 daltons. By gel filtration analysis, potent enhancing activity was found in scratch-AH in two fractions (fraction 7 and 13) and the pattern of the activity was different from that in the sera. Chemotactic activity of the

別刷請求先: 020 盛岡市内丸19-1 岩手医科大学眼科学教室 清野 雅子 (昭和63年1月27日受付)

Reprint requests to: Masako Seino, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Iwate Med. Univ.
19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Accepted for publication January 27, 1988)

scratch-AH for rabbit polymorphonuclear leukocytes was strongest among the para-AH and the sera. These results suggested that specific activities related to immunological and inflammatory responses appeared in the AH after the mechanical injury of corneal cells. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 987—995, 1988)

Key words: Corneal injury, Secondary aqueous humor, Immunosuppressive activity, Endothelial cell growth enhancing activity, Chemotactic activity

I 緒 言

房水 (aqueous humor; AH) は角膜や水晶体の機能維持のために、これらに栄養分を供給している。その成分のほとんどが無機質で、蛋白濃度は一次房水では血清の約100分の1の微量である。しかし、機械的刺激や炎症が生じると、房水の蛋白濃度は急激に上昇し、また、免疫グロブリン、補体などが高濃度に検出されるようになる。さらには多核白血球やリンパ球、単球などが侵入してくる (二次房水)^{1)~3)}。これらは毛様体や虹彩の血管壁に存在する血液—房水柵が破綻し、血液成分が漏出するためと考えられている。

著者はこれまでに、家兎角膜内皮細胞の初代培養細胞の六角形の形態は、インターロイキン1 (IL1) によって紡錘状に変化することを報告した⁴⁾。この形態の変化は、内皮細胞が損傷を受けたときの修復過程に類似していることから、角膜内皮損傷後の二次房水中のIL1活性の存在を推定し、その定量を試みたが、検出し得なかった (清野・稲田ら、未発表)。しかし、二次房水には一次房水にはみられない数多くの物質が含まれており、これらの物質は房水と接している角膜内皮細胞などの組織と免疫学的にあるいは炎症に際して、密接な関係を有していることが推察される。

そこで著者は、炎症のモデルのひとつとして、角膜の内皮と実質の一部に機械的に損傷を加えたのちに二次房水を採取し、これに含まれていると予想される免疫及び炎症に関与する物質が、PHA刺激による脾細胞の増殖及び培養角膜内皮細胞の増殖、あるいは多核白血球に対する化学遊走活性にいかに関与を及ぼすかについて検討を行った。

II 実験材料と方法

1. 実験動物

健康な白色家兎 (雄、体重2.5~3.0kg) を用いた。

2. 房水及び血清の採取

1) 損傷二次房水：塩酸オキシブプロカイン (ペノキ

シール®) で点眼麻酔後、角膜輪部より26G注射針を前房内へ刺入し、対側の輪部付近から刺入点まで放射状に5本の線をひく要領で、針先で角膜の内面を擦過することによって、角膜の内皮及び実質の一部に機械的に損傷を加えた。損傷の深さについては、予備実験として損傷後の角膜切片のH-E染色標本を観察し、内皮及び実質の約5分の1の深さまで損傷が達していることを確認した。別々の家兎について、内皮損傷後30分 (全実験で22眼、以下同じ)、60分 (14眼) 及び120分 (16眼) に再び点眼麻酔後、最初の刺入点から26G針付注射器により、一眼につき約0.2 mlの房水 (損傷二次房水) を採取した。

2) 穿刺二次房水：角膜内皮に損傷を加えずに、26G注射針による前房穿刺のみを行って、前房穿刺後30分 (12眼)、60分 (6眼) 及び120分 (6眼) に上記と同様の房水 (穿刺二次房水) を採取した。

3) 一次房水 (正常房水)：正常家兎眼 (10眼) に点眼麻酔を行った後、角膜輪部より26G針付注射器で前房から一眼につき約0.2 mlの房水 (正常房水) を採取した。

4) 血清 (rabbit serum; RS)：上述の房水を採取した家兎において、同時に耳静脈より5~10 mlの血液を採取し、血清を得た。上記1) 2) 3)の房水と対応する血清をそれぞれ損傷家兎血清、穿刺家兎血清、正常家兎血清とした。

以後、これらの房水及び血清を被検標品と総称することとする。

3. 蛋白量の定量

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) を標準蛋白として、Bio-Rad Protein Assay キット (Bio Rad) を用い、採取した被検標品の蛋白量を定量した。

4. 家兎脾細胞の培養、及び脾細胞の増殖に対する房水、血清の影響

正常家兎 (6羽) に、ペントバルビタールナトリウム (ネプタール®) を耳静脈より過剰投与して致死せ

しめ、直ちに無菌的に脾臓を摘出した。2.5%家兎自己血清加 RPMI 1640 培地 (Nissui) に脾細胞 ($3 \times 10^6/\text{ml}$) を浮遊させ、これに T 細胞分裂因子であるレクチン: phytohemagglutinin-P (PHA, Difco) $6.25 \times 10^{-6} \text{M}$ を 10% の濃度で加え、96 穴マルチ皿 (Nunc) に $200 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し、これに被検標品を $5 \sim 40 \mu\text{l}/\text{well}$ の種々の量で添加し、 37°C 、5% CO_2 、高湿下で培養した。なお、損傷家兎血清と穿刺家兎血清については、生理食塩水で希釈することにより、それぞれ対応する損傷二次房水、穿刺二次房水と同一の蛋白量に調整してから上記の操作を行った。48 時間後に ^3H -チミジン (Amersham) $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ を加えてさらに 18 時間培養したのち、脾細胞を自動セルハーベスター (ラボサイエンス) でガラス濾紙上に集めた。この脾細胞の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することによって脾細胞の ^3H -チミジンの取り込み量を計測し、脾細胞の分裂、増殖の指標とした。

なお、添加する自己血清の濃度が 2.5% よりも高濃度では ^3H -チミジンの取り込みが低下したので、自己血清の濃度は 2.5% とした。

5. 房水及び血清の高速液体クロマトグラフィーによる分画並びに各画分の脾細胞の増殖に及ぼす影響

損傷二次房水と損傷家兎血清、穿刺二次房水と穿刺家兎血清 (各々 3 羽、6 眼ずつ、ただし 30 分の損傷二次房水、損傷家兎血清については 4 羽、8 眼) について (血清は生理食塩水で希釈して房水と同一蛋白量に調整したのち)、高速液体クロマトグラフィー (Fast Protein Liquid Chromatography: FPLC, Pharmacia) のゲル濾過カラム (Superose 12) を用いて、分子量 (M.W.) の相異で分画した。すなわち、1/100 phosphate buffered saline (PBS) (－) で平衡化したカラムに上記の被検標品 $200 \mu\text{l}$ を注入し、流速 $0.5 \text{ ml}/\text{min}$ で分画量を 1.0 ml として分画した。分子量マーカーとしては、BSA (M.W. 68,000, Boehringer) 及び、キモトリプシノーゲン A (M.W. 25,000, Boehringer) を用いた。

得られた各画分を被検標品として、前項の 4. に示した方法で脾細胞の ^3H -チミジンの取り込み量を計測した。対照の PBS (－) による脾細胞への ^3H -チミジンの取り込み値を分母とし、各画分による取り込み値を分子として、stimulation index (SI) を計算し、各画分の活性 (1 以下が抑制活性) として表した。

6. 角膜内皮細胞の培養、及び培養内皮細胞の増殖に対する房水、血清の影響

正常家兎 (8 羽) にネプタール® を耳静脈より過剰投与して致死せしめ、直ちにレーザーメスと弯剪刀を用いて角膜片を採取した。デス膜ごと内皮細胞層を剝離し、0.25% トリプシンを 37°C で 1 時間反応させて内皮細胞を単細胞に分散させた。これを 10% ウシ胎児血清 (FCS, Boehringer) 加 Eagle's MEM (Nissui) で $1 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度に調整して、 $200 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつを 96 穴マルチ皿に分注し、約 48 時間、5% CO_2 下で単層培養した。初代培養細胞が subconfluent の状態になった時点で 1% FCS 加培地に交換し、1:1 から 1:16 まで生理食塩水で希釈した被検標品及び高速液体クロマトグラフィーにより分画した 30 分の損傷二次房水と損傷家兎血清、並びに穿刺二次房水と穿刺家兎血清を、各々 $20 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加えてさらに培養を続けた。24 時間後に ^3H -チミジン ($1 \mu\text{Ci}/\text{well}$) を加えてさらに 18 時間培養し、前項の 4. と同様にして培養角膜内皮細胞の取り込んだ放射活性を測定することによって、内皮細胞の分裂、増殖の指標とした。

なお、正常家兎 1 羽 2 眼の角膜から、40~70well 分の内皮細胞が得られた。

7. 房水及び血清の限外濾過による分画並びに各画分の角膜内皮細胞増殖に及ぼす影響

30 分と 120 分の損傷二次房水と損傷家兎血清、30 分と 120 分の穿刺二次房水と穿刺家兎血清 (血清は生理食塩水で希釈して房水と同一蛋白量に調整したのち) を、限外濾過膜であるセントリコン-10 (Amicon, 分子量 1 万で分画) に入れて、6,000 rpm で遠心し、その濾液を分子量 1 万以下の画分とした。また、膜上のものを生理食塩水で分画前の量までもどし、これを分子量 1 万以上の画分とした。前項の 6. の方法で培養した角膜内皮細胞に、1:1 から 1:16 まで生理食塩水で希釈した分子量 1 万以上あるいは 1 万以下の画分を加え、前項の 4. の方法で内皮細胞の放射活性を測定することにより、両者の画分の内皮細胞の増殖に及ぼす影響をみた。

8. 末梢血多核白血球に対する化学遊走活性の測定

正常家兎 (6 羽) の血液と 3% デキストラン T-500 (Pharmacia) を 3:2 の割合で混合し、室温で 1 時間静置した。白血球を含む上清を採取し、これを遠心分離を繰り返して RPMI 1640 培地で洗浄し、細胞数が約 $1 \times 10^7/\text{ml}$ となるように調整して多核白血球浮遊液を得た。10% FCS を含むハンクス液 (ヘベス緩衝液) で 1.5% アガロース溶液を作成し、固まらないうちに直径 6 cm のプラスチックシャーレに約 5 ml 流し、固め

た。これに直径3mmの穴を3mm間隔に3個一列にあけ、中央の穴に多核白血球浮遊液、両側の一方に被検標品(24眼, 215標品)を、もう一方に対照としてRPMI 1640培地を各々 $10\mu\text{l}$ ずつ入れ、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、高湿下に置いて白血球を2時間遊走させた。同程度の蛋白濃度で比較するために、蛋白濃度の高い被検標品については、生理食塩水で希釈することにより一旦 $10\sim 12\text{mg/ml}$ の蛋白濃度に調整したのち、それぞれを生理食塩水でさらに二倍段階希釈し、 $5\sim 6$ 種の蛋白濃度とした。プレートごとホルマン固定し、アガロース層を剥がし、プラスチック底に固定された細胞をギムザ染色した。これをオリンパスBH顕微鏡に装着した投影機でスクリーンに映し出し、多核白血球の遊走距離を測定した。対照の距離(A)と被検標品の距離(B)から、chemotactic index (CI)を B/A によって求め、化学遊走活性の指標とした。

III 結 果

1. 房水の蛋白量 (図1)

損傷二次房水の蛋白量は損傷後60分で平均 30.3mg/ml のピークに達した。穿刺二次房水の蛋白量は、

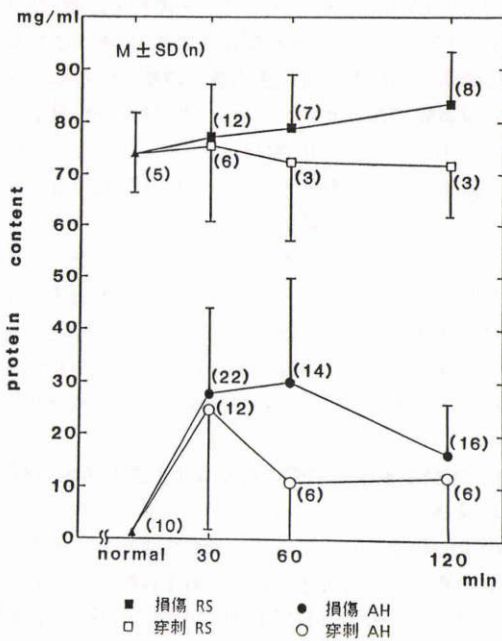


図1 損傷・穿刺二次房水、一次房水(正常房水)及び血清の蛋白量
二次房水をAH、血清をRSと略した。
RSの()は羽数を、AHの()は眼数を表す。

穿刺30分後が最も高く 24.9mg/ml で、60分後に 10.6mg/ml となった。なお一次房水(正常房水)の蛋白量は平均 1.0mg/ml であった。損傷家兎血清及び穿刺家兎血清の蛋白量は、いずれの時間でも正常家兎血清の値(平均 74.2mg/ml)と差がなかった。

2. PHAによる脾細胞増殖に及ぼす房水の影響 (図2, 3a, b, 4a, b)

損傷二次房水及び損傷家兎血清は、30分、60分、120分のいずれもほぼ同程度に脾細胞の ^3H -チミジンの取り込みを減少させ、脾細胞増殖を抑制する結果を得た。また減少率は、房水や血清の添加量が増加するほど大きくなった。穿刺二次房水と穿刺家兎血清及び正常家兎血清も、上記の損傷二次房水及び損傷家兎血清と同様に、添加量が増加するほど脾細胞の増殖を抑制した。図2にはこれらの代表として、一次房水及び30分の二次房水と血清の結果を示した。一次房水は添加量にかかわらず ^3H -チミジンの取り込みに何等の影響を及ぼさなかった。

損傷二次房水と損傷家兎血清との間にPHAによる脾細胞増殖に対する抑制作用に質的差が存在するか否かをみるため、高速液体クロマトグラフィーのゲル濾過カラムで分画した損傷二次房水と損傷家兎血清の画分毎の脾細胞増殖への影響を検討した。その結果、30分の損傷二次房水と損傷家兎血清との間で明らかな質的差異を認めた。すなわち、図3a, bにその代表例を

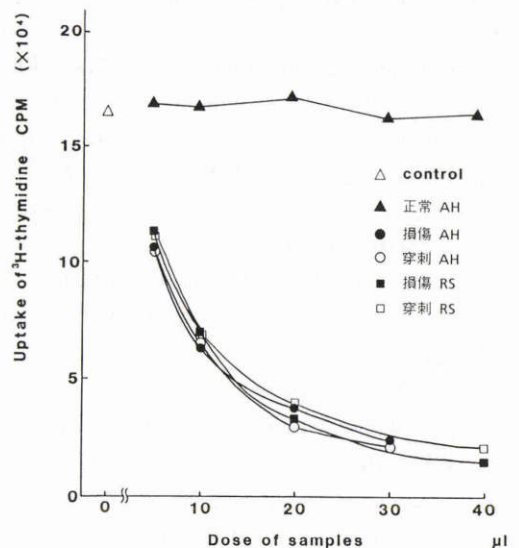


図2 PHAの家兎脾細胞増殖作用に及ぼす一次房水(正常房水)、二次房水及び血清の影響
 Δ は生理食塩水を加えた場合の対照を表す。

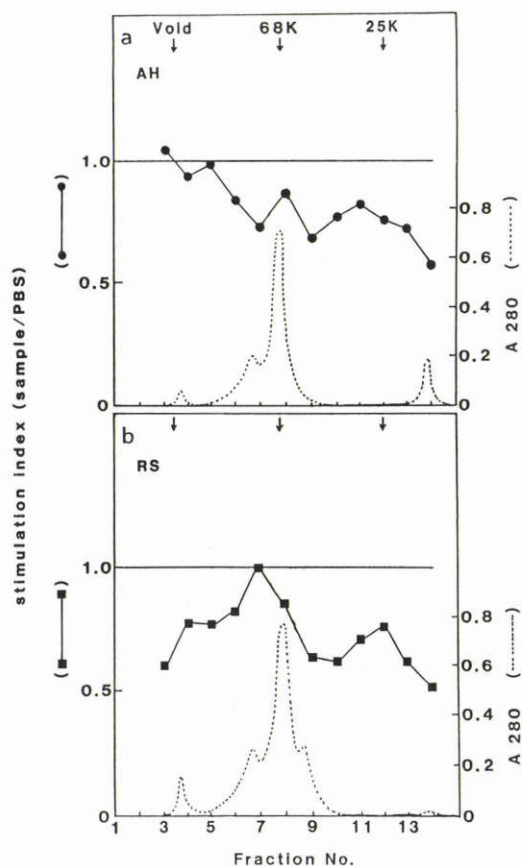


図3 30分後に得た損傷二次房水(a)及び損傷家兎血清(b)のゲル濾過画分のPHAの家兎脾細胞増殖作用に及ぼす影響

●—●または■—■は各画分の stimulation index (SI)を示した、SIは ^3H -チミジンの取り込み値について画分/PBS(—)で表した、----はOD 280でみた蛋白の溶出パターンを示す。

グラフにして示したが、房水の画分3から5まで(M.W. 150K~400K ダルトン)には脾細胞増殖に対する抑制活性はほとんど認められなかったが、血清の同画分には強い抑制活性が検出された。他方、画分7(70K~100K)では、房水に強い抑制活性が確認されたのに対し、血清には全く認められなかった。低分子の画分では、房水、血清ともに抑制活性が明瞭に検出され、特に画分14(6.5K~9.2K)で著明であったが、両者の抑制活性のパターンに明瞭な差はなかった。

120分の損傷二次房水と損傷家兎血清についても図4a, bにその代表例を示したように、両者間に30分の場合とはほぼ同じ傾向がみられたが、各画分毎の比較では房水と血清とはわずかに異なっていた。すなわち、

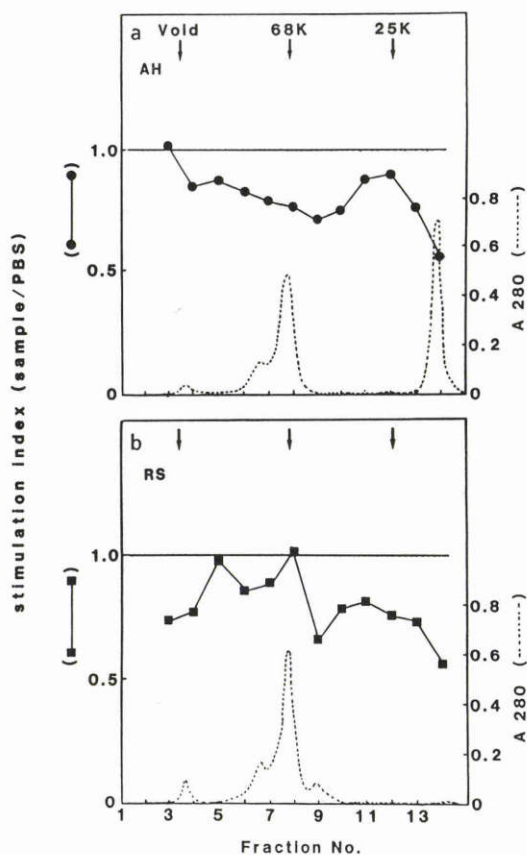


図4 120分後に得た損傷二次房水(a)及び損傷家兎血清(b)のゲル濾過画分のPHAの家兎脾細胞増殖作用に及ぼす影響

図3の説明と同じ。

房水では抑制活性が画分4からみられ始め、画分9まで次第に強まった。血清では、30分では画分7に抑制活性がみられなかったが120分では画分8で抑制活性が認められなかった。低分子の画分では、房水、血清ともに特に画分14に強い抑制活性が認められた。

60分の損傷二次房水と損傷家兎血清の脾細胞増殖抑制活性も、互いに異なる画分にみられ、それぞれ30分の成績に近い所見を得た。

穿刺二次房水の30分、60分、120分の結果は、図には示さないが、上記の30分の損傷家兎血清の画分毎の脾細胞の増殖抑制パターンにはほぼ類似していた。

以上から、損傷二次房水と損傷家兎血清には脾細胞に対する増殖抑制活性が見いだされ、両者の活性の強さに差異は認められなかったが、ゲル濾過で分画することによって、損傷二次房水中の抑制活性は、血清中

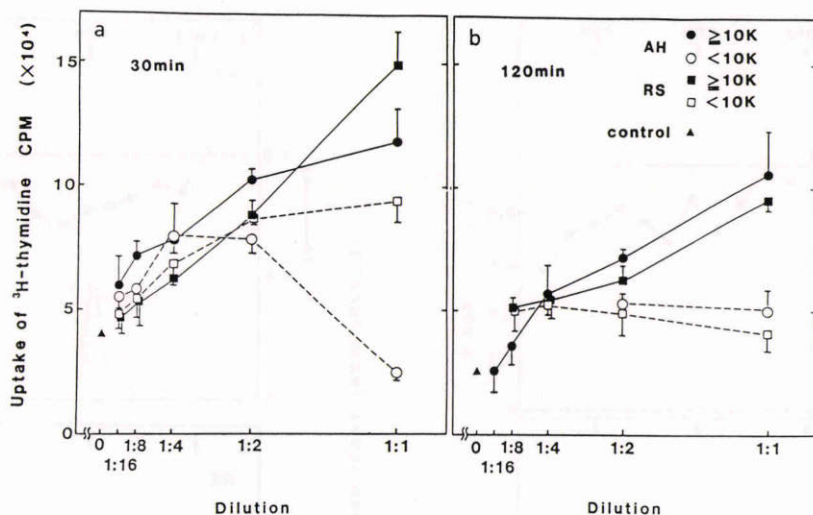


図5 培養家兎角膜内皮細胞の増殖に及ぼす30分(a)及び120分(b)の損傷二次房水及び損傷家兎血清の影響

▲は生理食塩水を加えた場合の対照を表す。

とは異なる分子量のものが担っていることがわかった。

3. 角膜内皮細胞の増殖に及ぼす房水の影響(図5a, b, 6a, b, c)

30分の損傷二次房水(6眼)では, 図5a, bにその代表例を示したように(グラフは各々の被検標品についての3回の実験結果の平均値 $\pm$ SDで表す), 限外濾過による10K以上の画分は, 房水の生理食塩水による希釈度が少ないほど, すなわち房水の濃度が高いほど, 内皮細胞の ^3H -チミジンの取り込みが増加し, 内皮細胞の分裂, 増殖が促進された事を示していた。10K以下の画分では1:16から1:4までの希釈度では ^3H -チミジンの取り込みは量依存性に増加したが, 1:1では対照の生理食塩水による場合よりもむしろ少なかった。一方, 損傷家兎血清(3羽)では, 10K以上, 10K以下いずれも同程度に量依存性に内皮細胞への ^3H -チミジンの取り込みを増加させたが, 1:1では両者に差が認められ, 10K以上の活性が強かった。

120分の損傷二次房水(4眼)及び損傷家兎血清(3羽)では, 10K以上の画分で房水, 血清のいずれも同程度に ^3H -チミジンの取り込みを増加させた。

次に, 高速液体クロマトグラフィーで分画した30分の損傷二次房水及び損傷家兎血清は分子量によって両者の増殖促進活性が異なることが明らかになった(図6a, cにその代表例を示す)。すなわち, 房水で画分3, 7, 10及び13に活性のピークが認められ, 特に画分7と13の活性が強かった。しかし血清では画分8と11に

のみ強い活性が存在した。

30分の穿刺二次房水の増殖促進活性は, 図6bに示すように, そのピークが画分8と13にみられ, 30分の損傷二次房水と損傷家兎血清の結果を組み合わせた結果であった。

以上のように, 角膜内皮細胞増殖を促進する活性物質は, 損傷二次房水と損傷家兎血清, あるいは穿刺二次房水と穿刺家兎血清のいずれにも分子量10K以上の画分にみられたが, 房水と血清とは分子量が異なる結果を得た。

4. 多核白血球に対する化学遊走活性(図7a, b)

損傷二次房水, 損傷家兎血清, 穿刺二次房水及び穿刺家兎血清の多核白血球に対する化学遊走活性は, 30, 60分及び120分のいずれも, 損傷二次房水が穿刺二次房水や両血清と比較して強かった(図7a, bに30分と120分の代表例を示す)。

以上のように, 損傷二次房水には, 穿刺二次房水や血清よりも強い多核白血球遊走活性の存在を確認した。

IV 考 按

生体のある局所に炎症が生じると, その炎症反応に関与する種々の活性物質が局所で産生ないし分泌される。著者が以前に二次房水中の定量を試みたIL1はその代表的なもので, それ自身様々な活性を示すとともに, 血行を介して肝に入り, 肝細胞からの急性期反応物質の産生も促す⁹⁾。炎症が眼で起こった場合には,

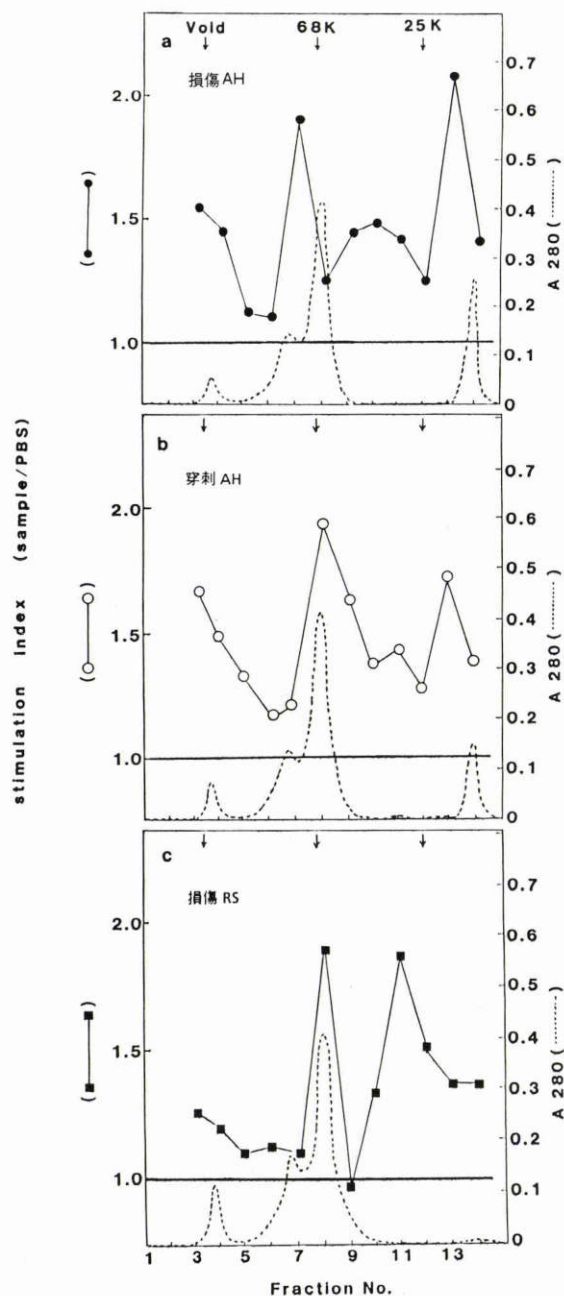


図6 30分後に得た損傷二次房水 (a), 穿刺二次房水 (b) 及び損傷家兎血清 (c) のゲル濾過画分の培養家兎角膜内皮細胞の増殖に及ぼす影響
各画分の³H-チミジンの取り込み値を対照のPBS (—) に対する stimulation index (●—● ○—○ ■—■) で表した。

血液—房水柵の透過性が変化するため、二次房水中に血液由来の成分が出現するが、この他に、炎症によ

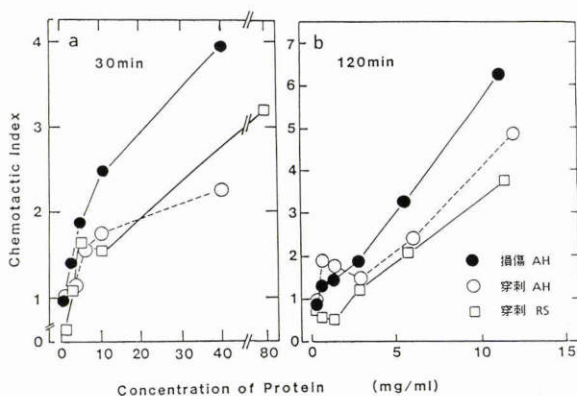


図7 30分 (a) 及び120分後 (b) に得た損傷・穿刺二次房水及び血清の家兎末梢血多核白血球に対する化学遊走活性
対照の遊走距離 (A) と被検標品 (B) から chemotactic index を B/A で表した。

て局所で産生ないし分泌された成分が前房中に検出されることが考えられる。角膜、虹彩あるいは毛様体などがこの局所的に出現する物質の産生ないし分泌に関与していると思われるが、本研究ではこのような物質の性質について、3種の活性を調べることにより検討した。

1. PHA による脾細胞増殖に及ぼす房水の影響

損傷、穿刺いずれの二次房水でも、それぞれの家兎血清の場合とはほぼ同様に脾細胞の増殖を抑制する結果を得たが、このことは、房水中に漏出した血清に起因する結果であるとも考えられる。しかし、損傷二次房水と損傷家兎血清を、FPLCのゲル濾過カラムで分画した各画分毎にみた結果では、両者の免疫抑制活性を表すSIは明らかに異なったパターンを示した。それに対し、穿刺二次房水と穿刺家兎血清のゲル濾過画分のSIは明瞭な差がなかった。すなわち、角膜損傷の有無で房水と血清との間に免疫抑制活性の相異がみられた。このことより、損傷二次房水中の免疫抑制活性は血清由来のものではなく、角膜の内皮や実質の損傷に関与して出現したものであることが示唆される。

損傷二次房水の画分毎の免疫抑制活性の強さは、30分と120分とで差があり、30分では画分7に、120分ではより高分子の画分にも抑制活性が認められた。これは、角膜損傷後の炎症早期に房水中に出現した抑制活性物質に加えて、時間の経過とともにさらに高分子の抑制活性物質が血液中あるいは角膜の損傷部位から房水中に出現した可能性を示している。

炎症時の房水中には柵の破綻によって血清も侵入す

るので、30分の損傷二次房水中にも血清の画分3～5に相当する150K～400Kの抑制活性が検出されることが予測されたが、実際には見いだせなかった。これは房水中に脾細胞の増殖を促進する別の活性が出現し、これらが競合したことによって抑制活性の発現がみられなかったことが考えられる。また、血液—房水柵に破綻を来した場合、血清成分が前房に一樣に漏出するのではなく、選択的に漏出する可能性もある。つまり、150K～400Kの抑制活性物質が選択的に漏出しなかった可能性もある。しかし、嶋田⁹⁾は血液—房水柵は正常時は選択的な柵であり、これが破綻すると選択性が消失すると述べている。従ってこの柵の変化による影響に関しては、上述の選択的漏出の考えだけでは説明し難い点が残し、さらに検討が必要と思われる。

家兎の脾臓リンパ球のPHAによる³H-チミジンの取り込みを、家兎血清が抑制した機作は不明である。血清は活性化された血液凝固因子を含み、これが脾細胞に対して毒性を有していることも推測される。しかし、その後、血漿を用いた実験でも血清と同様に脾細胞の増殖を抑制した(清野ら、未発表)ことから、活性化された血液凝固因子が脾細胞の増殖を抑制した可能性は少ない。また、脾細胞の増殖促進因子として、PHAの代わりにコンカナバリンAを用いても、血清によって脾細胞の³H-チミジンの取り込みが抑制された。従ってPHAとTリンパ球の特異的結合が自己血清によって抑制されたとも考え難い。なおこのような家兎脾臓リンパ球機能の家兎血清による抑制作用と同様の現象は、異種血清であるFCSでも認められた。

また、家兎血清はマウスリンパ球に毒性を示すとされているが、この毒性はアガロースやマウス組織によって吸収される¹⁰⁾と言われている。著者も別の実験で、アガロースで処理した家兎血清を用いて家兎脾臓リンパ球に対する影響を検討したが、脾臓リンパ球の³H-チミジンの取り込みは抑制された。

従って、家兎血清の家兎脾臓リンパ球に対する増殖抑制作用が単にin vitroの現象なのか、in vivoでも起こっているのかは、今後種々の検討によって明らかにすべきであろう。

以上の著者のゲル濾過の成績から、損傷二次房水中の免疫抑制作用は、侵入した血清だけによるものではなく、房水中に局所的に新たに出現した抑制活性物質によっていることが推察された。この抑制活性物質が前房内に侵入したリンパ球にどのように作用しているかは、非常に興味深いものであり、著者はこの抑制活

性の存在が、眼においては免疫反応が起こりにくいことの理由の一部となりうるものと推察している。

2. 角膜内皮細胞の増殖に対する房水の影響

角膜内皮細胞の増殖を促進する活性は、損傷二次房水、損傷家兎血清のいずれにも同等に30分及び120分に見られた。しかし、FPLCによるゲル濾過の分画による解析では、損傷二次房水、穿刺二次房水、血清(損傷家兎血清及び穿刺家兎血清)の三者の間に明らかに質的差が認められた。このことは、損傷二次房水中に血清及び穿刺二次房水の中にはない角膜内皮細胞増殖を促進する新たな活性(画分7)が出現したことを示している。

Ledbetter ら⁷⁾⁸⁾は、家兎やネコの前房穿刺後に得た二次房水が、ウシの角膜内皮細胞の増殖を促進したと報告した。さらに彼らは、活性炭で、プロスタグランジン(PG)や芳香族化合物を吸着した後の二次房水には、内皮細胞に対する増殖促進作用がみられなかったことから、その活性物質として、種々の培養細胞に対して分化促進作用を有するとされているPGEを推定している。著者の場合も、PGEが角膜内皮細胞増殖因子の一つとして考えられる。しかし、ゲル濾過の成績では、穿刺、損傷いずれの二次房水中にも分子量的にPGEを推定できる画分にその活性は見いだせなかった。ただし、PGEがcarrier蛋白と結合して存在していればゲル濾過によってPGE本来の分子量よりも高分子の物質として分画される可能性もあると考えられる。

ヒトの角膜内皮細胞は損傷を受けた場合、欠損部の補填は、その辺縁の細胞の拡大と移動によって行われ、内皮細胞の増殖は、ウシや家兎と比較すると極めてわずしか起こらない。しかし、Nayak ら⁹⁾は、角膜移植術のための提供角膜の不足を補うために、あらかじめ内皮細胞をin vitroで増殖させ、これを移植に用いることは興味あることとして、ヒト内皮細胞のin vitroでの増殖を試みている。これによると、ヒト角膜内皮細胞は特に、endothelial cell growth factor (ECGF), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF)などの増殖因子に反応して増殖したという。

以上から、PGEあるいは上記の増殖促進因子が内皮や実質の損傷を引き金として、直接それらの損傷細胞から房水中に出現し、内皮細胞の増殖に促進的に影響を与えていることが現在のところ最も考えられる。しかし、柵の破綻により血液成分が修飾されて房水中へ

移行したことも否定できない。

3. 多核白血球に対する化学遊走活性

本研究によって角膜損傷あるいは前房穿刺の後の房水中に多核白血球に対する化学遊走活性因子が存在すること、及びその活性は穿刺二次房水や血清よりも損傷二次房水において強いことが判明した。従って、損傷二次房水中には血清由来の多核白血球化学遊走活性に加えて、角膜局所で産生された化学遊走因子が含まれていることが示唆された。二次房水、特に角膜損傷による炎症惹起後の二次房水に白血球化学遊走活性を認めた報告は、著者の知るところではこれが最初である。

前房内へアラキドン酸、PGあるいはロイコトリエン B_4 を注入して前房内への白血球の集積状態を比較した実験¹⁰⁾や、これらの薬剤を pellet として角膜へ埋め込んで局所への多核白血球の集積をみた研究¹¹⁾で、ロイコトリエン B_4 に強い化学遊走活性があることが報告されている。また、前房穿刺、あるいはサルモネラエンドトキシンによる眼内炎の際に、房水中のロイコトリエン B_4 などのアラキドン酸のリボキシゲナーゼ代謝産物が非炎症眼よりも明らかに増加していたとの最近の報告¹²⁾がある。本研究の場合でもロイコトリエン B_4 などが多核白血球の遊走因子として考えられる。しかし、上述の報告とは異なる角膜内皮及び実質の機械的損傷の方法を施行した点を考慮すると、別の化学遊走活性に関する物質も否定できないと思われる。

4. 小括

著者の行った角膜内皮及び実質の損傷による実験的炎症の惹起方法によるこの種の検討は、これまでに報告がない。損傷二次房水中の脾細胞増殖抑制活性、培養角膜内皮細胞増殖促進活性及び多核白血球に対する化学遊走活性という3種の活性は、血清あるいは穿刺二次房水中のものとは質的に異なったことから、角膜内皮及び実質の一部に加えた損傷がこれらの活性の出現に特異的に関連している可能性が高い。いかなる細胞がこれらの活性因子の出現に関与しているのか、また、これらの活性はいかなる物質であるのかについては、本実験のみでは不明であり、実質細胞や内皮細胞の培養上清を用いて現在検討中である。

しかし、本研究によって、角膜の内皮及び実質の損傷後の二次房水には、免疫に関与する活性として、局所で産生される脾細胞の増殖抑制活性、PGE や種々の

増殖促進因子などの培養角膜内皮細胞増殖促進物質、及び炎症に関与するロイコトリエン B_4 などの化学遊走因子が出現し、それぞれ、炎症状態にある眼において合目的に作用している可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました眼科学講座田澤 豊教授、並びに細菌学講座吉田昌男教授に感謝いたします。またご助言、ご協力をいただきました細菌学講座稲田捷也講師、並びに教室員各位に謝意を表します。

文 献

- 1) Duke-Elder PM, Duke-Elder WS: The vascular responses of the eye. Proc Roy Soc B 109: 19—28, 1931.
- 2) 塩瀬芳彦: 眼内 barrier 機構とその臨床的意義. 臨眼 31: 9—21, 1977.
- 3) 嶋田孝吉: 眼における免疫の特異性. 松田英彦編, 眼科 Mook, 24, 眼疾患と免疫, 東京, 金原出版, 84—92, 1985.
- 4) 清野雅子, 小野寺毅, 熊谷俊一他: インターロイキン 1 と培養家兎角膜内皮細胞. あたらしい眼科 3: 1044—1046, 1986.
- 5) Oppenheim JJ, Gery I: Interleukin 1 is more than an interleukin. Immunol Today 3: 113—119, 1982.
- 6) Cohen A, Schlesinger M: Absorption of guinea pig serum with agar. Transplantation 10: 130—132, 1970.
- 7) Ledbetter SR, Hatchell DL, O'Brien WJ: Differential effect of secondary aqueous humor from rabbit and cat on DNA synthesis of cultured bovine corneal endothelial cells. Curr Eye Res 1: 723—726, 1981/1982.
- 8) Ledbetter SR, Hatchell DL, O'Brien WJ: Secondary aqueous humor stimulates the proliferation of cultured bovine corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 557—562, 1983.
- 9) Nayak SK, Binder PS: The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1213—1216, 1984.
- 10) Bhattacharjee P, Hammond B, Salmon JA, et al: Chemotactic response to some arachidonic acid lipooxygenase products in the rabbit eye. Eur J Pharmacol 73: 21—28, 1981.
- 11) Rochels R, Busse WD: In vivo evidence for the chemotactic activity of cyclooxygenase- and lipooxygenase-dependent compounds using a corneal implantation technique. Ophthalmic Rec 16: 194—197, 1984.
- 12) 増田寛次郎: 眼内炎症時の血液房水柵の破壊と化学伝達物質. 第91回日本眼科学会総会講演抄録集, 1987, p78.