

## 人眼水晶体上皮細胞の組織培養

## その2：水晶体上皮細胞の増殖・化生に対する

## ジクロフェナックナトリウムの抑制効果

西 佳代, 西 興史

西眼科病院

## 要 約

非ステロイド性抗炎症剤の人眼水晶体上皮細胞の増殖, 線維性化生に対する抑制効果を組織培養を用いて調べた。白内障術中前囊切開で得られた前囊片をそのまま検体とし, ジクロフェナックナトリウム $0.5\mu\text{g/ml}$ ~ $30\mu\text{g/ml}$ の各濃度を添加し静置培養した。各濃度で上皮細胞の増殖は抑制され, 病理組織で細胞の変性死滅が確認された。ジクロフェナックナトリウムの白内障術後の抗炎症効果, 特にフィブリン反応に対する効果は, プロスタグランジン合成抑制効果と共に上皮細胞増殖, 線維性化生抑制効果が関与している可能性がある。更に, この増殖, 線維性化生抑制効果から, 後発白内障の発生を有意に防止できる可能性が考えられる。(日眼会誌 95: 581-590, 1991)

キーワード：人眼水晶体上皮細胞, 非ステロイド性抗炎症剤, ジクロフェナックナトリウム, 増殖線維性化生, フィブリン反応

Tissue Culture of Human Lens Epithelial Cells  
Part II: Suppressive Effect of Diclofenac Sodium  
on Their Proliferation and Metaplasia

Kayo Nishi and Okihiko Nishi

Nishi Eye Hospital

## Abstract

We studied the suppressive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) on the proliferation and fibrous metaplasia of human lens epithelial cells (LEC) in cell culture. We cultured human LEC attached to a round piece of the central anterior capsule obtained by anterior capsulotomy during cataract surgery and added diclofenac sodium, the concentration of which varied from  $0.5\mu\text{g/ml}$  to  $30\mu\text{g/ml}$  gradually. Proliferation as well as fibrous metaplasia of LEC were suppressed. Histopathological examination revealed cell degeneration and death. Besides the apparent inhibition of diclofenac sodium on the biosynthesis of prostaglandins, this suppressive effect on LEC proliferation also may play a role in anti-inflammation after intraocular lens implantation. Further, secondary cataract may be prevented by this effect. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 581-590, 1991)

Key words: Human lens epithelial cell (LEC), Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), Diclofenac sodium, Fibrous metaplasia, Fibrin reaction

別刷請求先: 537 大阪市東成区中道4-14-26 西眼科病院 西 佳代

(平成2年6月15日受付, 平成2年10月25日改訂受理)

Reprint requests to: Kayo Nishi, M.D. Nishi Eye Hospital.

4-14-26 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan

(Received June 15, 1990 and accepted in revised form October 25, 1990)

## I 緒 言

ジクロフェナックナトリウム (ジクロード®), インドメタシンやフルピプロフェンは非ステロイド性抗炎症剤でサイクロオキシゲナーゼの抑制を介してプロスタグランディンの生合成を抑制すると考えられている。白内障手術後の炎症を抑制し<sup>1)~5)</sup>, 前房内蛋白をレーザーフレアセルメーターで測定した研究では非投与群と比べて有意にフレア値が低いという報告<sup>6)7)</sup>がある。又, 白内障術後のフィブリン反応に対しても非常に有効<sup>3)4)6)7)</sup>で数%~30%と言われている発生率が少なくなる。我々の施設では1%以下<sup>8)</sup>である。

このような劇的な臨床上的有効性は必ずしも本薬剤の有するプロスタグランジン生合成抑制作用だけでなく, 眼内組織に対する他の薬理効果も存在するのではないかと我々は考えた。即ち, 眼内レンズ挿入術後のフィブリン反応は水晶体上皮細胞の増殖, 線維性化生の間におきる生体反応である, と我々は提唱してきた<sup>9)~13)</sup>が非ステロイド性抗炎症剤は上皮細胞の増殖, 線維性化生を抑制するのではないかと考え組織培養によってこれを確認したので報告する。

## II 実験方法

眼内レンズ挿入術中, 前囊切開で得られた直径ほぼ5~6mmの円形の前囊片を10%胎児牛血清を含むEagle's MEM (阪大微研) の入った48穴 multidish 中に入れる。ジクロード®点眼液 (1ml中にジクロフェナックナトリウム1mg, 基剤として溶剤100ml中ホウ酸1.5g, ホウ砂0.45g, 保存剤クロロブタノール0.5g, ポリビニルピロリドン K25 3g, ポリソルベート80 0.5g含有)を培養液に加え0.5mlとした。37°C 5% CO<sub>2</sub>湿度100%中で培養し, 経時的に倒立位相差顕微鏡で観察した。培養液は週2回交換した。ジクロード®は1回添加の検体以外はその都度, 同量を添加した。ジクロード®点眼液の添加量はそれぞれ15 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 2.5 $\mu$ l, 1 $\mu$ l, 0.25 $\mu$ lである。培養液のジクロフェナックナトリウムの濃度はそれぞれ30 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 2 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 0.5 $\mu$ g/mlとなる。各濃度でそれぞれ5検体ずつ実験を行なった。更に, コントロールとして5検体で同じジクロード®点眼液からジクロフェナックナトリウムを除いた基剤のみの溶液15 $\mu$ lを培養液に持続添加して全量0.5mlとして培養した。

倒立位相差顕微鏡で特に水晶体上皮細胞がwellの

底と接する部分, 切開縁そしてwell周辺部への増殖を中心に4週目まで観察した。

## III 結 果

同様の前囊片を用いたヒト水晶体上皮細胞の組織培養では, 前報<sup>13)</sup>で報告したように, 60検体での観察において水晶体上皮細胞はwellの底に接すると, 早いものでは1日目より増殖, 線維芽細胞様細胞に化生を起こし, 前囊切開縁では特に早期に強い増殖, 化生が認められ, 6~7日目頃には, 前囊下全体がpleomorphで大小さまざまな細胞で占められる。この細胞増殖変化は遠心性にwellの底に沿って増加し, 4週目から8週目にかけて程度の差はあるもののほぼconfluentな状態になる。

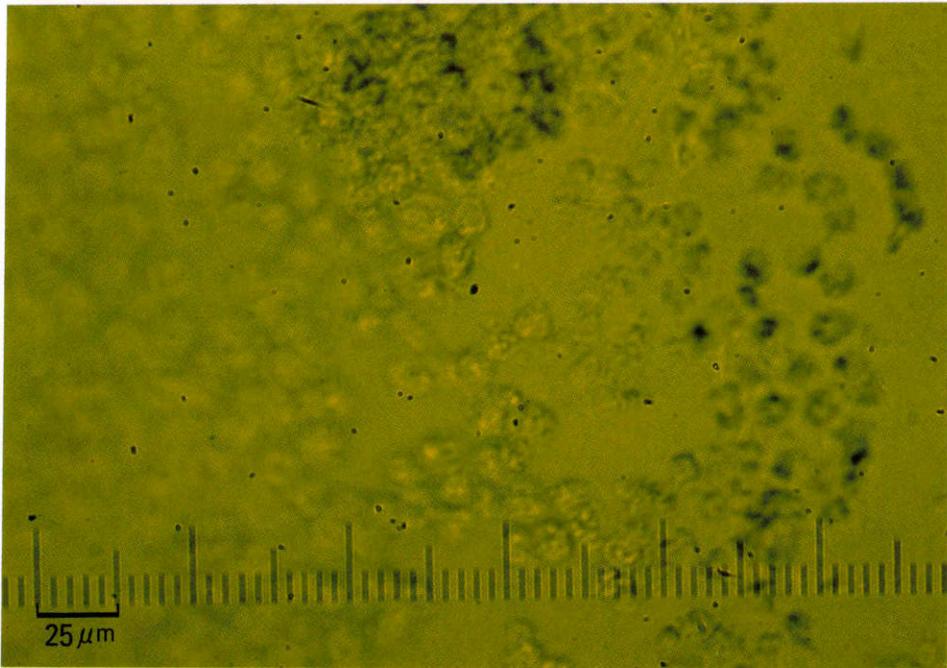
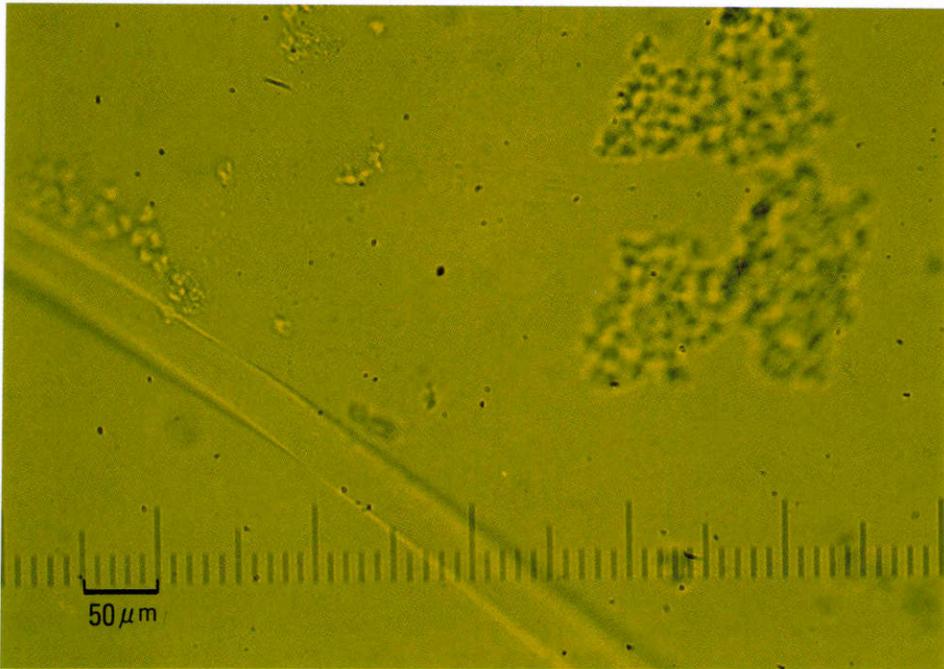
濃度30 $\mu$ g/mlを1回添加した場合には完全な抑制効果が得られ, その後の数週間の観察でも通常に見られる増殖, 線維芽細胞様細胞への化生は全く観察できなかった(図1a, 1b)。その病理組織所見はパパニコロウ染色で, 細胞増殖は見られず核の膨化変形がみられ, 通常見られるような紡錘状, 星状形あるいは突起を出した細胞は全く認められなかった(図2)。well上に増殖, 線維性化生する細胞も全く認められなかった(図3)。

20 $\mu$ g/ml 1回添加では, 5検体のうち2検体は完全に増殖が抑制され, 前囊の辺縁に線維状突起もなく全く透明であった(図4)。組織像は30 $\mu$ g/ml 1回添加群と同様に細胞の死滅像であった。2検体では, 前囊がwellの底に接する部分に限局して一部pleomorphな細胞が見られたがwell上に伸展, 増殖する細胞は全く認められなかった(部分抑制)(図5)。この組織像は細胞質は拡大・破壊し, 核も変形, 膨化し死滅した細胞の形態を呈していた。残りの1検体は抑制されなかったが非添加群と比して, その増殖, 線維芽細胞様細胞への化生の速度は2~3日遅く, 前囊縁よりwell上に増殖してくるのは10日目頃からであった。その後は, 勢いよく増殖, 化生を起こしていった。

10 $\mu$ g/ml 1回添加では, 5検体に前囊中心部より遠心性にwellの底にpleomorphな細胞が増殖し, その進行はやや遅れたものの, 抑制はできなかった(図6a, 6b)。

0.5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 2 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 持続添加群各々5検体では3例は完全に抑制された(図7a, 7b)。この組織像は前述の30 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml 1回添加群の抑制像と同様であった。1例は, 増殖, 化生

1a



1b

図 1a ジクロード®30 $\mu\text{g/ml}$  1回添加した検体の位相差顕微鏡写真(50 $\times$ )17日目。  
上方, 前囊とまばらな細胞, 前囊切開縁は透明, シャープで前囊下及び well 底(下  
方)への上皮細胞の増殖化生はみられない。  
図 1b 図 1a の拡大像(100 $\times$ )。上皮細胞の細胞質はやや萎縮し黒ずんでいる。

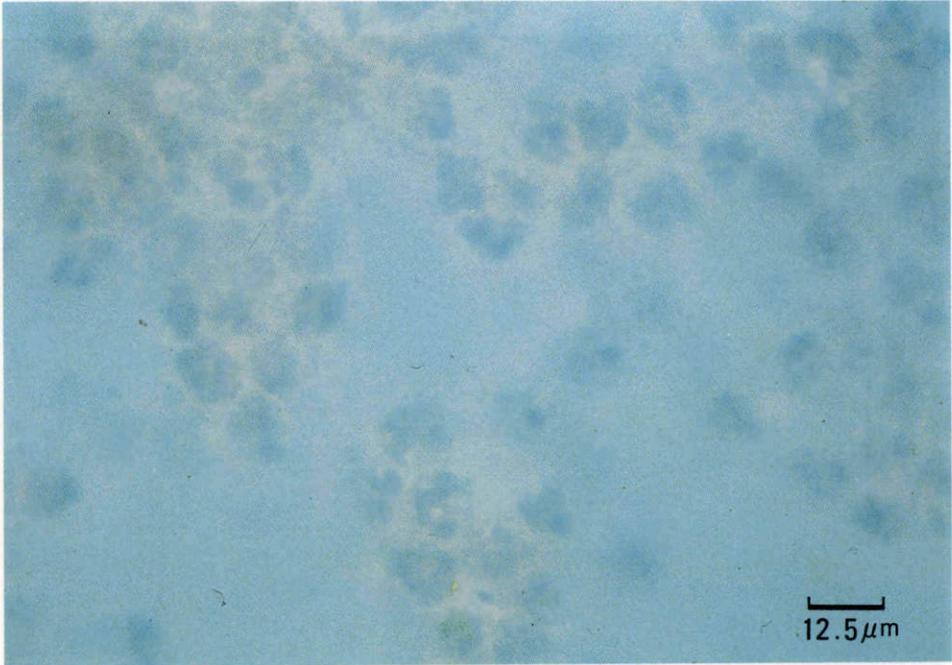


図2 図1aのババニコロウ染色光顕像(200×)4週目。核は変形, 膨化, 紡錘状, 星状形の細胞突起はみられない。

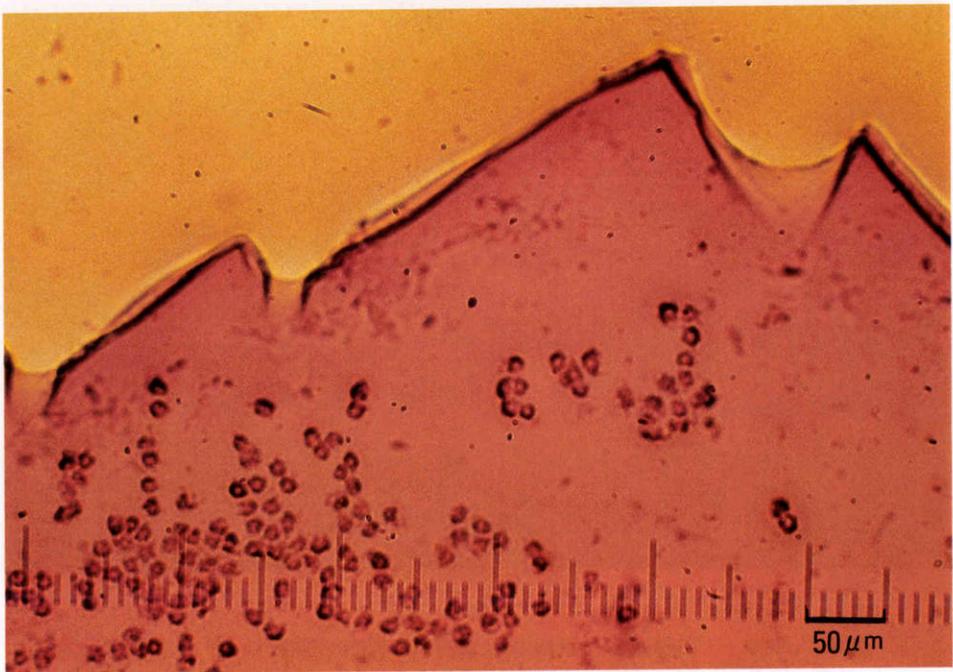


図3 図1aのwell底でのトルイジンブルー染色(50×)4週目。上皮細胞の増殖化生はみられず, well底(上方)には細胞はみられない。

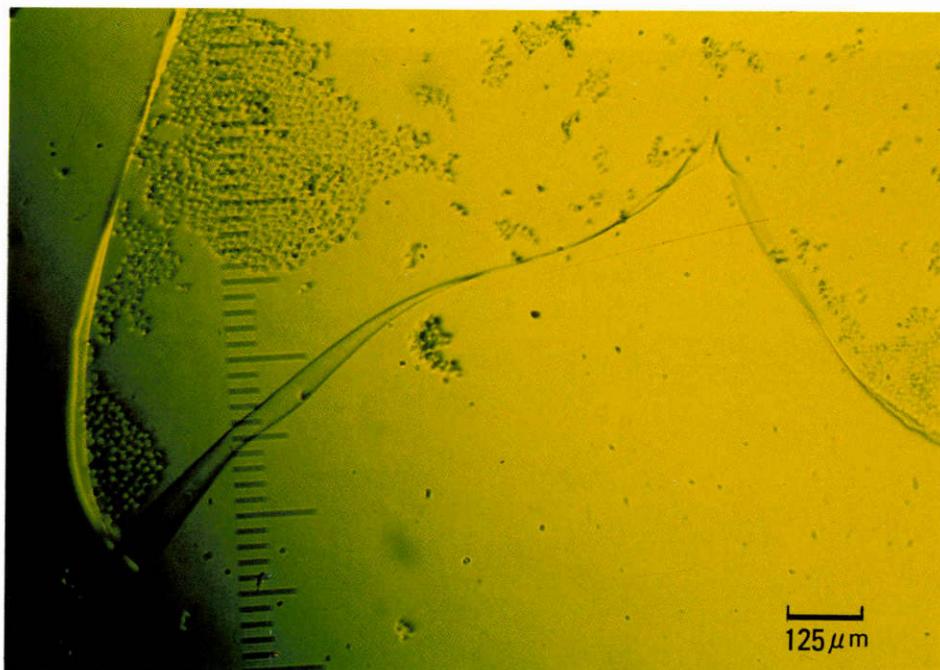


図4 ジクロード® 20 $\mu$ g/ml 1回添加した検体。位相差顕微鏡写真(20 $\times$ ) 7日目。前囊切開縁は透明、シャープで、増殖化生する上皮細胞はみられない。4週後まで増殖化生は見られない。

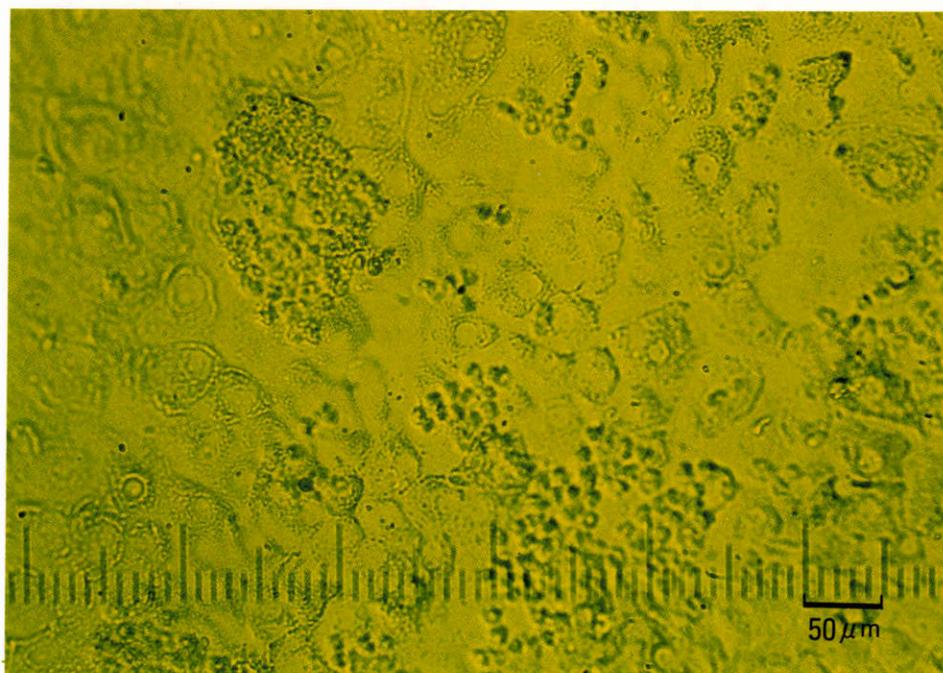
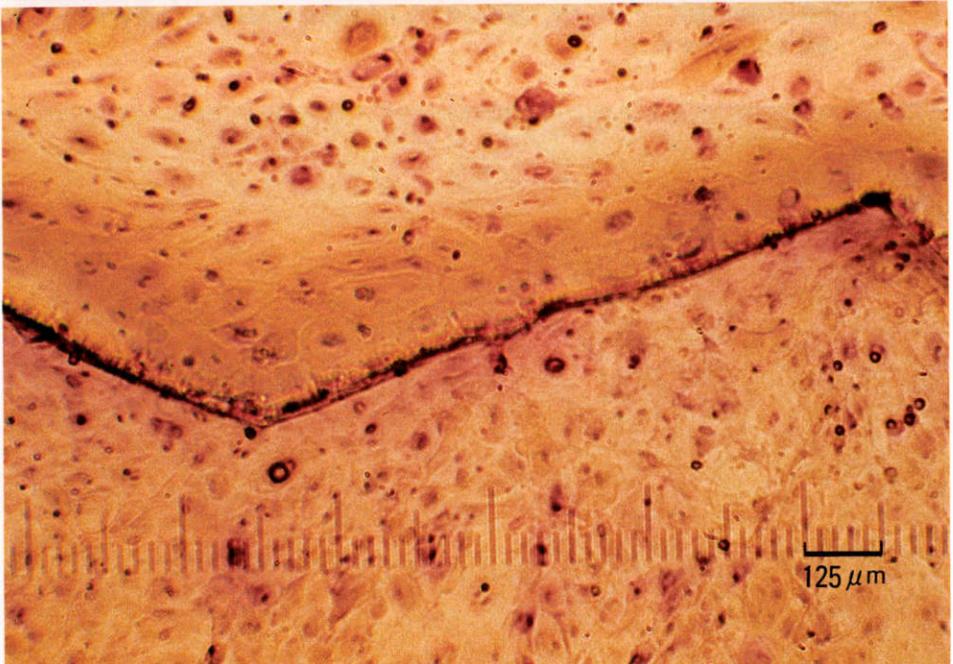
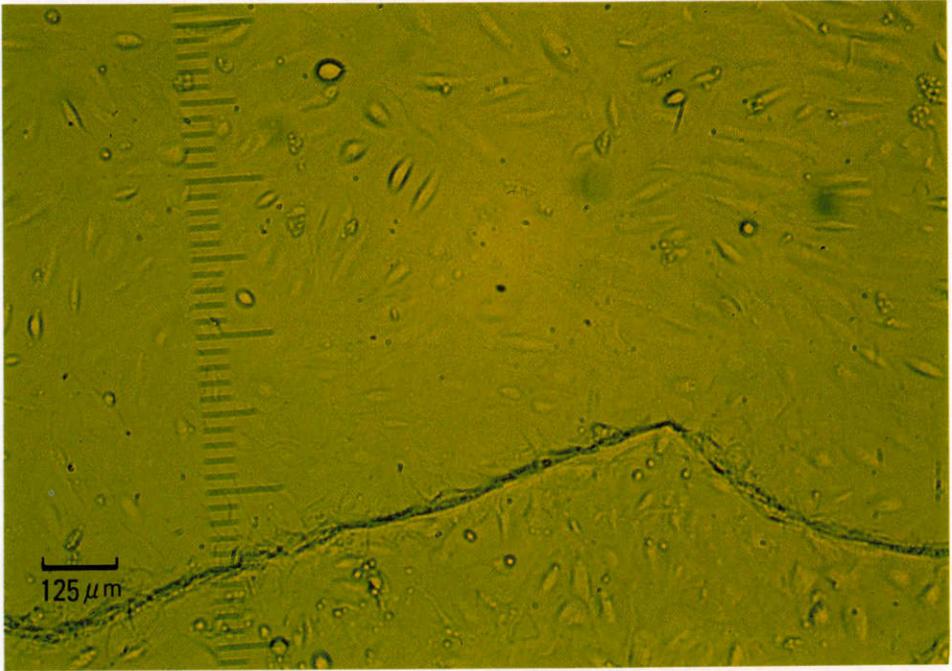


図5 ジクロード® 20 $\mu$ g/ml 1回添加した検体。位相差顕微鏡写真(50 $\times$ ) 10日目。wellの底と接した前囊下にみられる上皮細胞。細胞質は拡大変性している。

6a

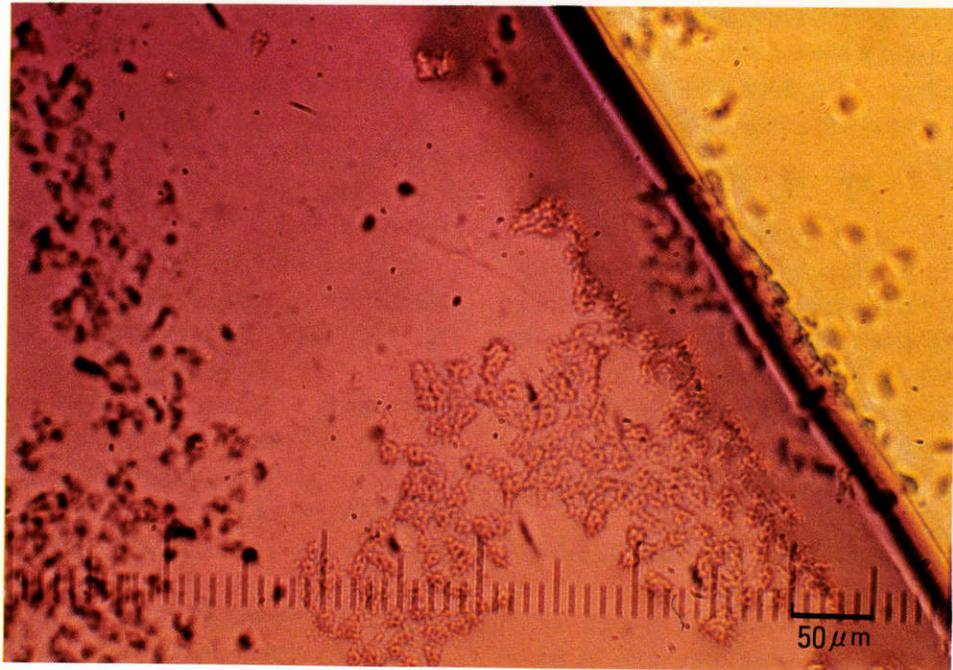
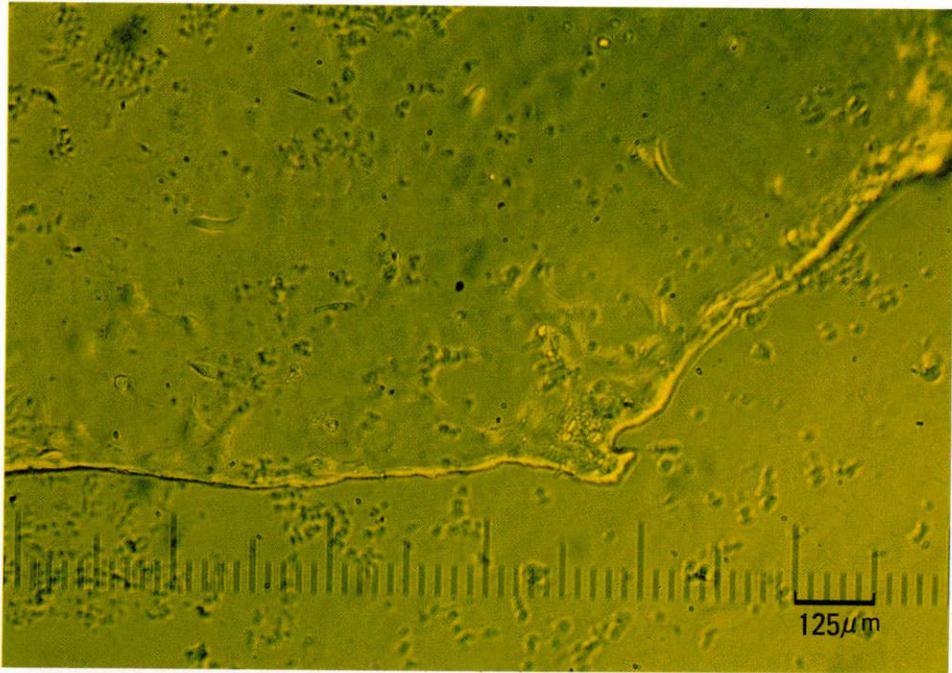


6b

図 6a ジクロード®  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  1回添加した検体。位相差顕微鏡写真 (20×) 13日目。増殖化生は抑制されず、前囊から well の底に増殖している。下方前囊部分、上方 well の底。

図 6b 図 6a のトルイジンブルー染色 (20×)

7a



7b

図 7a 濃度0.5 $\mu$ g/mlで増殖化生が抑制された検体 (20 $\times$ ). 14日目. 上方前囊部分, 下方 well の底. 散在する細胞は変形している. 増殖化生はみられない. 4 週後にも増殖化生はおこらない.

図 7b 図 7a のトルイジンブルー染色 (50 $\times$ ) 4 週目. 左方前囊部分, 右方 well の底. 少し変形した細胞は, トルイジンブルーに染らず, 死滅している.

表1 ジクロード®1回添加群

ジクロード®濃度	完全抑制	部分抑制	非抑制
30 $\mu$ g/ml	5	0	0
20 $\mu$ g/ml	2	2	1
10 $\mu$ g/ml	0	0	5

表2 ジクロード®持続添加群

ジクロード®濃度	完全抑制	部分抑制	非抑制
0.5 $\mu$ g/ml	3	0	2
1 $\mu$ g/ml	3	0	2
2 $\mu$ g/ml	3	0	2
5 $\mu$ g/ml	3	0	2
10 $\mu$ g/ml	3	0	2

の速度がやや遅いものの、非添加群と同様増殖、線維芽細胞様細胞へ化生した。1例は全く抑制されなかった。これらの結果を表1、表2に示した。

以上よりジクロード®濃度0.5 $\mu$ g/ml~10 $\mu$ g/mlの範囲では、ほぼ薬剤効果に差はなく、これら増殖、化生の抑制された検体での病理組織像は、細胞数の増加はなく、核の膨化変形が見られた。

基剤添加群では、上皮細胞の増殖化生抑制はみられずジクロード®非添加群と同様の増殖変化を示した。

#### IV 考 按

通常のヒト水晶体上皮細胞の組織培養検体は、早いもので翌日から、通常は3~6日目からwellの底に接した部分より細胞は増殖、線維芽細胞様細胞へ化生を起し、数週間後にはwellの底は例外なくこれらの増殖、化生を起した細胞で埋められるということが我々の前回の報告<sup>13)</sup>も含め知られている<sup>14)~19)</sup>。しかも検体の上皮細胞はほぼ100%、程度の差はあるものの、我々の行なった培養方法で増殖することが知られている<sup>13)</sup>。

今回の倒立位相差顕微鏡及び病理組織所見との比較から水晶体上皮細胞の増殖、化生はジクロード®の添加によって明らかに抑制されていると考えてよい。このジクロード®の房水移行濃度に関しては、白色家兎の実験で4回点眼後、一次房水中で1.53 $\mu$ g/ml、90分後の2次房水中には2.5 $\mu$ g/mlにも達するという報告<sup>20)</sup>がある。臨床的に術前・術後1日3回点眼では、術創からこの数倍には達するジクロード®が前房中に浸透していることは十分に考えられる。従って、今回の実

験に用いた各濃度はほぼ臨床に即したものと考えてよいであろう。又、基剤の影響をみたところ、使用濃度中の存在量では全く抑制していなかった。このように1回添加で完全抑制され、しかも低濃度でも同じ程度の抑制効果が得られることから、ジクロード®の抑制効果はある一定濃度に達すれば同様の効果が得られるということが考えられる。このジクロード®の抑制効果が細胞膜、細胞質、核などに直接働きかける障害作用によるのか、細胞自体が分泌している可能性のある種々のchemical mediators (サイトカイン)を抑制して間接的に増殖、化生を抑制するのかわ不明である。これは今後の課題であろう。

次にこの臨床的意義について考えると、白内障手術で前囊切開を行ない前囊切開縁で外傷を受けた上皮細胞やあるいは後房レンズに直接密接した上皮細胞は必ず増殖、線維性化生を遂げるのは日常の臨床で観察され、又、我々も報告してきたところである。これらの変化も既にin vitro内で観察されている<sup>13)</sup>。

我々は「眼内レンズ挿入術後の炎症は手術的侵襲、異物としての眼内レンズ、そして水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生に対する生体反応、即ち非特異的炎症反応である。」<sup>18)~13)</sup>との仮説を提唱した。そしてフィブリン反応はその増殖、線維性化生に対する炎症の極端に強いものでフィブリン沈着として顕現するものであると提唱した。ジクロード®はプロスタグランジン生合成を抑制するので、炎症の機序としての血液房水柵の破壊はプロスタグランジン生合成抑制を介して防止できると通常考えられている。これに加え、白内障術後必発する水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生を抑制すれば当然その術後の急性炎症は大幅に抑制されるであろう事は、我々の前述の仮説にのっとれば納得のいく事である。このことは現在報告されているジクロード®の消炎効果に一致するものである。

フィブリン反応眼でこのような非ステロイド性抗炎症剤の点眼を中止した場合に非常に強いフィブリン反応が見られるリバウンド現象は我々も観察してきたところである。又、同様の報告もある。これはプロスタグランジンの生合成抑制と並んで、この上皮細胞増殖、線維性化生抑制効果がなくなり、再び増殖、線維性化生することも関与している可能性がある。

更に白内障術後の炎症が数カ月以上持続し<sup>7)21)22)</sup>、その抑制に非ステロイド性抗炎症剤が有効であるとの多くの報告<sup>6)7)</sup>がある。このことから非ステロイド性抗炎症剤が水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生を抑制し、

これに起因すると我々が考えている炎症反応を抑制していると考えても理論的には可能である。このような臨床観察とジクロード®の水晶体上皮細胞増殖、線維性化生抑制作用から、逆に、「フィブリン反応を含む白内障術後の炎症は手術侵襲や眼内レンズの異物性と並んで特に長期的には水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生が関与する非特異的炎症である。」とする我々の仮説を支持するものであろう。

以上から今後どのような作用機序によってジクロード®が水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生を抑制するかということを知解する必要がある。更に白内障術後の炎症を水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生に起因するという観点から臨床観察を行なっていく必要もある。この点で surface modification を行ない、上皮細胞が眼内レンズと接した場合に増殖、線維性化生が強く誘発されないような工夫も今後特に重要になって行くであろう。

更に水晶体上皮細胞の増殖、線維性化生は上皮細胞の生命がつきるまで生じるので、当然抗炎症という観察からはこれを抑制するために長期にこのような抑制剤の投与が必要なことはいうまでもないであろう。又、観察された上皮細胞増殖、線維性化生の抑制から、非ステロイド性抗炎症剤を術後ある期間点眼することにより、後発白内障の発生を有意に防止できる可能性が考えられる。

本論文の要旨は第5回日本眼内レンズ学会で発表した。

#### 文 献

- 1) 松下卓郎, 大原國俊, 清水昊幸, 他: 水晶体囊外摘出術と超音波乳化吸引術における術中の縮瞳と術後炎症に対するインドメタシン点眼の効果. 日眼会誌 87: 431—436, 1983.
- 2) 大久保彰, 水流忠彦, 大原國俊: 前房穿刺後の炎症反応に対するフルルビプロフェン点眼液の抑制効果. あたらしい眼科 3: 554—556, 1986.
- 3) 小林定男, 山名敬庸, 門田正義, 他: 後房レンズ移植後のフィブリン反応に対するインドメタシン点眼の効果. あたらしい眼科 4: 1313—1316, 1987.
- 4) 宮谷博史, 草田英嗣, 初田高明: 眼内レンズ挿入術後炎症に対するインドメタシン点眼の功罪. 臨眼 42: 419—423, 1988.
- 5) Kraff MC, Sanders DR, McGuigan L, et al: Inhibition of blood-aqueous humor barrier breakdown with diclofenac. A fluorophotometric study. Arch Ophthalmol 108: 380—383, 1990.
- 6) 釣巻 穰, 澤 充, 清水昊幸: インドメタシン点眼の術後前房蛋白濃度と細胞数への影響. 臨眼 43: 183—186, 1989.
- 7) 大鹿哲郎, 増田寛次郎: 各種眼内レンズ術後炎症の定量的比較検討. 臨眼 43: 177—180, 1989.
- 8) 西 興史, 西 佳代: フィブリン反応に対するインドメタシン点眼の予防的效果. あたらしい眼科 7: 923—928, 1990.
- 9) 西 興史: 後房レンズ挿入後早期にみられる瞳孔膜. 臨眼 41: 331—336, 1987.
- 10) 西 興史: 後房レンズ挿入術後のフィブリン反応に対する超音波水晶体上皮細胞除去法の効果. 予報. あたらしい眼科 5: 628—632, 1988.
- 11) 西 佳代, 西 興史: 後房レンズ挿入術後に見られるフィブリン反応について. 日本の眼科 59: 1321—1326, 1988.
- 12) 西 興史, 植村恭子, 西 素子, 他: Iris Medallion Lens 挿入眼の長期観察結果. 臨眼 35: 821—828, 1981.
- 13) 西 佳代, 西 興史: ヒト水晶体上皮細胞の組織培養—その1. その形態変化とPMMA, サイトカインによる影響—. あたらしい眼科 8: 1213—1223, 1990.
- 14) Nagineni CN, Baht SP: Human fetal lens epithelial cells in culture: An in vitro model for the study of crystallin expression and lens differentiation. Curr Eye Res 8: 285—291, 1989.
- 15) Arita T, Lin L-R, Reddy VN: Differentiation of human lens epithelial cells in tissue culture. Exp Eye Res 47: 905—910, 1988.
- 16) Hamada Y, Okada TS: In vitro differentiation of cells of the lens epithelium of human fetus. Exp Eye Res 26: 91—97, 1978.
- 17) Reddy VN, Lin L-R, Arita T, et al: Crystallins and their synthesis in human lens epithelial cells in tissue culture. Exp Eye Res 47: 465—478, 1988.
- 18) Ringens P, Mungyer G, Jap P, et al: Human lens epithelium in tissue culture. Biochemical and morphological aspects. Exp Eye Res 35: 313—324, 1982.
- 19) Eguchi G, Kodama R: A study of human senile cataract. Growth and differentiation of lens epithelial cells in vitro cell culture. Ophthalmic Res 11: 308—315, 1979.
- 20) 大原國俊, 水流忠彦: 前房穿刺後の縮瞳と房水蛋白増加に対するジクロフェナクナトリウムの作

用. 日眼会誌 89: 977-982, 1989.

21) 水流忠彦, 奥野幸雄, 澤 充, 他: He-Ne レーザー散乱光強度分析による前房蛋白測定法の臨床的応用. 人工水晶体移植術後の前房蛋白の経時的

変化. 臨眼 41: 791-796, 1987.

22) 澤 充, 釣巻 稔, 清水昊幸: レーザー前房蛋白細胞測定装置による眼内レンズ挿入術後炎症の検討. 臨眼 42: 665-668, 1988.