

## 水晶体囊外摘出術による水晶体囊周囲の塩基性 線維芽細胞成長因子 (b-FGF) の局在の変化

林 信人\*, 加藤 整\*\*, 清澤 崇晃\*\*, 林 英之\*\*, 大島 健司\*\*, 山岡万寿夫\*\*\*

\*自衛隊福岡病院眼科, \*\*福岡大学医学部眼科学教室, \*\*\*武田薬品研究開発本部生物研究所

### 要 約

水晶体囊外術後の細胞増殖や血管新生に対する塩基性線維芽細胞成長因子(b-FGF)の関与を検討するため、モルモットに水晶体囊外摘出術を行い、免疫組織化学染色にて水晶体囊周囲における術前術後のb-FGFの局在の変化を調べた。囊外摘出術後12日では水晶体後囊に接した皮質側にb-FGFの免疫学的陽性所見を見たが、前囊側では認めなかった。また非手術眼やそれ以上経過したものでは明らかな陽性所見は認めなかった。b-FGFは水晶体上皮細胞の増殖をin vitroで促進することと今回の実験結果より、b-FGFは囊外術後の囊内細胞増殖(後発白内障)の成因に影響を及ぼす可能性があると考えられた。(日眼会誌 95:621-624, 1991)

キーワード: 塩基性線維芽細胞成長因子, 免疫組織化学染色, 水晶体囊外摘出術, 後発白内障, 血管新生

## The Change of Immunohistochemical Localization of Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) Around the Lens Capsule After Extracapsular Extraction

Nobuhito Hayashi\*, Hitoshi Kato\*\*, Takaaki Kiyosawa\*\*,  
Hideyuki Hayashi\*\*, Kenji Oshima\*\* and Masuo Yamaoka\*\*\*

\*Eye Clinic, Self Defence Force Fukuoka Hospital

\*\*Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University

\*\*\*Biology Research Laboratories, Research and Development Division,  
Takeda Chemical Industries Limited

### Abstract

It has been reported that basic fibroblast growth factor (b-FGF) accelerates proliferation of mesenchymal cells and epithelial cells of cornea and crystalline lens in vitro. The immunohistochemical localization of b-FGF on guinea pig lens capsule after extracapsular extraction (ECE) of the lens was studied in order to investigate the role of b-FGF on posterior capsular opacification after ECE and neovascularization. On the 12th postoperative day, immunohistochemical staining of b-FGF was recognized along the posterior capsule on the cortical side, but not along the anterior capsule. On non-operated eyes, scanty immunoreactive materials were seen in cells at the germinative center of the equatorial region. More than two months after ECE, almost no immunoreactive staining could be recognized. In this study, immunoreactive staining of b-FGF was recognized along the posterior capsule on cortical side after operation. It has also been reported that b-FGF stimulates proliferation of the lens epithelial cells in vitro. Therefore, it is suggested that b-FGF plays an important role on posterior capsular opacification after cataract formation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 621-624, 1991)

Key words: Basic fibroblast growth factor, Immunohistochemical staining, Extracapsular extraction, After cataract, Neovascularization

別刷請求先: 359 所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 林 信人

(平成2年9月14日受付, 平成2年11月15日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuhito Hayashi, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College.

3-2 Namiki, Tokorozawa 359, Japan

(Received September 14, 1990 and accepted in revised form November 15, 1990)

## I 緒 言

塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor: 以下 b-FGF と略す) は牛下垂体から見いだされた分子量16,000の単鎖ポリペプチドである<sup>1)2)</sup>。b-FGF は広く間葉系の細胞の増殖を促進, 特に血管内皮細胞の増殖を促進し, 血管新生を促すことが知られている<sup>2)3)</sup>。また b-FGF は網膜正常血管や基底膜に局在し<sup>4)</sup>、組織破壊に伴って放出されて周囲の細胞の増殖遊走を促す<sup>5)</sup>。正常の網膜にも b-FGF が存在しているが、これだけでその効果を示すことはない。糖尿病や網膜剝離のように血液網膜関門に何らかの破綻をきたしている場合には増殖膜が形成されるが、これが b-FGF の作用によるものかどうかについては現在議論されている<sup>6)</sup>。しかし、上皮細胞に対しては、例外的に角膜上皮細胞や水晶体上皮細胞には増殖促進作用を示す<sup>2)7)</sup>。一方 Jeanny らは胎児(胎生期)マウスの水晶体後嚢には<sup>125</sup>I でラベルした b-FGF が吸着すると報告しており<sup>8)</sup>、b-FGF の水晶体上皮細胞の増殖、臨床的には水晶体嚢外術後の後嚢混濁との関与が考えられる。しかし実際の水晶体の後嚢に b-FGF が存在するか否かは不明とされている。そこで今回我々は嚢外術後の細胞増殖や血管新生に対する b-FGF の関与を考え、モルモットに水晶体嚢外摘出術を行い、免疫組織化学染色にて水晶体嚢周囲の術前術後の b-FGF の局在の変化を調べてみた。

## II 実験方法

抗体: 1次抗体は武田薬品生物研究所より提供を受けた。以下にその精製法について述べる。組み換え型ヒト b-FGF (以下 rhbFGF と略す) の生理食塩水溶液 (1mg/3ml) を等量のフロイドの完全アジュバンド (以下 FCA と略す) と混濁し、乳濁化した。これを家兎背部に2ml/家兎の用量で20箇所程度にわけて皮内注射した。2週間後に rhbFGF の生理食塩水溶液 (1mg/1.5ml) を等量の FCA と混濁して乳濁化し、これを1ml/家兎の用量で追加免疫刺激した。さらに2週間後に rhbFGF の生理食塩水溶液 (1mg/1.5ml) を0.5ml/家兎の割合で耳静脈より投与した。この1週間後に抗体の力価を測定した。以上の操作をさらにもう一度繰り返した。抗体の産生を確認後、家兎の頸動脈にカニューレを挿入して全採血を行った。得られた抗体は-20℃で保存した。なお力価の測定と精度についてはすでに報告されている<sup>9)</sup>。

モルモット (ハートレイ種) (約400g) に対しケタミン30mg/kg + キシラジン5mg/kg (筋注) で麻酔した後、手術用顕微鏡下で envelope 法にてシムコ針を用いた計画的な水晶体嚢外摘出術を行った。術後12日、35日、48日、90日に同麻酔後、ペントバルビタールを腹腔内に注入し、苦痛なく死亡させたのち眼球を摘出した。対照には非手術眼を用いた。摘出した眼球は Zamboni 液 (ピクリン酸加パラホルムアルデヒド) 内にて一昼夜固定し、リン酸緩衝液 (PBS) にて固定液を洗い、PBS と OCT compound (Miles 社製) を 1 : 1 に混ぜたものに浸したのち、OCT compound に凍結包埋した。凍結した組織は Cryostat microtome (Reichert-Jung 社製) にて 8~9μm の切片とし、ゼラチンコーティングしたスライドガラスにのせ、風乾させたのち、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、anti human b-FGF rabbit IgG (抗 b-FGF 抗体) を 1 次抗体として (10分)、2 次抗体は goat Biotin 化 anti-rabbit IgG (Vector 社製) を用い (10分)、その後 ABC complex (Vector 社製) を加え (10分)、aminoethylcarbazole (AEC) にて発色した後最後に Gill's Hematoxylin V にて核染色を行った<sup>9)</sup>。なお染色時のコントロールとしては 1 次抗体のかわりに goat normal serum を用いた。

## III 結 果

嚢外摘出術術後12日では水晶体後嚢に接した皮質側に b-FGF の免疫学的陽性所見をみ、前嚢側では特に認めなかった (図 1)。前嚢と後嚢が接しているところでもその間の基質と後嚢側に陽性所見を認めた (図 2)。また非手術眼では水晶体赤道部の皮質細胞が軽度の陽性所見を示すのみ (図 3) で、手術眼のような陽性所見は認めなかった。術後35日後のものも後嚢側に b-FGF の弱い陽性所見を見た (図 4)。それ以上経過したものでは術後12日の眼のような明らかな陽性所見は認めなかった。

## IV 考 按

今回の実験において b-FGF が嚢外術後の後嚢周囲に出現するのを確認した。後嚢周囲の b-FGF は術後2週以後2~3カ月後までにはほとんど陽性所見を示さなくなり、線維性増殖による混濁の発症時期<sup>10)</sup>に一致している。また b-FGF は in vitro で水晶体上皮細胞の増殖、遊走、線維性化生を促進すると報告されており<sup>11)</sup>、今回の結果を合わせると後発白内障の発症に b-

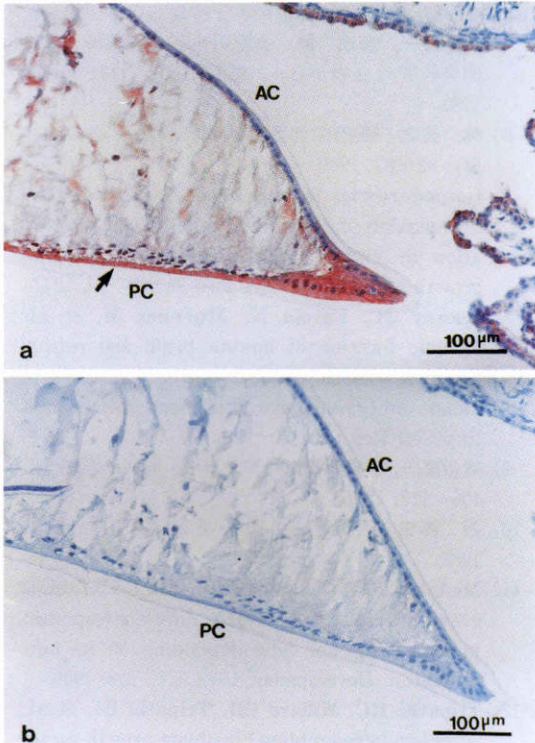


図 1 術後12日目：赤道部から後囊 (PC) に沿って b-FGF の陽性所見 (矢印) を認める。前囊側 (AC) にはそれを認めない。(×50) (上：抗 b-FGF 抗体使用，下：抗体のかわりに normal goat serum 使用)

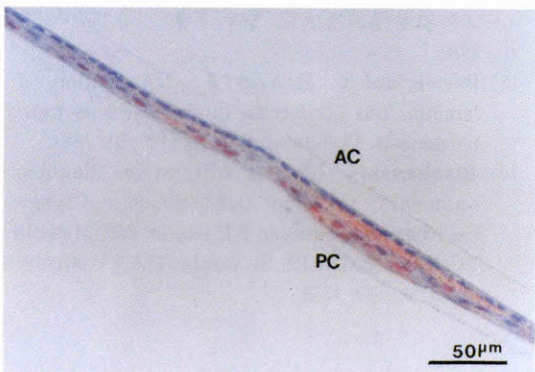


図 2 術後12日目：前後囊が接した部分。後囊側(PC) に上皮細胞類似の細胞の増殖を認め、基質と後囊側に陽性所見を認める。(×100)

FGF が関与しているものと考えられる。

また b-FGF は前囊にはさほど集積されず、主に後囊に沿って集積する。この違いは何によるものなのかを

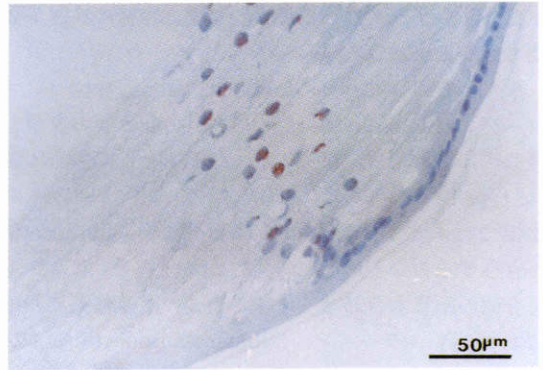


図 3 非手術眼：赤道部の皮質細胞に b-FGF のわずかな陽性所見を認める。(×100)

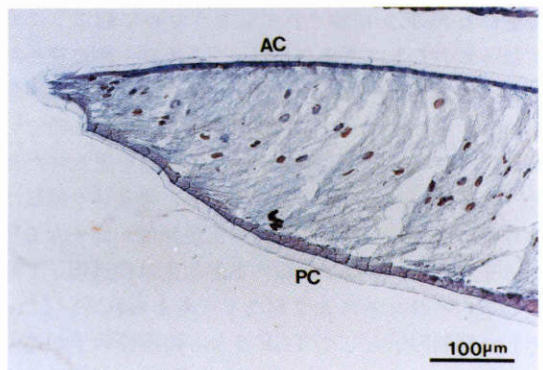


図 4 術後35日目：後囊 (PC) に沿って弱い陽性所見を認める。(×50)

考える上で 2 つの仮説が考えられる。1 つは細胞に b-FGF の受容体が存在し、その受容体に結合・集積されているとする考えであり、もう 1 つは細胞外基質に吸着しているとする考えである。赤道部の germinative center の最も細胞分裂能の高い細胞が陽性所見を示すことは前者の考えを、後囊に沿っての陽性所見は後者の考えを支持するものと思われる。

では b-FGF はどこからでてくるのだろうか。b-FGF は血清中ではほとんど見つからず、前房中には存在している<sup>12)13)</sup>。したがって前房中に放出された b-FGF がその受容体を有する後囊に集積されたと考えられる。また今回の実験でさらに時間が経過すると b-FGF が検出しにくくなってきたが、これは水晶体上皮細胞によって消費されたためか、時間経過により b-FGF の活性が低下したためかなどが考えられる。しかし現在に至るも b-FGF の作用発現以後の代謝過程は不明であ

るため、いずれも推論の域を脱せず、今後の検討が必要であると思われる。

また b-FGF は血管内皮細胞を増殖し、type IV コラーゲンと laminin は細胞の維持、分化形質の発現を介して、管腔形成に関与している<sup>3)</sup>。そして水晶体嚢は、type IV コラーゲンで構成されており<sup>14)</sup>、ラットの胎児ではあるが水晶体嚢には laminin と fibronectin が存在することは既に報告されている<sup>15)</sup>。したがって今回の結果も合わせると嚢外術後の水晶体嚢周囲には type IV コラーゲン、laminin、fibronectin および b-FGF が存在することになり、血管内皮細胞の遊走、そして血管新生が生じ易い状態にあると思われる。にもかかわらず、実際には血管の進入を見ることは臨床的に嚢外法手術後に極めて稀であるのは、水晶体上皮細胞に b-FGF が消費されてしまうために起こりにくくなっているとは考えられないだろうか。別の視点からみると、後嚢が b-FGF を吸着させ、水晶体上皮細胞が消費することにより、後嚢が b-FGF の拡散を防ぐいわば防護壁 (chemical barrier) の役割を果たすために、糖尿病において硝子体手術の際に水晶体全摘眼は嚢外眼に比較しルベオーシスの出現頻度が高くなる<sup>16)</sup>と考えられる。最近では眼内血管新生は促進因子と抑制因子のバランスにより起こると考えられている<sup>6)</sup>。そして抑制因子として TGF- $\beta$  などの液性因子が述べられている。しかし、その他にも b-FGF が後嚢に吸着するというような促進因子の非動化による抑制の機序が考えられ、今後さらに検討を加えていきたい。

#### 文 献

- 1) 清水信義：線維芽細胞増殖因子。日本臨床 44：24—34, 1986。
- 2) 加藤洋一：細胞成長因子 Growth Factors。日本組織培養学会編、朝倉書店、31—39, 1984。
- 3) 菅 幹雄：血管内皮細胞と血管新生。代謝 25：895—901, 1988。
- 4) 林 英之、加藤 整、野中 隆、他：霊長類成熟個体網膜における塩基性線維芽細胞増殖因子の局

- 在。第54回日本中部眼科学会抄録、130, 1988。
- 5) 須藤勝一、藤田 剛：血管新生とその制御—薬剤開発研究の立場から—。眼紀 40：1431—1443, 1989。
- 6) 林 英之：眼内血管新生機構。日眼会誌 94(抄録)：82—83, 1990。
- 7) Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR：Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. Exp Eye Res 25：75—89, 1977。
- 8) Jeanny JC, Fayein N, Moenner M, et al：Specific fixation of bovine brain and retinal acidic and basic fibroblast growth factors to mouse embryonic eye basement membranes. Exp Cell Res 171：63—75, 1987。
- 9) 渡辺慶一、中根一穂：酵素抗体法。東京、学際企画、106—113, 1985。
- 10) 西 興史：後嚢混濁。眼科手術 2：243—252, 1989。
- 11) McAvoy JW, Chamberlain CG：Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. Development 107：221—228, 1989。
- 12) Tripathi RC, Millard CB, Tripathi BJ, et al：A molecule resembling fibroblast growth factor in aqueous humor. Am J Ophthalmol 106：230—231(letter), 1988。
- 13) 梶原一人、林 英之、坪田一男：ヒト血管新生緑内障・白内障患者房水中の b-FGF の定量。日眼会誌 94(抄録)：225, 1990。
- 14) 矢島保道、唐沢容子：水晶体上皮細胞の眼内レンズ移植術後病態生理。眼科手術 2：267—277, 1989。
- 15) Parmigiani C, McAvoy J：Localization of laminin and fibronectin during rat lens morphogenesis. Differentiation 28：53—61, 1984。
- 16) Blankenship GW：Proliferative diabetic retinopathy principles and techniques of surgical treatment, In Ryan SJ, Glaser BM, Michels RG (ed)：Retina III. St Louis, The CV Mosby Co, 515—539, 1989。