

培養ヒト角膜上皮, 実質および内皮細胞による インターロイキン6の産生

坂本 真栄¹⁾²⁾, 稲田 捷也¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学細菌学教室, ²⁾ 岩手医科大学眼科学教室

要 約

培養ヒト角膜上皮, 実質および内皮細胞のインターロイキン6 (IL-6) の産生について, その培養上清中の IL-6 を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットでその抗原の量を測定することによって検討した。その結果, 上皮細胞は IL-6 を恒常的に産生することを確認した。実質細胞は lipopolysaccharide (LPS) あるいは IL-1 α による刺激によって IL-6 を誘導的に産生し, その産生のピークは添加後 48 時間であった。一方, 内皮細胞の培養上清中には無刺激でも IL-6 が認められ, LPS によってその産生は増強された。上皮, 実質および内皮細胞が産生した IL-6 のゲル濾過による分子量は何れもおおよそ 30 kDa であり, 実質細胞が産生した IL-6 の分子量は Western blotting の結果でも 30 kDa であった。角膜の上皮, 実質および内皮細胞は IL-6 を産生することによって角膜での炎症や免疫応答に関与していることが推測された。(日眼会誌 96: 702-709, 1992)

キーワード: インターロイキン6, インターロイキン1, 角膜上皮細胞, 角膜実質細胞, 角膜内皮細胞

Human Corneal Epithelial, Stromal and Endothelial Cells Produce Interleukin-6

Shin-ei Sakamoto¹⁾²⁾ and Katsuya Inada¹⁾

¹⁾Department of Bacteriology, ²⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University

Abstract

We have been investigating the production of cytokines in ocular tissues. In this paper, we demonstrated the *in vitro* production of interleukin-6 (IL-6) by human corneal epithelial, stromal and endothelial cells using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In culture supernatant of the stromal cells, the production of immunoreactive IL-6 was induced, depending upon the doses of lipopolysaccharide (LPS) or IL-1 α added into the culture. Detectable IL-6 activity in the supernatant of the stromal cells was found 2 hours after addition of IL-1 α and the activity increased to a peak level at 48 hours. On the other hand, in the supernatant of the endothelial cells, IL-6 activity was found even in unstimulated-culture, and induced further by LPS stimulation. The molecular weights (MWs) of the IL-6 produced by the epithelial, stromal and endothelial cells were calculated by gel filtration as about 30 kDa. From Western blotting analysis, the MW of IL-6 produced by the stromal cells was also determined to be 30 kDa. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 702-709, 1992)

Key words: Interleukin-6, Interleukin-1, Corneal epithelial cells, Corneal stromal cells, Corneal endothelial cells

別刷請求先: 020 盛岡市内丸 19-1 岩手医科大学眼科学教室 坂本 真栄
(平成 3 年 11 月 27 日受付, 平成 4 年 1 月 23 日改訂受理)

Reprint requests to: Shin-ei Sakamoto, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Received November 27, 1991 and accepted in revised form January 23, 1992)

I 緒 言

炎症反応や免疫応答は免疫系および非免疫系の細胞から産生されるインターロイキン (IL) などの種々のサイトカインによってその発症や進行が制御されている。このうち IL-6 は 212 残基のアミノ酸から構成される分泌蛋白で、その機能は細胞分化あるいはある種の遺伝子発現の誘導、細胞増殖の誘導あるいは抑制など多彩である。IL-6 は T 細胞、B 細胞、マクロファージなど免疫系の細胞からのみならず、線維芽細胞、血管内皮細胞、脳星状グリア細胞、腎メサンギウム細胞などの非免疫系の細胞からも産生される¹⁾ことが最近知られるようになった。上皮系の細胞では、皮膚の角質細胞がやはり IL-6 を産生する²⁾³⁾ことが報告されている。

以上のことから、眼組織、特に外界と接している角膜において、サイトカインが生体防御や炎症反応の惹起および進展に関与していることが容易に想像される。しかし、角膜におけるサイトカインの研究は少なく、培養したウサギ角膜上皮細胞が IL-1 様物質を産生するとの報告⁴⁾があるが、ヒト角膜での検討は比較的最近まで行われていなかった。そこで著者らは、これまでに角膜におけるサイトカイン産生について検討してきた。その結果、培養上皮細胞が IL-1 および IL-6 を恒常的に産生すること⁵⁾⁶⁾を明らかにした。

本研究では、実質および内皮細胞による IL-6 の産生を検討した。さらに、上皮、実質および内皮細胞の産生した IL-6 の分子量を決定するために培養上清のゲル濾過分析を行い、実質細胞の培養上清についてはさらに Western blotting によっても分子量の確認をした。また、サイトカインの特徴として、あるサイトカインが他のサイトカインを誘導する等の相互依存が存在し、サイトカインネットワークを形成することが知られており、角膜におけるサイトカインネットワークの存在に関しても考察した。

II 実験方法

1. 培養液

培養液は TC-199 培地 (ニッスイ) に L-グルタミン (10 mg/ml)、ペニシリン G (100 μ g/ml) ストレプトマイシン (100 μ g/ml)、およびウシ胎児血清 (GIBCO, USA) (10%) を添加したものを用いた。

2. エンドトキシンおよびサイトカイン

サイトカインの産生を誘導する幾つかの産生刺激物

質のうち、本研究では IL-6 の産生を誘導する目的で、エンドトキシンとして lipopolysaccharide (LPS) *E. coli* O 111 : B4 (Difco, USA)、インターロイキンとしてリコンビナントヒト IL-1 α (R and D systems, USA)、あるいはリコンビナントヒト IL-6 (R and D systems, USA) を用いた。

3. 実質細胞の培養および検体の採取

角膜に病変が認められなかったヒト摘出眼球 (68~79 歳までの 4 眼) から角膜を採取し、別々に培養してそれぞれの実験に用いた。培養方法は実体顕微鏡下にデスメ膜と角膜内皮細胞を剝離、除去して上皮と実質のみの標本を得た。この角膜片の実質の中層に切開を入れ、上皮を含んだ実質片と実質のみの組織片とに分けた。実質のみの切片をさらに約 3 mm 角の小片にし、培養皿 (Nunc 134673, 直径 15 mm, Denmark) に 1 個ずつ静置、固着させた。これに上記の培養液を 1 ml ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿度が 95% 以上のインキュベーターで培養し、培養液を 3 日毎に交換した。約 2 週間後より紡錘形の細胞の増殖が認められ、約 4 週間でコンフルエントになった。最初に接種した実質片を除去し、コンフルエントとなった培養実質細胞に 0.25% トリプシンを加えて、37 $^{\circ}$ C、15 分インキュベートしたのち、細胞をプラスチック製セルスクレーパー (Costar, 3010, USA) を用いて培養皿より機械的に剝離した。この細胞浮遊液を 800 rpm、15 分遠心し、得られた細胞沈渣に新しい培養液を加え、培養皿 (Nunc 134673, 直径 15 mm) に各 2×10^6 個ずつ接種し、コンフルエントになるまで培養した。コンフルエントになった約 1 週間後、培養細胞に LPS を 1, 10 μ g/ml, IL-1 α を 1, 10, 100 pg/ml, あるいは IL-6 を 1, 10, 100 pg/ml の濃度で添加した (各濃度ごとに $n=4$)。これらを添加した実質細胞を 48 時間、37 $^{\circ}$ C でインキュベートし、各穴の培養上清をそれぞれ採取して、3,000 rpm、20 分間遠心後、その上清を検体とし、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

IL-6 産生の経時変化は、上記と同様な方法で実質細胞を 3 代継代し、IL-1 α を 100 pg/ml の濃度で添加した実質細胞を用いて調べた。添加後 1, 2, 6, 24, 48 および 96 時間後に各々の培養上清を採取し (各時間ごとに $n=4$)、3,000 rpm、20 分間遠心してその上清を検体とし、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

4. 内皮細胞の培養および検体の採取

同一個体 (2 か月児) から得た 2 個の正常角膜より内皮細胞をデスメ膜ごと実体顕微鏡下で剝離した。こ

れを0.25%トリプシン-EDTAを用いて37℃, 30分間処理し, デス膜より内皮細胞を単離し, デス膜を除去した。内皮細胞の浮遊液を800 rpm, 15分間遠心し, 細胞沈渣に新しい培養液を加え, 培養皿(Nunc 134673, 直径15mm)に培養した。培養液は実質細胞の培養の場合と同じものを用いたが, その他にリコンビナント上皮細胞成長因子(EGF, Chemicon, USA)を50 ng/ml加えた。ほぼコンフルエントな状態になった時点で, これまでのEGFを含んだ培養液をEGFを含まない培養液に交換し, LPSを20 µg/mlの濃度になるように添加し(n=2), 37℃で1週間インキュベートした。その後, 各穴の培養上清をそれぞれ採取して, 3,000 rpm, 20分間遠心し, その上清を検体として-80℃で保存した。

5. 上皮細胞の培養および検体の採取

上皮細胞の培養上清の採取方法は, 既報⁹⁾にしたがった。概略を述べると, 3.で述べた方法で得られた上皮を含んだ実質片を3 mm角の10個の小片にし, 上皮側を上にして培養皿(Nunc 134673, 直径15 mm)に1個ずつ静置, 固着させた。これに前述の培養液を加え, 37℃, 5%CO₂, 湿度が95%以上のインキュベーターで培養した。コンフルエントとなった時点で上皮を含んだ実質片を除去し, その部位が上皮細胞によって覆われるまで, さらに数日間培養を続けた。再びコンフルエントになった時点で培養液を交換し, 2週間培養後, その培養上清を1つにまとめて採取し, 3,000 rpm, 20分間遠心してその上清を検体とし, 使用するまで-80℃で保存した。

6. IL-6の定量

IL-6の定量には, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を応用したIntertest-6 (Genzyme, MA, USA)を使用し, 抗原としてのIL-6を測定した。本測定法は, IL-6に対するマウスモノクローナル抗体を用いたサウンドウィッチ法で, 特異性と感度が高いとされている。このモノクローナル抗体を96穴プレートに固相化し, 前述の上皮, 実質あるいは内皮細胞の培養上清を希釈せず原液のまま加えて反応させた。また, 別に標準曲線を作成するための標準ヒトリコンビナントIL-6を培養液でそれぞれ10~0.156 ng/mlまで2倍6段階に希釈したものを加えて反応させた。さらに抗IL-6ビオチン化家兎抗血清を反応させ, 次に, アビジン化ペルオキシダーゼ標識抗家兎IgG抗体を反応させた。この後, ペルオキシダーゼの基質であるO-フェニレンジアミンを反応させ, 各穴のペルオキシ

ダーゼ酵素活性を波長492 nmのマイクロプレート用光度計(EAR 340, SLT, Austria)で計測し, 標準IL-6の吸光度より標準曲線を作成した。各検体中のIL-6の濃度は, 2回測定した値の平均値を標準曲線に当てはめて算出した。この定量法のIL-6の検出域は10~0.156 ng/mlである。なお, 陰性対照として10%ウシ胎児血清を加えたTC-199培地中のIL-6量を求めた。

7. 培養上清の高速液体クロマトグラフィー (Fast Protein Liquid Chromatography: FPLC) によるゲル濾過

LPSでIL-6の産生を誘導した実質または内皮細胞の培養上清, または上皮細胞の培養上清200 µlをFPLCシステム(Pharmacia, Sweden)のSuperose 12カラム(HR 10/30)に注入し, リン酸緩衝食塩水(pH 7.4)を30 ml/hの流量で流してゲル濾過を行った。開始10分後から分画された培養上清を0.5 mlずつ採取し, 各分画100 µlについてIL-6を前述したELISAによって測定した。測定値は各分画ごとに2回測定した平均値で表した。また, 分子量を決定するためにウシ血清アルブミン(分子量68,000: Pharmacia)と, キモトリプシノーゲン(分子量25,000: Pharmacia)を標準マーカーとして用いた。

8. 培養上清のWestern blotting

LPSでIL-6の産生を誘導した実質細胞の培養上清についてIL-6のWestern blottingを行った。検体45 µlに2%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)45 µlを加えて90℃で3分加熱し, SDS可溶化した。このSDS可溶化された検体45 µlを10%ポリアクリルアミドゲル(FUNA SDS-PAGE, フナコシ)で25 mA, 1時間電気泳動した。尚, 標準分子量マーカー(Low Molecular Weight Caribration Kit, Pharmacia)を別のレーンで泳動した。次に, このポリアクリルアミドゲルを, 転写装置(モデル 88, フナコシ)を用いてニトロセルロース膜(AO 45 A 224 D, 東洋濾紙)に30 V, 1時間の条件で転写した。転写後, 標準分子量マーカーのレーンを切り離しクマシーブルーで染色した。さらに残りのニトロセルロース膜をBlock Ace[®] (大日本製薬)を用いて24時間ブロッキングした後, ポリクローナル家兎抗ヒトIL-6抗体(Genzyme)をニトロセルロース膜上に重層して4時間反応させた。5%Tween 20を含んだリン酸緩衝食塩水で3回洗浄後, 2次抗体としてビオチン化ヤギ抗家兎抗体を2時間反応させた。3回洗浄後, アビジン化ペルオキシダーゼを1時

間反応させた後,十分に洗浄,3-3'-ジアミノベンチジンを15分間反応させて発色させた.以上の操作はすべて室温で行った.陰性対照としては10%ウシ胎児血清を含んだ培養液を用いて,上記と同様の方法で発色させた.

III 結 果

1. 培養細胞の状態

1) 実質細胞

培養した実質細胞の形態は紡錘形を示し,継代培養を行ってもその形態は変化しなかった.また,LPSまたはIL-1 α を添加しても形態変化は生じなかった.

2) 内皮細胞

培養した内皮細胞の形態は,生体で見られるような典型的な六角形を示さず,細胞は偽足様の突起を持っていた.また,LPSを添加してもその形態に著明な変化は生じなかった.

2. 培養上清中のIL-6量

1) 実質細胞

LPSを添加して培養した培養上清中のIL-6の測定結果を図1Aに示した.LPSを添加しない培養上清中のIL-6は測定限界以下であったが,LPSを添加することにより,培養上清中にIL-6が量依存性に増加した.即ち,LPS添加濃度が1あるいは10 $\mu\text{g/ml}$ のもののIL-6は,それぞれ平均 0.285 ± 0.065 および 0.96 ± 0.24 ng/mlであった.つぎにIL-1 α の添加実験でも,

IL-1 α を添加しない培養上清中のIL-6は測定限界以下であったが,IL-1 α の添加により培養上清中のIL-6は,LPS添加の場合と同様に量依存性に増加した(図1B).即ち,IL-1 α を1,10あるいは100 pg/ml添加した培養上清中のIL-6はそれぞれ平均 0.18 ± 0.06 , 1.46 ± 0.07 あるいは 2.10 ± 0.68 ng/mlであった.一方,IL-6を刺激として加えたもののIL-6は,すべての濃度で測定限界以下であった.IL-1 α 添加後のIL-6産生の経時変化は,図2に示したように,IL-1 α 添加2時間後より上昇し始め,48時間後にピークになった.IL-1 α の添加後の1,2,6,24,48および96時間のIL-6はそれぞれ平均 0.394 ± 0.037 , 0.764 ± 0.033 , 4.452 ± 0.511 , 13.56 ± 1.741 , 16.49 ± 0.367 および 16.22 ± 1.485 ng/mlであった.

2) 内皮細胞

内皮細胞の培養上清中のIL-6を図3に示した.IL-6はLPSを添加しない培養上清中にも平均 0.610 ng/ml検出された.さらに,20 $\mu\text{g/ml}$ のLPSの添加によってIL-6産生は誘導され,培養上清中のIL-6は平均 3.614 ng/mlに増加した.

3) 上皮細胞

刺激を加えない上皮細胞の培養上清中のIL-6は460 pg/mlであった.

3. FPLC

Superose 12 カラムによる,実質,内皮および上皮細胞の培養上清のゲル濾過の結果を図4に示した.

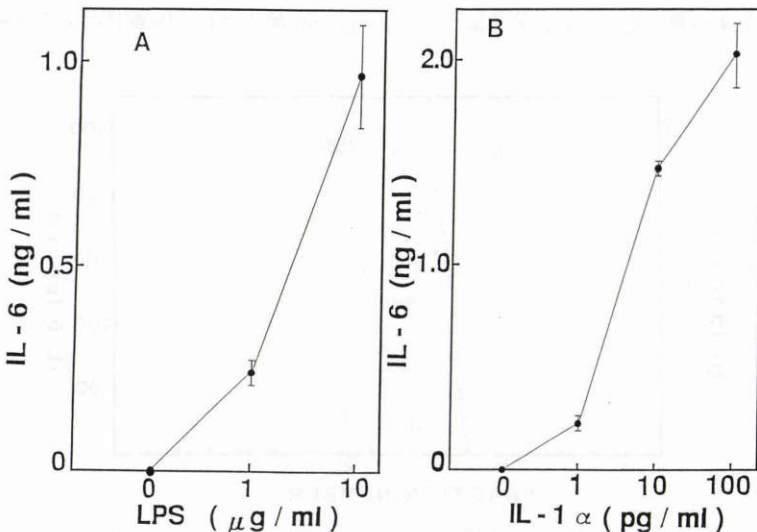


図1 LPS (A) および IL-1 α (B) 刺激による角膜実質細胞培養上清中の IL-6. いずれの刺激においても IL-6 産生は量依存性に誘導された.(平均値 $\pm$ 標準偏差)(n=4)

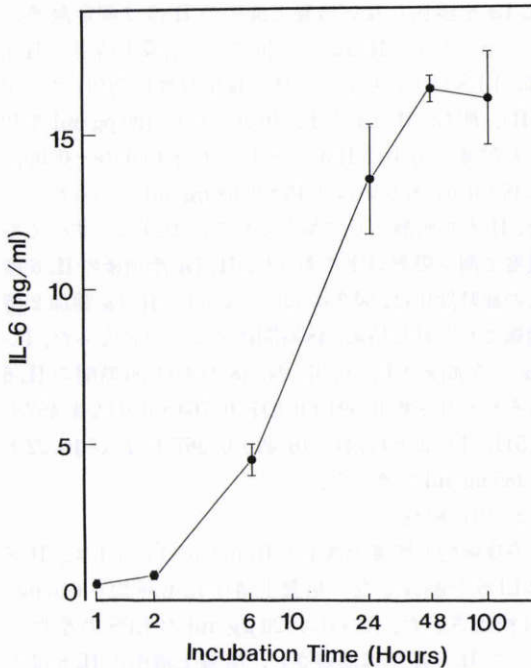


図2 IL-1 α 刺激による角膜実質細胞の IL-6 産生の経時的変化.
培養上清中の IL-6 は添加して 2 時間後より増加し始め, 48 時間後にピークになった. (平均値 $\pm$ 標準偏差) (n=4)

1) 実質細胞

実質細胞の培養上清のゲル濾過では, 17 および 18 番目の分画に IL-6 がそれぞれ 321 および 435 pg/ml 認められ, 18 番目の分画が最も強かった. 分子量マ

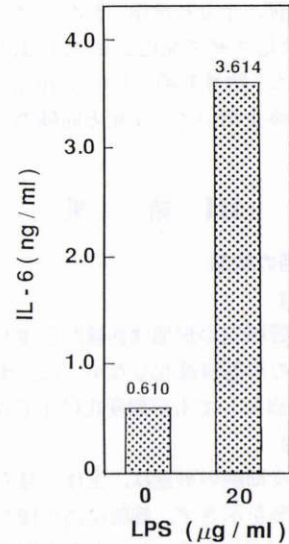


図3 無刺激および LPS 刺激による角膜内皮細胞培養上清中の IL-6.
LPS を添加しない培養上清中にも IL-6 が検出され, LPS によって IL-6 産生は誘導された. (n=2)

カーより求めたこれらの分子量は, それぞれ 30 および 35 kDa であった. 従って, LPS で誘導した実質細胞の培養上清中の IL-6 の分子量は, およそ 30 kDa と推定された.

2) 内皮細胞

内皮細胞の培養上清のゲル濾過では, 17, 18 および 19 番目の分画に IL-6 がそれぞれ 400, 490, および 420 pg/ml 検出され, 18 番目の分画が最も強かった. 分子

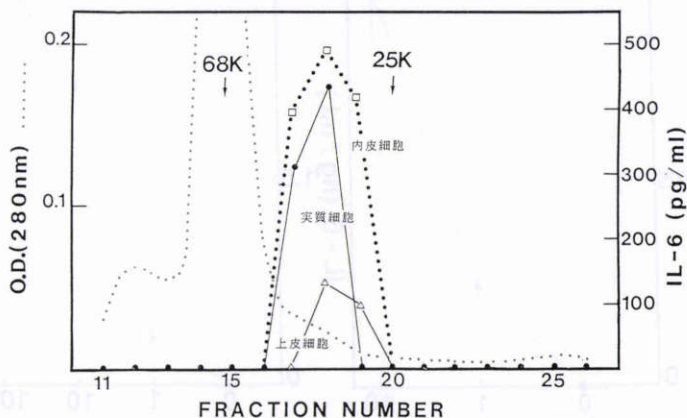


図4 角膜上皮, 実質および内皮細胞の培養上清のゲル濾過.
いずれにおいても IL-6 は 18 番目の分画にピークがあり, 標準分子量マーカーよりこれらの IL-6 の分子量はおよそ 30 kDa と推定された.

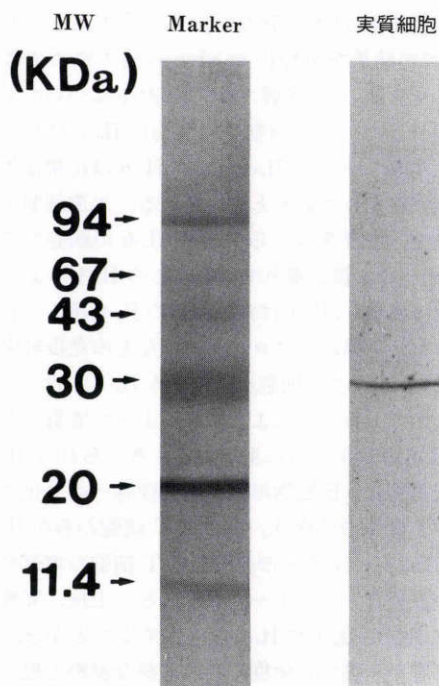


図5 角膜実質細胞培養上清の Western blotting.
30 kDa の位置に抗ヒト IL-6 抗体と反応したバンドが認められた。尚、図には示していないがマーカーと培養上清の原点の位置は同じである。

量マーカーより求めたこれらの分子量は、それぞれ 35, 30 および 27 kDa であった。従って、この内皮細胞の培養上清中の IL-6 の分子量は、およそ 30 kDa であると推定された。

3) 上皮細胞

上皮細胞の培養上清のゲル濾過では、18 および 19 番目の分画に IL-6 が認められ、それぞれ 133.8 および 102.2 pg/ml であった。実質細胞と同様に分子量マーカーよりその分子量を求めた結果、IL-6 の分子量はおよそ 30 kDa と推定された。

4. 培養上清の Western blotting

Western blotting の結果を図5に示した。左のレーンは標準分子量マーカーで、それぞれ 94, 67, 43, 30, 20, 11.4 kDa の6種類のバンドがクマシーブルーで染色された。一方、右のレーンの実質細胞の培養上清の Western blotting の結果では、分子量約 30 kDa の位置に抗ヒト IL-6 抗体と反応したバンドがあり、実質細胞が産生した IL-6 の分子量は Western blotting で測定した場合も、およそ 30 kDa であった。尚、陰性対照として用いた 10% ウシ胎児血清を含んだ TC-199 培

地の Western blotting では、抗ヒト IL-6 抗体に反応したバンドはなかった。

IV 考 按

細胞からのサイトカインの産生を調べる方法として、現在、細胞培養法を用いた実験系が多く用いられている。これは細胞を組織から単離することによって、生体の複雑な細胞間相互作用を単純化できるからである。今回、この細胞培養系を用いてヒト角膜実質および内皮細胞の IL-6 産生を検討した結果、これらの細胞の培養上清中に IL-6 活性を認め、検討したこれらの細胞が IL-6 を産生することが初めて明らかになった。

IL-6 の産生には、無刺激の状態でも産生される恒常的な産生と刺激によって産生される誘導的な産生とがある⁷⁾。すでに角膜上皮細胞からの IL-6 の産生は、刺激を必要としない恒常的な産生であることを報告⁶⁾したが、今回も恒常的な産生であることを確認した。さらに今回の結果より、角膜実質細胞では LPS や IL-1 α の刺激によって、IL-6 が誘導的に産生されることが判明した。また、内皮細胞では IL-6 が恒常的に産生され、なおかつ LPS によってその産生が増強され、誘導的な産生も認められた。これまでの報告⁷⁾では、T 細胞株 (HTLV-1)、正常マクロファージ・単球、T 24 膀胱癌細胞、血管内皮細胞などの細胞からの IL-6 産生は恒常的な産生であり、正常 T 細胞、B 細胞、線維芽細胞、星状グリア細胞などからの IL-6 の産生は誘導的な産生であるとされており、IL-6 の産生様式は細胞の種類によって異なっている。また、皮膚の角質細胞は IL-6 を恒常的に産生し、なおかつ刺激によってその産生は増強される²⁾。皮膚と角膜組織はいずれも体表層に位置していることを考え、皮膚と角膜における IL-6 産生を比較してみると、皮膚の角質細胞と同じ外胚葉由来の発生である角膜上皮細胞が、炎症や免疫応答に即応できるように角質細胞と同様、恒常的に IL-6 を産生していると考えられる。また、角膜では、上皮細胞での IL-6 の誘導的な産生は現在のところ認められないが、中胚葉由来の実質および内皮細胞が IL-6 を誘導的に産生した。このように上皮、実質および内皮細胞は IL-6 を恒常的または誘導的に産生して、機能的に IL-6 の産生を分担していると思われる。

実質細胞による IL-6 産生を培養上清中の IL-6 活性の経時変化で見ると、IL-1 α による刺激によって添加 2 時間後から上昇し始め、48 時間でピークに達した。血管内皮細胞を LPS で刺激した培養上清中の IL-6 活

性の経時変化を調べた報告⁹⁾でも、およそ2時間後から上昇し始めて48時間後にはほぼピークに達しており、実質細胞のIL-6産生と類似した経時変化であった。また、mRNAを指標にしたIL-6産生の経時変化を調べた報告¹⁷⁾によると、単球あるいは線維芽細胞では刺激後5、6時間でmRNAは最大レベルに達するが、T細胞あるいはB細胞では48時間後に最大となり、細胞の種類によりIL-6転写の経過が異なることが示されている。さらに、同じ線維芽細胞でも刺激の種類によってもIL-6転写の経過が異なる⁷⁾と言われており、実質細胞においても、IL-1 α によるIL-6産生の経時変化と、その他の刺激によるIL-6産生の経時変化が違ってくる可能性も考えられる。

実質細胞が産生したIL-6の分子量は培養上清のゲル濾過の結果、およそ30 kDaであった。Western blottingの結果でも、その分子量はおよそ30 kDaであり、ゲル濾過の結果と一致していた。また、角膜上皮および内皮細胞の産生するIL-6の分子量をゲル濾過によって決定した結果、どちらもその分子量はおよそ30 kDaであり、実質細胞が産生するIL-6とはほぼ同じ分子量であった。リコンビナントのIL-6の分子量は21 kDaとされているが、培養上清中のIL-6の分子量はその産生細胞により異なる⁹⁾と言われている。実際、皮膚の角質細胞は分子量24 kDaのIL-6を産生する²⁾。また、著者らは、ヒト網膜色素上皮細胞がIL-6を産生し、その分子量がおよそ30 kDaであることを明らかにした¹⁰⁾。この様な分子量の違いは、それぞれの産生細胞によってシアル酸などの糖鎖や、リン酸によるIL-6の修飾の程度が異なっているためと報告⁹⁾されている。同じ体表層の組織でも角膜が産生するIL-6と皮膚が産生するIL-6とでは、これらによる修飾が違っていると考えられる。

サイトカインの重要な性状の1つは、各サイトカインの作用は各々独立した作用であると同時に互いに関連した連鎖作用であることである。つまり、ある1つのサイトカインが産生されると、このサイトカインは別のサイトカインを誘導し、誘導されたサイトカインはさらに別のサイトカインを誘導するように、サイトカインの産生には、各種サイトカイン間での相互依存性が存在し、所謂サイトカインネットワークを形成している¹¹⁾。実質細胞によるIL-6の産生はIL-1 α によって誘導された。しかし、IL-6では実質細胞のIL-6産生は誘導されず、また、実質細胞はIL-1を産生しないこと⁹⁾から、IL-6の自己分泌産生(オートクリン)機構は

実質細胞には認められない。これらのことから、in vitroでの結果を単純にin vivoに当てはめて考えることはできないが、角膜でのIL-6産生について次のように推論した。上皮細胞は恒常的にIL-1およびIL-6を産生することから、IL-1およびIL-6は正常な状態でも上皮に存在していると考えられる。上皮細胞が傷害されると、上皮細胞からIL-1やIL-6が細胞外に放出され、ボーマン膜が壊れていればこのIL-1およびIL-6は実質に浸潤し、IL-1は実質細胞のIL-6産生を誘導する。また、角膜にマクロファージなどの免疫細胞が侵入していれば、この細胞が産生するIL-1を始めとする種々のサイトカインによる刺激によって実質や内皮細胞がIL-6を産生するに至ることも考えられる。IL-6はIL-1と同様に、B細胞の抗体産生細胞への分化誘導、キラーT細胞の活性化、およびT細胞からのIL-2の産生、IL-2レセプターの発現などT細胞の増殖や免疫応答の重要なメディエーターである。上皮、実質および内皮細胞がIL-1やIL-6を産生することから、これらの細胞が角膜での免疫応答に重要な役割を担っていると推測される。また、最近の免疫組織学的手法を用いた報告¹²⁾によれば、正常角膜の実質細胞はIL-1およびIL-6が陰性であるが、角膜ヘルペスに罹患した角膜の実質細胞ではいずれも陽性であり、この病変の発症や進行にIL-1およびIL-6が関与している可能性を示している。この様に角膜においてもサイトカインネットワークの存在が推測され、上皮、実質および内皮細胞はIL-1やIL-6を産生することによって、角膜での炎症や免疫応答に深く関与していると考えられた。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました細菌学講座、吉田昌男教授、並びに眼科学講座、田澤 豊教授に感謝します。

文 献

- 1) 松田 正, 平野俊夫: インターロイキン6 (IL-6). 日本生化学会編: 新生化学実験講座12, 分子免疫学I. 東京, 東京化学同人, 317-326, 1989.
- 2) Kupper ST, Min K, Sehgal P, et al: Production of IL-6 by keratinocytes. *Ann NY Acad Sci* 557: 454-464, 1989.
- 3) Luger TA, Schwarz T, Krutmann J, et al: Interleukin-6 is produced by epidermal cells and plays an important role in the activation of human T-lymphocytes and natural killer cells. *Ann NY Acad Sci* 557: 405-414, 1989.
- 4) Grabner G, Luger TA, Smolin G, et al: Corneal epithelial cell-derived thymocyte-activating factor (CETAF). *Invest Ophthalmol*

Vis Sci 23: 757—763, 1982.

- 5) 坂本真栄, 清野雅子, 田澤 豊, 他: ヒト角膜培養上清中の IL-1 活性—モノクローナル抗体を用いた ELISA による検出—. 眼紀 41: 505—510, 1990.
- 6) 坂本真栄, 千葉可芽里, 稲田捷也, 他: ヒト角膜上皮細胞によるインターロイキン 6, インターロイキン 1 α の産生. 日眼会誌 95: 728—732, 1991.
- 7) 審良静男: IL-6 産生細胞と遺伝子発現. 実験医学 7: 21—26, 1989.
- 8) Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, et al: Human endothelial cells produce IL-6. Ann NY Acad Sci 557: 374—387, 1989.
- 9) May LT, Santhanam U, Tatter SB, et al: Multiple forms of human interleukin-6. Ann NY Acad Sci 557: 114—121, 1989.
- 10) 千葉可芽里, 坂本真栄, 田澤 豊, 他: ヒト網膜色素上皮細胞は IL-6 を産生する. 日眼会誌 95(抄録): 282, 1991.
- 11) 笠倉新平: サイトカインによるサイトカインの誘導. 臨床免疫 22: 335—344, 1990.
- 12) 田川義継: 各臓器における免疫応答の特殊性. 眼. 臨床免疫 23: 128—135, 1991.