

人眼水晶体上皮細胞におけるインターロイキン1による プロスタグランジン E₂ の産生誘導

西 佳代¹⁾, 西 起史¹⁾, 今西 政二²⁾

¹⁾医療法人仁志会西眼科病院, ²⁾国立循環器病センター内科

要 約

我々は、フィブリン反応を含む眼内レンズ (IOL) 挿入術後の眼内炎は、残存水晶体上皮細胞が IOL と接して誘導される増殖、化生中にインターロイキン (IL)-1, IL-6 等、炎症初期に作用するサイトカインおよびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) が水晶体上皮細胞により産生されこれらが血液房水柵を破綻する結果である、との仮説を提唱した。この仮説を証明するため、我々は白内障の術中に得られた前嚢に付着した水晶体上皮細胞の組織培養を行い、その上清中に IL-1, IL-6, PGE₂ を検出し、すでに報告した。今回、PGE₂ 産生の経時変化と、同時に抗ヒト IL-1 ポリクロナール抗体を添加して PGE₂ 産生の経時変化を radioimmunoassay 法で測定した。抗ヒト IL-1 抗体添加群では、無添加群でみられるような PGE₂ の産生増加は認められなかった。即ち抗ヒト IL-1 抗体添加で PGE₂ 産生は抑制された。このことから IL-1 は PGE₂ の産生を誘導する事が明らかになった。(日眼会誌 97:156-161, 1993)

キーワード：人眼水晶体上皮細胞, 線維芽細胞様細胞, プロスタグランジン E₂, インターロイキン1, 抗ヒト IL-1 ポリクローナル抗体

Induction of Prostaglandin E₂ by Interleukin 1 in Human Lens Epithelial Cells

Kayo Nishi¹⁾, Okihiko Nishi¹⁾ and Masahito Imanishi²⁾

¹⁾Nishi Eye Hospital

²⁾Division of Hypertension and Nephrology, National Cardiovascular Center

Abstract

The authors proposed the hypothesis that pseudophakic inflammation, including the fibrin reaction, may be caused by interleukin (IL)-1, IL-6, other cytokines and/or prostaglandins (PGs), synthesized by residual lens epithelial cells (LEC). In testing our hypothesis, we have already detected IL-1 α , IL-6 and PGE₂ in the culture media of human LEC obtained by capsulotomy during cataract surgery. In this paper, we studied the time course of PGE₂-synthesis and interaction between IL-1 and PGE₂. PGE₂ concentration was measured by radioimmunoassay in the culture media to which rabbit anti-human IL-1 polyclonal antibody was added after culture for 6 h, 1 day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks. There was no increase of PGE₂, whereas in the untreated control culture media significant increase of PGE₂ was confirmed. The results show that the antihuman IL-1 polyclonal antibody suppressed PGE₂-synthesis. Thus, IL-1 induces PGE₂ synthesis in human LEC culture. (J Jpn Ophthalmol Soc 97:156-161, 1993)

Key words: Human lens epithelial cell, Fibroblast-like cell, Prostaglandin E₂, Interleukin 1, Anti-human IL-1 polyclonal antibody

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4年3月31日受付, 平成4年7月21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 March 31, 1992 and accepted in revised form July 21, 1992)

I 緒 言

フィブリン反応を含む偽水晶体眼の術後炎症の原因は残存水晶体上皮細胞が眼内レンズと接して増殖、線維性化生中に interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor- β (TGF- β) といった炎症の初期に作用するサイトカインおよびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を産生し、これらメディエーターが血液房水柵を破壊する結果である、との仮説^{1)~4)}を我々は提唱してきた。この仮説を証明するため我々は人眼白内障水晶体上皮細胞 (以下水晶体上皮細胞) の組織培養を行い、その上清中に IL-1 α ⁵⁾, IL-6⁶⁾ および、PGE₂⁷⁾ を検出し、すでに報告した。今回は組織培養を用いて水晶体上皮細胞における IL-1 による PGE₂ 産生の誘導について検討した。

II 実験方法

1. 水晶体上皮細胞の培養

老人性白内障 (合併症を有さない) 術中に得られた直径約 6 mm のほぼ円形の前囊に付着した水晶体上皮細胞をそのまま 1 検体とした。Eagle's MEM 0.5 ml (10% 仔牛血清, ペニシリン G 100 u/ml, 硫酸ストレプトマイシン 100 μ g/ml を含む) の入った 48 穴 multidish 1 穴に 1 検体を入れ、37°C, 湿度 100%, 5% CO₂ 循環のインキュベーター中で培養し、3 時間、6 時間、8 時間、1 日、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 週間目に上清を採取し、その都度培養液を交換した。採取した上清はただちに -20 ~ -70°C で凍結し測定まで保存した。

2. 薬剤無添加培養液中の PGE₂ 産生の経時変化

水晶体上皮細胞の培養経過中の PGE₂ 産生の自然経過をみるため、培養液 0.5 ml 中で検体を培養し (8 検体)、培養 3 時間後から 8 週目まで上記の方法で上清を採取し、その都度培養液を交換した。

3. IL-1 と PGE₂ 産生の関連

1) 抗ヒト IL-1 ポリクローナル抗体の添加

培養 6 時間後上清を採取し、家兎抗ヒト IL-1 α ポリクローナル抗体 25 μ l (1 mg/ml) (Genzyme, Boston) および家兎抗ヒト IL-1 β ポリクローナル抗体 25 μ l (1 mg/ml) (Collaborative Research Incorporated) を Eagle's MEM 0.45 ml に添加し計 0.5 ml として検体を培養した (6 検体)。所定期間培養後上清を採取し、同様の操作を 6 週目まで繰り返し施行した。

2) 家兎 IgG の添加

家兎ヒト IL-1 ポリクローナル抗体の対照として家兎 IgG を用いた。培養 6 時間後上清を採取し、家兎 IgG (Sigma, St. Louis) 50 μ l (1 mg/ml) を Eagle's MEM 0.45 ml に添加し計 0.5 ml として検体を培養した (8 検体)。所定期間培養後上清を採取し、同様の操作を 6 週目まで繰り返し施行した。

4. PGE₂ の定量

通常の方法を簡便化した方法⁸⁾⁹⁾で行った。即ち、上清 (300 μ l) に 0.05 M クエン酸溶液を添加して pH 3.5 とし、Bond-Elut C₁₈ (500 mg, Analytichem Intl., Inc., Harbor City, California) を用いて、蒸留水 2 ml で 2 回、10% メタノール 2 ml で 2 回、シクロヘキサン 2 ml で 2 回洗浄し、最後に酢酸エチル 2 ml で抽出した。抽出液に窒素ガスを吹きつけて乾燥させた後、^[125I]PGE₂ RIA kit (New England Nuclear Research Products, Boston) を用いてその PGE₂ を測定した。

5. 水晶体上皮細胞の増殖・形態変化

倒立位相差顕微鏡で経時的に観察した。

6. 生存細胞数算出

各 well 中の生存細胞数を算出するため最後の上清採取後、Ca, Mg フリーの PBS (phosphate buffered saline) 0.5 ml で 3 回洗浄し、PBS を除去した後、0.25% トリプシン + 0.02% EDTA \cdot 2 Na 0.4 ml を加えインキュベーター中で 10 分間放置した。その後、ピペットで吸引操作を行い細胞を well 底および前囊からはがし、細胞浮遊液 0.4 ml を 0.05% クリスタルバイオレット 0.1 ml の入った小試験管に移し計 0.5 ml の溶液とした。この溶液中のクリスタルバイオレットで染まった生存細胞を Fuchs-Rosenthal 血球計算盤で算出した。

III 結 果

1. 薬剤無添加での PGE₂ 産生の自然経過

培養 1 週目から 4 週目にかけて PGE₂ の産生量は増加していた。4 週目以降 8 週目までは PGE₂ 産生量はプラトーになる傾向を示していた。(図 1, 表 1)

2. 家兎 IgG 添加群

培養 2 週目から 4 週目にかけて PGE₂ の産生量は増加していた。4 週目から 5 週目にかけて PGE₂ 産生量はプラトー傾向を示し 5 週目から 6 週目にはやや減少傾向を示していた。(図 2, 表 1)

3. 家兎抗ヒト IL-1 ポリクローナル抗体添加群の PGE₂ 産生

培養の全期間中、PGE₂ 産生の増加はみられなかつ

た。この抗ヒト IL-1 ポリクローナル抗体添加群と薬剤無添加群の間での PGE₂ 産生量については 2 週目から 6 週目まで 5 % 以下の危険率で統計学的に有意差を認めた。(Scheffe F 検定)。また家兎 IgG 添加群との間では 3 週目から 6 週目まで 5 % 以下の危険率で有意差を認めた。(Scheffe F 検定)(図 2, 表 1)

表 1 PGE₂ 産生の経時変化

培養 日数	薬剤無添加群 (n=8)	抗ヒト IL-1 抗体 添加群 (n=6)	家兎 IgG 添加群 (n=8)
3時間	16.83±11.43		
6時間		28.98±4.30	11.46±10.62
8時間	27.19±21.16		
1日	115.90±117.20	33.49±7.46	45.92±31.89
1週	82.38±91.21	19.68±4.23	36.23±45.60
2週	181.50±106.90	27.94±21.59	60.74±63.83
3週	192.70±86.67	26.21±13.75	157.3±52.65
4週	228.60±113.60	20.62±15.44	202.7±41.41
5週	241.30±92.90	23.26±13.99	203.5±85.53
6週	260.60±107.20	16.45±10.52	173.1±65.68
7週	261.40±102.00		
8週	246.00±102.10		

平均値±標準偏差 単位: pg/ml
抗ヒト IL-1 抗体添加群と薬剤無添加群の間では 2 週から 6 週まで有意差が認められる。また家兎 IgG 添加群との間では、3 週から 6 週まで有意差が認められる (Scheffe F 検定)。

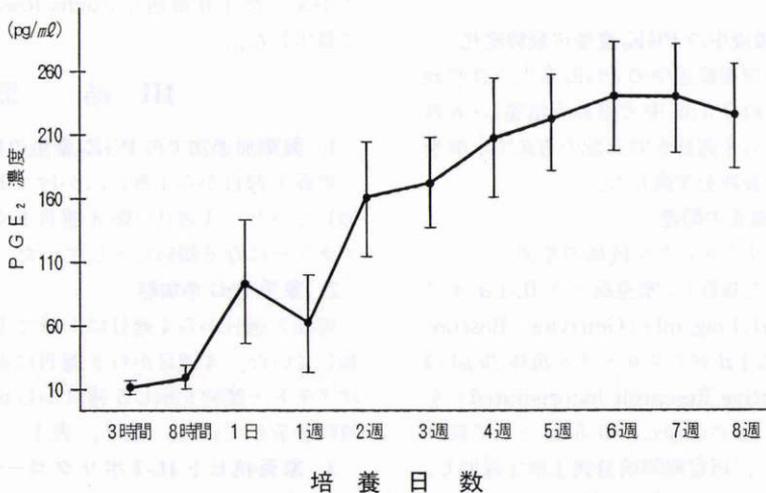


図 1 薬剤無添加群での PGE₂ 産生の経時変化。

培養 1 週目以降 PGE₂ 産生量は明らかに増加している。(平均値±標準偏差)(n=8)

4. 培養期間中の水晶体上皮細胞の形態変化

薬剤無添加群および家兎 IgG 添加群では 6 ~ 7 日目頃には前囊下全体が多形性の細胞で占められ、遠心性に well の底に沿って増殖し、線維芽細胞様細胞の形態を示し、4 週目から 8 週目にかけてほぼ confluent な状態を示した。

これに対して家兎抗ヒト IL-1 ポリクローナル抗体添加群では水晶体上皮細胞は前囊から脱落するものが多く、脱落せずに付着した水晶体上皮細胞も細胞質が萎縮変性を示し、増殖あるいは線維芽細胞様変化はほとんど認められなかった。

5. 各群での生存細胞数

薬剤無添加群の生存細胞数は 1.02±0.40 (×10⁴) (8 週目)、抗ヒト IL-1 抗体添加群は 0.14±0.08 (×10⁴) (6 週目)、家兎 IgG 添加群は 1.52±0.72 (×10⁴) (6 週目) で抗ヒト IL-1 抗体添加群では著明に減少していた。抗ヒト IL-1 抗体添加群と、家兎 IgG 添加群では 5 % 以下の危険率で有意差が認められた。(表 2)

IV 考 按

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、眼内炎症において血液房水柵を破壊する重要なメディエーターである事はよく知られている。虹彩、毛様体、角膜を含む種々の眼内組織で生産される事^{10)~14)}は衆知の事であるが、水晶体組織からの PGE₂ 産生に関する報告は少なく^{15)~20)}ある種の動物では否定的である¹⁵⁾¹⁶⁾。

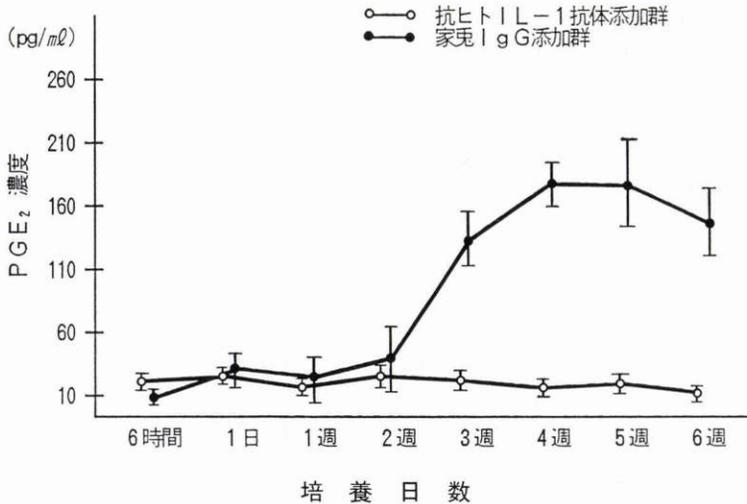


図2 抗ヒトIL-1抗体添加群と家兎IgG添加群でのPGE₂産生の経時的変化。抗ヒトIL-1抗体添加群(n=6)では全培養期間中、PGE₂産生量の増加は認められない。家兎IgG添加群(n=8)では2週目以降産生量は増加している。(平均値±標準偏差)

表2 生存細胞数

薬剤無添加群 n=8(8週目)	抗ヒトIL-1抗体添加群 n=6(6週目)	家兎IgG添加群 n=6(6週目)
1.02±0.40	0.14±0.08	1.52±0.72

抗ヒトIL-1抗体添加群では著明に減少している 単位: ×10⁴ 平均値±標準偏差

1982年 Taylor ら¹⁷⁾は仔牛の水晶体上皮細胞の上清中にPGsをradioimmunoassay法で検出できなかったが、1983年 Belisle ら¹⁸⁾はラット水晶体上皮細胞がPGsを産生している可能性を示唆し、1985年 Keeting ら¹⁹⁾はホモゲナイズされたラット水晶体からPGE₂の産生を報告した。更に1985年 Fleisher ら²⁰⁾は実験的に炎症を起こさせた家兎眼の水晶体からPGE₂が産生される事を報告した。我々⁷⁾は1990年人眼白内障水晶体上皮細胞の組織培養上清中に1週目より4週目に有意に高値にPGE₂が産生されていることを始めて報告した。

この血液房水柵を破綻させるメディエーター、PGE₂の産生を誘導する物質としてはIL-1²¹⁾²²⁾、IL-2²²⁾、腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF-α)²¹⁾といった炎症の初期に作用するサイトカインが知られている。IL-1とアラキドン酸代謝系との関係については、IL-1はcyclo-oxygenaseを誘導してPGE₂

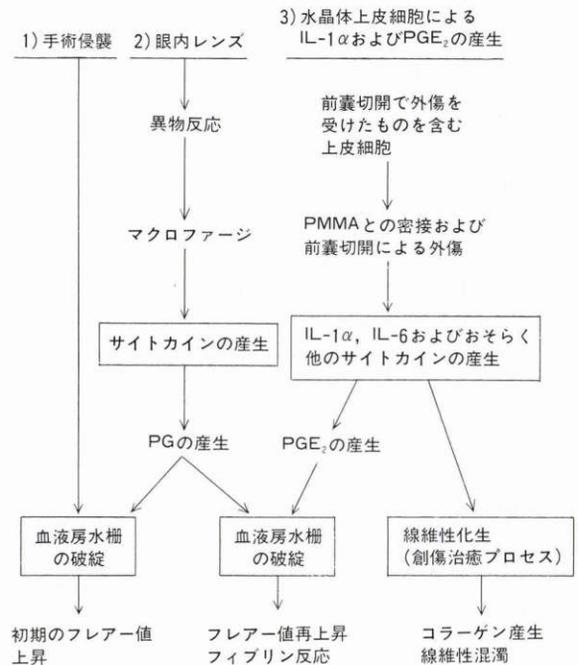


図3 偽水晶体眼の術後炎症およびフィブリン反応の原因。

(PG: プロスタグランジン, IL-1: インターロイキン-1)

を産生させる²³⁾, phospholipase A₂を活性化する²⁴⁾, lipoxygenaseを活性化する²²⁾等の報告がある。しかしこれらは、リウマチの滑膜細胞、家兎軟骨細胞などを検体としている。我々の調べた限りでは人眼白内障水晶体上皮細胞を用いての報告は未だ見当たらない。

IL-1が水晶体上皮細胞の培養2, 3, 4週目の上清中に検出された事は既に報告した⁵⁾, TNF- α については我々の方法では検出できなかった⁶⁾, 上皮細胞からの分泌の報告はない²⁵⁾といわれている。よって今回、我々は家兎抗ヒトIL-1ポリクローナル抗体で水晶体上皮細胞からのIL-1をブロックして、その上清中のPGE₂の産生量を測定する事でIL-1によるPGE₂の産生誘導を検討したのである。すなわち水晶体上皮細胞の培養経過中のPGE₂産生の経時変化を検討した。その結果薬剤無添加群では1週目以降PGE₂産生量は増加していた。家兎IgG添加群では2週目以降4週目まで産生量は増加していた。抗ヒトIL-1ポリクローナル抗体添加群では全培養期間中、産生は明らかに抑制された。換言すると、IL-1は水晶体上皮細胞からのPGE₂産生を誘導していると言えるだろう。同時にIL-1が水晶体上皮細胞から産生されることも示している。更に生存細胞数を検討すると培養6週間後において家兎IgG添加群は培養器中でconfluentな状態になり $1.52 \pm 0.72 (\times 10^4)$ であったが、抗ヒトIL-1添加群では $0.14 \pm 0.08 (\times 10^4)$ と有意に低かった。このことは我々²⁶⁾が以前に報告したようにIL-1が水晶体上皮細胞に対し増殖能を有することを示している。従って水晶体上皮細胞におけるIL-1のPGE₂に対する産生増大は、衆知のようにアラキドン酸カスケード中の各種酵素の活性化のみならず、水晶体上皮細胞に対する増殖能も作用機序として関与していると考えられる。

サイトカインは通常の内分泌ホルモンの作働法と異なって、経リンパ系や血管系でなく、局所的すなわちautocrine(産生細胞自身に作働)、paracrine(産生細胞周囲に作働)に作用するのが特徴である。従って培養器中で水晶体上皮細胞は先ずIL-1を産生し、このIL-1が自らあるいは周囲の細胞に作用して増殖させ、その内部に持つアラキドン酸カスケードの各種の酵素を活性化し、PGE₂を最終的に誘導すると考えられる。その過程ではトランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)、塩基性線維芽細胞成長因子(b-FGF)、IL-6といったさらに多くのサイトカインのネットワークが存在すると思われる。このIL-1とPGE₂の関与する過程は眼内レンズ挿入術後*in vivo*でも同様に起きている

と考えられ、フィブリン反応に先立ってこれらのメディエーターによって血液房水柵が破壊されると考えられる。

以上の結果より、我々が偽水晶体眼の術後炎症およびフィブリン反応の病理機序として提唱してきた(図3)多くの過程のうち、その一局面が明らかになったと考えられる。

本論文の要旨は1992年1月第15回日本眼科手術学会総会で発表した。

文 献

- 1) 西 興史: 後房レンズ挿入早期にみられる瞳孔膜. 臨眼 41: 331-336, 1987.
- 2) 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.
- 3) 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自防効果. あたらしい眼科 7: 923-928, 1990.
- 4) 西 起史, 西 佳代: 白内障術後の線維性前囊混濁. 臨眼 45: 1811-1815, 1991.
- 5) Nishi O, Nishi K, Imanishi M: Synthesis of interleukin-1 and prostaglandin E₂ by lens epithelial cells of human cataracts. Br J Ophthalmol 76: 338-341, 1992.
- 6) 西 佳代, 西 起史, 大本安一: 人眼水晶体上皮細胞によるサイトカインの産生. インターロイキン1(IL-1), 腫瘍壊死因子(TNF), インターロイキン6(IL-6), 上皮細胞成長因子(EGF)について. 日眼会誌 96: 715-720, 1992.
- 7) 西 佳代, 西 興史, 今西政仁: ヒト水晶体上皮細胞によるプロスタグランジンE₂の産生. あたらしい眼科 7: 1389-1392, 1990.
- 8) Powell WS: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. Prostaglandins 20: 947-957, 1980.
- 9) Imanishi M, Kawamura M, Akabane S, Matsushima Y, Kuramochi M, Ito K, et al: Aspirin lowers blood pressure in patients with renovascular hypertension. Hypertension 14: 461-468, 1989.
- 10) Ambache N: Irin, a smooth-muscle contracting substance present in rabbit iris. J Physiol 129: 65-66, 1955.
- 11) Anggard E, Samuelsson B: Smooth muscle stimulating liquids in sheep iris. The identification of prostaglandin F_{2 α} , prostaglandins and related factors. Biochem Pharmacol 13: 281-283, 1964.
- 12) Van Dorp DA, Jouvenaz GH, Struijk CB:

- The biosynthesis of prostaglandin in pig eye iris. *Biochem Biophys Acta* 1137: 396—399, 1967.
- 13) **Christ EJ, Van Dorp DA**: Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Biochem Biophys Acta* 270: 537—545, 1972.
 - 14) **Bhattacharjee P, Eakins KE**: Inhibition of the prostaglandin synthetase systems in ocular tissues by indomethacin. *Br J Pharmacol* 50: 227—230, 1974.
 - 15) **Guivernau M, Terragno A, Dunn MW, Terragno NA**: Estrogens induce lipoxygenase derivative formation in rabbit lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 214—217, 1982.
 - 16) **Kass MA, Holmberg NJ**: Prostaglandin and thromboxane synthesis by microsomes of rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 166—171, 1979.
 - 17) **Taylor L, Menconi M, Leibowitz HM, Polger P**: The effect of ascorbate, hydroperoxides, and bradykinin on prostaglandin production by corneal and lens cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 378—382, 1982.
 - 18) **Belisle EH, Eng PFC, Fu S-CJ**: Levels of prostaglandin E in rat lens in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(Suppl). ARVO abstracts, 202, 1983.
 - 19) **Keeting PE, Lysz TW, Centra M, Fu S-CJ**: Prostaglandin synthesis in the rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1083—1086, 1985.
 - 20) **Fleisher LN, Megahan MC**: Endotoxin-induced ocular inflammation increases prostaglandin E₂ synthesis by rabbit lens. *Exp Eye Res* 40: 711—719, 1985.
 - 21) **Elias JA, Gustilo K, Baeder W, Freundlich B**: Synergistic stimulation by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 138: 3812—3816, 1987.
 - 22) **Farrar WL, Humes JL**: The role of arachidonic acid metabolism in the activities of interleukin 1 and 2. *J Immunol* 135: 1153—1159, 1985.
 - 23) **O'Neill LAJ, Barrett ML, Lewis GP**: Induction of cyclo-oxygenase by interleukin-1 in rheumatoid synovial cells. *FEBS Letters* 212: 35—39, 1987.
 - 24) **Chang J, Gilman SC, Lewis AJ**: Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes: A possible signal for IL 1 action. *J Immunol* 136: 1283—1287, 1986.
 - 25) **Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltyne KC**: Cytokines. In: Stites DP, et al (Eds): *Basic Human Immunology*. Appleton and Lange, Norwalk, CT/San Mateo, CA, 78—100, 1991.
 - 26) **西佳代, 西起史**: ヒト水晶体上皮細胞の組織培養. その1—形態変化とPMMA, サイトカインによる影響—, *あたらしい眼科* 7: 1213—1223, 1990.