

家兎眼内レンズ移植術後の房水中塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)・ トランスフォーミング成長因子 α (TGF α) の定量

並 木 真 理

神戸大学医学部眼科学教室

要 約

白色家兎を対象に、超音波水晶体乳化吸引術(phacoemulsification)を施行した phaco 群と、phaco および眼内レンズ (IOL) 移植術を施行した phaco+IOL 群の房水中塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、トランスフォーミング成長因子 (TGF α) の経時的変化を検討した。bFGF は phaco 群、phaco+IOL 群 (10 pg/ml) とともに術前日は検出限界 (10 pg/ml) 以下であったが、術翌日には 250 ± 150 pg/ml, 300 ± 280 pg/ml と上昇し、1週目に最高値の 390 ± 180 pg/ml, 450 ± 270 pg/ml に達し、8週を経ても 130 ± 50 pg/ml, 180 ± 160 pg/ml 検出された。TGF α は両群ともに術前日および術後1日目は検出限界 (10 pg/ml) 以下であったが、3日目に 25 ± 50

pg/ml, 35 ± 100 pg/ml 検出され、その後順次低下し3週目で測定限界以下になった。前房水の経時的採取による bFGF, TGF α の上昇は 50 pg/ml 以下および 10 pg/ml 以下で軽微であった。bFGF, TGF α ともに phaco 群と phaco+IOL 群の間に有意差は認められなかったが、phaco+IOL 群の方が高値を示す傾向にあった。以上から、水晶体摘出術後の房水中には bFGF が増加しており、術後早期の囊混濁や収縮を促進する一因子である可能性が示唆された。(日眼会誌 98: 334—339, 1994)

キーワード: bFGF, TGF α , 後発白内障, 房水, IOL

Quantification of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and Transforming Growth Factor (TGF α) in Rabbit Aqueous Humor after Intraocular Lens Implantation

Mari Namiki

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kobe University

Abstract

Basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor α (TGF α) in rabbit aqueous humor were quantified before and after phacoemulsification (phaco) and intraocular lens (IOL) implantation by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). bFGF was not detected (< 10 pg/ml) before the operation, but increased to 250 ± 150 pg/ml in a phaco group and 300 ± 280 pg/ml in a phaco+IOL group on the first postoperative day. The concentration of bFGF in the aqueous humor was the highest in the first postoperative week, with a peak value of 390 ± 180 pg/ml, and then gradually decreased to 130 ± 50 pg/ml in the phaco group and 180 ± 160 pg/ml in the phaco+IOL group in the eighth postoperative week. TGF α was not detected (< 10 pg/ml) before the operation or on the first postoperative day in either group. 25 ± 50 pg/ml and

35 ± 100 pg/ml of TGF α was detected in a phaco group and a phaco+IOL group on the third postoperative day and then TGF α in the aqueous humor gradually decreased becoming undetectable in the third postoperative week. The level of bFGF and TGF α was higher in a phaco+IOL group than in a phaco group but there was no statistical significance. The results show that bFGF increases in the aqueous humor for several postoperative weeks and suggests that it is one of the factors that promote capsular opacities and shrinkage in the early postoperative period of cataract extraction. (Jpn Ophthalmol Soc 98: 334—339, 1994)

Key words: bFGF, TGF α , Aqueous humor, IOL, Secondary cataract

別刷請求先: 650 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1 神戸大学医学部眼科学教室 並木 真理
(平成5年7月19日受付, 平成5年12月3日改訂受理)

Reprint requests to: Mari Namiki, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kobe University,
7-5-1, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 650, Japan

(Received July 19, 1993 and accepted in revised form December 3, 1993)

I 緒 言

白内障術後の水晶体嚢の収縮や混濁は、水晶体上皮細胞の増殖・重層化、コラーゲンの産生亢進の結果起こることが明らかとなってきた^{1)~5)}。水晶体上皮細胞の増殖を促進あるいは抑制する液性因子が房水中や硝子体中に存在し、複雑に絡みあって水晶体上皮細胞の増殖能や機能的変化、形態変化を制御しているのではないかと推測されている。水晶体上皮細胞の増殖に促進的に働く因子として、上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor, EGF)^{6)~8)}、インスリン様細胞成長因子 (insulin like growth factor, IGF)⁶⁾⁷⁾、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)^{9)~13)}、インターロイキン 1 α (interleukin 1 α)¹⁴⁾などが報告されている。また、EGF と同一のレセプターに結合し、強い上皮細胞の増殖促進作用を有するトランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor α , TGF α)¹⁵⁾も水晶体上皮細胞の増殖を促進すると考えられる。我々はヒトを対象にした検討で、合併症のある白内障眼や水晶体摘出後眼において、房水中に bFGF や EGF が 1 ng/ml 程度存在する例があることをラジオイムノアッセイ法を用いて報告し¹⁶⁾、それらの細胞成長因子が術後の嚢混濁や収縮を助長する可能性があることを示唆した。しかし、人眼を対象にした検討では年齢、全身的基础疾患、眼科的合併症、白内障のタイプ、手術方法、房水採取の時期などがまちまちでマッチングが難しい。したがって、何が細胞成長因子の房水中濃度に影響を与えるのか、手術という人為的外傷が細胞成長因子の産生を促すのか、眼内レンズ (IOL) を挿入することが影響を及ぼすのか、いかなる細胞成長因子が主に水晶体上皮細胞に対して促進的に作用し、後発白内障や前嚢収縮や混濁を引き起こすのかなどの疑問に答えることができない。本報では家兎を対象に超音波水晶体乳化吸引術 (phaco) を施行し、IOL 挿入を行った群と行わなかった群について bFGF と TGF α の術前、術後の房水中濃度を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) で経時的に定量し、手術という外傷および IOL という異物を挿入することによる影響を検討し、若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. 材料と方法

実験動物は体重 3.0~4.0 kg の白色家兎で、未処置群 5 匹 10 眼、phaco を行った phaco 群 15 匹 18 眼、phaco および IOL 移植術を行った phaco+IOL 群 15 匹 18 眼、および手術操作を加えないこと以外は前の 2 つの手術群と同様の麻酔や前房水の採取を行った前房穿刺群 10 匹 10 眼である。なお、手術群の 3 匹については、片眼に phaco および IOL 移植と術後 2 か月間の房水採取を終了した後、交感性の反応を避ける目的で、1 か月の無処

置期間を置き、残る片眼に phaco および術後の房水採取を行った。手術は塩酸ケタミン (ケタラール®) 50 mg/kg を筋注し、全身麻酔をかけた後に 0.5% トロピカミド、5% 塩酸フェニレフリン点眼で散瞳させ、手術用顕微鏡下で無菌的に行った。Fornix base で結膜切開し、3×6 mm の強角膜トンネルを作成、3 mm のランツェで前房に入り、粘弾性物質で前房を形成し、10 時のサイドポートから直径約 5 mm の continuous curvilinear capsulorhexis を行い、Alcon 社製 10,000 compact で phaco を施行、粘弾性物質で前房を確保した後、phaco 群、phaco+IOL 群ともに創口を 6 mm に広げ、phaco+IOL 群では HOYA 製、全長 13.5 mm、光学部径 6 mm のスリーピース IOL を嚢内に固定し、両群とも 10-0 ポリプロピレンで水平縫合を一針置き、粘弾性物質を灌流除去し手術を終了した。終了時、硫酸ジベカシン 25 mg、ベタメタゾン 1 mg を結膜下に注射した。術前、術後 1 日目、3 日目、1 週目、2 週目、3 週目、4 週目、8 週目にディスプレイの注射筒をとりつけた 27 ゲージ針を角膜輪部から前房内に穿刺し、0.2~0.6 ml の房水を採取した。薬物療法は房水採取時の硫酸ジベカシン点眼のみであった。房水は採取した後、速やかに液体窒素で凍結させ -70℃ で保存した。フィブリンの析出している房水については、定量時に 3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を定量用検体とした。

2. bFGF, TGF α の定量

測定は、sandwich ELISA で行い、用いた抗体は bFGF の測定にはモノクローナル抗組み替え (recombinant, r) ヒト (human, h) bFGF マウス抗体 (Cal Bio) を、TGF α の測定にはモノクローナル抗体 rhTGF α マウス抗体 (Oncogene Science, Inc) とポリクローナル抗 rhTGF α ヒッジ抗体 (Chemicon International Inc) で一次抗体、二次抗体の濃度および反応時間、反応温度、洗浄の回数などは予備実験により決定した。ELISA の概要は、マイクロタイタープレートに一次抗体溶液を 100 μ l 分注して室温で一晩インキュベーションし、一次抗体固層化を行った後、150 μ l の 100 mM-NaCl 含有 50 mM 燐酸緩衝液 (PBS) に 10 (v/v)% ブロックエースを加えた washing buffer で 2 回洗浄し、PBS に 25 (v/v)% ブロックエースを含有した blocking buffer 150 μ l を分注して 4℃ で 1 時間インキュベートしてブロッキングを行った。その後、50 μ l の binding buffer (washing buffer と同じ組成) と 50 μ l のスタンダード溶液あるいは採取した房水を分注し、4℃ で 6 時間インキュベートした。その後、150 μ l の washing buffer で 4 回洗浄し、二次抗体溶液 100 μ l を入れ、4℃ で一晩インキュベートした。次に washing buffer で 3 回洗浄し、第二抗体であるペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories) 溶液を 4℃ で 6 時間反応させ、washing buffer 150 μ l で 6 回洗浄した後、ペルオ

キシダーゼ基質溶液である 0.02(w/v)% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン, 0.0025 (w/v)% 過酸化水素水, 100 mM-酢酸緩衝液(pH 5.5), 10(v/v)% ジメチルスルフォキシド水溶液 100 μ l を分注し, 37°C で 1 時間インキュベートして発色させ, 2 M-硫酸を反応停止液として 100 μ l 加えプレートリーダーで 450 nm の吸光度を 630 nm を対照に測定した. 検量線は hrbFGF(科研製薬のご好意により供与された), hrTGF α (Collaborative Biomedical Product) をスタンダードとして用いて作成した.

III 結 果

bFGF, TGF α の検量線の 1 例を図 1, 2 に示した.

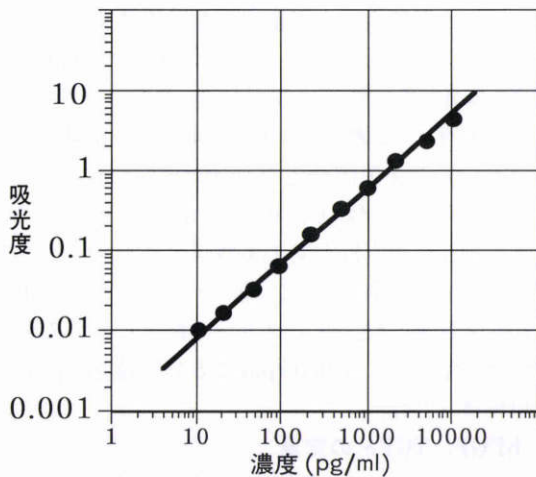


図1 塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の検量線の1例.

スタンダードには 10 pg/ml, 20 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 200 pg/ml, 500 pg/ml, 2 ng/ml, 10 ng/ml の rhbFGF を用いた. 検出限界は 10 pg/ml, 定量は直線性の良好な 50 pg/ml ~ 10 ng/ml の範囲で行った.

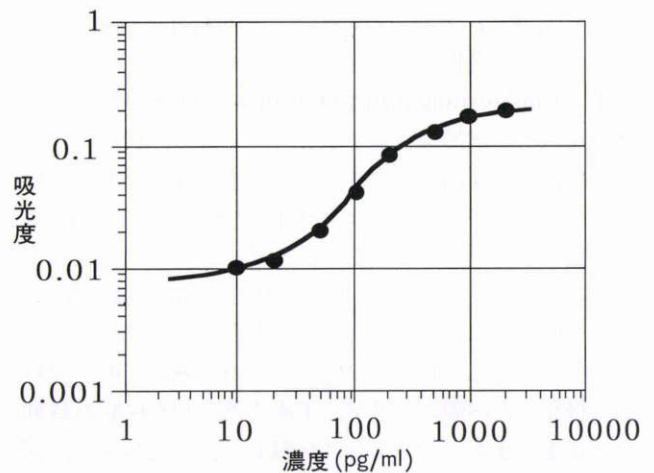


図2 トランスフォーミング成長因子(TGF α)の検量線の1例.

スタンダードには 10 pg/ml, 20 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 200 pg/ml, 500 pg/ml, 2 ng/ml の rhTGF α を用いた. 検出限界は 10 pg/ml, 定量は直線性の良好な 50 pg/ml ~ 500 pg/ml の範囲で行った.

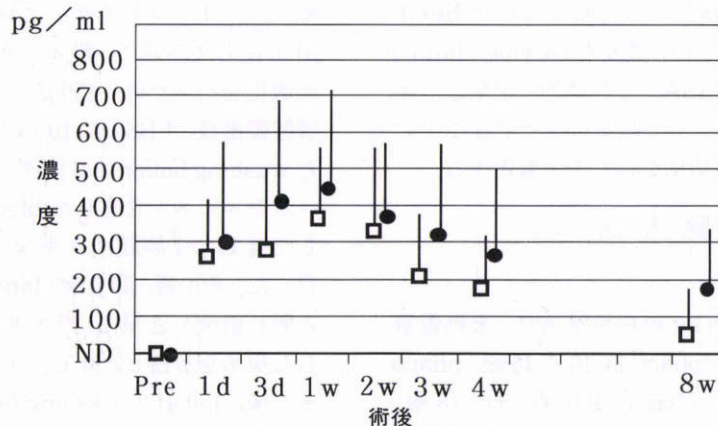


図3 Phaco 群, phaco+IOL 群の房水中 bFGF の経時的変化.

平均値±標準偏差を示し, bFGF は術翌日から 100~580 pg/ml 検出され, 術後 1 週目で最高値に達し, その後順次減少するが, 術後 8 週を経ても 80~300 pg/ml 検出された. なお, 未処置群では全例, bFGF は検出限界 (10 pg/ml) 以下であり, 前房穿刺群では微量に検出される例があったが, 50 pg/ml 以下で定量は不能であった. 黒丸: phaco+IOL 四角: phaco

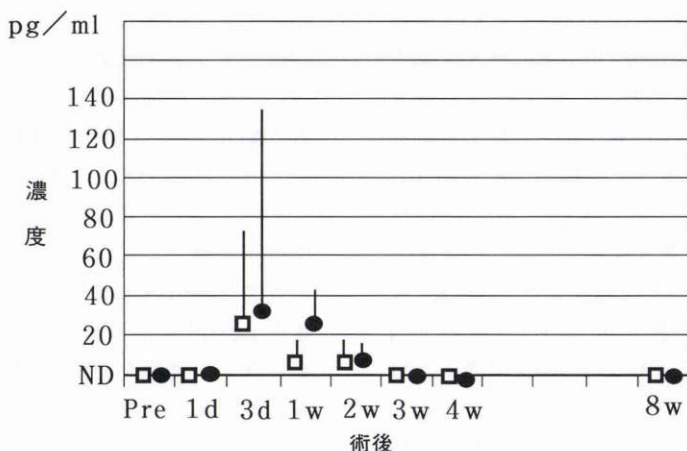


図4 Phaco 群, phaco+IOL 群の房水中 TGF α の経時的変化.

TGF α は術後3日目から最高で130 pg/ml 検出され, その後順次低下して術後3週目には再び検出限界以下となった. 未処置群, 前房穿刺群では TGF α は検出限界(10 pg/ml)以下であった. 黒丸: phaco+IOL 四角: phaco

は 250 ± 150 pg/ml, phaco+IOL 群は 300 ± 280 pg/ml と上昇し, 術後1週目には最高値の 390 ± 180 pg/ml, 450 ± 270 pg/ml に達し, 術後8週を経ても 130 ± 50 pg/ml, 180 ± 160 pg/ml 検出された. TGF α は術前日および術翌日には検出限界以下であったが, 術後3日目には phaco 群は 25 ± 50 pg/ml, phaco+IOL 群は 35 ± 100 pg/ml 検出され, その後順次低下して術後3週目で検出限界以下となった. 全期間を通じて phaco+IOL 群の方が phaco 群よりも bFGF, TGF α とともに高値を示す傾向にあったが, 統計学的有意差はなかった. また, 片眼に phaco+IOL, 3か月後にその片眼に phaco を行った3例についても bFGF, TGF α の経時的変化を両眼の間で比較したが, phaco 群と phaco+IOL 群の差異は明らかではなかった.

IV 考 按

水晶体上皮細胞の増殖促進作用を有する細胞成長因子は, EGF, bFGF, IGF, IL 1 α などが報告されている^{6)~14)}. また, EGF の作用する細胞に対しては, TGF α が EGF と同一のレセプターを介して作用し, より強い活性を有する¹⁵⁾ことが知られている. 水晶体上皮細胞に EGF レセプターが存在する⁶⁾ことを考えあわせると, TGF α は水晶体上皮細胞に対して増殖促進作用を有し, その作用は EGF より強く, より低濃度で後発白内障や術後の囊混濁・収縮を促進すると推測される. 術後どのような種類の細胞成長因子が房水中に産生され, 水晶体上皮細胞を増殖させているのかを解明するためには, EGF, bFGF, IGF, IL 1 α , TGF α をすべて測定する必要がある. しかしながら, 免疫学的手法で pg/ml レベルの微量定量を行う場合, 純度の高い抗体を入手する必要がある. また, 今回のように抗ヒト細胞成長因子抗体をウサギの細胞成長因子の定量に利用する場合, ヒトとウサギの間で高い免疫学的交差性を有する抗体が必要で

ある. 今回, それらの条件を満たす抗体のうち, 入手が可能であった抗 bFGF 抗体, 抗 TGF α 抗体を用いて微量定量を試みた. その結果, 従来のラジオイムノアッセイ法に比して十倍以上感度の高い定量が可能であった. 一方, EGF は種特異性が比較的高く, 異種間ではほとんど免疫学的交差性がないため, 抗ヒト EGF 抗体をウサギ EGF の微量定量に用いることはできない. 純度の高い抗ウサギ EGF 抗体の入手が今回は不可能であったため定量を行わなかった. bFGF は *in vitro* で水晶体上皮細胞の増殖を促進することが知られており^{8)~10)}, 水晶体線維細胞への分化にも関与しているのではないかと考えられている^{11)~13)}. 硝子体中の bFGF はラジオイムノアッセイ法で定量化されており, 増殖性糖尿病網膜症では $10 \sim 100$ ng/ml 検出されたと報告されている¹⁷⁾. 一方, ヒト房水中の bFGF については, 白内障術前の房水を検体とした western blot 法でその存在が示唆された¹⁸⁾. 我々の行ったラジオイムノアッセイ法による検討では, 緑内障や角膜穿孔性外傷, 心筋梗塞を合併した白内障眼や, 前老人性の前嚢下白内障例で, $0.4 \sim 1$ ng/ml の bFGF が房水中に検出された¹⁶⁾. しかし, 房水中の細胞成長因子の濃度は, 従来報告された硝子体内 bFGF 濃度より十倍以上低いようであり, 感度の低いラジオイムノアッセイ法は房水中細胞成長因子の定量には不適當であった. 一方, 細胞成長因子の至適濃度は数 ng/ml と一般に考えられているが, 数百 pg/ml あるいはそれ以下の濃度でも濃度依存性に生理活性を有する. そこで今回は, より感度の良好な ELISA 法で定量を試みた. その結果, 未処置群および他の3群の術前の房水では, bFGF は検出限界以下であった. したがって, 正常房水中には bFGF は存在するとしても非常に微量であると考えられた. また, 前房穿刺群では3例3検体で1週目に bFGF は検出されたが, すべて 50 pg/ml 以下であり, 前房穿刺による影響は存在するとしても軽微であると推測された. それに対し

て手術を行った2群では、水晶体摘出術後1週目で400~500 pg/ml, 最高1.4 ng/ml 検出され、術後8週を経ても100~200 pg/ml 検出された。以上から、正常房水にはbFGFは存在するとしても微量で、水晶体上皮細胞を増殖させる程度には存在せず、水晶体摘出術という人為的侵襲が加わると、bFGFの産生が亢進し房水中濃度が高まることが明らかとなった。今回の検討では術後数週の房水中bFGFは水晶体上皮細胞を増殖し得る濃度に達しており、術後早期の囊混濁や収縮を促進する一因子である可能性が考えられた。臨床的に術後早期における囊混濁や収縮は、術後約2か月で定常状態に達する。今回の結果では、術後8週を経過しても100~200 pg/mlのbFGFが検出されており、この濃度では水晶体上皮細胞に対する増殖作用が弱いこと、術後の水晶体上皮細胞の増殖を促進する因子は1つではなく、bFGF以外の因子の房水中濃度も経時的に低下して協同作用が減弱することなどが囊収縮・混濁の進行停止の理由と推測する。後発白内障が術後2~3年して著明になる症例が臨床的に見られることがあるが、それに際してbFGFが増殖促進因子になっているかどうかは今のところ不明である。今回、IOL移植群と非移植群のbFGF濃度に有意差はみられず、片眼にIOL移植を行い、その片眼にはphacoのみでIOLを移植しなかった3例についても両眼の間に明らかな差異を認めなかった。しかしながら、移植群の方が非移植群より常にbFGF濃度が高値を示したことから考えると、IOL挿入による影響はあるのではないかと推測する。水晶体摘出術自身の侵襲が大きく、それに比して異物であるIOLを移植することによる侵襲が小さいために、その影響がマスクされたのではないかと考える。また、手術を施行したこの2群についてはbFGF濃度の標準偏差が大きかったことも、有意差のなかった原因となっている。標準偏差を小さくする工夫が今後の課題として残される。bFGFの産生部位については今後検討していく必要があるが、水晶体上皮細胞や近傍の組織である毛様体からの産生が考えられ、硝子体腔から房水中に移行している可能性や、血行性に房水中に輸送される可能性も否定できない。おそらく複数の組織で産生されているのであろうが、その量的関係についても興味をもたれる。我々はin situ hybridization法を用いて水晶体上皮細胞によるbFGFの産生について検討し、産生の可能性があるという結果を得たが、詳細は別報に譲る。

TGF α については、房水中あるいは硝子体中の存在についても過去には検討されておらず、房水中にどの程度存在するのか全く不明であった。今回の実験では、正常房水および術翌日の房水中には検出限界以下であったが、術後3日目から若干増加し、最高で140 pg/ml 検出され、術後3週目には再び検出限界以下となった。増加の程度、期間ともに少なく、水晶体上皮細胞の増殖に関

与する因子の1つである可能性はあるが、大きな影響を及ぼしているとは考えにくかった。

以上から、術後早期に水晶体上皮細胞の増殖を促進する主要な因子の1つはbFGFであると考えられた。近年、bFGF-サポリンが1~10 nMの濃度ではbFGFのアンタゴニストとして働き、培養系ウシ水晶体上皮細胞の増殖を抑制させたとの報告がなされたが¹⁹⁾、今回の実験で水晶体摘出術後に房水中bFGFが約2か月に渡って数百pg/ml 検出されたことから、術後早期のbFGFブロッカーの使用が後発白内障や術後の囊収縮・混濁の抑制にin vivoにおいても有効である可能性が期待され、さらなる基礎的、臨床的研究が待たれる分野である。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲頂きました山本 節教授に深謝いたします。また、数々のご助言、ご協力を頂きました、田上勇作先生、片上千加子先生、平坂知彦先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 並木真理, 田上勇作, 森野以知朗, 嘉納雅文, 杉浦寅男: 眼内レンズ移植後の高度の前囊収縮・混濁についての毛様体鏡所見と前囊組織所見. 日眼会誌 97: 716-720, 1993.
- 2) 重光利朗, 馬嶋慶直, 石黒圭司, 湯 欣: ヒト眼内レンズ移植後の囊混濁および収縮についての組織学的検討. 臨眼 46: 502-503, 1992.
- 3) 石橋達朗, 荒木英生, 菅井 滋, 大西克尚, 猪俣 孟: 後房レンズ移植後にみられた水晶体前囊混濁の病理組織学的検討. 日眼会誌 97: 460-466, 1993.
- 4) Greenberg G, Hay ED: Cytodifferentiation and tissue phenotype change during transformation of embryonic lens epithelium to mesenchyme-like cells in vitro. Dev Biol 115: 363-379, 1988.
- 5) Laurent M, Kern P, Courtois Y, Regnault F: Synthesis of type I, III and IV collagen by bovine lens epithelial cells long-term culture. Exp Cell Res 134: 23-31, 1981.
- 6) Hollenberg MD: Receptors for insulin and epidermal growth factor: Relation to synthesis of DNA in cultured rabbit lens epithelium. Arch Biochem Biophys 171: 371-377, 1975.
- 7) Reddan JR, Wilson-Dziedzic D: Insulin growth factor and epidermal growth factor trigger mitosis in lenses cultured in a serum-free medium. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 409-416, 1983.
- 8) Gospodarowicz D, Mescher AL, Brown KD, Birdwell CR: The role of fibroblast growth factor and epidermal growth factor in the proliferative response of the corneal and lens epithelium. Exp Eye Res 25: 631, 1977.
- 9) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor: An angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. Cell Differentiation 19: 1-17, 1986.

- 10) **Arruti C, Cirillo A, Courtois Y**: An eye-derived growth factor regulates epithelial cell proliferation in the cultured lens. *Differentiation* 28: 286—290, 1985.
- 11) **Chamberlain CG, McAvoy JW**: Induction of lens fibre differentiation by acidic and basic fibroblast growth factor. *Growth Factors* 1: 125—135, 1989.
- 12) **Richardson NA, McAvoy JW**: Age-related changes in fiber differentiation of rat lens epithelial explants exposed to fibroblast growth factor. *Exp Eye Res* 50: 203—211, 1990.
- 13) **Lovicu FJ, McAvoy JW**: The age of rats affects the response of lens epithelial explants to fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2269—2278, 1992.
- 14) 西 佳代, 西 起史, 今西政二: 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. *日眼会誌* 97: 156—161, 1993.
- 15) 日本組織培養学会編: 細胞成長因子 part II. 東京, 朝倉書店, 65—69, 1987.
- 16) 並木真理, 田上勇作, 山本 節, 山中昭夫, 伊藤美樹, 嘉納雅文: ヒト房水中ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)・塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の存在. *日眼会誌* 96: 652—656, 1993.
- 17) **Baird A, Culler F, Jones KL, Guillemin R**: Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet* 7: 563, 1985.
- 18) **Tripathi RC, Millard CB, Tripathi BJ, Reddy V**: A molecular resembling fibroblast growth factor in aqueous humor. *Am J Ophthalmol* 106: 230—231, 1988.
- 19) **David T, Tassin J, Lappi DA, Baird A, Courtois Y**: Biphasic effect of the mitotoxin bFGF-saporin on bovine lens epithelial cell growth: Effect of cell density and extracellular matrix. *J Cell Physiol* 153: 483—490, 1992.