

氏名 (本籍) ふちがみ あき
淵上 あき (福岡県)

学位の種類 博士 (医学)

報告番号 甲第 1484 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)

学位論文題目

Sequential Analysis of Cytokines in Human Tears after Keratoplasty
(角膜移植術後症例の涙液中サイトカインの経時的解析)

論文審査委員 (主査)	福岡大学	教授	内尾 英一
(副査)	福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	教授	安波 洋一
	福岡大学	教授	藤田 昌樹

目的：角膜移植手術において拒絶反応は予後に影響する最も大きな因子の一つであるが、現在のところ拒絶反応の出現を予測することは困難である。角膜の免疫学的体系の研究が進められているが、拒絶反応におけるメカニズムはいまだに明らかにされていない。角膜に拒絶反応がおこったときの免疫細胞の活性の状態は、前房水のサイトカイン濃度を測定して調べる間接的な方法があるが、涙液中のサイトカイン濃度にも免疫細胞の活性状態が反映される。今回我々は、涙液中サイトカインの経時的変化を調べ、拒絶反応との関係を調査した。

対象と方法：福岡大学病院において、2011年8月から2012年9月までの期間に施行された角膜移植手術症例のうち、術後6か月間の経過観察が可能であった連続症例30人31眼とした。全層角膜移植手術（penetrating keratoplasty: 以下 PKP）25例、層状角膜移植手術（lamellar keratoplasty: 以下 LKP）6例および正常対象18例を対象とした。正常群は、感染症とアレルギーの既往のない健常者、ならびに白内障術前および硝子体術前の症例とした。症例群は33歳から85歳で、平均年齢は64.23±14.60（平均値±標準偏差）歳、男性17例女性14例であった。正常群は29歳から59歳で、平均年齢は39.4±10.3歳、男性8例女性10例であった。手術症例のまとめを表1に示した。

涙液採取および抽出方法は既報に従って行った。症例は、術前、術翌日、術後7日、術後1か月、術後3か月、術後6か月にシルマー法による濾過法で涙液を採取した。涙液抽出はシルマー紙に0.01Mリン酸緩衝液 pH7.2 (0.5mol NaCl, 0.5% Tween 20) 100μlを添加後4℃にて一晩振とうし、検体を作製した。サイトカインの測定はベクトン・デッキンソン(BD)社のBD™ Cytometric Beads Array システム(CBA)を用い、BD™ FACS Canto IIにて蛍光抗体法による多項目同時解析を行った。データ解析はBD社のFCAP Array 解析ソフトを使用した。解析対象は、7項目のサイトカイン IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17A とした。

統計学的検討は、Wilcoxon の順位和検定もしくは Mann-Whitney の U 検定にて比較し、危険率5%未満を統計学的に有意差ありとした。

本研究は、福岡大学病院臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

結果：正常群のサイトカイン濃度を図1に示した。正常群では、IL-2、IL-4、IL-10、TNFは5 pg/ml以下と低い値であった。この7つのサイトカインの中ではIL-6とIL-17Aが比較的高い値であり、それぞれ26 pg/ml, 21 pg/ml以上であった。

対象群のサイトカイン濃度の変化を図2に示した。PKPとLKPのすべての症例で拒絶反応の有無にかかわらず、術翌日のIL-6濃度が術前に比べ有意に上昇($p<0.01$, $p<0.01$)したが、他のサイトカインはIL-6のような術前後の有意な変化はなかった。IL-6は術後1か月で術前値まで低下したが、拒絶反応群では拒絶反応後に有意に再上昇していた($p<0.01$)。

拒絶反応はPKPの術後1か月で1例、3か月で2例、6か月で1例みられた。6か月間の拒絶反応の発症率はPKP 25例中4例16%であった。拒絶反応群と拒絶反応のなかった群での手術前のサイトカイン濃度の比較検討では、拒絶反応群はIL-2, IL-4, IL-10, TNF, IL-17Aが有意に高かった($p=0.0014$, 0.0014 , 0.0016 , 0.0011 , 0.0015)。特にIL-10は拒

絶反応のなかった群の 5 倍以上の濃度であった。一方で、拒絶反応群は拒絶反応のなかった群と比較して、術前の IL-6, IFN- γ の濃度が有意に低かった ($p=0.0016, 0.0016$)。拒絶反応群の術前値と正常群の比較では、拒絶反応群は IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A が有意に高く ($p=0.0023, 0.0025, 0.0025, 0.0015, 0.0025$)、IL-4, IFN- γ は有意に低かった ($p=0.0025, 0.0025$)。拒絶反応時の濃度を正常群と比較すると、IL-2, IL-6, TNF, IL-17A は有意に高く ($p=0.0023, 0.0025, 0.0016, 0.0025$)、IL-4, IL-10, IFN- γ は有意に低かった ($p=0.0025, 0.0025, 0.0025$)。

拒絶反応群の涙液中サイトカイン濃度の変化を図 3 に示した。拒絶反応時を 0 とし、拒絶反応がおこる 1 回前の採取点を -1、2 回前の採取点を -2 とした。左図は拒絶反応出現前の濃度変化である。右図は拒絶反応出現時の濃度変化である。IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A は拒絶反応が起こる前に有意に上昇し、拒絶反応が起きた時点で低下していた(各々、 $p=0.028$)。特に、IL-4 と IL-10 のサイトカイン濃度は拒絶反応がおこる前の濃度の 1/10 以下に著しく低下していた。IL-6 のみ拒絶反応の出現前も出現時も濃度が低下した。IL-6 は拒絶反応後に拒絶反応がない群と比較すると濃度が上昇していた ($p=0.0016$)。

結論：涙液中のサイトカイン濃度は個人差が大きく濃度だけでの評価は困難であったが、経時的に変化をみていくと類似した傾向が見られた。今回の検討で涙液中のサイトカイン濃度の解析が拒絶反応の予測に有用であると思われた。

今回の我々の結果をまとめると、術前に IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A が正常群より高い症例は拒絶反応をおこしやすく注意を要する。術後、IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A と多種のサイトカインが上昇した場合には、数週間以内に拒絶反応が起こることが予測された。診察を頻回に注意深く行い、ステロイドや免疫抑制剤の早期の投与を開始することができれば、拒絶反応が予防できるのではないかと考えられた。今後、さらなる症例の解析と免疫学的解明が必要である。

審査の結果の要旨

角膜移植手術において拒絶反応は予後に影響する最も大きな因子の一つであるが、現在のところ拒絶反応の出現を予測することは困難である。角膜の免疫学的体系の研究が進められているが、拒絶反応におけるメカニズムはいまだに明らかにされていない。角膜に拒絶反応がおこったときの免疫細胞の活性の状態は、前房水のサイトカイン濃度を測定して調べる間接的な方法があるが、涙液中のサイトカイン濃度にも免疫細胞の活性状態が反映される。今回の研究では、角膜移植が施行された 31 症例の涙液中サイトカインの経時的変化を調べ、拒絶反応との関係を調査した。

本研究の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、審査委員との主な質疑応答は以下の通りである。

1. 斬新さ

角膜移植と拒絶反応におけるサイトカインの報告は過去にもあるが、拒絶反応を予測する方法はいまだ解明されていない。前房水中のサイトカインや動物モデルでの組織片におけるサイトカインの報告はあるが、角膜移植と涙液中のサイトカインについての報告は少なく、今回のシルマー一方で涙液を採取した角膜移植前後の報告、IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A についての解析を行った報告は初めてである。

2. 重要性

角膜移植における 3 大合併症、拒絶反応・緑内障・感染症のうち、拒絶反応は予後に大きく関与するが、術後 1 割から 3 割の頻度で発症する。拒絶反応後不可逆的な変化が起きた場合には、再移植手術しか方法がない。拒絶反応を未然に防ぐことができれば将来有用である。本研究では、種々のサイトカインをモニタリングすることで、拒絶反応を予測することが可能であり、臨床応用として予防的にステロイドや免疫抑制剤の投与をすることで拒絶反応を防ぐことが可能ではないかと考えられた。

3. 研究方法の正確性

本研究ではアレルギー性結膜炎における涙液中サイトカインの測定方法を応用しており、確立された方法である。涙液の長さを各検体で測定しシルマー紙の余分な断端を切除後、すぐに-80度で凍結した。涙液を抽出するときに解凍し実験に使用しており、たんぱく質の変性はないと考えられる。シルマー紙の長さを計測することで涙液量の補正は正確に行えた。抗体や測定機械、解析ソフト等も実績のある薬品や機械を用いており、研究データは正確であると言える。

4. 表現の明確さ、及び結論

本論文は英語論文で、海外の学術誌に投稿中である。目的、方法、結果については、明確かつ詳

細に表現されている。また、結果の考察にあたっては、過去の文献を適宜引用し適切に行われている。

5. 主な質疑応答

Q: シルマーによる検査の精度は正確なのでしょうか。

A: 過去の報告で、特にアレルギー性結膜炎の分野ではシルマー法による検体の報告が多数見られます。日本大学の庄司先生の論文には、シルマー1mmあたり涙液が1 μ l抽出されるとの報告があります。既報の報告に基づいて行っており、精度は正確と考えます。

Q: 臨床応用への使用は可能でしょうか。

A: 今回の研究で、さまざまな種類のサイトカインが上昇した後に拒絶反応が起きていました。涙液中のサイトカインをモニタリングすることで、上昇の傾向が出た時点で、早めにステロイドの内服や免疫抑制剤の内服を予防的に開始すれば、拒絶反応を防げるのではないかと考えます。臨床応用が可能と考えます。

Q: 拒絶反応はどのように診断したのですか。

A: 細隙顕微鏡を用い、拒絶反応の出現時に特徴的な角膜内皮の白色の混濁 Khodadoust line の有無や浮腫、また臨床経過などから総合的に判断し診断しました。

Q: 涙液を用いる意味はあるのでしょうか。

A: 角膜移植後の反応は、直接前房水中のサイトカインに影響を与えることは知られているが、涙液中のサイトカインにも反映されると考え本研究を行いました。

Q: 再移植例の感作はないのでしょうか。

A: 今回の症例のうち、角膜移植の原因が拒絶反応後の再移植症例が1/3程度ありましたが、拒絶反応の出現群には再移植症例が1/4しかなく、拒絶反応がおこりにくいというわけではありませんでした。それぞれの移植された角膜に対して拒絶反応がおこっており、感作はないと考えます。

Q: 免疫抑制剤の治療の実際は。

A: 基本的には拒絶反応出現時にステロイドや免疫抑制剤の投与を開始しました。免疫抑制剤の副作用もあるので、全例投与するわけではありません。

Q: 拒絶反応時の治療開始のタイミングはいつですか。データへの影響はないのでしょうか。

A: 本研究では、拒絶反応の起きた4例全て、治療前のタイミングで涙液採取できました。全例、投薬開始前の数値になります。拒絶反応がおこった時点で、まず涙液を採取し、その後治療を開始しました。今回、偶然、3か月目、6か月目のタイミングでしたが、その間に拒絶反応が起きている症例があったら治療前のデータではなくなり、投薬の影響が考えられるので、より採取の間隔を短く設定していた方がよかったですと思いました。

Q: 患者さんは術後の不安を抱えていると思いますが、本研究のために涙液を採取され、さらに間隔もあいていることはどうなのでしょう。

A: 実際は外来受診中に涙液を集めているだけで、全例2週間から最低でも1か月に1回は診察をしていました。不調時はすぐに来院するように説明していますし、本研究のために来院

間隔をあけていたということはありません。

Q: グラフで、拒絶反応はどれに相当しますか。3つしかないけど。

A: 全て平均値でグラフを表記しているので、3か月の拒絶反応群のグラフは2症例の平均値になります。

Q: n = 4で言えるのか。

A: 涙液中のサイトカインは、個人差が非常に大きく解析時に苦労した点です。IL-6やIL-10を分母にした比の検討をしてみました。データ値に0が多く検討できませんでした。他にも、術前値を引く方法や、術前値との比で検討しましたが、有意差がでませんでした。ところが、拒絶反応時を0とし、その前を-1、-2として比較すると、拒絶反応前に有意に増減を認めており、4例でも有意差がでており意味のある結果だと考えています。

Q: 反対眼の涙液の動態はどうでしょうか。

A: 今回、実際には両眼とも採取して検討しています。非常に面白いことに、手術をしていない反対眼でも、手術眼と同様に涙液中のサイトカインが変動していました。眼科では交感性眼炎など、受傷眼の反対眼に炎症がおこることがあり、涙液中でも両眼同じような結果が出たことは面白い結果だと思います。

Q: 涙液中のサイトカインはどこから出ているのでしょうか。

A: 細胞性免疫、液性免疫どちらからも反応があり、胸腺や種々の細胞からの反応もあると思いますが、両眼のサイトカインが類似の傾向を示したことから、脳への信号が伝達した後にフィードバックされて両方の涙線から分泌されていると考えられます。

Q: 拒絶反応の機序は。

A: 現状では、詳細な機序はわかっておらず、解明がまたれるところです。

Q: サイトカインの動態は。

A: 現在、世界中で動物モデルを使って解明しているところです。明確なサイトカインの動態はわかっていません。

Q: 血中たんぱくの影響はないのか。

A: 今回の研究では、血中のたんぱく質の検査はしていません。今後検討します。ありがとうございました。

以上の内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑内容の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、本論文は学位に値すると評価された。