

氏名(本籍)	矢藤 繁 (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2647号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Effect of a topically applied neutralizing Antibody against vascular endothelial growth factor on corneal allograft rejection of rat (角膜移植後拒絶反応に対する血管内皮増殖因子中和抗体局所投与の効果に関する研究)
主査	筑波大学教授 医学博士 住田 孝之
副査	筑波大学教授 医学博士 木村 幸子
副査	筑波大学助教授 医学博士 中野 秀樹

論文の内容の要旨

(目的)

角膜移植後の拒絶反応では移植片への著明な新生血管の侵入と移植片の浮腫が認められる。一方、血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, 以下VEGF)は強力な血管新生促進作用と血管透過性亢進作用を持つ、本研究では、角膜移植後拒絶反応におけるVEGFの関与を明らかにすることを目的として、ラットの角膜移植拒絶反応モデルを用いてVEGF中和抗体点眼による拒絶反応抑制効果を検討した。

(対象と方法)

- 1) 8週齢Fisher雄ラットより径3mmの角膜片を採取し8週齢Lewis雄ラット左眼に移植した(Fisher雄ラットとLewis雄ラットでは組織適合抗原の相違があり、この組み合わせでの角膜移植ではほぼ全例に急性拒絶反応が起きることが知られている)。
- 2) 術後10日間、生理食塩水(A群)、ウサギIgG(2.0mg/ml:B群)あるいは抗ヒトVEGF121ウサギポリクローナル抗体(1.4mg/ml:C群)をそれぞれ左眼に10 μ lずつ1日5回点眼した(この抗VEGF抗体は東亜合成つくば研究所より供与されたものであり、ヒトとラットのVEGFの中和活性を有することが確認されている)。
- 3) 角膜移植片の観察は術直後から19日目まで実体顕微鏡下で行い、「透明度」・「血管新生範囲」・「新生血管径」・「浮腫」の4項目についてそれぞれ多段階評価を行った。
- 4) さらに、術後14日目にはグループ分けを知らされていない眼科専門医が、「移植片にしめる血管新生範囲の割合」・「新生血管径」・「浮腫」の3項目について評価をした。
- 5) 術後19日目でサクリファイス後眼球摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋後、PAS染色とVEGFの免疫組織染色を行った。免疫組織染色の一次抗体には抗VEGF121マウスモノクローナル抗体(東亜合成つくば研究所より供与)を使用した。
- 6) 統計学的手法として、眼科専門医の「移植片にしめる血管新生範囲の割合」の評価の解析には分散分析を用い、他の臨床的評価項目についてはMann-WhitneyU検定を用いた。P値が0.05より小さいものを有意差があるとした。また、透明度・血管新生範囲・新生血管径・浮腫の4項目の評価のうち、1項目でも最も拒絶反応が進行した段階(評価スコアが最大値)に達した時を移植片の死とし、「移植片の生存期間」をKaplan-Meier法で

比較した。

(結果)

- 1) 手術成功例 21 匹を無作為に 3 群に分け点眼開始したが、術後縫合離開例を除外し最終的に A 群 6 匹, B 群 7 匹, C 群 6 匹について評価した。
- 2) C 群では A・B 群に比べ, 4～12 日目の「透明度」・ 6～19 日目の「血管新生範囲」・ 6～19 日目の「新生血管径」・ 6～19 日目の「浮腫」において有意に抑制されていた。
- 3) 14 日目の眼科専門医による評価では, 「移植片にしめる血管新生範囲の割合」・「新生血管径」・「浮腫」の 3 項目とも C 群は A・B 群に比べ有意に抑制されていた。
- 4) 組織標本では C 群は A・B 群に比べ, 移植片での血管新生・炎症細胞浸潤・浮腫は少なかった。
- 5) VEGF の免疫組織染色では, C 群で移植片内の炎症細胞の一部と角膜上皮細胞に強陽性であった, A・B 群では減弱していた。
- 6) 移植片の生存期間は C 群は A・B 群に比べ有意に長かった。

(考察)

VEGF 中和抗体の局所投与により, 角膜移植後の拒絶反応で認められる申請血管の侵入と移植片の浮腫の改善を認めたことより, 角膜移植後拒絶反応に VEGF が関与していると考えられた。機序として移植片を異物として認識した免疫担当細胞が様々なサイトカインを分泌する中で VEGF も分泌し, 移植片への血管新生を誘導し炎症細胞の移植片への流入を容易にすること等により拒絶反応に促進的に働くのではないかと考えられた。実際, 本実験でも VEGF 中和抗体を投与した群では移植片への炎症細胞の浸潤も減少していた。

角膜移植後拒絶反応の治療・予防のために現在使用されている薬剤は, 主に免疫抑制剤や抗炎症剤であり, 血管新生の抑制をターゲットとした VEGF 中和抗体による治療は他の治療との併用による相加的または相乗的な治療効果が望めるのではないかと考えられた。また, 角膜移植では移植された角膜は生着するだけでなく, 透明度と形状を保つことが重要であり新生血管の侵入, 移植片の浮腫を抑制する VEGF 中和抗体はより有用ではないかと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は, 角膜移植後の拒絶反応において, 血管内皮増殖因子 (VEGF) が関与しているか否かを明らかにすることを目的として, ラットの角膜移植拒絶反応モデルを用いて抗 VEGF 抗体の移植片拒絶に対する効果を検討したものである。結果として, 抗体投与群では, 移植片における血管新生, 炎症細胞浸潤, 浮腫が有意に減少していることを示した。このことから, VEGF が角膜移植の拒絶反応に関わっていることが判明し, 抗体による中和作用により拒絶反応の治療効果が期待されることが考えられた。

本研究は, 角膜移植拒絶反応を血管新生という観点から検討した独創的な研究であり, 血管新生を誘導する VEGF を抑制することにより拒絶反応の新しい制御の可能性を示した点で高く評価される。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。