
原 著

極低出生体重児の血漿成長因子・サイトカイン濃度の検討

吉 野 秀 昭

新潟大学地域医療教育センター魚沼基幹病院

新潟大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野

(主任教授：福地健郎)

Simultaneous Analyses of Plasma Concentrations of 48 Growth Factors and Cytokines in very Low Birth Weight Infants

Hideaki YOSHINO

Department of Ophthalmology, Uonuma Institute of Community Medicine,

Niigata University Medical and Dental Hospital, Uonuma Kikan Hospital

Division of Ophthalmology and Visual Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Takeo FUKUCHI)

要 旨

【目的】極低出生体重児について、未熟児網膜症の発症の有無と網膜光凝固の要否で3群に分けて、血漿中の成長因子、サイトカイン濃度を測定した。

【方法】長岡赤十字病院新生児集中治療室に入室した18例を対象とした。児の健康状態が良好な場合に限り採血を行った。12症例から検体を得、48項目のmultiplex assayを行った。修正在胎週数33週から35週での検体について群ごとに濃度を比較した。

【結果】児の健康状態維持を最優先とするため採血を実施できた症例数および採血回数は少数に限られた。そのため統計解析は実施せず、各群間での傾向を把握することとした。採血時期が修正在胎週数33から35週の間の9症例で見ると肝成長因子 (Hepatocyte growth factor: HGF), interleukin-1 alpha; IL-1 α , stromal cell-derived factor 1-alpha; SDF-1 α , stem cell growth factor-beta; SCGF- β の4項目で光凝固群では値が小さい傾向があった。

【結論】血管成長因子とされるIL-1 α が未熟児網膜症に関しては抑制的に働く可能性、網膜保護作用を有する肝成長因子や網膜の発生に不可欠なSDF-1が不足することで未熟児網膜症が悪化する可能性が考えられるが、症例数の増加と経時的な検討を加える必要がある。

Reprint requests to: Hideaki YOSHINO
Department of Ophthalmology,
Uonuma Institute of Community Medicine,
Niigata University Medical and Dental Hospital,
Uonuma Kikan Hospital,
4132 Urasa, Minami-Uonuma,
Niigata 949-7302, Japan.

別刷請求先：〒949-7302 新潟県南魚沼市浦佐4132
新潟大学地域医療教育センター
魚沼基幹病院 眼科

吉 野 秀 昭

キーワード：極低出生体重児，未熟児網膜症，血管内皮成長因子，肝成長因子

緒 言

未熟児網膜症 (retinopathy of prematurity: ROP) は血管が未発達な周辺部網膜の虚血により血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) をはじめとする血管成長因子やサイトカインが産生された結果，病的新生血管が形成することで発症する¹⁾。網膜剥離を伴う重症 ROP では硝子体液中に VEGF が多く含まれることが報告されている²⁾。アンギオポエチン 1，アンギオポエチン 2 は血管新生に関わる成長因子であり，共通の Tie2 受容体に競合して作用する³⁾。アンギオポエチン 1 は血管壁の再構成・安定化に関与する⁴⁾。アンギオポエチン 2 は血管壁の不安定化に関与し，低酸素や VEGF の存在下で産生が亢進する⁵⁾。網膜剥離を伴う重症 ROP の硝子体液中にアンギオポエチン 1 と 2 が多く含まれることが報告されており⁶⁾，アンギオポエチン 1 と 2 は VEGF と同様に ROP の病態への関与が予想される。また肝成長因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) は高酸素網膜症モデルマウス⁷⁾の網膜に発現を認め⁸⁾，stage5 ROP の網膜下液に含まれている⁹⁾。ROP の病態には VEGF だけでなく，種々の血管成長因子，サイトカインの関与が予測される。

活動性が高く網膜剥離への進展が予想される ROP の治療には網膜光凝固が主に用いられる。網膜剥離を伴う症例には強膜バックリング手術や硝子体手術が用いられる。しかしながら網膜光凝固に抵抗する症例，網膜剥離を合併しながらも新生血管の活動性が高く硝子体手術施行がためられる症例が存在する。近年抗 VEGF 抗体を併用した網膜光凝固の成績¹⁰⁾や硝子体手術の報告がなされ¹¹⁾，抗 VEGF 抗体の硝子体注射に ROP の予後改善の期待が寄せられている。しかし抗 VEGF 抗体の硝子体注射に伴い血中の VEGF 濃度が減少することが明らかとなり¹²⁾，血中 VEGF 濃度の変化による全身への影響が懸念されるなか，抗 VEGF 抗体治療によって患児に運

動発達障害を生ずる可能性が指摘されている¹³⁾。一方で新生児の血中 VEGF や成長因子濃度を検討した既報は少ない^{14) 15)}。

現在，ROP の管理，特に重症化が予想される症例の治療時期決定は頻回の眼底検査に依存している。しかし成長の未熟な極低出生体重児にとっては眼底検査そのものが全身状態を悪化させうる負荷となっている。血中の血管成長因子の推移と ROP 重症化との関連が明らかとなればその濃度測定が眼底検査を補うものとして児の負担を軽減することが期待される。そのため，極低出生体重児の血漿中の VEGF をはじめとした血管成長因子を測定しその意義について検討した。

方 法

本研究はヘルシンキ宣言に則り，新潟大学医歯学総合病院 (No2015-2639) および長岡赤十字病院 (No2502) の倫理委員会の承認を得た後に，患児の父母に対し文書による同意を得た上で実施された。

対象：2017 年 1 月から 2 年間，長岡赤十字病院新生児集中治療室に入室した極低出生体重児 (18 例男児 12 例，女児 6 例)。除外対象は研究に供する採血が全身状態を悪化させる恐れのある症例，児の父母から同意を得られない症例とした。

採血：児の健康を最優先とするために採血は新生児科が行う全身状態把握のための採血に併せてのみ実施した。呼吸状態，栄養状態，貧血の程度から，新生児科が実施可能と判断したときのみ，研究に供する採血を実施した。200 μ L の全血を採取し，遠心分離して血漿を得た後 -80°C で凍結保存した。

測定：血漿中濃度は Bio-Plex Pro ヒトサイトカイン スクリーニング 48-Plex パネル (バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)) を用いて multiplex

表1 修正在胎週数 33 ~ 35 週の児の概要

自然寛解群は zone II stage 1 が 2 例, zone III stage 1 が 1 例
 光凝固群は zone II stage 2 が 2 例, zone II stage 3 が 1 例
 plus disease (+) となり治療適応となった。

| | no ROP (n=3) | remission (n=3) | PC (n=3) |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gestational age (weeks) | 29.8 (29-31.3) | 26.5 (25-27.7) | 25.2 (23.1-27.1) |
| Birth Weight (grams) | 1212 (852-1441) | 874 (692-1038) | 894 (702-1019) |
| PMA at Blood sampling (weeks) | 35.7 (35.6-35.9) | 34.0 (33.7-34.3) | 34.5 (34.3-34.6) |
| PMA at Onset of ROP (weeks) | — | 34.5 (34.3-35.0) | 31.9 (30.9-33.0) |
| PMA at photocoagulation (weeks) | — | — | 35.1 (32.9-36.9) |

PMA = post menstrual age
 ROP = retinopathy of prematurity.
 Numbers are expressed as the average (range).

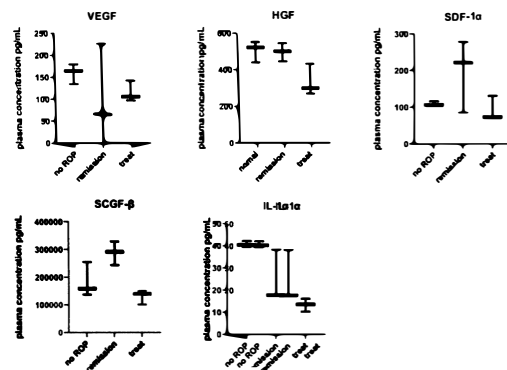


図1 修正在胎週数 33 週から 35 週の血漿中成長因子・サイトカイン濃度

no ROP: 未発症群 remission: 自然寛解群 treat: 光凝固群
 統計学的な差の検討に足る症例数は得られなかった。48 項目の内, HGF, IL-1α, SCGF-β, SDF-1α では光凝固群で他の群に対して濃度が小さい傾向があった。

assay を行った。同一ロットのスタンダード試料, 抗体ビーズを用いて検体ごとに 2 ウェルを用いて同時に測定した。

ROP の診断・治療: トロピカミド 0.5%, 塩酸フェニレフリン 0.5% 点眼液による散瞳後に 28D または 20D のレンズを用いた倒像鏡検査を行った。診断は国際分類¹⁶⁾ に準拠し, 光凝固の適応は ETROP study の基準¹⁷⁾ に則った。最も進行した病期を記載した。ROP を発症しなかった群 (未発症群; no ROP), 発症後に光凝固を要さず自然寛解した群 (自然寛解群; remission), 発症後網膜光凝固を行った後寛解した群 (光凝固群; treat) に分類した。

表2 各成長因子, サイトカインの血漿中濃度

各項目 () 内は測定下限値 各表の値は平均値である。

Plasma Concentrations of 48 Types of Growth factors and Cytokines

| | no ROP | remission | treat |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| HGF (7.09) | 505 (441-552) | 498 (445-546) | 334 (270-432) |
| IL-1α (6.65) | 40.7 (39.6-40.5) | 24.6 (17.8-38.2) | 13.3 (10.2-16.1) |
| LIF (2.05) | 15.7 (11.7-22.5) | 14.0 (9.74-20.6) | 2.2 (0-3.7) |
| CTACK (0.82) | 428 (382-478) | 810 (344-1095) | 201 (122-271) |
| Eotaxin (0.82) | 78.9 (58.0-113) | 86.5 (68.0-96.4) | 61.2 (53.0-70.1) |
| FGF basic (2.54) | 32.7 (28.4-37.7) | 31.4 (28.4-36.2) | 24.2 (23.1-25.8) |
| G-CSF (3.63) | 414 (255-610) | 363 (227-599) | 200 (189-213) |
| GM-CSF (0.19) | 3.97 (3.16-4.37) | 3.5 (1.47-3.50) | 3.01 (0.31-3.27) |
| GRO-α (13.45) | 295 (276-326) | 505 (298-643) | 255 (237-266) |
| IFN-α 2 (0.46) | 8.25 (6.45-11.4) | 7.74 (5.48-10.6) | 5.23 (4.72-5.48) |
| IFN-γ (1.05) | 30.2 (25.2-34.9) | 23.9 (14.6-35.6) | 20.9 (9.62-27.7) |
| IL-1β (0.24) | 4.59 (9.50-2.29) | 2.04 (1.68-2.55) | 1.43 (0.95-1.68) |
| IL-1Rα (3.16) | 820 (430-1327) | 501 (222-741) | 322 (206-446) |
| IL-2 (0.75) | 17.0 (9012-22.7) | 11.6 (5.98-21.3) | 5.78 (4.53-7.55) |
| IL-2Rα (1.65) | 289 (203-413) | 196 (111-336) | 250 (142-318) |
| IL-3 (0.13) | 0.63 (0.52-0.81) | 0.61 (0.43-0.81) | 0.43 (0.39-0.48) |
| IL-4 (0.09) | 2.46 (1.94-3.19) | 2.68 (2.28-3.02) | 1.75 (1.63-1.83) |
| IL-5 (0.86) | 54.9 (47.7-67.1) | 41.7 (23.4-67.1) | 34.1 (23.4-41.5) |
| IL-6 (0.34) | 9.24 (5.15-13.4) | 2.44 (0.70-3.31) | 3.42 (1.22-4.66) |
| IL-7 (1.22) | 33.4 (27.7-44.3) | 50.5 (35.0-62.2) | 40.8 (24.9-58.5) |
| IL-8 (0.36) | 281 (53.8-616.9) | 295 (20.5-839) | 18.3 (9.73-24.6) |
| IL-9 (1.08) | 79.1 (48.2-110) | 119 (103-131) | 73.3 (64.3-66.2) |
| IL-10 (0.69) | 15.2 (13.0-17.9) | 9.72 (6.42-14.3) | 9.91 (4.16-13.4) |
| IL-12 (p70) (6.39) | 8.42 (5.26-13.0) | 3.96 (2.43-6.32) | 3.79 (3.67-3.85) |
| IL-12 (p40) (0.78) | 11.2 (101-136) | 38.4 (0-115) | 43.1 (0-90.7) |
| IL-13 (0.22) | 2.01 (1.35-2.89) | 2.98 (2.51-3.21) | 1.87 (1.24-2.68) |
| IL-15 (12.82) | 266 (238-282) | 109 (0-279) | 149 (0-236) |
| IL-16 (0.25) | 164 (158-172) | 85.8 (39.8-156) | 98.5 (43.7-142) |
| IL-17 (1.16) | 26.8 (19.3-36.0) | 35.6 (26.6-40.7) | 25.3 (18.1-34.7) |
| IL-18 (0.31) | 35.9 (24.1-54.6) | 40.1 (34.2-48.5) | 43 (21.6-73.7) |
| IP-10 (1.43) | 132 (86.3-199) | 325 (89.9-534) | 129 (68.0-237) |
| MCP-1 (0.44) | 582 (431-867) | 386 (216-709) | 350 (100-627) |
| MCP-3 (0.24) | 1.01 (0.85-1.24) | 0.53 (0-0.99) | 0.39 (0-0.61) |
| M-CSF (0.27) | 76.4 (64.8-96.0) | 49.2 (24.1-92.8) | 61.8 (48.5-74.3) |
| MIF (2.45) | 7770 (6107-9944) | 3920 (1000-9492) | 4410 (784-7269) |
| MIG (1.39) | 230 (194-283) | 166 (103-271) | 143 (40.3-213) |
| MIP-1α (0.06) | 136 (22.5-265) | 74 (5.83-205) | 65.4 (23.6-13.6) |
| MIP-1β (1.41) | 317 (97.8-537) | 254 (132-483) | 84.2 (60.5-117) |
| β-NGF (0.23) | 2.19 (1.89-2.68) | 0.91 (0.43-1.79) | 1.51 (0.43-3.18) |
| PDGF-β (2.99) | 238 (145-354) | 1870 (265-3401) | 419 (119-951) |
| RANTES (3.98) | 7150 (2138-14300) | 12200 (10510-15040) | 5390 (4449-6327) |
| SCF (0.99) | 771 (757-786) | 633 (333-997) | 645 (251-1059) |
| SCGF-β (141.77) | 184000 (138000-255000) | 288000 (244000-329000) | 130000 (101000-150000) |
| SDF-1α (2.44) | 109 (105-116) | 195 (85.7-278) | 91.5 (70.1-131) |
| TNF-α (1.13) | 529 (116-772) | 289 (62-726) | 67.8 (39.1-115) |
| TNF-β (0.38) | 19.1 (16.9-20.8) | 5.51 (0-16.5) | 8.41 (0-13.9) |
| TRAIL (0.89) | 58.4 (51.4-67.6) | 69.4 (51.0-80.4) | 46.0 (39.1-57.9) |
| VEGF (1.16) | 159.6 (134-179) | 97.4 (0-226) | 114.9 (97-142) |

HGF = hepatocyte growth factor; IL = interleukin; LIF = leukemia inhibitory factor; CTACK = cutaneous T-cell attracting chemokine; FGF basic = fibroblast growth factor basic; G-CSF = granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF = granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GRO = growth related oncogene; IFN = interferon; IP-10 = interferon gamma-induced protein 10; MCP = monocyte chemoattractant protein; M-CSF = macrophage colony-stimulating factor; MIF = macrophage migration inhibitory factor; MIG = monokine induced by gamma interferon; MIP = macrophage inflammatory protein; NGF = neurotrophins like nerve growth factor; PDGF = platelet-derived growth factor; RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; SCF = stem cell factor; SCGF = stem cell growth factor; SDF = stromal cell-derived factor; TNF = tumor necrosis factor; TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand; VEGF = vascular endothelial growth factor.
 Levels are expressed as the average (range) pg/ml, with the minimum detectable level right side of each factor.

統計学的検討: 統計解析には GraphPad Prism (ver. 8.0.2 GraphPad Software 社) を用い, 血漿中濃度の各群間での差の有無を一元配置分散分析し, 群間で差があると言えた項目について Tukey's multiple comparisons test で多重比較を行うこととした ($p < 0.05$).

結 果

18 例が研究に参加し, 6 例は採血なく退院した。修正在胎週数 33 週から 35 週の間 9 症例 (男児 7 例, 女児 2 例) で検体を得た。9 症例の平均出生体重は 994g, 平均在胎週数は 27.2 週だった。3 例が発症せず (未発症群), 3 例が発症後自然寛

解し(自然寛解群), 3例が発症し網膜光凝固を要し, 治療後に寛解した(光凝固群). 自然寛解群の病期は zone II stage1 が2例, zone III stage1 が1例だった. 光凝固群の病期は zone II stage2 が2例, zone II stage3 が1例でいずれも plus disease に至り光凝固を行った. 光凝固後, ROP は寛解した. その他の3例はこの期間外に検体を得た. 未発症が2例で32週と37週での採血だった. 残る1例は発症後自然寛解し(zone II stage1) 30週で検体を得た. 各群とも得られた検体が少数であったため, 統計学的検討は行わず, 傾向を確認するため採血の時期が近い上記9例で各項目の濃度を群別に列挙することとした.

未発症群, 自然寛解群, 光凝固群でそれぞれ血漿中 VEGF 濃度は 159.6, 97.4, 114.9 pg/mL だった. 全48項目の中では HGF, interleukin-1 α ; IL-1 α , stromal cell-derived factor 1- α ; SDF-1 α , stem cell growth factor- β ; SCGF- β について, 光凝固群では各項目の濃度が小さい傾向があった. HGF の平均値は(未発症群: 自然寛解群: 光凝固群) = (505:498:334 pg/mL), IL-1 α は (40.7:24.6:13.3 pg/mL), SDF-1 α では (109:195:91.5 pg/mL), SCGF- β では (184,000:288,000:130,000pg/mL) だった.

考 察

ROP の重症化と血管成長因子の関係を検討するには眼局所の硝子体液を用いることが理想的と考えられ, その報告もなされている. ROP 眼の硝子体液中の VEGF 濃度は 360.8pg/ml, 先天白内障では 11.4pg/mL²⁾であり, 別の報告でも ROP 眼で 332pg/ml, 先天白内障眼で 37.9 pg/mL¹⁸⁾であり ROP 眼では硝子体液中の VEGF 濃度が高いことが明らかになっている. しかしながら硝子体液を得る機会は ROP が重症化し網膜剥離に至り, 児への負担の大きい硝子体手術が選択された時のみに限られる.

それに対して採血は全身状態把握のために日常

的に行われる手技であり, ROP 未発症の児や, 軽症の ROP 症例においても血液検体を得る機会は硝子体液に比べ多い.

血清中の VEGF 濃度の推移の報告として ROP に抗 VEGF 抗体硝子体注射を行った際のものがある. Sato らは stage 4,5 ROP を含む症例にベバシズマブの硝子体注射を行うと, 治療前の血清中の VEGF 濃度が 1628 \pm 929 pg/ml から, 注射2週間後で 269 \pm 157 pg/ml に減少することを示し¹²⁾, Wu らは stage 3 までの plus disease に至った ROP に同様の治療を行い, 注射前の血清 VEGF 濃度が 379 pg/ml から注射後減少し, 注射後から血清中にベバシズマブを検出し8週間にわたり続いたことを明らかにしている¹⁹⁾. このように抗 VEGF 抗体の硝子体注射により ROP の病勢が軽快するとともに血中に抗 VEGF 抗体が流出し, 血清 VEGF 濃度が低下することが明らかとなっている. また, 網膜光凝固とベバシズマブ硝子体注射とで ROP を治療した場合の血清中の VEGF 濃度の比較をすると, 注射後60日で両者とも血清 VEGF 濃度が低下することがわかっている²⁰⁾. これらのことから VEGF は ROP の病態に主要な役割を担っており, ROP の病勢の改善に伴い血中の VEGF 濃度が低下しうることがわかる.

ところで血清には血小板が含まれており, 血小板が凝集する際に VEGF を産生するため血清の VEGF 濃度は血漿のそれよりも高いことが知られている. 小児では血漿で 107.4 \pm 24.9pg/ml, 血清で 306.1 \pm 39.4pg/ml, 成人では血漿で 76.1 \pm 10.7pg/ml, 血清で 249.4 \pm 46.4pg/ml²¹⁾ という報告がある. 別の報告では健常成人において血漿で 38.2 \pm 7.7pg/ml, 血清で 230 \pm 63pg/ml²²⁾ である. そのため検体については血小板の影響を除けるという点で本報告でも用いた血漿が適正と考えられる.

合併する身体疾患によって血液中の VEGF 濃度に変化することはあり²³⁾ 血液検体のみから ROP の病態を検討するには限界がある. しかし全身状態把握のために日常的に行われる採血検査を基にすることで未発症例, 軽症例を含む多数

例での成長因子とROP重症化との関係を検討できる可能性がある。ひいては採血検査が、負担の大きい眼底検査に依存するROP管理の一助となることが期待できる。

しかし血中VEGF濃度とROPの病勢との関連の有無は報告により異なっている。低出生体重児の血漿中のVEGF濃度について平均在胎週数27.3週、平均出生体重962gの症例群で生後1週間以内での値は48.6pg/mlだったという報告がある²⁴⁾。Hellgrenらは低出生体重児の血清VEGF濃度の変化を本報告と同様にROP未発症群、自然寛解群、光凝固群で分け観察している¹⁵⁾。この報告では修正在胎週数34～36週において未発症群よりも光凝固群でVEGF濃度が高かった(未発症群：光凝固群=817～1076：1768～2139：pg/ml)。なおこれは光凝固群で治療を行った時期ではなく、ROPを発症した時期である。一方でPiehらはROP発症時期にあたる修正在胎週数34週を前後に未発症例と発症例の間の血漿中のVEGF濃度を比較したが差を認めなかった(32週未満では未発症：発症=658：904pg/ml, 36週以降では未発症：発症=437：344pg/ml)¹⁴⁾。HellgrenらはROPが発症後まもなく、重症化する前の期間で血清VEGF濃度の差を見出しており、一方でPiehらは発症前後の比較ではVEGFの濃度差を認めなかった。

対して本報告では光凝固前に近い時期の採血でSDF-1 α 、HGFなどの値が小さい傾向があり、VEGFにはそれを認めなかった。HellgrenらやPiehらの報告とあわせると、発症前後、光凝固前後といった一時点での比較では血中成長因子の濃度変化を捉えきれない可能性が考えられる。VEGFの経時的な変化を観察するにあたっては、ROPを発症した時期、増殖変化が強まった時期などがROP重症化と血中濃度の関係を検討するのに特に重要と考えられる。

本報告ではVEGF以外にSCGF- β 、IL-1 α 、SDF-1 α 、HGFの血漿中濃度が光凝固群で少ない傾向があった。

SCGF- β は骨髄や軟骨組織に豊富で赤血球、白血球の成長を促進するサイトカインの一つであ

り²⁵⁾、造血幹細胞移植後の造血機能回復の指標と考えられており²⁶⁾、これらのサイトカイン、成長因子の変化の理由をすべてROPの有無に求めるのは難しい。しかしながらIL-1 α は末梢血の単核球のVEGF mRNAの転写を誘導し、血管内皮細胞のVEGFR-2を介して血管新生亢進に寄与し²⁷⁾、血管内皮細胞に対してもVEGF mRNAの転写を誘導し、血管内皮細胞の遊走を刺激する^{28) 29)}。眼疾患とIL-1 α の関係を検討した報告では加齢黄斑変性症の血清中でIL-1 α が高値であり³⁰⁾、脈絡膜悪性黒色腫の硝子体液中でIL-1 α が高値であった³¹⁾が、ROPとの関係に言及したものは認めない。今回はIL-1 α が光凝固群で少ない傾向を認めており、ROPに関してはIL-1 α が血管成長に抑制的に働く可能性が考えられるため今後検討していく必要がある。

SDF-1は網膜血管の発生に不可欠であり³²⁾、血管内皮細胞に対してVEGF産生を誘導し、血管内皮細胞の遊走を直接誘導する³³⁾ケモカインである。虹彩新生血管を生じた網膜静脈閉塞症³⁴⁾や血管新生の旺盛なstage 4 ROPの硝子体液中に多く含まれる³⁵⁾。

HGFはその受容体であるc-Metのシグナル伝達を介して血管内皮細胞の運動能を亢進させ、管腔形成に関与するサイトカインである³⁶⁾。網膜色素上皮細胞に作用すると細胞間の結合が離開し、遊離する³⁷⁾。脈絡膜新生血管が生じる過程でVEGFに先行してHGFは発現する³⁸⁾。ROPモデルマウスにおいても網膜神経節細胞、内顆粒層でのHGFの転写が亢進し血管新生に寄与することがわかっている⁸⁾。またstage 5 ROPの硝子体液中に多く含まれ、増殖組織中でも発現を認め⁹⁾、HGFはROPをはじめとして、眼内の血管新生、増殖変化に大きな役割を果たしていることがうかがわれる。

一方で高眼圧による眼虚血症候群モデルマウスではヒトHGFの硝子体注射により網膜電図の振幅改善や網膜内層の萎縮を防ぐなどの網膜保護作用も報告され³⁹⁾、HGFは血管新生、増殖変化促進と対立して虚血網膜の保護作用も併せ持つと考えられる。

また増殖糖尿病網膜症の硝子体液中では VEGF, HGF とも高値だが、血清との濃度比をとると、HGF では対照としての網膜前膜においてより比率が高く、HGF が眼内での線維性増殖に関りが深いことが示唆されている⁴⁰⁾。

今回光凝固群で値が低い傾向を認めた成長因子の中で特に SDF-1 α や HGF は網膜疾患に関わる報告は多い。ROP との関連は未だ不明だが、極低出生体重児において SDF の低下が未発達な網膜の正常な成長を阻害する可能性や、HGF の低下が虚血網膜の細胞死をもたらす ROP 重症化につながるといった病態が考えられる。よってこれらの成長因子と ROP の発症および増悪との関係を解明する意義は大きい。しかしながら既報において VEGF の血中濃度が ROP の経過を通して常に高値でなかったことと同様に、種々の成長因子、サイトカイン濃度が時期によって変化する可能性はある。そのため今後、VEGF 単一ではなく SDF-1 α , HGF など複数の成長因子の濃度変化と ROP の病状の変化の両方を経時的に検討する必要がある。血中の成長因子の濃度変化と ROP の重症化との関係を見いだせば、血中濃度測定が眼底検査を補うもの、さらには重症化のマーカーとしての役割を果たすことが期待できるだろう。

結 論

極低出生体重児の血漿中の成長因子を測定した。症例数が限られたため統計学的な比較は困難だが、在胎週数 33 週から 35 週の症例では HGF と IL-1 α , SDF-1 α , SCGF- β の血漿中濃度が光凝固群で少ない傾向があった。IL-1 α は他の眼疾患において血管成長因子として知られるが ROP に関しては血管新生に抑制的な役割を果たす可能性を検討していく必要がある。HGF や SDF-1 α は血管新生を伴う眼疾患との関りが深く、HGF は虚血網膜の保護作用があり、SDF-1 α は網膜の発生に不可欠であることが知られている。これらの因子の不足が ROP の増悪に関与する可能性を考慮しなければならない。そのためには今後症例数

を増やし IL-1 α や HGF, SDF-1 α の血中濃度の経時的变化と光凝固の要否、重症化との関連の程度を検討し、ROP の管理の質を高めるとともに患児の加療の負担を軽減していきたい。

謝 辞

本研究は新潟大学医学部・大学院医歯学総合研究科血液・内分泌・代謝内科学分野 曾根博仁教授、牛木隆志医師、石黒創医師より検体の multiplex assay に関して助言を得た。

採血にあたり長岡赤十字病院新生児科 沼田修医師、小林玲医師、添野愛基医師、鈴木亮医師、桑原春洋医師の協力を得た。

長岡赤十字病院眼科 武田啓治医師、橋本薫医師、新潟大学医歯学総合研究科視覚病態学分野 吉田博光医師に研究に関わる診療に協力、助言を得た。

新潟大学医歯学総合研究科視覚病態学分野 福地健郎教授、長谷部日医師に研究に関わる助言、指導を得た。

文 献

- 1) Smith LE: Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP the Friedenwald lecture. Invest ophthalmol Vis Sci 49: 5177-5182, 2008.
- 2) Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T, Vitreous levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in eyes with retinopathy of prematurity. Ophthalmology 116: 1599-1603, 2009.
- 3) Koh GY, Kim I, Kwak HJ, Yun MJ, Leem JC, Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. Exp Mol Med 34: 1-11, 2002.
- 4) Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y, Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature 376: 70-74, 1995.
- 5) Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. Oncogene 18: 5356-5362, 1999.

- 6) Sato T, Shima C, Kusaka S, Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 151: 353-357, 2011.
- 7) Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R and D'Amore PA: Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 101-111, 1994.
- 8) Colombo ES, Menicucci G, McGuire PG and Das A: Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes retinal angiogenesis through increased urokinase expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1973-1800, 2007.
- 9) Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, McMeel JW, Kazlauskas A, Rahimi N, Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol* 156: 1337-1344, 2000.
- 10) Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ; BEAT-ROP Cooperative Group, Efficacy of Intravitreal Bevacizumab for Stage 3+ Retinopathy of Prematurity. *N engl j med* 364: 603-615, 2011.
- 11) Kusaka S, Shima C, Wada K, Arahori H, Shimojo H, Sato T, Fujikado T, Efficacy of intravitreal injection of bevacizumab for severe retinopathy of prematurity: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 92: 1450-1455, 2008.
- 12) Sato T, Wada K, Arahori H, Kuno N, Imoto K, Iwahashi-Shima C and Kusaka S: Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 153: 327-333, 2012.
- 13) Morin J, Luu TM, Superstein R, Ospina LH, Lefebvre F, Simard MN, Shah V, Shah PS, Kelly EN; Canadian Neonatal Network and the Canadian Neonatal Follow-Up Network Investigators. Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics* 137: e20153218, 2016.
- 14) Pieh C, Agostini H, Buschbeck C, Krüger M, Schulte-Mönting J, Zirrgiebel U, Dreys J, Lagrèze WA., VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Tie2 levels in plasma of premature infants: relationship to retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 92: 689-693, 2008.
- 15) Hellgren G, Löfqvist C, Hård AL, Hansen-Pupp I, Gram M, Ley D, Smith LE, Hellström A, Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in relation to retinopathy of prematurity. *Pediatric research* 79: 70-75, 2016.
- 16) The committee for the classification of retinopathy of prematurity. An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch ophthalmol* 102: 1130-1134, 1984.
- 17) Early Treatment For Retinopathy Of Prematurity Cooperative Group. Revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity: results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial. *Arch ophthalmol* 121: 1684-1694, 2003.
- 18) Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T, Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 116: 2165-2169, 2009.
- 19) Wu WC, Lien R, Liao PJ, Wang NK, Chen YP, Chao AN, Chen KJ, Chen TL, Hwang YS and Lai CC: Serum levels of vascular endothelial growth factor and related factors after intravitreal bevacizumab injection for retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol* 133: 391-397, 2015.
- 20) Kong L, Bhatt AR, Demny AB, Coats DK, Li A, Rahman EZ, Smith OE and Steinkuller PG: Pharmacokinetics of bevacizumab and its effects on serum VEGF and IGF-1 in infants with retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56: 956-961, 2015.
- 21) Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ and Brenchley PE: Vascular endothelial growth

- factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 94: 395-404, 1998.
- 22) Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM and Voelkel NF: In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275: H1054-1061, 1998.
- 23) Himeno W, Akagi T, Furui J, Maeno Y, Ishii M, Kosai K, Murohara T and Kato H: Increased angiogenic growth factor in cyanotic congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 24: 127-132, 2003.
- 24) Lassus P, Ristimäki A, Ylikorkala O, Viinikka L and Andersson S: Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1429-1433, 1999.
- 25) Hiraoka A, Yano Ki K, Kagami N, Takeshige K, Mio H, Anazawa H and Sugimoto S: Stem cell growth factor: in situ hybridization analysis on the gene expression, molecular characterization and in vitro proliferative activity of a recombinant preparation on primitive hematopoietic progenitor cells. *Hematol J* 2: 307-315, 2001.
- 26) Ito C, Sato H, Ando K, Watanabe S, Yoshida F, Kishi K, Furuya A, Shitara K, Sugimoto S, Kohno H, Hiraoka A and Hotta T: Serum stem cell growth factor for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32: 391-398, 2003.
- 27) Salven P, Hattori K, Heissig B and Rafii S: Interleukin-1 α promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J* 16: 1471-1473, 2002.
- 28) Ma J, Chen Q, Gu Y, Li Y, Fang W, Liu M, Chen X, Guo Q and Ma S: [Effect of colon cancer cell-derived IL-1 α on the migration and proliferation of vascular endothelial cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 37: 810-815, 2015.
- 29) Imaizumi T, Itaya H, Nasu S, Yoshida H, Matsubara Y, Fujimoto K, Matsumiya T, Kimura H and Satoh K: Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1 α --an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions. *Thromb Haemost* 83: 949-955, 2000.
- 30) Nassar K, Grisanti S, Elfar E, Lüke J, Lüke M and Grisanti S: Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253: 699-704, 2015.
- 31) Dunavoelgyi R, Funk M, Sacu S, Georgopoulos M, Zlabinger G, Zehetmayer M and Schmidt-Erfurth U: Intraocular activation of angiogenic and inflammatory pathways in uveal melanoma. *Retina* 32: 1373-1384, 2012.
- 32) Hasegawa T, McLeod DS, Prow T, Merges C, Grebe R and Lutty GA: Vascular precursors in developing human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2178-2192, 2008.
- 33) Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ and Oppenheim JJ: Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *Am J Pathol* 154: 1125-1135, 1999.
- 34) Ki-I Y, Arimura N, Noda Y, Yamakiri K, Doi N, Hashiguchi T, Maruyama I, Shimura M and Sakamoto T: Stromal-derived factor-1 and inflammatory cytokines in retinal vein occlusion. *Curr Eye Res* 32: 1065-1072, 2007.
- 35) Sonmez K, Drenser KA, Capone A Jr and Trese MT: Vitreous levels of stromal cell-derived factor 1 and vascular endothelial growth factor in patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 115: 1065-1070. e1, 2008.
- 36) Organ SL and Tsao MS: An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Nov; 3 (1 Suppl) : S7-S19, 2011.
- 37) Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ and Hinton

- DR: Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2782-2790.
- 38) Hu W, Criswell MH, Fong SL, Temm CJ, Rajashekhar G, Cornell TL and Clauss MA: Differences in the temporal expression of regulatory growth factors during choroidal neovascular development. *Exp Eye Res* 88: 79-91, 2009.
- 39) Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Arai J, Matsumoto K, Nakamura T and Yoshimura N: Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 528-536, 2002.
- 40) Simó R, Vidal MT, García-Arumí J, Carrasco E, García-Ramírez M, Segura RM and Hernández C: Intravitreal hepatocyte growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: A case control study. *Diabetes Res Clin Pract* 71: 36-44, 2006.

(令和元年 11 月 12 日受付)
