

# 培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞のプロスタグランジン D<sub>2</sub>の合成と代謝

城間 正, 山川 良治, 山城あけみ, 長瀧 重智

琉球大学医学部眼科学教室

## 要 約

培養ニワトリ胚網膜色素上皮におけるプロスタグランジン (prostaglandin, PG) D<sub>2</sub>の産生と代謝を検討した。産生については、培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞を 1-<sup>14</sup>C アラキドン酸でラベルし、培養液中のプロスタグランジン合成を薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) で検出し、産生量をラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) で測定した。代謝については、プロスタグランジンの代謝酵素である 15 位プロスタグランジン脱水素酵素活性を分光光度計で測定した。TLC で培養液中に PGD<sub>2</sub>が検出されたが、インドメタシン (10<sup>-5</sup>M) を培養液に添加すると検出されなかった。RIA では PGD<sub>2</sub>が定常状態で 198 ± 50 pg/6 × 10<sup>5</sup>/2 hours 検出されたが、この値は PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> よりも高

かった。また、ホモジナイズした培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞の 10,000 g 上清に、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 依存性 15 位プロスタグランジン脱水素酵素活性が示された。以上の結果から、培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞は PGD<sub>2</sub>を産生し、代謝していると考えられた。(日眼会誌 100: 501-506, 1996)

キーワード：培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞, プロスタグランジン D<sub>2</sub>, 薄層クロマトグラフィー, ラジオイムノアッセイ, 15 位プロスタグランジン脱水素酵素

## Production and Metabolism of Prostaglandin D<sub>2</sub> by Cultured Chick Retinal Pigment Epithelial Cells

Tadashi Shiroma, Ryoji Yamakawa, Akemi Yamashiro and Shigetoshi Nagataki

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

## Abstract

The production and metabolism of prostaglandin (PG) D<sub>2</sub> in cultured chick retinal pigment epithelial (RPE) cells were studied. The production of PGD<sub>2</sub> was evaluated using thin layer chromatography (TLC) after labeling the RPE cells with 1-<sup>14</sup>C arachidonic acid (AA) and radioimmunoassay (RIA). The metabolism was evaluated by measuring the activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. The conversion of AA to PGD<sub>2</sub> was detected by TLC, and this conversion was inhibited with indomethacin (10<sup>-5</sup>M). In a steady state, 198 ± 50 pg/6 × 10<sup>5</sup> cells/2 hours of PGD<sub>2</sub> was detected by RIA. The amount of PGD<sub>2</sub> was greater than that of both

PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity was detected in the 10,000 g supernatant of the RPE cells. These results demonstrated that cultured chick RPE cells produce and metabolize PGD<sub>2</sub>. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 501-506, 1996)

Key words: Cultured chick retinal pigment epithelial cells, Prostaglandin D<sub>2</sub>, Thin layer chromatography, Radioimmunoassay, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase

## I 緒 言

プロスタグランジン (prostaglandin, PG) は局所のホ

メオスタシスの維持に関わるオータコイドの一つで、眼におけるプロスタグランジンの役割については角膜<sup>1)~3)</sup>, 水晶体<sup>4)</sup>, 毛様体<sup>5)</sup>, 網膜<sup>6)~15)</sup>など、多くの組織で研

別刷請求先：903-01 沖縄県中頭郡西原町上原 207 琉球大学医学部眼科学教室 城間 正  
(平成7年10月11日受付, 平成8年2月22日改訂受理)

Reprint requests to: Tadashi Shiroma, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa-ken 903-01, Japan

(Received October 11, 1995 and accepted in revised form February 22, 1996)

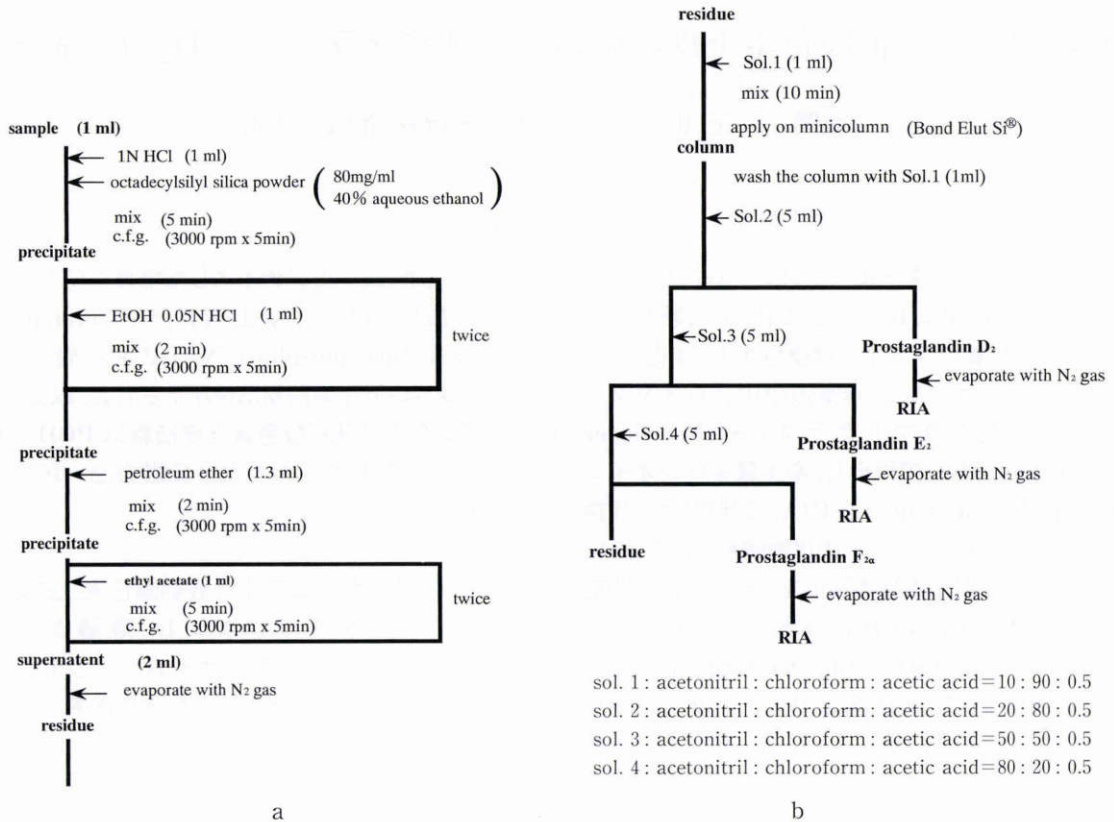


図 1 a, b.  
 a : プロスタグランジン(PG)抽出の概要, b : PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> の抽出方法.

究されている。網膜色素上皮細胞におけるプロスタグランジンに関しては、Yamakawa ら<sup>8)</sup>が培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞にグルタチオン依存性の極めて高い PGD<sub>2</sub>合成酵素活性が存在することを報告している。しかし、この PGD<sub>2</sub>合成酵素によるアラキドン酸から PGD<sub>2</sub>への変換については、彼らは確認できなかったと述べている。PGD<sub>2</sub>は神経細胞の調節因子として睡眠<sup>16)</sup>や体温調節<sup>17)</sup>に関与し、また細胞の増殖<sup>18)</sup>や分化<sup>19)</sup>にも関与している特異なプロスタグランジンであるが、網膜組織内で PGD<sub>2</sub>が果たしている役割についてはほとんどわかっていない。そこで、PGD<sub>2</sub>の網膜での役割を検討する第一歩として、本研究では培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞における PGD<sub>2</sub>の産生と代謝を研究した。

## II 実験方法

### 1. 実験材料

Eagle's minimum essential medium (MEM), ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は GIBCO 社 (New York, USA), 抗生剤 (penicillin, streptomycin) は BIO 社 (Walkersville, USA), octadecylsilyl silica (ODS), epidermal growth factor (EGF), A 23187, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) は和光純薬, インドメタシンは Sigma 社 (St. Louis, USA), [1-<sup>14</sup>C]アラキドン

酸, Hyperfilm betamax, Prostaglandin D<sub>2</sub> [<sup>3</sup>H] assay system, Prostaglandin PGD<sub>2</sub> [<sup>3</sup>H] assay system は Amersham 社, Prostaglandin E<sub>2</sub> [<sup>125</sup>I] RIA kit は NEN 社 (Boston, USA), 薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) プレートは MERCK 社 (Darmstadt, Germany), シリカミニカラム (BOND ELUT Si®) は Analitichem International 社 (Horbor, USA), 35 mm 培養皿は Corning 社 (New York, USA) 製のものを使用した。蛋白定量には Bio-Rad 社 (Hercules, USA) のキットを用いた。PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGB<sub>2</sub> は小野薬品から供与された。他の試薬は市販の和光純薬の特級指定のものを使用した。

### 2. 網膜色素上皮細胞の培養

胎生 7 日のニワトリ胚から摘出した眼球を使用した。林<sup>20)</sup>の方法を用いて実体顕微鏡下に網膜色素上皮を脈絡膜から剝離し、10% FBS と抗生剤を含む MEM の入った 35 mm 培養皿に入れ、37°C, 湿度 100%, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。実験にはすべて初代培養を用いた。

### 3. 薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) によるプロスタグランジンの検出

培養 3 週間で confluent (6 × 10<sup>5</sup>/35 mm dish) になった網膜色素上皮細胞を 1% FBS を含む MEM で 24 時間培養した。その後、4 μCi の [1-<sup>14</sup>C]アラキドン酸で細胞を 24 時間ラベルし、上清を取り除いてから 1% FBS を含



む MEM(対照群), および EGF (10 ng/ml), あるいは A 23187 (5  $\mu$ g/ml) を加えた培養液で 2 時間培養した。また, インドメタシンの作用を検討するために, 1% FBS を含む MEM にインドメタシン ( $10^{-5}$  M) を添加した条件下で細胞をラベルし, その後 2 時間培養した。各々の培養液 2 ml を HCl (1 N) で pH 3.0 に酸性化し, 酢酸エチル 6 ml と混合した後, 分取した酢酸エチル相を N<sub>2</sub> ガスで蒸発させ, 残留物を酢酸エチル 50  $\mu$ l に溶解した。この溶液を TLC プレートに塗布し, クロロホルム: メタノール: 水: 酢酸 (容積比 100:10:1:0.8) の混合溶媒を入れた展開層内で 50 分間展開した。対照として酢酸エチル 50  $\mu$ l に溶解した非標識 PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  を同時に展開し, ヨウ素蒸気で着色した。その後, TLC プレートを Hyperfilm betamax に 1 週間感光させ, Aloka 社の JTC-600 ラジオクロマナイザー (radiochromanalyzer) を用いて放射活性を測定した。

#### 4. ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) による PGD<sub>2</sub> の測定

Confluent (6  $\times$  10<sup>5</sup>/35 mm dish) になった網膜色素上皮細胞を 1% FBS を含む MEM で 48 時間培養し, その後, 培養液を捨て 1% FBS を含む MEM で 2 時間培養し, 培養液中のプロスタグランジンを RIA で測定した。また, 1% FBS を含む MEM にインドメタシン ( $10^{-5}$  M) を添加した培養液で, 同様に培養と測定を行い, インドメタシンの作用を検討した。培養液中のプロスタグランジンは川野ら<sup>21)</sup>の方法で抽出した。すなわち, 各々の培養液 (1 ml) を HCl (1 N) で pH 2~3 に酸性化してから octadecylsilyl silica (ODS) の 40% エタノール懸濁液 (ODS 担体濃度は 80 mg/ml) 1 ml と振盪攪拌し, ODS 担体にプロスタグランジンを吸着させた。プロスタグランジンを吸着した ODS 担体を 15% エタノール-0.05 N 塩酸溶液 1 ml で 2 回, 石油エーテル 1.3 ml で 1 回攪拌遠心し, 除蛋白と脱脂を行った。酢酸エチル 1 ml による ODS 担体からのプロスタグランジン溶出を 2 回繰り返した後, N<sub>2</sub> ガスで溶媒を蒸発させた (図 1 a)。残留物にアセトニトリル: クロロホルム: 酢酸の混合溶液 (容積比 10:90:0.5) 1 ml を加え振盪攪拌し, 溶液をシリカミニカラム (Bond Elut Si<sup>®</sup>) に添加してプロスタグランジンを吸着させた。その後, アセトニトリル: クロロホルム: 酢酸の混合比が 20:80:0.5 の溶媒で PGD<sub>2</sub>, 50:50:0.5 の溶媒で PGE<sub>2</sub>, 80:20:0.5 の溶媒で PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  をそれぞれ溶出した (図 1 b)。溶媒を N<sub>2</sub> ガスで蒸発させ, 残留物にラジオイムノアッセイキット添付のアッセイバッファー 500  $\mu$ l を加え振盪攪拌し, PGD<sub>2</sub> は Prostaglandin D<sub>2</sub> [<sup>3</sup>H] assay system, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  は Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  [<sup>3</sup>H] assay system, PGE<sub>2</sub> は Prostaglandin E<sub>2</sub> [<sup>125</sup>I] RIA kit を用いて定量した。使用した RIA kit の sensitivity は PGD<sub>2</sub> と PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  が 3~200 pg, PGE<sub>2</sub> は 0.3~25 pg であった。結果の検定は t-検定 (student t-

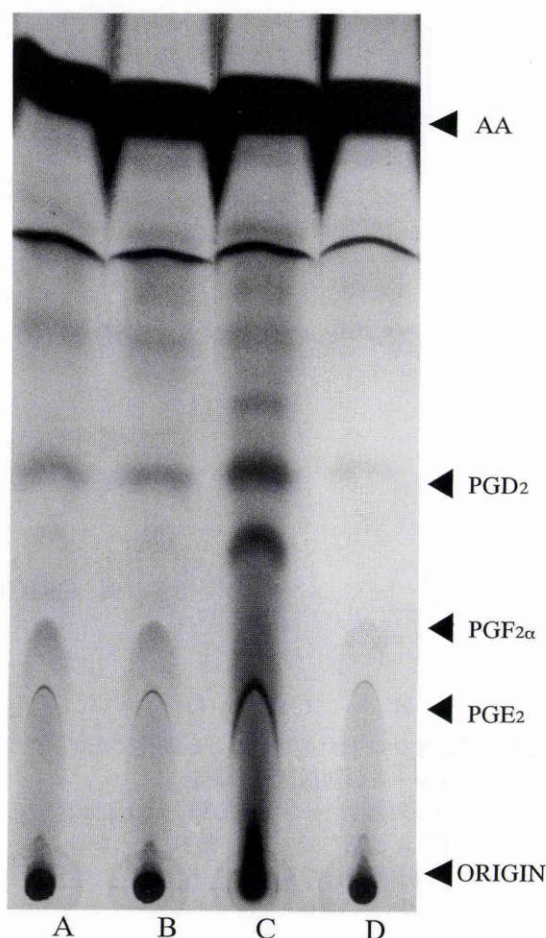


図2 オートラジオグラフィーによる薄層クロマトグラフィープレートの解析。

レーン A: 対照, レーン B: epidermal growth factor (EGF) 10 ng/ml 添加, レーン C: A 23187 5  $\mu$ g/ml 添加, レーン D: インドメタシン ( $10^{-5}$  M) 添加, AA: アラキドン酸

test) で行った。

#### 5. 15 位プロスタグランジン脱水素酵素活性の測定

Confluent になった網膜色素上皮細胞を phosphate buffer saline で洗浄後, 0.5 mM dithiothreitol を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて細胞を破壊し, さらに, ホモジナイズしてから遠心 (10,000 g, 20 分間) し, 上清を採取した。上清を各々 200, 400, 600, および 800  $\mu$ l を入れたセルに NAD または NADP を 2 mM, 0.5 M Glycin buffer (pH 9.5) を 400  $\mu$ l 加え, 液量が 2,000  $\mu$ l になるように水を加えた。この溶液を 2 つのセルに入れ, 24°C で定常状態になった時に一つのセルには対照としてエタノール 20  $\mu$ l, 他のセルにはエタノールに溶解した 20 mM の各種プロスタグランジンを 20  $\mu$ l 入れ, 24°C で反応させた。15 位プロスタグランジン脱水素酵素の活性は Tokumoto ら<sup>22)</sup>の方法により, 島津 UV 3000 分光光度計を用い, PGD<sub>2</sub> については 415 nm, PGB<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub> については NAD, NADP の吸光度である 340 nm を用いてスキャンした。モル吸光係数を PGD<sub>2</sub> は 45,600



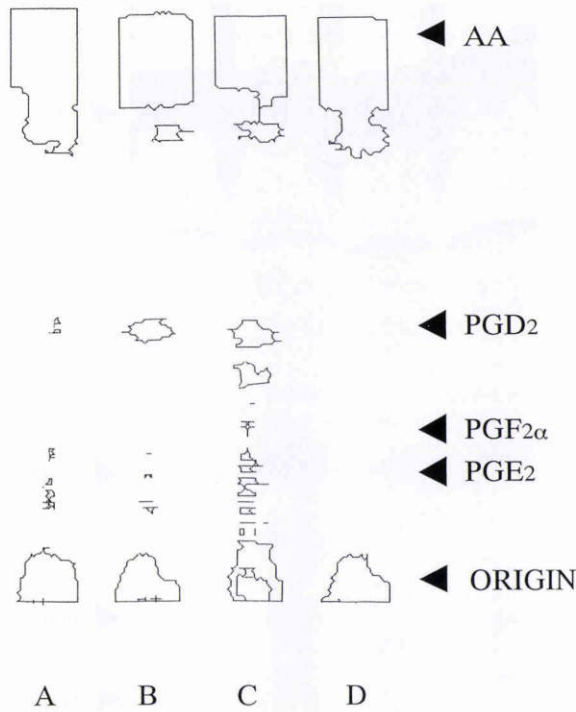


図3 ラジオクロマナイザーによる薄層クロマトグラフィープレートの放射活性の測定。

レーンA：対照，レーンB：EGF 10 ng/ml 添加，  
レーンC：A 23187 5 μg/ml 添加，レーンD：イン  
ドメタシン(10<sup>-5</sup>M)添加，AA：アラキドン酸

M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, PGB<sub>2</sub>は 9,200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, PGE<sub>2</sub>と PGF<sub>2</sub>αは 6,220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>として，酵素活性を計算した<sup>22)</sup>。蛋白定量は Bradford<sup>23)</sup>の方法でウシガンマグロブリンをスタンダードとして Bio-Rad 社のキットを用いて測定した。結果の検定は t-検定(student t-test)で行った。

### III 結 果

#### 1. TLC によるプロスタグランジンの検出

TLC プレートを Hyperfilm betamax に感光させると，対照，EGF (10 ng/ml) および A 23187 (5 μg/ml) を添加した培養液では非標識 PGD<sub>2</sub> と同位置に明らかなバンドを認めた。インドメタシン(10<sup>-5</sup>M)を添加した培養液でもバンドを認めたが，対照よりも薄かった(図2)。

ラジオクロマナイザーを用いて TLC プレートの放射活性を測定すると，対照，EGF (10 ng/ml) および A 23187 (5 μg/ml) を添加した培養液では非標識 PGD<sub>2</sub> と同位置に放射活性を検出したが，インドメタシン添加では検出しなかった(図3)。各レーンでの PGD<sub>2</sub> の位置の放射活性は，対照で 2.14% (2,166 cpm)，EGF 添加で 3.56% (3,498 cpm)，A 23187 添加で 2.55% (4,899 cpm)であった。PGE<sub>2</sub> の放射活性は対照および A 23187 添加で検出されず，EGF 添加で 0.2% (196 cpm)であった。PGF<sub>2</sub>α は対照および EGF 添加で検出されず，A 23187 添加で 0.55% (1,056 cpm)であった。

表1 定常状態における網膜色素上皮細胞のプロスタグランジン(PG)産生

	[平均値±標準偏差 (pg)] n=3		
	PGF <sub>2</sub> α	PGE <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub>
[インドメタシン非添加]	72±11	9.5±1	198±50*
[インドメタシン(10 <sup>-5</sup> M)添加]	68±4	8.7±3	104±6

\* : p<0.05

表2 培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞における15位プロスタグランジン脱水素酵素活性

基 質	酵素活性[平均値±標準偏差 pmol/mg/min]			
	PGD <sub>2</sub>	PGB <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	PGF <sub>2</sub> α
補 酵 素 NAD (n=3)	13.1±4.7	123.3±31.9	13.6±6.9	25.9±4.1
NADP (n=5)	30.3±6.2	392.5±28.7	25.6±4.8	49.5±7.9

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide

NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

#### 2. RIA によるプロスタグランジンの検出

培養液中に含まれる各種プロスタグランジンを RIA により定量したところ，PGD<sub>2</sub>は 198±50 pg と最も多く，PGE<sub>2</sub>が 9.5±1 pg，PGF<sub>2</sub>αは 72±11 pg であった。インドメタシン(10<sup>-5</sup>M)添加群での PGD<sub>2</sub>は 104±6 pg で，非添加群との間に有意差(p<0.05)があったが(表1)。PGE<sub>2</sub>は 8.7±3 pg，PGF<sub>2</sub>αは 68±4 pg で，非添加群との間に有意差はなかった。

#### 3. 15位プロスタグランジン脱水素酵素活性

PGD<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>αのいずれにおいても補酵素として NAD より NADP を加えた方が活性が高かった(p<0.01)。NADP を補酵素とし PGB<sub>2</sub>を基質とした条件で，最も高い活性が得られた(表2)。

### IV 考 按

Yamakawa ら<sup>8)</sup>はホモジナイズした培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞を用いて，アラキドン酸からプロスタグランジンへの変換を検討したが，TLC でプロスタグランジンに相当するバンドを検出できなかった。我々は，その理由をホモジナイズによりシクロオキシゲナーゼが失活したためと考えた。そこで，今回の実験では細胞が生きている状態での合成活性を検討するため，細胞を放射性アラキドン酸でラベルし，培養液中のプロスタグランジン合成を TLC で検出し，産生量を RIA で測定した。TLC で PGD<sub>2</sub>に相当するバンドが検出され，さらに，このバンドはインドメタシン処置によって抑制されることが明らかにされた。しかし，PGD<sub>2</sub>の放射活性は培養液中に放出された活性の 2.14% にすぎず，ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>刺激物質である A 23187 や，シクロオキシゲナーゼの



合成を誘導し、プロスタグランジン合成を高める<sup>24)</sup>とされる EGF を添加しても、活性の上昇は軽微であった。ウシ角膜では EGF を添加しない状態でもアラキドン酸から PGE<sub>2</sub> への変換が 13.7% と高い<sup>3)</sup>。また、amion cell では EGF を添加すると PGD<sub>2</sub> の放射活性は 2 倍から 5 倍増加する<sup>24)</sup>。これらの組織に比べると、網膜色素上皮細胞のシクロオキシゲナーゼ活性は低く、PGD<sub>2</sub> の合成能もきわめて低かった。また、PGE<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> に当たるバンドはわずかに認められるものの、放射活性はさらに低く、PGE<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> 合成についてはっきりした結果は得られなかった。ラジオイムノアッセイによる定量では PGD<sub>2</sub> が最も高い値を示し、PGF<sub>2α</sub>、PGE<sub>2</sub> と低い値を示した。PGF<sub>2α</sub> が PGE<sub>2</sub> に比べて高い値を示したのは、PGF<sub>2α</sub> が PGD<sub>2</sub><sup>25)</sup> および PGE<sub>2</sub><sup>26)</sup> の代謝過程において生成されることによる影響があるのかも知れない。いずれにしても、今回の結果は培養ニワトリ胚網膜色素上皮では定常状態で PGD<sub>2</sub> が最も多量に合成されていることを示している。

網膜におけるプロスタグランジン合成についてはウシ<sup>6)</sup>、ラット<sup>7)</sup>、ヒト<sup>11)</sup>、ネコ<sup>12)</sup>などでの報告があるが、感覚網膜での測定が多く、合成活性は全アラキドン酸の数%とされている。網膜色素上皮細胞におけるプロスタグランジン合成については、Ilan ら<sup>13)</sup>が  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone 刺激により網膜色素上皮細胞での PGE<sub>2</sub> と prostacyclin の合成が増加すると述べている。また、Kishi ら<sup>15)</sup>は我々と同様に培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞で合成される PGE<sub>2</sub> を測定し、24 時間培養後では PGE<sub>2</sub> 濃度が  $1,700 \pm 215 \text{ pg}/2 \times 10^5/\text{ml}$  と高値を示し、さらにインターロイキン-1 $\beta$ 、インターフェロン- $\beta$ 、腫瘍壊死因子  $\alpha$  により PGE<sub>2</sub> の合成が 4~5 倍に増加したと述べている。彼らは PGD<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> を同時に測定していないので、PGD<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> については今回の結果と比較できない。

今回、我々は培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞が PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> の中で PGD<sub>2</sub> を最も多く産生することを示したが、この結果はラットを用いた Goh ら<sup>27)</sup>の報告、すなわちラットの角膜・前部ぶどう膜では PGF<sub>2α</sub> に比べて PGE<sub>2</sub> の合成が高く、強膜・脈絡膜・網膜色素上皮では逆に PGF<sub>2α</sub> の合成が高いが、PGD<sub>2</sub> の合成能は眼球のいずれの部位においても圧倒的に高いという報告に一致していた。PGE<sub>2</sub> についての我々と岸らの結果との相違は、測定方法、培養液中の FBS 濃度(岸らは 10% FBS を培養液に添加している)、および培養時間の違いに起因すると思われる。

Goh ら<sup>27)</sup>は眼球組織に存在する PGD<sub>2</sub> 合成酵素は、グルタチオンの要求性、SH 剤の要求性、および基質の親和性から脳型の合成酵素に一致するとした。また、彼らは眼球組織での 15 位プロスタグランジン脱水素酵素活性を測定し、この酵素が肺に存在する NAD 依存性の type I

ではなく、PGB<sub>2</sub> を最もよい基質とする NADP 依存性の type II で、網膜・硝子体で最も活性が高いことを報告している。我々もニワトリ胚網膜色素上皮における脱水素酵素活性を測定したが、活性は NADP を補酵素とし PGB<sub>2</sub> を基質にした時が最も高かった。したがって、網膜色素上皮細胞の 15 位プロスタグランジン脱水素酵素は type II の NADP 依存性脱水素酵素と考えられる。

網膜にはプロスタグランジン受容体があり<sup>28)</sup>、また網膜での PGD<sub>2</sub> 産生が光刺激で増加する<sup>13)</sup>ことが報告されているが、プロスタグランジンが網膜や網膜色素上皮で果たしている役割についてはほとんどわかっていない。Cavallaro ら<sup>9)</sup>は PGE<sub>1</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> が暗順応状態での錐体と網膜色素上皮細胞の retinomotor movement を誘導し、内因性プロスタグランジンの産生を抑制すると retinomotor movement も抑制されるとし、Liversidge ら<sup>14)</sup>は網膜色素上皮細胞が PGE<sub>2</sub> を合成してリンパ球の働きを modulate することで血液網膜柵の役割を果たしていると述べている。また、Kishi ら<sup>15)</sup>はプロスタグランジンが網膜色素上皮細胞の増殖抑制因子である可能性を報告している。

今回の実験で網膜色素上皮細胞が PGD<sub>2</sub> を合成し、かつ代謝していることが明らかとなったが、PGD<sub>2</sub> は非酵素的に  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> に変換され、細胞の核内に取り込まれて細胞増殖を抑制したり<sup>18)29)</sup>、細胞の分化を制御している<sup>19)30)</sup>。したがって、合成された PGD<sub>2</sub> が網膜色素上皮細胞の増殖や分化、さらには感覚網膜や脈絡膜の増殖や分化にも関与していることが考えられ、今後は分子生物学的な手法<sup>31)</sup>を導入して網膜色素上皮細胞での PGD<sub>2</sub> の役割をさらに明らかにしたい。

#### 文 献

- 1) Gerritsen ME, Rimarachin J, Perry CA, Weinstein BI: Arachidonic acid metabolism by cultured bovine corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 698-705, 1989.
- 2) Jumblatt MM, Paterson CA: Prostaglandin E<sub>2</sub> on corneal endothelium cyclic adenosine monophosphate synthesis and cell shape are mediated by a receptor of the EP<sub>2</sub> subtype. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 360-365, 1991.
- 3) Jumblatt MM: Autocrine regulation of corneal endothelium by prostaglandin E<sub>2</sub>. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 698-705, 1994.
- 4) 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 E<sub>2</sub> の産生誘導. 日眼会誌 97: 156-161, 1993.
- 5) 松尾俊彦: 眼圧降下薬としてのプロスタグランジンの研究の現況. 日眼会誌 97: 289-295, 1993.
- 6) Birkle DL, Bazan NG: Lipoxygenase- and cyclooxygenase-reaction products and incorporation into glycerolipids of radiolabeled arachidonic acid in the bovine retina. Prostaglandins 27: 203-216, 1984.



- 7) **Birkle DL, Bazan NG**: Effects of  $K^+$  depolarization on the synthesis of prostaglandins and hydroxyeicosatetra (5, 8, 11, 14) enoic acids (HETE) in the rat retina. Evidence from esterification of 12-HETE in lipids. *Biochim Biophys Acta* 795: 564—573, 1984.
- 8) **Yamakawa R, Ogino N**: Chick retinal pigment epithelium exhibits glutathione requiring prostaglandin  $D_2$  synthetase activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1058—1062, 1986.
- 9) **Cavallaro B, Burnside B**: Prostaglandins  $E_1$ ,  $E_2$ , and  $D_2$  induce dark-adaptive retinomotor movements in teleost retinal cones and RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 882—891, 1988.
- 10) **Birkle DL, Bazan NG**: Light exposure stimulates arachidonic acid metabolism in intact rat retina and isolated rod outer segments. *Neurochem Res* 14: 185—190, 1989.
- 11) **Kulkarni PS**: Arachidonic acid metabolism in human and bovine retina. *J Ocul Pharmacol* 7: 135—139, 1991.
- 12) **Setty BN, Phelps DL, Walenga RW, Stuart MJ**: Identification of prostaglandins and hydroxyeicosatetraenoic acids in kitten retina: Comparison with other species. *Exp Eye Res* 53: 81—88, 1991.
- 13) **Ilan AB, Savion N, Naveh N**: Alpha melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) enhances eicosanoid production by bovine retinal pigment epithelium. *Prostaglandins* 43: 31—44, 1992.
- 14) **Liversidge J, McKay D, Mullen G, Forrester JV**: Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retinal barrier by autocrine  $PGE_2$  and membrane-bound mechanisms. *Cell Immunol* 149: 315—330, 1993.
- 15) **Kishi H, Mishima HK, Yamashita U**: Effect of cytokines and prostaglandins on the growth of chick retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 13: 833—837, 1994.
- 16) **Inoue S, Honda K, Komoda Y, Uchizono K, Ueno R**: Differential sleep-promoting effect of five sleep substances nocturnally infused in unrestrained rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6240—6244, 1984.
- 17) **Ueno R, Narumiya S, Ogorochi T, Nakayama T, Ishikawa Y, Hayaishi O**: Role of prostaglandin  $D_2$  in hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6093—6097, 1982.
- 18) **福島雅典**: プロスタグランジンと細胞増殖. 蛋核酵 36: 398—406, 1991.
- 19) **腰原康子**: プロスタグランジンと細胞分化. 蛋核酵 37: 937—947, 1992.
- 20) **林 倫子**: 網膜色素上皮細胞の組織培養に関する研究—正常ニワトリ胚網膜色素上皮の培養細胞について. 日眼会誌 81: 692—700, 1977.
- 21) **川野克己, 杉田増夫, 岡 昌則, 田端 昇**: Thromboxane  $B_2$ , 6-keto-prostaglandin  $F_{1\alpha}$  及び prostaglandin  $E_2$  の同時抽出法に関する検討. 炎症 7: 511—515, 1987.
- 22) **Tokumoto H, Watanabe K, Fukushima D, Shimizu T, Hayaishi O**: An NADP-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase specific for prostaglandin  $D_2$  from swine brain. *J Biol Chem* 25: 13567—13580, 1982.
- 23) **Bradford M**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248—254, 1976.
- 24) **Casey ML, Korte K, MacDonald PC**: Epidermal growth factor stimulation of prostaglandin  $E_2$  biosynthesis in amnion cells. *J Biochem* 16: 7846—7854, 1988.
- 25) **Watanabe K, Yoshida R, Shimizu T, Hayaishi O**: Enzymatic formation of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  from prostaglandin  $H_2$  and prostaglandin  $D_2$ . *J Biol Chem* 260: 7035—7041, 1985.
- 26) **Lin YM, Jarabak J**: Isolation of two proteins with 9-ketoprostaglandin reductase and NADP-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activities and studies on their inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 81: 1227—1234, 1978.
- 27) **Goh Y, Urade Y, Fujimoto N, Hayaishi O**: Content and formation of prostaglandins and distribution of prostaglandin-related enzyme activities in the rat ocular system. *Biochim Biophys Acta* 921: 302—311, 1987.
- 28) **Matsuo T, Cynade MS**: The  $EP_2$  receptor is the predominant prostanoid receptor in the human ciliary muscle. *Br J Ophthalmol* 77: 110—114, 1993.
- 29) **Narumiya S, Fukushima M**:  $\Delta^{12}$ -prostaglandin  $J_2$ , an ultimate metabolite of prostaglandin  $D_2$  exerting cell growth inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 739—745, 1985.
- 30) **Koshihara Y, Kawamura M**: Prostaglandin  $D_2$  stimulates calcification of human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 1206—1212, 1989.
- 31) **平田雅一, 牛首文隆, 成宮 周**: 循環器系のプロスタノイド受容体の構造と働き. 日本臨床 51: 178—182, 1993.