

エンドセリン-1 硝子体投与による前房内炎症と ET_A受容体拮抗薬による抑制効果

庄司 信行¹⁾, 大鹿 哲郎²⁾, 増田寛次郎³⁾

¹⁾武蔵野赤十字病院眼科, ²⁾東京大学医学部附属病院分院眼科, ³⁾東京大学医学部眼科学教室

要 約

エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1) (10^{-4} , 10^{-5} M) 投与後の前眼部の炎症反応を司る受容体を明らかにするために, ET-1 硝子体投与後の房水蛋白濃度の上昇に対する ET_A受容体拮抗薬(97-139)前処置の影響を有色家兎眼で観察した。また, 10^{-4} M ET-1 溶液投与後 2, 4, 24, 48 時間の房水プロスタグランジン(PG)E₂濃度とロイコトリエン(LT)B₄濃度を測定し, 97-139 溶液(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} M)前処置群と比較した。その結果, 10^{-4} M ET-1 投与群は 10^{-1} M 97-139 溶液の前処置により, 10^{-5} M ET-1 投与群は 10^{-2} M 97-139 溶液の前処置により, 房水蛋白濃度の上昇は完全に抑制された。また, ET-1 投与群では房水蛋白濃度の上昇とともに PGE₂濃度の上昇がみ

られ, 97-139 溶液の前処置によって房水蛋白濃度の上昇が抑制された群では, PGE₂濃度の上昇も抑制された。LTB₄濃度はいずれの群でも変化はみられなかった。以上の結果から, ET-1 は ET_A受容体を介してアラキドン酸カスケードに作用し, PGE₂産生を亢進させることによって, 前眼部炎症に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 101: 305-311, 1997)

キーワード: エンドセリン-1, 房水蛋白濃度, ET_A受容体拮抗薬, プロスタグランジン E₂濃度, ロイコトリエン B₄濃度

Anterior Chamber Inflammation after the Injection of Endothelin-1 into the Vitreous and the Effect of ET_A Receptor Antagonist

Nobuyuki Shoji¹⁾, Tetsuro Oshika²⁾ and Kanjiro Masuda³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Musashino Red Cross Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo Branch Hospital

³⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

Abstract

To assess the receptors which mediate the inflammatory reaction induced by endothelin-1 (ET-1), we investigated the influence of pre-treatment with an ET_A receptor antagonist (97-139) on the increase of aqueous protein concentration (APC) after the injection of ET-1 (10^{-4} , 10^{-5} M) into the vitreous cavity of pigmented rabbits. The concentration of prostaglandin E₂ (PGE₂) and leukotriene B₄ (LTB₄) in the aqueous humor after the injection of 10^{-4} M ET-1 with or without pre-treatment with 97-139 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} M) was also studied. Pre-treatment with 10^{-2} M and 10^{-1} M 97-139 completely prevented the APC increase induced by 10^{-5} M and 10^{-4} M ET-1, respectively. Increases in aqueous PGE₂

concentration were observed after the injection of ET-1, which was inhibited by pre-treatment with 97-139. Aqueous LTB₄ concentration was not changed significantly by ET-1. These results indicate that the effects of ET-1 on APC are at least partially mediated by the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid cascade, and that ET_A receptors play an important role in these reactions. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 305-311, 1997)

Key words: Endothelin-1, Aqueous protein concentration, ET_A receptor antagonist, PGE₂ concentration, LTB₄ concentration

別刷請求先: 180 東京都武蔵野市境南町1-26-1 武蔵野赤十字病院眼科 庄司 信行
(平成8年6月4日受付, 平成8年11月28日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuyuki Shoji, M.D. Department of Ophthalmology, Musashino Red Cross Hospital, 1-26-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180, Japan

(Received June 4, 1996 and accepted in revised form November 28, 1996)

I 緒 言

エンドセリン(endothelin, ET)¹⁾の受容体は,これまで ET-1 と ET-2 に親和性の高い ET_A受容体と, ET のサブタイプに非特異的な ET_B受容体, ET-3 に特異的な ET_C受容体の 3 種類の受容体の存在が証明されている^{2)~9)}. そのうち ET_A受容体は, 眼球内組織では虹彩・毛様体・網脈絡膜に存在するといわれ^{10)~12)}, ET-1 の投与による房水中プロスタグランジン(prostaglandin, PG)E₂濃度の上昇は ET_A受容体を介した反応と考えられている¹³⁾¹⁴⁾. また, これまでに我々は, エンドトキシンによる眼内炎惹起家兎眼において, 房水 ET-1 濃度が有意に上昇すること¹⁵⁾, 外因性 ET-1 の眼内投与により房水蛋白濃度が上昇すること, この反応がアラキドン酸カスケードを介したものである可能性が高いことを報告¹⁶⁾し, ET-1 と前眼部炎症の関連について報告してきた. したがって, これらの報告から, ET_A受容体拮抗薬の前処置を行った場合, PGE₂産生の抑制とともに ET-1 投与後の房水蛋白濃度上昇は抑制される可能性が考えられる. これまで, ET-1 投与後の房水中 PGE₂濃度上昇に対する ET_A受容体拮抗薬前処置の影響は, ET-1 硝子体投与後の眼圧変化を検討した杉山ら¹³⁾によって報告されているが, 房水蛋白濃度の上昇を確認した上での房水中 PGE₂濃度の測定はされていない. また, ET-1 投与の一定時間後の房水蛋白濃度, 房水中 PGE₂濃度と ET_A受容体の検討も報告¹⁷⁾されているが, この報告において用いられた 10⁻⁵M の濃度の ET-1 の場合, 我々の結果¹⁶⁾では, 1 回の ET-1 溶液の投与量が 10 μl と半量ではあるものの, ET-1 投与 1 時間後, 24 時間後では房水蛋白濃度はほぼ正常であり, 房水蛋白濃度と PGE₂濃度の関連を検討するためには, 他の測定時間や ET-1 濃度の検討が必要と考えられる. また, ET-1 はフォスホリパーゼ A₂の活性を高めることにより, アラキドン酸の放出を促進するといわれており¹⁸⁾, シクロオキシゲナーゼ系だけでなく, リポキシゲナーゼ系にも ET-1 は関与する可能性が考えられる. しかし, これまでロイコトリエン(leukotrien, LT)B₄濃度に関する検討はみられない.

今回我々は, ET-1 硝子体投与後の房水蛋白濃度の経時的変化に対する ET_A受容体拮抗薬の影響をレーザーフレアセルメーターを用いて検討した. さらに, ET-1 投与後あるいは ET_A受容体拮抗薬による前処置後の房水中 PGE₂濃度と LTB₄濃度を測定し, ET-1 とアラキドン酸カスケードの関連を検討した.

II 実験方法

1. 実験動物

実験には, 体重 1.5~2.5 kg の有色家兎を雌雄の別なく使用した. 麻酔は, 0.4% 塩酸オキシブプロカイン(ベノキシール®, 参天製薬)点眼麻酔のみとした.

2. 使用薬物と投与方法

選択的 ET_A受容体拮抗薬として, Mihara ら¹⁹⁾によって報告された非ペプチド系 97-139(塩野義製薬研究所)を用いた. ET-1(Human)(ペプチド研究所)および 97-139 溶液の希釈には眼内灌流液(オペガード® MA, 千寿製薬)を用い, 前者は 10⁻⁴, 10⁻⁵M の 2 種類に, 後者は 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵M の 5 種類になるように調整した. また, 対照液として, ET-1 を含まない眼内灌流液のみを用いた. 各溶液の投与量はいずれも 10 μl ずつとした. 各溶液は, 角膜輪部から約 2 mm 離れた部位からマイクロシリッジに接続した 30 G 針を用いて眼球中心に向けて刺入し, 硝子体中央部に針が入っていることを確認して硝子体内に投与した. なお, 針の刺入部から注入液の漏出がみられた場合は, 対象から除外した.

3. 実験方法

1) 実験 1: 97-139 溶液の前処置と ET-1 硝子体投与による房水蛋白濃度の経時的変化

まず, 対照液を両眼の硝子体に投与し, その 1 時間後右眼に 10⁻⁴M, 左眼に 10⁻⁵M の ET-1 溶液を投与した場合の房水蛋白濃度の測定を行った(各 n=6). 次に, 97-139 溶液硝子体投与による前処置の 1 時間後, ET-1 溶液あるいは対照液を投与した場合の房水蛋白濃度測定を行った. 投与した 97-139 溶液の濃度は, 10⁻⁴M ET-1 投与群の場合は 10⁻¹~10⁻⁴M の 4 濃度, 10⁻⁵M ET-1 投与群の場合は 10⁻²~10⁻⁵M の各 4 濃度とした(各 n=6). 房水蛋白濃度の測定にはレーザーフレアセルメーター(FC-1000, 興和)を用い, フォトンカウント値をアルブミン値に換算した²⁰⁾. 測定時間は, ET-1 投与前, ET-1 投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 168 時間とした.

2) 実験 2: PGE₂濃度と LTB₄濃度の測定

ET-1 溶液あるいは対照液投与の一定時間後に前房穿刺を行い, 150~200 μl の房水を採取し, PGE₂濃度²¹⁾²²⁾と LTB₄濃度²³⁾を radioimmunoassay 法により測定した. 前房穿刺の影響を避けるため, 房水採取は 1 眼 1 回のみとし, 投与した溶液と房水採取時間によって, 以下の群に分類した. すなわち, 10⁻⁴M ET-1 溶液単独投与(2, 4, 24, 48 時間群), 10⁻⁵M ET-1 溶液単独投与(2, 4, 24 時間群), 対照液単独投与(4, 24 時間群), 10⁻¹M 97-139 溶液前処置+10⁻⁴M ET-1 溶液投与(4, 24, 48 時間群), 10⁻²M 97-139 溶液前処置+10⁻⁴M ET-1 溶液投与(4, 24, 48 時間群), 10⁻³M 97-139 溶液前処置+10⁻⁴M ET-1 溶液投与(4, 24, 48 時間群), 10⁻¹M 97-139 溶液+対照液投与(4, 24 時間群), および無投与群である(各 n=6). 97-139 溶液の前処置の方法は実験 1 と同様である. なお, 投与した各溶液の濃度, 種類あるいは房水の採取時間は両眼で等しくした. また, 房水採取前にレーザーフレアセルメーターによって房水蛋白濃度を測定した.

4. 統計学的解析方法

実験 1 の場合, 同一濃度の ET-1 投与群において, 対照

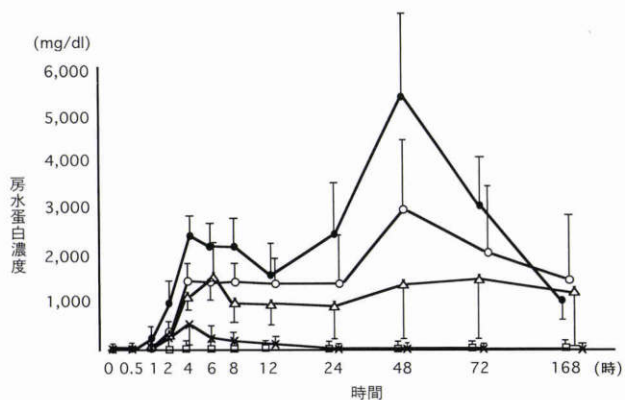


図1 10⁻⁴M ET-1硝子体投与による房水蛋白濃度と97-139 (ET_A受容体拮抗薬)の抑制効果。

●：対照液+10⁻⁴M ET-1 (n=6), ○：10⁻⁴M 97-139+10⁻⁴M ET-1 (n=6), △：10⁻³M 97-139+10⁻⁴M ET-1 (n=6), ×：10⁻²M 97-139+10⁻⁴M ET-1 (n=6), □：10⁻¹M 97-139+10⁻⁴M ET-1 (n=6)

*：p<0.05, **：p<0.01 (対応のないt-検定) ET-1：エンドセリン-1

平均値±標準偏差を示す。対照液+ET-1投与群との比較による有意差検定の結果は表1に示した。10⁻³M 97-139前処置群では、投与後4時間と48時間に房水蛋白濃度上昇の抑制がみられた。10⁻²M 前処置群では、軽度の房水蛋白濃度上昇はみられたものの、ET-1単独投与群に比べて、投与後2時間以降の房水蛋白濃度は有意に抑制された。10⁻¹M 前処置群では完全に抑制された。10⁻⁴M 前処置群では抑制効果はみられなかった。なお、97-139+対照液投与の場合は、房水蛋白濃度の上昇はみられず、図中には示さなかった。

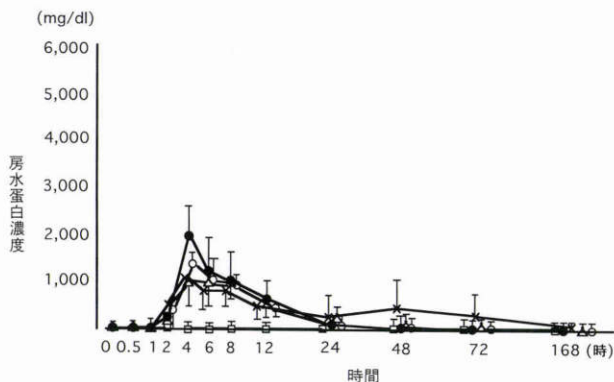


図2 10⁻⁵M ET-1硝子体内投与による房水蛋白濃度と97-139の抑制効果。

●：対照液+10⁻⁵M ET-1 (n=6), ○：10⁻⁵M 97-139+10⁻⁵M ET-1 (n=6), △：10⁻⁴M 97-139+10⁻⁵M ET-1 (n=6), ×：10⁻³M 97-139+10⁻⁵M ET-1 (n=6), □：10⁻²M 97-139+10⁻⁵M ET-1 (n=6)

*：p<0.05, **：p<0.01 (対応のないt-検定)

10⁻⁵M ET-1投与の場合、10⁻²M 97-139前処置群では、房水蛋白濃度の上昇は完全に抑制されたが、10⁻³M 97-139より低濃度の前処置群では、有意な抑制効果はみられなかった。有意差検定の結果は表2に示した。97-139+対照液投与の場合は房水蛋白濃度の上昇はみられなかったため、図中には結果を示さなかった。

同じ時間帯の4群間で行った。有意差を認めた場合には、Scheffeの多重比較法を用いた。有意水準はいずれも5%とした。測定値は平均値±標準偏差で示した。

III 結果

1. 実験 1

10⁻⁴M ET-1 投与群の結果を図1に、10⁻⁵M ET-1 投与群の結果を図2に示した。10⁻⁴M ET-1 投与の場合、ET-1投与後4時間と48時間に2つのピークを持つ房水蛋白濃度の上昇を認め、7日後にも回復しなかった。10⁻⁵M ET-1 投与の場合、ET-1投与後4時間にピークを持つ房水蛋白濃度の上昇を認め、24時間後にはほぼ正常値に回復していた。各濃度の97-139溶液+対照液の場合、いずれの濃度においても房水蛋白濃度の上昇はみられなかった。10⁻⁴M ET-1 投与群においては、10⁻⁴M 97-139溶液

液前処置群と各濃度の97-139前処置群とを比較し、対応のない場合のt検定によって各測定時間毎に有意差検定を行った。実験2の場合、まず、対照液単独投与群、10⁻¹M 97-139+対照液投与群、10⁻⁴M ET-1溶液単独投与群および10⁻⁵M ET-1溶液単独投与群の各測定時間毎の結果と無投与群を比較した。次に、10⁻⁴M ET-1溶液単独投与群と10⁻⁵M ET-1溶液単独投与群の比較を各測定時間毎に行った。以上の検討は、対応のないt検定を用いて行った。最後に、10⁻⁴M ET-1溶液単独投与群と各濃度の97-139前投与群の比較をKruskal-Wallis検定を用いて

表1 10⁻⁴M ET-1溶液単独投与後の房水蛋白濃度の上昇に対する97-139の抑制効果の有意差判定 (各n=6)

	測定時間(時間)										
	0.5	1	2	4	6	8	12	24	48	72	168
10 ⁻⁴ M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
10 ⁻³ M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
10 ⁻² M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	**	**	**
10 ⁻¹ M 97-139 前処置群	NS	NS	*	**	**	**	**	**	**	**	**

ET-1：エンドセリン-1, **：p<0.01, *：p<0.05, NS：有意差なし (対応のないt 検定)

表2 10⁻⁵M ET-1 溶液単独投与後の房水蛋白濃度の上昇に対する 97-139 の抑制効果の有意差判定 (各 n=6)

	測定時間(時間)										
	0.5	1	2	4	6	8	12	24	48	72	168
10 ⁻⁵ M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
10 ⁻⁴ M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
10 ⁻³ M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
10 ⁻² M 97-139 前処置群	NS	NS	NS	**	**	**	**	NS	NS	NS	NS

** : p<0.01, * : p<0.05, NS : 有意差なし (対応のない t 検定)

では抑制効果はみられなかったが, 10⁻³M 97-139 溶液の前処置では ET-1 投与後 4 時間値が 1,101.9±257.8 mg/dl, 48 時間値が 1,482.4±1,307.0 mg/dl と, 対照液+10⁻⁴M ET-1 投与群 (各 2,451±365.2 mg/dl, 5,386.0±2,261.7 mg/dl) に比べて房水蛋白濃度上昇が有意に抑制された (表 1). 10⁻²M 97-139 前処置の場合は, ET-1 投与後 2~12 時間まで軽度の房水蛋白濃度上昇がみられたが, 最高値が ET-1 投与 4 時間後の 641.8±516.4 mg/dl であり, 対照液+ET-1 投与群と比較すると, 房水蛋白濃度の上昇は 4~72 時間まで有意に抑制された. 10⁻¹M 97-139 前処置の場合は, 房水蛋白濃度の上昇は完全に抑制された. 10⁻⁵M ET-1 投与群においては, 10⁻³M より低濃度の 97-139 溶液の前処置では, いずれの測定時間においても抑制効果はみられなかった. 10⁻²M 97-139 溶液の前処置では, 房水蛋白濃度の上昇は完

全に抑制された (表 2).

2. 実験 2

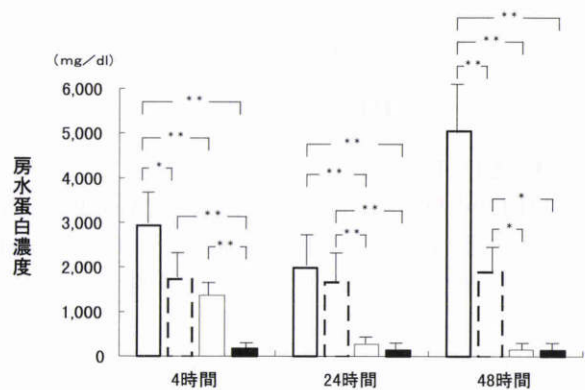
いずれの測定時間における比較でも, Kruskal-Wallis 検定で 4 群間に有意差を認めたので, 多重比較法を用いて検定した.

1) 房水蛋白濃度

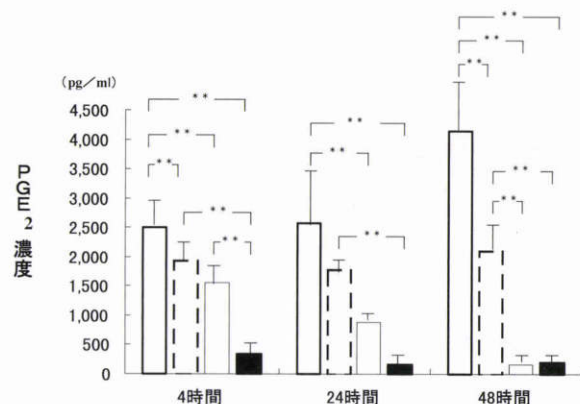
房水採取前に行った房水蛋白濃度の測定結果は, 実験 1 に示した結果と同様の変化がみられた (図 3 A).

2) PGE₂ 濃度

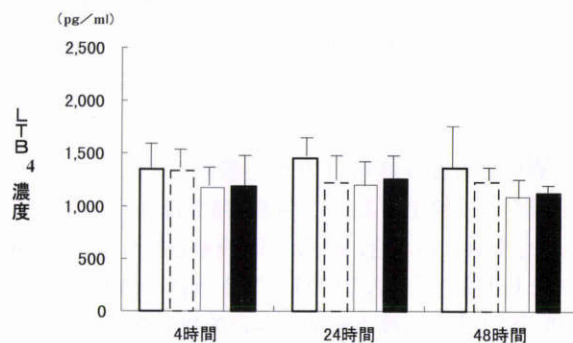
対照液投与群, 10⁻¹M 97-139 溶液+対照液投与群のすべての時間において, 無投与群との間に差を認めなかったが, 10⁻⁴M ET-1 溶液単独投与群および 10⁻⁵M ET-1 溶液単独投与群の各測定時間のすべての群で, PGE₂ 濃度の有意な上昇がみられた (表 3). 10⁻⁴M と 10⁻⁵M ET-1 溶液単独投与の比較では, 2 時間群, 4 時間群, 24 時間



A: 房水蛋白濃度



B: 房水PGE₂濃度



C: 房水LTB₄濃度

図3 ET-1投与後の房水蛋白濃度, PGE₂濃度, LTB₄濃度と97-139前処置の効果.

□: 10⁻⁴M ET-1 単独投与群, []: 10⁻³M 97-139+10⁻⁴M ET-1 投与群, □: 10⁻²M 97-139+10⁻⁴M ET-1 投与群, ■: 10⁻¹M 97-139+10⁻⁴M ET-1 投与群

* : p<0.05, ** : p<0.01 (Scheffe 多重比較検定)

PGE₂ : プロスタグランジン E₂, LTB₄ : ロイコトリエン B₄

各群の測定値を平均値±標準偏差で示した (n=6). 10⁻³M 97-139 前処置の 24 時間群を除いて, 97-139 前処置によって ET-1 による房水蛋白濃度 (A) あるいは房水 PGE₂ 濃度 (B) の上昇は有意に抑制された. 濃度の異なる 97-139 前処置群の間でも, 房水蛋白濃度において有意差を認めた場合, PGE₂ 濃度でも有意差を認めた. LTB₄ 濃度 (C) には有意差を認めなかった.

表3 房水蛋白濃度, PGE₂濃度, LTB₄濃度—無投与群との比較— (各 n=6)

	房水蛋白濃度 (mg/dl)	PGE ₂ 濃度 (pg/ml)	LTB ₄ (pg/ml)
無投与群	37.5±9.8	42.3±18.6	1,105.7±284.2
対照液投与			
4時間群	31.7±12.2	34.0±19.8	1,132.2±137.6
24時間群	46.7±38.7	41.8±26.0	1,226.7±323.4
10 ⁻¹ M 97-139+対照液			
4時間群	80.0±40.1	56.5±28.3	1,020.0±147.5
24時間群	67.7±39.5	59.2±31.7	1,110.8±245.0
10 ⁻⁴ M ET-1 溶液単独投与			
2時間群	1,166.2±630.4**	1,760.0±656.1**	1,138.2±560.3
4時間群	2,939.2±757.4**	2,500.0±485.3**	1,346.7±322.9
24時間群	1,996.1±971.2**	2,579.2±1,230.8**	1,455.0±367.9
48時間群	5,055.7±1,638.5**	4,140.0±1,667.2**	1,362.5±552.5
10 ⁻⁵ M ET-1 溶液単独投与			
2時間群	211.2±139.4	776.7±443.3**	1,374.7±644.8
4時間群	2,127.2±1,143.2**	1,415.0±265.3**	1,100.7±161.3
24時間群	166.2±119.8	801.2±290.0**	1,186.3±348.3

** : p<0.01 (対応のない t 検定) 平均値±標準偏差

表4 房水蛋白濃度, PGE₂濃度, LTB₄濃度—10⁻⁴ M ET-1 と 10⁻⁵ M ET-1 単独投与群の各測定時間における有意差検定— (各 n=6)

	測定項目		
	房水蛋白濃度	PGE ₂ 濃度	LTB ₄ 濃度
2時間群	p<0.01	p<0.05	NS
4時間群	NS	p<0.01	NS
24時間群	p<0.01	p<0.01	NS

NS : 有意差なし (対応のない t 検定)

IV 考 按

これまでに我々は, ET-1 の前房内投与¹⁵⁾と硝子体投与¹⁶⁾による房水蛋白濃度の経時的変化, およびこれらの反応に対する PG 阻害薬の抑制効果について検討し, ET-1 濃度に依存して房水蛋白濃度が上昇すること, これらの変化がアラキドン酸カスケードに深い関連を持つことを報告した. 今回我々は, ET-1 投与による房水蛋白濃度の上昇と ET_A 受容体の関連を検討するために, 非ペプチド系選択的 ET_A 受容体拮抗薬である 97-139¹³⁾¹⁹⁾を用いて, ET-1 硝子体投与後の房水蛋白濃度の上昇に対する 97-139 の前処置の影響を検討した. また, ET-1 とアラキドン酸カスケードの関連を調べるために, ET-1 投与後の PGE₂濃度, LTB₄濃度を測定し, さらに, ET_A 受容体拮抗薬の前処置による影響についても検討した.

用いた ET-1 溶液の濃度は, 前報¹⁶⁾の結果から 10⁻⁴M と 10⁻⁵M の 2 つの濃度の ET-1 溶液を用い, 今回は ET_A 受容体拮抗薬 97-139 の前処置による影響を検討した. その結果, 10⁻⁴M ET-1 溶液群の場合, 10⁻¹M 97-139 溶液によって房水蛋白濃度の上昇は完全に抑制された. 10⁻²M 97-139 溶液では, ET-1 投与後 4 時間の房水蛋白濃度上昇を不完全であるが, かなり良好に抑制し, 24 時間以降は完全に抑制していた. 10⁻³M 97-139 溶液では ET-1 投与 2 時間以降の房水蛋白濃度上昇を抑制することはできなかったが, 48 時間後の房水蛋白濃度の再上昇は抑制された. 10⁻⁴M 97-139 溶液では, ET-1 投与による房水蛋白濃度の上昇をほとんど抑制できなかった. 10⁻⁵M ET-1 溶液群では, 10⁻³M 97-139 溶液より低濃度の場合, 房水蛋白濃度の変化にほとんど影響を与えなかったが, 10⁻²M 溶液は ET-1 による房水蛋白濃度の上昇を完全に抑制した. 特に, 前回の報告¹⁶⁾で, 10⁻⁴M ET-1 溶液投与後 48~72 時間の房水蛋白濃度の上昇はプロスタグランジ

群とも前者が有意に高値であった(表4). 10⁻⁴M ET-1 溶液単独投与群と 97-139 の前処置を行った場合の比較では, 房水蛋白濃度の抑制がみられた群において, PGE₂濃度も同様に有意な抑制がみられた(図3). すなわち, ET-1 単独投与群(表3)と比べた場合, 10⁻¹M および 10⁻²M 97-139 溶液前処置では, 4 時間群(それぞれ 343.8±160.1 pg/ml, 1,555.8±492.3 pg/ml), 24 時間群(166.3±102.9 pg/ml, 888.8±160.3 pg/ml), 48 時間群(208.0±51.1 pg/ml, 165.8±36.0 pg/ml)と, いずれの時間帯でも PGE₂濃度の有意な抑制がみられた. 10⁻³M 97-139 溶液前処置では, 4 時間群(1,938.3±411.8 pg/ml), 48 時間群(2,106.7±724.2 pg/ml)で PGE₂濃度の有意な抑制がみられた. また, 各濃度の 97-139 溶液前処置群の間で房水蛋白濃度に有意差を認めた場合, PGE₂濃度にも有意差を認めた(図3B).

3) LTB₄濃度

無投与群との比較では, いずれの群においても LTB₄濃度の有意な上昇はみられなかった(表3). 10⁻⁴M と 10⁻⁵M ET-1 溶液単独投与群の比較(表4), あるいは 10⁻⁴M ET-1 溶液単独投与群と 97-139 の前処置を行った場合の比較でも LTB₄濃度に有意差はみられなかった(図3C).

ン合成阻害薬の併用によって抑制することが不可能であったが、97-139の前処置によって完全に抑制されたことから、初期のピークも48時間の再上昇もET_A受容体を介した反応であることがわかった。なお、10⁻³M 97-139溶液の前処置の場合、10⁻⁴M ET-1溶液群では測定時間によって有意な抑制効果がみられたのに対して、10⁻⁵M ET-1溶液群では抑制効果がみられなかったのは、有意判定の基準となるET-1単独投与後の房水蛋白濃度が10⁻⁴M ET-1溶液群の方が高く、抑制効果が現れやすかったためと考えられる。

ET-1はフォスホリパーゼA₂の活性を高めることにより、アラキドン酸の放出を促進するといわれており¹⁸⁾、リポキシゲナーゼ系、シクロオキシゲナーゼ系のいずれの系にもET-1は関与する可能性が考えられている。そのうち、家兎眼へのET-1投与後の房水PGE₂濃度に関する報告は、これまでもいくつかみられる。Granstromら²⁴⁾はET-1 4 pmolを前房内に10 μl投与し、その13分後の房水PGE₂濃度は10.5±2.1 ng/ml(対照; 0.1±0.06 ng/ml)に有意に上昇していたと報告している。杉山ら¹³⁾は10⁻⁵M ET-1溶液20 μl硝子体投与の場合、1時間後の房水PGE₂濃度は3,198.3±1,350.1 pg/ml、24時間後は2,700.0±544.8 pg/mlと、対照群に比して有意に上昇していたと報告している。さらに、10⁻²M 97-139溶液の前処置を10⁻⁵M ET-1投与の30分前に行った場合には、ET-1投与後1時間で房水PGE₂濃度は206.5±106.5 pg/ml、24時間で83.0±33.8 pg/mlに抑制されたと報告している。しかし、この報告ではPGE₂濃度と房水蛋白濃度の関連についての詳しい検討はされていない。PGE₂は血管透過性を亢進させることが知られており²⁵⁾、また、眼局所投与(点眼あるいは硝子体内投与)によって血液房水柵の破綻を生じ²⁶⁾²⁷⁾、房水蛋白濃度が上昇することが知られている²⁴⁾。そこで今回我々は、房水採取前にレーザーフレアセルメーターによるフレア値の測定を行い、ET-1硝子体投与による前房内炎症の程度と房水PGE₂濃度の関連を検討した。まず、対照液あるいは高濃度のET_A受容体拮抗薬(10⁻¹M 97-139)は房水蛋白濃度、房水PGE₂濃度に影響を与えないことを確認した。10⁻⁴M ET-1溶液単独投与の場合は2, 4, 24, 48時間群とも、無投与群と比較して房水蛋白濃度および房水PGE₂濃度の有意な上昇がみられた。10⁻⁵M ET-1溶液単独投与の場合は、いずれの時間群でも房水PGE₂濃度の有意な上昇がみられたが、房水蛋白濃度の有意な上昇がみられたのはPGE₂濃度の最も高かった4時間群だけであった。また、10⁻⁴Mと10⁻⁵M ET-1溶液の単独投与群を比較すると、房水蛋白濃度の2時間、24時間値は両群間で有意差を認め、房水PGE₂濃度の比較でもそれぞれ有意差を認めた。したがって、投与したET-1濃度に応じて房水PGE₂濃度は上昇し、PGE₂がある一定の濃度をこえると房水蛋白濃度が上昇すると考えられた。ただし、房

水蛋白濃度の4時間値は両群間で統計学的に有意差を認めなかったが、房水PGE₂濃度は10⁻⁴M ET-1溶液投与の方が有意に高値であり、そのために、10⁻⁴M ET-1溶液投与群の方がより長時間にわたって房水蛋白濃度の高値を示していたのではないかと推測された。また、ET_A受容体拮抗薬の影響を認めるために、10⁻¹~10⁻³Mの97-139と10⁻⁴M ET-1溶液の組み合わせによる房水PGE₂濃度の検討を行った。その結果、97-139前処置により房水蛋白濃度の上昇が抑制された場合、房水PGE₂濃度の上昇も有意に抑制され、その抑制の効果は97-139の濃度に依存していると考えられた。したがって、ET-1投与による房水蛋白濃度の上昇はET_A受容体を介したものである可能性が高いと考えられた。

一方、LTB₄は、眼内では強力な白血球集積作用を有し、眼炎症に関与しているといわれ^{25)28)~31)}、前房内投与によって房水中の白血球が増加することが報告²⁸⁾²⁹⁾されている。また、PGE₂との併用投与により血管透過性を亢進させる協調作用も知られている³¹⁾。しかし、今回の実験では、ET-1投与の有無にかかわらずLTB₄濃度は一定しており(表3, 4, 図3C)、10⁻⁴M ET-1の投与はLTB₄濃度に影響を与えない可能性が高いと考えられた。ただし、測定群によっては値のパラツキが大きく、LTB₄濃度に関して個体差が大きいことも予測され、同一個体での経時的変化の測定が将来的には望まれる。

以上から、ET-1投与による房水蛋白濃度の上昇は、ET_A受容体を介してアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ系に関与し、PGE₂濃度が上昇することによってもたらされる可能性が高く、リポキシゲナーゼ系の関与の可能性は低いと考えられた。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitui Y, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
- 2) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakaniishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-732, 1990.
- 3) Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, et al: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732-735, 1990.
- 4) Hosoda K, Nakano K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, et al: Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 287: 23-26, 1991.
- 5) Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T: Cloning and functional expression of human cDNA for the ET_B endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 656-663, 1991.

- 6) **Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, et al**: Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 248-255, 1991.
- 7) **Nakamuta M, Takayanagi R, Sakai Y, Sakamoto S, Hagiwara H, Mizuno T, et al**: Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 34-39, 1991.
- 8) **Karne M, Jayawickreme CK, Lerner MR**: Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268: 19126-19133, 1993.
- 9) **Kondoh M, Miyazaki H, Uchiyama Y, Yanagisawa Y, Masaki T, Murakami K**: Solubilization of two types of endothelin receptor, ET_A and ET_B from rat lung with retention of binding activity. *Biomed Res* 12: 417-423, 1991.
- 10) **Osborne NN, Barnett NL, Luttmann W**: Endothelin receptors in the cornea, iris and ciliary processes. Evidence from binding, secondary messenger and PCR studies. *Exp Eye Res* 56: 721-728, 1993.
- 11) **El-Mowafy AM, Abdel-Latif AA**: Characterization of iris sphincter smooth muscle endothelin receptor subtypes which are coupled to cyclic AMP formation and polyphosphoinositide hydrolysis. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1343-1351, 1994.
- 12) **MacCumber MW, D'Anna SA**: Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* 112: 1231-1235, 1994.
- 13) 杉山和久, **Haque SR, 岡田和正, 谷口 徹, 早川友康, 北澤克明**: エンドセリン受容体拮抗剤, 97-139の家兎眼眼圧などに及ぼす影響について. *日眼会誌* 99: 271-276, 1995.
- 14) **Abdel-Latif AA, Yousufzai SYK, El-Mowafy AM, Ye Z**: Prostaglandins mediate the stimulatory effects of endothelin-1 on cyclic adenosine monophosphate accumulation in ciliary smooth muscle isolated from bovine, cat, and other mammalian species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 328-338, 1996.
- 15) 庄司信行, 大鹿哲郎, 増田寛次郎: 有色家兎眼におけるエンドセリン-1と前眼部炎症. *日眼会誌* 99: 631-635, 1995.
- 16) 庄司信行, 大鹿哲郎, 増田寛次郎: エンドセリン-1硝子体投与による前房内炎症とプロスタグランジン合成阻害薬の抑制. *日眼会誌* 101: 209-214, 1997.
- 17) **Haque MSR, Sugiyama K, Taniguchi T, Kitazawa Y**: Effects of BQ-123, an ET_A receptor-selective antagonist, on changes of intraocular pressure, blood-aqueous barrier and aqueous prostaglandin concentrations caused by endothelin-1 in rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 40: 26-32, 1996.
- 18) **Abdel-Latif AA, Zhang Y, Yousufzai SYK**: Endothelin-1 stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandins in rabbit iris sphincter smooth muscle: Activation of phospholipase A₂. *Curr Eye Res* 10: 259-265, 1991.
- 19) **Mihara S, Nakajima S, Matumura S, Kohnoike T, Fujimoto M**: Pharmacological characterization of a potent nonpeptide endothelin receptor antagonist, 97-139. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1122-1128, 1994.
- 20) **Oshika T, Kato S, Sawa M, Masuda K**: Aqueous flare intensity and age. *Jpn J Ophthalmol* 33: 237-242, 1989.
- 21) **Powell WS**: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandins* 20: 947-957, 1980.
- 22) **Kawano K, Sugita M, Oka M, Tabata N**: A simple, rapid and simultaneous extraction of thromboxane B₂, 6-Ket-prostaglandin F_{1α}, and prostaglandin E₂. *Jpn J Inflammation* 7: 511-515, 1987.
- 23) 栗本文彦: ロイコトリエン. *日本臨牀* 48(増刊): 213-216, 1990.
- 24) **Granstam E, Wang L, Bill A**: Effects of endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) in the rabbit eye; role of prostaglandins. *Eur J Pharmacol* 194: 217-223, 1991.
- 25) 大内和雄, 渡辺雅子, 鶴藤 丞: 炎症とプロスタグランジン. *病態生理* 2: 799-804, 1983.
- 26) **Camras CB, Bito LZ, Eakins KE**: Reduction of intraocular pressure by prostaglandins applied topically to the eyes of conscious rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 1125-1134, 1977.
- 27) **Green K, Kim K**: Pattern of ocular response to topical and systemic prostaglandin. *Invest Ophthalmol* 14: 36-40, 1975.
- 28) **Bhattacharjee P, Hammond B, Salmon JA, Stepney R, Eakins KE**: Chemotactic response to some arachidonic acid lipoxygenase products in the rabbit eye. *Eur J Pharmacol* 73: 21-28, 1981.
- 29) **Stjernschantz J, Sherk T, Borgeat P, Sears M**: Intraocular effects of lipoxygenase pathway products in arachidonic acid metabolism. *Acta Ophthalmol* 62: 104-111, 1984.
- 30) 藤原久子, 片山寿夫, 中田敬一, 黒住精二, 羽里篤夫: 眼組織における Leukotriene B₄ (LTB₄) の作用とその抑制. *あたらしい眼科* 5: 143-147, 1988.
- 31) **Bray MA, Cunningham FM, Ford-Hutchinson AW, Smith MJH**: Leukotriene B₄: A mediator of vascular permeability. *Br J Pharmacol* 72: 483-486, 1981.