

# 外毒素誘発ぶどう膜炎家兎眼における網膜中心動脈血流速度の解析

山田利津子<sup>1)</sup>, 林 陽子<sup>1)</sup>, 上野 聰樹<sup>1)</sup>, 山田 誠一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>聖マリアンナ医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>東京医科歯科大学医学部医動物学教室

## 要 約

**目 的**：ブドウ球菌外毒素(staphylococcal enterotoxin B, SEB)を家兎硝子体内に接種後, 網膜中心動脈流速を測定し, 病理学的所見との関連について検討した。

**対象と方法**：家兎片眼硝子体内に 50 ng/kg の SEB を接種した。瞳孔径, 超音波パルスドプラ法を用いた流速, 心拍数の測定を行った。

**結 果**：瞳孔径, 平均流速は徐々に減少して 3~5 時間後に最低点に達したのち増加し, 14 日目以降は再び減少した。末梢血管抵抗指数は 3~5 時間目および 14 日目以降に上昇した。接種早期からリンパ球, 形質細胞, 多核白血球を中心とした細胞浸潤が前房内, 結膜輪部, 毛様

体, 網膜視神経線維層に出現し, 5 日目前後にはいったん軽快した。晩期は毛様体, 硝子体内の炎症の再燃と網膜杆体錐体層への細胞浸潤の拡大が観察された。

**結 論**：SEB 接種により早期, 晩期ぶどう膜炎が誘導された。ぶどう膜炎は早期および晩期で異なる発症機構によって惹き起こされている可能性が考えられた。(日眼会誌 103: 591—596, 1999)

**キーワード**：ブドウ球菌エンテロトキシン B, ぶどう膜炎, 超音波パルスドプラ法, アシアロ GM, 陽性細胞, T 細胞受容体

## Blood Flow Velocity in the Central Retinal Artery of Exotoxin-induced Uveitis in Rabbits

Ritsuko Yamada<sup>1)</sup>, Yoko Hayashi<sup>1)</sup>, Satoki Ueno<sup>1)</sup> and Sei-ichi Yamada<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, St. Marianna University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Medical Zoology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine

## Abstract

**Purpose** : Exotoxin-induced uveitis in rabbit eyes was established by intravitreal inoculation of staphylococcal enterotoxin B (SEB). Association between findings of pulsed Doppler assessments and histological features were evaluated.

**Material and Methods** : Eyes of rabbits were unilaterally inoculated with 50 ng/kg of intravitreal SEB. Pupil diameter, blood flow velocity in the central retinal artery in both eyes and heart rate were measured using an ultrasonic diagnostic apparatus after inoculation.

**Results** : The pupil diameter and the mean blood flow velocity in central retinal arteries decreased and reached a trough 3~5 hours after the inoculation, then increased. Pulsatility index showed reciprocal fluctuations. Histological features at the early phase after inoculation revealed lymphocytic, plas-

macytic, and polynuclear leukocytic infiltrations around the anterior chamber, limbal conjunctivae, ciliary body, and nerve fiber layer of the retina, followed by recovery after about 5 days. At the late phase, recurrent inflammations in the ciliary body and intravitreal space were observed in addition to invasion into the rod and cone layer.

**Conclusion** : Early and late phase uveitis was established by intravitreal SEB. It is considered that the uveitis may be caused by two different regulatory mechanisms. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 591—596, 1999)

**Key words** : Staphylococcal enterotoxin B, Uveitis, Pulsed Doppler technique, Asialo GM<sub>1</sub> positive cell, T cell receptor

## I 緒 言

黄色ブドウ球菌が産生する外毒素 staphylococcal en-

terotoxin B(SEB)は食中毒<sup>1)</sup>や toxic shock<sup>2)</sup>などの病因となる他, ヒトやマウスの T 細胞受容体(TCR) V $\beta$  領域と反応するスーパー抗原<sup>3)</sup>として知られている。近年, 川

別刷請求先：216-8511 川崎市宮前区菅生 2-16-1 聖マリアンナ医科大学眼科学教室 山田利津子  
(平成 10 年 4 月 15 日受付, 平成 11 年 5 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Ritsuko Yamada, M.D. Department of Ophthalmology, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511, Japan

(Received April 15, 1998 and accepted in revised form May 7, 1999)

崎病と *Yersinia pseudotuberculosis* 由来のスーパー抗原との関連が浮上してきている<sup>4)</sup>。ヒト結膜感染症の起炎菌として検出頻度の高いブドウ球菌は、molecular mimic disease としてある種のヒトぶどう膜炎と何らかの関連がある可能性が考えられる。これを仮説として、これまでブドウ球菌由来のスーパー抗原 SEB を家兎に接種して角膜浸潤病変<sup>5)</sup>とぶどう膜炎を誘導し、その病態について検討してきた。

眼症状を合併する多くの膠原病は閉塞性血管炎を病態とすることが知られており、進行すれば眼循環障害を来し、視機能の低下を招く。にもかかわらず、これまで各種ぶどう膜炎における眼循環動態についてあまり知られていない。

我々はベーチェット病の眼病変のある患者を対象に、眼窩内動脈の血流速度を超音波ドプラ法を用いて測定し、網脈絡膜の閉塞性血管炎の著明な症例では末梢循環抵抗の増大と流速・流量の減少がみられることを報告<sup>6)</sup>した。さらに、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎においては、眼窩内動脈の血流速度の上昇がみられることを報告<sup>7)</sup>した。今回は、各種ぶどう膜炎の眼循環動態と組織所見との関連を検討する一貫として、家兎に SEB 誘発ぶどう膜炎を誘導し、本病態における眼循環動態を解明するため、眼窩内動脈の血流速度を超音波パルスドプラ法を用いて測定し、興味ある知見が得られたので組織所見との関連で報告する。

## II 実験方法

### 1. 動物

雌 Dutch 種家兎 10 匹[体重平均  $1.9 \pm 0.1$  (平均値  $\pm$  標準偏差) kg] を用いた。

### 2. 方法

ブドウ球菌の外毒素は SEB (Sigma, St Louis, 米国) を pyrogen-free の 0.9% 塩化ナトリウムに溶解して  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  として用いた。30 ゲージ針とハミルトン注射筒を用いて、左眼硝子体内に毛様体扁平部から  $50 \text{ ng}/\text{kg}$  の SEB を接種した<sup>5)</sup>。右眼には同量の 0.9% 塩化ナトリウム溶液を接種し対照とした。接種前、接種後 30 分、1, 3, 5, 18, 24, 48, 54 時間、5, 7, 8, 10, 12, 14 日目に瞳孔径、超音波診断装置 SSA-260 A (探触子周波数 7.5 MHz) を用いた両側網膜中心動脈 (CRA) の血流速度、心拍数の測定を行った。流速の測定は、無麻酔下、ヒドロキシメチルセルロース点眼剤を音響媒体として直接法で行った。CRA の拍動性脈波は水平方向の走査で視神経乳頭の後方約 3 mm のカラードプラ画像を検出して測定した。

1, 3 時間後に各 1 匹 2 眼、1, 2, 7, 14 日目に各 2 匹 4 眼の前房水塗末および摘出眼球の病理学的所見の変動を観察し、血流動態との関連を検討した。瞳孔径は常に照度 50 lux でカリパスを用いて測定した。

### 3. 拍動性血流シグナルの解析

拍動性血流シグナルは内臓コンピュータにより、高速フーリエ変換 (fast Fourier transformation, FFT) を行い、最高流速 (Vmax)、最低流速 (Vmin)、平均流速 (Vmean) を求めた。各種測定誤差を最小限に止め末梢循環抵抗を類推する指標となる指数として知られる RI (Resistance Index)、PI (Pulsatility Index) を以下のように算出した。

$$\text{RI} = \frac{\text{Vmax} - \text{Vmin}}{\text{Vmax}}$$

$$\text{PI} = \frac{\text{Vmax} - \text{Vmin}}{\text{Vmean}}$$

血管閉塞性の変化の参考となる ATI (Acceleration Time Index)<sup>6)</sup> は、流速脈波の立ち上がり時間を一心拍の時間で割って算出した。

$$\text{ATI} = \text{AT}/\text{PT}$$

AT (Acceleration Time)、PT (Periodic Time)

### 4. 病理学的検索

眼球摘出は前房穿刺、房水採取直後に、10 ml の 5% ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール<sup>®</sup>) を耳介静脈から注入して屠殺したのち実施した。採取した前房水はライト・ギムザ染色を行い観察した。

摘出眼球は 10% 緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋したのち薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

### 5. 統計学的方法

接種前、接種後 30 分、1, 3, 5, 18, 24, 48, 54 時間、5, 7, 8, 10, 12, 14 日目にける血流速度、脈拍、瞳孔径の測定値は、時間を因子とした推移および病理所見から以下 7 群に分類して、前値と合わせて検討した。前値 (n: 10)、接種後 1 時間 (30 分、1 時間; n: 20)、3~5 時間 (3, 5 時間; n: 18)、1 日 (18, 24 時間; n: 14)、2 日 (48, 56 時間; n: 10)、7 日 (5, 7, 8 日; n: 10)、14 日 (10, 12, 14 日; n: 6)。群間の平均値は分散分析で有意差検定し、Fisher 法を用いて多重比較検定を行った。繁雑になることを避けるため、今回はすべて前値との比較結果についてのみ検討した。

## III 結果

### 1. SEB 接種後の両眼瞳孔径の変動

両眼瞳孔径は徐々に減少して 3~5 時間後に最低点に達し、以後徐々に増加し、7 日目以降は再び減少した (図 1)。SEB 接種眼は、1 時間 ( $p < 0.010$ )、3~5 時間 ( $p < 0.005$ )、1 日目 ( $p < 0.050$ )、7 日目 ( $p < 0.010$ )、14 日目 ( $p < 0.005$ ) が有意な変動がみられた。

### 2. SEB 接種後の心拍数の変動

心拍数は徐々に低下し 5 時間後に最低値に達し、以後徐々に前値に回復した。前値 [ $248.3 \pm 19.8$  (平均値  $\pm$  標準偏差)/分] と比べ、5 時間後 ( $231.5 \pm 18.2$ /分) のみ有意な ( $p < 0.0025$ ) 低下を示した。

### 3. CRA の拍動性シグナルの解析

接種眼の CRA の Vmean は徐々に減少して 3~5 時間

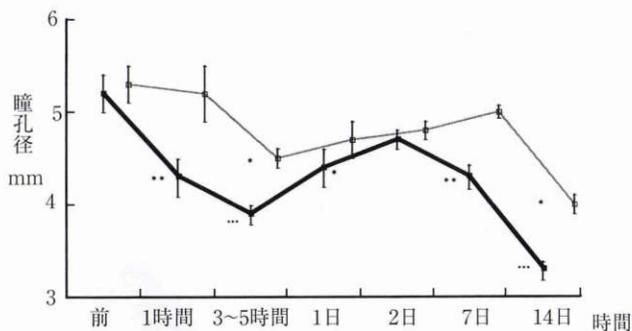


図1 Staphylococcal enterotoxin B(SEB)接種後の瞳孔径の変動.

エラーバーは標準誤差,\*\*\*:p<0.005,\*\*:p<0.01,\*:p<0.05

図には前値と比較検定した結果のみ記入した.

—:SEB 接種眼,-----:対照眼

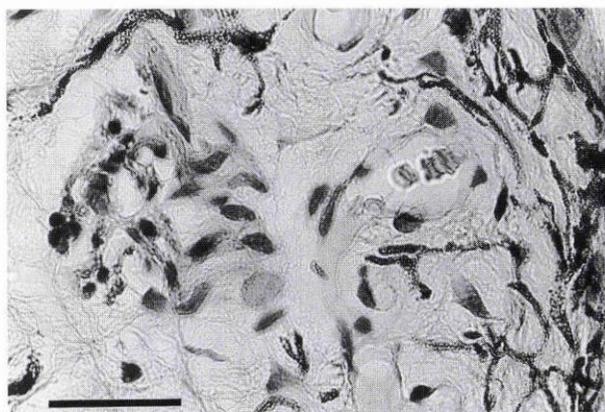


図5 3時間後,毛様体への細胞浸潤.

毛様体,輪部結膜にリンパ球,形質細胞などが浸潤していた.バーは50µm

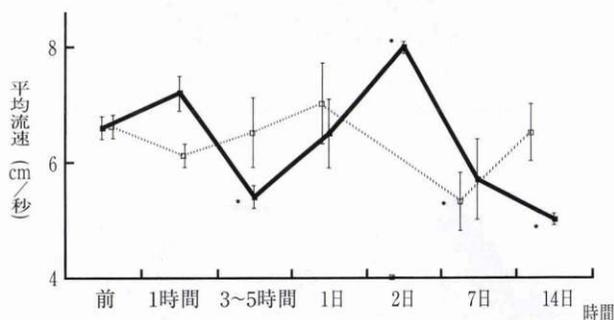


図2 SEB 接種後の網膜中心動脈平均流速の変動.

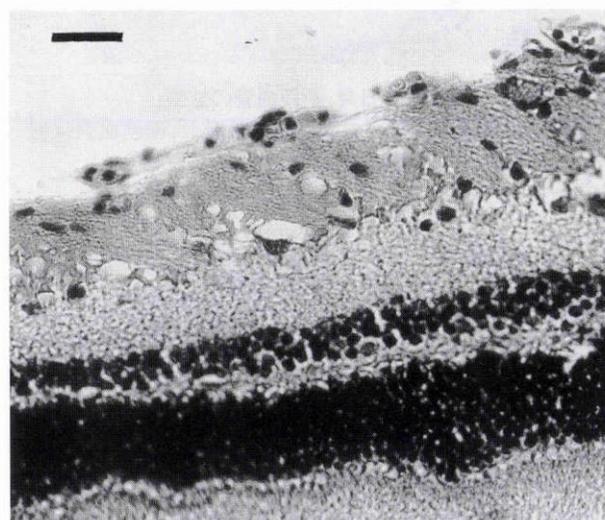


図6 1日目,網膜への浸潤.

網膜血管,視神経線維層,神経節細胞層にリンパ球,形質細胞,多核白血球(PMN)などの浸潤を伴う閉塞性血管炎を呈していた.バーは50µm

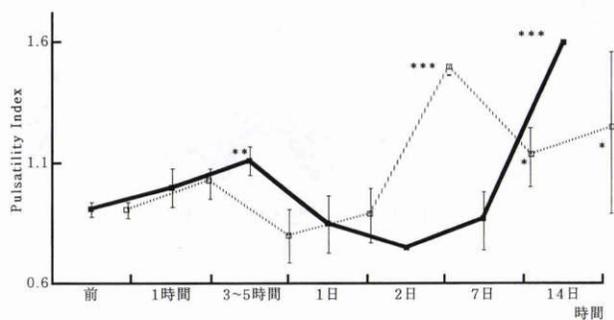


図3 SEB 接種後の網膜中心動脈 Pulsatility Index の変動.

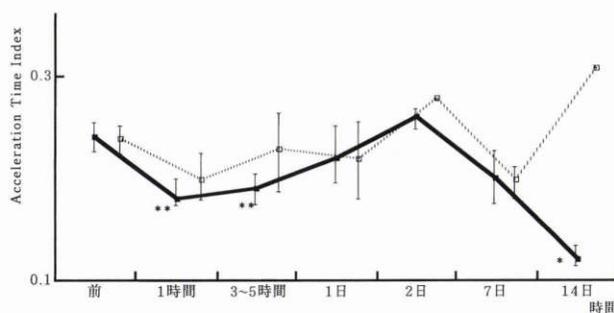


図4 SEB 接種後の網膜中心動脈 Acceleration Time Index の変動.

後に最低点に達し,以後徐々に増加して2日目に頂点に達したのち低下し,7日目以降は再び減少した(図2).前値と比べ,3~5時間後(p<0.050),2日目(p<0.033),14日目(p<0.050)が有意差を示した.VmaxおよびVminは同様に減少,増加,減少と三相性の変動を示したが,前値との比較では有意な変動を示さなかった.CRAのPIは徐々に増加して3~5時間後に頂点に達し,以後徐々に減少して2日目に最低点に達したのち増加し,7日目以降は再び増加した(図3).前値と比べ,3~5時間後(p<0.010),14日目(p<0.004)が有意差を示した.RIは同様に増加,減少,増加と三相性の変動を示したが,前値との比較では有意な変動を示さなかった.CRAのATIは徐々に減少して1,3~5時間後に最低点に達し,以後徐々に増加して2日目に頂点に達したのち低下し,7日目以降は再び減少した(図4).前値と比べ,1時間後(p<

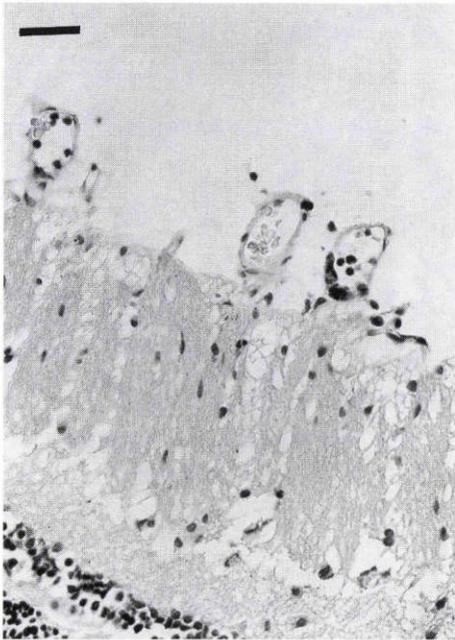


図7 2日目, 網膜血管の拡張.

網膜への浸潤はニューロン層へと波及し, 網膜血管は拡張性的変化を示した. バーは 50  $\mu$ m

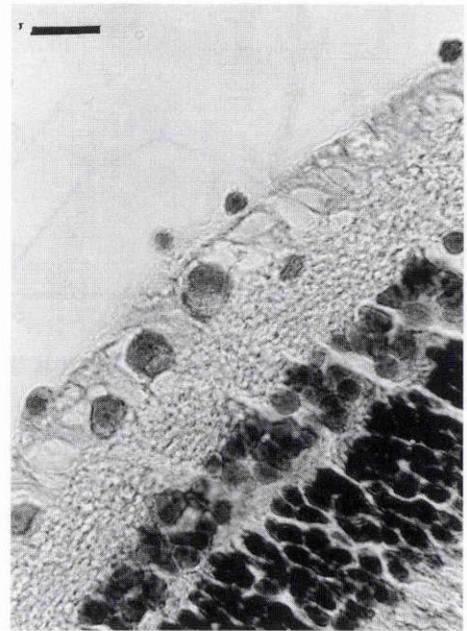


図9 7日目, 網膜への浸潤.

7日目, 網膜への浸潤はいったん軽快した. バーは 20  $\mu$ m

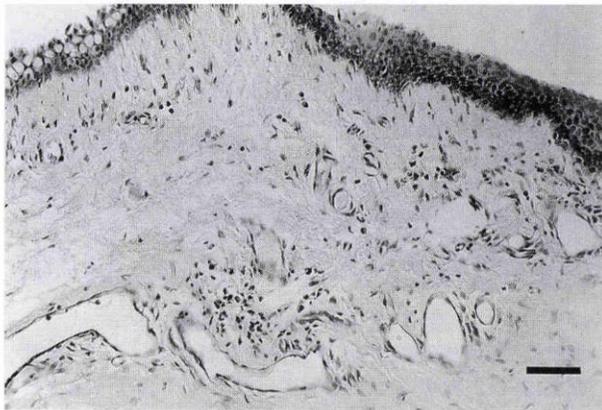


図8 2日目, 輪部血管の拡張と浸潤.

輪部結膜細胞浸潤病巣近位血管は拡張していた. バーは 100  $\mu$ m

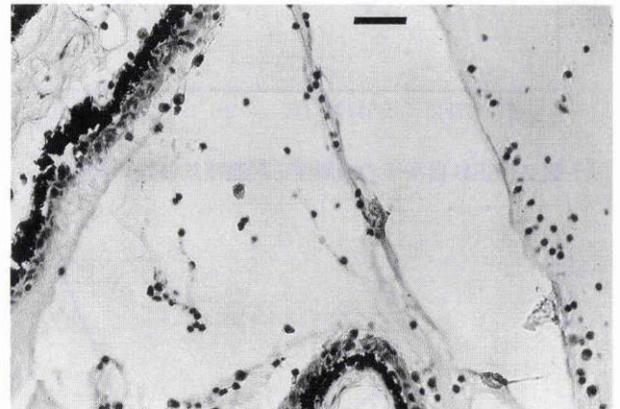


図10 14日目, 毛様体への浸潤.

14日目, 毛様体, 硝子体内への細胞浸潤は再燃した. バーは 50  $\mu$ m

0.000), 3~5 時間後 ( $p < 0.015$ ), 14 日目 ( $p < 0.042$ ) が有意差を示した.

#### 4. 前房水塗抹所見

SEB 接種 1 時間後から前房に多核白血球 (PMN) を主体とした細胞が浸潤していた.

14 日目ではリンパ球, 形質細胞, PMN がみられた.

#### 5. 病理所見

3 時間後, 毛様体, 輪部結膜にリンパ球, 形質細胞などが浸潤していた (図 5). 1 日目, 網膜血管, 視神経線維層, 神経節細胞層にリンパ球, 形質細胞, PMN などの浸潤を伴う閉塞性血管炎を呈していた (図 6). 2 日目, 網膜への浸潤はニューロン層へと波及し, 網膜血管 (図 7), 輪部結膜細胞浸潤病巣近位血管は拡張 (図 8) していた. 7 日目,

網膜への浸潤はいったん軽快 (図 9) した. 14 日目, 毛様体, 硝子体内への細胞浸潤は再燃 (図 11) し, 網膜へのリンパ球, 形質細胞, PMN, マクロファージなど細胞浸潤は再燃, 増強し杆体錐体層へと波及し (図 12), 再び閉塞性血管炎を生じていた.

## IV 考 按

ブドウ球菌外毒素はアクセサリ T 細胞<sup>8)</sup>の major histocompatibility complex (MHC) クラス II と結合して T 細胞を活性化する<sup>9)</sup>. 活性化 T 細胞は細胞増殖<sup>10)</sup>, interleukin (IL) -2<sup>9)</sup>,  $\gamma$ -インタフェロン<sup>11)</sup>などの産生作用を誘導する. これらのリンフォカインが作用して, マクロファージは IL-1 を産生する<sup>12)</sup>. アシアロ (ガングリオシ

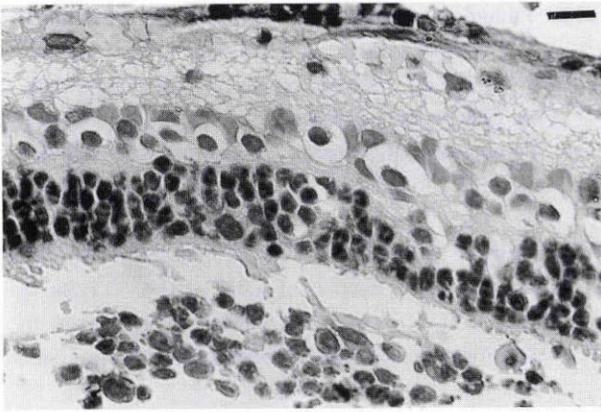


図 11 14 日目、網膜杆体錐体層への浸潤。

網膜へのリンパ球、形質細胞、PMN、マクロファージなど細胞浸潤は再燃、増強し杆体錐体層へと波及し、再び閉塞性血管炎を生じていた。バーは 20  $\mu\text{m}$

ド)  $\text{GM}_1$  陽性細胞<sup>13)</sup> の lymphokine activated killer (LAK) が介在して IL-2 などによる生体障害作用<sup>14)</sup> が生じる。このような SEB による LAK の活性化は接種後早期に発現され、無菌性の炎症像を多臓器に生じることが知られている。また、SEB は T 細胞受容体と結合して clonal deletion を生ずること<sup>15)</sup> も知られている。

今回は SEB を硝子体内に接種し、外毒素あるいはスーパー抗原誘発ぶどう膜炎を家兎眼に誘導できるかどうかを、瞳孔径の変動、超音波 B モード、M モード所見、組織所見から検討した。その結果、接種早期からリンパ球、形質細胞、PMN を中心とした細胞浸潤が前房内、結膜輪部、毛様体、網膜視神経線維層に出現した。早期ぶどう膜炎は閉塞性血管炎で始まり、接種 1 時間後、瞳孔径の異常にみられる変化として観察された。7 日目前後にはいったん軽快した。晩期ぶどう膜炎は毛様体、硝子体内の炎症の再燃と、網膜杆体錐体層への細胞浸潤の拡大と閉塞性血管炎を病態として、14 日目には観察された。

各種ぶどう膜炎における血流動態の変動を分析することは、血管炎の性質と程度の判定や治療方針の決定、および治療効果の判定に有用である可能性が考えられる。

これまで、超音波パルスドプラ法を用いて正常家兎 CRA の拍動性シグナルの分析を行い、家兎でもヒト CRA とほぼ類似の流速が観察された<sup>16)</sup>。

血管内を血液が流れる力源は、心室の収縮によって内圧が高められて得られる圧エネルギーによって血液に直接運動エネルギーが付与されることにあり、これらが血流エネルギーに変わる。血流速度は駆動圧差に比例して変化し、血管中の血流、血圧および流れに対する抵抗、これら 3 つの関係は、ちょうど電気回路における電流、電圧と電気抵抗との間のオームの法則と類同であることが知られている<sup>17)</sup>。

$$(\text{流量}) = (\text{駆動圧差}) / (\text{血管抵抗})$$

超音波ドプラ法では血流量の絶対値は測定できない

が、血流速度と末梢循環抵抗指数が算出されるので、血流量の変動が類推できる。また、中枢側の血管の狭窄ないしは閉塞性病変に伴い流速脈波の立ち上がり間隔が延長し<sup>18)</sup>、末梢側の拡張部において、FFT 波形の ATI が増加することが報告<sup>19)20)</sup> されている。

SEB 接種後、CRA の流速、ATI は早期から減少し、3~5 時間目を最低点として上昇し、2 日目を頂点として以後減少するため、3 相性の変動を示した。2 日目の上昇時は結膜輪部や網膜視神経線維層にみられるように血管拡張が観察された。また、末梢血管抵抗指数 PI は 3~5 時間目および 14 日目以降に上昇しており、このことから早期および晩期炎症時には CRA 血流量が減少していることが推測された。また、ATI の減少は血管の閉塞性病変を推測するものであり、血管の閉塞性、拡張性病変を示す組織所見との一致がみられた。また、炎症は 14 日目以降も継続していることが考えられ、より長期にわたる観察が必要であることが考えられた。さらに、SEB 接種に伴う血圧の変動についても併せて検討することが必要であると考えられた。

以上のことから、SEB 接種により早期、晩期ぶどう膜炎が誘導されることが推測された。また、早期ぶどう膜炎は LAK が介在する生体障害作用ないしは毒性が関連し、晩期ぶどう膜炎は T 細胞受容体の clonal deletion が関連して、各々異なる機序で発症している可能性が考えられ、より詳細な検討が必要であることが考えられた。超音波ドプラ法による眼窩内動脈流速測定は、縮瞳や中間透光体の混濁のため眼底が透見できない状況下においても非侵襲的に実施でき、循環動態に変動がみられる実験的疾患の経過観察に有用な検査法である。

## 文 献

- 1) 寺山 武, 五十嵐英夫: プドウ球菌. 厚生省監修: 微生物検査必携 細菌・真菌検査. 日本公衆衛生協会, 東京, D-133-142, 1987.
- 2) Larkin SM, Williams DN, Osterholm MT, Tofte RW, Posalaky Z: Toxic shock syndrome: Clinical, laboratory, and pathologic findings in nine fatal cases. *Ann Intern Med* 96: 858-864, 1982.
- 3) Mourad W, Scholl P, Diaz A, Geha R, Chatila T: The staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 triggers B cell proliferation and differentiation via major histocompatibility complex - unrestricted cognate T/B cell interaction. *J Exp Med* 170: 2011-2022, 1989.
- 4) Abe J, Kotzin BL, Jujo K, Melish ME, Glode MP, Kohsaka T, Leung DYM: Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V $\beta$  2 and V $\beta$  8 in Kawasaki disease. *Proc Natl Acad USA* 89: 4066, 1992.
- 5) 山田利津子, 栗山 茂, 久志本晋, 上野聰樹, 山田誠一: 敷き石状移行性角膜浸潤. あたらしい眼科 15: 109-112, 1998.

- 6) **Yamada R, Kudo M, Ueno S**: Analysis of hemodynamics in ocular Behçet's disease by the Doppler method. *J Med Ultrasonics* 24: 953—957, 1997.
- 7) **山田利津子, 林 陽子, 上野聰樹, 山田誠一**: エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における眼窩内動脈血流動態の解析. *日眼会誌 (臨時増刊)* 101: 178, 1997.
- 8) **山田利津子, 山田誠一, 山本光祥, 中村正夫**: T アクセサリー細胞が産生する非特異的抑制因子. *聖マ医大雑誌* 15: 126—129, 1987.
- 9) **Marrack P, Blackman M, Kushnir E, Kappler J**: The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J Exp Med* 171: 455—464, 1990.
- 10) **Fleischer B, Schrezenmeier H**: T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins clinical variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J Exp Med* 167: 1697—1707, 1988.
- 11) **Carlsson R, Fisher H, Sjögren HO**: Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cell. *J Immunol* 140: 2484—2488, 1988.
- 12) **Dinarello CA**: The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 5: 517—531, 1994.
- 13) **Yamada S, Yamada R, Hamajima K, Takahashi T**: Do idiotype-bearing monoclonal suppressor factors work on cytotoxic responses. *Yokohama Medical Bulletin* 36: 5—8, 1985.
- 14) **Penarrubia OG, Koster FT, Kelley RO, McDowell TD**: Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med* 169: 99—113, 1989.
- 15) **Kawabe Y, Ochi A**: Programmed cell death and extrathymic reduction of V $\beta$ +, CD 4, T cells in mice tolerant to CD 4+T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 349: 245—248, 1991.
- 16) **Yamada R, Yamada S**: Doppler assessment of ocular circulation in the eyes of the rabbits. *J Med Ultrasonics* 25: 29—37, 1998.
- 17) **Folkow B, Neil E**: *Circulation*: 4—13. Oxford Univ Press, London, 1971.
- 18) **Kotval PS**: Doppler waveform parvus and tardus—A sign of proximal flow obstruction. *J Ultrasound Med* 8: 435—440, 1989.
- 19) **二村 貢**: 胆嚢癌の超音波ドブラ法による血流解析. *Jpn J Med Ultrasonics* 23: 363—372, 1996.
- 20) **二村 貢, 山中恒夫**: 胆嚢癌の超音波ドブラ法による血流解析における Acceleration Time Index (ATI) の臨床的意義. *日消会誌* 93: 70, 1996.