

内因性ぶどう膜炎のエンドトキシン・モデル

2. 生化学的研究 (図6, 表1)

奥村 敦 司 (東京大学医学部眼科学教室 (現所属: 千寿製薬))

望 月 學 (東京大学医学部分院眼科学教室)

Biochemical Aspects of an Endotoxin Model for Endogenous Uveitis

Atsushi Okumura and Manabu Mochizuki

Department of Ophthalmology, Branch Hospital, University of Tokyo School of Medicine

要 約

さまざまな動物に対し、エンドトキシンを全身または局所に投与することによって眼炎症が引き起こされることが報告されている。今回、我々はルイスラットの足蹠皮下にエンドトキシンを注射することにより惹起させた眼炎症モデルを用いて、その炎症の動態や血液眼関門の破壊について検討した。エンドトキシン注射3～6時間後には、前房水中タンパク濃度や細胞数の増加、縮瞳が見られ始め、これらの所見は18～24時間後には最大となった。その後タンパク濃度と縮瞳の程度は減少していったが、細胞は1週間後でも認められた。また、前房水中のロイコトリエンズ (LTs) を HPLC 法にて定量した結果、6時間後から LTD₄ を検出し、24時間後にて最大となった。以上の結果より、眼に直接触れないで炎症を起こすことができるこのモデルは、内因性ぶどう膜炎のモデルのひとつとして、血液眼関門の破壊の機序などを解析する上で有用であると思われる。(日眼 91: 1147—1153, 1987)

キーワード: エンドトキシン, 眼炎症, ロイコトリエンズ, ラット, 血液眼関門破壊

Abstract

Inflammation induced by systemic injection of endotoxin can be a convenient model for endogenous uveitis since ocular inflammation can be induced without manipulating the eye. We examined the dynamics of various inflammatory parameters following injection of various endotoxins in the footpad of rats. The inflammatory pattern of three different endotoxins were found to be essentially the same *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium*. Protein contents of aqueous humor began to increase from 3 hours after the endotoxin injection, reached a peak level at 24 hours and returned to a normal level in the following several days. On the other hand, cells in the aqueous humor increased 3 hours after the injection, reached a peak level at 24 hours and maintained a high level even one week after the injection. Concerning the pupillary size immediately after the death of the rats, animals injected with endotoxin showed a miotic response. This miotic response was maximum between 18 and 48 hours after the endotoxin injection. Furthermore, we examined aqueous humor samples to evaluate leukotrienes (LTs) by high-pressure liquid chromatography. LTD₄ was detected in the aqueous humor at 6 hours and reached a peak level at 24 hours. The present data indicate that the systemic injection of endotoxin caused the disruption of the blood-ocular barrier soon after the injection. This model is useful for analyzing the pathophysiology of endogenous uveitis

別刷請求先: 112 東京都文京区目白台3-28-6 東京大学分院眼科 望月 學

Reprint requests to: Manabu Mochizuki, M.D. Department of Ophthalmology, Branch Hospital University of Tokyo School of Medicine

3-28-6 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan

(昭和62年5月25日受付) (Accepted May 25, 1987)

and the mechanism of the breakdown of the blood-ocular barrier. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 1147—1153, 1987)

Key words: endotoxin, ocular inflammation, leukotrienes, rat, breakdown of blood-ocular barrier

I 緒 言

グラム陰性菌のリポ多糖体 (Lipopolysaccharide ; LPS), いわゆるエンドトキシンの全身投与により, 補体系の活性化¹⁾²⁾, 血小板凝集因子の放出³⁾⁴⁾などの諸現象が認められることが報告されている。眼科領域においては, 従来よりウサギの耳静脈や眼内にエンドトキシンを注射し, 眼に炎症を惹起させた動物モデルについての研究が行われてきた。しかし, Bhattacharjee ら⁵⁾はラットを用いて, エンドトキシン全身投与後に血液眼関門の破壊が起こることを, 標識アルブミンの漏出及び蛍光眼底像により確認した。眼に直接触れることなく眼内炎症を惹起し得るこの動物モデルは, 内因性ぶどう膜炎の実験モデルとして有用であると考えられる。ウサギに比べ, ラットの場合は採取し得る房水量が少ないという欠点があるものの, ラットの抗原に対する種々のモノクローナル抗体が市販されているので, 免疫学的検索を詳細に行なうことが可能であるという点において大きな利点がある。我々は前報⁶⁾において, この実験モデル, すなわちラットの足蹠皮下にエンドトキシンを注射することにより生じる眼内炎症の経時変化についての形態学的研究を行ない報告した。今回は, この炎症モデルを用いて種々の炎症パラメーターについて主に生化学的な検討を行なったのでここに報告する。

II 実験材料及び方法

1. 実験動物

8~10週齢, 雄, 近交系ルイスラット (日本チャールズリバー, 厚木市, 神奈川県)。

2. エンドトキシン注射

Shigella flexneri, *Escherichia coli* 055 : B5または *Salmonella typhimurium* (DIFCO, Detroit, U.S.A.) のエンドトキシンを生理食塩水に溶解して, 1~1,000 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の範囲の用量でラット両後肢足蹠皮下にそれぞれ0.1ml ずつ注射した。また, コントロールラットには生理食塩水のみを注射した。

3. 実験計画

エンドトキシン注射後, 0, 1, 3, 6, 12, 18, 24,

48, 72時間及び1週間後の各時点において, ラットをCO₂にて殺処分した。直ちに, 手術用顕微鏡下にて瞳孔径の長径と短径を測定し, さらに27G 針にて前房水を約20 μl 採取した。このうち2 μl をタンパク濃度測定用に, 2 μl を細胞数計数用に, 残りをロイコトリエン測定用に供した。また, 各時点で測定に供したサンプル数はいずれも6または8であった。

4. 前房水中のタンパク濃度

前房水中のタンパク濃度の測定は, Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD Chemical Division, Richmond, California, U.S.A.) を用いて行なった⁷⁾⁸⁾。

5. 前房水中の細胞数

前房水中の細胞数は, 採取した房水をマイクロシリンジを用いスライドガラス上に塗布し, 自然乾燥後にライト染色を行ない, 光学顕微鏡下にて全視野の青く染まった細胞を計数した。

6. ロイコトリエンの定量

ロイコトリエンの定量は高速液体クロマトグラフィ法 (HPLC) とラジオイムノアッセイ法 (RIA) にて検討した。除タンパクを行なうために, 採取した一定量の前房水に2~4倍量のエタノールを加えて, -80℃にて保存した。一昼夜放置した後に, 4℃, 15,000回転で10分間遠心し, 上清を回収した。その上清を窒素ガス下にて濃縮し, エタノールを蒸発させた。この残渣を少量の下記の溶出液に再溶解して HPLC に注入し測定した。分離カラムには, Nucleosil 5C₁₈ (4.6mm×150mm) を用い, 溶出液としてアセトニトリル/水/メタノール/酢酸 (300 : 400 : 100 : 0.6, pH 5.6) を室温下0.7ml/min の速度で流した。ポンプは LC-6A (島津製作所, 京都) を用い, 検出器には紫外分光光度計 SPD-6A (島津) を用いて270nm の吸光度をモニターした。また, クロマトパック C-R3A (島津) にて記録計算を行なった。標準ロイコトリエンとして用いた LTC₄, LTD₄, LTE₄ については和光純薬工業 (株) より, LTB₄ は Paesel 社のものを入手した。また, LTC₄, LTD₄, LTE₄ は各々100ng, LTB₄ は50ng を用いて標準クロマトグラムを作成した。HPLC にて分離定量後に, ロイコトリエンに相当する分画を回収し, RIA を行なった。RIA は New England Nuclear 社の

ロイコトリエン測定用キットを用いて行なった。

III 結 果

1. 瞳孔面積の経時変化

殺処分直後の眼球を、手術用顕微鏡を用い一定光量のもとで観察したところ、生理食塩水のみを注射したコントロールラットでは強く散瞳していたのに対して、シゲラエンドトキシン(1mg/rat)を注射したラットでは、Fig. 1のごとく時間経過に伴って強い縮瞳が見られた。すなわち、注射6時間後でやや弱い縮瞳が見られ、12時間後では中程度の、そして18時間後では最も強い縮瞳が見られた。これは48時間後まで持続したが、その後は縮瞳も弱くなり、1週間後には縮瞳は見られなかった。

2. 細胞数の変化

1) 上記の瞳孔径の測定を行なったラットから得た前房水サンプル中の細胞数の変化について検討した。コントロールラットの前房水中には、細胞は全く検出されなかった。シゲラエンドトキシン注射3時間後では 600 ± 139 個/ml (mean \pm S.E., n=6)の細胞が見られ、24時間後には $2 \times 10^6 \pm 6.9 \times 10^4$ 個/ml (n=6)の値のピークに達した。その後、細胞数はタンパク濃度の場合と異なり、1週間後でも $2 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^3$ 個/ml (n=6)の細胞が見られた (Fig. 2)。

2) 次に、*S. flexneri*以外のエンドトキシン、すなわち*E. coli*, *S. typhimurium*についてもパターンが同じであるかどうかを検討するために、同様の実験を行なった。各々100 μ g/ratを注射した後に採取した前房水中の細胞数を調べた結果、用いた3種類のエンドトキシンの間で全く相違が見られず、エンドトキシン注

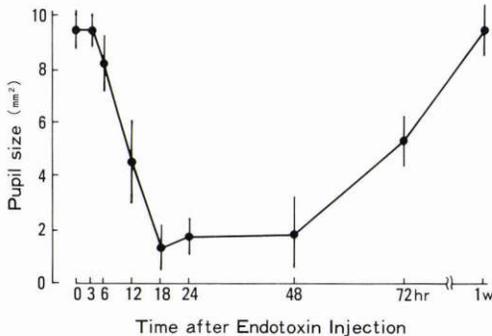


Fig. 1 Changes in the pupillary size following the injection of *S. flexneri* endotoxin (1mg/rat) into the hind footpads.

Results are expressed as the mean \pm S.E.. (n=8)

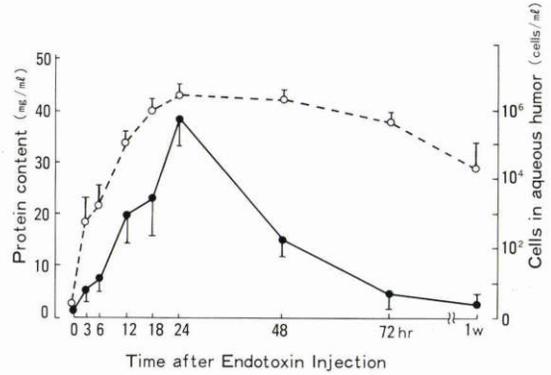


Fig. 2 Protein concentration (●—●) and the number of cells (○---○) in the aqueous humor following the injection of *S. flexneri* endotoxin (1 mg/rat) into the hind footpads.

Results are expressed as the mean \pm S.E.. (n=6 or 8)

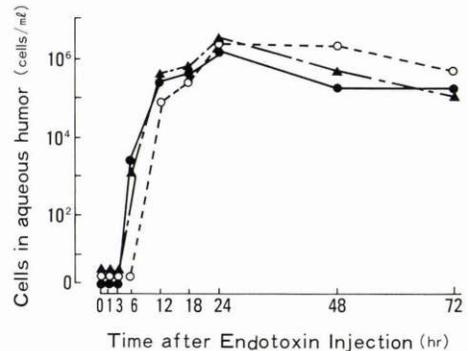


Fig. 3 The dynamics of the number of cells in the aqueous humor following the systemic injection of three different kinds of endotoxin (100 μ g/rat); ●—● *S. typhimurium*, ○---○ *E. coli*, ▲---▲ *S. flexneri*.

Results are expressed as the mean \pm S.E..

射24時間後には細胞数は最大となり、72時間後でもこの細胞数は依然として高い値であった (Fig. 3)。

3. 前房水中のタンパク濃度

1) 上記の実験を行なったラットから得た同じ房水サンプル中のタンパク濃度について検討した。シゲラエンドトキシン注射前には平均1.3 \pm 0.1mg/ml (mean \pm S.E., n=8)であったものが、注射3時間後には少量ではあるが有意な増加を示し、その後時間の経過とともに上昇し、24時間後には38.9 \pm 3.5mg/ml (n=6)のピークに達した。しかし、48時間後にはピークの約半分に減少し、1週間後には注射前の値に戻っ

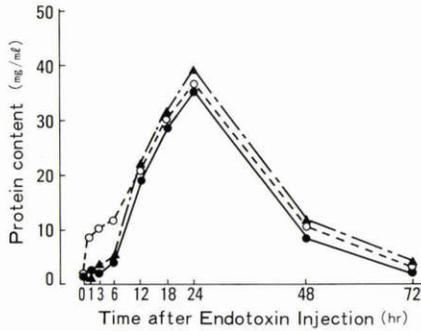


Fig. 4 The dynamics of protein concentration in the aqueous humor following the systemic injection of three different kinds of endotoxin (100 μ g/rat); ●—● *S. typhimurium*, ○—○ *E. coli*, ▲—▲ *S. flexneri*.

Results are expressed as the mean \pm S.E..

た (Fig. 2).

2) 次に、先に述べた3種類とエンドトキシンを用いた場合のタンパク濃度の変化について検討した。タンパク濃度の変化は、用いた3種類のエンドトキシンの間で大きな相違はなく、エンドトキシン注射3~6時間後より増加が始まり、その後時間経過とともに上昇し、24時間後には最大となった。その後は減少し始め、72時間後にはほぼ正常の値に戻った。ただし、*E. coli*を用いた場合には他のふたつのエンドトキシンと異なり、エンドトキシン注射1時間後からタンパクの増加が認められた (Fig. 4)。

3) エンドトキシン注射による炎症の強さの用量依存性を検討した。3, 10, 30, 100, 300, 1,000 μ g/ratのシゲラエンドトキシンを注射し、24時間後に採取した前房水サンプル中のタンパク濃度を炎症の指標とした。3 μ g/ratのエンドトキシンを注射した時には、前房水中のタンパク濃度は、コントロールラットと比べてほとんど変わらなかった。その後は、エンドトキシンの濃度に比例して増加し、300 μ g/rat以上の濃度で最大に達した (Fig. 5)。

4. 前房水中のロイコトリエン定量

標準ロイコトリエンをHPLCにて分析した結果、LTC₄、LTD₄、LTE₄、LTB₄の順に溶出した (Fig. 6a)。生理食塩水を注射したコントロールラットの前房水のクロマトグラムでは、前述の各種ロイコトリエンに相当するピークは検出されなかった (Fig. 6b)。しかし、エンドトキシン注射6時間後には矢印に示すようなピークが検出され、その溶出時間は標準LTD₄のピークと一致した (Fig. 6c)。時間経過とともにこのピーク

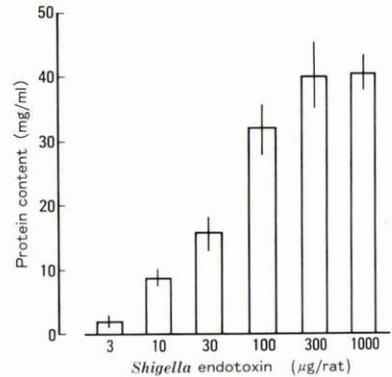


Fig. 5 The dose-dependent effect of endotoxin on the protein concentration in the aqueous humor. The sample was obtained 24hours after the systemic injection of *S. flexneri* endotoxin.

Results are expressed as the mean \pm S.E.. (n=6)

は大きくなり、エンドトキシン注射24時間後には最大となった (Fig. 6d)。また、標準ロイコトリエンのクロマトグラムを基準として定量計算を行ない、Table 1の結果を得た。すなわち、コントロールラットでは検出限界以下であったのに対して、エンドトキシン注射6時間後には6.4 \pm 1.3ng/ml、24時間後には51.0 \pm 5.3ng/mlと有意に増加していた。しかし、LTD₄以外のロイコトリエンに相当するピークは、単眼より得た房水サンプルでは検出されなかった。以上の結果は1眼から採取した房水を測定したものであるが、5眼の房水をプールして測定してみると図には示さないが、エンドトキシン注射24時間後にLTD₄に相当するピークがわずかながら検出された。また、HPLCによりLTD₄と判断された分画を回収した後に、一部の検体をRIAキットを用いて測定した結果、この分画には免疫学的に見てLTD₄と判断される物質が含まれていることが確認された。

IV 考 按

エンドトキシンによる眼炎症についての研究は、今まで実験モデルとして主にウサギを用いて行なわれてきたが、炎症という現象の解明に免疫学的な解析が必要不可欠となってきている今日では、モノクローナル抗体の利用が役に立つと考えられる。しかしながら、ウサギは遺伝的背景が十分に解明されていないので、ウサギに対するモノクローナル抗体の種類は限られているのが現状である。その点、ラットはウサギに比べると遺伝的背景もはっきりして、モノクローナル

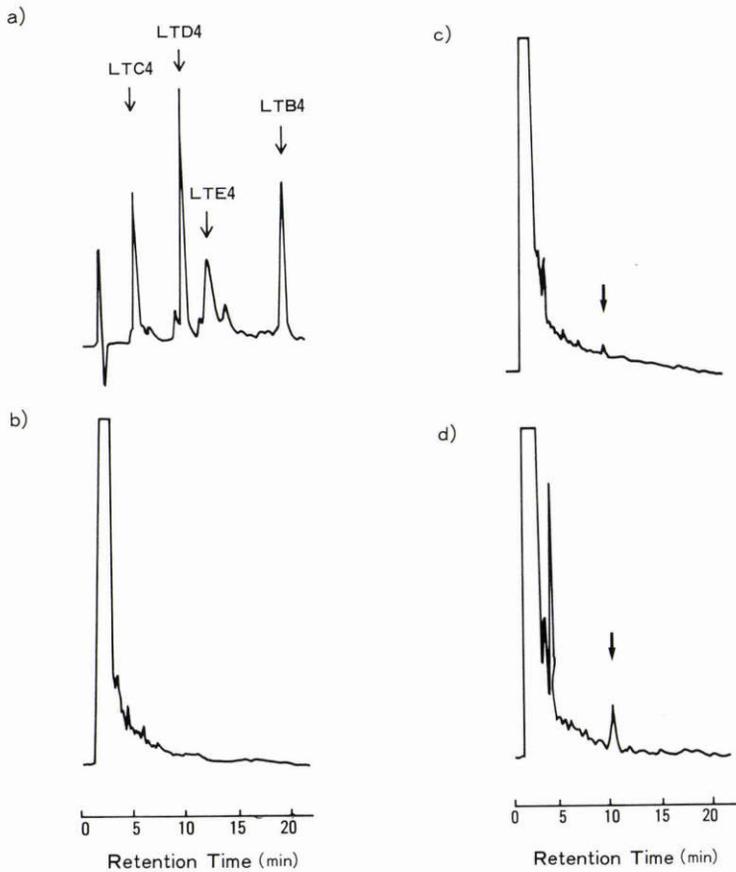


Fig. 6 Elution patterns of aqueous samples by HPLC following the systemic injection of *S. flexneri* endotoxin (1mg/rat) into the hind footpads.

a) Standard LTC₄, LTD₄, LTE₄ and LTB₄. b) Aqueous sample from saline-injected control rats. c) Aqueous sample from endotoxin-injected rats (6hr after the injection). d) Aqueous sample from endotoxin-injected rats (24hr after the injection).

Table 1 Leukotriene D₄ in aqueous humor measured by HPLC

Time (hr)	Concentration of LTD ₄ (ng/ml)	N
0	ND*	6
3	ND	5
6	6.4±1.3**	5
12	14.8±2.9	5
18	26.5±6.5	5
24	51.0±5.3	5
48	ND	5
72	ND	5

*ND: Not detected by HPLC.

**Results are shown as the mean±S.E.

抗体の種類も多い。また、モノクローナル抗体の利用に限らずいろいろな免疫学的手法を行なう上で、ラットを用いた場合の方が多岐にわたる実験を行なうのに適している。採取できる房水量が少ないという欠点はあるものの、このエンドトキシンによる眼炎症モデルを確立し、今後さらに詳しく解析を進める上で、ラットを用いたモデルの方が有用性が高いと考えられる。すでに我々は、ラットを用いて内因性ぶどう膜炎の実験モデルを作製し、眼及びその他の諸臓器の病理変化の動態について形態学的考察を行ない報告した⁶⁾。病理組織像を見ると、眼以外の諸臓器にはほとんど大きな変化が認められなかった。この理由については前報でも述べたように明らかにはされていないが、眼組織

が少量のエンドトキシンに対して感受性が特に高いものと考えられる。また、眼に起こった炎症は主に前眼部に強い変化が見られた。

今回、我々は炎症の指標として、前房水中のタンパク濃度、細胞数、瞳孔面積、ロイコトリエン濃度の変化について検討した。前房水中のタンパク濃度及び細胞数は、注射後3～6時間で両者共に急激な増加を示し、18～24時間でピークに達した。その後、前房水中タンパクは急速に減少するのに対し、前房内の細胞数は高いレベルを1週間以上維持していた。また、Fig. 2およびFig. 3において*S. flexneri*注射後の前房水中細胞数の立ち上がりパターンが異なっていることについては、ちょうどエンドトキシン全身注射の3時間後あたりを境にして細胞が前房水中に現れてくるものと考えられる。前房水中タンパク濃度の変動について、Bhattacharjeeら⁹⁾は注射後4時間後と24時間後の2峰性のピークを報告しているが、今回我々の実験では、3種類のエンドトキシンのいずれを用いても、注射18～24時間後に単一のピークを認めた。

瞳孔面積の変化について、一般的に動物の死後は散瞳状態となるが、今回の実験でもコントロールラットでは、殺処分直後に散瞳が観察された。一方、エンドトキシンを注射したラット眼においては、殺処分直後に強い縮瞳が観察された。この縮瞳は、エンドトキシン注射18～24時間後に最も強くなったが、1週間後にはコントロールのレベルに戻った。ここに述べた結果と前報の組織学的考察とを考え合わせると、この血液眼関門の破壊は一時的かつ可逆的なものであると思われる。

上述のごとく、エンドトキシンの足跡への注射により、前房水中のタンパク増加、細胞増加、及び縮瞳などの炎症反応が、注射後18～24時間をピークに生じることが明らかにされたが、これがどのような機序により生じるかについては、未だ一定の見解がない。今回、微量しか採取できないラットの房水を用いるこの実験系において、感度の上ではRIAに劣るが、一度に数種類の物質を定量できる可能性を持つHPLCを使うことができれば有用であると考え、HPLCによる測定を中心にロイコトリエンズの定量を行なった。その結果、LTD₄が眼内炎症の増強とともに前房水中に検出された。他のロイコトリエンズについては、1眼から得たサンプルを用いた場合にはHPLCでは測定不能であった。しかし、今回のデータでは示めさなかったが予備実験で数眼から得た房水をプールの検体では

LTB₄が微量ながら検出された。LTD₄は血管透過性亢進を起こすことが知られており⁹⁾¹⁰⁾、したがって房水中のタンパク増加の原因の一部はLTD₄によるものと考えられる。また、LTB₄は好中球遊走活性を促進することが知られており¹¹⁾¹²⁾、今回検出されたLTB₄がエンドトキシン注射後の細胞増加に関与していることを否定できない。今回の実験では、ロイコトリエン以外の化学伝達物質、例えばプロスタグランジンズ、サブスタンスP、ブラジキニン、VIP(血管作用性腸管ポリペプチド)などについての測定は行なっておらず、したがってエンドトキシン注射後の眼内炎症と化学伝達物質との相関については、これらを総合的に検討した後に明らかにされるものと思われる。現在我々の研究室では、これらの化学伝達物質について総合的に検討を進めている。

以上のような化学伝達物質の他に、エンドトキシンによる眼内炎症をmediateすると考えられる系としてIa抗原の関与が考えられる。すなわち、Kimら¹³⁾の報告によると、眼内に炎症を生じないような少量のエンドトキシンによっても、網膜血管内皮細胞や網膜色素上皮細胞にIa抗原が発現されることが明らかにされている。網膜血管内皮細胞や網膜色素上皮細胞は、血液眼関門のバリアーの存在する部位であり、さらにIa抗原は免疫応答及びそれに引き続く炎症反応に必要な不可欠な免疫応答遺伝子抗原である¹⁴⁾¹⁵⁾ことから、Ia抗原の発現が血液眼関門の破壊に関与していることが示唆される。さらに最近、Chanら¹⁷⁾により、S抗原によるラットの実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルにおいてもIa抗原の発現が報告されており、ますます眼炎症とIa抗原との関連性が重要なものになると考えられる。ラットはすでに述べたごとく、さまざまな免疫学的な解析が可能である実験動物であるので、これらの諸点について今後詳しく検討を加える予定である。

稿を終えるにあたり、御助言を下された東京大学医学部眼科学教室三島濟一教授、及びロイコトリエンの測定に関して御助言を下された東京大学医学部栄養学教室清水孝雄助教授に深謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第7回国際眼研究会議にて発表した。

文 献

- 1) Mergenhagen SE, Snyderman R, Gewurz H, et al: Significance of complement to the mechanism of action of endotoxin. *Curr Top Microbiol Immunol* 50: 37-77, 1969.

- 2) **Snyderman R, Phillips JK, Mergenhagen SE**: Biological activity of complement *in vivo*: Role of C_{5a} in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates. *J Exp Med* 13: 1131-1143, 1971.
- 3) **McKay DG, Margaretten W, Csavossy I**: An electron microscopic study of the effects of bacterial endotoxin on the blood vascular system. *Lab Invest* 15: 1815-1829, 1966.
- 4) **Beller FK**: The role of endotoxin in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Diath Hemorrh Suppl* 36: 125-249, 1969.
- 5) **Bhattacharjee P, Williams RN, Eakins KE**: An evaluation of ocular inflammation following the injection of bacterial endotoxin into the rat foot pad. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 196-202, 1983.
- 6) **奥村敦司, 望月 學**: 内因性ぶどう膜炎のエンドトキシン・モデル, 1. 形態学的研究, あたらしい眼科 4: 551-557, 1987.
- 7) **Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C**: The use of coomassie brilliant blue G-250 per chloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 64: 509-516, 1975.
- 8) **Bradford MM**: 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.
- 9) **Ueno A, Tanaka K, Katori M, et al**: Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotriene C₄ and D₄. *Prostaglandins* 21: 637-648, 1981.
- 10) **Hedqvist P, Dahlen SE, Bjork J**: Pulmonary and vascular actions of leukotrienes. *Adv Prostaglandin and Thromboxane Leukotriene Res* 9: 187-200, 1982.
- 11) **Smith MJ, Ford-Hutchinson AW, Bray MA**: Leukotriene B; A potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol* 32: 517-518, 1980.
- 12) **Palmer RM, Stepney RJ, Higgs GA, et al**: Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxigenase products on leukocytes of different species. *Prostaglandins* 20: 411-418, 1980.
- 13) **Kim MK, Palestine AG, Nussenblatt RB, et al**: Expression of class II antigen in endotoxin induced uveitis. *Curr Eye Res* 5: 869-876, 1986.
- 14) **Hirschberg H, Braathen LR, Thorsby E**: Antigen presentation by vascular endothelial cells and epidermal Langerhans cells; The role of HLA-DR. *Immunol Rev* 66: 57-77, 1982.
- 15) **Hood L, Steinmetz M, Malissen B**: Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Ann Rev Immunol* 1: 529-568, 1983.
- 16) **Unanue ER**: Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann Rev Immunol* 2: 395-428, 1984.
- 17) **Chan CC, Hooks JJ, Nussenblatt RB, et al**: Expression of Ia antigen on retinal pigment epithelium in experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* 5: 325-330, 1986.