

ロイコトリエン B₄の実験的、臨床的ぶどう膜炎における 意義について (図6, 表5)

藤原 久子*・滝川 泰*・片山 寿夫* (*川崎医大附属川崎病院眼科)
五島紳一郎**・岡本 繁*・中田 敬一*** (**岡山協立病院
***川崎病院医学教育研究部)

The Significance of Leucotriene B₄ in Experimental and Clinical Uveitis

Hisako Fujiwara, Yasushi Takigawa*, Toshio Katayama*

Shinichiro Goto**, Shigeru Okamoto* and Keiichi Nakata***

*Department of Ophthalmology, Kawasaki Hospital Kawasaki Medical School

**Okayama Kyoritsu Hospital

***Kawasaki Hospital Medical Research Center

要 約

ロイコトリエン B₄ (LTB₄) は、アラキドン酸代謝経路のリポキシゲナーゼ産物である。著者は、実験的アレルギー性眼内炎の際にリポキシゲナーゼが活性化されることを示した。今回はリポキシゲナーゼ産物のうち、白血球集積作用、白血球走化性の強い LTB₄ がぶどう膜炎において如何なる意義を有するかについて検討したので報告する。

LTB₄ を成熟白色雄家兎の硝子体に注入し、前房水中の蛋白と白血球数を測定した。また、エンドトキシンを硝子体に注入し実験的ぶどう膜炎をおこし、虹彩及び前房水中の LTB₄ を測定した。ぶどう膜炎患者血清中の LTB₄ 及び白内障手術前に採取した房水中の LTB₄ を測定した。結果は次のとおりである。LTB₄ は眼組織で合成され、眼組織においても LTB₄ は白血球集積作用がある。LTB₄ は実験的ぶどう膜炎の眼組織において増加する。パーチェット病患者血清では LTB₄ 値は高い。ぶどう膜炎患者の LTB₄ の血清レベルは、パーチェット病患者で特に重要である。(日眼 92: 209—214, 1988)

キーワード：ロイコトリエン B₄, 白血球集積作用, エンドトキシンぶどう膜炎, パーチェット病, 高速液体クロマトグラフィー併用の RIA

Abstract

We previously confirmed that lipoxygenase is activated in experimental allergic endophthalmitis. In this study, we investigated the role and significance of Leucotriene B₄ (LTB₄) in uveitis, which is one of the lipoxygenase products in the arachidonic acid pathway and causes strong leucocyte accumulation and chemotaxis. After LTB₄ was injected into the vitreous cavity of rabbits, protein and leucocyte level in the anterior chamber were estimated. Experimental uveitis was induced by injecting endotoxin into the vitreous cavity of white rabbits and the LTB₄ level in the iris and aqueous humor was measured. Serous LTB₄ levels were measured in patients with uveitis. LTB₄ levels from aqueous humor obtained from cataractous patients during operation were measured. The result showed that LTB₄ is biosynthesized in ocular tissues, in which it induced leucocyte accumulation. LTB₄ levels were elevated in aqueous humor and iris tissues with experimental uveitis induced by lipopolysaccharide.

別刷請求先：700 岡山市中山下 2—1—80 川崎医科大学附属川崎病院眼科 藤原 久子 (昭和62年 7 月22日受付)

Reprint requests to: Hisako Fujiwara, M.D. Dept. of Ophthalmol. Kawasaki Medical School

2-1-80 Nakasange Okayama City, 700 Japan

(Accepted July 22, 1987)

LTB_4 level was also increased in the serum of patients with Behçet's disease. The level of LTB_4 is an important parameter in patients with uveitis, especially with Behçet's disease. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 209-214, 1988)

Key words: Leukotriene B_4 , leucocyte accumulation, Endotoxin uveitis, Behçet's disease, RIA combined HPLC

I 緒 言

ロイコトリエン B_4 (LTB_4) はアラキドン酸代謝経路のリポキシゲナーゼ産物である。リポキシゲナーゼは主として血液細胞に豊富に存在し、その代謝物質は細胞遊走促進作用を持つものが多い。前報においてアルサス型眼内炎において、眼組織でのリポキシゲナーゼ代謝物質が増加することを示した¹⁾。今回はリポキシゲナーゼ産物のうち、白血球集積作用、白血球走化作用の強い LTB_4 がぶどう膜炎において如何なる意義を有するかについて検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

体重1.5~2.0kgの白色成熟雄家兔を用いた。また、正常人及びぶどう膜炎患者の血液、手術前に採取した老人性白内障患者の房水を用いた。

2. 実験方法

1) LTB_4 の家兔房水蛋白と白血球集積に及ぼす作用の検討

Prostaglandin E_2 (PGE_2) (フナコシ), LTB_4 (フナコシ)を250ng, 1 μ gの家兔硝子体に注入し、炎症の極期である24時間後に房水を採取した。房水中の蛋白をBio Rad Protein Assayにて測定した。また、Neubauer chamberにて白血球を計測した。

2) 家兔における実験的ぶどう膜炎の際の LTB_4 の動向についての検討

Lipopolysaccharide from *E. coli* (Sigma) の5 μ g/50 μ l 生食を硝子体に注入し、24時間後に房水及び虹彩組織を切除し LTB_4 を測定した。

3) 正常人及びぶどう膜炎患者の血液、手術時に採取した老人性白内障患者の房水中の LTB_4 の測定

採取にあたっては、採取後の LTB_4 の生合成の進行を阻止するため、リポキシゲナーゼ阻害剤であるカフェイン酸 (Sigma) で処理した器具を使用した。

4) LTB_4 の測定

虹彩組織、房水及び血清の LTB_4 の測定法を図1に

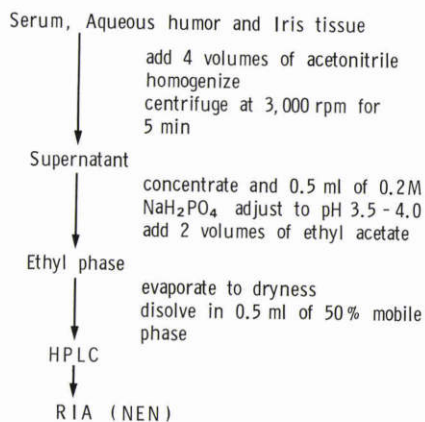


図1 Assay of LTB_4 in the iris tissue, aqueous humor and serum of rabbit

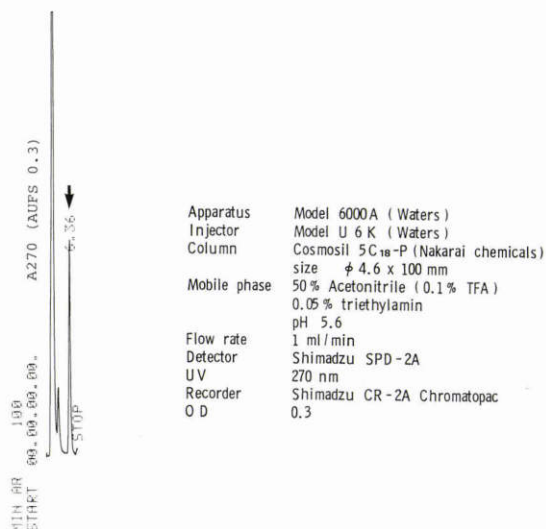
示した。4倍量のアセトニトリル (和光純薬) を加え、組織はホモジナイズし、3,000rpmで5分間遠沈し、上清を試料とした。試料を濃縮し、0.2M NaH_2PO_4 を0.5 mlを加え pH 3.5~4.0に調整した後、2倍量の酢酸エチルを加えた。酢酸エチル層をとり減圧乾固し、後述の高速液体クロマトグラフィーの移動相(0.1%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリル、0.05%トリエチルアミン pH 5.6)の50%溶液を0.5ml加えて、HPLCの試料とした。

5) HPLC の条件

装置は Model 6000A (Waters) で Injector は Model U 6K (Waters)、カラムは Cosmosil 5C₁₈-P (半井化学) $\phi 4.6 \times 100$ mm で移動相は50%アセトニトリル (0.1%TFAを含む) + 0.05%トリエチルアミン、pH 5.6であった。Detector は Shimadzu SPD-2A (島津) で UV は270nm で検出した。Recorder は Shimadzu CR-2A chromatopac (島津)、OD は0.3であった。

6) RIA

HPLCによって LTB_4 分画を得、 $[^3H]$ LTB_4 RIA kit (NEN) を用いて LTB_4 の測定を行った。

図2 Analysis of LTB₄ by RP-HPLC

III 実験結果

1. LTB₄とPGE₂の房水蛋白と白血球に対する効果

LTB₄とPGE₂は硝子体注入により房水中の蛋白を増加させるが、両者では有意差はなく、白血球集積作用はLTB₄が有意差をもって強く作用した(表1, 図3)。

2. エンドトキシンによる実験的ぶどう膜炎における眼組織中のLTB₄値

白色雄家兎の硝子体に Lipopolysaccharide from E.

表1 The effect of LTB₄ and PGE₂ on aqueous protein and leukocytes in aqueous humor

		Aqueous Protein (ng/ml)	Leukocytes/mm ³
LTB ₄	250 ng (N=3)	31.5 ± 14.8	22.5 ± 1.8*
	1 μ g (N=4)	34.7 ± 19	179.3 ± 30.7*
PGE ₂	250 ng (N=3)	38.3 ± 6.4	4.4 ± 1.9*
	1 μ g (N=4)	43.8 ± 11.9	53.5 ± 33.0*
Control (saline 0.1 ml)	(N=4)	6.8 ± 1.6	2.2 ± 2.5

24hr after intra vitreal injection
 Mean $\pm$ SD
 * P < 0.01

表2 LTB₄ levels in aqueous humor and iris of rabbit with experimental uveitis induced by lipopolysaccharide

	control eye	inflamed eye
Aqueous humor (pg/ml)	423.6 $\pm$ 102.5	539.0 $\pm$ 82.2
Iris tissue (pg/wwg)	905.0 $\pm$ 98.2*	1332.5 $\pm$ 237.2*

N = 4
 mean $\pm$ SE
 * P < 0.1

coli を注入すると房水中の LTB₄は上昇したが、硝子体に生食を注入した群とは有意差は認められなかった。しかし、虹彩組織ではぶどう膜炎発症群に有意に LTB₄は上昇した(表2, 図4)。

3. 正常人及びぶどう膜炎患者血清及び老人性白内障患者房水の LTB₄値

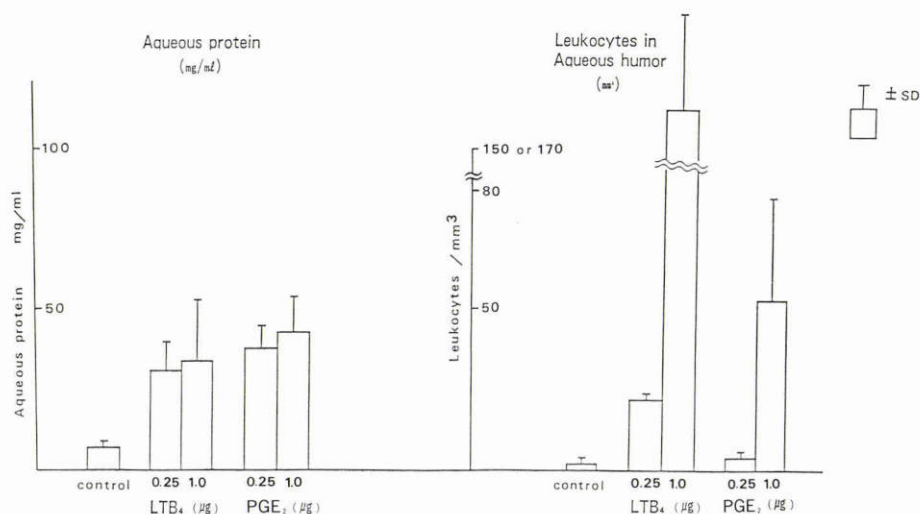


図3 The effects of intra vitreal injection of LTB₄ and PGE₂ on aqueous protein and accumulation of leukocytes

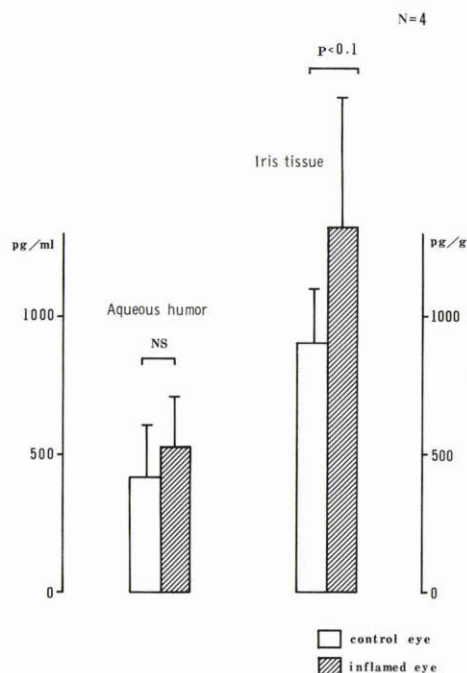


図4 LTB₄ levels in experimental immunologic uveitis in rabbit

正常人の血清 LTB₄値は19~76pg/mlであった(表3)。

それに対し房水中の LTB₄値は280~1,440pg/mlであり血清中より房水中に高い値を示した(表4)。

次にベーチェット病7例(完全型2, 不完全型5), Vogt-小柳-原田症候群5例, intermediate uveitis 2例の血清中の LTB₄値を表5に示した。1カ月以内

表3 LTB₄ levels of serum in normal subject

No	Age	Sex	LTB ₄ pg/ml
1	31	M	70
2	47	F	46
3	50	F	76
4	28	M	19
5	33	F	68
			55.8 ± 23.5 (19 - 76)

表4 LTB₄ levels in aqueous humor

(Aqueous humor of preoperative patients)

No	Age	Sex	Diagnosis	Complication	LTB ₄ pg/ml
1	79	M	Cataract	diabetes	1440
2	62	M	Cataract	none	350
3	72	F	Cataract	none	1110
4	75	F	Cataract	none	280
5	65	F	Cataract	Retinitis pigmentosa	390
					714 ± 526.7 (280 - 1440)

に全身性ステロイドが使用されたのはVogt-小柳-原田症候群の3例のみであった。正常人とぶどう膜炎患者血清中の LTB₄値をグラフに示した。ベーチェット患者血清中の LTB₄値は正常人のそれとくらべて有意差をもって高値を示した(図5)。

ぶどう膜炎患者の血清 LTB₄値と白血球数との相関をみたが、相関関係は認められなかった。

IV 考 按

LTB₄はアラキドン酸代謝経路のリポキシゲナーゼ

表5 Clinical data and LTB₄ levels in serum

patient No	Age	Sex	Diagnosis	Steroid within previous 1 month (topical, periocular, systemic)	Anterior chamber reaction	LTB ₄ (pg/ml)
1	52	M	Complete Behçet	topical betamethasone	hard KP	110
2	43	M	Complete Behçet	periocular injection of dexamethasone	2+ cell	128
3	49	F	Incomplete Behçet	none	none	100
4	42	M	Incomplete Behçet	topical betamethasone	1+ cell	130
5	60	M	Incomplete Behçet	topical betamethasone	hard KP	150
6	58	M	Incomplete Behçet	topical betamethasone	2+ cell	207
7	39	M	Incomplete Behçet	topical betamethasone	1+ cell	220
8	24	M	Vogt - Koyanagi - Harada	systemic and topical (prednisone and betamethasone)	none	76
9	44	M	Vogt - Koyanagi - Harada	systemic and topical (prednisone and betamethasone)	none	125
10	73	M	Vogt - Koyanagi - Harada	systemic and topical (dexamethasone and betamethasone)	2+ cell +1 flare mutton fat KP	86
11	65	M	Vogt - Koyanagi - Harada	topical betamethasone	none	203
12	55	F	Vogt - Koyanagi - Harada	topical betamethasone	2+ cell	110
13	47	F	Intermediate uveitis	topical betamethasone	hard KP	310
14	47	F	Intermediate uveitis	none	none	52

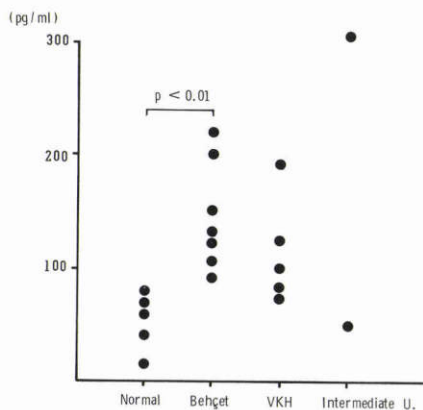


図5 Leukotriene B₄ levels of serum in normal subjects and in patients with uveitis

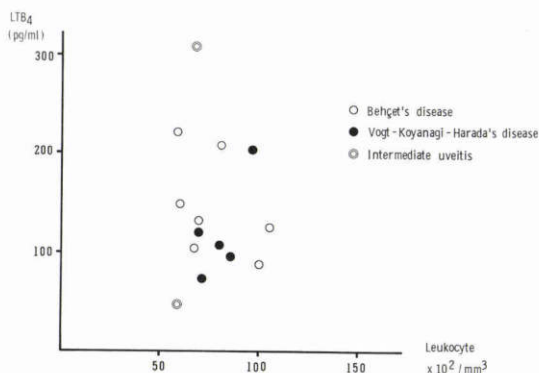


図6 LTB₄ levels of serum and leukocyte counts in patients with uveitis

代謝産物であり、きわめて強い白血球誘引作用ならびに白血球活性化作用がある。炎症時におこる血管透過性の亢進や白血球遊走能の亢進は重要な現象であり、LTB₄の炎症への関与は十分考慮されるところである。

LTB₄はリポキシゲナーゼ代謝産物ではもっとも強い白血球走化性を有するとされ²⁾、眼組織においても前房水中の白血球集積作用がもっとも強いことが明らかにされている³⁾⁴⁾。しかし、血管透過性亢進には関与しないとされる⁵⁾。

今回LTB₄を家兎の硝子体中に注入すると前房水の白血球の著明な集積作用が認められ、PGE₂とは著明な差違が認められた。

著者は、前報¹⁾において家兎のⅢ型アレルギー炎症の際に眼組織においてリポキシゲナーゼ代謝産物が増加することを示したが、今回エンドトキシンによる眼内炎の眼組織においてLTB₄が増加することを示し

た。

以上よりLTB₄は眼内炎の際には眼組織で生合成され、炎症における白血球集積現象に重要な役割をはたしていることが明らかである。

一方、人眼においてはParkerら⁶⁾はぶどう膜炎患者房水中のロイコトリエンを測定している。ぶどう膜炎患者の房水中のロイコトリエン値は、コントロール群のそれより50~66%程高い値を示したが、推計学的有意差を認めていない。

著者らは、房水中のLTB₄値が血清中のLTB₄値より高いことを明らかにした。これは、眼組織局所においてLTB₄が合成されるためと考えられた。

著者らは、倫理上の理由からぶどう膜炎患者の房水を採取することは不可能であったが、血清中のLTB₄を測定し正常人のそれと比較した。ベーチェット病患者においては、正常人に比し、有意差をもって血清中のLTB₄の高値が認められた。

ベーチェット病の病理組織学的特長の一つとして好中球の浸潤があげられている。

ベーチェット病では、眼発作前後に静脈血中の白血球とくに好中球の数が著明に増加し、また好中球の遊走活性が亢進することが明らかにされている⁷⁾。また、前房水中の白血球遊走活性も眼発作前に亢進するといわれている⁸⁾。

そしてベーチェット病患者の好中球機能の異常がblue nitro tetra zoliumの還元能の亢進⁹⁾やライソゾーム酵素活性の異常¹⁰⁾として指摘されている。

白血球遊走能の活性因子は血清と白血球それ自体の両方に存在するという考え¹¹⁾や、白血球の細胞質分画に存在するという考えがある¹²⁾。

また、ベーチェット病患者の多核白血球の微小管数が正常人のそれに比較して有意に増加しているという報告もある¹³⁾。

今回ベーチェット病患者の血清中のLTB₄値の上昇を認めたが、その由来は不明である。おそらく多核白血球と考えられるが、白血球数とは相関はなかった。著者らは白血球を分離してLTB₄を抽出し白血球中のLTB₄を測定したが、血清中の値と余り差違は認められなかった¹⁴⁾。LTB₄は好中球により ω 酸化され、20-OH-LTB₄、次いで20-COOH-LTB₄へと変換されるといわれる¹⁵⁾。白血球分離操作中にそれらの変化は十分起り得ると考えられ、LTB₄ ω 水酸化酵素の抑制剤が発見されていない現段階では、血清LTB₄の高値の由来は推察の域を出ない。

ベーチェット病患者の血清中の LTB_4 の高値は、本症の白血球遊走能の亢進を説明出来る一つの要素と考えられるが、今後発作時、寛解期などにおける動向について解析が必要である。

この論文の要旨は第91回日本眼科学会総会にて講演した。なお、この研究は昭和62年度文部省科学研究費(課題番号62570804)の援助を受けた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) 藤原久子：眼組織におけるリポキシゲナーゼ代謝物質と炎症について。眼紀 35: 671—676, 1984.
- 2) Palmer RMJ, Stepney GA, Higgs GA, Eakins KE: Chemokinetic activity of arachidonic acid lipoxigenase products on leucocytes of different species. Prostaglandins 20: 411—418, 1980.
- 3) Bhattacharjee P, Hammond B, Salmon JH, Stepney R, Eakins KE: Chemotactic response to some arachidonic acid lipoxigenase products in the rabbit eye. Eur J Pharmacol 73: 21—28, 1981.
- 4) Stjernschantz J, Sherk T, Borgeat P, Stears M: Intraocular effects of lipoxigenase pathway products in arachidonic acid metabolism. Acta Ophthalmol 62: 104—111, 1984.
- 5) Woodward DF, Ledgard SE: Comparison of leukotrienes as conjunctival microvascular permeability factors. Ophthalmic Res 17: 318—320, 1985.
- 6) Parker JA, Gotzl EJ, Friedlaender MH: Leukotrienes in the aqueous humor of patients with uveitis. Arch Ophthalmol 104: 722—724, 1986.
- 7) 松村則幸, 水島 裕: Behçet 病患者の白血球遊走による検討。厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和48年度研究業績, 190—193, 1974.
- 8) 増田寛次郎, 渋谷英美, 三島清一: Behçet 病前房水中の多核白血球遊走活性の経時的变化。眼臨 66: 734—737, 1972.
- 9) 森山穂積, 三村康男: ベーチェット病患者における末梢血好中球の NBT 還元試験。眼臨 69: 29—31, 1980.
- 10) 山田光則, 村井保一, 三村康男: ベーチェット病患者における好中球内 β -グルクロニダーゼ活性。日眼 84: 1099—1106, 1980.
- 11) Soble JD, Haim S, Obedeau N, Meshulam T, Merzbach D: Polymorphonuclear leucocyte function in Behçet's disease. J Clin Path 30: 250—253, 1977.
- 12) Takeuchi A, Kobayashi K, Mori M, Mizushima Y: The mechanism of hyperchemotaxis in Behçet's disease. J Rheumatol 8: 40—44, 1981.
- 13) 佐賀徳博, 松田英彦: ベーチェット病における多核白血球の微小管について。日眼 89: 349—353, 1985.
- 14) 藤原久子: 未発表データ.
- 15) 神奈木玲児: 酵素調製法と活性測定法。現代化学, 増刊 7, プロスタグランディン研究法(下), 14, 1987.

(第91回日眼総会原著)