

エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における 白血球と補体の動態 (図4, 表1)

板東 康晴・田内 芳仁・福宿 宏英 (徳島大学医学部眼科学教室)
松田 聡・三村 康男

要 約

ラットのエンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU) における末梢血白血球数, 房水白血球数および蛋白濃度, 血清および房水補体価 (CH50, C1, C3, C5), 血清 tumor necrosis factor (TNF) および各臓器の病理組織変化を経時的に検討した. 末梢血白血球数はエンドトキシン投与3~6時間後対照の約1/3に減少しその後房水白血球数および蛋白濃度に伴って増加した. 病理組織では3および24時間後虹彩, 肝, 肺および皮膚で小血管腔内に対照より多くの白血球が見られ血管内皮に付着していると思われる像も見られた. 血清補体価はC3の増加およびC5の一過性減少などの変動を認めた. 血清TNFは30分後から検出可能となり, 1.5時間後に3,500IU/mlと最高値をとりその後急激に減少し6時間以後は検出不能であった. EIUの発症には白血球の血管内皮への膠着, 補体の活性化, TNFの出現が関与している可能性が示唆された. (日眼会誌 93:369-374, 1989)

キーワード: エンドトキシン, ぶどう膜炎, 白血球膠着現象, 腫瘍壊死因子, 補体

The dynamics of leucocytes and complements in endotoxin induced uveitis

Yasuharu Bando, Yoshihito Tanouchi, Koei Fukuyado,
Satoshi Matsuda and Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine

Abstract

The dynamics of leukocytes, complement and tumor necrosis factor (TNF) were studied in endotoxin induced uveitis (EIU) in rats. Endotoxin was administered to footpads and the time courses of the following were examined: 1) the number of leukocytes in peripheral blood 2) the number of leukocytes and protein concentration of aqueous humor 3) complement (CH50, C1, C3, C5) in serum and aqueous humor 4) TNF in serum 5) histological changes in the eyes, lungs, liver, and skin. The number of leukocytes in peripheral blood decreased to one third that of controls during three to six hours after endotoxin administration, but increased thereafter along with the number of leukocytes and protein concentration in aqueous humor. More leukocytes were observed than in controls in the small vessels of the iris, lung, liver and skin, some of which attached to the vascular endothelium. Serum C3 increased and serum C5 transiently decreased after endotoxin administration. Serum TNF reached a peak (3500IU/ml) at 1.5 hours and rapidly decreased subsequently. It is suggested that the adhesion

別刷請求先: 770 徳島市蔵本町2-50 徳島大学医学部眼科学教室 板東 康晴
(昭和63年11月7日受付, 平成元年2月6日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuharu Bando, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Tokushima Univ.
2-50 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

(Received November, 7, 1988 and accepted in revised form February 6, 1989)

of leukocytes to vascular endothelium and the activation of complement system may play important roles in the development of EIU. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 369—374, 1989)

Key words: Endotoxin, uveitis, Leukocyte adhesion, Tumor necrosis factor, Complement

I 緒 言

ラットにエンドトキシンを局所または全身投与すると実験的ぶどう膜炎 (endotoxin induced uveitis, 以下 EIU と略す) を発症する事が知られている^{1)~3)}。エンドトキシンを全身投与するとまず一過性の顆粒球減少をきたし、それに続いて顆粒球増多⁴⁾や播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation, 以下 DIC と略す)⁵⁾⁶⁾を生じるが眼症状との関連についての報告は少ない⁷⁾。またエンドトキシンは補体の alternative pathway の活性化をうながすことも知られているが EIU との関連については一定の見解をみず^{7)~10)}、詳細な機序はいまだ不明である。今回我々は EIU の発生機序を解明するために、特に白血球数と補体価の経時的変化について検討した。

II 実験方法

実験動物は 8 週齢の雌、体重約 170g の近交系ルイスラット (日本チャールスリパー) を使用した。エンドトキシンは *Salmonella typhimurium* 由来の lipopolysaccharide (Difco, USA) 20mg を生理食塩水 20ml に溶解後、体重 1kg あたり 500 μ g の投与量でラットの後肢足蹠に皮下注射を行なった。また、生理食塩水を同様に投与したものを対照群とした。

1. 末梢血、前房水の採取

エンドトキシン投与後 0.5, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48 時間後に細隙灯および検眼鏡で前眼部と眼底を観察した後、5% pentobarbital sodium (ネプタール[®]) 0.1ml の腹腔内投与で麻酔、開胸し直ちに心腔内から採血した。その後過量の pentobarbital sodium の腹腔内投与で屠殺し、数分後前房水を 26 ゲージの注射針を用いて約 20 μ l 採取した。

2. 白血球数

採血した末梢血に少量のヘパリンを加えた後、直ちに白血球用メランジュールを用い Turk 液で染色し Burkner-Turk 算定盤で白血球数を算定した。前房水白血球数は房水 5 μ l を等量の Turk 液、染色し同様の方法で算定した。

3. 補体価

血清及び房水の CH50, C1, C3, C5 について Hong らの方法¹¹⁾により抗ウサギ赤血球抗体で感作した羊赤血球 (sensitized sheep erythrocytes, 以下 EA と略す) に対する溶血活性をマイクロタイター法で測定した。まずペロナール緩衝液 (Veronal buffer, 以下 VB と略す) 中で血清または房水を 10 倍希釈後マイクロタイタープレートで 25 μ l/well の 2 倍希釈系列を作成。CH50 の測定はこれに 1×10^8 個/ml の EA を 25 μ l 滴下し 37 $^{\circ}$ C で 60 分反応させた。C1 の測定はこれに 1×10^8 個/ml のラット C4 付着 EA を 25 μ l 滴下し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後、VB で 50 倍希釈したラット血清を 75 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。C3 の測定はこれに 1×10^8 個/ml のモルモット C1, 4 付着 EA を 25 μ l 加え、VB で 10 倍希釈した C2, 5, 6, 7, 8, 9 試薬 (Diamedix Corp, USA) を 75 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C で 60 分反応させた。C5 の測定はこれに 1×10^8 個/ml のモルモット C1, 4, 2, 3 付着 EA を 25 μ l 滴下し、VB で 50 倍希釈した C6, 7, 8, 9 試薬を 75 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C で 60 分反応させた。その後これらを 1,870g で 5 分間遠心し、50% 溶血を生じる希釈率を補体価とした。

4. 前房水蛋白濃度

ラット 3 匹 6 眼分の前房水を一つの試料として遠心した後、上清の蛋白濃度を測定した。測定には Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD Chemical Division, USA) を用い、クマシーブルー-G-250 の蛋白質結合時における吸光度を 595nm で比色定量し標準曲線から濃度を算出定した。

5. tumor necrosis factor (TNF) 活性

血清を TNF 高感受性細胞であるマウス由来 L-929 細胞とともに 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中で 18 時間培養後、クリスタルバイオレット液で 15~20 分間染色し、洗浄後 L-929 生細胞に取り込まれたクリスタルバイオレットの吸光度から TNF 活性を測定した¹²⁾。

6. 組織学的観察

エンドトキシン投与 3 時間および 24 時間後にラットを屠殺し、皮膚、腹筋、肝、肺の一部および眼球を摘出した。10%ホルマリンで固定、パラフィン包埋の後、ヘマトキシリンエオジン染色を行ない組織切片を光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. 前眼部および眼底所見

エンドトキシン投与3時間後から虹彩の充血が認められ、24時間後に虹彩炎はピークとなった。個体によって程度の差はあったが虹彩充血、縮瞳、およびフィブリンの折出がみられた。48時間後にはこれらの変化は減少した。一方眼底ではエンドトキシン投与6時間後から網膜血管の拡張が認められ、その後次第に増強し、24時間後に最高に達した。この時、網膜および脈絡膜血管の著明な拡張が認められ、一部に網膜出血も出現した。48時間後にはこれらの変化は減少した。

2. 末梢血白血球数

末梢血白血球数は対照群で $2,600 \pm 240$ 個/mm³であった。これはエンドトキシン投与30分後から減少し、投与3~6時間後には約700個/mm³と最低値をとり、その後増加し投与12時間後には $2,200$ 個/mm³と対照群と同程度の値になり、投与24時間後には $3,800$ 個/mm³、投与48時間後には $5,000$ 個/mm³となった(図1)。

3. 前房水中白血球数

房水中の白血球数は対照群およびエンドトキシン投与1.5時間後までは10個/mm³以下であった。これは投与3時間後から増加し始め、投与24時間後には最高値の $6,300 \pm 3,200$ 個/mm³となり、その後減少した(図1)。

4. 房水蛋白濃度

房水中の蛋白濃度は、対照群およびエンドトキシン投与後3時間以内では1.0~2.0mg/mlの範囲内であった。これはその後増加し、エンドトキシン投与24時間後にはピークの32.0mg/mlとなり、48時間後には6.3mg/mlとなった(図1)。

5. 末梢血補体価

CH50, C1, C3, C5とも、以下対照群との比率で表現すると、CH50はエンドトキシン投与30分後に対照群の約1.4倍に上昇し、その後減少し、投与24時間後には0.7倍となった。C1はエンドトキシン投与後1.5時間後に対照群の1.6倍に上昇した後減少し、投与24時間後には0.7倍となり、その後再び上昇し、48時間後には1.6倍となった。C3はエンドトキシン投与後増加し、6時間後には対照群の3.0倍、24時間後には6.2倍となり、その後減少した。C5はエンドトキシン投与直後から減少し3時間後には対照群の0.7倍となり、その後増加し、48時間後には2.0倍となった(図2)。

6. 前房水補体価

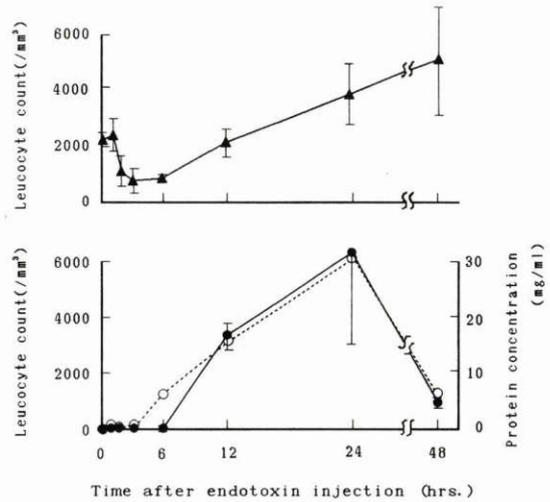


図1 エンドトキシン投与後の末梢血白血球数(▲—▲)、房水白血球数(●—●)および房水蛋白濃度(○---○)の経時的変化。結果は平均±標準偏差で表す。(n=6~9)

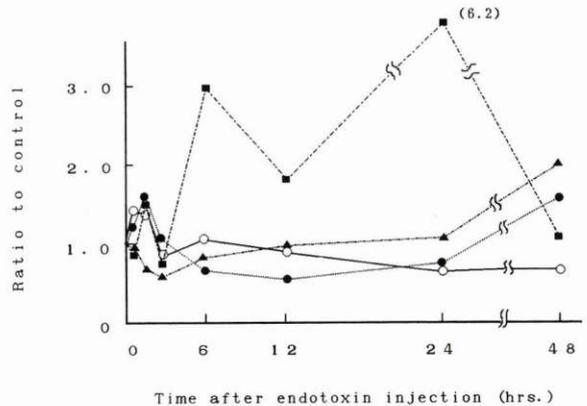


図2 エンドトキシン投与後血清補体価の経時的変化。各補体価は対照群との比で表す。(○—○ CH50, ●—● C1, ■---■ C3, ▲---▲ C5)

対照群およびエンドトキシン投与後6時間後まではほとんど検出されなかった。CH50, C1, C3, C5とも24時間後にもっとも高値となり、そのときのそれぞれの血清値に対する比率で表現するとそれぞれ、約0.4倍, 0.2倍, 0.1倍, 0.1倍と低値であった。

7. TNF

対照群では検出限界以下であった。エンドトキシン投与30分後から検出可能となり1.5時間後には $3,500$ IU/mlと最高値をとり、その後減少して投与6時間以後では検出不能であった(表1)。

表1 エンドトキシン投与後の血清 TNF 値の経時的变化(N.D.: 検出不能)

Time after Endotoxin Administration (hrs.)	Serum TNF (IU/ml) n=3
0	N.D.
0.5	198±117
1.5	3499±612
3	0.25±0.09
6	N.D.
12	N.D.
24	N.D.
48	N.D.



図3 エンドトキシン投与3時間後の虹彩組織所見。拡張した血管の内皮に隣接した好中球(矢印)が認められる(ヘマトキシリン-エオジン染色, ×1,000)。

8. 病理組織学的変化

眼球ではエンドトキシン投与3時間後虹彩毛様体の血管は軽度拡張し、虹彩や角膜輪部の血管腔に好中球がみられ、血管壁に付着していると思われる像もみられた(図3)。24時間後には虹彩毛様体の血管拡張はさらに著明となり、白血球の血管外浸潤と虹彩浮腫がみられた。肝では3時間後血管腔および類洞内に対照に比多数の白血球が見られ、血管壁や類洞壁に付着していると思われる像が多く見られた(図4)。24時間後も同様の所見を認めた。皮膚及び肺でも3時間後および24時間後の血管腔に対照より多くの白血球を認め

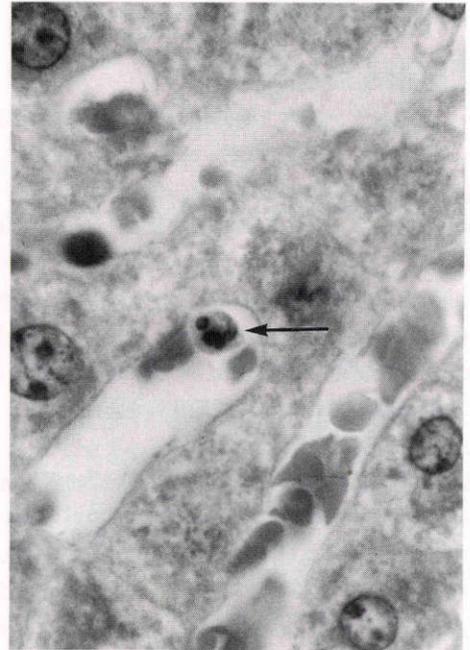


図4 エンドトキシン投与3時間後の肝の組織所見。類洞壁に隣接した好中球(矢印)を認める(ヘマトキシリン-エオジン染色, ×1,000)。

た。腹筋は血管成分が少ないため著明な変化は観察できなかった。

IV 考 按

エンドトキシンの全身投与はDICやシュワルツマン現象およびショックの実験モデルとして従来より研究されているが⁵⁾、全身的变化とEIUとの関連についての報告は少ない⁷⁾。エンドトキシンを全身投与すると一過性顆粒球減少の後、著明な顆粒球増多が出現することが以前から報告されている⁴⁾。この顆粒球減少が生じる際、細静脈内皮細胞への白血球の膠着現象が生じ、膠着した白血球から活性酸素やライソゾーム酵素が放出され、血管内皮障害の発生に重要な役割を果たすとされている¹³⁾¹⁴⁾。我々の結果でもエンドトキシン投与後末梢血の白血球数は減少し、3~6時間後には対照群の約1/3と著明に減少しその後増加し始め、24時間後には対照群の約2倍になった。組織学的にはエンドトキシン投与3時間後、虹彩や角膜輪部の小血管壁に白血球が付着していると思われる像がみられた。また肝、肺、皮膚など眼球以外の組織でも3時間後小血管や類洞に同様の所見がみられた。このように上記の膠着現象が各臓器の小血管に生じたため、循環血中

の白血球数が減少したと考えられた。

一方 EIU における補体の関与については現在まで一定の見解をみないが⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾、今回血清および房水の CH50, C1, C3, C5 を測定し、興味ある変動をみとめた。C3a はプロスタグランディン、血小板活性化因子、ヒスタミン、セロトニンをはじめとする化学伝達物質とともに血管透過性亢進に対し重要な役割を果たす⁸⁾¹⁵⁾と考えられている。今回の実験ではエンドトキシン投与 6 時間から 24 時間後で血清 C3 の高値を認め C3 が大量に産生されたことがうかがわれ血管透過性を亢進させ炎症を持続させる因子のひとつとして重要な働きをしていると考えられた。血清 C5 は 30 分後から減少し 3 時間後に最低値を示し、エンドトキシンにより補体の alternative pathway が活性化され C5 が消費されたことが考えられる。C5a はロイコトリエンや TNF、局所の血流速度とならび⁸⁾¹³⁾¹⁶⁾好中球の膠着現象を統御する因子として重要とされており、現在 C5 の活性化を阻害する薬剤の EIU に対する影響を検討中である。房水補体価はいずれも低値で血清から移行したと考えられる程度の値であった。

このように EIU 発症の機序として膠着白血球を介する血管内皮障害ならびに血管透過性亢進によって血液房水柵の破綻を生じている可能性が示唆される。しかし仮に早期に血液房水柵の破綻が生じたとしても、この時期には循環血液中の白血球数が減少しているため前房へ移行する白血球数が限られることが考えられ、血中の白血球数の回復とともに次第に前房への白血球の移行が起こることが今回の結果から推測される。

最近エンドトキシンはマクロファージに作用し TNF (tumor necrosis factor) の産生をうながすことが報告されている¹⁷⁾。TNF が血管内皮に作用すると好中球、単球、リンパ球が付着しやすくなり¹⁸⁾、さらに血管内皮細胞の細胞間連絡を解離させるとともに基底膜のフィブロネクチンを減少させ¹⁸⁾、炎症反応において重要な働きをおこなっているとされている。家兎にエンドトキシンを静注すると血中 TNF は静注後 15 分から上昇し 2 時間でピークになりその後下降するとされている¹⁹⁾。我々の結果ではエンドトキシン投与 30 分後には TNF は上昇しており、90 分で最高値を示し、3 時間後には低下していた。エンドトキシン投与早期における TNF の出現は EIU の発現に重要な役割を果たすものと考えられる。今後 TNF と EIU との関わりについてもさらに検討を加える予定である。

本研究は昭和 63 年度厚生省特定疾患研究費「ペーチェット病調査研究」の補助を受けた。

文 献

- 1) **Bhattacharjee P, Phylactos A:** Increased prostaglandin synthetase activity in inflamed tissues of the rabbit eye. *Eur J Pharmacol* 44: 75—80, 1977.
- 2) **Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, et al:** Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 286: 611—613, 1980.
- 3) **奥村教司, 望月 学:** 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. *日眼* 91: 1147—1153, 1987.
- 4) **Mechanic RC, Frei E, Landy M, et al:** Quantitative studies of human leukocytic and febrile response to single and repeated doses of purified bacterial endotoxin. *J Clin Invest* 41: 162—172, 1962.
- 5) **Morrison DC, Ulevitch RJ:** The effect of bacterial endotoxins on host mediation system. *Am j Pathol* 93: 527—617, 1978.
- 6) **Isobe J:** Platelet kinetic study in DIC. *Acta Haematologica Jpn* 41: 42—50, 1978.
- 7) **Rosenbaum JT, Wong K, Perez HD, et al:** Characterization of endotoxin-induced C5-derived chemotactic activity in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1184—1191, 1984.
- 8) **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.
- 9) **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.
- 10) **Howes EL, Wong KL, Hartiala KT, et al:** Complement and polymorphonuclear leukocytes do not determine the vascular permeability induced by intraocular LPS. *Am J Pathol* 118: 35—42, 1985.
- 11) **Hong K, Kinoshita T, Miyazaki W, et al:** An anticomplementary agent, K-76 monocarboxylic acid: Its site and mechanism of inhibition of the complement activation cascade. *J Immunol* 122: 2418—2423, 1979.
- 12) **Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, et al:** Effect of interleukin 2, Interferon- γ , and mitogens on the productin of tumor necrosis factors α and β . *J Immunol* 135: 2492—2497, 1985.

- 13) 末松 誠, 土屋雅春: 微小循環障害における活性酸素の関与. 血管内皮細胞障害における oxidative stress の意義. 医学のあゆみ 142: 729-732, 1987.
- 14) Yamada M, Shichi H, Yuasa T, et al: Superoxide in ocular inflammation. Human and experimental uveitis. J Free Radicals Biol Med 2: 111-117, 1986.
- 15) Cousins SW, Guss RB, Howes EL, et al: Endotoxin-induced uveitis in the rat: Observations on altered vascular permeability, clinical findings, and histology. Exp Eye Res 39: 665-676, 1984.
- 16) Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, et al: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8667-8671, 1985.
- 17) Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al: Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature 316: 552-554, 1985.
- 18) Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W, et al: Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. Am J Pathol 123: 16-24, 1986.
- 19) Beutler BA, Milsark IW, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor: Production, distribution and metabolic fate in vivo. J Immunol 135: 3972-3977, 1985.