

実験的エンドトキシン誘発播種性血管内凝固における 内因性ぶどう膜炎

三木 聡, 田内 芳仁, 大谷 知子, 山口 景子, 三村 康男
徳島大学医学部眼科学教室

要 約

エンドトキシン2回投与により発症する家兎の実験的播種性血管内凝固(DIC)モデルで内因性ぶどう膜炎発現の有無とその発現機序解明のため前房フレア値, 末梢血白血球数, 腫瘍壊死因子(TNF)活性および眼球, 肺, 肝, 腎の病理組織変化を経時的に検討した。初回エンドトキシン投与直後から末梢血白血球数の減少とTNF活性の上昇がおり, やや遅れて前房フレア値が上昇した。2回目エンドトキシン投与後も初回投与時と同様の反応を示したが, TNF活性は初回の20%であった。病理組織では2回目投与3時間後に各臓器にフィブリン血栓がみられ, DICが発現しており, また内因性ぶどう膜炎の発現も認められた。今回の実験では, エンドトキシン投与後のDIC発症過程における末梢血白血球数とTNF活性が血液房水柵の破綻に対し重要な作用を有する可能性が示された。(日眼会誌 95:152-157, 1991)

キーワード: 内因性ぶどう膜炎, エンドトキシン誘発播種性血管内凝固, 前房フレア値, 末梢血白血球数, 腫瘍壊死因子(TNF)活性

Endogenous Uveitis in Disseminated Intravascular Coagulation Induced by Endotoxin

Satoshi Miki, Yoshihito Tanouchi, Tomoko Otani,
Keiko Yamaguchi and Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine

Abstract

A study was made of endogenous uveitis in experimental disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. Endotoxin was injected intravenously twice with a 24-hour interval. The time courses of the following were examined: 1) aqueous flare using a laser flare-cell meter 2) the number of leukocytes in the peripheral blood 3) the tumor necrosis factor (TNF) activity in the serum and 4) histopathological changes in the eye, lung, liver and kidney. Aqueous flare increased at 1 hour and was maximal at 6 hours, accompanied by a rapid increase in TNF activity at 1 hour following the first endotoxin administration. The number of leukocytes decreased to 963 ± 266 cells/mm³ at 1.5 hours with subsequent leukocytosis within 12 hours. After the second injection of endotoxin, the aqueous flare peaked in 30 minutes and was twice as high as the first peak. Leukocyte number and TNF activity showed the same behavior. However, TNF activity was 20% that of the first peak. Histopathological examination indicated fibrin formation in the small vessels of systemic organs within 3 hours follow-

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 三木 聡
(平成元年10月17日受付, 平成2年9月5日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Miki, M.D. Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine.

2-50 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

(Received October 17, 1989 and accepted in revised form September 5, 1990)

ing the second administration of endotoxin. Endotoxin induced uveitis was induced in experimental DIC, and leukocytes and TNF activity may thus perform important roles. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 152-157, 1991)

Key words: Endogenous induced uveitis, Disseminated intravascular coagulation, Aqueous flare, Number of leukocytes, Tumor necrosis factor activity

I 緒 言

ウサギにエンドトキシンを全身投与すると実験的內因性ぶどう膜炎を発症することが知られているが、発現機序にはいまだ不明な点が多い¹⁾²⁾。また、エンドトキシンがペーチェット病の発症に関与するという報告もある³⁾。一方、エンドトキシンの2度の全身投与により播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation, 以下 DIC と略す) が発現することが知られており、その機序については詳細な研究がなされている^{4)~6)}。今回我々はペーチェット病をはじめとする難治性ぶどう膜炎の発現機序解明の手がかりになることを期待して、エンドトキシンを2回全身投与して作った実験的 DIC を用い、内因性ぶどう膜炎の発現の有無と前房中の蛋白濃度、末梢白血球数および血清 tumor necrosis factor (以下 TNF と略す) 活性を経時的に検討した。

II 実験方法

実験動物は体重約1.5~2.5kgの有色家兎9羽を使用した。エンドトキシンは *Salmonella typhimurium* 由来の lipopolysaccharide (Difco, USA) で、20mg を生理食塩水100ml に溶解後、体重1kg あたり200 μ g の投与量で耳静脈に静注し、さらに24時間後に同量静注した⁷⁾。

1. 前房フレアー値の測定

エンドトキシン初回投与0.5, 1.5, 3, 6, 12, 24時間後と2回目投与0.5, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48時間後にレーザーフレアーセルメーター (クリード1000, 興和社製) を用いて前房フレアー値を測定した⁸⁾。測定方法は、ミドリリン P[®] 散瞳下で5回反復測定をおこない平均値をとった。

2. 末梢白血球数

エンドトキシン初回投与0.5, 1.5, 3, 6, 12, 24時間後と2回目投与0.5, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48時間後にエンドトキシン静注の対側の耳静脈から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 Türk 液で染色し Bürker-Türk 算定盤で白血球数を算定した。

3. 血清 TNF 活性

エンドトキシン初回投与0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6時間後と2回目投与0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6時間後の血清を TNF 高感受性細胞であるマウス由来 L-929 線維芽細胞とともに37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 中で18時間培養後、クリスタルパイオレット液で15~20分間固定染色し、洗浄後 L-929 細胞に取り込まれたクリスタルパイオレットの吸光度から TNF 活性を測定した^{9)~11)}。

4. 病理組織学的観察

エンドトキシン初回投与3時間後、2回目投与3時間後に家兎を過量の5%pentobarbital sodium (ネンブタール[®]) で屠殺し、眼球、肺、肝、腎を摘出した。10%ホルマリンで固定、パラフィン包埋の後、各臓器のリンタングステン酸ヘマトキシリン染色 (以下 PTAH 染色と略す) と虹彩毛様体のヘマトキシリンエオジン染色 (以下 HE 染色と略す) を行い組織切片を光学顕微鏡で観察した。

5. 統計的処理は t 検定を用いておこなった。

III 結 果

1. 前房フレアー値

初回エンドトキシン投与1時間後から前房フレアーが増加しはじめ、6時間後に292 \pm 115フォトンカウント/msec とピークに達し、その後徐々に低下した。2回目エンドトキシン投与後は、30分後から急激に増加しはじめ、3時間後に1,230 \pm 520フォトンカウント/msec とピークになり、その後徐々に低下し、約5日後に10.9 \pm 5.2とほぼ正常値になった。初回投与時に比較し、2回目投与時の前房フレアー値のピークは有意 ($p < 0.01$) に上昇していた (図1)。

2. 末梢白血球数

末梢白血球数はエンドトキシン投与前で3,725 \pm 1,121個/mm³であった。初回エンドトキシン投与30分後から減少しはじめ、1.5時間後には963 \pm 266個/mm³と有意 ($p < 0.05$) に低下し、その後増加し投与12時間

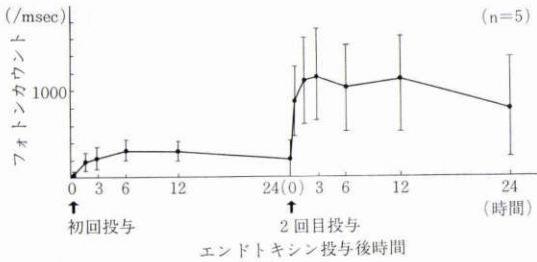


図1 エンドトキシン投与後の前房フレアー値。初回投与6時間後と2回目投与3時間後にピークに達した。

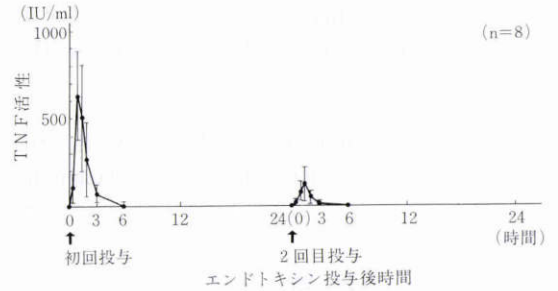


図3 エンドトキシン投与後のTNF活性。初回投与1時間後と2回目投与1.5時間後にピークに達した。

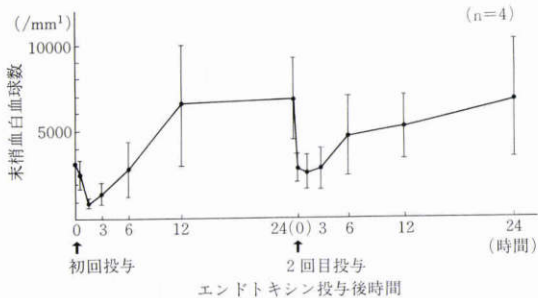


図2 エンドトキシン投与後の末梢血白血球数。初回投与1.5時間後と2回目投与1.5時間後に最低値をとった。

後には $6,845 \pm 2,664$ 個/ mm^3 ($p < 0.05$)となり投与前の約2倍となった。2回目エンドトキシン投与後も30分後から減少しはじめ、1.5時間後に $2,513 \pm 1,107$ 個/ mm^3 ($p < 0.05$)と最低値をとり、その後増加し投与24時間後には $6,838 \pm 3,443$ 個/ mm^3 ($p < 0.05$)となった(図2)。

3. 血清TNF活性

エンドトキシン投与前の家兎血清では検出限界以下であった。初回エンドトキシン投与30分後から検出可能となり、1時間後には 628 ± 365 IU/mlと最高値をとり、その後急激に減少して6時間後には検出限界以下であった。2回目のエンドトキシン投与後も30分後から検出可能となり、1.5時間後には 120 ± 112 IU/mlと最高値をとり、その後急激に減少した。ただ、2回目のTNF活性の最高値は1回目の約20%にすぎなかった(図3)。

4. 病理組織学的変化

眼球、肺、肝、腎ともフィブリン血栓は初回エンドトキシン投与3時間後には認められなかった。2回目投与3時間後には、虹彩毛様体の毛細血管内、肺毛細

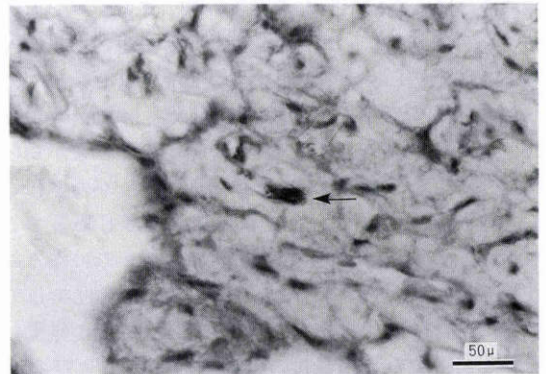


図4A エンドトキシン2回目投与3時間後の虹彩組織所見。毛細血管内にフィブリン血栓(矢印)が認められる。(PTAH染色, $\times 160$)

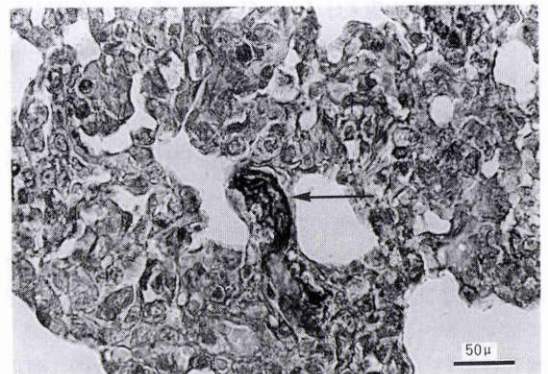


図4B エンドトキシン2回目投与3時間後の肺組織所見。毛細血管内に多数のフィブリン血栓(矢印)が認められる。(PTAH染色, $\times 160$)

血管内、肝類洞内、腎糸球体毛細血管内に深青色に染色されたフィブリン血栓が認められた(図4A~D)。すなわち2回目投与3時間後には各臓器にフィブリン血

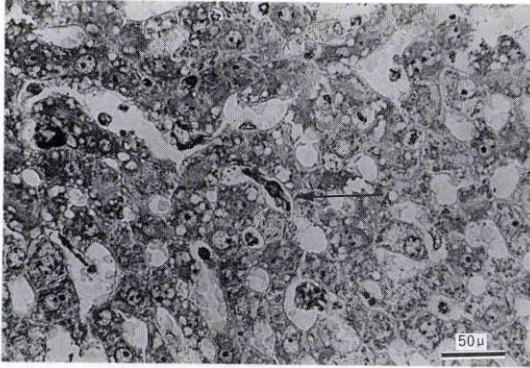


図4C エンドトキシン2回目投与3時間後の肝組織所見. 類洞内にフィブリン血栓(矢印)が認められる.(PTAH染色, ×160)

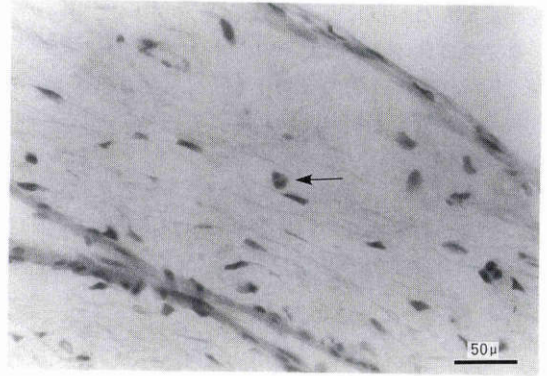


図5B エンドトキシン2回目投与3時間後の虹彩所見. 間質に好中球(矢印)が認められる.(HE染色, ×160)



図4D エンドトキシン2回目投与3時間後の腎組織所見. 糸球体毛細血管内に多数のフィブリン血栓(矢印)が認められる.(PTAH染色, ×160)

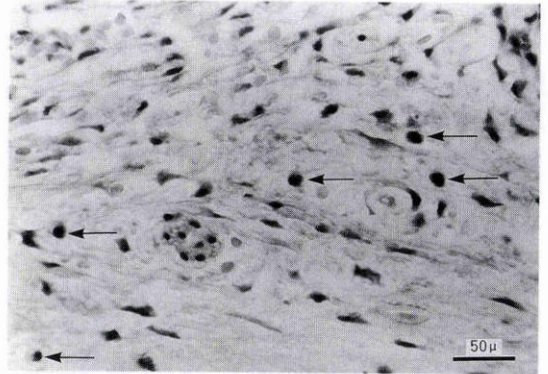


図5C エンドトキシン2回目投与3時間後の毛様体所見. 間質に好中球(矢印)が認められる.(HE染色, ×160)

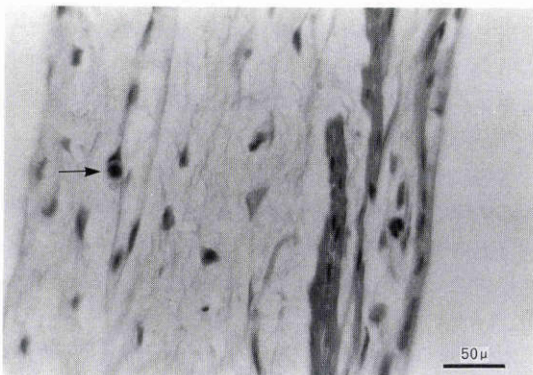


図5A エンドトキシン初回投与3時間後の虹彩所見. 間質に好中球(矢印)が認められる.(HE染色, ×160)

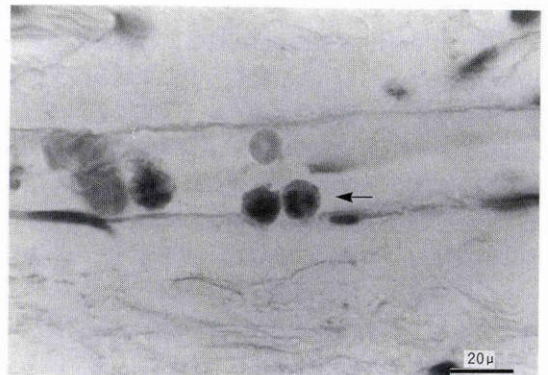


図5D エンドトキシン初回投与3時間後の虹彩所見. 血管内皮に隣接した好中球(矢印)が認められる.(HE染色, ×400)

栓が認められ、DICが発現していた。

虹彩毛様体のHE染色では、エンドトキシン初回投与3時間後も、2回目投与3時間後も間質に好中球が認められ、虹彩毛様体炎が起こっていたが、細胞浸潤の程度は2回目投与後がやや強いもののいずれも軽度であった。また、初回投与3時間後の虹彩には血管内皮に隣接した好中球が認められた。炎症細胞は、いずれも多核球であり単核球は認められなかった(図5A~D)。

IV 考 按

実験的DICにおける2度のエンドトキシン注射のうち初回投与は準備注射、2回目の投与は惹起注射と呼ばれている¹²⁾。DICにおける準備注射の意味については、従来から網内系をブロックすることにより惹起注射後のフィブリン形成を容易にすると考えられている¹³⁾¹⁴⁾。我々の組織学的検索の結果でも、眼球、肺、肝、腎とも準備注射後にはフィブリン血栓は認められず、惹起注射3時間後にはじめてフィブリン血栓が認められ、エンドトキシンを2回投与してはじめてDICが惹起されている。

家兎にエンドトキシンを1回投与すると内因性ぶどう膜炎が発症することは既に知られているが¹⁾、エンドトキシン2回投与によるDIC発症時の眼症状は知られていない。今回の実験ではDICの発症に伴って、初回投与後よりさらに強いぶどう膜炎が発症した。ただこのぶどう膜炎は、前房フレアーの高値に比して虹彩毛様体組織の炎症が軽度であり、実験的自己免疫性ぶどう膜炎のような強い組織破壊は認められなかった。現在のところ、これらの理由は不明であり、今後の検討を要する。

一方、末梢血白血球数は初回投与後から急激に減少し始めた。このことは末梢血管への白血球の膠着が原因と考えられる。我々は前報¹⁵⁾でラットのendotoxin induced uveitisにおける末梢血白血球数減少は虹彩、肝、肺、皮膚などの小血管への膠着によることを示した。今回も同様な膠着現象が起こっていた。白血球が虹彩毛様体の小血管の内皮細胞に膠着すると、白血球とくに好中球から活性酸素、ライソゾーム酵素をはじめとするさまざまなケミカルメディエーターが放出される¹⁶⁾。白血球の膠着現象にはTNFが大きく関与していることが知られており¹⁷⁾、今回の結果でも白血球数の減少とはほぼ同時に血液中のTNF活性値が上昇していることからその関与が強く考えられる。TNFは

エンドトキシンによりマクロファージが刺激されると産生され、血管内皮細胞の細胞間結合の解離、基底膜のフィブロネクチンを減少させ、血漿成分や細胞の血管外漏出を引き起こし、血管内皮細胞に新しい抗原を誘導する作用を有している⁹⁾¹⁰⁾¹⁸⁾。実際、TNFを硝子体中に投与すると虹彩毛様体炎が起こることをRosenbaumらが報告している¹⁹⁾。また最近はベーチェット病におけるTNFの関与についても研究が進められており、ベーチェット病患者の培養単核球で高いTNF産生量を示す例が認められている²⁰⁾。このことはベーチェット病患者の血液房水柵破綻にTNFが大きく関与している可能性を示しており、ベーチェット病の眼発作の発生機序として、何らかの誘因によりマクロファージが刺激されTNFを産生し、それによって白血球が血管内皮細胞に膠着して好中球が活性化されケミカルメディエーターを放出し、血液房水柵が破壊されるのではないかと我々は考えている。

2回目のエンドトキシン投与後はTNF活性が低いにもかかわらず前房中のフレアーはさらに強くなった。1回目投与24時間後には炎症が持続しており、血液房水柵の破綻が、機能的であれ一過性の器質的であれ、その修復がまだされていないことより、この時点で再びエンドトキシンを投与すると1回目よりも軽度の白血球膠着でも破壊はさらに強くなることが十分考えられる。TNF活性が2回目で低かった理由としてマクロファージがエンドトキシンに反応しなかったためか、あるいはTNFが1回目で充分放出されて枯渇してしまったことが考えられる。

マクロファージはまた、刺激によりplasminogen activatorやplasminogen activator inhibitorを放出することが知られており、微小循環系でのフィブリン析出・溶解の調節にかかわっていると考えられている²¹⁾。今回の実験でDIC発症過程においてぶどう膜炎も発症しており、いずれの発症にもマクロファージが大きな役割を果たしていることが示唆された。

さらにベーチェット病患者では、微小循環系での血栓が病理組織学的に認められており²²⁾、今回の実験の病理組織所見を考え合わせると、この実験モデルが難治性ぶどう膜炎のモデルとなる可能性があると思われる。

本研究は平成元年度厚生省特定疾患研究費「ベ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

- prostagrandin synthetase activity in inflamed tissue of the rabbit eye. *Eur J Pharmacol* 44: 75—80, 1977.
- 2) **Rosenbaum JT, Hartiala KT, Webster RO, et al**: Antiinflammatory effect of endotoxin. *Am J Pathol* 113: 291—299, 1983.
 - 3) 野口義國, 古澤修一, 野口ゆかり, 他: ペーチェット病における抗 LPS 抗体の研究. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和55年度研究業績, 135—140, 1981.
 - 4) **Apitz K**: A study of the generalized shwartzman phenomenon. *J Immunol* 29: 255, 1935.
 - 5) **Beller FK**: The role of endotoxin in disseminated intravascular coagulation. In: *Disseminated Intravascular Coagulation*. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 1969, 125.
 - 6) **McKay DG, Shapiro SS**: Altertation in the blood coagulation system induced by bacterial endotoxin. 1. In vivo generalized shwartzman reaction. *J Exp Med* 107: 353, 1958.
 - 7) **Morrison DC, Ulevitch RJ**: The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* 93: 527—617, 1978.
 - 8) 澤 充, 大久保彰, 奥野幸雄, 他: レーザー細隙灯顕微鏡による前房内蛋白濃度測定法. *日眼会誌* 91: 102—106, 1987.
 - 9) **Gemsa D**: International conference on tumor necrosis factor and related cytotoxins. *Immunobiology* 175: 1—143, 1987.
 - 10) **Ruff MR, Gifford GE**: Rabbits tumor necrosis factor, Mechanism of action. *Infection and Immunity* 31: 380—385, 1981.
 - 11) **Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, et al**: Effect of interleukin 2, interferon- γ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors α and β . *J Immunol* 135: 2492—2497, 1985.
 - 12) **Good RA, Thomas L**: Studies on the generalized shwartzman reaction. 2. The production of bilateral cortical necrosis of the kidney by a single injection of bacterial toxin in rabbits previously treated with thorotrast or trypan blue. *J Exp Med* 96: 625, 1952.
 - 13) **Smith RT, Thomas L, Good RA**: Generalized shwartzman reaction. 5. Intravenous injection of colloidal iron or carbon on response to rabbits to meningococcal toxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 82: 712, 1953.
 - 14) **Thomas L, Good RA**: Bilateral cortical necrosis of kidney in cortison treated rabbits following of bacterial toxins. *Proc Soc Exp Biol Med* 76: 604, 1951.
 - 15) 板東康晴, 田内芳仁, 福宿宏英, 他: 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. *日眼会誌* 93: 369—374, 1989.
 - 16) **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.
 - 17) **Endo H, Akahoshi T, Kashiwazaki S**: Additive effects of IL-1 and TNF on induction of prostacyclin synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 1007—1014, 1988.
 - 18) **Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W, et al**: Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act signly and in combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* 123: 16—24, 1986.
 - 19) **Rosenbaum JT, Howes EL, Rubin RM, et al**: Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 133: 47—53, 1988.
 - 20) 水島 裕, 松田隆秀, 石丸麻子, 他: ペーチェット病患者における TNF 産生量. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 82—83, 1989.
 - 21) **Chapman HA, Vavrin Z, Hibbs JB**: Macrophage fibrinolytic activity: Identification of two pathways of plasminogen formation by intact cells and of a plasminogen activator inhibitor. *Cell* 28: 653—662, 1982.
 - 22) 杉浦清治: わが国の葡萄膜炎について. *Vogt—小柳—原田病, Behçet 病を中心に*. *日眼会誌* 80: 1285—1326, 1976.