

細菌内毒素で惹起される角膜輪状膿瘍の形成機序について

三 浦 貴美子

岩手医科大学細菌学教室・眼科学教室

要 約

細菌内毒素によって惹起される角膜輪状膿瘍の形成機序について検討した。角膜輪状膿瘍の形成は、アラキドン酸代謝のホスホリパーゼ A₂ 阻害剤であるステロイド剤の結膜下注射とリポキシゲナーゼ阻害作用を有する TEI-3308 の点眼で抑制された。しかし、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンの点眼では逆に増強した。これらの結果より、内毒素による角膜輪状膿瘍の形成に、アラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物が関与していることが強く示唆された。また、角膜内に接種された内毒素を、抗内毒素モノクローナル抗体を用いて、免疫組織学的に検出した。内毒素は、少なくとも接種16日までは角膜内に存在することが確認された。内毒素による直接の白血球遊走作用よりは、むしろ二次的に産生されたメディエーターが輪状膿瘍の形成に関与することが形態学的にも示唆された。(日眼会誌 95:625-634, 1991)

キーワード：角膜輪状膿瘍，細菌内毒素，リポキシゲナーゼ代謝産物，免疫組織化学

The Mechanism of Corneal Ring Formation Caused by Bacterial Endotoxin

Fumiko Miura

*Department of Bacteriology, Department of Ophthalmology,
School of Medicine, Iwate Medical University*

Abstract

Corneal ring can be produced experimentally by injection of endotoxin into the rabbit cornea. To clarify this phenomenon, the effects of inhibitors of arachidonic acid metabolite were studied on the formation of the corneal ring. Phospholipase A₂ inhibitor (dexamethasone) and lipoxygenase inhibitor (TEI-3308) blocked the accumulation of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in the endotoxin-injected cornea, while cyclooxygenase inhibitor (indomethacin) enhanced PMN accumulation. This result suggests that products of the lipoxygenase reaction of arachidonic acid are related to the formation of the corneal ring induced by endotoxin. The existence of endotoxin in active form for a long period was also demonstrated immunohistochemically. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 625-634, 1991)

Key words: Corneal ring, Bacterial endotoxin, Lipoxygenase-reaction products, Immunohistochemical study

別刷請求先：020 盛岡市内丸19-1 岩手医科大学眼科学教室 三浦貴美子
(平成2年9月10日受付，平成2年11月19日改訂受理)

Reprint requests to: Fumiko Miura, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University.

19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Received September 10, 1990 and accepted in revised form November 19, 1990)

I 緒 言

グラム陰性菌角膜感染症では、病変の進行と共に角膜内に白血球が侵入し、角膜輪状膿瘍が形成される。この白血球侵入の機序については、抗原抗体複合体説¹⁾²⁾、補体説^{3)~5)}、細菌内毒素説⁶⁾⁷⁾などの報告があるものの、未だその本体は明らかではない。

Mondino ら³⁾⁴⁾⁶⁾が、細菌内毒素の角膜内接種で角膜輪状膿瘍が形成されることを報告して以来、この現象は無菌性角膜炎のモデルとして注目されている。

内毒素は、グラム陰性菌の細胞壁外膜に局在するリポ多糖 (lipopolysaccharide) で、生化学的には、親水性の O 抗原特異多糖および R コア多糖と、疎水性の lipid-A の 3 部分で構成される。また図 1 に示すように、糖鎖の違いによって、S 型、R 型 (Ra~Re)、lipid-A に分類され⁸⁾、生物活性の中心は lipid-A であることが知られている⁹⁾。内毒素は、微量で極めて多彩な生体反応を誘発する。細胞に対する直接の障害作用や白血球遊走作用により種々の炎症を引き起こすと共に、ヒスタミン、セロトニン、活性化補体、アラキドン酸代謝産物、腫瘍壊死因子など種々のメディエーターの遊離、産生を促進させることによって、二次的に炎症を誘発するといわれている¹⁰⁾。

本実験は、角膜輪状膿瘍の形成機序を明らかにする目的で、角膜実質内に内毒素を接種した後に種々のアラキドン酸代謝阻害剤を投与し、角膜輪状膿瘍の形成

に対する影響を検討した。また、角膜内に接種した内毒素の存在を、抗内毒素モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検出し、内毒素と白血球浸潤との関連を組織学的に観察した。

II 実験方法

1. 実験動物

体重2.5~3.6kgの角膜に病変のない白色雄性家兎89羽を用いた。

2. 接種溶液の調整

1) E. coli の S 型内毒素 (O111 : B4, Difco 社製) : 生理食塩水に浮遊させ音波処理し、2.5mg/ml の濃度に調整した後、10倍希釈法により10 μ g/40 μ l とした。

2) Salmonella minnesota の Re 型内毒素 : 生理食塩水を加えて音波処理し、2.5mg/ml の濃度に調整した後、10倍希釈法により10, 1, 0.1 μ g/40 μ l とした。

3) Salmonella minnesota の lipid-A : 0.025% トリエチルアミンで溶解後、1)と同様の方法で10, 1, 0.1 μ g/40 μ l とした。

4) 対照液 : 1)~3)の対照として、それぞれの溶解液のみを用いた。

3. 内毒素の角膜内接種

家兎角膜を塩酸オキシプロカイン (ペノキシール[®]) で点眼麻酔した後、1)~3)の溶液40 μ l を27ゲージ注射針を取り付けた100 μ l のマイクロシリンジ (TLT 型, Kloehn 社製) で、右眼角膜の中央部実質内に接種

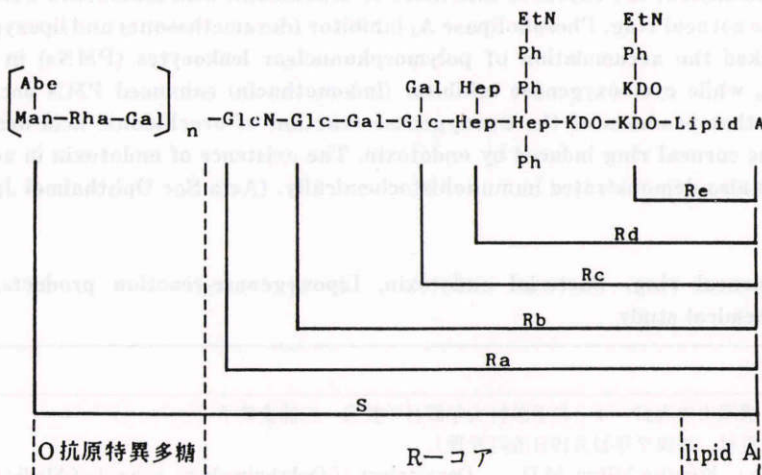


図1 内毒素の構造. KDO : ケトデオキシオクトン酸, Ph : リン酸, EtN : エタノールアミン, Hep : ヘプトース, Glc : グルコース, Gal : ガラクトース, GlcN : グルコサミン, Rha : ラムノース, Man : マンノース, Abe : アベコース

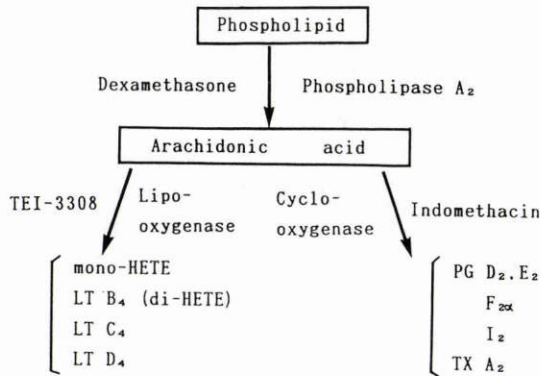


図2 アラキドン酸カスケードと代謝阻害剤

した。対照として、同一家兎の左眼角膜に、それぞれの対照液40 μ lを注入した。

4. アラキドン酸代謝阻害剤の投与

上記とは別の家兎の両眼の角膜に、S. minnesotaのRe型内毒素1 μ gを接種した後、下記のアラキドン酸代謝阻害剤を投与して、角膜輪状膿瘍形成に対する影響を調べた(図2参照)。

1) dexamethasone投与群：図2のカスケードのphospholipase A₂の阻害作用を有するステロイド剤¹¹⁾のdexamethasone 4mg/mlを含有するdexamethasone sodium phosphate(デカドロン注射液[®])を生理食塩水で2倍希釈し、その0.1ml(dexamethasone 200 μ g)を内毒素接種3時間後より、1日1回右眼の結膜下に注射した。対照として、左眼の結膜下に同量の生理食塩水を注射した。薬剤投与期間は、5日間と10日間の2群とした。

2) TEI-3308投与群：lipoxygenaseの作用を抑制する¹²⁾TEI-3308(帝人生化学研究所黒住精二博士より分与)を藤原ら¹³⁾の方法に準じて下記の点眼液に調整した。すなわち、TEI-3308 38mgにエタノール0.01mlを加え、70~80 $^{\circ}$ Cで熱して溶解し、これをゴマ油で希釈して、3.8%および0.38%点眼液とした。右眼に、TEI-3308点眼液を、左眼には対照として溶解希釈液を、内毒素接種3時間後より1日3回、5日間点眼した。

3) Indomethacin投与群：indomethacinはcyclooxygenase inhibitorとしての薬理作用を持つ^{14)~17)}。0.5% indomethacin点眼液であるインドメロール[®]と、これに溶媒であるヒマシ油を加えて0.05%に希釈した点眼液の2種類を使用した。右眼にはindomethacin点眼液を、左眼には対照としてヒマ

表1 角膜病変のclinical score(安東ら¹⁸⁾、一部改変)

1) Corneal edema	
slight	+1
mild	+2
severe	+3
2) Corneal abscess	
slender ring (less than 1/2 circle)	+1
slender ring (more than 1/2 circle)	+2
slender ring (complete circle)	+3
wide ring (complete circle)	+4
disc	+5

シ油を1日3回、5日間点眼した。

5. 角膜病変の観察

角膜病変の観察は、連日肉眼的に行ない、病変の程度を表1に示す様にscore化した。Scoreは安東ら¹⁸⁾の基準を一部改変し、最も重篤なものを8点とした。

6. Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

著者ら¹⁹⁾は、細菌内毒素によって惹起される角膜輪状膿瘍は、病理組織学的に強角膜輪部血管由来の、多核白血球(PMN)を主体とする炎症細胞の集簇によって構成されていることを確認している。また当教室の小野寺ら⁷⁾は、角膜輪状膿瘍の強さの程度を、PMN内に含まれる殺菌酵素であるMPO活性²⁰⁾を測定することによって定量できることを報告している。したがって、角膜輪状膿瘍の強さの程度の評価に、MPO活性を指標として用いた。myeloperoxidase (MPO) 活性測定用の角膜は、角膜輪状膿瘍の形成が最大になった時点、あるいは侵入血管由来の白血球の侵入を避けるため、角膜周辺部に血管が侵入し始める直前に摘出した。ペントバルビタール(ネプタール[®])の静脈内過剰投与の後、強角膜輪部にて角膜のみを摘出し、-80 $^{\circ}$ Cで冷凍保存した。

1) MPOの抽出法

家兎角膜の1眼を1検体として自然解凍後、細片とした。これに、potassium phosphate buffer (50mM, pH 6.0)で溶解したhexadecyltrimethylammonium bromide 0.5%溶液を1ml加え、氷水中で10分間ホモゲナイザーを用いて懸濁化した。この懸濁物を氷水中で20秒間音波処理した後、凍結融解を3度繰り返し、再度20秒間音波処理を加え40,000Gで15~20分間遠心分離した。上清は氷水中に保存し、沈渣に同様の操作を2度繰り返し、それぞれで得られた上清をプールし、最終量が3mlになるようにbufferを加えてMPO抽出液とした。

2) MPO 活性の測定

MPO 抽出液 0.15ml に、O-dianisidine dihydrochloride (16.7mg/100ml) と 0.0005% hydrogen peroxide を含む potassium phosphate buffer 1.35ml を加え、25°C で 90 分間反応させた。この反応液を、分光光度計にて吸光度 460nm で測定し、その値を MPO 活性とした。

7. 抗 Re 型内毒素モノクローナル抗体の作製

抗 Re 型内毒素モノクローナル抗体は、河西ら²¹⁾の方法に準じて作製した。BALB/C 雄性マウスに S. minnesota Re 595 のチメロサル処理死菌を 2 週間隔で 3~4 回静脈内に投与し、最終免疫後 3 日目のマウスから得た脾細胞をマウスミエローマ細胞 (P3-X63-Ag8) と 50% ポリエチレングリコール法で融合させた。増殖する融合細胞から limiting dilution によってクローニングし、その培養上清について ELISA を行ない、Re 型内毒素に対する抗体を産生するクローンを得た。このクローン化融合細胞をプリステン処理マウスの腹腔内に移植し、約 7 日目の腹水を採取した。遠心操作で細片を分離後、その上清をモノクローナル抗体として用いた。抗体価は、ELISA にて Re 型内毒素に対して 78,000 倍であった。

8. 免疫組織学的検索

角膜輪状膿瘍の形成がピークであった Re 型内毒素

0.3 % H₂O₂メタノール溶液

↓ PBS 洗浄

Avidin Biotin blocking kit

↓ PBS 洗浄

一次抗体

(5% スキムミルク加

抗 Re 型内毒素抗体)

↓ PBS 洗浄

ビオチン化二次抗体

↓ PBS 洗浄

A B C complex

↓ PBS 洗浄

発色 (D A B, H₂O₂)

↓

核染色 (hematoxylin)

図3 酵素抗体法の手順

接種 5 日目に角膜を摘出し、4% パラフォルム-0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) で角膜を固定した。その後、中央部で半切して、型のごとくパラフィンで包埋し、厚さ 4 μ m の切片を作製した。脱パラフィンした薄切切片をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、図 3 の手順で酵素抗体法を行ない検鏡した。また dexamethasone 10 日間投与群は、内毒素接種 16 日目に角膜輪状膿瘍の形成がピークになったので、この時点の角膜についても同様の染色を行なった。

酵素抗体法の特異性についての詳細は既報¹⁹⁾で述べたが、正常角膜、lipid-A 接種によって輪状膿瘍が形成された角膜、免疫吸収試験を行なった場合、抗 Re 型内毒素の代わりに正常血清や PBS を使用した場合のいずれでも染色されないことを確認した。

III 結果

1. 角膜実質内接種後の肉眼所見

1) 対照液接種群 (59羽59眼)

各内毒素に対するそれぞれの対照液の接種によって、いずれの場合にも直後には、注入部の角膜実質にびまん性の混濁が認められたが、24時間後には肉眼的に混濁を残さずに透明化した。その後、摘出までの全経過を通じて、角膜の混濁や炎症所見を示したものはなかった。

2) S 型内毒素接種群 (11羽11眼)

S 型内毒素 10 μ g 群では、接種 1 日後に眼瞼の軽度の発赤・腫脹、瞼球結膜の軽度の充血、虹彩の充血がみられた (図 4) が、角膜は透明であった。3 日後には瞼球結膜・虹彩の病変が増強して眼脂も出現し、角膜輪状膿瘍の形成が認められ始めた。4~5 日後、眼瞼および瞼球結膜の病変はさらに増強し、角膜輪状膿瘍の形成が最も明瞭になった (図 5)。6 日後には角膜への血管侵入がみられ、7 日後になると角膜の中央部も混濁し、角膜輪状膿瘍が不明瞭となった。

3) Re 型内毒素接種群 (36羽36眼)

いずれの濃度の Re 型内毒素接種でも、同様の経過で角膜輪状膿瘍が形成されたが、接種 1 日後に角膜の混濁や炎症所見を示したものはなく、2 日後になって、眼瞼の軽度の発赤・腫脹、瞼球結膜の軽度の充血、虹彩の充血、縮瞳がみられるようになった。角膜輪状膿瘍が形成され始めたのは接種 3 日後からで、眼瞼および瞼球結膜の病変はさらに増強し、4~5 日後、角膜輪状膿瘍の形成が最も明瞭になった。10, 1, 0.1 μ g のいずれの投与量でも、病変の出現時期および経過は同

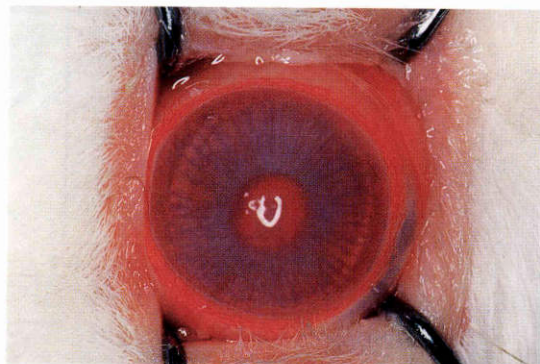


図 4 S 型内毒素接種 1 日後の肉眼所見。瞼球結膜の軽度の充血，虹彩の充血がみられるが，角膜は透明である。

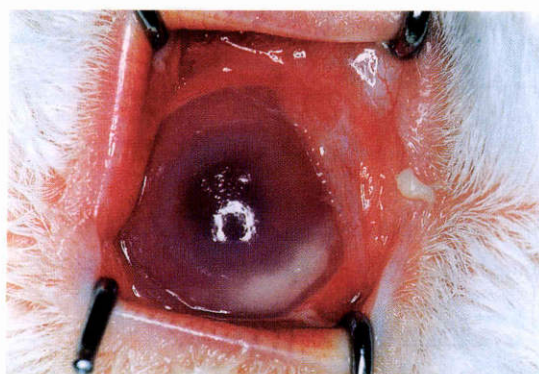


図 5 S 型内毒素接種 5 日後の肉眼所見。瞼球結膜および虹彩の充血が増強し，角膜には輪状膿瘍が形成されている。

じであったが，内毒素量が多い程，接種部より離れた場所に濃いリングが形成される傾向があった。

4) Lipid-A 接種群 (12羽12眼)

病変の出現時期および経過は，Re 型内毒素接種群と同様であった。すなわち，2 日後になって，眼瞼の発赤，瞼球結膜や虹彩の充血がみられ，これが徐々に増強した。4～5 日後になると，角膜輪状膿瘍が最も明瞭に形成される様になった。

2. 内毒素による角膜輪状膿瘍の形成率

各内毒素による角膜輪状膿瘍の形成率について，表 2 に示した。S 型内毒素 10 μ g 接種眼では 91% に，また Re 型内毒素および lipid-A の 10, 1, 0.1 μ g 接種眼では 100% に角膜輪状膿瘍が形成された。それぞれの対照液接種眼では，角膜輪状膿瘍は形成されなかった。

3. アラキドン酸代謝阻害剤による影響

表 2 内毒素による角膜輪状膿瘍の形成率
角膜輪状膿瘍形成眼/内毒素接種眼 (%)

	S 型	Re 型	Lipid-A
10 μ g	10/11 (91%)	6/6 (100%)	4/4 (100%)
control	0/11 (0%)	0/6 (0%)	0/4 (0%)
1 μ g	—	18/18 (100%)	4/4 (100%)
control	—	0/18 (0%)	0/4 (0%)
0.1 μ g	—	12/12 (100%)	4/4 (100%)
control	—	0/12 (0%)	0/4 (0%)

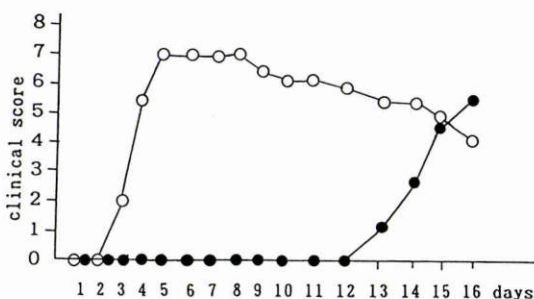


図 6 Dexamethasone 投与群の clinical score の経日変化

● Dexamethasone 投与眼 (n=5), ○ 対照液投与眼 (n=5)

1) ステロイド剤投与群 (n=10)

Re 型内毒素接種眼に，dexamethasone を投与した時の clinical score の経日変化 (平均値) を図 6 に示した。生理食塩水を投与した対照眼 (n=10) では，いずれも角膜輪状膿瘍が形成され，そのピークは内毒素接種 5 日目であった。dexamethasone 投与眼では，10 日間の投与中 (n=5) に，瞼球結膜や虹彩の充血などの炎症所見や，角膜輪状膿瘍を示すものはなかった。しかし，11 日目に dexamethasone の投与を中止すると角膜輪状膿瘍が形成されるようになった。輪状膿瘍が最も明瞭に形成されたのは内毒素接種 15～16 日目であった。

dexamethasone 投与 5 日目に角膜を摘出し，MPO 活性を測定した時の結果を図 7 に示す (n=5)。dexamethasone 投与眼の MPO 活性は 0.02 \pm 0.01 (対照 0.21 \pm 0.02) で有意に低かった (p<0.01)。dexamethasone は内毒素による角膜輪状膿瘍の形成を抑制することが判明した。

2) TEI-3308 投与群 (n=10)

3.8% および 0.38% TEI-3308 投与眼と対照眼のいずれでも，すべてに角膜輪状膿瘍が形成された。輪状膿

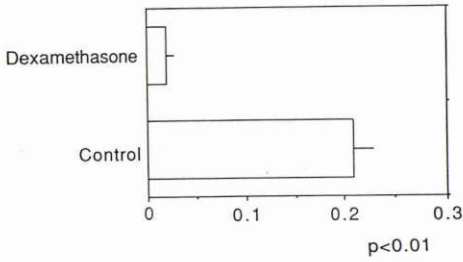


図7 Dexamethasone 投与5日後のMPO活性

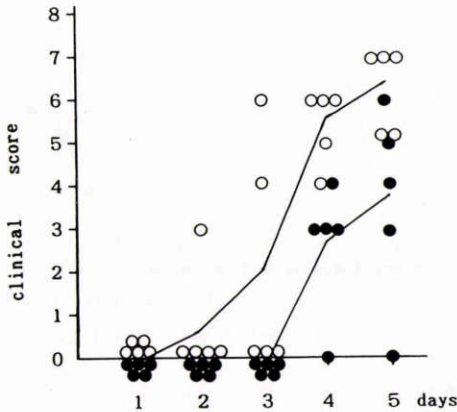


図8 3.8% TEI-3308投与群の clinical score の経日変化
● 3.8% TEI-3308 投与眼 (n=5), ○ 対照液投与眼 (n=5)

瘍の強さの程度は、0.38%溶液投与眼 (n=5) では、対照眼 (n=5) に比べ、肉眼的な差はなかった。3.8%溶液投与眼 (n=5) と対照眼の clinical score の経日変化を図8に示した。この図でみられるように、3.8%溶液投与眼では対照眼に比べ抑制傾向がみられた。MPO活性は、図9に示したように、3.8%溶液点眼群で 0.10 ± 0.02 (対照 0.23 ± 0.02) で、0.38%溶液点眼群で 0.13 ± 0.02 (対照 0.21 ± 0.02) であり、TEI-3308投与眼で有意に低かった ($p < 0.05$)。このように、TEI-3308は内毒素による角膜輪状膿瘍の形成を抑制することが判明した。

3) Indomethacin 投与群 (n=10)

0.5%および0.05%の indomethacin 投与眼と対照群 (n=10) のいずれでも、すべてに角膜輪状膿瘍が形成された。indomethacin 投与眼の輪状膿瘍の強さの程度は、対照眼と比べ肉眼的には差がなかった。MPO活性は、図10に示したように、0.5%溶液投与群 (n=5) で 0.23 ± 0.02 (対照 0.17 ± 0.03)、0.05%溶液投与群

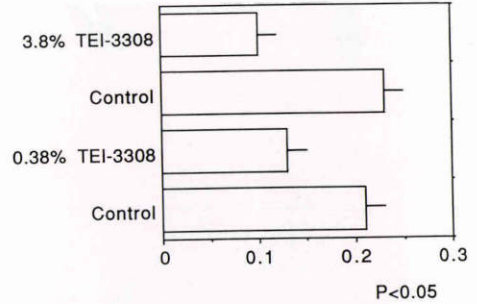


図9 TEI-3308 投与5日後のMPO活性

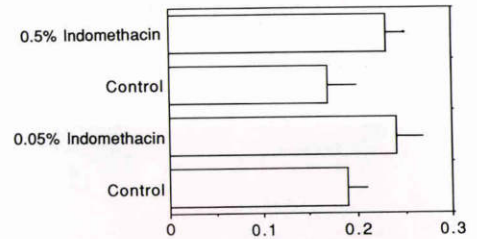


図10 Indomethacin 投与5日後のMPO活性

(n=5) で 0.24 ± 0.03 (対照 0.19 ± 0.02) であり、indomethacin 投与眼ではむしろ高い傾向があった ($p > 0.05$)。

4. 免疫組織学的所見 (n=6)

角膜輪状膿瘍の形成がピークであった接種5日目の免疫組織像を図11と図12に示す。内毒素の接種部位である角膜中央部 (図11) では、実質内に褐色に染まる内毒素が検出された。実質内の細胞は角膜実質細胞のみで、炎症細胞はみられなかった。これより周辺部 (図12) では、実質内に内毒素がわずかに染色され、多数の炎症細胞が集簇していた。炎症細胞は殆どが PMN で、好酸球、単球、リンパ球などがわずかにみられた。この部位は、肉眼的な輪状の混濁部に一致していた。

dexamethasone の10日間連続投与群では、dexamethasone の投与を中止すると角膜輪状膿瘍が形成され、そのピークは内毒素接種16日目であったが、その時の免疫組織像を図13と図14に示す。角膜中央部 (図13) には、実質内に褐色に染まる内毒素が染色されたが、接種5日目に比べると減少していた。炎症細胞はみられなかった。角膜周辺部 (図14) では、内毒素が検出され、PMN を主体とした炎症細胞がみられた。

IV 考 按

グラム陰性菌角膜感染症の際にみられる角膜輪状膿



図11 内毒素接種 5 日目の角膜中央部。(酵素抗体法, 64倍)角膜実質内に褐色に染まる内毒素陽性像がみられる。

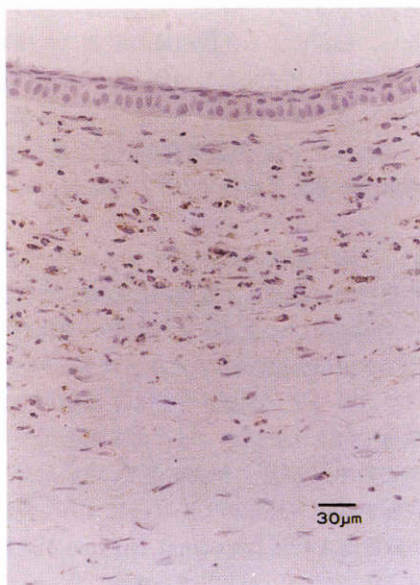


図12 内毒素接種 5 日目の角膜周辺部。(酵素抗体法, 64倍)角膜実質内に PMN を主体とする炎症細胞が多数みられる。褐色に染まる内毒素も僅かにみられる。



図13 Dexamethasone 10日間投与群の角膜中央部。(酵素抗体法, 64倍)内毒素接種16日目であるが, 内毒素が検出された。

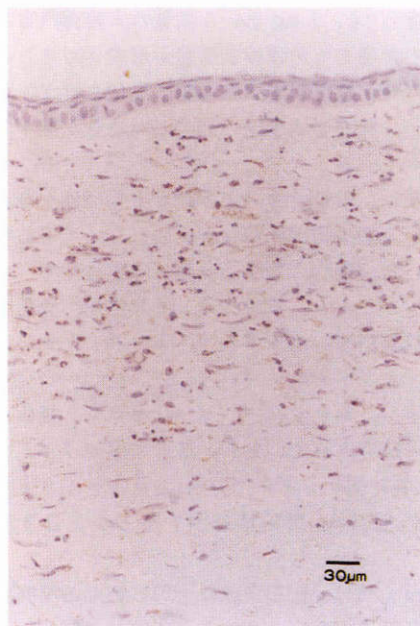


図14 Dexamethasone 10日間投与群の角膜周辺部。(酵素抗体法, 64倍)角膜実質内に PMN を主体とする炎症細胞が多数みられる。

瘍の形成機序については、実験的あるいは臨床的に諸種の知見があるものの、いまだその本体は明らかにされていない。細菌による角膜組織の破壊は、細菌の刺激により角膜内にPMNなどが侵入し、その細胞質内に含まれているコラゲナーゼやプロテアーゼなどの酵素が放出される²²⁾一方、角膜実質細胞が変性し、コラーゲンを溶解する酵素を放出する²³⁾ために起こるとされている。

Lyerlyら²⁴⁾は、霊菌の生菌とそのプロテアーゼを家兎の角膜実質内に接種し、電顕的に観察している。その結果、生菌あるいはプロテアーゼのいずれの場合でも、角膜内でproteoglycanの液化と消失がおり、これによってコラーゲン繊維が分散し、浮腫が生じる。しかし生菌では、プロテアーゼによる場合よりも、膿粘性の滲出物や、PMNの浸潤が多く、白血球遊走を促進する物質が産生されるので、これによって集積したPMNから放出されたlysosomal enzymeが角膜障害を増強するのではないかとしている。

Mondinoら⁶⁾は、緑膿菌や大腸菌の生菌、死菌および内毒素の角膜実質内接種で角膜輪状膿瘍が形成されたが、黄色ぶどう球菌の死菌やFreund's adjuvantでは形成されなかったことより、角膜輪状膿瘍の形成には内毒素が関与していると述べている。

小野寺ら⁷⁾も、1 ngという微量の大腸菌内毒素の角膜実質内接種でも角膜輪状膿瘍が形成されること、接種した内毒素量と形成率との間に量依存性がみられたことから、角膜輪状膿瘍の形成に内毒素が関与していると述べている。

内毒素は、微量で極めて多彩な生物活性を有し、抗腫瘍作用、感染防御作用など生体にとって有益な作用を示す一方、細胞に対する直接の障害作用や、エンドトキシンショック、致死作用、発熱作用、骨髄壊死などの重篤な病態を招来する²⁵⁾。エンドトキシンショックに関するメディエーターとして、カテコールアミン、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、補体などが以前から研究されているが、最近ではアラキドン酸代謝産物(特にトロンボキササンA₂とロイコトリエン)、血小板活性化因子、腫瘍壊死因子などが注目されている¹⁰⁾。

Bazanら²⁶⁾は、家兎角膜に全層にわたる冷凍凝固を加えて角膜炎を発症させると、角膜の各層で、アラキドン酸のリボキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼ代謝産物が合成されたと述べている。また、Verbeyら²⁷⁾は、家兎の角膜実質内にヒト血清アルブミンを接

種して角膜輪状膿瘍を発症させた実験で、アラキドン酸カスケードのホスホリパーゼA₂、リボキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼの各経路の代謝阻害剤を投与すると、いずれも角膜炎が抑制されたと報告している。これらは、種々の角膜炎にアラキドン酸代謝産物が関与していることを示している。

また小野寺²⁸⁾は、内毒素による角膜輪状膿瘍の形成が、ステロイド剤の結膜下注射で抑制され、アスピリンの静注で増悪したことから、アラキドン酸代謝のリボキシゲナーゼ経路が関与していることを示唆している。

さて本実験では、図2に示すようなアラキドン酸代謝阻害剤を投与して、内毒素による角膜輪状膿瘍の形成におよぼす影響を調べた。今回、内毒素はS. minnesotaのRe型を使用した。これは、Re型内毒素の構造が明らかにされていること、溶解性に優れていること、他の抗原に対する交叉反応性のきわめて少ない抗体を作製することができることによる。使用した家兎血清中の抗体価については測定していない。しかし工藤²⁹⁾は、感作血球凝集反応を用いた実験で、家兎血清中に抗S. minnesotaのRe型抗体は検出されなかったと報告している。

ステロイド剤は、細胞膜のリン脂質をアラキドン酸に転換する酵素であるホスホリパーゼA₂の阻害蛋白を誘導合成することによって、アラキドン酸カスケードのリボキシゲナーゼとシクロオキシゲナーゼの両経路を遮断する作用を有する¹¹⁾。今回、ステロイド剤であるdexamethasoneの投与によって、内毒素による角膜輪状膿瘍の形成は抑制された。

TEI-3308は、ロイコトリエンのアナログ構造をもったリボキシゲナーゼ阻害剤で、HETEやロイコトリエンなどの合成を低下させる¹²⁾¹³⁾。HETEやロイコトリエンは、強い白血球遊走作用を持つことが知られている。TEI-3308投与眼では、対照眼に比べMPO活性が低下していたことから、HETEやロイコトリエンなどの合成低下によって、角膜内へのPMNの浸潤が抑制されたと考えられる。Limbergら³⁰⁾は家兎にヘルペス性角膜炎をおこさせた実験で、TEIを投与すると、角膜炎は臨床的には抑制されなかったが、前房水内のロイコトリエンB₄、HETEおよび蛋白量が減少していたことから、ヘルペス性角膜炎の発症に、リボキシゲナーゼ経路が関与しているであろうと述べている。

indomethacinは、アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ経路を阻害し、プロスタグランジンの合成を

低下させる^{14)~17)}。本実験において、indomethacin 投与眼の MPO 活性は対照眼に比べて高く、抑制はみられなかった。

アスピリンもまたシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるが、これはプロスタグランジンの合成を低下させる反面、リポキシゲナーゼ経路の産物である HETE やロイコトリエンなどを増加させることが明らかになっている³¹⁾³²⁾。したがって、indomethacin の場合もアスピリンと同様に、シクロオキシゲナーゼ経路を遮断することによって、リポキシゲナーゼ経路の代謝産物である HETE やロイコトリエンなどが増加するのではないかと考えられる。その結果、indomethacin 投与眼ではむしろ角膜輪状膿瘍の形成が増悪する傾向になったと推察される。

以上の結果より、角膜輪状膿瘍形成の一因として、内毒素の接種によって角膜組織内におけるアラキドン酸代謝、特にリポキシゲナーゼ経路の代謝が進行して、その産物である HETE やロイコトリエンなどが二次的に角膜内に白血球を遊走させることが考えられる。

さて、既報において著者は、免疫組織学的な手法を用いて、角膜内に接種した内毒素の存在について報告した。内毒素は接種翌日には接種部位のみにみられた。4~5日目には殆どが接種部位であったが、周辺部にもわずかにみられる様になった。7日目には、中央部にみられる内毒素が減少し、角膜全体に認められる様になった。酵素抗体法では、角膜内の内毒素濃度の定量化はできないが、7日目の内毒素は4~5日目に比べて減少していたことより、内毒素は周辺部に向かって徐々に拡散し、角膜外に移動すると推察された。

今回行なった内毒素接種5日目の組織像で、内毒素は殆どが接種部位である角膜中央部に存在し、それを取り囲む様に、炎症細胞が輪状に集簇していた。dexamethasone の10日間投与群では、dexamethasone 投与中は全く炎症所見を示さず、投与を中止すると接種16日目であるにもかかわらず輪状膿瘍が形成された。この時の組織像で、角膜内に内毒素が検出された。接種した内毒素は、少なくとも接種16日目までは角膜内に存在することが確認された。したがって dexamethasone の投与中は、メディエーターの産生、遊離が抑制されていたが、投与を中止することによって、角膜内に存在する内毒素の生物活性が発現されたと考えられる。

本実験の結果から、内毒素による角膜輪状膿瘍の形成には、アラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物で

ある HETE やロイコトリエンなどが関与していることが強く推察された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただきました岩手医科大学医学部細菌学講座吉田昌男教授、眼科学講座田澤 豊教授、ならびに第二病理学講座里館良一教授に深く感謝いたします。本論文の要旨は第94回日本眼科学会にて口演した。

文 献

- 1) 庄司義治：眼科診療の実際。上巻，改訂第6版，第5章，東京，金原出版，177，1976。
- 2) 西 興史：角膜輪状膿瘍の臨床と病理。眼科 21：821—825，1979。
- 3) Mondino BJ, Brown SI, Rabin BS, et al: Alternate pathway activation of complement in a *Proteus mirabilis* ulceration of the cornea. Arch Ophthalmol 96: 1659—1661, 1978.
- 4) Mondino BJ, Brown SI, Rabin BS, et al: Role of complement in corneal inflammation. Trans Ophthalm Soc UK 98: 363—366, 1978.
- 5) Belmont JB, Ostler HB, Dawson CR, et al: Non-infectious ring-shaped keratitis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Ophthalmol 93: 338—341, 1982.
- 6) Mondino BJ, Rabin BS, Kessler E, et al: Corneal rings with gram-negative bacteria. Arch Ophthalmol 95: 2222—2225, 1977.
- 7) 小野寺毅，熊谷俊一，渡辺敏明，他：角膜輪状膿瘍の細菌内毒素による形成。眼紀 36: 1013—1018, 1985。
- 8) 岩永貞昭，丹羽 允，吉田昌男：内毒素—その構造と活性—。第1版，東京，医歯薬出版，13—32, 1983。
- 9) Luderitz O, Galanos C, Lehmann V, et al: Lipid A: Chemical structure and biological activity. J Infect Dis 128(Suppl): S17—29, 1973.
- 10) 西川浩平：エンドトキシンショックのメディエーター。代謝 26: 53—63, 1989。
- 11) 鶴藤 丞：アラキドン酸カスケードと薬。東京，現代医療社，23—38, 1985。
- 12) Hazato A, Kurozumi S, Ohta T, et al: Synthesis of methanoleukotriene A₄ analog and their pharmacological activities. Adv Prost Thromb Leuk Res 19: 639—642, 1989.
- 13) 藤原久子，片山寿夫，中田敬一，他：眼組織における Leukotriene B₄ (LTB₄) の作用とその抑制。あたらしい眼科 5: 143—147, 1988。
- 14) Bernard MJ, Steven MP, Bernard B: Indomethacin blocks arachidonic acid associated elevation of aqueous humors prostaglandin E. Invest Ophthalmol 12: 621—622, 1973.
- 15) Bhattacharjee P, Eakins KE: A Comparison of the inhibitory activity of compounds on

- ocular prostaglandin biosynthesis. Invest Ophthalmol 13: 967—972, 1974.
- 16) **Bhattacharjee P, Hammond BR**: Inhibition of increased permeability of the blood aqueous barrier by non-steroidal anti-inflammatory compounds as demonstrated by fluorescein angiography. Exp Eye Res 21: 499—505, 1975.
 - 17) **Podos SM, Becker B**: Comparison of ocular prostaglandin synthesis inhibitors. Invest Ophthalmol 15: 841—844, 1976.
 - 18) 安東えい子, 安東由喜雄, 井上正康, 他: アシル SOD 誘導体による角膜炎の阻止軽減. Cytoprotection & Biology 7: 373—381, 1989.
 - 19) 三浦貴美子, 切替照雄, 平田陸正, 他: 細菌内毒素による角膜輪状膿瘍の形成について—免疫組織学的検討—. 眼紀 41: 958—964, 1990.
 - 20) **Williams RN, Paterson CA, Eakins KE, et al**: Quantification of ocular inflammation: Evaluation of polymorphonuclear leucocyte infiltration by measuring myeloperoxidase activity. Curr Eye Res 7: 465—470, 1983.
 - 21) 河西信彦, 奥田克爾: モノクローナル抗体の作製法—微生物関連抗原を主として—. 日本細菌学会教育委員会編, 細菌学技術叢書 7, 東京, 菜根出版, 38—61, 1986.
 - 22) **Lazarus GS, Daniele JR, Brown RS, et al**: Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. J Clin Invest 47: 2622—2629, 1968.
 - 23) **Gray LD, Kreger AS**: Rabbit corneal damage produced by *Pseudomonas aeruginosa* infection. Infect and Immunity 12: 419—432, 1975.
 - 24) **Lyerly D, Gray L**: Characterization of rabbit corneal damage produced by *Serratia* keratitis and by a *Serratia* protease. Infect Immun 33: 927—932, 1981.
 - 25) 吉田昌男: 内毒素の生物活性概説. 内毒素—その構造と活性—, 148—158, 東京, 医歯薬出版, 1983.
 - 26) **Bazan HEP, Birkle DL, Beuerman R, et al**: Inflammation-produced stimulation of the synthesis of prostaglandins and lipooxygenase-reaction products in rabbit cornea. Curr Eye Res 4: 175—179, 1985.
 - 27) **Verbey NLJ, van Haeringen NJ, de Jong PTVM**: Modulation of immunogenic keratitis in rabbits by topical administration of inhibitors of lipooxygenase and cyclooxygenase. Curr Eye Res 7: 361—368, 1988.
 - 28) 小野寺毅: 細菌内毒素による角膜輪状膿瘍の形成機序について. 日眼会誌 91: 465—472, 1987.
 - 29) 工藤一顕: 抗サルモネラ Re 型菌抗体による内毒素反応(骨髄反応, Procoagulant 活性獲得反応)の抑制. 岩手医誌 34: 367—385, 1982.
 - 30) **Limberg MB, Birkle DL, Bazan HEP, et al**: The effect of a new lipooxygenase inhibitor on the production of arachidonic acid metabolites during experimental herpes simplex keratitis. Curr Eye Res 11: 1131—1135, 1988.
 - 31) 塩川優一: 抗炎症剤と活性酸素. 最新医学 39: 1362—1367, 1984.
 - 32) 伊藤敬三, 能勢尚志: KB-1043 ならびに数種抗炎症薬の Prostaglandin および SRS-A 合成に対する作用. 日薬理誌 80: 341—348, 1982.