

## 実験的ぶどう膜炎における水晶体リン酸化合物代謝

五十嵐弘昌<sup>1)</sup>, 吉田 晃敏<sup>1)</sup>, 田中 邦雄<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>旭川医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>旭川医科大学実験実習機器センター

### 要 約

エンドトキシンと網膜可溶性抗原 (S抗原) とをラットに投与し, 炎症程度の異なるぶどう膜炎を誘発後, <sup>31</sup>P-NMR スペクトロスコピーを用いて水晶体のリン酸化合物代謝動態を観察した。さらに, その変化と炎症の推移, および水晶体の組織学的変化との関連性を検討した。エンドトキシン投与群では, 前房内の炎症に伴って水晶体内の無機リン酸だけが有意に上昇するのに対して, 水晶体の形態学的変化は全く認められなかった。S抗原投与群では, 炎症の急性期に水晶体内のコリンリン酸, 無機リン酸およびアデノシン三リン酸の三者が有意に増加し, 炎症のピーク時からは逆に三者とも有意に減少した。水晶体の形態学的変化はこれらの代謝変化に遅れて発現した。これらの代謝変化は, 炎症というストレスに対する水晶体の生体膜維持機構の反応の結果と考えられ, 水晶体の形態学的変化の発現に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 96: 852-859, 1992)

キーワード: 核磁気共鳴法, 実験的ぶどう膜炎, 水晶体, ラット, リン酸化合物

## Dynamic Changes in the Organophosphate Metabolites of the Lenses Affected by Endotoxin and S-antigen Induced Uveitis

Hiromasa Igarashi<sup>1)</sup>, Akitoshi Yoshida<sup>1)</sup> and Kunio Tanaka<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College

<sup>2)</sup>Central Laboratory for Research and Education, Asahikawa Medical College

### Abstract

Using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy, the authors observed dynamic changes in the organophosphate metabolites in the lenses of two groups of Lewis rats affected by experimental uveitis induced by injecting Salmonella lipopolysaccharide (n=20) or S-antigen (n=25). A comparative study was done on the metabolic changes, the degree of inflammation, and histological changes in the rat lenses. Dynamic changes in the organophosphate profile in the lenses were measured by <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. Only inorganic phosphate showed a significant increase (p<0.05) related to the increased inflammation in the endotoxin group, but the lenses showed no morphological change. Choline phosphate, adenosine triphosphate, and inorganic phosphate increased significantly (p<0.01) in the acute stage of inflammation, but a significant decrease (p<0.01) was evident from the peak of inflammation, following the histological destruction of the lenses. Our results indicated that in experimental uveitis dynamic changes in the organophosphate profile of the lenses were closely related to the protecting reaction against the stress caused by inflammation. Furthermore, we theorized that the generation of the secondary cataract was associated with the decreased metabolism of the phosphate compounds. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 852-859, 1992)

Key words: Nuclear magnetic resonance, Experimental uveitis, Lens, Rat, Phosphate compound

別刷請求先: 078 旭川市西神楽4-5-3-11 旭川医科大学眼科学教室 五十嵐 弘昌

(平成3年12月27日受付, 平成4年2月27日改訂受理)

Reprint requests to: Hiromasa Igarashi, M.D. Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, 4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078, Japan

(Received December 27, 1991 and accepted in revised form February 27, 1992)

## I 緒 言

併発白内障は種々の眼内疾患に続発する水晶体の混濁であり、その最も多い原因疾患はぶどう膜炎である<sup>1)</sup>。併発白内障の発症に至るメカニズムとしては、ぶどう膜炎によって水晶体の外部環境、特に前房水の性状が変化し、二次的に水晶体の代謝が障害されるためと推測されている<sup>2)</sup>。しかしながら、ぶどう膜炎による併発白内障に関するこれまでの研究は、前房水の性状変化と水晶体の形態学的変化との関連性に関するものが中心であり<sup>3)-5)</sup>、炎症眼における水晶体内の代謝変化、特に水晶体の透明性維持に最も重要なリン酸化合物代謝<sup>6)</sup>を経時的に観察した報告はみられない。また、これまで用いられてきた併発白内障モデルは、動物眼内に直接アルブミンを投与して誘発したものが主であり<sup>8)</sup>、ぶどう膜炎のみならず直接刺激による炎症病像を除外できないため、内因性ぶどう膜炎のモデルとしては必ずしも適切ではなかった。

近年、細菌性エンドトキシン<sup>9)</sup>あるいは網膜可溶性抗原(S抗原)<sup>10)</sup>を動物の皮下に投与することにより、眼球に直接触れることなく、ぶどう膜炎を確実に発現させることが可能となった。これらの方法による炎症惹起は再現性に富み、さらに両者の方法を用いることにより、炎症の程度および持続期間の異なる眼内炎症を誘発可能である<sup>9)10)</sup>。

そこで本研究では、これら二つのラットぶどう膜炎モデル、すなわち炎症が急速に進行するエンドトキシンを用いたぶどう膜炎モデルと、これより緩徐に進行し強い炎症を誘発するS抗原を用いたモデルを対象として、生体試料に対して非破壊的にリン酸化合物を測定できる<sup>31</sup>P-NMRスペクトロスコーピーを用いて、水晶体内のリン酸化合物代謝動態の経時変化を観察した。さらに、その変化と炎症の推移および水晶体内の形態学的変化との関連性を検討した。その結果、ぶどう膜炎の炎症の推移と水晶体内のリン酸化合物代謝動態は密接に関連していることが明らかとなった。

## II 実験方法

### 1. 実験的ぶどう膜炎の誘発

実験動物として生後7週齢、体重約170gのLewis系雄性ラット(日本チャールスリバー)90匹を対象とした。

#### 1) エンドトキシン投与モデル

*Salmonella typhimurium* 由来のエンドトキシン

(DIFCO, Detroit, U.S.A.)30 mgを10 mlの生理食塩水に溶解して、ラットの後肢足蹠皮下に0.1 ml (300 μg/rat)投与した(E群, n=20)。また、対照として、同量の生理食塩水のみを後肢足蹠皮下に投与した(Ec群, n=20)。

#### 2) S抗原投与モデル

不完全フロイドアジュバント(Difco, Detroit, U.S.A.)に、*Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra (Difco, Detroit, U.S.A.)が2 mg/mlになるように溶解して、完全フロイドアジュバントを作製した。この完全フロイドアジュバントと、藤野ら<sup>11)</sup>の方法に従って精製したS抗原(600 μg/ml)を等量混合して乳化させた後、混合液をラットの後肢足蹠皮下に0.1 ml (30 μg/rat)投与した(S群, n=25)。また、対照として、0.1 mlの完全フロイドアジュバントのみをラットの後肢足蹠皮下に投与した(Sc群, n=25)。

#### 3) ぶどう膜炎誘発後の実験手順

E群およびEc群では投与直後、12時間目、24時間目および48時間目に、また、S群およびSc群では投与後3日、1週、2週、3週、4週目にそれぞれ5匹ずつ実験に用いた。まず、前眼部の炎症程度を観察した後、両眼から前房水を採取し、両眼の水晶体を摘出した。摘出した水晶体のうち片眼は水晶体のリン酸化合物の測定に用い、他眼は組織標本とするため即座に後述する方法で固定した。

### 2. 前房内炎症の評価

ラットをエーテルで麻酔後、細隙灯顕微鏡(Zeiss社製SL 30)を用いて前眼部の炎症所見、すなわち前房フレアおよび細胞数、虹彩血管の拡張程度を観察し、Hoganら<sup>12)</sup>の基準に従って分類した。また、同時に前眼部所見を携帯用眼底カメラ(ニコン)を用いて写真撮影した。次に、E群ラットに対しては30 G針を用いて前房水(20 μl)を採取し、Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD Chemical Division, Richmond, California, U.S.A.)を用いてその蛋白濃度を測定した。なお、S群ラットに対してはフィブリンが前房内に出現したため、十分量の前房水が採取できず、前房水蛋白濃度は測定できなかった。

### 3. <sup>31</sup>P-NMRスペクトロスコーピー

水晶体内のリン酸化合物代謝の測定には、静磁場強度6.3 Tesla、リン共鳴周波数109.25 MHzの日本電子製GX 270 WB FT-NMR装置を用いた。外径10×6.5 mmのアクリル製サンプル管にリン酸化合物を含まないクレブス重炭酸培地(pH 7.35)を充填し、その

中に水晶体1個を挿入して密封した。これを直径1.7 mmのエナメル線で作製した4回巻ソレノイドコイルに装着して測定した。なお、外部標準試料として20%ヘキサメチルホスホアミド(HMPA)を微小ガラス管(5.5×0.7 mm)内に封入してサンプル管内に装着した<sup>13)</sup>。

測定条件としては、パルス幅2  $\mu$ 秒の30°パルスを用い、パルス繰り返し時間0.5秒、積算回数を7,200回とした。従って、1スペクトルの測定時間は1時間である。

測定されたスペクトルは、各ピークをHMPAの高さを1として換算し、まず対照群の測定時間または測定日ごと(各5眼)に各ピークの平均を求めた。この値をもとに再度対照群およびそれに対応するぶどう膜炎群の各ピークを除し、各ピークの高さの平均値と標準偏差を求めた。また、統計学的検討には $t$ 検定を用いた。

#### 4. 組織標本の作製

水晶体を摘出後、即座に4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で固定し、アルコールにて脱水後、メタクリル樹脂(JB-4)に包埋した。さらに、1~2  $\mu$ mの切片を作成し、トルイジンブルーにて染色後、光学顕微鏡で観察した。

### III 結果

#### 1. 水晶体内リン酸化合物代謝変化

水晶体から観察された<sup>31</sup>P-NMRスペクトルの代表例を図1に示す。今回の研究においても、既報<sup>13)</sup>と同様の各リン酸化合物によるピークが観察された。本研究では特に、リン脂質代謝の指標としてコリンリン酸、高エネルギーリン酸化合物の指標として $\beta$ アデノシン三リン酸( $\beta$ -ATP)、およびATPの分解産物である無機リン酸の変化に着目した。

##### 1) エンドトキシン投与モデル

コリンリン酸およびATPは、エンドトキシン投与

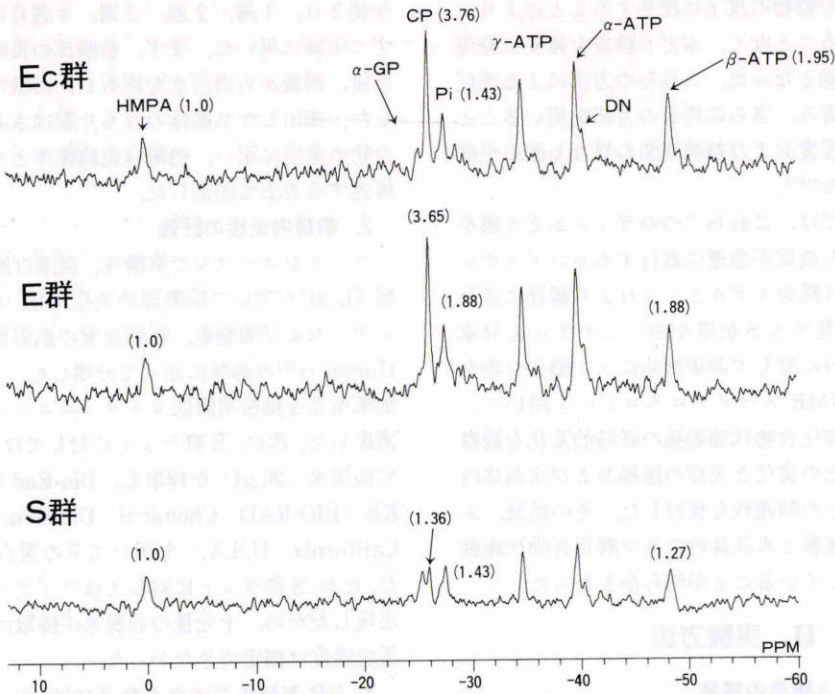


図1 <sup>31</sup>P-NMR スペクトルの代表例。

スペクトルは上段から生理食塩水投与直後のEc群、エンドトキシン投与後24時間目のE群(中段)およびS抗原投与後2週目のS群(下段)のスペクトルを示している。各スペクトルのピークは、左から順に外部標準のHMPA、 $\alpha$ グリセロリン酸( $\alpha$ -GP)、コリンリン酸(CP)、無機リン酸(Pi)、 $\gamma$ アデノシン三リン酸( $\gamma$ -ATP)、 $\alpha$ -ATP、ジヌクレオチド(DN)および $\beta$ -ATPを示す。

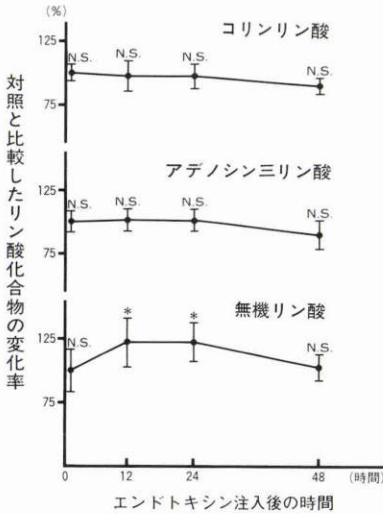


図2 E群のリン酸化合物代謝変化。

縦軸は対照を100%としたときの相対量を表す。コリンリン酸およびアデノシン三リン酸はエンドトキシン投与後変化を認めなかったのに対し、無機リン酸はエンドトキシン投与後上昇し、48時間目には低下した。(平均値±標準偏差, \*: p<0.05, N.S.: 有意差なし)

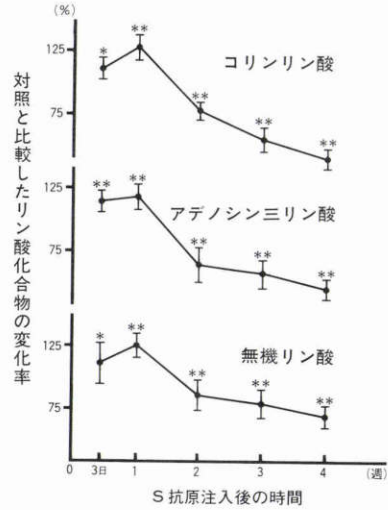


図3 S群のリン酸化合物代謝変化。

縦軸は対照を100%としたときの相対量を表す。コリンリン酸、アデノシン三リン酸および無機リン酸ともS抗原投与後3日目には有意に上昇し、1週目をピークにその後低下した。(平均値±標準偏差, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

後、Ec群に比べて有意な変化は認めなかったが、無機リン酸はエンドトキシン投与後上昇し、12時間目(122±20, p<0.05)と24時間目(123±15, p<0.05)に、Ec群に比べて有意な上昇を示し、その後低下した(図2)。なお、縦軸は対照の平均を100%としたときの相対量を示す。

2) S抗原投与モデル

S抗原投与後、コリンリン酸(111±6, p<0.01)、ATP(114±6, p<0.01)および無機リン酸(111±10, p<0.05)の三者とも3日目にはすでにSc群に比べて有意な上昇を示した。三者とも投与後、1週目をピークにその後低下し、2週目には有意に(それぞれ78±4, 64±15, 86±7, p<0.01)低下し、その後さらに低下した(図3)。なお、これも縦軸は対照の平均を100%としたときの相対量を表している。

2. 炎症の推移

エンドトキシンによるぶどう膜炎モデルにおいては、エンドトキシン投与後、前房内炎症は急速に進行し、投与後24時間目でピークとなり48時間目には消退傾向を示した(表1, 図4a~図4d)。前房蛋白濃度も、前房内の炎症の推移とほぼ同様な変化を示し、24時間目まで上昇し、その後は低下した(表1)。

S抗原によるぶどう膜炎モデルでは、S抗原投与後

表1 エンドトキシン投与群(E群)の細隙灯顕微鏡所見および前房蛋白濃度

	0時間	12時間	24時間	48時間
虹彩血管の拡張	-	+	++	++
前房フレアー(フィブリン)	(-)	+~++	++	+
細胞	-	+	++	+
前房蛋白濃度(mg/ml)	2.2±0.9 (n=5)	23.3±2.4 (n=5)	35.3±5.3 (n=5)	9.0±1.2 (n=5)

表2 S抗原投与群(S群)の細隙灯顕微鏡所見

	3日	1週	2週	3週	4週
虹彩血管の拡張	-	+	++	++	+
前房フレアー(フィブリン)	(-)	+~++	++	++	+
細胞	(-)	(-)	(+)	(+)	(+~+)
細胞	-	+	++	++	+
	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)

3日目には前房内に炎症所見は認められなかったが、1週目に軽度から中等度の虹彩血管の拡張、前房フレアーおよび細胞の増加を認めた(表2, 図5a~図5e)。炎症程度は2週目にピークとなり、前房内にフィブリンが析出した。しかし、その後フィブリンは徐々に消退して、4週目には観察されなくなり、かつ炎症もほとんど消退した。

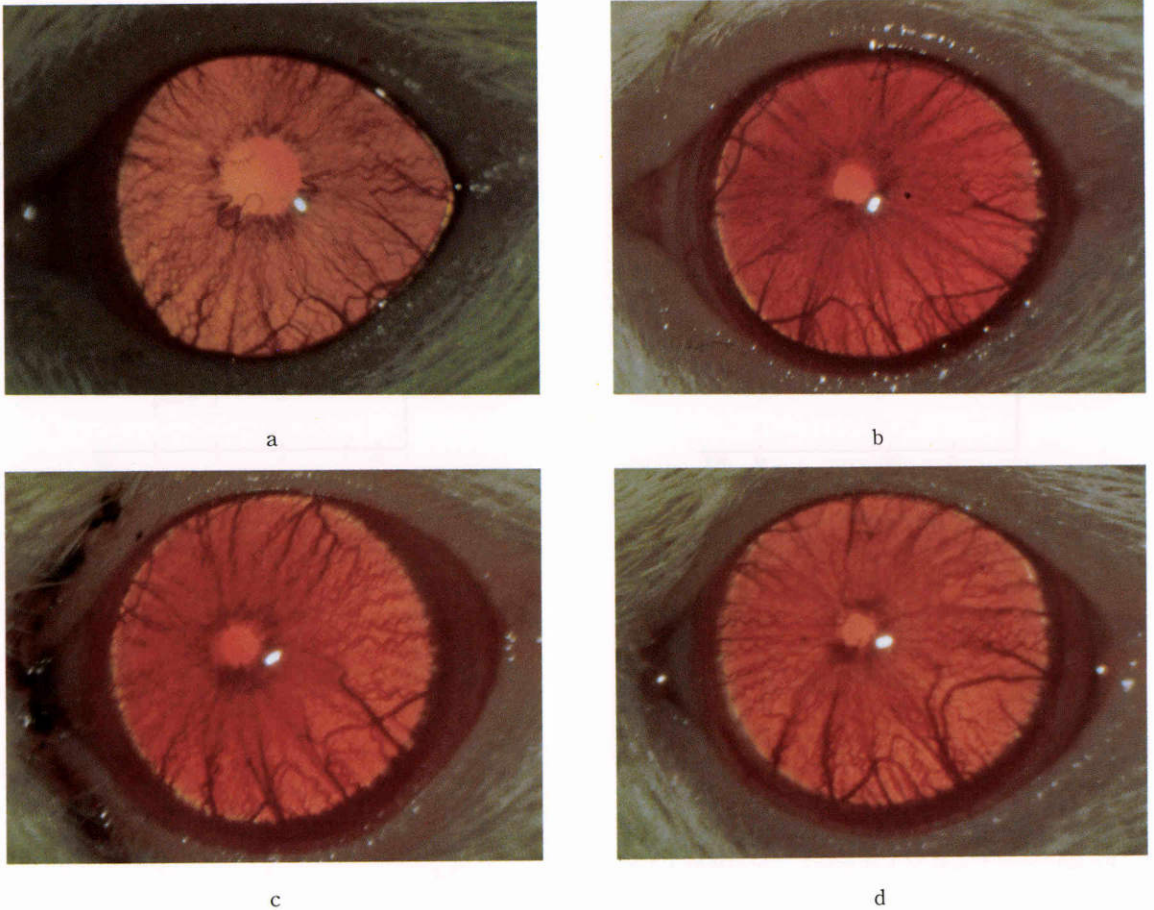


図4 a: Ec群(生理食塩水投与直後)の前眼部写真, b: E群(エンドトキシン投与後12時間目)の前眼部写真, 前房の軽度の混濁と虹彩血管の拡張が認められる, c: E群(エンドトキシン投与後24時間目)の前眼部写真, エンドトキシン投与後12時間目より強い前房の混濁と虹彩血管の拡張が認められる, d: E群(エンドトキシン投与後48時間目)の前眼部写真, 24時間目に比べ, 炎症はかなり消退している。

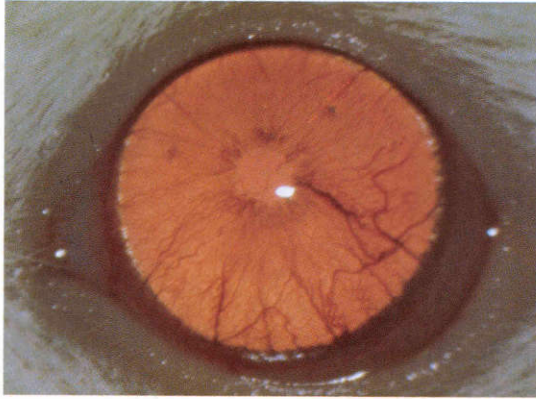
### 3. 形態学的変化

E群の水晶体においては, 観察期間中いずれも形態学的変化を認めなかった(図6a, 図6b)。これに対し, S群の水晶体では, S抗原投与後3週目から湾曲域の水晶体線維に軽度の膨化が認められ(図6c), さらに4週目では3週目比べてその膨化した水晶体線維の範囲は広がり, 湾曲構築に乱れを生じた(図6d)。

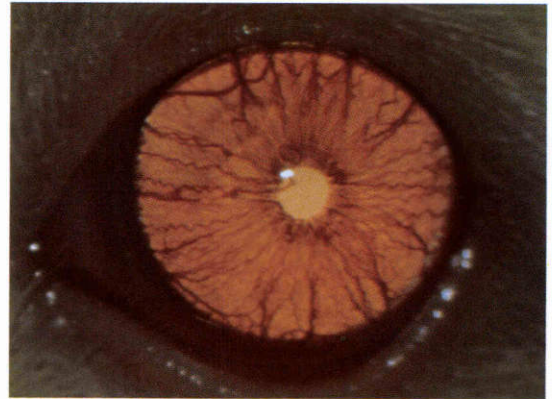
## IV 考 按

ぶどう膜炎に続発する白内障は, 房水の性状変化に伴った水晶体の代謝変化によって発症するものと推測されている<sup>1)</sup>。また, 房水の性状変化は血液眼内柵の破壊程度, すなわち炎症の程度に依存することが知られ

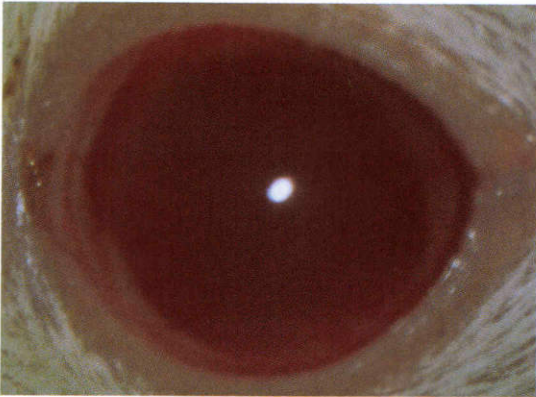
ている<sup>14)</sup>。本研究では, これまで未解明であった炎症の推移と水晶体内のリン酸化合物代謝動態, および水晶体の形態学的変化の三者の関連性を検討した。すなわち, 炎症程度とその持続期間の異なる二つのタイプのぶどう膜炎モデルを対象に, 炎症の推移に伴う水晶体のリン酸化合物代謝動態と形態学的変化とを経時的に解析した。その結果, 二つの実験的ぶどう膜炎モデルにおいては, 水晶体のリン酸化合物代謝動態と形態学的変化はそれぞれ異なることがわかった。すなわち, エンドトキシン投与群では, 炎症時には無機リン酸だけが有意に上昇し, 観察期間中, 形態学的変化が認められなかったのに対し, S抗原投与群では, 炎症の急性期にコリンリン酸, 無機リン酸およびATPの三者と



a



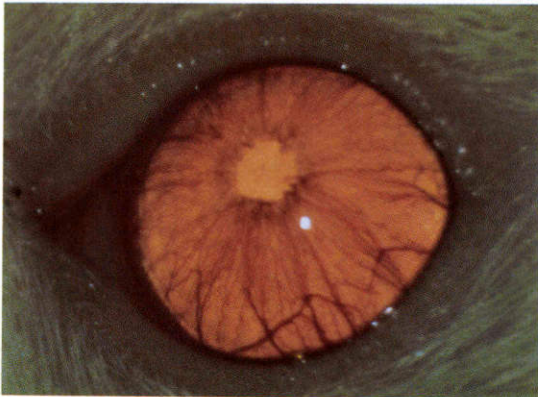
b



c



d



e

図5 a: S群 (S抗原投与後3日目) の前眼部写真, 対照と顕著な差を認めない. b: S群 (S抗原投与後1週目) の前眼部写真, 前房の軽度の混濁と虹彩血管の拡張が認められる. c: S群 (S抗原投与後2週目) の前眼部写真, 前房中に高度のフィブリンが析出し, 前房の透見が困難となった. d: S群 (S抗原投与後3週目) の前眼部写真, フィブリンはほぼ消退したが, 前房混濁と虹彩血管の拡張が認められる. e: S群 (S抗原投与後4週目) の前眼部写真, 3週目と比較し, 炎症はさらに消退し, 軽度の虹彩血管の拡張と前房内細胞, フレアーを残すのみとなった.

も増加し, 炎症のピーク時から逆に減少すること, さらに, これらの代謝変化に遅れて水晶体の形態学的変化が認められた.

ぶどう膜炎が発症した水晶体においては, 膜の透過

性が亢進するため水晶体内に  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  が貯留し,  $\text{K}^+$  が低下することが知られている<sup>35)</sup>. 正常水晶体においては, ATPのほとんどがこれらの陽イオンを中心とする能動輸送のために消費されている<sup>6)</sup>. 従って, 本研

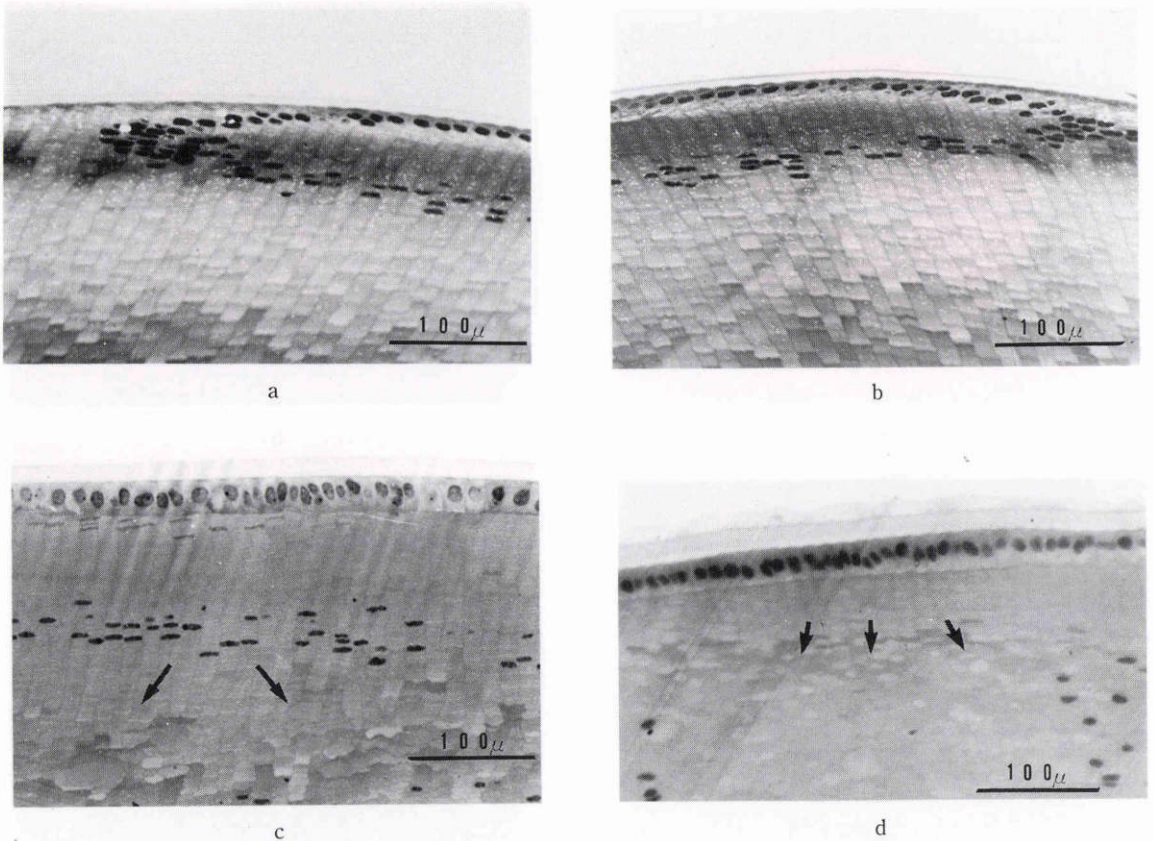


図6 a: Ec群(生理食塩水投与直後)の水晶体の組織標本(トルイジンブルー染色,  $\times 180$ ). b: E群(エンドトキシン投与後48時間目)の水晶体組織標本(トルイジンブルー染色,  $\times 180$ ). 水晶体には形態学的変化を認めない. c: S群(S抗原投与後3週目)の水晶体組織標本(トルイジンブルー染色,  $\times 180$ ). 水晶体湾曲域の水晶体線維に軽度の膨化が認められる(矢印). d: S群(S抗原投与後4週目)の水晶体組織標本(トルイジンブルー染色,  $\times 180$ ). 3週目に比べ膨化した水晶体線維の範囲が若干広がり, 湾曲域の構築に乱れが生じている(矢印).

究で得られた無機リン酸が炎症の進行に伴って上昇した結果は, 炎症時における膜の透過性亢進のため, ATPの消費が亢進したためと推測される.

一方, 無機リン酸の経時的变化に反比例するはずのATPは, エンドトキシン投与群では変化を認めず, S抗原投与群では無機リン酸と伴に一過性に増加し, その後減少した. ATPは水晶体内において, 能動輸送,  $\text{Ca}^{2+}$ のキレート作用, 膜の変形能の保持および各種の界面活性剤に対する抵抗性の保持など水晶体の膜機能を維持する上で重要な役割を担っている<sup>15)</sup>. また, ATPの減少に遅れて水晶体の形態学的変化が出現している. 従って, S抗原投与群においてATPが増加する機序は現時点では不明であるが<sup>16)</sup>, この増加は膜機能を維持する上で重要な変化と推測され, 炎症に対す

る水晶体形質膜の維持機構が関連した防御反応の結果と推測される. さらにATPの減少が水晶体の形態学的変化の発現に関与している可能性も示唆される. また, エンドトキシン投与群においても, 同様にATPは増加するものと推測されるが, 短時間に炎症が進行するためATPの消費も急速に亢進し, ATPピークにはほとんど変化を認めなかったものと推測される.

Chengら<sup>17)</sup>は, コリンがATPによってリン酸化されてコリンリン酸が産生されることから, コリンリン酸はATPの変化に依存することを推測している. 本研究の結果では, エンドトキシン投与群およびS抗原投与群ともにコリンリン酸とATPが平行して増減しており, この結果はChengらの説と一致する. 一方, ぶどう膜炎眼において, ホスホリパーゼA活性の上昇

に伴い、生体膜の重要な構成成分であるレンチンの分解が促進されるとの報告がある<sup>3)</sup>。コリンリン酸はレンチンの基質であるシチジン二リン酸コリンの前駆体であり、コリンリン酸の変化はレンチンの産生を規定する<sup>18)</sup>。従って、炎症時観察されたコリンリン酸の変化は、炎症というストレスに対して水晶体が形質膜構造を維持するために行った防御反応の結果と推測される。さらに、コリンリン酸の低下もATP同様、水晶体の形態学的変化の発現に関与している可能性が示唆される。

本論文の要旨は、第94回日本眼科学会総会(1990年、岡山)、第31回AMVO(1990年、サラソタ)および第32回ARVO(1991年、サラソタ)にて発表した。本研究に御協力を頂いた本学実験実習機器センター日下部光俊技官、宮川清志技官および本学眼科学講座福井勝彦技官に深謝致します。御校閣頂きました本学眼科学講座保坂明郎教授に深謝致します。

#### 文 献

- 1) **Kanski JJ**: Clinical Ophthalmology (2nd ed). London, Butterworths & Co, 233-259, 1989.
- 2) **宇山昌延**: ぶどう膜炎の症状と所見. 宇山昌延編: 眼科Mook 6 ぶどう膜炎. 東京, 金原出版, 11-28, 1980.
- 3) **Secchi AG**: Cataracts in uveitis. Trans Ophthalmol Soc UK 102: 390-394, 1982.
- 4) **村田忠彦, 田浦洋子**: 併発白内障の発生機構に関する研究(予報). 眼紀 26: 163-165, 1975.
- 5) **村田忠彦, 日隈陸太郎, 田浦洋子**: 併発白内障の房水組成について. 臨眼 28: 259-262, 1979.
- 6) **堀内正人**: エネルギー代謝. 岩田修造編: 水晶体—その生化学的機構, 東京, メディカル葦出版, 171-175, 1986.
- 7) **波紫秀厚**: Prostaglandin Eと併発白内障発生との関連性に関する研究. 日眼会誌 87: 1415-1421, 1983.
- 8) **小原真樹夫, 宇賀茂三, 石川 哲**: 実験的ぶどう膜炎による併発白内障の成因に関する基礎的研究. 日眼会誌 89: 740-748, 1985.
- 9) **Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, et al**: Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. Nature 286: 611-613, 1980.
- 10) **Wacker WB, Lipton HM**: Experimental allergic uveitis. II. Serologic and hypersensitive responses of the guinea pig following immunization with homologous retina. J Immunol 54: 441-444, 1970.
- 11) **藤野雄次郎, 川島秀俊, 奥村敦司, 他**: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(その1). 網膜抗原の分離精製法と病原性について. 日眼会誌 91: 498-507, 1987.
- 12) **Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P**: Signs and symptoms of uveitis. I. Anterior uveitis. Am J Ophthalmol 47: 155-170, 1959.
- 13) **吉田晃敏, 五十嵐弘昌, 田中邦雄, 他**: <sup>31</sup>P-NMR spectroscopyを用いたガラクトース白内障の代謝研究. 日眼会誌 93: 722-726, 1989.
- 14) **Ohara K, Okubo A, Miyazawa A, et al**: Aqueous flare and cell meter in iridocyclitis. Am J Ophthalmol 106: 487-488, 1988.
- 15) **錦織敏治**: 老人性白内障の代謝異常について. 第2報. 老人性白内障水晶体のATPとNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase活性について. 日眼会誌 86: 1379-1386, 1982.
- 16) **五十嵐弘昌, 吉田晃敏, 田中邦雄**: <sup>31</sup>P-NMRを用いたラット眼球内リン酸化化合物代謝の観察. 日磁医誌 11: 152-158, 1991.
- 17) **Cheng HM, Gonzales RG**: The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. Metabolism 35(Suppl 1): 10-14, 1986.
- 18) **Stryer L**: Biochemistry (3th ed). New York, WH Freeman and Company, 550, 1988.