

ラットのエンドトキシン誘発ぶどう膜炎における種々の lipopolysaccharide 投与量と炎症反応との関係

石黒 真美, 片山 寿夫, 立浪 和也, 開 繁義, 窪田 靖夫

富山医科薬科大学眼科学教室

要 約

Lipopolysaccharide (LPS) をラットの足蹠に注射し、ぶどう膜炎を作製した。まず LPS 投与量に対する炎症反応の変化を検討するために、前房水中の蛋白質濃度を指標とした。次いで、この反応に対する prostaglandin (PG) の関与を調べるために、PG 合成阻害剤の投与による反応の抑制を検討した。前房水中の蛋白質濃度は、6.3 μg の LPS 投与量では3時間目にピークとなる一峰性の上昇を示し、12.5~100 μg までの LPS 投与量では3時間目と24時間目にピークとなる二峰性に上昇し、LPS 投与量によってパターンの異なる反応を認めた。

PG 合成阻害剤を作用させると、その反応のピークは早期(3時間目)と後期(24時間目)の両方が30~60%抑制され、早期は LPS 投与量が少ないほど抑制率が高かった。100 μg 以下の LPS 投与量における LPS 誘発ぶどう膜炎では、PG が一部に関与していると考えられた。(日眼会誌 98:183-186, 1994)

キーワード: エンドトキシン誘発ぶどう膜炎, 前房水中蛋白質濃度, 二峰性のピーク, PG 合成阻害剤, ラット

The Effects of Various Doses of Lipopolysaccharide on Endotoxin-induced Uveitis in Rats

Mami Ishiguro, Toshio Katayama, Kazuya Tachinami, Shigeyoshi Hiraki and Yasuo Kubota

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Abstract

We induced intraocular inflammation by foot pad injection of lipopolysaccharide (LPS) in rats to investigate the inflammatory effects of the various doses of the LPS and the anti-inflammatory effects of prostaglandin (PG) synthetase inhibitor. The aqueous protein concentration curve showed two peaks, an early one at 3 hours and another at 24 hours after the injection, at doses higher than 12.5 μg per rat. The PG synthetase inhibitor reduced the

aqueous protein concentration by 30 to 60% at both of the two peaks. These results suggest the involvement of PG in the mechanism of the endotoxin-induced uveitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:183-186, 1994)

Key words: Endotoxin-induced uveitis, Aqueous protein concentration, Biphasic peak, PG synthetase inhibitor, Rat

I 緒 言

エンドトキシン(LPS)誘発ぶどう膜炎は、lipopolysaccharide (LPS) の全身投与により前眼部を中心とした眼炎症が引き起こされる内因性ぶどう膜炎の数少ない実験モデルである¹⁾。しかし、その発症機序に関する詳細は不

明であり、LPS 投与による眼反応は今までにいくつか報告されているが、必ずしも一致していない^{1)~6)}。LPS 投与量によって異なる生体反応が誘発されることから^{7~11)}、我々は眼反応も LPS 投与量に応じて変化すると考えた。

そこで今回、ラットを用いて前房水中の蛋白質濃度を

別刷請求先: 930-01 富山県富山市杉谷 2630 富山医科薬科大学眼科学教室 石黒 真美
(平成5年5月31日受付, 平成5年9月16日改訂受理)

Reprint requests to: Mami Ishiguro, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama-ken 930-01, Japan

(Received May 31, 1993 and accepted in revised form September 16, 1993)

指標として、種々の量の LPS による LPS 誘発ぶどう膜炎を作製し、また、prostaglandin (PG) 合成阻害剤投与による抑制効果を検討し、LPS 投与量による反応パターンの違いおよび LPS 誘発ぶどう膜炎における PG の関与について検討したので報告する。

II 実験方法

実験動物は、ウイスター系ラット（雄、6～8週齢、平均体重 150 g）を約 150 匹使用した。眼炎症の程度は、前房水中蛋白質濃度を指標とした。蛋白質濃度の測定は、色素結合法（Bio-Rad Protein Assay Kit : Bio-Rad）と HPLC 法（カラム [Shimpack DIOL₁₅₀], UV 検出 [280 nm]）の両方法で行った。有意差検定は Student の t 検定により、 $p < 0.05$ 以下を有意とした。

1. LPS 誘発ぶどう膜炎の作製

薬剤は同一のロット番号の lipopolysaccharide (E. Coli 055 : B 5, Sigma) を用い、生理食塩水 0.1 ml に溶解し、3.2, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 μg の用量で足蹠皮下に注射した。前房水は、LPS を注射後 1, 3, 6, 12, 24, 72 時間の各時点において、ジエチルエーテル麻酔下で 28 G 針を用い、1 眼から約 10 μl の前房水を採取してその蛋白質濃度を測定した。前房水採取時に血液が混入したものは除外した。生理食塩水のみを足蹠に注射したラットの前房水を対照とした。各時点の実験数は最低 4 匹であった。

2. PG 合成阻害剤の効果

PG 合成阻害剤は、diclofenac sodium（日本チバガイギー）を使用した。Diclofenac sodium は 1 回につき 2.5 mg を蒸留水 1 ml に溶解して、経口用ゾンデにて投与した。投与間隔は常に有効な血中濃度が得られるように考慮し、実験 1 と同様に作製された LPS 誘発ぶどう膜炎に対して LPS 注射 1 時間前と注射後 6 時間毎に投与した。前房水は、LPS を注射後 1, 3, 6, 12, 24 時間の各時点において採取し測定した。各時点の実験数は最低 4 匹であった。

III 結果

1. LPS 誘発ぶどう膜炎の作製（図 1）

炎症反応の指標とした前房水中蛋白質濃度は 3.2 μg の LPS 投与量では、どの時点でも上昇しなかった。6.3 μg の LPS 投与量では 1 時間目から上昇し、3 時間目でピークとなり、72 時間目まで徐々に減少する一峰性の変化となった。3 時間目のピークの蛋白質濃度は対照に比し有意 ($p < 0.05$) な上昇を示した。12.5, 25, 50, 100 μg の LPS 投与量では、1 時間目から上昇し 3 時間目にピークとなり、6 時間目に低下した。なお、3 時間目の蛋白質濃度は 6 時間目よりも有意 ($p < 0.05$) に上昇していた。その後、再び 24 時間目にピークとなる上昇を示し 72 時間目で対照まで低下し、3 時間目と 24 時間目を

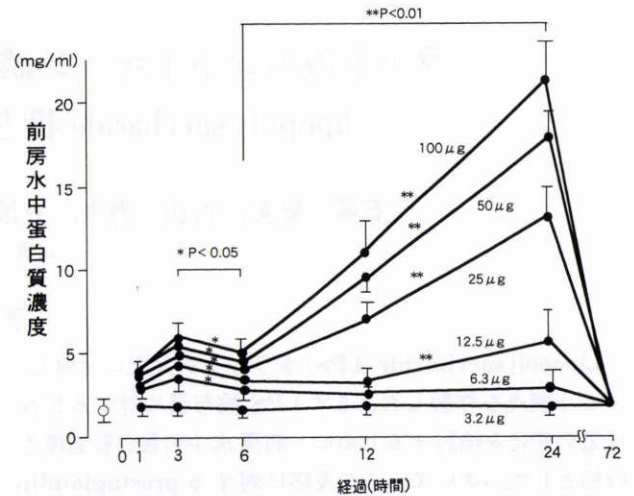


図 1 Lipopolysaccharide 投与量に対する前房水中蛋白質濃度の経時変化。平均値±標準偏差 (n=4)

ピークとする二峰性の変化を示した。早期と後期のピークは、12.5～100 μg の LPS 投与量すべてにおいて後期のピークが高く、LPS 投与量 100 μg での蛋白質濃度の平均は早期（3 時間目）で 5.4 mg/ml、後期（24 時間目）では 23.8 mg/ml を示した。

すなわち、LPS 投与量に対する前房水中蛋白質濃度の変化は、6.3 μg の LPS 投与量では一峰性の上昇を示し、12.5～100 μg の LPS 投与量では二峰性の上昇を示した。

2. PG 合成阻害剤の効果

6.3 μg の LPS の単独投与では前房水中蛋白質濃度は 3 時間目をピークとする一峰性の上昇を示したが、PG 合成阻害剤を作用させると、すべての時点で同程度に抑制され、3 時間目のピークは消失した（図 2）。

12.5 μg の LPS の単独投与では 3 時間目と 24 時間目の両ピークを認めていたが、PG 合成阻害剤を作用させると、3 時間目と 24 時間目の両ピークが消失した。3 時間目は対照より有意な上昇を認めるが、その後はほぼ同じレベルを保った（図 3）。

25～100 μg の LPS の単独投与でも 3 時間目と 24 時間目の 2 つのピークを認めていたが、PG 合成阻害剤を作用させると、3, 6, 12, 24 時間すべての測定時点で上昇は抑制された。図 4 は LPS 投与量 100 μg の結果である。PG 合成阻害剤を作用させても、3 時間目と 24 時間目の両ピークは認められるが、測定したすべての時点で抑制されている（図 4）。

3. PG 合成阻害剤の抑制率（図 5）

最少量の 6.3 μg の LPS 投与量に対する PG 合成阻害剤の前房水中蛋白質濃度の抑制率は 3 時間目と 24 時間目とも約 60% であった。12.5 μg の LPS 投与量に対する抑制率は 3 時間目で 40%、24 時間目で 70% であった。

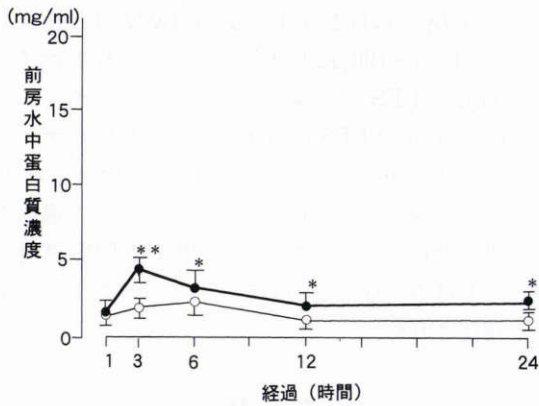


図 2 Lipopolysaccharide 投与量 6.3 µg における PG 合成阻害剤の効果.

黒丸：LPS 6.3 µg, 白丸：LPS 6.3 µg+PG 合成阻害剤, 平均値±標準偏差 (n=4)
LPS 投与群と LPS+PG 合成阻害剤投与群の有意差. *p<0.05, **p<0.01

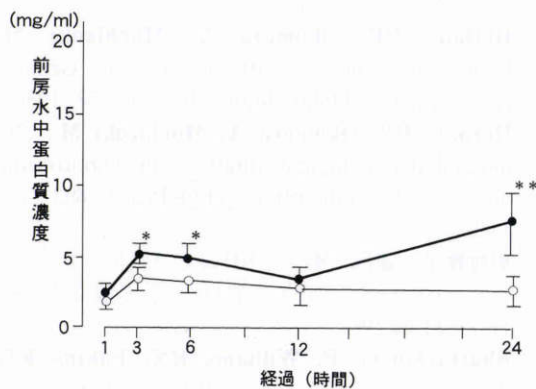


図 3 Lipopolysaccharide 投与量 12.5 µg における PG 合成阻害剤の効果.

黒丸：LPS 12.5 µg, 白丸：LPS 12.5 µg+PG 合成阻害剤, 平均値±標準偏差 (n=4)
LPS 投与群と LPS+PG 合成阻害剤投与群の有意差. *p<0.05, **p<0.01

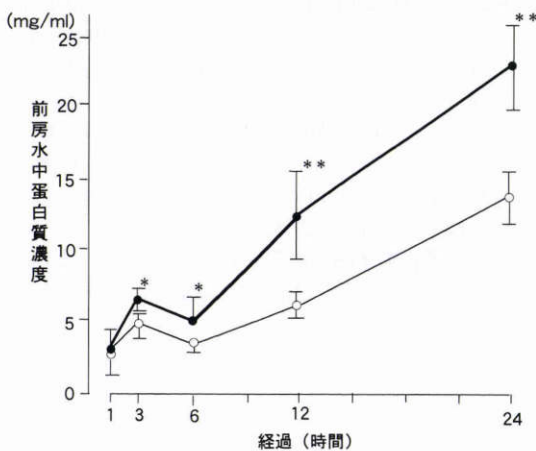


図 4 Lipopolysaccharide 投与量 100 µg における PG 合成阻害剤の効果.

黒丸：LPS 100 µg, 白丸：LPS 100 µg+PG 合成阻害剤, 平均値±標準偏差 (n=4)
LPS 投与群と LPS+PG 合成阻害剤投与群の有意差. *p<0.05, **p<0.01

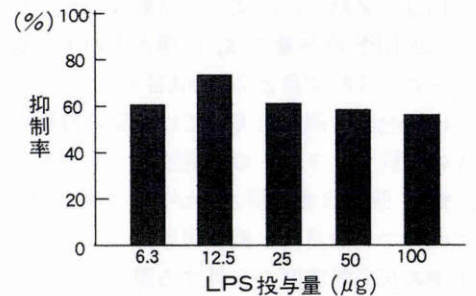
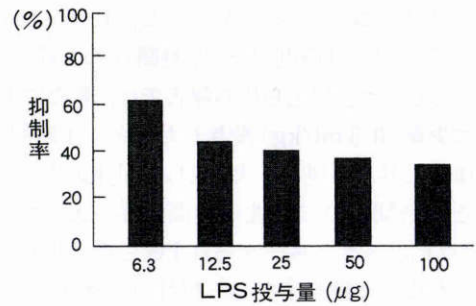


図 5 Prostaglandin 合成阻害剤の抑制率.

上段：LPS 投与後 3 時間目, 下段：LPS 投与後 24 時間目

25~100 µg の LPS 投与量に対する抑制率は 3 時間目で 35~40%, 24 時間目で 50~60%であった. すなわち, LPS 投与量による前房水蛋白質濃度の上昇に対する PG 合成阻害剤の抑制効果は, 早期の 3 時間目では LPS 投与量が少ないほど抑制率は高い傾向を示し, 後期の 24 時間目では 6.25~100 µg のすべての投与量において抑制率は 60% 前後と投与量による明確な差異は示さなかった.

IV 考 按

LPS は, 様々な生体反応を誘発することが知られている. 例えば, 家兎において全身シュワルツマン反応(DIC)が LPS 200 µg/kg の 2 回投与で起こり⁷⁾, エンドトキシンショックは 1~3 mg/kg の投与量で起こる⁸⁾. また, LPS 投与量により細胞レベルで起こる反応も異なる. 例えば, マウスのマクロファージにおける PGE の産生は 0.1 µg/ml で起こり⁹⁾, interleukin-1 (IL-1) の産生は 10 µg/ml で起こる¹⁰⁾. このように, LPS 投与量により引き起こされる生体レベル, 細胞レベルの反応が異なることから, 眼における反応も LPS 投与量により異なると考えられる. これまでの眼における LPS の反応の報告の違いも^{1)~6)} 投与量の違いのためとも考えられる. そこで我々は, 今回, 指標とした前房水中の蛋白質濃度の上昇を引き起こすことが可能な最少量の LPS 量をまず検討し, 次いで血液房水柵の保護に作用する PG 合成阻害剤の効果について検討を試みた.

今回, 150 g 前後のウイスター系ラットにおいて, 3.2 µg の LPS 投与量では対照に比し, 蛋白質濃度は有意な変化を示さなかった. 6.3 µg の LPS 投与量では, 3 時間

目に上昇する一峰性の変化を示した。12.5~100 μg の LPS 投与量では、3時間目と24時間目に上昇する二峰性の変化を示した。村上ら¹¹⁾の報告では、家兎に LPS を静脈内に少量(0.3 ml/kg)投与した場合、1時間目の一相性の体温上昇が出現し、大量(1.0 ml/kg)投与にて1時間目と3時間目の二相性の体温上昇が出現するという。発熱反応のメディエーターは PG と考えられ、PG 合成阻害剤を皮下に投与すると一相目の発熱反応は抑制される。二相目の発熱反応に関し、見解はまだ一定していない。今回の LPS 投与量では、前房水中の蛋白質濃度の上昇のピークは3時間目と24時間目であった。この時間的な違いは、発熱を調べた実験では家兎の静脈注射であり、我々の実験ではラットの足蹠注射であるためかもしれない。また、眼には血液房水柵があり、流血中の PG が増加しただけでは血液房水柵は破壊されない。発熱反応と前房水中の蛋白質濃度の上昇する眼反応は同様には考えられない。

PG 合成阻害剤を作用させると、6.3 μg の LPS 投与量でみられた3時間目のピークは消失した。12.5~100 μg でみられた3時間目と24時間目のピークは PG 合成阻害剤の投与により、二峰性の上昇は残存するものの、有意に抑制された。また早期の3時間目の上昇は、投与量が少ないほど抑制率が高かった。これらのことから、PG は早期と後期の両方に関与すると考えられた。今回使用した PG 合成阻害剤の投与量は LD₅₀ の約5分の1量であり、十分な抑制効果が得られる量と思われる。しかし、今回の100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 以下の LPS 投与量において、PG 合成阻害剤による全体の抑制率は30~60%であった。PG 合成阻害剤で抑制できない部分は、PG 以外のメディエーターが関与したと考えられる。LPS は単球、マクロファージ、好中球などの細胞で IL-1, tumor necrosis factor (TNF) などの炎症性サイトカインや、PGE₂, leukotriene B₄(LTB₄)を、また、血管内皮細胞では IL-1, platelet activating factor (PAF), PGE₂ など多くを産生させる。LPS 誘発ぶどう膜炎は、このように複雑に絡みあった炎症モデルと考えられる。そして LPS 投与量が大量になるほど多くのメディエーターが惹起され、複雑に絡み合った反応を引き起こすことが予想される。LPS 誘発ぶどう膜炎における PAF, PG, ロイコトリエンの関与については、別報の予定である。

今回用いた100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 以下の LPS 投与量のうち、最

少量の6.3 μg では前房水中の蛋白質濃度の上昇は一峰性となり、12.5~100 μg に増加すると二峰性を示すことは、6.3 μg の LPS 投与量で働くメディエーターに加えて12.5 μg 以上の LPS 投与量では、別のメディエーターが関与する可能性が示され、LPS の投与量は LPS 誘発ぶどう膜炎における反応パターンに大きな違いを与えることが明らかにされた。また、PG は LPS 誘発ぶどう膜炎における炎症反応のメディエーターの1つであることが確認された。

文 献

- 1) Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR: Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 286: 611-613, 1980.
- 2) 奥村敦司, 望月 學: 内因性ぶどう膜炎のエンドトキシン・モデル. 1. 形態学的研究. 3). あたらしい眼科 4: 551-557, 1987.
- 3) Herbolt CP, Okumura A, Mochizuki M: Endotoxin-induced uveitis in the rat. *Graefes's Arch Clin Exp Ophthalmol* 226: 553-558, 1988.
- 4) Herbolt CP, Okumura A, Mochizuki M: Immunopharmacological analysis of endotoxin-induced uveitis in the rat. *Exp Eye Res* 48: 693-705, 1989.
- 5) 奥村敦司, 望月 學: 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. 日眼会誌 91: 1147-1153, 1987.
- 6) Bhattacharjee P, Williams RN, Eakins KE: An evaluation of ocular inflammation following the injection of bacterial endotoxin into the rat food pad. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 196-202, 1983.
- 7) 小島 瑞: DIC とその周辺. 医歯薬出版, 66, 1980.
- 8) 玉熊正悦, 石山 賢: エンドトキシンショック. 中外医学双書, 61-65, 1979.
- 9) Kurland JI, Bockman R: Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 147: 952, 1978.
- 10) Lee K-C, Wong M, McIntyre D: Characterization of macrophage subpopulations responsive to activation by endotoxin and lymphokines. *J Immunol* 126: 2474-2479, 1981.
- 11) 村上 憲, 森本昭生, 酒井甫浩, 和田 實: 脳・血液関門を境にした発熱物質の作用機構. 炎症 8: 305-309, 1988.