

チロソールのぶどう膜炎発症眼における血液房水関門破綻  
に対する保護作用

佐藤 和昭

Protective effect of Tyrosol on breakdown of blood–aqueous  
barrier in uveitic eyes

Kazuaki SATO

## 目次

序論 .....	1
本論	
第 1 章　チロソールのマウスマクロファージ細胞株における 抗炎症効果および機序の検証	
緒言 .....	6
材料および方法	
1. 試薬 .....	7
2. 細胞培養 .....	7
3. チロソール処置と炎症誘起 .....	8
4. 細胞生存率の測定 .....	8
5. 各種炎症性メディエーター濃度の測定 .....	9
6. 炎症関連酵素の発現量評価 .....	10
7. 転写因子の免疫細胞化学的検索 .....	12
8. 統計解析 .....	12
結果	
1. 細胞生存率 .....	13
2. 各種炎症性メディエーター濃度 .....	13
3. 炎症関連酵素の発現量 .....	14
4. 転写因子の細胞内局在 .....	14
考察 .....	15
付図および付図説明 .....	17

第 2 章 チロソールのラットエンドトキシン誘発性ぶどう膜炎  
(EIU) モデルにおける血液房水関門 (BAB) 保護作用  
および機序の検証

緒言 .....	23
材料および方法	
1. 試薬 .....	24
2. 供試動物 .....	24
3. チロソール投与と EIU 誘導 .....	24
4. 臨床所見の評価 .....	26
5. 眼房水中の浸潤細胞数および蛋白質濃度の測定 .....	26
6. 前眼部の病理組織学的検索 .....	27
7. 眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度の測定 .....	27
8. 虹彩毛様体 (ICB) における免疫組織化学的検索 .....	28
9. 統計解析 .....	29
結果	
1. 臨床所見 .....	29
2. 眼房水中の浸潤細胞数および蛋白質濃度 .....	29
3. 前眼部の病理組織学的評価 .....	30
4. 眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度 .....	31
5. ICB における炎症関連酵素の発現量 .....	31
6. ICB における転写因子活性に関する評価 .....	32
考察 .....	32
付図および付図説明 .....	35

### 第 3 章 チロソールのイヌ前房穿刺 (ACP) 誘発性ぶどう膜炎

#### モデルにおける BAB 保護作用の検証

緒言 .....	44
材料および方法	
1. 供試動物 .....	45
2. チロソール投与と ACP によるぶどう膜炎誘導 .....	45
3. 臨床所見の評価 .....	46
4. 眼房水中の蛋白質濃度の測定 .....	47
5. 眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度の測定 .....	48
6. 統計解析 .....	48
結果	
1. 基礎的データの収集	
1-1. ACP による臨床所見の経時的変化 .....	48
1-2. ACP による BAB 破綻の経時的変化 .....	49
1-3. 眼房水中における炎症性メディエーター .....	49
2. チロソールの効果検証	
2-1. 眼房水中の蛋白質濃度 .....	50
2-2. 眼房水中の PGE2 濃度 .....	50
2-3. 臨床所見への影響 .....	51
考察 .....	51
付図および付図説明 .....	55
総括 .....	64
参考文献 .....	70

謝 辭 ..... 84

## 序論

ぶどう膜炎は眼内組織、とくに血管や色素が豊富な組織であるぶどう膜（虹彩、毛様体、脈絡膜）における炎症性疾患の総称である。本疾患は、ヒト医学のみならず獣医学領域においても一般的な眼科疾患であり、炎症細胞の浸潤や眼内組織の破壊により視機能が障害され、重症例では視覚喪失にいたる疾患である。本疾患は炎症の主座に基づき、前部（虹彩、毛様体）、中間部（毛様体扁平部付近）、後部（脈絡膜、網膜）、そして汎（眼内全域）ぶどう膜炎に分類される。前部ぶどう膜炎は発生頻度が最も高く[1]、また急激な病態悪化に伴い緑内障や網膜剥離などの視覚喪失の原因となる他の眼科疾患を続発することも少ないことから、重要疾患とされる。病因は多岐にわたり、特発性が最も多く、その他に感染性、免疫介在性、外傷性、腫瘍関連などが挙げられる。

これら様々な原因による前部ぶどう膜炎の共通病態として、血液房水関門（BAB）の破綻がある。BABは、虹彩毛様体領域（ICB）において、血液循環から眼内への異物輸送を制限するバリアとして機能し、眼の恒常性を維持している[2, 3]。BABの形成は、ICBにおける上皮細胞間および血管内皮細胞間の様々な接着分子よりなされ、とくに上皮細胞間のタイトジャンクションがバリア機能の中核を担う[4, 5]。前部ぶどう膜炎発症眼では、BAB破綻により二次的に産生される眼房水（二次房水）への血漿蛋白質の漏出や炎症細胞、血球およびフィブリンなどの炎症産物の放出が起こる。その結果、血漿様化した眼房水は混濁し、前部ぶどう膜炎に特徴的な臨床症状である「前房フレア」が観察される。前眼部

に浸潤した炎症細胞および ICB における上皮細胞への刺激に伴い、様々な炎症性サイトカインおよびケモカインが多量に産生・放出されることで、BAB を含む眼局所の組織障害が起こり、炎症が進行する [6]。BAB 破綻の要因とされる炎症性メディエーターの中で、とくに強力な作用を有するものとしてプロスタグランジン (PGs) が知られている。PGs は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) および特異的な PG 合成酵素による酵素反応を介して生合成されるエイコサノイドの一種である。PGs による生理活性作用には、血管の収縮または拡張 [7, 8]、気管支および子宮収縮 [9, 10]、血小板凝集への影響 [11] などの全身性から局所で発揮するものまで数多く存在する。また PGs は、炎症性メディエーターとして各部位における急性炎症の症状発現に関与することが広く知られている。眼組織において、PGs は眼房水中で最初に同定された炎症性メディエーターであり、これまでに PGs 関連のぶどう膜炎研究が数多くなされてきた [12-14]。PGs による眼症状は BAB 破綻のみならず、眼の充血や疼痛、縮瞳、眼圧の変動など様々である [15-18]。そして、PGs 合成酵素 (COX) 阻害剤として知られる非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、臨床症例や実験動物モデルにおいてこれらの眼症状を強く抑制することが報告されている [19, 20]。これらのことから、PGs は眼組織における炎症誘起や関連症状の発現において重要なメディエーターであることが明らかである。腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$  の眼房水中への過剰産生も、ぶどう膜炎の誘起・増幅において非常に重要な役割を果たすことが分かっている。TNF- $\alpha$  は、炎症早期に末梢組織において好中球やマクロファージなどの炎症細胞から産

生・放出される炎症性サイトカインであり、他の炎症性メディエーターや白血球の遊走に関わるケモカインの産生を誘導することで炎症反応を増悪させる[21]。硝子体内注射された TNF- $\alpha$ はBAB 破綻を起こし、その機序は BAB に影響を及ぼす様々な炎症性メディエーターの産生誘導であることが報告されている[22]。TNF- $\alpha$ が病態発現に大きく寄与する眼疾患（症状）として、ヒトで難病指定されているベーチェット病による重度ぶどう膜炎が有名である。近年開発された抗 TNF- $\alpha$ 抗体製剤は本疾患に対して良好な治療成績を示し、本疾患による失明率を大きく減少させている。また最近では、TNF- $\alpha$ の過剰産生がぶどう膜炎以外の眼科疾患においても発症因子となる可能性が指摘されている[23-25]。BAB 破綻を引き起こすメディエーターとして、一酸化窒素（NO）も重要である。NO は、血流調節機構において血管拡張作用や抗アテローム性動脈硬化作用を担っており、血管の恒常性維持に重要な役割を担っている[26]。一方、NO は非常に反応性の高い気体のラジカル分子でもあり、生体膜を自由に通り抜け、細胞および組織に対し強い毒性を示す。炎症やストレス時における NO の過剰産生には、誘導型 NO 合成酵素（iNOS）が関与する。ぶどう膜炎発症時、眼内組織において高発現する iNOS により産生誘導された NO は、血管透過性亢進作用により BAB を崩壊させることで[27]、ぶどう膜炎の病態形成に関与する。

上記の炎症性メディエーターを含む数多くの炎症関連蛋白質の遺伝子発現は、転写因子により制御されている。その中で核内因子（NF)- $\kappa$ B は免疫応答において中心的役割を果たす転写因子の一つとされ、炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの生理現

象に広く関与する。哺乳類において、NF- $\kappa$ Bファミリーには五つのサブユニット (p50、p65 (RelA)、c-Rel、p52、RelB) が存在し、通常は二量体を形成している。最も一般的な NF- $\kappa$ B 二量体は、p65/p50 である。通常状態の NF- $\kappa$ B は、細胞質内に存在する制御因子、inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)- $\alpha$  と結合し、核内移行シグナルがマスクされた形で不活性化されている。炎症性サイトカイン、フリーラジカル、紫外線、リポ多糖 (LPS) などのストレス刺激が加わると、細胞膜上の受容体を介して NF- $\kappa$ B 経路が活性化される。NF- $\kappa$ B 経路の上流にはいくつかの分岐が存在するが、I $\kappa$ B- $\alpha$  の活性制御因子である I $\kappa$ B キナーゼ (IKK) より下流は共通経路となる。刺激に伴い活性化した IKK は I $\kappa$ B- $\alpha$  をリン酸化し、ユビキチン化を受けた I $\kappa$ B- $\alpha$  は分解される。I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解により核内へ移行可能となった NF- $\kappa$ B は、ターゲット遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に結合し、遺伝子発現を促進する。NF- $\kappa$ B 経路はぶどう膜炎を含む各種炎症性疾患の発症に大きく関与することが明らかとされており [28–30]、本転写因子をターゲットとした分子標的治療薬の開発が広く進められている。

前述の通り、原因が特発性であることが多いぶどう膜炎では、抗炎症治療が主体となることが多い。現在利用可能な抗炎症薬は、コルチコステロイド、NSAIDs、免疫抑制剤が一般的であり、ヒトでは一部抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤などの分子標的薬が認可されている。これらの薬剤はぶどう膜炎に対して非常に有効であり、その根拠となるデータも多数報告されている [31, 32]。しかしながら、これらの薬剤には全身性および局所の副作用や治療適応となるケースの制限などの問題が存在し [32]、治療を断念するケースが

少なくない。そのため、眼科学全体における重要課題として、既存薬剤に代わる安全かつ広範なぶどう膜炎に有効となる新規治療薬の開発が掲げられてきた。

従来、ファイトケミカル（野菜、果物、豆類、植物など）由来の植物性食品が生活習慣病の予防に効果があるとされ、その機序に抗酸化作用が関与することが分かってきた。そして近年、抗酸化作用の起源となる物質の単離が幅広く行われるようになり、数多くの抗酸化物質が同定されてきた。その中でも様々な植物性食品に多く含有される物質が、チロソール（2-(4-Hydroxyphenyl) ethanol）である。チロソールは、とくにオリーブ油や白ワインに多く含有されるフェノール化合物の一つであり、抗糖尿病、抗腫瘍、心保護および神経保護作用などの多彩な生理学的活性作用が報告されている[33-36]。またチロソールは、LPS 刺激ヒト末梢血単球やホルボールエステル刺激マクロファージ様株化細胞における炎症反応、およびマウス LPS 誘導性急性肺障害モデルにおける炎症起因性肺障害に対して抑制効果を示すことが報告されている[37-39]。そこで著者は、チロソールによる抗炎症作用を眼組織へと展開し、ぶどう膜炎に対する有効性評価を試みた。

本研究は三つの章で構成され、第 1 章では培養細胞におけるチロソールの抗炎症効果、第 2 章ではラットのエンドトキシン誘発性ぶどう膜炎モデルにおけるチロソールの BAB 破綻抑制効果、第 3 章ではイヌの前房穿刺誘発性ぶどう膜炎モデルにおけるチロソールの BAB 破綻抑制効果について検証した。

## 本論

### 第 1 章 チロソールのマウスマクロファージ細胞株における 抗炎症作用および機序の検証

#### 緒言

炎症反応とは、様々な刺激により損傷および破壊を受けた組織や生体における、原因因子の排除のために傷害の修復や創傷治癒を惹起する防御および修復反応である。炎症を起こす刺激は、外傷、感染、自己免疫、アレルギー、腫瘍浸潤、虚血、毒物など多様であり、グラム陰性細菌の細胞壁成分である LPS（エンドトキシンの化学的本体）もその一つとして知られている。マクロファージは生体内に侵入した病原体に対して最初の防衛を担う細胞であり、細胞膜上に LPS を特異的に認識する toll-like receptor (TLR)-4 を発現している [40, 41]。TLR-4 はマクロファージをはじめとした炎症細胞だけでなく、各組織における上皮細胞などでも発現がみられる [42, 43]。LPS が TLR-4 に認識されると、転写因子経路が活性化され、炎症性サイトカインやケモカイン、アラキドン酸代謝産物などのメディエーターの産生を介して炎症反応が誘起・増幅される [44, 45]。

序論で述べたように、チロソールは *in vitro* および *in vivo* 研究において抗炎症効果が証明されている物質である。本章では、チロソールのぶどう膜炎に対する効果検証に先立ち、当研究室でも LPS 刺激マウスマクロファージ細胞株を用いたチロソールの炎症反応抑制効果の検証および機序解明を試みた。

## 材料および方法

### 1. 試薬

LPS (from *Salmonella enterica* serotype typhimurium) およびチロソール (2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol) は、Sigma-Aldrich Japan K.K. (Tokyo, Japan) より購入した。細胞培養の際に使用した牛胎児血清 (FBS)、ペニシリンおよびストレプトマイシン (Pen-Strep) および RPMI 培地は、Life Technologies Japan, K.K. (Tokyo, Japan) より購入した。ウェスタンブロット解析に使用した一次抗体は全てウサギポリクローナル IgG 抗体であり、抗 COX-2 および抗 iNOS 抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) より、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。ウェスタンブロット解析に使用した二次抗体は、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体であり、GE Healthcare Japan Corporation (Tokyo, Japan) より購入した。また、免疫細胞化学染色で使用した抗 NF- $\kappa$ B p65 ウサギポリクローナル IgG 一次抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より、アレクサフルオル 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体は Cell Signaling Technology Japan, K.K. (Tokyo, Japan) より購入した。

### 2. 細胞培養

本実験で使用したマウスの単球性白血病由来の株化細胞 RAW264.7 は、American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) より購入した。細胞は、非動化 FBS および Pen-Strep がそれぞれ 10% および 1% 添加された RPMI 培地中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>

の条件下で培養された。なお、本実験で使用した細胞の継代数は、すべて 20 以下のものとした。

### 3. チロソール処置と炎症誘起

適切な細胞数に希釈された細胞懸濁液を 1 mL ずつプレート内に播種し、チロソール処置の 1 時間前に 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で細胞を培養しウェル底に定着させた。炎症性メディエーターの濃度測定および炎症関連酵素の発現量評価では 24 穴プレートを  
使用し、転写因子の免疫細胞化学染色では 4 穴プレートの底にカバーガラスを置いたものを使用した。培養液除去後、各濃度のチロソール（最終濃度 10、50、100 μM）添加あるいは非添加の培地 1 mL を加え、24 時間培養した。その後、培地交換することなく、LPS（最終濃度 1 μg/mL）あるいは滅菌生理食塩水を 10 μL 培地内に添加した。群分けは、LPS およびチロソール非処置をコントロール群、LPS 感作およびチロソール非処置を LPS 群、LPS 感作および 10 μM チロソール処置を Tyr (10) 群、LPS 感作および 50 μM チロソール処置を Tyr (50) 群、LPS 感作および 100 μM チロソール処置を Tyr (100) 群とした。細胞の LPS 感作時間は、TNF-α、PGE<sub>2</sub>、NO の産生および COX-2、iNOS の発現に関しては 24 時間とし、NF-κB の細胞内局在に関しては 30 分間とした。なお、上記の LPS 感作時間は、予備実験により各パラメータのピークが確認された時間である。

### 4. 細胞生存率の測定

細胞生存率の評価には、Cell Counting Kit-8 (Dojindo

Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan) を用い、各群の使用サンプル数を  $n=3$  とした。キットの推奨プロトコルに従い、RAW264.7 細胞を 96 穴プレート内に播種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  の条件下で 24 時間前培養した。培養液除去後、各濃度のチロソール (10、50、100  $\mu\text{M}$ ) 添加あるいは非添加の培地 100  $\mu\text{L}$  を加え、48 時間培養した。チロソール処置後、培養液に Cell Counting Kit-8 溶液を添加し、3 時間呈色反応させた。吸光度の測定には MTP-300 マイクロプレートリーダー (Corona Electric Co., Ltd., Ibaraki, Japan) を使用し、測定波長 450 nm で吸光度を測定した。各群の吸光度からブランク (培地のみ) の吸光度を減算し、その値をコントロール群 (チロソール非添加) における平均値で除することで細胞生存率を算出した。

#### 5. 各種炎症性メディエーター濃度の測定

チロソール (10、50、100  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間前処置 (あるいは非処置) および LPS の 24 時間感作 (あるいは非感作) 後における培養液中の  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{PGE}_2$  および  $\text{NO}$  の濃度測定を行った ( $n=4$ /群)。 $\text{TNF-}\alpha$  および  $\text{PGE}_2$  の濃度測定は、市販の ELISA キット ( $\text{TNF-}\alpha$ : R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA.;  $\text{PGE}_2$ : Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) を用いて推奨プロトコルに従い行った。 $\text{NO}$  濃度は、市販の測定キット ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  Assay Kit-C II (Colorimetric) ~Griess Reagent Kit~; Dojindo Molecular Technologies Inc.) を用いて推奨プロトコルに従い測定を行った。吸光度の測定には MTP-300 マイクロプレートリーダーを用い、 $\text{TNF-}\alpha$  と  $\text{PGE}_2$  では測定波長を 450 nm、補正波長

を 540 nm とし、NO では測定波長を 540 nm とした。

## 6. 炎症関連酵素の発現量評価

ウェスタンブロット法により RAW264.7 細胞における COX-2 および iNOS の発現量を評価した (n=3/群)。チロソール (10、50、100  $\mu$ M) の 24 時間前処置 (あるいは非処置) および LPS の 24 時間感作 (あるいは非感作) 後、RAW264.7 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) で 3 回洗浄し、NP40 細胞溶解バッファー (1% NP40、50 mM Tris-HCl バッファー pH 7.5、150 mM NaCl、10% グリセロール、1 mM ブッ化フェニルメチルスルホニル、5 mM プロテアーゼインヒビターカクテル; Cell Signaling Technology Japan, K.K.) 200  $\mu$ L をウェル内に添加した。細胞溶解バッファーを添加し氷上で 20 分間静置した後、スクレーパーを用いて細胞溶解液を回収し、遠心分離機 (Centrifuge 5418 R; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を用いて 14000 g、4°C で 5 分間遠心分離した。遠心分離により得られた上清の一部は、ビシニコニン酸 (BCA) 蛋白質濃度測定キット (Pierce, Rockford, IL, USA) による蛋白質濃度測定に用いられた。残りの上清を同量のサンプルバッファー (ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 還元バッファー; 0.125 M Tris-HCl バッファー pH 6.8、5% SDS、10% 2-メルカプトエタノール、20% グリセロール、0.1% ブロムフェノールブルー) と混合し、95°C、4 分間でヒートブロックを行った。サンプルは使用まで 4°C で保存された。

同量 (1  $\mu$ g) の蛋白質を含むサンプルを電源装置 (PowerPac™ HC; Nippon Bio-Rad Laboratories K.K., Tokyo, Japan) を用い

て 8% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した (200V、400mA、約 45 分)。同電源装置を用いてセミドライ式により分離蛋白質をフッ化ポリビニルデンメンブラン (Merck Millipore, Co., Bedford, MA, USA) に転写した (15V、3A、15 分)。その後、メンブランを滅菌蒸留水で 10 倍希釈した PVDF Blocking Reagent (TOYOBO, Ltd., Osaka, Japan) に室温で 1 時間浸漬し、ブロッキング処理をした。ブロッキング後、メンブランを 0.1% Tween20 含有 Tris-HCl バッファー (TBS-T) を用いて 5 分間×3 回洗浄した。洗浄後、一次抗体を Solution 1 (TOYOBO, Ltd.) により希釈し、メンブランに添加後、室温で 1 時間反応させた。一次抗体の希釈倍率は、抗 COX-2 抗体および抗 iNOS 抗体では 200 倍、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体では 100 倍とした。反応後、メンブランを TBS-T で 5 分間×3 回洗浄し、Solution 2 (TOYOBO, Ltd.) により 20000 倍希釈した HRP 標識二次抗体をメンブランに添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、メンブランを TBS-T で 5 分間×3 回洗浄し、ECL Plus Western Blotting Detecting Reagents (GE Healthcare) を添加後、ケミルミネッセンス撮影装置 (FluorChem<sup>TM</sup>; Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, USA) を用いて目的蛋白質のバンドの可視化ならびにシグナル強度の数値化を行った。各蛋白質の発現量は、COX-2 と iNOS のシグナル強度を同サンプルの  $\alpha$ -tubulin のシグナル強度で除することで得られる相対シグナル強度を基に評価した。結果および図で示した数値は、各群の相対シグナル強度の平均値をコントロール群の相対シグナル強度の平均値で除した値である。

## 7. 転写因子の免疫細胞化学的検索

免疫細胞化学染色により NF- $\kappa$ B の細胞内局在を観察し、転写因子活性について評価した。チロソール（最終濃度 100  $\mu$ M）の 24 時間前処置（あるいは非処置）および LPS の 30 分間感作（あるいは非感作）後、RAW264.7 細胞を PBS で 2 回洗浄し、100% メタノールにより 20 分間、 $-20^{\circ}\text{C}$  で固定および透過処理を行った。メタノール処理後、細胞を TBS-T で 1 分間洗浄し、3%ヤギ血清（Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan）含有 TBS-T をウェル内に添加し、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング後、1%ヤギ血清含有 TBS-T を用いて 200 倍希釈された抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体をウェル内に添加し、1 時間  $4^{\circ}\text{C}$  で反応させた。反応後、TBS-T で 5 分間  $\times$  4 回洗浄し、続いて 1%ヤギ血清含有 TBS-T を用いて 1000 倍希釈されたアレクサフルオル標識二次抗体をウェル内に添加し、室温で 1 時間、暗室条件下で反応させた。反応後、細胞を滅菌蒸留水で 5 分間、1 回の洗浄を行った。核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて染色した。一連の処理をした細胞が付着しているカバーガラスをウェル底から取り出し、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E600; Nikon Co., Tokyo, Japan) を用いて観察、撮影を行った。

## 8. 統計解析

得られたデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。3 群以上の独立多群間におけるパラメトリック検定には、一元配置分散分析

(one-way ANOVA) および多重比較に Tukey 検定を行った。全ての統計分析は STATMATE III (ATMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行い、有意水準 ( $P$ ) は 0.05 未満とした。

## 結果

### 1. 細胞生存率

Cell Counting Kit-8 を用いて、各濃度 (10、50、100  $\mu\text{M}$ ) のチロソール 48 時間処置による RAW264.7 細胞の細胞生存率への影響を評価したところ、いずれの濃度も細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 1-1)。この結果を受け、以下の培養細胞実験では 10、50、100  $\mu\text{M}$  のチロソールを使用した。

### 2. 各種炎症性メディエーター濃度

LPS 感作 24 時間後におけるコントロール群の細胞培養液上清中の TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度は、それぞれ  $761.0 \pm 116.8$  pg/mL、 $398.4 \pm 85.1$  pg/mL、 $0.5 \pm 0.4$   $\mu\text{M}$  であった。LPS 群における TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度はそれぞれ  $8172.0 \pm 1139.1$  pg/mL、 $731.0 \pm 106.4$  pg/mL、 $14.7 \pm 0.7$   $\mu\text{M}$  と著しい上昇を示した。培養液上清中の TNF- $\alpha$  濃度について、Tyr (10) 群では  $7939.9 \pm 704.0$  pg/mL、Tyr (50) 群では  $6163.5 \pm 517.5$  pg/mL、Tyr (100) 群では  $4027.3 \pm 331.2$  pg/mL と濃度依存的減少がみられ、100  $\mu\text{M}$  では LPS 群と比較して有意差がみられた ( $P < 0.001$ ; Fig. 1-2A)。また、PGE2 濃度についても同様に、Tyr (10) 群では  $611.9 \pm 48.7$  pg/mL、Tyr (50) 群では  $596.5 \pm 11.2$  pg/mL、Tyr (100) 群では  $449.5 \pm 53.8$  pg/mL と濃度依存的減少がみられ、100  $\mu\text{M}$  では LPS

群と比較して有意差がみられた ( $P < 0.05$ ; Fig. 1-2B)。NO 濃度についても同様に、チロソール濃度 10  $\mu\text{M}$  で  $13.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$  で  $6.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  で  $5.4 \pm 0.6 \text{ pg/mL}$  と濃度依存的な産生抑制効果を示し、50  $\mu\text{M}$  および 100  $\mu\text{M}$  の濃度では LPS 群と比較して有意な減少がみられた ( $P < 0.001$ ; Fig. 1-2C)。

### 3. 炎症関連酵素の発現量

LPS 感作 24 時間後における PGE<sub>2</sub> と NO の合成にそれぞれ関与する COX-2 および iNOS の細胞内発現量についてウェスタンブロット法により解析したところ、LPS 群で著しい増加がみられた。チロソールは、両蛋白質の発現を濃度依存的に抑制した。COX-2 については、LPS 群と比較して Tyr (50) 群 ( $P < 0.05$ ) および Tyr (100) 群 ( $P < 0.01$ ) で有意な発現減少がみられた (Fig. 1-3A)。また、iNOS については、LPS 群と比較して全ての濃度のチロソールにより有意な発現減少がみられた (Tyr (10) 群 ( $P < 0.05$ )、Tyr (50) 群 ( $P < 0.01$ )、Tyr (100) 群 ( $P < 0.01$ ); Fig. 1-3B)。

### 4. 転写因子の細胞内局在

LPS 感作 30 分後における転写因子 NF- $\kappa$ B の細胞内局在を免疫細胞化学染色により調べ、その転写因子活性について評価した。NF- $\kappa$ B の細胞内局在は、コントロール群では細胞質内であるが、LPS 群ではほぼ全ての細胞において核内への局在変化が観察された。100  $\mu\text{M}$  のチロソールは、LPS 感作による NF- $\kappa$ B の核内移行を示す細胞数を大きく減少させた (Fig. 1-4)。

## 考察

組織に常在するマクロファージは、病原体を含む様々な異物刺激をパターン認識し、アラキドン酸代謝産物や炎症性サイトカイン、ケモカインなどの炎症性メディエーターを産生することで急性炎症反応を形成する[46]。そして、その産生機序において転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が非常に重要な役割を演じることが明らかにされている[46]。RAW264.7 細胞は、炎症反応や癌などの免疫関連研究に汎用されているマウス単球性白血病由来のマクロファージ様細胞株であり、NF- $\kappa$ B 経路の活性化が確認されている。本研究において、RAW264.7 細胞を LPS で刺激したところ、30 分後に NF- $\kappa$ B の活性化に伴う核内移行を示す細胞が最も多く観察され、24 時間後には TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO の過剰産生、ならびに COX-2 と iNOS の発現増加がピークを示した。これまでの報告と同様に、LPS 刺激 RAW264.7 細胞において、NF- $\kappa$ B 経路の活性化が各種炎症関連蛋白質の遺伝子発現の促進に関与したと考えられた。また、産生誘導された TNF- $\alpha$  は刺激物質として細胞表面に存在する受容体と結合し、NF- $\kappa$ B 経路を活性化することが知られている[47]。さらに、TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO は互いの産生を促進する相加効果を有することが報告されており[48-50]、このような正のフィードバックループが炎症反応の増悪に大きく寄与する可能性が示唆された。

本研究では、BAB 破綻の要因となる炎症性メディエーターに焦点を当て、チロソール前処置によるその産生抑制効果について検討した。その結果、チロソールは、LPS 刺激による各種炎症性メ

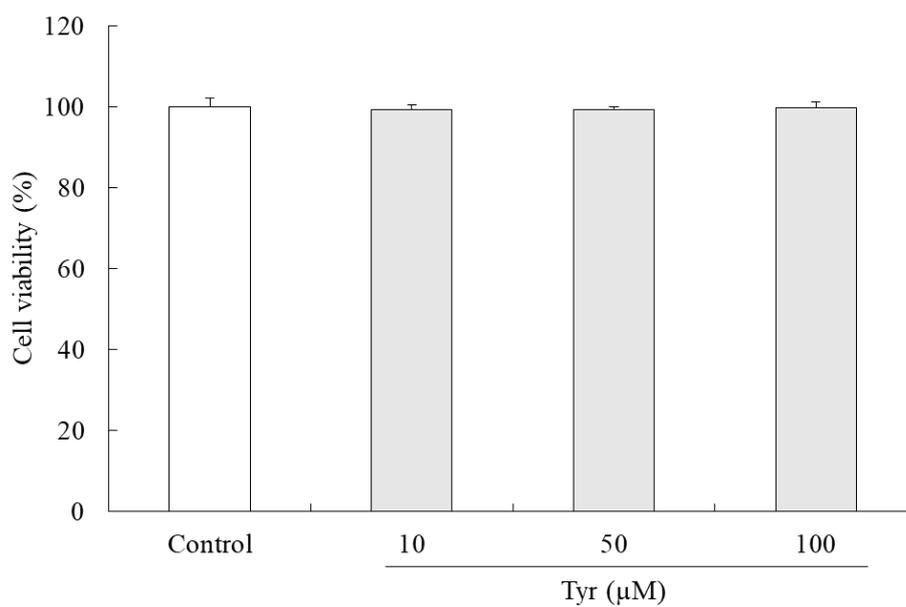
メディエーターの濃度上昇ならびにその生合成に関わる酵素の発現増加を濃度依存的に抑制し、100  $\mu\text{M}$  では LPS 群と比較していずれに対しても有意な抑制効果を示すことが明らかとなった。また、100  $\mu\text{M}$  のチロソールは、LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の核内移行を示す細胞数を大きく減少させた。したがって、チロソールは、上記の NF- $\kappa$ B 経路が関連する正のループを抑制する機序により、炎症抑制効果を示すことが考えられた。ぶどう膜炎を含む様々な眼科疾患発症眼において、活性酸素種 (ROS) の過剰産生が確認されている [51]。ROS は局所で組織障害を招くほか、NF- $\kappa$ B を活性化することで炎症反応にも関与することが報告されている [52]。また、NF- $\kappa$ B の活性阻害剤 (Caffeic acid phenyl ester; CAPE) による ROS の産生抑制が報告されていることから [53]、両者の間にも正のフィードバックが存在すると考えられている。いくつかの研究より、チロソールは ROS 産生を抑制することが証明されており [54, 55]、その作用も今回示された NF- $\kappa$ B 活性阻害に寄与した可能性が考えられた。

本章の結論として、チロソール前処置は、炎症誘起において重要な転写因子である NF- $\kappa$ B の活性阻害を機序として、BAB 破綻の要因となる炎症性メディエーターの産生抑制作用を示すことが *in vitro* レベルで示された。以上より、チロソールは眼内炎症反応に対して有効な物質である可能性が示唆された。

付図および付図説明

Fig. 1-1

各濃度のチロソールによる細胞生存率への影響



各濃度のチロソール添加後、RAW264.7細胞を48時間培養した。

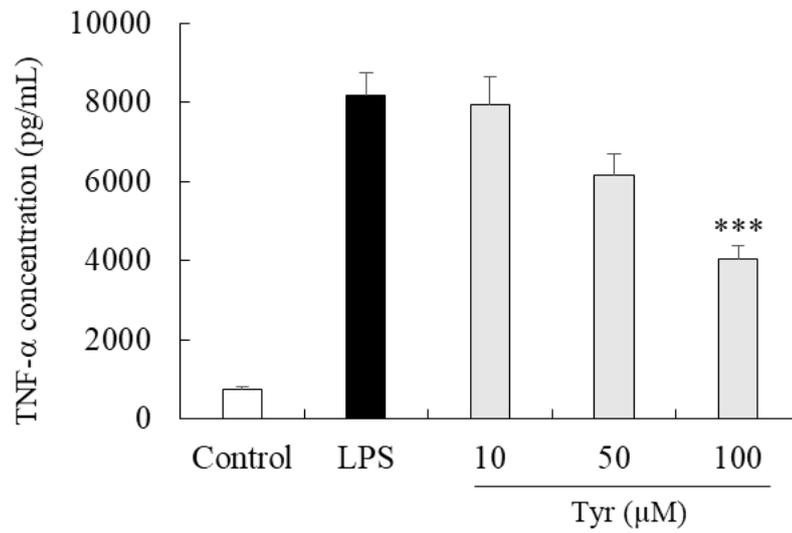
細胞生存率の評価には、Cell Counting Kit-8を使用した。

データは全て平均値 ± 標準誤差で示している (n=3/群)。

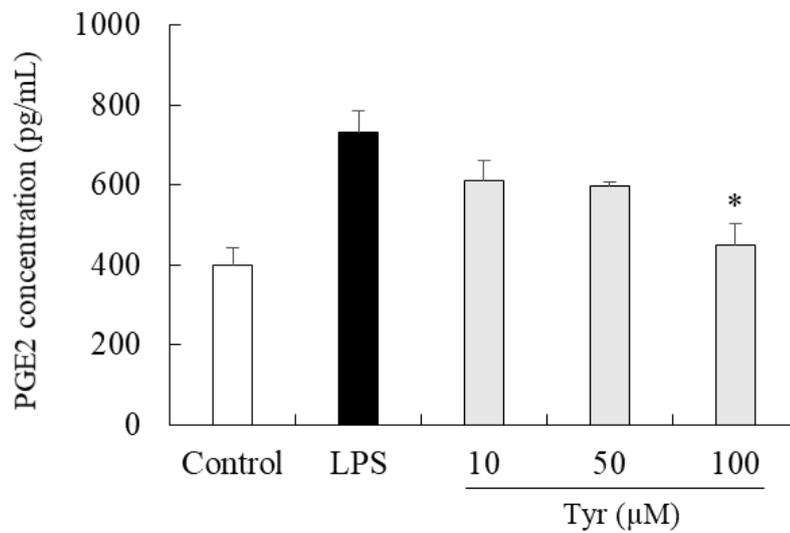
Fig. 1-2

LPS 刺激 RAW264.7 細胞における各種炎症性メディエーター産生  
に対する各濃度のチロソールの効果

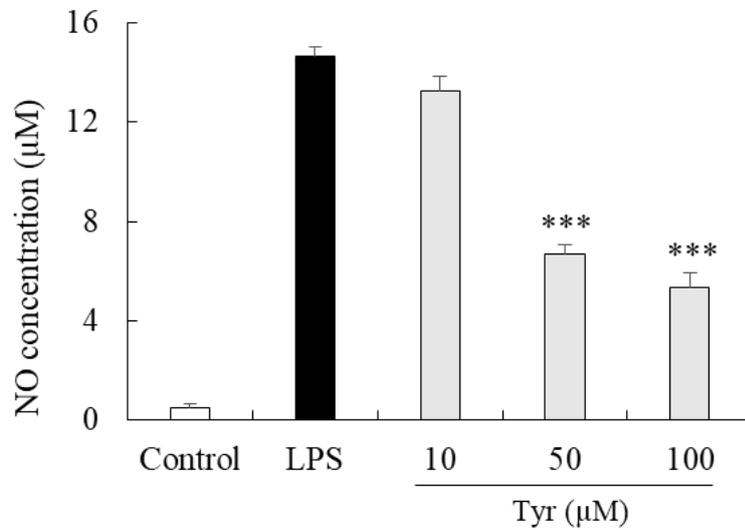
(A)



(B)



(C)



RAW264.7 細胞はチロソールと 24 時間培養後、LPS を 24 時間処置した。その培養液中における TNF- $\alpha$  (A)、PGE2 (B)、NO (C) の濃度を測定した。

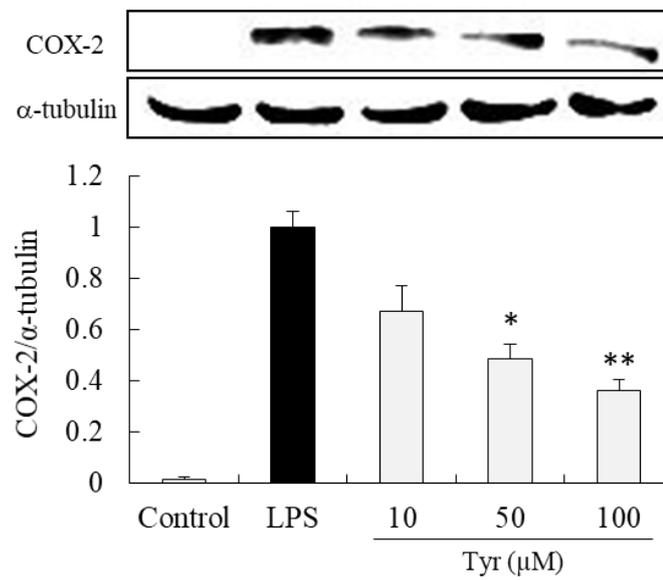
データは全て平均値  $\pm$  標準誤差で示されている (n=4/群)。

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (vs. LPS 群)。

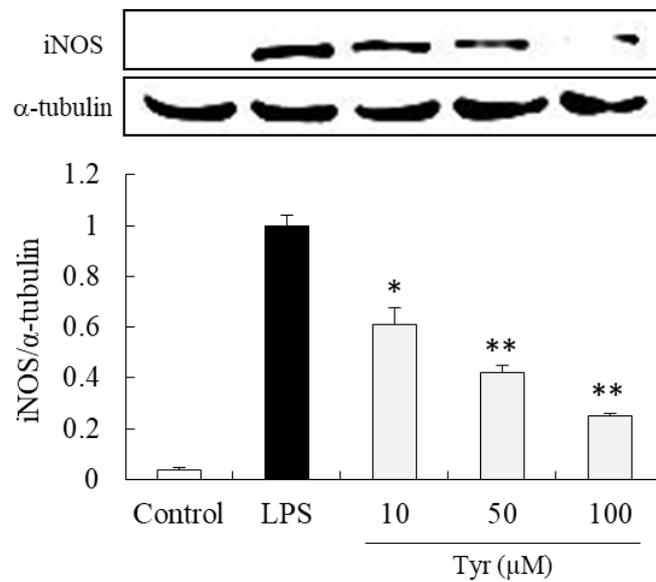
Fig. 1-3

LPS 刺激 RAW264.7 細胞における炎症関連酵素の発現に対する各濃度のチロソールの効果

(A)



(B)



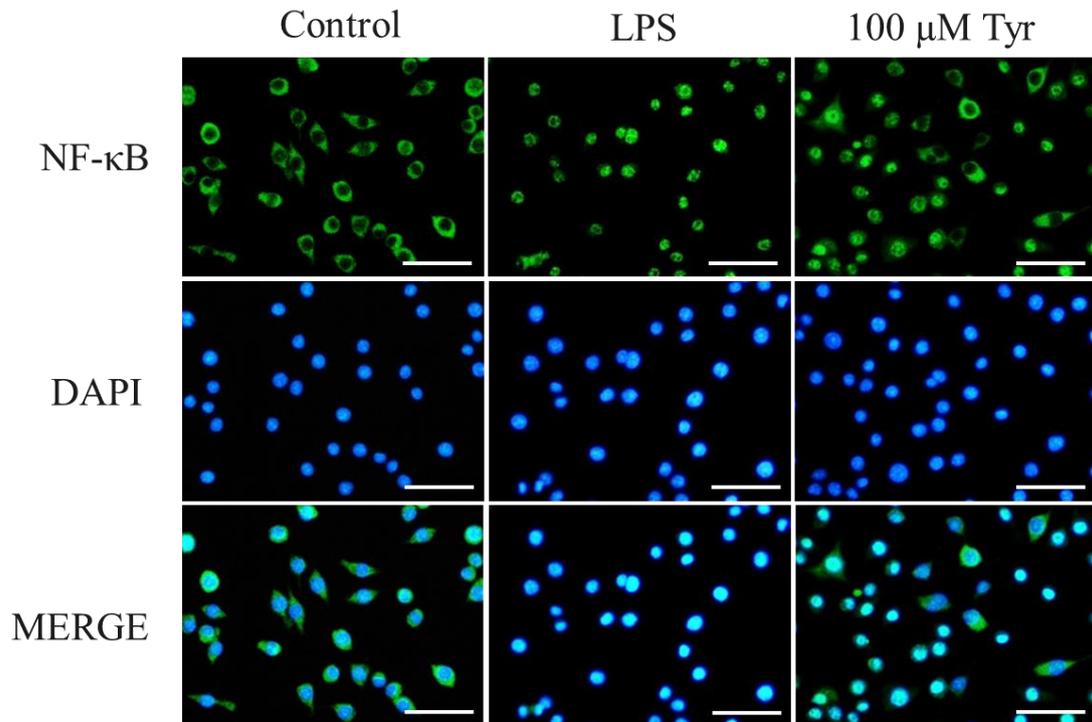
RAW264.7 細胞はチロソールと 24 時間培養後、24 時間の LPS 刺激を受けた。その細胞中における COX-2 (A)、iNOS (B) の発現量評価を行った。

データは全て平均値 ± 標準誤差で示されている (n=3/群)。

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (vs. LPS 群)。

Fig. 1-4

LPS 刺激 RAW264.7 細胞における NF- $\kappa$ B の核内移行に対する 100  $\mu$ M チロソールの効果



RAW264.7 細胞は 100  $\mu$ M のチロソールと 24 時間培養後、30 分間の LPS 刺激を受けた。その細胞中における NF- $\kappa$ B の細胞内局在について、免疫蛍光細胞染色により評価した。

100  $\mu$ M のチロソール処置群では、LPS 群でみられた NF- $\kappa$ B の核内移行を示す細胞数が大きく減少した。

Bars: 50  $\mu$ m。

## 第 2 章 チロソールのラットエンドトキシン誘発性ぶどう膜炎 モデルにおける BAB 保護作用および機序の検証

### 緒言

エンドトキシン誘発性ぶどう膜炎 (EIU) は、死滅したグラム陰性細菌による関節炎モデル作成の際に発見された現象であり、1980 年に Rosenbaum らにより最初に報告された [56]。その後、げっ歯類を用いた研究が盛んに行われるようになると、EIU が非特異的な急性前部ぶどう膜炎モデルとしてヒトのぶどう膜炎と非常に類似した病態を示すことが分かってきた。それ以降、EIU モデルはぶどう膜炎研究において、治療薬候補となる薬剤および物質の効果検証や機序解明などに広く利用されている [57-59]。ラット EIU モデルにおける初期の変化として、LPS 接種 1 時間後における虹彩血管の拡張や、接種 2 時間以内における BAB 破綻がみられる [60, 61]。その後、LPS 接種 8 時間から 12 時間後には虹彩毛様体 (ICB) における白血球浸潤が起こり、接種 24 時間後には病理組織学的所見ならびに BAB 破綻がピークに達する [61, 62]。これらの病態変化は、活性化した炎症細胞から産生・放出される各種炎症性メディエーターによるものと考えられており、その産生を統率するサイトカインの一つとして TNF- $\alpha$  が重要である [60]。PGE2 および NO は、EIU モデルにおいても BAB 破綻の主要なメディエーターであり [60]、さらに両者は EIU の病態悪化において相加効果を示す可能性が報告されている [63]。

本研究では、チロソールによるラットの EIU に対する抑制効果について検証した。また、第 1 章で示されたチロソールによる炎

症性メディエーターの産生抑制に関して確認実験を行った。

## 材料および方法

### 1. 試薬

LPS (from *Salmonella enterica* serotype typhimurium) およびチロソール (2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol) は、第 1 章と同じもの (Sigma-Aldrich Japan K.K.より購入) を使用した。免疫組織化学的染色に使用した一次抗体 (抗 COX-2、iNOS、NF- $\kappa$ B p65 および I $\kappa$ B- $\alpha$ 抗体) は、全てウサギポリクローナル IgG 抗体であり、Santa Cruz Biotechnology, Inc. より購入した。二次抗体は、ビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体であり、Nichirei Bioscience Co., Ltd. より購入した。

### 2. 供試動物

本実験では、EIU モデル動物として Lewis ラット (オス、7 週齢、170-180 g; Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を供試した。動物の飼育環境は、自由飲水および自由給餌で、6:00 a.m.から 8:00 p.m.まで明室、8:00 p.m.から翌 6:00 a.m.まで暗室となるよう管理した。動物の取扱いおよび実験内容は、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の声明に準じて行い、北里大学獣医学部の動物倫理委員会により承認認可されている。

### 3. チロソール投与と EIU 誘導

チロソールは、イソフルラン (Dainippon Sumitomo Pharma.

Co., Ltd., Osaka, Japan) 麻酔下で LPS 接種の 2 時間前、直後  
そして 2 時間後の計 3 回、尾静脈から投与した。チロソールの  
用量は 10、50、100 mg/kg とし、チロソール溶液の投与量を各  
用量間で同一にするため、滅菌生理食塩水を用いて 0.8 mL に調  
整した。また本実験では、臨床所見の評価、眼房水中の浸潤細  
胞数、蛋白質濃度とメディエーター濃度の測定、および前眼部  
の病理組織学的検索において、プレドニゾン酢酸塩 (1.0  
mg/kg; Sigma-Aldrich Japan K.K.) を陽性コントロールとして  
用いた。EIU は、0.2 mL の滅菌生理食塩水で調整された LPS 200  
μg を大腿部皮下へ 2 カ所に分け接種することにより誘導した。  
群分けは、LPS およびチロソール非処置をコントロール群、LPS  
接種およびチロソール非投与を LPS 群、LPS 接種および 10  
mg/kg チロソール投与を Tyr (10) 群、LPS 接種および 50 mg/kg  
チロソール投与を Tyr (50) 群、LPS 接種および 100 mg/kg チロ  
ソール投与を Tyr (100) 群、LPS 接種および 1.0 mg/kg プレド  
ニゾン投与を Pred 群とした。LPS 接種から評価までの時間は、  
臨床症状、眼房水中の浸潤細胞数、蛋白質濃度および炎症性メ  
ディエーター濃度、ICB の病理組織学的評価および炎症関連酵  
素の発現に関する免疫組織学的評価については 24 時間、ICB に  
おける転写因子活性に関する免疫組織学的評価については 3 時  
間とした。なお、上記の評価時間は、過去の報告と予備実験に  
より各パラメータがピークを示すことが確認された時間として  
設定した。

#### 4. 臨床所見の評価

LPS 接種 24 時間後におけるラットの前眼部を細隙灯生体顕微鏡 (KOWA SL-15 slit lamp microscope; Kowa Co., Ltd., Tokyo, Japan) により観察し、臨床症状を以下の基準で 5 段階にスコア化した (n=8/群)。なお、各個体における両眼のスコア値の平均を個体の値とした。スコア化は Ruiz-Moreno らの基準を用いて行い [64]、炎症所見がみられないものを 0、虹彩および結膜血管の分散した拡張を 1、虹彩および結膜血管の中等度の拡張を 2、前房フレアを伴う強い虹彩充血を 3、強い前房フレアを伴う瞳孔へのフィブリン付着がみられるものを 4 とした。

#### 5. 眼房水中の浸潤細胞数および蛋白質濃度の測定

LPS 接種 24 時間後、ラットに過量のペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し、安楽殺した。安楽殺直後、ラットの両眼から 30G 注射針を用いて手術用顕微鏡 (OME-1000; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 下で眼房水を採取した (両眼合計 25-30  $\mu$ L、n=8/群)。眼房水中の浸潤細胞数は、眼房水を同量の Türk 染色液と混合し、血球計算盤 (Bürker-Türk hemometer; Erma Inc., Tokyo, Japan) を用いて光学顕微鏡下で測定した。細胞数測定後、眼房水を遠心分離機 (Centrifuge 5418 R) を用いて 2500 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し上清を得た。眼房水中の蛋白質濃度は、BCA 法で測定した。吸光度測定には MTP-300 マイクロプレートリーダーを用い、測定波長は 540 nm とした。眼房水中の浸潤細胞数および蛋白質濃度は、眼房水採取日に測定した。

## 6. 前眼部の病理組織学的検索

眼房水中の浸潤細胞数および蛋白質濃度の測定で使用したラットとは異なる個体を使用し、前眼部の病理組織学的検索を実施した (n=8/群)。LPS 接種 24 時間後にラットを上記実験と同様の方法で安楽殺させた。安楽殺後、手術用顕微鏡下でラットの眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド/PBS (pH 7.4) で 12 時間固定した後、視神経乳頭付近を含む矢状断面を切り出し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋された眼球を矢状方向に薄切し (3  $\mu\text{m}$ )、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。光学顕微鏡下で ICB を含む前眼部、硝子体および網膜を観察し、以下の Jin らの基準に基づき病理所見のスコア化 (4 段階) を行った [65]。細胞浸潤がみられないものを 0、軽度の細胞浸潤がみられるものを 1、中等度の細胞浸潤がみられるものを 2、前眼部への滲出物を伴う重度の細胞浸潤がみられるものを 3 とした。

## 7. 眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度の測定

上記実験で使用したラットとは異なる個体を同様の方法で安楽殺し、両眼から採取した眼房水中の TNF- $\alpha$ 、PGE2 および NO の濃度を測定した (n=7/群)。TNF- $\alpha$  および PGE2 の濃度は、市販の ELISA キット (R&D Systems Inc.) を用いて推奨プロトコルに従い測定を行った。NO 濃度は、市販の比色法による NO 測定キット (Oxford Biomedical Research Inc., Oxford, MI, USA) を用いて推奨プロトコルに従い測定を行った。吸光度の測定には MTP-300 マイクロプレートリーダーを用い、TNF- $\alpha$  および PGE2

では測定波長を 450 nm、補正波長を 540 nm とし、NO では測定波長を 540 nm とした。

## 8. ICB における免疫組織化学的検索

LPS 接種 24 時間後の ICB における免疫組織学的検索では、病理組織学的検索で摘出、固定後パラフィン包埋された眼球組織を使用した。LPS 接種 3 時間後においては、上記とは異なるラットの眼球を同様の方法で摘出、固定しパラフィン包埋した。その後、ブロックの薄切、脱パラフィンおよびエタノールによる親水和を行い、切片を 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、オートクレーブによる熱処理により抗原を賦活化した。抗原賦活化の時間は使用する一次抗体により変更し、抗 COX-2、iNOS および I $\kappa$ B- $\alpha$ 抗体では 120°C で 5 分間、抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体では 120°C で 10 分間とした。PBS で洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために、0.3%過酸化水素化メタノールを添加し、室温で 20 分間反応させた。PBS で洗浄後、10%ヤギ血清を添加し、室温で 20 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング後、各一次抗体を添加し、4°C、overnight で反応させた。反応後、PBS で洗浄し、ビオチン標識二次抗体を反応させた (室温、30 分間)。反応後、PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Nichirei Bioscience Co., Ltd.) を添加し、室温で 40 分間反応させた。PBS で洗浄後、シンプルシステイン DAB 溶液 (Nichirei Bioscience Co., Ltd.) を添加し、発色させた。COX-2、iNOS および I $\kappa$ B- $\alpha$ に関しては、免疫組織化学的染色とヘマトキシリンによる核染色の重染色を行った。

## 9. 統計解析

得られたデータは、平均値±標準誤差で示した。3群以上の独立多群間におけるパラメトリックな検定には、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および多重比較に Tukey 検定を行った。ノンパラメトリックな検定には Kruskal-Wallis および多重解析に Newman-Keuls 検定を行った。全ての統計分析は STATMATE III を用いて行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 1. 臨床所見

LPS 接種 24 時間後における平均臨床スコアは、LPS 群で 3.75 と著しく上昇し、Tyr (10) 群で 3.5、Tyr (50) 群で 2.25、Tyr (100) 群で 1.38 と用量依存的なスコアの低下がみられた。また、50 mg/kg ( $P < 0.05$ ) および 100 mg/kg ( $P < 0.001$ ) の用量では LPS 群と比較して有意差が認められ、とくに 100 mg/kg では Pred 群 (スコア 1.50) と同等の抑制効果が示された (Fig. 2-1)。

### 2. 眼房水中の浸潤細胞数および蛋白質濃度

LPS 接種 24 時間後における眼房水中の浸潤細胞数は、コントロール群では非検出であったが、LPS 群では  $25.6 \pm 2.4 \times 10^5$  cells/mL であった。一方、Tyr (10) 群で  $17.6 \pm 3.4 \times 10^5$  cells/mL、Tyr (50) 群で  $14.1 \pm 3.9 \times 10^5$  cells/mL、Tyr (100) 群で  $8.3 \pm 2.8 \times 10^5$  cells/mL と用量依存的な眼房水中における浸潤細胞数の減少がみられ、いずれの用量でも LPS 群と比較して有意差が認めら

れた ( $P < 0.001$ )。とくに 100 mg/kg では Pred 群 ( $8.4 \pm 3.1 \times 10^5$  cells/mL) と同等の抑制効果が示された (Fig. 2-2A)。

眼房水中の蛋白質濃度は、コントロール群では  $143.0 \pm 33.2$  mg/dL であったが、LPS 群では  $2489.8 \pm 261.6$  mg/dL と顕著な上昇がみられた。チロソールは、10 mg/kg の用量で  $2053.1 \pm 446.8$  mg/dL、50 mg/kg で  $1629.0 \pm 170.0$  mg/dL、100 mg/kg で  $1457.3 \pm 237.0$  mg/dL と用量依存的な減少効果を示し、いずれの用量でも LPS 群と比較して有意差が認められた (10 mg/kg:  $P < 0.05$ 、50 mg/kg と 100 mg/kg:  $P < 0.001$ )。とくに 100 mg/kg では Pred 群 ( $1509.8 \pm 237.9$  mg/dL) と同等の抑制効果が示された (Fig. 2-2B)。

### 3. 前眼部の病理組織学的評価

LPS 接種 24 時間後の平均病理所見スコアは、LPS 群で 2.875 と著しく上昇し、Tyr (10) 群で 2.43、Tyr (50) 群で 1.75、Tyr (100) 群で 1.38 と用量依存的なスコアの低下がみられた。また、いずれの用量でも LPS 群と比較して有意差が認められ (10 mg/kg:  $P < 0.05$ 、50 mg/kg と 100 mg/kg:  $P < 0.001$ )、とくに 100 mg/kg では Pred 群 (スコア 1.50) と同等の抑制効果が示された (Fig. 2-3A)。前眼部の HE 染色像では、LPS 群でマクロファージおよび好中球を主体とした炎症細胞の前眼部への浸潤が観察されたが、100 mg/kg のチロソールにより炎症細胞浸潤の強い抑制が観察された (Fig. 2-3B)。

#### 4. 眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度

LPS 接種 24 時間後におけるコントロール群の眼房水中における NO 濃度は  $7.9 \pm 2.3 \mu\text{M}$  であり、TNF- $\alpha$  および PGE2 は非検出であった。LPS 群における TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度はそれぞれ  $195.2 \pm 30.6 \text{ pg/mL}$ 、 $1088.4 \pm 301.2 \text{ pg/mL}$ 、 $222.6 \pm 48.1 \mu\text{M}$  と顕著な上昇を示した。眼房水中の TNF- $\alpha$  濃度について、Tyr (10) 群で  $147.0 \pm 33.5 \text{ pg/mL}$ 、Tyr (50) 群で  $117.5 \pm 23.2 \text{ pg/mL}$ 、Tyr (100) 群で  $111.2 \pm 35.1 \text{ pg/mL}$  と用量依存的な減少効果がみられた (Fig. 2-4A)。また、PGE2 濃度についても同様に、Tyr (10) 群で  $727.1 \pm 311.3 \text{ pg/mL}$ 、Tyr (50) 群で  $365.5 \pm 120.5 \text{ pg/mL}$ 、Tyr (100) 群で  $298.8 \pm 146.1 \text{ pg/mL}$  と用量依存的な減少効果がみられた (Fig. 2-4B)。NO 濃度についても同様に、チロソールは 10 mg/kg の用量では  $169.4 \pm 35.0 \mu\text{M}$ 、50 mg/kg では  $147.2 \pm 31.3 \mu\text{M}$ 、100 mg/kg では  $117.3 \pm 22.7 \mu\text{M}$  と用量依存的な減少効果を示した (Fig. 2-4C)。チロソールは、LPS 接種によるこれら炎症性メディエーター産生増加に対して、全ての用量で LPS 群と比較して有意な抑制効果がみられた (10 mg/kg:  $P < 0.05$ 、50 mg/kg と 100 mg/kg:  $P < 0.001$ )。また、100 mg/kg のチロソールによるこれらのメディエーターの産生抑制効果は、プレドニゾロン (TNF- $\alpha$ :  $106.9 \pm 22.5 \text{ pg/mL}$ 、PGE2:  $308.0 \pm 157.5 \text{ pg/mL}$ 、NO:  $114.0 \pm 19.1 \mu\text{M}$ ) と同等であった。

#### 5. ICB における炎症関連酵素の発現量

PGE2 と NO の産生にそれぞれ関与する酵素、COX-2 および iNOS の ICB における発現について免疫組織化学的解析を行った。

LPS 接種 24 時間後、LPS 群で ICB 全領域における COX-2 および iNOS の著しい発現増加がみられたが、Tyr (100) 群では両蛋白質の発現減少がみられた (Fig. 2-5)。

## 6. ICB における転写因子 NF- $\kappa$ B 活性に関する評価

ICB における NF- $\kappa$ B の核内移行、ならびにその制御因子である I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解について、免疫組織化学的検索を行った。LPS 接種 3 時間における LPS 群の ICB では顕著な I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解ならびに NF- $\kappa$ B の核内移行が観察されたが、100 mg/kg のチロソールは I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解を抑制し、また NF- $\kappa$ B の核内移行を減少させた (Fig. 2-6)。

## 考察

EIU は LPS 接種により誘導される BAB 破綻を特徴とした急性ぶどう膜炎モデルであり、症状は比較的重度とされている。オスの若齢 Lewis ラットでより感受性が高いことが報告されており [60]、本研究でもこれに従った。全身性に接種された LPS は、他の組織に影響を与えることなく眼組織特異的に炎症反応を誘起する [56, 66]。眼組織に到達した LPS が組織常在マクロファージおよび ICB における上皮細胞の細胞膜に発現する TLR-4 に認識されると、様々な炎症性サイトカインやケモカインが産生誘導される [67]。それに伴い多数の炎症細胞の浸潤が起こり、さらに多量の炎症性メディエーターが産生されることで、局所炎症が増幅される。本研究では、LPS 接種 3 時間後におけるラットの ICB において、NF- $\kappa$ B の活性化に伴う核内移行ならびにその制御因子で

ある  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  の分解が観察された。LPS 接種 24 時間後には、前眼部における炎症細胞浸潤、眼房水中における各種炎症性メディエーター濃度の上昇、そして BAB 破綻による眼房水中の浸潤細胞数の増加および蛋白質濃度の上昇がみられ、また臨床スコアの上昇が認められた。EIU モデルに関する報告では、 $\text{TNF}-\alpha$  は LPS 接種 3 時間および 24 時間後の二峰性に、眼房中における産生のピークを示す [60]。また、眼房水中における  $\text{PGE}_2$  は、LPS 接種 6 時間後から上昇が確認され、約 24 時間後に NO とともに最大濃度を示すとされる [60, 68]。 $\text{TNF}-\alpha$  は、炎症反応の急性期に産生誘導され、他の炎症性メディエーター産生を促進するサイトカインであり、眼組織でも同様の作用を示す。PGs および NO については、両阻害剤の併用により EIU 抑制効果がより強まることが報告されており [63]、両メディエーターは EIU 悪化に対して相加的にはたらくと考えられている。上記結果および過去の報告より [69]、EIU モデルにおける BAB 破綻の機序において、LPS により活性化される  $\text{NF}-\kappa\text{B}$  経路と、それに伴う各種炎症性メディエーターの過剰産生が深く関与することが示唆された。

ラットにおけるチロソールの血中半減期は約 70 分間と短く [70]、また経口投与 1 時間後に全身性に広く分布し、4 時間後には尿中に排泄されるというデータが報告されている [71]。そのため本研究では、チロソールの血中濃度をより長く維持させるために、単回投与ではなく LPS 接種の 2 時間前から 2 時間毎に 3 回に分けて投与を行った。その結果、チロソールはぶどう膜炎症状を用量依存的に改善し、100 mg/kg の用量ではプレドニゾロンと同等の効果を示した。また、チロソールは眼房水中の浸潤細胞数お

よび蛋白質濃度、前眼部の病理所見スコア、そして眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度を用量依存的に改善し、とくに 100 mg/kg ではプレドニゾロンと同等の強い効果を示した。さらに、100 mg/kg のチロソールは ICB における COX-2 および iNOS の高発現、ならびに NF- $\kappa$ B の活性化に伴う核内移行と I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解を大きく抑制した。以上の結果より、チロソールは ICB において NF- $\kappa$ B 経路の活性化を阻害する機序で各種メディエーターの産生を抑制し、BAB 破綻を軽減したと考えられた。また、チロソールにより BAB 破綻が軽減され、前眼部における炎症細胞浸潤が抑制されたことで、炎症の過剰な増幅が回避されたことが推察された。

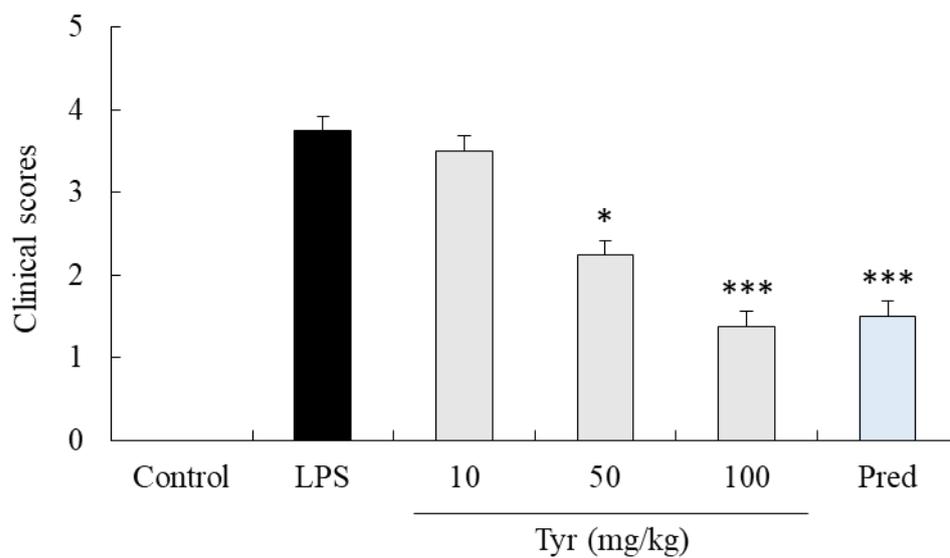
チロソールは安全域が非常に広く、ラットにおける半数致死量 (LD50) は経口投与で 2700 mg/kg、腹腔内投与で 1700 mg/kg と報告されている [72]。本研究では、最大用量 100 mg/kg のチロソール静脈内投与による主要臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓) への影響を病理組織学的に評価したところ、異常は認められなかった (データ示さず)。

EIU はグラム陰性細菌の細胞壁構成成分である LPS の接種により誘導される急性ぶどう膜炎モデルである。しかしながら、前述の通り NF- $\kappa$ B 経路の活性化は LPS 特有の反応ではなく、EIU は感染性というよりは非特異的ぶどう膜炎と認識されている。したがって、チロソールは NF- $\kappa$ B の活性化が病態発現・悪化に関与すると考えられる様々なぶどう膜炎に対して有効となる可能性が考えられた。

付図および付図説明

Fig. 2-1

ラット EIU モデルの臨床スコアに対する各用量のチロソールの効果



LPS 接種 24 時間後におけるラットの前眼部における臨床所見に基づくスコアリング。

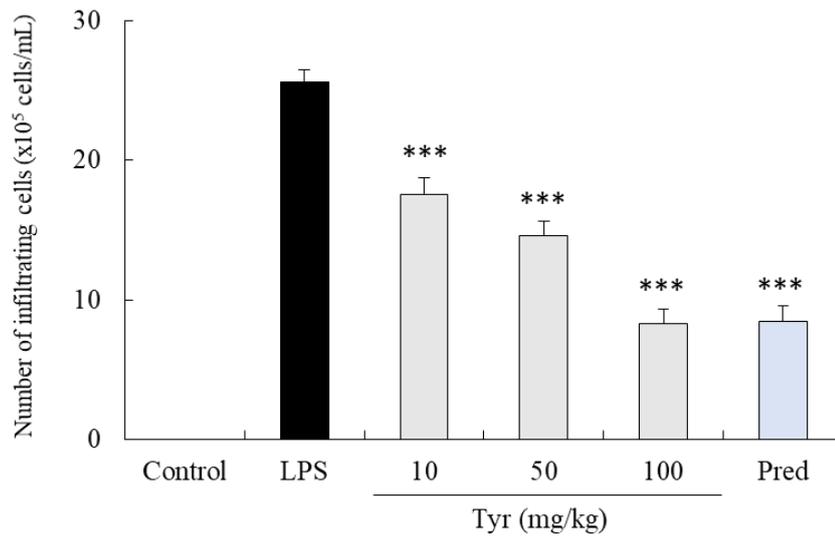
データは全て平均値 ± 標準誤差で示している (n=8/群)。

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (vs. LPS 群)。

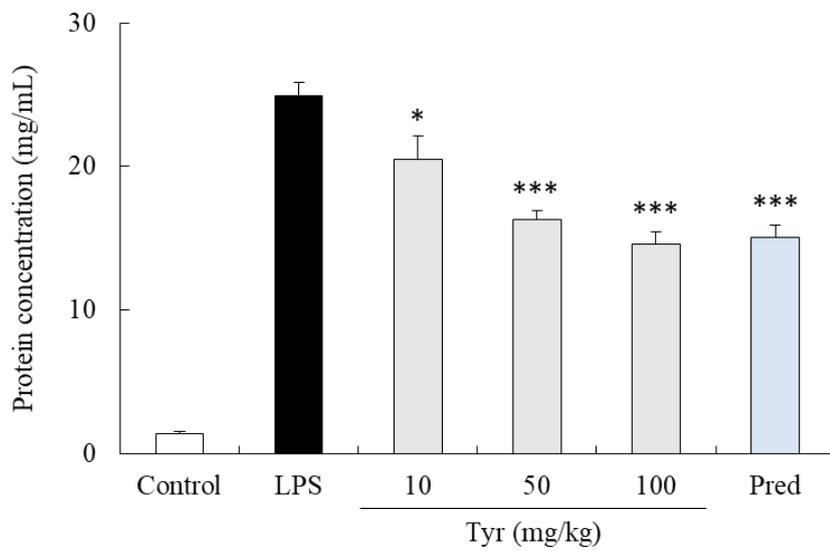
Fig. 2-2

ラット EIU モデルの眼房水における浸潤細胞数および蛋白質濃度に対する各用量のチロソールの効果

(A)



(B)



LPS 接種 24 時間後におけるラットの眼房水中の浸潤細胞数 (A)  
および蛋白質濃度 (B)。

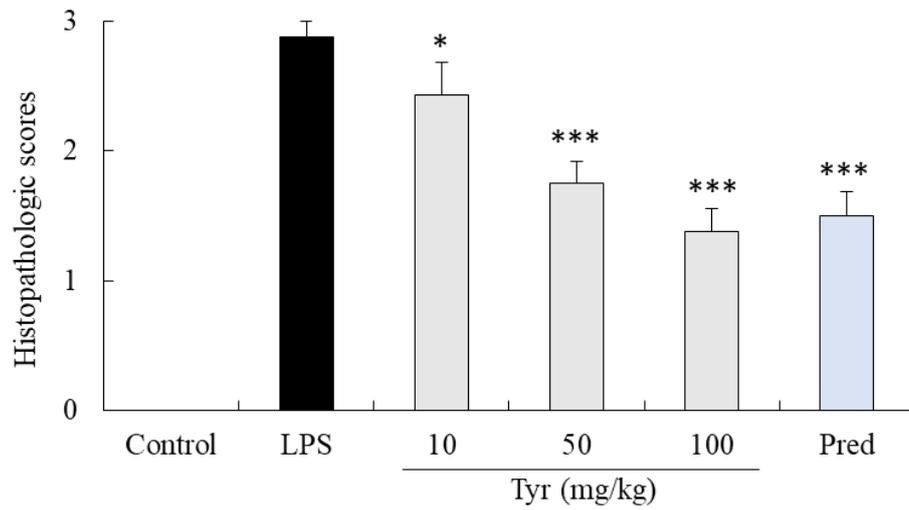
データは全て平均値  $\pm$  標準誤差で示している (n=8/群)。

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (vs. LPS 群)。

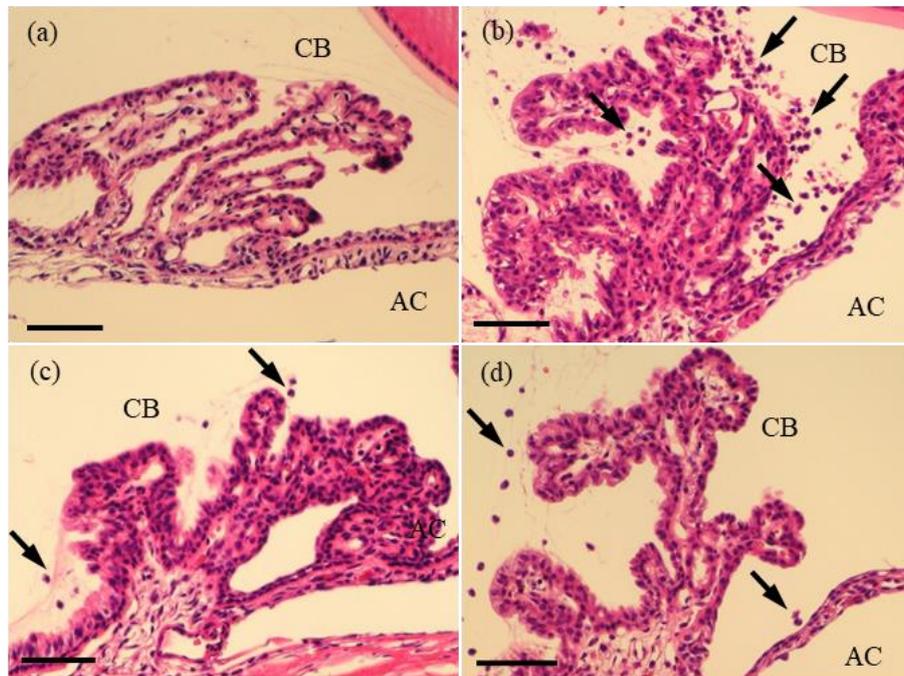
Fig. 2-3

ラット EIU モデルの前眼部における病理組織学的所見に対する  
各用量のチロソールの効果

(A)



(B)



LPS 接種 24 時間後におけるラットの前眼部の病理所見スコア (A) と HE 染色像 (B)。

スコア値は全て平均値  $\pm$  標準誤差で示している (n=8/群)。

HE 染色像において、コントロール群 (a) では前眼部に炎症細胞の浸潤は全く見られなかったが、LPS 群 (b) ではマクロファージおよび好中球を主とした著しい細胞浸潤が観察された。Tyr (100) 群 (c) では、Pred 群 (d) と同程度の炎症細胞浸潤の減少が認められた。

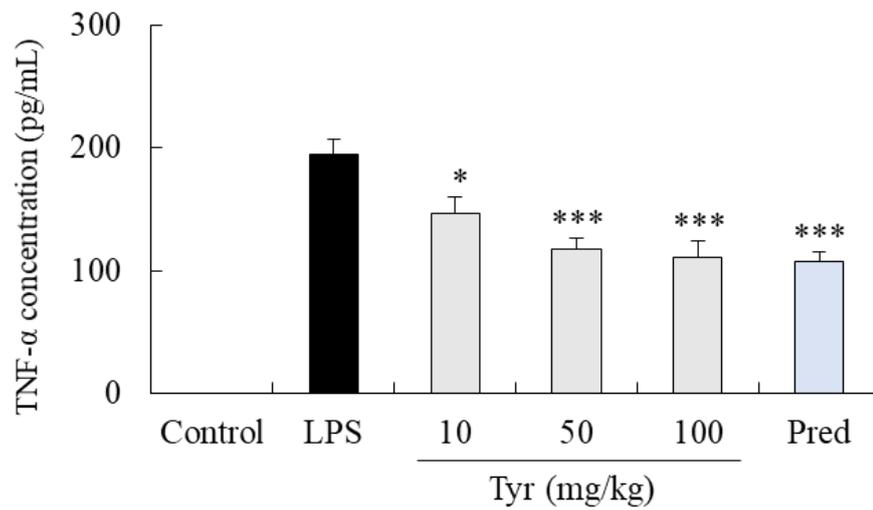
Bars: 100  $\mu$ m。矢印: 前眼部における炎症細胞。CB: 毛様体。

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (vs. LPS 群)。

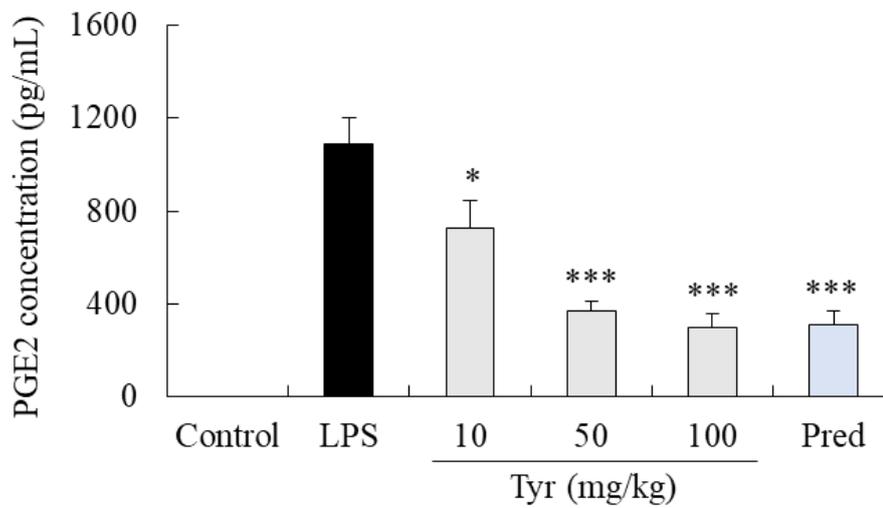
Fig. 2-4

ラット EIU モデルの眼房水中における各種炎症性メディエーター濃度に対する各用量のチロソールの効果

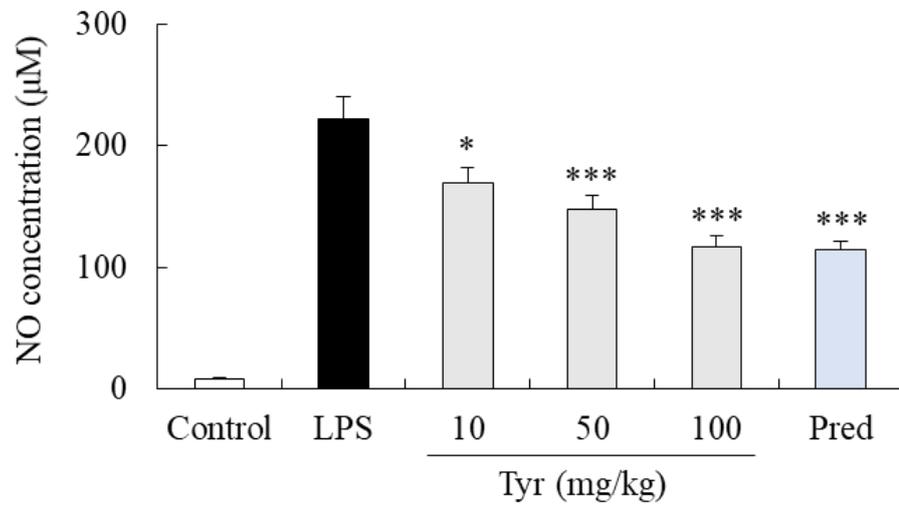
(A)



(B)



(C)



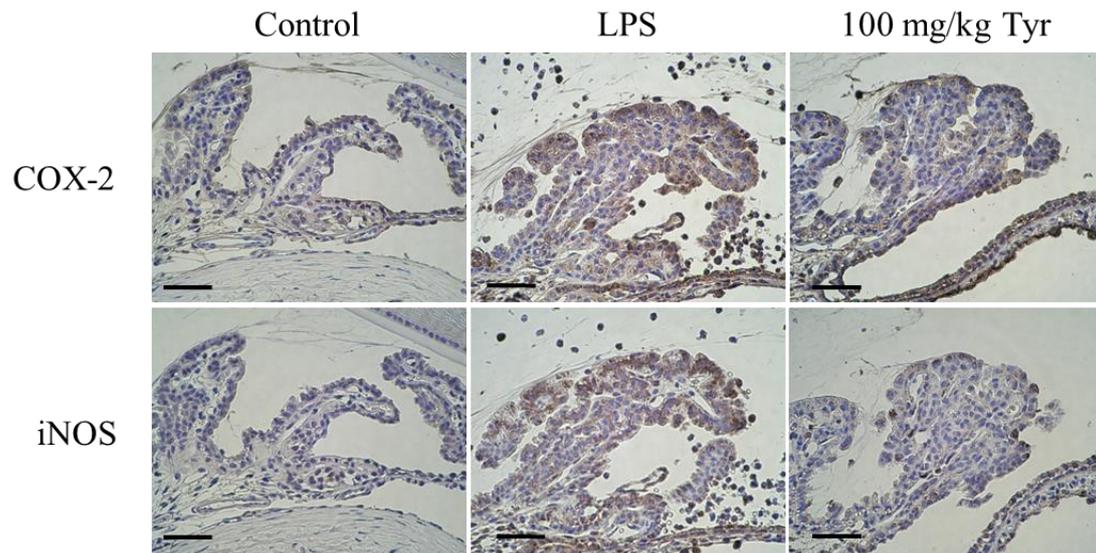
LPS 接種 24 時間後におけるラットの眼房水中における TNF- $\alpha$  (A)、PGE2 (B)、NO (C) の濃度。

データは全て平均値  $\pm$  標準誤差で示している (n=7/群)。

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (vs. LPS 群)。

Fig. 2-5

ラット EIU モデルの ICB における炎症関連酵素発現に対するチロソール 100 mg/kg の効果



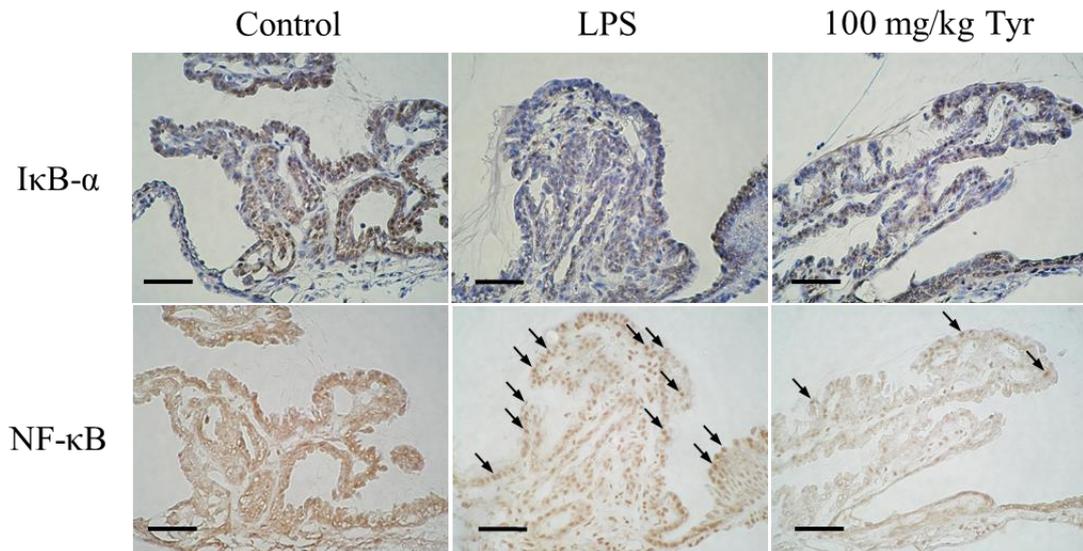
LPS 接種 24 時間後のラット ICB における COX-2 および iNOS の発現を免疫組織化学染色で評価した。

LPS 群ではいずれの酵素も著しい増加が観察されたが、Tyr (100) 群では両蛋白質の発現が抑制された。

Bars: 100  $\mu$ m。

Fig. 2-6

ラット EIU モデルの ICB における NF- $\kappa$ B 経路活性化に対するチロソール 100 mg/kg の効果



LPS 接種 3 時間後のラット ICB における I $\kappa$ B- $\alpha$  の発現ならびに NF- $\kappa$ B の細胞内局在を免疫組織化学染色で評価した。

LPS 群では I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解ならびに NF- $\kappa$ B の核内移行が観察されたが、Tyr (100) 群ではいずれの現象も抑制された。

Bars: 100  $\mu$ m。矢印: NF- $\kappa$ B が核内移行を示す上皮細胞。

### 第 3 章 チロソールのイヌ前房穿刺誘発性ぶどう膜炎モデル における BAB 保護作用の検証

#### 緒言

前房穿刺 (ACP) は、注射針の前房内穿刺による眼房水抜去のことで、診断あるいは治療を目的として臨床眼科で一般的に行われている手技である。他方で、ACP は一過性の BAB 破綻を誘起することから、イヌ、ネコおよびウサギなどの動物種におけるぶどう膜炎を誘導する方法として利用されてきた [73-75]。ACP は EIU よりも早期かつ重度の BAB 破綻を起こし、その結果、二次房水中の蛋白質濃度が著しく上昇する [73-75]。これまで本モデルに関して、既存の抗炎症治療薬による BAB 破綻抑制効果の検証が多くなされてきた [73, 76, 77]。一方、ACP 誘発性ぶどう膜炎の病態について検証した研究は著者が知る限り 1 報のみであり [78]、本モデルにおける BAB 破綻メカニズムは十分に明らかにされていない。加えて、イヌの眼内炎症反応に関連するメディエーターはいまだほとんど特定されておらず、病態に関して不明な点が多く残されている。

以上の背景より、本研究ではまず EIU モデルとならび急性 BAB 破綻を特徴とする ACP 誘発性ぶどう膜炎をイヌで誘導し、その基礎的データの収集に基づく病態解明を試みた。さらに、その結果を踏まえ、チロソールの本モデルにおける BAB 破綻抑制効果について検証した。

#### 材料および方法

## 1. 供試動物

本実験に供試されたビーグル犬（オスおよびメス、4-6歳、8.5-11.7 kg）は、動物繁殖研究所（Ibaraki, Japan）より購入した。イヌは、適切な温度、湿度および照明の環境下で個体毎のケージ内で飼育し、1日1回市販のドライフード（CLEAR Dog Diet CD-5M®; CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan）を給餌した。全てのイヌは、実験で使用される前に完全な眼科検査（外貌検査、細隙灯生体顕微鏡検査、眼底検査、シルマー涙液試験、角結膜のフルオレセイン染色、眼圧測定）を実施し、眼に異常がないことを確認した。実験終了後、ACP眼に対して、0.1%デキサメタゾン点眼液と0.3%オフロキサシン点眼液による点眼治療をTIDで5日間にわたり実施した。動物の取扱いおよび実験内容は、ARVOの声明に準じて行われ、北里大学獣医学部の動物倫理委員会により認可されている。

## 2. チロソール投与とACPによるぶどう膜炎の誘導

チロソールは、ACP実施日の2日前から当日の朝までBID（8:00 a.m.と8:00 p.m.）にて計5回、ミートボール状にした少量のフードの中に包み経口投与した。チロソールを含まないミートボールを同スケジュールで与えられたイヌをコントロール群とし、各用量（100、200、400 mg/kg）のチロソールが投与されたイヌを、それぞれTyr（100）群、Tyr（200）群、Tyr（400）群とした。また、本実験ではカルプロフェン（2.2 mg/kg, 経口投与, リマダイル®; Zoetis Japan K.K., Tokyo, Japan）を陽性コントロールとして用い、Carp群とした。ACP処置は、メデトミジン（0.01 mg/kg;

Nihonzenyaku Industry Co., Ltd., Fukushima, Japan)、ミダゾラム (0.15 mg/kg; Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japan) およびブトルファノール (Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan) の混合カクテルを静脈内投与し、鎮静条件下で行われた。ACP はランダムに選んだ片眼のみに行い、穿刺前に眼球および周囲の洗浄、ならびに 0.4%オキシブプロカイン塩酸塩 (ベノキシール®点眼液 0.4%; Santen Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) 点眼による局所麻酔を行った。ACP の際、眼科用マイクロ鑷子で結膜を把持し、眼球を安定化させた。ツベルクリンシリンジに 27G 注射針を取り付けたものを使用し、注射針を外背側角膜輪部より前房内に刺入し、眼房水を採取した。採取量は 0.5 mL とし、針先が虹彩、角膜内皮および水晶体に接触しないよう注意しながら 15 秒間かけて眼房水を採取した。眼房水の漏出がないことを確認した後、イヌをメデトミジン拮抗薬であるアチパメゾール塩酸塩 (0.05 mg/kg; Nihonzenyaku Industry Co., Ltd.) の静脈内投与により覚醒した。採取眼房水を遠心分離機 (MX-307 centrifuge; Tomy Digital Biology Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 3000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した後、蛋白質濃度および PGE2 濃度測定に使用した。蛋白質濃度測定は眼房水採取日に行い、PGE2 濃度測定用の眼房水は測定日まで -80°C で保存した。

### 3. 臨床所見の評価

本実験では、ACP 誘発性ぶどう膜炎モデルに関する基礎データの収集、ならびにチロソールによる症状軽減効果を検証するために、臨床所見の経時的評価を実施した。評価項目は、瞳孔径、眼

圧、充血、前房フレアとし、充血およびフレアは Bartoe らの基準(0: なし、1: 軽度、2: 中等度、3: 重度)を用いたスコアリングを行った[79]。瞳孔径に関してはデジタルキャリパーを用いて水平瞳孔径を測定し、眼圧は圧平眼圧計 (Tono-Pen AVIA Vet®; Reichert, Inc., Buffalo, NY, USA)を用いて測定し、前房フレアは細隙灯生体顕微鏡のスリット光により評価した。瞳孔径および眼圧は、個体間のばらつき補正のため、両眼測定し穿刺眼/非穿刺眼の比を算出した。各項目の評価時間は、基礎データ収集では ACP 後 15 分、30 分、60 分、2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24 時間とし (n=4)、チロソールの効果検証では 12 時間までとした (n=4/群)。これらの臨床所見評価のための ACP は、眼圧の日内変動を考慮し 10:00 a.m.に統一して行った[80]。

#### 4. 眼房水中の蛋白質濃度の測定

ACP 誘発性ぶどう膜炎に関するデータ収集のために、眼房水中の蛋白質濃度を指標として、ACP 後の BAB 破綻の経時的変化について評価した。二次房水採取時間は、ACP 後 30 分、60 分、2 時間、4 時間とした (n=3/各二次房水採取時間)。この検証より BAB 破綻のピークが 60 分であることが示されたため、チロソールの効果検証 (n=5/群) では、二次房水採取時間を ACP 後 60 分とした。なお、チロソールの効果検証実験で得られた眼房水の一部は、次のメディエーターの濃度測定にも使用した。眼房水中の蛋白質濃度は、BCA 法により測定した。吸光度測定には MTP-300 マイクロプレートリーダーを用い、測定波長は 540 nm を用いた。

## 5. 眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度の測定

BAB 破綻がピークを示す ACP 後 60 分における二次房水中の TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度を測定した (n=5/群)。TNF- $\alpha$  および PGE2 の濃度は、市販の ELISA キット (TNF- $\alpha$ : R&D Systems Inc.; PGE2: Cayman Chemical Co.) を用いて推奨プロトコルに従い測定した。NO 濃度は、市販の測定キット (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (Colorimetric) ~Griess Reagent Kit~; Dojindo Molecular Technologies Inc.) を用いて推奨プロトコルに従い測定を行った。吸光度の測定には MTP-300 マイクロプレートリーダーを用い、TNF- $\alpha$  および PGE2 では測定波長 450 nm、補正波長 540 nm、NO では測定波長 540 nm を用いた。

## 6. 統計解析

得られたデータは、平均値±標準誤差で示した。3 群以上の独立多群間におけるパラメトリックな検定には、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および多重比較に Tukey 検定を行った。ノンパラメトリックな検定には Kruskal-Wallis および多重解析に Newman-Keuls 検定を行った。全ての統計分析は STATMATE III を用いて行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 1. 基礎的データの収集

#### 1-1. ACP による臨床所見の経時的変化

ACP 後 24 時間までの瞳孔径と眼圧測定ならびに充血と前房フレアのスコアリングを行った。瞳孔径は、ACP 後 15 分から 60

分で著しい縮瞳を示し、その後 12 時間でベースライン近くまで回復した (Fig. 3-1A)。眼圧は、ACP 後 15 分まで眼圧低下が持続したが、30 分ではベースラインまで回復し、その後は変化を示さなかった (Fig. 3-1B)。充血のスコアは ACP 後 30 分から 60 分で最大となり、その後徐々に回復していった (Fig. 3-1C)。フレアのスコアは、ACP 後 60 分で最大となり 8 時間でベースラインまで回復したが、全体を通して非常に軽度であった (Fig. 3-1D)。本実験より、ACP に関連する臨床所見は 60 分までに大きな変化を示し、その後回復へ向かうことが分かった。

#### 1-2. ACP 後の眼房水中における蛋白質濃度の経時的変化

ACP 後 4 時間までにおいて、眼房水中の蛋白質濃度を指標として BAB 破綻の程度を評価した。ACP 後の二次房水中における蛋白質濃度は、30 分から上昇がみられ、60 分で最大となった。その後、ACP 後 2 時間および 4 時間では徐々に蛋白質濃度の低下がみられた (Fig. 3-2)。本実験より、ACP による BAB 破綻は 60 分と非常に早期にピークを示すことが明らかとなった。この結果を受け、以下の実験では二次房水採取時間を ACP 後 60 分とした。

#### 1-3. 眼房水中における炎症性メディエーター

BAB 破綻が最大となる ACP 後 60 分における眼房水中の TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度を測定した。ACP 後 60 分の二次房水中で上昇が確認されたメディエーターは PGE2 のみであり、TNF- $\alpha$  および NO は検出されなかった。

## 2. チロソールの効果検証

### 2-1. 眼房水中の蛋白質濃度

ACP 後 60 分で最大となる二次房水中の蛋白質濃度上昇に対するチロソール (100、200、400 mg/kg) の効果を検証した。一次房水中の蛋白質濃度は、各群ともに低く群間での有意差はなかった (Fig. 3-3A)。二次房水中の蛋白質濃度は、コントロール群で  $1776.9 \pm 249.6$  mg/dL、Tyr (100) 群で  $1746.2 \pm 228.7$  mg/dL、Tyr (200) 群で  $1155.5 \pm 187.8$  mg/dL、Tyr (400) 群で  $1167.5 \pm 190.5$  mg/dL、Carp 群で  $1087.9 \pm 180.0$  mg/dL といずれの群も一次房水と比較して有意な上昇を示したが、Tyr (200) 群および Tyr (400) 群ではコントロール群と比較し有意な低下がみられた ( $P < 0.001$ ; Fig. 3-3B)。また、200 mg/kg および 400 mg/kg のチロソールによる抑制効果は、カルプロフェンと同等であった。

### 2-2. 眼房水中の PGE2 濃度

本モデルの BAB 破綻の原因として二次房水中で唯一証明されている PGE2 の過剰産生に対するチロソール (100、200、400 mg/kg) の効果を検証した。一次房水中の PGE2 濃度は、各群ともに低く群間での有意差はなかった (Fig. 3-4A)。二次房水中の PGE2 濃度は、コントロール群で  $13.4 \pm 3.2$  ng/mL、Tyr (100) 群で  $14.5 \pm 5.7$  ng/mL、Tyr (200) 群で  $7.3 \pm 1.5$  ng/mL、Tyr (400) 群で  $7.8 \pm 2.0$  ng/mL、Carp 群:  $6.3 \pm 2.7$  ng/mL と各群で一次房水と比較して有意な上昇を示したが、Tyr (200) 群および Tyr (400) 群ではコントロール群と比較して有意な低下がみられた ( $P < 0.05$ ; Fig. 3-4B)。また、200 mg/kg および 400 mg/kg のチ

ロソールは、カルプロフェンと同等の効果を示した。二次房水中における PGE2 濃度と蛋白質濃度の結果には、同様の傾向がみられた。

### 2-3. 臨床所見への影響

本検証では、これまでの最大用量である 400 mg/kg のチロソールによる、ACP 後の臨床所見への影響を評価した。ACP に伴う各眼所見は 12 時間後には大きく回復することが示されたため、チロソールによる症状軽減効果の検証は ACP 後 12 時間までとした。また、本モデルにおけるフレアのスコアは非常に低いことが明らかとなったため、検証項目から除いた。瞳孔径について、400 mg/kg のチロソールとカルプロフェンはコントロール群と比較して、ACP 後 2、4、8 時間における縮瞳を有意に抑制し（2 時間： $P < 0.01$ ；4 時間： $P < 0.05$ ；8 時間： $P < 0.01$ ）、ベースラインまで早期に回復した（Fig. 3-5A）。眼圧については、全ての測定時間で各群間に有意差は認められなかったものの、Tyr (400) 群と Carp 群では、ACP 後 15 分においてコントロール群でみられた眼圧低下がわずかに減少する傾向を示した（Fig. 3-5B）。充血について、Tyr (400) 群と Carp 群で全ての測定時間において軽減傾向がみられ、8 時間および 12 時間ではコントロール群と比較して有意なスコアの低下がみられた（ $P < 0.05$ ；Fig. 3-5C）。

### 考察

ACP は臨床現場において診断や治療に用いられる手技であるが、一方で急性の BAB 破綻を引き起こすことが知られている。

その特性から、ACPは様々な動物種においてぶどう膜炎反応を誘起する目的で使用されている[73-75]。しかしながら、ACP誘発性ぶどう膜炎モデルにおける臨床所見やBAB破綻のメカニズムについては十分に検証されていない。そこで、本モデルにおける基礎的データとして臨床所見の経時的変化を評価したところ、ACP後60分までに縮瞳、眼圧変動、充血ならびに前房フレアの重症化が観察され、その後回復へ向かうことが示された。また、眼房水中の蛋白質濃度を指標としてACP後のBAB破綻の程度を経時的に評価したところ、臨床所見の結果と同様に60分後と非常に早期にピークを示すことが明らかとなった。BAB破綻の主要因とされているPGE2は、縮瞳、眼圧低下ならびに充血をもたらすことが広く知られている[81]。また、眼内組織より産生されたTNF- $\alpha$ は、直接的な眼圧低下作用を有する可能性が示唆されており[82]、他のメディエーター産生を促すことでも上記症状を惹起する。NOによる眼圧低下ならびに充血は数多くの研究で明らかにされており、一部の研究ではNOによる縮瞳作用も証明されている[83]。そこで、本モデルにおけるBAB破綻や臨床症状の原因となるメディエーターを探索するため、ACP60分後の二次房水中における炎症性メディエーターの濃度測定を行ったところ、上昇がみられたものはPGE2のみであった。この結果より、眼房水中におけるPGE2の過剰産生が、本モデルの病態形成において中心的役割を果たすことが示された。また、PGE2の過剰産生がACP後60分と非常に早期にみられたことから、本モデルにおけるPGE2産生の機序は、細胞質常在型のPGE2合成酵素群、すなわちCOX-1と細胞質型PGE合成酵素(cPGES)を介したもので

あると推測された[84]。

本研究では、ACP 誘発性を含むイヌの実験的前部ぶどう膜炎に対する有効性が証明されているカルプロフェンを陽性コントロールとして使用した[78, 85]。またカルプロフェンは、眼内手術後の炎症や術中縮瞳の予防、あるいはぶどう膜炎発症眼におけるBAB 破綻の軽減などを目的として獣医臨床眼科において広く使用されている経口薬剤である。ACP 後 60 分において、200 mg/kg および 400 mg/kg のチロソールは、コントロール群でみられた二次房水中における蛋白質濃度の上昇をカルプロフェンと同等に有意に抑制した。また、200 mg/kg および 400 mg/kg のチロソールは二次房水中の PGE2 濃度についても同様に、コントロール群と比較してカルプロフェンと同等に有意に減少させた。以上の結果より、チロソールの ACP 誘発性 BAB 破綻に対する軽減効果はカルプロフェンと同等であり、そしてこれらの効果は ACP 後早期に活性化する細胞質常在型 PGE2 合成酵素群の阻害を介した PGE2 過剰産生の抑制によるものと考えられた。

400 mg/kg のチロソールおよびカルプロフェンは ACP 後 30 分以降において縮瞳を抑制し、ACP 実施時の状態に回復を早めた。この結果は、両薬剤による二次房水中の PGE2 産生減少に起因すると考えられた。また、ACP 後の眼圧について、Tyr (400) 群および Carp 群ではコントロール群と比較していずれの時間でも有意差はみられなかったものの、15 分後にコントロール群でみられた眼圧低下を抑制する傾向が認められた。ACP 後 15 分でみられた眼圧低下は、房水抜去に伴う前房虚脱によるものと考えていたが、両薬剤による抑制を考慮すると、PGs 産生が眼圧低下に寄与

していた可能性が考えられた。さらに、400 mg/kg のチロソールとカルプロフェンによる充血の軽減傾向と早期回復も、両薬剤による PGE<sub>2</sub> 産生抑制に起因すると推察された。

イヌにおけるチロソールの安全性に関する報告は非常に少なく、著者が調べた限りでは 10 mg/kg (SID) の用量で 3 カ月間経口投与されても毒性を示さなかったとする 1 報のみである [72]。本研究では、より高用量 (最大用量 400 mg/kg、BID) のチロソールを経口投与されたイヌにおいて、投与期間中における摂食量と体重に影響を与えず、また投与後直ちに分布するとされる肝臓および腎臓の機能評価として、ACP 直前および ACP 後 24 時間における血液検査を行ったところ、いずれも異常は認められなかった (データ示さず)。

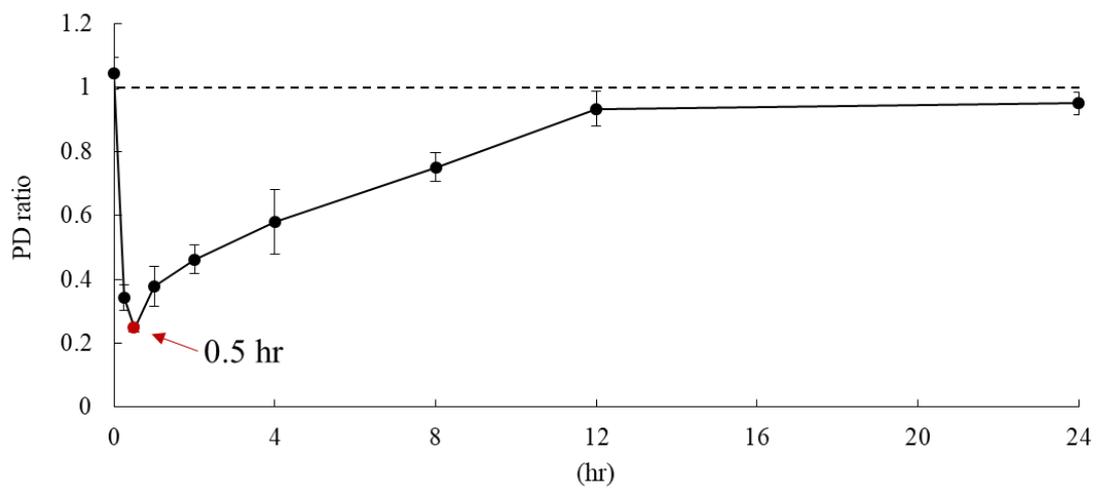
本研究では、第 2 章とは異なり ACP という外科的手技により誘導されるイヌの急性前部ぶどう膜炎モデルを用いて、病態形成に関わる基礎的データの収集およびチロソールによる BAB 破綻抑制効果の検証を行った。その結果、チロソールは、第 1 章および第 2 章では示されなかった細胞質常在型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素群の阻害を介して、ACP 誘発性ぶどう膜炎ならびに関連症状を抑制した可能性が考えられた。

付図および付図説明

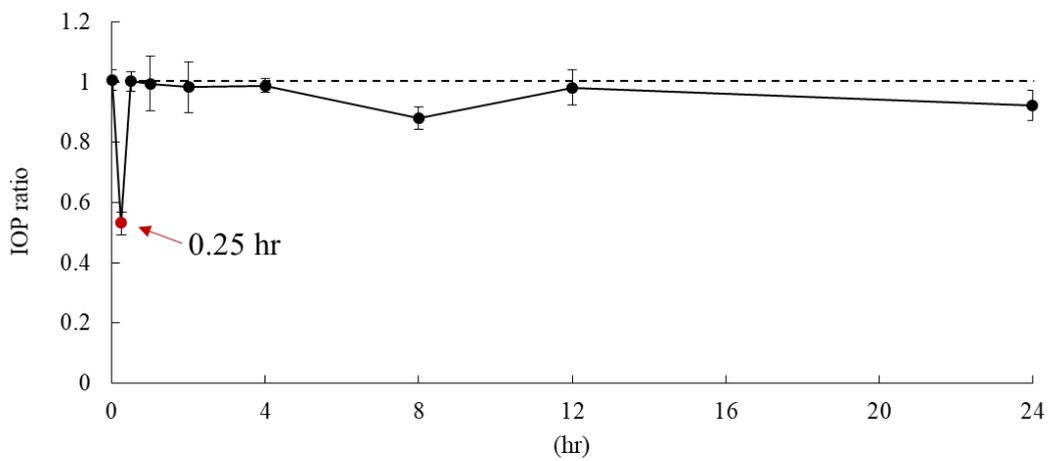
Fig. 3-1

ACPを受けたイヌにおける臨床所見の経時的変化

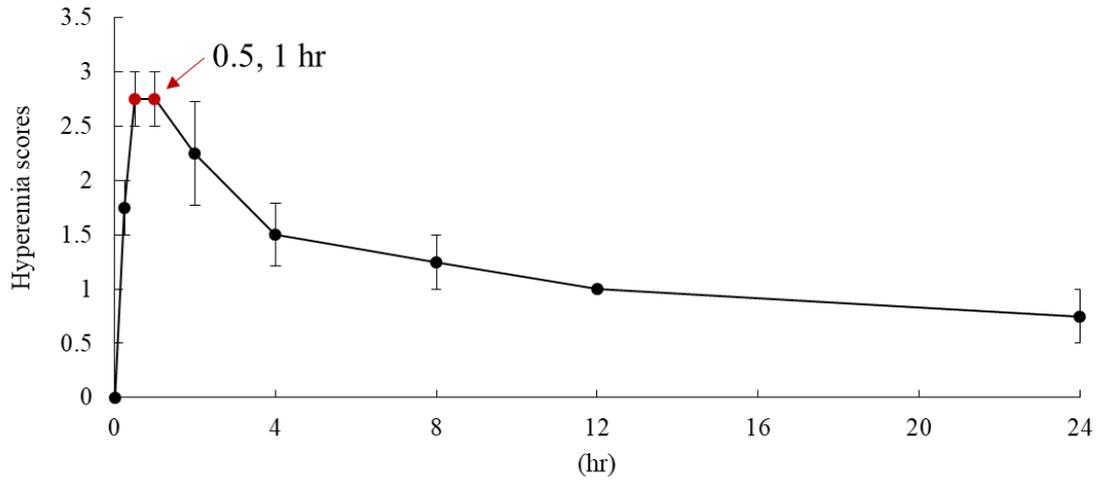
(A)



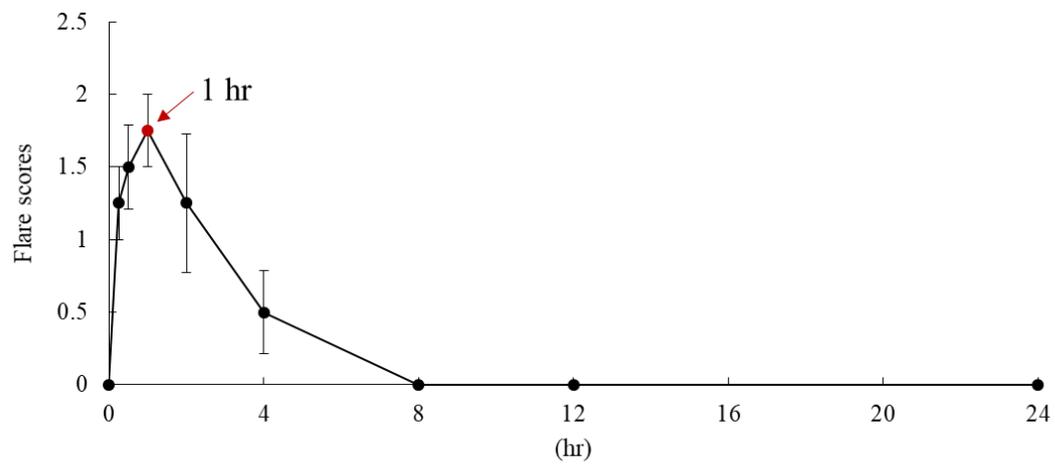
(B)



(C)



(D)



ACP 後 24 時間までにおけるイヌの瞳孔径 (A)、眼圧 (B)、充血 (C)、前房フレア (D) の経時的変化。

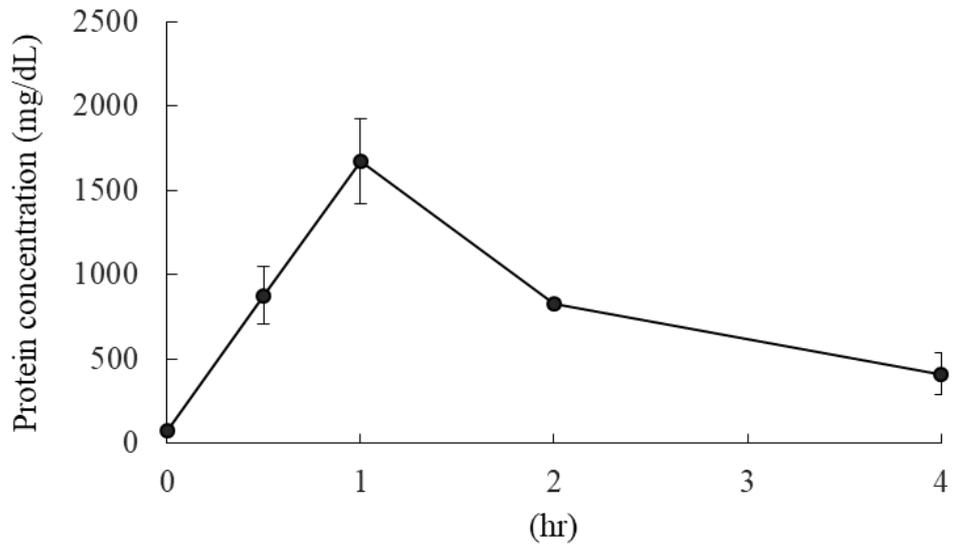
瞳孔径と眼圧については穿刺眼/非穿刺眼の比で評価し、充血と前房フレアについてはスコア値で評価した。

データは全て平均値 ± 標準誤差で示している (n=5)。

PD: 瞳孔径; IOP: 眼圧。

Fig. 3-2

ACP を受けたイヌの眼房水中における蛋白質濃度の経時的変化



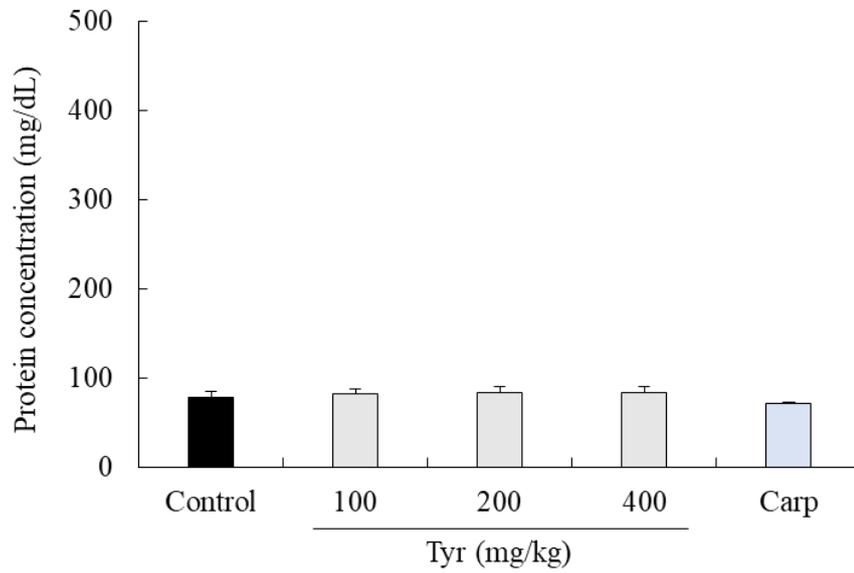
ACP 後 4 時間までにおけるイヌの BAB 破綻度について、眼房水中の蛋白質濃度を指標として評価した。

データは全て平均値 ± 標準誤差で示している (n=3)。

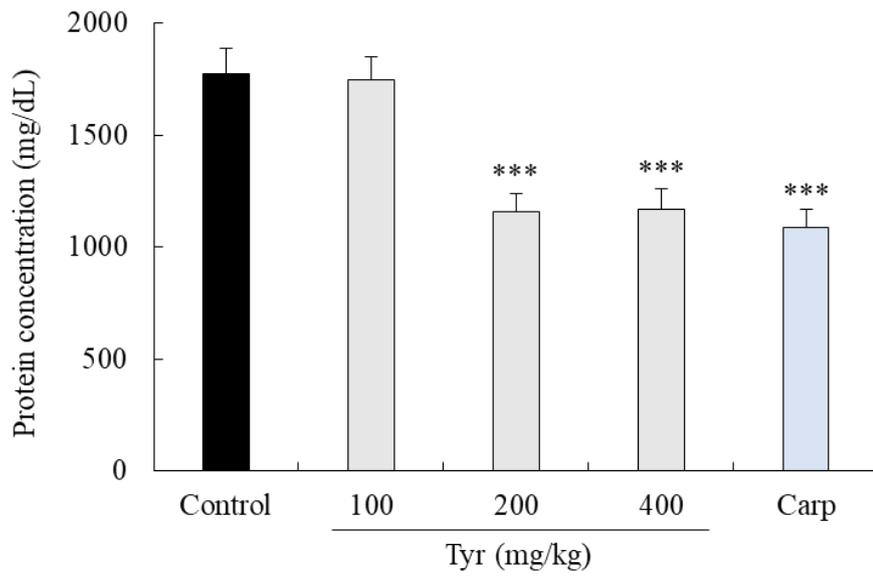
Fig. 3-3

イヌの ACP 誘発性 BAB 破綻に対する各用量のチロソールの効果

(A)



(B)



一次房水における蛋白質濃度 (A) と ACP 後 60 分における二次房水中の蛋白質濃度 (B)。

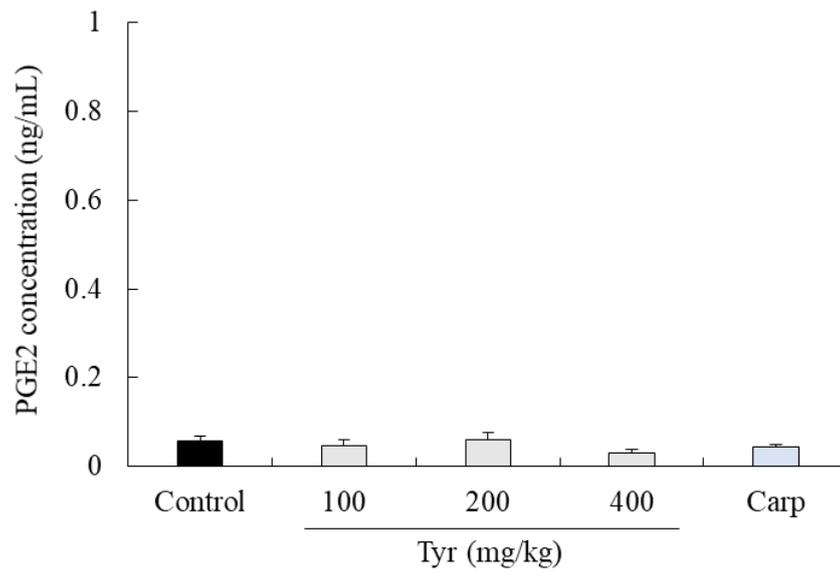
データは全て平均値  $\pm$  標準誤差で示している (n=5/群)。

\*\*\* $P < 0.001$  (vs. コントロール群)。

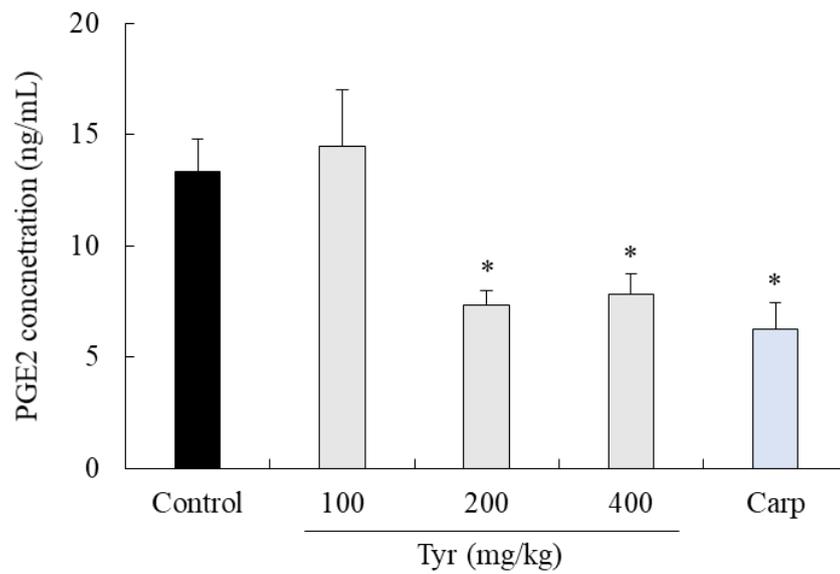
Fig. 3-4

ACP後のイヌの眼房水中におけるPGE2濃度に対する各用量のチロソールの効果

(A)



(B)



一次房水における PGE2 濃度 (A) と ACP 後 60 分における二次房水中の PGE2 濃度 (B)。

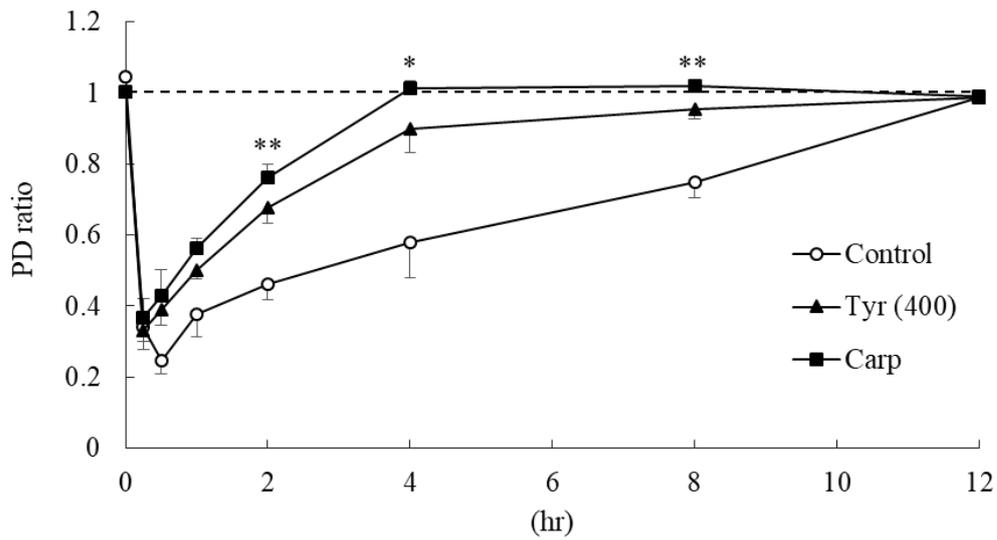
データは全て平均値  $\pm$  標準誤差で示している (n=5/群)。

\* $P < 0.05$  (vs. コントロール群)。

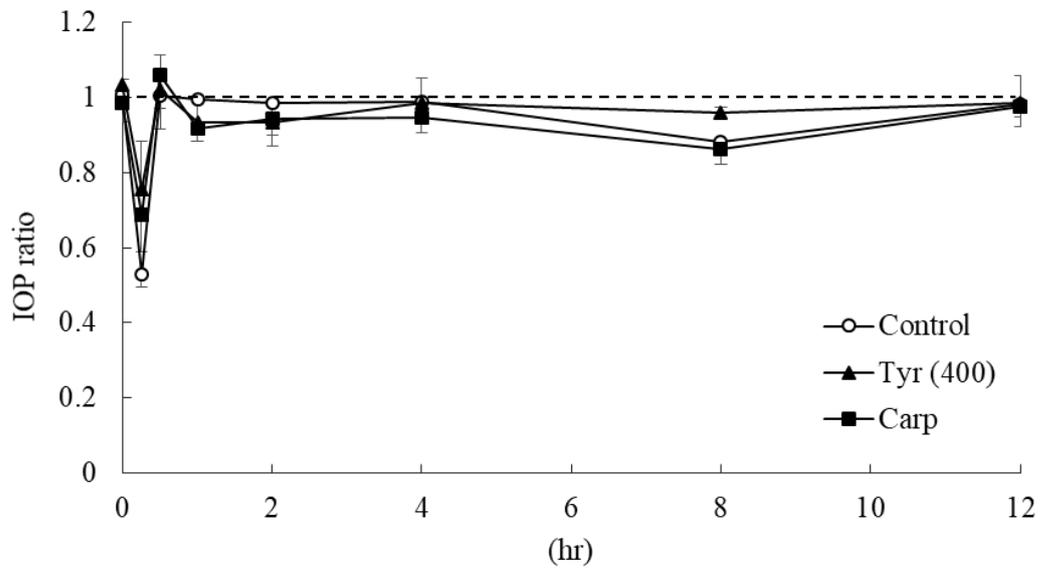
Fig. 3-5

ACP 後のイヌにおけるぶどう膜炎症状に対するチロソールの効果

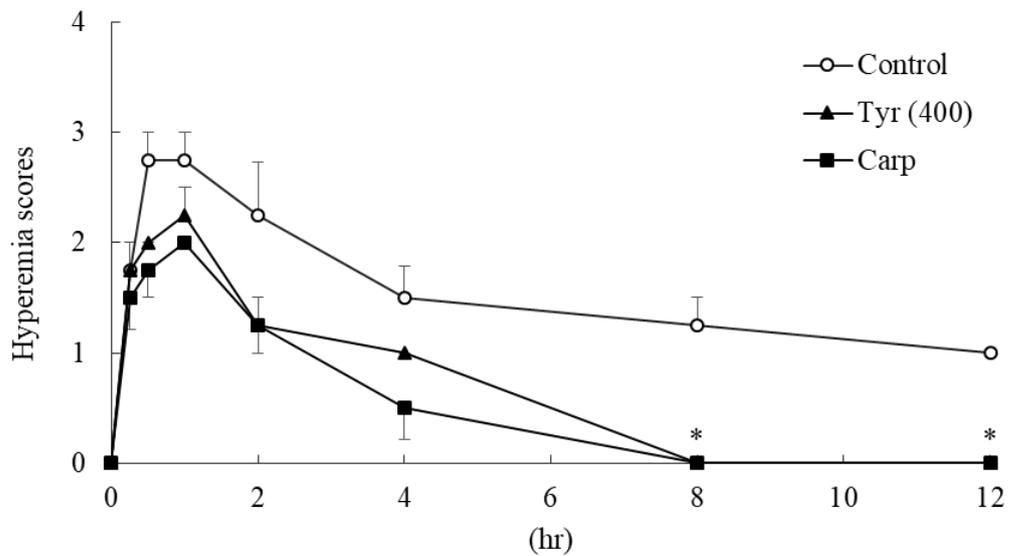
(A)



(B)



(C)



ACP 後 12 時間までにおけるイヌの瞳孔径 (A)、眼圧 (B)、充血 (C) に対する 400 mg/kg チロソールの抑制効果。

瞳孔径と眼圧については穿刺眼/非穿刺眼の比で評価し、充血についてはスコア値で評価した。

データは全て平均値 ± 標準誤差で示している (n=5/群)。

PD: 瞳孔径; IOP: 眼圧。

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (vs. コントロール群)。

## 総括

### [背景]

ぶどう膜炎は眼内組織における炎症性疾患の総称であり、ヒトを含む様々な動物種において視覚喪失の原因の上位に入る重要な眼科疾患である。その病因は、感染性、免疫介在性、外傷性、腫瘍関連、特発性など多岐にわたるが、いずれにも共通する病態として、BABの破綻が挙げられる。BABの崩壊は眼房水中への蛋白質漏出や炎症細胞の浸潤を起し、眼内における炎症反応の誘起、増幅をもたらす。

現在のぶどう膜炎治療薬としては、一般的な抗炎症薬（コルチコステロイド、NSAIDs）や免疫抑制剤に加え、一部の分子標的薬が利用可能となっている。しかし、これらの治療法には副作用や治療適応の制限などの問題が存在し、治療を断念するケースが少なくない。そこで、これらに代わる安全かつ広範なぶどう膜炎に有効となる新規治療薬の開発が求められている。近年、天然由来の抗酸化物質による様々な生物学的活性が注目を集めており、その一部で抗炎症効果を示すものも報告されている。著者は、植物性食品に多く含有されるチロソールを候補物質とし、BAB破綻の要因となる炎症性メディエーターに焦点を当て、ぶどう膜炎に対する有効性評価を行った。本研究は三つの章で構成され、第1章ではマウス由来マクロファージ細胞株を用いてチロソールの抗炎症効果と機序を検証し、第2章と第3章ではそれぞれ異なる機序で誘導される実験的BAB破綻に対するチロソールの抑制効

果について検証した。

## [方法・結果]

### (第 1 章)

マウス由来株化マクロファージ RAW264.7 細胞に対して LPS 刺激（最終濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）することで炎症反応を誘起した。チロソール処置（最終濃度 10、50、100  $\mu\text{M}$ ）は、LPS 感作 24 時間前から開始した。培養液上清中の炎症性メディエーターについて、TNF- $\alpha$ と PGE2 の濃度測定では ELISA 法を用い、NO の濃度測定では Griess 法を用いた。また、それぞれ PGE2 と NO の合成酵素である COX-2 および iNOS の細胞内発現量については、ウェスタンブロット法により評価した。これらの炎症関連蛋白質の遺伝子発現において中心的役割を演じる NF- $\kappa\text{B}$  の活性については、免疫蛍光細胞染色により細胞内局在を観察することで評価した。

チロソール前処置は、LPS 感作 24 時間後における TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO の産生増加、ならびに COX-2 および iNOS の高発現を濃度依存的に抑制し、最大用量 100  $\mu\text{M}$  では全てにおいて有意な抑制効果を示した。また、LPS 感作 30 分後の RAW264.7 細胞において、100  $\mu\text{M}$  のチロソール前処置は、NF- $\kappa\text{B}$  の活性化に伴う細胞質内から核内への局在変化を大きく抑制した。

### (第 2 章)

Lewis ラット（オス、7 週齢、170–180 g）に LPS (200  $\mu\text{g}/\text{head}$ ) を皮下接種することで重度の急性前部ぶどう膜炎 (EIU) を誘起した。チロソール投与 (10、50、100  $\text{mg}/\text{kg}$ ) は、LPS 接種 2 時間前、接種直後、接種 2 時間後の計 3 回、静脈内投与し、陽性コ

ントロールとしてプレドニゾロン酢酸塩 (1 mg/kg) を同スケジュールで投与した。本研究では、EIUの臨床症状のスコアリング、BCA法による眼房水中の蛋白質濃度測定と浸潤細胞数カウント、および前眼部の病理所見 (HE染色) のスコアリングを行った。また、第1章と同様の方法による炎症性メディエーター (TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO) 濃度の測定、ならびにICBにおけるCOX-2、iNOSとNF- $\kappa$ Bの核内移行抑制因子であるI $\kappa$ B- $\alpha$ の発現およびNF- $\kappa$ Bの細胞内局在についての免疫組織化学的検索を行った。

チロソール前投与は、LPS接種24時間後におけるEIUの臨床症状のスコア、眼房水中の蛋白質濃度と浸潤細胞数、および前眼部の病理所見のスコアをいずれも用量依存的に減少させ、最大用量100 mg/kgによる効果はプレドニゾロンと同等であった。またチロソールは、眼房水中における各種炎症性メディエーターの濃度上昇を用量依存的に抑制し、100 mg/kgの用量ではCOX-2およびiNOSのICBにおける高発現を抑制した。LPS接種3時間後のICBにおいて、チロソール前投与はNF- $\kappa$ Bの核内移行およびI $\kappa$ B- $\alpha$ の分解を示す細胞数を大きく減少させた。本章で設定したチロソールの投与条件では、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓において病理組織学的な異常はみられなかった。

### (第3章)

ビーグル犬 (オスおよびメス、4-6歳齢、8.5-11.7 kg) に対して、ACPにより急性前部ぶどう膜炎を誘導した。ACPは、27G注射針を用いて眼房水を0.5 mL抜去する方法で行った。チロソール投与 (100、200、400 mg/kg) は、ACP実施日の2日前から

当日の朝まで BID（計 5 回）の経口投与とし、陽性コントロールとしてカルプロフェン（2.2 mg/kg）を同スケジュールで投与した。本章では、チロソールによる BAB 破綻ならびに関連症状に対する効果検証に先立ち、本モデルの基礎的データの収集を行った。基礎的データの収集として、ACP 後の臨床症状（瞳孔径、眼圧、充血および前房フレア）と眼房水中の蛋白質濃度を指標とした BAB 破綻の経時的評価、ならびに眼房水中における炎症性メディエーター（TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO）濃度の測定を行った。眼房水中における各パラメータの測定方法は、前述と同様の方法とした。

本モデルにおける BAB 破綻および臨床症状の経時的変化を検証したところ、BAB 破綻は 60 分でピークを示し、臨床症状も 60 分あるいはより早期に著しい変化が観察された。この結果を踏まえ、ACP 後 60 分における眼房水中の各種炎症性メディエーターの濃度測定を行ったところ、PGE2 のみが著しい上昇を示し、他の炎症性メディエーターの産生増加は認められなかった。200 mg/kg および 400 mg/kg のチロソール前投与は、ACP 後 60 分における二次房水中の蛋白質濃度および PGE2 濃度を有意に減少させ、これらの効果はカルプロフェンと同等であった。また、400 mg/kg のチロソールはカルプロフェンと同程度に各臨床症状を軽減させ、早期回復へと導いた。本章で設定したチロソールの投与条件では、投与期間中の体重および摂食量に影響を与えず、また投与後の血液検査において肝臓および腎臓の機能異常は認められなかった。

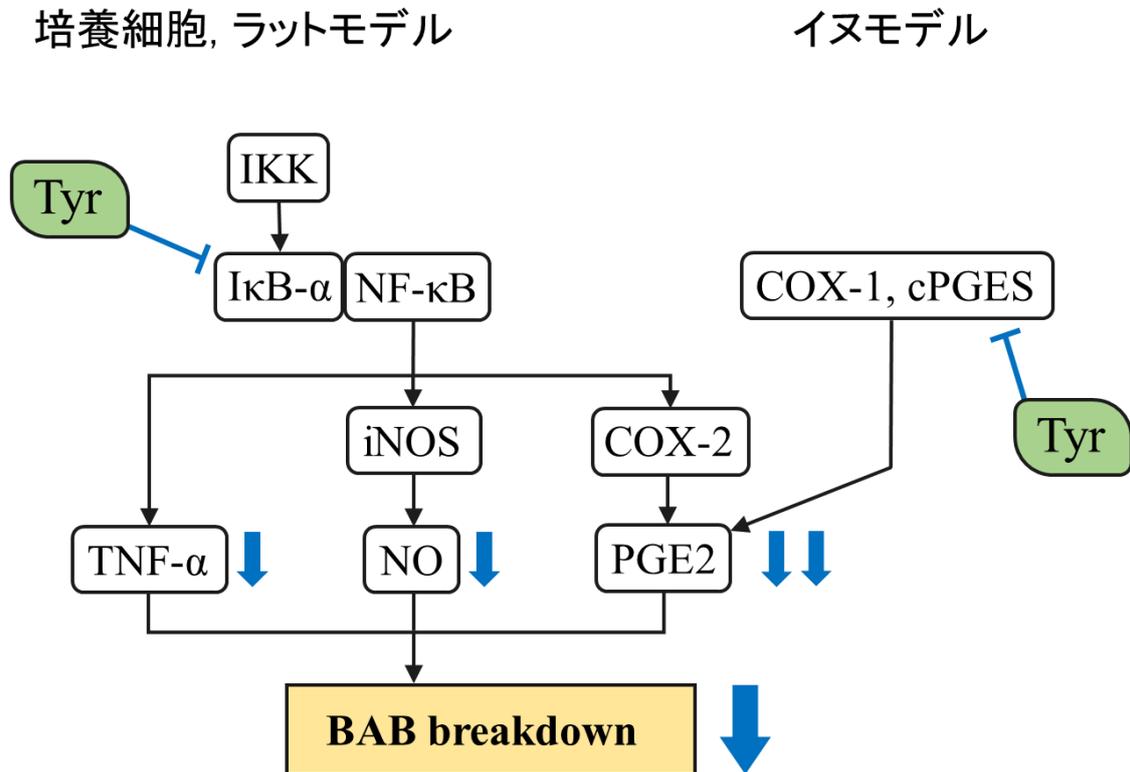
## [考察・結論]

第 1 章より、天然由来抗酸化物質の一つであるチロソールは、LPS 刺激 RAW264.7 細胞において、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性阻害を介して BAB 破綻の要因となる各種炎症性メディエーターの産生を抑制したと考えられた。そこで第 2 章では、EIU モデルを用いてチロソールによるこれらの効果について検証した。その結果、チロソールは第 1 章の結果と同様に、眼局所において炎症細胞から産生・放出される各種炎症性メディエーターの過剰産生を抑制し、BAB 破綻に対する保護作用によりぶどう膜炎症状を大きく軽減することが示された。そして、炎症性メディエーターの産生抑制の機序には、ICB における NF- $\kappa$ B の活性阻害が大きく関与することが示唆された。第 3 章では、EIU モデルとは異なる外科的方法 (ACP) により誘導されるイヌの急性ぶどう膜炎モデルを用いて、チロソールによる BAB 破綻保護作用について検証した。本研究より、初めて天然由来成分によるイヌの前部ぶどう膜炎に対する有効性が示された。また、チロソールは ACP 後 60 分という非常に早期の PGE<sub>2</sub> 産生を抑制したことから、細胞質常在型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素群の阻害を介して PGE<sub>2</sub> 過剰産生を抑制し、その機序により BAB 破綻を軽減したと推察された。

本研究より、天然由来成分であるチロソールは、各種炎症性メディエーターの産生抑制により、ぶどう膜炎の共通病態である BAB 破綻に対して既存薬剤と同等の保護作用を有する可能性が示された。本学位論文は、チロソールがぶどう膜炎治療において既存薬剤に代わる、あるいは補助的な治療戦略として有望であることを示したものであり、前述のぶどう膜炎治療法に関する課題

解決に大いに貢献できると考えられた。

<チロソールによる BAB 破綻抑制機序の概要図>



チロソールは、NF-κB 経路および細胞質常在型 PGE2 合成酵素系を阻害する機序で、PGE2 をはじめ BAB 破綻の要因となる各種炎症性メディエーターの産生を抑制することが示唆された。

Tyr: チロソール; NF-κB: nuclear factor κB; IκB: inhibitor of κB; IKK: IκB kinase; TNF: 腫瘍壊死因子; NO: 一酸化窒素; PGE2: プロスタグランジン E2; COX: シクロオキシゲナーゼ; iNOS: 誘導型 NO 合成酵素; cPGES: 細胞質型 PGE2 合成酵素。

## 参考文献

1. Tsirouki T, Dastiridou A, Symeonidis C, Tounakaki O, Brazitikou I, Kalogeropoulos C, Androudi S. A focus on the epidemiology of uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2018; 26(1): 2–16.
2. Freddo TF. A contemporary concept of the blood-aqueous barrier. *Prog Retin Eye Res*. 2013; 32: 181–195.
3. Butler JM, Unger WG, Grierson I. Recent experimental studies on the blood-aqueous barrier: The anatomical basis of the response to injury. *Eye (Lond)*. 1988; 2(Suppl): S213–S220.
4. Bill A. The blood-aqueous barrier. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1986; 105 (Pt 2):149–155.
5. Cunha-Vaz J. The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol*. 1979; 23(5): 279–296.
6. Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res*. 2006; 4(4): 294–309.
7. Edwards RM. Effects of prostaglandins on vasoconstrictor action in isolated renal arterioles. *Am J Physiol*. 1985; 248(6 Pt 2): F779–F784.
8. Murrant CL, Dodd JD, Foster AJ, Inch KA, Muckle FR, Ruiz DA, Simpson JA, Scholl JH. Prostaglandins induce vasodilatation of the microvasculature during muscle

- contraction and induce vasodilatation independent of adenosine. *J Physiol*. 2014; 592(6): 1267–1281.
9. Coleman RA, Sheldrick RL. Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br J Pharmacol*. 1989; 96(3): 688–692.
  10. Villar A, D'Ocon MP, Anselmi E. Calcium requirement of uterine contraction induced by PGE1: importance of intracellular calcium stores. *Prostaglandins*. 1985; 30(3): 491–496.
  11. Smith JB. Prostaglandins and platelet aggregation. *Acta Med Scand Suppl*. 1981; 651: 91–99.
  12. Neufeld AH, Sears ML. The site of action of prostaglandin E2 on the disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit eye. *Exp Eye Res*. 1973; 17(5): 445–448.
  13. Regnier A, Whitley RD, Benard P, Bonnefoi M. Effect of flunixin meglumine on the breakdown of the blood-aqueous barrier following paracentesis in the canine eye. *J Ocul Pharmacol*. 1986; 2(2): 165–170.
  14. Stjernschantz J, Bito LZ. The ocular effects of eicosanoids and other autacoids: historic background and the need for a broader perspective. *Prog Clin Biol Res*. 1989; 312: 1–13.
  15. Lee AJ, McCluskey P. Clinical utility and differential effects of prostaglandin analogs in the management of raised intraocular pressure and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol*. 2010; 4: 741–764.

16. Vegge T, Neufeld AH, Sears ML. Morphology of the breakdown of the blood-aqueous barrier in the ciliary processes of the rabbit eye after prostaglandin E2. *Invest Ophthalmol.* 1975; 14(1): 33–36.
17. Ambache N, Kavanagh L, Whiting J. Effect of mechanical stimulation on rabbits' eyes. Release of active substances in anterior chamber perfusates. *J Physiol.* 1965; 176: 378–408.
18. Eakins KE, Whitelocke RA, Perkins ES, Bennett A, Unger WG. Release of prostaglandins in ocular inflammation in the rabbit. *Nat New Biol.* 1972; 239: 248–249.
19. Nichols J, Snyder RW. Topical nonsteroidal anti-inflammatory agents in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol.* 1998; 9(4): 40–44.
20. Roze M, Thomas E, Davot JL. Tolfenamic acid in the control of ocular inflammation in the dog: pharmacokinetics and clinical results obtained in an experimental model. *J Small Anim Pract.* 1996; 37(8): 371–375.
21. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990; 4(11): 2860–2867.
22. De Vos AF, Van Haren MA, Verhagen C, Hoekzema R, Kijlstra A. Tumour necrosis factor-induced uveitis in the Lewis rat is associated with intraocular interleukin 6

- production. *Exp Eye Res.* 1995; 60(2): 199–207.
23. Yoo K, Son BK, Kim S, Son Y, Yu SY, Hong HS. Substance P prevents development of proliferative vitreoretinopathy in mice by modulating TNF- $\alpha$ . *Mol Vis.* 2017; 23: 933–943.
24. El-Markaby HS, Mohammed TH, El-Raggal TM. Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy: role of TNF blocker in severe cases. *Retina.* 2012; 32(10): 2102–2107.
25. Durieux P, Etchepareborde S, Fritz D, Rosolen SG. Tumor necrosis factor-alpha concentration in the aqueous humor of healthy and diseased dogs: a preliminary pilot study. *J Fr Ophthalmol.* 2015; 38(4): 288–294.
26. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017; 120(4): 713–735.
27. Mandai M, Yoshimura N, Yoshida M, Iwaki M, Honda Y. The role of nitric oxide synthase in endotoxin-induced uveitis: effects of NG-nitro L-arginine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(10): 3673–3680.
28. Kitamei H, Iwabuchi K, Namba K, Yoshida K, Yanagawa Y, Kitaichi N, Kitamura M, Ohno S, Onoé K. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), pyrrolidine dithiocarbamate. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(6): 1193–1201.

29. Li N, Song Y, Zhao W, Han T, Lin S, Ramirez O, Liang L. Small interfering RNA targeting NF- $\kappa$ B attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *BMC Physiol.* 2016; 16(1): 7.
30. Wang YM, Du GQ. Glycyrrhizic acid prevents enteritis through reduction of NF- $\kappa$ B p65 and p38MAPK expression in rat. *Mol Med Rep.* 2016; 13(4): 3639–3646.
31. Muñoz-Fernández S, Martín-Mola E. Uveitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006; 20(3): 487–505.
32. Dunn JP. Uveitis. *Prim Care.* 2015; 42(3): 305–323.
33. Chandramohan R, Pari L, Rathinam A, Sheikh BA. Tyrosol, a phenolic compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2015; 229: 44–54.
34. Hashim YZ, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, Kaisalo L, Wähälä K, Gill CI. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int J Cancer.* 2008; 122(3): 495–500.
35. Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(20): 9692–

9698.

36. Bu Y, Rho S, Kim J, Kim MY, Lee DH, Kim SY, Choi H, Kim H. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2007; 414(3): 218–221.
37. Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, Longoni B, Origlia N, Ferretti A, Cuttano MG, Giovannini L. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 957: 295–301.
38. Moreno JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(9): 1073–1081.
39. Wang WC, Xia YM, Yang B, Su XN, Chen JK, Li W, Jiang T. Protective Effects of Tyrosol against LPS-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 Activation and Activating the HO-1/Nrf2 Pathways. *Biol Pharm Bull*. 2017; 40(5): 583–593.
40. Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Jansen HM, Spek CA, van der Poll T. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *Eur Respir J*. 2006; 28(3): 622–626.
41. Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral

- monocytes. *Respir Res.* 2010; 11: 2.
42. Brito BE, Zamora DO, Bonnah RA, Pan Y, Planck SR, Rosenbaum JT. Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2004; 79(2): 203–208.
43. Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD, Millar AB. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 31(2): 241–245.
44. Guo H, Zhang Y, Cheng BC, Fu X, Zhu P, Chen J, Chan Y, Yin C, Wang Y, Hossen M, Amin A, Tse AK, Yu ZL. An ethanolic extract of the aerial part of *Siegesbeckia orientalis* L. inhibits the production of inflammatory mediators regulated by AP-1, NF- $\kappa$ B and IRF3 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biosci Trends.* 2018; 12(3): 330–337.
45. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, Bai Y, Qin Y, Li J, Feng S, Zhao P. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- $\kappa$ B, STAT3 or AP-1 activation. *Mol Med Rep.* 2018; 17(4): 5484–5491.
46. Barrios-Rodiles M, Tiraloche G, Chadee K. Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human

- macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha. *J Immunol.* 1999; 163(2): 963–969.
47. Coward WR, Okayama Y, Sagara H, Wilson SJ, Holgate ST, Church MK. NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? *J Immunol.* 2002; 169(9): 5287–5293.
48. Vivancos M, Moreno JJ. Role of Ca(2+)-independent phospholipase A(2) and cyclooxygenase/lipoxygenase pathways in the nitric oxide production by murine macrophages stimulated by lipopolysaccharides. *Nitric Oxide.* 2002; 6(3): 255–262.
49. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(15): 7240–7244.
50. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(6): 2694–2701.
51. Ung L, Pattamatta U, Carnt N, Wilkinson-Berka JL, Liew G, White AJR. Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease. *Clin Sci (Lond).* 2017; 131(24): 2865–2883.
52. Wang Y, Huang X, Cang H, Gao F, Yamamoto T, Osaki T, Yi J. The endogenous reactive oxygen species promote

- NF-kappaB activation by targeting on activation of NF-kappaB-inducing kinase in oral squamous carcinoma cells. *Free Radic Res.* 2007; 41(9): 963–971.
53. Jung WK, Lee DY, Choi YH, Yea SS, Choi I, Park SG, Seo SK, Lee SW, Lee CM, Kim SK, Jeon YJ, Choi IW. Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma. *Life Sci.* 2008; 82(13-14): 797–805.
54. Stiuso P, Bagarolo ML, Ilisso CP, Vanacore D, Martino E, Caraglia M, Porcelli M, Cacciapuoti G. Protective Effect of Tyrosol and S-Adenosylmethionine against Ethanol-Induced Oxidative Stress of Hepg2 Cells Involves Sirtuin 1, P53 and Erk1/2 Signaling. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(5). pii: E622.
55. Sun L, Fan H, Yang L, Shi L, Liu Y. Tyrosol prevents ischemia/reperfusion-induced cardiac injury in H9c2 cells: involvement of ROS, Hsp70, JNK and ERK, and apoptosis. *Molecules.* 2015; 20(3): 3758–3775.
56. Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature.* 1980; 286(5773): 611–613.
57. Sifre J, Alio JL, Ruiz IM, Ruiz O, Bellot JL. The antiinflammatory effect of nordihydroguaiaretic acid in endotoxin induced uveitis in rabbits. *Ocul Immunol*

- Inflamm.* 1993; 1(4): 337–342.
58. Kodama M, Numaga J, Yoshida A, Kaburaki T, Oshika T, Fujino Y, Wu GS, Rao NA, Kawashima H. Effects of a new dexamethasone-delivery system (Surodex) on experimental intraocular inflammation models. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2003; 241(11): 927–933.
59. Kanai K, Nagata S, Hatta T, Sugiura Y, Sato K, Yamashita Y, Kimura Y, Itoh N. Therapeutic anti-inflammatory effects of luteolin on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *J Vet Med Sci.* 2016; 78(8): 1381–1384.
60. Smith JR, Hart PH, Williams KA. Basic pathogenic mechanisms operating in experimental models of acute anterior uveitis. *Immunol Cell Biol.* 1998; 76(6): 497–512.
61. 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.* 1983; 24(2): 196–202.
62. Cousins SW, Guss RB, Howes EL Jr, Rosenbaum JT. Endotoxin-induced uveitis in the rat: observations on altered vascular permeability, clinical findings, and histology. *Exp Eye Res.* 1984; 39(5): 665–676.
63. Bellot JL, Palmero M, García-Cabanes C, Espí R, Hariton C, Orts A. Additive effect of nitric oxide and prostaglandin-E2 synthesis inhibitors in endotoxin-induced uveitis in the rabbit. *Inflamm Res.*

- 1996; 45(4): 203–208.
64. Ruiz-Moreno JM, Thillaye B, de Kozak Y. Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat. *Ophthalmic Res.* 1992; 24(3): 162–168.
65. Jin XH, Ohgami K, Shiratori K, Suzuki Y, Koyama Y, Yoshida K, Ilieva I, Tanaka T, Onoe K, Ohno S. Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2006; 82(5): 860–867.
66. Okumura A, Mochizuki M. Endotoxin-induced uveitis in rats: morphological and biochemical study. *Jpn J Ophthalmol.* 1988; 32(4): 457–465.
67. McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG. Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(8): 3234–3250.
68. McMenamin PG, Crewe JM. Cellular localisation and dynamics of nitric oxide synthase expression in the rat anterior segment during endotoxin-induced uveitis. *Exp Eye Res.* 1997; 65(2): 157–164.
69. Kanai K, Hatta T, Nagata S, Sugiura Y, Sato K, Yamashita Y, Kimura Y, Itoh N. Luteolin attenuates endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *J Vet Med Sci.* 2016; 78(8): 1229–1235.

70. Chernysheva GA, Smol'niakova VI, Cherkashina IV, Plotnikov MB, Tolstikova TG, Krysin AP, Sorokina IV. The main pharmacokinetic parameters of p-tyrosol upon intravenous injection in rats. *Eksp Klin Farmakol.* 2005; 68(6): 43–44.
71. Lee DH, Kim YJ, Kim MJ, Ahn J, Ha TY, Lee SH, Jang YJ, Jung CH. Pharmacokinetics of Tyrosol Metabolites in Rats. *Molecules.* 2016; 21(1): E128.
72. Saratikov, A. S. and Krasnov, E. A. 2004. *Rhodiola rosea* (Golden root): a valuable medicinal plant. pp. 1–205. Tomsk University Press, Tomsk.
73. Brightman AH 2nd, Helper LC, Hoffman WE. Effect of aspirin on aqueous protein values in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1981; 178(6): 572–573.
74. Rankin AJ, Krohne SG, Glickman NW, Glickman LT, Stiles J. Laser flaremetric evaluation of experimentally induced blood-aqueous barrier disruption in cats. *Am J Vet Res.* 2002; 63(5): 750–756.
75. Al-Ghadyan A, Mead A, Sears M. Increased pressure after paracentesis of the rabbit eye is completely accounted for by prostaglandin synthesis and release plus pupillary block. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979; 18(4): 361–365.
76. Regnier A, Whitley RD, Benard P, Bonnefoi M. Effect of flunixin meglumine on the breakdown of the blood-aqueous barrier following paracentesis in the canine eye. *J Ocul*

- Pharmacol.* 1986; 2(2): 165–170.
77. Rankin AJ, Sebbag L, Bello NM, Crumley WR, Allbaugh RA. Effects of oral administration of anti-inflammatory medications on inhibition of paracentesis-induced blood-aqueous barrier breakdown in clinically normal cats. *Am J Vet Res.* 2013; 74(2): 262–267.
78. Pinard CL, Gauvin D, Moreau M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Troncy E. Measurements of canine aqueous humor inflammatory mediators and the effect of carprofen following anterior chamber paracentesis. *Vet Ophthalmol.* 2011; 14(5): 296–303.
79. Bartoe JT, Davidson HJ, Horton MT, Jung Y, Brightman AH. The effects of bimatoprost and unoprostone isopropyl on the intraocular pressure of normal cats. *Vet Ophthalmol.* 2005; 8(4): 247–252.
80. Martín-Suárez E, Molleda C, Tardón R, Galán A, Gallardo J, Molleda J. Diurnal variations of central corneal thickness and intraocular pressure in dogs from 8:00 am to 8:00 pm. *Can Vet J.* 2014; 55(4): 361–365.
81. Doucette LP, Walter MA. Prostaglandins in the eye: Function, expression, and roles in glaucoma. *Ophthalmic Genet.* 2017; 38(2): 108–116.
82. Husain S, Yates PW, Crosson CE. Latanoprost-induced changes in rat intraocular pressure: direct or indirect? *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008; 24(4): 367–372.

83. Heyne GW, Kiland JA, Kaufman PL, Gabelt BT. Effect of nitric oxide on anterior segment physiology in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(7): 5103–5110.
84. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem.* 2000; 275(42): 32775–32782.
85. Krohne SG, Blair MJ, Bingaman D, Gionfriddo JR. Carprofen inhibition of flare in the dog measured by laser flare photometry. *Vet Ophthalmol.* 1998; 1(2–3): 81–84.

## 謝辞

稿を終えるに当たり、御懇切なる御指導、御教授を賜りました北里大学獣医学部小動物第2内科学研究室の金井一享教授、田島一樹助教に謹んで感謝の意を表します。

また本研究を遂行するに当たり、御助力を頂きました小動物第2内科学研究室の皆様から心から感謝を申し上げます。