眼組織における 5-HETE 合成

藤原 久子*

Biosynthesis of 5-HETE in rabbit ocular tissues Leukotriene B₄ (LTB₄) and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) are high potency chemotactic factor.

The author demonstrated lipoxygenase products from C¹⁴ arachidonic acid in rabbit ocular tissues. The release of 5-HETE from rabbit ocular tissue was estimated by HPLC and radioimmunoassay technique.

The amount was high in retina, choroid, anterior uvea and conjunctiva in that order.

The present results indicated that 5-HETE released from blood cell or from vascular tissues.

Hisako Fujiwara*

* Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School

key words: biosynthesis, 5-HETE, rabbit ocular tissues, HPLC, RIA

5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) は, Leukotriene B₄ (LTB₄) とともに強い白血球走化性因子であることが知られている。

筆者は先に家兎の眼組織において, アラキドン酸カスケードのうちのリポキシゲナーゼ経路について検討し, 12-HETE, 5-HETE, LTB₄ が合成されることを示した¹⁾。

また, 家兎の前房中に 5-HPETE, 5-HETE, 12-HETE を注入すると, 白血球の集積が認められたという報告もある²⁾。

今回, 5-HETE radioimmunoassay kit を用いて, 家兎の眼組織における 5-HETE の遊離を経時的に測定したので報告する。

材料と方法

(1) 材料

白色成熟雄家兎の結膜, 前部ブドウ膜, 脈絡膜, 網膜を試料とした。

(2) 5-HETE の抽出と分離

家兎眼から得た組織を計量の後, インドメサシン (Sigma) 2×10^{-5} M を含むタイロッド液に, 37°C で incubate した。図 1 に示すように, 5分, 10分, 20分, 30分, 60分と経時的に組織を採り出し, その medium を試料とした。

medium に 50% エタノール 1 ml を加え, 3,000 rpm 15分遠沈し, その上清を減圧乾固した。50%メタノール 0.5 ml を加え, HPLC にかへ, 5-HETE 分画を採り RIA を行った (図 2)。

*Tyrode's solution contained 2×10^{-5} M indomethacin

図 1 schema of incubation of rabbit ocular tissues

(3) HPLC

器種は Waters association model 440 で, カラムは TSK-Gel ODS-120A (東洋曹達) ($\Phi 4.6 \times 250$ mm 5μ), ガードカラムは cosmosil 10 C₁₈-P (半井化学) ($\Phi 4.6 \times 50$ mm) を使用した。溶離液はアセトニトリル:メタノール:水:酢酸 (33.6:5.4:61.1) pH 4.1, 室温で流出率は 1 ml/min, 検出波長 240 nm で測定した。記録は島津 C-R 2A クロマトパックで行った。

標品 5-HETE (Seragen) の溶出時間は 10.5 ± 1.0 分であった。

(4) RIA

HPLC で得た 5-HETE の分画を濃縮した。5-HETE (³H) RIA Kit (Seragen) にて測定した。緩衝液にて

* 川崎医科大学眼科学教室

図2 assay procedure of 5-HETE released from ocular tissue

apparatus: waters association model 440
column: TSK-Gel ODS-120A (Toyo Soda)
φ4.6×250mm 5μ
guard column: cosmosil 10C18 P φ4.6×50mm
(Nakarai chemicals)
solvent system: acetonitrile/methanol/water/acetic
acid 33.6/5.4/61/1 adjusted to pH 4.1
temperature: room temperature
flow rate: 1ml/min
monitor: 240nm
recorder: Shimadzu C-R 2A chromatopac

図3 analysis of 5-HETE by HPLC

原液を希釈し標準液をつくった。³H-5-HETEを加え攪拌し、抗血清を加えさらに攪拌し、4℃で24時間 incubateした。氷中でデキストラン被膜活性炭をよく攪拌しながら入れ、4℃で15分 incubate した。3,000 rpm で15分間遠沈し、活性炭に付着した遊離の³H-5-HETEを除き、上清を液体シンチレーションカウンター (Aloka) で測定した。常時標準曲線を作って測定値を得た (図5)。

結果

結膜、前部ブドウ膜、脈絡膜、網膜からの遊離を5, 10, 20, 30, 60分と経時的に測定したところ、網膜、脈絡膜からはほぼ同程度に遊離され、ついで、前部ブドウ膜、結膜の順に多く遊離された。時間ごとの遊離量を ng/wg/min であらわすと5～10分にピークを示した。

考 按

生体における炎症反応の進展にアラキドン酸代謝産物が深い関わりを持っていることが知られている。炎症には、発赤、腫脹、発熱、痛みの四大徴候のほかに、白血球遊走という現象があり、この白血球の誘引に LTB₄ や 5-HETE が強く作用しているとされている。

眼科領域では、アラキドン酸代謝のシクロオキシゲナーゼ経路については多数の研究がなされているが、一方

図4 elution pattern of standard 5-HETE

図5 standard curve of 5-HETE

の経路であるリボキシゲナーゼ経路についてはあまり知られていない。

Bhattacharjee ら²⁾は、家兎の前房水中に PGE₁, E₂, 5-HPETE, 5-HETE, 12-HETE など注入し、前房水中の白血球数、眼圧などを測定している。リボキシゲナーゼ代謝物質は主として細胞に対する作用を有すると述べている。

William ら³⁾は、各種動物の結膜、虹彩における C¹⁴アラキドン酸からの HHT, 12-HETE, 5-HETE の合成を明らかにした。筆者¹⁾もⅢ型アレルギー反応による実験的眼内炎において、リボキシゲナーゼ代謝物質の増加することを明らかにしている。

Birkle ら⁴⁾は、ウシ網膜のアラキドン酸代謝物質について、HPLC、薄層クロマトによって測定しており、5-HETE, 12-HETE の合成されることを明らかにした。

今回、5-HETE RIA kit が入手されたので Abe ら⁵⁾、寺尾⁶⁾、腰原⁷⁾の方法を参考として、家兎の眼組織からの 5-HETE の遊離量を経時的に測定した。5-HETE 遊離は網膜、脈絡膜に多く、次いで前部ブドウ膜、結膜の順に多く遊離され、5～10分にピークを示

表 1 basal release of 5 HETE from rabbit ocular tissue

time (min)		5	10	20	30	60
conjunctival tissue	ng/wwg	0.30±0.20	0.52±0.49	0.58±0.66	0.59±0.67	0.91±0.86
	ng/wwg/min	0.06±0.04	0.13±0.10	0.06±0.07	0.06±0.07	0.03±0.02
anterior uvea	ng/vwg	0.99±0.61	0.82±0.28	0.92±0.45	0.74±0.46	0.60±0.47
	ng/wwg/min	0.20±0.12	0.16±0.05	0.09±0.05	0.07±0.05	0.02±0.02
choroid	ng/wwg	2.57±0.67	3.99±1.92	3.17±1.43	3.82±1.11	3.46±1.52
	ng/wwg/min	0.51±0.10	0.79±0.38	0.32±0.14	0.38±0.11	0.11±0.05
retina	ng/wwg	2.75±1.24	2.65±1.56	3.68±1.25	3.80±0.70	2.30±0.42
	ng/wwg/min	0.55±0.25	0.53±0.31	0.37±0.13	0.12±0.03	0.08±0.01

(N=3, mean±SE)

図 6 basal release of 5-HETE from rabbit ocular tissue

され、しだいに減少するのが認められた。これはアラキドン酸の消費推移を示していると思われる。これらの遊離は主として血液細胞にあり、血管の多い組織からの遊離が大であるように思われる。この遊離量は PG レベルである。

RIA は鋭敏な、感度の高い測定法であるが、精度の高い抽出法と夾雑物を測定しないためのクリーアップシステムが必要であると同時に、すぐれた抗血清をつくるが必要とされている。今回の測定には、クリーンアップシステムとして HPLC を使用したが、この kit における抗血清は、LT や 5-15 Di HETE との交叉反応が大であり、なおすぐれた抗血清のつくられる必要がある。

今回、家兎眼組織において 5-HETE が合成され遊離されることが示されたが、前房水中にも 0.7 ng/ml 程度存在しているのでは⁸⁾、眼内炎症において白血球遊走現象にかかわっている可能性が十分ある。

まとめ

白血球走化因子の一つである 5-HETE について、家兎眼組織からの経時的遊離を HPLC および RIA にて測定した。血管の多い網膜、脈絡膜に多く、次いで前部ブドウ膜、結膜の順に遊離が多く認められた。

文 献

- 1) 藤原久子：眼組織におけるリポキシゲナーゼ代謝物質と炎症について。眼紀 35: 671-676, 1984.
- 2) Bhattacharjee, P., Hammond, B., Salmon, J.A., Stepney, R., Eakins, K.E.: Chemotactic response to some arachidonic acid lipoxygenase products in the rabbit eye. European J. of Pharmacology 73: 21-28, 1981.
- 3) William, R.N., Bhattacharjee, P., Eakins, K.E.: Biosynthesis of lipoxygenase products by ocular tissues. Exp. Eye Res. 36: 397-402, 1983.
- 4) Birkle, D.L., Bazan, J.G.: Lipoxygenase and Cyclooxygenase-reaction products and incorporation into glycerolipids of radiolabeled arachidonic acid in the bovine retina. Prostaglandins 27: 203-216, 1984.
- 5) Abe, M., Kawazoe, Y., Shigematsu, N.: Influence of salts on high-performance liquid chromatography of leukotriene, Analytical Biochem. 144: 417-422, 1985.
- 6) 寺尾泰次：ロイコトリエン (LT) およびヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定法。炎症 4 (supp.) 204-207, 1984.
- 7) 腰原康子、磯野豊和：ラジオイムのアッセイ法による生体試料中の LTC₄ の測定。炎症 5: 107-110, 1985.
- 8) 藤原久子：(未発表データ)。