

高眼圧によるラット虚血—再灌流の視神経虚血耐性現象

足立 和己, 高橋 寛二, 弓削 堅志, 三木 弘彦, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

生体には予めストレスが負荷されると、次に、強いストレスを受けても細胞障害は軽く済み、抵抗性を獲得する耐性現象のあることが知られている。ラット眼で、眼圧上昇によって視神経と網膜に虚血と再灌流を行い、視神経軸索の障害を組織学的に定量計測した。この障害に対し、視神経に耐性現象が生じるかどうかを調べた。予め組織学的に変化を生じないことを確認した短時間虚血(110 mmHg, 15 分間)を負荷した後、血流を再灌流させて1, 2, 4, 7, 14 日に再虚血(45 分間)を行い、その後は再灌流して1週間後に視神経軸索の崩壊を篩状板から2 mm 後方の視神経で定量計測し、45 分間の単独虚血後1週の所見と対比した。再虚血眼では、対照眼と比較して2日以

降で障害の軽減がみられ、統計学的に有意差をみた。7日に再虚血をした群が軸索の障害が最も軽度であったことから、視神経は眼圧上昇による虚血に対して虚血耐性現象があると思われる。7日にこの現象が最も強く生じていることが示された。この実験結果は、視神経は眼圧上昇による虚血に対して耐性を獲得すること、特に虚血に対する耐性は、ストレス負荷7日後にその現象が最も強く生じていることが明らかになった。(日眼会誌 101: 24—29, 1997)

キーワード：虚血再灌流障害, 耐性現象, 眼圧上昇, 視神経軸索, ストレス応答

'Ischemic Tolerance' in Ischemia-reperfusion Injury in the Optic Nerve in Rats

Masaki Adachi, Kanji Takahashi, Kenshi Yuge,
Hirohiko Miki and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Brief ischemia caused by high intraocular pressure induced tolerance to subsequent ischemia-reperfusion injury in rats. Male Wistar rats were subjected to 15 minutes of ischemia. This ischemic injury did not show distinct axonal damage in the optic nerve in electron microscopy. 1, 2, 4, 7, and 14 days after the first 15 min ischemia, the rats were subjected to a second ischemia for 45 minutes (ischemic tolerance). After 1 week, the rats were perfusion fixed and the optic nerves were processed for light and electron microscopy. Samples of the axonal density in the central optic nerve 2 mm behind the lamina cribrosa were observed and

counted an electron micrographs. In axonal morphometric findings, 2 days and more after brief ischemia, the damage was lessened more than after 45 minutes ischemia (control) and the difference was significant. This 'ischemic tolerance' induced by brief ischemia might be considered the same as brain ischemia-reperfusion injury. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 24—29, 1997)

Key words: Ischemia-reperfusion injury, Ischemic tolerance, High intraocular pressure, Axon, Stress phenomenon

I 緒 言

細胞へのストレスには、熱ショック、酸化ストレスや虚血によるものがある^{1)~3)}。また、ストレス応答には誘導さ

れるストレス蛋白の合成が必要で、数種類の蛋白が知られている^{4)~10)}。虚血によるストレスでは、海馬 CA1 領域の脳虚血負荷の実験で、予め軽度の虚血をストレスとして加えておくと、次に、致死的な虚血負荷に対して耐性を

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学眼科学教室 足立 和己

(平成8年3月13日受付, 平成8年7月20日改訂受理)

Reprint requests: Masaki Adachi, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan.

(Received March 13, 1996 and accepted in revised form July 22, 1996)

獲得する現象が知られている^{11)~13)}。ラット眼に虚血を負荷すると、虚血を起こす方法によって網膜の障害部位が異なり、眼圧上昇による方法では網膜の内層が最初に障害が生じる(神経線維層の菲薄化と神経節細胞の壊死脱落)ことが知られている^{14)~16)}。著者らは、前房内灌流法により高眼圧を作って眼虚血を一定時間発生ささせる方法で、網膜と視神経を障害するモデルについて、まず、軽度な虚血ストレスを負荷しておくこととストレス応答を生じ、再虚血による障害が軽減される虚血耐性現象があるかどうかを、視神経軸索を形態計測して検討した。

II 実験方法

生後6週齢のWistar系雄ラット20匹36眼を用いた。抱水クロラル400 mg/kgを腹腔内に投与して全身麻酔し、麻酔中に十分に保温を行い、前房内灌流装置として26G注射針の金属部分にシリコンチューブ(Dow Corning社製, 米国)を接続したものを角膜輪部から前房内に穿刺して、生理食塩水を灌流することにより眼内圧を110 mmHgに上昇させた。眼底検査によって網膜の全虚血を確認した。軽度のストレス負荷として15分間の高眼圧(110 mmHg)を維持した後、針を抜いて眼圧を正常に戻し血流を再灌流させた。眼底検査で網膜の血流が再開していることを確認した。このストレス負荷後、1, 2, 4, 7, 14日後に同様の方法で45分間の再虚血(110

mmHg)を起こし、ストレス応答モデルを作製した。対照眼は、軽度のストレス負荷なく、45分間虚血後に正常眼圧に戻し、血流を再灌流して1週間後に摘出したものとした。軽度ストレス負荷眼として、15分間虚血を同様の方法で作製した。その後、血液を再灌流させて1週間後に下記の灌流固定の上眼球摘出した。各群はすべて4眼用いた。

固定方法はペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)深麻酔下で、ハンクス液(日本製薬)で左心室から灌流脱血した後、4%グルタルアルデヒド(0.1 M カコジル酸緩衝液)で灌流固定の後、眼球を摘出し、続いて同固定液で4°Cで12時間浸漬固定を行った。1%四酸化オスミウム(0.1 M カコジル酸緩衝液)で75分間固定後、アルコール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。眼球の薄切切片を作り、トルイジンブルーで染色したものを光学顕微鏡(光顕)で、網膜と視神経を、超薄切切片を作ってウラン、鉛の二重染色したものを電子顕微鏡(電顕)を用いて視神経の変化を形態学的に調べた。

単位面積当たり($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m} = 10^4\ \text{mm}^2$)の正常軸索の数を測定することによって、組織障害の程度を定量評価した。正常と異常の判定は、電顕写真上でミエリン鞘の層構造がはっきりとわかり、内部構造やミトコンドリアもしっかりと保存されているものは明確な正常群とした。ミエリン鞘の層構造が保たれているが、内部構造の乱

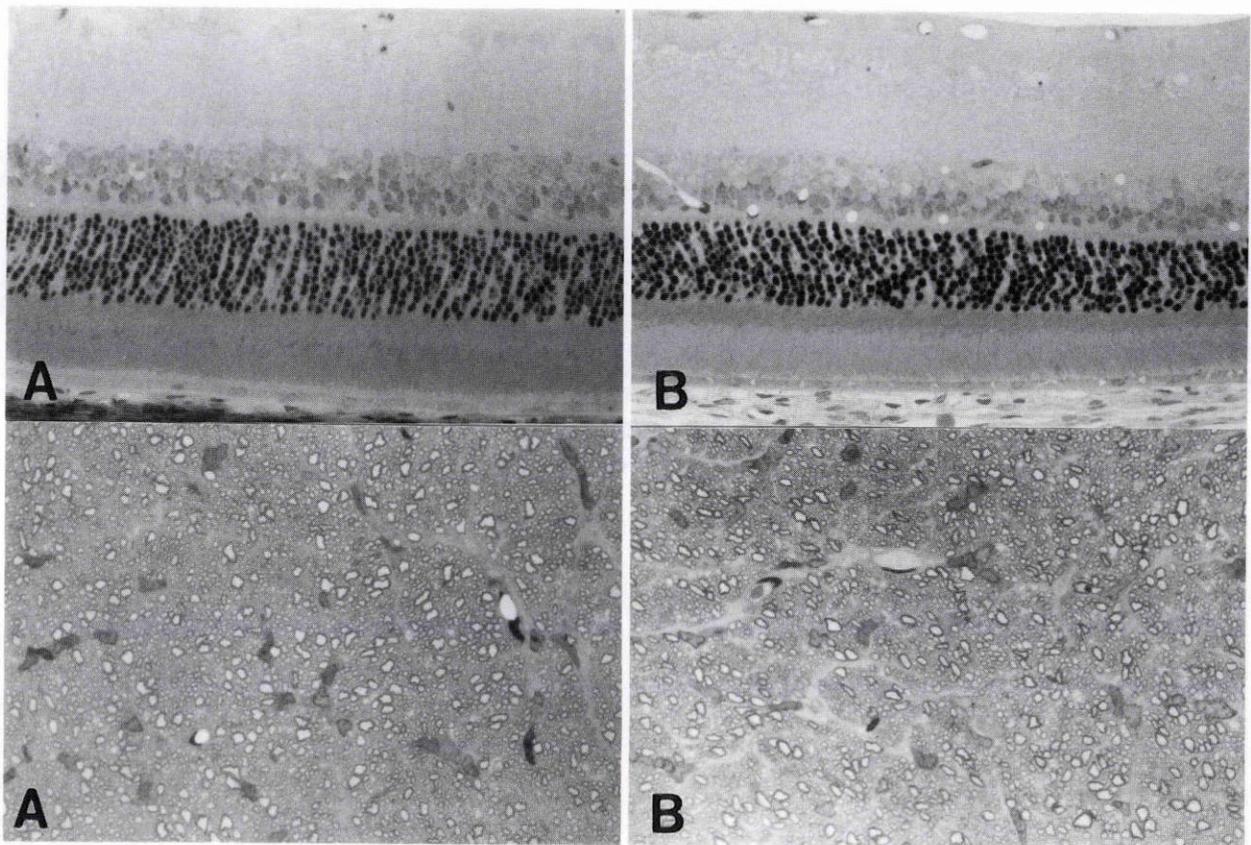


図1 網膜と視神経の光学顕微鏡(光顕)像。

無処置眼(A)と15分間虚血眼(B)網膜と視神経には異常をみなかった。

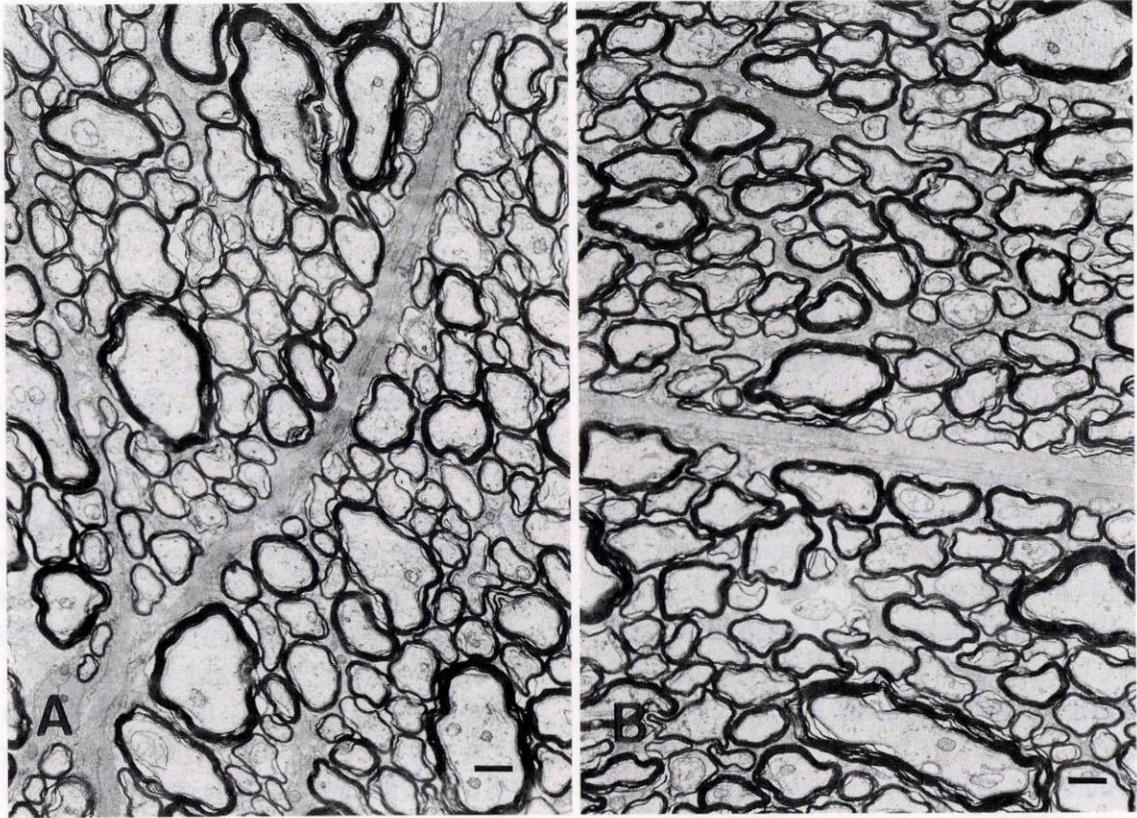


図2 視神経の電子顕微鏡(電顕)像.

無処置眼(A)と15分間虚血眼(B)を電顕でも、軸索は良く保たれ壊死に陥ったものもなく、両者に差はなかった。バーは1 μ m

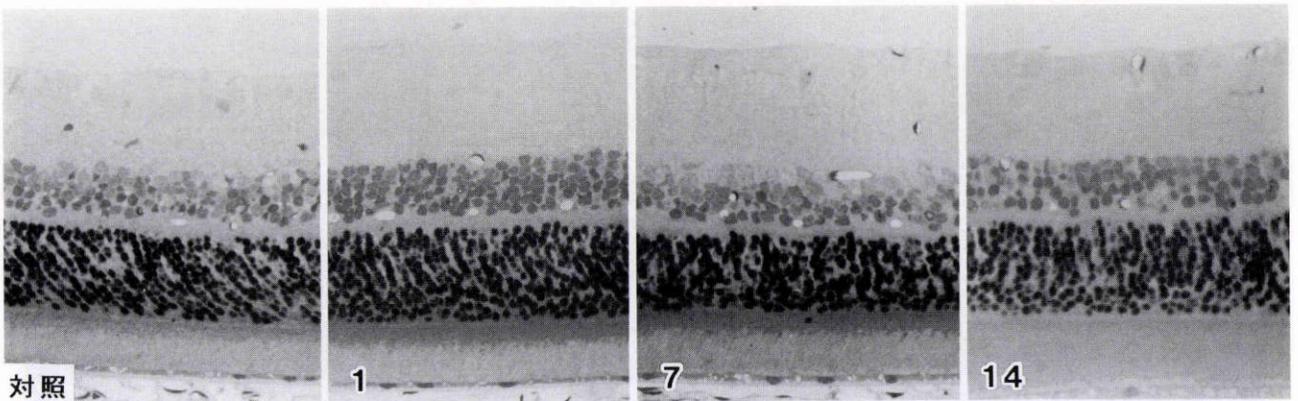


図3 網膜の光顕像.

対照(0)と比較して再虚血群(1, 7, 14日)には網膜内層の菲薄化がみられ、明瞭な保護作用はみられなかった。数字は処置後日数を示す。

れがあるものは正常群とした。ミエリン鞘が崩壊して形態がわからなくなったもの、内部構造が崩壊されて消失してしまったものは異常群とした。観察部位は網膜では眼球後極部を、視神経は眼球後方2mmの位置とし、形態計測に用いる部位は視神経横断面の中心部16か所を無作為に選択し、3,000~5,000倍の電顕写真を用いて計測を行った。この判定は、1人の検者が行った。

各群の平均値と標準偏差を求め、対照眼と各群間でt検定を用いて統計学的に検討した。

III 結果

15分間虚血をした軽度ストレス負荷眼では、光顕、電顕所見の双方で無処置眼と比較して網膜に形態学的に何ら変化をみなかった(図1, 2)。再虚血眼の再虚血1~14日目には網膜の光顕所見では、神経節細胞の脱落や神経線維層と内網状層の萎縮による菲薄化も対照眼と同程度にみられ、網膜内層障害の軽減はみられなかった。また、網膜の外層(外網状層から色素上皮細胞層)は両群ともに正常構造を保っていた(図3)。さらに、再虚血眼の視神経

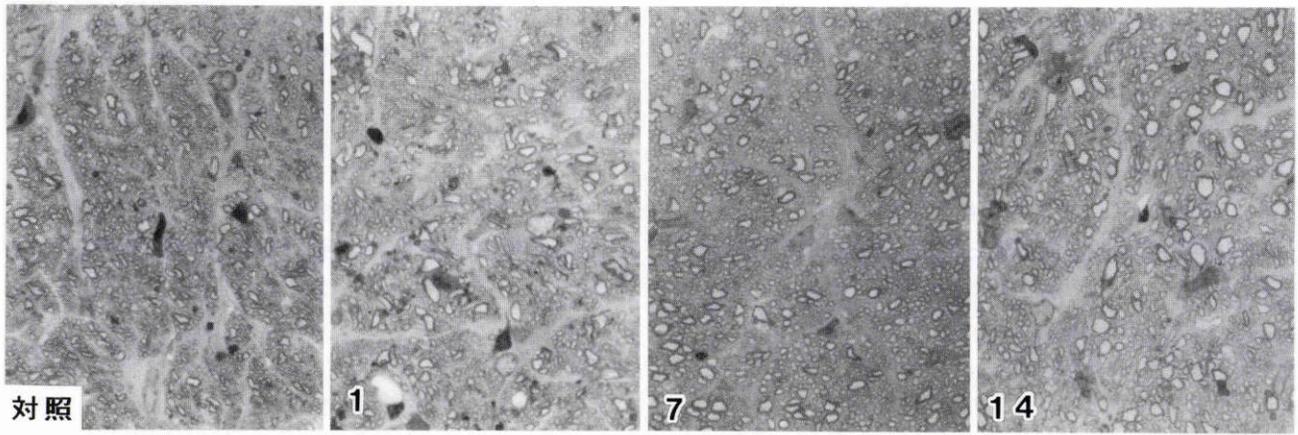


図4 視神経の光顕像.

対照(0)と比較して再虚血群の7日において視神経軸索には脱落変性に陥った変化が減少し,保護作用がみられた.

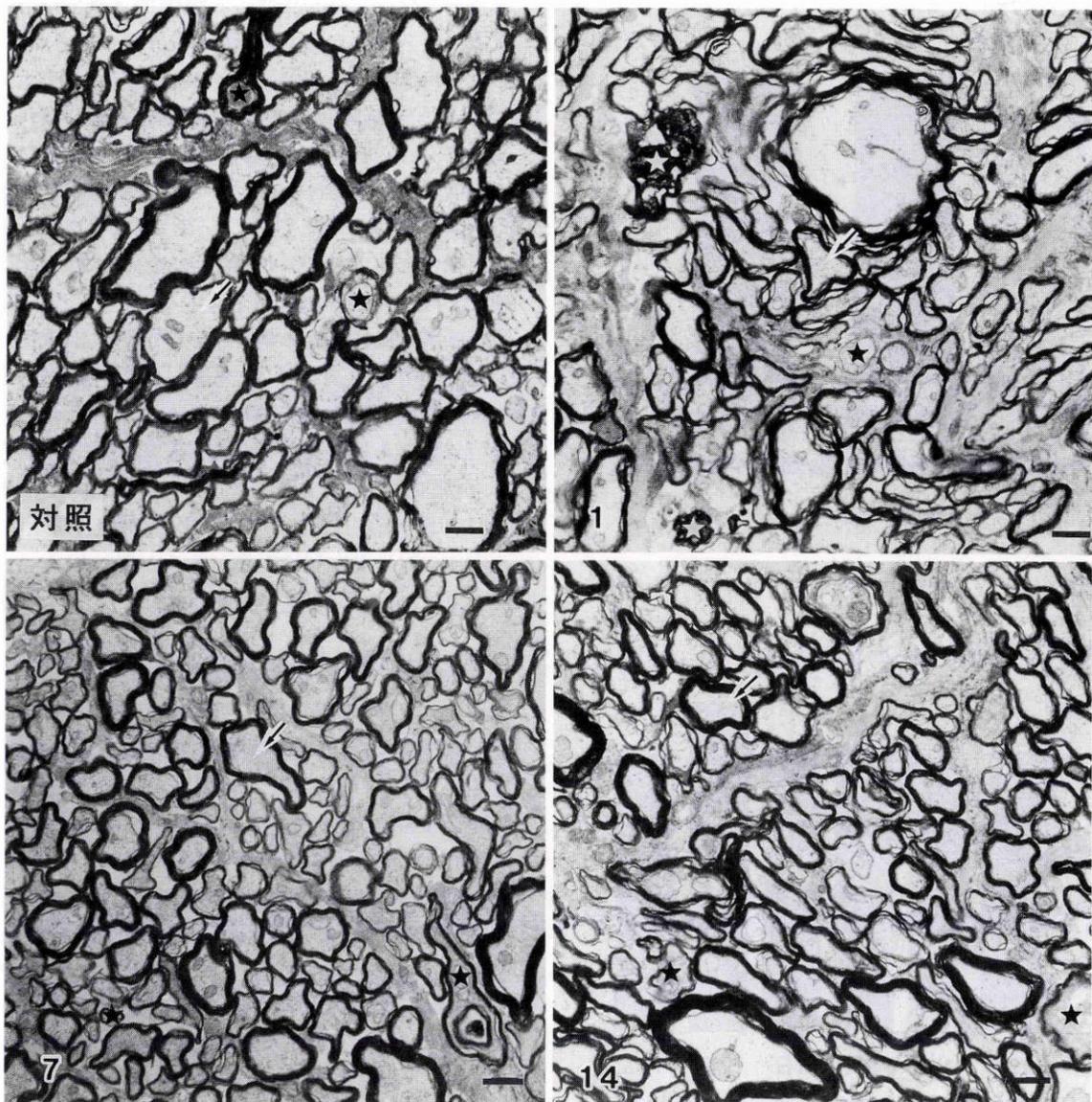


図5 視神経の電顕像.

対照(0)と比較して再虚血7日と14日の視神経には内部構造の形態を保った軸索が良く保たれており,7日に最も著しい軸索の保護作用がみられた.バーは1 μ m.正常な軸索を矢印で,異常な軸索を星印で示した.

の光顕では、明瞭な軸索の消失や細胞成分の増加や間質成分への置換はなかった(図4)。しかし、視神経を電顕で観察すると再虚血眼では、対照眼と比較して軸索の microtubules や microfilament などの内部構造の崩壊や、ミエリン鞘の層状構造の乱れがわずかであるが、対照眼よりも軽減しているのがみられた(図5)。

細胞障害の程度を、対照眼と再虚血眼で障害の程度を比較するために正常な軸索を電顕で形態計測した。無処置眼の正常な軸索数は、 111.3 ± 10.7 (平均値 \pm 標準偏差 $\times 10^4/\text{mm}^2$)、15分虚血眼は、 111.6 ± 10.4 であった(図6)。対照眼の軸索数は、 79.2 ± 6.4 、再虚血眼の再虚血1日は、 82.7 ± 9.3 、2日は 87.0 ± 9.2 、4日は 88.8 ± 13.2 、7日は 101.2 ± 10.4 、14日は 85.2 ± 12.1 であった(図7)。無処置眼と15分虚血眼との間に統計学的有意差は

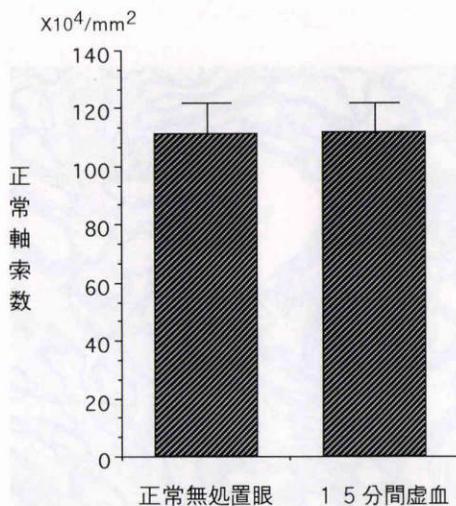


図6 無処置眼と15分間虚血眼の正常な軸索数の形態計測結果。

両者に差はない。棒グラフのバーは標準偏差を示す。

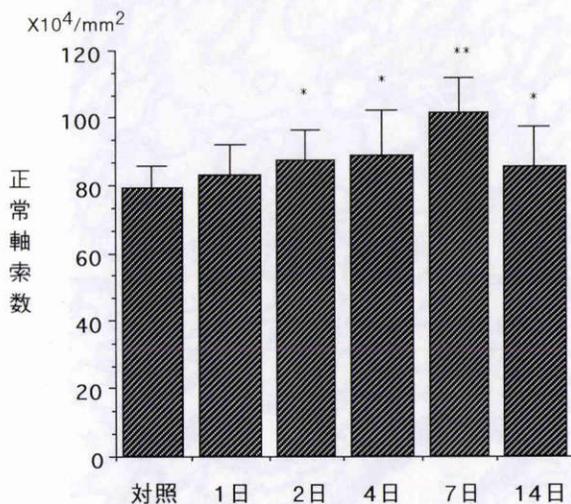


図7 対照眼と再虚血群の正常な軸索数の形態計測結果。

*印の2, 4, 14日は $p < 0.05$, **印の7日は $p < 0.01$ で有意差がみられた。棒グラフのバーは標準偏差を示す。

なかった。虚血2, 4, 14日は、対照眼と $p < 0.05$ で、虚血7日は $p < 0.01$ で統計学的に有意差があったが、1日では有意差はなかった。

IV 考 按

砂ネズミを用いた一過性前脳虚血モデルで、海馬CA1の神経細胞は5分間の虚血後、他の脳の神経細胞とは別に緩徐に細胞壊死に陥っていくことが知られ、遅発性細胞壊死と呼ばれている¹⁷⁾。この前脳虚血モデルを用いた実験で、予め軽度の虚血(2分間)を負荷しておく、次に致死的な虚血(5分間)を加えても、抵抗性を有するようになる虚血耐性現象が知られている^{11)~13)}。砂ネズミの虚血再灌流実験で、電顕を使って脳の障害を組織学的に報告¹⁸⁾した例はあるが、同様の虚血性現象が脳細胞と良く似た性質の眼の神経細胞においても発現しているかどうかを調べた報告はない。

我々の行った高眼圧による眼虚血実験では、神経細胞にストレスはかかるが、組織学的に何ら形態変化を起こさない虚血時間を予備実験から15分間の虚血とした。そして、網膜神経節細胞や神経線維層の網膜内層と視神経に障害を起こし、明らかな視神経の障害が電顕でみられる虚血時間を45分間とした。その結果、予め15分間の短時間の眼虚血を与えておくと、その後、本格的な45分間の虚血を与えても、視神経軸索の壊死脱落が対照眼と比較して障害の程度が軽減されること、すなわち神経細胞保護効果を視神経内の軸索の崩壊を形態計測することによって証明した。すなわち、電顕により再虚血1日目では視神経軸索の障害の軽減はみられなかったが、再虚血2日目以後からは軸索の崩壊壊死の軽減がみられた。しかも、再虚血2, 4, 14日は $p < 0.05$ で、再虚血7日は $p < 0.01$ で統計学的に有意差をみた。視神経は眼圧上昇による虚血に対し虚血耐性現象があると思われ、かつ、この耐性効果は再虚血7日に一番強く生じていることがわかった。

この実験では、放置すれば必ず死滅するであろう強い虚血による神経細胞壊死を抑制するような物質による治療が可能になり、神経細胞自身に虚血耐性を獲得させる方法が示唆された。今までに薬物による虚血障害の軽減実験が多く報告^{15)19)~22)}されている。すでに我々と同じ眼圧上昇による虚血再灌流障害を起こすラットによる実験で、網膜の脱落壊死を軽減できた薬物の報告には、Ca拮抗剤¹⁵⁾、麻薬拮抗剤²²⁾、basic fibroblast growth factor²³⁾があるが、今後はこの同じモデルを用いて、今まで使用されなかった薬物による視神経の保護効果も評価することができるので、今後の研究が期待される。

本論文の要旨は、第60回日本中部眼科学会(平成6年、神戸)において発表した。

本研究は、平成5年度文部省科学研究補助金「奨励研究(A)05771451」の援助を受けた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) 坂口健夫, 山田和雄, 早川 徹, 松本勝美, 片岡和夫, 中尾和民, 他: 遅発性細胞壊死の過程で核酸情報伝達系の障害が関与する可能性について, 脳神経 40: 629—635, 1988.
- 2) Milde LN: Pathophysiology of ischemic brain injury. *Critical Care Clinics* 5: 729—753, 1989.
- 3) 田口明彦, 松本昌泰, 大槻俊輔, 小川 智, 半田伸夫, 鎌田武信, 他: 遅発性神経細胞壊死と Apoptosis—砂ネズミ 5 分前脳虚血後の海馬での DNA fragmentaion の観察—, 臨床神経学 33: 1341, 1993.
- 4) Nowak TS: Synthesis of a stress protein following transient ischemia in the gerbil. *J Neurochem* 45: 1635—1641, 1985.
- 5) Wu B, Hunt C, Morimoto R: Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol* 5: 330—341, 1985.
- 6) Vass K, Welch WJ, Nowak TS: Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol* 77: 128—135, 1988.
- 7) Nowak TS, Ikeda J, Nakajima T: 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Supplement III Stroke* 21: 107—111, 1990.
- 8) Nowak TS, Bond U, Schlesinger MJ: Heat shock RNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia. *J Neurochem* 54: 451—458, 1990.
- 9) Izumoto S, Herbert J: Widespread constitutive expression of HSP90 messenger RNA in rat brain. *J Neurosci Res* 35: 20—28, 1993.
- 10) Nishi S, Taki W, Uemura Y, Higashi T, Kikuchi H, Kudoh H, et al: Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res* 615: 281—288, 1993.
- 11) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528: 21—24, 1990.
- 12) Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, et al: 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 561: 203—211, 1991.
- 13) Kirino T, Tsujita Y, Tamura A: Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 299—307, 1991.
- 14) Hughes WF: Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 53: 573—582, 1991.
- 15) Takahashi K, Lam TT, Edward DP, Büchi ER, Tso MOM: Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 110: 862—870, 1992.
- 16) Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, Miki H, Uyama M: High intraocular pressure induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 445—451, 1996.
- 17) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57—69, 1982.
- 18) Tomimoto T, Yanagihara T: Electron microscopic investigation of the cerebral cortex after cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil. *Brain Res* 598: 87—97, 1992.
- 19) Szabo ME, Droy-Lefaux MT, Doly M, Carre C, Braquet P: Ischemia and reperfusion-induced histopathologic changes in the rat retina; demonstration of free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1471—1478, 1991.
- 20) Ogawa N, Asanuma M, Mizukawa K, Hirata H, Chou H, Mori A: Post-ischemic administration of bifemerane hydrochloride prohibits ischemia-induced depletion of the muscarinic M1-receptor and its mRNA in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 591: 171—175, 1992.
- 21) Takeda Y, Hashimoto H, Kosaka F, Hirakawa M, Inoue M: Albumin-binding superoxide dismutase with a prolonged half-life reduces reperfusion brain injury. *Am J Physiol* 264: H1708—H1715, 1993.
- 22) Lam TT, Takahashi K, Tso MOM: The effects of Naloxone on retinal ischemia in rats. *J Ocul Pharmacol* 10: 481—492, 1994.
- 23) Zhang C, Takahashi K, Lam TT, Tso MOM: Effects of basic fibroblast growth factor in retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3163—3168, 1994.