

第 103 回 日本眼科学会総会 特別講演 I

眼と栄養

雨宮次生

長崎大学医学部眼科学教室

協同研究者

平山 善章, 高野潤之輔, 嵩 義則, 小川 月彦, 今村 直樹,
三島 一晃, Bhutto, Imran Ahemd, 宮 華青, 津田 恭央,
大庭 啓介, 宮村 紀毅, 金沢 佑隆, 上田 佳子, 芦 忠陽,
齋藤 了一, 北岡 隆, 大平 明弘(長崎大学医学部眼科学教室)

要 約

目的: 眼組織におけるビタミンと微量元素の作用を研究すること。

材料と方法: ラットまたはマウスを微量元素 Zn, Cu, Mn, Se, Mg, Cr の欠乏飼料, あるいはビタミン A, B₁₂, C, E の欠乏飼料で飼育した。また, Al とビタミン A 過剰実験も行った。結膜, 角膜, 網膜, 視神経を光学顕微鏡, 透過電子顕微鏡, 走査電子顕微鏡, エネルギー分散型 X 線分析装置, イオン顕微鏡を用いて検索した。これらの方法に, 組織化学, 組織細胞化学, 免疫組織化学の手法を組み合わせた。

結果: Zn, Cu, Mn, ビタミン A, C, E の欠乏は, 結膜においては杯細胞消失と結膜と角膜における微絨毛の著明な減少を起こした。杯細胞の元素は, 欠乏状態では変化した。さらには, 上皮細胞は, 細線維の発達不良と, 核クロマチンの異常分布をも起こした。

Zn, Cu, Mn, ビタミン A, E の各欠乏は, 視細胞を変性せしめ, 消失させた。Se 欠乏は, 水平細胞とアマクリン細胞を減少させた。ビタミン B₁₂ 欠乏は, 網膜神経線維層の神経線維を減少させた。Mg 欠乏は, 色素上皮細胞層に多巢性の壊死と視細胞核にアポトーシス様変化を招来した。Cr 欠乏は, 色素上皮細胞の視細胞外節層板の異常貪食を起こした。ビタミン B₁₂ は網膜における概日性リズムに関与していた。

Zn, Cu, Mn, ビタミン A, B₁₂, E 欠乏は, 視神経有髄神経線維のミエリンを変性・消失させた。

ビタミン A 過剰症では, 脂肪滴が網膜色素上皮細胞に出現し, アルコール脱水素酵素活性が色素上皮と視細胞外節層板から消失した。Al 過剰は網膜に中毒を起こし, 視細胞を消失させた。Al 沈着が外網状層の神経突起や樹状突起に存在した。Zn は角膜上皮創傷治癒に必要と考えられた。

考 按: 微量元素は, 通常, 酵素中に含有され, 多種多様な代謝作用をもつ。これらは多くの物質の合成と分解に関与している。Zn, Cu, Mn, Se のような微量元素やビタミン A, C, E は, 脂質過酸化を防止する。ある種のビタミンは, 上皮細胞, 神経線維, 神経細胞に親和性があり, 分化・発育, 維持に必要である。

結 論: Cu, Zn, Mn, Se, Mg, Cr やビタミン A, B₁₂, C, E は, 細胞の構造と代謝の維持に必要である。(日眼会誌 103: 829—850, 1999)

キーワード: 微栄養素, ビタミン, ビタミン A, ビタミン B₁₂, ビタミン C, ビタミン E, 微量元素, Zn, Cu, Mn, Mg, Cr, Se, Al, 結膜, 角膜, 網膜, 視神経

The Eye and Nutrition

Tsugio Amemiya

Department of Ophthalmology, Nagasaki University School of Medicine

Abstract

Purpose: To examine the effect of vitamins and trace elements on ocular tissue.

Materials and Methods: Rats or mice were fed diets deficient in the trace elements Zn, Cu, Mn, Se,

別刷請求先: 852-8501 長崎市坂本 1-7-1 長崎大学医学部眼科学教室 雨宮 次生
(平成 11 年 8 月 18 日受付, 平成 11 年 9 月 8 日改訂受理)

Reprint requests to: Tsugio Amemiya, M.D. Department of Ophthalmology, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

(Received August 18, 1999 and accepted in revised form September 8, 1999)

Mg, and Cr or in vitamins A, B₁₂, C, and E. In some rats Al and vitamin A were injected in excessive amounts. We studied the conjunctiva, cornea, retina, and optic nerve with a light microscope, transmission and scanning electron microscopes, an energy dispersive X-ray analyser, and an ion microscope. Histochemical, cytochemical, and immunohistochemical techniques were applied to the pathological specimens.

Results : Deficiencies of Zn, Cu, Mn, and vitamins A, C and E caused a loss of goblet cells in the conjunctiva and a prominent decrease of microvilli and microplicae in the conjunctiva and cornea. The elements in the goblet cells were changed in these conditions. In addition, epithelial cells showed poor fibrous development and abnormal distribution of chromatin in the nucleus.

Zn, Cu, Mn, and vitamins A and E deficiencies caused photoreceptor cells to degenerate and disappear. Se deficiency reduced the horizontal and amacrine cells. Vitamin B₁₂ deficiency reduced nerve fibers in the nerve fiber layer of the retina. Mg deficiency induced multifocal necrosis in the retinal pigment epithelium and apoptotic nuclear changes in the photoreceptor cells. Cr deficiency showed abnormal phagocytosis of the photoreceptor outer segment discs in the retinal pigment epithelium. Vitamin B₁₂ was found to be related to the circadian rhythm in the retina.

Deficiencies of Zn, Cu, Mn, and vitamins A, B₁₂, and E induced degeneration and disappearance of

myelin lamellae in the myelinated optic nerve fibers.

In hypervitaminosis A, lipid droplets appeared in the retinal pigment epithelium and alcohol dehydrogenase disappeared in the retinal pigment epithelium and photoreceptor outer segments. Excessive Al was toxic to the retina, which showed disappearance of photoreceptor cells. Al deposits were seen in dendrites and neurons in the outer plexiform layer.

Zn seemed to be necessary for corneal epithelial cell wound healing.

Discussion : Trace elements usually are contained in enzymes, which have many metabolic functions. They are related to synthesis and breakdown of many substances. Some trace elements such as Zn, Cu, Mn, and Se and vitamins including vitamins A, C, and E prevent peroxidation of lipids. Some vitamins have an affinity for specific tissues such as epithelial cells, nerve fibers, and neuronal cells and are needed for cell differentiation, development, and maintenance.

Conclusion : Cu, Zn, Mn, Se, Mg, and Cr and vitamins A, B₁₂, C, and E are necessary for maintenance of cellular structure and metabolism. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 829—850, 1999)

Key words : Micronutrient, Vitamin, Vitamin A, Vitamin B₁₂, Vitamin C, Vitamin E, Trace element, Zn, Cu, Mn, Mg, Cr, Se, Al, Conjunctiva, Cornea, Retina, Optic nerve

I 総論

栄養はあらゆる意味で健康の源であり、良質で十分な栄養は疾病を予防し、病気の回復、治癒を促進する。栄養不足はかつて我が国においても深刻な問題で、国家の問題であった。表題の栄養とは、微量栄養素、すなわち、ビタミンと微量元素を指す。両物質とも多くの代謝系において補酵素として、あるいは酵素中に含まれて関与し、この不足は関連酵素活性を低下させ、多岐にわたる代謝障害を惹起し、多様多彩な障害を示す。このような意味で、栄養という言葉を表題に用いた。

眼組織におけるビタミンや微量元素の生理作用が不明であるので、まず各種微量栄養素の欠乏を動物に惹起せしめ、眼組織における病理学的変化を研究した。また、過剰症についても一部研究した。

1. ビタミン

ビタミンは生体内必須の物質で、ヒトの体内では合成できないものが圧倒的に多く、食物中からビタミンを摂取する。この物質は諸種代謝において補酵素として作用する。また、特定の組織と結合して特有の作用を発揮した

り、ある程度以上の量では薬理作用をもつ。

本研究ではビタミン A, B₁₂, C, E の各欠乏症の眼に及ぼす影響について論ずる。ビタミン A については、過剰症についても研究した。

2. 微量元素

生体の微量元素とは、生体内に微量にしか存在しない元素であり、体内では合成されないため、食物から摂取するしかない元素をいう。微量の定義はあいまいであるが、かつて微量定量の困難であった時代に、痕跡的にしか確認できなかったほど微量という意味で、この名称がある。

微量元素は生体の要求に応じて、次のように分けられる。

1) 不可欠微量元素

Fe, I, Cu, Zn, Mg, Mn, Co, Mo, Se, Cr, Sn などである。

2) おそらく不可欠と思われる微量元素

Ni, F, Br, As, V, Cd, Ba, Sr などである。

3) 有毒元素

As, Pb, Cd, H などである。

いずれの微量元素も過剰に存在すれば有毒であるが、ひ素やカドミウムは、生体にとって微量でも不可欠なの

か有毒なのか不明な点がある。

以上の微量元素のうち、その欠乏が眼組織に及ぼす影響のわかっているものは非常に少ない。本研究では、Zn, Cu, Mn, Se, Mg, Cr について論ずる。また、Al については、その中毒について考察する。

3. 眼組織における微量元素の分布

眼組織における微量元素の定量を行った仕事は極めて少ない。湿重量で測定した古い記録がある¹⁾。それによると、ラットでは、Zn は網膜、角膜上皮、虹彩、硝子体、視神経の順で多く存在し、Cu は角膜上皮、網膜、視神経、脈絡膜、虹彩の順に、Mn は網膜、角膜上皮、硝子体、視神経、虹彩の順に多く含まれている。眼組織では、1 眼に含有される微量元素の量が極微量であるためか、測定値がばらついて、一定の値を得にくい。著者らはマウスの各眼組織の微量元素測定を試みたが、安定した値を得ることができなかった。微量である上に、組織が小さ過ぎるためと思われる。ヒト眼についての研究もあるが、その値もばらつきが大きく、信頼度は低い。

眼組織の微量元素を考えると、含有量も重要であるが、その分布も問題である。これを検索する手段としては、組織化学的方法があるが、検出できる元素は極めて少ない。

組織化学的検索を行った我々の研究²⁾によれば、Zn は網膜視細胞外節中に証明される。また、Cu は、角膜の上皮細胞、内皮細胞、虹彩、毛様体、水晶体上皮、網膜視細胞内節・外節、色素上皮細胞、脈絡膜、強膜、視神経中に存在する。

微量元素は金属含有酵素として生理的作用を発揮していると考えられている。例えば、Cu・Zn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, Cu 含有酵素として cytochrome C oxidase, Zn 含有酵素として alcohol dehydrogenase などがあるが、これらの酵素の組織化学的局在は、我々の検索した Cu, Zn に関する限り、元素の存在部位に一致するのである^{3)~7)}。

4. 栄養不足の原因

現在の日本では、ビタミンや微量元素が不足していることは考え難いと思われる。しかし、世界的にはこれら微量栄養素の不足は、特殊なあるいは稀な現象ではない。50 年前の我が国は貧困のどん底にあり、栄養問題の解決は国家の課題であった筈である。豊かな現在の日本人には考えられないかもしれないが、貧困は今なお世界の問題である。しかし、栄養不足は貧困のみから発生するものではない。その原因を列挙すると、下記ようになる。

1) 貧困の国

貧困による食糧不足による。

2) 偏食

宗教によっては食べてはいけない食物がある。例えば、イスラム教による豚肉の禁止である。また、イランとエジプトのある地域で、住民が小麦のパンのみしか摂取しな

かったために発生した集団亜鉛欠乏症は、微量元素の必要性を一躍有名にした Prasad⁸⁾の業績である。

偏食者が激しい運動をしたために微量栄養素が欠乏することがある。例えば、西日本地方で高校生の運動部に起こった脚気(ビタミン B₁ 欠乏症)は、カップラーメンなどの簡易食品で主食を摂るといような状態で激しい運動を行った場合に起こった 1 つの例である。

3) 抗生物質や抗結核剤などの薬剤投与

抗生物質や抗結核剤の中には微量元素と結合するキレート作用をもつものがあり、こういう薬剤の長期服用によりある種の微量元素が欠乏することがある。例えば、ethambutol 服用により亜鉛欠乏が起こり、視神経症が発症する⁹⁾¹⁰⁾。また、血圧降下剤の disulfiram, oxyquinolines, diiodohydroxyquin, penicillamine, DL - penicillamine, isoniazid, iproniazid, nialamide などがある^{7)~12)}。

4) 食品添加物の体内蓄積による微量元素の腸管からの吸収阻害、体外排出促進

ポリリン酸、フィチン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)などは、食品添加物として広く使用されている。ポリリン酸は、清涼飲料、缶詰、調味料、ハムなどの食品の品質改良や保水性の増大などに幅広く使われており、またフィチン酸は穀物類に多量に含まれるリン酸化合物で、ポリリン酸同様に食品添加物として広く使用されている。EDTA は缶詰、瓶詰めの酸化防止剤に使用されている。これらの物質は、亜鉛などの金属元素と結合して組織内に蓄積したり、腸からの吸収が阻害されて不足することがある。代表的金属として Zn がある。Zn 不足によって味覚が障害されたり、腎臓に蓄積して石灰化などを起こし、腎障害の原因になることがある。

5) 酸性雨により土壤中の微量元素が減少し、家畜や野菜などからの摂取量が減少

世界各地に酸性雨が降り、森林の木が広範囲にわたって枯れていることは広く知られている。この酸性雨は土壤にも影響を及ぼし、Zn や Se を減少させる。このような土壤で育った野菜や果実は Zn や Se が不足し、また牧場の牧草中の亜鉛やセレンウムも減少して、これを食べた牛の乳や肉中の亜鉛やセレンウムは少ない。こういう土地の野菜、果実、牛や羊の肉や乳を食べるヒトは、長い年月の間に Zn や Se 欠乏症に罹かる。

6) ある地域の土壤中の微量元素が少ない。

上述したように酸性雨などの要因によって土壤中の金属元素が減少することもあるが、元々ある金属元素が少ない地域がある。例えば、中国東北地方における Se 不足、コーカサス地方のヨード不足、Zn 不足などがそれぞれである。このような地方の野菜、果物、穀物、肉、牛乳などではある元素の量が低く、上述のような影響がヒトのみならず動物にも起こる。Se 欠乏による中国東北部の克山病、ヨード欠乏によるコーカサス地方の甲状腺腫、Zn 欠乏症などがよい例である。これらの微量元素欠乏症は、古

くから地方病として知られていた。

7) 毒性物質の環境汚染

工場廃棄物、一般のごみ、プラスチックなどの合成化学物質は、廃棄地域の地下水に入り込んで、土壌や水の重金属の量を増加させたり、あるいは重金属と結合物を作り、土壌や水の中の微量元素を減少させることがある。この場合は主として中毒が社会問題になる。この例として、水銀汚染の水俣病や、カドミウム中毒のイタイイタイ病などがある。

8) 高齢者の増加

世界的にも平均寿命が延びているが、日本では高齢人口の増加が著しい。高齢者では微量元素の腸管からの吸収が低下し、さらに蓄積された微量元素が少しずつ排泄されるために、微量元素不足になり勝ちである。

9) 慢性疾患

慢性疾患では、長年にわたりビタミンや微量元素の腸管からの吸収が阻害されたり、排出が吸収を上まわって、欠乏に陥る¹¹⁾。

10) 血液透析

血液透析患者は増加しつつあり、週3回の透析も決して珍しくない。血液が1回4時間近く体外循環により異物に接するので、血中微量元素が失われたり、減少することは起こり得ることである。Zn, Seの欠乏に罹ることが報告されている。また、血流が汚染されることもある。アルミニウムの混入によるアルミニウム脳症、アルミニウム骨症、Caが沈着する結膜・角膜・網膜結石¹³⁾などが報告されている。

11) 高カロリー人工栄養療法の普及

高カロリー輸液による静脈栄養法が普及し、本治療法が長期間に行われた場合、必須微量元素の欠乏症が起こるという報告がある。輸液は化学的に純粋な物質から成るので、長期間にわたり輸液のみの栄養が行われると欠乏症になる。現在までに報告されている欠乏微量元素は、Zn, Cu, Se, Mn¹⁴⁾¹⁵⁾, Cr, Moなどである。

以上のように、ビタミンや微量元素欠乏症は、食糧事情によってのみ発生するものではない。原因の中には、社会の進歩に伴う環境汚染や、医学の進歩に伴って生じたものもある。

II 微量元素とビタミンの実験的研究

1. 研究方法

以下に微量元素ならびにビタミン欠乏実験の方法と結果を述べるが、共通事項は以下の通りである。

動物は、1987年以前には、京都大学医学部眼科学教室において飼育され、1988年以降は「動物の保護及び管理に関する法律」ならびに「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に準拠して動物を取り扱い、長崎大学医学部動物実験施設において飼育した。飼育条件は室温21℃、12時間暗室、12時間明室にした。

屠殺の際は nembutal または pentobarbital の腹腔内注射を行い、麻酔下に眼球ならびに眼組織を摘出、採取した。採取した組織は、光学顕微鏡(光顕)用試料としては、10%中性ホルマリンに固定し、型のごとくパラフィン包埋した。3μmパラフィン切片をマイクロトームで作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、トリクローム染色、アザンマロリー染色、periodic acid Schiff(PAS)染色を施した。

透過電子顕微鏡(電顕)(TEM)用試料作製法: 4%グルタルアルデヒド・0.22Mカコジル酸緩衝液で1時間前固定後、1晩0.22Mカコジル酸緩衝液で洗浄し、Caulfield固定液(1%オスミウム酸・ペロナール緩衝液)で1時間後固定した。その後、試料をエタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドに浸漬し、Epon 812またはLuveak 812に包埋した。包埋試料はトリミングし、1μm切片を作製して1%トルイジンブルーで染色した。切片を鏡検して電顕観察に必要な部位を選定してトリミングし、Porter-Blum MT 2型マイクロトームで超薄切片を作製し、電顕で観察した。使用電顕は日立H12A, H12D, H300形TEMならびに日本電子JOEL JEM 1210型TEMである。

走査電子顕微鏡(SEM)用試料作製法: TEMに準じて固定脱水した。0.04%酢酸アミルで置換し、臨界点乾燥し、日立S-2360N形SEMで観察した。

分散エネルギーX線解析装置(EDXA)を使った電顕的要素分析: 眼組織を摘出、細切し、直ちに液体窒素で急速凍結し、30分後、凍結切片を作製した。SEMによる分析用には10μmの切片を作製し、シリコンウエハーに載せ、カーボンコーティング後、JSM 6400F(JEOL)で観察した。TEMによる分析には、凍結超薄切片を作製し、ナイロンメッシュに載せ、無染色でJEM 1210F(JEOL)電顕で観察し、分析した。

イオン顕微鏡(SIMS)用試料作製法: 眼組織摘出後、直ちに液体プロパンで急速凍結した。これを光顕ならびに金属顕微鏡下に観察し、これに基づいてSIMSによる観察を行った。試料を引き続きクリオスタットで10μmの切片にし、シリコンウエハーに載せ空気乾燥して、SIMSで分析した。O₂₊を一次イオン源で表示した。一次イオン加速電圧12.56V、二次イオン加速電圧は4.56Vである。

使用観察機器は、光学顕微鏡(光顕)、TEM、SEM、分析電子顕微鏡(分析電顕)、EDXA、イオン顕微鏡である。これらに無機有機物組織化学、酵素組織細胞化学、免疫組織化学の手法を併用した。

血清中微量元素の測定: 血清中の各種微量元素は、心臓刺穿によって採血し、3000回転10分間遠沈し、原子吸光法で測定した。

2. Zn欠乏

1) 材料と方法

Zn欠乏実験を以下のように行った。

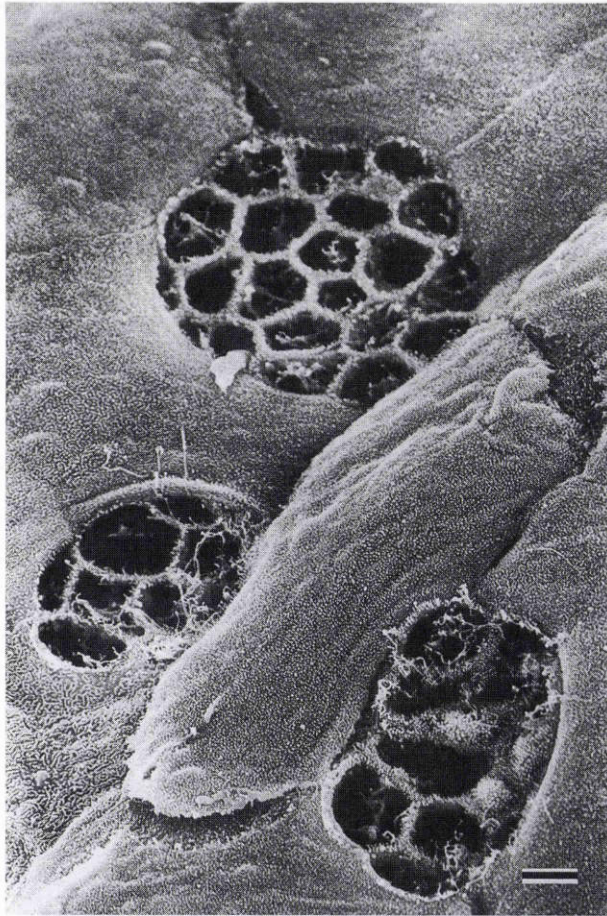


図1 Zn欠乏7週目のラット結膜.

杯細胞は減少し,残った杯細胞も変形し,顆粒も減り,空になったようにみえる.バーは2 μ m

使用動物:Wistar 京都ラット

飼育:生後21日目からZn欠乏飼料(Zn 0.07~0.38 mg/100 g含有)で飼育.水は純蒸留水を投与した.Zn欠乏飼料飼育1週毎に屠殺.

対照群:Znを4.9 mg/100 g含有する普通飼料と純蒸留水で飼育.

回復実験:Zn欠乏飼料飼育7週目からZnを30 ppm/ml含有する純蒸留水を飲料水とし,Znを4.9 mg/100 g含有する普通飼料で飼育した.回復飼料飼育3週後に屠殺した.

2) 結果

血清Zn:Zn欠乏群はZn欠乏飼料飼育7週目では,105 \pm 9.0(平均値 \pm 標準偏差) μ g/dl,対照群は189.8 \pm 8.7 μ g/dlで,両群の間には $p < 0.002$ の統計学的有意差を示した.回復実験群では162.0 μ g/dlであった.

全身状態:体重の増加は著しく減少し,サイズも小さく,体毛も粗である.

(1) 結膜¹⁶⁾

Zn欠乏飼料飼育5週目頃から変化は出現し,眼瞼眼珠結膜上皮細胞の微絨毛は減少し始め,7週目頃からこの微絨毛は非常に疎となり,上皮細胞も対照群の6~7層か



図2 Zn欠乏10週目の網膜内顆粒層.

細胞核が2層に減少した部分がみられる.バーは2 μ m

ら2~3層へと減少が著明になった.杯細胞は数を減少させ,形も萎縮し,分泌顆粒も減少し,形も不規則になった(図1).分析電顕で杯細胞中の分泌物の分析を行ってみると,存在元素の種類には変化はなかったが,Na, P, S, Cl, K, Caの量は減少した.

(2) 角膜¹⁷⁾

Zn欠乏飼料飼育1週間で角膜最表層の上皮細胞の微絨毛とひだ状突起が減少し始め,epithelial holeの数も減少し,形も不規則になった.これらの変化は4週間では極めて著明となった.以上はSEM所見であるが,角膜上皮細胞のTEM所見は以下の通りである.すなわち,角膜上皮最表層細胞において微絨毛とひだ状突起が減少し,細胞質内の張元線維も粗となり,線維束を形成しない.また,表面から2層目の上皮細胞の最表層の細胞との接触は本来微絨毛様であるが,これが細胞突起のような形態をとるようになった.これらの変化は経時的に著明となった.

回復実験群:SEMおよびTEMによる角膜上皮細胞の変化は回復実験2週間で回復し始め,4週間の終わりには,完全に形態的には対照群と変わらなかった.

(3) 網膜

Zn欠乏飼料飼育10週目の網膜では,色素上皮細胞に

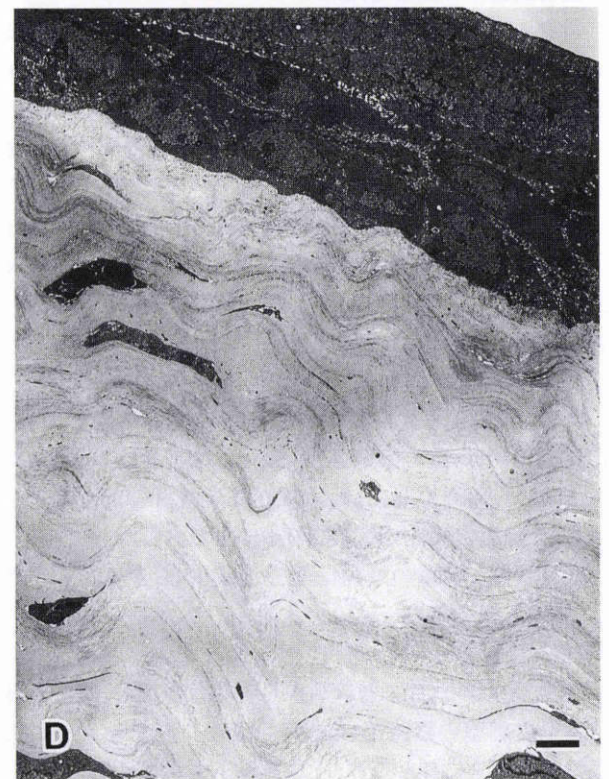
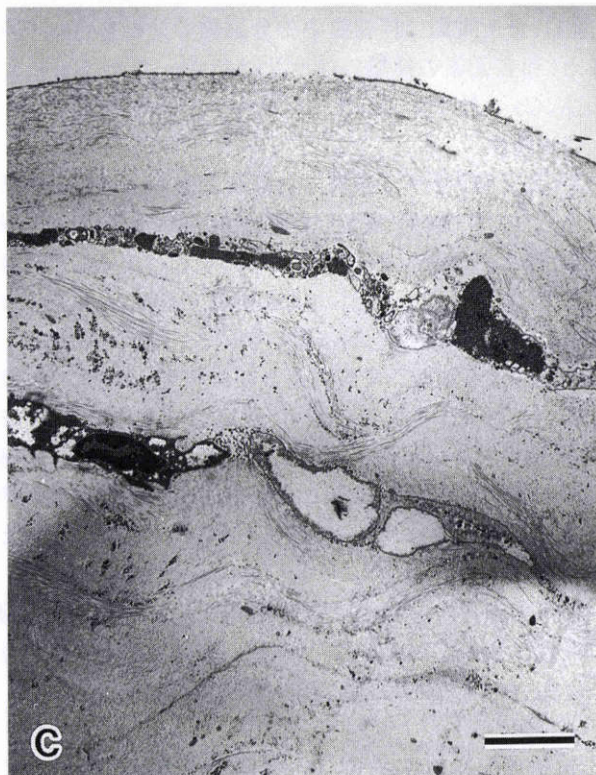
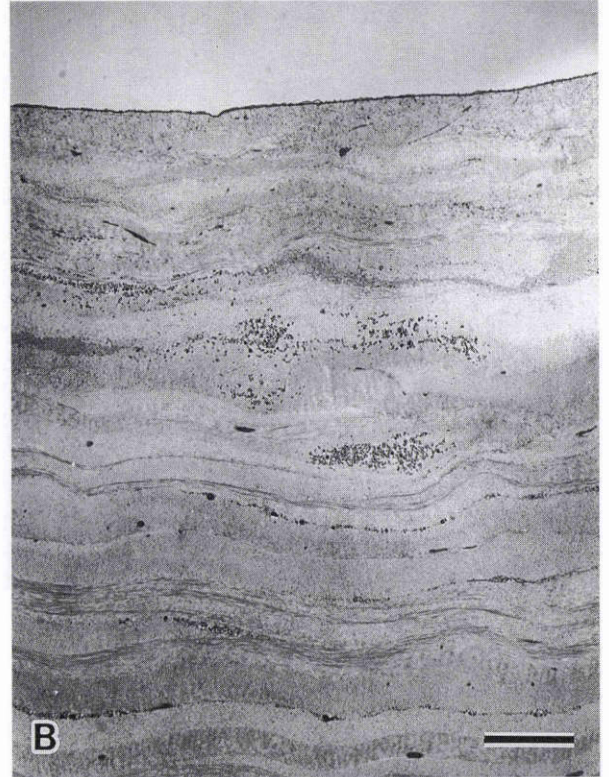
は電子密度の高い顆粒が出現した. 視細胞核が減少し, 内顆粒層は2層になった(図2).

Zn 欠乏飼料飼育 10 週後, 4 週間 30 ppm Zn 含有蒸留水を飲水させたラット網膜では視細胞核が著明に減少し, 外顆粒層は5~6層になった. また, 外網状層には電子密度の高い, 不規則な形状をした細胞が出現した.

(4) 視神経

Zn 欠乏飼料で 10 週間飼育したラットでは, 視神経中の有髄神経線維数は減少した. 層板の厚さも減少した. 星状膠細胞, 稀突起膠細胞の数は増加したが, 細胞内小器官には異常はなかった.

上記条件下のラットに 4 週間 30 ppm Zn 含有蒸留水を飲水させたラットでは, 有髄神経線維の数はさらに減少し, 回復はみられなかった.



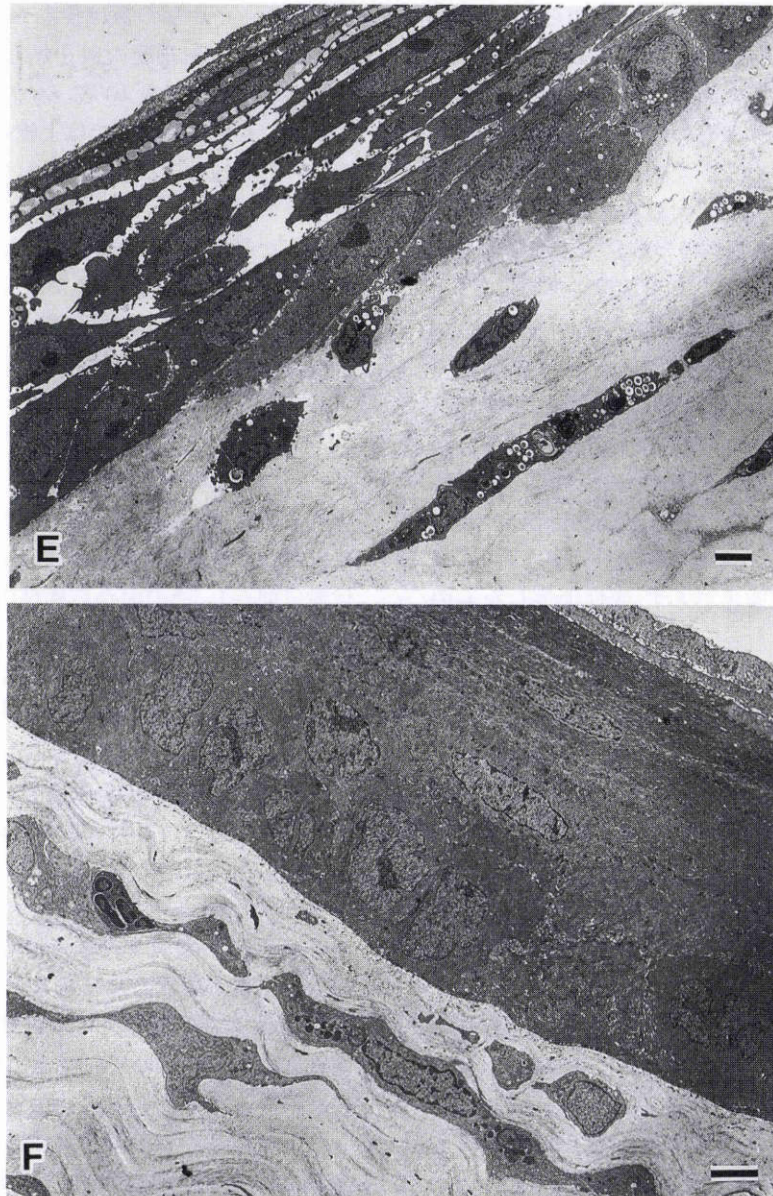


図3 A: 正常ラット角膜上皮全剥離 12 時間後角膜。

実質層に多形性細胞が出現している。上皮細胞はみられない。B: Zn 欠乏ラット角膜上皮全剥離 12 時間後角膜。上皮細胞はない。実質層に多形性細胞は存在しない。C: Zn 欠乏ラット角膜上皮全剥離後 Zn 投与 12 時間後角膜。正常対照と変わらない。D: 正常ラット上皮剥離 3 日目。上皮再生がみられる。E: Zn 欠乏ラット上皮剥離 3 日目。上皮再生がみられるが、上皮間が離解している。F: 上皮剥離後 Zn 回復ラットの 3 日目。正常ラットと変わらない上皮再生がみられる。パーは A~F 2 μ m

3) 考按

Zn は微量元素の中でも重要で、この欠乏はヒトでも比較的容易に起こる。Zn は金属含有酵素として、alkaline phosphatase, carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, DNA polymerase, RNA polymerase 中に存在する。したがって、Zn 欠乏は、これらの酵素活性を低下させる。Zn は眼組織では角膜上皮細胞中に大量に存在する。Zn は上述のように polymerase の活性に関与していることから、Zn 欠乏により蛋白合成が障害され、張元線維の成分であるミオシン様物質や微絨毛やひだ状突起下にあるアクチンフィラメントの障害によって、微絨毛やひだ状

突起を減少させるものと推測される。微絨毛やひだ状突起の減少は、涙液層形成を阻害し、角膜表面の感染防止を障害すると考えられる。Zn 欠乏症では異物感、流涙、羞明が生ずる理由の 1 つは、微絨毛やひだ状突起の著しい減少による涙液層形成不全であろう。また、眼瞼・眼球結膜における上皮細胞の微絨毛やひだ状突起の減少も、結膜表面の涙液ならびに分泌物保持を妨げる。また、杯細胞を萎縮させ、分泌物を変化させると同時に減少させて、角膜涙液層を一層障害させると考えられる。

Zn 欠乏の網膜所見としては、色素上皮に脂肪滴類似物が出現するという記載がある¹⁸⁾のみである。Zn 欠乏状態

では、ヒトでは暗順応が低下する¹⁹⁾ことが知られている。これは、Zn 含有酵素である alcohol dehydrogenase が Zn 欠乏により活性が低下するために、本酵素が関与するレチノールからレチナルへの反応に障害が起こり、ビタミン A 代謝が円滑に行われないために、暗順応障害が生ずると推測される。Zn 欠乏状態では、我々の実験結果は、色素上皮に貪食された視細胞外節の貪食完了が遅延すること、外節層板の電子密度にむらと破壊像のあること、回復実験後も視細胞核の数が著しく減少し続けることを示した。このことは、Zn 欠乏によりビタミン A 代謝障害を起し、ビタミン A を含有し、かつ、これによって機能を保持している視細胞は、ひとたび核に変性が起こると回復しないということを推定するものと思われる。

視神経においては、Zn は Cu・Zn spherulase 中に含有されているために、本酵素の活性が低下し、有髄神経鞘の脂質の過酸化が防止できず、変性消失したものと推測した。

2. Zn と創傷治癒

1) 使用動物：Wistar 京都ラット

方法：正常ラットを交配し、出産直後から母親を Zn 欠乏飼料で飼育した。生後 21 日目から仔を離乳し、Zn 欠乏飼料で飼育した。この仔ラットの生後 6 週間目に、角膜上皮を実体顕微鏡下で輪部からすべてカミソリ刃で剥離除去して、角膜実質を露出した。その後、12 時間、1, 3, 5, 7, 14 日目にそれぞれ眼球を摘出し、角膜を光顕、TEM で観察した。

対照実験は、正常ラットを普通飼料で飼育し、生後 3 週間目に上記同様に角膜上皮を剥離除去し、同様の経過で観察した。

回復実験は、Zn 欠乏飼料飼育 3 週目、生後 6 週目に上記同様に角膜上皮を剥離除去し、その直後から 30 ppm 亜鉛を含む水で飼育した。観察日は上記同様とした。

角膜は、光顕、TEM で観察した。また、パライン切片を下記の条件下で染色し、実質細胞中に出現した細胞が、貪食細胞であるか否かを検討した。第一抗体として、mouse anti-rat ED-1 (the monoclonal antibody ED-1, Serotec, Oxford, UK, macrophage/monocyte marker)、抗体濃度 1:100 dilution を、第二抗体として anti-mouse IgG antibody を用い、3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dotite) で発色した。

2) 結果

角膜上皮を剥離除去した角膜には、剥離 12 時間後にはいずれの群にも上皮細胞は存在しなかった。しかし、対照群と回復群には角膜実質層に多数の多形性の細胞が出現した。貪食細胞のための免疫染色をしたが染まらず、これらは角膜実質細胞と考えられた。この細胞は Zn 欠乏群にはみられなかった。実験 1 日後には対照群、回復群では上皮細胞が出現したが、Zn 欠乏群にはまだみられなかった。3 日後にはどの群にも上皮細胞が存在したが、Zn

欠乏群ではその層の数は少なかった(図 3)。実験後、日が経つにつれ上皮細胞の数を増したが、5 日目では対照群で 10 層、回復群でも 10 層、Zn 欠乏群では 8 層であった。しかし、Zn 欠乏回復群では上皮細胞が密に配列していたのに対し、対照群、Zn 欠乏群では疎で、細胞間が離解していた。デスモゾームも実験後 3 日目頃から出現するようになったが、正常群以外では少なかった。最表層の上皮細胞の微絨毛は、正常群では 3 日目、Zn 欠乏群では 7 日目、Zn 回復群では 5 日目に出現したが、その数はいずれの群でも少なかった。

3) 考按

Zn が創傷治癒に効果があるのではないかということ、古代エジプトの時代から、何となくいわれてきたことであるが、このことは皮膚の創傷治癒について主として研究されてきた。Zn は collagenase に含まれ、コラーゲン代謝に関与し、その面から創傷治癒を促進する効果を証明する研究²⁰⁾がある一方、効果はないとする研究²¹⁾²²⁾もある。角膜については、角膜実質に及ぶ創傷治癒に関する実験が主たるものであるが、これも Zn の治癒促進効果を肯定するもの²³⁾と、否定するもの²⁴⁾²⁵⁾があって、確立した説はない。本実験は角膜実質には傷害の及ばない角膜上皮の再生について限定したものである。Stem cell も残さないように角膜輪部からすべての角膜上皮を剥離除去して、上皮再生をみたところ、上皮再生は明らかに Zn 欠乏で遅延した。注目すべき点は、Zn 欠乏下では、角膜実質細胞の出現が確実に遅れることである。この実験の示すところは、角膜上皮再生には角膜実質細胞が関与し、その角膜実質細胞の出現や活性化には Zn を必要とするらしいということである。また、Zn を供給された群では、再生した上皮細胞間の接着が密であり、細胞間が解離することがなく、単に上皮の層数が回復するだけでなく、細胞の配列も早く正常化する。以上から、Zn は角膜上皮の再生に促進的に作用すると結論付けられた。このことは、難治性の角膜上皮剥離やびらん、硝子体手術時の角膜上皮剥離後の再生など、臨床的にも応用の余地があると思われる。

3. Mn 欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物：Wistar 京都ラット

方法：① Mn 欠乏飼料として Mn を 0.23 mg/100 g 含有する固形飼料を用い、対照群には Mn を 2.9 mg/100 g 含有する普通飼料を用いた。生後 21 日目に離乳し、雄ラットを Mn 欠乏飼料で飼育した。飼育 6, 12, 18, 30 か月目に屠殺し、網膜を TEM により観察した。

② 生後 21 日目に離乳し、雄雌ともに Mn 欠乏飼料で 3 か月飼育し交配した。得られた雄ラットを Mn 欠乏飼料で 2 か月間飼育し、屠殺した。このラットからは、角膜と視神経を摘出した。角膜は SEM と TEM で観察し、視神経は TEM で観察した。

回復実験：②において、5 か月間 Mn 欠乏飼料で飼育後、Mn を含む普通飼料で 3 か月間飼育し屠殺した。

2) 結果

血清 Mn 値は、5 か月の欠乏群は 2.6 ± 0.6 (平均値 \pm 標準偏差) $\mu\text{g/l}$ 、対照群 $4.5 \pm 0.4 \mu\text{g/l}$ で両群間に $p < 0.005$ で回復群では有意差をみなかった。統計学的に有意に低下した。

(1) 角膜²⁶⁾

角膜は薄くなり、特に固有層は著しく薄くなった。角膜上皮細胞は SEM では最表層の上皮細胞に暗細胞が増加し、暗細胞では微絨毛とひだ状突起が著しく減少した。また、TEM では上皮細胞中の張元線維が減少し、線維束の形成が少なくなった。上皮細胞の核は、クロマチンが疎となった。角膜固有層の厚さは、Mn 欠乏群 78 ± 13.6 (平均値 \pm 標準偏差) μm 、対照群 $96 \pm 11.4 \mu\text{m}$ で、統計学的に有意に減少した ($p < 0.05$)。固有層の角膜細胞数は、光顕的に増加しているように見えるが、固有層が薄いために見かけ上増加しているように見える。欠乏群では、固有層の膠原線維の配列には乱れはみられないが、膠原線維の直径は不均一であった。デスメ膜は欠乏群では $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 、対照 $2.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ で対照群に比し統計学的に有意に薄くなり ($p < 0.001$)、また固有層とデスメ膜の間に所々に亀裂がみられた。また、デスメ膜の電子密度も不均一となった。角膜内皮細胞は SEM で観察すると、六角形の細胞より五角形の細胞の方が多く、細胞の境界に近い所に所々円孔様の細胞の皺襞がみられた。これを TEM で観察すると、円孔様の皺襞は、内皮細胞同志の接合部近くの細胞突起であることが判明した。

(2) 網膜²⁷⁾

Mn 欠乏飼料飼育 12 か月後、視細胞外節は消失し始めた。18 か月後、視細胞外節・内節は完全に消失し、外顆粒層と色素上皮細胞は接した。生後 24 か月後、視細胞核はほぼ完全に消失し、内顆粒層の核と色素上皮が接した。網膜は視細胞が減少した分薄くなった。欠乏飼料飼育 30 か月目には、色素上皮細胞中に細胞突起が出現し、これは Müller 細胞の細胞突起と推測された。色素上皮細胞中には毛細血管が出現した。

(3) 視神経²⁸⁾

視神経は強膜から 3 mm の部を薄切して観察した。

有髄神経線維数は対照群に比し、Mn 欠乏群で統計学的に有意に減少した ($p < 0.0001$)。また、ミエリンの層の数と層の厚さも有意に減少した ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$)。一方、星状膠細胞と稀突起膠細胞は増加した。有髄神経軸索中のミトコンドリアのクリステが破壊された。

(4) 回復実験

Mn 欠乏回復群では血清 Mn 値は正常となった。また、角膜上皮最表層の細胞の微絨毛とひだ状突起は正常群と形態と数ともに相違なく、細胞内の tonofibril や線維束も増加し、核クロマチン分布も正常群と相違なかった。固

有層も厚さを増し、膠原線維の直径も均一となった。デスメ膜も厚さを増し、電子密度も均一となり、亀裂も消失し、正常群のそれとほとんど差がなかった。内皮細胞の円孔様皺襞も消失した。

網膜と視神経では回復しなかった。

3) 考按

Mn 含有酵素は脂質過酸化防止や、蛋白代謝、糖代謝、コラーゲン合成に関与している。すなわち、Mn 欠乏による影響は、Mn が種々の酵素に含まれることによって、多くの代謝に及び、その病態は多岐にわたる。視細胞外節、有髄神経線維ミエリンの崩壊、網膜毛細血管基底膜の肥厚は Mn 欠乏による Mn superoxide dismutase 活性低下による外節層板やミエリン鞘の脂質過酸化によるものと推測される²⁷⁾²⁸⁾。

角膜の固有層のコラーゲン減少やデスメ膜菲薄化、上皮細胞中の細線維減少、微絨毛、ひだ状突起の減少は、Mn 含有酵素の活性低下による蛋白、コラーゲン合成の不全によるものと推測される²⁶⁾。

視細胞が消失した後は、この細胞のニューロンも消失し、内顆粒層と色素上皮細胞が接することになる。また、Müller 細胞突起が伸びて、色素上皮細胞中に侵入したものと考えられる。

4. Cu 欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物：① Wistar 京都ラット

② Macular mouse (先天性銅欠乏マウス)

方法：① ラットを銅欠乏飼料で 7, 11 週間飼育後屠殺した。対照ラットには、同じ欠乏飼料と、 CuSO_4 20 ppm を含む純水で飼育した。網膜と視神経(強膜から 3 mm 後方)を TEM で観察した。

② Hemizygote macular mouse は生来 Cu を欠き、そのために生後 14~15 日の寿命である。したがって、生後 10~15 日の macular mouse の角膜、眼球結膜、網膜、脈絡膜、視神経を摘出し、TEM で観察した。対照として正常雄同腹マウスを用いた。なお、hemizygote macular mouse は生後 10 日目から食欲不振に陥り、餓死する可能性もあり、この影響を除外するために、正常雄同腹マウスを 10 日目から蒸留水のみで飼育し、14~15 日目に屠殺し、もう 1 つの対照とした。

③ Macular mouse は生後 7 日目に $50 \mu\text{gCuCl}_2/0.1 \text{ ml}$ 蒸留水を腹腔内注射すると 14~15 日目に死ぬことなく生存できる。 $50 \mu\text{gCuCl}_2/0.1 \text{ ml}$ 蒸留水を生後 7 日目に腹腔内注射し、生後 30 日目に屠殺し、網膜と脈絡膜を電顕用に固定、包埋した。また眼球結膜と角膜は、TEM と SEM で観察した。その他、網膜と脈絡膜については、分析電子顕微鏡を用いて分析した。

ジアミノベンチジン法による cytochrome C oxidase の組織細胞化学的検索を行った²⁹⁾。

2) 結果

実験①の血清銅値は銅欠乏飼料飼育群で対照群に比し、統計学的に有意に低かった($p < 0.01$). 実験②では、macular mouseは生後14~15日目に全例死亡したが、生後14日目では体重が低く、小さく、採血が困難で測定できなかった。

(1) 結膜

杯細胞はほとんど消失した。

(2) 角膜

TEM, SEMにより角膜の上皮最表層細胞の微絨毛とひだ状突起が減少したが、その程度はZn欠乏時ほどではない。上皮細胞は暗細胞が多く、細胞内小器官は細胞内に密に存在した。内皮細胞のSEM所見では、細胞接合部近傍に穴状に見える構造が多数みられた。しかし、この構造は、TEMによりZn欠乏でみられたのと同じように、隣接細胞近くの内皮細胞の大きな細胞突起による見掛け上のものであった。以上の変化は、回復実験では消失した。

(3) 網膜^{30)~33)}

銅欠乏飼料飼育群では、飼育22週目で視細胞内節に空胞が生じ、ミトコンドリアの膨化、拡大、増加がみられ、銅含有酵素であるcytochrome C oxidase活性が低下した。同じ変化はmacular mouseにもみられた。Macular mouseでは、脈絡膜と色素上皮細胞中のメラニン顆粒は減少したが、大きさは大きかった。この顆粒中の元素分析を行ったところ、CuとCaが対照群より増加していた。

(4) 視神経³⁴⁾³⁵⁾

Cu欠乏飼料飼育7週目のWistar京都ラットも、生後14日目のhemizygotic macular mouseでも、その有髄神経数は著明に減少し、軸索中のmicrotubulusは減少した。また、脱ミエリン軸索細胞も多くみられた。しかし、生後7日目にCuCl₂を投与したhemizygotic macular mouseでは、視神経の有髄神経線維数は対照群と有意差はなかった。

3) 考按

Cu欠乏はヒトでも起こり、Menkes病として知られる。本疾患のヒトの眼組織病理学的報告は1つある³⁶⁾。その網膜所見は実験的食餌性銅欠乏ラット、先天性銅欠乏マウスで得られたそれとほとんど同じであった。銅は銅含有酵素として、色素形成、脂質過酸化防止、ドーパミン分解、蛋白合成に関与している。したがって、Cu欠乏によって多岐にわたる病変が生ずる。Cu欠乏によって色素上皮や視細胞内節のミトコンドリアが膨化するの、ミトコンドリアがcytochrome C oxidaseの存在部位であることと関係があると考えられる^{30)~32)}。Cuはtyrosinaseに含有されることから、Cu欠乏により本酵素活性が低下し、色素上皮細胞や脈絡膜のメラニン顆粒数が減少するが、大きな塊となる傾向があった。また、メラニン顆粒中の元素も変化し、メラニン合成に異常の起こったものと推測した。メラニン顆粒中にCuが多いことは、Cu

が有効に利用できなかったものと推測した³³⁾。

Cu欠乏によって起こる視神経中の有髄神経減少、ミエリン鞘消失は、Cu・Zn superoxide dismutase活性低下による脂質膜過酸化増強が関係していると推察された。Wilson病ではCuが角膜に沈着する。Cuは角膜上皮細胞、内皮細胞に多く存在し、親和性があり、必須のものと考えられる。角膜上皮細胞内の細線維、ミトコンドリア、微絨毛、ひだ状突起などの構造維持、酸素供給、蛋白代謝、コラーゲン合成にCuは含有酵素として関与しており、それによる変化であろう。

5. Se欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物：Wistar京都ラット

方法：正常Wistar京都ラットを交配して得られた仔を、生後21日目に離乳し、Se欠乏飼料で飼育した。飼育12, 18, 24か月目に屠殺し、網膜、眼筋を摘出した。電顕用に固定、包埋し、TEMで観察した。対照として正常Wistar京都ラットを用いた。

2) 結果

血清Se値はSe欠乏飼料飼育6か月で検出以下に低下した。体重は12か月以降に正常に比し増加率を少し減じた。

(1) 網膜³⁷⁾

欠乏飼料飼育12か月では、視細胞外節が破壊され、視細胞核がやや減少した。

欠乏飼料飼育18か月では、視細胞数が減少し、4~5層残存するのみであった。網膜色素上皮細胞中には、ほとんどリポフスチンはなかった。一方、内顆粒層は1~2層に減少し、水平細胞核とアマクリン細胞核がほとんど消失した。

(2) 直筋³⁸⁾

Se欠乏飼料飼育24か月のラットの直筋には、異常所見を電顕的にみなかった。

(3) 外顆粒層に存在する毛細血管について、基底膜の厚さを検索した。Se欠乏飼料飼育12か月から基底膜は正常対照群より肥厚し始め、飼育18か月では $p < 0.0000006$ で統計学的に有意に肥厚した(表1)。しかし、ビタミンE欠乏による肥厚の方がより顕著であった($p < 0.0000006$)。

直筋の毛細血管の基底膜は、Se欠乏飼料飼育12か月から正常対照群に比し厚くなったが、統計的有意差はなかった。一方、ビタミンE欠乏ラットでは、有意に肥厚した(表2)。Se欠乏群ラットでは、毛細血管内皮細胞には異常所見をみなかった。

3) 考按

Se欠乏の網膜における特徴的な変化は、内顆粒層における細胞核の著明な減少で、特にアマクリン細胞核と水平細胞核の減少が著しい³⁷⁾。これらの細胞は、網膜の水平方向の構築に関与している。視細胞を中心に垂直方向の細胞が障害を受けるのが普通であるが、この点において

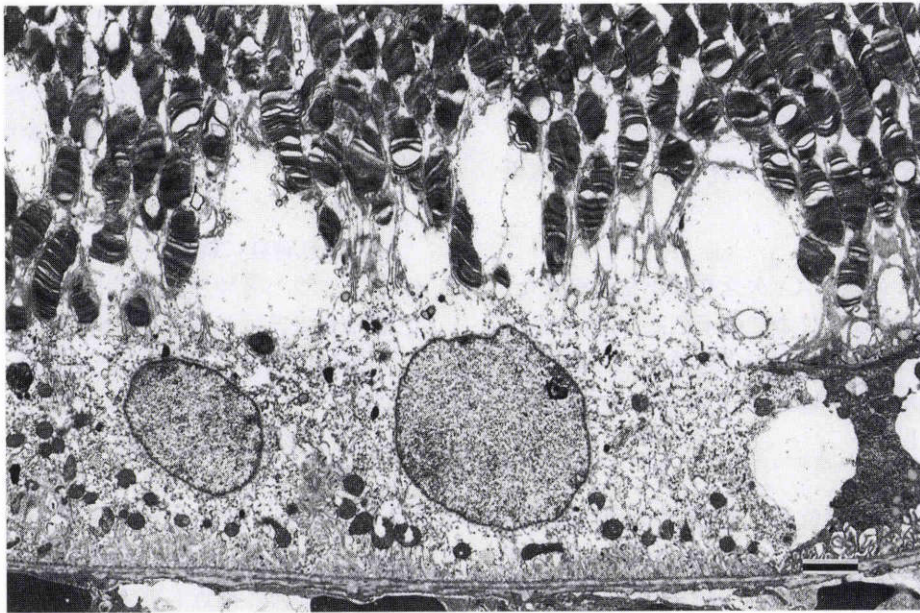


図4 Mg欠乏ラット視細胞と網膜色素上皮細胞。

視細胞外節層板が分離し、色素上皮細胞に貪食されている。色素上皮細胞は壊死になっている。バーは2μm

Seの欠乏は他の微量栄養素と異なる。しかし、この理由は不明である。

Seはselenoenzymeを介して強い抗酸化作用があり、その強さはビタミンEのそれに匹敵するといわれる⁴⁰⁾⁴¹⁾。しかし、眼組織におけるSeによる変化は、ビタミンE欠乏の変化とは全く異なった。すなわち、Se欠乏では、①網膜色素上皮細胞にはリポフスチンはほとんど出現しない、②視細胞外節の変化は軽微である、③網膜毛細血管の基底膜の肥厚は軽度で、管腔も狭くない、④直筋にリポフスチン顆粒はみられない、⑤直筋の毛細血管基底膜には肥厚はみられない、などである。SeはSelenoenzymeとして、強い抗酸化作用のあることは、生化学的には確かな事実であろうが、眼組織においては、ビタミンEほどの強い作用はみられなかった。

6. Mg欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物：Wistar 京都ラット

方法：正常ラットを交配後、出産した母親ラットをMg欠乏飼料(0.1 mg Mg/100 g)で飼育した。出生21日目に仔を離乳し、以後Mg欠乏飼料で飼育した。実験6週後に屠殺した。

対照ラットは普通飼料(含2.4 mg Mg/100 g)で飼育した。

網膜をTEM, SIMSで観察した。

2) 結果

血清Mgは、対照群 4.3 ± 0.7 (平均値±標準偏差)mEq/L、Mg欠乏群 1.2 ± 0.2 mEq/Lで、統計学的に有意にMg欠乏群で低下した。一方Caは、対照群で 11.0 ± 0.2 mEq/L、Mg欠乏群で 14.1 ± 0.6 mEq/Lで、有意に欠乏群で上昇していた。欠乏群では実験6週目頃から突然死、

音に驚いて飛び上がったたり、四肢に浮腫が起こった。

(1) 網膜⁴²⁾

光顕的に網膜色素上皮で所々に壊死像がみられ、その部では視細胞外節の配列が乱れた。外顆粒層の核には、所々に核凝縮がみられた。

TEMでは色素上皮細胞の細胞膜が破れ、細胞内小器官も減少し、破壊され、核膜も破れていた(図4)。しかし、両隣りの色素上皮細胞は正常にみえた。壊死部に接する視細胞外節は、この部を避けるように配列した。外顆粒層では、核に冠状のクロマチン塊や、大きなクロマチンの凝集塊を示すものがあり、これらはアポトーシスを起こしているものと考えられた。

SIMSは、Mg欠乏ラット網膜でMg低下、Ca上昇を示した。

3) 考按

Mg欠乏飼料飼育ラットは、血清値、症状から、Mg欠乏に罹っているとみてよい。また、SIMS所見から、本動物は、全身的のみならず、網膜においてもMg欠乏状態にある。

網膜色素上皮の所々に多発性に限局性の壊死を惹起せしめたことは、ヒトでは急性多発性網膜色素上皮症と病像⁴³⁾が似ており、Mg欠乏は本疾患の病因に関与している可能性がある。

色素上皮に何故壊死が起こるかは不明であるがMgの減少に伴いCaが上昇し、その結果NOが発生し、これが色素上皮細胞を傷害したものと推測した。視細胞核のアポトーシスには、Caの増加に関与しているものと思われる。

7. Cr欠乏

1) 材料と方法

使用動物：Wistar 京都ラット

方法：正常ラットを交配し、得られた仔を用いた。離乳と同時に Cr 欠乏飼料(自家製、Cr は検出可能以下)を投与した。実験後 3~6 か月目に屠殺した。

対照ラットは仔を離乳後も普通飼料で飼育し、Cr 欠乏群と同時期に屠殺した。

2) 結果

外見上は正常群と比較し、Cr 欠乏群は正常にみえた。血清 Cr 値は測定感度以下にまで低下したが、対照群は 0.2 µg/l 未満であった。血糖値は、正常群で 197.6±26.2 (平均値±標準偏差)mg/dl、Cr 欠乏群では 227.7±4.0 mg/dl と上昇を示した。

(1) 網膜⁴¹⁾

実験 3~7 か月では、網膜色素上皮細胞中の層状構造物が、消灯 1 時間前でも多くみられた。これ以外には異常はみられなかった。

3) 考按

Cr 欠乏ラットでは、飼育期間が長くなるにつれて血糖値が上昇した。Cr は作用機序は不明であるが血糖値の安定に役立つといわれており、糖尿病患者に Cr を投与すると、血糖値が改善することがみられている。本実験では、血清中の Cr が検出できないほどに低下し、血糖値も上昇しているため、動物は Cr 欠乏に罹っているものと推測した。

Cr 欠乏ラットの網膜色素上皮細胞の所見は、色素上皮細胞における視細胞外節の貪食能が概日性リズムが異常になっていることを推測する。現在までのところ、Cr が概日性リズムに関与しているという報告はないが、Cr が血糖値を改善するということから推測しても、Cr は概日性リズムの調節に関与している可能性があるかと推測する。

8. Al 過剰症

1) 実験材料と方法

使用動物：生後 5 週正常 Wistar 京都ラット

方法：① A 群：4% AlCl₃ を 0.3 ml 毎日腹腔内注射した。② B 群：4% AlCl₃ 0.2 ml を週 2 回陰莖静脈に注射した。それぞれの群は、注射開始 12 週目と 16 週目に屠殺した。試料は TEM 観察用と EDXA 分析用に作製した。分析は 200 秒、120 kV、EDXA で行った。

2) 結果

(1) 網膜の TEM 像

網膜は実験 ①、②ともに 12 週目から、視細胞外節の電子密度が低下し、層板数が減少した。また視細胞核も減少した。投与 16 週目のラットでは視細胞核・内節・外節と外網状層が消失した。色素上皮細胞に異常な顆粒がみられた。

(2) 網膜の Al

正常網膜には EDXA により Al は検出されない。しかし、Al 投与 16 週目の群では内顆粒層とそれに隣接する

細胞との間と、内顆粒層に存在する電子密度の高い顆粒に Al が検出された。正常網膜において検出された元素のうち、Al 投与群で検出されなかったものはなかった。定量的にも、Al 以外に多い元素も少ない元素もなかった。

3) 考按

Al は中枢神経に蓄積されるのではないかという説もあり、アルツハイマー病の病因として注目された¹⁵⁾。また、腎透析患者において Al が体内に蓄積されることがあり、眼科領域でも、血液透析で、結膜、角膜、網膜に結石の沈着することが知られている。しかし、この結石には Al は検出されていない¹³⁾。網膜は中枢神経細胞から構成されており、腎透析時に網膜に結石が沈着しやすいことから考えて、Al は網膜に沈着するものと推測された。Al を過剰に投与しても、組織内沈着や Al 増加を実証することは珍しく、この点も不可解な点である。本実験では Al が EDXA で証明され、視細胞外節と核の減少は、Al 中毒によるものと考えられた。

9. ビタミン A

1) 実験材料と方法

(1) 欠乏実験

使用動物：Wistar 京都ラット

方法：① 正常 Wistar 京都ラットを交配し、得られた雌ラットを生後 21 日目に離乳し、ビタミン A 欠乏飼料(ビタミン A 0.1 ppm 以下含有)で飼育した。このラットを欠乏飼料で飼育し、3, 4, 6, 7 か月目にペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®])麻酔下に網膜、角膜、眼瞼結膜を摘出した。それぞれの組織を TEM で検索した。同時に、角膜と眼瞼結膜については、SEM でも観察した。また、結膜は、杯細胞中の分泌物について、分析電顕を用いて各種金属元素を分析した。網膜については、脂肪染色、アルコール脱水素酵素の組織細胞化学的検索を行った。

② 正常雌京都ラットを 2~3 か月間ビタミン A 欠乏飼料で飼育した後、正常雄ラットと交配し、臍栓形成した日からビタミン A 欠乏飼料で飼育した。これから生まれた仔を母乳で育て、生後 21 日目からビタミン A 含有普通飼料で飼育した。生後 7 日、12 日、14 日、18 日目にペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®])麻酔下に眼球を摘出し、網膜を採取し、TEM で観察した。

(2) 過剰実験

動物：Wistar 京都ラット生後 25~30 日

方法：ビタミン A(チョコラ A[®], エーザイ)500 IU 5 か月間、5,000 IU 30 日間、10,000 IU 16 日間、30,000 IU 8 日間、それぞれ腹腔内注射した。

脂質およびビタミン A の組織化学的検出法⁴⁶⁾として、工藤法、脂質検出法⁴⁶⁾として、ズダン黒 B、1% オスミウム酸、ナイルブルー-硫酸塩、磷脂質検出法⁴⁶⁾として岡本・島本・上田・楠元・芝田法(一般証明法ならびに分離鑑



図5 ビタミンA欠乏ラット角膜最表層の走査電子顕微鏡(SEM)像。
角化がみられ、微絨毛は消失している。バーは2μm

別法), コレステリン脂肪およびコレステリン検出⁴⁶⁾のためのシュルツ法, 岡本・島本・園田法(硫酸法および硫酸・ヨードチンキ法)を用いた。形態学的にはTEMを用いて観察した。

2) 欠乏実験結果

(1) 結膜^{47)~49)}

ビタミンA欠乏飼料飼育4か月目の球結膜は角化を示し, 上皮細胞は減少し, 正常では6~7層ある上皮層が3~5層になった。上皮細胞中の細線維, リボゾーム, ミトコンドリアも減少した。また, 最表層の上皮細胞の微絨毛も減少した。杯細胞は著明に減少し, 残存する杯細胞中の分泌顆粒の均一性が失われ, 縮小した。分泌顆粒の元素分析を行ったところ, ビタミンA欠乏群では, Cl, Mg, Caが増加し, Na, P, S, K, Feには変化はなかった。

(2) 角膜⁵⁰⁾

ビタミンA欠乏飼料飼育4か月目においては, 角膜は白濁した。角膜のSEM像によると, 角膜最表層の微絨毛とひだ状突起は消失した(図5)。TEMによると, 最表層の上皮細胞には, 表面にケラチン層が形成され, 微絨毛, ひだ状突起もほとんどみられなかった。上皮細胞内小器官は粗に存在し, 細線維も減少し, 細胞質内には何も存在しない部位が多くみられた。浮腫の状態であると考えら

れた。また, 細胞膜の電子密度も低下した。しかし, 細胞間結合であるデスモゾームには異常はみられなかった。実質における膠原線維は粗となり, 配列も乱れた。内皮細胞には特に異常はみられなかった。

(3) 網膜

ビタミンA欠乏飼料飼育3か月目のラット網膜は, 視細胞外節層板に泡状の変化が生じ, 7か月目には外節は消失した。内節のミトコンドリアにはクリステに破壊がみられた。リボゾームも減少した。網膜色素上皮細胞では, 層状構造物が消失した。また, 細胞質に空胞が生じた^{51) 52)}。

以上の変化は, ビタミンA欠乏飼料飼育6か月後にビタミンA 5000 IUを毎日16日間腹腔内注射したところ正常網膜を呈した^{51) 52)}。

網膜の脂肪染色では, 欠乏飼料飼育3か月目には視細胞内節のリン脂質の染色性が低下したが, 回復実験群では, 正常群と同じ染色性を示した^{53) 54)}。アルコール脱水素酵素活性は, 正常ラットでは, 視細胞内節細胞質基質部, 外節層板上, 色素上皮細胞細胞質基質部に存在するが, 欠乏飼料飼育6か月目では, どの部位にも本酵素活性はみられなかった⁵¹⁾。

妊娠中からビタミンA欠乏飼料で飼育した母親から出生した仔では, 生後14日目から視細胞外節の発生がみられた。正常ラット仔では, 生後7日目に視細胞内節と色素上皮の間に層状構造物がみられ, 12日目には視細胞外節が多数みられた。その後, ビタミンA欠乏飼料で飼育のラットは成長が遅れ, 体重増加も少なく, 大きさも小さかったが, 視細胞外節は生後18日目から減少した^{55)~57)}。生後21日目からビタミンAを投与したところ網膜は回復した^{56) 57)}。

3) 過剰実験結果

ビタミンA過剰症ラットでは, ビタミンAが, 網膜色素上皮細胞ならびに視細胞外節に多量に出現した。正常網膜の脂肪構成を組織化学的に検索した結果を, ビタミンA過剰症ラット網膜のそれと比較したところ, 脂肪酸には相違をみなかった⁵⁴⁾。しかし, 過剰症ラット網膜では, ビタミンA 30,000 IU投与群と, 5,000 IU投与群の一部で, 燐脂質染色で, 視細胞外節が中等度~弱度に染色され, 内節は強度~中等度に染色された⁵⁴⁾ことは, 正常ではみられない所見であった。電顕的には, 過剰症では, 視細胞内節のリボゾームの増加, 網膜色素上皮細胞における脂肪滴出現とリボゾームの増加がみられた⁵⁸⁾。また, どの細胞膜も電子密度が高くなったが, 特に外節層板の電子密度は高かった。視細胞内節, 外節層板, 色素上皮細胞におけるアルコール脱水素酵素活性は消失したが, ビタミンA最終投与後70日後には再び出現した³⁾。

4) Sjögren症候群患者とビタミンA⁵⁹⁾

37歳, 女性。両眼眼痛, 異物感, 羞明を訴えて来院した。フルオレスチン試験で両眼角膜にびまん性にびらんが存

在し、シルマー試験で5 mm以下の涙液減少のあったこと、抗核抗体が陽性であったことと、唾液腺組織に特徴的な異常所見のみられたことから、primary Sjögren症候群と診断した。患者は看護婦で、主訴が強く、しょぼしょぼして目を開けていられないなどのため、勤務できないと訴えた。来院までに他院において各種点眼薬による治療を受けたが、無効であったという。しかし、同様に点眼薬による治療を行ったが、やはり無効であった。そこで、チョコラA®(ビタミンA 30,000 IU)を経口投与したところ、1週間後、両眼羞明感と異物感は消失し、細隙灯顕微鏡検査によって右眼の角膜びらんは消失し、左眼は僅かに残存するほどに改善した。その後、断続的にチョコラA®を内服し、自覚的、他覚的に乾性角結膜の症状を来していない。

5) 考按

ビタミンAは油性のビタミンで、日本人成人男子の1日所要量は2000 IUである。ビタミンAの作用は種々、多岐にわたるが、本研究で示したように、角結膜と網膜に分けて考えた方が論じやすい。

ビタミンA欠乏症でみられる角結膜の変化は、角膜軟化症として有名であるが、点状角膜炎が、進行すると上皮細胞が欠落し、炎症性細胞が浸潤し、角膜は混濁する⁶⁰⁾。また、角膜上皮細胞も角化する。こういう状態では、涙液層も崩壊し、病的細菌も繁殖しやすくなる⁵⁵⁾。このようなビタミンA欠乏状態にビタミンAを投与すると、角結膜は短期間に回復して、正常の角結膜になる⁶¹⁾。その理由について、ビタミンAの薬理作用を考える必要がある。すなわち、ビタミンAは、①上皮の正常な分化を促進するので、角膜や結膜の上皮再生を促すことが期待される。②粘液分泌上皮細胞と涙腺の分化と保持に関与している⁶²⁾。したがって、杯細胞の機能を高め、これによって涙液層の保持に役立っていると考えられる。したがって、ビタミンA欠乏症ではビタミンAを投与すると、消失または萎縮していた杯細胞は再生され、角膜上皮も再生され、正常の増殖をする。本研究のビタミンA欠乏症と回復実験結果は、この作用を裏付けるものであるが、不可解な現象もある。すなわち、ビタミンA欠乏による眼球乾燥症では、シルマー試験では涙液分泌低下はみられない⁶³⁾。その上、ビタミンA欠乏によって杯細胞が消失しているときにビタミンAを投与すると、杯細胞が再生する前に角膜は透明、表面は平滑になる⁶⁴⁾。したがって、ビタミンAは杯細胞の分泌による角膜の保護作用によらない角膜上皮再生作用や、その他不明の薬理作用によって、角膜の透明性を維持するものと考えられる。Sjögren症候群の眼球乾燥症でビタミンAが奏功した機序は、ビタミンAによって角膜上皮細胞の増殖、再生が促進され、粘液分泌が促進されて角膜涙液層が補強されて角膜びらんが治癒しやすくなったものと推測した。このような症例では、全身的ビタミンA欠乏症には罹患していな

いと考えられるが、局所的欠乏状態になっていたという可能性も考える必要がある。また、ビタミンは、少し過剰投与すると薬理作用が発揮されるという事実も重要である。

ビタミンAは網膜色素上皮細胞に貯蔵されている。また、視細胞杆体・錐体細胞外節層板の脂質膜はビタミンAを含有している。したがって、レチノール→レチナールを媒介する酵素であるアルコール脱水素酵素は視細胞外節層板上や内節と色素上皮細胞細胞質基質部に局在する³⁾。ビタミンAが欠乏すると、視細胞外節層板を構成する脂質がビタミンA欠乏とともに減少し、層板が変性し消失する。その結果、色素上皮が貪食する外節層板構造物が減少し、欠乏の進行とともにみられなくなる⁶⁵⁾。こういう状態では、視細胞内節と色素上皮細胞細胞質基質部からアルコール脱水素酵素活性は組織細胞化学的に証明されなくなる⁵¹⁾。すなわち、ビタミンAが欠乏しているため、ビタミンAの代謝が行われていないことを意味する。

ビタミンAは脂溶性ビタミンであるので、ビタミンA過剰投与によって網膜に移行し、細胞膜はリン脂質で構成されていることから細胞膜の電子密度が亢進したものと考えられる。特に、電顕的にはウラニル・鉛の二重染色を施さなくても十分に観察、写真撮影が可能なほどに膜の電子密度が高まった。また、色素上皮細胞中に多数の脂肪滴が出現したことは、これはビタミンA含有脂肪滴であると推測された⁵⁶⁾。ビタミンAは、肝臓では伊東細胞に貯蔵され、網膜では色素上皮細胞がビタミンA貯蔵細胞と考えられており、著者の実験ではビタミンAに放射性元素をラベルした研究は行っていないが、色素上皮細胞中には投与されたビタミンAが移行したものと考えられた。視細胞内節、色素上皮細胞のリボゾーム増加は、これらの細胞における代謝が活発に行われていることを思わせる。しかし、ビタミンA代謝において作用するアルコール脱水素酵素は、過剰症では消失したことは、ビタミンAは過剰に存在しても代謝されていないことを意味する。また、ビタミンAの中毒によって、細胞機能が低下したとも考えられる⁵⁸⁾。組織化学的にリン脂質の外節における減少と内節における増加は、障害されているであろう視紅の合成と分解の過程に、レシチンとスフィンゴミエリンが何らかの形で関与しているものと考えられる⁵⁴⁾。ビタミンAは小児や成人でも皮膚科領域で過剰に投与されることがあるが、様々な中毒症状を呈する。ビタミンAは過剰に存在しても、網膜に中毒を起こし、機能障害を起こすといえる。

10. ビタミンB₁₂欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物 Wistar 京都ラット。

方法：ラットを交配受精確認後、B₁₂欠乏飼料で飼育した雌ラットから出生、離乳した雄ラットを使用した。このラットをB₁₂欠乏群とB₁₂給与群(対照群)に分け、B₁₂給

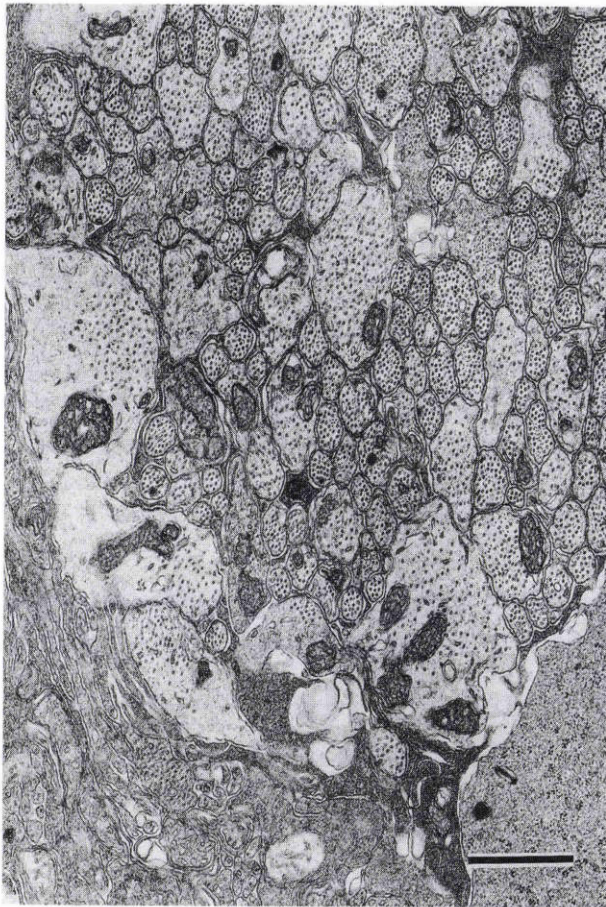


図6 ビタミンB₁₂欠乏ラット視神経。
有髓神経線維はみられない。バーは1μm

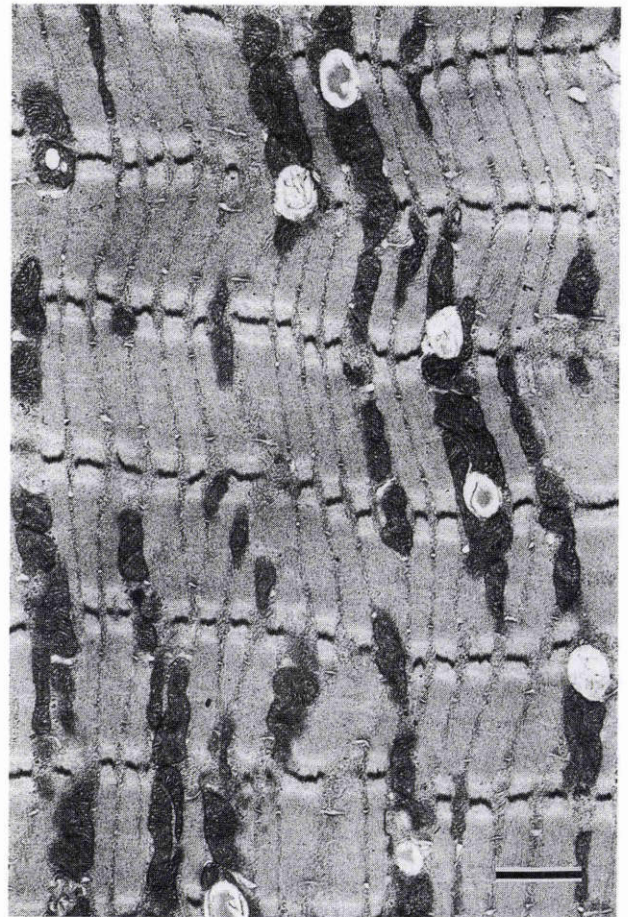


図7 ビタミンB₁₂欠乏ラット直筋。
脂肪滴が抜けたような構造がみられる。バーは1μm

与群にはCN-B₁₂ 1μg/rat/日となるように経口投与した。ラットは上述飼料で飼育168日目に心臓穿刺で採血後、眼球摘出した。

回復実験：ビタミンB₁₂欠乏飼料飼育3か月後、その第1,7,14日目にビタミンB₁₂ (1μg/g体重)を腹腔内注射し、かつ普通飼料(含ビタミンB₁₂ 5.0mg/100g)で3週間飼育し、屠殺した。

2) 結果

B₁₂欠乏ラット血漿B₁₂値は、 0.04 ± 0.02 (平均値±標準偏差)ng/mlで、対照ラットのそれは、 0.76 ± 0.14 ng/mlであった。

(1) 網膜

B₁₂欠乏ラットの光顕所見では、角膜、虹彩、毛様体、脈絡膜には異常をみなかった。しかし、網膜神経線維層、神経節細胞層には異常がみられた。すなわち、神経線維層は薄くなり、一部では欠損し、神経節細胞層との間で分離していた。B₁₂欠乏群の電顕所見は、神経線維層における神経細胞は減少し、束になって走行する神経細胞は少ないが、神経細胞の微細構造には異常をみなかった⁶⁶⁾。

(2) 視神経

視神経は篩状板から中枢側においてミエリン染色であるKlüver-Barrera法で不染であった。視神経乳頭は、篩

状板から硝子体側はほとんど異常をみなかったが、篩状板より中枢側ではミエリン構造が全く消失し、ほとんどの細胞は無髓神経細胞と星状膠細胞であった⁶⁶⁾(図6)。

(3) 網膜の概日性リズムへの影響

ビタミンB₁₂欠乏飼料飼育3か月目の網膜視細胞外節の色素上皮細胞への貪食の概日性リズムは、光照射3時間後に最高に達するのに対し、正常対照群ならびにビタミンB₁₂欠乏回復群では、貪食の最高は光照射2時間後であった⁶⁷⁾。

(4) 眼筋

直筋細胞内ミトコンドリアに接近して、脂肪滴と考えられる無構造物が電顕的に出現したが、その他の細胞内小器官、筋細線維の数や配列には異常をみなかった⁶⁶⁾(図7)。

(5) ビタミンB₁₂と緑内障の視神経

緑内障患者にビタミンB₁₂(メコバラミン)を1,500mg/日5年以上経口投与し、投与前後の視野を測定し比較した。

患者は28名(男性14名、女性14名)で、平均63.2歳であった。緑内障の種類は、開放隅角緑内障30名、閉塞隅角緑内障16名であった。続発性緑内障は5名であった。投与期間は平均78.8か月である。視野測定にはGoldmann

視野計を用い、視野の病期分類には、湖崎分類を用いた。ビタミン B₁₂ 投与群では、視野狭窄の程度が湖崎分類で IV, V 期の症例が非投与対照群に比べ有意に ($p < 0.01$) 多かった⁶⁸⁾。治療法については両群間に有意な相違はなかった。B₁₂ 治療開始前と、5 年以上治療後の視野の狭窄の進行度を非投与対照群と比較すると、 $p < 0.01$ で B₁₂ 投与群で狭窄進行度が低かった⁶⁸⁾。眼圧については、 $p < 0.05$ で有意に B₁₂ 投与群でよりよくコントロールされていた。したがって、ビタミン B₁₂ の投与は緑内障性視神経萎縮防止に有効であったといえる。

3) 考按

ビタミン B₁₂ の欠乏は、普通に食事摂取の行われている限り起こらない。ヒトでは、悪性貧血の場合のような病的状態で起こる。サルでは、ビタミン B₁₂ 欠乏飼料で飼育して、欠乏症状を発現させるのに 5 年かかった⁶⁹⁾。しかし、我々の実験で、ラットでは 3 か月でも欠乏を惹起せしめることができた。ビタミン B₁₂ 欠乏は、網膜では神経線維数を減少せしめ、視神経部の有髄神経線維を減少させた。ビタミン B₁₂ は神経細胞に親和性が強く、細胞内で核酸や蛋白代謝に補酵素として関与している。ビタミン B₁₂ 欠乏は B₁₂ を必要とする methionine synthetase と methyl-malonyl CoA mutase の反応に異常を来し、脂質と脂肪酸の構成に变化が起こる結果、有髄神経線維のミエリンが変性したり、脂肪滴が出現したりするのであろうと推論した⁶⁶⁾。ビタミン B₁₂ は 24 時間睡眠・覚醒リズムに障害のある患者に投与すると、リズムが正常化することが知られていた⁷⁰⁾。網膜視細胞外節は、色素上皮細胞に貪食される外節の数は光照射 2 時間後に最高に達し、その後は非常に少なくなる。本研究は、ビタミン B₁₂ によってこの概日性リズムが 1 時間ずれることを示した。ビタミン B₁₂ 投与により、このリズムの乱れは正常に復することから、概日性リズムにビタミン B₁₂ が関与していることは確かであり、このことを動物実験で初めて証明したものである。ビタミン B₁₂ が、概日性リズムをどのように制御しているかは不明であるが、次のような可能性がある⁶⁷⁾。すなわち、① ビタミン B₁₂ は光に対する感度を高める、② 光以外の同時発生要因に対する感度を高める、などである。ビタミン B₁₂ 欠乏により、同時発生要因に対する感度が低下し、概日性リズムに障害が生じ、ビタミン B₁₂ の投与とともに元の感度を再び取り戻したものと推測した。有髄神経がミエリン鞘を失って、変性消失し、その後をグリア系細胞である星状膠細胞が増殖すると推測された。ビタミン B₁₂ を視神経萎縮の進行する患者に投与すると視神経における代謝を亢進させ、脱ミエリンを防止し、有髄神経保持に有効で、萎縮の進行に対し抑制的に作用する結果、視野障害進行防止ならびに改善に役立つであろうと推測された。また、概日性リズムの正常化に役立つことから、眼圧の日内変動に対しても好結果をもたらすものと考えられる。この 2 点からも、緑内障患者に

ビタミン B₁₂ を投与することは、合理的であると考えられる。

11. ビタミン C 欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物：アスコルビン酸合成酵素欠損ラット

方法：アスコルビン酸合成酵素欠損ラットは、体内にアスコルビン酸合成酵素を欠くために、食物からビタミン C を合成できない動物である。したがって、ビタミン C を含有しない食物を投与すれば欠乏症になる。ビタミン C 欠乏飼料として普通飼料を 120 気圧下に 121°C で 20 分間加熱すると、ビタミン C 欠乏飼料ができる。本飼料と純水で本動物の生後 21 日目の離乳後に飼育した。C 欠乏飼料飼育 21 日目に眼球を摘出し、上眼瞼結膜、角膜、網膜を SEM, TEM で検索した。

対照動物は、上記飼料に純水中 1 mg/ml ビタミン C を含有する水で飼育した。

回復実験：離乳後 2 週間ビタミン C 欠乏飼料と純水で飼育後、ビタミン C 添加飲料水にしてから 3 週間目に屠殺した。

2) 結果

ビタミン C 欠乏飼料飼育により、体重の増加は正常群に比べ著しく減少し、歩行困難となり、最も長く生きても 35 日目に死亡した。血清ビタミン C 値は、正常対照群では平均 5~10 µg/ml、欠乏群では検出できなかった。

(1) 結膜

結膜上皮細胞層は著しく減少し、対照群は 6~7 層あるが、C 欠乏ラットでは、1~2 層になった。結膜最表層の上皮細胞の微絨毛は SEM, TEM とともに著しい減少を示した。第 2 層の上皮細胞は、正常では第 1 層の上皮細胞に対し、微絨毛様の細胞突起を出すのが普通であるが、C 欠乏ラットでは、細胞突起の数も非常に少なく、突起も大きかった。杯細胞は C 欠乏ラットでは著しく少なく、SEM で観察しても発見し難いほど少なく、残存する杯細胞も顆粒がみられず、空胞様を呈した。杯細胞を TEM で観察すると、C 欠乏ラットでは杯細胞も小さく分泌顆粒も少なく、核が圧迫された像もみられなかった。

(2) 角膜

角膜上皮最表層の細胞は、SEM で観察すると暗細胞が多く、微絨毛やひだ状突起がほとんどみられなかった(図 8)。TEM で観察すると、上皮細胞層の数は対照と変わらなかったが、上皮細胞内の細線維、張元線維は著しく減少し、そのため明細胞を呈することが多かった。また、上皮細胞の核は切痕が強く、不整形で、クロマチンも小塊状となって散在し、核小体も大きく明瞭となり、核の基質にも乏しかった。デスメ膜は対照ラットに比べ 1.5 倍位に肥厚した。内皮細胞は丈が高くなった。

(3) 視神経

有髄神経線維が減少し、ミエリンが薄くなった(図 9)。

3) 回復実験結果

ビタミン C 投与により、C 欠乏ラットは体重は増加

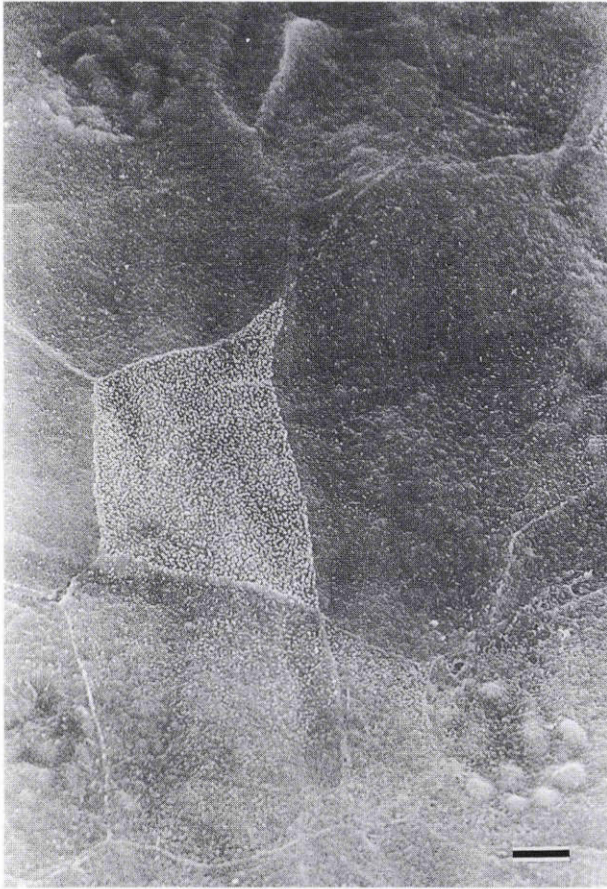


図8 ビタミンC欠乏ラット角膜最表層 SEM 像。

上皮細胞は、ほとんど暗細胞で、微絨毛、ひだ状突起を失っている。バーは2 μ m

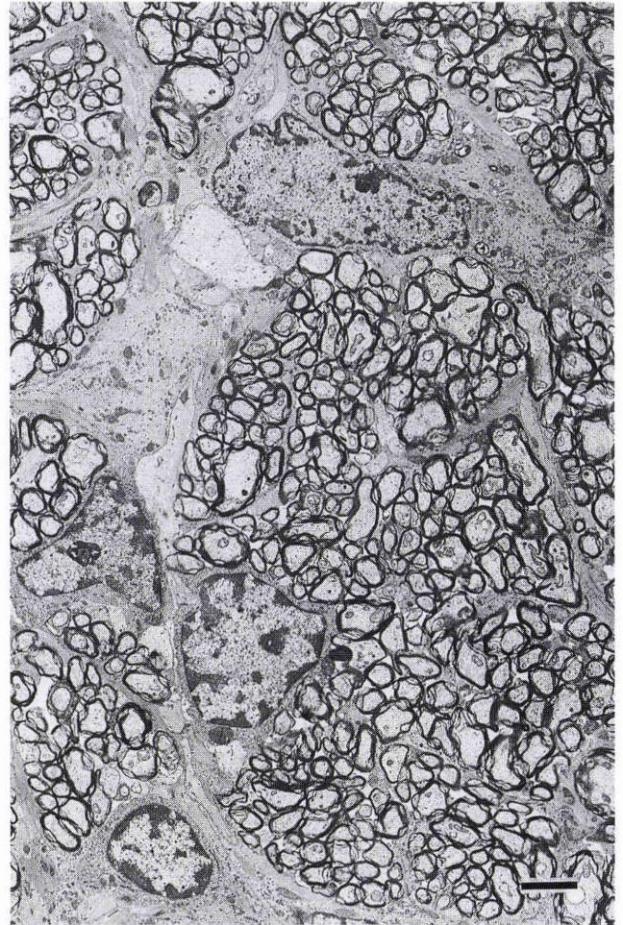


図9 ビタミンC欠乏ラット視神経。

有髄神経線維は減少している。バーは2 μ m

し、歩行可能となり延命した。血清中ビタミンC濃度は5~10 μ g/mlと正常となった。

(1) 結膜

結膜上皮細胞層は増加し、最表層細胞の微絨毛も増加し、ほぼ正常となった。また第2層の細胞突起も増加し、形態的にも微絨毛を呈した。

(2) 角膜

角膜上皮最表層は、明細胞が多くを占め、微絨毛も正常対照と変わらなくなった。細胞内の張元線維、細線維も増加し、核のクロマチン分布、形も対照と変わらなくなった。デスメ膜も厚さを減じ、内皮細胞の丈も対照と変わらなくなった。

4) 考按

ビタミンC(アスコルビン酸)は、この欠乏により壊血病が起こることは古くから知られた有名な事実である。また、前房水や水晶体にビタミンCが大量に含まれることも眼組織の特徴である⁷¹⁾。

ビタミンCの生体における作用の1つに、コラーゲンの生合成への関与がある⁷²⁾。したがって、結膜、角膜において、ビタミンC欠乏下では細胞内細線維や張元線維の発達不全や、微絨毛の核となる線維の発達不良などが惹

き起こされるものと推測した。

ビタミンCは生体内で酸化される際、モノデヒドロアスコルビン酸となり、このものが不対電子をもつ遊離基であるため、極めて反応性に富み、生体内に生ずる各種活性酸素を不活性化する作用をもっている⁷³⁾。したがって、ビタミンCの不足は、活性酸素の消去に不利で、脂質膜の虚弱化や透過性の亢進を起こす可能性がある。ビタミンCは脂肪代謝にも関与しており、このものの欠乏は、脂肪酸、コレステロールの減少を招来する。杯細胞は粘液分泌細胞で、ビタミンC欠乏は、この細胞を不活性化し、萎縮させるものと推測した。杯細胞の萎縮は、結膜と角膜上皮表面を覆う粘液層形成不全を起こし、眼表面の機能を低下させ、いわゆるドライアイを招来するものと推測する。

12. ビタミンE欠乏

1) 実験材料と方法

使用動物：Wistar 京都ラット

方法：正常 Wistar 京都ラットを交配して得られた雌ラットを生後21日目に離乳し、ビタミンE欠乏飼料で飼育し、飼育6, 12, 18か月目に麻醉下に網膜、上直筋を摘出した。網膜、直筋はTEMで観察した。

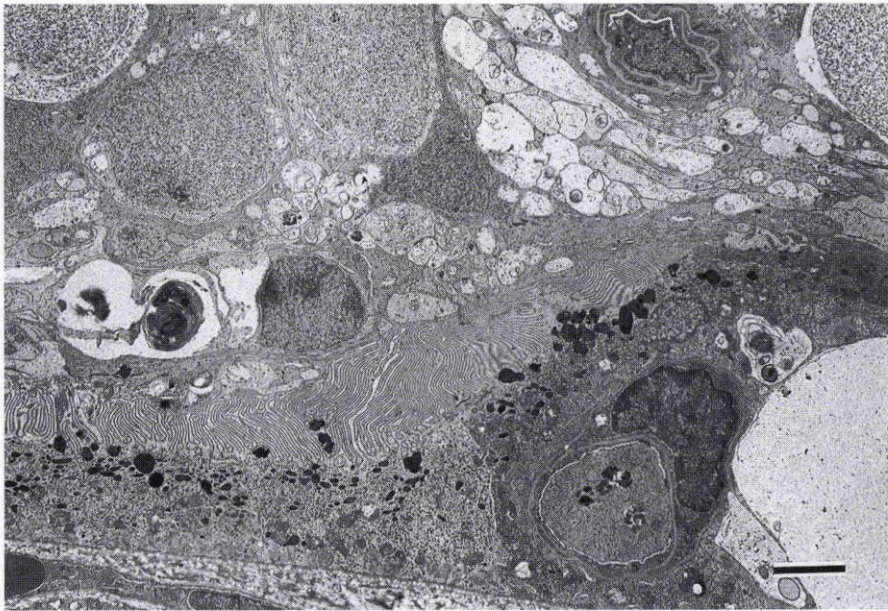


図10 ビタミンE欠乏ラット網膜.

色素上皮細胞に接して毛細血管が存在する. リポフスチン顆粒も多い. 内顆粒層が色素上皮細胞に接している. バーは4 μ m

酸ホスファターゼ活性の組織細胞化学的証明法は, Gomori⁷³⁾法を用いた.

対象として年齢に対応した正常 Wistar ラットの眼球, 直筋を使用した.

2) 結果

(1) 網膜

ビタミンE欠乏飼料飼育6か月目には, 網膜視細胞外節の層板に小泡が出現し, 網膜色素上皮細胞にはリポフスチンが増加した⁷⁴⁾. この時期の酸ホスファターゼ活性を組織細胞化学的に検索したところ, 外節層板上に酸ホスファターゼ活性が出現し, また色素上皮細胞にもリソソームのみならず細胞質基質にも同活性が散在して見られた⁷⁵⁾.

ビタミンE欠乏飼料飼育12か月目には, 視細胞が減少した. すなわち, 視細胞核は著しく減少し, 外顆粒層は4~5層となり, 視細胞外節も変性し, 数が少なくなった. 色素上皮細胞中には, リソソームが著しく増加した. 飼育18か月目には, 視細胞は外節から核までほとんど消失し, 内顆粒層の核が色素上皮細胞に接した⁷⁶⁾⁷⁷⁾. 外網状層の毛細血管と考えられる毛細血管が色素上皮細胞近傍にみられた(図10). このような網膜毛細血管の基底膜は著明に肥厚し, 管腔は狭く不規則であった⁷⁷⁾. 網膜血管の鋳型標本による検索結果は, 網膜動・静脈の数には変化はないが, 動・静脈ともに細く, 口径不同となった. 毛細血管網は2層構造を保持したが, 毛細血管は著しく数を減じ, 口径不同を呈し, 一部には狭窄がみられた. 一方, 網膜色素上皮細胞は, リポフスチンで充満し(図10), 視細胞外節に限局した初期変化は, 回復実験によって回復する⁷⁸⁾.

(2) 直筋

直筋は筋細線維の配列が乱れ, A, Z帯も変形を呈した. ミトコンドリアも空胞化を示し, リポフスチンが出現した³⁸⁾. 直筋毛細血管は, 基底膜が正常に比し薄くなり, 内皮細胞は空胞が出現し, 細胞間結合が離解し, 血球がその部から脱出している像もみられた³⁹⁾.

3) 考按

ビタミンEには脂質抗酸化作用があり, 細胞膜をはじめとして脂質膜の酸化変性を防いで維持に役立っている. したがって, ビタミンE欠乏になった場合には, 網膜では脂質膜である視細胞外節の層板がまず酸化を受け, 泡沫変化を起こし, 次いで変性消失するものと考えられる⁷⁴⁾. 視細胞の一部である外節を失った視細胞は次第に消失し, 色素上皮細胞は内顆粒層と接するようになる⁷⁹⁾. 色素上皮細胞は本来貪食細胞であるが, ビタミンE欠乏のためにリソソーム膜が破壊され, 水化酵素が拡散し, 老廃物の消化分解が機能せず, リポフスチンが大量に色素上皮細胞に蓄積すると考えられた⁷⁶⁾. リソソームが含有する水化酵素である酸性ホスファターゼ活性がビタミンE欠乏下で色素上皮細胞質基質や外節層板上に拡散していたのは, その証拠と考えられる⁷⁵⁾. ビタミンE欠乏下では, 血管基底膜が肥厚することが知られているが, 網膜毛細血管でも同様の変化がみられた. この変化も基底膜が酸化され, 老廃物が蓄積した結果と推測される³⁴⁾. 毛細血管も減少し, 狭小化, 口径不同などが起こり, 動脈硬化症の病態を示した. また, 本研究が示したように, ビタミンE欠乏早期であれば傷害は回復することから考えて, ビタミンEは老化防止に役立つかも知れない⁷⁸⁾. ビタミンE欠乏下では, 網膜色素上皮細胞中には老廃物である



図 11 Zn 欠乏ラットに角膜上皮全剥離を行い、その直後にビタミン A 5,000 IU を投与して、12 時間後の角膜。

角膜実質に変形の著しい角膜実質細胞がみられる。バーは 2 μ m。

リポフスチンが充満したが、直筋においても筋細線維間にリポフスチンが蓄積した³⁸⁾。また、直筋の毛細血管では基底膜は逆に薄くなり、内皮細胞間結合は離解し、血球が脱出している像を捉えることができたが、ビタミン E 欠乏症では皮下出血することが知られており、このような形での出血も起こっていると考えられた³⁹⁾。

13. ビタミンと微量元素の相互作用

1) Zn 欠乏とビタミン A

(1) 実験材料と方法

使用動物：Wistar 京都ラット

方法：2' の 1) 項で述べた方法で、Zn 欠乏群と対照群に角膜上皮の全剥離と除去を行った。Zn 欠乏ラットでは、上皮剥離除去を行った直後に、ビタミン A 5,000 IU を腹腔内投与したが、Zn 欠乏飼料で引き続き飼育した。屠殺、観察法は 2' の 1) 項に同じである。

(2) 結果

Zn 欠乏・ビタミン A 投与群と対照群の間には、実験 12 時間後の角膜には相違がなかった。すなわち、両群ともに角膜上皮細胞の出現はまだみられなかったが、実質には多数の変形の著しい角膜実質細胞がみられた(図 11)。それ以後の上皮の再生像は 2' の 2) 項で述べた対照群の所見通りであった。

2) ビタミン A 欠乏と Zn

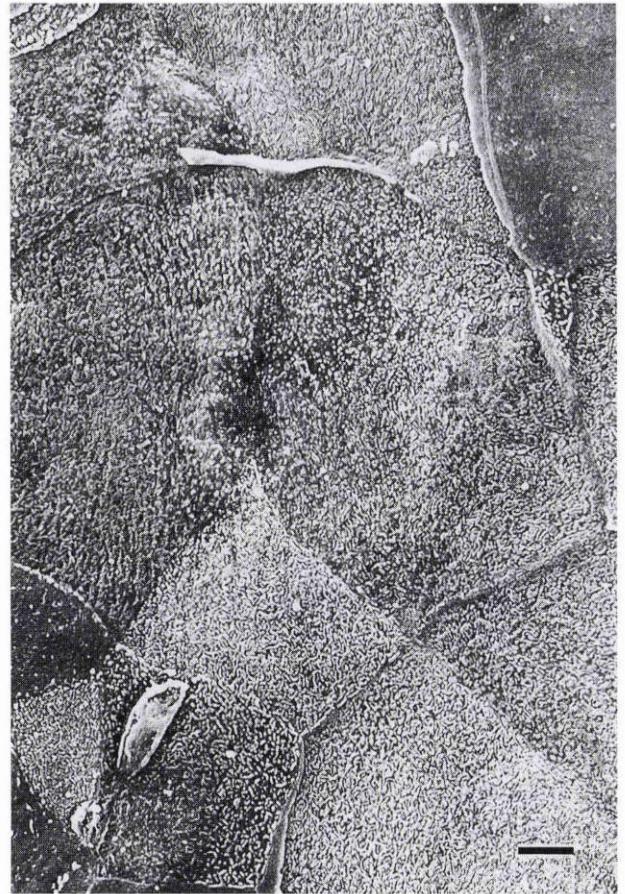


図 12 ビタミン A 欠乏飼料と Zn 水で 70 日間飼育したラットの角膜最表層 SEM 像。

上皮細胞の微絨毛は保たれている。バーは 2 μ m

(1) 実験材料と方法

使用動物：Wistar 京都ラット

実験方法：6 の 1) 項に則って実験を行い、① 生後 3 か月目に屠殺し、角膜と結膜を SEM と TEM で観察した。② 生後 21 日目に離乳してビタミン A 欠乏飼料で飼育しつつ飲水は超純水に 30 ppm の Zn を溶解したものをを用い、生後 3 か月目に屠殺した。

(2) 結果

i 結膜

結膜表面を SEM で観察すると、ビタミン A 欠乏群は 6 の 2) 項でみられた所見を呈した。しかし、Zn 水を飲水させた群では、結膜の最表層上皮細胞の微絨毛は正常対照群と同様に多数存在し、杯細胞の減少もみられなかった。TEM 像も上皮細胞の細胞内小器官も正常構造を示した。

ii 角膜

ビタミン A 欠乏 3 か月目の角膜表面の SEM 所見は、(3) で述べた通りである。しかし、Zn 水を飲水させたラットと角膜最表層の上皮細胞表面を SEM で観察すると、微絨毛が存在するものが多かったが、完全ではなかった(図 12)。TEM 像は、角膜上皮細胞の細胞内小器官は、正

常角膜上皮細胞内のそれとほとんど変わらないことを示した。

3) Zn 欠乏下における角膜創傷治療とビタミン A

(1) 実験材料と方法

2' の 1) に従って Zn 欠乏下で角膜上皮を全層剥離した。剥離直後にビタミン A 5,000 IU を腹腔内投与し、飼料は引き続き Zn 欠乏飼料を用いた。剥離後、12 時間後、1, 3, 5, 7, 14 日後に観察した。

(2) 結果

上皮剥離 12 時間後には上皮は全くみられなかった。しかし、角膜実質層には正常対照群で出現した多形性の角膜実質細胞が多数出現した。1 日目以降の上皮再生は、対照群とほとんど変わらなかった。

4) 考按

今までにビタミンと微量元素の相互作用について論じた報告は、極めて少ない。ビタミン A と Zn の眼組織に対する作用は多岐にわたるが、ともに結膜と角膜に対しては似たような欠乏所見を呈する。そこでどちらかを欠乏させ、他を特別に投与して、一方の欠乏所見を起こさせないようできないかを実験してみた。その結果、二者の欠乏で共通して起こる結膜・角膜最表層の上皮細胞の微絨毛を他を供給することによって維持でき、また結膜では杯細胞の数や構造も保持することができた。すなわち、ビタミン A と Zn は互いに相互作用を発揮して、互いに補完しあえることを示すことができた。この理由として、Zn は DNA 代謝と蛋白合成に関与しており、collagenase 中にも含まれ、瘢痕化を促し、創傷治療を促進すると考えられる。一方、ビタミン A 代謝においては、レチノールからレチナールを触媒するアルコール脱水素酵素が Zn 含有酵素であることから、Zn が添加されているとビタミン A が低下している状態ではアルコール脱水素酵素が活性化されたり、あるいはビタミン A が有効に利用されるなどによると思われる⁷⁹⁾。ビタミン A は、もともと上皮細胞の分化や構造維持に必要な物質であり、Zn はビタミン A が有効に利用されるのを助けるものと推測した。

一方、Zn 欠乏下でビタミン A を投与しても、Zn 欠乏による角膜上皮再生が促進され、正常と変わらない回復過程を呈したことは興味深い。ビタミン A は一般的にいて、上皮細胞の分化、発達、機能と密接な関係があることは、事実としてはわかっているが、その詳細な機序は不明である。Zn を含有するアルコール脱水素酵素が媒介するビタミン A の代謝経路以外にビタミン A の生理作用があつて、それが Zn の生理作用をも代償するものである可能性を推測する。上皮の分化、再生におけるビタミン A の生理作用は、Zn のそれより強力であると考えられた。

以上のように、ビタミン A と Zn の間には、相互作用があるといつてよい。

擱筆に当たり、下記の技官、実験助手、秘書に感謝の意を表

します。日比敏一氏(京都大)、鬼塚攝子、力丸洋子、頼富乃里子、山口真由美、小谷貴子、小林 希、原 弘美、嵩 妙子、日高幹和子、堀 千恵子の各氏(長崎大)。

また、本研究の一部は、文部省科学研究費基盤研究(C)課題番号 09671805, 1997—1999 に依った。

文 献

- 1) Tauber FW, Krause AC: The role of iron, copper, zinc, and manganese in the metabolism of the ocular tissue with special reference to the lens. *Am J Ophthalmol* 26: 260—266, 1943.
- 2) Hirayama Y: Histochemical localization of zinc and copper in rat ocular tissues. *Acta Histochem* 89: 107—111, 1990.
- 3) Amemiya T: Alcohol dehydrogenase system in the pigment epithelium of the rat retina—Normal, hypo- and hypervitaminosis A—. *日眼会誌* 71: 2115—2123, 1967.
- 4) Hirayama Y, Dake Y, Amemiya T: Cytochrome oxidase in rat ocular tissues with special reference to copper. *Acta Histochem* 93: 307—312, 1992.
- 5) Ogawa T, Ohira A, Amemiya T: Manganese and copper-zinc superoxide dismutase in the developing rat retina. *Acta Histochem* 99: 1—12, 1997.
- 6) Ogawa T, Ohira A, Amemiya T: Aging transition of superoxide dismutase in rat retina. *Histochem J* 30: 325—330, 1998.
- 7) Ogawa T, Ohira A, Amemiya T: Superoxide dismutases in retinal degeneration of WBN/Kob rat. *Curr Eye Res* 17: 1067—1073, 1998.
- 8) Prasad AS: Deficiency of zinc in man and its toxicity. In: Prasad AS (Ed): *Trace Elements in Human Health and Diseases*. Vol 1. Zinc and Copper. Academic Press, New York, 1—8, 1976.
- 9) Leopold IH: Zinc deficiency and visual impairment? *Am J Ophthalmol* 85: 871—875, 1978.
- 10) Karcioğlu ZA: Zinc in the eye. *Surv Ophthalmol* 27: 114—122, 1982.
- 11) Sandstead HH, Vo-Khactu, KP, Solomons N: Conditioned zinc deficiencies. In: Prasad AS (Ed): *Trace Elements in Human Health and Disease*. Vol 1. Zinc and Copper. Academic Press, New York, 33—49, 1976.
- 12) Klingberg WG, Prasad AS, Oberleas D: Zinc deficiency following penicillamine therapy. In: Prasad AS (Ed): *Trace Elements in Human Health and Disease*. Vol 1. Zinc and Copper. Academic Press, New York, 51—65, 1976.
- 13) 小関 武: 慢性腎不全患者における角結膜石灰沈着の電顕像. *臨眼* 35: 1435—1441, 1981.
- 14) Norose N, Arai K: Manganese deficiency due to long-term total parenteral nutrition infant. *Jpn J Parent Ent Nutr* 9: 978—981, 1987.
- 15) Mehta R, Reilly JJ: Manganese levels in a jaun-

- diced long-term total parenteral nutrition patient: Potentiation of haloperidol toxicity: Case report and literature review. *J Parent Ent Nutr* 14: 428—430, 1990.
- 16) 宮 華青, 雨宮次生, 馬場恒明: 結膜の病態と微量元素. *臨床電顕誌*, 31(増): 69, 1998.
- 17) Mizoguchi T, Amemiya T: Ultrastructure of the corneal epithelium of zinc-deficient rats—Deficiency and Recovery—. *Trace Elem Med* 92: 84—89, 1992.
- 18) Leure-duPree AE, McClain CJ: The effect of severe zinc deficiency on the morphology of the rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 425—434, 1982.
- 19) Morrison SA, Russell RM, Carney EA, Oaks EV: Zinc deficiency: A cause of abnormal dark adaptation in cirrhotics. *Am J Clin Nutr* 31: 276—281, 1978.
- 20) Hallbóók T, Lanner E: Serum-zinc and healing of venous leg ulcers. *Lancet* 2: 780—782, 1972.
- 21) Flynn A, Pories WJ, Strain WH, Hill OA Jr: Zinc deficiency in altered adrenocortical function and its relation to wound healing. *Lancet* 1: 789—791, 1973.
- 22) Haeger K, Lanner E: Oral zinc sulfate and ischemic leg ulcers. *J Vas Dis* 3: 77—81, 1974.
- 23) Bellows JG: Influence of local antiseptics on regeneration of corneal epithelium of rabbits. *Arch Ophthalmol* 36: 70—81, 1946.
- 24) Hubbard GB, Herron BE, Andrews JS, Elliot JH: Influence of topical and oral zinc upon corneal wound healing. *Br J Ophthalmol* 53: 407—411, 1969.
- 25) Sandstead HR, Lanier VG Jr, Shepard GH, Gillespie DD: Zinc and wound healing. *Am J Clin Nutr* 23: 514—519, 1974.
- 26) Gong H, Amemiya T: Corneal changes in manganese-deficient rats. *Cornea* 18: 472—482, 1999.
- 27) Gong H, Amemiya T: Ultrastructure of retina of manganese deficient rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1967—1974, 1996.
- 28) Gong H, Amemiya T: Optic nerve changes in manganese-deficient rats. *Exp Eye Res* 68: 313—320, 1999.
- 29) Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS: Nondropler ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J Cell Biol* 38: 1—14, 1968.
- 30) Dake Y: Electron histochemical examination of cytochrome oxidase in the retinal photoreceptor cell of copper deficient rats. *Acta Histochem Cytochem* 25: 371—378, 1992.
- 31) Dake Y, Amemiya T: Quantitative analysis of cytochrome oxidase activity in the retinal photoreceptor inner segments of copper deficient rats. In: Shimizu K (Ed): *Current Aspect in Ophthalmology*. Elsevier Science Publishing, BV, Amsterdam, 896—900, 1992.
- 32) Mishima K, Dake T, Amemiya T: Electron microscopic study of retinas of macular mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 (Suppl): s 101—s 105, 1996.
- 33) Mishima K, Amemiya T, Takano K: X-ray microanalysis of melanin granules of retinal pigment epithelium and choroid in hereditary copper deficient mice (macular mice). *Exp Eye Res* 68: 59—65, 1999.
- 34) Dake Y, Amemiya T: Electron microscopic study of the optic nerve in copper deficient rats. *Exp Eye Res* 52: 277—281, 1991.
- 35) Mishima K, Dake T, Amemiya T: Electron microscopic study of optic nerves of macular mice. *Exp Eye Res* 63: 85—90, 1996.
- 36) Seelenfreund MH, Gartner S, Vinger PF: The ocular pathology of Menkes' disease (Kinky hair disease). *Arch Ophthalmol* 80: 718—720, 1968.
- 37) Amemiya T: Retinal changes in the selenium deficient rat. *Internat J Vit Nutr Res* 55: 233—237, 1985.
- 38) Amemiya T: Difference in muscular changes in rats with vitamin E and selenium deficiency. *Internat J Vit Nutr Res* 57: 139—143, 1987.
- 39) Amemiya T: Effect of vitamin E and selenium deficiencies on rat capillaries. *Internat J Vit Nutr Res* 59: 122—126, 1988.
- 40) Hoekstra WG: Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed Proc* 34: 2083—2089, 1975.
- 41) Awad JA, Morrow JD, Hill KE, Roberts IJ, Berk RF: Detection and localization of lipid peroxidation in selenium- and vitamin E-deficient rat using F 2-isoprostanes. *J Nutr* 124: 810—816, 1994.
- 42) Gong H, Amemiya T: Retinal changes in magnesium-deficient rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: s 957, 1999.
- 43) Green WR: Acute multifocal placoid pigment epitheliopathy. In: Spencer WH (Ed): *Ophthalmic Pathology. An atlas and textbook*. 4th Ed., WB Saunders, Philadelphia, 1308—1311, 1996.
- 44) 上田佳子, 宮 華青, 宮村紀毅, 雨宮次生: Cr 欠乏ラットにおける網膜の電子顕微鏡的観察. *日眼会誌* 103(増): 123, 1999.
- 45) Lukiw WJ: Alzheimer's disease and aluminum. In: Yasui M, et al (Eds): *Mineral and Metal Neurotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, 113—126, 1997.
- 46) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英, 水谷 昭: 顕微鏡的組織化学, 第 3 版, 医学書院, 東京, 1965.
- 47) 宮 華青, 雨宮次生, 馬場恒明: 正常ラット眼瞼組織

- の分泌細胞の分析電子顕微鏡的研究. 電子顕微鏡 32(増2): 209—210, 1997.
- 48) 大庭啓介, 宮 華青, 雨宮次生, 馬場恒明, 高屋憲一: 眼瞼結膜のクリオスタット切片における EDX とイオン顕微鏡を用いた元素のイメージング. 電子顕微鏡 33(増2): 111—114, 1998.
- 49) 大庭啓介, 宮 華青, 雨宮次生, 馬場恒明: ビタミン A 欠乏時の結膜杯細胞における微量元素の役割. Biomed Res Trace Elements 9: 267—268, 1998.
- 50) 金沢佑隆, 宮 華青, 雨宮次生: ビタミン A 欠乏角膜軟化症に対する亜鉛の効果. 日眼会誌 103(増): 97, 1999.
- 51) Amemiya T: Cytochemical and Electron microscopic examination of the retina of rats with hypovitaminosis A. 日眼会誌 72: 1074—1099, 1968.
- 52) Amemiya T: Vitamin A and the retina. Eye, Ear, Nose and Throat Monthly 50: 341—346, 1971.
- 53) Amemiya T: Histochemical examination of retinas of vitamin A. Report 1. Distribution of vitamin A in the retina. 日眼会誌 71: 2079—2083, 1967.
- 54) Amemiya T: Histochemical examination of retinas of rats with vitamin A excess and deficiency. Report 2. Effect of vitamin A on the fat constitution in the retina. 日眼会誌 71: 2203—2211, 1967.
- 55) Amemiya T: Postnatal development of photoreceptor outer segments of vitamin A deficient rats. 22nd Internal Cong Ophthalmol Concilium 2: 171—179, 1976.
- 56) Amemiya T: Postnatal maldevelopment of the retina. Biol Neonat 32: 319—326, 1977.
- 57) 雨宮次生: 胎生期ならびに幼弱期のビタミン A 欠乏の視細胞・網膜色素上皮細胞へ及ぼす影響とその回復について. 日眼会誌 81: 347—354, 1977.
- 58) Amemiya T: Cytochemical and electron microscopic examination of the retina of rats with hypervitaminosis A. 日眼会誌 71: 2236—2251, 1967.
- 59) 岩崎むつよ, 雨宮次生: ビタミン A が奏効した Sjögren 症候群の 1 例. 眼臨 88: 41—43, 1994.
- 60) Sommer A: Effect of vitamin A deficiency on the ocular surface. Ophthalmology 90: 592—600, 1983.
- 61) Sommer A, Emran N, Tamba T: Vitamin A-responsive punctate keratopathy in xerophthalmia. Am J Ophthalmol 87: 330—333, 1979.
- 62) Huang AI, Tseng S, Kenyon KR: Change of paracellular permeability of ocular surface epithelium by vitamin A deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 633—639, 1991.
- 63) Sommer A, Emran N: Tear production in vitamin A-responsive xerophthalmia Am J Ophthalmol 93: 84—87, 1982.
- 64) Sommer A, Green WR: Goblet cell response to vitamin A treatment for corneal xerophthalmia. Am J Ophthalmol 94: 213—215, 1982.
- 65) Dowling JE, Gibbons IR: The effect of vitamin A deficiency on the fine structure of the retina. In: Smelser GK (Ed): The Structure of the Eye. Academic Press, New York, 85—99, 1961.
- 66) 雨宮次生, 河田哲典, 前川昭男: ビタミン B₁₂ 欠乏ラットの眼病理像. 内野治人編, 京都シンポジウム: メチル B₁₂ をめぐって. 協和企画通信, 東京, 80—85, 1987.
- 67) Imamura N, Dake Y, Amemiya T: Circadian rhythm in the retinal pigment epithelium related to vitamin B₁₂. Life Science 57: 1317—1323, 1995.
- 68) Sakai T, Murata M, Amemiya T: Effect of long-term treatment of glaucoma with vitamin B₁₂. Glaucoma 14: 167—170, 1992.
- 69) Agamanolis DP, Chester EM, Victor M, Kark JA: Neuropathology of experimental vitamin B₁₂ deficiency in monkeys. Neurology 26: 905—914, 1976.
- 70) Kamgar-Parsi B, Wehr TA, Gillin JC: Successful treatment of human non-24-hour sleep-wake syndrome. Sleep 6: 257—262, 1983.
- 71) Organisciak DT, Tiang Y-L, Wang H-M, et al: The protective effect of ascorbic acid in retinal light damage of rats exposed to intermittent light. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1195—1202, 1990.
- 72) 倉田忠男: ビタミン C. 日本ビタミン学会編: ビタミンハンドブック. 水溶性ビタミン, 化学同人, 京都, 171—191, 1989.
- 73) Gomori G: Microscopic Histochemistry. Principles and Practice. The University of Chicago Press, Chicago, 1952.
- 74) 雨宮次生: ビタミン E 欠乏のラット視細胞外節および網膜色素上皮細胞に及ぼす影響について. 日眼会誌 82: 822—826, 1978.
- 75) Amemiya T: Photoreceptor outer segment and retinal pigment epithelium in vitamin E deficient rats. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 216: 103—109, 1981.
- 76) 雨宮次生: 長期ビタミン E 欠乏ラット網膜色素上皮細胞ならびに視細胞の研究. 日眼会誌 84: 2133—2138, 1980.
- 77) Amemiya T: Effect of vitamin E administration on photoreceptor outer segment and retinal pigment epithelium of vitamin E deficient rats. Internat J Vit Nutr Res 51: 114—118, 1981.
- 78) 雨宮次生: 短期ビタミン E 欠乏ラット網膜の回復について. 日眼会誌 85: 410—414, 1981.
- 79) Smith JC Jr, McDaniel EG, Fan FF, Halsted JA: Zinc: A trace element essential in vitamin A metabolism. Science 181: 954—955, 1973.