

---

 総 説
 

---

## 酸化ストレスと眼

大平 明弘<sup>1)</sup>, 植田 俊彦<sup>2)</sup>, 大石健太郎<sup>3)</sup>, 平光 忠久<sup>3)</sup>, 明尾 潔<sup>4)</sup>, 小原 喜隆<sup>5)</sup><sup>1)</sup> 島根大学医学部眼科学講座, <sup>2)</sup> 昭和大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup> 浜松医科大学光量子医学研究センター<sup>4)</sup> あけお眼科医院, <sup>5)</sup> 獨協医科大学眼科学教室

## 要 約

酸化ストレスでは過剰なフリーラジカルの産生で生体防御に關与する抗酸化作用が減弱している。酸化ストレスは多くの眼の疾患にかかわり、加齢黄斑変性、未熟児網膜症、網膜光障害あるいは白内障の成因に關与する。

加齢黄斑変性の発症機序は未だ明らかにされていないが、有力な危険因子として可視光線による酸化ストレスが挙げられ、鉄の動態との關与を示唆されている。In vitro 実験では、 $\gamma$ 線でアポトーシスに關連するTPR-53BP2 遺伝子抑制とBCL2 遺伝子誘導が認められ、眼組織や細胞の酸化ストレスに対する耐性が高められている可能性が示された。

水晶体は紫外線に対し、フィルター効果によって、網膜への障害を防御しているが、現在の主流である白内障手術と眼内レンズ移植後には紫外線が影響して加齢黄斑変性を引き起こすことがあるため、青色光を吸収する黄色眼内レンズの有効性が指摘されている。この問題は未だに結論には達していないが、動物実験では明らかに過酸化脂質は減少する。(日眼会誌 112: 22—29, 2008)

キーワード：酸化ストレス、活性酸素、網膜光障害、加齢黄斑変性、加齢白内障

---

 A Review
 

---

## Oxidative Stress in Ocular Disease

Akihiro Ohira<sup>1)</sup>, Toshihiko Ueda<sup>2)</sup>, Kentaro Ohishi<sup>3)</sup>, Tadahisa Hiramitsu<sup>3)</sup>  
Kiyoshi Akeo<sup>4)</sup> and Yoshitaka Obara<sup>5)</sup><sup>1)</sup> Department of Ophthalmology, Shimane University School of Medicine<sup>2)</sup> Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine<sup>3)</sup> Photon Medical Research Center, Hamamatsu University, School of Medicine<sup>4)</sup> Akeo Eye Clinic<sup>5)</sup> Department of Ophthalmology, Dokkyo Medical University School of Medicine

## Abstract

The definition of oxidative stress implies increased oxidant production in animal cells characterized by the release of free radicals, resulting in cellular degeneration. The imbalance between excess free radical production and the antioxidant defense causes cellular damage resulting in lipid peroxidation. Oxidative stress is involved in many ocular diseases such as age-related macular degeneration, retinopathy of prematurity, retinal light damage, and cataract. Reactive oxygen species are involved in this process.

The pathogenesis of age-related macular degeneration is largely unknown. Excessive light and iron may enhance the progression of this disease. In *in vitro* study of the ciliary body, gamma irradiation inhibits TPR53BP2 expression associated with apoptotic cell death, and increased BCL2 is evident just after gamma irradiation.

Exposure to ultraviolet light has been postulated as

a cause of age-related macular degeneration (AMD), perhaps through damage to the retinal pigment epithelium. It seems logical, therefore, to replace the aging, yellowing lens with a blue light-absorbing yellow intraocular lens (IOL) in cataract surgery. The issue of whether cataract surgery is a risk factor for the development or progression of AMD remains controversial. *In vivo* studies suggest that lipid peroxidation decreases in the vitreous and retina after cataract surgery with or without intraocular lens implantation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112: 22—29, 2008)

Key words: Oxidative stress, Reactive oxygen species, Retinal light damage, Age-related macular degeneration, Age-related cataract

別刷請求先：693-8501 出雲市塩冶町 89—1, 島根大学医学部眼科学講座 大平 明弘 E-mail: aohira@med.shimane-u.ac.jp  
(平成 19 年 3 月 26 日受付, 平成 19 年 8 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Akihiro Ohira, M. D. Department of Ophthalmology, Shimane University School of Medicine, 89-1, Enya, Izumo, Shimane 693-8501 Japan

(Received March, 26, 2007 and accepted in revised form August, 27, 2007)

## I はじめに

細胞内外からのストレスは細胞にストレス応答, ストレスシグナルを誘導し, アポトーシス, 細胞周期制御, DNA 修復, 蛋白質分解や合成, シグナル伝達などのさまざまな生命現象を引き起こす。酸化ストレスは, ストレスの中でも重要な位置を占めている。酸化ストレスの原因として, 活性酸素種, 紫外線, 放射線, 金属, 薬剤, 化学物質あるいは細胞内で活性酸素種の産生を引き起こす刺激が考えられる。活性酸素は細胞内のミトコンドリアから発生する他, 外環境からの紫外線や放射線, 金属, チオール基を修飾するような化学物質によっても発生する。細胞内に活性酸素を発生させる刺激が酸化ストレスということが出来る。

## II 疾患と活性酸素

活性酸素種をはじめとする酸化ストレスが蛋白質, 脂質, 核酸といった生体構成成分の構造あるいは機能に悪影響を与え, 細胞機能の低下を来し, 老化や種々の疾患の成因に深くかかわることが知られている。生体は, 細胞へ降り注ぐ酸化ストレスの度合いに応じて, グルタチオン機構, チオレドキシシン機構, superoxide dismutase (SOD) といった一連の生体防御因子による防御機構の発現を調節することで, 酸化ストレスとの均衡を保ち, 細胞機能の低下を予防していると考えられている。この酸化ストレスと防御機構の均衡が崩れ, 酸化ストレス優位になることが, 疾患の発症, あるいは増悪に関与すると考えられる。

## III 酸化ストレスと眼科疾患

現在では眼科の疾患も酸化ストレス, 活性酸素とのかわりが広く報告されている。糖尿病, 高血圧, 高脂血症などによる網膜疾患, 加齢黄斑変性, 未熟児網膜症, 網膜血管閉塞症, 網膜光障害, 白内障, 緑内障, ぶどう膜炎, 角膜疾患などとの関係が指摘されている。

本稿では光による網膜障害, 可視光線と鉄による加齢黄斑変性, 放射線による酸化ストレスとアポトーシス制御ならびに白内障と過酸化反応について取り上げる。

## IV 光による網膜障害

光が生体に及ぼす作用機序は, Foote ら<sup>1)</sup>が述べているように, superoxide anion を経由する type I と, 一重項酸素を介する type II の反応であるため酸化ストレスの一つと考えられる。網膜光障害には, 強い光曝露による急性障害と日常生活光による慢性障害がある。強い光障害には, 本邦でも 50 例ほど報告<sup>2)</sup>されているレーザー光による障害やガリレオ以来数多く報告されている日食観察後などの太陽光による障害である。

日常生活光の慢性曝露で起こるのは, 嚢胞様黄斑浮腫

と, 加齢黄斑変性である。障害部位は光の集光する黄斑部に生じるため重篤な視力障害を来す。光は電磁波なので波長が短いほど強い障害を与えるが, そのエネルギー密度, 時間, 中間透光体による透過度によって異なってくる。

エネルギー密度とは, 網膜面状における光エネルギーを面積で割った  $J/cm^2$  で表される値である。したがって, 発光の面積の小さい光源を見つめるのは危険である。レーザーが危険なのは面積が小さいということが理由の一つである。もう一つ小さな光源の代表として発光ダイオード(LED)がある。青色 LED の障害閾値は  $28 J/cm^2$  と報告<sup>3)4)</sup>されている。

時間の因子も重要である。エネルギーが一定でも単位時間あたりのエネルギーと照射時間の積で考えた場合に生体に及ぼす作用は異なる。光線力学療法で使用されるように弱いエネルギーで長く照射した場合には, 光を吸収した物質の電子が励起し, これが基底状態に戻る際に基底状態の酸素にエネルギーが移動し, 主として一重項酸素を発生させる。日常生活光も含め, 通常的光障害つまり,  $0.01 \sim 50 W/cm^2$  で 1 s 以上の連続照射ならこの機序によるいわば光化学反応による障害となる。もう少し短くなり  $1 \mu s \sim 60 s$  で  $10 \sim 10^6 W/cm^2$  になると, 水溶液中の酸素への移動距離はせいぜい  $10 \mu m$  くらいであるため, 光吸収物質からエネルギーを受け取る酸素に数的余裕がなくなり, 光吸収物質自体が振動でエネルギーを緩和させるようになり, 温度上昇を来す。通常のアルゴンレーザーによる網膜光凝固反応などがこれにあたる。さらに時間が短くなり,  $100 fs \sim 500 ps$  で  $10^{11} \sim 10^{13} W/cm^2$  になると光を吸収した分子を構成している電子そのものが, 原子核を離れて飛び出す光アブレーションが起きる。Yttrium aluminium garnet (YAG), エキシマ, フェムト秒レーザーがこれにあたる<sup>5)</sup>。

光の波長による透過率も重要である。もし, 中間透光体が波長によらず同率に光を網膜に届かせるなら波長が短いほど網膜障害は強く起こる。しかし, 実際には特に水晶体によって  $435 nm$  以下の短い波長の光は網膜に届かない。そこでこの透過率と波長による障害度の積を考えたとき最も網膜に悪い光は  $440 nm$  の青色光となる。そこで, blue light hazard という概念が Ham ら<sup>6)</sup>によって提唱された。

これらの光と網膜の関係を考えた場合, 我々は水晶体を摘出した後<sup>7)</sup>は, 紫外線吸収のみに気を奪われることなく  $400 \sim 500 nm$  の波長<sup>8)</sup>にも注意を注ぐべきであろう。

## V 可視光線と鉄による酸化ストレス—加齢黄斑変性の発症機序の解明に向けて—

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) の原因は未だ特定されていないが, その有力な

危険因子として考えられているものに太陽光曝露がある<sup>9)</sup>。加齢黄斑変性(AMD)の動物モデルの一種である網膜光障害モデルを用いた網膜変性機序に関しては、光伝達関連の蛋白質を中心とした検討も進められている<sup>10)11)</sup>が、AMDの病因論を展開するためには十分ではない。一方、網膜、特に視細胞や色素上皮細胞は、鉄が比較的高濃度に存在し、鉄の代謝に関連した蛋白質、鉄を活性中心にもつ蛋白質が重要な役割を担っている<sup>12)</sup>が、*in vivo*の網膜光障害モデルは除鉄剤(デスフェリオキサミン)の投与により抑制される<sup>13)</sup>ことから、網膜光障害において鉄の関与が考えられた。

フェリチン(ferritin)は、細胞内外において酸化ストレスの起因となりうる遊離鉄イオンを取り込み、安全に貯蔵する蛋白質であり、視細胞などにも存在する。しかし、フェリチンをブタ視細胞外節画分とともにインキュベートすると、可視光線(白色光、特に380~450 nmの青色光)の照度に依存した脂質過酸化反応が短時間(10分以内)に惹起されることから、特別な光増感剤が存在しなくとも可視光線が酸化ストレスの原因となり得ることを示した<sup>14)</sup>。この脂質過酸化反応は、除鉄剤により抑制され、さらに電子スピン共鳴法によりヒドロキシルラジカルの発生が認められたことから、鉄イオンによるフェントン反応の関与が考えられる。先の報告からUV-Aや $\gamma$ 線によりフェリチンから鉄イオンが遊離することは既に知られていたが、鉄イオンを取り込んだフェリチンは $Fe^{3+}$ による茶褐色を呈し、可視光線の吸収が可能である。実際に、白色光や青色光のような可視光線もフェリチンから鉄イオンを遊離させる<sup>15)</sup>。この作用機序には、酸素濃度、活性酸素形成、温度による影響を受けないが、光の強度(時間・照度)、光の波長、pH、錯形成能を有する物質の存在・その濃度が重要な要因であることから、可視光線によるフェリチン貯蔵鉄の光還元反応を介して鉄イオンを遊離・放出させるとともに、一度遊離した鉄イオンがフェリチンにより再び取り込まれる際、リン脂質やキレート剤がこれを抑制することが関与している。これによりフェリチンから遊離した鉄イオンが酸化ストレスを惹起すると考えられる。

最近、ヒトAMDの網膜、網膜色素上皮細胞において、顕著な鉄の沈着がみられたという、AMDの研究上、画期的な興味深い報告がなされた<sup>16)</sup>。これはAMDをはじめとする光に関連する網膜疾患と鉄の動態との連関に関する分子機構について研究してきた我々の研究成果を裏付けるものである。

## VI 放射線による酸化ストレスと アポトーシス制御

放射線は細胞内の核のDNAに直接影響を与えることにより細胞死を制御したり、細胞内で水分子から活性酸素を発生させ、活性酸素消去酵素を誘導し、酸化ストレ

スに耐えうるような機構に關与している可能性がある。

放射線照射に眼組織におけるアポトーシスの制御作用を有することが証明できれば、臓器や組織の長期間保存も可能で、細胞間の相互作用をみるうえで有用となる。緑内障による視神経萎縮や網脈絡膜変性は細胞死を病態とし、根本的な治療が不可能とされており、細胞死を抑制する目的で応用することが可能かもしれない。また、加齢黄斑変性は加齢に酸化ストレスとして光障害などが加わることで起こり、糖尿病網膜症での新生血管は網膜虚血が引き金となる。加齢黄斑変性に対しては新生血管発生を抑える目的で $\gamma$ 線照射は既に応用されている。我々は緑内障に関連した組織として毛様体上皮を、網脈絡膜変性、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症に対しては網膜色素上皮と網膜血管内皮を選択し、放射線を照射した。

放射線には照射組織全体で均一に電離を起こす<sup>60</sup>Co $\gamma$ 線と組織内に到達する距離と範囲が調節可能なイオンビームがある。生体から分離されたブタ眼球は、血流の途絶により毛様体上皮と無色素上皮が細胞死に陥り、前房水も産生されなくなるため、眼球癆という状態となる。そこで、ブタ眼毛様体においてアポトーシス関連遺伝子であるTPR53BP2やBCL2遺伝子に $\gamma$ 線照射がどのような影響を与えるか免疫組織化学的に検討を行った。 $\gamma$ 線照射された毛様体上皮では器官培養後も形態を維持し、アポトーシス関連遺伝子であるTPR53BP2遺伝子の抑制とBCL2遺伝子の誘導が認められ、器官培養後の壊死性変化に対して防御的に働いていた<sup>17)18)</sup>。

イオンビームはNe, C, He, Hなどの原子をイオン化して加速する電離放射線であり、試料内部でエネルギーを失い一定の深さで止まるという特徴がある。水中での到達深度はイオン種と加速エネルギーによって異なり、350MeV Neでは0.57 mm、220MeV Cでは1.08 mm、50MeV Heでは1.64 mm、20MeV Hでは4.02 mmである。<sup>60</sup>Co $\gamma$ 線に続いて、イオンビームを毛様体に照射し<sup>19)</sup>、TPR53BP2依存性アポトーシスを促進するBAXや抑制するBCL2遺伝子の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、イオンビームが照射された毛様体ではアポトーシス制御遺伝子において、BAX遺伝子の顕著な発現が認められ、特に飛程の短い350MeV Neの照射の際に比較的強く、イオンビームが毛様体上皮におけるアポトーシスを制御し、前房水の産生にも影響を与える可能性を示唆した。

網膜変性を来す実験モデルであるRoyal College of Surgeons(RCS)ラットでは網膜色素上皮細胞(RPE)が脂質を多く含む視細胞外節を貪食しないために硝子体の過酸化脂質が正常ラットに比べて多い<sup>20)</sup>。酸化ストレスの指標として、ミトコンドリアや細胞質において活性酸素による生体膜リン脂質の障害を防御するグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)に着目し、RCSラットにおけるRPEや視細胞内節のミトコンドリアのGPxは減少、

変性した視細胞外節では増強していることを認めた<sup>21)</sup>。また、低酸素状態が培養 RPE における貪食能の低下とグルタチオン (GSH) の減少を引き起こしていることを元素分析により示した<sup>22)</sup>。ウシ培養 RPE において還元型、酸化型 GSH の割合を表すグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼの発現は UV-B 曝露により GPx に先行して影響を受けていた。

最近では、培養細胞に対する酸化ストレスを定量化するために LighCycler<sup>®</sup>により GPx の発現量をリアルタイムで測定し、長時間の紫外線照射後の培養 RPE の GPx 発現量は UV-A では増加、UV-B では著しい減少を示した。培養 RPE に対してイオンビーム照射では GPx 発現の増加、 $\gamma$ 線では GPx 発現の障害がみられた。イオンビーム照射の際にはエネルギーが狭い一点に集中的するため膜損傷などの障害防御のため UV-A 照射と同様に GPx 発現が誘導された可能性がある。LighCycler<sup>®</sup>による遺伝子発現のリアルタイム定量化について、今後は培養 RPE に続いて、培養網膜血管内皮細胞にも応用範囲を広げ、 $\gamma$ 線やマイクロビーム照射の影響を主として観察し、発現遺伝子も GPx や SOD などの活性酸素消去酵素ばかりでなく、TPR53BP2, BCL2, BAX などのアポトーシス関連遺伝子も試み、変性疾患の原因究明や治療、あるいは新生血管発生の制御に関連する可能性が示唆される。

## VII 網膜光障害の機序

光障害は最終的にはアポトーシスへ至ることが知られている<sup>23)</sup>。この過程で視細胞や網膜色素上皮細胞の光障害を抑制するさまざまな因子の研究が行われている。

可視光線による網膜光障害に対し、防御効果が示唆されているサイトカイン、神経栄養因子として、basic fibroblast growth factor (bFGF)<sup>24)</sup>、pigment epithelium-derived factor (PEDF)<sup>25)</sup>、ciliary neurotrophic factor (CNTF)<sup>26)</sup>、lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)<sup>27)</sup>、neurotrophin 3<sup>28)</sup>などがある。チオレドキシンはグルタチオン系とともに細胞内のレドックス制御にかかわる抗酸化因子のひとつである。活性中心に -Cys-Gly-Pro-Cys- というアミノ酸配列をもつ生体内レドックス制御にかかわる還元酵素のひとつである<sup>29)</sup>。

ラット網膜虚血再灌流モデルではチオレドキシシンが網膜組織に誘導される<sup>30)</sup>。プロスタグランジン E<sub>1</sub>が *in vitro* の系で網膜色素細胞にチオレドキシシンを誘導し過酸化水素に対する細胞障害を抑制すること<sup>31)</sup>、*in vivo* の系で虚血再灌流による網膜障害を抑制することが報告されている<sup>32)</sup>。また、硝子体内へのリコンビナントチオレドキシシンの投与により、網膜光障害の抑制も確認された<sup>33)</sup>。網膜は光受容体としての機能を主とする組織であるため、常に光刺激に曝露している。チオレドキシシン高発現マウスが白色光による網膜障害に対しても抵抗性で

ある<sup>34)</sup>。内因性チオレドキシシンを誘導する物質はプロスタグランジン E<sub>1</sub>に加えて、Sulforaphane<sup>35)</sup>や Geranylgeranylacetone<sup>36)</sup>が発見された。臨床的にはチオレドキシシン注入や高発現は現在のところ応用されていない。したがって、チオレドキシシン誘導剤によるチオレドキシシン強化療法は治療の選択肢のひとつとして有効かもしれない。

## VIII 白内障および偽水晶体眼と過酸化反応

高齢者の増加は白内障罹患率を上げることになるので、実際、白内障患者数は計り知れないほどの人数になるに違いない。白内障発症の直接的原因が未だ明らかでないことから白内障による障害の解決を手術による視機能の回復に頼っている。

白内障手術の進歩で quality of vision の改善は達成されたが、水晶体の代わりに眼内レンズを挿入したいいわゆる偽水晶体眼の眼組織における化学的変化について知るために白色家兎水晶体に超音波乳化吸引術 (PEA) を行って偽水晶体眼のモデルを作製した。偽水晶体眼に紫外線を照射することによって硝子体と網膜に生じる変化を過酸化反応を中心に調査し、紫外線曝露に対する眼内レンズの役割についても検討した。

白色家兎有水晶体眼における紫外線曝露による過酸化反応を検討するために、白色家兎に PEA を施行した。右眼に黄色着色レンズ、左眼に非着色紫外線カット眼内レンズを移植した。紫外線照射条件は UV-B を 3 KJ/m<sup>2</sup>で行った。照射後、硝子体と網膜を採取した。次に白内障水晶体の過酸化反応の測定を行うため、Cu・Zn-SOD 定量、superoxide scavenging 活性、および八木法蛍光法にて過酸化脂質測定を施行した。

紫外線照射による白色家兎有水晶体眼の硝子体と網膜における過酸化反応 (表 1) をみると、まず生じた O<sub>2</sub><sup>•-</sup>を消去するために SOD、GSH および ascorbic acid が作用するが、今回はこれらをまとめて superoxide scavenging 活性として検討した。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去能は紫外線照射によって硝子体 39.37 ± 23.01 U/ml (非照射 49.06 ± 47.66)、そして網膜 27.53 ± 11.95 U/ml (非照射 31.93 ± 5.58) と低下していた。過酸化脂質は、硝子体、網膜のいずれでも紫外線照射群で増加していた。

白色家兎偽水晶体眼の紫外線による硝子体と網膜における過酸化反応を検討した。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去活性は、硝子体では、着色眼内レンズ (IOL) 挿入眼が紫外線照射群ならびに非照射群ともに非着色 IOL 群より高値であった (表 2)。すなわち、硝子体のもつ主成分の特異性、手術による炎症の遷延化などが、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去活性を高値に保っていると思われる。網膜では、紫外線照射を受けると着色 IOL で O<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去活性が低値となった (表 3)。しかし、紫外線照射を行わないときの活性を測定すると着色 IOL 群 34.95 ± 14.78 U/ml が非着色 IOL 33.45 ± 8.50 U/ml

表 1 家兎有水晶体眼における紫外線(UV)照射による過酸化反応

部位 UV照射 過酸化物	硝子体		網膜	
	+	-	+	-
superoxide scavenging 活性(U/ml)	39.37±23.01	49.06±47.66	27.53±11.95	31.93±5.58
過酸化脂質 (nmol MDA/ml)	2.34±2.43	1.59±0.72	9.11±9.94	8.85±7.14

(平均値±標準偏差)  
(文献 42 より転載)

表 2 実験的偽水晶体眼・硝子体での UV 照射による過酸化反応

UV照射 IOL 過酸化物	照射群		非照射群	
	着色 IOL	非着色(UV カット) IOL	着色 IOL	非着色(UV カット) IOL
superoxide scavenging 活性(U/ml)	33.06±25.40	24.75±15.91	30.68±22.45	28.90±15.13
過酸化脂質 (nmol MDA/ml)	0.97±1.08	1.64±1.08	1.54±1.69	2.45±1.46

IOL：眼内レンズ，※：p<0.05.  
(文献 42 より転載)

表 3 実験的偽水晶体眼・網膜での UV 照射による過酸化反応

UV照射 IOL 過酸化物	照射群		非照射群	
	着色 IOL	非着色(UV カット) IOL	着色 IOL	非着色(UV カット) IOL
superoxide scavenging 活性(U/ml)	34.07±14.09	38.36±10.26	34.95±14.78	33.45±8.50
過酸化脂質 (nmol MDA/ml)	9.07±9.44	9.69±4.42	9.72±7.32	13.46±10.21

(文献 42 より転載)

とほとんど変化しない。過酸化脂質は紫外線照射，非照射群ともに着色 IOL 挿入眼で明らかに低下している。網膜では各 IOL 挿入群の紫外線非照射群で過酸化脂質が高値であった。特に非着色 IOL 群では紫外線照射を行わないにもかかわらず，明らかに増加していたことから過酸化反応が進行していると推察される。

加齢白内障では正常水晶体と比較して飽和脂肪酸が約 6.0% 増加している<sup>37)</sup>。不飽和脂肪酸が活性酸素によって電子を抜かれると脂質ラジカルが生じ，そこに酸素分子が作用すると脂質ペルオキシラジカルができる。このラジカルに脂質分子が水素を取られると過酸化脂質ができる。いったん生成された過酸化脂質は不飽和脂肪酸エステルを減少させて飽和脂肪酸を増加する。その結果，膜は柔軟性を失って機能を低下させ，蛋白質の変性，蛋白質間の架橋形成を行う。膜の脂質過酸化を抑制するために抗酸化酵素や抗酸化物質が働く。GSH は水晶体皮質に多く存在しているが，混濁が始まると速やかに減少する<sup>38)</sup>。GSH は混濁化を防ぐために抗酸化剤として作用していたために著しく減少すると考えられる。GPx

の基質になる他にフリーラジカルの無毒化，蛋白質 S—S 結合の還元，蛋白質—SH 結合の酸化防止に機能していることから GSH が減少するのは当然と思われる。白内障で増加した Cu イオンは GSH と鎖体を形成し，O<sub>2</sub><sup>·-</sup>を消去する作用があって O<sub>2</sub><sup>·-</sup>消去 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する<sup>39)</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を消去する活性が弱いと過酸化反応がより進行して白内障を進めることになる。過酸化反応を進行させる過酸化脂質は著者らの測定した正常水晶体の 0.078±0.011×10<sup>-2</sup>nmolMDA/lens に比較して白内障になると 50~70 倍に著しく増加していた。白内障の進行に過酸化反応が強いかかわっていることが明らかである。今回は発生した O<sub>2</sub><sup>·-</sup>を消去する機能の面から酸化ストレスが白内障の発症・進行に関係していることを解析した。

水晶体が混濁する現象に「酸化」が強く関係することは既に述べた如くである。酸化を促進させるには白内障発症に関係する因子である加齢を軸にして，紫外線，喫煙，糖尿病などが危険因子としてかかわっている。すなわち，紫外線曝露が白内障の直接的原因であるとするこ

とには疑問があるが、強い危険因子であることに違いはない。紫外線照射によって水晶体上皮細胞の DNA が損傷を受け、核酸の鎖が切断<sup>40)</sup>されたり水晶体上皮細胞の末端が線維に分化せずに後方に移動したりしていた。また、 $O_2^-$  消去活性が低下する傾向を呈した<sup>41)</sup>。紫外線から網膜を守るために角膜、水晶体および虹彩がフィルターとして防御作用をしている。いったん無水晶体状態になると角膜で吸収される短波長以外の紫外線が眼内に入ることから網膜への直接的障害が危惧される。

今回の研究で手術をしていない家兎(有水晶体)眼に紫外線を照射したところ  $O_2^-$  の消去活性が硝子体および網膜で紫外線照射群が明らかに低値であった。また、過酸化反応の生成系の指標である過酸化脂質は、有意差はないものの硝子体と網膜で増加していた。有水晶体眼であっても UV-B を 15 分間照射しただけで過酸化反応が硝子体と網膜で進行した成績は無水晶体眼においてはさらに過酸化反応が強くなることを示唆している。白内障手術では紫外線カット眼内レンズを挿入して光への対処をとっているが、偽水晶体眼の眼内ではどんな化学反応が起きているかを知る必要がある。偽水晶体眼の硝子体と網膜における過酸化への反応について比較してみた<sup>42)</sup>。 $O_2^-$  を消去する活性は紫外線照射をしていない着色眼内レンズと非着色眼内レンズでは差がなかったが、紫外線照射した着色眼内レンズの網膜での消去能が低下していた(表 3)。また、硝子体では着色眼内レンズが紫外線照射に関係なく消去活性が強い状態を示している(表 2)。紫外線非照射群でも活性値に変化を生じたことは白内障手術侵襲への組織反応の個体差や可視光への着色 IOL のフィルター効果などが影響していると考えられる。

一方、ラジカル生成系に作用する過酸化脂質は着色 IOL と非着色 IOL とで各組織で変化がみられた。すなわち、着色 IOL 挿入眼で過酸化脂質が低値であった。

この成績から着色 IOL は網膜に光化学障害を生じる波長である紫外線と可視光線域における短波長光に対して効果的なフィルターとして機能すると考えられる<sup>43)</sup>。また、まぶしさを軽くするために青っぽい色に感じるまぶしさを黄色で軽くする、色視症の解決のためにも黄色 IOL が挿入されている。着色レンズは濃い黄色では色覚が障害される危険がある。黄色 Polymethylmethacrylate (PMMA) IOL は紫外線曝露で器質的損傷はない<sup>44)</sup>。Nilsson<sup>45)</sup>らのデータからは黄色 IOL は主として青色ハザードの光化学損傷に対して網膜色素上皮を防御し、網膜電図を改善するので非着色紫外線吸収 IOL に比べて網膜を守るために適しているとしている。

非着色 IOL で過酸化脂質が各組織、とりわけ硝子体で着色 IOL よりも多量に存在していたのはやがて網膜の過酸化反応を進行させることが推察される。短波長可視光である青色光を曝露すると加齢黄斑変性にみられる

脈絡膜血管内皮で IV 型コラーゲンの合成が盛んになって Bruch's 膜の肥厚が生じる。この反応には過酸化による損傷が関係していて、反応を阻止するには還元型 GSH が必要とされる<sup>46)</sup>。有水晶体眼および偽水晶体眼で紫外線照射によって眼内に過酸化脂質が生成され、特に非着色 IOL で増加していたことは、慢性的紫外線曝露で過酸化反応が進行して膜の損傷や硝子体成分の変性などが起きて視機能障害を招来する可能性が高い。

我々は、白内障手術をして眼内レンズ(黄色着色、透明・紫外線カット)を挿入した偽水晶体眼に UV-B を照射し、過酸化反応がどのように生じているか、家兎硝子体と網膜を材料に検討した。手術をしない有水晶体眼では UV-B の照射で硝子体と網膜の superoxide scavenging 活性が低下し、その結果、過酸化脂質が増加した。偽水晶体眼は紫外線照射した硝子体では非着色・紫外線カット群で  $O_2^-$  消去能が明らかに低下していた。網膜にはラジカル消去能に明らかな差はなかったが、過酸化脂質は着色眼内レンズ群が有意 ( $p < 0.05$ ) に低値であった。着色眼内レンズは眼内に生じる過酸化反応を抑制していたと考えられる。

## IX おわりに

酸化ストレスは、発癌、老化、動脈硬化、痴呆などの重要な原因の一つと考えられる。眼科領域でもここで取り上げた加齢黄斑変性や白内障の発症に深く結びついている。このような酸化ストレスに対する生体防御機構として、グルタチオン、チオレドキシシンとその関連酵素群、SOD、カタラーゼなどが知られている。特に、チオレドキシシンはグルタチオンと並んで、蛋白質のチオール基の酸化を防御、あるいはチオール基の酸化還元(レドックス)を調節する因子として重要な役割を担っていると考えられている。一方、1990 年代はじめに、細胞内で産生された活性酸素が転写因子の活性化シグナルを伝えていることが報告された。以来、酸化ストレスが生体にとって意味のあるシグナルを伝達するためのレドックスセンサー機構として機能することが認識されるようになった。言い換えれば、大量の活性酸素は蛋白質や核酸を障害する。少量の活性酸素は細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとしても機能し、細胞の活性化、分化や増殖を促進していることが明らかにされてきた。またサイトカイン刺激などのさまざまな外的刺激により細胞内に少量の活性酸素が発生する。これらの研究が疾患の機序追究や治療に応用されることを期待する。

本稿は眼科酸化ストレス研究会からの総説である。

## 文 献

- 1) Foote SC: Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequence in biological system. In:

- Pryor WA (Ed) : Free Radicals in Biology, Academic Press, New York, 85—134, 1976.
- 2) **Koide R, Kora Y, Shikano M, Seki T, Inatomi M, Ozawa T** : Laser-induced eye injuries in Japan. *Laser in the Life Science* 9 : 68—80, 2000.
  - 3) 小出良平, 植田孝子, **Dawson WW, Hope GM, Ellis A, Samuelson D**, 他 : 青色発光ダイオードによる網膜障害. *日眼会誌* 105 : 687—695, 2001.
  - 4) **Dawson W, Nakanishi-Ueda T, Armstrong D, Reitze D, Samuelson D, Hope M**, et al : Local fundus response to blue (LED and Laser) and infrared (LED and Laser) sources. *Exp Eye Res* 73 : 137—147, 2001.
  - 5) **Boulnois JL** : Photophysical processes in recent medical laser development : a review. *Laser Med Sci* 1 : 47—66, 1986.
  - 6) **Ham WT, Mueller H, Sliney DH** : Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature* 260 : 153—155, 1976.
  - 7) **Pollack A, Marcovich A, Bukelman A, Oliver M** : Age-related macular degeneration after extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Ophthalmology* 103 : 1546—1554, 1996.
  - 8) **Ueda T, Taguchi Y, Tsukahara M, Yamamoto Y, Koide R** : Retinal light damage control by blue light-absorbing intraocular lens. *ARVO Program Summary Book, #808*, 2005.
  - 9) **Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Nondahl DM** : Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy : the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 119 : 246—250, 2001.
  - 10) **Reme CE, Grimm C, Hafezi F, Iseli HP, Wenzel A** : Why study rod cell death in retinal degenerations and how? *Doc Ophthalmol* 106 : 25—29, 2003.
  - 11) **Jacobson SG, McInnes RR** : Blinded by the light. *News and Views. Nature Genetics* 32 : 215—216, 2002.
  - 12) **Yefimova MG, Jeanny JC, Guillonneau X, Keller N, Nguyen-Legros J, Sergeant C**, et al : Iron, ferritin, transferrin, and transferrin receptor in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2343—2351, 2000.
  - 13) **Li ZL, Lam S, Tso MO** : Desferrioxamine ameliorates retinal photic injury in albino rats. *Curr Eye Res* 10 : 133—144, 1991.
  - 14) **Ohishi K, Zhang XM, Moriwaki S, Hiramitsu T, Matsugo S** : In the presence of ferritin, visible light induces lipid peroxidation of the porcine photoreceptor outer segment. *Free Radic Res* 40 : 799—807, 2006.
  - 15) **Ohishi K, Zhang XM, Moriwaki S, Hiramitsu T, Matsugo S** : Iron release analyses from ferritin by visible light irradiation. *Free Radic Res* 39 : 875—882, 2005.
  - 16) **Hahn P, Milam AH, Dunaief JL** : Maculas affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 121 : 1099—1105, 2003.
  - 17) **Akeo K, Funayama T, Ogawa A, Inoue R, Kobayashi Y** : The preservation of the organ-cultured ciliary body by gamma ray irradiation. *TIARA Annual Report 2002* : 107, 2003.
  - 18) **Akeo K, Funayama T, Ogawa A, Hamada N, Akeo Y, Kobayashi Y** : Effects of gamma irradiation on BCL2 and TPR53BP2 expression in the porcine ciliary body. *Exp Anim* 55 : 375—381, 2006.
  - 19) **Akeo K, Funayama T, Ogawa A, Kobayashi Y** : Ion beam irradiation has different influences on morphology of the cultured ciliary body among  $^{20}\text{Ne}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^4\text{He}$ , and  $^1\text{H}$ . *TIARA Annual Report 2003* : 96, 2004.
  - 20) **Zigler JS, JR, Hess HH** : Cataracts in the Royal College of Surgeons rat : Evidence for initiation by lipid peroxidation products. *Exp Eye Res* 41 : 67—76, 1985.
  - 21) **Akeo K, Tsukamoto H, Okisaka S, Hiramitsu T, Watanabe K** : The localization of glutathione peroxidase in the photoreceptor cells and the retinal pigment epithelial cells of Wistar and Royal College of Surgeons Dystrophic rats. *Pigment Cell Res* 12 : 107—117, 1999.
  - 22) **Akeo K, Fujiwara T, Yorifuji H, Okisaka S** : X-ray microanalysis and phagocytotic activity of bovine retinal pigment epithelial cells cultured under conditions of hypoxia. *Pigment Cell Res* 10 : 257—264, 1997.
  - 23) **Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wong ZQ, Wagner EF**, et al : The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med* 3 : 346—349, 1997.
  - 24) **LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH** : Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 11249—11253, 1992.
  - 25) **Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF** : In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1646—1652, 2001.
  - 26) **Walsh N, Valter K, Stone J** : Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Exp Eye Res* 72 : 495—501, 2001.
  - 27) **Machida S, Chaudhry P, Shinohara T, Singh DP, Reddy VN, Chylack LT Jr**, et al : Lens epithelium-derived growth factor promotes photoreceptor survival in light-damaged and RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1087—1095, 2001.
  - 28) **LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lavillacorta C, Unoki K, Sung CH**, et al : Protection

- of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 592—602, 1998.
- 29) **Yoshida T, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J** : The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process. *Ann NY Acad Sci* 1055 : 1—12, 2005.
- 30) **Ohira A, Honda O, Gauntt CD, Yamamoto M, Hori K, Masutani H**, et al : Oxidative stress induces adult T cell leukemia derived factor/thioredoxin in the rat retina. *Lab Invest* 70 : 279—85, 1994.
- 31) **Yamamoto M, Sato N, Tajima H, Furuke K, Ohira A, Honda Y**, et al : Induction of human thioredoxin in cultured human retinal pigment epithelial cells through cyclic AMP-dependent pathway ; involvement in the cytoprotective activity of prostaglandin E1. *Exp Eye Res* 65 : 645—652, 1997.
- 32) **Yamamoto M, Ohira A, Honda O, Sato N, Furuke K, Yodoi J**, et al : Analysis of localization of adult T-cell leukemia-derived factor in the transient ischemic rat retina after treatment with OP-1206 alpha-CD, a prostaglandin E1 analogue. *J Histochem Cytochem* 45 : 63—70, 1997.
- 33) **Tanito M, Masutani H, Nakamura H, Ohira A, Yodoi J** : Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1162—1167, 2002.
- 34) **Tanito M, Masutani H, Nakamura H, Oka S, Ohira A, Yodoi J** : Attenuation of retinal photooxidative damage in thioredoxin transgenic mice. *Neurosci Lett* 326 : 142—146, 2002.
- 35) **Tanito M, Masutani H, Kim YC, Nishikawa M, Ohira A, Yodoi J** : Sulforaphane induces thioredoxin through the antioxidant-responsive element and attenuates retinal light damage in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 979—987, 2005.
- 36) **Tanito M, Kwon YW, Kondo N, Bai J, Masutani H, Nakamura H**, et al : Cytoprotective effects of geranylgeranylacetone against retinal photooxidative damage. *J Neurosci* 25 : 2396—2404, 2005.
- 37) **Cotlier E, Obara Y, Tofness B** : Cholesterol & phospholipids in protein fractions of human lens and senile cataract. *Exp Eye Res* 350 : 267—278, 1978.
- 38) **Beebe, DC** : Protection against oxidation. *Adler's physiology of the eye*. 10st. 130—131, 2003.
- 39) 三好清徳, 石津和彦, 田中 久 : グルタチオン—銅(Ⅲ)錯体と SOD 活性. 磁気共鳴と医学 1 : 69—73, 1990.
- 40) 庄子英一 : 紫外線が水晶体上皮細胞 DNA に与える影響およびその機序. 日眼会誌 101 : 40—45, 1997.
- 41) 小原喜隆 : 活性酸素フリーラジカルと白内障. 日眼会誌 99 : 1303—1341, 1995.
- 42) 小原喜隆 : 酸化ストレスと白内障および偽水晶体眼. 日本白内障学会誌 16 : 2—12, 2004.
- 43) **Ham WT, Muller HA, Ruffolo JJ** : Action spectrum for retinal injury from near ultraviolet radiation in the aphakic monkey. *Am J Ophthalmol* 93 : 299—306, 1982.
- 44) **Baibzhayev MA, Chumayevskii NA** : Tinting effect of ultraviolet radiation on intraocular lens of polymethyl metacrylate. *Biomed Mater Eng* 4 : 1—6, 1994.
- 45) **Nilsson SE, Textorius O, Andersson BE, Swenson B** : Clear PMMA versus yellow intraocular lens material. An electrophysiologic study on pigmented rabbits regarding "the blue light hazard". *Prog Clin Biol Res* 314 : 539—553, 1989.
- 46) **Winkler B, Boulton ME, Gottsh JD, Sternberg P** : Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5 : 32—42, 1999.
-