

エタノールの視覚毒性に関する実験的研究

—ラットアルコール視神経症の生理組織学的研究—(図6)

種田 芳郎・奥脇 賢一・佐古 恒博* (北里大学医学部眼科
宇賀 茂三・宮田 幹夫・石川 哲 (*北里大学病院ヘルスサイエンスセンター)

Ethanol Optic Neuropathy in rats

Yoshiro Taneda, Kenichi Okuwaki, Tsunehiro Sako

Shigezo Uga, Mikio Miyata and Satoshi Ishikawa

Department of ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University

要 約

1%エタノールをラットに飲水させ、視覚誘発脳波(VEP)、ERGによる病態生理学的観察、ならびに視神経、網膜の病理組織学的観察を行い、エタノールを含有しない水を飲ませたコントロール群と比較した。フラッシュ刺激による VEP では、 N_1 頂点潜時が飲水後2週間目で最短になり、4週目では一度飲水前のレベルに復帰し、8週間目で有意に潜時が延長した。しかし P_1 頂点潜時に経時的变化の有意差は認めず、さらにフラッシュ刺激による ERG にも経時的变化を認めなかった。病理組織学的観察では、光顕切片において、コントロール群を含んだ全ての飲水群の網膜に変化は認めず、エタノール飲水群では視神経に2週間、および4週間飲水群に一部軸索の腫大を認めたものの著明な変化ではなかった。しかし8週間エタノール飲水群の視神経には中隔組織の拡大、軸索の不均一性を認め、電顕的観察では、軸索の配列の不整、かつ消失を認め、コントロール群に比して大径視神経線維の減少を認め、小径視神経線維で占められ、髄鞘構築の粗造も認めた。本実験はエタノール単独投与によるラット視神経症の動物モデルの作成に成功したものであると考えられた。(日眼 92:1154—1160, 1988)

キーワード：アルコール視神経症、エタノール、ラット、Flash VEP, Flash ERG

Abstract

Effects of oral administration of 1% ethanol were studied in rats by visual evoked potential (VEP) and electroretinogram (ERG) in response to flash stimuli. The retina and optic nerve were histopathologically examined. The N_1 (first negative wave) latency of VEP shortened at the second week after the start of ethanol, and it finally normalized at the 4th week. A significant prologation of N_1 latency was found at the 8th week. However P_1 (first positive wave) latency of VEP remained normal. The latency time and a-wave, b-wave, as well as oscillatory potentials in ERG were within normal limits.

Histopathological changes in the optic nerve fibers were obvious at the 8th week. They were enlargement of septal tissue (gliosis), non-homogenous dislocation of the medullated nerve fibers with large diameter. Obvious ethanol optic neuropathy was produced in rats after the 8th week of administration of ethanol (68.3g/kg in total). (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1154—1160, 1988)

Key words: Alcohol neuropathy, Ethanol, Rat, Flash VEP, Flash ERG

別刷請求先：228 神奈川県相模原市北里1-15-1 北里大学医学部眼科学教室 種田 芳郎
(昭和63年2月23日受付)

Reprint requests to: Yoshiro Taneda, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Kitasato Univ.
1-15-1 Kitasato, Sagami-hara 228, Japan

(Accepted for publication February 23, 1988)

I 緒 言

エタノールによる視神経障害の可能性はアルコール弱視、またはタバコ・アルコール弱視^{1)~3)}として臨床的に知られ、その成因として栄養障害、代謝物による障害、またエタノールによる直接毒性⁴⁾などが推定されている。しかし、今日に至るもエタノール単独投与による視神経症の実験的動物モデルの基礎的研究はほとんど行われていない。

そこで我々はラットにエタノールを長期にわたって飲水させ、エタノールの視覚毒性について電気生理学的、および病理組織学的に研究を行ない、今回ラットにアルコール視神経症と考えられる所見を作ることに成功したのでここに報告する。

II 実験方法

1. 使用動物および視覚誘発脳波 (Flash VEP) 記録用電極埋め込み法

飲水開始時点で、生後約10週齢(220~250g)の雄ウィスター系ラット(各群5匹、総数25匹)を用いた。これらの動物は室温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ および明暗周期12時間(点灯時間7:00~19:00、照度400~500 Lux)に維持された空調動物室内で金属性ケージに個別に収容し、飼料に固形型普通食(CE-2、日本クレア)を使用し自由に摂食させ、特に栄養学的に過不足な状態にならないよう配慮し飼育した。Flash VEP 記録用脳波電極埋め込みは Sato et al.⁵⁾の方法に従って施行した(図1)。つまりケタラル麻酔下(筋注で100mg/

kg 体重)においてラットの頭頂部皮膚切開後、ドリルを用いて頭蓋骨を穿孔し、硬膜表面上に接する様に埋め込んだ。部位は関電極を bregma より7mm 後方、midline の4mm 右側、不関電極を bregma より1mm 前方、midline の1mm 右側、そして接地電極を bregma より5mm 前方、midline 上に設定した。この埋め込みはケタラル麻酔の中枢への影響、また術後組織の炎症を除去する目的で1%エタノール飲水開始2週間前に行った。

2. エタノール投与方法、投与期間、およびグループ分類

日本薬局方試験特級エタノール(吉田製薬)を水道水に溶解し、1%エタノールにし、これを200ml 用給水ビンに入れラットに飲水させた。1%エタノールは設定期間中制限なく自由に飲水させ、2週間飲水させた群を1群(5匹)、2週間飲水後水道水単独にし6週間観察した群を2群(5匹)、4週間1%エタノールを飲水させた群を3群(5匹)、8週間1%エタノールを飲水させた群を4群(5匹)、そして水道水のみを飲水させた各群の時期に相当するコントロール群を5群(5匹)とした。

3. Flash VEP, Flash ERG の記録方法、条件、および時期

Flash VEP 測定は Sato et al.⁵⁾の方法に準じ、内腔を光沢白色塗料で塗装したチャンパー内にラットを入れ、頭部電極をスリッピングに接続した。このスリッピングは360°回転するためラットは自由に行動可能であり、また上部(ラットの頭部より25cm 直上)のキセノンライト(三栄測器 Photo Stimulator 3G21-P)はチャンパー内が白色になっている為、チャンパー内を均一に照射することが可能になっている。これによりラットの Flash VEP は無麻酔、無拘束下の条件で測定された。暗順応30分間、刺激強度は1.0J とし、3秒間隔で32回の光刺激に対する反応を増幅には日本光電の Dual-Beam Memory oscilloscope VC-10、加算には日本光電の Averager DAT-1100、記録には Yokokawa Electric Works の X-Y Recorder Type 3077 を用い、High cut 100Hz、Low cut 0.08Hz にて P₁、および N₁ の頂点潜時について測定した(図2)。

Flash ERG の測定は難波⁶⁾の方法に従い測定した。Eiraku Electric Co の ER-502を用い、ラットはベノキシール点眼にて角膜表面麻酔後、無麻酔にて拘束し、内面を光沢白色塗料で塗装した暗箱に入れた。関電極は、白金線の特製コンタクトレンズを作製し、角膜頂

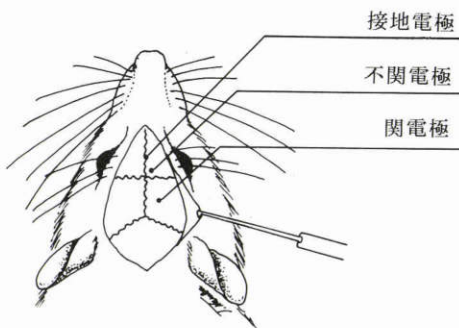


図1 Flash VEP 記録用脳波電極を示した埋め込み図(Sato et al.⁵⁾): 関電極は bregma より7mm 後方で midline の4mm 右側、不関電極は bregma より1mm 前方で midline の1mm 右側、そして接地電極は bregma より5mm 前方で midline 上に設置した。

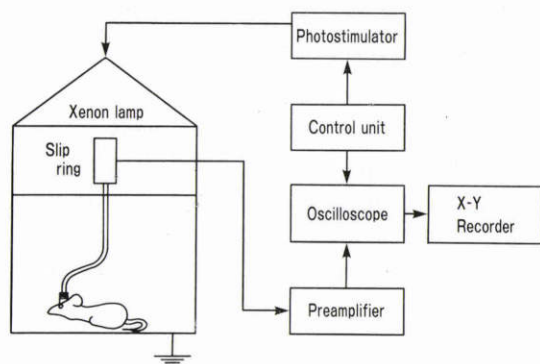


図2 無麻酔・無拘束下によるFlash VEP測定方法 (Sato et al.⁹⁾:スリップリングは360°回転可能, またチャンパー内は白色になっており均一に照射することが可能, これによりVEPは無麻酔, 無拘束下で測定される。

点に置いた。不関電極として針電極を頭皮下に置き, 接地電極は両耳介に置いた。30分暗順応後, 刺激は20 Jキセノンランプに, 白色フィルターをdiffuserとして使用し, 30cmの距離より刺激を行い, 内面白色の暗箱と共にGanzfeldの刺激を狙った。a波およびB波の時定数0.3秒で, 律動様小波を時定数0.003秒で記録した。記録時期はFlash VEP, ERGとも, 各群飲水開始直前, および1群では1%エタノール飲水開始後2週間目, 2群では1%エタノール飲水開始後2週間目と, 水道水単独にした後2週と6週間目, 3群では1%エタノール飲水開始後2週と4週間目, 4群では1%エタノール飲水開始後2週, 4週と8週間目, および5群では水道水飲水開始後2週, 4週と8週間目に記録した。なおラットの日内変動の影響を除く目的で, 各測定の間隔は定時間帯(19:00~21:00)に行った。

4. 病理組織学的検査

1群, 3群, 4群, および5群(コントロール群)において網膜, および視神経を病理組織学的に観察した。各群とも1%エタノール飲水終了直後, また5群では水道水飲水開始後2週, 4週と8週間目に行った。方法は, 50mg/mlネブタール溶液にて麻酔(腹腔内に0.1ml/100g体重)し, 左心室より1%パラホルムアルデヒドと1.25%グルタルアルデヒドを含む液で還流固定後, 視交叉前部より眼球までを一塊として取り出し細切し, さらに0.1Mカコジレイト緩衝液で洗浄, 1%四酸化オスミウムにて後固定した。アルコール脱水, エポキシ樹脂包埋後, トルイジンブルー染色にて網膜, および視神経を光顕にて観察した。視神経は球後

より2.5mm付近を観察し, 特に4群(1%エタノール飲水8週間群)と5群(コントロール群)においては, クエン酸鉛二重染色を行い電顕にて観察した。

III 結果

1. 平均1%エタノール飲水総量

1群(2週間飲水群)では 437 ± 17.9 ml, 3群(4週間飲水群)では 1032 ± 125.6 ml, 4群(8週間飲水群)では 1604 ± 263.2 mlであった。この飲水量を体重1kg当たりの平均エタノール量として換算すると1群では18.6g/kg, 3群では43.9g/kg, 4群では68.3g/kgで

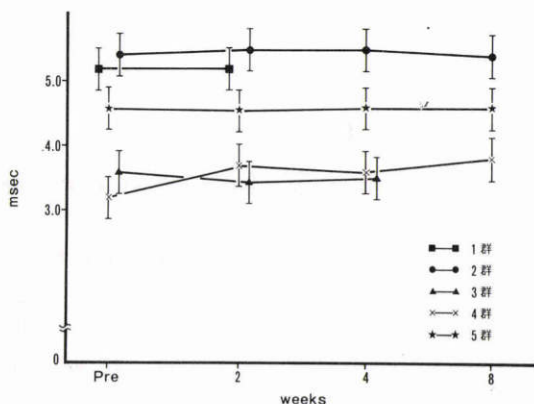


図3 Flash VEP-P₁頂点潜時の経時的所見:各群とも1%エタノール飲水前と飲水後の頂点潜時の間に有意差は認めない。

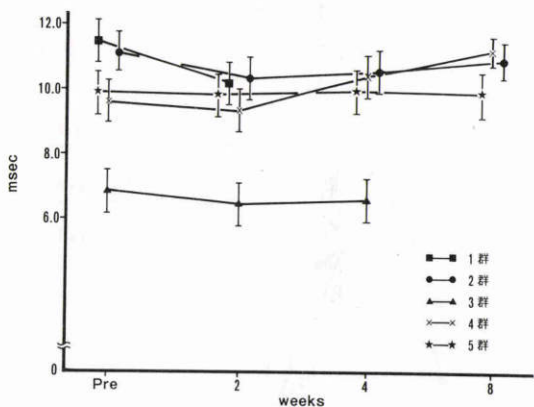


図4 Flash VEP-N₁頂点潜時の経時的所見:5群(コントロール群)は終始安定した値を示した。しかし1~4群ともエタノール飲水開始2週間目で短縮を示し, 2群では水道に戻した後最終的に, 飲水前のレベルに復帰している。4群では一度3週間目で飲水前レベルに復帰した後, さらに潜時が延長している傾向がある。

あった。

2. Flash VEP および ERG の結果

1) Flash VEP

今回の実験では Sato et al.⁵⁾の方法に準じて P_1 , N_1 を設定し判定に使用した。図3に P_1 頂点潜時の経時的変化を示す。各群とも飲水前の頂点潜時と飲水終了後の潜時を比較しても明らかな有意差を認めなかった。なお各群間の比較はラットの個体差があるため今回行わず、群内の経時的変化のみに注目した。図3と同様の方法で N_1 頂点潜時をプロットしたものを図4に示す。5群(コントロール群)は全期間とも安定しているのに対し、1~4群では2週間目で頂点潜時の短縮、その後潜時の延長を認めた。なお N_1 の頂点潜時においても P_1 と同様各群間の比較は行わなかった。ここで N_1 頂点潜時に関し、各群とも飲水前の N_1 頂点潜時を100%とし、各測定時期で、どの程度増減したかを比較(N_1 頂点潜時比: 図5)してみると、1群(2週間飲水群)では飲水前より2週間目で明らかに短縮し($p < 0.01$)、2群(2週間飲水後、6週間観察群)では2週間目で短縮し($p < 0.01$)、水道水単独にしてから2週間目に潜時が1%エタノール飲水前の値付近に復帰する傾向を示し、その後潜時が安定した($p < 0.05$)。3群(4週間飲水群)では2週間目で短縮した潜時が4週間目に飲水前の潜時に復帰する傾向を示した。4群

(8週間飲水群)では、2週間目に短縮した潜時が4週間目に飲水前の値を超え、8週間目にはさらに延長した($p < 0.01$)。これに対し5群(コントロール群)では潜時の経時的变化の比に有意差は認められなかった。

2) Flash ERG

1群から4群まで5群(コントロール群)と比較し a 波, b 波, および律動様小波とも頂点潜時, 振幅に経時的变化を認めず、また各群とも飲水前の値と比べても明らかな有意差を認めなかった。つまりエタノールは網膜にはERG的に異常を見つけることは出来なかった。

3. 病理組織学的観察結果

以上の結果からERG的には網膜に異常はなく、VEPの N_1 頂点潜時に異常を認められたので、この病変部位を検索するために病理組織学的検索を行った。

1) 網膜

1群, 3群, および4群とも5群(コントロール群)と比べ網膜の神経線維層, 神経細胞層, 内網状層, 内顆粒層, 外網状層, 外顆粒層, 視細胞層, 色素上皮等の各層において明らかな変性は認められなかった。

2) 視神経

光顕切片において、1群(2週間飲水群)は5群(コントロール群)と比較して著変を認めず(図6-1)、また3群(4週間飲水群)は腫脹した有髄線維が目立つが、その変性および脱落は明らかでなかった(図6-2)。しかし4群(8週間飲水群)では、5群(コントロール群)と比べ特に軟膜直下周辺部の有髄神経の脱落が明かとなり、正常の隔壁構造が失われていた(図6-3)。さらにこれを電顕的に観察すると有髄神経はコントロールに比しグリア突起によりしばしば置換され、髓

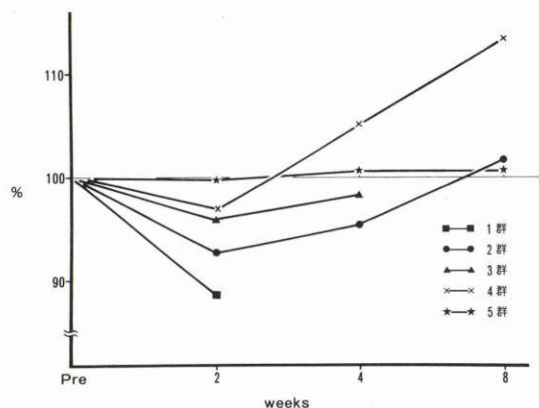


図5 Flash VEP- N_1 頂点潜時比の経時的所見: 各群とも飲水前の潜時を100%とし、各時期での増減を%で示した表。5群(コントロール群)が殆ど変化がないのに比べ、1~4群では2週間目で短縮し、2群は水道水に戻した後、6週間目にエタノール飲水前レベルに復帰していることが分かる。また4群ではエタノール飲水により潜時が延長し続けていることが分かる。

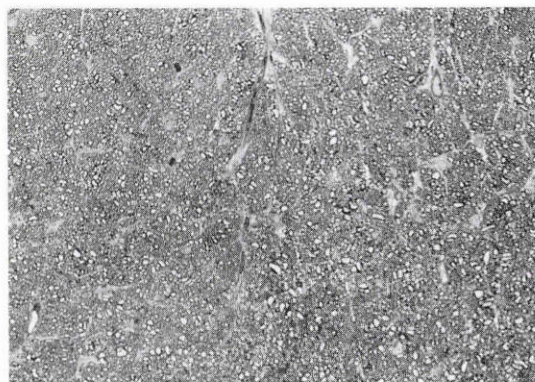


図6-1 2群(2週間飲水群)視神経の光顕写真。特に著変は認めず。トルイジン青染色, $\times 150$

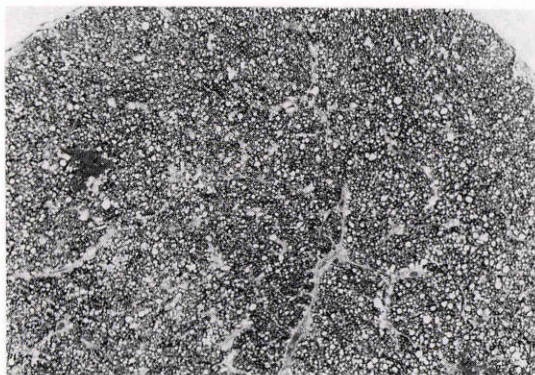


図6-2 3群(4週間飲水群)視神経の光顕写真。腫脹した有髄線維が目立つものの、変性および脱落は明らかでない。トルイジン青染色, $\times 150$



図6-3 4群(8週間飲水群)視神経の光顕写真。有髄神経の脱落が明らかになり、正常の隔壁構造が失われている。トルイジン青染色, $\times 150$

鞘は菲薄化し、一部に萎縮した軸索を認めた(図6-4)。しかし脱髄あるいは再生線維は明らかでなかった。4群では軸索の配列の不整、消失を認め、コントロール群(図6-5)に比べたい視神経線維が少なくなり、細

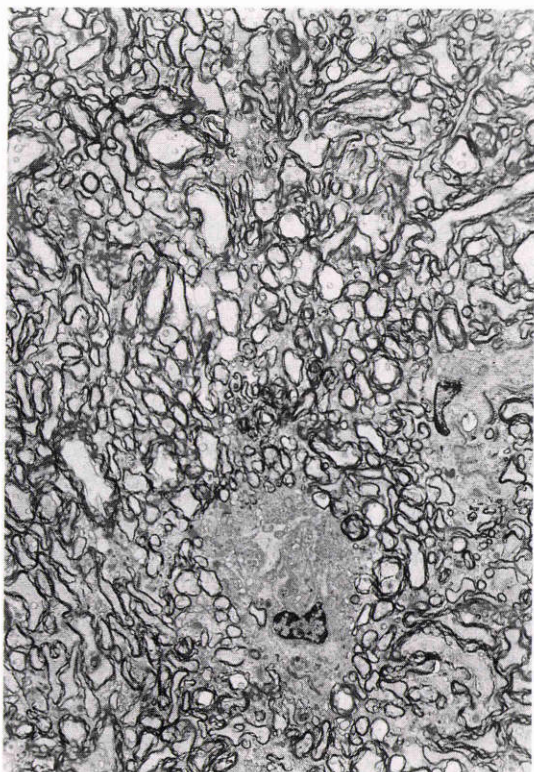


図6-4 4群(8週間飲水群)視神経の電顕写真。髄鞘の配列不整、脱落、グリア組織の増加が認められる。 $\times 2000$

い線維が大部分を占めていた。また、髄鞘も不均一の構造となり、構築の粗造を呈していた。一部には有髄神経線維の髄鞘が崩壊し、間質の結合組織と置換されていた。

IV 考 察

エタノールによる視神経障害は古くから報告され¹⁾、臨床的にはよく知られている疾患で、その成因に関してはビタミンの欠乏がその主たる原因⁷⁾であると考えられてきた。しかし今日では以上の原因以外にアルコール過剰摂取に基づく拒食による栄養障害、ビタミン欠乏またはビタミン代謝障害、さらにエタノール自体による直接障害が原因⁴⁾であると推定されている。タバコ・アルコール弱視のヒトにおいて乳頭黄斑線維の変性を認め、視神経障害を来すとしている報告²⁾や、VEPの潜時の延長が認められたとする報告⁸⁾と、認められなかったとする報告⁹⁾があり、現在においても十分な説明はなされておらず、また過去のアル

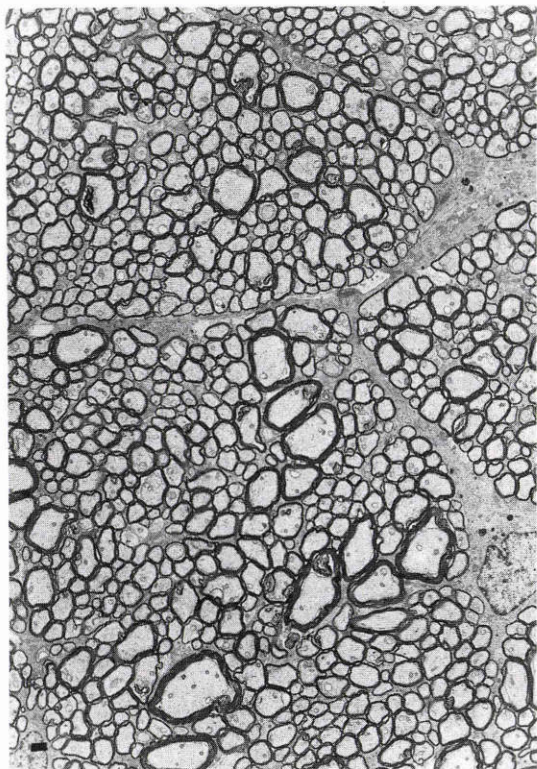


図6-5 5群(コントロール群)視神経の電顕写真。
図6-4と同時期のコントロールである。×2000

コール弱視による視神経症はほとんど臨床報告であり、実験的証明はされていない。

本実験はエタノール濃度を1%の低濃度にし、これを自由飲水させ、さらに飼料も栄養学的に過不足ないよう配慮した上で自由摂食で実験を行った。したがってエタノール摂取によって食欲に何らかの変化が乱れおこってくる欠乏性視神経障害が生ずる可能性はないと考えられる。その結果として、Flash VEPの N_1 頂点潜時において、2週間飲水群では飲水前より2週間目で明らかな短縮($p < 0.01$)を示し、2週間1%エタノール飲水後、水道水単独にし6週間観察した2群では、2週間目で一度短縮し($p < 0.01$)、水道水単独にした後、2週間目に潜時が1%エタノール飲水前の値付近に復帰する傾向を示し、その後潜時が安定した($p < 0.05$)。4週間飲水群では2週間目で短縮した潜時が4週間目に飲水前の潜時に復帰する傾向を示し、さらに8週間飲水群では、2週間目に短縮した潜時が4週間目に飲水前の値を超え、8週間目にさらに延長した($p < 0.01$)。これに対しコントロール群では潜時

の経時的变化の有意差は認められなかった。また、病理組織学的観察では網膜には異常を認めなかったものの、視神経の病理組織学的観察において、2週間飲水群、4週間飲水群において一部軸索の腫大を認めるのみで明瞭な変化が認めなかったが、8週間飲水群において明らかな視神経の組織学的変化を認めた。これらの変化は投与群全例に認められた。以上からVEPにおける N_1 頂点潜時の障害は、視神経の異常から発生したものと考えられた。

エタノール飲水群における2週間目のFlash VEPにおける N_1 頂点潜時は、飲水前の値に比べすべて短縮していた。しかし、この時期に相当する1群(2週間飲水群)における網膜、および視神経の病理組織学的検索結果では、コントロール群と比較しても、明らかな組織学的変化を認めなかった。一方、エタノール8週間飲水群においては、最終的にFlash VEPの N_1 頂点潜時が延長し、網膜の組織学的変化はないものの、光顕、電顕での病理組織学的検索で明瞭なる視神経の組織学的変化を呈していた。このことは、初期におけるエタノールの視覚毒性は、視神経レベルでの機能的な障害であり、形態学的な障害までに至らなかった為と考えられる。この変化は2群の飲水群において、一度短縮した潜時が水道水単独にした後、エタノール飲水前の値付近に復帰した後、その後潜時が安定したことより明らかであると思われる。つまり少量で短期間のエタノール投与は、視覚情報の伝達に促進的に働くことが明らかとなった。

Frisen¹⁰⁾はタバコ・アルコール弱視の初期に網膜の小血管に怒張、蛇行が認められたことより網膜の循環障害発生を報告しているが、今回我々の実験ではエタノール飲水群全てにおいて、電気生理学的検索および病理組織学的検索によっても網膜になら組織障害を認められなかったことより、エタノールによる初期の視覚機能への障害は網膜を除く視神経および、おそらく視神経を含む中枢視覚系の障害が示唆される結果となった。

一方、エタノールによる視覚毒性の長期における障害は、視神経の組織障害が生じてFlash VEPの N_1 頂点潜時の延長をきたしてくるものと考えられる。このことはエタノール8週間飲水群より明らかとなった。

この視神経の組織障害の発生はエタノールによって生じたものと考えられるが、視神経障害の発生には三通りの型が考えられる。一つは網膜側から発生した障害が視神経に達する順行性障害、二つ目は視神経単独

に発生する直接障害、最後が視神経より上位中枢側に発生した障害が視神経に達する逆行性障害である。この三通りの中で、網膜の病理組織学検索、また Flash ERG の結果より本報の視神経障害は順行性変化ではないことだけは推論できるが、今回の実験では視交叉より上位中枢の病理学的検索を行っていない為、直接障害、および逆行性障害の区別は不明であった。

8週間飲水群の視神経障害は、電顕観察結果において、軸索の配列の不整、消失、また髄鞘も構造の不均一、構築の粗造を呈し、一部には有髄神経線維の髄鞘が崩壊し、間質の結合織と置換されていることより、エタノールによる視神経の障害は軸索の変性が最初に始まり、ついで髄鞘に変化をおよぼし間質の結合織に置換されるものであると思われる。さらに興味あることは、8週間飲水群の電顕写真の視神経が全体的に細い線維で占められていることである。宇賀ら¹¹⁾¹²⁾は犬の慢性有機燐中毒の実験において、有機燐による視神経線維の変化が、小径線維よりも大径線維の退行消失を伴うことを報告しているが、今回我々の実験においても、エタノール飲水による視神経線維への変性が大径線維を中心に発症していることより、1%エタノール8週間飲水群の視神経組織障害は、急性変化よりも、慢性変化に近いものと考えられる。

本実験において、ラットの1%エタノール自由飲水および飼料の自由摂食による視神経障害では、2週間ないし3週間が可逆、不可逆の分岐点と思われた。そしてラットにおいて視神経障害が発生するエタノール量は8週間の期間に68.3g/kgが投与されると発症することがわかった。

文 献

- 1) Walsh FB, Hoyt WF: Clinical Neuro-

- ophthalmology. Vol 3, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 2163—2616, 1969.
- 2) Duke-Elder S: System of Ophthalmology. Vol 12, Henry Kimpton, London, 155—159, 1971.
- 3) Baker AB: Clinical Neurology. Vol 4, Harper & Row, Publishers, Philadelphia, 52—57, 1984.
- 4) 石井裕正: アルコール内科学. 東京, 医学書院, 329—340, 1981.
- 5) Sato S, Sugimoto S, Chiba S: An electrophysiological method for detecting visual toxicity in unrestrained rats. J Pharmacol 32: 489—497, 1982.
- 6) 難波龍人: 長期タバコ煙吸入のラット視覚毒性. 日眼 91: 801—806, 1987.
- 7) Grant M: Toxicology of the Eye. Second edition, Charles C Thomas, Publisher, Springfield, 466—472, 1974.
- 8) Krumsiek J, Kruger C, Patzold U: Tobacco alcohol amblyopia neuro-ophthalmological findings and clinical course. Acta Neurol Scand 72: 180—187, 1985.
- 9) Kupersmith MJ, Weiss PA, Carr RE: The visual-evoked potential in tobaccoalcohol and nutritional amblyopia. Am J Ophthalmol 95: 307—314, 1983.
- 10) Frisen L: Fundus changes in acute malnutritional optic neuropathy. Arch Ophthalmol 101: 577—579, 1983.
- 11) 宇賀茂三, 石川 哲, 向野和雄: コンピューター利用による正常及び変性視神経線維の定量的分析. 日眼 80: 1097—1100, 1976.
- 12) Uga S, Ishikawa S, Mukuno K: Histopathological study of canine optic nerve and retina treated by organophosphate pesticide. Invest Ophthalmol Visual Sci 16: 877—881, 1977.