

タバコ喫煙の視覚毒性 (図4, 表1)

奥 英弘・福島 一哉・佐古 博恒 (北里大学病院眼科)
 難波 龍人*・若倉 雅登 (*大阪医科大学眼科)

要 約

ラットを用いタバコ弱視のモデル実験を行った。Wistar 系雄ラット6匹に1日5時間、タバコ15本を副流煙として、52週間にわたり毎日喫煙させ慢性中毒を作成した。視覚誘発脳電位図 (VEP) では N1 P1頂点潜時の有意な延長を認めた。視神経を組織学的に検討したところ、グリアおよび間質の増加を認め、変化の強い1例では神経線維の瀰漫性脱落を認めた。電子顕微鏡観察では瀰漫性に無髄神経線維の増加、髄鞘の菲薄化を認めたが、軸索の変化は少なかった。神経線維の直径に対する数的割合を示すヒストグラムでは、大径線維の割合が減少し神経線維の小型化を認めた。網膜電位図 (ERG) には a 波、b 波の振幅および潜時に変化なく、組織学的にも網膜には変化を認めなかった。また座骨神経にも機能、形態学的に変化を認めなかった。以上より視神経は末梢神経よりタバコ喫煙の毒性を受けやすく、球後視神経での脱髄性変化が主体であると考えられた。(日眼会誌 93:617-624, 1989)

キーワード：タバコ強視, VEP 頂点潜時, 脱髄

Chronic toxicity of tobacco smoke on visual system

Hidehiro Oku, Kazuya Fukushima, Hirotsumi Sako
 Tatsuto Namba, Masato Wakakura

Department of ophthalmology, School of medicine, Kitasato university

Abstract

The chronic toxicity of tobacco smoke on the rats visual system was studied. Six male Wistar rats had been subjected to five hour's daily passive smoking of 15 cigarretes for 52 weeks, in an attempt to produce tobacco amblyopia.

Elongation of the peak latency time of N1 and P1 waves in the visual evoked potential (VEP) was recognized. Histopathologically, some degree of glial proliferation and pyknosis was observed in the optic nerves of all treated rats, and massive disappearance of nerve fibers was seen in one severely affected case. Electron microscopic examination proved that unmyelinated nerve fibers increased in number and, the myelin sheath was thinner than that of the untreated control rats, while axons were relatively well preserved. The distribution in the magnitude of the axon diameter histogram was shifted towards a smaller diameter than that of the control rats. Electroretinography (ERG) did not show any significant changes of the latency and the amplitude of both a- and b- waves, and no histopathological changes were seen in the sensory retina. Neither functional nor histological changes were seen in the schiatic nerves. These results indicated that the optic nerve is thought to be

別刷請求先：569 大阪府高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 奥 英弘
 (平成元年3月17日受付, 平成元年4月24日改訂受理)

Reprint requests to: Hidehiro Oku M.D. Dept. of Ophthalmol., Osaka Medical College
 2-7 Daigaku-machi, Takatsuki 569, Japan

(Received March 17, 1989 and accepted in revised form April 24, 1989)

more vulnerable to tobacco smoke than the peripheral nerves and we consider that a primary change of the nerve is demyelination at the retrobulbar portion of the optic nerve. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 617-624, 1989)

Key words: Tobacco amblyopia, VEP, Peak latency time, Demyelination

I 緒 言

喫煙による視覚毒性はタバコ弱視として古くより知られている。タバコに含まれるシアンがその原因物質として重要視されており、喫煙者では血中シアン濃度が上昇¹⁾している事が知られている。そしてシアンの無毒化に役立つビタミンB₁₂の低下、含硫アミノ酸などイオウ基の欠乏などがシアンの毒性を高め、視神経障害の発症を促進²⁾することが推察されている。シアンはLeber病でも重要視³⁾されており、喫煙はLeber病はじめ原因不明の視神経障害に関与している可能性がある。しかし喫煙による視覚毒性を動物実験により証明した報告は少なく、一酸化炭素、ニコチンの影響や欠乏性視神経症との異同など、その発症機序は依然不明である。

難波は視覚誘発脳電位図(VEP)を用いてタバコ喫煙ラットの視機能を検討し、喫煙32週でVEP頂点潜時の不可逆的延長を報告⁴⁾した。また豊永らもVEP潜時延長を報告し、視神経の脱髄性変化を考察⁵⁾している。今回喫煙期間を52週間(約1年)とし、タバコ煙に対する慢性中毒を作成し、VEPによりその視機能障害を再検する一方、組織学的にも視神経にグリアおよび間質の増加、髄鞘の菲薄化、無髄神経線維の増加、神経線維の小径化を認めた。また変化の強い例では神経線維の瀰漫性脱落を認め、器質的にも障害を認めたので報告する。

II 実験対象と方法

実験動物として、Wistar系雄ラット6匹を用い、9週齢、平均体重200gより喫煙を開始した。なお同数の6匹を対照とした。視機能検査としてbright flash ERGおよびflash VEPを用いた。タバコ喫煙方法、条件およびERG、VEPの測定は全て既報の方法⁴⁾に従い、VEPは針電極にて後頭結節より前10mmに関電極、18mmに接地電極、両耳介に不関電極をおき1Jキセノンランプで刺激し、3秒間隔で32回加算した。

組織学的検査

喫煙開始後52週の時点で、ネブタール麻酔下にて

左心室より1%パラホルムアルデヒドと1.25%グルタールアルデヒドを含む液で灌流固定した。なおその直前にビタミンB₁₂、シアン、一酸化炭素の各血中濃度測定のため心臓採血を行った。摘出した組織は0.1%カゴジレイト緩衝液で洗浄し、1%四酸化オスミウスにて後固定した。エタノール系列で脱水後、エポキシ樹脂包埋し、トルイジンブルー染色にて光学顕微鏡にて観察した。超薄切片は酢酸ウラニウム、クエン酸鉛にて二重染色し電子顕微鏡にて観察した。神経線維直径に対する神経線維の数的割合を示すヒストグラム作成のため、球後3mmの部分での視神経横断面中央部の光学顕微鏡写真を最終拡大率6,400倍に拡大し、神経線維1,000本以上(対照ラット1,098本、喫煙ラット1,125本)につきその軸索の直径を測定した。神経線維が斜めに切れている可能性があるため、短径をもって直径とした。

生化学的検査

ビタミンB₁₂はヘパリン採血後遠心分離にて、赤血球、血清を分離し、それぞれにつきKCN添加グルタミン酸緩衝液を加え熱湯加熱にて、シアノコバラミンの形で抽出し、⁵⁷Coを用いたradioimmunoassay⁶⁾にて測定した。

シアンはヘパリン採血した全血を10%硫酸中に入れHCNの形で気化させ、0.1%水酸化ナトリウムにて捕捉しピリジンピラゾロン法⁷⁾にて測定した。

一酸化炭素ヘモグロビン(COHb)の百分率は、1mm幅のセルを用い分光光度計(Hitachi spectrophotometer 124)にて波長413.1, 421.0, 430.7nmの各々の吸光度を求め測定^{8,9)}した。なお本論文での検定は全てStudent t testを用いた。

III 結 果

1. 体重変化

図1に体重の変化を示す。体重の増加は喫煙群で明らかに不良で、26週喫煙時の体重は、喫煙群では282.5±13.0gで対照群401.1±14.9gに比べ有意に低値であった(p<0.01)。

2. VEP

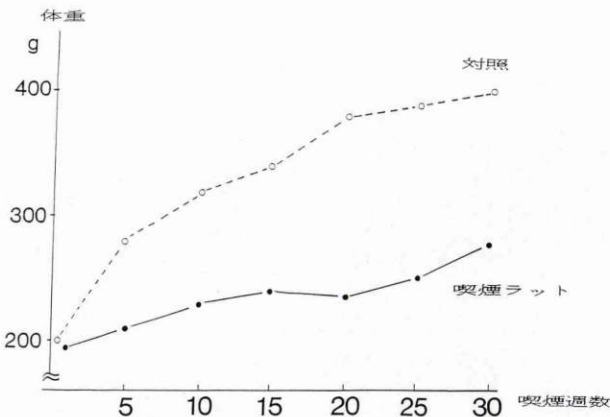


図1 喫煙群および対照群の体重曲線。喫煙群は明らかに体重増加が不良である。

表1 生化学的諸検査の結果。血中シアン、COHbの上昇を認め、ビタミンB12は赤血球レベルで減少していた。

	喫煙群	対 照
シアン $\mu\text{g/ml}$	0.2	検出されず
COHb %	5.04 ± 1.25	検出されず
VB12 (血清) pg/ml	$773 \pm 116^*$	855 ± 159
VB12 (赤血球) pg/ml	$158 \pm 14.6^{**}$	284 ± 25.5

VB12: ビタミンB12

* : $p > 0.05$

** : $p < 0.01$

約100msecに認められた陰性波をN1, 約150msecの陽性波をP1とし、頂点潜時の変化を検討すると6週以降P1潜時は有意に延長し($p < 0.05$), 52週喫煙時の頂点潜時は喫煙群でN1 $137.9 \pm 5.1\text{msec}$, P1 $215.3 \pm 12.0\text{msec}$ となり、対照群のそれぞれ 103.0 ± 10.6 , $149.8 \pm 17.7\text{msec}$ に比べ有意に延長していた ($p < 0.01$). 振幅については喫煙後1から2週頃で増大する傾向を認め52週喫煙時には低振幅となっていた。

3. ERG

a波, b波の振幅, 潜時には変化を認めなかった。

4. 生化学的検査

生化学的諸検査の結果を表1に示す。血中シアンはタバコ吸入群で $0.2\mu\text{g/ml}$ と対照に比べ上昇していた。ビタミンB₁₂は血清レベルでは有意差なく、赤血球レベルにおいて有意に低下していた ($p < 0.01$). また一酸化炭素ヘモグロビンは喫煙前のレベルで約5%と上昇していた。

5. 組織学的検査

図2に視神経の光学的顕微鏡, 図3に電子顕微鏡写

真をしめす。

1) 対照群の視神経

対照群のラット視神経は、星状膠細胞の突起でおおまかに仕切られた小線維束からなっていた(図2a, c)。電子顕微鏡による観察にて、神経維束は淡明な細胞質中にミトコンドリア, neurofilaments, neurotubulesなどを含み、そのほとんど全てが有髄神経であり、比較的厚い髄鞘によって包まれていた(図3a)。各線維間や線維束周辺には星状膠細胞の胞体と希突起膠細胞が散見された。

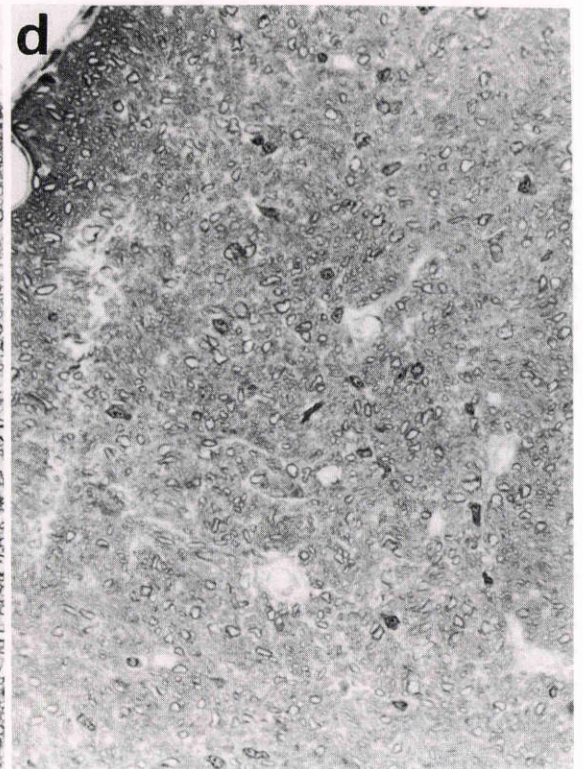
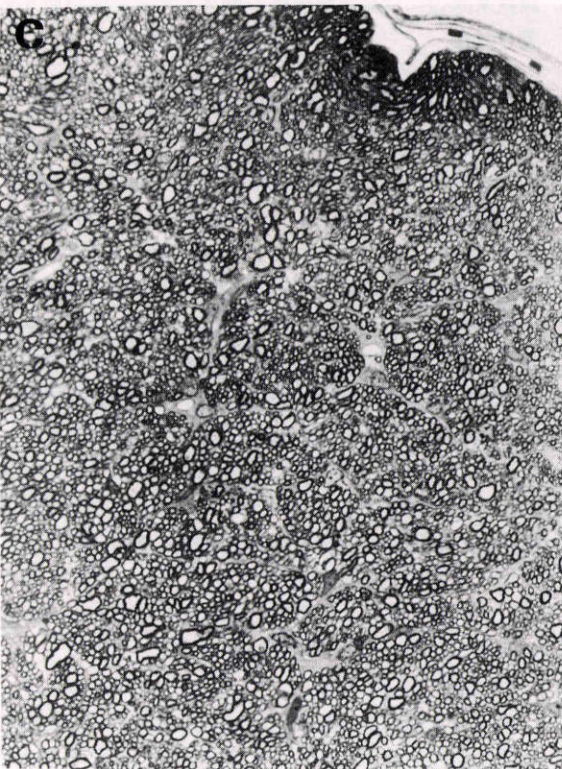
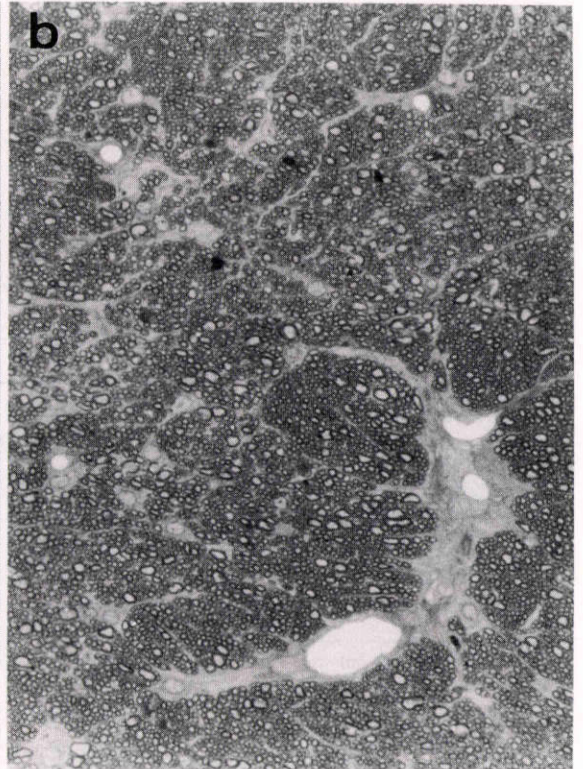
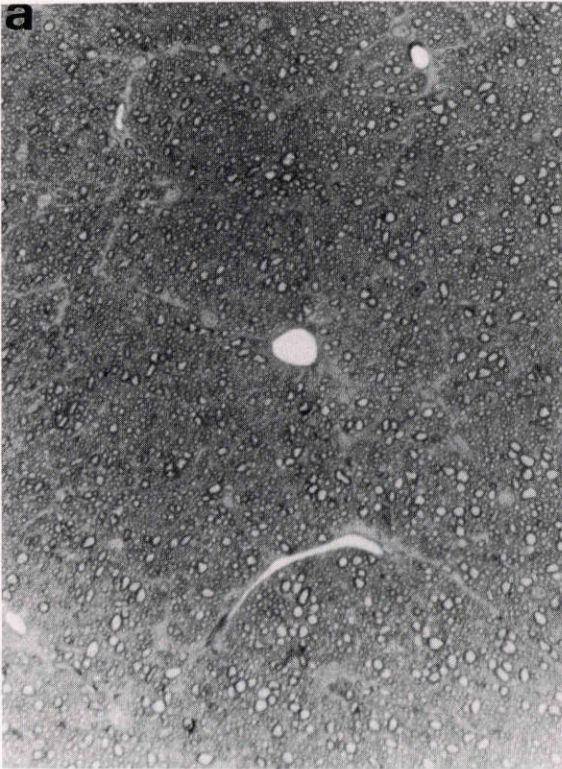
2) 喫煙群の視神経

タバコ喫煙群の視神経では、対照群のものに比べ、間質は血管周囲をはじめ増加しており、またグリア細胞の増殖を認めた。グリア細胞は多くの突起を出し、神経線維の間を分け入るよにのびていた(図2b)。電顕所見では、髄鞘はいたるところで菲薄化しており、中にはそれらが崩壊して渦巻状構造物を形成しているのがみられ、また髄鞘を持たない裸の神経線維も散見された。しかし、変性線維を貪食細胞が取り込む所見は認められなかった。軸索の変化は一般に乏しく、neurofilamentsやneurotubulesは比較的保存されていたが、局所的には軸索にも変性がおよんでいた(図3b)。また生理学的に変化の著しい1匹においては、神経線維の瀰漫性脱落が明らかに認められた(図2d)。

図4に神経線維の直径に対するヒストグラムを示す。図に示すように喫煙群では大径線維の割合が減少し、全体に神経線維が小型化していた。

3) 網膜, 座骨神経

網膜には網膜神経節細胞の減少を認めず、組織学的に著変を認めなかった。また座骨神経にも対照と比べ



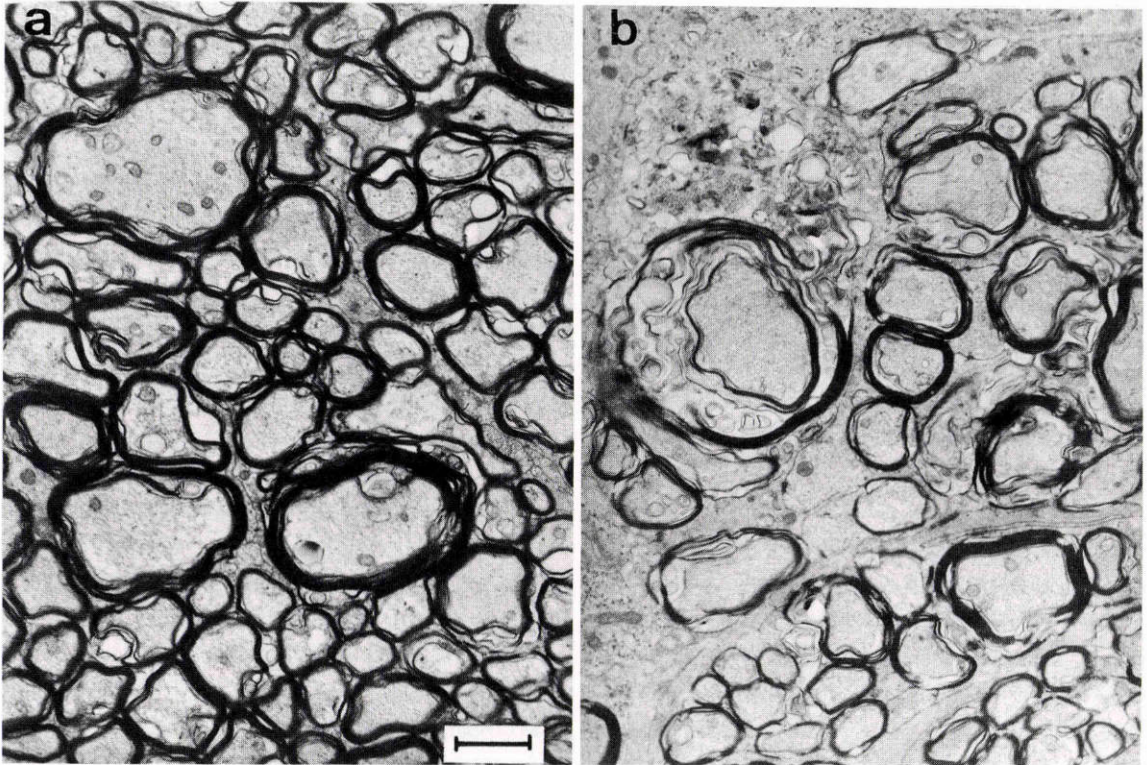


図3 視神経の電顕写真。a) 対照, b) 喫煙ラット。喫煙ラットでは髄鞘の非薄化を認め髄鞘を持たない線維が相対的に増え間質が増大している。軸索の変化は比較的程度であるが、なかには変性におちいった軸索を認める。(—: 0.5 μ m)

著明な変化は認められなかった。

IV 考 査

52週間(約1年)にわたる実験期間において、途中死亡例は認めなかった。またCOHbも当日喫煙前のレベルで約5%であり、ヒトのheavy smokerが8%程度のCOHb値を示す場合がある事¹⁰⁾を考えると、喫煙条件はヒトの場合とかけはなれておらず、本実験はヒトのタバコ弱視のモデル実験として適当であったと考えられる。

生理学的には既報の報告⁴⁾⁵⁾と同じく、VEPにて潜

時の延長を認めた。本実験でのVEP測定方法では、頭蓋骨の厚さなどで振幅が変化する事が考えられるが、長期間の喫煙にて振幅は小さくなり、52週喫煙時には明らかに低振幅となっていた。一方ERGは変化を認めず障害部位としては、神経節細胞、視神経から視中枢にかけてが考えられた。また喫煙初期には振幅が増大する傾向を認め、タバコ煙に含まれるニコチンなどの薬理作用による刺激ではないかと思われた。

切片作成の場所により、視神経中のグリアおよび間質の形態は異なる¹¹⁾ことが知られており、眼窩内視神経では、視交叉部分に比べ間質およびグリアが多く、

図2 視神経の光学顕微鏡写真。トルイジンブルー染色 $\times 400$ 。a) 対照, b) 喫煙ラットの視神経横断切片中央部。ともに中心血管を認めほぼ同じレベル。喫煙ラットの視神経では、グリアの増加を認め、その突起は神経線維の間に分け入る様に伸び、血管周囲の間質は著しく肥厚している。c) 対照, d) 変化の著しかった喫煙ラットの視神経横断切片周辺部。d)では軟膜付近の染色性は比較的良好だが、中心部は全体に染色性が低下しており、小線維束の区別も定かでなく、神経線維の脱落を認める。

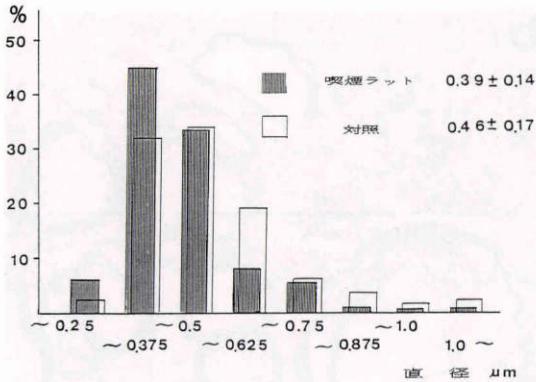


図4 軸索直径に対する神経線維の度数分布. 喫煙群では大径線維の割合が減り, 神経線維の小径化を認めた.

グリアは突起に富み胞体自身も大きいとされている. 従って組織学的に視神経を検討する場合, 視神経の同じ部分で切片を作成し, 比較検討する必要があると思われる. 我々は球後約3mmの眼窩内視神経の部分で比較検討し, さらに同部分で中心血管を認める切片の中央部を用いてヒストグラムを作成した.

ヒトのタバコ弱視の視神経所見では, 乳頭黄斑線維に一致して脱髄を認めるが, 組織反応は非常に乏しく, 貪食細胞の浸潤は非常に少ない¹²⁾とされている. ラットの場合黄斑を欠くため, ヒトの様な中心視野に一致する部位の選択的な障害は見られなかったが, 喫煙群視神経にはグリアおよび間質の増加, グリアの多突起化を認めた. またヒトの臨床例同様に, 感染や免疫が関与した脱髄性視神経炎で見られるような, マクロファージの遊走, 貪食などの組織反応は認められなかった. ラットの視神経線維は全て有髄神経であるとの報告¹³⁾があり, 我々の標本でも対照群の視神経線維は全て有髄線維であり, ごく少数認められた無髄神経線維は, ランビエ紋輪の部分で偶然切られた線維であると考えられた. 従って喫煙群で認められた髄鞘の菲薄化や無髄神経線維の増加はVEP潜時の延長をともなっていた事からも, 脱髄によるものと考えられた. これら髄鞘の変化は瀰漫性に認められたが, 軸索の変化は局在しており, 変化の主体は髄鞘であると考えられた. 変化の著しかった例では神経線維の瀰漫性脱落も認められ, このような組織変化はVEPの潜時延長および低振幅化という生理学的検査所見の主要な原因と思われた. しかし網膜にはERGに著変なく, また網膜神経節細胞にも形態学的に変化を認めず, 球後視神経にpri-

maryの障害が生じている可能性が強い. 一方座骨神経には神経伝導速度の低下を認めず⁴⁾, また組織学的にも変化を認めなかった. 従って喫煙に対しては末梢神経よりも, 視神経の方が障害されやすいと考えられた.

犬を用いた慢性有機燐中毒実験では視神経において間質, グリアの増加, 神経線維髄鞘の菲薄化, 神経線維の減少などの変化が認められる一方, 貪食細胞による変性線維の取り込みなどの組織反応は認められず, また網膜には神経節細胞の減少などの変化は認められなかったと報告されている^{14)~16)}. これらの変化は本実験の視神経所見と一致する点が多く, 興味深い. また有機燐の投与量5mg/kg/dayでは大径線維の消失を認め, さらに10mg/kg/dayに投与量を増やした場合, 小径線維の変性減少をきたし神経線維は対照の約半数に減少していた¹⁵⁾¹⁶⁾とされており, 本実験で大径線維の減少を認めたことは, 喫煙52週でも視神経は変性の過程にある事を意味する可能性が強い.

Leber病における視神経障害の要因としてシアンの先天性代謝異常が考えられている³⁾. すなわちLeber病の喫煙者は一般の喫煙者に比べ血液および尿中のチオシアン量が減少しており, 喫煙その他で体内に入った有毒なシアンを, 無毒なチオシアンに転換させる酵素欠損の存在が推察されている³⁾. またLeber病喫煙者ではビタミンB₁₂の内, シアノコバラミンの割合が増加しており¹⁷⁾, 一方正常人においては血中ビタミンB₁₂レベルと, シアンおよびチオシアン量は逆相関関係にある事が知られている¹⁷⁾. この事はビタミンB₁₂がシアンと密接な関係にある事を示し, シアンをシアノコバラミンの形で無毒化している可能性が示唆される²⁾¹⁷⁾. タバコ弱視においてもLeber病同様にタバコ煙中のシアンによる視神経障害が推察され²⁾, またその発症にはシアンを解毒するのに必要な含硫アミノ酸やビタミンB₁₂の欠乏の関与が考えられている²⁾. 本実験においても喫煙群において血中シアンの上昇を認め, またビタミンB₁₂も赤血球レベルで低下しており, シアン障害説の一端を支持する結果となっている. 視神経は組織学的には中枢神経系の構造をもち, 髄鞘は希突起膠細胞により作られる¹⁸⁾. 喫煙に際しては上記のごとくビタミンB₁₂の欠乏¹⁹⁾や, シアン化合物の体内吸引が生じ²⁰⁾, さらに高濃度の一酸化炭素に暴露される⁴⁾¹⁰⁾. ビタミンB₁₂はミエリンタンパクやレシチンの生合成に関して髄鞘形成に重要な役割を持つ²¹⁾. またシアンはミトコンドリアのチトクロームオキシデー

スを阻害²²⁾し、一酸化炭素とともに組織内呼吸を阻害する²²⁾。またシアンや一酸化炭素により大脳の希突起膠細胞の障害から脱髄をきたす事が知られている²²⁾²³⁾。従って本実験で見られた組織学的変化は、喫煙により髄鞘を維持するのに必要なタンパクや脂質の合成障害から脱髄をきたし、星状膠細胞や間質の増加が起こり、さらに進行すると軸索変性から神経線維の脱落が生じたのではないかと思われた。外側膝状体や大脳視中枢に対する組織学的検討ができていないので不明であるが、外側膝状体へ視神経から上行性に変性がおよんでいたり、またシアンや一酸化炭素などで大脳視中枢、大脳白質などに視神経病変とは独立して、あるいは primary に障害が生じている事も充分考えられ、それらが VEP の頂点潜時延長や低振幅化に寄与している可能性もある。今後それらに対し組織学的に検討を加える必要があると思われる。

以上のようにタバコ喫煙単独で、食餌、飲水を制限することなく、生理学的、形態学的に視神経障害を作成できた。ヒトにおいても heavy smoker には低栄養状態がしばしば見られ、さらにビタミン B 群の投与や栄養状態の改善で視機能の回復を認める²⁴⁾場合があり、タバコ弱視を欠乏性視神経症と同一視する考えがある^{24)~26)}。しかしヒトの臨床例では、アルコールの影響や食事の摂取状態など異なる要素が多く、低栄養状態が喫煙による二次的なものかどうかは明らかにされていない。今回食餌を制限することなく発育不良を認め、ビタミン B₁₂ の赤血球内レベルが低下していた事は極めて興味深く、喫煙そのものが栄養素の吸収障害あるいは代謝系の変化をきたしうると考えられた。またビタミン B₁₂ は血清レベルで対照と差がなく、赤血球内レベルで低下していたことは、ビタミン B₁₂ の組織内への取り込み障害を示唆する可能性もあると考えられた。現在ビタミン B₁₂ 欠乏食で飼育したラットの視機能につき検討中であり、またシアン、一酸化炭素、ニコチンなどの単独毒性についても検討を加える予定である。

稿を終えるにつき石川 哲主任教授、宮田幹夫教授の御指導、御校閲に感謝いたします。また実験に御協力いただいた故三好隆博先生に深謝し御冥福をお祈りいたします。

文 献

- 1) Darby PW, Wilson J: Cyanide smoking and tobacco amblyopia: Observation on the cyanide content of tobacco smoke. Br J Ophthalmol 51: 336-338, 1967.
- 2) Foulds WS, Chisholm IA, Pettigrew AR: The toxic optic neuropathies. Br J Ophthalmol 58: 386-390, 1974.
- 3) Wilson J: Leber's hereditary optic atrophy: A possible defect of cyanide metabolism. Clin Sci 29: 505-515, 1965.
- 4) 難波龍人: 長期タバコ喫煙のラット視覚毒性. 日眼 91: 801-806, 1987.
- 5) 豊永直人, 安達恵美子, エリーゼ中内他: タバコ煙暴露の視覚に対する影響. あたらしい眼科 4: 669-672, 1987.
- 6) Wide L, Killander A: A radiosorbent technique for the assay of serum vitamin B12. Scand J Clin Lab Invest 27: 150-159, 1971.
- 7) 菅野三郎: ビリジンピラゾロン法. 大気汚染研究協議会編: 大気汚染ハンドブック (1), (測定法), 東京, コロナ社, 205-206, 1975.
- 8) Small KA, Radford EP, Frazier JM, et al: A rapid method for simultaneous measurement of carboxy- and methemoglobin in blood. J Applied Physiology 31(1): 154-160, 1971.
- 9) 室屋英幸, 窪田為延, 北 博正他: 分光光計計による一酸化炭素ヘモグロビンの迅速測定法. 日衛誌 29(1): 103, 1974.
- 10) Spencer PS, Schaumburg HH: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 373-394, 1981.
- 11) Lessell S: The histology and histochemistry of the rat's optic nerve and chiasm. Am J Ophthalmol 84: 681-688, 1977.
- 12) Duke-Elder: System of Ophthalmology, Vol XIV: 145-155, Henry Kimpton, London, 1972.
- 13) Fukuda Y, Sugimoto T, Shirokawa T: Strain differences in quantitative analysis of the rat optic nerve. Exp Neurol 75: 525-532, 1982.
- 14) 向野和雄, 石川 哲, 宇賀茂三: 慢性有機燐中毒—その視神経, 末梢神経障害について. 眼臨 69: 969-971, 1975.
- 15) 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の定量的分析. 日眼 80: 1097-1100, 1976.
- 16) Uga S, Ishikawa S, Mukuno K: Histopathological study of canine optic nerve and retina treated by organophosphate pesticide. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 877-881, 1977.
- 17) 亀山正邦: 神経系疾患におけるシアン代謝—とくに ALS におけるシアン代謝障害について—。臨床神経 20: 999-1007, 1980.
- 18) 水野勝武: 視神経の生化学. 松崎 浩, 編, 眼科 Mook, 30, 視神経とその疾患. 東京, 金原出版, 39-52, 1986.
- 19) Foulds WS, Chisholm IA, Bronte-Stewart J, et al: Vitamin B12 absorption in tobacco

- amblyopia. *Brit J Ophthalmol* 53: 393-397, 1969.
- 20) **Jestico JV, Rylance GW, Taylor AW, et al:** Whole blood cyanide levels in patients with tobacco amblyopia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47: 573-578, 1984.
- 21) 田中信夫, 鈴木英史, 佐野茂顕他: ビタミン B12 と末梢神経障害. *臨床成人病* 14: 41-49, 1984.
- 22) **Spencer PS, Schaumburg HH:** Experimental and Clinical Neurotoxicology. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 250-253, 1981.
- 23) **Lessel S:** Experimental cyanide optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 86: 194-204, 1971.
- 24) **Carol FD:** The etiology and treatment of tobacco-alcohol amblyopia. *Am J Ophthalmol* 27: 847-863, 1944.
- 25) 根本 昭, 本田孔士: 欠乏性視神経症とその関連疾患. 松崎 浩編: 眼科 Mook, 30, 視神経とその疾患. 東京, 金原出版, 171-180, 1986.
- 26) **Victor M:** Tobacco-alcohol amblyopia. *Arch Ophthalmol* 70: 313-318, 1963.
-