

# 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎における 網膜組織障害と過酸化脂質

後藤 浩

東京医科大学眼科学教室

## 要 約

網膜S抗原により惹起されるLewisラットの自己免疫性ぶどう膜網膜炎の動物モデルを用い、発症後各病期における病理組織学的検索と、組織内浸潤多核白血球(PMNs)の量的マーカーとして知られるMyeloperoxidaseの定量を試みた。同時に網膜過酸化脂質の測定を行った。その結果、過酸化脂質の発生は、PMNsの浸潤を中心としたぶどう膜網膜炎の進行及び組織障害と密接な関係があることが明らかとなった。このことは眼内炎症における網膜組織障害の一因として考えられている過酸化脂質の発生が、活性化したPMNsから生じるフリーラジカル(活性酸素)によって引き起こされるという説を裏づけるものかもしれない。また、眼内に生じた過酸化脂質が組織に与える障害を確認するために、網膜内、特に視細胞に豊富に存在すると言われる高級不飽和脂肪酸、docosahexaenoic acid(22:6)の酸化物を硝子体内に注入し、網膜に対する障害を組織学的に明らかにした。(日眼会誌 95:455-461, 1991)

キーワード：実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎、網膜組織障害、過酸化脂質、多核白血球

## Retinal Tissue Damage and Lipid Peroxidation in Experimental Autoimmune Uveoretinitis

Hiroshi Goto

*Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College*

### Abstract

Retinal lipid peroxidation products were measured at various stages of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced in Lewis rats by retinal S-antigen. Histopathologic examination and measurement of myeloperoxidase, which is a quantitative marker of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in tissue, were also performed. The results showed that lipid peroxidation is closely implicated in the progression of uveoretinitis, and is related to the cellular infiltrate, which consisted primarily of PMNs, and to the retinal tissue damage. These findings may support the theory that oxygen-free radicals liberated from activated PMNs play a role in retinal tissue damage via peroxidation of membrane lipids. To ascertain the tissue damage caused by the lipid peroxidation products generated in the eye, intravitreal injection of an oxidized docosahexaenoic acid, a major polyunsaturated fatty acid in the photoreceptors of the retina, was performed and its toxicity in the retina was proved histologically. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95:455-461, 1991)

**Key words:** Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), Retinal tissue damage, Lipid peroxidation, Polymorphonuclear leukocyte

別刷請求先：160 新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学眼科学教室 後藤 浩

(平成2年8月31日受付, 平成2年10月12日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Goto, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College.

6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku 160, Japan

(Received August 31, 1990 and accepted in revised form October 12, 1990)

## I 緒言

眼疾患と活性酸素（フリーラジカル）及び過酸化脂質の関わりは以前より指摘されており、殊に白内障やある種の網膜疾患の発症機序に関して精力的な研究が行われてきている<sup>1)2)</sup>。フリーラジカルによる組織障害の一因は細胞膜脂質の過酸化によるという根拠<sup>3)~4)</sup>のもとに網膜疾患がしばしばこの分野における研究の対象となる背景には、1. 脊椎動物の視細胞桿体には、高級不飽和脂肪酸が生体の他のどの組織よりも豊富に存在する<sup>5)</sup>為に様々な因子が引き金となって過酸化反応が起こり易い状態にあり、2. 視細胞内節には多数のミトコンドリアが存在し、酸素代謝が活発で、しかも隣接する脈絡膜や網膜血管から豊富な酸素の供給が得られること<sup>6)</sup>などが挙げられる。一方、炎症局所に現われる食細胞、即ちマクロファージ、多核白血球（PMN）にはフリーラジカル産生能があることが知られ<sup>7)</sup>、眼内炎症においてもこのラジカルが網膜に及ぼす影響は容易に想像がつくが、炎症と網膜組織障害、殊に過酸化脂質について言及した研究は数少ない。

本研究では、Lewis ラットを用いた実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎（experimental autoimmune uveoretinitis, 以下 EAU）における網膜組織障害の経過を、浸潤多核白血球の量的マーカーである Myeloperoxidase の動向とともに病理組織学的に検索し、各ステージにおける過酸化脂質の定量を試みた。また、眼内に生じた網膜由来の過酸化脂質が正常網膜に与える影響を確認するために、網膜、特に視細胞外節に豊富に存在し、主要な脂肪酸である docosahexaenoic acid<sup>8)</sup>を酸化した状態で硝子体内に注入し、その影響を組織学的に検討した。

## II 実験方法

### 1. EAU における網膜組織障害と過酸化脂質

高野<sup>9)</sup>の方法に準じウシ網膜より得られた網膜可溶性抗原（以下 S 抗原）50 $\mu$ g/0.05ml を等量の Freund 完全アジュバントとともに生後約 1 カ月の Lewis ラットの片足臍部に接種した。同時に百日咳菌（pertussis toxin）1 $\mu$ g/0.3ml の静注を施行した。抗原接種後は経時的に眼炎症の観察を行った。

#### 1) 病理組織学的検索

S 抗原接種後 7 日、9 日、12 日、15 日、及び 18 日にラット眼球を摘出し、10%ホルマリンにて固定後、ヘマトキシリン-エオジン（H&E）染色を行い、光学顕微鏡に

て観察した。

#### 2) Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

EAU を生じた両眼球を経時的に摘出、輪部後方に切開を加え、水晶体ならびに硝子体を含む前眼部と後眼部に分け、後者より網膜を採取し、Bradley<sup>10)</sup>らの方法に従って MPO 活性を測定した。また、MPO 活性と浸潤多核白血球数の相関関係を調べるため、グリコーゲンの腹腔内注射によって得られたラット多核白血球<sup>11)</sup>をそれぞれ適当な数に調整し、その各々について MPO 活性を測定した。更に、EAU 眼における MPO 活性の局在を確認するために、4-chloro-1-naphthol と過酸化水素による迅速染色法<sup>12)</sup>を OCT compound に包埋された S 抗原接種後 12 日目の EAU 眼の凍結標本を用いて行った。

#### 3) 過酸化脂質の測定

i) Conjugated diene<sup>13)</sup>: 2) と同様にして網膜を採取後、Folch らの方法<sup>14)</sup>に準じて脂質を抽出した。即ち 0.05% の butylated hydroxy toluene (BHT) を含む 20 倍容量のクロロホルム/メタノール (2:1) にて網膜をホモジナイズした後、0.2 倍容量の蒸留水を加え十分に振盪し、更に 3,000rpm にて 15 分間遠心した。2 層に分離した試料の下層を集め、これを窒素ガス下に蒸発させ、最終的に得られた脂質を 1ml のエタノールで溶解し、波長 235nm における吸光度を conjugated diene 量として表した。

ii) Malondialdehyde (MDA) -TBA 反応<sup>15)</sup>: 得られた網膜を、10 倍容量の 1.15% KCl 溶液でホモジナイズした。1% リン酸 3ml 及び 0.67% チオバルビタール酸 (TBA) 1ml を加え振盪後、95°C の水槽内で加熱した。45 分後に試料を取り出し冷却後、4ml の n-ブタノールを加え激しく振盪し、3,000rpm にて 15 分間遠心した。ブタノール層（上層）を取り、535nm と 600nm における吸光度の差を測定値とした。

#### 2. 過酸化脂質の硝子体内注入

ラット片眼硝子体内に、酸化させた Methyl docosahexaenoate 10mg/ml を 10 $\mu$ l を、30G 針を用いて注入した。30G 針に接続したツベルクリン針を用いて注入した。希釈はリン酸緩衝液にて行ない、超音波で処理した。他眼には同濃度で未酸化のものを注入した。Docosahexaenoate の酸化は室温、遮蔽下で 72 時間空気にさらすことにより行われた。酸化による脂肪酸 hydroperoxide が生じたことを確認する為に薄層クロマトグラフィーを、石油エーテル: ジエチルエーテル: 酢酸 (70:30:1) の溶媒下で行った。24 時間後

に眼球を摘出し、組織学的検索を行った。

### III 結 果

#### 1. EAU と過酸化脂質

##### 1) EAU の時間経過に伴う病理組織学的変化

S抗原接種後7日目まではいかなる炎症所見も見られなかった。その後の典型的な経過は以下の通りであった。まず9日目に網膜外顆粒層の滲出性変化と炎症細胞の網膜浅層への浸潤がみられ、同時にごくわずかな多核白血球の浸潤が視細胞層に認められた(図1)。12日までに多核白血球を主体とした細胞浸潤は網

膜全層に拡がり、視細胞は破壊され、出血やより多くの滲出性変化が認められた(図2)。15日目になると網膜層構造の破壊、壊死はさらに進行しているものの、浸潤細胞の数はやや減少傾向を示し(図3)、18日目には外顆粒層も完全に崩壊、消失し、多核白血球もごく少数が散見されるにとどまり、脈絡膜を中心とした肉芽腫性の変化が認められた(図4)。

##### 2) MPO 活性

迅速染色法により、MPO陽性細胞が網膜から脈絡膜にわたって確認された(図5)。これらの細胞は図2で得られた所見から、主に多核白血球に一致するもの

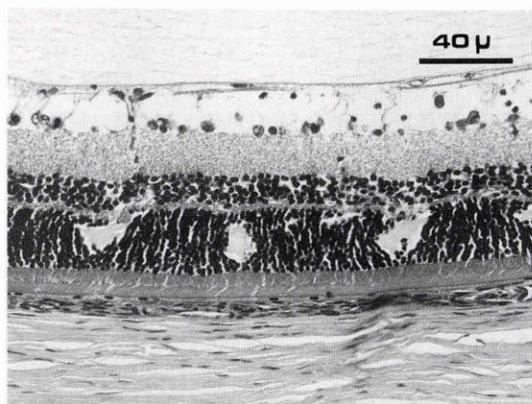


図1 S抗原接種後9日目、EAU発症日、網膜内に多核白血球、マクロファージ及びわずかなリンパ球の浸潤を認め、外顆粒層には限局性の滲出性変化が観察される。視細胞は比較的良好に保たれている。(H&E染色、×525)

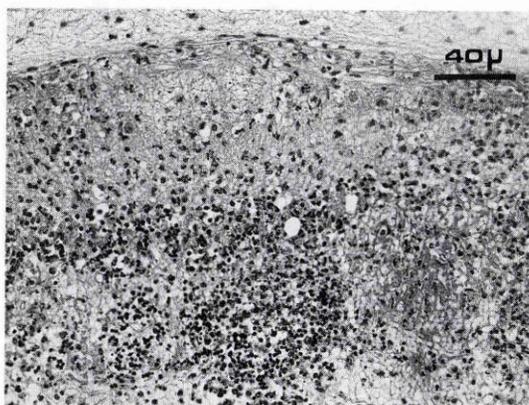


図3 接種後15日目。外顆粒層を含めた網膜層構造の破壊、壊死は更に進行しているが、浸潤炎症細胞の数は12日目に比べ減少している。(H&E染色、×450)

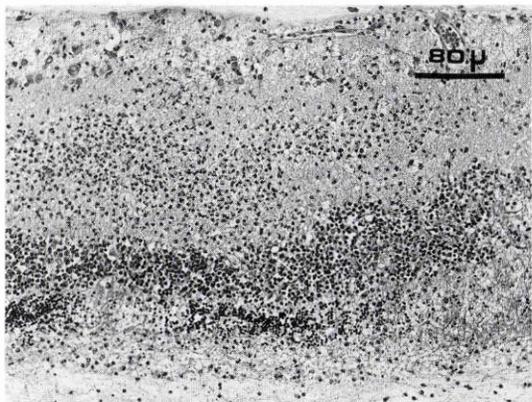


図2 接種後12日目。網膜内外層にわたり多核白血球を中心とする炎症細胞が無数に拡がって、視細胞は変性、崩壊している。(H&E染色、×250)

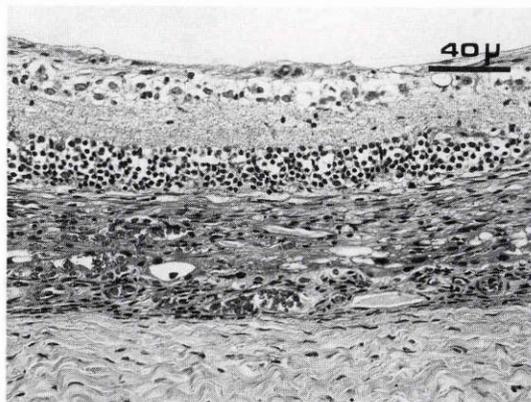


図4 接種後18日目。炎症細胞は明らかに減少し、網膜外層は萎縮、消失している。脈絡膜には肉芽腫の形成が認められる。(H&E染色、×450)

と思われた。図6に示すようにラット腹腔内より得られたPMNの数とMPO活性の間には直線的な相関関係が得られた。対象正常ラット網膜からMPO活性は検出されず、EAUラットではS抗原接種後9日目より明らかな活性の上昇がみられ、12日目には一気に高値を示し、以後15日、18日目と次第に低下していった(図7)。

3) 過酸化脂質

i) Conjugated diene (図8A): Controlにおける吸

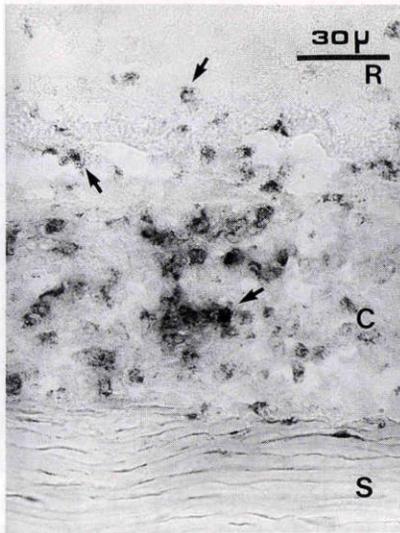


図5 EAU眼に浸潤したMPO陽性細胞(矢印)。網膜、脈絡膜にみられるこれらの細胞は主に多核白血球に一致する。(×700) R:網膜, C:脈絡膜, S:強膜

光度は網膜から抽出された脂質の末端吸収によるものである。7日目には有意な変化がみられないものの、炎症初期の9日目には明らかに高値となり、12日目には

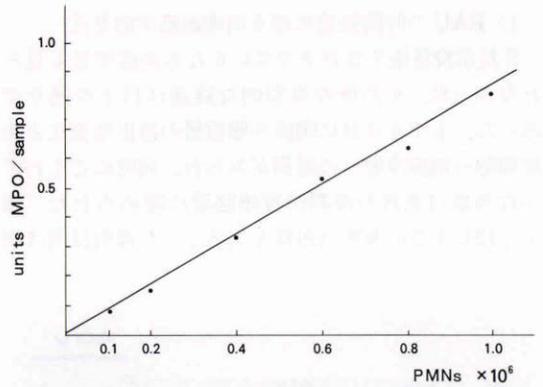


図6 多核白血球数とMPO活性との関係。相関係数: 0.996

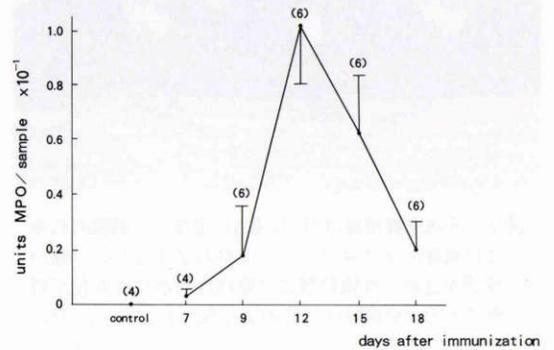


図7 MPO活性の動向

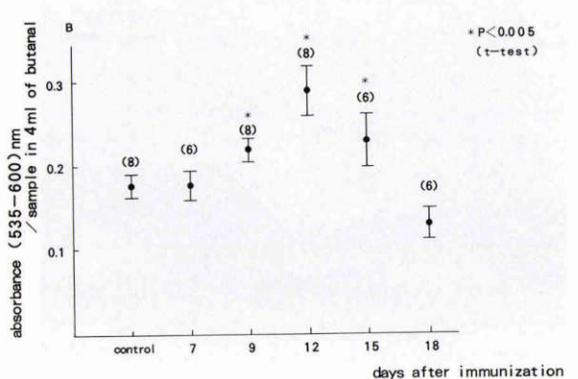
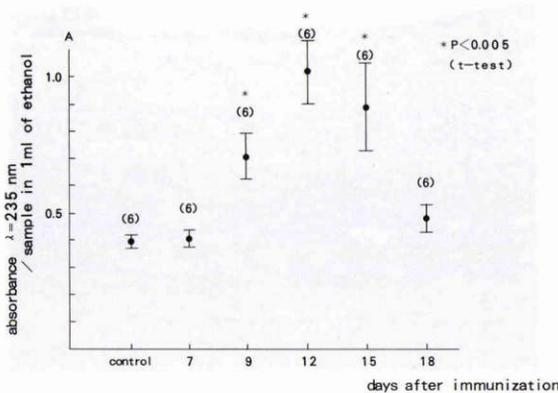


図8 過酸化脂質の動向  
A: Conjugated diene, B: MDA

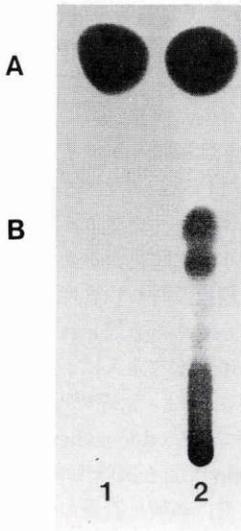


図9 薄層クロマトグラフィー

1. Unoxidized methyl docosahexaenoate, 2. Oxidized methyl docosahexaenoate  
A. Unchanged fatty acid, B. Fatty acid hydroperoxide

ピークを迎え、以後減少していった。

ii) MDA (図8B): Conjugated dieneと同様MDAも9日目より上昇し、以後も似たような推移を示したが、その変動幅は比較的小さく、また18日目にはcontrolよりも低い値を示した。

#### 2. 過酸化脂質の網膜に及ぼす影響

脂肪酸 hydroperoxide の発生は薄層クロマトグラフィーによって確認された(図9)。硝子体腔内注入24時間後、網膜神経線維層は破壊され、その他の内層構造も変性、浮腫をきたしていた(図10)。外顆粒層は比較的よく保たれているものの、視細胞にも変性がみられ、多核白血球の浸潤が散見された。未酸化の methyl docosahexaenoate の影響は、網膜内層の浮腫性変化をみるにとどまった。

### IV 考 按

網膜の変性、障害と過酸化脂質の研究は、平光らによる一連の報告やいわゆる light damage との関連においてこれまで数多く行われているが<sup>1)</sup>、眼内の炎症との関係についてはまだ不明な点も多い。内因性ぶどう膜炎の動物モデルとされるEAUを用いた実験では、Rao らが各種ラジカルスカベンジャーが網膜過酸化脂質の発生に抑制的に働くことを示しているのみで

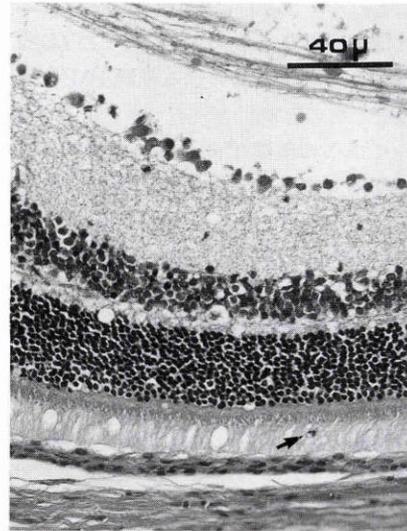


図10 過酸化脂質の硝子体内注入24時間後の組織像。網膜内層のみならず視細胞層にも変性がみられる。多核白血球(矢印)も散見される。(H&E染色, ×575)

ある<sup>16)</sup>。今回著者はある程度一定した炎症の推移が期待できるS抗原によるEAUモデルを用いて、その病期ごとに過酸化脂質を測定し、病理組織像との比較検討を行なった。S抗原の接種によって惹起されるLewisラットのEAUは、Tリンパ球によって介達される遅延型過敏反応によるとされており<sup>17)</sup>、50 $\mu$ g以上の比較的大量のS抗原を使用した場合には、特にその病初期から中期にかけてPMNsを主体とした炎症細胞浸潤と網膜構造の破壊がみられる<sup>18)</sup>。この細胞浸潤は抗原接種時に百日咳菌の静注を併用することで増強されることが知られており<sup>19)</sup>、今回はフリーラジカルの産生をより多くの活性化した食細胞から期待するために、このような激症型の動物モデルを利用した。また活性化したPMNsは他の食細胞に比べ数倍のフリーラジカル産生能を有する<sup>20)</sup>ことから、今回はこのPMNsに注目し、組織内に浸潤したPMNsの量的マーカーとして知られるMPOを測定し、炎症の程度をより明確にする試みを行なった。MPOは多核白血球のアズール顆粒内に多量に存在する酵素で、細胞重量の5%を占め、他の炎症細胞にはほとんど或いは全く存在しないとされている<sup>21)</sup>。そして実際、結果に示したようにMPO活性の推移(図7)は病理組織所見とも矛盾がないように思われた。即ち網膜内、網膜下のPMNsの浸潤はS抗原接種後9日目にはごくわずか

であったものが、12日目には無数に拡がり、以後減少していく様子が観察された。ただしこのMPO活性レベルはあくまで各病期における浸潤PMNsの程度比較の指標としてのみ利用されるべきで、検索組織の種類によってはこの酵素はすみやかに分解されてしまい、適切な値が得られないことが報告されている<sup>22)</sup>ことから、今回の結果においても、図6のような相関図から直ちに組織内の多核白血球の数まで推定するには無理があると思われる。実際、図5にみられるようにMPOの存在は炎症局所の多核白血球中に明らかであるが、その染色は脈絡膜内では強く、網膜内の血管外浸潤白血球中ではやや減弱しているようであった。

過酸化脂質の測定には従来より様々な方法が行なわれているが、いずれの方法も一長一短があり、特にin vivoにおいては非特異反応等を除外しきれない為とその絶対量を把握することは不可能である<sup>23)</sup>。また、過酸化脂質は脂質のhydroperoxide, endoperoxide等、多くの前駆体、誘導体、分解物を含んだ“動的不均一系”であるので<sup>24)</sup>、発生段階の異なる複数の産物を測定することが望ましいとされている<sup>4)</sup>。そこで今回は過去の報告<sup>4)16)</sup>に準じ、過酸化脂質反応の初期段階を反映するconjugated dieneと、hydroperoxideの分解産物であり、チオバルビツール酸(TBA)と反応するMDAの両方を測定した。結果はぶどう膜炎の発症日、即ち、S抗原接種後9日目には過酸化脂質の有意な上昇を認めた(図8)。同日における炎症の程度は、組織学的にもMPOのレベルの上でも非常に軽度のものであることを考えると、網膜内における過酸化脂質は炎症のごく初期でも生じることが伺えた。この過酸化脂質反応開始のトリガーが、本当に浸潤細胞から放出されたフリーラジカルによるものかどうかはなお不明であるが、いずれにしても以後12, 15, 18日目と、MPO活性を含めた炎症、組織障害の程度と並行するかのようにより過酸化脂質レベルが推移していったことは非常に興味深い(図1~4, 7, 8)。脂質の過酸化反応は一種の連鎖反応であるので、ひとたび何らかのトリガーが反応の開始にあずかれば、その後は次々と生成反応が起こりうる。ところが生体には数々の抗酸化機構、即ちビタミンE, superoxide dismutase, catalase等の存在が知られており、網膜においても例外ではなく<sup>6)</sup>、通常わずかな“トリガーの存在”に対してはこれらが必要以上の反応の進行を阻止しているものと考えられる。今回のS抗原による炎症モデルではこれらの防御機構では阻止できないほど急激に、しかも次々と

現われるPMNsを中心とするフリーラジカルの供給源が、網膜脂質の過酸化を推進していったのであろう。一方、活性化したPMNsそれ自体は過酸化脂質の値に影響しないことが既に報告されている<sup>4)16)</sup>。S抗原接種後18日目には炎症はかなり鎮まると同時に網膜外層が完全に消失し、この時期になると過酸化脂質も急激に減少した。これはフリーラジカルの影響の減少の影響もさることながら、過酸化脂質の発生源である高級不飽和脂肪酸が、網膜の著しい変性、壊死、瘢痕化とともに枯渇していったためと思われる。

過酸化脂質の硝子体内注入による網膜への影響はこれまでも報告されているが<sup>25)26)</sup>、今回は視細胞外節の主要な脂肪酸である、docosahexaenoic acidから得たhydroperoxideによる網膜障害を組織学的に確認することができた。過酸化脂質の崩壊産物は、連鎖反応の生じた局所から離れた所にも拡がり、細胞の浮腫、血管透過性の亢進を引き起こすとされており<sup>27)</sup>、図10に示したように硝子体側から最も離れた視細胞層にまで影響がみられたことは、このことを支持するものかもしれない。一方、S抗原による動物モデルについても言えることは、このような組織障害がほとんど常に網膜外層に顕著であり、これは高級不飽和脂肪酸を大量に含んだ視細胞層がフリーラジカルの恰好の標的となるとともに、局所に生じた過酸化脂質が更に隣接する組織を破壊していくためであろう。

過酸化脂質が組織障害に対して原因であるのか、結果であるのか、今だに明確ではなく、in vivoにおけるフリーラジカルとの関係も不明な点が残されているが、眼科領域にはベーチェット病や感染による眼内炎など、多核白血球の浸潤を伴いながら、網膜に致命的な障害を与えるケースは少なくなく、これら炎症性眼疾患と網膜過酸化脂質の関係について今後更に検討を加えていく予定である。

御校閲を賜りました松尾治互教授、臼井正彦教授に感謝致します。また、実験に際し、御指導いただいた南カリフォルニア大学Narsing A Rao教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 平光忠久：眼疾患とフリーラジカル・過酸化脂質。眼紀 39：1911-1926, 1988.
- 2) Wiegand RD, Jose JG, Rapp LM, et al: Free radicals and damage to ocular tissues, In Armstrong D, et al (ed): Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease, New York, Raven Press, 317-353, 1984.
- 3) Halliwell B, Gutteridge JMC: Lipid peroxidation, a radical chain reaction, In Halliwell B,

- Gutteridge JMC (ed): Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Clarendon Press, 139—170, 1985.
- 4) **Ward PA, Till GO, Hatherill JR**, et al: Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 76: 517—527, 1985.
  - 5) **Stone WL, Fronsworth CC, Dratz EA**: A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog rod outer segments. *Exp Eye Res* 28: 387—397, 1979.
  - 6) **van Kuijk FJGM**: Detection of lipid peroxidation associated with retinal degeneration using gaschromatography-mass spectrometry. *Durk, SSN-Nijmegen*, 15—35, 1988.
  - 7) **Fantone JC, Ward PA**: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 397—418, 1982.
  - 8) **Weiss SJ, LoBuglio AF**: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 47: 5—18, 1982.
  - 9) 高野 繁, 関 文治, 三橋正忠, 他: 網膜 S 抗原の新しい分析精製法について. *眼紀* 32: 491—496, 1981.
  - 10) **Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD**, et al: Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206—209, 1982.
  - 11) **Hirsh JG, Church AB**: Studies of phagocytosis of group A streptococci by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Exp Med* 111: 309—322, 1960.
  - 12) **Elias JM**: A rapid, sensitive myeloperoxidase stain using 4-chloro-1-naphthol. *Am J Clin Path* 73: 797—799, 1980.
  - 13) **Buege JA, Aust SD**: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302—310, 1978.
  - 14) **Forch J, Less M, Stanley GHS**: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497—509, 1957.
  - 15) **Uchiyama M, Mihara M**: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Ann Biochem* 86: 271—278, 1978.
  - 16) **Rao NA, Fernandez MA, Cid LL**, et al: Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis. *Arch Ophthalmol* 105: 1712—1716, 1987.
  - 17) **Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C**, et al: Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1—9, 1985.
  - 18) **Rao NA, Wacker WB, Marak GE**: Experimental allergic uveitis. Clinicopathologic features associated with varying doses of S antigen. *Arch Ophthalmol* 97: 1954—1958, 1979.
  - 19) **McAllister CG, Vistica BP, Sekura R**, et al: The effects of pertussis toxin on the induction and transfer of experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Immunol Immunopathol* 39: 329—336, 1986.
  - 20) **Reiss M, Roos D**: Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocyte and neutrophils. *J Clin Invest* 61: 480—488, 1987.
  - 21) **Schultz J, Kaminker K**: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. Content and localization. *Arch Biochem Biophys* 96: 465—467, 1962.
  - 22) **Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE**: Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods* 18: 137—142, 1987.
  - 23) **Barber AA, Bernheim F**: Lipid peroxidation. Its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Rev* 2: 355—403, 1967.
  - 24) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝: 過酸化脂質と生体. 学会出版センター, 東京, 1985.
  - 25) 平光忠久, 馬嶋慶直, 長谷川康紀, 他: 放射線網膜症成因機序としての過酸化脂質. *日眼会誌* 78: 819—825, 1978.
  - 26) **Armstrong D, Hiramitsu T, Gutteridge J**, et al: Studies on experimentally induced retinal degeneration. I. Effect of lipid peroxides on electroretinographic activity in the albino rabbit. *Exp Eye Res* 35: 157—171, 1982.
  - 27) **Southorn PA, Powis G**: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63: 381—389, 1988.