

有色家兎における網膜光傷害

—2. α -トコフェロールの効果—

湖崎 淳, 竹内 正光, 高橋 寛二, 山岸 和矢, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

我々は、長波長を除いたキセノン光を有色家兎眼に照射し、網膜色素上皮を初発部とする網膜光傷害の実験モデルを作成した。このモデルを用いて、フリーラジカルの消去物質である α -トコフェロールを照射前に有色家兎に投与し、光傷害の発生に及ぼす影響を臨床的ならびに組織学的に検討した。蛍光眼底造影で、照射12時間後に α -トコフェロール非投与群には乳頭下方に境界鮮明な強い過蛍光が見られたが、投与群では小範囲の軽い過蛍光を見るのみであった。組織学的には、非投与群

では12時間後には網膜色素上皮はほぼ壊死に陥っていた。しかし、投与群では12時間後の網膜色素上皮の傷害は軽度であった。 α -トコフェロールは、照射前に投与することによって、網膜色素上皮に発生する光傷害に対して強い保護効果があることが示された。(日眼会誌 98: 948-954, 1994)

キーワード：網膜光傷害, 光毒性, α -トコフェロール, フリーラジカル, 網膜色素上皮

Light-Induced Retinal Damage in Pigmented Rabbit

—2. Effect of α -tocopherol—

Jun Kozaki, Masamitsu Takeuchi, Kanji Takahashi,

Kazuya Yamagishi, Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

We have reported previously that xenon light exposure without long waves primarily damages the retinal pigment epithelium (RPE) of pigmented rabbits. Alpha-tocopherol, which is a free radical scavenger, was administered systemically to pigmented rabbits before light exposure in order to evaluate the protective effect against retinal light damage. In fluorescein angiography, at 12 hours after the light exposure, diffuse and marked hyperfluorescence was seen in the lower portion of the retina adjacent to the optic disc in the untreated group, and slight hyperfluorescence in a small area was seen in the treated group. Histopathologically,

the RPE became necrotic 12 hours after the light exposure in the untreated group. In the treated group, only slight damage appeared in the RPE 12 hours after the light exposure. The light-induced retinal damage, particularly in the RPE, was remarkably reduced by administration of alpha-tocopherol before the light exposure. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 948-954, 1994)

Key words: Retinal photic injury, Retinal phototoxicity, Free radical, Alpha-tocopherol, Retinal pigment epithelium

I 緒 言

網膜に対する光毒性にはすでに詳細な報告があり、特に傷害の発生とその修復の経時的変化についての実験報告がみられる^{1)~3)}。網膜に対する光照射は、温熱作用と光

化学作用を生じる。照射光の波長や照射条件によって傷害の初発部位は異なるが、視細胞外節¹⁾や網膜色素上皮²⁾³⁾が傷害される。著者らは本研究の前報⁴⁾において、有色家兎網膜に長波長を除いて、温熱作用を少なくしたキセノン光を照射したところ、網膜色素上皮がまず傷害さ

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 湖崎 淳

(平成6年4月18日受付, 平成6年6月14日改訂受理)

Reprint requests to: Jun Kozaki, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 1 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received April 18, 1994 and accepted in revised form June 14, 1994)

れ、次いで、視細胞外節が傷害されることを報告した。近年、細胞傷害の発生機序にフリーラジカルの関与が示され、短波長光照射による視細胞外節の傷害^{6)~10)}や網膜の過酸化脂質の増加^{11)~13)}はフリーラジカル産生による光化学作用が関係していることがわかってきた。それに対し、フリーラジカルの消去物質であるアスコルビン酸⁶⁾¹⁴⁾、ジメチルチオウレア⁷⁾⁸⁾、 α -トコフェロール⁹⁾¹¹⁾、スーパーオキシドディスムターゼ¹¹⁾¹³⁾などを投与し、これらの物質の網膜光傷害に対する保護効果が報告され、光照射による視細胞外節の傷害はフリーラジカルによる光化学作用が原因であることが確認された。

我々は、キセノン光照射による網膜傷害モデルの早期の傷害部位である網膜色素上皮において、その傷害の発生に対するフリーラジカルの関与を明らかにするため、 α -トコフェロールを光照射前に投与したところ、網膜、特に網膜色素上皮に対する光毒性を軽減する効果を認めたので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

体重2.0~4.0 kgの有色家兎を、 α -トコフェロール非投与群は5匹10眼、投与群は5匹10眼用いた。 α -トコフェロール投与群は光照射前2日、1日および光照射前4時間の計3回、30 mg/kgを下腿に筋肉内注射した。

両群とも光照射15分前からミドリンP®を頻回点眼して十分散瞳し、さらに、同液0.1 mlを結膜下注射した。照射中の麻酔は塩酸ケタミン(ケタラール®)40~60 mg/kgを筋肉内注射したのち、ペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)を20 mg/kg耳静脈に投与し、その後一定の麻酔状態が得られるように適宜追加した。

α -トコフェロールは油性液状で、同液2 ml中に酢酸トコフェロール(ユベラ®)を100 mg含んでいる。酢酸トコフェロールは体内吸収後 α -トコフェロールとなる。同液はエーザイ株式会社から提供を受けた。

2. 光照射

眼前30 cmの距離からキセノン光(ニデックXC-550 300 W)を1時間照射した。照射強度は0.89 W/cm²で行い、照射光が集光しないように家兎角膜に後極部用コンタクトレンズを装着した。光による熱作用の影響を少なくするために、眼前5 cmに熱吸収フィルター(ホヤHA-30)を置き、800 nm以上の長波長を吸収した。フィルター設置後の角膜面上での照射強度は0.3 W/cm²であった。その詳細は第1報⁹⁾で述べたとおりである。照射は前報では2時間行ったが、今回は1時間と短縮した。

3. 眼底検査と蛍光眼底造影

眼底検査と蛍光眼底造影を照射直後、3時間後、12時間後に行った。

4. 組織学的観察

光照射3時間後(各4眼)、12時間後(各6眼)に眼球

摘出のうえ、摘出眼球は半切後4%グルタルアルデヒド磷酸緩衝液で12時間前固定した後、蛍光眼底写真と比較しながら傷害部位を切り出し、1%オスミウム磷酸緩衝液で90分後固定、エタノール系列で脱水、エポキシ樹脂(エポン812)で包埋した。光学顕微鏡(光顕)的にはトルイジンプルーで染色し観察した。電子顕微鏡(電顕)的には超薄切片を作成し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色後観察した。

III 結果

1. 臨床所見

照射直後には検眼鏡的にも蛍光眼底造影でも異常を見なかった。光照射3時間後、 α -トコフェロール非投与群では、検眼鏡的には光照射を受けた乳頭下方の深層網膜に小範囲の白色の浮腫がごく軽度に見られ、蛍光眼底造影では造影早期から乳頭下方に非常に淡い、境界不鮮明な過蛍光が見られた(図1)。 α -トコフェロール投与群には、このような変化は見られなかった(図2)。

光照射12時間後、 α -トコフェロール非投与群には検眼鏡的には、網膜の白濁部位は拡大し、蛍光眼底造影では白濁部位に一致して境界の鮮明な強い過蛍光が見られた(図3)。このような変化は6眼中5眼に見られた。 α -トコフェロール投与群には、検眼鏡的にはほとんど変化は見られなかった。蛍光眼底造影では6眼中1眼に比較的強い過蛍光が見られたが、5眼では小範囲に軽い過蛍光を見たのみであった(図4)。

2. 病理組織学的所見

1) 照射3時間後

光照射部位に発生した蛍光造影で過蛍光を示した病巣中央の網膜脈絡膜を組織学的に検討した。照射3時間後に、光顕で見ると α -トコフェロール非投与群、投与群ともに網膜色素上皮、視細胞外節、内節、外顆粒層に異常



図1 光照射3時間後 α -トコフェロール非投与群の蛍光眼底造影。造影早期から乳頭下方に淡い、境界不鮮明な過蛍光が見られる。

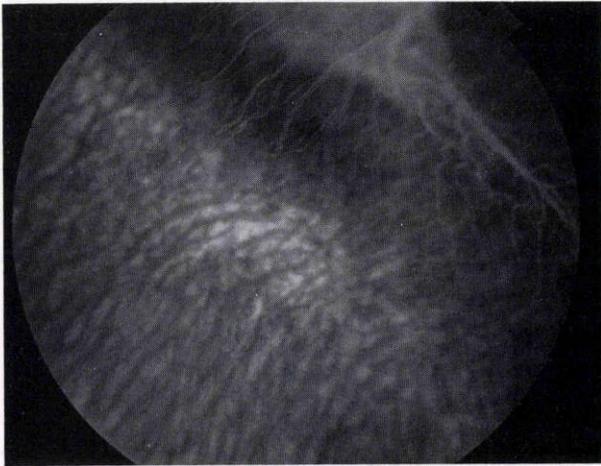


図2 光照射3時間後 α -トコフェロール投与群の蛍光眼底造影。
乳頭下方に過蛍光は見られない。

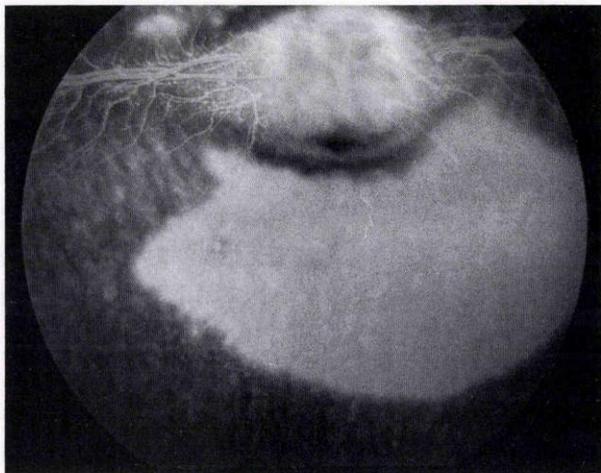


図3 光照射12時間後 α -トコフェロール非投与群の蛍光眼底造影。
光照射部位に一致して境界の明瞭な強い過蛍光が見られる。



図4 光照射12時間後 α -トコフェロール投与群の蛍光眼底造影。
乳頭下方に小範囲の軽い過蛍光が見られる。

は見なかった。

電顕で見ると、 α -トコフェロール非投与群では網膜色素上皮内は胞体の電子密度が高く、多くのミトコンドリアは著しく空胞化し、メラニン顆粒は胞体内に落込み、滑面小胞体や粗面小胞体の構造は不明瞭になり、基底陥入は開大していた。微絨毛の形態は保たれ、細胞間結合装置、Bruch(ブルッフ)膜、脈絡膜毛細血管の内皮細胞には異常を見なかった。視細胞外節にも異常を見なかった(図5)。 α -トコフェロール投与群では過蛍光部位が見られないため、光が照射された乳頭下方を幅広く切り出し検討した。網膜色素上皮はミトコンドリアの形態は比較的よく保たれていて、基底陥入の開大を見なかった。胞体内の粗面小胞体、滑面小胞体は形態をよく保ち、微絨毛、視細胞外節、ブルッフ膜、脈絡膜毛細血管の内皮細胞に異常を見なかった(図6)。

2) 照射12時間後

光顕で見ると、 α -トコフェロール非投与群では網膜色素上皮の胞体は著しく扁平化し、胞体内に色素顆粒を多数貪食したマクロファージ様の細胞が散在していた。外顆粒層には軽微な核の濃縮が見られたが、内層の網膜には異常を見なかった(図7)。 α -トコフェロール投与群では網膜色素上皮の頂部側の色素顆粒が小型化している他には異常を見なかった。視細胞や外顆粒層にも異常を見なかった(図8)。電顕で見ると、 α -トコフェロール非投与群の網膜色素上皮ではメラニン顆粒は胞体内に落ち込み、微絨毛、基底陥入は消失し、細胞内小器官は崩壊して、細胞はほぼ壊死に陥っていた。視細胞外節に著変を見なかった(図9)。 α -トコフェロール投与群の網膜色素上皮ではメラニン顆粒は小型となり、胞体内に軽度落ち込み、胞体内に少数の電子密度の高い、層状の構造物が見られたが、他には異常を見なかった。ミトコンドリアはやや変形していたが、形態はほぼ保たれていた(図7~10)。

IV 考 按

Noellら¹¹⁾はラットに青色光を照射し、視細胞外節や網膜色素上の傷害を発生させ、その経時的变化を報告した。Tsoら²⁾³⁾はサルに倒像鏡の光を照射し、網膜色素上皮の傷害を報告し、視細胞外節と網膜色素上皮が光傷害の発生部位であることを明らかにした。さらに、紫外線などの短波長光が視細胞外節の膜脂質を傷害し⁵⁾、光照射によって網膜の過酸化脂質が増加することが示された¹¹⁾¹²⁾。近年、フリーラジカルの研究が進み、これら視細胞外節の膜脂質の傷害は光照射により活性酸素の発生が原因であるといわれている^{5)10)~12)}。活性酸素を消去する物質であるアスコルビン酸⁶⁾、ジメチルチオウレア⁷⁾⁸⁾、 α -トコフェロール⁹⁾、スーパーオキシドディスムターゼ¹³⁾を光照射前にラットやマウスに投与し、青色光や緑色光などの短波長光を照射し、光傷害の発生が比較検討された。

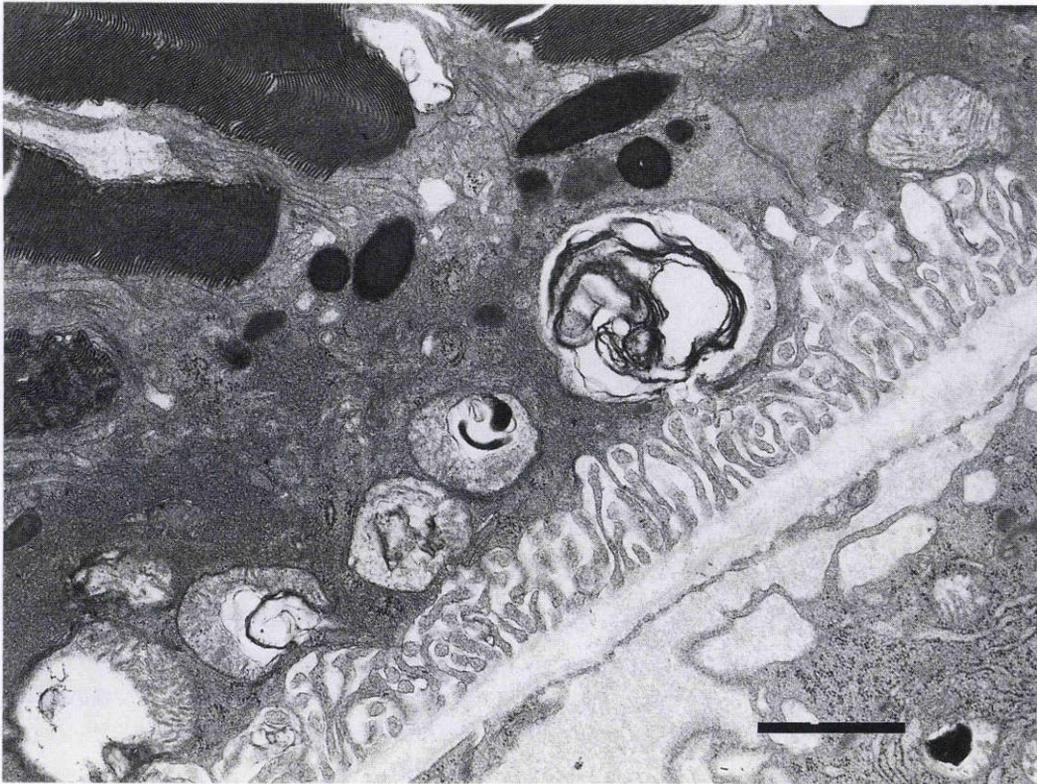


図5 光照射3時間後 α -トコフェロール非投与群の電子顕微鏡(電顕)像。

網膜色素上皮内の多くのミトコンドリアは著しく膨化し、空胞化し、メラニン顆粒は胞体内に落込み、滑面小胞体や粗面小胞体の構造はやや不鮮明となる。胞体の電子密度は高くなり、基底陥入は開大している。細胞間結合装置は保たれている。Bruch(ブルッフ)膜、脈絡膜毛細血管の内皮細胞に異常は見られない。視細胞外節にも異常を見ない。バーは $1\mu\text{m}$

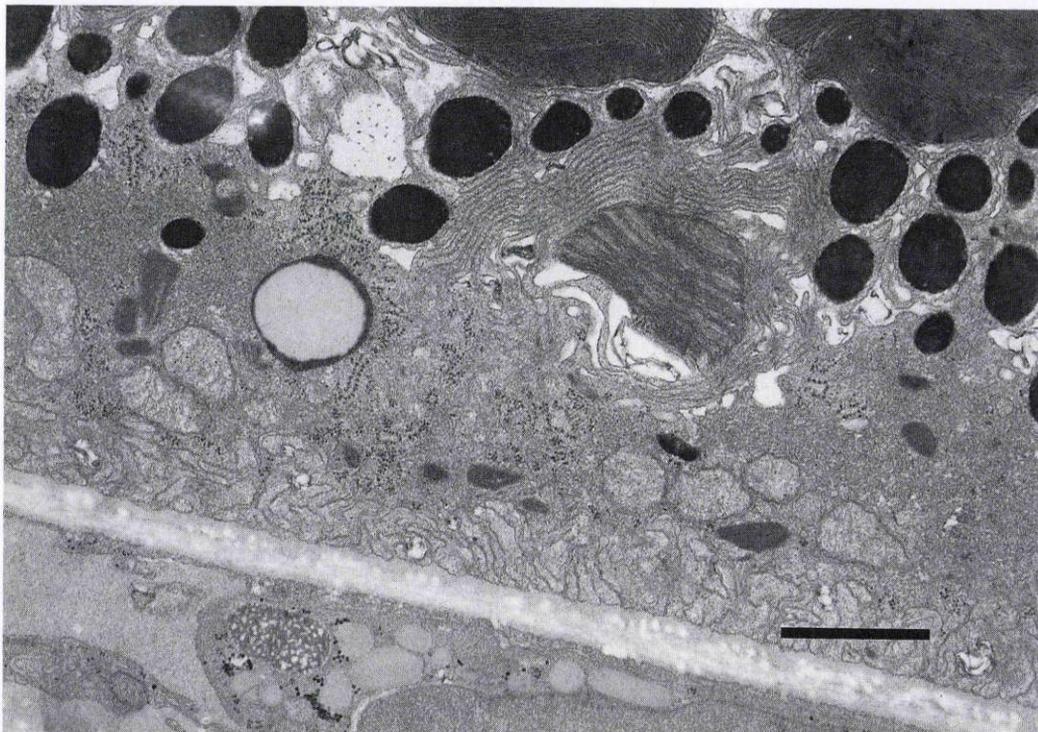


図6 光照射3時間後 α -トコフェロール投与群の電顕像。

網膜色素上皮内のミトコンドリアの形態は比較的保たれており、基底陥入の開大は見られない。粗面小胞体、滑面小胞体も形態的によく保たれ、胞体の電子密度も高くはない。ブルッフ膜、脈絡膜毛細血管の内皮細胞に異常は見られない。バーは $1\mu\text{m}$

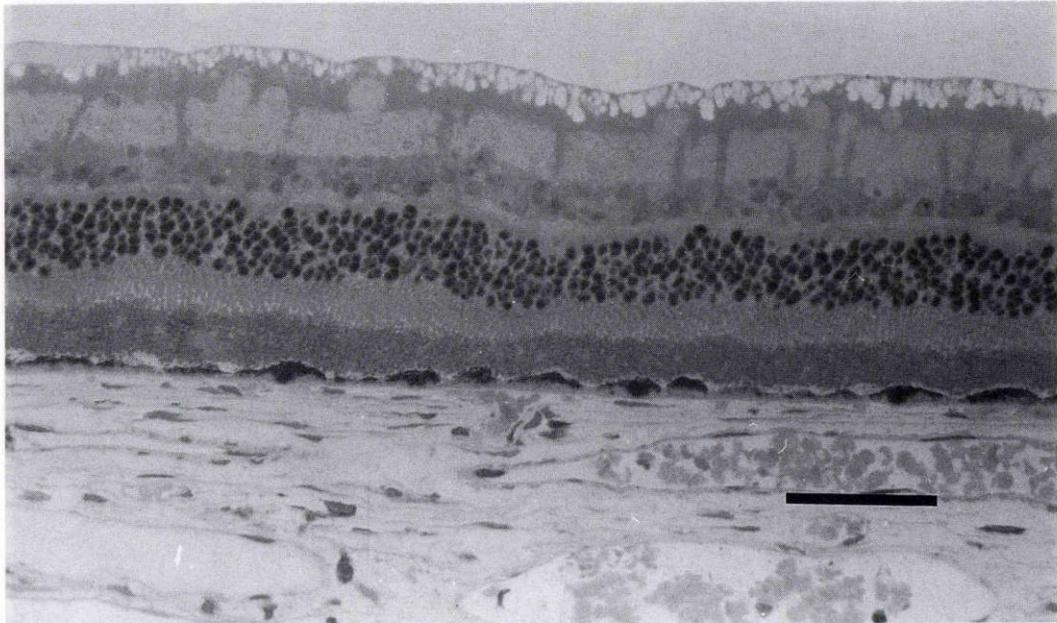


図7 光照射12時間後 α -トコフェロール非投与群の光学顕微鏡(光顕)像。

網膜色素上皮細胞の胞体は著しく扁平化し、胞体内に色素顆粒を多数貪食したマクロファージ様の細胞が散在していた。内層の網膜に異常は見ない。トルイジンブルー染色、バーは $3\mu\text{m}$

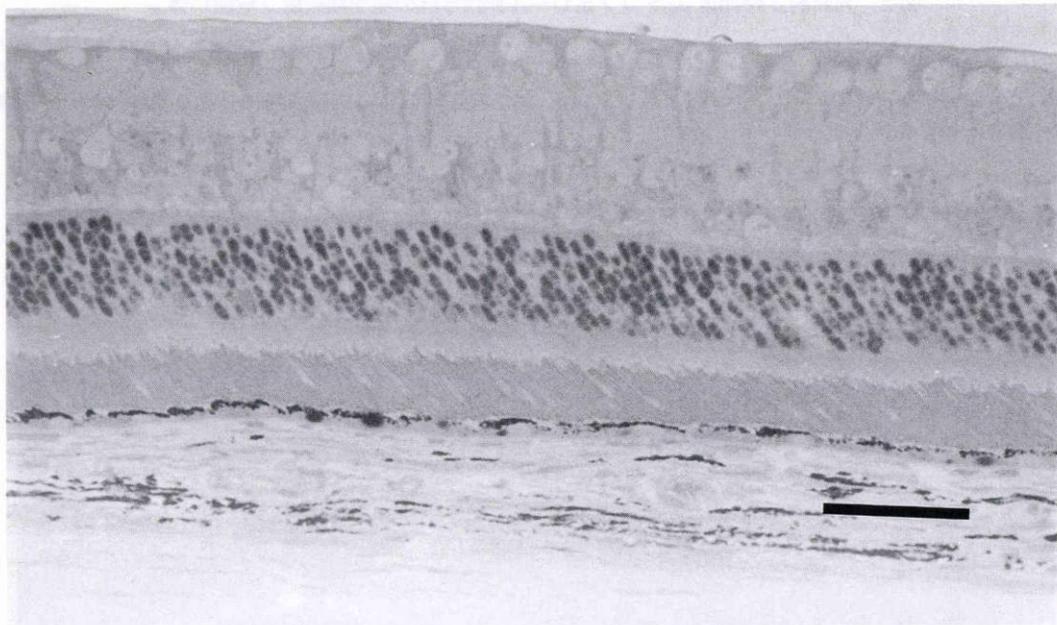


図8 光照射12時間後 α -トコフェロール投与群の光顕像。

網膜色素上皮の頂部側の色素顆粒が小型化している他に異常を見ない。バーは $3\mu\text{m}$

短波長光を照射することにより網膜の視細胞外節や外顆粒層が傷害されたが、これら活性酸素の消去物質を投与すると、いずれも視細胞外節の傷害や外顆粒層の核の減少が軽減したと報告されている^{6)~9)13)}。これらの実験で、短波長光による網膜視細胞外節や外顆粒層の傷害はフリーラジカルが関与していることが示された。

我々は、前報において長波長を除き、熱作用を少なくした可視光を主としたキセノン光を有色害兎に照射したところ、光照射直後から網膜色素上皮に電顕的に傷害が

見られ、照射12時間後には網膜色素上皮は強く傷害し、細胞内小器官はほぼ消失しており、細胞はほぼ壊死の状態であった。しかし、視細胞外節は正常であった。照射24時間後においては、網膜色素上皮は完全に融解壊死に陥っていた。視細胞外節の配列は乱れ短縮していた。照射6日後には病巣周辺から、未熟な網膜色素上皮細胞が再生してきた。すなわち、光照射によりまず網膜色素上皮が傷害され、次いで、視細胞外節が傷害されることを報告した⁴⁾。

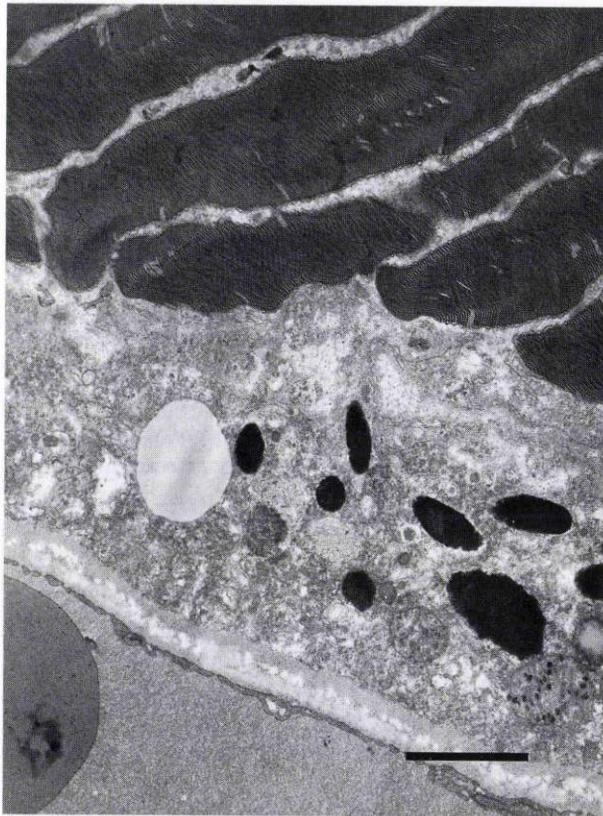


図9 光照射12時間後 α -トコフェロール非投与群の電顕像。

メラニン顆粒は胞体内に落ち込み、微絨毛、基底陥入は消失、細胞内小器官は崩壊しほぼ壊死に陥っている。視細胞外節に著変を見ない。バーは $1\mu\text{m}$

この実験モデルにおける光傷害の発生にフリーラジカルが関与していることを検討するため、活性酸素の消去物質である α -トコフェロールを光照射前に投与し、非投与群と比較検討した。今回の実験では傷害の程度を軽度にするため、光照射を1時間とした。

細胞膜の主成分である不飽和脂肪酸は、活性酸素の影響を受けて脂質ラジカル、ペルオキシラジカルとなる。ペルオキシラジカルは不飽和脂肪酸を過酸化脂質に変え、細胞膜は障害される。このとき、さらに脂質ラジカルが産生され、ペルオキシラジカルとなり、不飽和脂肪酸を過酸化脂質に変え、細胞膜はさらに障害される¹⁸⁾。 α -トコフェロールは脂溶性物質で細胞膜内に存在し、不飽和脂肪酸を保護するかたちで存在する。 α -トコフェロールはスーパーオキシドやヒドロキシラジカルとも反応するが、ペルオキシラジカルと強く反応し、細胞膜内での脂質過酸化の連鎖反応を停止させる¹⁹⁾。

α -トコフェロールは筋肉内注射後、血中濃度は約4時間後でピークに達し、約24時間持続する¹⁷⁾。このため、今回の実験では光照射2日前、1日前、照射4時間前の計3回、 α -トコフェロールを筋肉内注射した。

今回の実験では、前報と同じように蛍光眼底造影では α -トコフェロール非投与群は光照射3時間後に光照射



図10 光照射12時間後 α -トコフェロール投与群の電顕像。

網膜色素上皮内のミトコンドリアはやや変形しているが形態は比較的保たれている。メラニン顆粒は小型となり、軽度で胞体内に落ち込み、胞体内に少数の層状の構造物が見られる。視細胞外節に異常を見ない。バーは $1\mu\text{m}$

部位に淡い過蛍光が現れ、12時間後に境界の鮮明な強い過蛍光になった。 α -トコフェロール投与群では、光照射3時間後には変化は見られなかった。12時間後に小範囲に軽い過蛍光が見られたのみであって、非投与群と比べてその程度は著しく軽度であった。組織学的には、 α -トコフェロール非投与群は照射3時間後に網膜色素上皮のミトコンドリアが著しく空胞化し、胞体は軽度に傷害され、基底陥入は強く開大していた。12時間後では微絨毛、基底陥入は消失し、細胞内は崩壊し、ほぼ壊死に陥っていた。この変化は前報⁴⁾で見た12時間、24時間の変化と同じもので、光照射1時間によって網膜色素上皮に融解壊死が発生した。

しかし、 α -トコフェロール投与群では、3時間後は網膜色素上皮のミトコンドリアの形態は保たれており、基底陥入の開大もなく、ほとんど傷害されていなかった。12時間後でもミトコンドリアの形態はほぼ保たれており、細胞内の傷害も軽度であり、 α -トコフェロール非投与群と比べて明らかに差が見られた。

すなわち、前報でも示したごとく、前報の2時間、今回の1時間の光照射によって、網膜色素上皮が強く傷害

された。まず、網膜色素上皮内のミトコンドリアが傷害され、その後網膜色素上皮細胞は壊死に陥った。しかし、 α -トコフェロールの投与は光照射による色素上皮の傷害を、ごく軽度にする事が示された。

NADHなどの基質から酸素を用いてアデノシン三リン酸が産生される反応はミトコンドリアを中心に行われる。この代謝過程において活性酸素が産生され、光照射で活性酸素の産生はさらに増加する。また、ミトコンドリアは細胞内で脂質含量の非常に多い部位で脂質過酸化を受けやすい¹⁸⁾。光照射によって、主にミトコンドリア内に発生した活性酸素により、網膜色素上皮細胞内のミトコンドリアがまず傷害を受けたと考えられた。 α -トコフェロールの投与により、スーパーオキシドや特にペルオキシラジカルなどの活性酸素が消去され、ミトコンドリアが保護されたと考えられた。

以上の実験により、長波長を除いたキセノン光によって発生する網膜色素上皮の光傷害に対し、 α -トコフェロールの投与は強い保護効果を示すことが明らかになった。

本論文の要旨は第97回日本眼科学会(平成5年6月札幌)において湖崎が報告した。

本研究は文部省科学研究費(奨励研究 AO 4771391)の援助を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S: Retinal damage by light in rats. Invest Ophthalmol 5: 450-473, 1966.
- 2) Tso MOM, Woodford BJ: Effect of photic injury on the retinal tissues. Ophthalmology 90: 952-963, 1983.
- 3) Tso MOM: Photic injury to the retina and pathogenesis of age-related macula degeneration. In: Tso MOM, et al (Eds): Retinal Diseases-Biomedical Foundation and Clinical Management. B.J. Lippincott Company, Pennsylvania, 187-214, 1988.
- 4) 湖崎 淳, 竹内正光, 高橋寛二, 山岸和矢, 大熊 紘, 宇山昌延: 有色家兎における網膜光障害-1. 障害の発生と修復過程の病理組織学的研究-. 日眼会誌 98: 738-748, 1994.
- 5) Shvedova AA, Alekseeva OM, Kuliev IT, Muranov KO, Kozlov YP, Kogan VE: Damage of photoreceptor membrane lipids and proteins induced by photosensitized generation of singlet oxygen. Curr Eye Res 2: 683-689, 1982.
- 6) Organisciak DT, Wang H, Li ZY, Tso MOM: The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 1580-1588, 1985.
- 7) Lam S, Tso MOM, Gurne DH: Amelioration of retinal photic injury in albino rats by dimethylthiourea. Arch Ophthalmol 108: 1751-1757, 1990.
- 8) Organisciak DT, Darrow RM, Jiang YL, Marak GE, Blanks JC: Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1599-1609, 1992.
- 9) Katz ML, Eldred GE: Failure of vitamin E to protect the retina against damage resulting from bright cyclic light exposure. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 29-36, 1989.
- 10) Ham WTJ, Mueller HA, Ruffolo JJJ, Millen JE, Cleary SF, Guerry RK, et al: Basic mechanism underlying the production of photochemical lesions in the mammalian retina. Curr Eye Res 3: 165-174, 1984.
- 11) 平光忠久, 大城三和子: 紫外線照射による過酸化脂質形成と活性酸素消去酵素. あたらしい眼科 5: 1024-1026, 1988.
- 12) 山川直之, 高村健太郎, 臼井正彦, 原 敏: 紫外線を照射した網膜における過酸化脂質の変化. 眼紀 42: 629-634, 1991.
- 13) Yamashita H, Horie K, Yamamoto T, Nagano T, Hirano T: Light-induced retinal damage in mice. Hydrogen peroxide and superoxide dismutase activity in retina. Retina 12: 59-66, 1992.
- 14) Blanks JC, Pickford MS, Organisciak DT: Ascorbate treatment prevents accumulation of phagosomes in RPE in light damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 2814-2821, 1992.
- 15) 吉川敏一, 内藤裕二, 近藤元治: 疾患. J Act Oxyg Free Rad 1: 83-102, 1990.
- 16) 二木鋭雄: ビタミンEと酸素, ラジカルとの関連. 福場博保, 美濃 真(監)五十嵐脩(編): ビタミンE-基礎と臨床-1. 医歯薬出版, 東京, 59-76, 1985.
- 17) 中村哲也: ビタミンEの吸収, 分布, 排泄. 福場博保, 美濃 真(監)五十嵐脩(編): ビタミンE-基礎と臨床-1. 医歯薬出版, 東京, 33-58, 1985.
- 18) 藤田 直: ビタミンEとミトコンドリア. 福場博保, 美濃 真(監)五十嵐脩(編): ビタミンE-基礎と臨床-1. 医歯薬出版, 東京, 116-122, 1985.