

ウシ培養網膜色素上皮細胞に対する L-ドーパによる 細胞障害の微細形態学的検討

—メラニン顆粒の有無と酸素濃度変化による障害の相違—

村木 康秀¹⁾, 明尾 潔¹⁾²⁾, 田中 靖彦¹⁾, 藤原 達司³⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾防衛医科大学校眼科学教室

³⁾慶應義塾大学電子顕微鏡研究室

要 約

L-ドーパが培養網膜色素上皮細胞 (RPE) の微細構造に与える影響について、透過型電子顕微鏡を用いて観察し、併せてメラニン顆粒の有無と酸素濃度変化の影響による相違についても検討を行った。実験にはメラニン顆粒の有無により分離培養したウシ RPE を用いた。酸素濃度を 10% と 20% に調節し、100 μ M, 250 μ M の L-ドーパを添加した培養液を 24 時間作用させ、固定、エポン包埋の後、超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察した。メラニン顆粒の有無によらず、粗面小胞体は膨隆

し、リボゾームは消失していた。L-ドーパによる細胞内小器官への障害はメラニン顆粒を持たない RPE においてより強かったが、酸素濃度を 20~10% に低下することにより、その障害は軽度となった。(日眼会誌 99: 1203-1208, 1995)

キーワード: L-ドーパ, メラニン顆粒, 酸素, RPE, 粗面小胞体

Electron Microscopic Studies of Retinal Pigment Epithelial Cells Incubated with L-dopa in 10% and 20% Oxygen

Yasuhide Muraki¹⁾, Kiyoshi Akeo¹⁾²⁾, Yasuhiko Tanaka¹⁾
and Tatsushi Fujiwara³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

³⁾Electron Microscopic Laboratory, Keio University

Abstract

In order to make clear how the ultrastructure of the bovine second-passage retinal pigment epithelium (RPE) was affected by exposure to L-dopa and oxygen, we compared the toxic effects of melanotic and amelanotic RPE. The oxygen levels in the incubators and the L-dopa concentrations in the media were adjusted to 10% or 20% oxygen by adding nitrogen gas and 100 μ M or 250 μ M L-dopa, respectively. After 24 hours, melanotic and amelanotic RPE were fixed and embedded in epon. Ultrathin

sections were examined by transmission electron microscopy. Rough endoplasmic reticula were found to be dilated and ribosomes were extinguished in both melanotic and amelanotic RPE. The damage by L-dopa in melanotic RPE was less than that in amelanotic RPE and less in 10% oxygen than in 20% oxygen. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1203-1208, 1995)

Key words: L-dopa, Melanin granule, Oxygen, RPE, Rough endoplasmic reticulum

I 緒 言

細胞内に極く微量含まれる L-ドーパが神経伝達系や

メラニン合成に関係していることはよく知られている。L-ドーパによる細胞毒性は、皮膚科領域で初めて調べられ、メラニン産生能を持たない Hela 細胞ではドーパは

別刷請求先: 160 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 村木 康秀
(平成7年4月24日受付, 平成7年7月6日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuhide Muraki, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received April 24, 1995 and accepted in revised form July 6, 1995)

毒性を示さないが、メラノーマ細胞では著明に細胞障害を引き起こすと報告¹⁾されている。我々は、これまで、L-ドーパの培養網膜色素上皮細胞 (RPE) に与える影響について、酸素濃度を変化させた培養 RPE の細胞増殖^{2,3)}、メラニン合成⁴⁾や細胞周期⁵⁾の点から検討を行ってきた。その結果、L-ドーパの培養 RPE に対する細胞毒性は、ドーパからメラニンへと生合成される過程⁶⁾で産生される活性酸素とドーパクロームなどのメラニン前駆物質によることが明らかになった。また、ウシ RPE においてメラニン顆粒を持つ RPE (melanotic RPE: PE) と持たない RPE (amelanotic RPE: APE) の 2 種類の細胞間では、L-ドーパが細胞周期に与える影響が異なることも示した⁵⁾。一方、形態学的検討としては、三島ら⁷⁾が *in vivo* の系で、鶏胚 RPE にドーパが取り込まれることをアイソトープを用いたオートラジオグラフィで観察し、ゴルジ体、滑面小胞体に局在していることを証明している。しかし、L-ドーパが培養 RPE にどのような影響を与えるかについて微細形態学的に検討を加えた報告は、これまでにみられない。今回、L-ドーパの細胞内小器官に与える影響を、メラニン顆粒の有無と酸素濃度を低下させることによる酸素負荷の変化という点から検討した。

II 実験材料および実験方法

1. 実験材料

ウシ胎児血清, Ham F12, Dulbecco's modified Eagle's medium (phenol red 無添加) (PR-DMEM), NaHCO₃, fungizone, penicillin and streptomycin (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), phosphate buffer saline (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 60-mm petri dish (Falcon, Cockeysville, MD), trypsin (2.5%) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA).

2. 実験方法

前眼部、硝子体、網膜を除去したウシ眼杯をメラニン顆

粒の有無により 2 分割した。椀状になった各々に complete Ham F-12 (Ham F-12, 15% ウシ胎児血清, 0.125% NaHCO₃, fungizone (250 μg/ml), penicillin (41.5 IU/ml), streptomycin (41.5 μg/ml)) を加え、先端を丸くしたパスツールピペットを用い、実体顕微鏡下で擦過することにより RPE を採取し、径 60 mm 培養皿で PE と APE を培養した。酸素濃度可変の培養器 (B 5060 EK/O₂: Heraeus, Hanau, Germany) 内を暗所とし、36.8°C, 20% 酸素 (5% CO₂+95% Air) に設定した。培養液は complete Ham F-12 を用い、週に 1 回の割合で交換した。Confluent となった後 (約 2 週間後) に 0.25% trypsin を用いて細胞を継代培養し、継代 2 代目の細胞を実験に用いた。窒素ガスを混合することにより培養器内の酸素濃度を 10% と 20% になるように設定して、100 μM, 250 μM の濃度の L-ドーパを培養液 (PR-DMEM, 15% ウシ胎児血清) に添加した。24 時間、静置培養後、4% グルタルアルデヒド磷酸緩衝液で 12 時間固定し、1% 四酸化オスmium 溶液で 1 時間固定後、エタノール系列で脱水した。細胞を培養皿から剝離し、エボン 812 に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色後、透過型電子顕微鏡 (日立電子顕微鏡 HUA 12 S) で観察した。

III 結果

図 1~3 は、20% 酸素下の APE である。L-ドーパを添加していない APE (図 1) では、細胞内小器官が豊富に認められた。100 μM, 250 μM の L-ドーパ (図 2, 3) で細胞質内に多数の空胞がみられ、隣接する空胞が癒合しつつある像が観察された。また、空胞の近傍に粗面小胞体とライソゾームが認められた。

図 4~6 は、20% 酸素下の PE である。L-ドーパを添加していない PE (図 4) では、空胞は認められず細長い形の粗面小胞体が認められた。100 μM の L-ドーパ (図 5) では、細胞質内で空胞の占める割合はわずかであった。開いた粗面小胞体が多数認められるが、内容物の電子

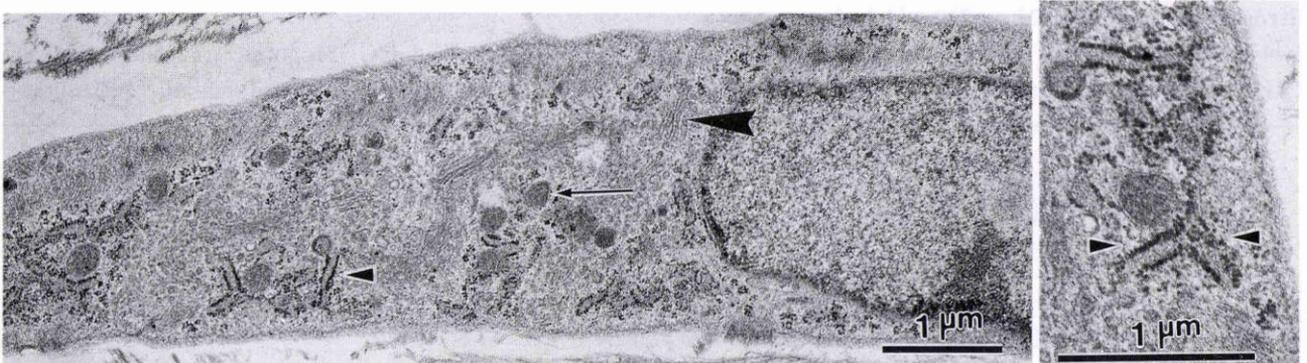


図 1 Amelanotic 網膜色素上皮細胞 (APE) (20% 酸素, L-ドーパ無添加)。

a: 細胞質内にゴルジ体 (大矢じり), ライソゾーム (矢印), 粗面小胞体 (小矢じり) が豊富に認められる。b: 粗面小胞体 (小矢じり) は、2 本鎖様でリボゾームの電子密度は高い。

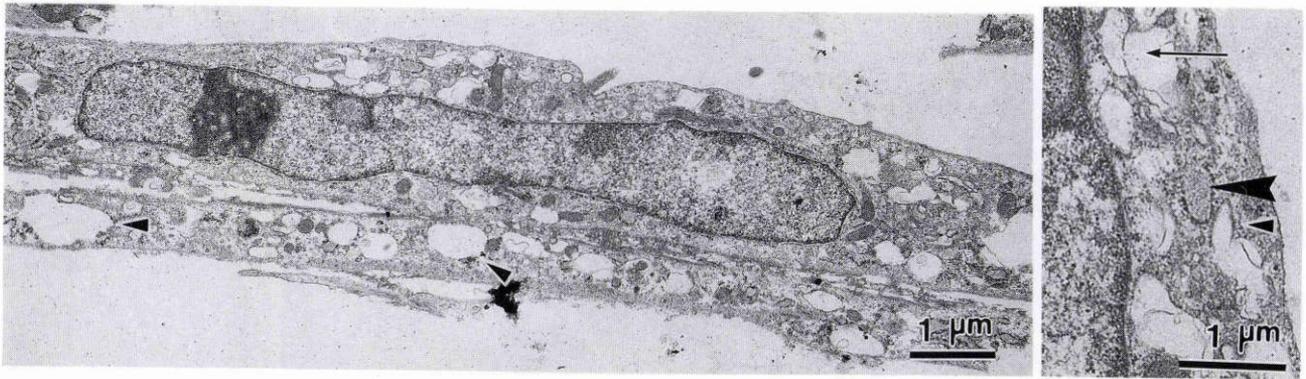


図2 APE(20% 酸素, 100 μ M, L-ドーパ添加).

a: 細胞内に多数の空胞(小矢じり)が認められる. b: 類円形の粗面小胞体(大矢じり)と一部にリボゾームを残した空胞(小矢じり)が認められる. 空胞と空胞が癒合しつつある像(矢印)が認められる.

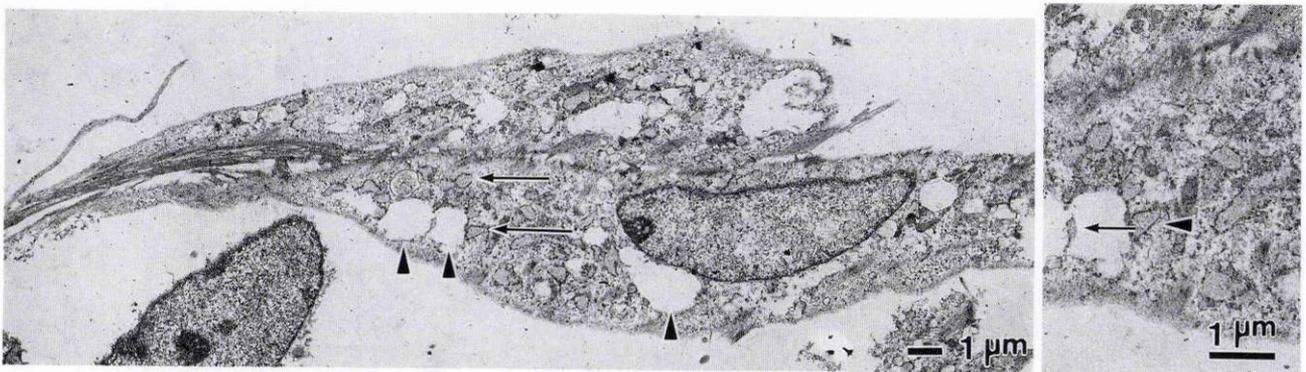


図3 APE(20% 酸素, 250 μ M, L-ドーパ添加).

a: 細胞質内に多数の空胞(小矢じり)と類円形の粗面小胞体(矢印)が認められる. b: 空胞の近傍に粗面小胞体(小矢じり)が認められる. 空胞と空胞が癒合しつつある像(矢印)が認められる.

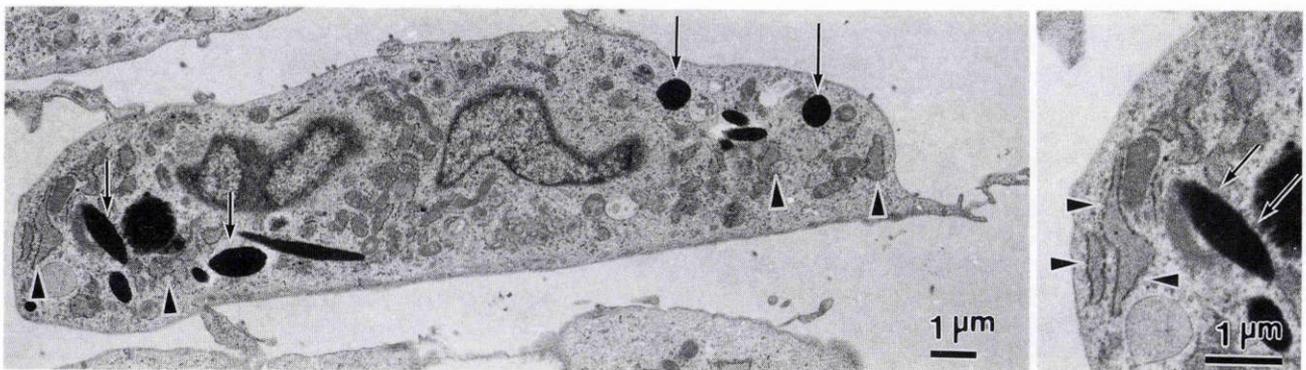


図4 Melanotic 網膜色素上皮細胞(PE)(20% 酸素, L-ドーパ無添加).

a: メラニン顆粒(矢印)が細胞質内に認められる. 類円形もしくは長細い形の粗面小胞体(小矢じり)が混在して認められる. b: メラニン顆粒(矢印)と粗面小胞体(小矢じり)が認められる.

密度は低下していなかった. 空胞の近傍に粗面小胞体とライソゾームが認められた. 100 μ M の L-ドーパで APE (図2) と PE (図5) を比較すると, PE において細胞障害が軽度であった. 250 μ M の L-ドーパ (図6) では, 粗面小胞体は著明に開いており内容物の電子密度も低下していた. また, 隣接する粗面小胞体の間にライソゾームが認められ, 粗面小胞体が癒合していた.

図7は, 10% 酸素下 250 μ M の L-ドーパの PE である. 粗面小胞体は開いているが, 細胞質内にわずかの空隙を認めるのみで, 20% 酸素下の PE と比較すると粗面小胞体の空胞化が軽減していた.

IV 考 按

培養 RPE の細胞外に投与された L-ドーパは細胞障害

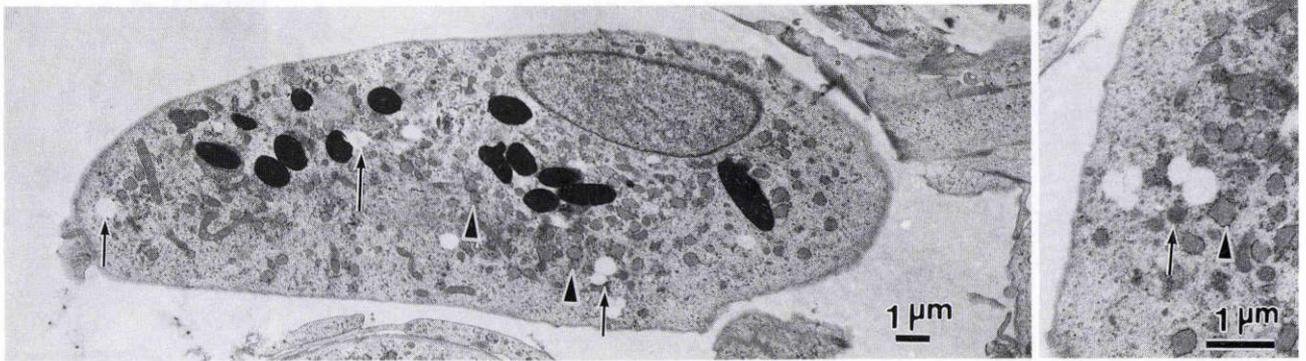


図5 PE(20% 酸素, 100 μ M, L-ドーパ添加).

a: 円形に開いた多数の粗面小胞体(小矢じり)と数個の空胞(矢印)が認められる. b: 空胞の近傍に粗面小胞体(小矢じり)とライソゾーム(矢印)が認められる.

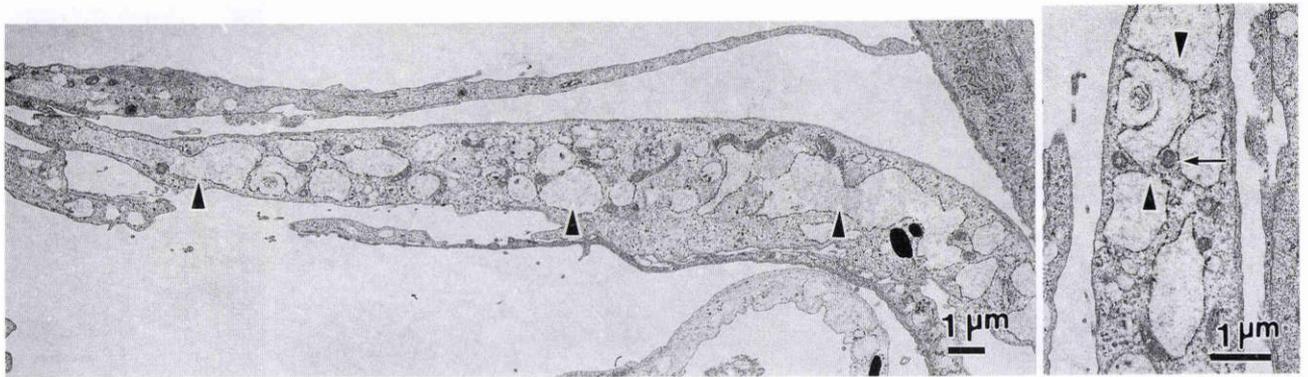


図6 PE(20% 酸素, 250 μ M, L-ドーパ添加).

a: 粗面小胞体(小矢じり)は著明に開いており, 内容物の電子密度は低い. b: 粗面小胞体が癒合しつつある像(小矢じり)が認められる. 粗面小胞体と粗面小胞体の間にライソゾーム(矢印)が認められる.

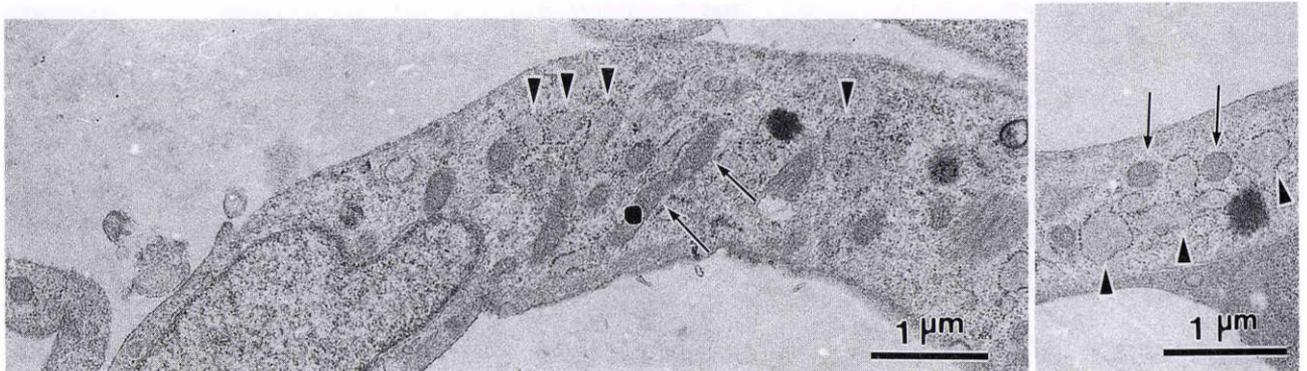


図7 PE(10% 酸素, 250 μ M, L-ドーパ添加).

a: 多数の開いた粗面小胞体(小矢じり)とミトコンドリア(矢印)が認められる. b: 粗面小胞体(小矢じり)とライソゾーム(矢印)が認められる. 粗面小胞体の内容物の電子密度の低下は認められない.

を引き起こし, それは, L-ドーパの酸化によるメラニン合成過程で生じる活性酸素⁸⁾⁻¹⁰⁾か, あるいはメラニン前駆物質¹¹⁾¹²⁾によると考えられている. 今回, L-ドーパが培養RPEにどのような影響を与えるか微細形態学的に検討を加えた結果, L-ドーパによる障害は, 細胞内小器官のうち, 特に粗面小胞体に強く認められた. 粗面小胞体は, 著明に開きリボゾームが消失して空胞化していた. 障害の

程度は, PEではAPEと比較して軽度であり, 酸素濃度を20~10%に下げることにより軽度になっていた. また, 隣接する粗面小胞体の間にライソゾームが認められ, 粗面小胞体の空胞化と癒合にはライソゾームが関与していると考えられた.

RPE内のドーパの経路について, 三島ら⁷⁾はアイソトープを用いて報告しており, 鶏卵の腹腔内に注射され

たドーパがRPEのゴルジ(Golgi)体に取り込まれた後、tubular channelを通り、メラニン合成を行う premelanosome や melanosome に運ばれることを観察している。本実験において、粗面小胞体が開いてリボゾームが消失していることから、培養液中のL-ドーパはRPE内に取り込まれた後、粗面小胞体の膜に障害を及ぼし、膜に結合したりリボゾームに影響を及ぼした可能性がある。しかし、投与されたL-ドーパが合成され、メラニンに至るまでの過程を観察するためにはアイソトープを用いた実験を培養RPEについても行う必要がある。

APEはPEに比べtyrosinase活性が低く、メラニン産生も少ないとされている¹¹⁾。このため生じる活性酸素やメラニン前駆物質が少なく、活性酸素の産生と活性酸素消去酵素(superoxide dismutase(SOD)やカタラーゼなど)の活性が低いレベルで均衡していることが推察される。メラニン顆粒に活性酸素を消去する作用があるとの報告¹⁴⁾⁻¹⁷⁾もあり、過剰のL-ドーパを投与することによりAPEはPEに比べ不活化できない活性酸素をより多く持つことになり、より強い細胞障害を呈したものと考えられた。

生体におけるRPEの酸素環境については、ネコの脈絡膜の酸素分圧は72 mmHg(9.5%×760 mmHg)であり¹⁸⁾、我々も20%、10%、5%酸素濃度での培養RPEの増殖率の測定で、10%が最も良好であったことを認めている。生体のRPEにとって最適な酸素濃度はおそらく10%に近い値と考えられる¹⁹⁾²⁰⁾。また、低酸素状態では消費されるSODが減少するためSOD活性が上昇し¹⁹⁾、L-ドーパの毒性も軽減すると報告²³⁾されている。これらのことから、10%酸素において障害が少なかったのは、20%酸素に比べ、10%酸素ではL-ドーパの酸化とメラニン産生経路が進まず、活性酸素とともにメラニン前駆物質の産生が低かったためと考えられる。

今回、我々はL-ドーパの細胞障害について、酸素濃度とメラニン顆粒の有無について検討を加えたところ、L-ドーパによる障害は粗面小胞体に顕著であり、メラニン顆粒の存在と低い酸素濃度が障害を軽減させることが明らかとなった。今後はSODを添加した実験系を用いて、活性酸素とL-ドーパの細胞障害についてさらに検討を加える方針である。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深謝申し上げます。

本論文論旨は、65th Annual Meeting of The American Association for Research in Vision and Ophthalmology (Sarasota, Florida 1993年5月)および第98回日本眼科学会総会(横浜市、1994年4月)において発表した。

文 献

- 1) Wick MM, Byers L, Frei E III: L-dopa: Selective toxicity for melanoma cells *in vitro*. *Science* 197: 468, 1977.
- 2) Akeo K, Ebenstein DB, Dorey CK: Dopa and oxygen inhibit proliferation of retinal pigment epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 49: 335-346, 1989.
- 3) 明尾 潔: 網膜色素上皮細胞の増殖と活性酸素. 活性酸素・フリーラジカル 3: 402-410, 1992.
- 4) Akeo K, Tanaka Y, Okisaka S: A comparison between melanotic and amelanotic retinal pigment epithelial cells *in vitro* concerning the effects of L-dopa and oxygen on cell cycle. *Pigment Cell Res* 7: 145-151, 1994.
- 5) Akeo K, Ueno N, Dorey CK: The effect of oxygen on melanin precursors released from retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Pigment Cell Res* 5: 379-386, 1992.
- 6) Prota G: Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 75: 122-127, 1980.
- 7) Mishima H, Hasebe H, Fujita H: Melanogenesis in the retinal pigment epithelial cells of the chick embryo. Dopa-reaction and electron microscopic autoradiography of ³H-dopa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 403-411, 1978.
- 8) Hochstein P: Futile redox cycling: Implications for oxygen radical toxicity. *Fundamental Applied Toxicol* 3: 215-217, 1983.
- 9) Tomita Y, Hariu A, Kato C, Seiji M: Radical production during tyrosinase reaction, dopa-melanin formation, and photoirradiation of dopa-melanin. *J Invest Dermatol* 82: 573-576, 1984.
- 10) Sealy RC, Puzyna W, Kalyanaraman B, Flex CC: Identification by electron spin resonance spectroscopy of free radicals produced during autoxidative melanogenesis. *Biochimica Biophysica Acta* 800: 269-276, 1984.
- 11) Pawelek JM, Lerner AB: 5,6-Dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature* 276: 627-628, 1978.
- 12) Pawelek JM, Korner A, Bergstrom A, Bologna J: New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells. *Nature* 286: 617-619, 1980.
- 13) Basu PK, Sarkar P, Menon I, Carre F, Persad S: Bovine retinal pigment epithelial cells cultured *in vitro*: Growth characteristics, morphology, chromosomes, phagocytosis ability, tyrosinase activity and effect of freezing. *Exp Eye Res* 36: 671-683, 1983.
- 14) Korytouski W, Hintz P, Sealy RC, Kalyanaraman B: Mechanism of dismutation of superoxide produced during autoxidation of melanin pigments. *Biophys Res Commun* 131: 659-665, 1985.
- 15) Musk P, Parsons PG: Resistance of pigmented human cells to killing by sunlight and oxygen radicals. *Photochem Photobiol* 46: 489-494, 1987.
- 16) Hubbard-Smith K, Hill HZ, Hill GJ: Melanin both causes and prevents oxidative base damage

- in DNA: Quantification by anti-thymine glycol antibody. *Radiation Research* 130: 160—165, 1992.
- 17) **Bustamante J, Bredeston L, Malanga G, Mordoh J**: Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell Res* 6: 348—353, 1993.
- 18) **Alder VA, Clingle SJ, Constable IJ**: The retinal oxygen profile in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 30—36, 1983.
- 19) **Akeo K, Curran SA, Dorey CK**: Superoxide dismutase activity and growth of retinal pigment epithelial cells are suppressed by 20% oxygen *in vitro*. *Curr Eye Res* 7: 961—967, 1988.
- 20) **Akeo K, Nagasaki K, Tanaka Y, Curran SA, Dorey CK**: Comparison of effects of oxygen and autoxidative enzymes on cell growth between retinal pigment epithelial cells and vascular endothelial cells *in vitro*. *Ophthalmic Res* 24: 357—364, 1992.
-