

第99回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

「活性酸素・フリーラジカルと眼疾患」

活性酸素・フリーラジカルによる硝子体の変化

上野 則夫

大阪大学医学部眼科学教室・株式会社資生堂医薬品研究所・基盤技術研究所

共同研究者

Bireswar Chakrabarti, 秋葉 純, Debnath Chattopadhyay, 梯 彰弘, 引地 泰一, 田野 保雄

要 約

人眼では加齢とともに硝子体が液化することが知られている。また、網膜硝子体疾患に伴い硝子体の液化がみられる。硝子体の構成成分の一つであるヒアルロン酸(HA)は活性酸素・フリーラジカル(以下、活性酸素)により低分子化することが知られており、硝子体のゲル構造の変化には活性酸素が関与していることが予想される。本研究では、種々の発生源の異なる活性酸素を用いて、それが硝子体に及ぼす影響について検討した。光増感剤としてリボフラビン(RF)を用い、ウシ硝子体を白色光で照射し、3時間後に硝子体液化を観察した。RFの光化学反応による硝子体液化は活性酸素によるHAの脱重合によるものであると推測された。硝子体内にはRFが微量存在するため、RFの光化学反応は加齢とともに起こる硝子体液化現象に寄与すると推測された。色素であるヘムと類似の構造を持つ光増感剤であるヘマトポルフィリンを用いてウシ硝子体を白色光で照射したところ、8時間後に硝子体は液化した。硝子体出血後にみられる硝子体液化には活性酸素が関与しているものと推測された。

アスコルビン酸(AA)存在下、金属イオン(Fe^{2+} , Cu^{2+})のウシ硝子体に与える影響について検討した。その結果、 Fe^{2+} あるいは Cu^{2+} により硝子体は液化し、AA添加により液化は増大した。金属イオン由来の活性酸素も硝子体液化に関与することが明らかとなった。眼内炎症における硝子体の変化を検討するため、エンドトキシンを用いて家兎眼に眼炎症モデルを作製し、硝子体の変化を検討した。その結果、硝子体は液化し、この液化はスーパーオキシドディスムターゼにより抑制された。したがって、炎症による硝子体液化にも活性酸素が関与することが明らかとなった。硝子体の変化に種々の要因が関与しているが、活性酸素が深く関与していると考えられる。網膜硝子体疾患や加齢による硝子体変性を防止あるいは遅延させるため、明確な病因に基づいた確かな治療法を求める研究が期待される。(日眼会誌 99:1342-1360, 1995)

キーワード：硝子体、液化、活性酸素、フリーラジカル、加齢変化

Changes in Vitreous Structure Caused by Oxygen Free Radicals

Norio Ueno

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, and Pharmaceutical Laboratories and Basic Research Laboratories, Shiseido, Inc

Abstract

Vitreous liquefaction in humans is considered to be part of the normal ocular aging process and is associated with vitreoretinal pathology. Because hyaluronic acid (HA), one of the main components

of the vitreous gel structure, is degraded by reactive oxygen species (ROS) including oxygen free radicals, the structural changes in the vitreous may be caused by ROS. To investigate the effect of ROS on

別刷請求先：223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050 資生堂基盤技術研究所高分子材料研究グループ 上野 則夫
(平成7年8月25日受付,平成7年10月27日改訂受理)

Reprint requests to: Norio Ueno, Ph.D. Polymer Research Group, Basic Research Laboratories, Shiseido. 1050 Nippa-cho, Kouhoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 223, Japan

(Received August 25, 1995 and accepted in revised form October 27, 1995)

the vitreous gel structure, we treated animal vitreous with ROS, which was generated from various sources. Using riboflavin as a photosensitizer, calf vitreous was irradiated with visible light (two 15-W fluorescent lamps) and found to be considerably liquefied. The liquefaction resulted from HA depolymerization induced by ROS. Because of the small amount of riboflavin naturally present in the vitreous, a riboflavin-sensitized photochemical reaction may contribute to age-related vitreous liquefaction. Hematoporphyrin (HP), which is similar in chemical structure to heme in blood, was also used as a photosensitizer. Irradiation with HP destroyed the calf vitreous gel structure and caused liquefaction. A HP-sensitized photochemical reaction may contribute to vitreous liquefaction observed after vitreous hemorrhage. Because metal ions, including Fe^{2+} and Cu^{2+} , can catalyze to generate ROS, liquefaction occurred when we treated calf vitreous with Fe^{2+} or Cu^{2+} at 4°C. Adding ascorbic acid to the vitreous during the reaction increased the rate of liquefaction. Therefore, metal ion catalyzed ROS

may also contribute to vitreous liquefaction, such as that found in an injured eye with siderosis. To investigate the relation between inflammatory cell mediated ROS and vitreous liquefaction, an endotoxin-induced uveitis model was created in the rabbit eye. Upon inflammation, the vitreous gel contracted and released a water-like liquid. Because superoxide dismutase can suppress the liquefaction, the destruction of the vitreous gel structure resulted from ROS generated from inflammatory cells. Although many unknown factors contribute to vitreous liquefaction, ROS may be the main cause of vitreous structure alterations. To prevent or delay the progress of vitreous liquefaction in the normal aging process or vitreous pathology, a new therapeutic procedure based on clear scientific studies is needed. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1342-1360, 1995)

Key words: Vitreous, Liquefaction, Reactive oxygen species, Free radicals, Aging process

I 緒 言

眼球の約 4/5 を占める硝子体は、水晶体、毛様体と網膜の間に位置し、透明で無血管のゲル状の物質である。硝子体は、光学的に透明性を維持し、周囲の眼組織を機械的に支持するだけではなく、その高い粘弾性によりショックアブソーバーとして働き、外傷性網膜剝離を予防するなど、外力から眼組織を保護している。硝子体ゲルは、約 99% の水と 0.9% の低分子成分(塩化ナトリウム、アスコルビン酸、少量の脂質など)と 0.1% の高分子成分[ヒアルロン酸(HA)、コラーゲン、他の可溶性タンパク質など]から構成されている^{1)~6)}。硝子体ゲルのレオロジカルな状態(弾性、粘性)は、種や年齢によって大きく異なっている。加齢による硝子体液化⁷⁾や網膜硝子体疾患に伴う硝子体液化はしばしば観察される^{3)~9)}。40~50 代の硝子体には液化がみられ、70~80 代では硝子体の 50% 以上が液化していることが知られている^{3)~9)}。このように眼科の臨床において硝子体液化はしばしば観察されているにもかかわらず、その液化機構については明確な説明がなされていない。

硝子体液化は加齢現象の一つと考えられているが、硝子体のゲル構造の喪失と硝子体の異常には明らかに関連がある¹⁰⁾。例えば、死体眼の観察によると、後部硝子体剝離眼には硝子体液化の程度が強く⁹⁾¹¹⁾¹²⁾、また、硝子体液化は網膜色素変性、強度近視、先天網膜分離症、周辺部ぶどう膜炎、ワグナー病などにしばしば観察される¹³⁾¹⁴⁾。

硝子体の主要構成成分であるコラーゲンは、タイプ I

や III のコラーゲン分子と同様に、3 本のコイル状のポリペプチドのサブユニット(α 鎖と呼ばれる)から成るタンパク質(長さ約 300 nm, 直径約 1.5 nm)であり、それぞれのサブユニットは 1,050 のアミノ酸から成ると考えられている^{3)~6)}。この 3 本の鎖が一つの軸の周りにコイル状に回旋し、それぞれの鎖の間は水素結合の架橋で結合して、特徴的な右回りの三重らせん鎖を形成している。コラーゲン分子は、すぐ隣の分子に対して約 1/4 ずつずれて配列して束になり、コラーゲン原繊維(fibril)を作っている^{3)~6)15)16)}。硝子体コラーゲンは、 $\alpha 2$ 鎖が認められないことから、軟骨に特異的と考えられていたタイプ II コラーゲンからできていると思われてきたが、アミノ酸組成が軟骨のコラーゲンとは微妙な違いがあるため、硝子体のコラーゲン繊維は特殊なタイプ II コラーゲンから成り立っていることが明らかとなった^{3)16)~18)}。免疫組織学的手法による研究から、発生期の硝子体やその後の発達過程の硝子体中にタイプ II とともにタイプ IX コラーゲンがあることが示された。したがって、硝子体のコラーゲンは大部分は特殊なタイプ II であり、少量のタイプ IX を含有していると考えられる^{6)16)~20)}。

硝子体のもう一つの主要構成成分である HA は硝子体ゲル構造の安定化に重要な役目を果たしている^{1)~8)}。HA はウシ硝子体からはじめて抽出・精製され、ウロン酸を含んでいるため、「ガラス状」という意味の(hyalos)とウロン酸(uronic acid)から hyaluronic acid(ヒアルロン酸)と名づけられた²¹⁾。HA は、滑液、皮膚、硝子体など、哺乳類のさまざまな器官や組織に広く存在している。HA

は、二糖単位(N-アセチル- β -D-グルコサミンと β -D-グルクロン酸)が繰り返し連続して一本の長い線状の(枝別れの無い)高分子を形成している生体高分子化合物である^{22)~24)}。その平均分子量は、抽出起源により大きく異なるが、人眼硝子体で約 300~400 万である^{1)~6)}。乾燥 HA の体積比は、およそ 0.66 ml/g であるのに対して、生理食塩水中の HA の体積比は、およそ 2,000~3,000 ml/g である。したがって、最大限に水分を含んだ HA と乾燥 HA の比は、3,000~4,500 である⁴⁾。これは、HA の長い線状の分子が、溶液中では開いたコイル状の形態を示し、大きなスペースを占めていることを示唆するものである。HA の水を保持する能力は、その開いたコイル状の三次元構造による可能性が高いとされている^{4)22)~24)}。

HA は、その化学的な性質から、立体配座(conformation)を変化させたり、他の化合物(例えば、コラーゲン)との相互作用の変化を引き起こす。このような HA の変化は硝子体ゲル構造を変化をさせ、硝子体液化を引き起こすものと推測されている¹⁰⁾²³⁾。これは、硝子体に HA 分解酵素であるヒアルロニダーゼを注入すると硝子体液化と網膜剥離が引き起こされることから明らかである^{25)~27)}。もちろん、ヒアルロニダーゼを硝子体に注入することは生理的ではないが、この研究により、HA の脱重合化が硝子体のゲル構造の崩壊に重要な役割を果たしていることがわかった。このような HA の変化による硝子体ゲル構造の喪失は加齢による硝子体液化に深く関与するものと考えられる⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾。

Balazs らは、HA を含む多糖類に対する紫外線や γ 線の影響について検討し、照射により発生するであろうヒドロキシラジカル(OH, hydroxyl radical)により多糖類が脱重合することを明らかにした^{10)28)~30)}。エネルギーの高い紫外線や放射線のみならず、可視光線でも色素やアスコルビン酸の存在下、HA の粘度が低下したり、また、硝子体のゲル溶積が低下することが報告されている³¹⁾³²⁾。また、炎症細胞内で酵素により生成されたスーパーオキシド(O_2^- , superoxide anion radical)により滑液中の HA を脱重合することも知られている¹⁰⁾³³⁾。

光照射により、生体内では光増感剤の存在下、分子状酸素から活性酸素・フリーラジカル、例えば、一重項酸素(1O_2 , singlet oxygen), O_2^- , OH, 過酸化水素(H_2O_2 , hydrogen peroxide)が発生し、また、他の原因(金属イオン類の触媒作用や炎症反応など)により活性酸素・フリーラジカルが発生し、その近傍の組織に傷害を与える¹⁰⁾³⁴⁾³⁵⁾。特に、眼組織は光を受けて機能する感覚器であり、紫外線・可視光線の影響を受けやすい。その光学的特性から角膜は 300 nm 以下の波長の短い(エネルギーの高い)紫外線を吸収し傷害を受ける(このことが水晶体・硝子体を保護していることになる)^{35)~38)}。水晶体は角膜を透過した 300~400 nm の紫外線を吸収し、そのエネルギーが水晶体の主要構成成分のクリスタリンの変性を引

き起こすため、紫外線照射が白内障の原因の一つと考えられている^{39)~41)}。硝子体は水晶体・角膜を透過してきた 400 nm 以上の可視光線を受けるが、そこに光増感剤があれば活性酸素・フリーラジカルが発生し傷害を受ける¹⁰⁾。特に、硝子体は他の眼組織に比べ細胞成分が少なく、また、代謝率も低く、傷害に対する回復力が弱く、組織傷害が顕著に現れると推測される。

本研究では、発生源の異なる活性酸素・フリーラジカルが硝子体に及ぼす影響について検討した。なお、後述するように活性酸素のなかにはフリーラジカルである物やそうでない物も含まれているが、本論文では、主に活性酸素の硝子体に与える影響を検討するので、特にことわりのない限り、「活性酸素・フリーラジカル」の代わりに「活性酸素」を用いる。

II 光化学反応による硝子体の変化

1. リボフラビン存在下の白色光照射による仔牛硝子体の変化

リボフラビン(RF)は水溶性ビタミンとして種々の働きがあり、医薬品としても重要であるが⁴²⁾、また、光増感剤としても作用することがある¹⁰⁾³⁵⁾。光増感剤は、光エネルギーを受けて化学構造が変化し、その過程で化学的に活性な物質を作り出すことができる化合物である^{43)~45)}。RF の場合、白色光を受けて、酸素から活性酸素を発生させる。この活性酸素が HA を脱重合させて、低分子化させることは知られている³⁵⁾⁴⁴⁾。そこで、硝子体内に存在する RF を光増感剤として用いて、それにより発生する活性酸素による硝子体の変化を検討した¹⁰⁾。

実験には仔牛の硝子体を用いた。屠殺場から保冷箱に入れて輸送された新鮮な仔牛眼の角膜輪部から 5 mm 後方の強膜を剪刀で輪状に切開し、網膜、脈絡膜、強膜を除去した後、硝子体を水晶体後面から剥離した(図 1)¹⁰⁾。取り出した硝子体をあらかじめ秤量しておいた 20 ml のビーカーに入れ、硝子体の重量を測定し、RF (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加した(最終濃度: 3 μ mol/L)。さらに、二つの対照群、すなわち、遮光対照群(光増感剤を含有し遮光した硝子体群)と照射対照群(光増感剤を含有せず白色光照射を行った硝子体群)を用意した。硝子体から水分の蒸発を防ぐためラップでビーカーの口を塞ぎ、光増感剤を完全に硝子体内に浸透させるため、ビーカーを約 16 時間冷蔵庫に保管した。その後、硝子体を 37°C に保ちながら、15 W の蛍光灯 2 本から成る蛍光灯スタンドにより 0~6 時間硝子体を白色光で照射した¹⁰⁾。この状態で硝子体に照射される白色光の強度は約 22,000 Lux であり、これは快晴のボストン市の初夏の正午の太陽光の約 4 分の 1 と同じ照射強度であった。

照射後、図 1 のように、グラスファイバーの網(10×16 cm, 網目サイズ: 1.5 mm)と濾紙(Whatmann No.1, 直径 18.5 cm)により、硝子体をゲル硝子体と液化硝子体に

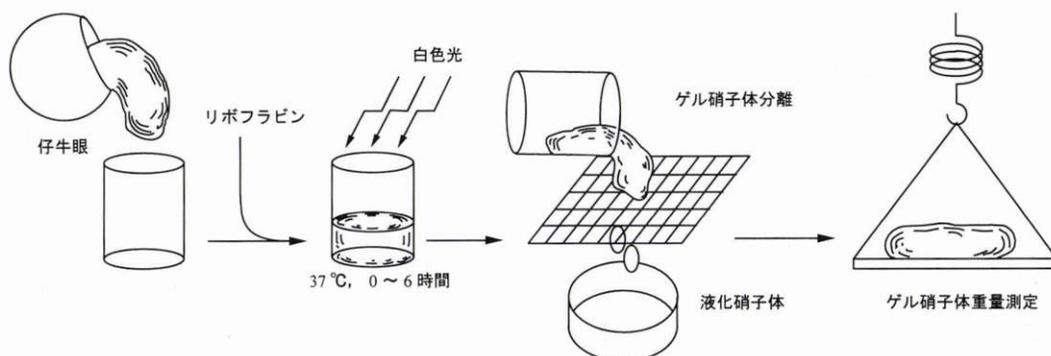


図 1 リポフラビン (RF) 存在下の硝子体の白色光照射実験.

仔牛眼は角膜輪部から 5 mm 後方の強膜を剪刀で輪状に切開し、網膜、脈絡膜、強膜を取り除いた後、硝子体を水晶体後面から剝離した。取り出した硝子体に RF を加えた (最終濃度: 3 μmol/L)。増感剤を完全に硝子体内に浸透させるため、ビーカーを約 16 時間冷蔵庫に保管し、その後硝子体を 37°C に保ちながら、15 W の蛍光灯 2 本から成る蛍光灯スタンドにより硝子体を 0 ~ 6 時間白色光照射を行った。照射後、グラフファイバーの網 (10×16 cm, 網目サイズ: 1.5 mm) と濾紙により、硝子体をゲル硝子体と液化硝子体に分離し、ゲル硝子体の重量を測定し、硝子体ゲル率を計算した。

分離し、ゲル硝子体の重量を測定し、硝子体ゲル率を下記の式により計算した¹⁰⁾。

硝子体ゲル率 (%) =

$$\frac{\text{分離後のゲル硝子体 (g)}}{\text{照射前のゲル硝子体 (g)}} \times 100$$

さらに、光化学反応による硝子体の変化と、酵素による硝子体の変化とを比較するため、ヒアルロニダーゼ (HAase) を用いて実験を行った。硝子体に HAase (Sigma) を添加し (最終濃度: 60 units/g)、酵素を完全に

硝子体内に浸透させるため、約 40 時間冷蔵庫に保管した。その後、対照群とともに 37°C で 0 ~ 6 時間培養した (対照群および実験群とも遮光状態)。培養後、上述の方法でゲル硝子体を分離し、硝子体ゲル率を求めた¹⁰⁾。

実験の結果、図 2 のように RF 存在下、照射 6 時間後の実験群のゲル硝子体は液化し、多量の水分がネットの下に濾紙に吸収され、その重量は照射開始前に比べ 23% 減少し、二つの対照群と比較してその減少は有意であった。また、HAase を用いた実験では、光化学反応によるよりも強い硝子体液化反応がみられた (図 3)。

以上の実験の結果をまとめると、① RF 存在下、白色光

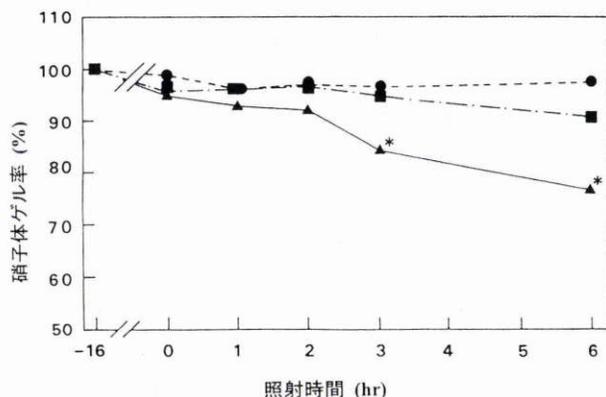


図 2 リポフラビン存在下の光化学反応による硝子体の変化.

リポフラビン (RF) 存在下に仔牛硝子体を白色光で照射し、硝子体ゲル率の変化を観察した。図中の●は遮光対照群 (RF を含有し遮光した硝子体群) を、■は照射対照群 (RF を含有せず白色光照射を行った硝子体群) を、▲は実験群 (RF 3 μmol/L 含有した硝子体群) を表す。それぞれのデータポイントは 6 個の平均値を表す。*: p < 0.05 (Kruskal-Wallis test). (Ueno N, et al: Effects of visible-light irradiation of vitreous structure in the presence of a photosensitizer. Exp Eye Res 44: 863-870, 1987 より Academic Press の許可を得て転載)

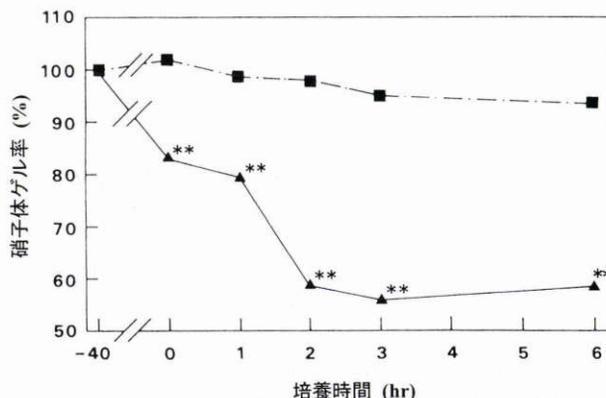


図 3 ヒアルロニダーゼによる硝子体の変化.

硝子体にヒアルロニダーゼ (HAase) を添加し、培養後の硝子体ゲル率の変化を観察した。図中の■は対照群を、▲は実験群 (最終濃度: 60 units/g) を表す。それぞれのデータポイントは 6 個の平均値を表す。**: p < 0.01 (Mann-Whitney test). (Ueno N, et al: Effects of visible-light irradiation of vitreous structure in the presence of a photosensitizer. Exp Eye Res 44: 863-870, 1987 より Academic Press の許可を得て転載)

照射により硝子体は有意に液化した。② RF の光化学反応により発生した活性酸素により HA が脱重合を起こし低分子化することから³³⁾³⁵⁾, RF の光化学反応による仔牛硝子体の液化は、活性酸素(主に $\cdot\text{OH}$)による HA の脱重合によるものであると考えられた。③ 硝子体内には RF が微量存在するため⁴⁶⁾, RF と可視光による硝子体液化は、加齢による硝子体液化現象に寄与しているものと考えられた¹⁰⁾。

2. リボフラビン存在下の白色光照射による硝子体コラーゲンおよびヒアルロン酸の変化

上述の実験で、RF と白色光により発生した活性酸素により硝子体は液化することが明らかとなり¹⁰⁾, 加齢による硝子体の液化のモデルになることが考えられた。臨床的に高齢者の液化硝子体中には、比較的太く絡まったコラーゲン繊維が観察されることから、活性酸素が硝子体の主要構成成分であるコラーゲンや HA の物性に影

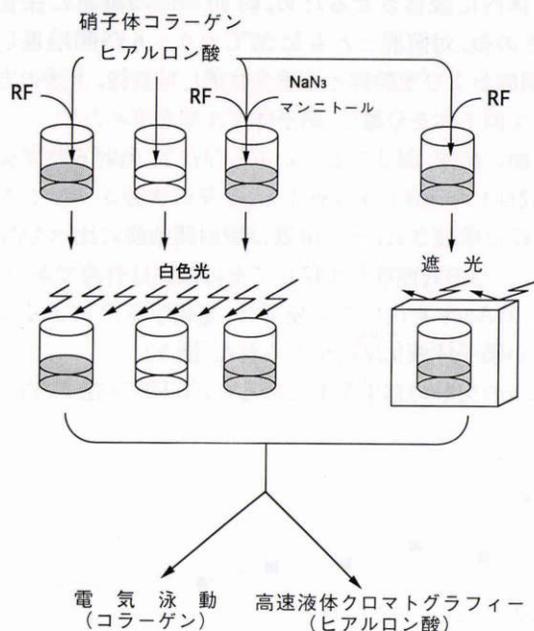


図4 リボフラビン存在下の硝子体コラーゲンあるいはヒアルロン酸(HA)の照射実験。

硝子体コラーゲンは仔牛硝子体から抽出・精製した。鶏冠から抽出・精製された分子量約200万のHAを用いた。照射は15Wの蛍光灯2本から成る蛍光灯スタンドにより行った。リボフラビンの硝子体実験と同様に、遮光対照群と照射対照群を用意した。一定時間照射後、コラーゲンは、sodium dodecyl sulfate (SDS)ゲル電気泳動法により、HAは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。なお、SDSゲル電気泳動法ではグラディエントゲル(4~20%, Daiichi Gel, Integrated Separation Systems, Hyde Park, MA, USA)を用いた。HPLCシステムは、Waters 600 Multisolvant Delivery System (Milipore, Milford, MA)とゲルパーミエーションHPLCカラム(Spherogel TSK G 6000 PW, 7.8 mm i.d. ×30 cm; Beckman, San Ramon, CA, USA)を用いた⁴⁷⁾。

響を与えると考えられる⁵⁾。そこで、活性酸素の硝子体コラーゲンやHAに対する影響について検討した⁴⁷⁾。

実験方法の概略を図4に示す。硝子体コラーゲンは仔牛硝子体から抽出・精製した^{47)~49)}。照射実験にはコラーゲンを0.5 mol/Lの酢酸に溶解して用いた。HAは鶏冠から抽出・精製された分子量約200万のものを用いた⁴⁷⁾。

照射実験では、コラーゲン溶液(4 mg/l)を小型のプラスチックビーカー(直径11 mm)に入れ、RFを添加し(最終濃度:1 mmol/L)、蒸発を防ぐためビーカーに透明ラップでカバーを掛け、白色光で照射した。HA(1 mg/ml)は、照射面積200 mm²の小型のプラスチック皿に入れ、RFを添加し(最終濃度:0.2 mmol/L)、蒸発を防ぐため透明のプラスチックカバーを掛け、白色光で照射した。照射方法はRFの硝子体実験と同様に、15Wの蛍光灯2本から成る蛍光灯スタンドにより0~24時間白色光を照射した。また、RFの硝子体実験と同様に¹⁰⁾, 遮光対照群と照射対照群を用いた。一定時間照射後、コラーゲンは sodium dodecyl sulfate (SDS)ゲル電気泳動法により、HAは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した⁴⁷⁾⁵⁰⁾。

RF存在下に白色光照射後、コラーゲンを4% SDS サンプルバッファに入れ通常のように処理すると、実験群のサンプルチューブの底部に沈殿が認められたが、遮光対照群および照射対照群では沈殿は観察されなかった。これらのコラーゲンサンプルをSDSゲル電気泳動法で分析した結果が図5である。レーン1~6までは、それぞれ0, 0.5, 1, 3, 6, 24時間照射したものである。レーン7と8は照射対照群と遮光対照群である。実験群は対照群と比較して照射時間が長くなるにつれて、コラーゲン α 鎖のバンドが薄くなり、架橋形成して不溶化した部分が増加し、可溶性成分が減少していることが明らかである。このSDSゲルのデンスitomータースキンの結果を図6に示す。照射時間が長くなるにつれて α 鎖のバンドが薄くなり、ピークが低くなってゆき、コラーゲンが徐々に架橋形成して可溶性成分が減少してゆくことが示されている。また、 α 鎖に対する β 成分(α 鎖の二量体)の割合が増加し、コラーゲンの架橋形成の傾向を示している。さらに、 α 鎖のピークは少し右に移動して α 鎖の分子量が増加していることも示されている⁴⁷⁾。

HPLCによるHAの分析結果を図7に示す。RFの存在下白色光の照射によりHAのピークが右に移動して、照射時間とともにHAの分子量が低下してゆくことがわかる。このHAの分子量の変化を照射時間との関係を表1に示す⁴⁷⁾。

さらに、RFの存在下の硝子体コラーゲンの変化のメカニズムを検討するため、 $^1\text{O}_2$ の消去剤であるアジ化ナトリウム(NaN_3)を用いてRFの照射実験を行った⁵¹⁾。図8はそのSDSゲル電気泳動の結果である。レーン3, 4, 5のように NaN_3 の濃度が高くなるにつれて α 鎖の

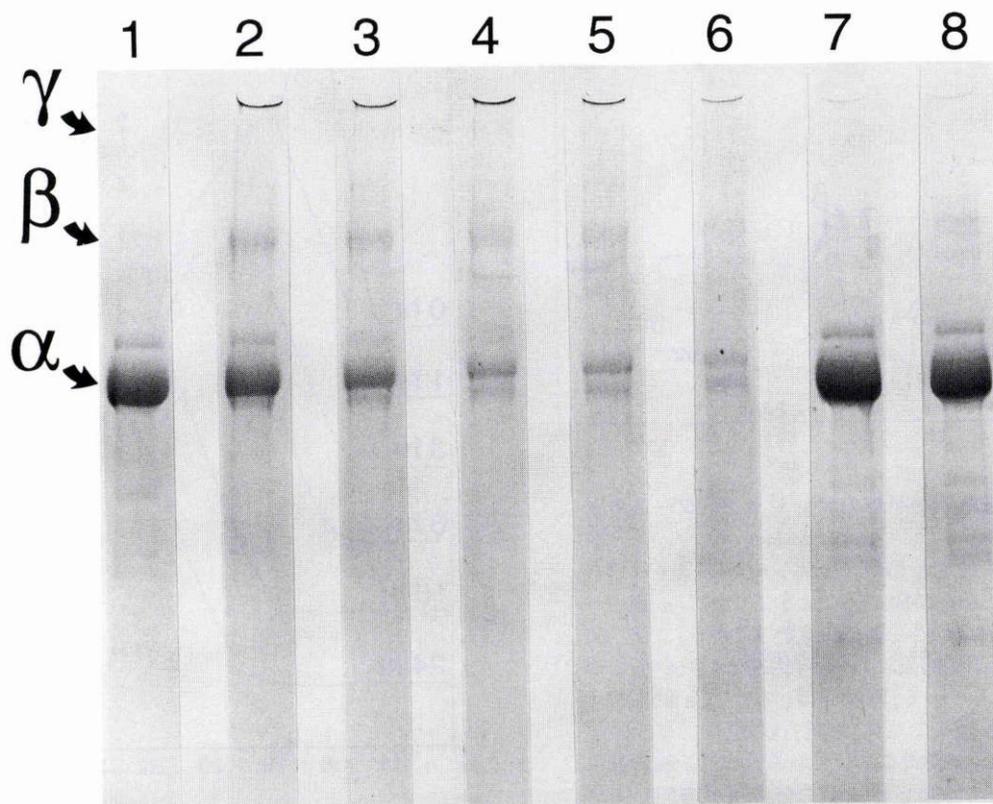


図5 リボフラビン存在下、白色光照射後の硝子体コラーゲンの sodium dodecyl sulfate (SDS) ゲル電気泳動法の結果。

レーン1～6は、それぞれ0, 0.5, 1, 3, 6, 24時間照射したものである。レーン7と8は照射対照群と遮光対照群である。実験群は対照群と比較して照射時間が長くなるにつれて、コラーゲンα鎖のバンドが薄くなり、架橋形成して不溶化した部分が増加し、可溶性成分が減少していることが明らかである。(Akiba J, et al: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. Curr Eye Research 13: 505-512, 1994 より Oxford University Press の許可を得て転載)

バンドが濃くなり、可溶性成分が増加し、コラーゲンの架橋形成が抑制されているのがわかる。一般に¹O₂は重水中(D₂O)で、その寿命が長くなることが知られている³⁵⁾⁵¹⁾。そこで、コラーゲンに対する¹O₂の作用を確認するため、D₂Oでの照射実験を行った(図9)。レーン1のD₂Oで

は、レーン2の軽水中よりもコラーゲンのバンドは薄くなり、架橋形成がより強く起こっていることが示されている。一方、HAのD₂OでのRF存在下の照射実験では、D₂Oの効果はみられず、HAの低分子化は¹O₂によるものではないと推測された⁴⁷⁾。

表1 リボフラビン (RF) 存在下、白色光照射によるヒアルロン酸の分子量の変化^a

照射時間 (hr) ^b	分子量 (万)
0	202
1	101
3	52
6	39
16	21
24	16

^a: ヒアルロン酸 (HA) の分子量はゲルパーミエーション高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。既知の分子量の HA によりキャリブレーションした HPLC カラムを用いることにより、サンプルの分子量を計算した⁴⁷⁾。

^b: HA (1 mg/ml) は、照射面積 200 mm² の小型のプラスチック皿に入れ、RF を添加し (最終濃度: 0.2 mmol/L)、15 W の蛍光灯 2 本から成る蛍光灯スタンドにより 0~24 時間白色光を照射した。

ここでの結果を整理すると、① RF と白色光の光化学反応により、硝子体の主要成分であるコラーゲンは架橋形成して一部は不溶化し、可溶性成分のα鎖の分子量が増加した。② HA は脱重合して低分子化した、③ *in vitro* での仔牛硝子体の液化現象¹⁰⁾はこのようなメカニズムにより起こっているものと考えられた⁴⁷⁾。

3. ヘマトポルフィリン存在下の白色光照射による硝子体の変化

これまで硝子体内に微量存在する RF の光化学反応による硝子体の液化現象について検討してきたが、それ以外の原因によっても硝子体液化が観察される。例えば、硝子体出血時においても硝子体の一部が変化することが知られている⁵⁾。そこで、血液色素ヘムと同じポルフィリン化合物であるヘマトポルフィリン (HP) を用いて⁵²⁾、白色光照射時における硝子体の変化を検討した⁵³⁾。また、その硝子体変化のメカニズムを検討するため、HP あるいは

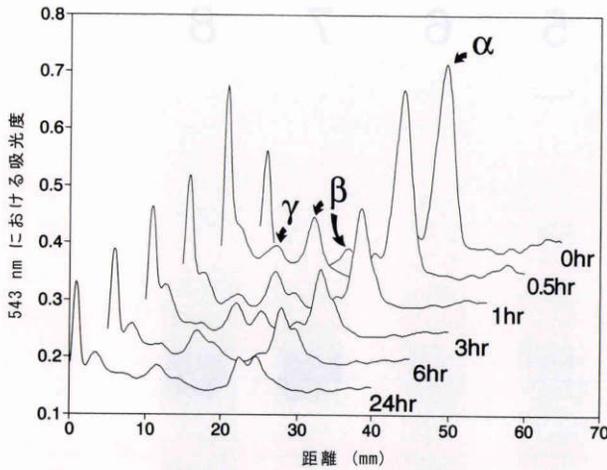


図6 SDS電気泳動ゲルのデンシトメータースキャン。

SDS電気泳動ゲル(図5)をデンシトメーターでスキャンした。照射時間が長くなるにつれて、 α 鎖のバンドが薄くなり、ピークが低くなってゆき、コラーゲンが徐々に架橋形成して、可溶性成分が減少してゆくことを示している。照射時間とともに、 α 鎖に対する β 成分(α 鎖の二量体)の割合が増加し、コラーゲンの架橋形成の傾向を示している。また、 α 鎖のピークは少し右に移動して α 鎖の分子量が増加していることも示されている。なお、デンシトメータースキャンにはスキャナーアタッチメント付きの分光光度計(DU-70, Beckman, Fullerton, CA, USA)を用いた。(Akiba J, et al: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. Curr Eye Research 13: 505-512, 1994よりOxford University Pressの許可を得て転載)

血液色素の代謝物であり、生体内で白色光により活性酸素を発生するビリルビンを用いて³⁴⁾⁵¹⁾⁵²⁾、コラーゲンやHAに対する作用を検討した⁵⁴⁾⁵⁵⁾。

HP存在下の硝子体照射実験は、仔牛の硝子体を用い、図1のRFの実験と同様の方法で硝子体を取り出し、硝子体ゲル1g当たり0.1 μ mol(以下0.1 μ mol/gと表す)のHP(Sigma)を添加した。RFの実験¹⁰⁾と同様に遮光対照群と照射対照群を用意した。硝子体から水分の蒸発を防ぐためラップでビーカーの口を塞ぎ、光増感剤を完全に硝子体内に浸透させるため、ビーカーを約16時間冷蔵庫に保管した。その後、15Wの蛍光灯2本から成る蛍光灯スタンド(照射強度:約22,000Lux)により硝子体を0~24時間白色光照射を行った。照射後RFの実験と同様に硝子体ゲル率を計算した¹⁰⁾。また、照射後のゲルの硬さを測定するため、ゲルの圧縮率を測定した。測定には物質の硬度を測定するために用いられる針入度計(penetrometer)を用い、硝子体ゲルのような柔軟な物質の測定のため、その先端の針をプランジャーに変更して用いた。圧縮率が高いときはプランジャーが速く落下し、プランジャー速度(mm/min)が大きい値を示し、ゲルは柔らかいことが示される⁵³⁾。

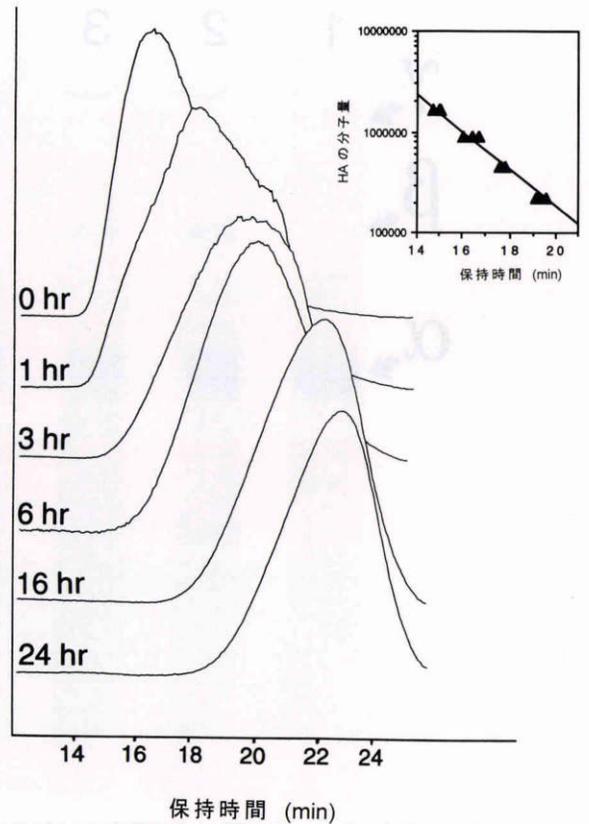


図7 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるヒアルロン酸(HA)分子量の測定。

リポフラビン存在下、白色光の照射によりHAのピークが右に移動して、照射時間とともにHAの分子量が低下してゆくことを示している。挿入図は既知の分子量のHAによる検量線を示し、キャリブレーションしたHPLCカラムを用いることにより、サンプルの分子量を計算した。(Akiba J, et al: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. Curr Eye Research 13: 505-512, 1994よりOxford University Pressの許可を得て転載)

HPによる照射実験の結果を図10に示す。二つの対照群では24時間照射後、約8%の硝子体ゲルの減少を示したのに対して、実験群では照射時間の延長とともに硝子体ゲル率は低下し、24時間には14%のゲルが有意に減少した。照射24時間後のHPの用量作用曲線では、HPの濃度依存的に硝子体ゲル率が低下してゆくことが明らかとなった(図11)⁵³⁾。

白色光照射後の硝子体ゲルの状態を検討した結果、RFの実験では硝子体ゲル構造が変化して柔らかくなったが、HPでは、硝子体は水分を失っているにもかかわらず、そのゲルの形態を保っていた。結果は表2に示すように、照射8, 24時間とも、実験群と対照群の硝子体の圧縮率には有意差はみられず、HP存在下白色光照射により、硝子体はそのゲル構造を保ったまま水分を失い、硝子体ゲル率が低下したことが明らかとなった。これは、硝子体ゲルの「離漿」(syneresis)であると考えられた⁵³⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾。

次に、HP存在下の白色光照射による硝子体ゲルの離

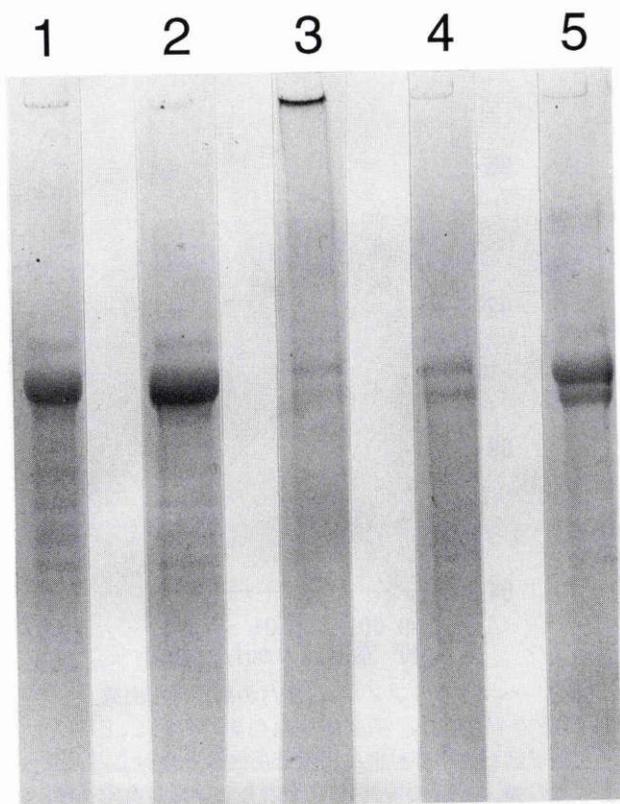


図 8 アジ化ナトリウム(NaN_3)存在下での照射実験後の硝子体コラーゲンの SDS ゲル電気泳動の結果。

リポフラビン(RF)の存在下の硝子体コラーゲンの変化のメカニズムを検討するため、一重項酸素の消去剤の NaN_3 を用いて RF の照射実験を行った。レーン 1 と 2 はそれぞれ遮光対照群と照射対照群である。レーン 3, 4, 5 のように NaN_3 (0, 10, 100 mmol/L) の濃度が高くなるにつれて、 α 鎖のバンドが濃くなり、可溶性成分が増加し、コラーゲンの架橋形成が抑制された。(Akiba J, et al: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. Curr Eye Research 13: 505-512, 1994 より Oxford University Press の許可を得て転載)

漿現象の作用メカニズムを検討するため、コラーゲンゲルを HP (最終濃度: 1 mmol/L) とともに、毛細管 (内径: 0.46 mm, 長さ: 100 mm) につめて、これらに 0, 24, 48, 96 時間の白色光照射を行い、コラーゲンゲルの長さの変化を検討した⁵³⁾。その結果、HP を含有したコラーゲンゲルは照射時間の経過とともに、二つの対照群に対して有意に短くなり、HP 存在下、白色光によりコラーゲンゲルが収縮したことが明らかとなった (図 12)。これは、HP 存在下、白色光から発生する活性酸素 (主に $^1\text{O}_2$ と考えられている)³⁴⁾⁵¹⁾⁵⁸⁾ により、コラーゲン分子が変性し、その分子間に何らかの架橋形成反応が起こったものと推測された⁵³⁾。

さらに、HP 存在下、白色光により発生する活性酸素によるコラーゲン収縮の分子レベルでのメカニズムを検討するため、硝子体およびタイプ I コラーゲン (カンガルー尻尾から抽出, Sigma) を用いて、RF のコラーゲン実験

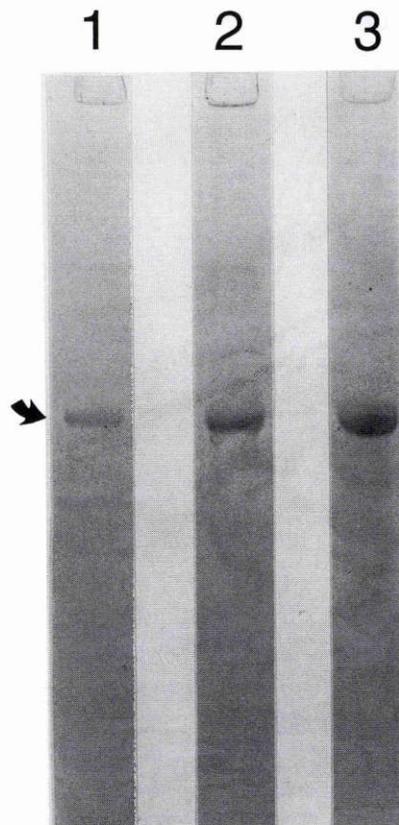


図 9 重水中 (D_2O) での照射実験後の硝子体コラーゲンの SDS ゲル電気泳動の結果。

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は重水中 (D_2O) で寿命が長くなることが知られていたため、コラーゲンに対する $^1\text{O}_2$ の作用を確認するため、 D_2O での照射実験を行った。レーン 1 の D_2O でコラーゲンのバンドは、レーン 2 の軽水中よりも薄くなり、架橋形成がより強く起こっていることを示している。レーン 3 は遮光対照群である。(Akiba J, et al: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. Curr Eye Research 13: 505-512, 1994 より Oxford University Press の許可を得て転載)

表 2 硝子体ゲルの圧縮率^{a)}

照射時間 (hr)	プランジャー速度 (mm/min) ^{b)}		
	遮光対照群	照射対照群	実験群
8	7.59 ^{c)}	7.59	8.24
24	7.01	7.62	7.49

^{a)} : 照射後のゲルの硬さを測定するため、物質の硬度を測定するために用いられる針入度計 (penetrometer) (Thomas, Philadelphia, PA, USA) の先端の針をプランジャーに変更して用いた。圧縮率が高いときはプランジャーが速く落下し、プランジャー速度 (mm/min) が大きい値を示し、ゲルは柔らかいことが示される。

^{b)} : プランジャー速度 (mm/min) は、1 分ごと 4 回プランジャーの位置を測定し、経過時間と移動距離の回帰直線の傾きを計算し、プランジャー速度 (mm/min) とした。

^{c)} : 7~8 の測定値の中央値を表す。

(Kakehashi A, et al: Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. Ophthalmic Res 26: 51-59, 1994 より S. Karger の許可を得て転載)

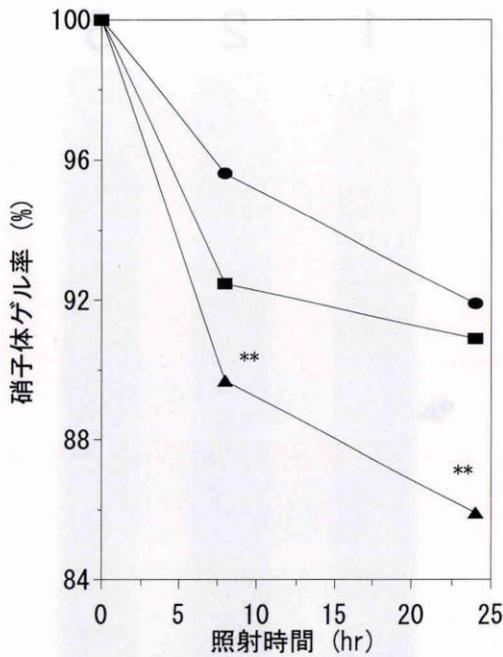


図10 ヘマトポリフィリン(HP)存在下の白色光照射による硝子体の変化。

HP存在下に仔牛硝子体を白色光で照射し、硝子体ゲル率の変化を観察した。図中の●は遮光対照群(HPを含有し遮光した硝子体群)を、■は照射対照群(HPを含有せず白色光照射を行った硝子体群)を、▲は実験群(HP 0.1 $\mu\text{mol/g}$ 含有した硝子体群)を表す。それぞれのデータポイントは7~8個の中央値を表す。**: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test). (Kakehashi A, et al: Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. Ophthalmic Res 26: 51-59, 1994 より S. Karger の許可を得て転載)

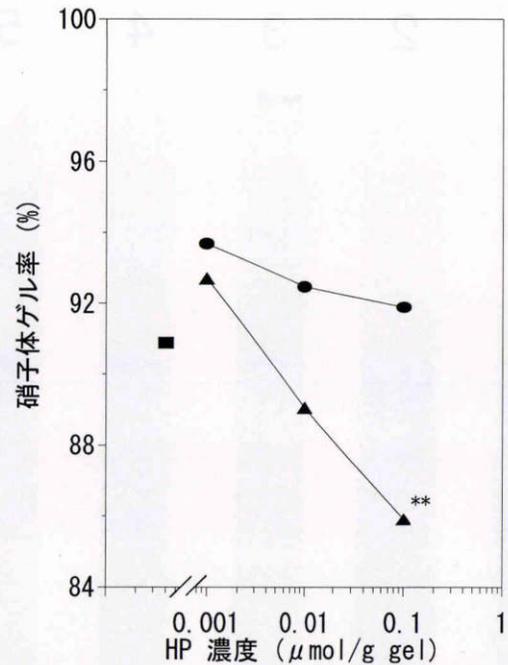


図11 ヘマトポリフィリン(HP)の用量作用曲線。

HP存在下に仔牛硝子体を白色光で照射し、HPの硝子体ゲル率に対する用量作用曲線を検討した。図中の●は遮光対照群(HPを含有し遮光した硝子体群)を、■は照射対照群(HPを含有せず白色光を照射した硝子体群)を、▲は実験群(HP 0.001~0.1 $\mu\text{mol/g}$ 含有した硝子体群)を表す。それぞれのデータポイントは7~8個の中央値を表す。**: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test). (Kakehashi A, et al: Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. Ophthalmic Res 26: 51-59, 1994 より S. Karger の許可を得て転載)

と同様に照射実験を行った⁵⁴⁾。コラーゲン溶液(4 mg/l)を小型のプラスチックビーカー(直径11 mm)に入れ、HPを添加し(最終濃度: 1 mmol/L)、蒸発を防ぐためビーカーに透明ラップでカバーをかけ、白色光を照射した。照射方法はRFの実験と同様に、15 Wの蛍光灯2本から成る蛍光灯スタンドにより0~24時間白色光照射を行った。対照群として遮光対照群と照射対照群を用いた。照射後、コラーゲンはSDSゲル電気泳動法により分析した。その結果、RFの実験と同様に、照射後の実験群のコラーゲンではSDSサンプルバッファ中で沈殿が観察された。遮光対照群および照射対照群では沈殿は観察されなかった。このことから、コラーゲンの一部が架橋形成化していることがわかった⁵⁴⁾。また、可溶性成分のコラーゲンのSDSゲル電気泳動の結果も、RFの実験と同様に、実験群は対照群に比べコラーゲンの α 鎖のバンドが薄くなり、照射時間とともにコラーゲンが徐々に架橋形成して、可溶性成分が減少してゆくことが示された。また、 α 鎖に対して β あるいは γ 成分の割合、すなわち、 α 鎖の二量体や三量体の成分の割合が増加し、コラーゲン

は架橋形成傾向にあることが示された。また、 α 鎖のピークは少し右に移動して α 鎖の分子量が増加していることも示された⁵⁴⁾。次に、 $^1\text{O}_2$ の消去剤である NaN_3 を用いて⁵¹⁾、上述と同様の照射実験を行った。その結果、 NaN_3 の濃度が高くなるにつれて、 α 鎖のバンドが濃くなり、可溶性成分が増加し、コラーゲンの架橋形成が抑制されてゆくのがわかった⁵⁴⁾。

また、血液色素の代謝物であるビリルビンを用いて同様の実験を行った。SDSゲル電気泳動の結果は、上述のHPの結果と同様にコラーゲンの α 鎖に対して β あるいは γ 成分の割合が増加し、コラーゲンは架橋形成傾向にあることがわかった⁵⁵⁾。

HP存在下、白色光により発生する活性酸素によりコラーゲンの架橋形成が起こることが明らかとなったが、硝子体のもう一つの主要構成成分のHAについてHPLCを用いて検討した⁵³⁾。RFの実験方法と同様に⁴⁷⁾、HA(鶏冠由来、分子量: 約80万)を小型のプラスチックビーカー(直径11 mm)に入れ、HPを添加し(最終濃度: 1 mmol/L)、蒸発を防ぐため透明のプラスチックカ

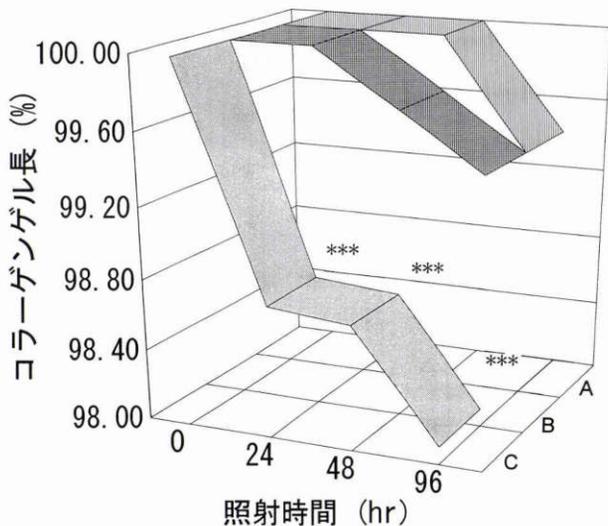


図12 ヘマトポリフィリン(HP)存在下の白色光照射によるコラーゲンゲル長の変化。

HP存在下の白色光照射によるコラーゲンに対する影響を検討するため、コラーゲンゲルをHP(最終濃度: 1 mmol/L)とともに毛細管(内径: 0.46 mm, 長さ: 100 mm)につめて、0, 24, 48, 96時間の白色光照射を行った。1群は10本の毛細管から成る。リボンAは照射対照群(HPを含有せず白色光照射を行った群)、リボンBは遮光対照群(HPを含有し遮光した群)、リボンCは実験群(HPを含有し照射した群)を表す。***: $p < 0.005$ (Kruskal-Wallis test). (Kakehashi A, et al: Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. *Ophthalmic Res* 26: 51-59, 1994より S. Karger の許可を得て転載)

バーをかけ、0~24時間白色光を照射した。照射後HPLCによりHAの分子量の変化を求めた。その結果、遮光対照群と照射対照群ではHA分子量の若干の低下が認められたものの、ほぼ実験前と同様の分子量を保持していた。一方、実験群のHAの分子量は、照射1時間で約13%減少し、3時間後には35%、6時間後には58%と急激に減少し、24時間後ではHA分子量は実験前に比べ80%減少した(図13)⁵³⁾。

ここでの結果を整理すると、

① HPあるいはビリルビンの存在下、白色光により発生する活性酸素(主に 1O_2)により、コラーゲンに架橋形成が起こるとともにHAの低分子化が起こる。② その結果として、硝子体から主に水分が離れる「離漿現象」(syneresis)が起こり、硝子体ゲル率が低下したものと推測される⁵³⁾。

III 金属イオン(Fe^{2+} , Cu^{2+})による硝子体の変化

ここまでは、光化学反応により発生する活性酸素による硝子体の変化について検討したが、それ以外の発生源の活性酸素による硝子体の変化についても検討する。

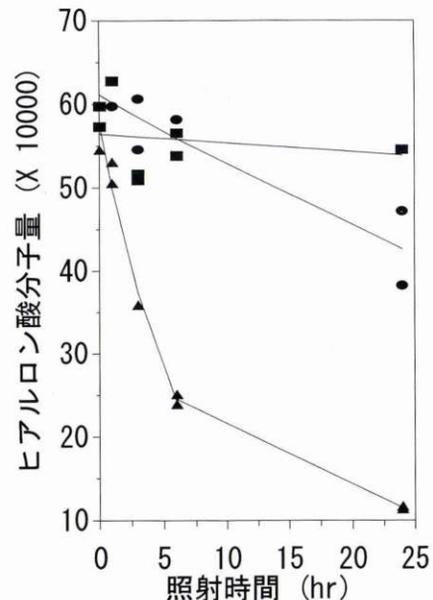


図13 ヘマトポリフィリン(HP)存在下の白色光照射によるヒアルロン酸(HA)の分子量の変化。

高速液体クロマトグラフィーによるHAの分子量を測定した。HP存在下白色光の照射によりHAの分子量が低下してゆくことが示されている。図中の●は遮光対照群(HPを含有し遮光したHA)を、■は照射対照群(HPを含有せず白色光照射を行ったHA)を、▲は実験群(HPを含有したHA)を表す。なお、HPLCシステムは、Waters 600 Multisolvent Delivery System (Millipore, Milford, MA)とゲルパーミエーションHPLCカラム(Spherogel TSK G 6000 PW, 7.8 mm i.d. × 30 cm; Beckman, San Ramon, CA, USA)を用いた。(Kakehashi A, et al: Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. *Ophthalmic Res* 26: 51-59, 1994より S. Karger の許可を得て転載)

アスコルビン酸(AA)の存在下、金属イオン、特に鉄イオン(Fe^{2+})および銅イオン(Cu^{2+})により活性酸素が発生し、それによりHAが脱重合して低分子化することが知られている^{59)~61)}。そこで、AA存在下、 Fe^{2+} あるいは Cu^{2+} による硝子体の変化について、仔牛硝子体を用いて検討した⁶²⁾。

硝子体の実験は、仔牛の硝子体を用い、図1のRFの実験と同様の方法で取り出した硝子体に Fe^{2+} あるいは Cu^{2+} を添加した。硝子体から水分の蒸発を防ぐためラップでピーカーの口を塞ぎ、酵素などの生化学反応を止めるため、4°Cで反応させた。また、別の実験では、AAあるいはOHの消去剤であるマンニトールを加え、4°Cで反応させた。0~48時間低温培養後、RFの実験と同様に硝子体ゲル率を計算した。さらに、 Fe^{2+} あるいは Cu^{2+} による硝子体変化のメカニズムを検討するため、硝子体の主要構成成分であるHAに Fe^{2+} あるいは Cu^{2+} を作用させ、その後、HAの分子量の変化についてHPLCを用い

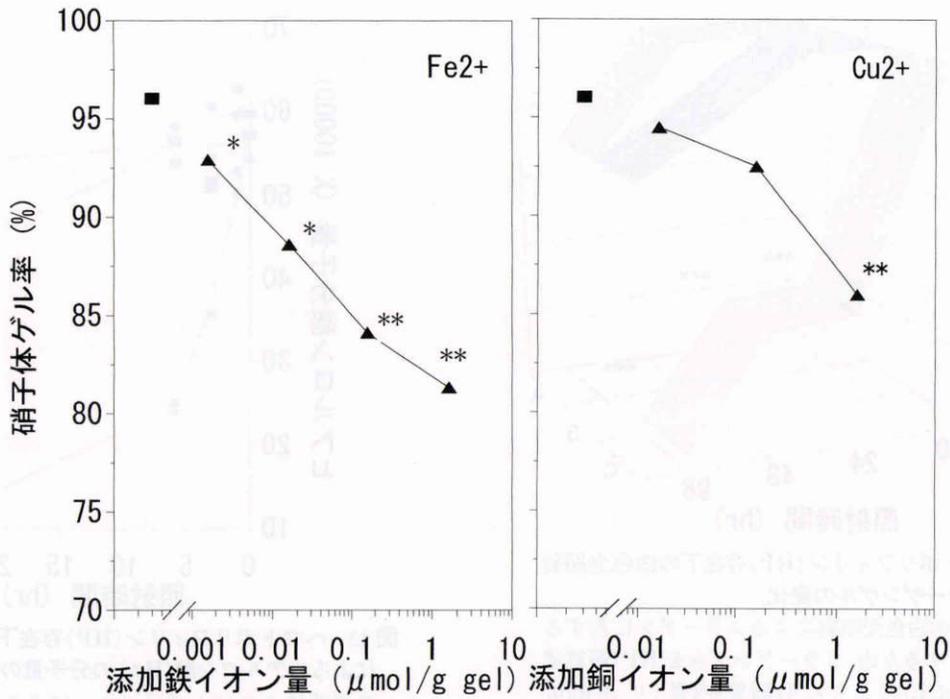


図14 金属イオン(Fe²⁺, Cu²⁺)による硝子体の変化(用量作用曲線).

鉄イオン(Fe²⁺)あるいは銅イオン(Cu²⁺)による仔牛硝子体の変化の用量作用曲線を検討した. 図中の■は対照群を, ▲は実験群(0.00145~0.145 μmol/g の Fe²⁺あるいは Cu²⁺含有した硝子体群)を表す. それぞれのデータポイントは4個の平均値を表す. *: p<0.05, **: p<0.01(Mann-Whitney test). (Chattopadhyay D, et al: Metalion-catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid: Role of radicals and radical ions. Ophthalmic Res 24: 1-7, 1992 より S. Karger の許可を得て転載)

て検討した⁶²⁾. その結果, 24時間培養後の Fe²⁺あるいは Cu²⁺による硝子体液化の用量作用実験では, 低濃度の Cu²⁺では硝子体の液化がみられなかったが, 0.145 μmol/g の用量では硝子体は有意に液化した. Fe²⁺では, 0.00145 μmol/g の低濃度でも有意な硝子体液化が認められ, さらに Fe²⁺の濃度が高くなるにつれて液化は増大した. このことから, Fe²⁺は Cu²⁺よりも硝子体液化作用が強いことが示された(図14)⁶²⁾. Fe²⁺あるいは Cu²⁺による硝子体液化作用のタイムコース実験において, Cu²⁺では, 培養7時間後には硝子体ゲルは約86%になり, その後24時間まで変化はなく, 48時間後硝子体ゲルは72%に有意に減少した. Fe²⁺では, 培養7時間後から硝子体ゲルは85%になり, その後時間の経過とともに減少して, 48時間後には硝子体ゲルは75%に有意に減少した(図15)⁶²⁾.

Fe²⁺あるいは Cu²⁺(それぞれ1.45 μmol/g)を加え, さらに AA を添加した硝子体では, AA が1.45 μmol/g 以上の場合, その液化反応は対照群よりも有意に高くなった. また, Fe²⁺あるいは Cu²⁺(それぞれ1.45 μmol/g)を硝子体に加え, さらにマンニトールを添加した硝子体では, マンニトールの濃度が0.145 μmol/g 以上の場合, Fe²⁺あるいは Cu²⁺による硝子体液化は対照群よりも有意に抑制された⁶²⁾.

HA に Fe²⁺あるいは Cu²⁺を作用させ, HA の分子量

の変化について HPLC を用いて検討した結果, 表3のように, Fe²⁺あるいは Cu²⁺は AA の存在下で, 活性酸素を発生して, HA の脱重合を起こすことが明らかとなっ

表3 金属イオン(Fe²⁺, Cu²⁺)によるヒアルロン酸(HA)の分子量の変化^{a)}

サンプル ^{b)}	分子量
HA	435,000
HA/Cu ²⁺	435,000
HA/Fe ²⁺	427,000
HA/アスコルビン酸/Cu ²⁺	96,200
HA/アスコルビン酸/Fe ²⁺	23,900

^{a)}: HA の分子量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した. 既知の分子量の HA によりキャリブレーションした HPLC カラムを用いることにより, サンプルの分子量を計算した. 分子量は少なくとも2回の測定値から計算した. なお, HPLC システムは, Waters 600 Multisolute Delivery System (Millipore, Milford, MA) とゲルパーミエーション HPLC カラム (Spherogel TSK G 6000 PW, 7.8 mm i.d. × 30 cm; Beckman, San Ramon, CA, USA) を用いた.

^{b)}: HA の最終濃度は0.42 mg/ml, Cu²⁺あるいは Fe²⁺は4 μmol/L, アスコルビン酸は390 μmol/L, HA サンプルは室温にて2時間反応させ, その後4℃で約16時間透析した.

(Chattopadhyay D, et al: Metal ion-catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid: Role of radicals and radical ions. Ophthalmic Res 24: 1-7, 1992 より S. Karger の許可を得て転載)

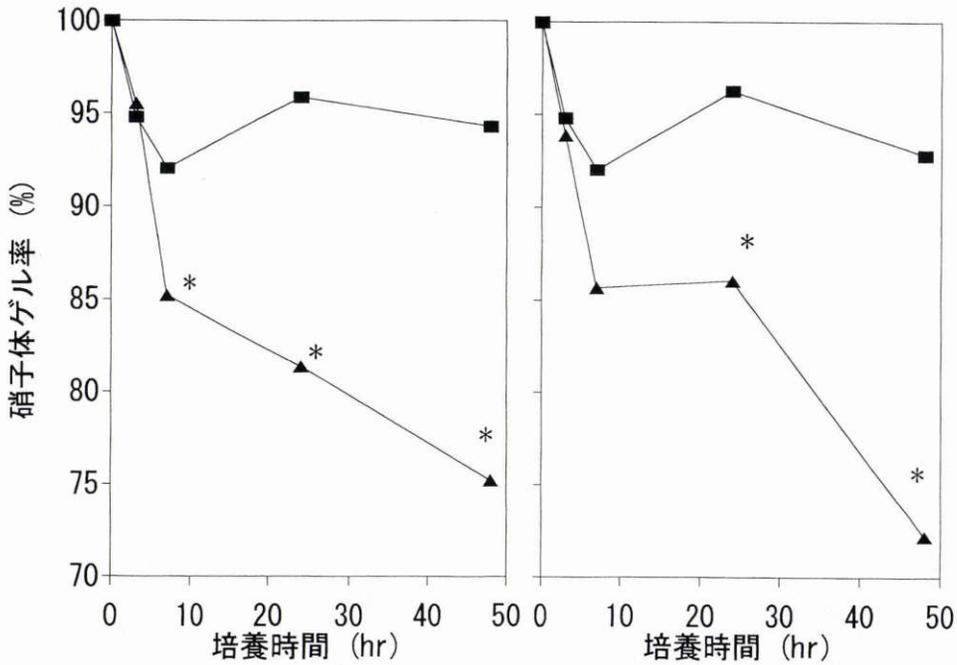


図15 金属イオン(Fe²⁺, Cu²⁺)による硝子体の変化.

鉄イオン(Fe²⁺)あるいは銅イオン(Cu²⁺)による仔牛硝子体ゲル率の変化を観察した. 図中の■は対照群を, ▲は実験群(0.145 μmol/gのFe²⁺あるいはCu²⁺含有した硝子体群)を表す. それぞれのデータポイントは4個の中央値を表す. *: p<0.05(Mann-Whitney test). (Chattopadhyay D, et al: Metal ion-catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid: Role of radicals and radical ions. Ophthalmic Res 24: 1-7, 1992 より S. Karger の許可を得て転載)

た⁶²⁾.

ここまでの結果をまとめると,

①硝子体は比較的高濃度のAAを含んでおり^{1)~6)}, Fe²⁺あるいはCu²⁺を硝子体に添加した場合, 硝子体は液化した. ②さらにAAを添加した場合, 硝子体液化は強くなった. ③OHの消去剤であるマンニトールを加えると⁵¹⁾, 硝子体液化は抑制された. ④したがって, 活性酸素によりHA分子が脱重合して, 低分子化が起こり^{59)~61)}, 硝子体の水分保持能力が低下して, 硝子体液化が起こったものと考えられる. 眼球鉄錆症(ocular siderosis)や銅症(chalcosis)⁶³⁾でみられる硝子体液化は, このようなメカニズムにより起こるものと推測される⁶²⁾.

IV 眼内炎症時に発生する活性酸素による硝子体の変化

炎症反応時に, 活性酸素, 特に主として好中球から発生するO₂⁻が組織傷害に関与していることが知られている⁴³⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾. そこで, エンドトキシンを家兎眼内に注入して眼炎症のモデルを作成し^{66)~68)}, 炎症時の硝子体の変化について検討した. さらに, 活性酸素が関与すると考えられる眼炎症時の硝子体変化のメカニズムを検討するため, 硝子体コラーゲンの変化についても検討した⁶⁹⁾.

実験には, ニューゼーランド白色種の家兎を用いた. 麻酔下, 家兎眼内にエンドトキシン(Sigma)200 ngを注入して, 眼炎症を惹起させた. その後, 家兎を麻酔薬で安楽死させ, 眼球を摘出して, 硝子体を取り出し, そのゲル化

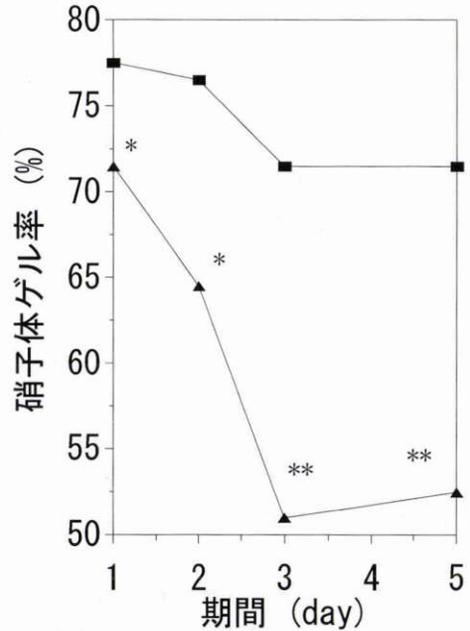


図16 エンドトキシン眼炎症における硝子体の変化. エンドトキシン眼炎症における家兎硝子体ゲル率の変化を観察した. 図中の■は対照群を, ▲は実験群(200 ng/eyeのエンドトキシン投与)を表す. 炎症期間とともに硝子体の液化が進むことが示されている. それぞれのデータポイントは4個の平均値を表す. *: p<0.03, **: p<0.01(Mann-Whitney test). (Hikichi T, et al: Evidence of cross-link formation of vitreous collagen during experimental ocular inflammation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (in press) より Springer-Verlag の許可を得て転載)

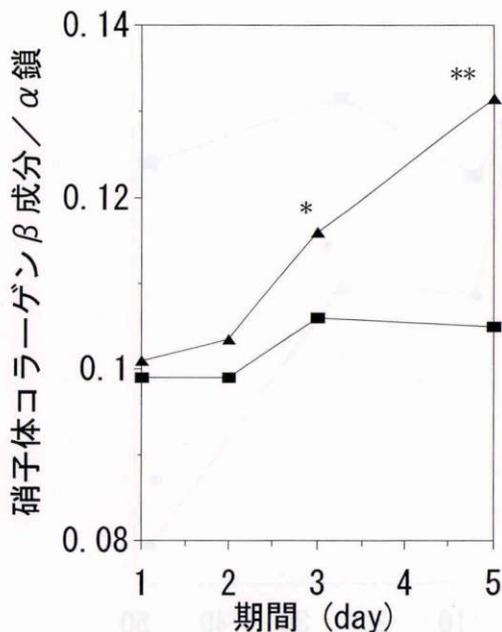


図17 エンドトキシン眼炎症における硝子体コラーゲンの α 鎖に対して β 成分の割合の化.

エンドトキシン眼炎症における家兎硝子体コラーゲンの SDS ゲル上で測定された α 鎖に対して β 成分の割合の炎症期間による変化を表す. 図中の■は対照群を, ▲は実験群(200 ng/eye のエンドトキシン投与)を表す. 炎症期間が長くなると α 鎖に対して β 成分の割合が増加してゆき, 架橋形成傾向が増加してゆくことが示されている. 炎症期間1, 2, 3, 5日でのデータポイントはそれぞれ8, 4, 8, 7個の平均値を表す. *: $p < 0.03$, **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test). (Hikichi T, et al: Evidence of cross-link formation of vitreous collagen during experimental ocular inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (in press)より Springer-Verlag の許可を得て転載)

率を測定した⁶⁹⁾. さらに, 対照眼あるいは実験眼の硝子体からコラーゲンを常法⁷⁰⁾に従って抽出し, それらのコラーゲンを SDS ゲル電気泳動法により分析した⁶⁹⁾.

その結果, 摘出した眼球から, 強膜, 脈絡膜, 網膜を取り除き, 硝子体が水晶体後面に付着している状態で空中に保持し, 対照眼と実験眼の硝子体を比較すると, エンドトキシンによる眼炎症モデルの硝子体ゲルは対照眼に比べ明らかに小さく, 若干の混濁がみられた. 対照眼の硝子体ゲルは透明で, 長さ3~4 cm に垂れ下がっていた. このことから, 実験眼の硝子体は液化してゲル硝子体が減少していることが明らかとなった. また, 実験眼に O_2^- の消去剤としてよく知られているスーパーオキシドディスムターゼ(SOD) (Sigma)を注入した場合, 硝子体液化は抑制された⁶⁹⁾.

硝子体ゲル率の測定の結果, 対照眼では実験開始1日後には78%であり, 5日後には74%となり, 大きな変化はみられなかった. それに対して, 実験眼では, 実験1日

後には72%であり, 5日後には52%となり, 硝子体ゲル率は有意に減少し, 炎症期間とともに硝子体の液化が進むことが明らかとなった(図16)⁶⁹⁾.

硝子体コラーゲンを4% SDS サンプルバッファに入れ通常のように処理すると, 実験群のサンプルチューブの底部に沈殿がみられたが, 対照群では沈殿は観察されなかった. したがって, 炎症眼の硝子体コラーゲンの一部は架橋形成していることが明らかとなった⁶⁹⁾. コラーゲンサンプルを SDS ゲル電気泳動法で分析した結果, 炎症群は対照群に比べコラーゲンの α 鎖に対する β あるいは γ 成分の割合が増加し, すなわち, α 鎖の二量体や三量体の成分が増加し, コラーゲンが架橋形成傾向にあることが示された. また, 炎症眼に SOD を添加した場合, α 鎖に対する β 成分の割合増加は抑制された. 図17には硝子体コラーゲンの α 鎖に対する β 成分の割合の炎症期間による変化を示す. 炎症期間が長くなると α 鎖に対する β 成分の割合が増加してゆき, 架橋形成が増加してゆくことが示されている⁶⁹⁾.

ここまでの結果をまとめてみると,

① エンドトキシンの硝子体注入により, 家兎眼内に炎症が起こり, 硝子体は液化した. また, この硝子体液化は SOD により抑制された. ② 炎症眼の硝子体コラーゲンの一部は架橋形成し, α 鎖に対する β あるいは γ 成分の割合が増加していた. ③ SOD により α 鎖に対する β 成分の割合の増加は抑制された. ④ これは炎症細胞により O_2^- が発生した結果, 硝子体コラーゲンに架橋形成が起こり, 硝子体が液化したものと推測された⁶⁹⁾.

V 考 按

これまで, 発生源の異なる種々の活性酸素を用いて, それらが硝子体に及ぼす影響について検討した. 活性酸素(類)は若干複雑であるので, 硝子体の変化に関与すると考えられる活性酸素について整理する.

「通常大気中に存在する酸素よりも反応性の高い活性化された酸素とその関連分子の総称である」⁶⁴⁾⁷¹⁾と定義されている活性酸素は, 生体内でも不安定で反応性に富み, 生体分子を攻撃し, 疾病, 発癌, 加齢に伴う変化に関与する悪玉のように考えられるが, 体内に侵入した病原体や癌細胞などを処理するときには, 生体にとっては必要なものである⁴⁴⁾⁶⁴⁾⁷¹⁾. 一方, フリーラジカルは「不對電子を1つまたはそれ以上有する分子および原子」と定義されている^{64)71)~73)}. 活性酸素のなかにはフリーラジカルであるものも含まれている⁴⁴⁾.

我々が呼吸している酸素は, O_2 で表される安定に結合した2原子から成る酸素分子で, 三重項酸素(3O_2)とも呼ばれる^{44)64)71)~73)}. この分子には二個の不對電子があるものの, それら電子のスピンが同じ方向であるため, 3O_2 は基底状態にあり反応性が乏しく活性酸素ではない. この 3O_2 に外部からのエネルギーが加わり, すべての電子が

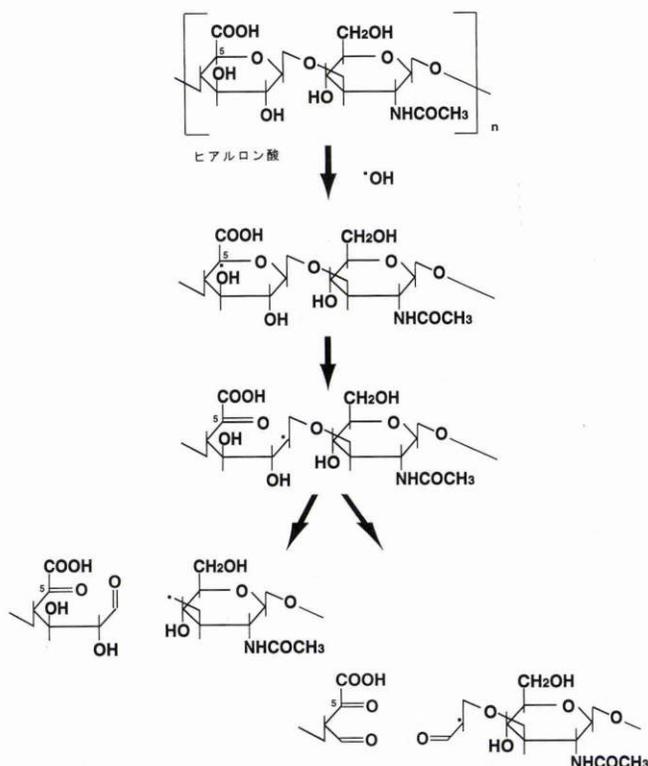
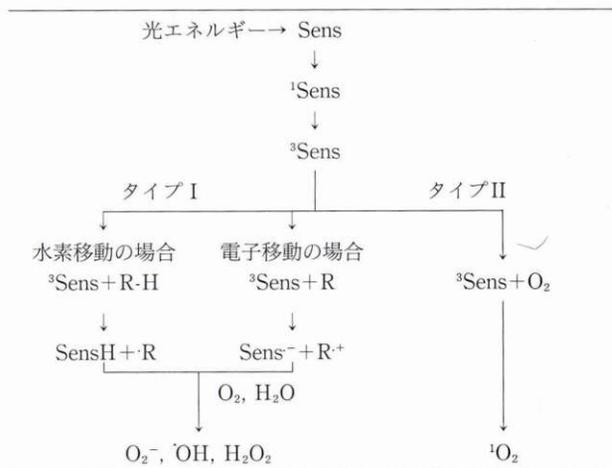


図 18 ヒアルロン酸 (HA) の分解機構。

一般に、 $\cdot\text{OH}$ の HA の分解過程は、種々の糖ラジカルの生成による物と考えられている。HA のグルクロン酸のカルボキシル基の根元の C 5 位の水素が $\cdot\text{OH}$ により引き抜かれやすいため、グルクロン酸の C 5 位のラジカル化が起こり、その結果、糖リングが不安定になりグリコシド結合解裂が引き起こされ、HA の脱重合化が起こると考えられている^{79)~81)}。

対になり不對電子がなくなったものを $^1\text{O}_2$ といい、ラジカルではないが反応性が高く活性酸素の一つである。その高い反応性のため種々の分子と化学的に結合したり、他の分子に励起エネルギーを渡して、その分子を励起状態にする⁴⁴⁾。生体内では、光化学反応により発生することが多い。 O_2^- は酸素分子が一個の電子を得て発生するラジカルであり、生体内での発生源としては活性化された食細胞(好中球など)、細胞内顆粒(ミトコンドリアなど)、酵素(キサンチンオキシダーゼなど)などがある^{44)64)71)~73)}。 O_2^- は反応性がそれほど強くないが、好中球による殺菌作用や炎症反応において重要である。 H_2O_2 は不對電子を持っていないのでラジカルではないが、不安定で H_2O と O_2 に分解され、強い酸化剤になる。 H_2O_2 は活性酸素としては強い活性をもたないが、 Fe^{2+} や Cu^{2+} と反応して $\cdot\text{OH}$ を生じることから生体内では重要である。 $\cdot\text{OH}$ は反応性がきわめて高く、生体物質に対して、水素イオンの引き抜きや供与、あるいは電子を移動させるなどの作用があり、活性酸素のなかでは重要である。発生源は、紫外線や放射線以外では、 Fe^{2+} などの金属イオンの触媒作用により、 H_2O_2 から発生すると考えられている⁶²⁾⁶⁴⁾⁷¹⁾。一酸化窒素(NO)も活性酸素に関連するフリーラジカルであ

表 4 光酸化のメカニズム^{a)}



Sens, $^1\text{Sens}$, $^3\text{Sens}$ は光増感剤とそれらの一重項状態および三重項状態を表す。

$\cdot\text{SensH}$ は水素ラジカルと結合した光増感剤を、 $\text{Sens}^{\cdot-}$ はアニオン化した光増感剤ラジカルを表す。R-H はアルキル基をもった化合物の一般式である。

O_2^- はスーパーオキシドラジカルを、 $\cdot\text{OH}$ はヒドロキシルラジカルを、 H_2O_2 は過酸化水素を、 $^1\text{O}_2$ は一重項酸素を表す。

^{a)} : 文献³⁴⁾⁴⁰⁾

り、種々の生理活性もあり非常に興味深い^{74)~77)}。NO は炎症細胞からも発生することが知られており、上述の硝子体炎症時の硝子体の変化にも関係があると推測されるが³⁾、詳細は未だ不明である^{74)~77)}。

第II章の1.で記述したように、RF を光増感剤として用いて、白色光照射により *in vitro* で仔牛硝子体を液化させることが可能となった¹⁰⁾。RF 存在下の白色光照射による硝子体液化は家兎眼を用いた *in vivo* での実験でも観察された。秋葉の報告⁷⁸⁾によると、家兎硝子体内にリン酸リボフラビン(0.2 $\mu\text{mol}/\text{eye}$)を投与し、スライドプロジェクターで家兎眼を0~6時間照射し、その後眼球を摘出して、硝子体のゲル率を検討したところ、照射6時間後の遮光対照群と照射対照群は約10%の液化率であるのに対して、実験群は約60%の硝子体が液化した。また、ラジカル消去剤であるSOD、カタラーゼ、あるいはマンニトールをRFと同時に家兎硝子体に注入すると、RF存在下の液化が抑制された⁷⁸⁾。この報告から、RF存在下白色光照射による硝子体液化は *in vitro*¹⁰⁾でも *in vivo*でも観察され、このことは加齢による硝子体液化に活性酸素が関与していることを示唆するものと考えられる¹⁰⁾⁷⁸⁾。

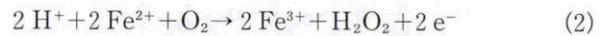
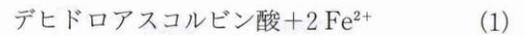
本研究では、RFの光化学反応により硝子体コラーゲンが架橋形成することを示し、 D_2O 中で架橋形成反応が増強されることから、コラーゲンの架橋形成反応に関与する活性酸素は主として $^1\text{O}_2$ であることを明らかにした⁴⁷⁾。また、HAの低分子化は D_2O 中では増強されず、HAの脱重合化には $^1\text{O}_2$ の関与が少ないことが明らかとなった⁴⁷⁾。通常、RFを光増感剤とする光化学反応では、

表4に示したように、タイプIの過程が優勢的に起こり³⁴⁾⁴⁰⁾、活性酸素のうち O_2^- や $\cdot OH$ や H_2O_2 が生成する。しかし、 1O_2 を発生するタイプIIの反応が全く起こらないとは考えにくく、本研究でのRFの光化学反応では、タイプIの過程に比べタイプIIの過程がより少ない確率で起こっており、コラーゲンの架橋形成反応を引き起こすに十分な量の 1O_2 が生成されたと考えるのが妥当であろう。

HAの脱重合化には活性酸素のなかで $\cdot OH$ が関与している^{79)~81)}。一般に、 $\cdot OH$ によるHA分解過程は、種々の糖ラジカルの生成によるものと考えられている(図18)。HAのグルクロン酸のカルボキシル基の根本のC5位の水素が $\cdot OH$ により引き抜かれやすいため、グルクロン酸のC5位のラジカル化が起こり、その結果、糖リングが不安定になり、グリコシド結合解裂が引き起こされ、HAの脱重合化が起こると考えられている^{79)~81)}。本研究でのRF存在下の白色光照射による硝子体液化に関連するHAの脱重合化は、 D_2O 中では増強されず、 1O_2 は関与していないことから、上述した $\cdot OH$ によるHAの分解機構を通じて、HAの脱重合化が起こっているものと推測される。

HPあるいはビリルビンの存在下、白色光により発生する活性酸素(主に 1O_2)により、コラーゲンに架橋形成が起こるとともにHAの低分子化が観察された。その結果として、硝子体から主に水分が離れる「離漿現象」(syneresis)⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁸⁾⁸²⁾が起こり、硝子体ゲル率の低下したものと推測される。RFによる反応では、硝子体液化に伴いゲル構造の崩壊が顕著になったが、HPによる反応では、比較的硝子体のゲル構造が保持され、離漿現象がみられた。これは、HPは一般にタイプIIの光酸化により活性酸素(主として 1O_2)を発生させることが知られているため^{83)~85)}、光照射によりHPはタイプIIの過程を優勢的に通じて 1O_2 をより多く発生し、硝子体コラーゲンの架橋形成を起こすが、HAの脱重合を起こさせる $\cdot OH$ の発生する割合が低かったために、硝子体ゲル構造の破壊が少なく、硝子体ゲルの離漿現象がみられたものと推測される。一方、RFの光酸化の場合には、前述したようにタイプIIの過程よりもタイプIがより優勢的に起こり、 $\cdot OH$ 、 O_2^- 、 H_2O_2 などの活性酸素の発生は、 1O_2 の発生よりも化学量論的に多くなり、硝子体ゲル構造の中で、コラーゲンの架橋形成よりもHAの脱重合反応がより強く起こり、硝子体ゲル構造の崩壊が始まったものと推測される⁴⁷⁾。もちろん明確な説明には、さらに詳細な速度論的な研究が必要となる。

AA存在下、金属イオンにより硝子体液化を引き起こすことが明らかとなった⁶²⁾。金属イオン触媒による自動酸化機構による活性酸素の発生についての研究はよく知られている^{59)~62)84)85)}。その活性酸素の発生メカニズムは、次のような化学式で表される。



$\cdot OH$ の消去剤であるマンニトールにより硝子体液化が抑制されたことから、この機構で発生した $\cdot OH$ が硝子体液化に最も重要な役割を果たしていることは明らかである。HAのみを用いた実験から、 $\cdot OH$ による硝子体液化は、図18のような分解機構によるHAの脱重合によるものであると推測される。

眼炎症モデルにおける硝子体液化の実験では、エンドトキシンの硝子体注入により、家兎眼内に炎症が起こり、硝子体は液化した。これは炎症細胞により活性酸素(O_2^- 、 $\cdot OH$)が発生し、硝子体が液化したものと推測される⁶⁹⁾。

炎症時に出現する食細胞(好中球、好酸球、単球、マクロファージなど)は生体防御機構の一部であり、体内に侵入した微生物などを貪食し、細胞内顆粒と融合してphagolysosomeを形成して、活性化された O_2^- 生成酵素により生成された活性酸素で非特異的な殺菌が行われる⁵¹⁾⁸⁶⁾⁸⁷⁾。白血球の場合には、細胞膜中に存在する O_2^- 生成酵素(NADPH oxidase)により、 O_2 が1電子還元を受け 1O_2 が生成する。



この時、細胞外や周囲の組織中に放出された O_2^- は速やかに H_2O_2 になる。この反応はSODにより促進される⁵¹⁾⁸⁶⁾⁸⁷⁾。



生成した H_2O_2 は、さらに Fe^{2+} あるいは Cu^{2+} 存在下で $\cdot OH$ を生じることとなる。



本研究における炎症細胞による硝子体液化は、エンドトキシンにより食細胞が活性化され、その細胞膜中の O_2^- 生成酵素により発生した O_2^- により硝子体コラーゲンが架橋形成し、さらに、炎症に伴う眼内出血により、血液中の遊離した $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ が硝子体内に注入し、上述の(6)式のように生成した O_2^- から $\cdot OH$ が発生し、硝子体ゲルの主要成分であるHAが脱重合化し、その水分保持能力が低下したために硝子体液化が起こったものと考えられる。

本研究では、発生源(光化学反応、炎症反応、金属イオン)の異なる種々の活性酸素を用いて、*in vitro*あるいは*in vivo*での硝子体に及ぼす影響について検討した。活性酸素により硝子体の主要構成成分であるコラーゲンが架橋形成して硝子体のゲル構造の変化を引き起こし、また、同時にもう一つの主要構成成分であるHA分子の脱重合が起こり、その膨大な水分保持能力が低下したため、硝子体の液化あるいは離漿現象(syneresis)が起きると考えられた。硝子体のゲル構造の変化には活性酸素が深く関与していることが明らかとなった。

臨床的には、硝子体中の繊維性混濁は加齢とともに増加することが知られている⁵⁾。Aikbaら⁸⁸⁾は、仔牛(1~3週齢)と成牛(3~4歳)の硝子体コラーゲンをSDSゲル電気泳動法により分析し、コラーゲンの α 鎖の分子量は、仔牛では105,000(中央値, n=9), 成牛では115,000(n=7)であり、成牛のコラーゲンの α 鎖の分子量は仔牛に比べて有意に大きくなっていることを報告している(p<0.01, Mann-Whitney test)。また、 α 鎖に対する β 成分の割合を比べると、仔牛では0.100(n=9), 成牛では0.122(n=7)となり、成牛のコラーゲンの β 成分/ α 鎖は仔牛に比べて有意に大きくなっていた(p<0.01)。この結果は、加齢により牛硝子体コラーゲンの分子量が増大し、 β 成分/ α 鎖も増加してコラーゲンが架橋形成傾向にあることを示している⁸⁸⁾。また、人眼硝子体コラーゲンの分析では、 α 鎖の分子量は、若年者群(22~41歳)では104,900(n=3), 高齢者群(64~98歳)では112,239(n=5)となり、高齢者群の硝子体コラーゲンの α 鎖の分子量は若年者群に比べて有意に増加していた(p<0.05)。この報告では、牛眼において、加齢により硝子体コラーゲンの高分子成分が増加し、また、牛眼および人眼においても、コラーゲンの α 鎖の分子量の増加が観察された⁸⁸⁾。この加齢による硝子体コラーゲンの変化には、種々の原因が考えられるが(例えば、酵素を介在したコラーゲンの架橋形成⁸⁹⁾や非酵素的な糖化⁹⁰⁾など)、上述したように、硝子体にはRFは微量ではあるが存在し⁴⁶⁾、可視光線を60~90年の長期間にわたり照射されているため、RF存在下の光化学反応がこの報告で観察された加齢によるコラーゲンの変化に大きな役割を果たしているとも推測される。

本研究での実験的硝子体液化における硝子体コラーゲンの架橋形成は、臨床的に観察される加齢による硝子体コラーゲンの変性(繊維性混濁など)や網膜硝子体疾患での硝子体変性と同様のものと考えられる。実験的な硝子体の変化速度と加齢や疾病による硝子体の変化速度には大きな違いがあるが(実験的には24~48時間で認められる変化でも、加齢の変化には20~30年が必要であろう)、日常の臨床で観察される硝子体液化の機構には、本研究で示された活性酸素による硝子体液化と同様の機構のものもあると推測される。したがって、活性酸素による硝子体の変化の機構を基にして硝子体液化を防止あるいは遅延させ得ることが可能となるかも知れない。例えば、硝子体の液化と後部硝子体剝離を防止することが可能となれば、裂孔原性網膜剝離を予防することが可能になると期待される。このような新しい治療法の研究が進むことが期待される。

また、硝子体液化の機構を解明することは、必ずしも、硝子体液化を防止することだけにとどまらず、場合によっては液化を促進することが、将来、可能となり得るかも知れない。網膜を牽引している部位の硝子体を変化さ

せることにより、牽引性網膜剝離を予防することが可能となるかも知れない。さらには、糖尿病網膜症において、完全後部硝子体剝離を人工的に作製できれば、網膜症の増殖化を防ぐことが可能となり、多くの失明を未然に防ぐことが可能となる。もちろん、このような治療方法を確立するためには、数多くの基礎研究が必要となろう。最後に、本研究から安全なコントロールされた硝子体液化法を探求するための新たな研究プロジェクトが始まることがあれば、著者と共同研究者にとって望外の喜びとするところである。

稿を終えるにあたり、宿題報告の機会をお与えいただいた日本眼科学会評議員各位、ならびに第99回日本眼科学会総会会長栗屋 忍先生、座長の労をお取りいただいた平光忠久先生に心から感謝申し上げます。本研究は著者と共同研究者によりハーバード大学医学部眼科教室・スケペンス眼研究所で実施された。共同研究者をはじめ、スケペンス眼研究所、大阪大学医学部眼科学教室、資生堂医薬品研究所・基盤技術研究所各位のご協力に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) **Berman ER, Voaden M**: The vitreous body. In: Graymore CN (Ed): *Biochemistry of the Eye*. Academic Press, London, 373-471, 1970.
- 2) **Berman ER**: *Biochemistry of the Eye*, Plenum Press, New York, 291-307, 1991.
- 3) **Ueno N, Watanabe M, Chakrabarti B**: Macromolecules of the vitreous body: A review. *Folia Ophthalmol Jpn* 42: 983-991, 1991.
- 4) **Balazs EA, Denlinger JL**: The vitreous. In: Davson H (Ed): *The eye* 3rd ed, Academic Press, London, 533-589, 1984.
- 5) **Sebag J**: *The Vitreous*, Springer-Verlag, New York, 17-58, 73-95, 97-160, 1989.
- 6) **上野則夫, 秋葉 純**: 硝子体の構造と組成. 本田弘士(編): *眼の生化学・分子生物学*. 眼科診療プラクティス. 文光堂(印刷中).
- 7) **Balazs EA, Flood MT**: Age related changes in the physical and chemical structure of human vitreous. *Third International Congress of Eye Research. Proceedings of the International Society for Eye Research*. Osaka, Japan, 1978.
- 8) **Balazs EA, Denlinger JL**: Aging changes in the vitreous. In: Sekuler R, et al (Eds): *Aging and Human Visual Function*, Alan R Liss, Inc, New York, 45-57, 1982.
- 9) **O'Malley C**: The pattern of vitreous syneresis—A study of 800 autopsy eyes. In: Irvine AR, et al (Eds): *Advances in Vitreous Surgery*. Charles C Thomas, Springfield, IL, 17-33, 1976.
- 10) **Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, Chakrabarti B**: Effects of visible-light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Exp Eye Res* 44: 863-870, 1987.
- 11) **Foos RY, Wheeler NC**: Vitreoretinal juncture—synchysis senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* 89: 1502-1512, 1982.

- 12) **Larsson L, Osterlin S**: Posterior vitreous detachment—A combined clinical and physicochemical study. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 223: 92—95, 1985
- 13) **Schepens CL**: Retinal Detachment and Allied Diseases. WB Saunders, Philadelphia, 37—67, 599—638, 1983.
- 14) **Chaine C, Sebag J, Coscas C**: The induction of retinal detachment. *Trans Ophthalmol Soc UK* 103: 480—485, 1983.
- 15) **Lentner C**: Geigy Scientific Table Vol 4. Ciba-Geigy, Basle, Switzerland, 191—196, 1986.
- 16) **Scott JE**: The chemical morphology of the vitreous. *Eye* 6: 553—555, 1992.
- 17) **Liang JN, Chakrabarti B**: Spectroscopic studies on pepsin-solubilized vitreous and cartilage collagens. *Curr Eye Res* 1: 175—181, 1981.
- 18) **Ayad S, Weiss JB**: A new look at vitreous-humour collagen. *Biochem J* 218: 835—840, 1984.
- 19) **Fitch JM, Mentzer A, Mayne R, Linsenmayer TF**: Acquisition of type IX collagen by the developing avian primary corneal stroma and vitreous. *Dev Biol* 128: 396—405, 1988.
- 20) **Yada T, Suzuki S, Kobayashi K, Kobayashi M, Hoshino T, Horie K, et al**: Occurrence in chick embryo vitreous humor of a type IX collagen proteoglycan with an extraordinarily large chondroitin sulfate chain and short $\alpha 1$ polypeptide. *J Biol Chem* 265: 6992—6999, 1990.
- 21) **Meyer K, Palmer JW**: The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 107: 629—634, 1934.
- 22) **Laurent T**: Introduction. In: Evered D, et al (Eds): *The Biology of Hyaluronan*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1—5, 1989.
- 23) **Chakrabarti B, Park JW**: Glycosaminoglycans: Structure and Interaction. *CRC Crit Rev Biochem* 8: 225—313, 1980.
- 24) **Comper WD, Laurent TC**: Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* 58: 255—315, 1978.
- 25) **Foulds WS**: Experimental retinal detachment. *Trans Ophthalmol Soc UK* 83: 153—170, 1983.
- 26) **Machemer R, Norton EWD**: Experimental retinal detachment in the owl monkey. I. Methods of production and clinical picture. *Am J Ophthalmol* 66: 388—396, 1968.
- 27) **Algvere P, Balazs EA**: Experimental retinal detachment in owl monkeys. Effect of intravitreal hyaluronidase injection and embolization of the choroidal and retinal circulation. Limitations and prospects for retinal surgery. *Mod Probl Ophthalmol* 12: 152—166, 1974.
- 28) **Bothner-By CT, Balazs EA**: Effect of ionizing radiations on glucose solutions. *Radiation Res* 6: 302—317, 1957.
- 29) **Balazs EA, Laurent TC, Howe AF, Varga L**: Irradiation of mucopolysaccharides with ultraviolet light and electrons. *Radiation Res* 11: 149—164, 1959.
- 30) **Balazs EA, Davies JV, Phillips GO, Young MD**: Transient intermediates in the radiolysis of hyaluronic acid. *Radiation Res* 31: 243—255, 1967.
- 31) **Balazs EA**: Die Mikrostruktur und Chemie des Glaskörpers. In: Jaeger W (Ed): *Bericht über die 68. Zusammenkunft der deutschen ophthalmologischen Gesellschaft*, Heidelberg 1967. JF Bergmann Verlag, Munich, 536—572, 1967.
- 32) **Sundblad L, Balazs EA**: Chemical and physical changes of glycosaminoglycans and glycoproteins caused by oxidation reduction systems and radiation. In: Balazs EA, et al (Eds): *The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars Vol II-B*. Academic Press, New York, 229—250, 1966.
- 33) **McCord JM**: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529—531, 1974.
- 34) **Foote CS**: Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. In: Pryor WA (Ed): *Free Radicals in Biology Vol II*. Academic Press, New York, 85—133, 1976.
- 35) **Andley UP, Chakrabarti B**: Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 115: 894—901, 1983.
- 36) **Napalkov NP** (Ed): *The effects of solar UV radiation on the eye*. Report of an informal consultation, Geneva, 30 August-3 September, 1993, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1994.
- 37) **Dayhaw-Barker P, Barker FM**: Photoeffects on the eye. In: Jackson EM (Ed): *Photobiology of the Skin and Eye*. Marcel Dekker, New York, 117—147, 1986.
- 38) **Ueno N, Chakrabarti B**: Liquefaction of human vitreous in model aphakic eyes by 300nm UV photolysis: monitoring liquefaction by fluorescence. *Curr Eye Res* 9: 487—492, 1990.
- 39) **Kuck JFR**: Cataract formation. In: Graymore CN (Ed): *Biochemistry of the Eye*. Academic Press, London, 319—371, 1970.
- 40) **Chakrabarti B, Bose SK, Mandal K**: Conformation of mammalian lens protein: Photoinduced changes in relation to cataract formation. *J Indan Chem Soc* 63: 131—137, 1986.
- 41) **Zigler JS**: Lens proteins. In: Albert DM, et al (Eds): *The Principle and Practice of Ophthalmology*. WB Saunders, Philadelphia, 97—113, 1994.
- 42) **鈴木郁生, 他(編)**: 第12改正, 日本薬局方解説書, 廣川書店, 東京, C2275—C2282, 1991.
- 43) **Megaw JM, Drake LA**: Photobiology: An overview. In: Jackson EM (Ed): *Photobiology of the Skin and Eye*. Marcel Dekker, New York, 1—31, 1986.
- 44) **上野則夫, 秋葉 純**: フリーラジカルと硝子体, あた

- らしい眼科 12: 1067-1074, 1995.
- 45) **Bose SK, Mandal K, Chakrabarti B**: Sensitizer-induced conformational changes in lens crystallin-II. Photodynamic action of riboflavin on bovine α -crystallin. *Photochem Photobiol* 43: 525-528, 1986.
 - 46) **Long C** (Ed): *Biochemists' Handbook*, EFN Spon, London, 711, 1961.
 - 47) **Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B**: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Research* 13: 505-512, 1994.
 - 48) **Swann DA, Sotman SS**: The chemical composition of bovine vitreous-humor collagen fibres. *Biochem J* 185: 545-554, 1980.
 - 49) **Seery CM, Davison PF**: Collagens of the bovine vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1540-1550, 1991.
 - 50) **Ueno N, Chakrabarti B**: Glycosaminoglycans conformation and change on periodate oxidation. *Biopolymers* 28: 1891-1902, 1989.
 - 51) **Halliwell B, Gutteridge JMC**: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed, Clarendon Press, Oxford, UK, 22-85, 366-415, 1989.
 - 52) **McDonagh AF**: Photochemistry and photobiology of tetrapyrrole pigments. In: Valenzano DP, et al (Eds): *Photobiological Techniques*. Plenum Press, New York, 59-76, 1991.
 - 53) **Kakehashi A, Ueno N, Chakrabarti B**: Molecular mechanisms of photochemically induced posterior vitreous detachment. *Ophthalmic Res* 26: 51-59, 1994.
 - 54) **Kakehashi A, Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B**: Evidence for singlet oxygen-induced cross-links and aggregation of collagen. *Biophys Biochem Res Comm* 196: 1440-1446, 1993.
 - 55) **Hikichi T, Ueno N, Trempe CL, Chakrabarti B**: Cross-linking of dermal collagen induced by singlet oxygen. *Biochem Mol Biol International* 33: 497-504, 1994.
 - 56) **Davis MD**: Vitreous contraction in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 74: 741-751, 1965.
 - 57) **Tolentino FI, Lee PF, Schepens CL**: Biomicroscopic study of vitreous cavity in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 75: 238-246, 1966.
 - 58) **Gottfried V, Peled D, Winkelman JW, Kimel S**: Photosensitizers in organized media: Singlet oxygen production and spectral properties. *Photochem Photobiol* 48: 157-163, 1988.
 - 59) **Matsumura G, Pigman W**: Catalytic role of copper and iron ions in the depolymerization of hyaluronic acid by ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 120: 526-533, 1965.
 - 60) **Harris MJ, Herp A, Pigman W**: Depolymerization of polysaccharides through the generation of free radicals at a platinum surface: A novel procedure for the controlled production of free-radical oxidations. *Arch Biochem Biophys* 142: 615-622, 1971.
 - 61) **Fridovich I**: Oxygen radical, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: Pryor WA (Ed): *Free Radicals in Biology Vol I*, New York, Academic Press, 239-277, 1976.
 - 62) **Chattopadhyay D, Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B**: Metal ion catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid: Role of radicals and radical ions. *Ophthalmic Res* 24: 1-7, 1992.
 - 63) 清水弘一, 他(編): *標準眼科学*, 医学書院, 153-159, 1981.
 - 64) 近藤元治: フリーラジカルって何だ? *日本医学館*, 1-56, 1991.
 - 65) **Halliwell B, Gutteridge MC**: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14, 1984.
 - 66) **Bito LZ**: Inflammatory effects of endotoxin-like contaminants in commonly used protein preparations. *Science* 196: 83-85, 1977.
 - 67) **Bhattacharjee P, Williams RN, Eakins KE**: An evaluation of ocular inflammation following the injection of bacterial endotoxin into the rat foot pad. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 196-202, 1983.
 - 68) **Csukas S, Paterson CA, Brown K, Bhattacharjee P**: Time course of rabbit ocular inflammatory response and mediator release after intravitreal endotoxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 382-387, 1990.
 - 69) **Hikichi T, Ueno N, Chakrabarti B, Trempe CL, Yoshida A**: Evidence of cross-link formation of vitreous collagen during experimental ocular inflammation. *Greafes Arch Clin Exp Ophthalmol* (印刷中).
 - 70) **Burke JM**: An analysis of rabbit vitreous collagen. *Connective Tissue Res* 8: 49-52, 1980.
 - 71) 近藤元治: いま, フリーラジカルが面白い, (近藤元治編) *最新医学からのアプローチ*, 第4巻, フリーラジカル, メジカルビュー社, 2-6, 1992.
 - 72) 二木鋭雄: フリーラジカル—その発生・検出・反応・消去—. *フリーラジカルの臨床* 3: 1-10, 1988.
 - 73) 二木鋭雄, 野口範子: 活性酸素・フリーラジカルとはどのようなものか? (近藤元治編) *最新医学からのアプローチ*, 第4巻, フリーラジカル, メジカルビュー社, 9-13, 1992.
 - 74) **Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ**: The surprising life of nitric oxide. *Chemical and Engineering News* 72: 26-38, 1993.
 - 75) 佐久間一郎, 北島 顯: NOの薬理作用. 谷口直之(編): *活性酸素の臨床への展望*. 一酸化窒素(NO)とSOD. 医薬ジャーナル社, 東京, 23-28, 1994.
 - 76) 宮坂信之: NOと炎症—特に関節炎について. *実験医学* 13: 998-1001, 1995.
 - 77) 長野哲雄: 特異なラジカル種 NOは生体でどのような反応をひき起こすか. *実験医学* 13: 894-897, 1995.
 - 78) 秋葉 純: 光力学(photodynamic action)による硝子体の変化. *日眼会誌* 96: 731-736, 1992.

- 79) 由井伸彦, 岡野光夫, 桜井靖久: 生体内分解性ヒドロゲルによる炎症応答型薬物送達システム. *Drug Delivery System* 7: 411-416, 1992.
- 80) 由井伸彦: 生体内分解性ヒドロゲルを用いた炎症応答型薬物送達システム. *生体材料* 12: 135-141, 1994.
- 81) 紅 陽子, 末次一博, 田中 弘: 活性酸素によるヒアルロン酸の断片化の抑制. *香粧会誌* 17: 207-213, 1993.
- 82) Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B: Molecular mechanisms of posterior vitreous detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231: 408-412, 1993.
- 83) Bickers DR: Photosensitization by porphyrins. In: Goldsmith LA (Ed): *Biochemistry and Physiology of the Skin*, Vol 2, 755-768, Oxford University Press, New York, 1983.
- 84) Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G: The fenton reagents. *Free Radical Biology & Medicine* 15: 435-445, 1993.
- 85) Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymology* 186: 1-85, 1990.
- 86) Floyd RA: Basic free radical biochemistry. In: Yu BP (Ed): *Free Radicals in Aging*. CRC Press, Boca Raton, FL, 39-55, 1993.
- 87) 住本英樹, 竹重公一郎, 水上茂樹: 好中球の superoxide 生成. *フリーラジカルの臨床* 1: 15-23, 1987.
- 88) Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B: Age-related changes in the molecular properties of vitreous collagen. *Curr Eye Res* 12: 951-954, 1993.
- 89) Bailey AJ, Robins SP, Balian G: Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature* 251: 105-109, 1974.
- 90) Bailey AJ, Kent MJC: Non-enzymatic glycosylation of fibrous and basement membrane collagens. In: Baynes JW, et al (Eds): *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*. Alan R Liss, New York, 109-122, 1989.