

網膜光傷害における α -トコフェロールの保護効果

—ニトロブルーテトラゾリウム染色による検討—

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

網膜光傷害の発生にはフリーラジカルが関与すると考えられている。光照射を行った網膜におけるフリーラジカルの発生状態を組織化学的に証明するために組織片にニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 染色を行って検討した。さらに、フリーラジカルの消去物質である α -トコフェロールの保護効果を検討した。家兎網膜にキセノン光を60分間照射した。照射直後に眼球を摘出し、0.1 mM NBT 溶液に37°Cで60分間反応させ、網膜の切片を光学顕微鏡で観察した。光照射眼では非照射の対照眼に比べ網膜内層が強く染色された。光照射前から α -トコ

フェロールを投与した眼では網膜内層の染色はごく軽度であった。光照射によって網膜内層にフリーラジカルが多く発生し、 α -トコフェロールの投与でフリーラジカルの発生は抑制されることが示された。(日眼会誌 99: 161-165, 1995)

キーワード：網膜光傷害, α -トコフェロール, ニトロブルーテトラゾリウム染色, フリーラジカル
網膜光毒性

Protective Effect of α -Tocopherol in Retinal Light Damage of Pigmented Rabbits

—Evaluation by Nitro Blue Tetrazolium Staining—

Jun Kozaki, Masamitsu Takeuchi, Kanji Takahashi,
Kazuya Yamagishi, Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama*Department of Ophthalmology, Kansai Medical University*

Abstract

Free radicals are thought to be one of the causes of retinal light damage. Experiments were performed to identify the production of free radicals in light exposed retinas of rabbits using nitro blue tetrazolium (NBT) staining. In addition, a free radical scavenger, α -tocopherol, was administered systemically before light exposure to evaluate the protective effect against the retinal light damage. Pigmented rabbits were exposed to xenon light without long waves for 60 minutes. The eyes were enucleated immediately after light exposure, and incubated in the equilibrated media at 37°C with 0.1 mM NBT solution for 60 minutes. After incubation, the eyes were embedded in paraffin, sectioned, and mounted without further staining. The same proce-

dures were done to the tocopherol treated retinas. In the light exposed eyes, the NBT staining was markedly observed at the inner retina, and the staining was more remarkable than that of the non-exposed eyes. The tocopherol treated eyes showed weaker NBT staining in the inner retina than the non-treated eyes. The results suggest that free radicals are increased in the inner retina by light exposure and α -tocopherol suppresses production of free radicals. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 161-165, 1995)

Key words: Retinal light damage, α -Tocopherol, Nitro blue tetrazolium staining, Free radical, Retinal phototoxicity

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学眼科学教室 湖崎 淳

(平成6年7月11日受付, 平成6年9月7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 July 11, 1994 and accepted in revised form September 7, 1994)

I 緒 言

光照射による網膜の傷害は、視細胞外節や網膜色素上皮に発生する^{1)~7)}。網膜光傷害は主に光照射による化学作用が原因であり、ラジカル反応により視細胞外節や網膜色素上皮細胞の膜における過酸化脂質の形成が成因とされている。視細胞外節から網膜色素上皮の網膜外層は光を吸収する物質が豊富に存在し、豊富な脈絡膜循環により高い組織酸素分圧に曝されて活性酸素が産生されやすく、また、外節にはラジカル連鎖反応を起こす不飽和脂肪酸が多い、などの理由で視細胞外節から網膜色素上皮が光傷害の主病巣になるとされている⁸⁾。ラジカル反応を抑制するため、フリーラジカルの消去物質であるアスコルビン酸⁹⁾¹⁰⁾、ジメチルチオウレア¹¹⁾¹²⁾、 α -トコフェロール¹³⁾¹⁴⁾などの投与によって、光照射による組織傷害が抑制されたと報告されている^{9)~14)}。これらの実験は、光照射による組織傷害によってフリーラジカルが発生することを証明している。我々も有色家兎網膜に光を照射し、網膜色素上皮を初発とする網膜光傷害モデルを作成した⁷⁾。さらに、ラジカル反応を抑制する α -トコフェロールをあらかじめ投与すると、光による網膜の組織傷害が軽減されることを証明した¹⁴⁾。この光傷害モデルでは、網膜内層には組織変化はみられなかった。

ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) は分子量 817.6 の黄色の可溶性の粉末で、還元されると formazan と呼ばれる青色の不溶性複合物となり、青色の微細な沈着物として観察される¹⁵⁾。過去には Kuwabara ら¹⁶⁾¹⁷⁾、Cogan ら¹⁸⁾¹⁹⁾が網膜の脱水素酵素の局在を調べるために用いたり、白血球の貪食胞の酵素活性の評価²⁰⁾に用いられた。最近では、NBT はスーパーオキシドアニオンと反応して formazan に変わると考えられて、培養神経細胞²¹⁾²²⁾や培養網膜色素上皮²³⁾でのスーパーオキシドの産生とスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の効果、脳組織でのフリーラジカルの産生²⁴⁾²⁵⁾、電気泳動を用いての各眼球組織での SOD 活性の評価²⁶⁾²⁷⁾、有機溶媒中のスーパーオキシドアニオンの定量²⁸⁾など、フリーラジカルの産生や SOD の効果の評価に用いられている。

我々は、組織傷害の起こっていない網膜内層でのフリーラジカルの発生状況を証明するために、NBT を用いて網膜内層を染色し、無処置例、光照射例、 α -トコフェロール投与例を検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

体重 2~4 kg の有色家兎を用いた。全く無処置の対照群、光照射を行い、 α -トコフェロールを投与していない群、あらかじめ光照射前に α -トコフェロールを投与しておいて光照射を行った群の 3 群について、それぞれ 3 匹 6 眼用いた。

2. α -トコフェロール投与

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。 α -トコフェロールは光照射前 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。

3. 光 照 射

光照射は、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 (ケタラル®) 40~60 mg/kg を筋肉内注射した後、ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) 20 mg/kg を耳静脈に投与し、その後、一定の麻酔状態が得られるように適宜追加した。

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、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。

4. 組織学的観察

光照射直後に眼球摘出のうえ、摘出眼球は半切後、NBT 0.1 mM を含む眼灌流液 (BSS プラス®希釈液) に 37°C で 60 分間浸漬した。その後、6% ホルマリン溶液で 12 時間固定した後、後極部を切り出し、メタノール系列で脱水、パラフィンで包埋し、6 μ m の光学顕微鏡用切片を作った。切片は追加染色を行わないで、光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. 臨 床 所 見

照射直後、検眼鏡的に眼底には異常をみなかった。

2. 組織学的所見

無処置の対照群では、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、視細胞内節に微細な顆粒状の沈着物 (formazan) がみられた。視細胞外節には沈着物はみられなかった。網膜のほぼ全層に微細な沈着物がみられたが、網膜の外層ほど沈着物は多くみられた (図 1)。

光照射を行った α -トコフェロール非投与群では、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、視細胞内節に微細な顆粒状、針状の沈着物がみられた (図 2)。対照群と比較して、外顆粒層や視細胞内節での沈着物の量には変化はなかったが、神経節細胞層と内網状層に沈着物が著明に増加していた。

α -トコフェロールを投与した後に光照射を行った群では神経節細胞層と視細胞内節に僅かに NBT の沈着物がみられたが、外顆粒層や視細胞外節には沈着物はみら

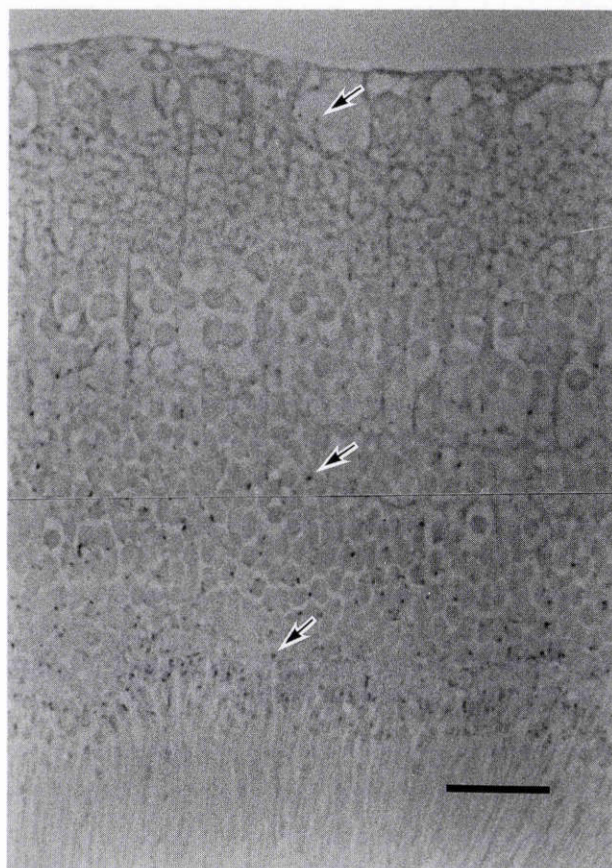


図 1 対照群の光学顕微鏡像。

神経線維層，神経節細胞層，内網状層，内顆粒層，外網状層，外顆粒層，視細胞内節に微細な顆粒状の沈着物がみられる。視細胞内節，外顆粒層に沈着物が多い。NBT 染色，バーは 20 μm



図 2 光照射群。

神経線維層，神経節細胞層，内網状層，内顆粒層，外網状層，外顆粒層，視細胞内節に微細な顆粒状，針状の沈着物がみられる。対照群と比べ神経節細胞層，内網状層に沈着物が著明に増加している。NBT 染色，バーは 20 μm

れなかった(図 3)。対照群や α -トコフェロール非投与群と比べて，網膜全層で沈着物が明らかに減少していた。

IV 考 按

Kuwabara ら¹⁶⁾¹⁷⁾，Cogan ら¹⁸⁾¹⁹⁾は網膜の乳酸脱水素酵素や補酵素の局在を NBT 染色を用いて観察した。また，Nathan ら²⁰⁾は慢性肉芽腫症における白血球の食細胞の酵素活性の低下を NBT 染色を用いて検討した。これらの研究から，NBT 染色を酵素の還元反応の指標として用いた。

NBT はスーパーオキシドアニオンの存在で還元され，formazan となることがわかり，最近ではフリーラジカル発生の指標として用いられている^{21)~27)}。Sáez ら²¹⁾，Chan ら²²⁾は培養神経細胞でのフリーラジカル発生を NBT 染色を用いて観察し，Dorey ら²³⁾は培養網膜色素上皮でフリーラジカルの発生と SOD 活性を NBT 染色を用いて観察した。これらの研究では培養細胞にフリーラジカルが発生する刺激を与え，NBT 染色を行い，formazan の発生を証明している。また，Kontos ら²⁴⁾，Armstead ら²⁵⁾は脳組織にアラキドン酸や虚血などフリーラジカルの発生する刺激を与え，脳表面を NBT で染色し，

脳表面の formazan を観察した。これらの刺激で，NBT の染色は増加し，SOD やインドメタシンの投与で染色は減少したと報告している。西田ら²⁸⁾はジメチルスルホキシド溶液中のスーパーオキシドアニオンを NBT で染色し，その吸光度とスーパーオキシドアニオンの濃度は直線関係を示すことを明らかにした。

Zhang ら²⁹⁾はラット網膜に 24 ルックスの光を 12 時間照射し，NBT 染色を用いて観察した。光照射した網膜の視細胞層や外顆粒層，外網状層，内顆粒層，内網状層，神経節細胞層，ミュラー細胞が染色され，SOD の前処置で網膜内層の染色は減少し，シアン化カリウムなどフリーラジカル消去物質の阻害剤の投与で染色は増加したと報告し，フリーラジカルによる網膜光傷害の評価に NBT が有用であると報告した。さらに，染色は NBT 浸漬の時間と濃度に比例するとし，1 mM，60 分の浸漬が最も良いとした。

我々は，有色家兎網膜に長波長を吸収したキセノン光を 1 時間照射し，網膜色素上皮を初発とした網膜光傷害を作成した¹⁴⁾。光照射後 3 時間から網膜色素上皮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



図3 光照射前に α -トコフェロールを投与した群。
神経節細胞層と視細胞内節に僅かに沈着物がみられ
る。網膜全層では沈着物が著明に減少している。
NBT染色、バーは20 μ m

落ち込み、基底陥入は開大した。しかし、視細胞や網膜内層には異常をみなかった。光照射12時間後では視細胞や網膜内層には異常をみなかったが、網膜色素上皮はほぼ壊死に陥っていた。これと同じ条件で、光照射前2日、1日および照射前4時間の計3回、 α -トコフェロールを投与すると、照射3時間後では網膜色素上皮のミトコンドリアの形態は比較的良好に保たれていた。12時間後にも網膜色素上皮の傷害は軽度であった¹⁴⁾。このように、光照射による網膜傷害は先に網膜色素上皮に現れ、 α -トコフェロールの投与はそれを著明に軽減することを示した。

本報の実験は同様の条件で光照射を行い、前報⁷⁾¹⁴⁾では組織学的に光傷害の発生しなかった網膜内層をNBT染色を用いて観察した。 α -トコフェロールの投与量は前報¹⁴⁾と同様に行った。NBT染色はZhangら²⁹⁾の報告に従い、濃度は0.1 mM、浸潤時間は60分とした。

無処置の対照群ではNBT染色により神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、視細胞内節に微細な沈着物がみられた。特に、外顆粒層と視細胞内節に多くみられ、このことは、特に光照射を行わなくても、これらの部位にスーパーオキシドが産

生されていることが示された。

光照射を行うと、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、視細胞内節にNBT染色で沈着物がみられた。特に、神経節細胞層と内網状層では沈着物が著明に増加し、スーパーオキシドの量が増加したことが示された。

この方法では眼球を半切後、NBT溶液に浸漬するため、浸漬中に網膜剥離が起こり、網膜外層での沈着物の評価は困難であった。

従来の報告^{1)~6)8)~13)}や前報に示した我々の網膜光傷害の発生実験⁷⁾¹⁴⁾では網膜光傷害は網膜内層にはみられず、視細胞や網膜色素上皮に発生した。しかし、本邦の研究で光照射を行うことで組織傷害の発生していない網膜内層にもスーパーオキシドの増加がみられた。スーパーオキシドは寿命が非常に短く、染色法によって組織学的に証明するのは困難である。しかし、光照射直後の染色で沈着物が観察されたことから、光照射の刺激でスーパーオキシドは増加する可能性が示された。網膜内層にスーパーオキシドが増加したのは産生されたスーパーオキシドの寿命を考えると、視細胞で発生したスーパーオキシドが網膜内層へ移動したと考えるよりも、網膜内層にあるミトコンドリアで発生したと思われる。短時間の照射では組織傷害は発生しないが、長期間照射することにより組織傷害が発生してくる可能性は考えられた。

あらかじめ α -トコフェロールを投与しておいて、光照射をした群では神経節細胞層と視細胞内節に僅かにNBT染色による沈着物はみられたが、網膜全層には沈着物は著明に減少していた。

細胞膜の主成分である不飽和脂肪酸はスーパーオキシドなどの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を傷害する。 α -トコフェロールはペルオキシラジカルと強く反応し、細胞膜での脂質過酸化反応を停止させる³⁰⁾。しかし、 α -トコフェロールはスーパーオキシドにも作用するとされている³⁰⁾³¹⁾。今回の実験でも、 α -トコフェロール投与群では沈着物が著明に減少していたことは、 α -トコフェロールはスーパーオキシドに作用し、消去したものと考えられた。すなわち、 α -トコフェロールはペルオキシラジカルとスーパーオキシドの両方に作用し、網膜を保護すると考えられた。

以上の研究から、①NBT染色で網膜でのフリーラジカルが染色され、フリーラジカルは神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、視細胞内節にみられた。②すなわち、光照射を行わなくても網膜にフリーラジカルが産生されている。③光照射によって、組織傷害は発生しなかったが、網膜内層、特に神経節細胞層と内網状層にフリーラジカルが増加するこ

とがわかった。④ α -トコフェロールを投与すると、光照射しても網膜内層のスーパーオキサイドは著しく軽減した。すなわち、 α -トコフェロールはスーパーオキサイドの発生を抑制することがわかった。

本論文の要旨は第98回日本眼科学会総会(平成6年4月横浜)で湖崎が報告した。

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) Parver LM, Auker CR, Fine BS: Observation on monkey eyes exposed to light from an operating microscope. *Ophthalmology* 90: 964—972, 1983.
- 4) 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*. BJ Lippincott Company, Pennsylvania, 187—214, 1988.
- 5) Collier RJ, Waldron WR, Zigman S: Temporal sequence of changes to the gray squirrel retina after near-UV exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 631—637, 1989.
- 6) Friedman E, Kuwabara T: The retinal pigment epithelium. IV The damaging effects of radiant energy. *Arch Ophthalmol* 80: 265—279, 1968.
- 7) 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.
- 8) 根木 昭: 網膜光毒性. *眼科* 31: 1239—1248, 1989.
- 9) Organisciak DT, Wang HM, Li ZT, Tso MOM: The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1580—1588, 1985.
- 10) 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.
- 11) Lam S, Tso MOM, Gurne DH: Amelioration of retinal photic injury in albino rats by dimethylthiourea. *Arch Ophthalmol* 108: 1751—1757, 1990.
- 12) Organisciak DT, Darrow RM, Jiang YL, Marak GE, Blank JC: Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1599—1609, 1992.
- 13) 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.
- 14) 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—2. α -トコフェロールの効果—. *日眼会誌* 98: 948—954, 1994.
- 15) Altman FP: Tetrazolium salts and formazan. *Prog Histochem Cytochem* 9: 1—59, 1976.
- 16) Kuwabara T, Cogan D: Tetrazolium study on the retina: I. Introduction and technique. *J Histochem Cytochem* 7: 329—333, 1958.
- 17) Kuwabara T, Cogan D: Tetrazolium study on the retina: III. Activity of metabolic intermediates and miscellaneous substrates. *J Histochem Cytochem* 8: 214—224, 1960.
- 18) Cogan D, Kuwabara T: Tetrazolium study on the retina: II. Substrate dependent patterns. *J Histochem Cytochem* 7: 334—341, 1959.
- 19) Cogan D, Kuwabara T: Tetrazolium study on the retina: IV. Distribution of reductase in ocular tissue. *J Histochem Cytochem* 8: 380—384, 1960.
- 20) Nathan DG, Baehner RL, Weaver DK: Failure of nitro blue tetrazolium reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 48: 1895—1904, 1969.
- 21) Sáez JC, Kessler JA, Bennett MVL, Spray DC: Superoxide dismutase protects cultured neurons against death by starvation. *Proc Natl Acad Sci* 84: 3056—3059, 1987.
- 22) Chan PH, Chen SF, Yu ACH: Induction of intracellular superoxide radical formation by arachidonic acid and by polyunsaturated fatty acids in primary astrocytic cultures. *J Neurochem* 50: 1185—1193, 1988.
- 23) Dorey CK, Khouri GG, Syniuta LA, Curran SA, Weiter JJ: Superoxide production by porcine retinal pigment epithelium *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1047—1054, 1989.
- 24) Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, et al: Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 57: 142—151, 1985.
- 25) Armstead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CW: Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am J Physiol* 255: 401—403, 1988.
- 26) Crouch R, Priest G, Duke EJ: Superoxide dismutase activities of bovine ocular tissues. *Exp Eye Res* 27: 503—509, 1978.
- 27) Newsome DA, Dobard EP, Liles MR, Oliver PD: Human retinal pigment epithelium contains two distinct species of superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2508—2513, 1990.
- 28) 西田雄三, 渡辺 泉, 鶴浦 啓: 有機溶媒中におけるスーパーオキサイドアニオンのNBT法による定量. *J Act Oxyg Free Rad* 2: 515—521, 1991.
- 29) Zhang H, Agardh E, Agardh CD: Nitro blue tetrazolium staining: A morphological demonstration of superoxide in the rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231: 178—183, 1993.
- 30) 二木鋭雄: ビタミンEと酵素, 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—*, 医歯薬出版, 東京, 56—76, 1985.
- 31) Sakamoto W, Fujie K, Mino M, Murota S: Vitamin E and macrophage. In: Mino M, et al (Eds): *Vitamin E—Its usefulness in health and in curing diseases*. Japan Sci Soc Press, Tokyo, 209—217, 1993.