

電気生理学的にみた網膜の虚血一再灌流障害に対する抗酸化剤の役割

加藤 千晶

岩手医科大学医学部眼科学教室

要 約

網膜の虚血一再灌流障害に対する抗酸化剤の影響を、有色家兎眼の再灌流後の網膜電図(ERG)を指標として検討した。眼圧を140 mmHg, 60分間上昇させて眼虚血を負荷した後、眼圧を正常まで低下させて再灌流を開始した。再灌流開始直後(早期投与群)または1時間後(後期投与群)にマニトール, polyethylene glycol superoxide dismutase (PEG-SOD) あるいはアスコルビン酸を家兎に点滴静注した。生理食塩水を早期投与群と同様に投与したものを対照とした。ERG a, b波を虚血前および再灌流後に記録した。再灌流開始4時間後のb波振

幅の回復率は、早期投与群ではいずれの薬物も対照に比較して有意に良好であった。後期投与群ではPEG-SODの回復率が対照に比較して有意に良好であった。以上から、いずれの抗酸化剤も虚血一再灌流障害に有効であり、抗酸化剤の種類によっては再灌流後に投与された場合でもその効果があると思われる。(日眼会誌 99:552-557, 1995)

キーワード: 網膜, 虚血一再灌流障害, 抗酸化剤, 活性酸素, 網膜電図

An Electrophysiological Study on the Effect of Antioxidant Drugs Against Retinal Ischemia-reperfusion Damage

Chiaki Kato

Department of Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine

Abstract

The effects of antioxidant drugs on retinal ischemia-reperfusion damage were studied by electroretinograms (ERGs) from reperfused Dutch rabbit eyes. After inducing retinal ischemia by increasing the intraocular pressure (IOP) up to 140 mmHg for 60 minutes, the reperfusion was started by lowering the IOP to the normal level. Mannitol, polyethylene glycol superoxide dismutase (PEG-SOD), or ascorbic acid was administered by drip-infusion to the rabbits immediately after (early group) or 1 hr after (delayed group) the start of reperfusion. Saline, as a control, was administered by the same method as the early group. The a- and b-waves were recorded before the ischemia and during the reperfusion. In the early group treated by each drug, the recovery rates of the b-wave

amplitudes at 4 hrs after the start of reperfusion were significantly greater than those in the controls. In the delayed group, the ERG recovery rate in rabbits treated with PEG-SOD was significantly better than in the controls. These results indicated that all these drugs were effective in protecting from the retina from the ischemia-reperfusion damage, and that some antioxidant drugs might be effective even when they were administered after the start of reperfusion. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 552-557, 1995)

Key words: Retina, Ischemia-reperfusion, Antioxidant drugs, Active oxygens, Electroretinogram

I 緒 言

灌流障害によって虚血に陥った組織に灌流が再開されると、その障害がさらに悪化することが明らかになって

おり、虚血一再灌流障害として注目されている。例えば、ラットの網膜中心動脈および毛様体動脈を結紮して作成した網膜虚血によって生じた内網状層の浮腫は、再灌流後にその浮腫がより強くなることが報告¹⁾されている。

別刷請求先: 020 岩手県盛岡市内丸19-1 岩手医科大学医学部眼科学教室 加藤 千晶

(平成6年10月24日受付, 平成6年12月27日改訂受理)

Reprint requests to: Chiaki Kato, M.D. Department of Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine, 19-1 Uchimaru, Morioka-shi, Iwate-ken 020, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form December 27, 1994)

一方、網膜の虚血一再灌流障害に抗酸化剤を投与することによって組織障害が軽減することから、虚血一再灌流障害には活性酸素が関与していることが推察され、抗酸化剤の有効性を唱える報告^{2)~5)}が多い。しかしながら、網膜虚血一再灌流障害における活性酸素の産生は未だ明確にされておらず、また、抗酸化剤の個々の特性や有効な投与時期などについても不明な点が多く残されている。そこで今回、網膜虚血一再灌流に対する抗酸化剤の役割を明確にする目的で、マニトールおよび polyethylene glycol superoxide dismutase (PEG-SOD)、さらに網膜光障害で発生するフリーラジカルに対して有効⁶⁾といわれているアスコルビン酸の3種の抗酸化剤を網膜虚血一再灌流作成後に時期を変えて投与し、網膜電図(ERG)を指標としてその有効性を比較した。

II 実験方法

1. 対象

有色家兎(体重1.8~2.2 kg) 29匹 29眼を用いた。両眼をミドリンP®で極大散瞳した後に、ウレタンの腹腔内注射(1.0 g/kg)で麻酔し、適時ウレタン(0.5 g/kg)を追加して無痛下で実験を行った。

2. 眼虚血の作成法

眼虚血の作成には眼圧上昇法⁷⁾を用いた。22 Gの血管留置針(サーフロ®)を角膜輪部から前房内に刺入し、内針を抜き取り、カテーテルの先端約3 mmを前房に留置した。このカテーテルと三方活栓の一端とをチューブでつなぎ、他端にはU字型水銀柱を連結した。さらに、三方活栓の中央端にヘパリン加生理食塩水を満たした注射筒をつなぎ、三方活栓の水銀柱側を閉鎖し、この注射筒を押して眼圧を上昇させた後に、三方活栓の中央端を閉鎖した。水銀柱圧で確認しながら、眼圧を140 mmHgに60分間維持することによって眼虚血を与えた後、眼圧を正常に戻して再灌流させた。

3. ERGの記録方法

家兎の被検眼の瞬膜を切除し、球結膜を10時から2時の部まで剝離して、銀一塩化銀電極(UHC, UNIQUE MEDICAL)を角膜上(関電極)と角膜輪部後方3 mmの強膜上(不関電極)にそれぞれ設置した。刺激光として250 Wハロゲンランプ光を直径6 mm、長さ90 cmのファイバーオプティクスで眼前3 cmまで誘導し、角膜面上の照度を4,000 luxに調光した。刺激持続時間は4秒とし、発生したERGを交流増幅(AVB-21, 日本光電, high cut 300 Hz, low cut 5 Hz)し、サーマルアレイレコーダー(RTA-1100, 日本光電)で描記した。ERGは40分間の前暗順応後に虚血前、再灌流開始直前および開始1時間後から1時間間隔で4時間後まで暗順応下で、1眼につき3ないし5分間隔で2または3回記録した。今回の実験ではERGのaおよびb波の振幅を検討の対象とし、a波振幅は基準線から陰性に向かう波型の最低点

までを、b波振幅はa波の最低点から陽性に向かう波型の最高点までとした。

4. 薬物と投与方法

使用した薬物は20% マニトール溶液(D-mannitol, マニトンS 20%®, 杏林製薬) 5 ml/kg, PEG-SOD(武田製薬) 15,000 U/kgあるいはアスコルビン酸(acidum ascorbicum, 山善製薬) 500 mg/kgである。マニトールはそのままを、PEG-SOD およびアスコルビン酸は生理食塩水(5 ml/kg)に溶解して、おのおの耳介静脈から20分間で点滴投与した。また、生理食塩水(5 ml/kg)を再灌流開始と同時に投与したものを対照とした。

薬物の投与開始時期は再灌流開始と同時に(早期投与群)あるいは再灌流開始後1時間(後期投与群)とした。実験動物は、早期投与群はマニトール4眼, PEG-SOD 3眼およびアスコルビン酸4眼、後期投与群はそれぞれの薬物について各4眼、対照に6眼を用いた。

虚血前のERG a, b波振幅に対する再灌流後の振幅の割合を回復率とし、各薬物と対照、および各薬物間で比較し、その結果はstudent's paired t-検定で有意差を求め、危険率(p)=0.05未満を有意とした。

III 結果

1. 早期投与群

マニトール, PEG-SOD, アスコルビン酸あるいは生理食塩水を再灌流と同時に投与した例の虚血前、再灌流開始1, 2, 3および4時間後に記録した各1例のERG波形を図1に示した。虚血負荷によってa, b波はその振幅の計測が困難なほど減弱したが、再灌流開始1時間後にはいずれの例でも振幅は回復し、その後も時間の経過とともに増大した。

1) a波振幅の回復率

a波振幅について、各薬物毎に3ないし6眼の平均回復率(平均値±標準偏差)の経時的变化を図2に示した。再灌流開始後すべての時点で、いずれの薬物投与群でも対照よりも良好な回復率を示す傾向がみられた。再灌流開始1時間後では、マニトール, PEG-SOD およびアスコルビン酸投与群の回復率(%)は、それぞれ31.2±20.3 (n=4), 69.8±23.9 (n=3) および47.0±21.8 (n=4)で、対照の16.9±19.1 (n=6)よりも高値を示したが、対照との間で有意な差は認められなかった。しかし、マニトールは2および3時間後の時点で、PEG-SOD およびアスコルビン酸は3時間後以降に対照より有意(p<0.05あるいはp<0.01)に良好な回復率を示した。各薬物間ではPEG-SODが1時間後でアスコルビン酸より、2時間後でマニトールより有意(p<0.01)に良好であったが、3時間以降は各薬物間に有意差はなかった。

2) b波振幅の回復率

再灌流開始1時間後のマニトール, PEG-SOD およびアスコルビン酸投与群のb波振幅の平均回復率(%)は、

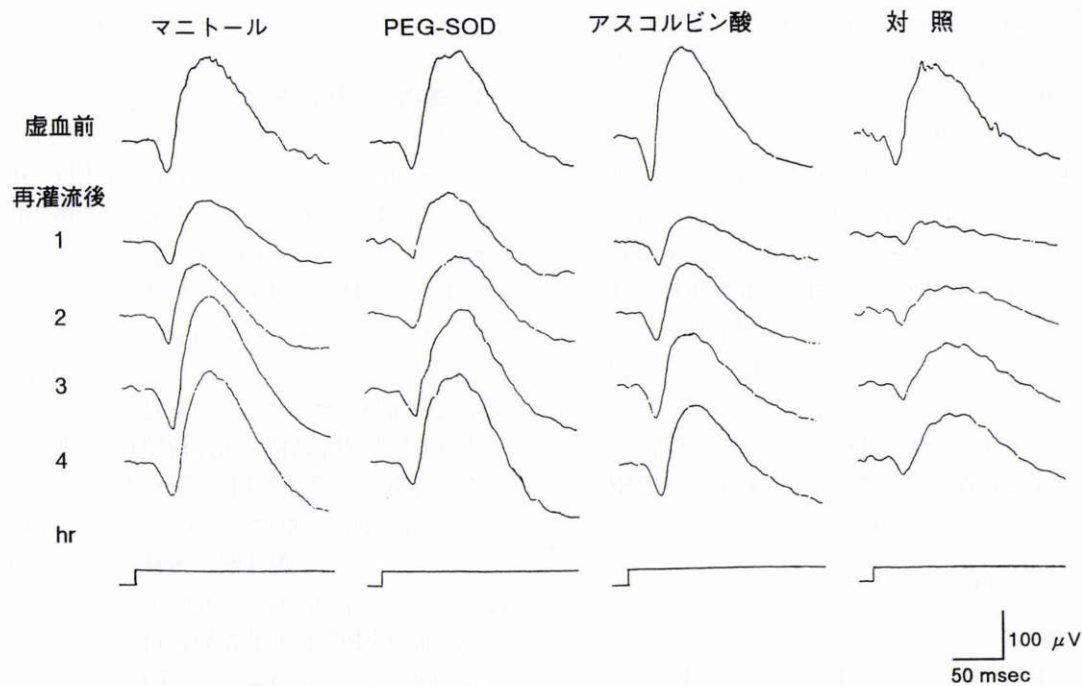


図1 早期投与群の各薬物投与眼および対照眼の虚血前および再灌流後の網膜電図(ERG)波形例.
PEG-SOD: polyethylene glycol superoxide dismutase

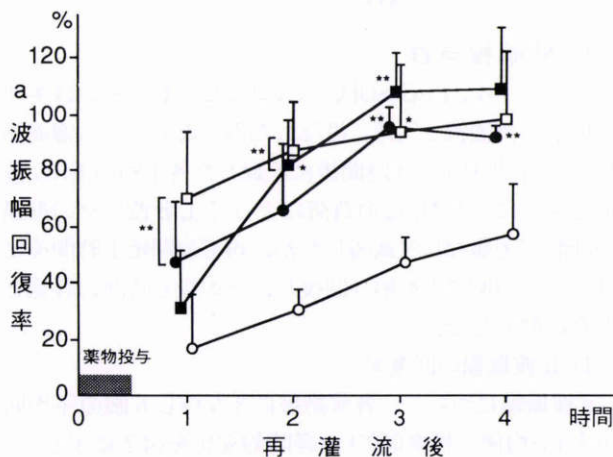


図2 早期投与群の再灌流および薬物投与後のa波振幅の平均回復率の経過.
p: 危険率, $p < 0.05$ が有意差あり. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$
黒四角: マンニトール, 白四角: PEG-SOD, 黒丸: アスコルビン酸, 白丸: 対照

それぞれ 44.5 ± 12.1 , 53.0 ± 1.0 および 30.9 ± 9.2 であり, その後もすべての時点で対照 (24.3 ± 2.9) を上回った. マンニトールおよび PEG-SOD は再灌流後の全時点で, また, アスコルビン酸では再灌流開始2時間後以降に対照よりも有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に回復率は良好であった. また, 薬物間ではマンニトール投与群では全時点で, PEG-SOD 投与群では3時間以降にアスコルビン酸よりも回復率は有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に良好であった(図3).

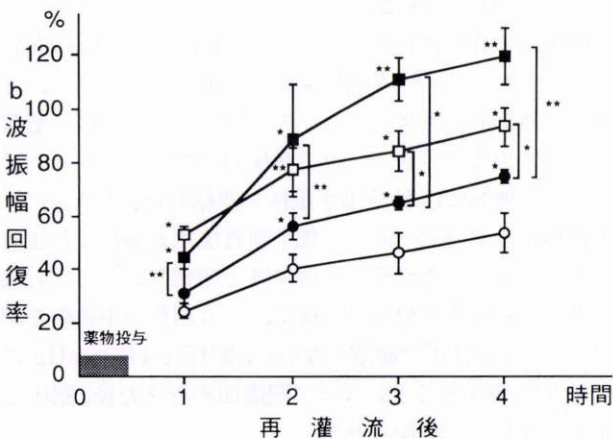


図3 早期投与群の再灌流および薬物投与後のb波振幅の平均回復率の経過.
p: 危険率, $p < 0.05$ が有意差あり. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$
黒四角: マンニトール, 白四角: PEG-SOD, 黒丸: アスコルビン酸, 白丸: 対照

2. 後期投与群

マンニトール, PEG-SOD およびアスコルビン酸を再灌流開始1時間後から投与し始めた例の虚血前, 再灌流開始1, 2, 3 および4時間後に記録したERGの波形の各1例を図4に示した. 再灌流開始1時間後からの投与であっても, a, b波の振幅は投与後の時間の経過とともに増大した.

1) a波振幅の回復率

再灌流開始1時間で薬物投与直前のマンニトール, PEG-SOD およびアスコルビン酸のa波振幅の平均回復率

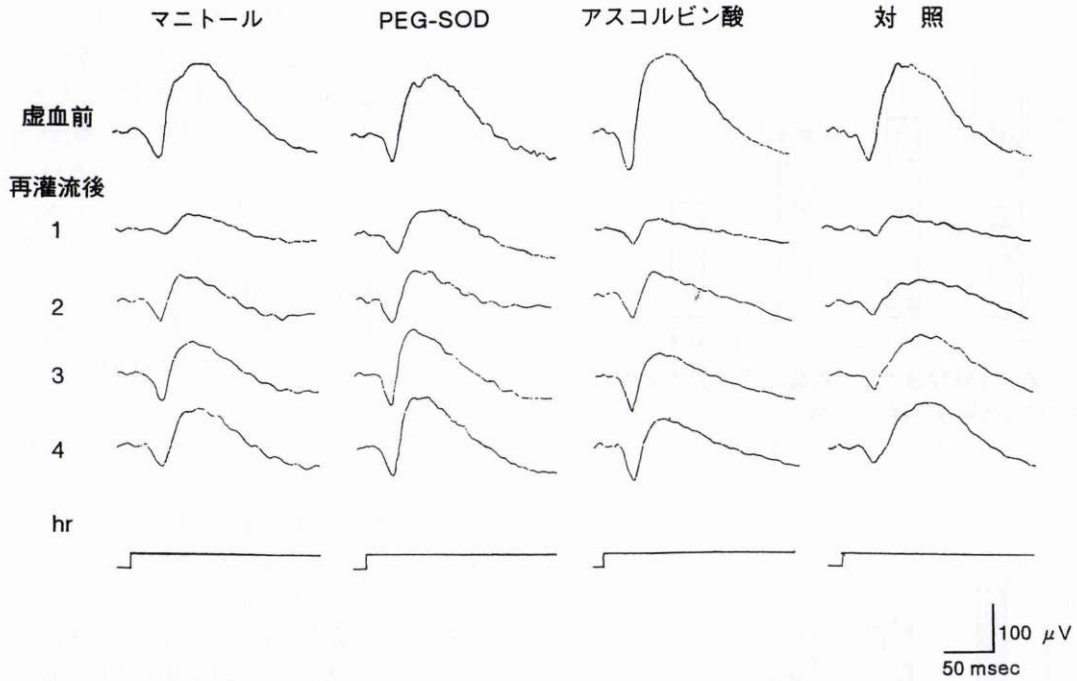


図 4 後期投与群の各薬物投与眼および対照眼の虚血前および再灌流後の ERG 波形例。

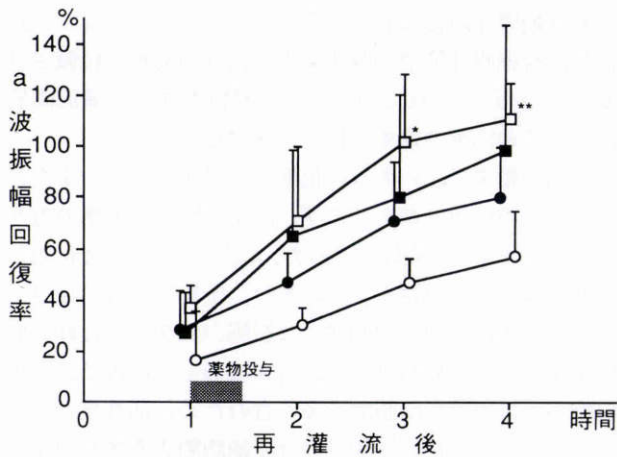


図 5 後期投与群の再灌流および薬物投与後の a 波振幅の平均回復率の経過。

p: 危険率, $p < 0.05$ が有意差あり. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

黒四角: マニトール, 白四角: PEG-SOD, 黒丸: アスコルビン酸, 白丸: 対照

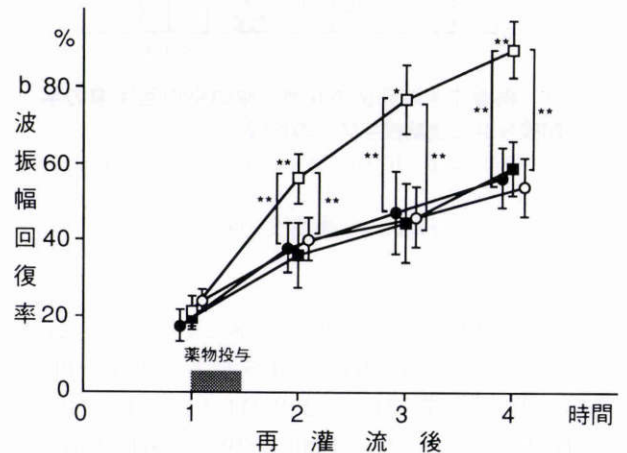


図 6 後期投与群の再灌流および薬物投与後の b 波振幅の平均回復率の経過。

p: 危険率, $p < 0.05$ が有意差あり. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

黒四角: マニトール, 白四角: PEG-SOD, 黒丸: アスコルビン酸, 白丸: 対照

(%) は 27.1 ± 16.0 ($n=4$), 36.4 ± 9.9 ($n=4$) および 28.8 ± 14.7 ($n=4$) で, 対照の 16.9 ± 19.1 と有意差はなかった. 投与後も, マニトールおよびアスコルビン酸では 4 時間までの間, 対照よりも有意な増大は認めなかった. しかし, PEG-SOD は再灌流開始 3 時間(投与後 2 時間)以降に対照と比較して回復率が有意 ($p < 0.05$) に良好であった. 各薬物間では有意差はなかった(図 5).

2) b 波振幅の回復率

再灌流開始 1 時間後で薬物投与直前のマニトール, PEG-SOD およびアスコルビン酸の b 波振幅の平均回復

率は 19.6 ± 3.2 , 21.4 ± 3.9 および 17.6 ± 4.3 で, いずれも対照 (24.3 ± 2.9) と差はなかった. 再灌流開始 2 時間(投与後 1 時間)以降はアスコルビン酸およびマニトールの回復は対照と同様の経過を示したのに対し, PEG-SOD の回復率は対照および他の 2 剤に比較して有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に良好であった(図 6).

3. 投与時期の検討

ERG の振幅が再灌流開始 4 時間後に最大値を示したことから, 投与時期の違いによる回復率の比較を再灌流開始 4 時間後の時点で行った. a 波振幅の 4 時間後の回

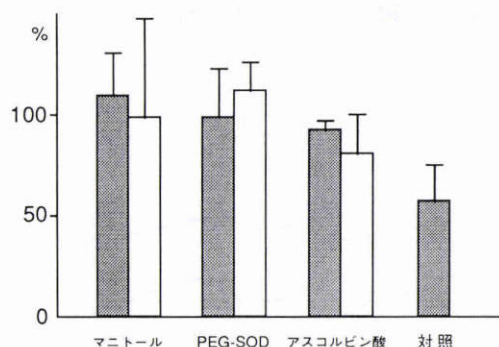


図7 再灌流4時間後のa波振幅の平均回復率の早期投与群と後期投与群との比較。

網：早期投与群，白：後期投与群

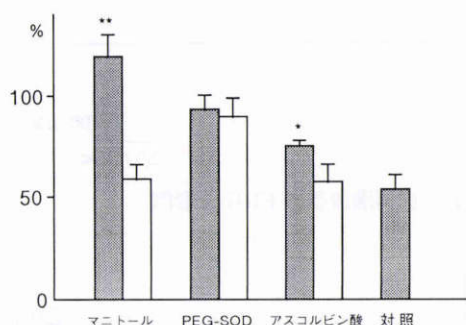


図8 再灌流4時間後のb波振幅の平均回復率の早期投与群と後期投与群との比較。

p：危険率， $p < 0.05$ が有意差あり，**： $p < 0.01$ ，*： $p < 0.05$

網：早期投与群，白：後期投与群

回復率(%)を早期投与群と後期投与群とで比較すると、マニトールはそれぞれ 109.2 ± 21.5 および 98.6 ± 49.3 、PEG-SOD は 98.7 ± 24.0 および 111.4 ± 14.3 、アスコルビン酸は 92.0 ± 4.4 および 80.3 ± 19.8 であり、いずれの薬物でも両群間に有意差を認めなかった(図7)。

b波振幅の回復率(%)を早期と後期投与群とで比較すると、マニトールは 119.5 ± 10.8 および 52.7 ± 7.2 、PEG-SOD は 93.3 ± 7.3 および 89.8 ± 7.4 、アスコルビン酸は 75.5 ± 3.0 および 57.7 ± 8.9 であり、マニトールおよびアスコルビン酸は早期投与群が有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に良好であったが、PEG-SOD では両群間に有意差はなく、後期投与でも早期投与と同等の効果が認められた(図8)。

IV 考 按

虚血一再灌流時には網膜に活性酸素が発生し、これが脂質を過酸化することによって網膜の細胞膜に障害を引き起こすことが考えられている。そこで、抗酸化剤を投与して活性酸素を消去することにより、網膜保護効果を証明した報告がある。すなわち、Szabo ら²⁾はラットの網膜中心動脈および毛様体動脈を結紮して眼虚血を作成

し、半減期の長い PEG-SOD を再灌流5分前に静脈投与した結果、再灌流後の内網状層の浮腫を軽減させたと報告している。電気生理学的に観察したものとしては、Gupta ら³⁾はマニトールが虚血一再灌流時に発生するヒドロキシラジカルを消去することに着目し、家兎眼に80分の眼圧上昇による眼虚血を負荷した後、再灌流直前に同剤を静脈投与して、再灌流開始24時間後のERG b波およびc波振幅に良好な回復が得られたことから、マニトールは眼虚血一再灌流障害に対して有用な薬剤であると述べている。Nayak ら⁴⁾はSODを60分または75分の家兎虚血眼に投与したところ、60分の虚血眼で良好なb波振幅の回復がみられたが、75分では対照と差はなかったとしている。これらの報告ではいずれも再灌流開始直前に抗酸化剤の投与が行われているが、虚血一再灌流に伴う活性酸素は再灌流直後から産生され、再灌流3時間後よりも24時間後の方が組織障害が強くなる⁸⁾。したがって、今回は再灌流後の時間が経過したのちの投与であっても抗酸化剤に網膜保護効果があるか否かを調べるため、再灌流開始後の2時点に同剤を投与してその効果を比較した。また、抗酸化剤の一つであるアスコルビン酸は網膜光障害において発生するフリーラジカルと反応し、視細胞外節や網膜色素上皮細胞の変性を軽減させることが報告⁶⁾されているので、網膜虚血一再灌流障害に対しての同剤の効果も併せて検討した。

今回の結果で、いずれの抗酸化剤によっても、また、投与時期の如何にかかわらず、a波振幅の回復率の方がb波のそれよりも良好であった。a波は元来、虚血に対してb波よりも抵抗性があり、また、振幅もb波に比べて小さいため、虚血後のわずかな振幅の回復でも良好な回復率を示したと思われる。また、a波の発生起源である視細胞外節は不飽和脂肪酸を多く含むため、活性酸素や他のフリーラジカルの影響を受けて細胞障害を被りやすいが、抗酸化剤の投与が過酸化脂質の発生を防ぎ、視細胞層の保護に役立ったことも考えられる。他方、b波は主として網膜内層の機能を反映しているが、組織学的にはSzabo ら¹⁾は、ラット網膜の虚血時間が延長するほど再灌流後に網膜内層の厚さが増加し、60分虚血では再灌流2時間後に、90分虚血では再灌流4時間後に網膜内層が最も厚くなると報告しており、網膜の虚血一再灌流障害はb波に影響しやすいと考えられ、a波よりも回復が遅く、回復率も低いものと思われた。

網膜虚血一再灌流の影響を反映するb波の回復を各薬物でみると、マニトールでは早期投与群のERGの回復は良好であり、特に再灌流開始3時間後にはb波振幅は全例が100%以上の回復を示した。前述したGupta ら³⁾の再灌流開始24時間後のb波振幅回復率も82%で良好な値を呈している。このように同剤の投与によってb波振幅が虚血前の状態にまで回復した事実から、同剤は虚血一再灌流障害に対して有用な薬物であることが考

えられる。眼圧上昇による網膜虚血では血液・網膜関門の破綻が生じており、この関門を通過したマニトールが活性酸素を消去するとともに、網膜浮腫の軽減にも関与し³⁾、アスコルビン酸や PEG-SOD を上まわる回復率を示したと思われる。

PEG-SOD の早期投与群の回復率は再灌流前に SOD を予防投与した Nayak ら⁴⁾の結果とほぼ同程度であり、再灌流直後の投与では PEG-SOD の有効性は SOD のそれと差はなかった。PEG-SOD と反応したスーパーオキシドは過酸化水素に変換される。カタラーゼは過酸化水素を水と酸素に変える酵素であり、SOD とカタラーゼの併用によって虚血—再灌流障害に対する有効性が高まるとの報告⁴⁾⁵⁾もあることから、今後これらの併用も検討する価値があると思われる。

アスコルビン酸については、早期投与群では b 波振幅の回復は対照よりも有意に良好であったことから、網膜光障害のみならず眼虚血にも応用が可能であると思われた。虚血—再灌流障害以外にも実験的糖尿家兎の網膜では過酸化脂質が増加⁹⁾し、その消去機構が低下している¹⁰⁾ことから、投与が容易で副作用も少ない同剤は糖尿病網膜症を始めとする虚血性疾患の予防的投与に有効性が示唆される。

抗酸化剤の臨床的な使用を考える場合、虚血後もしくはそれに伴う再灌流後の投与の有効性が問題となる。しかしながら、これまでの報告では抗酸化剤を再灌流前に投与したもの^{2)~5)}だけである。今回の結果で、マニトールおよびアスコルビン酸の後期投与では ERG の回復には対照と有意差はなく、網膜の保護効果が認められなかった。しかし、PEG-SOD では再灌流1時間後からの投与でも投与1時間後に ERG が急速に回復し始め、2 および 3 時間後は早期投与群とほぼ同程度にまで回復した。このことは、抗酸化剤の種類によっては再灌流後の時間が経過した後の投与であっても網膜保護効果を発揮する可能性を示すものと思われた。

再灌流後の時間が長ければ組織障害も強くなる⁸⁾ので、薬剤の濃度、効果発現までの時間あるいは有効時間などが活性酸素の消去に深く関与してくるものと思われる。PEG-SOD は分子量が大きいので心房内投与後に血中活性が速やかに上昇し、血中の半減期も約 30 時間と長く、薬物効果が長時間維持される¹¹⁾。また、虚血—再灌流におけるスーパーオキシドは細胞内のミトコンドリアもしくは血管内皮でのキサンチン—オキシダーゼ系を発生場所としている。内皮細胞に親和性をもつ PEG-SOD は血管内皮障害も軽減し、その結果、組織障害の軽減に役立った¹²⁾ものと思われた。

虚血—再灌流障害には虚血そのものによる障害と再灌流によって引き起こされる障害がある。虚血による網膜障害を軽減する薬物としては、神経細胞のグルタミン酸レセプター拮抗剤であるデキストロメトर्फアン⁷⁾¹³⁾や、

細胞内へのカルシウムの流入を防いで、細胞内酵素活性を低下させるカルシウム拮抗剤¹⁴⁾が知られている。これらの薬物に再灌流障害を軽減する抗酸化剤を併用すれば、虚血—再灌流障害の軽減の一層の促進が予想され、今後臨床応用への可能性が十分に考慮される。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました田澤豊教授に深謝いたします。また、終始御指導いただいた森 敏郎医師、ならびに菅原岳史医師に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P: Free radical-mediated effects in reperfusion injury: A histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res* 23: 225—234, 1991.
- 2) Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Carré C, Braquet P: Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1471—1478, 1991.
- 3) Gupta LY, Marmor MF: Mannitol, dextromethorphan, and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* 111: 384—388, 1993.
- 4) Nayak MS, Kita M, Marmor MF: Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2018—2022, 1993.
- 5) Vériac S, Tissie G, Bonne C: Alterations of energetic metabolite levels by free radicals during optic nerve ischemia. *Current Eye Res* 11: 275—278, 1992.
- 6) Li ZY, Tso M, Wang H, Organisciak DT: Amelioration of photic injury in rat retina by ascorbic acid: A histopathologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1589—1598, 1985.
- 7) 菅原岳史: 網膜虚血に対するグルタミン酸レセプター拮抗剤 (Dextromethorphan) の神経細胞保護効果. *日眼会誌* 96: 884—891, 1992.
- 8) Büchi ER: Cell death in the rat retina after pressure-induced ischemia-reperfusion insult: An electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 55: 605—613, 1992.
- 9) 小原喜隆, 油井秀夫, 門屋講司, 堀内三郎: 糖尿家兎眼組織における過酸化脂質の変動. *眼紀* 32: 450—454, 1981.
- 10) 門屋講司: 糖尿家兎網膜の過酸化脂質とその消去機構. *日眼会誌* 85: 646—655, 1981.
- 11) 田村裕男, 斎藤 頌, 波多野道信, Lucchesi BR: 実験的虚血/再灌流モデルにおける polyethylene glycol 結合型 superoxide dismutase の心筋梗塞巣縮小効果. *循環器科* 24: 91—99, 1988.
- 12) Beckman JS, Minor RI, Freeman BA: Augmentation of antioxidant enzymes in vascular endothelium. *J Free Rad Biol Med* 2: 359—365, 1986.
- 13) Yoon YH, Marmor MF: Dextromethorphan protects retina against ischemic injury *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 107: 409—411, 1989.
- 14) Crosson CE, Willis JA, Potter DE: Effect of the calcium antagonist, nifedipine, on ischemic retinal dysfunction. *J Ocular Pharmacol* 6: 293—299, 1990.