



## Retinal light damage : protective effect of $\alpha$ -tocopherol

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青沼, 秀実 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1535">http://hdl.handle.net/10271/1535</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 258号	学位授与年月日	平成 9年12月 5日
氏 名	青 沼 秀 実		
論文題目	Retinal light damage : protective effect of $\alpha$ - tocopherol ( $\alpha$ - トコフェロールによる網膜光障害防御の形態学的検討)		

博士(医学) 青 沼 秀 実

## 論文題目

Retinal light damage: protective effect of  $\alpha$ -tocopherol

( $\alpha$ -トコフェロールによる網膜光障害防御の形態学的検討)

## 論文内容の要旨

### [はじめに]

網膜光障害の原因の一つとして、光照射時に発生するフリーラジカルにより、光受容器膜の不飽和脂肪酸が過酸化反応を起こすことが考えられている。フリーラジカルのscavengerである $\alpha$ -トコフェロールの網膜光障害に対する防御効果を調べるため、 $\alpha$ -トコフェロール補填食と欠乏食を与えた2群のラットで形態学的検討を行った。

### [材料ならびに方法]

3週齢の雄白色Wistarラットを2群に分け、補填群には $\alpha$ -トコフェロール補填食(ニコチン酸トコフェロール: 58.5mg/100g)、欠乏群には欠乏食(全トコフェロール: 0.1mg/100g以下)を与えた。以上2群のラットを12時間の明(3~5 lux)、12時間の暗の周期の下で飼育した。2カ月飼育後、high performance liquid chromatographyにより両群の神経網膜中のトコフェロール含有量を測定した。残りのラットに0、1、3、6、12、24、72時間の連続光照射を行い、眼球を摘出した。光照射装置は15w昼光色蛍光灯9本から成り、照度は2500lux、輝度は2000Candela/m<sup>2</sup>であった。摘出した眼球の後極部4mm四方を対象に透過型電子顕微鏡による観察を行った。さらに、電顕用ブロックを厚さ1 $\mu$ mに細切、トルイジンブルーで染色し、全長約2700 $\mu$ mの中で、La Vailの方法に準じ、網膜色素上皮内で濃染するphagosomeの面積と個数を画像解析した。

### [結果]

#### 1. 神経網膜中の $\alpha$ -トコフェロール含有量

補填群が23.34 $\mu$ g/g、欠乏群が0.3 $\mu$ g/gであった。

#### 2. 透過型電子顕微鏡所見

光照射前では両群に異常を認めなかった。光照射1時間後では色素上皮において両群ともミトコンドリアの空胞化が見られ、程度としては欠乏群の方が強かった。視細胞外節は欠乏群においては先端の1/3に層構造の乱れが見られたが、補填群では層構造の乱れはなかった。光照射24時間後では、補填群で視細胞核の60%に核濃縮が見られたのに対し、欠乏群では90%であった。以上の経過を通じ網膜の内層に大きな変化は見られなかった。

#### 3. phagosomeの画像解析

large phagosomeの数は照射1時間では補填群で多く、照射3、6、12時間では欠乏群で多かった。照射24、72時間では両群間で大きな違いはなかった。

### [考察]

色素上皮は照射1時間でミトコンドリアの空胞化等の所見が見られたが、照射時間が長くなっても障害があまり進行しなかった。一方、視細胞は照射時間に伴い障害が強くなった。これらの所見より今回

の研究で引き起こされた網膜光障害はNoell等の報告した光化学障害と考えられた。

視細胞外節は先端部から脱落して色素上皮に取り込まれ phagosome となり消化される。LaVail は外節の幅の半分の大きさ (約  $0.44 \mu\text{m}$ ) 以上の phagosome を large phagosome とした。今回の画像解析の結果から phagosome の面積とその個数の対数値は負の相関関係にあり、large と small の phagosome に境界は引けるものではなかった。照射 3、6、12 時間で large phagosome が欠乏群で多かったのは、欠乏群色素上皮の消化能力の低下を反映していると考えた。

#### 〔結論〕

$\alpha$ -トコフェロールはある程度の光障害防御効果は有していると考えられたが、網膜中の  $\alpha$ -トコフェロール含有量が両群間で約 80 倍も違うことを考えると、これらの結果は大きな違いではなかった。この点については他の防御因子との関係もあると推察した。phagosome の画像解析は網膜光障害の検討において有用な方法と考えた。

### 論文審査の結果の要旨

網膜は光を感受する組織であるが、過剰の光により障害が起こることは、既にギリシャ時代より日蝕性網膜症として知られている。近年増加傾向にある加齢性黄斑変性では光の影響 (光化学反応 photochemical reaction) が発症原因の一つと考えられ、網膜色素変性では光は憎悪因子と考えられている。

網膜光障害の一機序として、光照射時に発生する活性酸素が網膜の視細胞外節に豊富に含まれる不飽和脂肪酸をラジカル化し、脂肪酸が連鎖反的に次々と過酸化されて、視細胞外節を変性させてゆく過程が考えられている。また free radical は網膜色素上皮や他の網膜の細胞のミトコンドリア、ライソゾーム、核の生体膜の脂肪酸をラジカル化することでこれらの細胞にも傷害を与えることが考えられる。free radical scavenger である  $\alpha$ -トコフェロールは視細胞外節や細胞内小器官の生体膜にも豊富に含まれ、それ自身がラジカル化することで、これらの過酸化反応を防止すると考えられ、網膜光障害に対して防御効果を有すると考えられているが、過去の in vivo の実験の報告では、防御効果があるとするものと、ないとするものがあり、一致した結果は得られていない。

視細胞外節はその先端部から脱落し網膜色素上皮に食食され phagosome と呼ばれ、色素上皮内で分解されていく。phagosome の大きさと個数は、色素上皮の食食能、分解能などの機能を反映すると考えられる。申請者は以前より網膜色素上皮内の phagosome について興味を持っており、必須脂肪酸欠乏時の検討を報告している。

今回の研究でも網膜光障害のパラメータとして phagosome に注目し、phagosome の数と大きさを定量化するために画像解析法を工夫して研究に用いた。

今回の研究では、 $\alpha$ -トコフェロール欠乏食と補填食で 2 か月間飼育した 2 群のラットに様々な時間 ( $\leq 72$  時間) 白色蛍光燈による連続照射を行い、透過型電子顕微鏡による形態学的変化と網膜色素上皮内の phagosome の画像解析結果を検討した。

その結果、補填食群は欠乏食群に比べ、

- (1) 光照射 1、3 時間で視細胞外節と網膜色素上皮の変化が弱かった。
- (2) 光照射 3、6、12 時間で網膜色素上皮の大きな phagosome 数が少なかった。
- (3) 光照射 24 時間において核濃縮 (apoptosis) を起こした視細胞が少なかった。

(4) 光照射24、72時間では両群の間にはphagosomeに差は認められなかった。

以上4点より $\alpha$ -トコフェロールは短時間(≤24時間)の照射であれば、光障害に対してある程度の防御効果を有することが分かった。

これまでは、光学顕微鏡標本からlargeとsmall phagosomeに大別して検討されているが、今回の画像解析によりphagosomeの個数の対数値はその面積と負の相関関係があり、largeとsmall phagosomeの間に明確な境界線はないことも明らかにされた。今後光障害防御因子等を検討する上でより詳細な情報の得られるこの方法は有用である。

本研究は網膜光障害に対する $\alpha$ -トコフェロールの防禦効果を示し、網膜光障害の機序に過酸化反応が関与していることを明らかにして、その予防的研究に貢献したことが論文審査会で評価された。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) ビタミンE摂取量の決めかた、普通食のトコフェロール量はどれくらいか
- 2) 光照射中の他の実験条件は 光はラットに均等に当たっていたか
- 3) 視細胞外節は何故光によって障害が起こりやすいか
- 4) 視細胞外節の変性とphagosomeの大きさ、数との関係は
- 5) 正常群でのphagosomeの大きさと数との比較は
- 6) phagosomeの画像解析法について
- 7) これまでの報告での網膜光障害に対するトコフェロールの効果は
- 8) 網膜光障害後の長期観察例は
- 9) トコフェロールの効果に関して動物種による違いはあるか
- 10) 網膜光障害はalbinoとpigmentedで差があるのか
- 11) 24、72時間の光照射ではphagosomeに差が認められないが、考えられる理由は
- 12) これまでの報告での網膜光障害のparameterには何が用いられているか
- 13) 光による活性酸素・過酸化脂質は網膜のどの部位に生じるのか
- 14) トコフェロールの網膜光障害の防御機序について
- 15) 網膜光障害に対する他の防御的薬剤について
- 16) 網膜に多い不飽和脂肪酸の種類とその比率は
- 17) この研究を臨床応用に役立てることが出来るか

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 星 野 知 之 副査 助教授 鮫 島 道 和