



Microdialysis measurement of ascorbic acid in rabbit vitreous after photodynamic reaction

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 張, 暁梅 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1201

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	医博第 348号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	張 曉 梅		
論文題目	Microdialysis measurement of ascorbic acid in rabbit vitreous after photodynamic reaction (家兎硝子体での光線力学的反応によるアスコルビン酸の変化—マイクロダイアリシス法による—)		

博士(医学) 張 曉 梅

論文題目

Microdialysis measurement of ascorbic acid in rabbit vitreous after photodynamic reaction

(家兎硝子体での光線力学的反応によるアスコルビン酸の変化—マイクロダイアリシス法による—)

論文の内容の要旨

[はじめに]

アスコルビン酸(AA)が眼内に多量にあるのは光酸化に対して防御的な役割をしているためと考えられている。AAは生体組織における重要な抗酸化物質の一つであるが、眼内ではphotooxidationに対して防御的な役割をしていることが知られている。

硝子体も水晶体、網膜など眼組織に対する光障害に対して保護作用的役割をしており、抗酸化物質の存在が注目されて、これまでAAなどの定量が硝子体サンプルを採取する方法で行われてきた。最近、生体組織内の物質をin vivoで測定できる高速液体HPLC—マイクロダイアリシス法が様々な組織で種々の物質の測定に応用されている。今回、我々は光増化剤であるfluorescein(F)投与後の家兎眼に光照射を行って光線力学的反応の硝子体のAAへの影響をマイクロダイアリシス法によりin vivoで検討した。この研究は硝子体のAAをin vivoで長期間測定した最初の報告である。

[方法]

- 1 白色家兎(3.2-4.0kg)の片眼の硝子体中に7mmの透析膜部位を含むマイクロダイアリシス法用のprobe(10mm)を挿入し、probeとHPLCを繋ぐtubeは、眼球上—眼瞼下—額部皮下の経路で装着し、両耳間の皮膚から外部に出し固定した。
- 2 測定方法：マイクロダイアリシス法により、固定器に入れた家兎の硝子体中のprobeから回収した透析液はauto injectorにより分析カラムに導入し、透析液中のAA濃度をHPLC-ECD 300(Eicom)により測定した。1回の測定回収は15分間毎で行い、1日に約3時間の測定を行った。
- 3 probeのin vitro回収率：probeを種々のAA濃度のテスト液の中に挿入し、得られた透析液中のAA濃度測定を行った。透析液から測定したAA濃度とテスト液中の濃度から回収率を計算した。
- 4 コントロール群：手術後4~5日安定した測定値が得られてから14日間、測定を行った群。
照射群では、麻酔した家兎に片眼に25,000 lxの光照射を1日2時間行った。照射群を4つのグループに分け、
 - I 家兎の片眼光照射を1日2時間、2日間照射した群。
 - II F(30mg/kg)静注1時間後に、家兎の片眼に2時間光照射を1回行った群。
 - III F静注投与と2時間の光照射を2日間で2回行った群。
 - IV AA(150mg/kg)の静注を光照射24時間前と各光照射30分前に行い、IIIと同様の条件でF投与と光照射を行った群。

[結果]

- 1 AAのprobeによるin vitro回収率は35.2±1.3%であった。
- 2 コントロール群(n=4)における14日間の硝子体内のAA濃度は家兎眼により514.3±51.7から561.3±

106.5pmol/15 μ l(mean \pm SD)まで変動した。

- 3 F投与なしで、2回の光照射を行った群(I)におけるAA濃度は、照射後においても、変化はなかった。
- 4 Fの静注投与をして、1回の光照射を行った群(II)では、AA濃度は、照射2日目から減少し始め、6日目では32.6%減少(n=3, p<0.005)し、14日目では正常値にまで回復した。
- 5 Fの静注投与をして、2回の光照射を行った群(III)では、AA濃度は、照射後1日目から減少し始め、5日目では65.5%減少(n=4, p<0.005)した。14日目でも回復しなかった。
- 6 AA投与群ではF静注した後の2回照射群(IV)におけるAA濃度は、1日目では処置前よりも、高い値を示したが、その後の2週間は、減少が認められなかった。

[考察と結論]

- 1 HPLC-マイクロダイアリシス法によって、家兔硝子体内のAA量の測定がin vivoそして長期間(2週間)で可能であった。
- 2 硝子体のAAは光照射のみでは低下はしなかったが、F静注投与下での光照射により有意に低下し、2回の光照射による低下は著明で不可逆的であった。
- 3 硝子体のAAがF存在下での光照射により、著明に、かつ長期間減少したことは、光線力学的反応により生じた活性酸素種に対してAAが消去作用をしたことによると考えられた。また光線力学的作用がAAを産生している血液-房水柵に傷害を与えたことによることも推測された。
- 4 硝子体のAAは眼の光線力学的反応から生じる種々の活性酸素に対し消去作用を行い、光傷害に対して防衛的役割をしていることが、今回の研究からも確認された。

論文審査の結果の要旨

マイクロダイアリシスは生体組織の細胞外液に存在する物質をin vivoで測定するための技法である。この方法を種々の高感度検出法と組み合わせて用いることにより、多くの生体物質の分離定量が可能になっている。最近、眼研究の分野においてもマイクロダイアリシスを用いた研究が始まっており、硝子体においてアミン物質やグアノシンなどの測定例が報告されている。しかし、アスコルビン酸の報告例はまだない。

アスコルビン酸の生体内での役割の一つは抗酸化作用である。眼内にもアスコルビン酸が多量に存在しているのは眼内における光酸化に対する防衛作用を担うことであり、硝子体のアスコルビン酸も水晶体や網膜を光障害から防衛する役割をしていると従来から考えられている。そこで、申請者は光障害に対するアスコルビン酸の防衛作用を明らかにする目的で、光照射と光増感剤による光線力学的反応によって硝子体のアスコルビン酸濃度の変化が起こるかどうかをマイクロダイアリシス法によってin vivoで検討した。またアスコルビン酸の大量投与による抑制効果についても調べた。

対象の選定と方法は以下の通りである。

実験動物として白色家兔を用いた。片眼の硝子体に膜長7mmのマイクロダイアリシス用プローブを留置した。プローブを介して回収したアスコルビン酸の濃度は、オートインジェクターを接続した高速液体クロマトグラフにより、15分間隔で3時間に亘って測定した。測定は家兔を固定器に入れて行った。光照射はプローブを挿入した片眼にタンゲステン・ハロゲンランプにより照度25,000luxで行った。家兔は

コントロール群と以下の4群に分けた。

I群： 光照射を1日2時間、2日間に行った。

II群： 光増感剤であるフルオレセイン (Fluorescein ; 30mg/kg) 静注1時間後に光照射を1日 (2時間) 行った。

III群： フルオレセイン (30mg/kg) 静注1時間後に光照射を2日 (2時間/日) 間行った。

IV群： アスコルビン酸 (150mg/kg) 静注を光照射24時間前と各照射30分前に行い、III群と同じ方法でフルオレセイン投与と光照射を施行した。

主な結果は以下の通りである。

- (1) 硝子体透析液のアスコルビン酸濃度は、プローブ挿入手術後4~5日後には安定した値を示し、14日間の変動は $514.3 \pm 151.7 \text{ pmol}/15 \mu\text{l}$ ($n=4$, 平均±標準偏差) から $561.3 \pm 106.5 \text{ pmol}/15 \mu\text{l}$ と僅かであった。すなわち、家兎硝子体におけるアスコルビン酸濃度の安定した測定がin vivoでかつ長期間 (14日間) に亘って可能であることが明らかになった。
- (2) フルオレセイン非投与下 (I群) では、光照射はアスコルビン酸濃度に何んらの影響を与えなかった。一方、フルオレセイン投与下では、光照射によりアスコルビン酸濃度の著明な低下が認められた。すなわち、1回の照射 (II群) によりアスコルビン酸濃度はベースラインから最大32.6% (6日目) の減少を示した。さらに、2回の照射 (III群) では最大65.5% (5日目) まで減少した。また、アスコルビン酸濃度は、1回照射では14日後には元のレベルにまで回復したが、2回照射では回復しなかった。すなわち、光線力学的反応により生じた活性酸素種に対してアスコルビン酸が消去作用をした結果、アスコルビン酸濃度の低下がもたらされたと考えられた。また、2回の照射による不可逆的な低下はアスコルビン酸の能動輸送を行っている毛様体上皮 (血液-房水柵) にまで障害が及んだためと推測された。
- (3) フルオレセインと2回の光照射による硝子体アスコルビン酸濃度の不可逆的減少は大量のアスコルビン酸投与により抑制され (IV群)、光酸化に対するアスコルビン酸の投与の有効性が示唆された。

申請者はこれらの結果に基づいて、眼の光線力学的反応から生じる種々の活性酸素に対して硝子体のアスコルビン酸は消去作用を行い、光障害に対して防御的な役割を果たしていると結論している。

これに対し審査委員会では、本研究が硝子体のアスコルビン酸のin vivoでの安定した測定を長期に亘って可能にした初めての報告であること、および、硝子体のアスコルビン酸が光酸化に対して防御的役割をしていることをin vivoで初めて示唆した知見であることが評価された。

本論文の審査過程において、主として次のような質疑が行われた。

- 1) プローブの挿入位置はどのようにして決めたか
- 2) リンゲル液のCaCl₂濃度を3mMとした理由
- 3) 光の強さを25,000 luxとした理由
- 4) 透析液から推定される硝子体のアスコルビン酸濃度は文献値と一致するか
- 5) フルオレセインの用量はどのようにして決めたか
- 6) コントロール群に同じ大量のアスコルビン酸を静注した場合、硝子体レベルのアスコルビン酸濃度

はどうか

- 7) 組織学的検索は行ったか
- 8) プローブ挿入により炎症反応は生じたか
- 9) 長期測定はどのくらいの期間可能か、他の組織でも可能か
- 10) 実験群にフルオレセイン単独投与群が必要ではないか
- 11) ラジカル産生反応は急速に起こるが、アスコルビン酸が光照射数日後に最大低下するのはなぜか
- 12) アスコルビン酸産生に関与するグルタチオンに対する影響はなかったか
- 13) フルオレセインによるショックはなかったか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中 原 大 一 郎
副査 堀 田 喜 裕 副査 渡 邊 裕 司