

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

あたらしい眼科 (1998.05) 15巻5号:635～640.

【フリーラジカルと眼】 活性酸素と硝子体液化

秋葉 純

活性酸素と硝子体液化

Reactive Oxygen Species and Vitreous Liquefaction

秋葉 純*

はじめに

眼内で最大の体積を占める硝子体は大量の水を含有するゲル状組織である。ヒトでは加齢現象だけでなく、硝子体出血やぶどう膜炎などの種々の疾患に伴って硝子体の液化がみられる。液化のメカニズムはいまだ十分に解明されていないが、硝子体を構成する主要成分であるヒアルロン酸とコラーゲンが活性酸素により変化することから、硝子体の液化には活性酸素が関与していると推測される。

本稿では、活性酸素が関与していると筆者が考える硝子体液化について解説する。

I 硝子体の構造と液化

硝子体は、光学的に透明性を維持し、隣接する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、外力から眼球を保護している。重量の99%は水であり、0.9%の低分子成分と0.1%のヒアルロン酸、コラーゲンなどの高分子成分から構成されている¹⁻⁴⁾。硝子体ゲルの分子構造はいまだ解明されていないが、コラーゲン線維と大量の水を保持したヒアルロン酸の相互作用によりゲルが維持されていると考えられる⁵⁾。Balazsら^{3,4)}は、コラーゲン線維の立体的な格子状構築の間に大量の水を保持したヒアルロン酸が充満しているとするゲル構造モデルを発表している(図1)。硝子体のコラーゲンは、大部分が特殊なタイプIIコラーゲンであり、強い張力に耐える不溶性

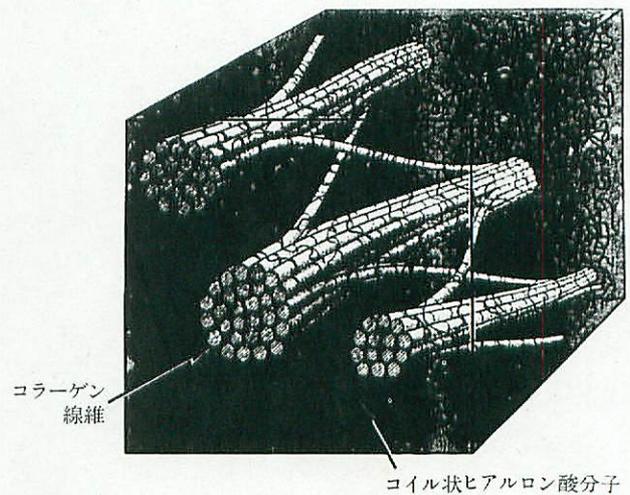


図1 硝子体ゲルの分子構造モデル (Sebag J, Balazs EA : Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 187-191, 1989 より改変)

線維をつくり、硝子体の骨格を形成している。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸が繰り返し連鎖する線状の重合体であり、コイル状の立体構造により大量の水を保持できると考えられている。

硝子体の液化とはゲル(固体)状態の硝子体がゾル(液体)に変化することである⁶⁾。液化は加齢現象の1つとして健康な高齢者にみられるだけではなく、眼球鉄錆症や銅症、ぶどう膜炎などの眼疾患でも観察される。硝子体はコラゲナーゼやヒアルロナーゼなどの酵素により液化すること、100°Cの加熱や超音波による強烈な振

* Jun Akiba : 旭川医科大学眼科学講座

〔別刷請求先〕 秋葉 純 : 〒078-8510 旭川市西神楽4線5号3-11 旭川医科大学眼科学講座

動などの物理的刺激⁷⁾、Nd-YAG レーザーの照射によっても液化することから、なんらかの原因により硝子体のゲル構造が破壊されると、硝子体は大量の水を保持することができなくなり液化すると考えられている。

II 活性酸素とは？

活性酸素とは「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物質の総称である」と定義される^{8,9)}。活性酸素は生体内でも反応性に富み、発癌や加齢に伴う変化に関するだけでなく、生体内に侵入した病原体や癌細胞を攻撃したりする際にも関与する。一方、活性酸素としばしば混同されるフリーラジカルは「不対電子を1つ以上有する分子および原子」である。したがって、活性酸素のなかにはヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$; hydroxyl radical) やスーパーオキシド (O_2^- ; superoxide radical) のようにフリーラジカルであるものも一重項酸素 ($^1\text{O}_2$; singlet oxygen) や過酸化水素 (H_2O_2) などのフリーラジカルでないものも含まれている。本稿では、活性酸素による硝子体液化について述べるため、「活性酸素・フリーラジカル」ではなく「活性酸素」を用いることとする。

III 活性酸素と硝子体の関係

1. 活性酸素は硝子体中で生成されている

もし、硝子体の液化に活性酸素が関与しているとなれば、硝子体中に活性酸素が存在しているはずである。それでは本当に硝子体中で活性酸素は生成されるのだろうか？

活性酸素は反応性がきわめて高く、それゆえ短命であることから、生体内の活性酸素を直接測定することは困難であった。そこで Taguchi ら¹⁰⁾は、過酸化水素 (H_2O_2) に感受性をもつ蛍光色素である 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) と硝子体フルオロフォトメトリーを用いることにより、生体の硝子体中の過酸化水素を測定することに成功した。また、白色光の照射により硝子体中の過酸化水素が増加することを明らかにした。したがって、生体でも硝子体中に過酸化水素をはじめとする活性酸素がつねに生成されており、種々の状況で活性酸素が増加すると考えられる。

2. 硝子体には活性酸素に対する防御機構が存在する
それでは硝子体中に生成された活性酸素は硝子体を構成する分子とすぐに反応するのだろうか？

硝子体にはスーパーオキシドを特異的に分解する酵素である Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や過酸化水素を分解するカタラーゼ活性が認められること^{11,12)}、また同様の役割を果たすと考えられるアスコルビン酸やビタミンEが存在することから、硝子体には活性酸素を除去する防御機構が存在することは明らかである。したがって、硝子体中に生じた活性酸素はすみやかにこれらの物質と反応して消去されると考えられる。しかし、硝子体に存在する除去能力を上回る活性酸素が生成された場合は、活性酸素と硝子体を構成する分子が反応して、硝子体の液化をひき起こすのではないかと考える。

IV 硝子体の液化をどう評価するのか？

それでは硝子体が液化しているかどうかをどう評価したらよいのか？

硝子体の液化を評価する代表的な方法として、細隙顕微鏡と前置レンズを用いて硝子体の光学切片を観察する方法がある。この方法は臨床的には大変有用であるが、動物眼では軽度の液化を捉えることがむずかしく、定量化できないなどの欠点がある。そこで、筆者らは

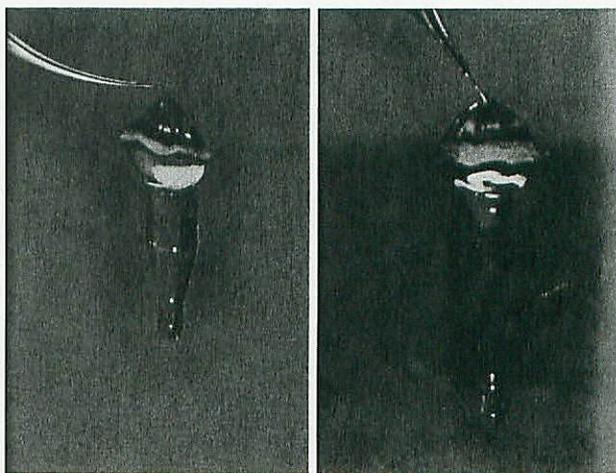


図2 硝子体を露出した眼球を吊り下げたところ
左の硝子体は形態をよく保っているのに対し、液化した右の硝子体は張力を失い、大きく垂れ下がっている(文献14より)。

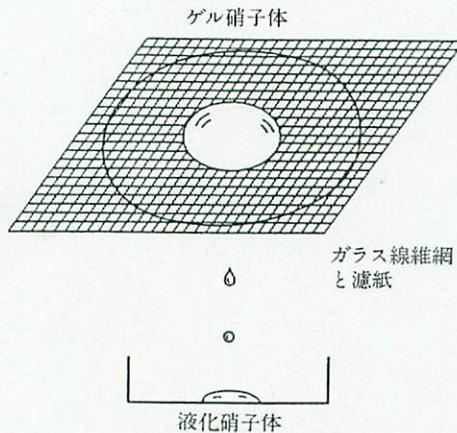


図3 ゲル硝子体と液化硝子体の分離

眼球から取り出した硝子体を円形の濾紙とプラスチックで被覆されたガラス線維網の上にのせた。液化硝子体はすみやかに濾紙に吸収された後、シャーレに滴下した(文献14より)。

Foos ら¹³⁾の suspension-in-air 法を参考に、摘出した眼球から強膜、脈絡膜、網膜を取り除き、硝子体を露出させた眼を空中に吊り下げたところ、液化が進行した硝子体は張力を失い、大きく垂れ下がることが観察された(図2)¹⁴⁾。つぎに取り出した硝子体をゲル硝子体と液化硝子体に分離して(図3)、それぞれの重量を測定することにより、次式から硝子体液化度を算出する方法を用いた^{7,14,15)}。

硝子体液化度 (%) =

$$\frac{\text{液化硝子体の重量 (g)}}{\text{ゲル硝子体の重量 (g)} + \text{液化硝子体の重量 (g)}} \times 100$$

この方法は眼球から硝子体を取り出す際に、硝子体ゲルを損傷する危険性はあるが、習熟すれば手技的にむずかしくなく、安定した結果が得られる。以下に述べる実験研究ではこの方法を用いて硝子体の液化の評価をしている。

V 活性酸素が関与している硝子体液化

それでは、どのような状況で活性酸素が硝子体の液化に関与しているのだろうか？ 現在、活性酸素が関与していると筆者が考える硝子体液化を表1に示し、その生成のしくみを図4に示す。ここでは筆者と共同研究者の研究をもとに、それぞれについて概説する。

表1 活性酸素の関与が考えられる硝子体変化

1. 加齢	4. 眼球鉄錆症、銅症
2. 硝子体出血	5. ぶどう膜炎
3. 無水晶体眼	

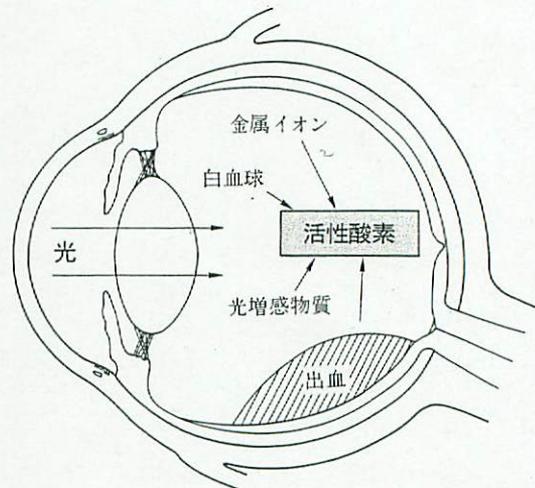


図4 硝子体中での活性酸素の生成

1. 加齢による硝子体液化

前述のように硝子体は正常な加齢現象の1つとして液化する。Balazs ら³⁾による剖検眼の観察では、4歳で早くも硝子体は液化しており、眼球が成人の大きさに達する14~18歳ではすでに硝子体体積の約20%が液化している。臨床的には、はじめに硝子体ゲル内に小さな液化腔(lacuna)が形成され(図5)、これらは融合して大きな液化腔を形成し、やがて硝子体は虚脱して液化硝子体とゲル硝子体に分離し、後部硝子体剝離を生じることが観察される。

硝子体が水を保持する能力の大部分を司るヒアルロン酸は活性酸素により脱重合して低分子化し、水保持能が低下することが知られていることから¹⁶⁾、筆者らは加齢による硝子体液化のメカニズムとして可視光と光増感物質の光化学反応の結果生じる活性酸素に着目した。光増感物質とは、光エネルギーをう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つくりだす化合物である。正常の硝子体に存在する光増感物質であるリポフラビン(ビタミンB₂)は、光と反応するとタイプIの光化学反応が優位に起こり、スーパーオキシドやヒドロキ



図 5 液化した硝子体の細隙灯顕微鏡写真

細隙光は右側より入射しており、左側の縦線は網膜からの反射である。硝子体ゲル中に小さな液化腔と線維性混濁がみられる。

シラジカル、過酸化水素を生成する(図6)¹⁷⁾。また、同時にタイプIIの過程も起こり、わずかながら一重項酸素も生成される。

実験では、取り出した仔ウシの硝子体にリボフラビンを加えて白色光を照射した後、前述の方法で硝子体液化度を求めた。その結果、6時間の光照射で23%の硝子体液化を認めた¹⁵⁾。また家兎を用いた *in vivo* の実験でも同様の結果が得られた¹⁴⁾。さらに活性酸素の消去剤により液化が抑制されることも判明した。以上の結果から、リボフラビンと白色光の光化学反応により生じた活性酸素により硝子体が液化することが明らかとなった。

そこで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とヒアルロン酸がどのように変化するのかという点について検討した¹⁸⁾。SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)ゲル電気泳動法を用いた分析により、コラーゲンは分子間に架橋を形成して、一部は不溶化することが明らかとなった。また、ヒアルロン酸は脱重合して低分子化することが高速液体クロマトグラフィーによる分析によ

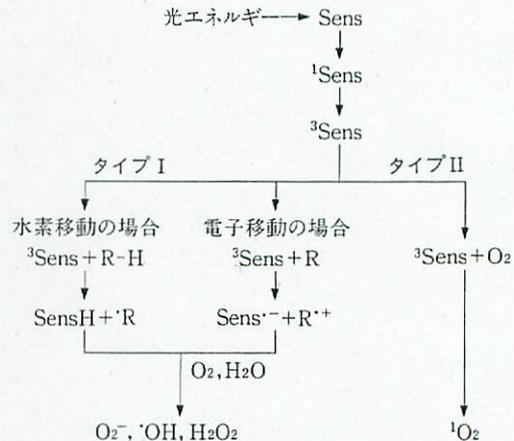


図 6 光酸化のメカニズム

Sens, ${}^1\text{Sens}$, ${}^3\text{Sens}$ は光増感物質とそれらの一重項および三重項状態を表す。SensH は水素ラジカルと結合した光増感物質を、 $\text{Sens}^{\cdot-}$ はアニオン化した光増感物質ラジカルを表す。R-H はアルキル基をもった化合物の一般式である。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はスーパーオキシドを、 $\cdot\text{OH}$ 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(文献9より)。

り判明した。したがって、活性酸素によりコラーゲンとヒアルロン酸の両者が変化して、硝子体の液化が生じるものと考えられる。

光の受容器官である眼は、一生涯にわたり光に曝露される。また、硝子体にはリボフラビンが含まれており、他の光増感物質も存在する可能性が高い。そこで、ヒトの硝子体では光化学反応により活性酸素が発生していると考えられる。一方、高齢者の硝子体では、コラーゲンの凝集により線維性混濁がみられること¹⁹⁾、ヒアルロン酸の分子量が若年者に比べて低下していることが知られている。これらのことから、加齢による硝子体の液化には活性酸素が関与していると推測される。

2. 硝子体出血後の硝子体液化

硝子体出血の後に硝子体が液化することは日常の臨床でしばしば経験する。血液色素ヘムの代謝産物であるビリルビンは光増感物質であり、光と反応して活性酸素を生成する。ビリルビンは硝子体中に存在しており、とくに硝子体出血後には増加すると考えられる。そこでビリルビンの光化学反応が硝子体コラーゲンとヒアルロン酸に及ぼす影響について検討した²⁰⁾。その結果、ビリルビ

ンの光化学反応で生じた活性酸素により、コラーゲンは分子間に架橋を形成して一部が不溶化し、ヒアルロン酸は脱重合して低分子化することが明らかとなった。したがって、出血後の硝子体液化にはビリルビンの光化学反応により生じる活性酸素が関与していると推測される。しかしながら、トランスグルタミナーゼをはじめとする種々の血清成分²¹⁾やヘモグロビンから放出される鉄イオンなども液化に関与していると考えられる。

3. 無水晶体眼の硝子体液化

無水晶体眼では硝子体の液化が急速に進行して後部硝子体剝離を生じる。水晶体は300~400 nmの紫外線の大部分を吸収して、眼内に紫外線が入らないように働いている。したがって、無水晶体眼では、本来水晶体に吸収されるべき紫外線が硝子体に入射しており、この紫外線により硝子体中に活性酸素が生じ、硝子体が液化するものと推測される²²⁾。しかし、硝子体中の物質が房水へ移行しやすくなることや眼球運動とともに硝子体が前方へ移動することも原因として考えられている。

4. 眼球鉄錆症 (siderosis), 銅症 (chalcosis) にみられる硝子体液化

鉄や銅が眼に飛入すると、金属イオンが眼内に溶け出して、網膜変性や白内障だけではなく、硝子体の著しい液化を生じる。硝子体には比較的高濃度のアスコルビン酸が含まれているため、アスコルビン酸の存在下で金属イオンによりヒドロキシラジカルなどの活性酸素が発生する(図7)^{23,24)}。そこで取り出した仔ウシ硝子体に金属イオンを加えたところ、24時間後に硝子体は明らかに液化した²⁵⁾。また、この反応はヒドロキシラジカルの消去剤であるマンニトールにより抑制された。つぎに *in vivo* の実験で家兎硝子体中に銅イオンを注入したとこ

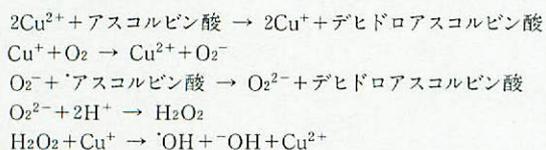


図7 アスコルビン酸存在下での銅イオンによる酸化反応

ろ、硝子体の著しい液化を認めた²⁶⁾。したがって、硝子体中のアスコルビン酸と金属イオンの反応により生じた活性酸素、とくにヒドロキシラジカルによりヒアルロン酸分子が脱重合して低分子化が起こり²⁷⁾、コラーゲン分子は切断されて架橋を形成し^{28,29)}、硝子体が液化したものと考えられる。眼球鉄錆症や銅症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と考えられる。

5. ぶどう膜炎にみられる硝子体液化

後部ぶどう膜炎でも硝子体の一部に液化が観察される。これには血液眼柵の破壊による血液成分の漏出や炎症細胞から出される酵素などのさまざまな要因が関与している³⁰⁾。一方、炎症時に出現する白血球では、細胞膜中に存在するスーパーオキシド生成酵素(NADPH oxidase)が活性化してスーパーオキシドを生成して非特異的な殺菌を行っていることから³¹⁾、ぶどう膜炎でも硝子体に浸潤した好中球により生成されたスーパーオキシドが液化に関与している可能性がある。そこで家兎眼内にエンドトキシンを注入して炎症を誘発したところ、硝子体の液化が観察された³²⁾。また、この液化はスーパーオキシドの消去剤であるスーパーオキシドディスムターゼにより抑制された。さらに、液化硝子体ではコラーゲン分子が架橋を形成していることが明らかになった。一方、炎症時のスーパーオキシドによりヒアルロン酸が脱重合して粘弾性が低下することが知られている¹⁹⁾。したがって、ぶどう膜炎では浸潤した好中球により生成されたスーパーオキシドにより、硝子体のヒアルロン酸は低分子化し、コラーゲンは架橋を形成して硝子体が液化するというメカニズムも部分的に関与していると推測される。

おわりに

活性酸素の関与が考えられる硝子体液化について解説した。加齢、硝子体出血、無水晶体眼、金属イオン、ぶどう膜炎による硝子体液化には、活性酸素が関与していると考えられる。いずれの場合も、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分子は架橋を形成し、一部は不溶化して線維性混濁を生じる。同時にヒア

ルロン酸分子は脱重合して分子量が低下し、水分保持能力が低下する。この両者の変化が同時に起こることにより、硝子体のゲル構造が変化して液化すると考えられる。将来、活性酸素による硝子体液化のメカニズムがさらに解明され、安全に硝子体液化と後部硝子体剝離をつくりだしたり、抑制することができるようになれば、硝子体手術とは別の治療法となることが期待される。

文 献

- 1) Berman ER, Voaden M : The vitreous body. *Biochemistry of the Eye* (ed by Glaymore CN), p 373-471, Academic Press, New York, 1970
- 2) Balazs EA : The molecular biology of the vitreous. *New and Controversial Aspects of Retinal Detachment* (ed by McPherson A), p 3-15, Harper & Row, New York, 1968
- 3) Balazs EA, Denlinger JL : The vitreous. *The Eye* (ed by Davson H), p 533-589, Academic Press, London, 1984
- 4) Sebag J : *The Vitreous*. p 17-29, Springer Verlag, New York, 1989
- 5) 上野則夫, 秋葉 純 : 硝子体の構造と組成. *眼科診療プラクティス* 22, やさしい眼の細胞・分子生物学, p 230-233, 文光堂, 1996
- 6) 秋葉 純 : 硝子体の液化. *眼科診療プラクティス* 22, やさしい眼の細胞・分子生物学, p 238-241, 文光堂, 1996
- 7) 岩田修造 : 硝子体液化に関する生化学的考察. *日眼会誌* 85 : 1969-1974, 1981
- 8) 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
- 9) 上野則夫 : 活性酸素・フリーラジカルによる硝子体の変化. *日眼会誌* 99 : 1342-1360, 1995
- 10) Taguchi H, Ogura Y, Takanashi T, Hashizoe M, Honda Y : In vivo quantitation of peroxides in the vitreous humor by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1444-1450, 1996
- 11) Crouch R, Priest DG, Duke EJ : Superoxide dismutase activities of bovine ocular tissues. *Exp Eye Res* 27 : 503-509, 1978
- 12) Liles MR, Newsome DA, Oliver PD : Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 109 : 1285-1288, 1991
- 13) Foos RY, Wheeler NC : Vitreoretinal juncture, synchisis senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* 89 : 1502-1512, 1982
- 14) 秋葉 純 : 光力学作用 (photodynamic action) による硝子体の液化. *日眼会誌* 96 : 731-736, 1992
- 15) 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
- 16) McCord JM : Free radicals and inflammation : protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185 : 529-531, 1974
- 17) Foote CS : Photosensitized oxidation and singlet oxygen : Consequences in biological systems. *Free Radicals in Biology* (ed by Pryor WA), vol II, p 85-133, Academic Press, New York, 1976
- 18) Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B : Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Res* 13 : 505-512, 1994
- 19) Sebag J : Age-related changes in human vitreous structure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 225 : 89-93, 1987
- 20) Hikichi T, Akiba J, Ueno N, Yoshida A, Chakrabarti B : Cross-linking of vitreous collagen and degradation of hyaluronic acid induced by bilirubin-sensitized photochemical reaction. *Jpn J Ophthalmol* 41 : 154-159, 1997
- 21) Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B : Molecular mechanisms of posterior vitreous detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231 : 408-412, 1993
- 22) Ueno N : Liquefaction of human vitreous by N-formylkynureine-type photosensitizer in model aphakic eyes : Monitoring liquefaction by fluorescence. *Curr Eye Res* 9 : 487-492, 1990
- 23) Oliver CN, Levine RL, Stadtman ER : A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging. *J Am Geriatr Soc* 35 : 947-956, 1987
- 24) 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 oxidation. *Arch Biochem Biophys* 142 : 615-622, 1971
- 25) 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
- 26) Akiba J, Yanagiya N, Kakehashi A, Hikichi T, Kado M, Yoshida A, Ueno N : Copper-ion-catalyzed vitreous liquefaction in vivo. *Ophthalmic Res* 29 : 37-41, 1997
- 27) 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
- 28) Uchida K, Kato Y, Kawasaki S : Metal-catalyzed oxidative degradation of collagen. *J Agric Food Chem* 40 : 9-12, 1992
- 29) Kano Y, Sakano Y, Fujimoto D : Cross-linking of collagen by ascorbate-copper ion systems. *J Biochem* 102 : 839-842, 1987
- 30) Hogan MJ : Inflammation and its effect on the vitreous. *Trans Ophthalmol Soc UK* 95 : 378-381, 1975
- 31) 住友英樹, 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
- 32) Hikichi T, Ueno N, Chakrabarti B, Trempe CL, Yoshida A : Evidence of cross-link formation of vitreous collagen during experimental ocular inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 : 47-54, 1996