

氏 名	高 梨 泰 至
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1673 号
学位授与の日付	平成 11 年 1 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Fluorophotometric quantitation of oxidative stress in the retina in vivo. (網膜における酸化ストレスの生体内蛍光測定に関する研究)

(主査)

論文調査委員 教授 野間昭典 教授 淀井淳司 教授 本田孔士

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) 活性酸素は網膜光障害, 網膜虚血, 未熟児網膜症など様々な網膜病変の原因として知られている。近年, 細胞膜透過性の蛍光色素 2', 7', -dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて細胞内の過酸化水素を定量的に解析することが可能となった。DCFH-DAは細胞内に拡散し細胞内エステラーゼにより脱アセチル化され無蛍光のDCFHとして細胞内に取り込まれる。過酸化水素, 過酸化脂質の存在によりDCFHは蛍光性の 2', 7', -dichlorofluorescein (DCF) に酸化される。DCFとフルオレセインナトリウムは励起波長と蛍光波長がほぼ同様のため, 眼科用フルオロフォトメーターを用いて定量できる。本研究ではDCFHとフルオロフォトメーターを用いて網膜細胞内に生じた過酸化水素を定量する事を試みた。

(方法) 蛍光測定にはFluorotron Master (Ocumetrics) を用いた。1~100000picomole/mlの範囲でのDCFの蛍光強度を測定し, 検量線を作成した。DCFHに過酸化水素 (10pM-100nM) を負荷し生じるDCF産生の濃度依存性を測定した。DCFH, 過酸化水素 (1 nM) にカタラーゼ (0.32~3200 U/ml) を加え抑制効果を測定した。

有色家兎眼に硝子体手術を施行し 5 μ M DCF-DAおよびDCFH-DAを灌流しFluorotron Masterを用いて網膜の蛍光を測定した (各 5 眼)。酸化ストレスとして 5 μ M DCFH-DA灌流後, 300 μ M過酸化水素を 5 分間負荷し網膜を蛍光測定した (4 眼)。実験眼を摘出し網膜の凍結標本切片を作成しDCF蛍光の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

(結果) 1~100000 picomole/mlの範囲でDCF濃度と蛍光強度は直線的に相関した。DCFHは過酸化水素 (10pM~100 nM) により濃度依存性にDCFを産生した。また, カタラーゼはDCF産生を濃度依存性に抑制した。

5 μ M DCF-DAの硝子体灌流にて網膜内に $2,006 \pm 274$ picomole/mlのDCFが産生した。DCFは少なくとも30分は網膜内に捕捉されていた。5 μ M DCFH-DAの硝子体灌流では網膜内のDCF産生はわずか (8.35 ± 1.11 picomole/ml) だった。DCFH-DAの硝子体灌流後, 5 分間の300 μ M過酸化水素を負荷にて有意なDCF産生 (30.7 ± 13.1 picomole/ml) を認めた。蛍光顕微鏡による網膜切片においてDCF-DA灌流眼では網膜全層および網膜色素上皮細胞層に強い蛍光を認めた。DCFH-DA灌流眼は対照眼とほぼ同様であった。過酸化水素負荷眼では網膜神経節細胞層に著明な蛍光増加を認めた。

(考察) 眼科用フルオロフォトメトリーを用いた実験系においてもDCFHは過酸化水素を定量的に測定できることが明らかになった。

DCF-DAの硝子体灌流にて網膜内に著明なDCFを認めたが, DCFは組織学的に網膜全層および網膜色素上皮細胞に取り込まれることが確認された。脈絡膜にはDCFは取り込まれなかった。DCFH-DAの硝子体灌流にて網膜内にDCF産生はほとんど認められなかったが, DCFH-DAとDCF-DAは分子構造は極めて似かよっているため網膜内にDCFHは取り込まれているものの細胞内の過酸化水素産生がわずかなためDCFが産生されなかったものと思われた。過酸化水素負荷にて有意なDCF産生が網膜内, 特に神経節細胞層に認められた。過酸化水素は脂溶性であり濃度勾配に従って細胞内に拡散するため, 細胞内のDCFHと反応してDCFが産生されたものと思われた。

本研究で用いた実験系は網膜の酸化ストレスの定量に有用な方法と思われた。

論文審査の結果の要旨

本研究では酸化ストレスによって網膜に生じた過酸化水素をin vivoにおいて計測するために、過酸化水素感受性蛍光色素 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) と眼科用フルオロフォトメーターを用いた実験系の開発を目的とした。眼科用フルオロフォトメーターは 1 nM - 100 μ M までの 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) 蛍光測定が可能であった。2', 7'-dichlorofluorescein (DCFH) は過酸化水素 (10 pM-100 nM) DCF を濃度依存性に産生し、これはカタラーゼにより抑制された。DCFH-DA のin vivoにおける有色家兎眼網膜への取り込みを調べるため、硝子体手術を施行した後に DCFH-DA と類似分子構造を持つ 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) にて硝子体灌流したところ DCF が網膜および網膜色素上皮細胞に取り込まれることが組織学的に認められた。このことから DCFH-DA 硝子体灌流にて DCFH は網膜および網膜色素上皮細胞に取り込まれると結論した。DCFH-DA の硝子体灌流では、網膜内の DCF の産生がわずかであり、硝子体手術そのものによる網膜内過酸化水素産生はわずかと結論した。一方、過酸化水素の硝子体灌流により網膜内 DCF 産生が有意に上昇し、DCF は主に網膜神経節細胞層に産生されることを組織学的に確認した。

以上の研究は網膜における過酸化水素産生をin vivoにおいて高感度の計測を可能とし、酸化ストレスによって生じる活性酸素種の網膜における役割の解明に貢献し、特に硝子体手術による網膜への酸化ストレスの評価を可能にした点において硝子体手術の安全性確認に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年10月9日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。