

若年(6 週齢)ラット網膜における Super Oxide Dismutase(SOD) 活性と、Nitric Oxide Synthase(NOS) 活性の共存

Okabe, Masashi / 岡部, 雅史

(出版者 / Publisher)

法政大学多摩研究報告編集委員会

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学多摩研究報告 / 法政大学多摩研究報告

(巻 / Volume)

29

(開始ページ / Start Page)

43

(終了ページ / End Page)

49

(発行年 / Year)

2014-05-30

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010292>

若年(6週齢)ラット網膜における Super Oxide Dismutase (SOD) 活性と、Nitric Oxide Synthase (NOS) 活性の共存

岡部雅史¹⁾

Co-Localization of Histochemical Activity of SOD & NOS in Retina of Young-Adult (6weeks Old) Rat.

Masashi OKABE

はじめに

眼の役割と老化

放射線に属する可視光線（非電離放射線）を知覚することは、視覚の発達している生物において、外界の情報を認識する主要な方法となっている。多くの哺乳類において、360nm（紫色）～830nm（赤色）に相当する波長の可視光線の知覚器官である眼球は、非電離放射線の強度（光度）と波長（色彩）を検出する器官として発達し、特にヒトにおいては、視覚が外界情報の実に80%以上を占めている¹⁾。眼球に入射した可視光線は水晶体によって屈折され、網膜上に焦点を結び、結像する。網膜上には視細胞と神経細胞が配置され、光度と色彩をそれぞれ個別に反応することによって視覚として認識する。ヒトの場合、視野角は水平約200°・垂直約125°（下75°・上50°）に達し、この範囲の視覚情報を片目あたりわずか10cm²の網膜上に配置された約1億個の視細胞（錐体細胞、桿体細胞）が光刺激を受容し、明暗覚と色覚へ情報処理を行い視神経細胞へと伝達している。視覚情報の利用を高度に発達させた生物において眼は、活動時間のほぼすべてにおいて視覚器官としての作動を必要とされており、極めて過酷な使用状況であるといえる。実際に、多くの哺乳類において、眼は老化の早期に出現する器官であり、ヒトにおいても俗に「1-歯、2-

-眼、3-生殖器」の順番に加齢によって老化がみられると広く認識されている（正確には「歯 目 マラ」と言い、特に男性にとって生理機能の老化の出現する課程として認識されている）。ヒトのみならず、ペットの犬、猫、動物園で飼育下の大型哺乳類においても、各生物種の平均寿命のおよそ60～70%程度の生存期間ではやくも眼の老化・劣化が観察される（網膜剥離、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、白内障など）という²⁾。なぜ眼は老化が現れるのが早いのであろうか？

網膜の酸素消費と血流調整

網膜は、大脳、小脳、心筋、腎臓、肝臓などの代謝速度の大きい他の臓器を凌駕し、最も酸素消費量の大きい器官として認識されており、その酸素消費量は0.04～0.06ml O₂/g・minに達することが報告されている³⁾。このように酸素消費の激しい網膜は、前述の加齢による疾患たとえば加齢黄斑変性症や、糖尿病性網膜症、虚血性網膜剥離などの発生がよく見られる。また、酸素の過剰代謝による障害である未熟児網膜症の発生もよく知られた事象である。これらの疾患の発生は、ミトコンドリア内部での酸素代謝に伴う活性酸素ラジカルの発生に起因すると考えられており、また、この活性酸素ラジカルの発生が、前述に述べたように、眼、特に網膜の老化につながっていると推測できる。網膜が酸素消費量が大きい器

1) 法政大学経済学部

官であることは明らかにされている一方、細胞内部における活性酸素の発生レベルは未だ明らかでなく、またそれに対する生体防御の程度も不明である。加えて、網膜血管網の血流調整に関する知見も極めて乏しい。

そこで本稿では、活性酸素に焦点をあて、特に網膜における活性酸素の消去（不均化反応）を行う酵素である Super Oxide Dismutase (SOD) と網膜血管網を弛緩・拡張させ組織中の血流量を調節する作用を有する一酸化窒素 (NO) を合成する酵素 (Nitric Oxide Synthase (NOS)) の分布を個別に明らかにすることによって、網膜における活性酸素と、一酸化窒素の相互作用の可能性を考察することを目的とした。研究の取りかかりとして、まず最初に、老化の起きていない、若年 (6 週齢) ラットを研究対象として用いることとし、網膜組織の若い状況下での SOD 活性、NOS 活性の分布状態を調べることにした。

実験方法

1 実験動物および試薬

実験動物として6週齢のウィスターラット (SPF、♂、体重 200 ~ 220g) を用いた。

組織タンパク転写用のマトリックスシート剤としてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜および、表面平滑化ニトロセルロース膜を用いた。

緩衝液としてトリスバッファー化生理食塩水 (TBS: 40mM Tris - 33mM HCl - 152mM NaCl, pH 7.4) を使用した。

NOS 活性染色試薬として電子供与体 (NADPH: 還元型 β -ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド・リン酸) および発色剤 (NBT: ニトロブルーテトラゾリウム) を用いた。

SOD 活性染色試薬として活性酸素発生剤としてリボフラビン (ビタミン B₂)、発色剤は NBT を用いた。

2 機材

組織切片の作成にクライオスタット、活性酸素発生のために紫外線ランプ (360nm) を用いた。

画像観察用にオリンパス顕微鏡 BX50、銀塩フィル

ムカメラにオリンパス OM2n を用いた。

3 実験動物の処理

実験動物は国際実験動物取り扱い規約に則り、無用な苦痛を与えぬように、二酸化炭素を吸引させ、深麻酔状態にせしめた後、実験に供した。胸部 (横隔膜より上部) 正中線に沿って切開し、心臓の左心室より冷 TBS (0℃) を灌流させ、同時に右心房を切開し放血を行った。500ml の冷 TBS の大動脈灌流によって全身から血液の除去がなされた後、眼球を実験サンプルとして摘出した。実験動物の解剖には、ネンブタール (ペントバルビタール)、またはエーテルなどの麻酔薬が通常用いられるが、本研究においては、視細胞、視神経への予期せぬ影響が考えられたため、ドライアイスから発生した二酸化炭素を麻酔剤として用いた。

4 実験手順

サンプルは組織接着用グルーを用いて、切削台へ -18℃ にて接着された後、クライオスタットに装着され、凍結新鮮切片が作成された (厚さ 20 μ m: 矢状切片)。

作成された凍結新鮮切片はそのまま In Situ Blotting 法⁽⁴⁾ に供され、組織中の高分子がマトリックスシート (サイズ 10×20mm) 上へ転写された (図 1)。

マトリックスシートとして、SOD 活性の検出にはニトロセルロース (NC) 膜、NOS 活性の検出には PVDF 膜が用いられた。

4-1 SOD 活性の検出 (図 2)

SOD 活性は活性酸素の除去作用として示される。そのため、組織化学的に SOD 活性の染色を行うためには、活性酸素の発生剤と活性酸素によって発色する色素の組み合わせによって組織像を発現させる必要がある。本研究では既報⁽⁵⁾ の活性酸素発生剤として紫外線励起リボフラビン、発色色素として NBT を用いる方法を発色基質液の組成割合と反応条件を以下のようにわずかに改変して採用した⁽⁶⁾。

眼球組織中の高分子が転写されたニトロセルロース (NC) 膜は、転写面を上部にして、発色基質液 (15 μ M リボフラビン、2.5mM NBT in TBS) に浸され、360nm の紫外線を照射された (シート面におい

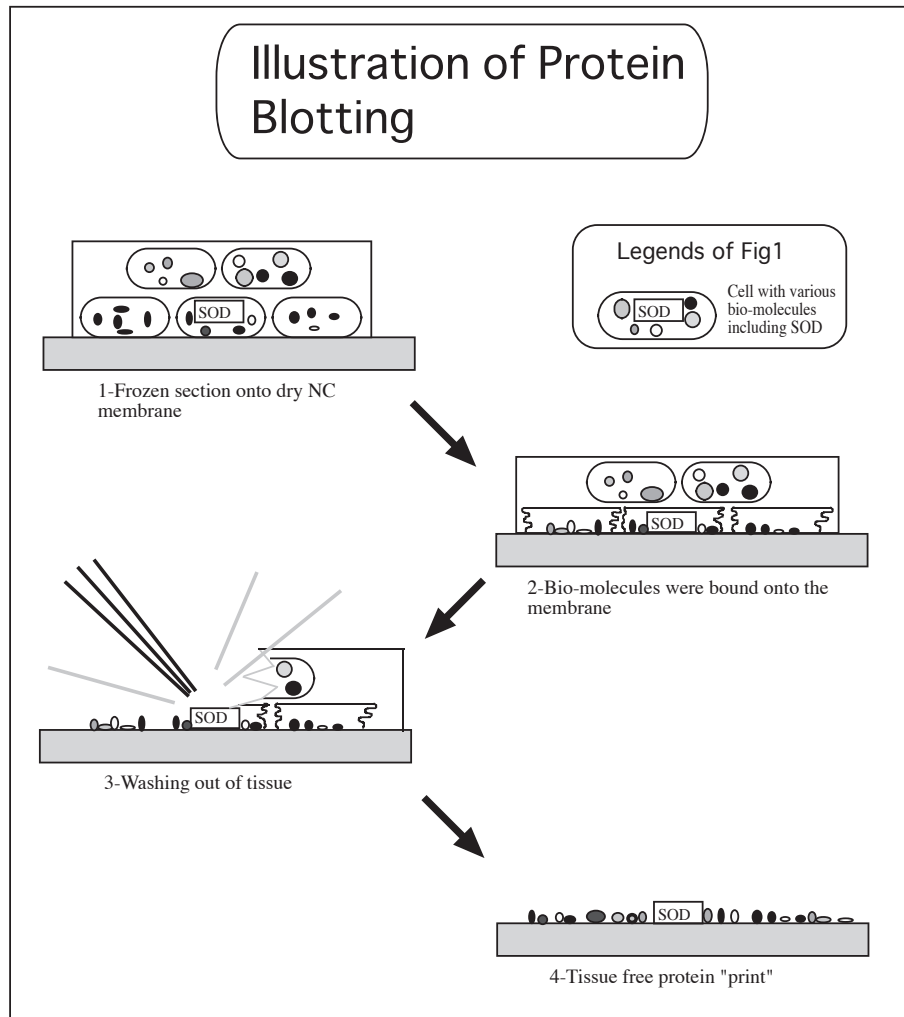


図 1

て 20000 ルクス、15 分、20℃)。組織像が現像された後、発色基質液は蒸留水にて洗浄され、除去された。活性染色が現像されたニトロセルロース膜は、顕微鏡にて観察され、カメラによって銀塩フィルムに記録された。

4-2 NOS 活性の検出 (図 3)

NOS 活性は電子供与体から基質へ電子をわたす(酸化活性)化学変化として示される(NADPH diaphorase 活性)。電子供与体として NADPH を用い、酸化基質として NBT を用いた。既報の反応条件⁽⁷⁾を以下のように改変し、NOS 活性を NADPH diaphorase 活性として発色・現像させた。眼球組織中の高分子が転写された PVDF 膜は、転写面を上部にして、発色基質液(1.5mM NADPH、0.15mM NBT in TBS)に浸された(120 分、20℃)。組織像が現像された後、発色基質液は蒸留水にて洗浄され、除去された。活性染色が現像さ

れた PVDF 膜は、顕微鏡にて観察され、カメラによって銀塩フィルムに記録された。

結果 (写真 1AB および図 4)

SOD 活性の分布 (写真 1A)

SOD 活性は活性酸素を除去する酵素活性であるため、活性酸素による NBT の沈殿発色を阻止する活性として現れる。つまり、SOD 活性が発現しているところは染色されず、明度の高い部分(白色に近い部分)として示される(図 2 イラスト参照)。

SOD 活性は図 4 イラストに示されているとおり、網膜の双極細胞・アマクリン細胞・水平細胞層および視細胞(桿体細胞・錐体細胞層)に極めて強い SOD 活性(活性酸素除去活性)が認められた。網膜の最内層(眼球内側)の神経繊維層、神経細胞層、外網

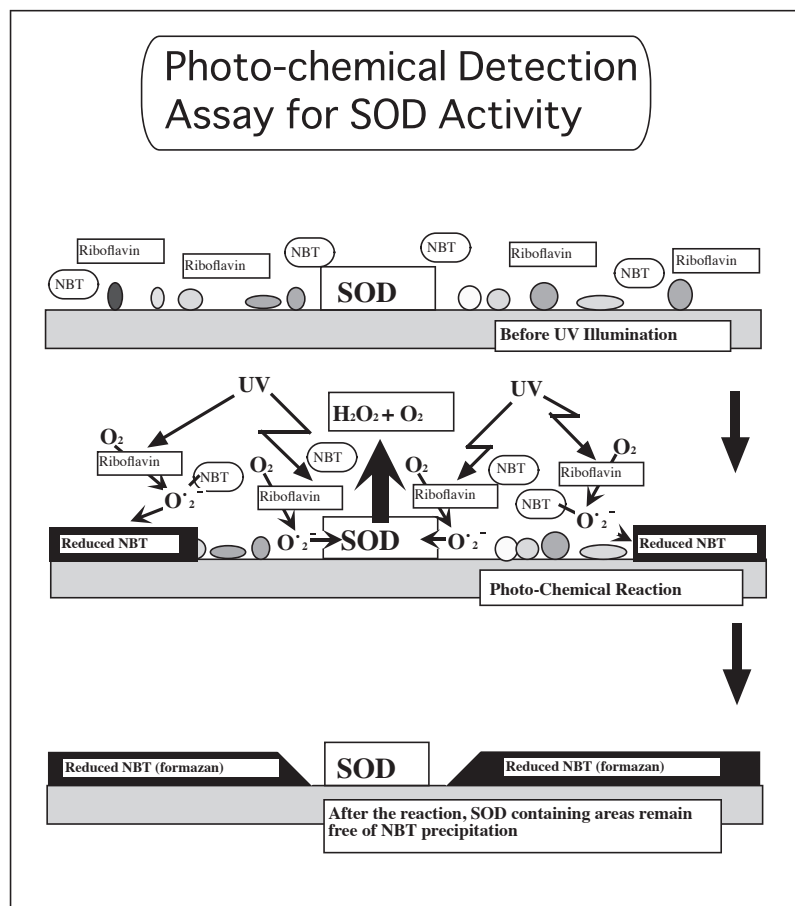


図 2

状層には NBT の発色が認められることから SOD 活性は弱いと判断された。(写真 1A 左方向が眼球内側、右方向が眼球外側)

NOS 活性の分布 (写真 1B)

本研究では NOS 活性は NBT 酸化活性として示される。つまり、NOS 活性の発現している部位は NBT の発色が認められるところ（黒色になっている部分）として示されている。

NOS 活性 (NADPH diaphorase 活性) は写真 1B に示されているように、網膜最内層の網膜血管層、神経繊維層、神経細胞層に極めて強い NOS 活性が発現していた。さらに網膜外側 (眼球外側より) の桿体細胞、錐体細胞層に薄い層状に強い活性が認められた。網膜中層では網膜組織内の神経繊維 (軸索) に活性が認められた。

考察

網膜の細胞とその活動周期 (リフレッシュレート)

網膜は、酸素消費量が最も激しい器官であり、酸素呼吸の結果、活性酸素の発生量が多い事が推測され、それが眼の老化が早くから進む要因であろうと推測されている⁽⁸⁾。

今回、本研究によって、若年ラット網膜組織内の環境として、SOD 活性が認められることから、活性酸素ラジカルの発生レベルが低く保たれている可能性が示された。SOD 活性は主として網膜内層の双極細胞・アマクリン細胞・水平細胞層および視細胞 (桿体細胞・錐体細胞) にあたる部位に認められた。これらの細胞は、可視光線の強度情報 (明るさ) と周波数情報 (色) を処理し、最終的に網膜表面の神経細胞に伝達する作用を持ち、網膜表面に結像した光情報を、視覚情報へと変換・伝達するスイッチングハブとして働いている。この働きは、眼の基本的な役割として極

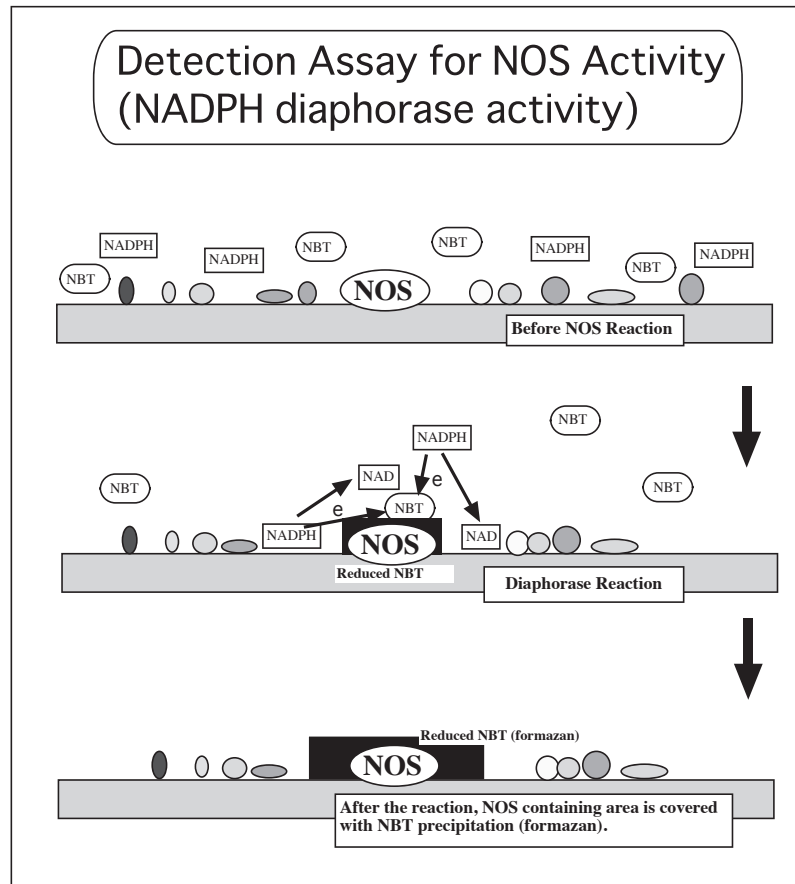


図 3

めて重要である。一般的にヒトを含む哺乳類の場合、スイッチングハブとしての作用は、物を注視した場合、およそ 30～50Hz の時間解像度（フリッカー値）を示す。このフリッカー値は、細胞の情報伝達 1 サイクルの周期を示しており、細胞活動のリフレッシュレートとして理解できる。このように活動リフレッシュレートの大きい視細胞が多数集合して網膜が形成されており、それによって、外敵などの素早い動きも認識できるようになっている反面、細胞活動が極めて短周期なため（リフレッシュレート：時間解像度が大きい）、時間あたりのエネルギー消費が激しく、網膜が極めて多量の酸素を消費する器官となっていることも理解でき、ここに SOD 活性が認められたことは極めて理にかなっているように考えられる。なお、このフリッカー値は神経細胞の疲労度によって大きく変動することが知られており、ヒトの場合には産業衛生上の疲労度検出手段ともなっている。

網膜の NOS と血流調節

一方で網膜は酸素供給量を維持するために、網膜最内層に網膜血管網を密に配置していることが明らかとなっており、多くの眼科医師によって研究がなされている。

今回の結果から、網膜最内層（網膜血管網・神経繊維層）に極めて強い NOS 活性が認められた。NOS によって産生された NO は極めて分子量が小さい（分子量 30）ため、酸素分子の吸収と同様に、特にレセプターなどの機能タンパクが細胞表面になくとも、分子の拡散によって極めて自由に近隣（およそ 20～40 μm ：細胞 2～3 層）の血管平滑筋細胞の細胞膜を通過し細胞に取り込まれ、血管の拡張作用が現れる⁽⁹⁾。NO の血管拡張機能は古くから経験的に知られてきた。たとえば ニトログリセリンを扱う工場（おおくはダイナマイト生産工場）従業員の休日狭心症・心臓発作などの発生事例（平日の工場勤務日は発作の発生が極めて少なかった）から、ニトロ化合物の吸引が心臓血管（冠状動脈）の拡張作用があることが判明

網膜拡大写真と細胞配置図(同縮尺)

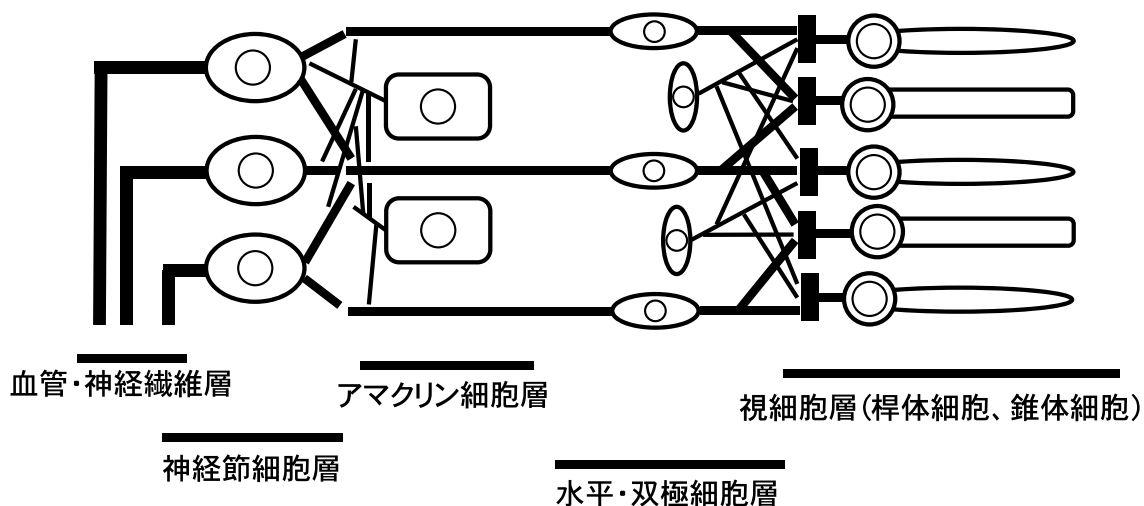


写真1 および図4

したのは有名な例である（実際はニトログリセリン・ニトロ化合物からNOが産生され、血管拡張作用を示している⁽¹⁰⁾）。このようにNOのもつ血管拡張作用や他の作用が明らかになり、NO研究者がノーベル賞を受賞したのもつい最近のことである（1998年ノーベル医学・生理学賞⁽¹¹⁾）。現在ではNOの持つ血管拡張作用と血流量の増大効果を利用した派生薬剤としてバイアグラや発毛薬（リアップ）などが有名である。

今回の実験の結果、若年ラットの網膜血管網にNOS活性が認められたことは、網膜自身が自己の血流をNOの産生によって調節している可能性を示す証拠となり得る物である。

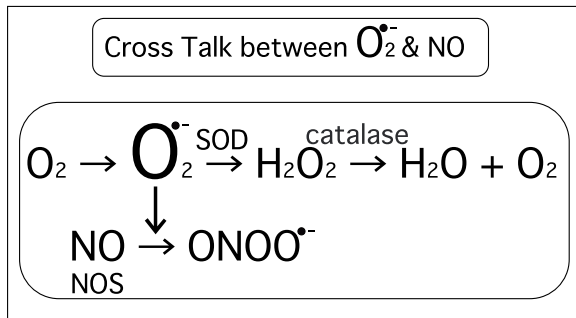


図 5

網膜のラジカル発生環境

一方において NO は反応性に富む分子種であり、組織内で生じた活性酸素分子とも容易に反応し、パーオキシナイトライト (ONOO ラジカル) を形成し、細胞内のタンパク質や核酸を酸化し、酸化ストレスの発生を促すことも報告されている⁽¹²⁾。つまり、NO が、本来の有益な作用 (血管拡張作用) を示すか、有害な作用 (生体高分子の酸化作用) を示すか? 作用の分かれ道は NO 産生現場の活性酸素ラジカルの発生程度に影響されうる (図 5) と推測される。

今回、本研究において、網膜組織内の SOD 活性の分布と、NOS 活性の分布を示し得た点では、画期的な結果であり、網膜内の組織酸化環境に以下のような大きな知見を与えることができた。

つまり、若年ラット網膜においては、活性酸素ラジカルの発生レベルが低いことが考えられるため NO は本来の作用を発揮し、ONOO ラジカルへの転換は起こりにくいことが考えられる。

ただし、今回の結果は 6 週齢の若いラットの網膜によるものであり、加齢状態のラット (通常ではラットの寿命は 24 ~ 36 ヶ月ほどである) たとえば、24 ヶ月齢あたりのサンプルにて同様の調査を行い、ヒトの加齢状態における網膜の老化を SOD 活性、NOS 活性の変化で再現できるかどうかを至急行うことが将来の課題として残されている。

本研究は 2013 年 9 月 ~ 2014 年 8 月の在外研究に行った研究の一部をまとめたものである。

引用文献

- (1) 井上、川島、坪田 (2013) : 眼老化とバイオマーカー. *Anti-aging Science* 5:52
- (2) 左向 (2004) : ベットにおける白内障とその管理について. *動物臨床医学会誌* 25:229
- (3) Norbert D, Wangsa W, Robert A (2003): Retinal Oxygen. *Arch Ophthalmol.* 121:547
- (4) Okabe M, Nyakas C, Buwalda B, Luiten PG (1993): In Situ Blotting: A novel method for direct transfer of native proteins from sectioned tissue to blotting membrane: Procedure and some applications. *J Histochem Cytochem.* 41:927
- (5) Beauchamp C, Fridvich I. (1971): Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276
- (6) Okabe M, Saito S, Saito T, Ito K, Kimura S, Niioka T, Kurasaki M (1998): Histochemical Localization of Superoxide Dismutase Activity in Rat Brain. *Free Rad. Biol & Med.* 24:1470
- (7) Vincent SR, Kimura H (1992): Histochemical Mapping of Nitric Oxide Synthase in the Rat Brain. *Neuroscience* 46:755
- (8) 戸張 (2001): 老化に基づく疾患の病態 - 老化と眼障害. *医学と薬学* 45:539
- (9) Bian K, Doursout MF, Murad F (2008): Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens. (Greenwich)* 10:304
- (10) 奏江 (2013): 冠攣縮性狭心症の疾患概念の確立. *LiSA* 20:728
- (11) http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998 was awarded jointly to Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro and Ferid Murad "for their discoveries concerning nitric oxide as a signalling molecule in the cardiovascular system".
- (12) Olanow CW (1993): A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16:439