

Title	Reactive Oxygen Species Involved in Phenazine- Methosulfate-Induced Rat Lens Opacification : An Experimental Model of Cataract
Author(s)	木勢,惠一
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38563
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、〈ahref="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

# The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏 名 **木 勢 惠** 一

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号第11165号

学位授与年月日 平成6年3月15日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 Reactive Oxygen Species Involved in Phenazine-Methosulfate-

**Induced Rat Lens Opacification** 

— An Experimental Model of Cataract —

(活性酸素種による Phenazine methosulfate 誘発ラット水晶体混濁

一 実験的白内障モデル 一)

論文審查委員

(主査) 教 授 田野 保雄

(副査) 教 授 志賀 健 教 授 谷口 直之

## 論文内容の要旨

#### 【目的】

Phenazine methosulfate(以下 PMS と略す)は、赤血球膜を障害し溶血することが、既に知られている色素である。この PMS を摘出したラット水晶体を培養する際に培養液に添加すると、初期の老人性白内障とよく似た形態変化を認めた。嫌気条件下ではこの PMSによる形態変化が認められなかったので、酸素の存在の有無がこの混濁に関与すると考えた。そこで、この PMS による水晶体混濁に活性酸素が関与していると考えその証明のため本研究を行った。

# 【方法】

#### 1. 水晶体の培養および観察

水晶体は、4週齢のウィスター系雄ラットより得た。ラットをエーテルで賭殺後、実体顕微鏡のもとで眼球を摘出した。培養液は、Jin. Kinoshita 培地(pH7.40、286mOsml/kgH $_2$ O)を用い、摘出水晶体を、37 $^{\circ}$ Cで15時間器官培養した。PMS には光増感作用があるので培養等は遮光条件下で行った。写真撮影は、PMS の吸収ピークをさけるために、500nm 以下をカットするフィルターを用いて行った。写真撮影後、組織学的検討、含水量、電解質の測定、Na、K-ATPase の活性の測定などを行った。

#### 2. 組織学的検討

写真撮影後、テクノビットで包埋して切片を作成し、トルイジンブルーで染色の上、光学顕微鏡で観察した。

3. 水晶体の含水量および Na, K の測定

写真撮影した水晶体は、湿重量の測定後、105℃で12時間乾燥させ乾燥重量を測定し、その差から含水量を算出した。 さらに30%硝酸で60℃、120分間消化して Na、K の含量を原子吸光分析で測定した。

4. Na, K-ATPase 活性の測定

写真撮影後、水晶体をホモジナイズし、モリブデン・ブルー法により測定した。Na、K-ATPase 活性は、全ATPase 活性からウアバイン非感受性 ATPase 活性を差し引いたものと定義した。

#### 5. 電子スピン共鳴の測定

PMS による混濁現象に活性酸素の関与が考えられたので、摘出した水晶体を直ちにホモジナイズし、PMS を加え、嫌気条件下(100%窒素)および好気条件下(20%酸素)で、電子スピン共鳴で活性酸素の検出を試みた。また還元

系の関与をみるために PMS に NAD (P) H, NAD (P) を加えた系についても測定を行った。電子スピン共鳴の測定は、DMPO を用いたスピントラップ法で行った。

6. 近紫外・可視部吸収スペクトルの測定

PMS および, それに NADH, あるいは超酸化カリウムを加えた系で色素生成の確認を近紫外・可視部吸収(300~650nm)で確認した。

#### 【結果および考察】

- 1. および2. の実験で、酸素存在下では、PMS 添加した群には、水晶体混濁が生じた。光学顕微鏡所見では、水晶体上皮細胞の欠落、配列の乱れ、皮質の線維細胞の膨化、空胞化変性が認められた。一方、嫌気条件下では、混濁がおこらず透明であった。
- 3. の実験で、嫌気条件下の群では、全例(n=5)ともコントロール群と比較して含水量および Na, K の含量には有意差は、認められなかった。一方、高濃度酸素条件下の群(n=6)では、含水量の増加および Na 含量の増加および K 含量の低下がみられ Na/K 比は、逆転していた(p <0.01)。
- 4. の実験で、PMS を添加すると Na, K-ATPase 活性は、有意に低下していた( $p\langle 0.05, n=5\rangle$ 。
- 5. の実験では、嫌気条件では、ホモジナイズした水晶体と PMS との反応において、活性酸素の発生はみられなかったが、酸素存在下では OH ラジカルが発生した。水晶体のない系において、 PMS に NAD(P)H を加えた場合は、 OH ラジカルが検出されたが、 NAD(P)を加えた場合には、 OH ラジカルは検出されなかった。 NAD(P)Hによって、 PMS は還元され PMSH となり、 OH ラジカルを産生すると考えられる。 このことより Na、 ATPase 活性は、 PMSH が酸素を還元し発生した活性酸素によって失活したと考えられる。
- 6. の実験では、PMS(酸化型)は、黄色であるため吸光度は、380nm に吸収極大がみられた。NADH を加えた直後は、380nm の吸収は消失したが、そのまま空気中に24時間インキュベートすると褐色調を呈した520nm に吸収極大をもつスペクトルが得られた。さらに活性酸素(超酸化カリウム)を加えると520nm の吸収は、増大した。これより PMS とのインキュベートで水晶体が褐色調を呈したのは、活性酸素が関与していると考えられる。

## 【総括】

以上の実験系より、水晶体では PMS(酸化型)は、NAD(P)H などの細胞内還元系により PMSH(還元型)となり、酸素を還元して活性酸素を発生する事が明らかになった。

さらに発生した活性酸素は、水晶体膜に存在する Na, K-ATPase 活性を失活させることにより細胞内外のイオンバランスがくずれ、水晶体の混濁が生じたと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

近年、老人性白内障(水晶体の混濁)の成因の一つとして、活性酸素の関与が指摘され、その方面での研究が、盛んに行われている。しかし、その研究のための適当な実験モデルがなかった。本研究は、活性酸素を発生するフェナジンメト硫酸を用いて、ラットから摘出した水晶体の器官培養で、水晶体の混濁(白内障)を引き起こす系を確立し、さらに組織学的な検討、生化学的な検討、電子スピン共鳴の測定などによって、その発症機構を調べたものである。この系では、白内障は、十数時間という短時間で認められた。この形態は、ヒトの老人性白内障の初期変化ときわめて類似したものであった。光学的顕微鏡による観察ではこの白内障の原因と考えられる病理所見を認めた。また、生化学的な実験および電子スピン共鳴の測定からこの水晶体の混濁は、フェナジンメト硫酸によって発生した活性酸素が、水晶体の上皮細胞に存在する Na、KーATPase 活性を失活させた結果ひきおこされたことを明らかにした。以上得られた知見は、今後、活性酸素による白内障の発症の基礎研究となる重要なものであり、学位論文に値するものと考えられる。