

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：32666  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592248  
 研究課題名（和文）ラット網膜虚血-再還流モデルにおける水素点眼の網膜神経保護効果の研究  
 研究課題名（英文）Protection of the Retina by Rapid Diffusion of Hydrogen: Administration of Hydrogen-Loaded Eye Drops in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury  
 研究代表者：  
 小原澤 英彰（OHARAZAWA HIDEAKI）  
 日本医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：20350035

研究成果の概要（和文）：

ラット網膜虚血 - 再灌流モデルを用い、網膜虚血 - 再灌流時の酸化ストレス障害に対して水素分子（H<sub>2</sub>）点眼液が網膜の神経保護効果があるかを検討した。H<sub>2</sub>点眼液投与群と生理食塩水投与群で比較検討した。H<sub>2</sub>点眼液投与群では、酸化ストレスマーカー陽性およびTUNEL陽性細胞が有意に減少しており、網膜神経細胞の障害を抑制することが確認された。また、グリオーシスを伴う網膜厚の菲薄化も抑制され、H<sub>2</sub>点眼液が網膜の神経保護に有効であることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

This study was conducted to explore the neuroprotective effect of H<sub>2</sub>-loaded eye drops on retinal ischemia- reperfusion (I/R) injury in rats. H<sub>2</sub>-loaded eye drops reduced the number of retinal apoptotic and oxidative stress marker- positive cells and prevented retinal thinning with an accompanying activation of Muller glia, astrocytes, and microglia. The results suggest that H<sub>2</sub>-loaded eye drops are a highly useful neuroprotective and antioxidative therapeutic treatment for acute retinal I/R injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2010年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
2011年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜虚血-再灌、水素分子、網膜神経保護、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種は、生体内で酸素を利用する過程において生成されるが、生体にはこれを消

去するシステムが備わっている。しかし、活性酸素種の過剰な生成は生成と消去のバランスを崩し、酸化ストレスとなる。特に、活

性酸素種の中でもヒドロキシラジカル ( $\text{OH}\cdot$ ) は最も強力な活性酸素種であり、その解毒システムについてもあまりよく知られていない。しかし、水素分子 ( $\text{H}_2$ ) が脳における虚血 - 再灌流時に発生する  $\text{OH}\cdot$  を消去し、組織を保護することが発見された<sup>1)</sup>。眼科領域においても、同じく虚血 - 再還流障害時に酸化ストレス障害を起す網膜において、 $\text{H}_2$  が網膜神経保護に有効である可能性が考えられた。

1) Ohsawa I et al.: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007; 13: 688-694.

## 2. 研究の目的

緑内障は日本における中途失明原因第1位の眼疾患である。現在行われている緑内障の治療は、眼圧降下剤の点眼により眼圧下降させることを第一選択肢とし、点眼にて眼圧下降しない場合は手術により眼圧を下降させる。眼圧を十分下降させることにより、網膜・視神経障害の進行を抑制するとされている。緑内障の発症機序の一因に酸化ストレスによる網膜神経節細胞死がある。しかし、点眼、手術いずれにしても網膜神経細胞を直接保護する作用がある訳ではなく、眼圧を下降させることにより間接的に網膜神経細胞を保護していると考えられている。特に緑内障の中でも急性緑内障発作は一夜にして失明に陥る危険性が非常に高い疾患である。どのような機序により網膜神経細胞死を惹起するかは十分解明されていないが、網膜における虚血 - 再還流障害による活性酸素種の発生が病態の形成に重大な影響をおよぼすことが一因と考えられる。そのために、動物を用いた虚血 - 再還流モデルによる網膜障害

を抑制するための研究が行われている。活性酸素種は一定時間の虚血後に血流が再開した直後から多量に発生すると考えられており、網膜を含め脳、心臓、腎臓、肝臓などのいろいろな臓器で細胞障害の引き金になっている可能性が示唆されている。眼球については、Ophirらが、一定時間の虚血直後の再還流時に、 $\text{OH}\cdot$  は最も発生するという結果を示している<sup>1)</sup>。活性酸素種の中でも  $\text{OH}\cdot$  は最も強力な活性酸素種であり、無差別に核酸、脂質、蛋白質に反応し、細胞死を誘導している。したがって、 $\text{OH}\cdot$  をスカベンジすることは抗酸化プロセスとして最も重要であると考えられるが、 $\text{OH}\cdot$  の解毒システムについてはあまりよく知られていなかった。現在までに、網膜虚血 - 再還流障害に対する  $\text{OH}\cdot$  スカベンジャーを全身投与することによるアプローチが有効であることが報告されている<sup>2)</sup>。大澤らは、気体である  $\text{H}_2$  がどの臓器にも細胞内にも自由に拡散でき、活性酸素種のなかで最も毒性の高い  $\text{OH}\cdot$  を選択的に還元する新しい概念の抗酸化物質であり、 $\text{H}_2$  がラット脳の虚血 - 再還流モデルにおいて  $\text{OH}\cdot$  による酸化ストレス障害を抑制すると報告した<sup>3)</sup>。 $\text{H}_2$  が脳における虚血 - 再還流時の酸化ストレス障害の抑制に有効であることから、同じく虚血 - 再還流障害時に酸化ストレス障害を起す網膜においても  $\text{H}_2$  が網膜神経保護に有効である可能性が考えられた。また、 $\text{H}_2$  は細胞膜を容易に透過して拡散することから、点眼による局所投与が有効な可能性があると考えた。 $\text{H}_2$  点眼液を  $\text{OH}\cdot$  スカベンジャーとして使用する利点として、投与方法が点眼であるため容易であり、かつ全身投与と違い全身への副作用の可能性が

非常に低いということである。これらの理由から本研究の着想に至った。

1)Ophir A et al.: Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res.* 1993; 57: 351-357.

2)Ophir A et al. Protection of the transiently ischemic cat retina by zinc-desferrioxamine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35: 1212-1222.

3)Ohsawa I et al.: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007; 13: 688-694.

### 3. 研究の方法

7 週齢のSDラットを用いて、眼圧を110mmHgに上昇させることにより網膜の血流を遮断し60分間虚血状態を継続させ、60分後に眼圧を正常に戻すことで網膜の血流を再開させることにより網膜虚血-再灌流モデルを作製した。水素点眼は、水素ガスを生理食塩水に溶解させ準備した。虚血開始から再灌流後30分までの間、持続的に眼表面へ水素点眼を行った。対照として生理食塩水のみを点眼を行った。評価方法としては、再灌流直後に網膜での $\cdot\text{OH}$ レベルを測定した。また、再灌流1日目にTUNELおよび酸化ストレスマーカー(4-HNE、8-OHdG)陽性細胞数を測定し、対照と比較した。さらに、再灌流7日目には網膜厚の測定と、グリア細胞の活性化を免疫染色を行い、対照と比較した。

### 4. 研究成果

水素点眼は硝子体中での水素濃度を上昇させ、再灌流直後の網膜での $\cdot\text{OH}$ レベルを有意に抑制した。また、水素点眼は再灌流1日目のTUNELおよび酸化ストレスマーカー

(4-HNE、8-OHdG)陽性細胞数を有意に抑制した。さらに、再灌流7日目には網膜厚の減少(図1)およびグリア細胞の活性化を有意に抑制した。以上の結果から、水素点眼は、ラット網膜虚血再灌流モデルにおいて酸化ストレスから網膜神経を保護する効果を示すことが今回の研究から確認された。

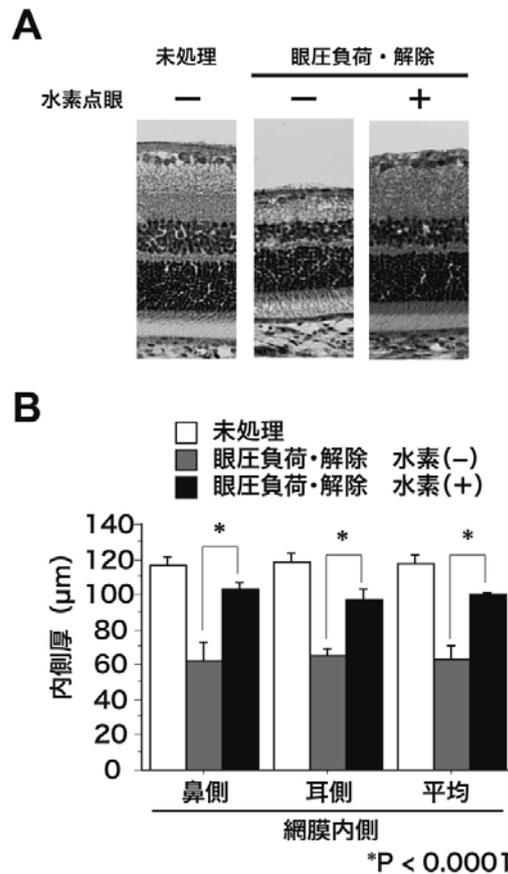


図1: H<sub>2</sub>点眼液の効果。ラット網膜虚血-再灌流1週間後 A: HE染色、B: 網膜内層厚

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S. and Ohsawa, I: Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: Administration

of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(1): 487-492, 2010  
doi: 10.1167/iovs.09-4089 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S., Ohsawa, I.: Rapid diffusion of hydrogen protects the retina: Administration to the eye of hydrogen-containing saline in retinal ischemia-reperfusion injury. OCC 2010 World Congress. 2010. 3. 17. (Santa Barbara)

2. Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Takahashi, H., Ohta, S., Ohsawa, I.: Rapid diffusion of hydrogen molecule from hydrogen-containing eye drops reduces retinal ischemia-reperfusion injury. 7<sup>th</sup> ASMRM・10<sup>th</sup> J-mit. 2010.12.16. (Fukuoka)

3. 小原澤英彰 五十嵐勉 横田隆 藤井博明 鈴木久晴 町出充 高橋浩 太田成男 大澤郁朗: ラット網膜虚血再灌流モデルにおける水素点眼による神経保護効果. 第114回日本眼科学会総会. 2010年4月16日 (名古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小原澤 英彰 (OHARAZAWA HIDEAKI)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20350035

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: