

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462670

研究課題名(和文) 網膜酸化ストレス傷害に対する水素水点眼の効果

研究課題名(英文) The effect of hydrogen for retinal oxidative stress

研究代表者

高橋 浩 (Takahashi, Hiroshi)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：00188046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：内眼手術と酸化ストレスの関連では、白内障超音波乳化吸引術(PEA)における角膜内皮障害の原因としてフリーラジカル特にヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)の関与が示唆されてきた。水素ガスがPEAにおける酸化ストレス障害から保護できるか検討を行った。ウサギを用い前房内でPEAを行い、水素含有眼内灌流液と通常の眼内灌流液の比較検討を行った。5時間後、角膜を摘出し、角膜浮腫、酸化ストレスマーカーのリアルタイムPCRと免疫染色を行った。角膜浮腫は有意に減少し、酸化ストレスマーカーも水素群で有意に減少した。今回の研究により、水素含有眼内灌流液はPEA由来の酸化ストレスから角膜内皮保護する結果を証明した。

研究成果の概要(英文)：In phacoemulsification, ultrasound induces hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) formation, damaging corneal endothelium. The effects of H₂ in phacoemulsification were evaluated in rabbits, comparing H₂-dissolved and control solutions. The whole cornea was excised and subjected to image analysis for corneal edema, real-time semiquantitative PCR (qPCR) and immunohistochemistry for oxidative stress marker. Corneal edema was significantly less and the increases in anti-oxidative mRNA expressions were significantly suppressed in the H₂ group. In addition, corneal endothelial cell expressions of oxidative stress markers were significantly lower in the H₂ group. In conclusion, H₂ dissolved in the ocular irrigating solution protected corneal endothelial cells from phacoemulsification-induced oxidative stress and damage.

研究分野：眼科

キーワード：酸化ストレス 白内障手術 超音波 水素 角膜内皮

1. 研究開始当初の背景

内眼手術と酸化ストレスの関連では、白内障超音波乳化吸引術(PEA)における角膜内皮障害の原因としてフリーラジカルの関与が示唆されてきた。我々の検証により実際に角膜内皮細胞が酸化ストレス障害を受けることが明らかとなった。内眼手術の中でも最も件数の多い PEA の組織傷害因子として活性酸素種、特に OH・が重要であることを確認し、内眼手術と酸化ストレスの関連を考える契機となった。

一方、水素ガスは組織・細胞種を問わず自由に拡散して OH・を選択的に還元する新しい概念の抗酸化物質である。以前、我々はラット網膜の虚血再還流障害モデルを用いて水素ガスを溶解した点眼液の効果を検討したところ、水素ガスは速やかに硝子体から網膜に到達して網膜厚の菲薄化を抑制した。そのため、内眼手術における水素ガス応用という着想に至り、眼科手術用眼内灌流液への水素ガス溶解を利用した研究に着手した。

2. 研究の目的

内眼手術である、網膜硝子体手術における網膜酸化ストレス障害および白内障手術における角膜内皮障害に対する水素による保護効果を検証した。

3. 研究の方法

100%水素ガスを充填したアクリルボックス内にオペガードネオキットを 24 時間留置し、水素含有眼内灌流液を作製した。In vitro において超音波による活性酸素を水素で軽減できるか見るために、Electron Spin Resonance(ESR)法と Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF) で検討を行った。9 週齢の日本白色家兔オスに対し、水素含有眼内灌流液または通常の眼内灌流液を用いて、前房内で 90 秒間 30%のパワーで超音波発

振を行った。5 時間後、角膜を切除し検討を行った。角膜浮腫を画像処理し、数値化し比較検討した。qRT-PCR で酸化ストレスマーカーの Heme oxygenase (HO)-1、catalase (CAT)、superoxide dismutase 1 (SOD1)、SOD2 の検討を行った。免疫染色で 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) を用い、水素の抗酸化作用について検討した。

4. 研究成果

水素眼内灌流液は約 60%程度の飽和度を示した。豚眼を用い、連続灌流したところ、30 分後も 50%以上の飽和度を保てた。ESR 法、HPF 法共に水素を用いることで有意に活性酸素の発生を抑えた。超音波後、角膜内皮を回収し、qRT-PCR を施行したところ、HO-1、CAT、SOD2 の発現が水素群で有意に低下した。フラットマウントにて 8-OHdG、4-HNE の免疫染色を行ったところ、陽性細胞の有意な減少を確認した。角膜浮腫を数値化し比較検討したところ、水素群にて角膜浮腫の改善が有意に示された。これらの結果から眼内灌流液に含まれる水素はフリーラジカルの発生を抑制させ、角膜内皮への侵襲を軽減させる可能性があると考えられた。

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 3 件)

1. Igarashi T, Ohsawa I, Kobayashi M, Igarashi T, Suzuki H, Iketani M, Takahashi H. Hydrogen prevents corneal endothelial damage in phacoemulsification cataract surgery. Sci Rep. 2016 Aug 8;6:31190. doi: 10.1038/srep31190. 査読有り

2. Takahashi K, Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Yaguchi C, Iijima O, Yamazaki Y, Katakai Y, Miyake N, Kameya S, Shimada T, Takahashi H, Okada T. Improvement of AAV-mediated transduction by surgical Internal limiting membrane (ILM) peeling in nonhuman primate retina. Mol ther. 2017 Jan 25;1:296-302
3. Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Kameya S, Fujimoto C, NakamotoK, Takahashi H, Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Hirai O, Shimada T, Okada T, Takahashi H. Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient intraocular pressure (IOP) elevation. Mol Vis. 2016 Jul 16;22:816-26.

〔学会発表〕(計4件)

1. 高橋浩：白内障手術侵襲を科学する、特別講演、第39回日本眼科手術学会学術総会、平成28年1月、博多、福岡国際会議場
2. 五十嵐勉、大澤郁朗、小林舞香、鈴木久晴、高橋浩：白内障手術時の超音波由来フリーラジカルによる角膜内皮障害に対する水素の有用性、第70回日本臨床眼科学会、平成28年11月、京都、国立京都国際会館
3. 五十嵐勉. Innovation in ocular gene therapy、シンポジウム、第121回日本眼科学会総会 4月 東京、東京国際フォーラム
4. Takahashi K, Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Yaguchi C, Iijima O, Yamazaki Y, Katakai Y, Miyake N, Kameya S, Shimada T, Takahashi H, Okada T. Improved intravitreal AAV-mediated inner retinal gene

transduction by surgical internal limiting membrane (ILM) peeling in cynomolgus monkeys. The association of research in vision and ophthalmology. May. Baltimore.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：内眼手術時の酸化ストレス障害に対する水素分子含有予防又は治療薬
 発明者：高橋浩、大澤郁郎、五十嵐勉
 権利者：高橋浩、大澤郁郎、五十嵐勉
 種類：特許
 番号：特願 2016-009784
 出願年月日：2016年1月21日出願
 国内外の別：日本、PCT 国際出願

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋浩 (Hiroshi Takahashi)
 日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授
 研究者番号：00188046

(2)研究分担者

五十嵐勉 (Tsutomu Igarashi)
 日本医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10421190

金田誠 (Makoto Kaneda)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授
 研究者番号：30214480

(3)連携研究者

大澤郁郎 (Ikuroh Ohsawa)

独)東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・研究副部長
研究者番号:30343586