実験技術

過酸化脂質誘導ウサギ角膜血管新生モデル

中西 孝子¹⁾, 植田 俊彦²⁾

要約：酸化ストレスは生体内にある不飽和脂肪酸を過酸化脂質へと変化させるとともに，糖尿病網膜症や加齢黄斑変などの原因となるため，過酸化脂質の増加が疾患の原因に関与していると考えられている．この過酸化脂質の一つであるリノール酸ヒドロパーオキシド (LHP) をウサギ角膜実質に投与した．明らかな炎症所見が無いにもかかわらず，約2週間にわたって，輪部血管から角膜実質に血管新生が生じるモデルを作成した．経時的に摘出した角膜片中にはLHP投与後24時間までに，投与されたLHPは消失した．さらに tumor necrosis factor- α (TNF- α)，vascular endothelial growth factor (VEGF)，matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 活性が6時間から12時間をピークに出現した．投与24時間後に輪部血管から新生血管の発芽が観察された．その後，新生血管はLHP投与14日後まで1日あたり0.24 mmの割合でLHP投与部位に向かって成長し，約3 mmとなった．TNF- α 阻害薬，抗酸化作用を持つ漢方薬（柴苓湯）などを前投与した場合，血管新生は抑制されたことより，酸化ストレスの関与が考えられた．しかし，vitamin Eでは抑制されなかったことより，本モデルではTNF- α やVEGF，MMP-9活性だけでなく，それ以外の因子が含まれていると考えられた．

1. はじめに

過酸化脂質 (thiobarbituric reactive substances : TBARS) はインスリン抵抗性糖尿病患者血液中では男性で $491 \pm 183 \mu\text{mol/L}$ ，女性では $507 \pm 85 \mu\text{mol/L}$ と健常人 ($275 \pm 85 \mu\text{mol/L}$) に比べて有意に増加しており，血中TBARS量の増加に伴い，網膜症の発症リスクが高くなることが報告されている(1)．

増殖糖尿病網膜症で硝子体切除術後の硝子体TBARS量は正常に比べて2～6倍有意に増加している(2-4)．また，加齢にともないブルッフ膜でのTBARS量が増加することも報告されている(5)．この過酸化脂質(LOOH)は Fe^{2+} など金属イオンの存在下Fenton様反応でアルコキシラジカル($\text{LO}\cdot$)やヒドロキシラジカル($\text{OH}\cdot$)を生じ(6)，あらたに不飽和脂肪酸から水素を引き抜き($\text{L}\cdot$)連鎖成長反応が進行し，細胞に障害を起こす．健全な生体でもある程度の過酸化脂質は生成され，抗酸化物や抗酸化酵素により酸化還元バランスが保たれているので，発病には至らないと考えられている．しかし，このバランスがくずれた時，過酸化脂質や活性酸素種による酸化ストレスは眼内血管新生をとまなう糖尿病網膜症や加齢黄斑変性の原因の1つになりうると考えられる．この生体に存在する過酸化脂質の一つであるリノール酸ヒドロパーオキシド(LHP)をウサギ角膜(7)，網膜(8)，網膜下(9)に投与し，新生血管モデルを作成することに成功した．LHPは血管新生に関与するサイトカイン：tumor necrosis factor- α (TNF- α)，vascular endothelial growth factor (VEGF)，interleukin-1 α ，basic fibroblast growth factorや細胞外基質を分解するプロテアーゼの一種であるmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (10)を活性化し，血管新生を誘導した．そこで本稿では，これらのモデルの中でも，作成および観察の容易な角膜血管新生モデルを紹介する．

2. 角膜血管新生モデル

実験動物には雄性ニュージージーランドラビット (ウサギ) 体重2.5～3.0 kgを使用した．

①リノール酸ヒドロパーオキシド (LHP) 作成

キーワード：血管新生，角膜，過酸化脂質，ウサギ

昭和大学医学部¹⁾第二薬理学教室，²⁾眼科学教室 (〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8)

e-mail: tachueda@med.showa-u.ac.jp 原稿受領日：2006年3月22日，企画教育委員会依頼原稿

Title: Lipid hydroperoxide-induced corneal neovascularization rabbit model

Author: Takako Nakanishi-Ueda, Toshihiko Ueda

方法 (11) : Linoleic acid 250 mg (18:2) と 10 mg soybean lipoxidase を 0.1 M borate buffer pH 9.0, 100 mL に溶解し, 酸素を十分に加え, 4℃にて2時間インキュベーションした. さらに 10 mg soybean lipoxidase を加え, 2時間インキュベーションした後, 5g NaCl を加え, 溶解し, 100 mL 無水 diethyl ether にて3回抽出操作を行った. 50 g Na_2SO_4 を加え脱水した後, ろ紙を用いてろ過し, 窒素流去により LHP oil を作成し, -80℃にて保存し, 実験に使用した.

②角膜投与方法: ウサギを ketamine (35 mg/kg), xylazine 5 mg/kg で麻酔後, 手術用顕微鏡下にて角膜上輪部から 4.5 mm の位置が先端となるように 30 ゲージ針を角膜実質に刺入し, 20 mM borate buffer pH 9.0 にて調整した 40 mM LHP を 10 μL 投与し, コントロールには 20 mM borate buffer pH 9.0 を 10 μL 投与した (図1). 投与部位は直径 4 mm の円状スポットとして観察された.

③角膜血管新生観察: LHP 投与後, 14日まで眼科手術用顕微鏡下, キャリパーを用いて角膜最長新生血管長を測定した. LHP 投与時に観察された直径 4 mm の白いスポットは観察終了時まで残存したが, 20 mM borate buffer pH 9.0 投与によるスポットは2日後には消失した. LHP または 20 mM borate buffer pH 9.0 角膜実質投与後, 眼科手術顕微鏡による観察では結膜充血や眼脂などの炎症反応はなかった. 20 mM borate buffer pH 9.0 投与では血管新生は観察されなかったが, LHP 投与では24時間後には上輪部血管から投与部位へ向かって血管の発芽を観察した. 血管は1日あたり 0.24 mm の割合で成長した (図2, 3). この血管はスポットを包み込むように成長を維持する. LHP 投与2週間後に蛍光前眼部撮影を行った結果, 先端部分からのみフルオレッセインは漏出し, 輪部血管に近い部分からは漏出せず, 成熟した血管となっていることが明

図1 ウサギ角膜 LHP 投与部位

図2 LHP 誘導角膜血管新生

最長血管長は LHP 投与 7 日後に 2 mm, 10 日後で 3.8 mm, 14 日後では 5.0 mm だった.

図3 LHP 誘導角膜新生血管

LHP 投与 3, 7, 10, 14 日後にキャリパーにて最長血管長を測定した結果を示した. Average $\pm$ SE mm, n = 5.

図4 蛍光前眼部撮影

新生血管先端部からフルオレッセインが漏出した (9).

らかとなった (図4).

④組織学的観察: 光学顕微鏡による観察では角膜実質内に長く細い血管が走行していることが確認された. 血管周囲に炎症性細胞は観察されなかった (400 倍). 電子顕微鏡による観察では管腔形成中の血管を捕らえることができた. 中央に好中球, 周囲に細く伸びた小胞体と lucent area が観察され, tight junction が形成される前であることがわかった (4000 倍) (7).

図5 角膜のLHP投与部位と生化学分析に用いた分割部位

⑤生化学的実験：LHP投与後経時的に屠殺後眼球を摘出し、図5に示すように角膜を分割した。投与部位（injection site），上部（superior）を切り出し、重量を計測した。各サンプルを液体窒素にて凍結後，クライオプレス（マイクロテックニチオン，千葉）を用いて粉碎し，200 μ L 精製水を加えた後，超音波処理を行い，過酸化脂質測定試料とした。また，これらの処理後，10,000 rpm にて5分間の遠心操作を行い，上清を採取し，サイトカインおよびMMP-9の測定に使用した。

⑥過酸化脂質：TBARS量として測定し，マロンジアルデヒド（MDA）量に換算して表示した(12)。LHP投与直後，投与部位では3790 pmol MDA/mg proteinとなり，1時間以内にsuperiorに到達し，24時間後にはほぼ消失した（図6）。

⑦TNF- α ：WEHI164 subclone 13 fibroblastを用いたCytotoxic bioassay法により測定した(13)。LHP投与3時間後には増加し，12時間後にピークとなった（図7）。

⑧VEGF：Quantikine[®] immunoassay kits（R&D system）を用いて測定した。いずれの部位でも12時間後にピークとなった（図8）。VEGFはLHP刺激により角膜実質細胞で生成される(14)。

⑨MMP-9活性：Zymographyにより測定した(15)。いずれの部位でも6時間後には増加したが，superiorではその後減少し，新生血管の成長に伴いinjection siteでは増加した（図9）(16)。

3. 角膜血管新生阻害薬の評価

TNF- α 抗体の角膜実質への投与やpentoxifyllineの点眼によりLHP誘導角膜血管新生は抑制され，TNF- α 生成抑制により血管新生が抑制できることを示唆した(7)。また，抗酸化作用を持つ柴苓湯や，五苓散，

図6 LHP投与後の角膜中TBARS量の変化

—○—: LHP投与部位 (injection site), ---△---: 上部 (superior). Average $\pm$ SE pmol MDA/mg protein, n = 4 (9).

図7 LHP投与後の角膜中TNF- α の変化

—○—: LHP投与部位 (injection site), ---△---: 上部 (superior). Average $\pm$ SE pg/mg protein, n = 4 (9).

図8 LHP投与後の角膜中VEGFの変化

—○—: LHP投与部位 (injection site), ---△---: 上部 (superior). Average $\pm$ SE pg/mg protein, n = 4 (9).

図9 LHP投与後の角膜中MMP-9活性変化

LHP投与6時間のMMP-9活性を100%としたときの比で示した。—○—: LHP投与部位 (injection site), ---△---: 上部 (superior). Average $\pm$ SE, n = 3 (19).

小柴胡湯の経口摂取による血管新生抑制効果には VEGF 含量の低下が関与していることが示唆された(17)が, vitamin E 投与では抑制されなかった(18). ストレプトゾトシン投与による高血糖モデルでは LHP 誘導血管新生は2倍増となり, VEGF 量も24時間後に injection site, superior site とともに2倍量となり(19), この血管新生は vitamin E 投与により抑制され, LHP 投与24時間後の VEGF 量も減少していることがわかった(18).

4. おわりに

これまで過酸化脂質は酸化ストレスの結果と考えられてきた. しかし, 増加した過酸化脂質は, アルコキシラジカル ($\text{LO}\cdot$) やヒドロキシラジカル ($\text{OH}\cdot$) を形成し, 再び酸化ストレスの原因となりうる. 細胞膜を自由に通過できる H_2O_2 による刺激に比べ, 過酸化脂質は角膜内から徐々に消失し, 持続的に酸化ストレスをおよぼすことができる. 強すぎる酸化ストレスは, caspase を介して細胞をアポトーシスに導く(20)が, 低レベルの酸化ストレスでは細胞内で VEGF の産生を増加し(21), アラキドン酸の放出を促した(22). また, 細胞障害を引き起こすより低濃度の LHP により血管内皮(23), 結膜上皮(24)細胞増殖は増加した. 従来の血管新生モデルでは, 増殖因子の投与により作

成されるモデルであった. 今回の LHP 投与による角膜新生血管モデルは, 従来の方法より, さらに上流のレベルからの刺激であること, 本来血管のない組織であるため観察しやすいことから, より優れたモデルであると考えられる.

文 献

- 1) Armstrong D, et al. J Diab Comp. 1992;6:116-122.
- 2) Augustin AJ, et al. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 1993; 231:647-750.
- 3) Tanaka Y. Jpn Ophthalmol Soc. 1998;102:576-582.
- 4) Verdejo C, et al. Eye. 1999;13:183-188.
- 5) Richard F, et al. Retina. 1999;19:141-147.
- 6) Yagi K, et al. Biochem Biophys Res Comm. 1992;183:945-951.
- 7) Ueda T. Angiogenesis. 1997;1:174-184.
- 8) Armstrong D. Angiogenesis. 1998;2:93-104.
- 9) Tamai K. Exp Eye Res. 2002;74:301-308.
- 10) Iwai S. Curr Eye Res. 2006;31:337-346.
- 11) Armstrong D, et al. Methods Mol Biol. 1998;108:139-145.
- 12) Armstrong D, et al. Adv Exp Biol Med. 1994;366:43-58.
- 13) Ignatowski T, et al. Brain Res. 1994;665:293-299.
- 14) Nishimura E, et al. Showa Univ J Med Sci. 2001;13:35-41.
- 15) Grant MB, et al. Diabetes. 1998;47:1311-1317.
- 16) Iwai S, et al. Jpn J Ocul Pharmacol. 2006;20:in press.
- 17) Ueda T, et al. Atarashii Ganka. 1998;15:1303-1307.
- 18) Tsuchiya T, et al. Atarashii Ganka. 2003;20:379-383.
- 19) Higa A, et al. Current Eye Res. 2002;25:49-53.
- 20) Meyer TN, et al. J Biol Chem. 2001;276:22048-22055.
- 21) Kuroki M, et al. J Clin Invest. 1996;98:1667-1675.
- 22) Birkle DL, et al. Neurochem Res. 1989;14:185-190.
- 23) Yamada Y, et al. J Clin Biochem Nutr. 1998;25:121-130.
- 24) Yamamoto Y, et al. Pathophysiol. 2000;6:225-230.

著者プロフィール

中西 孝子 (なかにし たかこ)

昭和大学医学部第二薬理学教室, 講師, 医学博士.

◇1986年昭和大学薬学部卒業, 昭和大学医学部第二薬理学教室就職, '93-'94年 SUNY at Buffalo にて客員助教授. ◇趣味: 旅.

植田 俊彦 (うへだ としひこ)

昭和大学医学部眼科学教室, 助教授, 医学博士.

◇1985年昭和大学医学部卒業, '89年昭和大学医学部大学院修了, 眼科学教室入局, '93-'94年 SUNY at Buffalo にて客員助教授. ◇趣味: クワガタ虫の捕獲と飼育.