

緑内障と白内障における房水中フリーラジカルの検討： 糖尿病および血管新生緑内障の有無での差違

忍田 栄紀, 新井 清美, 酒井 美紀, 筑田 眞

獨協医科大学越谷病院眼科

要 約

目的：房水中フリーラジカルの種類の違いを緑内障群と白内障群で比較すること。

対象と方法：緑内障群 44 眼と白内障群 15 眼の房水中フリーラジカルを electron spin resonance (ESR) で測定し、その検出率を比較した。また、患者の糖尿病 (DM) の合併、血管新生緑内障 (NVG) の合併の有無でサブグループ解析を行った。

結果：フリーラジカルはアスコルビン酸フリーラジカル (AFR)・微量スーパーオキシド (SO) を含む AFR (AFR+)・微量 AFR を含む SO (SO+) の 3 種類で、各種検出率は、緑内障群 (最多 SO+) と白内障群 (最多

AFR)、緑内障の DM 群 (最多 SO+) と非 DM 群 (最多 AFR)、白内障の DM 群 (最多 AFR+) と非 DM 群 (最多 AFR) で各々有意差があった。NVG では DM の有無にかかわらず全例で SO+ が検出された。

結論：房水中 SO は白内障より緑内障で発生しやすく、緑内障・白内障とも非 DM より DM で発生しやすかった。NVG で SO と血管新生の強い関連が示唆された。(日眼会誌 118 : 759-767, 2014)

キーワード：フリーラジカル, 緑内障, 白内障, 糖尿病, 血管新生緑内障

Study of Free Radicals in Aqueous Humor in Glaucoma and Cataracts : Differences in Presence or Absence of Diabetes Mellitus and Neovascular Glaucoma

Eiki Oshida, Kiyomi Arai, Miki Sakai and Makoto Chikuda

Department of Ophthalmology, Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital

Abstract

Purpose : This study was conducted for the purpose of comparing differences in the types of free radicals in the aqueous humor of glaucoma and cataract patients.

Subjects and methods : Free radicals in the aqueous humor of 44 glaucoma eyes and 15 cataract eyes were measured by electron spin resonance (ESR), followed by comparing the detection rates. In addition, subgroup analyses were also conducted for the presence or absence of complications of diabetes mellitus (DM) and neovascular glaucoma (NVG) in the patients.

Results : Three types of free radicals were measured, ascorbate-free radical (AFR), AFR containing a trace amount of superoxide (SO) (AFR+), and SO containing a trace amount of AFR (SO+). Significant differences were observed in the detection rates of each type between the glaucoma group (maximum

SO+) and the cataract group (maximum AFR), between the DM group (maximum SO+) and the non-DM group (maximum AFR) in the glaucoma, and between the DM group (maximum AFR+) and the non-DM group (maximum AFR) in the cataract. SO+ was detected in all cases of NVG regardless of whether they were DM or non-DM.

Conclusion : Glaucoma cases are more susceptible to the generation of SO in the aqueous humor than cataracts, and they are more liable to occur in DM than in non-DM in both glaucoma and cataract cases. This study suggest an evidence for a strong correlation with SO and vascularization in NVG.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc) 118 : 759-767, 2014.

Key words : Free radicals, Glaucoma, Cataract, Diabetes mellitus, Neovascular glaucoma

別刷請求先 : 343-8555 越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 忍田 栄紀

(平成 25 年 10 月 29 日受付, 平成 26 年 4 月 7 日改訂受理) E-mail : e.oshida@nifty.com

Reprint requests to : Eiki Oshida, M. D. Department of Ophthalmology, Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital, 2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya-shi, Saitama-ken 343-8555, Japan

(Received October 29, 2013 and accepted in revised form April 7, 2014)

I 緒 言

フリーラジカルは、活性酸素の中でも不対電子を持つため、非常に反応性が高く不安定な物質である。生体においては過酸化反応による組織障害など種々の病態に関係し、白内障や糖尿病網膜症などでも酸化ストレスの関与が報告されている^{1)~5)}。房水中にはL-アスコルビン酸(L-AsA)、還元型グルタチオン(GSH)、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼなどさまざまな抗酸化物質が存在し、房水中の抗酸化に機能しているが、原発開放隅角緑内障(primary open-angle glaucoma: POAG)で白内障に比べ房水中の抗酸化物質の低下が報告されており⁶⁾、緑内障でも過酸化反応の関与が推察されている。しかし、フリーラジカル自体を測定して、緑内障と白内障で比較した報告はない。そこで今回我々は、緑内障群と白内障群の房水中フリーラジカルをelectron spin resonance (ESR)で直接測定し、その種類と検出率の違いから緑内障・白内障におけるフリーラジカルの関与を比較検討した。

また、糖尿病(diabetes mellitus: DM)や血管新生緑内障(neovascular glaucoma: NVG)では、以下のようにフリーラジカルが発生しやすいことや、過酸化反応が病態の発症および進行に関与することが報告されているため、緑内障群、白内障群の中で、さらにDMの有無、NVGの有無で細分化し、各々比較した。

糖尿病網膜症の硝子体では、非酵素的糖化反応であるグリケーションにより、スーパーオキシド(SO)の消去物質であるCu, Zn-SODに立体障害が生じて不活性化し、SOの消去能が低下していることが知られている³⁾。そこで、DMの有無についても比較検討を行った。

血管が存在する組織では虚血あるいは虚血後再灌流時にフリーラジカルの発生が知られており、眼虚血が背景にあるNVGでは緑内障の中でもフリーラジカルの発生する確率が高いのではないかと考え、緑内障についてはNVGの有無にも注目して検討を行った。さらに、DMが虚血の原因になることもあり、NVGにおけるDMの有無についても比較検討した。

II 対象および方法

対象は、2008年1月~2011年1月に獨協医科大学越谷病院眼科にて線維柱帯切除術、白内障手術を施行した症例で、表1のとおり緑内障44眼(DM 21眼、非DM 23眼)、白内障15眼(DM 5眼、非DM 10眼)、計59眼である。手術時平均年齢は 65.7 ± 10.6 歳(平均値 \pm 標準偏差)であった。緑内障44眼の内訳はNVG 13眼(DM 7眼、非DM 6眼)、POAG 21眼(DM 10眼、非DM 11眼)、原発閉塞隅角緑内障(primary angle-closure glaucoma: PACG)9眼(DM 4眼、非DM 5眼)、正常眼圧緑内障(normal-tension glaucoma: NTG)1眼(非DM)であり、

NVGの有無では、NVG 13眼(DM 7眼、非DM 6眼)、非NVG 31眼(DM 14眼、非DM 17眼)となる。NVG 13眼におけるDM 7眼はすべて増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy: PDR)によるNVGであり、非DM 6眼は網膜中心静脈閉塞症(central retinal vein occlusion: CRVO)によるNVGが4眼、内頸動脈狭窄症によるNVGが2眼である。

線維柱帯切除術もしくは白内障手術時に27G針付きの1ccシリンジで採取した房水を実験に供した。房水は直ちに専用容器に移し液体窒素にて凍結保存し、後日ESRのスピントラッピング法でフリーラジカルを測定した。ラジカルのトラップ剤には5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)を用いた。ESRの測定条件は著者らの既報⁷⁾のとおりである。140 μ lの超純水にDMPO 10 μ lを加えて混和後、房水を20 μ l添加し測定した。発生したラジカル種の特定のためにSODを用い分析した。SODはCu, Zn-SOD(10 U/ μ l)を40 μ l、超純水は100 μ l、DMPOと房水の量は上述と同様で、房水以外の溶液をすべて予め調製後、最後に房水を注入して同様にESRで測定した。

また、SOとL-AsAとの反応についての確認実験として、*in vitro*にてヒポキサンチン—キサンチンオキシダーゼ系でSOを発生させ、濃度の異なるL-AsA(0~60 mg/dl)を加え、房水測定時と同様の条件のESRで測定し、SOの波形変化を検討した。この確認実験に使用した試薬の詳細は、ヒポキサンチン(2 mM)を33.3 μ l、キサンチンオキシダーゼ(0.4 U/ml)を33.3 μ l、DMPOを10 μ l、diethylenetriaminepentaacetic acid(5.5 mM)を23.4 μ l、超純水を50 μ l、L-AsA(0~60 mg/dl)を20 μ lである。

なお、対象患者には研究の主旨を説明し、同意を得たうえでヘルシンキ宣言に基づいて研究を実施した。本研究は獨協医科大学越谷病院生命倫理委員会の承認を得ている。

III 結 果

*in vitro*で発生させたSOに濃度の異なるL-AsAを反応させたESRの波形は図1のようになった。図1の1番上の波形であるSO単独の波形は、L-AsAを加えるとL-AsAの濃度が高くなるにつれて徐々に変化するが、途中、上から4~7番目の波形のようにアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)とSOが混在する波形となり、最終的に1番下の波形であるAFR単独の波形に近づいていった。

今回、房水から検出されたESRの波形は、完全型AFRの波形(ESR波形①)、不完全型AFRの波形(ESR波形②)、AFRと異なる波形(ESR波形③)の3パターンに大別された(図2)。ESR波形①は、SOを消去するSODを添加しても変化を認めない波形で、このフリーラジカルはAFRである。ESR波形②は、AFRの波形

表 1 対象

| | | | (n = 59) | | |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------|-----------|-----------|
| | | | 症例 No | 疾患 | 年齢 (歳) |
| 緑内障 44 眼 (64.0±10.8 歳) | DM 21 眼 (66.3±7.2 歳) | NVG 7 眼 (65.6±10.6 歳) | 1 | PDR | 51 |
| | | | 2 | PDR | 56 |
| | | | 3 | PDR | 63 |
| | | | 4 | PDR | 63 |
| | | | 5 | PDR | 69 |
| | | | 6 | PDR | 76 |
| | | | 7 | PDR | 81 |
| | | 非 NVG 14 眼 (66.6±5.3 歳) | 8 | POAG | 60 |
| | | | 9 | POAG | 62 |
| | | | 10 | POAG | 63 |
| | | | 11 | POAG | 63 |
| | | | 12 | POAG | 63 |
| | | | 13 | POAG | 64 |
| | | | 14 | POAG | 72 |
| | | | 15 | POAG | 74 |
| | | | 16 | POAG | 74 |
| | | | 17 | POAG | 75 |
| | | | 18 | PACG | 62 |
| | | | 19 | PACG | 64 |
| | | | 20 | PACG | 67 |
| | | | 21 | PACG | 70 |
| 非 DM 23 眼 (61.9±13.1 歳) | NVG 6 眼 (67.3±9.8 歳) | | 22 | CRVO | 53 |
| | | | 23 | CRVO | 59 |
| | | | 24 | CRVO | 70 |
| | | | 25 | CRVO | 79 |
| | | | 26 | 内頸動脈狭窄症 | 68 |
| | | | 27 | 内頸動脈狭窄症 | 75 |
| | | 非 NVG 17 眼 (60.0±13.9 歳) | 28 | POAG | 38 |
| | | | 29 | POAG | 54 |
| | | | 30 | POAG | 56 |
| | | | 31 | POAG | 57 |
| | | | 32 | POAG | 57 |
| | | | 33 | POAG | 57 |
| | | | 34 | POAG | 59 |
| | | | 35 | POAG | 59 |
| | | 36 | POAG | 70 | |
| | | 37 | POAG | 74 | |
| | | 38 | POAG | 77 | |
| | | 39 | PACG | 21 | |
| | | 40 | PACG | 63 | |
| | | 41 | PACG | 66 | |
| | | 42 | PACG | 72 | |
| | | 43 | PACG | 73 | |
| | | 44 | NTG | 67 | |
| 白内障 15 眼 (70.8±8.2 歳) | DM 5 眼 (70.4±13.0 歳) | | 45 | 白内障 | 48 |
| | | | 46 | 白内障 | 71 |
| | | | 47 | 白内障 | 76 |
| | | | 48 | 白内障 | 76 |
| | | | 49 | 白内障 | 81 |
| | | 非 DM 10 眼 (71.0±5.5 歳) | 50 | 白内障 | 64 |
| | | | 51 | 白内障 | 66 |
| | | | 52 | 白内障 | 67 |
| | | | 53 | 白内障 | 69 |
| | | | 54 | 白内障 | 69 |
| | | | 55 | 白内障 | 69 |
| | | | 56 | 白内障 | 71 |
| | | | 57 | 白内障 | 76 |
| | | | 58 | 白内障 | 79 |
| | | | 59 | 白内障 | 80 |
| 平均値±標準偏差 | | | | 65.7±10.6 | |

NVG 全体：13 眼(66.4±9.8 歳)，非 NVG 全体：31 眼(63.0±11.2 歳)。

DM：糖尿病，NVG：血管新生緑内障，PDR：増殖糖尿病網膜症，POAG：原発開放隅角緑内障，PACG：原発閉塞隅角緑内障，NTG：正常眼圧緑内障，CRVO：網膜中心静脈閉塞症。

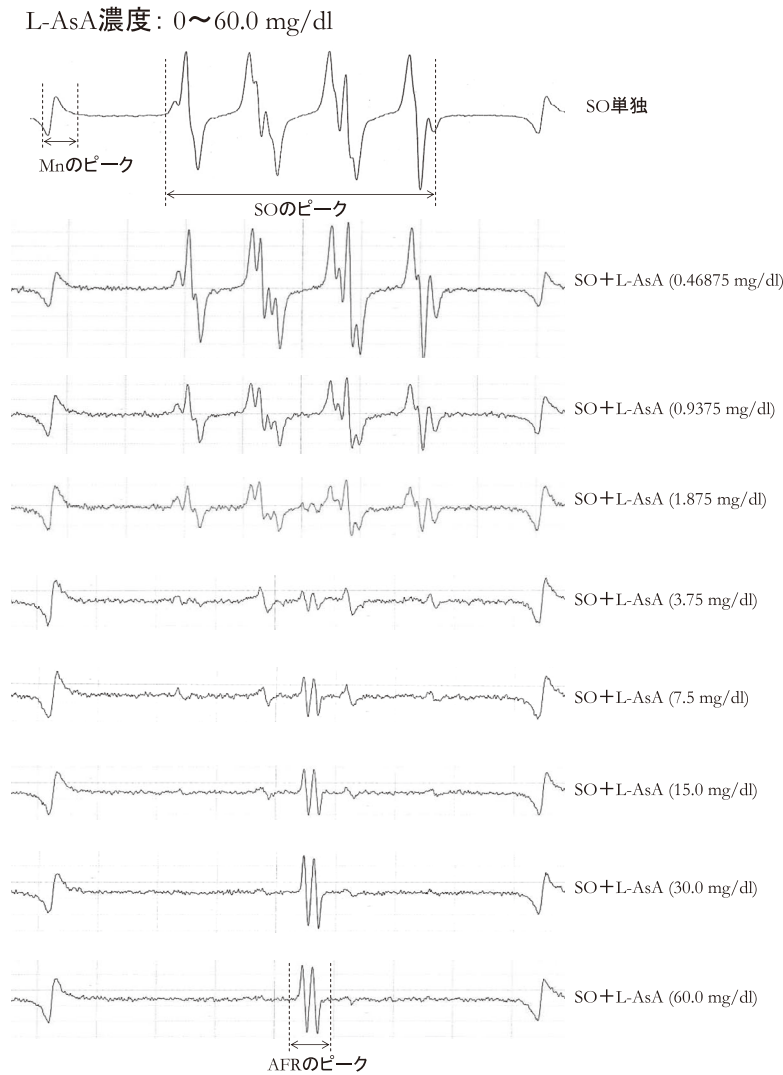


図1 スーパーオキシド(SO)に反応させたL-アスコルビン酸(L-AsA)の濃度によって変化する electron spin resonance(ESR)波形.

SOの波形は、L-AsAを加えるとL-AsAの濃度が高くなるにつれて徐々に変化し、SOとアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)が混在する波形になったのち、最終的にAFRの波形に近づいていった。

によく似ているが、AFRの波形に特徴的な2つのピークの形がやや変形していたり、不揃いな波形で、SODの添加により完全型AFRの波形に変化した。このことと図1の結果から、このフリーラジカルは大部分がAFRであり、そこに微量のSOが含まれている。このフリーラジカルをAFR+とした。ESR波形③は、ESR波形①および②とは明らかに異なり、ESR波形②よりさらにAFRの部分のピークの形が大きく崩れ、AFRのピーク高が完全型AFRの半分以下に低くなっており、SODの添加で完全型AFRの波形に変化した。このことと図1の結果から、この波形③は微量のAFRが含まれているが、波形②に比べ、より多量のSOの発生が明らかであり、このフリーラジカルをSO+とした。

各症例のESR波形と特定されたフリーラジカルの種類については表2のとおりである。これらを緑内障、白内障、DMの有無、さらに緑内障の中ではNVGの有無

で分け、特定された3種類のフリーラジカルの種類ごとの検出率の比較を表3~6に示した。これらのフリーラジカルの検出率については χ^2 検定で解析を行った。また、酸化ストレスには加齢の影響も考えられることから、群間の年齢はMann-WhitneyのU検定で比較した。

1. 緑内障群と白内障群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較(表3)

緑内障群44眼(64.0±10.8歳)ではAFRが15眼(34%)、AFR+が11眼(25%)、SO+が18眼(41%)で検出され、白内障群15眼(70.8±8.2歳)ではAFRが10眼(67%)と緑内障群より割合が高く、AFR+が5眼(33%)、SO+は検出されなかった。緑内障群と白内障群での比較で3種類のフリーラジカルの検出率に有意差があった($p<0.01$)。年齢にも両群で有意差があり、緑内障群のほうが低値だった($p<0.01$)。

しかし、上記比較には、DM患者、NVG患者が含ま

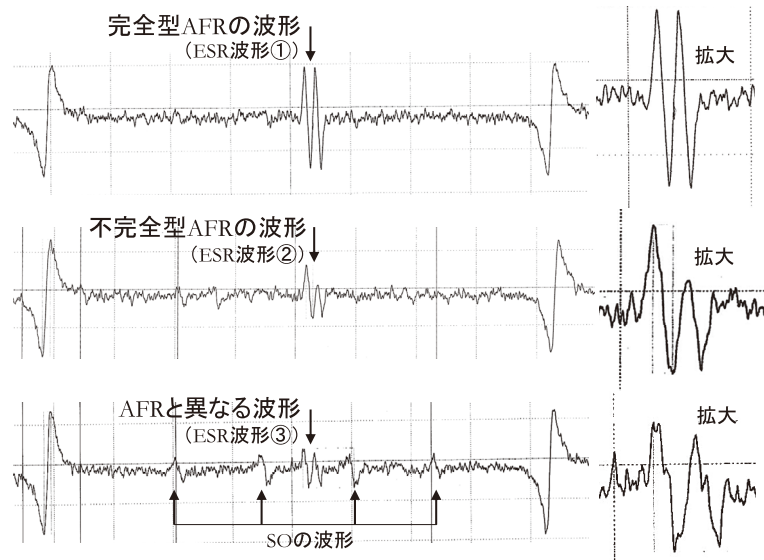


図 2 房水から検出された ESR 波形.

上段：完全型 AFR の波形 (ESR 波形 ①).

中段：不完全型 AFR の波形 (ESR 波形 ②).

下段：AFR と異なる波形 (ESR 波形 ③).

れており、これら疾患のフリーラジカルの影響が含まれている。純粋な緑内障と白内障の比較という意味で、非 DM で非 NVG の緑内障と非 DM の白内障でも比較した。非 DM で非 NVG の緑内障群 17 眼 (60.0 ± 13.9 歳) では AFR が 13 眼 (76%)、AFR+ が 4 眼 (24%)、SO+ は検出されなかった。非 DM の白内障群 10 眼 (71.0 ± 5.5 歳) では AFR が 9 眼 (90%)、AFR+ が 1 眼 (10%)、SO+ は検出されなかった。非 DM で非 NVG の緑内障群と非 DM の白内障群での比較では 3 種類のフリーラジカルの検出率に有意差はなかった。両群の年齢には有意差があり、非 DM で非 NVG の緑内障群のほうが低値だった ($p < 0.01$)。

2. 緑内障と白内障における DM 群と非 DM 群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較 (表 4)

緑内障における DM 群 21 眼 (66.3 ± 7.2 歳) では AFR が 2 眼 (10%) と一番少なく、AFR+ が 7 眼 (33%) と二番目に多く、SO+ が 12 眼 (57%) と一番多く検出された。一方、非 DM 群 23 眼 (61.9 ± 13.1 歳) では AFR が 13 眼 (57%) と一番多く、AFR+ が 4 眼 (17%)、SO+ が 6 眼 (26%) で検出された。緑内障における DM 群と非 DM 群での比較で 3 種類のフリーラジカルの検出率に有意差があり ($p < 0.01$)、年齢には両群で有意差がなかった。

白内障における DM 群 5 眼 (70.4 ± 13.0 歳) では AFR が 1 眼 (20%)、AFR+ が 4 眼 (80%) で検出され、AFR より AFR+ が多く、SO+ は検出されなかった。非 DM 群 10 眼 (71.0 ± 5.5 歳) では AFR が 9 眼 (90%) とほとんどを占め、AFR+ が 1 眼 (10%)、SO+ は検出されなかった。白内障における DM 群と非 DM 群での比較で 3 種

類のフリーラジカルの検出率に有意差があり ($p < 0.05$)、年齢には両群で有意差がなかった。

3. NVG 群と非 NVG 群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較 (表 5)

NVG 群 13 眼 (66.4 ± 9.8 歳) で検出されたのは全例 SO+ であった。非 NVG 群 31 眼 (63.0 ± 11.2 歳) では AFR が 15 眼 (48%) と一番多く検出され、次に AFR+ が 11 眼 (36%) と多く、SO+ が 5 眼 (16%) と一番少なかった。NVG 群と非 NVG 群での比較で 3 種類のフリーラジカルの検出率に有意差があり ($p < 0.0001$)、年齢には両群で有意差がなかった。

4. NVG と非 NVG における DM 群と非 DM 群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較 (表 6)

NVG における DM 群 7 眼 (65.6 ± 10.6 歳)、非 DM 群 6 眼 (67.3 ± 9.8 歳) とともに検出されたのは全例 SO+ であった。NVG における DM 群と非 DM 群での比較で 3 種類のフリーラジカルの検出率に有意差はなく、年齢にも両群で有意差がなかった。

非 NVG における DM 群 14 眼 (66.6 ± 5.3 歳) では AFR が 2 眼 (14%) と一番少なく、AFR+ が 7 眼 (50%) と一番多く、SO+ が 5 眼 (36%) で検出された。非 DM 群 17 眼 (60.0 ± 13.9 歳) では AFR が 13 眼 (76%) で一番多く検出され、AFR+ が 4 眼 (24%)、SO+ は検出されなかった。非 NVG における DM 群と非 DM 群での比較で 3 種類のフリーラジカルの検出率に有意差があり ($p < 0.01$)、年齢には両群で有意差がなかった。

表 2 結果

| | | | 症例 No | ESR 波形 | SOD 添加後 ESR 波形 | 特定された フリーラジカル種 | |
|--------------|---------------|------------|---------------|--------|-------------------|-------------------|------|
| 緑内障 44 眼 | DM 21 眼 | NVG 7 眼 | 1 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 2 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 3 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 4 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 5 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 6 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 7 | ③ | ① | SO+ | |
| | 非 NVG 14 眼 | | | 8 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 9 | ③ | ① | SO+ |
| | | | | 10 | ③ | ① | SO+ |
| | | | | 11 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 12 | ① | ① | AFR |
| | | | | 13 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 14 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 15 | ③ | ① | SO+ |
| | | | | 16 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 17 | ① | ① | AFR |
| | | | | 18 | ③ | ① | SO+ |
| | | | | 19 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 20 | ② | ① | AFR+ |
| | | | | 21 | ③ | ① | SO+ |
| 非 DM 23 眼 | NVG 6 眼 | | 22 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 23 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 24 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 25 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 26 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 27 | ③ | ① | SO+ | |
| | | | 非 NVG 17 眼 | | | 28 | ① |
| | 29 | ① | | | | ① | AFR |
| | 30 | ② | | | | ① | AFR+ |
| | 31 | ① | | | | ① | AFR |
| | 32 | ① | | | | ① | AFR |
| | 33 | ① | | | | ① | AFR |
| | 34 | ② | | | | ① | AFR+ |
| | 35 | ① | | | | ① | AFR |
| | 36 | ② | | | | ① | AFR+ |
| | 37 | ① | | | | ① | AFR |
| | 白内障 15 眼 | DM 5 眼 | | 45 | ② | ① | AFR+ |
| 46 | | | | ① | ① | AFR | |
| 47 | | | | ② | ① | AFR+ | |
| 48 | | | | ② | ① | AFR+ | |
| 49 | | | | ② | ① | AFR+ | |
| 非 DM 10 眼 | | | | 50 | ① | ① | AFR |
| | | | | 51 | ① | ① | AFR |
| | | | | 52 | ① | ① | AFR |
| | | | | 53 | ① | ① | AFR |
| | | | | 54 | ① | ① | AFR |
| | | | | 55 | ① | ① | AFR |
| | | | | 56 | ① | ① | AFR |
| | 57 | | | ① | ① | AFR | |
| 58 | ① | ① | AFR | | | | |
| 59 | ② | ① | AFR+ | | | | |

ESR : electron spin resonance, SOD : スーパーオキシドディスムターゼ, AFR : アスコルビン酸フリーラジカル, SO : スーパーオキシド.

ESR 波形は, ① : 完全型 AFR の波形, ② : 不完全型 AFR の波形, ③ : AFR と異なる波形.

フリーラジカルは, AFR+ : 微量 SO を含む AFR, SO+ : 微量 AFR を含む SO.

表 3 緑内障群と白内障群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較

| | A (%) | | B (%) | |
|------|--------------|--------------|-----------------------|----------------|
| | 緑内障群 (全体) | 白内障群 (全体) | 緑内障群 (非 DM, 非 NVG) | 白内障群 (非 DM) |
| AFR | 15/44(34) | 10/15(67) | 13/17(76) | 9/10(90) |
| AFR+ | 11/44(25) | 5/15(33) | 4/17(24) | 1/10(10) |
| SO+ | 18/44(41) | 0/15(0) | 0/17(0) | 0/10(0) |

緑内障群と白内障群で検出率に有意差あり (p<0.01).

緑内障群と白内障群で検出率に有意差なし.

表 4 緑内障と白内障における DM 群と非 DM 群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較

| | A. 緑内障 (%) | | B. 白内障 (%) | |
|------|------------|-----------|------------|----------|
| | DM 群 | 非 DM 群 | DM 群 | 非 DM 群 |
| AFR | 2/21(10) | 13/23(57) | 1/5(20) | 9/10(90) |
| AFR+ | 7/21(33) | 4/23(17) | 4/5(80) | 1/10(10) |
| SO+ | 12/21(57) | 6/23(26) | 0/5(0) | 0/10(0) |

DM 群と非 DM 群で検出率に有意差あり (p<0.01).

DM 群と非 DM 群で検出率に有意差あり (p<0.05).

表 5 NVG 群と非 NVG 群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較

| | A (%) | |
|------|------------|-----------|
| | NVG 群 | 非 NVG 群 |
| AFR | 0/13(0) | 15/31(48) |
| AFR+ | 0/13(0) | 11/31(36) |
| SO+ | 13/13(100) | 5/31(16) |

NVG 群と非 NVG 群で検出率に有意差あり (p<0.0001).

60 mg/dl の状態に近く、ESR 波形②は、7.5~15 mg/dl の状態に近く、ESR 波形③は、3.75 mg/dl の状態に近い。すなわち、ESR 波形①および②が検出された房水は、Fong らの述べている AsA が高含有量の群に相当し、SO の消去能が高く過酸化刺激を受けにくく、ESR 波形③が検出された房水は、AsA が極少量の群に相当し、SO の消去能が低く過酸化刺激を受けやすいのではないかと推察した。

このことと今回の結果から、ESR 波形①が検出された房水では、SO 消去物質の活性も高く、さらに L-AsA の再生能力も高い状態と考えられ、SO の消去に L-AsA が機能し AFR が検出されたと考えた。ESR 波形②が検出された房水では、SO の消去に L-AsA が機能し AFR となるが、消去しきれなかった微量の SO が AFR に混在し検出されたと考えた。ESR 波形③が検出された房水では、SO 消去物質の活性が低下して、多量の SO が房水中に存在している状態と考えられ、L-AsA は SO を捕捉して AFR となる。そのうち一部の AFR はさらに SO を捕捉して D-AsA の状態まで過酸化を受けるものもある。D-AsA から L-AsA への再生能力も低く、AsA 酸化還元サイクルが不活化する。消去しきれずに残存していた SO と D-AsA まで過酸化を受けなかった微量 AFR が混在し ESR で検出されたと考えた。また、SOD を添加し AFR が検出されたのは、SOD により多量に発生していた SO の一部が消去され、L-AsA の SO 消去能に余裕が生じたことと、L-AsA が D-AsA の段階まで過酸化されずに AFR の段階でとどまることができたためと考えた。

今回、表 3A から緑内障のほうが白内障より房水中の

IV 考 按

房水は、血液中に比べアスコルビン酸(AsA)が高濃度で、AsA は房水中における抗酸化に寄与している⁸⁾。還元型の L-AsA がフリーラジカルなどの 1 電子を還元すると AFR が出現し、その AFR がさらに 1 電子を還元すると酸化型アスコルビン酸(D-AsA)が産生される。このことから、AFR は AsA の還元型から酸化型への中間産物といわれている。房水中の AFR は、白内障眼では門屋ら²⁾が報告し、緑内障眼については我々が初めて検出している⁷⁾。AFR は AFR 還元酵素により L-AsA に還元され、また、D-AsA はグルタチオン酸化還元サイクルの機能により還元され、AsA 酸化還元サイクルが活性化し、抗酸化能を発揮する。

Fong ら⁹⁾は、開放隅角緑内障の房水には AsA が極少量の群と、高含有量の群があり、極少量の群の房水の AsA は過酸化刺激を受けやすいと報告している。今回我々が測定した ESR 波形①は、図 1 の L-AsA の濃度が 30~

表 6 NVG と非 NVG における DM 群と非 DM 群での房水中フリーラジカルの種類ごとの検出率の比較

| | A. NVG (%) | | B. 非 NVG (%) | |
|------|------------|----------|--------------|-----------|
| | DM 群 | 非 DM 群 | DM 群 | 非 DM 群 |
| AFR | 0/7(0) | 0/6(0) | 2/14(14) | 13/17(76) |
| AFR+ | 0/7(0) | 0/6(0) | 7/14(50) | 4/17(24) |
| SO+ | 7/7(100) | 6/6(100) | 5/14(36) | 0/17(0) |

DM 群と非 DM 群で検出率に有意差なし。 (p<0.01).

SO が発生しやすい(SO 消去能が低下している)ことが示された。Babizhayev ら¹⁰⁾は、POAG では白内障に比べ房水および線維柱帯と Schlemm 管で過酸化脂質が増加し、線維柱帯と Schlemm 管の破壊に過酸化反応の関与を示唆している。今回の結果でも、緑内障のほうが白内障より過酸化反応が進行している確率が高いと考えられた。ただし、表 3B では緑内障群のほうが白内障群より SO が発生しやすい傾向にはあったが、2 群間に有意差がなかったことから、さらなる検討が必要である。また、表 4 から緑内障および白内障の両症例とも、DM のほうが非 DM より房水中の SO が発生しやすいことが示された。さらに、表 5 から NVG のほうが非 NVG より房水中の SO が発生しやすいことが示された。また、表 6A から NVG においては DM 群・非 DM 群ともに全例で検出されたフリーラジカルは SO+ であったことから、房水中の SO と血管新生との強い関連が示唆された。そして、NVG の房水において、DM の既往がなくても眼虚血が SO の発生に起因し、NVG の発症要因となっている可能性が高いことが明らかとなった。さまざまな組織で虚血時には新生血管が生じることが知られているが、新生血管形成のメカニズムは、虚血あるいは虚血後再灌流時に発生したフリーラジカルの刺激によって誘導される血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現によるといわれ、今回の結果から、NVG でも新生血管が形成される過程で SO の発生が大きく影響していると考えられた。そして、表 6B から非 NVG においても、DM のほうが非 DM より房水中の SO が発生しやすいことが示された。さらに、非 NVG において、非 DM 群では SO+ がまったく検出されなかったのに対して、DM 群では SO+ が 5 例検出され、SO の発生には DM が影響していると考えられた。我々は、硝子体や水晶体でみられる DM に伴うグリケーションによる抗酸化能の低下や糖の自動酸化³⁾¹¹⁾、さらには、細小血管障害が起きている場合には虚血によっても SO が発生している可能性を推察している。また、この 5 例は NVG 発症の前段階である可能性も考えられた。VEGF は血管新生に関与するサイトカインで、グリケーションの後期反応の最終糖化産物 (AGEs) はサイトカインの合成・分泌に関与し、DM における血管新

生に AGEs が影響するといわれている。当科でも硝子体において、AGEs の一種であるペントシジンと VEGF に正の相関がみられたことを報告している¹²⁾。過酸化反応はグリケーションの後期反応の進行にも関与するので、今回 DM 群の房水で確認された SO の発生はグリケーションの後期反応を進行させる可能性があり、それにより VEGF の発現が誘発され、硝子体と同様の血管新生が前房内でも生じ、NVG の発症・進行に関与する可能性が考えられた。フリーラジカルの消去能を高め、抗酸化力を増強することは NVG 発症予防の一つとして検討する価値があると推察した。

房水中の SO は白内障より緑内障で発生しやすく、緑内障・白内障とも非 DM より DM で発生しやすかった。また、NVG で SO と血管新生の強い関連が示唆された。本研究は多症例を詳細に分類し解析を行ったが、群間で年齢差を認めたものもあったことから、症例数を増やし、群間の年齢差をなくしての比較も必要であると考えている。

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました東北文化学園大学医療福祉学部 門屋講司教授に深甚なる謝意を表します。

利益相反：利益相反公表基準に該当なし

文 献

- 1) Vinson JA: Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 13: 151-162, 2006.
- 2) 門屋講司, 安田礼子, 田中 寧, 新井清美, 筑田眞, 小原喜隆: アトピー白内障患者の房水におけるアスコルビン酸フリーラジカルの定量. *あたらしい眼科* 15: 263-266, 1998.
- 3) 田中 寧: 糖尿病網膜症の発症に関わる硝子体の過酸化反応. *日眼会誌* 102: 576-582, 1998.
- 4) 大平明弘, 植田俊彦, 大石健太郎, 平光忠久, 明尾潔, 小原喜隆: 酸化ストレスと眼. *日眼会誌* 112: 22-29, 2008.
- 5) 岡本洋幸, 新井清美, 筑田 眞: 白内障水晶体前囊片の過酸化物質総量の測定. *あたらしい眼科* 29: 563-571, 2012.
- 6) Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA,

- Llesuy SF** : Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 137 : 62-69, 2004.
- 7) **Oshida E, Matsumoto Y, Arai K** : Free radicals in the aqueous humor of patients with glaucoma. *Clin Ophthalmol* 4 : 653-660, 2010.
- 8) **Reiss GR, Werness PG, Zollman PE, Brubaker RF** : Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. *Arch Ophthalmol* 104 : 753-755, 1986.
- 9) **Fong D, Etzel K, Lee PF, Lin TY, Lam KW** : Factors affecting ascorbate oxidation in aqueous humor. *Curr Eye Res* 6 : 357-361, 1987.
- 10) **Babizhayev MA, Bunin AY** : Lipid peroxidation in open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 67 : 371-377, 1989.
- 11) 橋本浩隆, 新井清美, 筑田 真, 小原喜隆 : グリケーションと白内障. *眼臨紀* 3 : 567-579, 2010.
- 12) 橋本浩隆, 新井清美, 筑田 真, 小原喜隆 : ヒト硝子体における血管内皮増殖因子とペントシジンの関係. *日眼会誌* 102 : 442-446, 1998.
-