

氏名	さえき ゆうすけ 佐伯有祐
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第482号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	胎仔期、新生仔期および成熟ラット角膜における抗酸化酵素の発現：免疫組織化学的研究
学位論文審査委員	(主査) 井上幸次 (副査) 大浜栄作 山田一夫

学位論文の内容の要旨

抗酸化酵素は、発生過程において未熟な組織を酸化ストレスより防御するため必要であることが様々な臓器で報告されている。しかし、角膜における報告はこれまでにない。本研究では、発達過程のラット角膜において抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1)、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) およびチオレドキシニンペルオキシダーゼ (TPx) の発現とその強度が、出生、開眼等、角膜を取り巻く環境の変化によってどのように変化するかを免疫組織化学的に検討した。

材料及び方法

Sprague-Dawley ラットの胎仔期角膜 (胎生 15 日、胎生 17 日、胎生 20 日: 各 n=10)、新生仔期角膜 (生後 0 日、生後 7 日、生後 14 日、生後 17 日、生後 21 日: 各 n=10)、成熟角膜 (生後 28 日: n=12) を用いた。

4%緩衝パラホルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋をした後、6 μ m の連続切片を作製し、1 枚はヘマトキシリン・エオジン染色に用い、4 枚を免疫組織化学染色に供した。免疫組織化学染色は、ストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法により行い、一次抗体として以下の家兎ポリクローナル抗体を使用した。すなわち、抗ラット SOD1 抗体、抗ラット SOD2 抗体は 2000 倍に希釈したもの、抗ラット GPx 抗体、抗ラット TPx 抗体は 1500 倍に希釈したものである。反応産物の発色には 3, 3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAKO, Glostrup, Denmark) を使用し、角膜上皮細胞層、実質膠原線維、ケラトサイト、内皮細胞層における染色性を、陰性、弱陽性、中等度陽性、強陽性の 4 段階で評価した。

結果

角膜上皮細胞層では、胎生 15 日から SOD1、SOD2、GPx に対する弱陽性所見が認められた。その後これらの染色性は増強し、胎生 20 日には、SOD1 は強陽性、SOD2 と GPx は中等度陽性所見を示し、微弱ではあるが TPx に対する陽性反応も認められた。これらの反応性は出生直後 (生後 0 日) にすべて低

下し、生後 7 日には再び増強し、開眼直前である生後 14 日には角膜上皮細胞層の SOD1、SOD2、GPx に対する染色性は強陽性を示した。開眼直後である生後 17 日に SOD1、SOD2 の染色性は中等度陽性に、GPx の染色性は軽度陽性に再び減弱したが、生後 21 日に増強し、成熟角膜である生後 28 日には、SOD1 では角膜上皮細胞の胞体に一致したびまん性の強い陽性所見が、SOD2 では顆粒状の中等度陽性所見が認められた。GPx も角膜上皮細胞の胞体に一致してびまん性、中等度陽性所見を示した。TPx の染色性はごく軽度であった。角膜実質膠原線維には陽性反応は見られなかった。ケラトサイトには胎生 20 日より SOD1、SOD2、GPx に対する軽度の染色性が認められた。角膜内皮細胞層では、胎生 17 日より SOD1、GPx の軽度陽性所見が見られ、胎生 20 日には SOD2 に対する染色性も認められた。生後 7 日には SOD1 は中等度陽性へと増強し、生後 14 日には TPx に対する染色性も認められた。

考 察

角膜上皮細胞層では、胎生 15 日から軽度の SOD1、SOD2、GPx の発現が認められ、以後増強し、胎生 20 日、すなわち出生直前に最初のピークが認められた。このことは、他臓器におけると同様、出生後に生じる酸化ストレスに対してあらかじめ準備しているものと考えられた。出生直後に、SOD1、SOD2、GPx、TPx の発現が一時的に低下したが、その理由については明らかでない。各抗酸化酵素の染色性は、生後 7 日には胎生 20 日のレベルまで増強し、新生仔期において各抗酸化酵素の発現が誘導されることが考えられた。各酵素の発現は、閉眼している生後 14 日まで増強し、開眼直後の生後 17 日には全て低下していた。これは、外気酸素や紫外線等により増大した酸化ストレスを処理したためと推測されたが、詳細については今後検討する必要がある。一方、角膜内皮細胞においても、胎仔期より抗酸化酵素が発現していたが、これは内皮細胞のポンプ機能維持のために発生した酸化ストレスを消去するためと考えられた。

結 語

発達過程にあるラット角膜における抗酸化酵素 SOD1、SOD2、GPx および TPx の発現を免疫組織化学的に検討した。胎仔期より角膜上皮細胞に抗酸化酵素の発現が認められた。生後 0 日（出生直後）、生後 17 日（開眼直後）に一時的に各抗酸化酵素の発現の低下が認められた。角膜内皮細胞においても、胎仔期より抗酸化酵素の発現が認められた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、胎仔期、新生仔期および成熟ラット角膜における抗酸化酵素 SOD1、SOD2、GPx および TPx の発現を免疫組織化学的に検討したものである。その結果、角膜上皮細胞層では、胎生 15 日より SOD1、SOD2、GPx が発現し、胎生 20 日には TPx も発現すること、これらは出生直後（生後 0 日）に全て低下し、生後 14 日（開眼直前）に最も強く発現し、生後 17 日（開眼直後）に再び減少した後、生後 21 日に再び増強することを明らかにした。こうした発現の変化は、出生や開眼など角膜を取り巻く環境の変化に伴う酸化ストレスの変化に対応していると考えられた。本研究は、発達過程のラット角膜における抗酸化酵素の発現とその変化を初めて明らかにしたものであり、明らかに学術的水準を高めたものと認められる。