

速 報

中程度 LED ブルーライト照射によるマウス網膜の変性について

川手美穂¹, 木下明美¹, 品川英朗², 山野眞利子^{†1}

¹大阪府立大学 総合リハビリテーション学部 栄養療法学専攻, 583-8555 大阪府羽曳野市はびきの3-7-30

²東大阪大学短期大学部 健康栄養学科, 577-8567 東大阪市西堤学園町3-1-1

受付: 2014年9月11日, 受理: 2014年10月21日

Exposure mild-level LED light induces retina edema

Miho KAWATE,¹ Akemi KINOSHITA,¹ Hideo SHINAGAWA,² and Mariko YAMANO^{†1}

¹Department of Clinical Nutrition, School of Comprehensive Rehabilitation, Osaka Prefecture University, 3-7-30 Habikino, Habikino City, Osaka 583-8555, Japan; ²Department of Health Nutrition, Higashiosaka Junior College, 3-1-1 Higashiosaka City, Osaka 577-8567, Japan

Received 11 September 2014; accepted 21 October 2014

Key words : LED blue light (青色LED照射); mouse retina (マウス網膜); edema (浮腫)

1 はじめに

近年パソコンやスマートフォンの普及率はますます高くなり、もはや生活の必需品化している。パソコンやスマートフォンなどのバックライトにはLEDブルーライトが使用され、これらの普及率の高まりとともに、ヒトでのブルーライトの暴露量が増加している。ブルーライトとは、可視光線のなかでも波長が短い390~495 nmの光である。我々の眼に入る光は、380 nm から780 nmの波長の可視光が硝子体を通して網膜へと到達する¹。それ以外の光は角膜や水晶体で吸収される。また波長の短いものほど光のエネルギーが強く、前述したブルーライトがまさにそうである。LEDは寿命も長く、消費電力が5分の1と少ないために、近年我が国は蛍光灯からLED照明に変換政策をとり²、その普及率も高まっている。さらに、LED照明は、多くが2種のLED光、すなわちLEDブルーライトと黄色のLED光を混合することで高輝度の白色発光を発生させており、青色単色よりも強いエネルギーを生じていることが明らかになっている³。

「加齢黄斑変性」とは、加齢によって、網膜の中心部である黄斑部に浮腫等の障害が生じ、視野が見えにくくなる疾患である。これは、現在欧米における成人の失明原因第一

位の疾患で、我が国でも50歳以上の約1%が発症しており、近年著しく増加しているとされている⁴。Suzuki等は加齢黄斑変性が発症する過程において、LEDブルーライトの暴露が影響すると報告した⁵。その研究では、マウスをLEDブルーライト照射下で1週間飼育したところ、網膜全層で、リン脂質の酸化が誘導、増強され、それは生後2ヶ月のマウスに比べて12ヶ月マウスで著明であったと報告した⁵。また、炎症反応時に遊走するマクロファージを示すとされる monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) もLED照射によって網膜で増加したことより、加齢に伴って抗酸化作用が減弱し、光による酸化ストレスを受けやすくなり、この酸化ストレスの蓄積が網膜黄斑部に浮腫等を引き起こす「加齢黄斑変性」の発症に関与しているのではないかと示唆している⁵。

そこで本研究は、加齢黄斑変性実験の準備研究として、生後2ヶ月の若齢成熟マウスで、さらにSuzuki等の用いた黄斑変性を比較的起こしやすいとされるC57BL/6Jマウスとは系統の異なるC57BL/6Nマウスを用い、彼らと同様の方法でマウスにLEDブルーライトを照射し、目の中心窩付近の黄斑部や網膜全体を詳細に組織化学的に検討し、LEDブルーライト照射が若齢成熟マウスには影響がないのか否かを検討した。

[†]連絡著者 E-mail: myamano@rehab.osakafu-u.ac.jp

2 方法

2.1 動物の作成

7週齢のオスの C57BL/6N マウス (日本 SLC) 6匹を 1 週間通常飼育したのち、コントロール群マウス 2匹、LED ブルーライト 1 週間照射マウス (LED1W 群) 2匹、LED ブルーライト 2 週間照射マウス (LED2W 群) 2匹と分けた。飼育条件としてコントロール群では蛍光灯を、LED ブルーライト照射群では LED ブルーライト (E-Bright, Osaka, Japan, 波長 466 nm) を用いて、ケージの中央部で 1000 lux の照度になるように設置した (Fig. 1)。照明は 1 日 12 時間の明暗周期とし、8 時から 20 時までの明期に上述のライトを点灯した。餌はオリエンタル酵母 (MF) を与え、飲食・飲水は自由摂取とし、室内温度は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で管理した。この動物実験は、大阪府立大学動物実験指針 (承認番号: 動物実験 25-61 号) に則って行い、実験動物や条件は先行研究である Suzuki 等の論文⁵を参考にして行った。

2.2 材料採取と免疫組織化学

最終日にそれぞれのマウスをネブタール (200 mg/kg) で深麻酔させ、固定液 (4% パラホルムアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液含有; PFA) で灌流固定したのち、両眼の眼球摘出を行った。取り出した眼球は PFA に浸漬させながら実

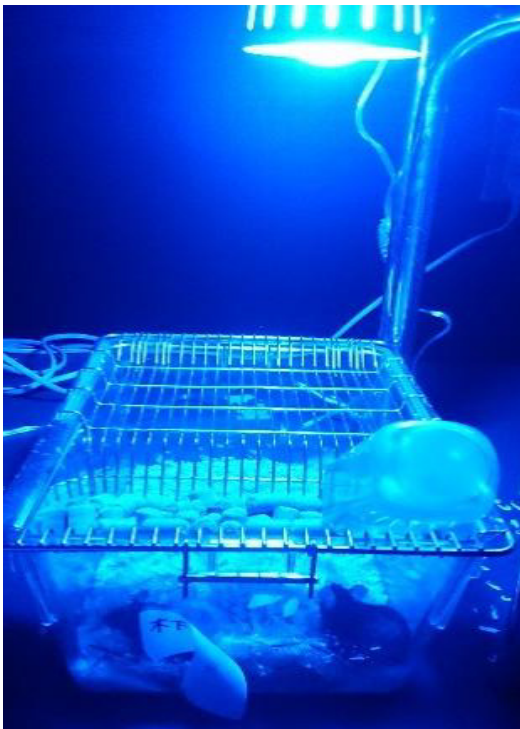


Fig. 1 LED ブルーライト照射群

LED ブルーライトをケージ、中のマウスに対して、1000 lux の照度になるように設置した。通常飼育の明暗サイクル同様、8 時から 20 時までの明期に 12 時間点灯した。1 週間継続群 (LED1W) と 2 週間継続群 (LED2W) を作成した。

体顕微鏡下で周辺の筋肉や水晶体を除去、視神経と黄斑部、網膜が残るように標本を採取した。その後 30% スクロース (0.1 M リン酸緩衝液含有) で浸漬し、クリオスタット (ミクROOM, ドイツ) で厚さ $12 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、ゼラチンスライドガラスに貼り付けた。このとき、切片は視神経部分に対して垂直になるように網膜を薄切した。作製された連続切片のうち 1 枚をヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を、その隣接切片を網膜部分において炎症や変性が出現するとされている以下の抗体を用いて二重蛍光免疫染色を行った。使用した抗体は、血管増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF: Santa Cruz, mouse IgG, 200 倍希釈)、血管壁のペリサイトを標識する platelet-derived growth factor receptor beta (PDGR- β : Abcam, rabbit IgG, 100 倍希釈)、神経膠細胞アストロサイトを標識する glial fibrillary acidic protein (GFAP: Santa Cruz, goat IgG, 500 倍希釈)、炎症性マクロファージを標識する monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1: Abcam, rabbit IgG, 200 倍希釈)、アポトーシス時に細胞に出現する caspase-3 (Cell Signaling, rabbit IgG, 500 倍希釈) で、Alexa-fluor 594 または Alexa-fluor 488 を結合させた二次抗体 (Invitrogen) を用いて蛍光二重標識し、封入時に VECTASHIELD 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 含有封入剤 (Vector) で蛍光核染色を同時に行った。

二重免疫した標本はオリンパス蛍光顕微鏡で同一視野を G 励起 (Alexa-fluor 594, 赤色) と F 励起 (Alexa-fluor 488, 緑色)、DAPI は V 励起 (青色) で交互に観察しオリンパスの顕微鏡計測ソフト (Cell Sense) で画像を取り込み、中心窩近傍を中心に網膜全体を詳細に観察した。

3 結果

蛍光灯下で飼育されたコントロール群マウスの網膜と、LED ブルーライトの照射下で 1 または 2 週間飼育されたマウスの網膜を H&E 染色で比較観察した結果、Fig. 2 の A~C に示すようコントロール群と LED ブルーライト照射群とでは著明な差はないように思われた。しかし連続切片を DAPI による蛍光核染色で観察すると、コントロール群では網膜の内果粒層 (inner nuclear layer: INL) や外果粒層 (outer nuclear layer: ONL) では密に規則正しく細胞核が並んで認められるが、LED 群では穴のように DAPI 陽性細胞核が抜けている部が多数認められた (Fig. 2D~F)。LED1W 群では INL に、2 週間照射群では INL に加えて ONL にも同様な部が多数認められた。この部を H&E 染色で詳細に観察したところ細胞や核の異常や線維細胞や大型のマクロファージ細胞等の発現は認められず、細胞内液の

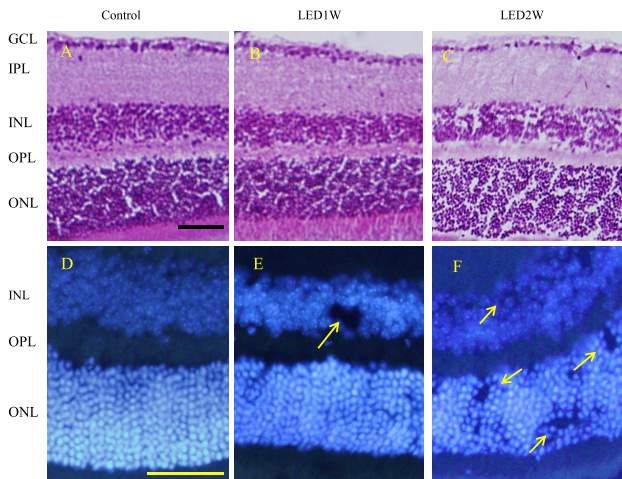


Fig. 2 マウス網膜における H&E 染色 (上段), DAPI による核染色 (下段) の顕微鏡写真

(A-C)はマウス網膜の中心窩近くの H&E 染色の顕微鏡写真である。コントロール群のマウス網膜(A)に比べて、LED1W群(B)、LED2W群(C)では、組織学的に大きな変化は認められなかった (Scale bar = 50 μ m)。 (D-F)は隣接切片の DAPI による核染色である。コントロール群(D)では INL, ONL とも細胞核が均一に認められるが、LED1W群(E)では、INL に矢印で示すように細胞核の抜けた穴のように見える様態 (黄矢印) が多数認められた。LED2W群(F)では INL に加えて ONL にも細胞核の抜けた様態 (黄矢印) が層全体に多数認められた。GCL: 神経節細胞, IPL: 内網状層, INL: 内果粒層, OPL: 外網状層, ONL: 外果粒層 (Scale bar = 50 μ m)。

漏出からできる単純浮腫と思われた。また、この浮腫は中心窩付近のみならず網膜全体に同等の頻度で認められた。

そこで次にこれらの浮腫部周囲の細胞が壊れているか否かを検討した。アポトーシスを起こしている細胞には Caspase-3 が活性化することが知られている⁶。そこで LED1W, LED2W の浮腫の認められる網膜において、細胞がアポトーシスを起こしているかどうか、活性化 caspase-3 抗体を用いて免疫染色したところ陽性反応は見られず、浮腫近傍の細胞はアポトーシスを起こしていないことが示唆された (Fig. 3)。

次に炎症により浮腫が生じたのか否かを検討するため、炎症反応時に遊走するマクロファージに発現される MCP-1 の免疫染色をしたところ Fig. 4 に示した通り、MCP-1 の免疫反応はコントロール群と同様、LED ブルーライト照射群で殆ど認められず、炎症によるマクロファージの遊走は認められないと考えられる。さらに VEGF は新たな血管を通じる場所の細胞が分泌する増殖因子であるが⁸、VEGF 免疫反応は殆ど認められず、新生血管は発生していないことが示唆された (Fig. 4)。

GFAP は神経膠細胞のうちアストロサイトで作られる

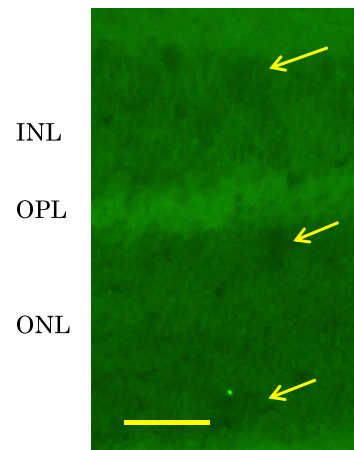


Fig. 3 LED2W 群のマウス網膜 Caspase-3 免疫蛍光顕微鏡写真

LED2W 群マウス網膜において活性化 caspase-3 免疫染色を行ったところ、陽性反応はみられず、黄矢印で示す浮腫が見られる細胞周辺でもアポトーシスによる細胞死は起こしていないことが示唆された (Scale bar = 50 μ m)。

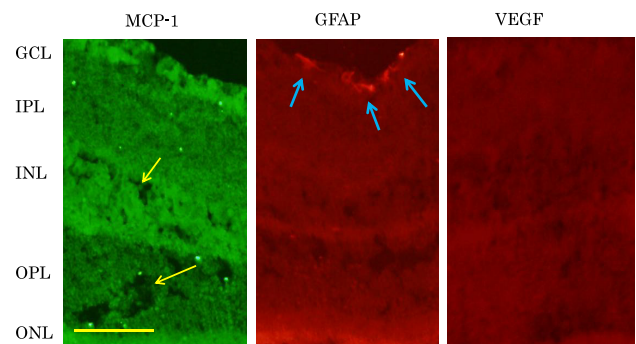


Fig. 4 LED2W 群マウス網膜の免疫蛍光顕微鏡写真

LED2W 群マウスの網膜における免疫蛍光顕微鏡写真である。左は MCP-1 免疫反応で MCP-1 陽性のマクロファージの出現は認められなかった。また黄色矢印で示すように INL, OPL, ONL に黒く抜けたような様態が多数認められた。中央写真は GFAP による免疫染色で、GCL にのみ陽性が認められた (青矢印)。右写真は VEGF による免疫染色で、陽性反応は殆ど認められなかった (Scale bar = 100 μ m)。

タンパク質で、アストロサイトのマーカーとして知られている⁷。GFAP 免疫反応においてはコントロール群と LED ブルーライト照射群いずれにおいても神経節細胞層 (ganglion cell layer; GCL) にのみ認められたが、その量や形態に変化はみられなく (Fig. 4)、H&E 染色で GCL の神経節細胞を観察したが、細胞の形態異常や脱落等も認められないことより三次ニューロンの視神経系には異常が生じていないことが示唆される。

PDGFR β は、血管損傷部位での血液凝固機序により放出される血小板由来増殖因子の結合によって活性化する因子として知られており⁸、血管における炎症や創傷治癒の過

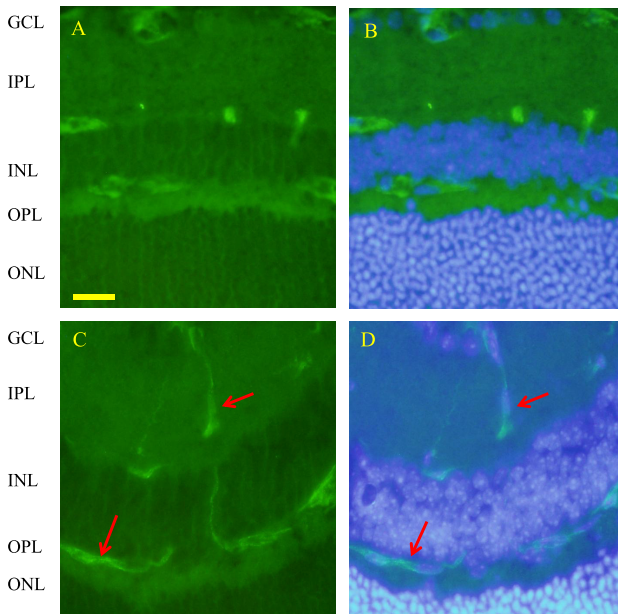


Fig. 5 PDGFR- β 抗体による免疫蛍光顕微鏡写真

PDGFR- β による免疫蛍光顕微鏡写真である。コントロール群(A)では GCL や INL に近接して PDGFR- β 陽性細胞が認められた。LED2W 群(C)では陽性細胞の数に変化はないが赤矢印で示すように PDGFR- β 陽性細胞の突起が大きく伸展していることが認められた。(B&D)は DAPI による核染色写真との合成写真である。PDGFR- β 陽性反応は血管を取り囲む壁細胞に認められた。(Scale bar = 20 μ m)

程で発現が上昇する。今回の免疫反応では、Fig. 5Aに示すように、コントロール群では GCL と INL に近接する血管近傍おそらく血管壁の細胞に PDGFR- β 陽性反応が認められた。Fig. 5C で示すように LED2W 群ではそれらに加えて PDGFR- β 陽性反応は内網状層(inner plexiform layer : IPL) や INL 内に向かって、突起を長く伸展しているような陽性反応が認められた(赤矢印)。DAPI による核染色と比較したところ血管壁のペリサイト様細胞であることが示唆された(Fig. 5B&D)。なお上記の様な浮腫や免疫反応等の変化は黄斑部では認められなかった。

4 考察

本研究より、LED ブルーライトは強い光エネルギーをもって暴露し、マウスの網膜において広範に浮腫を起していることが明らかとなった。また LED の照射を1週間、2週間と継続するにつれて内果粒層から外果粒層へ広範に拡がっていることが明らかになった。また、炎症性マクロファージのマーカーである MCP-1 は免疫反応陰性で、マクロファージの出現は認められなかったと思われる。また GFAP 陽性のアストロサイトにはいずれも変化はなく LED ブルーライトにより神経細胞層におけるニューロンやグリア細胞

の異常は認められなかったと思われる。血管増殖因子である VEGF 抗体による免疫反応ではいずれも変化はみられず、血管新生はまだ起こっていないことが示唆される。

PDGFR- β は血管内皮細胞の周りの壁細胞(ペリサイト)に認められる。コントロールマウスでは視神経細胞層や内果粒層に近接する部に陽性細胞が散在して認められる。しかし PDGFR- β 陽性細胞は2週間の LED 照射により陽性細胞の形態が変化し、突起が長く伸展していることが認められた。血管内皮細胞のすぐ外側に存在するペリサイトは被覆率をあげて血管からの透過性を守るとされる^{9,10}。今回おそらく浮腫により透過性が上昇した血管内皮細胞を、その周囲にあるペリサイトが被覆率をあげて透過性を抑えようと、活発に突起を伸ばしていることが考えられる。また網膜の浮腫が起きている部分において細胞内に Caspase-3 活性が発現していなかったことより、視神経細胞や果粒細胞でアポトーシスを起こしていないことが示唆される。したがって、マウスの網膜は LED ブルーライトの照射によって、アポトーシスによる細胞死を起しているのではなく、特に内果粒層・外果粒層部で、広く単純な浮腫¹¹が起きていることがいえる。そして、LED ブルーライトによる暴露時間が長時間にわたるほどその影響は強いことと考えられる。

眼に入った光は、一度網膜全層を通過して桿状体、錐状体によって感受され、その興奮が内方に向かって伝わり、最後は神経線維によって眼球から出る仕組みとなっている。内果粒層部は、視覚伝導路の第二ニューロンにあたる双極細胞の細胞体の存在する層で、さらに水平細胞やアマクリン細胞、ミュラーの支持細胞の細胞体も含まれている。LED ブルーライト1週間照射群でこの内果粒層に浮腫が認められたことより双極細胞などの組織の働きが障害されていることが示唆される。

外果粒層部は、明るさや色の感覚をつかさどる桿状体細胞・錐状体細胞の核が存在する層で、発生学的にはこの細胞層を視覚伝導路の第一ニューロンといわれる¹²。LED ブルーライト2週間照射群でこの部分にも浮腫が認められたことより桿体錐体細胞の働きも障害されていることが示唆され、視野が見えにくくなる等マウスの視覚に何らかの異常が起こっていることが考えられる。また、今回実験動物として使用したマウスは夜行性であるため、LED ブルーライトの照射時間中の明期における活動時間は短い。したがって、マウスへの LED ブルーライトの曝露量は少ないはずである。しかし、その比較的短い照射時間のなかであっても本研究の結果で示すように網膜に浮腫を起したことより LED ブルーライトの脅威は大きいといえる。今回

の研究では黄斑変性を比較的起こしやすいとされる C57BL/6J マウスではなく C57BL/6N マウスを用いたためか黄斑部の変性は認められなかった。また今回の研究では一定期間 LED ブルーライトの照射直後のマウス網膜の観察であったため、今回認められた浮腫の出現がこれから回復するのか、あるいは悪化するのか、そのままであるのかは不明であり、LED ブルーライト照射後のマウスの網膜を経過観察していくことも必要である。また今後網膜障害予防の研究として抗酸化作用をもつアスタキサンチン等の投与実験で、このマウスをモデルとして検討していきたいと考える。

文献

- 1 飛田満彦 (1998) 色感覚と色知覚, 色から吸収スペクトルへの道, “色彩科学”丸善出版, 東京, pp.30-31.
- 2 小紫正樹 (2010) LED 照明の現状と将来. 照明学会誌, 94: 220-223.
- 3 Kitai A (2011) Principles of solar cells, LEDs and diodes : the role of the PN junction, [宇佐美徳隆 監訳 (2013) 太陽電池と LED の原理, “発光ダイオード”, 丸善出版, 東京, p.232.
- 4 Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M, et al. (2003) Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population: the Hisayama study. Br J Ophthalmol, 87: 469-472.
- 5 Suzuki M, Tsujikawa M, Kamei M, et al. (2012) Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. J Cell Sci, 125: 2407-2415.
- 6 小澤美奈子 (2006) 細胞死, アポトーシスのシグナル伝達, アポトーシスの実行, “細胞生物学”(永田和弘, 中野明彦, 米田悦啓 編) 東京化学同人, 東京, pp.155-156.
- 7 Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al. (2008) “Molecular cell biology” [石浦章一, 榎森康文, 堅田利明, ほか訳 (2010) 細胞の増殖と分化, 細胞の誕生, 分化, そして死, “分子細胞生物学第 6 版”東京化学同人, 東京, p.822.]
- 8 Cooper GM, Hausman RE (2007) “The cell : a molecular approach” [小澤美奈子 (2008) 細胞死と再生, 幹細胞と成体組織の維持, “クーバー細胞生物学”(須藤和夫, 榎田利明, 榎森康文, ほか 訳) 東京化学同人, 東京, pp.579-580.
- 9 Daneman R, Zhou L, Kebede AA, et al. (2010) Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. Nature, 468: 562-566.
- 10 Armulik A, Genovè G, Betsholtz C, et al. (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature, 468: 557-561.
- 11 永井秀一 (1979) 総論, 浮腫の考え方 “浮腫 : 成因, 診断, 治療”(吉田尚, 今井正, 海老原昭夫 編) 永井書店, 大阪, p.1.
- 12 金原優 (1993) 感覚器系, 視覚器 “標準組織学各論”(藤田尚男, 藤田恒夫 編) 医学書院, 東京, pp.432-435.