

## 無眼球症 (anophthalmos) ラットの発症抑制

岩本壮太郎、\*川野 純一、\*\*伊吹 太希

### Inhibition of anophthalmos in rats

Soutarou Iwamoto, Jun-ichi Kawano and Taiki Ibuki\*\*

#### Abstract

Reduction in the occurrence of anophthalmos (congenital absence of the eye) in genetically predisposed rats through the use of supplements was demonstrated here. The KUHWR rats used in the present experiments were bred in the authors' colonies, and anophthalmos, defined as the absence of one or both eyes, was observed in 53.4% of fourth-generation rats (F4). Among the fifth-generation progeny (F5) born to F4 parents with anophthalmos of both eyes (W-type), anophthalmos occurred in 100 of 195 (51.3%) progeny that were born to F4 parents with anophthalmos of both eyes (W-type) following normal pregnancy, (F5-0). In the experimental group F5-a, anophthalmos occurred in 37 of 71 (52.1%) progeny born to F4 parents that were given a 50% moromi (mash) vinegar solution in place of drinking water from start of gestation to three weeks postparturition. Similarly, no inhibitory effects were observed in progeny in the experimental group F5-b, which were born to F4 parents that were given lutein (6 mg/day) as a supplement in regular drinking water, as indicated by occurrence of anophthalmos in 65 of 121 (53.7%) progeny. Subsequently, progeny born to W-type F5-a and F5-b parents under normal breeding conditions showed markedly decreased occurrence of anophthalmos with 14 of 48 rats (29.2%) and 41 of 148 (27.7%) progeny in groups F6-a and F6-b, respectively, showing anophthalmos. These results suggest that administration of moromi vinegar and lutein improved the constitution of F5 rats and subsequently reduced the occurrence of anophthalmos in F6 rats. Three months after this experiment, anophthalmos was observed in 46 of 69 (group F5-c, 66.7%) progeny born to F4 parents under normal breeding conditions. Subsequently, anophthalmos was observed in 32 of 73 (group F6-c, 43.8%) progeny born to group F5-c W-type parents, indicating that the clear reduction in anophthalmos observed in groups F6-a and F6-b compared to groups F5-a and F5-b was due to moromi vinegar and lutein, and the effects of these supplements were thought to be transient.

Key words : Anophthalmos, rat, Moromi biniger, Lutein

キーワード：無眼球症、ラット、モロミ酢、ルテイン

2007.11.12受理

#### 緒言

著者らは、無眼球症 (anophthalmos)・小眼球症 (microphthalmos) を発症する Wistar 系ラット

(KUHWR-rat) を開発した。このラットは偶然に発見されたものであるが、4世代の継代繁殖によって平均50%前後の発症率が維持されている(表1)。自然発生した今回の系統は、こうした類の奇形の原因究明や、遺

伝子組み換えによる治療の可能性、治験薬の開発に大きく寄与することができる。また、高齢者のQOL向上の一端として緑内障、白内障等の眼疾患予防薬の開発は緊急の課題であるが、その実験動物としての可能性も考えられる。このラットの系の確立と遺伝子情報は貴重な実験動物の獲得をもたらす。実験の第一段階として、発症抑制の可能性の検討を進めた。

形態学的な事実として、1. 上述の無眼球症、小眼球症のほかに眼球が存在しているにもかかわらず視神経の欠損例や眼球サイズに様々な変異例が存在する。視神経欠損例の眼球の網膜は正常例の網膜と構造的な差異は見られない。2. 眼球あるいは視神経の存在しない例でも視交叉以降の視索が存在し、左右の視索を結ぶ交連線維が存在する。

継代繁殖により、その発症率は高くなっているが、小眼球症あるいは中間的な変異も増加するようになった。したがって、これらの症例はall or non で発生するというよりは、発生あるいは発育の過程で、器官形成における何らかの発育障害が生じているように思われることから、佐藤焼酎製造場からの依頼があったモロミ酢の有効利用の実験として計画した。比較材料として、カロテノイドの一種であるルテインを使用した。その結果、いずれも2世代後に、高い抑制効果を示すデータが得られた。

### 材料および方法

本研究の対象となったKUHWR-atラットは、外見上、全盲 (W-type)、片目 (S-type)、正常 (N-type) の3群に分けられるが、その生態の観察では全盲のラットは音に敏感で、行動のための感覚は主として洞毛あるいは下顎切歯による触覚が中心である。交配は一部の例外を除いて、両眼球を失ったもの (W-type) 同士で行われた。第4世代 (F4) では見られなかった小眼球症 (M-type) は眼球の直径が正常ラットの50%以下のものとした。M-typeは両眼球とも小眼球症であるもの (M-type) のほかに、片眼が正常であるMN-type、片眼のみであるもの (SN-type) のほか、後述のMn-typeがある。各個体の解剖結果から一見正常に見える眼球でも、片眼あるいは両眼球が正常な眼球よりもやや小さい (直径が60~80%) のものがあり、これらは中眼球例 (n-type) として分類し、両眼球とも中眼球症のものは (nn-type)、片側が正常で片側が中眼球例であるもの (Nn-type)、片側が無眼球症で片目が中眼球症であるもの (Mn-type) がある。また、外見上、W-typeに分類されていたもののうち3例では片側が小眼球症の例 (眼

閉鎖症=Ankyloblephalonの併存) であったが、これらはSM-typeに分類した。無眼球症発症例はS型およびW型のものとした。

焼酎製造後に残る残渣 (焼酎滓) は従来、廃棄されていたが近年、これらの処分に規制が加えられたこともあり、焼酎製造各社はそのリサイクルとして、家畜飼料、バイオエタノールの抽出などに工夫を凝らしている。延岡の佐藤焼酎製造場ではいち早く、この焼酎滓から抽出したモロミ酢を熊本工業大学との共同研究で胃癌の抑制効果を持つ健康飲料の開発に結び付けることに成功している。今回は、このモロミ酢の有効性について本学との共同研究として行われた。また、効果の比較・検討する材料として眼疾患の予防効果があるとされるブルーベリーを検討したが、実験当初に入手が困難であったため、某製薬会社が発売しているサプリメントのルテインを使用した。当初の計画では緑内障や白内障等の視覚障害に対する予防効果が高いとされるアントシアニンを含有するとされるブルーベリーを使用する予定であったが、定期的に入手し難いこともあり、類似する効果があるとされるルテインを使用することにした。

本実験は、平成17年度「九州保健福祉大学動物実験管理委員会」の承認の下に行われた。

### 結果

#### 1. KUHWR-atの系譜

この特殊な遺伝的素因を持つラットの系譜の詳細は報告<sup>1)</sup>済みであるが概要を表1に示した。この表に見られるとおり、第4世代 (F4) ではanophthalmos発症例 (両眼もしくは片眼を失っている) は53.4%であった。両眼を失った (W-type) F4の個体から産まれた第5世代 (F5) の通常出産 (F5-0) では195頭のうち100頭 (51.3%) でanophthalmosを発症していた。

	F1	F2	F3	F4
N	8	38	57	35
Nn	0	0	0	0
SN	0	16	17	17
W	0	0	13	23
計	8	54	87	75

表1. KUHWR-atの系譜

2. モロミ酢の効果

同一のF4世代において、妊娠から生後3週までの間、飲料水に代えて50%に希釈したモロミ酢を与えて出産・育児をさせた結果、実験群（F5-a）では71例中37例（52.1%）に発症し、その抑制効果は認められなかった。しかし、F5-a群が通常飼育で出産したF6-a群では無眼球症は48頭中わずか14頭（29.2%）であり、明らかに抑制効果が認められた。しかし、このF6-aが通常飼育で出産したF7-a群では発症例は再び64例中45例（70.3%）と著しく増加していた。（表2）

	F5-0	F5-a	F6-a	F7-a	F6-aN
N	68	21	15	12	28
Nn	17	11	16	1	14
nn	10			2	
MN				2	
Mn		2	3	2	
M				0	
SN	45	15	9	17	6
Sn	17			8	
SM				3	
W	38	22	5	17	2

表2. モロミ酢飲用による変化

3. ルテインの効果

同様に水は通常のものを与えサプリメントとしてルテイン（6 mg/day）を投与した実験群での出産（F5-b）でも121例中65例（53.7%）が発症し、モロミ酢と同様に抑制効果は認められなかった。しかし、この実験群（F5-b）のW-typeが通常飼育で産んだF6-bにおける無眼球症の発生率は148例中41例（27.8%）と著しく改善された。（表3）

	F5-0	F5-b	F6-b	F6-bN	F5-d	F6-d
N	68	34	41	10	12	20
Nn	17	14	41	8	6	16
nn	10	1	12	0	1	2
MN		2	8	0	3	0
Mn		1	5	2	1	3
M		4	0	0	0	0
SN	45	29	20	4	16	8
Sn	17	4	10	0	10	5
SM		1	3	0	5	3
W	38	31	8	0	15	16
計	195	121	148	24	69	73

表3. ルテイン服用による変化

これらの結果は、モロミ酢・ルテインによって第5世代の体質が改善され、第6世代での無眼球症の発生率低下をもたらせたことを示唆するものであった。一方で、F5-aの正常な眼球を持つF5-aN typeが産出したF6-aNでも50例中8例（16%）が発症しており、正常例でも遺伝的要因は維持されていると考えられる。また、F5-bの正常な眼球を持つF5-bN typeが産出したF6-bNでも24例中4例（16.7%）で発症しており、ほぼおなじような結果が得られた。ただし、F6-aN 群では両眼に発症したものの2例、一眼に発症したものの6例であったのに対しF6-bNの4例はすべて一眼で発症したものであった。

4. 効果の持続性

この実験の3ヵ月後、F4群が通常飼育で産出したF5-d群では69例中46例（66.7%）が無眼球症を発症している。このF5-d群が産出したF6-d群では73例中32例（43.8%）が無眼球症を発症しており、F5-a, F5-b群に比べてモロミ酢・ルテインの効果は明らかに低下していた。

考察

従来、食物実験等で人為的に発症させた例はあるが、本例のような自然発生的眼球喪失例は通常、SD系ラットで20%、Wister系では1%程度の発症率であり、KUHWRatは眼疾患に関する実験動物としては画期的な発症率といえる。また、無眼球症・小眼球症の発症（催奇形性）抑制効果の実験についても確認できる素因を持つ。一方で、発症例が100%を示していないことから、こうした遺伝的な異常の発生は抑制できる可能性があるのではないかという疑問から、本実験を開始した。

本実験は以下の点でこれまでにない研究結果をもたらせた。1. 無眼球症、小眼球症、視神経の欠損の実例は、少数例であり今回の研究により多数の資料が蓄積された。2. 視神経は網膜の神経節細胞の線維であり、網膜が正常であるにもかかわらず線維が伸長しないという特異的な変異はこれまでの報告にない。3. ラットにおける視索の中に交連線維があることは報告されていたが、視神経が欠損する無眼球症でも存在することは、これらの繊維が視覚情報以外にも役割を持つことを示唆している。

1. 無眼球症（Anophthalmos）の素因

これまでにも無眼球症ラットの報告<sup>2-4)</sup>はあるが、これほど多数の発症例は見られない。無眼球症の原因については、ビタミンAの欠乏、亜鉛の欠乏、硝子体動脈のapoptosisなど多くの説<sup>5-11)</sup>が報告されているが決定的な素因は明らかになっていない。また、その遺伝的要因として転写制御因子 Pax 6 が関わっているという説<sup>12-14)</sup>

が有力である。マウスでは Pax6 がヘテロの場合は片眼の小眼球症になるが、ホモの場合は鼻咽道の形成も不十分になり、授乳困難が原因で育たないとされている。ラットではこのような現象は見られず、小数の原因不明な乳児期の死亡例や、育児放棄例を除いて育児は正常に行われた。無眼球症は遺伝的素因によって生じるとされ、その発症は悉無率 (all or non) に従うと考えられてきた。これまでの著者らの観察では、小眼球症や中眼球サイズの症例など、不完全な移行型が認められることから、発生あるいは発育途上での形成不全、発育不全によって生じる可能性が高い。Pax6 が眼球形成にかかわっていることは明らかであるが、そのかわりには必ずしも、all or non ではなく、形成・発育の阻害因子による、あるいは阻害要因の抑制因子の欠損・不足が生じるためと考えるのが妥当である。

## 2. モロミ酢・ルテインの効果

実験に用いたモロミ酢は佐藤焼酎製造場が生産している製品で、このモロミ酢を用いて Kadota らが癌細胞の増殖抑制効果があることを報告<sup>15,16)</sup>し、粉末化したものを素に、清涼飲料水として販売を開始している。今回、モロミ酢の供給を受けて出産・育児された F5 世代には効果が認められず、その子供である F6 世代で効果が現れたことは予想外の結果であったが、投与前の F5-0 や投与を停止した後に出産した F5-d および F6-d の結果を見る限り、F5-a がモロミ酢の影響を受けていることは明らかである。すなわち F5 世代の体質が改善され、その結果として F6 世代での発症を抑制したことを示唆している。

比較検討する目的で用いたサプリメントのルテインは、視覚器に与える効果が大きく、緑内障・白内障の予防効果があるとされてきた<sup>17,21)</sup>が、今回はこれを裏付ける結果となった。

## 3. 神経学的課題

ヒトの視覚は平行視であることから視交叉は半交叉であり、視野の大部分が左右の眼球に重複しており、左右の視野が対側の脳皮質に投影されることが知られている。一方、ラットは霊長類の一部を除く多くの哺乳類と同様に左右の眼球の視野が重複する部分はほんの一部であり、視交叉では約 95% が対側へと交叉するとされている。また、視索には網膜由来の視神経線維のほかに、左右の視索を結ぶ交連線維が存在することが文献に記載されている。これらの線維は左右の上丘・外側膝状体(背側・腹側)・背側終核・旁二連核に端を発する線維である<sup>22)</sup>とされているが、ヒトではこのような線維の報告はない。視覚情報の中枢へのつながりについて、非対側性や視床核・上丘・脳幹間の相互連絡などの部分的報

告<sup>23,29)</sup>はあるが、交連線維の意味については明らかではない。視神経の存在しない状況での交連線維を含めたこれらの線維がどのような役割を持つのかが注目される。

Rao と Diwan<sup>30)</sup>は無眼球ラットにおける光刺激(日周期の変化)の変更による影響について、その影響はほとんどないことを報告している。KUHW-rat においても、無眼球ラットの行動は特に正常ラットと異なるところはないが、視覚情報を遮断された無眼球ラットは音に敏感であること、行動のための情報は主として、聴覚・洞毛・下顎切歯の触察に頼っている。

ヒトにおける感覚統合は少子化が進行している現在、とりわけ幼児教育、発育・発達障害の領域において重要な課題となっている。その研究は少数例の試行錯誤を頼みとしており、その成果は遅々として歩むことができない。実験動物としてのラットはさまざまな試行を可能にする。ラットとヒトではそのレベル差が大きいことを踏まえても、多くの研究者が参画できることの意義は大きい。本研究は、モロミ酢そのものを使い、さらに同様の効果を持つ添加物を加え、特定食品としてではなく、一般家庭で使える食品への応用を考えている。

本研究は独立行政法人「科学技術振興機構」平成 17 年度、実用化のための育成研究課題(奇形ラットを利用した健康食品の効用に関する研究)の補助金を受けて行われた。

## 文献

1. 岩本壮太郎, 園田徹, 川野純一 他: 眼瞼閉鎖ラットの形態学. 2. 無眼球症. 九州保健福祉大学研究紀要 7: 195-198, 2006
2. 渋谷一元: 実験動物における眼疾患—その 1—日本生物化学研究所報告. 1-4: 2005
3. Williams D: Laboratory animal ophthalmology - An overview. *Animal Technology* 43: 147-165, 1992
4. Bardakjian TM, Steinberg L, Schneider A. The genetics of anophthalmia/ microphthalmia. *J Ophthalmic Prosthet.* 2: 15-22, 1997
5. Kallen B, Robert E, Harris J, : The descriptive epidemiology of anophthalmia and microphthalmia. *Int J Epidemiol*, 25: 1009-16, 1996
6. Padmanabhan R, Singh G, Singh S: Malformations of the eye resulting maternal hypervitaminosis. A during gestation in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 110 (4): 291-8, 1981

7. Snodderly DM : Evidence for protection against age - related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr ; Supplement* 62 : 14485-14615, 1995
8. Seddon JM et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age related macular degeneration. *JAMA*, 272 : 1413-1420 1994
9. Cellerino A, Bahr M, Isenmann S. Apoptosis of the in the developing visual system. *Cell Tissue Res.*, 301 : 53-69. 2000
10. Rogers JM and Hurley LS, Effects of zinc deficiency on morphogenesis of the fetal rat eye. *Development* 99 ; 231-238, 1987
11. Taniguchi H, Kitaoka T, Gong H, Amemiya T. :Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye., *Anat Anz.* 181 : 555-60. 1999
12. Shibuya K, Tajima M & Nunoya T  
Anophthalmia and retinal Degeneration associated with stenosis of the optic foramen in Fischer 344 Rats. *Vet Pathol* 37 : 264\_267 2000
13. Azuma N, Tadokoro K, Asaka A et al. : The pax6 is isoform bearing an alternative spliced exon promote the development of the neural retinal structure. *Human Molecular Structure*, 14 : 735-745, 2005
14. Macdonald R & Wilson S : Distribution of Pax6 protein during eye development suggests discrete roles in proliferative and differentiated visual cell. *Dev Genes Evol*, 206 : 363-369, 1997
15. Lyon MF, Bogani D, Boyd Y et al. : Further genetic analysis of two autosomal dominant mouse eye defect, *Ccw* and *Pax6* coop. *molecular vision*, 6 : 199-203, 2000
16. 廣瀬茂、田神修、家藤治幸、松本陽子、上岡龍一  
焼酎蒸留粕（廃液）を利用した新素材転換システムに関する基礎研究—がん細胞増殖抑制効果— *化学工業論文集* 28:621-625, 2002
17. Kadota Y, Hirose S, Iefuji H et al. : Inhibitory effect of extracts from Shouchu distillation remnants on the growth human stmac tumor cells. *J Chemical engineering Japan*, 38 : 157-157, 2005
18. Peng YM et al. : A nonsaponification method for the determination of carotenoids , retinoids, and tocopherols in solid human tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2 : 139-144 1993
19. Yeum KJ, Taylor A, Tang G, RussellRM. : Measurement of carotenoids, retinoids, and to copherols in human lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36 : 2756 – 2761, 1995
20. Bone RA, Landrum JT, Hime GW, Cains A, Zamor J : Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34 : 2033–2040, 1993
21. Snodderly DM Evidence for protection against age–related macular degene & ation by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr*, Suppl 62 : 1448S–1461S, 1995
22. Ikeda Y., Takahashi S, Kimura J, Cho YM, Imaida K, Shirai, S, and Shirai, T : Anophthalmia in litters of female rats treated with the food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. *Toxicol Pathol*, 27 : 628-631, 1999
23. Sefton AJ, Dreher B & Harvey A, Visual system. *The rat nervous system*,; 3rd ed. Elsevier Academic Press (Ed.Paxinos G) , San Diego, USA, pp1083-1165, 2004
24. Yamasaki DS, Krauthamer G. and Rhoades RW : Organization of the intercollicular pathway in rat. *Brain res*, 300 : 368-371, 1984
25. Moore RY, Weis R, and Monga MM : Efferent projections of the intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus. *Comp Neurol*, 420 : 398-418, 2000
26. Foster GA, Sizer AR, & Roberts MHT : Afferent projections to the rostral anterior pretectal nucleus of the rat; A possible role in the processing of noxious stimuli. *Neuroscience* 29 : 685- 694 ,1989
27. Land PW, Lund RD. Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science*, 205 (4407) : 698-700, 1975
28. Tokunaga A, Sugita S, Otani K :

- Uncrossedretino-geniculate and retino-tectal projection in the hereditary unilaterally microphthalmic rats. *Neurosci Res*, 4 : 195-210, 1987
29. Tokunaga A, Sugita S, Otani K et al. : Uncrossed retinal projection to the medial nuclei. *Exp Neurol*, 95 : 516-20, 1987
30. Lund RD, Miller BF.: Secondary effects of fetal eye damage in rats on intact central optic projection. *Brain Res*. 92 : 279-89, 1975
31. Rao SH, Diwan PV. A behavioral profile of bilateral anophthalmic mutant rats. *Exp Anim*, 44 : 67-9, 1995