

## 糖尿病ラットにおける角膜上皮細胞増殖能

山本 成章<sup>1)</sup>, 片上千加子<sup>2)</sup>, 山本 節<sup>2)</sup><sup>1)</sup>三菱神戸病院眼科, <sup>2)</sup>神戸大学医学部眼科学教室

## 要 約

糖尿病角膜上皮症の発症機序解明の一助とする目的で, ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを作製し, 糖尿病発症後, 1, 2, 3, 6 か月目における角膜上皮細胞増殖能について<sup>3</sup>H-チミジンオートラジオグラフィで検討した。糖尿病ラットにおいて, 発症後 1 か月目では正常ラットと比較して角膜上皮層の厚さは薄く, 上皮細胞増殖能は低下していたが, 2 か月目では正常ラットとほぼ同等であった。3 か月目の糖尿病ラットでは上皮の接着性の低下を示す所見を認め, 上皮細胞増殖能は正常ラットに比

して亢進していた。発症後 6 か月目では正常ラットと同等であった。3 か月目の糖尿病ラットにおける角膜上皮細胞増殖能の亢進は, 角膜上皮の turnover の亢進を示唆する所見と考えられた。(日眼会誌 102:475—480, 1998)

キーワード: ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット, 角膜上皮細胞増殖能, <sup>3</sup>H-チミジンオートラジオグラフィ, 糖尿病角膜上皮症, 糖代謝異常

## Proliferation of Corneal Epithelial Cells in Diabetic Rats

Naruaki Yamamoto<sup>1)</sup>, Chikako Katakami<sup>2)</sup> and Misao Yamamoto<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Mitsubishi Kobe Hospital<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

## Abstract

In order to elucidate the mechanisms of diabetic corneal epitheliopathy, we investigated the proliferation of corneal epithelial cells of streptozotocin-induced diabetic rats in the 1st, 2nd, 3rd and 6th months after the onset of diabetes using <sup>3</sup>H-thymidine autoradiography. After the 1st month in diabetic rats, histological examination revealed that corneal epithelial layer was thin, and proliferation of corneal epithelial cells was decreased compared with that of normal untreated rats. After the 2nd month, proliferation of corneal epithelial cells showed no difference from normal rats. After the 3rd month in diabetic rats, the attachment of the epithelial layer to the stroma was loose and proliferation of corneal epithelial cells was increased compared

with that of normal untreated rats. After the 6th month, proliferation of corneal epithelial cells showed no difference between diabetic rats and normal rats. We suggest that increased turnover rate of corneal epithelial cells may account for increased proliferation of corneal epithelial cells in diabetic rats during the 3rd month. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 475—480, 1998)

Key words: Streptozotocin-induced diabetic rat, Proliferation of corneal epithelial cells, <sup>3</sup>H-thymidine autoradiography, Diabetic corneal epitheliopathy, Sugar metabolism disorder

## I 緒 言

糖尿病眼合併症の一つに角膜上皮障害をあげることができる。糖尿病患者では白内障手術や硝子体手術, 光凝固などを契機として角膜上皮障害を発症することが多く, 糖尿病患者の角膜上皮には潜在的な異常が存在し, 手術侵襲が加わることによって臨床的に問題となる角膜障害

が生じると考えられる。その発症機序については不明な点が多いが, アルドース還元酵素の関与する糖代謝異常の関与が示唆されている。糖尿病角膜上皮症発症機序解明の一助とする目的で, 今回著者らはストレプトゾトシン投与による糖尿病ラットを作製し, <sup>3</sup>H-チミジンを用いたオートラジオグラフィによって糖尿病発症後, 1, 2, 3, 6 か月目における角膜上皮細胞増殖能について正常ラット

別刷請求先: 652-0863 兵庫県神戸市兵庫区和田宮通 6-1-34 三菱神戸病院眼科 山本 成章

(平成 9 年 5 月 21 日受付, 平成 10 年 3 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Naruaki Yamamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Mitsubishi Kobe Hospital, 6-1-34 Wadamia-ori, Hyogo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 652-0863, Japan

(Received May 21, 1997 and accepted in revised form March 13, 1998)

と比較検討したので報告する。

## II 実験対象ならびに方法

実験動物として、体重 120 g のウイスター種ラットを 43 匹 86 眼使用した。これらに対して 80 mg/kg 体重のストレプトゾトシン(和光純薬工業)を腹腔内に投与し、投与後の血糖値が 300 mg/dl 以上になったものを糖尿病発症ラットとした。糖尿病発症ラットに関しては 1 週間毎に血糖を測定し、糖尿病状態の継続を確認すると同時に眼球摘出時に正常血糖値を示すものは除外した。糖尿病発症後、1, 2, 3, 6 か月後に糖尿病ラットと同週齢の無処置ラットを各々ベントバルビタールナトリウム(ネプタール®)腹腔内過量投与による致死後、眼球摘出を行った。摘出眼球を<sup>3</sup>H-チミジン(Amersham, 100~130 Ci/mmol) (10 μCi/ml) を含む培養液(Dulbecco's minimum essential medium) (GIBCO) 中で 37°C 6 時間標識した後、10% ホルマリン固定し強角膜片のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン後、暗室内で 50% コニカ NR-M2 オートラジオグラフィ用乳剤に浸し、乾燥させ、シリカゲル在中の暗箱内で 4°C で保存し、2 週間の露出を行った。露出後暗室内において、フジレンドール(富士フィルム)で 5 分間現像後フジレンフィクス(富士フィルム)で 5 分間定着後、水洗し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。その後、光学顕微鏡下に角膜上皮を組織学的に観察し、各切片における全角膜上皮細胞数および<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み細胞数をすべて計測し、上皮細胞 1,000 個当たりの<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み上皮細胞数を算出した(本動物実験は「動物の保護および管理に関する法律」に則して施行した)。

## III 結 果

糖尿病発症後 1 か月目のラットでは同週齢の正常ラットに比較し低体重であり、全身的に発育遅延が認められた。正常ラットにおいても、この週齢では角膜上皮層は多層化が十分ではなく未熟である所見を認め、糖尿病ラットではより顕著であった。<sup>3</sup>H-チミジン取り込み細胞数は、糖尿病ラットでは正常ラットに比較して有意に減少していた(1% 以下の危険率)(図 1, 表 1)。

発症後 2 か月目では、糖尿病ラットと正常ラットの角膜上皮層の組織所見に顕著な差異を認めなかった。<sup>3</sup>H-チ

ミジン取り込み上皮細胞数は、糖尿病ラットでは正常ラットに比し減少していたが、有意差はなかった(図 2, 表 1)。

発症後 3 か月目では、糖尿病ラットの角膜上皮基底細胞に空胞変性がみられるものが存在した(図 3)。また、糖尿病ラットの角膜上皮基底膜は正常ラットの角膜上皮基底膜に比し肥厚を示し、実質との接着性の低下を示唆する所見(図 4)が認められた。特に、4 眼においては接着性の低下が著明で、上皮が広範囲にわたって実質から剥離していた。眼球摘出時には上皮は接着しており、<sup>3</sup>H-チミジン標識後の標本作製の過程で剥離したものと思われたが、これらの眼球は上皮細胞増殖能の検討対象から除外した。上皮剥離の存在しない糖尿病ラットの<sup>3</sup>H-チミジン取り込み細胞は、正常ラットに比し有意に増加していた(1% 以下の危険率)(図 3, 表 1)。

さらに発症後 6 か月目においては、糖尿病ラットにおいて細胞の空胞変性、基底膜の障害が著しく(図 5)、5 眼において上皮の接着性低下による広範囲にわたる上皮剥離を認めた。眼球摘出時には上皮は接着しており、<sup>3</sup>H-チミジン標識後の標本作製の過程で剥離したものと思われたが、これらの眼球は上皮細胞増殖能の検討対象から除外した。上皮剥離の存在しない糖尿病ラットの<sup>3</sup>H-チミジン取り込み細胞は、正常ラットと有意の差はなかった(図 5, 表 1)。

## IV 考 按

糖尿病患者では内眼手術後や光凝固後などにしばしば角膜上皮障害を発症するが<sup>1)</sup>、その発生機序については不明な点が多い。糖尿病患者では角膜知覚の低下が生じることが古くから知られており<sup>2)-9)</sup>、糖尿病性神経症の一部分症としてとらえられている。最近、角膜知覚神経の機能が正常であることが角膜上皮の維持、増殖に重要であることが明らかとなりつつあり<sup>10)-15)</sup>、角膜知覚の低下した糖尿病患者では角膜上皮障害が生じやすい状態であると考えられる。また、糖尿病患者では涙液分泌も低下しており<sup>16)17)</sup>、涙液成分の異常も報告<sup>17)18)</sup>されている。さらに、糖尿病では基底膜の厚さ、構成成分の変化が全身的に生じるとされ<sup>19)</sup>、角膜上皮では上皮基底膜の肥厚、多層化<sup>20)</sup>、上皮下の沈着物<sup>17)21)22)</sup>、ヘミデスモゾームの減少<sup>23)</sup>、アンカーリング線維の実質への穿通の減少<sup>24)</sup>、上皮基底

表 1 上皮細胞1,000個当たりの<sup>3</sup>H-チミジン取り込み角膜上皮細胞数(個)

月齢	正常ラット	糖尿病ラット
1	29.15 ± 12.58 (n = 10)	11.38 ± 2.91* (n = 10)
2	15.86 ± 3.48 (n = 11)	13.09 ± 3.70 (n = 10)
3	15.76 ± 7.57 (n = 12)	28.64 ± 7.74* (n = 7) (上皮剥離例は除外)
6	11.86 ± 5.05 (n = 8)	14.06 ± 9.10 (n = 5) (上皮剥離例は除外)

\* : 正常ラットの数値との間に有意差を認めた(p < 0.01) 平均値 ± 標準偏差

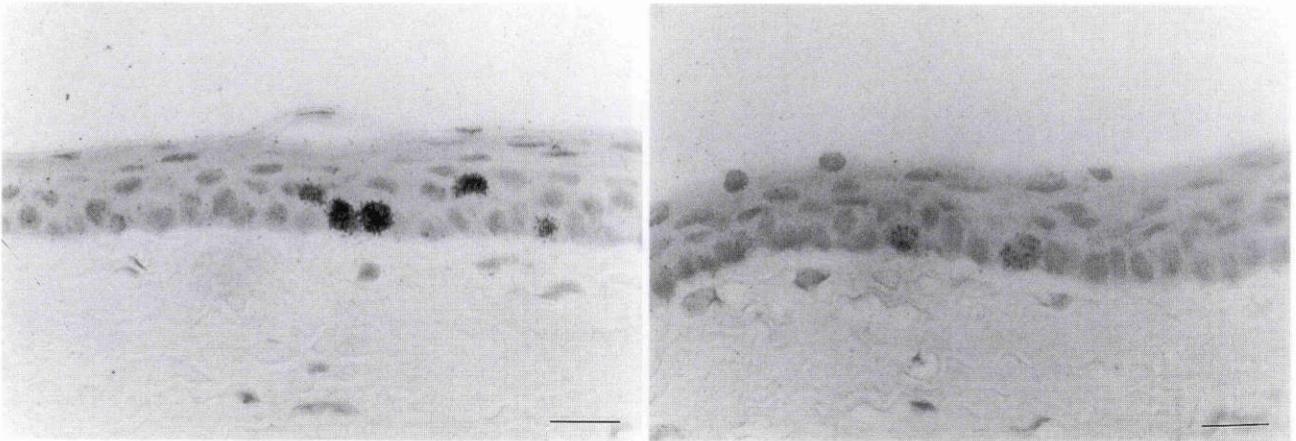


図1 1 か月目の正常ラット(左)と糖尿病ラット(右)の角膜上皮( $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィ). 正常ラットに比較して糖尿病ラットでは角膜上皮層は未熟である所見が認められ, 上皮細胞増殖能も正常ラットに比し低下している. パーは  $10\ \mu\text{m}$

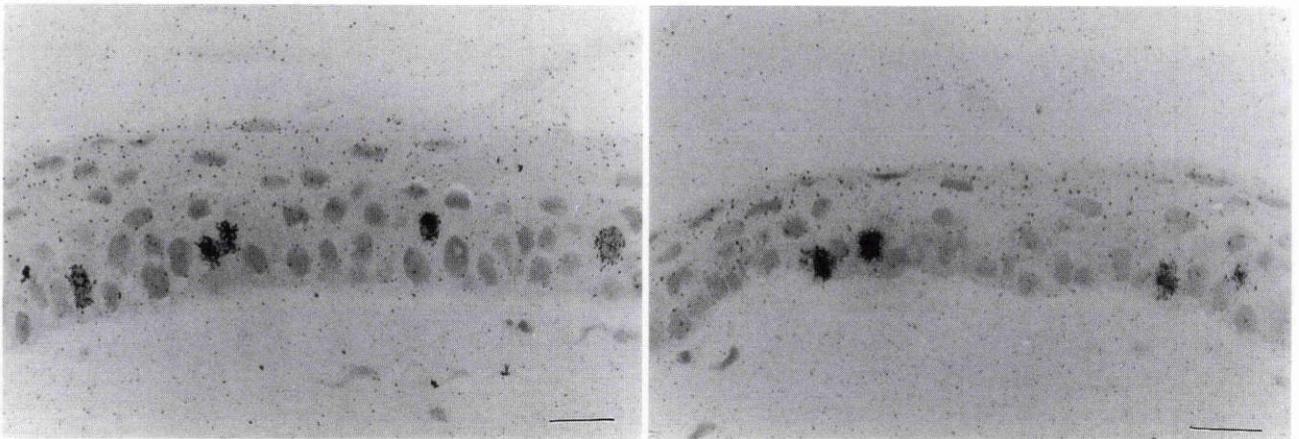


図2 2 か月目の正常ラット(左)と糖尿病ラット(右)の角膜上皮( $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィ). 正常ラットと糖尿病ラットの角膜上皮層の組織学的所見に著明な差異を認めず, 上皮細胞増殖能もほぼ同等である. パーは  $10\ \mu\text{m}$

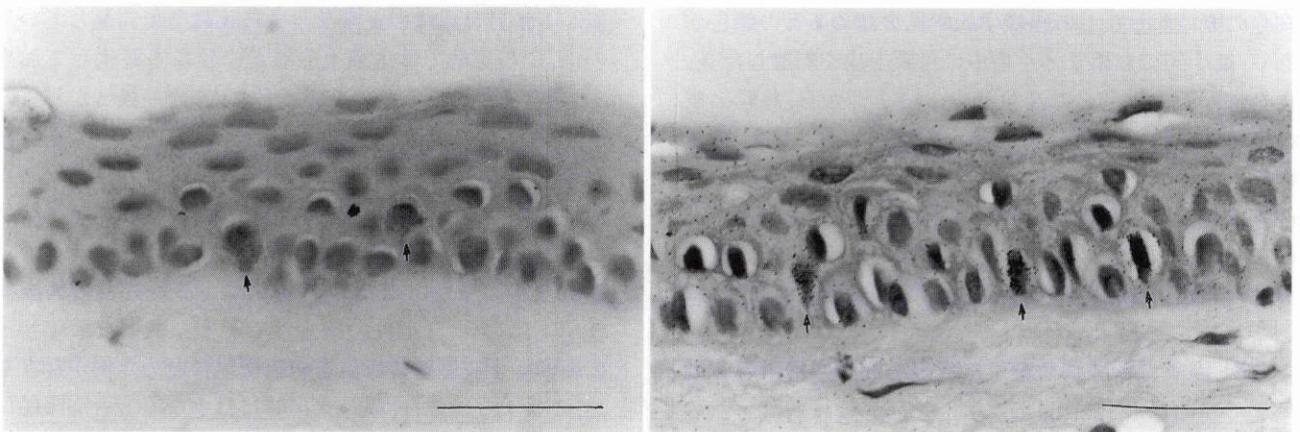


図3 3 か月目の正常ラット(左)と糖尿病ラット(右)の角膜上皮( $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィ). 糖尿病ラットでは上皮細胞の空胞変性が多数認められるが, 比較的健常と思われる基底細胞が $^3\text{H}$ -チミジンを取り込み活発に増殖している. $^3\text{H}$ -チミジン取り込み細胞を矢印で示す. パーは  $10\ \mu\text{m}$

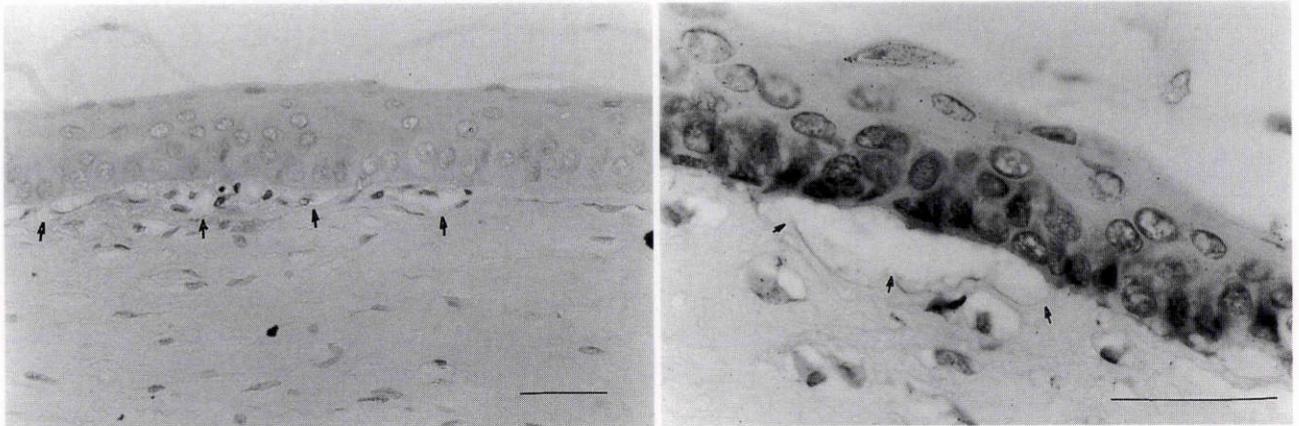


図4 糖尿病ラット3か月目ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の角膜上皮。  
角膜上皮基底膜と実質との間に間隙形成(矢印)を認め、実質との接着性の低下を示唆する所見が認められる。  
バーは20  $\mu\text{m}$ (左)と10  $\mu\text{m}$ (右)

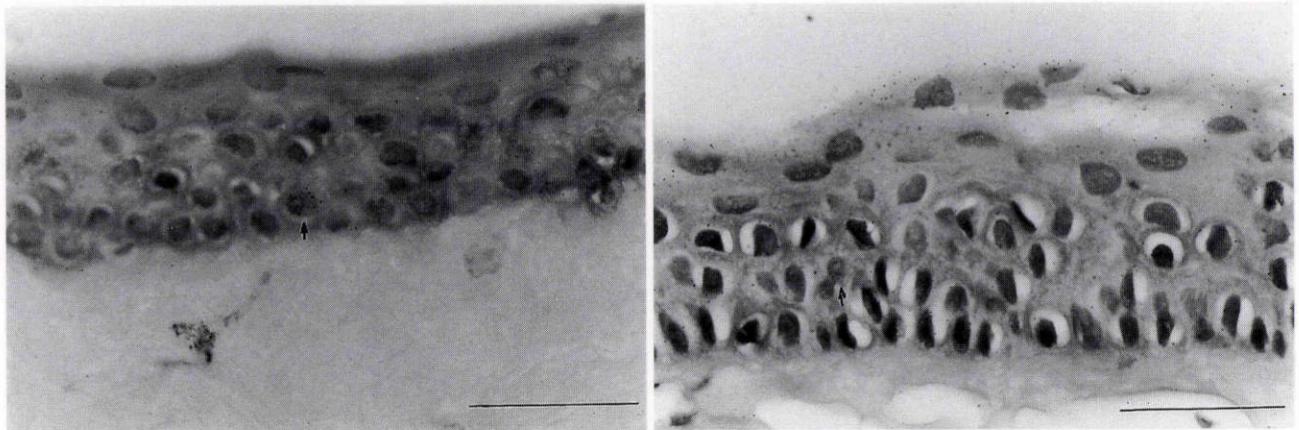


図5 6か月目の正常ラット(左)と糖尿病ラット(右)の角膜上皮( $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィ)。  
糖尿病ラットにおいて基底膜部分の障害,上皮細胞の空胞変性が高度であり,上皮細胞増殖能も低下している。 $^3\text{H}$ -チミジン取り込み細胞を矢印で示す。バーは10  $\mu\text{m}$

細胞の変性<sup>25)~29)</sup>などの組織学的所見を認めるとの報告があり,臨床的にも硝子体手術中に角膜上皮を剥離した後,再発性角膜上皮びらんを生じやすいことから,角膜上皮の接着性の低下が示唆されている。動物においても,糖尿病ラットやガラクトース血症のラットにおいて角膜上皮剥離後の創傷治癒速度の遅延および再生上皮の混濁が認められたと報告<sup>21)30)</sup>されている。しかしながら,糖尿病における角膜上皮細胞増殖能について詳細な検討はほとんどなされていない。

今回,我々は糖尿病角膜上皮症の発症機序解明の一助とする目的で,ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの角膜上皮について糖尿病発症後1,2,3,6か月目において,組織学的および細胞増殖能について検討した。その結果,糖尿病発症後1か月目のラットでは,角膜上皮の未熟性が強く,正常ラットに比較して上皮細胞増殖能も有意に低下していた。正常ラットにおいて角膜上皮細胞増殖

能が2か月目以降の正常ラットに比較して亢進しているのは,この週齢では角膜上皮層が十分に多層化しておらず,発育途中にあるためと考えられた。発症後2か月目の糖尿病ラットでは,正常ラットと著明な差異は認めなかった。3か月目の糖尿病ラットでは,角膜上皮細胞増殖能は正常ラットに比し亢進していた。6か月目の糖尿病ラットにおいては,角膜上皮細胞増殖能は正常ラットと有意な差はなかった。3か月目および6か月目の糖尿病ラットにおいて,上皮の接着性の著明な低下を示唆する広範囲の上皮剥離の所見を組織切片に認めた例が存在した。この上皮剥離は,眼球摘出時には少なくとも肉眼的には存在せず, $^3\text{H}$ -チミジン標識中もしくは以後の切片作製の過程で生じたことが考えられ,上皮の $^3\text{H}$ -チミジン取り込みについての検討には,これらの眼球は除外した。

今回,我々はストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いたが,本実験糖尿病モデルはインスリン依存性糖尿

病の未治療, 血糖非コントロール例に近いと考えられ, 高血糖が持続するため早期から重篤な糖代謝異常による角膜上皮の組織障害を生じていた。すなわち, 糖尿病発症後 3 か月目および 6 か月目において, 角膜上皮基底細胞の異常および上皮の接着性の低下を示す所見が認められた。上皮の接着性の低下が著明で, 上皮剥離を伴っていた群と上皮の接着性の低下が著しくない群とが存在したが, 上皮の接着性の低下の著明な群は, 糖代謝異常による上皮基底細胞の障害が高度であった可能性がある。Thoft<sup>25)</sup>は同様のストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットで糖尿病発症後 8 か月で角膜上皮にソルビトールが蓄積する例と蓄積しない例があると報告しており, 今回のストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいても, 糖代謝異常の高度な例とそうでない例が存在する可能性が考えられる。3 か月目の糖尿病ラットにおいて, 上皮細胞増殖能が正常ラットに比し亢進していたのは糖代謝異常によって上皮基底細胞が障害され, 代償性に比較的障害が軽微な細胞の増殖能が亢進し, 上皮の turnover が活性化された可能性がある。発症後 6 か月になると, さらに糖代謝異常による細胞障害が進行し, 3 か月目に比して全体に上皮細胞増殖能の低下が惹起されたものと考えられる。Thoft<sup>25)</sup>も電子顕微鏡所見で糖尿病発症 3 か月のラットでは角膜上皮細胞は比較的健常であるが, 糖尿病発症 8 か月のラットでは上皮基底膜の肥厚と基底細胞の変性が著明であったと述べている。糖尿病患者においても血糖コントロール不良の例では, 本ラットと類似の病態を生じていることも推測される。

角膜知覚神経に関しては角膜知覚測定ならびに末梢神経染色<sup>27)31)32)</sup>を施行したが, 糖尿病ラットと正常ラットの間に明らかな差異は認められなかった(未発表データ)。しかしながら, ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいて角膜知覚の低下を認めたとの報告<sup>14)</sup>があり, 再検討を要すると思われる。以上, 今回の実験結果から, 本糖尿病ラットでは糖代謝異常によると考えられる角膜上皮の接着性の低下と上皮細胞障害を認め, 糖尿病の経過中に角膜上皮細胞の増殖能の亢進を示す時期が存在し, 以降増殖能が低下することが明らかになった。組織切片上, 角膜上皮剥離の出現した例については, さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

## 文 献

- 1) Gary NF, Richard AT, Henry DP, Felentino IT: Factors related to corneal epithelial complications after closed vitrectomy in diabetics. Arch Ophthalmol 97: 1076—1078, 1979.
- 2) Scullica L, Proto F: Rilievi clinici e statistici sulla sensibilità corneale nei diabetici. Bolletino d Oculistica 44: 944—954, 1965.
- 3) Schwartz DE: Corneal sensitivity in diabetics. Arch Ophthalmol 91: 174—178, 1974.
- 4) Aswathi P, Sarbnai KP, Maheshwari BB, Garg BK, Chand L, Singn HP: Corneal sensations in diabetes mellitus. Acta XXII Concilium Ophthalmologicum Paris 1974. 1: 402, Masson, Paris, 1976.
- 5) Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S: Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. Arch Ophthalmol 95: 2193—2196, 1977.
- 6) Nielsen NV: Corneal sensitivity and vibratory perception in diabetes mellitus. Acta Ophthalmol 56: 406—411, 1978.
- 7) Rogel GD: Corneal hypesthesia and retinopathy in diabetes mellitus. Trans Am Acad Ophthalmol 87: 229—233, 1980.
- 8) 横田卓也, 佐々木一之, 山秋 久, 中泉裕子: 糖尿病患者の角膜知覚. 眼紀 32: 1787—1792, 1981.
- 9) 東堂なをみ: 糖尿病性神経障害の指標としての角膜知覚. 眼紀 42: 846—850, 1991.
- 10) Arai K, Sun N, Kuwayama Y, Kinoshita S, Ohashi Y, Manabe R: Effect of trigeminal denervation on rabbit corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 31(Suppl): 469, 1990.
- 11) Richard OS, Mark AP, Kathleen S, Kamal N, Karen JS: Diabetic keratopathy as a manifestation of peripheral neuropathy. Am J Ophthalmol 96: 368—371, 1983.
- 12) Hirschfeld JG, Lopez-Briones LG, Belmonte C: Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. Exp Eye Res 59: 597—605, 1994.
- 13) 細谷比左志: 糖尿病性角膜症. あたらしい眼科 13: 845—851, 1996.
- 14) Hosotani H, Ohashi Y, Kinoshita S, Matsumoto T, Awata T: Effect of topical aldose reductase inhibitor CT-112 on corneal sensitivity of diabetic rats. Curr Eye Res 15: 1005—1007, 1996.
- 15) 川上淳子, 片上千加子, 山本 節: 角膜輪部切開の上皮創傷治癒に及ぼす影響. あたらしい眼科 10: 1345—1352, 1993.
- 16) 小川葉子, 鴨下 泉, 吉野健一, 小野真史, 坪田一男: 糖尿病患者におけるドライアイ. あたらしい眼科 9: 1867—1870, 1992.
- 17) 片上千加子: 糖尿病の神経眼科: 角膜知覚, 涙液. 眼紀 46: 109—114, 1995.
- 18) Tsutsumi O, Tsutsumi A, Oka T: Epidermal growth factor-like, corneal wound healing substance in mouse tears. J Clin Invest 81: 1067—1071, 1988.
- 19) Martinez-Hernandez A, Amenta PS: The basement membrane in pathology. Lab Invest 48: 656—677, 1983.
- 20) Alvarado J, Murphy C, Juster R: Age-related changes in the basement membrane of the human corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1015, 1983.
- 21) Friend J, Thoft RA: The diabetic cornea. Int Ophthalmol Clin 24: 111—123, 1984.

- 22) **Manuel BD, Peter FK, Henry NF, Tian-Sheng Hu, Jin HK**: Corneal reepithelialization in galactosemic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:563—569, 1983.
- 23) **Tabatabay CA, Bumbacher M, Baumgartner B, Leuenberger PM**: Reduced number of hemidesmosomes in the corneal epithelium of diabetics with proliferative retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 226:389—392, 1988.
- 24) **Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK**: Decreased penetration of anchoring fibrils into the diabetic stroma. A morphometric analysis. *Arch Ophthalmol* 107:1520—1523, 1989.
- 25) **Friend J, Ishii Y, Thoft RA**: Corneal epithelial changes in diabetic rats. *Ophthalmic Res* 14:269—278, 1982.
- 26) **大黒信行, 大橋裕一**: ARI と角膜疾患 The effects of aldose reductase inhibitor on diabetic keratopathy. *眼科* 36:749—754, 1994.
- 27) **Christopher SO, Lawrence FB**: Changes in corneal innervation during postnatal development in normal rats and in rats treated at birth with capsaicin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1810—1815, 1990.
- 28) **田中 稔, 福士 克**: 糖尿病における角膜上皮の変化. *日眼会誌* 85:1216—1225, 1981.
- 29) **Ilene KG, Sandra JS, Ann ST**: Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:212—220, 1987.
- 30) **Fukushi S, Merola O, Tanaka M, Datiles M, Kinoshita JH**: Reepithelialization of denuded corneas in diabetic rats. *Exp Eye Res* 31:611—621, 1980.
- 31) **小山恭子, 藤田晋吾, 宮園祐一郎, 大庭紀雄**: ラット角膜神経繊維の定量. *あたらしい眼科* 1:531—533, 1984.
- 32) **Christopher SO, Karen RS, Lawrence FB**: Sprouting of corneal sensory fibers in rats treated at birth with capsaicin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:112—121, 1991.