

アトピー白内障における水晶体上皮細胞障害とアポトーシス —病理組織学的および免疫組織化学的研究—

三原 悦子¹⁾, 宮田 元²⁾, 長田 正夫¹⁾, 大浜 栄作²⁾

¹⁾鳥取大学医学部眼科学教室, ²⁾鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

要 約

目 的：アトピー白内障における水晶体上皮細胞障害とアポトーシスとの関連を明らかにする。

方 法：アトピー白内障 13 例の水晶体前嚢片を病理組織学的および免疫組織化学的に検討し, 老人性白内障 25 例と比較検討した。

結 果：病理組織学的にアトピー白内障に特異的な所見はなかったが, 水晶体上皮細胞の脱落や扁平化, 細胞質の空胞化などの程度はアトピー白内障群の方が老人性白内障群に比して強い傾向があった。Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) 法により検出された断片化 DNA 陽性上皮細胞の陽性率は, アトピー白内障群および老人性白内障群とも同程度であった。しかし, アポト

シス促進蛋白 Bax の陽性率は, アトピー白内障群では $29.1 \pm 35.0\%$ (平均値 \pm 標準偏差), 老人性白内障群では $2.7 \pm 7.0\%$ で, アトピー白内障群で有意に高かった ($p < 0.05$)。一方, アポトーシス抑制蛋白 Bcl-2 の陽性率は, アトピー白内障群で $1.4 \pm 3.4\%$, 老人性白内障群で $44.3 \pm 35.7\%$ であり, アトピー白内障群で有意に低かった ($p < 0.05$)。

結 論：以上の結果から, アトピー白内障の水晶体上皮細胞障害にはアポトーシスの関与がより強いことが推定された。(日眼会誌 104: 409—416, 2000)

キーワード：アトピー白内障, 水晶体上皮細胞, アポトーシス, Bax, Bcl-2

Lens Epithelial Cell Damage and Apoptosis in Atopic Cataract —Histopathological and Immunohistochemical Studies—

Etsuko Mihara¹⁾, Hajime Miyata²⁾, Masao Nagata¹⁾ and Eisaku Ohama²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University

²⁾Division of Neuropathology, Institute of Neurological Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University

Abstract

Purpose : To elucidate the relationship between damage of lens epithelial cells and apoptotic cell death in patients with atopic cataract.

Methods : Histopathological and immunohistochemical studies were carried out using anterior lens capsules obtained at surgery from 13 patients with atopic cataract and from 25 patients with senile cataract.

Results : No specific histopathological findings were found in the lens epithelial cells in atopic cases. However, the frequency and severity of histopathological findings such as flattening, nuclear pyknosis, and loss of cells were more frequent and more severe in atopic cases than in senile cases. The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) method re-

vealed that the mean ratio of cells containing fragmented DNA to whole epithelial cells was almost the same in both atopic and senile cases. However, the mean ratio of Bax-positive cells was significantly higher in atopic cases (mean \pm standard deviation, $29.1 \pm 35.0\%$) than in senile cases ($2.7 \pm 7.0\%$) ($p < 0.05$). The mean ratio of Bcl-2-positive cells was significantly lower in atopic cases ($1.4 \pm 3.4\%$) than in senile cases ($44.3 \pm 35.7\%$) ($p < 0.05$).

Conclusion : These results suggest that apoptotic cell death may play an important role in the development of lens epithelial cell damage in atopic cataract. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 409—416, 2000)

Key words : Atopic cataract, Lens epithelial cells, Apoptosis, Bax, Bcl-2

別刷請求先：683-8504 米子市西町 36-1 鳥取大学医学部眼科学教室 三原 悦子

(平成 11 年 8 月 18 日受付, 平成 11 年 12 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Etsuko Mihara, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University, 36-1 Nishi-cho, Yonago 683-8504, Japan

(Received August 18, 1999 and accepted in revised form December 7, 1999)

I 緒 言

アトピー白内障は、日本人のアトピー性皮膚炎患者の12.4%に合併することが報告¹⁾されており、近年、成人型アトピー性皮膚炎患者の増加に伴い増加傾向にある²⁾³⁾。

アトピー白内障の病因については、水晶体蛋白免疫説⁴⁾⁵⁾、血清IgE関連説⁶⁾、主要塩基性蛋白(major basic protein, MBP)細胞障害説⁷⁾⁸⁾やストレス曝露に伴う自己免疫説⁹⁾¹⁰⁾などの諸説があるが、未だ結論は得られていない。

近年、老人性白内障の発症に水晶体上皮細胞におけるアポトーシスの関与が推定されている^{11)~16)}。アトピー白内障はその発症時期が20~30代に多いことから、老人性白内障とは発生機序を異にすると予想されるが、アトピー白内障とアポトーシスとの関連を検討した報告はない。本研究では、アトピー白内障の水晶体上皮細胞障害とアポトーシスの関連について、病理組織学および免疫組織化学的に検索し、老人性白内障と比較検討した。

II 実験方法

1. 対 象

白内障手術を受けた20~44歳のアトピー白内障患者13例[29.5±6.4歳(平均値±標準偏差)]と50~84歳の老人性白内障患者25例(70.8±8.2歳)の片眼の水晶体前囊片を検索した。対象患者の臨床的特徴を表1に要約した。水晶体混濁のタイプは、前者では前囊下白内障6眼(症例A1~A6)、前囊下+後囊下白内障5眼(症例A7~A11)、全白内障2眼(症例A12, A13)、後者では前囊下白内障5眼(症例S1~S5)、後囊下白内障5眼(症例S6~S10)、皮質白内障7眼(症例S11~S17)、後囊下+皮質白内障5眼(症例S18~S22)、全白内障(老人性の場合)は成熟を意味する)3眼(症例S23~S25)であった。

水晶体前囊片は、水晶体中央部でカンオープナー法、あるいは連続円形破囊法(continuous circular capsulorhexis, CCC)により前囊切開を行い、前囊鑷子で採取した。採取に当たっては、術前に対象患者のインフォームド・コンセントを得た。

2. 病理組織学的検索

摘出された前囊片は直ちに10%緩衝ホルマリンで1~3日間固定した後、十分に水洗しアルコール上昇系列で脱水し、パラフィン包埋した。ユング型ミクロトーム(Yamato)で、前囊表面に垂直な厚さ4μmの組織切片を作製した。組織切片は、連続して4枚作製することを原則とし、それぞれ1枚をhematoxylin and eosin(HE)染色に、他の3枚を後述する各種免疫染色に供した。1切片上の細胞数が極端に少ない場合は、さらに追加切片を用いて細胞数を増やし検討した。

水晶体上皮細胞の病理組織学的所見の半定量的解析として、光学顕微鏡(Olympus)の400倍倍率下で、HE染色

表1 アトピー白内障, 老人性白内障患者の臨床的特徴

症例 No.	年齢(歳)	性別	水晶体混濁のタイプ
A1	27	M	Asc
A2	32	M	Asc
A3	30	F	Asc
A4	20	M	Asc
A5	30	F	Asc
A6	29	M	Asc
A7	28	M	Asc + Psc
A8	44	M	Asc + Psc
A9	32	M	Asc + Psc
A10	20	F	Asc + Psc
A11	24	F	Asc + Psc
A12	36	M	To
A13	32	M	To
S1	78	M	Asc
S2	65	M	Asc
S3	60	M	Asc
S4	74	F	Asc
S5	50	M	Asc
S6	70	M	Psc
S7	69	M	Psc
S8	77	F	Psc
S9	79	F	Psc
S10	74	M	Psc
S11	70	F	Cor
S12	76	F	Cor
S13	52	M	Cor
S14	77	F	Cor
S15	66	M	Cor
S16	63	F	Cor
S17	77	M	Cor
S18	69	M	Psc + Cor
S19	63	M	Psc + Cor
S20	84	M	Psc + Cor
S21	75	F	Psc + Cor
S22	76	F	Psc + Cor
S23	73	F	To
S24	72	F	To
S25	81	F	To

M: 男性, F: 女性, Asc: 前囊下白内障, Psc: 後囊下白内障, Cor: 皮質白内障, To: 全白内障

切片で無作為に100個の水晶体上皮細胞を観察し、以下の4段階に分類した。すなわち、-は病的所見なし、+は1~30個の細胞に病的所見あり、++は31~80個の細胞に病的所見あり、+++は81~100個の細胞に病的所見あり、とした。

3. 免疫組織化学的検索

1) 断片化DNAの検出

断片化DNAの検出は、In Situ Apoptosis Detection Kit (Oncor, Gaithersburg, MD, 米国)を用い、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)法¹⁷⁾により行った。パラフィ

表 2 アトピー白内障, 老人性白内障の水晶体上皮細胞の病理組織学的所見

症例 No.	水晶体混濁のタイプ	水晶体上皮細胞の変化				
		核濃縮・脱落	細胞質の空胞化	扁平化	重層化	皮質内への迷入
A1	Asc	++	-	++	-	++
A2	Asc	+	-	+++	+	na
A3	Asc	+++	+	++	-	+++
A4	Asc	+++	-	++	+	na
A5	Asc	-	-	+	-	na
A6	Asc	++	+++	+	++	na
A7	Asc+Psc	+	++	+	-	na
A8	Asc+Psc	++	-	+++	-	+
A9	Asc+Psc	++	-	++	-	+++
A10	Asc+Psc	++	-	++	-	+
A11	Asc+Psc	+	-	++	-	+
A12	To	++	-	+++	-	++
A13	To	++	-	++	+	+
病的所見出現率(%)		12/13 (92.3)	3/13 (23.1)	13/13 (100)	4/13 (30.8)	
S1	Asc	+	+	+	-	-
S2	Asc	-	-	-	-	-
S3	Asc	+	-	+	-	+
S4	Asc	+	+	+	-	na
S5	Asc	+	+	+	+	+
S6	Psc	-	-	-	-	-
S7	Psc	-	-	-	-	na
S8	Psc	-	-	-	-	na
S9	Psc	-	-	-	-	na
S10	Psc	+	+	+	+	na
S11	Cor	-	+	-	-	+
S12	Cor	+	-	+	+	na
S13	Cor	+	-	-	-	-
S14	Cor	+	-	-	-	-
S15	Cor	-	-	-	-	na
S16	Cor	-	-	-	-	na
S17	Cor	-	+	+	+	na
S18	Psc+Cor	-	+	-	-	na
S19	Psc+Cor	+	-	+	+	na
S20	Psc+Cor	+	-	+	+	-
S21	Psc+Cor	-	-	-	+	na
S22	Psc+Cor	-	-	+	-	na
S23	To	-	-	+	-	na
S24	To	+	+	+	-	na
S25	To	+	-	-	-	na
病的所見出現率(%)		12/25 (48.0)	8/25 (32.0)	12/25 (48.0)	7/25 (28.0)	

- : 病的所見なし, + : 400 倍視野で 100 個の水晶体上皮細胞中 1~30% の細胞に所見がある.
 ++ : 同じく 31~80% の細胞に所見がある. +++ : 同じく 81~100% の細胞に所見がある. na : 前
 囊片に水晶体皮質の付着がなかったもの.

ン切片を通常の方法によって脱パラフィンした後, 3% 過酸化水素水により内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し, 蒸留水で洗浄した後, 0.01 M リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) で洗浄した. Equilibration buffer を室温で 5 分間反応させ, さらに, TdT を 37°C で 90 分間反応させた. その後, stopping buffer 中で 37°C で 30 分間インキュベートし, PBS で洗浄後, anti-digoxigenin-peroxidase に室温で 30 分間反応させ

た. PBS で洗浄した後, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (DAKO, Glostrup, デンマーク) 10 mg を PBS で溶解して 0.1% とし, これに 0.001% H₂O₂ を加えた溶液を用いて発色を行った. 核の染色には 0.5% メチルグリーンを用いた. 核のみが陽性のものを陽性細胞とし, 細胞質まで褐色に染まったものは偽陽性とし, 陰性細胞とした.

2) アポトーシス関連蛋白 (Bax, Bcl-2) の検出

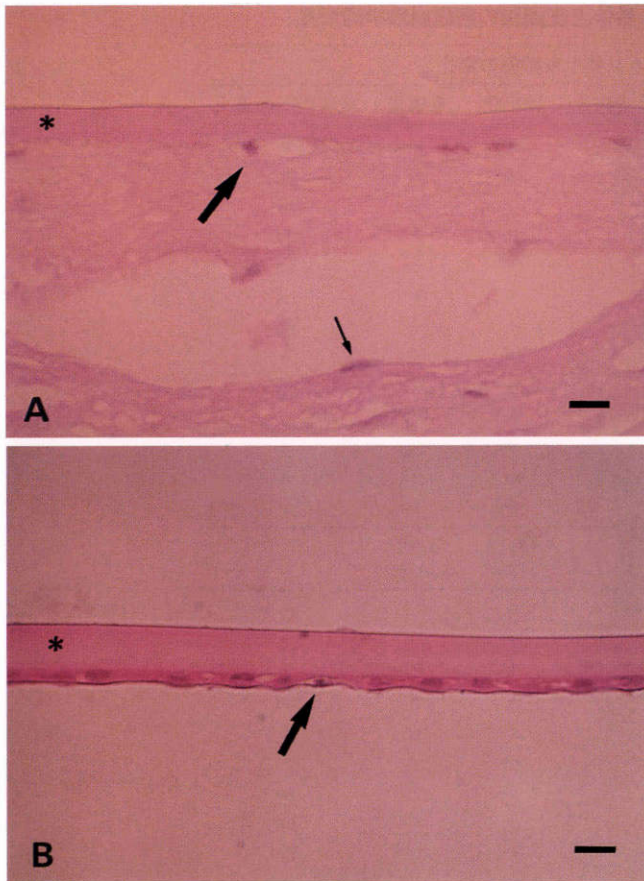


図1 アトピー白内障, 老人性白内障前嚢片の病理組織像.

A: アトピー白内障. 水晶体上皮細胞の脱落, 扁平化, 細胞質の空胞性変化(矢印)を示す. 水晶体皮質へ迷入した水晶体上皮細胞もある(小矢印). B: 老人性白内障. 水晶体上皮細胞の扁平化(矢印)と重層化の程度はAに比して軽度である. *: 前嚢. Hematoxylin and eosin (HE) 染色. バーは 10 µm

アポトーシス関連蛋白(Bax, Bcl-2)は, avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC 法)により検出した. パラフィン切片を通常の方法で脱パラフィンし, 3% 過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した. 蒸留水で洗浄した後, 0.05 M クエン酸緩衝液中で 10 分間マイクロウェーブ(600 W)を照射, 煮沸させ, 抗原賦活を行った. 蒸留水および PBS で洗浄後, 非特異的反応阻止のため, PBS にウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma, St Louis, MO, 米国) を 1% の割合で加えた BSA-PBS (PH 7.4) を用いて 1:200 に希釈したヤギ正常血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, 米国) を室温で 60 分間反応させた. その後, 一次抗体を 4°C で 18 時間反応させた. 使用した一次抗体は, 以下のマウスモノクローナル抗体である. すなわち, BSA-PBS を用いて 1:300 に希釈した抗 Bax 抗体 (MBL), および同じく 1:60 に希釈した抗 Bcl-2 抗体 (DAKO, Glostrup, デンマーク) である. 一次抗体と反応させた後, PBS で洗浄し, 二次抗体として 1:300 に希釈したビオチン標識ヤギ



図2 アトピー白内障, 老人性白内障水晶体上皮細胞における断片化 DNA の発現.

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) - mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) 法.

A: アトピー白内障. B: 老人性白内障. いずれも核にのみ陽性所見がある(矢印). *: 前嚢. バーは 10 µm

抗マウス IgG 抗体 (DAKO, Glostrup, デンマーク) (pH 7.4) を室温で 1 時間反応させた. PBS で洗浄後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ヒストファイン SAB-PO (R) キット, ニチレイ) を室温で 1 時間反応させ, PBS で洗浄後, DAB-H₂O₂ で発色を行った. Bax, Bcl-2 とともに細胞質のみが陽性のものを陽性細胞とし, 核が褐色に染まったものや細胞質が弱陽性のものは偽陽性とし, 陰性と判定した. また, 明らかに細胞質に反応のないものは陰性とした.

3) 免疫染色における陽性細胞の比率

各症例ごとに各免疫染色標本上で観察し得る全水晶体上皮細胞数を数え, そのうちの陽性細胞数をこれで除し, 陽性率 (%) を算出した. また, アトピー白内障群および老人性白内障群における平均陽性率 [平均値 ± 標準偏差 (2 標準誤差)] を算出し, Student の t 検定で有意差検定を行った.

III 結 果

1. 病理組織学的所見

病理組織学的にアトピー白内障に特異的な所見はなかった. しかし, アトピー白内障の水晶体上皮では, 表 2 にみるごとく, 13 例中 13 例 (100%) で上皮細胞の扁平化が, 13 例中 12 例 (92.3%) で楕円形やソーセージ様の核濃縮や上皮細胞の脱落が観察された. また, 上皮細胞の重層化所見は 13 例中 4 例 (30.8%) に, 細胞質の空胞化は 13 例中 3 例 (23.1%) にあった. 前嚢片に水晶体皮質が付着していた標本では, 水晶体皮質へ迷入した水晶体上皮細胞の他, 水晶体線維の配列の乱れ, 空胞形成, 崩壊の所見もあった (図 1 A).

表3 アトピー白内障, 老人性白内障の水晶体上皮細胞における TUNEL 染色および Bax, Bcl-2 免疫染色陽性細胞の割合

症例 No.	TUNEL 陽性率*		Bax 陽性率		Bcl-2 陽性率	
	% (陽性細胞数/総細胞数)		% (陽性細胞数/総細胞数)		% (陽性細胞数/総細胞数)	
A1	10.3	(7/68)	0.0	(0/50)	0.0	(0/60)
A2	20.0	(12/60)	85.7	(36/42)	0.0	(0/50)
A3	9.5	(19/200)	41.2	(73/177)	0.0	(0/180)
A4	6.9	(24/350)	27.5	(66/240)	0.0	(0/320)
A5	9.4	(6/64)	27.8	(20/72)	0.0	(0/60)
A6	5.5	(5/91)	0.0	(0/102)	7.7	(13/168)
A7	3.3	(2/61)	0.0	(0/50)	0.0	(0/60)
A8	29.4	(15/51)	0.0	(0/48)	0.0	(0/60)
A9	16.7	(36/215)	14.2	(29/204)	10.0	(255/251)
A10	15.8	(19/120)	12.5	(8/64)	0.0	(0/130)
A11	0.0	(0/133)	0.0	(0/103)	0.0	(0/103)
A12	8.3	(6/72)	100.0	(42/42)	0.0	(0/56)
A13	12.7	(13/102)	69.0	(40/58)	0.0	(0/80)
平均値±標準偏差 (2標準誤差)	11.4±11.7(4.7)		29.1±35.0(19.4)**		1.4±3.4(1.9)**	
S1	18.8	(36/192)	0.0	(0/100)	92.2	(178/193)
S2	8.6	(47/547)	0.0	(0/530)	9.0	(27/300)
S3	6.7	(21/314)	26.8	(71/265)	70.9	(158/223)
S4	20.8	(22/106)	13.6	(31/228)	64.0	(73/114)
S5	1.3	(4/301)	0.0	(0/313)	56.9	(62/109)
S6	40.3	(168/417)	0.0	(0/400)	94.3	(247/262)
S7	21.3	(128/600)	0.0	(0/415)	88.0	(117/133)
S8	14.1	(67/476)	0.0	(0/472)	60.2	(59/98)
S9	11.8	(59/500)	0.0	(0/420)	6.9	(13/188)
S10	23.2	(76/327)	0.0	(0/313)	31.6	(24/76)
S11	1.4	(4/277)	0.0	(0/200)	80.5	(198/246)
S12	35.4	(172/486)	0.0	(0/420)	45.2	(52/115)
S13	4.9	(21/428)	0.0	(0/413)	24.4	(65/266)
S14	4.8	(13/273)	20.8	(15/72)	0.0	(0/200)
S15	9.0	(29/324)	6.1	(10/163)	4.3	(11/256)
S16	18.7	(63/337)	0.0	(0/351)	0.0	(0/300)
S17	2.8	(2/72)	0.0	(0/60)	0.0	(0/300)
S18	42.0	(29/69)	0.0	(0/73)	94.4	(101/107)
S19	16.8	(54/322)	0.0	(0/320)	47.3	(142/300)
S20	27.8	(101/363)	0.0	(0/413)	51.5	(117/227)
S21	19.6	(102/520)	0.0	(0/506)	69.0	(82/119)
S22	6.7	(6/89)	0.0	(0/91)	21.8	(12/55)
S23	10.3	(12/116)	0.0	(0/90)	96.2	(102/106)
S24	24.3	(70/288)	0.0	(0/280)	0.0	(0/200)
S25	4.5	(8/178)	0.0	(0/182)	0.0	(0/100)
平均値±標準偏差 (2標準誤差)	15.8±11.7(4.7)		2.7±7.0(2.8)		44.3±35.7(14.3)	

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labelling

*: 総水晶体上皮細胞数に対する陽性 transerferase 細胞数の割合.

** : 有意差あり ($p < 0.05$).

老人性白内障の水晶体上皮では, 表 2 のごとく, 25 例中 12 例 (48.0%) に上皮細胞の扁平化があり, 核濃縮や上皮細胞の脱落も 25 例中 12 例 (48.0%) にあった. また, 細胞質内の空胞化は 25 例中 8 例 (32.0%) にあり, 上皮細胞の重層化 (図 1 B) は 25 例中 7 例 (28.0%) に観察された.

以上のように, 病理組織学的所見の出現率や重症度を考慮した半定量的な解析結果からは, 水晶体上皮細胞の扁平化や核濃縮・脱落などの出現率はアトピー白内障で

高頻度, かつ高度であった (表 2).

2. 免疫組織化学的所見

水晶体上皮細胞における TUNEL 染色陽性細胞は, アトピー白内障, 老人性白内障ともに核にのみ陽性所見があった (図 2 A, B). その平均陽性率は, アトピー白内障群で 11.4 ± 7.7 (平均値±標準偏差)%, 老人性白内障群で 15.8 ± 11.7 % であり, 両者の間に有意差はなかった (表 3). また, TUNEL 陽性細胞は核濃縮を来した細胞の一部

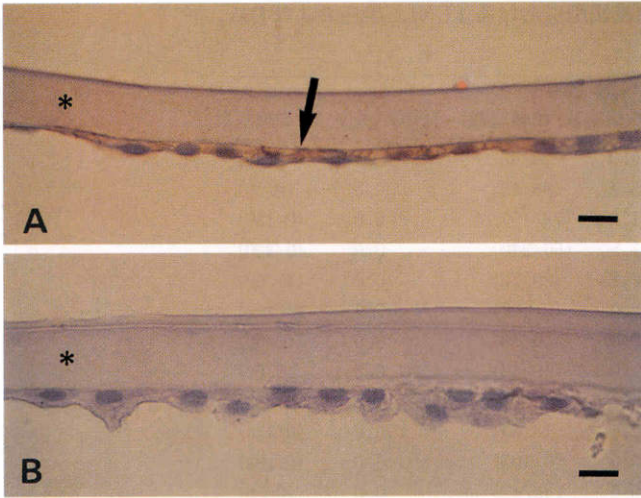


図3 アトピー白内障, 老人性白内障の水晶体上皮細胞におけるアポトーシス促進蛋白 Bax の発現 (Bax 免疫染色).
A: アトピー白内障, 細胞質に陽性所見がある (矢印).
B: 老人性白内障, 陽性細胞はほとんどない. *: 前囊. バーは 10 μm

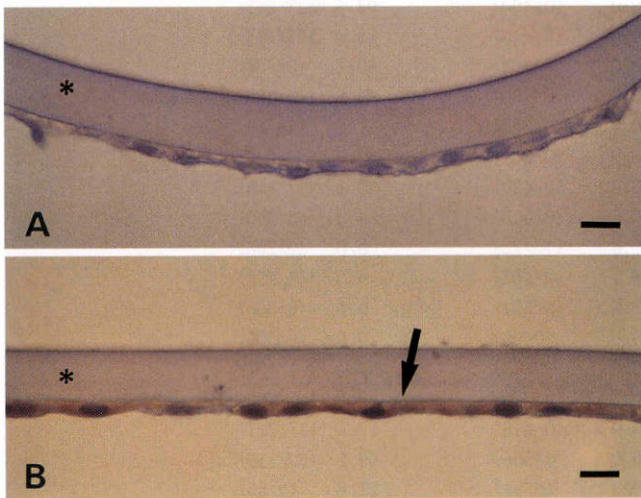


図4 アトピー白内障, 老人性白内障水晶体上皮細胞におけるアポトーシス抑制蛋白 Bcl-2 の発現 (Bcl-2 免疫染色).
A: アトピー白内障, 陽性細胞はない. B: 老人性白内障, 細胞質に Bcl-2 の発現があった (矢印). *: 前囊. バーは 10 μm

であり, 組織学的変化とアポトーシスは必ずしも一致しなかった.

Bax 陽性細胞は, 細胞質に陽性所見があり (図 3 A), アトピー白内障群における平均陽性率は $29.1 \pm 35.0\%$ であり, 老人性白内障群の平均陽性率 $2.7 \pm 7.0\%$ に対して有意 ($p < 0.05$) に高かった (表 3).

Bcl-2 陽性細胞も Bax と同様, 細胞質に陽性所見があり (図 4 B), アトピー白内障群の平均陽性率は $1.4 \pm 3.4\%$ で, 老人性白内障群の平均陽性率 $44.3 \pm 35.7\%$ に対し

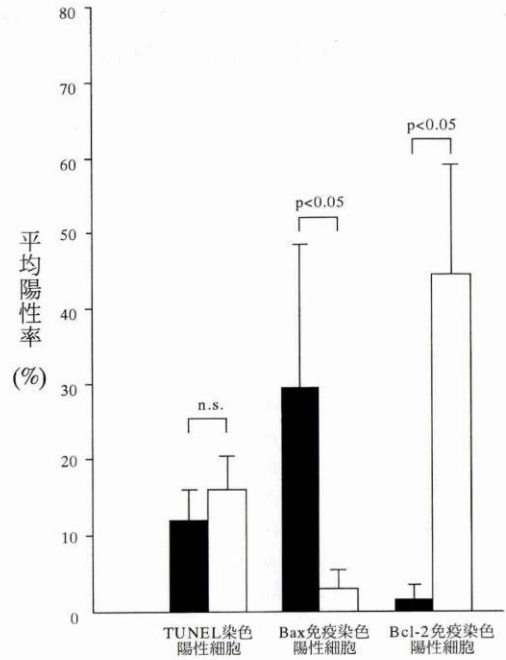


図5 アトピー白内障, 老人性白内障の水晶体上皮細胞の免疫組織化学的検索結果.
■: アトピー白内障 (n=13), □: 老人性白内障 (n=25). 平均陽性率は平均値±2 標準誤差を表す. n.s.: 有意差なし ($p > 0.05$, Student の t 検定).

て有意 ($p < 0.05$) に低かった (表 3). 図 5 に, これらの所見を示した.

IV 考 按

アトピー白内障の病理組織学的所見として, これまでに水晶体上皮細胞の重層化⁹⁾, 整列の不整化¹⁰⁾, 細胞脱落¹⁸⁾などが報告されている. 今回我々の得たアトピー白内障の病理組織像は, 従来の報告⁹⁾¹⁰⁾¹⁸⁾とはほぼ一致していた. また, アトピー白内障と老人性白内障の病理組織像は質的には共通しており, アトピー白内障に特異的な所見はなかった. しかしながら, 水晶体上皮細胞の扁平化や核濃縮・細胞脱落などの所見は, 老人性白内障に比してアトピー白内障で出現率が高く, より重症であった.

近年, 白内障における水晶体上皮細胞変性とアポトーシスについての様々な研究が報告^{11)~16)}されている. Liら¹²⁾は手術で採取した 12~94 歳の各種白内障 (アトピー白内障は含まない) 20 例の水晶体前囊を TUNEL 法と DNA fragmentation assay を用いて検索した結果, 水晶体上皮細胞に 4.4~41.8% のアポトーシス細胞を検出し, 水晶体上皮細胞のアポトーシスが老人性白内障の進展において細胞生物学的な基盤であることを推測している. また, 西ら¹⁵⁾は種々の段階の白内障における水晶体上皮細胞のアポトーシスを検索し, 水晶体上皮細胞のアポトーシス出現頻度が白内障の進行に関連していることを報告している.

我々は本研究で、まず TUNEL 染色を用いてアトピー白内障 13 例と老人性白内障 25 例における水晶体上皮細胞の DNA 断片化を検索した。その結果、TUNEL 陽性細胞の出現頻度はアトピー白内障群で $11.4 \pm 7.7\%$ 、老人性白内障群で $15.8 \pm 11.7\%$ であり、両群間に有意差はなかった。齧歯類の肝臓では、生理的老化に伴い TUNEL 陽性細胞が増加することが示されている¹⁹⁾²⁰⁾。加齢に伴う水晶体上皮細胞のアポトーシスに関する検討は報告されていないが、生理的老化に伴い増加している可能性は否定できない。老人性白内障群はアトピー白内障群に比して平均年齢が著しく高く、老人性変化として生理的にアポトーシスの出現頻度が高まっている可能性も考えられる。すなわち、アトピー白内障での結果は疾患固有の病変機序によるものを示すのに対し、老人性白内障での結果は病変機序による変化に生理的老化の修飾が加わっている可能性がある。一方、Harocopos ら²¹⁾は組織採取時や固定までの検体処理過程で組織破壊が起こり、これによる壊死性変化が水晶体上皮細胞の TUNEL 陽性率を著しく高めていると報告している。TUNEL 法は断片化 DNA を検出するものであるが、これはアポトーシスのみならずネクローシスをも検出することを意味する²²⁾。したがって、これらは TUNEL 陽性細胞の出現頻度が予想以上に高く、かつアトピー白内障と老人性白内障との間に有意差がないことの原因と考えられる。

次に、水晶体上皮細胞におけるアポトーシス関連蛋白 Bax, Bcl-2 の発現を免疫組織化学的に検索した。Bcl-2 はアポトーシス抑制活性を有し、ほとんどすべての刺激で誘導されるアポトーシスを効率よく抑制する。Bax は、Bcl-2 とヘテロダイマー、および Bax ホモダイマーを形成し、細胞内で Bax の比率が高くなると Bcl-2 のホモダイマーは減少し、Bax とのヘテロダイマーおよび Bax ホモダイマーが増加してアポトーシス感受性は高まる²³⁾。逆に、Bcl-2 の比率が高まると Bax ホモダイマーの存在比が減少し、細胞はアポトーシス抵抗性を獲得する。すなわち、Bcl-2 と Bax の比率がアポトーシス誘導時の細胞の生存を決定するとされている²³⁾。本研究では、アトピー白内障でアポトーシス促進蛋白である Bax の陽性率が有意に高く、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 は有意に低いことが示された。この所見から、アトピー白内障では老人性白内障に比してアポトーシスの機序の占める比率がより高い可能性が推測される。また、本研究ではアトピー白内障の Bax 陽性率および老人性白内障の Bcl-2 陽性率のばらつきが非常に大きくなったが、数えた組織の場所と白内障の進行程度の違いによるところが大きいと考えられる。本研究では限られた組織片による検索を余儀なくされ、さらに白内障の進行程度によるグループ分けを行っていないために標準偏差の値が大きくなったと考えられる。

アトピー性皮膚炎患者では白内障を有する患者の方が

白内障のない患者より、血清 IgE が有意に高いという報告⁶⁾がある。これはアトピー性皮膚炎患者の免疫学的異常が白内障の進行に関与している可能性を示している。好酸球内の特異顆粒中に含有されている MBP は細胞膜の浸透性を変化させ、細胞死を惹き起こす⁷⁾。アトピー白内障患者の水晶体上皮細胞には MBP の沈着していることが免疫組織化学的に証明されている⁸⁾。また、MBP はアトピー白内障患者の前房水中にも存在するが、老人性白内障患者の水晶体上皮細胞や前房水には存在しない⁸⁾ことから、アトピー白内障患者では、MBP がアポトーシスに関与している可能性も考えられる。

長田ら⁹⁾、石倉ら¹⁰⁾は自己免疫疾患の原因蛋白質として注目されているストレス応答蛋白質(stress-response protein, srp)60 がアトピー白内障の水晶体上皮細胞に特異的に発現していることを明らかにし、アトピー白内障の発症に自己免疫が関与している可能性を示している。この srp 60 は自己免疫疾患である若年性関節リウマチの関節滑膜にも発現することが報告²⁴⁾されているが、この滑膜細胞は高率にアポトーシスを示すとの報告²⁵⁾もあり、srp 60 の発現とアポトーシスの関連が推測される。さらに、最近では白内障の原因としてフリーラジカルの関与も指摘されており²⁶⁾、特にアトピー白内障ではその影響が注目されている。Niwa ら²⁷⁾によると、アトピー性皮膚炎患者では血清中過酸化脂質が増加し、白血球内の superoxide dismutase (SOD) の誘導性が低下する結果、フリーラジカルが過剰となり、白内障が発症する。Spector ら²⁶⁾はラットの水晶体上皮細胞は酸化ストレスにより DNA レベルで障害を受けるとし、それを TUNEL 法、DNA laddering 法、および形態学的に明らかにしている。これは過酸化反応と水晶体上皮細胞のアポトーシス、延いては白内障との関連を推測させる。すなわち、アトピー素因による IgE, MBP, あるいはフリーラジカルといった各種ストレスにより水晶体上皮細胞のアポトーシスが誘導され、白内障を発症せしめている可能性が考えられる。

今回の検討により、アトピー白内障の水晶体上皮細胞変性は老人性白内障に比してアポトーシスの占める比率がより高い可能性が推測された。アポトーシスの原因およびアポトーシスとアトピー白内障との関連をより明確にするには、今後、さらに電子顕微鏡による水晶体上皮細胞の形態学的検索や DNA laddering 法²⁶⁾など、多方面からのより詳細な検討が必要である。

稿を終えるに当たり、終始変わらぬご指導、ご校閲を賜りました鳥取大学医学部眼科学教室玉井嗣彦教授に深謝いたします。また、水晶体材料を提供して下さいました東京医科大学眼科学教室白井正彦教授に心から感謝いたします。

本稿の要旨は第 103 回日本眼科学会総会(1999 年、千葉)で報告した。

文 献

- 1) Uehara M, Amemiya T, Arai M: Atopic cataracts in a Japanese population. With special reference to factors possibly relevant to cataract formation. *Dermatologica* 170:180—184, 1985.
- 2) 勝島晴美, 宮崎幾代, 関根伸子, 西尾千恵子, 松田三千雄: アトピー性皮膚炎における白内障および網膜剥離の合併頻度. *日眼会誌* 98:495—500, 1994.
- 3) 中野栄子, 岩崎琢也, 小山内卓哉, 山本和則, 宮内恵: アトピー性皮膚炎の眼合併症. *日眼会誌* 101:64—68, 1997.
- 4) Fagerholm P, Palmquist B-M, Philipson B: Atopic cataract: Changes in the lens epithelium and subcapsular cortex. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221:149—152, 1984.
- 5) Angunawela, II: The role of autoimmune phenomena in the pathogenesis of cataract. *Immunology* 61:363—368, 1987.
- 6) 笹部哲生, 諏訪雄三, 川村俊彦, 青木敏之: アトピー性皮膚炎に合併した白内障の発症と血清 IgE の関係. *日眼会誌* 101:389—392, 1997.
- 7) Abu-Ghazaleh RI, Gleich GJ, Prendergast FG: Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers: A mechanism for toxicity. *J Membrane Biol* 128:153—164, 1992.
- 8) Yokoi N, Hirano S, Okamoto S, Matsumoto Y, Yokoi K, Ikeda T, et al: Association of eosinophil granule major basic protein with atopic cataract. *Am J Ophthalmol* 122:825—829, 1996.
- 9) 長田正夫, 石原涼子, 高木 茂, 隈上武志, 玉井嗣彦, 加藤信介, 他: アトピー白内障の前囊, 水晶体上皮細胞の組織病理, 免疫組織化学的検討. *あたらしい眼科* 13:1739—1743, 1996.
- 10) 石倉涼子, 長田正夫, 加藤信介, 大浜栄作: アトピー患者の水晶体上皮におけるストレス応答蛋白 60 の発現: 病理組織学的及び免疫組織化学的研究. *米子医誌* 49:7—20, 1998.
- 11) Li W-C, Kuszak JR, Wang G-M, Wu Z-Q, Spector A: Calcimycin-induced lens epithelial cell apoptosis contributes to cataract formation. *Exp Eye Res* 61:91—98, 1995.
- 12) Li W-C, Kuszak JR, Dunn K, Wang R-R, Ma W, Wang G-M, et al: Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 130:169—181, 1995.
- 13) Li W-C, Spector A: Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract. *Free Radic Biol Med* 20:301—311, 1996.
- 14) 広島由佳子, 臼井正彦, 矢那瀬紀子, 水口純一郎, 荻部安宏, 海老原善郎: ヒト白内障水晶体上皮細胞変性とアポトーシス. *あたらしい眼科* 15:707—711, 1998.
- 15) 西 起史, 西 佳代: ヒト白内障水晶体上皮細胞におけるアポトーシス. *あたらしい眼科* 15:1309—1313, 1998.
- 16) 西 起史, 西 佳代, 和田香織, 大本安一: ヒト白内障水晶体上皮細胞における Fas-Fas リガンド経路によるアポトーシス. *あたらしい眼科* 15:1445—1450, 1998.
- 17) Kyprianou N, Isaacs J: Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocr J* 122:552—562, 1988.
- 18) Majima K, Majima Y, Kousaka M: Cell-biological analysis of atopic cataractous lenses. *Ophthalmologica* 212:310—317, 1998.
- 19) Muskhelishvili L, Hart RW, Turturro A, James SJ: Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in livers of diet-restricted and *ad libitum*-fed B6 C3 F1 mice. *Am J Pathol* 147:20—24, 1995.
- 20) Higami Y, Shimokawa I, Okimoto T, Tomita M, Yuo T, Ikeda T: Effect of aging and dietary restriction on hepatocyte proliferation and death in male F 344 rats. *Cell Tissue Res* 288:69—77, 1997.
- 21) Harocopos GJ, Alvares KM, Kolker AE, Beebe DC: Human age-related cataract and lens epithelial cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2696—2706, 1998.
- 22) Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJH, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH: A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *In situ* end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41:7—12, 1993.
- 23) 本山 昇: Bax Bcl-2 associated X protein. 三浦正幸, 他(編): *Bio Science 用語ライブラリー アポトーシス*. 羊土社, 東京, 88—89, 1997.
- 24) Boog CJP, de Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, van der Zee R, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJS, et al: Two monoclonal antibodies generated against human hsp 60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J Exp Med* 175:1805—1810, 1992.
- 25) Asahara H, Hasumura T, Kobata T, Yagita H, Okumura K, Inoue H, et al: Expression of Fas antigen and Fas ligand in the rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 81:27—34, 1996.
- 26) Spector A, Wang G-M, Wang R-R, Li W-C, Kuszak J: A brief photochemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. I. Transparency and epithelial cell layer. *Exp Eye Res* 60:471—481, 1995.
- 27) Niwa Y, Iizawa O: Abnormalities in serum lipids and leukocyte superoxide dismutase and associated cataract formation in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 130:1387—1392, 1994.