

緩徐発症型ラット糖白内障 (図4)

赤木 好男・田坂 宏・田辺 稔邦・吉川 隆男・池部 均 (京都府立医大眼科学教室)
 茶本 薫・高橋 幸男・宮本 嘉久・照林 宏文

Slow development of rat sugar cataracts

Yoshio Akagi, Hiroshi Tasaka, Toshikuni Tanabe,
 Takao Yoshikawa, Hitoshi Ikebe, Kaoru Chamoto,
 Yukio Takahashi, Yoshihisa Miyamoto & Hirofumi Terubayashi
Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

要 約

最近、アルドース還元酵素がラット糖白内障と同様にヒト糖尿病性白内障の病因として注目されている。しかし二つの白内障の大きな違いは、白内障の発生部位が異なることである。本研究の目的はラットにおいてヒト糖尿病性白内障と同様の実験白内障を作成することである。実験には成熟ラット(体重200g)を用い25%ガラクトース食を与えるか、ストレプトゾトシン(STZ)注射により糖白内障を作成した。大量投与のSTZ糖尿病ラットでは白内障は赤道部に初発したが、少量投与のSTZ糖尿病ラットやガラクトース投与ラットでは表層皮質に初発し、赤道部皮質はわずかに水晶体線維膨化を認めるのみであった。以上の結果より、ラット糖白内障はその形態学的特徴より2タイプに分けることができた。すなわち急速進行赤道部型白内障と緩徐進行表層皮質型白内障である。そして後者がヒト糖尿病性白内障に類似していた。(日眼 91:122-126, 1987)

キーワード：ヒト糖尿病性白内障，ラット糖白内障，アルドース還元酵素，成熟ラット

Abstract

It is very likely that aldose reductase (AR) is implicated in pathogenesis of the human diabetic cataract as well as rat sugar cataract. The morphological discrepancy between human and rat sugar cataracts is the following: In rats the cataract appears at first as vacuoles in the equatorial region of the lens, while the human diabetic cataract commonly appears as a superficial lens opacity. In this study we tried to resolve this discrepancy. Mature rats (body weight 200gm) were fed 25% galactose feed or made diabetic by an intravenous injection of streptozotocin (30~100mg/kg). Histological and AR-immunohisto-chemistry examinations were performed at various intervals. The rats administered a high dosage of streptozotocin (STZ) rapidly developed cataracts in the equatorial region of the lens. In the rat with a galactose diet and a low dosage STZ injection, cataracts appeared first on the superficial cortex with minimal lens fiber swelling at the bow region. From these results we conclude that the rat sugar cataract can be divided into two types by their morphological appearance: the rapidly developed equatorial and slowly developed superficial types. The pattern of the latter is very close to the human diabetic cataract. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 122-126, 1987)

Key words: human diabetic cataract, rat sugar cataract, aldose reductase, mature rat.

はじめに

アルドース還元酵素 (AR) がラット糖白内障の起因酵素であるという説¹⁾²⁾は Polyol osmotic 説と呼ばれ、Kinoshita によって提唱された。糖白内障の基本的病理像は水晶体線維膨化³⁾であり、筆者らは、これまで抗ラット水晶体 AR 血清を用いた免疫組織化学的手法によってラット糖尿病およびガラクトース白内障を観察し、膨化に一致して必ず異常 AR 局在が認められる事から、本説を免疫組織化学的に立証してきた⁴⁾⁵⁾。線維膨化は、通常、ラット水晶体の赤道部や前赤道部に初発し、前皮質、後皮質に漸次進展する。しかし、一般的なヒト糖尿病性白内障をよく見ると、前後表層皮質の線維膨化を伴う後囊下混濁を示す場合が多い。ラットとヒトにおけるこの発症部位の違いに注目し、生後週齢の異なるラットガラクトース白内障を調べたところ成熟ラットでは赤道部ではなく表層皮質に初発する事が判った⁶⁾⁷⁾。本研究では、その事実を更に発展させ、ヒト糖尿病性白内障の形態学的近似ラットモデルを作る事を最終目標とし、ラット糖白内障を形態学的に再検討する事を目的とした。

実験方法

本実験には生後 6 週齢 (体重 200g) Sprague-Dawley 系ラットを 90 匹使用し、それらをガラクトース白内障群と糖尿病性白内障群の二群に分けた。(1) ガラクトース白内障群：ラットに 25% ガラクトース含有食餌を与え飼育した。(2) 糖尿病性白内障群：streptozotocin (STZ) を 30~100mg/kg の各量で尾静脈から一回注射した。血糖は水晶体摘出時に、Glucose analyzer (Beckman Instruments Inc.) を用いて測定した。両群の水晶体は経時的に摘出し 4% paraformaldehyde 含有 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) にて 1~2 日固定し、半数は光顕的、他は免疫組織化学的観察を行った。光顕試料は所定の方法にてアルコール脱水し、メタクリル樹脂 (JB-4) に包埋した。それらから 1~2 μ の切片を作製しトルイジン青染色後観察した。免疫組織化学用試料は 10~20% 濃度のサッカロース含有同緩衝液に浸漬し、それらから約 15 μ の凍結切片を作製した。それらの凍結切片に対し、抗ラット水晶体 AR 山羊血清 (Kador, P.F., National Eye Institute, U.S.A. 精製) を第一抗体とする PAP 法にて染色を行った。対照としてはあらかじめ吸収試験を行った抗血清または山羊血清を第一抗体の代わりに用い、特異反応が出現し

ない事を確かめた。

結 果

糖尿病性白内障群：血糖値は個々のラットでばらつきを示したが、おおよそ STZ 投与量に比例して高くなった。最低値は 30mg/kg 投与の 166mg/dl、最高値は 100mg/kg 投与の 873mg/dl であった。しかし、白内障発症は必ずしも血糖値と比例せず、同様な高血糖値を示しても発症時期、程度に差異がある場合が多かった。STZ を 70~100mg/kg 投与したラット水晶体では、2~3 週後から赤道部やや深層に AR 異常局在を伴う線維膨化が出現し始め、次第にそれらは幅を増し前極方向に拡大していった。3~4 週後では赤道部から前赤道部の皮質に水晶体線維液化が認められる様になった。又、赤道部最表層部は正常に保たれていたが、その層状線維群の中でも液化領域に近いものに軽い膨化を認めた。この時期の水晶体 AR 局在は、上皮細胞層と液化領域に内接する数層の組織学的に非膨化正常線維群に見られた。また、液化領域内にも淡い瀰漫性染色や限局性濃染部位が観察され、後囊側皮質にも異常染色がみられた。しかし、この時期ではまだ後皮質線維膨化は認められなかった (図 1)。一方、STZ を 30~50mg/kg 投与したラット水晶体では、2~3 週後には異常が観察されなかった。4 週後頃になり初めて線維膨化が出現したが、赤道部や前赤道部皮質は正常で、前極部に近い上皮細胞層直下の表層皮質に線維膨化が見られた。線維膨化に接している上皮細胞は増殖し多層化する場合が多かった。後皮質でも、後赤道部から後極にかけての後囊直下線維に軽度の膨化が出現した。AR 局在をみると、前皮質では線維膨化部位の周囲に淡い異常染色が認められ、光顕的に重層していた上皮細胞はすべて濃染した (図 2 b)。赤道部は免疫組織化学的にも異常 AR 局在は見られなかった (図 2 a) が、後皮質では後囊にそった線維に線状膨化と AR 異常染色線維が混在するのが観察された (図 2 c)。投与 6 週後でも赤道部や前赤道部には軽度の膨化が見られるのみであり (図 3 a)、前極部を中心とする上皮細胞下の表層皮質と後囊下最表層線維の膨化はさらに明瞭に観察された (図 3 b, c)。赤道部での細胞核配列は乱れ前極方向に移動していた。

ガラクトース白内障群：25% ガラクトース含有食餌飼育 3 週後頃から前極部付近の最表層線維および後赤道部から後縫合部にわたる後囊直下表層水晶体線維に膨化が出現したが、赤道部皮質には異常が認められな

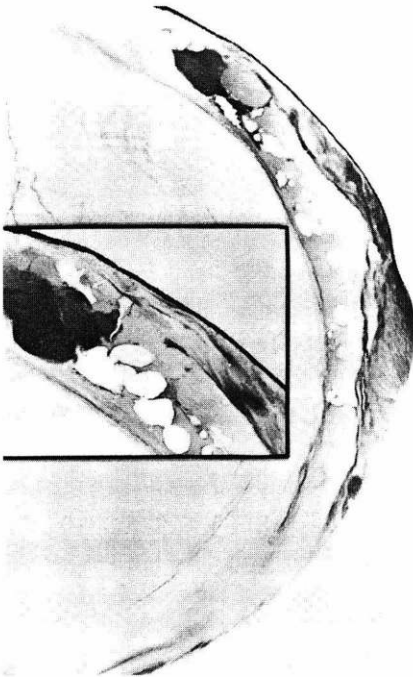


図1 ラット糖尿病性白内障(streptozotocin 75~100 mg/kg 投与群) 3週後におけるAR局在。赤道部から前皮質にかけて液化領域が存在する。AR染色は上皮細胞層、液化領域内、その内側非膨化線維の三つの部位に見られる。後皮質には異常AR染色のみ存在し、線維膨化は認められない(PAP染色, ×27)。

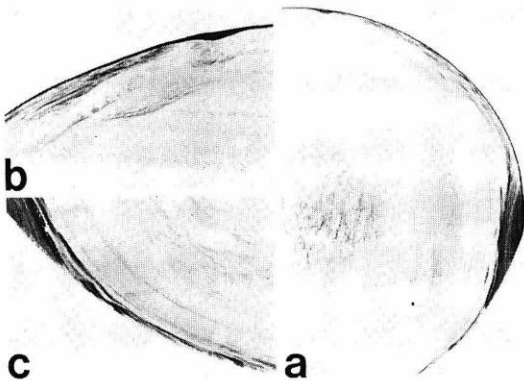


図2 ラット糖尿病性白内障(streptozotocin 30~50 mg/kg 投与群) 4週後におけるAR局在。赤道部(a)には線維膨化やAR異常染色は認められず、上皮細胞下(b)、後嚢下(c)にはAR異常染色を伴う線維膨化・液化が見られる。重層上皮細胞はすべて濃染する(PAP染色, a ×25, b, c ×50)。

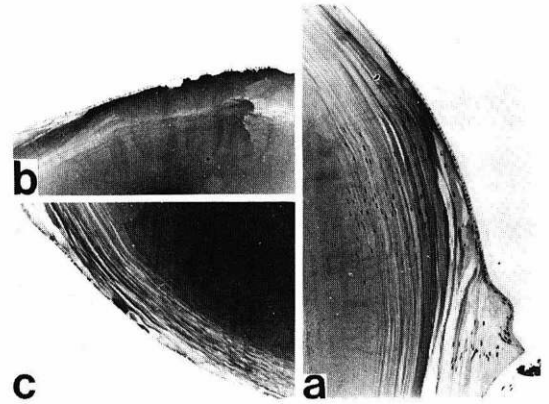


図3 ラット糖尿病性白内障(streptozotocin 30~50 mg/kg 投与群) 6週後における光顕像。赤道部(a)にも軽度の線維膨化が見られるが、前極部を中心とした上皮下表層皮質(b)には液化が、後嚢にそった皮質(c)には線状線維膨化が明瞭に認められる(トルイジン青染色, a ×50, b, c ×20)。

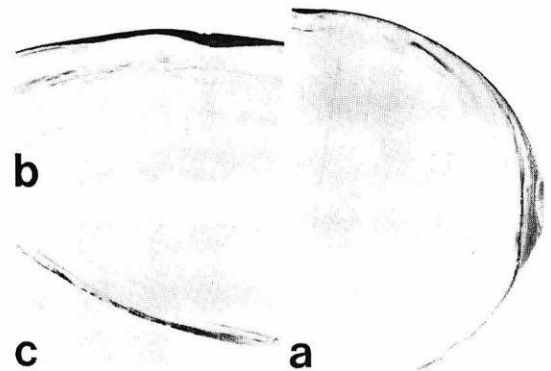


図4 ラットガラクトース白内障3週後におけるAR局在。赤道部(a)には線維膨化やAR異常染色は認められないが、前極表層皮質(b)に線維膨化が観察され、後赤道部から後極にかけての最表層皮質(c)に異常AR染色ならびに線状膨化線維が混在している。重層上皮細胞はすべて濃染する(PAP染色, a ×25, b, c ×50)。

部皮質には異常染色は見られず(図4 a), 前皮質ならびに後皮質表層部に局限してAR異常染色が認められた。前皮質側では液化領域に内接する非膨化線維の淡い染色と濃染する重層上皮細胞、後皮質側では後嚢下の線状膨化線維に混在してAR異常染色が観察された(図4 b, c)。

考 察

糖尿病の代表的な眼合併症のひとつに白内障が挙げ

かった。前皮質と後皮質の線維膨化を比べると前者の方がその幅がかなり広がった。AR染色標本でも赤道

られる。白内障手術のめざましい進歩によって、過去に比べはるかに安全に糖尿病患者に対する白内障手術ができるようになった。しかし、いかなる手術も100%絶対安全である訳ではなくまた混濁したから摘出すると言うのは極論すれば理想的な医療ではない、いったん混濁した水晶体をなんらかの方法で再び透明化できればそれにこした事はない。この観点から世界の多くの研究者が老人性、糖尿病性などの白内障の原因究明に携わっている。原因が判明すればその治療も可能となる。老人性白内障の研究は更に大きな課題である老化のメカニズム解明につながると考える。

糖尿病性白内障の研究のひとつの大きな出発点は van Heyningen によるポリオール代謝系路の発見である⁸⁾、Kinoshita はそれを更に発展させアルドース還元酵素 (AR) が糖白内障発症の起因酵素である事を提唱した¹²⁾ (Polyol osmotic 説)。現在では多くの研究からその説は広く認められるに至り、筆者らも実験的ガラクトースおよび糖尿病性白内障などのラット糖白内障の原因は AR にある事を AR-免疫組織化学的に証明してきた⁴⁾⁹⁾。この AR 研究過程で登場したのが AR 阻害剤 (ARI) であり、その薬剤を投与する事によってラット糖白内障の発生を抑制・阻止したり^{9)~11)}、いったん発生した白内障水晶体を再び透明化させる事 (ARI-reversal) ができる⁴⁾¹²⁾ 事実は、Polyol osmotic 説のひとつの重要な根拠ともなっている。ARI のラット糖白内障に対する効果は劇的であり、動物実験ではあるが、過去の抗白内障薬の中でもこれほどの薬剤効力を示したものはない¹³⁾。これがヒト糖尿病性白内障に対する新しい治療薬として ARI が注目されている理由である。しかし、臨床治験を行う前に解決すべき事柄は多い。その中のひとつにヒト糖尿病性白内障も AR に起因して発症しているのかどうか、治癒すると仮定した場合どのような治癒像を呈するのかの二点が挙げられる。筆者らは、水晶体嚢内摘出手術時に得られたヒト糖尿病症例および非糖尿病症例のうち主に後嚢下混濁を呈した白内障水晶体を、抗ヒト AR 血清-免疫組織化学的に観察した。すると、前者にのみ前嚢下、後嚢下にラット糖尿病性白内障と同様な線維膨化を伴う AR 異常染色線維が見られた¹⁴⁾。この事実からヒト糖尿病性白内障も AR が起因酵素であること、即ち ARI 投与によって治療しうる可能性があることと筆者らは推測するに至った。次に解決すべき問題は、前述の通り治癒像をあらかじめラットを用いて確かめる事である。臨床的に見て一般的な、いわゆる仮

性と呼ばれる糖尿病性白内障は皮質表層の線維膨化を伴う後嚢下混濁の型を示す¹⁵⁾が、これは特徴的所見ではなく老人性を含む非糖尿病性白内障でも同様な混濁を認める事が多い。従って細隙灯顕微鏡所見のみで糖尿病患者の白内障を糖尿病性と断定する事は困難である。また糖尿病患者では老人性白内障出現も早くなると言われている。現在、白内障を細隙灯写真撮影によって他覚的に表示する方法が開発され成果をあげている。しかし、糖尿病患者に出現した白内障も前述のごとく AR の関与するものとそうでないものが混在している可能性が高い事から、たとえ ARI の効果があったとしても水晶体全体として見れば白内障進行と誤って判断される恐れがある。これが ARI によるラット白内障治癒像を臨床治験前に十分把握せねばならない理由である。

ラット糖白内障の基本的病理像は線維膨化である。膨化は赤道部のやや深層皮質に初発して前皮質、後皮質と順次進展し核部分を取り巻く様にすべての皮質が液化する。ここまでの変化が AR に起因するものであり、核部分の白濁は二次的なものである。この白内障進行中の一定の時期に ARI を投与すると赤道部での新たな線維崩壊が阻止され増殖可能となり、また液化領域内側の正常線維膨化が停止し水晶体は赤道部、前皮質、後皮質の順に再透明化する。これが ARI-reversal の本態であると筆者らは結論した⁴⁾。しかし、ラット糖白内障治癒像をそのままヒト糖尿病性白内障に当てはめることはできない。なぜなら両者の発症部位が異なるからである。この矛盾点を解明しヒト糖尿病性白内障治癒像を前もってラットで確認する事が筆者らのめざしている所であり、本研究の目的でもある。

生後3週齢の幼若ラットを25%以上のガラクトース含有食餌飼育したり、大量の STZ を静脈注射して生じる糖白内障は赤道部から発症する(急速進行赤道部型)⁴⁾⁵⁾。一方、結果の項で述べた様に生後6週齢成熟ラットを25%ガラクトース含有食餌飼育したり、少量の STZ を投与して生じる糖白内障は赤道部ではなく表層皮質に線維膨化が初発した(緩徐進行表層皮質型)。この所見は同じラットでも幼若か成熟か、原因となるストレスの大小によって白内障発生部位が異なることを意味し、後者の成熟緩徐進行表層皮質型白内障はまさしくヒト糖尿病性白内障に近似した像を呈する事が判明した。今後の課題は当然このモデルを用い白内障治癒過程を調べる事である。

AR の研究の中で最も遅れている部分は生体内での

生理作用に関してである。ARは無為に存在しているとは考えられず長期間それを阻害する事には治療の本質としては問題が残る。臨床的には短期間のみ投与する場合もあると予測されるが、仮に強い副作用が出現し臨床的に使用出来ないとしてもAR, ARI研究を通じて得られた糖尿病性合併症に関する膨大な知識は今後の糖尿病研究に大きく寄与すると信じる。

結 論

生後6週齢(体重200g)ラットを25%ガラクトース含有食餌飼育群および30~100mg/kgのstreptozotocin (STZ) 経尾静脈1回注射群の二群に分け、発症した糖白内障水晶体を組織学的、抗ラット水晶体アルドース還元酵素(AR)血清-免疫組織化学(PAP法)的に観察し次の結論を得た。

(1) ガラクトース白内障は赤道部ではなく前後表層皮質に発症した。

(2) 糖尿病性白内障においてSTZ大量投与では赤道部に、少量投与では前後表層皮質に発症した。

(3) ラット糖白内障は原因の大小、ラットの成熟性の二要素によって発症様式が異なり、急速進行赤道部型、緩徐進行表層皮質型に分類できる。

(4) 緩徐進行表層皮質型ラット糖白内障はヒト糖尿病性白内障に最も近似した動物モデルである。

本論文の要旨は第90回日本眼科学会において発表した。また、文部省科学研究費の補助を一部受けた。

文 献

- 1) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. Invest Ophthalmol 4: 786—799, 1965.
- 2) **Kinoshita JH**: Mechanism initiating cataract formation. Invest Ophthalmol 13: 713—724, 1974.
- 3) **Friedenwald JS, Rytel D**: Contribution to the histopathology of cataract. Arch Ophthalmol 53: 825—831, 1955.
- 4) 赤木好男, 田坂 宏, 中路 裕, 糸井素一, **Kador**

PF, Kinoshita JH: ラットガラクトース白内障に対するAldose reductase (AR) 阻害剤の効果. 日眼 89: 1276—1281, 1985.

- 5) 赤木好男, 中路 裕, 糸井素一, **Kador PF, Kinoshita JH**: 実験的ラット糖尿病白内障におけるAldose reductaseの局在性について. 眼紀 36: 1207—1211, 1985.
- 6) 赤木好男, 田坂 宏, 秋宗万理, 滝 純, 糸井素一: 幼若および成熟ラットガラクトース白内障の初期像. あたらしい眼科 2: 1304—1306, 1985.
- 7) 赤木好男, 田坂 宏, 田辺稔邦, 宮谷博史, 糸井素一: 幼若および成熟ラットガラクトース白内障発症様式. 眼紀 37: 803—808, 1986.
- 8) **van Heyningen R**: Formation of polyol by the lens of the rat with sugar cataract. Nature 184: 194—196, 1959.
- 9) **Datiles M, Fukui H, Kuwabara T, Kinoshita JH**: Galactose cataract prevention with sorbinil, an aldose reductase inhibitor: a light microscopic study. Invest Ophthalmol 22: 174—179, 1982.
- 10) **Fukushi S, Merola LO, Kinoshita JH**: Altering the course of cataracts in diabetic rats. Invest Ophthalmol 19: 313—315, 1980.
- 11) 田坂 宏, 赤木好男, 中路 裕, 宮谷博史, 吉川隆男, 糸井素一: Aldose reductase 阻害剤, Eisai E-1008のガラクトース白内障に対する効果, その3. 眼紀 37: 797—802, 1986.
- 12) **Tian-Sheng H, Datiles M, Kinoshita JH**: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. Invest Ophthalmol 24: 640—644, 1983.
- 13) **Kador PF**: Overview of the current attempt toward the medical treatment of cataract. Ophthalmol 90: 352—364, 1983.
- 14) **Akagi Y, Kador PF, Kinoshita JH**: Aldose reductase distribution in the rat and human diabetic cataracts. Invest Ophthalmol In press.
- 15) 藤永 豊: 糖尿病性白内障, 1. 病理. 眼科Mook, No. 8, 220—233, 1979.

(第90回日眼総会原著)