

## 実験的糖尿病性角膜内皮障害

## II. アルドース還元酵素阻害剤 (ARI) との関連性について (図6)

赤木 好男・高橋 幸男・田辺 稔邦・池部 均 (京都府立医大眼科学教室)  
馬嶋 清如・宮谷 博史・宮本 嘉久・照林 宏文

Prevention of Experimental Diabetic Corneal Endotheliopathy  
with Aldose Reductase Inhibitor

Yoshio Akagi, Yukio Takahashi, Toshikuni Tanabe, Hitoshi Ikebe,  
Kiyoyuki Majima, Hiroshi Miyatani, Yoshihisa Miyamoto and Hirofumi Terubayashi

*Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine*

## 要 約

生後3週齢ラットを50%ガラクトース含有食餌, aldose reductase 阻害剤 (ARI, M-79175, エーザイ) 混入同食餌, 通常食餌の三群に分け約6週間飼育後, 経角膜の冷凍法にて内皮細胞を破壊し修復像を組織学的, AR免疫組織化学的に観察し比較検討し次の結論をえた。(1)凍結前でガラクトース群に出現していた角膜上皮基底細胞AR異常局在をARIは是正し, それによって生じる糖尿病性角膜上皮障害治療の可能性を示唆した。(2)ガラクトース群では正常群に比べ修復が遅延し, ARI投与はそれを改善した。(3)糖尿病性角膜内皮障害とは糖尿病患者内皮細胞障害時その修復が遅延することを意味する。(4)糖尿病性角膜内皮障害発症にはARが関与していること, ARIはそれを改善せしめることを強く示唆した。(日眼 91:187-193, 1987)

キーワード: ガラクトースラット, 糖尿病性角膜内皮障害, ARI, 免疫組織化学, AR

## Abstract

Rat corneal endothelial cells of normal and treating galactosemic rat with or without aldose reductase inhibitor (ARI, M-79175, Eisai) were destroyed by transcorneal freezing. The corneas were examined by means of the light and electron microscopy and AR-immunohistochemistry. Prominent multilayered AR-positive cells appeared only in the corneas of galactosemic rat treated with out ARI. They could be seen even at 14 days after freezing. These regenerating cells in both normal and galactosemic rat with ARI disappeared by 7 days, forming several layers 4 days. These results show the abnormality in the corneal endothelial healing of the galactosemic rat. The delay could be prevented by treating of galactosemic rats with ARI. This study suggests that AR plays a role in the corneal endotheliopathy observed in diabetes. (Act Soc Ophthalmol Jpn 91: 187-193, 1987)

Key words: galactose rat, diabetic corneal endotheliopathy, ARI, immunohistochemistry, AR

## はじめに

糖尿病性網膜症や白内障などの糖尿病性合併症のなかでも角膜内皮障害は, 最近になって知られてきた。

Schlitzら<sup>1)</sup>糖尿病患者の角膜内皮細胞を specular microscope によって観察し次の結論をえた。糖尿病患者でも内皮細胞の形態異常(大小不同, 多形性)が存在し, 経過が長いとさらに内皮細胞数も減少し, その

別刷請求先: 〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル 京都府立医科大学眼科学教室 赤木 好男  
Reprint requests to: Yoshio Akagi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med.  
Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan  
(昭和61年8月1日受付) (Accepted August 1, 1986.)

角膜内皮細胞は脆弱性を有すると言う。糖尿病性角膜内皮障害はそれ自身で水疱性角膜症をおこすほど重篤なものでないが、今後、糖尿病患者に対する眼内レンズ手術など内皮細胞に障害を与える機会が増加することを考えると、動物実験でその本態を十分確かめておく必要がある。

われわれは既にガラクトース血症ラットの角膜内皮細胞を経角的に凍結破壊し、正常ラットと比べるとその修復は相当遅延することを報告<sup>2)</sup>し、ラットにも糖尿病性角膜内皮障害が存在する事を確認した。糖尿病性合併症発症の起因酵素と言われている aldose reductase (AR) がこの内皮障害とも関係するかどうかを次に調べる必要があり、これが本研究の目的である。

## 実験方法

実験には体重50g (生後3週齢) の Sprague Dawley 系ラットを12匹使用した。それらを以下の3群に分けた。(1) 研究室用通常食餌飼育群 (対照群)、(2) 50g ガラクトース含有食餌飼育群 (ガラクトース単独群)、(3) 50g ガラクトース含有食餌に AR 阻害剤 (ARI) M-79175 (エーザイ) を0.005%濃度混入食で飼育した群 (ARI ガラクトース群)。各群のラットを約6週間飼育した。角膜内皮細胞の凍結破壊は角膜中央部にあらかじめアセトン・ドライアイス中で $-70^{\circ}\text{C}$ に冷却した先端部直径1.5mm のステレンス棒を約20秒間あてて行った。凍結破壊後経時的にネブタール致死麻酔にて眼球摘出し、以下の方法にて観察した。

光顕・電顕的観察—角膜を1%paraformaldehyde・1%glutaraldehydeを含む0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 固定と1%四酸化オスミウムによる再固定後、所定の方法にてアルコール脱水しエポン包埋した。光顕切片はトルイジン青、電顕切片は電子染色後それぞれ観察した。

免疫組織化学的観察—試料は4%paraformaldehydeを含む0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) にて固定し、その後、10~20%サッカロース含有緩衝液に浸漬した。角膜の試料から10~15 $\mu$  の凍結切片を作成し、抗ラット水晶体 AR 山羊血清 (Dr.P.F. Kador, NEI, USA 精製) を第一抗体とする PAP 法にて染色を行った。尚、染色時にあらかじめ吸収試験を行った抗血清もしくは山羊血清を第一抗体の代わりに用い対照とし、特異反応のないことを確かめた。

## 結果

凍結破壊前—対照群, ARI ガラクトース群, ガラクトース単独群の角膜における AR 陽性染色は上皮および内皮細胞にのみ見られ、実質層を含む他の層には染色は見られなかった。上皮細胞層において前二者はび慢性 AR 染色が淡く観察されたのに対し、後者では上皮細胞層のうち他層は同様に染色されたが、基底細胞層のみは染色性が強かった。内皮細胞層は三者とも上皮細胞に比べ濃く染色されその像に差異はなかった (図1)。ARI ガラクトース群およびガラクトース単独群角膜内皮細胞の光顕・電顕的観察では対照群と同様で微細構造についても異常はなかった。

凍結破壊2日後—三者とも内皮細胞欠損部はほとんど修復され、この時期における修復像には三者間で大きな差異は認められなかった。すなわち内皮細胞は前房側に凹凸不整を示し、障害部中央付近には球状円形となった内皮細胞が数層塊状をなして分布していた。これらの細胞はすべて AR 染色陽性であったが、ガラクトース単独群の場合が他の二者に比べ少し全体の膨

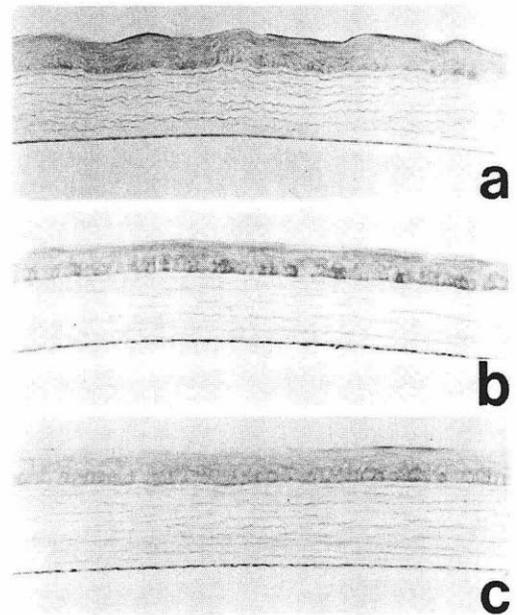


図1 凍結破壊前角膜における AR 局在。対照群 (a)、ガラクトース単独群 (b)、ARI ガラクトース群 (c) のいずれでも内皮細胞は濃染し、差異は認められない。上皮細胞層も瀰漫性に染色されたが、ガラクトース血症群では基底細胞層のみが濃染する (PAP 染色,  $\times 115$ )。

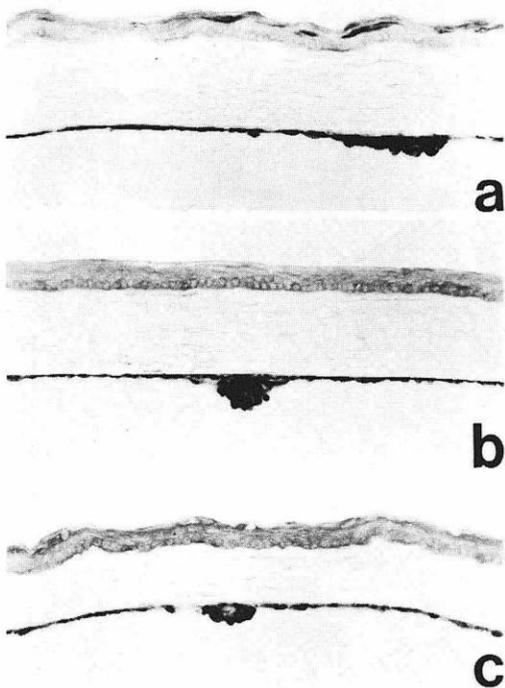


図2 凍結破壊2日後角膜におけるAR局在. 対照群 (a), ガラクトース単独群 (b), ARI ガラクトース群 (c) のいずれでも欠損部は覆われ, 凍結部位に球状円形化皮内細胞が塊状をなしている (PAP 染色, × 115).

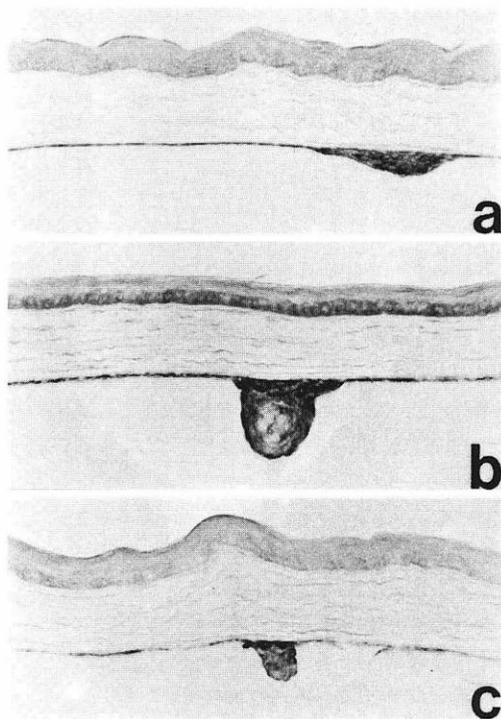


図3 凍結破壊4日後角膜におけるAR局在. ガラクトース単独群 (b) のみ凍結部位に巨大球状突出が見られる. 対照群 (a), ARI ガラクトース群 (c) では高さの低い重層細胞群が見られる (PAP 染色, × 115).

隆が大きい例が多かった(図2). ガラクトース単独群のこの時期の角膜を電顕的に見ると, 障害部付近では円形で疎な細胞質や電子密度の高い核をもつ細胞, 細胞質自身が電子密度の高くなった細胞などが見られ, その他の部位における一層の内皮細胞も細胞質が疎になり核や細胞質の電子密度が高くなっていた.

凍結破壊4日後一対照群では角膜中央部付近に扁平になった数層のAR染色陽性内皮細胞が台形状をなしているのが見られるだけで, その他の領域では2日目に見られた凹凸不整は消失し内皮細胞は光顕的に正常に復していた(図3 a). 一方, ガラクトース単独群では凹凸不整は残存し, 凍結部位内面に実体顕微鏡による観察でアメーバ状もしくは円形の大型膨隆構造物が複数個ほとんどの例で出現していた. 膨隆構造物のAR染色を見ると表層部では他の内皮細胞と同様濃く見られたが, その中央部ではまだらとなり白く抜けた所も見られた(図3 b). 光顕的には膨隆構造物表層部は円形化正常細胞質をもつ内皮細胞が数層覆っていた

が, 膨隆内部には変性細胞群が存在した(図4 a). 電顕的に見ると膨隆表層部は主として核および細胞質が円形化した皮内細胞からなり, 内部は電子密度の高いものや, 逆に疎な細胞質をもつ細胞が見られ dense body も出現した(図4 b, c). それ以外の周辺部では一層の凹凸不整内皮細胞が分布した. ARI ガラクトース群でも膨隆構造物は時々見られたがその大きさは小さく, AR染色も淡かった(図3 c). 他の部位では内皮細胞は対照群と同様扁平化し正常に復していた.

凍結破壊7日後一対照群, ARI ガラクトース群ではこの時期になると, 前例で内皮細胞は完全に扁平化し正常化していた(図5 a, c). ガラクトース単独群では半数以上の例で膨隆構造物はこの時期でも残存し, その茎が大変細くなったものも多く, AR染色はその内部が4日後のものより更に淡くなった(図5b). 光顕・電顕的に突出部を観察すると4日後に比べ細胞質正常円形化内皮細胞の数が増加していた. 内部には空胞などの細胞崩壊断片が散在するのが観察された.

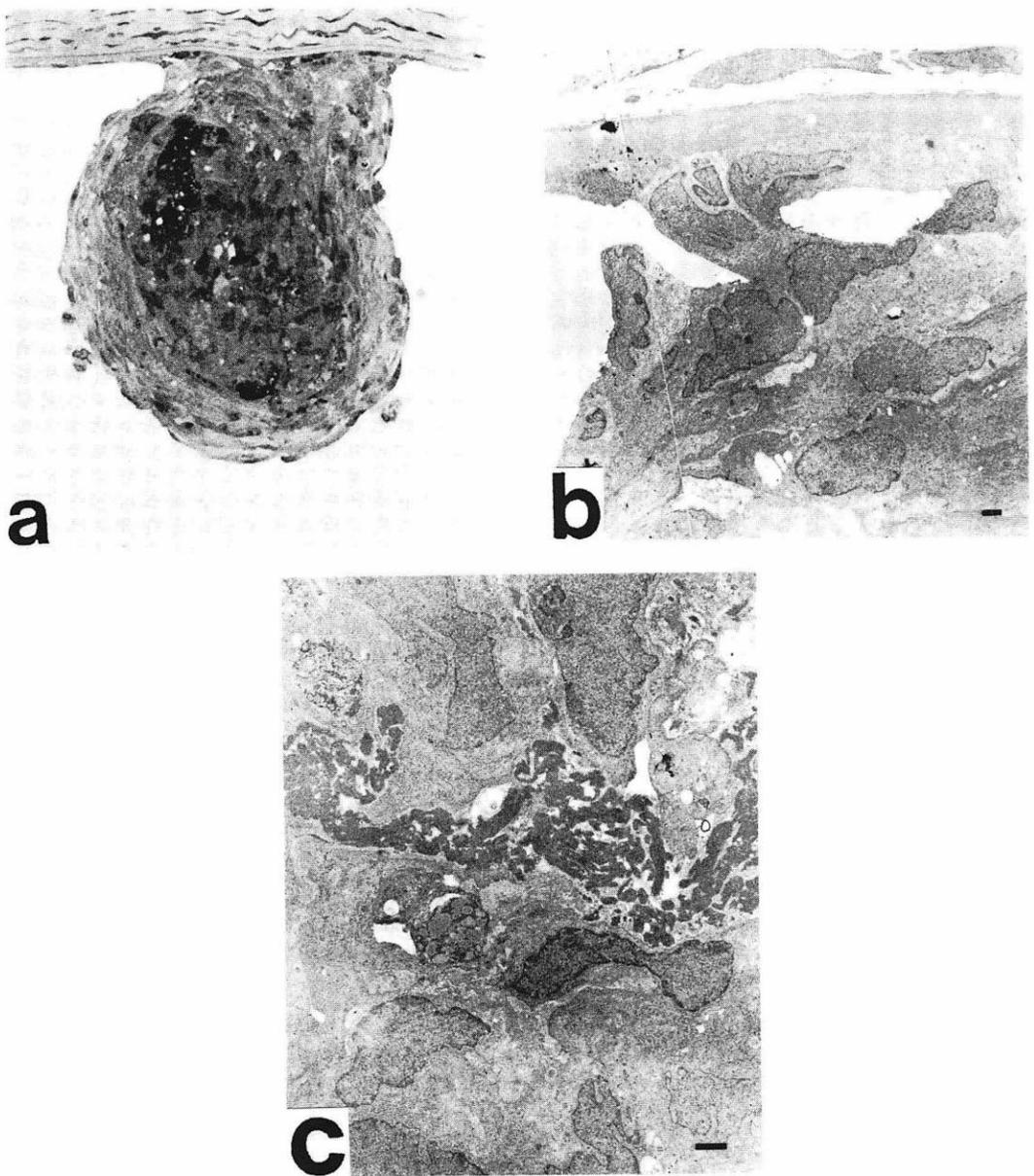


図4 ガラクトース単独群凍結破壊4日後角膜光顕像(a)と電顕像(b,c). 球状突出表層部には扁平細胞, 内部には変性細胞群が観察される(a, トルイジン青染色×200. b, c, bar は $1\mu$ ).

凍結破壊14日後一対照群, ARI ガラクトース群には異常は認められなかった. ガラクトース単独群ではこの時期でも膨隆構造物が観察されたが, AR 染色はほとんど消失していた(図6).

## 考 按

糖尿病性眼合併症のうち最も代表的なものは, 網膜症と白内障である. 最近になって角膜内皮障害も存在することが知られてきた. Schlzら<sup>1)</sup>は糖尿病患者の角膜内皮細胞を specular microscope にて観察し

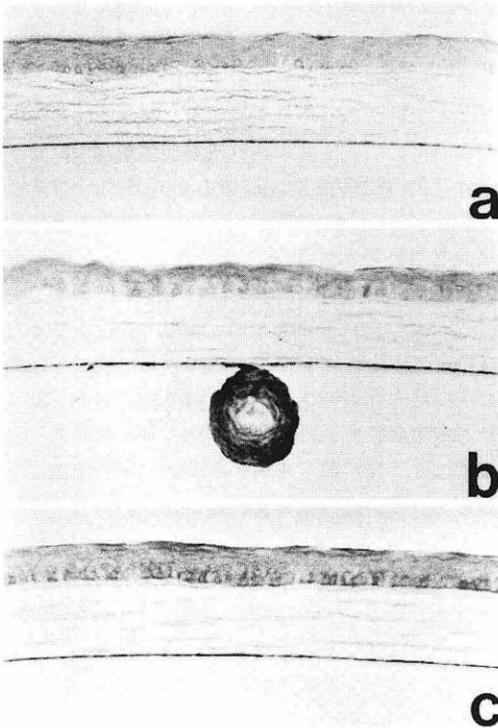


図5 凍結破壊7日後角膜におけるAR局在。ガラクトース単独群(b)には球状突出部が残存するが、対照群(a)、ARIガラクトース群(c)では完全に正常に復する(PAP染色,  $\times 115$ )。

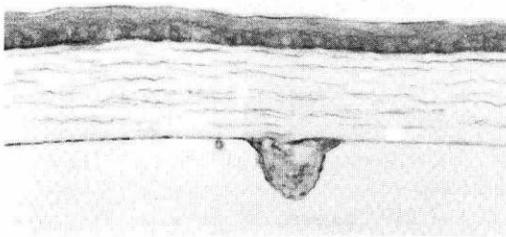


図6 ガラクトース単独群凍結破壊14日後角膜におけるAR局在。本群ではこの時期でもAR染色性が乏しい球状突出部が観察される(PAP染色,  $\times 200$ )。

pleomorphism や polymegathism つまり多形性, 大小不同などの形態異常が存在する事を報告した。経過の長いI型(若年型)糖尿病症例ではそれに加え内皮細胞数も減少すると言う。Yeeら<sup>3)</sup>, 松田<sup>4)</sup>も同じ手法で確認し, 糖尿病性角膜内皮障害の存在が明らかとなった。臨床的に見て判るように糖尿病患者がそれだけの

理由で水疱性角膜症をおこす事はない。しかし, 糖尿病症例に対する, 硝子体手術, 白内障眼内レンズ手術の増加, 緑内障などを併発した場合の長期に亘る点眼薬の使用などを考えると, 今後益々内皮細胞を障害する機会は増加する事が予想される。従ってヒトで確認された以上, 動物でもその存在を確かめ本態を明らかにしなければならない。

角膜内皮障害の根拠となった多形性, 大小不同所見は決して糖尿病に特徴的なものではない。原因はなにであっても内皮細胞を脱落させるようなストレスが加わった場合, 内皮細胞は移動もしくは拡大して欠損部を覆う性質を持つ。その移動細胞は大きくなったり角がとれ円形化する。すなわち多形性, 大小不同などの形態異常を有する内皮細胞が出現する訳である<sup>5)</sup>。従って糖尿病患者角膜内皮細胞には非糖尿病患者に比べなんらかの原因でより強いストレス負荷が絶えずかかっており, 結果として脆弱性を有すると考える方が妥当である。前述の通り糖尿病状態が長い場合にのみ内皮細胞が脱落する<sup>1)</sup>のでこのストレスは糖異常と関連しそれ程大きくないにしても無視できないと推測する。

実験的糖尿病の長年に亘る研究から Kinoshita はその起因酵素がアルドースリダクターゼ(AR)である事を主張した<sup>6)</sup>。その後の多くの研究から糖尿病性合併症のすべてもこのARが起因酵素となっている可能性が示唆されている。その根拠のひとつの事実はAR阻害剤(ARI)の全身もしくは点眼投与が白内障発症を抑制・阻止し, いったん発症した白内障を治癒させる事である<sup>8)</sup>。また糖尿病<sup>9)</sup>およびガラクトース血症<sup>10)</sup>ラットの角膜上皮細胞再生は正常ラットに比べ遅延し, ARI全身投与によって正常に復するという事も報告されている。ガラクトース血症ラット白内障は糖尿病白内障とARに関していえば同じ理論的背景をもつが, 糖尿病モデルは全身状態・体重増加が相当障害される。すなわち角膜径も小さいので比較判定実験は困難を伴う。一方, ガラクトース血症モデルは全身状態がほとんど障害されず, めざす糖異常が確実に強力である。例を挙げると白内障はばらつきなく短期間で発症し, 網膜細小血管基底膜肥厚<sup>11)</sup>, イヌにヒト様網膜症も出現する<sup>12)</sup>と報告されている。また, ARはヒト<sup>13)</sup>, イヌ<sup>14)</sup>, ラット<sup>2)15)</sup>の内皮細胞に共通して豊富に分布する。これらの事実からガラクトース血症ラットはARに関し考えられるヒト糖尿病の最適のモデルと言え, これが本実験で同ラットを用いた理由である。

ARに関する理論から言って出現する病理像は水晶体線維で代表される様な細胞膨化である。無処置糖尿常ラット角膜上皮、内皮細胞などにはその所見は出現しない。その理由は不明であるが、細胞自身が変性しなくともその機能を障害している可能性が高い。それを支持する事実として、ガラクトース血症ラット角膜上皮基底膜異常<sup>16)</sup>、網膜細小血管基底膜肥厚<sup>17)</sup>などの間接的異常が挙げられる。

われわれは既にガラクトース血症および正常ラットの内皮細胞を経角膜的冷凍破壊しその修復が前者の方が後者より遅延することを報告した<sup>2)</sup>。冷凍破壊と言う手段を用いた理由は、結果の項で述べた様に微細構造に異常は認められないことから糖尿病性角膜内皮障害が無処置状態では極めて軽微なもので簡単にはその本態は検出できないと考え、人工的破壊後の修復における細胞動態の異常として捉えようと試みた。いずれにしてもその遅延をARIが改善させるかどうかを調べる必要がありこれが本実験の目的としたところである。

最後に本実験結果について考察する。凍結前角膜のAR免疫組織化学的観察によって上皮細胞層ではガラクトース単独群でのみ基底細胞がARを豊富に有する事が示唆された。内皮細胞では少なくともAR染色上三者の間に差異を見つけることはできなかった。凍結2日後では三者とも欠損部は覆われ円形化細胞からなる重層所見にほとんど違いはなかったが、この事から三者に対する凍結の侵襲は同一であったと考える。対照群、ARIガラクトース群角膜内皮細胞はその後膨隆構造物を形成することなく正常に復するのに対し、ガラクトース単独群では7~14日目でも異常細胞群が残存する例が半数以上あった。前房側に突出するこの異常細胞群は、変性細胞を取り囲む再生内皮細胞から成っており、本実験方法では不明であるがその数の多さから考えて分裂後移動した細胞を主体とすると推測する。最終的には消失し線維芽細胞と異なりARを有している事からいわゆるretrocorneal membraneではないと判断する。三者共通の凍結条件でなぜガラクトース単独群でのみ前房側突出異常細胞群が出現したのかは不明であるが、凍結破壊後内皮細胞が重層する所見そのものは正常家兎角膜修復過程でもみられる反応<sup>17)</sup>であり、本群では重層が極端で遷延化するつまり内皮細胞が異常細胞増殖を含む過剰反応を起こしているものと考えられる。

以上の事からガラクトース血症ラット角膜では内皮

細胞修復が遅延し、ARI投与によって改善すると結論する。糖尿病患者でも同様の遅延が起こりうると思われる。また前述の内皮細胞に対する絶え間ないストレスの原因とARがあげられる。つまり糖尿病性角膜内皮障害はARによって惹起される可能性が高く、ヒト糖尿病性角膜内皮障害をARI投与が是正する可能性を示唆するものである。また、ARIは角膜上皮基底細胞層の異常AR局在も是正したことからそれに伴う糖尿病性角膜上皮障害の改善も期待できる。将来、もしARIが日常臨床に登場した時、使用方法は点眼または全身投与で、内皮細胞が相当障害されている糖尿病症例の手術に先立ち投与したり、難治性上皮剝離症例に対する使用が予想される。糖尿病症例の手術に先立ち投与したり、難治性上皮剝離症例に対する使用が予想される。糖尿病性角膜障害は長い期間経過して発症するのであるから、ARIが効果を有したとしても抗生物質のように即効性でないことは言うまでもない。本実験で使用したARI, M-79175(エーザイ)はラット糖白内障に強力な効果を示す<sup>8)</sup>。つまり、角膜を十分透過する訳で、このような性質をもつARIの場合には、全身投与で副作用出現の可能性を考えると局所投与の方が使いやすい。

本論文は第90回日本眼科学会総会にて発表した。文部省科学研究費の援助を一部受けた。

#### 文 献

- 1) Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF, Schultz KJ: Corneal endothelial changes in type I diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 98: 401-410, 1984.
- 2) 赤木好男, 高橋幸男, 池部 均, 田辺稔邦, 宮谷博史, 糸井素一: 実験的糖尿病性角膜内皮障害. I. 正常ラットおよびガラクトース血症ラット角膜内皮細胞修復の形態学的観察. *眼紀* 37: 809-813, 1986.
- 3) Yee RW, Matsuda M, Kern TS, Engerman RL, Edelhauser HF: Corneal endothelial changes in diabetic dogs. *Curr Eye Res* 4: 759-766, 1985.
- 4) 松田 司: 糖尿病角膜の内皮細胞. *眼科* 28: 399-409, 1986.
- 5) 赤木好男, 佐々木研二, 糸井素一, 西田克次: ゲンタマイシン結膜下注射が白色家兎角膜内皮細胞におよぼす影響について. *眼紀* 31: 207-217, 1980.
- 6) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia. *Invest Ophthalmol* 4: 786-799, 1965.
- 7) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. *Invest Ophthalmol* 13: 713

- 724, 1974.
- 8) 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—免疫組織化学的研究—. 日眼 89: 1276—1281, 1985.
  - 9) Fukushi S, Merola LO, Tanaka M, Datiles M, Kinoshita JH: Reepithelization of denuded corneas in diabetic rats. Exp Eye Res 31: 611—621, 1980.
  - 10) Datiles MB, Kador PF, Fukui HN, Hu T, Kinoshita JH: Corneal re-epithelialization in galactosemic rats. Invest Ophthal Vis Sci 24: 563—569, 1983.
  - 11) Robison WG, Kador PF, Kinoshita JH: Retinal capillaries: Basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. Science 221: 1177—1179, 1983.
  - 12) Engerman RL, Kern TS: Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. Diabetes 33: 97—100, 1984.
  - 13) Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, Kuwabara T, Kinoshita JH: Localization of aldose reductase in the human eye. Diabetes 33: 562—566, 1984.
  - 14) Kern TS, Engerman RL: Distribution of aldose reductase in ocular tissues. Exp Eye Res 33: 175—182, 1981
  - 15) Ludvigson MA, Sorenson RL: Immunohistochemical localization of aldose reductase. Diabetes 29: 450—459, 1980.
  - 16) 高橋幸男, 赤木好男, 秋宗万理, 田村邦嘉, 糸井素一: 糖尿病性角膜上皮障害と Aldose reductase. 第2報. 実験的ガラクトース血症ラット角膜について. 日眼 90: 336—340, 1986.
  - 17) 赤木好男, 佐々木研二, 中路 裕, 小玉裕司, 池部均, 糸井素一: 家兎角膜上皮細胞の初期再生過程にゲンタマイシン結膜下注射の及ぼす組織学的変化について. 眼紀 33: 1175—1182, 1982.

(第90回日眼総会原著)