

アルドースリダクターゼ阻害剤 (ARI), その4.

点眼によるガラクトース白内障発生抑制効果 (図8, 表1)

田坂 宏・赤木 好男・吉川 隆男
池部 均・高橋 幸男・茶本 薫 (京都府立医科大学眼科学教室)
宮本 嘉久・照林 宏文・上野 正孝* (* エーザイ中央研究所)
田中 和夫*

Prevention of Rat Galactose Cataract with Topical Aldose Reductase Inhibitor, E-1008

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

要 約

体重50gの幼若ラットに25%ガラクトース食を与え、各濃度のアルドースリダクターゼ阻害剤(E-1008, エーザイ)を点眼薬として投与した。白内障発生阻止は、水晶体内ガラクトitol量の測定、光学顕微鏡学的観察、アルドースリダクターゼ抗体を使った免疫組織化学的観察により検索した。0.01%以上の濃度の点眼薬で白内障発生阻止効果を認めた。結果として、アルドースリダクターゼ阻害剤の主な働きは水晶体赤道部での新たな水晶体線維崩壊の防止であると思われた。(日眼 91:246—253, 1987)

キーワード: アルドースリダクターゼ, ガラクトース白内障, アルドースリダクターゼ阻害剤, 免疫組織化学, ラット

Abstract

Rats weighing fifty gram fed a 25% galactose diet were treated topically with various concentrations of aldose reductase inhibitor (ARI), E-1008 (Eisai, Japan). The prevention of cataracts were examined by means of the measurement of galactitol, light microscopy and AR-immunohistochemistry. Eye drops higher than 0.01% concentration of E-1008 could effectively prevent the progress of galactose cataract. The results suggests that the main role of ARI may be to block the breakdown of newly formed lens fibers at the bow region. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 246—253, 1987)

Key words: aldose reductase, galactosemic cataract, aldose reductase inhibitor, immunohistochemistry, ret

はじめに

アルドース還元酵素 (AR) は糖 (グルコース) を糖アルコール (ソルビトール) に代謝する酵素であり、この代謝がソルビトール経路の第一段階である¹⁾。実

験的糖尿病やガラクトース血症などの糖異常状態では、この AR 作用によって糖アルコールが細胞内に蓄積され、白内障が発症する事が明らかにされている^{2)~4)}。つまり、ラット糖尿病性白内障とガラクトース白内障は同一の病理像をもち⁵⁾、AR 阻害剤 (ARI) 投

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 田坂 宏

Reprint requests to: Hiroshi Tasaka, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med.

Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(昭和61年9月24日受付) (Accepted September 24, 1986.)

与で発症が同様に抑制され^{6)9)~12)}, AR に関して同一理論的発症背景をもつとされている. 筆者らも, これまで, 実験的ラット糖白内障と AR 阻害剤 (ARI) の関係を AR 免疫組織化学的に調べ, AR が起因酵素であると考えた^{5)~7)}. ラット糖白内障のうち, より個体差なく短期間のうちに発症するガラクス白内障を用いて, 本研究では, 濃度の異なる ARI 点眼投与によって白内障発生がどのように抑制されるかをガラクトール測定, 組織学および AR—免疫組織化学的観察によって検討した.

実験方法

実験には体重50g (生後 3 週齢) の SD 系ラットを118匹用いた. ラットを25%ガラクトース含有餌料にて4週間飼育し, 同時に ARI である6-fluoro-2-methylspiro (chroman-4,4'-imidazolidine)-2',5'-dione (E-1008, Eisai) を以下の4群に分け1日2回両眼点眼投与を行った. (1) 溶解液 (1ml 中に燐酸1ナトリウム0.36%, 燐酸2ナトリウム1.55%, Nacl 0.16%, glycerin 0.43%, benzalkonium chloride 0.005%を含む) 投与群(対照群), (2) 0.002%濃度薬剤投与群(0.002%群), (3) 0.01%濃度薬剤投与群 (0.01%群), (4) 0.05%濃度薬剤投与群(0.05%群). 1週毎各群6匹の眼球を摘出し, 片眼6個の水晶体はガラクトール測定用とし, Hayman の方法¹³⁾に準じ, 小野の報告¹⁴⁾と同じ方法で液体ガスクロマトグラフィ (島津, GC-6AM) にて測定した. 他眼6個の水晶体は組織学用とし, 4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M 燐酸緩衝液 (pH 7.4) にて固定した. 光顕試料はアルコール脱水後, メタクリル樹脂 (JB-4) 包埋し1 μ に薄切後トルイジン青で染色後観察した. 免疫組織化学用試料は固定後, 所定の方法にて約15 μ の凍結切片を作成し, それらに対し PAP 法を用いた. 第1抗体は抗ラット水晶

体 AR 山羊血清 (Kador, P.F. NEI, NIH 精製) を使用し, 対照として, 第1抗体の代わりに, あらかじめ吸収試験を行った抗血清あるいは山羊血清を用い, 特異反応のないことを確かめた.

結 果

薬剤投与群で, 結膜充血等の刺激症状や急性毒性と思われる所見は見られなかった.

(A) 生化学的所見

各群のガラクトール量は表1に示した. 通常食群 (無処置群) ではガラクトールはほとんど検出されなかった. 点眼群において14日後までのガラクトール量は点眼剤の濃度に完全に反比例していた. 3週以降0.05%群を除き急激に低下していた. 一方, 0.05%群では3週迄は増加するがそれ以降一定となった.

(B) 組織学, AR 免疫組織化学的所見

(1) 対照群—4~7日後に赤道部皮質に膨化が出現した. 3週後には, 2週後に見られた水晶体赤道部から前皮質, 後皮質に及ぶ皮質の液化はさらに進展し, 全周の皮質が液化し水晶体中央部の核部分を取りかこむように存在した (図1).

(2) 0.002%点眼群—7日後赤道部皮質に線維膨化像が出現したが, 後皮質は正常に保たれていた. 2週後では後皮質線維も膨化した. 3週後赤道部では膨化領域の軽減と線維増殖による修復像が認められた. 4週後修復はさらに進み, 前皮質の液化領域に外接する部分に赤道部から前極部に線維がのびていたが, 前皮質, 後皮質の液化領域は更に拡大した (図2). 2週後の水晶体では赤道部, 前皮質の液化領域とその内側の非膨化線維に正常水晶体では見られない AR 陽性線維が存在した (図3). 4週後には液化領域内にみられたび漫性 AR 局在は逆に軽減し, 液化領域外接部分に赤道部から前極部に非 AR 陽性線維がのびていた (図

表1 実験前から4週後までの水晶体中ガラクトール量 (μ mole/g) の経時的変化.
() 内は水晶体数を示し, 標準偏差を付記した. それぞれ日のガラクトール量内で, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ の危険率にて有意差を認める.

	0 日	7 日	14日	21日	28日
無処置群	0 (6)	—	—	0 (6)	3.0 \pm 0.5 (6)
対照群	—	71.1 \pm 2.1 (6)	75.9 \pm 6.1 (6)	37.0 \pm 11.4 (6)	21.9 \pm 3.0 (6)
0.002%群	—	68.1 \pm 2.0 (6)	75.3 \pm 2.7 (6)	36.0 \pm 9.7 (6)	36.4 \pm 9.1 (6)
0.01%群	—	60.0 \pm 3.1 (6)*	69.1 \pm 1.9 (6)	52.6 \pm 4.6 (6)	56.4 \pm 2.9 (8)**
0.05%群	—	42.1 \pm 3.7 (6)**	55.2 \pm 2.4 (6)*	60.8 \pm 0.8 (6)	60.4 \pm 0.8 (8)**

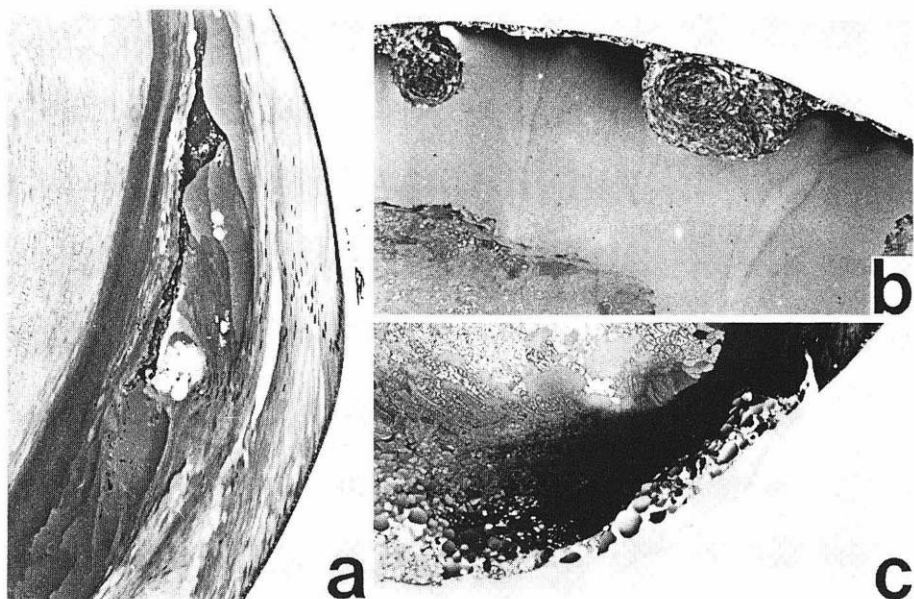


図1 対照群 (ARI 非投与群) 3週の写真像、赤道部 (a) 前皮質 (b) 後皮質 (c) を含んで全周の皮質が液化し、核部分を取りかこんでいる。前皮質 (b) では液化皮質中に増殖した上皮細胞がみられる (トルイジン青染色, $\times 60$)。

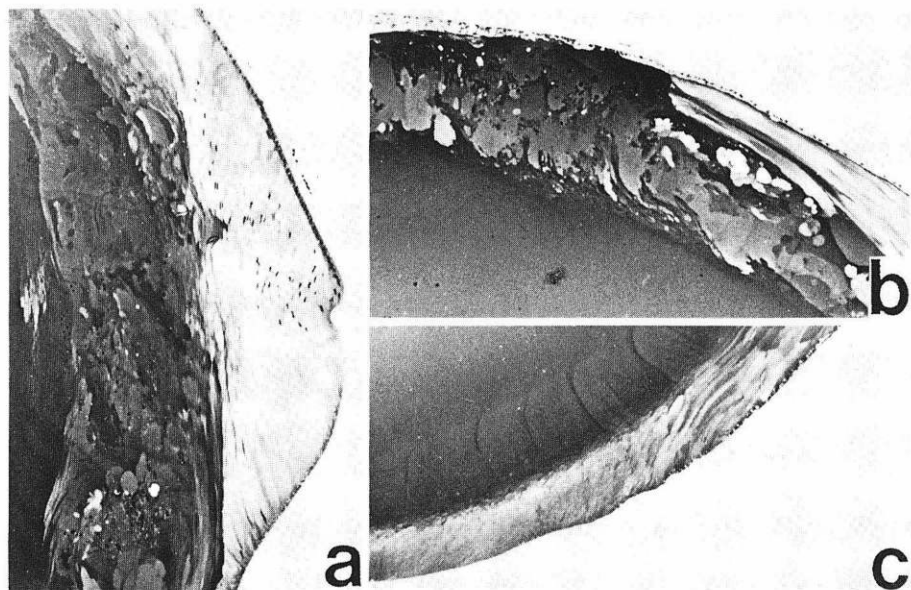


図2 0.002%濃度 E-1008点眼群 4週の写真像、赤道部 (a) には液化領域の軽減と線維増殖による修復像が認められる。前皮質 (b) では上皮細胞下に赤道部から前極部に向かう線維がのびている。後皮質 (c) でも線維膨化が観察される (トルイジン青染色, $\times 60$)。



図3 0.002%濃度 E-1008点眼群 2週 の AR 免疫組織化学像。赤道部、前皮質（枠内）の液化領域内とその内側非膨化線維に異常 AR 染色が存在する（PAP 染色、 $\times 50$ ）。

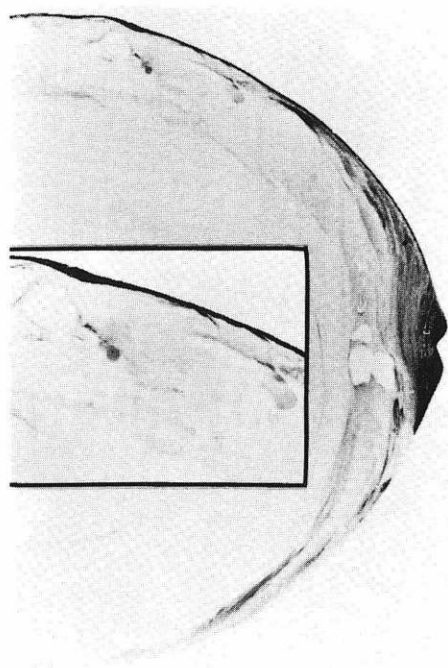


図4 0.002%濃度 E-1008点眼群 4週 の AR 免疫組織化学像。赤道部、前皮質（枠内）の液化領域内の異常 AR 染色は淡くなり、上皮細胞下に非 AR 染色線維がのびている（PAP 染色、 $\times 50$ ）。

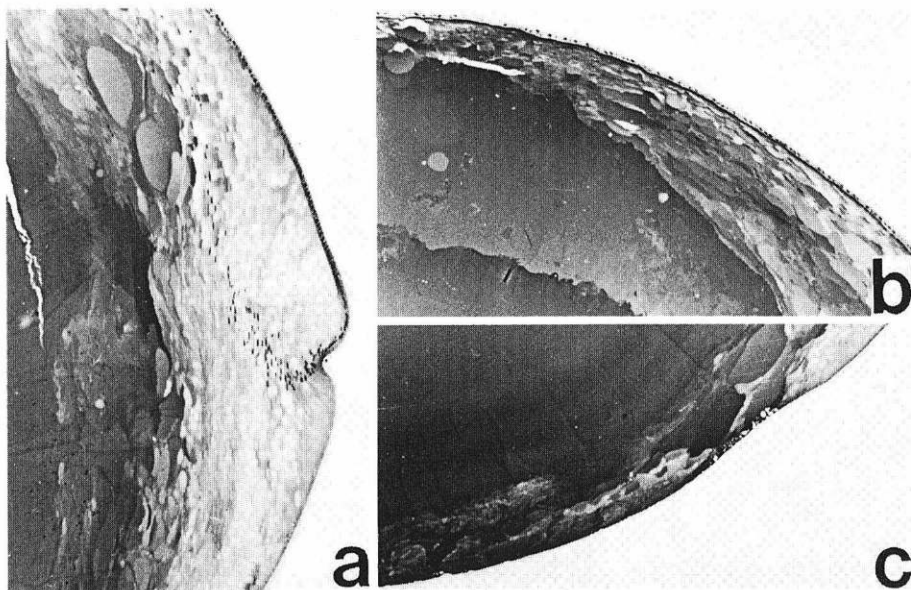


図5 0.01%濃度 E-1008点眼群 4週 の光顕像。赤道部（a）前皮質（b）後皮質（c）に線維膨化が認められるが、とくに前皮質（b）に強い（トリイジン青染色、 $\times 60$ ）。

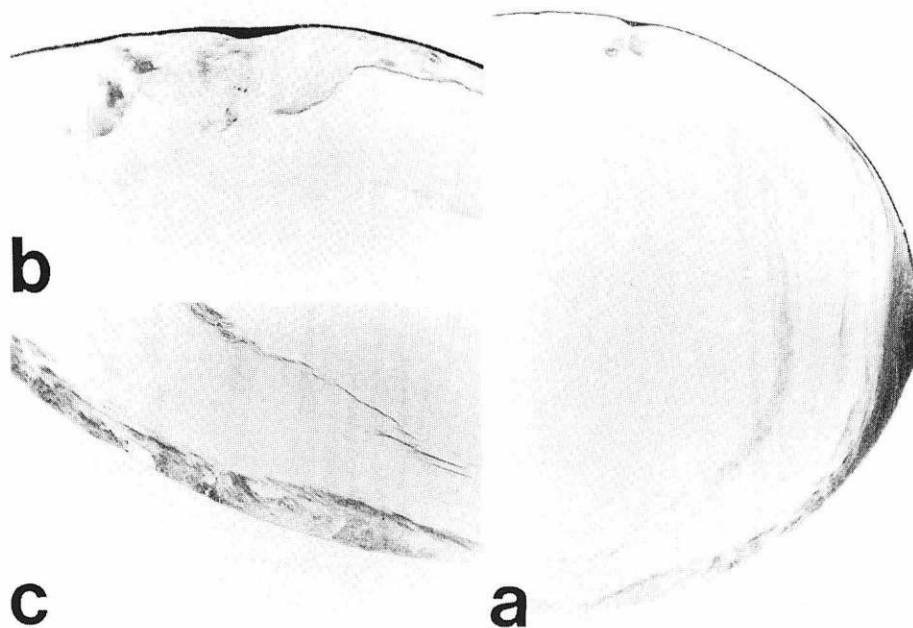


図6 0.01%濃度 E-1008点眼群 4週の AR 免疫組織化学像。赤道部 (a) にも AR 異常染色が出現し、前皮質 (b) に中等度の線維膨化と上皮細胞の増殖像、後皮質 (c) には軽度の異常染色がみられる (PAP 染色, a \times 25, b, c \times 50)。

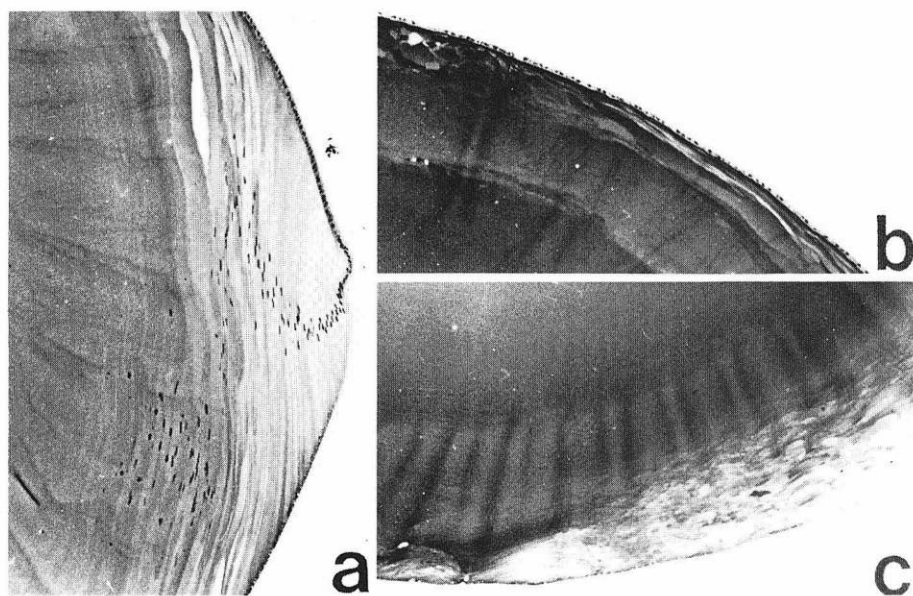


図7 0.05%濃度 E-1008点眼群 4週の光顕像。線維膨化は前皮質 (b)、後皮質 (c)、赤道部 (a) の順に弱い (トルイジン青染色, \times 60)。

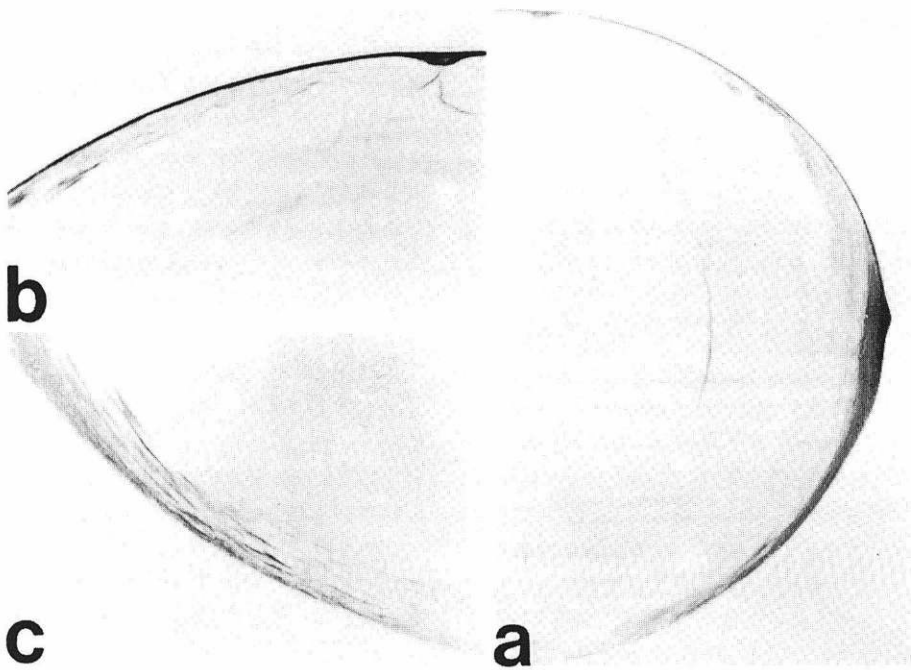


図8 0.05%濃度 E-1008点眼群 4 週の AR 免疫組織化学像。赤道部 (a) はほぼ正常で、前皮質 (b) の上皮細胞下と後皮質 (c) には軽度の AR 異常染色が認められる (PAP 染色, a×25. b, c×50)。

4)。

(3) 0.01%点眼群—7 日後には異常所見はなかった。2 週後赤道部にほとんど異常はなく、前皮質表層に中程度、後囊下線維に軽度の膨化が見られた。3 週後赤道部皮質に軽度膨化が出現し、前皮質表層の膨化はさらに進行し液化領域も認められるようになった。4 週後両部位の膨化、液化は少し拡大し、後皮質の線維膨化も増加した (図 5)。AR 局在は、2 週には赤道部はほぼ正常で前皮質表層に中程度、後皮質に軽度染色される異常 AR 局在が存在し、4 週には赤道部にも異常 AR 局在が観察された (図 6)。

(4) 0.05%点眼群—7 日後水晶体に異常はなかった。2 週後前極近傍の上皮細胞下線維にのみ一部膨化像が見られた。3 週後には赤道部皮質も少し膨化し、上皮細胞下線維の膨化はその幅をました。しかし後皮質の線維には異常はなかった。4 週後赤道部における変化は進行はしないものの、上皮細胞下の線維膨化はさらに強まり、その一部は液化した。そして後囊下線維にもわずかに膨化が出現した (図 7)。正常水晶体では存在しない AR 陽性線維は 2 週後上皮細胞下に見られ、4 週後にはその幅をまし、後皮質にも軽度染色

される AR 局在がみられた (図 8)。

考 察

Van Heyningen¹⁾はラットの糖白内障水晶体にポリオールを検出し、このポリオールは水晶体の解糖作用を阻害すると報告した。これが AR を中心とするポリオール経路の最初の発見である。Kinoshita はさらにその研究を発展させ Polyol-osmotic 説を確立した²⁾³⁾。本説は多くの研究から確認され、ヒト糖尿病性白内障にも AR が関与している可能性は高いとされており⁴⁾¹⁵⁾、ARI は白内障のみならずヒト糖尿病性合併症の新しい治療薬として期待されている。本研究はラットガラクトース白内障を用い、世界で開発されている ARI の中でも最も強力なものの一つである 6-fluoro-2-methyl-spiro (chroman-4,4'-imidazolidine)-2',5'-dione (E-1008, Eisai) の濃度別白内障発生抑制効果を検討すること、すなわち濃度の異なる ARI に対して水晶体がどのように反応するかを調べるのが目的である。ラットにおけるガラクトース白内障は、AR に関して、糖尿病性白内障と同一の理論的背景^{6)8)9)~12)}をもつと考えられ、より短期間に、ばらつきなく発症す

るため、薬剤の効果判定には最も適当であると考え本実験に用いた、白内障進行状態は組織学的には水晶体線維膨化、生化学的には代謝産物であるガラクトース測定によって知ることができる。AR免疫組織化学を用いた理由は、同一切片上でAR局在と線維膨化を同時に知ることができるからである。免疫組織化学的AR局在は酵素活性ではなく、抗原となるAR蛋白量の多少を示す。ラット糖白内障の基本的病理像は水晶体線維膨化⁸⁾であるが、白内障の経過中および発症原因の条件によって線維崩壊のおこる部位は異なる。また、AR活性の大半を占める上皮細胞は白内障末期でも崩壊せずむしろ増殖する。これらの事から白内障を有する水晶体のAR活性を水晶全体として測定しても、どれだけの活性量が線維膨化と関係するのかを判断することは困難である。ラット糖白内障のAR局在を調べると線維膨化に必ず先行してAR陽性線維が出現する^{5,7)}、つまり線維膨化は免疫組織化学的AR局在と一致する。

次に実験結果について考察する。0.05%薬剤1日3回点眼投与がラットガラクトース白内障を強く抑制することを筆者らはすでに報告⁶⁾したが、同濃度1日2回投与でも赤道部皮質と上皮細胞下に軽度線維膨化が認められただけで後皮質は正常に保たれ、点眼回数による白内障発生抑制効果の差は少ないと考える。本群でガラクトース量は徐々に増加したがこれは前皮質線維液化に起因するものと思われる。3週、4週後のガラクトース量に差がなかった理由は、組織学的所見から赤道部における再生線維による修復が活発となり白内障進行が停止したためと推測される。0.01%群では対照群より遅れて前皮質表層、後皮質、赤道部の順に線維膨化が出現し、十分でないものの白内障発生を相当遅延させる効果があった。0.002%群は初期では対照群と同様の線維膨化がみられ、白内障発生を予防できなかった。しかし、皮質での線維膨化が進行したのに対し赤道部病変はむしろ軽減し線維増殖による修復像がみられた。本濃度も無効というわけではなく、AR阻害作用が弱いため水晶体線維末端部崩壊は阻止できないが、赤道部での再生線維の新しい崩壊を防止していると考え。対照群、三種濃度群におけるガラクトース量は2週後までほとんど薬剤濃度に反比例したが、3週以降0.05%群を除き急激に低下した。この時期の水晶体は組織学的に広範囲な前皮質線維液化が観察されることから、それ以前にも徐々に漏出している可能性は否定できないが、少なくとも2週以降水

晶体からガラクトースを含む大量の蛋白漏出があったと推測される。同様な結果を観察した他の研究者も、水晶体からの漏出と考えている¹¹⁾¹⁶⁾。従って0.05%群以外では3週以降のガラクトース量測定結果の判断は慎重にすべきであり、前述の赤道部における修復は組織学的検索によってはじめて可能となる¹²⁾¹⁷⁾。これらの結果からラットガラクトース白内障はE-1008の濃度に比例して抑制され、確実に白内障発生を予防するのに必要な点眼濃度は0.01%以上であると思われる。他のARIであるICI 128, 436 (ICI, UK), Sorbinil (Pfizer, U.S.A.)の点眼および混餌による全身投与もラット糖白内障の発生を抑制し、また治癒させる^{9)~12)}。それらと今回のE-1008点眼投与による白内障発生抑制効果とを単純に比較することはできないが、本薬剤の効果は0.1% Sorbinil点眼投与による効果と同程度と思われる。しかしE-1008は、0.01~0.05%の低濃度で有効であり、長期連用によるARIの副作用の発現も考慮した場合、点眼投与に有利なARIと考えられる。

0.05%群では後期まで赤道部は正常で、前、後皮質表層線維にのみ膨化が観察された。白内障が早期から進行した最低濃度である0.002%群でも、後期に赤道部再生線維による白内障修復像が見られたことから、ARIは赤道部、前皮質、後皮質の順に白内障発生を抑制し、白内障修復には赤道部再生線維が中心的役割を果たしていると考え。

0.05%群で観察された白内障所見は10%ガラクトース幼若ラットおよび25%ガラクトース成熟ラット白内障と近似している¹⁸⁾。3者が近似した理由は、ARIが25%ガラクトース幼若ラット急速発生型白内障を予防遅延させた結果、10%ガラクトース緩徐発生型幼若、成熟ラットガラクトース白内障の発生様式と近似したものと考えられる。つまり幼若、成熟にかかわらず緩徐におこるラットガラクトース白内障は、赤道部に初発せず、上皮細胞層や後囊下の水晶体線維末端から発生する。このことは、臨床的に通常観察されるヒト糖尿病性白内障が、皮質最表層ととりわけ後囊下皮質に発症することを考えると興味深い事実である。

結 論

ラットガラクトース白内障に対するARI (E-1008)点眼の濃度別抑制効果をガラクトース測定、組織学的およびAR免疫組織化学的観察によって検討し次の結論をえた。

- (1) 点眼剤濃度に比例して白内障発生は抑制され、有効濃度は0.01%以上であった。
- (2) ARIは赤道部、前皮質、後皮質の順に白内障発生を抑制した。
- (3) ARI投与にもかかわらず発生した白内障は、上皮細胞層下や後嚢下に初発した。
- 本論文の要旨は第90回日本眼科学会総会にて発表した。また、文部省科学研究費の補助を受けた。

文 献

- 1) **Van Heyningen R**: Formation of polyol by the lens of the rat with sugar cataract. *Nature* 184: 194—196, 1959.
- 2) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. *Invest Ophthalmol* 4: 786—799, 1965.
- 3) **Kinoshita JH**: Mechanism initiating cataract formation. *Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
- 4) **Kinoshita JH, Fukushima S, Kador P, Merola LO**: Aldose reductase in diabetic complications. *Metabolism* 28: 462—469, 1979.
- 5) 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, 1986.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) **Friedenwald JS, Rytel D**: Contribution to the histology of cataract. *Arch Ophthalmol* 53: 825—833, 1955.
- 9) **Fukushi S, Merola LO, Kinoshita JH**: Altering the course of cataracts in diabetic rats. *Invest Ophthalmol* 19: 313—315, 1980.
- 10) **Datiles M, Fukui H, Kuwabara T, Kinoshita JH**: Galactose cataract prevention with sobinil, an aldose reductase inhibitor. An light microscopic study. *Invest Ophthalmol* 22: 174—179, 1982.
- 11) **Tian-Sheng Hu, Datiles M, Kinoshita JH**: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. *Invest Ophthalmol* 24: 640—644, 1983.
- 12) 赤木好男, 秋宗万理, 中路 裕, 田坂 宏, 茶本薫, 糸井素一: Aldose reductase 阻害剤(iCI. 128, 436). *眼紀* 37: 991—995, 1986.
- 13) **Hayman S, Lou MF, Merola LO, Kinoshita JH**: Aldose reductase activity in lens and other tissue. *Biochem Biophysiol Acta* 123: 474—480, 1966.
- 14) 小野英樹, 野沢義則, 早野三郎: 実験的糖白内障に対する aldose reductase 阻害剤 M-79175 の効果. *日眼* 86: 1343—1350, 1982.
- 15) **Akagi Y, Kador PF, Kinoshita JH**: Aldose reductase distribution in the rat and human diabetic cataracts. *Invest Ophthalmol* In press.
- 16) **Reddy VN, Schwass D, Chakrapani B, Lim CP**: Biochemical changes associated with the development and reversal of galactose cataracts. *Exp Eye Res* 23: 483—493, 1976.
- 17) **Unakar NJ, Genyea C, Reddan JR, Reddy VN**: Ultrastructural changes during the development and reversal of galactose cataracts. *Exp Eye Res* 26: 123—133, 1978.
- 18) 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.

(第90回日眼総会原著)