

# 糖性白内障水晶体の上皮細胞増殖現象に対する 生化学的解析 (図7, 表1)

神谷美保子・馬嶋慶直 (藤田学園保健衛生大学眼科)  
中澤清 (名城大学薬学部一般教育)  
岩田修造 (名城大学薬学部生体物理化学)

## Biochemical Analysis Related to Proliferation of Lens Epithelial Cells in Sugar Cataract

Mihoko Kamiya<sup>1)</sup>, Yoshinao Majima<sup>1)</sup>, Kiyoshi Nakazawa<sup>2)</sup>  
and Shuzo Iwata<sup>3)</sup>

*Department of Ophthalmology, Fujita-Gakuen University, School of Medicine<sup>1)</sup>*

*Department of General Education, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University<sup>2)</sup>*

*Department of Biophysical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University<sup>3)</sup>*

### 要 約

ストレプトゾトシン投与による糖性白内障水晶体の上皮細胞層ではその初期において、(1) 上皮細胞数の増加、(2) Hexokinase および Aldose Reductase 活性の増加傾向、(3) 糖代謝産物である乳酸産生量の増加、(4) ATP 産生量の増加が認められた。以上のことより、水晶体内部への過剰グルコース流入に対して糖代謝変動がおき、活発な細胞分裂が生じると考えられる。また、これに伴う細胞数の増加は全体としての糖代謝サイクルを促進させるが、個々の細胞では、代謝の減衰が始まり、それが水晶体混濁化につながると考えられる。(日眼 91: 459—464, 1987)

キーワード：糖性白内障、水晶体上皮細胞増殖、糖代謝回転、ストレプトゾトシン

### Abstract

Biochemical parameters in the lens epithelium of streptozotocin (STZ)-treated rats were determined *in vivo* and compared with those of a control group. The following results were obtained: 1) The proliferation of epithelial cells in the treated rat lens was increased. 2) Hexokinase of the glycolytic pathway and aldose reductase of the sorbitol pathway indicated a higher activity rate in the lens epithelial layer of the treated rat rather than those in the control rats. 3) The production of lactate in the glycolytic pathway in the lens epithelial layer was increased in the treated rats. 4) The ATP content in the lens epithelial layer of the treated rat was higher than that in the control rats. These results suggest that the pathways of sugar metabolism in the lens epithelium are stimulated by elevated levels of glucose, and such changes may lead to a burst of mitoses. Furthermore, an abnormal proliferation of epithelial cells with bursts of mitoses may accelerate the sugar metabolism turnover in the lens, however which the increased number of cells may advance the overall metabolic cycle the metabolism of individual cells may decrease, which could lead to cataract formation. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 459—464, 1987)

別刷請求先：470-11 愛知県豊田市沓掛町田楽ヶ窪1—98 藤田学園保健衛生大学医学部眼科教室 神谷美保子

Reprint requests to: Mihoko Kamiya, M.D. Fujita-Gakuen Univ., School of Med.

1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-11, Japan

(昭和61年12月8日受付) (Accepted December 8, 1986.)

**Key words: Sugar cataract, Proliferation of the epithelial cells, Turnover of sugar metabolism, Streptozotocin**

## I 緒 言

糖尿病性白内障の成因を明らかにするためには、高血糖状態下における水晶体内部での代謝機構の変動が最も重要な鍵となるであろう。

そこで、代謝機構の変動を著明に反映する水晶体上皮細胞の挙動に着眼し、今回はストレプトゾトシン(STZ)投与のラットを供試動物として、その水晶体の上皮細胞増殖度、糖代謝関連酵素活性(Hexokinase 活性および Aldose Reductase 活性)と乳酸産生量、さらに ATP 産生量につき、in vivo において検討したので報告する。

## II 方 法

### (1) 実験材料

実験的糖尿病は3週齢、Wistar 系雄性ラットに、24時間絶食後、ストレプトゾトシン(STZ: Sigma 社製)を70mg/kg 腹腔内投与して惹起させ、対照群には同量のクエン酸緩衝液を投与した。STZ 投与群には投与後2日目と実験当日(投与後10日目と28日目)の尿糖が(3+)以上検出されており、かつ細隙燈顕微鏡で水晶体混濁が赤道部皮質に軽度、観察されたものを使用した。

STZ 投与後10日目と28日目において、クロロホルム麻醉下に水晶体を摘出して上皮細胞層(カプセル附着)を分離し、前記生化学的パラメーターの測定を行なった。

### (2) 測定方法

#### ① 水晶体上皮細胞数測定

水晶体上皮を0.01%Actinase®(科研製薬)液中で37°C, 20分間インキュベーションし細胞を分離した後、0.05%Crystal violet で核染色し、血球計算盤を用いて測定した。

#### ② 糖代謝関連酵素活性測定

水晶体上皮20眼分を氷冷した5mM-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.6) 250 $\mu$ l でホモジナイズした後、10,000g, 20分遠心し、その上清をサンプルとした。Hexokinase 活性は、Scharma の方法<sup>1)</sup>、Aldose Reductase 活性は、Hayman と Kinoshita の方法<sup>2)</sup>を一部、改変し、測定した(緩衝液にはそれぞれ、Tris-HCl, リン酸ナトリウムを用いた)。

#### ③ 乳酸産生量測定

水晶体上皮を MEM 1ml 中で24時間、37°C インキュベーションし、MEM 中に産生された乳酸量をラクトレートテスト(ベーリンガー、マンハイム社)を用いて測定した。

#### ④ ATP 産生量

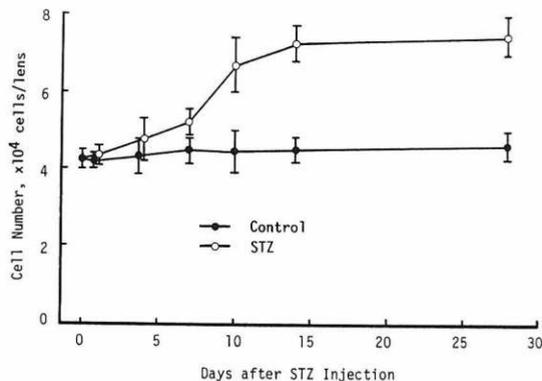


Fig. 1 Cell number of lens epithelia of STZ-treated rat. Bars represent S.D. of 6 lenses.

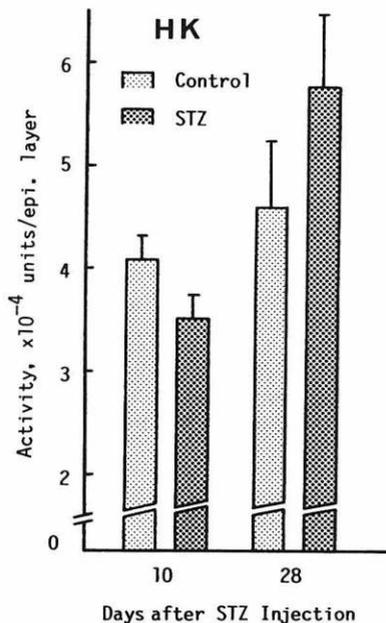
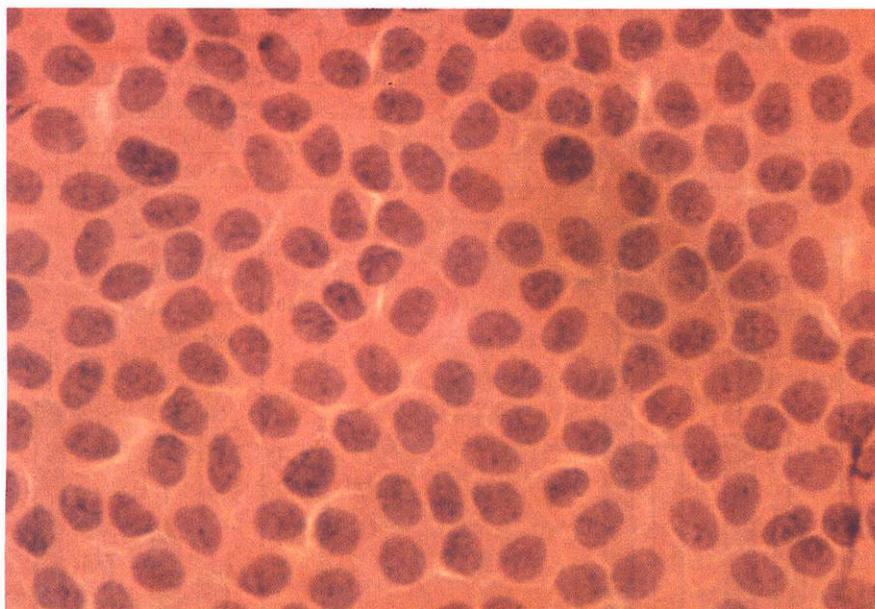


Fig. 2 Hexokinase activity of lens epithelial layer of STZ-treated rat. Bars represent S.D. of 3 times.



(a) control 群, H-E 染色 (×400)



(b) STZ 投与群, control 群に比して, 約 2 倍の上皮細胞数増加が認められる, H-E 染色 (×400)

**Fig. 7** Photomicrograph of lens epithelium from STZ-treated rat (Central area).

水晶体上皮10眼分を氷冷した蒸留水250 $\mu$ lでガラスホモジナイザーを用い、均質化した後、1.2N PCAを加えて除タンパクを行い、その上清をサンプルとした。ATPテスト(ペーリンガー、マンハイム社)を用いて測定した。

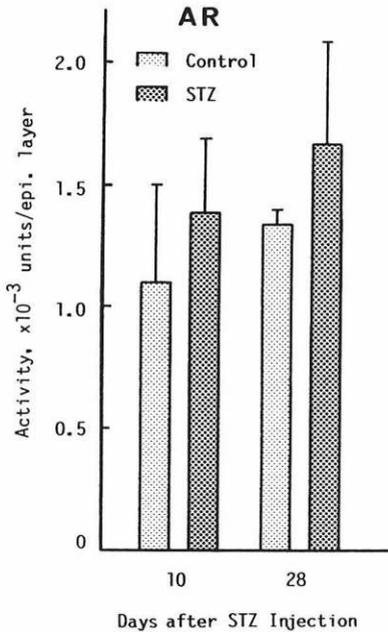


Fig. 3 Aldehyde reductase activity of lens epithelial layer of STZ-treated rat. Bars represent S.D. of 3 times.

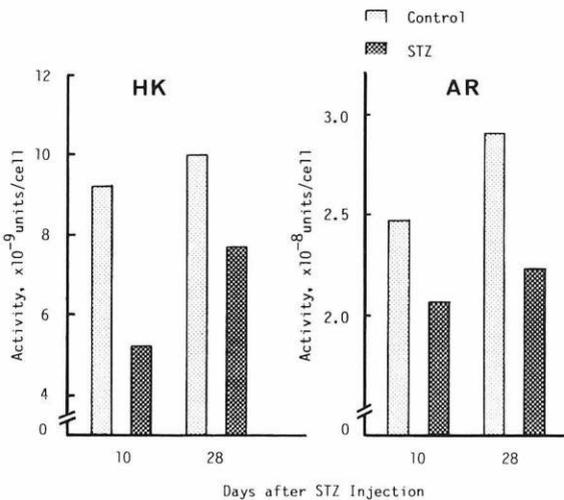


Fig. 4 Hexokinase and aldehyde reductase activities of lens epithelial cell of STZ-treated rat.

(3) 組織学的検索

抽出した水晶体をエタノール：酢酸 (= 3 : 1) 混合液で固定した後、カプセルを剥離し、スライドガラス上に伸展させて、上皮細胞の Hematoxilin-Eosin 染色を行なった。

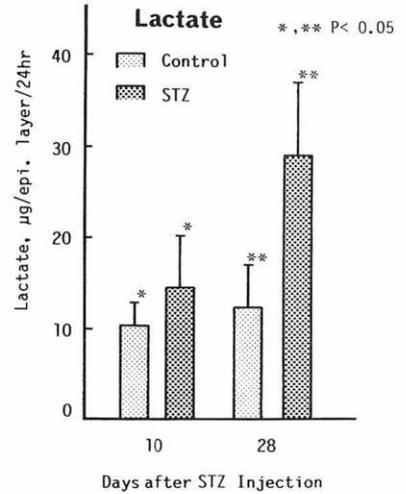


Fig. 5 Lactate production from lens epithelial layer of STZ-treated rat. Bars represent S.D. of 6 lenses.

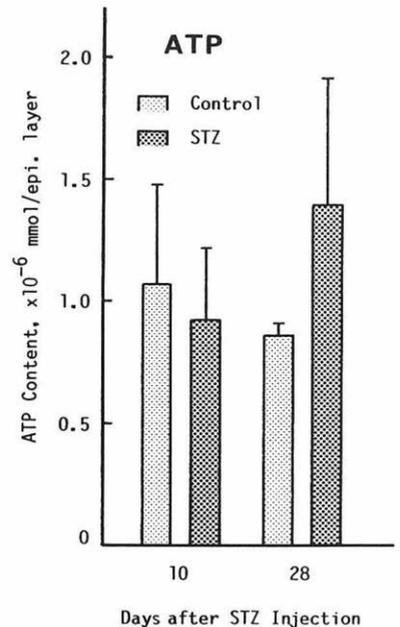


Fig. 6 ATP contents of lens epithelial layer of STZ-treated rat. Bars represent S.D. of 3 times.

**Table 1** Effect of STZ on biochemical parameters of rat lens epithelial layer.

Days*	Group	Cell Number**	HK Activity***	AR Activity <sup>§</sup>	Lac Product <sup>§§</sup>	ATP Content <sup>§§§</sup>
10	Control	4.45 ± 0.54	4.09 ± 0.22	1.10 ± 0.40	10.19 ± 2.60	1.07 ± 0.41
	STZ	6.70 ± 0.69	3.51 ± 0.22	1.39 ± 0.30	14.50 ± 5.67	0.92 ± 0.30
28	Control	4.60 ± 0.40	4.60 ± 0.68	1.34 ± 0.15	12.40 ± 4.72	0.86 ± 0.03
	STZ	7.50 ± 0.53	5.77 ± 0.71	1.67 ± 0.42	29.16 ± 8.06	1.40 ± 0.53

\* Days after STZ Injection

\*\*  $\times 10^4$  cells/lens\*\*\*  $\times 10^{-4}$  units/lens epi. layer§  $\times 10^{-3}$  units/lens epi. layer§§  $\mu\text{g/lens epi. layer/24hr}$ §§§  $\times 10^{-6}$  mmol/epi. layer

### III 結 果

#### (1) 水晶体上皮細胞数

Fig. 1の如く、STZ投与群では対照群に比して投与10日目で約1.5倍、投与28日目では約1.8倍の上皮細胞数増加を認め、STZ投与初期において活発な細胞分裂が起きていることがわかった。

#### (2) 糖代謝関連酵素活性

Hexokinase活性(Fig. 2)およびAldose Reductase活性(Fig. 3)ともにSTZ投与28日目では水晶体上皮細胞増殖により、上皮細胞層全体で増加傾向が認められた。

しかし、いずれの酵素活性も細胞1個あたりでは減少しており、すでに細胞内活性低下が生じていることを認めた(Fig. 4)。

#### (3) 乳酸産生量

糖代謝系最終産物としての乳酸量は、Fig. 5の如く、STZ投与28日目において、対照群の約2倍に増加していた( $p < 0.05$ )。

#### (4) ATP産生量

STZ投与28日目ではFig. 6の如く、ATP産生量増加が認められたが、これは上皮細胞数増加による結果であると思われる。

これらの測定結果をまとめてTable 1に示した。

#### (5) 組織学的検索

STZ投与後の水晶体上皮伸展標本を作製し、形態学的観察を行なった。水晶体前極部において、STZ投与28日目では対照群に比して細胞の小型化、密な配列による細胞数増加が認められ、また活発な分裂像も観察された(Fig. 7)。

### IV 考 按

STZ投与による糖性白内障水晶体の上皮細胞層ではその初期において細胞分裂が活発となり、細胞数増

加をひき起こし、同時に、糖代謝関連酵素や糖代謝産物の増加によって示される糖代謝回転の促進が認められた。

細胞分裂と白内障発生との関連についてはいくつかの報告<sup>3)~5)</sup>があり、最近ではガラクトース白内障において、merdinal lowの不整配列が皮質白内障発生に関連<sup>5)</sup>しているとの報告も見られる。ここで興味あることは、生化学的にみた糖代謝変動と形態学的に示される細胞構築の異常が同時期に存在することである。白内障発生の原因が浸透圧変化<sup>(6)7)</sup>や酸化<sup>(8)9)</sup>に関連しているという説は現在、最も支持されているが、外部からの刺激に対して生体が起こす防御反応の実態を知るには組織学的観察が必要と考えられる。

糖性白内障発生の初期における活発な細胞分裂は、生体の防御反応の一つと考えられるが、分裂後、ある日数を経た成熟細胞では、すでに代謝上の欠陥が存在している。このことは、上皮細胞層全体で見かけ上の代謝促進がみられても、上皮細胞1個あたりでは活性低下が認められたことによって知ることができる。

すなわち、糖性白内障の惹起因子は過剰糖の糖アルコールへの変換現象であるが、この異常代謝機構における代謝欠陥が、細胞増殖による細胞構築の乱れとともに、水晶体混濁化を促進させていくものと推察された。

#### References

- 1) Sharma C, Manjeshwar R, Weinhouse S: Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver. J Biol Chem 238: 3840—3845, 1963.
- 2) Hayman S, Kinoshita JH: Isolation and properties of lens aldose reductase. J Biol Chem 240: 877—882, 1965.
- 3) Cotlier E: The mitotic cycle of the lens epithelium. Effect of age and galactose. Arch Ophthalmol 68: 115—123, 1962.

- 4) **Grimes P, von Sallmann L**: Lens epithelium proliferation in sugar cataracts. *Invest Ophthalmol* 7: 535—543, 1968.
  - 5) **Gona O**: Cytoarchitectural changes in the lens epithelium of galactose-fed rats. *Exp Eye Res* 38: 647—652, 1984.
  - 6) **Kinoshita JH**: Mechanism of initiating cataract formation (Protector lecture). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 713—724, 1974.
  - 7) **Kinoshita JH, Kader P, Catiles M**: Aldose reductase in diabetic cataracts. *J Am Med Assoc* 246: 257—261, 1981.
  - 8) **Trevithick JR, Creighton MO, Ross WM, et al**: Modeling cortical cataractogenesis: 2. In vitro effects on the lens of agents preventing glucose- and sorbitol-induced cataracts. *Can J Ophthalmol* 16: 32—38, 1981.
  - 9) **Ross WM, Creighton MO, Stewart-Dehaan PJ, et al**: Modeling cortical cataractogenesis: 3. In vivo effects of vitamin E on cataractogenesis in diabetic rats. *Can J Ophthalmol* 17: 61—66, 1982.
-