

糖尿病性角膜上皮障害における基底細胞の動態

第1報 対照群の BrdU 免疫組織化学による検討 (図2)

横井 則彦・岡本庄之助・赤木 好男
照林 宏文・茨木 信博・堤 元信 (京都府立医科大学眼科学教室)
糸井 素一

Investigation of The Movement and Proliferation of Basal Cells by BrdU Immunohistchemistry in Control Group of Diabetic Corneal Epitheliopathy

Norihiko Yokoi, Syonosuke Okamoto, Yoshio Akagi, Hirofumi Terubayashi,
Nobuhiro Ibaraki, Motonobu Tsutsumi and Motokazu Itoi
Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

要 約

ラット角膜上皮剝離後の修復過程における基底細胞の動態を Bromodeoxyuridine (BrdU) 標識による免疫組織化学的方法を用いて観察した。今回は正常対照群について追跡実検で検討し次の結論をえた。1) 無処置対照群の上皮細胞の寿命は約5日である。2) 上皮部分剝離群における剝離部は再生上皮によって24時間後には被覆された。その前期修復は周辺上皮基底細胞の増殖が関与する上皮細胞移動であり、剝離部が被覆されたのちの後期修復は剝離部を被覆した再生上皮基底細胞の増殖および移動が関与する。(日眼 92: 1112—1116, 1988)

キーワード: BrdU 標識, 角膜上皮修復, 基底細胞, ラット, 糖尿病性角膜上皮障害

Abstract

The movement and proliferation of basal cells were examined by bromodeoxyuridine (BrdU) immunohistochemistry, in normal control rats and in the regenerating process after abrasion of the corneal epithelium. BrdU, an analogue of thymidine, can be incorporated into cells synthesizing DNA, and proliferative basal cells of corneal epithelium are traced using anti-BrdU monoclonal antibody. In the corneal epithelium of the control group, BrdU-labelled cells were first observed in the basal cell layer. They moved up throughout the epithelium and disappeared as superficial cells within approximately four days. In the group in which the corneal epithelium was partially abraded, forming a lesion 3mm in diameter, BrdU-labelled basal cells could be observed from 1 hour until the fourth day. It was demonstrated that the movement and proliferation of basal cells played an important part in the regenerating process of corneal epithelium. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1112—1116, 1988)

Key words: BrdU labelling, Corneal epithelial regeneration, Basal cell, Rat, Diabetic corneal epitheliopathy

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 横井 則彦
(昭和62年11月2日受付)

Reprint requests to: Norihiko Yokoi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med.
Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan
(Accepted for publication November 2, 1987)

I 緒 言

糖尿病患者の観察及び動物実験から、糖尿病性角膜上皮障害の存在が知られている。これまでの動物実験ではストレプトゾトシン投与による糖尿病ラット¹⁾、ガラクトース血症ラット²⁾のそれぞれで、角膜上皮を全剥離し、その修復過程をフルオレスセイン染色で見ると、両者の治癒速度が正常対照群に比べて遅延しており、部分的な上皮剥離では、その差は検出できなかったと報告されている。しかし、我々は、糖尿病性角膜上皮障害は、上皮の基底細胞の病変によると考えており、部分的な上皮剥離でも、修復過程における基底細胞の動態を観察すれば、対照群との差が検出できると考えている。なぜなら、角膜上皮の修復は上皮剥離部への上皮の遊走とそれに続く基底細胞の分裂によって行われ、部分剥離後の修復過程をフルオレスセイン染色で見ると、概ね上皮の遊走による修復過程を見ているに過ぎず、基底細胞の増殖による修復過程は余り評価していないことになるからである。

そこで今回はその第一歩として、角膜上皮剥離後の修復過程における基底細胞の動態を正常対照群について検討した。従来、角膜上皮基底細胞の動態観察は、³H-thymidine を用いたオートラジオグラフィ法で行われてきたが、その方法は放射性同位元素を用いる問題点と、手技が煩雑で時間がかかるという欠点があった。今回は、その欠点を補い、かつ再現性が高く感度のよい、新しい Bromodeoxyuridine (BrdU) 標識による免疫組織化学的方法を用いた。

II 実験方法

体重200gの Sprague-Dawley 系ラットを20匹使用し、通常飼料で飼育しながら実験を行った。それらを無処置正常対照群と実験群に分けた。後者は角膜上皮を剥離部の直径が約3mm 径になるように剥離した部分剥離群である。角膜上皮の剥離には10%ゼラチン塗布ガラス板を作成し用いた。BrdU 投与量は50 μ g/g 体重で、両群ともラット腹腔内一回投与とした。部分剥離群では剥離直後に投与したが両群とも投与後、1, 12, 24時間後、2, 3, 4日目まで眼球摘出を行った。眼球摘出はエーテル麻酔後ペントバルビタール腹腔内過量投与による致死後行い、摘出眼球から輪部を含む角膜ボタンを取り出し、ただちに4%paraform aldehydeを含むphosphate buffer (pH7.4) に36時間固定した。固定角膜試料は10~20%濃度の sucrose を含む

buffer にて脱水し、約15 μ の凍結切片を作成した。得られた切片は5N HCL にて処理し抗 BrdU モノクローナル抗体を第一抗体とする ABC 法で反応後、DAB 溶液で染色を行い観察した。

III 結 果

1. 無処置正常対照群

BrdU 腹腔内一回投与 1 時間後の角膜上皮においては標識された基底細胞が散在しているのが観察された(図 1A)。標識細胞の分布状態には角膜中央部と周辺部に大きな差はなかった。投与 2 日後では標識細胞は少し表層に向かって移動している像が認められた。ま

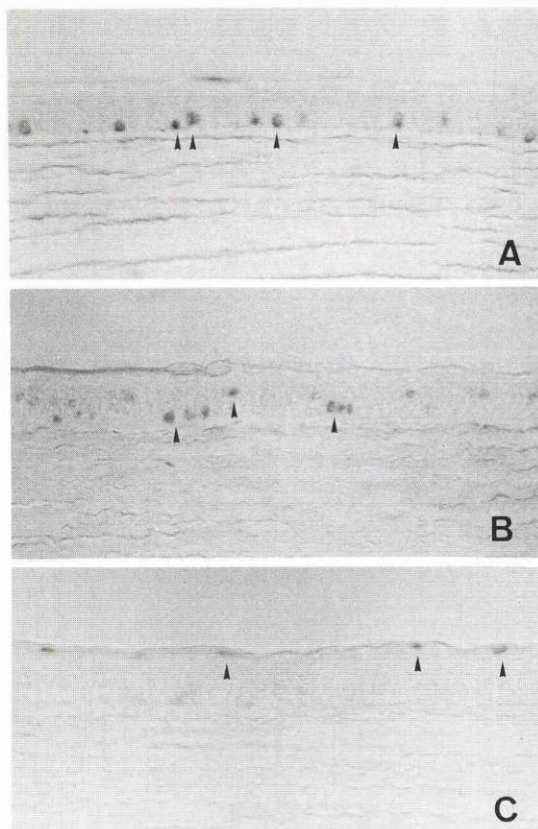


図 1 正常対照角膜上皮細胞層 BrdU 標識像。BrdU 投与 1 時間後では、多くの基底細胞核が標識されている(A)。標識細胞の分布状態は、角膜中央部と周辺部では差はほとんどなかった。投与 2 日後では、標識細胞は表層に移動して角膜上皮中層に認められるようになる(B)。4 日後では、最表層細胞のみ標識され(C)それ以降は標識細胞は観察されなくなる(ABC 法、DAB 反応、 $\times 170$)。矢印は標識細胞を示す。

れに標識された基底細胞も見られたが核標識の濃度は極めて淡く、強く標識されている細胞のほとんどが上皮中層部に分布していた(図1B)。投与4日後では上皮最表層の細胞のみ標識され基底細胞や中層の細胞には標識された核をもつ細胞はまったく観察されなかった(図1C)。本群において標識角膜実質細胞や内皮細胞はまったく認められなかった。4日後以降の角膜上皮では標識細胞は見られなかった。

2. 角膜上皮部分剥離群

剥離1時間後、非剥離部上皮においては標識された基底細胞が、剥離部を取り囲む部位付近からそれより周辺部の上皮にかけて分布に偏りなく散在していた。剥離12時間後、標識された基底細胞を含む再生上皮が剥離部に伸びていたが、再生上皮の先端部は剥離部に近づくほど扁平になっていた(図2B)。また周辺上皮においては連続する基底細胞の標識が見られ、上皮の表層はひだを形成していた(図2A)。剥離1日後、剥離部は再生上皮によって完全に被覆され、再生上皮にも連続した標識基底細胞が見られた。しかし周辺上皮

においては、上皮の基底層だけでなく中層にも標識細胞が見られた。剥離2日後、角膜中央の再生上皮においても、上皮の基底層に加えて、中層にも標識細胞が見られた(図2C)。剥離3日後、再生上皮、中間周辺上皮及び周辺上皮の表層に標識細胞が見られた。しかし再生上皮、中間周辺上皮には標識基底細胞が上皮基底層にも見られ、角膜中央から周辺に行くに従って基底層の標識細胞は目立たなくなっていた。剥離4日後、角膜中央部の再生上皮基底層ではこの時期でも標識細胞が散在していた(図2E)。中間周辺上皮では標識基底細胞が減少し、周辺上皮では標識表層細胞も見られなくなった(図2D)。

IV 考 按

糖尿病性角膜上皮障害は動物実験においてはストレプトゾトシン投与による糖尿病ラット¹⁾、ガラクトース血症ラット²⁾のそれぞれにおいて上皮再生遅延という形で角膜上皮障害の存在することが明らかにされており、これらは Aldose Reductase (AR) 阻害剤投与

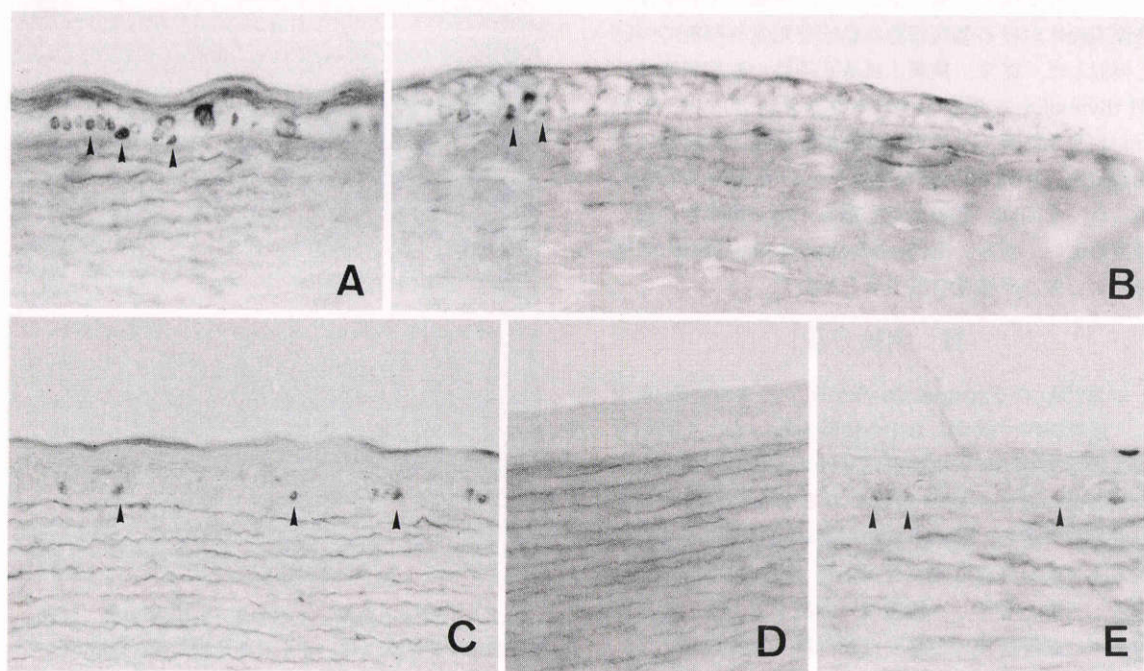


図2 角膜上皮部分剥離群の BrdU 標識像。剥離12時間後では、標識基底細胞を含む再生上皮が伸び(B)、再生上皮の先端部は扁平になっていた。周辺上皮(A)では、連続する基底細胞の標識が見られ、上皮の表層はひだを形成していた。剥離2日後角膜中央部(C)には標識細胞は上皮の基底層と中層に見られた。剥離4日後角膜中央部(E)には、標識細胞は上皮の基底層にも見られ、角膜周辺部(D)には、標識細胞は見られなかった(ABC法、DAB反応、 $\times 170$)。矢印は標識細胞を示す。

にて正常に復することが報告されている。また、ガラクトース血症ラット角膜上皮細胞層においては基底細胞層に他の層に比べ特にARの分布が多いのに対し、正常対照群が上皮細胞層に偏りなくAR分布を認めるという事実³⁾から糖尿病性角膜上皮障害は基底細胞の病変によって起こっており、しかもその発症にARが関与している事が推測されている。さらに糖尿病ラット⁴⁾、ガラクトース血症ラット⁵⁾の角膜上皮基底細胞の詳細な観察から、上皮基底膜部に基底膜の不規則な湾入及び特異な沈着物の存在が認められており、AR阻害剤投与によりそれらの形態異常が抑制されることが知られている⁵⁾⁶⁾。以上の事実より、糖尿病の角膜上皮においては角膜上皮中、特に基底細胞層にPolyolの集積が起こりその結果何らかの機序で基底細胞が選択的に死滅するのではないかとする考えがある⁵⁾。そこで我々は基底細胞の死滅による修復障害であれば角膜上皮における基底細胞の動態を追跡すれば、基底細胞の死滅を示唆する異常が観察できるのではないかと考えた。今回はまず角膜上皮の創傷治癒における対照群の作成を試みたが、従来の³H-thymidineを用いた方法ではなく、これまで角膜上皮への利用の報告のない新しい免疫組織化学的方法を用いた。

家兎を用いたこれまでの角膜上皮の創傷治癒に関する³H-thymidineによる研究では、上皮細胞は約1週間前後のlife spanを持つことが知られている⁷⁾。また上皮の創傷に対する修復は創傷後24時間までの早期には欠損部への上皮細胞各層のslidingないしmigrationによって行われ、その後は基底細胞の分裂による増殖が加わることによって行われることが知られている⁷⁾⁹⁾。今回の実験では今後のAR関係の実験のために、ラットの対照群を作製することを目的とした。そこでまず、正常ラットに対してBrdU標識を用いて角膜上皮のlife spanを調べてみると、本実験の条件では、約5日であることが分かった。部分剝離群では連続した標識細胞は上皮基底細胞の増殖を示すもの、また上皮の中層あるいは表層に見られる標識細胞は基底細胞の娘細胞の表層への移動を示すものと考えられた。従ってラットの角膜上皮部分剝離における修復過程は剝離後12時間目までは周辺上皮における基底細胞の増殖と剝離部に伸びる再生上皮の移動によってなされ1日目以降は剝離部を覆った再生上皮の基底細胞の増殖によってなされると考えられた。周辺上皮においては剝離後4日目には標識細胞が見られなくなっており剝離しない場合より基底細胞の増殖が盛んになって

いると考えられた。また、再生上皮でも3日目に上皮表層に標識細胞が見られたことは周辺上皮と同様の増殖の亢進を考えさせたが、同時に基底層にも標識細胞が見られたことは再生上皮の修復がまだ続いている事を想像させた。さらに4日目でも剝離部で標識基底細胞が見られたことは剝離部での修復の進行を裏づけるものである。

今回採用したBrdU標識による免疫組織化学的方法は1980年代になって登場した新しい方法であり¹⁰⁾¹¹⁾、thymidine類似物質であるBrdUをtracerとして用い、増殖細胞のcell cycleのDNA合成期(S期)に取り込ませ、その後の増殖細胞の分化増殖過程を追跡するもので、今回観察系には免疫ペルオキシダーゼ染色法を高感度にしたABC法を用いた。これまでの³H-thymidineを用いた角膜上皮基底細胞の動態観察は家兎を用いて前房内注入で行われており、しかも角膜上皮剝離後の基底細胞の追跡実験では剝離後1日目に注入してそのあとの基底細胞の動きを追跡している⁷⁾⁹⁾。今回はBrdUをラットの腹腔内投与で、しかも角膜上皮剝離直後に投与して基底細胞の動態を追跡実験で観察できた。すなわち今回の方法は感受性、再現性に優れた方法であり、今後、糖尿病性角膜上皮障害とARとの関連、AR阻害剤の効果を検討してゆく上で基底細胞の動態を知る有用な方法であると考えられ、今回その対照群の検討ができた。

文 献

- 1) Fukushi S, Merola LO, Tnaka M, et al: Reepithelialization of denuded corneas in diabetic rats. *Exp Eye Res* 31: 611—621, 1980.
- 2) Datiles M, Kador PF, Fukui HK, et al: Corneal re-epithelialization in galactosemic rats. *Invest Ophthalmol* 24: 563—569, 1983.
- 3) 赤木好男: Aldose reductase (AR) と糖尿病眼合併症. *眼科* 27: 1101—1111, 1985.
- 4) Friend J, Ishii Y, Thoft A: Corneal epithelial changes in diabetic rats. *Ophthalmic Res* 14: 269—278, 1982.
- 5) 高橋幸男, 赤木好男, 秋宗万理他: 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(2): 336—340, 1986.
- 6) 赤木好男, 高橋幸男, 小玉裕司他: 糖尿病ラット眼病変に対するAldose Reductase Inhibitor (ONO-2235) の効果—組織学的研究一. *あたらしい眼科* 1: 857—859, 1984.
- 7) 原 二郎: Autoradiographyによる角膜上皮再生の研究. *眼紀* 3: 443—466, 1962.

- 8) Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG: Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. Invest Ophthalmol 15: 4—14, 1976.
 - 9) 北野周作: 角膜の創傷治癒について. 眼紀 29: 1341—1358, 1978.
 - 10) 高橋 学, 佐々木功典, 村上知之: Brmodeoxyuridine 標識による細胞動態の解析. 最新医学 40: 80—84, 1985.
 - 11) 茨木信博, 堤 元信, 横井則彦他: ラットガラクトース白内障における水晶体上皮細胞について第一報. 眼紀 38: 359—365, 1987.
-