

ガラクトース血症イヌと糖尿病性網膜症

その1. アルドース還元酵素阻害剤による
壁細胞選択的消失防止について (図4, 表1)

赤木 好男・照林 宏文・池部 均 (京都府立医科大学眼科学教室)

Peter F. Kador・Jin H. Kinoshita (National Eye Institute National Institute of Health)

Prevention of Pericyte Ghost Formation in Retinal Capillaries by Aldose Reductase Inhibitor In Galactose-fed Dogs with Diabetic Retinopathy

Yoshio Akagi, Hirofumi Terubayashi, Hitoshi Ikebe,
Peter F. Kador*, Jin H. Kinoshita*

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

*National Eye Institute, National Institute of Health

要 約

30%ガラクトース含有食餌投与(本報告最長24カ月)によって,ガラクトース血症イヌを作成した。そして,糖尿病性網膜症の発症ならびにアルドース還元酵素阻害剤(ARI)の効果をトリプシン消化標本によって観察し,次の様に結論した。(1)21カ月で,壁細胞の選択的消失所見とそれともなう内皮細胞核の分布異常(集積,離散)所見がみられた。(2)正常対照群およびARI投与群では上記病変は出現しなかった。(3)24カ月でも出血,白斑などの臨床所見は全く見られなかった。(4)以上の結果から,ARIは臨床所見発症前に見られる壁細胞消失を防止すると考えた。(日眼 92:1479-1484,1988)

キーワード:糖尿病性網膜症,ガラクトース血症イヌ,アルドース還元酵素阻害剤(ARI),壁細胞,内皮細胞

Abstract

The role of aldose reductase in the progression of diabetic retinopathy has been investigated in beagle dogs fed a 30% galactose diet with or without aldose reductase inhibitors (ARI). Eye were enucleated from dogs in each group periodically and their retinal capillaries were examined by trypsin-digested flat preparations. The pericyte ghost formation was observed after 21 months of galactose feeding and many of the capillaries containing pericyte ghosts frequently demonstrated a proliferation of endothelial cells. No abnormal findings were observed in retinas both of normal controls and galactose-fed dogs treated with ARIs. These findings suggest that pericyte ghost development occurs prior to clinical signs of retinopathy and that their formation can be prevented by ARI administration. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1479-1484,1988)

Key words: Diabetic retinopathy, Galactosemic dog, Aldose reductase inhibitor, Pericyte (Mural cell), Endothelial cell

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
(昭和63年4月23日受付)

Reprint requests to: Yoshio Akagi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med.
Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Accepted for publication April 23, 1988)

I 緒 言

糖尿病性網膜症の初期病理学的変化のひとつに壁細胞 (mural cell, pericyte) の選択的消失所見がある。網膜症発症機序は未だ不明であるが、毛細血管緊張性に関与する壁細胞の変性がまず起こり、その結果として細小血管の透過性亢進、毛細血管瘤、血管閉塞が出現すると考える説 (Cogan and Kuwabara) がある¹⁾²⁾。一方、ラット糖白内障の起因酵素 (ポリオール浸透圧説³⁾⁴⁾, Kinoshita) であるアルドース還元酵素 (AR) は、ヒト壁細胞に存在する事が免疫組織化学的に観察され、また培養壁細胞が AR 活性を有し、さらに糖を糖アルコールに代謝することも確かめられている。これらの事実は AR の動きによって壁細胞が消失し、それが引き金となって網膜症が発症・進展していく可能性があることを示唆するものである。本研究の目的は現時点においてヒト糖尿病性網膜症の数少ない動物モデルとされているガラクトース血症イヌ⁵⁾⁶⁾をもちいて網膜症に対するアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) の効果を調べる事である。

II 実験方法

イヌ：本実験には生後9カ月の雄ビーグル犬を用い、それらを以下の四群に分け飼育した。(1) 正常食餌飼育群 (対照群)。(2) 30%ガラクトース含有食餌飼育群。(3) ARI, Sorbinil (S-6-fluoro-spirochroman-4-5'-imidazolidine-2', 4'-dione, Pfizer) 混入30%ガラクトース含有食餌飼育群。(4) ARI, M-79175 (2-methyl-6-fluoro-spirochroman-4-5'-imidazolidine-2', 4'-dione, Eisai) 混入30%ガラクトース含有食餌飼育群。ARI 投与はいずれも土、日を除く平日口内強制投与である。ARI 一日投与量は、Sorbinil と M-79175 それぞれ実験開始後4カ月までは625mg, 0.5mg/kg それ以降875mg, 1.0mg/kg とした。

網膜標本：摘出した眼球をただちに4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (0.1M, pH 7.4) に浸漬し角膜、虹彩、水晶体の前眼部組織を注意深く取り去った。2~3時間の固定 (4℃) 後、強膜をぶどう膜から剥離した。そして鋸状縁部位 (イヌでは網膜・毛様体境界線は鋸状ではなくほぼ直線) に沿って切断し毛様体を除去し、最後に脈絡膜と網膜とを細心の注意をはらい剥離した。視神経は網膜と脈絡膜との間で切断した。以上の操作で作成した全網膜試料は更に5~7日固定 (4℃) したのちトリプシン消化した。トリプ

シン消化は全網膜試料を3%トリプシン (Difco, 1:250) 含有トリス緩衝液 (0.1M, pH 7.8) に入れ37℃もしくは室温にて振盪しながら行った。トリプシン消化液中での消化時間は10~20分以内である。消化された網膜血管試料はあらかじめゼラチンを塗布したスライドガラスに伸展して貼付した。その際、網膜を十分に伸展させるため、血管標本の下方六時の位置で視神経乳頭にいたる切開を剪刀にて入れた。標本は空気乾燥ならびに水洗後、PAS-ヘマトキシリン (Sigma, 各々十分間) の二重染色を行った。最後にアルコール系列にて脱水し、キシレンにて透徹後封入し通常の光学顕微鏡にて観察した。本研究での観察は、乳頭付近および最周辺部網膜以外の中間部網膜に限り行った。

III 結 果

実体顕微鏡観察所見：ビーグル犬眼球においては視神経から角輪輪部までの距離は耳側の方が鼻側より少し長い。しかし、前者の方の毛様体、特に扁平部の幅は後者のそれに比べ数倍以上であり、その結果耳側網膜の方が鼻側網膜より乳頭からの距離が短い。主幹血管は動静脈が一对をなし乳頭から水平および上方方向に逆T字をなしてのびておりそれら計三組の血管はよく発達していた。垂直下方に向かって分布する血管は発達が悪い例が多かった。ガラクトース血症 ARI 非投与群をはじめとする今回の実験群の中で出血、白斑などの臨床所見を示した例はまったくなかった。

光学顕微鏡的観察：(1) 正常食餌飼育群 (対照群)。本群のイヌ網膜を注意深くトリプシン消化を行い、スライドに貼付した全網膜血管を図1に示す (図1)。乳頭を中心として逆T字形に主幹動静脈が分布する。乳頭から網膜最周辺部までの距離は、耳側が最も短く次いで上下側、鼻側網膜が最も長い。乳頭耳側の黄斑部にあたる部位には特殊な血管網は存在しない。毛細血管を詳細にみていくと二種類の核が分布することが判る。つまり、ヘマトキシリンに濃染する球状の核と淡染する楕円形の核である。前、後者の数の比は網膜全体を通じておよそ1:2.5であり、両者の核は乳頭付近の後極部、周辺部ともそれぞれ均一に分布していた。球状核すなわち壁細胞の核は血管壁からはみだす様に分布したり、血管の正面に位置したりしていた (図2)。血管中央分布している核の中で、両者の鑑別が困難な例も時々あった。

(2) 30%ガラクトース含有食餌飼育群。本群15カ月までの網膜血管は対照群とまったく同様であり、PAS-

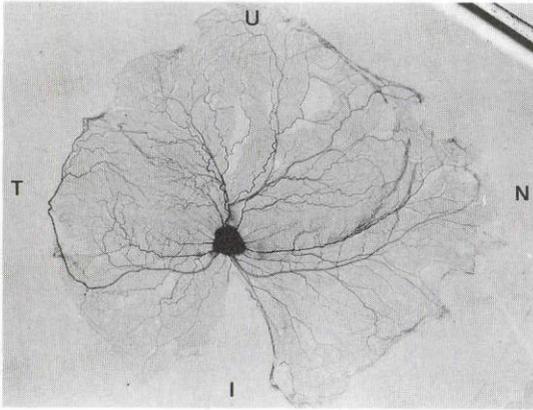


図1 スライドに貼付した全網膜血管。主幹血管は逆T字形に分布する。乳頭からの距離が短い方が耳側である (PAS-ヘマトキシリン染色, T:耳側, N:鼻側, S:上側, I:下側, ×4).

ヘマトキシリン染色後光顕による観察でも両者の間で違いはなかった。つまり、壁細胞および内皮細胞は均一に分布し、壁細胞の選択的消失所見も見られなかった。19カ月では二眼中一眼にヘマトキシリン染色にて染色されない核を有する壁細胞つまり ghost mural cell が出現した。時間経過と共に ghost mural cell の出現頻度は増し、21カ月になると本群四眼中三眼に明確な壁細胞選択的消失所見が観察された。更に、24カ月では本群四眼すべての例で ghost 化した壁細胞を認めた (表1)。表1で示したように、ghost 化壁細胞の出現頻度はガラクトース含有食餌飼育の期間に比例して増加した。異常細胞は主として後極部より中間周辺部でよく見られ、単発で分布したり数個集まって観察されたりした。網膜全体でその数は100個以上認められた。単発の壁細胞消失血管にはほとんど認められなかったが、複数の壁細胞消失血管では内皮細胞核の分布異常を認めた。つまり、正常対照群網膜細小血管では内皮細胞核が一般的に言って等間隔で均一に分布するのに対し、これらの血管では内皮細胞核が疎になり消失したようになり、集合し増殖像のような所見がみられた (図3a, b)。また、壁細胞と内皮細胞の両者の核が消失している、いわゆる acellular vessels も出現した (図3c)。一般的に、それらの血管では周囲の血管より拡張していた。本群では光顕による以上のような所見以外には出血、白斑などの糖尿病性網膜症初期症状はまったく認められなかった。

(3) ARI, Sorbinil および (4) ARI, M-79175 混入

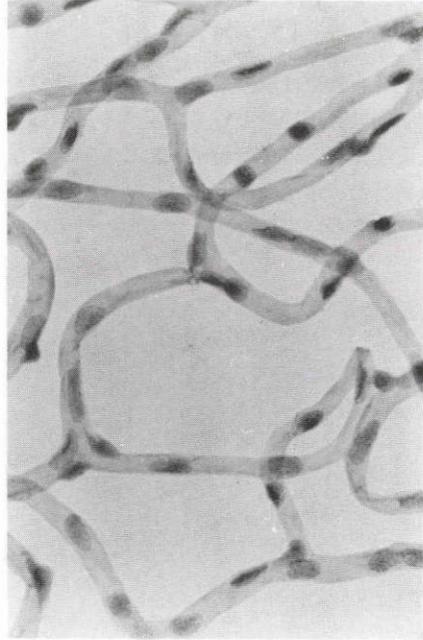


図2 正常対照群網膜トリプシン消化標本。ヘマトキシリン濃染球状核 (壁細胞) と淡染楕円形 (内皮細胞) の二種類の細胞核が認められる。前者は細胞壁からはみだすように位置することが多い。また、両者はそれぞれ一定の間隔をもって分布する。(PAS-ヘマトキシリン染色, ×1,000).

表1 イヌ網膜における壁細胞消失所見の出現頻度。壁細胞消失所見の見られた網膜数/調べた網膜数を示す。

期間	正常食餌対照群	ガラクトース食群		
		非ARI投与	Sorbinil	M-79175
12カ月	0/2	0/2	—	—
15カ月	0/2	0/2	—	—
19カ月	0/1	1/2	—	—
21カ月	0/3	3/4	0/4	0/4
24カ月	0/4	4/4	0/4	0/4

30%ガラクトース含有食餌飼育群全8例の網膜標本では前述のような壁細胞消失やそれともなる内皮細胞核分布異常の様な所見は観察されず、正常対照群と同様であった (図4, 5)。本実験24カ月以内に観察したビーグル犬42頭42眼における壁細胞消失の出現頻度を表1に示す。

IV 考 按

糖尿病性網膜症は検眼鏡的に毛細血管瘤, 出血, 白斑などを初期臨床症状として発症する。そして, 後期には血管閉塞さらに血管新生が起こり光凝固などの治療にも抵抗し, 増殖性病変が進行するため不幸にも失明する症例も多い疾患である。本症に対する蛍光眼底

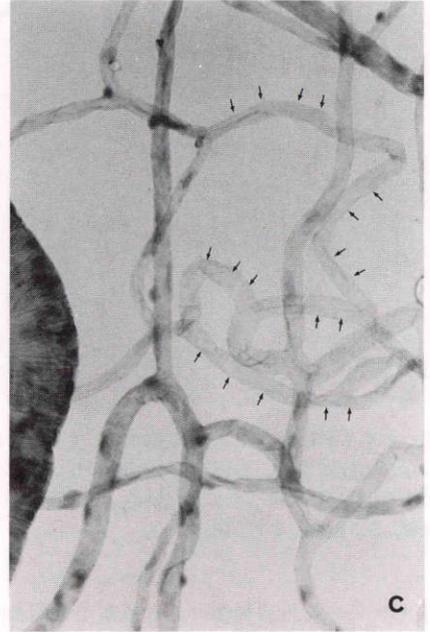
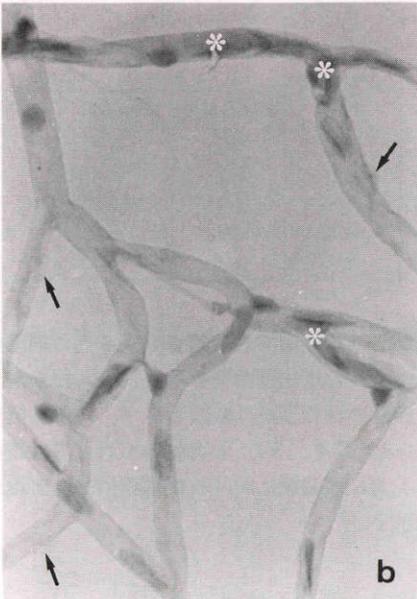
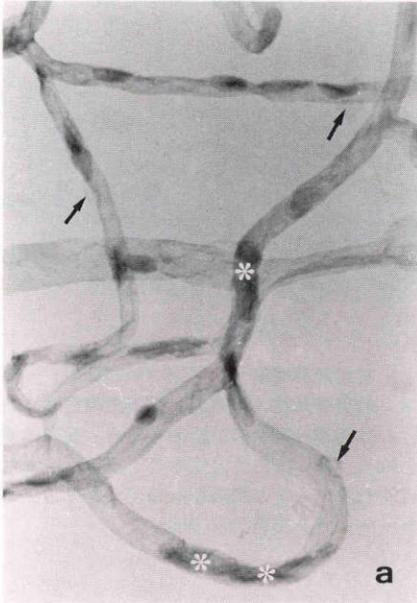


図3 30%ガラクトース含有食餌飼育群網膜トリプシン消化標本。本群では, 壁細胞の消失つまりghost化した壁細胞(矢印)が眼底の所々に見られる(a, b)。その様な血管では多くの場合, 内皮細胞核が異常に集積(*印)したり疎になったりしている。また時として両者の核が全く認められない, いわゆるAccellular capillaryも観察された(c) (PAS-ヘマトキシリン染色, $\times 1,000$)。

造影法, 光凝固法の発達による診断・治療面, さらに, 硝子体手術発達による晩期症例に対する治療面が長足の進歩をとげている。しかし, それに比べどんなメカニズムで発症するかという初期網膜症発症機序に関しての知見は乏しく, いまだによく判っていない。従って, 現時点では糖尿病性合併症を直接治療できる薬剤もない。本研究の最終目標はこの薬剤の開発であり, アルドース還元酵素阻害剤(ARI)が糖尿病性網膜症を治療できるかどうかを知ることである。今回の研究を開始した理由として三つの大きな背景があげられる。まず一番目の背景を次に述べる。前述の通り, 正確な網膜症発症メカニズムは今なお不明であるものの, 網膜トリプシン消化標本の観察によって多くの知見がえられた¹⁾²⁾。本法は数万個以上分布する網膜血管構築細胞を一望できる特徴を有し, 一断面のみで全体を判断せねばならない電顕などの断面的観察の欠点を補う。さて, 本症において最も初期に起こる病理学的所見のひとつに壁細胞の選択的消失があり, この事に関して

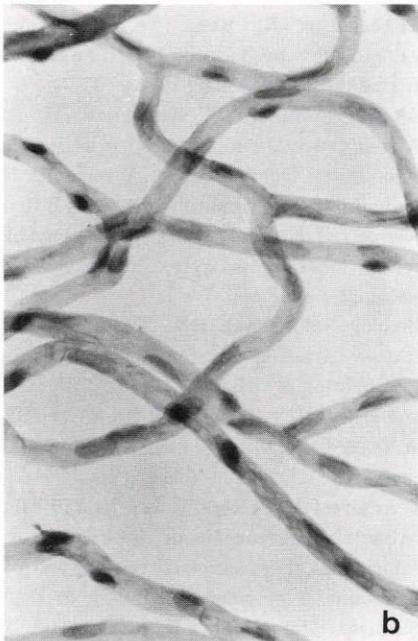
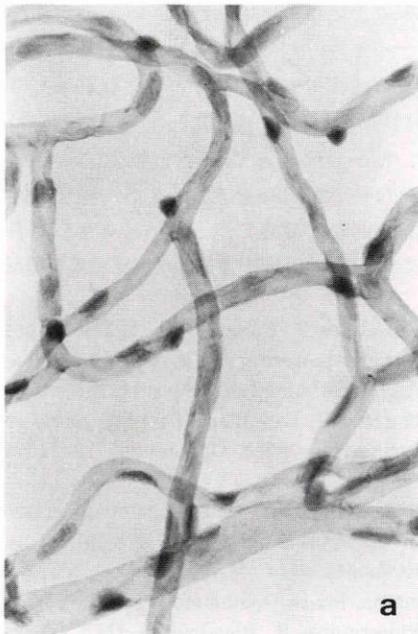


図4 アルドース還元酵素阻害剤 (ARI) である Sorbinil (Pfizer) および M-79175 (Eisai) 混入30%ガラクトース含有食餌飼育群網膜トリプシン消化標本。本群では前者 (a), 後者 (b) 共に消失壁細胞は認められず, 細胞分布も正常対照群と同様であった。(PAS-ヘマトキシリン染色, $\times 1,000$).

は異論が無い。Cogan²⁾は主幹血管における平滑筋細胞の役割と対比させ、毛細血管における壁細胞は血管緊張性を保つ役割をもつと考えた。つまり、本細胞の消失によって、限局性および瀰漫性毛細血管拡張が生じる。前者は毛細血管瘤となり、後者は透過性異常血管に対応する。このような血流動態の変化のため近傍の細小血管には血流が減少・停止し、これが、細小血管閉塞のもととなる。多くの糖尿病性網膜症トリプシン消化標本の観察から以上のような発症のメカニズムを推測したCoganのこの説は20年以上も前に発表されているが、現在なお否定されておらずまたこれに代わり機序のすべてを説明できる説もない。一口で言うと、Coganは壁細胞消失が網膜症を起こすと考えた。この場合の消失細胞とは、細胞膜は正常に保たれているものの、内部の核ならびに細胞質が膨化変性しヘマトキシリン染色液で核染色されなくなった状態をさす。網膜血管トリプシン標本において壁細胞が側面に位置し、血管壁から突出した状態で分布するときは消失細胞を確認するのは容易である。しかし、中央部に分布している場合はそれを確認することは不可能である。つまり、観察された壁細胞消失数より実際の数の方が多いことになる。

二番目の背景は糖アルコール浸透圧説³⁾⁴⁾ (Kinoshita)である。糖尿病による高血糖で壁細胞の膨化変性はなぜ起こるのであろうか？ 血液中のグルコース量が高くなると、アルドース還元酵素 (AR) が働き始めグルコースをソルビトールに代謝する。ソルビトールが蓄積すると細胞内浸透圧が上昇し、水分が吸引され細胞膨化変性が起こる。ラット糖白内障の研究から水晶体線維の反応として明確にされたこの一連の過程が壁細胞にも当てはまると考えられる。なぜなら、まず免疫組織化学的観察からヒト壁細胞にARが存在することが証明された⁷⁾。培養壁細胞もグルコースやガラクトースなどの糖を糖アルコール (ソルビトールやガラクトール) に代謝し、直接生化学的にもAR活性が証明された⁸⁾⁹⁾。これらのことから、壁細胞がARを含むのは確実である。つまり、壁細胞消失がARの働きによって起こる、言い換えるとアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) 投与が壁細胞選択的消失を抑制する可能性が高いと考えられる。

最後の背景事実は糖尿病性網膜症動物モデルの存在である。われわれは過去に、一年間の72%フルクトース食餌負荷糖尿病ラットの網膜をトリプシン消化標本によって観察したところ、壁細胞消失、毛細血管瘤な

どの所見はまったく認められなかった¹⁰⁾。したがって、少なくとも一年以内のラットにはヒト様糖尿病性網膜症が起こらないと結論した。このように、網膜症の簡便な動物モデル作成は困難である。最近、Engermannらは糖尿病イヌに網膜症が出現したことを報告した⁵⁾。さらに特記すべきことに彼らは、ガラクトース血症イヌにもヒト様網膜症を観察した⁶⁾。その報告によると、ガラクトース血症32カ月で眼底には壁細胞消失、毛細血管瘤などの病理学的所見に加え、出血、白斑などの糖尿病網膜症を示す臨床所見も同時に見られたという。ARはグルコースとまったく同様にガラクトースを還元しそれぞれの糖アルコールに代謝する。糖尿病の高グルコース血症とガラクトース血症とを結びつけるものはARしかないので、ガラクトース血症イヌに網膜症様所見が見られたこと自体ARが糖尿病性網膜症に対する関与を強く示唆するものである。以上の三つの背景から、本研究の具体的な目的は必然的に次のようになる。(1)ガラクトース血症イヌに本当に初期網膜症病変である壁細胞消失は出現するのか？(2)発症したとすると、ARIは壁細胞消失を抑制するのか？(3)壁細胞消失がなければその後の網膜症病変は発症しないのか？

本論文における最長観察期間は24カ月である。結果の項で述べたように、現時点で目的(1)、(2)には答えを出すことができた。つまり、ガラクトース血症イヌ網膜には網膜症初期病変である選択的壁細胞消失が出現し、ARIはそれを抑制した。内皮細胞と壁細胞との関係については不明な点が多い。しかし、最近、両細胞を細胞培養し相関関係を調べた報告がある。それによると、壁細胞は内皮細胞の増殖を抑制し、その効果は細胞間直接連絡によって生じる。電顕的観察によると、壁細胞の細胞突起はところどころで基底膜を貫いて内皮細胞細胞質と直接接しておりこの部位から何らかの物質の移送、つまり信号が出され壁細胞が内皮細胞をコントロールしていると推測した¹¹⁾。Coganがトリプシン標本の観察から、20年以上も前に推測した両者の関係を示す説に科学的裏づけがついて出始めた訳である。所見の項で述べたように、壁細胞消失血管で内皮細胞核の異常分布が認められたことは、前者の消失によって生じた結果である可能性が強い。

目的(3)である壁細胞消失がその後の網膜症病変の原因となるかどうかを知ることは今後の研究を待たねばならない。ARIが網膜症に効果を有するとしても、

筆者らが過去に予測¹²⁾¹³⁾したようにそのごく初期症例である。つまり、治療と言うよりむしろ予防治療的に使用されるはずで光凝固法にとって代わるものではない。この点から投与は長期にわたるので副作用も心配である。だからと言ってARIを無視するのも良くない。なぜならAR研究を通じてまさに糖尿病性網膜症の本態にわれわれはさし迫っていけるからである。

本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) **Kuwabara T, Cogan DG**: Studies of retinal vascular patterns. Part 1, Normal architecture. Arch Ophthalmol 64: 904—911, 1960.
- 2) **Cogan DG, Kuwabara T**: The mural cell in perspective. Arch Ophthalmol 78: 133—139, 1967.
- 3) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. Invest Ophthalmol 4: 786—799, 1977.
- 4) **Kinoshita JH**: Mechanism of cataract formation. Invest Ophthalmol 13: 713—724, 1977.
- 5) **Engermann R, Bloodworth JMB Jr, Nelson S**: Relationship of microvascular disease in diabetic with metabolic control. Diabetes 26: 760—769, 1977.
- 6) **Engermann R, Kern TS**: Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. Diabetes 33: 97—100, 1984.
- 7) **Akagi Y, Kador PF, Kinoshita JH, et al**: Aldose reductase localization in retinal mural cells. Invest Ophthalmol 24: 1516—1519, 1983.
- 8) **Hohman TC, Nishimura C, Robison WG, et al**: Aldose reductase in cultured human and canine retinal capillary pericytes. Invest Ophthalmol 26(Suppl): 328, 1986.
- 9) **Buzney SM, Frank RN, Varma SD, et al**: Aldose reductase in retinal mural cells. Invest Ophthalmol 16: 392—396, 1977.
- 10) **赤木好男, 池部 均, 高橋幸男他**: ラット糖尿病性網膜症の可能性について。日眼 90: 1674—1679, 1986.
- 11) **D'Amore PA, Orledge A, Jacobs J**: The role of matrix components in the control of vascularization. The Microenvironment and Vision, Cell and Developmental Biology of the Eye, Sheffield JB, Hilfer SR (eds), New York, Springer-Verlag, 29—53, 1987.
- 12) **赤木好男**: Aldose reductase (AR)と糖尿病性眼合併症。眼科 27: 1101—1111, 1985.
- 13) **赤木好男**: アルドース還元酵素と網膜症。眼科 28: 417—423, 1986.