

実験的糖尿病性角膜内皮障害

III. 新しいアルドース還元酵素阻害剤 (Statil, ICI) の効果 (図6)

照林 宏文・赤木 好男・高橋 幸男
池部 均・宮本 嘉久・茨木 信博 (京都府立医科大学眼科学教室)
横井 則彦・堤 元信・糸井 素一

Prevention of Experimental Diabetic Corneal Endotheliopathy
with a New Aldose Reductase Inhibitor

Hirofumi Terubayashi, Yoshio Akagi, Yukio Takahashi,
Hitoshi Ikebe, Yoshihisa Miyamoto, Nobuhiro Ibaraki,
Norihiro Yokoi, Motonobu Tutumi and Motokazu Itoi

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, 新しいアルドース還元酵素 (AR) 阻害剤 (Statil, ICI) 混入同食餌, 通常食餌の三群に分け3週間飼育後, 経角膜の冷凍法にて内皮細胞を破壊 (人工レンズ挿入手術, 硝子体手術に相当する) し, その修復像を組織学的, AR免疫組織化学的に観察し次の結論をえた。(1) ガラクトース群では正常群に比べ修復が遅延し, AR阻害剤投与はそれを改善した。(2) ガラクトース血症ラット角膜内皮障害発症にはARが関与しており, AR阻害剤はそれを改善せしめることを強く示唆した。(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と思われた。(日眼92:151—155, 1988)

キーワード: ガラクトース食飼育ラット, 糖尿病性角膜内皮障害, 免疫組織化学, AR, AR阻害剤

Abstract

The corneal endothelial cells of normal rats and galactosemic rats treated with or without an aldose reductase (AR) inhibitor (Statil, ICI) were destroyed by transcorneal freezing. The corneas were examined by light and electron microscopy, and by AR-immunohistochemistry. Multilayered-AR-positive endothelial cells appeared only in the corneas of galactosemic rats, and they could be seen even at 14 days after freezing. These AR-positive regenerating cells in both normal and galactosemic rats treated with AR inhibitor disappeared by 7 days, forming several layers at 4 days. These results show abnormality in the corneal endothelial healing of the galactosemic rat. The delay was prevented by the administration of AR inhibitor. This study suggests that AR plays a role in the corneal endotheliopathy observed in diabetic patients. (Acta Soc Ophthalmol Jap 92: 151—155, 1988)

Key words: Galactosemic rat, Diabetic corneal endotheliopathy, Immunohistochemistry, Aldose reductase, Aldose reductase inhibitor

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町通店小路上ル 京都府立医科大学眼科学教室 照林 宏文
(昭和62年8月10日受付)

Reprint requests to: Hirofumi Terubayashi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto Prefectural Univ. of Med.
Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Accepted August 10, 1987)

I 緒 言

眼内レンズ手術や硝子体手術の普及と共に、術後の角膜内皮障害に遭遇する機会も増加している。特に糖尿病患者において、前記術後に水疱性角膜症などの重篤な内皮障害を引き起こすことが稀にある。従って、糖尿病患者においては正常者に比べ角膜内皮細胞のき弱性の存在が想像できる。今後、糖尿病患者に対する眼内レンズ手術など角膜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と思われる。なお糖尿病患者に角膜内皮細胞の形態異常（大小不同、多形性）¹⁾が存在することは、スベキュラマイクロスコープの観察により証明されており、さらに経過が長くなると内皮細胞数も減少することが知られている。

私達は既にガラクトース血症ラットの角膜内皮細胞を経角膜的に凍結破壊し、正常ラットに比べその修復はかなり遅延することを報告し²⁾、ラットにも糖尿病性角膜内皮障害が存在することを確認した。さらに一種のアルドース還元酵素阻害剤である M-79175（エーザイ）が、この修復遅延を正常化させることを示した³⁾。本研究の目的は、新しいアルドース還元酵素阻害剤の Statil (ICI) の効果を検索することである。

II 実験方法

実験には体重50g（生後3週齢）の Sprague Dawley 系ラットを使用した。それらは以下の3群に分けた。
(1) 研究室用通常食餌飼育群（対照群），15匹。(2) 50g ガラクトース含有食餌飼育群（ガラクトース単独群），15匹。(3) 50g ガラクトース含有食餌にアルドース還元酵素阻害剤（ARI）Statil (ICI) を0.046%濃度混入食で飼育した群（ARI ガラクトース群），15匹。まず各群のラットを8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℃に冷却した先端部直径1.5mm のステンレス棒を約20秒間あてて行った。凍結破壊後経時的にネン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・電顕の観察：角膜を1%パラフォルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒドを含む0.1M 磷酸緩衝液（pH 7.4）固定ならびに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：角膜は4%パラフォルムアルデヒドを含む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せきした。10~15 μ m の凍結切片を作成し、抗ラット水晶体アルドース還元酵素（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。なお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。

III 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 陽性染色は上皮細胞と内皮細胞にのみ見られ実質層には認められなかった。ただしガラクトース単独群では、上皮細胞層のうち基底細胞層のみは染色性が強かった。内皮細胞層は三群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）。

凍結破壊2日後：三群とも内皮細胞欠損部は修復され、障害中央部では球状円形となった内皮細胞が増殖し、数層塊状をなして分布していた。これらの細胞は

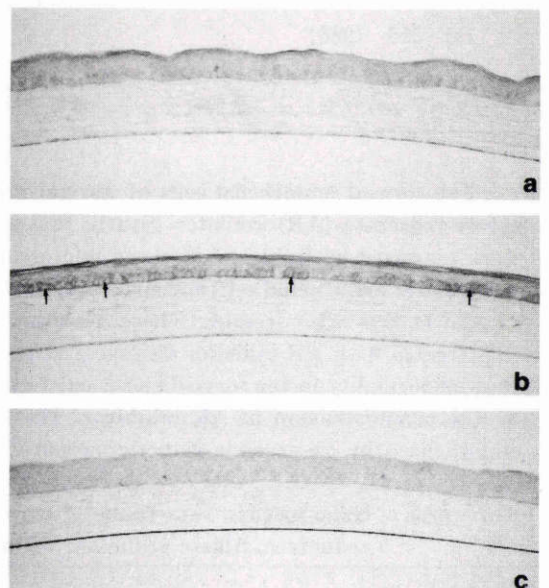


図1 凍結破壊前角膜における AR 局在。対照群(a)，ガラクトース単独群(b)，ARI ガラクトース群(c)のいずれでも内皮細胞は濃染し、差異は認められない。上皮細胞層もびまん性に染色されたが、ガラクトース血症群では基底細胞層（矢印）のみが濃染する（PAP 染色， $\times 100$ ）。

すべて AR 染色陽性であった。ガラクトース単独群では他の二群に比べ、増殖内皮細胞の膨隆が大きい例が多かった(図 2)。

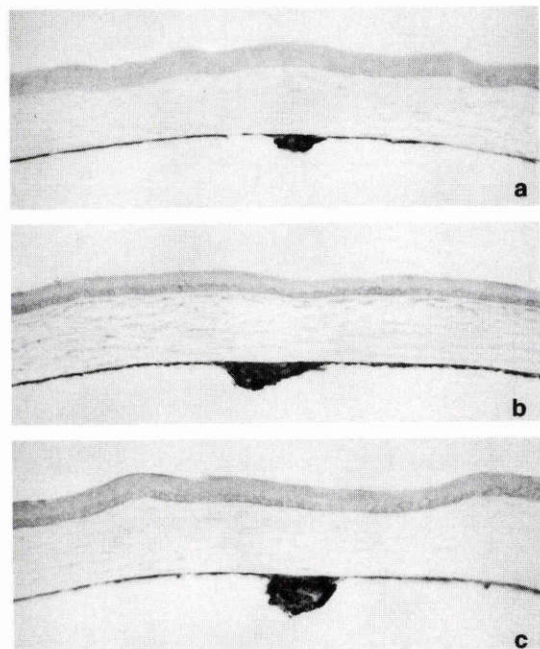


図 2 凍結破壊 2 日後角膜における AR 局在。対照群 (a), ガラクトース単独群 (b), ARI ガラクトース群 (c) のいずれでも欠損部は覆われ、凍結部位に球状円形化内皮細胞が塊状をなしている (PAP 染色, $\times 100$)。

凍結破壊 4 日後：対照群では、角膜中央部の凍結破壊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 3a)。ガラクトー

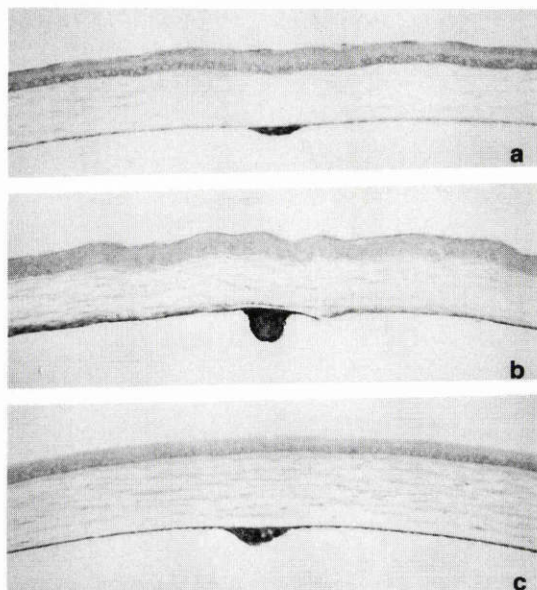


図 3 凍結破壊 4 日後角膜における AR 局在。ガラクトース単独群 (b) のみ凍結部位に巨大球状細胞塊が見られる。対照群 (a), ARI ガラクトース群 (c) では高さの低い重層細胞群が見られる (PAP 染色, $\times 100$)。

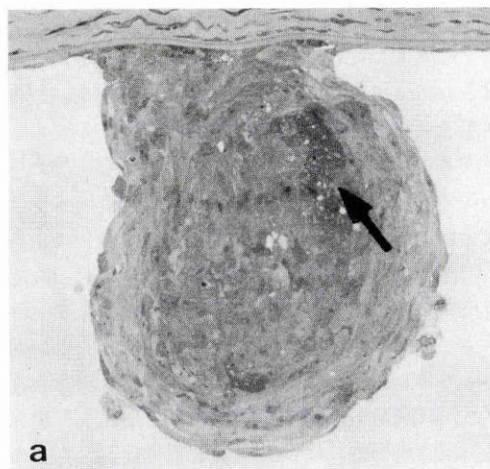


図 4 ガラクトース単独群凍結破壊 4 日後角膜光顕像 (a) と電顕像 (b)。球状突出表層部には扁平細胞、内部には変性細胞群 (矢印) が観察される (a, トルイジン青染色 $\times 200$, b, bar は 1μ)。

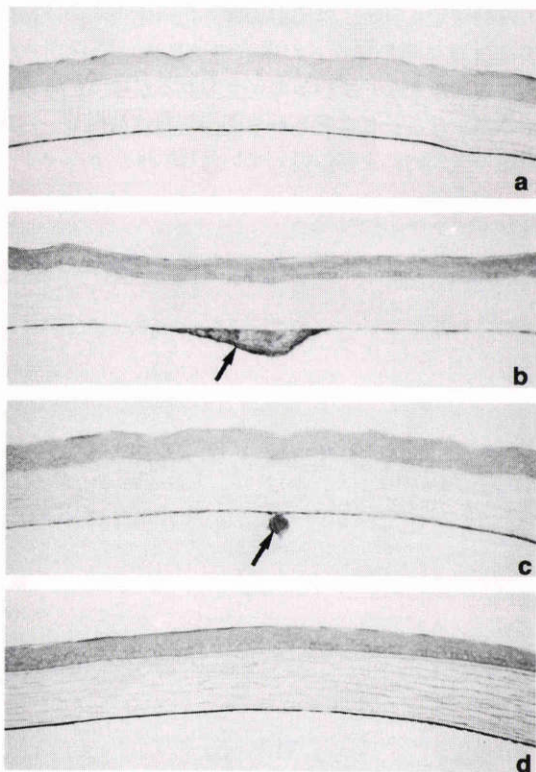


図5 凍結破壊7日後角膜におけるAR局在。ガラクトース単独群 (b, c) には異常増殖細胞塊 (矢印) が残存するが、対照群 (a), ARI ガラクトース群 (d) では完全に正常に復する (PAP 染色, $\times 100$).

ス単独群では、角膜凍結部位内皮細胞側に円形的大型膨隆構造物が複数個見られた。この膨隆構造物のAR染色を見ると、その内部の中央部ではまだらとなりAR染色陰性の場所も観察された(図3b)。電顕観察では、膨隆構造物表層部は円形化正常細胞質を持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4a)。これらの細胞は電顕観察において変性細胞であることを確認した(図4b)。ARI ガラクトース群でも膨隆構造物は時々見られたが、その大きさは小さかった(図3c)。凍結部位以外の部位では内皮細胞は対照群と同様に扁平化し正常に復していた。

凍結破壊7日後：対照群、ARI ガラクトース群では、全例で内皮細胞は完全に扁平化し正常化していた(図5a, d)。ガラクトース単独群では、半数以上の例で膨隆構造物は残存していた(図5b, c)。光顕、電顕観察では4日後のものより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

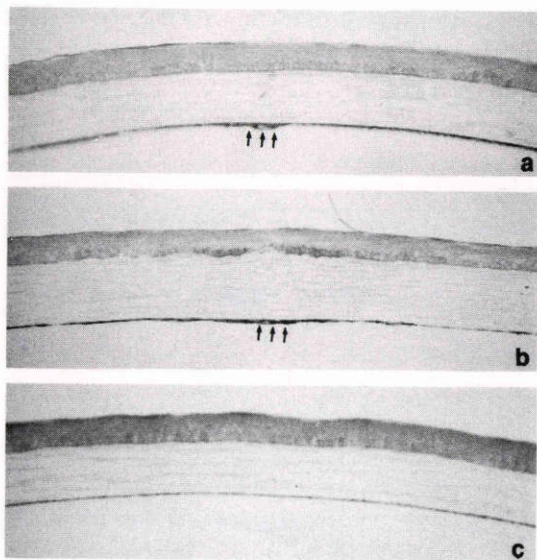


図6 凍結破壊14日後角膜におけるAR局在。ガラクトース単独群 (a, b) では非常に扁平な細胞増殖塊 (矢印) が依然残存するが、対照群やARI ガラクトース群 (c) では正常化したままである (PAP 染色, $\times 100$).

が散在するのが観察された。

凍結破壊14日後：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、この時期でも小さな膨隆構造物が観察された(図6)。

IV 考 察

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に従い、糖尿病性角膜内皮障害の存在が注目されてきている。Schlzlら¹⁾、Yeeら⁴⁾、松田⁵⁾は糖尿病患者の角膜内皮細胞には多形性、大小不同という形態異常の存在を明らかにした。しかし臨床的に見てわか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ことはない。原因はなにであっても角膜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。そしてその移動細胞は大きくなったり、角がとれ円形化して、多形性、大小不同という形態異常を有する内皮細胞が出現する訳である。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、結果としてき弱性を有すると考えられる。

現在、糖尿病性眼合併症はアルドース還元酵素によ

り引き起こされている可能性が模索されている。この端を発したのは、Kinoshitaの実験的糖白内障についてのポリオール説ならびに、アルドース還元酵素(AR)がその起因酵素であるという結果からである⁶⁾⁷⁾。実験的には、ガラクトース食飼育ラットすなわちガラクトース血症ラット白内障は糖尿病ラット白内障とARに関していえば同じ理論的背景をもつ。ところが糖尿病ラットは全身状態や体重増加が悪く、個体差も大きい。一方、ガラクトース血症ラットは全身状態がほとんど障害されず、ARに対しても良い基質である。例を挙げると、白内障はばらつきなく短期間で発症し、イヌにはヒト様網膜症も出現する⁸⁾と報告されている。またARはヒト⁹⁾、イヌ¹⁰⁾、ラット²⁾¹¹⁾の内皮細胞に豊富に分布する。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、これが本実験でガラクトース血症ラットを用いた理由である。

我々はすでに、ガラクトース血症ラットおよび正常ラットの角膜内皮細胞を経角膜の凍結破壊し、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²⁾。凍結破壊という手段を用いた理由は、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、人工的凍結破壊後の修復における細胞動態の異常としてとらえようと試みた。すでにAR還元酵素阻害剤の一種であるM-79175(エーザイ)が、ガラクトース血症ラットにおいて観察された修復遅延を正常化することを認めた³⁾。本実験では、他のアルドース還元酵素阻害剤であるStatil(ICI)の効果を調べると共に、糖尿病性角膜内皮障害がARと関係している事を証明することである。

本実験において凍結破壊2日後では、対照群、ガラクトース単独群、ARIガラクトース群の3群において、角膜内皮側の欠損部は覆われ円形化細胞からなる重層所見にはほとんど違いはなく、凍結破壊の侵襲は同一であると思われた。ところが、対照群、ARIガラクトース群で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て、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ものが多かった。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AR免疫活性を持つ再生内皮細胞から成り立っていた。これは、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た。

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、二種のAR還元酵素阻害剤(M-79175, Statil)投与により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考えられる。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アルドース還元酵素阻害剤投与が是正する可能性を示唆するものである。

本論文は第91回日本眼科学会総会にて発表した。

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) 赤木好男, 高橋幸男, 田辺稔邦, 池部 均, 馬嶋清如, 宮谷博史, 宮本嘉久, 照林宏文: 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(AIR)との関連性について. *日眼会誌* 91(2): 187—193, 1987.
- 4) Yee RW, Matuda M, Kern TS, Engerman RL, Edelhauser HF: Corneal endothelial changes in diabetic dogs. *Curr Eye Res* 4: 759—766, 1985.
- 5) 松田 司: 糖尿病角膜の内皮細胞. *眼科* 28: 399—409, 1986.
- 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) Engerman RL, Kern TS: Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes* 33: 97—100, 1984.
- 9) Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, Kuwabara T, Kinoshita JH: Localization of aldose reductase in the human eye. *Diabetes* 33: 562—566, 1984.
- 10) Kern TS, Engerman RL: Distribution of aldose reductase in ocular tissues. *Exp Eye Res* 33: 175—182, 1981.
- 11) Ludvigson MA, Sorenson RL: Immunohistochemical localization of aldose reductase. *Diabetes* 29: 450—459, 1980.

(第91回日眼総会原著)