

糖尿病性瞳孔反応, 虹彩異常とアルドース還元酵素

その3. 実験ガラクトース血症ラットに見られる虹彩血管透過性変化に
おけるアルドース還元酵素阻害剤の役割 (図2)

照林 宏文・赤木 好男 (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)

Diabetic Changes of Pupillary Reactions and Iris Histology No 3. The Role of Aldose Reductase Inhibitor to Iridal Vessel Hyperpermeability of Galactose-fed Rats

Hirofumi Terubayashi¹⁾, Yoshio Akagi¹⁾, P.F. Kador²⁾ and J.H. Kinoshita²⁾

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine¹⁾

National Eye Institute, National Institute of Health²⁾

要 約

50%ガラクトース食餌で長期間(3, 5カ月)飼育したラットにおいて, 虹彩血管透過性亢進を Horseradish Peroxidase (HRP) 酵素組織化学法を用いて光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡学的に証明した. HRP 反応物は毛細血管から虹彩実質に漏出し, びまん性に観察できた. さらに, 2種のアルドース還元酵素阻害剤(Sorbinil, Tolrestat)の投与は, 虹彩血管透過性亢進の出現を予防できた. (日眼 92: 1577—1581, 1988)

キーワード: 50%ガラクトース食餌, ラット, 虹彩血管透過性亢進, Horseradish Peroxidase, アルドース還元酵素阻害剤

Abstract

Sprague-Dawley strain rats were fed 50% galactose chow for 3 or 5 months, and found the hyperpermeability of iridal vessels with regard to horseradish peroxidase (HRP) by means of light and electron microscopical enzyme histochemistry. HRP products were observed diffusely along the iridal stroma outside the capillaries. Two kinds of aldose reductase inhibitors, Sorbinil and Tolrestat, prevented the above appearance of hyperpermeability of iridal vessels with regard to HRP. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1577—1581, 1988)

Key words: 50% Galactose chow, Rat, Hyperpermeability of iridal vessels, Horseradish peroxidase, Aldose reductase inhibitor

I 緒 言

糖尿病性網膜症の重症度や進行度を知るひとつの手

段としては, 蛍光眼底撮影における血管透過性亢進の
所見が非常に重要である. しかもこの所見は網膜症発
生病理とも関係しており, 網膜症初期変化のひとつを

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 照林 宏文
(昭和63年5月6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 for publication May 6, 1988)

なしている。この蛍光眼底撮影の際に、虹彩における血管透過性亢進を認める事があるが、これは虹彩ルペオージスの早期発見のために重要な徴候である。さらに、この虹彩血管透過性亢進は、蛍光血管撮影において網膜血管透過性亢進に先立つ変化であるという報告¹⁾もあり、临床上虹彩における血管透過性亢進の検索が重要だと思われる。

本研究では、50%ガラクトース食餌にて飼育した実験ガラクトース血症ラットにおいて、虹彩血管透過性亢進を Horseradish Peroxidase (HRP) 酵素組織化学法にて組織学的に証明し、この透過性亢進に対する2種類のアルドース還元酵素阻害剤 (Sorbinil, Tolrestat) の予防効果を検索した。

II 実験方法

生後3週齢(体重50g)の Sprague-Dawley 系雄ラット60匹を使用し、以下の4群に分けた。正常群：正常

食餌で飼育する群15匹。ガラクトース群：50%ガラクトース食餌で飼育する群15匹。Sorbinil ガラクトース群：50%ガラクトース食餌にアルドース還元酵素阻害剤の Sorbinil (Pfeizer) を0.04%加えた食餌で飼育する群15匹。Tolrestat ガラクトース群：50%ガラクトース食餌にアルドース還元酵素阻害剤の Tolrestat (Ayerst) を0.045%加えた食餌で飼育する群15匹。

食餌開始後2, 3, 5カ月の時点で虹彩血管透過性を Horseradish Peroxidase (HRP, Sigma Type II) の透過性により組織学的に検索した。すなわちエーテル麻酔下にてラットの尾静脈より HRP (30mg/100g body weight) を注入し、30分後に眼球を摘出し、さらに虹彩のみを取り出し Diaminobenzidine (DAB) 反応を行い、HRP 反応物を検出した。HRP 反応条件は、10ml の0.05M Tris-HCL 緩衝液 (pH 7.6) に0.01% hydrogen peroxide と5mg の 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を加え室温で15分間反応させた。

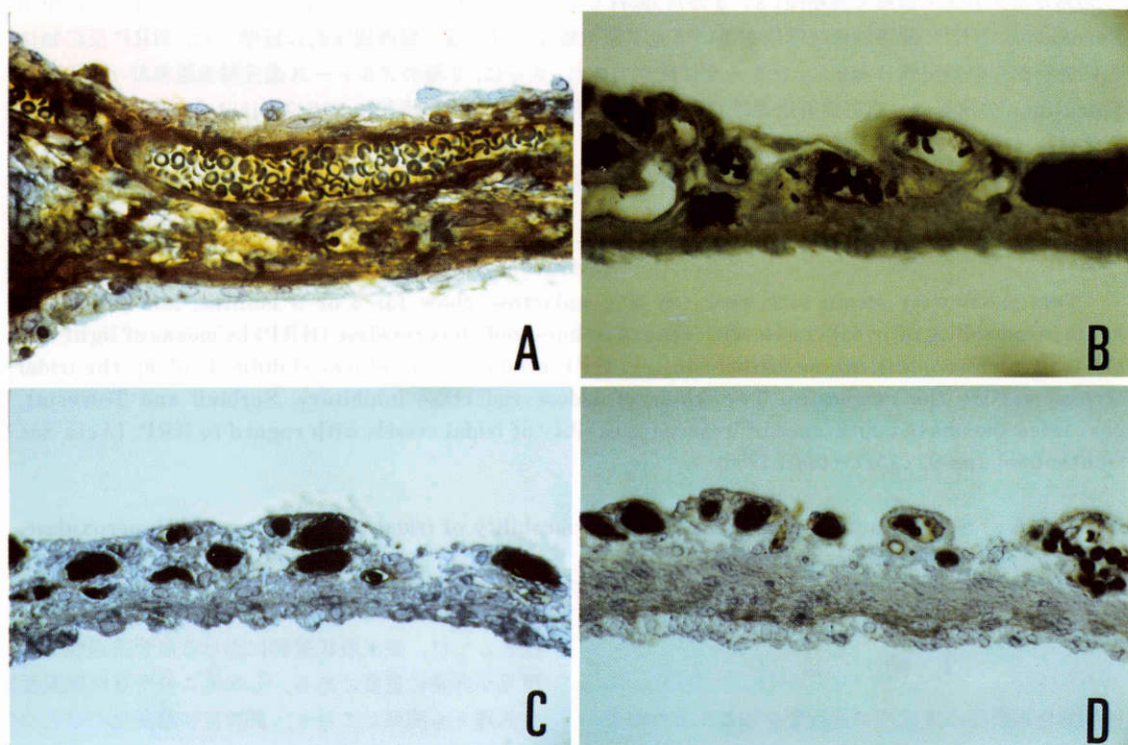


図1 5カ月間飼育ラット虹彩(A-D, X210)の血管透過性を HRP 酵素組織化学法を用いて検索する。50%ガラクトース食餌ラット虹彩では、瞳孔縁(A)より中央部全体において、HRP 反応物(茶褐色)を血管外にびまん性に観察できた。Sorbinil(C)ならびに Tolrestat(D)同時投与群では、HRP の血管外漏出を防止できた。正常食餌飼育ラットでも、HRP 反応物は虹彩血管内にのみ認められた (B)。

反応後これらの虹彩は四酸化オスミウムで後固定し、つづいてアルコール脱水し最後にエポン包埋した。光顕観察用はトルイジンブルー染色を行い、電顕観察はクエン酸鉛で染色後 JEM 100B 電顕で行った。

III 結 果

(1) 正常群

全経過を通じ HRP 反応物は虹彩血管内に局限してのみ観察でき、虹彩実質への漏出は光顕(図 1B)ならびに電顕において認められなかった。

(2) ガラクトース群

食餌開始 5 カ月の光顕観察において、褐色の HRP 反応物が虹彩の瞳孔縁から虹彩根部にかけ、血管外の実質にびまん性に認められた(図 1A)。電顕観察では、HRP 反応物は黒く認められ、瞳孔散大筋の基底膜や、

虹彩実質の細胞間に血管から漏出してきたものが観察できた(図 2)。食餌開始 3 カ月の時点では、5 カ月と同様の所見が得られた。しかし、2 カ月では、光顕ならびに電顕観察によっても、HRP 反応物は虹彩血管内に局限して観察され、血管外への漏出は見られなかった。

(3) Sorbinil あるいは Tolrestat ガラクトース群

食餌開始後 3 カ月、5 カ月において、ガラクトース群にのみ観察できた HRP の虹彩血管からの漏出は、Sorbinil あるいは Tolrestat のアルドース還元酵素阻害剤の投与により防止できた(図 1C, D)。

IV 考 案

糖尿病性網膜症の患者の網膜症の重症度や進行度を知るためには、蛍光血管撮影検査は必須である。つま

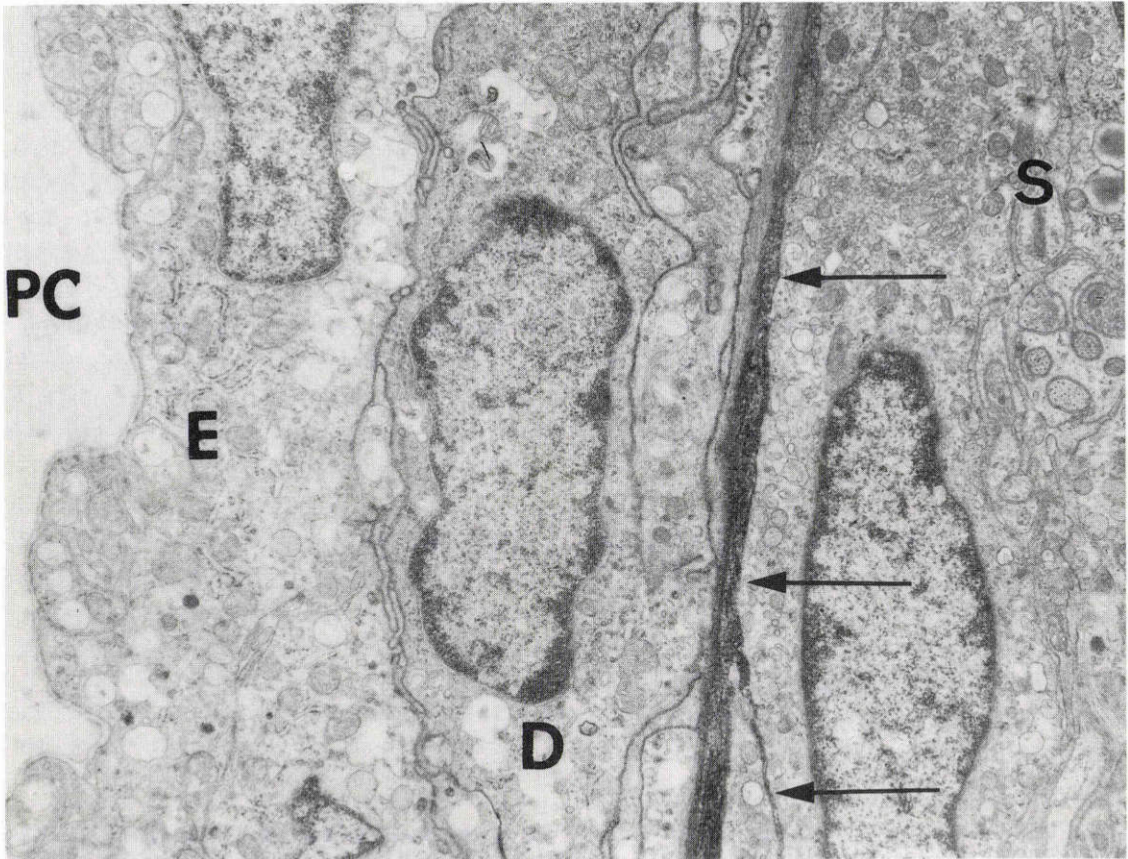


図 2 50%ガラクトース食餌にて、5 カ月間飼育ラット虹彩の HRP 反応物の電顕観察像。電子密度の高い HRP 反応物(矢印)は、散大筋細胞の基底膜に一致して認められ、後房側への漏出は観察できなかった。Bars=1 μ m. PC: posterior chamber, E: Epithelial cell, D: Dilator muscle cell, S: Stroma.

り網膜新生血管からの蛍光色素漏出ならびに網膜血管からの蛍光色素漏出の検出は、治療法の決定上非常に重要である。さらに眼底蛍光血管撮影の際に、瞳孔縁の虹彩血管からの蛍光色素の漏れを認めることもあり、虹彩ルベオージスの早期発見のためにも、眼底蛍光血管撮影の際の前眼部観察は有用だと考えられる。さらにフルオレスセインという蛍光色素に対する血管透過性亢進を、網膜血管より早期に虹彩血管で認めたという報告¹⁾があり、糖尿病患者において虹彩血管透過性亢進は網膜血管透過性亢進に先立つ変化である可能性もあると思われる。

現在までに実験糖尿病動物において、虹彩血管透過性亢進を組織学的に再現し、光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡にて観察した多くの報告が見られる。例えば、ストレプトゾトシン静注ラットを2～6カ月間飼育し、Horseradish Peroxidase (HRP) をトレーサーとして用い、虹彩血管の透過性を調べた論文がある²⁾。彼らの報告によると、ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットにおいてのみ、虹彩血管内皮細胞は多くのHRP含有顆粒を含み、内皮細胞間や基底膜にもHRP反応物を認めている。さらに血管外の実質組織にもHRP反応物は恒常的に認められた。今回用いたガラクトース血症ラットは、このストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットとは異なるが、3カ月ならびに5カ月の長期間飼育したものに、HRPに対する虹彩血管透過性亢進を認めた。しかし、電顕観察においては血管内皮細胞内にはHRP顆粒を認めず、血管外の実質組織や瞳孔散大筋の基底膜にHRP反応物を観察した。ところが色素上皮細胞間を通りぬけ後房側に漏出した所見は認めなかった。

血液網膜関門については、本実験では5カ月間飼育ガラクトースラット網膜を検索したが、HRP反応物は血管内に限局して観察でき、血管外への漏出は認めなかった。電顕観察においても同様に血管外への漏出は認めなかった。ところが、2カ月から6カ月間飼育されたストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの網膜において、血管外や内皮細胞間隙、基底膜にHRP反応物を認めたとする報告³⁾や、コントロール不良アロキサン誘導糖尿病イヌにおいて、内皮細胞間隙を通りHRPが血管外に漏出するのが観察しえた報告⁴⁾がある。これらの差はガラクトース血症とストレプトゾトシンあるいはアロキサン誘導糖尿病との違いかも知れない。しかし、イヌには長期間ガラクトース食餌を与え飼育することにより、ヒト糖尿病性網膜症類似の網

膜症モデルが作成でき⁵⁾、ラットでは長期間ガラクトース食餌にて飼育しても網膜症モデル作成ができない⁶⁾という事実を裏付けるものと思われる。つまり、実験ガラクトース血症イヌとラットにおいて、網膜血管透過性亢進が生じるかどうか、ヒト糖尿病性網膜症類似の網膜症作成の可否を決定すると考えられる。

最近アルドース還元酵素阻害剤(ARI)が糖尿病性眼合併症の治療薬の一つとして登場⁷⁾して、その中でも特に実験糖尿病ならびにガラクトース白内障に対する予防効果と治療効果は、明確に証明されている。本実験で用いたARIは、SorbinilとTolrestatの2種類であり、各々ヒダントイン誘導体ARIとカルボン酸誘導体ARIに属している。これらのARIはラットガラクトース白内障に対して優れた予防効果と治療効果を示した^{8)~10)}。そして今回は、これらの2種のARIのガラクトース血症ラットで観察できた虹彩血管透過性亢進に対する予防効果を確認した。

我々は、カルボン酸誘導体に属するもうひとつのARIであるStatil (ICI, UK)を用い、ガラクトース血症ラットにおいて観察できた虹彩血管透過性亢進に対する予防効果をすでに報告した¹¹⁾。臨床と同様にフルオレスセインという蛍光色素を使い前眼部蛍光血管撮影を行った。25%ガラクトース食餌1カ月、2カ月間飼育ラットにのみ虹彩瞳孔縁からの蛍光色素漏出を認め、Statilの投与によりその出現は防止できた。

以上のように構造式の異なる3種類のARI投与がすべて同様な効果を示したことから、ガラクトース食餌飼育ラットで見られる虹彩血管透過性亢進にARが関与していることは疑いもない。つまりARIが将来糖尿病性網膜症の血管透過性亢進に対する予防薬、治療薬として使用される可能性がある。残る問題点は、虹彩血管透過性亢進が血管内皮細胞間隙の破綻によるのか、内皮細胞の細胞質内を通過することによるのか、という透過性亢進の経路を明確にすることである。

本論文の要旨は第92回日本眼科学会総会にて口演した。

文 献

- 1) Klein S, Marre E, Zenker H-J, et al: Zur Korrelation von diabetischer Irido- und Retinopathie. *Forstschr Ophthalmol* 79: 428—430, 1983.
- 2) Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y: Disruption of iridial blood-aqueous barrier in experimental diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 219: 159—164, 1982.
- 3) Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y: Dis-

- truption of blood-retinal barrier in experimental diabetic rats: An electron microscopic study. *Exp Eye Res* 30: 401—410, 1980.
- 4) **Wallow IHL, Engerman RL**: Permeability and patency of retinal blood vessels in experimental diabetes. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 16(5): 447—461, 1977.
 - 5) **Engerman RL, Kern TS**: Experimental galactosemia produces diabetic retinopathy. *Diabetes* 33: 97—100, 1984.
 - 6) 赤木好男, 池部 均, 高橋幸男他: ラット糖尿病性網膜発症の可能性について. *日眼* 90(12): 1674—1679, 1986.
 - 7) **Kinoshita JH**: Mechanism initiating cataract formation. *Proctor Lecture Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
 - 8) **Datiles M, Fukui H, Kuwabara T, et al**: Galactose cataract prevention with sorbinil, an aldose reductase inhibitor: An light microscopic study. *Invest Ophthalmol* 22: 174—179, 1982.
 - 9) **Tian-Sheng HU, Datiles M, Kinoshita JH**: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. *Invest Ophthalmol* 24: 640—644, 1983.
 - 10) 赤木好男, 田坂 宏, 中路 裕他: 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—免疫組織化学的研究—. *日眼* 89(11): 1276—1281, 1985.
 - 11) 照林宏文, 岡本庄之助, 堤 元信他: アルドース還元酵素阻害剤の糖尿病性虹彩性血管透過性亢進に対する効果, その 1. 実験ガラクトースラットにおいて. *眼紀* 40: 1988 (掲載予定).
-