

ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能

(1) 50%ガラクトース食餌飼育ラットにおいて (図6)

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* (*アメリカ国立眼研究所)

Proliferative Ability of Lens Epithelial Cells in Cataracts in 50% Galactose Chow-fed Rats

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

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine
and National Eye Institute, *National Institute of Health, USA

要 約

ラットにガラクトース含有食餌を与え生じる実験的ガラクトース白内障では、水晶体線維細胞はガラクトチトールの蓄積によって膨化と液化が起こり、徐々に壊されていく。ところが同時に、盛んな水晶体上皮細胞の再生も観察される。本研究では、この水晶体上皮細胞増殖能を知るために、³H-thymidine オートラジオグラフィ法を用い上皮細胞の DNA 合成能を検索した。50%ガラクトース食餌開始 3, 4 日目にラベル細胞が最も多く見られ、増殖帯以外の部での異所性増殖を確認した。白内障はこれ以後も進行したが、食餌開始後 2, 3 週目にはラベル細胞の数は減少し、異所性増殖も消失した。(日眼 92:1869—1874, 1988)

キーワード: 50%ガラクトース食餌, ガラクトース白内障, 水晶体上皮細胞, ³H-thymidine オートラジオグラフィ, DNA 合成能

Abstract

In experimentally induced galactose cataracts in rats, lens fiber cells were gradually destroyed accompanied by the appearance of swelling and liquefaction occurring due to the accumulation of galactitol. Besides the destruction of lens fiber cells, marked regeneration of lens epithelial cells was observed in all animals. In this study, we used the technique of ³H-thymidine autoradiography and examined DNA synthesis in the lens epithelial cells. On the third or fourth day from the animals beginning to eat 50% galactose chow, we observed many ³H-thymidine labeled cells and clarified germinative areas spreading over the entire epithelium. Cataracts progressed gradually, but the number of labelled cells decreased and disappeared after two or three weeks from the beginning of feeding with 50% galactose chow. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1869—1874, 1988)

Key words: 50% galactose chow, Galactose cataract, Lens epithelial cell, ³H-thymidine autoradiography, DNA synthesis

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7月22日受付, 昭和63年8月29日改訂受理)

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

(Received July 22, 1988 and accepted in revised form August 29, 1988)

I 緒 言

白内障研究にはラットにガラクトース含有食餌を与えて生じるガラクトース白内障をよく用いる。このガラクトース白内障は、食餌をガラクトース含有食からガラクトースを含まない正常食に変換することにより、混濁水晶体が透明治癒化する現象がありこれをいわゆる Diet-Reversall と呼んでおり、我々も光学顕微鏡学的に証明した¹⁾。さらにアルドース還元酵素阻害剤は、このガラクトース白内障に対し治療効果ならびに予防効果を有することもすでに報告した^{2)~6)}。以上の結果より、いったん生じた白内障が透明治癒するためには、再生水晶体上皮細胞が重要な働きを担っていると思われる。

以前我々は⁷⁾、BrdU 免疫組織化学の手法にて DNA 合成中の水晶体上皮細胞をラベルし、ラットのガラクトース白内障における上皮細胞の DNA 合成能を調べたが、この BrdU 免疫組織化学を利用した方法では、方法が容易であるという大きな利点を認めるものの、厚

い切片を使用するのでひとつの切片の厚みに複数個の細胞が並びラベル細胞の数を正確に把握できなく、さらに塩酸処理が必要であり水晶体の凍結切片形態保持が非常に困難であるという大きな欠点がある。今回は、³H-thymidine オートラジオグラフィ法という確立された信頼できる方法により、DNA 合成中の水晶体上皮細胞の核をラベルし、これをマーカーとしてその増殖能を検索した。

II 実験方法

体重200g(生後6週齢)Sprague-Dawley 系雄ラット5匹、体重50g(生後3週齢)Sprague-Dawley 系雄ラット21匹を使用した。50%ガラクトース食餌開始前に、体重200gのラット5匹と体重50gのラット3匹を使い、これらの両眼球の前房中に5 μ lのmethyl-³H-thymidine (81.7Ci/mmol, New England Nucler)を1回注入し、次いで2時間後に両眼球を摘出し、水晶体を含む前眼部のみを4%paraformaldehydeを含むリン酸緩衝液(pH 7.4)にて固定した。50%ガラクトー

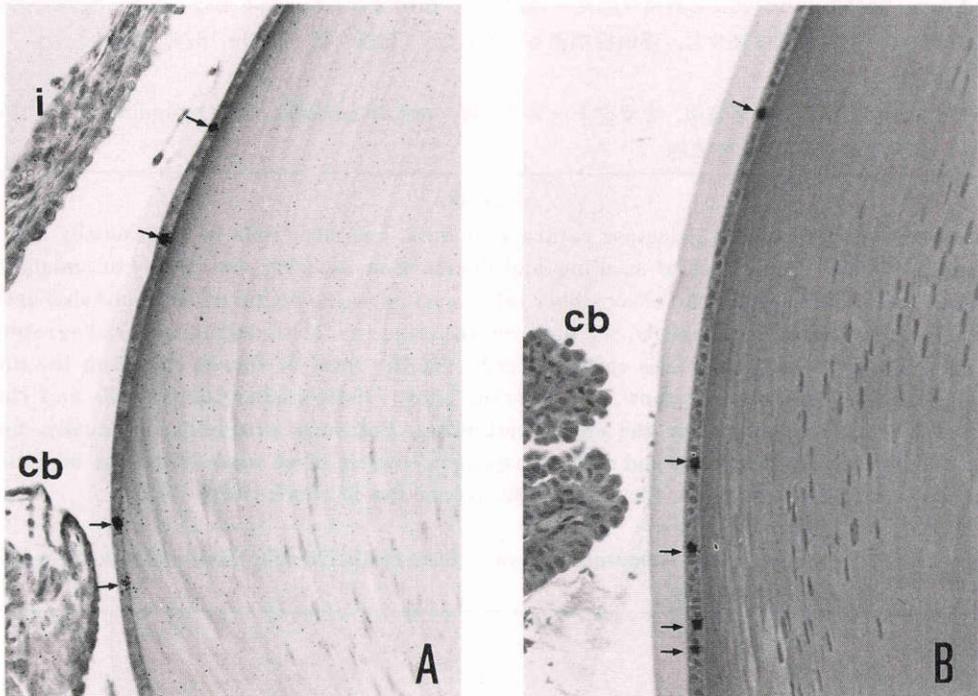


図1 体重50g, 生後3週齢の正常ラット(A)と体重200g, 生後6週間の正常ラット(B)の水晶体赤道部増殖帯におけるサイミジン標識細胞(矢印)を示す。標識細胞の核は黒い顆粒が集積しており、豊富なDNA合成の進行を表現している。標識細胞の数は、2種のラット間で差はなかった。トルイジンブルー染色, $\times 150$, cb: ciliary body, i: iris.

ス食餌開始後は、体重50g（生後3週齢）Sprague-Dawley系雄ラット18匹を用い、2日、3日、4日、7日、14日、21日目に、前記と同様の実験を行い、水晶体を含む前眼部を固定した。

数日間固定後、アルコール脱水、メサキレイト包埋し、眼球矢状断の1 μ mの薄切片を作成し、スライドグラスに塗布した。次いでこのスライドグラスを、従来

のオートラジオグラフィ法に従い乳剤をかけ（Kodak NTB2を使用）、現象・定着、トリイジン青にて対比染色し、標識された銀粒子を光学顕微鏡にて観察した。

III 結果

(1) 50%ガラクトース食餌開始前

成熟ラット（体重200g、生後6週齢）でも未成熟ラット（体重50g、生後3週齢）でも、3H-thymidine標

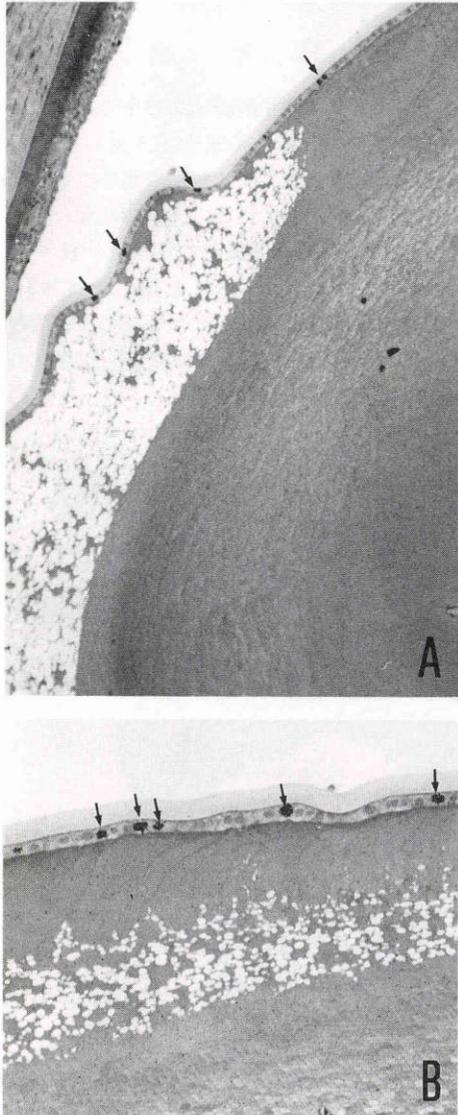


図2 50%ガラクトース食餌開始後3日目の水晶体、増殖帯に見られる標識細胞（矢印）数の増加（A、 $\times 80$ ）とともに、前囊下上皮細胞層にも多くの標識細胞（矢印）が観察でき（B、 $\times 150$ ）、異所性増殖の出現を確認した。トリイジンブルー染色。

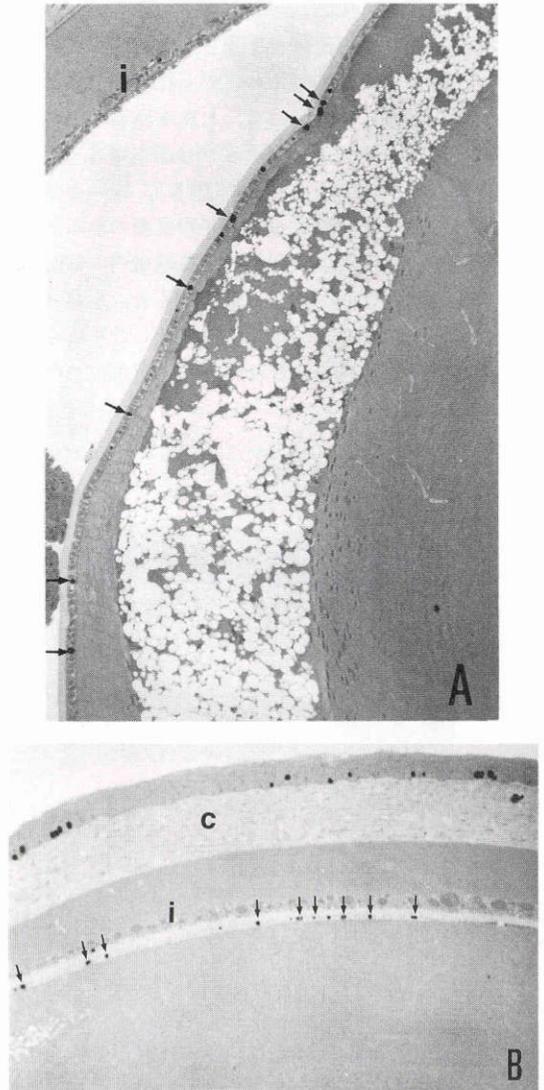


図3 50%ガラクトース食餌開始後4日目の水晶体、上皮細胞層の増殖帯（A）ならびに前囊下上皮細胞層（B）における標識細胞（矢印）数はピークとなり、豊富な異所性増殖を示した。トリイジンブルー染色、 $\times 80$ 。i: iris, c: cornea.

識水晶体上皮細胞（以後は標識細胞と呼ぶ）は、増殖帯にのみ限局して観察でき、その数も一切片当り、3～6個であった(図1)。標識細胞の数の大小は、今回調べたラットの成熟度とは関係なかった。

(2) 50%ガラクトース食餌開始後

50%ガラクトース食餌開始後2日、3日目には、水晶体赤道部表層皮質において水晶体線維細胞の顕著な膨化と液化を認め、ガラクトース白内障の進行を確認した。同時に、増殖帯に見られる標識細胞数の増加とともに、前囊上下皮細胞層にも多くの標識細胞が観察でき、異所性増殖の出現を確認した(図2)。この時点では、前囊下上皮細胞層において上皮細胞の重層化は見られなかった。4日目には、上皮細胞層の増殖帯ならびに前囊下上皮細胞層における標識細胞はピークとなり、豊富な異所性増殖を示した(図3)。同時点の虹彩ならびに毛様体を観察すると、虹彩裏面の色素上皮細胞、毛様体の無色素上皮細胞と実質組織内の細胞に標識細胞を認めた(図4)。7日目になると、水晶体線維の液化は赤道部だけではなく前囊下ならびに広く進行しているが、赤道部ならびに異所性増殖部位での標識

細胞の数は減少した。ただし前囊下上皮細胞層での異所性増殖はわずかながら存続していた(図5)。14日、21日目になると、水晶体線維細胞の膨化、液化は強度になり皮質部はもちろんのこと核部にまで進行し、成熟白内障の像を呈した。さらに赤道部最表皮質は再生された正常水晶体線維細胞により置換され、透明化している。そして、前囊下上皮細胞層での異所性増殖はほぼ消失し、正常水晶体で見られるのと同様に、標識細胞は増殖帯にのみ限局して観察できた(図6)。

IV 考 察

ラットなどの哺乳動物の眼組織の中で、成熟した後もDNA合成を行い細胞増殖を繰り返している部分は、角膜上皮細胞と水晶体赤道部増殖帯の上皮細胞であることはよく知られている。実験的にも、ラット、マウス、家兎の水晶体上皮細胞の増殖能が ^3H サイミジンオートラジオグラフィ法を用い調べられている^{8)~12)}。結果は水晶体増殖帯においてのみ数個のラベル細胞が見られ、今回検索した体重50gと200gのラットで観察できた結果と同様であった。ラット水晶体の

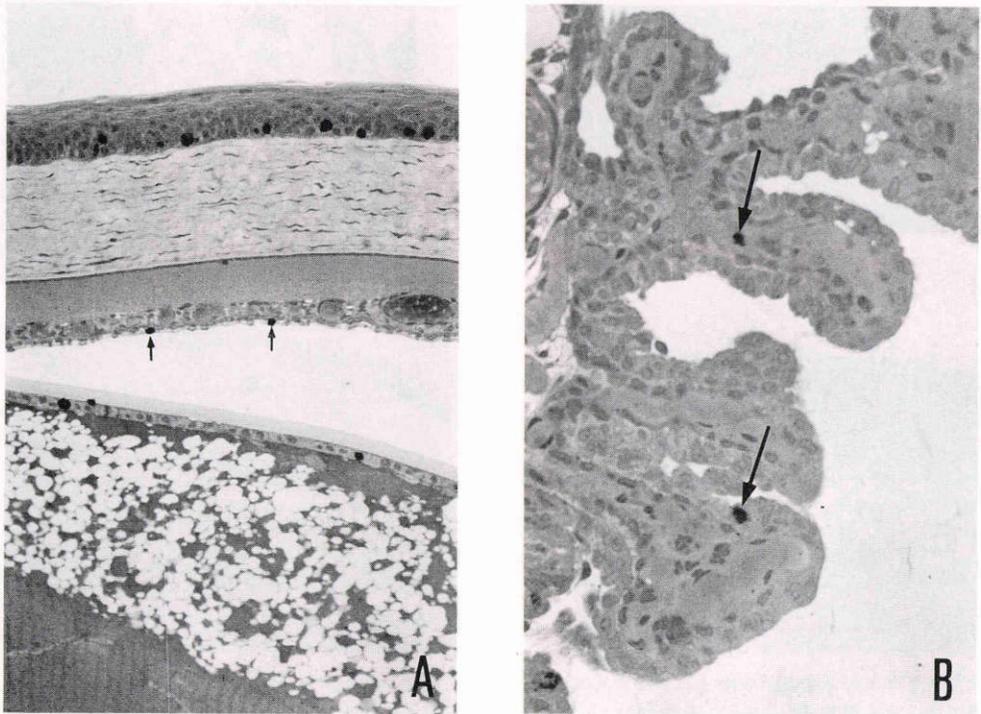


図4 50%ガラクトース食餌開始後4日目の虹彩と毛様体。虹彩裏面の色素上皮細胞(A)、毛様体の無色素上皮細胞と実質組織内の細胞(B)に標識細胞(矢印)を認めた。トルイジンブルー染色、 $\times 150$ 。

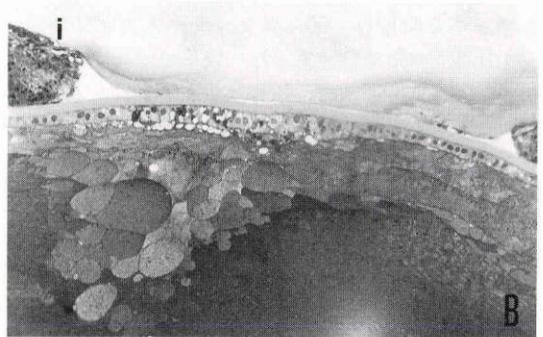
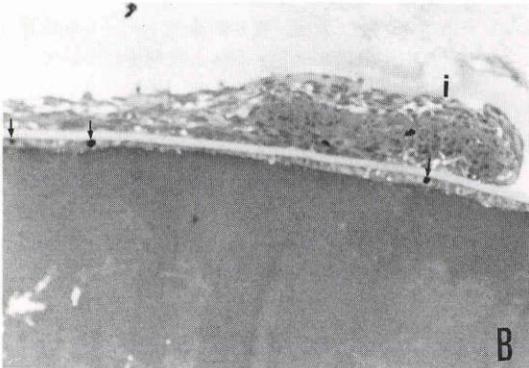
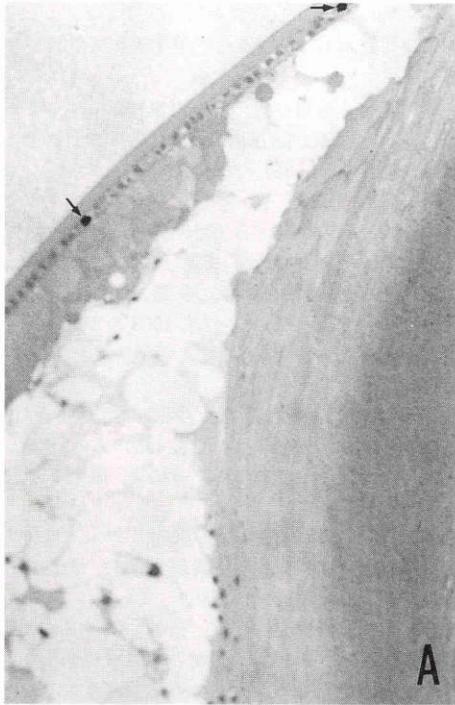


図5 50%ガラクトース食餌開始後7日目の水晶体。赤道部増殖帯(A)ならびに異所性増殖部位での標識細胞(矢印)の数は減少した。ただし前囊下上皮細胞層での異所性増殖はわずかながら存続していた(B)。トルイジンブルー染色。×150。i: iris.

図6 50%ガラクトース食餌開始後21日目の水晶体。前囊下上皮細胞層での異所性増殖は消失し(B, ×150)。正常水晶体で見られるのと同様に、標識細胞(矢印)は増殖帯にのみ局限して観察できた(A, ×80)。トルイジンブルー染色。i: iris.

正常成長過程において、生後3週齢(体重50g)と生後6週齢(体重200g)との間には、数個のサイミジン標識細胞が水晶体上皮細胞層増殖帯にのみ認められる点において、差はなかった。つまり体重50gと200gの間では、ラットの成熟度による差は見いだせなかった。これは、ラット水晶体上皮細胞は一生涯を通じDNA合成を行いたゆまない新陳代謝をしている事を意味し、驚くべき事である。

今回の実験では、この生後3週齢ラットに50%ガラクトース含有食餌という刺激を与え、ガラクトース白内障形成過程における水晶体上皮細胞のDNA合成能を、³Hサイミジンオートラジオグラフィーの方法を用い検索した。まず今回の結果をまとめてみる。50%ガラクトース食餌開始後21日目までの全過程において、赤道部増殖帯には標識細胞が認められ、絶えまない水晶体線維細胞の増殖が想像できた。50%ガラクトース

食餌開始3日目には、前囊下上皮細胞層に標識細胞の存在を確認し、異所性増殖を示唆した。4日目には、赤道部増殖帯ならびに前囊下の異所性増殖部位での標識細胞数の増加を認めた。7日目には、前囊下での異所性増殖はわずかながら存続するものの、標識細胞の総数は明らかに減少した。14日目、21日目には異所性増殖は消失し、赤道部増殖帯における標識細胞数は数個となり正常状態と同様になった。

1960年代前半には、 ^3H サイミジンを使った哺乳動物の水晶体上皮細胞増殖能の研究が非常に盛んであり、多くの新知見が得られた。生後6カ月の成熟ラットを70%ガラクトース含有食餌にて飼育しガラクトース白内障を作成し、本研究と同様の方法にて水晶体上皮細胞を ^3H -サイミジンにて標識し、DNA合成能を観察した報告がある¹³⁾。この報告では、70%ガラクトース食餌開始後サイミジン標識細胞数を数えると、食餌開始4~6日で最大数となり、正常時の12倍となるのを述べている。さらにこれらの標識細胞は、水晶体上皮層全体に均一に分布すると異所性増殖の存在についても記述されている。我々の結果では、赤道部増殖帯ならびに前囊下上皮細胞層(異所性増殖)に標識細胞数が最も増加する時期は、50%ガラクトース食餌開始後3~4日目でやや早期であった。我々の実験では使用したラットが生後3週齢の幼若ラットであったことが、その主原因と考えられる。

彼らの報告¹³⁾によると、ガラクトース食餌飼育ラットにおいてのみ虹彩と毛様体に標識細胞が認められ、正常食餌飼育ラットでは観察できなかった。同様に我々の結果でも、50%ガラクトース食餌飼育ラットにおいてのみ、その虹彩の色素上皮細胞と毛様体の無色素上皮細胞と実質細胞に標識細胞が認められた。ガラクトース食餌飼育期間と標識細胞数との関係については、明確な結論は得られていないが、ガラクトース食餌飼育期間が長くなればなるほど、その標識細胞株が増加するということはないようである。

ラットのガラクトース白内障には、ガラクトース食餌を正常食餌に変換することにより白内障が治癒するというDiet-Reversalの現象¹⁴⁾があり、さらに各種のアルドース還元酵素阻害剤による治療も可能であり、白内障治癒過程における水晶体上皮細胞再生能力が重要であると思われる。今後も ^3H -thymidine オートラジオグラフィーの手法を用い、標識細胞の動態を検索する

つもりである。

本論文の要旨は第27回日本白内障学会にて講演した。

文 献

- 1) 堤 元信, 田坂 宏, 照林宏文他: ラットガラクトース白内障 Diet-Reversal の形態学的研究. 日眼会誌 92(2): 297-301, 1988.
- 2) 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. 日眼会誌 89: 1276-1281, 1985.
- 3) 田坂 宏, 赤木好男, 中路 裕他: Aldose Reductase 阻害剤, Eisai E-1008 のガラクトース白内障に対する効果, その3. 眼紀 37: 797-802, 1986.
- 4) 赤木好男, 秋宗万理, 中路 裕他: Aldose Reductase 阻害剤 (ICI, 128, 436) その1. ラットガラクトース白内障に対する効果. 眼紀 37: 991-995, 1986.
- 5) 赤木好男, 田坂 宏, 中路 裕他: ラット糖白内障とアルドース還元酵素阻害剤 (ARI). あたらしい眼科 3: 1467-1470, 1986.
- 6) 宮本嘉久, 赤木好男, 田坂 宏他: アルドース還元酵素阻害剤 (E-1008 エーザイ) 点眼のガラクトース白内障治療効果, その5. 点眼剤濃度差の比較検討. 眼紀 38: 900-906, 1987.
- 7) 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1報. 眼紀 38(3): 359-365, 1987.
- 8) Harding CV, Hughes WL, Bond VP, et al: Autoradiographic localization of tritiated thymidine in whole-mount preparations of lens epithelium. Arch Ophthalmol 63: 59-65, 1959.
- 9) Hanna C, O'Brien JE: Cell productin and migration in the epithelial layer of the lens. Arch Ophthalmol 66: 129-133, 1961.
- 10) Mikulicich AG, Young RW: Cell proliferation and displacement in the lens epithelium of young rats injected with tritiated thymidine. Invest Ophthalmol 2(4): 344-354, 1963.
- 11) von Sallmann L, Grimes P: Effect of age on cell division, ^3H -thymidine incorporation, and diurnal rhythm in the lens epithelium of rats. Invest Ophthalmol 5(6): 560-567, 1966.
- 12) Hanna C, Keatts HC: Cell migration in the adult rat and rabbit lens. Exp Eye Res 7: 244-246, 1968.
- 13) Hanna C, O'Brien JE: Studies on galactose cataract formation utilizing thymidine-tritium. Arch Ophthalmol 64: 88-91, 1960.