

糖性白内障の発症機構に関する細胞学的検討 (図8, 表1)

神谷 美保子・馬 嶋 慶 直 (藤田学園保健衛生大学眼科学教室)

岩 田 修 造 (名城大学薬学部生体物理化学教室)

Cytological Aspects of Sugar-induced Cataract Formation

Mihoko Kamiya*, Yoshinao Majima*, Shuzo Iwata**

*Department of Ophthalmology, Fujita-Gakuen Health University School of Medicine

**Department of Biophysical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University

要 約

糖性白内障において、水晶体混濁の進行する過程で上皮細胞増殖が著明に認められる。今回、糖性白内障防止に有効とされる Aldose Reductase Inhibitor (ARI) および Vitamin E (Vit. E) を投与し、この細胞増殖が抑制されたことにより、細胞増殖と水晶体混濁化との間に密接な関連のあることが判明した。また、生化学的、組織学的検討を行なったところ、これらの細胞増殖挙動と代謝変動、細胞構築の異常が一致して認められ、白内障発症には、生物学的活性度の強い上皮細胞の動態が大きく関与していることが示唆された。(日眼 92: 262—268, 1988)

キーワード：糖性白内障、水晶体上皮細胞増殖、AR 阻害剤、ビタミン E

Abstract

Rats fed a 30% galactose diet were treated with aldose reductase inhibitor (ARI) and Vitamin E, and the increased proliferation of the lens epithelial cells was observed in vivo in relation to lens opacification. We recognized relationship between the epithelium proliferation and opacification, as proliferation was reduced by administration of ARI or Vitamin E which are possible anti-cataract drugs. In animals given ARI, the proliferation of the epithelial cells and galactitol accumulation in the lens were obviously reduced, then lactate production was maintained at the same level as in normal lens. When we observed the photomicrograph of the lens epithelium of a rat fed galactose with ARI, we could not find the area of increased density corresponding to the "Y proliferative reaction" at the central region of the lens. These results in biochemical and histological studies suggest that the viability of the lens epithelial cells influences the progress of sugar-induced cataract formation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 262—268, 1988)

Key words: Sugar cataract, Proliferation of the epithelial cells, Aldose reductase inhibitor, Vitamin E

I 緒 言

糖性白内障における水晶体上皮細胞増殖と水晶体混濁化との関連¹⁾²⁾を明らかにするため、今回、著者らは

糖性白内障の進行防止に有効と報告されている Aldose Reductase Inhibitor (ARI)^{3)~5)}および Vitamin E (Vit. E)⁶⁾を投与して水晶体の上皮細胞数と生化学的、組織学的検討を行ない、興味ある結果を得たので

別刷請求先：470-11 豊明市沓掛町田楽ヶ室 1—98 藤田学園保健衛生大学医学部眼科教室 神谷美保子 (昭和62年9月2日受付)

Reprint requests to: Mihoko Kamiya, M.D. Fujita-Gakuen Univ., School of Med.

1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-11, Japan

(Accepted September 2, 1987)

水晶体に蒸留水1mlを加え、氷冷下にホモジナイズした後、トリクロロ酢酸を加え30分放置後遠心を行ない、除タンパクした。その上清を Ellman 法⁹⁾で測定した。

5) 水晶体中 Vit. E 量 (α -トコフェロール)

水晶体中の Vit. E の定量は、阿部ら¹⁰⁾の方法に従って行なった。まず、水晶体に蒸留水2mlを加え、ホモジナイズした後、n-Hexaneを加えよく攪拌後、遠心した。上層の n-Hexane 層から一定量分取し溶媒を留去した。その残留物に n-Hexaneを加えて溶かし、一部を HPLC カラムに注入した。カラムは Nucleosil 5 NH₂、移動相は n-Hexane: isopropanol (=98:2) の混合溶媒を用い、蛍光測定(Ex. 290nm, Em. 325nm)によって検出した。

6) 水晶体上皮細胞層の乳酸産生量

水晶体からカプセル(上皮細胞附着)を剥離し、8% FBSを含む Eagle's MEM 0.5ml 中で24時間培養した後、培養液中に産生された乳酸量をラクトートテスト(ペーリンガー・マンハイム社)を用いて測定した。

7) 水晶体中ガラクトクトール量

水晶体を蒸留水1mlでホモジナイズし、沸騰水浴中で10分熱処理後、遠心を行なって除タンパクした。そ

の上清を凍結乾燥し、残渣に酢酸エチルとトリフルオロ酢酸を加えて TFA 化したものをガスクロマトグラフィーにて測定した。カラムは3mm×2mのガラスカラム、充てん剤は5%XE-60、カラム温度は160℃、検出は水素炎イオン化検出器で行なった。

III 結 果

1. 水晶体上皮細胞数

Fig. 2は上皮細胞数の経時変化を示したもので、ガラクトース投与でその異常増加がみられるのに対し、ガラクトース+ARI 同時投与では著明な増加抑制、ガラクトース+Vit. E 同時投与でもその抑制が認められた。いずれも水晶体10眼(n=10)の平均細胞数を示した。

2. 水晶体混濁度

Fig. 3は、この時期における水晶体混濁度を示したもので、ARI 同時投与では有意な混濁抑制を認め、Vit. E 同時投与ではその混濁の軽減を認めたものの有意な差はみられなかった。各 score は水晶体10眼(n=10)につき、平均値を表示した。

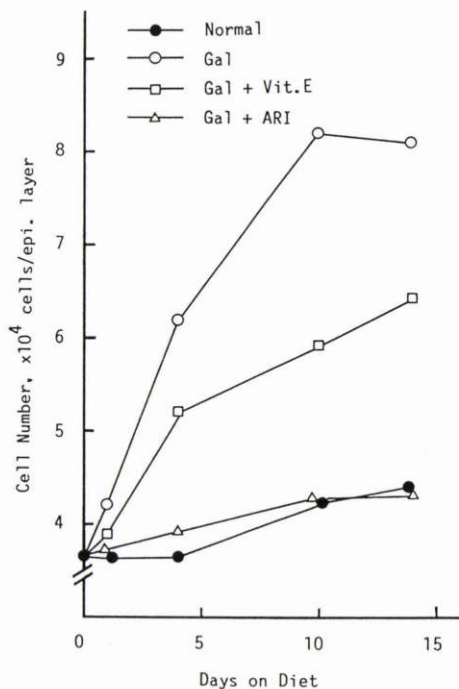


Fig. 2 Effects of Vit. E and ARI on cell number of lens epithelia of galactose-fed rat.

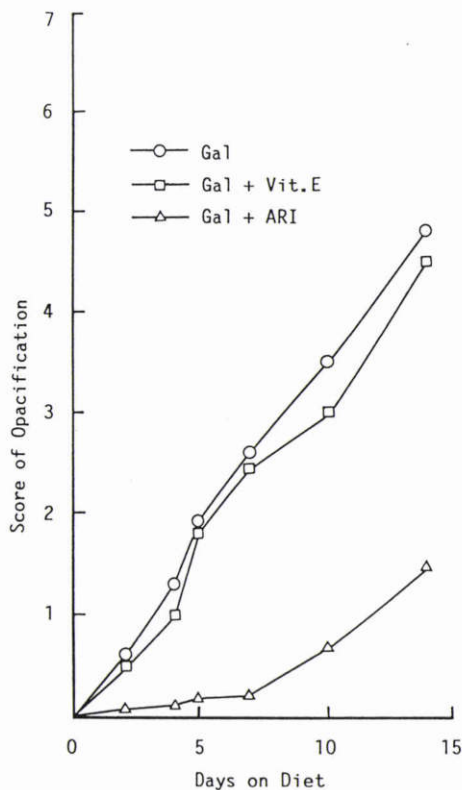


Fig. 3 Effects of Vit. E and ARI on opacification

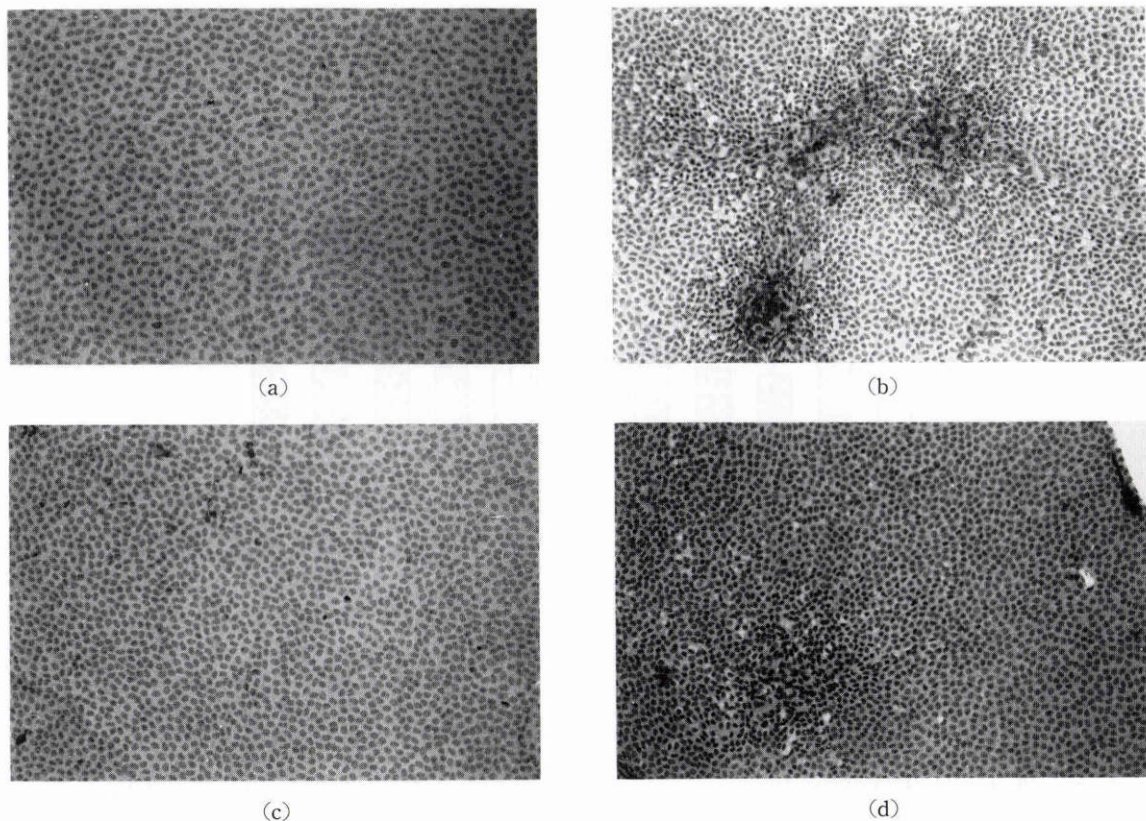


Fig. 4

3. 組織伸展標本

次に、水晶体前極部における組織伸展標本作製し、形態学的観察を行なった。Fig. 4-(a)に正常水晶体を、Fig. 4-(b)にガラクトース投与により典型的なY字状細胞増殖領域を認める所見を示した。

また、Fig. 4-(c)に示すように、ARI同時投与による水晶体前極部では増殖領域は全く認められず、正常水晶体とほぼ同様の細胞構築を示した。Fig. 4-(d)のVit. E同時投与ではY字状細胞増殖領域は認めなかったものの、小塊状細胞増殖領域が散在して認められた。いずれも投与10日目の標本である。(H-E染色, $\times 200$)

4. 水晶体中 GSH 量および Vit. E 量

酸化還元系に対する影響をみるため、水晶体中 GSH 量および Vit. E 量を投与10日目で測定した ($n=6$)。

Fig. 5-(a)の如く、正常群の GSH 量は $8\text{mmol/kg H}_2\text{O}$ であるのに対し、ガラクトース投与群では $1\text{mmol/kg H}_2\text{O}$ 、ARI同時投与群、Vit. E同時投与群でも著明な GSH 量減少が認められた ($p<0.001$)。

このことから、ガラクトース投与による酸化障害が示唆されるとともに、ARI同時投与による混濁抑制は浸透圧変化の防止が重要因子であることが再確認された。

水晶体中 Vit. E 量は正常群に比して、ガラクトース投与群では有意な減少を示したが、ARI同時投与および Vit. E同時投与ではいずれも正常レベルを維持していた (Fig. 5-(b))。ここで、ARI同時投与の場合に Vit. Eが正常レベルに維持されていることも興味深い現象と考えられた。

5. 上皮細胞層あたりの乳酸産生量

次に、解糖系への影響をみるため、一水晶体上皮細胞層における乳酸産生量を測定した ($n=6$)。Fig. 6に示すように、ガラクトース投与群と Vit. E同時投与群ではいずれも乳酸産生量の有意な増加が認められたが ($p<0.001$)、ARI同時投与群ではその増加は全く認められず、正常群とほぼ同レベルにとどまった。これらのことから ARI同時投与では解糖系の異常亢進を正常代謝に近い状態に調節している可能性も考えられ

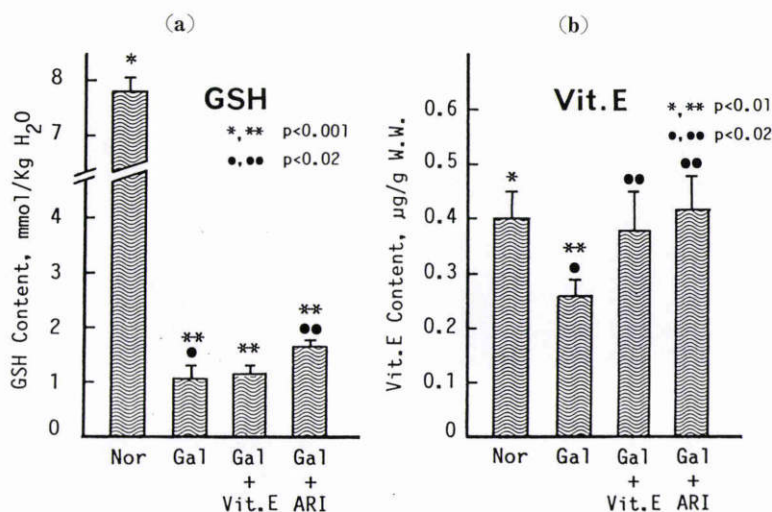


Fig. 5 Effects of Vit. E and ARI on GSH and Vit. E content in the lens of galactose-fed rat.

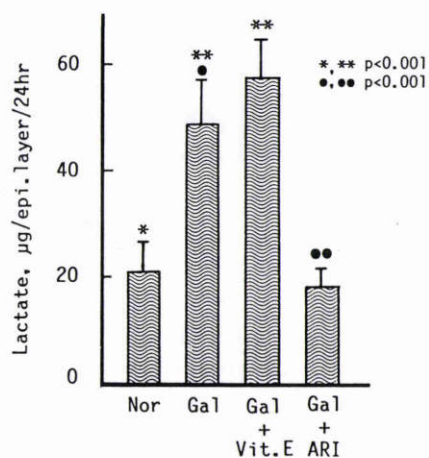


Fig. 6 Effects of Vit. E and ARI on lactate production of lens epithelial layer of galactose-fed rat.

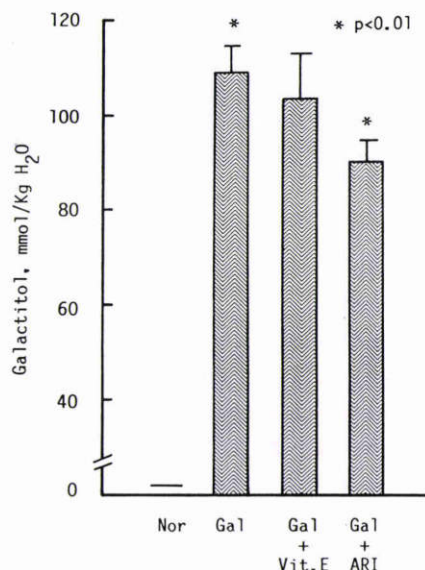


Fig. 7 Effects of Vit. E and ARI on Galactitol accumulation in the lens of galactose-fed rat.

た。

6. 水晶体中ガラクトール量

Fig. 7 に示すように(n=6), ガラクトース投与群に比して ARI 同時投与群ではガラクトール量蓄積の有意な抑制が認められた ($p<0.01$). このことから, ARI 同時投与による水晶体混濁の抑制が浸透圧変化に起因することは明らかであり, 1 日に 1 回の点眼投与のみでも十分に効果のあることが判明した。

7. 後投与群における上皮細胞数と水晶体混濁度

最後に, 後投与群すなわち, ガラクトース投与 4 日

目より薬剤を投与した場合の上皮細胞数経時的変化と水晶体混濁度をグラフに表示した(n=6). Fig. 8-(a) に示すように, ARI 後投与では上皮細胞数増加の抑制, Vit. E 後投与でも抑制の傾向が認められた. Fig. 8-(b)は, この期間における水晶体混濁度を示し, ARI 後投与では混濁進行の抑制がみられた。

また, ここで, diet reversal につき, 追加して検討したところ, 上皮細胞数増加は完全に停止し, 水晶体

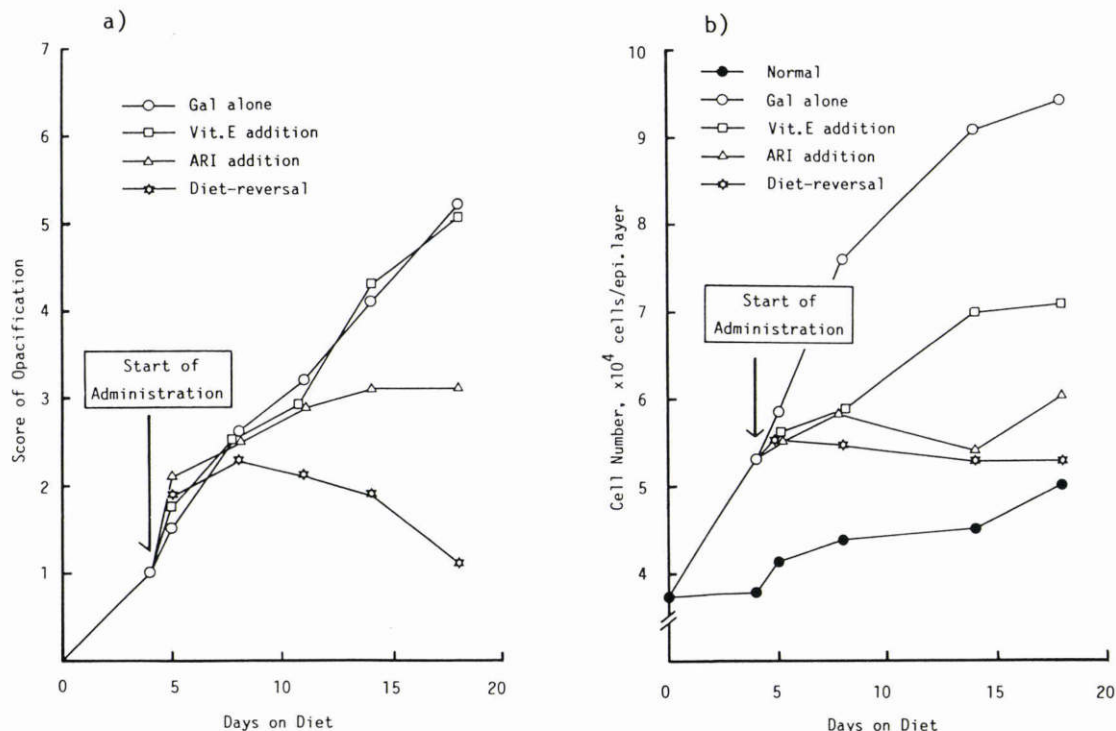


Fig. 8 Effects of Vit. E and ARI on cell number of lens epithelia and opacification of lens of galactose-fed rat.

混濁度も徐々に軽減し、透明化していくのを認めた。

IV 考 按

著者らは、前回、ガラクトース白内障において水晶体混濁の進行する過程で、上皮細胞増殖が著明に認められることを報告したが¹⁾、糖性白内障防止に有効とされる ARI や Vitamin E を投与した場合には上皮細胞増殖が抑制され、この増殖現象と水晶体混濁とが密接に関連していることが判明した。

上皮細胞数と水晶体混濁化とは、ARI 同時投与において明らかな相関を認めた。しかし、Vit. E 同時投与の場合にはガラクトース単独投与に比して上皮細胞数増加の抑制は認められたものの、有意に水晶体混濁を抑制することはできなかった。これは、ARI 同時投与では投与10日目でも正常群の上皮細胞数とほぼ同レベルであったのに対し、Vit. E 同時投与ではすでに正常群の約1.5倍の細胞数増加が生じていたためと考えられる。

また、白内障発症との関連は、ガラクトース投与による水晶体膨潤のため、崩壊した細胞を修復するために、上皮細胞増殖がおこるのではないかと考えられているので²⁾、今回、抗白内障薬としての ARI 投与によ

りその原因が除去され、膨潤および上皮細胞増殖が抑制されたものと推論された。これらのことは組織伸展標本にて明瞭に示され、ガラクトース白内障にみられる Y 字状細胞増殖領域が、ARI 投与では完全に消失していた。

さらに、代謝変動との関係を検討した。酸化還元系に対する影響を調べたところ、ガラクトース白内障では著明な GSH 量減少を認め、酸化障害が示唆されたが、ARI 同時投与、Vit. E 同時投与のいずれの場合にも有意な GSH 量減少を認めた。これは、ARI 投与による水晶体混濁の抑制は抗酸化作用よりもむしろ浸透圧変化の防止が主要因子であること、また、Vit. E 投与による抗酸化作用は膜機能と密接に関連して作用することが報告されているように⁶⁾、過酸化脂質の抑制が重要な意味をもち、直接的には GSH 合成経路に関与しないものと考えられる。

次に、解糖系における乳酸産生量を比較すると、ARI 投与では正常レベルを維持していたことから、ARI がソルビール径路のみでなく解糖系への影響を及ぼしている可能性が考えられた。

今回の研究から、白内障発症機構には、生物学的活

性度の強い上皮細胞の増殖挙動が大きく関与していることが考えられ、細胞レベルでの研究と生体の恒常性に関する検討が重要と考えられた。

稿を終えるにあたり、ビタミンE測定に御協力をいただきましたエーザイ株式会社に深謝致します。また、実験の御協力をいただきました名城大学中澤清講師、鈴木あつみ研究員に感謝致します。

文 献

- 1) 神谷美保子, 馬嶋慶直, 岩田修造: 糖尿病性白内障に関する細胞レベルでの考察, 日眼 90: 291—296, 1986.
- 2) 茨木信博, 赤木好男, 糸井素一他: 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, 眼紀 38: 359—365, 1987.
- 3) Datiles M, Fukui H, Kuwabara T, Kinoshita JH: Galactose cataract prevention with sorbinil, an aldose reductase inhibitor: A light microscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 174—179, 1982.
- 4) Hu T-S, Meralo LO, Kuwabara T, Kinoshita JH: Prevention and reversal of galactose

cataract in rats with topical sorbinil. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 603—605, 1984.

- 5) Hu T-S, Datiles M, Kinoshita JH: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 640—644, 1983.
- 6) 平井樹男, 馬嶋慶直, 石黒伊三雄他: ガラクトース投与ラットにおける水晶体ビタミンEと白内障との関連, 眼紀 37: 1266—1270, 1986.
- 7) Fournier DJ, Patterson JW: Variations in ATPase activity in the development of experimental cataracts. Proc Soc Exp Biol Med 137: 826, 1971.
- 8) Sippel TO: Changes in the water, protein and glutathione contents of the lens in the course of galactose cataract development in rats. Invest Ophthalmol 5: 568—575, 1966.
- 9) Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 82: 70, 1959.
- 10) 阿部皓一, 大前雅彦, 勝井五一郎: 肝臓中のトコフェロール同族体の微量迅速定量法, ビタミン 50: 453—457, 1976.