

BrdU を用いたガラクトース血症ラット角膜内皮細胞の修復動態の検索

その 1. 経角膜凍結破壊後の角膜内皮の増殖 (図 7)

茨木 信博・照林 宏文・赤木 好男・提 元信 (京都府立医科大学眼科学教室)
 横井 則彦・岡本庄之助・糸井 素一

Corneal Endothelial Healing in Galactosemic Rats

Proliferation of Residual Endothelial Cells

Nobuhiro Ibaraki, Hirofumi Terubayashi, Yoshio Akagi, Motonobu Tutumi,

Norihiko Yokoi, Syounosuke Okamoto and Motokazu Itoi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

要 約

糖尿病性角膜内皮障害の本態を明らかにするために、生後 3 週齢の SD 系ラットを 50% ガラクトース含有食餌 (ガラクトース単独群), アルドース還元酵素阻害剤混入同食餌 (ARI ガラクトース群), 正常食餌 (対照群) の 3 群に分け 8 週間飼育後、角膜内皮を経角膜の凍結破壊した後の残存内皮細胞の増殖について、抗 Bromodeoxyuridine (BrdU) 免疫組織化学的方法を用いて検討を行った。BrdU は thymidine の類似物質であり、DNA 合成期 (細胞周期の S 期) の核にとりこまれるため、組織内での増殖の盛んな細胞の局在を認識できる。ARI ガラクトース群, 対照群では凍結破壊後 7 日目には BrdU 陽性細胞は認められなくなったが、ガラクトース単独群では 14 日目においても BrdU 陽性細胞が認められた。このことより、実験ガラクトース血症ラット角膜内皮破壊後の残存内皮細胞は長期間異常増殖すること、またアルドース還元酵素阻害剤はこれを正常化することが明らかとなった。(日眼 92: 423—432, 1988)

キーワード: 糖尿病性角膜内皮障害, ガラクトースラット, 細胞増殖, Bromodeoxyuridine, アルドース還元酵素阻害剤

Abstract

The corneal endothelial cells of normal rats and galactosemic rats treated with or without aldose reductase inhibitor (ARI) were destroyed by transcorneal freezing. Proliferation of the residual endothelial cells was investigated via anti-bromodeoxyuridine (BrdU) immunohistochemistry using the ABC method. BrdU, an analogue of thymidine, can be incorporated specifically into synthesizing DNA (i.e. in the S-phase of cell cycle). BrdU-positive cells could be seen in both normal and galactosemic rats treating with ARI at 1 hr after freezing, and disappeared within 7 days. However they could be seen in galactosemic rats even at 14 days. These results show that the residual endothelial cells in galactosemic rats proliferate for a considerable time, and the abnormality of corneal endothelial healing could be prevented by ARI. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 423—432, 1988)

Key words: Galactosemic rat, Corneal endothelial healing, Residual endothelial cell proliferation
 Bromodeoxyuridine, Aldose reductase inhibitor

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 茨木 信博
 (昭和62年 9月18日受付)

Reprint requests to: Nobuhiro Ibaraki, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med. Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigy-ku, Kyoto 602, Japan

(Accepted September 18, 1988)

I 緒 言

糖尿病性眼合併症として、網膜症と白内障が存在することはよく知られているが、角膜障害とくに内皮障害については最近注目されるようになってきた。Schultzら¹⁾は、Specular microscopeを用いて糖尿病患者の角膜内皮を観察し以下の結論を得た。糖尿病患者の角膜内皮では、多形性や大小不同などの形態異常が存在する。さらに、経過の長いI型糖尿病患者においては、それらの所見に加えて内皮細胞数も減少する。これらの事実から彼らは糖尿病性角膜内皮細胞障害が存在することを主張した。臨床的に見ても判るように、糖尿病患者がそれだけの理由で水疱性角膜性のような重篤な眼合併症を起こすことはない。しかし、糖尿病患者に対する、硝子体手術・白内障眼内レンズ手術などが頻繁に行われてきていることを考えると、今後ますます内皮細胞を障害する機会が増加することが予想される。従って、ヒトで内皮障害が確認された以上、動物においてその存在を確認し、本態を明らかにする必要がある。

われわれは既にガラクトース血症ラットの角膜内皮を経角膜的に凍結破壊し、組織学的観察により正常ラットに比べその修復が相当遅延することを報告²⁾し、ガラクトース血症ラットが糖尿病性角膜内皮障害のモデルとなり得ることを確認した。一方、糖尿病性眼合併症の起因酵素といわれているアルドース還元酵素(AR)が、ヒト³⁾、ラット⁴⁾角膜内皮に豊富に分布することが証明されており、さらにわれわれは、2種のアルドース還元酵素阻害剤(ARI)(M-79175 エーザイ、ICI128, 436 ICI)がガラクトース血症ラットで見られた内皮細胞修復遅延を正常化することを報告⁵⁾⁶⁾し、ARが糖尿病性角膜内皮障害の起因酵素である可能性を強く支持した。

ガラクトース血症ラット角膜内皮の修復遅延の理由を推論すると、脱落した内皮を補填するために周囲の内皮細胞の増殖と移動が起こるが、その増殖あるいは移動過程に正常ラットとの間に差異があると思われる。本研究では、この内皮細胞の修復過程を明確にするために、DNA合成期(S期)に細胞の核に取り込まれるthymidineの類似物質であるBromodeoxyuridine(BrdU)を標的物質として用い、ガラクトース血症ラット角膜を凍結破壊し、修復時の角膜内皮の増殖について検討を行った。

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72匹用いた。それらを以下の3群にわけた。(1)研究室用通常食飼育群(対照群)、(2)50%ガラクトース含有食餌群(ガラクトース単独群)、50%ガラクトース含有食餌にARI(ICI128, 436 ICI)を0.046%濃度混入食で飼育した群(ARIガラクトース群)。各群のラットを約6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。凍結硬塊後経時的(1時間後、4日後、7日後、14日後)にBrdUを体重gあたり50 μ g腹腔内に投与し、ネブタール致死麻酔下で眼球摘出した。摘出眼球から角膜を取り出し、ただちに4%paraformaldehydeを含むphosphate buffer(pH 7.4)に36時間浸漬固定した。固定試料を10~20%の濃度のsucroseを含む同bufferに浸漬した後、約15 μ の凍結切片を作成した。得られた切片を5HNC1に10分浸漬した後、抗BrdUモノクローナル抗体を第一抗体とするABC法で反応後、DAB溶液で染色を行い観察した。

III 結 果

凍結破壊前：対照群、ガラクトース単独群、ARIガラクトース群いずれにおいても角膜内皮にBrdU陽性細胞は認められなかった(図1)。

凍結破壊1時間後：凍結破壊部の角膜内皮が脱落し、周囲の残存内皮にBrdU陽性細胞が多数認められた。対照群、ガラクトース単独群、ARIガラクトース群に差は認められなかった(図2, 3)。

凍結破壊4日後：凍結破壊部に内皮細胞の重層化が認められ、内部にBrdU陽性細胞が認められた(図4)。また周辺の内皮細胞には多数のBrdU陽性細胞が認められた(図5)。対照群、ガラクトース単独群、ARIガラクトース群に差は認められなかった。

凍結破壊7日後：対象群においては、内皮細胞の重層化は消失していたが、BrdU陽性細胞は認められた(図6a)。ガラクトース単独群においては、内皮細胞の重層化とBrdU陽性細胞が多数認められた(図6b)。ARIガラクトース群においては、対照群とほぼ同じ所見を呈した(図6c)。

凍結破壊14日後：対照群・ARIガラクトース群ともに内皮細胞の重層化はなく、BrdU陽性細胞も認めら

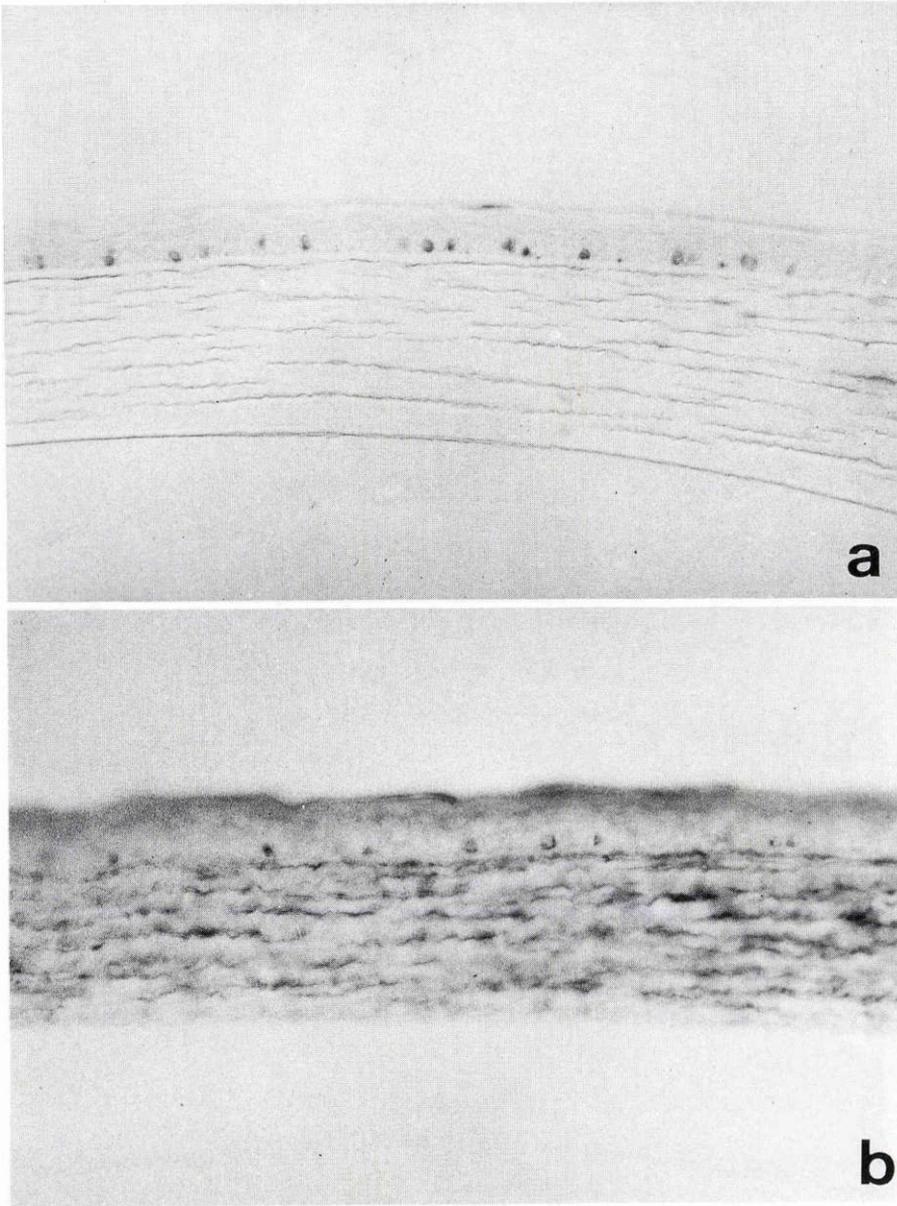


図1 凍結破壊前角膜における BrdU 陽性細胞の局在. 対象群 (a), ガラクトース群 (b)共に角膜内皮には BrdU 陽性細胞は認められない(ABC法, DAB 染色, ×400).

れなかった(図 7a, c). ガラクトース単独群においては, いぜん内皮細胞の重層化と BrdU 陽性細胞が多数認められた(図 7b).

IV 考 按

実験的糖白内障に関する研究から Kinoshita⁷⁾⁸⁾は, その起因酵素がアルドース還元酵素 (AR) であると主

張した. この説は polyol-osmotic 説と呼ばれ, その後多くの追試によって確認された. また, 白内障のみならず他の糖尿病性合併症も AR が起因酵素となっている可能性が示唆されている. この AR は, ヒト³⁾, イヌ⁹⁾, ラット⁴⁾に共通して角膜内皮に豊富に存在しており, 糖尿病性角膜内皮障害も AR が関与している可能性は大きい. 既にわれわれは, ガラクトース血症ラッ

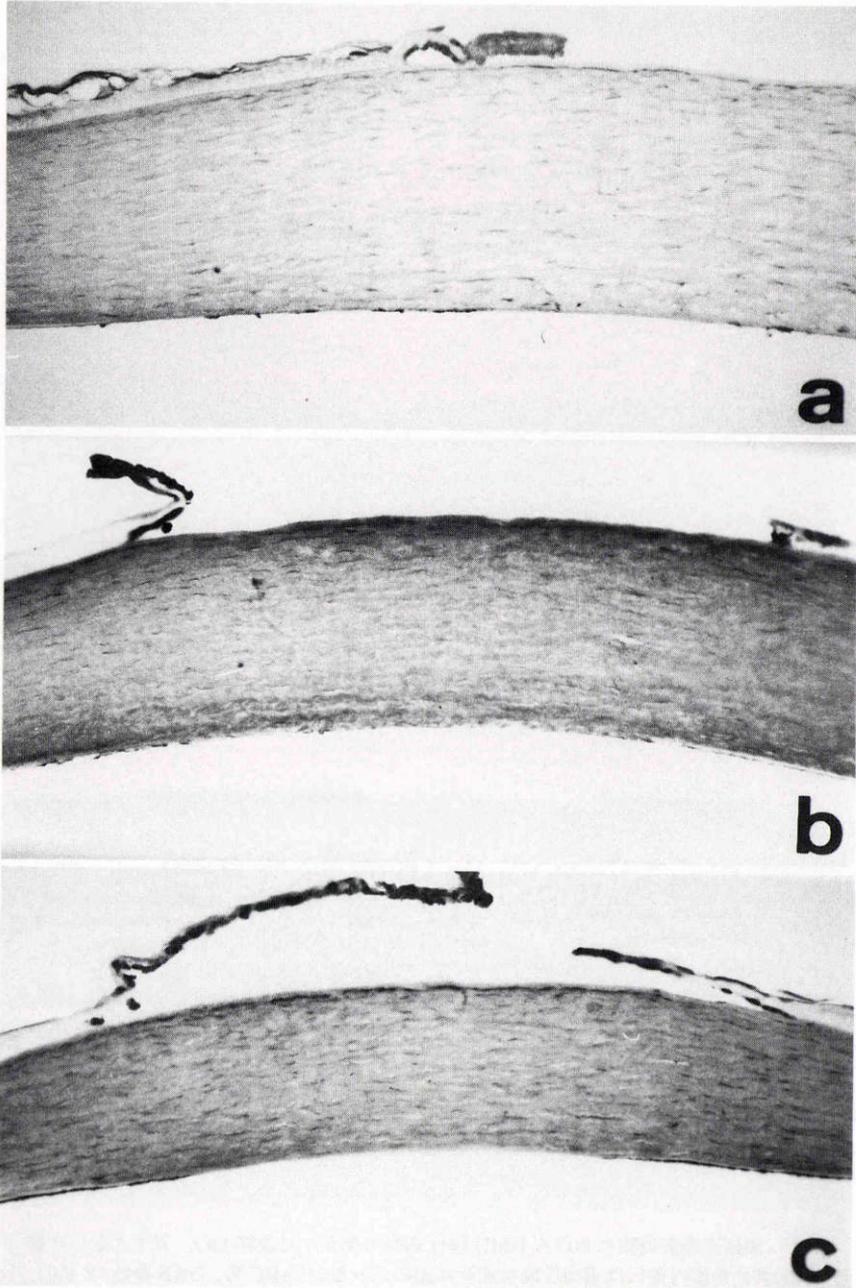


図2 凍結破壊1時間後における BrdU 陽性細胞の局在. 対象群 (a), ガラクトース群 (b), ARI ガラクトース群 (c) いずれにおいても凍結破壊部の内皮細胞が脱落し周辺の残存内皮に BrdU 陽性細胞が多数認められる (ABC法, DAB 染色, $\times 400$).

トおよび正常ラットの角膜内皮を経角膜的凍結破壊し、組織学的に検討を行い、その修復が前者の方が後者より遅延することを報告²⁾し、ガラクトース血症ラットが糖尿病性角膜内皮障害のモデルとなり得ること

とを確認した。ガラクトース血症ラットを用いた理由は、ラット角膜内皮に AR が存在すること⁴⁾、糖尿病ラットのように全身状態がほとんど侵されないこと、AR の理論的背景は糖尿病ラットと同一であること、

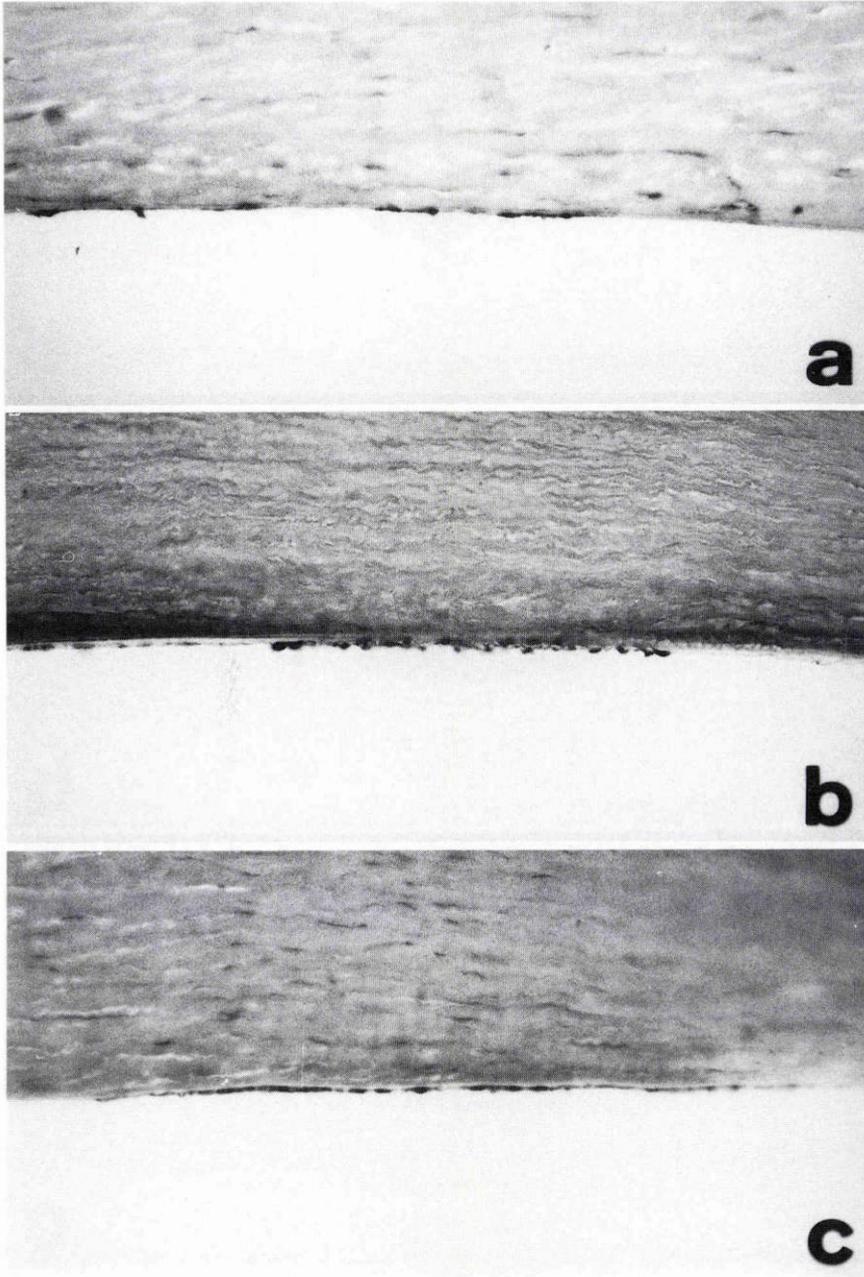


図3 凍結破壊1時間後における BrdU 陽性細胞の局在，凍結破壊の周辺部に，対象群 (a)，ガラクトース群 (b)，ARI ガラクトース群 (c) いずれも BrdU 陽性細胞が多数認められる (ABC 法，DAB 染色， $\times 800$)。

発症が確実で個体差が少ないことである。また，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は無処置の状態では極めて軽微なもので簡単にはその本態を明らかにするには困難と考え，人工的破壊後

の修復過程を形態学的に検討することによって，糖尿病性角膜内皮障害を捉えようとした。さらにわれわれは，2種類のアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) (M-79175 エーザイ，ICI128, 436 ICI) が，ガラクトース

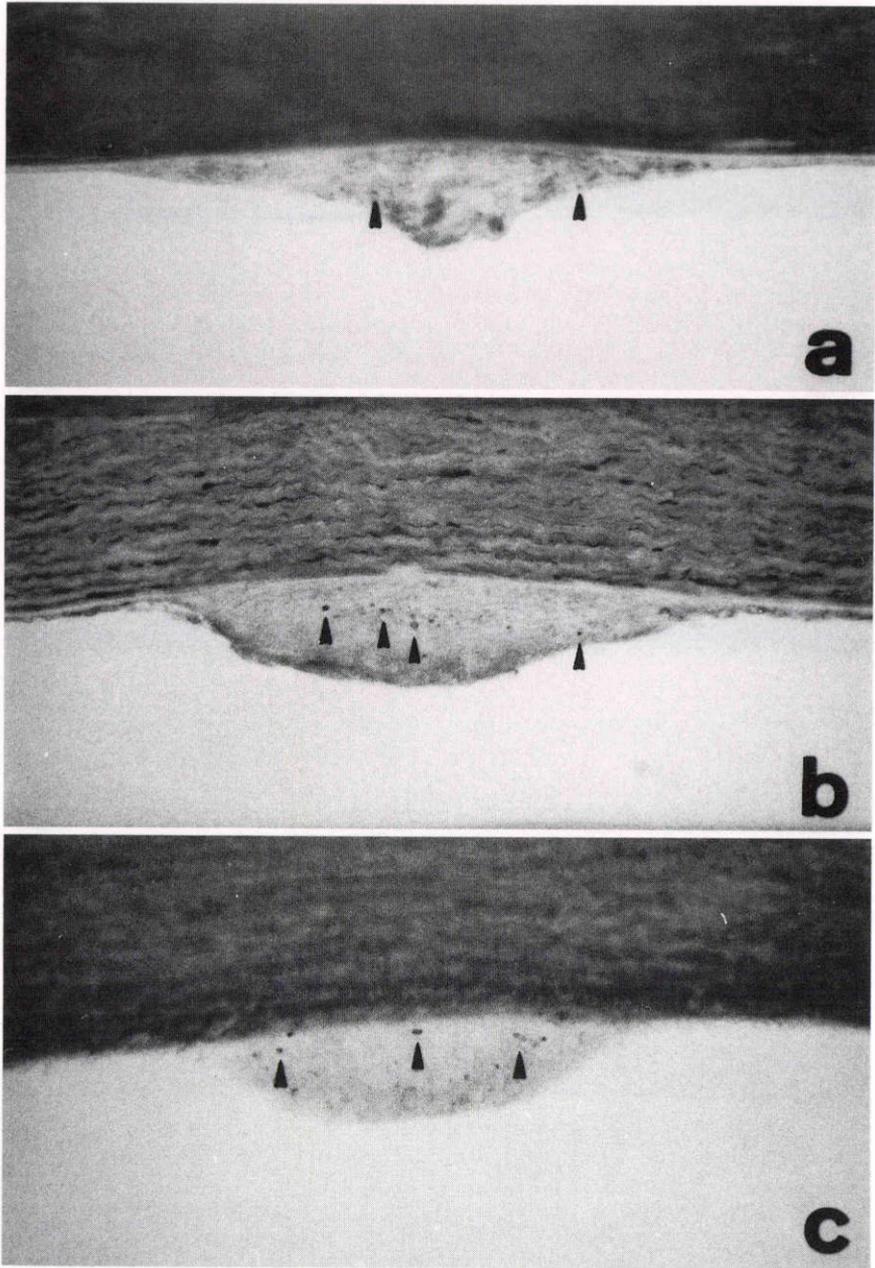


図4 凍結破壊4日後における BrdU 陽性細胞の局在. 対象群 (a), ガラクトース群 (b), ARI ガラクトース群 (c) いずれにおいても凍結破壊部に内皮細胞の重層化が認められ, 内部に BrdU 陽性細胞が認められる(矢印)(ABC法, DAB 染色, $\times 800$).

血症ラットで見られた角膜内皮障害の修復遅延を正常化することを報告⁵⁾⁶⁾し, 糖尿病性角膜内皮障害も AR がその起因酵素である事を強く支持した.

これまでのわれわれの実験²⁾⁵⁾⁶⁾では, 凍結破壊に

よって角膜内皮が脱落し, まずその欠損部に重層化した内皮細胞が認められるが, 正常対照群では7日目には重層化は認められず一層の内皮細胞で覆われるのに対し, ガラクトース血症ラットにおいてはその重層化

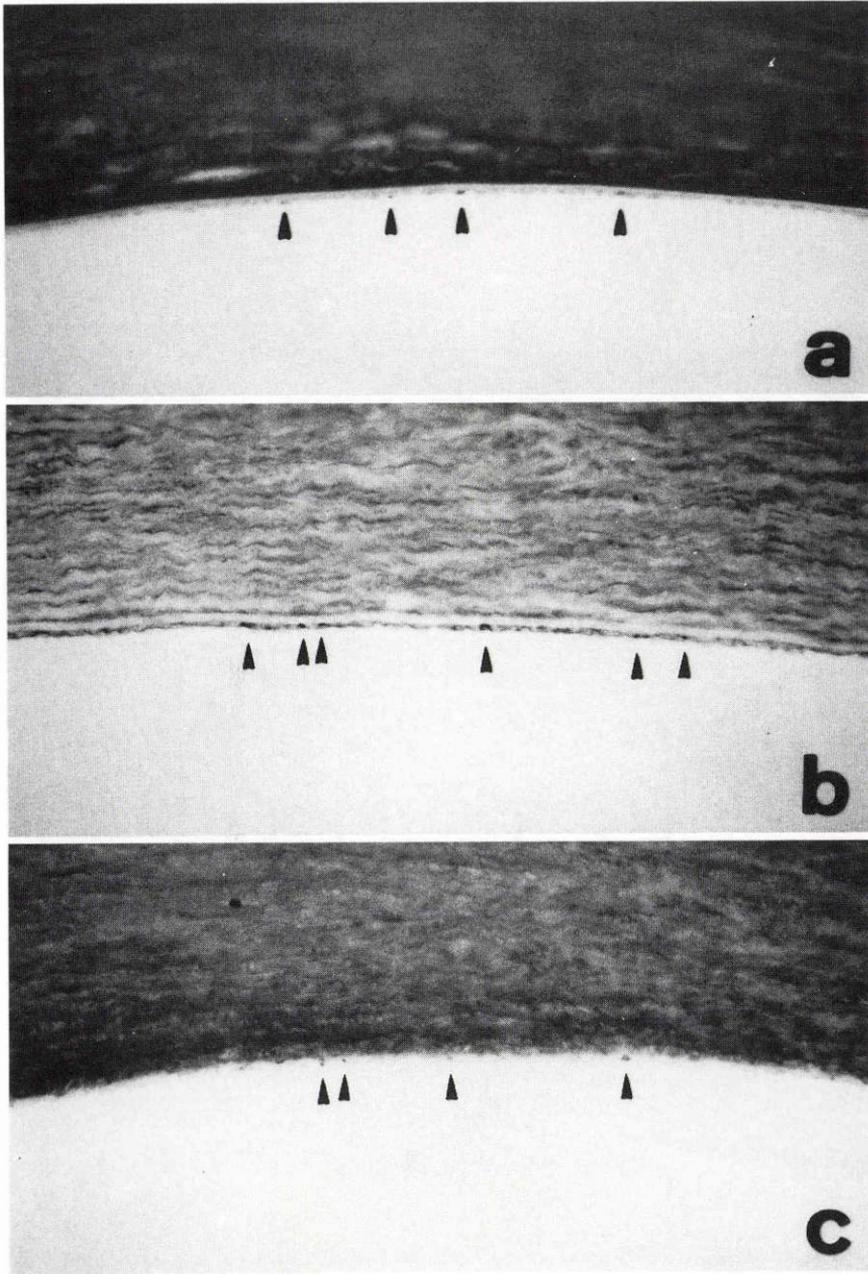


図5 凍結破壊4日後における BrdU 陽性細胞の局在. 対象群 (a), ガラクトース群 (b), ARI ガラクトース群 (c) いずれにおいても凍結破壊の周辺部に BrdU 陽性細胞が多数認められる (ABC 法, DAB 染色, $\times 800$).

が14日目においても認められるというものであった。この内皮細胞の重層の遷延化がいかんして起こるかを推論すると、凍結破壊によって脱落した内皮の周辺部分の内皮細胞が分裂増殖し、脱落部位へ移動する過程

に異常があるためではないかと考えることが出来る。ところが、通常の光顕による観察では、重層化している細胞が現在も増殖しているのか、あるいは既に増殖が終わった結果なのかを正確には判断できず、また細

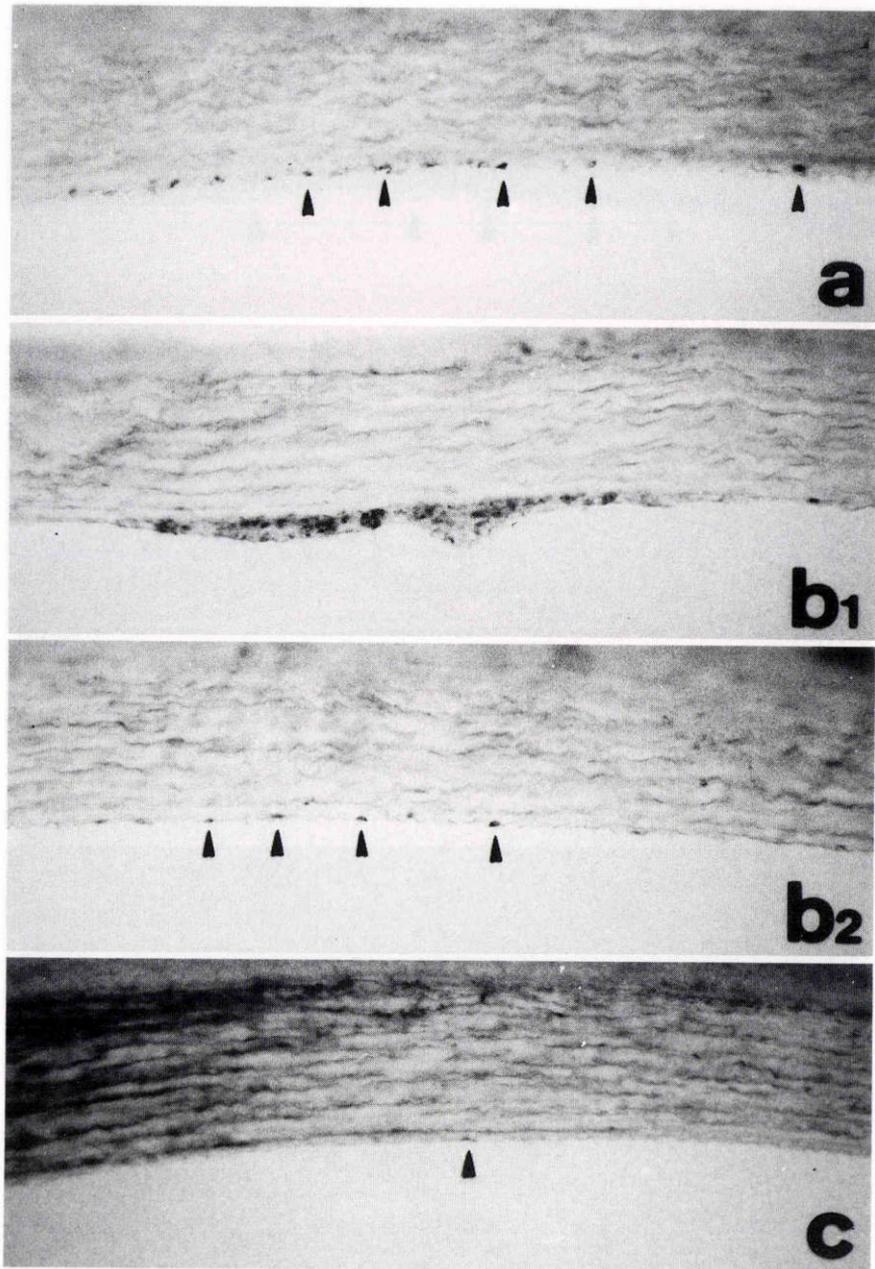


図6 凍結破壊7日後における BrdU 陽性細胞の局在。対象群(a), ARI ガラクトース群(c)においては内皮細胞の重層化は認められないが, BrdU 陽性細胞は散見できる(矢印)。ガラクトース群においては凍結破壊部に内皮細胞の重層化と BrdU 陽性細胞が認められ(b1), 周辺部においても BrdU 陽性細胞が多数認められる(b2) (ABC法, DAB染色, $\times 400$)。

胞の移動についても検討も困難である。すなわち、細胞の増殖・移動を動的に観察するには、なんらかの標的物質を細胞内に取り込ませ、その標的物質を追跡し

なければならない。今回の実験で用いた BrdU は、DNA を合成する thymidine の類似物質であるため、DNA 合成期 (S 期) にある細胞では、あらたに合成さ

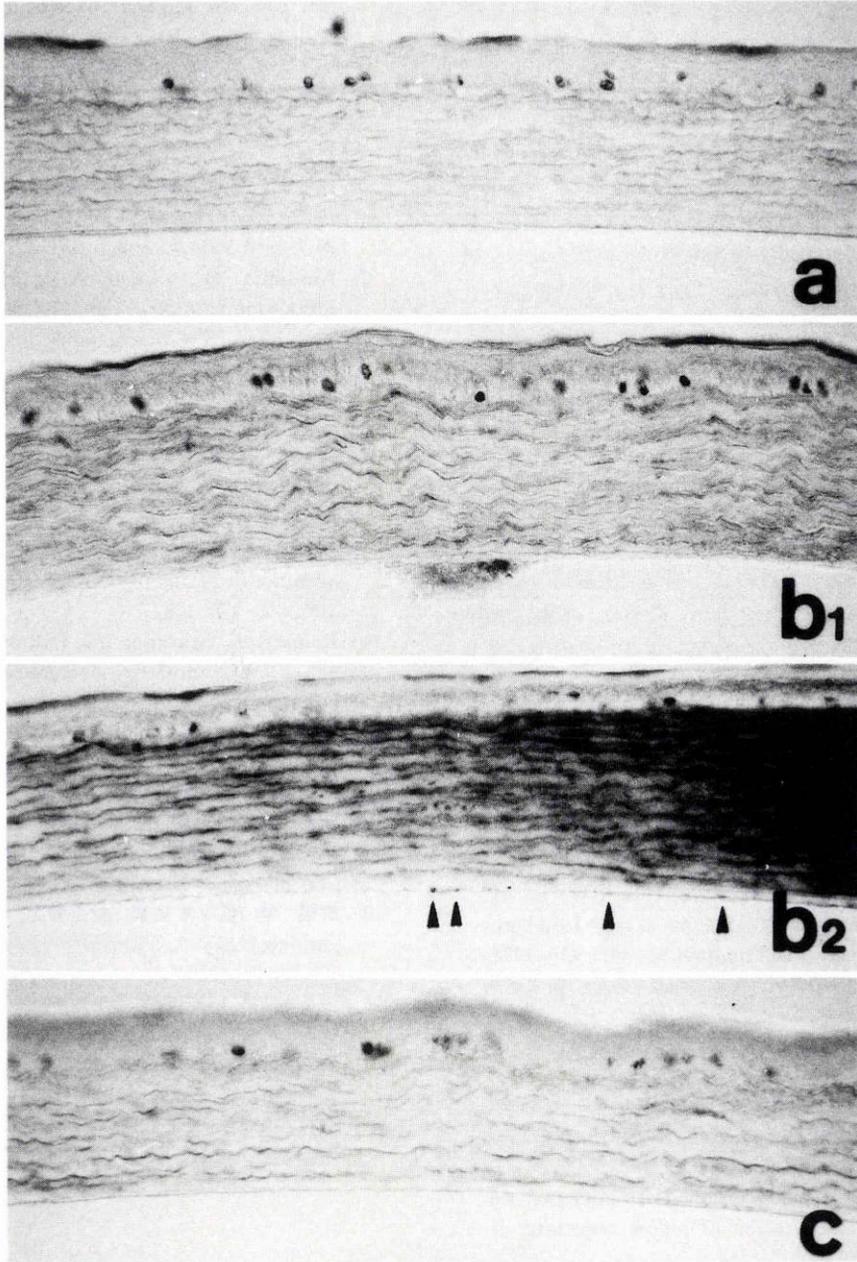


図7 凍結破壊14日後における BrdU 陽性細胞の局在。対象群(a), ARI ガラクトース群(c)においては内皮細胞の重層化ならびに BrdU 陽性細胞は認められない。ガラクトース群においては凍結破壊部に内皮細胞の重層化と BrdU 陽性細胞が認められ(b1), 周辺部においても BrdU 陽性細胞が多数認められる(b2矢印)(ABC法, DAB染色, $\times 400$).

れる DNA 内に取り込まれる。細胞分裂・増殖の盛んな組織に BrdU を取り込ませた後、DNA を単鎖にするために塩酸処理を行い、露出した BrdU と抗 BrdU モ

ノクローナル抗体を反応させ、免疫組織化学的方法を用いることにより、S 期にある細胞の組織内での局在を認識することができる^{10)~15)}。

最後に今回の実験結果について考按する。まず、無処置のものでは BrdU 陽性細胞は対象群・ガラクトース単独群・ARI ガラクトース群いずれにおいても認められず、このことは単にガラクトース負荷のみでは内皮細胞の異常増殖は起こらないことを意味する。次に、凍結破壊後の所見は、破壊直後より対象群・ガラクトース単独群・ARI ガラクトース群いずれにおいても脱落した内皮の周辺に BrdU 陽性細胞が多数認められ、残存内皮の増殖は破壊直後より始まることが明らかとなった。さらに、ガラクトース単独群では他の2群より長期にわたり BrdU 陽性細胞が認められ、このことはガラクトース単独群では残存内皮が長期間異常に増殖することを意味する。

以上のことより、ガラクトース血症ラット角膜内皮の損傷治癒過程の一つの現象として、周辺の残存内皮細胞の分裂増殖が長期間にわたると結論できる。しかし、今回の結論からだけでは、損傷治癒遅延の理由を明確に説明することはできない。それは、分裂し増殖した内皮細胞がどのように移動し脱落した部位を覆っているのかを検討する必要があるからである。今後この内皮細胞の移動について実験を行い、ガラクトース血症ラット角膜内皮の損傷治癒遅延の理由についてさらに検討する予定である。

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, et al:** 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 均他: 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) **Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, et al:** Localization of aldose reductase in the human eye. *Diabetes* 33: 562-566, 1984.
- 4) **Ludvigson MA, Sorenson RL:** Immunohistochemical localization of aldose reductase. II. Rat eye and kidney. *Diabetes* 29: 450-459, 1980.
- 5) 赤木好男, 高橋幸男, 田辺稔邦他: 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 (ARI) との関連性について. *日眼* 91: 187-193, 1987.
- 6) 照林宏文, 赤木好男, 高橋幸男他: 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. *日眼* 投稿中.
- 7) **Kinoshita JH:** Cataracts in galactasemia. *Invest Ophthalmol* 4: 786-799, 1965.
- 8) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. *Invest Ophthalmol* 13: 713-724, 1974.
- 9) **Kern TS, Engerman RL:** Distribution of aldose reductase in ocular tissues. *Exp Eye Res* 33: 175-182, 1981.
- 10) **Gratzner HG:** Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982.
- 11) **Dolbeare F, Gratzner HG, Pallavicini MG, et al:** Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5573-5577, 1983.
- 12) **Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, et al:** Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 72: 1844-1850, 1983.
- 13) 高橋 学, 佐々木功典, 村上教之: Bromodeoxyuriding 標識による細胞動態の解析. *最新医学* 40: 80-84, 1985.
- 14) 佐々木功典, 荻野哲朗, 村上知之他: モノクロナル抗 BrdU 抗体を利用した人癌組織の標準率測定法. *病理お組床* 3: 565-567, 1985.
- 15) 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: 359-365, 1987.

(第91回日眼総会原著)