

ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能

(3) 50%ガラクトース白内障の再生水晶体上皮細胞の動態と アルドース還元酵素阻害例

照林 宏文・辻 俊明・松本 康宏 (京都府立医科大学眼科学教室)
池部 均・赤木 好男

要 約

³H-thymidine オートラジオグラフィ法において水晶体上皮細胞層におけるラベル細胞の数は、50%ガラクトース食餌開始4日目に最大になることより、食餌開始後4日目にラベル実験を行った。以後、経時的にラベル細胞の動きを観察した。1週間後にはラベル細胞は赤道部弓状部付近に移動し、2から4週間後には再生水晶体線維よりなる水晶体表層皮質にまで移動した。3週間後にはラベル細胞にも膨化と液化が観察できた。ただし、4週間後までのすべての時期において、前囊下の水晶体上皮細胞層と上皮細胞塊にも残存ラベル細胞が見られた。同様の実験は、正常食飼育群ならびに50%ガラクトース食餌に1種類のアルドース還元酵素阻害剤(Statil)を同時投与した群にも行った。ラベル細胞の皮質深層部への移動は、3群間で大差はなかった。アルドース還元酵素阻害剤は、ガラクトース白内障発症予防にほぼ比例してラベル細胞の動態を正常化した。(日眼会誌 93:1044-1053, 1989)

キーワード：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，ラベル細胞，アルドース還元酵素阻害剤

Movement of Regenerated Lens Epithelial Cells in 50% Galactose Cataract and an Aldose Reductase Inhibitor

Hirofumi Terubayashi, Toshiaki Tsuji Yasuhiro Matumoto

Hitoshi Ikebe and Yoshio Akagi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

In experimental galactose cataract of rats, lens fiber cells were gradually destroyed by swelling and liquefaction occurring due to the accumulation of galactitol. In addition to the destruction of lens fiber cells, marked regeneration of lens epithelial cells was universally observed. In this study, we used the technique of ³H-thymidine autoradiography and examined the movement of regenerated (DNA synthesis) lens epithelial cells.

On the fourth day from the starting of 50% galactose chow, ³H-thymidine was injected into the anterior chamber. After one week, ³H-thymidine-labelled epithelial cells was observed at the bow region of the equatorial area. After 2 to 4 weeks, labelled cells were found in the regenerated lens fibers of the cortex. After 3 weeks, labelled cells about to be destroyed by swelling and liquefaction

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
(平成元年5月22日受付，平成元年7月17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 May 22, 1989 and accepted in revised form July 17, 1989)

were recognized. However, a few labelled cells were still observed in the epithelial cell layer.

The same experiments were performed in two groups of normal chow-fed one and 50% galactose + an aldose reductase inhibitor (Statil)-fed one. The movements of ^3H -thymidine labelled epithelial cells in the above two groups were almost identical. In addition, the movement of labelled cells was normalized by an aldose reductase inhibitor. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 1044-1053, 1989)

Key words: Galactose cataract, Lens epithelial cell, ^3H -thymidine autoradiography, Labelled cell, Aldose reductase inhibitor

I 緒 言

ラット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 (Diet-Reversal) があり、われわれ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 (ARI) は、このガラクトース白内障に対し治療ならびに予防効果を有することも報告してきた^{2)~6)}。以上の結果より、白内障水晶体の再透明化には赤道部における再生線維による修復が不可欠であると考えている。つまり、再生された水晶体上皮細胞の動態を検索することは、現時点では夢物語だとしても、未来の白内障治療薬開発の面からも極めて重要だと思われる。

われわれは、 ^3H -thymidine オートラジオグラフィの手法を用い、ラットガラクトース白内障発生過程において、水晶体上皮細胞は赤道部以外の部でも異所性増殖を繰り返し、破壊された水晶体線維の修復を行い、再透明化に重要な働きをしている事を証明した⁷⁾。本研究では、ラベル細胞の経時的な動きを調べガラクトース白内障発症メカニズムを探ると共に、ARI のガラクトース白内障予防効果を、水晶体上皮細胞動態の面から検討した。

II 実験方法

本実験には、体重50g (生後3週齢) の Sprague-Dawley 系雄ラット45匹を、正常食餌で飼育する群 (正常群)、50%ガラクトース食餌で飼育する群 (ガラクトース群)、50%ガラクトース食餌に0.046%Statil (ICI, England) を混入した食餌で飼育する群 (ガラクトース ARI 群) の3群に分けて飼育した。各々の食餌開始後4日目に、すべてのラットの両眼球の前房中に5 μl の methyl- ^3H -thymidine (81.7Ci/mmol, New England Nuclear) を1回注入し、次いで経時的 (1, 2, 3, 4, 6週間後) 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。

数日間固定後、アルコール脱水、メサクリレイト包埋し、眼球矢状断の1 μm の薄切片と、試料によっては水晶体赤道部付近の眼球横断1 μm の薄切片を作成し、スライドガラスに塗布した。次いでこのスライドガラスを、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、トル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

各々の食餌を開始し、4日目に前房への ^3H -thymidine 注入実験を行った。

(1) 正常群

食餌開始4日目の時点で ^3H -thymidine ラベルされる上皮細胞は、すべて赤道部増殖帯においてDNA合成を行っている細胞である⁷⁾。実験後1週間目には、ラベル細胞は前囊下から赤道部増殖帯、赤道部弓状部にかけての水晶体上皮細胞層にのみ観察でき、水晶体皮質の線維細胞層には認められなかった (図1A)。2週間目には、大部分のラベル細胞は赤道部弓状部から水晶体線維細胞層の皮質表層部に進入するのが観察できた (図1B)。一部のラベル細胞は、前極近くの前囊下水晶体上皮細胞内層にも見られた (図2A)。3週間目になると、ラベル細胞は2週間目に比べさらに内上方側の皮質深層部に移動するのが観察でき、4週間目ではさらに内上方側に移動しており、特に横断面切片では2から3週間目にかけての内側への移動が明瞭に認められた (図1C, D, 2C, D)。この時点でも増殖帯に残存したラベル細胞を認めた (図2B)。6週間経過するとラベル細胞は検出できなかった。

(2) ガラクトース群

食餌開始4日目の時点で ^3H -thymidine ラベルされる上皮細胞は、赤道部増殖帯においてその数は増加し

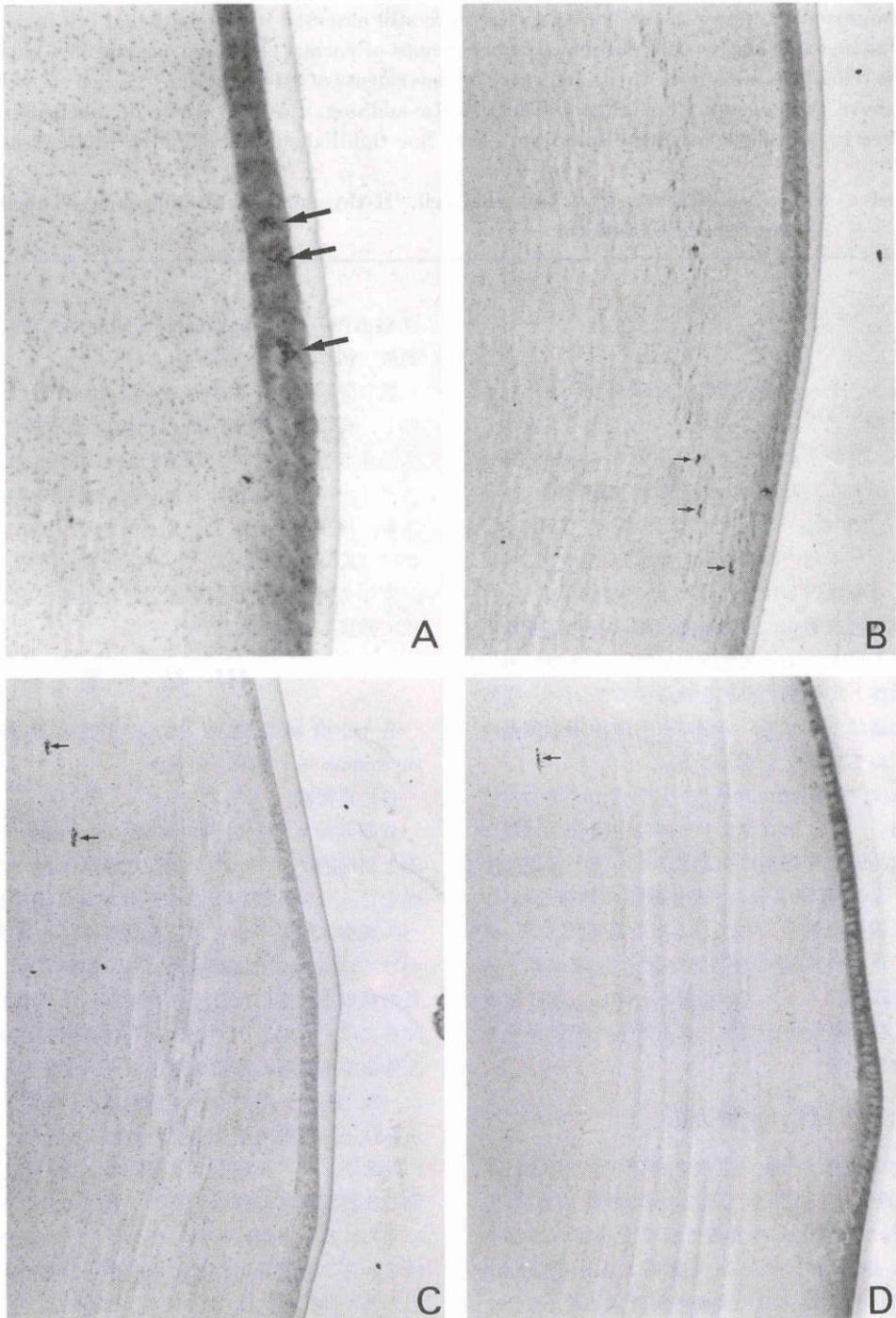


図1 正常群ラベル実験後の経過. 実験後1週間 (A, $\times 460$), 2週間 (B, $\times 230$), 3週間 (C, $\times 230$), 4週間 (D, $\times 230$) と経時的にラベル細胞 (矢印) は皮質深層部に移動した. トルイジンブルー染色.

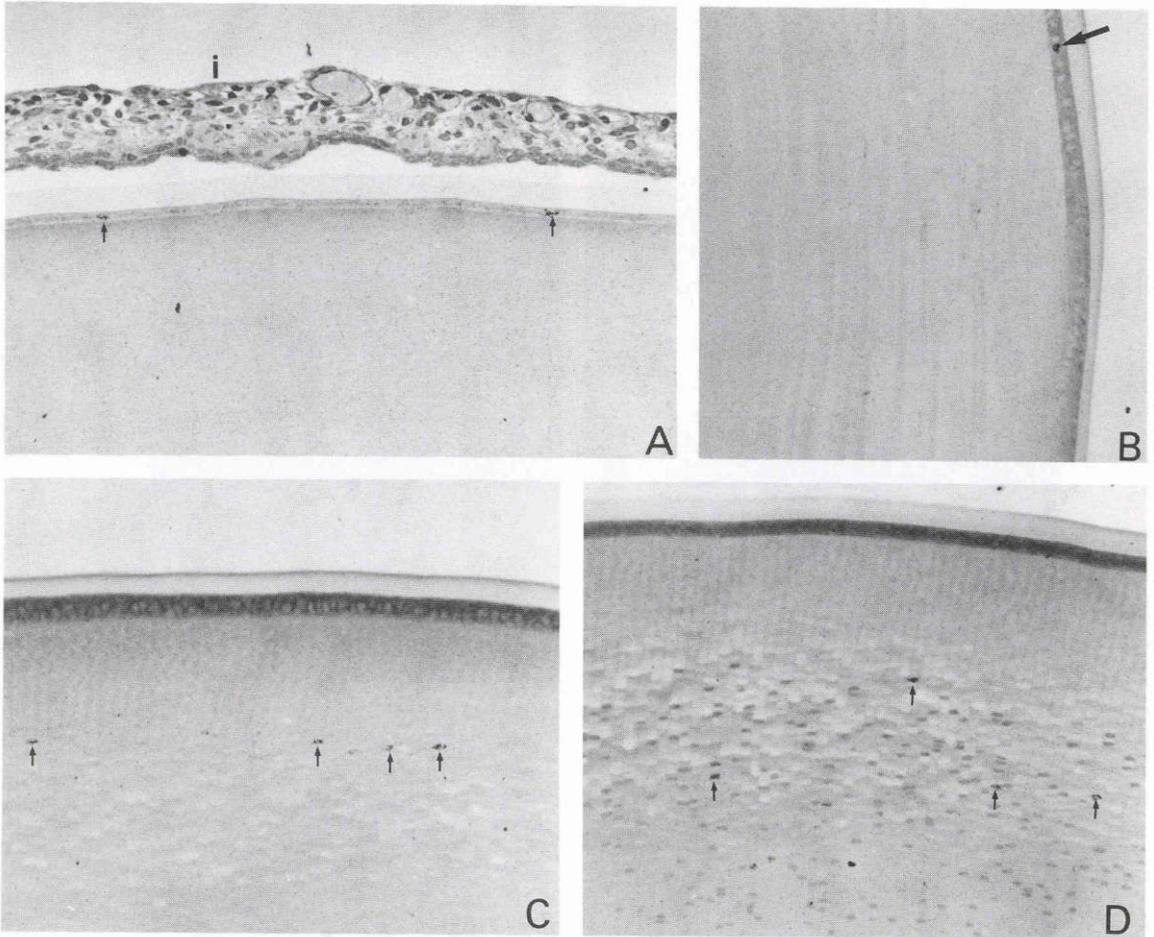


図2 正常群。実験後2週間 (A, ×230) において、ラベル細胞 (矢印) は前囊下上皮細胞層に認められた。実験後4週間 (B, ×230) においても、赤道部弓状部にラベル細胞 (矢印) は観察された。赤道部弓状部よりやや前方の水晶体上皮細胞層を含む横断面切片を見ると、実験後2週間 (C, ×230) に比べ3週間 (D, ×230) の方が、ラベル細胞 (矢印) の皮質深層部への移動が確認された。トルイジンブルー染色。i: iris.

ており、さらに前囊下水晶体上皮細胞層に均一に観察された (異所性増殖)⁷⁾、その後、1から4週間と経時的に赤道部弓状部から皮質表層部に移動し、再生された透明水晶体線維細胞層を形成した (図3A, B, C)。この進行速度は正常群とほとんど差は認めなかった。横断面切片で見ると、実験後3週間目において皮質表層部に移動したラベル細胞にも膨化の進行を観察した (図4D)。食餌開始4日目に前囊下上皮細胞層においてラベルされた上皮細胞 (異所性増殖) は、実験後1から3週間目に前囊下に形成される上皮細胞塊を構成し (図4A, B)、4週間目においても上皮細胞塊内に存在

するのを認めた (図4C)。この時点においても、前囊下の上皮細胞塊以外の上皮細胞層にもラベル細胞の存在を確認した (図3D)。正常群と同様に、実験後6週間経過するとラベル細胞は検出できなかった。

(3) ガラクトースARI群

実験開始後1週間目から4週間目において、白内障は前囊下と後囊下に局限して見られ、赤道部への波及は認められなかった。ラベル細胞の増殖帯から皮質表層部への移動速度と動態には、正常群やガラクトース群と比べても差がなかった (図5A, B, C, D)。横断面切片で見ると、実験後4週間目においてかなり内側

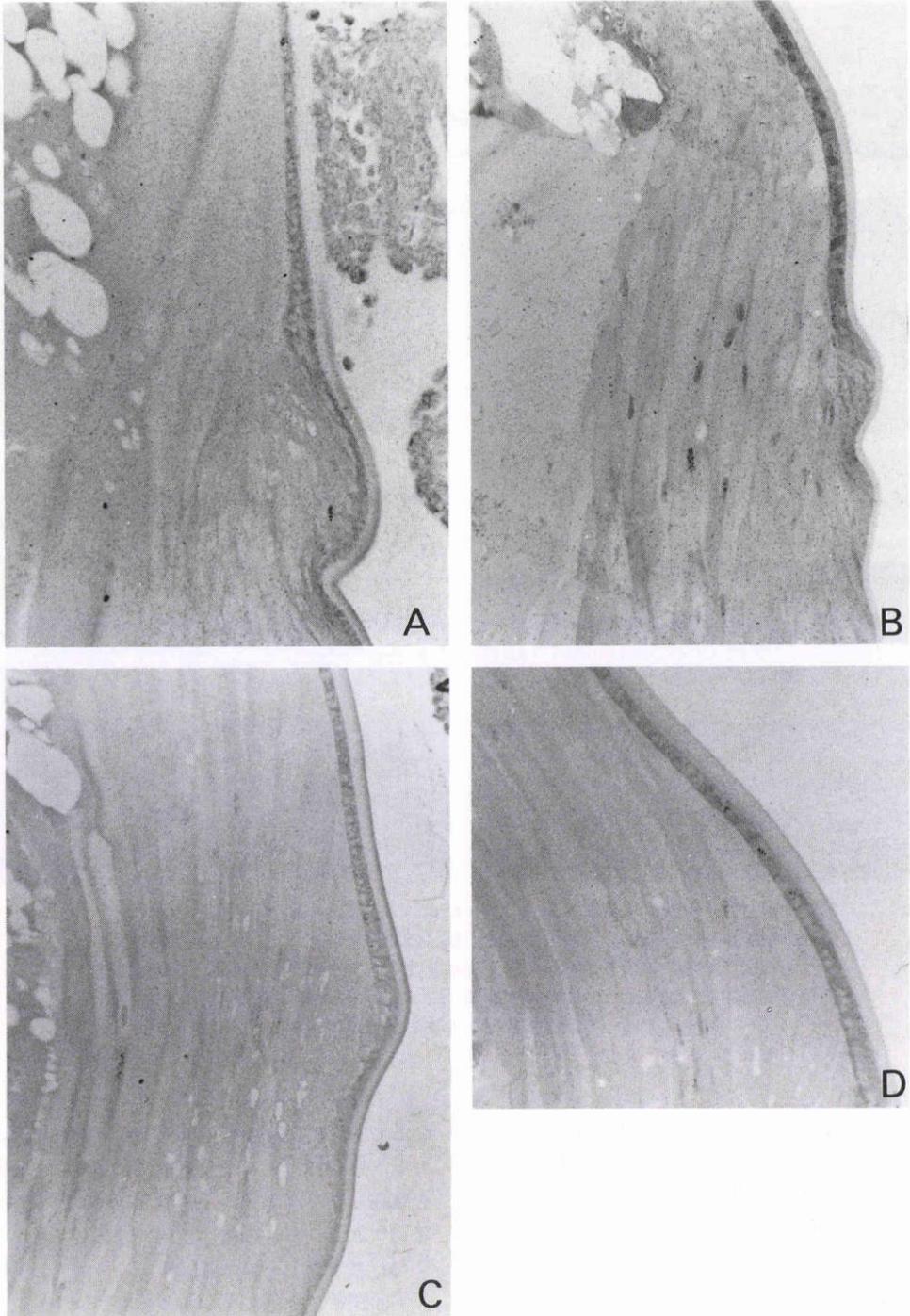


図3 ガラクトース群ラベル実験後の経過. 実験後1週間 (A, $\times 230$), 3週間 (B, $\times 230$), 4週間 (C, $\times 230$) と経時的にラベル細胞 (矢印) は皮質深層部に移動し, 再生透明水晶体線維を形成した. 実験後4週間においても, 増殖帯付近の前囊下上皮細胞層にラベル細胞 (矢印) を認めた (D, $\times 230$). トルイジンブルー染色.

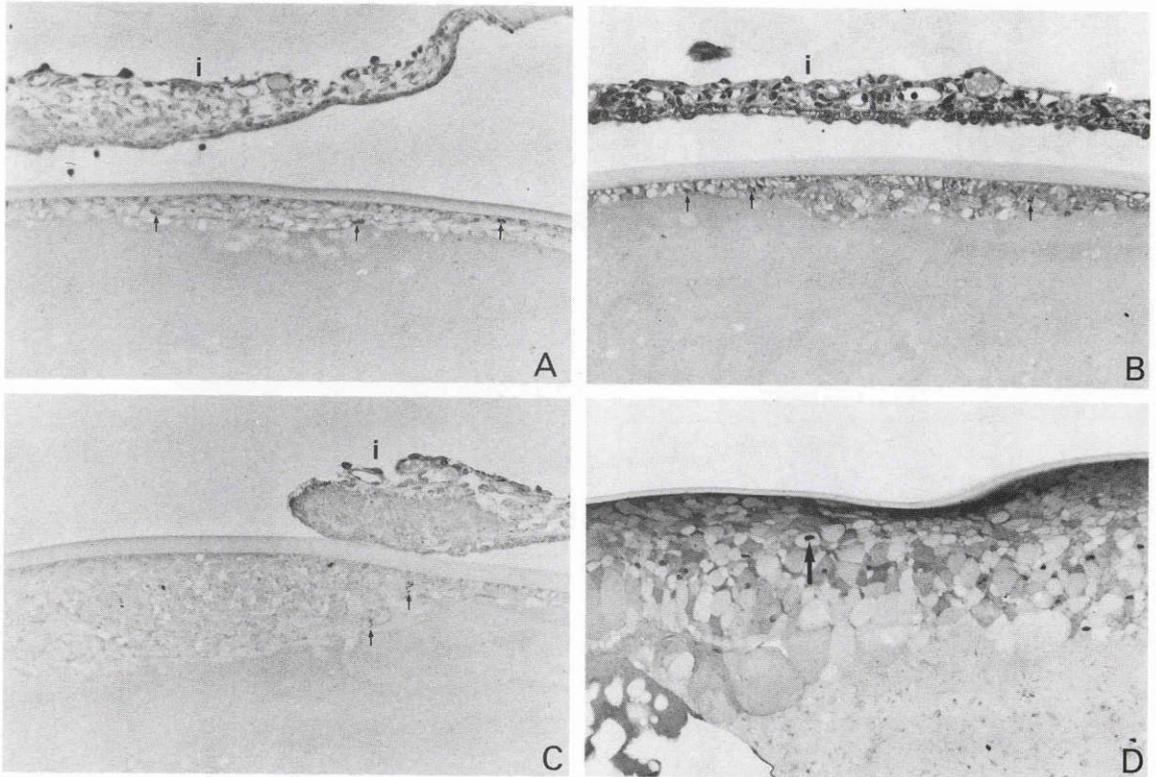


図4 ガラクトース群. 実験後1週間 (A, $\times 230$), 3週間 (B, $\times 230$), 4週間 (C, $\times 230$) 目において, 前嚢下に形成された上皮細胞塊の中にもラベル細胞 (矢印) の存在が確認できた. 実験後3週間目の時点の赤道部弓状部よりやや後方の水晶体上皮細胞層を含まない横断面切片を見ると, ラベル細胞 (矢印) の膨化の開始が観察できた (D, $\times 230$). トルイジンブルー染色, i: iris.

の皮質部への移動を確認した (図 6D). ガラクトース群で観察されるような前嚢下上皮細胞層での異所性増殖は軽度存在するようであり, 実験開始後1週間目, 2週間目には正常群で認められるラベル細胞の数に比べ多くのラベル細胞を前嚢下上皮細胞層に確認した (図 6A, B). 4週間後においても, 赤道部増殖帯から前嚢下上皮細胞層にかけてラベル細胞の存在を確認した (図 6C). 上記2群と同様に, 実験後6週間経過するとラベル細胞は検出できなかった.

IV 考 察

成熟した後も DNA 合成を行い細胞増殖を繰り返している水晶体赤道部増殖帯の上皮細胞については, 過去にラット, マウス, 家兎において, ^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)}. 我々の結果⁷⁾でも, 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, 差はなかった. ところが, 生直後の幼若ラット水晶体では, 赤道部増殖帯を含む前嚢下上皮細胞層全域において DNA 合成ならびに細胞増殖を行っていることが証明されている⁹⁾¹⁰⁾. Hanna によると⁹⁾, 生後1日目より生後2週間目の幼若ラット水晶体では, DNA 合成は増殖帯と前嚢下水晶体上皮細胞層にみられ, 盛んな異所性増殖の存在を証明している. われわれも同様の結果を生後0日, 3日目の幼若ラット水晶体において確認している. しかし, 異なる点は生後7日目には成熟ラットと同様に増殖帯においてのみラベル細胞が検出でき, 異所性増殖は消失した (未発表). 正常発達過程においては, すべての水晶体上皮細胞が生直後に持っていた細胞増殖能力は, 成熟とともに失われていき, 増殖帯にのみ存在する上皮細胞が一生涯保有すると考え

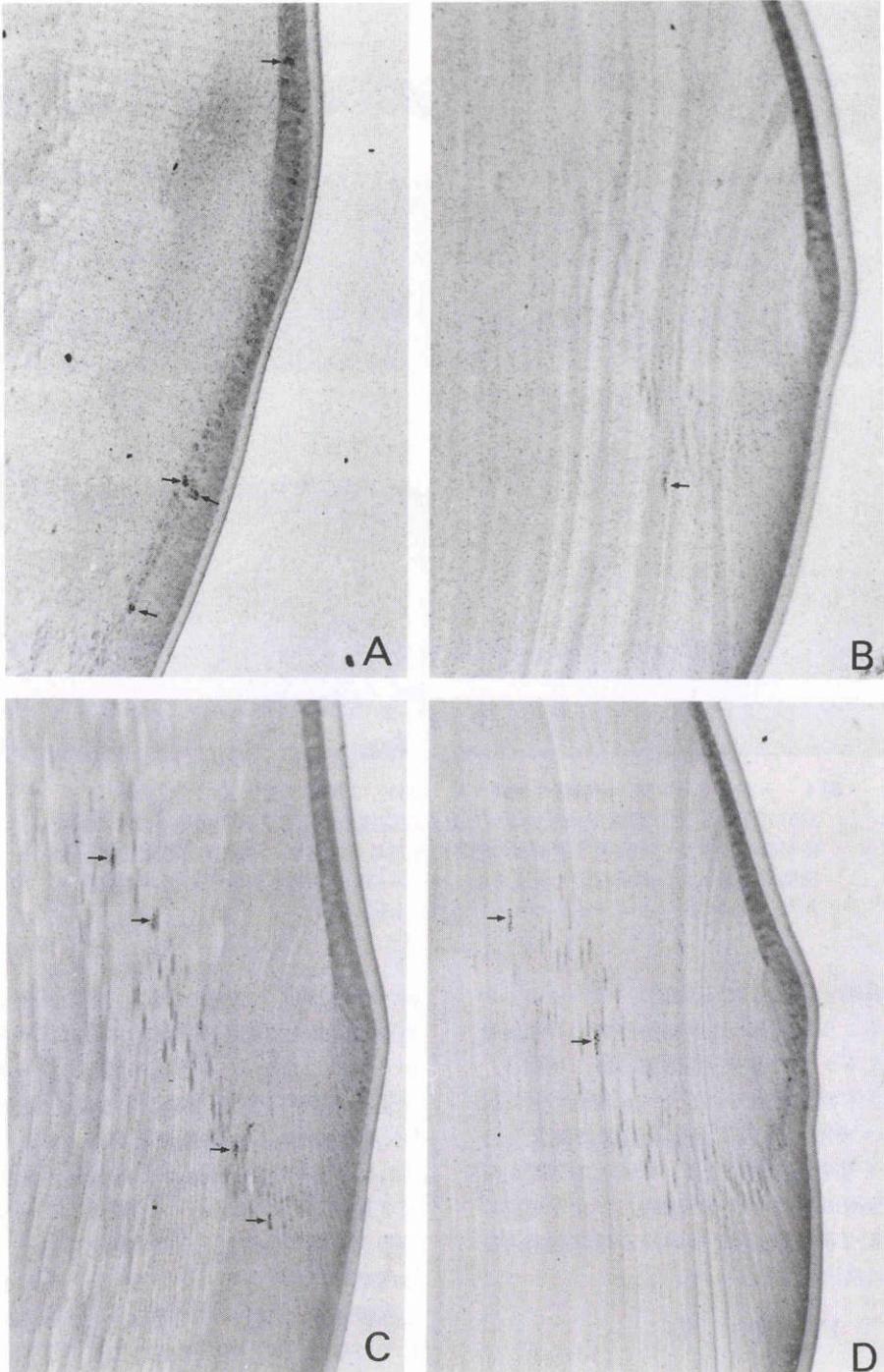


図5 ガラクトースARI群ラベル実験後の経過. 実験後1週間(A, $\times 230$), 2週間(B, $\times 230$), 3週間(C, $\times 230$), 4週間(D, $\times 230$)と正常群とほぼ同様に, 経時的にラベル細胞(矢印)は皮質深層部に移動した. トルイジンブルー染色.

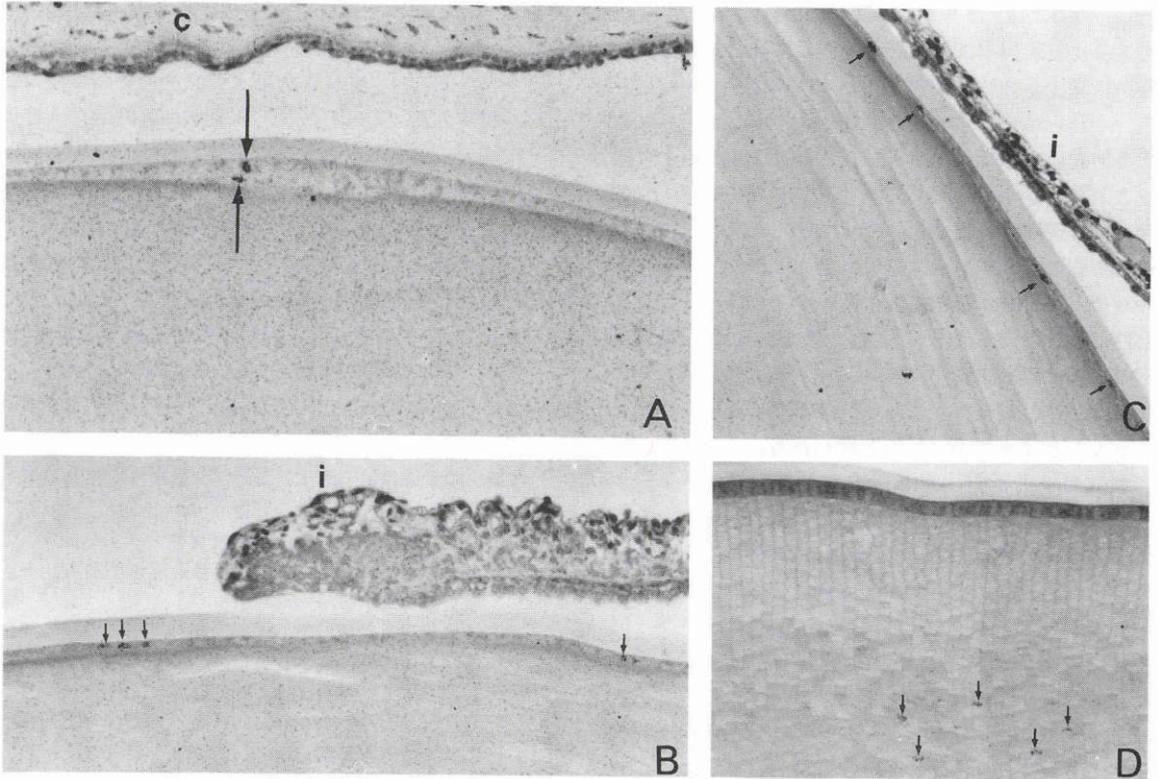


図6 ガラクトースARI群. 実験後1週間(A, ×230), 2週間(B, ×230), 4週間(C, ×230)目において, 前囊下上皮細胞層に比較的多くのラベル細胞(矢印)を認めた. 実験後4週間目の赤道部弓状部よりやや前方の水晶体上皮細胞層を含む横断面切片を見ると, 正常群とほぼ同様に, ラベル細胞(矢印)の皮質深層部内側への移動を確認した(D, ×230). トルイジンブルー染色. i: iris, c: cornea.

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, 水晶体上皮細胞を ^3H -サイミジンにてラベルし, 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ラベル細胞数を数えると, 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. さらにこれらのラベル細胞は, 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. 以前の我々の結果⁷⁾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)にラベル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, その主要原因と考えられた. 本研究で ^3H -サイミジン前房内注入という実験を50%ガ

ラクトース食餌開始後4日目に行った根拠はこの結果に基づき, ラベル細胞の数を最大にするように試みた.

今回の実験では, 50%ガラクトース食餌開始後4日目に, 水晶体上皮細胞層増殖帯ならびに前囊下での異所性増殖によるDNAラベル細胞の経時的な動態を検討することを目的とした. さらに同時に, ラットガラクトース白内障¹⁴⁾や糖尿病性白内障¹⁴⁾に対し強い予防効果と治療効果を有する1種のアルドース還元酵素阻害剤, ICI 128, 436 (ICI, England, Statilともいう)によるラットガラクトース白内障発症防止された水晶体でのラベル細胞の動態をも観察した.

赤道部増殖帯においてDNA合成を行っているラベルされた上皮細胞は, ラット水晶体の正常成熟と伴に, 赤道部弓状部から皮質表層部へと移動し, 透明水晶体表層皮質を形成する. 50%ガラクトース白内障の水晶体においてもほぼ同様のラベル細胞の動態が観察され

た。一般的には、ガラクトース白内障水晶体において、赤道部皮質最表層部には必ず膨化、液化の起こっていない正常水晶体線維細胞よりなる透明部分が観察される。これらの正常水晶体線維細胞は、ガラクトース白内障形成過程早期に再生された水晶体上皮細胞より構成される事が判明している¹⁾。50%ガラクトース食餌開始後3週間目になると、透明であったラベル水晶体線維細胞にもアルドース還元酵素よりガラクトールの蓄積が始まり、細胞の膨化開始を今回確認した。正常群ならびにガラクトースARI群では、再生水晶体線維の膨化は認められず、アルドース還元酵素阻害剤の効果は、この正常再生水晶体線維細胞の膨化崩壊阻止であることはまちがいないと思われる。

本研究の正常群、ガラクトース群、ガラクトースARI群の3群において、増殖帯でのラベル細胞の皮質深層部への移動には数の大小以外に差は認めなかった。この理由は、実験開始後4週目において、ガラクトース群の水晶体は、正常群ならびにガラクトースARI群の水晶体に比べかなり小さい事によると思われた。つまり、一見ガラクトース群とその他の2群との間でラベル細胞の皮質内への移動速度が同様に見えるが、実際はガラクトース群水晶体は小さいので、皮質全長との比を考えると、移動速度は他の2群に比してかなり早いことが想像できた。しかし、正確な定量化は今回は行っておらず、将来に残された課題である。

50%ガラクトース食餌開始後4日目に前囊下上皮細胞層に認められる異所性増殖によるラベル細胞は、その後1週間から4週間にかけて、白内障の進行と伴に前囊下上皮細胞塊を形成したり、赤道部増殖帯から前囊下の上皮細胞層にびまん性に分布する事を確認できた。50%ガラクトース食餌にアルドース還元酵素阻害剤の同時投与群(ガラクトースARI群)では、形態学的には、白内障発症予防効果はかなり強く、軽度白内障を前囊下と後囊下のみ認められ、赤道部には異常所見は認められなかった。しかし前囊下上皮細胞層での異所性増殖によるラベル細胞は食餌開始後2~4週間目にも、赤道部増殖帯から前囊下の上皮細胞層ならびに上皮細胞塊に検出された。ここでの大きな疑問点は、何が前囊下での異所性増殖を引き起こすかである。現在のところ、ガラクトース白内障自身と高ガラクトース血症の可能性が想像できるが、その回答は今後の課題と考えている。

本研究と同じ³H-サイミジンオートラジオグラフィの方法を用いた、Hannaらによる正常ラット水

晶体上皮細胞の細胞増殖とその動態を調べた報告⁹⁾がある。それによると、生後4週齢のWistar系ラットではラベル細胞は水晶体赤道部よりやや前方の増殖帯にのみ観察され、それらのラベル細胞は経時的に水晶体線維細胞より成る水晶体皮質方向に移動し、8週間にて増殖帯から脱核を始める皮質部までの3/4の距離を移動することを示した。今回の結果では、50%ガラクトース食餌負荷後4日目にラベルを行い、その後2週間目にラベル細胞が弓状部から表層皮質へと進入するのが見られ、4週間目には表層皮質深層部へと移動し、一部のラベル細胞にはガラクトース蓄積による膨化が始まるのが観察でき、以前の結果¹⁵⁾とほぼ同様であった。

本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会にて発表した。

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: 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) 照林宏文, 赤木好男, Peter F. Kador 他: 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. 日眼会誌 92: 1869-1874, 1988.
- 8) Harding CV, Hughes WL, Bond VP, et al: Autoradiographic localization of tritiated thymidine in whole-mount preparations of lens epithelium. Archives Ophthalmol 63: 59-65, 1959.
- 9) Hanna C, O'Brien JE: Cell production and migration in the epithelial layer of the lens. Archives Ophthalmol 66: 129-133, 1961.
- 10) Mikulicich AG, Young RW: Cell prolifera-

- tion and displacement in the leens 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. *Archives Ophthalmol* 64: 88—91, 1960.
 - 14) **赤木好男, 田坂 宏, 茶本 薫 他**: Aldose Reductase 阻害剤 (ICI 128, 436) その 2. ラット糖尿病性白内障に対する効果. *眼紀* 38: 217—221, 1987.
 - 15) **照林宏文, 辻 俊明, 赤木好男**: ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能(2)再生水晶体上皮細胞の動き. *眼紀* (投稿中).
-