

# アルドース還元酵素阻害剤(ARI)の白内障抑制効果 形態学的判定基準について

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

## 要 約

アルドース還元酵素阻害剤 (ARI) の白内障抑制効果判定の形態学的基準を作成することを目的とし、50g ラットを25%ガラクトース食餌で飼育し2種 (ADN-138およびFR 74366) のARI (それぞれの低、高濃度薬剤で計4種類) のラットガラクトース白内障に対する抑制効果を検討し、これまでのわれわれの報告から総合的に次のように結論した。①ガラクトース白内障は水晶体赤道部から前赤道部にかけての表層皮質に初発し前皮質、最後に後皮質に線維膨化・液化が進展する。②ARI効力の強弱によって生じる形態学的差異は大きく分けて5段階に分類できる。③ラット生後週齢により上記形態学的差異の発現時期に差はあるものの変化の本質は5段階分類に従う。(日眼会誌 93:494-500, 1989)

キーワード：ラット水晶体，ガラクトース白内障，アルドース還元酵素阻害剤，組織学

## Morphological classification of the prevention of aldose reductase inhibitor on rat galactosemic cataract

Yoshio Akagi, Hitoshi Ikebe, Hirofumi Terubayashi,  
Yukio Takahashi and Toshiaki Tsuji

*Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine*

### Abstract

A Morphological classification indicating the stage of the prevention of aldose reductase inhibitor (ARI) on the rat galactosemic cataract was investigated. Three week old rats (body weight 50g) were fed with a 25% galactose diet. Two kinds of ARIs (ADN-138, FR-74366) were used with a different dose 25% galactose fed each drug. The rats on the 25% galactose diet rapidly developed cataracts in the equatorial region of the lens followed by total cataracts. The morphological processes of the galactose cataracts receiving preventive treatment of ARI were divided into 5 types according to their intensity. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 494-500, 1989)

Key words: rat lens, galactose cataract, aldose reductase inhibitor, histology

## I 緒 言

実験的糖尿病およびガラクトース血症にともない発

症する白内障つまり糖白内障の起因酵素は、アルドース還元酵素 (以下ARと略す) であり、その理論的背景をポリオール浸透圧説 (Kinoshita) と呼ぶ<sup>1)~3)</sup>。こ

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 赤木 好男  
(平成元年2月22日受付，平成元年3月22日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshio Akagi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med.  
Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received February 22, 1989 and accepted in revised form March 22, 1989)

の説を最も強く支持する実験的根拠は、数種類以上のアルドース還元酵素阻害剤（以下ARIと略す）が白内障発症を抑制する事である<sup>4)~6)9)</sup>。ARIの白内障抑制効果を判定するにあたり指標となるものは代謝産物である糖アルコール量の生化学測定と、形態学的線維膨化所見の二者である。糖白内障の本質は与える原因の強さおよび動物の生後週齢の違いによって刻々と部位の変化する糖アルコール蓄積現象と後続する線維膨化である。しかも条件によっては糖アルコールは水晶体の外へ漏出してしまふ。つまり、白内障とは均一物体中における均一糖アルコール蓄積現象では決してない。これらの見地から本研究は、ARIのin vivoにおける実験的白内障抑制効果に関してもう一方の指標である組織学的所見から見た効果判定基準を作ることを目的とする。

## II 実験方法

本実験には、体重50g（生後3週齢）のSprague-Dawley系ラットを120匹用いた。それらをまず(A)通常食で飼育した群(通常食群)と(B)25%ガラクトー

ス含有食にて飼育した群の二群に大きく分けた。(B)群は更にARIを混餌しない群(25%G群)と、以下のごとくARI(2種類、各2種濃度)を混餌(w/w)投与した4群計5群に分けた。ADN-138(キョーリン製薬、化学名8'-chloro-2', 3'-dihydrospiro[pyrrolidine-3', 6' (5'H)-pyrrolo[1, 2, 3-de] [1, 4]benzoxazine]-2, 5, 5'-trione)をそれぞれ、(1)0.1%(高濃度ADN群)、(2)0.01%(低濃度ADN群)の割合で混入した食餌で飼育。FR 74366(藤沢薬品、化学名[3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-7-chloro-2, 4-dioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinazolin-1-yl] acetic acid)をそれぞれ、(3)0.075%(高濃度FR群)、(4)0.025%(低濃度FR群)の割合で混入した食餌で飼育。この(A)(B)合わせて5群のラット水晶体を食餌開始後5週まで各週毎眼球摘出した。摘出眼球を直ちに4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4)に浸漬し、水晶体を取り出した。同固定液で4~5日間固定し、その後、アルコール系列にて脱水し、メタクリル樹脂(JB-4、デュボン社)包埋後、トルイジン青で染色し光学顕微鏡にて観察した。

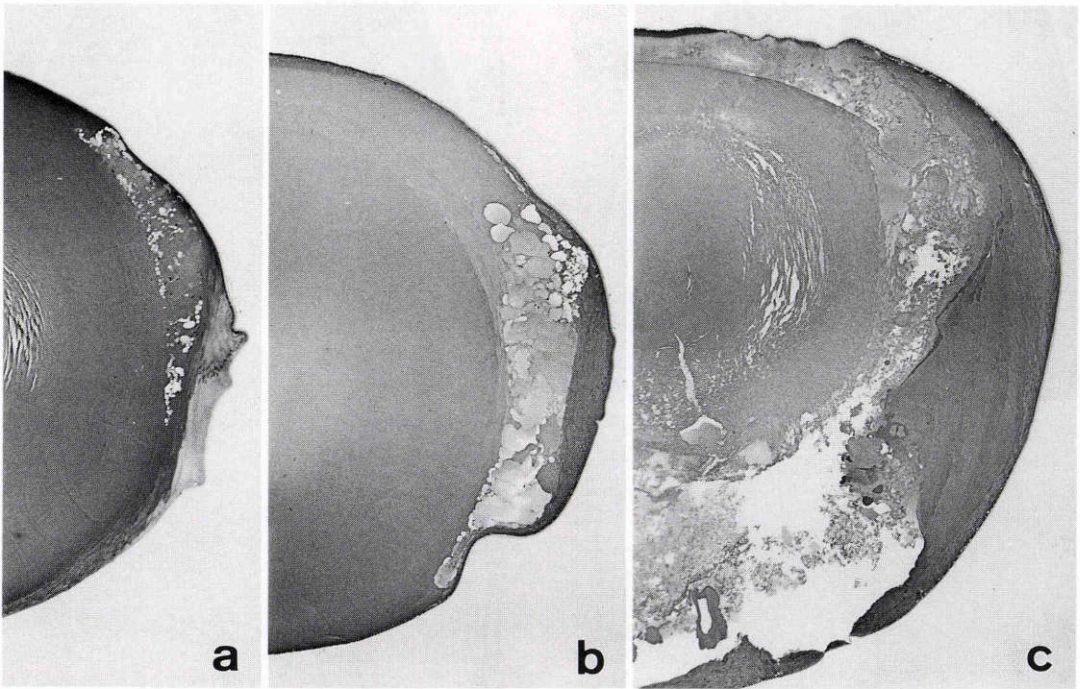


図1 25%ガラクトース血症白内障光顕像。1週後(a)赤道部から前赤道部皮質に膨化・液化が認められ、2週頃(b)膨化部位は前・後皮質に向かって拡大し、3~4週(c)では全周の皮質が液化している(トルイジン青染色, ×40)。



### III 結 果

25%G群：実験開始後1週で赤道部から前赤道部に至る皮質の強い膨化を認めた(図1a)。2週頃その膨化部位は上皮細胞層直下の前皮質に向かって拡大し、同時に後皮質にも進展していったが、膨化の程度は前皮質がより強かった(図1b)。実験開始後3~4週になると赤道部最表層を除いた皮質が全周にわたり液化していた(図1c)。軽度な時期では液化領域の内部に閉じ込められた皮質および核部分はまったく正常であったが、しだいに液化領域は皮質の全層におよんだ。しかし、核部は最後まで膨化・液化することはなく、また前後囊下に正常新生線維が観察されることはなかった。

高濃度FR群：食餌開始後1~2週では、水晶体線維に膨化・液化はみられなかった。3週では前囊下皮質に軽微な線維膨化が出現した(図2)。この時期にお

ける線維膨化領域は上皮細胞層に近接していたが、4週目になると線維膨化は非常にゆっくり拡大していくと同時に、上皮細胞層と膨化領域との間に非膨化線維(正常線維)が介在するようになった。後囊下皮質にも軽微な線維膨化が認められた(図3)。食餌開始後5週では膨化領域と前囊下との間の非膨化線維の幅が広くなり、それに加え後囊下と膨化領域との間にも正常線維が進入してくるため、膨化領域は内部に閉じ込められたように分布するのが観察された。一方、赤道部皮質は最後まで正常に保たれていた(図4)。

低濃度FR群：食餌開始後2群で前・後囊下の表層皮質に膨化領域が出現した。膨化は前皮質の方に早く出現し(1週目)、その程度も強かった。さらに経過し3~5週後になると、しだいに前・後囊下の表層皮質の膨化領域は融合していった。同時に前後皮質膨化領

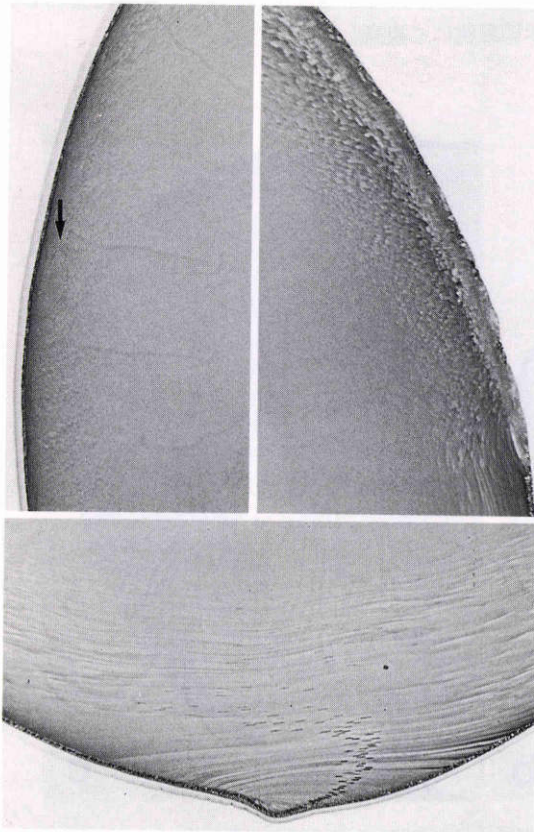


図2 高濃度FR群3週後光顕像。前囊直下皮質にのみ軽微な線維膨化(矢印)がみられる。(×120)

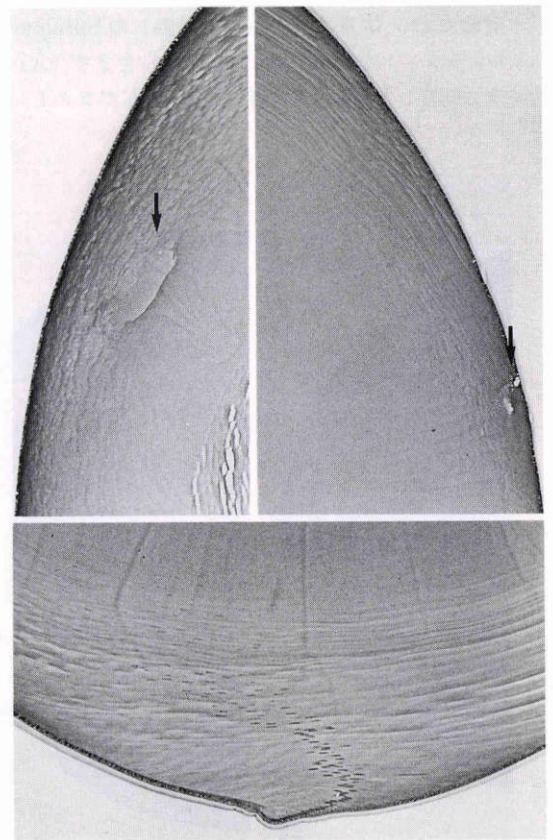


図3 高濃度FR群4週後光顕像。上皮細胞層と膨化領域(矢印)との間に正常線維が介在し、後囊直下皮質にも軽微な線維膨化(矢印)が認められる。(×120)



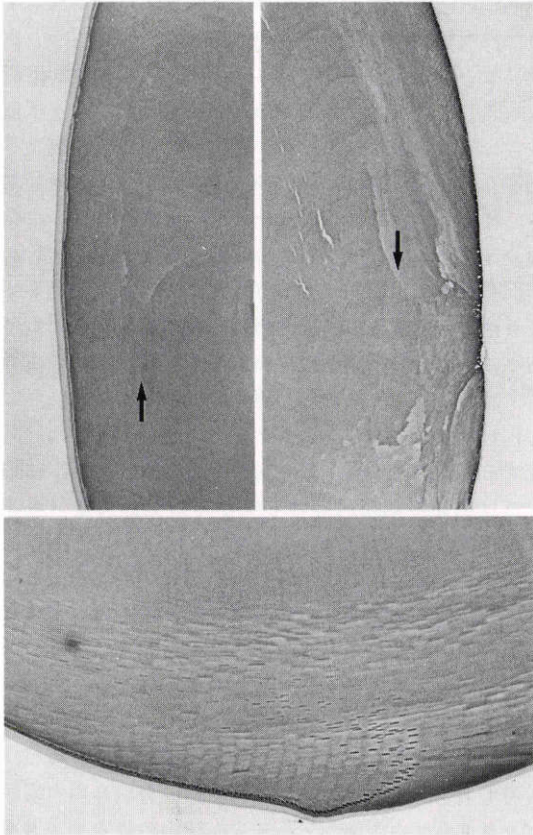


図4 高濃度FR群5週後光顕像。膨化領域と前・後囊下との間に非膨化線維が見られ、膨化領域(矢印)は内部に閉じ込められたように分布する。赤道部皮質は正常に保たれている。(×120)

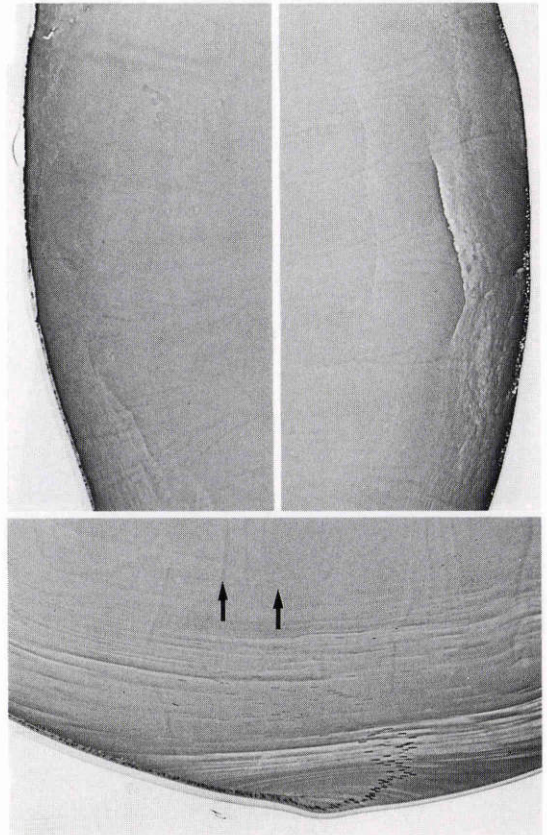


図5 低濃度FR群4~5週後光顕像。内部に閉じ込められたように分布する前・後囊下の膨化領域を互いに連絡させるように、赤道部深層皮質線維の軽度の膨化(矢印)が認められる。(×120)

域とそれぞれの囊との間には非膨化線維が介在していくのも観察された。3週では赤道部深層皮質には線維の膨化は見られなかったが、4~5週になるとこの部の線維も極めて軽度膨化し、前後皮質膨化領域を互いに連絡させるような像を呈した(図5)。

高濃度ADN群：食餌開始後1~2週には水晶体線維に膨化・液化はみられなかった。3週目に水晶体線維の膨化が前・後囊下皮質に認められ、4週目にはそれらがさらに増強・融合し、前・後囊との間には非膨化線維が介在するのが観察された。赤道部皮質は4週まで正常に保たれていた。

低濃度ADN群：食餌開始後2週で前・後囊下の表層皮質に膨化領域が出現した。膨化は前皮質の方に早く出現し(1週目)、その程度も強かった。赤道部皮質には線維の膨化はなかった。3週では前囊下皮質の膨

化領域は広範囲に融合し、赤道部皮質にも線維の膨化が観察された。4週では前囊下皮質は強く膨化・液化し、赤道部および後囊下皮質の膨化の程度も強かった。なおこの時期までに皮質の膨化・液化領域と前・後囊との間には非膨化線維の介在が認められなかった(図6)。

通常食餌群：全観察期間を通じ水晶体線維に異常所見は認められなかった。

各群とも白内障進展の時間的経過には多少のズレが、とくに低濃度ARI群には観察されたが進展様式には明かなばらつきは見られなかった。

#### IV 考 察

糖尿病性白内障の最も代表的な動物実験モデルはStreptozotocin(STZ)を注射投与して生じるラット糖



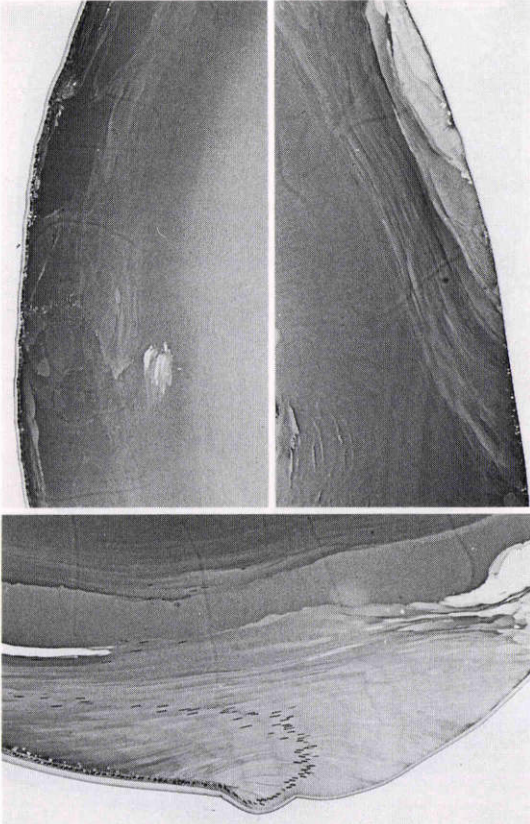


図6 低濃度ADN群4週後光顕像。前囊下皮質は強く膨化・液化し、赤道部および後囊下皮質の膨化の程度も強かった。膨化・液化領域と後囊との間には正常線維の介在は認められない。(×120)

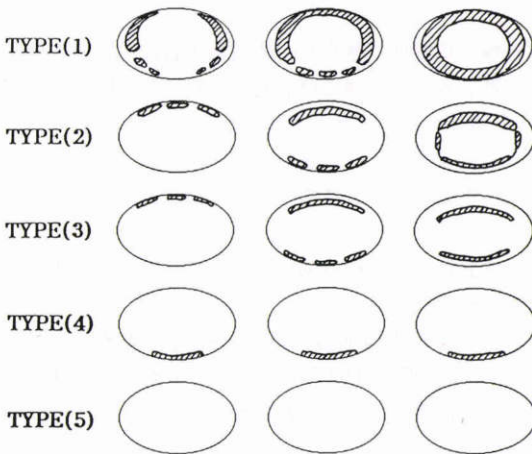


図7 ARIの実験的白内障抑制効果に関する組織学的効果判定基準。ARI効力による白内障進展様式の違いを示す。

尿病性白内障である。本薬剤は静脈などに一回注射するだけで膵臓ラ氏島のβ細胞を選択的に破壊する。血糖は投与後急速に上昇、多い時はその値は600mg/dlにも達し、投与さえ確実であれば血糖値におけるばらつきはそう大きくない。しかし全身状態は悪く数カ月経過しても体重増加がほとんど認められない例もあり、体重にはばらつきが多い。この糖尿病ラットに発症する白内障はなぜかこれら血糖・体重とは必ずしも相関関係なく出現し、細隙灯検査による初発時期も2～6週と大変幅広い。以上のことから判るように本白内障は、薬剤の効果を経験した条件下で互いに比較検討して調べる事を目的とした研究には適していない。この代わりになるものがガラクトース血症にともない発症する白内障である。アルドース還元酵素(AR)に関しては前述の糖尿病性のもと同じ発症背景(ポリオール浸透圧説)<sup>1)~3)</sup>をもち、ガラクトクトールと呼ばれる糖アルコールが蓄積するため白内障が起こる。本症は全身状態も悪化せず、白内障がほとんどばらつきなく短期間で発症するので、薬剤効果の判定には最もふさわしい白内障と考える。これが本実験でガラクトース白内障を選んだ理由である。

糖白内障成因に関するポリオール浸透圧説を裏づける最も大きな根拠は、前述の実験的糖尿病性白内障やガラクトース白内障などのラット糖白内障をアルドース還元酵素阻害剤(ARI)が抑制する事実<sup>4)~6)</sup>である。しかし、現在世界で開発されているどのARIでも実験的ラット白内障を100%完全に抑制する程強力ではない。ARIを投与しても程度の差はあれ白内障が出現する。それではARI効果の強弱によって発症する白内障自身に形態学的違いがあるのだろうか? この問いに答えることが本研究の目的としたところである。

ラット糖白内障に対するARI効果強弱判定の評価は、水晶体における代謝産物である糖アルコールの生化学的測定と形態学的検索の両面からなされるべきである。言うまでもなく前者は、定量的検索方法でありしかも糖白内障発症に関するポリオール浸透圧説の理論から考えても後者に先行する変化である。われわれの過去の実験でも、白内障の初期段階ではその値は、ARI濃度依存性でありしかも白内障の本質的病変である線維膨化出現とよく一致した。以上の長所と同時に次のふたつの欠点をもつ。蓄積された糖アルコールによって水分が吸引され続けると線維液化が著明となり、ある時点で、囊外へと漏出する。そのため値は急激に低下する<sup>7)</sup>。この漏出がいったん起こればそれ以後



後の水晶体内糖アルコール測定はまったく意味がなく、測定値比較はできない。もう一点は、漏出限界点以前で同じ値を示したとしても線維膨化部位も同じであるとは限らないことである。線維膨化部位はガラクトール量の絶対値に依存しているのではなく、ラットの生後週齢および増加速度に関係すると考える<sup>8)</sup>。これらの事から形態学的検索もあわせて必要であり、ラット糖白内障に対するARI効力判定の形態学的基準がつかられなければならないと考える。

ラット水晶体は、赤道部での上皮細胞の増殖、線維細胞への変換、線維としての成長と生涯絶え間なく成長し続けている。白内障はこのような環境の中で起こる線維崩壊であり連続的な線維再生つまり修復と拮抗して生じる現象と理解しなければならない。このためARIの白内障抑制効力の強弱によって線維膨化の発症する部位が変遷してくるのである。本実験での所見とわれわれが過去に行った実験結果<sup>4)~9)</sup>を照らし合わせ考えると、ARI効力の強弱によって生じる形態学的差異は大きく分けて5段階に分類できる(図7)。生後3週齢のラットに25%以上のガラクトース含有食餌を与えて生じる白内障は水晶体赤道部から前赤道部にかけての表層皮質に初発する。そして前皮質、しだいに後皮質に線維膨化・液化が進展し、最終的に正常線維の新生を見ることなく全白内障へと進む。(1)5段階分類のまず一番目はARI効力の最も弱い場合<sup>4)</sup>で、発症の日数は少し遅れるものの前述の非ARI投与群と本質的に同じ経過で線維膨化が生じるものである。この場合水晶体は最後には白濁し全白内障を呈する。(2)二番目は更に遅れて発症する場合で前皮質に初発する。つぎに後皮質が膨化しそれらに対応する線維群である赤道部深層皮質線維が膨化するにいたる。この時期になると、崩壊と修復のバランスで後者の方が強くなり液化領域は層間に閉じ込められた様に分布する。(3)三番目はtype(2)と同変化を示すが経過はさらに遅い。またこのtypeでは赤道部深層皮質線維に膨化は認められない。(4)四番目はもっとも遅く発症するつまりARI効力の極めて強い場合<sup>9)10)</sup>である。この場合における白内障線維膨化は赤道部、前皮質には全く認められず後囊下の皮質にのみ限局性におこる。(5)ARI効力の最も強い場合には水晶体線維に膨化は認められない。(2)(3)(4)および(5)は原則として核部分の白濁する全白内障は呈さない。以上の様に線維膨化が起こる部位の違いに基づき、in vivoにおけるARIの白内障抑制効果強弱を形態学的に分類できる。もっ

とも、ARI投与による白内障抑制実験後の白内障進展における時間的経過はラットの生後週齢により異なるものの、その形態学的進展経過は上記の分類が基本をなす。今回の研究で用いた高・低濃度FR群はそれぞれ白内障変化の軽微なtype(3)および(2)に分類され、高濃度ADN群は白内障変化のかなり強いtype(3)に、低濃度ADN群は進展経過はtype(2)であるが正常線維の新生を見ることなく(type(1))type(1)とtype(2)の中間型に分類される。今後出現するであろう新しいARIの効力をこの形態学分類によって判定し、強さをランクづけできるとわれわれは確信する。

最後に白内障が抑制される程度が異なれば、なぜ線維膨化発症部位が違うのかを考察する。Van Heyningen<sup>11)</sup>によって最初に発見されたこのAR-糖アルコール回路は、反応産物である糖アルコールによって平衡が保たれる反応でなく基質量とAR酵素活性にのみ左右される一方的反応である。本実験の基質つまりガラクトースは一定とみなすことができるので、AR酵素活性の差異によって発症部位が異なるものと推測される。ARIはAR酵素のどこかに結合し、糖を糖アルコールに還元出来ないようにしてしまう。つまり、当然の帰結としてARIの効力に応じてin vivoにおけるAR酵素活性が抑制されるのである。ARI効果が強ければ、糖アルコール蓄積は少なくゆるやかである。結局、疑問は糖アルコール蓄積が急激であるか緩徐であるかによってなぜ発症部位に差が出来るかと言うことになる。現時点ではこの理由については不明である。水晶体線維細胞の中での糖アルコール蓄積に偏りがあるのかもしくは膜の強度に違いがあるためかもしれない。今後研究されなければならない点である。

本論文の一部は第92回日本眼科学会にて発表した。

#### 文 献

- 1) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia. Invest Ophthalmol 4: 786-799, 1965.
- 2) Kinoshita JH: Mechanism initiating cataract formation. Invest Ophthalmol 13: 713-724, 1974.
- 3) Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, et al: Aldose reductase in diabetic complications. Metabolism 28: 462-469, 1979.
- 4) 田坂 宏, 中路 裕, 田村邦嘉他: アルドースリダクターゼ阻害剤, Eisai E-1008, ONO-2203のガラクトース白内障に対する効果. あたらしい眼科 2: 1283-1286, 1985.
- 5) 田坂 宏: アルドース還元酵素阻害剤(ARI)によ

- るラットガラクトース白内障抑制効果—組織学的・免疫組織化学的研究—。あたらしい眼科 3: 1761—1774, 1986.
- 6) 赤木好男, 秋宗万里, 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.
- 7) 赤木好男, 照林宏文, 池部均他: ラットガラクトース白内障の発症・進展について. 眼紀: 投稿中, 1989.
- 8) 赤木好男, 田坂宏, 田辺稔邦他: 幼若および成熟ラットガラクトース白内障発症様式. 眼紀 37: 803—808, 1986.
- 9) 赤木好男, 池部均, 高橋幸男他: Aldose reductase 阻害剤 (M-79175) の実験的長期糖尿病眼合併症に対する効果. 臨眼 40: 258—259, 1986.
- 10) 岡本庄之助, 照林宏文, 赤木好男他: アルドース還元酵素阻害剤と糖尿病性白内障. 1. ヒト糖尿病性白内障モデルの作成. あたらしい眼科 4: 1745—1747, 1987.
- 11) van Heyningen R: Formation of polyols by the lens of the rat with sugar cataract. Nature 184: 194, 1959.

(第92回日眼総会原著)