

ガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮障害 (図5)

池部 均・照林 宏文・赤木 好男 (京都府立医科大学眼科学教室)
 P.F. Kador*, J.H. Kinoshita* (*アメリカ国立衛生研究所)

要 約

ガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮の変化およびそれに対するアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) 投与の影響を形態学的に検討した。SD系ラットを10カ月間①50%ガラクトース食餌, ②0.004%ARI (Alcon 1576) 含有50%ガラクトース食餌, ③通常食餌の3種類の食餌で飼育した。各群の毛様体突起の連続切片を前頭断方向に作製し光顕的に観察するとともに, 個々の毛様体突起切片における毛様体無色素性上皮細胞層と色素性上皮細胞層との面積比を digitizer を用い測定した。その結果, 各群において毛様体突起の数に差はなく, また通常食餌群およびARI投与群では2層の上皮細胞は立方型を呈していた。一方ガラクトース食餌群では色素性細胞の形態に変化は認められなかったが無色素細胞は著名な円柱型を呈し面積測定でも明かな拡大を示した。ガラクトース血症ラットにおける毛様体無色素性上皮細胞の著明な肥大およびARI投与によるその完全抑制は, 毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づける所見と結論した。(日眼会誌 93: 758-762, 1989)

キーワード: ガラクトース血症ラット, 毛様体無色素性上皮細胞, アルドース還元酵素阻害剤, 組織学

Ciliary Body Changes Associate with Aldose Reductase in Galactosemic Rats

Hitoshi Ikebe, Hirofumi Terubayashi, Yoshio Akagi,
 P.F. Kador* and J.H. Kinoshita*

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

Abstract

Morphological changes of the ciliary body epithelium in rats fed a 50% galactose diet for 10 months with or without aldose reductase inhibitor (ARI) were investigated by both light microscopic observation and measurement of cell size. Aldose reductase was immunohistochemically observed to be present in non-pigmented epithelial cells of ciliary body and structural change (hypertrophy) was observed only in non-pigmented epithelial cells of galactosemic rats. In contrast, no hypertrophic changes were seen in rats fed with ARI. These results strongly suggest that aldose reductase is associated with hypertrophic change of non-pigmented epithelial cells of the ciliary body. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 758-762, 1989)

Key words: Galactosemic rat, Ciliary body, Non-pigmented epithelial cells, Aldose reductase inhibitor, Histology

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 池部 均
 (平成元年5月19日受付, 平成元年6月17日受理)

Reprint requests to: Hitoshi Ikebe, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto Pref. Univ. of Med.
 Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan
 (Received May 19, 1989 and accepted June 17, 1989)

I 緒 言

糖尿病性眼合併症として網膜症、白内障、角膜上皮・内皮障害などが臨床的によく知られている。実験的にもいずれの合併症もアルドース還元酵素(AR)を発生する起因酵素(ポリオール浸透圧説)^{1)~3)}とすることが証明され、さらにアルドース還元酵素阻害剤(ARI)投与による合併症抑制の事実はその説を支持する重要な根拠ともなっている^{4)~8)}。一方、血液-房水障および房水産生に重要な役割を果たすといわれる毛様体無色素性上皮細胞もARを有することが免疫組織化学的に確かめられている⁹⁾。つまり毛様体上皮細胞にも糖尿病性変化の存在することが強く示唆される。本研究の目的は、糖尿病の動物モデルとされるガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮の変化およびそれに対するARI投与の影響を形態学的に調べ、毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づけることである。

II 方 法

Sprague-Dawley系ラットを10カ月間以下の3種類の食餌で飼育した。つまり①50%ガラクトース食餌(ガラクトース食餌群)、②0.004%ARI(Alcon 1576)含有50%ガラクトース食餌(ARI投与群)、③通常食餌

(通常食餌群)である。各群につき2匹ずつのラットが本研究に用いられた。眼球は4% paraformaldehydeを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて1~2日固定された。固定中、虹彩を含む全周毛様体を取り出し、実体顕微鏡による観察・写真撮影を行った。所定の方法にてアルコール脱水しメタクリル樹脂(JB-4)に包埋した。ついで2 μ の連続切片を前頭断方向に毛様体扁平部から虹彩までの範囲で作製しトレイジン青染色後光学顕微鏡にて観察した。またすべての連続切片から各群約300個の毛様体突起を無作意的に選び、280倍の写真上で各突起の毛様体無色素性上皮細胞層(NPE)と色素性上皮細胞層(PE)との面積比(NPE/PE面積比)をdigitizer(GTCO digitizing tablet using the Vessel digitizing program for the IBM-PC)を用い測定した。測定に用いた毛様体突起は、その切片において2種類の毛様体上皮細胞と間質とが同時に観察できるものに限った。

通常食餌で飼育されたSD系ラット毛様体におけるAR局在を免疫組織化学的方法を用い調べた。眼球は4% paraformaldehydeを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて1~2日固定された。虹彩・毛様体を含む組織をトリミングした後、これを10~20%サッカロース含有同燐酸緩衝液に浸漬し約15 μ mの毛様体凍結切片を作成した。それらの切片に対し抗ラット水晶

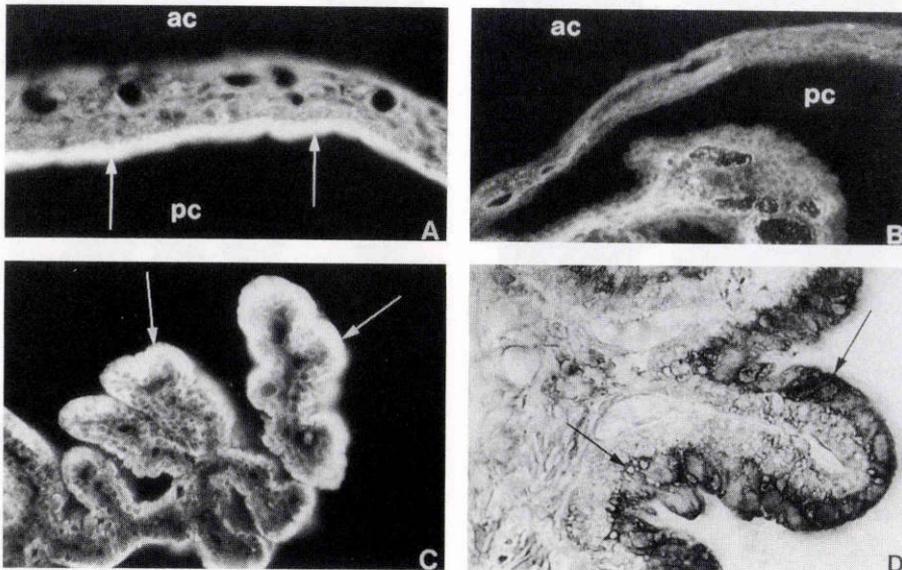


図1 対照(図1B)には特異反応は全く認められない。蛍光抗体間接法(図1C)およびPAP法(図1D)では毛様体無色素性上皮細胞だけにAR免疫陽性反応(矢印)が見られる。図1Aは虹彩におけるAR局在を示す。ac, pcは各々前房、後房を示す。

体 AR ヤギ血清 (P.F. Kador, NEI, NIH, USA 精製) を第一抗体とする peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法および蛍光抗体間接法にて染色を行った。対照としてあらかじめ吸収試験をした抗血清もしくはヤギ血清を第一抗体の代わりに用い特異反応のないことを確認した。

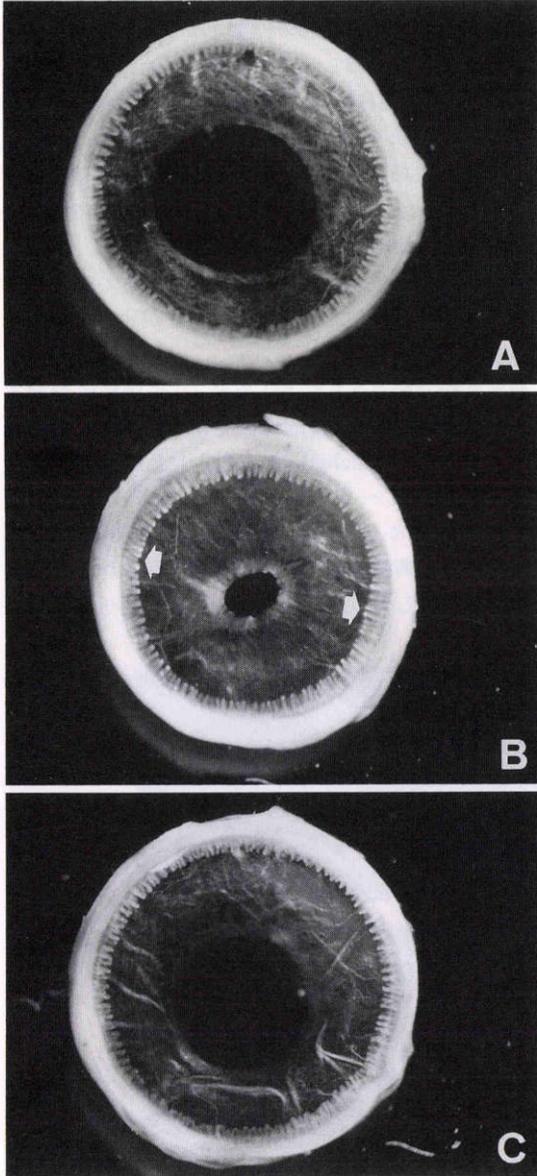


図2 ガラクトース食餌群(図2B)では毛様体突起先端部に銀白色調に輝く部位(矢印)が存在するが、通常食餌群(図2A)およびARI投与群(図2C)には見られない。各群において毛様体突起の数に差はない。

III 結 果

免疫組織化学(図1):対照(図1B)には特異反応は全く認められなかった。蛍光抗体間接法(図1C)およびPAP法(図1D)では毛様体無色素性上皮細胞だけに一致してAR免疫陽性反応が見られた。色素性上皮細胞には陽性反応は見られなかった。

実体顕微鏡による観察(図2):ガラクトース食餌群



図3 毛様体無色素性細胞は通常食餌群(図3A)およびARI投与群(図3C)では立方型を呈しているが、ガラクトース食餌群(図3B)では円柱型を呈し著明に拡大している。色素性細胞の形態は3群に差は認められない($\times 60$)

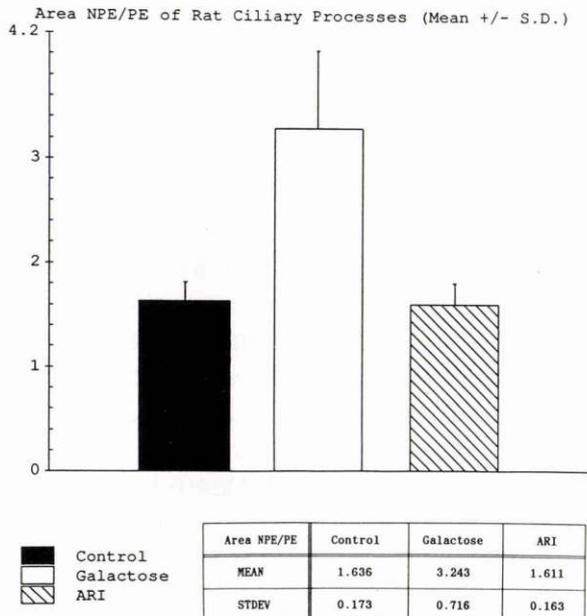


図4 Case 1のNPE/PE面積比測定結果

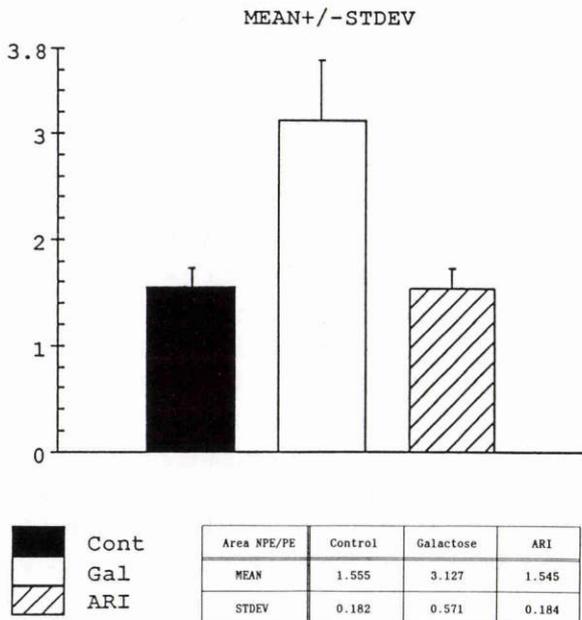


図5 Case 2のNPE/PE面積比測定結果

(図2B)ではほぼすべての毛様体突起先端部に銀白色調に輝く部位が存在したが、他の2群(図2A, C)には見られず毛様体突起は一般的な透明性を呈していた。また各群において毛様体突起の数に差はなかった。

光学顕微鏡による観察(図3):通常食餌群(図3A)およびARI投与群(図3C)では毛様体無・色素性細胞とも立方型を呈しそれらの核は細胞質の中央に位置する。ガラクトース食餌群(図3B)では無色素性細胞は円柱型を呈し著明に拡大していた。この変化による無色素細胞層の異常な厚みの増加が、他2群に比べガラクトース食餌群における個々の毛様体突起の増大を示す。またこの群でも色素性細胞は立方型を呈し、形状および大きさなどの点で他群のそれと大きな違いは認められなかった。

NPE/PE面積比測定:Case 1およびCase 2のNPE/PE面積比測定結果をそれぞれ図4, 図5に示した。いずれにおいても通常食餌群およびARI投与群には平均値・標準偏差値に差は認められない。一方ガラクトース食餌群におけるNPE/PE面積比の平均値は通常食餌群およびARI投与群のそれに比べ約2倍であった。

IV 考 察

糖尿病性網膜症, 白内障, 角膜上皮・内皮障害はい

ずれもアルドース還元酵素(AR)を起因酵素として発症する(ポリオール浸透圧説)^{1)~3)}ことが証明されている。これは網膜, 水晶体, 角膜上皮・内皮, どの組織においてもARの局在の確認される部位においてガラクトース負荷時だけに組織学的変化が出現・進展し, さらにそれらの合併症がアルドース還元酵素阻害剤(ARI)投与により抑制される^{4)~8)}事実により強く支持される。本研究では糖尿病における毛様体上皮障害の組織学的証明, すなわち毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づけることを目的とする。そのため糖尿病の動物モデルとされるガラクトース血症ラットを用い, ①毛様体上皮細胞におけるAR局在の免疫組織化学的手法による確認, ②AR局在の証明される組織に限局したガラクトース負荷に伴う組織学的変化の存在, ③この変化がARI投与により抑制されることを実証する必要がある。

まず毛様体無色素性上皮細胞層と色素性上皮細胞層との面積比測定について考察する。測定に影響をおよぼす因子として, いわゆる切片の斜め切れおよび面積比計算に際し色素性上皮細胞層の面積を分母につまり対照に選んだことが挙げられる。本研究では切片の斜め切れによる影響を排除するため, 連続切片を毛様体偏平部から虹彩までの全範囲で作製し, すべての連続切片から全く無作意的に計測されるべき毛様体突起の

切片を選び出した。さらに各群約300個と定量的組織学には充分なものと考えられる数の計測を行った。この方法を用い得られた極めて高い精度の測定結果は、切片の斜め切れによる測定値への影響が問題にならないものであることを示す。次に、すべての切片において観察したところ、ガラクトース食餌群における毛様体色素性上皮細胞層の面積が通常食餌群およびARI投与群におけるその面積より切片によりやや大きいことはあっても小さいということにはなかった。つまり3群の無色素性上皮細胞層の面積を比較する上で各々の色素性上皮細胞層の面積は対照として用いることができる。このNPE/PE面積比測定方法は十分にガラクトース食餌群における毛様体無色素性上皮細胞層の面積の拡大を証明し得たと考えられる。以上本方法により得られた高精度の面積比測定結果は本研究における毛様体無色素性上皮細胞の組織学的変化を正確に定量化したものであると結論する。

さて毛様体における免疫組織化学的AR局在はLudvigsonら⁹⁾により精巢から抽出・精製されたAR抗体を用いすでに報告されている。本研究ではラット水晶体由来のAR抗体を用い免疫組織化学的手法により同様の結果を得た。つまり毛様体上皮細胞層には無色素性上皮細胞にのみARの局在が認められ、色素性上皮細胞にはARの局在は認められないことを確認した。光学顕微鏡による観察では、ガラクトース食餌群において無色素性上皮細胞にのみ組織学的変化が見られた。通常食餌群では立方形であったこの細胞が円柱形を示した。ARI投与群における無色素性上皮細胞は通常食餌群と同様立方形を呈し組織学的変化は見られなかった。さらにこの変化はNPE/PE面積比測定によりガラクトース食餌群のみににおける無色素性上皮細胞の面積拡大であることがわかった。実体顕微鏡で見られたガラクトース食餌群の毛様体突起先端部の銀白色調に輝く部位は上記の組織学的変化に対応し光の透過性が妨げられているためと考えられる。ここで無色素性上皮細胞層の面積拡大が細胞個々の肥大を示すのか細胞増殖によるのかが問題になる。光顕的にこの細胞が明らかに円柱形を呈しさらに面積比測定結果を説明し得るほどの細胞のあるいは核の重なりが認められず、また3群の毛様体突起数に差のないことは無色素性上皮細胞層の面積拡大が無色素性上皮細胞個々の面積拡大つまり肥大を示すものと考えられる。このように今回の研究ではAR局在が唯一認められる無

色素性上皮細胞にのみガラクトース負荷に伴い組織学的変化(肥大)が生じ、その変化はARI投与により抑制されることが明かとなった。つまりガラクトース血症における毛様体無色素性上皮細胞の肥大を立証し、毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づけることができた。

最後にガラクトース血症ラットにおける毛様体無色素性上皮細胞の肥大の機序および意義について考察する。Kinoshitaによって提唱された糖白内障形成に関するPolyol-Osmotic説¹⁾⁻³⁾をAR局在の認められた毛様体無色素性上皮細胞にもあてはめることができる。実験的糖尿病やガラクトース血症においてARは活性化され糖をポリオールに還元する。ポリオールはすぐ他の物質に代謝されずまた細胞からも容易に漏出できない。よってポリオールは徐々に細胞内に蓄積され細胞内浸透圧は上昇する。その結果細胞内に水分は吸収され毛様体無色素性上皮細胞は膨化・肥大すると考えられる。このようにして形成された細胞の肥大により毛様体無色素性上皮細胞のもつ重要な機能がどのように障害されるのかは明かではない。今後の研究に期待されることである。

本論文の要旨は第93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 PF, et al: Aldose reductase in diabetic complications. *Metabolism* 28: 462-469, 1979.
- 4) 赤木好男, 照林宏文, 池部 均他: ガラクトース血症イヌと糖尿病性網膜症. 糖尿記録 印刷中, 1989.
- 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一組織学的・免疫組織化学的研究一. あたらしい眼科 3(12): 1761-1774, 1986.
- 6) 赤木好男, 池部 均, 照林宏文他: 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. 日眼会誌 93(4): 494-500, 1989.
- 7) 高橋幸男, 赤木好男, 秋宗万里他: 糖尿病性角膜上皮障害とAldose Reductase. 第2報. 実験的ガラクトース血症ラット角膜について. 日眼会誌 90(2): 336-340, 1986.
- 8) 茨木信博: 実験的糖尿病の角膜内皮損傷時の修復動態. あたらしい眼科 5(11): 1643-1650, 1988.
- 9) Ludvigson MA, Sorenson RL: Immunohistochemical localization of aldose reductase. II. Rat eye and kidney. *Diabetes* 29(6): 450-459, 1980.

(第93回日眼総会原著)