

新しいアルドース還元酵素阻害剤 (FR74366) のラット ガラクトース白内障に対する効果

辻 俊明*, 松本 康宏*, 森 和彦*, 池部 均*
照林 宏文*, 赤木 好男*, 谷本 剛**

*京都府立医科大学眼科学教室

**国立衛生試験所

要 約

新しいアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) である FR74366 (藤沢) のラットガラクトース白内障に対する濃度別 (0.025%, 0.075%) 抑制効果, およびいったん発症した白内障に対する治療効果を組織学的・生化学的に解析し, 以下の結論を得た. FR74366は白内障発症抑制効果・治療効果を有する. 両効果は薬剤濃度に依存し, 低濃度 FR74366 (0.025%) は作用が弱く効果にばらつきがみられたが, 高濃度 FR74366 (0.075%) は強力な効果を有した. (日眼会誌 94:120-127, 1990)

キーワード: アルドース還元酵素阻害剤, ガラクトース白内障, ラット

Preventional and Therapeutic Effects of Aldose Reductase Inhibitor FR74366 on Rat Galactose Cataract

Toshiaki Tsuji*, Yasuhiro Matsumoto*, Kazuhiko Mori*,
Hitoshi Ikebe*, Hirofumi Terubayashi*, Yoshio Akagi*
and Tsuyoshi Tanimoto**

*Department of Ophthalmology Kyoto Prefectural University of Medicine

**National Institute of Hygienic Sciences

Abstract

Preventional and reversal effects of a new aldose reductase inhibitor FR74366 on the rat galactose cataract were examined biochemically and light microscopically. A high concentration (0.075%) FR74366 showed sufficient effects both to prevent and reverse cataract, but low concentrations (0.025%) FR74366 was not effective as 0.075% FR74366. These results indicate that FR74366 can be useful drug for cataract. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94:120-127, 1990)

Key words: Aldose reductase inhibitor, Galactose cataract, Rat.

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 辻 俊明
(平成元年7月31日受付, 平成元年8月31日改訂受理)

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

(Received July 31, 1989 and accepted in revised from August 31, 1989)

I 緒 言

アルドース還元酵素 (AR) は、実験的糖白内障の起因酵素であることが証明されている¹⁾²⁾。またヒト糖尿病性白内障の発生にも AR が関与している可能性は高く^{3)~5)}、その治療薬として AR 阻害剤 (ARI) が注目されている。

われわれはいままでに、異なった構造式を持つ数種類の ARI のラットガラクトース白内障に対する影響を検討し、程度の差はあるもののいずれの ARI も白内障を抑制し治癒させることを報告してきた^{6)~13)}。最近、まったく新しい構造式をもつ ARI (FR74366, 藤沢) が開発された。本研究では、本薬剤のラットガラクトース白内障に対する抑制効果、およびいったん発症した白内障に対する治癒効果を組織学的・生化学的に解析し、有効性の検討をおこない、さらにそのメカニズムについても検索したのでここに報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

生後3週齢 (体重50g) のSD系ラットを以下の4群に分け飼育した。なお本実験で使用したARIはFR74366 [3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-7-chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinazolin-1-yl] acetic acid, 藤沢] である。

- 1) 25%ガラクトース食餌にて飼育した群 (ガラクトース群)。
- 2) 正常食で飼育した群 (正常食群)。
- 3) 0.075%ARI を混入した25%ガラクトース食餌で飼育した群 (高濃度ARI群)。
- 4) 0.025%ARI を混入した25%ガラクトース食餌で飼育した群 (低濃度ARI群)。

白内障抑制効果判定のためには、実験開始と同時に上記の4群に分けた (抑制効果判定実験)。治癒効果判定のためには、ラットを25%ガラクトース食餌で1週間飼育し白内障を形成せしめた後、上記の4群に分けた (治癒効果判定実験)。抑制効果判定実験は実験開始後5週まで、治癒効果判定実験は食餌変換後5週まで1週ごと各群のラットの眼球を摘出し、1眼の水晶体を組織学的観察に、他眼を生化学的ガラクトース量測定に使用した。

2. 生化学的測定

水晶体中ガラクトース量は、小野の方法¹⁴⁾、により液体ガスクロマトグラフィー法にて測定した。

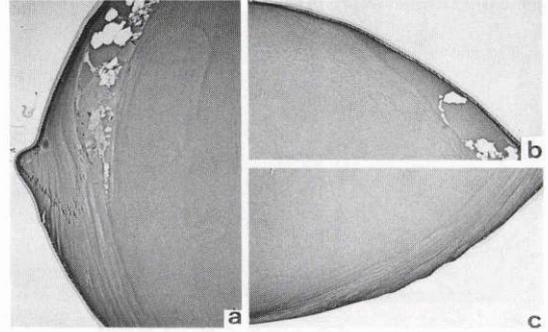


図1 抑制実験・ガラクトース群1週目の光顕像。水晶体線維の膨化と液化が赤道部 (a) から前皮質 (b) にかけて認められる。後皮質 (c) は正常。(トルイジン青染色, ×55)

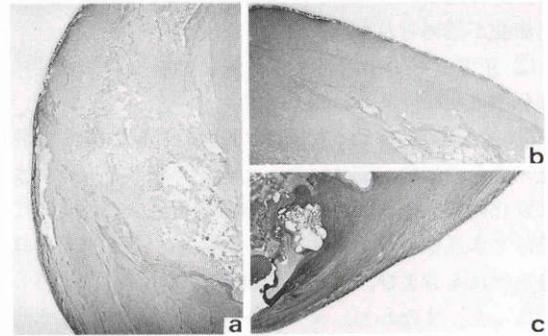


図2 抑制実験・ガラクトース群4週目の光顕像。水晶体線維には赤道部 (a)、前皮質 (b)、後皮質 (c) に著明な膨化、液化が認められる。(トルイジン青染色, ×55)

3. 組織学的観察

水晶体を4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M 燐酸緩衝液 (pH 7.4) にて1~2日間固定し、アルコール系列 (30~95%) にて脱水、メタクリル樹脂 (JB-4) に包埋し、1~2 μ に薄切後トルイジン青で染色し光学顕微鏡にて観察した。

III 結 果

1. 光顕的観察所見

1) 抑制効果判定実験

① ガラクトース群：1週目には、水晶体線維の膨化と液化が赤道部から前皮質にかけてみられ (図1)、2週目にはその膨化は後皮質にもおよんだ。3週目には赤道部、前皮質、後皮質の線維膨化・液化はさらに進

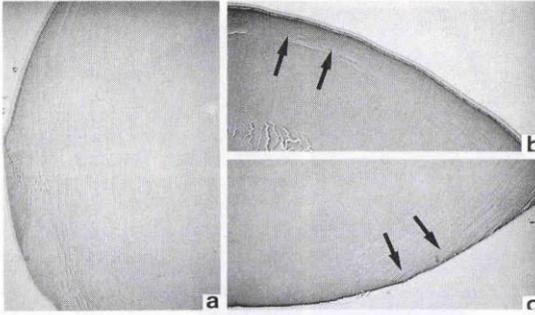


図3 抑制実験・低濃度ARI群5週目の光顕像。前皮質(b)および後皮質(c)に進行した線維膨化、液化が認められる。膨化、液化領域と前、後嚢との間には非膨化線維(矢印と前・後嚢との間にみられる)が介在している。(トルイジン青染色, ×55)

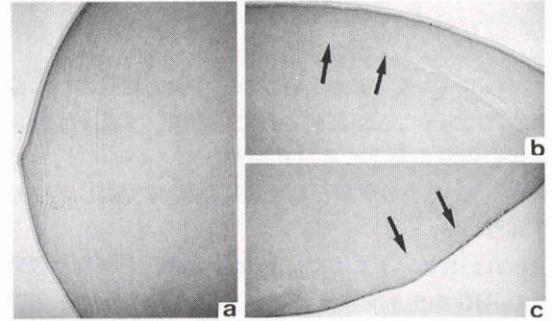


図4 抑制実験・高濃度ARI群5週目の光顕像。前皮質(b)と後皮質(c)に水晶体線維膨化が認められる。膨化領域と前、後嚢との間には非膨化線維(矢印と前・後嚢との間にみられる)が介在している。(トルイジン青染色, ×55)

行し、4週目以降には、全領域にわたって著明な膨化と液化が認められた(図2)。

② 正常食群：1週目から5週目まで水晶体線維に膨化や液化は認められなかった。

③ 低濃度ARI群：この群では、水晶体線維の膨化・液化の程度が個体によって若干の差があった。まず変化の強い個体では、1週目に赤道部から前皮質にかけて水晶体線維の膨化・液化がみられ、2週目には後皮質にもおよび、3週目以降それらの変化は進行していった。すなわち、ガラクトース群とくらべて水晶体線維の膨化・液化の程度は軽いものの同様の進行様式を示した。一方変化の弱い個体では、1週目に水晶体前皮質に線維膨化が現れ、2週目には後皮質にも同様の変化がみられた。1週目にみられた前皮質での水晶体線維の膨化領域は最表層つまり上皮細胞に接して存在していたが、2週目になると膨化領域と上皮細胞との間にわずかの非膨化線維(再生正常線維)がわりこむ様な形で認められた。3週間目以降週がたつにつれて、この非膨化線維の幅は広がっていった。また2週目において認められた後皮質での膨化領域も前皮質でみられたものと同じように、2週目では膨化領域は後嚢に接していたが、3週目になると後嚢との間に非膨化線維が介在するようになり、4週目以降この非膨化線維は幅をましていった(図3)。

④ 高濃度ARI群：食餌開始後1週及び2週目では、水晶体線維に膨化・液化はみられなかった。3週目には前嚢直下前皮質に局限した線維の膨化が認められ、4週目には後皮質にも線維膨化がみられた。この時期には前皮質での線維膨化領域と上皮細胞層との間

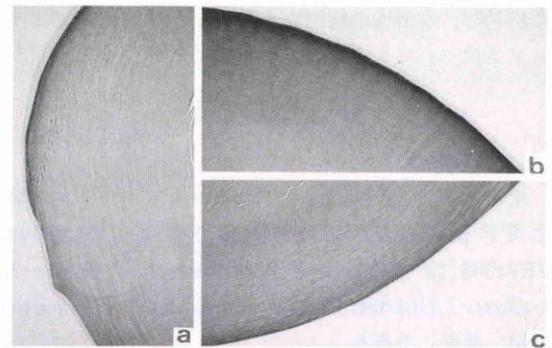


図5 治癒実験・正常食群変換5週目の光顕像。赤道部(a)、前皮質(b)、後皮質(c)とも非常に幅広い非膨化線維がみられ、線維膨化、液化領域はほとんど認められない。(トルイジン青染色, ×55)

に非膨化線維が介在するようになり、5週目にはこの非膨化線維の幅が広がっていった。また後皮質での水晶体線維の膨化領域は、4週目では後嚢に接していたが、5週目には深部に位置するようになり、後嚢との間には非膨化線維が存在していた(図4)。

2) 治癒効果判定実験

① ガラクトース群：この群の所見は抑制効果判定実験のガラクトース群と同様であった。

② 正常食群：食餌変換後1週目には、赤道部から前皮質表層にかけて非膨化再生線維がのびており、2週目にはこの線維は幅を増し後皮質表層にもおよんだ。3週目以後再生線維は赤道部・前皮質・後皮質とも幅を増し、それとともに線維膨化・液化領域はせまくなりかつ深層におしこめられていった(図5)。1週目か

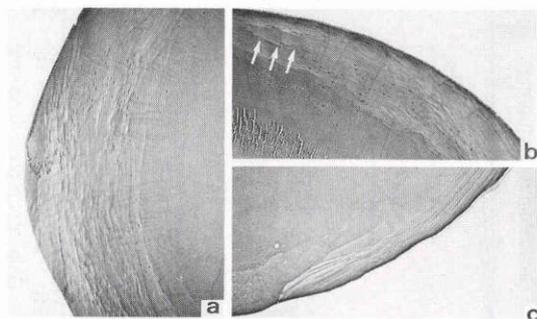


図6 治癒実験・低濃度ARI群変換5週目の光顕像。
 水晶体線維の膨化、液化の程度の弱いもの。赤道部(a)、前皮質(b)、後皮質(c)とも再生線維がみられる。赤道部の表層には非膨化線維が存在し、深層には水晶体線維膨化が認められる。前皮質の最表層には非膨化線維が認められ、その深層には膨化領域が島状に存在する。(矢印)。(トルイジン青染色、×55)

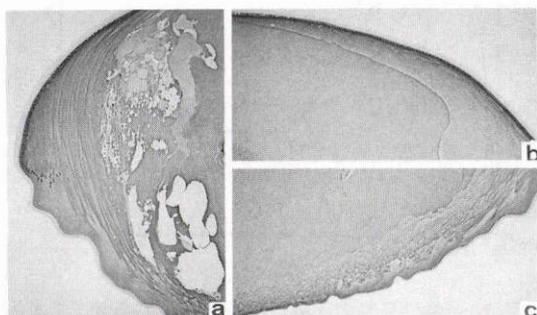


図7 治癒実験・低濃度ARI群変換5週目の光顕像。
 水晶体線維の膨化、液化の程度の強いもの。赤道部(a)にのみ非膨化線維が認められ、前皮質(b)、後皮質(c)には水晶体線維の膨化と液化がみられる。(トルイジン青染色、×55)

ら5週目までを通じて非膨化線維の幅は次に述べる高および低濃度ARI群より広く、膨化・液化領域はARI群よりせまかった。

③ 低濃度ARI群：抑制効果判定実験と同様、水晶体線維の膨化・液化の程度が個体によって若干の差があった。膨化・液化の程度の軽いものでは、食餌変換後2週目には赤道部から前皮質・後皮質の表層にむかって再生線維がのびており、3週目以降それは幅をまし、4週目には前皮質では前極にまでおよんだ。それとともに膨化・液化領域は深層部におしこめられていった。また2週目および3週目の前皮質表層部では

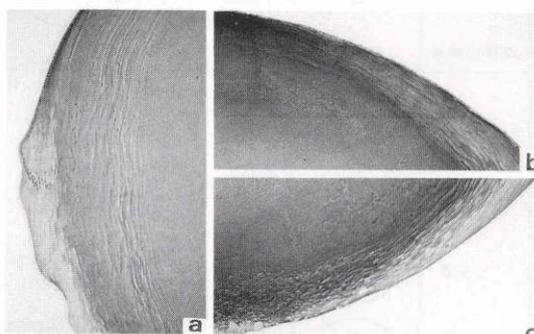


図8 治癒実験・高濃度ARI群変換5週目の光顕像。
 赤道部(a)、前皮質(b)、後皮質(c)とも幅広い再生線維がみられるが、前皮質と後皮質の表層部では再生線維に膨化が認められる。(トルイジン青染色、×55)

	抑制効果			
	25%G	高ARI	低ARI	
1週				
2週				
3週				
4週				
5週				

図9 抑制効果判定実験における組織学的変化のまとめ。斜線および点であらわした部分は線維膨化・液化を示す。図の低濃度ARI群の左側は水晶体線維の膨化・液化の程度の弱いもの、右側は程度の強いものを示す。

この再生線維にも膨化がみられ、5週目にはそのさらに表層に新たに非膨化線維があらわれ、再生線維の膨化領域は前皮質下に島状に認められた(図6)。一方、水晶体線維の膨化・液化の程度の強いものでは、1週目から5週目を通じ赤道部にのみ非膨化線維がみられ、前および後皮質には水晶体線維の膨化・液化が認められるのみであった。赤道部の非膨化線維は週数とともにその幅を増していった(図7)。

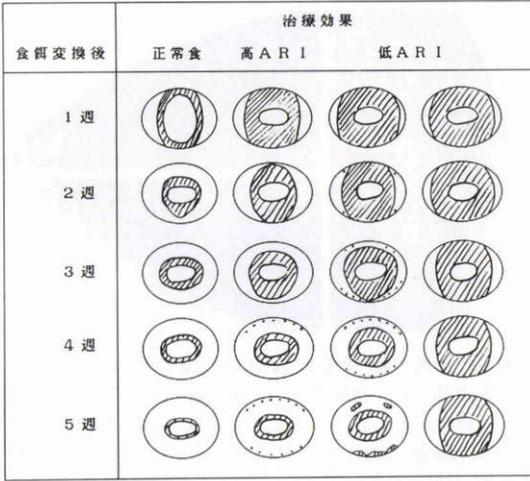


図10 治療効果判定実験における組織学的変化のまとめ。斜線および点であらわした部分は線維膨化・液化を示す。図の低濃度ARI群の左側は水晶体線維の膨化・液化の程度の弱いもの、右側は程度の強いものを示す。

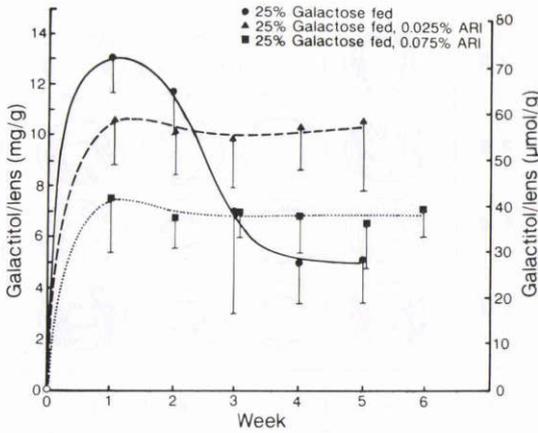


図11 抑制効果判定実験の水晶体あたりのガラクトール量

④ 高濃度ARI群：食餌変換後1週目では、赤道部のみ再生線維が存在したが、2週目になるとそれは後皮質表層にのびてゆき、3～4週目には前および後極におよんだ。4～5週目では前・後皮質の最表層部で再生線維にも膨化がみられた(図8)。

抑制・治療効果判定実験における経時的組織変化のまとめを各々図9・10に示す。

2. 生化学的測定結果

水晶体中のガラクトール量をレンズあたりとタン

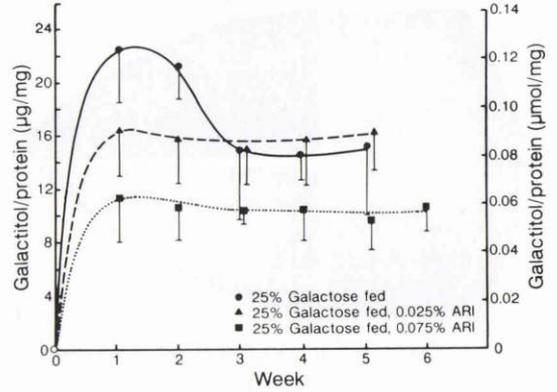


図12 抑制効果判定実験のタンパクあたりのガラクトール量。

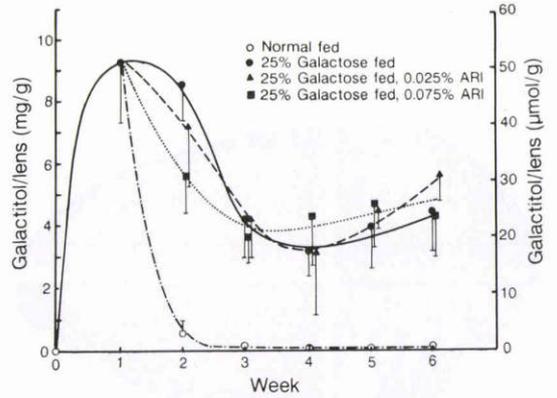


図13 治療効果判定実験の水晶体あたりのガラクトール量。グラフの1週目に食餌変換した。

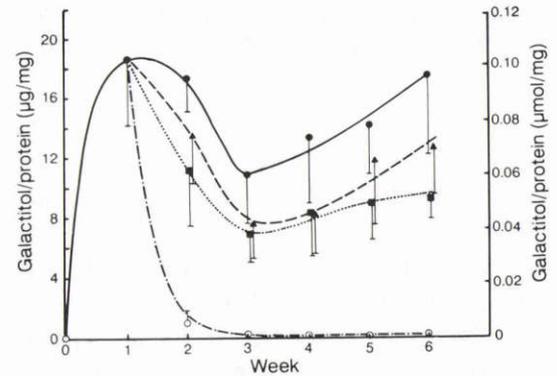


図14 治療効果判定実験のタンパクあたりのガラクトール量。グラフの1週目に食餌変換した。

バクあたりの量で示す。

1) 抑制効果判定実験

レンズあたりあるいはタンパクあたりのいずれもガラクトース群では1週目にガラクトール量は著明な増加を示し、以後急激に低下した。ARI群では1週目から5週目までを通じておおよそ一定の値を示し、低濃度ARI群では高濃度ARI群よりも高い値を示した(図11, 12)。

2) 治癒効果判定実験

レンズあたりでもタンパクあたりでもガラクトース群・ARI群とも食餌変換後1週目にはガラクトール量は急激に減少し、高濃度ARI群・低濃度ARI群・ガラクトース群の順に低値を示したが、3週目以降はいずれの群でもわずかに増加した。正常食群では、食餌変換後最もすみやかに減少し、2週目以降はほとんど0となった(図13, 14)。

IV 考 按

ラット糖白内障がアルドース還元酵素(AR)を起因酵素として発症するというポリオール浸透圧説は、多くの研究から明らかにされている¹¹⁾²⁾。このARの働きを阻害するARIは、ラット糖白内障の発症を抑制するばかりではなく、一旦発症した白内障を治癒させる効果も持っており、このことがポリオール浸透圧説を支える根拠ともなっている⁶⁾⁸⁾¹⁵⁾。ヒトでも糖尿病性白内障の成因にARが関与している可能性が示唆されており^{3)~5)}、糖尿病性白内障に対する新しい治療薬としてARIが注目されている。一方ガラクトース含有飼料投与により生じる実験的ガラクトース白内障は、ストレプトゾチン投与により生じる糖尿病性白内障とARに関していえば同じ発症機序で生ずると考えられる¹⁶⁾。しかもラットガラクトース白内障は糖尿病性白内障にくらべて短期間で発症し、個体差も少なくかつ全身状態もほとんど障害されない。これがガラクトース血症ラットが実験的糖尿病性眼合併症の最適動物モデルであると考えられる理由であり、本実験でもこれを用いたわけである。

われわれは、すでに数種のARIがガラクトース白内障発生を抑制し、かつ白内障を治癒する働きのあることを組織学的に明らかにしてきた^{6)~13)}。FR74366はいままでのARIとは異なる化学構造をもっているため¹⁷⁾、本白内障に対していかなる効果を有するのかわかることは極めて興味深い。そこで本実験ではFR74366の0.75%と0.025%の2種類の濃度薬剤を用

いて、ラットガラクトース白内障に対する抑制効果および治癒効果を検討した。白内障進行状態を判定するために、水晶体線維の膨化・液化を組織学的に検索し、またガラクトースの代謝産物であるガラクトールの量を生化学的に測定した。

まず抑制効果判定実験の組織像をみると、高濃度ARI群では3週目まで水晶体線維は正常であり、白内障形成が強く抑制されていることがわかる。低濃度ARI群では高濃度ARI群よりも早期に水晶体線維膨化が生じているが、白内障の強かったものでも対照群とくらべて程度は軽く、白内障形成は軽度抑制されているといえる。従ってFR74366の白内障抑制効果には濃度依存性があり、高濃度では強い効果を有するが、低濃度では作用は弱いということが明らかとなった。ここで、低濃度ARI群で組織所見にばらつきがみられた理由は、ガラクトース投与により白内障が形成される力と、ARIによりそれを阻止する力が拮抗しているため、各個体はいずれかの優位な力の方向にむかって進行してゆき、その結果ばらつきが多くなったと考えることもできる。またARI投与群にみられた前皮質及び後皮質の限局性線維膨化領域は、週数がたつにつれて中心側へ移ってゆくことが観察された。水晶体線維は赤道部で形成され、前・後皮質にのびてゆく。つまりARI投与によっても限局性の線維膨化は生ずるが、その後線維膨化が抑えられ、赤道部から前・後皮質に再生正常線維がのびてゆき、皮質の表層をおおい、その結果膨化領域が中心側へおしこめられたと思われる。

治癒効果判定実験をみると、正常食群およびARI群では赤道部での再生線維が増殖し、経時的に前および後皮質の表層にのびてゆき、液化領域とおきかわってゆくのが観察された。ARIの作用機序は赤道部における再生線維の新たな崩壊を抑制することであると考えられているので⁹⁾、本実験でも高濃度ARI群、低濃度ARI群では、この機序の結果赤道部から再生線維がのびてゆき、液化・膨化領域にとってかわり、白内障修復がなされたものと思われる。この再生線維の量は正常群、高濃度ARI群、低濃度ARI群の順に多かった。従ってここでもARIの白内障修復効果には濃度依存性が認められ、高濃度ARI投与は低濃度ARI投与よりも強い効果があることがわかった。また正常食変換は完全なAR抑制効果のあるARI投与と等価であると考えられ¹⁸⁾、本実験でも高濃度ARI群よりもすみやかに白内障修復が行われた。このことは、高濃度ARI

投与でも AR 抑制がまったく完全には行われていないことを示唆する。一方 ARI 投与群では前・後皮質表層の再生線維にも膨化がみられた。高濃度 ARI 群では変換後 4～5 週目に前・後皮質表層部に再生線維の膨化がみられた。ばらつきが多いため強い効果を有した低濃度 ARI 群では、変換後 2～3 週目に表層部に、その後皮質下に移ってゆく再生線維の膨化が観察された。つまり抑制効果判定実験で見られた白内障進展様式が、治癒効果判定実験における再生線維にも同様に認められたわけである。また今回と同様の実験によって得られた組織学的所見をもとに白内障抑制および治癒効果を比較すると、FR74366は Statil[®], E-1008¹⁰⁾¹²⁾とほとんど同程度の効果をもつと思われる。

つぎに水晶体ガラクトール量について考察する。抑制効果判定実験で、1 週目および 2 週目では、ガラクトール量はガラクトース群、低濃度 ARI 群、高濃度 ARI 群の順に高値を示した。この結果は形態学的観察にみられた水晶体線維の膨化・液化の多少を裏づけていると思われる。2 週目以降ガラクトース群でガラクトール量が急激に低下しているのは広範囲な線維液化の結果ガラクトールを含む水晶体物質の漏出がおこったためと推定されるが¹⁹⁾²⁰⁾、1 週目でも少々の漏出が生じている可能性がある。治癒効果判定実験の食餌変換後 1 週目では、正常食群・高濃度 ARI 群・低濃度 ARI 群の順にガラクトール量は低値を示した。この結果は、組織学的な白内障修復がこの順にすみやかにおこなわれているという事実を説明するものであるが、3 週目以降 ARI 群でわずかにガラクトール量が増加したのは、ARI 投与によってもガラクトール産生が完全には抑制できなかったことを示すものと思われる。

以上の結果より FR74366は Polyol-osmotic 説に基づいてラットガラクトース白内障を抑制し、かつ治癒することが明らかとなった。また白内障発生抑制効果および治癒効果とも濃度依存性がみられ、0.025%の低濃度では0.075%の高濃度よりその作用は弱く、効果も若干ばらつきが多いが、後者では強力な作用を有するといえる。

本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会にて報告した。

文 献

- 1) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia. Invest Ophthalmol 4: 786—799, 1965.
- 2) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. Invest Ophthalmol 13: 713—724, 1974.
- 3) Priore A, van Heyningen R: The effect of diabetes on the content of sorbitol, glucose, fructose and inositol in the human lens. Exp Eye Res 3: 124—131, 1964.
- 4) Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, et al: Localization of aldose reductase in the human eye. Diabetes 33: 562—566, 1984.
- 5) Akagi Y, Kador PF, Kinoshita JH: Immunohistochemical localization for aldose reductase in diabetic lenses. Invest Ophthalmol 28: 163—167, 1987.
- 6) 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.
- 7) 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-2235 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 田坂 宏, 中路 裕, 田村邦嘉, 他: Aldose reductase 阻害剤 (E-1008, ONO-2235) のガラクトース白内障に対する効果 (その 2). 臨眼 40: 260—261, 1986.
- 12) 宮本嘉久: アルドース還元酵素阻害剤 (ARI) 点眼のガラクトース白内障治療効果—点眼剤濃度差の比較検討—. あたらしい眼科 4: 1735—1744, 1987.
- 13) 横井則彦, 照林宏文, 岡本庄之助, 他: アルドース還元酵素阻害剤 ADN-138 のラットガラクトース白内障抑制効果. 組織学的・生化学的検討. あたらしい眼科 6: 444—448, 1989.
- 14) 小野英樹, 船橋正員, 早野三郎: ガスクロマトグラフ法による人白内障水晶体における遊離の糖および糖アルコールの分析. 日眼会誌 85: 1475—1478, 1981.
- 15) Tian-Sheng H, Datiles M, Kinoshita JH: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. Invest Ophthalmol 24: 640—644, 1983.
- 16) Kinoshita JH, Fukushi S, Kador PF, et al: Aldose reductase in diabetic complications.

Metabolism 28: 462-469, 1979.

- 17) 辻 俊明, 高橋幸男, 松本康宏, 他: 新しいアルドース還元酵素阻害剤 FK74366 (藤沢) の効果.
1. ラットガラクトース白内障予防効果, 眼紀, 印刷中.
- 18) 堤 元信, 田坂 宏, 赤木好男, 他: ラットガラクトース白内障 Diet reversal の組織学的研究. あたらしい眼科 4: 699-702, 1987.
- 19) Reddy VN, Schwass D, Chakrapani B, et al: Biochemical changes associated with the development and reversal of galactose cataracts. Exp Eye Res 23: 483-493, 1976.
- 20) Tian-Sheng H, Datiles M, Kinoshita JH: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 640-644, 1983.
-