

全伸展標本による水晶体上皮細胞増殖能の検討

—その1. 正常ラット水晶体の老齢化による変化—

照林 宏文, 辻 俊明, 茨木 信博, 森 和彦, 池部 均, 赤木 好男

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

幼若ラットから老齢ラットまでの水晶体上皮細胞の全伸展標本を作成し, ^3H -サイミジンオートラジオグラフィを組合わせ, DNA合成中の細胞をラベルしその分布を検索した. 生後1週目までは ^3H -サイミジンラベル細胞(ラベル細胞)は上皮細胞層にほぼ均一に分布し, 明らかな赤道部増殖帯の形成は見られなかった. 生後3週や7週齢になるとラベル細胞は主に増殖帯に分布し, 前囊下の上皮細胞層に見られるラベル細胞数は, 成熟とともに減少した. 生後24週齢の老齢ラットでは増殖帯に限局して観察され, ヒト成人水晶体に近似していると思われた. (日眼会誌 95:222-227, 1991)

キーワード: 水晶体上皮細胞, 全伸展標本, ^3H -サイミジンオートラジオグラフィ, 赤道部増殖帯, ラベル細胞

Changes of Cell Kinetics of Rat Lens Epithelial Cells with Aging

Hirofumi Terubayashi, Toshiaki Tsuji, Nobuhiro Ibaraki

Kazuhiko Mori, Hitoshi Ikebe and Yoshio Akagi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

Whole-mount preparations of developing rat lens epithelium were made and ^3H -thymidine autoradiography was performed on them. The distribution of ^3H -thymidine-labeled (DNA-synthesizing) epithelial cells was examined by the above combined methods. Labeled cells were evenly distributed in the epithelial cell layer (not the definitely germinal zone) until 1 week after birth. In 3- or 7-week-old rat lens, labeled cells were mainly distributed in the germinal zone, and the number of labeled cells localized in the anterior subcapsular epithelial cell layer decreased according to age of the rat. The 24-week-old rat showed localization of labeled cells at the germinal zone, which seemed to be similar to the human adult lens. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 222-227, 1991)

Key words: Lens epithelial cell, Whole-mount preparation, ^3H -thymidine autoradiography, Germinal zone, Labeled cell

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2年7月16日受付, 平成2年8月22日改訂受理)

Reprint requests to: Hirofumi Terubayashi, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received July 16, 1990 and accepted in revised form August 22, 1990)

I 緒 言

哺乳動物の水晶体上皮細胞は、生後においても絶えずDNA合成と細胞増殖を行い、その容積を増大させている。ラットにおいては生後3週齢や7週齢の成熟ラットでは、その場は主に赤道部増殖帯であることはよく知られているが、その他の部位についての知見は少ない¹⁾。さらに24週齢の老齢ラットや生後1週間以内の幼若ラットについての記載は見られない。これらの疑問点を明らかにすることが、今回の研究目的となる。

本研究では、³H-サイミジンオートラジオグラフィ法をラット水晶体上皮細胞の全伸展標本上に展開した。以前にも同様に伸展標本を用いた報告²⁾があるが、赤道部から他方の赤道部まで全体を見たものではない。さらに成熟ラットのみで調べられており、すべての成熟度のラットでの研究ではない。本研究において開発した方法は、生後3日目の幼若ラットから生後24週目の老齢ラットまでのすべての水晶体上皮細胞を比較的容易に採取でき、将来の白内障研究に非常に有用な方法である。

ラットにガラクトース含有食餌を与え生じるガラクトース白内障においては、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的に証明した³⁾。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⁴⁾⁻⁹⁾。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、増殖帯から前囊下にかけてのすべての水晶体上皮細胞の再生増殖能を検索することは、現時点では不可能だとしても、将来の白内障治療薬の開発、最も理想的な眼内レンズとしての水晶体上皮細胞移植という新しい手術法開発の面からも極めて重要だと思われる。

II 方 法

本実験には、幼若ラットから老齢ラットまでのSprague-Dawley系雄ラットを用いた。幼若ラットとしては、生後3日目(これ以前の幼若ラットでは技術的な問題があり実験できなかった)、7日目、3週齢のラットを、成熟ラットとしては生後7週齢ラットを、老齢ラットとしては生後24週齢ラットを、各々6匹づ

つ使用した。実験は、エーテル麻酔下にすべてのラットの両眼球の前房中に5 μ lのmethyl-³H-thymidine(81.7Ci/mmol, New England Nuclear)を1回注入し、次いで2時間後に両眼球を摘出した。摘出眼球は前眼部のみを利用し、水晶体後囊側より切開して水晶体上皮細胞層と被膜のみを一塊として取り出し、全伸展標本を作成した。標本は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、標本の被膜を下に上皮細胞を上にして、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)、現像・定着、トリ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記録した。

カラー画像解析装置Spicca IIを用い、一定面積54.169 $\times 10^{-3}$ mm²のスケールを一方の赤道部末端から他方の赤道部末端まで水平移動させ、この一定面積当たりの全細胞数と全ラベル細胞数とをカウントした。各々の群において少なくとも、3つの異なる水晶体全伸展標本において、少なくとも6カ所の部位において検索した。全ラベル細胞数、細胞密度(全細胞数/一定面積)を各々計測しその平均値を求め縦軸とし、横軸を赤道部末端からの距離として、グラフで表現した。

III 結 果

1. 幼若ラット群

ラベル細胞は標本の最末端より少し中央部よりに集

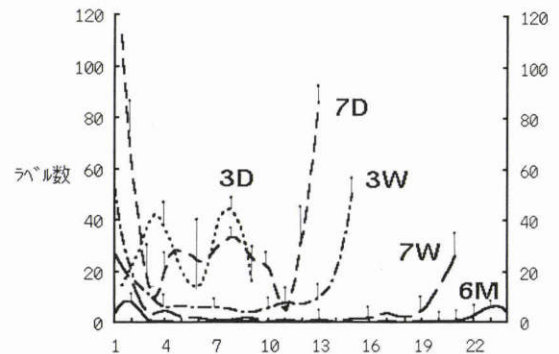


図1 生後3日目から24週目までのラット水晶体上皮細胞層内のラベル細胞数の総数を示すグラフ。縦軸はラベル細胞数を、横軸は一方の赤道部から他方の赤道部までの水晶体上皮細胞層での部位を示し、水晶体の直径に相当する。バーは標準偏差を示し、n=6である。3D:生後3日目, 7D:生後7日目, 3W:生後3週齢, 7W:生後7週齢, 6M:生後6カ月。

積しており、この部分が赤道部増殖帯に相当すると思われた。しかし、生後3日目では、このラベル細胞の集積がやや中央部よりであり、しかもなだらかなピーク

を示し、増殖帯形成が不十分であると判断できた(図1)。生後7日目になると、赤道部の末端近くにラベル細胞の集積が見られ、増殖帯形成の完成が想像できた

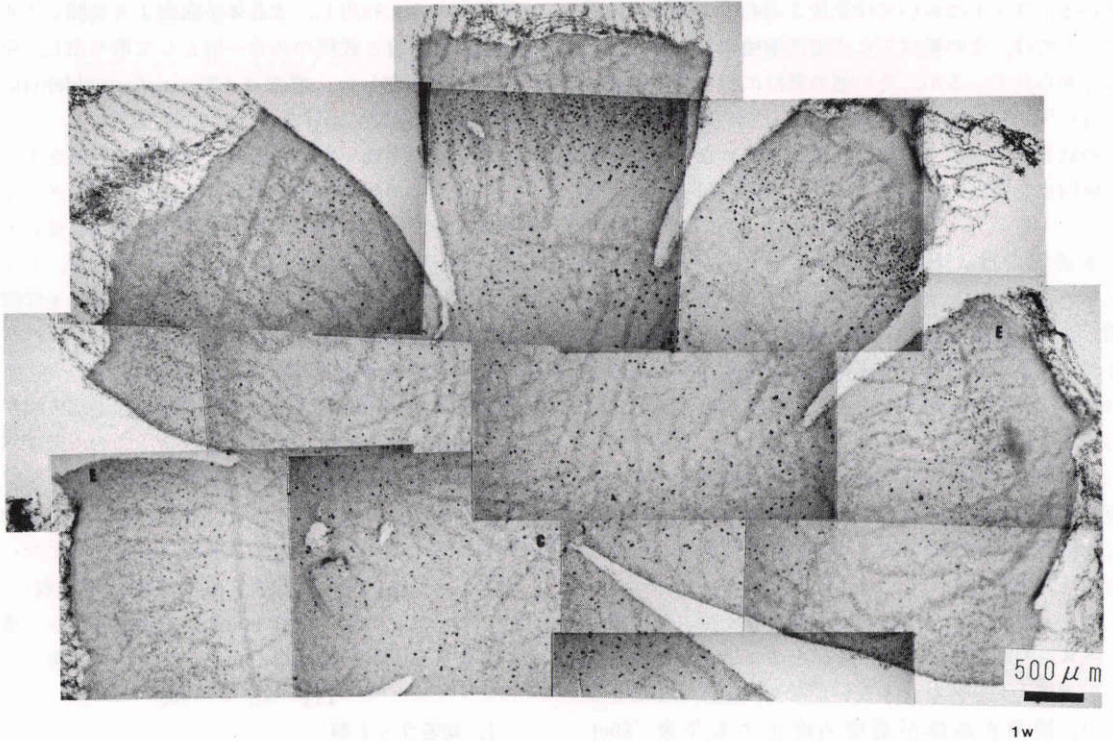


図2 生後7日目ラット水晶体全伸展標本におけるラベル細胞(核が黒くラベルされている)の局在。増殖帯の形成が見られる。トルイジン青染色。C:水晶体中央部, E:水晶体赤道部。

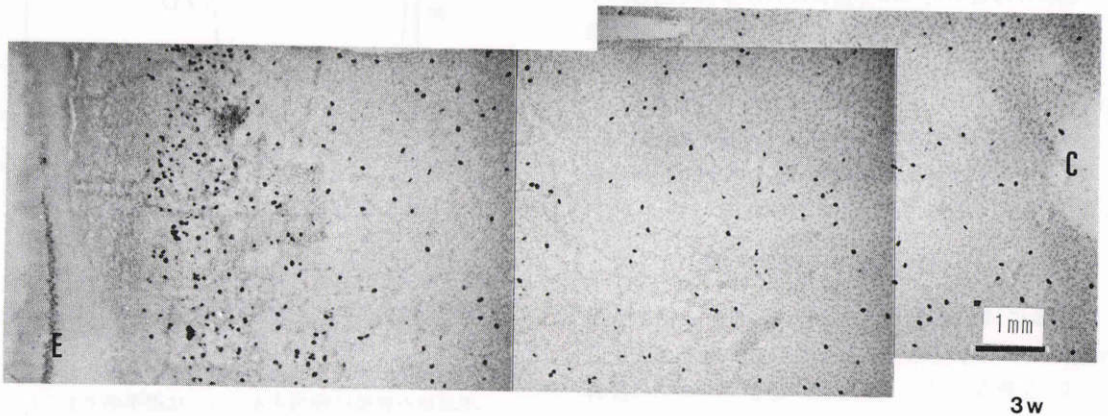


図3 生後3週齢ラット水晶体全伸展標本におけるラベル細胞(核が黒くラベルされている)の局在。水晶体中央部にもかなりのラベル細胞が観察される。トルイジン青染色。C:水晶体中央部, E:水晶体赤道部。

(図2), 前囊下上皮細胞層内(中央帯)でのラベル細胞は成熟につれ減少した。つまり, 生後3週目では, 明確な増殖帯形成と前囊下中央帯での増殖の減少が観察できた(図3)。生後7日目に比べ, ラベル細胞総数も少なかった。全上皮細胞数は生後3週目において測定したが, 中央部での細胞数が最も小さく, 赤道部増殖帯に向かうほど細胞密度は増加する傾向があった(図4)。

2. 成熟ラット(生後7週齢)

生後3週齢ラットと同様の結果であるが, 増殖帯な

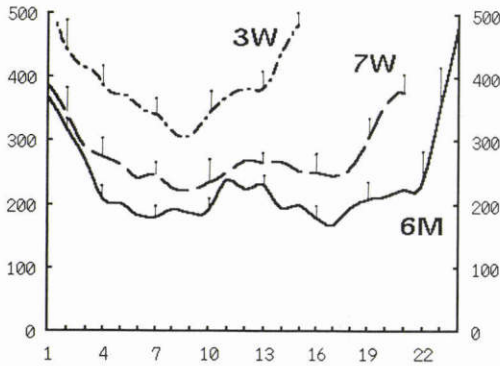


図4 生後3, 7, 24週齢ラット水晶体上皮細胞の一定面積 $54.169 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ 当たりの総数。縦軸は上皮細胞数を, 横軸は一方の赤道部から他方の赤道部までの水晶体上皮細胞層での部位を示し, 水晶体の直径に相当する。増殖帯付近の細胞数が最も多く, 中央部の前囊下での細胞数が少ない傾向は共通した特徴である。老化につれ細胞数は減少する。パーは標準偏差を示し, $n=6$ である。3W: 生後3週齢, 7W: 生後7週齢, 6M: 生後6カ月。

らびに前囊下中央帯でのラベル細胞数は, 約1/2であった(図1)。さらに, 細胞密度も生後3週齢ラットと比べると, 低値であったが, 全細胞数の分布曲線〔赤道部増殖帯において細胞密度が最も高く, 前囊下中央帯では低い細胞密度〕はよく似ていた(図4)。

3. 老齢ラット(生後24週齢)

ラベル細胞総数の著明な減少が見られた(図5)。増殖帯でのラベル細胞は, 生後6週齢に比べ約1/3にまで減少していた(図1)。全上皮細胞数(細胞密度)においては, 生後7週齢ラットに比べ減少していた。その分布曲線では, 前囊下での減少が認められた(図4)。

IV 考 按

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, 光顕用切片上での ^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¹⁰⁻¹³。同様の方法を用いた以前の我々の結果¹⁴でも, 生後3週齢(体重50g)と生後6週齢(体重200g)ラット水晶体では, 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, 中央帯増殖の存在は確認できなかった。しかし, Hardingら²⁾の水晶体上皮細胞層の全伸展標本にての観察結果では, 中央部前囊下にもラベル細胞を認めている。彼らの報告では, 全伸展標本作成方法や ^3H サイミジン混入培養液中に水晶体を浸すという点などで, 今回の我々の方法と異なる点はあるものの, 今回の全伸展標本を用いた方法による生後3週齢でもかなりの中央帯増殖を前囊下上皮細胞層に認めた結果と, ほぼ一致していた。従って, ラベル細胞の有無を論じるためには, 水

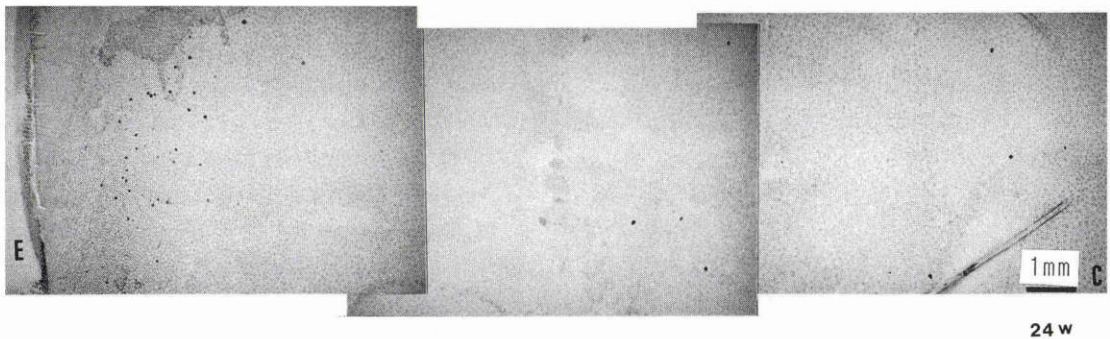


図5 生後24週齢ラット水晶体全伸展標本におけるラベル細胞(核が黒くラベルされている)の局在。中央部にはほとんどラベル細胞は見られない。トルイジン青染色。C: 水晶体中央部, E: 水晶体赤道部。

晶体上皮細胞層全伸展標本において検索することが重要であると考えられる。

ところが、顕微鏡切片上での³Hサイミジンオートラジオグラフィ法において、出生直後の幼若ラット水晶体では、赤道部増殖帯を含む前囊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¹⁰⁾¹¹⁾。たとえばHannaによると¹⁰⁾、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合成は増殖帯と前囊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切片上で確認している(未発表)。さらに、今回の全伸展標本を用いた結果では、さかんな中央帯での増殖を生後3日目の幼若ラット水晶体において観察できた。生後0日目水晶体においても、同様の実験を行ったが技術的に無理であった。さらに成熟した生後3、7、24週目のラットにおいても、その総数は減少するものの、前囊下水晶体上皮細胞層中央帯増殖を確認した。ただし、生後24週目の老齢ラット水晶体では、その増殖は非常に稀であると思われ、ヒト水晶体に近似していると思像できた。すべての水晶体上皮細胞が出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、老齢化した状態では、増殖帯にのみ存在する上皮細胞が一生涯保有すると思われる。

水晶体上皮細胞層全伸展標本上において³Hサイミジンオートラジオグラフィを展開し、その増殖能を検索した論文は前記のごとくHardingら²⁾によるものが、最初であり、正常状態のラット、家兎、カエル水晶体において報告している。ラット水晶体正常発達過程について、この方法を用いた報告は今回が最初であると思われる。

ラットガラクトース白内障発症過程における水晶体上皮細胞増殖能を、切片上で³Hサイミジンオートラジオグラフィを行い報告した論文が過去にある。すなわち、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¹³⁾。この報告では、70%ガラクトース食餌開始後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、記述されている。同様の実験を我々も行い報告^{14)~16)}しているが、我々の結果では、赤道部

増殖帯ならびに前囊下上皮細胞層(中央帯)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4日目でやや早期であった。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、その主原因と考えられた。ラットでは、ガラクトース白内障作成により増殖帯以外の部位の上皮細胞は、幼若な時代に有する増殖能を思い出すことが想像できる。

ラット水晶体全伸展標本においてその水晶体上皮細胞有糸核分裂像を観察した報告が過去にある。たとえば、三木¹⁷⁾は、赤道部での有糸核分裂像の局在とその総数の季節による変動(夏>秋>冬>春)、ならびにエビネフリン、ブレドニブロン静注による減少を報告した。Cotlier¹⁸⁾は、生後7週、16週、1年のラットを比べ老化による有糸核分裂像の減少を認めている。しかし、水晶体上皮細胞層での局在についてはほとんど記載されていない。本論文がその最初のものであると思われる。

ラットガラクトース白内障についても有糸核分裂数の増減が報告されている。Cotlier²⁰⁾によると、30%ガラクトース食餌負荷後4日目に有糸核分裂数は1.5倍と最高になり、7日目には逆に正常以下に低下することが判明している。この結果は我々の結果^{14)~16)}と一致するものであり、非常に興味ある。Grimesとvon Sallmannの報告¹⁹⁾でも50%ガラクトース食餌を与え、全く同じ結論を得ており、ガラクトース食餌負荷後4日目のピークという事実の重要性が増強している。さらに、視床下部切除ラットではガラクトース白内障はより早く進行し、有糸核分裂数も増加することが、Cotlier²⁰⁾によって報告された。GonaとGorelli²¹⁾は脳下垂体前ホルモンであるプロラクチン投与により、ガラクトース白内障によって誘発される有糸核分裂数増加傾向の若干の減弱が認められた事を報告した。

ガラクトース食餌濃度に関係のない食餌開始後4日目のラベル細胞数ピークと、7日目から14日目にかけての著明な減少^{14)~16)}の理由を探るための第1歩として、今回正常ラット水晶体の老齢化によるラベル細胞数の変化を検索したわけであるが、今後ともその実態の究明が将来の大きな課題である。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会(平成2年、岡山)にて発表した。

なお本研究は、文部省科学研究費補助金(01440074)の補助を受けた。

文 献

- 1) 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 Vis Sci* 5: 560-567, 1966.
- 2) Harding CV, Hughes WL, Bond VP, et al: Autoradiographic localization of tritiated thymidine in whole-mount preparations of lens epithelium. *Arch Ophthalmol* 63: 58-65, 1960.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 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) Hanna C, O'Brien JE: Cell production and migration in the epithelial layer of the lens. *Arch Ophthalmol* 66: 103-107, 1961.
- 11) Mikulicich AG, Young RW: Cell proliferation and displacement in the lens epithelium of young rats injected with tritiated thymidine. *Invest Ophthalmol* 2: 344-354, 1963.
- 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. *Arch Ophthalmol* 64: 708-711, 1960.
- 14) 照林宏文, 赤木好男, Kador PF, 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.
- 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 40: 1820-1824, 1989.
- 16) 照林宏文, 辻 俊明, 松本康宏, 他: 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剤. 日眼会誌 93: 1044-1053, 1989.
- 17) 三木敏夫: 水晶体上皮細胞の有糸核分裂の年齢, 季節, 及び副腎ホルモンによる変動. 日眼会誌 65: 2207-2224, 1961.
- 18) Cotlier E: The mitotic cycle of the lens epithelium. *Arch Ophthalmol* 68: 801-809, 1962.
- 19) Grimes P, von Sallmann L: Lens epithelium proliferation in sugar cataracts. *Invest Ophthalmol* 7: 535-543, 1968.
- 20) Cotlier E: Hypophysectomy effect on lens epithelium mitosis and galactose cataract development in rats. *Arch Ophthalmol* 67: 116-122, 1961.
- 21) Gona O, Gorelli L: Mitosis in the lens epithelium of the galactose-fed rat after prolactin treatment. *Curr Eye Res* 4: 59-63, 1985.