

γ-グルタミルシステイニルエチルエステル (γ-GCE) の 点眼によるラット実験的糖尿病性白内障の発症に 対する抑制効果

服部 博之*, 馬嶋 慶直*, 深見 洋己*, 鳥居 久稔*
長村 洋一**, 石黒伊三雄***, 太田 好次***

*藤田学園保健衛生大学医学部眼科学教室, **同 衛生学部臨床化学, ***同 医学部生化学

要 約

還元型グルタチオン (GSH) の前駆物質となりうる γ-グルタミルシステイニルエチルエステル (γ-GCE) の水溶液とリポソーム溶液の点眼によるストレプトゾトシン糖尿病ラットの白内障発症抑制効果について調べた。白内障の発症は、γ-GCE の水溶液やリポソーム溶液の点眼で有意に抑制された。その抑制効果は、リポソーム溶液の方が水溶液よりも強かった。また、糖尿病ラットで γ-GCE の水溶液やリポソーム溶液の点眼によって白内障の発症が認められなかった水晶体の GSH 量は、ほぼ正常レベルに保たれていた。以上の結果より、γ-GCE の水溶液やリポソーム溶液の点眼はラット糖尿病性白内障の発症を抑制し、その作用は水溶液よりもリポソーム溶液の方が強いことが明らかとなった。また、この γ-GCE の糖尿病性白内障抑制効果は、その点眼によって水晶体 GSH 量の減少が抑制されたことと関連性のあることが示唆された。(日眼会誌 95: 228-234, 1991)

キーワード: γ-グルタミルシステイニルエチルエステル (γ-GCE), ストレプトゾトシン (STZ), 糖尿病, 白内障, 還元型グルタチオン (GSH)

The Inhibitory Effect of γ-Glutamylcysteinylethyl Ester (γ-GCE) Instillation on Experimental Diabetic Cataract Formation in Rats

Hiroyuki Hattori*, Yoshinao Majima*, Hiroki Fukami*, Hisatoshi Torii*

Youichi Nagamura**, Isao Ishiguro*** and Yoshiji Ohta***

Department of Ophthalmology*, Department of Biochemistry***, Fujita Health University School of Medicine,
Department of Clinical Chemistry**, Fujita Health University School of Hygiene

Abstract

The effect of the instillation of γ-glutamylcysteinylethyl ester (γ-GCE), which has been reported to function as a precursor of glutathione, on cataract formation was examined in rats in which diabetes had been induced by Streptozotocin (STZ). Three days after i.p. treatment with 50mg/kg body weight of STZ, male Wistar rats aged 6 weeks received instillations of γ-GCE in solution or liposomes prepared with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) for a period of 9 weeks. Cataract formation

別刷請求先: 401-11 豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田学園保健衛生大学医学部眼科学教室 服部 博之
(平成元年12月7日受付, 平成2年8月10日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroyuki Hattori, M.D. Fujita-Gakuen University School of Medicine,
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake 470-11, Japan

(Received December 7, 1989 and accepted in revised form August 10, 1990)

and development were observed by use of a cataract camera every week. After 9 weeks' observation, the lenses were enucleated and the content of the lens GSH was measured. Instillation of γ -GCE in solution or liposomes to STZ-diabetic rats not only inhibited cataract formation but also kept lens GSH level almost at the control level. In addition, the inhibitory effect of the instillation of γ -GCE in liposome was stronger than that of γ -GCE in solution. The present results indicate that the administration of γ -GCE in solution or in liposomes inhibits diabetic cataract formation, possibly by preventing lens GSH depletion. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 228-234, 1991)

Key words : γ -Glutamylcysteinylethyl ester (γ -GCE), Streptozotocin (STZ), Diabetes, Cataract, Reduced glutathione (GSH)

I 緒 言

白内障眼における還元型グルタチオン (GSH) の減少はヒト及び各種の実験動物において古くから報告されている¹⁾。また GSH は白内障の発生に密接な関わりを有することが示唆されている²⁾ので、水晶体内の GSH の減少を抑制したり、それを水晶体内に供給することは、白内障を治療する上で効果が期待できると考えられる。

既に、GSH は点眼製剤として臨床に用いられており、その白内障進行および角膜疾患に関する効果は評価されている³⁾。しかし、GSH は細胞膜透過性が低いので、その膜透過性を高め、組織移行性を良くすることができれば、さらに治療効果を上げることができると思われる。

今回、我々は良好な膜透過性を有し、GSH の前駆物質となりうる γ -glutamylcysteinylethyl ester (γ -GCE) を、その水溶液ならびに dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を用いてリポソーム体とした、 γ -GCE 含有リポソーム溶液をストレプトゾトシン (STZ) 投与で惹起した実験的糖尿病のラットに点眼投与し、それらの点眼による白内障発症抑制効果について調べた。

II 実験材料および方法

1. 試薬

STZ は Sigma 社製を、DPPC は日本油脂社製を、また γ -GCE は帝人の藤井克彦博士によって合成され、提供されたものを用いた。その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた。

2. 実験動物と糖尿病の作製

実験には 6 週齢、体重約 180g の雄性 Wistar 系ラットを用いた。糖尿病は 50mg/kg のストレプトゾトシン

(STZ) を 0.1M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解し、1 夜絶食させたラットに腹腔内注射して惹起した。また、非糖尿病群には同量のクエン酸緩衝液を投与した。

3. 実験群と γ -GCE の点眼方法

実験群は非糖尿病群と糖尿病群からなり、その糖尿病群は更に生理食塩水のみを点眼投与した STZ 群、DPPC のリポソームのみを点眼した STZ+DPPC 群、 γ -GCE 水溶液を点眼した STZ+ γ -GCE 群、そして、 γ -GCE の DPPC リポソーム溶液を点眼した STZ+ γ -GCE 含有 DPPC 群に分けた。点眼投与は尿糖を確認した STZ 投与後 3 日目より開始し、それぞれの溶液を 1 回に 10 μ l ずつ 1 日 3 回、60 日間行った。その際、点眼に用いた γ -GCE 溶液の濃度は約 2.8mg/ml であった。

4. 白内障の観察方法

白内障の観察は STZ を投与した 3 週間目より細隙灯顕微鏡を用いて毎週行い、NEITZ 社製 cataract camera CTR-2000 にて撮影した。水晶体の混濁度は図 1 に示す 4 群の grade に分類し、その score で評価した。即ち、水晶体混濁度の判定は、図 1 に示すように grade 0 はまったく混濁の認めないものとし、grade 1 は皮質に軽度の混濁を認めるもの、grade 3 を皮質全体にわたる混濁およびそれ以上の浸濁を認めるものとし、その中間のものはすべて grade 2 とした。そして、それぞれを score として表し、その点数で評価した。

5. γ -GCE 含有リポソームの調製方法

Grade	Score	
0	0	まったく混濁を認めないもの
I	1	皮質に軽度の混濁を認めるもの
II	2	Grade I と III の間のもの
III	3	皮質全体にわたる混濁を認める以上のもの

図 1 水晶体混濁度の判定法

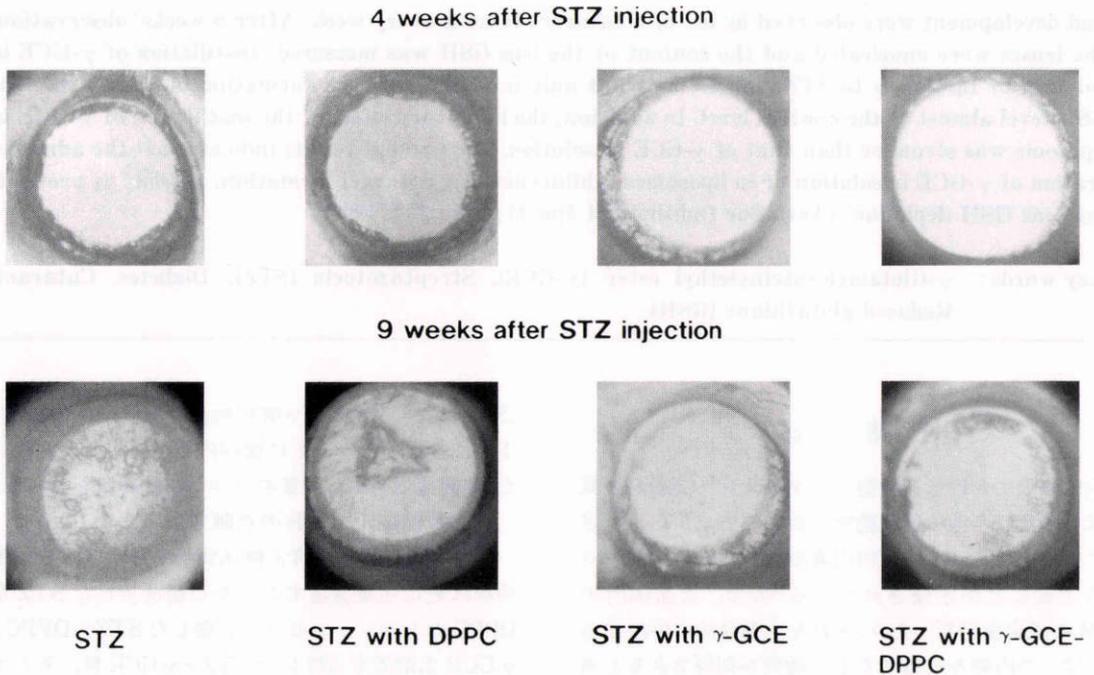


図2 STZ投与後4週目と9週目における各点眼投与群の水晶体の混濁状態

γ -GCE含有リポソームは γ -GCEをHank's balanced salt solutionに溶解後、 γ -GCEと同量のDPPCを加え超音波処理を行い、最終的にsmall unilamella vesiclesの形にして調製した。その調製液は透明な γ -GCE溶液と異なり、一様な懸濁液であった。

6. 水晶体GSHの測定方法

60日間の白内障観察の後に得られたカプセルを除去していない水晶体のGSH量は既報のDTNB法⁴⁾にて測定した。

III 結 果

1. 白内障の発症と進行

糖尿病群における白内障の発症はSTZ投与後4週目より認められ、4週目ではその群の一部にgrade 1の皮質混濁が現われ、5週目では全例に白内障が認められた。STZ+DPPC群においても白内障の発症は糖尿病群と同様に、STZ投与後4週目でその群の一部に軽度の皮質混濁が見られ、5週目では全例に白内障が認められた。一方、STZ+ γ -GCE群においては、STZ投与後6週目においてその61%に、9週目においてその75%に白内障の発症が認められた。STZ+ γ -GCE含有DPPC群では白内障の発症はSTZ投与後4週目で

は全く認められず、6週目でその25%に、また9週目でその50%にのみ白内障の発症が認められた。即ち、これら4群のSTZ投与後4週目と9週目の水晶体の混濁の状態は図2に示したようであった。

白内障の進行の経過を水晶体混濁度のscoreで表わすと図3に示すように、糖尿病群ではscoreはSTZ投与後7週目で約2、9週目で約3であった。また、白内障の進行はSTZ+DPPC群と糖尿病群との間で有意差は認められなかった。STZ+ γ -GCEおよびSTZ+ γ -GCE含有DPPC群においては、白内障の進行はSTZ+ γ -GCE群ではSTZ投与後8週目に、また、STZ+ γ -GCE含有DPPC群では投与後5週目より9週目において有意に抑制されていた。

2. STZラットの体重の変化

表1に示すように、STZ投与後3、6および9週目における糖尿病ラットの体重は衰弱のため、コントロール群に比べ有意に少なく、体重増加の抑制が認められた。しかし、糖尿病ラット間ではほぼ同様の体重変化を示した。

3. STZ投与後9週目における水晶体湿重量

STZ投与後9週目の屠殺時における糖尿病ラット水晶体湿重量は、コントロール群に比べて少ない傾

向にあった(図 4)。また、糖尿病ラット間では水晶体湿重量に差は認められなかった。

4. STZ 投与後 9 週目における水晶体内の GSH 量

STZ 投与後 9 週目における各実験群の水晶体内 GSH 量は図 5 および 6 に示した。糖尿病群の水晶体

GSH 量はコントロール群の約 4 分の 1 であり、また STZ+DPPC 群のその含量は糖尿病群のそれとほぼ同レベルであった。しかし、STZ+ γ -GCE 群ならびに STZ+ γ -GCE 含有 DPPC 群においては、水晶体 GSH 量にばらつきがあり、非白内障眼でその含量は白内障水晶体よりも多い傾向が認められた。しかも、STZ+ γ -GCE 含有 DPPC 群においては白内障眼と非白内障

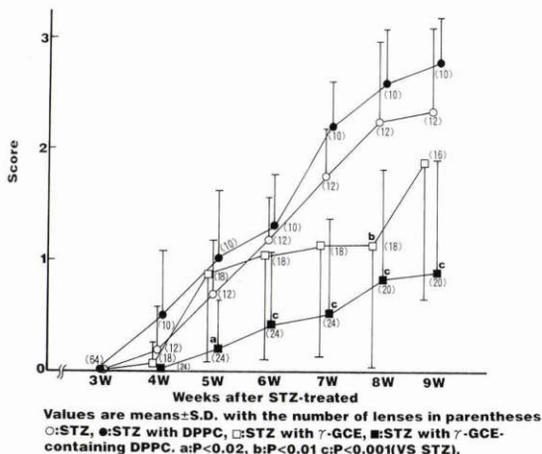


図 3 糖尿病群における白内障の発症と進行

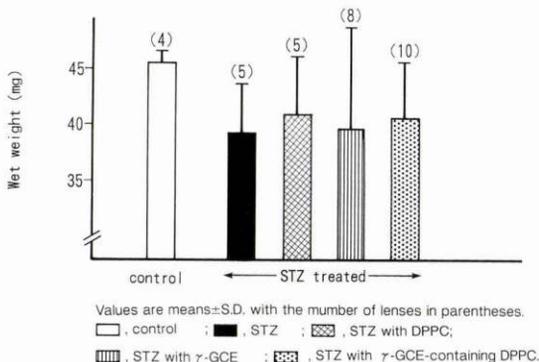
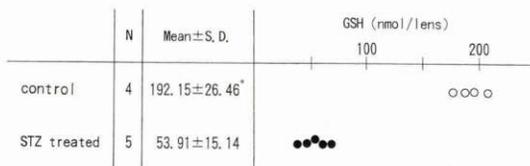


図 4 STZ 投与後 9 週目における水晶体湿重量

表 1 STZ 糖尿病ラットの体重の変化

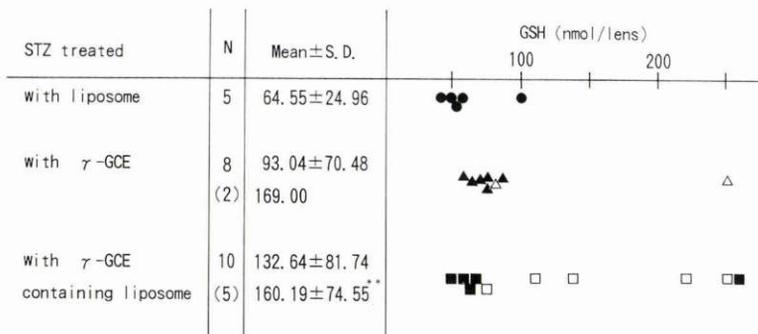
Weeks	Body weight (g)				
	Control (4)	STZ (5)	STZ with DPPC (5)	STZ with γ -GCE (8)	STZ with γ -GCE-DPPC (10)
3	278 ± 9	209 ± 21 ^C	178 ± 11 ^C	178 ± 26 ^C	214 ± 44 ^B
6	369 ± 27	225 ± 36 ^C	180 ± 19 ^{C,*}	217 ± 22 ^C	263 ± 65 ^D
9	413 ± 31	204 ± 41 ^C	189 ± 28 ^C	209 ± 87 ^C	272 ± 89 ^C

Values are means ± S.D. with the number of rats in parentheses. a, p < 0.05 (vs Control); b, p < 0.01 (vs Control); c, p < 0.001 (vs Control); *, p < 0.05 (vs STZ).



Values are means ± S.D. ○, Non-Cataractous lens; ●, Cataractous lens. *, p < 0.01 (vs STZ treated)

図 5 STZ 投与後 9 週目における STZ 投与群と対照群の水晶体 GSH 量



Values are means ± S.D. Δ , \square , Non-Cataractous lens; \bullet , \blacktriangle , \blacksquare , Cataractous lens. * * , p < 0.02 (vs STZ treated)

図 6 STZ 投与後 9 週目における各点眼投与群の水晶体 GSH 量

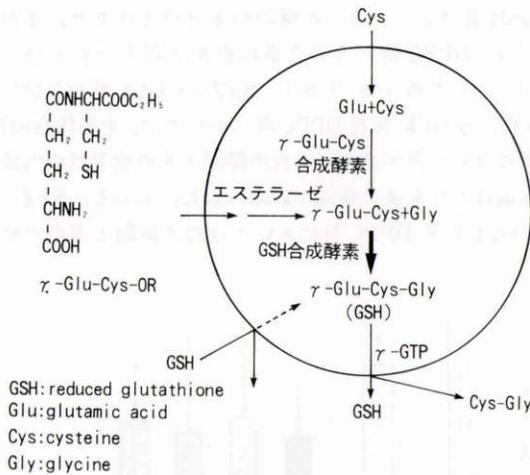


図7 細胞内外におけるGSHの生合成・代謝

眼の水晶体GSH量に有意な差が認められ、非白内障眼のその含量はほぼコントロール群のレベルであった。

IV 考 按

γ -GCEは図7に示すように、グルタミン酸とシステインにエチル基がエステル結合したものである。 γ -GCEは良好な膜透過性を有し、組織内ではエステラーゼにより加水分解され、さらにGSH合成酵素によってグリシンと結合してGSHとなるとされている⁵⁾。

今回著者らは、STZ糖尿病ラットを用いて γ -GCEの白内障抑制効果を点眼で調べた。その結果、糖尿病群ならびにDPPCリボソームを単独投与した糖尿病群においては、4週目より水晶体皮質に軽度の混濁を認め、さらに、5週目においては両群の全例に白内障を認めた。それに対し、STZ+ γ -GCE投与群およびSTZ+ γ -GCE含有DPPC投与群においては有意な白内障の発症抑制効果が認められ、特に γ -GCE含有リボソーム投与群ではその効果は著明であった。即ち、 γ -GCE含有リボソーム投与群ではSTZ投与後4週目においては白内障の発症は全く認められず、さらに9週目に至ってもその50%に白内障は発症しなかった。

このように、 γ -GCEの水溶液あるいはリボソーム溶液の投与で糖尿病性白内障の発症は抑制されるが、その効果はリボソーム溶液の方が強いことが明らかとなった。これは、既に著者らが報告した⁶⁾ γ -GCEのin vitroでの水晶体内への移行およびそのリボソーム体のin vivoにおける実験的糖尿病性白内障の発症に対

する予防効果の結果もあわせて考えると、リボソーム体とした方が水溶液のものよりも γ -GCEの水晶体内への移行量が増加するためであると考えられる。この γ -GCEが水溶液よりもリボソーム体の形で点眼された方が水晶体内へよく移行することに関しては、リボソームそのものが角膜や水晶体膜と高い親和性を示すために、内包されている γ -GCEがそれらの組織に取り込まれ易くなっている可能性が考えられる。

パルミチン酸は水晶体膜脂質を構成している代表的な脂肪酸である⁷⁾。また、白内障水晶体において、特に糖尿病性白内障では飽和脂肪酸であるパルミチン酸は減少し、不飽和脂肪酸が増加することが報告されている⁸⁾。さらに、Louら⁹⁾は、最近ラットを用い、STZ糖尿病性白内障およびin vitroのガラクトースやキシロースによる糖性白内障において、phosphorylcholineの取り込みが増加していることを報告している。また、著者ら¹⁰⁾はvitamin E (Vit. E)含有リボソームの点眼におけるVit. Eの水晶体内への取り込み実験において、パルミチン酸よりなるリン脂質のリボソーム点眼が、オレイン酸よりなるリン脂質のリボソーム点眼の次に水晶体内へのVit. Eの移行が良かったことを報告した。これらのことより、パルミチン酸よりなるリン脂質で調製したリボソームは、それ自身水晶体膜脂質と融合してその組織内へ取り込まれる結果、内包された γ -GCEも水晶体内に取り込まれている可能性も考えられる。このリボソームの水晶体への取り込みは、おそらく水晶体膜脂質構成成分にパルミチン酸が多く含まれているという特性に関係しているものと思われる。

また、 γ -GCEは水溶性であるので、 γ -GCEとリボソームの関係は脂溶性のVit. Eの場合とは当然異なっていると考えられる。おそらく、 γ -GCEのリボソーム溶液では、 γ -GCEはリボソーム内に封入された形で存在していると思われる。更に、 γ -GCEはリボソーム体とすることにより、一層白内障発症抑制効果を増し、また水晶体のGSH減少の抑制効果をも増したことから、リボソーム体に封入される物質が水性であろうと油性であろうと、その物質の水晶体への取り込みはリボソーム体とすることにより増加しうることを示唆される。

水晶体への γ -GCEの取り込み量に影響を与える因子は多く存在するが、今回の実験ではその投与効果を明瞭にするために、 γ -GCEとDPPCを超音波処理してリボソームを調製し、コレステロールなどは用いな

かった。また、Vit. E の水晶体内移行¹⁰⁾の報告の中でも述べてきたように、リボソーム体として投与する薬物の投与濃度や投与条件に加え、リボソームの調製法により眼内および水晶体への薬物の移行量は異なってくる事が予想される。これらに関しては現在検討中である。

また、本実験の結果からSTZ糖尿病ラットでの γ -GCEの白内障発症抑制とGSHの多い上皮を含んだカプセル付きの水晶体GSH量の減少に対する抑制との間に関連性のあることが考えられる。最近、Lowら¹¹⁾はSTZ糖尿病ラットでの水晶体GSH量の減少がGSHの合成に必要なアミノ酸の膜輸送の低下と水晶体からのGSHの遊出によることを示している。従って、この γ -GCEの水晶体GSH量の減少に対する抑制は γ -GCE、 γ -GCEがエステラーゼで分解されて生ずる γ -glutamylcysteine (γ -GC)、あるいはこの γ -GCからグルタチオン合成酵素を介して生成されたGSHが水晶体膜機能の維持に与えることに基づくか、または γ -GCEが加水分解されて生ずる γ -GCより生成されたGSHが減少したGSHの補充に与っていることによると推察される。また、著者らはSTZ糖尿病ラットで白内障の発症以前より水晶体Vit. Eレベルが低下することを認め、水晶体Vit. Eと糖尿病性白内障の発症との間に関連性のあることを示し¹²⁾、またVit. E投与でSTZ糖尿病性白内障の発症が抑制され、しかもその白内障発症の抑制がVit. Eの抗酸化作用よりも膜安定化作用に基づくことを明らかにしている¹³⁾。これらのことより、 γ -GCE点眼によるSTZ糖尿病性白内障の発症抑制は、 γ -GCE、 γ -GCあるいは γ -GCより生成されたGSHが水晶体Vit. Eレベルの維持に与り、水晶体膜機能の低下を防ぐことによる可能性が考えられる。また、実験的糖尿病性白内障の発症に関しては、水晶体内へのアルドース還元酵素を介してグルコースより生ずるソルビトールの蓄積によって起きるosmotic stressに基づくことが、Kinoshita¹⁴⁾によって示唆されている。このアルドース還元酵素を介するソルビトールの生成に γ -GCEや γ -GCが影響している可能性も考えられる。今後さらに γ -GCEの糖尿病性白内障発症抑制の作用機序をSTZ糖尿病ラットで検討していくつもりである。

V 要 約

GSHの前駆物質となりうる γ -GCEを用いて、その水溶液とリボソーム封入体の点眼液を調製し、それら

の点眼によるSTZ糖尿病ラットの白内障発症抑制効果について調べ、次の結果を得た。

1. ラット糖尿病性白内障の発症は、 γ -GCE水溶液ならびに γ -GCE含有リボソーム溶液の点眼で有意に抑制された。その抑制効果は、 γ -GCE含有リボソーム溶液の方が γ -GCE水溶液よりも強かった。
2. ラット糖尿病性白内障水晶体のGSH量は、 γ -GCE水溶液ならびに γ -GCE含有リボソーム溶液の点眼で白内障の発症を認めなかったものでは、ほぼ正常レベルに保たれていた。

以上の結果より、 γ -GCE水溶液ならびに γ -GCE含有リボソーム溶液の点眼で、ラット糖尿病性白内障の発症は抑制されることが明らかになったが、その作用は γ -GCE水溶液よりも γ -GCE含有リボソームの方が強かった。また、この γ -GCEの糖尿病性白内障発症抑制効果は、 γ -GCE水溶液および γ -GCE含有リボソーム点眼によって、水晶体GSH量の減少が抑制されることと関連性のあることが示唆された。

γ -GCEを提供して下さいました帝人の藤井克彦博士に深謝致します。

文 献

- 1) Harding JJ, Crabbe MJC: The lens: Development, proteins, metabolism and cataract. VI. Cataract, L, Conclusions on experimental cataract. Davson DH (ed): The Eye. London, Academic Press Vol 1B, Chap 3, 435, 1984.
- 2) Harding JJ, Crabbe MJC: The lens: Development, proteins, metabolism and cataract. III. Non-protein constituents of the lens, J, Glutathione and related peptides. Davson DH (ed): The Eye. London, Academic Press, Vol 1B, Chap 3, 247-252, 1984.
- 3) 戸張幾生, 桐沢長徳, 馬嶋慶直, 他: 初期老人性白内障に対するグルタチオン点眼用の臨床効果—二重盲検法による検討—. 眼臨 76: 1779-1787, 1976.
- 4) Beautler E, Duron O, Kelly BW: Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 61: 882-888, 1963.
- 5) Ohtsu A, Kitahara S, Fujii K: Anticataractogenic property of glutamylcysteine monoethyl ester in an animal model of cataract. Exp Eye Res 投稿中.
- 6) 服部博之, 馬嶋慶直, 鳥居久稔, 他: 還元型グルタチオン前駆物質 γ -グルタミルシステイニルエチルエステルの水晶体内移行と糖尿病性白内障予防効果. あたらしい眼科 6: 1887-1890, 1989.
- 7) Cotlier E, Obara Y, Toftness B: Cholesterol

- and phospholipids in protein fractions of human and senile cataract. *Biochem Biophys Acta* 530: 267-278, 1978.
- 8) 小原喜隆, 一迫 浄, 油井秀夫, 他: 糖尿病性白内障の過酸化反応. *日眼会誌* 84: 1972-1978, 1980.
 - 9) **Lou MF, Garadi R, Thomas DM, et al:** The effect of an aldose reductase inhibitor on lens phosphorylcholine under hyperglycemic conditions: Biochemical and NMR studies. *Exp Eye Res* 48: 11-24, 1989.
 - 10) 服部博之, 馬嶋慶直, 鳥居久稔, 他: Vitamin E 含有リボソームの点眼における水晶体内移行について. *あたらしい眼科* 5: 1752-1756, 1988.
 - 11) **Lou FM, Dickerson JE Jr, Garadi R, et al:** Glutathione depletion in the lens of galactosemic and diabetic rats. *Exp Eye Res* 46: 517-530, 1988.
 - 12) 平井樹男, 馬嶋慶直, 太田好次, 他: 実験的糖尿病性ラットにおける水晶体ビタミンEと白内障化との関連性. *日眼会誌* 90: 313-320, 1986.
 - 13) 平井樹男, 馬嶋慶直, 中村紀美, 他: 実験的糖尿病性白内障のビタミンE投与効果. *あたらしい眼科* 3: 247-250, 1986.
 - 14) **Kinoshita JH:** Mechanism of initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 713-724, 1974.
-