

ラット糖尿病性白内障の核磁気生理学的解析

森 和彦*, 照林 宏文*, 赤木 好男*, 岡本庄之助*

堤 元信*, 池部 均*, 吉崎 和男**, 西川 弘恭***

京都府立医科大学眼科学教室*, 第一生理学教室**, 明治鍼灸大学生理学教室***

要 約

ストレプトゾトシン静注によるラット糖尿病性白内障に対するアルドース還元酵素阻害剤 (ARI, FR74366) の効果を, 磁気生理学的ならびに組織学的に比較検討した。その結果, 縦緩和時間 (T_1) は経時的に大きく延長し混濁の程度と相関していた。横緩和時間 (T_2) は生体内の水の二つの存在状態を反映しており, 皮質に多い分画 (slow T_2) が延長し, 核の分画 (fast T_2) は変化を示さなかった。これらは組織学的変化に先立っており, 初期の水晶体変化を鋭敏にとらえていると考えられた。また ARI (FR74366) はこれらの変化をよく抑制した。以上のことから, 将来のヒト糖尿病性白内障の初期診断および抗白内障薬の効果判定においても磁気共鳴画像 (MRI) が有効であることを示した。(日眼会誌 95: 336—342, 1991)

キーワード: プロトン核磁気共鳴法, 緩和時間 (T_1 , T_2), アルドース還元酵素阻害剤, ラット糖尿病性白内障, 水晶体

Quantitative Study of Rat Diabetic Cataract, by the Relaxation Times of Nuclear Magnetic Resonance

Kazuhiko Mori*, Hirofumi Terubayashi*, Yoshio Akagi*, Shounosuke Okamoto*
Motonobu Tsutsumi*, Hitoshi Ikebe*, Kazuo Yoshizaki** and Hiroyasu Nishikawa***

*Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

**1st Department of Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

***Department of Physiology, Meiji College of Oriental Medicine

Abstract

The prophylactic effects of a new aldose reductase inhibitor (ARI), FR74366 on streptozotocin-induced rat diabetic cataract were examined by means of proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) relaxation time. We compared the findings with the histological finding, and it was recognized that longitudinal and transverse relaxation times (T_1 , T_2) were prolonged before the histological changes appeared. The ARI, FR74366, prevented histologic changes and had detected by the $^1\text{H-NMR}$ method. The results showed that $^1\text{H-NMR}$ could be useful in the early detection of human diabetic cataract and the evaluation of the effectiveness of anti-cataract agents, for example, AR inhibitors. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 336—342, 1991)

Key words: Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$), Relaxation times (T_1 , T_2), Aldose reductase inhibitor (ARI), Rat diabetic cataract, Lens

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 森 和彦
(平成2年7月27日受付, 平成2年9月20日改訂受理)

Reprint requests to: Kazuhiko Mori, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

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

(Received July 27, 1990 and accepted in revised form September 20, 1990)

I 緒 言

近年、磁気共鳴画像 Magnetic Resonance Imaging (MRI) は装置の飛躍的発達に伴い解像度が著しく向上してきており、実験室レベルでは磁気共鳴顕微鏡とも言うべき MRI microscopy が開発され¹⁾、摘出した眼球に対して応用されつつある^{2)~5)}。このような MRI の基礎的因子には緩和時間ならびに Proton 密度があるが、実際の生体におけるこれら因子の詳細な検討はいまだ十分にはなされていない。Proton 核磁気共鳴法 (¹H-NMR) の対象核種、プロトンはおもに水分子として存在しており、生体内の水情報が非侵襲非破壊的にえられると予想される。すなわちこれら因子を詳細に調べ組織ならびに生化学的所見とあわせて総合的に判断することは、MRI 画像の解析から組織の定量化を行なう際に重要となると考えた。

一方、アルドース還元酵素 (AR) を起因酵素とするラット糖白内障はヒト糖尿病性白内障の実験モデルとしてよく用いられている。われわれは AR 阻害剤 (ARI) の 1 つ FR74366 がこれらラット糖白内障に対して抑制ならびに治療効果を有することを示し⁶⁾、ラットガラクトース白内障に対して¹H-NMR 法を応用し、組織学的ならびに生化学的所見との対応をみてきた⁷⁾⁸⁾。本研究の目的は、さらにヒト糖尿病性白内障のモデルに近いストレプトゾトシン静注ラット糖尿病性白内障を用い、核磁気生理学的所見 (緩和時間 T_1 , T_2) と組織学的所見を比較検討し、将来の MRI による白内障定量化および各種 ARI 効果判定の基礎的データを得ることにある。

II 実験方法

体重 50g、生後 3 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット 112 匹に Streptozotocin 100mg/kg を尾静脈から静注し、以下の 4 群に分け 1~7 週間飼育した。なお本実験で使用した ARI は FR74366 [$\{3-(4\text{-bromo-2-fluorobenzyl})-7\text{-chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-1-yl\}$ acetic acid, 藤沢薬品] である。A. 通常食群 (DM 群), B. 低濃度 ARI 群 (FR74366 0.025% 含有食; 低 FR 群), C. 高濃度 ARI 群 (FR74366 0.075% 含有食; 高 FR 群), D. 正常対照群 (CR 群)。1, 2, 4, 7 週目に各群 6 匹から水晶体を摘出し、すぐに加湿した NMR 試料管 (外径 10 mm, WILMAD Co., USA.) に密封し緩和時間を測定した。測定にはスピネコー NMR 装置 (JEOL JNM-

FSE-60E, 共鳴周波数 60MHz) を用い、得られた波形を記憶装置、加算平均装置を経てマイクロコンピュータ (NEC PC-9801VM2) に取り込みデータ処理プログラムにて緩和時間 (T_1 , T_2) を算出した。算出は片対数グラフの傾きより時定数を求める方式を用い、複数の成分からなるときにはその差分につき同様に傾きからそれぞれの緩和時間を求めた。また、y 切片の比からそれぞれの成分の分布割合を求めた。

緩和時間の測定は既報⁷⁾⁸⁾に従い、縦緩和時間 (T_1) に対しパルス系列として Inversion Recovery 法 (IR) を、横緩和時間 (T_2) に Carr-Purcell Meiboom-Gill 法 (CPMG) を用いた。IR 法では、繰返し時間 4sec, パルス間隔 (τ) 40Nmsec ($N=1, 2, 3, \dots, 50$), 積算 1 回, CPMG 法では、繰返し時間 5sec, $\tau=2.5$ Nmsec ($N=1, 2, 3, \dots, 50$), 積算 4 回, ループ 100 回とした。なお緩和時間測定は Cold Cataract の影響を考慮し条件を統一するため、すべて 25°C にて行なった。

緩和時間測定後、試料を加熱乾燥 (120°C, 48 時間) し乾燥重量を計測して湿重量との差から水分含有量を求めた。また水分含有率は、水分含有量を湿重量で割ることにより求め、さらにこの値を緩和時間測定よりえられた各成分の水分分布割合に配分することで、それぞれの成分の水分含有率も求めた。さらに組織学的検索目的にて 4 群から緩和時間測定とは別に水晶体を摘出し 4% paraformaldehyde を含む 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) にて 5 日固定し、アルコール系列で脱水、メタクリル樹脂 (JB-4) に包埋し薄切、トルイジン青染色後、光学顕微鏡にて観察した。

III 結 果

1. 縦緩和時間 (T_1)

各群の水分含有率の経時的变化を図 1A, 緩和時間の長い成分 (slow T_1) と短い成分 (fast T_1) の経時的变化を図 1B に示す。水分含有率は CR 群では加齢とともに減少傾向を認めたが、DM 群では実験開始後 1 週目からすでに CR 群と比べ有意な増加を示した ($p<0.05$)。fast T_1 は経時的に変化を示さず、また各群の間でも有意差はなかった (DM 群: fast $T_1=83.7\pm 20.3$ ms, 低 FR 群: fast $T_1=69.7\pm 13.9$ ms, 高 FR 群: fast $T_1=83.7\pm 12.3$ ms, CR 群: fast $T_1=92.5\pm 22.3$ ms, 7th week)。一方 slow T_1 では、CR 群で slow 成分の水分含有率の変化と対応する加齢に伴う減少傾向を認め、DM 群で 1 週目から経時的に延長

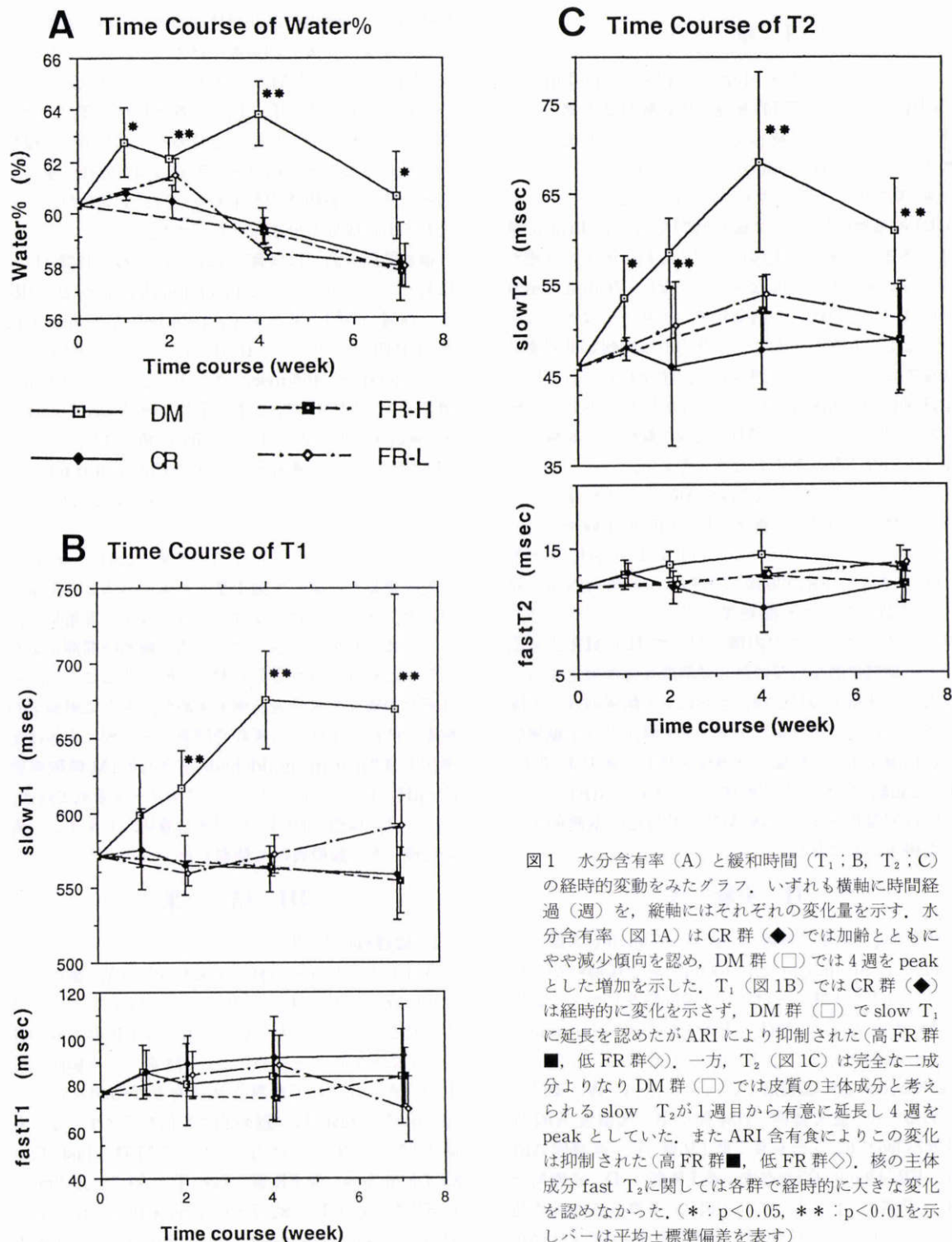


図1 水分含有率(A)と緩和時間(T₁;B, T₂;C)の経時的変動をみたグラフ。いずれも横軸に時間経過(週)を、縦軸にはそれぞれの変化量を示す。水分含有率(図1A)はCR群(◆)では加齢とともにやや減少傾向を認め、DM群(□)では4週をpeakとした増加を示した。T₁(図1B)ではCR群(◆)は経時的に変化を示さず、DM群(□)でslow T₁に延長を認めたがARIにより抑制された(高FR群■, 低FR群◇)。一方、T₂(図1C)は完全な二成分よりなりDM群(□)では皮質の主体成分と考えられるslow T₂が1週目から有意に延長し4週をpeakとしていた。またARI含有食によりこの変化は抑制された(高FR群■, 低FR群◇)。核の主体成分fast T₂に関しては各群で経時的に大きな変化を認めなかった。(*: p < 0.05, **: p < 0.01を示しバーは平均±標準偏差を表す)

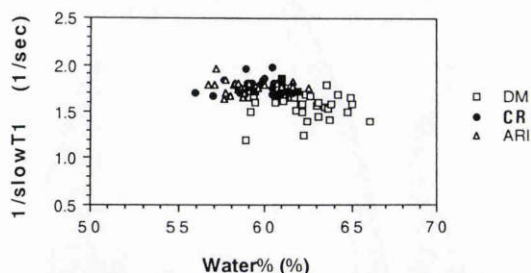
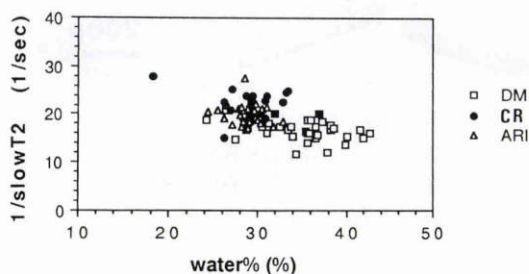
Relationship between $1/T_1$ & water%Relationship between $1/T_2$ & water%

図2 Relationship between water% and $1/T_1$, $1/T_2$. 緩和時間の逆数 ($1/T$) とその成分の水分含有率 (Water%) の関係を見たグラフ。 $1/\text{slow}T_1$ (上), $1/\text{slow}T_2$ (下) とも Water% との間に直線関係が認められたが、それぞれの間の相関係数 R は $R = -0.4751(T_1)$, $-0.5350(T_2)$ であった。(DM 群: □, CR 群: ●, 高 FR 群 & 低 FR 群: △)

していった (1st week: $\text{slow } T_1 = 598.4 \pm 34.3\text{ms}$, 7th week: $\text{slow } T_1 = 669.3 \pm 76.4\text{ms}$). ARI 群においては、低 FR 群、高 FR 群いずれにおいてもこのような $\text{slow } T_1$ の延長が抑制された (低 FR 群: $\text{slow } T_1 = 591.8 \pm 19.9\text{ms}$, 高 FR 群: $\text{slow } T_1 = 554.9 \pm 22.1\text{ms}$, 7th week). また緩和時間の逆数 ($1/\text{slow } T_1$) と slow 成分の水分含有率との間に直線関係が認められた (図2上).

2. 横緩和時間 (T_2)

皮質の主体成分と考えられる $\text{slow } T_2$ と核の主体成分 $\text{fast } T_2$ の経時的变化を図1Cに示す。DM 群では $\text{slow } T_2$ が1週目から有意に延長を示した (DM 群: $\text{slow } T_2 = 53.4 \pm 4.7\text{ms}$, CR 群: $\text{slow } T_2 = 47.9 \pm 1.3\text{ms}$, $p < 0.05$). また ARI 含有食によりこの変化は抑制され、CR 群との間に有意差を認めなかった (低 FR 群: $\text{slow } T_2 = 51.1 \pm 4.2\text{ms}$, 高 FR 群: $\text{slow } T_2 =$

$48.7 \pm 6.1\text{ms}$, CR 群: $\text{slow } T_2 = 48.8 \pm 6.1\text{ms}$, 7th week). 核由来の $\text{fast } T_2$ に関しては各群ともに経時的に変化を認めなかった (DM 群: $\text{fast } T_2 = 13.4 \pm 1.7\text{ms}$, 低 FR 群: $\text{fast } T_2 = 13.9 \pm 0.9\text{ms}$, 高 FR 群: $\text{fast } T_2 = 12.1 \pm 1.4\text{ms}$, CR 群: $\text{fast } T_2 = 12.1 \pm 1.5\text{ms}$, 7th week). T_2 においても T_1 と同様に緩和時間の逆数 ($1/\text{slow } T_2$) と slow 成分の水分含有率の間に直線関係が認められた (図2下).

3. 組織学的観察

DM 群の1週目では組織学的に未だ明らかな異常は認めなかった ($n = 6$) が、4週目には赤道部皮質から前皮質にかけて線維膨化・液化が認められた ($n = 6$). 7週目になると赤道部から前後皮質におよぶ広範囲な線維液化変性所見を認めた (図3左, $n = 6$). これらの所見は ARI 投与群 (低 FR 群: 図3右, 高 FR 群: 図3中) ではいずれも完全に抑制されていた ($n = 6$).

IV 考 按

近年の技術革新は著しく MRI 技術においても装置の飛躍的発達に伴う解像度の向上、高速撮影法の開発などめざましいものがある。さらに実験室レベルでは磁気共鳴顕微鏡とでも言うべき MR microscopy が開発¹⁾され、すでに摘出眼球に対して応用した研究^{2)~5)}もなされつつある。このような MRI の利点は、生体情報を生きたままの状態から無侵襲に得られることであり、病態解析や組織定量化に際しては大きな武器になる。Proton 核磁気共鳴法 ($^1\text{H-NMR}$) の対象核種、プロトンはおもに生体内で水分子として存在しており、本法では生体内の水情報^{9)~15)}が非侵襲非破壊的にえられると予想される。

ところで、現在実用化されている MRI の基本的画像構成因子は Proton 密度ならびに緩和時間であるが、実際の生体におけるこれら因子の詳細な検討はいまだ十分にはなされていない。すなわち緩和時間の生物物理化学的側面からの検討は種々おこなわれている^{9)~15)}ものの、緩和時間の延長が生体において何を反映しているか正確には把握しきれていない。ある疾患に対して MRI 画像上、high intensity か low intensity かを検討するだけでなく、緩和時間の変化をもたらした実際の組織における病態との対応を調べる必要がある。すなわちこれら因子を詳細に調べ組織ならびに生化学的所見とあわせて総合的に判断することは、MRI 画像の解析から組織の定量化を行なう際に重要となると考えた。

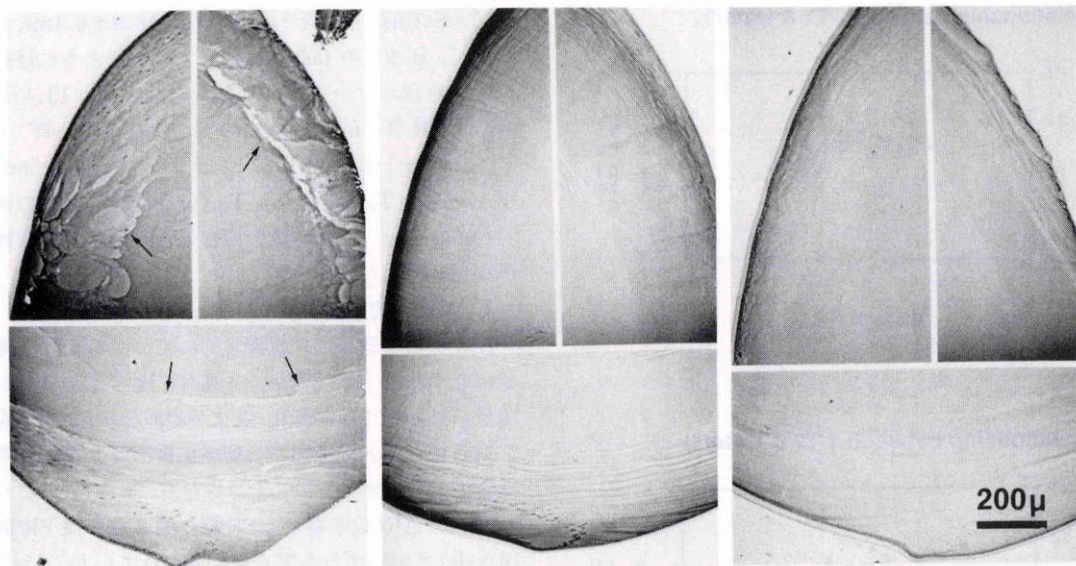


図3 Streptozotocin 静注後7週間飼育した各群の光学顕微鏡写真。DM群では赤道部から前後皮質におよぶ全周性の線維膨化を認めた(左、矢印)。ARI含有食を与えた群では、高FR群(中)、低FR群(右)、いずれにおいてもこれら水晶体線維の変化は抑制された。これらは各群n=6で全て同じ所見を認めた。(×45, トルイジン青染色)

一般に緩和時間は縦緩和時間(スピン—格子緩和時間; T_1)と横緩和時間(スピン—スピン緩和時間; T_2)の二種類に分けられ、 T_1 は核の磁気モーメントと周囲環境との相互作用を、 T_2 は核スピン間の相互作用を表すと説明される¹⁰⁾¹²⁾。 $^1\text{H-NMR}$ においては、 T_1 は水の核スピンと周囲の高分子化合物(タンパク分子など)との相互作用を反映し、また T_2 は水分子の動き易さすなわち易動度 mobility と対応しているといわれている。生体内の水分子はリガンド H_2O (結合水)とフリー H_2O (自由水)に大別することができ、両者の間には Chemical exchange と呼ばれる相互交換が存在している^{9)11)~14)}。緩和時間はこの Chemical exchange と密接な関連があり、リガンド H_2O とフリー H_2O の存在確率によって修飾された「交換している状態」を反映し、これら水分子の平均的な運動性の指標となるといえる。

一方、ラット糖白内障はヒト糖尿病性白内障のモデルであり、その発症理論は以下の通りである。すなわちアルドース還元酵素(AR)は糖を糖アルコールに変換するが、この糖アルコールは膜透過性が悪くまた容易に代謝されない。したがって徐々に水晶体線維中に蓄積し、それに伴い浸透圧差によって水を吸引するこ

とから水晶体線維の膨化・液化を引き起こす。線維の膨化・液化は二次的にタンパクの変性をきたし、その結果水晶体の混濁を生じると考えられる(Polyol-Osmotic 説¹⁶⁾¹⁷⁾)。この理論の直接的証明として種々のAR阻害剤(ARI)が糖アルコールの蓄積を抑制し、本白内障を予防・治癒させる事実¹⁸⁾¹⁹⁾がある。したがって糖アルコール蓄積に続く水の変化をとらえ、その程度を定量化し、ARIのような抗白内障薬の効果をみるには、 $^1\text{H-NMR}$ 法こそがまさに適していると考えられる。この点、白内障混濁を撮影写真の陰影として解析する諸方法にはない大きな利点である。

すでにわれわれは、ラットガラクトース白内障に対して $^1\text{H-NMR}$ を用い緩和時間を測定することにより、水晶体混濁出現前の初期変化やARIによる白内障治療過程をとらえる際に有効であることを示してきた⁷⁾⁸⁾。今回実験に用いたストレプトゾトシンは膵臓ラ氏島 β 細胞を選択的に破壊することによりラットに糖尿病を発症させ、その結果高血糖による白内障をおこすことができる。したがって本研究では同じ発症機転を持つこの白内障でも、 $^1\text{H-NMR}$ により同じようにその初期から変化をとらえ得るかどうかを調べ、あわせてARIの効果をみるとともに、緩和時間の由来につ

いても検討を加えることを目的とした。

今回の実験結果において、緩和時間、特に T_2 が slow T_2 と fast T_2 とに完全に分離されたことは、水晶体内の水が緩和時間の異なる二つの分画に大別されることを示している。すなわち T_2 は水分子の易動度 mobility と対応することより、長い緩和時間をもつ分画 (slow T_2) は動きやすい水 (フリー- H_2O) であり、短い緩和時間をもつ分画 (fast T_2) はリガンド H_2O に対応するといえる。両者の由来をさらに詳しく知るため水晶体を機械的に皮質と核に分割し緩和時間を測定した実験より、皮質では slow T_2 の占める割合が、また核では fast T_2 の占める割合が大きかった (未発表データ)。したがって DM 群における slow T_2 の延長は、皮質における水晶体線維の膨化・液化所見に対応し、同部におけるフリー- H_2O の増加を示していると考えられる。さらにこれが1週目から有意に延長を示したことは、組織学的に変化が認められる前の変化をとらえている可能性がある。また4週目から7週目にかけての slow T_2 の有意な低下 ($p < 0.05$) は、水晶体のバリア機構が破綻した結果としてのフリー- H_2O の漏出を反映していると考えられた。このことはグラフには示していないが slow 成分の水含有率の経時的変化からも裏付けられた。一方、 T_1 に関しては水晶体内の水の構成成分に対して単一成分からなるとする説や三つの成分からなるとする説など種々の説^{19)~22)}がある。今回の実験では一応二つの成分に分けることができたが、その意味付けに関しては今後さらなる検討が必要と思われる。緩和時間の逆数と水含有率との相関関係が明確ではないこと (相関係数 $R = -0.4751 : T_1$, $R = -0.5350 : T_2$) から、緩和時間の変化は単に水含有率の変化のみに依存するものではなく、他の因子の影響を受けている可能性が示唆された。いずれにせよこれら緩和時間の変化は、同程度の混濁が等しい緩和時間を示していたことより、組織学的にみた水晶体線維の膨化・液化領域の程度との間に対応が認められた。

すなわちこれらの事実は、将来高分解能 MRI を水晶体研究に応用することにより、水晶体を一つの器官としてとらえた場合のその代謝の局在性、膜機能の反映としての水の動き、白内障発症時の代謝動態などを生きたままの状態で把握し、ARI などの抗白内障薬の効果を判定しうる可能性を示したといえる。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Cho ZH, Ahn CB, Juh SC, et al: Nuclear

magnetic resonance microscopy with 4- μ m resolution: Theoretical study and experimental results. Med Phys 15: 815-824, 1988.

- 2) Aguayo JB, Blackband SJ, Wehrle JP, et al: NMR Microscopic studies of eyes and tumors with histological correlation. Ann NY Acad Sci 508: 399-413, 1988.
- 3) Ahn CB, Anderson JA, Juh SC, et al: Nuclear magnetic resonance microscopic ocular imaging for the detection of early-stage cataract. Invest Ophthalmol Visual Sci 30: 1612-1617, 1989.
- 4) Cheng HM, Yeh LI, Barnett P, et al: Proton magnetic resonance imaging of the ocular lens. Exp Eye Res 45: 875-882, 1987.
- 5) Williams TR, Perry BC, Koenig JL: 1H Magnetic resonance imaging study of bovine ocular tissue. Ophthalmic Res 22: 89-94, 1990.
- 6) 辻 俊明, 松本康宏, 森 和彦, 他: 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. 日眼会誌 94: 120-127, 1990.
- 7) 森 和彦, 照林宏文, 赤木好男, 他: ラットガラクトース白内障水晶体内水の NMR 緩和時間による解析. 眼紀 40: 2890-2895, 1989.
- 8) 森 和彦, 松本康宏, 池部 均, 他: 新しいアルドース還元酵素阻害剤 (ARI, FR74366) の核磁気共鳴法を用いた効果判定. 臨眼 44: 443-446, 1990.
- 9) Stankeiwicz PJ, Metz KR, Sassani JW, et al: Nuclear magnetic resonance study of free and bound water fractions in normal lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2361-2369, 1989.
- 10) Davis PL, Kaufman L, Crooks LE, et al: NMR characteristics of normal and abnormal rat tissues. Kaufman L, Crooks LE, Margulis AR: Nuclear Magnetic Resonance Imaging in Medicine. New York, Igaku-Shoin, 71-100, 1981.
- 11) Neville MC, Paterson CA, Rae JL, et al: Nuclear magnetic resonance studies and water "ordering" in the crystalline lens. Science 184: 1072-1074, 1974.
- 12) Gadian DG, 今井昭一 訳: 医学生物学のための NMR. 生体系への応用. 新潟, 西村書店, 117-140, 1985.
- 13) 吉川研一, 逢坂 昭: NMR による病態解析. 化学の領域 35: 18-28, 1981.
- 14) 逢坂 昭, 吉川研一: 生体内における水の存在状態. 病態生理 4: 97-103, 1985.
- 15) 會我美勝, 恵良聖一, 亘 弘: 生体内における水構造と 1H -NMR 情報. 日本生理誌 50: 53-69,

- 1988.
- 16) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald memorial lecture. Invest Ophthalmol 4: 786—799, 1965.
- 17) **Kinoshita JH**: Mechanisms initiating cataract formation, Proctor lecture. Invest Ophthalmol 13: 713—724, 1974.
- 18) 赤木好男, 照林宏文, 池部 均, 他: アルドース還元酵素阻害剤(ARI). 眼紀 40: 1698—1703, 1989.
- 19) **Racz P, Tompa K, Pocsik I**, et al: Water fractions in normal and senile cataractous eye lenses studied by NMR. Exp Eye Res 36: 663—669, 1983.
- 20) **Lerman S, Ashley DL, Long RC Jr**, et al: Nuclear magnetic resonance analyses of the cold cataract: Whole lens studies. Invest Ophthalmol Visual Sci 23: 218—226, 1982.
- 21) **Pope JM, Chandra S, Balfe JD**: Changes in the state of water in senile cataractous lenses as studied by nuclear magnetic resonance. Exp Eye Res 34: 57—63, 1982.
- 22) **Racz P, Tompa K, Pocsik I**: The state of water in normal and senile cataractous lenses studied by nuclear magnetic resonance. Exp Eye Res 28: 129—135, 1979.
-