

眼球の微量金属動態

八木橋 修, 石川 弘, 北野 周作

日本大学医学部眼科学教室

要 約

自然発症糖尿病マウスである NOD マウスと亜鉛欠乏ラットを用いて、各臓器と眼球の金属動態を比較検討した。ICP 発光分析システムを用いて各臓器の微量金属の定量を行った結果、NOD マウスの糖尿病発症群と亜鉛欠乏ラットのいずれにおいても、他臓器と比較して、眼球とくに網脈絡膜において、著しい亜鉛の低下が認められた。また、亜鉛の各臓器への取り込みをみても、網脈絡膜において著しい取り込みの低下が認められた。このことから、眼球は各臓器の中でも代謝異常に伴う金属動態の変動が著明に現われる臓器であり、とくに網脈絡膜において最も変動が大きいことが判明した。以上の事実は、各種の病態を考える上で重要な示唆を与えるものと考えられる (日眼会誌 95:771-775, 1991)

キーワード：眼, 微量金属, 亜鉛, NOD マウス

The Dynamics of Trace Elements in Eye Tissues

Osamu Yagihashi, Hiroshi Ishikawa and Shusaku Kitano

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University

Abstract

The dynamics of trace elements in various organs and eye tissues of NOD mouse and zinc deficiency rat were examined. Zinc content in eye tissues, especially the retina and choroid of NOD mouse with spontaneous diabetes mellitus and zinc deficiency rat were significantly decreased. Zinc uptake also was decreased in the retina and choroid, as compared with other organs. As a result, it was concluded that eye tissues, especially the retina and choroid were markedly reflected changes of the dynamics of trace elements. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:771-775, 1991)

Key words: Eye, Trace element, Zinc, NOD mouse

I 緒 言

近年、生体における必須元素として、亜鉛、銅、鉄、マンガンなどの幾種かの微量金属が注目されている¹⁾²⁾。しかし、生体の代謝に伴う微量金属の動態については依然不明の点が多く、とりわけ眼球についての

報告は少なく³⁾、角膜における創傷治療⁴⁾、白内障における金属動態⁵⁾、夜盲⁶⁾に関する報告などが散見されるのみである。最近、糖尿病で亜鉛の低下をはじめとする金属代謝の異常が認められているが⁷⁾、眼での検討はなされていない。そこで我々は、インスリン依存型の自然発症糖尿病マウスである NOD マウスを用い、

別刷請求先：173 板橋区大谷口上町30-1 日本大学医学部眼科学教室 八木橋 修

(平成元年12月14日受付, 平成2年12月12日改訂受理)

Reprint requests to: Osamu Yagihashi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University.

30-1 Ōyaguchikami-machi, Itabashi-ku 173, Japan

(Received December 14, 1989 and accepted in revised form December 12, 1990)

眼球と他臓器における金属動態を比較検討した。また、これと対比する目的で、低亜鉛飼料にて飼育した亜鉛欠乏ラットを作製し、眼球各組織における金属動態を検討したので報告する。

II 実験方法

まず、実験系を2つのグループに分け、糖尿病についての実験系と亜鉛欠乏についての実験系で行った。

1. NOD マウスの実験

糖尿病については、実験動物としてインスリン依存型自然発症糖尿病マウスであるNOD系マウスを用い、糖尿病発症30日未満のものを発症初期群（血糖値 $301 \pm 68 \text{mg}/100 \text{ml}$ ）、糖尿病発症30日以上のもをを発症長期群（血糖値 $370 \pm 20 \text{mg}/100 \text{ml}$ ）として、各臓器を発症初期、長期共に10匹ずつ検討した。また眼球では、各群の20眼の水晶体と、網膜絡膜とをそれぞれ一検体とし、発症初期群と発症長期群をまとめて発症群として測定した。対照群としては、NOD系マウスの無発症（血糖値 $113 \pm 21 \text{mg}/100 \text{ml}$ ）のものを10匹測定し、眼球の各組織については同様に5匹10眼を一検体として測定した。

さらに、追加実験として、亜鉛の取り込み状態から金属動態を観察する目的で、 ^{65}Zn をNODマウスに経口投与して ^{65}Zn の測定も行った。方法は、NODマウスに ^{65}Zn を塩化亜鉛(ZnCl_2)の形で胃ゾンデにて $50 \mu\text{Ci}/\text{kg}$ ずつ投与し、末梢組織まで十分に分配されるよう48時間経過した後、各組織を摘出して同様の検体数につ

いて ^{65}Zn の測定を行った。

2. 亜鉛欠乏ラットの実験

亜鉛欠乏の実験はWister系ラットを用い、精製低亜鉛飼料 $0.42 \text{mg}/100 \text{g}$ を2カ月与え、低亜鉛血症が確認できたものを亜鉛欠乏群として10匹を使用し、精製低亜鉛飼料に $10.5 \text{mg}/100 \text{g}$ の硫酸亜鉛を添加した飼料を2カ月与えたものを対照群として10匹使用した。そして、各臓器を摘出して各々の金属量の測定を行ったが、眼球各組織については、糖尿病マウスの実験と同様に、10眼をまとめて測定を行った。

3. 金属量の測定

金属量の測定方法は、各群のマウス及びラットをエーテル麻酔下で脱血し、屠殺後直ちに各臓器を摘出し、眼球の場合は顕微鏡下にて角膜、水晶体、網脈絡膜、強膜に分離した。これを生理的食塩水、精製水にて洗浄した後一定量を定量しPlasma-asherにて低温灰化し、内部標準物質である 0.2ppm のベリリウムを含んだ 0.05N 塩酸に溶解した。金属の測定は独立した2つの分光器を持つ日立ICP発光分析システム306を用い内部標準同時測定法にて行った⁸⁾。

III 結果

以下の実験結果は、各群各臓器についてはt検定にて有意差の検定を行った。また、眼球各組織では亜鉛以外は、実測値にて報告する。

1. NOD系マウスの実験結果

まず、自然発症糖尿病マウスであるNOD系マウス

表1 NODマウスの微量金属と亜鉛の取り込み

	銅 (ppm)	マンガン (ppm)	亜鉛 (ppm)	^{65}Zn 取り込み (%)
肝臓				
対照群	4.14 ± 0.23	0.84 ± 0.06 ***	23.1 ± 1.3 *	17.4 ± 0.6
発症初期群	4.43 ± 0.27	1.11 ± 0.11 †	26.5 ± 1.8 †	20.1 ± 3.0
発症長期群	4.62 ± 0.70	2.08 ± 0.70	28.7 ± 5.1	19.9 ± 3.0
腎臓				
対照群	4.92 ± 0.14	1.26 ± 0.04	19.2 ± 1.1 **	18.0 ± 0.9
発症初期群	5.17 ± 0.28	1.27 ± 0.07	15.1 ± 8.5	15.9 ± 1.5 *
発症長期群	4.89 ± 0.19	1.48 ± 0.31	17.0 ± 0.3 †	12.4 ± 1.4 †
脳				
対照群	3.57 ± 0.12 *	0.41 ± 0.02	14.5 ± 0.7 *	1.8 ± 0.5
発症初期群	3.29 ± 0.16 **	0.41 ± 0.03	15.1 ± 0.6	1.6 ± 0.2
発症長期群	3.89 ± 0.24 †	0.41 ± 0.02	15.8 ± 0.8 †	1.5 ± 0.5

(各群 n = 10)

測定値は平均値±標準偏差 * : p < 0.05 ** : p < 0.01

表2 NOD マウスの微量金属量と亜鉛の取り込み

		銅 (ppm)	マンガン (ppm)	亜鉛 (ppm)	⁶⁵ Zn 取り込み (cpm)
水晶体	対照群	0.196	0.169	4.9±0.68	223±75.3
	発症群	0.134	0.062	4.8±0.54	209±66.9
網脈絡膜	対照群	0.443	0.134	4.9±0.56	1146±101**
	発症群	0.517	0.121	5.0±0.65	454±48.8

測定値は、亜鉛はn=3、それ以外は10眼の実測値

** : p < 0.01

表3 亜鉛欠乏ラットと対照の微量金属量

		銅 (ppm)	マンガン (ppm)	亜鉛 (ppm)
肝臓	対照群	4.39±0.89	1.92±0.37*	31.5±8.1*
	亜鉛欠乏群	3.87±0.64	2.21±0.21 [↓]	24.0±2.8 [↓]
腎臓	対照群	6.29±1.46	0.81±0.31**	23.5±7.2
	亜鉛欠乏群	6.47±0.99	1.07±0.08 [↓]	19.9±1.2

(各群 n = 10) 測定値は平均±標準偏差

* : p < 0.05 ** : p < 0.01

での各臓器と眼球各組織を比較する。表1のように肝臓では、銅、亜鉛、マンガン共に対照群から糖尿病発症初期群、糖尿病発症長期群の順に増加していた。特に亜鉛は、対照群23.1±1.3ppmに対し、発症初期群26.5±1.8ppm、発症長期群28.7±5.1ppmと有意な増加を示した。次に腎臓をみると、銅、マンガンでは変化はないが、亜鉛は対照群19.2±1.1ppmに対し、発症長期群17.0±0.3ppmと有意な低下を示した。さらに脳では銅は対照群3.57±0.12ppmに対し、発症初期群3.29±0.16ppmと低下し、逆に、発症長期群では3.89±0.24ppmと増加していることが認められた。亜鉛も対照群14.5±0.7ppmに対し、発症初期群では変化はないが、発症長期群15.8±0.8ppmと増加を示していた。以上の組織と比較して眼球各組織の結果を表2に示した。水晶体において銅は、対照群0.2ppmに対し、糖尿病発症群で0.13ppmと低値を示し、マンガンも対照群0.17ppmに対し、発症群0.06ppmと低値を示していたが、亜鉛は、対照群4.9±0.68ppmに対し、発症群4.8±0.54ppmと有意な差は認められなかった。一方、網脈絡膜では、銅とマンガンに大きな変化はなく、亜鉛も対照群4.9±0.56ppmに対し、発症群5.0±0.65ppmと有意差は認められなかった。

次に、⁶⁵Znを用いた亜鉛の取り込みについてみると、まず肝臓では、対照群17.4±0.6%に対し、発症初期群で20.1±3.0%と有意な差は認めなかった。腎臓では、対照群18.0±0.9%に対し、発症長期群で12.4±1.4%と有意な低下を示した。また、脳では亜鉛の取り込みに対照群と発症群で有意な差は認められなかったが、眼球各組織の⁶⁵Znの取り込みをみると、まず水晶体では亜鉛の取り込みは対照群223±75.3cpmに対し、209±66.9cpmと変化は認めていない。ところが、網脈絡膜においては、対照群の1,146±101cpmに対し、発症群では454±48.8cpmと著しい取り込みの低

表4 亜鉛欠乏ラットと対照の微量金属量

		銅 (ppm)	マンガン (ppm)	亜鉛 (ppm)
水晶体	対照群	0.063	0.073	4.36±0.31
	亜鉛欠乏群	—	0.092	4.24±0.29
網脈絡膜	対照群	0.353	0.160	5.46±0.38**
	亜鉛欠乏群	0.149	0.167	3.97±0.26 [↓]

測定値は、亜鉛はn=5、それ以外は10眼の実測値

** : p < 0.01

下を認めており他臓器に比較しても最も大きな変動を示していた。なお、各臓器における⁶⁵Znの取り込みは、測定した臓器の全体量との比率で求めたが、眼球組織は⁶⁵Znの取り込み量の実測値で比較した。

2. 亜鉛欠乏ラットの実験結果

亜鉛欠乏状態の各臓器の微量金属の変化は表3のように、肝臓および腎臓では、共に銅やマンガンに変化はなかった。しかし、亜鉛は肝臓で対照群31.5±8.1ppmに対し、亜鉛欠乏群では24.0±2.8ppmと有意に低下を示し、腎臓でも亜鉛は対照群が23.5±7.2ppmに対し、亜鉛欠乏群19.9±1.2ppmと有意に低下していた。次に、眼球各組織をみると(表4)、まず水晶体では、亜鉛のみしか測定しなかったが、対照群4.36±0.31ppmに対し、亜鉛欠乏群でも4.24±0.29ppmと変化は認めなかった。しかし、網脈絡膜では亜鉛欠乏ラットの亜鉛の低下は著しく正常ラット5.46±0.38ppmに対し、亜鉛欠乏群では3.97±0.26ppmと著しい低下を示していた。

IV 考 按

従来より、生体と金属に関する報告は種々なされてきたが、眼球についての報告は少なく、その結果についても統一性をみない。これは、眼球組織自体が小さく、さらに角膜、水晶体等を分離していくと、微量金属の定量の段階で測定が困難であったためと考えられる。しかし、測定方法の進歩により、眼球各組織における微量金属の定量も次第に行われるようになった。人眼中の微量金属の測定は、1943年 Tauber と Krause により初めて行われた⁹⁾。その報告では、動物と同様に人眼中に最も多く含まれる微量金属は亜鉛であるとされている。1980年の Karcioğlu の報告では、人組織の全身の亜鉛量は成人男子で1.4~2.3g/70kgで、各臓器の平均含有量は20~30 μ g/gであるが、眼球では角膜41、毛様体227、水晶体21、網膜464、脈絡膜472、強膜148、視神経170 μ g/gと特に網脈絡膜で高値を示している¹⁰⁾。

次に、亜鉛の役割について考えてみたい。亜鉛は、1) DNA代謝と蛋白合成に関与しており、また、2) 酵素の cofactor としても重要な役割をはたしていることが従来から知られている。眼球で亜鉛がどのような役割を示しているか各組織毎に見てみると、まず角膜では、亜鉛はコラゲナーゼに存在しているとの報告¹¹⁾やDNAの合成に関与することから創傷治癒を促すとの報告¹²⁾がある。次に水晶体では白内障との関係が注目され、動物実験では亜鉛欠乏で白内障の発生を認めたと¹³⁾、人眼ではまだ不明の点が多い。さらに網脈絡膜では、人眼でも動物眼でも眼内では最も亜鉛の局在が多いと報告¹⁴⁾¹⁵⁾されている。そして、亜鉛は循環型ビタミンA即ちレチノールから、活性型ビタミンAであるレチナールへの転換酵素である alcohol dehydrogenase の cofactor として関与しており、重症アルコール性肝障害および慢性膵炎では暗順応が低下し、亜鉛投与にて暗順応が改善したという報告¹⁶⁾¹⁷⁾がある。また実験動物では亜鉛欠乏によって網膜障害が発生したと報告⁶⁾もある。その他、最近では、老人性黄斑変性を含めた黄斑変性症の治療で亜鉛を投与した群に症状の改善が認められ、亜鉛を投与していない群では症状の改善が認められなかったことから、亜鉛の欠乏が病態の発生に関与しているのではないかという報告¹⁸⁾がある。さらに、球後視神経炎で血清亜鉛の低下を示した報告¹⁹⁾もあり、眼と亜鉛の関係が注目されている。

今回我々は、日常眼科領域でよく遭遇する糖尿病を取り挙げて、自然発症糖尿病マウスである NOD マウスを用い、微量金属の動態について考察した。まず、眼球以外の各臓器の金属動態をまとめてみると、肝臓では糖尿病発症時に亜鉛やマンガンの取り込みが上昇しさらに時間が経過しても金属量の変動は認められなかった。この理由としては、肝臓ではサイトプラズマ中のメタロチオネイン²⁰⁾が生成され、これに亜鉛や銅が結合して金属の保持が行われていると考えられる。これに対し腎臓では、糖尿病発症時に微量金属の低下が認められたが、これは腎臓が解毒排泄臓器であるために、微量金属も保持することができず、代謝の変化と共に一定量低下したものと考えた。さらに、脳組織では糖尿病発症初期群で金属量は変化ないか低下傾向を示すものの、時間の経過と共に微量金属が増加していくことが認められた。従って脳は、金属の供給が他臓器に比べ緩徐で、回復に長期間を必要とする臓器と考えられる。

次に、眼球各組織について考察する。まず水晶体では、亜鉛の取り込み、総量共に著明な変化はない。しかし、網脈絡膜をみると、対照に比べ糖尿病発症群では亜鉛の総量には変化はないが、取り込み量で著しい低下を示している。このことから網脈絡膜は、代謝の変動が生じた場合まともに影響を受け、亜鉛等の欠乏状態を引き起こし易く、また回復しにくいことが考えられた。

さらに我々は、眼球特に網脈絡膜での亜鉛欠乏状態が、実際に食餌の亜鉛を制限した場合でも発生するのかわを確認するために、亜鉛欠乏ラットの実験を行った。その結果、肝臓や腎臓では、亜鉛の低下の傾向はあるものの有意な変化は認められなかったのに対し、やはり、網脈絡膜においては著しい亜鉛の低下が亜鉛欠乏ラットで認められた。このことは他臓器に比較して眼球は、亜鉛の供給が制限された場合に変動を来し易く、しかも回復が遅れることが示されている。

以上の事実より、網脈絡膜は金属の保持作用を持たない上に、供給の制限も加わる組織であることが考えられる。その結果、金属動態の変化をまともに受け、代謝の変化をそのまま反映する臓器と考えられる。このことは、眼科領域では糖尿病等の代謝異常が発生した際に、網膜症が発症しやすいこととも関連していると思われ、今後更に追求していく必要があると考えられる。ただし、本実験では、眼球各組織の金属量の測定を各個体毎には行わず、実験毎に一検体としてまと

めて測定した。この理由としては、各個体毎の眼球各組織が極めて少量であり、微量金属（特に亜鉛量）によっては測定限界以下の値しか示さなかったことと、測定精度をより高める必要があったためである。また、亜鉛については同一条件下での測定を行う予定であったが、食餌や飼育スペース、マウスの死亡による検体数の減少等により、有意差の検定を行うために止むを得ず追加実験を繰り返して行った。そのため、 ^{65}Zn の取り込みは、各臓器との比較ができないため眼球各組織のみcpm単位にて報告した。

最後に、従来動物では色素上皮層に亜鉛の含量が多い²¹⁾とされてきたが、ヒト眼球においては、亜鉛が網膜のどの部位に存在するかも未だ不明の点があり、我々も組織切片を作成して検討中である。さらに、今回の実験ではマウスやラットを用いたため、ヒト組織と金属量にかなりの差を生じたが、今後はヒト組織に近い実験動物についても実験を行う予定である。

稿を終えるにあたり、御指導頂きました本学化学教室、竹内重雄助教授と佐々木朝照講師ならびに化学教室員一同に深謝致します。

文 献

- 1) 氏家瑞恵：生体微量金属代謝に関する研究。第1報。日眼会誌 83: 2149—2157, 1979.
- 2) 氏家瑞恵：生体微量金属代謝に関する研究。第2報。日眼会誌 83: 2158—2165, 1979.
- 3) **Karcioglu ZA**： Zinc in the eye. *Surv Ophthalmol* 27: 114—122, 1982.
- 4) **Strain WH**： Experimental studies on the acceleration of burn and wound healing. *Univ Rochester Reports* 18, 1953.
- 5) **Stanojevic-Paovic A, Hristic V, Krsmanovic J**： Macro and microelements in the cataractous eye lens. *Ophthalm Res* 19: 230—234, 1987.
- 6) **Oomen HAPG**： Vitamin A, deficiency, xerophthalmia and blindness. *Nutr Rev* 32: 161—166, 1962.
- 7) **Suzuki K, Arakawa Y, Takeuchi S, et al**： Abnormalities of serum metals in patients with Diabetes Mellitus. *J Trace Elements Exp Med* 2: 51—210, 1989.
- 8) 佐々木朝照, 竹内重雄, 木許一良, 他： ICP 発光分析による生体試料中の金属分析法の検討。微量金

属代謝 14: 153—159, 1986.

- 9) **Tauber FW, Krause AC**： The role of iron, copper, zinc and manganese in the metabolism of the ocular tissues with special reference to the lens. *Am J Ophthalmol* 26: 260—266, 1943.
- 10) **Karcioglu ZA**： Pathology of zinc and copper related disorder in humans and animals. In **Karcioglu ZA, Sarper MR** (eds): Zinc and copper in medicine. Springfield, IL, Charles C Thomas, 181—223, 1980.
- 11) **Berman MD, Manabe R**： Corneal collagenases: Evidence for zinc metalloenzymes. *Ann Ophthalmol* 5: 1193—1209, 1973.
- 12) **Pories WT, Shear EW, Jordan DR, et al**： The measurement of wound healing. *Surgery* 59: 821—824, 1966.
- 13) **Ketora GH**： Influence of dietary zinc on cataracts in rainbow trout. *J Nutr* 109: 965—969, 1979.
- 14) **Bowness TM, Morton RA, Shakir MH, et al**： Distribution of copper and zinc in mammalian eyes. Occurrence of metals in mebanin fractions from eye tissue. *Biochem J* 51: 521—530, 1952.
- 15) **Galin MA, Nano HD, Hall T**： Ocular zinc concentration. *Invest Ophthalmol* 1: 142—147, 1962.
- 16) **MacClain CT, Van Thiel DH, Parker S**： Alterations in zinc, vitamin A, and retinal binding protein in chronic alcoholics: A possible mechanisms for night blindness and hypogonadism. *Alcoholism Clin Exp Res* 3: 135—141, 1979.
- 17) **Toskes P, Dawson W, Fitzgerald C**： Treatment of the retinopathy associated with chronic pancreatitis. *Clin Res* 26: 50A, 1978.
- 18) **Newsome DA**： Oral zinc in macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 106: 192—198, 1988.
- 19) 原田景子, 伊藤恭平： 球後視神経炎の血清亜鉛値。眼臨 79: 1224—1226, 1985.
- 20) **Kagi JHR, Vallee BL**： Metallothionein: A cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* 235: 3460—3465, 1960.
- 21) **Figuroa R, Weiss H, Smith JC, et al**： Effect of ethambutol on the ocular zinc concentration in dogs. *Am Rev Resp Dis* 104: 592—594, 1971.