

糖尿病における角膜・水晶体代謝の非侵襲的測定： 生体眼での測定

島崎 潤^{1),2)}, 坪田 一男^{1),2),3)}, 服部 正和⁴⁾, Ronald A. Laing²⁾

¹⁾慶応義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾ボストン大学医学部眼科学教室

³⁾東京歯科大学眼科学教室, ⁴⁾ジョスリン糖尿病センター

要 約

糖尿病での水晶体および角膜の代謝変化を、レドックスフルオロメトリーを用いて生体眼で測定しうるか遺伝性糖尿病マウスにおいて検討した。nonobese diabetic (NOD) マウスの角膜上皮、角膜内皮・および水晶体上皮内の還元型ピリジンヌクレオチド (PN)、および酸化型フラボプロテイン (Fp) よりの自己蛍光を測定し、その比 (PN/Fp 比) を代謝状態の指標とした。NOD マウスの角膜内皮と水晶体上皮において PN/Fp 比はコントロールに比して有意に増加していたが、角膜上皮では差を認めなかった。スペキュラーマイクروسコープによる角膜内皮細胞の形態分析においても有意の変化を認めなかった。これらの結果は、糖尿病において角膜内皮および水晶体上皮で早期より代謝状態の変化が生じていること、レドックスフルオロメトリーはこの変化を検出する手段として有用であること、を示唆していると考えられた。測定された代謝状態の変化は、ポリオール経路の活性増加を反映している可能性が考えられた。(日眼会誌 96: 119-124, 1992)

キーワード: レドックスフルオロメトリー, 糖尿病, 角膜, ポリオール経路, ピリジンヌクレオチド

Noninvasive Metabolic Analysis of the Diabetic Cornea and Lens: In vivo Measurement

Jun Shimazaki^{1),2)}, Kazuo Tsubota^{1),2),3)}, Masakazu Hattori⁴⁾
and Ronald A. Laing²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University

²⁾Department of Ophthalmology, Boston University School of Medicine

³⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College ⁴⁾Joslin Diabetes Center

Abstract

In vivo measurement of metabolic changes in diabetic cornea and lens were performed using redox fluorometry in nonobese diabetic (NOD) mice. Autofluorescence from reduced pyridine nucleotides (PN) and oxidized flavoproteins (Fp) were measured, and the PN/Fp ratio was used as a tissue metabolism indicator. The PN/Fp ratios were significantly higher in the diabetic corneal endothelium and lens epithelium than in the control group's, but such was not the case in the corneal epithelium. Morphometric analysis of the corneal endothelium using specular microscopy revealed no significant

別刷請求先: 160 新宿区信濃町 35 慶応義塾大学医学部眼科学教室 島崎 潤

(平成2年10月12日受付, 平成3年5月31日改訂受理)

Reprint requests to: Jun Shimazaki, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University.

35 Shinano-Machi, Shinjuku-ku 160, Japan

(Received October 12, 1990 and accepted in revised form May 31, 1991)

differences between the two groups. These results indicate that redox fluorometry is able to detect early metabolic changes in the corneal endothelium and lens epithelium, which are induced by diabetes mellitus. Activation of the polyol pathway may be responsible for the change. Corneal epithelia may be less susceptible to diabetic changes than the corneal endothelium and lens epithelium. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 119-124, 1992)

Key words: Redox fluorometry, Diabetes mellitus, Cornea, Polyol pathway, Pyridine nucleotides

I 緒 言

糖尿病に起因する前眼部合併症としては、糖尿病性白内障が従来より良く知られているが、近年角膜知覚の低下¹⁾、角膜上皮治癒遅延²⁾³⁾、再発性角膜上皮剝離⁴⁾、術後の遷延性角膜浮腫³⁾⁵⁾などの角膜障害(糖尿病性角膜症)が報告されてきている。その発症機序はいまだ不明であるが、糖尿病性白内障におけるのと同様、ポリオール経路の活性増加が関与している可能性が示唆されている⁴⁾⁶⁾⁷⁾。また、Chengら⁶⁾⁷⁾は、糖尿病動物モデルを用いて還元型ピリジヌクシオチド(以下PNとする)が水晶体上皮と角膜上皮において増加していることを報告し、これはポリオール経路の活性上昇を反映しているとした。角膜内皮に対する糖尿病の影響としては、スペキュラーマイクロスコープによる形態解析で、内皮細胞平均面積の変動係数(CV値)の増加、六角形細胞出現率の減少などが報告されている⁸⁾¹⁰⁾。その機序については不明であるが、角膜内皮においてもポリオール経路の活性が比較的強く認められることより¹¹⁾¹²⁾、アルドースの貯留によって内皮細胞の形態異常が引き起こされている可能性も考えられている¹⁰⁾。我々はこれまで、レドックスフルオロメトリーを用いて、高濃度ブドウ糖液により灌流された水晶体¹³⁾・および角膜内皮が有意に高いPNシグナルを発生し、これが組織内のreduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)濃度の増加を反映していることを示してきた(角膜内皮については未発表)。今回我々は、レドックスフルオロメトリーを用いて、生体眼において糖尿病での水晶体および角膜の代謝変化を検出し得るか否か検討したので報告する。スペキュラーマイクロスコープを用いた角膜内皮細胞の形態解析も行い、内皮細胞の形態変化と代謝状態の変化の関連についても併せて検討した。

II 実験方法

1. 試料

遺伝性糖尿病マウスであるnonobese diabetic(NOD)mouseを用いて測定を行った(n=8)。実験に用いられたNODマウスの日齢・糖尿病発症よりの期間・性別・実験当日の血糖値を表1に示す。NODマウスは遺伝的にタイプIの糖尿病を発症し、インスリン依存型の糖尿病の動物モデルとして用いられている¹⁴⁾。病理学的には膵β-cellへのリンパ球浸潤を示し、症状として高血糖、体重減少、多尿、インスリン分泌低下を呈する。通常は、早朝尿糖値に応じてインスリンの皮下注射を行って尿糖(±)、血糖値150mg/dl程度にコントロールしてきたが、実験当日はインスリンを注射しなかった。実験直前にテストテープを用いて血糖の測定を行った後、マウスを塩酸ケタミンとLidocaineの筋肉内注射で麻酔し、金属板上にテープで頭部を固定、レドックスフルオロメーター下に置いた。マウス用開眼器にて充分に開眼した後、角膜上にMethylcelluloseを滴下して対物レンズとの間を満たし、PNおよびFpシグナルの測定を角膜上皮・内皮・水晶体上皮について行った。その後、スペキュラーマイクロスコープにて角膜内皮細胞の写真撮影を行い、内皮細胞の形態的变化について検討を行った。対照としては、糖尿病を発症していない同胞マウスを用い(n=8)、同様の測定を行った。

2. レドックスフルオロメトリー

レドックスフルオロメトリーは、眼球銀行用スペ

表1 NODマウスのデータ

	糖尿病発症群 (n=8)	糖尿病非発症群 (n=8)
日 齢 (日)	210±98	210±96
糖尿病発症よりの期間 (日)	48±27	—
性 別	雄	雌
血 糖 値 (mg/dl)	437±63	122±41

NOD: nonobese diabetic (Mean±SD)

キュラーマイクروسコープ(Bio-Optics, LSM 2100 C)と同一の光学部を持ち、それに100 Wのマーキュリーランプ、回転式フィルター、光子計量装置を組み合わせ、各部分の操作、データの保存・解析にパーソナルコンピュータを使用している^{13)15)~17)}。本装置により、きわめて薄い光学切片からの蛍光を組織に侵襲を与えることなく測定することが可能である。今回の測定に用いた条件下では上下方向の分解能は約40 μm 、平面方向の測定領域は、約150 $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ であった。組織のPNシグナルと酸化型フラボプロテインよりの自己蛍光(Fpシグナル)を測定するため、励起光として366 nm (PNシグナル)と438 nm (Fpシグナル)を用い、440 nm (PNシグナル)と540 nm (Fpシグナル)の蛍光を測定した。本研究においてはレドックスフルオロメトリーによる代謝状態の指標としてPNシグナル単独ではなく、PNシグナルとFpシグナルの比(PN/Fp比)を用いた。PNシグナルは、組織中の還元型ビリジンスクレオチド量と強い相関を持っている事が知られているが¹⁸⁾、生体眼を用いた実験においては、試料の生理的な動きに伴ってPNシグナルは動揺してしまう。これまでの報告においてPN/Fp比を指標として用いることによりこの様な誤差を減少させる事が示されており¹⁹⁾、今回もこれに従った。測定は540/540 nmシグナルによる観察光で角膜上皮、内皮、または水晶体上皮に焦点を合わせた状態で行った。1平面における各々の蛍光の測定時間は1秒で、各々のシグナルにおける測定時間は約1分、通常3

~5回の測定を連続して行い、その平均値を代表値としてとった。

3. スペキュラーマイクروسコープ

角膜内皮細胞の観察は、スペキュラーマイクروسコープを用いて行った。臨床用の広視野スペキュラーマイクروسコープ(キーラー甲南, モデル580 S)を用い、対物レンズと角膜の間をMethylcelluloseで満たして観察した。映像は、35 mmフィルムに記録し、Bio-Optics社製の角膜内皮解析用プログラムECC 2000-2を使用し、細胞平均面積・平均面積の変動係数(CV値)・六角形細胞出現率、の3項目について検討を行った。

統計学的な有意差の検討には、paired t検定を用いた。

III 結果

1. レドックスフルオロメトリー

糖尿病発症マウスにおけるPN/Fp比は角膜内皮と水晶体上皮で非発症群に比して有意に増加していたが、角膜上皮においては差を認めなかった(図1)。FN・Fpシグナルの各々の値は、いずれの組織においても両群の間に有意の差を認めなかった(表2)。

2. スペキュラーマイクروسコープ

スペキュラーマイクروسコープによる角膜内皮の形態解析では、平均面積については両者の間にまったく差を認めず、糖尿病群においてCV値の増加、および六角形細胞出現率の減少傾向が認められたが、いずれ

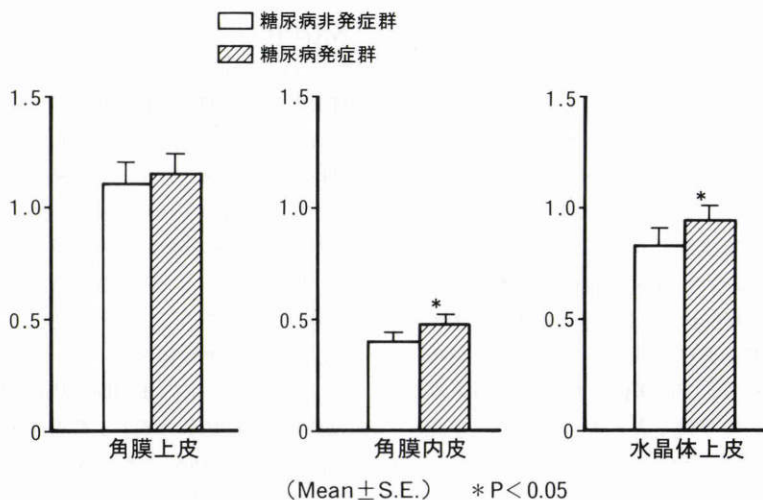


図1 角膜上皮・角膜内皮・および水晶体上皮におけるPN/Fp比。

表2 角膜上皮・角膜内皮・および水晶体上皮におけるPN・Fpシグナル

部 位	糖 尿 病 群			非 糖 尿 病 群		
	PN シグナル	Fp シグナル	PN/Fp 比	PN シグナル	Fp シグナル	PN/Fp 比
角膜上皮	392±40	391±61	1.11±0.08	355±29	356±48	1.09±0.08
角膜内皮	290±49	603±74	0.48±0.19	238±20	735±107	0.35±0.03
水晶体上皮	205±11	200±18	1.06±0.06	144±12	172±12	0.85±0.06

PN: 還元型ビリジンスクレオチド Fp: 酸化型フラボプロテイン (Mean±S.E.)

表3 NOD マウスの角膜内皮細胞のスペキュラーマイクロスコープによる解析

	糖尿病発症群 (n = 8)	糖尿病非発症群 (n = 8)	p value
平均細胞面積 (μm^2)	328.6±10.5	324.4±14.0	0.39
平均細胞面積の変動係数 (CV 値)	0.27±0.02	0.25±0.01	0.15
六角形細胞出現率 (%)	66.0±1.7	70.2±2.8	0.09

NOD: nonobese diabetic (Mean±S.E.)

も非発症群との間で統計学的に有意の差とはならなかった(表3)。

IV 考 按

今回の実験において、NOD マウスの角膜内皮と水晶体上皮におけるPN/Fp比の有意な上昇が認められた。この変化がどのような生化学的変化を反映しているのかを特定することは今回の結果のみからではできない。従来、糖尿病において水晶体²⁰⁾²¹⁾および角膜⁴⁾²⁰⁾²²⁾でポリオール経路の活性が上昇すること、それに伴ってPNが増加することが報告されている。また我々は、高濃度ブドウ糖液中、および薬剤惹起性糖尿病ウサギの角膜内皮細胞が *in vitro* での実験において、NADH/NAD⁺比の増加とPNシグナルの増加が生じていることを認めている(未発表データ)。これらの事は、今回観察されたPN/Fp比の増加が、NADHの増加を反映していること、およびそれがポリオール経路の活性上昇を示している可能性が高いことを表していると考えられた。ただし、今回は、*in vivo* の実験であり、測定部位に完全に焦点を合わせることはできないため、PNシグナルではなく、PN/Fp比を指標として用いた。今回の実験で得られたPN、およびFpシグナルの各々は、糖尿病群と非糖尿病群で有意の差を認めなかったにもかかわらず、PN/Fp比では有意の上昇を示したことはこの間の事情を表しているものと推測された。

ポリオール経路においては、グルコースからソルビトールに変換されるときにアルドース還元酵素により

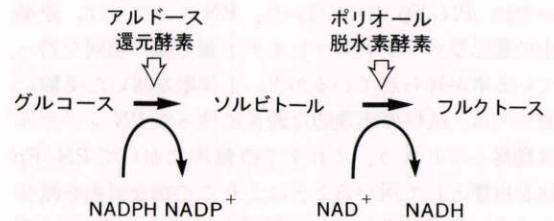


図2 ポリオール経路とビリジンスクレオチド。

NADPHよりNADP⁺へ変換され、ソルビトールからフルクトースへ変換されるときにソルビトール脱水素酵素によりNAD⁺はNADHへ変換される(図2)。レドックスフルオロメトリーは、ビリジンスクレオチド(NAD(H)およびNADP(H))量の変化を検出すると考えられるが、水晶体および角膜においてはNADP(H)はNAD(H)の約1/10しか存在しない^{23)~25)}ために、ポリオール経路の活性増加により、PNの酸化還元状態の平衡は還元方向へと移動することとなる。

従来糖尿病においては、臨床的に角膜厚の増大²⁶⁾²⁷⁾・硝子体手術などの内眼手術後の遷延性角膜浮腫^{3)~5)}が報告され、内皮細胞のポンプ作用の低下の存在が推測されている。これまで、これに対応する角膜内皮細胞の異常所見としては、スペキュラーマイクロスコープにおいて内皮細胞平均面積のCV値の増大・六角形細胞出現率の減少が観察されたのが唯一のものである^{8)~10)}。本研究でも、CV値の増加、六角形細胞出現率の減少傾向がコントロールに比して認められていたが、統計学的な有意のレベルには達しなかった。レ

ドックスフルオロメトリーにより、角膜内皮の酸化還元状態の変化を形態的な変化が生じない時点で測定し得たことは、細胞レベルでの代謝変化が糖尿病性角膜症の早い時期に生じていることを示唆すると共に、この方法が糖尿病性角膜症の診断に有用である可能性を示していると考えられた。

酸化還元状態の変化は、角膜上皮細胞においては認められなかった。この結果は、臨床的に糖尿病での角膜上皮の変化が、むしろ角膜内皮における変化よりも明らかであり、かつこれに対しアルドース還元酵素阻害剤の投与が有効であったという報告²⁸⁾のある事と矛盾するように感じられる。しかし、ある種のアルドース還元酵素阻害剤は、本来のポリオール経路活性の阻害以外の薬理作用も有していることが近年報告されており²⁹⁾、アルドース還元酵素阻害剤が有効であったということのみでポリオール経路の関与と断定するには、若干の議論の余地がある。スペキュラーマイクロスコープを用いた研究によれば、糖尿病患者の角膜上皮形態は通常状態では変化せず、白内障手術などのストレスがその上加わった後のみ変化が生じるとされており³⁰⁾、糖尿病状態における角膜上皮の変化、およびポリオール経路の関与については、今後一層の検討が必要であると考えられる。

稿を終えるに臨み、貴重なご指導を賜り、御校閲をいただきました慶応義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) **Schwartz DE**: Corneal sensitivity in diabetics. *Am J Ophthalmol* 91: 174—178, 1974.
- 2) **Michels RG, Ryan SJ**: Results and complications of 100 consecutive cases of pars plana vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 80: 24—29, 1975.
- 3) **Brightbill FS, Myers FL, Bresnick GH**: Post-vitrectomy keratopathy. *Am J Ophthalmol* 85: 651—655, 1978.
- 4) **Foulks GN, Thoft RA, Perry HD, et al**: Factors related to corneal epithelial complications after closed vitrectomy in diabetics. *Arch Ophthalmol* 97: 1076—1078, 1979.
- 5) **Perry HD, Foulks GN, Thoft RA, et al**: Corneal complications after closed vitrectomy through the pars plana. *Arch Ophthalmol* 96: 1401—1403, 1978.
- 6) **Cheng H-M, Gonzalez RG, von Saltza I, et al**: Glucose flux and redox state of pyridine dinucleotides in the rat lens. *Exp Eye Res* 46: 947—952, 1988.
- 7) **Hay A, Cheng HM, Gonzalez RG, et al**: Activation of the sorbitol pathway in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 (Suppl): 31, 1986.
- 8) **Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, et al**: Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 98: 401—410, 1984.
- 9) **Yee RW, Matsuda M, Kern TS, et al**: Corneal endothelial changes in diabetic dogs. *Curr Eye Res* 4: 759—766, 1985.
- 10) **Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF**: Corneal endothelial morphology in the rat: Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 940—948, 1988.
- 11) **Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, et al**: Localization of aldose reductase in the human eye. *Diabetes* 33: 562—566, 1984.
- 12) **Kern TS, Engerman RL**: Distribution of aldose reductase in ocular tissues. *Exp Eye Res* 33: 175—182, 1981.
- 13) **Tsubota K, Krauss, JM, Kenyon KR, et al**: Lens redox fluorometry: Pyridine nucleotide fluorescence and analysis of diabetic lens. *Exp Eye Res* 49: 321—334, 1989.
- 14) **Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, et al**: Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim* 29: 1—13, 1980.
- 15) **Laing RA, Fischberg J, Chance B**: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide fluorescence from the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 96—102, 1980.
- 16) **Tsubota K, Laing RA, Kenyon KR**: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide and flavoprotein in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 785—789, 1987.
- 17) **Tsubota K, Laing RA, Chiba K, et al**: Noninvasive metabolic analysis of preserved rabbit cornea. *Arch Ophthalmol* 106: 1713—1717, 1988.
- 18) **Shimazaki J, Tornheim K, Laing RA**: Correlation of redox fluorometry and analytical measurements of pyridine nucleotide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2274—2278, 1989.
- 19) **Chance B, Schoener B, Oshino R, et al**: Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. *J Biol Chem* 254: 4764—4771, 1979.
- 20) **Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, et al**: Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism* 28 (Suppl): 462—469, 1979.

21) **Varma SD, Kinoshita JH**: Sorbitol pathway in diabetic and galactosemic rat lens. *Biochimica Biophysica Acta* 338: 632-640, 1974.

22) **Friend J, Thoft RA**: The diabetic cornea. *Int Ophthalmol Clin* 24: 111-123, 1985.

23) **Morley NH, Toth A**: Oxidized pyridine nucleotides and lactic acid in the corneal tissue of rabbits. *Can J Biochem Physiol* 39: 477-483, 1961.

24) **Giblin FJ, Reddy VN**: Pyridine nucleotides in ocular tissues as determined by the cycling assay. *Exp Eye Res* 31: 601-609, 1980.

25) **Masters BR, Riley MV, Fischbarg J, et al**: Pyridine nucleotides of rabbit cornea with histotoxic anoxia: Chemical analysis, non-invasive fluorometry and physiological correlates. *Exp Eye Res* 36: 1-9, 1983.

26) **Olsen T, Busted N, Schmitz O**: Corneal thickness in diabetes mellitus. *Lancet* 1: 883, 1980.

27) **Busted N, Olsen T, Schmitz O**: Clinical observations on the corneal thickness and the corneal endothelium in diabetes mellitus. *Br J Ophthalmol* 65: 687-690, 1981.

28) **Ohashi Y, Matsuda M, Hosotani H, et al**: Aldose reductase inhibitor (CT-112) eyedrops for diabetic corneal epitheliopathy. *Am J Ophthalmol* 105: 233-238, 1988.

29) **Tao RV, Takahashi Y, Kador PF**: Effect of aldose reductase inhibitors on naphthalene cataract formation in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 (Suppl): 352, 1990.

30) **Tsubota K, Chiba K, Shimazaki J**: Corneal epithelium in diabetic patients. *Cornea* 10: 156-160, 1991.