

## ガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮障害 (2)

池部 均, 照林 宏文, 岡本庄之助, 松本 康宏

堤 元信, 茨木 信博, 赤木 好男

京都府立医科大学眼科学教室

### 要 約

ガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮の変化およびそれに対するアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) 投与の影響を形態学的に検討した。SD系ラットを18か月間、①50%ガラクトース食餌、②0.075%ARI (FR 74366, Fujisawa) 含有50%ガラクトース食餌、③通常食餌で飼育した。各群の毛様体突起の連続切片を前頭断方向に作製し光顕的に観察するとともに、個々の毛様体突起切片における毛様体無色素上皮細胞層と色素上皮細胞層との面積比を color image analyzer を用い測定した。その結果、通常食餌群およびARI投与群では2層の上皮細胞は立方型を呈していた。一方ガラクトース食餌群では色素細胞の形態に変化は認められなかったが無色素細胞は著明な円柱型を呈し面積比測定でも明かな拡大を示した。つまり18か月飼育ガラクトース血症ラットにおいて毛様体無色素上皮細胞は著明に肥大し、FR 74366 投与はこれを完全に抑制した。よって上記毛様体変化はARを起因酵素として発症する糖尿病性眼合併症として位置づけられた。(日眼会誌 96: 860-864, 1992)

キーワード: ガラクトース血症ラット, 毛様体, 無色素上皮細胞, アルドース還元酵素阻害剤, 組織学

## Ciliary Body Changes Associate with Aldose Reductase in Galactosemic Rats (2)

Hitoshi Ikebe, Hirofumi Terubayashi, Shounosuke Okamoto, Yasuhiro Matsumoto, Motonobu Tsutsumi, Nobuhiro Ibaraki and Yoshio Akagi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

### Abstract

Morphological changes of the ciliary body epithelium in rats fed a 50% galactose diet for 18 months with or without aldose reductase inhibitor (ARI: FR74366, Fujisawa) were investigated on colonal sections by both the light microscopic observation and the measurement of the area of non-pigmented epithelium (non-PE) as the ratio of non-PE/PE. The measurement was performed with color image analyzer. Structural change (hypertrophy) was observed only in non-pigmented epithelial cells of galactosemic rats. In contrast, no hypertrophic changes were seen in galactosemic rats treated with FR74366. These results strongly suggest that aldose reductase is associated with hypertrophic change of non-pigmented epithelial cells of the ciliary body as one of the diabetic complications. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 860-864, 1992)

Key words: Galactosemic rat, Ciliary body, Non-pigmented epithelial cells, Aldose reductase inhibitor, Histology

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町広小路 京都府立医科大学眼科学教室 池部 均  
(平成3年10月31日受付, 平成4年1月29日改訂受理)

Reprint requests to: Hitoshi Ikebe, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji, Kamikyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received October 31, 1991 and accepted in revised form January 29, 1992)

## I 緒 言

糖尿病性眼合併症として網膜症, 白内障, 角膜上皮・内皮障害などが臨床的によく知られている。いずれもアルドース還元酵素 (AR) を合併症発生の起因酵素 (ポリオール浸透圧説)<sup>1)~3)</sup> とすることが実験的に証明されている。これは網膜, 水晶体, 角膜上皮・内皮, どの組織においても, 免疫組織化学的手法による AR の局在の確認, AR 局在部位にガラクトース負荷時だけに組織学的変化が出現・進展し, さらにそれらの合併症がアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) 投与により抑制される<sup>4)~8)</sup> 事実により強く支持される。一方, 血液一房水柵および房水産生に重要な役割を果たすといわれる毛様体無色素上皮細胞も AR を有することが免疫組織化学的に確かめられている<sup>9)</sup>。つまり毛様体上皮細胞にも糖尿病性変化の存在することが強く示唆される。この仮説を確かめるために前回, 糖尿病の動物モデルとされるガラクトース血症ラットを用い, 10 か月間 50% ガラクトース食餌, ARI (Alcon 1576) 含有 50% ガラクトース食餌にてラットを飼育し, 各々の群で毛様体無色素上皮細胞の肥大およびその正常化を形態学的に示し, 毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づける報告をした<sup>10)</sup>。この提案をより明確にするため, 今回の研究では, さらに長期間のガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮の変化およびそれに対する新しい ARI (FR 74366) 投与の影響を形態学的に調べた。

## II 実験方法

Sprague-Dawley 系ラットを 18 か月間以下の 3 種類の食餌で飼育した。① 50% ガラクトース食餌 (ガラクトース食餌群), ② 0.075% ARI (FR 74366, Fujisawa) 含有 50% ガラクトース食餌 (ARI 投与群), ③ 通常食餌 (通常食餌群) である。各群につき 5 匹ずつのラットが本研究に用いられ, ペントバルビタールナトリウム (ネプタール<sup>®</sup>) 致死麻酔下にて全眼球を摘出した。眼球は 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 1~2 日固定された。固定中, 全周毛様体を含むトリミングを行った。所定の方法にてアルコール脱水しメタクリル樹脂 (JB-4) に包埋した。ついで 2  $\mu$  の連続切片を前頭断方向に毛様体扁平部から虹彩までの範囲で作製しトルイジン青染色後光学顕微鏡にて観察した。またすべての連続切片から各群約 100 個の毛様体突起を無作意的に選び,

個々の毛様体突起を光学顕微鏡で観察し, カラーカメラ (ITC-370 M, Ikegami) からカラーイメージアナライザー (SPICA II, Avio) に画像を入力した。ついで CRT 上の画像の 2 種類の細胞層境界をトレースし (図 1 A), ホストコンピュータにより各突起の毛様体無色素上皮細胞層 (NPE) と色素上皮細胞層 (PE) の占めるピクセル数を測定し (図 1 B), 各突起における細胞層の面積比 (NPE/PE 面積比) を算出した。ただし測定に用いた毛様体突起は, その切片において 2 種類の毛様体上皮細胞と間質とが同時に観察できるものに限った。なお測定部位は図 1 に示されるように毛様体突起先端部より約 1/3 までとした。

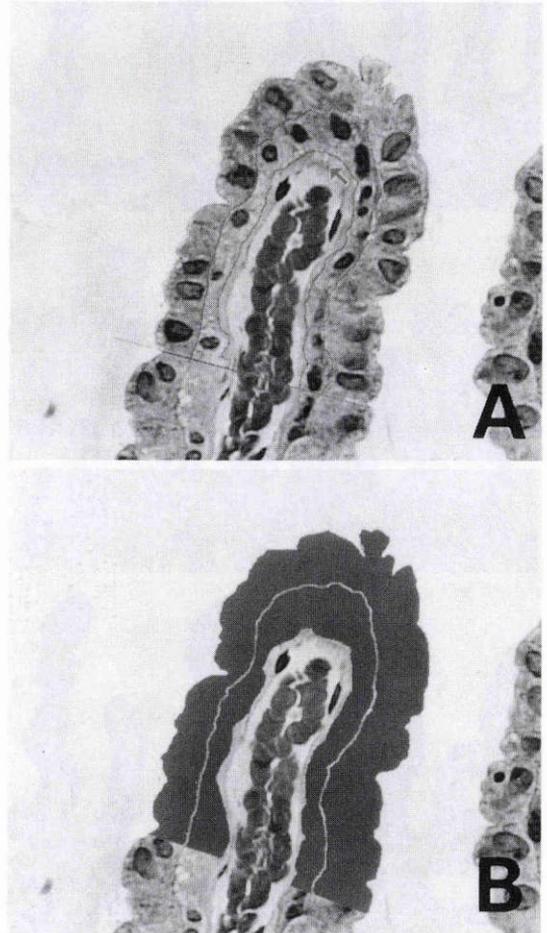


図1 カラーカメラから入力したカラーイメージアナライザーの画像。CRT 上の画像の 2 種類の細胞層境界をトレースし (A), ホストコンピュータにより突起の各細胞層の占めるピクセル数を測定 (B)。

### III 結 果

光学顕微鏡による観察(図2)：通常食餌群(図2A)では毛様体無・有色素上皮細胞とも立方型を呈しそれらの核は細胞質の中央に位置する。一方ガラクトース食餌群(図2B)では無色素上皮細胞は円柱型を呈し核は細胞質の辺縁に位置する。この変化による無色素上

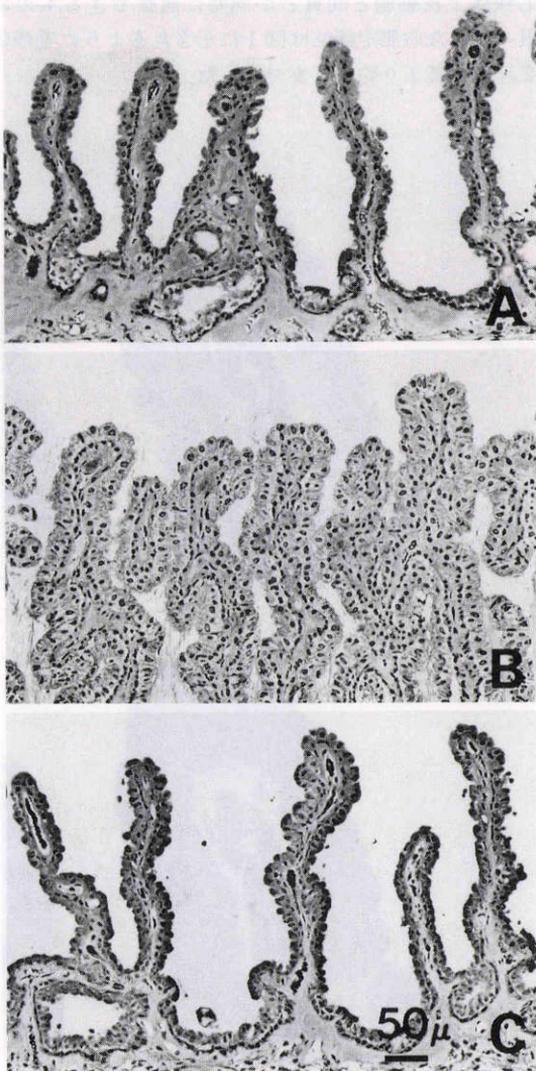


図2 毛様体無色素細胞は正常群(A)およびARI群(C)では立方型を呈しているが、ガラクトース群(B)では円柱型を呈し著明に拡大している。色素細胞の形態は3群に差は認められない。(トルイジン青, ×110)

皮細胞層の異常な厚みの増加が、ガラクトース食餌群における個々の毛様体突起の太さの増大を示す。またこの群でも有色素上皮細胞は立方型を呈し、形状および大きさなどの点で他群のそれと大きな違いは認められなかった。ARI投与群(図2C)では通常食餌群と同様の所見が見られ、無・有色素上皮細胞とも立方型を呈し毛様体突起に太さの増大はなかった。

NPE/PE面積比測定：3群(各群5眼)すべてのNPE/PE面積比測定結果をそれらの平均値±標準偏差をもとに表1に示し、各群5眼の結果を図3にまとめ図示した。個体により若干の変動はあるものの、ガラクトース食餌群におけるNPE/PE面積比測定結果は明らかに通常食餌群およびARI投与群の測定結果と異なり高値を示している。各群でまとめたNPE/PE面積比の平均値±標準偏差は、通常食餌群で1.582±0.195、ガラクトース食餌群で2.544±0.317、ARI投与群で1.694±0.229である。通常食餌群に比べp<0.001と有意にガラクトース食餌群でNPE/PE面積比は約1.6倍に増加し、ARI投与群ではガラクトース食餌群における変化が抑制され通常食餌群に極めて類

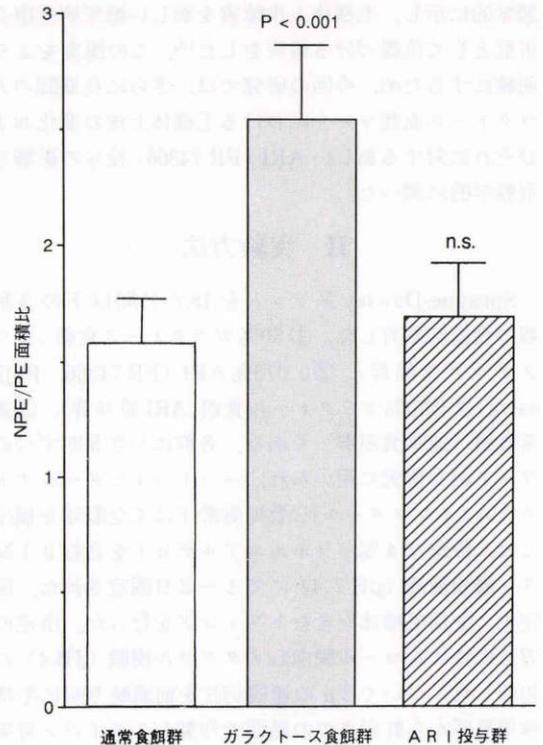


図3 3群のNPE/PE面積比測定結果、縦軸にその平均値・標準偏差値を示す。

表1 3群5眼すべてのNPE/PE面積比測定結果と各群のまとめ

| 通常食餌群       | ガラクトース食餌群                | ARI投与群                 |
|-------------|--------------------------|------------------------|
| 個々の測定結果     |                          |                        |
| 1.584±0.157 | 2.566±0.308              | 1.721±0.268            |
| 1.630±0.192 | 2.384±0.285              | 1.765±0.216            |
| 1.576±0.189 | 2.526±0.303              | 1.645±0.194            |
| 1.492±0.210 | 2.710±0.334              | 1.690±0.173            |
| 1.602±0.216 | 2.628±0.249              | 1.581±0.203            |
| 各群の平均       |                          |                        |
| 1.582±0.195 | 2.544±0.317<br>(p<0.001) | 1.694±0.229<br>(有意差なし) |

通常食餌群に比べ、ガラクトース群で $p<0.001$ , ARI投与群で有意差なしであった

似した測定値を示し検定にて有意差を認めなかった。

#### IV 考 按

糖尿病性眼合併症として毛様体の形態学的研究に関する報告は多くはみられない。Engermanら<sup>11)</sup>は、糖尿病状態における毛様体上皮の基底膜肥厚をヒトとイヌとで報告し、全身の糖尿病コントロールによりその程度は左右されるとし、これを糖尿病性変化と考えた。また岡本<sup>12)</sup>はガラクトース白内障の毛様体無色素上皮細胞を電顕で観察し、mitochondriaの膨化・crysteの消失・surface infoldingの萎縮を認め、房水産生低下を示唆する所見と考察している。毛様体上皮の血液-房水柵機能に関しては、石橋ら<sup>13)</sup>は12か月飼育糖尿病ラットにhorseradish peroxidase (HRP)を静注し、無色素上皮細胞間にあるtight junctionでHRPの後房への移行が阻止されることから、糖尿病において毛様体上皮の透過性亢進はないと結論している。しかし糖尿病における毛様体上皮障害に関する報告は少なく、毛様体にどのような形態的变化がどのような機序で起こるのかを十分理論的に説明し得る報告は見られない。この目的にかなうためには当然、糖尿病性眼合併症の起因酵素であるARの存在を中心に毛様体上皮障害を論じていかねばならないと考えられる。

この一連の研究では、糖尿病における毛様体上皮障害の組織学的証明、すなわち毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づけることを目的とした。前回、ラット毛様体無色素上皮細胞にARが免疫組織化学的に局在し、10か月間ガラクトース食餌で飼育することによりこの細胞が肥大化する、さらにこの組織学的変化がガラクトース食餌にARI (Alcon

1576)を混入することにより正常化することを報告し、毛様体上皮障害を新しい糖尿病性眼合併症として位置づけることを提案した<sup>10)</sup>。この提案をより明確にするため今回、さらに長期間ガラクトース食餌で飼育した時のラット毛様体上皮細胞の形態学的変化、異なるARIによる毛様体上皮細胞に及ぼす影響を検討した。つまり前回報告した毛様体上皮障害が、ある一定の期間だけでなくガラクトース負荷がかかる限り再現性を持って観察され得るということ、さらにその障害が1種類のARIだけでなく異なる構造式をもつARIでも抑制されることを確認し、糖尿病性眼合併症としての毛様体上皮障害の存在をさらに明確にできると考えた。

今回の研究で用いたARIはFR 74366 [3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-7-chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinazolin-1-yl] acetic acid, Fujisawa]である。構造式にカルボン酸を含み、ヒダントイン環を含むAlcon 1576とは異なる種類の新しいARIであり、実験的糖尿病白内障の発症抑制および治癒に及ぼすその強力なARI効果が報告されている<sup>6)</sup>。これらの理由によりFR 74366を本研究で用いるARIとして選択した。

毛様体無色素上皮細胞層と色素上皮細胞層との面積比(NPE/PE面積比)測定について検討する。試料作製に関しては前回の報告と全く同じ方法によるものであり、測定に影響をおよぼす因子としての、いわゆる切片の斜め切れおよび面積比計算に際し色素上皮細胞層の面積を分母(対照)に選んだことの影響は測定上の問題にならなかった。つまり、連続切片を毛様体扁平部から虹彩までの全範囲で作製し、すべての連続切片から全く無作意的に計測されるべき毛様体突起の切片を選び出し、定量的組織学には充分なものと考えられる数の計測を行うことにより、切片の斜め切れによる影響のない極めて高い精度の測定結果を得ることができた。また、本試料でもすべての切片において観察したところ、ガラクトース食餌群における毛様体色素上皮細胞層の面積が通常食餌群およびARI投与群におけるその面積より切片によりやや大きいことはあっても小さいということはなく、3群の無色素上皮細胞層の面積を比較する上で各々の色素上皮細胞層の面積を対照として用いることができた。

前回の報告と異なる方法はカラー画像処理装置を用いて面積比測定を行った手法にある。光顕切片の写真撮影・プリント・印画紙上でのトレース・digitizerに

よる面積測定という過程を必要とする前法に比べ、本法では光学顕微鏡から直接に画像を処理装置に入力できるため方法が簡便、かつ簡便ゆえに人為的操作の余地は少ない。また画像処理を加えることにより2種類の細胞層境界をより明瞭に確認でき、正確に再現性をもって面積測定が行えた。ただ、digitizer的操作をせず画像処理のみで測定を行うのが人為的操作が介入しないという点で理想的ではあるが、今回はトルイジン青という単染色のためその施行は困難であった。完全に人為的操作を省いた方法を理想とすれば、本測定方法に若干の改良点を今後に残すものの、本方法により得られた高精度の面積比測定結果は本研究における毛様体無色素上皮細胞の組織学的変化を正確に定量化したものであると考える。

光学顕微鏡的観察によると、18か月間通常食餌で飼育されたラット毛様体無色素上皮細胞は立方形を呈し、10か月間同食餌で飼育されたものと形態学的に差異はなかった。NPE/PE面積比測定結果によってもこれは裏づけられる。つまり10か月間通常食餌群のNPE/PE面積比は2匹のラットで得られ、それぞれ $1.636 \pm 0.173$ 、 $1.555 \pm 0.182$  (平均値±標準偏差)であった<sup>10)</sup>。一方、18か月間通常食餌群のNPE/PE面積比は5匹のラットの結果をまとめ $1.582 \pm 0.195$ とラット生後月齢による差はなかった。ガラクトース食餌群ではNPE/PE面積比は $2.544 \pm 0.317$ と、通常食餌群と比較すると明らかに無色素上皮細胞層の面積拡大を示し、ARI投与群では $1.694 \pm 0.229$ とガラクトース負荷による面積拡大を抑制した。このように、ある一定の時期だけでなくガラクトース負荷がかかる限り、異なった時期にも無色素上皮細胞層の面積拡大が再現性を持って観察され得るということ、さらにその障害が1種類のARIだけでなく2種類のARIで抑制されることが今回の研究で明らかになった。つまり、今回の研究で糖尿病性眼合併症としての毛様体上皮障害の存在をさらに明確にできた。

本論文の要旨は第95回日本眼科学会にて発表した。

#### 文 献

- 1) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia.

Invest Ophthalmol 4: 786-799, 1965.

- 2) Kinoshita JH: Mechanism initiating cataract formation. Invest Ophthalmol 13: 713-724, 1974.
- 3) Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, et al: Aldose reductase in diabetic complications. Metabolism 28: 462-469, 1979.
- 4) 赤木好男, 照林宏文, 池部 均, 他: ガラクトース血症イヌと糖尿病性網膜症—ARIは糖尿病性網膜症の新治療薬になりうるか—. 第32回日本糖尿病学会総会記録, 糖尿病記録号, 97-102, 1989.
- 5) 田坂 宏: アルドース還元酵素阻害剤(ARI)によるラットガラクトース白内障抑制効果—組織学的・免疫組織化学的研究—. あたらしい眼科 3: 1761-1774, 1986.
- 6) 赤木好男, 池部 均, 照林宏文, 他: アルドース還元酵素阻害剤(ARI)の白内障抑制効果形態学的判定基準について. 日眼会誌 93: 494-500, 1989.
- 7) 高橋幸男, 赤木好男, 秋宗万里, 他: 糖尿病性角膜上皮障害とAldose Reductase. 第2報. 実験的ガラクトース血症ラット角膜について. 日眼会誌 90: 336-340, 1986.
- 8) 茨木信博: 実験的糖尿病の角膜内皮損傷時の修復動態. あたらしい眼科 5: 1643-1650, 1988.
- 9) Ludvigson MA, Sorenson RL: Immunohistochemical localization of aldose reductase. II. Rat eye and kidney. Diabetes 29: 450-459, 1980.
- 10) 池部 均, 照林宏文, 赤木好男, 他: ガラクトース血症ラットにおける毛様体上皮障害. 日眼会誌 93: 758-762, 1989.
- 11) Engerman RL, Colquhoun PJ: Epithelial and mesothelial basement membranes in diabetic patients and dogs. Diabetologia 23: 521-524, 1982.
- 12) 岡本晴彦: ガラクトース白内障における毛様体のAcid-Phosphataseの電顕組織学的研究. 眼紀 34: 663-677, 1983.
- 13) 石橋達郎, 谷口慶晃, 田中健蔵: 実験的糖尿病ラットにおけるぶどう膜循環障害発生機序とその意義に関する電顕的研究. 日眼会誌 86: 191-199, 1982.