

全伸展標本による水晶体上皮細胞増殖能の検討

その3 ガラクトース食餌負荷によるマウス水晶体上皮細胞増殖能の変化

照林 宏文, 堤 元信, 岡本庄之助, 池部 均, 赤木 好男

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

高ガラクトース血症は生じるが、白内障は生じない高ガラクトース血症マウスを用いて、水晶体上皮細胞増殖能を全伸展標本上で³H-サイミジンラベル細胞の分布状態より検討した。ラットガラクトース白内障とは異なり、ラベル細胞数の増加は認めなかった。この事実より、ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能亢進は高ガラクトース血症自体により誘発される可能性は非常にすくないと考えられる。(日眼会誌 96: 9-14, 1992)

キーワード: マウス水晶体, 高ガラクトース血症, 白内障, ³H サイミジン, 全伸展標本

Cell Kinetics of Lens Epithelial Cells on the Whole-mount Preparation

(3) Changes of Mouse Cataract Lens by Feeding Galactose

Hirofumi Terubayashi, Motonobu Tsutsumi, Shounosuke Okamoto

Hitoshi Ikebe and Yoshio Akagi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

In this study, we used ICR (Institute of Cancer Research) strain mouse because they showed hypergalactosemia but not cataractogenesis. We examined the proliferative ability of the lens epithelial cells by means of a whole-mount preparation of epithelium and ³H-thymidine autoradiography. An increased number of labelled cells was not found in the mouse. The increased proliferative ability of epithelial cells in rat galactose cataract did not seem to be caused by hypergalactosemia. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 96: 9-14, 1992)

Key words: Mouse lens, Hypergalactosemia, Cataract, ³H-thymidine, Whole-mount preparation

I 緒 言

ラットガラクトース白内障発生時の水晶体上皮細胞増殖能変化については、古くは細胞分裂像 (mitosis)

の数を計測した報告がある¹⁾⁻³⁾。われわれも³H-thymidine の上皮細胞核への取り込みにより DNA 合成能を定性、定量化した報告⁴⁾⁻⁶⁾、さらにそれを発展させカラー画像解析装置 SpiccaII を用い³H-thymidine

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 照林 宏文
(平成3年3月1日受付, 平成3年4月15日改訂受理)

Reprint requests to: Hirofumi Terubayashi, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

465 Kajji-cho, Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received March 1, 1991 and accepted in revised form April 15, 1991)

ラベル細胞（以下ラベル細胞と略す）数を定量化した報告を行った⁷⁾⁸⁾。これらの結果をまとめると、生後3週齢から7週齢のラットでは、ガラクトース白内障発症のごく早期のガラクトース食餌開始4日目頃に細胞分裂像の数、ラベル細胞数が前囊下中央帯で急増し、7日目になると逆に両者とも正常以下に低下した。しかもこの増殖動態変化は、ガラクトース食餌のガラクトース含有濃度を50%、25%、15%と3段階に変化させても一定であった。ガラクトース食餌開始4日目には、50%ガラクトース食餌群でも白内障は組織学的に赤道部から前囊下表層皮質に局限しており、15%ガラクトース食餌群では組織学的に白内障が形成される前であり、この事実は水晶体上皮細胞増殖能との関係を考える上で非常に興味深い。

ガラクトース白内障発生についてはポリオール浸透圧説によって完全に理解される⁹⁾。つまり、①高ガラクトース血症、②糖アルコール（ガラクトチール）蓄積にと水分吸収による生化学的变化、③水分吸収による水晶体線維膨化を伴う形態学的変化、という経路で説明される。アルドース還元酵素は①から②の経路に働いている。ガラクトース白内障発生早期の上皮細胞増殖亢進の刺激としては、①②③のすべての可能性が考えられる。今回の実験は、ガラクトース食餌飼育にて高ガラクトース血症は生じるが、ガラクトース白内障は生じないマウス水晶体をモデルとして用いて¹⁰⁾、ラットガラクトース白内障発症早期の水晶体上皮細胞増殖能の変動（増殖亢進とそれに続く正常以下への低下）の原因としての①高ガラクトース血症の可能性を検討する事である。

II 実験方法

本実験には、生後7週齢のICR(Institute of Cancer Research)系雄マウス63匹を用いた。21匹ごとの3群に分け、第1群は正常食餌にて飼育し(正常群)、第2群は50%ガラクトース含有食餌にて飼育(ガラクトース群)、第3群は50%ガラクトースに0.075%FR 74366(Fujisawa)アルドースの還元酵素阻害剤(ARI)混入食餌にて飼育した(ガラクトースARI群)。食餌開始1日、4日、7日、14日、28日目に各々3匹のラットについて実験を行った。なお食餌開始4日目にガラクトース群のラットの血中ガラクトース濃度を測定した。実験は、エーテル麻酔下にマウスの両眼球の前房中に5 μ lのmethyl-³H-thymidine(81.7 Ci/mmol, New England Nuclear)を1回注入し、次い

で24時間後に両眼球を摘出した。摘出眼球は前眼部のみを利用し、水晶体後極側より切開して水晶体上皮細胞層と被膜のみを一塊として取り出し、全伸展標本を作成した。標本は4%paraformaldehydeを含む磷酸緩衝液(pH 7.4)にて固定した。

数日間固定後、標本の被膜を下に上皮細胞を上にして、スライドガラスに塗布した。次いでこのスライドガラスを、従来のオートラジオグラフィ法に従い乳剤をかけ(Kodak NTB 2を使用)、現象・定着、トルイジン青にて対比染色し、標識された銀粒子を光学顕微鏡にて観察記録した。

白内障の程度を知るために、3群の各々3匹のマウスにおいて実験開始後28日目の水晶体を摘出、4%paraformaldehydeを含む磷酸緩衝液(pH 7.4)にて固定し、メタクリレート樹脂包埋し、薄切片を作成後、トルイジン青にて対比染色し光学顕微鏡にて観察した。

III 結果

1. 血中ガラクトース濃度測定

生後3週齢ラットを正常食餌、15%、25%、50%ガラクトース食餌、50%ガラクトース+0.075%ARI(FR 745366)食餌にて飼育し、4日目に血中ガラクトース濃度測定を行った結果も合わせて図1に示す。

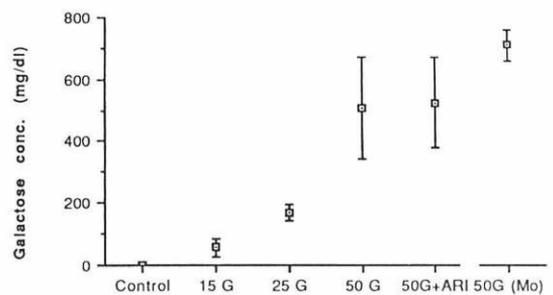
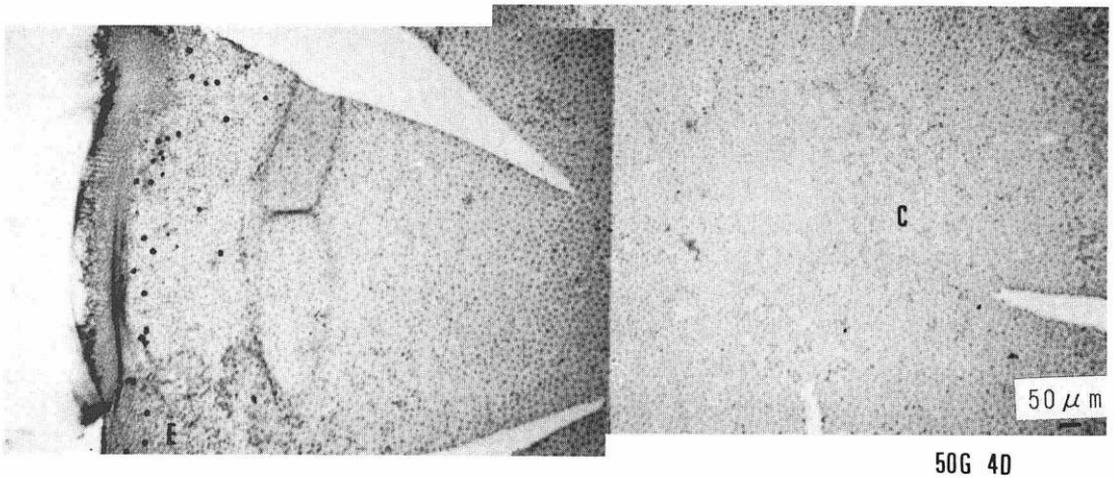
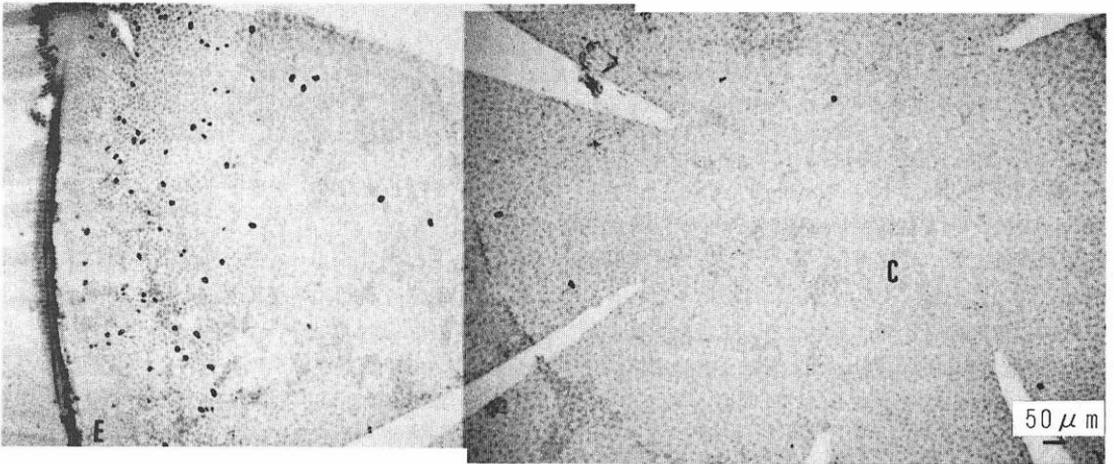


図1 ラット、マウスの血中ガラクトース濃度測定結果。生後3週齢のSD系雄ラットを正常食(Control)、15%ガラクトース含有食餌(15 G)、25%ガラクトース含有食餌(25 G)、50%ガラクトース含有食餌(50 G)、50%ガラクトース+0.075%アルドース還元酵素阻害剤(FR 74366)含有食餌(50 G+ARI)にて飼育し、食餌開始4日目に採血し、血中ガラクトース濃度を測定した。同様に生後7週齢のICR系雄マウスに50%ガラクトース含有食餌(50 G(Mo))を与え、4日目に採血し血中ガラクトース濃度を測定した。横軸は各々の動物群を示し、縦軸は血中ガラクトース濃度(mg/dl)を示す。



50G 4D

図2 50%ガラクトース食餌飼育後4日目のマウス水晶体上皮細胞全伸展標本, ラットとは異なり, 前囊下中央帯ならびに増殖帯におけるラベル細胞増加は観察されない($\times 100$, ヘマトキシリン染色). C: 中央部, E: 赤道部.



50G,ARI 4D

図3 50%ガラクトース+0.75%FR 74366 食餌飼育後4日目のマウス水晶体上皮細胞全伸展標本, ラットとは異なり, 前囊下中央帯ならびに増殖帯におけるラベル細胞増加は観察されない($\times 100$, ヘマトキシリン染色). C: 中央部, E: 赤道部.

ガラクトース食餌飼育ラットにおいては, 食餌のガラクトース濃度に比例した血中ガラクトース濃度増加を示した. ガラクトースARI群でもガラクトース単独群と変わらず血中ガラクトース濃度増加を示した. ARIの血中ガラクトース濃度への影響は見られなかった. マウスにおいては, 50%ガラクトース食餌で飼育するとラットに50%ガラクトース食餌で飼育した場合と同程度に, 血中ガラクトース濃度上昇が観察された.

2. 全伸展標本上でのラベル細胞数の変動

正常群ではラベルの変動は赤道部やや前方に集積し, 増殖帯を形成した. 前囊下中央部でも数個のラベル細胞が観察された. ガラクトース食餌開始1, 4, 7, 14, 28日目に検索したが, ガラクトース群とガラクトースARI群において, ラベル細胞数増加は増殖帯ならびに中央帯においても認められなかった(図2, 3). 実験の全期間中, 正常群ではラベル細胞数はほぼ一定であった(図4).

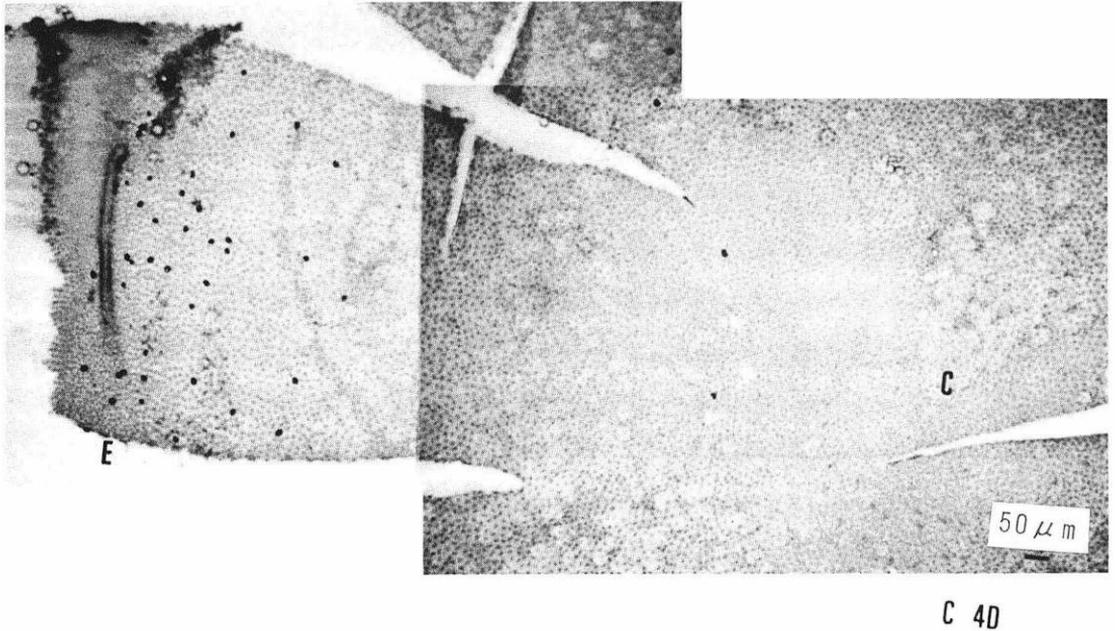


図4 図2および3と同週齢の正常食餌飼育マウス水晶体上皮細胞全伸展標本。正常食餌飼育群では全経過中変化はない。ラベル細胞は増殖帯に集約して見られ、中央帯には数個のラベル細胞が観察されるのみである(×100, ヘマトキシリン染色)。C: 中央部, E: 赤道部。

3. 白内障の観察

50%ガラクトース食餌開始28日目にも白内障は生体顕微鏡観察において認めなかった。さらに光学顕微鏡観察(図5)でも、皮質浅層部には空砲が見られ、さらに赤道部から弓状部にかけての上皮細胞配列にわずかな乱れが認められるものの、明確な線維細胞膨化は観察されなかった。

IV 考 按

ラットにガラクトース含有食餌を与え飼育したり、ストレプトゾトシン静注により糖尿病を作成すると、糖白内障を生じる。これは、Kinoshita⁹⁾のポリオール浸透圧説により説明しえた。ところが、マウスではガラクトース含有食餌にて飼育しても、自然発症糖尿病マウスにおいても糖白内障は生じない。もちろんガラクトース含有食餌にて飼育すると高ガラクトース血症になることは本研究でも確認した。マウス糖白内障が生じにくい原因については、Varmaら¹⁰⁾が明確な解答を出している。つまり、(1) アルドース還元酵素がラット水晶体に比べ1/10と非常にすくない、(2) 蓄積した糖アルコール(ガラクトール)を分解するポリオール分解酵素はラットと同量存在する、(3) したがって、

白内障を生じるだけのポリオール蓄積はない、と説明されている。

ラットのガラクトース白内障発症早期の水晶体上皮細胞増殖能の変動(増殖亢進とそれに続く正常以下への低下)は、よく知られた事実である^{1)2)4)~8)11)}。この原因については明確な答がない。可能性のあるものとしては、高ガラクトース血症、糖アルコール(ガラクトール)蓄積と水分吸収による生化学的変化=線維細胞配列の僅かの乱れであり、形態学的に白内障が証明される以前の状態、水分吸収による水晶体線維細胞膨化を伴う形態学的変化=形態学的に明かな白内障、があげられる。しかし、ラットの15%ガラクトース食餌群では、組織学的に白内障が形成される前に上皮細胞増殖能亢進が生じ⁸⁾、水分吸収による水晶体線維細胞膨化を伴う形態学的変化=形態学的に明かな白内障の可能性は否定的である。

マウス水晶体上皮細胞、特に前囊下中央帯の上皮細胞の増殖能については、Uga¹²⁾によるガラス針による前囊破壊の外傷性白内障の研究結果を見ると、細胞分裂の急激な増加が外傷後2日目に認められている。われわれもYAGレーザーによる外傷性白内障の実験をラットで行い¹³⁾、外傷後1日に³H-thymidineラベル上

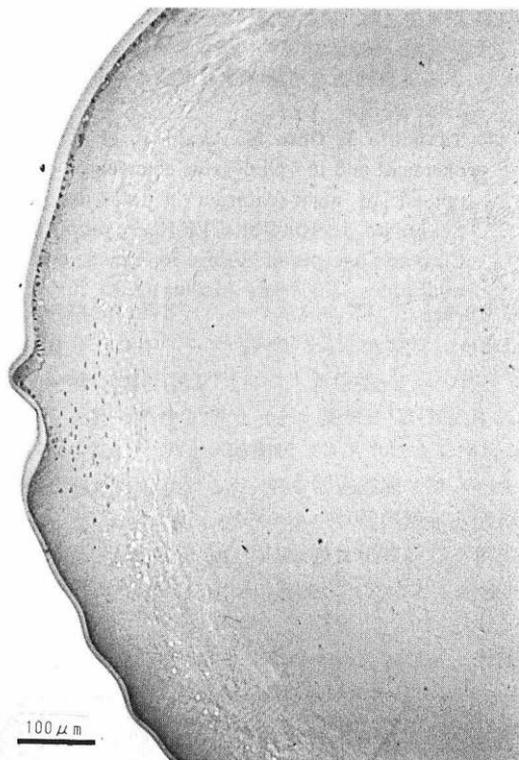


図5 50%ガラクトース食餌飼育後28日目のマウス水晶体光学顕微鏡観察像。皮質浅層部には空胞が見られ、赤道部から弓状部にかけての上皮細胞配列にわずかな乱れが見られるものの、明確な線維細胞膨化は観察されなかった(×260, トルイジンブルー染色)。

皮細胞が外傷部周囲の前囊下中央帯において急増した。これらの事実よりマウスとラットの中央帯水晶体上皮細胞の増殖動態に大差はないと考えられた。

本実験の結果では、50%ガラクトース食餌開始1日目から28日目のすべての経過においてラベル細胞数の増加、減少は観察できなかった。高ガラクトース血症はあっても白内障が生じないとラベル細胞は増加しないと結論できた。従って、ラットにおけるガラクトース白内障初期のラベル細胞増加は“高ガラクトース血症”単独による可能性はないと考えられる。

ラットに与える食餌に含まれるガラクトース濃度を50%、25%、15%と3段階に変え、程度の異なる白内障を作成し、本実験と同様の実験をおこないラベル細胞の変動を検索すると、3群のすべてで食餌開始4日目に中央帯でのラベル細胞急増が観察された⁸⁾。ところが、食餌開始4日目というのは25%と15%ガラク

トース群では光学顕微鏡学的には白内障を認めない時期である。この事実はマウス水晶体と同じである。しかし、ガラクトール蓄積、水分吸収という生化学的变化の面より見ると、15%群においても50%群の約2/3の8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteinのガラクトールの蓄積が食餌開始4日目に観察されている¹⁴⁾。マウス水晶体では、50%ガラクトース食餌にて9週間飼育して7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteinガラクトールの蓄積がやっと認められるのみであり¹¹⁾、ラットに比べ非常に少ない蓄積量と判断できる。この生化学的な原因による形態学的には把握できない線維細胞分裂の乱れが生じており、ガラクトース白内障早期の上皮細胞増殖亢進の刺激としては、糖アルコール(ガラクトール)蓄積と水分吸収による生化学的变化による可能性が最も高いと思われる。

本論文の要旨は第17回水晶体研究会(平成3年,千葉)にて発表した。なお本研究は、文部省科学研究費補助金(01440074)の補助を受けた。

文 献

- 1) Grimes P, von Sallmann L: Lens epithelium proliferation in sugar cataracts. Invest Ophthalmol 7: 535-543, 1968.
- 2) Cotlier E: Hypophysectomy effect on lens epithelium mitosis and galactose cataract development in rats. Arch Ophthalmol 67: 116-122, 1961.
- 3) Gona O, Gorelli L: Mitosis in the lens epithelium of the galactose-fed rat after prolactin treatment. Curr Eye Res 4: 59-63, 1985.
- 4) 照林宏文, 赤木好男, Kador PF, 他: ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能(1). 50%ガラクトース食餌飼育ラットにおいて. 日眼会誌 92: 1869-1874, 1988.
- 5) 照林宏文, 辻 俊明, 赤木好男, 他: ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能(2). 再生水晶体上皮細胞の動き. 眼紀 40: 1820-1824, 1989.
- 6) 照林宏文, 辻 俊明, 松本康宏, 他: ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能(3). 50%ガラクトース白内障の再生水晶体上皮細胞の動態とアルドース還元酵素阻害剤. 日眼会誌 93: 1044-1053, 1989.
- 7) 照林宏文, 辻 俊明, 茨木信博, 他: 全伸展標本による水晶体上皮細胞増殖能の検討, その1. 正常ラット水晶体の老齢化による変化. 日眼会誌 95: 222-227, 1991.
- 8) 照林宏文, 茨木信博, 辻 俊明, 他: 全伸展標本による水晶体上皮細胞増殖能の検討, その2. ラットガラクトース白内障による変化. 眼紀 42: 425

- 431, 1991.
- 9) **Kinoshita JH**: Mechanism initiating cataract formation. Proctor Lecture. Invest Ophthalmol 13: 713—724, 1974.
 - 10) **Varma SD, Kinoshita JH**: The absence of cataracts in mice with congenital hyperglycemia. Exp Eye Res 19: 577—582, 1974.
 - 11) **Hanna C, O'Brien JE**: Studies on galactose cataract formation utilizing thymidine-tritium. Arch Ophthalmol 64: 708—711, 1960.
 - 12) **Uga S**: Wound healing in the mouse lens. Exp Eye Res 32: 175—186, 1981.
 - 13) **岡本庄之助, 照林宏文, 堤 元信, 他**: Nd-YAG レーザー照射による白内障モデル(1). 照射部位による上皮細胞増殖能と進展形式の変化. 眼紀: 1991, 印刷中.
 - 14) **Tanimoto T, Ohta M, Akagi Y, et al**: Biochemical and morphological changes on development of sugar cataract in rat lens, in N Sakamoto, JH Kinoshita, PF Kador, et al (ed): Current Concepts of Aldose Reductase and its Inhibitions. Excerpta Medica 913: 207—212, 1990.
-