

ラット糖白内障モデル水晶体の核磁気共鳴法による解析

森 和彦

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

プロトン核磁気共鳴法は生体内水の存在状態を非侵襲的に得られる唯一の方法であり、白内障初期の変化を捕え得る可能性を秘めている。ヒト糖尿病白内障のモデルであるラットガラクトース白内障に対して *in vivo* 核磁気共鳴画像を用い、その白内障描出能を組織学的検索と比較検討した。また、併わせて緩和時間と水分含有率との間の関係に関しても考察を加えた。その結果、*in situ, in vivo* のラットにおいて、初期の緩和時間延長に対応した皮質領域の高信号域の拡大、および進行した白内障における水晶体線維の液化変性に対応する所見が描出可能であり、さらには抗白内障薬の効果判定にも使用し得ることが示された。(日眼会誌 97: 1157-1164, 1993)

キーワード：核磁気共鳴法，緩和時間，ラットガラクトース白内障，アルドース還元酵素阻害剤，水晶体

Magnetic Resonance Imaging Study on Rat Sugar Cataract.

Kazuhiko Mori

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) is one of the most important methods for non-invasively evaluating the state of water in the biological system. It could be useful for evaluation of the early changes of cataract. In this study, *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) was applied to rat galactosemic cataract, which is a model of the human diabetic cataract, and compared with the histological findings. The relationship between the relaxation times (T1, T2) and the water contents were discussed. The T1 and T2 values were prolonged and the high intensity area of the lens cortex was enlarged from the early stage of the cataract (two days after the intake of galactose). These changes preceded the histological changes. This suggests that MRI is applicable for the evaluation of anti-cataract agents, for example aldose reductase inhibitors, against human diabetic cataract. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1157-1164, 1993)

Key words: Nuclear magnetic resonance, Relaxation time, Rat galactosemic cataract, Aldose reductase inhibitor, Lens

I 緒 言

ヒト糖尿病白内障の発病理論である polyol 浸透圧

説¹²⁾によれば、糖アルコール蓄積により水晶体内に水が流入し、その結果、水晶体タンパク質の秩序構造が乱れ水晶体混濁が生じる。一方、これまでの白内障定

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 森 和彦
(平成5年4月15日受付，平成5年5月21日改訂受理)

Reprint requests to: Kazuhiko Mori, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Hirokouchi-agaru, Kawaramachi, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received April 15, 1993 and accepted in revised form May 21, 1993)

量法が光の透過性の変化を撮影写真の濃淡により解析するもの^{3)~5)}であるのに比べ、プロトン核磁気共鳴法 (proton nuclear magnetic resonance, $^1\text{H-NMR}$) は生体内の水の動態を非侵襲的に調べることができ^{6)~8)}、光の透過性変化よりも早期の変化を捕え得る可能性がある。

正常水晶体ならびに混濁水晶体における水分子の存在状態は、 $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間による報告^{9)~14)}や、differential scanning calorimetry (DSC) を用いた報告^{15)~17)}があるが、これらの報告はいずれも *in vitro* で一定時間経過した後の変化をみたものであり、経時的な変化を *in situ*, *in vivo* で解析し、さらに抗白内障薬の効果判定にまで応用した報告はない。

本論文では、種々の濃度のガラクトース負荷を与えたラットの白内障発症過程における水の動態を *in vitro* $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間で解析し、さらに *in vivo* 磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) を用いて白内障発症時の経時的な変化を追跡した。また、抗白内障薬の1つであるアルドース還元酵素阻害剤 (aldose reductase inhibitor, ARI) の白内障予防効果について MRI により検討した。

II 実験方法

実験にはラットガラクトース白内障を用いた。Sprague-Dawley 系 rat (3週齢, 体重 50 g, 雄) 230匹を以下の5群に分け、それぞれ4週間飼育した。A: 15% galactose 含有食 (オリエンタル酵母工業, 東京) 負荷群 (15 G 群), B: 25% galactose 含有食負荷群 (25 G 群), C: 50% galactose 含有食負荷群 (50 G 群), D: 25% galactose + ARI (FR-74366 0.075%) 混合飼料負荷群 (ARI 群), E: 正常対照群 (NC 群)。使用した ARI は FR 74366, [3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-7-chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-1-yl] acetic acid (藤沢薬品, 大阪) である。各群につき経時的に NMR 緩和時間測定, 水分含有率測定, 組織学的検索を行った。

緩和時間測定は、食餌開始後 2, 4, 7, 11, 14, 21, 28 日目に水晶体を摘出して加湿 NMR 試料管 (外径 10 mm, WILMAD Co., USA) に入れ、スピンエコー NMR 装置 (JNM-FSE-60 E, JEOL) を用いて行った。なお、結果は 6 例の測定値の平均値と標準誤差で示した。パルス系列は縦緩和時間 (T1) に対し inversion recovery 法 (IR), 横緩和時間 (T2) に Carr-Purcell Meibom-Gill 法 (CPMG) を用いた。測定条

件、緩和時間の算出法、および水分含有率の計測は既報^{18)~20)}に従った。

MR 画像解析は 25 G 群, ARI 群および NC 群の 3 群につき同一個体 ($n=3$) で経時的に行った。装置は超伝導磁石 MRI 装置 (CSI-II 4.7 Tesla, General Electric Co., USA) を用いた。ラットを麻酔 (sodium pentobarbital, 50 mg/kg b.w., ip) 後自家製テフロン樹脂台により, Bird Cage 型 Imaging Coil (内径 160 mm, General Electric Co., USA) 内に固定し超伝導磁石中に置いた。測定条件は、パルス系列 spin echo (SE) 法 (繰返し時間 TR=300~4,000 msec, エコー時間 TE=18~90 msec), スライス厚 1.2 mm, pixel size 0.22 mm, field of view (FOV) 56.02 mm×56.02 mm, matrix 256 dots×256 dots, 積算回数 2~4 回である。これらの条件でラットの水晶体径が最大となる眼球正中面での前頭断面画像を得た。

組織学的検索は既報^{18)~20)}に従い、ラットに致死量の麻酔薬を投与した後、眼球から水晶体を摘出し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) + 4% ホルマリンで 5 日間固定した後、脱水、樹脂 (JB-4, Polysciences, Inc., USA) 包埋、薄切、染色 (toluidine blue) し、光学顕微鏡観察 (400 倍) を行った。なお、統計処理はすべて t-検定によった。

III 結果

各群の NMR 緩和時間 (T1, T2) 水分含有率の変化を図 1 に示す。ガラクトース負荷ラット水晶体 NMR 緩和時間は既報^{18)~20)}のように fast 成分と slow 成分とに分けられた。負荷するガラクトース濃度に依存して時期的に早期からの緩和時間延長ならびに水分含有率上昇を認め、これらの変化は ARI 投与によって抑制された。また、組織学的には変化の認められない 15 G 群の早期においても緩和時間の有意な延長を認め、組織学的変化に先立つ白内障発症に対する変化を捕えることができた。水分含有率や T1 の変化と比較して T2 は早期に変化を示した。

NC 群の MR 画像を図 2 に示す。それぞれの MRI 測定の TR/TE は図 2 a, b, c, d の順に 2,000/18, 2,000/20, 2,000/40, 2,000/80 (msec) であり, proton 密度強調画像 (図 2 a), T2 強調画像 (図 2 d), および proton 密度 T2 中間強調画像 (図 2 b, c) に対応する。これらの強調画像では水晶体は周囲の高信号を示す硝子体の中に低信号領域として明確に区別されており、また水晶体皮質は核と比較して高信号を示し、かつ両

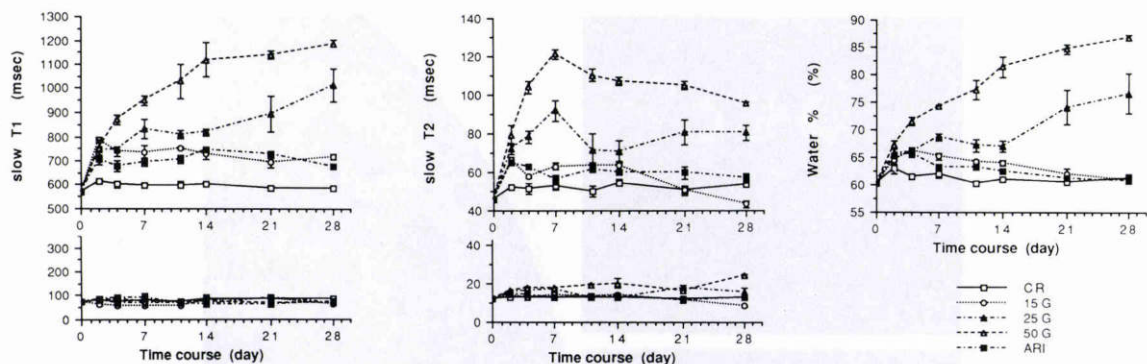


図 1 緩和時間 (T1: 左, T2: 中), 水分含有率 (右) の経時的変化。

いずれも横軸に時間経過(週), 縦軸に変化量を示す。ガラクトース濃度に依存した緩和時間の延長を認め、アルドース還元酵素阻害剤含有食により抑制された。T2 は T1 に比較して早期から急激な変化を示した。指標は各群の平均値を、バーは標準誤差を表す (n=6)。

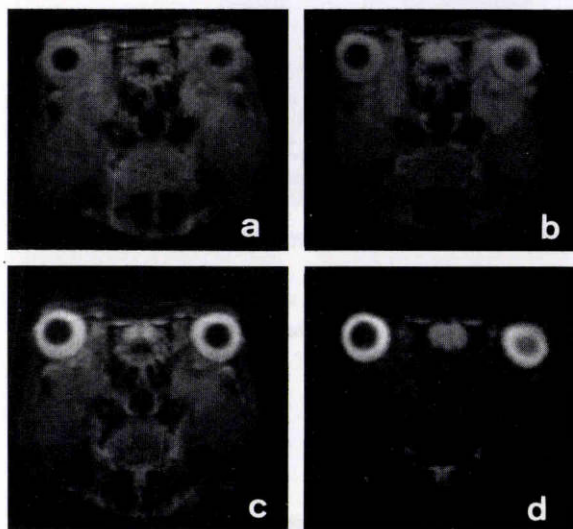


図 2 種々の条件による正常対照群前頭断核磁気共鳴像。

それぞれの測定条件 (繰返し時間/エコー時間) は a, b, c, d の順に 2,000/18, 2,000/20, 2,000/40, 2,000/80 (msec) である。T2 強調効果が強いほど水分含有量の多い硝子体が強調された画像となっている (spin echo, 4.7 Tesla)。

者の境界は段階的に移行していた。一方、T1 強調画像 TR 300/TE 20 では硝子体に比較しても、むしろ水晶体皮質が高音に描出されていたが、信号雑音比が不良で詳細な観察はできなかった。T2 が白内障の比較的早期から 60 msec 以上に延長することから、最も水晶体内部の状態の変化が確認できる TR/TE 2,000/40 の条件を以下の解析に用いた。

4 週目の 25 G 群 (図 3 a) では、水晶体皮質領域に高音領域 (Hi) が出現し、周囲硝子体 (Vt) との境界が不鮮明化していた。これは組織学的な全周性の水晶体線維液化変性に対応していた (図 3 b, n=5), また、皮質の変性により浮遊状態となった水晶体核 (Nu) が周囲の液化部分 (Hi) と明確に区別され、水晶体嚢内でやや下方に偏位した、いわゆるモルガ=白内障の像を呈していることが MR 画像上から確認できた (図 3 a)。

次に 25 G 群の初期の MR 画像上の変化を図 4 に示す。測定条件は同様に TR 2,000/TE 40 を用いた。図 4 a, b, c の順に 25% galactose 食負荷後 2 日, 4 日, 7 日目である。水晶体皮質部分での高音領域幅の拡大が認められ (矢印), 白内障初期における水晶体皮質での緩和時間の延長が示唆された。また、図 5 には ARI 群の 4 週目の MR 画像 (図 5 a) および組織像 (図 5 b) を示す。組織上は水晶体線維の液化膨化が抑制されていた (n=5) が、MR 画像上は皮質領域の高音領域が軽度拡大 (矢印) していた。

IV 考 按

$^1\text{H-NMR}$ で観測される NMR 緩和時間は各臓器や組織ごとの結合水と自由水の存在分布割合を反映しており、非侵襲的に生体内の水情報を得ることができ⁶⁾⁸⁾²¹⁾。生体組織中における水の存在様式は、タンパク質などの巨大分子のために動きの制限された結合水と呼ばれる成分と、その他の自由水と呼ばれる成分が存在し、両者が相互に交換している状態 (chemical exchange) にある。これまで水晶体に対して NMR 緩

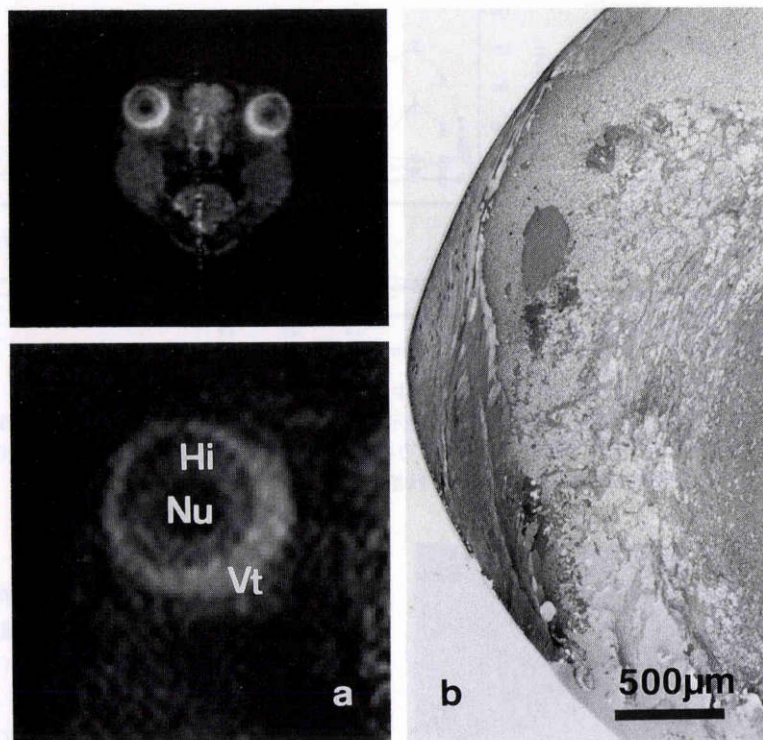


図3 25%ガラクトース含有食負荷群4週目の核磁気共鳴画像(a)および光学顕微鏡写真(b).

水晶体皮質に高信号領域が認められ、核はやや下方へ偏位している。Nu：水晶体核，Hi：液化変性皮質，Vt：硝子体，spin echo，TR 2,000/TE 40，4.7 Tesla，組織学的には全周性皮質の広範囲な水晶体線維液化膨化所見を認める（トリイジン青染色）。

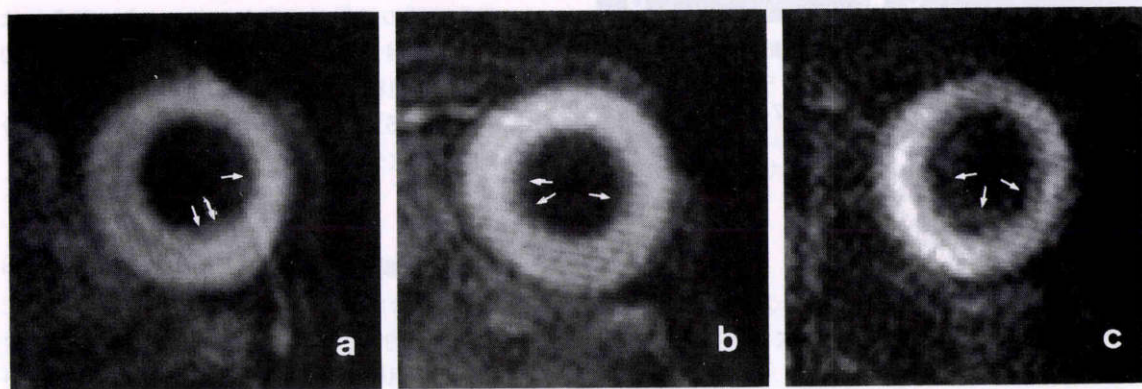


図4 25%ガラクトース含有食負荷群初期の核磁気共鳴画像。

食餌負荷後2日目(a)，4日目(b)，7日目(c)の順に水晶体赤道部相当部位の皮質領域の拡大(矢印)が認められた (spin echo，TR 2,000/TE 40，4.7 Tesla)。

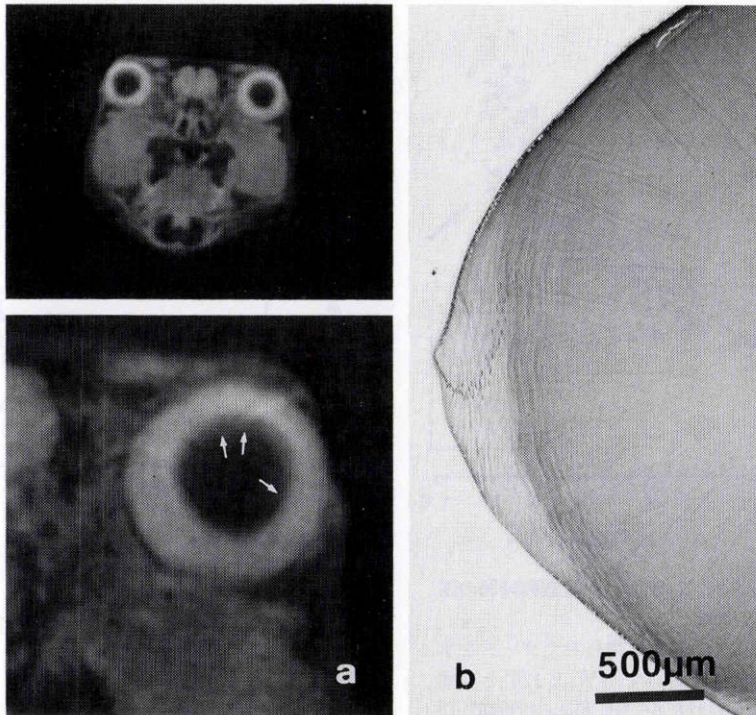


図 5 アルドース還元酵素阻害剤含有食群 4 週目の核磁気共鳴画像 (a) および光学顕微鏡写真 (b)。

核磁気共鳴画像では水晶体皮質領域の拡大 (矢印) が認められた (spin echo 法, TR 2,000/TE 40, 4.7 Tesla) が, 組織学的には皮質の液化膨化所見を認めなかった (トルイジン青染色)。

和時間を測定した報告には Raczy ら¹¹⁾¹⁴⁾, Lerman ら¹²⁾, Pope ら¹³⁾, Cheng ら²²⁾のものがあるが, 白内障発症時の経時的な変化を *in vivo* で捕えた報告はない。正常水晶体の NMR 緩和時間は, T1 が単一成分からなり 500~600 msec, T2 が二成分からなり 10~20 msec と 30~40 msec であるとする報告が多い。しかし, Raczy ら¹¹⁾は吸引脱水法を用いた結果から少なくとも三成分に分離可能としており, 磁場強度ならびに方法の違いにより諸説がある。今回の実験では T1, T2 いずれも二成分となった点でこれまでの報告とは異なるが, 今回用いた NMR 緩和時間測定法が初期の縦緩和過程を捕えられるため, 短い T1 成分も観測できたと考えられる。このような複数の成分については, これまで種々の解釈がなされている。Stankeiwicz ら¹⁰⁾はタンパク質濃度と短い T2 成分の割合とが比例したことから, 短い T2 成分が結合水, 長い T2 成分が自由水に由来するとしている。一方, 脳浮腫に対する NMR 緩和時間の研究²³⁾²⁴⁾からは, ある種の隔壁で隔

てられた 2 つの水分画が存在し, この分画間での水分子の変換が共鳴周波数よりも遅いことに起因するとし, 長い T2 が細胞外液成分, 短い T2 が細胞内液成分に由来するとしている。

今回の実験結果では水晶体核で短い T2 成分のみが観測され, これは水晶体の構造である中心部に向かう高密度なタンパク質の凝集のために水晶体核においては自由水成分がほとんど存在しないためと考えられる。すなわち, 短い T2 成分は主として結合水を, 一方長い T2 成分は主として自由水を反映していると考えられる。

次に白内障発症時の緩和時間の変化について考察する。糖尿病白内障を含め糖白内障では, アルドース還元酵素 (AR) が生成する糖アルコールの浸透圧差により水晶体内に流入した水が種々の代謝異常とともに水晶体線維の膨化・液化を引き起こし, その結果水晶体の混濁が生じる (polyol-osmotic 説¹⁾²⁾) と考えられている。これまで老人性白内障の際に結合水が放出され

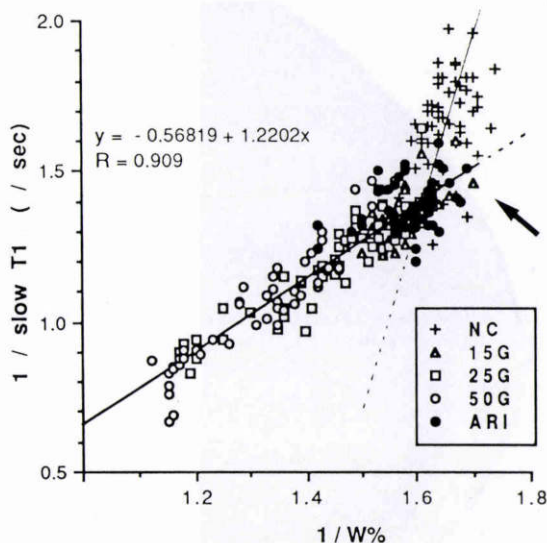


図6 水分含有率の逆数 (1/W%) と縦緩和時間の逆数 (1/T1) の間の関係。

各指標はそれぞれの水晶体から得られたデータを示す。白内障の進行過程において 1/W と 1/T との間には直線関係が認められたが、NC 群と白内障群 (15 G, 25 G, 50 G) との間に breaking point (矢印) が存在した。

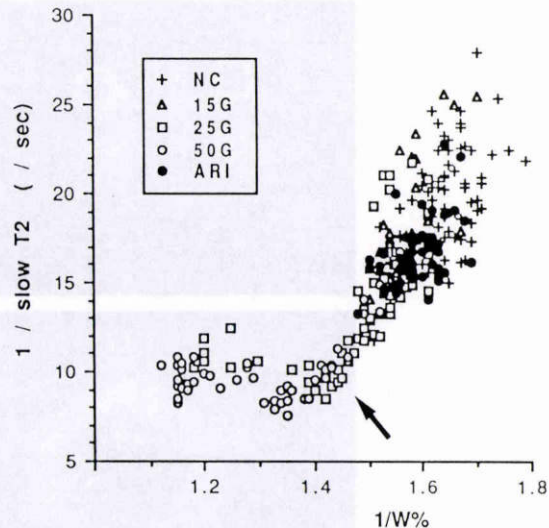


図7 水分含有率の逆数 (1/W%) と横緩和時間の逆数 (1/T2) の間の関係。

指標は各水晶体のデータを示す。breaking point (矢印) は比較的末期に認められた。

自由水になるとする報告¹⁴⁾があるが、糖白内障においては未だ両者の関係を緩和時間から解釈した報告はない。緩和時間と結合水、自由水の分布割合との間の関係式¹⁰⁾²⁵⁾は以下に示す通りである。

$$1/T = a/T_b + (1-a)/T_f$$

$$W = (G_b + G_f) / (G_b + G_f + G_s)$$

: water content

$$a = G_b / (G_b + G_f) : \text{bound water fraction}$$

$$k = G_b / G_s : \text{hydration fraction}$$

$$1/T = p \times (1/W) + (1/T_f - p)$$

$$p = k \times \{ (1/T_b) - (1/T_f) \}$$

この式から周囲環境に変化がなく自由水や結合水の緩和時間 (T_f , T_b)、水和比 (k) が一定であれば緩和時間の逆数と水分含有率の逆数の間には直線関係が成り立つことが示される。今回の実験においては、図6に示すように正常対照群と白内障群との間に breaking point (図6, 矢印) が存在しており、白内障出現に伴って直線の傾きが小さくなった。固形成分重量 (G_s) は白内障進行とともに減少していたことから、傾きの変化は結合水 (G_b) の相対的な減少、すなわち自由水成分の増加を示している。つまり、白内障初期に

はガラクトースの蓄積により浸透圧が上昇し、それに伴って結合水の変化以前に自由水の形で水が流入してくると思われる。

さらにこれらの水は、凝集したクリスタリン配列の間隙に徐々に侵入し、タンパク質に対して水との相互作用を起こす部位を増加させると考えられる。したがって、水を結合水化させるタンパク質量が増加し、全体の水分子における結合水分画が増えるために緩和時間は短縮すると予想される。50% galactose 含有食負荷後7日目以降も水分含有率は増加するにも関わらず、緩和時間 (slow T2) に短縮傾向が認められたのはこのためであると考えられる (図7, 矢印より左)。

次に、これらの NMR 緩和時間を実際の画像解析に応用した結果について検討する。過去の画像解析の報告には Cheng ら²²⁾、Ahn ら⁹⁾、Williams ら²⁶⁾のものがあがあるが、いずれも *in vitro* の実験系であり、今回のように同一個体で経時的に追跡したものはない。正常群 T2 強調画像において、水晶体皮質から核にかけ段階的に信号強度の低下した所見は、水晶体皮質表層ほど緩和時間の長い自由水成分が多く存在し、核に近いほど緩和時間の短い結合水成分の占める割合が多いためと考えられる。一方、25 G 群における初期の水晶体皮質領域の拡大、7日目の皮質深層における高信号領域 (Hi) の出現は、緩和時間の長い水分子割合の増加が主

として水晶体皮質から生じることを示しており、Ahnら⁹⁾の結果と一致した。また、ARI群では末期に至っても高信号領域は出現せず、皮質領域が軽度拡大するにとどまった。

すなわち、これらの事実は、水晶体研究へのMRIの応用が水晶体の膜機能を反映した水の動きを *in vivo* で把握し、さらにAR阻害剤の効果判定の際にも同一個体での経時的变化を定量的に捕え得ることから、他の白内障定量法や生化学的方法にはない利点を持つと結論できる。

本論文の要旨はUS-Japan Aldose Reductase Workshop および第68回日本生理学会大会において発表した。

稿を終えるにあたり、直接研究の御指導を賜りました京都府立医科大学眼科学教室赤木好男助教授、明治鍼灸大学生理学教室西川弘恭教授、京都府立医科大学第一生理学教室森本武利教授、ならびに論文のご校閲を賜りました京都府立医科大学眼科学教室木下 茂教授に心から深謝いたします。

文 献

- 1) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. Protector lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 13: 713—724, 1974.
- 2) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald memorial lecture. Invest Ophthalmol 4: 786—799, 1965.
- 3) Hockwin O, Lerman S, Ohrloff C: Investigations on lens transparency and its disturbances by microdensitometric analyses of Scheimpflug photographs. Curr Eye Res 3: 15—22, 1984.
- 4) 弓削経夫, 竹田 仁: 徹照および細隙燈写真による白内障の数量表示法の検討. 日眼会誌 89: 1046—1051, 1985.
- 5) 柏木豊彦, Khu PM, Ahlgren SC, Wolfe J: Scheimpflug 写真による白内障の新しい評価法. 日眼会誌 92: 1833—1838, 1988.
- 6) 曾我美勝, 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.
- 7) Neville MC, Paterson CA, Rae JL, Woessner DE: Nuclear magnetic resonance studies and water “ordering” in the crystalline lens. Science 184: 1072—1074, 1974.
- 8) Gadian DG: Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems. Oxford University Press, New York, 109—132, 1982.
- 9) Ahn CB, Anderson JA, Juh SC, Kim I, Garner WH, Che ZH: Nuclear magnetic resonance microscopic ocular imaging for the detection of early-stage cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1612—1617, 1989.
- 10) Stankeiwicz PJ, Metz KR, Sassani JW, Briggs RW: Nuclear magnetic resonance study of free and bound water fractions in normal lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2361—2369, 1989.
- 11) Racz P, Tompa K, Pocsik I, Banki P: Water fractions in normal and senile cataractous eye lenses studied by NMR. Exp Eye Res 36: 663—669, 1983.
- 12) Lerman S, Ashley DL, Long RC Jr, Goldstein JH, Megaw JM, Gardner K: Nuclear magnetic resonance analyses of the cold cataract: Whole lens studies. Invest Ophthalmol Vis Sci 23: 218—226, 1982.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Bettelheim FA, Ali S, White O, Chylack LT Jr: Freezable and non-freezable water content of cataractous human lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 122—125, 1986.
- 16) Wang X, Bettelheim FA: Distribution of total and non-freezable water contents of galactosemic rat lenses. Curr Eye Res 7: 771—776, 1988.
- 17) Cameron IL, Contreras E, Fullerton GD, Kellermayer M, Ludany A, Miseta A: Extent and properties of nonbulk “bound” water in crystalline lens cells. J Cell Physiol 137: 125—132, 1988.
- 18) 森 和彦, 照林宏文, 赤木好男, 吉崎和男, 西川弘恭: 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.
- 19) 森 和彦, 松本康宏, 池部 均, 照林宏文, 赤木好男, 吉崎和男, 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.
- 20) 森 和彦, 照林宏文, 赤木好男, 岡本庄之助, 堤 元信, 池部 均, 他: ラット糖尿病性白内障の核磁気生理学的解析. 日眼会誌 95: 336—342, 1991.
- 21) 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.
- 22) Cheng HM, Yeh LI, Barnett P, Miglior S, Eagon JC, Gonzalez G, et al: Proton magnetic resonance imaging of the ocular lens. Exp

- Eye Res 45 : 875—882, 1987.
- 23) Bakay L, Kurland RJ, Parrish RG, Lee JC, Peng RJ, Bartkowski HM: Nuclear magnetic resonance studies in normal and edematous brain tissue. *Exp Brain Res* 23 : 241—248, 1975.
- 24) 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 吉崎和男, 西川弘恭: 核磁気共鳴法(NMR)による脳浮腫の研究. *脳神経* 33 : 569—575, 1981.
- 25) Kaneoke Y, Furuse M, Inao S, Saso K, Yoshida K, Motegi Y, et al: Spin-lattice relaxation times of bound water—its determination and implications for tissue discrimination. *Mag Res Imaging* 5 : 415—420, 1987.
- 26) Williams TR, Perry BC, Koenig JL: 1H magnetic resonance imaging study of bovine ocular tissue. *Ophthalmic Res* 22 : 89—94, 1990.