

# ラットガラクトース白内障における水晶体上皮細胞の動態

—顕微蛍光測光法による核 DNA の定量—

高柳 克典, 久保 江理, 都筑 昌哉, 小林 達治

森 和彦, 高橋 幸男, 赤木 好男

福井医科大学眼科学教室

## 要 約

ラットガラクトース白内障の発生過程において顕微蛍光測光法を用い、水晶体上皮細胞核 DNA 量を測定することにより細胞動態を検討した。6 および 12 週齢ラットを用い、正常食で飼育する群、25% ガラクトース食で飼育する群、25% ガラクトース食を 5 日間のみ投与した群に分けて行った。食餌投与開始後、経時的に前囊を取り出し DAPI 染色で上皮細胞核 DNA の定量を行った。対照群では 4C を示す核はわずかであったが、ガラクトース群では 3 日目から 4C が増加し、5 日目にピークとなり、以後徐々に減少していった。また、8C を示す核がみられ

た。ガラクトースの投与を中止した群では、中止後速やかに 4C は減少していった。以上の結果から、ガラクトース投与による水晶体上皮細胞の早期の変化として増殖の活性化が、また、上皮細胞のトラブルの一つとして細胞の多倍体化が示され、このような変化は、ヒト前囊下白内障の成因にも関係すると考えられた。(日眼会誌 99: 1127—1132, 1995)

キーワード：ガラクトース白内障、水晶体上皮細胞、多倍体細胞、顕微蛍光測光法、DAPI 染色

## Cell Kinetics of Rat Lens Epithelium by Cytofluorometric Nuclear DNA Determination

Katsunori Takayanagi, Eri Kubo, Shousai Tsuzuki, Tatsuji Kobayashi,  
Kazuhiko Mori, Yukio Takahashi and Yoshio Akagi

*Department of Ophthalmology, Fukui Medical School*

## Abstract

The cell kinetics of rat lens epithelium was assessed by measuring the changes in the nuclear DNA contents during sugar cataract formation. six- and 12-week-old Sprague-Dawley male rats were used and divided into the following groups: fed on normal chow, fed on 25% galactose diet, and fed on normal chow after 5 days on the 25% galactose diet. Every second day following the beginning of each chow feeding, lenses were extracted, and lens capsules with epithelial cells were obtained. After a few day's fixation in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole)-stained lens epithelial cells were measured by fluorescence cytophotometry. The epithelia in the normal chow-fed rats contained

many 2C and a few 4C nuclei. In the 25% galactose-fed rats, 4C nuclei increased gradually in number until the fifth day, and then decreased slowly day by day. Abnormal polyploid nuclei (8C) were observed in the 25% galactose-fed rats. 4C nuclei decreased rapidly after the diet reversal. These results indicate that galactose feeding caused higher DNA synthesis of rat lens epithelial cells and a higher possibility of abnormal cell division. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1127—1132, 1995)

Key words: Galactose cataract, Lens epithelial cell, Polyploid, Cytofluorometry, DAPI staining

別刷請求先：910-11 福井県吉田郡松岡町下合月 23-28 福井医科大学眼科学教室 高柳 克典  
(平成6年12月20日受付, 平成7年6月13日改訂受理)

Reprint requests to: Katsunori Takayanagi, M.D. Department of Ophthalmology, Fukui Medical School. 23-28  
Shimoaizuki, Matsuoka-cho, Yoshida-gun, Fukui-ken 910-11, Japan

(Received December 20, 1994 and accepted in revised form June 13, 1995)

## I 緒 言

白内障や後発白内障の薬物治療の可能性を追求するためには、直接的にも間接的にも水晶体上皮細胞の動態を検索することが極めて重要である。なぜなら、それらの治療には上皮細胞が最も大きな役割を果たすからである。我々は、水晶体上皮細胞の異常な細胞分裂を示す多倍体細胞が、ヒトの種々のタイプの白内障の中で前嚢下白内障でのみ高頻度に出現することを報告<sup>1)</sup>した。つまり、前嚢下白内障では上皮細胞の増殖が活発になるのである。極めて緩慢な増殖しか行わない水晶体上皮細胞が、いかなるメカニズムでこのような増殖を開始するのかを知ることが、我々の最終目標である。

水晶体上皮細胞の動態を検索するため、我々はラットガラクトース白内障を用いてきた。理由は、白内障がばらつきなく発症するからである。そして、<sup>3</sup>H-サイミジンオートラジオグラフィ法を用い、ラットガラクトース白内障の発生過程において水晶体上皮細胞が赤道部以外の部位でも一定期間異所性増殖が起こっている事実を確かめた<sup>2)</sup>。今回の研究では、これらの事実をさらに落射型顕微鏡蛍光測光法を用いて水晶体上皮細胞核 DNA 量を測定することにより検討し、また、<sup>3</sup>H-サイミジンを取り込まない、つまり、細胞周期の S 期以外の状態の細胞の核 DNA 量をも検索し、ヒトでの結果と比較検討することを目的とした。

## II 実験方法

実験は Sprague-Dawley 系雄ラットを用い、週齢および食餌の違いにより次の 5 群に分けて行った。① 6 週齢および 12 週齢ラットを正常食餌で飼育する群(対照群)、② 6 週齢ラットを 25% ガラクトース含有食餌で飼育する群、③ 12 週齢ラットを 25% ガラクトース含有食餌で飼育する群、④ 6 週齢ラットに 25% ガラクトース含有食餌を 5 日間投与した後、正常食餌に戻した群、⑤ 12 週齢ラットに 25% ガラクトース含有食餌を 5 日間投与した後、正常食餌に戻した群の 5 群である。食餌投与開始 9 日後まで各群 3 匹ずつ、1 日毎に経時的にエーテルによる致死麻酔後、両眼球を摘出し、赤道部で眼球を半分に分断した。次に、水晶体嚢を後方から切開して水晶体核と皮質を除き、水晶体上皮細胞を被膜ごと取り出し、4% paraformaldehyde を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で固定した。

数日間固定後、上皮細胞を上にしてスライドガラスに伸展し、前嚢の周辺部を切り取り中央部(直径約 1.5 mm)のみを残し、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, ナカライテスク)染色<sup>3)</sup>で上皮細胞核 DNA を染色した(図 1)。染色液は 50 ng/ml DAPI, 10 mM EDTA-2 Na, 100 mM NaCl, 100 mM 2-mercaptoethylamine hydrochloride (pH 7.4) の組成で

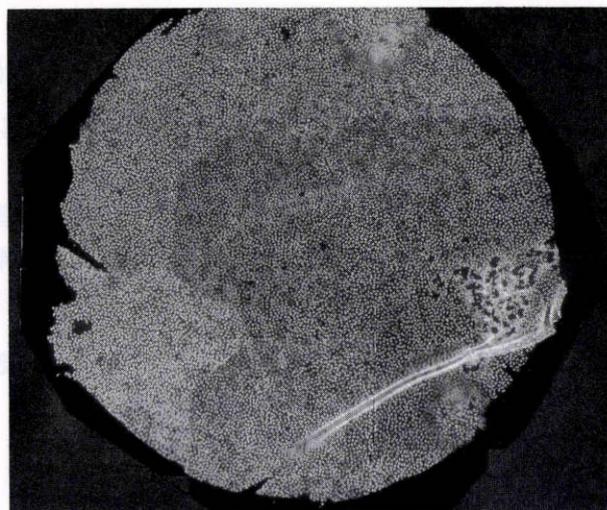


図 1 蛍光顕微鏡写真(DAPI 染色).  
6 週齢ラットの水晶体前嚢中央部、直径約 1.5 mm.

用いた。染色は室温で 30 分以上行い、さらに新鮮な染色液を滴下し封入した。DAPI は DNA のアデニン-チミン塩基対に特異的にイオン結合する蛍光色素で、その発する蛍光強度は DNA 量を反映している。また、特異蛍光が強く減衰が遅いため、核のみが明るい蛍光を呈し背景とのコントラストはきわめて明瞭である。細胞核 DNA 蛍光定量には落射型顕微鏡蛍光測光装置(BH-QRFL, Olympus)を用い、波長 365 nm の励起フィルター、波長 430 nm のダイクロイックミラー、波長 450 nm の測光フィルターを使用し測光を行った。対物レンズは 40 倍を用い、400 倍視野で観察しながら大きな核や、蛍光の輝度の強い核など多倍体細胞である可能性のある核はすべて測定し、その結果、多倍体細胞でない正常のものも含まれていたが、測定した核の数は各標本あたり約 150 個であった。得られたデータは、測光装置にオンラインされたコンピュータ(HP-85 F, Hewlett Packard, USA)によって処理しヒストグラムで表した。

## III 結 果

結果は図 2, 3 に示す。図 2 は X 軸に蛍光強度つまり DNA 量を、Y 軸に核の数をとりヒストグラムで表した。各群の各日数において 1 標本のみヒストグラムを提示したが、それぞれ他の 5 眼においても 4C の増減は同様のパターンであった。図 3 は各群のそれぞれの日数における 6 眼について、4C 核の数を平均し、その経時変化をグラフにしたものである。4C の蛍光強度から 10% の偏位を示すものまでを算定している。正常食餌群では、食餌投与開始後 1, 3, 5, 7 日目においていずれもヒストグラムのパターンに変化はなく、24 眼すべてにおいてヒストグラム上優勢なピークは 1 つであった。つまり、ほとんどの核は均一な蛍光強度を呈しており、4C を示す核はわずかであった(図 2 A, 3 A)。

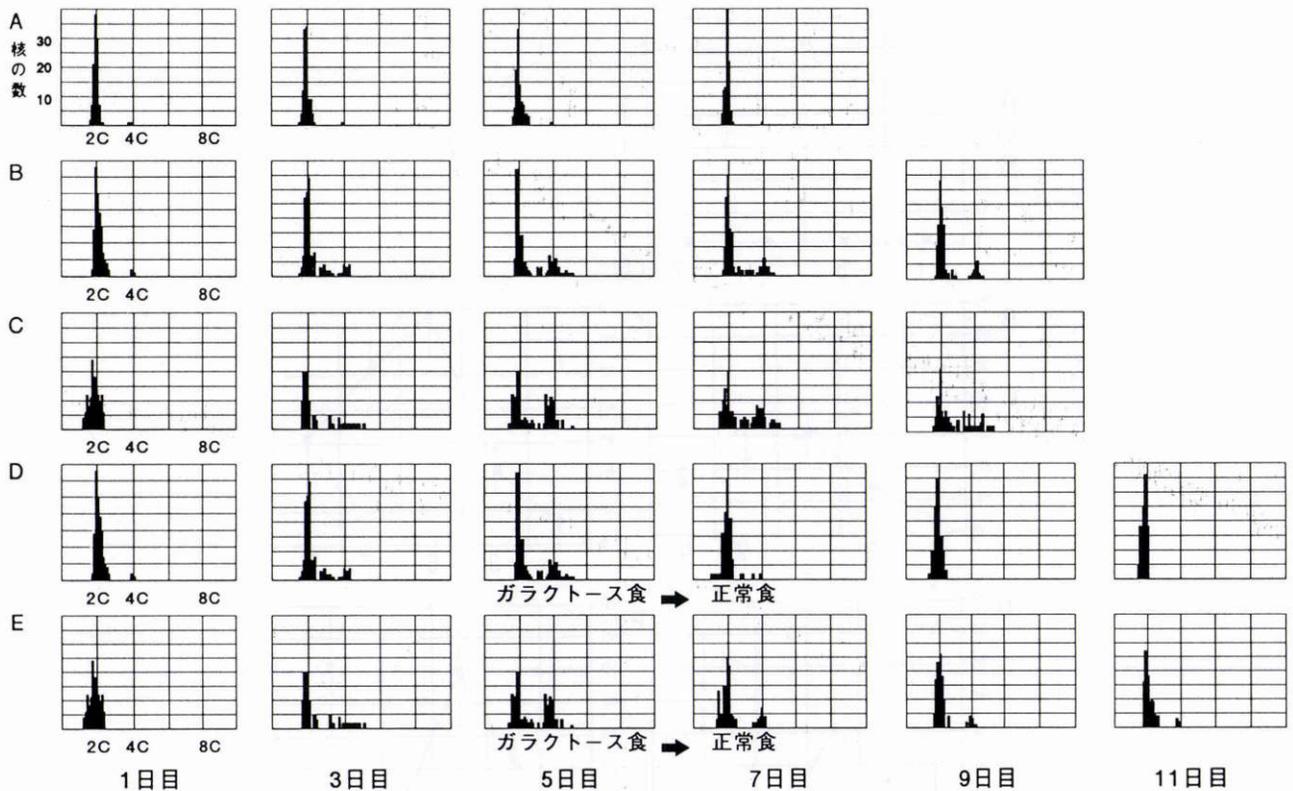


図2 水晶体上皮細胞核 DNA 量のヒストグラム。

X 軸：蛍光強度(DNA 量), Y 軸：核の数. A: 6 週齢, 正常食餌群(対照群). B: 6 週齢, 25% ガラクトース含有食餌群. C: 12 週齢, 25% ガラクトース含有食餌群. D: 6 週齢, 25% ガラクトース含有食餌を5日間で中止した群. E: 12 週齢, 25% ガラクトース含有食餌を5日間で中止した群. ヒストグラム上, 明瞭なピークが2つみられ, それぞれ2Cと4Cを示す蛍光強度の位置であった.

一方, 6 週齢および12 週齢ラットの25% ガラクトース投与群では, 食餌投与開始3日目から, 2C~4Cにかけての蛍光強度を示す核が増加し, 5日目には4Cは最も多く検出された. その後, 7, 9日目と徐々に4Cは減少していった(図2B, C, 3B, C). 核は重なることなく単層に配列し, ほぼ均一な間隔で並んでいた. 検出された4Cはほとんどが分裂像を呈していた核であり, 集簇性はみられず前囊中央部に散在していた(図4). 6 週齢と12 週齢の違いとして, 7日目以降の4Cの減少傾向は6 週齢の方が速やかであった. また, 6 週齢のガラクトース投与群の5日目の2眼と9日目の1眼に1個ずつ, 8Cのproportionalityを示す大きな核がみられた(図5).

25% ガラクトース含有食餌を5日間のみ投与し正常食餌に戻した群では, 6, 12 週齢ともに7日目以降4Cが急激に減少した. つまり, ガラクトースの投与を中止して2日後には4Cがわずかになった. 特に6 週齢では, 12 週齢に比較しより速やかに4Cが減少した(図2D, E, 3D, E).

#### IV 考 按

ヒトでは, 種々の臓器で加齢に伴い多倍体細胞が出現することが報告<sup>4)</sup>されているが, 本実験では, ガラクトース白内障の水晶体上皮細胞におけるDNA ploidy pat-

ternについて実験的に検索した. DNAを蛍光色素で染色し定量する方法にはいくつかあるが, 細胞核の大きさ, あるいは分裂像であるか否かなどを顕微鏡下で観察しながら測定するためにフローサイトメトリーは用いず, また, 4Cの核がどの部位に, どのように配列しているのか, 集簇性があるのか, 重層か単層かを確認するため細胞を単離する方法を採らず, 前囊についたまま落射型顕微蛍光測光法で行った.

本実験では, 生理的条件下で増殖活性が低い成熟ラットのの前囊中央部の上皮細胞の動態を検索するため, 前囊中央部の直径約1.5mmの領域を対象にした. また, 通常の細胞の2倍あるいは4倍のDNAを有する多倍体細胞の存在を知るため, 多倍体である可能性のある大きな核や強い蛍光を発している核はすべて測定した. 蛍光顕微鏡下で観察すると, 多倍体細胞は正常の細胞に比べ明らかに大きいかまたは蛍光の輝度が強くみられた. ただ, 逆に輝度が強く, 大きな核であっても実際に測定してみると2Cであるものもあった. このため, 多倍体細胞を見逃すことなくすべて検出する目的で, わずかでも大きな核や強い蛍光を発している核はすべて測定した.

正常食餌群ではほとんどの核が2Cであったが, この結果は<sup>3</sup>H-サイミジンオートラジオグラフィ法による結果<sup>5)</sup>と一致しており, 成熟ラットのの前囊中央部ではほと

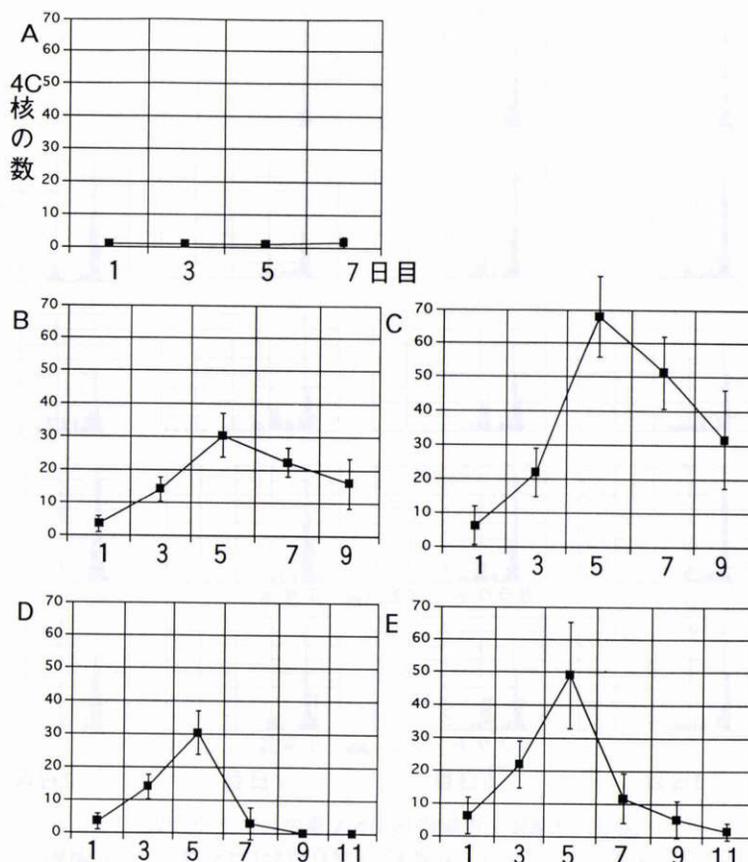


図3 4C核数の経時的変化。

縦軸は核の数、横軸は食餌開始からの日数、4Cから10% 偏移した蛍光強度を示す核までを算定し、各群の4C核の数の経時的変化を表した。バーは標準偏差を示し、 $n=6$ である。A: 6週齢、正常食餌群(対照群)。B: 6週齢、25%ガラクトース含有食餌群。C: 12週齢、25%ガラクトース含有食餌群。D: 6週齢、25%ガラクトース含有食餌を5日間で中止した群。E: 12週齢、25%ガラクトース含有食餌を5日間で中止した群。対照群は4Cが極めて少ないが、ガラクトース投与により5日目をピークとした4Cの増加がみられ(B, C)、投与中止により4Cは速やかに減少した(D, E)。

んどの上皮細胞は増殖していないといえる。しかし、ガラクトース負荷により6週齢でも12週齢でも増殖帯以外の部位でのDNA合成が惹起されることが証明された。 $^3\text{H}$ -サイミジンを用いた水晶体横断面切片の観察<sup>9)</sup>でも、50%ガラクトース食餌を投与すると、前囊下において水晶体上皮細胞の異所性の増殖がみられた。これは3週齢のラットを用いているが、3~4日目にラベル細胞数が最多であった。今回の実験では6週齢と12週齢を用いたが、5日目に4Cは最も多く検出された。この異所性増殖の機序としては、上皮細胞直下の水晶体線維の膨化、液化が原因ではないかと推測される。ガラクトース投与により、高ガラクトース血症が起こり、その結果、水晶体の変化として、上皮細胞に接する前皮質の線維の膨化と再生線維の割り込みが観察されている<sup>7)</sup>。したがって、これらの現象が上皮細胞の異所性増殖に関与していることは間違いない。ところが、高ガラクトース血症を起こしても白内障を発症しないマウスでは上皮細胞の増殖が観察されなかった事実<sup>8)</sup>は、高ガラクトース血症そのものが上皮細胞の増殖を惹起するのではなく、高ガラクトース血症

により発生した水晶体線維の膨化、液化が原因であると考えた方が理にかなっている。ヒトの前囊下白内障でも上皮細胞が増殖し重層化した領域が認められており<sup>9)</sup>、また、ラットにおいても線維の膨化した部分に上皮細胞が増殖している所見が観察されている<sup>10)</sup>。また、ガラクトース食餌を中止し正常食餌に戻した場合再び4Cが減少する現象について、水晶体上皮細胞の直下の膨化、液化した水晶体線維に、速やかに健全な線維が侵入し修復されていく機序が考えられる。あたかも緩んでいた床が再び張り替えられて、上皮細胞が落ち着いたかのようなのである。つまり、これらの考察から、上皮細胞は緊張が失われると一時的に増殖するという性質が判明した。しかし、6週齢と12週齢ラットの両者ともなぜ5日目にピークを迎え、白内障は継続して進行し上皮細胞周囲の緊張は緩み続けるのに、なぜ増殖が停止に向かうのかは不明である。

今回検出された4Cの核が、正常の細胞周期における $G_2$ 期のものか、あるいは正常な細胞周期から逸脱し、通常の2倍のDNAをもつに至った4倍体細胞であるかの

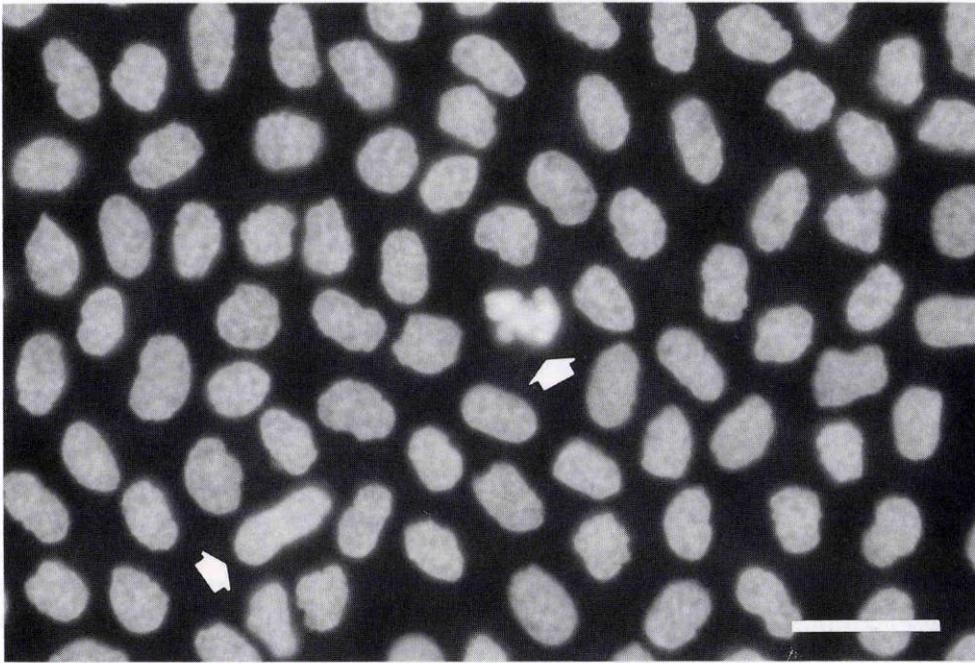


図4 蛍光顕微鏡写真(DAPI染色).

25%ガラクトース含有食餌投与5日目(12週齢ラット)の水晶体上皮細胞核. 4Cを呈する核(矢印)の多くは分裂像を呈していた. バーは20 $\mu$ m

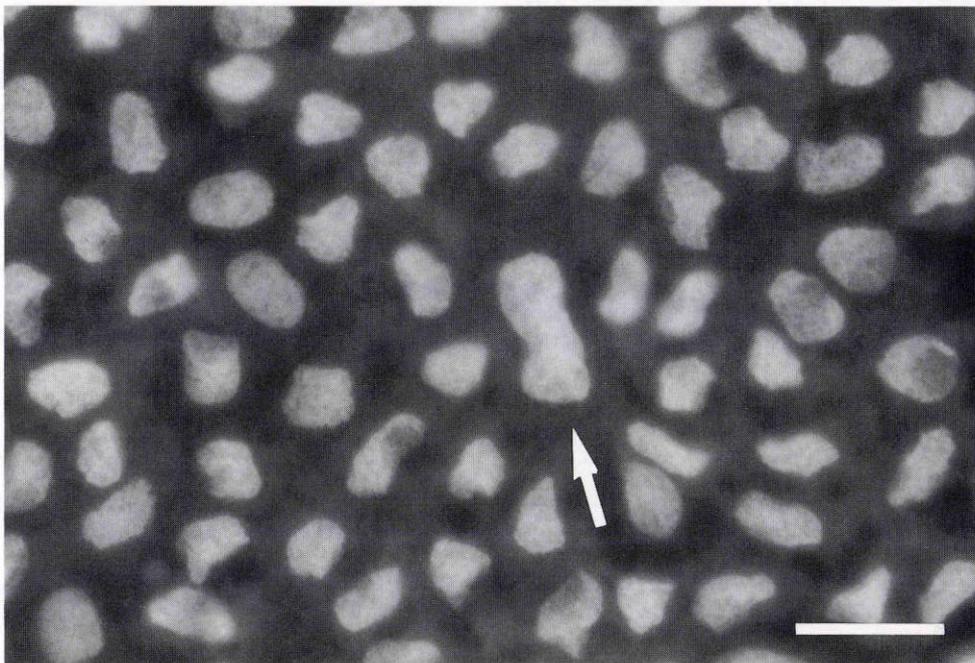


図5 蛍光顕微鏡写真(DAPI染色).

25%ガラクトース含有食餌投与5日目(6週齢ラット)の水晶体上皮細胞核. 周囲の核の数倍の大きさを有する8Cを呈する核(矢印). バーは20 $\mu$ m

判断は難しい.ただ,ほとんどの4Cの核は分裂像を呈していたこと,さらに,2Cと4Cの中間値のDNA量を有する核,つまり細胞周期のS期と思われる核がみられたことから,この4Cは4倍体細胞というよりG<sub>2</sub>期の細胞であると思われる.しかし,数個ではあるが8Cの proportionality を示す核がみられたことから,8Cにな

る前の状態としての4倍体細胞である可能性も否定できない.

糖尿病などに合併するヒトの前囊下白内障やまた膨隆白内障では,上皮細胞に4倍体から16倍体までの多倍体細胞がみられたと報告<sup>911)</sup>されている.この糖尿病白内障のモデルと考えられるガラクトース白内障についても多

倍体細胞が存在しているのか、また、どのように発生してくるのかを実験的に検証することを目的とした。本実験の結果から、通常増殖活性の低い前囊中央部の上皮細胞がガラクトース負荷により突然増殖起転が働くようになった。ヒトの糖尿病白内障においても、やはり上皮細胞に本実験結果と同様の変化が起こり、このような通常と異なる何らかの上皮細胞のトラブルが白内障発症に関与することが伺える。本実験では8Cのproportionalityを示す核がわずかにみられた。この異常細胞分裂を示す多倍体細胞の発生のメカニズムとして、中西<sup>12)</sup>は細胞核DNA二重鎖間にcross-linkが存在し、核の分離が起こらずに多倍体細胞になるとしている。さらに、このcross-linkは体細胞の核の中で時間当たり一定の頻度で確率論的に出現し、潜在的に集積してくるcross-link(潜在的要因)とDNA合成期→分裂期への突入(誘発要因)との2つの要因が相乗されて多倍体細胞が顕現化されると報告している。また、藤本<sup>4)</sup>は人体の種々の臓器における細胞核DNA量の検討から、多倍体化は生理的条件下では増殖活性がきわめて低く、大部分が細胞周期の静止期であるような臓器に生じやすいとしている。今回検出された8Cも潜在的要因としてのDNA二重鎖間のcross-linkと、誘発要因としてのガラクトース投与、つまり、上皮直下の水晶体線維の膨化、液化が作用した結果かも知れない。今回は、8Cの出現が6週齢のラットに限られており、なぜ12週齢のラットにみられなかったのか疑問であるが、8Cの存在は測定した全156眼中わずか3眼であり、しかも1個ずつと極めて少ないため、そもそも8Cの発生率はかなり低いと考えられる。対象眼を多くすれば、12週齢ラットにも検出できたのかも知れない。

以上から、ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞の早期の変化として、増殖帯以外の部位で異所性の増殖が惹起されること、また、水晶体上皮細胞のトラブルの一つの現象として細胞の多倍体化が発生していることを示し、ヒト前囊下白内障の成因には、ラットガラクトース白内障にみられたような変化が関係しているのではないかと考えられた。

## 文 献

- 1) 石田美幸, 岡本庄之助, 池部 均, 照林宏文, 赤木好男, 高松哲郎: ヒト前囊下白内障における上皮細胞DNAの定量—原因疾患によるDNA分布パターンの変異—. 臨眼 46: 500—501, 1992.
- 2) 照林宏文, 赤木好男, Kador PF, Kinoshita JH: 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.
- 3) Hamada S, Fujita S: DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. Histochemistry 79: 219—226, 1983.
- 4) 藤本高久: 加齢及び病変に伴う人体主要臓器細胞の核DNA量変動の解析. 京府医大誌 94: 403—421, 1985.
- 5) 照林宏文, 辻 俊明, 茨木信博, 森 和彦, 池部 均, 赤木好男: 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.
- 6) 照林宏文, 辻 俊明, 松本康宏, 池部 均, 赤木好男: 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例—. 日眼会誌 93: 1044—1053, 1989.
- 7) 辻 俊明, 松本康宏, 森 和彦, 池部 均, 照林宏文, 赤木好男, 他: 新しいアルドース還元酵素阻害剤(FR74366)ラットガラクトース白内障に対する効果. 日眼会誌 94: 120—127, 1990.
- 8) 照林宏文, 堤元 信, 岡本庄之助, 池部 均, 赤木好男: 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—. 日眼会誌 96: 9—14, 1992.
- 9) 田坂 宏, 赤木好男, 吉川隆男, 池部 均, 高橋幸男, 照林宏文, 他: アルドースリダクターゼ阻害剤(ARI), その4. 点眼によるガラクトース白内障発生抑制効果. 日眼会誌 91: 246—253, 1987.
- 10) 阿部映一: 顕微蛍光測光法による白内障の水晶体上皮細胞核DNAの定量的研究. 眼紀 41: 1114—1122, 1990.
- 11) 石田美幸, 池部 均, 照林宏文, 赤木好男, 糸井素一, 高松哲郎: ヒト白内障水晶体上皮の細胞動態—顕微蛍光測光法による上皮細胞核DNAの定量—. 眼紀 43: 84—89, 1992.
- 12) 中西和夫: 2核細胞及び多倍体細胞出現のメカニズム. 京府医大誌 87: 521—536, 1978.