— 原 著 —

実験的糖尿病ラットにおける水晶体, 房水, 硝子体の 生化学的变化とアルドース還元酵素 阻害剤 TAT の影響

斎藤 仁子

日本医科大学眼科学教室

Biochemical changes in lens, aqueous humor and vitreous body and
effects of aldose reductase inhibitor (TAT) on
rats with experimental diabetes

Hitoko Saito

Department of Ophthalmology, Nippon Medical School

The etiology of diabetic cataract is usually explained by the following process; the conversion of glucose and galactose to polyol by aldose reductase, then the accumulation of polyol in lens, and the opacity of lens. Another explanation is that the hyperoxidation of lens membrane due to an increase of active oxygen and lipid peroxide in lens induces diabetic cataract. The experimental animals used in the present study were rats with galactose cataract and streptozotocin cataract. We measured the levels of antioxidants (glutathione, ascorbic acid) and lipid peroxide (malondialdehyde) in lens, aqueous humor and vitreous body. Furthermore we studied the effects of aldose reductase inhibitor (TAT) on these levels. In streptozotocin diabetes rats, the increased malondialdehyde levels in lens, aqueous humor and serum were suppressed by TAT administration. In galactose and streptozotocin diabetes rats, the decreased levels of glutathione and ascorbic acid were suppressed by TAT administration.

Key words: diabetic cataract, aldose reductase inhibitor, galactose diabetes, streptozotocin diabetes

緒 言

糖尿病性白内障の発症原因について詳細な研究がなされており, アルドース還元酵素がグルコースやガラクトースからポリオールへ変換し, このポリオールが水晶体内に蓄積する結果, 水晶体線維細胞の膨化, 液化を生じ, 水晶体が混濁するポリオール浸透圧説が有力である^{1,2)}.

一方, 活性酸素や過酸化脂質による障害が老人性ヒト白内障や実験的白内障に関与する酸化的ストレス説も有力である^{3,4)}. 実験的白内障モデルにおいては, 過酸化水素の増大が起これ, この結果水晶体膜の過酸化が進み, 白内障となると考えられている⁵⁻¹⁰⁾. 白内障水晶体における脂質過酸化物の増大は房水, 硝子体の過酸化水素の増大と相関する. これら酸化物に対し, 水晶体内で最も重要な抗酸化剤は, 還元型グルタチオンとアスコルビン酸であり, ほとんどのヒト白内障あるいは動物実験モデルで認められている. アルドース還元

Correspondence to Hitoko Saito, Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Fig. 1 The structure of TAT
Chemical name: [5-(3-thienyl) tetrazol-1-yl] acetic acid, Molecular formula: $C_7H_6N_4O_2S \cdot H_2O$, Molecular weight: 228.23

酵素阻害剤と白内障との相関をさらに検証するため、ガラクトース白内障とストレプトゾトシン白内障の水晶体、房水、硝子体の抗酸化物質としてグルタチオン (GSH) およびアスコルビン酸、脂質過酸化物質としてマロンジアルデヒド (MDA) の消長を検討した。また、これらにアルドース還元酵素阻害剤がどのように影響するかをストレプトゾトシン糖尿病ラットのソルビトール蓄積を阻害し¹¹⁾、ガラクトース白内障の悪化を遅延させるアルドース還元酵素阻害剤 TAT (Fig. 1)¹²⁾で検討した。

研究材料および方法

(1) 糖尿病ラットの作製

1) ガラクトース糖尿病ラット

3 週齢の雄性 SD ラットを用いた。D-ガラクトースとオリエンタル MF 飼料を 25 対 75 に混合した固形飼料を自由摂取させた。対照群にはオリエンタル MF 飼料を各期間自由摂取させた。

アルドース還元酵素阻害剤 TAT (わかもと製薬で合成) は、ガラクトース食開始二日前より 0.5% メチルセルロースに懸濁し、午前 9 時と午後 5 時の 2 回、40 mg/kg の用量で経口投与した。ガラクトース食後、2, 4, 8 および 15 日目に軽くエーテル麻酔してから、心臓穿刺により採血し、直ちに眼球を摘出した。

2) ストレプトゾトシン糖尿病ラット

(i) 予防実験: 8 週齢の雄性 SD ラットを用いた。糖尿病ラット作製のため、2 mM のクエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシン (シグマ社) 65 mg/kg を一晩絶食させたラット尾

静脈より注射した。TAT 投与は、注射後 0.05% TAT を含むオリエンタル MF 飼料を自由摂取させた。対照群はオリエンタル MF 固形飼料を各期間自由摂取させた。4, 8 および 15 日目に同様に採血した後、眼球を摘出した。

(ii) 治療実験: 予防実験と同様の条件でストレプトゾトシンを注射した。注射後、ラットに 5 日間通常のオリエンタル MF 固形飼料を自由摂取させた。6 日目より 0.05% TAT を含むオリエンタル MF 固形飼料を与え、40 日目に同様に眼球を摘出した。

(2) 白内障の観察

ガラクトース糖尿病の場合、ラットの採血前に 0.5% トロピカミド点眼液 (わかもと製薬) で十分散瞳後、細隙灯顕微鏡で観察を行った。なお、水晶体の混濁度は Sippel¹³⁾の方法に従い、評価を行った。ストレプトゾトシン糖尿病の場合、40 日目の採血前に同様に観察を行い、Shylack¹⁴⁾に準じ評価した。

(3) 水晶体、房水、硝子体の分離¹⁵⁾

摘出した眼球は、直ちに角膜を通して 27 G 注射針で房水を吸引し、次いで 26 G 注射針で硝子体を集めてから水晶体を分離した。房水、硝子体は左右両眼分をあわせ、採取当日に過酸化脂質、グルタチオンおよびアスコルビン酸の測定を行い、残りは -80°C に保存した。

水晶体については、左右別個に重量を測定後、1 mM の EDTA を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 400 μl を加え、計 1,000 μl として生化学的分析試料とした。血液は遠心後、血清を分離し生化学的分析の測定試料とした。

(4) 生化学的分析

(i) 過酸化脂質: 水晶体ホモジネート、房水および硝子体の過酸化脂質は Ohkawa¹⁶⁾の方法に準じて行った。すなわち、過塩素酸で除タンパク後、チオバルビタールと反応させ、その生成物を蛍光法 (励起波長: 515 nm, 蛍光波長: 553 nm) により測定した。

血清中の過酸化脂質は八木¹⁷⁾の方法による過酸化脂質—テストワコーキット (和光純薬) を用いた。これらの過酸化脂質はマロンジアルデヒド

(MDA) 量として求めた。

(ii) 還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) : Hissin¹⁸⁾ の O-フタルアルデヒドによる蛍光法 (励起波長 : 350 nm, 蛍光波長 : 420 nm) に準じて測定した。還元型グルタチオンの場合, メタリン酸で除タンパク後, 上清を 0.1% O-フタルアルデヒド処理して発光させた。また, 酸化型グルタチオンは N-エチルマレイミド処理後, 同様の操作を行った。

(iii) アスコルビン酸 : 岡村¹⁹⁾ の α , α' -Dipyridyl 法に従って行った。トリクロロ酢酸で除タンパク後, 常法通り反応させ, 可視部 525 nm で測定した。

(iv) タンパクとグルコース : タンパク濃度の測定は BCA Protein Assay kit (PIERCE, USA) を, グルコースは O-トルイジン・ホウ酸法¹⁵⁾ を使用したグルコースーテストワコー (和光純薬) で行った。

(v) ポリオールの測定 : ストレプトゾトシン糖尿病ラットの 4 日目についてポリオールの測定を行った。ガスクロマトグラフィー (GC) による測定は次のように行った。水晶体の場合, ホモジネート 25 μ l, 房水および硝子体は 5 μ l をとり, α -

メチル-D-マンノシド (1 μ mol/ml) 20 μ l を添加した。0.2 N-ZnSo 450 μ l を添加し, よくかくはんしてから 50°C, 10 分間加温した後, 0.2 N-Ba(OH) 250 μ l を加え, 0°C 1 時間放置した。次いで 10,000 rpm 10 分間遠心し, 上清を濃縮乾固した。この試料を一晚減圧乾燥した後, TMSI-C (N-trimethylsilyl imidazole, ジーエルサイエンス社) 0.1 ml を加え, 37°C, 1 時間反応した。これを GC 装置に注入しポリオールの測定を行った。

(vi) GC 条件 : カラム温度 190°C, インジェクター温度 220°C, 検出器および検出器温度, FID 270°C, ガスおよび流量 He, 15 ml/min, カラム化学品検査協会, G-100, 40 m, 装置 島津 GC-17 A。

結 果

1. 細隙灯顕微鏡観察

細隙灯顕微鏡観察結果を Fig. 2 に示した。ガラクトース食ラットの場合 4 日目まで水晶体の混濁は認められなかったが, 8 日目には 87.5% の動物に赤道部を中心とした水晶体の混濁が認められた。15 日目には 100% のラットに水晶体の混濁が認められ, その程度も水晶体中央部にまで混濁が認められた。それに対し, TAT 投与群では 8 日目

Fig. 2 Effect of TAT treatment on the severity of lenticular opacities in diabetic rats.

Table 1 Lens weight in diabetic rats

Period after treatment (days)	Lens weight			
	2	4	8	15
	mg/lens	mg/lens	mg/lens	mg/lens
Control	20.23±1.41 ¹⁾ n=16	21.83±0.90 n=16	23.60±1.07 n=16	26.36±1.04 n=16
Galactose, untreated	20.90±1.77 n=16	21.95±1.73 n=16	23.02±1.49 n=16	23.47±3.12 ²⁾ n=16
Galactose, TAT-treated	20.34±1.42 n=16	21.89±1.64 n=16	22.64±1.20 n=16	23.40±2.11* n=16
Control	— ³⁾	31.23±1.57 n=18	31.66±1.21 n=16	35.75±2.36 n=146
Streptozotocin, untreated	—	31.77±1.05 n=18	32.41±2.42 n=16	33.45±1.05* n=14
Streptozotocin, TAT-treated	—	31.24±1.19 n=18	32.84±1.83 n=18	33.55±2.83 ²⁾ n=18

1) Values are mean±S.D., 2) Significant difference from control: *: $p<0.005$, **: $p<0.05$, 3) Not measured.

で20%弱の動物に白内障が認められただけで、15日目においても40%弱のラットになんらの白内障の混濁も認められなかった。

ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは40日目の観察において、水晶体中央部の混濁が全例に認められた。TAT投与群にも水晶体中央部を中心とする混濁が認められたが、非投与群に比べ、その程度は小さかった。

なお、いずれの実験も正常群にはなんらの白内

障の混濁も認められなかった。

2. 水晶体重量

Table 1 に示したように水晶体重量ではガラクトース食15日目には正常群の約26.4 mg に対し、ガラクトース食群では23.5 mg と有意な減少を示した。一方、ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおいても同様の結果がみられた。TAT投与

Fig. 3 Levels of lens glutathione in galactosemic rats. Values are mean ± S.D. (n=8)
Significant difference from control;
*: $p<0.001$, **: $p<0.005$

Fig. 4 Levels of lens glutathione in streptozotocin treated rats. Mean ± S.D.; number of rats used in parenthesis.
Significant difference from control;
*: $p<0.001$, **: $p<0.005$

群でも糖尿病ラットとほぼ同じ水晶体重量減少が観察された。

3. 過酸化脂質 (Table 2-1, 2)

ガラクトース食群において水晶体の4日目にMDAが有意に増加していただけであるが、房水においては2, 4および8日目にガラクトース食で有意にMDAの増加がみられた。この房水でのMDA増加はTAT投与群では有意に抑制されていた。硝子体および血清中のMDAにはほとんど変化は観察されなかった。

ストレプトゾトシン糖尿病ラットの水晶体のMDAは4, 8および15日目で有意な上昇を示していたが、TATはこの上昇を抑制しなかった。しかしながら15日目の房水におけるMDAの上昇はTATにより抑制されていた。一方、血清には明らかなMDAの上昇が認められ、TAT投与群の8および15日目はこの上昇を有意に抑制した。

4. グルタチオン (Fig. 3, 4, Table 3-1, 2)

ガラクトース食の水晶体のGSHでは急激な含量の低下が認められ、8および15日目では約1/3

Table 2-1 MDA content in lens, aqueous humor, vitreous human and serum of galactosemic rats

Period after treatment		lens (nmol/lens)	aqueous humor (nmol/ml)	vitreous humor (nmol/ml)	serum (nmol/ml)
2 day	Control	0.037±0.012 ¹⁾	0.29±0.09	2.26±0.53	14.32±1.98
	Galactose, untreated	0.031±0.004	0.65±0.21 ²⁾	1.78±0.60	11.51±0.91 ^{**}
	Galactose, TAT-treated	0.033±0.002	0.53±0.20 ^{**2)}	2.10±1.46	11.20±1.00 [*]
4 day	Control	0.027±0.005	0.26±0.09	1.22±0.46	9.03±1.10
	Galactose, untreated	0.031±0.004 ^{***2)}	0.52±0.11 [*]	1.02±0.62	17.86±0.95 [*]
	Galactose, TAT-treated	0.030±0.004	0.55±0.22 [*]	0.58±0.29 ^{**}	8.04±1.54 ³⁾
8 day	Control	0.045±0.004	0.28±0.14	1.46±0.51	9.65±1.13
	Galactose, untreated	0.031±0.004 [*]	0.74±0.57 [*]	3.74±0.99 [*]	9.35±1.12
	Galactose, TAT-treated	0.029±0.003 ³⁾ [*]	0.30±0.17 ⁴⁾	3.86±0.53 [*]	8.10±1.23 ^{**}

1) Data represents the mean±S.D. of eight values, 2) Significant difference from control, * ; p<0.005,

** ; p<0.01, *** ; p<0.05, 3) p<0.005 vs galactose, untreated, 4) p<0.05 vs galactose, untreated.

Table 2-2 MDA content in lens, aqueous humor, vitreous human and serum of streptozotocin treated rats

Period after treatment		lens (nmol/lens)	aqueous humor (nmol/ml)	vitreous humor (nmol/ml)	serum (nmol/ml)
4 day	Control	0.036±0.008(9) ¹⁾	0.67±0.37(9)	2.47±1.15(9)	8.62±0.99
	Streptozotocin, untreated	0.076±0.010 ^{**2)} (9)	0.65±0.21(9)	2.44±0.58(9)	11.64±4.24 [*]
	Streptozotocin, TAT-treated	0.075±0.019 [*] (9)	0.53±0.20(9)	1.51±0.54(9)	15.36±7.21 ^{***2)}
8 day	Control	0.042±0.006(8)	0.91±0.09(8)	2.09±0.71(8)	11.02±3.12(8)
	Streptozotocin, untreated	0.087±0.017 ^{**} (8)	0.97±0.07(8)	1.44±0.45(8)	18.08±8.49 ^{***} (8)
	Streptozotocin, TAT-treated	0.084±0.011 [*] (9)	0.94±0.05(9)	1.52±0.36(9)	11.46±2.41 ³⁾ (9)
15 day	Control	0.043±0.003(7)	1.31±0.09(7)	2.36±0.59(7)	11.07±1.90(7)
	Streptozotocin, untreated	0.069±0.004 [*] (7)	1.52±0.14 ^{**2)} (7)	2.33±0.37(7)	21.87±9.39 ^{**} (7)
	Streptozotocin, TAT-treated	0.067±0.003 [*] (9)	1.38±0.08 ^{***} (9)	1.87±0.17(9)	12.65±6.82 ³⁾ (9)

1) Values are mean±S.D. : The number of animals in parenthesis, 2) Significant difference from control,

* ; p<0.005, ** ; p<0.01, *** ; p<0.05, 3) p<0.05 vs streptozotocin, untreated.

Table 3-1 Reduced and oxidized glutathione of aqueous humor and serum in galactosemic rats

Period after treatment		GSH (μmol/ml)		GSSG (μmol/ml)	
		serum	aqueous humor	serum	aqueous humor
2 day	Control	1.119±0.171 ¹⁾	N.T. ²⁾	0.061±0.007	N.T.
	Galactose, untreated	1.068±0.163	N.T.	0.083±0.009* ³⁾	N.T.
	Galactose, TAT-treated	1.093±0.111	N.T.	0.076±0.008*	N.T.
4 day	Control	0.998±0.065	N.T.	0.055±0.004	N.T.
	Galactose, untreated	0.883±0.097** ³⁾	N.T.	0.066±0.005*	N.T.
	Galactose, TAT-treated	1.023±0.099 ⁴⁾	N.T.	0.069±0.005*	N.T.
8 day	Control	1.019±0.054	0.060±0.040	0.054±0.003	0.191±0.047
	Galactose, untreated	0.823±0.096*	0.112±0.036**	0.068±0.004*	0.207±0.024
	Galactose, TAT-treated	0.878±0.116*	0.058±0.021 ⁵⁾	0.068±0.004*	0.246±0.033 ⁴⁾ **
15 day	Control	1.068±0.054	0.055±0.039	0.053±0.004	0.199±0.055
	Galactose, untreated	0.870±0.103*	0.160±0.218	0.065±0.006*	0.231±0.064
	Galactose, TAT-treated	0.879±0.059 ⁵⁾ *	0.038±0.030	0.062±0.002*	0.205±0.031

1) Data represents the mean $\pm$ S.D. of eight values, 2) N.T.=Not tested, 3) Significant difference from control : * : p<0.005, ** : p<0.01, 4) p<0.01 vs galactose, untreated, 5) p<0.005 vs galactose, untreated.

Table 3-2 Reduced and oxidized glutathione of aqueous humor and serum in streptozotocin treated rats

Period after treatment		GSH(μmol/ml)		GSSG(μmol/ml)	
		serum	aqueous humor	serum	aqueous humor
4 day	Control	1.293±0.177(9) ¹⁾	0.025±0.010(9)	0.068±0.002(9)	0.143±0.014(9)
	Streptozotocin, untreated	1.392±0.155(9)	0.032±0.007(9)	0.073±0.008 ^{***2)} (9)	0.138±0.012(9)
	Streptozotocin, TAT-treated	1.476±0.273(9)	0.029±0.007(9)	0.061±0.002 ^{3)•2)} (9)	0.150±0.024(9)
8 day	Control	1.408±0.209(8)	0.024±0.006(7)	0.067±0.003(8)	0.140±0.051(8)
	Streptozotocin, untreated	1.255±0.070 ^{***} (8)	0.113±0.076*(8)	0.066±0.002(8)	0.170±0.031(8)
	Streptozotocin, TAT-treated	1.313±0.124(9)	0.074±0.043*(9)	0.067±0.007(9)	0.179±0.051(9)
15 day	Control	1.461±0.337(7)	0.028±0.009(7)	0.070±0.002(7)	0.145±0.016(7)
	Streptozotocin, untreated	1.397±0.114(7)	0.033±0.010(7)	0.074±0.004 ^{***} (7)	0.151±0.041(7)
	Streptozotocin, TAT-treated	1.264±0.132 ⁴⁾ (9)	0.066±0.053 ^{***} (9)	0.065±0.005 ^{5)••2)} (9)	0.158±0.027(9)

1) Values are mean $\pm$ S.D. the number of animals in parenthesis, 2) Significant difference from control : * : p<0.005, ** : p<0.01, *** : p<0.05, 3) p<0.005 vs streptozotocin, untreated, 4) p<0.05 vs streptozotocin, untreated, 5) p<0.005 vs streptozotocin, untreated.

まで含量が低下した。TAT 投与群は 2, 4 および 15 日目での GSH 含量の低下に抵抗した。ストレプトゾトシン糖尿病でも同様の GSH の低下が観察され TAT 投与は 4, 8 および 15 日目に GSH 含量低下に抵抗した。

房水の GSH は水晶体とは逆に増加傾向が認められ, TAT はこの増加を抑制した。血清中ではガラクトースあるいはストレプトゾトシン糖尿病いずれも GSH にほとんど影響しなかった。

血清と房水中の GSH/GSSG 比をみると血清

Fig. 5-1 Ascorbic acid of lens in galactosemic rats. Mean $\pm$ S.D. (n=8)
Significant difference from control :
* ; $p < 0.001$, ** ; $p < 0.005$

Fig. 5-2 Ascorbic acid of lens in streptozotocin treated rats. Mean $\pm$ S.D.; number of rats used in parenthesis.
Significant difference from control :
* ; $p < 0.001$, ** ; $p < 0.005$

Fig. 5-3 Ascorbic acid of serum in galactosemic rats. Mean $\pm$ S.D. (n=8)
Significant difference from control :
* ; $p < 0.001$, ** ; $p < 0.005$, *** ; $p < 0.01$

Fig. 5-4 Ascorbic acid of serum in streptozotocin treated rats. Mean $\pm$ S.D.; number of rats used in parenthesis.
Significant difference from control :
* ; $p < 0.005$, ** ; $p < 0.01$

で20/1, 房水で1/3 と大きな構成比の違いがみられた。

5. アスコルビン酸 (Fig. 5-1, 2, 3, 4)

ガラクトース, ストレプトゾトシン糖尿病の水晶体はいずれも経時的にアスコルビン酸の低下を

Table 4-1 Contents of protein, lens, aqueous humor and vitreous humor of galactosemic rats

	Period after treatment	lens (mg/lens)	aqueous humor (mg/ml)	vitreous humor (mg/ml)
2 day	Control	8.5±0.9 ¹⁾	5.9±2.2	4.6±0.9
	Galactose, untreated	8.3±1.1	9.8±5.4*** ²⁾	6.5±1.5** ²⁾
	Galactose, TAT-treated	8.3±0.7	11.4±4.1***	6.9±1.7* ²⁾
4 day	Control	9.5±0.9	5.2±2.6	2.7±0.6
	Galactose, untreated	9.5±1.3	11.5±3.8*	3.1±0.8
	Galactose, TAT-treated	10.3±1.5	4.3±1.6 ³⁾	3.6±1.3
8 day	Control	9.0±1.2	3.7±0.9	3.1±0.5
	Galactose, untreated	9.0±2.0	7.3±2.6*	4.2±1.0***
	Galactose, TAT-treated	7.8±1.1	4.0±1.0 ⁴⁾	3.1±0.7
15 day	Control	10.8±1.8	5.0±2.2	3.1±0.9
	Galactose, untreated	9.9±2.4	4.3±1.9***	7.2±4.0***
	Galactose, TAT-treated	10.7±1.6	2.4±1.4 ⁵⁾	4.2±1.7 ⁵⁾

1) Data represents the mean±S.D. of eight values, 2) Significant difference from control, * : p<0.005, ** : p<0.01, *** : p<0.05, 3) p<0.05 vs galactose, untreated, 4) p<0.01 vs galactose, untreated, 5) p<0.05 vs galactose, untreated.

Table 4-2 Contents of protein in lens, aqueous humor and vitreous humor of streptozotocin treated rats

	Period after treatment	lens (mg/lens)	aqueous humor (mg/ml)	vitreous humor (mg/ml)
4 day	Control	12.8±1.4(9) ¹⁾	4.5±2.9(9)	4.0±1.0(9)
	Streptozotocin, untreated	12.2±1.5(9)	4.2±0.8(9)	4.3±1.1(9)
	Streptozotocin, TAT-treated	12.3±2.0(9)	4.5±3.8(9)	4.1±1.1(9)
8 day	Control	12.4±1.1(8)	5.0±2.4(8)	— ²⁾
	Streptozotocin, untreated	12.3±0.7(8)	7.5±3.0(8)	—
	Streptozotocin, TAT-treated	12.7±1.6(9)	5.2±2.5(9)	—
15 day	Control	12.9±3.7(7)	2.4±0.6(7)	4.9±1.4(7)
	Streptozotocin, untreated	12.5±1.3(7)	4.3±1.7* ³⁾ (7)	5.5±1.4(7)
	Streptozotocin, TAT-treated	13.4±1.8(9)	5.3±3.1*(9)	3.9±1.2 ⁴⁾ (9)

1) Values are mean±S.D. : The number of animals in parenthesis, 2) Not measured, 3) * : Significant difference from control, p<0.05, 4) p<0.05 vs Streptozotocin, untreated.

示し、TAT 投与はこの低下を抑制した。

血清中のアスコルビン酸も低下を示したが、TAT 投与はこれを抑制しなかった。

6. タンパク (Table 4-1, 2)

ガラクトース糖尿病ラットにおいて、水晶体の可溶性タンパクの増減は認められなかった。しかしながら房水、硝子体ではタンパクの上昇が認められ、房水において明らかであり、この上昇は

Table 5 Contents of glucose in aqueous humor, vitreous humor and serum of streptozotocin treated rats

Period after treatment		aqueous humor (mg/ml)	vitreous humor (mg/ml)	serum (mg/dl)
8 day	Control	99.3±13.4 (8) ¹⁾	61.1±12.4 (8)	132.9±28.8 (8)
	Streptozotocin, untreated	511.7±35.1* ²⁾ (8)	376.4±27.8* (8)	828.4±171.1* (8)
	Streptozotocin, TAT-treated	421.2±48.9 ³⁾ * (9)	293.8±19.4 ³⁾ * (9)	706.1±134.4* (9)
15 day	Control	116.1±42.8 (7)	66.5±21.9 (7)	153.9±27.0 (7)
	Streptozotocin, untreated	346.4±33.4* (7)	333.6±23.3* (7)	775.2±101.6* (7)
	Streptozotocin, TAT-treated	329.0±79.3* (9)	302.5±70.6* (9)	618.2±293.7* (9)

1) Values are mean±S.D. : The number of animals in parenthesis, 2) * : Significant difference from control, p<0.005, 3) p<0.005 vs Streptozotocin, untreated.

Table 6 Sugar and polyol in aqueous humor vitreous humor and lens on streptozotocin treated rats

Treatment		Content (μmol/g)		
		Glucose	Sorbitol	Myo-inositol
Aqueous H.	Control	2.24±0.82 ¹⁾	N.D.	0.15±0.02
	Streptozotocin, untreated	19.19±3.50* ²⁾	0.34±0.13	0.15±0.02
	Streptozotocin, TAT-treated	15.77±3.78 ³⁾ *	0.25±0.12	0.13±0.04
Vitreous H.	Control	4.72±1.4	N.D.	0.088±0.027
	Streptozotocin, untreated	23.94±2.23*	0.19±0.07	0.084±0.012
	Streptozotocin, TAT-treated	19.93±2.15 ⁴⁾ *	0.18±0.03	0.085±0.021
Lens	Control	N.D.	N.D.	1.86±0.21
	Streptozotocin, untreated	4.39±1.2	20.18±2.61	0.78±0.15*
	Streptozotocin, TAT-treated	4.20±1.16	16.45±4.63 ³⁾	0.91±0.22*

1) Values are mean±S.D., 2) Significant difference from control, p<0.001, 3) p<0.05 vs Streptozotocin, untreated, 4) p<0.005 vs Streptozotocin, untreated.

TAT 投与で抑制された。

ストレプトゾトシン糖尿病ではこのような現象はなく、15 日目の房水にタンパクの上昇が認められたのみであった。

7. グルコース (Table 5)

ストレプトゾトシンを注射したラットは、全個体で血糖値は 300 mg/dl 以上であった。TAT はこの血清中のグルコースになんら影響しなかった。

房水、硝子体においても糖尿病時には糖含量が

上昇したが、血糖値の 1/2 程度であった。TAT 投与群では 8 日目の房水、硝子体のグルコース濃度がストレプトゾトシン投与群に比べ低かった。ポリオールと同時測定した 4 日目のグルコース濃度も房水、硝子体で有意に低かった (Table 6)。

8. ポリオール (Table 6)

ストレプトゾトシン糖尿病ラットの水晶体においてソルビトール量は有意に増加しており、TAT 投与群のソルビトールは糖尿病群に比較して有意に減少していた。ミオイノシトールは糖尿病群、

Table 7 Data from the reversal study

			Control (n=14)	STZ ¹⁾ , untreated (n=20)	STZ, TAT-treated (n=14)
Glucose	Plasma	(mg/dl)	276.4±47.3 ²⁾	784.2±147.3 ³⁾	663.4±143.5 ⁴⁾
	Aqueous H.	(mg/dl)	105.2±10.6	412.5±33.0*	365.4±30.6 ⁵⁾
	Vitreous H.	(mg/dl)	57.9±25.1	360.5±30.2*	326.1±27.0 ⁶⁾
Protein	Lens	(mg/lens)	10.7±1.2	9.0±1.1*	8.8±0.8*
	Aqueous H.	(mg/ml)	3.7±1.1	8.4±2.5*	6.1±2.8 ⁷⁾ ***
	Vitreous H.	(mg/ml)	5.9±1.8	9.7±4.3**	6.4±2.3 ⁷⁾
MDA	Plasma	(nmol/ml)	10.9±3.1	28.9±13.6*	24.9±15.0**
	Lens	(nmol/lens)	0.058±0.008	0.079±0.020**	0.124±0.020 ⁵⁾ *
	Aqueous H.	(nmol/ml)	1.06±1.09	0.63±0.97	0.34±0.47 ⁶⁾ ***
	Vitreous H.	(nmol/ml)	6.18±5.29	5.74±4.56	5.72±2.08
Glutathione (GSH)	Plasma	(nmol/ml)	1.4±0.3	1.5±0.2	1.4±0.3
	Lens	(nmol/lens)	74.9±7.0	41.3±6.1*	44.9±5.5*
	Aqueous H.	(nmol/ml)	54.3±21.3	222.5±213.6**	100.4±73.1 ⁴⁾ ****
	Vitreous H.	(nmol/ml)	62.9±21.5	174.2±153.1 ³⁾ ***	92.0±31.7 ⁴⁾ **
Ascorbic acid	Plasma	(nmol/ml)	83.0±19.8	47.5±11.9*	55.9±17.1**
	Lens	(nmol/lens)	12.9±1.9	7.8±2.2*	9.1±1.2 ⁴⁾ *

1) Streptozotocin, 2) Values are mean±S.D., 3) *: Significant difference from *: $p<0.001$, **: $p<0.005$, ***: $p<0.01$, ****: $p<0.05$, 4) $p<0.05$ vs STZ, untreated, 5) $p<0.001$ vs STZ, untreated, 6) $p<0.005$ vs STZ, untreated, 7) $p<0.01$ vs STZ, untreated.

TAT 投与群とも正常群に比べ減少していた。

考 察

9. 治療実験 (Table 7)

ストレプトゾトシン処理により、血漿中のグルコースの大幅な増大が認められた。これに対し房水、硝子体中のグルコース濃度は約 $1/2$ であり、TAT 投与群はストレプトゾトシン処理のみより若干であるが有意にグルコース濃度を減少させた。房水、硝子体中のタンパクもストレプトゾトシン処理で有意に増加し、この増加は TAT 処理で抑制された。

MDA は血漿、水晶体で増加していたが、TAT 処理で効果は認められなかった。

グルタチオンは水晶体で減少し、房水、硝子体で増大しており、TAT 処理は水晶体での減少を抑制しなかったが、房水、硝子体での増加を抑制した。

アスコルビン酸では水晶体、血漿ともストレプトゾトシン処理により減少した。TAT 処理は水晶体における減少を抑制したが、血漿中濃度に影響しなかった。

糖尿病性白内障の成因にソルビトール代謝に関係するアルドース還元酵素が関与するポリオール浸透圧説^{1,2)}が有力であるが、その他の種々の要因である NADPH、還元型グルタチオン (GSH)、ATP の減少や水晶体タンパクの glycosylation などが考えられている。

GSH は水晶体の透明維持に重要な役割を持っていて、GSH の劇的な減少は白内障の成因の一つと考えられている。この GSH の役割として活性酸素に対する直接的な保護効果、あるいは膜タンパクなどの反応性チオールの保護が考えられ、過酸化が白内障化に重要な因子であると推定されている。これは、ポリオール pathway の亢進により NADPH が消費されると、この系から活性酸素が産生され、これが脂質過酸化反応を進行させ、MDA などの脂質過酸化物質が増加してくる。この活性酸素を無毒化するために scavenging 系に関係するアスコルビン酸やグルタチオンなどの抗酸化物質が作用すると考えられる。

今回の実験で糖尿病モデルでは、水晶体、房水、

血清でのMDAの上昇が認められ、アルドース還元酵素阻害剤のTAT投与は房水、血清のMDA生成を抑制したが、水晶体のMDA抑制はほとんど認められなかった。これらのことは高血糖状態ではアルドース還元酵素の強い活性のためポリオール pathway が亢進し、GSH やアスコルビン酸が著しく減少し、過酸化脂質の増加にアルドース還元酵素阻害剤の作用が追いつかないが、血清ではアルドース還元酵素阻害剤の薬物濃度も高く、アルドース還元酵素の働きを十分抑制していることが考えられる。

一方、水晶体内のグルタチオン、アスコルビン酸の減少はTAT投与により抑制されたが、正常値までは改善されなかった。房水において還元型グルタチオンの増加が認められたが、これは水晶体および水晶体周辺のグルタチオンが房水中に漏出したと考えるのが妥当である。この増加がTATで改善されることは、水晶体周辺の水晶体以外の組織ならばアルドース還元酵素に対し、より感受性の高い組織、すなわち水晶体膜、房水近辺の組織の障害によると推定される。Linklater¹⁵⁾はストレプトゾトシン糖尿病ラットでは、房水、硝子体にγ-クリスタリンの増大を認めていることから水晶体膜の障害を示唆している。しかしながら、水晶体からのGSHの漏出であれば、初期のGSH減少時から房水中にGSHの増加を認めてもよいと思われるが、今回の実験では認められなかった。一方、房水中のグルコース濃度、あるいはMDAがTAT投与により若干抑制されることから、単に水晶体および水晶体周辺のグルタチオンが房水中に漏出したのではなく、血液・房水柵関門が関与している可能性もあるかと思われる。

結 論

ガラクトースおよびストレプトゾトシン糖尿病白内障ラットの水晶体、房水および硝子体中の抗酸化物質としてのグルタチオン、アスコルビン酸を、また脂質過酸化物質としてのマロンジアルデヒドを測定した。これら生化学的因子の変動に対するアルドース還元酵素阻害剤TATの影響を検討し、次の結果を得た。

1) ストレプトゾトシン糖尿病ラットの水晶体、房水および血清においてMDAは正常群に比べ増加しており、TAT投与はこのMDA増加を抑制した。

2) ガラクトースおよびストレプトゾトシン糖尿病ラットの水晶体のグルタチオンおよびアスコルビン酸含量は低下しており、TAT投与はこれらの減少を抑制した。

3) 糖尿病ラットの房水においてタンパクおよびグルタチオン濃度が上昇しており、この上昇はTAT投与により有意に抑制された。また、房水では血清中と相関したグルコースの上昇がみられたが、血清中と異なりTAT投与でグルコースの有意な抑制がみられた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました恩師清水由規教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Kinoshita, J.H.: Mechanism of initiating cataract formation (Protector lecture). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 13, 7713~7724, 1974.
- 2) Kinoshita, J.H., Koder, P., and Catiles, M.: Aldose reductase in diabetic cataracts. J. Am. Med. Assoc., 246, 257~261, 1981.
- 3) Spector, A.: The search for a solution to senile cataract. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 25, 130~146, 1984.
- 4) Chylack, L.T., Jr.: Mechanisms of senile cataract formation. Ophthalmology, 91, 596~601, 1984.
- 5) Bhuyan, K.C., and Bhuyan, D.K.: Regulation of hydrogen peroxide in eye humor, effect of 3-amino-1-H-1,2,4-triazole on catalase and glutathione peroxidase of rabbit eye. Biochim. Biophys. Acta, 497, 641~651, 1977.
- 6) Bhuyan, K.C., and Bhuyan, D.K.: Superoxide dismutase of the eye; Relative functions of superoxide dismutase and catalase in protecting the ocular lens from oxidative damage. Biochim. Biophys. Acta, 542, 28~38, 1978.
- 7) Spector, A., and Garner, W.H.: Hydrogen peroxide and human cataract. Exp. Res., 33, 673~681, 1981.
- 8) Tomba, M.C., Gandolfi, S.A., and Maraini, G.: Search for an oxidative stress in human senile cataract; Hydrogen peroxide and ascorbic acid in the aqueous humour and malondialdehyde in the lens. Lens Res., 2, 263~276, 1985.

- 9) Bhuyan, K.C., Master, R.W.P., and Coles, R.: Adduct in human senile cataract. *Mech. Ageing. Dev.*, **34**, 289~296, 1986.
- 10) Bhuyan, K.C., and Bhuyan, D.K.: Molecular mechanism of cataractogenesis (3); Toxic metabolite of oxygen as initiation of lipid peroxidation and cataract. *Curr. Eye. Res.*, **3**, 67~81, 1984.
- 11) Inukai, S., Agata, M., Sato, M., Naitou, A., Matsukawa, H., and Goto, M.: Characterization of a novel aldose reductase inhibitor, TAT, and its effects on streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Jan. J. Pharmacol.*, **61**, 221~227, 1993.
- 12) 中村 健: ガラクトース 白内障 に対する aldose reductase 阻害剤 TAT の効果. *眼科臨床医報*, **88**, 1821~1828, 1994.
- 13) Sippel, T.O.: Changes in the water, protein and glutathione contents of the lens in the course of galactose cataract development in rats. *Invest. Ophthalmol.*, **5**, 568~575, 1966.
- 14) Chylack, L.T., Leske, M.C., Sperduto, R., Khu, P., Mc Carthy, D., and the Lens Opacities Case-Controle Study Group: Lens opacities classification system. *Arch. Ophthalmol.*, **106**, 335, 1988.
- 15) Linklater, H.A., Dziaszowski, T., McLeod, H.L., Sanford, S.E., and Trevithick, J.R.: Modelling cortical cataractogenesis VIII; Effects of butylated hydroxytoluene (BHT) in reducing protein leakage from lenses in diabetic rats. *Exp. Res.*, **43**, 305~313, 1986.
- 16) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animals tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351~358, 1979.
- 17) 八木国夫: Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿または血清中の過酸化脂質の微量定量法. *ビタミン*, **49**, 403~405, 1975.
- 18) Hissin, P.J., and Hilf, R.: A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, **74**, 214~226, 1976.
- 19) 岡村正人: ビタミン C 定量法 3. α , α' -Dipyridyl 法. *ビタミン*, **56**, 425~434, 1982.

(受付: 1994年12月22日)