

犬白内障の進行度とそのレンズ上皮細胞の面積変化

印牧信行¹⁾ 圓尾拓也¹⁾ 恩田 賢¹⁾ 落合秀治^{2)†}

- 1) 麻布大学獣医学部 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71)
 2) 麻布大学生物科学総合研究所 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71)

(2010年5月19日受付・2010年12月27日受理)

要 約

水晶体摘出術を行った成熟白内障と過熟白内障のレンズ上皮細胞 (lens epithelial cells : LEC) について、白内障の進行度とその細胞面積および細胞密度の関係を調べたので報告する。正常ビーグル犬のLECの面積のヒストグラムにおいて、累積比率50%到達点は $210 \sim 230 \mu\text{m}^2$ であったのに対し、成熟白内障および過熟白内障ではそれぞれ $250 \sim 270 \mu\text{m}^2$ および $310 \sim 330 \mu\text{m}^2$ であった。いっぽう、LECの細胞密度は正常では、 $4645 \pm 249 \text{cells}/\text{mm}^2$ であったのに対し、成熟白内障および過熟白内障ではそれぞれ、 $3954 \pm 260 \text{cells}/\text{mm}^2$ 、 $3130 \pm 195 \text{cells}/\text{mm}^2$ であり、成熟白内障が正常の85%、過熟白内障では67%となった。白内障が進行するに従い容積分画のばらつきが大きくなり、LEC面積の増加すなわち細胞容積の増加とともに、また、単位面積当たりの細胞密度の低下が起きていると推測された。

——キーワード：白内障，レンズ上皮細胞，細胞面積変化。

----- 日獣会誌 64, 465～468 (2011)

白内障は眼科領域で最も重要な疾病の一つであり、犬は哺乳類の中でその発症頻度が最も高い。レンズ組織は2種類の細胞、すなわち、レンズ上皮細胞 (lens epithelial cells : LEC) とそれらが分化したレンズ線維細胞で構成されている。LECは立方体状の単層の上皮細胞でレンズ組織で唯一細胞分裂能を有し、細胞分裂後、レンズ核方向に移動し、レンズ線維細胞となる。レンズ線維細胞は核を消失し、透明度が高く安定性の高いクリスタリンを多量に含むきわめて分化の進んだ組織である。レンズを形成する細胞は動物の活動中、絶え間なく収縮拡張を繰り返すことで「レンズ」としての機能を果たしている。白内障はレンズ内の構成分子の調和が崩れ、その構造に異常をきたすことにより生じるが、発症原因とLECの関与については不明な点が多い [1, 2]。正常なLECの構造や機能については人についての報告があるが [3]、犬の白内障の成熟度の違いによる細胞面積の変化についての報告はない。本研究は、LECの生理機能が白内障進行に及ぼす影響を解析する第一歩として、白内障進行度とそのLECの細胞面積および細胞密度の関係について解析した。

材 料 お よ び 方 法

供試眼：供試眼は麻布大学付属病院眼科において2000年5月30日から2005年3月22日の期間にレンズ摘出術を行った犬の成熟白内障症例32例と過熟白内障5例を用いた。年齢は1歳2カ月から14歳5カ月で、成熟白内障では平均5歳11カ月齢で、また過熟白内障では平均3歳7カ月齢であった。性別は雌雄それぞれ1頭で両眼より水晶体摘出術を行ったため雄18頭、雌17頭となった。また体重は1.4kgから30.6kgであった。対照犬として2歳齢の水晶体が正常なビーグル5頭を用いた。すべての生体試料は麻布大学実験動物委員会の指針に従って採材し、実験に供した。また、症例についてはすべて飼い主の承諾書を得た。

レンズ前囊の採取方法：レンズ摘出術の際に前囊剪刀で切開して採材された前囊はただちに、2.5%グルタルアルデヒドで固定し、4℃で保存後、5mm×約3mmに細切した。0.05%トルイジンブルーで染色した後、洗浄、脱水した。これをキシレンにより透徹し、スライドグラスにのせ、封入剤にて前囊を封入した。倒立型顕微鏡 (IX70, オリンパス(株), 東京) を用いて明視野位相差

† 連絡責任者：落合秀治 (麻布大学生物科学総合研究所)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

☎042-754-7111 FAX 042-754-9930

E-mail : ochiaih@azabu-u.ac.jp

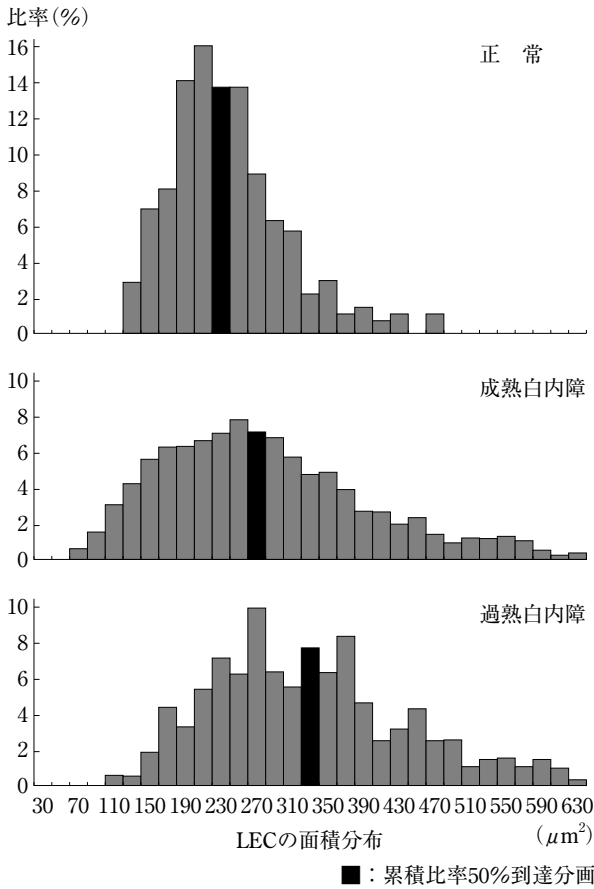


図1 成熟白内障、過熟白内障および正常ビーグル犬におけるLEC面積のヒストグラム

観察法を行った。Graphics TabletおよびGrip Pen (XD-0608-U, 株ワコム, 埼玉)を用いて細胞を囲む円を描き、画像解析ソフト (ImageJ, 米国立衛生研究所, U.S.A)を用いて、LECの面積 (μm²)を測定した。面積を測定した細胞は、採材した前囊に付着している細胞のうち、細胞の重層がみられず単層細胞で敷き詰められた領域の細胞を対象とした。1検体当たりの細胞測定数は成熟白内障症例で平均92個 (最小25個, 最大230個)、過熟白内障で平均80個 (最小37個, 最大125個であった。また対照ビーグルでの1検体当たりの細胞測定数は平均75個 (最小46, 最大124個)であった。測定LECから、細胞面積のヒストグラムとそのヒストグラムから算定される累積比率50%到達点を求めた。LEC細胞密度はLECの平均面積の逆数を cell/mm²の単位として算定し、平均値±標準誤差で示した。LEC細胞密度の群間比較は、分散が等しくないと仮定したスチューデントの*t*検定を用いて行った。

成績

成熟白内障、過熟白内障および正常ビーグル犬におけるLEC面積:測定したLEC面積をヒストグラムで表した (図1)。成熟白内障 (n = 32)におけるLEC面積の

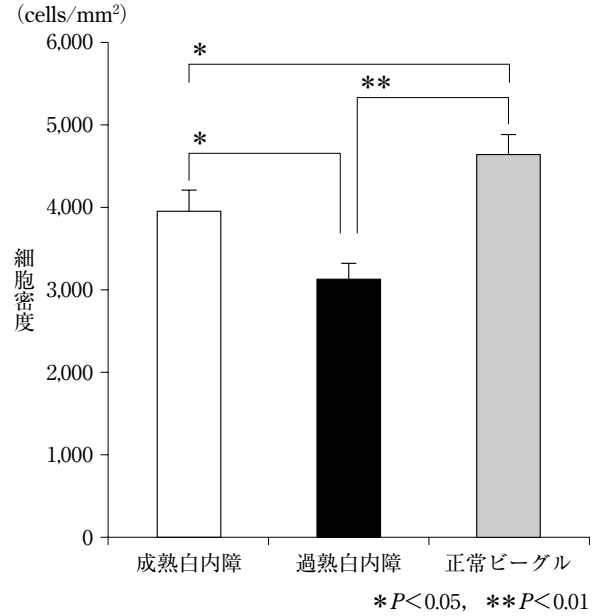


図2 成熟白内障、過熟白内障および正常ビーグル犬におけるLEC密度の比較

ヒストグラムでは250~270 μm²の分画の頻度が最も高かった。累積比率50%到達点は成熟白内障群では250~270 μm²であり、過熟白内障群では310~330 μm²であった。過熟白内障 (n = 5)におけるLEC面積のヒストグラムでは270~290 μm²の分画が最も高かった。また、成熟白内障と比較して分布にばらつきが多い傾向にあり、おおむね右に推移していた。対照ビーグル犬 (n = 5)の累積比率50%到達点は210~230 μm²で、成熟白内障および過熟白内障よりも小さかった。

成熟白内障、過熟白内障および正常ビーグル犬におけるLEC密度:LEC密度は成熟白内障が3954 ± 260 cells/mm²、過熟白内障が3130 ± 195 cells/mm²であった。これに対し、正常ビーグルのLEC密度は4645 ± 249 cells/mm²で、成熟白内障および過熟白内障に比べ有意に (P = 0.0013)高かった (図2)。成熟白内障群に比べ過熟白内障群は800 cells/mm²ほど低い値を示した。

考察

本研究において、レンズ摘出術を行った成熟白内障と過熟白内障のLECについて、白内障の進行度とその細胞面積および細胞密度の関係を調べた。正常ビーグル犬の面積のヒストグラムにおいて、累積比率50%到達点は210~230 μm²であったのに対し、成熟白内障および過熟白内障ではそれぞれ250~270 μm²および310~330 μm²であった。すなわち、白内障が進行するに従い容積分画のばらつきが大きくなり、過熟白内障は成熟白内障より大きい傾向が示された。いっぽう、LECの細胞密度は成熟白内障および過熟白内障ではそれぞれ正常の85%、67%と有意に低下した。成熟白内障から過熟

白内障へ進行するとLEC面積の増加すなわち細胞容積の増加がおり、また、単位面積当たりの細胞密度の低下が同時に起こると推測された。本研究でわれわれは犬白内障のLECについて、その面積、密度に焦点を絞り比較解析を行った。人では年齢に対する変化や前囊の染色法の影響が報告されている [4, 5]。今後は犬と人との違いや染色法による相違点についても検討を試みたい。

また、白内障の発症原因についてはさまざまな要因が報告されている。最も臨床例が多いのが老齢性白内障であり、糖尿病などの疾病による代謝異常や紫外線、放射線などの酸化傷害、ウイルスや細菌などの感染症が原因となる。

いっぽう、糖尿病白内障はその発症メカニズムが明らかにされている。すなわち、血糖の上昇によりアルドース還元酵素が活性化され、ソルビトール経路（グルコース [アルドース還元酵素] →ソルビトール→フルクトース）が増加する。そのため、水晶体の浸透圧増加による水晶体内の含水量が増加し、異常な細胞の膨潤が白内障を誘導している。細胞容積調節に係わる輸送体やチャネルはいくつか知られている。株化された人のLECを用いた研究では細胞外の浸透圧が低いとき、膨潤した細胞はKとClを一当量ずつ細胞内から細胞外へ輸送することにより、元の容積を回復することが報告された [6]。逆に、高浸透圧下では、細胞は一旦収縮するが、KとNaを一当量ずつ、Clを二当量を細胞外から細胞内へ輸送するNa-K-Cl共輸送体（NKCC）が機能し、同時に水が細胞内に流入することにより浸透圧変化による細胞容積変動に対応していた [6]。また、その機能の破綻が異常な細胞の膨潤や収縮を引き起こし、白内障を誘発することも示された [7]。このようにLECでは細胞容積の恒常性がレンズ組織の機能に重要な影響を与えていることが明らかにされつつある。また、レンズ組織は細胞内外の水の輸送にきわめて重要な水チャネル（アクアポリン：AQP）が特に発現が高いことが知られている [8]。レンズ前囊では光から来る酸化ストレスにより多量の H_2O_2 が発生している。房水中にも H_2O_2 が高濃度で存在し、水晶体は常にこれらの酸化物質のストレスにさらされている。そのためレンズ内には多量の還元型グルタチオン（GSH）が存在し、その量はレンズ皮質から核に移るに従って減少している。興味深いことに、容積調節については相反する機能を有するKCCとNKCCは、細胞内GSH濃度や酸化剤添加により活性が大きく左右され、その活性制御モデルが提唱されているが [9]、レンズ組織の細胞でもあてはまる可能性が高い。何らかの異常をきたしたレンズの細胞では、酸化ストレスの増大

→GSH濃度の低下→KCCおよびNKCC活性の異常な変動→細胞容積維持能の破たん→溶解性タンパク質の凝固が生じている可能性も考えられる。本研究結果から、白内障進行に伴うレンズ上皮細胞の面積増加は、細胞容積膨潤の機能を持つNKCCの活性化、もしくは細胞収縮の機能を果たすKCCの不活化の可能性も考えられた。現在、白内障のLECについて、その初代培養細胞の安定した培養条件の検討を行っている。今後これらの細胞を用いて、細胞容積とNKCCとKCCなどのイオン輸送体、ならびに水輸送との関連について検討を加え、犬白内障由来のLECでそれらの生理機能活性に正常のものと相違点があるかを検討したい。

今回の報告では過熟白内障は5例と少ない。今後、評価する症例数を増やし、犬種と発症率、進行速度と採取した年齢、さらに発症原因（糖尿病性、家族性の有無）の詳細の解析を進めたい。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費（19580376）ならびに麻布大学による支援を受けて行ったものである。

引用文献

- [1] Bhat SP : The Ocular Epithelium. Bioscience Report, 21, 537-563 (2001)
- [2] 岩田 岳 : 白内障の発生, 眼科診療プラクティス, 本田孔士編, 189-193, 文光堂, 東京 (1996)
- [3] Oharazawa H, Ibaraki N, Ohara K : Age-related changes of human lens epithelial cells in vivo, Ophthalmic Res, 33, 363-366 (2001)
- [4] Nanavaty MA, Johar K, Sivasankaran MA, Vasavada AR, Praveen MR, Zetterström C : Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract, J Cataract Refract Surg, 32, 1483-1488 (2006)
- [5] Charakidas A, Kalogeraki A, Tsilimbaris M, Koukoulomatis P, Brouzas D, Delides G : Lens epithelial apoptosis and cell proliferation in human age-related cortical cataract, Eur J Ophthalmol, 15, 213-220 (2005)
- [6] Lauf PK, Warwar R, Brown TL, Adragna NC : Regulation of potassium transport in human lens epithelial cells, Exp Eye Res, 82, 55-64 (2006)
- [7] Chee KS, Kistler J, Donaldson PJ : Roles for KCC transporters in the maintenance of lens transparency, Invest Ophthalmol Vis Sci, 47, 673-682 (2006)
- [8] Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH : Functions of aquaporins in the eye, Prog Retinal Eye Res, 27, 420-433 (2008)
- [9] Adragna NC, Di Fulvio M, Lauf PK : Regulation of K-Cl cotransport : from function to genes, J Membr Biol, 201, 109-137 (2004)

Analysis of Relationship Between Maturity of Cataract
and Size of Lens Epithelial Cells

Nobuyuki KANEMAKI*, Takuya MARUO, Ken ONDA and Hideharu OCHIAI†

* *School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, 252-5201, Japan*

SUMMARY

We investigated the relationship between the progression of a cataract and the size or cell population density of its lens epithelial cells (LEC) in canines. The middle fraction of the cell size observed in normal dogs and in dogs with mature and hypermature cataracts was $210\text{--}230\ \mu\text{m}^2$, $250\text{--}270\ \mu\text{m}^2$, and $270\text{--}290\ \mu\text{m}^2$, respectively. The cell population density was $3954 \pm 260\ \text{cells}/\text{mm}^2$ and $3130 \pm 195\ \text{cells}/\text{mm}^2$, respectively. Mature cataracts accounted for 85% and hypermature cataracts for 67% compared with the normal. It was speculated that as cataracts progressed, cell volume varied markedly and cell size or cell volume increased while cell population density decreased. — Key words : cataract, lens epithelial cells, size of cell.

† *Correspondence to : Hideharu OCHIAI (Research Institute of Biosciences, Azabu University)*

1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, 252-5201, Japan

TEL 042-754-7111 FAX 042-754-9930 E-mail : ochiaih@azabu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 465 ~ 468 (2011)