

ヒト褐色および非褐色白内障水溶性分画における 遊離非トリプトファン蛍光物質の研究

岩瀬 剛¹⁾, 白尾 悦子²⁾, 白尾 裕¹⁾, 松川 茂³⁾, 福田 龍二⁴⁾

¹⁾金沢大学医学部眼科学教室, ²⁾加賀八幡温泉病院眼科

³⁾福井医科大学実験実習機器センター, ⁴⁾金沢大学医学部第一生化学教室

要 約

ヒト白内障水溶性分画(以下、核)水溶性分画中の遊離非トリプトファン蛍光物質含有量を調べた。非糖尿病患者から囊外摘出法で得られた個々の核(非褐色22眼、褐色9眼)を均一化後遠心分離し、上清を限外濾過後、濾液を高速液体クロマトグラフィーで分析した。3-ヒドロキシキヌレニングルコシドおよび未同定の物質1種が蛍光物質として検出された。前者の含有量は非褐色核群($0.55 \pm 0.49 \mu\text{mol/g}$ 湿重量)および褐色核群($0.90 \pm 0.64 \mu\text{mol/g}$ 湿重量)間で有意差を示さなかった($p > 0.1$)が、後者は褐色核群で有意に増加していた($2.2 \times 10^3 \pm 5.4 \times$

10^3 area unit/g 湿重量対 $1.4 \times 10^5 + 1.1 \times 10^5 \text{ area unit/g}$ 湿重量; $p < 0.01$)。β-グルコシダーゼは後者に相当するピークを消失させた。これらの結果は、β-グルコシドである未同定の蛍光物質が核褐色化に関連する可能性を示唆する。(日眼会誌: 100: 369-375, 1996)

キーワード: 蛍光物質, 褐色白内障, 高速液体クロマトグラフィー, 水溶性分画, 3-ヒドロキシキヌレニングルコシド

Comparison of Free Non-tryptophan Fluorescent Substances in Water-soluble Fraction of Brunescant and Non-brunescant Human Cataract

Takeshi Iwase¹⁾, Etsuko Shirao²⁾, Yutaka Shirao¹⁾,
Shigeru Matsukawa³⁾ and Ryuji Fukuda⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine

²⁾Eye Clinic, Kagayawata Rehabilitation Hospital

³⁾Central Research Laboratories, Fukui Medical School

⁴⁾Department of Biochemistry I, Kanazawa University School of Medicine

Abstract

We compared the concentrations of protein-unbound non-tryptophan fluorescent substances in the water-soluble fraction between non-brunescant (NBr) and brunescant (Br) human cataractous lens nuclei. Lens nuclei (NBr, 22 eyes; Br, 9 eyes) from non-diabetic patients, obtained by extracapsular cataract extraction, were individually homogenized and centrifuged. The supernatants were subsequently ultra-dialyzed and assessed by high pressure liquid chromatography. 3-Hydroxykynurenine-O-β-glucoside (3-HKG) as well as an unidentified fluorescent substance was detected. While the concentrations of the former substance did not significantly differ between the NBr and the Br nuclei (NBr, $0.55 \pm 0.49 \mu\text{mol/g}$ wet weight; Br, $0.90 \pm 0.64 \mu\text{mol/g}$ wet weight; $p > 0.1$), the concentration of the latter

substance was significantly greater in the Br nuclei than in the NBr nuclei (NBr, $2.2 \times 10^3 \pm 5.4 \times 10^3 \text{ AU/g}$ wet weight; Br, $1.4 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5 \text{ AU/g}$ wet weight; AU: area unit, $p < 0.01$). An incubation of the dialysate with β-glucosidase eliminated the peak corresponding to the latter substance. These results suggest that an unidentified protein-unbound fluorescent substance, which is presumably a β-glucoside, in the lens nuclei is related to the coloration of human lens nuclei. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 369-375, 1996)

Key words: Fluorescence, Brunescant cataract, High pressure liquid chromatography, Water-soluble fraction, 3-hydroxykynurenine-O-β-glucoside

別刷請求先: 920 石川県金沢市宝町13-1 金沢大学医学部眼科学教室 白尾 裕
(平成6年11月16日受付, 平成7年12月26日改訂受理)

Reprint requests to: Yutaka Shirao, M.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine, 13-1 Takara-machi Kanazawa-shi, Ishikawa-ken 920, Japan

(Received November 1994 and accepted in revised form December 26, 1995)

I 緒 言

ヒト水晶体核は加齢とともに着色し、時として核白内障を呈するが、さらに高度に着色し褐色白内障に至ることがある。水晶体タンパクには幼年期以降に波長 350 nm 付近の紫外光で励起され、波長 440 nm 付近に極大をもつ蛍光(以下、青色蛍光)が生じ、これは加齢とともに徐々に増加する¹⁾。この蛍光は水晶体の着色現象と密接な関係があると考えられてきた^{2)~5)}が、これに対する反論もある⁶⁾⁷⁾。ヒト水晶体水溶性分画中にはタンパクに結合していない3種類の非トリプトファン蛍光物質[キヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニグルコシド(以下、3-HKG)、未同定の3-HKG類似のグルコシド]が存在することを van Heyningen⁸⁾が報告したが、それらの蛍光物質と白内障水晶体核(以下、核)の着色との関連についての研究は著者らの知る限り少ない⁸⁾⁹⁾。最近、Inoueら¹⁰⁾は van Heyningen のいう未同定の3-HKG類似のグルコシドが α -deamino-3-OH-L-kynurenine-O- β -D-glucoside (DHKN-Glc)であることを発見し、また、Inoueら¹¹⁾はこの物質の誘導体である2-amino-3-hydroxyacetophenone-O- β -D-glucoside (AHA-Glc)が水晶体不溶性タンパクに結合していることを報告した。水晶体の着色は不溶性タンパク²⁾³⁾⁶⁾および水晶体タンパクの蛍光^{2)~5)}と関連があることが指摘されているので、蛍光物質であるAHA-Glcが水晶体不溶性タンパクに結合している¹¹⁾ことは、AHA-Glcおよびこれの前駆物質と推定され、水溶性分画中に遊離の状態が存在するDHKN-Glc¹⁰⁾(すなわち、van Heyningen⁸⁾のいう未同定の3-HKG類似のグルコシド)が水晶体褐色化に関連する可能性を示唆している。

今回、我々は核水溶性分画中における遊離の蛍光物質を高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)を用いて分析し、非褐色核および褐色核間で比較した。さらに、今回検出された蛍光物質のうちの一つが van Heyningen⁸⁾によってその存在を指摘され、Inoueらによって同定された物質(DHKN-Glc)¹⁰⁾と同一であるか否かを類推することを目的として、それを β -グルコシダーゼによって分解することを試みた。

II 材料および方法

1. 材 料

糖尿病に罹患していない老人性白内障患者から水晶体囊外摘出法により得られた核を材料とした。核は摘出後速やかに -4°C で保存し、数日以内に肉眼的な着色の程度によって褐色(Pirie IV²⁾に相当)または非褐色(淡褐色~黄色、Pirie IまたはIIに相当)の2群に分類したうえ、湿重量を秤量後、 -80°C で冷凍保存した。褐色核および非褐色核の個数ならびにその摘出患者の年齢は、それぞれ9個、 72.7 ± 10.5 歳(平均値 \pm 標準偏差)ならびに22個、 76.7 ± 6.4 歳であった。術前に核着色の程度が判定でき

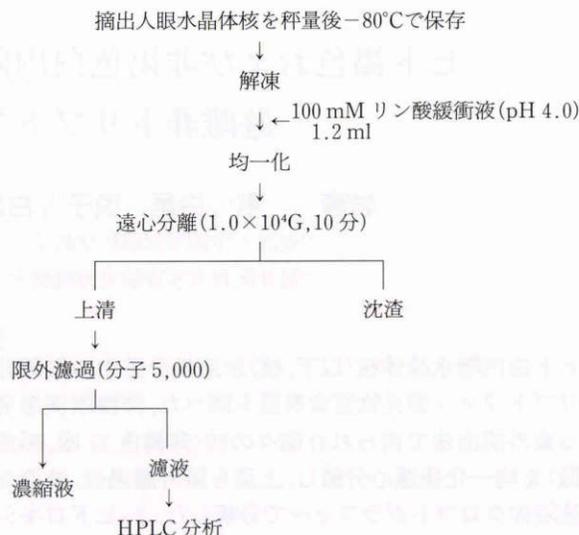


図1 試料作成手順のフローチャート。
HPLC: 高速液体クロマトグラフィー

ないほど皮質混濁が著しかった水晶体から得られた核および褐色、非褐色のいずれにも分類しがたい核は検討の対象から除外した。

β -グルコシダーゼ添加実験には、上記の褐色核のうち2個および摘出後速やかに冷凍保存された糖尿病歴・年齢などが不明な褐色核4個を使用した。

2. 方 法

実験1: 個々の核における蛍光物質含有量の測定

それぞれの核を解凍後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0) 1.2 ml 中で均一化し、 $1.0 \times 10^4 \text{G}$ で10分間遠心分離を行い、その上清を採取した。この上清を分画分子量5,000の限外濾過膜(ウルトラフリーC 3-LCC, 日本ミリポアリミテッド)で処理して得られた濾液を試料とし、下記のHPLC(HLC 803-D, 東ソー)条件①で分析し(図1)、含有量を算出した(後記)。

実験2: β -グルコシダーゼ添加実験

実験1の方法で褐色核から得られた同一の試料から100 μl を分注し、pH 7.0のリン酸緩衝液(対照)または0.2 mg/mlの β -グルコシダーゼ(和光純薬)溶液をそれぞれ20 μl 添加後、 37°C において48時間インキュベートしHPLCで分析した。この際、実験1と同様のHPLC条件では、3-HKGと3-HKGの β -グルコシダーゼによる分解産物である3-ヒドロキシキヌレニン(以下、3-HK)の保持時間が近似しているため、両者のクロマトグラム上での区別が困難なので、下記のHPLC条件②で分析した。ただし、3-HKGの紫外吸光ピーク単位面積当たりのモル数を求める際には下記のHPLC条件①を用いた。

HPLC条件①: 分析カラムにはTSK-GEL ODS-80 Ts(東ソー)を使用し、室温で100 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)をA液、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)とアセトニトリルの50%対50%混合液をB液として、流速1.0 ml/minで作用時間30分のリニア

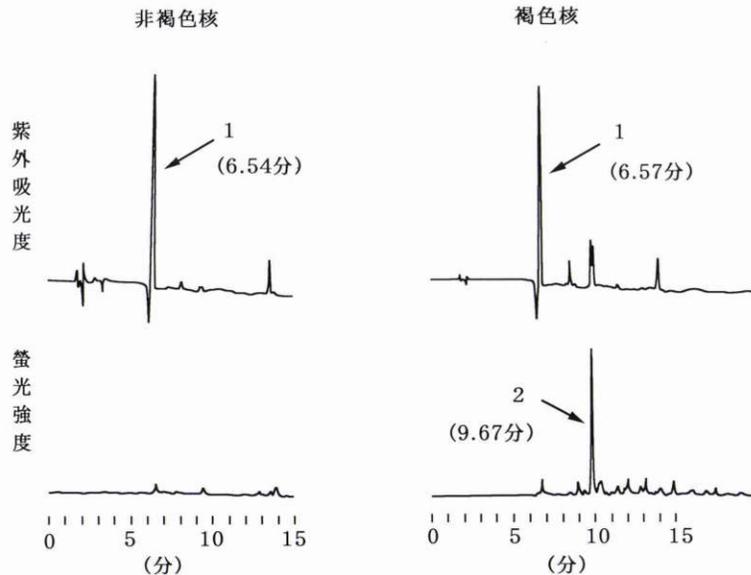


図2 非褐色核(左)および褐色核(右)から得られた試料のクロマトグラム。

上段は紫外吸光度,下段は蛍光強度をそれぞれ示す。6.5分近傍の紫外吸光ピークは非褐色核でも褐色核でも観察されたが(矢印1),9.7分近傍の蛍光ピークは褐色核のみに認められた(矢印2)。HPLC条件①を採用(方法参照)。

グラジェント法でA液からB液へと移行させながら溶出させた。紫外線検出器(検出波長360nm)と蛍光検出器(励起波長350nm,蛍光検出波長440nm)を直列に配し,同時にクロマトグラムを記録した。

HPLC条件②:実験1のHPLC条件のうち,移動相のみを以下のごとく変更した。A液を100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0),B液を100mMリン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルの70%対30%混合液とし,最初の10分間A液を単独で流した後,作用時間30分のリニアグラジェント法でA液からB液へと移行させた。

実験1における個々の核における3-HKG含有量(本論文では核湿重量当たりの3-HKGモル数と定義する)は,3-HKGから発せられる蛍光が微弱で定量の指標としては不適当なので,3-HKGの紫外吸光ピーク面積を指標とし,次のように求めた。試料単位容積をHPLC分析して得られる3-HKGの紫外吸光ピーク面積値に下記の方法で求めた3-HKGの紫外吸光ピーク単位面積当たりのモル数を乗じることによって試料単位容積中の3-HKGのモル数を知り,この値を核1個から得られる試料全量当たりに換算することで核1個に含まれる3-HKGのモル数を求め,それを核湿重量で除した。

3-HKGの紫外吸光ピーク単位面積当たりのモル数は以下のごとく算出した。1分子の3-HKGが β -グルコシダーゼによって分解されると1分子の3-HKが生じることから¹²⁾,実験2の β -グルコシダーゼ添加実験においてリン酸緩衝液を添加・インキュベートした試料と β -グルコシダーゼ溶液を添加・インキュベートした試料をそれぞれ同量HPLCに注入した場合,前者のHPLC注入液

に含まれる3-HKGのモル数と後者のHPLC注入液に含まれる3-HKのモル数は等しい。このモル数は,後者のクロマトグラム上の3-HKの紫外吸光ピーク面積を既知のモル数の3-HK(和光純薬)溶液のクロマトグラム上の紫外吸光ピーク面積と比較すれば知ることができる。このようにして得られたモル数を,前者のクロマトグラム上の3-HKGの紫外吸光ピーク面積で除することによって,3-HKGの紫外吸光ピーク単位面積当たりのモル数を求めた。なお,この場合,実験1と条件を同一にするためにHPLC条件①を用いた。

未同定蛍光物質含有量は,HPLC上のarea unit(以下AU)で表した蛍光強度ピーク面積を核湿重量で除して求めた。

III 結 果

図2に非褐色核および褐色核から得られた試料のクロマトグラムの例を示す。それぞれ上のクロマトグラムが紫外吸光度を,下のクロマトグラムが蛍光強度を示す。保持時間6.5分近傍の紫外吸光ピーク(図2,矢印1)は核の着色の程度にかかわらず,すべての試料において検出された(図略)。このピークは,他の報告¹³⁾¹⁴⁾および β -グルコシダーゼ添加によりこのピークが消失し,変わりに3-HKに相当するピークが出現するという本報結果(後記,図5)を勘案すれば,3-HKGに相当すると考えられた。一方,図2矢印2に示す保持時間9.67分の蛍光ピークは褐色核からの試料のすべてで明瞭に観察されたが,非褐色核からの試料の大部分では微弱であった。このピークに相当する物質は,水晶体水溶性分画中に存在し,かつその化学構造がこれまでに同定されている蛍光物

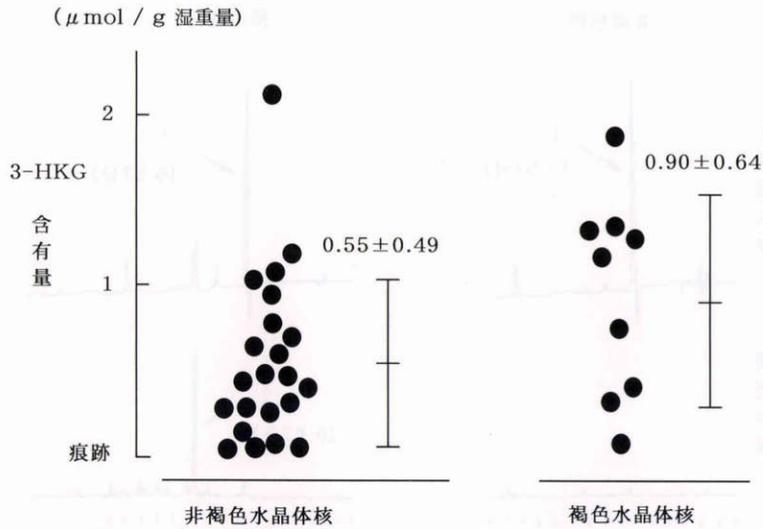


図3 個々の非褐色核(左)および褐色核(右)における3-HKG含有量(核湿重量当たりのモル数). 各群の右側の横線および縦線はそれぞれの群における平均値±標準偏差を示す. 3-hydroxykynurenine-O- β -glucoside(以下, 3-HKG)含有量には非褐色群および褐色群との間で有意差はなかった($p > 0.1$).

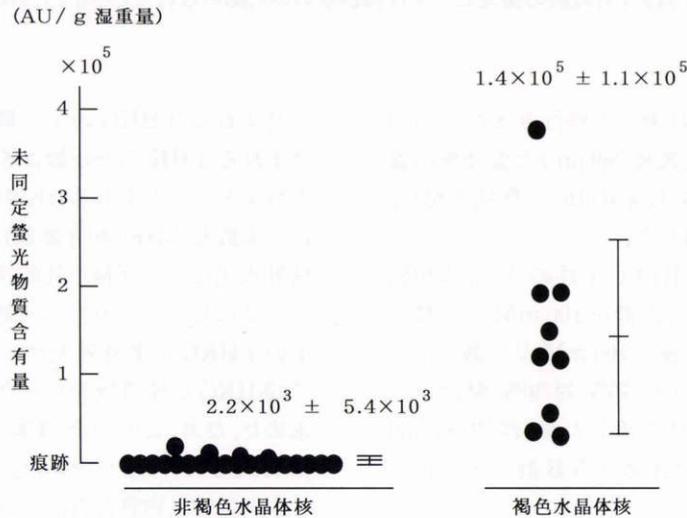


図4 個々の非褐色核(左)および褐色核(右)における湿重量当たりの未同定蛍光物質含有量. 各群の右側の横線および縦線は、それぞれの群における平均値±標準偏差を示す. 未同定蛍光物質含有量は、非褐色群に比べて褐色群で有意に高かった($p < 0.01$).

質, すなわち, 3-HKG およびキヌレニン⁸⁾とは保持時間を異にするので, これらの物質ではなく, その化学構造も今のところ不明なので, 以後本報では未同定蛍光物質と呼称する. なお, キヌレニンに相当するピークは本報のHPLC条件では, すべての試料において検出不能であった.

非褐色核および褐色核間で, 3-HKG含有量および未同定蛍光物質含有量を比較した. 3-HKG含有量は非褐色および褐色核の間で有意差を示さなかった(図3, 非褐色, $0.55 \pm 0.49 \mu\text{mol/g}$ 湿重量: 褐色, $0.90 \pm 0.64 \mu\text{mol/g}$ 湿重量; $p > 0.1$). それに対し, 未同定蛍光物質含有量は褐色核で有意に増加していた(図4, 非褐色, $2.2 \times 10^3 \pm 5.4 \times 10^3 \text{AU/g}$ 湿重量: 褐色, $1.4 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5 \text{AU/g}$ 湿重量, $p < 0.01$).

図5左にリン酸緩衝液を添加してインキュベートした試料(対照)の, 中央に β -グルコシダーゼを添加してインキュベートした試料の, 右に純品の3-HK(和光純薬)のそれぞれHPLC条件②で得られたクロマトグラムを示す. それぞれ上のクロマトグラムが紫外吸光度を, 下のクロマトグラムが蛍光強度を示す. 対照では保持時間8.27分に紫外吸光のピークが認められたが(図5左上段, 矢印1), β -グルコシダーゼを作用させた試料ではこのピークは消失し, 保持時間6.39分に新たなピークが出現した(図5中央上段, 矢印2). 新たに出現したピークの保持時間は, 3-HKのそれ(図5右上段, 矢印3)に極めて近かった. 一方, 対照では保持時間21.46分に検出された未同定蛍光物質のピーク(図5左下段, 矢印4)は, β -グルコシダーゼを添加した試料では消失した(図5中央下段). こ

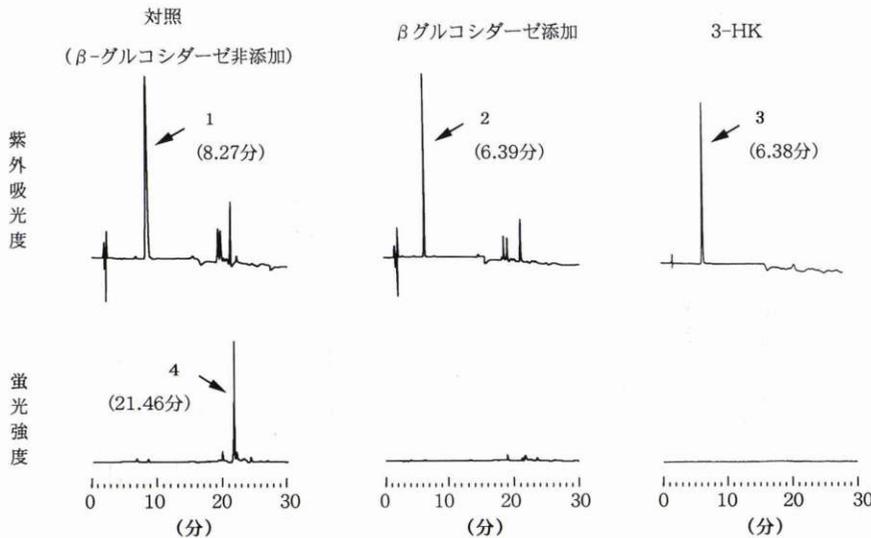


図5 褐色核から得られた試料の β -グルコシダーゼによる分解。

褐色核から得られた試料にリン酸緩衝液(左)または β -グルコシダーゼ溶液(中央)を添加し、48時間のインキュベート後におけるそれぞれのクロマトグラム。右は3-HK(純品)のクロマトグラム。上段は紫外吸光度、下段は蛍光強度をそれぞれ示す。 β -グルコシダーゼ添加によって紫外吸光では8.3分近傍に認められていたピーク(矢印1)が消失し、6.4分近傍に新たなピーク(矢印2)が出現したが、これは3-HKの保持時間(矢印3)に極めて近かった。また、蛍光では21.5分近傍に認められていたピーク(矢印4)が β -グルコシダーゼ添加によって消失した(中央下段)。HPLC条件②を採用(方法参照)。

れと同様の結果は、これを含めて調べた6個の核のすべてで認められた。

IV 考 按

水晶体核着色度の判定には、生体眼で判定する方法^{15)~17)}と摘出された水晶体で判定する方法^{2)~4)6)~9)}がある。本報で、摘出された核について判定する方法を採用した理由は、生体眼を細線灯顕微鏡で観察して判定する場合にはしばしば混濁した皮質を通して、しかも光学的切片で評価しなければならないので、むしろ摘出された核そのものを直視して判断の方が容易で、かつ確実と考えたからである。また、本報では着色度を主観的に判定した。着色度の客観的評価方法としては色度座標を用いたcolor analysis¹⁷⁾の報告があるが、過去の数多の報告^{2)~4)6)~9)15)16)}では生体眼および摘出された水晶体の着色の程度は主観的に判定されており、さらに著者らにはcolor analysisと主観的判定法の結果¹⁷⁾がよく対応するように見受けられ、しかも本報では淡黄色ないし黄色の核を非褐色、褐色ないし黒褐色の核を褐色と定義し、両者の間の着色状態のものは除外したので、主観的分類によっても着色度の恣意的判定を回避できると考えた。

本報では、水溶性分画中にタンパクに結合しておらず、かつ青色蛍光を発するある種の蛍光物質(本報でいう未同定蛍光物質)が非褐色核に比べて、褐色核において著明に増加していることが明らかになった(図4)。この未同定蛍光物質が水晶体タンパクの着色にどのようにかわるかは今のところ詳かではないが、この未同定蛍光物質が従来から着色との関連が示唆されてきた^{2)~5)}水晶体タ

ンパクの青色蛍光と関連する可能性が考えられる。水晶体タンパクの着色と青色蛍光の関連の有無については以下のごとく諸説があり、関連を支持する所見としては、①着色の増強に伴って水晶体全タンパク量に占める水不溶性タンパク分画(着色タンパクの大部分が属する²⁾)の比率は増加する²⁾³⁾が、水不溶性タンパク分画から検出される青色蛍光の強度は水溶性タンパク分画からのそれよりも大きいこと³⁾、②着色が強い核においては高分子化したタンパクが著明に増加している³⁾¹⁸⁾が、高分子化したタンパクから検出される青色蛍光の強度は、高分子化していないタンパクから検出されるそれに比べ大きいこと³⁾、③水晶体囊内摘出術で得られた核白内障あるいは褐色白内障水晶体から検出される青色蛍光の強度は、同等の年齢の皮質白内障水晶体から検出されるそれに比べ著明に大きいこと⁴⁾、④水晶体タンパクの尿素可溶性分画をタンパク分解酵素で分解し分子篩クロマトグラフィーで分析すると、波長340~360 nmで紫外吸収を示す分画(黄色調の指標となる⁵⁾)と、この青色蛍光を発する分画がよく一致する⁵⁾こと、などがあげられる。一方、関連を支持しない所見としては、①もし着色の程度とタンパクの青色蛍光との間に関連があるとすれば、着色の程度と単位タンパク重量当たりから検出される青色蛍光の強度は正相関することが予想されるはずであるが、着色白内障(核白内障、褐色白内障)水晶体と非着色水晶体(正常水晶体、皮質白内障)との間で単位タンパク重量当たりから検出される青色蛍光の強度を比較したところ、水溶性分画においては着色水晶体と非着色水晶体の間で差を示さず⁶⁾⁷⁾、水不溶性分画においても着色水晶体と非

着色水晶体の間で差を示さない⁶⁾か、あるいは非着色水晶体に比べて着色水晶体の方でむしろ小さいこと⁷⁾、②グアニジン不溶性分画⁸⁾(着色タンパクの大部分が属する)のタンパク分解酵素による加水分解産物の青色蛍光の強度は、グアニジン可溶性分画のタンパク分解酵素による加水分解産物の青色蛍光の強度より若干大きいに過ぎないことがあげられよう。

このように諸説があるものの、水晶体タンパクの青色蛍光と着色との間に関連があるとすれば、未同定蛍光物質と水晶体タンパクの青色蛍光との関連については、以下のような関係を可能性として考え得る。水晶体着色の過程で、①青色蛍光を発する物質が水晶体タンパクに結合した状態で形成され、それが解離して未同定蛍光物質(またはその前駆物質)になる、②未同定蛍光物質がまず形成され、それ(またはその代謝産物)が水晶体タンパクに結合して青色蛍光を発する、③水晶体タンパクと未同定蛍光物質の前駆物質に同一機序が作用して、それぞれ独立に蛍光性を有するような構造に変化する可能性などである。

未同定蛍光物質が β -グルコシダーゼによって性質を変えた(図5中央下段)ことは、未同定蛍光物質が β -グルコシドであることを示唆する。本報では、まず実験1の蛍光物質含有量測定で未同定蛍光物質が検出された新鮮な2検体に β -グルコシダーゼを添加し、上記の結果を見出した。さらに、糖尿病の有無や年齢の不詳な4個の水晶体核から得られた検体でも同様の結果を得た。この際、実験1と同様に糖尿病の有無や年齢が既知の水晶体核を用いるべきであろうが、実験1を終了後 -20°C で凍結保存された検体(糖尿病の有無や年齢が既知)では変質も懸念されたので、むしろ糖尿病の有無や年齢が不詳であるものの、褐色の核から得られた新鮮な検体で調べた。

水晶体水溶性分画に存在するグルコシドとしては、van Heyningen⁸⁾によって3-HKGおよび3-HKG類似のグルコシドの存在が指摘されていたが、Inoueら¹⁰⁾は後者がDHKN-Glcであることを発見した。また、Inoueら¹¹⁾は白内障水晶体の不溶性タンパクからはAHA-Glcが検出されることも報告した。そして、彼ら¹⁰⁾は加齢とともに増加する水晶体タンパクの蛍光は、3-HKGから脱アミノ化によって生じたDHKN-Glcを経て生成されたAHA-Glcが水晶体タンパクに疎水結合することに由来する可能性を指摘した。水晶体着色の増強は不溶性タンパクの増加を伴うこと²³⁾、着色の大部分が不溶性タンパクに属すること⁶⁾、および水晶体タンパクの蛍光は着色と密接な関係があること²⁴⁻²⁵⁾を勘案すれば、不溶性タンパクに結合している蛍光物質であるAHA-Glcが水晶体の着色現象に関連していることが予想される。さらに、AHA-Glcの前駆物質であるDHKN-Glcについても同様のことが予想される。これは、本報で褐色核において β -グルコシドである蛍光物質が有意に増加していたとい

う所見からも示唆される。

また、3-HKGは光増感物質として作用し、水晶体タンパクを架橋・高分子化させる(すなわち白内障の発生を助長する)可能性が指摘されている¹⁹⁾が、一方で3-HKGの蛍光半減期が著しく短いなどの観点から、光増感物質として作用するとは考えにくいという説²⁰⁾もある。3-HKG含有量と核着色の程度との間に関連がなかったという本報結果(図3)は、3-HKGが光増感物質として作用するという説を積極的には支持しない。3-HKGよりもはるかに強い蛍光性を有する未同定蛍光物質が非褐色核に比べて褐色核で有意に多かったという本報結果(図4)は、未同定蛍光物質が光増感作用²¹⁾を発揮して水晶体核の着色に伴う水晶体タンパクの架橋・高分子化現象¹⁸⁾を引き起こす可能性を示唆しているかも知れない。

本報は、核の着色に伴って未同定蛍光物質が増加すること、および未同定蛍光物質が β -グルコシドである可能性が高いことを明らかにした。DHKN-Glcも β -グルコシドであることを勘案すれば、未同定蛍光物質はDHKN-Glcである可能性が高いと推定される。今後は未同定蛍光物質とDHKN-Glcの異同を決め、さらに水晶体タンパクとの相互作用を調べるのが人眼水晶体核着色機構の解明の端緒になり得ると考える。

ご校閲いただきました金沢大学医学部眼科学教室河崎一夫教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Satoh K, Bando M, Nakajima A: Fluorescence in human lens. *Exp Eye Res* 16: 167-172, 1973.
- 2) Pirie A: Color and solubility of the proteins of human cataracts. *Invest Ophthalmol* 7: 634-650, 1968.
- 3) Augusteyn RC: Distribution of fluorescence in the human cataractous lens. *Ophthalmic Res* 7: 217-224, 1975.
- 4) Lerman S, Borkman R: Spectroscopic evaluation and classification of the normal, aging, and cataractous lens. *Ophthalmic Res* 8: 335-353, 1976.
- 5) Bando M, Nakajima A, Satoh K: Coloration of human lens protein. *Exp Eye Res* 20: 489-492, 1975.
- 6) Stein PJ, Henkens RW, Yamanashi BS, Wolbarsht M: Studies on brunescant cataracts. II. Fluorescence studies on normal and brunescant lens proteins. *Ophthalmic Res* 8: 388-394, 1976.
- 7) Yappert MC, Borchman D, Byrdwell WC: Comparison of specific blue and green fluorescence in cataractous versus normal human lens fractions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 630-636, 1993.
- 8) van Heyningen R: Assay of fluorescent glucosides in the human lens. *Exp Eye Res* 15: 121-126, 1973.
- 9) Bessems GJH, Hoenders HJ: Distribution of aromatic and fluorescent compounds within single

- human lenses. *Exp Eye Res* 44: 817—824, 1987.
- 10) **Inoue A, Satoh K**: Identification of a fluorescent glucoside isolated from the protein-free extract of human lens. *Bioorganic Medical Chemistry Letters* 4: 2303—2306, 1994.
 - 11) **Inoue A, Satoh K**: Identification of a new fluorescent compound isolated from human lens insoluble protein fraction. *Bioorganic Medical Chemistry Letters* 3: 345—346, 1993.
 - 12) **Bando M, Nakajima A, Satoh K**: Spectrophotometric estimation of 3-OH L-kynurenine O- β -glucoside in the human lens. *J Biochem* 89: 103—109, 1981.
 - 13) **Dillon J**: Photolytic changes in lens proteins. *Curr Eye Res* 3: 145—150, 1984.
 - 14) **Wood AM, Truscott RJW**: UV Filters in human lenses: Tryptophan catabolism. *Exp Eye Res* 56: 317—325, 1993.
 - 15) 佐々木一之, 小野雅司, 青木功喜, 加藤信世, 森根優, 中泉裕子, 他: 白内障分類試案. *日眼会誌* 93: 796—800, 1989.
 - 16) **Chylack LT, Leske MC, Khu P, Kashiwagi T, Sperduto R**: Lens opacities classification system II (LOCS II). *Arch Ophthalmol* 107: 991—997, 1989.
 - 17) **Sasaki K, Hiiragi M, Sakamoto Y, Shibata T**: *In vivo* color analysis of human crystalline lenses. *Ophthalmic Res* 17: 21—26, 1985.
 - 18) **Buckingham RH**: The behavior of reduced proteins from normal and cataractous lenses in highly dissociating media: Cross-linked proteins in cataractous lenses. *Exp Eye Res* 14: 123—129, 1972.
 - 19) **Bando M, Mikuni I, Obazawa H**: Acceleration of calcium-induced aggregation of rat lens soluble protein by photosensitization with 8-methoxypsoralen and 3-hydroxy-L-kynurenine O- β -glucoside. *Exp Eye Res* 34: 953—960, 1982.
 - 20) **Dillon J, Wang R-H, Atherton SJ**: Photochemical and photophysical studies on human lens constituents. *Photochem Photobiol* 52: 849—854, 1990.
 - 21) **Goosey JD, Zigler JS, Kinoshita JH**: Cross-linking of lens crystallins in a photodynamic system: A process mediated by singlet oxygen. *Science* 208: 1278—1280, 1980.