

培養家兎水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態

—アルドース還元酵素阻害剤による影響—

中村 二郎¹⁾, 伊藤 紳¹⁾²⁾, 可児 一孝¹⁾, 岡本 良平³⁾¹⁾滋賀医科大学眼科学教室, ²⁾東レ株式会社, ³⁾滋賀医科大学実験センター

要 約

20 mM グルコース-1-¹³C 含有 tissue culture medium 199 (TCM 199) で培養した家兎水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態を, ¹³C, ³¹P-nuclear magnetic resonance (NMR) スペクトロスコピー (¹³C, ³¹P-MRS) で観察した。また, それらの代謝動態に対するアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) の影響について, 同様に ¹³C, ³¹P-MRS で観察した。

20 mM のグルコース負荷により, ソルビトール, ソルビトール-3-リン酸, α -グリセロリン酸は培養開始後速やかに増加した。グルコース, 乳酸, アデノシン三リン酸 (ATP) は有意な変化を示さなかった。ARI を培養液に添加したところ, ソルビトールおよびソルビトール-3-リン酸は速やかに減少したが, α -グリセロリン酸が減少するまでに若干の時間を要した。グルコースおよび ATP は有意な変化を示さなかった。乳酸はおおよそ2倍に増加した。

これまでのアロキサン誘発糖尿病家兎水晶体, 高濃度 (5~40 mM) グルコース含有 TCM 199 培養家兎水晶体, 20 mM ガラクトース含有 TCM 199 培養家兎水晶体における糖, リン酸化合物の代謝動態, および今回の観察結果から, アルドース還元酵素は単にソルビトール経路を活性化するだけでなく, 嫌氣的解糖 (Embden-Meyerhof pathway) を抑制して解糖活性を制御し, 水晶体におけるエネルギー代謝を制御し, さらにリン脂質関連物質の代謝に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 102: 561—569, 1998)

キーワード: 家兎水晶体, 20 mM グルコース-1-¹³C 含有 tissue culture medium 199 (TCM 199), ¹³C, ³¹P-NMR スペクトロスコピー, アルドース還元酵素阻害剤 (ARI), 糖およびリン酸化合物

Metabolic Changes of Aldose and Phosphorus Metabolites
in Incubated Rabbit Lenses

— Effects of Aldose Reductase Inhibitor —

Jiro Nakamura¹⁾, Shin Itoh¹⁾²⁾, Kazutaka Kani¹⁾ and Ryohei Okamoto³⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science, ²⁾Toray Industries Inc.³⁾Central Research Laboratory, Shiga University of Medical Science

Abstract

We measured the metabolic changes in aldose and phosphorus metabolites in rabbit lenses incubated with tissue culture medium 199 (TCM 199) containing 20 mM glucose-1-¹³C, using ¹³C, ³¹P-NMR Spectroscopy (¹³C, ³¹P-MRS). Then we investigated the effects of aldose reductase inhibitor (ARI) on those metabolic changes, using the same method.

In the incubated rabbit lenses, rapid increases were recognized in sorbitol, sorbitol-3-phosphate, and α -glycerophosphate. The levels of glucose, lactate, and adenosin triphosphate (ATP) did not change significantly. Once ARI was added, the levels

of sorbitol and sorbitol-3-phosphate were reduced immediately, but the reduction of α -glycerophosphate needed some time after the addition of ARI. On the other hand, the levels of lactate increased approximately two-fold, and the levels of glucose and ATP did not change significantly.

Considered with our other observations on the metabolic changes in alloxan induced diabetic rabbit lenses, and in rabbit lenses incubated with high concentrations (5~40 mM) of glucose-TCM 199 or 20 mM galactose-TCM 199, these results suggest that aldose reductase not only activates the polyol path-

別刷請求先: 520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町 滋賀医科大学眼科学教室 中村 二郎
(平成9年12月26日受付, 平成10年4月20日受理)

Reprint requests to: Jiro Nakamura, M.D. Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science, Seta Tsukinowa-cho, Otsu-shi, Shiga-ken 520-2192, Japan

(Received December 26, 1997 and accepted in revised form April 20, 1998)

way but also controls the Embden-Meyerhof pathway, energetic metabolic changes, or phospholipid-associated metabolic changes. (J Jpn Ophthalmol Soc 102 : 561—569, 1998)

I 緒 言

アロキサン誘発糖尿病家兎水晶体¹⁾や 20 mM グルコースあるいは 20 mM ガラクトース含有 tissue culture medium 199 (TCM 199) で培養した家兎水晶体²⁾³⁾におけるリン酸化合物の代謝動態を³¹P-nuclear magnetic resonance (NMR) スペクトロスコピー (³¹P-MRS) で観察したところ、ソルビトール-3-リン酸 (S-3-P) および α -グリセロリン酸 (α -GP) が著明に増加するのが観察された。

S-3-P は、フルクトース-3-リン酸 (F-3-P) とともに、それぞれソルビトールおよびフルクトースから直接リン酸化され、生成されると考えられている^{4)~9)}。一方 α -GP は、ホスホコリン (PC)、グリセロホスホエタノラミン (GPE) あるいはグリセロホスホコリン (GPC) などのリン脂質関連物質と同様、その代謝変動がアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) により抑制されること^{10)~12)}、およびその代謝経路に関しては現時点では不明である¹³⁾が、その生成経路に関して、嫌氣的解糖を経て α -GP デヒドロゲナーゼにより生成されるのではないと考えられる²⁾³⁾こと、あるいはソルビトール経路からフルクトースを経て生成されるのではないと考えられる³⁾¹⁴⁾ことなどから、グリセロリン脂質からグリセロールを経て生成されていると考えられる³⁾¹⁴⁾。すなわち、アルドース還元酵素 (AR) は生体膜関連物質、特にグリセロリン脂質の代謝に関与している可能性がある。

これらに関してさらに理解するために、20 mM グルコース-1-¹³C を添加した TCM 199 で培養した家兎水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態に対する ARI の影響について観察した。

II 実験材料および方法

1. 水晶体の摘出および培養

2 kg ニュージーランド白色家兎をペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®]) で致死麻酔後、直ちに水晶体を摘出して培養した。

水晶体摘出は正田の方法¹⁵⁾を参考に、以下の方法で実施した。すなわち、

1) 摘出眼球を滅菌生理食塩水で洗浄後、別の容器の 70% エタノールで 10 秒間消毒する。

2) 次いで、この眼球をペニシリン G : 200 Units/ml、ストレプトマイシン硫酸塩 : 200 μ g/ml およびアンホテリシン B : 50 μ g/ml を含む Hanks 液 (以下、抗生剤含有 Hanks 液) に移す。

3) この抗生剤含有 Hanks 液中で顕微鏡下に、眼球後極

Key words : Rabbit lens, TCM 199 containing 20 mM glucose-1-¹³C, ¹³C, ³¹P-NMR spectroscopy, Aldose reductase inhibitor (ARI), Aldose and phosphorus metabolites

部から水晶体を摘出した。

(4) 摘出水晶体は 35.0°C の抗生剤含有 Hanks 液に 5 分間温存後、水晶体 1 個につきそれぞれ 10 ml の培養液とともに滅菌容器に封入し、暗室内で 35.0°C で保存した。培養液は、グルコースの含まれていない TCM 199 に 20 mM グルコース-1-¹³C を添加したもの (以下、20 mM グルコース TCM 199) を使用した。この培養液には抗生剤および抗真菌剤は添加していない。

2. 培養水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態の測定

培養 0, 5, 10, 20, 50 時間後に、糖およびリン酸化合物の代謝動態を¹³C, ³¹P-NMR スペクトロスコピー (¹³C, ³¹P-MRS) を用いて測定し、ARI 添加前の測定値とした。測定には、各培養条件および各培養時間ごとに 3 匹 3 眼の水晶体を用いた。

3. アルドース還元酵素阻害剤の影響の観察

アルドース還元酵素阻害剤 (ARI: AD-5467, 武田) を 100 μ M となるように培養 0, 5 あるいは 10 時間後に培養液中に添加し、その後の糖およびリン酸化合物の代謝動態を培養開始 5, 10, 20, 50 時間後に¹³C, ³¹P-MRS で観察した。測定には、各培養条件および各培養時間ごとに 3 匹 3 眼の水晶体を用いた。

4. ¹³C, ³¹P-MRS

測定装置は、6.3 テスラ FT-NMR (JEOL JNM-GX270) を使用した。

測定条件は、¹³C-MRS でパルス角 : 90°, パルス繰り返し時間 : 3.6 秒、積算回数 : 500 回、測定温度 : 4°C で、外部標準物質をテトラメチルシラン (TMS) とした。³¹P-MRS ではそれぞれ 30°, 0.5 秒、10,000 回、4°C で、外部標準物質としてヘキサメチルホスホルアミド (HMPA) を使用した。各標準物質は、測定中、常に一定量が 10 mm ϕ サンプル管の一定の位置となるように容器に封入し、サンプル管内に設置した。

1 回の測定には 1 個の水晶体を使用し、リン酸無添加の Krebs-Henseleit 溶液 (KCl : 4.7 mM, NaCl : 118.0 mM, MgSO₄ : 0.6 mM, CaCl₂ : 1.25 mM, Glucose : 11.0 mM, NaHCO₃ : 25.0 mM 水溶液を 95% O₂, 5% CO₂ でバブリングした) とともにサンプル管に挿入した。¹³C-MRS で測定終了後、直ちに³¹P-MRS で測定した。

III 結 果

培養家兎水晶体の¹³C-MRS のスペクトルの代表例として、図 1 の上段に 20 mM グルコース TCM 199 で 20 時間培養した水晶体のスペクトルを、下段に同培養液に

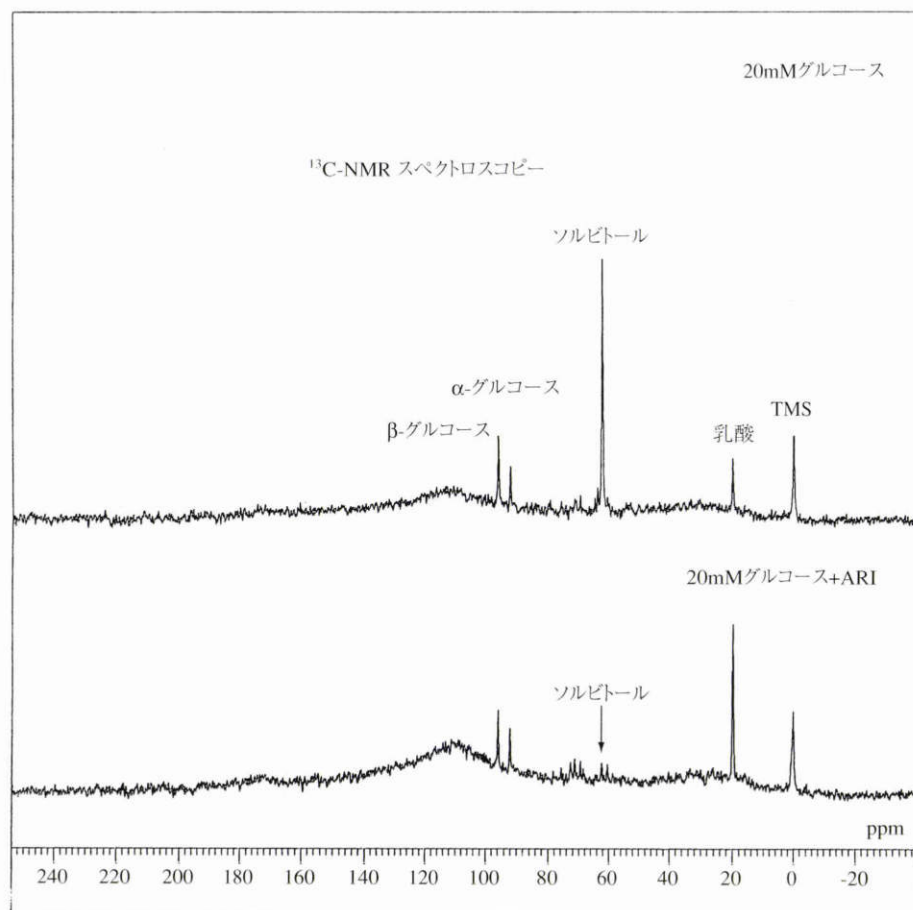


図 1 ^{13}C -MRS で得られた水晶体のスペクトルの代表例.

^{13}C -MRS: ^{13}C -nuclear magnetic resonance

ARI (100 μM) を培養開始前に添加した場合の培養 20 時間後のスペクトルを示す。ソルビトールの生成はほぼ完全に抑制されており、ここに使用した ARI (AD-5467, 武田) は有効であることが理解される。また、グルコースには著明な変化は観察されないが、乳酸が著しく増加しているのが認められる。

図 2 に ^{31}P -MRS の代表的スペクトルを示す。すなわち、上段から 20 mM グルコース TCM 199 で 20 時間培養した家兎水晶体のスペクトル (図 2 の上段)、ARI を培養開始前に添加した場合の培養 20 時間後のスペクトル (図 2 の中段)、および無処置の家兎水晶体のスペクトル (図 2 の下段) である。上段のスペクトルで観察される S-3-P および α -GP の増加が ARI を添加することにより (中段) 抑制されているのが認められる。ARI を添加した場合 (図 2 の中段)、無機リン酸が増加しているのも認められる。アデノシン三リン酸 (ATP) はほとんど変化していない。

図 3~10 に、ARI を培養開始 0.5 あるいは 10 時間後に添加した場合のソルビトール (図 3)、グルコース (図 4)、乳酸 (図 5)、S-3-P (図 6)、 α -GP (図 7)、ATP (図 8)、ATP と無機リン酸 (図 9)、および無機リン酸 (図 10) の経時変化を示す。各代謝変化は、それぞれの外部標準物質で

ある TMS あるいは HMPA のスペクトル面積を 1 とした相対値 (%) で表示した。

ソルビトールは培養開始後速やかに漸増したが、ARI 添加後には直ちに抑制された (図 3)。

グルコースは ARI を添加しても、あるいは添加しなくても有意な変化は示さなかった (図 4)。

乳酸は ARI を添加することにより増加した。この変化は、ARI を培養開始前に添加しても、あるいは培養開始 5 あるいは 10 時間後に添加してもその増加の程度には関係なく、ARI 添加後、速やかにおよそ 2 倍に増加した (図 5)。ところで、ペントースリン酸回路の初段階として、グルコース-6-リン酸の 1 位の酸化によりリブロース-5-リン酸および nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) が生成されるが、グルコース-1- ^{13}C がペントースリン酸回路を経て代謝される場合、1 位の ^{13}C が酸化されて $^{13}\text{CO}_2$ となり、リブロース-5-リン酸は ^{13}C を有さないため、それ以降の代謝により産生される乳酸は ^{13}C を有さず、したがって ^{13}C -NMR スペクトロスコピーでは観察できない。すなわち、ここで観察される乳酸は嫌氣的解糖を経て代謝された乳酸-3- ^{13}C であり、嫌氣的解糖を経て代謝される乳酸がおおよそ 2 倍に増加したものと考えられる。

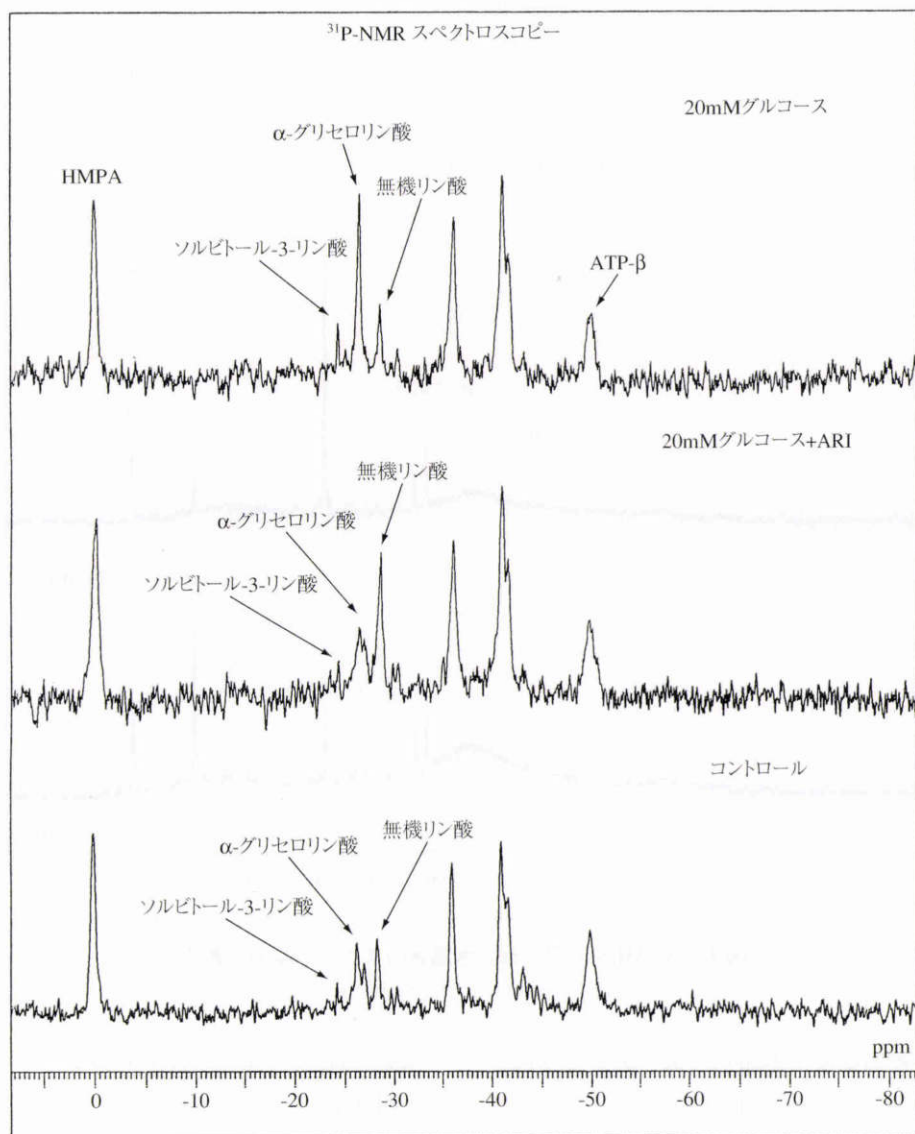


図2 ^{31}P -MRS で得られた水晶体のスペクトルの代表例。

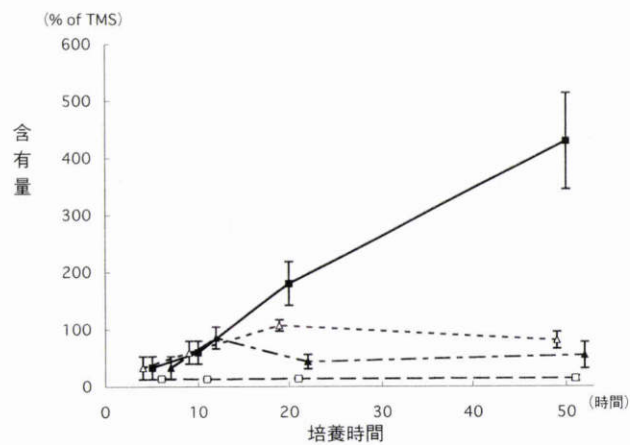


図3 ソルビトールの経時変化。

■：ARIは添加せず，□：ARIを培養開始前に添加，
▲：ARIを培養5時間後に添加，△：ARIを培養10時間後に添加，ARI：アルドース還元酵素阻害剤

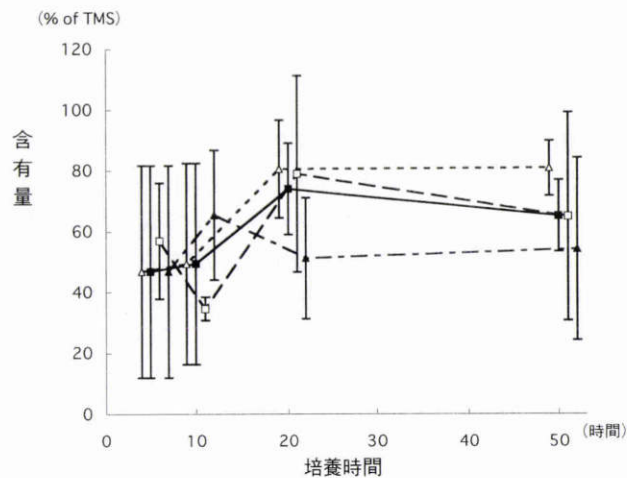


図4 グルコースの経時変化。

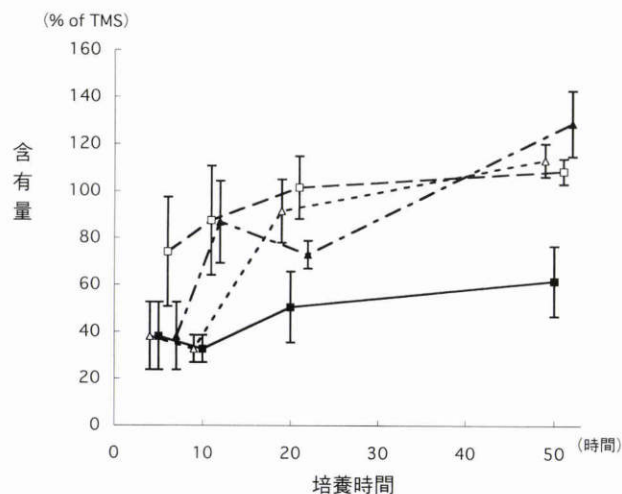
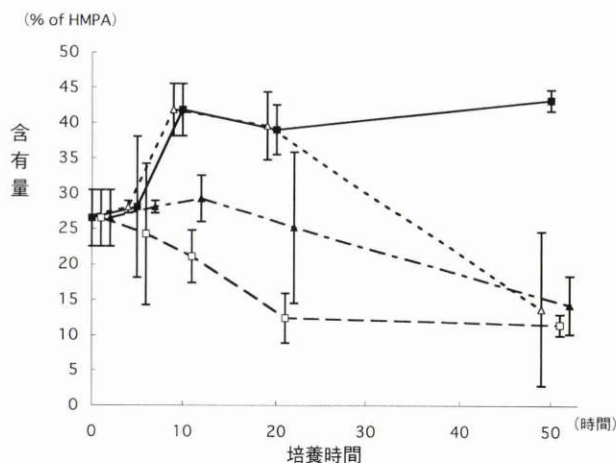
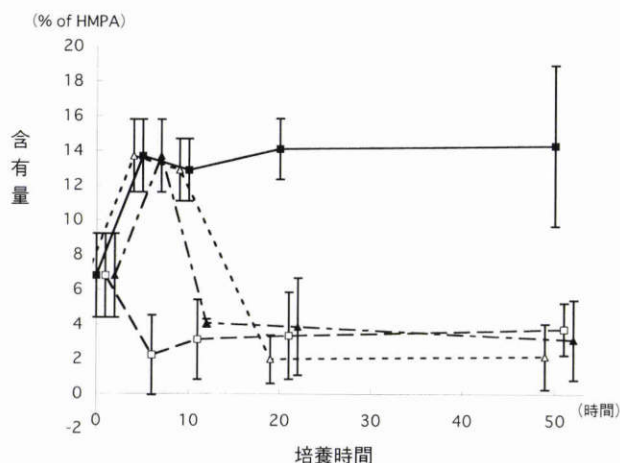
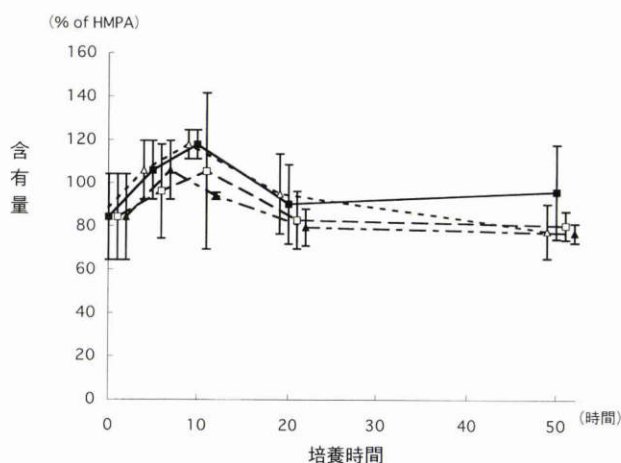


図 5 乳酸の経時変化.

図 7 α -GP の経時変化.
 α -GP: α -グリセロリン酸図 6 S-3-P の経時変化.
S-3-P: ソルビトール-3-リン酸図 8 ATP の経時変化.
ATP: アデノシン三リン酸

S-3-P はソルビトールと同様, 培養開始後速やかに増加したが, ARI を添加することで速やかに抑制された. また ARI を添加した場合, 培養開始前の値よりもさらに減少する傾向を示した (図 6).

α -GP は培養開始後速やかに増加したが, ARI を添加すると減少した. この減少はソルビトールや S-3-P と比較してそれほど速やかなものではなく, ARI の添加から α -GP の抑制までにはある程度の時間を要した. また, ARI 添加前の値よりも小さくなる傾向を示した (図 7).

ATP は培養開始 5 ないしは 10 時間後にピークとなるような一時的な増加を示し, 続いて培養開始前の値に戻るような傾向を示した. その変化の様態および変化量は, ARI を添加しても, あるいは添加しなくても同様であった (図 8).

無機リン酸は, 20 mM グルコース TCM 199 で 50 時間培養した水晶体では, ATP の一時的な増加にほぼ一致して, 一時的に減少する傾向を示した (図 9).

無機リン酸は ARI を添加することにより増加した (図 10).

IV 考 按

20 mM グルコース TCM 199 培養系で, ARI 添加後, 家兎水晶体のグルコースは有意な変化を示さなかった (図 4). 一方, 乳酸は約 2 倍に増加した (図 5).

これまでの TCM 199 培養家兎水晶体における観察で, 培養液中のグルコース濃度を 5, 10, 20, 40 mM と増加させた場合, 水晶体中のグルコース含有量は, ほぼソルビトールの増加率に比例して増加したが, 乳酸は変化しなかった²⁾. この結果に関して, グルコースは解糖活性に依存した受動的な輸送形式をとる¹⁶⁾とされているが, 嫌氣的解糖は飽和状態に達しているものの, 他の経路 (ソルビトール経路あるいはペントースリン酸回路など) が活性化されたため, 水晶体中のグルコース含有量が増加したものと考えた²⁾.

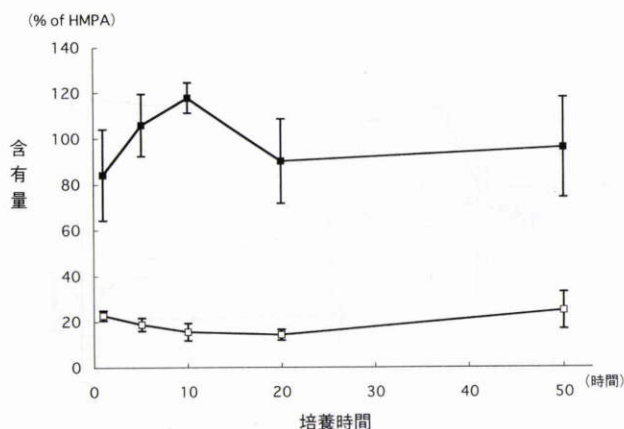


図9 ARI無添加の場合のATPと無機リン酸の経時変化.

■: ATP □: 無機リン酸

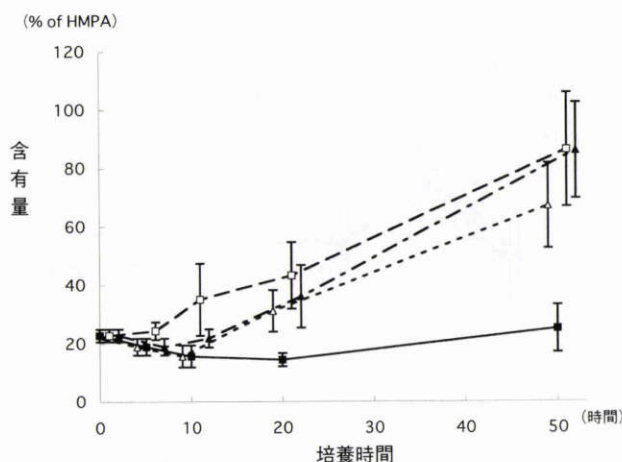


図10 無機リン酸の経時変化.

今回、20 mM グルコース培養系で AR が活性化された状態でも、また ARI によりソルビトール経路が抑制された状態でも、水晶体中のグルコース含有量が変化しなかったこと、および ARI を添加したことで乳酸は約 2 倍に増加したこと、ARI を添加することにより、それまでは AR により抑制されていた嫌氣的解糖が、ソルビトール経路を経て代謝されていた分のグルコースを用いて、さらに活性化された可能性があると考えた。すなわち、グルコースを負荷した家兎水晶体では、AR は単にソルビトール経路を活性化するだけでなく、嫌氣的解糖の抑制にも関与していると考えられる。そして、ARI を添加したことでその抑制が解かれ、嫌氣的解糖がさらに活性化された可能性がある。ただし乳酸の増加に関しては、単に嫌氣的解糖が活性化されたのみならず、ARI がピルビン酸カルボキシラーゼあるいはピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体を阻害した可能性も考えられる。

S-3-P は培養開始後速やかに増加し、ARI の添加により速やかに抑制された。また ARI を添加した場合、培養開始前の値よりもさらに減少する傾向を示した(図 6)。

家兎水晶体では正常状態でも S-3-P が認められるが、これは、正常状態でも、AR によりソルビトール経路がある程度活性化されているためであると考えられる。この代謝活性が ARI により完全に抑制されたため、培養開始前に水晶体中に内在していた S-3-P が分解・代謝され、培養開始前の値よりもさらに小さくなったものと考えられる。

S-3-P は、F-3-P とともに 1989 年に Szwergold ら⁴⁾⁵⁾により同定された物質で、その代謝経路に関しては、それぞれ、おそらくソルビトールあるいはフルクトースより 3-ホスホキナーゼにより直接リン酸化されているものと推測されている^{6)~9)}。今回、ARI を添加することによりソルビトールの低下と同様、速やかに抑制されたことから、S-3-P はソルビトールから直接リン酸化され生成されていると考えて矛盾はないように思われる。

ところで、20 mM ガラクトース含有 TCM 199 培養家兎水晶体におけるリン酸化合物の代謝動態を³¹P-MRS で観察したところ、S-3-P の増加、あるいはそれに代わる代謝産物(例えばガラクトクトール-3-リン酸)のスペクトルは認められなかった³⁾。50% ガラクトース食餌ラット水晶体の³¹P-MRS の観察で、2 本の未知の共鳴スペクトルが 6 ppm 近傍で得られており¹⁷⁾、それらが S-3-P に代わる代謝物質である可能性はあるが、20 mM ガラクトース含有 TCM 199 培養家兎水晶体では認められなかった。したがって、これまでの観察結果から、S-3-P は、①アロキサン誘発糖尿病家兎水晶体で増加した¹⁾こと、②20 mM グルコース TCM 199 培養家兎水晶体ではソルビトールと同様に漸増し³⁾、また、培養液中のグルコース濃度を 5, 10, 20, 40 mM と高くするに従い、ソルビトールと同様、その産生量も増加する傾向を示した²⁾こと、および今回の結果で、③ARI を添加することにより、ソルビトールと同様、速やかにその産生が抑制されたことなどから、S-3-P はソルビトールを経て代謝されているものと考えられる。さらにその経路として、ガラクトース培養家兎水晶体では S-3-P はそれに代わる代謝産物も含めて観察されなかった³⁾ことから、ソルビトールが直接リン酸化される経路以外に、ソルビトールデヒドロゲナーゼによりフルクトース→F-3-P を経て産生されている可能性もある。

ラット水晶体では、グルコースを負荷することで初めて S-3-P および F-3-P の双方が観察される¹⁰⁾¹⁸⁾のに対して、家兎水晶体では無処置の水晶体でも S-3-P が認められ、グルコースを負荷すると S-3-P は増加する^{1)~3)}。さらに家兎水晶体では、F-3-P は無処置の水晶体、あるいはグルコースのみを負荷した水晶体などでは観察されず、グルコースとフルクトースを同時に負荷して初めて観察されるようになる⁸⁾。このように動物種によりそれらの代謝動態は異なるが、これら S-3-P および F-3-P は、水晶体蛋白の非酵素的グリコシル化に大きく関与す

る⁴⁾⁵⁾とされている。どの程度関与しているかは不明であるが、加齢ラット水晶体の観察でグルコースの増加は認められなかったが、ソルビトール、S-3-P、フルクトース、および F-3-P の増加が観察されたことから、加齢によりソルビトール経路が活性化され、S-3-P および F-3-P が増加し、加齢白内障の形成に関与している可能性が示唆されている⁹⁾。

α -GP は培養開始後速やかに増加したが、ARI を添加した場合、添加してから抑制されるまでにある程度の時間を要した。また、ARI 添加前の値よりも小さくなる傾向を示した(図 7)。

α -GP は、ソルビトールデヒドロゲナーゼにより産生される nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) を利用して、嫌氣的解糖を経て α -GP デヒドロゲナーゼにより産生されると考えられている¹³⁾。しかしながら、① TCM 199 培養家兎水晶体における観察で、培養液中のグルコース濃度が 5 mM では、すでに嫌氣的解糖は飽和状態に達しているように考えられたが、グルコース濃度を 10, 20, 40 mM と高くするにつれ、ソルビトールおよび α -GP は増加したものの、乳酸は変化しなかった²⁾(嫌氣的解糖の活性度と α -GP の産生量が比例しない)こと、② 20 mM ガラクトース-1-¹³C 含有 TCM 199 培養水晶体では、 α -GP-3-¹³C およびフルクトース-1-¹³C が増加しなかった³⁾(α -GP は、ガラクトースから嫌氣的解糖あるいはソルビトール経路を経て、直接生成されてはいない)こと、③ 20 mM ガラクトース-1-¹³C 含有 TCM 199 培養水晶体で、乳酸-3-¹³C は経時的に増加傾向を示したものの、少量認められるのみであった³⁾(20 mM グルコース培養家兎水晶体および 20 mM ガラクトース培養家兎水晶体では α -GP は同程度に増加したが、20 mM ガラクトースは α -GP 産生分に見合うだけのグルコースを嫌氣的解糖へ供給してはいない)こと、および④ 5 mM グルコース培養水晶体で認められた以上の α -GP が、ソルビトールデヒドロゲナーゼの基質とはなり得ないガラクトースを産生する 20 mM ガラクトースおよび 5.5 mM グルコース含有 TCM 199 培養水晶体で認められた³⁾(α -GP はソルビトール経路を経て代謝されるのではないと考えられる)ことなどから、増加した α -GP は、ソルビトール経路あるいは嫌氣的解糖以外の経路を経て生成されていると考えられる³⁾。さらに ARI を添加してから α -GP が抑制されるまでにはある程度の時間を要したことを考えあわせると、AR は α -GP の生成に関して直接的ではなく、グリセリン脂質からの代謝経路を制御することにより、結果として α -GP の生成を制御している可能性が考えられる。

ところで、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット水晶体では、 α -GP の増加以外に PC, GPE, GPC の減少が観察されている^{10) 18)}が、これらの物質はリン脂質の前駆体あるいは分解産物であることから、膜の代謝に関する重要

な変化である^{11) 12) 19)}可能性がある。 α -GP も同様にリン脂質の前駆体あるいは分解産物であるが、これら α -GP を含めたリン脂質関連物質の代謝変化、あるいはそれらのうちの一部の変化は、アロキサン誘発糖尿病家兎水晶体¹⁴⁾、遺伝性白内障ラット (ICR/f) 水晶体²⁰⁾、紫外線 (UV-A) を照射したリス水晶体²¹⁾、マウスの虚血肝モデル²²⁾でも観察され、Hachisuka ら²²⁾は細胞膜におけるリン脂質の分解が亢進したためであると推察した。同様の変化はまた、部分肝切除後のラット再生肝モデルでも観察されている^{23) 24)}が、これらについては急速な細胞増殖により惹起されたリン脂質の合成亢進によるものと考えられている。ラット再生肝モデルでは PC の減少に加えてホスホエタノラミンの増加が観察されているが、これについて Murphy ら²³⁾は、ホスファチジルエタノラミン特異的ホスホリパーゼ C の活性亢進によりホスファチジルエタノラミンの分解が亢進されているためであると推察している。

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット水晶体で観察される α -GP の増加、および PC, GPE, GPC の減少については、ARI で抑制される^{10) ~ 12)}こと、糖尿病家兎水晶体¹⁾あるいは 20 mM グルコース TCM 199 培養家兎水晶体、20 mM ガラクトース TCM 199 培養家兎水晶体で増加した α -GP が、ソルビトール経路あるいは嫌氣的解糖を経て代謝されているのではない可能性がある²³⁾ことなどを考えあわせると、AR が細胞膜の変化を通してリン脂質の代謝に関与している可能性があると考えられる。

ATP は、培養開始 10 時間後にピークを有するようない時的な増加を示した。またこの変化および変化量は、ARI を添加しても、しなくても著変を示さなかった(図 8)。この際、無機リン酸は ARI を添加することにより増加した(図 9, 10)。

TCM 199 培養家兎水晶体における観察では、TCM 199 中のグルコース濃度を 5, 10, 20, 40 mM に増加した場合、グルコース濃度が 5 mM 以上では乳酸は変化せず、嫌氣的解糖はすでに飽和状態に達しているかのようには思われた。さらにソルビトール経路は、TCM 199 中のグルコース濃度を 5, 10, 20, 40 mM に増加した場合、培養液中のグルコース濃度に応じてより強く活性化されたが、ATP は有意な変化を示さなかった²⁾。一方で、20 mM ガラクトース TCM 199 培養家兎水晶体における観察では、ATP の急峻な減少が観察された³⁾。これらの結果から、ガラクトースはソルビトールデヒドロゲナーゼの基質とはなり得ないため、フルクトース以降の代謝経路をも含めた意味でのソルビトール経路は、嫌氣的解糖を経ずに ATP を産生している可能性があると考えられる。すなわち、TCM 199 培養家兎水晶体で、TCM 199 中のグルコース濃度が 5 mM では嫌氣的解糖により ATP が生成されているが、10 mM 以上では AR が嫌氣的解糖を制御し、ソルビトールの過剰蓄積による ATP の減少

分に対しては、ソルビトール経路による ATP の補充が始まる。ARI が添加されソルビトール経路が抑制されると、嫌氣的解糖に対する抑制が解かれ、ここに、それまではソルビトール経路を経て代謝されていた分のグルコースによる嫌氣的解糖経由の ATP の補充が始まる。この際、無機リン酸は増加しているが、この増加分が内在していた S-3-P および α -GP からのリン酸の脱離によると考えられる無機リン酸量よりも著しく多いことから、ATP の消費も増大している可能性が考えられる。さらに、ARI の添加により ATP は変化せずに乳酸は増加したが、グリセロリン脂質から分解生成されと考えられる α -GP も低下していることから、グリセロリン脂質からの ATP の補給路も断たれている可能性が考えられ、ペントースリン酸回路などのエネルギー代謝経路が異常に活性化されている可能性も考えられる。

以上、グルコース負荷家兎水晶体に ARI を作用させた場合、ソルビトール、S-3-P、 α -GP の増加は完全に抑制され、正常状態における値よりも低値を示し、乳酸はほぼ2倍に増加するなど、単にソルビトール経路が抑制されて水晶体中の代謝が正常状態に復するのではなく、嫌氣的解糖がさらに活性化される、あるいはソルビトール経路は正常状態でも若干活性化されていると考えられるが、それが全く抑制されてしまう、さらにエネルギー代謝が異常活性化されるなど、正常状態とは全く異なった代謝動態が展開される可能性が示唆された。

文 献

- 1) 中村二郎, 伊藤 紳, 岡本良平: アロキサソ誘発糖尿病家兎の水晶体における磷酸化合物の動態— ^{31}P -NMR Spectroscopy による解析—, 眼 紀 42: 1851—1857, 1991.
- 2) 中村二郎, 可児一孝, 伊藤 紳, 岡本良平: 培養家兎水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態その1 培養液中のグルコース濃度による相違, 眼 紀 49: 140—144, 1998.
- 3) 中村二郎, 可児一孝, 伊藤 紳, 岡本良平: 培養家兎水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態その2 20 mM グルコース培養液と 20 mM ガラクトース培養液による相違, 眼 紀 49: 228—233, 1998.
- 4) Szwergold BS, Kappler F, Brown TR, Pfeffer P, Osman SF: Identification of D-sorbitol 3-phosphate in the normal and diabetic mammalian lens. J Biol Chem 264: 9278—9282, 1989.
- 5) Szwergold BS, Kappler F, Brown TR: Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. Science 247: 451—454, 1990.
- 6) Petersen A, Szwergold BS, Kappler F, Weingarten M, Brown TR: Identification of sorbitol 3-phosphate and fructose 3-phosphate in normal and diabetic human erythrocytes. J Biol Chem 265: 17424—17427, 1990.
- 7) Petersen A, Kappler F, Szwergold BS, Brown TR: Fructose metabolism in the human erythrocyte. Biochem J 284: 363—366, 1992.
- 8) Lal S, Szwergold BS, Kappler F, Brown TR: Detection of fructose-3-phosphokinase activity in intact mammalian lenses by ^{31}P NMR spectroscopy. J Biol Chem 268: 7763—7767, 1993.
- 9) Lal S, Szwergold BS, Taylor AH, Randall WC, Kappler F, Brown TR: Production of fructose and fructose-3-phosphate in maturing rat lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 969—973, 1995.
- 10) Gonzalez RG, Barnett PA, Cheng H-M, Chylack LT: Altered phosphate metabolism in the lens exposed to high glucose and its prevention by an aldose reductase inhibitor. Exp Eye Res 39: 553—562, 1984.
- 11) Cheng H-M, Gonzalez RG: The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. Metabolism 35(Suppl): 1, 10—14, 1986.
- 12) Lou MF, Garadi R, Thomas DM, Mahendroo PP, York BM Jr, Jernigan HM Jr: The effect of an aldose reductase inhibitor on lens phosphorylcholine under hyperglycemic conditions: Biochemical and NMR studies. Exp Eye Res 48: 11—24, 1989.
- 13) Cheng H-M, Xiong H, Hirose K: Generation of α -L-glycerophosphate in the lens. Exp Eye Res 49: 281—285, 1989.
- 14) 中村二郎, 伊藤 紳, 可児一孝, 岡本良平: アロキサソ誘発糖尿病家兎水晶体におけるリン脂質関連物質の代謝動態, あたらしい眼科 15: 439—442, 1998.
- 15) 足田光史: 器官培養法, 岩田修造編, 水晶体 その生化学的機構, メディカル出版, 東京, 427—435, 1986.
- 16) 堀内正人: 糖代謝, 岩田修造編, 水晶体その生化学的機構, メディカル出版, 東京, 176—188, 1986.
- 17) Cheng H-M, Xiong H, Xiong J, Tsubota K: Metabolic studies of galactosemic cataract. Exp Eye Res 51: 345—349, 1990.
- 18) Gonzalez RG, Miglior S, Von Saltza I, Buckley L, Neuringer LJ, Cheng H-M: ^{31}P NMR studies of the diabetic lens. Magn Reson Med 6: 435—444, 1988.
- 19) Cheng H-M, Xiong J, Tanaka G, Chang C, Asterlin AA, Aguayo JB: Analysis of concurrent glucose consumption by the hexose monophosphate shunt, glycolysis, and the polyol pathway in the crystalline lens. Exp Eye Res 53: 363—366, 1991.
- 20) 中村二郎, 伊藤 紳, 可児一孝, 岡本良平: 遺伝性白内障ラット(ICR/f)水晶体におけるリン酸化合物の加齢変化, あたらしい眼科 11: 1115—1118, 1994.
- 21) Thomas DM, Papadopolou O, Mahendroo PP, Zigman S: Phosphorus-31 NMR study of the ef-

- fects of UV on squirrel lenses. *Exp Eye Res* 57 : 59—65, 1993.
- 22) **Hachisuka T, Nakayama S, Tomita T, Takagi H** : ^{31}P nuclear magnetic resonance study of phospholipid metabolites in ischemic liver. *J Surg Res* 53 : 251—256, 1992.
- 23) **Murphy EJ, Brindle KM, Rorison CJ, Dixon RM, Rajagopalan B, Radda GK** : Changes in phosphatidylethanolamine metabolism in regenerating rat liver as measured by ^{31}P -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1135 : 27—34, 1992.
- 24) **Morikawa S, Inubushi T, Kitoh K, Kido C, Nozaki M** : Chemical assessment of phospholipid and phosphoenergetic metabolites in regenerating rat liver measured by *in vivo* and *in vitro* ^{31}P -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1117 : 251—257, 1992.
-