

糖尿病網膜症の発症に関わる硝子体の過酸化反応

田中 寧

獨協医科大学越谷病院眼科

要 約

糖尿病患者の血液では非酵素的糖化反応(グリケーション)とともに過酸化反応が進行している。そこで、硝子体が網膜と相互に物質の交換を行っていることに着目し、糖尿病網膜症を有する眼の硝子体の変化について過酸化反応およびグリケーション関連物質の変動を指標に検討した。Superoxide dismutase (以下、SOD)総量は、血清と硝子体で糖尿病群(DM群)22例23眼と非糖尿病群(非DM群)16例16眼に有意差はなかったが、SOD活性はDM群の硝子体で有意な低下($p<0.05$)がみられた。

glycated Cu, Zn-SOD量および glycated protein量はDM群の硝子体で増加がみられた。過酸化脂質量はDM群の硝子体で有意な増加($p<0.05$)がみられた。以上から、糖尿病網膜症の硝子体ではグリケーションが起こり、活性酸素消去機構が崩れ、過酸化反応が進行していることが推定された。(日眼会誌 102: 576—582, 1998)

キーワード: 糖尿病網膜症, 硝子体, グリケーション, SOD, 過酸化脂質

Peroxidative Reactions in the Vitreous as Related to Diabetic Retinopathy

Yasushi Tanaka

Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

The blood of diabetics often shows enhanced peroxidative reactions and non-enzymatic glycosylation, or glycation. These features should also be manifest in the vitreous in diabetic eyes. I quantitated the level of superoxide dismutase (SOD) in the serum and the vitreous in 22 eyes of 23 diabetics and in 16 eyes of 16 nondiabetics. The total amount of serum SOD was the same in both groups. There was a significant decrease in SOD activity in the diabetic vitreous ($p<0.05$). The diabetic vitreous also showed

increases in glycated Cu, Zn-SOD and glycated protein. The level of lipid peroxidases was significantly increased in the diabetic vitreous ($p<0.05$). These findings suggest that glycation is enhanced in the diabetic vitreous resulting in collapse of active oxygen scavenging and in progressed peroxidation. (Jpn Ophthalmol Soc 102: 576—582, 1998)

Key words: Diabetic retinopathy, Vitreous, Glycation, SOD, Lipid peroxides

I 緒 言

糖尿病眼合併症の発症機序の解明と治療への対応は、眼科医に課せられた大きな課題である。糖尿病患者の血液では非酵素的糖化反応(グリケーション)とともに過酸化反応が進行しているが^{1)~13)}、糖尿病網膜症を有する者の血液でも、やはり過酸化反応が起きていることが報告^{6)~13)}されている。そこで、今回硝子体が網膜と隣接して相互に物質の授受を行っていることに着目し、糖尿病網膜症を有する眼の硝子体の変化について過酸化反応およびグリケーション関連物質の変動を指標に検討した。

今回は糖尿病網膜症者の硝子体を材料に過酸化脂質

量、グルコース量、glycated protein量、glycated superoxide dismutase(SOD)量、および銅イオン量を測定し、また、抗酸化物質としてSODの活性と量、還元型グルタチオンおよびL-アスコルビン酸を定量し、非糖尿病者と比較することから過酸化反応を検討した。

II 対象および研究方法

1. 対 象

対象は、硝子体切除術を施行した増殖糖尿病網膜症(以下、DM群)22例23眼、平均年齢57.9歳で、外傷性網膜剥離のために硝子体切除術を行った非糖尿病患者(以下、非DM群)16例16眼、平均年齢54.6歳を対照とした。両群

別刷請求先: 343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 田中 寧

(平成9年9月4日受付, 平成10年5月7日改訂受理)

Reprint requests to: Yasushi Tanaka, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, 2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya-shi, Saitama-ken 343-8555, Japan

(Received September 4, 1997 and accepted in revised form May 7, 1998)

ともに初回手術時の硝子体を材料とした。また、透析治療中の症例は除いた。全身状態との関連をみるために同一患者の血液を術前空腹時に採取した。

硝子体は眼内灌流液(オペガード MA[®])とともに、氷槽内で全量を採取して実験に供したため、本実験では各測定結果を 1 硝子体当たり、(/vit)で表した。採取した硝子体は、図 1 の方法で前処理を行った。

2. 研究方法

1) SOD の定量ならびに活性値の測定

SOD 総量[Cu,Zn-SOD 量(1-1)]は免疫学的測定法で

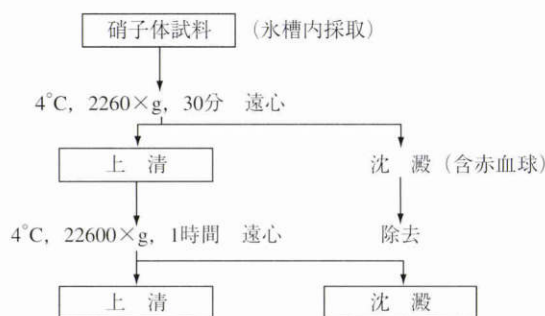


図 1 硝子体試料分離法。

硝子体試料は酵素活性を維持するために氷槽内で採取し、N₂ガスを充填して酸化を防いだ。混入した血液を除くために直ちに遠心分離を行い、さらに遠心分離をして試料の前処理を行った。

ある enzyme - labelled immunosorbent assay (ELISA) 法¹⁴⁾、SOD 活性は生物学的測定法(1-2))である nitro-blue tetrazolium (NBT) 還元法¹⁵⁾および以下の方法で測定した。

NBT 還元法では superoxide (O₂⁻) と結合できる活性型 SOD (O₂⁻ scavenging 活性) を感知するが、SOD がグリケーションされて活性を失うと感知されなくなる。これに対し、ELISA 法の抗 Cu,Zn-SOD 抗体は不活性となった SOD とも反応するため、glycated SOD となって活性を失った SOD も含めた SOD 総量の測定が可能である(図 2)。

しかし、NBT 還元法による SOD の測定では、L-アスコルビン酸や還元型グルタチオン (GSH) などの低分子物質の O₂⁻ scavenging 活性も含めて測定する可能性があるため、これらの物質による影響を除くため、以下の方法で純粋な SOD 活性の値を求めた。

SOD 活性 = NBT 還元法 - (L-アスコルビン酸 + GSH の O₂⁻ 消去活性) (U/vit.) (図 2)

2) glycated SOD の定量

(1) *In vitro* における glycated SOD

SOD の glycation を *in vitro* で証明するために以下の実験を行った。まず、glycated SOD を作製するために Cu,Zn-SOD 標品に 100 mg/dl のグルコースを加え、37℃、24 時間反応させた後、2 mM Tris-HCl、0.1 M KCl (pH 7.6) で 1 l/回、1, 2, 6, 12 時間後に buffer を交換しな

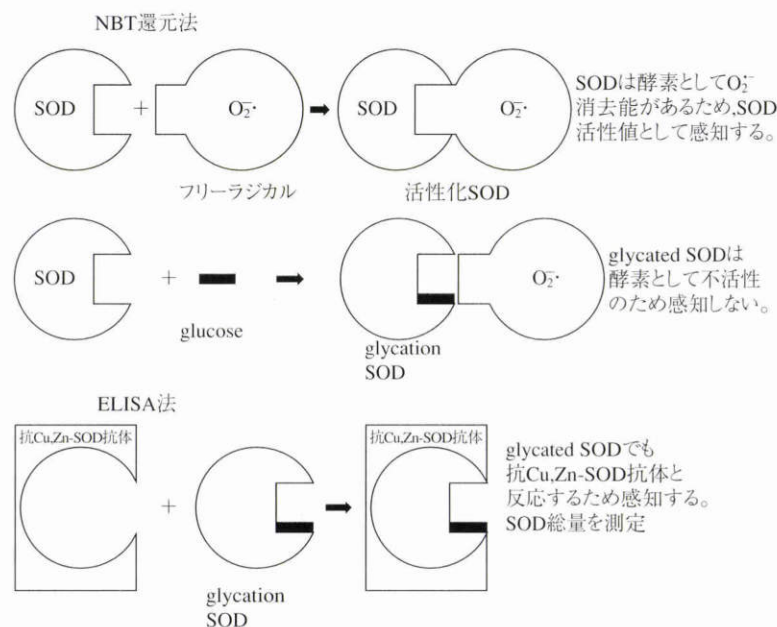


図 2 Superoxide dismutase (SOD) の測定方法の比較。

Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元法は、O₂⁻ 消去能を測定する方法であり、正常な SOD は O₂⁻ を消去する活性があるため SOD 活性値として感知するが、glycation された glycated SOD は不活性酵素であり、O₂⁻ scavenging 活性を有しないため感知しない。

Enzyme-labelled immunosorbent assay (ELISA) 法は、glycated SOD でも抗 Cu,Zn-SOD 抗体と反応するため、正常な SOD のみならず、glycated SOD も含めた SOD 総量を測定する。

がら4℃で透析してグルコースを除いた。この glycated SOD と、グルコース無添加と同様の条件で反応させたもの(Cu, Zn-SOD)を対照として、NBT 還元法を用いて $O_2^{\cdot-}$ scavenging 活性を測定した。

(2) 硝子体中の glycated Cu, Zn-SOD の定量

硝子体中の glycation された Cu, Zn-SOD 量はボロン酸カラムを用いたアフィニティ・クロマトグラフィーで、glycated protein を分取後、マウス由来抗 Cu, Zn-SOD モノクローナル抗体と、ペルオキシダーゼ標識抗 Cu, Zn-SOD・モノクローナル抗体(マウス由来)を用いた ELISA 法で定量した³⁾。

ボロン酸カラムは、TOSOH(株)の TSKgel boronate-5 PW を用いた。これはカラムの担体のフェニルホウ酸がアルカリ領域において、四面体構造をとり、これが糖のシスジオールと結合することを利用して glycated protein をカラムに吸着させ、その後、溶出液の pH を酸性領域にして分離する方法である¹⁶⁾。今回はクロマトグラフィー用ミニカラムに TSKgel boronate-5 PW を充填し、A 液：20 mM HEPES-NaOH, 10 mM $MgCl_2$ (pH 8.5) 15 ml でカラムを安定化させてから、硝子体試料を注入し A 液を流して硝子体中の glycated protein のみをカラムに吸着させた。

次に溶液の pH を、B 液：20 mM 酢酸 buffer で酸性 (pH 3.0) に下げて吸着していた glycated protein を溶出させて分取した。溶出された glycated protein 画分を、直ちに4℃、2 mM tris HCl, 0.1 M KCl (pH 7.6) で 1 l/回、1, 2, 6, 12 時間後に各 1 回ずつ buffer を交換しながら透析した。その試料に含まれる glycated Cu, Zn-SOD 量を ELISA 法で判定した。

3) その他の過酸化反応関連物質の測定

蛋白質の glycation の反応生成物であるケトアミン量 [3-1)] の測定はフルクトサミン測定法¹⁷⁾、グルコース量 [3-2)] はグルコースデヒドロゲナーゼ法¹⁸⁾、過酸化脂質量 [3-3)] は八木法蛍光法¹⁹⁾、過酸化水素量 [3-4)] はチタン過酸化水素呈色法²⁰⁾、銅イオン量 [3-5)] はバソクプロイン法²¹⁾を用いて測定した。L-アスコルビン酸量 [3-6)] はアスコルビン酸オキシダーゼ法²²⁾、還元型グルタチオン (GSH) [3-7)] はグリオキサラゼ法²³⁾で測定した。

DM 群と非 DM 群の各測定値については t 検定を行い、検討した。

III 結 果

1.1) Cu, Zn-SOD 量 (SOD 総量)

硝子体では DM 群と非 DM 群に差はなかった (図 3)。

血清では DM 群が非 DM 群に比べて 27% 増加していたが、有意な変化ではなかった (図 4)。

1.2) SOD 活性

硝子体の SOD 活性は、DM 群 4.7 ± 3.8 (平均値 $\pm$ 標準偏差) U/mg protein $\cdot$ vit で非 DM 群 9.0 ± 8.9 U/mg pro-

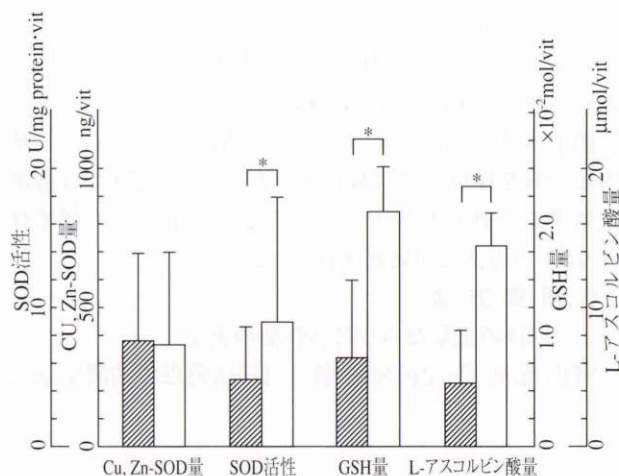


図 3 硝子体中の活性酸素消去系物質。

■：糖尿病群 (DM 群)，□：非糖尿病群 (非 DM 群)
SOD 活性、還元型グルタチオン (GSH) 量、L-アスコルビン酸量は、糖尿病 (DM) 群で有意に低下がみられた。*：
 $p < 0.05$

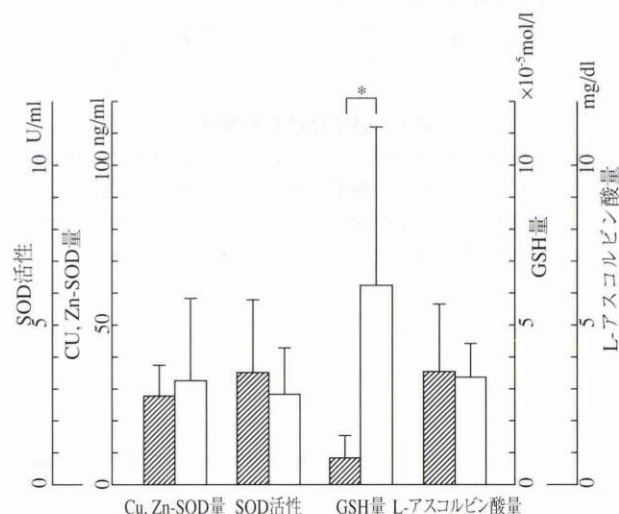


図 4 血清中の活性酸素消去系物質。

血清中 GSH 量は、硝子体中と同様に DM 群で有意に低下した。*： $p < 0.05$

tein $\cdot$ vit に比べて有意 ($p < 0.05$) に低値であった (図 3)。血清では DM 群でやや低下していた (図 4)。

2.1) *In vitro* における glycated SOD

グルコースを負荷した glycated SOD の $O_2^{\cdot-}$ scavenging 活性は 24% で、同量のグルコース無添加の SOD 標品の 50 U の活性値 52% より明らかに低下していた (図 5)。すなわち、高グルコース状態である糖尿病における glycated SOD は活性が低下していることが *in vitro* でも確認された。

2.2) 硝子体中 glycated Cu, Zn-SOD 量

図 6 の矢印部分が glycated protein のクロマトグラムであり、ボロン酸カラムのアフィニティー・クロマトグラフィーと抗 Cu, Zn-SOD 抗体を用いた ELISA 法で硝

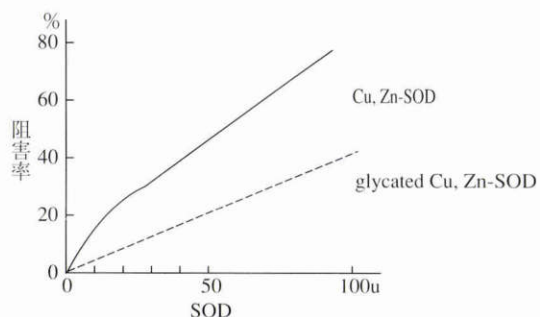


図5 SOD, glycated SOD の O_2^- scavenging 活性の比較.

Cu, Zn-SOD を対照として, グルコースを負荷した glycated SOD の O_2^- scavenging 活性を, NBT 還元法で測定した. glycated SOD の活性値は標準 Cu, Zn-SOD に比べて低下していた.

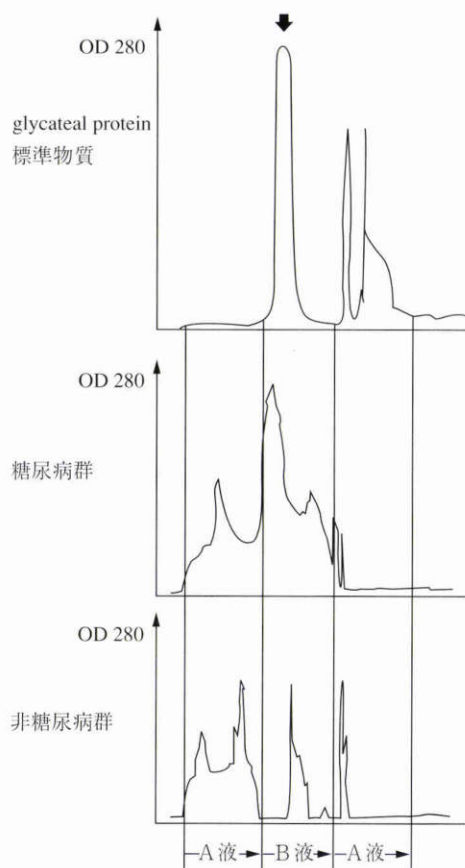


図6 アフィニティークロマトグラフィーによる硝子体中 glycated protein のクロマトグラム.

↓部分が glycated protein のクロマトグラムである. 溶離液はA液15分→B液15分→A液15分の順に1.0 ml/分で流した (glycated protein 画分のB液の溶出液から, 透析後, ELISA 法で glycated Cu, Zn-SOD 量を測定した).

子体試料から glycated SOD を検出した (図6).

ELISA 法で測定した glycated Cu, Zn-SOD 量は DM

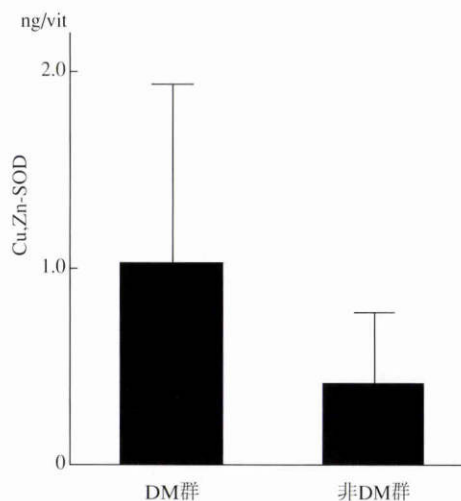


図7 硝子体中の glycated Cu, Zn-SOD.

図6のアフィニティークロマトグラフィーで分離した glycated protein 画分から, 硝子体中の glycated Cu, Zn-SOD 量を ELISA 法で測定した. DM 群で増加がみられた.

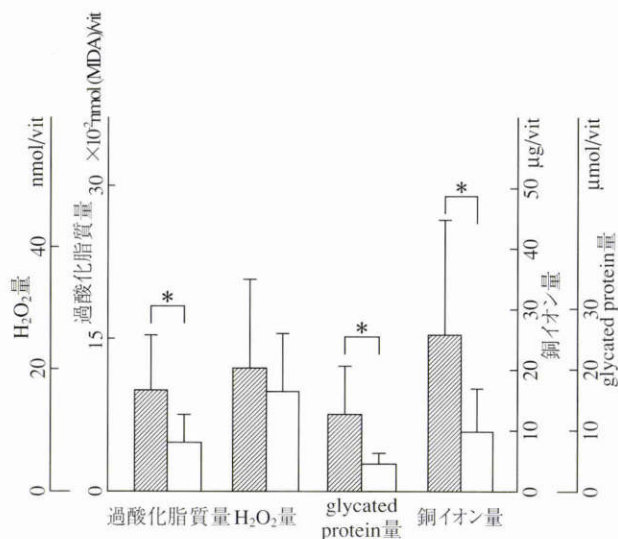


図8 硝子体中の活性酸素生成系物質.

過酸化脂質量, glycated protein 量, 銅イオン量は, DM 群で有意に高値を示した. *: $p < 0.05$.

群 1.04 ± 0.89 (平均値 $\pm$ 標準偏差) ng/vit, 非 DM 群 0.43 ± 0.33 ng/vit と DM 群で増加がみられた (図7).

3.1) glycated protein (ケトアミン) 量

硝子体は, DM 群 12.13 ± 8.17 (平均値 $\pm$ 標準偏差) $\mu\text{mol/vit}$, 非 DM 群 4.06 ± 2.03 $\mu\text{mol/vit}$ と DM 群で有意 ($p < 0.05$) に高値を示したため, DM 群では硝子体中の glycation が進行していることが明らかである (図8). 血清では DM 群で増加傾向を示したものの, 有意な変化はみられなかった (図9).

3.2) グルコース量

硝子体グルコース量は, DM 群 5.84 ± 3.51 (平均値 $\pm$

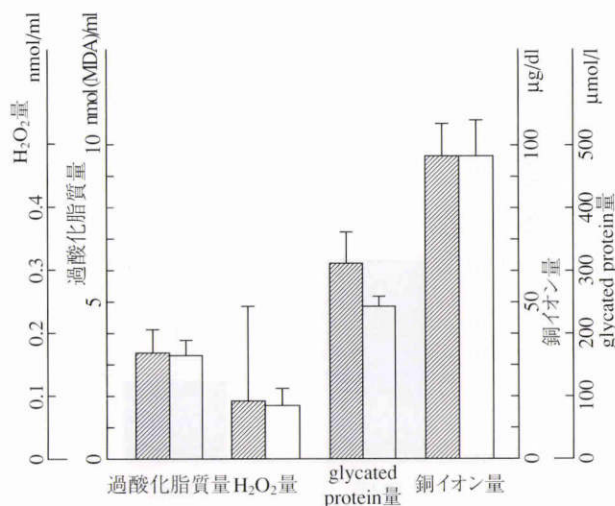


図9 血清中の活性酸素生成系物質。
血清中では各群で有意差はなかった。

標準偏差)mg/vit, 非DM群 3.00 ± 1.31 mg/vit で, 硝子体は当然のことながらDM群で高値であった。血清グルコース量もDM群 146.39 ± 38.67 mg/dl, 非DM群 93.00 ± 7.92 mg/dl とDM群が有意($p < 0.01$)に高値であった。

3.3) 過酸化脂質量

硝子体ではDM群 $9.7 \pm 5.4 \times 10^{-2}$ (平均値±標準偏差) nmol(MDA)/vit, 非DM群 $4.5 \pm 2.7 \times 10^{-2}$ nmol(MDA)/vit とDM群で有意($p < 0.05$)に増加した(図8)。血清ではDM群と非DM群がほぼ同値であった(図9)。

3.4) 過酸化水素量

硝子体はDM群 19.60 ± 15.01 nmol/vit, 非DM群 16.18 ± 9.63 nmol/vit であった(図8)。血清ではDM群と非DM群がほぼ同値であった(図9)。

3.5) 銅イオン量

硝子体は, DM群 26.11 ± 18.79 (平均値±標準偏差) µg/vit, 非DM群 9.71 ± 7.77 µg/vit で, DM群が有意($p < 0.05$)に高値を示した(図8)。

血清ではDM群, 非DM群でほぼ同じ値であった(図9)。

3.6) L-アスコルビン酸量

硝子体ではDM群 4.5 ± 3.9 µmol/vit が非DM群 14.5 ± 2.3 µmol/vit より有意($p < 0.05$)に低下していた(図3)。

血清ではほとんど差はなかった(図4)。

3.7) GSH量

硝子体では, DM群 $0.8 \pm 0.7 \times 10^{-2}$ mol/vit, 非DM群 $2.1 \pm 0.4 \times 10^{-2}$ mol/vit で, DM群に有意($p < 0.05$)な低下がみられた(図3)。

血清も同様にDM群 $0.8 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M, 非DM群 $6.2 \pm 5.0 \times 10^{-5}$ M とDM群で有意($p < 0.05$)に低下した(図4)。

IV 考 按

過酸化の過程で発生するラジカルのうち $O_2^{\cdot-}$ は反応性に富み, 生体を構成する蛋白質, 核酸, 脂質, 糖質に障害を与えるので, 生体内にはこの $O_2^{\cdot-}$ を消去する防御機構があり, SODをはじめ, 抗酸化作用のあるL-アスコルビン酸やGSHなどが作用している。

SOD活性が低下すると $O_2^{\cdot-}$ を消去することができず, $LOO^{\cdot}$ (ペルオキシラジカル) や $LO^{\cdot}$ (アルコキシラジカル) が連鎖的に生成し, 過酸化脂質が生成される。もちろん, $O_2^{\cdot-}$ のみならずその他の O_2 , H_2O_2 , $HO^{\cdot}$, $HO_2^{\cdot}$ などの活性酸素も各々直接か, または金属イオンを介して脂質過酸化反応の開始剤²¹⁾となり, 細胞やミトコンドリアの膜の構成成分である不飽和脂肪酸が活性酸素により容易に過酸化を受け, 膜機能が障害される。糖尿病ではインスリンの作用不足, 高血糖, 高脂血症などと関連して活性酸素やフリーラジカルの生成が亢進し, 一方ではSODやビタミンEなどのスカベンジャー作用も低下しているため, 糖尿病では過酸化反応が強く生じることから糖尿病の成因にフリーラジカルが関与しているとの報告^{3)~12)}が多い。

糖尿病のうち, 網膜症を有する患者では血清過酸化脂質の増加が著明で¹¹⁾, SOD活性の低下がみられるといわれている¹²⁾。また, 既報²⁾で我々は血清HbA_{1c}と硝子体中Cu, Zn-SOD量は正の相関を示すが, DM群と非DM群で量的な差はほとんどみられず, それに反してSOD活性は有意に低下していることを報告した。その際, SODの量的な差がみられなかったのは, DM群で不活性なglycated SODが増加したためではないかと推察した。その仮説を実証するために, 本報ではglycationされたSODの分離, 定量を試みた。

本研究でも, DM群では硝子体中のSOD総量は非DM群とほぼ同値であるが, そのうちglycationされたSOD(glycated SOD)がDM群では非DM群より多く存在し, その結果SOD活性は有意に低下していた。

硝子体中のグルコースも高値であり, 今回の研究では血清よりむしろ硝子体でglycationが進行し, glycated protein量が有意に増加していた。

Glycationによる過酸化反応が誘発される機序の1つとしてCu, Zn-SODの活性中心のリジン122とリジン128にglycationが起これると, そのリジン残基から立体的に8Å以内に存在するヒスチジン残基に配位していた Cu^{2+} が放出されて, SODは活性を失う⁴⁾といわれている。今回, DM群で硝子体中銅イオン量が高値であり, 硝子体でも上記と同様の反応が起こり, 銅イオンが遊離してSOD活性が低下する一連のglycationにより誘発される過酸化反応が生じていた可能性が大きい。

また, 硝子体中 H_2O_2 量もDM群でやや増加していた。その原因としては, 硝子体中の銅が過剰に存在するDM

では、 H_2O_2 は SOD 以外の系でも産生され、しかも H_2O_2 scavenger であるカタラーゼは、銅過剰状態では活性が低下することも知られている²⁵⁾。また、本実験結果では還元型グルタチオンも低下しているため、グルタチオンペルオキシダーゼの活性も低下していると思われる。このように H_2O_2 消去能の低下も相まって、 H_2O_2 が増加していると思われる。すなわち、硝子体中 H_2O_2 量が DM 群で増加しているということは、 $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{HO}^\cdot + \text{OH}^-$ のフェントン様反応が進行して非常に反応性の高い $\text{HO}^\cdot$ を生成しやすい状態であるということであり、かつ $\text{O}_2^{\cdot-}$ を消去すべきである Cu, Zn-SOD 自身も生じた $\text{HO}^\cdot$ により分子が断片化される¹⁾ため、さらに硝子体中 SOD 活性が低下し、 $\text{HO}^\cdot$ による過酸化反応も亢進したと思われる。事実、DM 群の硝子体中過酸化脂質は有意に増加していた。一方、糖尿病硝子体中の L-アスコルビン酸や GSH などの $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenger の活性は DM 群で有意に低下していたことも、過酸化反応の進行にさらに拍車をかけたと思われる。

一方、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ や、過剰の銅イオンとアスコルビン酸の共存下で生成した $\text{HO}^\cdot$ により、硝子体のゲル構成成分の一つであるヒアルロン酸が断片化されることが報告²⁶⁾ 27) されている。そして、 O_2 や銅イオン存在下での SH 基 $\rightarrow$ S-S 結合反応の進行、glycation の亢進によりコラーゲン線維に無秩序な架橋が形成され、ヒアルロン酸とコラーゲン間の相互作用に変化が生じて、硝子体中の豊富な水分量を保持することが不可能となり、硝子体が液化したという説は本実験結果からも推察できる。

硝子体内の物質は、主として毛様体上皮から生成されたものが硝子体に入り、網膜にとり込まれて毛細血管へ排出されるといわれている。しかし、物質拡散の速度と水晶体、網膜、視神経などの周囲組織の代謝による修飾により、糖尿病などの病的状態では硝子体内の物質の流れは必ずしも一定ではないと思われる。藤原ら²⁸⁾ によれば、正常状態の房水や後部水晶体におけるグルコースや ATP は、水晶体前面および網膜脳層で消費されるため、含有量が低いといわれている。しかし、本実験でみられたように DM 群の硝子体のグルコース量や glycation 度合は高く、糖尿病患者では硝子体中の物質の移動が毛様体上皮 $\rightarrow$ 硝子体 $\rightarrow$ 網膜 $\rightarrow$ 毛細血管へとスムーズに行われずに硝子体中に停滞する時間が長くなり、これまで述べた glycation および oxidation される機会が増したと思われる。この glycation および oxidation 誘引物質の硝子体内半減期の延長は、糖尿病の網膜に形態的ならびに機能的な障害を与えた可能性が考えられる。このことは本実験で DM 群の血清よりも硝子体の方が SOD 活性、glycated protein 量、過酸化脂質量、銅イオン量、L-アスコルビン酸量の変化が著しいことから推察できる。

糖尿病患者の硝子体と網膜間の物質移動については、筑田ら²⁹⁾ が詳細に検討しており、正常状態では硝子体 $\rightarrow$ 網

膜への物質移動の流れの方向が、増殖糖尿病網膜症の時には網膜 $\rightarrow$ 硝子体の流れが一時的に生じることがあり、その後、また徐々に長い時間をかけて硝子体から網膜へ吸収されると報告されている。この網膜 $\rightarrow$ 硝子体への逆行が硝子体中のグルコース、銅イオンなどの各物質濃度を急激に変化させ、その後、硝子体 $\rightarrow$ 網膜へ再吸収されるまでの時間が長いために、これまで述べた glycation および oxidation が進行して、さらに、網膜から毛細血管への物質の移動を防げて網膜に損傷を与えたことも考えられる。

また糖尿病では、網膜血管の透過性亢進により血液網膜柵の機構が破綻し、毛細血管に起こった変化が細動脈に及び、その結果、網膜浮腫、網膜出血、硬性白斑などを生じて網膜症を発生するとの報告¹⁾ もあり、血液—網膜柵の破綻が網膜—硝子体の物質交換に影響していると考えられる。

以上から、糖尿病網膜症の病態に硝子体の glycation や過酸化反応が密接に関与していることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、常に御指導いただいた獨協医科大学眼科小原喜隆教授、および獨協医科大学越谷病院眼科新井清美研究員に深謝いたします。

本論文の要旨は、第 100 回日本眼科学会総会において報告した。

文 献

- 1) 田中 寧, 平野清美, 土屋寛芳, 小原喜隆: PDR, PVR の硝子体における過酸化反応. 臨眼 85: 2624—2627, 1991.
- 2) 田中 寧, 平野清美, 土屋寛芳, 小原喜隆: 糖尿病網膜症の硝子体 Cu, Zn-SOD 量. 眼紀 43: 1111—1116, 1992.
- 3) 谷口直之, 新井 桂, 木下憲明: SOD の細胞内での修飾. 蛋白質核酸酵素 33: 2921—2926, 1988.
- 4) 谷口直之: スーパーオキシドジスムターゼの構造, 機能および病態生化学. 生化学 64: 1103—1115, 1992.
- 5) 高橋素子, 谷口直之: グリケーションとフリーラジカル. 活性酸素・フリーラジカル 4: 134—141, 1993.
- 6) 水野有武: 糖化蛋白と糖尿病性網膜症. 眼科 33: 821—826, 1991.
- 7) 河盛隆造, 森島豊彦, 鎌田武信: 糖尿病性血管合併症の原因としての糖代謝異常. Diabetes Frontier 1: 391—398, 1990.
- 8) 近藤元治: 糖尿病とフリーラジカル. Diabetes Frontier 2: 7—17, 1991.
- 9) Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N: Glycation and inactivation of human Cu, Zn-superoxide dismutase. J Biol Chem 262: 16969—16972, 1987.
- 10) 林 純子, 井藤英喜: 糖尿病におけるフリーラジカルと動脈硬化. 活性酸素・フリーラジカル 4:

- 178—183, 1993.
- 11) 石橋達朗: 糖尿病性網膜症とフリーラジカル. 活性酸素・フリーラジカル 4: 193—198, 1993.
 - 12) Nishida T, Nakagawa S, Manabe R: Superoxide dismutase activity in diabetic retina. Jpn J Ophthalmol 28: 377—382, 1984.
 - 13) 宮田 哲: 蛋白グリケーションの機構. 糖尿病の分子生物学, 実験医学 9: 527—532, 1991.
 - 14) Nishimura N, Ito Y, Adachi T, Hirano K, Sugimura M, Sawaki S: Enzyme immunoassay for cuprozinc-superoxide dismutase in serum and urine. J Pharmacobiodyn 5: 394—402, 1982.
 - 15) 花田寿郎, 茂手木皓喜: 血清(漿)スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)測定法の基礎的検討と臨床的意義. 臨床検査機器・試薬 8: 629—635, 1985.
 - 16) Akparov VK, Stepanov VM: Phenylboronic acid as a ligand for biospecific chromatography of serine proteinases. J Chromatogr 155: 329—336, 1978.
 - 17) Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR: Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clin Acta 127: 87—95, 1982.
 - 18) 宮原洋一, 福田千佐子: Glucose dehydrogenase を用いた血糖, 尿糖の初速度分析法: 臨床検査機器・試薬 3: 100—106, 1980.
 - 19) 八木国夫: Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿又は血清中過酸化脂質の微量定量法. ビタミン 49: 403—405, 1975.
 - 20) Patti PF, Bonet-Maury P: Méthode colorimétrique pour le dosage de la catalase. Bull Ste Chim Biol 35: 1177—1180, 1953.
 - 21) 林 振民, 小原喜隆, 新井清美: 白内障と金属イオン. 清野 進, 他(監): 糖尿病研究ストラテジー, 秀潤社, 東京, 281—285, 1995.
 - 22) Beutler HO, Beinstingl G: Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 76: 69—75, 1980.
 - 23) 東 胤昭: グルタチオンの分離と定量法. 蛋白質核酸酵素 33: 1370—1382, 1988.
 - 24) 島崎弘幸: 過酸化脂質と生体. The Lipid 3: 14—20, 1992.
 - 25) National Research Council 編, 木村正巳, 他 訳, ヒトの銅代謝: 環境汚染物質の生体への影響 12, 銅・鉄, 東京化学同人, 東京, 28—49, 1977.
 - 26) 秋葉 純: 光力学作用(photodynamic action)による硝子体の液化. 日眼会誌 96: 731—736, 1992.
 - 27) 上野則夫: 活性酸素・フリーラジカルによる硝子体の変化. 日眼会誌 99: 1342—1360, 1995.
 - 28) 藤原久子, 綿織敏治, 津田和良: 硝子体内低分子物質の分布について. 眼紀 33: 853—857, 1982.
 - 29) 筑田 眞, 小原喜隆, 星 兵仁: 各種病的状態における硝子体細胞の対応. 第2報. 硝子体出血の晩期吸収過程について. 眼紀 34: 771—779, 1983.