

Chemical shift imaging を用いた培養ウシ水晶体におけるグルコース およびソルビトールの局在の観察

中村 二郎¹⁾, 澤田 智子¹⁾³⁾, 西田 保裕¹⁾, 可児 一孝¹⁾

岡本 良平²⁾, 森川 茂廣³⁾, 犬伏 俊郎³⁾

¹⁾滋賀医科大学眼科学教室, ²⁾滋賀医科大学実験センター, ³⁾滋賀医科大学分子神経科学研究センター

要 約

目 的: 高濃度のグルコース下で培養したウシ水晶体における糖代謝物質の局在を核磁気共鳴(magnetic resonance, MR)法を用いて観察し, その測定方法の有用性について検討する。

方 法: ウシ水晶体を 50 mM グルコース-1-¹³C 添加 tissue culture medium 199 (TCM 199) で培養し, 培養 1, 2, 4, および 6 日後に水晶体中のグルコース-1-¹³C およびソルビトール-1-¹³C の局在を 2 テスラ chemical shift imaging (CSI) Omega system を用いて観察した。¹³C 核に直結した MR 感度の高い¹H-核を測定することにより, 間接的に¹³C-MR の情報を得る方法(¹H-¹³C gradient-selected heteronuclear multiple-quantum coherence, GH-HMQC 法)を用いた。

結 果: ウシ水晶体中のグルコース-1-¹³C およびソルビトール-1-¹³C の局在を, 2 テスラ CSI を用いて観察することができた。CSI では, グルコースは培養 1

日後に後極部も含め高濃度に水晶体の周辺部に存在した。その後漸減し, 培養 6 日後には膜機能の破綻によると考えられるが, ほとんど観察できない程度にまで減少した。ソルビトールは水晶体前部および赤道部付近に蓄積し, 培養 6 日後までほとんど変化しないように思われた。

結 論: 今回用いた方法は, 画像の解像度(信号の検出感度)が低い(したがって測定時間が長い)ため, まだまだ問題点は多い。しかしながら, 非侵襲的に異なる物質について連続して観察できることから, 応用範囲は広く, かつ有用性の高い方法であると考えられる。(日眼会誌 107: 571-577, 2003)

キーワード: Chemical shift imaging (CSI), ウシ水晶体, グルコース-1-¹³C 添加 TCM 199, グルコース-1-¹³C, ソルビトール-1-¹³C

Localization of Glucose and Sorbitol in Incubated Bovine Lenses Using Chemical Shift Imaging

Jiro Nakamura¹⁾, Tomoko Sawada¹⁾³⁾, Yasuhiro Nishida¹⁾, Kazutaka Kani¹⁾

Ryohei Okamoto²⁾, Shigehiro Morikawa³⁾, and Toshiro Inubushi³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science

²⁾Research Center, Shiga University of Medical Science

³⁾Molecular Neurobiology Research Center, Shiga University of Medical Science

Abstract

Purpose: To use chemical shift imaging (CSI) to measure the metabolic changes in glucose metabolites in bovine lenses incubated in tissue culture medium 199 (TCM 199) with a high concentration of glucose and to evaluate the viability of this method.

Methods: We detected an accumulation of ¹³C-labeled glucose and sorbitol in the bovine lenses incubated in TCM 199 containing 50 mM glucose-1-¹³C for 1, 2, 4, or 6 days using a 2 T CSI Omega system. ¹H-¹³C gradient-selected heteronuclear multiple-quantum coherence (GH-HMQC) in nuclear magnetic resonance (NMR), an indirect method of detecting nuclei in low sensitivity by ¹H NMR, was used to observe ¹³C-enriched metabolites in the bovine lens *in vivo*.

Results: We found an accumulation of ¹³C-labeled glucose and sorbitol using the 2 T CSI Omega system. The level of glucose increased rapidly in the posterior segment of the lens as well as the anterior segment at one day after the beginning of incubation.

Then it diminished gradually, and could no longer be detected on the 6th day after the start of incubation possibly because of the breakdown of the cell membrane. The levels of sorbitol increased in the anterior area and the equator of the lens one day after the beginning of incubation, and remained unchanged for 6 days.

Conclusion: We encountered many problems especially with the imaging resolution (consequently the time for measurement was prolonged), but this approach may be useful for non-invasive monitoring of ¹³C-labeled compounds. We believe this method will be especially useful for detecting various metabolites *in vivo*.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107: 571-577, 2003)

Key words: Chemical shift imaging (CSI), Bovine lens, TCM 199 including glucose-1-¹³C, Glucose-1-¹³C, Sorbitol-1-¹³C

別刷請求先: 520-2192 大津市瀬田月輪町 滋賀医科大学眼科学講座 中村 二郎

(平成 14 年 2 月 13 日受付, 平成 15 年 4 月 2 日改訂受理)

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

(Received February 13, 2002 and accepted in revised form April 2, 2003)

I 緒 言

核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) は、生体内に最も多量に存在する水分子のプロトン (^1H) 核の共鳴線を利用し、主として生体の形態学的な情報を得るために利用されている。最近ではそれに加え、生体内に比較的高濃度に存在する代謝物質や投与した薬物の検出が可能となり、これら化学物質の生体内での分布情報が得られるようになってきた (chemical shift imaging, CSI)¹⁾²⁾。しかしながら、眼科領域ではその対象とする臓器が非常に小さいことに加え、その組成も特異的であることから、これらの画像情報を得るのは非常に困難である。

糖尿病白内障の成因に関しては、ソルビトールをその主因とする浸透圧説を中心に、非酵素的糖化説、酸化ストレス説があり、それらの相互作用により白内障が生ずるものと考えられている。ソルビトールの水晶体内の蓄積に関しては、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット水晶体を用いた実験で、アルドース還元酵素に対する抗体を用いた蛍光酵素抗体法によりアルドース還元酵素の局在は観察されている³⁾が、実際のソルビトールの局在は観察されていない。今回は、高濃度のグルコース- $1\text{-}^{13}\text{C}$ 含有 tissue culture medium 199 (TCM 199) で培養したウシ水晶体におけるグルコース- $1\text{-}^{13}\text{C}$ とその代謝産物であるソルビトール- $1\text{-}^{13}\text{C}$ の局在を CSI を用いて観察し、その有用性について検討した。

II 実験材料および方法

1. 水晶体の摘出および培養

ウシ眼球は屠殺場から入手した。水晶体の摘出は正田⁴⁾の方法を参考にして実施した。すなわち、眼球を 70% エタノール溶液で 10 秒間消毒した後、ペニシリン G : 200 Units/ml, ストレプトマイシン硫酸塩 200 μg /ml, およびアンホテリシン B 50 μg /ml を含有する Hanks 溶液 (以下、抗生剤含有 Hanks 液) に移す。この抗生剤含有 Hanks 液中で顕微鏡下に眼球後極部から水晶体を摘出した。摘出した水晶体は 37°C の抗生剤含有 Hanks 液中に 5 分間温存した後、50 mM グルコース- $1\text{-}^{13}\text{C}$ 含有 TCM 199 (Earle's buffer) 中で、37°C で培養した。培養開始時に、95% O_2 , および 5% CO_2 混合ガスを培養管中に十分に封入した後密封し、以後は密封培養管中で培養した。培養 1, 2, 4, および 6 日後に、CSI を用いて水晶体中のグルコース- $1\text{-}^{13}\text{C}$ およびソルビトール- $1\text{-}^{13}\text{C}$ の局在を観察した。これらとは別に、培養 1, 2, 4, および 6 日後のウシ水晶体を過塩素酸抽出標本とし、 ^{13}C -NMR スペクトロスコピー (magnetic resonance spectroscopy, ^{13}C -MRS), および ^{31}P -MRS を用いて、それぞれグルコースとその代謝物質およびリン酸化合物の代謝動態を観察した。

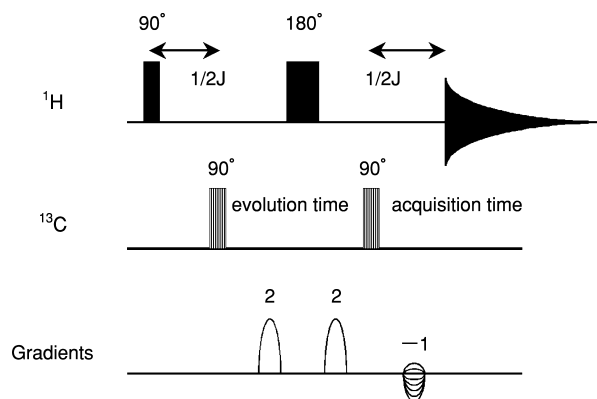


図 1

今回使用したパルス系列で、gradient-enhanced heteronuclear multiple quantum coherence (GE-HMQC) の基本的なパルス系列である。

2. CSI の測定方法および測定条件

CSI には、GE 社製 2 テスラ CSI Omega system を用いた。信号検出には、自作の ^{13}C - ^1H 二重同調の表面コイルを用いた。 ^{13}C RF パルスには、DANTE⁵⁾の周波数選択パルスを用いた。TR (繰り返し時間) は 1 秒、FOV (field of view) は $30 \times 30 \text{ mm}^2$ とし、スライス選択は行わず、 8×8 blocks で 256 回積算した。1 回の測定には、およそ 5 時間を要した。測定中、水晶体は 5.5 mM グルコース含有 TCM 199 (Hanks' buffer) 中で温存した。測定には 1 個の水晶体を用い、まずグルコース画像を得た後、引き続き同一水晶体を用いてソルビトール画像を得た。CSI の測定には長時間 (グルコース画像とソルビトール画像とで、およそ 10 時間) を要するため、一連の観察 (グルコース- $1\text{-}^{13}\text{C}$ およびソルビトール- $1\text{-}^{13}\text{C}$ の局在を 1 回ずつ測定) を終えた後、水晶体は廃棄した。

図 1 に、今回使用したパルス系列 (Hurd ら⁶⁾より改変) を示す。この実験で用いた gradient-enhanced heteronuclear multiple quantum coherence (GE-HMQC) の基本的なパルス系列である。HMQC 法を基に傾斜磁場パルスによって MQC 選択法を採用する方法で、 ^{13}C 核のスピンのによって分裂した ^1H 信号のみを選択的に検出する ^1H - ^{13}C 多量子 (MQ) 相関法である¹⁾²⁾。グルコース- $1\text{-}^{13}\text{C}$, およびソルビトール- $1\text{-}^{13}\text{C}$ を区別するために、 ^{13}C RF パルスとして DANTE の周波数選択パルスを用いた。位相傾斜磁場を 2 回目の ^{13}C RF パルスの後に負荷した。この方法では、 ^{13}C に直結した ^1H を測定することにより、間接的に ^{13}C の情報を得ることが可能である¹⁾²⁾。これに CSI を組み合わせることによって代謝画像を得た。

3. ^{13}C , ^{31}P -MRS の測定方法および測定条件

培養したウシ水晶体は、Gonzalez ら⁷⁾の方法に準じて過塩素酸抽出標本にした。すなわち、水晶体を同重量の 10% 過塩素酸とともに液体窒素下で粉碎し、細粉末とした。これを氷中で 4°C までゆっくりと溶解し、遠心

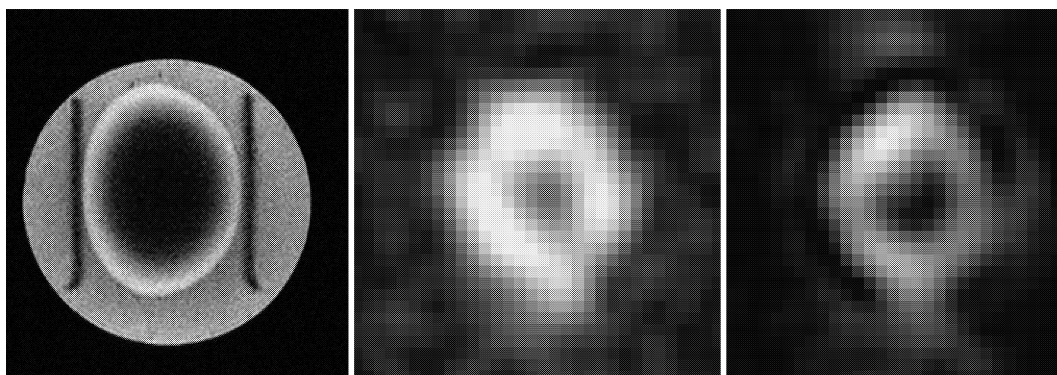


図 2 培養 1 日後の CSI ウシ水晶体の chemical shift imaging (CSI)
左からプロトン画像, グルコース画像, ソルビトール画像である。

分離した。得られた上清は, KOH あるいは HCl を用いて pH 9.5 に調整した。これを再び遠沈し, 上清は凍結乾燥の後 20 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液で溶解し, ^{13}C , ^{31}P -MRS の測定に用いた。1 回の測定には 1 個のウシ水晶体を用い, まず ^{13}C -MRS で観察し, 引き続き同一試料を用いて ^{31}P -MRS で測定した。

測定装置は, 6.3 テスラ FT-NMR (JEOL JNM-GX 270) を使用した。測定条件は ^{13}C -MRS で, パルス角: 90° , パルス繰り返し時間 3.6 秒, 積算回数 500 回で, 1 回の測定にはおよそ 30 分を要した。 ^{31}P -MRS では, パルス角 30° , パルス繰り返し時間 1 秒, 積算回数 10,000 回で, 1 回の測定にはおよそ 2 時間 50 分を要した。 ^{13}C -MRS でグルコース代謝の進行度を観察し, ^{31}P -MRS では主にアデノシン 3 リン酸 (ATP) の変化量から, 培養水晶体の状態 (細胞としての活性度) を観察した。

III 結 果

培養 1 日後のウシ水晶体 CSI のプロトン画像, グルコース画像およびソルビトール画像を図 2 に示す。プロトン画像では, プロトン密度の高い水晶体周辺部で high intensity となっている。グルコースは水晶体周辺部に多く存在するが, グルコースはソルビトールと比較して, 培養 1 日後にすでに水晶体のほぼ全域に高濃度で存在する。ソルビトールも水晶体周辺部に多く存在するが, 特に水晶体赤道部から前部 (図では左方) で高濃度である。

培養 2 日後のウシ水晶体 ^{13}C -MRS の代表例を図 3 に示す。各ピークは, β -グルコース, α -グルコース, ソルビトール, そして乳酸の信号である。それぞれの物質の含有量は, それぞれの物質のスペクトル面積として表される。グルコース量は, α -グルコースと β -グルコースの和で表される。

培養 4 日後のウシ水晶体 ^{31}P -MRS の代表例を図 4 に示す。各ピークは, ソルビトール-3-リン酸 (S-3-P), α -グリセロリン酸 (α -GP), ホスホエタノラミン

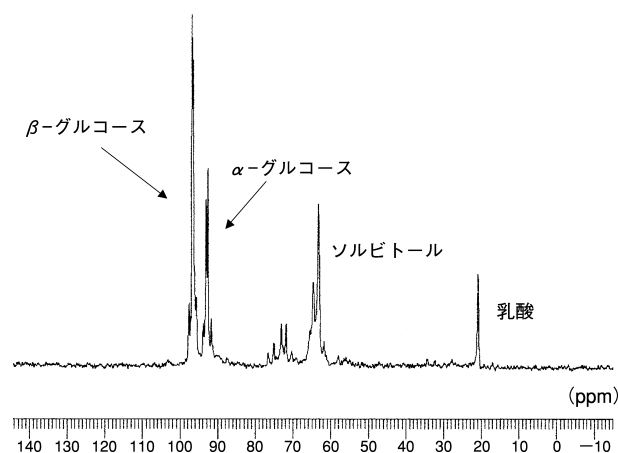


図 3 培養 2 日後のウシ水晶体の ^{13}C -magnetic resonance spectroscopy (MRS)。

各ピークは左からそれぞれ, β -グルコース, α -グルコース, ソルビトール, そして乳酸である。

(PE), ホスホコリン (PC), 無機リン酸 (Pi), グリセロホスホエタノラミン (GPE), グリセロホスホコリン (GPC), そして ATP 群の信号である。S-3-P⁸⁾はソルビトールからの代謝産物と考えられており⁹⁾, この増加の度合は, ソルビトールそれ自体の変化量と併せて, ソルビトール経路の活性化の指標と考えることができる。水晶体の活性度は ATP の量, すなわち, この図で ATP- β のスペクトル面積の変化量から推察した (ATP 群の各スペクトルは, ATP- γ +アデノシン 2 リン酸 (ADP)- β , ATP- α +ADP- α , ATP- β の信号であるが, ATP- β のスペクトルには ADP の情報は含まれていない)。

培養 1~6 日後までのグルコース画像では, グルコースは培養 1 日後に水晶体の前部だけでなく後部にも広く拡散し, 高密度に存在した (図 5)。その後, 培養 4 日後まで漸減し, 培養 6 日後には画像としてはとらえられなくなった。

培養 1~6 日後までのソルビトール画像では, ソルビトールは, 培養 1 日後には主に水晶体の赤道部から前部

付近にかけて高濃度に存在する(図6)。その後、培養6日後までソルビトールに著明な変化はなかった。

^{13}C -MRS の培養1~6日後までの経時変化を図7に示す。水晶体中のグルコース含有量(α -グルコース+ β -グ

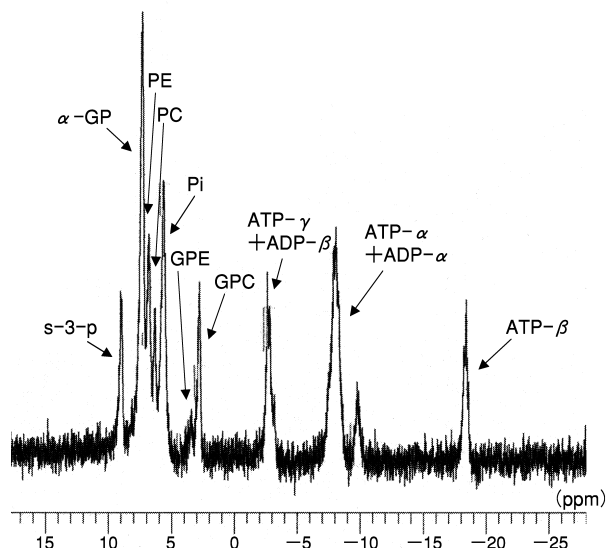


図4 培養4日後のウシ水晶体の ^{31}P -MRS.
各ピークは左からそれぞれ、ソルビトール-3-リン酸(S-3-P)、 α -グリセリン酸(α -GP)、ホスホエタノラミン(PE)、ホスホコリン(PC)、無機リン酸(Pi)、グリセロホスホエタノラミン(GPE)、グリセロホスホコリン(GPC)、そしてアデノシン3リン酸(ATP)群である。

ルコース)は、培養6日後までほとんど変化していない。一方、ソルビトールは培養6日後まで著明に増加し続けた。

^{31}P -MRS の培養0日(対照)から6日後までの経時変化をみると、S-3-Pおよび α -GPは漸増した(図8)。ATP- β はほとんど変化しなかったが、培養6日後にはやや減少した。

ウシ水晶体では、アルドース還元酵素活性はラットや家兎と比較してそれほど高いとはいえない¹⁰⁾ものの、この培養系で十分なソルビトール経路活性が得られていた。またATP- β は、培養4日後までほとんど変化しなかったことから、培養4日後までの水晶体の培養は順調であったと考えられる。ただ、培養6日後にはやや減少していることから、6日後には水晶体の細胞としての活性がやや減弱した可能性がある。

IV 考 按

糖尿病白内障の成因に関しては、ソルビトールをその主因とする浸透圧説を中心に、非酵素的糖化説、酸化的ストレス説などがあり、それらの相互作用により白内障が生ずるものと考えられている。糖尿病水晶体におけるアルドース還元酵素の局在に関しては、ラット水晶体のアルドース還元酵素に対する抗体を用いた蛍光酵素抗体法により、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット水晶体で、ストレプトゾトシン静注2週後に水隙の出現とともに水晶体上皮細胞下に染色がみられ始め、6~8週後ま

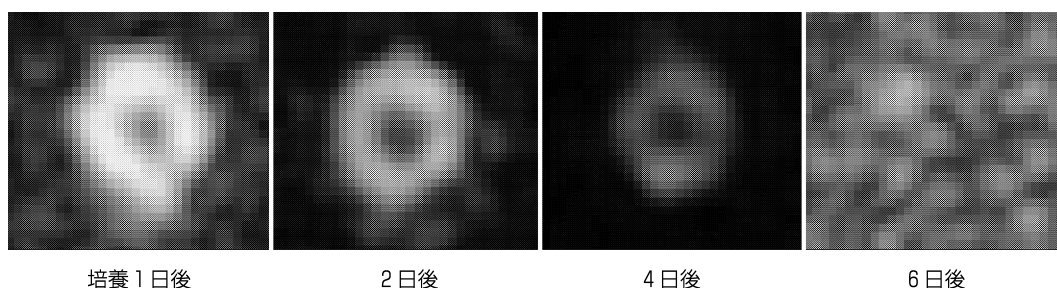


図5 培養1~6日後までのグルコース画像の経時変化。

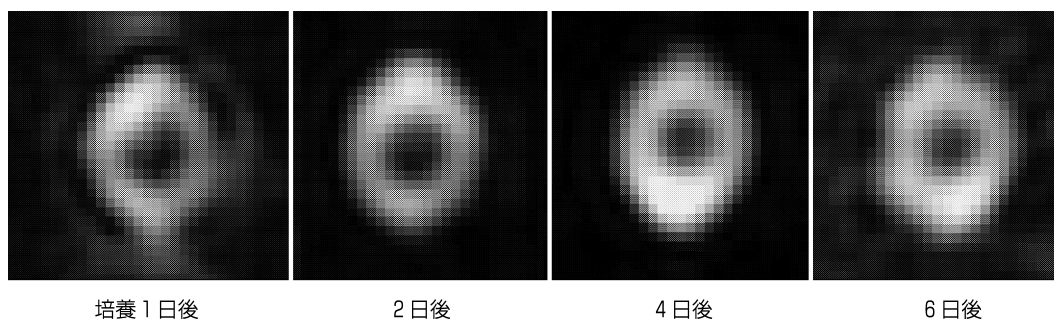
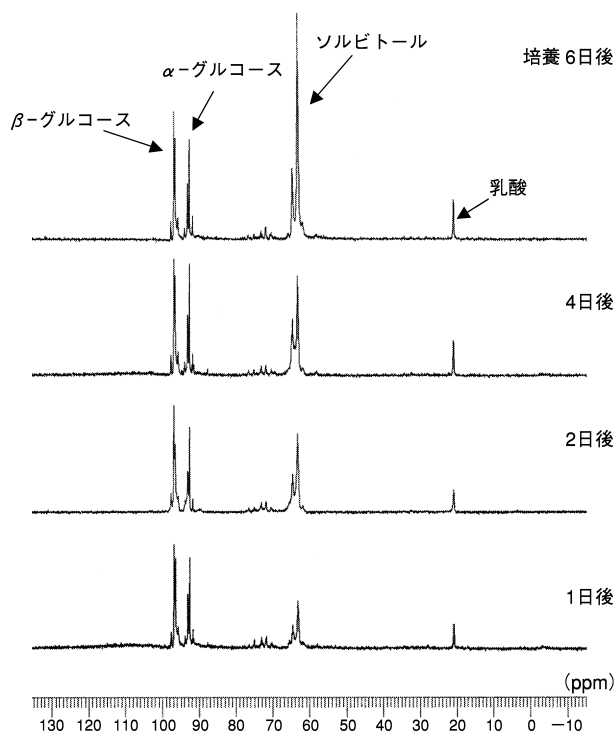


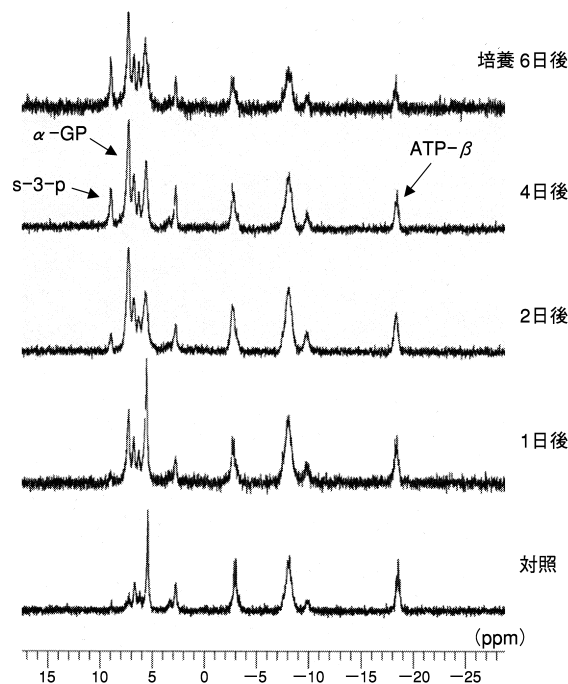
図6 培養1~6日後までのソルビトール画像の経時変化。

図 7 培養 1～6 日後までの ^{13}C -MRS の経時変化.

では水胞の形成とともに強く染色されていくのが観察されたとしている。そしてアルドース還元酵素の活性亢進は、代謝活性が亢進することよりもむしろ酵素が蓄積するためであると結論づけている³⁾。とするならば、培養水晶体中に蓄積されるソルビトールも、その局在性により、ある蓄積パターンが観察されるのではないかと考え、今回の実験を施行した。

MRI は、生体に最も多量に存在する水分子の ^1H -核の信号をとらえることで、生体の形態的な情報を与えてくれる。これはまた、 ^1H -核が共鳴周波数、天然同位体比の点で最も有利な核で、MR 感度が他の核種と比較して極めて高いことにも依存している。一方、MRS や CSI では、生体の代謝情報を得ることができる。しかしながら、その対象となる ^1H -核以外の核種、例えば ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{23}Na 、あるいは ^{31}P などでは MR 感度が低いこと、さらに眼科領域ではその対象とする組織の小さいこと、および組成の特異性などから、その測定は非常に困難である。ただ、 ^{13}C は天然同位体比が他の核種と異なり 1.108% と極端に低いいため、逆に ^{13}C で標識した物質を使用することで効果的な標識を得ることができる²⁾。今回はその標識物質としてグルコース-1- ^{13}C を用い、さらにそれに結合している ^1H の信号を測定することにより、高濃度のグルコース-1- ^{13}C 含有 TCM 199 で培養したウシ水晶体におけるグルコース-1- ^{13}C 、およびその代謝産物であるソルビトール-1- ^{13}C の局在を CSI を用いて観察することができた。

培養 1 日後の CSI (図 2) で、グルコースはソルビトール

図 8 培養 0 日 (対照) から 6 日後までの ^{31}P -MRS の経時変化.

ルと比較して水晶体のほぼ全域に高濃度で存在するのが観察された。この後グルコースは培養 4 日後まで漸減し、6 日後には画像としてとらえられなくなった (図 5)。一方 ^{13}C -MRS では、培養 1 日後にグルコース (α -グルコース + β -グルコース) はソルビトールと比較してかなり高濃度に存在した (図 7)。これは特に、図 2 と矛盾のない結果である。その後、ソルビトールは著明に増加したが、グルコースはほとんど変化しなかった (図 7)。水晶体中のグルコース含有量は、高濃度のグルコースを含有した培養液で培養した家兎水晶体でも、培養早期にプラトーに達し、その後ほとんど変化しないことが観察されている^{11)~13)}。グルコースが培養早期にプラトーに達し、その後ほとんど変化しないのは、グルコースが解糖活性に依存した受動的な輸送形式をとる¹⁴⁾ためであると考えられる。すなわち、高濃度のグルコースを含有する培養液で培養している水晶体では、おそらく嫌氣的解糖は飽和状態に達しており、水晶体中のグルコースは、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) が活性化された分だけ高い、ある一定値に保たれているためであると考えられる。ところが、今回のウシ水晶体の CSI による観察では、グルコースの含有量は培養 4 日後まで漸減し、培養 6 日後には画像としてとらえられなくなった。高濃度グルコース溶液で培養した家兎水晶体における pulse-chase study¹⁵⁾で、グルコースは指数関数的に代謝され、減少するのが観察されている¹⁶⁾。水晶体中でのグルコースは主に、嫌氣的解糖系、ソルビトール経路、およびペントースリン酸回路を経て代謝されると考えられるが、糖尿病状態ではソルビ

トル経路の活性化とともに、特に NADPH の供給源としてペントースリン酸回路が活性化される¹⁶⁾¹⁷⁾。そのため、測定に長い時間を要する CSI による観察では、培養時間が長く、ソルビトールがより多く蓄積している水晶体でペントースリン酸経路を経て代謝されるグルコース量が増えており、結果として測定されるグルコースの量が減少したものと考えられる。

ソルビトールは、培養 1 日後には主に水晶体の赤道部から前部にかけて蓄積したが、培養 6 日後までほとんど変化しないように思われた(図 6)。一方¹³C-MRS では、培養 1 日後にはグルコース濃度と比較してごくわずかのソルビトールが観察される程度であったのが、培養 6 日後まで漸増傾向を示し、培養 6 日後には著明に蓄積していた(図 7)。ソルビトールは家兎水晶体を用いた pulse-chase study では、一次関数的に減少していくのが観察されている¹⁶⁾。ソルビトールはアルドース還元酵素によりグルコースから生成され、フルクトース、あるいは S-3-P^{9)19)~21)}に代謝されていくと考えられる。ソルビトール濃度が高いと代謝されるソルビトールも増加し、その結果、およそ 10 時間の CSI 測定時間を経て、ソルビトールの CSI 画像には著明な変化がなかったものと考えた。

今回、2 テスラ CSI 装置を用いて、高濃度グルコース培養液で培養したウシの水晶体におけるグルコースおよびソルビトールの化学シフト画像を得ることができた。ソルビトールおよび S-3-P の含有量から、ソルビトール経路は十分に活性化され、また、ATP の含有量(図 8)からは水晶体の活性は培養 4 日後までは十分に保たれていると考えられた。しかしながら、10 時間に及ぶ CSI の測定時間のため、CSI 画像と¹³C-MRS で同じ結果を得られなかった。眼科領域ではその対象組織の小さいこと、および組成の特異性などから十分な測定は困難である。今回も、それらの局在の経時変化を観察するには、測定時間が長すぎるため、満足できる結果は得られなかった。ただ、同一水晶体を用いてグルコース画像、そして引き続きソルビトール画像が得られたこと、すなわち、NMR の特徴の一つである組織の非侵襲性を考慮すると、この測定法の有用性は高いと考える。今後、さらに高分解能の CSI 装置を用いることで測定時間は短縮できるものと考えられる。また、観察できる核種や物質の枠が拡大し、さらに測定方法や技術も進歩すれば、動物実験のみならず、広く臨床にも応用できるようになる可能性がある。

文 献

- 1) Inubushi T, Morikawa S, Kito K, Arai T : ¹H-detected *in vivo* ¹³C NMR spectroscopy and imaging at 2T magnetic field : Efficient monitoring of ¹³C-labeled metabolites in the rat brain derived from 1-¹³C-glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 191 : 866—872, 1993.
- 2) 犬伏俊郎, 森川茂廣, 木村亮之, 半田譲二 : 脳内 ¹³C-標識代謝産物の MR による高感度検出. *Brain Hypoxia* 8 : 3—11, 1994.
- 3) Akagi Y, Kador PF, Kinoshita JH : Immunohistochemical localization for aldose reductase in diabetic lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 163—167, 1987.
- 4) 疋田光史 : 器官培養法. 岩田修造(編) : 水晶体 その生化学的機構. メディカル薬出版, 東京, 427—435, 1986.
- 5) Morris GA, Freeman R : Selective excitation of Fourier transform nuclear magnetic resonance. *J Magn Reson* 24 : 433—462, 1978.
- 6) Hurd RE, John BK : Gradient-enhanced proton-detected heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy. *J Magn Reson* 91 : 648—653, 1991.
- 7) Gonzalez RG, Miglior S, Von Saltza I, Buckley L, Neuringer LJ, Cheng H-M : ³¹P NMR studies of the diabetic lens. *Magn Reson Med* 6 : 435—444, 1988.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Jedziniak JA, Chylack LT, Cheng H-M, Gillis MK, Kalustian AA, Tuig WH : The sorbitol pathway in the human lens : Aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20 : 314—326, 1981.
- 11) Chylack LT, Jr, Kinoshita JH : A biochemical evaluation of a cataract induced in a high glucose medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 88 : 401—412, 1969.
- 12) Gonzalez RG, Willis J, Aguayo J, Campbell P, Chylack LT, Jr, Schleich T : ¹³C nuclear magnetic resonance studies of sugar cataractogenesis in the single intact rabbit lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22 : 808—811, 1982.
- 13) 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一. *眼紀* 49 : 140—144, 1998.
- 14) 堀内正人 : 糖代謝. 岩田修造(編) : 水晶体 その生化学的機構, メディカル薬出版, 東京, 176—188, 1986.
- 15) Daniels F, Alberty RA : *Physical Chemistry*. John Wiley and Sons, New York, 325—369, 1966.
- 16) Gonzalez RG, Barnett P, Aguayo J, Cheng H-M, Chylack LT, Jr : Direct measurement of

- polyol pathway activity in the ocular lens. Diabetes 33 : 196—199, 1984.
- 17) **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.
- 18) **Cheng H-M** : The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. Diabetes 35 : 426—432, 1986.
- 19) **Petersen A, Kappler F, Szwergold BS, Brown TR** : Fructose metabolism in the human erythrocyte. Biochem J 284 : 363—366, 1992.
- 20) **Lal S, Szwergold BS, Kappler F, Brown TR** : Detection of fructose-3-phosphokinase activity in intact mammalian lenses by ³¹P NMR spectroscopy. J Biol Chem 268 : 7763—7767, 1993.
- 21) **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.
-