

## ヒト硝子体液化に対するプロテオグリカンの変化と過酸化反応の影響

高橋 一則, 新井 清美, 林 振民, 田中 寧

獨協医科大学越谷病院眼科

## 要 約

**目的:** 硝子体液化の原因の一つに, *in vitro* では活性酸素によるヒアルロン酸の低分子化が報告されている。今回我々は *in vivo* ヒト硝子体の液化について, プロテオグリカン(PG)の断片化の度合と過酸化反応の影響を検討した。

**対象と方法:** 対象の硝子体は, 糖尿病網膜症 5 眼, 網膜剝離 12 眼, 網膜静脈閉塞症 2 眼, 黄斑円孔 1 眼とした。PG の断片化をセルロースアセテート膜電気泳動で, 過酸化反応の影響は, 銅および鉄イオン, 過酸化水素, 過酸化脂質, L-アスコルビン酸濃度,  $O_2^{\cdot-}$ -scavenging 活性を測定して検討した。

**結果:** PG の電気泳動は, 原点のみに発色した原点型と, それ以外の泳動型に分類された。泳動型では銅イオンおよび過酸化水素濃度は高値であり, 過酸化脂質量は有意に高値であったが,  $O_2^{\cdot-}$ -scavenging 活性は低値であった。

**結論:** ヒト硝子体の PG 断片化およびグリコサミノグリカンと蛋白質の解離に過酸化反応の関与が証明された。(日眼会誌 110 : 171—179, 2006)

**キーワード:** ヒト硝子体, 液化, プロテオグリカン, 電気泳動, 過酸化反応

## The Degree of Degraded Proteoglycan in Human Vitreous and the Influence of Peroxidation

Kazunori Takahashi, Kiyomi Arai, Shimmin Hayashi and Yasushi Tanaka

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

## Abstract

**Purpose :** The degradation of hyaluronic acid induced by reactive oxygen species has been reported *in vitro* as a cause of vitreous liquefaction. In this study on *in vivo* human vitreous liquefaction, we examined the degree of degraded proteoglycan (PG) in human vitreous and the influence of peroxidation.

**Subjects and Methods :** In this study we examined the vitreous of 5 eyes with diabetic retinopathy, 12 eyes with retinal detachment, 2 eyes with retinal vein occlusion, and one eye with macular hole. The degree of degraded PG was determined by cellulose acetate membrane electrophoresis. To evaluate the influence of oxidation, copper ions, iron ions, hydrogen peroxide, lipid peroxide, L-ascorbic acid concentrations, and superoxide scavenging activity were measured.

**Results :** The electrophoretic patterns of PG

were classified into the origin type (non-fragmented PG) in which only the origin was stained, and the mobile type (fragmented PG) showed other patterns. In the mobile type, the copper ion and hydrogen peroxide concentrations were higher, and the lipid peroxide concentrations were significantly higher, while the superoxide scavenging activity was lower.

**Conclusion :** These results indicated that the degradation of PG and dissociation of glycosaminoglycan in human vitreous were associated with peroxidation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 110 : 171—179, 2006)

**Key words :** Human vitreous, Liquefaction, Proteoglycan, Electrophoresis, Oxidation

別刷請求先 : 343-8555 越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 高橋 一則  
(平成 16 年 8 月 6 日受付, 平成 17 年 5 月 23 日改訂受理)

Reprint requests to : Kazunori Takahashi, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, 2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya 343-8555, Japan

(Received August 6, 2004 and accepted in revised form May 23, 2005)

## I 緒 言

硝子体の有形成分は、主にコラーゲンファイバーとヒアルロン酸(HA)、その他コンドロイチン硫酸<sup>1)</sup>、ヘパラン硫酸<sup>2)</sup>などのグリコサミノグリカン(GAG)により構成されている。

GAG は、従来はムコ多糖と呼ばれ、二糖単位が繰り返す長い鎖状構造の多糖で、二糖のうち一方が常にグルコサミンまたはガラクトサミンである。糖残基の種類により7グループに大別されるが、いずれも長い鎖中の多数の高負荷陰イオン性基による電気的反発力でコイル状構造をとる傾向にある。その構造的特徴によりGAGは粘性や弾性、また多量の水を吸収して大きな体積を占める水和ゲル形成能を持っている<sup>3)4)</sup>。

HA以外のGAGは“橋渡し構造”と呼ばれるグルクロナシルーガラクトシルーガラクトシルーキシロースの4糖構造を介して、コア蛋白質と共有結合してプロテオグリカンを形成している<sup>1)</sup>。ウシ硝子体では、主にパーシカンなどのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが検出されており<sup>1)</sup>、そのC末端はEGF(上皮細胞増殖因子)様、レクチン様、CRP(補体調節蛋白質)様ドメインが存在し、様々な分子の糖残基と結合して三次元的構造を形成すると考えられている。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのN末端はHAと非共有結合するドメインがあり、HAとパーシカンが結合するHAリンク蛋白質もウシ硝子体で検出されている<sup>1)</sup>。

また、HAはリンク蛋白質とともにコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどのプロテオグリカンのアミノ末端側の球状ドメインで非共有結合して会合している。また、プロテオグリカン同士でも会合し、カルボキシル末端では様々な分子の糖残基と結合して三次元的構造を形成すると考えられている。一方、コラーゲンは正味の電荷が正であるため、負を帯びた物質であるGAGを持つプロテオグリカンとは静電的に結合しやすく、相互作用を示すことが知られている<sup>5)</sup>。HAとプロテオグリカンの巨大な会合体(aggregate)はII型コラーゲン線維と結合し、コラーゲン線維の網目骨格の間を埋め尽くして大量の水分子と水和ゲルを形成し、硝子体のゲル構造の保持に重要であると考えられる。

硝子体液化の原因の一つとして、*in vitro* 実験では、アスコルビン酸存在下で金属イオンを介した活性酸素によるHAの低分子化が報告<sup>6)</sup>されている。しかし、これらの報告はいずれも蛋白質処理などの前処理を行い、HAなどのGAG内部での断片化を検討しているが、GAGの構造は健全でも、GAGとコア蛋白質の結合状態の変化によるプロテオグリカンの断片化、HAとプロテオグリカンの結合状態の変化、コラーゲンとプロテオグリカンの会合状態の変化についてはまだ報告されていない。GAG自身の断片化の前に、より変化しやすい静

電的な結合が基本のGAGと蛋白質の結合状態が変化することにより、水和ゲルの水分保持能力が変化して硝子体ゲルがゾル化(液化)するのではないかと考えた。そこで我々は *in vivo* における硝子体の液化をGAGと蛋白質(プロテオグリカンとコア蛋白質、リンク蛋白質、コラーゲンなど)との結合状態の変化に着目し、今回、プロテオグリカンからGAGを抽出する前処理を取って行わず、GAGと蛋白質が結合した状態のまま直接、電気泳動を行うという全く新しい方法を報告する。

また、硝子体のゲルからゾルへの変化の過程に、プロテオグリカンの断片化およびGAGと蛋白質との結合状態の変化をひき起こす要因の一つとして過酸化反応の関与についても検討した。

## II 実験方法

### 1. 対象ならびに検査項目

明らかな硝子体出血の既往のない症例で、実験の主旨を説明し、承諾を得た20症例を対象とした。硝子体の採取は、硝子体手術開始時になるべく血液を混入させないように注意し、眼内灌流液を灌流させないままゲル部分約1.0 mlを切除吸引し試料とした。本研究では、物理化学的な見地から硝子体の物性に着目し、その物性変化を探求するために、多種類の症例の硝子体を対象とした。疾患の内訳は増殖糖尿病網膜症5眼(平均年齢48.0歳)、非糖尿病眼では網膜剥離12眼(54.1歳)、網膜静脈閉塞症2眼(62.0歳)、黄斑円孔1眼(66.0歳)であった。

それらの試料にプロテオグリカンの断片化を調べるためにセルロースアセテート膜電気泳動を行い、さらに過酸化反応の影響を調べるために銅イオン、鉄イオン、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、過酸化脂質、スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) scavenging 活性、L-アスコルビン酸濃度を測定した。

### 2. 電気泳動

#### 1) 電気泳動の前処理(図1)

採取したヒト硝子体を遠心分離し、その下層を使用することで、ゾル部分の混入を避け、ゲル部分をそのまま試料とし、電気泳動した。ゲルに電気刺激を加えることにより、蛋白質とGAGとの結合状態が変化してゾル化し、泳動された程度から、硝子体ゲルの液化し易さを判定した。

また、定性のために一部の試料については蛋白質分解処理としてプロテアーゼ処理、あるいはHA消化酵素であるヒアルロニダーゼ処理も行った。プロテアーゼ(type XXV, SIGMA)は試料200  $\mu$ lに対して0.1 mg使用し、37°Cで24時間反応させた。ヒアルロニダーゼ(和光純薬, 300 U/mg)は試料25  $\mu$ lに対して2 mg混和し、37°C, 30分間反応させた後、4°C, 一昼夜さらに反応させた。また、今回使用したヒアルロニダーゼはHA、コ

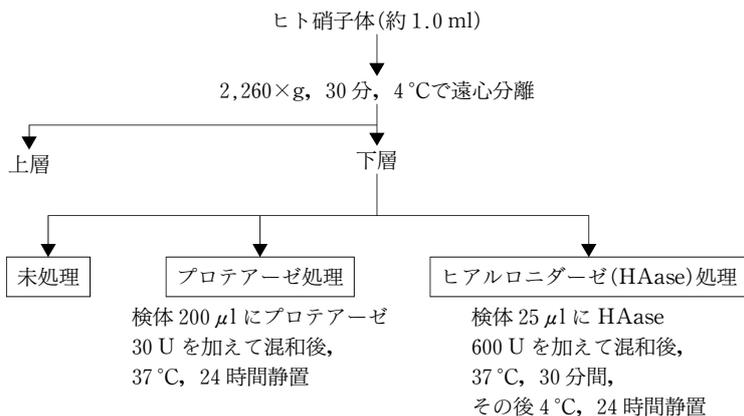


図 1 電気泳動の前処理.

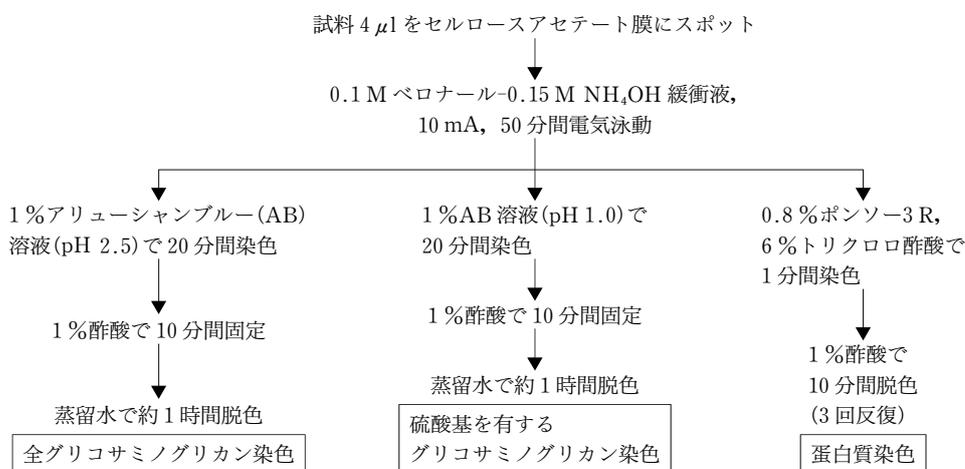


図 2 セルロースアセテート膜電気泳動法.

ンドロイチン 4 硫酸および 6 硫酸に作用し、N-アセチルヘキサミンの第一位の炭素と酸素との架橋との間の結合を加水分解するものを使用した。

2) セルロースアセテート膜電気泳動法(図 2)

5×10 cm のセルロースアセテート膜(SEPARAX-SP, 富士写真フィルム)を 0.1 M ペロナール-0.15 M アンモニア緩衝液で 30 分間湿潤させた後、試料 4 μl と標準 GAG(Acid Mucopolysaccharide Kit, 生化学工業)1 μl を膜の原点にスポットし、10 mA で 50 分間泳動した。その後、全種類の GAG を染色可能である pH 2.5 の 1.0% アリュージェンブルー溶液(武藤化学薬品)で室温にて 10 分間染色を行った後、1% 酢酸溶液で 10 分間室温で固定し、蒸留水で 3 回脱色(10 分間, 10 分間, 60 分間)した<sup>7)</sup>。

一部の試料について、硫酸基を持つ GAG すなわちケラタン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン 4 硫酸および 6 硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンを染色する pH 1.0 の 1.0% アリュージェンブルー(武藤化学薬品)によって、室温で 10 分間染色後、同様に固定、脱色を行った。また、0.8% ボンソー-3 R-6% トリクロロ酢酸溶液

(ナカライデスク)により蛋白質を室温で 1 分間染色し、1% 酢酸溶液で固定、脱色操作を 1 分~1 分 30 秒間で 3, 4 回繰り返した。泳動の結果は、デンシトメトリー(コスモ F 808)によるデンシトグラムで分類した。

3. 過酸化反応関連物質および消去物質の測定

銅イオンはバソクプロイン法<sup>8)</sup>で、鉄イオンはバソフェナンスロリン法<sup>8)</sup>で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はチタン過酸化水素法<sup>9)</sup>で、過酸化脂質は八木法蛍光法<sup>10)</sup>で、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>scavenging 活性は NBT (nitroblue tetrazolium) 還元法<sup>11)</sup>で、L-アスコルビン酸濃度はアスコルビン酸オキシダーゼ法<sup>12)</sup>で、それぞれ試料 100 μl を測定した。結果の統計学的解析は Mann Whitney の U 検定と Pearson の相関係数を用いた。原点型と泳動型の存在頻度の違いについては  $\chi^2$  検定で解析した。

III 結 果

1. 電気泳動

1) 電気泳動像

プロテアーゼおよびヒアルロニダーゼによる前処理をしないで電気泳動し、pH 2.5 のアリュージェンブルー

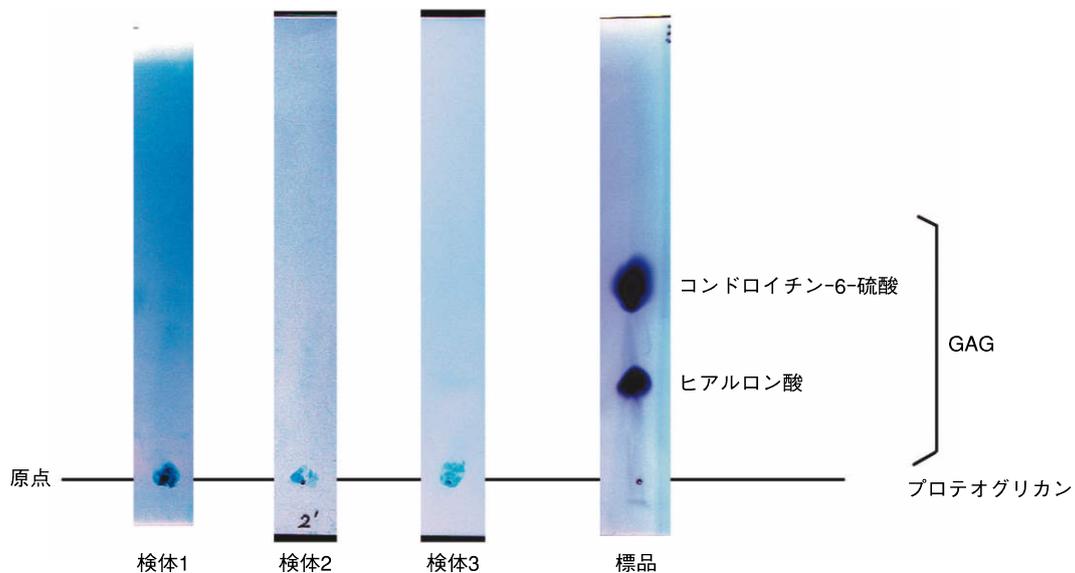


図3 プロテオグリカンのセルロースアセテート膜電気泳動(原点型).  
GAG: グリコサミノグリカン

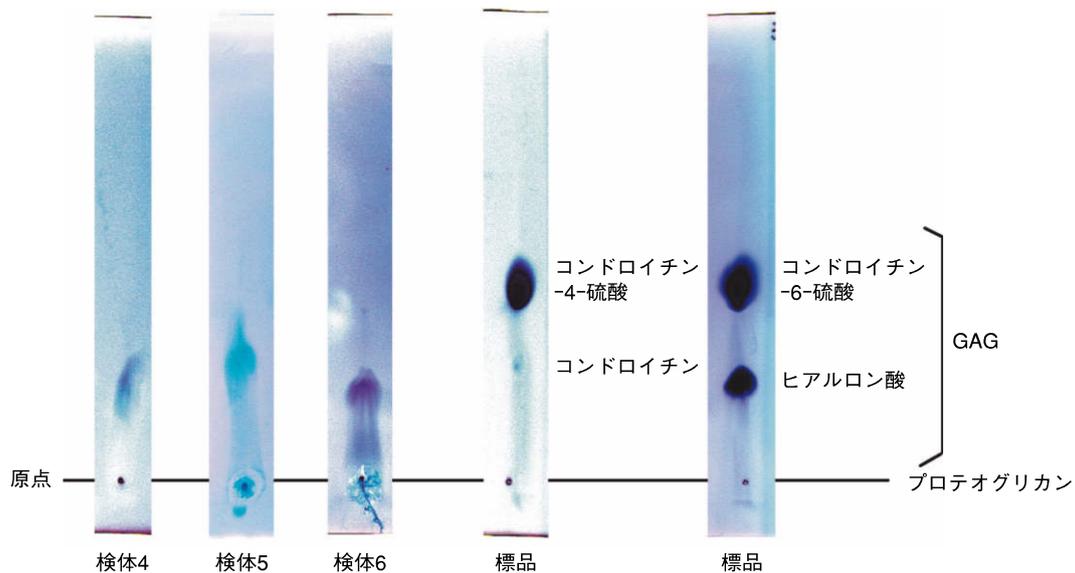


図4 プロテオグリカンおよびGAGのセルロースアセテート膜電気泳動(泳動型).

溶液で染色した結果、試料がスポットした原点に留まり泳動されないで、原点にのみ発色した検体1~3(図3)と、原点から泳動されて、試料をスポットした原点以外にも発色した検体4~6(図4)とに分類された。

原点以外にも発色した検体5について、プロテアーゼおよびヒアルロニダーゼによる酵素処理を前処理として行った結果を図5に示した。(a)の泳動は、前処理なしでpH 2.5のアリュースャンブルー溶液によって全てのGAGの染色を行ったもの(前述)である。(b)は泳動前にプロテアーゼ処理を行ったもので、原点の発色は消失した。また、(c)は泳動前にプロテアーゼ処理をし、pH 1.0のアリュースャンブルーによって硫酸基を持つGAGのみの染色を行ったものである。同じく原点には

発色しないが、原点以外に発色が認められることからHA、コンドロイチン以外のGAGが泳動されていることが確認された。また、(d)でヒアルロニダーゼ処理をしたものでは全ての発色の消失が認められた。また、蛋白質染色では、プロテアーゼ未処理の(e)では原点と泳動部分全域に発色し、プロテアーゼ処理した(f)では全域で発色が消失した。

## 2) デンシトグラム(図6, 7)

図6の最下段のデンシトメトリー像は原点のみに発色したものの、3段目は原点以外にも発色したものを示した。

このデンシトグラムから原点の発色の度合を原点存在率とし、その分布をみた(図7)。この結果から原点存在

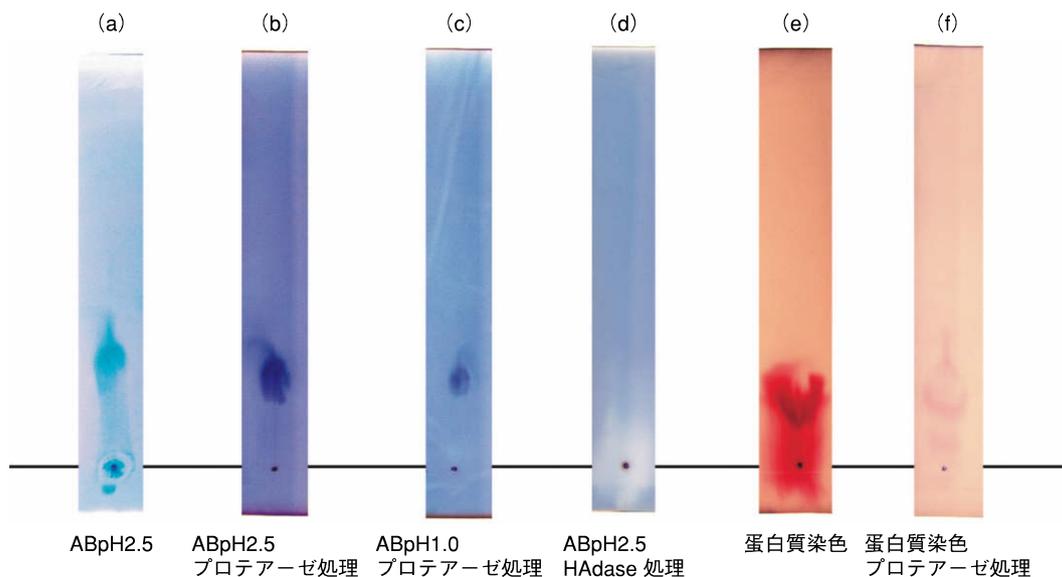


図 5 検体 5 のセルロースアセテート膜電気泳動.

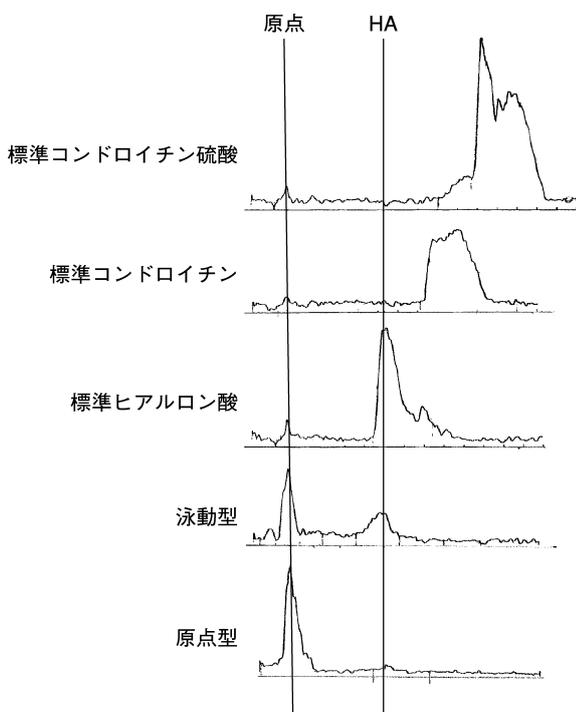


図 6 泳動状態のデンストメトリー.  
HA：ヒアルロン酸

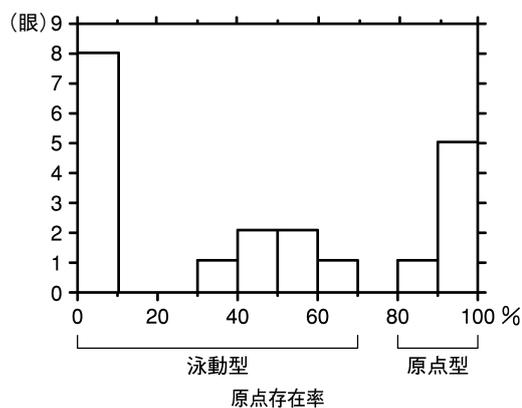


図 7 原点存在率ヒストグラム.

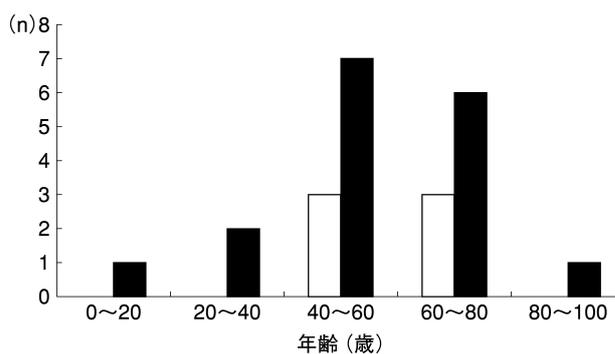


図 8 泳動タイプと年齢分布.  
□：原点型, ■：泳動型

率が 80% 以上のものを原点型, 80% 未満は泳動型の二群に分類した(表 1).

原点型と泳動型の二群で比較すると, 原点型の原点存在率は  $96.2 \pm 6.5\%$ , 泳動型は  $20.1 \pm 23.9\%$  で, この二群間には有意差がみられた ( $p < 0.0001$ ). 年齢は, 原点型 ( $60.7 \pm 7.0$  歳) と泳動型 ( $51.1 \pm 15.1$  歳) で有意差はみられず, また, 年齢と原点存在率の相関もみられなかった. 原点型と泳動型の年齢別にみたヒストグラムを供覧する(図 8).

また, 疾患別で比較すると, 糖尿病網膜症は全例(100%)泳動型で, 原点存在率は  $26.5 \pm 27.1\%$  であった. 非糖尿病眼 15 眼では原点型 6 眼(40%), 泳動型 9 眼(60%)で, 原点存在率は原点型 ( $96.2 \pm 6.5\%$ ), 泳動型 ( $15.4 \pm 22.6\%$ ) で有意差がみられた ( $p < 0.0001$ ). さ

表 1 対象と原点存在率一覧

デンシトメトリー 原点存在率	泳動タイプ	年齢	診断
1	100.0	原点型	56 網膜剝離
2	100.0	原点型	59 網膜剝離
3	100.0	原点型	69 網膜剝離
4	97.3	原点型	64 網膜静脈閉塞症
5	96.6	原点型	50 網膜剝離
6	83.2	原点型	66 黄斑円孔
7	62.8	泳動型	24 増殖糖尿病網膜症
8	57.9	泳動型	60 網膜剝離
9	56.0	泳動型	48 増殖糖尿病網膜症
10	43.0	泳動型	57 網膜剝離
11	41.1	泳動型	68 増殖糖尿病網膜症
12	31.2	泳動型	60 網膜静脈閉塞症
13	6.8	泳動型	63 網膜剝離
14	0	泳動型	17 網膜剝離
15	0	泳動型	40 網膜剝離
16	0	泳動型	45 増殖糖尿病網膜症
17	0	泳動型	54 網膜剝離
18	0	泳動型	55 増殖糖尿病網膜症
19	0	泳動型	58 網膜剝離
20	0	泳動型	66 網膜剝離

表 2 硝子体中の過酸化反応関連物質および消去物質の推移

測定項目(単位)	原点型	泳動型
銅イオン (ng/ml)	340.2±96.6	485.2±254.1
鉄イオン (ng/ml)	115.7±26.1	120.0±52.0
過酸化水素 (nmol/ml)	0.113±0.088	0.212±0.173
過酸化脂質 (nmol(MDA)/ml)	0.043±0.002*	0.046±0.001*
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> scavenging 活性 (U/ml)	13.80±13.40	8.00±9.08
L-アスコルビン酸 (μg/ml)	12.99±1.15	14.07±11.77

\* : p&lt;0.05 平均値±標準偏差

に非糖尿病眼のうち網膜剝離では、原点型 4 眼(33.3%)、泳動型 8 眼(66.7%)で、原点存在率は原点型(99.2±1.7%)、泳動型(13.5±23.3%)で有意差がみられた(p<0.0001)。

糖尿病の有無で、原点型と泳動型の割合を  $\chi^2$  検定で比較したところ、有意差がみられた(p<0.001)。

## 2. 過酸化反応関連物質および消去物質の推移(表 2)

デンシトグラムの結果をもとに、原点型と泳動型で銅イオン、鉄イオン、過酸化水素、過酸化脂質量、O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging 活性、L-アスコルビン酸濃度について検討した。硝子体中の過酸化反応関連物質としては、鉄イオン含有量では差がなかった。泳動型では銅イオン含有量および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は有意差は認めないが高値であり、過酸化脂質量は有意に高値(p<0.05)であった。また、過酸化反応関連物質の消去能としての O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging 活性は原点型で高値であった。さらに硝子体中 L-アスコルビン酸濃度では差がみられなかった。

## IV 考 案

ヒト硝子体の GAG について、石丸ら<sup>13)</sup>、西内ら<sup>14)</sup>は糖尿病網膜症眼の硝子体内酸性ムコ多糖について GAG のウロン酸量を測定して、その変動を報告しているが、これらはいずれもプロテアーゼによる前処理を行ってから測定しているため、GAG と蛋白質の結合したプロテオグリカンやコラーゲンなどの蛋白質との結合状態での検討はなされていない。Breen M ら<sup>15)</sup>はプロテアーゼ消化した試料の他に、プロテアーゼ未処理の正常ヒト硝子体 4 眼から HA の存在を確認しているが、これは凍結乾燥処理をしており、GAG と蛋白質の結合状態についての検討はなされていない。秋谷ら<sup>16)</sup>はヒト胎生期の硝子体においてプロテアーゼによる前処理は行わず、組織切片の化学染色により HA、コンドロイチン硫酸あるいはデルマトン硫酸の存在については報告しているが、やはり蛋白質との結合状態については述べられていない。

また、過酸化反応については、家兎硝子体において *in vivo* で、秋葉<sup>17)</sup>、Hikichi ら<sup>18)</sup>により O<sub>2</sub><sup>-</sup> またはヒドロキシラジカル(HO<sup>•</sup>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの活性酸素が硝子体液化に関与すると報告されている。また *in vitro* では、アスコルビン酸存在下で銅イオン量、鉄イオン量の増加に伴いフェントン反応で発生した HO<sup>•</sup> によってウシ硝子体の液化が促進したと報告<sup>3)</sup>されており、それは HO<sup>•</sup> により HA が脱重合して低分子化し、硝子体の水分保持能が低下したためではないかと述べている。その他にリポフラビン存在下で、照射時に発生した HO<sup>•</sup> により HA が低分子化するとの報告<sup>19)</sup>もみられる。

そこで今回我々は、硝子体手術で採取したヒト硝子体を可能な限り硝子体ゲルそのものの物性を探求するために、従来は行われていないプロテアーゼ未処理の状態での電気泳動を行い、その結果について検討した。さらに *in vivo* での GAG の蛋白質との結合状態から硝子体の液化に過酸化反応が与える影響について検討した。

電気泳動では、図 3 の検体 1~3 は、試料をスポットした原点にのみ発色しており、これらは GAG が蛋白質と結合した状態を保っているために分子量が大きく、泳動されずに原点に残っているものと思われた。一方、図 4 の検体 4~6 は、試料をスポットした原点以外にも発色しており、これはプロテオグリカンの断片化あるいは GAG と蛋白質の結合が解離したために泳動されたものと思われた。検体 5 と検体 6 は原点と原点以外にも発色がみられるため、GAG が蛋白質と結合しているものと結合していないものが共存していると考えた。そこで、検体 5 の定性実験(図 5)で、(a)の原点にはプロテオグリカンなど蛋白質が結合した GAG が、泳動部分には遊離した GAG が染色されていることを(a)、(b)の比較で確認した。(b)のプロテアーゼ処理後の GAG 全種の染

色で原点の発色が消失したことから、分子量が大きすぎて泳動されなかった蛋白質結合型の GAG が、プロテアーゼ処理で蛋白質の結合から解放されたため泳動されたと考えられた。これは (e) プロテアーゼ未処理と (f) プロテアーゼ処理後の蛋白質染色の泳動像の比較でも明らかである。また、(c) のプロテアーゼ処理した pH 1.0 アリュージャンブルーでの硫酸基を持つ GAG のみの染色では、原点以外に発色が認められたため、泳動されていた GAG には、HA、コンドロイチンなど硫酸基を持たない GAG だけではなく、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン 4 硫酸および 6 硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンなどの硫酸基をもつ GAG も存在することが確認された。さらに (d) のヒアルロニダーゼ処理では全ての発色の消失が認められるが、今回用いたヒアルロニダーゼは HA のみならずコンドロイチン 4 硫酸および 6 硫酸も消化するため、硝子体のゲルにこの 3 者の存在が示唆された。この電気泳動の結果をデンシトメトリーで定量して (図 7)、原点にとどまった原点型と泳動型に分類した。これは図 5 の検討で分かるように、GAG と蛋白質との結合状態の違いによって分類された。すなわち、プロテアーゼ未処理では GAG と蛋白質の会合体は泳動されない (原点型) が、プロテオグリカンが断片化あるいは GAG が蛋白質から遊離して、GAG 単独になると泳動されやすく (泳動型) なると考えられる。電気泳動による電気刺激が硝子体ゲルに加わっても、原点型は GAG と蛋白質の解離が起こらずゲル構造が変化しない。一方、泳動型は硝子体ゲルに電気刺激が加わることにより、① プロテオグリカンのコア蛋白質と GAG を結合している橋渡し構造の 4 糖が変性あるいは欠落した状態。② HA とプロテオグリカンやその他の蛋白質を結合するリンク蛋白質 (HA 結合蛋白質) の変性か消失、③ プロテオグリカンや HA 会合体の負電荷が減少してコラーゲンとの結合状態が変化して解離した状態、以上 3 項目のうち一つ以上が起こっている硝子体のゲルの網目構造が変化した状態であると思われる。

さらに原点型と泳動型を比較すると、泳動型で過酸化脂質が有意に高値であったため、ウシ硝子体で報告された GAG の低分子化だけでなく GAG と蛋白質の解離 (前述のプロテオグリカンの断片化、リンク蛋白質の消失、コラーゲンからの解離) にも過酸化反応が影響していることが判明した。

そこで、GAG の蛋白質からの解離に影響を及ぼした活性酸素の種類について検討すると、鉄イオンは原点型と泳動型でほとんど差はみられなかったが、銅イオンと過酸化水素については有意差こそなかったものの泳動型で高値であった。これは  $\text{Cu}^{+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$  のフェントン様反応により  $\text{HO}\cdot$  が発生していた可能性が強いと思われる。また L-アスコルビン酸も原点型、泳動型ともに硝子体中に存在しており、上野<sup>19)</sup>、

Chattopadhyay D ら<sup>6)</sup>が、*in vitro* のウシ硝子体で L-アスコルビン酸、金属イオン存在下での  $\text{HO}\cdot$  による HA の低分子化と硝子体の液化を報告しているように、泳動型のヒト硝子体では銅イオンを介した  $\text{HO}\cdot$  による HA の低分子化のみならず GAG と蛋白質の解離による液化が亢進していた可能性がある。

さらに  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -scavenging 活性は、泳動型で低値であったため泳動型では  $\text{O}_2^{\cdot-}$  が発生しやすく、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  もプロテオグリカンの断片化および GAG と蛋白質の解離に関与している可能性が示唆された。*in vivo* では、家兎の硝子体でリン酸リボフラビン存在下の照射時に発生した  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  により硝子体の液化が生じることを報告<sup>17)</sup>しているが、本実験でも泳動型では  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{HO}\cdot$  の発生が考えられ、 $\text{H}_2\text{O}_2$  も検出されている。したがって、ヒト硝子体のゲルでも、泳動型ではこれらの活性酸素により、蛋白質側の正電荷の低下や GAG 側の電荷の変化によりコイル状構造の変性が既に生じており、GAG と蛋白質の結合力が弱く、GAG と蛋白質が解離しやすい状態にあり、その結果、水和ゲルの水分保持能力が低下し、硝子体の液化が亢進する一因である可能性は大きいと思われる。

ヒト臍帯の HA について、McCord<sup>21)</sup>は  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が HA を脱重合して粘度を低下させることを報告している。本実験でも  $\text{O}_2^{\cdot-}$  および  $\text{H}_2\text{O}_2$  が泳動型のヒト硝子体で発生あるいは増加していることが考えられるので、プロテオグリカンの断片化が硝子体の粘度を低下させている可能性も推察できる。過酸化反応により、GAG の低分子化<sup>19)</sup>のみならず、前述の①②③の状態をひき起こし、プロテオグリカンの断片化および GAG と蛋白質との結合状態の変化によって、硝子体の液化だけではなく粘性の変化もひき起こし、ゲル構造を変化させたことが考えられた。

今回検討した症例では、非糖尿病網膜症眼では原点型と泳動型の比率は 1:2 であったが、糖尿病網膜症は全例で泳動型であり、非糖尿病眼と糖尿病眼では原点型と泳動型の出現頻度に有意差がみられている。今回採取した硝子体は、手術開始時に切除したゲル部分のみであり、さらにその試料を遠心分離した下層を使用しているため、これは眼内で最も液化しておらず硝子体ゲルの網目構造が保持されている部分であると思われる。それにもかかわらず糖尿病網膜症の硝子体では 5 眼全てが泳動型であったため、GAG と蛋白質はかなり解離しやすく、ゲル構造が変化し、硝子体の液化が進行しやすい状態であることが確認された。すなわち、糖尿病眼の硝子体のゲルは、イオン強度の変化、過酸化反応などによって硝子体内の電荷が変化することにより、蛋白質側の正電荷が低下して GAG との結合力が弱くなり、GAG と蛋白質が解離しやすい、また、GAG 側の電荷が変化してコイル状構造が変わり、水和ゲルの水分保持能力が低

下しやすい状態にあると考えられた。ただ、今回は症例数が少なく疾患別についての硝子体液化については、さらなる検討が必要と思われる。

硝子体におけるプロテオグリカンの断片化が、網膜に与える影響についてはまだ明確ではない。ヘパリン硫酸プロテオグリカン(HSPG)は、ヘパリン結合性のサイトカインの固相化、受容体への転送とプロテアーゼからの保護などの機能がある<sup>4)22)</sup>ため、網膜表面のサイトカインの作用と安定性の低下が泳動型では起きていることも考えられる。しかしホ乳類の硝子体ではヘパリン硫酸は確認されているが、その作用は未確認である。線維芽細胞に PDGF (platelet-derived growth factor) と TGF- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ ) が作用すると、プロテインキナーゼ C による細胞内シグナル伝達系を介して HA の産生が促進され<sup>23)24)</sup>、高分子量 HA は血管新生を抑制し、低分子量 HA は血管新生を促進するとの報告<sup>21)</sup>もあるため、プロテオグリカンの断片化とサイトカインの関係も今後検討する予定である。

また今後、切断されやすいプロテオグリカンの種類の同定と GAG と蛋白質の解離原因として、前述の ①②③のうち、どの頻度が高いかということと、病態別による GAG と蛋白質の解離の度合と過酸化反応の関係についても例数を増やして更に検討していく所存である。

稿を終えるに当たり、御指導頂いた獨協医科大学眼科小原喜隆教授、獨協医科大学越谷病院眼科筑田 眞教授に深謝致します。また貴重な助言を頂いた生化学工業(株)櫻井勝清様、宮浦修様に御礼申し上げます。本研究は獨協医科大学医学総合研究所、越谷臨床共同利用部門、第二共同利用室で行った。

## 文 献

- 1) Reardon A, Heinegard D, MacLeod D, Sheehan JK, Bishop PN : The large chondroitin sulfate proteoglycan versican in mammalian vitreous. *Matrix Biol* 17 : 325—333, 1998.
- 2) Bishop PN : Structural Macromolecules and Supramolecular Organisation of the Vitreous Gel. *Prog Retin Eye Res* 19 : 323—344, 2000.
- 3) 木全弘治 : プロテオグリカンの構造と機能. 藤本大三郎(編) : 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. アイピーシー, 東京, 89—111, 1990.
- 4) 宮坂昌之, 矢原一郎(編) : 細胞接着. 用語ライブラリー. 羊土社, 東京, 28—51, 1996.
- 5) 林 利彦 : コラーゲン分子と他の物質との相互作用. 藤本大三郎(編) : 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. アイピーシー, 東京, 20—22, 1990.
- 6) Chattopadhyay D, Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B : Metal ion catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid : Role of radicals and radical ions. *Ophthalmic Res* 24 : 1—7, 1992.
- 7) 羽山正義 : アルシアン青染色. 月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊. 医歯薬出版, 東京, 104—107, 1988.
- 8) 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.
- 9) Patti PF, Bonet-Maury P : Methode colorimerique pour le dosage de la catalase. *Bull ste chim Biol* 35 : 1177—1180, 1953.
- 10) 八木国夫 : Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿または血清中過酸化脂質の微量定量法. *ビタミン* 49 : 403—405, 1975.
- 11) 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.
- 12) Beutler Ho, Beinstingl G : Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 76 : 1370—1382, 1980.
- 13) 石丸裕晃, 山根伸太, 西内貴子, 田内芳仁, 三村康男 : 糖尿病性網膜症眼の硝子体内酸性ムコ多糖について(第一報). *臨眼* 40 : 658—659, 1986.
- 14) 西内貴子, 石丸裕晃, 西原 勝, 山根伸太, 三村康男 : 糖尿病性網膜症眼の硝子体内酸性ムコ多糖について(第二報). *眼紀* 37 : 1103—1110, 1986.
- 15) Breen M, Bizzel JW, Weinstein HG : A galactosamine containing proteoglycan in human vitreous. *Exp Eye Res* 24 : 409—412, 1978.
- 16) 秋谷 忍, 佐賀歌子, 植村恭夫 : ヒト発達硝子体のグリコサミノグリカンに関する組織学的研究. *眼紀* 34 : 706—710, 1983.
- 17) 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.
- 18) Hikichi T, Ueno N, Chakrabarti B, Trempe CL, Yoshida A : Evidence of cross-link formation of vitreous collagen during experimental ocular inflammation. *GRAEFES Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 : 47—54, 1996.
- 19) 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.
- 20) Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B : Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Res* 13 : 505—512, 1994.
- 21) McCord JM : Free radicals and inflammation, protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185 : 529—531, 1974.
- 22) 羽瀧脩躬 : プロテオグリカン糖鎖のいろいろ. 神奈木玲児(編) : 複合糖質. メジカルビュー社, 東京, 36—48, 1994.
- 23) 山下英俊 : トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- $\beta$ )スーパーファミリーの眼組織における作用. *日眼会誌* 101 : 927—947, 1997.
- 24) Suzuki M, Asplund T, Yamashita H, Heldin C-H, Heldin P : Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- $\beta_1$  involves activa-

tion of protein kinase C. *Biochem J* 307 : 817—821, 1995.

Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228 : 1324—1326, 1985.

25) **West DC, Hampson IN, Arnord F, Kumar S :**

---