

# 老人性白内障水晶体のコレステロール代謝

—クリスマスツリー白内障について (図6, 表1)

藤原久子・山本覚次 (川崎医大眼科学教室)

古谷朱美 (岡山済生会病院眼科)

中田敬一 (川崎病院医学研究部)

## Membrane Cholesterol and Phospholipid in Human Lenses

Hisako Fujiwara\*, Kakuji Yamamoto\*, Akemi Furutani\*\*  
and Keiichi Nakata\*\*\*

\* Department of Ophthalmology Kawasaki Medical School

\*\* Okayama Saiseikai Hospital

\*\*\* Kawasaki Medical Research Center

### 要 約

老人性白内障水晶体, クリスマスツリー白内障水晶体, 若年透明水晶体を sucrose density gradient 法にて分画し各分画のコレステロールを TCL 及び HPLC にて, 磷脂質を Pcospholipid Test Wako にて測定した。老人性白内障水晶体の線維形質膜分画はコレステロールの高値が認められコレステロール/磷脂質比の上昇が認められた。老人性白内障水晶体でのこれらの現象は加齢による水晶体線維の核への授動と水晶体線維の硬化を示す一つの指標と考えられた。(日眼 91: 312—317, 1987)

キーワード: 老人性白内障水晶体, クリスマスツリー白内障, コレステロール磷脂質, 水晶体線維形質膜

### Abstract

Membrane preparation was obtained from human cataractous lenses, Christmas tree cataractous lenses and young normal lenses by the method of sucrose density gradient. Membrane cholesterol was measured by high performance liquid chromatography and total phospholipid was measured by Phospholipid-Test Wako. 1. The high cholesterol content and the high cholesterol/phospholipid (c/p) mol ratio in membrane and in insoluble fraction of cataractous lens was revealed. 2. The high cholesterol content of membrane and the high c/p ratio were seen to be similar in cataractous and christmas tree cataractous lenses. 3. These observation suggest that lens membrane fiber displace toward the center of lens by aging and increase high rigidity in cataractous lens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 312—317, 1987)

Key words: senile cataractous lens, Christmas tree cataract, cholesterol, phospholipid, lens membrane fiber

## I 緒 言

老人性白内障の形成において水晶体線維膜の構造

的, 機能的破壊が一つの重要な因子であることは言うまでもない。

水晶体線維形質膜の主要構成成分であるコレステ

別刷請求先: 〒700 岡山市中山下2-1-80 川崎医科大学附属川崎病院眼科 藤原 久子

Reprint requests to: Hisako Fujiwara, M.D. Dept. of Ophthalmol. Kawasaki Medical School

2-1-80 Nakasange Okayama City, 700 Japan

(昭和61年8月22日受付) (Accepted August 22, 1986.)

ロール及び磷脂質を測定し、白内障形成におけるこれらの役割について検討した。

また、コレステロール、コレステロールエステル結晶の沈着とされているクリスマスツリー白内障水晶体についても検討したので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 実験材料

屠殺場から得た牛、豚水晶体及び白色家兎水晶体及び全摘された老人性白内障水晶体を材料とした。

### 2. 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるコレステロール、コレステロールエステルの分析

それぞれ水晶体に2mM CaCl<sub>2</sub>を含むTKM buffer<sup>1)</sup>を水晶体の10倍量加えホモジナイスした、但し牛水晶体は皮質と核を分けた。

遠沈管に density 1.22蔗糖/TKM buffer (2mM CaCl<sub>2</sub>を含む)を15ml入れ、その上に上記のホモジネートを重層した。

PRS-65T (日立)で40,000rpm 5時間遠沈した。d 1.22の層と上層との間を採取した。但し人眼水晶体では、上清と中間層と沈澱層の3分画を得た。各分画を40,000rpm 30min 遠沈し、人眼水晶体の上清を除くその他の分画を水洗し24,000rpm 10min で遠沈し、沈査を試料とした。

各層を分取し4~5mlのFolch液で2回抽出を行い、クロロホルム層をとり、クロロホルム・酢酸(100:1)溶液2mlにとかしSilica Sep-Pak (Waters)<sup>2)</sup>に添加し、クロロホルム・酢酸溶液2mlで溶出、さらに14mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮した(図1)。

TLCプレート(20×20cm)(Merk)の下から、1.5cmの部に試料をマイクロピペットにて添加した。展開溶媒はヘキサン・エチルエーテル・酢酸(90:10:1)で16cm展開した。発色試薬はFeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oで100℃で2~3分で呈色させた。

### 3. 人水晶体中のコレステロールの定量

前述のようにして得られた人水晶体の各分画中の中性脂肪分画から高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりコレステロールを分析、定量した<sup>3)</sup>。装置はModel 6000A (Waters)でModel U 6K injector (Waters)を用いた。カラムはCosmosil 5SL φ4.6×150mm+Cosmosil 10SL 50mm(半井化学)で移動相はヘキサン-nブチルクロライド-アセトニトリル-酢酸(90:10:1.5:0.01)で206nmで検出し、chromatopac C-RIA (Shimadzu)で分析した。

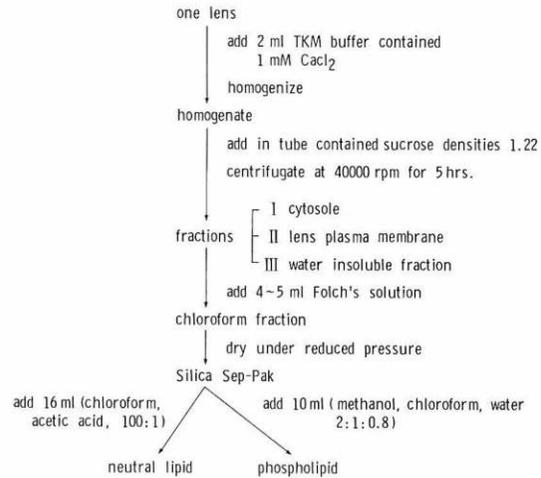


図1 Isolation of Lens Fiber Plasma Membrane and Extraction of Lipids

### 4. 人水晶体中の磷脂質の定量

人水晶体の各分画をFolch液で抽出の後、Silica Sep-Pakに添加し、メタノール・クロロホルム・水(2:1:0.8)10mlで溶出して磷脂質を得た(図1)。Phospholipid-Test Wako (和光純薬)キットを用いて磷脂質を測定した。

## III 実験結果

図2にSucrose density gradientにより、分画された水晶体を示した。クリスマスツリー白内障水晶体の中層にコレステロール結晶と思われる塊状物を認めた(\*印)。

同じ様に老人性白内障水晶体の分離されたII層とIII層を透過型電子顕微鏡によって観察した。II層には水

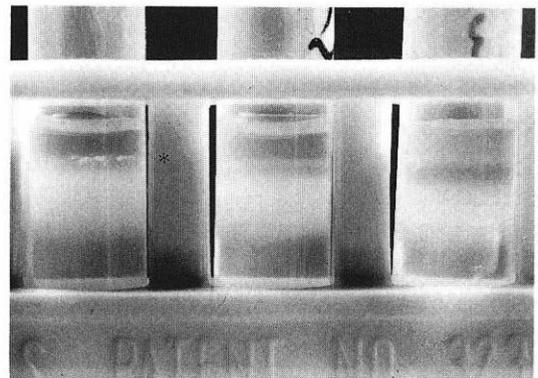


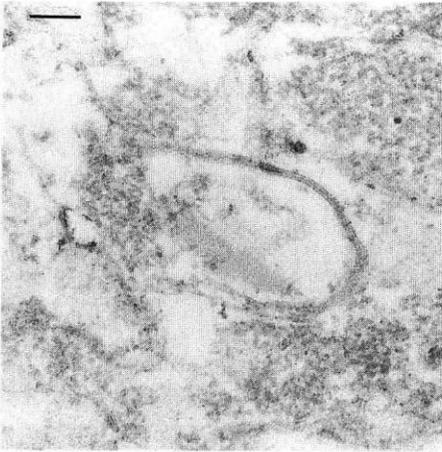
図 2

表1 Cholesterol and Phospholipid of Human Lens

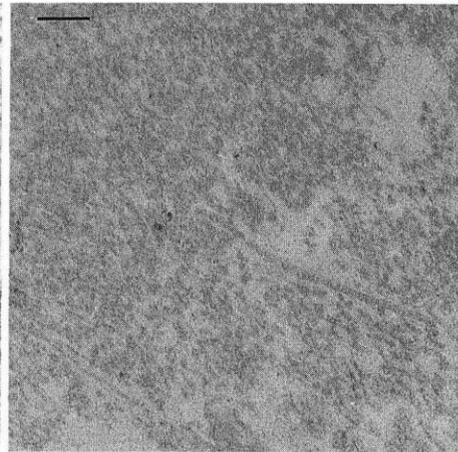
|                                       |               | cholesterol (μg/lens) | phospholipid (μg/lens) | c/ph (μg/μg) | c/ph (mol/ml) |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------|------------------------|--------------|---------------|
| normal lens (n=2)                     |               |                       |                        |              |               |
| age                                   | wet weight mg | I 9.3                 | 20.7                   | 0.44±0.03    | 0.91          |
| (38)                                  | 206.05        | II 115.5              | 90.8                   | 1.78±0.36    | 3.67          |
|                                       |               | III 42                | 76.8                   | 0.85±0.27    | 1.75          |
| cataractous lens (n=10)               |               |                       |                        |              |               |
| (50-86)                               | (154.9-225)   | I 36.5±16.1           | 29.6±8.6               | 0.96±0.2     | 1.99±0.3      |
| 68.4±3.9                              | 191±8.5       | II 515 ±54.4          | 215.4±22.9             | 2.4 ±0.1     | 4.95±0.2      |
|                                       |               | III 285.9±41.6        | 116 ±18.6              | 2.53±0.2     | 5.22±0.5      |
| Christmas tree cataractous lens (n=2) |               |                       |                        |              |               |
| (80-86)                               | 228.6         | I 8.3                 | 8.2                    | 1.03         | 2.15          |
|                                       |               | II 759.95             | 190                    | 3.93         | 8.15          |
|                                       |               | III 174               | 78.2                   | 2.22         | 4.55          |

mean ± SE

I cytosol  
 II lens plasma membrane  
 III water insoluble fraction



II 分画



III 分画

図3 bar=0.1μm

晶体線維形質膜が認められた。III層にも線維形質膜の混在が認められた(図3)。

TLCによるコレステロール、コレステロールエステルの分析では、老人性白内障晶体ではII層、III層にコレステロールのみならずコレステロールエステルの存在が認められた(図4)。

HPLCによるコレステロールの定量の結果を表1に示した。正常水晶体は38歳男の両眼透明水晶体である。老人性白内障晶体は50歳から86歳(平均年齢68±3.9歳)の10コである。クリスマスツリー白内障晶体は80歳及び86歳の2コである。老人性白内障晶体は、若年正常水晶体にくらべII層(線維形質膜分画)のコレステロール(μg/lens)は明らかに高値を示した。ク

リスマスツリー白内障晶体もII層のコレステロールは正常水晶体に比し高値を示したが、老人性白内障晶体とは大差を認めなかった。

磷脂質は線維形質膜分画において老人性白内障晶体でやや高値を示した。コレステロール/磷脂質(mol/mol)比を見るとクリスマスツリー白内障晶体>白内障晶体>若年正常水晶体の順であった。これらの結果を図6に示した。

#### IV 考 按

Cotlier, Obara ら<sup>4)</sup>は人眼水晶体形質膜(不溶性分画)においてコレステロール/磷脂質比は皮質部で3.5、核部で3.4であるが、老人性白内障晶体では皮質部で

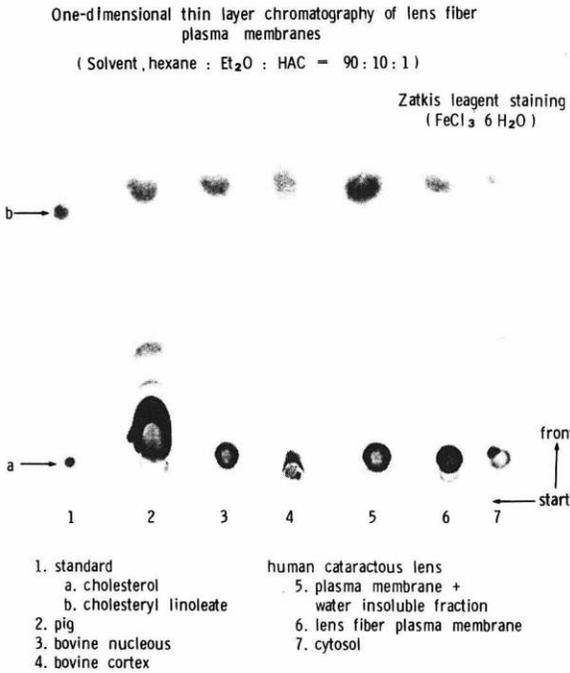


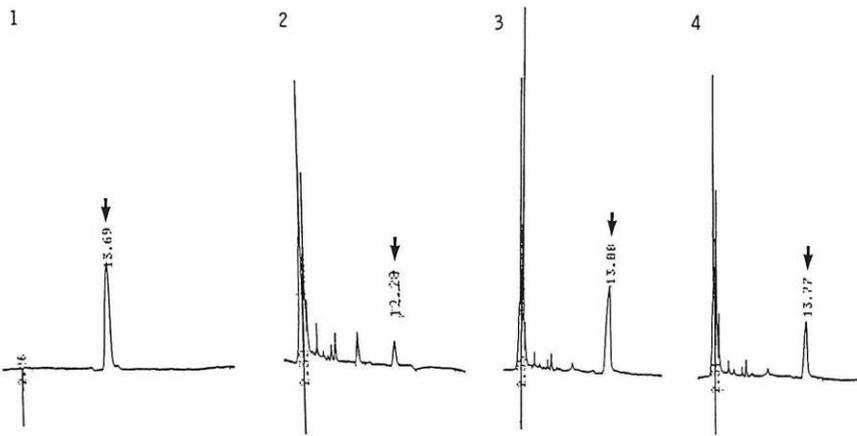
図 4

4.2, 核部で4.5とやや上昇することを述べている。また皮質では尿素可溶性, 不溶性分画においてはコレステロールと sphingomyelin の増加が認められ, 核部ではグワニジン可溶性分画においてコレステロールと sphingomyelin が増加することを認めている。

Garner ら<sup>5)</sup>は, 人白内障水晶体の膜の破壊における生化学的裏付けについて研究しているが, 全水晶体の総磷脂とコレステロールは正常水晶体と差を認めていないが, 膜においてはいずれもやや減少の傾向を認めている。

Rosenfeld ら<sup>6)</sup>は正常水晶体と白内障水晶体の磷脂質, コレステロール, 脂肪酸の量には差は認められなかったが, 正常水晶体では脂質の大部分が膜に存在しているのに対し, 白内障水晶体ではその1/2しか膜に存在しないことを述べている。膜でのコレステロール/磷脂質の比は, 正常水晶体で1.21であるのに対し白内障では1.47であることを述べている。

一方, Gooden ら<sup>7)</sup>は中性脂質と磷脂質をシアル酸, カラムクロマトグラフィーと二次元 TLC により分析し, 白内障水晶体形質膜分画のコレステロール/磷脂質比が1.5~2.77であるのに対し, 同年齢の正常水晶体のそれは1.0~2.46で有意差を認めていない。Dillon ら<sup>8)</sup>



- 1. standard cholesterol
- 2. Fraction I ( cytosol )
- 3. Fraction II ( lens fiber plasma membrane )
- 4. Fraction III ( Plasma membrane + water insoluble fraction )

Column : Cosmosil 5SL φ 4.6 x 150mm + Cosmosil 10SL φ 4.6 x 50mm  
Mobile phase : hexane - n butyl chloride - acetonitrile - acetic acid ( 90 : 10 : 1.5 : 0.01 )

Flow rate : 1.0 ml/min

Detection : chromatopac C-RIA 206nm

図 5 HPLC separation of cholesterol from human cataractous lens

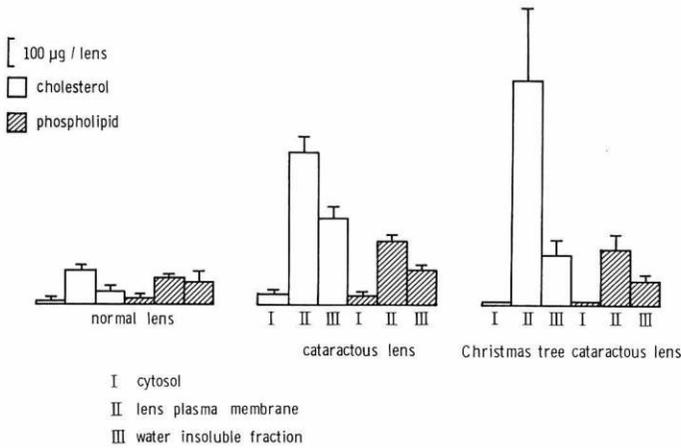


図6 Lipids of Human Lens

は老人の正常水晶体と老人性白内障水晶体における中性脂肪要素を HPLC で分析し、コレステロールの酸化物を検討したがいずれにも発見されなかった。しかし、現在迄に報告されていなかったコレステロール代謝物質12種のセラマイドと Vitamin E を抽出し同定し、これらは年とともに蓄積される傾向にあると述べている。

Zigman<sup>9)</sup>は老人水晶体と白内障水晶体では膜の磷脂質の著明な低下を認め、sphingomyelin が増加することを述べている。

Li<sup>10)</sup>は人眼水晶体を連続切片にしてコレステロールと磷脂質の分布を TLC によって分析した。正常水晶体では、磷脂質は比較的均一な分布を示したが、コレステロール/磷脂質の比は皮質から核へ向かうにつれ上昇しているが、白内障水晶体においても同様の傾向を認めている。コレステロール/磷脂質の比は膜の rigidity を現わすものであり、核部の形質膜において高値を示すことは、核部混濁の機構と皮質のそれとは異なっていることを示すものであるとのべ、また形質膜線維の皮質から核部への移行を示すものと説明している。

クリスマスツリーは1968年飯沼ら<sup>11)</sup>が老人性白内障水晶体の核部にクリスマスツリーの飾りを連想されるキラキラ光る結晶様物質を発見し命名したものである。その後組織学的研究によりその結晶がコレステロール及びコレステロールエステルであることが示された。魚谷ら<sup>12)</sup>の報告によると GC-MS によりコレステロールを検索し確認した結果、コレステロールは大部分は遊離型で、対側白内障水晶体に比べ増量してい

なかったとしている。

今回我々は、Sucrose density gradient 法にて老人性白内障水晶体、クリスマスツリー白内障水晶体、38歳透明水晶体を分画し、各分画のコレステロール、磷脂質を測定した。老人性白内障水晶体及びクリスマスツリー白内障水晶体は若年透明水晶体に比し、線維形質膜分画及び不溶性分画において明らかにコレステロールの高値を認め、またコレステロール/磷脂質比の上昇を認めた。クリスマスツリー白内障水晶体は老人性白内障に比し、その線維形質膜中のコレステロール値のやや上昇を認め、これがコレステロール結晶化の一因と考えられる。

我々は、従来人眼水晶体では殆んど検査できなかったコレステロールエステル<sup>13)</sup>を、老人性白内障水晶体線維形質膜より抽出し、GC-MS により確認し、その構成脂肪酸にパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸などを認めている<sup>14)</sup>。

老人性白内障水晶体の線維形質膜分画及び不溶性分画のコレステロールの高値とコレステロール/磷脂質比の上昇は、加齢による水晶体線維の核への移動を示すとともに、コレステロール形成とあいまって水晶体線維の硬化を示すものと考えられる。

## V 結 論

老人性白内障水晶体(10個)、クリスマスツリー白内障水晶体(2個)、38歳の透明水晶体(2個)について、Sucrose density gradient 法にて、水晶体を分画し、各分画のコレステロール、磷脂質を測定した。

老人性白内障水晶体の線維形質膜分画は、若年透明

水晶体の同分画に比し、コレステロールの高値を示しコレステロール/磷脂質比の上昇が認められた。また可溶性分画、即ち Cytosole 分画でのコレステロール値には老人性白内障水晶体と正常水晶体では差異を認めなかったが、老人性白内障不溶性分画のコレステロール値の高値が認められた。クリスマスツリー白内障においても線維形質膜分画にコレステロールの高値が認められ、これがコレステロール結晶化の一因と考えられた。

老人性白内障水晶体の線維形質膜分画及び不溶性分画でのコレステロールの高値と、コレステロール/磷脂質比の上昇は、加齢による水晶体線維の核への移動と水晶体線維の硬化を示す一つの指標と考えられた。

#### 文 献

- 1) **Ramaekers FCS, Dunia I, Dodemont HJ, Benedetti EL, Bloemendal H:** Lenticular intermediate-sized filaments: Biosynthesis and interaction with plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3208—3212, 1982.
- 2) **Hamilton JG, Comai K:** Separation of neutral lipids and free acids by highperformance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. *J of Lipid Res* 25: 1142—1148, 1984.
- 3) **Adams DA, Freauff SJ, Erickson KL:** Plasma membrane isolation and fatty acid analysis of membrane lipids from murine lymphocytes. *Analytical Biochemistry* 144: 228—232, 1985.
- 4) **Cotlier E, Obara Y, Toftness B:** Cholesterol and phospholipid in protein fractions of human lens and senile cataract. *Biochem Biophys Acta* 530: 267—278, 1978.
- 5) **Garner MH, Roy D, Rosenfela L, Garner WH, Spector A:** Biochemical evidence for membrane disintegration in human cataracts. *Medical Science* 78: 1892—1895, 1981.
- 6) **Rosenfela L, Spector A:** Changes in lipid distribution in the human lens with the development of cataract. *Exp Eye Res* 33: 641—651, 1981.
- 7) **Gooden MM, Takemoto LJ, Rintoul D:** Evidence for reduced lipid order in plasma membranes from cataractous human lenses. *Current Eye Res* 2: 367—375, 1982/1983.
- 8) **Dillon J, Mehlman B, Ponticorvo L, Spector A:** The state of neutral lipids in normal and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 37: 91—98, 1983.
- 9) **Zigman S, Paxhia T, Girsch S:** Lipids of human lens fiber cell membranes. *Current Eye Res* 3: 887—896, 1984.
- 10) **Li Luku So Lydia, Spector A:** Membrane cholesterol and phospholipid in consecutive concentric section of human lenses. *J of Lipid Res* 26: 600—609, 1985.
- 11) 飯沼 巖, 山中 守: Christbaumschmuck-Kat cataract の 1 例. *眼科* 10: 392—393, 1968.
- 12) 魚谷 純, 松戸武夫, 猪川嗣朗: クリスマスツリー飾様白内障 1 例の組織所見およびコレステロールについて. *眼臨* 74: 39—44, 1980.
- 13) **Broekhuysse RM:** Biochemistry of membranes, Mechanisms of cataract formation in the human lens edited by Duncan, G. 151—163, Academic Press, London, NY, Toronto, Sydney, San Francisco, 1981.
- 14) 藤原久子, 五島紳一郎, 片山寿夫, 中田敬一: 第25回日本白内障学会, 1986.

(第90回日眼総会原著)