

遺伝性白内障マウス水晶体のコレステロール代謝に関する研究 (図8, 表1)

中西 祥治 (鳥取大学医学部眼科学教室)

Studies on the Metabolism of Cholesterol in Lenses of Hereditary Cataractous Mice

Shoji Nakanishi

Department of Ophthalmology Tottori University School of Medicine

要 約

遺伝性白内障マウスとして代表的な *cac* マウスにおけるコレステロール代謝の一端を解明するため、その水晶体および血漿中の遊離型コレステロール (FC), エステル型コレステロール (EC) または総コレステロール (TC) などを分析し以下の結果を得た. 1) *cac* マウス水晶体の FC, TC 含有量は15日, 35日齢において対照マウス (*cac/ddY*) と比較して有意に低く, EC 含有量は35日, 60日齢で有意に高かった. 2) 35日齢 *cac* マウスの水晶体線維細胞膜画分の FC および TC 含有量は対照マウスと比較して有意に高かった. 3) *cac* マウスの血漿 TC 値は15日, 35日および60日齢で対照マウスと比較して有意に低かった. そして FC 値は15日および60日齢で, また EC 値は15日および35日齢で対照マウスより低かった. 以上の結果より, *cac* マウスでは対照マウスと比べて水晶体局所だけでなく全身的にもコレステロール代謝に変化があることが明らかになった. (日眼 92: 1530—1536, 1988)

キーワード: 遺伝性白内障マウス, 水晶体, コレステロール代謝, 遊離型コレステロール, エステル型コレステロール

Abstract

Lenses and plasma from the *cac* strain mouse ("Nakano mouse"), a representative hereditary cataractous mouse, were analyzed for free cholesterol (FC), esterified cholesterol (EC), and total cholesterol (TC) in order to elucidate cholesterol metabolism in this strain. In 15- and 35-day-old *cac* mice, FC and TC contents of lenses were significantly less than those in the respective control (*cac/ddY*) mice. The EC content of lenses were significantly greater in the *cac* mice of 35 and 60 days old than in control mice. Furthermore, lens fiber cell membrane fraction from 35-day-old *cac* mice contained significantly more FC and TC than that from the control mice. In addition, the plasma TC levels in 15-, 35- and 60-day-old *cac* mice were significantly lower than those in control mice. The plasma FC level in 15- and 60-day-old mice and the EC level in 15- and 35-day-old mice were significantly lower than the corresponding levels in corresponding control mice. These results demonstrate that the *cac* mouse has some abnormality in cholesterol metabolism not only locally in the lens but also systemically. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1530—1536, 1988)

別刷請求先: 683 米子市西町86 鳥取大学医学部眼科学教室 中西 祥治 (昭和63年5月26日受付)

Reprint requests to: Shoji Nakanishi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tottori Univ. School of Med.

86 Nishi-machi, Yonago 683, Japan

(Accepted for publication May 26, 1988)

Key words: Hereditary cataractous mouse, Lens, Cholesterol metabolism, Free cholesterol, Esterified cholesterol

I 緒 言

遺伝性白内障マウスとして代表的な cac マウス（いわゆる中野マウス）は白内障の動物モデルとして重要であり、その水晶体の組織学的、生化学的研究は数多くあるが脂質に関する研究は比較的少ない。

水晶体中の脂質の主要成分はコレステロールとリン脂質であり、これらはまた水晶体線維細胞膜の構成成分としても重要である^{1)~9)}。

そこで、本研究ではそれらのうちのコレステロールについて cac マウスにおける代謝の一端を解明するため、水晶体、その線維細胞膜画分、及び血漿中の遊離型コレステロール(FC)、エステル型コレステロール(EC)などを分析し、対照マウスと比較検討を行った。

II 実験方法

1. 実験動物及び水晶体試料

研究対象には cac マウスを用い、その対照として cac マウスと ddY マウスを交配した第1世代のマウス(cac/ddY マウス)を用いた。両マウスは生後15日、35日、または60日間飼育した後、体重を測定してから頸椎脱臼によって致死させ、直ちに両眼球を摘出し、実体顕微鏡下で後部強膜を切開して水晶体を摘出した。水晶体は濾紙上で硝子体や血液など他の組織付着物を除去し、湿重量を測定した後、バイアルびんに窒素とともに封入し、分析に供するまで -20°C 以下で冷凍保存した。

2. 水晶体中のコレステロールとスクアレンの分析

マウスの水晶体左右1対2個ずつを Folch 液（クロロホルム：メタノール=2:1, V/V）3.0ml とともに Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジナイズした。このとき、コレステロールの回収率を測定するために $[1, 2-^3\text{H} \text{ (N)}]$ コレステロール（60 Ci/mmol）及び $[\text{コレステリール}-4-^{14}\text{C}]$ オレエート（59.4 mCi/mmol（いずれも New England Nuclear）をそれぞれ $0.125\mu\text{Ci}$ 及び $0.025\mu\text{Ci}$ ずつ加えた。沈澱物を濾過して除去し、濾液に0.2倍容量の0.9%食塩水を加えて十分振とう後、遠心分離した。上層（水性メタノール層）を除去し、下層（クロロホルム層）を窒素気流下で蒸発乾固して総脂質残渣を得た。

この脂質残渣をシリカゲル・カラムクロマトグラ

フィー¹⁰⁾で FC 画分と EC 画分に分画した。すなわち、残渣をヘキサン2.0ml に溶解し、2.2g のシリカゲル（AR, 100メッシュ, Mallinckrodt）・カラムに注ぎ、エーテル：ヘキサン（1:49, V/V）、エーテル：ヘキサン（1:9, V/V）、エーテル：ヘキサン（1:1, V/V）、及びメタノール：エーテル（1:3, V/V）各20ml で順次溶出し、それぞれの溶出液を分画採取した（画分 I, II, III, 及びIV）。このクロマトグラフィーでは画分 I に EC, 画分IIIに FC が溶出される。

EC 画分を窒素気流下で蒸発乾固し、エタノール1.0 ml に溶解し、2M KOH0.2ml を加えて振とう後、 70°C に1時間加熱してけん化した。アルカリ性の水解液を水10ml で希釈後、ヘキサン10ml ずつで4回抽出し、合わせたヘキサンを水5ml ずつで3回水洗した後、減圧下に蒸発乾固した。得られた残渣を再び上述のシリカゲル・カラムで分画し、画分 I' と画分 III'（ダッシュ符号は EC 画分水解後の再クロマトグラフィーによる画分を示す）にそれぞれスクアレンと FC を溶出した。以上の操作により得られた FC（画分III）、水解後の EC（画分III'）及びスクアレン（画分 I'）の溶出液を窒素気流下で蒸発乾固後、 $50\mu\text{l}$ のアセトンに溶解し、一部はガスクロマトグラフィー（GC）による分析に供し、一部は放射活性測定の試料とした。

GC 分析は島津製 GC-3BF 型装置により1.5%OV-1（Gaschrom Q, 100—200メッシュ）を充填したガラスカラム（3mm×1.7m）を使用して行った。試料注入槽温度 255°C 、恒温槽温度 230°C 、キャリアガス（ N_2 ）流量 46.2ml/min とし、水素炎イオン化検出器を用いた。コレステロール及びスクアレンはそれぞれの標準標品（和光純薬及び半井化学製）を用いて保持時間を比較して同定し、またピーク面積による検量線を作成して定量した。この GC による定量値を各試料に内部標準として加えた $[^3\text{H}]$ コレステロール及び $[^{14}\text{C}]$ コレステリール・オレエートの回収率によって補正して各試料の分析値とした。それらの平均回収率（ $\pm\text{S.E.}$ ）は $[^3\text{H}]$ コレステロールについて $62.7\pm0.9\%$ （ $n=35$ ）、また $[^{14}\text{C}]$ コレステリール・オレエートについて $59.7\pm1.0\%$ （ $n=35$ ）であった。

放射活性測定は各試料をバイアルびんに移し、シンチレーター（ACS II, Amersham）10ml を添加して溶解後、液体シンチレーションスペクトロメーター

(TRI-CARB4640, Packard) によって行った。

3. 水晶体線維細胞膜画分のコレステロールとスクアレンの分析

水晶体線維細胞膜画分は Zigman ら⁵⁾の方法に従って調製した。すなわち、35日齢のマウスの水晶体8～16個(4～8対)に4.0mlの1mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えてホモジナイズし、10℃で13,000×g, 35分間遠沈した。沈渣を2.0mlの同じ緩衝液で1回洗浄後、8M 尿素液1.0mlを加えてサスペンションとし、この尿素液の濃度を4Mに希釈後、10℃で20,000×g, 20分間遠沈した。その沈渣を4M 尿素液2.0mlずつで4回洗浄した。この最終沈渣を水晶体線維細胞膜画分とし、水晶体の場合と同じ方法でコレステロールとスクアレンの分析を行った。

4. 血漿中のコレステロールの分析

マウスをエーテル麻酔下に開胸し、心臓穿刺により血液を採取した。分離した血漿中の総コレステロール(TC)及び遊離型コレステロール(FC)をそれぞれデタミナーTC“555”及びFC“555”(協和メデックス)を用いて酵素法により測定した。このさい、島津紫外可視分光光度計UV-160を用いた。

なお、実験結果は平均値±S.E.で表わし、Studentのt検定によって平均値の間の有意差を検討した。

III 結 果

1. 体重及び水晶体重量

cac マウスの体重はどの日齢においても対照マウスと比較して有意に少なく、約80%しかなかった(Table 1)。水晶体1個当りの湿重量も対照マウスより少なかったが、日齢を加えるにしたがって対照との相対比は小さくなった(15日齢80%, 35日齢64%, 60日齢57%)。また、35日齢について単位体重に対する水晶体1個の相対重量を比べると cac マウスでは対照マウ

スの82%しかなかった。

2. 水晶体のコレステロール及びスクアレン含有量

水晶体中のFCの分析結果をFig. 1に示した。FC含有量は対照マウスにおいて15日齢に比べて35日及び60日齢では高値を示した。しかし、35日齢と60日齢の間には有意差は認められなかった。cac マウスでも35日及び60日齢では15日齢に比べて高値を示した。しかし、対照マウスと比較すると15日及び35日齢では有意に低値であった。

Fig. 2はEC含有量を示す。ECはFCに比べると一般に微量にしか存在しなかった(両マウスの各日齢を通してFCの9～15%)。対照マウスにおいて15日齢と35日齢との間に差違がなかったが、60日齢では35日齢より有意に高かった。cac マウスでは加齢とともに著

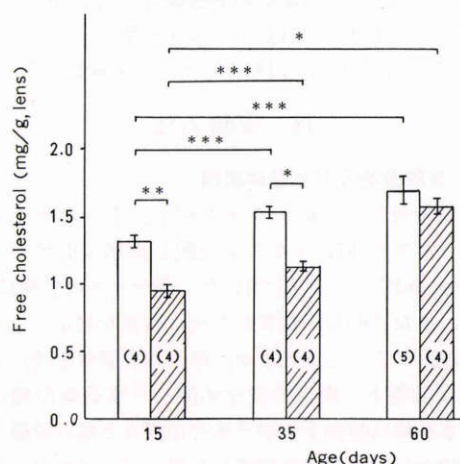


Fig. 1 Free cholesterol content of lenses. Results are expressed as the mean±S. E. Figures in parentheses represent the number of mice studied. Open bar, control; hatched bar, cac mouse. Significant difference: * $p<0.001$, ** $p<0.01$, *** $p<0.05$.

Table 1 Body weight and lens weight.

Values are expressed as the mean±S.E. Figures in parentheses represent the number of: ^amice, ^blenses, and ^clenses and mice. *Significantly different from controls at $p<0.001$.

Mouse	Body weight (g)			Lens weight			
				Wet weight (mg)			Relative wet weight (mg/g, body weight)
	Days of age			Days of age			Days of age
	15	35	60	15	35	60	35
Control	7.67±0.13(14) ^a	23.3±0.92(11) ^a	32.7±0.29(9) ^a	2.83±0.07(12) ^b	4.82±0.11(12) ^b	6.24±0.11(10) ^b	0.201±0.008(10) ^c
cac mouse	6.07±0.08(15)*	19.2±0.49(9)*	26.9±0.80(10)*	2.26±0.06(12)*	3.08±0.05(12)*	3.53±0.06(12)*	0.165±0.004(10)*

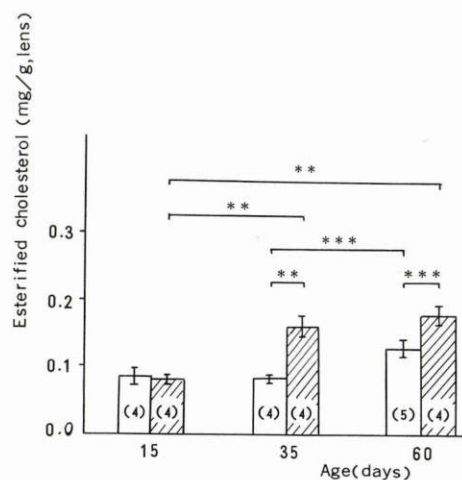


Fig. 2 Esterified cholesterol content of lenses. Legends are the same as those in Fig. 1.

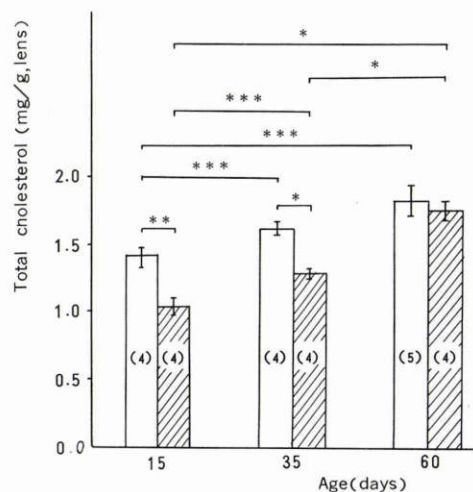


Fig. 3 Total cholesterol content of lenses. Values are given as the sum of those of free and esterified cholesterol. Other legends are the same as those in Fig. 1.

しく増加し15日齢では対照マウスとの間に差は認めなかったにもかかわらず35日及び60日齢では有意に高値を示した。

Fig. 3はTC含有量を示す。TCは対照マウスにおいて15日齢と比べて35日及び60日齢では高い値を示した。cac マウスでは15日及び35日齢において対照マウスと比較して有意に低値であった。

スクアレンについては各マウスにおける日齢の間、また各日齢における両マウスの間に有意差は認められ

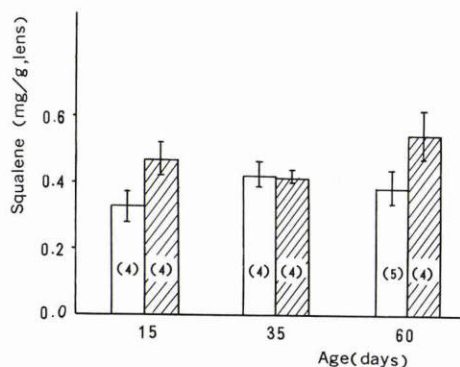


Fig. 4 Squalene content of lenses. Legends are the same as those in Fig. 1.

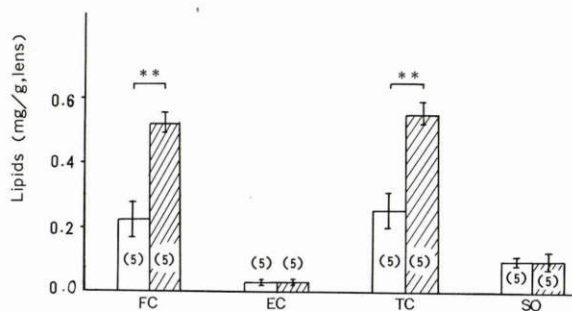


Fig. 5 Cholesterol and squalene contents of fiber cell membrane fraction of lenses from mice of 35 days. Figures in parentheses represent the number of pooled samples of 8-16 lenses. FC, free cholesterol; EC, esterified cholesterol; TC, total cholesterol; SQ, squalene. Other legends are the same as those in Fig. 1.

なかった (Fig. 4)。

3. 水晶体線維細胞膜画分のコレステロール及びスクアレン含有量

Fig. 5に35日齢の両マウスについての分析結果を示す。水晶体のこの画分においてもコレステロールはFCが大部分を占めECは少なかった。cac マウスではFCは対照マウスの2倍以上も含まれ、その分だけTCは高い値を示した。EC及びスクアレンの含有量については両マウス間に差は認められなかった。

4. 血漿コレステロール値

Fig. 6にTCの測定結果を示す。TC値は対照マウスでは15日齢と比べて35日齢では約60%に低下し、60日齢でもこれと変わらなかった。cac マウスではどの日齢においても対照マウスと比較しておよそ1/

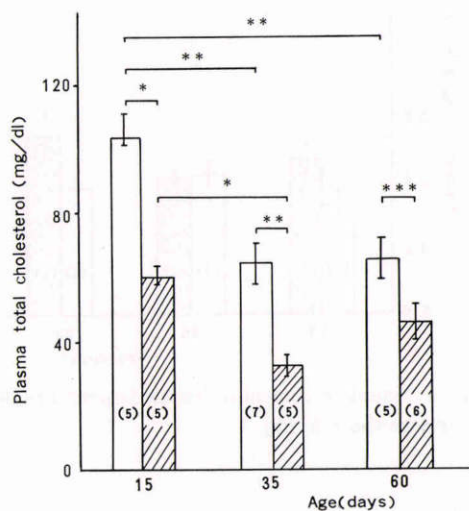


Fig. 6 Plasma total cholesterol level. Legends are the same as those in Fig. 1.

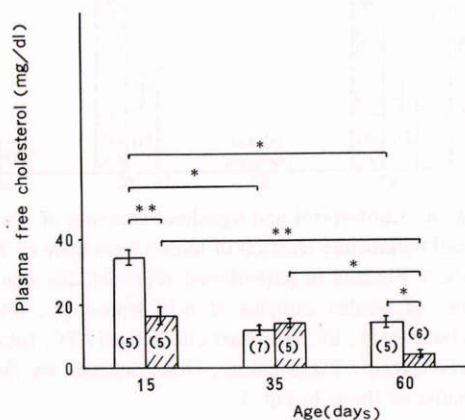


Fig. 7 Plasma free cholesterol level. Legends are the same as those in Fig. 1.

2~2/3という低い値を示した。

FC値も Fig. 7 にみられるように対照マウスでは15日齢に比べて35日及び60日齢では低値を示した。cacマウスでは対照マウスと比較して15日及び60日齢においてそれぞれ1/2及び1/3以下の低値を示した。

Fig. 8にEC値を示す。ECは両マウスの各日齢において一般にFCよりかなり高い値を示した。対照マウスでは15日齢に比べて35日及び60日齢では低い傾向を示した。cacマウスは15日及び35日齢では対照マウスと比較して低いEC値を示した。また、cacマウスでは35日齢で15日及び60日齢と比べて低いEC値がみられた。

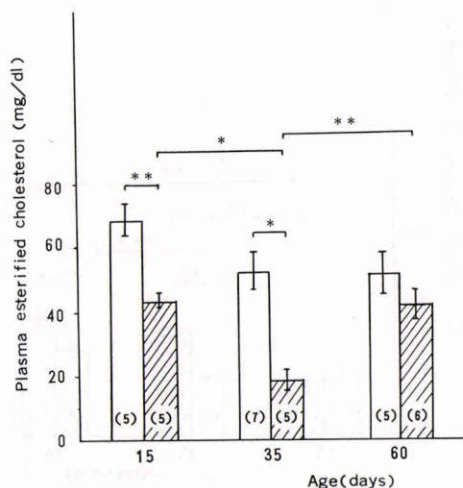


Fig. 8 Plasma esterified cholesterol level. Values are given as the difference between those of total and free cholesterol. Other legends are the same as those in Fig. 1.

IV 考 按

コレステロールはリン脂質とともに水晶体中の脂質の主要成分であり、水晶体線維細胞膜の構成成分として、その物理的・化学的秩序性を維持するために重要である⁸⁾。コレステロールには遊離型とエステル型があり、水晶体中では大部分が遊離型として存在するが¹⁾、血漿中では逆にエステル型が主体を占めリポ蛋白質の形で存在している¹¹⁾。

水晶体中のコレステロールは水晶体自身で合成されたもの^{8)12)~14)}と外部から取り込まれたもの、すなわち房水中のリポ蛋白質由来のもの⁴⁾⁶⁾から成っている。したがって、水晶体コレステロールの動態には当然血漿コレステロールも関与することが考えられる。

水晶体のコレステロール含有量については、ヒトやウシでは加齢に伴ってコレステロールが蓄積することが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。Obara ら¹⁾やCotlier ら²⁾は、ヒト白内障水晶体の蛋白非結合脂質に含有されるコレステロールは正常水晶体と比較して軽度減少しているが、蛋白結合脂質(膜脂質)に含有されるコレステロールは白内障で著明に増加していることから、白内障では脂質が蛋白質と強く結合して凝集反応を生じ、これが水晶体に混濁を生じさせると推論した。一方、Rosenfeld ら³⁾は正常水晶体と白内障水晶体のコレステロール含有量に差はないが、正常水晶体では大部

分が膜に存在しているのに対し、白内障水晶体では全体の1/2量しか膜に存在しないことを見だし、これは白内障では水晶体線維細胞膜の破壊が起きているためであると指摘した。

コレステロールは生体組織においてはアセチルCoAからスクアレン、ラノステロール、7-デヒドロコレステロールなどの多くの中間体を経て生合成される¹⁷⁾。Albers-Jacksonら¹⁴⁾はウサギ水晶体をインキュベートして、¹⁴C-酢酸からスクアレンなどの中間体を経てコレステロールが生合成されたことを報告している。魚谷¹⁸⁾もマウス水晶体中にコレステロール合成の中間体であるスクアレンが存在することを報告している。

cac マウスは劣性遺伝性白内障マウスで、生後15日目の水晶体は透明であるが、24日目前後に水晶体核部に pin head opacity が生じ、その後1～2週間で成熟白内障となる¹⁹⁾。その発生機序については、何らかの原因によりNa, K-ATPase 阻害物質が水晶体内に残存するためNa, K-ATPase 活性の低下が起こり、Na⁺の増加、K⁺の減少をきたして水晶体が膨潤し混濁が生じるとされている¹⁹⁾。

著者はこの研究において15日、35日、または60日齢のcac マウスと対照マウス(cac/ddY)の水晶体及び水晶体線維細胞膜画分のFCとEC(FC+EC=TC)及びスクアレン、また血漿中のFCとTC(TC-FC=EC)を測定して両マウスについて比較検討した。

まず、両マウスに認められた加齢に伴う水晶体のFC, EC, 及びTC含有量の増加傾向は、ヒトやウシについての報告¹⁵⁾¹⁶⁾と一致した。

特徴的な所見として、cac マウス水晶体中のFCとTCは15日、35日齢で対照マウスより有意に少なかったのに、逆にEC含有量は35日、60日齢では有意に多いという結果が得られた。このようにcac マウス白内障水晶体にECの割合が多いことは水晶体のコレステロール代謝に変化が起こっていることを示すものと考えられる²⁰⁾。

35日齢cac マウスの水晶体線維細胞膜画分を分析した結果、FC及びTCは対照マウスの2倍以上含まれていることがわかった。この結果はObaraら¹⁾ならびにCotlierら²⁾のヒト白内障水晶体についての報告と類似しており、cac マウス白内障水晶体線維細胞膜ではFCと蛋白質が複合体を形成して膜の流動性の低下をきたしているものと推察された。この細胞膜画分にもECが含まれていたがFCと比べると微量であ

り、cac マウスと対照マウスとで含有量に差違はなかった。また、スクアレンの存在も認められ、水晶体線維細胞においてもコレステロール合成系の存在の可能性が示唆された。

上述のように、この実験ではcac マウスについて水晶体、また水晶体線維細胞膜画分のコレステロール含有量が対照マウスと異なることを明らかにした。とくに、未だ白内障が発生しない15日齢でもすでに水晶体のFC及びTC含有量が正常より低いという事実からすると、このマウスには白内障発生以前より水晶体のコレステロール含有量の低下をきたす要因が存在するものと考えなければならない。ちなみにcac マウスでは14日齢ですでに正常マウスに比べてNa, K-ATPaseの活性が低いことが認められている¹⁹⁾。しかし、そのことがその日齢で水晶体のコレステロール含有量の低下を引き起こす直接の要因であるかどうかは目下不明である。

cac マウスの血漿TC値はどの日齢においても対照マウスより有意に低かった。このようなcac マウスの低コレステロール血症はこの遺伝性変異動物に固有な素因によるものと考えられる。一方、血漿コレステロール値は水晶体のコレステロール含有量に影響を及ぼし得るという報告¹⁹⁾があるので、全身性変化としての低コレステロール血症による水晶体局所におけるコレステロールの動態への影響も無視し得ないものと考えられる。この問題についてはさらに今後の検討が必要であらう。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました鳥取大学医学部眼科学教室藤永 豊教授、生化学教室小倉道雄教授、また直接の御指導ならびに御助力をいただいた生化学教室綾木義和助教授ほか教職員各位に深謝致します。

本論文の要旨は第92回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Obara Y, Cotlier E, Lindberg R, et al: Cholesterol, cholesterol ester, and sphingomyelin complexed to protein of normal human lens and senile cataracts. Doc Ophthalmol Proc Prog Lens Biochem Res 8: 193—203, 1976.
- 2) Cotlier E, Obara Y, Toftness B: Cholesterol and phospholipids in protein fractions of human lens and senile cataract. Biochem Biophys Acta 530: 267—278, 1978.
- 3) Rosenfeld L, Spector A: Changes in lipid distribution in the human lens with the development of cataract. Exp Eye Res 33: 641—650, 1981.

- 4) **Cenedella RJ**: Source of cholesterol for the ocular lens, studied with U18666A: a cataract-producing inhibitor of lipid metabolism. *Exp Eye Res* 37: 33—43, 1983.
- 5) **Zigman S, Paxhia T, Marinetti G, et al**: Lipids of human lens fiber cell membranes. *Curr Eye Res* 3: 887—896, 1984.
- 6) **Zelenka PS**: Lens lipids. *Curr Eye Res* 3: 1337—1359, 1984.
- 7) **Li LK, So L, Spector A**: Membrane cholesterol and phospholipid in consecutive concentric sections of human lenses. *J Lipid Res* 26: 600—609, 1985.
- 8) 小原喜隆: 白内障の生化学—最近のトピックス—. あたらしい眼科 3: 479—486, 1986.
- 9) 亀井 鏖: 脂質. 岩田修造 編, 水晶体, その生化学的機構. 東京, メディカル葵出版, 112—121, 1986.
- 10) 市田篤郎: アセトン溶性脂質, とくにグリセリドの微量分画定量法について. 北海道医誌 38: 55—66, 1963.
- 11) **Gibbons GF, Mitropoulos KA, Myant NB**: Biochemistry of cholesterol. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 109—110, 1982.
- 12) **Culp TW, Cunningham RD, Tucker PW, et al**: In vivo synthesis of lipids in rabbit iris, cornea and lens tissues. *Exp Eye Res* 9: 98—105, 1970.
- 13) **Cenedella RJ**: Sterol synthesis by the ocular lens of the rat during postnatal development. *J Lipid Res* 23: 619—626, 1982.
- 14) **Albers-Jackson B, Farris BD, Swindell RT**: Incorporation of ^{14}C acetate into the sterols of rabbit lens in organ culture. *Curr Eye Res* 2: 607—611, 1983.
- 15) **Davson H**: The Eye. New York, Academic Press, 403, 1969.
- 16) **Broekhuysen RM**: Membrane lipids and proteins in ageing lens and cataract. The Human Lens—in Relation to Cataract. Ciba Foundation Symposium 19, Amsterdam, London, New York, Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland, Associated Scientific Publishers, 135—149, 1973.
- 17) **Gibbons GF, Mitropoulos KA, Myant NB**: Biochemistry of cholesterol. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 138—166, 1982.
- 18) 魚谷 純: 水晶体中のステロールの動態に関する研究. 日眼 88: 155—161, 1984.
- 19) 岩田修造: 水晶体, その生化学的機構. 東京, メディカル葵出版, 361—370, 1986.
- 20) 藤原久子, 五島紳一郎, 片山寿夫他: 老人性白内障水晶体形質膜のコレステロールエステルについて. 日眼 91: 200—207, 1987.

(第92回日眼総会原著)