

老人性白内障における水晶体とその房水の蛍光 X 線分析 (図 7, 表 4)

渡 辺 博 (東邦大学医学部眼科学教室)

An X-ray Fluorescence Analysis of Human Senile Cataractous Lenses and Their Aqueous Humor

Hiroshi Watanabe

Department of Ophthalmology, Toho University School of Medicine

要 約

老人性白内障30眼 (初発・未熟・成熟各10眼) の水晶体と房水の組成について蛍光 X 線分析を行い次の結果を得た。1. 水晶体, 房水ともに Na, P, S, Cl, K, Ca, Zn, Mg の 8 元素が検出された。2. 白内障の進行に伴って水晶体では Na, P, S, Cl, Ca, Zn, Mg は増加し K のみが減少した。3. 白内障の進行に伴って房水では Na, Ca のみが減少し, その他の元素には著変は見られなかった。同一患者の水晶体と房水との元素分析で認められた白内障の進行に対応した特異的な変動はカルシウムが房水では減少し水晶体では増加したことで, これはナトリウムの減少と増加に先行して生じる。これらの結果から, 老人性白内障の進行に伴う水晶体の組成の変動は水晶体の膜機能の変化に依存することが示唆される。(日眼 92: 82—89, 1988)

キーワード: 老人性白内障, 蛍光 X 線分析, 水晶体, 房水, 元素分析

Abstract

Human senile cataractous lenses and their aqueous humor were analyzed by an X-ray fluorescence analyzer to determine whether any changes occurred in the composition of these tissues during the development of the senile cataract. Thirty human senile cataractous lenses and their aqueous humor were examined. The number of specimen at each stage was as follows: incipient 10, immature 10 and mature 10. In the elemental analysis of the lenses and aqueous humor, fluorescent X-rays of sodium, phosphorus, sulphur, chlorine, potassium, calcium, zinc and magnesium were detected. Among these lens elements only potassium decreased, whereas the other elements increased with the maturation of the cataract. In the elemental analysis of aqueous humor, sodium and calcium presented intensity changes opposite to those shown in the lens analysis. Clear changes could not be seen in the other elements. From these results, it seems that the elemental changes of the lenses are related not only to the elemental changes of the aqueous humor but also to the changes of membrane functions of the lens. The characteristic elemental changes during the development of senile cataract are the decrease of calcium in the aqueous humor and increase in the lens in advance of the decrease and increase of sodium. These results indicate that the elemental changes in the lens during the development of the senile cataract result from changes in the membrane function of the lens. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 92: 82—89, 1988)

Key words: Senile cataract, X-ray fluorescence analysis, Lens, Aqueous humor, Elemental analysis

別刷請求先: 143 東京都大田区大森西 6—11—1 東邦大学医学部眼科学教室 渡辺 博
(昭和62年 7月10日受付)

Reprint requests to: Hiroshi Watanabe, M.D. Dept. of Ophthalmol., Toho Univ. School of Med.
6-11-1 Omori-Nishi, Ōta-ku, Tokyo 143, Japan

(Accepted July 10, 1987)

I 緒 言

老人性白内障の成因について諸説があり種々検索が行なわれている。水晶体蛋白のSH基の酸化¹⁾、糖質²⁾、脂質含有量の変動³⁾および電解質バランスの変動²⁾⁴⁾⁵⁾に基づくという水晶体の組成変化に原因を求めるものや水晶体の細胞外液的役割の房水の組成変化に原因を求めるものがある⁶⁾。しかし同一眼の水晶体と房水の組成を同時に分析したものは著者らが発表した実験的白内障の家兎眼についての報告⁷⁾以外にはない。著者はこれまでの実験をさらに追求するために、今回は臨床的に老人性白内障の同一個体の水晶体と房水の組成を分析して進行過程における組成の変動の有無及びその意義を検索する目的で、近年医学領域にも応用が試みられている⁸⁾⁹⁾蛍光X線分析装置X-ray fluorescence analyzer (以下XRF)による元素分析を行なった。

XRFは試料にX線を照射して元素を励起し、発生した二次X線(蛍光X線)の強度を測定する機器で、固体および液体のいずれの試料の元素分析も可能であるという特性をもつ(Fig. 1)。

II 実験方法

年齢54歳~90歳の老人性白内障の水晶体と房水について検索を行なった。検体は白内障の進行過程による区分で初発白内障群(Group I)、未熟白内障群(Group II)、成熟白内障群(Group III)の3グループに分けた。各群の検体数はいずれも10眼とし合計30眼について検索した。房水は水晶体摘出前に輪部より翼状針にて穿刺採取し、その0.05mlについて分析した。水晶体は顕微鏡下で冷凍凝固、全摘出し、可及的速やかに真空凍

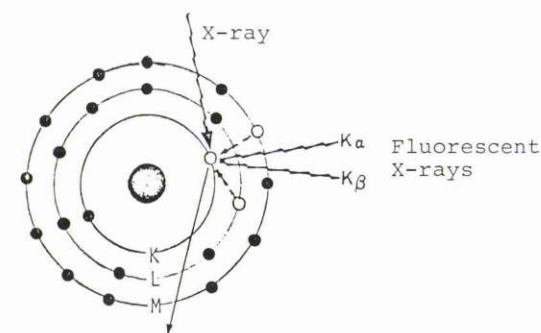
結乾燥機(山本製作所, SK200)を用いて凍結乾燥(-40℃, 平均50時間)した。試料はエネルギー分散型分光器を装着したXRF(RIGAKU Ultra Trace System)を用いて加速電圧20KV, 試料電流2mAで元素分析した。分析は間接法(Mo対陰極X線管球を励起した1次X線でTiフィルターを励起してその特性X線で試料を励起する分析法)で行なった。XRFの分析能力を判定する目的で前実験として正常な家兎眼より房水を採取し、その0.025ml, 0.050ml, 0.075ml, 0.100mlについて蛍光X線分析を行なった。検出された各元素の特性X線強度はいずれも検体の量に正比例する結果であった(Fig. 2)。したがってXRFが今回の分析に応用可能な機器であると判断して実験を行なった。

III 結 果

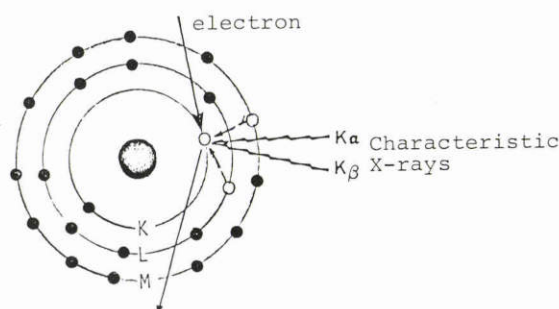
1) 水晶体の分析結果

老人性白内障の水晶体の分析で、Group I, II, III共にNa, P, S, Cl, K, Ca, Zn, Mgが検出された(Fig. 3)。各元素のX線強度(特性X線強度から連続X線強度を引いたもの)の単位重量当たりの相対強度をTable 1に示した。

Naの強度にはGroup IとGroup IIの間には有意差が認められなかったが、Group IIIはGroup I, IIに比べてより有意(0.1%)の高値を示した(Table 1, Fig. 4)。Pの値もNaと同様にGroup IとGroup IIの間には変化が認められなかったが、Group IIIはGroup I, Group IIに比べてより有意(0.1%)に高値であった(Table 1, Fig. 5)。ClもNaやPと同様にGroup IとGroup IIの間には有意差が認められなかったが、Group IIIはGroup I, Group IIに比べて



(X-ray fluorescence analyzer)



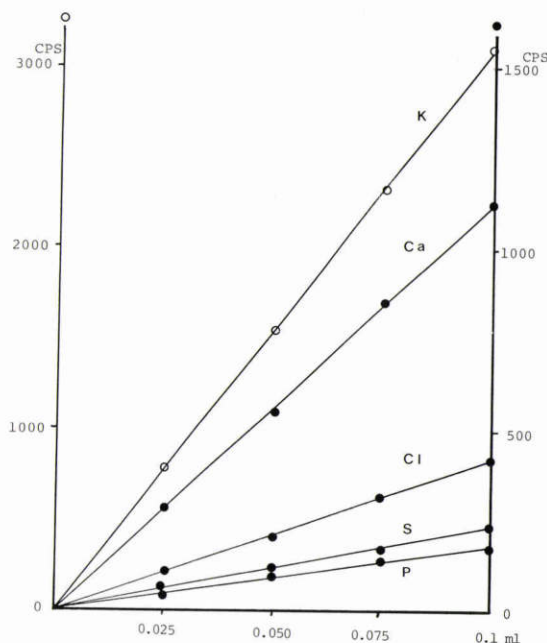
(Electron probe X-ray microanalyzer)

Fig. 1 mechanism of microbeam analysis

Table 1 means and standard deviations of the fluorescent X-ray intensities of the human senile cataractous lenses

Elements	Group I (n=10)	Group II (n=10)	Group III (n=10)
Sodium	44.7±13.3	46.3±12.6	118.6±19.3 ^{***}
Phosphorus	48.7±20.8	49.4±17.4	132.8±39.7 ^{***}
Sulphur	168.5±35.9	297.8±60.1 ^{***}	553.7±101.1 ^{***}
Chlorine	177.0±105.1	243.9±165.9	1,118.3±177.6 ^{***}
Potassium	157.6±44.4	79.1±15.0 ^{***}	43.9±14.7 ^{***}
Calcium	533.8±109.5	1,194.2±151.4 ^{***}	1,826.9±141.5 ^{***}
Zinc	24.1±2.3	33.4±3.3 ^{***}	51.5±6.1 ^{***}
Magnesium	55.7±11.6	85.0±33.2 [*]	155.0±24.7 ^{***}

Note: An asterisk (*) and triple asterisks (***) show the significant levels of 0.5% and 0.1% between group I and II, or I and III. Triple circles (***) show the significant levels of 0.1% between Group II and III.

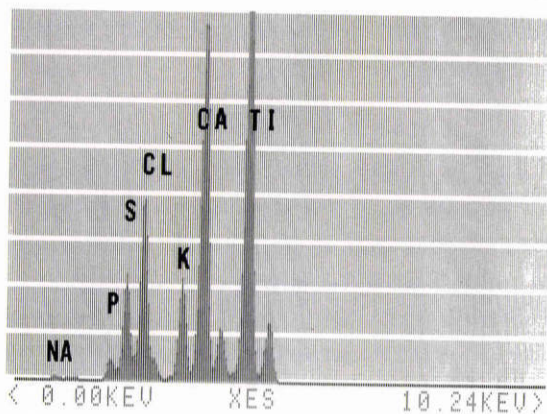
**Fig. 2** fluorescent X-ray intensity of P, S, Cl, K and Ca in the aqueous humor of the normal rabbit

より有意(0.1%)に高値を示した(Table 1, Fig. 6). Kは今回の分析で検出された8元素中で唯一白内障の進行とともに減少が認められた元素であった。その減少は等比級数的で Group I と Group II, Group II と Group III の間のいずれにも X線強度に有意差(0.1%)が認められた(Table 1, Fig. 4). Caの値は白内障の進行に対応して等差級数的な増加を示しその増加には各群間の全てに有意差(0.1%)が認められた

L-36-6

PR= S 200SEC 0 INT

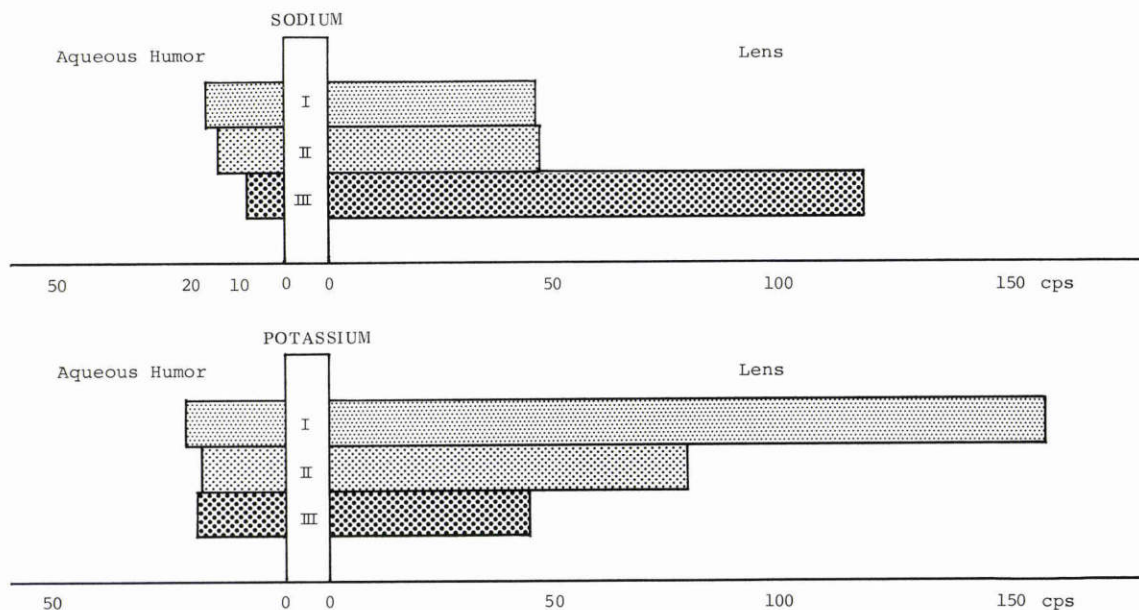
V=4096 H=10KEV 1:30 AQ=10KEV 10

**Fig. 3** fluorescent X-ray spectrum of the human senile cataractous lenses

(Table 1, Fig. 6). MgはGroup IとIIでは0.5%, Group IIとGroup IIIでは0.1%の有意差のある増加を示した(Table 1, Fig. 7). SはCaとほぼ同様に等差級数的な増加を示し各群間には有意差(0.1%)が認められた(Table 1, Fig. 5). ZnはGroup IとII, Group IIとIIIのいずれにも有意差(0.1%)のある増加が認められた(Table 1, Fig. 7).

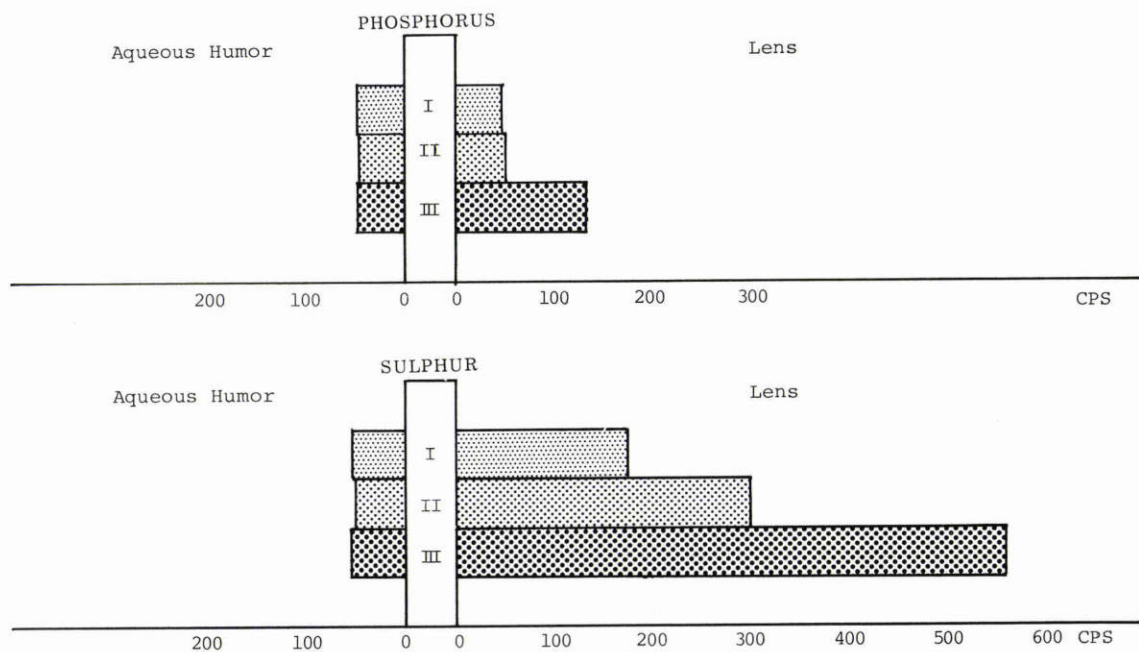
2) 房水の分析結果

房水の分析においても Na, P, S, Cl, Ca, K, Zn, Mgが検出された(Table 2). これらの元素のうち NaとCaのX線強度に白内障の進行に対応した有意



I: incipient cataract II: immature cataract III: mature cataract

Fig. 4 histograms of the fluorescent X-ray intensities of Na and K



I: incipient cataract II: immature cataract III: mature cataract

Fig. 5 histograms of the fluorescent X-ray intensities of S and P

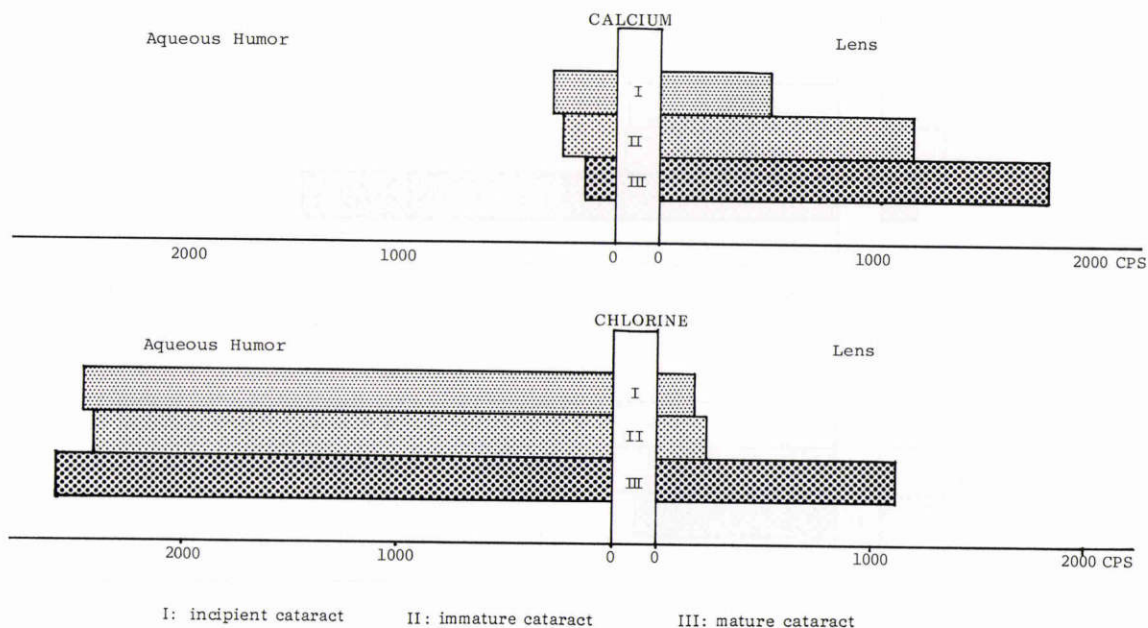


Fig. 6 histograms of the fluorescent X-ray intensities of Ca and Cl

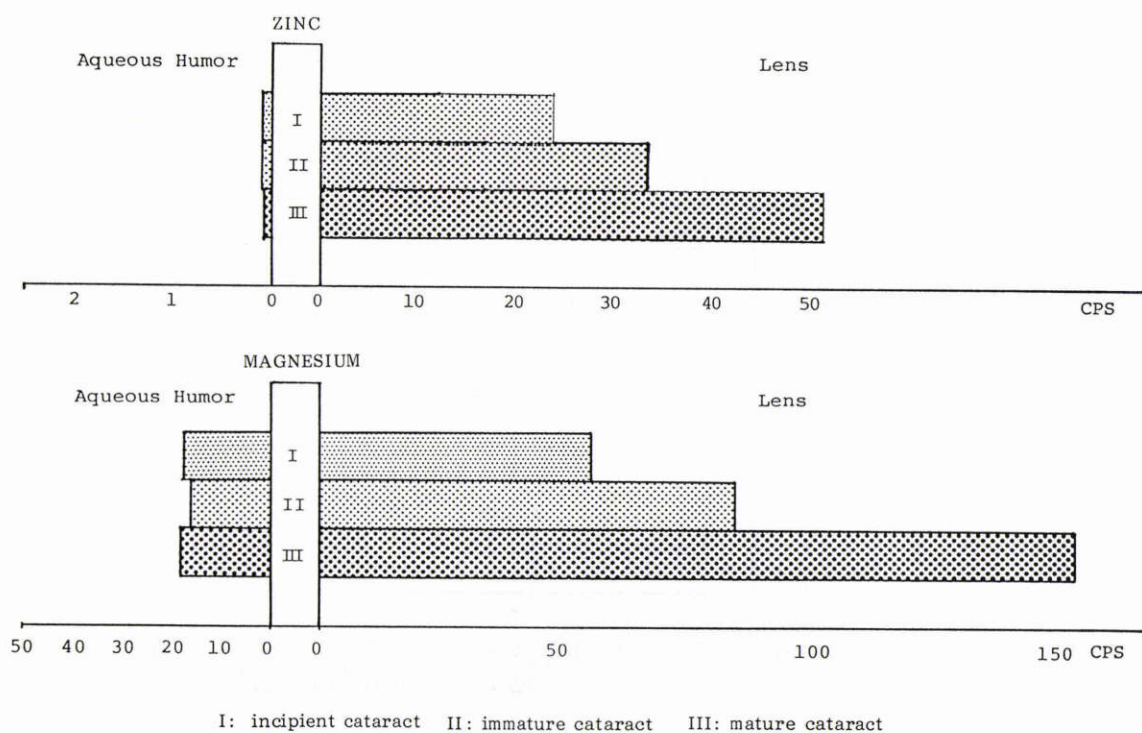


Fig. 7 histograms of the fluorescent X-ray intensities of Zn and Mg

(0.1%)の減少が観察された。両元素共に Group III がより低い値を示した (Figs. 4 & 6). P, S, Cl, K,

Zn および Mg はいずれも Group I, II, III の分析値が殆ど同じであった。このうち Zn を除く他の 5 元素で

Table 2 means and standard deviations of the fluorescent X-ray intensities of the aqueous humor in human senile cataracts

Elements	Group I (n=10)	Group II (n=10)	Group III (n=10)
Sodium	15.9 ± 1.1	13.3 ± 1.1 ***	7.6 ± 2.9 ***
Phosphorus	44.4 ± 5.3	43.5 ± 6.2	44.2 ± 3.2
Sulphur	58.1 ± 10.7	56.4 ± 4.9	59.9 ± 3.8
Chlorine	2,474.8 ±331.8	2,417.8 ±353.1	2,592.1 ±198.7
Potassium	21.5 ± 4.6	18.1 ± 5.8	18.7 ± 3.7
Calcium	290.7 ± 23.2	230.9 ± 22.5 ***	135.0 ± 39.9 ***
Zinc	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.23 ± 0.05
Magnesium	17.3 ± 7.1	15.8 ± 2.4	18.0 ± 7.7

Note : Triple asterisks (***) show the significant levels of 0.1% between Group I and II, or Group I and III. Triple circles (***) show the significant levels of 0.1% between Group II and III.

Table 3 instruments of microbeam analysis

Probe source (action)	(reaction)	Instrumention
electron	electron-ray emmision	Auger electron analyzer
	X-ray emmision	Electron probe X-ray microanalyzer (EPMA)
	electron scattering	Electron microscope Electron diffraction
X-ray	X-ray emmision	X-ray fluorescence analyzer (XRF)
ion	charged particle formation	Ion mass microanalyzer
Light (Laser)	emmision spectrum	Laser spectrum analyzer
	Raman spectrum	Laser Raman spectrophotometer

は Group II の値が Group I, III よりやや低い値(Figs. 4, 5, 6 & 7)であったが、有意差は認められなかった。

3) 水晶体と房水の分析結果の比較

水晶体と房水の分析結果を比較すると、水晶体、房水ともに白内障の進行に対応した X 線強度の変化を示した元素は Na と Ca のみであった。Group I と比較して Na は房水では Group II から減少し、水晶体では Group III から増加したのに対し Ca の増減は水晶体、房水ともに Group II からで、水晶体では増加が、房水では減少が見られた。また水晶体では Group III から P と Cl が、Group II から S, Mg, Zn が有意差をもって増加し K が減少したが、房水のこれらの各元素はいずれも有意の増減を示さなかった。

IV 考 按

人体を構成する組織や細胞のように、極めて均一な範囲が小さく、また状態の変化の著しい対象を解析するためにこれまでに多くの機器や技法が導入されてき

たが、microbeam analysis もその一つである (Table 3)。なかでも electron probe X-ray microanalyzer (EPMA) は形態に対応した元素分析が可能な機器として医学領域への応用も多い¹⁰⁾。著者らも EPMA を用いて老人性白内障の水晶体を分析することを試み、Na, P, S, Cl, Ca, K の変動を観察している¹¹⁾。今回の分析に用いた XRF は、EPMA に比して微小部位での形態に対応した分析ではおとるが検体の状態すなわち固体、液体にかかわらず分析が可能であり試料作製も容易でしかも試料の損傷もなく分析できるなどの利点がある機器である。今回の分析では EPMA で検出されなかった Mg や Zn も検出しており、今後眼科領域のみならず他の医学領域での利用が十分考えられる。

白内障の進行に伴う水晶体内電解質の変動について Duncan & Bushell¹²⁾は白内障の種類により電解質の変動が異なることを強調している。木下ら⁴⁾や山本ら⁵⁾は白内障の種類により電解質の変動が異なるのではな

くむしろ水晶体の混濁の程度により Na, Ca, Clが増加し, Kが減少するとしている. 老人性白内障の水晶体を混濁の程度により3段階(初発・未熟・成熟)に区分した今回のXRFによる分析でも Na, Ca, Clは増加し Kは減少するという結果で, 木下ら⁴⁾や山本ら⁵⁾の成績を支持するものであった. XRFによる分析では遊離のものも組織・細胞に結合したものもすべてを包括した元素分析のため遊離したものか否かは識別出来ない. しかし絶対量に有意差のある変動が生じたことは元素に出入りがあったことを示すものであると考えて結果の解析を試みた.

水晶体を構成する陽イオンのうち, NaとKは水晶体における多くの生化学的異常に応じて容易に変化する¹³⁾. 著者の検索では, 白内障の成熟とともにNaは増加, Kは減少したが, これは岩田ら¹⁴⁾のNaイオンは白内障の進行に従って増加し, Kイオンは逆に減少するという報告に一致した. 老人性白内障水晶体における両元素の増減を, そのNa/K蛍光X線強度化(モル比ではない; 蛍光X線強度におよぼす生体組織, 測定方法および採取方法の影響については今後検討する)により比較すると(Table 4), 水晶体混濁が軽度である初発群(Group I)の値は, 0.284であったが, 混濁が進んだ成熟群(Group III)では約10倍の2.701となった. 房水におけるNa/K値は初発群(Group I)では0.740と水晶体値よりも高い値であったが, 成熟群(Group III)では0.406と低下し, これは水晶体のNa量の増加とK量の低下によると考えられる. このことから房水中のNaが水晶体内に結合型Naとして蓄積されるとともに, 水晶体膜の変化による水晶体外へのKの排出が促進されたことが示唆される. 岩田ら¹⁴⁾は水晶体のイオンレベルは水晶体混濁因子の一つとされているCaイオンレベルとは正の相関があると述べているが, 今回の分析ではCaの増加はNaの増加に先行して観察された. CaイオンはMgイオンとともに水晶体の生理機能に関係する2価の陽イオンである. 特にCaイオンは水晶体の内部と外部の環境(房水)における濃度勾配が重要であるとされている¹³⁾. すなわち哺乳動物の正常な水晶体中のCa濃度は房水のCa濃度よりも低い¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾. そのCaがNaの増加の少ない未熟群(Group II)から等差級数的に増加し, また房水中のCaは減少した. これはCaが房水から水晶体内に移行し蓄積されたことが考えられる. 水晶体の混濁とCaイオンとの関連性については多くの報告があるが未だその増加機構については十分に説明されてい

Table 4 change in Na/K ratio of fluorescent X-ray intensities of lens and aqueous humor in the progress of human senile cataracts

	Group I	Group II	Group III
Lens	0.284	0.585	2.701
Aqueous humor	0.740	0.735	0.406

い. 基本的には水晶体タンパクの親和性の問題と考えられているが, その素因としてCaの透過性に関与する膜構造の破壊や1価陽イオンバランスの変動による蛋白質の変性などがあげられている¹³⁾. 1価陽イオンバランスの変動に先行してCa量に変化が認められたことは岩田¹⁷⁾の遺伝性白内障マウス水晶体におけるCa含量についての報告と対比すると, 今回検索したより早期の白内障水晶体においてすでにCaの増加がおこっていることが考えられる. 水晶体膜の破壊又はCaイオン輸送系の障害により房水から水晶体へCaイオンが流入・蓄積し次いで1価の陽イオンに変動がおきたと考えるべき結果であった. もう一つの2価陽イオンであるMgについての報告は少なく, 水晶体における機能も補酵素としての役割や膜構造安定化作用などが知られているのみである¹³⁾. 木下ら⁴⁾やSwanson & Truesdale¹⁸⁾は変化がないと報告しているが, 筆者の分析では有意差のある増加がみられており今後の検索を要する.

その他の元素のうちClは生体内では1価の陽イオンの対イオンとして存在し, 浸透圧, 酸塩基平衡, 水分保持に関する1価陰イオンである. このClも白内障の進行に伴って増加したが, これはMarainiら¹⁵⁾の報告に一致する. 房水のCl量には有意の増減がないのに水晶体のClが増加したことは, Caによる水晶体内の1価イオンに対する作用が陽イオンのみならず陰イオンにも及ぶことが考えられる. またPもClと同様水晶体の初発群と未熟群では差異がなく成熟群にのみ増量が認められ, かつ房水のそれには変化がなかった. 両者で検出されたPは有機りん酸化合物に対応するものと考えられるがPがどのような構造物として存在するかが不明であるため成熟群におけるPの増量の意義を判別し難いが, Caの増量とも対応するのでリン酸カルシウムであることも考えられる. Sも白内障の進行に伴い水晶体では増加したが房水では変化がみられなかった. Sの強度は蛋白質に含有されるSや含硫アミノ酸, あるいは無機のSイオンを表示していると考えられるが, 今回の実験方法ではどの種類かを

同定することはできず、今後さらに物質の同定を進める必要がある。白内障の水晶体における蛋白の変化については1価陽イオンの流入による変性や混濁とともにシスチンが減少し、シスチンが著しく増量することが報告されている¹⁹⁾。今回の分析で示された水晶体のSの増量を、構成蛋白質のうちSH基をもつβクリスタリンが白内障では減少する報告と考え合わせると、含硫アミノ酸あるいは無機Sイオンなどの増加を示すものと考えられる。また今回の研究でも白内障の進行過程で水晶体が時に茶褐色を呈する例がみられており、Sの増量が水晶体の硬化や有色化に関与するとすれば、レーザーラマン(Table 3)などによる構成分子の分析も必要となろう。

種々の微量元素のうちZnのみが検出されたが、これは今回の検索では一次X線の励起源としてTiフィルターを用いたためである。従って異なったフィルターを用いてより広範な分析を実施すれば、その他の微量元素であるCo, Cu, Fe, Seをも検出が可能である。Znと白内障の進行との対応に関しては一定の知見がない²⁰⁾。また同じ2価イオンであるSeがCa蓄積を起こさせ白内障を誘発させるという報告²¹⁾があるが、Seなどのアルカリ土類金属であるCdにたいし微量のZnが拮抗作用をもつこと(Gunn et al.²²⁾)からZnの蓄積には水晶体混濁との関連も充分考えられ興味ある結果である。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました当教室河本道次教授に深謝致します。また御協力いただきました本学第二解剖学教室猪俣賢一郎教授に感謝し、御指導、御校閲を賜りました同教室野首和人助教授ならびにXRF分析を担当していただいた理学電気工業(株)の各位に深謝致します。なお本論文の要旨の一部は25th International Congress of Ophthalmology (Rome, 1986) 及び第90回日本眼科学会総会(四日市, 1986)において口演した。

文 献

- 山本覚次, 松尾英彦, 大本佐和子, 山元和子: 老人性白内障の成因に関する研究, 日眼 76: 1309—1317, 1972.
- 船橋正員, 早野三郎, 小森敏郎, 小野英樹: 人眼白内障の糖質, 電解質について, 日眼 84: 1512—1516, 1980.
- 小原喜隆, 佐瀬義彦, 玉田康房, 一迫浄・老人性白内障における脂質の変動, 眼紀 30: 332—337, 1979.
- 木下 茂, 上野則夫, 塩崎陽一, 豊島健吉: 人眼白内障における水晶体内電解質の変動について, 眼紀 29: 558—561, 1978.
- 山本覚次, 錦織敏治, 矢道健介, 花房直路: 老人性白内障の分類とその生化学的背景について, 臨眼 33: 1021—1026, 1979.
- 大岡良子, 河本道次: 白内障と房水酸塩基平衡, 日眼 77: 167—175, 1973.
- 橘川真弓, 馬場敏生, 渡辺 博, 大岡良子, 野首和人: 家兎眼の実験的外傷性白内障におけるX線マイクロアナリシスと房水塩基平衡, 日眼 85: 851—861, 1981.
- Ong PS, Lund PK, Litton CE, Mitchell BA: An energy dispersive for analysis trace elements in human blood serum. *Advances in X-ray Analysis* 16: 124—133, 1973.
- 松本和子: エネルギー分散蛍光X線による生体試料中の微量元素の分析, 臨床検査 24: 762—766, 1980.
- 水平敏知, Russ JC: 分析電子顕微鏡, 日本メディカルセンター, 東京, 1978.
- Watanabe H, Komoto M, Nokubi K, Inomata K: X-ray microbeam analysis of human cataractous lenses (in press). 10th Congress of the Asia Pacific Academy of Ophthalmology India, 1985.
- Duncan G, Bushell AR: Ion analysis of human cataractous lenses. *Exp Eye Res* 20: 223—230, 1975.
- 岩田修造編著: 水晶体, その生化学的機構, メディカル葵出版, 東京, 1986.
- 岩田修造, 竹鼻 真, 中村正雄: ヒト白内障水晶体の生化学的研究(第1報), 水晶体混濁状態におけるヒトと動物のイオン変動の比較, 眼紀 29: 362—368, 1978.
- Maraini G, Bracchi DP, Campanini G: Changes in calcium content of the human lens in senile cataract. *Exp Eye Res* 24: 98—98, 1977.
- 福井成行: 水晶体の透明性とカルシウムとの関連関係, 日眼 76: 1303—1308, 1972.
- Iwata S: Process of lens opacification and membrane function. *A Review Ophthalmic Res* 6: 138—154, 1974.
- Swanson AA, Truesdale AW: Elemental analysis in normal cataractous human lenses and tissue. *Biochemical Biophysical Research Communications* 45: 1488—1496, 1971.
- Takemoto LT: Amino acid composition of normal and cataractous human lens proteins. *Exp Eye Res* 23: 1—7, 1976.
- Karcinoglu ZA: Zinc in the eye. *Surv Ophthalmol* 27: 114—122, 1982.
- Bince GE, Hess JL: Biochemical changes associated with selenite induced cataract. *Exp Eye Res* 33: 505—514, 1981.
- Gunn SA, Gould TC, Anderson WAD: The selective injurious response of testicular and epididymal blood vessels to cadmium and its prevention by zinc. *Am J Pathol* 42: 685—702, 1963.

(第90回日眼総会原著)