

角膜上皮の糖代謝におけるオキシレーションの存在と 代謝阻害剤の及ぼす影響 (図3)

坪 田 一 男 (慶応義塾大学眼科, 国立栃木病院眼科)

Ronald A. Laing (Boston University)

Glycolytic Oscillations in the Rabbit Corneal Epithelium

Kazuo Tsubota and Ronald A. Laing*

Keio University School of Medicine, National Tochigi Hospital

*Boston University School of Medicine

要 約

角膜上皮の還元型ピリジンヌクレオチド (PN) と酸化型フラボプロテイン (Fp) を経時的に測定し PN/Fp 比をとるとオキシレーション (代謝レベルの振動) が存在する。このオキシレーションが糖代謝由来のものであることを確かめるために代謝阻害剤を用いてその影響を検討した。PN と Fp の測定にはこれら補酵素の特徵的な蛍光を用いるレドックスフルオロメーターを使用した。白色家兎角膜上皮の PN/Fp 比を生体、摘出眼球、組織培養の3条件にて90分間連続測定した。更に1mM の KCN と iodoacetamide を投与し PN/Fp 比の変化を測定した。PN/Fp 比は3条件のいずれでもオキシレーションを示しその周期は22~32分で振幅は1.2~2.2であった。KCN 投与によりこの比は増加し iodoacetamide にて低下した。ミトコンドリアの呼吸阻害剤である KCN の投与だけでは PN/Fp 比のオキシレーションは消失しないが、糖代謝の完全な阻害剤である iodoacetamide を用いるとオキシレーションは消失した。よってオキシレーションの由来は主に角膜上皮の解糖系に存在すると考えられた。(日眼 92: 959-962, 1988)

キーワード: オキシレーション, 角膜上皮, 糖代謝, 代謝阻害剤, レドックスフルオロメーター

Abstract

Proper corneal metabolism is essential to the maintenance of normal corneal epithelial function. Corneal redox fluorometry, which monitors the metabolic state by measuring signals from reduced pyridine nucleotides (PN) and oxidized flavoproteins (Fp), was used to study metabolic changes non-invasively in the cornea under a variety of conditions. Under normal conditions in the cultured cornea, enucleated whole globe, or in vivo, the metabolic ratio (PN/Fp) was observed to oscillate over a range of amplitude from 1.2 to 2.2 during a period from 22 to 32 minutes depending on the cornea being measured. A respiratory inhibitor (1mM of KCN) increased this ratio with oscillation. In contrast, a total metabolic inhibitor (1mM of iodoacetamide) decreased this ratio and the oscillation disappeared. The oscillation is believed to represent oscillations of enzyme and substrate concentrations in the glycolytic pathways that manufacture the ATP necessary for normal epithelial function. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 959-962, 1988)

Key words: Corneal Epithelium, Oscillation, Glycolysis, Redox Fluorometry, Pyridine Nucleotides

別刷請求先: 320 栃木県宇都宮市中戸祭 1-10-37 国立栃木病院眼科 坪田 一男 (昭和63年 1 月 8 日受付)

Reprint requests to: Kazuo Tsubota, M.D. National Tochigi Hospital

1-10-37, Nakatomatsuri, Utsunomiya Tochigi, Japan

(Accepted for publication January 8, 1988)

I 緒 言

角膜の透過性を維持してゆくためには、正常の生理的機能が必要である。角膜の生理的機能の重要なひとつである角膜内皮によるポンプ作用にはATPをはじめとするエネルギー源を要するが、この供給はミトコンドリアによる酸化的磷酸化、嫌気性解糖、ペントースシャントにより行なわれている^{1)~3)}。コンタクトレンズによる酸素分圧の低下⁴⁾⁵⁾や糖尿病における血糖の上昇⁶⁾⁷⁾はこれら糖代謝に直接影響を与えるため、角膜における糖代謝の状態を知ることが重要なことと考えられる。

現在までの角膜の評価法には、角膜の透過性測定、角膜厚測定、スベキュラーマイクロスコープによる内皮観察など様々なものがあるが代謝状態を侵襲なく測定できるものはなかった。最近 Laing らがレドックスフルオロメーターを用いて角膜の上皮、実質、内皮の3層の酸化型ビリジンスクレオニド(PN)と酸化型フラボプロテイン(Fp)を測定する方法を開発し⁸⁾⁹⁾、その後 Masters らが酸素分圧の低下によるPNの変化を測定することに成功している¹⁰⁾。

今回我々はさらにこのレドックスフルオロメーターの精度を上げて、連続して角膜上皮のPNおよびFpを測定し、正常状態におけるPN/Fp比の動態とPN/Fp比に対する代謝阻害剤の影響について若干の知見を得たので報告する。

II 方 法

レドックスフルオロメーターは還元型ビリジンスクレオニドと酸化型フラボプロテインをその特徴ある蛍光を用いて測定するがその原理はビリジンスクレオニドが約360nmの励起にて約460nmの蛍光を発生し、フラボプロテインが約440nmの励起光にて約550nmの蛍光を発生することにある。使用したレドックスフルオロメーターはスベキュラーマイクロスコープを利用してその測定部位を決めることができるようになっている。このシステムはマイクロコンピュータにて制御されておりフィルターの自動交換、データの収録、保管、解析、角膜内皮から上皮への自動スキニングを行なうことができる¹¹⁾。

測定の際には焦点を測定部位に合せ、0.1秒間の蛍光を測定した。PNおよびFpを0.1秒毎に30回測定しこの30回の蛍光測定の平均値と標準偏差をコンピュータにて計算して1データとして取り扱った。測定器

械の安定性を確かめるためにPNとFpに類似した蛍光色素を持つPolymethyl methacrylate (PMMA)人工角膜を使用して90分間の測定を行なった。

実験にはそれぞれ4羽の白色家兎を用いた。まず生体における測定では白色家兎(3~4kg)をケタミンおよびxylazineの筋注にて麻酔し、レドックスフルオロメーター下に家兎を固定し角膜上皮のPN/Fp比を連続して90分測定した。測定中には必要に応じて麻酔薬を追加した。摘出眼球における測定ではキシロカインにて球後麻酔を行なった後眼球を摘出しこの眼球をレドックスフルオロメーター下に上皮を上にして固定しPN/Fp比を連続測定した。組織培養液中の測定では眼球より強角膜切片を作成しMaCarely-Kaufman Medium (MK-medium)中にいれてPN/Fp比の測定を行なった。測定の際に生体および摘出眼球では上皮とレドックスフルオロメーターの測定レンズの間には1%メチルセルロースを使用した。また測定はすべて室温にて行なった。

代謝阻害剤の影響をみる実験では1mM KCNと1mM iodoacetamideをそれぞれMK-medium中に投与しそれぞれのPN/Fp比の変化を観察した。

III 結 果

本装置により人工角膜を測定した結果を図1に示す。PN/Fp比は安定しており、90分間の平均及び標準偏差は 1.5 ± 0.03 であった。

生体、摘出眼球、MK-medium中の3状態のPN/Fp比の連続測定ではすべての実験にて人工角膜と異なりオシレーションが観察された。典型的な結果を図2

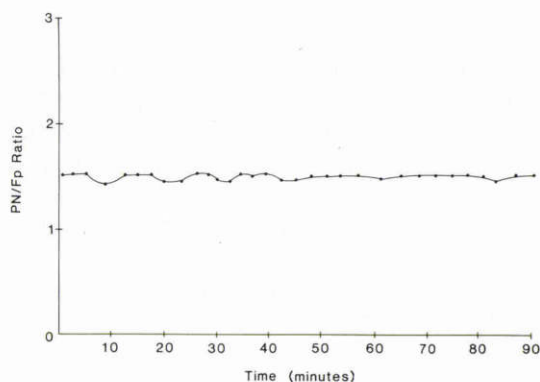


図1 PMMA人工角膜のPN/Fp比の経時的変化。比はほぼ一定しておりオシレーションは認められない。

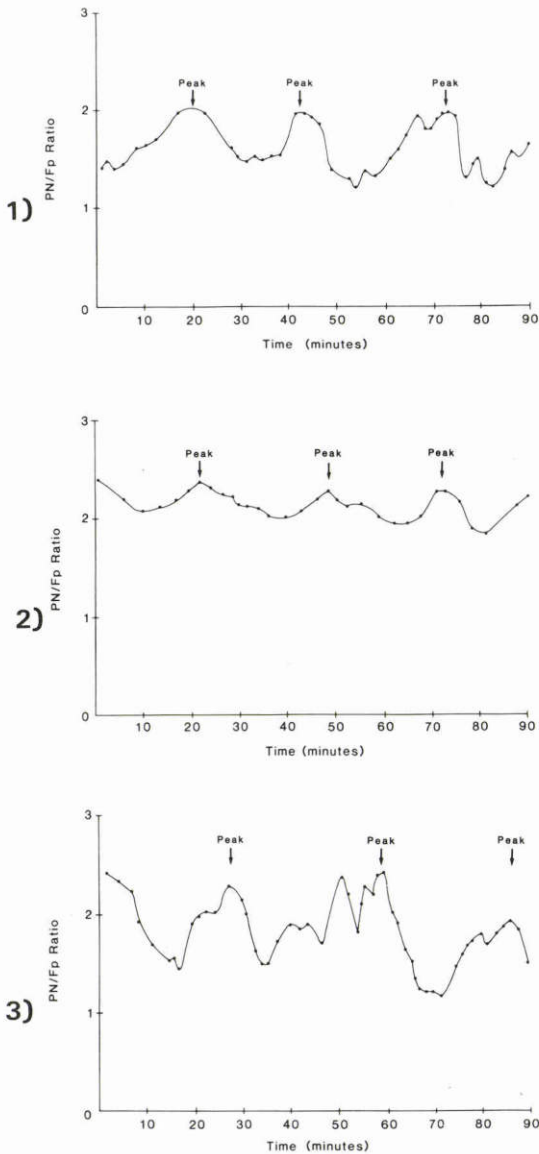


図2 上より, 1) In vivo 家兎角膜上皮, 2) 摘出眼球の角膜上皮, 3) 強角膜切片の角膜上皮における PN/Fp 比の経時的変化. それぞれにオキシレーション (代謝レベルでの振動) が認められる. ↓はピークをしめす.

に示す. 生体では PN/Fp 比は 1.2~2.2 (平均 1.7) の振幅を示し, 周期は 22~28 分であった. 摘出眼球と MK-medium 中の角膜ではそれぞれ 1.8~2.4 (平均 2.1) と 1.2~2.4 の振幅で周期はどちらも 22~32 分であった.

1mM の KCN が投与されると角膜上皮の PN/Fp

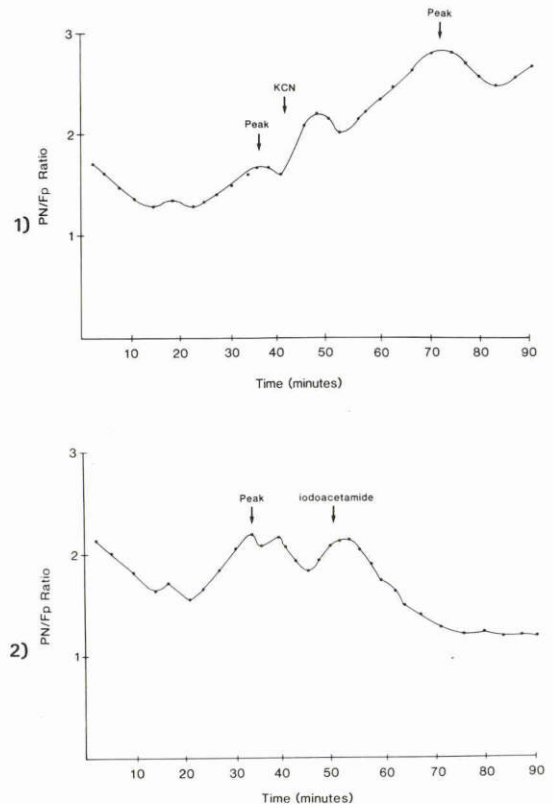


図3 強角膜切片上皮における PN/Fp 比に対する, 1) 1mM KCN と 2) 1mM iodoacetamide の影響. ↓は代謝阻害剤の投与をしめす. KCN 投与により PN/Fp 比は増加するがオキシレーションは消失しない. 一方 iodoacetamide 投与により PN/Fp 比は低下しオキシレーションも消失した.

比はすぐに増加するがオキシレーションは続いていた. 一方 1mM の KCN を投与するとこの比は低下しオキシレーションは消失した. 典型的な例を図 3 に示す.

IV 考 案

角膜上皮の糖代謝におけるオキシレーションの存在はいまだ報告されておらず今回が初めての報告である. 人工角膜による PN/Fp 比の測定では安定した値が得られているのでこのオキシレーションは装置由来のものではなく角膜自身からのものと考えられる. さらに生体, 摘出眼球, MK-medium 中の強角膜切片の 3 条件において同様のオキシレーションが得られたことはこれが呼吸や循環などの全身の影響のものでなく角膜自身の持つ代謝レベルのオキシレーションであることを示唆している.

KCN はミトコンドリアの呼吸阻害剤として有名であり¹²⁾, 投与すると PN は上昇し, Fp は低下することにより PN/Fp 比は増加することが知られている¹¹⁾. 今回の投与により正に PN/Fp 比は増加したがこの際オキシレーションは続いており, PN/Fp 比のオキシレーションはミトコンドリア由来でないことが示唆された.

Iodoacetamide はミトコンドリアの呼吸に加えて解糖系自体を阻害する強力な代謝阻害剤である¹²⁾. この薬剤の投与により PN/Fp 比は低下するがこの際オキシレーションも消失することは興味深い. KCN のみでは消失しないこのオキシレーションが解糖系の阻害によって消失することより, このオキシレーションは解糖系自体に大きく関連するものと思われた.

解糖系のオキシレーションの存在は理論的に実在が推測されているものの, 生体または動物細胞において, 実験的に証明された報告はない. 今までの報告ではプリンやピリジンヌクレオシドのオキシレーションがイースト菌や実験系にて観察されているのみであり^{13)~17)}, 今回の実験にて生体および摘出組織にてオキシレーションが観察されたことは大変興味深い. Tornheim らは解糖系のオキシレーションの振幅や周期は pH や酵素濃度に依存しその存在は ATP/ADP 比を高く保つことにあると報告している¹⁸⁾. 自動制御機構はある物質の濃度を一定レベルに保つフィードバック機構である. 機械工学ではよく知られているようにフィードバック機構は時間の遅れを持ちこれがオキシレーションの原因となりうる. よく知られている例はサーモスタットによりコントロールされている部屋の温度調節機構であり部屋の温度は一定の温度内でオキシレーションしている. 解糖系における化学反応に時間的遅れが生じ, この制御機構にオキシレーションが生まれることは十分考えられることである. この点において細胞における解糖系のオキシレーションの解明にレドックススルオロメーターの方法論が役立つと考えられ採来の研究が期待される. 角膜の重要な生理機能であるポンプ作用や上皮修復機転は ATP に依存しており, 角膜糖代謝を研究する上でオキシレーションの存在は重要であると思われた.

御校閲覧きました産業医科大学眼科秋谷忍教授, 慶応義塾大学眼科植村恭夫教授に謝辞致します.

References

- 1) Kinoshita JH, Masurat T: The direct

- oxidative carbohydrate cycle of bovine corneal epithelium. Arch Biochem Biophys 53: 9—19, 1954.
- 2) Kinoshita JH, Masurat T, Helfant M: Pathways of glucose metabolism in corneal epithelium. Science 122: 72—73, 1955.
- 3) Thoft RA, Friend J: Corneal epithelial glucose utilization. Arch Ophthalmol 88: 58—62, 1971.
- 4) Polsle KA, Decker M: Oxygen tension under a contact lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 108—113, 1979.
- 5) Thoft RA, Friend J: Biochemical aspects of contact lens wear. Am J Ophthalmol 80: 139—145, 1975.
- 6) Hay A, Cheng HM, Gonzalez G, Kenyon KR: Activation of the sorbital pathway in the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl) 27: 31, 1986.
- 7) Friend J, Kiorpes TC, Thoft RA: Insulin sensitivity and sorbitol production of the normal rabbit corneal epithelium in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 913—919, 1980.
- 8) Laing RA, Fischbarg J, Chance B: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide fluorescence from the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 96—102, 1980.
- 9) Tsubota K, Laing RA, Kenyon KR: Metabolic changes of the cornea preserved in MK medium vs K-Sol as determined by redox fluorometry. Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl) 27: 126, 1986.
- 10) Masters BR: A noninvasive optical method to measure oxygen tension at the corneal epithelium. Curr Eye Res 4: 725—727, 1985.
- 11) Tsubota K, Laing RA, Kenyon KR: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide and flavoprotein in the lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 785—789, 1987.
- 12) Lehninger AL: Electron transport, oxidative phosphorylation, and regulation of ATP production. In Principles of Biochemistry. New York, Worth Publisher, Inc, 467—510, 1982.
- 13) Chance B, Schoener B, Elsaesser S: Control of the wave form of oscillations of the reduced pyridine nucleotide level in a cell-free extract. Biochemistry 52: 337—341, 1964.
- 14) Berridge MJ, Rapp PE: A comparative survey of the function, mechanism and control of cellular oscillators. J Exp Biol 81: 217—279, 1979.
- 15) Hess B: The glycolytic oscillator. J Exp Biol 81: 7—14, 1979.
- 16) Friesen WO, Block GD: What is a biological oscillator. Am J Physiol 246: 847—851, 1984.
- 17) Sel'kov EE: Self-Oscillations in glycolysis. European J Biochem 4: 79—86, 1968.
- 18) Tornheim K: Oscillations of the glycolytic pathway and the purine nucleotide cycle. J Theor Biol 79: 491—541, 1979.