

^{31}P -NMR spectroscopy を用いたガラクトース 白内障の代謝研究 (図51, 表1)

吉田 晃敏*・五十嵐弘昌* (旭川医科大学眼科)
日下部光俊**・田中 邦雄** (**旭川医科大学機器センター)

要 約

^{31}P -NMR spectroscopy を用いて、ラットガラクトース白内障形成過程における水晶体内のエネルギー磷酸化合物の代謝動態を観察し、以下の結果を得た。1. ガラクトース群水晶体の早期における最も顕著な代謝変化は、 α -glycerophosphate に認められ、25%ガラクトース食餌投与後少なくとも3日目からコントロール群のそれに比べて有意に増加し、さらに3週目まで高値を示した。以後は徐々に低下し、5週目で有意な低下を示した。2. adenosine triphosphate (ATP) はガラクトース群でコントロール群に比べて2週目から有意な減少を示し、その後もさらに低下し続けた。3. 無機磷酸はガラクトース群ではコントロール群に比べて徐々に増加し、1週で有意な増加を示し2週目で最大となり、その後は逆に低下した。今回の基礎的研究により ^{31}P -NMR spectroscopy 法は、これまでは生化学的および組織学的手法により研究されていたガラクトース白内障の病態をその代謝動態の面から、非破壊的に測定しうる研究手段として有用なことが示唆された。(日眼会誌 93:722-726, 1989)

キーワード：ガラクトース白内障，核磁気共鳴法，磷酸化合物，代謝，アルドース還元酵素

A Study on the Metabolism of Galactose Cataract Using a ^{31}P -NMR Spectroscopy

Akitoshi Yoshida*, Hiromasa IGARASHI, Mitsutoshi Kusakabe** and Kunio Tanaka**

*Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College

**Central Laboratory for Research and Education, Asahikawa Medical College

Abstract

Using a ^{31}P -NMR spectroscopy, we monitored the metabolic kinetics of energyorganophosphate compound in rat lens during the process of generating galactose cataract. The most remarkable metabolic change in the earlier phase of galactose cataract formation was found in α -glycerophosphate. This increased significantly, as compared to controls, since the day 3 of gwiny feed containing 25% galactose. The high level lasted for up to three weeks, decrease followed by a gradual decrease and subsequently a significant decrease at five weeks. Adenosine triphosphate (ATP) showed a significant decrease in the galactose group compared to the controls from two weeks after untration of the sperment and the decrease continued. Inorganic orthophosphate increased gradually in the galactose group as compared to the controls, the increase being of significance at one week reading a maximum at two weeks followed by a subsegment decrease. Our basic study suggests that ^{31}P -NMR

別刷請求先：078 旭川市西神楽4-5-3-11 旭川医科大学眼科学教室 吉田 晃敏
(平成元年4月13日受付，平成元年5月26日改訂受理)

Reprint requests to: Akitoshi Yoshida, M.D. Dept. of ophthalmol., Asahikawa Medical College
4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078, Japan

(Received April 13, 1989 and accepted in revised form May 26, 1989)

spectroscopy is a useful technique in lens of the metabolic kinetics, to nondestructively determine the pathophysiology of galactose cataract, which has been studied biochemically and histologically. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 722-726, 1989)

Key words: Galactose cataract, NMR spectroscopy, Phosphorus-31 (^{31}P), Metabolism, Aldose reductase

I 緒 言

近年、核磁気共鳴法 (NMR) の飛躍的進歩により、映像法である imaging (MRI) は、眼科領域でも X 線 CT につぐ新しい画像診断法として急速に普及しつつある。他方、MRI より長い歴史を持つ NMR 本来の分析法、NMR spectroscopy は、生体組織の代謝を *in vivo* で非破壊的にまた連続的に測定可能な手法として、最近医学の各分野で注目されている。

我々は、以上のような本法の特徴に着目し、 ^{31}P -NMR spectroscopy を用いたモルモット摘出眼球および水晶体における燐エネルギー代謝動態の測定法およびその結果を報告した¹⁾。

一方、糖尿病性白内障の類似モデルとしてラットガラクトース白内障は有用であり^{2)~6)}、近年、アルドース還元酵素との関連において特に注目されてきた^{7,8)}。

そこで今回は、 ^{31}P -NMR spectroscopy を用いて、今日まで未解明な点が多かったガラクトース白内障形成過程での代謝動態を、特に燐酸化合物の代謝動態に着目して計測することを試みた。

II 実験方法

1. 対象

対象として、生後 3 週齢 (体重 50g 前後) の Wistar 系 Rat 63 匹を用いた。これらを 2 群に分け (表 1)、ガラクトース群 (43 匹) には 25% ガラクトース含有食餌を、コントロール群 (20 匹) には普通食餌を投与した。投与後、3 日から 5 週まで、順次ネブタールを用いて致死麻酔を行ない、眼球を摘出しさらに眼球後極部から切開を加え microscope を用いて水晶体を摘出して 1 個ずつエネルギー代謝動態の計測に用いた。なお、測定には片眼の水晶体のみを用い、他眼のそれは組織学的検索に用いた。

2. 燐エネルギー代謝動態の計測

水晶体内の燐エネルギー代謝動態の計測は、 ^{31}P -NMR 法により行なった。測定装置として、燐共鳴周波数 109.25 MHz、静磁場強度 6.3 Tesla の FT-NMR 装

表 1 対象例数

投与期間	群	ガラクトース群 (匹)	コントロール群 (匹)
3 日		4	2
5 日		4	2
1 週		8	2
2 週		8	4
3 週		7	4
4 週		8	4
5 週		4	2
計		43	20

置 (JEOL GX-270WB) を使用した。

まず、摘出した水晶体 (1 個) を、phosphate free Krebs bicarbonate medium (pH 7.35) で満たした微小サンプル管 (6.5 mm \times 10 mm) に挿入した。なお、このサンプル管内には、20% hexamethyl phosphoramide (HMPA) を微小ガラス管内に封入して取り付け、外部基準試料とした。

次に、前述の微小サンプル管をソレノイドコイル (8 mm \times 8 mm, 4 回巻) 内に挿入し、 ^{31}P -NMR 法により水晶体内の燐エネルギー代謝動態を計測した。測定条件は、パルス幅: 2 μ sec (30° パルス)、パルス繰り返し時間: 0.5 sec、積算回数: 7,200 回で、1 スペクトルあたりの測定時間を 1 時間とした。

III 実験成績

まず図 1 にコントロール群のラット水晶体を 1 時間測定した結果得られたスペクトルの代表例を示す。各ピークは、左から、HMPA, α -glycerophosphate (α -GP), phosphoryl chorine (PC), 無機燐酸 (Pi), γ -adenosine triphosphate (γ -ATP) β -adenosine diphosphate (β -ADP), α -ATP α -ADP, nicotinamide adenine dinucleotide/reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD/NADH) そして β -ATP である。外部基準として用いた HMPA によるピーク位置を 0 ppm に設定し、各スペクトルに対するコントロールとした。

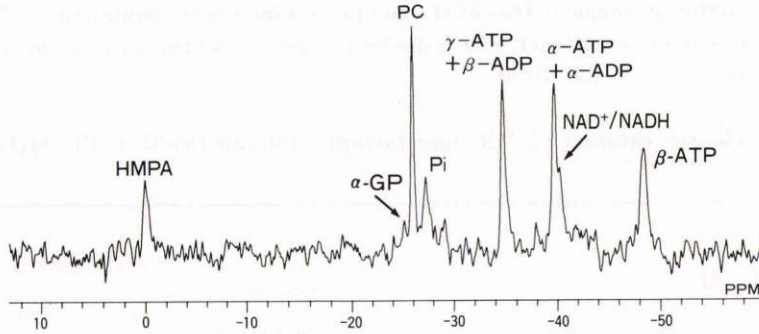


図1 コントロール群スペクトル

HMPA: hexamethyl phosphoroamide. α -GP: α -glycerophosphate. PC: phosphorylcholine. Pi: 無機 磷酸. γ -ATP β -ADP: γ -adenosine triphosphate β -adenosine diphosphate. NAD/NADH: nicotinamide adenin dinucleotide/reduced nicotinamide adenine dinucleotide. HMPA のピークを0ppm に設定.

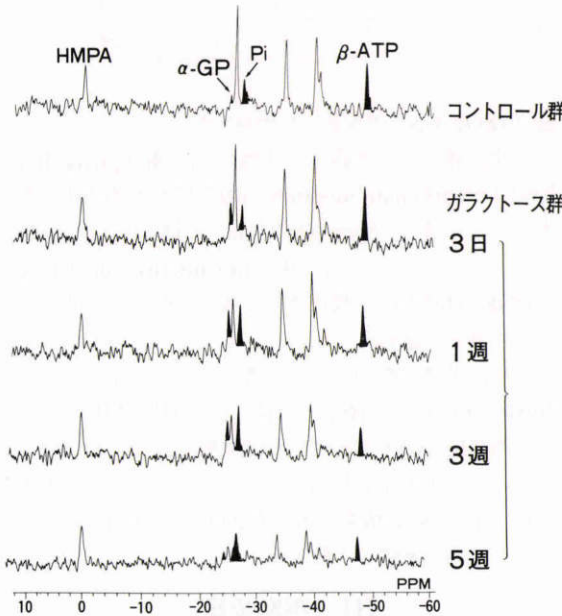


図2 コントロール群とガラクトース群スペクトルの 代表例. HMPA, α -GP, Pi, β -ATP に関しては図1 参照.

図2にコントロール群とガラクトース群ラットの水晶体から得られたスペクトルの代表例を示す. 各スペクトルは上段から, コントロールラット水晶体, そして, ガラクトール食餌投与後3日, 1週, 3週, 5週目のラット水晶体から得られたものである. ガラクトース食餌投与後3日目ですでに, α -GPのピークの高さがコントロールのそれと比較して明らかに増加していることがわかる. また, 無機磷酸のピークの高さ

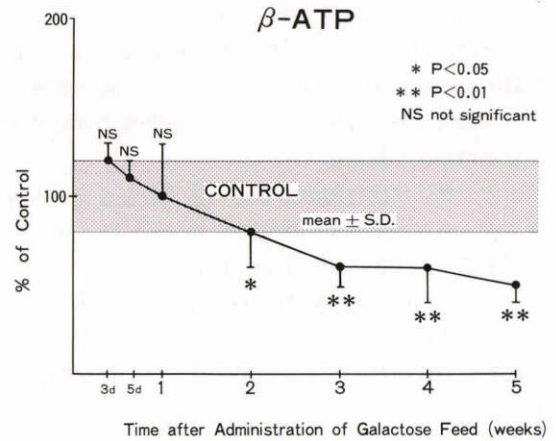


図3 ガラクトース群水晶体における β -ATPの変化. 縦軸はコントロール群の平均を100%とした時の相対量. 斜線内がコントロール群の mean \pm S.D. : mean \pm SD.

は徐々に増加するのに対して, ATPの動態を表わす β -ATPのピークは徐々に低下した. 5週目ではすべてのピークの高さの低下を認めた. なお, コントロール群内においては, 少なくとも3日目から5週の実験期間内において α -GP, 無機磷酸および β -ATPの変動は極めて小さかった. 従って, 以下に示す各ピークの検討ではコントロール群として一括して総計処理を行なった. 以下に, ガラクトース群水晶体における β -ATP, 無機磷酸そして, α -GPの経時の変化をコントロール群水晶体のそれらと比較して示す.

図3に, まずガラクトース群水晶体における β -ATPの変化を示す. 縦軸はコントロール群 (n=20)

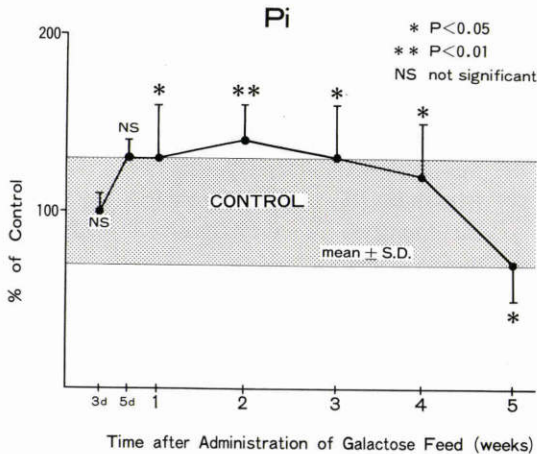


図4 ガラクトース群水晶体における無機燐酸の変化。縦軸はコントロール群の平均を100%とした時の相対量。斜線内がコントロール群の mean ± S.D. : mean ± S.D.

化を示す。ガラクトース食餌投与後無機燐酸は徐々に増加し、1週目でコントロール群と比べ有意な増加を示した。また、2週目で最大となり、その後は逆に低下し続け5週目で有意な低下を示した。

図5に、ガラクトース群水晶体における α -GPの変化を示す。すなわち、ガラクトース食餌投与後3日目ですでにコントロールの値に比べ約2倍高く、さらに3週目まで高値を示した。しかしながら、以後は徐々に低下し5週目で有意な低下を示した。

IV 考 按

ラットガラクトース白内障が糖尿病性白内障の類似モデルとして有用とされる主な理由としては、第1に、ガラクトース食餌投与開始から白内障発症までの期間が短いこと、第2に、ガラクトースの投与量およびその投与期間を変えることにより種々の程度の病態が作製でき、しかも作製した病態の程度に関しばらつきが少ないことの2点が挙げられる。しかしながら、ガラクトース白内障に関する従来の研究は、もっぱらダルトロールや還元型ピリジヌクレオチド燐酸の役割を明らかにすることに向けられ、ATPや燐酸化合物の代謝に関してはあまり注意が払われていなかった。その大きな理由の一つは、これらの化合物の代謝動態を測定する手段が生化学的手法に限られ、この手法では測定前のいわゆる前処理に起因する測定誤差が大であったことによると考えられる。

我々は、これらのガラクトース白内障作製実験が有する利点と *in vivo* で生体組織の代謝が測定できる NMR 法とに着目して、今日まで未解明であったガラクトース白内障形成過程における代謝動態を、特に燐酸化合物に着目して検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。すなわち、最も早期から起こる代謝変化は、 α -GP の増加であり、今回の実験からガラクトース食餌投与後少なくとも3日目でコントロール群に比べ有意に増加することが判明した。さらに、無機燐酸の増加とこれと表裏一体をなす ATP の低下がガラクトース食餌投与後1~2週目より起こり、投与5週目ではすべての燐酸化合物が減少するという一連の代謝変化が初めて明らかとなった。

我々の結果は、水晶体をガラクトース添加液中で培養した時の燐エネルギー代謝変化と一致する。Greinerら¹¹⁾は、³¹P-NMR法を用いてウサギの水晶体をガラクトース含有緩衝液で培養しながら経時的にその燐代謝を観察し、 α -GPが加速度的に増加し、ATPが低下

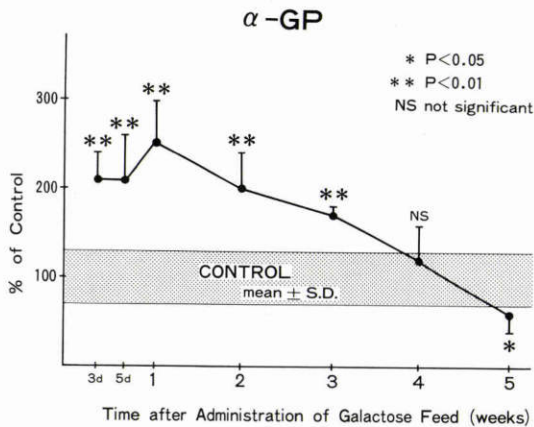


図5 ガラクトース群水晶体における α -GPの変化。縦軸はコントロール群の平均を100%とした時の相対量。斜線内がコントロール群の mean ± S.D. : mean ± S.D.

の平均を100%とした時の相対量を示し、斜線内がコントロール群における MEAN ± SD を示す。横軸はガラクトース食餌投与期間を示す。ガラクトース群における β -ATPは、コントロール群に比べて投与3日目から1週目までは有意差はなく、2週目から有意に低下しその後もさらに低下し続けた。この β -ATPの変化の程度は、別報で詳述する水晶体の組織学的変化の程度とよく相関した。

図4に、ガラクトース群水晶体における無機燐の変

することを観察した。 α -GPの増加はまた、 ^{31}P -NMR法を用いてストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの水晶体を観察した結果とも類似し、ガラクトース白内障におけるこの現象の背景にはやはりアルドース還元酵素の関与が考えられている⁹⁾¹⁰⁾。我々はこの点に関して、引き続きアルドース還元酵素阻害剤を用いた実験を進めている。

今回の実験では、25%ガラクトース食餌投与後5週目になると、無機リン酸も含めたすべてのリン酸化合物のスペクトルが低下した。この現象は水晶体組織の崩壊によるリン酸化合物の水晶体外への流出によると考えられる¹²⁾。我々はこの点を明らかにするため、これらの代謝動態と組織学的変化との関連を検討中である。

以上、今回の基礎的研究により、 ^{31}P -NMR法は、従来は生化学的および組織学的手法により研究されていたガラクトース白内障の病態を磷エネルギー代謝動態の面から、非破壊的に測定し得る研究手段として有用なことが示唆された。さらに、ガラクトース食餌投与後、ごく初期からの代謝変化を検出できることが判明したことは極めて意義のあることと考える。

今後は、ガラクトース食餌投与後の、水晶体における形態的变化との関連、さらにアルドース還元酵素阻害剤の効果などについて検討していきたい。

稿を終えるにあたり、ご助言下さったハーバード大学眼科、Hong-Ming Cheng, PhD.に感謝する。御校閲を賜りました旭川医科大学眼科学講座、保坂明郎教授に深謝致します。

本論文の要旨は、第54回日本中部眼科学会(1988年、京都)で発表した。

文 献

- 1) 吉田晃敏, 田中邦雄, 保坂明郎他： ^{31}P -NMR spectroscopy法を用いた眼球内代謝の研究。1. 摘出眼球での測定。第92回日本眼科学会, 1988. 京都.
- 2) Lerman S, Ishida BK: Pathogenetic factors in experimental galactose cataract. Part III. Arch Ophthalmol 63: 160—163, 1960.
- 3) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia. Invest Ophthalmol 4: 786—799, 1965.
- 4) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. Invest Ophthalmol 13: 713—723, 1974.
- 5) Reddy VN, Schwass D, et al: Biochemical change associated with development and reversal of galactose cataracts. Exe Eye Res 23: 483—493, 1976.
- 6) 赤木好男, 中路 裕, 糸井素一: 実験的糖尿病白内障における Aldose reductase の局在性について—免疫組織化学的研究—. 眼紀 36: 1207—1211, 1985.
- 7) Kinoshita JH, Kador P, et al: Aldose reductase in diabetic cataracts. JAMA 246: 257—261, 1981.
- 8) 赤木好男, 秋宗万里, 中路 宏他: Aldose reductase 阻害剤 (ici. 128, 436) その1. ラットガラクトース白内障に対する効果. 眼紀 37: 991—995, 1986.
- 9) Cheng HM, Gonzalez RG: The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. Metabolism 35: 10—14, 1986.
- 10) Gonzalez RG, Miglior S, von Saltz I, et al: ^{31}P -NMR studies of the diabetic lens. Magnetic Resonance in Medicine 6: 435—444, 1988.
- 11) Greiner JV, Kopps SJ, Sanders DR, et al: Dynamic changes in the organophosphate profile of the experimental galactose-induced cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 613—624, 1982.
- 12) Cheng HM: 私信, 1988.