

遺伝性白内障 (cac) マウス水晶体の白内障発症過程におけるリン脂質の変化について

杉 森 宏 之

鳥取大学医学部眼科学教室, 同 生化学教室

要 約

遺伝性白内障 (cac) マウスの白内障の発症過程における水晶体リン脂質 (PL) とコレステロール (Ch) の変動を調べた。cac マウスの総 PL 量は加齢とともに減少し、成熟白内障となった35日齢では対照マウス (cac/ddY) と比較して少かった。総 Ch 量は加齢とともに増加したが、35日齢では対照マウスに比べて少かった。14日齢 cac マウスの水晶体 Ch/PL 比は対照マウスに比べて小さいのに、21日齢以後には対照マウスに比べて大きくなった。リン脂質組成では、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン (PS) およびスフィンゴミエリン (Sph) が主成分で、フォスファチジルイノシトールもわずかに認められた。加齢に伴って、PS は対照マウスで漸次増加したのに、cac マウスでは減少し、Sph は対照マウスでは変化なく、cac マウスでは増加した。これらの結果より、cac マウス水晶体のリン脂質、特に PS および Sph 代謝の変化が、成熟白内障形成過程で確認された。(日眼会誌 94: 566—571, 1990)

キーワード: 遺伝性白内障 (cac) マウス, 水晶体, リン脂質, コレステロール, 薄層クロマトグラフィー

Phospholipids in Lenses of the cac Mouse

Hiroyuki Sugimori

Department of Ophthalmology and Biochemistry, Tottori University School of Medicine

Abstract

Changes of the phospholipid content of lenses were studied in the cac mouse, with inherited cataracts, during the course of development of cataracts. In the cac mice the total phospholipid content decreased with age and was lower than in the control (cac/ddY) mice at 35 days of age. The total cholesterol content increased with age in both mice, but it was lower in the cac mice than in the controls at 35 days of age. The cholesterol/phospholipid ratio was smaller in the cac mice than in the controls at 14 days of age, while the ratio became greater in the cac mice than in the controls at 21 days of age or more. Phospholipids were mainly composed of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine (PS) and sphingomyelin (Sph), with a trace of phosphatidylinositol. With age, the PS content increased gradually in the controls while it decreased in the cac mice and the Sph content was unchanged in the controls while it increased in the cac mice. These results suggest some metabolic alterations of phospholipids, especially of PS and Sph in the lenses of the cac mouse with aging. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 566—571, 1990)

Key words: cac Mouse, Lens, Phospholipid, Cholesterol, TLC

別刷請求先: 683 米子市西町86 鳥取大学医学部眼科学教室 杉森 宏之
(平成元年9月6日受付, 平成元年12月21日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroyuki Sugimori, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tottori Univ. School of Med.
86 Nishi-machi, Yonago 683, Japan

(Received September 6, 1989 and accepted in revised form December 21, 1989)

I 緒 言

リン脂質は、生体組織において細胞膜の基本的な構成成分として、膜の安定化、脂質の運搬、蛋白合成、膜イオン能動輸送に関する機能など重要な機能に関与している。したがって、水晶体組織においてもリン脂質は、その膜機能に重要な働きを演じていることが推定される。これまでに水晶体リン脂質の分析は、ヒトのほか種々の動物で行われているが、マウスではほとんど報告がない¹⁾。また、遺伝性白内障マウスの一つである cac マウス²⁾の水晶体脂質に関する研究は、コレステロール³⁾⁴⁾や過酸化脂質⁵⁾については行われているが、リン脂質に関する研究は見当たらない。

そこで、本研究ではマウス白内障発症過程における水晶体リン脂質の動態を調べる目的で、cac マウス水晶体のリン脂質およびコレステロールを分析し、対照マウス水晶体のそれらとの比較を行った。また、そのほか血漿リン脂質についても分析して比較検討した。

II 実験方法

1. 実験材料

遺伝性白内障マウスの一つである cac マウス（いわゆる中野マウス²⁾を研究対象とし、14日齢、21日齢、35日齢および60日齢の動物の水晶体および血漿を用いた。水晶体はそれぞれ湿重量にして23~37mg（6~10個分）を1検体として用いた。対照動物としては、cac マウスと ddY マウスを交配したヘテロタイプの第1世代マウス（cac/ddY マウス）を用いた。ヘテロタイプマウスの水晶体は透明で、すべての点で正常マウスと同様に成長するといわれている⁶⁾。

2. 実験方法

1) 水晶体中の総脂質の抽出

マウスを頸部脱臼により致死させ、両眼球を摘出し、実体顕微鏡下に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の付着物を除去し、湿重量を測定した後、分析試料とした。分析試料から Folch の方法⁷⁾にしたがって総脂質を抽出した。

2) 水晶体リン脂質量の分析

①総リン脂質

脂質試料をクロロホルムに溶解してその一部をとり、Ames の方法⁸⁾によってリン脂質に含まれる無機リン酸量を定量し、測定値よりリン脂質平均分子量を750として総リン脂質量を算定した。

②各リン脂質成分

脂質試料の一部をクロロホルム-メタノール（2：1、容量比：以下同様）に溶解し、薄層板（Merk 社製 TLC silica gel 60 プレート、20cm×20cm）にスポットし、二次元展開により、各成分を分離した。一次展開にはクロロホルム-メタノール-水（65：25：4）を、二次展開にはクロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水（5：2：1：1：0.5）を用いた⁹⁾。展開後、0.6%重クロム酸カリウムを含む55%硫酸液を噴霧後、180℃、15分間加熱して各成分を検出し、同時にリン脂質標準試料（Sigma 社製）の混合物を用いて同様に操作したものと比較して各成分を同定した。各成分のスポットに相当する部分のシリカゲルをかきとり、総リン脂質の定量⁹⁾の場合と同様にしてリン脂質を定量した。

3) 水晶体総コレステロールの分析

脂質試料をクロロホルム-メタノール（2：1）に溶解してその一部をとり、中西の方法⁴⁾により加水分解後、コレステロールをn-ヘキサンで抽出した。その抽出物についてコレステロールを薄層クロマトグラフィ-（TLC）により精製した。このとき、コレステロールの回収率を求めるために、内部標準として既知量の[1,2-³H(N)]コレステロール（60 Ci/mmol, New England Nuclear）を加えた。試料をクロロホルム-メタノール（2：1）に溶解し、上記の薄層板上にクロロホルム-メタノール-水（65：25：4）¹⁰⁾で一次展開した。コレステロールを0.02%ローダミン6G液で紫外線下に検出し、標準試料と比較して同定し、クロロホルムで抽出後、ガスクロマトグラフィ-（GC）による分析および放射活性測定に供した。

GC分析には島津製GC-4CM型装置により1.5%OV-17（Gaschrom Q, 80~100メッシュ）を充填した4CM用ガラスカラム（3mm×2m）を使用した。試料注入槽温度280℃、カラム槽温度255℃、キャリアガス（N₂）流量40ml/minとし、水素炎イオン化検出器を用いた。放射活性は液体シンチレーションスペクトロメーター（TRI-CARB 4640, Packard）で測定し、その回収率を用いてGC分析による定量値を補正した。

4) 血漿総リン脂質量の測定

心臓穿刺によって得た血漿（2~数四分）1.0ml中のリン脂質をトリクロール酢酸で沈殿させ、リン脂質基準液を用いてPhospholipid-Test Wako（和光純薬）により分光学的に測定した。

なお、実験結果はすべて平均値±標準偏差（means±

SD) で表示し、平均値の間の有意差の検定には、Student の t 検定を用い、危険率が 5% 以下を有意とした。

III 結 果

1. 水晶体混濁の発現

本実験に用いた cac マウス水晶体においては、中野の報告²⁾と同様に、25日齢前後の両眼の水晶体中心部に“pin-head opacity”が出現し、35日齢頃には成熟白内障がみられた。対照マウス (cac/ddY) 水晶体にはいずれの日齢においても全く混濁をみなかった。

2. 体重 (表 1)

cac マウスの体重は、60日齢までは対照マウス (cac/ddY) と比較して有意に低値であったが、90日齢では両者に有意な差はなかった。

3. 水晶体総リン脂質量 (図 1)

水晶体総リン脂質量は、対照マウスでは加齢とともにやや減少傾向を示したが、統計学的には有意差を認

めなかった。しかし、cac マウスでは加齢とともに有意に減少し、特に35日齢では対照マウスに比べて有意に少く、対照マウスの約71%であった。

4. 水晶体総コレステロール量 (図 2)

水晶体総コレステロール量は、両マウスとも加齢とともに増加したが、一般に cac マウスでは対照マウスに比べて低い傾向があり、特に35日齢では有意に低く、対照マウスの約87%であった。

5. 水晶体コレステロール/リン脂質比 (表 2)

水晶体のコレステロール/リン脂質比は、両マウスとも加齢とともに大きくなった。また、14日齢では対照マウスの方が大きかったが、21日齢では cac マウスが大きくなり、その後両マウスの差は広がっていた。

6. 水晶体リン脂質組成 (図 3, 図 4)

水晶体リン脂質組成は、どちらのマウスでもフォスファチジルコリン (PC)、フォスファチジルエタノールアミン (PE)、フォスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (Sph) の 4 種類が主要成分で、その他フォスファチジルイノシトール (PI) もわずかに (1%

表 1 対照マウス (cac/ddY) および cac マウスの体重の日齢変化 (g, means±SD)

日齢	対照 (n)	cac (n)
生後14日	7.39±0.21 (9)	5.95±0.13 (10)*
21日	14.8 ±0.36 (10)	11.9 ±0.94 (11)*
35日	22.4 ±0.50 (14)	18.5 ±0.39 (14)*
60日	30.9 ±0.94 (13)	26.0 ±0.35 (14)*
90日	30.0 ±0.88 (10)	30.5 ±0.82 (10)

* 対照との比較: p<0.001

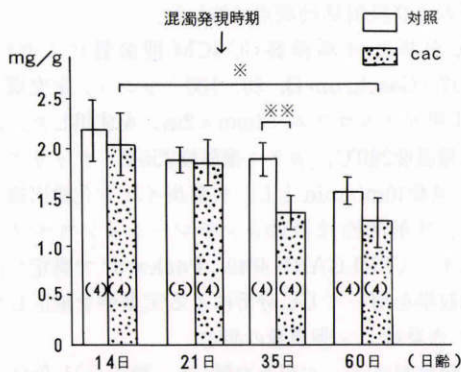


図 1 対照マウス (cac/ddY) および cac マウスの水晶体総リン脂質量の日齢変化 (mg/g・水晶体湿重量, means±SD)

図中の () 内の数字は検体数を表わす (以下同様)。

※ p<0.05, ※※ p<0.01

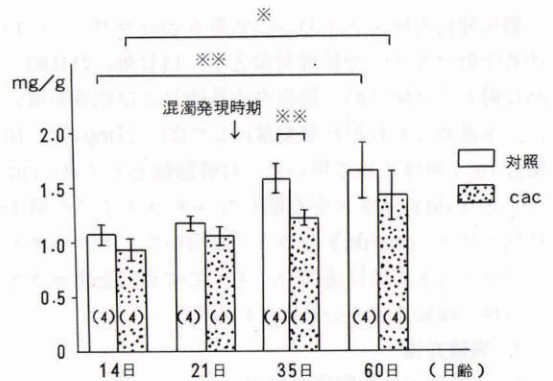


図 2 対照マウス (cac/ddY) および cac マウスの水晶体総コレステロール量の日齢変化 (mg/g・水晶体湿重量, means±SD)

※ p<0.05, ※※ p<0.01

表 2 対照マウス (cac/ddY) および cac マウスの水晶体のコレステロール/リン脂質比

日齢	対照	cac
生後14日	0.52	0.49
21日	0.62	0.66
35日	0.81	0.95
60日	0.99	1.24

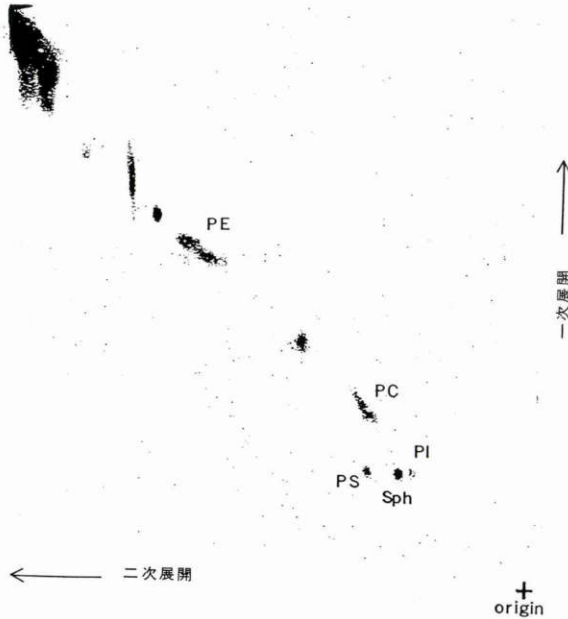


図3 マウス水晶体リン脂質の二次元薄層クロマトグラム

PE: フォスファチジルエタノールアミン, PC: フォスファチジルコリン, PS: フォスファチジルセリン, Sph: スフィンゴミエリン, PI: フォスファチジルイノシトール

一次展開溶媒: クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4), 二次展開溶媒: クロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水 (5:2:1:1:0.5)

以下)認められた。加齢に伴う PC および PE の変動には両マウス間に特に差異はなく PC はやや減少の傾向、PE はやや増加の傾向を示した。これに対して PS は対照マウスでは増加したのに、cac マウスでは逆に減少し、35日齢では対照マウスの約33%に、60日齢では約26%になっていた。また Sph は対照マウスでは変動が見られなかったのに対し、cac マウスでは増加して、35日齢では対照マウスの約2倍に、60日齢では約4倍になっていた。

7. 血漿総リン脂質量 (図5)

血漿総リン脂質量は両マウスとも14日齢に対して21日齢では半減したが、その後35日齢では変化はなく、60日齢ではやや増加する傾向がみられた。両マウス間にはいずれの日齢においても有意な差異はなかった。

IV 考 按

cac マウスは遺伝性白内障マウスで、生後間もなく水晶体が混濁してくるが、その他の点で異常はなく正常マウスと同様に成長するといわれている¹¹⁾。しかし、本実験では、cac マウスの体重増加は、ヘテロタイプのマウスに比べて成長過程では不良であった。また、cac マウスのコレステロールに関する研究において、中西⁴⁾や Noda ら¹²⁾は血漿中のコレステロール異常を、また Noda ら¹²⁾⁻¹⁴⁾は胆汁酸代謝の異常を認めている。このような体重増加の不良や脂質代謝の異常から、cac マウスは水晶体局所のほか全身的組織にも代謝異常を伴っていることが推定される。しかし、全身的なリン脂質代謝の指標として血漿リン脂質を測定したところ、cac マウスの血漿リン脂質レベルは対照マウスと比べて差異がなかった。cac マウスの白内障発症と血漿リン脂質の濃度の間には直接には関係がないものと考えられた。また、血漿リン脂質は両マウスとも14日齢に比べて21日齢ではおよそ半減し、これは一種の加齢変化とみられるが、その機構は不明である。

水晶体総リン脂質量に関して Broekhuysse¹⁵⁾は、ヒトでは加齢に伴って増加するが、ラット、ウサギやウシでは加齢に伴って減少することを認め、これはヒト水晶体が生涯成長し続けるのに対し、ラット水晶体などは比較的早く成長が止まることに関係があると推測している。本実験では、マウス水晶体総リン脂質はラットなどと同様に加齢とともに減少する傾向がみられた。

ほとんどの動物の水晶体リン脂質組成では Sph, PC, PS, PE および PI が大部分を占めているが、動物の種類によって大きな違いがあり、たとえばサルやヒトでは Sph が多く、PC, PS, PE が少ない¹⁵⁾。本実験では、マウス水晶体の主要なリン脂質は PC, PE, PS, PI および Sph の5種類で、PC, PE, PS, Sph の順に多く、PI は極めて少ないことを明らかにした。この結果はラット水晶体リン脂質の組成¹⁵⁾に類似していた。

Rosenfeld ら¹⁶⁾は、ヒト老人性白内障の水晶体総リン脂質量が正常に比べ半減することを見出し、これを細胞膜崩壊の結果と推測している。cac マウスで総リン脂質が減少する原因も、これと同様に、白内障の進行に伴った細胞膜の変化によるものと考えられる。Andrews ら¹⁷⁾は、先天性白内障マウスの一つである Philly mouse 水晶体のリン脂質を調べ、Sph, PC, PE を見出し、そのうち PC および PE の減少を認めている。

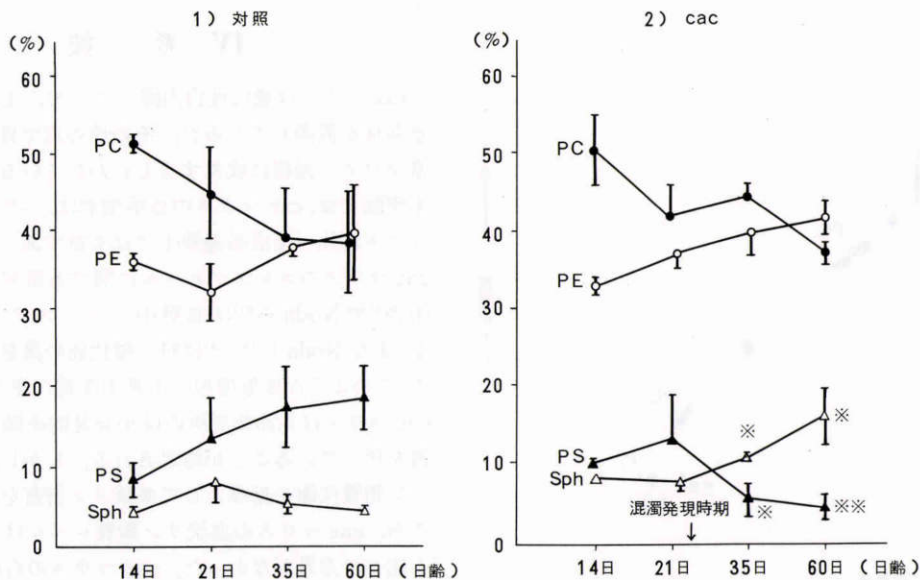


図4 対照マウス (cac/ddY) および cac マウスの水晶体リン脂質組成の日齢変化 (% , means±SD)
 ● : フォスファチジルコリン(PC), ○ : フォスファチジルエタノールアミン(PE),
 ▲ : フォスファチジルセリン (PS), △ : スフィンゴミエリン (Sph)

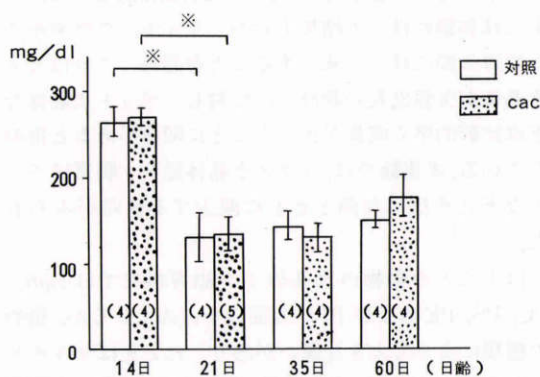


図5 対照マウス (cac/ddY) および cac マウスの血漿総リン脂質量の日齢変化 (mg/dl, means±SD)
 ※ p<0.001

また, Mizuno¹⁸⁾は, ラットのトリパラノール白内障およびガラクトース白内障で, PSはともに半減するが, PCはトリパラノール白内障で減少しても, ガラクトース白内障では増加し, また Sphはトリパラノール白内障では増加するが, ガラクトース白内障では減少するとし, 白内障発症機構の違いも水晶体リン脂質変動に反映されるといっている. cac マウスでは21日齢から35日齢にかけて PSの減少および Sphの増加傾

向を認め, 成熟白内障となった35日齢以後には PSと Sphの逆転がみられた.

cac マウスの白内障の発症原因は, 膜能動輸送系酵素である Na, K-ATPase 活性の低下にあるとされている¹⁹⁾. すなわち, 水晶体混濁の発現前より Na, K-ATPase 活性の低下が始まり, 能動輸送に関する陽イオンバランスを崩壊させ, 21日齢頃から急激な Na イオンの増加と K イオンの減少をきたし, 水晶体の膨潤, さらに混濁が生じる. 本実験にみられる21日齢から35日齢におけるリン脂質組成の変化は, 膜成分の安定性や膜酵素の活性に影響を及ぼし, 白内障の進行に関与している可能性がある. 生体膜において Na, K-ATase は, その活性に脂質を必要とし, 特にその活性の維持に PSが必要であるという報告²⁰⁾がある. また, ラットのトリパラノール白内障では, Na, K-ATPase の活性の低下に, PSのわずかな減少が関係しているといわれている¹⁸⁾. したがって, トリパラノール白内障とは発症機序は異なるものの, cac マウスにおいても Na, K-ATPase 活性と PS とが関係していることが考えられ, PSの減少が Na, K-ATPase 活性低下を一層進行される可能性がある. また, Sphは加齢や白内障の発症に伴って大きく変動し, Sphの増加は膜の流動性低下をもたらすといわれている¹⁾. 以上のことから,

cac マウスにおける白内障の発症や進行に対して、水晶体のリン脂質、特に PS や Sph の代謝が重要な関わりをもっていることが示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました鳥取大学藤永 豊名誉教授、鳥取大学医学部眼科学教室玉井嗣彦教授、生化学教室小倉道雄教授に深く感謝いたします。また終始ご助言をいただいた生化学教室綾木義和助教授ほかご助力をいただいた教職員各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Zelenka PS: Lens lipids. *Curr Eye Res* 3: 1337-1359, 1984.
- 2) 中野健司, 山本硯三, 沓掛源四郎, 他: マウスの遺伝的白内障について. *臨眼* 14: 1772-1776, 1960.
- 3) 魚谷 純: 水晶体中コレステロールの動態に関する研究. *日眼会誌* 88: 155-161, 1984.
- 4) 中西祥治: 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. *日眼会誌* 92: 1530-1536, 1988.
- 5) 武田憲夫, 石川 清: 白内障と過酸化脂質—臨床例ならびに遺伝性白内障マウスについて—. *日眼会誌* 85: 1688-1693, 1981.
- 6) Iwata S: Phenotypical analysis and biochemical parameters of hereditary mouse cataracts carrying recessive and dominant genes. In Regnault F, Hockwin O, Courtois Y (eds): *Ageing of the Lens*. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 171-179, 1980.
- 7) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.
- 8) Ames BN: Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* 8: 115-118, 1966.
- 9) Rouser G, Siakotos AN, Fleischer S: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1: 85-86, 1966.
- 10) Frederiks WM, Broekhoven S: Separation and determination of lipids by one-dimensional micro-thin-layer chromatography followed by densitometry. *J Chromatogr* 150: 171-177, 1978.
- 11) Iwata S, Kinoshita JH: Mechanism of development of hereditary cataract in mice. *Invest Ophthalmol* 10: 504-512, 1971.
- 12) Noda Y, Sugimori H, Nakanishi S, et al: Variations in cholesterol and bile acid metabolism in the cac mouse. *Med Sci Res* 16: 1175-1176, 1988.
- 13) Noda Y, Sugimori H, Ogura M: A greater rate of transformation of cholic acid into deoxycholic acid in the cac mouse during the enterohepatic circulation. *Med Sci Res* 17: 209-210, 1989.
- 14) Noda Y, Ogura M: A decreased rate of 7α -hydroxylation of deoxycholic acid to cholic acid in the cac mouse. *Med Sci Res* 17: 595, 1989.
- 15) Broekhuysse RM: Lipids in tissues of eye. IV. Influence of age and species differences on the phospholipid composition of the lens. *Biochim Biophys Acta* 218: 546-548, 1971.
- 16) Broekhuysse RM: Phospholipids in tissues of the eye. III. Composition and metabolism of phospholipids in human lens in relation to age cataract formation. *Biochim Biophys Acta* 187: 354-365, 1969.
- 17) Andrews JS, Leonard-Martin T, Kador PF: Membrane lipid biosynthesis in the Philly mouse lens. I. The major phospholipid classes. *Curr Eye Res* 3: 279-285, 1984.
- 18) Mizuno GR, Chapman CJ, Chipault JR, et al: Lipid composition and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity in rat lens during triparanol-induced cataract formation. *Biochim Biophys Acta* 644: 1-12, 1981.
- 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) Dahl JL, Hokin LE: The sodium-potassium adenosinetriphosphatase. *Ann Rev Biochem* 43: 327-356, 1974.