前房水に漏出する水晶体クリスタリンと老人性白内障の関連について

児玉俊夫
愛媛大学医学部眼科学教室

要約

老人性白内障の混濁形態と水晶体の膜障害の関連を明らかにするために，老人性白内障患者の前房水へ漏出する水晶体可溶性クリスタリン濃度をラジオイムノアッセイ法で測定して，皮質，後嚢下および成熟白内障で比較した．1歳ヒト正常水晶体より高速液体クロマトグラフィーによりα，β，γ-クリスタリンを分離し，ラジオイムノアッセイの抗原として用いた．前房水のα-クリスタリン濃度は皮質と後嚢下白内障では比較的低濃度(4～160ng/ml)であったが，成熟白内障では漏出量は増加していた．γ-クリスタリンではα-クリスタリンと比較すると，皮質と後嚢下白内障において前房水への漏出量は多量であるが(26～900ng/ml)，成熟白内障で漏出が増加する傾向は変わらなかった．β-クリスタリンについては皮質と後嚢下白内障ではα-クリスタリンと同程度の漏出量を示したが（3～250ng/ml)，成熟白内障では非常に高値を示した．(日眼会誌 95：1065—1070，1991)

キーワード：前房水，白内障，水晶体クリスタリン，ラジオイムノアッセイ，高速液体クロマトグラフィー

Lens Crystallin Leakage in Aqueous Humor from Human Cataractous Lenses

Toshio Kodama
Department of Ophthalmology, Ehime University, School of Medicine

Abstract

The amounts of human lens crystallins in the aqueous humor from various types of cataract patients were measured by radioimmunoassay. α, β and γ-crystallins as antigens for radioimmunoassay were purified from one-year-old normal human lens by TSK3000SW gel permeation column using high performance liquid chromatography. The amounts of both α- and γ-crystallin in the aqueous humor from the patients with cortical and posterior subcapsular cataract were relatively low but in the case of mature cataract those of both crystallins increased. While the amounts of β-crystallin in aqueous humor from cortical and posterior subcapsular cataract patients were at the same level compared with α-crystallin, those from mature cataract patients showed extremely high values. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 1065—1070, 1991)

Key words: Aqueous humor, Cataract, Lens crystallin, Radioimmunoassay, High-performance liquid chromatography

別刷請求先：790 松山市春日町83 愛媛県立中央病院眼科 児玉 俊夫
(平成2年12月28日受付，平成3年2月14日改訂受理)
Reprint requests to: Toshio Kodama, M.D. Eye Clinic, Ehime Prefectural Central Hospital. 83 Kasuga-cho, Matsuyama 790, Japan
(Received December 28, 1990 and accepted in revised form February 14, 1991)

I 緒 言

電気生理学的研究により水晶体を1つの巨大細胞と考え，そのカプセルと内部の形質膜が全体的に機能する膜として働いているという機構が提唱されている[1]．老人性白内障はこの膜機能が低下するために水晶体内部のホメオスタシスが破綻し，水晶体の混濁が起こってくると考えることができる．水晶体は無血管組織なので房水より必要な栄養と酸素をとりこみ，代謝産物を排出している．そのため，前房水への水晶体固有物質の漏出の程度をみることにより水晶体の膜機能の変化をとらえることができる．すなわち，水晶体の膜機能が低下して内部のホメオスタシスがくずれると水晶体細胞内の可溶性蛋白質が水晶体外へ流出する．水晶体に存在する主要な可溶性蛋白質は分子量の大きさによって α，β および γ-クリスタリンに分類されるが，今回は老人性白内障水晶体の膜障害の程度を α，β と γ-クリスタリンの前房水への漏出という現象より検討した．

II 実験方法

対象は術前に白内障摘出術に伴う手術操作について説明し，同意を得た老人性白内障患者で，術前に皮質，後嚢下および成熟白内障群に分類した．各群とも年齢は50～80歳で，全身的に重篤な合併症を認めなかった．前房水は強角膜切開時に前房穿刺して採取し，−80℃で保存した．

1. 抗 α，β，γ-クリスタリン抗体作製

水晶体可溶性蛋白質である α，β，γ-クリスタリンは幼児の正常水晶体より分離した．1歳の網膜芽細胞腫患者より眼球摘出して得た水晶体を用いた．術前検査で肉眼的に硝子体腔内には腫瘍の浸潤は認めなかった．前報[2]に従い，水晶体は脱カプセル後，0.1M 硫酸ナトリウム，0.06M リン酸緩衝液 pH 7.0で均一化後，20,000×g，4℃，30分で可溶性分画を分離して，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により各クリスタリン分画を得た．HPLC は LKB 社の HPLC システムを用い，使用カラムは TSK3000SW ゲル濾過カラム(東ソー社)で，移動相は0.1M 硫酸ナトリウム，0.06M リン酸緩衝液 pH 7.0を用いた．流速は1ml/min，検出波長は280nm で α，β および γ-クリスタリンを分取した(図1)．各クリスタリンに対する白色家兎抗血清は前報[3]に従って作製した．抗 α，β，γ-クリスタリン抗体は各々，他のクリスタリンに対して免疫拡散法で交叉性を認めていないものを実験に用いた．

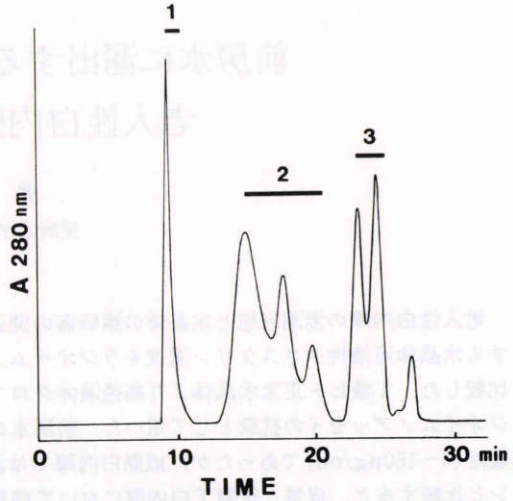

図1 1歳ヒト水晶体の可溶性蛋白質の TSK3000 SW によるゲル濾過図．分画1は α-クリスタリン，分画2は β-クリスタリン，分画3は γ-クリスタリンに相当する．

2. 抗 β-クリスタリン精製抗体

抗 β-クリスタリン抗体についてはさらにアフィニティークロマトグラフィーにより β-クリスタリンに対する特異抗体を精製し，それについても実験を行った．アフィニティクロマトグラフィーのカップリングゲルの作製には Pharmacia Fine Chemicals 社の小冊子の方法[4]に従った．作製した β-クリスタリンのカップリングゲルをカラムにつめ，抗 β-クリスタリン血清を加えて，10mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5，次に10 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5，0.5M 塩化ナトリウムで洗浄した．結合した免疫グロブリンを溶出させるために0.1M グリシン，0.2M 塩酸 pH 2.5を加えて，カラムより滴下した液が pH 7.0になるようにあらかじめ1M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0の入った試験管に採取した．各フラクションの β-クリスタリンに対する抗体価を調べるための enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) は Eager ら[5]の方法に従った．最も抗体価の高いフラクションを精製抗体として次のラジオイムノアッセイの実験に用いた．

3. クリスタリンの ^{125}I 標識

放射性ヨウ素の標識はクロラミン T 法[6]に従った．即ち，0.5M リン酸緩衝液 pH 7.4に溶解した各クリスタリン溶液 (50μg/50μl) に0.5mCi の Na ^{125}I (Amersham，USA) とクロラミン T 水溶液 (50μg/25μl) を

加え30秒間反応させて，メタ重亜硫酸ナトリウム溶液（50μg/25μl）を加えて反応を停止した．反応液はリン酸緩衝液 pH 7.4，10%牛アルブミン，1%ヨウ化カリウム溶液を加え，Sephadex G-100で^{125}Iに標識されたクリスタリンと遊離した放射性ヨウ素を分離した．

4. ラジオイムアッセイ

ラジオイムノアッセイは2抗体法を用いた競合的結合測定法[7]で前房水の各クリスタリン濃度を測定した．反応液は0.1%アジ化ナトリウム，0.5%牛アルブミンを含んだ0.01M リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.8を用いた．まず各クリスタリン溶液（2.5～10,000ng）または希釈した前房水0.1ml，抗体溶液0.1mlと^{125}Iをラベルした各クリスタリン溶液（10,000～20,000cpm）0.1mlを混合し，4℃，24時間で反応させた．なお抗体の希釈率は抗α，β，γ-抗体では5,000倍で，β-クリスタリンの精製抗体は蛋白濃度が低いため250倍でラジオイムノアッセイを行った．次に1%正常家兎血清と0.01M エチレンジアミン4酢酸（EDTA）を含んだ反応液0.1mlと，2次抗体として抗家兎IgG抗体（Biomarker，USA）0.1mlを加えてさらに4℃，24時間反応させた．反応後は3,000rpm，30分で遠心分離を行い，上清を吸引した試験管をガンマカウンター（Aloka 社）で比放射能を測定した．

各試料の蛋白質濃度の測定はLowryら[8]の方法に従った．

III 結　果

図1は1歳ヒト正常水晶体より可溶性分画を分離して，HPLCによって水晶体クリスタリンを分離したときの流出図である．分画1はα-クリスタリン，分画2はβ-クリスタリン，分画3はγ-クリスタリンに相当する．

図2はクロラミンT法により^{125}Iを標識したα，β，γ-クリスタリンと未反応の遊離した放射性ヨウ素をSephadex G-100で分離した流出図である．αとγ-クリスタリンでは最初のピークの主要分画をとり，^{125}Iの標識クリスタリンとしてラジオイムノアッセイに用いた．β-クリスタリンは最初のピークではなく，2番目のピークを^{125}I標識クリスタリンとした．即ち，β-クリスタリンはSH基を多く含むペプチドなので[9]流出図において最初のピークは操作中に生じた凝集産物と考え，この分画はβ-クリスタリンの抗原性を失っている可能性があるので，2番目のピークをラジオイムノアッセイに用いた．最初のピークを^{125}I標識クリスタリンとしてラジオイムノアッセイを行うと次の図3に示すようなS字状曲線とならずこのピークはβ-クリスタリンの抗原性を失っていると考えた．

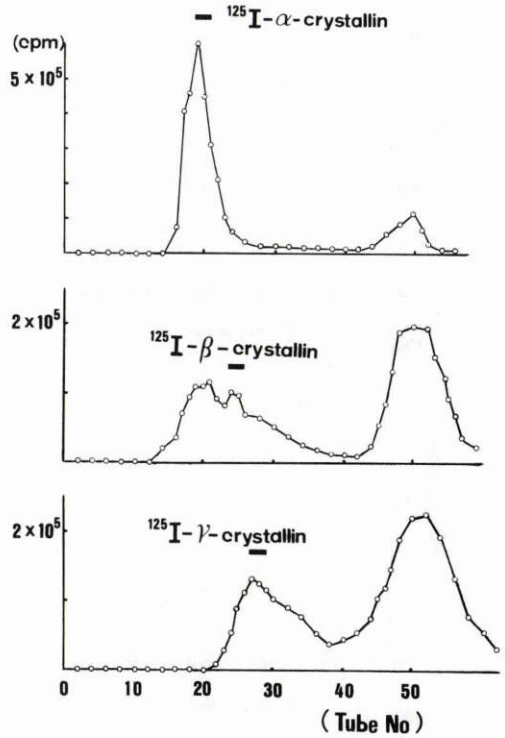

図2　Sephadex G-100カラムによる標識クリスタリンと無機放射性ヨウ素の分離．Sephadex G-100カラム（10×500mm），0.1M リン酸緩衝液 pH 7.4，0.2%牛アルブミン，0.1%アジ化ナトリウムで溶出．

図3はラジオイムノアッセイを行ったときの，各クリスタリンの標準曲線である．横軸にそれぞれ種々の濃度の遊離抗原の対数をとり，縦軸に標識抗原と抗体の結合量を分子に，未反応の遊離標識抗原を分母とした百分率をプロットした．標識抗原の結合型/遊離型の百分率は各クリスタリンの濃度が増加するとしだいに減少してS字状曲線を示す．なお，抗αと抗γ-クリスタリン抗体はそれぞれ他のクリスタリン抗原に対して0～10,000ng/mlの範囲内で3%以下の免疫交叉性を認めたが，抗β-クリスタリン抗体ではα-クリスタリンに対して10%以下，γ-クリスタリンに対して3%以下の免疫交叉性を認めた．

図4は皮質，後嚢下および成熟白内障患者の前房水における可溶性クリスタリンの濃度を示す．前房水のα-クリスタリン濃度は皮質白内障では6～160ng/ml，

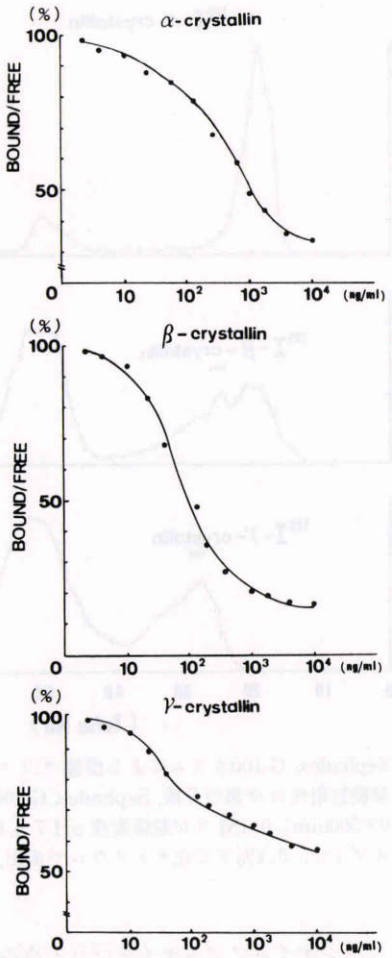

図3 各クリスタリンの標準曲線．横軸は種々の濃度の遊離抗原の対数を表わし，縦軸に標識抗原の結合型/遊離型の百分率を示す．

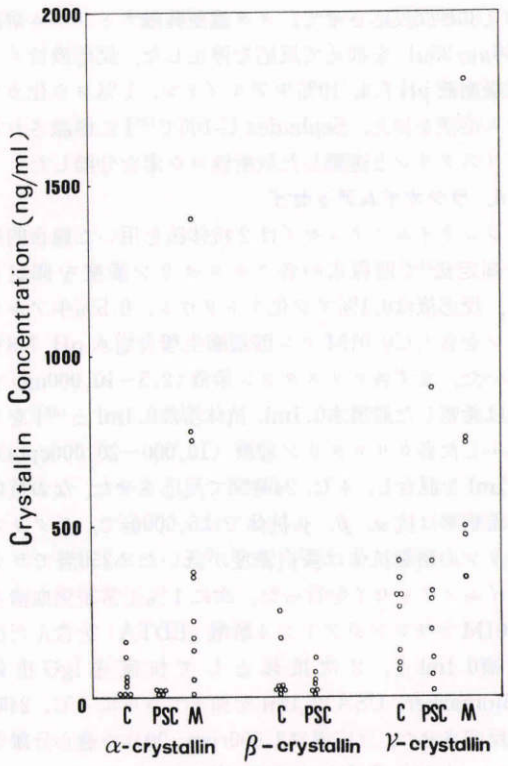

図4 皮質，後嚢下および成熟白内障の前房水における各クリスタリン濃度
C：皮質白内障，PSC：後嚢下白内障，M：成熟白内障を表わす．

後嚢下白内障では4～21ng/ml であった．β-クリスタリン濃度は皮質白内障では3～250ng/ml，後嚢下白内障では6～120ng/ml であった．一方，γ-クリスタリン濃度は皮質白内障では90～400ng/ml，後嚢下白内障では26～900ng/ml と，γ-クリスタリンは他のクリスタリンと比較すると前房水濃度は高値を示した．成熟白内障では前房水の α-クリスタリン濃度は12～1,400 ng/ml，γ-クリスタリン濃度は350～1,800ng/ml と他の未熟白内障と比較するとかなり増加していた．しかし，成熟白内障の前房水の β-クリスタリン濃度は5,200～70,000ng/ml（平均28,800ng/ml）と非常に高値であったため，図4には示していない．抗 β-クリスタリンの精製抗体を用いたラジオイムノアッセイでは抗 β-クリスタリン血清を用いた実験と同様の結果が得られたが，成熟白内障ではやはり非常に高値であった．なおこの精製抗体は α と γ-クリスタリンに対してラジオイムノアッセイ法でも免疫交叉性を認めていない．

IV 考 按

ヒト前房水中に漏出する水晶体蛋白質は過熟白内障などのときみられる水晶体起因性ブドウ膜炎の原因と考えられており，以前より白内障の進行と水晶体クリスタリンの前房水濃度に興味がもたれている．Sandberg ら[10]はヒト前房水中の α と γ-クリスタリン濃度を測定して，白内障の認められないヒト前房水にクリスタリンの漏出が認められ，皮質白内障でその濃度が増加すると報告している．ラットでも，正常ラット前房水に存在する γ-クリスタリンが糖尿病白内障ラットの前房水ではその濃度が増加すると報告されている[11]．さらにセレン誘発白内障ラットの前房水にお

いても α, β, γ-クリスタリンの漏出が著明となっている[12]．さらに砂川ら[13]はヒト血清中の抗レンズクリスタリン抗体を調べたところ，加齢とともに各抗体の出現率が上昇することを報告している．Coulterら[14]はヒト血清における γ-クリスタリンの濃度が0～950pg/ml（平均200pg/ml）と報告し，前房水に漏出した水晶体クリスタリンがさらに血液中にはいることが明らかになった．本報告では白内障患者の前房水へ漏出する水晶体クリスタリン量を測定して各種白内障で比較することにより，白内障の混濁形態と水晶体の膜障害について検討した．

Sandbergら[10]によれば，白内障のないヒト前房水の α-クリスタリン濃度は0～8 ng/ml, γ-クリスタリン濃度は2～57ng/mlであるのに対して，皮質内白内障では各々0～90ng/ml, 0～550ng/mlと白内障化により前房水への水晶体クリスタリンの漏出が増加することを報告している[10]．本報告でも皮質白内障において α-クリスタリンの前房水濃度は6～160ng/ml, γ-クリスタリン濃度は90～400ng/mlと前報[10]と同様の結果が得られた．γ-クリスタリンの前房水濃度が α-クリスタリンより高いのは，γ-クリスタリンの方が分子量が小さいために水晶体のいわゆる膜組織を透過しやすいと思われる．後嚢下白内障では α と γ-クリスタリンの前房水濃度は皮質白内障とあまり変わらなかった．しかし成熟白内障では皮質及び後嚢下白内障と比較すると，α, γ-クリスタリンとも前房水への漏出量は増加していた．今まで報告のなかった β-クリスタリンの前房水濃度は皮質と後嚢下白内障では α-クリスタリンと同程度であったが，成熟白内障では非常に高値を示した．以上，皮質及び後嚢下白内障ではクリスタリンの前房水濃度が同程度であったことより，未熟白内障の段階では水晶体の膜機能は変わらないと考えられる．しかし，白内障が進行して成熟白内障になると前房水へのクリスタリンの漏出が増加するという結果から，成熟白内障では水晶体のカプセルと内部の形質膜の透過性が亢進するということが明らかになった．

ラジオイムノアッセイ法はBersonら[15]によるインシュリンの測定に始まり，試料の微量物質の測定が簡便ということで広く普及している．ラジオイムノアッセイ法は抗原抗体反応が特異的であればあるほど試料中の測定物質をより正確に測定することができるので抗原が精製されているものほどよいといえる．この報告では1歳のヒト水晶体より α, β および γ-クリスタリンを分離して抗原とした．水晶体のクリスタリンは加齢とともにdisulfide（s-s）結合の形成[16]，glycosylation[17]，deamidation[18][19]およびracemization[20]などが起こり，ペプチド鎖が修復されると抗原決定基（epitope）に変化を生じるため，加齢水晶体のクリスタリンを抗原とすると抗原抗体反応が正確に行なわれない可能性が考えられる．さらに加齢水晶体では α-クリスタリン分画に高分子量凝集分画（HMW分画）を含むことが知られているが，HMW分画の構成蛋白には α, β, γ-クリスタリンを含むことが報告されており[21]，抗原として不適当となる．そのため加齢変化の始まっていない1歳のヒト水晶体を試料として各クリスタリンを分離して抗原とした．

次にこれらのクリスタリンを抗原として白色家兎に免疫し抗体を得たが，ラジオイムノアッセイに用いる抗体の特異性は作製された抗体のもつ分子多様性（heterogeneity），他の抗原との免疫交叉性（cross-reactivity）および抗原抗体反応の阻害物質（inhibitor）の存在によって左右される[22]．この報告では成熟白内障で前房水の β-クリスタリン量が非常に高値を示したが，この原因について抗体の特異性という点から考えてみたい．抗体のもつ多様性については，皮質と後嚢下白内障より得た前房水では β-クリスタリンは測定可能範囲であり，β-クリスタリンに対する抗体には問題はなかったと考えている．抗 β-クリスタリン抗体の他のクリスタリンに対する免疫交叉性については，ラジオイムノアッセイ法で α-クリスタリンに対して0～10,000ng/mlの範囲内で10%以内で，γ-クリスタリンに対しては数%以内の免疫交叉性を認めたのみであった．第3の問題点である抗原抗体反応の阻害物質に関しては前房水に存在する補体の存在がラジオイムノアッセイに影響を及ぼしている可能性がある[22]．正常前房水中にも補体は存在しているので[23]，この実験では正常家兎血清の希釈に0.01M EDTAを含んだ反応液を用いて補体の不活性化をはかった．

さて，成熟白内障の前房水の β-クリスタリン濃度が非常に高値を示した原因として成熟白内障では水晶体形質膜の膜破壊が著明となり，実際に β-クリスタリンの前房水への漏出がかなり多量となったのか，クリスタリン以外の他の構造蛋白質や膜蛋白質のうち β-クリスタリンと抗原決定基が類似しているものを β-クリスタリンとして測定したかは不明で，今後の検討が必要である．

この論文の要旨は第94回日本眼科学会で発表した．本研究は文部省科学研究費奨励研究（A）01771416の補助を受け

た．稿を終えるにあたり助言していただいた本学附属実験実習機器センターRI部門田中盛重先生と今治第一病院眼科樺澤泉先生に深く謝意を表します．

文 献

1) **Patmore L, Duncan G**: The physiology of lens membranes, In Duncan G (ed), Mechanism of Cataract Formation in the Human Lens, London, Academic Press, 193—217, 1981.
2) **Hansen JS, Takemoto DJ, Takemoto LJ**: Monoclonal antiserum to gamma crystallin: Characterization and use as a probe of changes in the aging human lens. Lens Res 2: 207—219, 1984—1985.
3) **Kabasawa I, Tsunematsu Y, Barber GW,** et al: Low molecular weight proteins of the bovine lenses. Exp Eye Res 24: 437—448, 1977.
4) Pharmacia Fine Chemicals: Affinity Chromatography Principles and Methods. 東京，ファルマシア・ジャパン，15—18, 1983.
5) **Eager KB, Kennett RH**: The use of conventional antisera in the production of specific monoclonal antibodies, In Langone JJ, Van Vunakis H (ed), Methods in Enzymology Vol 121 Immunochemical Techniques Part 1 Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies, Orlando, Academic Press, 59—69, 1986.
6) **Hunter WM, Greenwood FC**: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194: 495—496, 1962.
7) **Ogawa M, Takatsuka Y, Kitahara T,** et al: Radioimmunoassay of human pancreatic amylase, In Langone JJ, Van Vunakis H (ed), Methods in Enzymology Vol 74 Immunochemical Techniques Part C, New York, Academic Press, 290—298, 1981.
8) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL,** et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265—275, 1951,
9) **Davson H**: The lens—The proteins, In Davson H, Physiology of the Eye. (4th ed), New York, Academic Press, 133—134, 1980.
10) **Sandberg HO, Closs O**: The alpha and gamma crystallin content in aqueous humor of eyes with clear lenses and with cataracts. Exp Eye Res 28: 601—610, 1979.
11) **Linklater HA, Dzialoszynski T, McLeod HL,** et al: Modelling cortical cataractogenesis XI Vitamin C reduces γ-crystllin leakage from lenses in diabetic rats. Exp Eye Res 51: 241—247, 1990.
12) **Watanabe H, Shearer TR**: Lens crystallins in aqueous humor and vitreous humor in selenite overdose cataract. Curr Eye Res 8: 479—486, 1989.
13) **砂川光子，吉田晴子**：末梢血液中の抗レンズクリスタリン抗体，その1．加齢に伴う変動．日眼会誌 90: 1361—1365, 1986.
14) **Coulter JB, Hunnicutt RE**: γ-crystallin in human serum as a predictor of anticataract drug effectiveness. Invest Ophthalmol Vis Sci (Abstract) 31: 435, 1990.
15) **Berson SA, Yallow RS**: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J Clin Invest 38: 1996—2016, 1959.
16) **Harding JJ**: Disulphide crosslinked protein of high molecular weight in human cataractous lens. Exp Eye Res 17: 377—383, 1973.
17) **Pande A, Garner WH, Spector A**: Glucosylation of human lens protein and cataractogenesis. Biochem Biophys Res Commun 89: 1260—1266, 1979.
18) **Kramps JA, De Jong WW, Wollensak J,** et al: The polypeptide chains of α-crystallin from old human eye lenses. Biochim Biophys Acta 533: 487—495, 1978.
19) **Takemoto L, Emmons L, Granstrom D**: The sequences of two peptides from cataract lenses suggest they arise by deamidation. Curr Eye Res 9: 793—797, 1990.
20) **Masters PM, Bada JL, Zigler JS**: Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. Nature 268: 71—73, 1973.
21) **Kodama T, Wong R, Takemoto L**: High molecular weight aggregate from cataractous and normal human lenses. Characterization by antisera to lens crystallins. Jpn J Ophthalmol 32: 159—165, 1988.
22) **Skelley DS, Brown LP, Besch PK**: Radioimmunoassay. Clin Chem 19: 146—186, 1973.
23) **Mondino BJ, Rao H**: Complement levels in normal and inflamed aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 380—384, 1983.