

ガラクトース白内障形成過程における水晶体内の 代謝変化と形態学的変化の関連

五十嵐弘昌*, 吉田 晃敏*, 田中 邦雄**

*旭川医科大学眼科学教室, **旭川医科大学実験実習機器センター

要 約

ガラクトース白内障形成過程におけるリン酸化化合物代謝動態を³¹P-NMR スペクトロスコピーで観察し、生化学的変化および形態学的変化と比較検討したところ以下の結果が得られた。1. スペクトル中の α グリセロリン酸のピークは、水晶体内のズルシトール含有量と極めてよく類似した経時的変化を示した。なお、同ピーク低下の時期が水晶体組織の崩壊の時期とよく相関していた。2. コリンリン酸は、ATPの低下が認められる以前に顕著な低下が認められた。3. アデノシン3リン酸(ATP)の低下は水晶体組織の崩壊が全周におよぶ時期から顕著となり、その後水晶体の崩壊にともない徐々に低下した。4. 水晶体内のイノシトール含有量は、ガラクトース食餌投与後、急激に低下した。以上の結果から、 α グリセロリン酸は水晶体外へ流出することにより低下することが推測された。また、ATPは水晶体の組織学的崩壊にともなって低下し、その低下は水晶体上皮近傍から始まることが推測された。さらにこのATPの低下によりイノシトールの能動輸送が障害される可能性も示唆された。(日眼会誌 95:474-480, 1991)

キーワード：核磁気共鳴法, ガラクトース白内障, α グリセロリン酸, コリンリン酸, アデノシン3リン酸

Relation between Metabolic and Histological Changes in the Rat Lens during the Pathogenesis of Galactose Cataract

Hiromasa Igarashi*, Akitoshi Yoshida* and Kunio Tanaka**

*Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College

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

Abstract

A comparative study of the metabolic kinetics of organophosphate compounds, biochemical changes and histological changes, in the rat lens during the process of the generating galactose cataract. The change of α -glycerophosphate (α -GP) with time was analogous to that of dulcitol and the decrease of α -GP depended on histological destruction. Furthermore phosphorylcholine decreased considerably before adenosine triphosphate (ATP) decreased, the latter commencing when the histological destruction of the lens progressed to all around the lens. In addition, inositol decreased rapidly after ingestion of galactose. It was concluded that the decrease of α -GP was caused by the flow from the lens, and the decrease of ATP started from the epithelium in the lens. Therefore, it was speculated that the decrease of inositol was caused by decrease in the active transport of inositol. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:474-480, 1991)

Key words: Nuclear magnetic resonance, Galactose cataract, α -Glycerophosphate, Phosphorylcholine, Adenosine triphosphate

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 五十嵐弘昌
(平成2年4月2日受付, 平成2年10月6日改訂受理)

Reprint requests to: Hiromasa Igarashi, M.D. Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College,
4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078, Japan

(Received April 2, 1990 and accepted in revised form October 6, 1990)

I 緒 言

$^{31}\text{P-NMR}$ スペクトロスコピーは、生体組織のリン酸化合物代謝を *in vivo* でしかも経時的に測定できる手法として、近年眼科領域でも多数用いられている^{1)~3)}。著者らは本法を用いて、ラットガラクトース白内障形成過程におけるリン酸化合物代謝動態を観察した。その結果、早期に起こる最も顕著な代謝変化は α グリセロリン酸の増加であり、アデノシン3リン酸およびコリンリン酸は徐々に低下することを報告した¹⁾。本研究ではこれらの結果に基づき、さらにリン酸化合物代謝動態、生化学的变化および形態学的変化の三者の関連を検討した。

II 方 法

1. 対象

対象として、生後3週齢のウイスター系ラット43匹を用いた。これらをガラクトース群とコントロール群の2群に分類した。すなわち、25%ガラクトース含有食餌を投与した群をガラクトース群、普通食餌を投与した群をコントロール群とした(表1)。

2. 水晶体の摘出

各々の食餌投与後、3日、5日、1週、2週、3週、4週目にエーテル麻酔下でラットの両眼を摘出し、後極部より強膜を放射状に切開し硝子体を除去後、チン小帯を切開し水晶体のみを摘出した。

3. $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトロスコピー

摘出した2個の水晶体のうち片方を、 $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトロスコピーによりリン酸化合物代謝動態を解析した。測定には静磁場強度6.3Tesla、リン共鳴周波数109.25MHzの日本電子製GX-270WB FT-NMR装置を用いた。既報¹⁾にしたがい、自作した内径4.5mmのサンプル管内に、外部標準試料として20%ヘキサメチルホスホリアミド(HMPA)を微小ガラス管内に封入して装着した。サンプル管内をリン酸化合物を含有しないクレブス重炭酸培地(pH 7.35)で満たし、その中に水晶体を1個挿入して測定した。なお、測定には直径1.7mmのエナメル線で作製した4回巻ソレノイドコイルを用いた。測定条件としては、パルス幅2 μsec の30 $^\circ$ パルスを用いて、パルス繰り返し時間0.5sec、積算回数を7,200回とし、1スペクトルの測定時間を1時間とした。

4. ガスクロマトグラフィー

$^{31}\text{P-NMR}$ スペクトルの測定終了後、サンプル管よ

表1 対象の内訳

投与期間	群	
	ガラクトース群 (匹)	コントロール群 (匹)
3日	6	2
5日	5	2
1週	5	2
2週	5	2
3週	5	2
4週	5	2
	31	12

り取り出した水晶体を内部基準(キシリトール)とともにホモジナイズし、 ZnSO_4 を加えさらにホモジナイズした。その後 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ で中和し遠心分離を行った。次に、上清を凍結乾燥させ、ピリジン、ヘキサメチルジシラジンおよびトリクロロクロロシランを加え、加温しながらシリル化し、ガスクロマトグラフィー(島津製GC-7AG)によってズルシトールとイノシトールを測定した。

5. 組織標本

摘出した片眼は、摘出後即座に4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で固定し、アルコールにて脱水後、メタクリル樹脂(JB-4)に包埋した。その後、1~2 μm の切片を作成しトルイジンブルーにて染色後、光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. リン酸化合物の測定結果

ラット水晶体で観察された $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトルは、コントロール群およびガラクトース群とも外部標準のHMPA、 α グリセロリン酸(α -GP)、コリンリン酸(CP)、無機リン酸(Pi)、 γ アデノシン3リン酸(γ -ATP)、 α -ATP、ジヌクレオチド(DN)、および β -ATPであった(図1)。ガラクトース群で得られたスペクトルの経時変化をまとめると、コントロール群に比べてガラクトース群の α -GPは、3日目ですでに有意な上昇を示し、1週目をピークとして2週目より徐々に低下した(図2)。また、図3に β -ATPおよびCPの経時変化を示す。 β -ATPはガラクトース投与後1週目までは有意な変化は認められず、2週目から有意な低下を示し、その後も低下し続けた。一方、CPはガラクトース食餌投与後より低下し、5日目からは有意な低下を示し、その後も徐々に低下した。

2. ズルシトールおよびイノシトールの経時変化

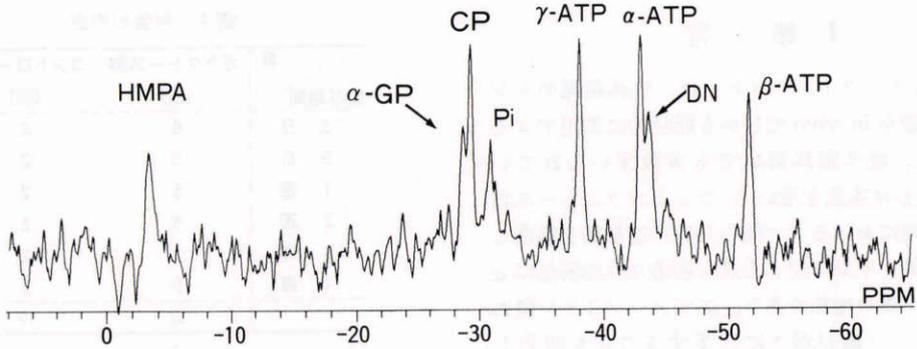


図1 ガラクトース食餌投与後1週目のガラクトース群ラット水晶体より得られたスペクトルの代表例。HMPA:20%ヘキサメチルホスホアミド, α -GP: α グリセリン酸, CP:コリンリン酸, Pi:無機リン酸, γ -ATP: γ アデノシン3リン酸, α -ATP: α アデノシン3リン酸, DN:デヌクレオチド, β -ATP: β アデノシン3リン酸。

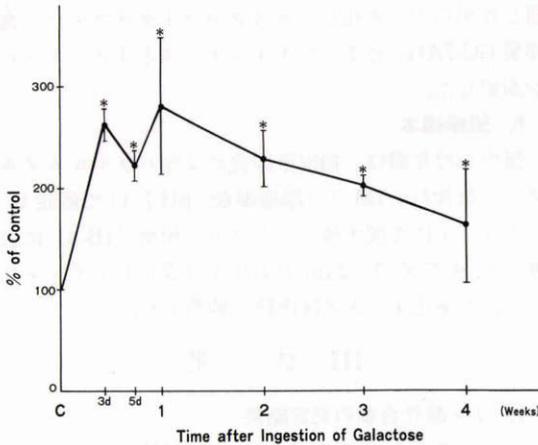


図2 ガラクトース群水晶体における α -GPの経時変化。縦軸はコントロール群の平均を100%とした時の相対量。(C:コントロール, *: $p < 0.01$)

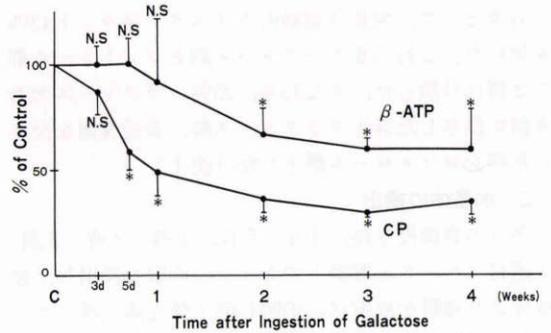


図3 ガラクトース群水晶体における β -ATPおよびCPの経時変化。縦軸はコントロール群の平均を100%とした時の相対量。(C:コントロール, *: $p < 0.01$, NS: not significant)

図4, 5にガスクロマトグラフィーで測定したズルシトールおよびイノシトールの経時変化を示す。コントロール群に比べガラクトース群におけるズルシトールは(図4),すでに3日目では有意な上昇を示し,1週目をピークに2週目より低下した。一方,イノシトールは(図5),3日目より有意な低下を示しその後も低下し続けた。

3. 形態学的変化

図6にコントロール群,図7に3日目のガラクトース群の水晶体の組織像を示す。この時点では水晶体全体にわたって両群間に差異は認められなかった。図8

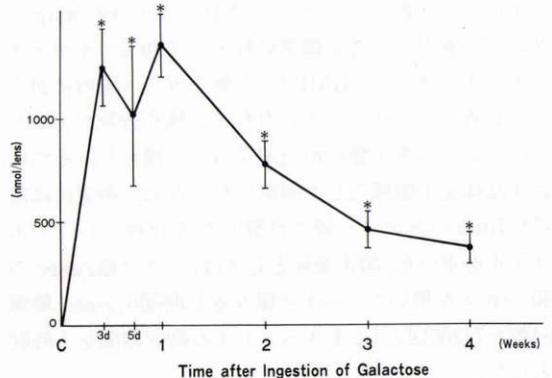


図4 ガラクトース群水晶体におけるズルシトールの経時変化。(C:コントロール, *: $p < 0.01$)

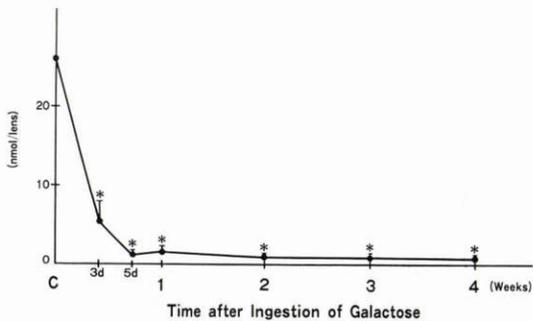


図 5 ガラクトース群水晶体のイノシトールの経時変化。(C: コントロール, *: $p < 0.01$)

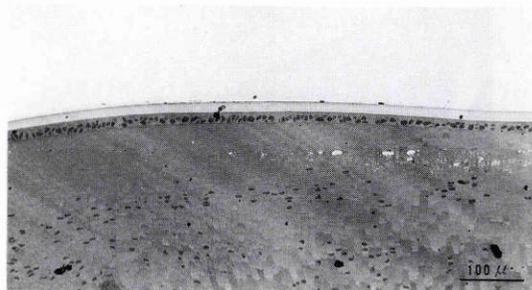


図 8 1 週目のガラクトース群水晶体。赤道部を中心に水晶体線維の軽度の膨化、液化が認められる。(トルイジンブルー染色, $\times 80$)

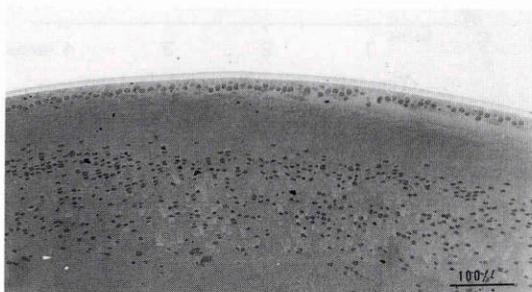
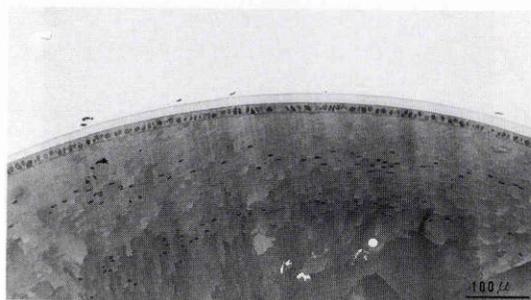


図 6 コントロール群水晶体。(トルイジンブルー染色, $\times 80$)



a

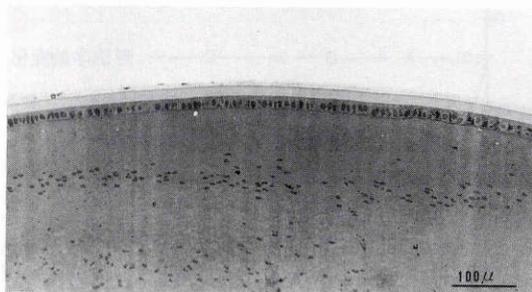
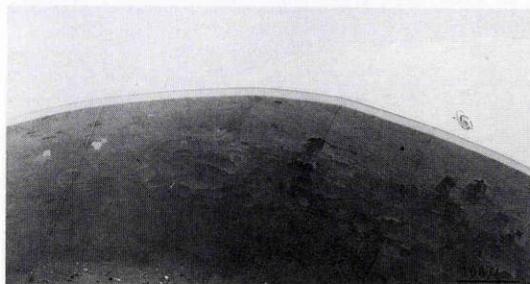


図 7 3 日目のガラクトース群水晶体。この時点ではコントロール群水晶体と差異は認められない。(トルイジンブルー染色, $\times 80$)



b

図 9a, b 2 週目のガラクトース群水晶体。a は前囊側, b は後囊側水晶体線維の軽度の膨化、液化が水晶体全周におよんでいる。(トルイジンブルー染色, $\times 80$)

にガラクトース群の 1 週目の水晶体を示す。赤道部を中心に水晶体線維の軽度の膨化、液化が認められた。2 週目では(図 9a, b) 1 週目に比べ水晶体線維の膨化、液化はさらに高度となり、水晶体全周におよんでいた。3 週目(図 10)と 4 週目(図 11)においては、2 週目にみられた水晶体の崩壊がさらに進行し、水晶体皮質はもとより核部にまでおよんだ。

図 12に α -GP およびズルシトール、図 13に β -ATP, CP およびイノシトールの経時変化と形態学的変化との関連を示す。図中の A は、形態学的に水晶体線維に軽度の膨化および液化が認められるまでは、B は水晶体線維の膨化および液化が水晶体の全周に広がるま



図10 3週目のガラクトース群水晶体. 水晶体の崩壊が顕著になっているのがわかる.(トルイジンブルー染色, ×80)

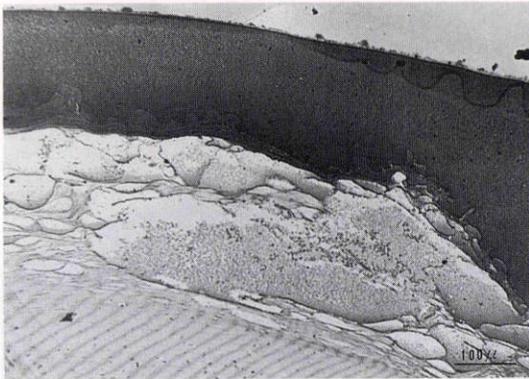


図11 4週目のガラクトース群水晶体. 3週目とほぼ同様な高度な水晶体線維の崩壊が認められる.(トルイジンブルー染色, ×80)

で、Cは水晶体に高度な崩壊が認められる時期を表している。図から明らかなように、 α -GPとズルシトールは経時的にはほぼ同様な変化を示した。形態学的には、水晶体線維の膨化、液化がほぼ全周に広がる2週目にそれらの低下が始まり、さらに水晶体の崩壊にともなって低下した。また、CPおよびイノシトールは、ATPの低下および形態学的変化が認められる以前に

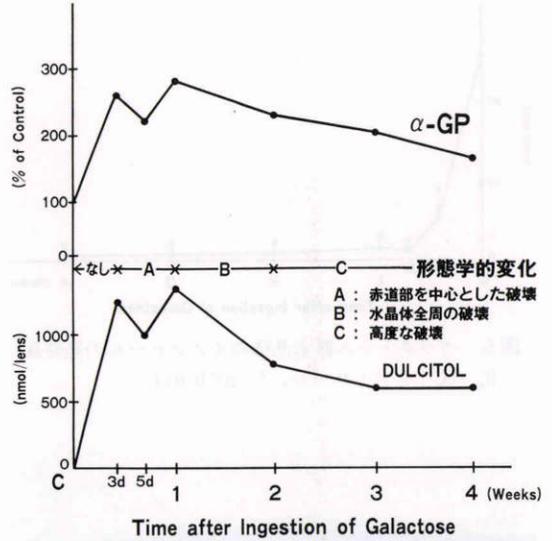


図12 α -GP, ズルシトールおよび形態学的変化の関連.

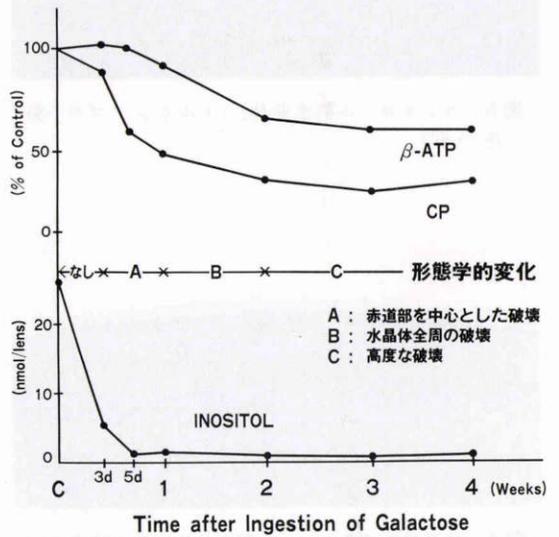


図13 β -ATP, CP, イノシトールおよび形態学的変化の関連.

有意な低下を示した。

IV 考 按

α -GPが過剰に産生される機構に関してはまだ不明な点が多い。しかし、一旦上昇した α -GPがその後低下する原因として、著者らは前報¹⁾でKinoshitaら^{4)~7)}がズルシトールの低下する原因が水晶体の流出現象に

よるとしたように、 α -GPも水晶体からの流出による可能性が高いことを指摘した。本稿で得られた結果では α -GPの経時変化はズルシトールの経時変化と極めて類似し、さらにそれらの低下が水晶体線維の崩壊がほぼ全周におよぶ時期に始まっている(図12)。したがって、 α -GPの低下は膜の透過性変化にともなった流出現象に起因すると推測される。

CPがガラクトース食餌投与後、徐々に低下することは、前報¹⁾および今回の結果より明らかであり、これはChengら²⁾の報告と一致する。これに関しChengら²⁾は、CPとATPが同時に低下することより、まず水晶体上皮部で浸透圧負荷に対するATPの消費が増大するためATPの低下が起り、CPはその基質であるATPの低下によるコリンのリン酸化の障害が起るため低下すると説明している。このATPの低下はKuckら³⁾によっても確認されており、さらに著者らはこのATPの低下に関して、ラット水晶体のエネルギー供給源の98%以上が効率の悪い嫌気性解糖に依存しているため⁹⁾と推測している。また、CPは生体膜の構成成分であるレシチンの基質である。レシチンは水晶体上皮およびその近傍において合成されているため¹⁰⁾¹¹⁾CPの代謝も水晶体上皮および近傍において行われていると推測される。したがって、ATPの低下は水晶体上皮およびその近傍で起こっているものと考えられる。これに関しても、ほとんどが水晶体上皮に存在するNa-K ATPase活性が、ガラクトース白内障形成過程において徐々に低下することより裏付けられる⁵⁾¹²⁾。しかし、今回の測定ではCPの低下がATPの低下が認められる以前に認められた(図3, 図13)。これに関して以下のように推測した。水晶体におけるATPは、実際のATPの供給、代謝の場である水晶体上皮部で少なく、ほとんどが皮質および核に存在しているため¹³⁾¹⁴⁾、³¹P-NMRスペクトロスコピーで測定されるATP量は、水晶体のATP含有量の大部分を占める皮質および核の値を反映していることになる。したがって、水晶体上皮部でATPの低下が起り、CPの産生低下が起っているにもかかわらず、今回の著者らの測定方法ではATPの低下を検出できなかったものと考えている。この点に関し、現在さらに感度を高める測定方法を検討中である。

また、今回の研究において水晶体の崩壊度とATPの低下とがよく相関した。今回の結果から明らかなように、³¹P-NMRスペクトロスコピーで最も顕著な変化を示すのは α -GPである。しかし、これは一旦上昇

した後、水晶体の崩壊にともない徐々に低下するためその解釈には慎重を要する。これに対しATPは、水晶体の崩壊の進行にともない徐々に低下する。したがって、ATPの低下は水晶体の組織学的崩壊度を知る一つの指標となることを示唆している。

イノシトールは、水晶体上皮で能動輸送され水晶体内に補充される。しかし、ガラクトース白内障形成過程において、このイノシトールが低下することが明らかとなった¹⁵⁾。この低下に関しKinoshitaらは、ガラクトース溶液による水晶体の培養実験から、水晶体の膨潤現象によってイノシトールが流出するためと説明している¹⁵⁾。しかし、今回の結果から明らかなように、イノシトールの低下は、ガラクトース食餌投与後、水晶体に形態学的変化が出現する以前に著減する(図13)。したがって、イノシトールの低下は、水晶体上皮での能動輸送の破綻による可能性が高く、水晶体上皮でのATPの消耗にともなっていることが推測される。

以上より、ガラクトース白内障形成過程におけるリン酸化合物代謝動態、生化学的変化および形態学的変化の関連性より、前報で明らかにしたリン酸化合物代謝のより詳細な動態について検討できた。今後、本法の感度の改善や他の核種の測定などを加え、さらに詳細な研究を進めていきたい。

本論文の要旨は、第93回日本眼科学会総会(1989年、京都)で報告した。保坂明郎教授のご校閲に深謝いたします。

文 献

- 1) 吉田晃敏, 五十嵐弘昌, 田中邦雄, 他: ³¹P-NMR spectroscopy を用いたガラクトース白内障の代謝研究. 日眼会誌 93: 722-726, 1989.
- 2) Cheng HM, Gonzales RG: The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. Metabolism 35: 10-14, 1986.
- 3) Gonzales RG, Miglior S, Cheng HM, et al: ³¹P-NMR studies of the diabetic lens. Magn Reson Med 6: 435-444, 1988.
- 4) Kinoshita JH, Futterman S, Satoh K, et al: Factors affecting the formation of sugar alcohols in ocular lens. Biochim Biophys Acta 74: 340-350, 1963.
- 5) Kinoshita JH: Cataracts in galactosemia. Invest Ophthalmol Vis Sci 4: 786-799, 1965.
- 6) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 13: 713-724, 1974.
- 7) Kinoshita JH, Kador P, Catiles M: Aldose reductase in diabetic cataracts. JAMA 246: 257

- 261, 1981.
- 8) **Kuck JFR Jr**: Metabolism of the Lens. Cataract and Abnormalities of the Lens (ed Bellows JG). New York, San Francisco, London, Grune and Stratton Inc, 97—123, 1975.
 - 9) **Hockwin O, Blum G, Korte I**, et al: Studies on the citric acid cycle and its portion of glucose breakdown by calf and bovine lenses in vitro. *Ophthalmol Res* 2: 143—148, 1971.
 - 10) **Broekhuysse RM, Bugemann G**: Lipids in tissues of the eye. Uptake of lipids by the rabbit lens in vitro. *Exe Eye Res* 26: 567—572, 1978.
 - 11) **Davson H**: Chapter 3, The intraocular pressure, In Davson H (ed): *The Eye Vol 1*. New York, San Francisco, London, Academic Press, 252—254, 1962.
 - 12) **Fournier DJ, Patterson JW**: Variation in ATPase activity in the development of experimental cataracts. *Pros Soc Exp Biol Med* 137: 826—832, 1971.
 - 13) **Frohman CE, Kinsei VE**: Studies on the crystalline lens. V. Distribution of various phosphate-containing compounds and its significance with respect to energetics. *Arch Ophthalmol* 48: 12—18, 1952.
 - 14) 錦織敏治, 花房路子, 山元一敏, 他: 水晶体線維形質膜に対する ATP の役割. *あたらしい眼科* 4: 93—96, 1987.
 - 15) **Kinoshita JH, Barber GW, Merola LO**, et al: Changes in the levels of free amino acids and myo-inositol in the galactose-exposed lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 8: 625—632, 1969.
-