

老人性白内障の核混濁の成因に関する生化学的研究

小原 喜隆, 平野 清美

獨協医科大学越谷病院眼科

要 約

水晶体の核は加齢とともに形成されるが、白内障ではさまざまな色調、大きさそして硬さが観察される。白内障の発生機序を明らかにするために核を構成する成分や混濁に関与する因子を追求することは意義あることである。著者らはさきに白内障で遊離脂質は正常水晶体に比較して量的変化をしないが尿素溶性蛋白質画分では核および皮質のコレステロールやリン脂質が増加する結果を得た。老人性白内障の色調の異なった核を材料に脂質・蛋白質結合体(リポ蛋白)の同定と量的変動について研究した。組織におけるリポ蛋白の実験方法は著者らが独自に考案した方法で行った。水溶性および尿素溶性画分においてリポ蛋白はカイロミクロン, very low density lipoprotein(VLDL), low density lipoprotein(LDL)そして high density lipoprotein(HDL)が同定された。リポ蛋白総量は核の色調が濃くなるにしたがって減少したが、その中でHDLだけが増加していた。核が淡黄色から褐色になるとリポ蛋白の異化が進行し膜の崩壊と物質輸送の障害を来すものとする。(日眼会誌 95:575-580, 1991)

キーワード: 老人性白内障核, リポ蛋白, カイロミクロン, HDL, 尿素溶性画分

The Biochemical Study in the Nucleus Opacification of the Senile Cataractous Lens

Yoshitaka Obara and Kiyomi Hirano

Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

The lens nucleus has various colors, sizes and hardnesses. It is of significance to investigate the components of the nucleus and the factors participating in the mechanism of development of cataract. Recently, the author demonstrated that free lipid in cataract does not undergo quantitative change, compared with that in the normal lens but that the cholesterol and phospholipid in the nucleus and cortex increase in the urea-soluble protein fraction. An assay of lipid-protein complex (lipoprotein) was made and also quantitative changes were studied using nucleus with different colors in senile cataract. The study was made by the technique developed by the author because no other experimental procedure has been established for lipoprotein in the tissue. Chylomicron, VLDL, LDL and HDL were identified in lipoprotein. The amount of lipoprotein decreased as the color of the nucleus became dense, but only HDL among these increased. The catabolism of lipoprotein advanced when the color of nucleus changed from light yellow to brown, suggesting that disorder in mass transfer is caused (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:575-580, 1991)

Key words: Senile cataractous lens nucleus, Lipoprotein, Chylomicron, HDL, Urea-soluble fraction

別刷請求先: 343 越谷市南越谷2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 小原 喜隆
(平成2年9月14日受付, 平成2年10月26日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshitaka Obara, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine.

2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya, Saitama 343, Japan

(Received September 14, 1990 and accepted in revised form October 26, 1990)

I 緒 言

水晶体は生体の中で最も蛋白質に富む器官であるので、白内障の発生機序を明らかにするために蛋白質の分析が古来から広く研究されている。著者らは水晶体には蛋白質と脂質の結合体が存在していることを見出したこと¹⁾²⁾から、白内障の原因を追求するには脂質蛋白質結合体の変化を明らかにする必要があると考えた。

水晶体の核は加齢とともに形成されるが、臨床的には大きさや硬度そして色調などがさまざまである。老人性白内障にみられる各種の核における脂質蛋白質結合体（リポ蛋白質）の変動について検討した。

II 対象および方法

1. 研究材料（図1，2）

白内障手術で得た水晶体核を色調によって淡黄色（A）、黄色（B）、黄褐色（C）、赤褐色（D）の4種に分け、各々10個づつを1検体とした。

図2に示す如く水晶体を Tris-HCl buffer (0.02M pH 7.6) で注意深く攪拌して核と皮質に分離した。核の湿重量を測定した後に同じく Tris-HCl buffer でホモジナイズして 4℃、15,000rpm (25,400×g) で遠心分離を1時間行った。上清は水溶性画分とし、沈殿は 8M 尿素で溶出後、直ちに Tris-HCl (0.002M pH 7.6)、0.1M KCl で6時間の透析を開始し、3回繰り返して尿素を除き、リポ蛋白質を再生して、4℃、15,000rpm で1時間の遠心分離後の上清を尿素溶性画分とした。

2. 試料の作成³⁾（図3）

得られた水溶性画分と尿素溶性画分の材料を各々カ

ラム（流速35ml/hr, 4℃, 0.15M NaCl pH 7.0）で Bio-Gel A-50m, Bio-Gel A-5m を用いてゲル濾過を行って分離した。分離された分画を同じ方法で得た標準品（Sigma Co.）のピークから high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) およびカイロミクロンの各リポ蛋白質画分を同定した。

3. リポ蛋白質定量方法³⁾

1) 検量線の作成（表1）

リポ蛋白質のうち、LDL, VLDL およびカイロミクロンの測定は BLF 栄研キットで行った。標準血清の粉末を3.0mlの精製水で溶解し、その0.1mlを標準血清として使用した。波長650nmの吸光度の測定値の差 (O.D.A-O.D.B) を縦軸にとり、そして標準血清のラベル記載表示値 (LDL+VLDL) を横軸として検量線を作成した。

HDL 測定のための検量線は HDL-C555 栄研キットにより、既知のコレステロール標準液と555nmの吸光

表1 LDL, VLDL, カイロミクロン定量のための
検量線の作成方法

試験管 操作	A (LDL+VLDL+カイロミクロン)	B (カイロミクロン)
標準血清	0.1ml	0.1ml
BLF 試液 I	4.0ml	
BLF 試液 III		4.0ml
5秒混和、室温(25±3℃)に25分静置、10分以内に精製水を対照に650nmで吸光度測定		
標準血清吸光度	O. D. A.	O. D. B.

BLF 試液 I : ヘパリンナトリウム 50mg/l, 塩化ナトリウム

II : ヘパリンナトリウム 50mg/l, 塩化ナトリウム 6mg/l

III : ヘパリンナトリウム 50mg/l, 塩化ナトリウム 9mg/l



図1 実験に供した老人性白内障核

A : 淡黄色核, B : 黄色核, C : 黄褐色核, D : 赤褐色核

表 2 LDL, VLDL, カイロミクロンの定量方法

試験管 実験操作	1 (LDL+VLDL+カイロミクロン)	2 (VLDL+カイロミクロン)	3 (カイロミクロン)
標準血清	0.1ml	0.1ml	0.1ml
BLF 試液 I	4.0ml		
BLF 試液 II		4.0ml	
BLF 試液 III			4.0ml
5 秒混和, 室温(25±3°C)に25分静置, 10分以内に精製水を対照に 650nm で吸光度測定			
試料吸光度	O. D. 1.	O. D. 2.	O. D. 3.

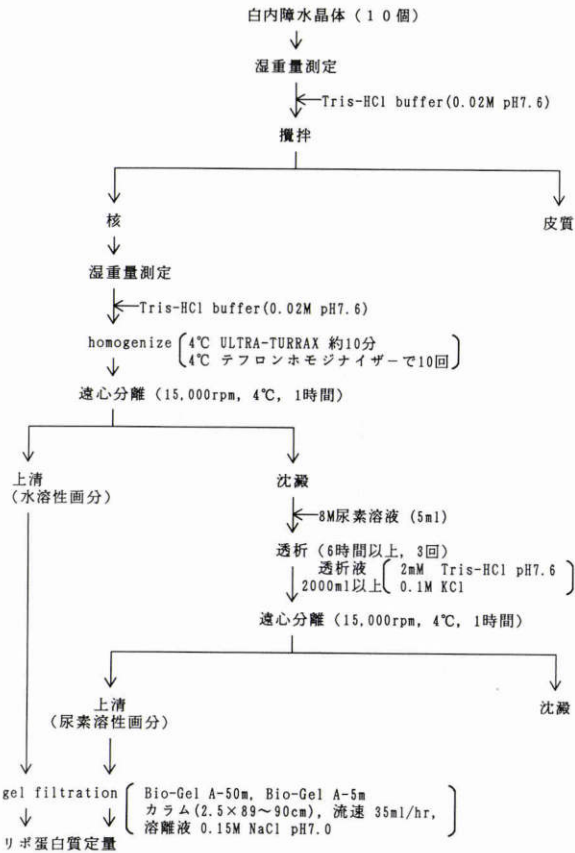


図 2 リポ蛋白質定量の実験方法

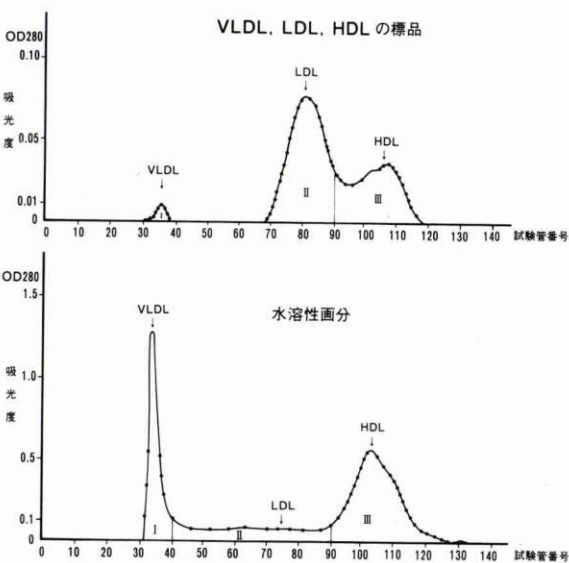


図 3 Bio-gel A-50m で析出したリポ蛋白質各分画の同定

表 3 HDL の定量方法

対象 実験操作	試料	標準	blank
試料	0.3ml		
沈澱試液	0.3ml		
混和後10分室温静置, 3000rpm 10分遠心			
上清	0.05ml		
コレステロール標準液		0.05ml	
蒸留水			0.05ml
酵素試液	3.0ml	3.0ml	3.0ml
混和後37°C の恒温槽で5分加温, 60分以内に波長 555nm で吸光度測定			

度から得た.

2) 各種リポ蛋白質の定量 (表 2, 3)

LDL, VLDL, カイロミクロンの定量: 硫酸多糖類が LDL, VLDL そしてカイロミクロンと不溶性の複合体を作る性質を応用して試薬の濃度やイオン, pH を変化させて濁度を測定し, 以下の式から定量した.

<LDL>

表4 老人性白内障核におけるリポ蛋白質量

水溶性画分					
lipoprotein fraction	lens nucleus	A	B	C	D
カイロミクロン		106.0±67.2	108.0±21.0	87.2±12.9	68.4±32.3
VLDL		13.3±3.5	19.7±12.2	13.3±0.6	12.5±6.3
LDL		32.9±0.1 ^{C:***, D:*}	30.6±15.3	17.1±1.1 ^{A:**}	8.4±6.7 ^{A:**}
HDL		9.5±6.0	22.0±3.6	24.0±10.2	33.0±12.8
total		161.7±76.8	180.3±52.1	141.6±24.6	122.3±58.1

単位=μg/lens nucleus (*: P<0.05, **: P<0.01 Mean±S.D.)

尿素溶性画分					
lipoprotein fraction	lens nucleus	A	B	C	D
カイロミクロン		3180.0±831.9 ^{D:**}	3050.0±560.0 ^{D:**}	1770.0±574.1	1080.0±72.9 ^{A, B:**}
VLDL		539.0±259.0	379.0±168.5	354.0±168.6	212.0±77.8
LDL		261.0±63.3 ^{D:**}	276.0±108.0 ^{D:**}	270.0±88.9 ^D	52.0±21.3 ^{A, B, C:**}
HDL		26.0±2.5	41.0±5.0	40.0±13.2	84.0±42.9
total		4006.0±1156.7 ^{D:**}	3746.0±841.5 ^{D:**}	2434.0±844.8	1428.0±214.9 ^{A:**, B:**}

単位=μg/lens nucleus (*: P<0.05, **: P<0.01 Mean±S.D.)

$$\frac{\text{試料吸光度} \{(\text{LDL} + \text{VLDL} + \text{カイロミクロン}) - (\text{VLDL} + \text{カイロミクロン})\}}{\text{標準血清吸光度} \{(\text{LDL} + \text{VLDL} + \text{カイロミクロン}) - \text{カイロミクロン}\}}$$

×標準血清表示値(LDL+VLDL)=LDL 値 (mg/dl)

<VLDL>

$$\frac{\text{試料吸光度} \{(\text{VLDL} + \text{カイロミクロン}) - \text{カイロミクロン}\}}{\text{標準血清吸光度} \{(\text{LDL} + \text{VLDL} + \text{カイロミクロン}) - \text{カイロミクロン}\}}$$

×標準血清表示値(LDL+VLDL)=VLDL 値 (mg/dl)

<カイロミクロン>

$$\frac{\text{試料吸光度} (\text{カイロミクロン})}{\text{標準血清吸光度} \{(\text{LDL} + \text{VLDL} + \text{カイロミクロン}) - \text{カイロミクロン}\}}$$

×標準血清表示値(LDL+VLDL)

=カイロミクロン値 (mg/dl)

HDL の定量: 実験操作については表3に示したが定量は酵素法による反応から求めた。酵素試液にはコレステロールエステラーゼ102単位, コレステロールオキシダーゼ20単位, ペルオキシダーゼ50単位, 4-アミノアンチピリン6.4mg/105ml, 発色試薬が含有されている。沈殿試薬としてはリンタンングステン酸350mgとMgCl₂ 285mg/35mlを用いている。またコレステロール50mg/dlが標準液として使われている。

HDL の定量は試料の吸光度/標準の吸光度×50×

2で計算した。

III 結 果

1. 水晶体核の重量

白内障手術で摘出した水晶体の核を皮質から分離して直ちに湿重量を測定した。A群55.0±19.5mg/lens, B群73.5±7.2mg/lens, C群82.3±14.9mg/lens, D群82.1±12.0mg/lensであった。

2. 水晶体に存在するリポ蛋白質画分

カラムクロマトグラフィーによるゲル濾過によって水晶体核には、高密度リポ蛋白質(HDL), 低密度リポ蛋白質(LDL), 超低密度リポ蛋白質(VLDL)およびカイロミクロンと思われる4画分が同定された。なお皮質にも同種類のリポ蛋白質の存在が確認された。

3. リポ蛋白質の定量(表4)

各種核のうちA群(淡黄色核)にリポ蛋白質が最も多い。すなわち水溶性画分におけるリポ蛋白質はA群161.7±76.8μg/lens nucleus, B群180.3±52.1μg/lens nucleus, C群141.6±24.6μg/lens nucleus, D群122.3±58.1μg/lens nucleusである。一方、尿素溶性画分ではA群4006.0±1156.7μg/lens nucleus, B群3746.0±841.5μg/lens nucleus, C群2434.0±844.8μg/lens nucleus, D群1428.0±214.9μg/lens nucleus

が定量された。リポ蛋白質の90%以上が尿素溶性画分に存在することが明らかである。リポ蛋白質量は水溶性画分では各種の核の間で変動が少ないが、尿素溶性画分では核の着色が強いほどリポ蛋白質量が少なく、D群はA群の約1/3量に減少している。

VLDL, LDLそしてカイロミクロンは核の色調が褐色になるにしたがって減少しているが、尿素溶性画分で減少が著しい。VLDLは水溶性画分ではほとんど変化しないものの尿素溶性画分では明らかに減少している。しかし、HDLは他のリポ蛋白質画分の変動とは逆に核の褐色化にともなって増加している。

IV 考 按

水晶体の主成分は蛋白質であるが、膜構成の見地から脂質も重要な成分である。水晶体の混濁は水晶体線維の崩壊を意味するので混濁を生じる原因を明らかにするためには膜を構成する蛋白質のみならず脂質の変化について追求する必要がある。白内障では水晶体蛋白質は凝集され、さまざまな変化を来すことは明らかであるが、脂質は量的な変化に乏しく、代謝活性に低下がみられる⁴⁾。

水晶体に存在する脂質にはリン脂質とコレステロールが多いがその他トリグリセライド、モノグリセライド、コレステロールエステル、そして遊離脂肪酸が含まれている¹⁾。これらの遊離脂質の量は正常水晶体と白内障とではほぼ同量であってむしろ白内障で減少している²⁾。しかし、これらの脂質は白内障では蛋白質画分の中から多量に抽出され、リン脂質もコレステロールも正常水晶体に比較して明らかに増加していた¹⁾ことから水晶体の混濁には脂質と蛋白の結合体の関与が強く示唆される。

水晶体の透明性を保つためには形態的秩序性と生化学的秩序性が必要であって、蛋白質と脂質の結合形式にも一定の規則があるに違いない。脂質が組織中でエネルギー源としてそして膜構造の要として利用されるためには水分とうまく混ざり合わなければならない。脂質のうち、両親媒性脂質(リン脂質とコレステロール)は非極性脂質(コレステロールエステルとトリグリセライド)を包み込むようにして蛋白質と結合することによって水と混ざり合うような形をつくっている。いわゆるリポ蛋白質として存在している。

リポ蛋白質は血漿中の性状について詳しく知られている。リポ蛋白質は脂質と蛋白質が結合する割合に数種類があって各々密度が異なるために遠心法や電気泳

動法によって数種に分離することが出来る⁵⁾。比重や直径の異なる各種のリポ蛋白質は結合しあう脂質の構成も蛋白質の割合も異なっており、特徴ある性状をもっている。比重が最も軽いカイロミクロンは蛋白質が1%しか結合せずほとんどが脂質(主にトリグリセライド)である。次に低比重である超低密度リポ蛋白質(VLDL)は7~10%の蛋白質を有するもののやはり脂質(トリグリセライドが多い)が主体である。低密度リポ蛋白質(LDL)はVLDLに比べて蛋白質が多くなり脂質もコレステロールエステル、コレステロールそしてリン脂質の割合が増加する。高密度リポ蛋白質(HDL)は蛋白質が30%以上(33~57%)を占め脂質ではリン脂質やコレステロールと多く結合している。

蛋白質は脂質の表層をとり囲むようにして結合しており、アポリポ蛋白質と呼ばれている。血液には19種類のアポリポ蛋白質の存在が証明されており、例えば、HDLの主要なアポ蛋白質はA-1とA-2である。各種アポリポ蛋白質は分子量やC末端のアミノ酸残基の種類そして糖残基の存在も異なり結合したリポ蛋白質の性質を決定づける機能がある。

リポ蛋白質の代謝経路は6種類に区別されるようである⁶⁾。すなわち外部から摂取されたカイロミクロンがカイロミクロンレムナントとして肝臓にとりこまれる外因性脂質経路、肝臓で合成されたコレステロールエステル、コレステロール、トリグリセライドがリポ蛋白質リパーゼの関与で全身の組織に分配される内因性経路、その他末端組織から肝臓へのコレステロール逆転送経路、VLDL→HDLサイクル、コレステロールエステル転送経路そしてスカベンジャー経路である。多彩な代謝過程が血液では展開されていることからその異常症として高リポ蛋白血症や遺伝性アポリポ蛋白質異常との関係が以前から論じられている⁷⁾。リポ蛋白質の性状が解明されるにつれてアポリポ蛋白質と高血圧や糖尿病との関係が注目されている⁸⁾⁹⁾。

リポ蛋白質の眼組織における存在はウシの角膜で証明されている¹⁰⁾のみで、人眼では未だ報告されていない。

ヒト白内障水晶体を材料にカラムによる抽出同定と特異的試薬を用いた反応によって各種リポ蛋白質が定量された。リポ蛋白質の90%以上が水晶体の尿素溶性画分に存在していた。白内障水晶体では尿素溶性蛋白質画分に多量のコレステロールやリン脂質が存在していた事実からも同画分におけるリポ蛋白質の動態には注目すべきである。最も多量に含有されるリポ蛋白質

はカイロミクロンで、次いで VLDL, LDL となり, HDL が最も少ない。カイロミクロン, VLDL そして LDL は核の着色に伴って減少したが HDL だけは逆に増加していた。この現象は水溶性画分および尿素溶性画分ともに同様の傾向を示した。水晶体のリボ蛋白質で最も多いカイロミクロンと次に多い VLDL はともに構成成分にトリグリセライドを主体としており蛋白質が少ない。両者ともリボ蛋白質リパーゼの働きでトリグリセライドが分解されることによって細胞に取り込まれる。水晶体核が着色するにしたがってリボ蛋白質リパーゼの活性が低下したためにカイロミクロンと VLDL 量が減少したのであろう。リボ蛋白質リパーゼは骨格筋や肺などの生体に広く分布する酵素であるが水晶体での存在は報告されていないので今後証明する必要がある。LDL は VLDL の異化産物であるが VLDL とは構成成分が異なりコレステロールエステルとアポリポ蛋白質を多く含有する。LDL は受容体によって細胞内に取り込まれるので核の着色(硬化)に比例した LDL の減少はレセプターの異常を推察させる。HDL は末梢組織からコレステロールを肝臓に転送する機能をもつことから、白内障で増加するコレステロールを消去するためのフィードバック作用として増加したと考えられる。また、HDL はカイロミクロンの異化過程でも作られるので核の着色の進行とともにカイロミクロンの異化が進み、その際に HDL の合成が増加したものと予想される。

リボ蛋白質が尿素溶性画分すなわち水不溶性画分に存在したことは蛋白質の凝集を主体とした水晶体の混濁にリボ蛋白質がかかわっていることを意味している。また核の着色の程度に反して HDL 以外のリボ蛋白質が減少していた成績は異化作用の亢進と物質輸送の停滞を物語っていると思われる。

水晶体におけるリボ蛋白質は水晶体線維や細胞の膜構成に必要とされて水晶体発生の当初から合成されて存在していたものが証明されたのか、あるいは本物質の分子量からは考えにくいことではあるが血液由来であるかどうかは現在のところ推測の域をでない。

本研究には解決しなければならない課題が今後に残されている。現時点では組織からのリボ蛋白質を抽出

する方法がないので独自に考えた研究方法で行っているが超遠心による材料の purification が必要であろう。カイロミクロンや VLDL へのリボ蛋白質リパーゼ, HDL に作用するレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼなどの酵素活性の証明, さらにはリボ蛋白質の性状を決定づけるアポ蛋白質の分析などを今後追求することによって新分野が展開するものと期待している。

本稿の要旨は第93回日本眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Obara Y, Cotlier E, Lindberg R, et al: Cholesterol, cholesterol ester, and sphingomyelin complexed to protein of normal human lens and senile cataract. *Documenta Ophthalmologica* 8: 193—203, 1976.
- 2) Cotlier E, Obara Y, Toftness B: Cholesterol and phospholipids in protein fractions of human lens and senile cataract. *Biochimica et Biophysica Acta* 530: 267—278, 1987.
- 3) 岡崎三代, 原 一郎: 血漿リポタンパク質の分析, 続生化学実験講座 3, 膜脂質と血漿リポタンパク質(下), 東京化学同人, 618—632, 1986.
- 4) 小原喜隆: 水晶体の過酸化反応と混濁機構. *眼紀* 34: 1842—1844, 1983.
- 5) 上代淑人: 脂質の輸送と蓄積. *ハーバー生化学*, 丸善, 東京, 241—279, 1988.
- 6) 奏 霞哉: コレステロールとリボ蛋白質代謝. *Medicina* 19: 790—795, 1982.
- 7) 山本 章, 横山信治: 脂質おもに血漿リポ蛋白質に関連した先天代謝異常概説, *蛋核酵* 33: 760—768, 1988.
- 8) 石井周一, 櫻林郁之介, 飯村康夫, 他: 糖尿病患者の血清アポリポ蛋白 A-I, A-II および B の測定とその臨床的検討. *臨床病理* 35: 319—324, 1987.
- 9) Ahmed HK, Solman A, David JE, et al: Integrated regulation of very low density lipoprotein, triglyceride and apolipoprotein B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 217—225, 1982.
- 10) 吉沢 透, 河村 悟, 三木直正: 眼の生化学的特徴. *生化学データブック II*, 東京化学同人, 589, 1980.