

^{31}P -NMR スペクトロスコピーを用いたラット ガラクトース白内障の代謝研究(2)

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水晶体内の微量なリン酸化合物代謝動態の経時変化を、核磁気共鳴(^{31}P -NMR)法を用いて計測した。生後3週齢のラット(Lewis系)に25%ガラクトース含有食餌を投与後、3日、1、2、3、4週目に水晶体を摘出し測定に用い、以下の3点が明らかとなった。1) グリセロホスホリルコリン(GPC)はコリンリン酸(CP)と類似した経時変化を示し、ガラクトース投与後3日目から有意な低下となり、その後も徐々に低下した。CPの低下がGPCの産生抑制につながる事が推測された。2) 無機リン酸(Pi)は、ガラクトース投与後一旦上昇し、3週目をピークに以後低下した。アデノシン三リン酸(ATP)は2週目から低下したが、ガラクトース投与1週目までは有意な変化を認めず、Piを必要としないATPの産生回路の関与が示唆された。3) アデノシン二リン酸(ADP)は3日目まで有意な変化を認めず、1週目から有意に低下した。ヌクレオチド糖はガラクトース投与後一旦上昇し、2週目をピークにその後低下した。ADPはADP糖に代謝される可能性が示唆された。(日眼会誌 96:3-8, 1992)

キーワード: 核磁気共鳴法, ガラクトース白内障, 代謝, リン酸化合物

The Metabolism of Galactose Cataracts Evaluated by Phosphorous-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (2)

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

*Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College

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

Abstract

The authors evaluated the metabolic kinetics of organophosphate compounds in the course of the evolution of galactose cataracts in rat lenses using phosphorous-31 nuclear magnetic resonance (^{31}P -NMR) spectroscopy. Three-week-old rats (Lewis) were fed with a 25% galactose diet for three days, and one, two, three and four weeks. Metabolic changes in the lenses were measured and the following results were obtained: (1) Changes in glycerophosphorylcholine (GPC) levels over the time course were analogous to changes for choline phosphate (CP); both GPC and CP level showed a significant decrease in the galactose-fed sample compared with the controls from three days after ingestion, and then continued to decrease gradually. This suggested that the decrease of GPC was associated with the level of CP. (2) Inorganic orthophosphate (Pi) increased gradually after the ingestion of galactose, reaching a maximum at third week, and subsequently falling. Adenosine

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3年1月29日受付, 平成3年3月4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 January 29, 1991 and accepted in revised form March 4, 1991)

triphosphate (ATP) levels did not show any significant changes at one week, but had fallen significantly at two weeks. There might be metabolic pathways for production of ATP without requirement of Pi in the lens for at least the first one week. (3) Adenosine diphosphate (ADP) levels did not show any significant changes at three days, but had fallen significantly at one week. Nucleotide sugar (NS) increased gradually after the ingestion of galactose, reaching a maximum at second week, and then decreasing. This suggested that the ADP was converted to ADP sugar. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 96: 3—8, 1992)

Key words: Nuclear magnetic resonance, Galactose cataract, Metabolism, Phosphate compounds

I 緒 言

今日まで糖白内障の発生にはアルドース還元酵素が仲介するポリオール回路が関与していることが明かにされてきた¹⁾²⁾。しかし、この糖白内障形成過程における代謝動態には未解明な点が多く残されている。著者らは、糖尿病性白内障の類似モデルである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、³¹P-NMR スペクトロスコピーを用いて計測し、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ること、ATPおよびコリンリン酸が病期にもなって低下すること、さらにこれらのリン酸化合物代謝動態の経時変化が、水晶体の組織学的崩壊過程とよく相関することを報告した³⁾⁴⁾。今回は、³¹P-NMR スペクトロスコピーの測定感度を上昇させることにより、ガラクトース白内障形成過程において、既報³⁾の手法では検出できなかった微量なリン酸化合物の検出およびその経時的変化の観察を目的として研究を行った。

II 方 法

1. 対象

対象として生後3週齢のLewis系ラット35匹を用いた。これらをガラクトース群(25匹)とコントロール群(10匹)の2群に分類し、ガラクトース群には25%ガラクトース含有食餌を、コントロール群には普通食餌を投与した。

食餌投与後、3日、1週、2週、3週、4週目にガラクトース群は5匹、コントロール群は2匹ずつの片眼の水晶体を摘出し、これを³¹P-NMR スペクトロスコピーで測定した。また、他眼については今回の研究には用いなかった。

2. 水晶体の摘出

ラットにエーテル麻酔を行い、結膜を輪部切開で強

膜より剝離後、外眼筋、視神経の順に切断して全眼球を摘出した。そして、眼球後極部より強膜を放射状に切開し、硝子体を除去後、チン小帯を切断して水晶体のみを摘出した。

3. ³¹P-NMR の測定

NMRの測定には、静磁場強度6.3 Tesla、リン共鳴周波数109.25 MHzの日本電子製GX 270 WB FT-NMR装置を用いた。既報³⁾に従い、外径10×6.5 mmのアクリル製サンプル管にリン酸化合物を含有しないクレブス重炭酸培地(pH 7.35)を充填し、その中に水晶体を1個挿入して密封した。これを直径1.7 mmのエナメル線で作製した4回巻ソレノイドコイルに装着して測定を行った。尚、このサンプル管内には、外部標準試料として20%ヘキサメチルホスホアミド(HMPA)を微小ガラス管(5.5×0.7 mm)内に封入して装着した。

測定条件は、パルス幅2 μ secの30°パルスを用い、パルス繰り返し時間を0.5 secとし、既報³⁾では7,200回(1スペクトルの測定時間は1時間)であった積算回数を、測定感度の増強のため、今回は36,000回(1スペクトルの測定時間は5時間)とした。尚、今回の研究に先立ち、1スペクトル1時間の測定を連続して8回繰り返し、連続8時間の測定を行ったところ、既報³⁾で報告したスペクトルの各ピークは、5時間までは有意な変化を認めなかった。

4. 結果の解析

スペクトルごとの各ピークをHMPAの高さを1として換算し、コントロール群は10眼まとめて、ガラクトース群は測定日ごと(各5眼)に、各ピークの平均値と標準偏差を求めた。コントロール群とガラクトース群間の統計学的検討には、t検定を用いた。また、コントロール群の各スペクトルのピークは、今回の研究期間内でも既報³⁾と同様に変化は認められなかった。

III 結果

コントロール群ラットの水晶体より得られたスペクトルの代表例を図1に示す。既報³⁾と同様に α -グリセリン酸(α -GP)、コリンリン酸(CP)、無機リン酸(Pi)、 α 、 β 、 γ の各ATP、ヂヌクレオチド(DN)が検出された。今回は新たにグリセロホスホリルコリン(GPC)、 β -ADP、ヌクレオチド糖(NS)が検出された。次にガラクトース群ラットの水晶体より得られた各ピークの経時的変化を示す(図2~5)。縦軸はコン

ロールを100%としたときの相対量を表す。 α -GPの経時変化では(図2)、コントロール群に比べガラクトース群では3日目ですでに有意な上昇を示し、1週目をピークに2週目より徐々に低下した。この経時変化は既報³⁾の経時変化とよく類似しているが、1週目の値が既報³⁾では約250%まで上昇しているのに対し、今回の研究では約150%となった。しかし、標準偏差は、既報³⁾で約50%近いのに対し、今回の研究では約15%であり、既報³⁾に比べ今回の研究では測定値のばらつきが少ないことがわかる。GPCおよびCPの経時変化を

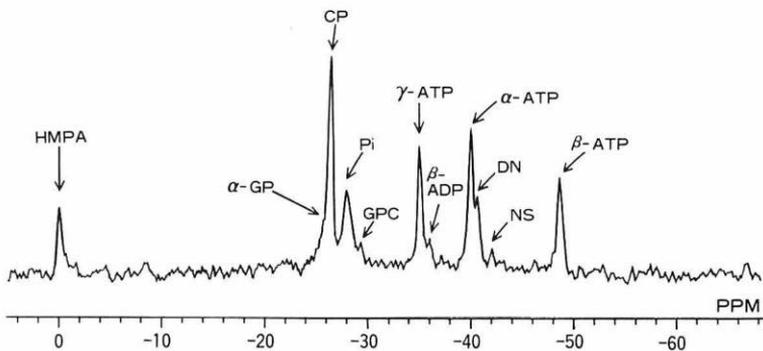


図1 コントロール群スペクトル。HMPA：ヘキサメチルホスホアミド、 α -GP： α グリセリン酸、CP：コリンリン酸、Pi：無機リン酸、GPC：グリセロホスホリルコリン、 γ -ATP： γ アデノシン3リン酸、 β -ADP： β アデノシン2リン酸、 α -ATP： α アデノシン3リン酸、DN：ヂヌクレオチド、NS：ヌクレオチド糖、 β -ATP： β アデノシン3リン酸。

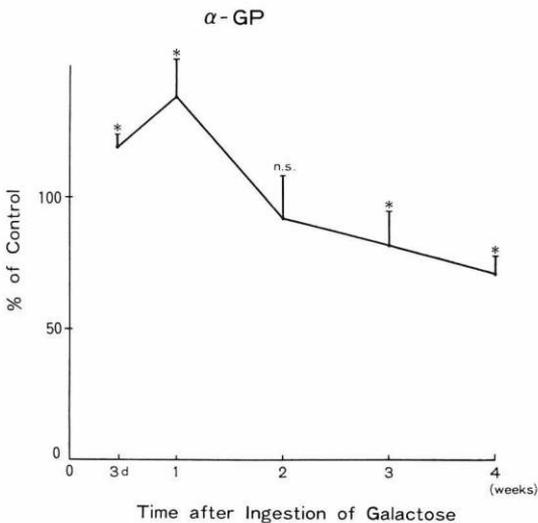


図2 ガラクトース群水晶体における α -GPの経時変化。縦軸は、コントロール群の平均を100%とした時の相対量。(*: $p < 0.01$, n.s.: not significant)

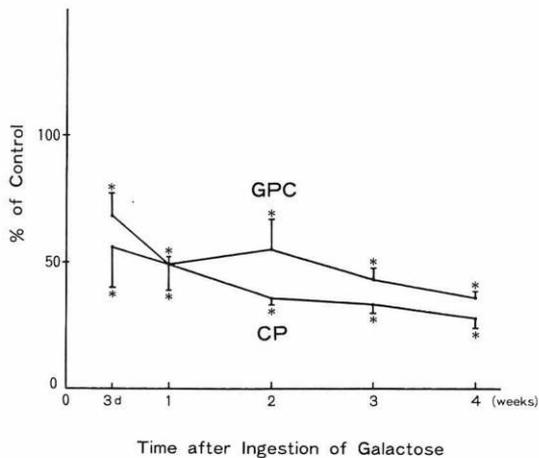


図3 ガラクトース群水晶体におけるGPCおよびCPの経時変化。縦軸は、コントロール群の平均を100%とした時の相対量。(*: $p < 0.01$)

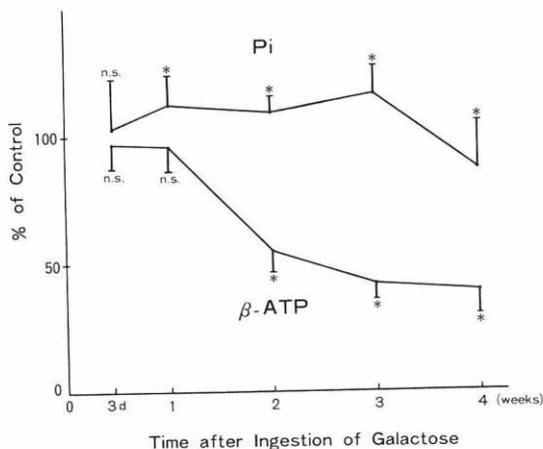


図4 ガラクトース群水晶体におけるATPおよびPiの経時変化。縦軸は、コントロール群の平均を100%とした時の相対量。(* : $p < 0.01$, n.s.: not significant)

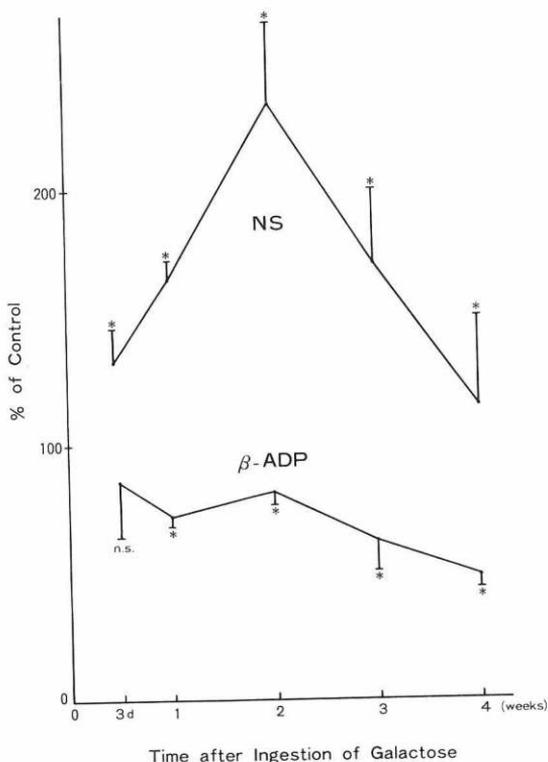


図5 ガラクトース群水晶体におけるADPおよびNSの経時変化。縦軸は、コントロール群の平均を100%とした時の相対量。(* : $p < 0.01$, n.s.: not significant)

みると(図3), 両者ともガラクトース投与後3日目より有意な低下を示した。PiとATPの経時変化では(図4), ATPは初期には変化を認めなかったが、2週目より有意に低下した。一方、Piはガラクトース投与後1週目より有意な上昇を示し、3週目をピークにその後低下した。また、今回測定されたCP, Piおよび β -ATPの経時変化は、既報³⁴⁾で報告した経時変化とほぼ同様な値を示したが、標準偏差については、 α -GPと同様に半減した。ADPおよびNSの経時変化をみると(図5), ADPはガラクトース投与後1週目より有意な低下を示したのに対し、NSはガラクトース投与後一旦上昇し、2週目をピークに3週目より低下した。

IV 考 按

既報では、1時間であった測定時間を今回は5時間としたことにより、測定感度は約2.4倍となった。しかし、³¹P-NMRスペクトロスコピーは、測定時間内における種々のリン酸化合物量の変動を、その平均値として算出している。また、測定時間の延長は試料の劣化を引き起こすため、5時間の測定では1時間の測定に比べ、試料が劣化している可能性が高い。したがって、時間の経過とともに試料の代謝動態が変化している場合、1時間の測定と5時間の測定を単純に比較することはできない。しかし、我々が今回の研究に先立ち行った連続8時間の測定で、測定開始5時間まではスペクトルのピークに変化が見られなかったことより、今回の測定法は1時間の測定に比べ、試料の劣化を考慮せずに測定感度の上昇を期待できる手法と考えられる。さらに、今回の結果では α -グリセロリン酸、無機リン酸、コリンリン酸およびATPの標準偏差が既報³⁴⁾に比べ小さかったことは、測定値のばらつきが少ないことを示しており、今回の測定法が既報³⁾に比べ、測定感度の上昇にともない測定値の信頼性および再現性にも優れていることが示唆される。しかし、 α -グリセロリン酸に関しては、既報³⁾と今回の測定結果に約100%の差があった。これは今回の測定時間の延長による測定値への影響とも考えられるが、先にも述べたように連続8時間の測定で5時間までは変化が認められなかった。したがって、他の原因による可能性が高い。この点に関し現在検討中である。

糖白内障形成過程におけるリン酸化合物代謝の特徴の一つとして、コリンリン酸の急激な低下が指摘されている⁴⁵⁾。今回の著者らの研究においても、同様にコリンリン酸の低下が認められた。さらに今回は、この

コリンリン酸とグリセロホスホリルコリンの経時的変化が類似していることが明かとなった。グリセロホスホリルコリンはレシチンの分解産物であり、レシチンはコリンリン酸を基質とするCDPコリンとジアシルグリセロールがエステル化して産生される。また、Chengら⁵⁾は、糖白内障形成過程におけるコリンリン酸の低下をコリンのリン酸化の障害のためと説明している。従って、今回の研究成績および過去の研究を総合すると、糖白内障の形成にあたっては、まずコリンのリン酸化の障害によるコリンリン酸の低下が起これ、それとともなってレシチンの産生低下、さらにはレシチンの分解産物であるグリセロホスホリルコリンの産生低下が引き起こされるものと推測される。また、 α -グリセロリン酸はジアシルグリセロールを経由して、レシチンへと代謝される。従って、 α -グリセロリン酸のガラクトース白内障形成過程における初期の増加は、コリンリン酸の低下にともなったレシチンの産生低下による α -グリセロリン酸の消費の低下による可能性も推測される。

今回の測定では、無機リン酸はガラクトース投与後、1週目より有意な上昇を示し、その後3週目までは高値を示した。この無機リン酸の上昇は、浸透圧負荷に対する水晶体内の恒常性維持のためのエネルギー消費であり⁵⁾、無機リン酸の上昇に比例したATPの脱リン酸化をともなうと考えられる。しかし、ATPは、ガラクトース投与後1週目までは有意な変化を認めず、ガラクトース投与後2週目より急激に低下した。従って、ガラクトース投与後少なくとも1週目までは、浸透圧負荷に対して急激に消耗したATPを補充するために、無機リン酸を必要としないATPの産生経路の存在が示唆される。このようなATPの産生を満足する経路は、現在のところ二つ考えられる。まず1つ目は、クレアチンリン酸からクレアチニンキナーゼがATPを産生する経路である。クレアチンリン酸は、通常、水晶体や角膜のNMR測定では検出できず³⁾⁻⁷⁾、これは主にエネルギー代謝の活発な肝臓や心臓などで、ATPの貯蔵庫として存在する。しかし、Hayashiら⁶⁾はビタミンA欠乏家兎の角膜で、Tsubotaら⁷⁾はコンタクトレンズ装用によって、角膜にクレアチンリン酸が出現することを報告している。二つ目は、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸キナーゼがATPを産生する経路である。この経路はクエン酸回路の不可逆反応を迂回してATPを産生するもので、好気性解糖の行われる組織で存在する。しかし、水晶体におけ

るATPの産生は98%が嫌気性解糖に依存しており⁸⁾、好気性解糖そのものの占める割合が小さく、さらにこの迂回路であるホスホエノールピルビン酸が通常のATP産生に関与している可能性は低いものと考えられる。しかしながら、これも好気性解糖が主体でないにせよ水晶体内にクエン酸回路が存在する以上、この回路が存在している可能性は高い。従って、ガラクトース白内障形成過程における水晶体内の急激なATPの消耗によって、クレアチンリン酸とホスホエノールピルビン酸のどちらか、もしくは両方がATP供給経路として活性化されている可能性が示唆される。

また、今回の研究でもう一つ注目すべきことは、ADPとヌクレオチド糖の経時的変化である。ADPはATPの脱リン酸化にともない無機リン酸と同時に産生される。従って、無機リン酸の上昇にともないADPも上昇しなければならない。ところが、今回の結果から明かなように、ガラクトース投与後ADPは初期には変化せず、1週目より有意に低下した。従って、ADPはATP以外のリン酸化合物へと代謝されるか、もしくは水晶体外へ流出したものと考えられる。しかし、今回の結果からヌクレオチド糖は2週目まで上昇すること、さらにグルコース1リン酸が、ガラクトースから始まる解糖系の中間代謝産物であることより、ADPは水晶体外へ流出したと考えるよりも、ADPとグルコース1リン酸から産生されるヌクレオチド糖、すなわちADP糖に代謝された可能性の方が強く示唆される。

以上、今回の研究より、既報³⁾で示したガラクトース白内障形成過程におけるリン酸化合物の経時的変化を、より詳細に検討することができた。今後は、今回検出されたグリセロホスホリルコリン、ADPおよびヌクレオチド糖の変動が水晶体機能に及ぼす影響について、さらに検討していきたいと考える。

本論文の要旨は、第15回日本核磁気共鳴医学大会(1990、岐阜)にて発表した。

本研究に際し、ご協力頂きました本学眼科学教室福井勝彦技官および実験実習機器センター日下部光俊技官に深謝いたします。

文 献

- 1) Kinoshita JH, Futterman S, Satoh K, et al: Factors affecting the formation of sugar alcohols in ocular lens. *Biochem Biophys Acta* 74: 340-350, 1963.

- 2) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 4: 786—799, 1965.
 - 3) 吉田晃敏, 五十嵐弘昌, 田中邦雄, 他: ^{31}P -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.
 - 4) 五十嵐弘昌, 吉田晃敏, 田中邦雄: 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. *日眼会誌* 95: 474—480, 1991.
 - 5) **Cheng HM, Gonzales RG**: The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism* 35(Suppl 1): 10—14, 1986.
 - 6) **Hayashi K, Cheng HM, Kenyon KR**, et al: Metabolic changes in the cornea of vitamin A-deficient rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 769—772, 1989.
 - 7) **Tsubota K, Kenyon KR, Cheng HM**: Hard contact lens induced metabolic changes in rabbit corneas. *Exp Eye Res* 49: 769—775, 1989.
 - 8) **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. *Ophthalmic Res* 2: 143—148, 1971.
-