

## 低カルシウム血症白内障における $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性

高橋 浩

日本医科大学眼科学教室

### 要 約

低カルシウム血症に伴う白内障について、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を含む生化学的パラメーターを検討した。4週齢の幼若ラットに低カルシウム、かつビタミン  $\text{D}_3$  を欠いた食餌を与え白内障の発生を観察した。約4週間後、前囊下白内障を認めた時点で血清および前房水のカルシウム濃度は著明に低下していた。水晶体中のカルシウム含量も有意に低下したが、ナトリウム含量は上昇を示した。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて測定した  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、有意な変化を示さなかった。以上から、初期段階の低カルシウム血症白内障は、水晶体外部環境（前房水）

の低カルシウムによる上皮細胞膜の障害に伴うナトリウムの流入が原因であろうと推測した。また、透過電子顕微鏡を用いた  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の局在の観察では、水晶体上皮細胞、皮質線維細胞の形質膜および上皮細胞の細胞内小器官膜に活性を認めた。（日眼会誌 98：142-149, 1994）

キーワード：カルシウム、低カルシウム血症白内障、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

## $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Activity in the Hypocalcemic Cataract

Hiroshi Takahashi

Department of Ophthalmology, Nippon Medical School

### Abstract

We used an animal model of hypocalcemic cataract to investigate the changes of the cation levels and the  $\text{Ca}^{2+}$  pump ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) function in the lens. Wistar rats (4 weeks old) were fed with a low calcium and no vitamin  $\text{D}_3$  diet. After 4 weeks on this diet, anterior subcapsular cataract was recognized, when calcium concentration in the aqueous humor and serum had significantly decreased. Calcium content in the lens decreased and sodium content increased.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity detected by  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  assay did not show significant change. We concluded that cataract during the early stage

of hypocalcemia is caused by membrane damage with low calcium level in the aqueous humor and sodium content increase in the lens. We also studied the ultracytochemical localization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and found it in the plasma membrane of the lens epithelium and cortex and also in the epithelium organelles. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:142-149, 1994)

Key words: Calcium, Hypocalcemic cataract,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

## I 緒 言

低カルシウム (Ca) 血症に白内障が合併することは、tetany cataract などと称せられるごとく古くから知られており<sup>1)</sup>、低カルシウム血症により混濁を来した水晶体における生化学的パラメーターの動態には興味深いものがある。低カルシウム血症は様々な疾患に合併するが、実験的には食餌中のカルシウム量を制限することによる

低カルシウム血症白内障の動物モデル<sup>2)</sup>の他、活性型ビタミン  $\text{D}_3$  の不足の影響<sup>3)</sup> に関しても報告されている。一方、カルシウムポンプである  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の活性が水晶体の透明性維持に大きく関与していることも明らかにされており<sup>4)</sup>、本研究では、食餌中のカルシウム量ならびに活性型ビタミン  $\text{D}_3$  摂取量を制限することにより生じた低カルシウム血症白内障について、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を含む生化学的パラメーターの変化を検討した。また、

別刷請求先：113 東京都文京区千駄木 1-1-5 日本医科大学眼科学教室 高橋 浩  
(平成5年6月14日受付, 平成5年9月2日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Takahashi, M.D. Department of Ophthalmology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received June 14, 1993 and accepted in revised form September 2, 1993)

表1 飼料配合表

コーンスターチ	37.5%
ビタミンフリーカゼイン	25.0%
$\alpha$ ポテトスターチ	10.0%
セルロースパウダー	8.0%
大豆油	6.0%
グラニュー糖	5.0%
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.49%
ミネラル混合*	6.0%
ビタミン混合**	2.0%

\*ミネラル混合中  $\text{CaHPO}_4$  (-)

\*\*ビタミン混合 (100 g) 中

ビタミン  $\text{D}_3$  (-)

パントテン酸カルシウム 50 mg

他の組織では多く報告<sup>5)</sup>されている  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の水晶体における組織化学的局在を電子顕微鏡 (電顕) にて観察した。

## II 実験方法

4週齢のウイスター系雄ラットに4~6週間、正常の約20% (0.09 wt%) のカルシウム含量で、かつビタミン  $\text{D}_3$  を含まない食餌 (改変 AIN 配合 A 変形, オリエンタル酵母工業, 表1) を与え、同週齢の正常食飼育ラットを対照群として以下の観察, 測定を行った。ラットの使用に当たっては、エーテルを用いてすべて無痛下で行った。

### 1. 細隙灯ならびに光学顕微鏡 (光顕) 所見

白内障の発生を細隙灯顕微鏡にて観察し、確認した時点で光学顕微鏡標本を作製した。

### 2. 血清ならびに前房水カルシウム濃度測定

腹部の大動脈から動脈血を採取、さらに眼球摘出後、前房水を採取し、いずれも比色定量法 (OCPC 法) にて測定した。

### 3. 水晶体含水率およびカルシウム, ナトリウム含量測定

摘出水晶体を蒸留水で洗浄し、湿重量を測定した後、真空乾燥器にて乾燥、乾燥重量を測定し、含水率を求めた。これを80℃の温湯中、水晶体1個につき、50  $\mu\text{l}$  の精密分析用硝酸にて完全に溶解した後、1 ml の  $\text{H}_2\text{O}$  を加え、遠心分離 (3,000 g, 10分) した。得られた上清に2 ml の  $\text{H}_2\text{O}$  を添加したものをナトリウム測定用サンプル、同上清に100  $\mu\text{l}$  の塩化ランタンを添加した後、さらに遠心分離 (3,000 g, 15分) して得た上清をカルシウム測定用サンプルとし、島津製作所製 AA-650 原子吸光度計にて測定した。

### 4. 水晶体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性測定

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性測定は水晶体全体 (上皮, 皮質, 核のすべてを含む) を対象とした。測定効率を上げるため、膜成分を多く含むサンプルを作製した。

#### 1) サンプル作製

表2  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 反応液の組成 (総量 350  $\mu\text{l}$ )

50 mM histidine-HCl (pH 7.4)
3 mM $\text{MgCl}_2$
5 mM $\text{NaN}_3$
100 mM KCl
3 $\mu\text{g/ml}$ ionophore A 23187
5 mM [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP ( $6 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{mol}$ )
sample (0.1 mg/ml)
上記に加えて以下の (a) もしくは (b) を含む
(a) 0.5 mM EGTA (pH 7.4)
(b) 125 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$ -EGTA buffer

Borchman らの membrane enriched preparation 法<sup>6)</sup> に準拠し、摘出水晶体5眼に6倍重量のバッファーA (0.3 M sucrose, 10 mM HEPES-HCl pH 7.4, 2 mM dithiothreitol, 0℃) を加え、冷却しつつガラスホモジェナイザーでホモジェネートを作製後、遠心分離 (3,000 g, 3分, 4℃) し、その上清をさらに超遠心分離 (105,000 g, 60分, 0℃) して得た沈殿物に、再びバッファーA 0.5 ml を加えてホモジェネートを作製、これをサンプルとした。また、サンプルの蛋白質量を Lowry 変法<sup>7)</sup> にて測定した。

#### 2) 反応液

反応液の組成は表2に示すが、総量 350  $\mu\text{l}$  中にサンプル 50  $\mu\text{l}$  を含む。0.5 mM EGTA にて  $\text{Ca}^{2+}$  フリーとしたものを (a) 液、酵素が依存する所定の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を得るために Katz ら<sup>8)</sup> の方法に準じて 125  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  と EGTA を混合したバッファーを含むものを (b) 液とした。

#### 3) 測定

$^{32}\text{Pi}$  活性測定はイソブタノール中の燐モリブデン酸複合体抽出法<sup>9)</sup> に従った。37℃, 5分間の温度平衡後、反応液に 5 mM [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (adenosine 5'- [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] triphosphate: Amersham Corporation)  $6 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{mol}$ , 70  $\mu\text{l}$  を添加して反応を開始し、10, 20, 30分の各時点で15% TCA 200  $\mu\text{l}$  を加えて停止した。これを2.5 N 硫酸中5% モリブデン酸アンモニウム 300  $\mu\text{l}$ , さらにイソブタノール: ベンゼン 1:1 (v:v) 1,000  $\mu\text{l}$  と混合後、遠心分離 (3,000 g, 10分, 4℃) して得られた上清 300  $\mu\text{l}$  を5 ml のシンチラント (Insta Gel<sup>®</sup>) に溶解し、 $^{32}\text{Pi}$  活性を液体シンチレーションカウンター (アロカ製 LC 3000) にて測定した。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、所定濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を含む (b) 液と  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートした (a) 液との測定値の差によって求めた。

4) 予備実験として、(b) 液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を  $10^{-6}$ - $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ - $10^{-3}\text{M}$  に設定し、最高値の約80%を得られる濃度を求め、その濃度で、欠乏食群と対照群を比較した。

#### 5. 透過型電子顕微鏡所見

対照群を対象として、Ando らのくえん酸鉛法<sup>10)</sup> に準拠し、ATP を基質として10 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase が ADP を生成すると同時に遊離してくる Pi

表3 電顕用反応液の組成(最終濃度)

1.0 M glycine-0.1 M KOH 緩衝液 (pH 9.0)	250 mM
ATP	3 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
レバミソール	2.5 mM
くえん酸鉛	4.0 mM
蒸留水にて容量を調整	

を鉛イオンで捕捉し、反応局所に磷酸鉛の形で沈着させて観察した。酵素活性を失活させないために固定条件には特に注意を要した。摘出水晶体を2%パラフォルムアルデヒド、0.25%グルタルアルデヒドに8%蔗糖、0.1 M カゴジレート緩衝液(pH 7.4)を加えた混合固定液に2~3分間浸漬した後、レーザーメスにて前後方向に4分割した。この断片を4℃、30分間、同固定液にて浸漬、前固定を行った。固定後、上記の蔗糖加カゴジレート緩衝液にて洗浄、さらに、1 mM の EGTA を添加した緩衝液に20分間浸漬して、組織細胞内に残存するカルシウムをキレートした後、表3に示す反応液に室温にて30分間浸漬した。以後、常法に従いブロックを作製、超薄切片にウラン単染色を施し、日立 H-800 透過電子顕微鏡にて観察した。対照として、Ca<sup>2+</sup>-ATPase の阻害剤であるクエルセチンを上記の反応液に50 μM になるよう混合したもの、反応液の ATP を ADP に変更したものの2つを検討した。

### III 結 果

#### 1. 細隙灯ならびに光学顕微鏡所見

欠乏食投与開始後約4週で、細隙灯顕微鏡により前囊下皮質白内障の発生を確認した(図1)。光学顕微鏡では、上皮細胞の多層化、細胞質の空胞化、線維細胞の細胞構造の消失が見られた(図2)。

#### 2. 血清および前房水カルシウム濃度

表4に示すごとく、欠乏食群は血清値、前房水値のいずれも対照群に比較して著明にカルシウム濃度の低下を見た(p<0.001)。

#### 3. 水晶体含水率およびカルシウム、ナトリウム含量

表5に示すごとく、含水率は、欠乏食群において軽度上昇の傾向を認めたものの、両群に有意差を認めなかったが、水晶体中ナトリウム含量は欠乏食群で有意に上昇していた(p<0.005)。一方、水晶体中カルシウム含量は有意な低下を見た(p<0.001)。

2, 3の結果から、各成分間のカルシウム含量についての相関を求めたところ、血清-前房水間では相関係数0.96、前房水-水晶体間では0.82と高い相関を認めた(図3, 4)。

#### 4. Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

予備実験の結果を図5に示す。反応液のCa<sup>2+</sup>濃度が10<sup>-4</sup>Mの時に最も高い活性値が得られた。これをもとに



図1 欠乏食投与開始後4週間目の細隙灯電顕微鏡所見。前囊下皮質白内障を認める。

Ca<sup>2+</sup>濃度を10<sup>-5</sup>Mに設定した本実験では、表6のごとく欠乏食群において活性値の軽度上昇が見られたものの、有意差は認められなかった。

#### 5. 電子顕微鏡所見

図6で示す上皮部では細胞膜の他に細胞内小器官の膜部分に、図7では皮質の線維細胞膜部分に、図8では後囊の皮質細胞膜にもCa<sup>2+</sup>-ATPase活性を反映する鉛の沈着を認めた。なお、対照実験では反応を認めなかった。

### IV 考 按

日本人のカルシウム摂取量は平均1日600 mg 不足で、欧米人に比べまだまだ不足した状態にあり、特に老人において、カルシウム総量の不足による骨粗鬆症の大きな原因ともなっている<sup>11)</sup>。一方、血清カルシウム濃度は、正常域を大きく逸脱しないようにホメオスタシスが保たれており、カルシウムの摂取不足が血清カルシウム濃度の低下に直結するわけではない。その機構の1つにビタミンD<sub>3</sub>がある。ビタミンD<sub>3</sub>は肝臓および腎臓で代謝されて活性型の1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>へと変換され、骨吸収および腸管からのカルシウム吸収を促進し、血清カルシウム濃度を上昇させる<sup>12)</sup>。したがって、さらにビタミンD<sub>3</sub>の不足が重なれば、血清カルシウム濃度の維持に代償不能の影響を与え得る。以上から、カルシウム摂取の不足、およびビタミンD摂取不足あるいは活性化不全の老人は慢性的な低カルシウム血症状態にあり、これが白内障の発生に何らかの影響を及ぼしている可能性があると思われる。その生化学的パラメーターを推測するため、今回、幼若ラットを低カルシウムかつビタミンD<sub>3</sub>欠乏の栄養状態におき、その相乗効果により血清カルシウム濃度の低下を早期から来す白内障モデルとして用いた。白内障の発生を認めなかったという低カルシウム食のみのラットでの実験<sup>3)</sup>に比較して、早期から明らかに白内障の発生を見た。ビタミンD<sub>3</sub>欠乏に関しては、今回は低カルシウムとの相乗効果にのみ注目したが、局所的な生化学的影響も含めて今後検討する必要があると思われる。

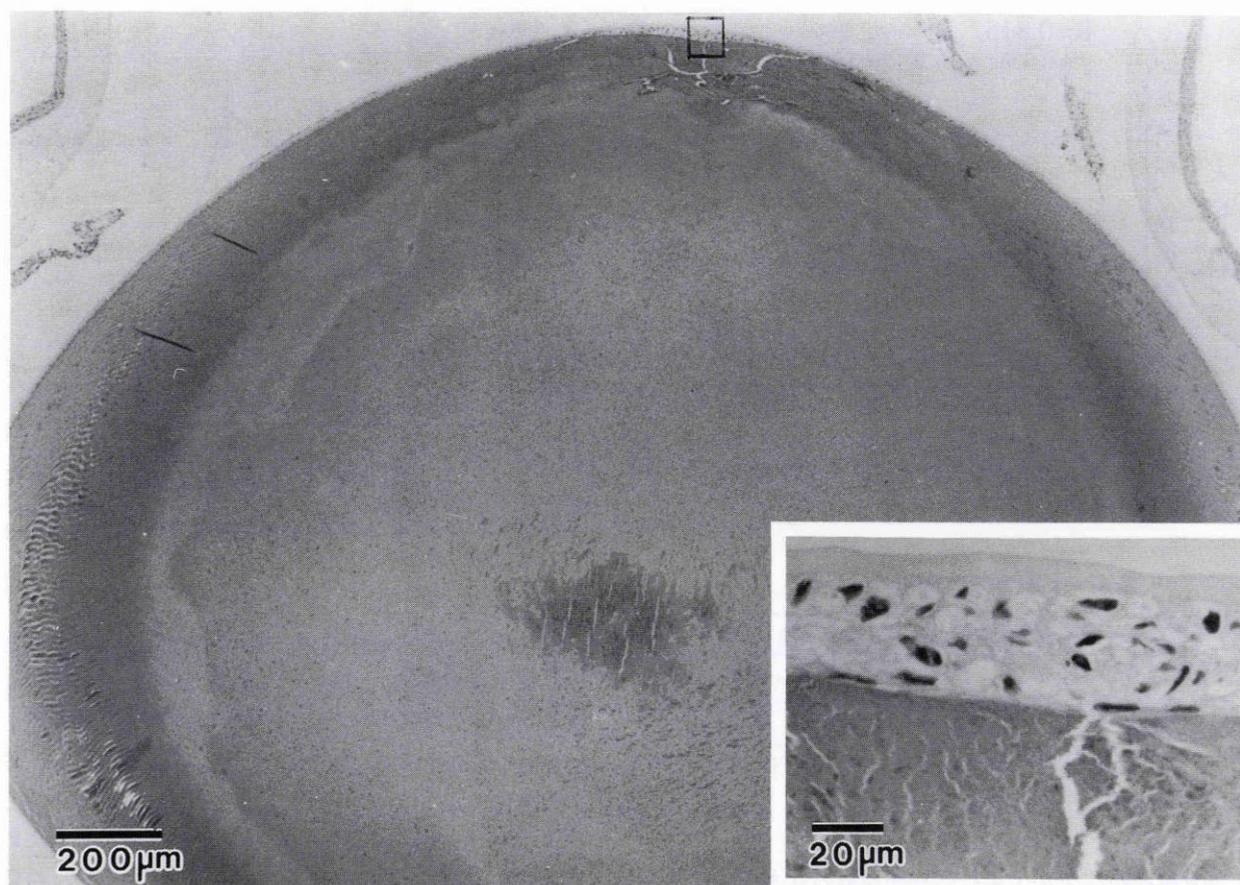


図2 同水晶体の光学顕微鏡所見。  
上皮細胞，水晶体線維層の hydration 像を認める。

表4 血清，前房水カルシウム濃度

	血 清	前 房 水
Control	10.8±0.26	5.4±0.26
Hypocalcemic	4.4±0.14 (p* < 0.001)	2.4±0.18 (p < 0.001)

数値は平均値±標準誤差（単位：mg/dl），各群とも n=5  
\*：p 値は Student t test により求めた

表5 水晶体含水率，およびカルシウム，ナトリウム含有量

	含水率	Ca	Na
Control	53.2±0.9	0.32±0.01	32.4±1.6
Hypocalcemic	54.2±0.9 (NS)	0.23±0.01 (p < 0.001)	42.2±1.4 (p < 0.005)

数値は平均値±標準誤差（単位：含水率は%，他は mmol/kg H<sub>2</sub>O） 各群とも n=5

カルシウムイオンは，水晶体の透明性に関してその増減により相反する影響を及ぼす。水晶体内部のカルシウムが増加すると，蛋白質の会合を来して混濁を招くこと<sup>13)14)</sup>は広く知られている。一方，*in vitro* の実験において，外部環境のカルシウム濃度が低下すると膜機能の障害が起こることも報告<sup>15)</sup>されており，低カルシウムによる白内障に深く関係する事実であろうと思われる。今回，

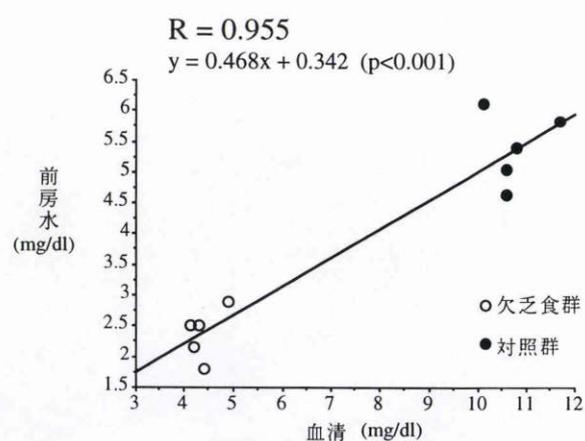


図3 カルシウム濃度，含量の相関および回帰直線。  
血清～前房水。

実験(2)では，血清カルシウム濃度は低カルシウム，ビタミン D<sub>3</sub> 欠乏食投与により著明に低下した。前述したように，カルシウム摂取不足に加えてビタミン D<sub>3</sub> の不足という負荷があるためにホメオスタシスがくずれ，低下を招いたものであろう。前房水カルシウム濃度も低下していたが，これが血清カルシウム濃度を反映することは今までも報告<sup>2)16)17)</sup>されており，今回も血清と前房水のカルシウム値の間には高い相関を認めた(図3)。この前房水カ

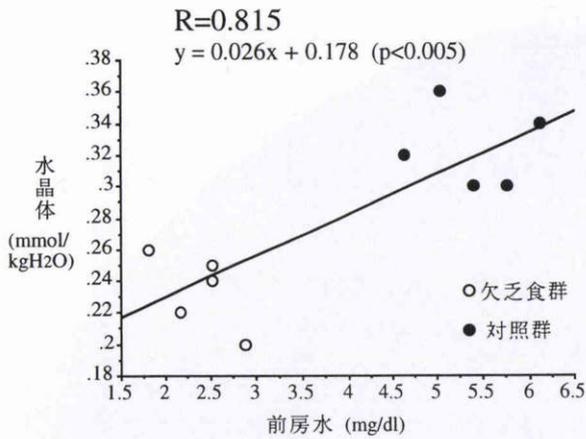


図4 カルシウム濃度、含量の相関および回帰直線。前房水～水晶体。

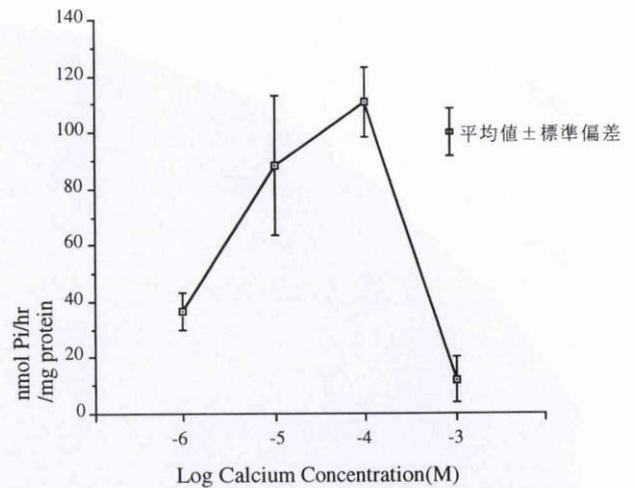


図5 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性測定予備実験。反応液の最適 Ca<sup>2+</sup>濃度を上記から 10<sup>-5</sup>M とした。

表6 水晶体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

	Ca <sup>2+</sup> -ATPase 活性
Control	88.4 ± 11.1
Hypocalcemic	104.0 ± 11.5 (NS)

数値は平均値 ± 標準誤差 (単位: nmol Pi/hr/mg protein) 各群とも n=5

ルシウム濃度の低下が上記した外部環境の低カルシウム状態に相当するとすれば、水晶体膜機能の障害が *in vivo*

でも起こり得ると思われる。実験(1)では、細隙灯顕微鏡で前囊下皮質混濁、および光顕で水晶体皮質の浮腫像を認め、また、実験(3)では、水晶体中ナトリウム含量の増加を見た。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性に関しては、*in vitro*の実験において、カルシウム欠乏が活性を刺激するという報告<sup>18)</sup>や、膜機能障害によるナトリウムの流入に対して、活性が代償的に上昇するという報告<sup>19)</sup>があり、今回もその活性は上昇している可能性があるが、結果的にはナ

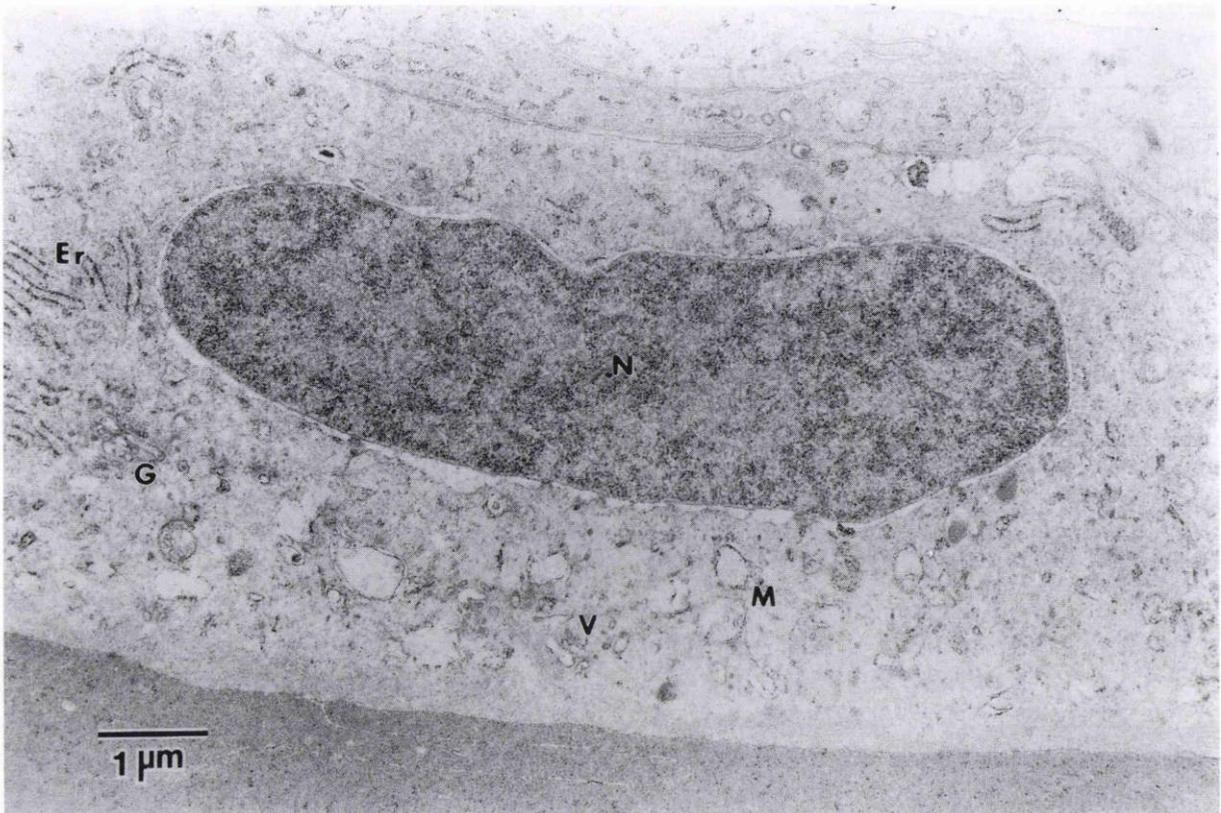


図6 透過電子顕微鏡所見：上皮部。

細胞内小器官の膜部分に活性を示す鉛の沈着を認める。

N: nucleus, Er: endoplasmic reticulum, G: Golgi body, V: vacuole, M: mitochondria

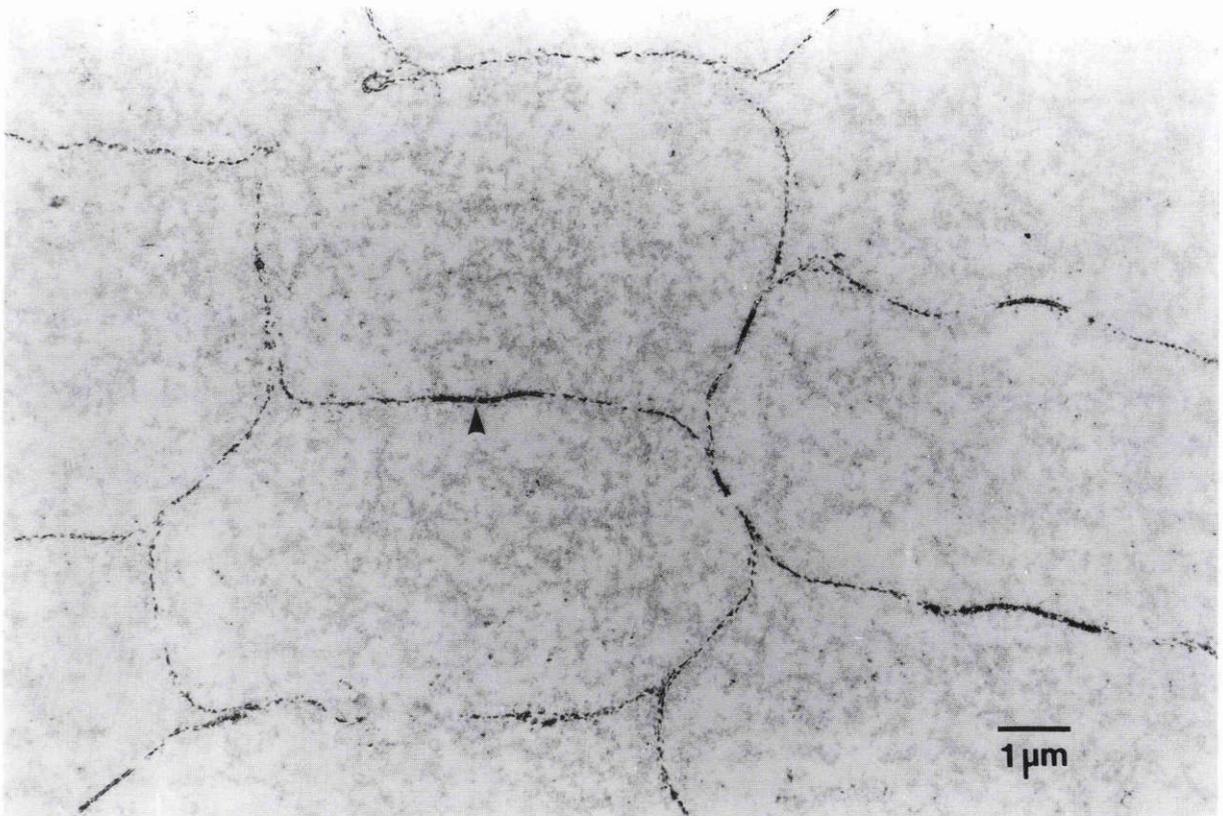


図7 透過電子顕微鏡所見：水晶体線維。形質膜，特に矢印部（gap junctionと思われる）に高い活性を認める。

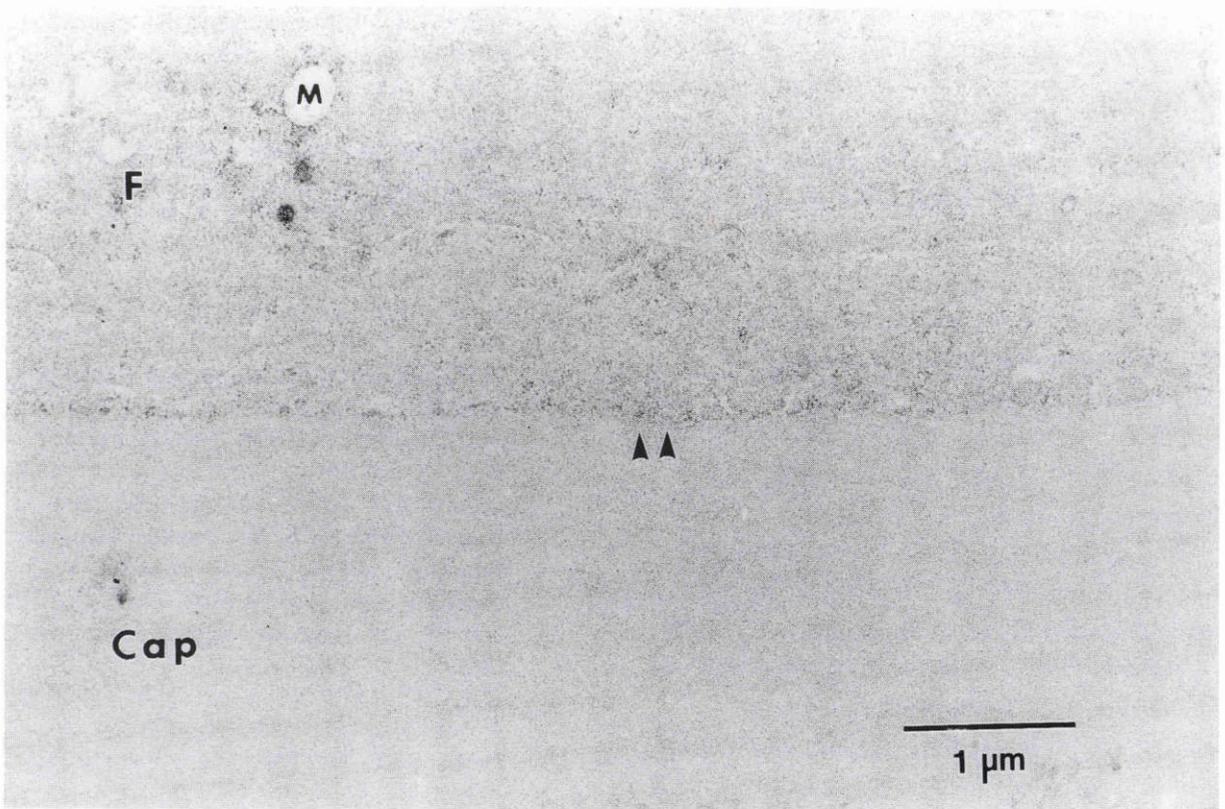


図8 透過電子顕微鏡所見：後囊部。矢印部は後部皮質と後囊の接着部の活性を示す。F: cortical fiber, Cap: capsule, M: mitochondria

トリウム蓄積が生じたものと思われる。一方、カルシウム含量は低下しており、水晶体中カルシウムが白内障発生に影響を及ぼしている可能性は少ない。以上から、今回認めた白内障は、外部環境（前房水）低カルシウムによる膜機能障害の結果、ナトリウムの流入を招き生じたものと推測した。

カルシウムイオンはすべての細胞において細胞内伝達物質としての働きをしており、外的刺激によって細胞内カルシウム濃度が増加し、多くの細胞内反応を活性化する。このため、通常、細胞内カルシウムイオン濃度は、 $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$ Mと、細胞外のカルシウムイオン濃度（ $10^{-3}$ M）に比較して、著しく低いレベルに維持されている。この細胞内カルシウムホメオスタシスには、いくつかの機能が関与しているが、最も重要なのが、形質膜や小胞体膜に存在する $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseである。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseは、細胞内外の濃度差に逆らってカルシウムイオンを細胞外に汲み出す働きをしており、水晶体においてもその存在が証明されている<sup>4)</sup>。ここで、水晶体を1個の細胞とみなした場合、形質膜に相当する上皮細胞層が、水晶体全体のトータルのカルシウムの汲み出しを行っていると考えられる。実験(4)では、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性値は対照群と欠乏食群との間に有意差を認めなかった。水晶体を上皮、皮質、核の成分に分離して各分画の活性値を求めた報告<sup>4)6)20)</sup>によると、上皮および皮質には高い活性を認めるものの核には活性を認めなかったとされている。今回の実験では、全水晶体を対象としたが、初めに作製したホモジェネート中に存在する比較的重い塊状の水晶体核成分が最初の遠心分離によってほとんど分離され、残った上皮および皮質両成分の活性値が得られたものと思われる。上記したように、実験(3)で水晶体中カルシウム含量は低下していたが、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性値に著変を見なかったこと、また、前房水カルシウム濃度と水晶体中カルシウム含量の間に高い相関を認めたこと(図4)から、この水晶体中カルシウム含量の低下は、*in vitro*の低カルシウム環境水晶体培養実験における、水晶体中カルシウム低下の報告<sup>21)</sup>と同様に、外部環境の低カルシウムを反映したものと考えられる。低カルシウム血症白内障モデルでは、初期には水晶体中カルシウム含量は低下し、時間の経過とともに蓄積してくると報告<sup>2)</sup>されている。今回、少なくとも初期の時点では、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性に著変のないことが示されたが、カルシウム含量の減少から増加への転換現象に $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase機能が深く関係している可能性は大きい。どの時点で、如何なる機序で転換が生じるかは今後の研究の成果を待ちたい。

実験(5)において、図6に示す上皮細胞ではさまざまな細胞内小器官の膜部分にも旺盛な活性を認めたが、形質膜における局在に関しては、apicalあるいはbasalの判別は不能であった。図7の皮質線維細胞では矢印の部位に特異的に高い活性を認めた。カルシウムが細胞間の接

合、gap junctionの構造に深く関与していることは報告<sup>22)</sup>されており、この場合もおそらくgap junctionに相当する部位に、高い $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性が認められたものではないかと推測された。図8の後極部でも皮質線維に活性の存在を認め、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性は水晶体後部にも存在することが示された。今回の実験では、標本の作成、特に不安定な酵素活性を保つため弱い固定のまま切片を作成する点にかなりの困難を伴ったが、他の組織と同様、水晶体においても有用な方法であると思われる。

最後に、研究の御指導を頂いた日本医科大学眼科学教室清水由規教授、同第一生化学教室阿部靖子講師、同第二病理学教室村田順造講師に深謝いたします。

本論文の要旨は第96回日本眼科学会総会において発表した。

#### 文 献

- 1) Duke-Elder WS: System of Ophthalmology. Mosby, St. Louis, Vol. XI, 176—181, 1969.
- 2) Delamere NA, Paterson CA, Holmes DL: Hypocalcemic Cataract. I: An animal model and cation distribution study. *Metab Pediatr Ophthalmol* 5: 77—83, 1981.
- 3) 宮里和明: ビタミンD欠乏による白内障に対する活性型ビタミンDの効果について. *眼臨* 86: 784—792, 1992.
- 4) Hightower KR, Leverenz V, Reddy VN: Calcium transport in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1059—1066, 1980.
- 5) Ando T, Miyahara H, Fujimoto K, Miyajima H, Ogawa K: Ultracytochemical localization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity on the epithelial cells of rat trachea. *Acta Histochem Cytochem* 15: 812—826, 1982.
- 6) Borchman D, Delamere NA, Paterson CA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in the rabbit and bovine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 982—987, 1988.
- 7) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 8) Katz AM, Repke DI, Upshaw JE, Polascik MA: Characterization of dog cardiac microsomes. *Biochem Biophys Acta* 205: 473—490, 1970.
- 9) Seals JR, McDonald JM, Bruns D, Jarett L: A sensitive and precise isotopic assay of ATPase activity. *Anal Biochem* 90: 785—795, 1978.
- 10) Ando T, Fujimoto K, Miyahara H, Miyajima H, Ogawa K: A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. *Acta Histochem Cytochem* 14: 705—726, 1981.
- 11) 柴田 博: 高齢者のカルシウム摂取一疫学的考察一. *臨床科学* 24: 1255—1261, 1988.
- 12) De Luca HF, 森内幸子: ビタミンDの代謝並びに作用に関する最近の知見. *ビタミン* 50: 135—141, 1976.
- 13) Jedziniak JA, Kinoshita JH, Yates EM, Hocker LO, Benedek GB: Calcium-induced aggregation

- of bovine lens alpha-crystallins. *Ophthalmol Vis Sci* 11 : 905—915, 1972.
- 14) **Spector A, Rothschild C** : The effect of calcium upon the reaggregation of bovine alpha crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12 : 225—231, 1973.
- 15) **Delamere NA, Paterson CA** : The influence of calcium-free solutions upon permeability characteristics of the rabbit lens. *Exp Eye Res* 28 : 45—53, 1979.
- 16) **Cole DF** : Comparative aspects of the intra-ocular fluids. In : Davson H, et al (Eds) : *The Eye*, Vol 5. Academic Press, London, 71—161, 1974.
- 17) 木下 茂, 上野則夫, 塩崎陽一, 豊島健吉, 花房俊昭, 伏見尚子 : 特発性副甲状腺機能低下症における白内障についての一考察. *眼紀* 28 : 1429—1433, 1977.
- 18) **Hamilton PM, Delamere NA, Paterson CA** : The influence of calcium on lens ATPase activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18 : 434—436, 1979.
- 19) **Paterson CA** : Distribution and movement of ions in the ocular lens. *Doc Ophthalmol* 31 : 1—28, 1972.
- 20) **Borchman D, Paterson CA, Delamere NA** :  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in the human lens. *Current Eye Res* 8 : 1049—1054, 1989.
- 21) **Delamere NA, Paterson CA** : Hypocalcaemic Cataract. In : Duncan G, et al (Ed) : *Mechanisms of Cataract Formation in the Human Lens*. Academic Press, London, 219—236, 1981.
- 22) **Peracchia C** : Calcium effects on gap junction structure and cell coupling. *Nature* 271 : 669—671, 1978.
-