

ヒト糖尿病白内障におけるリポ蛋白質の変動

小原 喜隆¹⁾, 平野 清美¹⁾, 森 吉臣²⁾¹⁾獨協医科大学越谷病院眼科, ²⁾獨協医科大学越谷病院病理

要 約

糖尿病患者にみられた白内障におけるリポ蛋白質を, 超遠心浮上法と結合沈澱法を用いて定量し, 同年齢層で同じ混濁度の老人性白内障と比較検討した. リポ蛋白質分画にはカイロミクロン, 超低密度リポ蛋白質 (VLDL), 低密度リポ蛋白質 (LDL) および高密度リポ蛋白質 (HDL) が分離, 定量された. その結果, カイロミクロンが最も多く定量された. これらのリポ蛋白質分画の総量は両群に差がなかった. しかし, 糖尿病白内障で, 超低比重リポ蛋白質 (VLDL) ($14.84 \pm 0.55 \mu\text{g}/\text{lens}$) と低比重リポ蛋白質 (LDL) ($20.97 \pm 0.58 \mu\text{g}/\text{lens}$) が老人性白内障のそれぞれ $6.30 \pm 0.46 \mu\text{g}/\text{lens}$ と $7.45 \pm 0.61 \mu\text{g}/\text{lens}$ に比較して有意に増加していた. VLDL の増加は糖

尿病によるリポ蛋白質リパーゼ活性低下のために異化反応が進まないため, また LDL の上昇は LDL が糖化されたため蓄積したものとされた. VLDL と LDL の増加は糖尿病 LDL の受容体が, 水晶体上皮およびその下層に局在することが組織学的方法で証明された. 受容体の存在はリポ蛋白質が外部からの供給で受容されることが可能であることを意味している. (日眼会誌 98: 481-486, 1994)

キーワード: リポ蛋白質, ヒト糖尿病白内障, LDL, 酸化, LDL レセプター

The Lipoproteins in Human Diabetic Cataract

Yoshitaka Obara¹⁾, Kiyomi Hirano¹⁾ and Yoshiomi Mori²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine²⁾Department of Pathology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

Four kinds of lipoproteins contained in human diabetic cataract lens were separated by of sequential floatation in an ultracentrifuge, and the quantities of each were determined by selective precipitation. Chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), and high density lipoprotein (HDL) were separated from cataract lenses as lipoprotein fractions, and quantified. Chylomicron was present in the largest quantity among the four. There was no significant difference between the total amount of lipoprotein contained in diabetic cataract lenses (96.95 ± 4.03

$\mu\text{g}/\text{lens}$) and that in senile cataract lenses ($89.51 \pm 8.35 \mu\text{g}/\text{lens}$). The quantities of VLDL and LDL, however, were significantly larger in diabetic cataract lenses (14.84 ± 0.55 and $20.97 \pm 0.58 \mu\text{g}/\text{lens}$, respectively) than in senile cataract lenses (6.30 ± 0.46 and $7.45 \pm 0.61 \mu\text{g}/\text{lens}$, respectively). We demonstrated histologically that LDL receptors are localized on the lens epithelium and its underlying layer (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 481-486, 1994)

Key words: Lipoprotein, Human diabetic cataract, LDL, Oxidation, LDL receptor

I 緒 言

糖尿病白内障の成因は, 全身ならびに水晶体における糖の代謝異常が強く関わっていることは周知のことである. 白内障の原因の一つに膜の障害があげられるが, そ

の指標として膜の移動性に関係しているリポ蛋白質が水晶体の病的変化を現す物質として認識される. 一方, 糖尿病では血液の糖代謝のみならず脂質代謝, 特にリポ蛋白質代謝に異常を生じることから, 水晶体におけるリポ蛋白質の変化を追求することは, 糖尿病白内障の成因を

別刷請求先: 343 埼玉県越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 小原 喜隆
(平成5年8月12日受付, 平成5年12月15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-shi, Saitama-ken 343, Japan

(Received August 12, 1993 and accepted in revised form December 15, 1993)

明らかにするために役立つと考えた。

II 材料および実験方法

1. 材料 (図1)

65~70歳の糖尿病患者にみられた黄色に混濁した白内障を今回の研究では糖尿病白内障とした。対象とした白内障を有する糖尿病患者は内科で治療を受け、罹病期間が10年以上でHbA1cが平均7.1% (6.5~9.0%)の症例であった。また、同年齢層で同程度に混濁した全身合併症

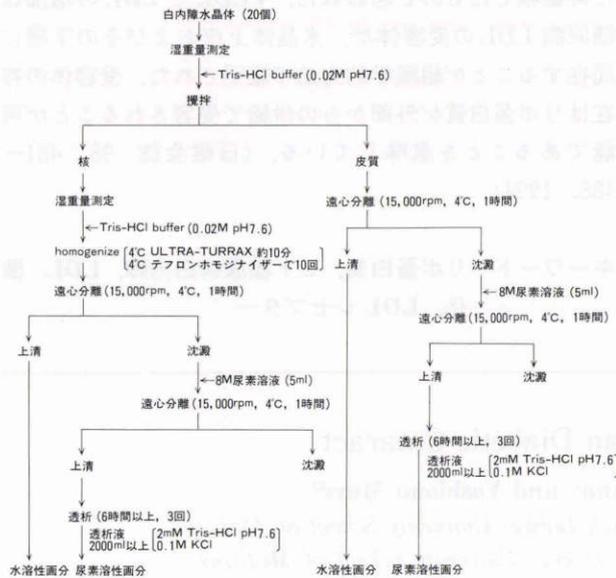


図1 リポ蛋白質測定用試料の作成。



図2 超遠心浮上法によるリポ蛋白質各分画の分離抽出方法。

のない老人性白内障を対照とした。白内障水晶体は、手術の際に核を娩出した後、皮質を注意深く灌流液とともに吸引して材料とした。20個を1検体として、各群それぞれ10検体 (n=10) を使用した。図1の方法でホモナイズし、水溶性分画と尿素溶性分画に分離して実験に供した。

2. リポ蛋白質分画の試料作成 (図2)

超遠心浮上法¹⁾に順じて各リポ蛋白質分画を分離した。超遠心分離機は Beckman Model L (L8-55) Type 50 Ti ローターを使用した。

各種リポ蛋白質の分離への操作は図2に示した。リポ蛋白質中の脂質含量の違いに基づく比重の差を利用して、超遠心によって浮上してくるリポ蛋白質を種類別に分取する方法である。水晶体のホモナイズ後、試料4.0mlに比重1.006g/mlの0.195M NaCl溶液2.0mlを重層し、 $2.6 \times 10^4 \cdot g$ で30分遠心した。浮上層を分取し、さらに比重1.006g/ml溶液2.0mlを加えて $2.6 \times 10^4 \cdot g$ 、1時間遠心して得た上層がキロミクロン (CM) である。第1回目の超遠心後の下方に残った層に比重1.006g/ml溶液2.0mlを重層後、 $11.4 \times 10^4 \cdot g$ 、16時間超遠心を行って3層に分離し、最上層が超低密度リポ蛋白質 (VLDL) である。最下層に0.195M NaCl, 2.44M NaBrの比重1.182g/ml溶液2.0mlを重層後、 $10.9 \times 10^4 \cdot g$ 、20時間超遠心した。その結果、上方に浮上した層が低密度リポ蛋白質 (LDL) である (図3)。LDLを分取後、下層に0.195M NaCl, 7.65M NaBrの比重1.478g/ml溶液2.0mlを重層して、 $10.9 \times 10^4 \cdot g$ 、40時間超遠心して上層に高密度リポ蛋白質 (HDL) 分画を得た。

3. リポ蛋白質定量方法

超遠心で種類別に分取したリポ蛋白質を、基本的には岡崎ら²⁾の血漿リポ蛋白質の分析方法のうちの硫酸多糖類を用いた結合沈澱法で定量した。結合沈澱法は、これらのリポ蛋白質分画が硫酸多糖類などの多価陰イオンと反応して、2価の金属イオン (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} など)

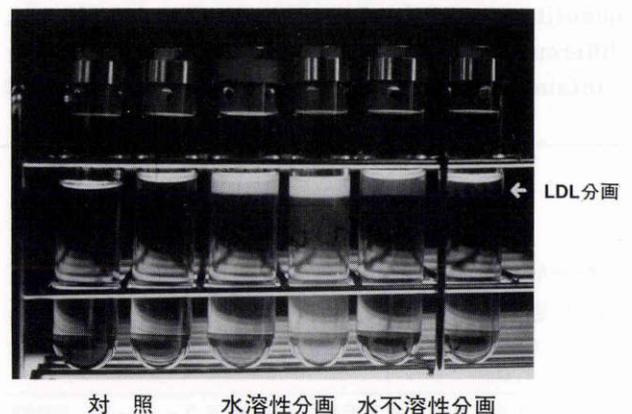


図3 超遠心浮上法で得られた LDL 分画。

最表層に輝く溶液表面の直下に存在する白色層が LDL 分画である。

注) LDL: low density lipoprotein

存在下で複合体を形成し、イオン強度、pHなどの条件を変えることにより段階的に複合体を生成させて各クラスのリポ蛋白質を測定する方法である。CM, VLDL, LDLは、ヘパリン-Ca沈澱法で、HDLはリンタングステン酸-MgCl₂法による結合沈澱法とコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼなどを用いた酵素法を併用して定量した。その詳細については、著者らが既報で述べた³⁾。

4. 水晶体におけるLDL受容体の局在

水晶体におけるLDLのbinding siteを明らかにするために蛍光抗体法⁴⁾を応用して、蛍光プローブで標識した標準LDL(Biomedical Technologies, Inc)を用いて、蛍光顕微鏡で観察した。

水晶体脱臼および緑内障のために囊内摘出された水晶体(56歳, 60歳, 72歳いずれも男性で全身疾患のない)3個を1個ずつ直ちにカプセル(TISSUE-TEK)に入れて上から包埋剤のコンパウンドを注入し、カプセルごとドライアイスの小片を入れたエタノール(99.0%)中で急速に凍結して標本を作成した。カプセルを取り除いてクリオスタットで薄切後、1時間 room temperatureで風乾し、1mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)でコンパウンドを洗浄した。蛍光プローブとしては、Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate)を使用し、Dil-LDL 200 μg/mlを30 μlずつ2回、4℃, over nightで遮光して反応させた。1mM Tris-HCl Buffer(pH 7.4)で洗浄後、封入剤のBiomed Gel/Mount Aqueousを用いてカバーガラスをかけた。蛍光顕微鏡(Olympus BH-2)を用い、Excitation 455 nm, Emission 530 nmで観察し、Nikon FX-35 Aで撮影した。フィルムはKodak Ektachrome 100_{HC}を使用した。

水晶体自体のもっている自家蛍光の影響を除くために、対照としてDil-LDLを反応させない切片を同時に観察、撮影した。

III 結 果

1. リポ蛋白質量

1) 水溶性分画(表1)

水溶性分画中のリポ蛋白質量は、糖尿病白内障が40.91±0.87 μg/lensで、老人性白内障の13.12±1.04に比較して明らかに多量に存在した。HDLは老人性白内障とほぼ同量であるが、CM, VLDL, そしてLDLが有意(p<0.01)に増加していた。そのうち、特にCMは22.24±0.97と多量に含有され、総リポ蛋白質量の約50%を占めているのが特徴的であった。糖尿病白内障では低密度リポ蛋白質が水溶性分画で増加していることが明らかとなった。

2) 水不溶性分画(表2)

尿素溶性分画中のリポ蛋白質は老人性白内障(76.49±

表1 白内障水晶体中リポ蛋白質量 一水溶性分画一

リポ蛋白質の種類	老人性白内障	糖尿病白内障	t-test
CM	2.31±0.94	22.24±0.97	p<0.01
VLDL	3.48±0.71	7.96±0.21	p<0.01
LDL	2.36±0.81	6.29±0.36	p<0.01
HDL	4.97±0.33	4.42±0.41	N.S.
計	13.12±1.04	40.91±0.87	p<0.01

単位: μg/lens n=10

CM: chylomicron, VLDL: very low density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein

表2 白内障水晶体中リポ蛋白質量 一水不溶性分画一

リポ蛋白質の種類	老人性白内障	糖尿病白内障	t-test
CM	45.43±8.24	18.10±2.91	p<0.01
VLDL	2.82±0.21	6.88±0.88	p<0.01
LDL	5.09±0.41	14.68±0.80	p<0.01
HDL	23.15±0.66	16.38±2.01	N.S.
計	76.49±7.48	56.04±4.18	p<0.05

単位: μg/lens n=10

7.48 μg/lens)で、糖尿病白内障(56.04±4.18)より多く含有されていた。各リポ蛋白質分画のうち、CMが老人性白内障で有意(p<0.01)に多く存在していた。しかし、VLDLとLDLは水溶性分画における変化と同様に、糖尿病白内障で有意(p<0.01)に増加していた。HDLは糖尿病白内障で減少していた。老人性白内障の水不溶性分画には水溶性分画の約6倍量のリポ蛋白質が含まれており、その60%がCMであった。

3) 全水晶体におけるリポ蛋白質量(図4)

リポ蛋白質の総量は糖尿病白内障(96.95±4.03 μg/lens)と老人性白内障(89.61±8.35)で有意の変化はみられなかった。そこで、各リポ蛋白質の種類別にみてみ

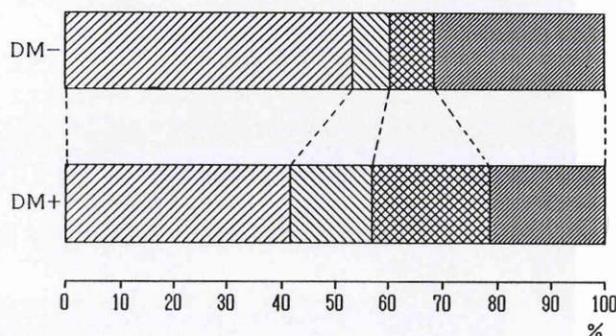


図4 白内障水晶体におけるリポ蛋白質含有率の変動。
 斜線 CM 点線 VLDL 格子 LDL 縦線 HDL

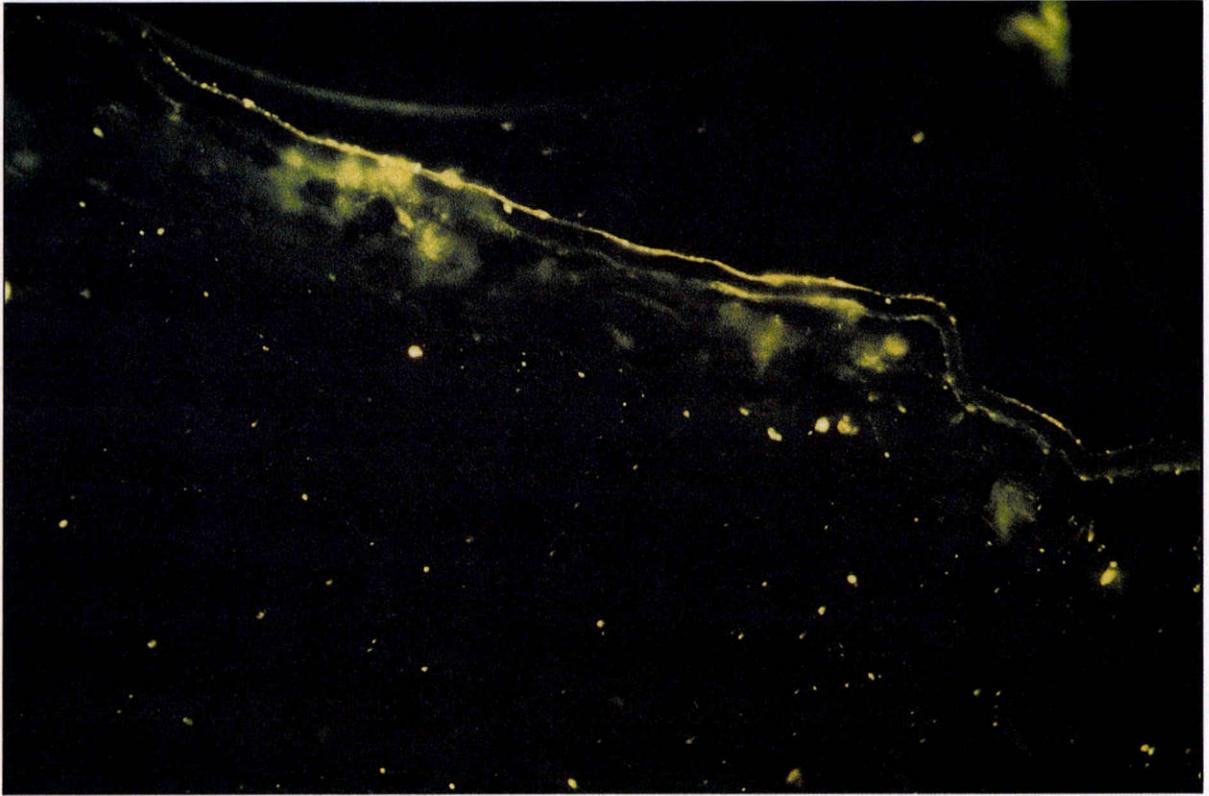


図5 蛍光標識物質である Dil-LDL と結合した LDL 受容体が水晶体上皮および皮質浅層に局在している。皮質深部にも顆粒状に散在しているため、ここにも LDL 結合部位が存在すると思われる。
 Dil: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate

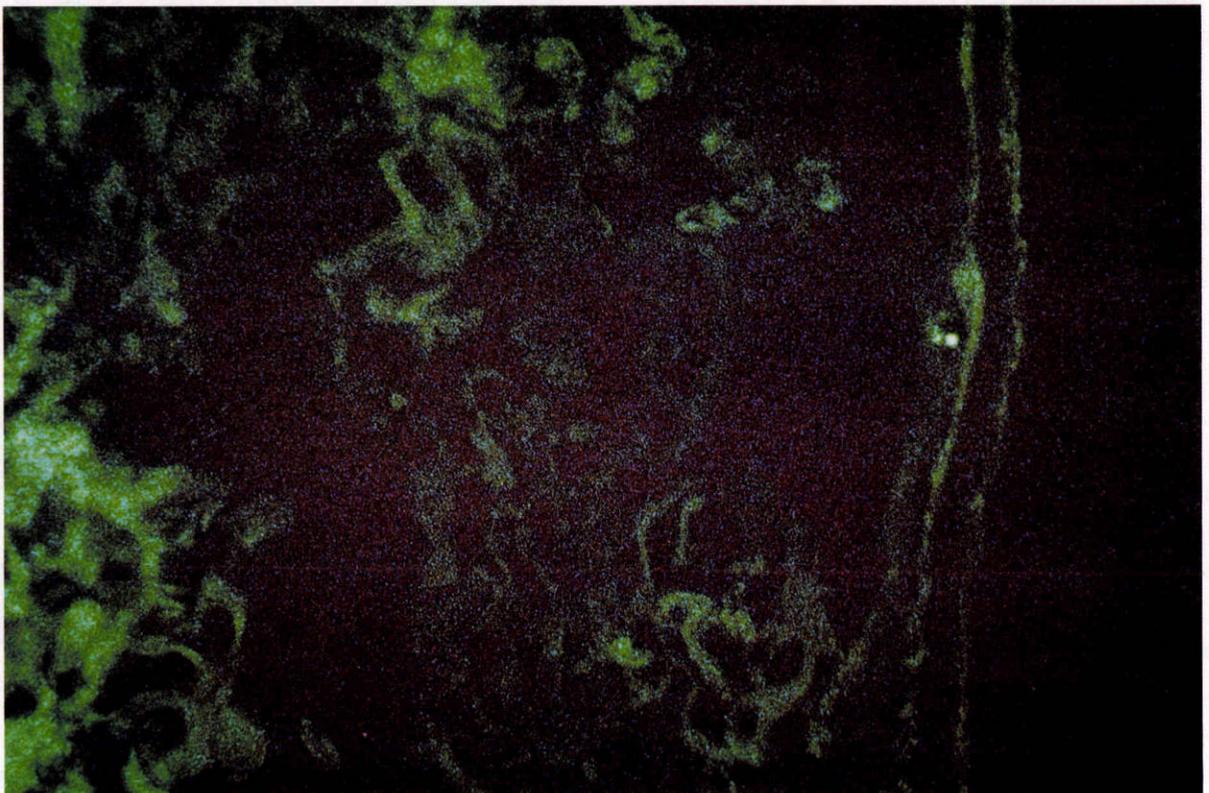


図6 Dil-LDL を反応させない同一部位で、図5の蛍光発色は水晶体のもつ自家蛍光ではないことがわかる。

ると、糖尿病白内障で CM (40.34 ± 1.50) が 41.6% と最も多いが、他の VLDL, LDL, そして HDL が各々 15.3% (14.89 ± 0.55), 21.6% (20.97 ± 0.58), 21.5% (20.80 ± 1.21) とほぼ均等な構成を成していた。一方、対照とした老人性白内障では CM (47.74 ± 4.59) が 53.3% と主要成分であって、次いで HDL が 31.4% (28.61 ± 1.54) を占め、VLDL と LDL はそれぞれ 7.0% (6.30 ± 0.46), 8.3% (7.45 ± 0.61) と僅かであった。すなわち、両群は総リポ蛋白質量には差がないが、各々のリポ蛋白質についてみると、老人性白内障に比べて糖尿病白内障では VLDL, LDL 含有量の増加と HDL 含有量の低下という種別変動が現れていた。

2. LDL 受容体の局在 (図5, 6)

全摘出された水晶体を用いて、蛍光プローブで標識した LDL が水晶体内の LDL 受容体と結合することを利用して、その存在を確認した。その結果、LDL 受容体は材料として使用した3個の水晶体のすべてで、水晶体上皮ならびにその下層に存在することが明らかとなった。

IV 考 按

水晶体は、房水や硝子体といういわば体液に囲まれて生理機能を維持している。したがって、周囲の眼組織だけでなく、全身の影響を受けやすい器官である。水晶体が全身の異常を反映している代表的疾患が糖尿病に伴って生じる白内障である。

糖尿病では心血管障害や動脈硬化が進行しやすく、血液の脂質代謝に異常を生じるといわれ、特にリポ蛋白質の変化が注目されている。白内障では水晶体の膜が障害されることから、リポ蛋白質は膜の構成成分である脂質の需要供給の点で非常に重要であり、その変化を明らかにする必要がある。

眼におけるリポ蛋白質に関する報告は、著者ら³⁾の水晶体の他に吉沢ら⁵⁾が角膜で測定しているにすぎない。組織におけるリポ蛋白質の定量方法は確立されていないので、その抽出に工夫が要求される。

リポ蛋白質の抽出方法には、液体クロマトグラフィー法、結合沈澱法や電気泳動法もあるが、超遠心浮上法が基本とされる²⁾。超遠心浮上法は、各リポ蛋白質の脂質、蛋白質の構成比の違いから生じる比重の差を利用して超遠心を行い、段階的に浮上してくる各リポ蛋白質を分取する方法である。リポ蛋白質は構成成分に脂質を含有するため、同分子量の脂質を含まない蛋白質とも比重の違いにより正しくリポ蛋白質を分離することができる。超遠心分離で最上層に浮上してくるリポ蛋白質分画は肉眼的にもはっきりと識別される(図3)。著者らがゲル濾過で抽出したリポ蛋白質を定量した成績³⁾は、今回に比較して非常に高値であった。ゲル濾過では純度を高めるのに限度があり、リポ蛋白質以外の HMW も測定していた危険性も考えられるため、今回行った超遠心浮上法+結

合沈澱法の方がリポ蛋白質の分取、定量により適していると思われる。この方法により、前回のゲル濾過で抽出したリポ蛋白質と比較して、より精度の高い試料を得ることが出来た。

次に、水晶体中で検出されたこれらのリポ蛋白質が果たして水晶体内外のどちらの由来であるかということを追求するために、リポ蛋白質受容体の水晶体内局在を組織学的に証明する必要がある。免疫組織学的方法である蛍光抗体法を改良して、蛍光プローブで修飾した LDL を全摘ヒト水晶体に作用させ、水晶体上皮およびその下層に蛍光 LDL の存在が確認された(図5)。

蛍光 LDL 結合部位、すなわち LDL 受容体が存在するという事は、LDL の水晶体外からの供給を示唆するものであり、全身から水晶体への脂質輸送、また、水晶体からの不要脂質排出の経路を解く重要な鍵になると思われる。今回、リポ蛋白質受容体の局在を LDL 分画を代表に証明したことは、水晶体におけるリポ蛋白質の生体外からの受容供給を裏付ける結果と考えられる。

Cenedella⁶⁾は、リポ蛋白質を構成する蛋白質部分であるアポリポ蛋白質 A-1 をヒト房水中に証明している。アポ A-I は HDL の構成成分であり、他のリポ蛋白質も房水から水晶体内に取り込まれた可能性が伺える。また、HDL 中のアポ A-I の大部分は CM から移行するため、白内障で増加した水晶体中の CM から房水中の HDL に移行した可能性も考えられる。水晶体中のリポ蛋白質は、血液中のリポ蛋白質が血液-房水柵を通過して房水中に入り、水晶体囊に存在するグリコサミノグリカンを介して水晶体との授受が行われていると思われる。水晶体囊には、グリコサミノグリカンの一つのヘパラン硫酸が存在し、細胞表面におけるリポ蛋白質リパーゼ(LPL)のアンカーの役割を担っている。LPL は CM, VLDL 中のトリグリセライド(TG)をグリセロールと脂肪酸に加水分解する酵素であり、その繋ぎ手のヘパラン硫酸の水晶体囊中含量が加齢とともに減少することが報告されている⁷⁾。本実験で明らかとなった老人性白内障水晶体中カイロミクロン蓄積は、このヘパラン硫酸の減少に起因している可能性が強いと推察している。

糖尿病では高 TG 血症を示すことが多く、VLDL が上昇する⁸⁾⁹⁾他に、LDL-コレステロールの上昇¹⁰⁾や HDL-コレステロールの低下¹¹⁾がみられる。

糖尿病白内障水晶体における VLDL の上昇は、LPL の認識部位であり、活性化因子でもあるアポリポ蛋白質 C-II がグリケーションされたため、LPL 活性が低下して VLDL → LDL の異化作用の反応速度が低下したためと思われる。

LDL は、ヒトでは VLDL の異化によって生成されるが、糖尿病でみられる LDL の増加は LDL の分解が障害されることに起因している¹²⁾。LDL の異化障害は、LDL レセプター自身の異常と、LDL 側がグリケーションされ

てレセプターと結合できなくなり、分解能力が低下したために起きたと思われる。白内障においてもレセプター認識部位であるアポリポ蛋白質 B が、非酵素的糖化であるグリケーションにより変性することは明らかであり、その成績は他稿で報告する予定である。

また、糖尿病白内障における HDL の低下には、グリケーションの亢進と LPL の活性低下が関係していると思われる¹²⁾。すなわち、アポリポ蛋白質 A-I がグリケーションにより HDL 粒子から脱落して HDL の崩壊が亢進したことで、LPL 活性低下により TG-rich リポ蛋白質からリン脂質やアポリポ蛋白質 (A, C, E) を HDL へ転送する能力が低下したことが関与していると思われる。

今回の研究と併行して行ったアガロースゲル電気泳動を用いた白内障水晶体中のリポ蛋白質の電気泳動では、酸化型 LDL の大きなスポットと酸化型 HDL が証明された。白内障においては、活性酸素スキベンジング機能の低下により過酸化反応が進行し¹³⁾、その結果として出現してくる酸化型リポ蛋白質が、glycated リポ蛋白質とともに変性リポ蛋白質の増加をもたらす、水晶体におけるリポ蛋白質代謝異常の一因になっていると思われる。すなわち、糖尿病白内障で、老人性白内障と比較して有意に増加した LDL は、グリケーションと酸化により変性した LDL がレセプターと結合できずに蓄積したためと考えられる。

過剰なフリーラジカルや glucose は、脂質過酸化や S-S 結合の増加とアマドリ転換後の異常な蛋白質間架橋の形成を引き起こし、糖尿病合併症の発現に影響を与えている。また、フリーラジカルはグリケーションを進める前期あるいは後期反応に関与しているともいわれる¹⁴⁾。

本研究で認められた VLDL と LDL の有意な増加は、糖尿病白内障においてリポ蛋白質がグリケーションや酸化を受けた結果、異化障害が起こり、蓄積されたためと思われる。そして、高 CM、高 LDL 特有の白く濁る散乱光の増加や、全身と水晶体間の脂質授受機構の乱れによる水晶体内恒常性の維持力低下が、白内障の発生ならびに進行に関与していると解釈される。

文 献

- 1) Hatch F, Lees RS: *Advances in Lipid Research*. Academic Press, New York, Vol 6, 1, 1968.

- 2) 岡崎三代, 原 一郎: 血漿リポ蛋白質の分析. 続生化学実験講座 3, 膜脂質と血漿リポ蛋白質(下), 日本生化学会編, 東京化学同人, 618-632, 1986.
- 3) 小原喜隆, 平野清美: 老人性白内障の核混濁の成因に関する生化学的研究. 日眼会誌 95: 575-580, 1991.
- 4) 川生 明: 第 2 章. 免疫組織化学. III. 蛍光抗体法, 病理技術マニュアル 4, 病理組織化学とその技術. 日本病理学会編, 医歯薬出版, 182-200, 1987.
- 5) 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.
- 6) Cenedella RJ: Lipoprotein and lipids in cow and human aqueous humor. *Biochem Biophys Acta* 793: 448-454, 1984.
- 7) Laurent M, Romquin N, Regnault F: Purification and identification of a glycosaminoglycan in the lens capsule of bovines; Its variation during aging. *Interdiscipl. Topics Geront* 12: 71, 1978.
- 8) Dunn FL, Rasken P, Bilheimer DW, Grundy SM: The effect of diabetic control on very low density lipoprotein-triglyceride metabolism in patients with type II diabetes mellitus and marked hypertriglyceridemia. *Metabolism* 33: 117-123, 1984.
- 9) Kissebah AH, Alfarsi S, Evans DJ, Adams PW: Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 217-225, 1982.
- 10) Sosenko JM, Breslow JL, Miettinen OS, Grabay KH: Hyperglycemia and plasma lipid levels, a prospective study of young insulin-dependent diabetic patients. *N Engl J Med* 302: 650-654, 1980.
- 11) Laakso M, Pyörälä K, Voutilainen E, Marniemi J: Plasma insulin and serum lipids and lipoproteins in middle-aged non-insulin-dependent diabetic and non-diabetic subjects. *Am J Epidemiol* 125: 611-621, 1987.
- 12) 林 睦郎: 内分泌疾患とリポ蛋白. 疾患とリポ蛋白, 84-90, 第一化学薬品(株), 1989.
- 13) 小原喜隆, 油井秀夫, 門屋講司, 波紫秀厚, 大村まゆみ, 堀内三郎: 糖尿病性白内障発生への過酸化反応の影響. 日眼会誌 86: 1393-1399, 1982.
- 14) 近藤元治, 中華幸治: 糖尿病における蛋白のグリケーションとフリーラジカル: 糖尿病記録号, 121-122, 1992, 医学図書出版, 東京, 1992.