

## 第99回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

## 活性酸素・フリーラジカルと眼疾患

## 活性酸素・フリーラジカルと白内障

小原 喜隆

獨協医科大学越谷病院眼科

## 共同研究者

門屋 講司, 新井 清美, 田中 寧, 林 振民, 吉田紳一郎  
庄子 英一, 橋本 浩隆, 川崎真木生, 佐藤 洋子

## 研究協力者

竹鼻 真, 宇賀 茂三, 西郡 秀夫, 壬生 寛之, 石井 康雄, 井上 周

## 要 約

白内障の発生機序は未だ解明されていない。特に老人性白内障は加齢現象の行く末に生じるものとは考えにくく、発生を誘発する因子が多次的に多数あることから、原因を特定できずにいるのが現状である。しかし、白内障の直接的原因は明らかに出来ないもの、諸々の因子によって生じる現象に共通しているのが酸化(oxidation)であると思われる。

過酸化反応を生じ、そして進行させて組織に傷害を来すのが活性酸素・フリーラジカルであることから、白内障の発生について過酸化反応の観点から追求した。

## 1. 水晶体における過酸化反応

## 1) 加齢

ラット水晶体では、ラジカル消去に作用する酵素である superoxide dismutase (SOD) と抗酸化作用を有する還元型グルタチオン (GSH) が加齢とともに減少していた。その結果、24 か月齢で過酸化脂質が急激に増加した。もう一つの特徴的变化は、24 か月齢水晶体で  $Ca^{++}$  が非常に増加したことである。加齢では過酸化が進行して膜が傷害され、蛋白質の凝集が進んで透明維持が難しくなっている。膜の流動性を表すリポ蛋白質は酸化型の低比重リポ蛋白質 (LDL) や高比重リポ蛋白質 (HDL) が加齢とともに増加していた。老化促進マウス (SAM) 水晶体においても過酸化反応が進行していた。

ヒト水晶体における加齢的反応は蛍光強度の変化で判

定した。40代になると自発蛍光強度が増し、60代になると10代の6.3倍にもなった。

## 2) ラジカルの発生

核型白内障で  $HO\cdot$  の発生が ESR (electron spin resonance) で証明された。アスコルビン酸ラジカルは成熟型白内障で直接的に証明された。他の白内障では  $H_2O_2$  を付加することによって容易にアスコルビン酸ラジカルが発生した。ラジカルの発生に Fe イオンと Cu イオンが影響し、特に Cu イオンの作用が強い。

## 3) 酸化関連物質の変化

老人性白内障と糖尿病白内障を核型 (N)、皮質型 (C)、後囊下混濁型 (P)、そして成熟型 (M) に分けて検討した。

過酸化脂質が両白内障で N に最も多い。過酸化反応防衛に働く Cu, Zn-SOD は N 型に多いものの、活性値が低くて不活性となっている。  $H_2O_2$  scavenging (catalase と glutathione peroxidase) 活性の低下は  $H_2O_2$  の消去が不完全となるために  $H_2O_2$  を残存させることになる。M 型で  $H_2O_2$  が少ないのは SOD 活性が低いため  $H_2O_2$  を生成出来ないことによる。  $H_2O_2$  は両白内障ともに P で最も多い。糖尿病白内障での減少が目立っていた。グルコースは糖尿病白内障で M に最も多く、老人性白内障では N に多く含まれていた。非酵素的糖化反応の産物であるフルクトサミンは両白内障で N に多く存在していた。

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7年8月25日受付, 平成7年10月19日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshitaka Obara, M.D. Department of Ophthalmology, Dokkyo Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine. 2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya-shi, Saitama-ken 343, Japan  
(Received August 25, 1995 and accepted in revised form October 19, 1995)



Cu と Fe イオンは過剰な場合は過酸化反応を進行させる(フェントン(様)反応), Cu イオンは過酸化反応を促進させる方向に作用し, 糖尿病においては特に影響が強い。

#### 4) 膜の変化

膜の主成分である脂質はリン脂質と中性脂質が主体である。リン脂質はスフィンゴミエリンが最も多く, 次いでフォスファチジルエタノールアミン, フォスファチジルコリンなどが存在し, 白内障ではリゾ体(リゾフォスファチジルエタノールアミン)の割合が増えていた。白内障では飽和脂肪酸が増加した。リポ蛋白質はカイロミクロン, 超低比重リポ蛋白質(VLDL), LDL そして HDL の存在が証明された。LDL のレセプターが水晶体上皮に存在し, 外因性 LDL が水晶体嚢内に取り込まれる像が確認された。白内障では酸化型 LDL も水晶体嚢を通過して入っていた。VLDL と LDL が糖尿病白内障で有意に増加していた。糖尿病ではグリケーション(非酵素的糖化)が進行するため, リポ蛋白質も糖化され, 糖化 LDL と糖化 HDL の増加がみられた。糖化率は水溶性分画で高率であった。

### 2. 水晶体周囲環境(体内)の変化と過酸化反応

#### 1) 糖尿病における水晶体周囲環境(房水, 硝子体および血液)の過酸化反応

過酸化脂質は血液では糖尿病白内障者と老人性白内障者で差がないが, 水晶体, 房水および硝子体では有意に多い。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は糖尿病の各部位で増加していた。これは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を消去する酵素の活性が低下したことによる。

活性酸素消去に関連する Cu, Zn-SOD は, 各部位では量的変化は少ないが, 活性値は明らかに低下していた。抗酸化物質としての GSH は各部位で減少し, 血液と硝子体では有意に減少した。GSH の減少はグルタチオンリダクターゼやグルタチオンペルオキシダーゼの活性低下につながる。L-アスコルビン酸は白内障水晶体と硝子体で有意に減少していた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を消去する酵素活性も白内障と硝子体で有意に減少していた。

Fe イオンは各部位で変化していないが, Cu イオンはすべての部位で増加し, 特に水晶体と硝子体で有意に増加していた。糖尿病にみられる糖化反応は各部位で強く生じることは当然であるが, 蛍光を含んだペントシジンなどの糖化終末産物(advanced glycosylated endproduct,

AGE)の存在が確認され, 糖尿病白内障で増加していることが定量的に証明された。

2) 両面灌流型水晶体培養装置を用いた高グルコース環境および酸化防御欠如状態が水晶体の過酸化反応に与える影響

培養液グルコース濃度を 300 mg/dl にして水晶体を 3 週間灌流培養すると水晶体の過酸化脂質は 7 倍にも増量し, SOD は量的にも機能的にも低下していた。過剰なグルコースは過酸化反応を進め, 蛋白質を糖化するように作用する。

Cu, Zn-SOD, L-アスコルビン酸, そして GSH という酸化防御物質を灌流培養液から除くと過酸化脂質が 10 倍に増え, SOD の量的および活性値の低下がみられた。

### 3. 水晶体周囲環境(体外)の変化と過酸化反応

#### 1) 紫外線(UV-B)照射によるラット水晶体の過酸化反応と組織変化

ラットを麻酔下で片眼に 1 週間隔で UV-B を 1 回 3.0 kJ ずつ 3 回照射した。脂質は照射によって若年ラットでは合成能が高まるが, 水溶性蛋白質への変化はあまりみられていない。

過酸化脂質は非照射群では加齢に伴って増加しているが, 照射群では 12 か月齢で減少していた。しかし, 18 か月齢になると非照射群に比べて増加していた。これは同時期に脂質量が急激に減少したことに関連があると思われる。SOD 活性は 6 か月齢から低下しはじめ, 18 か月齢では非照射群の 50% にまで低下した。

UV-B 照射によって水晶体上皮末端が後方に移動し, 水晶体線維に膨化がみられた。

#### 2) UV-B 照射による DNA の変化

UV-B を 0.5~5.0 kJ/m<sup>2</sup> まで段階的にウシ水晶体上皮細胞に照射すると, 照射量に比例して DNA が破壊されていた。紫外線は水晶体の過酸化反応の進行に影響を与え, DNA の鎖切断を生じて水晶体を混濁化へと進める因子の一つといえる。(日眼会誌 99:1303-1341, 1995)

キーワード: 糖化反応, Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ, 紫外線照射, 両面灌流型水晶体器官培養装置, 水晶体自発蛍光

## The Oxidative Stress in the Cataract Formation

Yoshitaka Obara

Department of Ophthalmology Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

### Abstract

The lens of the eye is an avascular tissue surrounded by fluids such as the aqueous humor and vitreous body, with one side facing toward the

outside of the body. We investigated peroxidative reactions occurring in cataractous lenses, examining changes within the lens tissue as well as in the



surrounding environment.

### 1. Peroxidative reactions in lenses

#### 1) Aging and peroxidative reactions

The activity of superoxide dismutase (SOD) began to decrease in the lenses of rats at six months of age. Moreover, the level of lipid peroxide increased significantly in the lenses of rats at 24 months of age. Lipoproteins became increasingly oxidized with age. The levels of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Ca}^{++}$ , ions that are important to the maintenance of membrane function, also varied significantly with age. In the lenses of six-month-old Senescence Accelerated Mice (SAM), there was a marked decrease in the ability of scavenge active oxygen and a marked increase in the amount of lipid peroxide. In human lenses, the level of autofluorescence increased as the lens fiber structure changed with age.

#### 2) Generation of free radicals inside the lens

We verified that  $\text{HO}^{\cdot}$  and ascorbic acid radicals were being generated inside cataractous lenses using electron spin resonance (ESR).

#### 3) Changes in oxidation-related substances in cataractous lenses

Senile cataractous lenses and diabetic cataractous lenses were classified as four types, cortical, nuclear, posterior subcapsular, and mature. In cataractous lenses from all types of diabetic patients, the levels of glucose, glycated protein, and lipid peroxide were higher than in senile cataractous lenses. Among the four types of cataracts, the accumulation of peroxides was the greatest in the nuclear type both diabetic and senile cataractous lenses.

#### 4) Transitional metals

Iron ions and copper ions existed in lens tissue. In particular, the subepithelial region of the lens stained strongly for copper ions. The increased level of copper ions in cataractous lenses is likely to be related to the increased peroxidation in this tissue.

#### 5) Changes in membrane

Lowered levels of phospholipids and a higher degree of saturation of fatty acids were observed in senile cataractous lenses as compared with normal lenses. The increased saturation of fatty acids indicated that there was a damage to the membrane structure due to peroxidative reactions. The receptors for low density lipoprotein (LDL) were shown to exist on the epithelium of normal lenses. Acetyl-LDL, a denatured lipoprotein was incorporated into senile cataractous lenses but not into normal lenses, suggesting that the barrier function of the mem-

brane deteriorates in cataractous lenses. Moreover, in diabetic cataractous lenses, the levels of very low density lipoprotein (VLDL) and LDL significantly increased.

#### 2. Change in the environment surrounding the lens and peroxidative reactions.

1) Changes in the levels of oxidation-related substances in blood, aqueous humor, and vitreous body from diabetic patients: all had decreased levels of reduced glutathione and superoxide scavenging activity, and increased levels of lipid peroxide and glycated protein. This may have been due to a reduction in the anti-oxidative potential in the environment surrounding the lens due to the enhanced glycation. Changes in the level of oxidation related substances in the vitreous body in particular, will likely have a significant impact on the lens.

#### 2) Changes in lenses as the surrounding environment deteriorates

Human lenses were cultured for three weeks under conditions similar to those found *in vivo* utilizing the culture system that we had originally designed and constructed. When protective activity against peroxidation was reduced, the amount of lipid peroxide increased significantly. In the presence of high levels of glucose, the levels of lipid peroxide increased and the amount and activity of SOD decreased.

#### 3. Effects of changes in the external environment on peroxidative reactions

##### 1) Ultraviolet irradiation

One eye of rats (1, 6, 12, 18 months old) was irradiated with UV-B at  $3\text{ kJ/m}^2$  3 times a week under anesthesia. The level of lipid peroxide was increased and the level of lipid was decreased in 18-month-old rats.

##### 2) DNA damage in bovine lens epithelial cells correlated with the dose of UV-B irradiation.

In conclusion, we suggest that lenses develop peroxidation-mediated opacification due to both internal and external environmental changes in addition to the metabolic activity within the lens tissue itself. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1303-1341, 1995)

Key words: Glycation, Cu, Zn-superoxide dismutase, Ultraviolet-B irradiation, Double-faced perfusion system, Autofluorescence



## I 緒 言

白内障の成因に関する研究は、古くて新しい研究課題である。成因については生化学、病理・形態学、分子生物学、疫学、そして画像解析など実に多方面から長年にわたって検討がなされている。しかし、水晶体の混濁を惹起させる主因をみつけたことは未だ達成されていない。白内障研究に関して生化学における最近の研究分野を文献的に整理してみると、1/4が酸化関連物質についての論文であって、次いで糖代謝や糖化に関する研究が約20%を占めている。他には蛋白質・アミノ酸(15%)、膜(12%)、細胞増殖(9%)、酵素(7%)、薬物(5%)、加齢(4%)、その他(3%)となっている。酸化関連物質の中には脂質、蛋白質、核酸、そして酸化に関与する酵素や抗酸化物質も含まれるので研究領域が広い。そのうえ、酸化で膜が損傷され、糖化が酸化消去酵素の活性を低下させること、そして薬物や加齢によっても酸化が促進されることを考えると、最近の白内障研究は酸化現象の解明に向かっていくといっても過言ではないようである。

混濁した水晶体に起こっている生化学的变化は膜の異常、代謝異常、そして酸・塩基の不均衡としてとらえることが出来る。膜にはチャンネルが存在し、膜一膜にはギャップジャンクションがあって、物質移動を可能にしている。チャンネルが崩れると、膜の能動輸送や受動輸送が障害される。能動輸送の異常はNa<sup>+</sup>・K<sup>+</sup>-ATPaseやCa<sup>2+</sup>-ATPase活性の低下によるポンプ機能の異常として生じ、受動輸送は膜内の拡散速度の異常の結果、Na<sup>+</sup>の蓄積とK<sup>+</sup>の流出によるCa<sup>2+</sup>の流入がみられる。その他にも膜の主要成分であるリン脂質や膜蛋白質の酸化によって膜のバリア機能が失われて膜構造が不整化する。

水晶体には蛋白質を代表として糖質、脂質、アミノ酸、核酸などが存在して物理的ならびに機能的均衡を保っている。蛋白質代謝の重要性は周知のことであるが、糖の蛋白質への影響が注目される。すなわち、非酵素的に蛋白質を糖化する反応である。この現象は糖尿病患者の白内障は、当然ながら老人性白内障でも起きている。また、抗酸化酵素の一つであるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)も糖化させて酵素活性を低下させ、酸化を進めることになる。

酸・塩基平衡の失調とは酸化現象の亢進にある。酵素が加齢、紫外線照射、膜に存在する不飽和脂肪酸、そして酸化酵素の影響で活性酵素・フリーラジカルとなって蛋白質、脂質、核酸、そして酵素に損傷を与えるので、水晶体の混濁化を促進する重要な因子と考えられる。

これら白内障でみられる生化学的三大主要変化ともいうべき異常所見には、生体のもつ加齢に基づくホルモンの不均衡、カルシウム失調、そして耐糖能の低下などが影響し、その他に全身および眼局所の疾病あるいは薬物により病的な反応として進めることになる。体内からの影

響だけでなく、体外からも紫外線、放射線、そして熱などに代表される因子が白内障のトリガーとして作用していると考えられる。

過酸化反応が多くの疾病の発症に関係することが注目されているが、その理論的根拠は*in vitro*での反応結果によるところが多いように思われる。本稿では水晶体に生じている過酸化反応を水晶体を取り囲んでいる生体と、生体外の環境の変化との観点から考察する。

## II 対象ならびに実験方法

### 1. 対 象

#### 1) ヒト水晶体

水晶体の脂質構成に関する研究で使用した正常水晶体は、著者が以前に米国イリノイ大学眼科学教室(指導E. Cotlier 教授)で行った研究で、米国アイバンク協会から入手したものである。年齢60~70歳の7眼を、1眼を1検体として使用した。今回の研究で水晶体の器官培養ならびにリポ蛋白質の受容体の組織的証明には脱臼水晶体(外傷の既往3眼、原因不明1眼)を正常水晶体として使用した。

ヒト白内障水晶体は年齢60~70歳の老人性白内障と糖尿病白内障を手術の際に採取して材料とした。老人性白内障は、全身の代謝異常や悪性腫瘍によるX線照射などの既往のない人とした。ここでいう糖尿病白内障とは、老人性白内障と同年齢層で糖尿病に罹患して、現在治療中の人で手術の適応となった白内障である。

白内障手術における材料の採取は、超音波乳化吸引術で乳化した水晶体を水槽内のボトルに集めた後、直ちに遠心分離を行って試料とした。囊外摘出術では核とそれに付着している皮質を注意深く採取し、残った皮質を丁寧に吸引して両者を合わせて試料とした。採取した水晶体を研究の試料に供するに際しては、患者の同意を得て行った。

#### 2) ヒト白内障の形態分類

ヒト白内障を極大散瞳して細隙灯顕微鏡で観察して皮質型、核型、後囊下型および成熟型に分けた。その判定はすべて同一人が行った。

#### 3) 血液、房水および硝子体

血液と房水は、老人性白内障および糖尿病白内障の手術の際に患者の承諾のもとに採取した。硝子体は増殖性糖尿病網膜症の硝子体手術の際に得られた。対照として使用した硝子体は全身疾患のない人の網膜剥離で、硝子体手術を施行した場合ならびに眼外傷で硝子体手術を行った際に採取した。硝子体手術で切除、吸引した硝子体は水槽内のボトルに集められ、直ちに遠心分離を行って試料とした。

#### 4) 動物モデル

##### ① ラット水晶体

##### イ) 加齢と過酸化反応



1, 6, 12, 24 か月齢の Fischer 系雄ラットの水晶体 1 個を 1 検体として 6 個を使用した。生化学的研究に供する前に水晶体重量を測定した。

#### ロ) 紫外線照射

1, 6, 12, 18 か月のラットの片眼に麻酔下で UV-B (312 nm) 3 kJ/m<sup>2</sup> を 1 週に 1 回ずつ 3 回照射した。各群の酸化関連物質および糖質, 脂質, 蛋白質の変動を測定した。12 か月齢のラットを対象に紫外線による形態変化を観察した。

#### ② マウス水晶体

老化促進マウス (senescence accelerated mouse (SAM)-P 1) の 2 か月および 6 か月齢を水晶体の加齢現象の対象とした。

#### ③ ウシ水晶体

摘出眼球から注意深く水晶体を摘出した。水晶体をリン酸 buffer 緩衝液で満たした 35 mm 径 6 穴マルチウルク中で器官培養した。紫外線による上皮細胞 DNA 傷害の程度を知るために UV-B (ATTO 社製・HP-15 M, 312 nm) 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 kJ/m<sup>2</sup> の各線量を前囊側から照射した。

## 2. 実験方法

### 1) 水晶体における過酸化反応

#### i) ラット水晶体の酸化関連物質の測定

##### ① Superoxide dismutase (SOD)

水晶体重量の 9 倍量の 50 mM リン酸 buffer (pH 7.8) で水晶体をホモジネートして 10<sup>5</sup>・g, 60 分遠心した。SOD 以外の還元性物質を除くために透析膜を用いて, 上清をリン酸 buffer で 24 時間透析して試料とした。SOD 活性の測定は Marklund ら<sup>1)</sup>の方法によった。すなわち, 試料 (0.1 ml) に空気をバブリングしたリン酸 buffer (0.8 ml) と 0.4 mM pyrogallol (0.1 ml) を加えた。吸光度計 (島津 UV-190) を使用して 420 nm の吸光度を測定し, 10 分後に再度測定した。活性値は 25°C で 1 分間に 0.4 mM pyrogallol の自動酸化を 50% 抑制する酵素活性で表した。

##### ② 還元型グルタチオン

Imai ら<sup>2)</sup>の方法で HPLC を用いて測定した。5% トリクロロ酢酸を含有した蒸留水で水晶体をホモジナイズし, 4°C, 15,000・g で 20 分間遠心した。上清 (0.2 ml) に 5 mM EDTA を含んだ 1 N HCl (0.05 ml) と 4.6 mM 4-fluoro-7-sufamoylbenzofuranzan (ABD-F) 含有の 0.1 M borax (0.8 ml) pH 9.3 を加えて 60°C, 5 分間温めた。過剰な ABD-F を除去するために AcDEt (2 ml) を混合して 5 分間, 15,000・g で遠心した。この操作を 2 回繰り返して行った。最後に試料 (0.7 ml) に 10% tri-n-butyl-phosphate methanol (0.05 ml) と 0.1 M borax (7.65 mM ammonium 7-fluorobenz-2-oxa-1.3-diazo 4-sulfonate (SBD-F) 0.15 ml を加え 60°C で 20 分間温めて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の試料とした。

HPLC の条件: 検出器: spectrofluorometer (JASCO 820-FP, Ex 380 nm, Em 515 nm), キャリアー: 0.15 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: CH<sub>3</sub>CN (9:1), カラム: YMC packed column AM-312 (150×6.0 mm), 温度: 40°C, 流速: 1.0 ml/min

##### ③ 過酸化脂質

Dahle ら<sup>3)</sup>の方法に順じて行った。1 ml の蒸留水でホモジナイズした後, 0.4 ml を採って 20% sodium dodecyl sulfonate (30 μl), 100 mM EDTA (15.0 μl), 20% acetic acid (560 μl), そして 20 mM thiobarbituric acid の 50% acetic acid 溶液を加えた。

室温で冷やした後 n-butanol (3.0 ml) を加えて転倒混和後, 1,500・g, 10 分間遠心した。Butanol 層の蛍光を spectrofluorometer (島津 RF-500 LC) を用いて蛍光波長 553 nm (励起波長 515 nm) で測定した。

##### ④ アルカリ金属 (類)

水晶体を真空 (100°C, 24 時間) で乾燥させた。乾燥した水晶体に 100°C のオイルバスの中で 61% 硝酸 (0.25 ml) を加えて熱し, 蒸留水 (0.4 ml) で希釈して 1,500・g で 4°C, 5 分間遠心した。上清を 10 倍の蒸留水で希釈して Na, K の測定に用いた。Ca の測定には上清の一部を 9:1 の割合で 10% lanthanum chloride で希釈した。測定には吸光度計 (島津 AA-670) を使用した。

##### ⑤ リポ蛋白質

水晶体を 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) でホモジナイズして遠心分離 (4°C, 22,600・g 1 時間) を行った。試料 20.0 μl をアガロースゲル電気泳動 (ポル E フィルムシステム, 定電圧 90 V, 0.05 M ベルナル緩衝液, pH 8.6) で 45 分間泳動した<sup>4)</sup>。泳動後脂質染色液をフィルムにかけて 37°C, 30 分間インキューベートした。その後, 反応停止液 (脱色液) に 10 分漬け, 2 時間水洗して自然乾燥を行った。

リン脂質含有リポ蛋白質の同定は lipid profile テスト ケミファコーピーエル・A (日本ケミファ) で染色してデンシトメトリーを行い, そして定量は デタミナー-PL を用いた酵素法によった。コレステロール含有リポ蛋白質の同定には ネスコート TC 発色液 (CHDH 法) を使ってデンシトメトリーを行い, NC-コレステロール T による酵素法で定量した。

##### ii) 老化促進マウス

2 か月齢と 6 か月齢の senescence accelerated mouse (SAM)-P 1 の水晶体を材料に superoxide scavenging 活性と過酸化脂質を測定した。

##### iii) 組織学的観察

摘出した 2 か月齢と 24 か月齢のラット水晶体および 2 か月齢の SAM マウス水晶体を 4% グルタルアルデヒドに入れて数日間浸漬した。その後, 緩衝液中に浸しながら実体顕微鏡下に観察した。

試料の一部はさらに脱水, エポキシ樹脂に包埋し, 0.5



mmの厚目の切片をトルイジン青で染色して光学顕微鏡(光頭)で観察した。

iv) ヒト水晶体自発蛍光の加齢変化

水晶体の透明な10~60代(14~69歳)まで各年代15名ずつ(90名)の水晶体自発蛍光を定量した。定量方法は吉田<sup>9)</sup>の方法によった。

2) 水晶体におけるラジカルの発生

i) 白内障からのラジカルの検出

水晶体における過酸化反応の変化を知るためにはフリーラジカルが水晶体に発生しているか、あるいは生成されやすい状態にあるかを明らかにする必要がある。フリーラジカルは常磁性であるので、electron spin resonance(ESR)で検出が可能である。しかし、ラジカルの寿命が短くてESRでは検出できなかつたり、酸素ラジカルに軌道角運動量が存在してスピン-格子緩和が速いために直接測定出来ないなどの問題がある<sup>6)</sup>。そこで、トラップ剤でラジカル反応を捕えてスピン付加体をESRで測定した。トラップ剤には5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)を使用した。

ヒト白内障を核および皮質を出来る限り採取して1.0 mlの超純水で水中でホモジナイズし、そのうち180  $\mu$ lを分取し、0.01% DMPO 20  $\mu$ lを加えた。40秒後にJes-REIX型電子スピン共鳴装置(日本光電)にかけてラジカルの発生を反応波として確認し、ラジカルの強度をマンガマーカの強さの比率から求めた。ラジカル反応が明らかでない場合は、検体に1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 75  $\mu$ lを加えて過酸化反応を促進させてラジカル発生を容易にさせた。ESRでの測定条件は以下に示した。

ESR 測定条件

Magnetic field	336.0 $\pm$ 10.0 mT
Power	8 mW
Time constant	0.1 sec
Frequency modulation	100 KHz
Modulation	0.125 mT
Amplitude	7.9 $\times$ 100
Sweep time	2.0 min
Temperature	25°C

3) ヒト白内障、房水、硝子体および血液における酸化関連物質の変化

① 過酸化脂質定量(図1)

過酸化脂質は八木法、蛍光法(過酸化脂質-テストワコー)によって定量した。検体(水晶体(沈澱)、硝子体、房水、血清)に1/12 N 硫酸 4.0 mlを加えてよく混ぜた後、10% リンタングステン酸水溶液 0.5 mlで攪拌して室温に5分間静置した。遠心分離(1,580-g, 10分間)して沈澱を得た。沈澱層に1/12 N 硫酸 2.0 mlと10% リンタングステン酸水溶液 0.3 mlを加え、遠心分離(1,580-g, 10分間)した。再び得られた沈澱と標準液(テトラエトキシプロパン 5 nmol/ml) 0.1 mlおよび試薬盲検に蒸留水

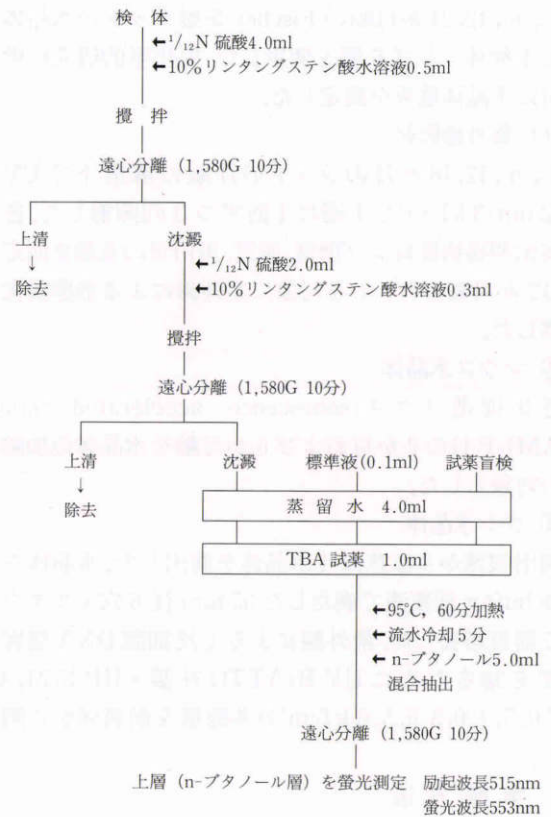


図1 過酸化脂質定量法。

4.0 mlとTBA試液(酢酸 8.8 mol/l, チオバルビツール酸 3.35 mg/ml) 1.0 mlを加えた。遠沈管上にガラス玉を置いて沸騰水中で60分間加熱して流水で冷却する(5分間)。各検体にブタノール 5.0 mlを入れて混合し、遠心分離(1,580-g, 10分)を行って上層(ブタノール層)を蛍光測定した。蛍光測定は励起515 nm, 蛍光波長 553 nmによった。過酸化脂質量(nmol MDA)はマロンジアルデヒド(MDA)を標準物質として、その蛍光値の検量線を求め、その検量線から沈澱の蛍光値に相当する量を求めた。

② 過酸化水素定量ならびに過酸化水素消去酵素活性測定法(図2, 3)

定量ならびに酵素活性の測定はチタン過酸化水素呈色法を基本として試薬量やインキュベーションの時間および温度などを独自の考えで工夫した。

この方法は過酸化水素と酸化チタンとの反応によって生じる黄色を比色することからH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量を求める。そのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を消費した量からH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を消去する酵素活性をチタン呈色阻害率として算出する。

③ Cu,Zn-SOD量

Cu,Zn-SOD測定用キット(宇部興産)を用いて定量した。

(イ) 抗ヒトCu,Zn-SOD抗体固相化プレートに水晶体試料(100  $\mu$ l)を各セルにマイクロピペットで分注する。シールをして室温に2時間静置させる。一次抗原抗体反応。



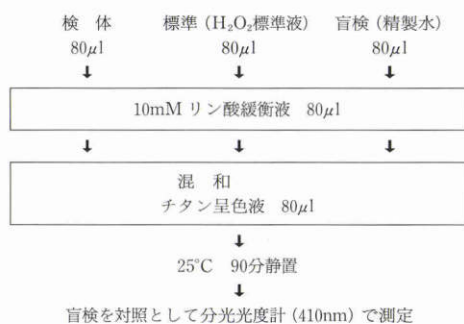
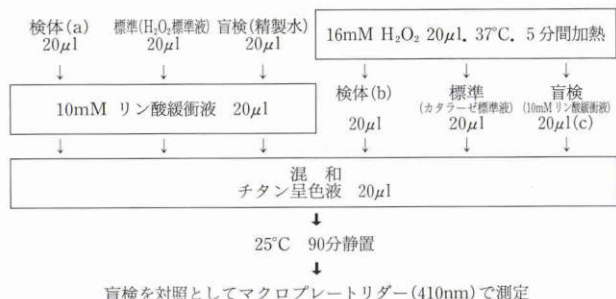


図 2 過酸化水素定量法.



$$\frac{\text{過酸化水素量} = (a)}{\text{過酸化水素消去酵素活性 (チタン呈色阻害率)} = \frac{(c+a)-b}{c+a} \times 100\%}$$

図 3 過酸化水素消去酵素活性測定法.

(ロ) 各セルから溶液を除いて洗浄液を各セルに 200 μl ずつ分注して数秒間経過後に廃棄する洗浄操作を 3 回繰り返す。洗浄液を完全に除去する。

(ハ) ペルオキシダーゼで標準化した酵素標識抗体溶液を各セルに 100 μl ずつ分注し、室温に 2 時間静置。一二次抗原抗体反応。

(ニ) 酵素標識抗体のうち、過剰な部分を洗浄液で 200 μl ずつ 3 回洗浄除去する。

(ホ) 発色試薬(フェニレンジアミンタブレット)をセルに 100 ml ずつ分注し、室温、暗所で正確に 15 分間静置させる。

(ヘ) 反応停止液を 50 μl ずつ分注して反応を停止させる。

(ト) 492 nm の吸光度を測定。

④ Superoxide scavenging 活性(図 4)

NBT 還元法(SOD テストワコー)によって測定した。検体(水晶体, 硝子体, 房水, および血清), 盲検(蒸留水), 検体盲検(検体), 試盲検(蒸留水)の各々 0.1 ml を加えて 37°C で 10 分間加温した。検体と盲検には酵素液(キサンチンオキシダーゼ 0.049 U/ml) 1.0 ml を、そして検体盲検と試薬盲検には 0.1 M リン酸 Buffer(ブランク液)を加え、37°C で 30 分間加温した。加温に際しては 20 分から 5 分毎に E(盲検) - E(試薬盲検)の吸光度が 0.28 以上になるまで加温を続けて測定し、0.28 以上の時点で反応を停止させるので加温に約 30 分を要する。各々の試料に反応停止液(ドデシル硫酸ナトリウム) 2.0 ml を加えて

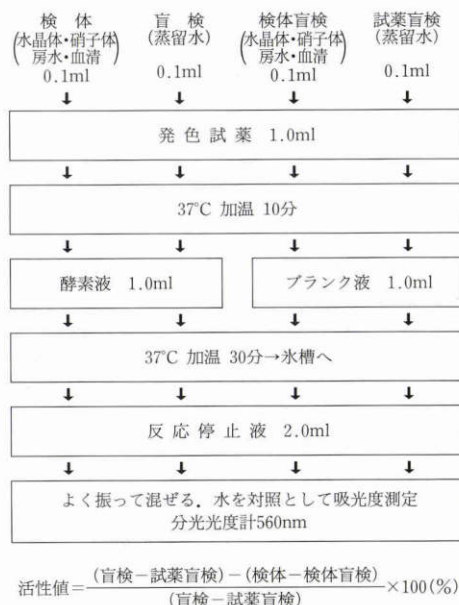


図 4 Superoxide scavenging 活性.

十分に混ぜた後、水を対照として吸光度(560 nm)を測定した。

⑤ グルタチオン(還元型)の定量

グルタチオンを正確に分離、定量するためにグルタチオンがカルボキシル基を複数もつこと(カルボキシル基を複数もつアミノ酸は少ない)を利用して生成アミノ酸との分離を行った。対イオンとして陽イオン(臭化テトラプロピルアンモニウム)を選択した逆相イオン対クロマトグラフィーを用い、オルト(O)-フタルアルデヒドを誘導体化試薬としてポストカラム誘導体化法による蛍光検出法によってグルタチオン量を測定した。白内障は超音波乳化吸引術で水槽内採取し、直ちにホモジナイズした後、遠心分離(24,000・g)して水溶性分画を得た。分子量 3,000 の限外濾過によって除蛋白質し、HPLC の試料とした。グルタチオンの還元型と酸化型を分離するために逆相イオン対クロマトグラフィーを利用したが、酸化型は HPLC の試料濃度が希薄なため検出されなかった。

HPLC の条件:

カラム: AsahipaKOCB-50(4.6 mmI.D.×150 mmL).  
移動相: 20 mM 臭化テトラプロピルアンモニウム含有 100 mM ホウ酸カリウム緩衝液(pH 8).

移動相流速: 0.8 ml/min.

反応試薬: 0.08% O-フタルアルデヒドと 0.04% N-アセチル-L システインを含む 100 mM ホウ酸カリウム緩衝液(pH 10).

反応試液流速: 0.25 ml/min.

反応管: 0.5 mmI.D.×2 m.

反応温度: 40°C.

検出波長: 励起波長 350 nm, 蛍光波長 450 nm.

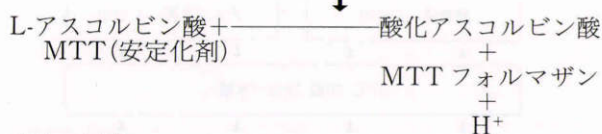
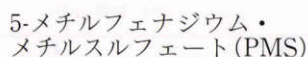
⑥ アスコルビン酸定量

白内障手術で得られた水晶体を直ちに超純水でホモジ

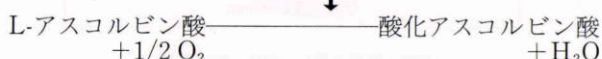
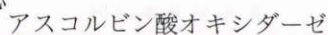


ネットして遠心分離(10,000・g)で上清を得て試料とした(房水は超純水で2倍希釈した).アスコルビン酸の定量はF-キットL-アスコルビン酸(パーリンガー・マンハイム社)を使用した.

#### 検体の反応



#### 盲検の反応



生成されたMTT-フォルマザンの増加を吸光度(578 nm)で測定する.

#### ⑦ グルコース定量

グルコースがグルコースデヒドロゲナーゼの作用により酸化される際,同時にNADPがNADPH<sub>2</sub>に変化する.NADPH<sub>2</sub>の生成速度はグルコース量に比例することから,340 nmにおける吸光度の増加速度を測定することによりグルコースを定量する.測定にはデタミナーGL-Rを使用した.検体,標準液(グルコース水溶液 200 mg/dl)および試薬盲検(精製水)を用意する.検体,標準液および試薬盲検の各々75 μlに反応液(グルコースデヒドロゲナーゼ安定化剤 287 単位をリン酸緩衝液(pH 7.75)界面活性剤 10 mlに溶解したもの)のうち,2 mlをリン酸緩衝液(pH 7.75)界面活性剤 125 mlに混合したもの)3.0 mlずつ加える.37°C恒温セル付き分光光度計内で盲検を対照とし,1~2分までの波長 340 nmにおける吸光度増加値を測定する.

グルコース値(mg/dl) =

$$\frac{\text{検体の吸光度増加値}}{\text{標準液の吸光度増加値}} \times 200$$

#### ⑧ 糖化蛋白質(フルクトサミン)定量(図5)

糖が蛋白質やアミノ酸などのアミノ基とMaillard反応によってケトアミン(フルクトサミン)を生成する.フルクトサミンは強アルカリでは還元力を有するエンジオールを産生し,塩化ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を還元してホルマザンを生成する.フルクトサミンの定量はケトアミンがアルカリ溶液中で発現する還元力の総和として測定している.検体,標準液(フルクトサミンキャリアレーター「ロシュ」II1バイアルに正確に1.0 mlの精製水を加えて溶解する)および試薬盲検(精製水)を用意する.検体,標準液および試薬盲検の各々50 μlに発色試薬(発色試薬1錠を緩衝液6 mlに溶解.溶解後30分放置し,静かに混和したのち,使用する)1.0 mlずつ加える.37°Cでインキュベートし,10分および15分

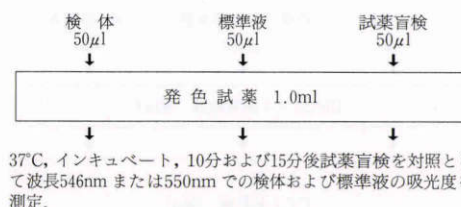


図5 糖化蛋白質(フルクトサミン)定量法.

後に試薬盲検を対照として波長 550 nm で吸光度を測定する.インキュベーション 10 分後の吸光度はアスコルビン酸やグルタチオンなどの還元物質との反応(予備反応)を測定している.15 分後の吸光度は強アルカリ中でのフルクトサミンの還元力を測定している.標準液の吸光度差と比較することから,検体のフルクトサミン値を得る.

$$\begin{aligned} \text{フルクトサミン値} &= \frac{\text{標準液の}}{\text{フルクトサミン値}} \times \\ & \frac{\text{検体を測定したときの}}{\text{10分と15分後の吸光度差}} \\ & \frac{\text{標準液を測定したときの}}{\text{10分と15分後の吸光度差}} \end{aligned}$$

#### ⑨ ペントシジン測定法

白内障晶体の試料 1 ml と同量の 12 mol/l 塩酸を混合し,シールドグラスチューブを用い,110°Cで20時間の加水分解をする.加水分解物を0.45 μmol(pore size)の膜フィルター(DIS-MIC-25 cs,東洋濾紙)で濾過する.

加水分解物 200 μl を 20 ml の水(Milli-Q Water)で希釈し,0.8×1.0 cm SP-Sephadex C-25 カラムに添加する.カラムを0.1 mol/l 塩酸 20 ml で洗浄した後,1.0 mol/l 塩酸 5 ml で溶出した.溶出液を減圧下で蒸発させた後,残留物を 200 μl の 1.0% heptafluorobutyric acid n-heptafluorobutyric acid で溶解した.その溶解液 100 μl を用い,HPLC でペントシジンを測定した.HPLC の条件は,flow rate 1 ml/min,移動層には acetonitrile と 40 mmol/l HFBA を使用し,8 mm×10 cm column pre-packed with Radial-Pak C<sub>18</sub>を用いて Excitation: 335 nm, Emission: 385 nm で測定した<sup>7)</sup>.ペントシジン標準物質は,浜松医科大学整形外科高橋正哲先生から提供されたものを使用した.

#### ⑩ Glycated Cu, Zn-SOD の定量方法

糖化された Cu, Zn-SOD の測定はボロン酸カラムによるカラムクロマトグラフィーによって行った<sup>8)</sup>.ボロン酸カラムは中性以下の pH では非電荷物質として存在するが,弱アルカリでは水酸化物イオンと結合してフェニルボロン酸陰イオンとして存在し,シス-ジオール基をもつ糖や核酸などと安定なエステルを形成する.pH を 6.0 以下に下げると,結合した物質をカラムに吸着した物質と溶出するものとに分けることができる.クロマトグラフィー用ミニカラム,セパコール・ミニ(生化学工業)にゲル(Boronate 5 PW)(東ソー)を充填した.検体 10 ml をカラムに流し,吸着させた.次に,溶離液 A(20 mM



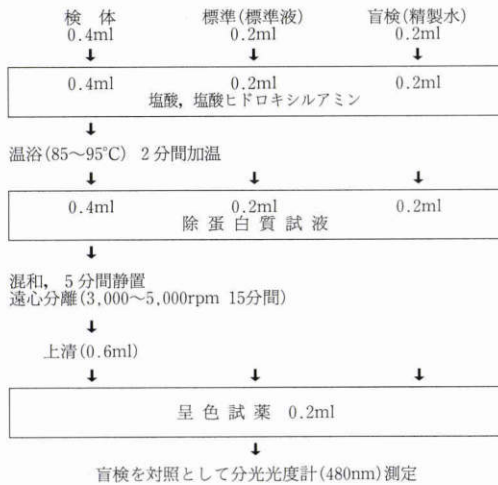


図6 銅イオン定量方法.

HEPES-NaOH+10 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8.5)を流し,分光検出器(280 nm)でモニターしながらカラム吸着のピークが最も下降した時点で溶解液 B(20 mM 酢酸緩衝液(pH 3.0))をカラムに流した.溶解液 Bを流すことによって糖化蛋白を溶出させた.この溶離液を採取して,24時間透析を行った後,Cu,Zn-SODを定量した.透析はSpectra/por membrane(スペクトラム社) MWCO 10000 にカラムから溶出した液を入れ,透析液(2 mM Tris-HCl,0.1 MKCl(pH 7.6))で1,2,6,12時間に交換した.最後に残った透析膜中の液をCu,Zn-SOD量に供した.定量には前述のCu,Zn-SOD測定用キット(宇部興産)による酵素免疫測定法を用いた.

## ⑪ 遷移金属

## イ) 銅イオンの定量(図6)

銅はCu<sup>2+</sup>として蛋白と結合して存在しているので,塩酸と塩酸ヒドロキシルアミンによってCu<sup>2+</sup>を蛋白から遊離させる.Cu<sup>2+</sup>はCu<sup>+</sup>に還元されるので,Cu<sup>+</sup>と特異的に反応するバソクプロインによって反応生成したCu-バソクプロイン複合体(橙黄色)を比色定量する.定量にはネスコートCuキット-N(バソクプロイン法・日本商事)を用いたが,予備実験から試料や試薬の使用法ならびに実験操作を考案し,独自の方法をとった.実験器具が銅に汚染されないように5~10%塩酸に一夜浸漬させ精製水でよく洗浄して,日光をさけて乾燥させ,カバーをかけて保存するなど,細心の注意を払った.定量操作には検体0.4mlと標準(銅200 μg/l)および検体を各々0.2mlとした.検体には0.4ml,そして標準と盲検には0.2mlの塩酸を加えた.検体は温浴(沸騰後火を止めて温度調節をする)で2分間加温する.その後,除蛋白質試液を検体に0.4ml,そして標準と盲検に0.2mlずつ加えた.検体は混和した後に5分間静置して試験管口をフィルムで覆って遠心分離を行う.得られた上清(0.6ml)を清潔な他の試験管に移して混和する.標準ならびに盲検はよく混ぜる.検体,標準および盲検に呈色試液(バソクプロイ

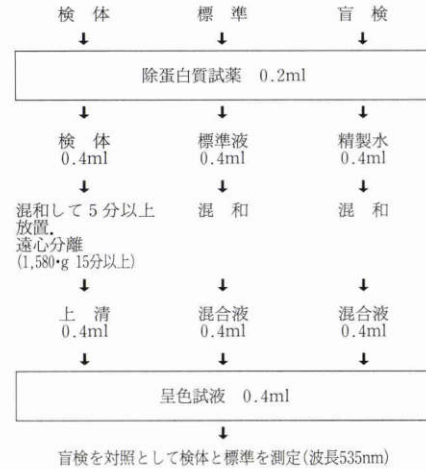


図7 鉄の定量方法.

ンスルホン酸ナトリウム 500 mg/l)0.2 mlを加えて混和する.分光光度計(波長480 nm)で盲検を対照として検体と標準を測定する.

$$\text{銅濃度(mg/検体)} = \frac{\text{検体}}{\text{標準}} \times 200$$

## ロ) 銅の組織染色

ルベアン酸反応によって行った<sup>9)</sup>.操作方法は凍結後クリオスタットで切片を作成し,染色液((ルベアン酸50 mg+エタノール50 mg)2.5 ml+10%酢酸ナトリウム液50 ml)に37°C,12~16時間入れる.次いで,70%エタノールに3~5時間入れてキシロールで透徹する.

## ハ) 鉄イオンの定量(図7)

Fe<sup>3+</sup>は酸性下でチオグリコール酸とトリクロロ酢酸によって還元されてFe<sup>2+</sup>となる. Fe<sup>2+</sup>は結合していたトランスフェリンから分離する.分離した後,バソフェナンスロリンと反応してFe-バソフェナンスロリン複合体を生成することから比色定量する.ネスコートFeキット-N(標準法・日本商事)を用いて,試料や試薬の使用法に予備実験の成績から工夫を加えて定量を行った.

呈色反応を測定する操作方法はまず,検体,標準(鉄200 μg/100 ml)および盲検(精製水)を準備する.各サンプルに除蛋白質試液(トリクロロ酢酸75 g/l)0.2 mlに検体,標準および盲検0.4 mlを加えてよく混和する.検体に関しては,混和後5分間静置して遠心分離(1,580g以上,15分以上)する.検体は上清の0.4 mlを清潔な別の試験管に移してよく混和する.検体,標準および盲検の各々に呈色試液(バソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム150 mg/l)0.4 mlを加えてよく混和する.混和後,盲検を対照として標準と検体を分光光度計(535 nm)で測定する.

$$\text{鉄定量(μg/検体)} = \frac{\text{検体}}{\text{標準}} \times 200$$

## ⑫ カルシウム定量法(図8)

ダイヤカラーCa測定試薬(小野薬品)を用いてAU



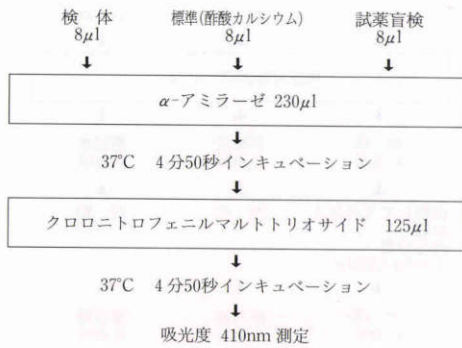


図8 カルシウム定量法.

5200 自動分析機(オリンパス工業)で測定した.

測定原理, Ca は濃度依存的に試薬中の α-アミラーゼを活性化する. 活性化されたアミラーゼが基質であるクロロニトロフェニルマルトトリオサイドに作用してクロロニトロフェノールを生成する. このクロロニトロフェノールの吸光度を 410 nm で測定する.

4) 膜の変化

i) 水晶体脂質構成

① 脂質抽出方法(図9)

水晶体 1 個をガラスホモジナイザーにとってクロロホルム(以下, C)2; メタノール(以下, M)1 の 20 ml を使っ

てホモジナイズを行う<sup>10)</sup>. 直ちに遠心分離(438×g, 30分, 室温)して上層と下層を得る. 上層は N<sub>2</sub>ガスを加えて冷室保存する. 下層は 10 ml の C : M(2 : 1) で N<sub>2</sub>ガスの下で 12~14 時間溶解する. 溶解層は同様に遠心し, 上層は前記と同様に N<sub>2</sub>ガスを加えて保存する. 下層には 10 ml の C : M(2 : 1) を加えて 40°C で reflux を行い, 次いで, C : M(1 : 2) の 10 ml を用いて同様な操作をした. 収集した上層は, N<sub>2</sub>ガスの下でエバポレーションを行い乾固させた. 得られた粗脂質は 2 ml の C : M : H<sub>2</sub>O(3 : 48 : 47) で 4 回, そして C : M : 0.1% NaCl(3 : 48 : 47) の溶液で 5 回洗浄して, その度遠心分離を繰り返し行い, その上清を N<sub>2</sub>ガス下で蒸発乾固させ, 総脂質を得た. 乾燥重量を測定して総脂質量とした.

② 薄層クロマトグラフィー

i) 脂質分画の分離・同定

前記の方法で得られた総脂質を 300 μl の C : M(2 : 1) で溶解し, その全量をシリカゲル(Q4)薄層板の下端から 3.0 cm の位置に 4.0 cm 幅で塗布した. 同時に他のレーンに脂質の標準品を塗布した. クロマトグラフィーの展開液は第一次展開に石油エーテル : エーテル : 酢酸(30 : 70 : 1) を用いた<sup>11)</sup>. 第一次展開液は資料を塗布した部位から 16.0 cm まで展開させた. プレートを完全に乾燥させた後, 一次展開と同じ方向に原点から 11.0 cm

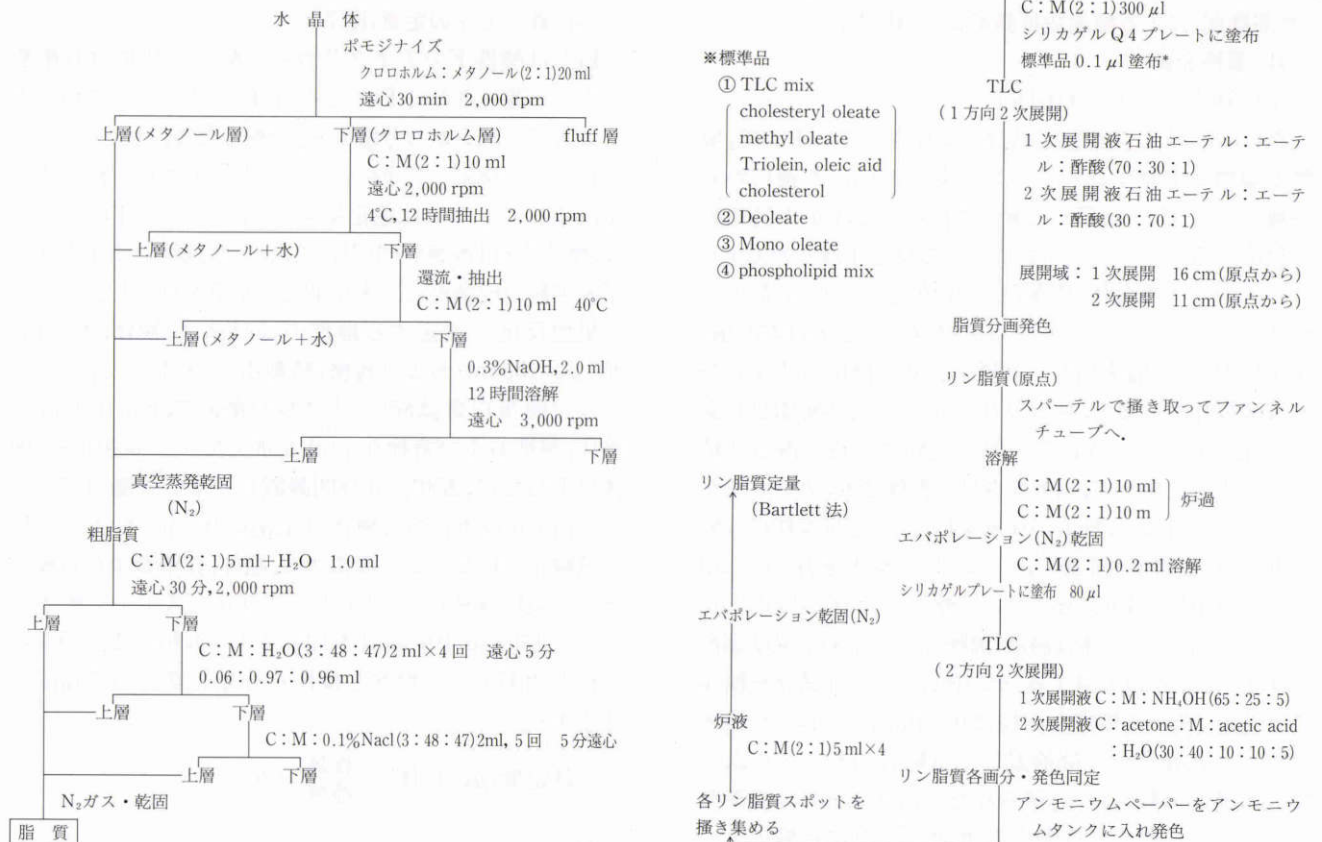


図9 水晶体脂質ならびにリン脂質抽出方法.



の高さまで展開を行った。展開した簿層板を完全に乾燥させてモリブデン酸アンモニウム-過塩素酸 (AMPA) を噴霧して各脂質スポットを発色させた。同時に展開した標準品の移動度から各脂質を同定した。

ロ) リン脂質各分画の分離・同定 (図 9)

thinlayer chromatography で同定されたリン脂質スポットをスパテルで掻き取って C: M (2:1) と C: M (1:2) の各 10 ml で溶解して濾過した。N<sub>2</sub> ガス下で濾液を蒸発乾固させ、乾燥重量を測定した。全リン脂質を C: M (2:1) 200 μl で溶解した。溶液の全量をシリカゲル簿層板上の一点 (右下方) に塗布して乾燥させた。二方向の二次展開簿層クロマトグラフィーを行うことによって各リン脂質分画を分離させた。展開液は一次展開に C: M: NH<sub>4</sub>OH (65:25:5)。二次展開に C: アセトン: M: 酢酸: 水 (30:40:10:10:5) を使用した。

リン脂質分画の同定は標準品を塗布したシリカゲルプレートと同じ展開槽に入れて二次展開を行って、その移動度から確認した。簿層板上に出現するリン脂質分画の位置はヨードを噴霧して視認した。

③ リン脂質量

Bartlett<sup>12)</sup>の方法によって各リン脂質分画のリン量を定量した。

④ リン脂質脂肪酸組成の分析

全リン脂質およびリン脂質各分画の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーによって分析した。脂肪酸分析に用いた機械は Hewlett-packard 社製 モデル 5700-A

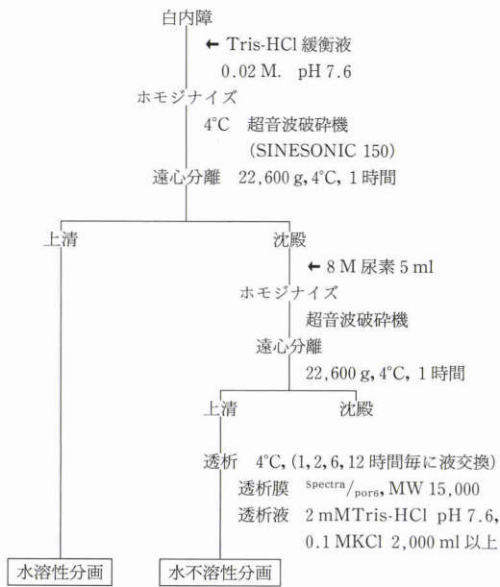


図 10 リポ蛋白質測定用試料作成法。

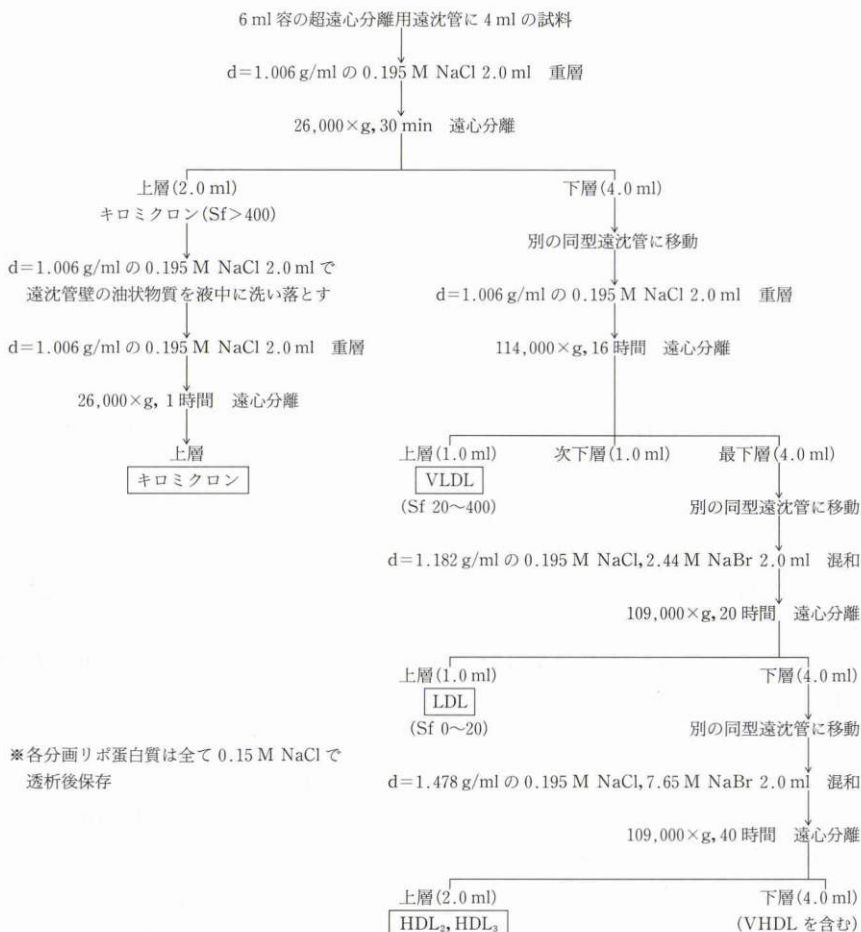


図 11 リポ蛋白質分画の分離ならびに採取方法。



(USA). カラムは1/8インチ径, 6フィートで14% EGSS-Xを充填している. キャリアガスに $N_2$ を使用し180°Cで行った. メチレーションはメタノールに溶解した4%  $H_2SO_4$  (2.0 ml)で80°C, 3時間を要した. 室温に放置した後に1.5 mlのヘキサンを加えてよく混和し, その上層を保存した. 同じ操作を5回繰り返して行って上層を得た. 収集した上層を乾燥させた後, ヘキサン40  $\mu$ lで再度溶解してガスクロマト分析機に注入した. リン脂質分画のうち, スフィンゴミエリンは14% BF 3 1.0 ml (Spelco)でメチレーションした. 脂肪酸の同定は標準品を同様の条件で, ガスクロマトのカラムに流して出現時間から決定した. 標準品にはPUFA-1(C 14:0~C 24:1, 11種の脂肪酸含有)PUFA-2(C 16:1~C 22:5, 8種)およびRM-3(C 14:0~C 24:1, 10種)を使用した.

## ii) リポ蛋白質の変動

### ① 材料(図10)

材料とした白内障は手術の際に核を出来るだけ皮質を付けたまま摘出したのち, 残った皮質を注意深く灌流液とともに吸引した. 採取水晶体10個を1検体として8検体を実験に供した. 水晶体を水溶性分画と水不溶性分画に分けて試料とした.

### ② リポ蛋白質の分画の分離ならびに定量方法

#### イ) リポ蛋白質分画の採取方法(図11)

リポ蛋白質を種類別に分画するには超遠心浮上法<sup>13)</sup>を行った. 分離の基本は含有される脂質量の差によって比重が異なることを利用して超遠心を行い, 浮上してくるリポ蛋白質を分取し, 0.15 MNaClで透析を行った. 図11に示した手順に従って, まず試料に0.195 MNaCl(比重1.006 g/ml)を重層して遠心分離( $2.6 \times 10^4 \cdot g$ , 30分)して浮上した層を分取した. 分取した層に同様の溶液を重層して再び遠心分離( $2.6 \times 10^4 \cdot g$ , 1時間)してカイロミクロン(CM)を得た. 上層を採取した後の下層に同じく0.195 MNaClを重層して超遠心( $11.4 \times 10^4 \cdot g$ , 16時間)を行った. 最上層に超低密度リポ蛋白質(VLDL)が浮上した. 以後, 下層に対してNaClとNaBrを用いて $d=1.182$  g/mlと $d=1.478$  g/mlと比重を高くした溶液を重層し, 遠心分離も20時間と40時間で行って, 各々上層に浮上した低密度リポ蛋白質(LDL)と高密度リポ蛋白質(HDL)を分離することが出来た.

#### ロ) リポ蛋白質の定量

硫酸多糖類と2価金属イオンを用いた結合沈澱法によった<sup>14)</sup>. CM, VLDL, LDLはヘパリン-Ca沈澱法で, HDLはリンタングステン酸-Mg法による結合沈澱法および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, ペルオキシダーゼを用いたコレステロール発色法を併用した. 水晶体で測定する方法は既報<sup>15)</sup>で述べたごとくである.

### ③ HDL, LDL分画中のアポリポ蛋白質A-1およびBの定量

アポリポ蛋白質の抗体である抗アポA-1, 抗アポBを用いた免疫比濁法であるTIA法<sup>16)</sup>で定量した.

#### ④ 糖化HDL, LDLの定量

図11で分離したHDLおよびLDL分画を試料として, フルクトサミン測定法を行い, glycatedアポリポ蛋白質A-1およびB 100量を測定した. フルクトサミン測定法ではglycated polylysine量として測定されるため, アポリポ蛋白質A-1およびB 100のリジン残基数をそれぞれ21個および354個としてglycatedアポリポ蛋白質A-1およびB 100量を換算した.

次に, HDLおよびLDLの主要構成蛋白質はアポリポ蛋白質A-1およびB 100であり, グリケーションの起こる部位は, 蛋白質中のリジン残基であるため, ③と④の上記の結果を比較してHDLおよびLDLのグリケーション率を求めた.

#### ⑤ LDL受容体の局在

薄切した水晶体に蛍光プローブの付いたLDL(Dil-LDL)200  $\mu$ g/mlを一昼夜4°Cで反応させて蛍光顕微鏡で観察した結果, LDL受容体が水晶体上皮ならびにその下層に存在することがわかった<sup>17)</sup>. 今回は囊の付いたままの水晶体をまず最初にDil-LDL中に3日間, 4°Cで浸漬した後, 凍結切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した.

#### 5) 両面灌流型水晶体器培養装置による水晶体培養実験

水晶体からの情報を*in vivo*に近い状態から得るために, より生理的条件下で水晶体を培養することを考えた. 水晶体は前囊側を房水という液体培地, 後囊側を硝子体というゲル状培地に包まれて非常に理想的な培養条件が成り立っている. *In vivo*における条件に近づくためにヒトの房水ならびに硝子体に含有されるあらゆる成分で作られた培地(表1)を房水側と硝子体側に灌流させる両面灌流型水晶体器培養装置を開発した(図12).

装置の素材はダイフロン®であるが, アクリルでも作製した. 図13は設計図である. 房水側も硝子体側も円筒型になっていて, 房水側の容量が3 ml, ゲル側(硝子体側)は30 mlなために大きさの違う円筒型がT字に交差した形をとっていて, その交差部分に水晶体を置いている. 房水側と硝子体側の接点に水晶体保持のためにセルカルチャーインサート用の膜を設置した. 房水側は入液の先端を水晶体の近くにおいて排出口を遠くすることによって, より新鮮な房水が水晶体に接するようにした. 硝子体ゲル側は, 円筒型の中での流速分布を一定にするために液体クロマトグラフィーカラムの原理を応用して入排液部分の細管から円筒型までの部分を円錐型に作った. 円筒型と内錐型との培養部分に, ゲルを支えるためにメッシュとセルカルチャーインサート用の膜を設置した. 装置内に空気が残存しないようにエア抜きの細管を付けた. 培養器に付属する入液路には輸液パックを脱気して装置し, 排液路には空の輸液パックを用いた. 流速



表1 両面灌流型器官培養装置灌流液成分

房水		硝子体	
Na <sup>+</sup>	142 mM	Na <sup>+</sup>	137 mM
K <sup>+</sup>	4 mM	K <sup>+</sup>	4 mM
Ca <sup>2+</sup>	3 mM	Ca <sup>2+</sup>	3 mM
Cl <sup>-</sup>	134 mM	Cl <sup>-</sup>	112.8 mM
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26.2 mM
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20 mM	アルブミン	40 mg/dl
リン酸	0.62 mM	グルコース	30 mg/dl
アルブミン	60 mg/l	乳酸	70 mg/dl
プレアルブミン	35 mg/l	ビルビン酸	7.3 mg/dl
フィブロネクチン	2.5 ng/l	クエン酸	1.9 mg/dl
ヒアルロン酸	1.1 ng/l	アスコルビン酸	36 ng/dl
トランスフェリン	15.0 mg/l	Cu, Zn-SOD	378 ng/dl
グルコース	49.9 mg/dl	グルタチオン	0.19 g/dl
乳酸	4.5 mM	硝子体ゲル	
アスコルビン酸	1.1 mM	ヒアルロン酸 Na	12 mg/30 ml
Cu, Zn-SOD	2,200 ng/dl	コラーゲンII	3.6 mg/30 ml
EGF	0.1 mg/dl		
IgG	3.0 mg/dl		
グルタチオン	0.17 mg/dl		

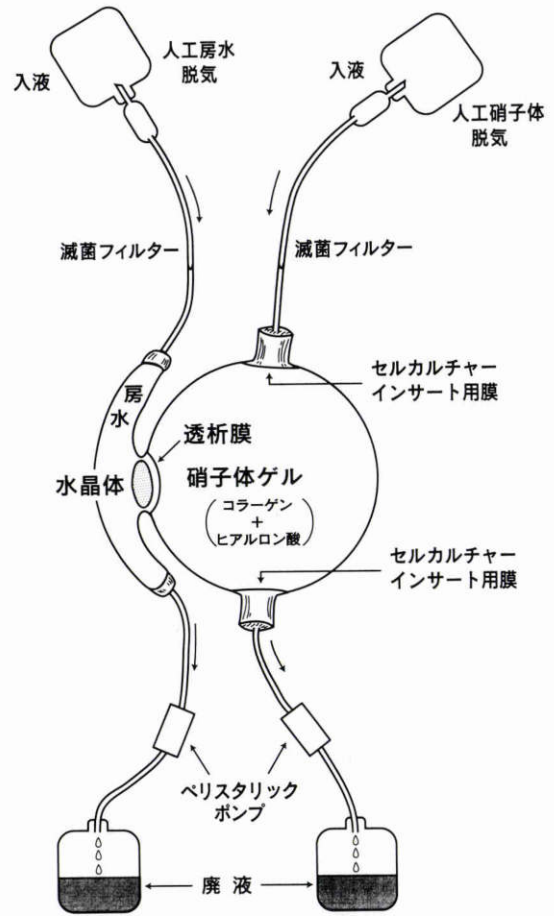


図12 両面灌流型器官培養装置。

*In vivo*に近い条件で水晶体を培養。前囊側を人工房水、後囊側を硝子体ゲルと人工硝子体成分で一定速度の持続灌流を3週間行った。

は、房水側は2 μl/分、硝子体側は85 μl/分にペリスタリックポンプで調整した。入液の成分には前述したように眼科教科書に報告されているヒトの房水と硝子体の成分のほとんどすべてを加えた。硝子体側にII型コラーゲンとヒアルロン酸を加えて硝子体灌流液の流れが一定方向に配向するようにしている。叙上の条件による培養を生理的条件下器官培養とした。本装置は房水-水晶体-硝子体の相互作用の研究に活用できる装置である。

i) 病的環境における水晶体培養

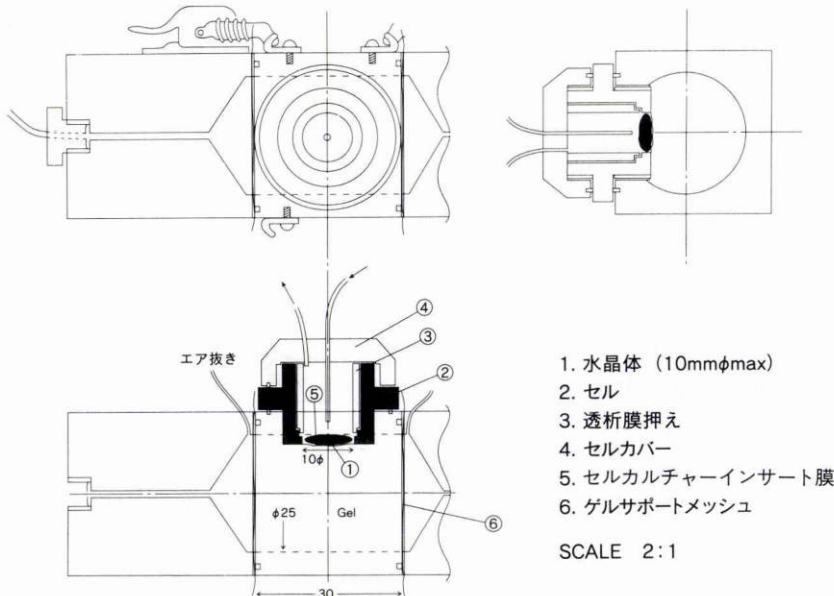


図13 両面灌流型器官培養装置の設計図。

房水側も硝子体側も同筒型。流速分布を一定にするため液体クロマトカラムの原理から細管-円筒型までを円錐型にした。酸素の影響を除くためにエア-抜き細管を設置。



表2 ラット水晶体における酸化関連物質の加齢変化

項目 月齢	Superoxide dismutase 活性 (u/g lens)	GSH (nmol/g.lens)	過酸化脂質 (nmol/g・lens)	ナトリウム mEq/kg.w.w.	カリウム mEq/kg.w.w.	カルシウム mEq/kg.w.w.
1	97.56±2.85	4,649.46±60.95	3.30±0.13	21.20±0.45	105.85±1.33	1.05±0.03
6	71.94±4.68*	3,664.21±52.98*	3.80±0.35	22.60±1.32	96.91±2.30*	1.18±0.33
12	61.60±3.77*	3,327.81±44.48*	3.54±1.03	26.90±0.91	93.90±0.84*	1.12±0.06
24	59.99±1.47*	2,641.23±57.75*	4.38±0.75	30.59±1.18	88.41±0.74*	2.03±0.10*

n=4~7 \* : p<0.01 平均値±標準偏差

① 高グルコース培養：灌流培地のグルコース濃度を300 mg/dl に調整して、水晶体を3週間培養した。

② 過酸化防御能欠如状態：灌流培地の成分からL-アスコルビン酸、還元型グルタチオンおよびCu,Zn-SODを取り去った状態で水晶体を3週間培養した。

6) 紫外線照射と水晶体の変化

i) ラット水晶体へのUV-B照射

生後1, 6, 12, 18か月のラットに麻酔下で片眼を遮閉した状態で、他の片眼にUV-B(312 nm)を照射した。照射量は1回3.0 kJ/m<sup>2</sup>で、1週間に1回ずつ3回繰り返した。

ii) UV-B照射によるウシ水晶体上皮細胞のDNA変化

摘出したウシ水晶体にUV-B(312 nm)を0.5, 1.0, 3.0, 5.0 kJ/m<sup>2</sup>照射した。照射された水晶体から上皮細胞を付けたまま前囊を採取、PBS中でピペッティングで上皮細胞を分離して、遠心分離(2,500 rpm, 10分)を行って細胞を回収する。回収した細胞を0.5% low melting temperature agarose(60 μl)(GibcoBRL 5517 UA)で溶解してスライドガラスに塗布する。その際、スライドガラスは前以て0.5% normal agarose(seakem GTG genetic technology grade 50072)でコーティングしている。スライドガラスに細胞を溶解したアガロースを載せ、その上に0.5% Low melting temperature agarose(100 μl)をかける。Lysing solution(1% sarkosyl, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton 100 pH 10.0)で検体の細胞膜と核膜を溶解する。その結果、DNAが露出してくる。電気泳動でDNAの泳動をみることになるが、泳動緩衝液として1 mM EDTA, 300 mM NaOHの強アルカリ液を用いてDNA鎖を真直にし、電気泳動(Bio-Rad DNA sub-cell®, 25 V, 20分)にかける。DNAの移動度からその傷害程度を知ることが出来る。DNAの移動は蛍光顕微鏡(オリンパス)で観察し撮影(Kodak TX-400)した。

III 結 果

1. 水晶体における過酸化反応

1) 加齢と過酸化反応

i) ラット水晶体における加齢変化

① 水晶体重量

6か月齢49.68±0.27 mg, 12か月齢58.76±0.20, 24か月齢65.06±0.26と月齢とともに増加した。

② ラジカル消去系(表2)

ラジカル消去に働くsuperoxide dismutaseと還元型グルタチオンはともに同じような加齢変化を示した。すなわち、1か月齢に比較して6か月齢ですでに有意(p<0.01)に減少し、24か月齢になると1か月齢の約60%になった。加齢によって過酸化物の消去に作用する物質が量的ならびに機能的に低下していた。

③ 過酸化脂質(表2)

過酸化物の生成に関係する過酸化脂質は24か月齢で

表3-1 ラット水晶体リポ蛋白質含有脂質量の加齢変化

リン脂質量 リポ蛋白質 分画	月齢		
	6	12	24
LP-x	4.23	6.53	8.03
chylomicron	2.80	1.92	2.11
Ox-LDL	1.39	1.73	6.59
LDL	8.17	4.45	5.34
Ox-HDL	2.02	4.08	6.04
HDL	3.74	2.10	2.60
計	22.35	20.81	30.71

単位：μg/lens

表3-2 コレステロール量

リポ蛋白質 分画	月齢		
	6	12	24
LP-x	3.53	3.29	6.78
chylomicron	3.64	3.25	3.28
Ox-LDL	0.57	0.58	1.69
LDL	1.47	1.09	1.32
Ox-HDL	1.63	1.04	3.10
HDL	0.45	0.51	1.21
計	11.29	9.76	17.38

単位：μg/lens



はじめて急激に増加した。

④ アルカリ金属類(表2)

加齢とともにカリウムが減少してナトリウムが増加するために水晶体は高ナトリウム,低カリウムの状態にある。水晶体の透明性が失われる24か月齢でカルシウムの急激な増加が特徴的である。水晶体中カルシウムの増加は蛋白質の凝集や膜の変化を起こして水晶体が透明性を失うことになる。

⑤ リポ蛋白質のリン脂質とコレステロールの変動(表3)

カイロミクロンは,元来トリグリセライドが主成分でリン脂質やコレステロールが少ないために加齢による変化は少ない。LDLはコレステロールが主成分であるが,加齢によって酸化型LDLが著しく増加し,特にリン脂質の増加が目立っている。HDLは蛋白質(アポリポ蛋白質)を主体としているが,リン脂質も含んでいる。加齢とともに酸化型HDLが増加し,リン脂質およびコレステロールの増加として証明された。リポ蛋白質のリン脂質およびコレステロールが加齢で増加していた。その原因が酸化型のLDLとHDLが増加したことにあり,特に24か月齢の酸化型LDLにおけるリン脂質の増加にある。酸化型のLDLやHDLは受容体に結合出来ず,代謝されにくくなって蓄積されることになる。したがって,両者が増加することは代謝されないまま残ることになるので,膜が傷害されやすい状態にあることを意味している。

ii) 老化促進マウス(SAM)水晶体の過酸化反応(表4)

2か月齢と6か月齢SAM水晶体では,Cu,Zn-SOD量の減少が著しく,6か月齢になると測定可能値以下であった。同時に,その活性値も6か月齢で2か月齢の約50%に低下していた。その結果,過酸化脂質は2か月齢 $5.6 \pm 0.6 \times 10^{-2}$ nmol MDAに比べ,6か月齢で $9.3 \pm 0.8$ に増加したことから,SAMでは過酸化反応が急激に進行することが明らかとなった。

iii) 組織学的変化

① ラット水晶体(図14)

24か月齢では6か月齢に比べ,上皮では単位面積当た

りの細胞数が減少していた。前部皮質部では皮質線維の膨化と変性がみられた。Bow領域では構築の乱れはあったが軽微であった。後部皮質では前部皮質と同じく線維の膨化と変性を生じていた。

② SAMマウス(図15)

2か月齢ではbow構築が正常であったが,6か月齢でbow areaの細胞核が塊状になったり,離れて存在したりして乱れている。

iv) ヒト水晶体蛍光強度の加齢変化(表5)

生体眼で水晶体の加齢変化を表す指標の一つに自発蛍光がある。健常者の透明水晶体では,30代までは一定の規則性をもって増強していた。40代( $14.50 \pm 12.88$ )からの自発蛍光は強度の度合が増して,60代( $29.11 \pm 18.48$ )になると10代( $4.60 \pm 8.22$ )の6.3倍になった。糖尿病患者の場合は,各年代で健常者よりも明らかに蛍光強度が強い。蛍光強度の増強は健常者の場合と同じく,60代( $50.79 \pm 43.79$ )で著明にみられた。

2) 水晶体におけるラジカルの発生

i) 白内障からのラジカルの検出

① HO<sup>•</sup>の発生(図16)

白内障の混濁型別とラジカル生成の関係を調べた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を付加しない水晶体試料のみの実験では,研究に供した試料の中で核型混濁にのみHO<sup>•</sup>の発生をみた。

② アスコルビン酸ラジカル(図17)

成熟型混濁では,アスコルビン酸フリーラジカル(AFR)が検出された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を附加させた実験では,後囊下混濁+核混濁型および成熟型混濁でAFRが発生していた。後囊下混濁単独ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えても過酸化反応は起きず,ラジカルの生成はみられない。ESRでとらえたラジカルの波形はAFRと思われるが,SODやカタラーゼを加えると波形が減少したり消失することからO<sub>2</sub><sup>-•</sup>やHO<sup>•</sup>が混合して存在している可能性もあるかも知れない。核型混濁では直接にラジカルは証明されなかったが,過酸化状態ではAFRが発生し,水晶体混濁がさらに進行した成熟型では直接的にAFRをトラップすることが出来た。このラジカルはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>付加でさらに増強された。また,アスコルビン酸オキシダーゼを同時に作用すると,このラジカルは消失したため,AFRであるこ

表4 老化促進マウス(SAM)水晶体の過酸化反応

酸化 関連物質	月齢 (月)	
	2	6
Cu, Zn-SOD量 (ng/lens)	0.25	nd
Superoxide scavenging 活性 (U/lens)	63.3±51.3	32.8±19.8
過酸化脂質量 (×10 <sup>-2</sup> nmol MDA/lens)	5.6±0.6	9.3±0.8

nd: not detected

表5 ヒト水晶体蛍光強度の年齢別変化

水晶体 年齢	健常者 (n=18)	糖尿病患者 (n=14)
10代	4.60±8.22	
20代	6.78±7.01	15.61±7.39
30代	8.67±9.98	15.62±10.91
40代	14.50±12.88	21.0±14.36
50代	18.43±12.43	29.1±28.8
60代	29.11±18.48	50.79±43.79



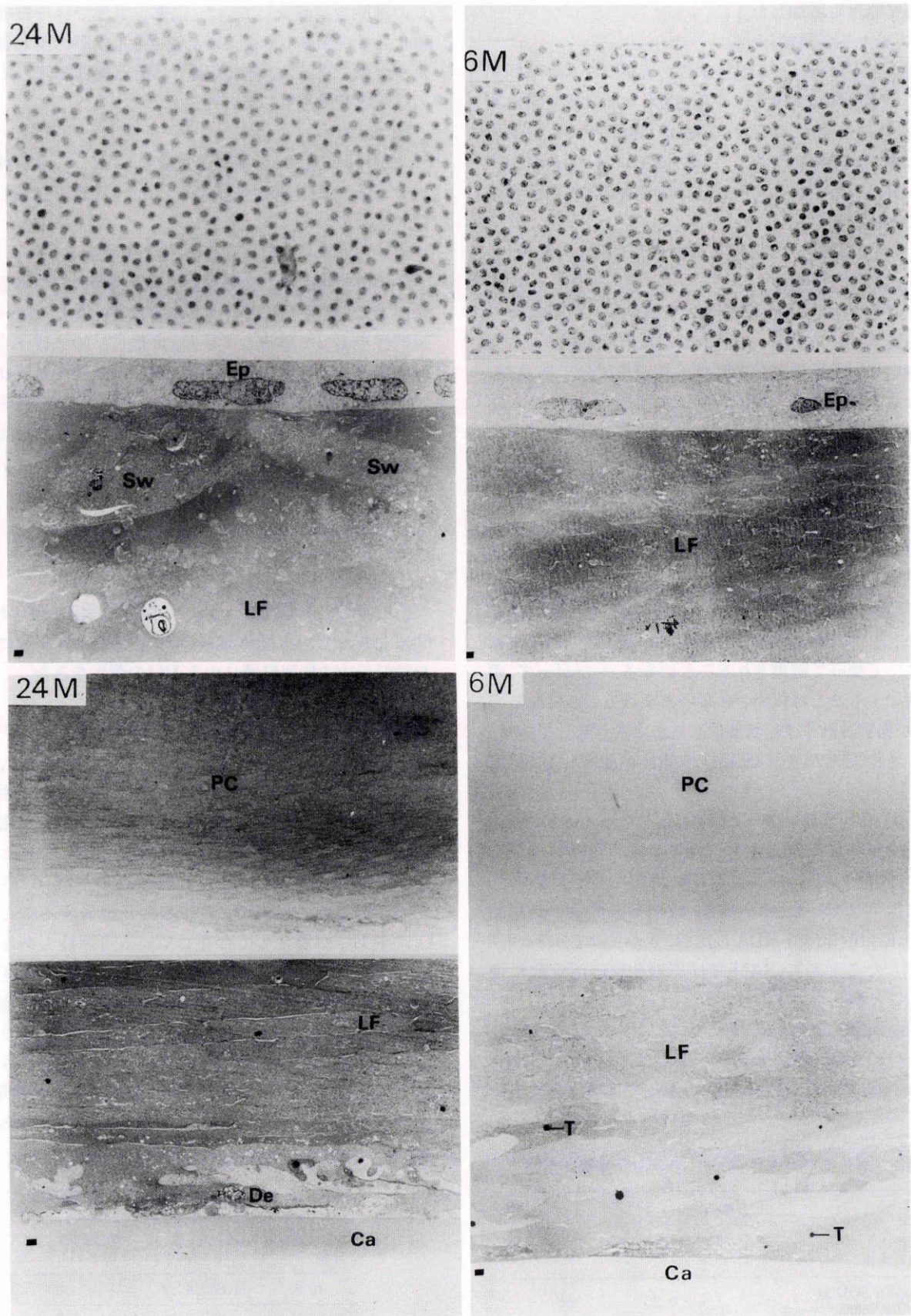


図14 ラット水晶体の加齢による組織変化。

24か月齢で単位面積当たりの上皮細胞数減少。前部および後部皮質線維の変化と膨化。

Ep: epithelium, Sw: swollen, LF: lens fiber, PC: posterior cortex, T: terminal body, Ca: capsul, De: degeneration



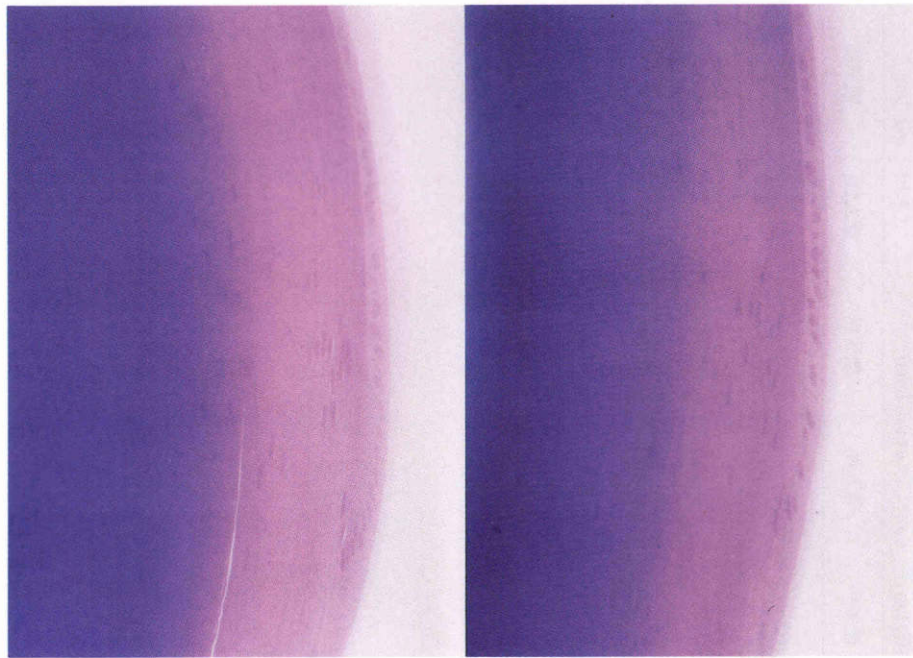


図15 老化促進マウス(SAM)の水晶体.

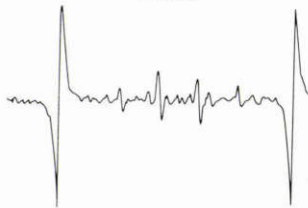
6 M では bow 領域で細胞核が塊状になったり離れて配列が乱れている.

測定条件

Magnetic field	336.0 ± 10 mT
Power	8 mW
Time constant	0.1 sec
Frequency modulation	100 kHz
Modulation	0.125 mT
Amplitude	7.9 × 100
Sweep time	2 min.
Temperature	25 °C

ハイドロキシラジカル (HO<sup>•</sup>)

白内障



アスコルビン酸ラジカル

白内障



房水



図16 電子スピン共鳴(ESR)によるフリーラジカルの証明.

白内障

+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+SOD

+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+SOD+Catalase



図17 白内障におけるアスコルビン酸ラジカルに対する消去作用.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を付加するとラジカルは増強する.しかし,ラジカル消去酵素によって減弱する.

とが特定できた.

3) 白内障における酸化関連物質の変化(表6)

i) 過酸化脂質量

過酸化脂質は核型混濁(N)で両白内障群とも最も多く含有されていた.N型に存在する過酸化脂質量は皮質型(C)および後囊下皮質型(P)に比較して有意(老人性白内障 p<0.05,糖尿病白内障 p<0.01)に多い.成熟型(M)はN型に次いで過酸化脂質が多かった.



表 6-1 水晶体混濁型別酸化関連物質の変動 (1)

ラジカル酸化関連物質 白内障	生成系		消去系		L-アスコルビン酸 ( $\times 10^{-2}$ mg/lens)							
	老人性	糖尿病	老人性	糖尿病								
過酸化脂質 $\times 10^{-2}$ nmol(MDA)/lens												
皮質混濁型	21.97 $\pm 15.96$	42.30 $\pm 25.67$	30.76 $\pm 11.72$	26.06 $\pm 4.35$	4.12 $\pm 2.25$	4.93 $\pm 3.80$	3.760 $\pm 3.458$	1,033 $\pm 643$	0.462 $\pm 0.101$	0.210 $\pm 0.183$	9.4 $\pm 4.4$	3.5 $\pm 1.8$
核混濁型	47.00 $\pm 34.91$	113.77 $\pm 21.61$	29.73 $\pm 6.89$	28.39 $\pm 0.64$	5.27 $\pm 1.99$	6.33 $\pm 2.91$	3.146 $\pm 2.459$	1,605 $\pm 458$	0.374 $\pm 0.122$	0.235 $\pm 0.071$	2.8 $\pm 1.3$	0.8 $\pm 0.4$
後囊下混濁型	19.56 $\pm 16.35$	21.62 $\pm 13.94$	34.64 $\pm 12.73$	31.11 $\pm 11.57$	4.48 $\pm 2.25$	4.38 $\pm 4.08$	2.314 $\pm 1.985$	2,134 $\pm 1,509$	0.346 $\pm 0.211$	0.233 $\pm 0.141$	n.d.	n.d.
成熟型	39.16 $\pm 28.81$	54.72 $\pm 50.60$	22.57 $\pm 11.59$	29.11 $\pm 17.15$	2.54 $\pm 2.37$	1.90 $\pm 0.08$	2.128 $\pm 3,288$	1,328 $\pm 607$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

表 6-2 水晶体混濁型別酸化関連物質の変動 (2)

ラジカル酸化関連物質 白内障	ラジカル酸化		その他の		カルシウム ( $\times 10^{-3}$ mEq/lens)				
	老人性	糖尿病	老人性	糖尿病					
過酸化脂質 $\times 10^{-2}$ nmol(MDA)/lens									
皮質混濁型	126.2 $\pm 68.2$	149.2 $\pm 110.3$	9.09 $\pm 5.76$	10.16 $\pm 5.05$	14.18 $\pm 8.42$	15.82 $\pm 9.29$	22.51 $\pm 5.29$	22.36 $\pm 8.75$	0.6 $\pm 0.4$
核混濁型	161.3 $\pm 84.0$	196.2 $\pm 53.9$	11.50 $\pm 3.58$	18.26 $\pm 16.45$	13.45 $\pm 6.24$	19.01 $\pm 1.81$	14.87 $\pm 5.33$	12.91 $\pm 0.91$	1.63 $\pm 0.41$
後囊下混濁型	144.8 $\pm 91.5$	132.0 $\pm 52.1$	5.14 $\pm 2.97$	7.22 $\pm 8.31$	11.14 $\pm 3.54$	10.35 $\pm 3.58$	17.62 $\pm 5.19$	17.77 $\pm 6.08$	1.07 $\pm 0.58$
成熟型	112.3 $\pm 77.4$	222.7 $\pm 133.2$	9.17 $\pm 6.23$	5.81 $\pm 1.04$	11.68 $\pm 8.11$	17.79 $\pm 5.11$	14.56 $\pm 12.45$	21.13 $\pm 14.50$	2.28 $\pm 0.70$



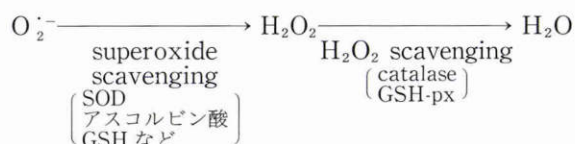
## ii) 過酸化反応防御能に関与する物質の変化

## ① Cu, Zn-SOD 量および活性

Cu, Zn-SOD は両白内障群で N 型に多く存在する。特に、老人性白内障では M 型の 2.0 倍に相当する量 ( $p < 0.05$ ) が、そして糖尿病白内障では 3.3 倍量が含有されていた。一方、Cu, Zn-SOD 活性については、NBT 還元法で測定したため、還元型グルタチオンや L-アスコルビン酸などの superoxide 除去作用を示す低分子量還元物質の作用も含めた superoxide scavenging 活性として表現した。Cu, Zn-SOD 量の最も多い N 型の活性値は高値とはいえ、老人性白内障では C 型 ( $106.1 \pm 97.3$  U/mg prot.lens) に比較して低値 ( $79.2 \pm 74.81$ ) であり、糖尿病白内障でも P 型 ( $60.0 \pm 43.8$ ) より低い ( $39.9 \pm 12.25$ )。すなわち、N 型では SOD が量的には存在するものの、ラジカルの消去の活性が低い。すなわち、不活性の SOD が多く存在していて、その機能を発揮できにくい状態にあると思われる。老人性白内障と糖尿病白内障で比較すると、全体的にどの型でも糖尿病白内障で SOD 量は多いが、superoxide scavenging 活性は低い傾向があった。

② H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging 活性

Catalase と glutathione peroxidase (GSH-px) の 2 つの酸素活性を合わせた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging 活性を測定した。この活性の測定法には酸素電極を用いる方法や紫外線の吸収で見る方法があるが、測定法が確立されていない状態で、著者らの研究でも安定した値を得るために努めたが、数値が安定しなかった。老人性白内障  $34.15 \pm 27.93$  U/lens に対し、糖尿病白内障  $34.51 \pm 41.23$  と変化がない。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発生量は糖尿病白内障で  $28.67 \pm 10.73$  nmol/lens で、老人性白内障  $27.24 \pm 12.19$  より多い。著者ら<sup>18)</sup>が過去に測定した結果では GSH-px 活性は糖尿病白内障が老人性白内障より有意に低下していた。老人性白内障では、C 型では superoxide scavenging 活性も N 型より低下していないことから、C 型では O<sub>2</sub><sup>-</sup> が発生しているが、superoxide scavenging 機能により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に変えられる。しかし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging 活性が低下しているため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が消去されずにそのまま残ってしまうことが考えられた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は非常に強力な酸化力を持ち、増加すると生態に悪影響を及ぼすといわれる。そのため、C 型では白内障を引き起こす要因として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による影響が強いのではないかとと思われる。一方、M 型では superoxide scavenging 活性が低下しているために H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成量は減少しているが、基質である O<sub>2</sub><sup>-</sup> は消去されずに残るため、これが白内障化に影響していると推察される。



## ③ 還元型グルタチオン (GSH)

GSH は GSH-px の基質として、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や過酸化脂質を還元して H<sub>2</sub>O や LOH にする抗酸化作用がある。その他、GSH は単独や銅イオンなどと錯体を形成して O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去に働き、蛋白質の SH 基 (PSH) に反応して蛋白質の凝集 (PSSP) を防ぐことも知られている。今回は HPLC を用いて、純粋にグルタチオンのみを介在する -SH を測定した。両白内障群の M 型には GSH が検出されなかった。

白内障の進行に合わせて GSH が抗酸化剤として利用され、酸化型に移行したと思われる。老人性白内障では P 型 ( $0.346 \pm 0.211$  μmol/lens)、次いで N 型 ( $0.374 \pm 0.122$ )、糖尿病白内障では C 型 ( $0.210 \pm 0.183$ ) で、老人性白内障に比べて有意 ( $p < 0.01$ ) に減少していた。

## ④ グルコースおよびフルクトサミン

グルコースは水晶体の透明性を維持するエネルギー源として必要であり、蛋白質、核酸、そして脂質の代謝にも関係することから、その変動は影響が大きい。老人性白内障では N 型に最も多くグルコースが含まれている ( $161.3 \pm 84.0$  mg/lens)。次いで P 型 ( $144.8 \pm 91.5$ ) に多く、M 型が最も少ない ( $112.3 \pm 77.4$ )。しかし、糖尿病白内障では M 型が最も多く ( $222.7 \pm 133.2$  mg/lens)、次いで N 型 ( $196.2 \pm 53.9$ ) であった。いずれの型の白内障でも糖尿病白内障でグルコースが多いことは予想された結果であるが、全身状態を反映した成績であった。非酵素的な蛋白質の糖化反応 (glycation) の産物であるフルクトサミンは、老人性白内障および糖尿病白内障ともに N 型に最も多く存在していた。糖尿病白内障では M 型にグルコースが多いにもかかわらず、フルクトサミンが少ない。これは、M 型では水溶性蛋白質が少なく、凝集が進んでいるために露出しているリジン残基が少ないためにフルクトサミンが生成されないのではないかとと思われる。また、フルクトサミンからさらにグリケーションが進行してペントシジンなどの最終産物に移行したことも考えられる。N 型はグルコースとフルクトサミンを豊富にもっている。

## ⑤ 水溶性蛋白質

老人性白内障では M 型の水溶性蛋白質が低値 ( $19.3 \pm 12.5$  μg/lens) であることが特異的である。糖尿病白内障の M 型 ( $45.0 \pm 7.9$ ) と比較しても有意 ( $p < 0.05$ ) に減少している。成熟型となって不水溶性蛋白質が増加した結果と考えられる。

## ⑥ 遷移金属

Fe や Cu イオンは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とフェントン (様) 反応を起こしてヒドロキシラジカルを生成し、過酸化反応を進行させる作用がある。その他、Cu イオンは過酸化脂質が存在すると脂質ラジカルを連鎖的に生成させることも知られている。今回は Cu をイオンとして定量して白内障間で比較した。Cu イオンは同年齢層の透明水晶体と比較して



白内障で明らかに増加している。糖尿病白内障では  $10.59 \mu\text{g}/\text{lens}$  含有されて老人性白内障の  $(3.87 \mu\text{g}/\text{lens})$  の約3.0倍にもなった。Feイオンも糖尿病白内障で増加する傾向にあった。

4) 膜の変化

① ヒト水晶体の脂質組成(図18)

薄層板上に試料を塗布した部位(原点)にリン脂質(PL)が存在した。PLの上方に出現した脂質は標準品に一致せず、同定は不可能なために確認されていない。未同定スポット(UN)。次いでモノグリセライド(MG)、コレステロール(C)、フリー脂肪酸(FFA)、エステル型脂肪酸

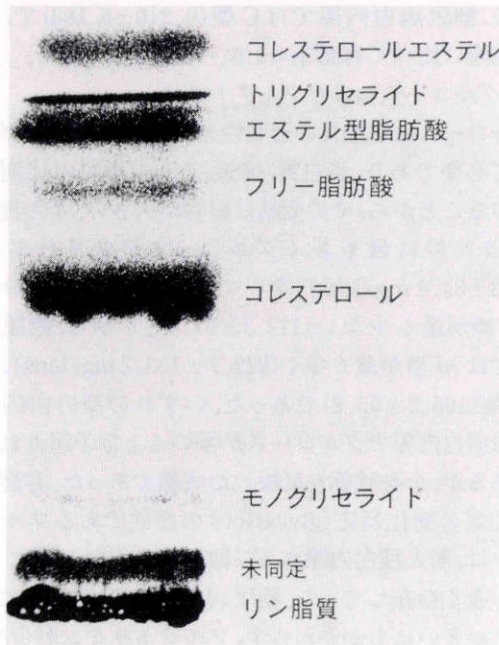


図18 ヒト水晶体の脂質組成。大部分がリン脂質と中性脂質である。

(MeFA), トリグリセライド(TG), コレステロールエステル(CE)が同定された。

② ヒト水晶体のリン脂質組成(図19)

最も大きなスポットがスフィンゴミエリン(SM)である。他のリン脂質分画は、試料を塗布した原点から近い順にリゾフォスファチジルエタノールアミン(LPE), フォスファチジルコリン(PC), フォスファチジルエタノールアミン(PE), フォスファチジルセリン(PS), そしてフォスファチジルイノシトール(PI)である。

③ ヒト水晶体のリン脂質量(表7)

老人性白内障( $384.86 \pm 50.10 \mu\text{g Phosphorus}/\text{dry.g. lens}$ )では正常水晶体( $537.73 \pm 98.93$ )に比較して明らかに減少した。リン脂質分画においてもすべての分画で減少し、特にPEおよびPC分画で著しかった。白内障では膜が破壊されて脂質合成能も低下したためと考えられ

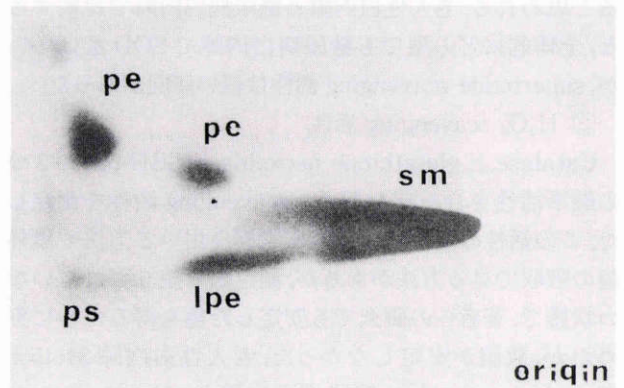


図19 ヒト水晶体のリン脂質組成。

sm: スフィンゴミエリン, pc: フォスファチジルコリン, lpe: リゾフォスファチジルエタノールアミン, pe: フォスファチジルエタノールアミン, ps: フォスファチジルセリン

表7 ヒト水晶体リン脂質量

リン脂質分画	水晶体		正常水晶体		老人性白内障	
	リン	量	Phosphorus $\mu\text{g}\cdot\text{p}/\text{g. lens}(\%)$		Phosphorus $\mu\text{g}\cdot\text{p}/\text{g. lens}(\%)$	
Sphingomyelin		$340.90 \pm 25.74$	$(63.40 \pm 7.90)$	$302.33 \pm 7.90$	$(78.56 \pm 2.42)$	
Phosphatidyl ethanolamine		$45.49 \pm 13.09$	$(8.46 \pm 1.25)$	$19.85 \pm 4.30$	$(5.16 \pm 0.92)$	
Lysophosphatidyl ethanolamine		$38.86 \pm 6.96$	$(7.23 \pm 1.74)$	$26.74 \pm 6.05$	$(6.95 \pm 1.96)$	
Phosphatidyl choline		$31.66 \pm 10.17$	$(5.89 \pm 1.96)$	$10.56 \pm 3.75$	$(2.74 \pm 6.85)$	
Phosphatidyl serine		$19.32 \pm 6.07$	$(3.59 \pm 1.40)$	$8.55 \pm 2.87$	$(2.22 \pm 1.08)$	
Phosphatidyl ethanolamine		$11.53 \pm 5.82$	$(2.14 \pm 1.11)$	$7.75 \pm 2.10$	$(2.01 \pm 0.62)$	
Unidentified spots		$49.97 \pm 32.67$	$(9.29 \pm 7.75)$	$9.08 \pm 4.57$	$(2.36 \pm 1.18)$	
合計		$537.73 \pm 98.63$		$384.86 \pm 50.10$		

\* 水晶体乾燥重量

正常水晶体 =  $63.25 \pm 10.13 \text{ mg}$   
老人性白内障 =  $55.02 \pm 8.35 \text{ mg}$



表8 ヒト水晶体リン脂質の脂肪酸組成

脂肪酸	正常水晶体 (%)	老人性白内障 (%)
12:0	Tr.	Tr.
14:0	0.42 (0.24-0.74)	1.35 (1.29-2.34)
14:1	0.28 (0.14-0.45)	0.84 (Tr.-1.10)
16:0	42.73 (28.81-57.24)	47.72 (44.29-49.20)
16:1	1.46 (0.75-2.77)	0.44 (Tr.-0.84)
18:0	3.36 (3.15-3.66)	3.02 (1.20-5.47)
18:1	4.90 (4.36-5.54)	4.93 (1.44-5.27)
18:2	0.47 (0.24-0.67)	1.21 (0.15-1.27)
19:0	—	0.46 (Tr.-0.50)
20:0	0.19 (0.10-0.30)	0.61 (Tr.-1.10)
20:2	0.54 (3.94-7.03)	Tr.
20:4	0.19 (0.10-0.37)	Tr.
22:0	1.63 (0.38-2.01)	1.89 (0.24-3.50)
23:0	Tr.	Tr.
24:0	6.30 (2.48-8.78)	3.03 (2.82-4.49)
24:1	7.59 (5.00-10.59)	11.79 (4.57-14.03)
25:0	3.27 (2.01-5.00)	3.54 (2.10-4.71)
26:0	3.15 (2.44-4.33)	5.05 (3.57-9.39)
26:1	17.51 (6.81-22.01)	14.12 (11.17-17.92)
飽和脂肪酸	61.05 (50.79-73.38)	66.67 (64.03-73.32)
不飽和脂肪酸	38.95 (25.62-49.21)	33.33 (26.68-45.97)

表9 Sphingomyelinの脂肪酸組成

脂肪酸	正常水晶体 (%)	老人性白内障 (%)
14:0	1.93 (0.68-2.31)	1.21 (0.52-3.22)
14:1	0.28 (Tr.-0.52)	0.38 (Tr.-0.84)
16:0	63.65 (59.66-66.79)	62.25 (59.25-67.72)
16:1	1.23 (0.54-2.03)	0.91 (0.50-1.50)
17:1	—	1.86 (Tr.-2.09)
18:0	1.66 (1.05-3.84)	5.11 (4.90-7.64)
18:1	0.67 (0.50-1.60)	1.65 (1.05-2.76)
19:1	Tr.	0.44 (Tr.-1.05)
20:0	0.77 (0.34-1.03)	0.16 (Tr.-0.40)
20:1	0.66 (Tr.-0.95)	0.44 (0.30-0.52)
20:X	1.23 (1.06-2.31)	0.51 (Tr.-1.23)
22:0	4.79 (2.31-6.78)	1.92 (1.05-2.32)
22:1	1.98 (Tr.-2.69)	1.61 (0.87-2.62)
23:0	0.23 (Tr.-0.56)	4.18 (3.06-7.12)
23:1	Tr.	0.93 (Tr.-1.82)
24:0	5.28 (4.04-7.10)	4.41 (3.93-6.13)
24:1	13.86 (10.23-15.08)	7.27 (5.02-11.70)
25:0	—	2.47 (1.07-4.94)
26:0	—	0.60 (Tr.-1.16)
26:1	0.83 (Tr.-1.36)	1.46 (0.90-2.86)
27:0	—	0.21 (Tr.-0.63)
27:1	0.93 (Tr.-1.52)	—
飽和脂肪酸	78.33 (69.35-86.18)	32.54 (75.32-89.54)
不飽和脂肪酸	21.67 (14.88-30.65)	17.46 (11.08-25.60)

表10 Phosphatidyl ethanolamineの脂肪酸組成

脂肪酸	正常水晶体 (%)	老人性白内障 (%)
14:0	0.50 (0.30-0.86)	1.49 (0.72-1.92)
14:1	0.44 (0.21-0.63)	1.06 (0.79-1.52)
16:0	6.69 (5.89-8.48)	17.62 (9.06-19.18)
16:1	0.64 (0.22-1.25)	0.63 (Tr.-1.29)
18:0	4.08 (2.30-5.88)	7.79 (4.41-9.18)
18:1	6.32 (4.99-7.30)	10.37 (5.62-20.12)
18:2	Tr.	1.97 (0.43-3.94)
20:0	Tr.	1.82 (Tr.-2.64)
20:1	Tr.	0.55 (Tr.-1.20)
20:2	Tr.	0.74 (Tr.-1.52)
22:0	1.18 (1.11-1.25)	3.58 (2.70-3.64)
22:2	3.79 (1.51-4.71)	3.86 (1.12-5.72)
22:X*	31.02 (27.03-35.12)	26.77 (15.16-38.37)
22:6	14.31 (12.67-17.15)	5.76 (Tr.-9.89)
26:2	32.03 (30.19-33.92)	15.99 (7.87-24.11)
飽和脂肪酸	11.45 (10.19-14.77)	32.30 (23.18-45.20)
不飽和脂肪酸	88.55 (85.23-89.81)	67.70 (59.66-77.24)

表11 Lysophosphatidyl ethanolamineの脂肪酸組成

脂肪酸	正常水晶体 (%)	老人性白内障 (%)
14:0	1.31 (0.86-1.85)	1.13 (Tr.-1.96)
14:1	2.13 (1.03-3.24)	2.64 (1.47-3.84)
16:0	51.23 (49.64-55.86)	32.99 (29.58-49.64)
16:1	2.11 (0.81-4.40)	1.45 (0.71-2.46)
18:0	23.11 (15.11-31.18)	14.47 (11.97-17.40)
18:1	1.47 (0.93-2.19)	1.04 (0.76-1.94)
18:2	1.91 (0.90-2.52)	Tr.
20:0	1.75 (1.44-2.01)	3.85 (1.40-6.70)
20:2	0.90 (Tr.-2.10)	1.45 (1.07-2.76)
20:4	1.71 (0.98-2.03)	8.68 (4.67-14.34)
22:0	3.43 (3.15-4.60)	4.62 (1.90-6.34)
24:0	4.27 (1.05-8.54)	10.84 (8.83-12.43)
24:1	4.67 (2.34-9.35)	5.14 (2.43-6.84)
24:X*	Tr.	11.70 (5.40-19.28)
飽和脂肪酸	85.10 (79.19-92.42)	67.90 (64.25-70.29)
不飽和脂肪酸	14.90 (8.98-21.81)	32.10 (31.75-34.69)

表12 Phosphatidyl cholineの脂肪酸組成

脂肪酸	正常水晶体 (%)	老人性白内障 (%)
14:0	1.13 (Tr.-2.05)	3.84 (1.94-6.74)
14:1	1.17 (Tr.-2.45)	1.68 (Tr.-2.30)
16:0	27.02 (18.38-31.53)	40.75 (28.86-52.17)
16:1	2.79 (1.79-3.13)	1.68 (1.06-2.30)
18:0	10.42 (7.90-11.74)	7.90 (6.98-8.42)
18:1	2.97 (1.07-3.97)	4.87 (4.13-6.02)
18:2	Tr.	0.48 (Tr.-1.12)
20:0	Tr.	1.71 (0.35-3.16)
20:2	Tr.	Tr.
22:0	5.79 (1.42-9.23)	3.91 (1.19-7.81)
22:2	18.27 (8.62-24.48)	13.62 (7.90-18.94)
24:X*	30.44 (16.71-39.91)	19.59 (13.35-24.30)
26:1	Tr.	Tr.
飽和脂肪酸	44.36 (40.09-58.66)	58.08 (53.89-61.44)
不飽和脂肪酸	55.64 (42.35-57.91)	41.92 (38.56-46.11)

る。  
 ④ ヒト水晶体リン脂質の脂肪酸組成(表8~12)  
 脂肪酸は16:0と26:1が主体で60%をしめていた。不飽和脂肪酸が正常水晶体で38.95%であったが、白内障では33.33%に減少し、飽和化現象が起きていた。SM



分画では脂肪酸が飽和脂肪酸と二重結合一個の不飽和脂肪酸だけから成っているので白内障でも変化が少ない。PE分画およびPC分画では、白内障になると飽和脂肪酸が10~20%も増加していた。不飽和脂肪酸が酸化されて飽和化したことを示していた。LPE分画だけは酸化によってPEが分断されるために不飽和化が進んでいた。

⑤ リポ蛋白質量(表13)

ヒト水晶体には血液と同じようにCM, VLDL, LDL, そしてHDLが存在していた。老人性白内障と糖尿病白内障ではリポ蛋白質の総量に明らかな差は見られないが、各分画で特徴ある変動をしていた。なかでもVLDLとLDLは糖尿病白内障で有意に増加していた。

⑥ 糖化LDLおよび糖化HDL(表14, 15)

糖尿病でグリケーションが進行することは当然のごとく予想される。そこで、糖尿病白内障で増加したLDLの性質を調べるためにLDLのグリケーションの程度を測定した。LDLの主要構成蛋白質であるアポ蛋白質B100が、糖尿病白内障では糖化されていた。特に、不水溶性分画においてはアポリポ蛋白質B100は老人性白内障 $0.51 \pm 0.31 \times 10^{-3} \text{nmol/lens}$ に比較して、糖尿病白内障では $2.03 \pm 1.08$ と有意( $p < 0.05$ )に増加していた。LDL中のアポリポ蛋白質B100の総量は、老人性では $35.35 \pm 4.50 (\times 10^{-3} \text{nmol/lens})$ であり、糖化したアポリポ蛋白質B100は $1.97 \pm 0.60 (\times 10^{-3} \text{nmol/lens})$ と比較すると、LDLのグリケーション率は5.6%であった。糖尿病白内障のグリケーション率は8.2%であったため、

表13 白内障におけるリポ蛋白質量

	水溶性		不水溶性	
	老人性	糖尿病	老人性	糖尿病
CM	$2.31 \pm 0.94^{**}$	$22.24 \pm 0.97$	$45.43 \pm 8.24^*$	$18.10 \pm 2.91$
VLDL	$3.48 \pm 0.71^{**}$	$7.96 \pm 0.21$	$2.82 \pm 0.21^{**}$	$6.88 \pm 0.88$
LDL	$2.36 \pm 0.81^{**}$	$6.29 \pm 0.36$	$5.09 \pm 0.41^{**}$	$14.68 \pm 0.80$
HDL	$4.97 \pm 0.33$	$4.42 \pm 0.41$	$23.15 \pm 0.66$	$16.38 \pm 2.01$
計	$13.12 \pm 1.04^{**}$	$40.91 \pm 0.87$	$76.49 \pm 7.48^*$	$56.04 \pm 4.18$

単位  $\mu\text{g/lens}$   
n=8

CM: カイロミクロン, VLDL: 超低密度リポ蛋白質, LDL: 低密度リポ蛋白質, HDL: 高密度リポ蛋白質

\*\* : 老人性白内障と糖尿病白内障の間  $p < 0.01$  \* :  $p < 0.05$

表14 白内障におけるLDL分画中アポリポ蛋白質B100のグリケーション量

水晶体	総アポB100量	glycatedアポB100量	glycation率	
	( $\times 10^{-3} \text{nmol/lens}$ )	( $\times 10^{-3} \text{nmol/lens}$ )	(%)	
老人性白内障	水溶性分画	$13.62 \pm 0.35^*$	$1.08 \pm 0.16$	7.9
	水不溶性分画	$21.73 \pm 4.15^*$	$0.51 \pm 0.31^*$	2.3
	計	$35.35 \pm 4.50$	$1.97 \pm 0.60$	5.6
糖尿病白内障	水溶性分画	$23.02 \pm 1.80$	$2.59 \pm 1.45$	11.2
	水不溶性分画	$24.17 \pm 2.37$	$2.03 \pm 1.08$	8.4
	計	$47.19 \pm 4.17$	$3.85 \pm 1.39$	8.2

\* :  $p < 0.05$

表15 白内障におけるHDL分画中アポリポ蛋白質A-1のグリケーション量

水晶体	総アポA-1量	glycatedアポA-1量	glycation率	
	$\times 10^{-1} \text{nmol/lens}$	$\times 10^{-1} \text{nmol/lens}$	(%)	
老人性白内障	水溶性分画	$1.75 \pm 0.07^{**}$	$0.43 \pm 0.36^{**}$	24.6
	水不溶性分画	$0.79 \pm 0.34$	$0.21 \pm 0.03^{**}$	26.6
	計	$2.54 \pm 0.41$	$0.65 \pm 0.39$	25.6
糖尿病白内障	水溶性分画	$1.23 \pm 0.11$	$0.98 \pm 0.19$	79.7
	水不溶性分画	$0.66 \pm 0.53$	$0.36 \pm 0.04$	54.5
	計	$1.89 \pm 0.64$	$1.34 \pm 0.23$	70.9

\*\* :  $p < 0.01$



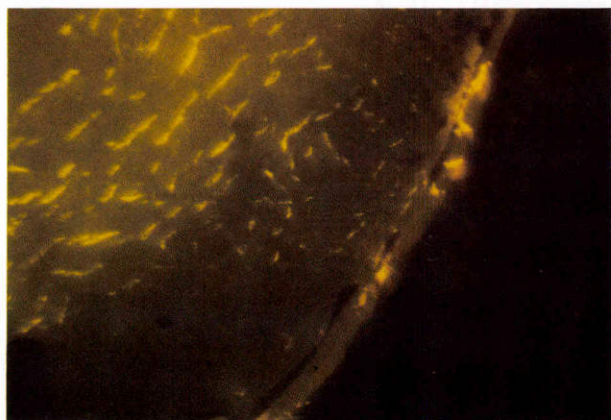


図20 蛍光プローブで標識された低比重リポ蛋白質 (LDL)が水晶体囊を通して受容体に取り込まれている。

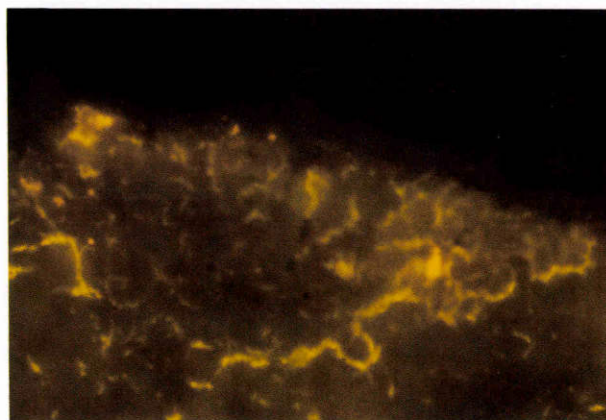


図22 白内障水晶体では膜が崩壊するために酸化型 LDLも囊内に取り込まれている。

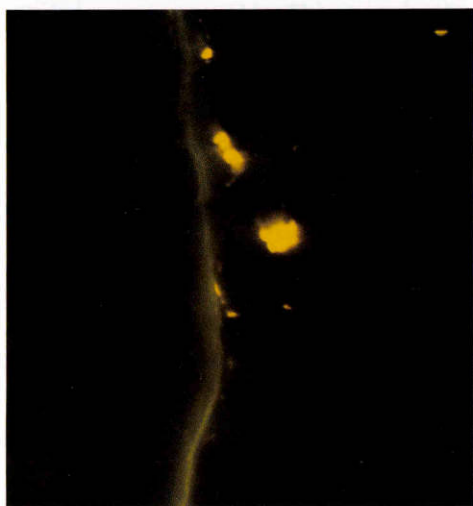


図21 正常水晶体では酸化型 LDLは囊内に取り込まれない。



図23 老人性白内障における銅の存在。成熟型白内障の前部皮質に褐色に染色されている。

やはり糖尿病白内障の方がグリケーション度合いが進んでいた。水溶性と不水溶性とで比較すると、水溶性分画のグリケーション率が高かった。

HDL量は水溶性分画では両白内障群間に変化はなかったが、不水溶性では糖尿病白内障でやや減少していた。HDL分画中のアポリポ蛋白 A-1量も糖尿病でやや低下していたが、HDL分画中の glycated アポリポ蛋白 A-1量は逆に糖尿病白内障で増加していた。そのため、糖尿病白内障のHDLのグリケーション率は約70%と非常に高率であった。水溶性分画と不水溶性分画を比較すると、水溶性分画でグリケーション度合いが高かった。

#### ⑦ LDL受容体の局在(図20~22)

水晶体に存在するリポ蛋白の由来を調べるために、外因性のリポ蛋白が水晶体中に入るかどうかを実験したところ、蛍光プローブで標識されたLDLが水晶体囊を通して水晶体上皮に存在する受容体に取り込まれていた。図20は水晶体囊内に取り込まれたLDLが上皮付近

に顆粒状に、そして皮質深層では代謝された形で線維間に比較的規則性をもって存在している。酸化型LDL (AC-Dil-LDL)は、正常水晶体では図21に示すように水晶体囊内に入ることはない。しかし、白内障になると膜の破壊が進んで、図22のごとく水晶体に取り込まれている。酸化型LDLは水晶体上皮に存在するLDL受容体ベジクルに吸着されたものの、分解されないまま粒状になって皮質内に認められる。

#### 2. 水晶体周囲環境(体内)の変化と過酸化反応

1) ヒト糖尿病における血液、房水、硝子体の酸化関連物質の変動(表16)

##### i) 過酸化反応生成系物質の変化

#### ① 過酸化脂質

白内障手術の際に得た水晶体と同一人の血清を採取して過酸化脂質を定量したところ、糖尿病患者では非糖尿病



表 16 糖尿病における水晶体とその周囲環境の過酸化反応

過酸化物質	検体		水晶体		房水		硝子体		血清	
	糖尿病	非糖尿病	糖尿病	非糖尿病	糖尿病	非糖尿病	糖尿病	非糖尿病	糖尿病	非糖尿病
生成系	過酸化脂質 ( $\times 10^{-2}$ nmol (MDA)/lens)	53.3 $\pm$ 38.5	34.8 $\pm$ 31.6	6.74 $\pm$ 3.34	0.89 $\pm$ 0.49	9.7 $\pm$ 5.4	4.5 $\pm$ 2.7	3.38 $\pm$ 0.71	(nmol (MDA)/ml)	3.30 $\pm$ 0.47
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	28.67 $\pm$ 10.73 (nmol/lens)	27.24 $\pm$ 12.19	0.57 $\pm$ 0.06 (nmol/ml)	0.46 $\pm$ 0.19	19.60 $\pm$ 15.01 (nmol/vit)	16.18 $\pm$ 9.63	0.09 $\pm$ 0.15 (nmol/ml)	(nmol (MDA)/lens vit ml)	0.08 $\pm$ 0.03
消去系	Cu•Zn-SOD ( $\mu$ g/lens)	4.9 $\pm$ 3.7	4.0 $\pm$ 2.3	10.5 $\pm$ 3.1 (ng/ml)	10.5 $\pm$ 4.4	378.0 $\pm$ 318.9 (ng/vit)	370.8 $\pm$ 331.2	34.8 $\pm$ 22.8 (ng/ml)	(U/mg prot. lens)	27.4 $\pm$ 15.0
	Superoxide Scavenging 活性	42.20 $\pm$ 36.89 (U/mg prot. lens)	68.25 $\pm$ 25.72	7.1 $\pm$ 5.6 (U/ml)	20.8 $\pm$ 15.3	4.7 $\pm$ 3.8 (U/mg prot. vit)	9.0 $\pm$ 8.9	2.7 $\pm$ 1.5 (U/ml)	(U/mg prot. vit)	3.2 $\pm$ 2.6
系	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Scavenging 活性	14.96 $\pm$ 14.48 (U/lens)	29.87 $\pm$ 24.62	1.59 $\pm$ 1.44 (U/ml)	1.20 $\pm$ 1.01	2.40 U/vit	19.09	0.33 $\pm$ 0.36 (U/ml)	( $\times 10^{-5}$ mol/l)	0.32 $\pm$ 0.20
	還元型 グルタチオン	0.21 $\pm$ 0.14 (nmol/lens)	0.32 $\pm$ 0.20	n.d.	n.d.	0.8 $\pm$ 0.7 ( $\times 10^{-2}$ M/vit)	2.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.7 ( $\times 10^{-5}$ mol/l)		6.2 $\pm$ 5.0
そ	L-アスコルビン酸	0.0098 $\pm$ 0.021 (mg/lens)	0.0323 $\pm$ 0.0268	0.27 $\pm$ 0.11 (mg/ml)	0.22 $\pm$ 0.07	4.5 $\pm$ 3.9 ( $\mu$ mol/vit)	14.5 $\pm$ 2.3	3.5 $\pm$ 2.1 (mg/dl)		3.3 $\pm$ 1.1
	Cu イオン	15.74 $\pm$ 5.62 ( $\mu$ g/lens)	12.61 $\pm$ 6.58	8.54 $\pm$ 4.14 ( $\mu$ g/dl)	7.65 $\pm$ 1.07	26.11 $\pm$ 18.79 ( $\mu$ g/vit)	9.71 $\pm$ 7.77	96.6 $\pm$ 10.86 ( $\mu$ g/dl)		96.62 $\pm$ 9.37
の	Fe イオン	21.99 $\pm$ 5.52 ( $\mu$ g/lens)	17.99 $\pm$ 7.07	3.31 ( $\mu$ g/dl)	4.94 $\pm$ 0.19	19.59 $\pm$ 11.41 ( $\mu$ g/vit)	12.88 $\pm$ 10.26	86.93 $\pm$ 25.53 ( $\mu$ g/dl)		90.73 $\pm$ 29.09
	グルコース	175.1 $\pm$ 87.4 (mg/lens)	136.1 $\pm$ 80.2	147.2 $\pm$ 65.4 (mg/dl)	98.8 $\pm$ 35.3	254.1 $\pm$ 163.5 (mg/vit)	174.8 $\pm$ 126.0	146.39 $\pm$ 38.67 ( $\mu$ mol/l)		93.00 $\pm$ 7.92
他	フルクトサミン	9.33 $\pm$ 8.15 ( $\mu$ mol/lens)	7.55 $\pm$ 5.47	69.01 $\pm$ 25.23 ( $\mu$ mol/l)	47.79 $\pm$ 32.09	12.13 $\pm$ 8.17 ( $\mu$ mol/vit)	4.06 $\pm$ 2.03	310.0 $\pm$ 51.1 ( $\mu$ mol/l)		242.8 $\pm$ 15.9

\*\* : p<0.01 \* : p<0.05  
nd=not detected



者と差がない。白内障水晶体では透明水晶体( $0.078 \pm 0.011 \times 10^{-2} \text{ nmolMDA/lens}$ )に比べて著しく多量に存在するが、老人性白内障よりわずかに多い傾向であった。硝子体では硝子体手術の際に採取した試料を材料に測定したので、網膜剥離手術や外傷で得られた硝子体と比較して約2倍量であった。房水には糖尿病で有意に多量の過酸化脂質が含有されており、血液房水柵の破壊による全身からの影響が考えられる成績であった。

## ② $\text{H}_2\text{O}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2$ 量はSODおよびカタラーゼやGSH-pxの活性によって決められる。糖尿病では各部位でわずかに増加していた。その原因は $\text{H}_2\text{O}_2$ を消去する酵素(カタラーゼとGSH-px)の活性が糖尿病で低下していたためと考えられる。特に硝子体と水晶体で低下していた。

### ii) 活性酸素消去関連物質の変化

#### ① Cu, Zn-SOD量およびsuperoxide scavenging活性

発生した $\text{O}_2^-$ の消去に作用するSODの量的ならびに機能的変化を測定した。Cu, Zn-SOD量は糖尿病( $4.9 \pm 3.7 \mu\text{g/lens}$ )および非糖尿病( $4.0 \pm 2.3$ )ともに正常水晶体( $13.4 \pm 0.2$ )よりも減少していた。血清、硝子体および房水では両群に変化がない。しかし、活性値は糖尿病の各部位で明らかに低下していた。硝子体における低下は糖尿病が $4.7 \pm 3.8 \text{ U/mg protein vit.}$ で、非糖尿病 $9.0 \pm 8.9$ に比較して有意( $p < 0.05$ )であった。房水と水晶体でも糖尿病で活性の低下が明らかであった。すなわち、白内障ではSOD活性は糖尿病で正常水晶体( $73.0 \pm 5.2 \text{ U/mg protein lens}$ )の53%に低下していた。房水は糖尿病 $7.1 \pm 5.6 \text{ U/ml}$ で、非糖尿病( $20.8 \pm 15.3$ )の約1/3の活性値であった。

## ② 抗酸化物質

### イ) 還元型グルタチオン

還元型グルタチオン(GSH)の測定法が水晶体はHPLC法、他の部位はグリオキサラーゼ法によったために測定値に相違があるかも知れないが、糖尿病ではあらゆる部位で明らかに減少していた。特に、血清と硝子体で有意に減少していた。水晶体では老人性白内障に比較して約30%減少していた。GSHの減少はグルタチオンレドックスサイクルに関係するグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-px)やグルタチオンリダクターゼ(GR)活性の低下につながる。

### ロ) L-アスコルビン酸

糖尿病患者の白内障と硝子体で有意( $p < 0.05$ )に減少していた。房水や血清では老人性と変化がないことから、水晶体中での抗酸化作用で消費されたと考えられる。

## ③ $\text{H}_2\text{O}_2$ 消去酵素

糖尿病白内障では老人性白内障の1/2に活性が低下し、硝子体では約1/10になっていた。糖尿病の水晶体と硝子体ではカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼ

のどちらか、あるいは両方の活性が低下したことを意味している。房水と血清では両者に変化はなかった。

### iii) その他の過酸化反応関連物質

#### ① 遷移金属イオン

鉄イオンは血清、水晶体、硝子体、そして房水のすべてで変動が少ない。水晶体および硝子体で増加しているものの、房水ではやや減少していた。一方、銅イオンは糖尿病の各部位で増加し、特に水晶体では $10.59 \pm 6.25 \mu\text{g/lens}$ と非糖尿病患者( $3.84 \pm 1.67$ )に比較して有意( $p < 0.01$ )に増加し、また、硝子体でも $26.11 \pm 18.79 \mu\text{g/vit}$ と非糖尿病患者( $9.71 \pm 7.77$ )より有意に多量に含有されていた。

#### ② グリケーション(グルコース、フルクトサミン、ペントシジン)

グルコースが糖尿病患者の血清はもちろん水晶体、硝子体、そして房水の各部位に多く存在していたことは当然の結果である。糖は蛋白質のアミノ基とシッフ塩基を形成し、アマドリ転換してフルクトサミンなどの糖化蛋白質を生じるが、このように非酵素的に起こるglycationによって活性酸素を生じることがあるので、過酸化反応に関連する物質として測定した。グリケーションの初期化合物には糖化蛋白質としてフルクトサミンが形成され、後期反応産物には蛍光を含んだペントシジンなどの糖化終末産物(advanced glycated endproduct)が産出される。ペントシジンは糖尿病白内障 $2.60 \pm 2.57 \text{ nmol/lens}$ が老人性白内障 $1.60 \pm 0.84$ より多い結果であった。

フルクトサミンは、水晶体では糖尿病白内障と老人性白内障との間に差はない。しかし、硝子体では糖尿病が非糖尿病の約3倍量になっていた。水晶体中の水不溶性蛋白質は糖尿病で増加しているが、相対蛍光強度も糖尿病白内障( $613.10 \pm 53.91 \times 10^2$ )で老人性白内障( $403.28 \pm 108.75 \times 10^2$ )に比べて増加していた(表17)。グリケーションの後期反応ではペントシジンなどの蛍光物質が生成されることから、糖尿病でグリケーションが進行していたことが伺える。

#### 2) 実験的高グルコース環境における培養ヒト水晶体の過酸化反応(表18)

ヒト房水、硝子体と同一組成をもった培養液のグルコース濃度のみを300 mg/dlにして灌流しながら、ヒト正常水晶体を3週間培養した。いわゆる生理的状態の人工房水と硝子体で培養された水晶体に比較して、 $\text{O}_2^-$ 消

表17 白内障のグリケーションによる相対的蛍光強度

白内障	蛍光( $\times 10^2$ )		蛋白質(mg/ml)	
	水溶性	水不溶性	水溶性	水不溶性
糖尿病(+)	$389.13 \pm 53.9$	$613.10 \pm 53.9$	$8.55 \pm 2.01$	$12.70 \pm 3.14$
糖尿病(-)	$262.20 \pm 104.28$	$403.28 \pm 108.75$	$9.48 \pm 5.41$	$8.07 \pm 3.61$



表 18 病的環境下における培養ヒト水晶体の過酸化反応

酸化関連物質	水晶体環境		過酸化防御能欠如状態
	生理的条件	高グルコース	
蛋白質 ( $\mu\text{g}/\text{lens}$ )	1,930.0	1,375.0	1,450.0
過酸化脂質 (nmol(MDA)/lens)	0.037	0.255	0.343
Cu, Zn-SOD 量 (ng/lens)	16.8	8.6	7.4
superoxide scavenging 活性 (U/lens)	29.0	3.0	15.7
glucose (mg/lens)	1.69	23.2	2.6
フルクトサミン (nmol/lens)	26.8	52.4	24.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/lens)	0.640	3.536	3.367

表 19 紫外線(UV-B)照射ラット水晶体の過酸化反応

検査項目	月齢 UV-B	1		6		12		18	
		照射	対照 (非照射)	照射	対照 (非照射)	照射	対照 (非照射)	照射	対照 (非照射)
糖(グルコース) (ng/lens)		4.9	4.6	4.2	5.1	2.9	3.6	3.5	1.9
フルクトサミン ( $\mu\text{mol}/\text{lens}$ )		0.389	0.463	0.475	0.209	0.231	0.263	0.253	0.274
蛋白質(水溶性) (mg/lens)		1.66	1.90	1.87	1.89	2.06	1.99	1.93	2.04
脂質 (ng/lens)		97.5	60.0	100.0	80.0	60.0	82.5	67.5	80.0
過酸化脂質 ( $\times 10^{-2}$ nmol(MDA)/lens)		10.1 $\pm$ 2.4	9.5 $\pm$ 2.3	9.2 $\pm$ 0.6	14.8 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 1.1	17.2 $\pm$ 1.6	11.7 $\pm$ 1.7	6.5 $\pm$ 1.1
Cu, Zn-SOD (ng/lens)		0.93	0.78	0.59	0.70	0.45	0.65	0.59	0.46
Superoxide scavenging 活性 (U/mg prot. lens)		9.34	8.58	8.72	11.11	8.01	10.30	6.89	14.0

過酸化脂質 n=4  
他は n=3

去に働く酵素の一つである SOD が量的にも機能的にも低下して防御機能を果たしていない。その結果、過酸化脂質が約 7.0 倍、そして H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が約 5.0 倍に増加していた。グルコースが増加することは当然の結果であるが、正常水晶体の約 15 倍にも増量したのは予想以上である。過剰なグルコースの影響で、グリケーションの中間産物であるフルクトサミンが約 2.0 倍に増加していた。

3) 酸化防御欠如状態における培養ヒト水晶体の過酸化反応(表 18)

Cu, Zn-SOD, L-アスコルビン酸および還元型グルタチオンを灌流液に加えない状態で水晶体を培養した。グルコース濃度は生理的状态であったためか、グルコースやフルクトサミンは対照と比べて変動がない。しかし、酸化酵素および酸化剤が欠如した条件を反映して、SOD 量と superoxide scavenging 活性がともに約 50% に減少していた。高グルコース状態で培養した結果に比べて SOD 活性が高いが、その原因は灌流液にアルブミンが入っているため、これによる酸化が行われた可能性がある。高グルコース状態で培養した場合もアルブミンが

灌流液に入っていたが、グルコースとグリケーションを起こしたために酸化能が発揮できずに superoxide scavenging 活性が低下していたと考える。

酸化防御が欠如した状態の特徴的現象は、過酸化脂質が対象の約 10 倍にも増加していたことであった。

### 3. 体外環境の変化と水晶体の過酸化反応

1) 紫外線(UV-B)照射によるラット水晶体の酸化関連物質の変動および形態的变化

i) 糖質、脂質および蛋白質(表 19)

糖質はグルコース量として定量したところ、1 か月齢から 18 か月齢間の加齢に従って減少しているが、UV-B 照射による影響は明らかでない。脂質は非照射群では加齢による変化は生じていないが、照射群では若年ラット(1 か月と 6 か月齢)では非照射群より増加しているため、脂質合成能が高まり、逆に高齢ラット(12 か月と 18 か月齢)では合成能の低下が推察された。水溶性蛋白質は照射群では 12 か月齢以外は非照射群に比べてやや減少していたが、あまり変化は見られなかった。

蛋白質のリジン残基と糖が非酵素的に反応するグリ



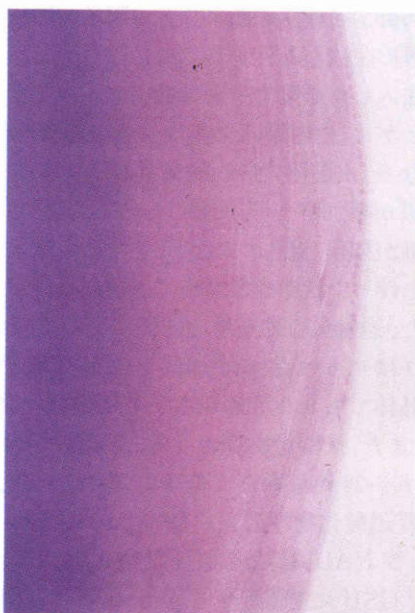


図 24 UV-B 照射ラット水晶体(非照射).

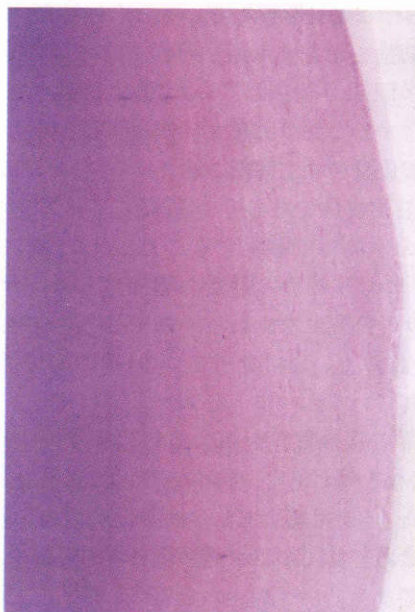


図 25 UV-B 照射ラット水晶体.

非照射に比べて水晶体上皮末端の後方移動と線維が膨化している。

ケーションの中間産物である糖化蛋白質(フルクトサミン)は若年ラットに多く,特に照射群の6か月齢で明らかに増加していたが,12か月齢および18か月齢では非照射群と同じレベルまで減少している。フルクトサミンはグリケーションの前期反応と後期反応の丁度中間の物質であるため,照射群では12か月齢以降はグリケーションの後期反応に移行した可能性が考えられる。また,非照射群のグルコースとフルクトサミンが加齢による増加をしていないので,耐糖能は18か月でも維持されていると思われる。

ii) Superoxide scavenging 活性と過酸化脂質(表

19)

スーパーオキシド消去活性は加齢で増加する傾向を示した。照射群では6か月齢から減少しはじめ,高齢(12か月および18か月齢)で低下が明らかとなった。特に18か月齢では非照射群(14.0 U/mg protein lens)の50%(6.89 U/mg protein lens)に低下していた。

過酸化脂質は,非照射群では加齢に伴って増加している。しかし,照射群では増加が予想されたが,12か月齢ではむしろ減少していた。これは脂質量が12か月齢で急激に減少していることと関係が深いと思われる。非照射群では脂質量は減少しておらず,一定レベルを維持していた。照射群の12か月齢は脂質量および過酸化脂質が特異的減少を示したが,脂質合成能に何らかの支障が生じたものと考えられる。過酸化脂質は18か月齢になると,照射群( $11.7 \pm 1.7 \times 10^{-2}$  nmolMDA/lens)で非照射群( $6.5 \pm 1.1$ )より増加していた。

iii) 形態変化(図 24, 25)

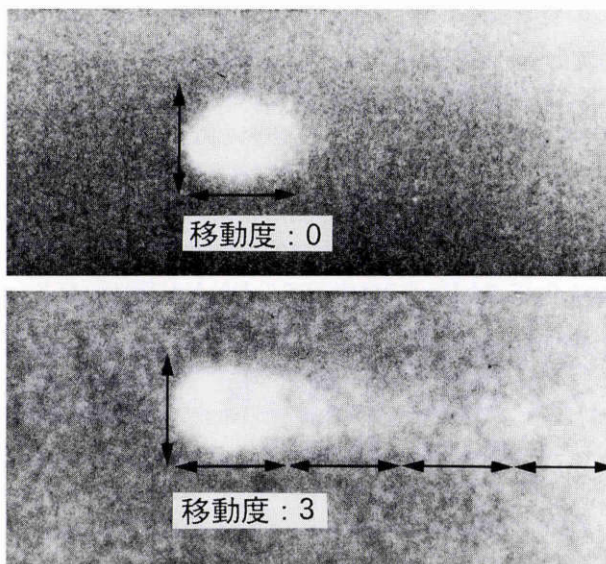


図 26 DNA 移動度の測定.

蛍光標識されたDNAが縦径:横径=1:1が移動度0で,1:4を移動度3とした。

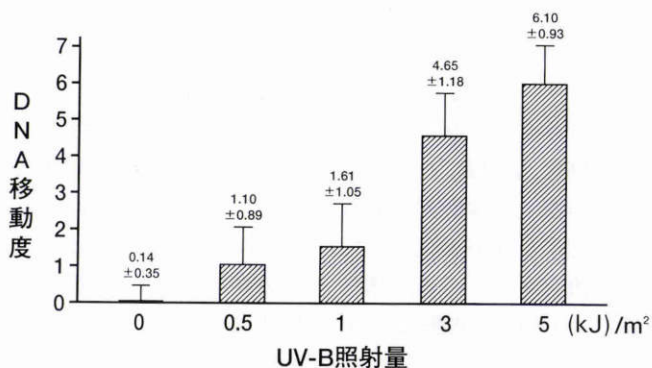


図 27 UV-B 照射量と水晶体上皮 DNA 移動度の関係.



表 20 UV-B 照射量別水晶体上皮細胞 DNA 電気泳動の移動の割合

照射量 kJ/m <sup>2</sup>	DNA 移動度	Relative migration distance							
		0	1	2	3	4	5	6	7
0		86	14						
0.5		27	37	32	4				
1.0		19	21	36	24				
3.0				1	19	24	29	22	5
5.0						3	23	29	45

(%)

12 か月齢水晶体を材料に非照射群と比較した。両群ともに組織変化は軽微であるが、水晶体上皮末端の後方移動と上皮下の水晶体線維に膨化がみられた。これらの所見は両群にみられたが、照射群に幾分強く生じ、上皮末端が水晶体線維に分化しないまま後方に移動しているのが特徴的であった。

2) 紫外線(UV-B)照射による水晶体上皮細胞 DNA の変化(図 26, 27, 表 20)

図 27 から明らかであるが、UV-B 照射量に比例して DNA の移動度が増している。照射しない例でも 15%位は移動度 1 を示す細胞があるので移動度 1 を正常に含めると、0.5 kJ/m<sup>2</sup>照射では約 65% は未だ正常像を保っていることになる。1.0 kJ/m<sup>2</sup>では 60% の DNA が破壊され、3.0~5.0 kJ/m<sup>2</sup>ではすべての DNA が鎖切断をされている。

#### IV 考 按

##### 1. 水晶体における過酸化反応

###### 1) 加齢と過酸化反応

加齢は生理的活性が徐々に、そして不可逆的に低下するものでせられない生理的現象とされている。しかし、加齢に伴う疾患は病的反応とされて予防や治療の対象となっている。したがって、細胞や個体の存立に関係する核酸、蛋白質、そして膜脂質などの代謝回転の維持が生理的な加齢と病的反応を伴う加齢現象の出現を食い止め、その進行を遅らせる鍵を握っていると考えられる。

加齢の原因の一つに、細胞や組織において連続的に生じるフリーラジカルの有害反応の蓄積が老化をもたらしているとするフリーラジカル説がある<sup>19)</sup>。フリーラジカルは核酸、蛋白質、そして膜脂質の合成、代謝に強く影響していることは事実である。フリーラジカルによる過酸化反応が全身の組織で行われ、その反応の様相は血液でよく研究されている。過酸化反応の産物である過酸化脂質はヒト血清で加齢によって増加している<sup>20)</sup>。一方、加齢によって増加しないとする報告<sup>21)</sup>もあって定説はないことから、加齢そのものが過酸化反応を促進することは少なく、動脈硬化や糖尿病などによる病的状態や過酸化脂

質生成を防御する機能の低下などの因子が加わった際に過酸化脂質の生成が進行することになる。

血中に注入した過酸化脂質は前房に入って水晶体に達する<sup>22)</sup>ことから、白内障の発症は全身の影響を受けていることになる。水晶体で形態的異常が始まる前に血清の過酸化脂質が増加する<sup>23)</sup>。加齢ラット水晶体では上皮下の皮質線維が膨化、変性するなど、すでに組織学的に明らかに変化を伴った状態ではじめて過酸化脂質が有意に増加していた。過酸化脂質発生の防御に働く抗酸化酵素のうち、SOD はヒト水晶体で加齢とともに低下する<sup>24)</sup>。ラット水晶体でも 6 か月齢からすでに SOD 活性が低下していた。また、抗酸化物質のうち、還元型グルタチオン(GSH)は 6~24 か月齢まで低下を続けていた。GSH とともに脂質過酸化物の消去に働く glutathione peroxidase および NADPH<sub>2</sub> の存在下で酸化型グルタチオン(GSSG)を GSH に変化させる glutathione reductase がヒト水晶体で加齢に相関して減少している<sup>24)</sup>。GSH 合成に関係する cystathionase 活性が老齢ラット水晶体で低下している<sup>25)</sup>ことも影響していると思われる。

膜の流動性を示すリポ蛋白質が 24 か月齢では酸化型の HDL や LDL が増加していた。酸化を受けたために受容体と結合することが出来ず代謝回転も鈍くなって水晶体内に酸化型のまま蓄積されている。したがって、リポ蛋白質の主要成分であるリン脂質とコレステロールが 24 か月齢の水晶体で増加することになる。特に、24 か月齢で LDL におけるリン脂質の増加は LDL が酸化されたためにリン脂質に含まれる不飽和脂肪酸が過酸化を受け、代謝されにくい形になっている。その結果、膜の流動性が失われていく。

加齢による膜の傷害を表しているもう一つの現象は Ca の有意な上昇にある。今回の研究で、水晶体の透明性が失われた 24 か月齢で Ca と過酸化脂質の急激な増加が特徴的であった。Ca が水晶体蛋白質の凝集やカルシウム依存性プロテアーゼ活性の上昇<sup>26)</sup>に関係して水晶体の混濁化に影響していることは知られている。細胞外への Ca<sup>++</sup>の汲み出しは 2 つの並行した機構、すなわち、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup>交換系と膜に存在する Ca<sup>++</sup>ポンプによって行われるといわれている。Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup>交換系は Ca<sup>++</sup>を汲み出すために Na<sup>+</sup>の濃度勾配のエネルギーを利用する。一般に膜に局在する Ca<sup>++</sup>チャンネルからは細胞外からの Ca<sup>++</sup>流入は起こらないとされている<sup>27)</sup>。しかし、ラット水晶体では加齢により Na 量が増加し、K 量が減少している。これは Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ポンプの能動輸送に障害が起きていることを示している。水晶体中の Na 濃度が増加すると、正常と逆転した Na<sup>+</sup>濃度勾配エネルギーが生じ、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup>交換活性が増加され、Ca<sup>++</sup>の水晶体内への流入が起きたと考えられる。また、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup>交換活性の増強には O<sub>2</sub><sup>-</sup>による交換体の還元と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化が共存して必要であるといわれている。前項で述べたように加齢により



過酸化反応消去機能が低下しているため、このこともCa<sup>++</sup>の流入を促した可能性が示唆される。このようにして水晶体にCa<sup>++</sup>過剰状態が成立したものと考えられる。水晶体にCa<sup>++</sup>が増加すると、Ca<sup>++</sup>依存性プロテアーゼや膜ホスホリパーゼの活性が高まり、リゾリン脂質の増加やリン脂質構成の変化、アラキドン酸の遊離などの膜の変化をさらに引き起こし、膜機能の低下という悪循環に陥ると思われる。

老化促進マウス(SAM-P 1)は、老化現象を明らかにするために好都合なモデルである。SAM-P 1では生後100日齢以後で赤血球の数や容積の減少や血液の老化現象が出現する<sup>28)</sup>。血清や肝における過酸化脂質が生後2~3か月で増加することから、生後早くから過酸化脂質の生成が始まって、加齢とともに進行する<sup>29)</sup>。今回、研究に使用した6か月齢SAMの水晶体では明らかに過酸化脂質が増加していた。過酸化反応の防御に働く抗酸化酵素の一つであるCu, Zn-SOD量は6か月齢で測定されないレベルまで減少し、活性値も2か月齢の約50%に低下していた。抗酸化酵素であるglutathione peroxidaseも10か月齢SAM-P 1の赤血球と肝で減少していた<sup>30)</sup>ことから、加齢で全身の過酸化反応が進行していることが窺われる。ヒト水晶体には数種類の蛍光物質が存在する。蛍光は大きく分けると、Ex 280/Em 350 nmのトリプトファン蛍光(purple 蛍光)とEx 340/Em 420 nm付近の波長のトリプトファンの酸化代謝産物の蛍光、すなわち、non-triptophan 蛍光(blue 蛍光)の2種類があり、そのうち、青色蛍光には水溶性のものと水不溶性蛋白質と結合して存在するものがある。水不溶性蛋白質に結合する蛍光物質は加齢で増加する<sup>31)</sup>。一方、水晶体のもつ黄色色素は大部分が水不溶性分画に存在して加齢的に増加している。したがって、ヒト水晶体の色素と蛍光は密接な関係にある。青色蛍光のうち、トリプトファンの酸化による分解産物である水溶性の黄色色素にはL-キヌレニン(KN), 3-ヒドロキシ-キヌレニン(HKN), 3-ヒドロキシ-キヌレニン-O-β-D-グルコシド(HKN-Glc), α-ジアミノ-3-ヒドロキシ-L-キヌレニン-O-β-D-グルコシド(DHKN-Glc)などがある。そのうち、HKN-Glc(Ex 365, Em 485 nm)は若年者で多く存在するが、加齢とともに減少する。しかし、水不溶性蛋白質と結合している黄色色素のアントラニル酸(Ex 330/Em 420 nm)や2-アミノ-3-ヒドロキシシアセトフェノンO-β-D-グルコシド(AHA-Glc)(Ex 360/Em 480 nm), キサントマチンβ-カリボリンなどの蛍光物質は加齢とともに増加している。また、老人性白内障の着色した水晶体にはメイラード反応の産物であり、蛍光をもつペントシジン(Ex 335/Em 385 nm)の存在も確認されており、加齢による耐糖能低下の影響も考えられる。

脂質過酸化亢進状態あるいは老化した組織から有機溶媒で蛍光物質が抽出される。その蛍光強度から組織の脂

質過酸化状態が判断される<sup>32)</sup>。Dillardら<sup>33)</sup>はラット肝のミクロゾーム、ミトコンドリア、リゾゾームをO<sub>2</sub>存在下でインキュベートすると、蛍光物質(Ex 360/Em 430 nm)が生成され、抗酸化剤で生成が阻害されることを報告している。このように過酸化反応と蛍光物質は非常に密接な関係にあり、フリーラジカルが関与している。

生体眼による観察でもヒト水晶体では加齢に伴って自発蛍光が強くなっていった(表5)。すなわち、白内障を認めない水晶体であっても長年の近紫外線照射の影響に加えて加齢による過酸化反応防御機能が低下した結果、ラジカルを蛍光物質が吸収し、酸化されて励起されるために蛍光を発すると考えられる。

最近、井上ら<sup>34)</sup>は水晶体の蛍光色素のうち、グルコシドをもつAHA-GlcやHKN-GlcはO<sub>2</sub><sup>-</sup>やHO<sup>•</sup>などのフリーラジカルの消去能を持っていることを証明している。これより、水晶体に存在するグルコシドの蛍光物質は加齢によりSODや還元型グルタチオンなどの過酸化反応消去機能が低下しているなかで、フリーラジカル消去に働く重要な物質であると思われる。生体眼で測定した各年代の蛍光強度から、40代が過酸化反応消去機能低下の時期に当たるために蛍光強度が強くなるものと思われる。このようなグルコシド蛍光物質で消去しきれないほどのフリーラジカルが発生した状態の時に水晶体は混濁化への道を辿ることになるのではないかと推察される。

## 2) 水晶体におけるラジカルの発生

L-アスコルビン酸は活性酸素やフリーラジカルを還元し、自身は酸化されてアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)となる。

AFRはNAD(P)H<sup>+</sup>を電子供与体とするAFR還元酵素によって還元される。ヒト水晶体にはアスコルビン酸酸化還元サイクルが存在しており<sup>35)</sup>、正常水晶体ではAFR還元酵素活性が高いことから、L-アスコルビン酸はラジカルを消去する作用がある。L-アスコルビン酸は水溶性抗酸化剤として働くが、膜の抗酸化としてはビタミンEが脂質ラジカルを消去する。L-アスコルビン酸は、その際に生じたビタミンEラジカルを膜の表面で還元再生することが出来ること<sup>36)</sup>から、ビタミンEとの相乗作用がある。

白内障ではL-アスコルビン酸の減少と不溶性蛋白質の増加に伴ってAFR還元酵素活性も低下することから、L-アスコルビン酸の抗酸化能力の減少が考えられる。

フリーラジカルのうち、最も反応性の強いHO<sup>•</sup>が核型白内障で発生し、そして核型混濁も含めた成熟型混濁においてAFRの存在が証明されたことから、白内障の進行、取り分け核混濁の発生には過酸化反応の亢進が影響している。

## 3) 白内障における酸化関連物質の変化

白内障の混濁様式はさまざまで、老人性白内障であっても赤道部から楔状に混濁する皮質型だけでなく、核型、



後囊下皮質型、混合型などがあり、糖尿病、併発性、そして外傷性白内障でもそれぞれ多彩な混濁型がある。内的小および外的侵襲に対する防御機構に白内障の部位的に特徴があって、反応の相違が混濁様式に関係している。酸化防御機能についても白内障では透明水晶体に比べると、その機能が低下していると思われる。

$O_2^-$ への抗酸化酵素として働く superoxide dismutase、そして  $H_2O_2$  に対する GSH-px や catalase 活性を測定した結果では、 $H_2O_2$  scavenging 活性は白内障の進行と関係なく変化が少ないようであるが、SOD や GSH-px は白内障の混濁型によって明らかに変化が見られる。Cu, Zn-SOD が老人性白内障の核型に最も多く、特に成熟型に比べて有意に多い量が存在したにもかかわらず、その活性値に他の混濁型と明らかな差のある上昇は見られていない。その傾向は、むしろ糖尿病白内障ではっきりとしている。

Cu, Zn-SOD の量と活性値が相関しない原因の 1 つに、Cu, Zn-SOD がグリケーションを受けたために活性が低下していることが考えられる。両白内障ともに核型でフルクトサミンが最も多いことから、グリケーションの亢進は明らかであるが、糖化された Cu, Zn-SOD は Cu を遊離することになるので、活性中心を失った SOD は不活性となったまま Cu, Zn-SOD の形は保っているため、ELISA 法で測定すると、その量は多くても活性値は低いという現象が起きる。放出された Cu イオンは  $H_2O_2$  と反応 ( $Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{++} + OH^- + HO^{\cdot}$ ) してヒドロキシラジカルを生成し、過酸化を進行するように作用し、さらに SOD 分子をも切除する<sup>37)</sup>。Cu, Zn-SOD のグリケーションによって  $HO^{\cdot}$  の発生が ESR を用いた方法で確認されている。Cu イオンは両白内障、特に糖尿病白内障で豊富に存在するので、 $H_2O_2$  と反応してラジカルを次々に生成することになる。

SOD 活性は白内障で減少するが、皮質では核の色調に伴って徐々に低下するのに対して、核では色調が少しでも濃くなると急激に活性を失う<sup>38)</sup>。 $H_2O_2$  scavenging 活性は老人性白内障と糖尿病白内障で変化がなかった。皮質および核で白内障の核混濁の進行と関係なく一定であるとする報告と一致していた。しかし、白内障で有意に減少する成績もある。カタラーゼは  $H_2O_2$  が低濃度では不活発に働くといわれる反面、glutathione peroxidase と同等に  $H_2O_2$  を代謝するともいわれ、定説がない。その原因の一つは、著者は  $H_2O_2$  scavenging 酵素の測定をチタン呈色法によったが、安定した測定値を得ることが大変難しいことから、測定方法が確立されていないことが成績の安定しない大きな要因と思われる。

Glutathione peroxidase (GSH-px) は少量の  $H_2O_2$  を消去する方向に作用しているが、白内障になると正常水晶体に比較して有意に減少している。活性の低下は白内障の程度に関係し、特に核混濁の進行に伴って著しい。

GSH-px が脂質ヒドロパーオキシドの消去作用をするためには GSH を基質とする。しかし、GSH は水晶体の混濁の早期から著しく減少するので、GSH-px も活性を失う。

GSH は、ヒト正常水晶体では浅層皮質(上皮を含む)と深層皮質にほぼ同量存在し、核に少ない。いったん混濁が始まると、GSH は皮質と核で同程度の減少率を示す。今回の研究では、GSH は全体的に糖尿病白内障で減少しており、白内障が進行した成熟型では両白内障群で検出されていないことが特徴的であった。糖尿病白内障では老人性白内障に比較して、皮質型および核型で GSH が減少し、特に皮質型では有意 ( $p < 0.05$ ) に低値であった。GSH は抗酸化作用としてさまざまな機能をもっており、前述した GSH-px の基質となるばかりでなく、他はフリーラジカルの無毒化 ( $GSH + R \rightarrow GS + RH \rightarrow GSSG$ )、蛋白質 S-S 結合の還元 ( $2 GSH + PS-SP \rightarrow 2 PSH + GSSG$ )、蛋白質-SH 基の酸化防止そして、グリケーションの予防などに働いている。

遷移金属のうち、Fe や Cu イオンは過酸化反応の開始反応に関与するといわれる。反応が開始されるとラジカルが発生して脂質を攻撃することになる。Cu イオンおよび Fe イオンは生体の酸化現象に強くかかわっている。白内障の型別に Cu イオン含有量をみると糖尿病白内障に多く存在していた。また、両白内障群で P 型が最も少なく、糖尿病白内障では N 型と M 型に多いことが注目される。過酸化脂質も N 型と M 型に多く、特に糖尿病白内障の M 型では老人性の 2 倍以上になっている。増加した銅イオンは過酸化脂質と反応して脂質ラジカルを生成するため、さらに過酸化反応が加速したものと思われる。Cu イオンが増加した原因には眼組織に存在する Cu イオンを含むチトクローム C オキシダーゼ、チロシナーゼ、そして Cu, Zn-SOD などの銅含有酵素から、何らかの理由で Cu イオンが放出されること、また、長期間にわたって微量な血清銅からの蓄積が考えられる。

白内障混濁様式のうち、N 型はラジカル生成系が活発で、酸化防御能に欠けるために過酸化脂質が最も多い。これらの結果から、過酸化反応は核から皮質へと波及していくことがいえる。

#### 4) 膜の変化

リン脂質は蛋白質とともに生体膜の主要な構成成分であるだけでなく、エネルギー、核酸などの生理活性物質のリン酸供給源としても働いている。リン脂質の構造と機能の性格は脂肪酸組成によって決められる。脂肪酸には必須脂肪酸と生体内で合成可能な脂肪酸とがある。必須脂肪酸には n-6 系列のリノール酸 (18:2) 系列と n-3 系列の  $\alpha$ -リノレン酸 (18:3) 系列があって、n-6 系列のリノール酸系列は動物の成長、皮膚の生理機能に、 $\alpha$ -リノレン酸系列は脳神経機能の維持に関与している。水晶体では  $\alpha$ -リノレン酸 (18:3) が欠如しているのは Ander-



sonら<sup>39)</sup>の報告と一致している。しかし、フォスファチジルエタノール(PE)分画でドコサヘキサエン酸(DHA)(22:6)が存在したことは、合成経路からしてヒト水晶体でリノレン酸が完全に欠如しているか確認する必要がある。

ヒト水晶体ではリノール酸系列(18:2→20:4)が存在していた。アラキドン酸(20:4)からはプロスタグランディン、ロイコトリエンなどホルモン様物質が作られる。一方、生体では飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸を酵素反応で合成出来るが、ヒト水晶体においてもバルミチン酸(16:0)からパルミトオレイン酸(16:1)、そしてステアリン酸(18:0)からオレイン酸(18:1)を合成する経路の存在が明らかとなった。リン脂質分画はそれぞれ特異的な脂肪酸組成をもっており、PEが不飽和脂肪酸を最も多く含有し、次いでフォスファチジルコリン(PC)が二重結合以上の不飽和脂肪酸を多く持っている。スフィンゴミエリン(SM)は不飽和脂肪酸がモノ不飽和脂肪酸のみから成っている。リン脂質全体では正常水晶体と白内障とで脂肪酸鎖長にも、そして脂肪酸組成にも著しい変動はみられず、白内障で飽和化現象がみられた。

しかし、正常水晶体リン脂質の主要成分であるSMでは、炭素数20以下の脂肪酸が70%以上である。不飽和脂肪酸はすべてがモノ不飽和脂肪酸から成っていることは他のリン脂質分画にはみられない特異的な性質であり、ネルボン酸(24:1)を有する唯一のリン脂質である。PEは細胞の増殖に関与し、リン脂質分画の中で最も多く不飽和脂肪酸を多く含んでいる。白内障になるとステアリン酸からの不飽和がみられるものの、他の不飽和脂肪酸は減少して全体的には飽和脂肪酸が約20%増加していた。ドコサヘキサエン酸(22:6)は、水晶体のPEで証明された唯一のリノレン酸系列のリン脂質分画であり、22:6はPEに取り込まれやすいといわれていること<sup>40)</sup>と一致していた。PCは細胞膜に多く存在し、膜中のLCAT(lecithin-cholesterol acyltransferase)の基質として細胞膜のコレステロールの逆転輸送に関与している。PCの脂肪酸組成は飽和脂肪酸(44.4%)と不飽和脂肪酸(55.6%)がほぼ均衡を保っているが、白内障では飽和脂肪酸が58.1%に増加して飽和化を示していた。その他、フォスファチジルイノシトール(PI)やフォスファチジルセリン(PS)が存在し、白内障でそれぞれ脂肪酸が飽和化する傾向があった。リゾフォスファチジルエタノールアミン(LPE)は他のリン脂質分画と比較して異なった脂肪酸組成を持っている。他のリン脂質分画と同じく16:0や18:0が主成分であるが、この分画だけが白内障で減少したために不飽和脂肪酸が増加する結果となった。

今回の結果からは、リゾ体はBroekhuysen<sup>41)</sup>の報告のようなリゾフォスファチジルコリン(LPC)の存在は確認されず、LPEだけが証明された。SMのように二重結

合を一個しか持たないモノ不飽和脂肪酸から成っているリン脂質は別にして、他のリン脂質は二重結合を二個以上有する、いわゆる多価不飽和脂肪酸に富んでいる。二つの二重結合に挟まれた反応性の大きい部位は連鎖的な酸化反応を受けやすい<sup>42)</sup>。すなわち、二重結合に挟まれた活性水素がラジカルによって引き抜かれることになる。酸化されやすいのは二重結合の数が多い場合であるので、PEのようにDHA(22:6)をはじめとして二つ以上の二重結合を多く有しているリン脂質は酸化されやすいことになる。その結果、白内障ではPE不飽和脂肪酸が正常水晶体よりも20%も減少していた。脂肪酸組成の著しい変化はPEの含有量にも明らかな影響がみられた。正常水晶体で、 $45.49 \pm 13.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1} / \text{dry.g.lens}$ とSM分画に次いで多く存在していたが、白内障では $19.85 \pm 4.30$ と正常水晶体の40%に減少した。PEはリン脂質分画のなかでは多価不飽和脂肪酸を多く含有していたために最も酸化の影響を受けることになる。次いでPC分画にも同様な反応が生じ、白内障において飽和化とともにリン量も正常水晶体の30%に減量する結果となった。一方、SMは多価不飽和脂肪酸が一つも存在しないので酸化の影響も受けず、白内障でわずかに飽和化されるだけで、他のすべてのリン脂質分画が減少したにもかかわらず、含有量においても変化が少ない。SMを簿層クロマトグラフィーで分離すると5つの種類に分けられる。そのうち、3つの分画が白内障で増加していた。脂肪酸組成は、やはり白内障で軽度ながら飽和化が進行していた<sup>43)</sup>。

注目されるのはLPEの変化である。LPE分画で不飽和脂肪酸が白内障で32.10%(正常水晶体14.90%)に増加した主な原因は、アラキドン酸の増加に因るものといえる。白内障で $\text{Ca}^{++}$ が増加したためにホスホリパーゼ $\text{A}_2$ が活性化され、細胞膜リン脂質から不飽和脂肪酸のアラキドン酸が遊離してきたものと考えられる。過酸化反応が進行して過酸化脂質(LOOH)が生成されるとホスホリパーゼ $\text{A}_2$ がその部の脂肪酸を切り出すように作用する。切り離された過酸化脂肪酸はグルタチオンペルオキシド(GSH-PX)とグルタチオン(GSH)によって還元され、脂質アルコール(LOH)に分解される<sup>44)45)</sup>( $\text{LOOH} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ )。ホスホリパーゼ $\text{A}_2$ はグルタチオンペルオキシダーゼと協力して、いわば生体膜脂質の過酸化に対して膜から過酸化脂質を除去する機構として作用している。しかし、グルタチオンペルオキシダーゼの活性が落ちていると生成されたLOOHは、遷移金属イオン(Fe, Cu)が存在するとアルコキシラジカル( $\text{LO}^\cdot$ )やペルオキシラジカル( $\text{LOO}^\cdot$ )( $\text{LOOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LO}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+} + \text{LOOH} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{LOO}^\cdot + \text{H}^+ + \text{Fe}^{2+}$ )を形成する反応が進行する。 $\text{LO}^\cdot$ や $\text{LOO}^\cdot$ は過酸化反応を開始する基になることから、連鎖的に過酸化反応が進行してしまう。すなわち、過酸化リン脂質から過酸化脂肪酸を遊離させる<sup>46)47)</sup>。このようにホス



ホリパーゼ A<sub>2</sub>は膜脂質に作用し、しかもグルタチオンペルオキシダーゼ活性が低下していたり、還元型グルタチオンが不足していると脂質ラジカル(L)を生じ、次いで脂質ヒドロパーオキシド(LOOH)を形成するように働く。

リン脂質分画のリン量はSM分画以外のすべての分画が白内障で減少して全体でも有意に減少していた。

酸化されにくい脂肪酸構成を持っているSM分画以外は酸化されやすいために膜構造が破壊され、膜の流動性を失い、脂質合成能も低下して白内障化へと進行することになる。

リポ蛋白質は膜の主要成分である脂質の供給源として重要であって、その変動は膜傷害が起きていることを意味している。

糖尿病白内障ではVLDLとLDLが増加していた。また、この変化はインスリンやビタミンEあるいはプロブコールで抑制されていた<sup>48)</sup>ことから、VLDL, LDLの増加は糖尿病の進行に影響しており、ヒト糖尿病白内障でもその発症と進行に過酸化の影響が深く関与していると考えられる。その増加原因について考察してみると、VLDLはリポ蛋白質リパーゼ(LPL)によってトリグリセライドがグリセロールと脂肪酸に加水分解される。糖尿病ではVLDL分子中におけるLDLの認識部位であるアポリポ蛋白質C-IIがグリケーションされて、LDL活性が低下してVLDL→LDLへの異化作用の反応速度が低下してVLDLが蓄積してきたものと思われる。次に、LDLが増加した原因には以下の二点が考えられる。第一はLDL受容体の変化である。LDLは諸臓器に存在する受容体から細胞内に取り込まれる。LDL受容体は細胞内コレステロール量が増加すると、活性が低下してLDLの取込を抑制している。水晶体においては上皮細胞および皮質浅層に受容体の存在が認められた。リポ蛋白質は水晶体上皮に存在しているLDL受容体を介して水晶体外から取り込まれた生体由来の可能性が考えられる。今回、LDL粒子が水晶体嚢を通過して水晶体のLDL受容体に取り込まれた事実は、血液中のリポ蛋白質が血液房水嚢を通過して房水中に入り、水晶体嚢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考えられる。すなわち、生体と水晶体の物質授受にinteractionの存在を意味する結果と思われる。LDLは受容体にアポ蛋白質Bが認識されて細胞に取り込まれる。取り込まれたLDLはアミノ酸、遊離コレステロールと脂肪酸に分解されて膜の合成に利用される。修飾されたLDLとして、通常のLDLを無水酢酸で処理して作ったアセチルLDLを用いて変性LDLの取り込みを研究したところ、正常水晶体では取り込まれなかったため(図21)、正常水晶体には変性LDLのスカベンジャー受容体は存在しないと思われる。アセチルLDLが正常水晶体では取り込まれず、白内障で取り込まれた(図

22)のはLDL受容体に異常が起こったことを示している。そのため、白内障で変性LDLが蓄積され、膜の破壊が進行したと思われる。特に、糖尿病白内障では受容体による処理機能が麻痺し、アセチル化LDLという人工的な変性LDLも取り込んでしまったように、糖化LDLや過酸化LDLなどの変性LDLも取り込んでしまい、全体としてLDLが水晶体中に高濃度のまま蓄積される結果になったと思われる。

第2はLDL自身の変性にある。水晶体は生まれた時にもった細胞を水晶体の中心部に向かって押し込むことによって一生持ち続ける特殊な器官である。水晶体は長年の近紫外光の照射や加齢による防御機能低下により、何らかの機序で変性修飾を受ける機会が多く、水晶体に入ってから変性リポ蛋白質となる危険がある。糖尿病状態では、さらにその危険性が増すと思われる。

LDLはVLDLの異化によって生成される。酸化型LDLを*in vivo*で直接に定量することはなされていないが、動脈硬化病巣に存在することが証明されている<sup>49)</sup>。水晶体でポルEシステムを用いてアガロース電気泳動を行ったところ、加齢に従って酸化型HDLと酸化型LDLが検出された<sup>50)</sup>。この成績は5mM硫酸銅で4°C、一昼夜処理した後生食で14°C、24時間透析した酸化型血清と標準血清と比較した結果である。

銅イオンが存在するとリポ蛋白質は酸化され、通常のリポ蛋白質泳動像よりも陽極側に泳動される。これは、リポ蛋白質中の微量な過酸化脂質と銅イオンが $LOOH + Cu^{2+} \rightarrow LO_2 + Cu^+ + H^+$ 、 $LOOH + Cu^+ \rightarrow LO + Cu^{2+} + OH^-$ のように反応して連鎖的にラジカルを生成し、アルデヒドなどの二次生成物がアポリポ蛋白質に結合したり、アポリポ蛋白質の塩基性アミノ酸のLys, Argの正電荷が酸化されるために、リポ蛋白質分子の陰性荷電が増加して酸化型HDLや酸化型LDLのように陽極側に強く泳動されるといわれている<sup>51)</sup>。また、老人性白内障では正常水晶体に比べ銅イオンおよび鉄イオンが増加している。LDLは銅や鉄イオンが存在すると、これらの遷移金属イオンがLDL中の不飽和脂肪酸を酸化し、脂質ラジカル(L)を形成する。脂質ラジカルは連鎖反応的に過酸化脂質を形成し、酸化型LDLが生成される。その過程でアポ蛋白質Bもラジカルによって攻撃され、LDL受容体との結合に非常に重要であるLys, Argが陽性荷電を失う。そして、細胞内のLDLの処理経路が進まなくなったと思われる。さらに、各所で切断されるため、受容体とうまく結合できなくなる。酸化型LDLは過酸化脂質を多く含んで細胞毒性が認められることから<sup>52)</sup>、その蓄積は病変の進行に関係する。LDL受容体は、単一ポリペプチドがLDLの結合、インターナリゼーション、LDLの解離、そしてリサイクリングなど多様な機能を有している<sup>53)</sup>。前述のように白内障ではLDL受容体が異常となり、変性LDLが取り込まれたことに加え、水晶体内部



で作られてしまった酸化型 LDL などの変性 LDL は、LDL 受容がもつ機能のうちの LDL の解離からうまく作動しなくなったために水晶体中に蓄積したと考えられる。すなわち、細胞内の LDL の処理経路のうち、エンドソーム内部のエンドソーム膜のプロトンポンプがうまく動かないためにエンドソーム内部 pH を酸性条件に保てず、LDL をアミノ酸、遊離コレステロール、脂肪酸に解離できないために蓄積したものとする。一方、糖尿病白内障では、前述の要因による LDL の変性のみならず、グリケーションによる変性も加わることになる。グリケーションされた蛋白質から活性酸素が生成される<sup>54)55)</sup>ことから、アポリポ蛋白質 B がグリケーションされたことによって活性酸素が生じ、LDL の過酸化が進行することになる。糖尿病でみられるアテローム変性の原因の一つに LDL のグリケーションによる活性酸素の発生が関係している<sup>56)</sup>。アポリポ蛋白質 B のグリケーションによって生じる  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  が糖尿病における過酸化物質除去能の低下と相まって除去されずに蓄積する。アポリポ蛋白質 B のグリケーションが糖尿病白内障で増加し、特に水不溶性蛋白質分画で有意に増加したことはグリケーションの後期反応で生じる架橋形成を引き起こし、蛋白質の凝集化を促進させることになる。

## 2. 水晶体周囲環境(体内)の変化と過酸化反応

糖尿病の発生原因として、また、合併症の進行にフリーラジカルが密接に関係している。膵臓の  $\beta$  細胞は、酸化酵素が少ないためにフリーラジカルの侵襲を受けやすい<sup>57)</sup>。アロキサンは生体内でジアシル酸に還元されるが、これが酸化を受けて  $O_2^-$  を生じる。生じた  $O_2^-$  に SOD が作用して  $H_2O_2$  になり、金属イオン ( $Fe^{++}$ ,  $Cu^+$ ) の作用で  $HO\cdot$  を発生させて  $\beta$  細胞を破壊するといわれる<sup>58)</sup>。 $HO\cdot$  は DNA を破壊して、その修復に必要な NADH を枯渇させ、 $\beta$  細胞におけるインスリン分泌を不能にさせる。アロキサンと  $\beta$  細胞を反応させると、ラジカルが発生することが ESR で証明されていることから糖尿病の発生にラジカルが強く関与していることが理解される<sup>59)</sup>。アロキサンで惹起させた高血糖家兎の血清では投与後ただちに過酸化脂質が増加するが、水晶体ではやや遅れて増加しはじめ、その後、経日的に上昇し続ける<sup>60)</sup>。今回の研究で白内障手術の際に得られた糖尿病患者の血清、水晶体および房水における過酸化脂質は各々の部位で変化していたが、房水での増加が顕著であった。房水では血液房水柵の破壊によって全身や周囲眼組織から過酸化脂質が流入したと考えられるが、一方では房水における過酸化防御機能が弱いことも推察される。水晶体では過酸化脂質量は両白内障群ともに正常水晶体の 1.5~1.9 倍量に増加したことから、過酸化反応が生じていることは明らかであるが、両白内障間では DM 群でやや増加しているが、有意な変化はみられない。

Casatagliola ら<sup>61)</sup>の報告では、糖尿病患者の白内障では

過酸化脂質が非糖尿病患者白内障の 2 倍に、そして正常水晶体の約 7 倍に増加している。

次に、活性酸素消去酵素の一つである SOD について考えてみる。糖尿病ではグルコースが Cu, Zn-SOD のもつリジン残基と非酵素的に反応してシッフ塩基を作ってアマドリ化合物を形成する。すなわち、グリケーションが起りやすいといわれている。グリケーションされた SOD は糖尿病白内障で有意に増加している。Cu, Zn-SOD 量は両白内障ともに正常水晶体に比べて減少し、特に糖尿病白内障で少ない傾向であった。しかし、SOD の活性値は糖尿病白内障で正常の約 60% にまで低下していた。したがって、SOD 含量に変化が少ないにもかかわらず、活性が有意に低下していたのは SOD がグリケーションされたためと考えられる。糖のもつシスジオール基がポロン酸カラムと親和性があることを利用したアフニティクロマトグラフィーと ELISA 法を組み合わせることによってグリケーションされた Cu, Zn-SOD 量を抽出し測定したところ、糖尿病白内障では老人性白内障の約 5 倍にもなっていた。その結果、糖尿病患者の白内障では Cu, Zn-SOD が糖化されているために多量に回収されたことになる。そして、活性値は老人性白内障の 87.8% に減少した。

Cu, Zn-SOD がグリケーションを受けることはグルコースとインキュベートすると活性が低下して、ケトアミンを生成することからも明らかである。グリケーションされた Cu, Zn-SOD は断片化されて活性酸素を発生する。谷口<sup>37)</sup>によれば、活性酸素として  $O_2^-$  が生成され、Cu, Zn-SOD から活性中心の Cu イオンが遊離するため、SOD は活性を失い、次いで Cu イオンの作用でフェントン反応から  $HO\cdot$  が生まれる。したがって、グリケーションされた SOD は  $O_2^-$  を処理できず、それらを蓄積して糖尿病の白内障を発生・進行させるものと考えられる。SOD はヒト水晶体では赤道部に多く存在する<sup>62)</sup>ので、その活性が低下することは最も代謝活性の高い部位である赤道部が酸化ストレスに対して抵抗力を失うことになり、水晶体の混濁化を進める。

Cu, Zn-SOD はヒト房水で糖尿病と非糖尿病で差がなく含有量が少ないので、酸化防御能に欠けていると思われる。また、SOD 活性は糖尿病患者の硝子体で有意に低下したのは Kernell ら<sup>63)</sup>の報告と一致しており、白内障の進行に硝子体の影響が関係している成績である。グルコースと反応するリジン残基は SOD の立体構造に重要である active site の liganding loop 構造といわれる部位に存在するリジン-122 と -128 が主体である<sup>37)</sup>。Cu, Zn-SOD のように、立体的に 8 Å 以内にヒスチジンが存在するリジンにグリケーションが起ると、そのヒスチジン残基でペプチド結合が切断されてヒスチジン残基に配位していた Cu イオンが遊離してくる<sup>37)</sup>。Cu イオンは Fe イオンと同様に、 $HO\cdot$  を生成して細胞や組織障害を強め



るように作用する。

過酸化反応を促進させる因子の一つに遷移金属イオンがある。従来、Fe イオンは  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$  (フェントン反応)、 $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{HO}^\cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$  (ハーバーワイス反応) で最も反応性の強い  $\text{HO}^\cdot$  を生成することから、過剰の Fe イオンは過酸化反応の促進因子とされている。一方、Cu イオンも同様のフェントン様反応 ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^+ \rightarrow \text{HO}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Cu}^{2+}$ ) を示す。糖尿病白内障の発生と進行に Cu イオンの関与が注目される。水晶体ばかりでなく、血液、房水、そして硝子体でも Cu イオンの増加がみられた。Cu が増加した原因には、糖尿病によって血管透過性が高まって、長年にわたって微量に増加している血中の Cu が眼内に移行し、蓄積したこと、または Cu 含有酵素からの遊離が考えられる。全身から眼への Cu の移行については、アイソトープをラベルした  $\text{Cu}^{64}$  を静脈内に注入したところ、血液脳脊髄関門を通過して1時間後に眼球に移行した像で証明されている<sup>64)</sup>。

一方、Cu 含有酵素は多数あるが、そのうちチロシナーゼ、チトクローム C オキシダーゼおよび SOD などが水晶体に存在する。SOD には他にミトコンドリアに存在して Mn を含有する種類もあるが、Cu、Zn-SOD からの Cu の放出が注目される。いったん増加した Cu イオンは白内障で増加している  $\text{H}_2\text{O}_2$  とフェントン様反応を起こして非常に反応性の強い  $\text{HO}^\cdot$  を生成する。 $\text{HO}^\cdot$  は脂質、蛋白質、そして核酸の変性を引き起こすことになる。また、水晶体だけでなく、硝子体や房水でも明らかに増加している過酸化脂質と反応してペルオキシラジカルを生成し、その連鎖反応から過酸化を亢進させる。このように、Cu イオンは活性酸素消去能を低下させ、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどを発生させて脂質、蛋白質、そして核酸に傷害を与えるだけでなく、解糖系、ペントースリン酸回路を阻害して白内障を発症・進行させる重要な因子の一つとなっている。 $\text{Cu}^{++}$  はグルタチオン (GSH) のチオール基と反応して錯体を形成する。GSH 1分子と Cu の1分子の錯体はスーパーオキシドを消去する活性をもって強い SOD 作用があり、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する<sup>65)</sup>。生理的 pH 状態で Cu イオンと GSH が適当量に存在すると錯体を形成して  $\text{O}_2^{\cdot-}$  は消去するが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成してしまう。 $\text{H}_2\text{O}_2$  消去能が低下した状態では酸化ストレスの進行がより促進され、白内障化がより進むことになる。

GSH は蛋白質-SH 基の還元状態の維持、陽イオン輸送や膜透過性、そして水晶体線維の三次元構造の維持にとって必要な膜 SH 基の保護、そして  $\text{H}_2\text{O}_2$  の毒性を除去する機能的役割などに作用している。 $\text{H}_2\text{O}_2$  はヒト白内障で房水中に高濃度に存在しており<sup>66)</sup>、DM 群の方が高濃度であり、水晶体中でも老人性白内障に比べ増加して

いたので、白内障の進行を阻止するためには GSH を多量に必要とする。GSH の測定にはアミノ酸の SH 基も定量されるので、今回は HPLC を用いて純粋に GSH 量を測定した。糖尿病白内障で明らかに減少した GSH の減少は白内障の初期から生じる現象であるが、その原因の一つに酸化ストレスから水晶体の透明性を守るために抗酸化剤として利用されたこと、また、前述したように  $\text{Cu}^{2+}$  と錯体を形成するために使用されたことがあげられる。

酸素が何らかの原因で還元されて生じる  $\text{O}_2^{\cdot-}$  は不均化反応によって  $\text{H}_2\text{O}_2$  に変換したり、その  $\text{H}_2\text{O}_2$  は  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Cu}^+$ ) と反応して  $\text{HO}^\cdot$  を作る。また、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  と  $\text{Fe}^{3+}$  との反応でも  $\text{HO}^\cdot$  が生じて細胞・組織に障害を与える。毒性を弱めるために  $\text{O}_2^{\cdot-}$  には SOD が、 $\text{H}_2\text{O}_2$  に対してはカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px) が消去酵素として作用している。その他、非酵素として抗酸化作用を有するものに L-アスコルビン酸、還元型グルタチオン、ビタミン E などがある。

L-アスコルビン酸は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  以外の活性酸素やフリーラジカルを還元することができる<sup>36)</sup>。L-アスコルビン酸自身は酸化されてアスコルビン酸フリーラジカルとなるが、NAD(P)H を電子供与体とするアスコルビン酸フリーラジカル (AFR) 還元酵素によって還元され、残りはデヒドロアスコルビン酸になる。坂東ら<sup>35)</sup>によると、AFR 還元酵素はヒト水晶体で活性が高いので、正常状態ではラジカルを消去することができるが、白内障水晶体ではその活性が低下しているために L-アスコルビン酸を再生する能力が減少している。AFR が白内障で生じることは ESR で証明した。これは、白内障で AFR 還元酵素活性が低下しているため、AFR の半減期が長くなり検出されたものと思われる。また、増加した Cu イオンは L-アスコルビン酸と反応して AFR を産生することも白内障で AFR が生じた原因の一つと思われる。

グリケーションはあらゆる部位の蛋白質に生じ、メイラード反応の進行過程で蛍光をもった終末糖化産物 (advanced glycated endproduct, AGE) が作られ、また、ラジカルも産生される。グリケーションの初期産物をフルクトサミンとして測定すると、水晶体ばかりでなく硝子体や房水でも糖尿病で多量に存在し、グリケーションの進行が明らかであった。グリケーションが活発に行われると蛋白質が凝集<sup>67)</sup>するので、白内障はより進行することになる。グリケーションによって蛋白質は架橋を形成するので、グリケーションの進行によっても水不溶性蛋白質が増加してくる。今回の成績でも糖尿病白内障では水不溶性蛋白質が明らかに増加しており、グリケーションによる架橋形成の進行を伺わせた。一方、グリケーションの後期反応産物には特有の蛍光物質 (ペントシジン) が含まれている。糖尿病白内障では老人性白内障に比



較して水不溶性分画で蛍光強度が強く、ペントシジン量も明らかに多かった。AGEが多く産生されることはグリケーションが過去に盛んに行われていたことを推察させる。後期反応とその生成物から自動酸化によって $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ が生成されたり<sup>68)</sup>、蛋白質がさらに架橋されて高分子蛋白質を作るなどの反応には遷移金属が関与している。

糖化されたポリリジンに $Fe^{3+}$ を加えた系にリン脂質リポゾームやLDLを添加すると、多量のチオバルビツール酸反応物質である変性脂質が生じるとされる<sup>69)</sup>。

グリケーションはリポ蛋白質においても生じる。リポ蛋白質は脂質の運搬に関係して、膜の易動性を表す指標となるが、糖尿病白内障ではLDL分画が増加していた。LDLがグリケーションされていたことは白内障水晶体に糖化されたアポ蛋白質Bの存在が証明され、特に糖尿病白内障の水不溶性分画で $7.18 \pm 3.84 \times 10^{-4} \text{ nmol/lens}$ と老人性白内障 $1.79 \pm 1.10$ に比べて有意( $p < 0.05$ )に増加していたことから明らかである。糖尿病患者の白内障水晶体と硝子体でCuイオンが有意に増加しており、特に白内障で著明であった。リン酸緩衝液にCuイオンを加えると、LDLに含まれる不飽和脂肪酸が容易に酸化されてしまい、Cuイオンだけがこの緩衝液中ではLDLの酸化変性を起こしていた<sup>70)</sup>。

LDL分画を構成するアポリポ蛋白質Bがグリケーションされるので、LDL受容体に認識されにくくなる。受容体に受け入れられず、また、結合しても分解処理が行われないLDLは血中や組織にも顆粒状に停滞する。血中の糖化LDLは、糖尿病患者では正常者の2倍量である<sup>71)</sup>。グリケーションされたLDLから $O_2^-$ などの活性酸素が産生されるため、アポリポ蛋白質の変性のみならず、リン脂質などの脂質成分の過酸化も次第に進行する。

糖化LDLは酸化的修飾を受けて酸化LDLの形成が考えられる。糖尿病白内障のリポ蛋白質をアガロース電気泳動を行うと、リポ蛋白質は酸化型になっているため、負に荷電していて、全体的に強く陽極側に泳動された。そのうえ、通常の酸化型HDLよりさらに酸化型の強いHDLが生じていた。糖尿病ではグリケーションだけでなく、そこからさらに自動酸化を起こしてフリーラジカルを産生する。同時に、SODの活性低下やL-アスコルビン酸量の減少、そしてグルタチオンレドックスサイクルの活性低下などによって活性酸素消去能の低下や酸化関連金属イオンの増加などの酸化ストレスの亢進状態にあると考えられる。

次に、実際にこのような水晶体周囲の環境の変化が、水晶体の透明維持に影響を与えるかどうかについて実験的に検討を行った。両面灌流型器官培養装置を用いて、生体に近い状態の生理的状态に調整された人工の房水と硝子体とで培養したものを対象として、高グルコース状態や抗酸化防御能欠如状態による培養結果と比較した。

高グルコース(300 mg/dl)の房水および硝子体培養液で、より *in vivo* に近い条件下で灌流しながらヒト水晶体を3週間培養したところ、糖尿病の際に生体に生じる過酸化反応と同じ現象がみられた。発生した $O_2^-$ の消去に働くSODが量的ならびに機能的に極度に低下して酸化防御能が欠如した状態となっている。その結果、過酸化脂質が7倍にも増加した。過剰なグルコースによって蛋白質のグリケーションが進み、フルクトサミンは著しく増加していた。Superoxide scavenging活性がほとんど活性を失った状態になったのはSODがグリケーションされたことによると思われた。糖尿病におけるグリケーションを介した過酸化反応の進行が高グルコースという実験条件によって立証されたことになる。

次に、強力な抗酸化機能をもつSOD、L-アスコルビン酸、そして還元型グルタチオンが欠如した状態を生体で起こさせることは難しいが、著者らが考案した *in vivo* に近い培養系で、この条件の硝子体および房水を作り出し、糖尿病の場合と同様に3週間、37°Cで両面灌流型培養装置で培養した。培養液にSODがないにもかかわらず、水晶体に少量の $O_2^-$  scavenging活性が存在したのは、水晶体に常存しているSODが定量され、また、過酸化防御能欠如状態の培養でも、アルブミン、プレアルブミンなどの蛋白質が入っているため、それによる $O_2^-$  scavenging活性値が測定されたためと思われる。いずれにしても $O_2^-$  scavenging活性は生理的条件で培養された水晶体の50%に減少していた。SOD活性が低いので $O_2^- \rightarrow H_2O_2$ の反応が進行しにくいために $H_2O_2$ の生成が少ない。消去能力の低下によって過酸化連鎖反応は進行して過酸化脂質を多量に生成していた。房水のSODやGSHは白内障で減少しており<sup>72)</sup>、今回の測定でも房水と硝子体の $O_2^-$  scavenging活性および $H_2O_2$  scavenging活性は糖尿病で減少している。したがって、SOD、アスコルビン酸および還元型グルタチオンが欠如していることは糖尿病白内障の状態にあることを意味している。

エネルギー源であるグルコースは、房水に49.9 mg/dl、硝子体に30 mg/dlが培養液に含まれているので代謝が営まれ、電子伝達系に必要なNAD(P)Hの供給も正常に行われていると考えられる。本来、NAD(P)Hはグルタチオン還元酵素(グルタチオンリダクターゼ)の作用に利用された酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに変化させる。そして、還元型グルタチオンとNAD(P)Hの存在のもとにグルタチオンペルオキシダーゼが $H_2O_2$ を $H_2O$ に変化させて、過酸化脂質の消去に働く<sup>73)</sup>。ところが、今回の実験では還元型グルタチオンを加えない条件であるために生じた過酸化脂質や $H_2O_2$ を処理する能力に欠けている。その結果、活性の強いHO $\cdot$ や種々のラジカルが発生して過酸化がいつそう進行していく。グルコースは生理的濃度を含有しているため、蛋白質のアミノ基と非酵素的に結合して糖化蛋白質を形成すること



もなく、フルクトサミン量の増加はみられない。

これらの2つの実験結果は水晶体の透明性を維持していくためには、房水や硝子体などの周囲環境が正常であることが必須であることを意味している。いい換えれば、無血管組織である水晶体は生体において房水や硝子体という半固体の培地に包まれて非常に巧みに培養されて透明性を維持しており、それらの培地の組成が変化してしまうと透明性を失うという周囲環境の変化と密接に関係している器官であることがこの実験で判明した。

### 3. 体外環境の変化と水晶体の過酸化反応

ヒト水晶体は波長 300~400 nm の近紫外線を遊離のトリプトファンでも吸収するが、大部分はトリプトファンの代謝産物である 3-HKN-Glc(3-OH キヌレニン O-β グルコシド)や HKN(ヒドロキシキヌレニン), KN(キヌレニン)などの遊離の蛍光物質および水晶体蛋白質に結合した蛍光性黄色物質(結合性色素)によって吸収している。3-HKN-Glc などの遊離の蛍光物質は加齢により減少するが、紫外線を吸収する蛋白質結合性色素は加齢とともに増加し、水晶体は黄色味を増す<sup>74)</sup>。結合性色素の本態は明らかでなかったが、井上ら<sup>75)</sup>によれば、遊離の蛍光物質と同じトリプトファンの酸化代謝産物であるアントラニル酸やキサントマチン、そして近頃構造が明らかになった AHA-Glc や DHKN-Glc などのグルコシドをもった黄色蛍光物質、またグリケーション後期反応産物であるペントシジン、その他まだ未同定の物質も多種類が含まれているという。

水晶体に存在する蛍光物質は、水晶体蛋白質の光酸化を増強するという報告<sup>76)</sup>もある。また、3-HKG の前駆物質であるキヌレニン誘導体に紫外線を照射すると水晶体蛋白質が凝集し、それには一重項酸素による酸化が関与していること、そして結合性色素も光増感作用のあることが報告<sup>77)</sup>されている。しかし、これらはいずれも蛋白質と結合していない遊離の状態でも実験されており、また、3-HKG のようにグルコシドの形もとっていないためであり、これらの発する蛍光レベルも低値である。井上らが白内障水晶体で発見した蛋白質に結合している AHA-Glc や遊離状態で存在する DHKN-Glc などのグルコシドの構造をもった蛍光物質は、近紫外線が照射されても活性酸素を発生せず、光増感作用を示さない。また、実験的に遊離状態にし、しかもグルコシド構造をもたない AHA は、近紫外光照射により  $O_2^-$  を発生することも確認されている。しかも蛍光強度はグルコシド構造をもつ AHA-Glc, DHKN-Glc の方がグルコシド構造を持たない AHA や HKN より非常に強く、蛋白質存在下では減弱もほとんど見られなかったという<sup>78)</sup>。

すなわち、グルコシドでなく、しかも蛋白質と結合していない状態でのキヌレニン誘導体が近紫外線を受けると励起状態になって活性酸素を生成し、水晶体蛋白質と反応しクロスリンクしてくるものと考えられる。しかし、グ

ルコシド構造をもつ蛍光色素は近紫外線照射を受けて励起状態になると、蛍光を発することによってエネルギーを放出し、基底状態に戻すという活性酸素生成を防御する近紫外線フィルター作用を示しているものと思われる。

今回の成績では1週間に1回 3 kJ/m<sup>2</sup>を照射し、その1週間後に同量の照射をさらに2回行う方法で行われ、生体のままの照射であるため、当然のことながらほとんどの色素は蛋白質と共存した状態であるために紫外線照射が少ない条件下では、やはり酸化関連物質の明らかな変化は示されなかった。

蛋白質では12か月齢を除いた各月齢で水溶性蛋白質量が減少したことから、不溶性蛋白質の増加を伺わせた。

紫外線(UV-B)を家兎水晶体に上皮側から照射すると上皮細胞が障害され、ヒト水晶体に N<sub>2</sub> ガスをつめた PBS buffer 中で照射すると近紫外線(340 nm)は水晶体線維に吸収されて線維構造は破壊され、無秩序な並び方となっている。水野<sup>79)</sup>によると、正常水晶体線維は六角形のハニカム構造をとっているため、450 nm 以下の短波長は吸収するが、それ以上の可視光線は吸収せず、波長を邪魔することなく網膜に到達させるようにしているという。その線維と線維の間隔や構造が乱れると、本来素通しさせるはずの長波長の波形が進路を邪魔し、吸収または反射することになり、散乱光が増えて白内障となる。上皮細胞では膜の能動輸送が障害を受け、イオンの不均衡が生じ、Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> の増加と K<sup>+</sup> の減少が明らかであった<sup>80)</sup>。膜の障害が著しいことから、膜構造の主体である脂質は1か月齢や6か月齢の若いラットでは紫外線照射による膜損傷を修復する能力があるために一時的に脂質合成能が高まっているものと考えられるが、6か月齢以後では膜損傷が進行して脂質合成能も障害されて脂質量が明らかに減少していた。膜が障害されると、膜を構成している脂質に存在する不飽和脂肪酸が攻撃されてラジカルを生じ、連鎖的に過酸化脂質が生成されると考えられる。酸化防御機能に関係する酵素のうちの一つである Cu, Zn-SOD をみると、量的には照射の影響はラットの月齢によって一定していない。しかし、活性値は照射群で減少していた。その結果、過酸化脂質の増量が予想されたが、18か月齢だけが増加していた。

UV-B 照射条件が間隔をおいて照射しているため、その間に何らかの修復機転が働いて高齢になるまで過酸化脂質が生成されないでいた。これは照射群では基になる脂質量そのものが12か月齢以降減少したことと、酸化防御として作用する他の酵素(glutathione peroxidase, catalase)や抗酸化剤の機能が正常であったこと、あるいは過酸化脂質は生成されたものの、過酸化反応が進行せずに反応停止状態にあったことなどが予想される。

今回のラットの実験では軽度の UV-B 照射であったにもかかわらず、形態的には唯一水晶体上皮細胞の末端



が線維に分化しないまま後方に移動している所見が見られた。したがって、UV-B照射が軽度であると上皮細胞の変化が主体となる。細胞の障害程度は核酸の変化からも知ることができる。水晶体上皮細胞のDNAがUV照射や $H_2O_2$ によって障害されることが報告<sup>81)82)</sup>されている。

UV照射による上皮細胞の核酸変異は白内障発生に重要な因子となっている。UV-B照射によるDNA傷害の程度をsingle strand breakを生じたDNAの電気泳動による相対移動度から判定してみると、照射量に比例して移動度が長くなり、DNAの傷害の程度が進んでいた。UV-Bは上皮細胞のDNAに変異を来すことが十分に考えられ、DNAが変性すると水晶体の細胞分裂に異常を来し、正常な上皮細胞の増殖ができず、また、正常な酵素、蛋白質を作ることもできなくなり、水晶体上皮細胞から線維への分化過程にも支障を来し、そして全体的な代謝活性も維持できなくなって、混濁をもたらすことになる。DNAのsingle strand breakはFeイオンのキレート剤である1,10-phenanthrolineによって抑制された。UV-B照射によるDNA損傷にFeイオンが関係していたことから、 $H_2O_2$ とともにフェントン反応が行われ、発生したHOがDNAに損傷を与えていたと考えられる。また、鉄キレート剤により上皮細胞中の電子伝達系などで働いていたチトクローム系などの鉄酵素が機能しなくなり、電子伝達系で発生していた活性酸素が生成しなくなり、一時的にDNA損傷が抑制されたとも考えられる。

$H_2O_2$ は細胞内に非常に低密度に存在するが、光に暴露されると蓄積している。 $H_2O_2$ はDNAのsingle strand breakを生じるが $H_2O_2$ 単独では起こさず、おそらくFeイオンの存在を必要として作用を発揮してHOを生成する<sup>83)</sup>。細胞障害の強いHOの産生は上皮細胞の損傷につながり、そして水晶体透明維持の破綻へと展開していく。このように、近紫外線は水晶体の核酸、蛋白質、蛍光物質、そして線維構造など多岐にわたって影響を及ぼしていることが明らかとなった。

#### 文 献

- 1) **Marklund S, Marklund G**: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biol* 47: 469-474, 1974.
- 2) **Imai K, Toyooka T**: Fluorometric assay of thiols with fluorobenzoxadiazoles. *Methods in Enzymology*, vol 143. In: Jakoby W et al (Eds): 67-75. Academic Press, Orlando. 1987.
- 3) **Dahle LK, Hill EG, Holman RT**: The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 98: 253-261, 1962.
- 4) **浦田武美**: 電気泳動法によるリポ蛋白分画法. *臨床検査* 29: 1344-1352, 1985.
- 5) **吉田紳一郎**: ヒト水晶体自発蛍光の生体内定量化に関する研究. *獨協医学会誌* 10: 31-42, 1994.
- 6) **池上雄作**: 活性酸素ラジカルのESR, 活性酸素・フリーラジカル 2: 491-497, 1991.
- 7) **Takahashi M, Kushida K, Kawana K, Ishihara C, Denda M, Inoue T, et al**: Quantification of cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects. *Clin Chem* 39: 2162-2165, 1993.
- 8) **谷口直之, 新井 桂, 木下憲明**: SODの細胞内での修飾-Cu,Zn-SODのグリケーションによる不活性化-1. *蛋核酵* 33: 2921-2926, 1988.
- 9) **山田和順**: 無機物の検出, ルベアン酸反応(光顕用), *組織化学*. 南江堂, 東京, 296-297, 1987.
- 10) **Folch JLM, Sloane-Stanley GH**: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.
- 11) **Kelley TF**: Separation with uni-dimensional TLC of all neutral lipid classes. *J Chromatog* 22: 456-457, 1966.
- 12) **Bartlett GR**: Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234: 466-468, 1959.
- 13) **Hatch F, Lee RS**: *Advances in lipid research*. Academic Press New York, Vol 6. 1, 1968.
- 14) **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.
- 15) **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.
- 16) **山田満広, 市川晴彦, 大西将則**: Turbidimetric immunoassay (TIA)法による血清アポタンパクの自動測定法. *臨床検査機器・試薬* 11: 794-800, 1988.
- 17) **小原喜隆, 平野清美, 森 吉臣**: ヒト糖尿病性白内障におけるリポ蛋白質の変動. *日眼会誌* 98: 481-486, 1994.
- 18) **小原喜隆, 一迫 浄, 油井秀夫, 堀内三郎, 佐藤芳行**: 糖尿病白内障における過酸化反応. *日眼会誌* 84: 1972-1978, 1980.
- 19) **Harman D**: The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7124-7128, 1981.
- 20) **Yagi K**: Role of lipid peroxides in aging and age-related diseases, *New Trends in Biological Chemistry*. In: Ozawa T, (Ed): Japan Sci Pross, 207-223, 1991.
- 21) **建名 徹, 吉峯 徳, 葛谷文男**: 過酸化脂質. *老人科診療* 7: 145-147, 1986.
- 22) **大橋武昭**: 放射性過酸化脂質(1-<sup>14</sup>C linoleic acid peroxide)の眼球内移行について. *日眼会誌* 75: 1415-1419, 1971.
- 23) **Yagi K, Komura S, Ihara N, Abe H, Konishi H, Arichi S**: Serum lipid peroxide levels in rats with inherited cataracts. *J Appl Biochem* 7: 202-206, 1985.
- 24) **Ohrloff C, Hockwin O, Olson R, Dickman S**: Glutathione peroxidase, glutathione reductase and superoxide dismutase in the aging lens. *Curr Eye Res* 3: 109-115, 1984.
- 25) **Ferrer JV, Gasco E, Sastre J, Pallardo FV, Asensi M, Vina J**: Age-related changes in



- glutathione synthesis in the eye lens. *Biochem J* 269: 531-534, 1990.
- 26) **Grinwald PW**: Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: Influence of extracellular sodium. *J Mol Cell Cardiol* 14: 359-365, 1982.
  - 27) **岡部栄通朗, 高橋俊介**: 心筋虚血—再灌流傷害とフリーラジカル. *Mebio* 11 (4): 25-35, 1994.
  - 28) **Abe H, Orita M, Arichi S**: Erythrocyte deformability in aging. *Mech Aging Dev* 27: 383-390, 1984.
  - 29) **Yagi K, Yoshino K, Komura S, Kondo K, Ohishi N**: Lipid peroxide levels in the senescence-accelerated mouse. *J Clin Biochem Nutr* 5: 21-27, 1988.
  - 30) **Yoshino K, Komura S, Ohishi N, Komura K, Yagi K**: Enzyme activities involved in the senescence-accelerated mouse. *J Clin Biochem Nutr* 12: 27-34, 1992.
  - 31) **Satoh K**: Fluorescence in human lens. *Exp Eye Res* 16: 167-172, 1973.
  - 32) **Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL**: Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52: 1-9, 1973.
  - 33) **Dillard DJ, Tappel AL**: Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phenylalanine. *Lipids* 8: 183-189, 1973.
  - 34) **Inoue A, Satoh K**: Identification of a fluorescent glucoside isolated from the protein-free extract of human lens. *Bioorganic Medical Chemistry Letters* 4: 2303-2306, 1994.
  - 35) **Bando M, Obazawa H**: Ascorbate free radical reductase and ascorbate redox cycle in the human lens. *Jpn J Ophthalmol* 32: 176-186, 1988.
  - 36) **二木鋭雄**: アスコルビン酸・グルタチオン, 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構. *蛋核酵* 33: 2862-2868, 1988.
  - 37) **谷口直之**: スーパーオキシドギスムターゼの構造, 機能および病態生化学. *生化学* 64: 1103-1115, 1992.
  - 38) **Fecondo JV, Augusteyn RC**: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exp Eye Res* 36: 15-23, 1983.
  - 39) **Anderson RE, Maude MB, Feldman GL**: Lipids of ocular tissues. *Biochim Biophys Acta* 187: 345-353, 1969.
  - 40) **小林哲幸, 奥山浩美**: リン脂質の代謝と機能, リン脂質脂肪酸. *The Lipid* 3: 474-482, 1992.
  - 41) **Broekhuysen RM**: Phospholipid in tissues of the eye. *Biochim Biophys Acta* 187: 354-365, 1969.
  - 42) **二木鋭雄**: 変性脂質. 生体における変性脂質の発生メカニズム. *現代医療* 26: 1409-1413, 1994.
  - 43) **Obara Y, Cotlier E, Kim JO, Lueck K, Tao R**: Sphingomyelin species stored in human senile cataract. *Invest Ophthalmol* 15: 966-968, 1976.
  - 44) **佐藤佐多良**: 動物の老化とヒトの老化—そのしくみと制御(2). *日本薬剤師会雑誌* 41: 941-953, 1989.
  - 45) **Sevanian A, Mukkassah-Kelly S, Montestruque S**: The influence of phospholipase A<sub>2</sub> and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipidperoxides. *Arch Biochem Biophys* 223: 441-452, 1983.
  - 46) **Yasuda M, Fujita T**: Effect of lipid peroxidation on phospholipase A<sub>2</sub> activity of rat liver mitochondria. *Jpn J Pharmacol* 27: 429-435, 1977.
  - 47) **Sevanian A, Kim E**: Phospholipase A<sub>2</sub> dependent release of fatty acids from peroxidized membrane. *J Free Radic Biol Med* 1: 263-271, 1985.
  - 48) **Moral DW, Chisolm GM**: Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Research* 3: 1827-1834, 1989.
  - 49) **O'Brien K, Nagano Y, Gown A, Kita T, Chait A**: Probucol treatment affects the cellular composition but not anti-oxidized low density lipoprotein immunoreactivity of plaques from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arteriosclerosis Thrombosis* 11: 751-759, 1991.
  - 50) **小原喜隆**: 白内障. 4. 2病因. 増田寛次郎(編), 眼科学体系2, 中山書店, 東京, 113-126, 1993.
  - 51) **野口範子**: 血管とフリーラジカル. *Mebio* 11(4): 36-42, 1994.
  - 52) **Morel DW, Dicorleto PE, Chisolm GM**: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4: 357-364, 1984.
  - 53) **山本徳男**: 高脂血症の正しい見方. リポ蛋白受容体とその異常. *LDL-receptor(基礎)Current Therapy* 7: 57-60, 1989.
  - 54) **Sakurai T, Tsuchiya S**: Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Letters* 236: 406-410, 1988.
  - 55) **Kawakishi S, Tsunehiro J, Uchida K**: Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydrate Research* 211: 167-171, 1991.
  - 56) **Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M**: Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochemical Biophysical Research Communications* 173: 932-939, 1990.
  - 57) **朝山光太郎**: 糖尿病とフリーラジカル. *最新医学* 45: 1736-1742, 1990.
  - 58) **Fisher LJ, Hamburger SA**: Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase and a metal chelate. *Diabetes* 29: 213-216, 1980.
  - 59) **糖塚 守, 桜井 弘, 川田 純**: アロキサンによる糖尿病発現のESRによる研究. *磁気共鳴と医学* 1: 157-161, 1990.
  - 60) **小原喜隆**: 白内障と活性酸素・フリーラジカル—糖



- 尿病白内障, 活性酸素フリーラジカル 3: 450—456, 1992.
- 61) **Costagliola, Iuliano G, Menzione M, Nesti A, Simonelli F, Rinaldi E**: Systemic human diseases as oxidative risk factors in cataractogenesis. *Ophthalmic Res* 20: 308—316, 1988.
- 62) 関根康生, 本村幸子, 原田勝二, 小湊慶彦: ヒト水晶体における Superoxide dismutase 活性の局在について. 白内障水晶体と透明水晶体の比較. *臨眼* 43: 169—171, 1989.
- 63) **Kernell A, Lundh BL, Marklund SL, Skoog KO, Björkstén B**: Superoxide dismutase in the anterior chamber and vitreous of diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3131—3135, 1992.
- 64) 沢下仁子: (私信).
- 65) 三好清徳, 石津和彦, 田中 久: グルタチオン—銅(II) 錯体と SOD 活性. *磁気共鳴と医学* 1: 69—73, 1990.
- 66) **Reddy VN**: Glutathione and its function in the lens. *Exp Eye Res* 50: 771—778, 1980.
- 67) **Mannier VM, Stevens VJ, Cerami A**: Nonenzymatic glycation sulfhydryl oxidation, and aggregation of lens protein in experimental sugar cataract. *J Exp Med* 150: 1098—1107, 1979.
- 68) **Sakurai T, Tsuchiya S**: Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett* 236: 406—410, 1988.
- 69) **Sakurai T, Kimura S, Nakano M, Kimura H**: The oxidative modification of low density lipoprotein by nonenzymatically glycosylated peptide-Fe complex. *Biochim Biophys Acta* 1086: 273—278, 1991.
- 70) **Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jürgens G**: Biochemical structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol* 3: 77—92, 1990.
- 71) **Schleicher E**: Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins *FEBS Lett* 129: 1—4, 1981.
- 72) 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.
- 73) **Reddy VN, Giblin FJ**: Metabolism and function of glutathione in the lens: Human cataract formation (Ciba foundation symposium 106), 65—87, Pitman London, 1984.
- 74) **Weal RA**: Human lenticular fluorescence and transmissivity and their effects on vision. *Exp Eye Res* 41: 457—473, 1985.
- 75) **Inoue A, Satoh K**: Identification of a fluorescent glucoside isolated from the protein-free extract of human lens. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 4: 2303—2306, 1994.
- 76) **Van Heyningen R**: Photo-oxidation of lens proteins by sunlight in the presence of fluorescent derivatives of kynurenine, isolated from human lens. *Exp Eye Res* 17: 137—147, 1973.
- 77) **Zigler JS, Goosey JD**: Photosensitized oxidation in the ocular lens: Evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. *Photochem Photobiol* 33: 869—874, 1981.
- 78) 井上 周: ヒト水晶体新規黄色色素の構造解析とその光化学的性質に関する研究. 東京理大博士論文, 1995.
- 79) 水野有武: 光・眼・視覚, 絵のようにみるということ. 産業図書, 東京, 1—46, 1994.
- 80) **Hightower KR, Reddan JR, McCready JP, Dziedzic DC**: Lens epithelium: A primary target of UV-B irradiation. *Exp Eye Res* 59: 557—564, 1994.
- 81) **Worgul BV, Rothstein H**: Radiation cataract and mitosis. *Ophthalmic Res* 7: 21—32, 1975.
- 82) **Kleiman NJ, Wang RR, Spector A**: Ultraviolet light induced DNA damage and repair in bovine lens epithelial cells. *Curr Eye Res* 9: 1185—1193, 1990.
- 83) **Meneghini R, Hoffmann ME**: The damaging action of hydrogen peroxide on DNA of human fibroblasts is mediated by a non-dialyzable compound. *Biochim Biophys Acta* 608: 167—173, 1980.