ヒト白内障水晶体の生化学的研究 (第 3 報¹⁾)
摘出水晶体の混濁度合と外部環境順応性²⁾

竹鼻 眞,* 岩田修造

名城大学薬学部

Biochemical Studies on Human Cataract Lens. III.¹⁾ Relation between Opaque
Situation and Adaptation to Extraenvironment of Lens *in Vitro*²⁾

MAKOTO TAKEHANA* and SHUZO IWATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University,
Yatogo, Tempaku-ku, Nagoya, 468, Japan

(Received April 30, 1982)

This paper describes differences in the adaptivity to the extraenvironment between two opaque situations in human cataract lenses after enucleation.

The early and the premature cataract lenses of men were incubated in balanced salt solution containing 10 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) for three hours. The pH value of the medium containing the early cataract lens decreased more than that of the premature cataract lens. This pH value is correlated with increasing lactic acid production in the incubation medium from the cataract lenses.

The early cataract lenses maintained normal cation level after three hours of incubation. However, the premature cataract lenses developed into mature cataract as a result of decreasing K^+ and increasing Na^+ levels.

These results suggest that the early cataract lenses may retain normal metabolic activity *in vivo*, presumably due to normal levels of enzyme activities. In contrast, enzymatic activities in the premature cataract have already decreased. This short time incubation method may therefore be a useful means for monitoring the metabolic activity during various stages of the human cataract lens.

Keywords—human lens; human senile cataract; cation; lactic acid; metabolic activity

前報^{1,3)}までにヒト老人性白内障水晶体の混濁形態別における陽イオン分布の変動, および glutathione, reduced form (GSH), adenosine-5'-triphosphate (ATP) 含量, さらに Na , K -ATPase の活性変化などを検討した。その結果, 実験的白内障の進行に伴っての生化学パラメーターの変動とは異なり, ヒトの初期白内障では, 正常イオンバランスが維持されているものの, GSH 量はすでに著しく低下しており, ATP 量は混濁進行にしたがって減少することが判明した。また, これらの物質の水晶体内分布は, 核と皮質において相違のあることを明らかにし, 能動輸送系の乱れは ATP 量の低下に一致することなどを考察した。

一般に, 実験発症モデルとしての動物白内障は短時間で急激な混濁進行がみられ, まず, Na^+ , K^+ のレベルに変化が生じるなど, 急性毒性的な状態を示すが, ヒト老人性白内障は長い年月の間に徐々に白濁進行を示すのが特徴である。これは, 老化体に好発するヒト老人性白内障の水晶体が, 透明性維持のために, 解糖系に依存するエネルギー代謝を温存しているためであり, また, 外部からの混濁因子の影響が微弱なためと考えられる。したがって, 病的状態, すなわち混濁状態の異なる水晶体の代謝機能維持能を客観的に把握しておくことは重要である。

本報では, ヒト白内障の初期と中期の水晶体を摘出後, 眼内環境とは異なる系, すなわち *in vitro* の medium 中で incubation を行い, 一定時間後の水晶体の乳酸生成能および Na^+ , K^+ レベルの変動について検討し, 摘出病的な水晶体の外部環境順応性についての情報を入手しようと試みた。

実験の部

ヒト老人性白内障水晶体 ヒト老人性白内障水晶体は、前報¹⁾と同様に手術で摘出された直後に氷冷保存し、約2時間経過したものを実験に供した。これらのヒト病的水晶体は、名古屋市の三宅眼科病院、および名古屋市立緑市民病院眼科より恵与されたものである。患者年齢は63才から78才で、若年性白内障水晶体、合併症を起こしている併発白内障水晶体、および手術時に機械的損傷を受けた水晶体はこの実験から除外した。

水晶体 Incubation 用平衡塩類溶液 この平衡塩類溶液は、哺乳動物水晶体の短時間 incubation 用 medium として当研究室で開発したもので、蒸留水 900 ml にグルコース 990 mg, KCl 399 mg, NaCl 7960 mg, K_2HPO_4 174 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 257 mg, HEPES 2380 mg を溶解し、37°C にて 1N NaOH で pH 7.3 に調製したのち、水を加えて 1000 ml としたものである。浸透圧は 286 mOsm/l である。

水晶体 Incubation Medium の pH 変化の測定 摘出直後から保冷していた水晶体を 37°C に適応させるために、2 ml の medium 中で 37°C 5 分間 preincubation を行ったのち、4 時間の incubation を継続した。そして 30 分、1 時間、その後 1 時間ごとに 4 時間まで経時的に medium の pH を測定した。使用した電極は、東洋理科(株)製微小 pH 結合電極 SE-1600 GC 型で、これを日立・堀場 F-7 ss 型 pH メーターに接続して測定した。

供試水晶体は、前報¹⁾で図示したごとく、初期白内障として nucleus I と radial タイプを用い、成熟白内障水晶体として flocky タイプを使用した。なお、この pH 測定も含めて、以下の実験にはそれぞれの混濁タイプにつき、3 個の水晶体を用いた。

乳酸生成量の測定 pH 変化の測定と同様に水晶体を 2 ml の medium 中で 37°C 5 分間の preincubation 後、4 時間の incubation を行った。

供試水晶体は初期白内障である radial、中期白内障の nucleus II、そして成熟白内障の flocky and nucleus である。Radial については 1, 2, 4 時間の incubation を行い、nucleus II と flocky and nucleus については 1 時間と 4 時間の incubation を行い、medium 中に放出された乳酸量を Gutmann らの方法⁴⁾によって測定した。

白内障水晶体の陽イオンレベル維持能の検討 混濁度の異なる 2 種類の白内障水晶体、すなわち混濁初期で正常イオンレベルを保持しているもの、および、すでに眼内で白内障が進行してイオンレベルに変動の認められる水晶体を、それぞれ 5 ml の medium 中で incubation することによって、 Na^+ , K^+ レベルを指標として環境変化に対する順応性を検討した。 Na^+ , K^+ は前報^{1,3)}までの方法にしたがい、原子吸光法で測定した。

結果および考察

水晶体 Incubation Medium の pH 変化

各種タイプのヒト白内障水晶体を incubation し、medium の pH 変動を経時的に測定した結果を Fig. 1 に示す。Incubation 開始後 2 時間までは、どのタイプの水晶体においても pH 7.2 前後を維持し、その差は認められなかったが、3 時間以後になると pH の低下が観察され、各タイプ間で顕著な差が出現した。そして、incubation 終了の 4 時間後では、中期白内障の flocky タイプで pH が 7.3 から 6.7 に低下し、初期白内障の radial では pH 7.3 から 6.3 にまで低下するのが認められた。また、同じ初期白内障水晶体である nucleus I の incubation medium は、pH 6.2 まで低下した。なお、対照として同時に加温した incubation medium は、4 時間後でも調製時の pH である 7.3 を維持していた。

以上の結果、中期白内障水晶体を incubation した medium の pH 低下が小さく、初期白内障水晶体の incubation medium で pH の低下が大きいという事実は、中期白内障では、すでに水

Fig. 1. pH Changes of Medium incubating Human Senile Cataract Lenses

—○—: buffer,
—▲—: flocky opacity lens,
—●—: radial opacity lens,
—■—: type I of nuclear opacity lens.

Fig. 2. Lactic Acid Producing Levels in Medium from Human Senile Cataract Lenses

—●—: radial opacity lens,
—▲—: type II of nuclear opacity lens,
—■—: flocky and nuclear opacity lens.

Fig. 3. Human Early Cataract Lens

TABLE I. Cation Levels in Human Senile Cataract Lenses before (*in Vivo*) and after Incubation (*in Vitro*)

		Na ⁺ (mg/g D.W. ^a)	K ⁺ (mg/g D.W.)	Na ⁺ /K ⁺	Ca ²⁺ (mg/g D.W.)
<i>In vivo</i>	Early cataract	1.20±0.52	11.65±4.38	0.10	0.08±0.04
	Premature cataract	3.31±1.11	6.86±2.36	0.48	0.18±0.06
<i>In vitro</i>	Early cataract	2.34±0.78	11.36±4.22	0.21	0.08±0.05
	Premature cataract	9.06±3.17	3.03±1.34	2.99	0.34±0.10

a) D.W.: dry weight.

晶体自身の代謝活性が低下しているために、解糖系による乳酸生成が微少であったことに起因していると考えられる。また、nucleus I の incubation medium で最も pH 低下が顕著であったことは、水晶体の最も不活性な部位である核のみに混濁障害が限局されており、代謝活性の大きな皮質および上皮細胞層⁵⁾は正常に代謝し、特にエネルギー源としてのグルコース代謝⁶⁾が活発に行われたための乳酸生成であると推察される。このことは、水晶体の形態学的特徴に依存した代謝機能の分布性と混濁部位の解糖機能消失とが一致したものと考えられる。そこで、この事実をさらに検討するために、乳酸生成量を測定した。

乳酸の生成

Incubation medium 中に放出される水晶体からの乳酸量を経時的に測定した (Fig. 2)。混濁度合の異なる水晶体を供試材料として、incubation 4 時間後を比較してみると、radial で 10.2, nucleus II で 8.9, flocky and nucleus で 6.7 mg/100 ml という値が得られ、混濁の進行した水晶体ほど乳酸生成量の少ない結果を示した。これは、混濁の進行した障害の大きい水晶体ほど pH 変化が小さいという前述の結果とよく相関しており、水晶体の混濁による代謝活性の変化、そして、眼内とは異なる *in vitro* の環境に置かれた時の代謝活性維持能が、混濁形態に依存することが示唆された。

白内障水晶体の陽イオンレベル維持能

前報^{1,3)} までに報告したごとく、ヒト白内障水晶体の初期では、イオンレベルは正常であるが、中期白内障以後は混濁度合と Na⁺, K⁺ の変動とがよく相関する。そこで、イオンレベルの正常な水晶体と、イオンレベルに変動の生じはじめた水晶体の 2 種類を incubation し、Na⁺, K⁺ レベルを指標⁷⁾ として環境変化に対する順応性を検討したのが Table I である。*In vivo* における Na⁺, K⁺ 量は、摘出後直ちに原子吸光分析にて測定したもので、正常イオンレベルの水晶体は、Na⁺ 1.20±0.52, K⁺ 11.65±4.38 mg/g dry weight (D.W.) で、0.10 の Na⁺/

K^+ 値を示す。一方、イオンレベルの変化し始めた水晶体は、 Na^+ 3.31 ± 1.10 , K^+ 6.86 ± 2.54 mg/g D.W. であり、 Na^+/K^+ 値は 0.48 であった。Incubation に用いた水晶体は、これらと同等の混濁度をもつ摘出水晶体であり、それぞれ 3 個ずつを使用した。

Incubation を 4 時間行くと、medium の pH 変動が大きく、pH 6.8 以下を示すようになるので、incubation 時間は 3 時間とし、medium 量は 5 ml とした。その結果、正常イオンレベルをもつ初期白内障水晶体 (Fig. 3) は、incubation 後もそのレベルを維持し、 Na^+/K^+ 値は 0.21 で、レベル変化は認められず、 Ca^{2+} も正常値の 0.08 mg/g D.W. を示した。一方、*in vivo* ですでにイオンレベルに変化の生じている水晶体 (Fig. 4-a) は、incubation 後さらにレベル変動が進行し、 Na^+ 9.06, K^+ 3.03 mg/g D.W. と完全に Na^+ , K^+ の逆転が起こり、 Na^+/K^+ 値は 2.99 を示した。また、混濁度も増加し、 Ca^{2+} の蓄積も顕著となり 0.34 mg/g D.W. と、正常の 4 倍の値を示し、成熟白内障の様相を呈した (Fig. 4-b)。

以上の結果より、混濁度の異なる水晶体を、眼内とは異なる *in vitro* の外部環境に移すと、それぞれの混濁度に依存して代謝活性維持能に差異が認められ、乳酸生成量は、障害の少ない初期白内障水晶体では代謝が活発で量も多いが、白内障の進行した水晶体では、生成量の少ないことが判明した。また、陽イオンレベルを指標にすると、初期白内障の水晶体では、*in vivo* のレベルを *in vitro* でも維持していたが、中期白内障水晶体では、短時間の incubation でイオンレベルが細胞外性に変化し、成熟白内障の状態にまで進行した。

水晶体内部環境における生化学パラメーターを分析するとき、摘出時に物理的損傷、あるいは刺激が加わってもさしつかえないが、incubation を行うには摘出水晶体が無傷であることが絶対条件である。したがって、本研究のために 2 個所の病院から恵与された病的水晶体の中には、incubation 不可能なものも混在しており、本報の研究には供試水晶体数に制限があった。また、最近の白内障手術には種々なる方法が採用され、超音波破碎による方法⁸⁾ などが繁用されている。しかし、本研究に使用される水晶体は、全摘出法による intact lens でなければならず、前述のごとく数に制限があった。したがって、 Na^+ , K^+ および Ca^{2+} の測定は、前報¹⁾ のように水晶体を核と皮質に分離しての分析は行わず、全水晶体での値を示した。

本報における *in vitro* での水晶体の短時間 incubation による代謝能検索法は、水晶体の加齢変化⁹⁾ や、老化体に好発する白内障の動態を研究するうえで有用な一手段になるものと考えられる。

この研究は、文部省科学研究費総合研究 (A) No. 437037 によって進められたものである。

謝辞 無傷の病的水晶体を恵与して下さいました、名古屋市の三宅眼科病院の三宅謙作博士、ならびに名古屋市立緑市民病院眼科の菅 誠一博士に感謝致します。

(a)

(b)

Fig. 4. Human Premature Cataract Lens

(a): before incubation,
(b): after three hours incubation.

引用文献および注

- 1) 第2報：岩田修造，竹鼻 眞，薬誌，**102**, 940 (1982).
- 2) 第2回国際眼研究会議日本部会，名古屋，1979年12月.
- 3) 岩田修造，竹鼻 眞，中林正雄，日本眼科紀要，**29**, 362 (1978).
- 4) I. Gutmann, A.W. Wahlefeld, "Methods of Enzymatic Analysis," Vol. III, ed. by H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, p. 1464.
- 5) V.N. Reddy, *Invest. Ophthalmol.*, **18**, 1000 (1979).
- 6) R. van Heyningen, *Exp. Eye Res.*, **4**, 298 (1965).
- 7) S. Iwata, J.H. Kinoshita, *Invest. Ophthalmol.*, **10**, 504 (1971).
- 8) C.D. Kelman, *Am. J. Ophthalmol.*, **64**, 23 (1967).
- 9) O. Hockwin, "Lens Ageing and Development of Senile Cataracts," *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, Vol. 12, ed. by H.P. von Hahn, S. Karger, Basel, 1978.