

氏名・(本籍)	中村二郎(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第244号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成10年9月24日
学位論文題目	培養家兎水晶体における糖およびリン酸化合物の代謝動態 —アルドース還元酵素阻害剤による影響—

審査委員	主査 教授	犬伏俊郎
	副査 教授	可児一孝
	副査 教授	堀池喜八郎

## 論文内容の要旨

### 【目的】

アロキサン誘発糖尿病家兎水晶体や20mMグルコースあるいは20mMガラクトース含有TCM 199で培養した家兎水晶体では、ソルビトール-3-リン酸(S-3-P)および $\alpha$ -グリセロリン酸( $\alpha$ -GP)が著明に増加した。S-3-Pはフルクトース-3-リン酸(F-3-P)とともに、それぞれソルビトールおよびフルクトースから直接リン酸化され、生成されると考えられている。一方 $\alpha$ -GPは、ホスホコリン(PC)、グリセロホスホエタノラミン(GPE)あるいはあるいはグリセロホスホコリン(GPC)などのリン脂質関連物質と同様、その代謝変動がアルドース還元酵素阻害剤(ARI)により抑制されること、およびその生成経路に関して、嫌氣的解糖やソルビトール経路を経て生成されるのではないかと考えられることから、グリセロリン脂質からグリセロールを経て生成されている可能性があり、さらにアルドース還元酵素(AR)がこれら生体膜関連物質の代謝に関与している可能性がある。これらに関してさらに情報を得るために、20mMグルコース-1- $^{13}$ Cを添加したTCM 199で培養した家兎水晶体の糖およびリン酸化合物の代謝動態に対するARIの影響について観察した。

### 【実験材料および方法】

2kg白色家兎の水晶体を、グルコースの含まれていないTCM 199に20mMグルコース-1- $^{13}$ Cを添加した培養液(以下、20mMグルコースTCM 199)で培養した。培養0, 5, 10, 20および50時間後に、糖およびリン酸化合物の代謝動態を $^{13}$ C、 $^{31}$ P-NMRスペクトロスコーピー( $^{13}$ C,  $^{31}$ P-MRS)を用いて測定した。またアルドース還元酵素阻害剤(ARI: AD-5467, 武田)を100 $\mu$ Mとなるように、培養0, 5, あるいは10時間後に培養液中に添加し、その後の代謝変化を同様に $^{13}$ C、 $^{31}$ P-MRSで観察した。

測定装置は本学設置の6.3テスラFT-NMR(JEOL JNM-GX270)で、測定条件は $^{13}$ C-MRSでパルス角: 90°、パルス繰り返し時間: 3.6秒、積算回数: 500回、測定温度: 4°Cで、外部標準物質としてテトラメチルシラン(TMS)を使用した。 $^{31}$ P-MRSではそれぞれ30°、0.5秒、10,000回、4°Cで、費用順物質をヘキサメチルホスホルアミド(HMPA)とした。

### 【結果】

ARI添加後ソルビトールは直ちに抑制され、グルコースは有意な変化を示さなかった。乳酸はおよそ2倍に増加した。S-3-Pはソルビトールと同様速やかに抑制された。 $\alpha$ -GPはある時間を経た後に減少した。ATPは一時的な増加の後、培養開始前の値に戻った。その変化の様態はARIの有無にかかわらず同様であった。無機リン酸はARIを添加することにより増加した。

### 【考察】

ARI添加後グルコースは有意な変化を示さなかったが、乳酸は約2倍に増加したことから、ARIを添加することにより、それまではARにより抑制されていた嫌氣的解糖が、ソルビトール経路を経て代謝されていた分のグルコースを用いてさらに活性化されたと考えられる。すなわち、ARは単にソルビトール経路を活性化するだけでなく、嫌氣的解糖の抑制にも関与している可能性がある。

S-3-Pは培養開始後速やかに増加し、ARIの添加により速やかに抑制された、S-3-PはF-3-Pとともに、おそらくソルビトールあるいはフルクトースより3-ホスホキナーゼにより直接リン酸化されていると推測されているが、ガラクトース培養家兎水晶体では、S-3-Pはそれに代わる代謝産物も含めて観察されなかったことから、その経路以外に、ソルビトールデヒドロゲナーゼによりフルクトースF-3-Pを経て産生されている可能性もある。

a-GPはARIを添加した場合、ある程度の時間を経て減少した。a-GPは、嫌氣的解糖を経てa-GPデヒドロゲナーゼにより産生されると考えられているが、今回の結果およびこれまでの観察結果から、a-GPは、ソルビトール経路あるいは嫌氣的解糖以外の経路を経て生成されていると考えられる。さらにARIを添加してからa-GPが抑制されるまでにはある程度の時間を要したことから、ARはa-GPの生成に関して、直接的ではなく、グリセロリン脂質からの代謝経路を抑制することにより、結果として、a-GPの生成を抑制している可能性が考えられる。

ところで糖尿病水晶体では、a-GPの増加以外に、PC、GPEおよびGPCの減少が観察されているが、これらはa-GPも含めてグリセロリン脂質の前駆体あるいは分解産物であり、膜の代謝に関連するリン酸化化合物である。これらの変化もARIで抑制されることから、ARは、リン脂質の代謝を通して生体膜の代謝に関与している可能性がある。

#### 【結 論】

ARは単にソルビトール経路を活性化するだけでなく、嫌氣的解糖を抑制し、さらにはリン脂質の代謝に関与して生体膜を抑制している可能性がある。従ってARIを作用させた場合、正常状態とは全く異なった代謝動態が展開される可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、家兎水晶体を20mMグルコース-1-<sup>13</sup>C添加培養液で培養し、水晶体中の糖およびリン酸化化合物（ソルビトール、ソルビトール-3-リン酸、 $\alpha$ -グリセロリン酸、グルコース、乳酸、ATP）の代謝動態を<sup>13</sup>C、<sup>31</sup>P-NMRスペクトロスコピーで観察したものである。さらにその培養系にアルドース還元酵素阻害剤を添加し、その後の代謝変化を観察することで、アルドース還元酵素の生理的意義に関しても考察している。その結果、アルドース還元酵素はソルビトール生成経路を活性化する以外に、(1) 嫌氣的解糖を抑制する、(2) エネルギー代謝に関与する、(3) グリセロリン脂質の代謝に関与する、という可能性を示唆した。これらの成果は糖尿病性白内障のみならず、加齢白内障、紫外線白内障などの成因の解明にも大きく寄与するものと考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年8月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。