

鶏胚を用いたグルココルチコイド作用・副作用の研究  
—白内障の発症機序から治療効果を残した予防を考える—

西郡 秀夫

**Steroid (Glucocorticoid)-induced Cataract**

Hideo NISHIGORI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagami-ko, Sagami-hara City 199-0195, Japan*

(Received June 1, 2006)

Glucocorticoids (GC) have been widely used as a therapeutic drug for various diseases. However, there are many complications of GC therapy including cataracts. In a series of studies to elucidate the actions of GC using 15-day-old developing chick embryos, we found that GC produced hyperglycemia, hyperlipemia, osteoporosis, and cataractous lenses with a high incidence (>90%) within 48 h. Cataract formation is caused by oxidative stresses, probably derived from GC effects on the main target organ, the liver, and can be prevented by radical scavengers including ascorbic acid, and insulin. Ascorbic acid does not inhibit the inflammatory and immunosuppressive effects of GC. Therefore by analyzing and decreasing risk factors producing side effects, it will be possible to improve GC therapy without the loss of GC activity.

**Key words**—glucocorticoid; developing chick embryo; cataract; glutathione; oxidative stress; protein phosphatase

1. はじめに

1-1. 研究の背景　なぜ、こんな研究をはじめたのか？ 表題に含めた3つのキーワードの由来からキーを叩くことにする。

薬局を継ぐ運命から東京薬科大学へ進学（1953年）。学年が進むにつれてクスリア売店の乱立と繁栄に目が向き始め、薬局薬剤師に幻滅・失望・不安を覚え始めた頃に大学院が設置されることになった。「1期生」にパイオニア的魅力を感じて修士課程（1963年）へ、博士になれば貧乏人でも憧れの海外生活ができることを知って博士課程へ進学・・・言ってみれば、いままで続けてきた研究と教育生活の歩みの原点は、小学、中学、高校時代に観た「米国映画の影響」と「モロトリウム」にある。

学部4年次における故新延信吉教授（生化学教室）の「ホルモン」の講義に触発され、スマートな基本

骨格を持つ「ステロイドホルモン」の作用に興味を持ち、修士課程で「アンドロゲンの抗ヒスタミン作用」、博士課程では薬理学教室（故相沢義雄教授）で「エストロゲンの子宮への作用」の研究をさせていただいた。さらにD.O. Toft博士（Mayo Clinic, ミネソタ州）のところで（1977—1979年）では「プロゲステンの受容体の分離・活性化機構」の研究<sup>1,2)</sup>をすることができた。ステロイドホルモンは生理作用から4グループに分類されるが、手を染めていなかったのは「コルチコイド」で、次は「グルココルチコイドで何かしよう」と思ったのが表題に含めた第1のキーワードである。

ポスドクとして、エストロゲンの作用機序を解明する道を拓いたG.C. Mueller教授（McArdle Laboratory, ウィスコンシン大学）の研究室（1968—1970年）で学んだ培養細胞の実験手法が、北里大学薬学部（西村千昭教授）での「核小体とウイルス増殖」<sup>3-5)</sup>らの研究に役立ち、またウイルスを増殖させるときに用いた「受精鶏卵・鶏胚」に興味を覚え（1971—1978年）、独立したら「受精鶏卵を使って何かしよう」と考えた。これが第2のキーワードである。

帝京大学薬学部医療薬学II分野薬物治療学教室（〒199-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐）

Present address: Iwate Medical University, 19-1 Uchi-maru, Morioka City 020-8505, Japan

e-mail: hnishigo@iwate-med.ac.jp

本総説は、平成17年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

「受精鶏卵を用いたグルココルチコイドの作用・副作用の発現機序」の研究を開始できたのは、1979年10月帝京大学薬学部へ赴任し、故岩鶴素治教授から「好きな研究をなさい」と強く奨められたからである。

第3のキーワードは「失敗」が生み出したものです。グルココルチコイドの薬物相互作用を酵素誘導から研究するための基礎実験をしていたところ、ある日教務職員で後に「グルココルチコイド誘発鶏胚白内障の研究」で学位を受ける李さん（現 Lee J.W. 博士, NIH, NEI）が、「間違っ、100倍量を投与しました。失敗なので捨てます・・・」と申し訳なさそうに報告にきたのがきっかけである。「観察、特に最初の動物実験は解剖して、よく観察せよ」をモットーにしていた筆者にとっては「チャンス到来」でした。彼女と2人で解剖しながら「全体的に発育が遅れている、足の骨が短い、肝が緑黄色」と確認していたときに、「あつ!! 水晶体が濁っている」・・・生体のダイヤモンドとも形容される水晶体（直径約2mm、湿重量約6mg）が白濁しているのを観たときは大きな驚きであった。

周到な準備から始めた研究ではなく、「グルココルチコイドで何かしよう」、「受精鶏卵・鶏胚で何かしよう」、「何かしてみたら、白内障がでた」・・・非科学的発想と失敗から出てきたテーマが、約25年あまり続いたことになる。実験は「興味があったら、まず実行」、公表は「四球でも、まず出塁」という姿勢で臨んできたので、研究内容を年代順に紹介すると混乱を招くことになる。そこで、本稿では筋道を立てて行った研究のように再構成して記述する。また、「タイプライター・ロットリング・白黒スライド」時代の実験方法で得られた「現象中心」の結果を独善的に解釈し、推測した内容なので、最先端を走る読者から嘲笑されることを覚悟して述べる（誤った解釈、推測は小生の責任である）。

さて、グルココルチコイド（以下GCとする）の一種であるコーチゾンが Mayo Clinic の Hench と Kendall (1950年ノーベル賞受賞)らによってリウマチに著効を示すことが明らかにされてから50年以上が経過した。<sup>6)</sup> この間、プレドニゾロンやデキサメタゾンなどの多くの誘導体が開発され、しかもそれらが多彩な薬効を発揮することが示され、“非常に切れ味の鋭い不思議な薬”として、多くの疾患

の治療に適用されるようになった。しかし、副作用が多いことも明らかになり、特に長期しかも多量に必要とする原発性ネフローゼ症候群、膠原病、関節リウマチなどの患者さんや腎などの臓器移植を受けた患者さんでは、著しく「Quality of Life」が損なわれる場合が多く、治療を継続する際に問題となっている。今までに、「治療効果を残して、副作用はなくす」ことを目指して、投与法の検討、剤形の工夫、新規GC薬の開発、易感染症に対する抗生剤の使用などの薬物併用などが試行されてきたが、副作用の発症機序が解明できていないこともあって、多くの課題が未解決のまま残っている。

受精鶏卵・鶏胚でGCの作用・副作用の研究を開始して、まず気がついたことは、GCを投与すると血中のグルコース、トリグリセイドやコレステロールなどの脂質が上昇し、成長の遅延、骨形成の抑制が起き、同時に、水晶体が混濁する白内障<sup>7)</sup>が発症したことである。これらの現象は臨床的に「GC治療時に現れる副作用」としてよく知られていたので、鶏胚で現れたことに非常に興味を持った。

**1-2. GC誘発白内障について** 白内障を研究の中心に展開することにした主な理由は次の2点である。

1) 白内障は、加齢、糖尿病、紫外線・電離放射線、飢餓、GCなどの薬剤で発症することが明らかになっているが発症機序は不明である。しかし、発症機序として酸化ストレスの関与が強く疑われている。

2) 「酸化ストレス・活性酸素と疾患」について、国内外で関心が集まり始めた。

1960年に Black ら<sup>8)</sup>がGC投与で水晶体の後嚢下に混濁が現れることを発表したのが端緒となり、GC誘発白内障は臨床<sup>9-11)</sup>と基礎の研究者から注目されることになった。基礎研究としては、トランスグルタミナーゼ誘導による水晶体タンパク間の cross-linking 説、<sup>12)</sup>ステロイドの20位カルボニル基と水晶体タンパクのアミノ基間でのシッフ塩基の形成と Heyns 転位による結合説、<sup>13)</sup>リン酸化阻害説、<sup>14)</sup>Na-K-ATPase ポンプ機構阻害説<sup>15)</sup>などの諸説が出されてきた。しかし、*in vitro*での研究、あるいはGCの生物作用を考慮しなで行った研究に対する指摘<sup>16,17)</sup>もあり、今でも発症機序の解明には至っていない。<sup>18)</sup>

「鶏胚に GC を投与すると白内障が発症する」という実験系は、「GC 誘発白内障研究モデル」として、どの程度有用なのか？

筆者らは、「鶏胚での白内障は GC 作用に依存して発症するのか」、「GC に対する鶏胚の薬理的反応性はどうか」、「ヒトでみられる「現象」がどの程度現れるか」を調べることから実験を開始した。

なお、ヒトでの GC 誘発白内障の水晶体に関する生化学的データと比較することを考えたが、データは皆無で、しかも近年の白内障手術法—超音波で白内障水晶体を破碎し、吸引する—では試料を採取することが困難なので、今後も入手が難しいことをあらかじめ述べておく。

## 2. GC 投与で鶏胚の水晶体が白濁する—白内障—

放卵後の受精鶏卵を 37.5°C、湿度 68% で孵置し、15 日齢（孵卵開始日を 1 日齢とする）で、0.25  $\mu\text{mole}$  のヒドロコルチゾン（コハク酸エステル、以下 HC とする）を気室部に投与すると、20 時間後より水晶体核周囲帯に白色環（stage III）が現れ、それが中心部に向けて肥厚し、48 時間以内に 90% 以上の水晶体の核部が白濁し stage IV（核部中心部を残して白濁）から stage V（核部全体が白濁）の白内障水晶体になる（Fig. 1(a)）。しかし、この白濁は可逆的で時間の経過とともに消滅し、投与後 96 時間までにほとんどの水晶体が透明になる。<sup>7)</sup> 組織学的に白内障水晶体を調べると、細胞間接着に必要と言われる GM3 や sialyl-lewis<sup>x</sup> ガングリオシドの分布が少ない水晶体核周囲帯に phase separation<sup>19,20)</sup> で生じたと思われる無数の vacuole が存在し（Fig. 1(b)）、線維細胞間に卵円形間隙（直径 2—8  $\mu\text{m}$ ）の出現が観察されたが（Fig. 1(c)）、これらは白濁の消失とともに消滅した。<sup>21)</sup> 「白濁」は光が水晶体を通過するとき vacuole で乱反射し、肉眼的に観察される現象と考えられる。

## 3. GC の作用と鶏胚—GC 誘発白内障モデルとして使えるか—

**3-1. ステロイドの構造と水晶体の白濁化** ステロイドホルモン関連薬剤の中で、副作用として白内障を発症させるのは GC 類である。そこで、この特徴が受精鶏卵で再現できるか確かめた。Table 1 に示すように、白内障はヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾンなどの GC 類に限って発症し（両水晶体とも同 stage）、しかも発症惹起度は

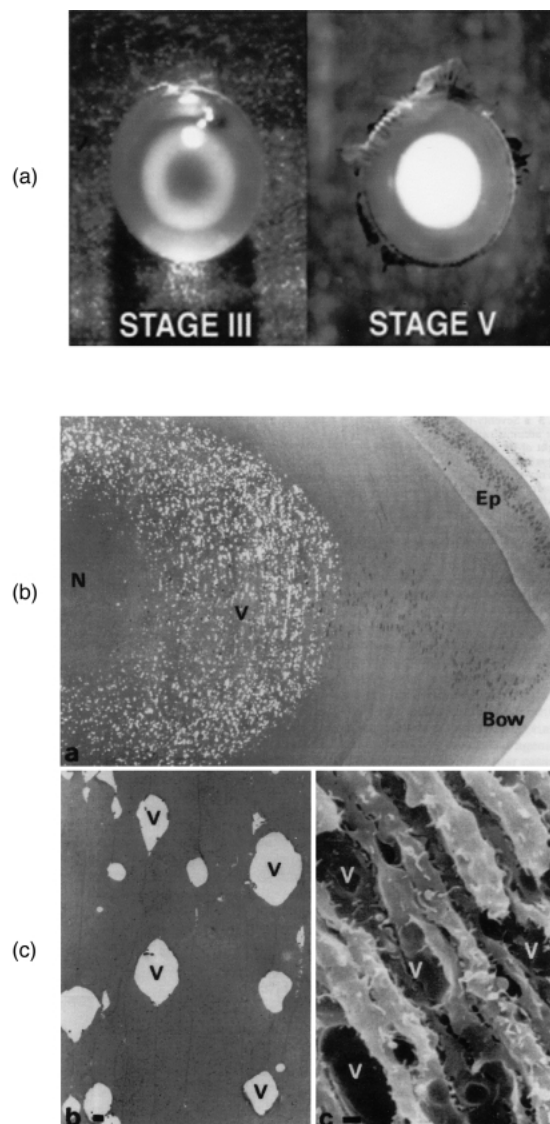


Fig. 1. GC-induced Cataract Lens

Lens was isolated from chick embryo 48 hrs after the administration of HC on day 15 and prepared for morphological studies as described in paper.<sup>21)</sup> Middle: by light microscope, Bottom left: by transmission electron microscope, Bottom right: by scanning electron microscope.

ほぼ抗炎症力価に比例していた。<sup>22)</sup> コルチゾンの投与では発症しなかったが、この理由は鳥類の 11 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ活性が低く（なく）、11 位ケトン基が還元されて活性型のヒドロコルチゾンに変換され難いことによると推測している。<sup>23)</sup>

また、15 日齢鶏胚から摘出した水晶体で確立した器官培養系に GC、ミネラルコルチコイド、アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステン類を添加したところ、水晶体の白濁化はすべてのステロイドでみられた。<sup>24)</sup>

以上の実験結果より、GC 誘発白内障の研究モデ

Table 1. Cataract-Producing Effects of Steroids in Developing Chick Embryos

Steroids	Dosage ( $\mu\text{mol/egg}$ )	Frequency (IV—V)	Antiinflammatory activity
<u>Glucocorticoids</u>			
Hydrocortisone			1
	0.25	8/10	
+ RU486	0.25	0/10	
Prednisolone			3.5—4
	0.25	9/10	
+ RU486	0.25	0/10	
Dexamethasone			25—30
	0.01	7/10	
+ RU486	0.25	0/10	
Betamethasone			25—30
	0.05	9/10	
Cortisone			0.8
	1	2/10	
<u>Mineralocorticoid</u>			
Aldosterone	0.25	0/10	
<u>Androgen</u>			
Methyltestosterone	0.25	0/10	
<u>Estrogen</u>			
Estradiol	0.25	0/10	
Ethinylestradiol	0.25	0/10	
<u>Progestins</u>			
Progesterone	0.25	0/10	
19-nor-ethisterone	0.25	0/10	

Each steroid at the indicated dosage was administered to ten 15-day-old developing chick embryos. At 48 hr after steroids administration, the lenses were classified from I to IV—V. Data were expressed as number of embryos with stage IV+V lenses/10 embryos.<sup>22)</sup> Data from RU486 treatment were described in the paper.<sup>28,29)</sup>

ルとしては、生物活性に関係なく水晶体が白濁する器官培養系は不適切で、受精鶏卵で実験することが妥当であると判断した。

### 3-2. GC の作用

**3-2-1. 血液成分の変化** GC 投与時に臨床的に高血糖、高脂血症が発症することはよく知られ、その機構もかなり解明されている。15 日齢鶏胚に HC を投与したときにも同様の現象が現れ、水晶体混濁が最もひどくなる 48 時間後には血液中グルコースが約 2.5 倍、遊離脂肪酸、トリグリセリド、総コレステロールがそれぞれ約 2 倍、約 10 倍、約 2 倍となり、その後減少し、96 時間後には対照値に回復する (Fig. 2).<sup>25)</sup> また、後述するように (Fig. 4)、過酸化脂質 (LPO) などの酸化性ストレスの指標となるチオバルビツール酸反応物 (TBARS) の測定も行ったが、20 時間後より急上昇し、48 時間後には約 7 倍になり、その後減少することも判明した。

また、HC 投与で生じるこれらの血液成分の上昇がインスリン投与で抑制されることも明らかになった (Table 2).<sup>25)</sup>

**3-2-2. 骨成長の抑制** HC 投与後 48 時間の大腿骨、脛骨の重量、長さはいずれも対照群の 70—80% で抑制されていたが、Ca/P 比は変化しなかった (未発表)。

**3-2-3. Mifepristone (RU486) による GC 作用の抑制** RU486 は哺乳類において、プロゲステロンと GC の受容体部位に作用し、アンタゴニスト的効果を示すが、鳥類ではプロゲステロン受容体とは結合せず、グルココルチコイド受容体に特異的に作用すると言われている。<sup>26,27)</sup> Tables 1, 2 に RU486 の GC 作用に対する効果を示したが、RU486 は GC 誘発白内障の発症を完全に抑制した。<sup>28,29)</sup> また高血糖、血中脂質の上昇などの現象も抑制された。<sup>30)</sup>

GC を 15 日齢鶏胚に投与して現れる「現象・効果」が臨床的にみられる現象と類似し、しかも

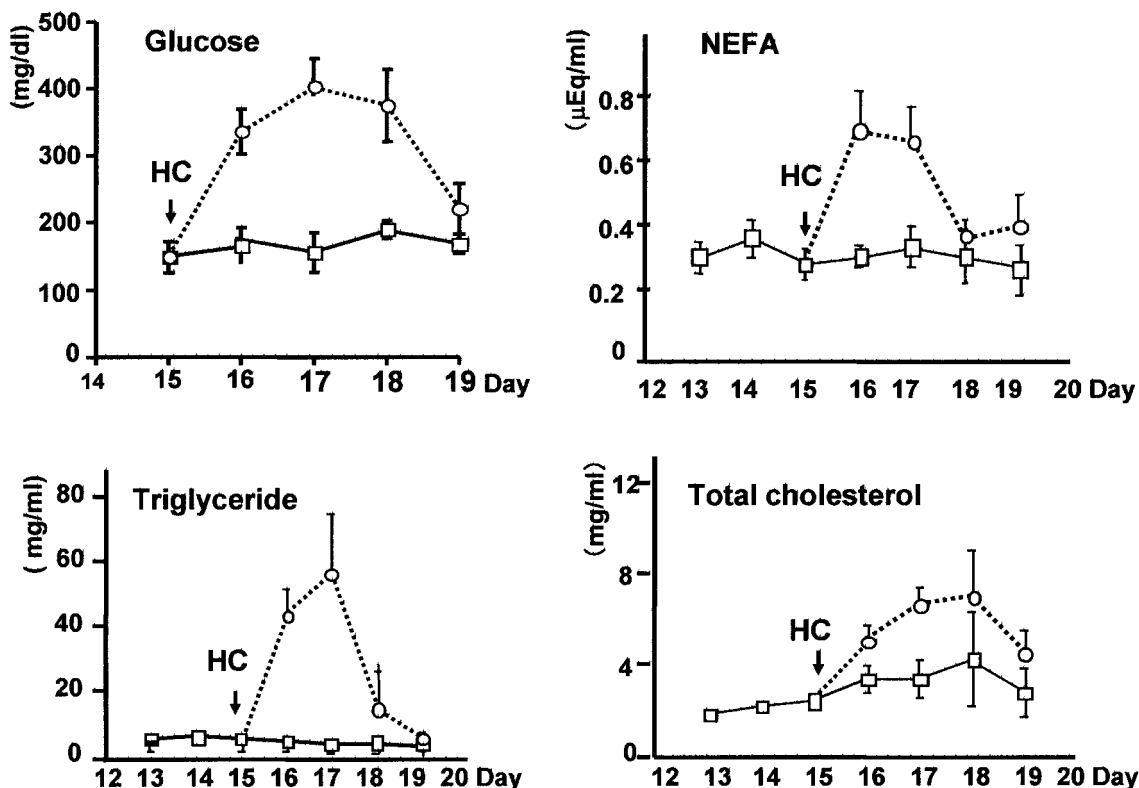


Fig. 2. Alteration of Glucose and Lipids Levels in Serum of Developing Chick Embryos after HC Administration  
 Glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), triglyceride and total cholesterol in serum were determined at the indicated day after the administration of HC on day 15 as described in paper.<sup>25)</sup>

Table 2. Effects of Treatment of HC Alone and with Anticataract Agents on the Several Components in Lens, Blood and Liver of Developing Chick Embryos

	a) Lens				b) Lens (I—V) mixed			c) Blood		d) Liver		
	I (%)	II (%)	III (%)	IV—V (%)	GSH	Glucose (%)	TBARS (%)	Glucose (%)	TBARS (%)	TBARS (%)	GSH (%)	ATP (%)
Control	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
HC	0	0	10	90	52.9	1500— 2500	130— 152	200	680— 878	780— 846	64.7	62
+RU486 <sup>28,29)</sup>	100	0	0	0	96	ND	98	ND	250	200	105	ND
+Insulin <sup>25)</sup>	86	2	7	5	88.6	225	105	53	110	215	92.6	116
+Thyroxine <sup>34)</sup>	88	9	3	0	100	ND	105	55	133	291	74	85
+Ascorbic acid <sup>45,50)</sup>	52	4	18	26	60	61.5	110	ND	248	260	64.6	ND
+PQQ <sup>51)</sup>	60	10	30	0	85	ND	ND	ND	ND	ND	107	ND

Agents were administered to 15-day-old developing chick embryos after the treatment of HC (0.25  $\mu$ mol/egg). a), b) At 48 hr after HC treatment, lenses were classified from stage I to IV—V, and their GSH, glucose and TBARS amounts were determined as described in papers. c) At 48 hr after HC treatment, glucose and TBARS were determined as described in papers. d) TBARS at 48 hr and GSH and ATP at 24 hr after HC treatment were determined. All data were expressed as % of control calculated from data of papers.

RU486 で抑制されたことは、受精鶏卵がグルココルチコイドの作用・副作用を研究する上で有用な実験系の1つになり得ると判断した。

4. 白内障の発症における肝の関与

4-1. GC 受容体の有無 GC 誘発白内障が GC

受容体の機能を介して発症することが明らかになり、次の興味は水晶体における GC 受容体の有無である。そこで、水晶体から 105000 g 上清分画を調製し、抗 GC 抗体で処理後、SDS—PAGE で電気泳動し、ウエスタンブロット解析法で調べた。鶏胚

でも GC 受容体の存在が知られている肝<sup>31)</sup>から調製した上清分画では 93 kDa 付近に GC 受容体と推定されるバンドが認められたが、水晶体標品では認められなかった。また、上清分画をトリチウム標識デキサメタゾンと反応させ、蔗糖密度勾配法を用いて GC 受容体の検出を行ったところ、肝上清分画では GC 受容体と思われる 9S 領域に放射活性のピークがみられ、それが 0.4MNaCl 処理で 4S にトランスフォームすることを認めたが、水晶体上清分画では確認できなかった。<sup>28)</sup>

GC の作用は標的器官では受容体を介して発現するので、水晶体の白濁化は GC の水晶体への直接的な作用ではなく肝などで生成した因子が水晶体に到達することで引き起こされると推測した。

**4-2. インスリンでの検討** GC 受容体を有する多くの器官の中で、血液成分に影響を及ぼすのは主として肝における代謝能の変化である。特に糖代謝系において、GC とグルカゴンは糖新生を促進し高血糖を惹起するが、インスリンは GC 効果に拮抗的に作用することが知られている。すなわち、GC は、インスリンとは逆に、解糖系酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホエノールピルビン酸

カルボキシキナーゼ、フルクトース -1,6-ビスホスファターゼ、グルコース -6-ホスファターゼなどを誘導し、糖新生を促進する (Fig. 3).<sup>32)</sup>

Table 2 に GC 投与で生じる白内障の発症、高血糖の発現に対するインスリンの効果を示したが、いずれもインスリン投与によって抑止された。また、肝の ATP とグルタチオン (GSH) 量を同時に測定したが、GC 投与では ATP, GSH がともに対照群の約 60% に低下したが、インスリンはこれらの減少も防止した。インスリンは肝における糖新生経路において GC 効果に拮抗的に作用することによって、高血糖の発現を抑制し、クエン酸サイクル活性の低下とこれに連動した ATP 産生の減少、さらに GSH 生合成の低下を抑止したと考えている。

Table 3 で示すように、インスリン、<sup>25)</sup> クエン酸サイクルの中間体であるイソクエン酸、<sup>33)</sup> チロキシン<sup>34)</sup> の投与で白内障の発症が抑止されることから、GC 投与の肝における糖代謝とそれに派生する反応が白内障の発症に深く関与していると推測した。

## 5. リスクファクター

GC 投与後、肝代謝能の変化で過剰に生成し、血液成分として上昇するグルコースと LPO は白内障

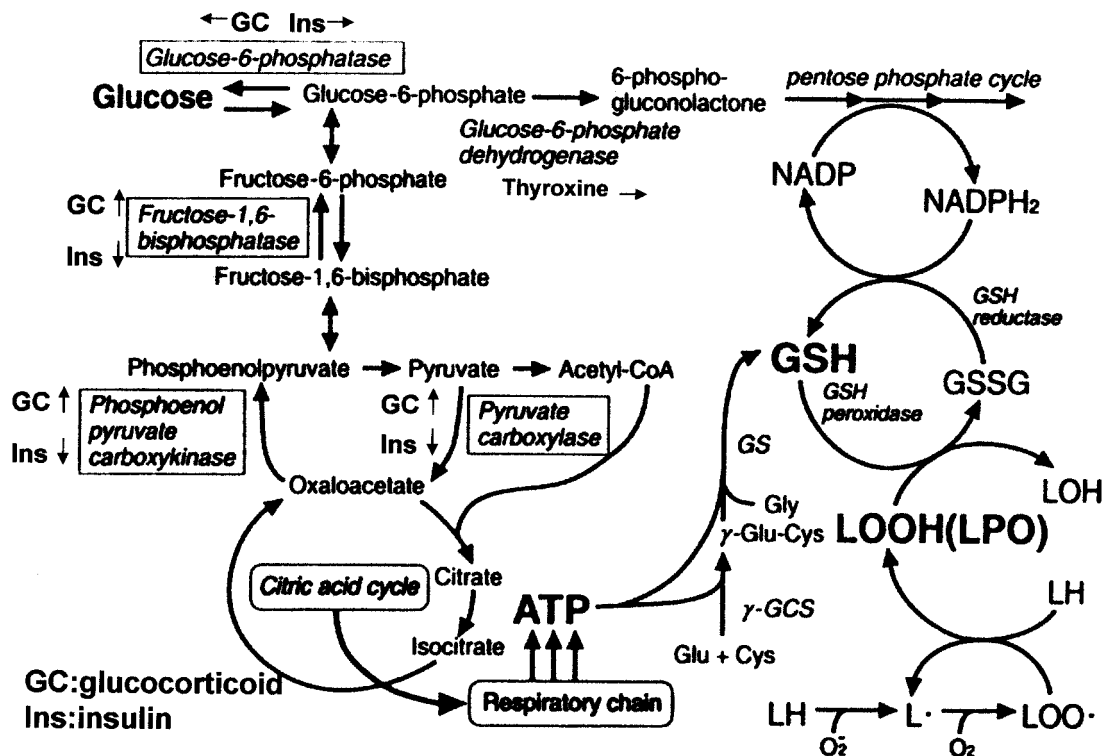


Fig. 3. Action Sites of GC and Insulin in Glucose Metabolism

Table 3. List of Agents Showing Preventive Effects on GC Induced Cataract of Developing Chick Embryos

Agents	A Total dose ( $\mu\text{mol}/\text{embryo}$ )	B Average of stage	A×B
Control		1	
HC alone		3.9	
+ Insulin <sup>25)</sup>	0.13	1.3	0.17
+ Thyroxine <sup>34)</sup>	0.03	1.3	0.04
+ Isocitrate <sup>33)</sup>	45	1.3	58.5
+ Propylene glycol <sup>39)</sup>	4500	1.3	5850
+ PQQ <sup>51)</sup>	7.5	1.7	12.8
+ Ascorbic acid <sup>50)</sup>	60	2.2	132
+ SA3443 <sup>53)</sup>	20	1.8	36
+ SA3441 <sup>53)</sup>	20	2	40
+ Tiopronine <sup>52)</sup>	40	2.2	88
+ Cysteamine <sup>52)</sup>	40	2.6	104
Ineffective			
+ Ergothioneine <sup>52)</sup>	40	3	120
+ Cysteamine <sup>52)</sup>	5	3.5	17.5
+ Glutathione <sup>52)</sup>	40	3.8	152
+ ox Glutathione <sup>52)</sup>	20	3.3	66

Agents were administered as indicated in papers after the administration of HC (0.25  $\mu\text{mol}/\text{egg}$ ) to 15-day-old developing chick embryos. At 48 hr after HC treatment, lenses were classified from stage I to stage IV—V. Average of stages were calculated by scores of 1 (stage I), 2 (stage II), 3 (stage III) and 4 (stage IV—V).

発症危険因子として疑われている。

**5-1. グルコース—糖白内障と同じ？—** 高血糖が原因とされる白内障として、ヒトにおける糖尿病白内障、ラットのストレプトゾトシン誘発白内障、ガラクトース誘発白内障がよく知られ、それらの発症機序に関する代表的仮説には「ポリオール蓄積説」<sup>35,36)</sup>と「グリケーション説」<sup>37)</sup>がある。前者は、水晶体に蓄積したグルコースがアルドースレダクターゼでソルビトールに変換、滞留することで浸透圧が上昇し、この浸透圧を下げるために流入した水分でイオンバランスが崩れ、白濁化を誘発するという説である。事実、アルドースレダクターゼ阻害薬がラット糖白内障で予防効果を示し、「ヒトでも・・・」と一時期、期待を抱かせていた。後者はグルコースのアルデヒド基とタンパク質アミノ基間での Schiff 塩基の形成とそれに続くアマドリ転移による結合で生じるタンパク質変性が原因とする説である。

15 日鶏胚に HC を投与すると血中グルコース濃度は上昇し、24 時間後から 72 時間後まで 350—400 mg/dl と対照群の 2 から 3 倍になるが、水晶体が透明になる 96 時間後には対照値まで低下する (Fig.

2, Table 2)。水晶体中 (Table 2)、房水中濃度も上昇し、白内障水晶体では 30—48 時間後に対照群の 20 倍以上になるが、その後低下し、98 時間後にはほぼ対照値へ戻る。<sup>38)</sup> そこで、「ポリオール蓄積説」で指標とされるソルビトールとフルクトース、「グリケーション説」の指標とされる 5-ヒドロキシフルフルールを測定したが、どの指標も透明水晶体と白内障水晶体のいずれにおいても検出できなかった。<sup>17)</sup>

HC 投与後 4 時間と 28 時間にインスリンを投与すると血中、水晶体中のグルコースの増加と白内障の発症が抑止される (Table 2) ことから、グルコースの著増自体が白濁の原因となる可能性も考えた。しかし、白内障の発症を抑止する化合物 (Table 3) の投与で、透明性が維持された水晶体の中にも白濁水晶体と同程度にグルコース濃度の高いものがあった。<sup>39)</sup>

以上の結果から、「ポリオール蓄積説」、「グリケーション説」のいずれも、また「グルコースの著増自体」も水晶体白濁の原因になっている可能性はないと考えた。

## 5-2. LPO—GSH との関係—

**5-2-1. TBARS (以下文脈によって LPO を使用) 値の変動について** 過酸化水素や過酸化脂質 (LPO) などの過酸化物は白内障惹起因子として疑われている。<sup>40-42)</sup> Figure 4 は, HC 投与後 48 時間の肝中 LPO が白内障を発症させる投与量 (0.25  $\mu\text{mol}/\text{egg}$ ) になると急上昇すること, またこの用量を投与したときの肝,<sup>43)</sup> 血液,<sup>44)</sup> 水晶体中<sup>45)</sup> における TBARS の経時的变化を示したデータである. 肝と血液中では 20 時間後から急上昇し, 30—48 時間で約 8 倍となり, その後減少する. 水晶体中の LPO は血液・房水経由で入ると推測されるが, GC 投与後, 白濁の最もひどくなる 48 時間後に対照群の 1.3—1.5 倍になり, その後透明性の回復とともに減少した.<sup>45)</sup>

**5-2-2. GSH の変動について** Figure 5 に示すように肝における GSH の低下は水晶体より約 24 時間早く起きる. すなわち, GC 投与後 24 時間で対照群の約 65%<sup>33,46)</sup> にまで低下するが 48 時間後には対照群値 (650—700  $\text{nmol}/\text{liver}$ ) にまで回復し, その後リバウンド的に上昇した. 一方, 水晶体中の

GSH 量は GC 投与後に一時的に上昇するが 20 時間後から白濁化の進行とともに減少し, 48 時間後の白濁水晶体では対照群 (15—17  $\text{nmol}/\text{lens}$ ) の約 50% になったが, 透明性の回復とともに GSH は対照群の値まで増加した.<sup>7)</sup>

GSH の生合成阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン (BSO) を投与したデータも Fig. 5 に示したが, 肝, 水晶体における GSH 量の減少は GC 投与群よりも顕著に現れ, しかも長時間続いた. しかし, 白内障は発症せず, また TBARS は肝, 血液中, 水晶体のいずれにおいても増加しなかった.<sup>46)</sup>

以上の結果より, GC 投与では LPO 自体の生成が促進していることを示す結果と考えている.

GSH はグルタチオンペルオキシダーゼ系と共役して, 過酸化脂質などの生成を制御し, 消去する (Fig. 3). GC 投与後, 肝では GSH の生合成が低下し, 一方で LPO の生成が亢進していることから推測すると, TBARS と GSH の推移は LPO と GSH 間の消耗戦の結果を示している. GC 投与後 20 時間近くまで, GSH は LPO を消去するために利用されて減少するが, 次第に LPO が優位となり, 20

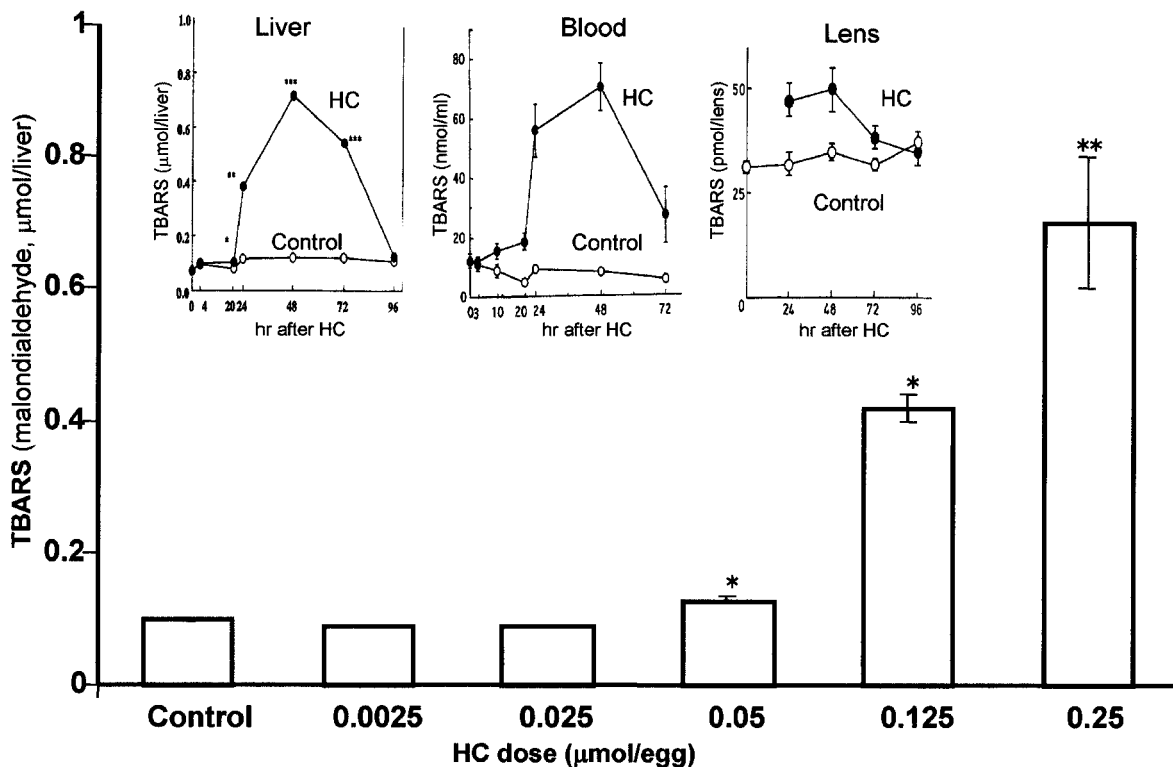


Fig. 4. Effects of HC on TBARS Level of Liver, Blood and Lens of Developing Chick Embryos after HC Administration. TBARS in liver, blood and lens were determined at the indicated time after the administration of HC on day 15 as described in paper.<sup>43-45)</sup>



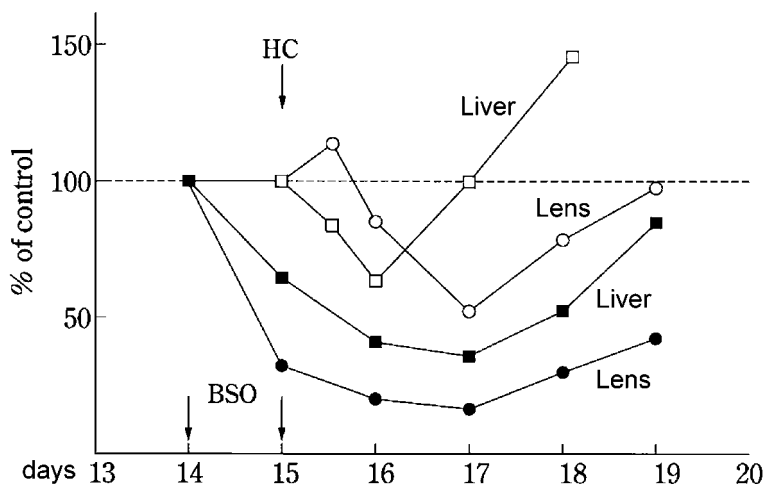


Fig. 5. Alteration of Glutathione Level in Lens and Liver of Developing Chick Embryos after HC and BSO Administration  
 Open circle and square: HC (Hydrocortisone succinate, 0.25 μmol) was administered on day 15. Closed circle and square: BSO (Buthioninesulfoximine, 30 μmol) was administered on day 14 and 15. Methods were described in paper.<sup>33,46)</sup>

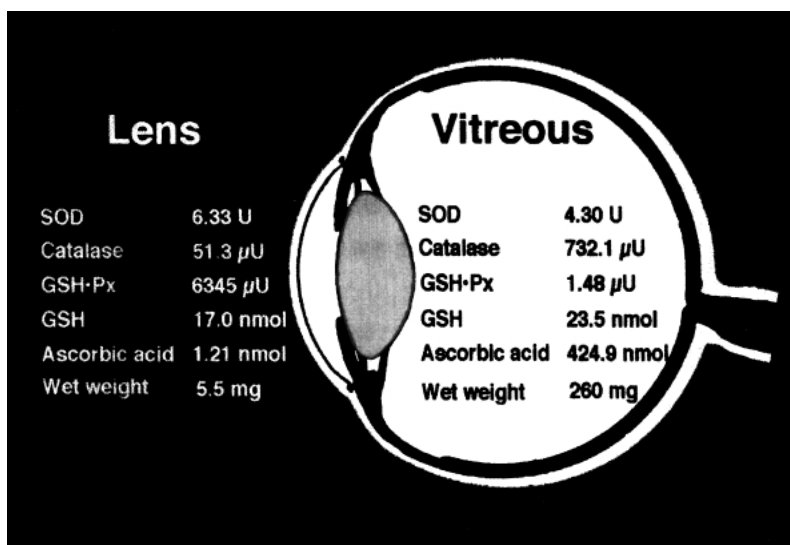


Fig. 6. Antioxidant Defense Systems of Lens and Vitreous Body of Developing Chick Embryo  
 Unpublished data.<sup>30)</sup>

時間後から急上昇し、血流中に流入し、水晶体へも移行すると考えられる。

肝ではGC投与後にカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなどの酸化防御系酵素活性の低下と酸化反応の活性化,<sup>47)</sup> ビリベルジンの蓄積などの代謝能が変化していることも見出している。<sup>48)</sup>

水晶体は房水(アスコルビン酸濃度が高い)と硝子体(トランスフェリンがある)に挟まれた器官で、それ自身も種々の酸化防御機構を備えている。<sup>49)</sup> 鶏胚でも同様と思われ、実際に測定するとFig. 6に示すように水晶体にはグルタチオンペルオキシダー

ゼ、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などの酵素とGSHが存在する。<sup>30)</sup> 肝で生成し、水晶体に侵入したと考えられるLPOはこのような環境でGSHと再び戦争を始め、LPOが水晶体の酸化防御機能を越えて優位になると白内障発症への段階へ入ると推測される。

以上の考えを模式図で整理すると、Fig. 7に示すように投与されたGCは血流によって多くの器官に分布し、恐らく水晶体にも取り込まれる。しかし、水晶体の白濁は侵入したGCの作用で誘発されるのではなく、むしろ肝におけるGCの作用によって糖

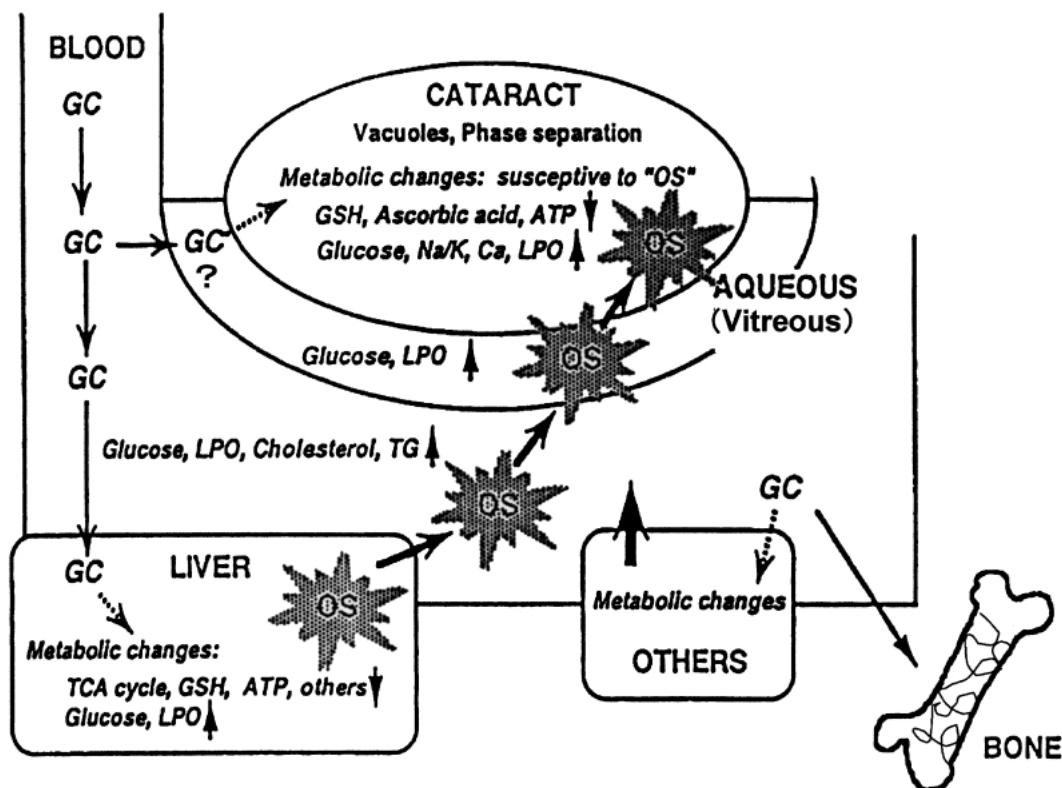


Fig. 7. Proposal Mechanism of GC-induced Cataract Formation of Developing Chick Embryo

新生と過酸化反応が亢進し、LPOなどの酸化性ストレスの生成が促進され、それらが血流、房水さらに硝子体を経由して水晶体に入り、水晶体の酸化防御機能を凌駕すると、細胞間における間隙形成の過程が始まり最終的に白内障になると推測した。

#### 6. GC誘発白内障の発症を予防する

いままでの実験結果から推測すると、GC誘発白内障の発症は、A) 肝のグルタチオン量を維持し、過酸化脂質などの生成を抑止する。B) 水晶体における酸化防御能を高める。ことができれば、GC誘発白内障の予防は可能と考えられる。

受精鶏卵・鶏胚の実験系では点眼投与ができないので、A) の肝機能への作用を目的とし、次の視点から薬物の検索をした。

i) GCによる糖新生などの異常亢進を制御しGSHの生合成低下などの代謝能変化を修整できると考えられる化合物

ii) 活性酸素種の消去と過酸化脂質の分解を促す化合物

Table 3に示したのはいままでに抗白内障効果が認められた化合物のうちの一部である。

A欄は総投与量 ( $\mu\text{mol}/\text{egg}$ )、B欄は水晶体白濁

度の平均 (4が最大)、C欄はA×Bで、数字の小さいほど白内障抑止力が強いことを示している。

i) に分類されるのは、インスリン<sup>25)</sup>とイソクエン酸<sup>33)</sup>またグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性化作用のあるチロキシン<sup>34)</sup>で、代謝調整作用効果で白内障発症の予防効果を示すと考えられる。特にホルモンであるインスリンとチロキシンが極低用量で強い効果を示したことはGCの作用を解析するためにも興味深い知見と思われる。一方、ii) に分類されるのはアスコルビン酸<sup>45,50)</sup> PQQ<sup>51)</sup> チオプロニンなどのSH化合物<sup>52,53)</sup>で、ラジカル捕捉作用によって白内障発症の予防効果を示したと推測している。

Table 2に示したように、インスリン<sup>25)</sup> イソクエン酸<sup>33)</sup> アスコルビン酸<sup>45,50)</sup> PQQ<sup>51)</sup>などはGC投与による水晶体と肝のGSHの減少を防ぎ、水晶体、肝及び血液中TBARSの増加を抑止することが認められた。

なお、GC誘発白内障発症時にみられる骨成長抑制はラジカル捕捉剤では予防できなかった。

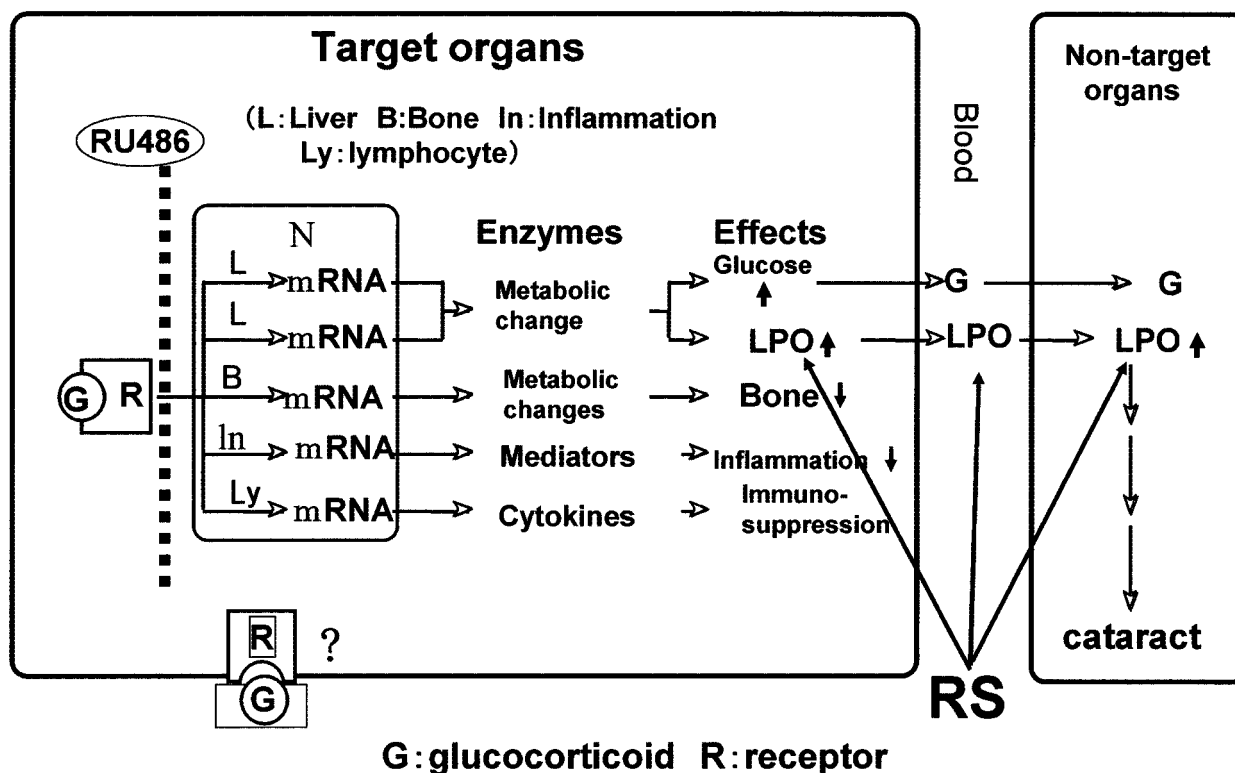


Fig. 8. GC-induced Phenomena and Inhibition by RU486 and Radical Scavengers

7. GCの薬効を残して、白内障の発症を抑制する

標的器官におけるGC作用の発現機構についてはかなり明らかにされているが、ここでは最も古典的な模式図 (Fig. 8) で簡略に述べる。すなわち、GC効果はGCが細胞質GC受容体と複合体を形成し、それが細胞核に移行し、転写、翻訳過程を経て、酵素生成を誘導し、標的器官に特有なプロダクトを生成することで現れる。プロダクトは標的器官自体に変化を起こすとともに血液で非標的器官に運ばれ、そこで2次的にGC効果を現すこともある。

抗白内障効果を示した化合物の中で、例えばRU486はGC受容体機能を不活化するので、白内障を予防するばかりでなく治療効果の発現も抑制すると考えられる。一方、ラジカル捕捉剤は翻訳後過程でプロダクト—LPO (TBARS) —の生成を抑制するので、薬理効果、例えば抗炎症効果を残すことが可能であると考えた。そこで、マウスの耳介にアラキドン酸を塗布し、炎症で起きる腫脹に対するGCの抗炎症作用とその効果に及ぼすアスコルビン酸の影響を調べたところ、GCの抗炎症効果はアスコルビン酸でむしろ強まることが分かった (Fig. 9)。

アスコルビン酸などのラジカル捕捉剤は、GCの抗炎症効果を減じることなく副作用のGC誘発白内障の発症を予防できる可能性を示すことができた。

8. 水晶体でのGSHの役割と白濁化への一歩一推測—

水晶体は、コラーゲンなどから構成される水晶体囊 (カプセル) によって覆われ、その内側には水晶体前極部 (房水接触面) から赤道部まで一層の上皮細胞が密着している。上皮細胞は増殖帯で増殖し、線維細胞に分化後、前極部から後極部 (硝子体接触面) に線維状に伸長し、順次中心へ向って押し込められながら細胞内小器官、細胞核を消失し、細胞膜も不明瞭となり、最終的に水晶体核を形成する。このプログラムが一生涯スムーズに進行し、細胞、線維が規則正しく密につまった構造体が形成され続けると透明性が維持される。<sup>54)</sup> プログラムは強力な酸化防御機構 (Fig. 6) に守られ、種々の成長因子やサイトカイン、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼの関与の下で進行すると考えられている。

筆者らは、まだ未解明の部分が多いプロテインホスファターゼ<sup>55)</sup>に焦点を絞り、水晶体の透明性維持

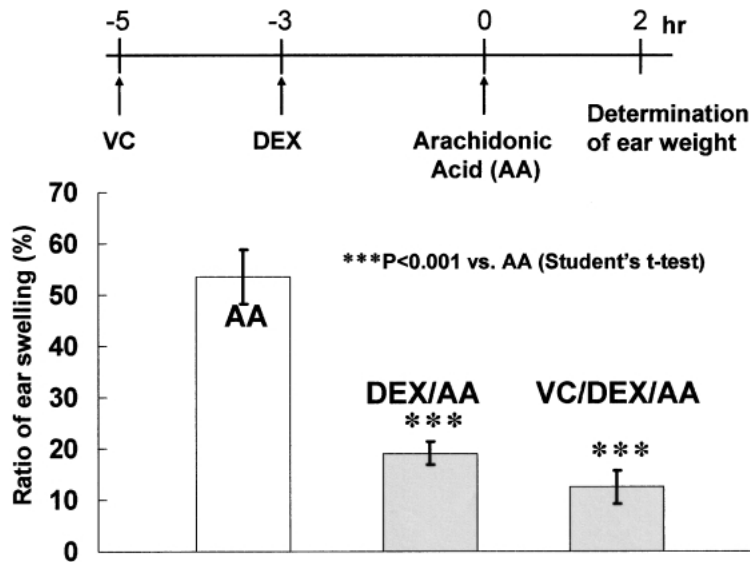


Fig. 9. Effect of Ascorbic Acid on Inflammatory Activity of GC

Effects of dexamethasone (20  $\mu$ g) alone, and ascorbic acid (10 mg) and dexamethasone on the ear-inflammation of mice produced by arachidonic acid (125  $\mu$ g) (were examined unpublished).

とその可逆的障害ともいえる GC 誘発白内障水晶体において、細胞間に現れる vacuole 形成過程の解析を試みている。今までに種々のホスファターゼが存在し、<sup>56)</sup> その中にプロテインセリン/スレオニンホスファターゼに属する PP1, PP2A, PP2B が含まれ、PP2C が水晶体に存在することを初めて報告した。<sup>57)</sup> また、18 kDa のプロテインチロシンホスファターゼ活性ピーク<sup>58)</sup> が、LMW-PTP であることを作成したポリクローナル抗 LMW-PTP ペプチド抗体で明らかにし、その存在を LMW-PTP の mRNA が発現していることで確認した。<sup>59)</sup> LMW-PTP の機能については不明な点が多いが、細胞間接着を堅固にするために重要な *N*-カドヘリン・ $\beta$ -カテニン・アクチン複合体が形成されるときに必要な  $\beta$ -カテニンの脱リン酸化に参与していることが報告されている。<sup>60)</sup> 鶏胚水晶体でも抗 LMW-PTP 抗体が  $\beta$ -カテニンと結合することを免疫沈降法で確認し、免疫組織染色で細胞膜に共存することを観察している。<sup>61)</sup> 興味深いことは、LMW-PTP がシステインチオール基を酵素活性中心に持ち、<sup>62)</sup> 他の PTP と同様に酸化されることにより酵素活性が低下することである。<sup>62,63)</sup> GC 誘発白内障の発症には酸化性ストレスが関与している可能性が強いため、発症に至る過程で LMW-PTP が酸化されて活性が低下し、複合体の形成が未成熟の状態に留まり、細胞間に間隙が生じる可能性が考えられた

(Fig. 10)。そこで、Triton 分画法<sup>64)</sup> で調べたところ、正常水晶体中の *N*-カドヘリンは単独で存在する未成熟形と複合体で存在する成熟形の両分画にほぼ同程度に存在するが、白内障水晶体では未成熟形の *N*-カドヘリンが多いことが分かった。また、抗 *N*-カドヘリン抗体を用いた染色で白内障水晶体の細胞配列が無秩序で、しかも染色が水晶体核周囲部まで達しており、未成熟の状態<sup>65)</sup> であることも判明した。<sup>61)</sup>

水晶体において、タンパク間 (内) S-S 結合、タンパク-SH と GSH が結合したタンパク-S-S-G などは酸化ストレスに暴露されるとみられる現象で、そのために水晶体はタンパク-SH 基を保護あるいは還元するためのチオレドキシン、チオールトランスフェラーゼを有し、その際 GSH が重要な働きをしていると考えられている。<sup>66-68)</sup>

鶏胚水晶体でも同様のタンパク-SH 防御機構が存在し、LMW-PTP 活性などの酵素活性の維持を通して水晶体の密な構造形成に係わっている可能性があるため、引き続き研究中である。

## 9. おわりに

受精鶏卵は「生命誕生のカプセル」とも言われ、発生・分化<sup>69)</sup> やウイルス増殖の研究、催奇性試験など広い分野で使われてきた。

筆者らは、GC 薬の作用・副作用を解析する実験系として使用したところ、ヒトでみられる状態と類

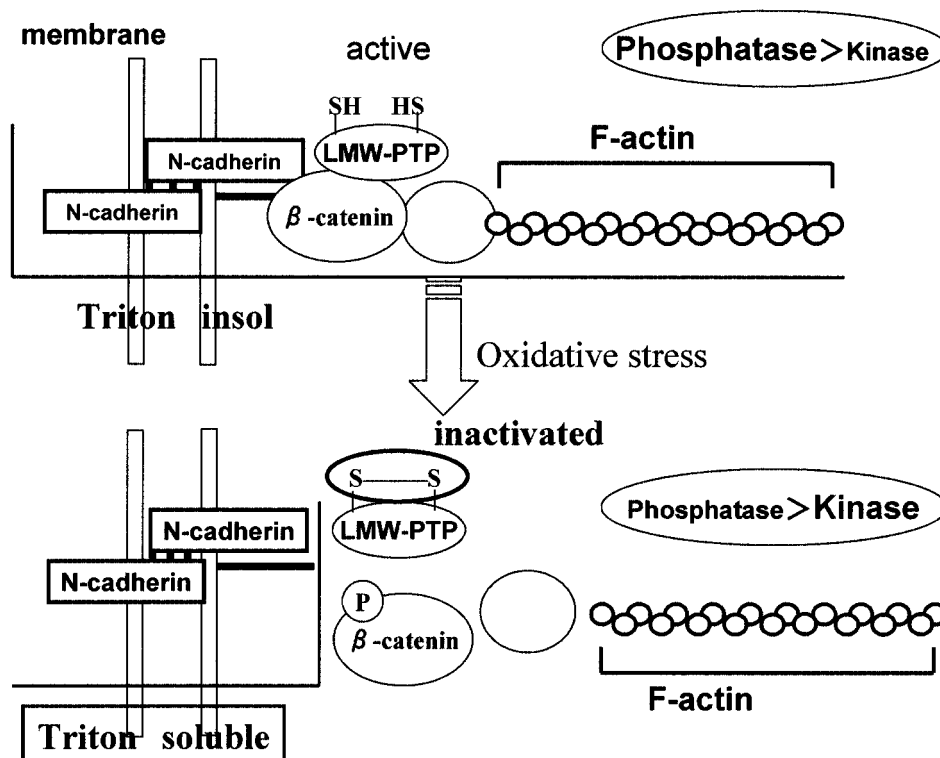


Fig. 10. Participation of LMW-PTP in Cadherin, Catenin and Actin Complex

似した「現象」が発現（メカニズムは不明だが）した。そして、副作用には白内障のように酸化ストレスが原因になっている場合もあり、アスコルビン酸などを用いれば抗炎症作用を損なわずに白内障の発症を抑制できる可能性を見出した。GC作用の発現機作の解析，特にプロダクト解析をすれば，薬効を維持した状態で副作用を軽減することができること，また有効な医薬品を開発できる可能性があることを再確認できた。

受精鶏卵・鶏胚は興味深い系で，医薬品の急性毒性試験（15日齢で投与し，48時間後に判定）を行うと，マウス，ラットの静脈注射のデータと極めて類似している結果が得られる。<sup>70)</sup> また，卵殻外培養法を作成すると鶏胚の挙動がビデオ撮影でき，例えばタバコ煙の水溶性分画（体重60kg当り1本分に相当）を滴下すると鶏胚の運動が緩慢になり，「紫煙の妊婦内胎児への影響？」を示唆するデータも得られる。<sup>71)</sup> 「こんな状態が繰り返されたのちに孵化したら，そのヒヨコは？」など，「発生中での環境変化と孵化後への影響—異常行動や代謝異常などの発現—」を研究する系としても有用である。

受精鶏卵・鶏胚を用いる実験は，受精卵自体が安

価なこと，設備として孵化用フラン器があれば，通電し，保湿用水を補給すれば，ほぼ同一条件で“n”の多い実験ができること，などから非常に経済的である。独立した閉鎖系内で，栄養分をリサイクルしながら孵化し，孵化すれば2本足で歩き回り，喋り始める，このドラマは驚異である。長所と短所を知り，限界を知って使用すれば利用価値は十分にあると思われる。

眼疾患の解明と予防・治療薬の開発については，「情報量の80%以上は目から入る」と言われているように，QOV（Quality of Vision）はQOLに大きく影響する。WHOは，「世界には約4500—5000万人（9割以上が途上国者）の失明者がいて，その2/3は避けられる失明である」という現状認識から，「2020年までに予防や治療で回避できる失明は解決しよう」と行動中である。白内障が原因となる失明は人工レンズとの置換手術法の進歩で防ぐことが可能になったが，世界的にみると高齢者の増加，紫外線被曝の広がり，栄養の過不足，医師不足と経済的問題などの理由から著増することが予測され，予防薬・治療薬の開発が望まれている。緑内障，糖尿病網膜症，加齢黄斑変性などの重篤な眼疾患は今後益

々増加することは確実視されているので、薬学からの協力が必要であることを強調したい。

この5—6年間は、薬学教育の見直し、実務実習の問題、教員の再教育、6年制論議等々についての喧騒があり、その間小生も流れに遅れないように教育ワークショップを手伝わせていただき、また学内では井上圭三学部長以下全教員の協力の下、渡邊真知子助教授とともに「事前教育・OSCEモデルの確立」<sup>72)</sup>に携わってきた。これらは、学生時代に「薬剤師とは？ 薬学とは？」と疑問を抱いていたにもかかわらず、以後はほとんどなにも行動してこなかったことに対する罪滅ぼしである。

6年制の第1期生がどのような教育を受け、CBTを受け、OSCEを受け、実務実習を受け、薬剤師国家試験を受け、どんな薬剤師さんに育っていくのか、どんな研究者に育っていくのか、そのための環境整備がどの程度できているのか、期待と不安を覚えながら拙稿を終える。

**謝辞** 研究は主として帝京大学薬学部薬剤学教室、RI中央研究施設、薬物治療学教室で行い、多くの先輩、同輩、後輩の助言、助力卒論生の協力があったて実施された。日米白内障研究機構からの受賞(1993, 2005), Gordon Research Conference (1990, 1992)での講演という身に余る機会を得られたのも皆様の御支援のおかげであり、列記させていただく諸兄姉にはとくに深謝申し上げます。帝京大学薬学部教員：故岩鶴素治教授、丸山一雄教授、LEE J.W.博士(現NIH, NEI)、林留女、山内靖久学士、小佐野博史教授、梅田泉助教授。大学院生(修士)：水村正史、石田理、背戸川卓、栢沼太郎、村上勲、柏康弘、田邊武士、高田慶、渡辺浩志、力丸純一、吉井雅人、横溝智章、仲井晋二、中田紘史、石井貴士、野村喬史、中村嘉孝、天野史子、手塚優、渡辺加小理の諸氏。浜道修生氏、本学以外の先生方：宇賀茂一博士(元北里大学医学部)、水野有武博士(元慈恵医科大学)、小木曾学博士(元東京工業大学)、疋田光史博士(参天製薬株式会社)、小原喜隆教授(元独協医科大学)、佐々木一之教授(金沢医科大学)、竹鼻眞教授(共立薬科大学)、故岩田修造教授。また、帝京大学薬学部においては、学部長故管孝男先生、野島庄七先生、遠藤浩良先生、井上圭三先生を始めとして、

多くの先生からの励ましをいただき、深甚より感謝します。

## REFERENCES

- 1) Nishigori H., Toft D., *J. Biol. Chem.*, **254**, 9155–9161 (1979).
- 2) Nishigori H., Toft D., *Biochemistry*, **1**, 77–83 (1980).
- 3) Nishigori H., Nishimura C., *Exp. Cell Res.*, **96**, 311–316 (1975).
- 4) Nishigori H., Nishimura C., *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1714–1717 (1975).
- 5) Nishigori H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 445–449 (1978).
- 6) Hench P. S., Kendall E. C., Slocumb H., Polley H. F., *Mayo Clin. Proc.*, **24**, 181–197 (1949).
- 7) Nishigori H., Lee J. W., Iwatsuru M., *Exp. Eye Res.*, **36**, 617–622 (1983).
- 8) Black R. L., Oglesby R., von Sallman L., Bunin J., *JAMA.*, **174**, 166–171 (1960).
- 9) Skalka H. W., Prehal J. T., *Arch. Ophthalmol.*, **98**, 1773–1777 (1980).
- 10) Debnath S. C., Abomelha M. S., Jawdat M., Chang R., Alkhaider A. A., *Ann. Ophthalmol.*, **19**, 435–437 (1987).
- 11) Urban R. C., Cotlier E., *Surv. Ophthalmol.*, **31**, 102–110 (1989).
- 12) Lorand L., Hsu L. K., Siefring Jr. G. E., Rafferty N. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 1356–1360 (1981).
- 13) Manabe S., Bucala R., Cerami A., *J. Clin. Invest.*, **74**, 1803–1810 (1984).
- 14) Ono S., *Ringan*, **32**, 9–16 (1978).
- 15) Maymann C. I., Miller D., Tijerina M. L., *Acta Ophthalmol.*, **57**, 1107–1116 (1979).
- 16) Dickerson Jr. J. E., Dotzel E., Clark A. F., *Exp. Eye Res.*, **65**, 507–516 (1997).
- 17) Nishigori H., Lee J. W., Yamauchi Y., Maruyama K., Iwatsuru M., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**, 168–174 (1987).
- 18) Jobling A. J., Augusteyn R. C., *Cli. Exp. Optom.*, **85**, 61–75 (2002).
- 19) Ogiso M., Hoshi M., Nishigori H., *Exp. Eye Res.*, **68**, 229–236 (1999).
- 20) Mizuno A., Nishigori H., Iwatsuru M., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **30**, 132–137 (1989).
- 21) Uga S., Nishigori H., Ishikawa S., *Graefes*

- Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **232**, 415–420 (1994).
- 22) Lee J. W., Iwatsuru M., Nishigori H., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **11**, 533–541 (1995).
- 23) Moscona A. A., Piddington R., *Science*, **158**, 496–497 (1967).
- 24) Kosano H., Nishigori H., *Dev. Ophthalmol.*, **35**, 161–168 (2002).
- 25) Watanabe H., Kosano H., Nishigori H., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1846–1852 (2000).
- 26) Groyer A., Bouc Y. L. E., Joab I., Radanyi C., Renoir J.-M., Robel P., Baulieu E. E., *Eur. J. Biochem.*, **149**, 445–451 (1985).
- 27) Schweizer-Groyer G., Cadepond F., Groyer A., Idziorek T., Mariller M., Baulieu E. E., *J. Steroid Biochem.*, **30**, 291–294 (1988).
- 28) Nishigori H., Kosano H., Umeda I. O., Nishigori H., *Life Sci.*, **75**, 3027–3033 (2004).
- 29) Hamamichi S., Kosano H., Naka S., Umeda I. O., Nishigori H., *Exp. Eye Res.*, **77**, 575–580 (2003).
- 30) Tanabe T., Kosano H., Nishigori H., Abstract of papers, US-JAPAN Cooperative Cataract Research Group Meeting, Kona, Hawaii, October 1997, p. 65.
- 31) Oikarinen A., *Med. Biol.*, **65**, 199–202 (1987).
- 32) Mayes A., “Harper’s Biochemistry,” 25th ed., Simon & Schuster, New York, 1996, p. 198.
- 33) Lee J. W., Iwatsuru M., Nishigori H., *Curr. Eye Res.*, **10**, 629–635 (1991).
- 34) Kosano H., Watanabe H., Nishigori H., *Exp. Eye Res.*, **72**, 643–648 (2001).
- 35) Kinoshita J. H., Merola L. O., Dikmak E., *Exp. Eye Res.*, **1**, 405–410 (1962).
- 36) Kinoshita J. H., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **13**, 713–724 (1974).
- 37) Chiou S. H., Chylack Jr. L. T., Bunn F. H., Kinoshita J. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 894–898 (1980).
- 38) Nishigori H., Lee J. W., Yamauchi Y., Iwatsuru M., *Exp. Eye Res.*, **49**, 515–522 (1989).
- 39) Nishigori H., Lee J. W., Iwatsuru M., *Ophthalmic Res.*, **27**, 350–355 (1995).
- 40) Reddy V. N., *Exp. Eye Res.*, **50**, 771–778 (1990).
- 41) Spector A., *FASEB. J.*, **9**, 1173–1182 (1995).
- 42) Mibu H., Nagata M., Hikida M., *Exp. Eye Res.*, **58**, 85–90 (1994).
- 43) Nishigori H., Lee J. W., Iwamoto Y., Hayashi R., Maruyama K., Iwatsuru M., *Life Sci.*, **35**, 981–985 (1984).
- 44) Nishigori H., Lee J. W., Yamauchi Y., Iwatsuru M., *Biochem. Int.*, **13**, 147–153 (1986).
- 45) Nishigori H., Hayashi R., Lee J. W., Yamauchi Y., Iwatsuru M., *Curr. Eye Res.*, **5**, 37–40 (1986).
- 46) Murakami I., Kosano H., Ogihara-Umeda I., Nishigori H., Uga S., Ishikawa S., *Exp. Eye Res.*, **63**, 673–681 (1996).
- 47) Lee J. W., Iwatsuru M., Nishigori H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 655–660 (1998).
- 48) Nishigori H., Ishida O., Umeda I. O., *Life Sci.*, **52**, 305–312 (1993).
- 49) Harding J. J., “Biochemistry of the Eye,” ed. by Harding J. J., Chapman & Hall Medical London, 1997, pp. 94–133.
- 50) Nishigori H., Hayashi R., Lee J. W., Maruyama K., Iwatsuru M., *Exp. Eye Res.*, **40**, 445–451 (1985).
- 51) Nishigori H., Yasunaga M., Mizumura M., Lee J. W., Iwatsuru M., *Life Sci.*, **5**, 593–598 (1989).
- 52) Nishigori H., Hayashi R., Lee J. W., Iwatsuru M., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**, 1051–1055 (1984).
- 53) Setogawa T., Kosano H., Ogihara-Umeda I., Kayanuma T., Nishigori H., *Exp. Eye Res.*, **58**, 689–695 (1994).
- 54) Horwitz J. H., Jaffe N. S., “Lens and Cataract, Vol 3, Textbook of Ophthalmology,” eds. by Podos S. M., Yanoff M., Gower Medical Publishing, New York, 1992.
- 55) Kikuchi K., *Seikagaku*, **10**, 1247–1254 (2005).
- 56) Umeda I. O., Kashiwa Y., Nakata H., Nishigori H., *Life Sci.*, **73**, 1161–1173 (2003).
- 57) Umeda I. O., Nakata H., Nishigori H., *Exp. Eye Res.*, **79**, 385–392 (2004).
- 58) Umeda I. O., Kashiwa Y., Nishigori H., *Exp. Eye Res.*, **73**, 123–132 (2001).
- 59) Tezuka Y., Umeda I., Nishigori H., Abstract of papers, US-JAPAN Cooperative Cataract Research Group Meeting, Kona, Hawaii, October 2005, p. 64.
- 60) Taddei M. L., Chiarugi P., Cirri P., Francesca Buricchi F., Fiaschi T., Giannoni E., Talini D., Raugei G., Giampietro Ramponi G., *Can-*

- cer. Res.*, **62**, 6489–6499 (2002).
- 61) Amano F., Umeda I., Nishigori H., Abstract of papers, US-JAPAN Cooperative Cataract Research Group Meeting, Kona, Hawaii, October 2005, p. 60.
- 62) Heneberg P., Draber P., *Curr. Med. Clin. Chem.*, **12**, 1859–1871 (2005).
- 63) Caselli A., Marzocchini R., Camici G., Manao G., Moneti G., Pieraccini G., Ramponi G., *J. Biol. Chem.*, **273**, 32554–32560 (1998).
- 64) Leong L. A., Menko S., Grunwald G. B., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 3503–3510 (2000).
- 65) Beebe D. C., Vasiliev O., Guo J., Sbui Y., Bassnett S., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 727–734 (2001).
- 66) Gladyshev V. N., Liu A., Novoselov S. V., Krysan K., Sun Q. A., Kryukov V. M., Kryukov G. V., Lou M. F., *J. Biol. Chem.*, **276**, 30374–30380 (2001).
- 67) Raghavachari N., Qiao F., Lou M. F., *Exp. Eye Res.*, **68**, 715–724 (1999).
- 68) Qiao F., Xing K., Liu A., Ehlers N., Raghavachari N., Lou M. F., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 743–751 (2001).
- 69) Mizuno T., *Iden*, **5**, 71–73 (1997).
- 70) Nishigori H., Mizumura M., Iwatsuru M., *Cell Biol. Toxicol.*, **8**, 255–265 (1992).
- 71) Hamamichi S., Nishigori H., *Toxicol. Lett.*, **119**, 95–102 (2001).
- 72) *Yakuji-Nippou*, No. **10087**, 15–19 (2005).