

螢光造影法・組織検査による結膜の加齢変化

高橋 明宏¹⁾, 沖坂 重邦¹⁾, 明尾 潔¹⁾, 武谷ピニロピ²⁾

¹⁾防衛医科大学校眼科学教室, ²⁾武谷病院眼科

要 約

球結膜の加齢変化を調べる目的で, 糖尿病, 高血圧症のない全身的に健康な白内障術前患者 35 例 35 眼の結膜螢光造影法による結膜の螢光造影面積, および球結膜組織標本から上皮基底細胞のメラニン顆粒, 実質中の血管および肥満細胞について検討した。結膜螢光造影法では, 球結膜のフルオレセイン造影面積は加齢とともに増加していた。組織学的検索では, 結膜実質毛細血管の加齢に伴う狭細化はほとんどなかったが, メラニン顆粒を有する基底細胞と脱顆粒している肥満細胞の数は年代と正の相関があり, 加齢に伴って有意に増加することが判明した。以

上のことから, 加齢に伴う結膜血管の狭細化は起こらないが, 加齢により毛細血管の脆弱化が示され, 内皮細胞, 周皮細胞の機能は低下していると思われる。また, 加齢に伴う上皮基底細胞のメラニン増加はメラニンの生合成および崩壊経路の障害が原因となり, 脱顆粒した肥満細胞の増加は外的刺激や生物活性物質の代謝異常によるものと考えられる。(日眼会誌 100:296-301, 1996)

キーワード: 結膜, 加齢変化, 血管, メラニン顆粒, 肥満細胞

Aging Changes in Conjunctiva Visualized by Fluorescein Angiography and Histopathology

Akihiro Takahashi¹⁾, Shigekuni Okisaka¹⁾, Kiyoshi Akeo¹⁾
and Piniropi Taketani²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

²⁾Eye Clinic, Taketani Hospital

Abstract

In order to investigate the aging changes of the conjunctiva, we examined fluorescein-positive areas by fluorescein angiography. The deposition of melanin in basal cells, the degranulation of mast cells, and the lumens of capillaries were examined by light microscopy in 35 cataractous eyes without diabetes or hypertension. The fluorescein leakage increased with aging. The number of basal cells with deposition of melanin granules and mast cells with degranulation correlated significantly with aging. On the other hand, the narrowing of capillary lumens in conjunctival stroma was not observed with aging. Based on the above results, we conclude

that the weakness of the conjunctival vessels without the narrowing of capillary lumens might be caused by functional disorder of the endothelium and pericytes. The increase of deposition of melanin granules in basal cells may be caused by the breakdown of the metabolic pathway of melanin. Long-time mechanical stimuli and metabolic disorders of active substances may increase the degranulation of mast cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 100:296-301, 1996)

Key words: Conjunctiva, Aging changes, Blood vessels, Melanin granules, Mast cells

I 緒 言

高齢になると, 結膜は若年者に比べて透明性を減じ, 表面の凹凸不整が目立ってくる。組織学的には, 上皮細胞は角化傾向を示してくる。上皮組織は萎縮し, 実質には硝

子様変性や脂肪沈着が起こり, 弾性線維の消失も認められるようになる。このような結膜の概説的な加齢変化については報告¹⁾されているが, 角膜, ぶどう膜, 網膜などの組織での報告^{2)~4)}のような, 経時的に観察した加齢変化についての報告はみられない。そこで著者らは, 球結膜

別刷請求先: 359 埼玉県所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 沖坂 重邦

(平成7年4月6日受付, 平成7年12月12日改訂受理)

Reprint requests to: Shigekuni Okisaka, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama-ken 359, Japan

(Received April 6, 1995 and accepted in revised form December 12, 1995)

毛細血管の透過性の加齢変化を調べる目的で年齢群毎に結膜蛍光造影法を行うとともに、組織学的にも毛細血管、基底細胞、肥満細胞の変化についても検討し、興味ある知見を得たので、ここに報告する。

II 実験方法

対象として、防衛医科大学校病院眼科および武谷病院眼科における白内障手術前患者のうち、本研究に対する説明と文書による同意の得られた42~82歳の35例を用いた。対象患者はすべて、高血圧症、糖尿病などの全身疾患を認めず、前眼部に炎症所見を認めなかった。年代別に分けると、40~49歳6眼、50~59歳8眼、60~69歳8眼、70~79歳11眼、80歳以上2眼であった。手術2日前に結膜蛍光造影検査を行い、白内障手術時に結膜の一部を切除し組織学的検索を施行した。

1. 結膜蛍光造影法を用いた検査

前眼部撮影装置(フォトリットカメラ, コーフ SC-6)に蛍光造影ユニットを取りつけ、腕正中静脈から10%フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®) 5mlを静注し撮影した。撮影時、対象者には下方約30度を固視させ、12時方向角膜輪部から上方約3mmの球結膜が正面にくるようにして撮影を行った。静注後、どの年齢においても前毛様動脈が造影される時間が20~23秒であり、静脈系の血管が造影される時間が30秒以上かかり、静注50秒ではどの症例でも均一な血管像が得られたので、それぞれの症例で静注後50秒前後の写真を選択した。撮影したフィルムをキャビネに拡大し(図1)、12時角膜輪部から上方1.5mm離れた部位から4.5mm離れた部位までの正方形(縦3mm×横3mm)の範囲に限定し、その中で蛍光漏出領域の割合を画像処理装置(東芝, TOSPIX U)を用い計測し、加齢により蛍光造影面積が変化しているかどうか検討した。

2. 組織学的検索

白内障手術時に12時の角膜輪部から3~4mm上方の結膜を一部切除し(縦1mm×横3mm)、2.5%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド混合液(pH 7.2, 0.15 M 燐酸緩衝液)で固定、エタノール系列脱水後、JB-4包埋した。組織の中央部分厚さ3 μ mの連続組織片から無作為に10枚を選び1%アズールII染色した後、40倍対物レンズを用いて光学顕微鏡写真を撮影した。キャビネに拡大した写真を画像処理装置(日本アピオニクス, SPICCA II)を用い、結膜の毛細血管内腔面積を計測し、40代、50代、60代、70代、80代に分け面積を比較検討した。また、結膜上皮および実質を観察し、上皮基底細胞内メラニン顆粒の沈着、実質中の肥満細胞の脱顆粒についても加齢変化がみられるかどうか検討した。

3. 統計学的検索

統計学的検索にはフルオレセインの結膜血管内および血管外に漏出していた面積、結膜の毛細血管内腔面積、メ

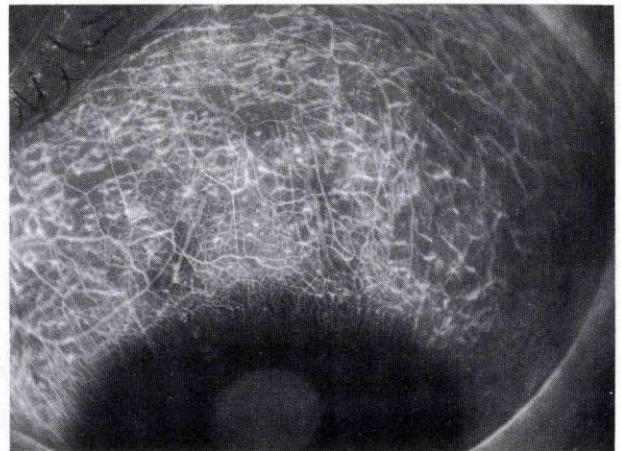


図1 結膜蛍光造影写真(フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)注入後50秒, 48歳)。

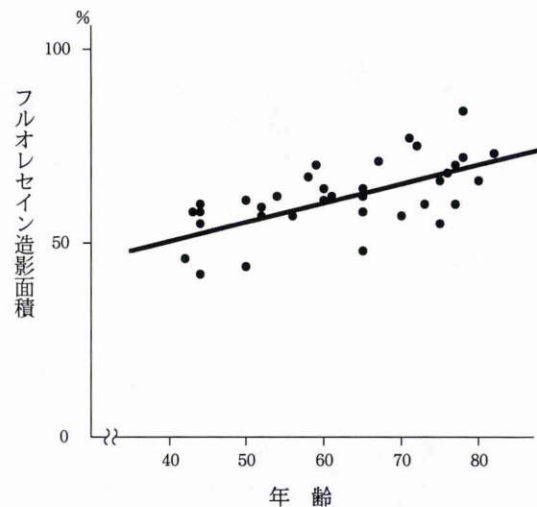


図2 加齢とフルオレセイン造影面積(%)の関係。
 $Y=7.765+0.884 X, r=0.65, n=35, p<0.01$

ラニン顆粒を有する基底細胞数(基底細胞50個当たり)、肥満細胞数(結膜上皮0.5mm当たり)を従属変数、年代を独立変数とした直線回帰分析を用い、各々について相関係数、回帰係数の算出を行った。コンピュータソフトウェアとして、Sigma Stat(Jandel Scientific Co, USA)を使用した。

III 結果

1. 結膜蛍光造影法

結膜蛍光造影写真(図1)から、フルオレセインが造影されている面積を計算した。各年代毎の平均は、40代が53.39%、50代が58.57%、60代が60.96%、70代が67.84%、80代が69.62%であり、加齢に伴い増加していた。直線回帰分析による統計処理をすると相関係数は $r=0.65(p<0.0001)$ であり、フルオレセインの造影された面積と年齢の間には正の有意な相関が認められ、加齢とともにフルオレセインの造影されている面積が有意

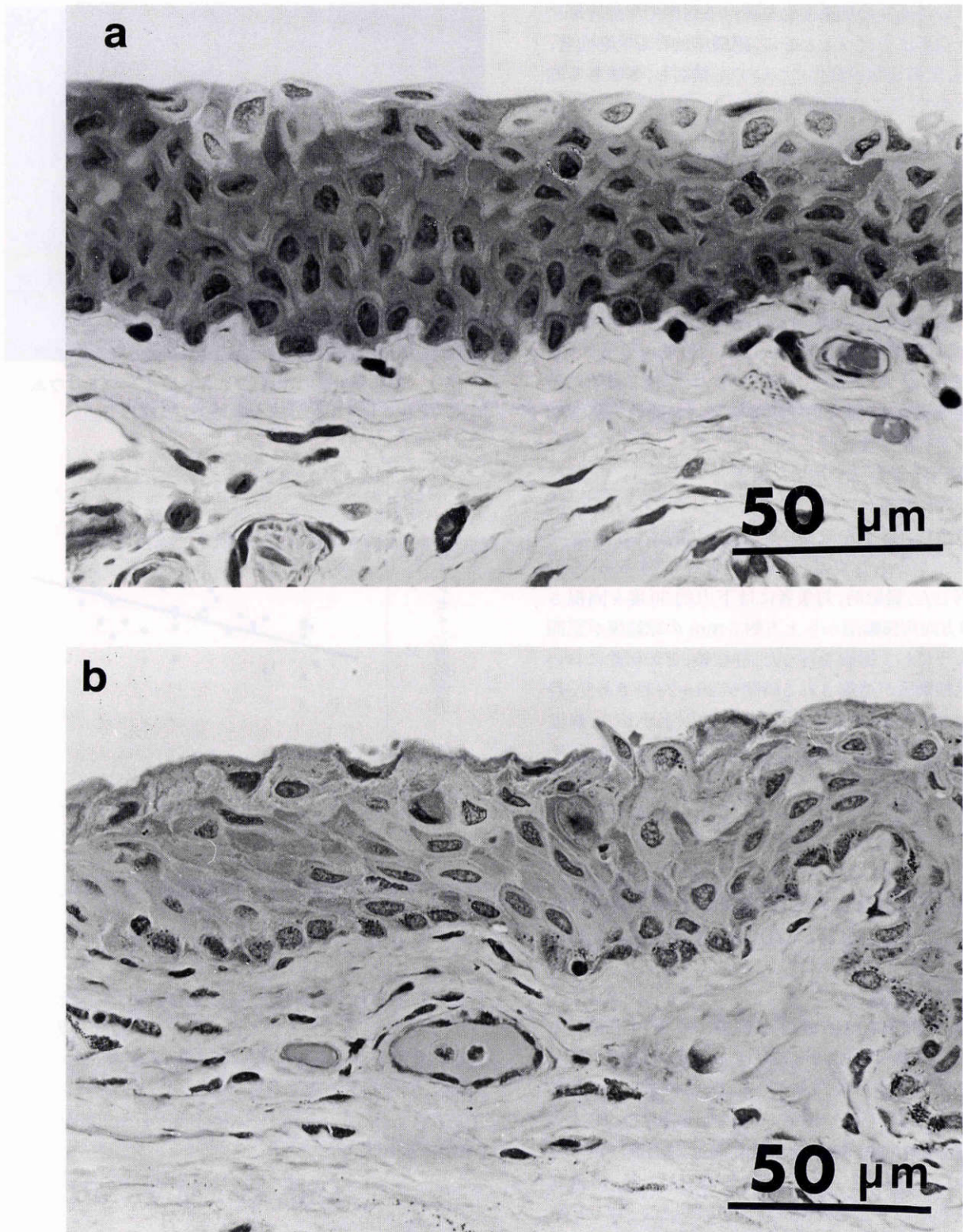


図3 結膜上皮および実質の光学顕微鏡写真(アズールII染色).

a: 48歳. 結膜上皮基底細胞にメラニン顆粒が認められず, 肥満細胞は脱顆粒していない. b: 84歳. 上皮基底細胞にメラニン顆粒が認められ, 脱顆粒している肥満細胞も多数認められる.

に増加していることが明らかになった.

2. 組織学的検索(図3)

結膜毛細血管内腔の面積は, 40代では $3.26 \pm 0.53 \times 10^{-4} \text{mm}^2$, 50代は $2.41 \pm 0.39 \times 10^{-4} \text{mm}^2$, 60代は $2.44 \pm$

$0.63 \times 10^{-4} \text{mm}^2$, 70代は $2.88 \pm 0.69 \times 10^{-4} \text{mm}^2$, 80代は $2.36 \pm 0.43 \times 10^{-4} \text{mm}^2$ となった. 50代と60代と比べるとほとんど毛細血管内腔面積に差がみられず, 各年代毎の血管内腔面積を t 検定により比較したが, 統計的な有

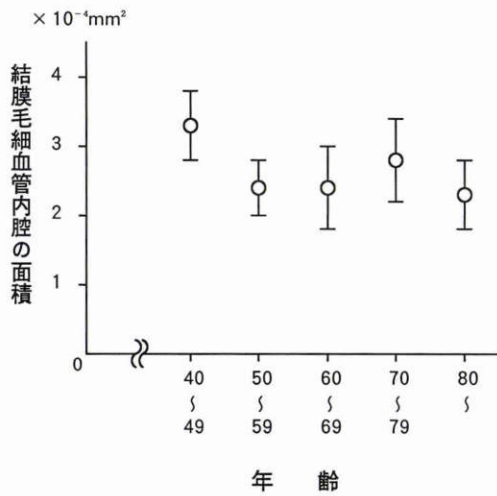


図 4 加齢と結膜毛細血管内腔の面積の関係。

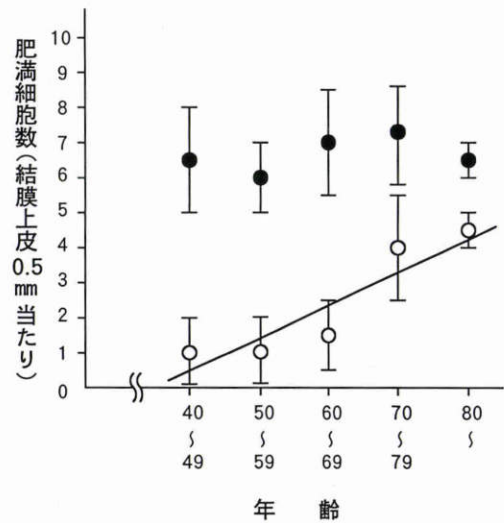


図 6 加齢と結膜実質中肥満細胞の関係。

●は肥満細胞総数, ○は脱顆粒した肥満細胞数を示す。
 $Y = -2.95 + 0.0896 X, r = 0.54, n = 26, p < 0.005$

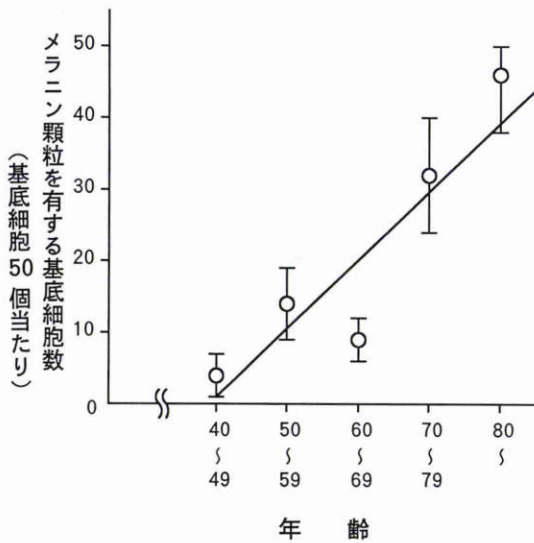


図 5 加齢とメラニン顆粒を有する結膜上皮基底細胞の関係。

$Y = -36.8 + 0.946 X, r = 0.72, n = 27, p < 0.0001$

意差はなく、直線回帰分析による統計処理によっても血管内腔面積と年代との間には有意な相関は認められなかった(図 4)。

結膜上皮の観察では、高齢者には上皮基底細胞内にメラニン顆粒の沈着が多く認められた。上皮基底細胞 50 個あたりにメラニン顆粒が認められる基底細胞数を各年代毎に測定すると、40代は 4.3 ± 2.5 個、50代は 14.7 ± 3.6 個、60代は 8.8 ± 2.1 個であったが、70代は 32.8 ± 8.3 個、80代は 43.5 ± 4.5 個であり、70歳以上ではメラニン顆粒の分布が多く認められた。メラニン顆粒を有する基底細胞数と年代との相関を直線回帰分析により検討したところ、相関係数は $r = 0.72 (p < 0.0001)$ と正の有意な相関が認められ、メラニン顆粒を有する基底細胞は加齢に伴い有意に増加することが統計学的に証明された(図 5)。

結膜実質では肥満細胞の変化が著明であった。肥満細

胞数自体は、切片上の結膜上皮 0.5 mm 当たりの実質で測定すると、40代は 6.7 ± 1.7 個、50代は 5.7 ± 1.5 個、60代は 6.8 ± 2.2 個、70代は 7.2 ± 1.8 個、80代は 6.5 ± 0.5 個と著明な数の変化は認められなかった。しかし、脱顆粒している肥満細胞数を同様に測定すると、40代は 1.2 ± 1.1 個、50代は 1.2 ± 1.1 個、60代は 1.7 ± 0.9 個であったが、70代は 3.8 ± 2.1 個、80代は 4.5 ± 0.5 個となり、70歳以上では著明に脱顆粒している肥満細胞が多く認められた。さらに、直線回帰分析により脱顆粒している肥満細胞数と年代の間には正の相関 ($r = 0.54, p < 0.005$) が示され、肥満細胞数自体は加齢により変化を受けないが、脱顆粒している肥満細胞数は加齢に伴って有意に増加することが判明した(図 6)。

IV 考 按

蛍光造影検査法による前眼部についての報告^{9)~11)}は数多くみられる。今までの報告では、血管動態から前毛様体動脈を静脈と定義すべきであるという報告⁹⁾や、結膜炎および強膜炎など病的な疾患での血管透過性亢進を示す報告⁹⁾がある。しかし、加齢に伴い結膜に変化が生じるかどうかに関しては検討されていないようである。今回の著者らの実験結果では、加齢とともに結膜にフルオレセインの造影されている程度が強くなっていくという結果が得られた。蛍光造影面積が広がるということは、組織学的検索で血管内腔面積が各年代でほぼ一定であることから、血管の透過性亢進を反映しているのではないかと推測する。蛍光造影検査で球結膜に観察される血管には上強膜毛細血管と結膜毛細血管の 2 種類がある。正常眼では、結膜毛細血管には血管外へのフルオレセインの漏出がなく、上強膜毛細血管のみに血管の透過性があるといわれ、結膜炎、強膜炎などの病的な状態では結膜毛細血

管も上強膜毛細血管とともに血管の透過性が亢進するといわれている¹⁰⁾¹¹⁾。今回の我々の実験では、その両者を合わせて計測しているため、どちらの血管からの透過性が亢進しているかについては検討されていないが、加齢とともに毛細血管の透過性が亢進していることが明らかになった。血管の透過性とは、血管内腔物質が血管壁を通過して血管外に出ていく状態を意味する。血管内皮の透過機構は、内皮細胞間の接着部に存在する狭い間隙を経由する輸送、小胞(パイノサイトーシス)による輸送、内皮細胞の細胞膜を通る輸送、内皮細胞間の大きな間隙を通る輸送などの経路がある¹²⁾¹³⁾。それらの機構の一つ、あるいは多数が組み合わさり、血液成分が内皮細胞の外側に漏出していくものと考えられている。加齢とともに、血管内皮細胞の形態および機能の脆弱化が起こり、上記の血管内皮細胞の透過機構に変化が生じ、血管の透過性亢進が進むものと思われる。

組織学的検索では、加齢に伴う結膜毛細血管内腔の狭細化はほとんどみられないが、結膜上皮基底細胞のメラニン顆粒の沈着および結膜実質内の脱顆粒した肥満細胞の増加が観察された。

虹彩での血管構造の加齢変化としては、血管壁の基底膜の肥厚、細胞内小器管の発達を伴う周皮細胞の増生、輪状結合織である外膜の肥厚が挙げられている²⁾¹³⁾¹⁴⁾。血管内腔の減少が起こることということは、内皮細胞、周皮細胞の機能低下との関連があると考えられている。これに反し、加齢に伴う結膜血管の内腔の狭細化がほとんど認められなかったことは、眼内にある虹彩血管とは加齢に対する反応が異なっているように思われる。

組織学的検索では、高齢者の結膜上皮基底細胞内にメラニン顆粒の増加が観察された。表皮メラノサイトはメラニンを生成する細胞であり、神経堤から発生する。皮膚科領域では、メラノサイトの生成物であるメラノソームは、その隣接する表皮細胞に移動または分泌されており、皮膚の色はメラノサイトから移動した基底細胞内のメラノソームの量に左右される。メラニンがメラノソームにおいて好気性オキシダーゼであるチロジナーゼの作用によりチロジンから生合成され、ドーパ、ドーパキノンを経てメラニンが合成される。また、皮膚表皮では、メラノソームからメラノサイトへの移行の際、メラノサイトの分泌作用と表皮細胞貪食作用が一緒になってメラノサイトの樹枝状突起が伸長して表皮細胞に貪食され、貪食された後、phagolysosome内に崩壊される^{15)~17)}。皮膚表皮内のメラニン顆粒は加齢とともに増加していることが知られており、結膜上皮基底細胞においても、加齢に伴い、メラニンの生合成経路および崩壊経路において代謝障害が起こり、メラニン顆粒の増加が生じてくるものと考えられる。

肥満細胞は結合組織に富んだ皮膚、粘膜下層などにおいて、主として小血管や神経の周囲に散在性に分布する

細胞で、その原形質内に好塩基性の顆粒を有する細胞である¹⁸⁾。顆粒内にはヒスタミン、セロトニンなどのアミン類、ヘパリンなどの酸性ムコ多糖類、プロテアーゼなどの各種酵素類を有し、薬理的に活性のある物質を産生し顆粒中に貯蔵している。肥満細胞の脱顆粒の原因としてよく知られているのはI型のアレルギー反応である。肥満細胞の表面にはIgEに対するレセプターが存在し、抗原が結合すると脱顆粒が起こる。しかし、肥満細胞の脱顆粒はアレルギー反応だけではなく、物理的・化学的・種々のホルモンの刺激によって制御を受けている¹⁹⁾²⁰⁾。脱顆粒は細胞内の環状ヌクレオチド、cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)とcyclic guanosine monophosphate (cGMP)の濃度によって調節されている。cAMPの濃度上昇やcGMPの合成阻害は脱顆粒を抑制する方向で働き、逆にcAMPの合成阻害、cGMPの濃度上昇は脱顆粒に促進的に作用する。cAMPの合成を促進する物質としてヒスタミン、コーチゾンなどがあり、逆に抑制する物質としてプロスタグランジンE₂、Ca²⁺、アセチルコリンなどがある。また、放出された顆粒に対しては抗ヒスタミン剤や好酸球の産物によって調節を受けている。結膜実質内の組織学的検索では、加齢により脱顆粒した肥満細胞の増加が認められたが、この増加の要因はI型アレルギー反応によってではなく、手術時の洗眼による機械的な刺激が最も考えられ、肥満細胞内のホルモン、生物活性物質の代謝過程も機械的・化学的による脱顆粒に促進的な方向に作用しているのではないかと考えられる。

翼状片も加齢に伴い増加進行し、結膜上皮下にも脱顆粒した肥満細胞が多数認められること²¹⁾から、翼状片の発生病理と結膜の加齢変化との間に相関が存在するのかもしれない。

本研究を遂行するにあたり、種々なるご高配を賜った順天堂大学医学部眼科学教室金井 淳教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 沖坂重邦：眼病理(41) 加齢変化、病理と臨床 10：187—196, 1992.
- 2) 木村泰朗, 沖坂重邦, 樋渡正五：加齢による虹彩の形態学的変化。眼紀 32：2325—2333, 1981.
- 3) 沖坂重邦, 工藤正人：ぶどう膜の老人性変化。眼科Mook, 29, 老人と眼, 金原出版, 東京, 138—146, 1986.
- 4) Marshall J: The aging retina. Eye 1: 282—295, 1987.
- 5) 池上宗洋：前眼部蛍光造影, その1. 前毛様血管。日眼会誌 78: 371—385, 1974.
- 6) 池上宗洋, 丸山明信：前眼部蛍光造影, その2. 上強膜と結膜血管系との相互関係。日眼会誌 79: 1393—1404, 1975.
- 7) Meyer PAR: Patterns of blood flow in episcleral vessels studied by low dose fluorescein videangiography. Eye 2: 533—546, 1988.
- 8) Talusan ED, Schwartz B: Fluorescein angiography. Arch Ophthalmol 99: 1074—1080, 1981.

- 9) **Meyer PAR:** The circulation of the human limbus. *Eye* 3: 121-127, 1989.
- 10) **Meyer PAR, Watson PG:** Low dose fluorescein angiography of the conjunctive and episclera. *Br J Ophthalmol* 71: 2-10, 1987.
- 11) **Watson P, Booth-Mason S:** Fluorescein angiography in the differential diagnosis of sclerokeratitis. *Br J Ophthalmol* 71: 145-151, 1987.
- 12) **山元寅男:** 血管透過の形態. *脈管学* 18: 5-10, 1978.
- 13) **山元寅男, 奥田隆司:** 血管透過性の超微形態学. *脈管学* 21: 99-102, 1981.
- 14) **山之内守:** 加齢に伴う人眼虹彩血管の電子顕微鏡像に関する研究. *日眼会誌* 73: 767-784, 1969.
- 15) **生寺 貞:** 皮膚におけるメラニン代謝について. *日皮会誌* 88: 763-789, 1978.
- 16) **生寺 貞, 棚橋善郎:** メラノサイトの微細構造と機能. *細胞* 4: 16-25, 1972.
- 17) **三島 豊:** 色素異常症, 色素細胞内 eumelanin 生成機構. *現代皮膚科学大系*: 中山書店, 東京, 10-23, 1983.
- 18) **谷奥喜平, 三浦 修, 野口義圀, 旗野 倫:** 真皮性アレルギーの病理. *皮膚と免疫アレルギー*: 金原出版, 東京, 49-86, 1974.
- 19) **柏木 登, 大谷文雄:** 抗原の排除. *図説免疫, 免疫応答のしくみ*: 日経サイエンス社, 東京, 114-177, 1985.
- 20) **市川 厚, 斉藤光貫:** 肥満細胞の機能と顆粒の生化学. *蛋白質核酸酵素* 23: 865-877, 1978.
- 21) **門田裕子:** 翼状片の発生機序について. *日眼会誌* 91: 324-334, 1987.