

糖尿病患者における角膜自発蛍光の検討

石野 豊¹⁾, 横井 則彦¹⁾, 安原 徹¹⁾, 山崎 俊秀¹⁾,
小泉 閑¹⁾, 池田 恒彦²⁾, 木下 茂¹⁾

¹⁾京都府立医科大学眼科学教室, ²⁾大阪医科大学眼科学教室

要 約

目的：糖尿病患者における角膜自発蛍光の検討を行った。

対象と方法：インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)患者 28 名 28 眼, 健常対象者 67 名 67 眼を対象とした。全例に対し還元型ピリジンヌクレオチド(PN)および、ペントシジン, ピラリンを除く advanced glycation end-product (AGE)の蛍光波長を含む前眼部フルオロフォトメータを用いて, 角膜自発蛍光を測定した。NIDDM 患者群に対しては血液検査を施行し, 角膜自発蛍光と血液中の糖尿病のパラメータ, 年齢, 糖尿病罹病期間との相関について検討した。

結 果：角膜自発蛍光強度は NIDDM 患者では健常

者に比べて有意に高かった($p < 0.0001$)。各種の糖尿病の血中パラメータと角膜自発蛍光強度の間には有意の相関はなかった(すべて $r < 0.4$)。健常者において, 角膜自発蛍光強度は年齢と正の相関があった($r = 0.438$)。

結 論：糖尿病患者の角膜の角膜自発蛍光の高値は, 角膜における PN および AGE の増加と関係がある可能性が推定された。(日眼会誌 104 : 572—576, 2000)

キーワード：角膜自発蛍光, 還元型ピリジンヌクレオチド, Advanced glycation endproduct, フルオロフォトメトリ

Investigation of Corneal Autofluorescence in Diabetic Patients

Yutaka Ishino¹⁾, Norihiko Yokoi¹⁾, Toru Yasuhara¹⁾, Toshihide Yamasaki¹⁾, Kan Koizumi¹⁾
Tsunehiko Ikeda²⁾ and Shigeru Kinoshita¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

Abstract

Purpose : The investigation of corneal autofluorescence in diabetic patients.

Objects and Methods : Corneal autofluorescence was investigated with a newly developed fluorophotometer (wave length : excitation, 290 ~ 390 nm ; emission, 430 ~ 630 nm) having, fluorescence characteristics involving those of reduced pyridine nucleotides (PN) and advanced glycation endproduct (AGE) except pentosidine and pyrrolidine. Twenty-eight patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and sixty-seven healthy volunteers were studied.

Results : The corneal autofluorescence was 1.65

times higher than that of controls ($p < 0.0001$). In non-insulin-dependent diabetes mellitus, the corneal autofluorescence was not correlated significantly with various diabetic parameters in blood ($r < 0.4$). In controls, the corneal autofluorescence was correlated significantly with age ($r = 0.438$).

Conclusion : The corneal autofluorescence has some relation with PN and AGE accumulation in the cornea. (J Jpn Ophthalmol Soc 104 : 572—576, 2000)

Key words : Corneal autofluorescence, Reduced pyridine nucleotides, Advanced glycation endproduct, Fluorophotometry

I 緒 言

我々は先に, 最も一般的な蛍光色素であるフルオレセ

イン励起用のフルオロフォトメータを用いて糖尿病患者の角膜自発蛍光強度が高値になっていることを報告した¹⁾。しかし, 自発蛍光の由来は現在までのところ明確で

別刷請求先：602-0841 京都市上京区河原町通広小路ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 横井 則彦
(平成 11 年 5 月 20 日受付, 平成 11 年 12 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to: Norihiko Yokoi, M.D., Ph.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajicho, Hirokoji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received May 20, 1999 and accepted in revised form December 6, 2000)

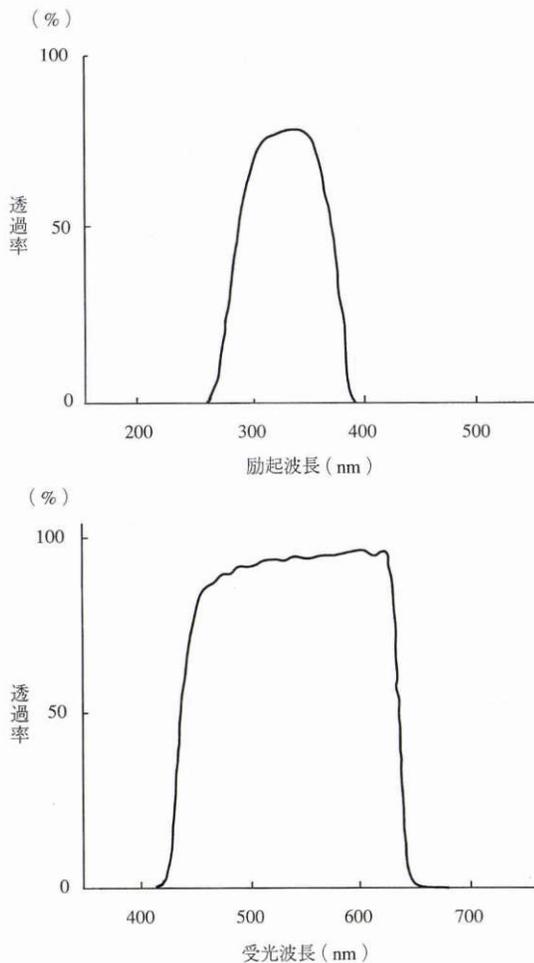


図 1 今回使用したフルオロフォトメータのフィルタの分光特性。

はない。

糖尿病と角膜との関連では、糖尿病角膜症において、ポリオール経路との関連²⁾³⁾が推定されている。ポリオール経路の活性に伴って組織における還元型ピリジンヌクレオチド(以下、PN)の濃度が上昇することが知られており⁴⁾⁵⁾、このPNは、一方で蛍光特性を持つこと知られている。さらに、糖尿病の病態においては、近年、advanced glycation endproduct(以下、AGE)が注目されており⁶⁾⁷⁾、AGEもまた蛍光特性を持つことが知られている。つまり、蛍光特性を有するPN、AGEは糖尿病の病態と関連があると考えられ、PNおよびペントシジンを除くAGEの蛍光波長を含むフルオロフォトメータを用いることで、糖尿病と角膜自発蛍光の関係が明確になるのではないかと考え、それについて検討した結果、若干の知見が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 対象

対象は、1998年7～11月の間に当科外来を受診したインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)患者28名28眼〔年

齢 59.3 ± 11.2 (平均値 \pm 標準偏差)、33～74歳、男性17名、女性11名〕、健常対象者67名67眼(年齢 51.2 ± 20.0 歳、8～85歳、男性21名、女性46名)である。健常対象者群では眼疾患のある例、コンタクトレンズ装用者、点眼治療を受けている例は除外した。また、NIDDM群ではこれら以外に内眼手術既往例、糖尿病以外に内科的疾患の既往のある例を除外した。また、今回は糖尿病角膜上皮症を伴わないサブクリナルな例での角膜の自発蛍光を検討するため、フルオレセイン染色で角膜上皮障害のある例は、健常対象者群、NIDDM群とも除外した。

2. 方法

本研究は、京都府立医科大学における人間を直接対象とする医学研究審査委員会の承認を受けた(HRC-5)。

角膜自発蛍光の測定には、既報⁸⁾のスリット型前眼部フルオロフォトメータFL 500[®](興和社製)を改良し、PNの蛍光特性〔excitation(以下、Ex)360nm, emission(以下、Em)460nm〕・AGEの蛍光特性(Ex 350～370nm, Em 440nm)の両者をカバーし得るフィルタ特性(励起波長を260～390nm, 蛍光受光波長を430～630nm)を持つフルオロフォトメータを用いた(図1)。AGEの一種であるペントシジンはEx 335nm, Em 385nmであり、ピラリンは蛍光を有しないため、本実験ではこれらのAGEの自発蛍光は測定していない。一方、トリプトファン酸化代謝産物(3-ヒドロキシキヌレニン-O- β -O-D-グルコシドやヒドロキシキヌレニン、L-キヌレニンなど)の自発蛍光の波長(Ex 320～360nm, Em 440nm中心)やチロシンなどアミノ酸の二次光も、今回の測定蛍光波長領域に含まれるため、これらの自発蛍光もPN、AGEの蛍光とともに測定していると思われる。なお、今回は、PN、ペントシジンを除くAGE、トリプトファン酸化代謝産物などを合計した蛍光を測定しており、個々の物質を分けての測定は行っていない。被験者のインフォームド・コンセントを十分に得た上で、この装置を用いて、フォーカルダイヤモンドの最大断面を安静時の被験者の左眼角膜表面に合わせ、角膜中央部で自発蛍光の測定を10回行い、その値を平均した。また、角膜自発蛍光測定後に採血を行い、糖尿病のパラメータ[hemoglobinA1c(HbA1c)、hemoglobinA1c(HbA1c)、フルクトサミン、1.5-anhydroglucitol(1.5-AG)、血清脂質(遊離脂肪酸、総コレステロール、トリグリセライド、 β リポ蛋白質、high density lipoprotein cholesterol(HDL-c))]について調べ、角膜自発蛍光とこれらの血液中のパラメータ、年齢、糖尿病罹病期間との関連を検討した。

2群の測定値は、Mann-WhitneyのU検定を用いて比較し、血液中のパラメータ、年齢、糖尿病罹病期間との相関関係の検定にはPearsonの相関係数を用いた。検定は、危険率5%未満の場合を有意とした。

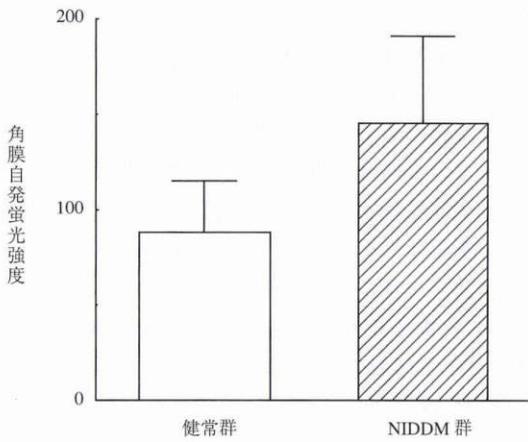


図2 健常群とインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)群の角膜自発蛍光の比較。

角膜自発蛍光強度はNIDDM群(144.6±45.6)が健常群(87.6±26.9)に比べて有意に高く(p<0.0001),平均で1.65倍の高値を示した。

III 結 果

1. 健常群とNIDDM群における角膜自発蛍光の比較(図2)

NIDDM群28名28眼(年齢59.3±11.2歳,33~74歳,男性17名,女性11名)と年齢をマッチさせた健常対象者46名46眼(年齢59.2±11.1歳,31~85歳,男性11名,女性35名)を対象として両群における角膜自発蛍光を比較検討した。その結果,角膜自発蛍光強度はNIDDM群が144.6±45.6,正常群が87.6±26.9であり,NIDDM患者で健常者に比べて自発蛍光値は有意に高く(p<0.0001),平均で1.65倍の高値を示した。

2. NIDDM群の糖尿病の血液中パラメータと角膜自発蛍光の関係(図3)

角膜自発蛍光とどの血液パラメータとの間にも有意な相関はなかった。

HbA 1($r = -0.117, p = 0.555$), HbA 1 c($r = -0.123, p = 0.534$), フルクトサミン($r = -0.263, p = 0.176$), 1.5-AG($r = -0.058, p = 0.770$), 遊離脂肪酸($r = 0.356, p = 0.063$), 総コレステロール($r = 0.042, p = 0.832$), トリグリセリド($r = -0.023, p = 0.907$), β リポプロテイン($r = -0.002, p = 0.993$), HDL-c($r = 0.057, p = 0.774$)。

3. NIDDM群の罹病期間と角膜自発蛍光の関係(図4)

両者の間に有意の相関はなかった($r = 0.192, p = 0.327$)。

4. 年齢と角膜自発蛍光の関係(図5)

健常群において,角膜自発蛍光と年齢との間には正の一次相関があった($r = 0.438, p = 0.0002$)。一方,NIDDM群においては,角膜自発蛍光と年齢との間に有意の相関はなかった($r = 0.045, p = 0.820$)。

IV 考 按

糖尿病の角膜で,角膜の自発蛍光が強くなっているこ

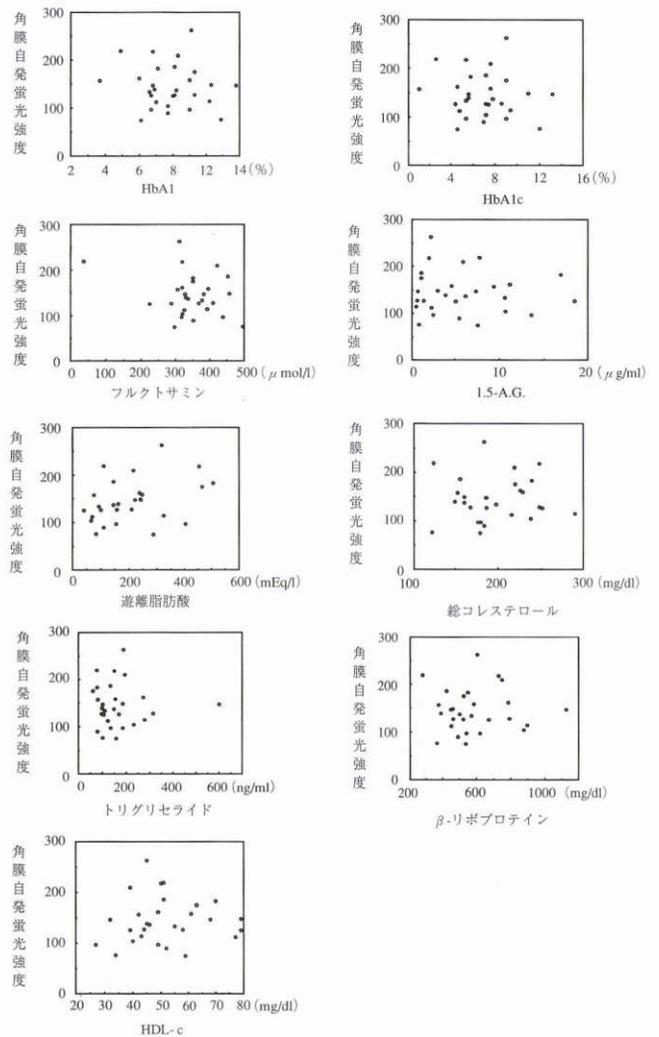


図3 NIDDM群の糖尿病の血液中パラメータ(HbA 1, HbA 1 c, フルクトサミン, 1.5-AG, 遊離脂肪酸, 総コレステロール, トリグリセリド, β リポプロテイン, HDL-c)と角膜自発蛍光の関係。

それぞれ両者の間に有意の相関はなかった〔HbA 1($r = -0.117, p = 0.555$), HbA 1 c($r = -0.123, p = 0.534$), フルクトサミン($r = -0.263, p = 0.176$), 1.5-AG($r = -0.058, p = 0.770$), 遊離脂肪酸($r = 0.356, p = 0.063$), 総コレステロール($r = 0.042, p = 0.832$), トリグリセリド($r = -0.023, p = 0.907$), β リポプロテイン($r = -0.002, p = 0.993$), HDL-c($r = 0.057, p = 0.774$)〕。

とが古くから指摘されており,糖尿病に関連した角膜の代謝異常との関連が推定されている^{9)~12)}。これまでの報告では,フルオロトロンマスターを初めとする,フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)の励起に適したフルオロフォトメータが用いられてきているため,糖尿病患者における高い自発蛍光の由来として,酸化型フラボプロテイン(Fp)との関連が推定されている¹⁰⁾。また,このフルオレサイト®の蛍光領域において検討された自発蛍光において,その蛍光強度と糖尿病網膜症の重症度が相関することも報告¹⁰⁾されており,我々も同様の結果を先に報告¹⁾している。

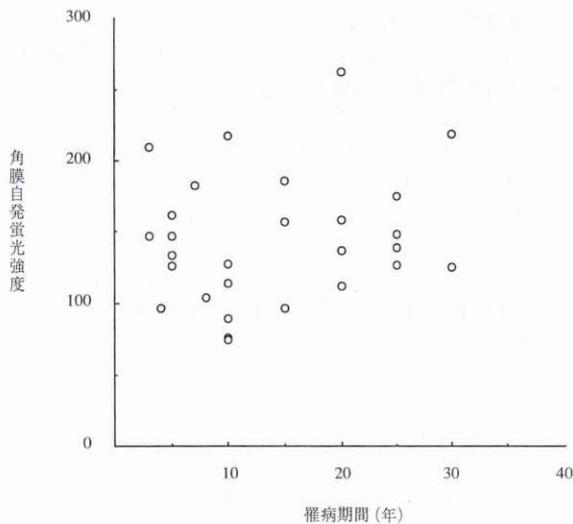


図4 NIDDM 群の罹病期間と角膜自発蛍光の関係。
両者の間に有意の相関はなかった($r=0.192, p=0.327$)。

一方、角膜の代謝を調べるのに適したレドックスフルオロフォトメトリーを用いたマウスでの検討では、角膜上皮においても角膜内皮においても Fp, PN 由来の蛍光は、それら単独では糖尿病でも健常マウスと差がないが、それらの比、すなわち、PN/Fp は角膜上皮では差はなかったが、角膜内皮では糖尿病で高値を示した¹²⁾¹³⁾と報告されている。また、AGE と角膜自発蛍光の関係については現在まで報告がない。そこで、今回の検討では、糖尿病と角膜自発蛍光の関係をより明らかにするため、PN およびペントシジンを除く AGE の蛍光波長を含むフルオロフォトメータを開発し、糖尿病と角膜自発蛍光の関係について検討をした。さらに、今回のフルオロフォトメータでは、既報⁸⁾の装置と同様の特徴、すなわち、フルオロフォトメータの受光系を被検眼の正面に設置した状態で、測定に最も有効な領域であるフォーカルダイヤモンドを被験者の角膜表面に再現よく決定できる特徴が保存されているため、再現性よく自発蛍光を短時間(0.2秒)で測定することが可能であった。

今回の検討では、健常群と比べて NIDDM 群の角膜自発蛍光は有意に高値を示した。しかし、NIDDM 群の各種の糖尿病の血中パラメータ、罹病期間との間には、我々の先のフルオロフォトメトリーによる検討¹⁾と同様、有意な相関はなかった。今回の検討では、糖尿病の病態と関連の深い、ペントシジンを除く AGE, PN, トリプトファン¹⁾の酸化代謝産物などの蛍光領域を測定したため、NIDDM 群の角膜で正常群に比べて角膜自発蛍光が高値を示したことは、角膜におけるこれらの増加を意味するものであると考えられる。

角膜は代謝回転の遅い蛋白であるコラーゲンが豊富に存在するため、グリケーションにより AGE が形成されている可能性がある。角膜と同様に代謝回転の遅い蛋白であるクリスタリンが豊富に存在し、角膜と同様、血流の

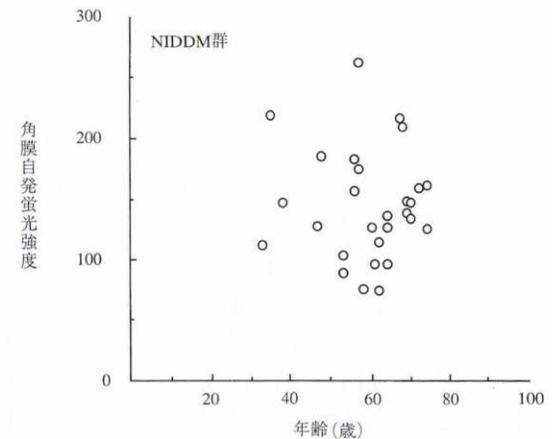
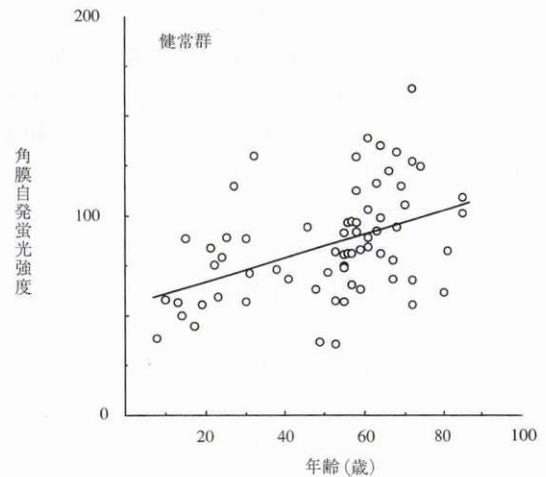


図5 年齢と角膜自発蛍光の関係。

正常群において角膜自発蛍光と年齢との間には正の一次相関があった($r=0.438, p=0.0002$)。

NIDDM 群においては、角膜自発蛍光と年齢との間に有意の相関はなかった($r=0.045, p=0.820$)。

支配を受けないヒトの水晶体では、AGE の同定・定量がされており、加齢によって水晶体でのグリケーションによる AGE の増加が起こることが報告¹⁴⁾¹⁵⁾されている。これまで、角膜と AGE との関連を調べた報告はないが、今回の検討で、健常群の角膜自発蛍光と年齢の間に正の相関があったことは、加齢に伴う角膜のコラーゲンのグリケーションによる AGE 化の関与が考えられた。しかし、より AGE との関連が推定される糖尿病で、年齢と角膜自発蛍光との相関はなかった。この理由として、NIDDM 患者の糖尿病に依存した AGE 化の個人差が年齢による違いをマスクした可能性が考えられた。

また、今回の検討では、予想に反して、ヘモグロビンのグリケーションを反映する HbA 1c, フルクトサミンと角膜自発蛍光との間に有意な相関はなかった。HbA 1c やフルクトサミンはグリケーションの中間産物であり、血液中における半減期が短い。これに対して、角膜自発蛍光生成原因の一つであると思われる AGE はグリケーションの後期反応生成物であり、角膜においては半減期が長く、代謝回転の遅いコラーゲンが多く存在し

ている。この血液中と角膜における半減期の長さの違いおよびグリケーションの中間生成物と後期反応生成物との間にタイムラグのあること、そして AGE 以外の蛍光も感知していることが、今回の検討において HbA 1, HbA 1c, フルクトサミンと角膜自発蛍光との間に有意な相関がなかった原因ではないかと考えられた。近年、AGE と糖尿病との関連を示す報告が多数散見され、ヒトの糖尿病性腎症および慢性腎不全の腎臓¹⁶⁾、動脈粥状硬化症の病変部¹⁷⁾、網膜の視神経乳頭部の血管壁¹⁸⁾など、各種の生体内組織における AGE の局在が明らかにされている。角膜においても、今後、組織学的に AGE の関与を検討する必要があると考えられた。

PN はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化や細胞質における解糖系の補酵素として活用されるため、レドックスフルオロフォトメトリーを用いた角膜全層における検討では、角膜の内皮あるいは上皮に、その強い蛍光スペクトルが観察されることが報告¹⁹⁾されている。さらに、アルドース還元酵素阻害剤が糖尿病ラットの角膜上皮のバリアー機能の促進に効果的であったという報告²⁰⁾とともに、ポリオール経路と糖尿病角膜症との関連が推定されている²¹⁾²²⁾。ポリオール経路においては、ポリオール経路の活性化によって PN が増加する⁴⁾⁵⁾ことも知られている。つまり、今回の蛍光領域で得られた糖尿病角膜における自発蛍光の高値には、PN も AGE と同様に重視して考えるべきであると思われる。

今後の課題として、① 糖尿病網膜症の病期と角膜自発蛍光の関係、② 同一対象における糖尿病網膜症の臨床経過と角膜自発蛍光の推移を検討することが挙げられ、これらを検討することにより、角膜自発蛍光と AGE あるいは PN との関連がより明確となるものと思われる。

文 献

- 1) 石田美幸, 横井則彦, 奥沢淳治, 前田耕志, 木下 茂: 糖尿病網膜症における角膜自発蛍光の測定. 日眼会誌 99: 308—311, 1995.
- 2) Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, Kuwabata T, Kinoshita JH: Localization of aldose reductase in the human eye. Diabetes 33: 562—566, 1984.
- 3) Kern T, Engerman RL: Distribution of aldose reductase in ocular tissue. Exp Eye Res 33: 175—182, 1981.
- 4) Friend J, Thoft RA: The diabetic cornea. Int Ophthalmol Clin 24: 111—123, 1985.
- 5) 矢部千尋: アルドース還元酵素を介するポリオール代謝と糖尿病合併症. 京府医大誌 106: 353—360, 1997.
- 6) Horiuchi S, Araki N, Morino Y: Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the maillard reaction. J Biol Chem 266: 7329—7332, 1991.
- 7) 荒木令江, 堀内正公: 蛋白グリケーションの生化学. 糖尿病学, 1993. 診断と治療社, 東京, 123—137, 1993.
- 8) 横井則彦, 木下 茂, 秋山光一: 新しい前眼部フルオロフォトメーターを用いた角上皮バリアー機能の測定. 日眼会誌 98: 641—647, 1994.
- 9) Stolwijk TR, van Best JA, Boot JP, Oosterhuis JA: Corneal autofluorescence in diabetic and penetrating keratoplasty patients as measured by fluorophotometry. Exp Eye Res 51: 403—409, 1990.
- 10) Stolwijk TR, van Best JA, Oosterhuis JA, Swart W: Corneal autofluorescence: An indicator of diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 92—97, 1992.
- 11) Chang S-W, Hu F-R: Changes in corneal autofluorescence and corneal epithelial barrier function with aging. Cornea 12: 493—499, 1993.
- 12) 島崎 潤, 坪田一男, 服部正和, Laing RA: 糖尿病における角膜・水晶体代謝の非侵襲的測定: 生体眼での測定 日眼会誌 96: 119—124, 1992.
- 13) Shimazaki J, Tubota K, Yoshida A, Tornheim K, Laing RA: Changes of corneal redox state in diabetic animal models. Cornea 14: 196—201, 1995.
- 14) Araki N, Ueno N, Bireswar C, Morino Y, Horiuchi S: Immunochemical evidence for presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. J Biol Chem 267: 10211—10214, 1992.
- 15) 橋本 浩隆: 糖尿病白内障と非酵素的糖化反応の関係. 日眼会誌 102: 34—41, 1998.
- 16) Makino H, Shikata K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H, et al: Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. Kidney Int 48: 517—526, 1995.
- 17) Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al: Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. Am J Pathol 147: 654—667, 1995.
- 18) Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomura H, Ikeda K, Horiuchi S: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. Diabetologia 40: 764—769, 1997.
- 19) Tsubota K, Laing RA, Chiba K, Hanninen LA, Kenyon KR: Noninvasive metabolic analysis of rabbit cornea. Arch Ophthalmol 106: 1713—1717, 1988.
- 20) Yokoi N, Niiya A, Komuro A, Yokogaki S, Naka H, Awata T, et al: Effect of aldose reductase inhibitor CT-112 on the corneal epithelial barrier of galactose-fed rats. Curr Eye Res 16: 595—599, 1997.