

フルオロフォトメトリーによる網膜色素上皮
加齢変化の検討 (図5, 表4)

北川 桂子・勝 安彦 (愛知医科大学眼科学教室)
西田 祥蔵・小椋祐一郎* (*京都大学医学部眼科学教室)

Fluorophotometric Evaluation of Aging Changes in
Human Retinal Pigment Epithelium

Keiko Kitagawa, Yasuhiko Katsu, Shozo Nishida
and Yuichiro Ogura*

Department of Ophthalmology, Aichi Medical University

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

要 約

フルオロフォトメトリーにより、眼底の自発蛍光を計測することから、*in vivo*で網膜色素上皮の加齢変化を評価することについて検討した。人工的無水晶体眼(年齢52歳~87歳, 平均72歳)25例35眼と有水晶体眼(年齢9歳~29歳, 平均22歳)20例21眼について、網脈絡膜自発蛍光値を測定した結果、網脈絡膜自発蛍光値は50歳代から上昇し、統計学的に年齢と有意の正の相関をみとめた。今回観察された網脈絡膜自発蛍光値の上昇は、主として網膜色素上皮の **lipofuscin** の増加を反映しているものと考えられた。(日眼 92:780-784, 1988)

キーワード: 自発蛍光, 加齢, リポフスチン, 網膜色素上皮, フルオロフォトメトリー

Abstract

Autofluorescence of the fundus at the macular region was measured by fluorophotometry to evaluate age-related changes in human retinal pigment epithelium. Aphakic eyes after uneventful intracapsular cataract extraction (35 eyes of 25 cases, age 52 to 87 years, average 72 years) and normal phakic eyes (21 eyes of 20 cases, age 9 to 29 years, average 22 years) were examined.

Autofluorescence at the macula of aphakic eyes increased in an age-dependent manner ($r=0.514$, $p<0.01$) as follows: 15.0ngEq/ml for the sixth decade ($n=1$), 17.2 ± 4.2 for the seventh decade ($n=11$), 21.3 ± 3.6 for the eighth decade ($n=16$) and 24.6 ± 2.7 for the ninth decade ($n=7$). It was interpreted that the autofluorescence mainly originates from lipofuscin in human retinal pigment epithelium, and that the increase of autofluorescence with age is attributed to the accumulation of lipofuscin. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:780-784, 1988)

Key words: Autofluorescence, Aging, Lipofuscin, Retinal pigment epithelium, Fluorophotometry

I 緒 言

老人性黄斑変性症は高齢者人口の増加とともに視覚

障害の重要な原因疾患になりつつある。老人性黄斑変性症ではドルーゼンがその発生の重要な素因となるとされ、ドルーゼン形成には網膜色素上皮細胞中のリポ

別刷請求先: 480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 愛知医科大学眼科学教室 北川 桂子
(昭和63年2月15日受付)

Reprint requests to: Keiko Kitagawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Aichi Medical Univ.
Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi 480-11, Japan

(Accepted February 15, 1988)

フスチン顆粒が関連するといわれている¹⁾²⁾。

網膜絡膜における加齢変化に対する超微形態学的^{3)~9)}あるいは生化学的^{10)~13)}な面からの研究はすすみ、網膜色素上皮細胞内でのリポフスチン顆粒の増加が指摘されている。年齢ともなうリポフスチン顆粒の増加は、老人性黄斑変性症の初期変化と関係する可能性がある。しかし、ヒト生体眼でリポフスチンの動態と眼底所見とを関連づけて研究された報告はまだない。一方、リポフスチンは自発蛍光を有し、紫外線にて励起すると、黄色光を発する¹⁴⁾。この性質を利用すれば、その蛍光をフルオロフォトメーターにてとらえることが可能である。そこで我々は、フルオロフォトメトリーを応用し、眼底の自発蛍光を計測することから *in vivo* で網膜色素上皮の加齢変化について検討した。

II 実験対象および方法

対象は、水晶体による光透過率の減弱の影響を除外するために、合併症なく施行された水晶体嚢内摘出術後の人工的無水晶体眼25例35眼であり、年齢は52歳~87歳、平均72歳(表1)、術後期間7日~15年、平均2.5年である。症例は全て全身疾患を有せず、精密細隙灯顕微鏡検査にて黄斑部に異常の認められないものとした。また、対照として水晶体混濁のない有水晶体眼20例21眼についても検討した。尚、有水晶体眼については、Zeimer ら¹⁵⁾の報告から水晶体光透過率90%以上とされる20歳代以前の全身的、眼科的に異常を認めない健常者を選んだ。年齢は9歳~29歳、平均22歳である(表2)。Gamma-Inami fluorophotometer を使用し、測定条件は、slit beam 幅0.6mm, slit beam 高3.0mm, 測定角16°, probe size 0.45mm ϕ (表3)とし散瞳下にて fundus mirror を装着後、中心窩を含む眼底黄斑部を網膜の後方からスキャンを初め、得られたピーク値(chorio-retinal peak)を、網脈絡膜自発蛍

表1 人工的無水晶体眼の年齢分布。

52歳~87歳, 平均72歳, 男12眼, 女23眼, 25例35眼

年齢(歳)	性別		計(眼)
	男(眼)	女(眼)	
50~59	0	1	1
60~69	2	9	11
70~79	5	11	16
80~89	5	2	7
計(眼)	12	23	35

表2 有水晶体眼の年齢分布。

9歳~29歳, 平均22歳, 男12眼, 女9眼, 20例21眼

年齢(歳)	性別		計(眼)
	男(眼)	女(眼)	
~ 9	0	2	2
10~19	0	3	3
20~29	12	4	16
計(眼)	12	9	21

表3 測定条件。

slit beam 幅	0.6mm
slit beam 高	3.0mm
測定角	16°
probe size	0.45mm ϕ

光値として解析した。今回使用した Gamma-Inami fluorophotometer のダイアグラムを図1に示す。フォトマルチプライヤーをアイピースの上につけ、X-Y recorder をくみこみ、一定のスピードで左右のぶれなくひけるようモーターをつけて改良してある。使用フィルターは、exciter filter GS-3800, barrier filter GS-3801(図2)である。これらのフィルターは従来のフルオロフォトメトリー用のものであり、フルオレスセインナトリウムに optimal spectrum を有する。

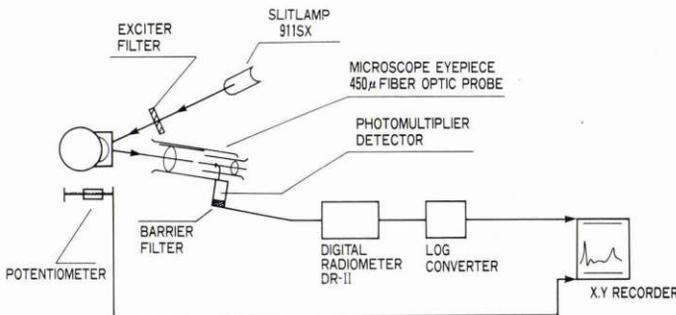


図1 Gamma-Inami fluorophotometer のダイアグラム。

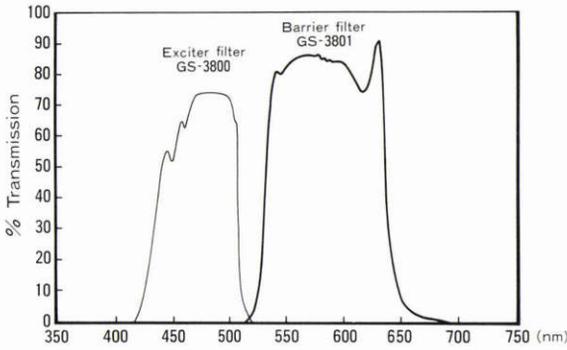


図2 Gamma-Inami fluorophotometerのフィルター特性。Exciter filter GS-3800: Peak wavelength 500nm, 10% transmission 425~515nm. Barrier filter GS-3801: Peak wavelength 575nm, 10% transmission 532~638nm.

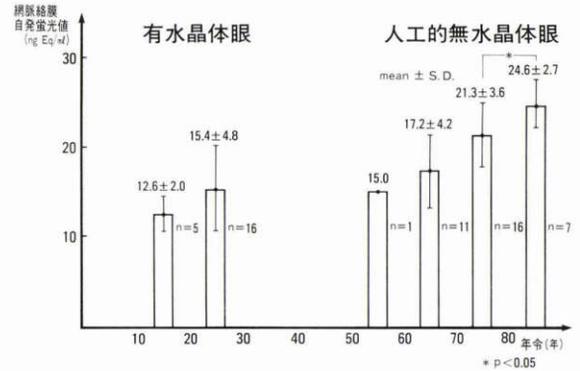


図4 全症例の測定結果。網脈絡膜自発蛍光値は年齢とともに上昇する。

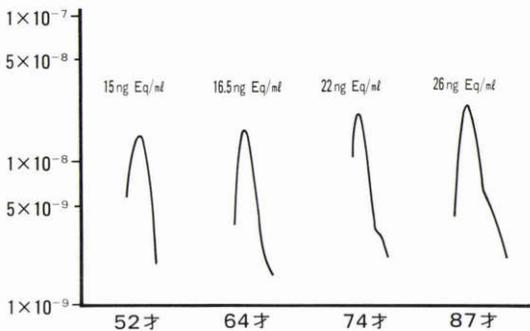


図3 年代別代表症例の網脈絡膜自発蛍光値。曲線のピーク値を網脈絡膜自発蛍光値 (ngEq/ml) とした。加齢にともない網脈絡膜自発蛍光値は上昇している。

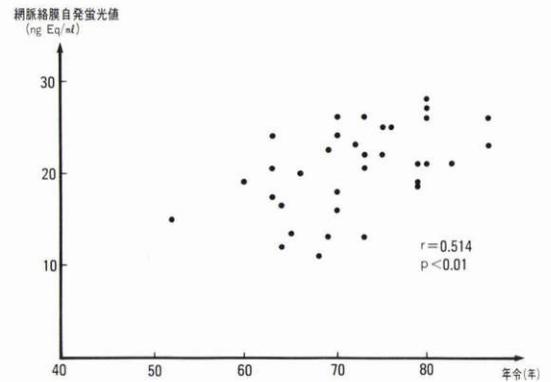


図5 網脈絡膜自発蛍光値は、50歳以上で統計学的に年齢と有意の正の相関を認めた (p<0.01)。

尚、網脈絡膜自発蛍光値は、フルオレスセインナトリウムに換算した単位 (ngEq/ml) で表わした。

III 結果

実際の代表的な症例4例の測定結果を図3に示す。曲線のピーク値(網脈絡膜自発蛍光値)は年齢とともに上昇している。全症例を年齢別に整理してみると、図4のごとく、網脈絡膜自発蛍光値は、人工的無水晶体眼では、50歳代15.0ngEq/ml(n=1), 60歳代17.2±4.2ngEq/ml(n=11), 70歳代21.3±3.6ngEq/ml(n=16), 80歳代24.6±2.7ngEq/ml(n=7)であり、70歳代と80歳代間に有意差を認めた (p<0.05)。又、有水晶体眼では、10歳代12.6±2.0ngEq/ml(n=5), 20歳代15.4±4.8ngEq/ml(n=16)であった。50歳以上

表4 術後期間による網脈絡膜自発蛍光値の比較。術後1~2週の早期のものと術後1年以上経過しているものとの間で網脈絡膜自発蛍光値を、それぞれの年代別に比較検討したが、両者に有意差は認められなかった。

網脈絡膜自発蛍光値 年齢(歳)	術後早期 (1~2週)	術後1年以上
60~69	15.5±4.5(n=5)	18.6±3.4(n=6)
70~79	22.0±4.0(n=7)	20.8±3.1(n=9)
80~89	23.3±2.1(n=3)	25.5±2.7(n=4)

単位: ngEq/ml

の全症例の測定結果をプロットすると、図5に示すごとく、網脈絡膜自発蛍光値は、統計学的に年齢と有意の正の相関を認めた (p<0.01)。

水晶体摘出操作が、また無水晶体眼であることが、網脈絡膜自発蛍光値に影響を与えるものであるかどうか検討するために術後期間が1~2週のものとは1年以

上のものに分け、各年代別に比較検討したが、両者に有意差はみとめられなかった(表4)。

IV 考 按

網膜の加齢変化としてリポフスチン顆粒の網膜色素上皮細胞への沈着が組織学的あるいは生化学的に確認されている¹⁾²⁾⁷⁾¹⁰⁾¹²⁾¹³⁾。リポフスチン顆粒は網膜色素上皮細胞の貪食反応の残渣であろうと推定されており¹⁾¹⁸⁾、同様の貪食反応残渣がドルーゼン形成の原因物質とも推定され²⁾¹⁹⁾、さらにリポフスチン顆粒の蓄積は老人性黄斑変性症の発症に重要な要素であると考えられる²⁾がいまだ推定の域をでない。網膜色素上皮細胞内のリポフスチン顆粒の定量ないしは半定量は老人性黄斑変性症網膜ではなされていないこと、そしていずれも臨床的になされたものではないことがその原因の一部である。ヒト生体眼で臨床的にしかも非侵襲的に、網膜色素上皮細胞のリポフスチン顆粒量を測定または推定できるなら、リポフスチン顆粒と老人性黄斑変性症の関係を明らかにすることに役立つであろう。水晶体嚢内摘出術後の眼底自発蛍光量をフルオロフォトメトリーで測定したわれわれの結果では、自発蛍光量が50歳代以降、年齢とともに明らかに増加している。

Eldredら¹⁴⁾のmicrospectrofluorometerによる網膜色素上皮切片での詳細な検討で、加齢とともに増加するヒト網膜色素上皮細胞内リポフスチン顆粒は、波長366nmの励起光で従来から報告されている450nm付近¹⁰⁾¹⁶⁾²⁰⁾以外に、540~640nmに幅広い極大値を持つ蛍光を発し、さらに網膜色素上皮から単離したリポフスチン顆粒が波長366nmの励起光で黄色の蛍光を発することを明らかにしている。本報告では市販のスリットランプフルオロフォトメーターを使用したため、励起波長が425~515nm、蛍光波長が532~638nmと励起波長がリポフスチンの励起ピークと比べやや長波長側に偏位している。これらの波長によっても励起され、網膜色素上皮の加齢による自発蛍光の変化を捉えることが可能であったが、フィルター波長に関しては今後検討する余地があるものと考えられる。

また、リポフスチン顆粒以外にも網膜色素上皮細胞内に蛍光物質の存在が示唆される。メラニン顆粒も自発蛍光をもつ¹⁰⁾が、メラニン顆粒はリポフスチン顆粒とは逆に加齢にともない減少することが明らかにされており²⁾⁷⁾¹²⁾¹³⁾¹⁷⁾、今回認められた加齢に伴う自発蛍光の増加には関与していないと考えられる。ビタミンA

も蛍光をもち360nmで励起した時、蛍光の極大波長は495nmで²⁰⁾、リポフスチン顆粒より短波長側にあり今回のフィルター特性ではリポフスチン顆粒の蛍光をより多く捕えているものと考えられるが、区別は困難である。リポフスチン顆粒が視細胞外節貪食物の残渣である¹⁾²¹⁾なら、当然ビタミンA関連物質を含む可能性がある。しかしビタミンAがどの程度リポフスチン顆粒に含まれているかは不明である。また加齢に伴い視細胞数が減少しているとする報告²²⁾もあり、ビタミンA関連物質は加齢に伴い増加せず、むしろ減少するのではないかと考えられる。

一方、水晶体の光透過率は加齢により減少し、60歳以上では、約10~20%の光が水晶体によって吸収・散乱を受けるために眼底まで透過しない²³⁾。したがって、本報告のように眼底の微量の蛍光を定量測定する場合には、水晶体による光の吸収・散乱の影響を考慮する必要がある。今回は、水晶体の影響を全く排除するという点から、無水晶体眼のみを対象としたが、フルオロフォトメトリーにて、水晶体自発蛍光の測定を行うことにより、その光透過率を算出することが可能である¹⁵⁾²³⁾。その透過率にて補正することによって、有水晶体眼においても網脈絡膜蛍光の値を正確に定量することが、可能であると考えられる。

以上より、今回観察された加齢に伴う網脈絡膜の自発蛍光の増加は、網膜色素上皮のリポフスチン顆粒の蓄積を反映している可能性が大きく、自発蛍光量を網膜の加齢の指標とすることができると考えられる。フルオロフォトメトリーを網膜の加齢変化、老人性黄斑変性症の発症機構、網膜色素上皮ジストロフィーの研究に応用する緒が開けたといえよう。

文 献

- 1) 宇山昌延, 大熊 紘: 感覚器の加齢(眼球)一とくに網膜色素上皮と Bruch 膜の変化一. 医学のあゆみ 136: 934-937, 1986.
- 2) 水野計彦: 網脈絡膜の加齢変化. 眼科 28: 613-619, 1986.
- 3) Friedman E, Ts'o MOM: The retinal pigment epithelium II. Histologic changes associated with age. Arch Ophthalmol 79: 315-320, 1968.
- 4) Mishima H, Hasebe H, Kondo K: Age changes in the fine structure of the human retinal pigment epithelium. Jpn J Ophthalmol 22: 476-485, 1978.
- 5) 近藤和義: マウス網膜色素上皮細胞の加齢に関する超微構造的な研究 I. 定量的解析について. 日眼 83: 707-720, 1979.

- 6) 星野元宏, 水野計彦: 網膜脈絡膜の Aging に関する病理組織学的研究—第1報—光学顕微鏡による黄斑部の観察. 日眼 86: 1616—1632, 1982.
- 7) 水野計彦, 星野元宏: 網膜脈絡膜の Aging に関する病理組織学的研究—第3報—電子顕微鏡による黄斑部色素上皮の観察. 日眼 88: 641—652, 1984.
- 8) **Boulton M, Marshall J**: Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: A model for aging. *Brit J Ophthalmol* 70: 808—815, 1986.
- 9) **Marshall J**: The aging retina: Physiology or pathology. *Eye* 1: 282—295, 1987.
- 10) **Wing GL, Blanchard GL, Weiter JJ**: The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 601—607, 1978.
- 11) **Feeney L**: Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 583—600, 1978.
- 12) **Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S**: Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 195—200, 1984.
- 13) **Weiter JJ, Delori EC, Wing GL, et al**: Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 145—152, 1986.
- 14) **Eldred GE, Miller GV, Stark WS, et al**: Lipofuscin: Resolution of discrepant fluorescence data. *Science* 216: 757—759, 1982.
- 15) **Zeimer RC, Noth JM**: A new method of measuring in vivo the lens transmittance, and study of lens scatter, fluorescence and transmittance. *Ophthalmic Res* 16: 246—255, 1984.
- 16) **Kikugawa K, Ido Y**: Studies on peroxidized lipids. V. Formation and characterization of 1, 4-dihydropyridine-3,5-dicarbonyl aldehydes as model of fluorescent components in lipofuscin. *Lipids* 19: 600—608, 1984.
- 17) **Schmidt SY, Peisch RD**: Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1063—1067, 1986.
- 18) **Feeney-Burus L**: The pigments of the retinal pigment epithelium. In *Current Topics in Eye Research*. Vol. 2. Zadunaisky JA, Davson H, eds, pp119—178, Academic Press, New York, 1980.
- 19) **Farkas TG, Sylvester V, Archer D**: The ultrastructure of drusen. *Am J Ophthalmol* 71: 1196—1205, 1971.
- 20) **Csallany AS, Ayaz KL**: Quantitative determination of organic solvent soluble lipofuscin pigments in tissues. *Lipids* 11: 412—417, 1976.
- 21) **Young RW**: Renewal systems in rods and cones. *Ann Ophthalmol* 5: 843—854, 1973.
- 22) **Gartner S, Henkind P**: Aging and degeneration of the human macula. 1. Outer nuclear layer and photoreceptors. *Brit J Ophthalmol* 65: 23—28, 1981.
- 23) **van Best JA, Tjin A Tsoi EWSJ, Boot JP, et al**: In vivo assessment of lens transmission for blue green light by autofluorescence measurement. *Ophthalmic Res* 17: 90—95, 1985.