

光力学作用 (photodynamic action) による硝子体の液化

秋 葉 純

旭川医科大学眼科学教室

要 約

生体内で光力学作用 (photodynamic action) の結果生じるフリーラジカルによる硝子体の液化について検討した。家兎硝子体中にリン酸リボフラビンを注入し、白色光を照射して光力学作用をおこした。摘出した眼球の液化硝子体の重量を測定して、硝子体液化度を算定した。照射1時間後の実験眼の硝子体液化度は38%、3時間後は50%、6時間後は59%であり、いずれも対照眼に比べて硝子体は有意に液化した。また、フリーラジカルを除去する Cu, Zn-superoxide dismutase や catalase, あるいは mannitol が硝子体中に存在することにより、硝子体の液化は有意に抑制された。今回の結果から、加齢による硝子体の液化に光により生じるフリーラジカルが関与している可能性が示唆された。また、硝子体にはフリーラジカルを除去して液化を防ぐ機構が存在していると推測された。(日眼会誌 96:731-736, 1992)

キーワード：硝子体液化，光力学作用，フリーラジカル，加齢，リボフラビン

Photodynamically Induced Vitreous Liquefaction in Vivo

Jun Akiba

Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College

Abstract

Photodynamically induced vitreous liquefaction in rabbit eye was investigated. Photosensitizer, riboflavine phosphate, was injected into the vitreous cavity of the rabbit before white-light irradiation. After the irradiation (0, 1, 3, 6 hr) the rabbit vitreous body was separated into gel and liquid portions. The liquid vitreous body was weighed, and the vitreous liquefaction percentage was calculated. One hour irradiation caused 38% of liquefaction of the eye; 3 hr, 50% liquefaction; 6 hr, 59% liquefaction. Although irradiated control eye (without photosensitizer) and the dark adapted control eye (non-irradiated) showed 10-15% liquefaction throughout the experimental period, the liquefaction percentage of the experimental vitreous bodies was significantly larger than that of the control vitreous. Inhibition experiment showed that the radical scavengers (Cu, Zn-superoxide dismutase, catalase, and mannitol) could suppress the photodynamically induced vitreous liquefaction. Results indicated that free radicals, including hydroxyl radical and superoxide anion, which are generated by photosensitizer and visible light irradiation, may contribute to the age-related vitreous liquefaction of humans. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 731-736, 1992)

Key words: Vitreous liquefaction, Photodynamic action, Free radical, Aging, Riboflavine

別刷請求先：078 旭川市西神楽4-5-3-11 旭川医科大学眼科学教室 秋葉 純

(平成3年10月31日受付，平成4年1月23日改訂受理)

Reprint requests to: Jun Akiba, M.D. Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College,
4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078, Japan

(Received October 31, 1991 and accepted in revised form January 23, 1992)

I 緒 言

眼球内で最大の容積を占める硝子体は、大量の水を含有するゲルである¹⁾。硝子体重量の99%は水であり、コラーゲン線維やヒアルロン酸などの固形成分は1%にすぎない^{2)~5)}。人では加齢とともに硝子体のゲル構造は徐々に崩壊して水を保持できなくなり、液化硝子体を生じる^{6)~9)}。剖検眼の観察では4歳ですでに液化した硝子体が認められ¹⁰⁾、その後加齢とともに硝子体容積に占める液化硝子体の割合は増加し、40歳代では30%、80歳代では50%以上であると報告されている⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾。液化の進行により、やがて硝子体はその形態を維持できなくなり、虚脱して後部硝子体剥離を生じる^{12)~15)}。この液化と後部硝子体剥離の一連の過程は、人硝子体の正常な老化現象ではあるが、硝子体を取り囲む網膜や水晶体に多大な影響を及ぼすと考えられ、とりわけ後部硝子体剥離は裂孔原性網膜剥離の最大の病因である¹⁶⁾。しかし、加齢による硝子体の液化の機序については解明されていない。

硝子体のゲル構造は、コラーゲン線維の3次元格子状構築の間に大量の水を保持したヒアルロン酸が充満して維持されていると考えられている^{2)~5)}。1974年にMcCord¹⁷⁾は、酵素反応で発生したsuperoxide radicalがヒアルロン酸を脱重合し、ウシの滑液の粘性を低下させることを発見し、フリーラジカルのヒアルロン酸への影響について報告した。また、Andleyら¹⁸⁾は、一重項酸素(¹O₂)がヒアルロン酸の立体配座(conformation)を変化させることを示した。ゲル構造の維持に重要な役割を演じているヒアルロン酸の脱重合や立体構造の変化は、硝子体の液化をひきおこすことが知られている¹⁹⁾²⁰⁾。そこでUenoら²¹⁾は、牛硝子体に光感受性物質を加えて可視光を照射することによりin vitroで硝子体が液化することを示し、光力学作用(photodynamic action)により生じるフリーラジカルの関与を示唆した。

本研究では、家兎硝子体中に光感受性物質を注入して白色光を照射し、in vivoで光力学作用の結果生じるフリーラジカルによる硝子体の液化について検討したので報告する。

II 方 法

1. 光力学作用

有色家兎(ダッチ種、体重1.5~2.0 kg)36匹を実験動物の飼養及び保管等に関する基準にしたがい取り

扱った。ketamine hydrochloride (20 mg/kg)とpentobarbital sodium (25 mg/kg)筋注にて麻醉後、Mydrin P[®]で散瞳した。0.5%xylocaineを点眼後、強角膜輪部より3 mm後方から27ゲージ針を硝子体中央に挿入し、リン酸リボフラビン(2×10⁻³M、扶桑薬品工業)を0.1 ml注入した。注入後、+90ジオプトリレンズ(ニコン)と細隙灯顕微鏡を用いて、硝子体および眼底を観察し、出血や網膜に穿孔のないことを確認した。開眼器をかけ、角膜より60 cmの距離からスライドプロジェクター(1,000 W)で白色光を0, 1, 3, 6時間照射した。照度計(DX-100、竹村電機製作所)による測定の結果、角膜表面の照度は570×10²luxであった。硝子体中に拡散したリボフラビンが光の照射により緑色の蛍光を発するのが観察された。角膜の乾燥を防ぐために、照射中は生理食塩水を頻回に点眼した。

同様の方法で生理食塩水を硝子体中に注入して光を照射した眼、およびリン酸リボフラビンを注入して遮閉をおこなった眼を、それぞれ対照とした。

硝子体の液化の抑制をみる実験では、Cu, Znsuperoxide dismutase (Sigma, St. Louis, USA) 1.5 mg (5,355 units), catalase (Sigma) 1.25 mg (60,875 units), mannitol (Sigma) 2×10⁻⁵ molを、それぞれリン酸リボフラビン(2×10⁻³M)とともに硝子体中に注入し、白色光を3時間照射した。

2. 硝子体液化の判定

照射終了後、細隙灯顕微鏡と+90ジオプトリレンズを用いて、硝子体の液化の程度を生体内で観察した。次に、pentobarbital sodiumを250 mg静注し、死亡確認後ただちに眼球を摘出した。輪部より5 mm後方の強膜を剪刀で輪状に切開し、強膜、脈絡膜、網膜を取り除いた後、水晶体後面より硝子体を損傷しないように鈍的に剥離した。取り出した硝子体を円形の濾紙(東洋濾紙 No. 1, 直径11 cm)とプラスチックで被覆されたガラス線維網(口径1.0 mm, サイズ15 cm×10 cm)の上におき、ゲル硝子体から液化硝子体を分離した(図1)。液化した硝子体は速やかに濾紙に吸収された後、下のシャーレに滴下した。この分離を室温(25°C)で30秒間行った後、濾紙に吸収された液体とシャーレに滴下した液体の重量を測定した。この両者を合計したのから、はじめに硝子体に注入した液体0.1 mlの重量を引いたものを液化硝子体の重量とした。ゲル硝子体と液化硝子体の重量の和を本来の硝子体の重量と考え、次式により硝子体液化度を算出した。

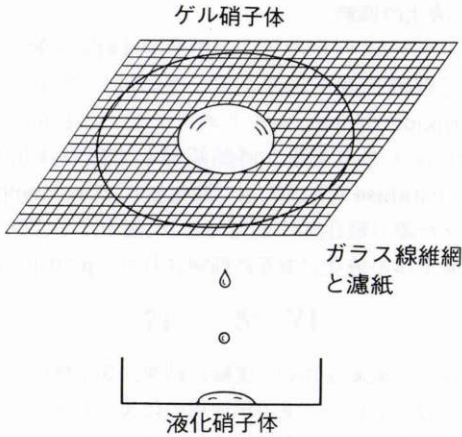


図1 ゲル硝子体と液化硝子体の分離。
 眼球から取り出した硝子体を円形の濾紙とプラスチックで被覆されたガラス線維網の上にのせた。液化硝子体は速やかに濾紙に吸収された後、シャーレに滴下した。分離は、室温(25℃)で30秒間行った。

$$\text{硝子体液化度 (\%)} = \frac{\text{液化硝子体の重量(g)}}{\text{ゲル硝子体の重量(g)} + \text{液化硝子体の重量(g)}} \times 100$$

硝子体液化度の比較には、ノンパラメトリック検定

法 (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test) を用いた。有意水準が5%未満のものを、統計学的に有意とした。

III 結果

1. 硝子体の観察

細隙灯顕微鏡による生体内での観察では、リボフラビンを注入して光を照射した実験眼の硝子体は、対照眼と比較して液化が強い印象をうけたが、明確な差は認められなかった。しかし、摘出した硝子体の観察では、対照眼の硝子体は形態をよく保っていたのに対し、実験眼の硝子体は液化により張力を失っていた(図2)。

2. 硝子体液化度

対照眼の硝子体液化度は、6時間を経過してもそれぞれ14%以下であり、わずかな硝子体の液化を示すのみであった(図3)。これに対して、リボフラビンを注入して光を照射をした実験眼の硝子体液化度は、照射1時間後は38% (p<0.05), 3時間後は50% (p<0.01), 6時間後は59% (p<0.01) であり、いずれも硝子体は有意に液化した。

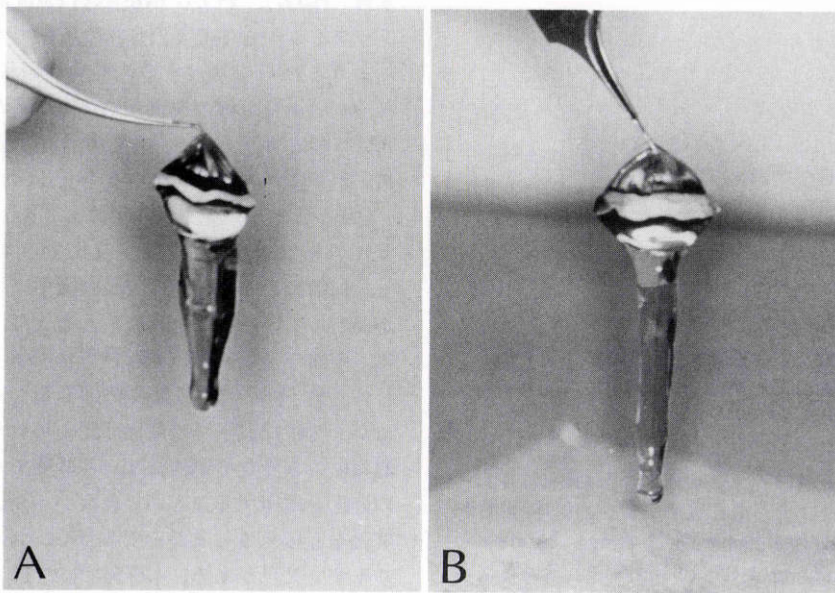


図2 強膜、脈絡膜、網膜を取り除き、硝子体を露出させた眼を吊り下げたところ。遮閉をした対照眼の硝子体(A)は、形態をよく保っているのに対し、リボフラビンを注入し白色光を3時間照射をした実験眼の硝子体(B)は、液化により張力を失い、大きく垂れ下がっている。

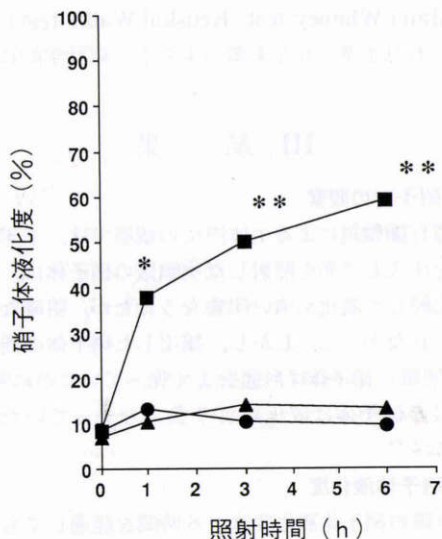


図3 光力学作用の硝子体ゲルに対する影響。

▲は、生理食塩水を注入し白色光を照射した対照眼、●は、リン酸リボフラビン ($2 \times 10^{-3} M$) を注入し遮閉をした対照眼、■は、リン酸リボフラビンを注入し白色光を照射した実験眼。各点は4眼の中央値を示す。
*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ (Kruskal-Wallis test).

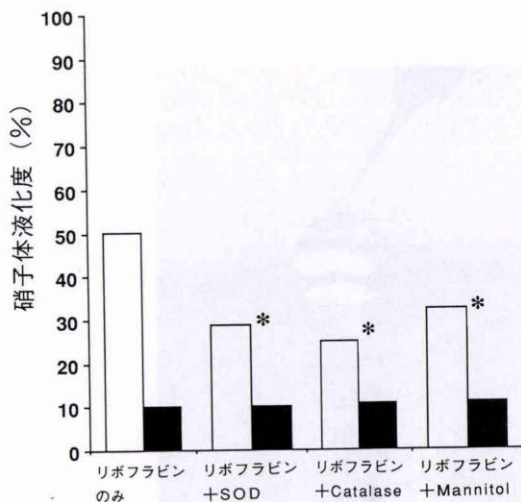


図4 ラジカル・スカベンジャーの硝子体液化に対する影響。

Cu, Zn-superoxide dismutase (1.5 mg), catalase (1.25 mg), mannitol ($2 \times 10^{-5} mol$) を、それぞれリン酸リボフラビン ($2 \times 10^{-3} M$) とともに硝子体中に注入した。白のバーは白色光を3時間照射した眼、黒のバーは遮閉した眼。各バーは4眼の中央値を示す。SODはCu, Zn-superoxide dismutaseをあらわす。*, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

3. 液化の抑制

リボフラビンのみを注入して光を3時間照射した眼の硝子体液化度が50%であるのに対して、Cu, Zn-superoxide dismutaseをリボフラビンとともに硝子体中に注入して光を3時間照射した眼の液化度は29%, catalaseを加えた眼の液化度は25%, mannitolを加えた眼の液化度は32%であり(図4), いずれの場合も硝子体の液化は有意に抑制された ($p < 0.05$).

IV 考 按

今回の家兎眼を用いた実験の結果、硝子体中の光感受性物質と光による光力学作用の結果生じるフリーラジカルにより、生体内で硝子体が液化することが明らかになった。硝子体が水を保持する能力の大部分を司ると考えられているヒアルロン酸は、N-acetyl glucosamine とグルクロン酸が繰り返し連鎖する線状の重合体であり、コイル状の立体構造を持つ²⁾⁻⁵⁾。ヒアルロン酸の脱重合や立体構造の変化は硝子体の液化をひきおこすため、このコイル状の立体構造が大量の水を保持する能力に貢献していると考えられている³⁾¹⁹⁾。光感受性を有するリボフラビンは、酸素の存在のもとで光に曝露されると、主としてtype Iの光力学作用をおこし²²⁾²³⁾、superoxide anion (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2), および hydroxyl radical ($\cdot OH$) のフリーラジカルを生じる。今回の実験でも、光力学作用によりこれらのフリーラジカルが硝子体中に発生して、ヒアルロン酸の脱重合や立体構造が変化し、ヒアルロン酸とコラーゲン間の相互作用に変化が生じた結果、硝子体が液化したものと考えられる。

Uenoら²¹⁾は、光力学作用により生じたフリーラジカルが *in vitro* で硝子体を液化することを初めて示し、加齢による硝子体の液化の機序にフリーラジカルが関与しているのではないかと考えた。彼らは、同時に、今回の実験とほぼ同様の方法で *in vivo* の実験を行い、硝子体の液化を細隙灯顕微鏡をもちいて観察したが、明確な硝子体の液化は認められなかった。この観察による液化の判定法は、本研究でも明かな硝子体の液化を検出することができなかつたように、軽度の液化をとらえることがむずかしく、しかも主観的になりやすい欠点がある。本研究では、1) Uenoらの実験の10倍量のリボフラビンを用い、より強い光を照射したことにより、多量のフリーラジカルが生じたと考えられること、2) 液化の判定法として、分離した液化硝子体の重量を測定して硝子体液化度を算定する方法を

用いたことにより、フリーラジカルによる *in vivo* の硝子体の液化を初めてとらえることができたと考えられる。

光の受容器官である眼は、出生直後より一生涯にわたり光に曝露される。太陽光線や室内の人工光線は幅広い波長をもつが、紫外線は角膜、房水、および水晶体で吸収されてしまい、硝子体にはほとんど到達しないため²⁴⁾、紫外線がヒアルロン酸を脱重合することは知られているが²⁵⁾、無水晶体眼でないかぎり紫外線が硝子体に及ぼす影響はきわめて軽微であると考えられる。本実験でもちいた光の照射強度は $570 \times 10^2 \text{ lux}$ であり、これは北海道の夏期の快晴日の正午の太陽光の照射強度 ($1,120 \times 10^2 \text{ lux}$) のほぼ半分にあたり、屋外作業者の眼が受ける白色光と近いものと考えられる。一方、正常の人硝子体には微量ではあるがリポフラビンが含まれており²⁾、他の光感受性物質も硝子体中に存在する可能性が高い。また、人硝子体中央の酸素分圧は $15.9 \pm 2.8 \text{ mmHg}$ であると報告されている²⁶⁾。したがって、人硝子体でも酸素の存在下で光感受性物質と可視光による光力学作用が実際におきている可能性が十分考えられる。人では加齢による硝子体の液化が、光軸上、とくに光の最も集中する黄斑前の硝子体から始まるという観察結果は²⁷⁾、加齢による硝子体の液化に光が関与していることを示唆していると思われる。

Cu, Zn-superoxide dismutase は O_2^- , catalase は H_2O_2 を、それぞれ特異的に分解する酵素である。また、mannitol は $\cdot\text{OH}$ を除去する物質として知られている。今回の実験は、これらのフリーラジカルを除去する物質が硝子体中に存在することより、生体内での光力学作用による硝子体の液化が有意に抑制されることを明らかにした。硝子体には superoxide dismutase 活性、catalase 活性が認められることから²⁸⁾²⁹⁾、硝子体にはフリーラジカルを除去して液化を抑制する防御機構が存在することは明らかである。Superoxide dismutase, catalase 以外に同様の役割を果たすものとして、アスコルビン酸³⁾やビタミン $\text{E}^{21)}$ が考えられている。したがって、硝子体に存在すると思われる除去能力を上まわるフリーラジカルが光力学作用により発生し、わずかなヒアルロン酸の脱重合や立体構造の変化が長期間にわたり累積した結果が、加齢による硝子体の液化につながるのではないかと考える。

硝子体は、 100°C の加熱や超音波による強烈な振動などの物理的刺激³⁰⁾、 Fe^{+3} や Cu^{+2} の金属イオンの存在³¹⁾、あるいは collagenase³⁰⁾、hyaluronidase²¹⁾³⁰⁾ の酵

素や Nd-YAG レーザーの照射³²⁾によっても、ゲル構造が破壊され、液化することが知られている。しかし、これらの液化は特殊な条件のもとで生じたものであり、加齢による硝子体の液化の機序とは考えにくい。今回の実験結果から、加齢による硝子体の液化に光により生じるフリーラジカルが関与している可能性が示唆された。また、硝子体にはフリーラジカルを除去して液化を防ぐ機構が存在していると推測された。

稿を終えるにあたり、ご指導いただいた Eye Research Institute and Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, USA の Bireswar Chakrabarti 博士、ならびに上野則夫博士に感謝いたします。また、ご校閲いただいた保坂明郎教授に感謝いたします。なお本研究は、三島済一記念眼科研究国際交流基金の助成を受けた。

文 献

- 1) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: Histology of the Human Eye. Philadelphia, Saunders, 607—637, 1971.
- 2) Berman ER, Voaden M: The vitreous body, in Graymore CN (ed): Biochemistry of the Eye, New York, Academic Press, 373—471, 1970.
- 3) Balazs EA, Denlinger JL: The vitreous, in Davson H (ed): The Eye, London, Academic Press, 533—589, 1984.
- 4) Sebag J: The vitreous. New York, Springer-Verlag, 17—29, 1989.
- 5) Balazs EA: The molecular biology of the vitreous, in McPherson A (ed): New and Controversial Aspects of Retinal Detachment, New York, Harper & Row, 3—15, 1968.
- 6) Goldmann H: Senescenz des Glaskörpers. Ophthalmologica 143: 253—279, 1962.
- 7) Eisner G: Zur Anatomie des Glaskörpers. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 193: 33—56, 1975.
- 8) O'Malley P: The pattern of vitreous syneresis. A study of 800 autopsy eyes, in Irvine HR, O'Malley C (eds): Advances in Vitreous Surgery, Springfield, Charles C Thomas, 17—33, 1976.
- 9) Oksala A: Ultrasonic findings in the vitreous body at various ages. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 207: 275—280, 1978.
- 10) Balazs EA, Denlinger JL: Aging changes in the vitreous, in Dismukes K, Sekular R (eds): Aging and Human Visual Functions, Modern Aging Research Series (vol 2), New York, Alan R Liss, 45—47, 1982.
- 11) Foos RY, Wheeler NC: Vitreoretinal junc-

- ture, synchysis senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* 89: 1502-1512, 1982.
- 12) **Larsson L, Osterlin S**: Posterior vitreous detachment—A combined clinical and physicochemical study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 223: 92-95, 1985.
 - 13) **Pischel DK**: Detachment of the vitreous as seen with slit lamp examination. *Trans Am Ophthalmol Soc* 50: 329-346, 1952.
 - 14) **Lindner B**: Acute posterior vitreous detachment and its retinal complications. *Acta Ophthalmol* 87(Suppl): 1-108, 1966.
 - 15) 高橋正孝: 経年性後部硝子体剥離. 1077 正常眼の分析. *臨眼* 36: 1137-1141, 1982.
 - 16) **Schepens CL**: *Retinal Detachment and Allied Diseases*. Philadelphia, WB Saunders, 37-67, 1983.
 - 17) **McCord JM**: Free radicals and inflammation. Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529-531, 1974.
 - 18) **Andley UP, Chakrabarti B**: Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 115: 894-901, 1983.
 - 19) **Chakrabarti B, Park JW**: Glycosaminoglycans. Structure and interaction. *CRC Crit Rev Biochem* 8: 225-313, 1980.
 - 20) **Armand G, Chakrabarti B**: Conformational differences between hyaluronates of gel and liquid human vitreous. Fractination and circular dichroism studies. *Curr Eye Res* 6: 445-450, 1987.
 - 21) **Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, et al**: Effects of visible light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Exp Eye Res* 44: 863-870, 1987.
 - 22) **Foote CS**: Photosensitized oxidation and singlet oxygen. Consequences in biological systems, in Proyor WA (ed): *Free Radicals in Biology*, New York, Academic Press, 85-133, 1976.
 - 23) **Bose SK, Mandel K, Chakrabarti B**: Sensitizer-induced conformational changes in lens crystallin. II. Photodynamic action of riboflavin on bovine α -crystallin. *Photochem Photobiol* 43: 525-528, 1986.
 - 24) **Zigman S**: Light damage to the lens, in Miller D (ed): *Clinical Light Damage to the Eye*, New York, Academic Press, 65-78, 1987.
 - 25) **Balazs EA, Laurent TC, Howe AF, et al**: Irradiation of mucopolysaccharides with ultraviolet light and electrons. *Radiation Res* 11: 149-164, 1959.
 - 26) **Sakaue H, Negi A, Honda Y**: Comparative study of vitreous oxygen tension in human and rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1933-1937, 1989.
 - 27) **Tolentino FI, Schepens CL, Freeman HM**: *Vitreoretinal Disorders*. Philadelphia, Saunders, 121-129, 1976.
 - 28) **Crouch R, Priest DG, Duke EJ**: Superoxide dismutase activities of bovine ocular tissues. *Exp Eye Res* 27: 503-509, 1978.
 - 29) **Liles MR, Newsome DA, Oliver PD**: Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 109: 1285-1288, 1991.
 - 30) 岩田修造: 硝子体液化に関する生化学的考察. *日眼会誌* 85: 1969-1974, 1981.
 - 31) **Chattopadhyay D, Akiba J, Ueno N, et al**: Metal ion-catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid. Role of radicals and radical ions. *Ophthalmic Res* (in press).
 - 32) **Nasrallah F, Ueno N, Chakrabarti B, et al**: Can the neodymium YAG photodisruptor liquefy the vitreous? *Ophthalmic Laser Therapy* 3: 63-69, 1989.