

老化促進モデルマウスにおけるブルッフ膜の加齢性変化

高田百合子, 緒方奈保子, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

老化促進モデルマウス (senescence accelerated mouse, SAM) P/1 の 2, 8, 14 か月齢の眼球を用いて, ブルッフ膜の加齢による形態学的変化をタンニン酸染色を行い, 透過型電子顕微鏡で観察した. 対照群としては BALB/c マウスの眼球を用い比較検討した. SAM 眼球後極部では, ブルッフ膜は加齢に伴い肥厚がみられた. なかでも脈絡膜毛細血管側の基底膜の肥厚が著しかった. 内外膠原線維層の膠原線維の直径は, 2 か月齢では直径の大小不同が著しいが, 成長と共に均一化の傾向が見られた. さらに加齢が進むと線維間の離間が大きくなり, 基質内に微細線維様物質が多く見られるようになった. 周辺部では, 後極部に見られる特徴的な変化が少なく, 加齢の影響が少なかった. BALB/c マウスの眼球後極部でも SAM と同様の変化を認めたが, SAM に比べて発現時期は遅かった. すなわち, SAM ではブルッフ膜においても正常老化性変化が促進して見られ, それは特に後極部で著しかった. (日眼会誌 97: 595-601, 1993)

キーワード: 加齢性変化, ブルッフ膜, 老化促進モデルマウス, タンニン酸染色, 老化

Age-related Changes in Bruch's Membrane of the Senescence Accelerated Mouse

Yuriko Takada, Nahoko Ogata, Hiroshi Ohkuma
and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

We studied pathological changes in Bruch's membrane of Senescence Accelerated Mouse (SAM) P/1. Tannic acid was used to demonstrate collagen fibers and microfibrils in Bruch's membrane. With aging, thickening of Bruch's membrane, especially thickening of the basement membrane of the choriocapillaris, was remarkable. The distance between collagen fibers also became wider, and many more fine fibrils appeared around each collagen fibril with aging. These changes were observed more in the posterior area than in the periphery. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 595-601, 1993)

Key words: Aging changes, Bruch's membrane, Senescence accelerated mouse, Tannic acid staining, Senescence

別刷請求先: 570 守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 高田百合子

(平成4年9月28日受付, 平成4年12月17日改訂受理)

Reprint Requests to: Yuriko Takada, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received September 28, 1992 and accepted in revised form December 17, 1992)

I 緒 言

老化に伴う眼底変化は重要で、以前から多くの報告があるが^{11)~13)}、未だ不明の点が多い。一方、老化促進モデルマウス *senescence accelerated mouse* (以下 SAM と略す)は、1981年竹田ら¹⁴⁾¹⁵⁾によって確立された。SAM は老化促進とアミロイド症を呈する系統で、促進老化を呈する P 系と正常な老化過程を示す R 系とがあり、SAM P 系の平均寿命は 11.8 か月、R 系では 17.3 か月である。そして、集団としての老化特性および病理学的所見から、SAM P 系および R 系ともに集団としては質的に同一な加齢過程を経て死に至っており、両系間の違いは、ただ老化徴候発現の時期およびその程度の差にあると考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾。このため、正常老化の強調所見は短期間の経過観察でわかり、様々の部門から研究され報告されている^{16)~20)}。その特徴としては、行動性の低下、脱毛、覆毛光沢の減退消失、覆毛粗雑、脊椎前後弯増強、寿命の短縮などがある。

眼科領域では眼瞼炎、白内障などが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾²⁰⁾。我々²¹⁾は SAM P/1 を用い、網膜色素上皮細胞を中心に加齢による変化を観察し、網膜色素上皮細胞における基底側細胞膜嵌入の開大、細胞間隙の離開、胞体内のリポフスチン顆粒の増加を既に報告した。このような変化は生後 5 月からみられ、正常の対照 BALB/c マウスと比べると老化が早く現れた。また、これらの変化は後極部網膜に強く周辺部には少なかった。

今回はさらに、網膜脈絡膜の物質輸送の通路に当たるブルッフ膜が加齢に伴って変化する過程の組織像を一層明らかにするため、タンニン酸染色を用いて²²⁾形態学的に観察した。

II 実験方法

SAM P/1 の生後 2 か月、8 か月、14 か月齢のものを全身状態、行動などを観察したのちエーテル麻酔下にて眼球摘出した。対照実験としては、BALB/c マウスの同月齢を用いた。それぞれ各時期について 3 匹 5 眼以上観察に用いた。

試料作成は、1/2 カルノフスキー液 (2% グルタルアルデヒド、2% パラフォルムアルデヒド) にて灌流および浸漬にて前固定した後、細切を行い、1% 四酸化オスミウム液 (0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.4) にて後固定の後、エタノール系列にて脱水、プロピレンオキサイドにて置換の後、エポンにて包埋した。電子顕微

鏡観察には、超薄切片作成後、通常の酢酸ウラン、鉛による二重染色法と、タンニン酸²²⁾ (0.6% タンニン酸、1.4% パラニトロフェノール、0.05% 酢酸ウラン)、鉛による染色を行った。そして今回は、タンニン酸を用いたときの所見を主に報告する。またブルッフ膜の厚さ、膠原線維直径などの測定は一つの組織について、10 か所以上を 3~5 万倍にて電子顕微鏡撮影し、平均値、標準偏差を計算した。

III 結 果

生後 2 か月齢の SAM P/1 の後極部網膜では、ブルッフ膜の厚さは $0.820 \pm 0.211 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準偏差) であった (図 1)。基底膜の厚さは、網膜色素上皮細胞側では $0.038 \pm 0.005 \mu\text{m}$ 、脈絡膜毛細血管板側では $0.054 \pm 0.019 \mu\text{m}$ であった。膠原線維の断面直径は $0.049 \pm 0.011 \mu\text{m}$ であった。膠原線維直径の大小不同がみられたが、規則正しく配列していた (図 2)。

生後 8 か月齢の SAM P/1 の後極部網膜では、ブルッフ膜の厚さは $1.009 \pm 0.288 \mu\text{m}$ とやや肥厚していた (図 3)。基底膜の厚さは、網膜色素上皮細胞側では $0.44 \pm 0.007 \mu\text{m}$ と増大していた。また、脈絡膜毛細血管板側では $0.071 \pm 0.016 \mu\text{m}$ と 2 か月齢に比べかなり肥厚していた。膠原線維の断面直径は $0.043 \pm 0.007 \mu\text{m}$ で、2 か月齢と変化が少なかったが、大小不同はあまり著明ではなかった。また各膠原線維間はやや拡大し、その周囲に微細線維様物質をみた (図 4)。

生後 14 か月齢の SAM P/1 の後極部網膜ではブルッフ膜の厚さは $0.882 \pm 0.199 \mu\text{m}$ であった (図 5)。基底膜の厚さは、網膜色素上皮細胞側では $0.043 \pm 0.006 \mu\text{m}$ で、8 か月齢と変化をみななかった。しかし、脈絡膜毛細血管板側では $0.082 \pm 0.020 \mu\text{m}$ とさらに増大し、網膜色素上皮細胞側基底膜の約 2 倍の厚さになった。膠原線維の直径は $0.045 \pm 0.008 \mu\text{m}$ で加齢による変化をみななかったが、膠原線維断面直径の大小不同は増加し、線維間の離開、線維配列の乱れがみられた。また各膠原線維間には、微細線維様物質が増加していた (図 6)。

対照の BALB/c マウスの後極部でも SAM と同じように加齢性変化がみられた。しかし、その変化は軽く、主に 12 か月齢以降で、SAM に比べるとかなり遅い時期に同様の変化が出現した (図 7, 8)。

周辺部網膜では、SAM P/1、BALB/c とともに加齢による変化は著明でなく、差をみななかった。

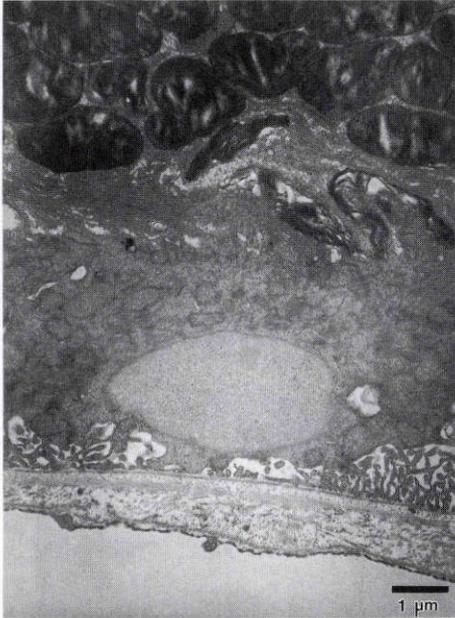


図1 生後2か月齢のSAM P/1の後極部網膜。ブルッフ膜の厚さは $0.820 \pm 0.211 \mu\text{m}$ である。(タンニン酸染色)

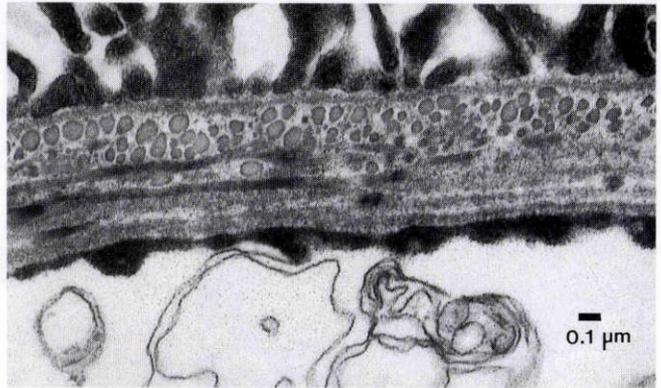


図2 生後2か月齢のSAM P/1の後極部ブルッフ膜。基底膜の厚さは、網膜色素上皮細胞側では $0.038 \pm 0.005 \mu\text{m}$ 、脈絡膜毛細血管板側では $0.054 \pm 0.019 \mu\text{m}$ 、膠原線維の断面直径は $0.049 \pm 0.011 \mu\text{m}$ である。膠原線維直径の大小不同がみられるが、規則正しく配列している。(タンニン酸染色)

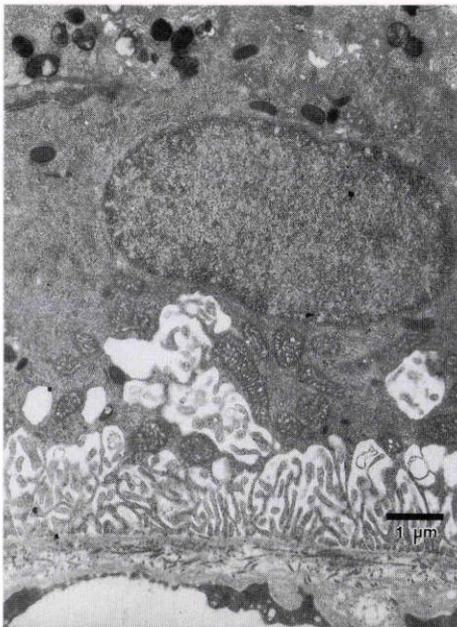


図3 生後8か月齢のSAM P/1の後極部網膜。ブルッフ膜の厚さはやや肥厚している。(タンニン酸染色)

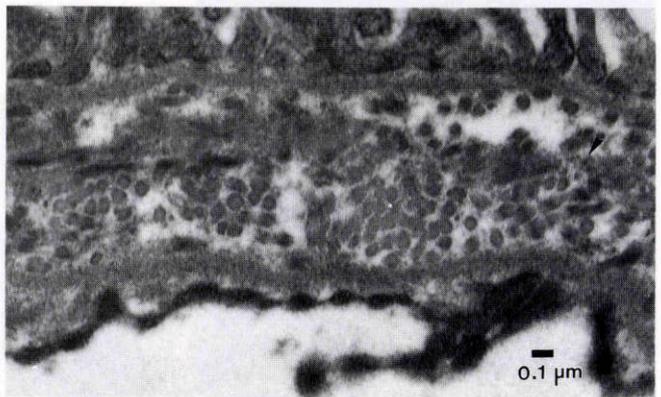


図4 生後8か月齢のSAM P/1の後極部ブルッフ膜。基底膜の厚さは、網膜色素上皮細胞側では増大している。脈絡膜毛細血管板側では、2か月齢に比べかなり肥厚している。膠原線維の断面直径は、2か月齢と変化が少ないが、大小不同はあまり著明ではない。各膠原線維間はやや拡大し、微細線維様物質をみる(矢尻)。(タンニン酸染色)

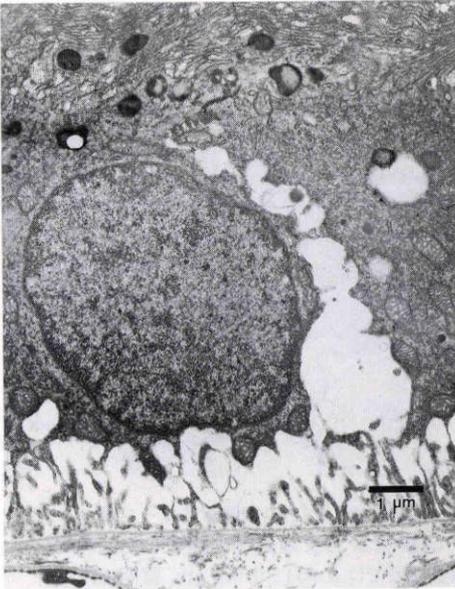


図5 生後14か月齢のSAM P/1の後極部網膜。ブルッフ膜の厚さは $0.882\mu\text{m} \pm 0.199\mu\text{m}$ である。(タンニン酸染色)

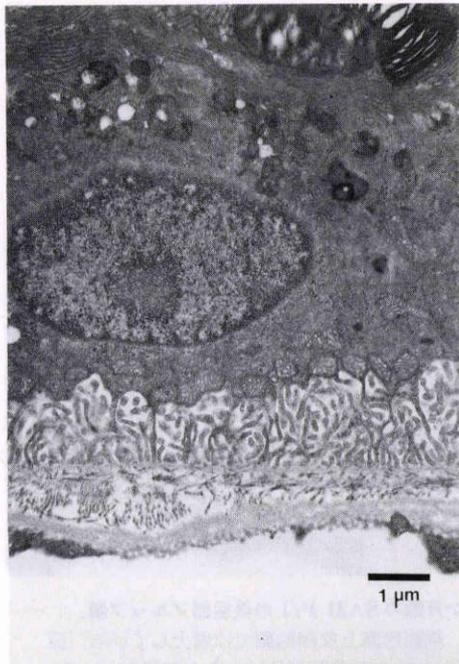


図7 生後12か月齢のBALB/cの後極部網膜。ブルッフ膜の厚さはこの頃よりわずかに肥厚がみられる。(タンニン酸染色)



図6 生後14か月齢のSAM P/1の後極部ブルッフ膜。基底膜の厚さは、網膜色素上皮細胞側では8か月齢と変化がない。脈絡膜毛細血管板側ではさらに増大し、網膜色素上皮細胞側基底膜の約2倍の厚さになる。膠原線維の直径は変化はないが、膠原線維断面直径の大小不同は再び増加し、線維間の離開、線維配列の乱れがみられる。また各膠原線維間には、微細線維様物質が増加している(矢尻)。(タンニン酸染色)

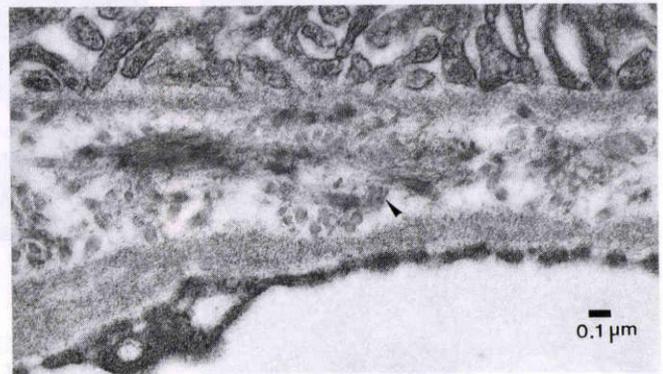


図8 生後12か月齢のBALB/cの後極部ブルッフ膜。基底膜の厚さは、脈絡膜毛細血管板側で増加している。膠原線維の大小不同はあまり著明ではない。各膠原線維間には微細線維様物質をみる(矢尻)。(タンニン酸染色)

IV 考 按

網膜脈絡膜の加齢性変化は、従来から多くの報告がある^{11)~13)}。

ブルッフ膜は、電子顕微鏡的には内側から、網膜色素上皮細胞の基底膜、内側膠原線維層、弾性線維層、外側膠原線維層、脈絡膜毛細血管板の基底膜の5層から成っている。人眼におけるブルッフ膜の加齢変化は、初期には膠原線維層に変化が現れ、小さい空胞、電子密度の高い微細顆粒物質、粗大な顆粒物が蓄積し、線維成分が増加すると言われている。これらの変化は進行すると次第に増加して、50歳以降では外側膠原線維層にまで広がり、電子密度の高い微細顆粒物質や無構造物質が蓄積し外側膠原線維層も厚くなる。また弾性線維層は加齢が進むと断裂し、次第に不明瞭になるとされている⁹⁾。SAM P/1では、後極部網膜におけるブルッフ膜の厚さは加齢と共に若干増加していた。網膜色素上皮細胞側基底膜は成熟に伴い厚くなったが、8か月齢以降は変化がなかった。脈絡膜毛細血管板側の基底膜は、2か月齢の早期では網膜色素上皮細胞側の基底膜とほぼ同じであったが、加齢と共に肥厚し14か月齢では網膜色素上皮細胞側に比べ2倍の厚さになった。

人眼では、2歳の幼児のブルッフ膜の厚さは約1.6 μm であるが、Hogan¹¹⁾によると加齢変化は既に20歳以降で観察され、70歳頃になると約3.6 μm と2倍以上に厚さが増加している。今回のSAMでもブルッフ膜の肥厚がみられたが、人眼ほど著しくなかった。しかし基底膜の肥厚は網膜色素上皮細胞側、脈絡膜毛細血管板側共にみられ、これは網膜色素上皮細胞あるいは脈絡膜毛細血管内皮細胞の加齢による機能変化を反映していると思われる。

膠原線維の直径は加齢によっても、その全体を平均すると変わらなかった。また、線維の直径は成熟に伴い大小不同は少なくなり均一化した。加齢が進むと再び大小不同がみられ、線維間の離開、配列の乱れがみられた。加齢と共に各膠原線維間には微細線維様物質が増加しており、これはとくに外膠原線維層に著明であった。

一般には、老化動物では膠原線維の直径が増加し²³⁾、膠原線維の直径の不同が目立ち、線維に捻れが見られることがある。そして横断面では線維の輪郭が不正となる。このような変化が起こる理由は明らかではないが、加齢に伴って起こるコラーゲンの架橋や線維間の

セメント物質の変化に起因するものと推定した²⁴⁾。Mausel²⁵⁾は加齢と共にコラーゲンのH³-プロリンの取り込みの減少とC₁₄-グルコサミンの取り込みの増加が起こることを報告している。今回の結果では、2か月から8か月と加齢が進むと線維の直径は均一化し、成長過程と考えられた。そして、さらに加齢が進むと大小不同が著明になった。これは成長と共に網膜色素上皮細胞の膠原線維産生が活発化すると共に、膠原線維も成長し均一化していくが、さらに加齢が進み老化すると細胞機能の衰弱をきたし膠原線維産生が低下し、線維の成長が止まり、さらには従来からある線維が変性するため、大小不同が出現すると思われた。そして膠原線維間には微細線維様物質が多数見られるようになった。ヒトでは50歳を過ぎると、このような物質の増加はブルッフ膜の網膜色素上皮細胞のみならず、脈絡膜側でも観察される。さらに網膜色素上皮細胞由来と思われる残余物、脂肪、被膜小胞などの集積が観察される^{26)~28)}。

このようにブルッフ膜の肥厚は、基底膜の肥厚、膠原線維間への微細線維様物質の貯留の増大があげられ、従来の報告と同様であった。そして、これらの加齢性変化が網膜色素上皮細胞側と脈絡膜毛細血管板との間の物質輸送の変化を表しているのではないかと推定した。さらに加齢の進行と共に、膠原線維間の離開、配列の乱れが著明になり、このような変化が加齢性黄斑疾患の発生素地となると思われた。

周辺部ではこれらの変化は少なく、後極部に強くみられた。これは、加齢に伴う病変が黄斑部に起こる原因について、Gass²⁹⁾が述べているように黄斑部は短毛様体動脈からきわめて豊富な血液供給をうけており、黄斑部の脈絡膜毛細血管内圧は高く、脈絡膜血流量が多く、加齢による老化に黄斑部の毛細血管が耐え得ない。また、黄斑部の網膜色素上皮細胞の代謝は他の部位に比べてきわめて活発である。さらに黄斑部の網膜色素上皮細胞は長期間にわたり光を浴びている。このような網膜色素上皮細胞の加齢に伴う代謝の変化がブルッフ膜を構成している膠原線維産生などに影響を与えていると思われた。

対照のBALB/cマウスでも同様の变化を認めたが、変化の程度はゆるやかで12月齢以降に著明になった。このことは、SAMが対照動物と比べて早期より加齢変化がみられ、老化の動物モデルとして有意義であると思われた。

本稿の要旨は、第57回日本中部眼科学会(1991年9月21

日, 浜松)において高田が発表した。

稿を終えるにあたり, 老化促進モデルマウスを配布して頂きました京都大学胸部疾患研究所竹田俊男教授に感謝致します。

文 献

- 1) **Hogan MJ, Alvarado JA**: Studies on the human macula. IV Aging changes in Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 77: 410-420, 1967.
- 2) **Hogan MJ**: Bruch's membrane and disease of the macula. *Trans Ophthalmol Soc UK* 87: 113-161, 1967.
- 3) **Tso MO, Friedman E**: The retinal pigment epithelium. III. Growth and Development. *Arch Ophthalmol* 80: 214-216, 1968.
- 4) **Friedman E, Tso MO**: The retinal pigment epithelium. II. Histologic changes associated with age. *Arch Ophthalmol* 79: 315-320, 1968.
- 5) **Wright JR, Calkins E, Breen WJ**: Relationship of amyloid to aging. Review of literature and systematic study of 83 patients derived from a general hospital population. *Medicine* 48: 39-60, 1969.
- 6) **Hogan MJ**: Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. *Trans Acad Ophthalmol* 76: 64-80, 1972.
- 7) **Mishima H, Hasebe H, Kondo K**: Age changes in the fine structure of the human retinal pigment epithelium. *Jpn J Ophthalmol* 79: 475-486, 1978.
- 8) **Mishima H, Hasebe H**: Some observation in the fine structure of age changes of the mouse retinal pigment epithelium. *Albrecht v Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 22: 476-485, 1978.
- 9) **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細胞の観察. *日眼会誌* 88: 641-652, 1984.
- 10) **三嶋 弘, 後長道伸**: 網膜色素上皮細胞と血液網膜柵の加齢変化. 戸張幾生(編): *眼科 Mook*, 29, 老人と眼, 金原出版, 東京, 36-50, 1986.
- 11) **水野計彦, 三宅養三, 平野耕治**: 黄斑部の加齢変化の超微形態所見. 厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究班, 昭和62年度研究報告書, 66-69, 1988.
- 12) **松村美代, 本田孔士**: 眼の加齢 1. 加齢による形態変化. 市川 宏(編): *眼科 Mook*, 39, 労働眼科, 金原出版, 東京, 22-30, 1989.
- 13) **Feeny BL, Burns PR, Gao C**: Age-related macular changes in human over 90 years old. *Am J Ophthalmol* 109: 265-278, 1990.
- 14) **Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, et al**: A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17: 183-194, 1981.
- 15) **Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K**: Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 39: 911-919, 1991.
- 16) **Takeshita S, Hosokawa M, Irino M, Higuchi K, Shimizu K, Yasuhira K, et al**: Spontaneous age-associated amyloidosis in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 20: 13-23, 1982.
- 17) **Hosokawa M, Takeshita S, Higuchi K, Shimizu K, Irino M, Toda K, et al**: Cataract and other ophthalmic lesions in senescence accelerated mouse (SAM). Morphology and incidence of senescence associated ophthalmic changes in mice. *Exp Eye Res* 38: 105-114, 1984.
- 18) **Hosokawa M, Asida Y, Tsuboyama T, Chen WH, Takeda T**: Cataract in senescence accelerated mouse (SAM). 2. Development of a new strain of mouse with late-appearing cataract. *Exp Eye Res* 47: 629-640, 1988.
- 19) **Hosokawa M, Hosono K, Higuchi A, Aoike A, Kawai K, Takeda T**: Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. I. Age-associated early decline in immune activities of cultured spleen cells. *Immunology* 62: 419-423, 1987.
- 20) **西本浩之, 宇賀茂三, 宮田幹夫, 石川 哲**: 10か月齢から13か月齢老化促進マウス水晶体の加齢性変化. *あたらしい眼科* 6: 1851-1853, 1989.
- 21) **緒方奈保子, 大熊 紘, 金井清和, 南後健一, 高田百合子, 宇山昌延**: 老化促進モデルマウスの網膜色素上皮細胞, プルッフ膜の加齢性変化. *日眼会誌* 96: 180-189, 1992.
- 22) **Kajikawa K, Yamaguchi T, Katsuda S, Miwa A**: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J Electron Microsc* 24: 287-289, 1975.
- 23) **Fitton JS**: The morphogenesis of avian tendon. *Proc R Soc Lond Ser B* 644: 556-576, 1955.
- 24) **梶川欽一郎**: 結合組織. 1版, 金原出版, 東京, 131-176, 1984.
- 25) **Mausel E, Bouissou H, Rieraggi MT, Julian M**: Age dependent biochemical changes in dermal connective tissue. Relationship to histological and ultrastructural observations. *Connect Tissue Res* 8: 33-39, 1980.
- 26) **Garron LK**: The ultrastructure of the retinal pigment epithelium with observations on the

- choriocapillaris and Bruch's membrane. *Trans Am Ophthal Soc* 61: 545-588, 1963.
- 27) **Essner E, Gordon SR**: Demonstration of microfibrils in Bruch's membrane of the eye. *Tissue and cell* 16: 779-788, 1984.
- 28) **Killingsworth MC**: Age-related components of Bruch's membrane in the human eye. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 225: 406-412, 1987.
- 29) **Gass DMJ**: Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium. III. Senile disciform macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 63: 617-645, 1967.
-