

原 著

前眼部蛍光測定装置による水晶体自発蛍光の生体内定量

獨協医科大学越谷病院 眼科¹⁾

新越谷アイクリニック²⁾

いきいき眼科³⁾

吉田眼科病院⁴⁾

中村 昌弘^{1,2)} 新井 清美¹⁾ 小俣 仁¹⁾

林 振民^{1,3)} 吉田紳一郎^{1,4)} 筑田 眞¹⁾

要 旨 前眼部蛍光測定装置を改良し、励起側中心波長 Ex 340 nm (260-390 nm)、蛍光側中心波長 Em 440 nm (400~710 nm) で白内障のない水晶体の自発蛍光を *in vivo* で測定した。水晶体自発蛍光値の年代別変化は、10 歳代 38.7 ± 8.4 (photoncount/msec)、20 歳代 56.0 ± 15.4 、30 歳代 74.4 ± 14.4 、40 歳代 94.2 ± 28.6 、50 歳代 115.3 ± 27.0 、60 歳代 113.8 ± 32.3 で、50 歳代まで加齢とともに増加し、水晶体の自発蛍光は年齢と有意な正の相関を示した ($r=0.76$, $p<0.01$)。水晶体の自発蛍光値の増加は加齢現象を示す指標の一つであり、本測定装置により水晶体の加齢変化を非侵襲かつ簡便に測定できると考えられた。

Key Words : 水晶体, 自発蛍光, 前眼部蛍光測定装置, 加齢

I 緒 言

ヒト水晶体では 340 nm 付近の波長で励起すると 440 nm 付近に発する自発蛍光があり、加齢とともに増加することが摘出された水晶体の *in vitro* での測定で報告されている¹⁾。年齢と共に変化する水晶体の自発蛍光は加齢現象を示す指標の一つと考えられることから、その値を正確に定量化することが望まれている。著者らは前眼部撮影装置と画像解析装置を改良し、生体眼における水晶体の自発蛍光の定量化について報告した²⁻⁵⁾。今回、より簡便に改良した新たな前眼部蛍光測定装置を用いて生体眼における水晶体の自発蛍光の定量化を行ったので報告する。

II 対象および方法

1. 対 象

10 歳から 60 歳の各年代で白内障のない検診患者およびボランティアの水晶体を対象とした。屈折異常以外の

前眼部および後眼部疾患のあるもの、全身疾患で糖尿病のあるものは除外した。対象は検診患者およびボランティアである。10 歳代は 33 例 66 眼 (平均年齢 13.8 ± 2.7 歳)、20 歳代は 20 例 37 眼 (24.6 ± 2.8)、30 歳代は 19 例 35 眼 (33.2 ± 3.0)、40 歳代は 27 例 53 例 (44.5 ± 3.3)、50 歳代は 67 例 126 眼 (55.0 ± 2.8)、60 歳代は 46 例 83 眼 (63.9 ± 3.0)、10 歳未満 (8 ± 0) についても 5 例 10 眼と例数が少ないが測定を行った。なお本研究に際し被験者に研究の趣旨を説明し本人の同意を得たうえで研究を行った (獨協医科大学越谷病院生命倫理委員会 承諾番号 越谷 22025)。

2. 方 法

1) 前眼部蛍光測定装置 (アンテリアフルオロメーター FL-500, 興和社製) の仕様 (表 1, 図 1)

水晶体に対する光源とカメラのなす角度は、“光源—水晶体—カメラ”の測定角度は 90° に固定し、前眼部撮影装置の励起光源から水晶体までの光路上に励起フィルター (excitation filter : Ex) HOYA U-340 [中心波長 340 nm (260~390 nm)] を挿入し、水晶体からカメラまでの光路上には蛍光フィルター (emission filter : Em) FUJIS SC42+FUJI SP5+HOYA CM500S [中心波長 440 nm (420~690 nm)] を挿入して水晶体の自発蛍光を測定し

平成 27 年 3 月 31 日受付, 平成 27 年 6 月 10 日受理
別刷請求先 : 中村昌弘

〒343-0845 埼玉県越谷市南越谷 1-11-4 新越谷ビルプラザ館 1 階 新越谷アイクリニック

表1 前眼部蛍光撮影装置の仕様 (アンテリアフルオロメーター FL-500, 興和社製)

| | |
|--------------|--|
| 投光系 | |
| 測定ランプ | ハロゲンランプ (7.2V, 15W) |
| 励起フィルター | バンド幅 260~390 nm |
| マスク形状 (被験眼上) | Area mode 直径 2.5 mm |
| 受光系 | |
| 蛍光フィルター | バンド幅 420~690 nm |
| マスク形状 (被験眼上) | Area mode 直径 2mm のサークル内に直径 0.1 mm のピンホールを 37 個開口 |
| 測定角 | 90° |
| 測定時間 | 0.2 秒 |
| スリットランプ機能 | 光源 (ハロゲンランプ 12V, 30W) |

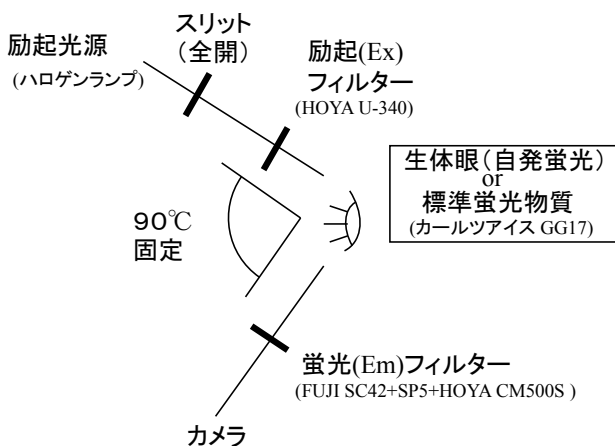


図1 前眼部撮影装置による自発蛍光測定-構造図-

た。自発蛍光値は、標準蛍光物質（スタンダード CG17, カールツアイス社製）を前眼部蛍光測定装置の生体眼を測定する位置に設置して測定を行い、その値を基準に毎回補正を行って同一条件で水晶体自発蛍光値を測定した。被検者の眼球運動や瞬目の影響を少なくするために水晶体の観察は白色光で行い、測定時に切り替えスイッチで瞬時に測定光に切り替わるように改良した。

2) 水晶体蛍光強度の測定

暗室にて十分な散瞳下（7.0 mm 以上）で前眼部蛍光測定装置を用いて水晶体中央部の蛍光強度を測定した。蛍光強度は5回以上の測定値から平均を求めた。また暗室の微弱光を補正するため測定直前にバックグラウンド値（5回以上の平均）を測定した。水晶体自発蛍光値（photoncount/msec）は測定値よりバックグラウンド値を引いた値とした。

測定結果は Mann-Whitney の U 検定およびピアソンの相関係数を用いて統計解析を行った。

III 結 果

1. 水晶体の自発蛍光値は、年齢と有意な正の相関がみられた ($r=0.76, p<0.01$) (図2)。

2. 水晶体自発蛍光の年代別変化

水晶体自発蛍光値は、10歳代 38.7 ± 8.4 , 20歳代 56.0 ± 15.4 , 30歳代 74.4 ± 14.4 , 40歳代 94.2 ± 28.6 , 50歳代 115.3 ± 27.0 , 60歳代 113.8 ± 32.3 で、50歳代まで加齢とともに増加していた (図3)。隣接する各年代間では、10歳代と20歳代、20歳代と30歳代、30歳代と40歳代、40歳代と50歳代で各々有意差があり (各 $p<0.01$)、50歳代と60歳代間では有意差はなかった。また例数が少ないが10歳未満と10歳代とでは有意差がなかった。

IV 考 察

生体眼での水晶体自発蛍光の測定について、著者らは長年にわたって前眼部撮影装置の撮影条件、Ex, Em フィルター、画像解析装置を改良し自発蛍光の定量化について報告している²⁻⁵⁾。今回、より簡便な新しい前眼部蛍光測定装置を用いて、白内障のないヒト水晶体の自発蛍光の測定を行い加齢変化について検討した。水晶体の自発蛍光物質は様々な種類が知られており、各々の性質や作用に様々な違いがある。その中で、今回測定された自発蛍光がどの物質に由来する可能性が高いか、過去の文献を参照し今回得られた結果と考え合わせて、白内障のない水晶体で加齢とともに増加する自発蛍光物質について可能な限り、以下に考察した。

ヒト水晶体では加齢とともに黄色に着色する現象がみられる。これは主にトリプトファンの酸化代謝産物 (oxidation metabolite of tryptophan; Ox-trp metabo) による影響が大きいといわれている^{6,7)}。Ox-trp metaboの自発蛍光物質は網膜保護のための紫外線 (UV) フィルターとして機能し、今回の測定波長域である中心波長

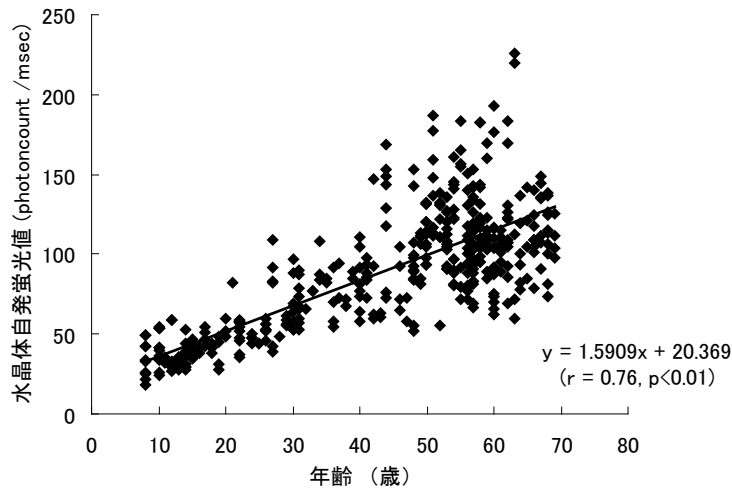


図2 全身疾患や屈折異常以外の眼疾患がない対象者における水晶体自発蛍光と年齢の関係

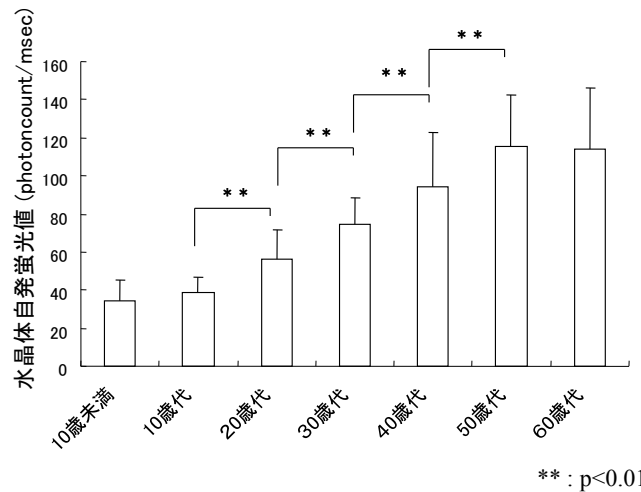


図3 年代別の水晶体自発蛍光

340 nm 付近 (Ex 320~360 nm) の励起で中心波長 440 nm 付近 (Em 420~440 nm) に蛍光を発生し、長期間の近紫外線 (UVA) 暴露などにより、加齢とともに不溶性の蛋白質結合型 Ox-trp metabo の自発蛍光が増加することが報告されている^{1,6,7)}。

不溶性の Ox-trp metabo 蛍光物質は、非配糖体の一部の蛍光物質は光増感剤として UV 暴露で活性酸素を産生して蛋白質の架橋形成を促進し水晶体を混濁させるが、2-amino-3-OH-acetophenone-O-β-glucoside (AHA-Glc) などの配糖体の蛍光物質は光増感作用を示さず UVA 照射でもスーパーオキシドなどの活性酸素の生成は非常に少なく、α-クリスタリンなど水晶体蛋白質の変化も生じないため、抗酸化作用をもち生体に安全な長寿命の UV 除去フィルターと考えられている⁸⁾。

水溶性の Ox-trp metabo の蛍光物質のうち、キヌレニ

ン、3-OH-kynurenine-O-β-glucoside (3-OHKG)、α-diamino-3-OH-kynurenine-O-β-glucoside (DHKN-Glc) などがよく知られているが、これらは加齢とともに減少する⁹⁾。キヌレニは非配糖体で UV 照射により活性酸素を発生させる光増感物質である⁶⁾が、ストレス蛋白質の一種である αB-クリスタリンの存在下ではその分子シャペロンの機能により UV 照射時のキヌレニからの活性酸素の発生が抑制されることが知られている¹⁰⁾。しかし加齢によりシャペロン機能も他の抗酸化物質同様に低下すると全体的な抗酸化能が低下し、S-S 結合性架橋の増加と膜機能の低下などにより、水溶性蛋白質が凝集・高分子化して不水溶性化し、その高分子量蛋白質が更にシャペロン機能を阻害して水溶性蛋白質の減少、水晶体の混濁化につながるといわれている⁶⁾。3-OHKG や DHKN-Glc は配糖体で、3-OHKG は光増感

作用はなく抗酸化作用を示すことが知られている⁸⁾。一方、加齢とともに増加する自発蛍光物質として、水溶性の Ox-trp metabo のうち Glutathionyl-3-OH-kynurenine-O- β -glucoside (GSH-3-OHKG) が報告されている⁹⁾。GSH-3-OHKG も配糖体であり抗酸化作用を持つ還元型グルタチオン (GSH) と前述の 3-OHKG が結合した蛍光物質である¹¹⁾。その含有量は加齢や UV 暴露時には GSH や 3-OHKG の変動に密接に影響すると報告されている⁹⁾。

本研究で加齢とともに自発蛍光の増加がみられたため、混濁前の水晶体においてもこれら不溶性の AHA-Glc など蛋白質結合型の Ox-trp metabo と水溶性の GSH-3-OHKG の蛍光物質が増加している可能性が考えられる。不溶性蛋白質の増加に伴い水晶体の混濁が進行することを考慮すると、本研究で増加していた自発蛍光は蛋白質非結合型で水溶性の GSH-3-OHKG の増加による可能性の方が高いことも推察される。

Ox-trp metabo 以外の蛍光物質として、白内障眼では不溶性蛋白質の増加に関与する架橋形成物質のペントシジンなど、非酵素的後期糖化反応産物 (AGEs) の蛍光物質が存在し加齢とともに増加する^{12~14)}。このペントシジンの水晶体中の濃度と自発蛍光強度は有意な相関 ($r=0.59$, $P<0.01$) があり、糖尿病白内障の方が加齢白内障に比べペントシジン濃度は有意に高値であるが、ペントシジンの至適蛍光波長 (Ex 335 nm, Em 385 nm) での自発蛍光強度については、糖尿病白内障の方が加齢白内障に比べて高値であったが有意差はなかった^{13,14)}。これは糖尿病白内障においても加齢による影響が、自発蛍光の測定ではより強く反映された結果ではないかと考えられる。ペントシジンはアルギニン由来の構造を持つ AGEs 性蛍光物質であるが老化ヒト水晶体中におけるアルギニン由来の AGEs が増加¹⁵⁾ し、加齢により非糖尿病患者においても過酸化反応などによってアルデヒド類が増加し AGE 化が進むとの報告¹⁶⁾ があり、糖尿病・非糖尿病白内障ともに加齢による耐糖能の低下や過酸化反応が水晶体の自発蛍光強度に影響しているのではないかと考えられる。また加齢による抗酸化能の低下により水晶体中の酸化型アスコルビン酸が増加し、アスコルビン酸からのペントシジンの形成も *in vitro* の系では考えられている¹⁷⁾ が、アスコルビン酸が UV フィルターとして機能する 300 nm 以下の紫外線の低波長域 (UVB) は角膜で吸収され水晶体には到達しない。しかし水晶体はアスコルビン酸が豊富に存在する組織であり、還元型の L-アスコルビン酸は UVA 照射時に AGEs の分解に関与するとの報告¹⁸⁾ や酸化型アスコルビン酸と AGEs が関与して水晶体の着色化に関与するとの報告¹⁹⁾ もある。前述の

キヌレニンやペントシジンは着色性色素である。

本検討では Ex340 nm (260~390 nm), Em440 nm (400~710 nm) であるため直接ペントシジン由来の自発蛍光の測定を想定してはならず、糖尿病患者では自発蛍光が高いことも報告されている^{20,21)} ため、本検討の対象からは除外した。また、非白内障眼を対象としている本研究の蛍光値には不溶性蛋白質が低年齢層では少ないと考えられ、ペントシジンの自発蛍光による影響も少ないと思われる。しかし本研究で白内障のない水晶体においても加齢に伴う自発蛍光の増加が確認されたことは、抗酸化能・耐糖能の加齢による低下が影響した結果と考えられる。

摘出水晶体のホモジネート試料からの *in vitro* 測定では、水晶体自発蛍光は 30 歳まではゆるやかに増加し、40 歳以降に急速に増加した後、次第に加齢とともに増加することが報告されている¹⁾。本研究で生体眼においても水晶体の自発蛍光は加齢とともに増加していることが明らかとなった。年齢と自発蛍光値は正の相関を示し、10 歳代から 50 歳代までは隣接する各年代間で自発蛍光値に有意差があり、ほぼ一定に 50 歳代まで年齢に従って徐々に蛍光値が増加するという規則的な変化がみられたが、*in vitro* での報告にある 40 歳以降の急速な増加はみられなかった。これは、*in vivo* と *in vitro* の違いだけでなく、我々の測定では摘出水晶体全体での蛍光値とは異なり、瞳孔領における水晶体蛍光値であること、生体眼における測定であるため摘出後に生じる過酸化反応の影響がないこと、細隙灯顕微鏡により厳密に非手術適応を確認した透明水晶体を対象に限定した結果ではないかと考えている。

年齢と水晶体自発蛍光が有意な正の相関を示したことは、年齢増加に伴う光暴露の蓄積時間と正比例しているということであり、水晶体の自発蛍光値の増加は加齢現象を示す指標の一つと考えられる。本測定装置は生体に影響を与えずに簡便に測定出来ることから加齢現象の程度判定には有効性が非常に高いと思われる。

硝子体手術後の水晶体の変化として小椋らは、水晶体の自発蛍光値と光線透過率は、50 歳未満の群では術後 1 年を経過しても有意な変化がみられなかったが、50 歳以上の群では術後 3 ヶ月以降、徐々に、自発蛍光の増加と光線透過率の低下、水晶体の核硬化にともなう近視化が認められ、硝子体手術後の核白内障の進行の確率も高齢であるほど高く、60 歳代では術後 1 年後に 81% と報告されている²²⁾。本検討で白内障のない水晶体において 50 歳代と 60 歳代の間で自発蛍光値の有意差がみられなかったことと、上記の硝子体手術後の水晶体の変化が 50 歳以上の群で生じるということを考え合わせると、本検討

の50歳代からの水晶体は非白内障の状態であっても加齢変化はかなり進行しており、もし、硝子体手術など水晶体周囲の環境の変化や過酸化反応の生じやすい状況下におかれるなどの要因により、水晶体は容易に変化し混濁が進行しやすい状態にあることが推察される。そして、50歳以上で自発蛍光が高い例では、水晶体の混濁が進行しやすい状態にあることが推定されるため、抗酸化物質の摂取など予防的な措置の推奨指針などに活用できる可能性も考えられた。

V 結 論

摘出水晶体での自発蛍光と同様に生体眼でも加齢と共に自発蛍光が増加することが確認された。しかし *vitro* の結果と異なり白内障のない水晶体においては、10歳代から50歳代までは加齢とともに水晶体の自発蛍光が増加していることが明らかとなった。本研究は、白内障のない水晶体での検討であるため、今後、様々な疾患での自発蛍光の変化を検討する上での基礎となるデータである。

文 献

- 1) Satoh K, Bando M, Nakajima A : Fluorescence in human lens. *Exp Eye Res* **16** : 167-172, 1973.
- 2) 吉田紳一郎 : ヒト水晶体自発蛍光の生体内定量化に関する研究. *獨協医誌* **10** : 31-42, 1994.
- 3) Lin J, 吉田紳一郎, 新井清美, 他 : 白内障水晶体の自発蛍光の定量化. *あたらしい眼科* **14** : 139-143, 1997.
- 4) 吉田紳一郎, 林振民, 中村昌弘, 他 : 網膜静脈分枝閉塞症の水晶体蛍光. *臨床眼科* **49** : 465-468, 1995.
- 5) 吉田紳一郎 : 眼のバイオメトリー —眼を正確に測定する— IV. 中間透光体 7. 水晶体自発蛍光の測定. *眼科プラクティス* **25** : 149-153, 2009.
- 6) 岩田修造編著 : 水晶体—その生化学的機構. メディカル葵出版, 1986.
- 7) 小原喜隆, 新井清美 : 眼の光障害 I 光の眼障害 4 水晶体 白内障の成因としての光. *眼科診療プラクティス* **5** : 22-27, 2002.
- 8) 井上周 : ヒト水晶体新規黄色色素の構造解析とその光学的性質に関する研究. 東京理科大学博士論文, 1995.
- 9) Bova LM, Sweeney MH, Jamie JF, et al : Major changes in human ocular UV protection with age. *IOVS* **42** : 200-205, 2001.
- 10) Aquilina JA, Truscott RJ : Kynurenine binds to the peptide binding region of the chaperone alphaB- crystallin. *Biochem Biophys Res Commun* **285** : 1107-1113, 2001.
- 11) Garner B, Vazquez S, Griffith R, et al : Identification of glutathionyl-3-hydroxykynurenine glucoside as a novel fluorophore associated with aging of the human lens. *J Biol Chem* **274** : 20847-20854, 1999.
- 12) Sell DR, Monnier VM : Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J Biol Chem* **264** : 21597-21602, 1989.
- 13) Hashimoto H, Arai K, Yoshida S, et al : Pentosidine and Autofluorescence in Lenses of Diabetic Patients. *Jpn J Ophthalmol* **41** : 274-277, 1997.
- 14) 橋本浩隆, 新井清美, 筑田眞, 他 : グリケーションと白内障. *眼科臨床紀要* **3** : 567-579, 2010.
- 15) Sell DR, Monnier VM : Conversion of arginine into ornithine by advanced glycation in senescent human collagen and lens crystallins. *J Biol Chem* **279** : 54173-54184, 2004.
- 16) Sell DR, Monnier VM : Ornithine is a novel amino acid and a marker of arginine damage by oxoaldehydes in senescent proteins. *Ann NY Acad Sci* **1043** : 118-128, 2005.
- 17) Nagaraj RH, Sell DR, et al : High concentration between Pentosidine protein cross-link and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 10257-10261, 1991.
- 18) Argirov OK, Lin B, et al : Phototransformations of advanced glycation end products in the human eye lens due to ultraviolet A light irradiation. *Ann N Y Acad Sci* **1043** : 166-173, 2005.
- 19) Cheng R, Feng Q, et al : LC-MS display of the total modified amino acids in cataract lens proteins and in lens proteins glycosylated by ascorbic acid in vitro. *Biochim Biophys Acta*. **1762** : 533-543, 2006.
- 20) 石子智士, 吉田晃敏, 高橋正年, 他 : 網膜症発現前の若年糖尿病患者における水晶体自然蛍光と血液眼内透過性機能. *臨床眼科* **46** : 203-206, 1992.
- 21) 西垣昌人 : 糖尿病患者における水晶体自発蛍光の研究. *大阪医科大学雑誌* **52** : 25-30, 1993.
- 22) 小椋祐一朗, 北側桂子, 荻野誠周 : 硝子体手術後の水晶体の変化について—自発蛍光と屈折度測定による定量的検討—. *日眼会誌* **97** : 627-631, 1993.

Quantification of Autofluorescence in Human Lens

Masahiro Nakamura^{1,2)}, Kiyomi Arai¹⁾, Hitoshi Omata¹⁾, Shimmin Hayashi^{1,3)},
Shinichiro Yoshida^{1,4)}, Makoto Chikuda¹⁾

Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo Medical University¹⁾
Shinkoshigaya Eye Clinic²⁾
Lively Eye Clinic³⁾
Yoshida Eye Hospital⁴⁾

To investigate changes in lens autofluorescence with aging, we measured the *in vivo* autofluorescence of non-cataract lenses using an anterior fluorophotometer. The FL-500 anterior fluorophotometer is a non-invasive, simplified quantification measuring device with improved filters of optimum wavelengths to measure lens autofluorescence (excitation filter : center 340 nm (260–390 nm), emission filter : center 440 nm (400–710 nm)). The subjects were 410 non-cataract eyes from volunteers aged 8–69 without systemic disease such as diabetes. Autofluorescence was compared between lenses grouped according to age (decades). Thus, autofluorescence was 38.7 ± 8.4 (photoncount/msec) for the second decade of life (10–19 years old), 56.0 ± 15.4

for the third (20–29 years old), 74.4 ± 14.4 for the fourth (30–39 years old), 94.2 ± 28.6 for the fifth (40–49 years old), 115.3 ± 27.0 for the sixth (50–59 years old), and 113.8 ± 32.3 for the seventh (60–69 years old). These measurements increased significantly from the first to the fifth decade ($p < 0.01$), so lens autofluorescence was significantly correlated with age ($r = 0.76$, $p < 0.01$). In conclusion, the autofluorescence of non-cataract lenses increases with age from 10 to 50 years, and therefore represents a good indication of aging.

Key words : autofluorescence, fluorophotometer, human lens, aging