

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

眼科 (1990.09) 32巻10号:1029~1035.

新しい検査と治療 Vitreous fluorophotometry

吉田晃敏

## I. 検 査

## 11. Vitreous fluorophotometry

吉 田 晃 敏\*

## I. はじめに

眼球内には、その恒常性維持の一機構として、血液眼内柵 (blood-ocular barrier, BOB) がある。この BOB は、房水と眼組織との間に存在する 関門機構である 血液房水柵 (blood-aqueous barrier, BAB) と 硝子体・網膜と血液との間に存在する 血液網膜柵 (blood-retinal barrier, BRB) とに 2 分される。

これら柵の透過性は、加齢やいろいろの眼疾患の病態と密接に関連しているため、その透過性を *in vivo* で、定量的に測定することは極めて有用となる。これを可能にした手法が fluorophotometry である。

本稿では、主として BRB の透過性機能を測定する vitreous fluorophotometry (VFP) に関して、その原理、検査法、そして得られた知見を、BRB の基礎的事項とともに述べてみたい。

## II. 血液網膜柵 (BRB) の基礎

## 1. 解 剖

網膜組織と血液とが接する部位は 2 カ所あり、その第 1 は網膜血管であり、第 2 は脈絡膜毛細血管板に面する網膜色素上皮細胞である。前者は inner BRB、後者は outer BRB と呼ばれている。

## 1) inner BRB

1966 年 Shakib と Cunha-Vaz によつて報告

されたように、網膜血管における内皮細胞間の結合形態は他組織のそれと異なる“zonula occludens”と呼ばれる tight junction であり、虹彩血管のそれらとも異なつてヒスタミンの投与によつても解離せず、いわゆる“nonleaky tight junction”と呼ばれている。この junction は、血液中の物質が網膜組織あるいは硝子体腔中へ移動することを制御していると考えられている。

## 2) outer BRB

網膜色素上皮細胞層は、脈絡膜と対面する最初の網膜細胞層である。光学顕微鏡を用いた実験報告から、網膜色素上皮細胞層間で、tyrpan-blue や fluorescein の通過が阻止されることが知られている。また、電子顕微鏡を用いた実験では、隣接する網膜色素上皮細胞間には、網膜血管内皮細胞間に認められたと同様な“tight junction”を認める。したがつて、網膜色素上皮細胞間の接合は、脈絡膜毛細血管板側から漏出してきた血液成分の網膜側への流入を阻止する関門となり得る。

以上述べたように、BRB の主座は網膜血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞とに存在する。以下に、BRB の透過性機能について概説したい。

## 2. BRB の透過性機能

一般に、膜の透過性機能には 2 つの異なつた挙動が考えられている。それらは、受動輸送機能と能動輸送機能である。前者はある tracer の濃度勾配に従つた拡散による動きであり、後者は濃度勾配に反して移動する動きと定義でき

\* Akitoshi YOSHIDA 旭川医科大学眼科学講座、助教授 (主任: 保坂明郎教授)

第1表 血液網膜透過性機能

- |                                |
|--------------------------------|
| 1. 内方透過性: inward permeability  |
| 血液→網膜, 眼球内 (受動的)               |
| (実際には, BRBはこの方向の動きを阻止するように働く)  |
| 2. 外方透過性: outward permeability |
| 眼球, 網膜→血液 (能動的)                |

る。

BRB における透過性機能としても同様のことが考えられており(第1表), 血液中の物質が受動的に眼球内に移行する(内方透過性機能, inward permeability(Pin), 実際には BRB は血液中の物質が眼球内へ移行するのを阻止するように働く)反面, 眼球内の物質を能動的に血液中に送り出している(外方透過性機能, outward permeability, Pout) ことが知られている。これらの機能を知る方法としては, いろいろの tracer を用いる組織細胞化学的手法や, 螢光色素を用いる螢光測定法 (fluorophotometry) がある。以下に, 特に in vivo での測定が可能な vitreous fluorophotometry (VFP) を用いた BRB 透過性機能の解析を紹介したい。

### III. 硝子体螢光測定法 (VFP)

#### 1. 測定原理

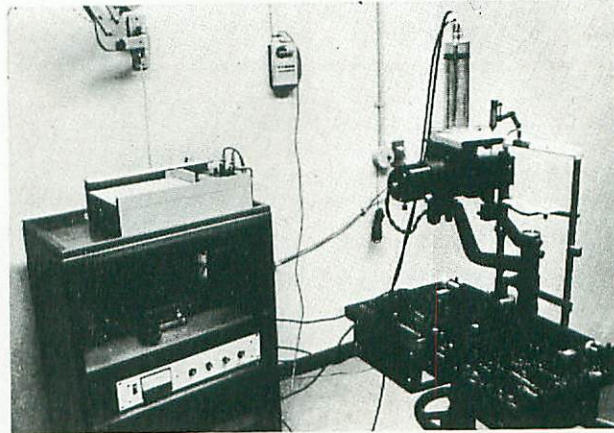
本法は, 1967年 Cunha-Vaz と Maurice によって初めて BRB 透過性機能の評価に応用され, 現在までいろいろの装置が開発されてきた。これらの装置の原理は類似し, 白色光源からの光を螢光励起フィルターを通して眼内に入射させ, これと一定の角度を成す螢光検出光束幅との交点領域 (sampling volume) の螢光強度を干渉フィルターを通して測定し, 眼内の螢光色素濃度として換算するものである。

#### 2. 装置

市販の装置としては, Gamma-Inami 製,



第1図 Coherent 製 Fluorotron Master



第2図 旭川医大式 fluorophotometer (1986, 吉田ら)

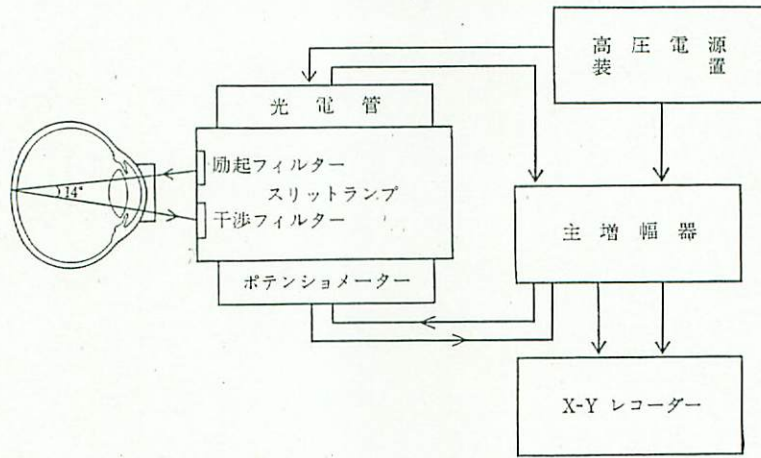
Metrion 製 Fluoromet, Coherent 製 Fluorotron Master, Topcon 製など数機種があり, さらに各研究者が独自に開発した研究用のものがある。第1図に Fluorotron Master, 第2図に筆者らが開発した装置を, 第3図にそのブロックダイアグラムを示す。

#### 3. 検査方法

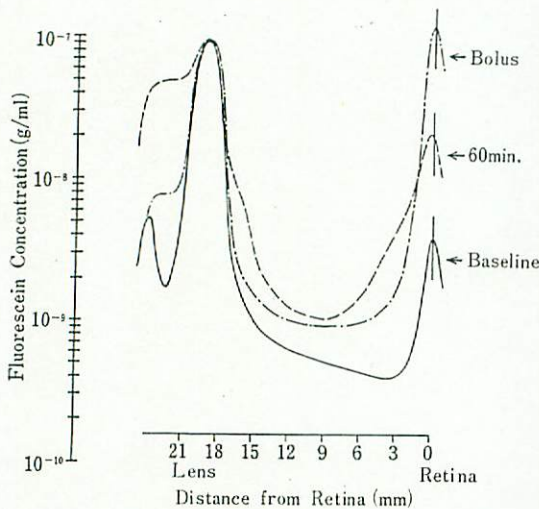
##### 1) Inward Permeability (内方透過性)

BRB の内方透過性を知るため, 一般的に以下のように検査を行う。まず, 眼内の自然螢光 (autofluorescence) を測定する(第4図)。この際眼内螢光の測定は, 角膜から中心窩までの光軸上をそれぞれの機械が有する sampling volume の範囲で連続的に測定する。次に, 各施設で決めた体重 (kg) あたり一定量 (7mg~14mg) の fluorescein-NA (F) を静注する。静注 F 量が多い場合 (14mg/kg など) には, 静注 2~3 分後に網脈絡膜螢光による硝子体螢光値の影響, すなわち tailing effect を知る目的で, いわゆる bolus scan を行う。次に, BRB

Vitreous fluorophotometry 装置の概略図



第3図 ブロックダイアグラム (旭川医大式, 1986, 吉田ら)



第4図 VFP による眼内蛍光曲線 (27歳正常眼)

から硝子体内への F 漏出状態を知るため、通常は F 静注 60 分後をその 1 つの目安として測定を行う。

BRB の透過性機能を正確に検索するためには、F 静注後における眼内の F 濃度を正確に測定することのみならず、血中の F 濃度、とりわけ BRB を通過するといわれている free の F、すなわち protein-unbound fluorescein (PUF) 濃度を正確に測定し、この両者から BRB の透過性を算出するのが理想である。そこで、PUF 濃度動態を知るために、通常は F 静注後少なく

とも 2 回 PUF を測定しなければならない。筆者らは F 静注後、10 分と 65 分に採血し、限外濾過法と fluorophotometer により PUF 濃度を測定している。

## 2) Outward Permeability (外方透過性)

BRB の外方透過性機能、すなわち硝子体側から血液中への透過性 (この場合は主として BRB の F に対する能動輸送能) を知るためには、当然ながら長時間にわたり硝子体中の F 濃度を経時的に測定しなければならない (kinetic vitreous fluorophotometry)。したがって、通常は、F 静注の一時間後から何回か上に述べた方法で測定を繰り返す (解析方法の項参照)。

## 4. 解析方法

### 1) Inward Permeability

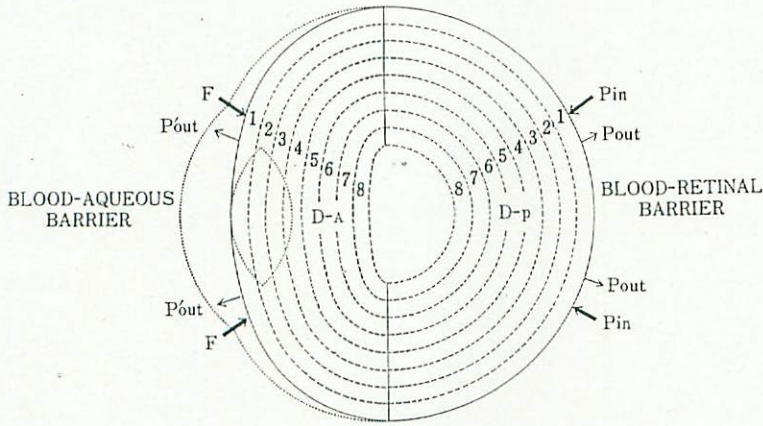
BRB の内方透過性機能を知るため、歴史的にいくつかの解析方法が用いられてきた。

#### (1) $F'_{(60,3)}(\text{g/ml})$

最も古典的な補正方法で、F 静注後 60 分で網膜より 3 mm の硝子体値から自然蛍光値 (baseline) を差し引いた値 (baseline 補正) である。しかしながら、この値には血液中の F 濃度の影響が考慮されていない。

#### (2) $F'_{(60,3)}/S(\text{hr}^{-1})$

$F'_{(60,3)}$  値を個々の症例の PUF の動態、S を用いて補正した値である。S 値は、PUF 濃度



第5図 Computer Simulation model (1986, 吉田ら)

曲線,  $C_p(t)$  を用いて求め,

$$S = \int_0^{60} C_p(t) dt \text{ で与えられる。}$$

(3)  $Cav/S(\text{hr}^{-1})$

F 静注後 60 分における後部硝子体値 (たとえば網膜から 3mm~6mm の点, 数点) を baseline 補正してそれらを平均し, これを S 値で除した値である。

(4)  $Pin(\text{cm}/\text{min})$

Computer Simulation 法により BRB の内方透過性係数, inward permeability ( $Pin$ ) を求めることができる (第5図)。求めた  $Pin$  は, 理論的には BRB の内方透過性を最もよく反映し, またこの方法により, 後部硝子体ゲルの“液化度”の指標となる後部硝子体内拡散係数, diffusion coefficient in the posterior vitreous ( $D-p$ ) をも求めることが出来, F の BRB における permeability と vitreous 中の diffusion とを区別して知ることが出来る。

筆者らは, 以上の各 index を相互に比較した結果 (第2表), BRB の  $Pin$  と最もよく正の相関を有し, しかも  $D-p$  との相関が小さい index は  $F'_{(60,3)}/S$  であることが判明した。したがって, BRB の内方透過性機能を知るためには, VFP により硝子体蛍光を測定し, Simulation 法を用いて  $Pin$  値を求めるか, 簡便法としては  $F'_{(60,3)}/S$  値を求めるのが良い。

第2表  $Pin$ ,  $D-p$  と各 index との相関係数

	$Pin$	$D-p$
$F'_{(60,3)}/S$	0.940 (①)	0.584 (②)
$Cav/S$	0.906 (②)	0.820 (①)
$F'_{(60,3)}$	0.863 (③)	0.547 (③)

( ) 内の数字は  $Pin$  および  $D-p$  に対する各相関係数間の順位 (大→小)。

## 2) Outward Permeability

Kinetic VFP により, 硝子体中の蛍光色素濃度の推移がわかることは前述した。1980年 Chen らは, F は体内 (肝) で速やかに代謝され, fluorescein monoglucuronide (FG) となることを報告した。その後の研究で, FG は F とは対照的に active transport を受けにくく, 両者は硝子体内よりの排出のメカニズムが異なることが判明した。このことは, VFP を用いて BRB の outward permeability を知るためには, この両者を区別して測定する必要があることを意味している。

このため, 色素の投与方法 (結膜下注射), Kinetic VFP を用いた二相分離解析法, 動物眼に F, FG を直接注入して, それらの動態変化を測定する方法などが考えられてきた。しかしながら, 今日に至つても in vivo で BRB の  $Pout$  を正確に測定することは, 動物眼の硝子体中に色素を直接注入する以外容易ではなく, 今後の課題である。

#### IV. VFP によつて得られた臨床知見

今日まで VFP によつて得られた知見は数限りなく、詳細は各原著論文および総説に譲るが、その一部を簡単に紹介したい。

##### 1. 糖尿病

VFP が臨床応用された直後の時期には、糖尿病患者では網膜症の出現前から、この手法を用いると BRB の透過性が亢進していることがわかるという報告が数多く出された (Cunha-Vaz ら, 1975, Waltman ら, 1978)。しかしながら、その後の追試でこれらの報告のいくつかに対し、対象の選定、加齢による影響、硝子体の変化、測定上の問題点などの観点から疑問がなげかけられた。したがって、現時点では、VFP を用いた解析では網膜症出現前の患者の BRB の内方透過性に関しては、群内のばらつきが大きく (正常、異常が混在し)、この群の平均値と正常群の平均値を比較すると、有意差がない場合が多いとする考えが一般的である。むしろ興味は、BRB の内方透過性が亢進している例の原因が、BRB 透過性と血糖コントロール状態 (FBS, HbA<sub>1c</sub> など) や罹病期間などの内科的因子との関連において注目されている。さらに、網膜症の進行に伴つて BRB の透過性が亢進すること、また特に黄斑浮腫や、foveal avascular zone の範囲と VFP の値が相関する (Smith ら, 1987, 宮里ら, 1987) との報告もある。また、網膜症のある患者に光凝固を行うと、術後 2~3 ヶ月は BRB の透過性が進行する例があるが、その後は回復することが知られている。

これらの研究から、本法を用いることにより網膜症の進行を評価出来ること、そして将来必ず出現してくるであろう、aldose reductase inhibitor (ARI) も含めた網膜症に対する治療薬の薬効判定にも本法が有用であることが予想される。

一方、方法論に多少の問題点は残しているものの、糖尿病患者の BRB では、外方透過性機能である active transport が低下しているとす

る報告がある。さらに最近、坪井ら (1990) は、アセタゾラマイドが糖尿病患者において BRB の active transport を上昇させ、網膜浮腫の軽減に有効であるとする興味ある報告をしている。以上述べてきたように、今後、VFP は糖尿病患者に対する治療薬の薬効判定に活用されることが予測される。

##### 2. 高血圧症、網膜循環障害

高血圧症においても、細動脈の口径不同が出現する時期から、VFP を用いて BRB の内方透過性が亢進していること (Krogsgaard ら, 1983, Kayazawa ら, 1984)、妊娠中毒症ではさらに重症であること (Chaine ら, 1986)、腎性高血圧症でも BRB の透過性が亢進しており、血液透析後はむしろ BRB の内方透過性が亢進する (三宅ら, 1987) などの報告がある。

網膜静脈閉塞症例においては、その初期には背景にある高血圧症や動脈硬化症の病態と類似しており、BRB の内方透過性が亢進している。さらに虚血性病変が進行すると、さらにその透過性が亢進するとされている。

##### 3. 網膜変性疾患

網膜変性疾患を対象に VFP を用いて検討した報告には興味深いものが多い。

Gieser ら (1980) は、X-linked retinitis-pigmentosa (XLRP) の女性保因者にも、VFP 検査で異常を検出できたと報告した。これに対し、三宅ら (1981) は否定的な見解を述べている。最近、Rusia, Fishman ら (1989) は、choroidermia および XLRP の保因者を調べ、特に周辺網膜に色素異常のある XLRP 保因者では、choroidermia 例とは異なつて、BRB 透過性の異常を認め、VFP の異常は Scotopic ERG の異常と相関していると報告した。

Fishman ら (1986) は、cone rod degeneration における VFP の異常を、Miyake ら (1983, 1984) は cone rod degeneration, 網膜色素変性症、小口病、白点網膜症、停止性夜盲における VFP 所見の意義を詳細に報告している。

その他、Fundus flavimaculatus (Fishman

ら, 1982, 三宅ら, 1982), 老人性黄斑症, Crystalline retinopathy (Yoshida ら, 1985) に関し, VFP を用いた研究がある。このように, 変性疾患の病態をより詳しく知るためには, VFP を用いた BRB の inward, outward の permeability に関する知見は, 今後も有用となる。

#### 4. 被手術眼

Miyake (1982) は, 水晶体囊内摘出術後1年以上を経過したみかけ上正常な眼底を有する症例で VFP を行うと, 高率に後部硝子体に螢光強度の増加を認め, 手術後長期間にわたり BRB の透過性が亢進していることを示した。このことは, 術後に生じることがある CME との関連において注目されている。

また Miyake ら (1985) は, 無水晶体眼と偽水晶体眼における CME の遷延例には, BRB の outward permeability の低下が関与している例が多いことを報告した。

近年では, レーザーフレアセルメーターを用いて, 白内障術後の BAB の透過性変化は良く解析できるようになった。しかしながら, BRB の透過性に関しては, VFP は現存する唯一の定量的検査法であり, 無水晶体眼や偽水晶体眼に対する VFP 検査には, 解析法とデータ解釈の観点から注意しなければならない点があるが, 本法は今後有用な検査法として改良と工夫が加えられていくことであろう。

その他の被手術眼, すなわち網膜光凝固, 網膜冷凍凝固, そして網膜剝離術後眼を対象としたいいくつかの研究に関しては, 他の総説あるいは原著を参照されたい。

#### 5. その他

加齢に伴い, 正常正視眼では 40 歳代から BRB の内方透過性が亢進すること (吉田ら, 1986), 近視眼においては, 近視のごく早期から BRB の内方透過性が亢進しており, これに遅れて硝子体の液化が始まること (吉田ら, 1986) が VFP を用いた研究から明らかとなってきた。

視神経疾患に関しては, 急性球後視神経炎,

pars planitis, PE 症候群を対象とした研究があり, VFP の有用性が報告されている。

また, ぶどう膜炎を対象とした fluorophotometry の研究に関しては, その多くは anterior fluorophotometry であり, それらについては本稿では割愛する。一方, 原田病では, 網脈絡膜に高濃度の螢光色素を検知するものの, 後部硝子体腔にはその漏出が少ないことより, outer BRB の透過性亢進が主, すなわち網膜色素上皮が病変の主座であることが VFP を用いて確かめられ (米谷ら, 1983), 網膜の血管病変が主であるベーチェット病とは異なることが知られている (原ら, 1987)。

#### V. おわりに

以上, 眼科検査法としての Vitreous fluorophotometry について, 基礎からこれを用いて得られた臨床的知見に至るまで, 盛りだくさんの内容を概説した。本検査法は, 1970 年代後半から急激に普及し, 紆余曲折を繰り返して今日に至っている。その内訳は, 主として測定方法とデータの解析に関するものであり, 詳細は紙面の制限があり十分述べられず, 概略のみにとどめた。

本法は, BRB の透過性機能を知ることが出来る現存する唯一の臨床的検査法である。今後も本法が正しく理解され, 臨床検査およびいろいろの疾患の病態生理の解明のため, 益々発展していくことを願つて止まない。

#### 文 献

- 1) Ashton, N., Cunha-Vaz, J.G.: Effect of histamine on the permeability of the ocular vessels. Arch. Ophthalmol., 73: 211~223, 1965.
- 2) Chen, S.C. et al.: Studies on the metabolites of fluorescein in rabbit and human urine. Chem. Pharm. Bull., 28: 1403~1407, 1980.
- 3) Cunha-Vaz, J.G., Maurice, D.M.: The active transport of fluorescein by retinal vessels and the retina. J. Physiol., 191:

- 467~486, 1967.
- 4) Cunha-Vaz, J.G. et al.: Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br. J. Ophthalmol.*, 59 : 649~656, 1975.
  - 5) Cunha-Vaz, J.G.: The blood-ocular barrier. *Surv. Ophthalmol.*, 23 : 279~296, 1979.
  - 6) 萱澤文男, 三宅謙作 : Fluorophotometry の臨床, 眼紀, 38 : 1079~1094, 1987.
  - 7) Kitano, S., Nagataki, S.: Transport of fluorescein glucuronide out of the vitreous. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27 : 998~1001, 1986.
  - 8) 三宅謙作 : Fluorophotometry の臨床応用, あたらしい眼科, 2 : 775~780, 1985.
  - 9) 三宅謙作 : 硝子体腔からの物質の能動輸送をめぐって, 日眼, 92 : 909~945, 1989.
  - 10) 三宅養三, 他 : 網膜変性疾患の Vitreous Fluorophotometry—最近の知見から—, 眼科, 25 : 1431~1441, 1983.
  - 11) Ogura, Y. et al.: Estimation of the permeability of the blood-retinal barrier in normal individuals. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 26 : 969~976, 1985.
  - 12) 小椋祐一郎 : 硝子体フルオロフォトメトリーの臨床的意義, 臨眼, 42 : 1031~1035, 1988.
  - 13) Seto, C. et al.: Study of fluorescein glucuronide 2. A comparative ocular kinetic study of fluorescein and fluorescein glucuronide. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 224 : 113~117, 1986.
  - 14) Tsuboi, S.: Fluid movement across the blood-retinal barrier—A review of study with vitreous fluorophotometry, *Jpn. J. Ophthalmol.* 1990 (in press).
  - 15) 吉田晃敏, 保坂明郎 : 新しい硝子体フルオロフォトメーターの試作, 臨眼, 38 : 1195~1199, 1984.
  - 16) 吉田晃敏 : Vitreous fluorophotometry の誤差論, 眼科, 26 : 839~847, 1984.
  - 17) 吉田晃敏 : Vitreo-Retino-Ciliary Barrier の研究 5. 正常眼における網膜内方透過性係数及び硝子体内拡散係数の加齢による変化, 日眼, 90 : 589~594, 1986.
  - 18) 吉田晃敏 : 血液網膜関門の基礎, 眼科, 31 : 1227~1232, 1989.
  - 19) Yoshida, A. et al.: Inward and outward permeability of the blood retinal barrier. In : Cunha-Vaz, J.G., Leite, E.B., ed. *Ocular fluorophotometry and the future*, Proceedings of Symposium IV of the International Society of Ocular Fluorophotometry, Amsterdam Kugler & Ghedini, 89~97, 1989.

\*

\*