

網膜剥離—復位モデルの作製と評価

今井 和行¹⁾²⁾, 林 篤志²⁾, Eugene de Juan Jr²⁾

¹⁾新潟大学医学部眼科学教室²⁾, The Wilmer Ophthalmological Institute

要 約

黄斑部網膜移動手術や剥離—復位した網膜の機能回復などの研究のため、簡便な網膜剥離—復位モデルを考案した。家兎眼の硝子体を予め硝子体腔ガス注入によって液化した後、網膜剥離を強膜側から作製した。髄翼下強膜をジアテルミー凝固し、同部位の強膜、脈絡膜を翼状針で穿孔して、網膜下に液注入した。全体の60~70%程度の網膜を剥離した後、できる限り網膜下液を吸引した。網膜穿孔や網膜下出血を殆ど起こさずに網膜剥離を作製し、高率に復位を得た。3匹の家兎については網膜電図(electroretinogram, ERG)で術後経過を観察した。若干数の

家兎について経時的に組織を検討した。網膜復位後3日目のERGのa, b波の振幅は、各々術前の30%, 40%に減少し、14日目に70%, 80%まで回復し、以後変化は少なかった。組織は術後14日目に視細胞内・外節の変性、配列の乱れなどを認めたが、3か月後にほぼ回復した。本モデルは少ない侵襲で広範囲の剥離—復位網膜を作製できる。(日眼会誌 102:161—166, 1998)

キーワード: 網膜剥離—復位モデル, 網膜剥離, 網膜電図, 視細胞, 家兎

Method and Evaluation of Experimental Retinal Reattachment

Kazuyuki Imai¹⁾²⁾, Atsushi Hayashi²⁾ and Eugene de Juan Jr²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

²⁾The Wilmer Ophthalmological Institute, The Johns Hopkins University School of Medicine

Abstract

An animal model of retinal reattachment is needed to study experimental macular relocation and recovery of reattached retina. The purpose of this study was to develop and evaluate a simple technique of retinal reattachment. We used the right eye of 13 pigmented rabbits for this experiment. 3 weeks before the operation, the eyes underwent a gas induced vitreous compression with sulfur hexafluoride gas. Transscleral subretinal hydrodissection was used to create a partial (60~70% of the whole retina) retinal detachment. Retinal reattachment was observed in ten eyes 18 hours after the operation. The dark-adapted electroretinograms (ERGs) were recorded in 3 rabbits from 3 days to 3 months after the surgery. Selected eyes were enucleated for his-

tology. The amplitude of ERGs (a-wave and b-wave) were reduced to 30% and 40% of the control eyes on day 3. These waves were restored up to 70% and 80% of normal at 2 weeks and showed no significant changes thereafter. Degeneration and loss of photoreceptors in the early days after surgery as seen by light microscopy were almost completely restored to normal at 3 months after surgery. This model provides large retinal detachment and reattachment with minimized inflammatory response. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 161—166, 1998)

Key words: Retinal reattachment model, Retinal detachment, Electroretinogram, Photoreceptor, Rabbit

I 緒 言

従来、視力回復が望めなかった加齢性黄斑変性などの黄斑下新生血管膜に対して、外科的治療法の開発が進められている。単なる新生血管膜の除去¹⁾だけでなく、網膜移動による黄斑偏位術により視力回復が試みられてい

る^{1)~3)}が、これらの手術には意図的な網膜剥離の作製が必須である。近年まで、網膜剥離は失明につながる難治性の眼疾患と考えられてきた。しかし現在では、網膜剥離における硝子体の関与などの病態の理解が進んだことや硝子体手術の開発による治療法の進歩もあり、網膜復位率は95%程度まで向上した。増殖性硝子体網膜症の危険はあ

別刷請求先: 951-8122 新潟県新潟市旭町通1-757 新潟大学医学部眼科学教室 今井 和行
(平成9年5月6日受付, 平成9年10月21日改訂受理)

Reprint requests to: Kazuyuki Imai, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahimachi-dori, Niigata-shi, Niigata-ken 951-8122, Japan

(Received May 6, 1997 and accepted in revised form September 21, 1997)

るが、意図的に網膜剥離を作製し、復位させることが可能となっている。今後は、単に復位させるだけでなく、復位網膜の機能回復についても検討する必要がある。動物実験では剥離網膜の復位により視細胞外節の再生が示されており^{4)~7)}、臨床上も網膜機能は網膜復位によりある程度回復するが、長期間の経過観察では黄斑変性のために再度視力は低下する⁸⁾。実用に堪え得る視力がでないために“spare eye”に留まっている網膜剥離治癒眼は非常に多い、生体自体の防御機能や回復力による剥離—復位網膜の機能回復に限界があるように思える。しかし、剥離—復位網膜の回復過程での生化学的な研究⁹⁾¹⁰⁾は少なく、積極的な治療による復位網膜の保護、回復を目的とした実験は見当たらない。これは、少ない侵襲で広範囲に網膜を剥離し復位させることが可能な実験モデルがなかったためと考える。今回我々は、簡便な網膜剥離—復位モデルを考案したので、その方法と評価について報告する。

II 実験方法

1. 手術

実験の手術には有色家兎(体重2~3.5 kg)13匹を用いた。なお、今回の手術法を確立するまでに、さらに15匹の有色家兎が用いられている。硝子体を液化するために、網膜剥離作製3週間前に硝子体腔ガス注入を両眼に行った。術前に塩酸ケタミン(ケタラール[®]) (25 mg/kg)、キシラジン塩酸塩(セラクター[®]) (5 mg/kg)筋注で全麻した。1%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリンで散瞳し、開瞼器を掛けて30ゲージ針で前房穿刺し、前房水を0.1 ml吸引して眼圧を下げた。家兎の体位を腹臥位とした後、6時の角膜輪部から2 mm後極側で30ゲージ針を硝子体中に刺入した。硝子体手術用のコンタクトレンズで経瞳孔的に観察しながら硝子体中央部で、sulfur hexafluoride (SF₆)ガス0.4 mlを硝子体中にゆっくり注入した。気泡が針先から離れたのを確認した後、針を引き抜いた。最後にゲンタマイシン軟膏を点入した。

SF₆ガスは注入後14日前後で吸収された。SF₆ガス注入3週間後に網膜剥離を作る手術を右眼13眼に対して行った。左眼は対照とし、剥離手術を行わなかった。上記のように全麻、散瞳した後、眼球を脱臼し、手術用手袋を切開して作製したドレープで眼球を固定した。イソジンによって眼球を消毒し、点眼麻酔を行った。以後の操作は硝子体手術用のコンタクトレンズを用いて、経瞳孔的に眼底を観察しながら施行した(図1A)。まず、ジアテルミー針によって結膜を穿孔した後に、針の先端で眼球を圧迫陥凹して位置を決め、網膜の厚い髓翼の下の強膜を狙って凝固を行った(図1B)。これにより注射針で脈絡膜を穿孔する際の出血が防止でき、また、強膜、脈絡膜の脆弱化により穿孔が容易になる。次に、ラクテックリング入り10 mlの注射筒につないだ25ゲージ翼状針のペベルを横向きにして、切り口の側面で凝固部強膜を切

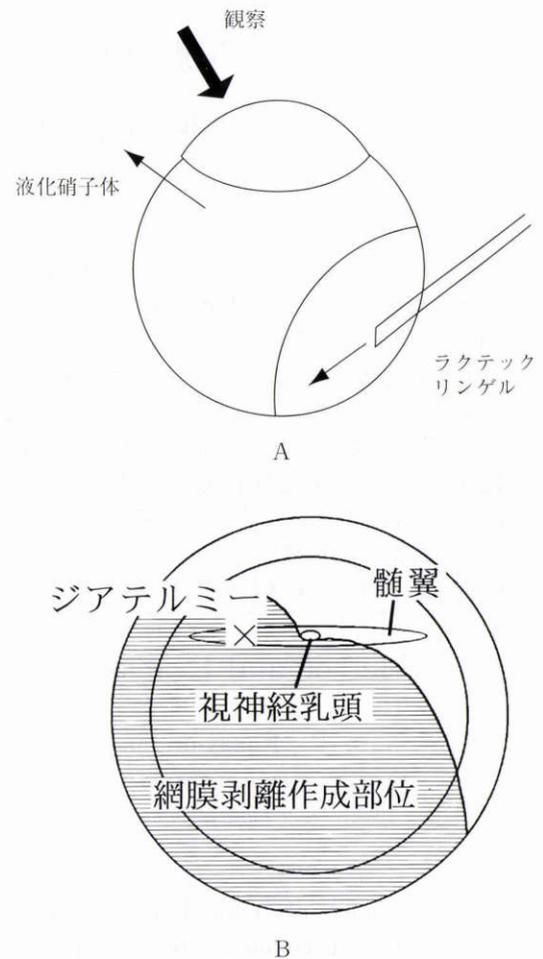


図1 剥離作製方法。

A: 経瞳孔的に眼底をみながら強膜側から25ゲージ翼状針を刺入し、網膜下にリング液を注入して網膜を剥離する。網膜剥離の作製とともに、液化硝子体が角膜輪部付近の強膜創から排出される。B: 網膜が穿孔し難いように網膜の厚い髓翼下の強膜を刺入部とする。予めジアテルミー凝固して、強膜・脈絡膜を穿孔しやすくし、網膜下出血を予防する。全網膜の60~70%が剥離できる。

開するように穿孔した(図2A)。注射針の抵抗がなくなり、眼底観察下に脈絡膜に覆われた針先の形がより明瞭になることで強膜の穿孔がわかる。続いて、網膜を穿孔せずに脈絡膜を25ゲージ翼状針の針先で引っかけて引き裂くように穿孔した(図2B)。ここで、少量のラクテックリング液を注入すると、脈絡膜下に液が回ったときは茶色い隆起が浅く広がり、網膜下に液が入ったときは青白い網膜が胞状に剥離するので、脈絡膜穿孔の有無が確認できる。網膜下へのラクテックリング液注入時に、4時方向の角膜輪部から2 mm後極側の部位を20ゲージ針で穿孔し、液化硝子体を自然排液した(図1A)。網膜に裂孔を作らず、また、25ゲージ翼状針の刺入創からも液漏れはなく、網膜下腔は閉鎖腔になっているために容易に全網膜の60~70%程度の網膜剥離を作製した。次に、網膜下液をできる限り吸引し、液化硝子体の排液のため作製した強膜創から硝子体腔にラクテックリング液を

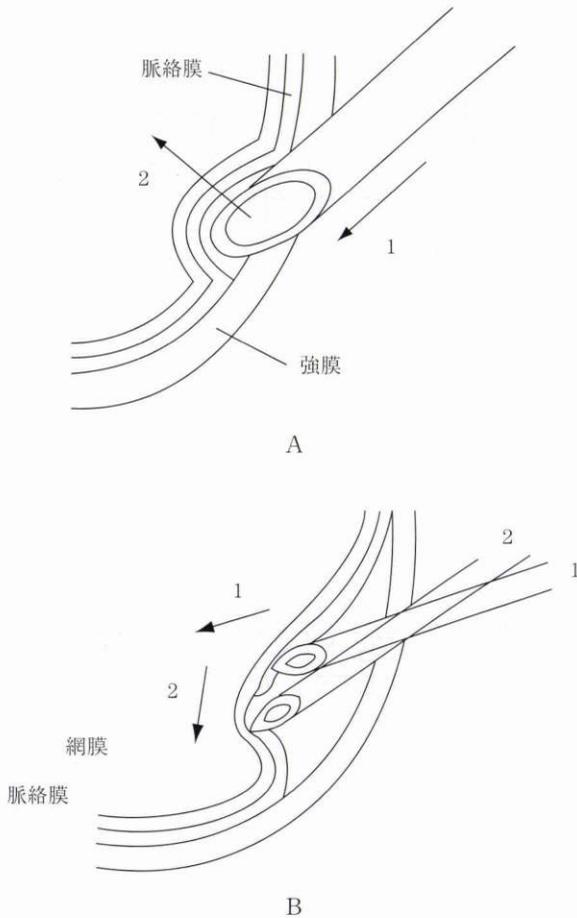


図 2 強膜, 脈絡膜の穿孔方法.

A: 凝固部強膜にベベルを横向きにした 25 ゲージ翼状針の先を刺入し(1), 切開するように穿孔する(2). 硬性のある強膜は針の刃の部分で切開されるが, 抵抗が少なく弾性の高い脈絡膜は針の側面で圧排され穿孔しない.
B: ベベルを横向きにしたまま針先で脈絡膜を少し引っ掛けて(1), やや前進させながら網膜から離れる方向に戻して引き裂くように穿孔する(2).

注入して網膜をできる限り復位させた. この強膜創は 5-0 ナイロン糸で縫合した. ゲンタマイシン軟膏を点入し, 眼瞼を 5-0 シルク糸で縫合, 閉瞼して手術を終了した.

2. 評価

3 匹の家兎(体重 2~3 kg)の網膜剥離—復位モデルを網膜電図(electroretinogram, ERG)と眼底写真により術前, 術後 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 95 日目に経過観察した. 1 時間以上の暗順応の後, 上記のごとく全麻, 散瞳を行った. 接触コンタクトレンズ電極(ERG jet by Las Sanne, Universol, Switzland)を両眼の角膜に装着し, 不関電極は各々同側の耳朶起始部に置いた. 60 秒毎に 5 回 ERG 波を記録, 増幅し, 平均化した(Epic-XL Version 3.03, LKC System Inc). 個体差や, 日内変動を避けるために, a 波, b 波の振幅について手術眼と対照眼の比(右眼/左眼比)を求めた.

さらに, 網膜剥離—復位後 7, 14, 28, 95 日目に 7 眼の網膜組織を光学顕微鏡によって検討した. 抜眼後, 角膜輪

部から 2 mm 後極で, 2% パラホルムアルデヒドと 2% グルタルアルデヒドを含んだ 0.1 M のリン酸緩衝液(pH 7.4)約 0.3~0.4 ml を 3~4 か所から硝子体腔に注入した. また, これと同じ溶液に眼球全体を浸けた. 1 時間後に前眼部を除去し, 後眼部を 4℃ で固定液に一晩浸潤させた. 翌日, 標本を 0.1 M のリン酸緩衝液で 2 回洗浄した. 髄翼下方部の網膜切片を 2% オスミウムテトラオキサイドを含む 0.1 M リン酸緩衝液で後固定し, リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後, エタノール上昇系列で脱水した. プロピレンオキサイドを浸透させた後, LX-112 レジン(Ladd, Burlington, Vermont)で包埋した. ミクロトーム(Sorvall Porter Blum MT 2 ultramicrotome)で光学顕微鏡用の 1 μm の切片を作製した後, 0.5% トリイジンブルーで染色した.

III 結果

1. 手術

実験の対象とした 13 匹 13 眼中で合併症は網膜穿孔 2 眼, 強い術後炎症 1 眼であり, これらは除外された. 明らかな網膜下出血は認めなかった. 残りの 10 匹 10 眼で網膜の 60~70% 程度の広範な網膜剥離を作製し, 術後 18 時間以内に自然復位を得た(図 3 A, B).

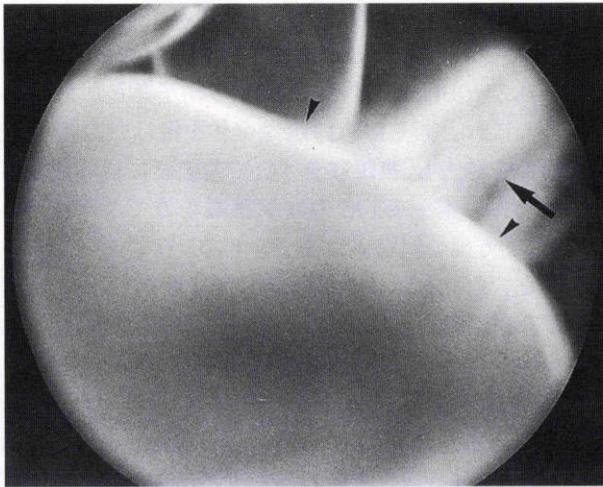
2. 評価

ERG の a 波は網膜復位後 3 日目に術前の 30% 程度の振幅に減少した. b 波も 40% 程度に減少したが, 14 日目に各々 70~80% 程度まで回復し, 以後 3 か月後まで変化はなかった(図 4 A, B). 網膜組織は光学顕微鏡像で復位後 14 日目には視細胞内・外節の変性, 配列の乱れや網膜色素細胞の一部消失などを認めたが, 3 か月後に視細胞外節の長さがやや短いもののほぼ回復した(図 5 A, B).

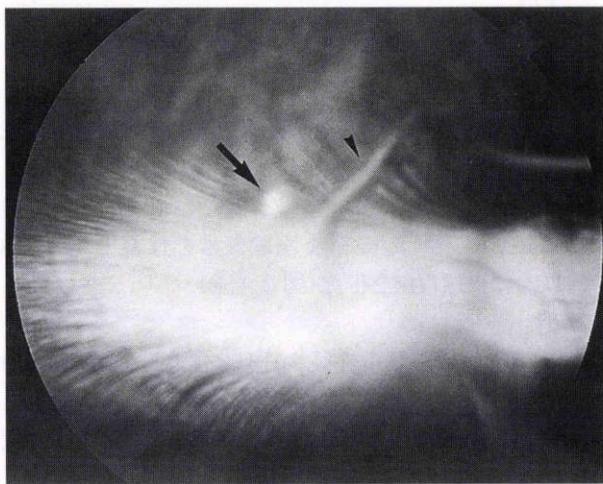
IV 考 按

我々は加齢性黄斑変性などの黄斑下新生血管膜に対する治療のために, 強膜短縮を利用して実験的に黄斑部網膜を剥離, 移動し, 復位させた¹¹⁾. この方法は増殖性硝子体網膜症が発症しにくく, 網膜復位は比較的容易だが, 移動網膜の機能回復が問題点として残されている. この網膜移動手術をより有効なものとするために, 基礎実験として, 網膜移動をしていない剥離—復位網膜の障害や回復の経過を明らかにし, 積極的に網膜を保護, 回復させる研究が必要であると考え. ところで, 網膜虚血—再灌流に関しては, 生化学的, 分子生物学的に網膜回復や保護の研究¹²⁾が行われており, 我々も細胞内情報伝達物質活性化の報告¹³⁾をした. しかし, 剥離—復位網膜では, 組織学的には視細胞外節の回復^{4)~7)}が示されているが, 生化学的な網膜回復の研究は少ない⁹⁾¹⁰⁾.

従来網膜剥離—復位実験のモデルの多くは, 硝子体側からマイクロピペットなどで網膜下腔に液化硝子体などを注入して網膜剥離を作製し, 自然復位を待つ方法¹⁴⁾



A



B

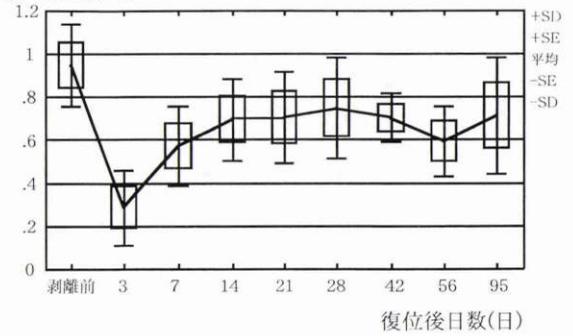
図3 眼底写真.

A: 網膜剥離作製時. 矢じり; 広範な胞状網膜剥離が認められる. 矢印: 髄翼. B: 網膜復位時(術翌日). 矢じり; わずかに網膜皺が認められる. 矢印; ジアテルミー凝固後強膜, 脈絡膜を穿孔した部位.

や, 強膜内陥術⁵⁾, 硝子体内ガス注入⁶⁾を施行することで網膜復位を得ていた. しかし, これらは①網膜裂孔が大きくなりかねない, ②広い範囲の網膜剥離の作製が難しい, ③広範囲の網膜剥離ができた場合は自然復位が難しい⁵⁾, ④強膜内陥術や硝子体内ガス注入を行った場合は侵襲が大きいため, 強い炎症, 感染や増殖性硝子体網膜症発症の可能性がある, などの欠点が考えられる. 我々は, 広範な剥離を作製し, 確実な復位を得るために, 強膜側から網膜裂孔を作らずに網膜を剥離—復位させる方法を選択した.

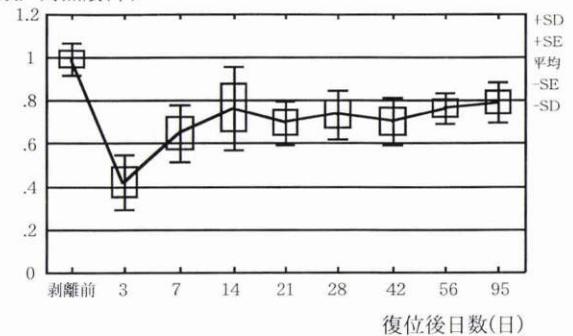
従来の強膜側からの網膜剥離作製方法⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾は, 操作の煩雑さに加えて, 網膜下出血, 網膜裂孔などの合併症が問題であった. これらは髄翼下の強膜を穿孔すること, 穿孔部を予めジアテルミー凝固すること, 針による穿孔方法を工夫することで解決した. 強膜側からの盲目的な操作

ERG a波の振幅
復位眼/対照眼(率)



A

ERG b波の振幅
復位眼/対照眼(率)



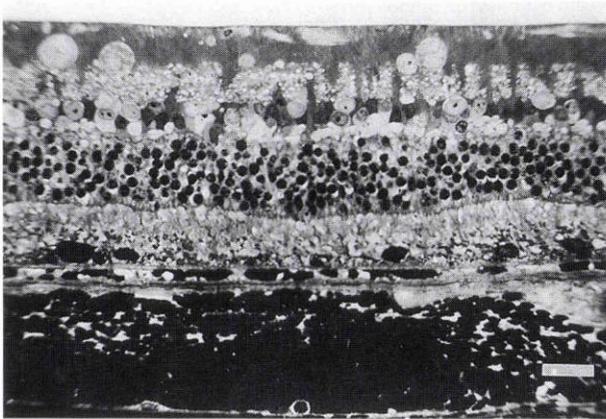
B

図4 網膜剥離—復位眼(右眼)の対照眼(左眼)に対する網膜電用(ERG).

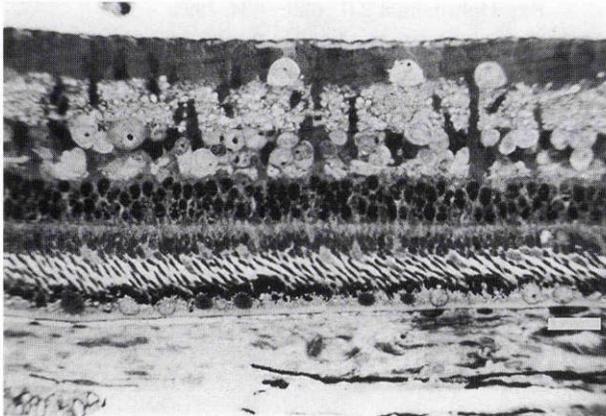
A: a波の振幅は網膜復位後3日目に術前の30%まで減少したが, 14日目に70%程度に回復し, 以後変化はなかった. B: b波の振幅は網膜復位後3日目に術前の40%まで減少したが, 14日目に80%近くに回復し, 以後変化はなかった. SDは標準偏差, SEは標準誤差,

でも網膜の剥離—復位が可能との報告¹⁵⁾があるが, 我々は経瞳孔的に眼底を観察しながら操作することで, より高率に網膜裂孔を作らずに網膜剥離を作製し, 復位を得た. また, 硝子体内ガス注入で予め硝子体を液化しており, 機械的な硝子体切除術が不要なので炎症が軽減でき, 感染の機会が少ない. 以上のように, 今回の実験モデルは, 簡便かつ最小限の侵襲で, 十分な広さの網膜剥離を作り, しかも確実な復位が可能な方法であると考えられる.

本法の問題点は, ①長期間の網膜剥離ができない, ②剥離の範囲を一定にすることがやや難しい, ③網膜裂孔を作らないので本来の網膜剥離像とはやや異なる, などが挙げられる. しかし, 我々は網膜移動の基礎実験や剥離—復位網膜における網膜の蛋白産生などの生化学的な研究を目的としている. そのため, 炎症の影響や感染の機会を最小限にして, 短期間で復位する広い網膜剥離は, 我々の実験には適切なモデルであると考えられる. 単に病像に類似するのではなく, 目的に応じたモデルが選択されるべきである.



A



B

図 5 網膜の光学顕微鏡像。

A: 復位後 14 日目。視細胞内・外節の変性、配列の乱れや網膜色素細胞の一部消失を認めた。バーは 20 μm

B: 復位 3 か月目。視細胞外節は長さがやや短いものの再生しており、配列の乱れもあまりない。網膜色素上皮細胞も一層に並んでいる。バーは 20 μm

動物実験で剥離—復位網膜の ERG を同一眼で経時的に記録した報告¹⁷⁾¹⁸⁾は少ない。サル眼¹⁷⁾では全剥離後の復位網膜において、時間経過とともに ERG b 波の振幅の回復が示されており、サル眼の組織像の回復と比較されている。しかし、網膜復位のために強膜内陥術が行われており、手技が複雑で侵襲が強いのではないかと考える。最近、家兎眼での限局した範囲の剥離—復位網膜に局所 ERG を用いた実験¹⁸⁾があるが、家兎眼の復位網膜の組織像とは比較されていない。剥離網膜機能の評価に局所 ERG は有効な方法であると考え、剥離網膜の機能には網膜下腔の大きさ¹⁹⁾が影響する可能性があり、広い網膜剥離眼による検討が必要かも知れない。

本実験で a 波は網膜復位後 3 日目に術前の 30% 程度に、b 波も 40% 程度の振幅に減少し、復位後 14 日目に ERG の振幅は a 波が術前の 70%、b 波も 80% 程度まで回復したが、以後 3 か月目まで明らかな回復傾向はなかった。一方、光学顕微鏡による網膜組織像は復位後 14 日目に視細胞内・外節の変性、配列の乱れや網膜色素細胞の

一部消失を認めたが、3 か月後には視細胞外節の長さがやや短いものの、ほぼ正常の組織像を示した。網膜剥離の期間が最長で 18 時間程度と短時間だったことが網膜血管の少ない家兎を用いたにも拘わらず、網膜の機能、形態の回復をもたらしたと考える。また、光学顕微鏡像では網膜復位後 14 日目と 3 か月目とで視細胞内・外節や網膜色素細胞層の形態的な回復にかなりの違いがあるにも拘わらず、ERG の振幅に差があまりないことは興味深い結果であると思われる。しかし、症例数が少なかったこと、網膜剥離が全剥離でなかったこと、網膜血管の少ない家兎を用いたことから、本実験で網膜組織像の回復と ERG の関係を説明することは難しいので、今後検討していきたい。

我々の実験的黃斑移動の論文(投稿中)において、網膜剥離の作製方法は詳述されていない。この実験的黃斑移動にも用いた網膜の剥離—復位方法は、簡便で、手術侵襲を最小限に抑え、広範囲の網膜剥離が作製できるため、網膜回復の実験にも有用と考え、今回、詳しく記述した。また、前述の論文に記載した復位後 2 週間までの ERG に 3 か月後までのデータを追加した。この ERG と光学顕微鏡による組織像とから、本実験方法による剥離—復位網膜の機能と形態の回復を示した。今回の網膜剥離—復位モデルは、剥離網膜の障害、復位後の回復の研究に加えて、網膜下への網膜色素細胞や薬物などの注入による網膜の保護、回復の研究に応用できる可能性があり、有用であると考え。

稿を終えるに当たり、ご校閲をいただきました新潟大学医学部眼科学教室阿部春樹教授、ご協力いただきました小川一郎先生に深謝いたします。本論文の要旨は第 19 回日本眼科手術学会総会において報告した。

文 献

- 1) de Juan E Jr, Machemer R: Vitreous surgery for hemorrhagic and fibrous complications of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 105: 25—29, 1988.
- 2) Machemer R, Steinhorst UH: Retinal separation, retinotomy, and macular relocation: II. A surgical approach for age-related macular degeneration? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231: 635—641, 1993.
- 3) Ninomiya Y, Lewis JM, Hasegawa T, Tano Y: Retinotomy and foveal translocation for surgical management of subfoveal choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 122: 613—621, 1996.
- 4) 中村周平: 実験的網膜剥離に関する研究。形態学的観察。第 2 報。実験的網膜剥離についての観察補遺、並びに網膜剥離復位後の観察成績。日眼会誌 71: 520—543, 1967.
- 5) Machemer R: Experimental retinal detachment in the owl monkey. IV. The reattached retina. *Am J Ophthalmol* 66: 1075—1091, 1968.

- 6) **Anderson DH, Guerin CJ, Erickson PA, Stern WH, Fisher SK**: Morphological recovery in the reattached retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 168—183, 1986.
- 7) **Guerin CJ, Lewis GP, Fisher SK, Anderson DH**: Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 175—183, 1993.
- 8) **Amemiya T, Yoshida H, Harayama K, Miki M, Koizumi K**: Long-term results of retinal detachment surgery. *Ophthalmologica* 177: 64—69, 1978.
- 9) **Kroll AJ, Machemer R**: Experimental retinal detachment in the owl monkey. 8. Photoreceptor protein renewal in early retinal reattachment. *Am J Ophthalmol* 72: 356—366, 1971.
- 10) **Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK**: Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1474—1482, 1990.
- 11) **Imai K, de Juan E Jr**: Experimental surgical macular relocation by scleral shortening. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(4, suppl): S116, 1996.
- 12) **Nayak MS, Kita M, Marmor MF**: Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2018—2022, 1993.
- 13) **Hayashi A, Koroma BM, Imai K, de Juan E Jr**: Increase of protein tyrosine phosphorylation in rat retina after ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2146—2156, 1996.
- 14) **Marmor MF, Abdul-Rahim AS, Cohen DS**: The effect of metabolic inhibitors on retinal adhesion and subretinal fluid resorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 893—903, 1980.
- 15) **本多繁昭**: 実験的網膜剥離における剥離下ならびに自然復位後の ERG. *日眼会誌* 73: 948—971, 1969.
- 16) **Machemer R, Steinhorst UH**: Retinal separation, retinotomy, and macular relocation: I. Experimental studies in the rabbit eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231: 629—634, 1993.
- 17) **Hamasaki DI, Machemer R, Norton EW**: Experimental retinal detachment in the owl monkey. VI. The ERG of the detached and reattached retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 177: 212—221, 1969.
- 18) **Kim SD, Naoi N, Maruiwa F, Sawada A**: Electrical responses from locally detached retina and its recovery after reattachment. *Ophthalmologica* 210: 195—199, 1996.
- 19) **森 敏夫**: 大きさの異なる実験的網膜剥離からの ERG. *日眼会誌* 95: 1248—1251, 1991.