

高血圧自然発症ラットにおける網膜の毛細血管床構築の経時的変化

久保 勝文, 吉本 弘志

弘前大学医学部眼科学教室

要 約

網膜細動脈の狭細の程度は、高血圧症の末梢血管抵抗の指標とされている。末梢血管抵抗は、主に細動脈の狭細化や収縮によると考えられているが、毛細血管床との関係についてはほとんど知られていない。今回、この関係を調べるために正常血圧ウイスター京都系ラットおよび高血圧自然発症ラット(脳卒中難発症ラットおよび脳卒中易発症ラット)を用い、6週齢、15週齢および20週齢の網膜毛細血管網の網目1個当たりの面積計測を行った。網膜毛細血管網の網目1個当たりの面積は、正常血圧ウイスター京都系ラットでは全週齢で一定で、6週齢の高

血圧自然発症ラットと正常血圧ラットの比較では有意差はなく、15週齢の高血圧自然発症ラットでは有意に拡大し、20週齢の高血圧自然発症ラットでは血管網が著しく拡大し測定不能であった。以上から、高血圧の持続は毛細血管構築に変化を及ぼし、血管床の減少が末梢血管抵抗増大に関与している可能性が考えられた。(日眼会誌 102:3-7, 1998)

キーワード：高血圧, 血管抵抗, 網膜毛細血管網, 高血圧自然発症ラット, 網目1個当たりの面積

Architectural Changes with Duration of Hypertension in the Retinal Capillary Network of Spontaneously Hypertensive Rats

Masabumi Kubo and Hiroshi Yoshimoto

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

Abstract

Narrowing of the retinal artery in hypertension has been considered as an indicator of peripheral vascular resistance, which is largely caused by contraction or narrowness of retinal arterioles. But the relationship between peripheral vascular resistance and the retinal capillary network is little known. To study this relationship, three groups of age-matched rats were used: normotensive Wistar-Kyoto rats 6, 15, and 20 weeks of age, and spontaneously hypertensive rats (stroke-resistant spontaneously hypertensive rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats) 6, 15, and 20 weeks of age. The size of the retinal capillary network in a given area was measured in these groups. There was no difference in the size of the retinal capillary network at any point in the Wistar-Kyoto rats. There was no difference in the size of the

retinal capillary network among the three groups at 6 weeks of age, but there was a significant increase in spontaneously hypertensive rats at 15 weeks. We could not measure the size of the retinal capillary network in part of the spontaneously hypertensive rats at 20 weeks.

These results suggested that retinal capillary network becomes larger with duration of hypertension and it acts to increase peripheral vascular resistance. (J Jpn Ophthalmol Soc 102:3-7, 1998)

Key words: Hypertension, Vascular resistance, Retinal capillary network, Spontaneously hypertensive rat, Size of retinal capillary networks

I 緒 言

従来、高血圧症における網膜血管の病変については末梢血管抵抗の主座である細動脈を中心に種々検索されて

いる^{1)~7)}。

しかし、管腔100 μm 以下の流入細動脈に始まる網膜循環は、Simionescu ら⁸⁾の報告にあるように、arteriole-capillaries-venule units (ACV-units) で構成される文字ど

別刷請求先：036 青森県弘前市在府町5 弘前大学医学部眼科学教室 久保 勝文
(平成9年3月11日受付, 平成9年7月23日改訂受理)

Reprint requests to: Masabumi Kubo, M.D. Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine,
5 Zaifu-cho, Hirosaki-shi, Aomori-ken 036, Japan

(Received March 11, 1997 and accepted in revised form July 23, 1997)

おりの微小循環系である。よって、運命共同体というべきこのような ACV-units において、細動脈の病変が毛細血管や細静脈に何らかの病変を及ぼすのではないかと考えられる⁹⁾。

事実、末期高血圧症での蛍光眼底撮影では、無灌流野の存在が報告¹⁰⁾されており、実験的末期高血圧動物において組織学的にも毛細血管の閉塞が報告¹¹⁾されている。

もし、網膜循環領域で高血圧の持続により毛細血管の閉塞性病変が起これば、流面積の減少という意味で末梢血管抵抗が増加すると考えられる。今回は、このことを高血圧動物における網膜毛細血管の網目構造の面積の経時の変化から検討した。

II 実験方法

実験動物は、正常血圧ウイスター京都系ラット (Wistar-Kyoto rat: 以下, WKY) について生後 6 週齢 8 匹, 15 週齢 5 匹および 20 週齢 4 匹の計 17 匹, また、高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rat: 以下, SHR) では脳卒中難発症ラット (stroke-resistant spontaneously hypertensive rat: 以下, SHRSR) について生後 6 週齢 6 匹, 15 週齢 7 匹および 20 週齢 1 匹の計 14 匹, 脳卒中易発症ラット (stroke-prone spontaneously hypertensive rat: 以下, SHRSP) について 6 週齢, 15 週齢をそれぞれ 7 匹および 20 週齢 1 匹の計 15 匹, 全体で 46 匹の雄の右眼のみを用いた。なお、これらの実験で用いた WKY, SHRSR, および SHRSP は、すべて SHR など疾患モデル共同研究会から購入した。血圧は、tail cuff method により、血圧自動記録装置 (PS-100, 理研開発) を用いて測定した。なお、眼球摘出直後に、形態的成長の指標として角膜径を測定した。網膜毛細血管床の観察撮影は、三上ら^{12)~14)}のゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本法 (intravenously injected gelatin fluorescein preparation, IVGFP) に準拠して行った。エーテル麻酔下でゼラチン加フルオレスセインナトリウム (フルオレサイト[®]) 溶液を one shot で静注し、直ちに眼球を摘出し眼球の角膜径を測定した後に、固定網膜伸展標本を作製した。Blue violet (BV) 落射型蛍光顕微鏡 (BH 2-RFK, オリンパス, 励起フィルター 410 nm, 吸収フィルター 530 nm) を用い観察し、網膜の中間周辺部を同定した後に、その部位の深層毛細血管網の撮影を行った。なお、ここでいう中間周辺部とは視神経乳頭からおよそ 2~3 mm 離れた部位から赤道部までを指す。また、写真撮影には全自動顕微鏡撮影装置 (PM-10ADS, オリンパス) を用い、フィルムはフジ-ASA100 を使用した。撮影した写真はコーナン社製画像解析装置 (KC-87A, コーナン) を用い、毛細血管網の網目 1 個当たりの面積を測定した。1 眼当たり 40 個の網目 1 個当たりの面積を測定し、群全体の面積の平均値を加算し、それぞれの群の平均値と標準偏差とした。検定は 3 群間の比較は Duncan の多重比較を、2 群間では

Student の t 検定を用いて危険率 5% をもって有意差とした。

III 結果

1. 体重・角膜径の経時的变化

WKY では、6 週齢で 5~5.5 mm, 15 週齢で 6.0~6.5 mm および 20 週齢で 6.0~6.5 mm であった。SHRSR 群では 6 週齢で 5 mm, および 15 週齢と 20 週齢で 6 mm, SHRSP 群では 6 週齢で 5~5.5 mm, 15 週齢で 6~6.5 mm および 20 週齢で 6.0 mm であった。各群ともに体重の増加に伴い角膜径は増加した。また、3 群間で統計学的な差が認められず、体重および角膜径をみる限り 3 群間での成長差は認めなかった (表 1)。

2. WKY, SHRSR および SHRSP の血圧推移

WKY の血圧は、6 週齢で 145 ± 6.0 (平均値 $\pm$ 標準偏差) mmHg, 15 週齢で 124 ± 8.7 mmHg および 20 週齢で 124 ± 12.6 mmHg と正常血圧であった。SHRSR の血圧は 6 週齢で 159 ± 14.5 mmHg, 15 週齢で 204 ± 14.7 mmHg および 20 週齢で 221 mmHg であった。SHRSP では 6 週齢で 167 ± 12.0 mmHg, 15 週齢で 206 ± 12.4 mmHg および 20 週齢で 220 mmHg であった。6 週齢で既に SHRSR 群は WKY 群より血圧上昇を認め、同時期にまた SHRSP 群も WKY 群より血圧上昇を認めた。15 週齢の血圧は SHRSR 群および SHRSP 群では WKY 群よりも有意に高かったが、SHRSR 群と SHRSP 群との間に有意差を認めなかった (表 2)。

表 1 各群の匹数および体重・角膜径の経時的变化

		6 週	15 週	20 週
WKY	角膜径 (mm)	5.2 ± 0.3	6.0 ± 0.4	6.3 ± 0.3
	体重 (g)	176 ± 5.5	295 ± 7.1	432 ± 17.9
	匹数	8	5	4
SHRSR	角膜径 (mm)	5.0 ± 0.1	6.0 ± 0.0	6.0
	体重 (g)	168 ± 13.0	282 ± 13.0	417
	匹数	6	7	1
SHRSP	角膜径 (mm)	5.2 ± 0.3	6.2 ± 0.2	6.0
	体重 (g)	174 ± 11.0	306 ± 8.9	350
	匹数	7	7	1

平均値 $\pm$ 標準偏差

WKY: 正常血圧ウイスター京都系ラット, SHRSR: 脳卒中易発症ラット, SHRSP: 脳卒中難発症ラット

表 2 収縮期血圧 (mmHg) の経時的变化

	6 週	15 週	20 週
WKY	145 ± 6.0	124 ± 8.7	124 ± 12.6
SHRSR	$159 \pm 14.5^*$	204 ± 14.7	221
SHRSP	$167 \pm 12.0^{**}$	$206 \pm 12.4^{**}$	220

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

3. 各群の網膜毛細血管網の網目 1 個当たりの面積の経時的变化

落射型蛍光顕微鏡下での観察では以前の報告^{(5)~(7)}と同様に、視神経乳頭付近では毛細血管網の多層構築が観察され、中間周辺部では 2 層の毛細血管網が観察され、深層の毛細血管網はループを形成していた。さらに、周辺では毛細血管網は 1 層となり、最周辺部では毛細血管網がアーケード状になっているのが観察された。

WKY で 6 週齢, 15 週齢および 20 週齢で、網膜毛細血管の網目 1 個当たり面積の測定を行い、経時的变化を観察した。6 週齢で 41.1 ± 10.6 (平均値 $\pm$ 標準偏差) μm^2 , 15 週齢で $44.7 \pm 4.9 \mu\text{m}^2$, および 20 週齢で $41.4 \pm 9.2 \mu\text{m}^2$ で

あった。Duncan の多重比較では、この両者間に統計的有意差がなく、成長しても網膜毛細血管の網目 1 個当たりの面積は一定であった(表 3)。

SHRSR 群では、6 週齢で $35.6 \pm 4.8 \mu\text{m}^2$, 15 週齢で $57.8 \pm 10.0 \mu\text{m}^2$, 20 週齢で $75.1 \mu\text{m}^2$ であり、SHRSP 群では、6 週齢で $39.3 \pm 6.7 \mu\text{m}^2$, 15 週齢で $61.6 \pm 11.6 \mu\text{m}^2$ であり、20 週齢では網膜血管網が破壊され、網目 1 個当たりの面積が著しく拡大し計測不能だった。網目 1 個当たりの面積の増加は、SHR では 2 つの群ともに統計学的に有意であった。なお、6 週齢から 15 週齢への面積の増加率は WKY, SHRSR および SHRSP でそれぞれ 8.2%, 58% および 57% であった。

4. WKY 群, SHRSR 群および SHRSP 群との比較

6 週齢では 3 群間に有意な面積の差を認めなかったが、15 週齢では SHRSR 群および SHRSP 群は WKY 群に比較し面積が有意に増加していた。図 1 ~ 3 にそれぞれ WKY と SHRSP の IVGFP を示す。図 2 では図 1 と比較

表 3 網膜毛細血管の網目 1 個当たりの面積 (μm^2) の経時的变化

	6 週	15 週	20 週
WKY	41.1 ± 10.6	44.7 ± 4.9	41.4 ± 9.2
SHRSR	35.6 ± 4.8	$57.8 \pm 10.0^{**}$	75.1
SHRSP	39.3 ± 6.7	$61.6 \pm 11.6^{**}$	計測不能

** : $p < 0.01$

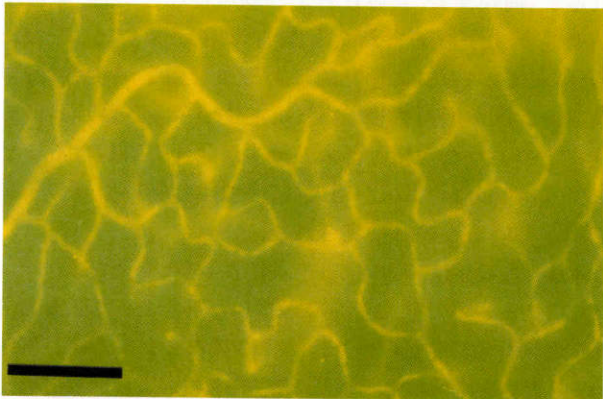


図 1 15 週齢の正常血圧ウイスター京都系ラット(対照)のゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本。バーは 100 μm

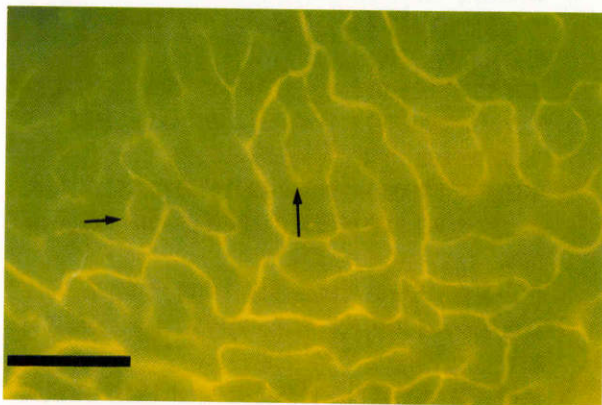


図 2 15 週齢の脳卒中易発症ラットのゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本。
→: 毛細血管の脱落もしくは閉塞が推測される部位
バーは 100 μm

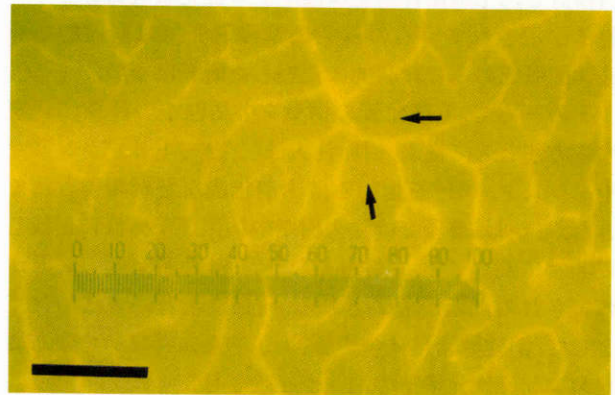


図 3 20 週齢の脳卒中難発症ラットのゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本。
対照と比較すると、網目 1 個当たりの面積は明らかに大きい。毛細血管の脱落もしくは閉塞している部位(矢印)を認める。バーは 100 μm

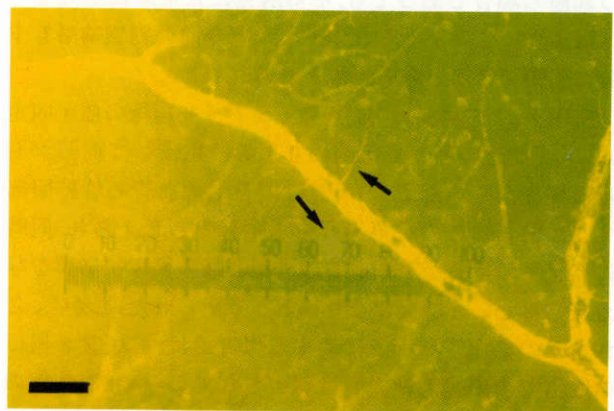


図 4 20 週齢の脳卒中易発症ラットのゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本。
細動脈からの毛細血管の分岐が明らかに減少し、分岐した毛細血管も狭小化している(矢印)。バーは 100 μm

すると網目 1 個当たりの面積は大きく、毛細血管の蛇行が認められたり、毛細血管の脱落と考えられる部分も多く観察され、視覚的にも両者の差は明確であった。特に、20 週齢のSHRSRではその特徴は強く認めた。また、20 週齢のSHRSPのIVGFPでは細動脈からの毛細血管の分岐が明らかに減少または狭小化し、深層の毛細血管床はほとんど観察できず、そのため、その網目 1 個当たりの面積の計測はできなかった(図 4)。

SHRSR 群と SHRSP 群間との比較では、高血圧の程度が強いSHRSP群により大きな面積の増加を認めたが、統計的には有意差を認めなかった(表 3)。

IV 考 按

眼科領域における高血圧症への興味は、主に検眼鏡的に観察可能な網膜血管、特に網膜細動脈に限られ¹⁾⁶⁾⁷⁾、組織学的検索も細動脈を中心に行われてきた^{2)~5)13)14)}。

また、一部では脈絡膜病変の報告⁸⁾も認められるが、しかし興味を中心は細動脈におかれている¹¹⁾¹⁸⁾。つまり、今回検討した毛細血管病変は臨床的に蛍光眼底撮影でその脱落が示されているのみ¹⁰⁾で、基礎研究では断面的な形態学的研究のみで経時的に観察した研究はない。

その一方で、毛細血管の構築を広範囲かつ詳細に観察する方法として従来、樹脂注入法^{19)~21)}や、トリブシン^{22)~27)}やエラストーゼ²⁸⁾を用いる酵素消化法などが報告されてきた。しかし、前者では注入樹脂の粘稠度が血液に比較して非常に高いことが問題となり²¹⁾、病変部位への流入が障害される問題が危惧される。同様に後者の方法の欠点として、消化酵素自体の影響、人工的な血管走行の分布変化および三次元構造の消失が指摘されていた²⁷⁾。

一方、今回用いた IVGFP 法¹²⁾¹³⁾は、同一標本を用いて微小循環系の血管構築から電子顕微鏡による観察を連続的に行うことができる利点があり、今までは SHR や家兎に用いられている^{12)~14)29)}。本法を用いれば、従来の鋳型標本などとは異なり、かなりの血管閉塞などの病変がある網膜の場合であっても、その所見に人工産物が入る余地は少ないことが知られており¹⁴⁾²⁹⁾、今回の実験結果も十分に信頼できるともと思われる。

SHR 群は 15 週齢、つまり昇圧後 7~8 週後の血圧固定期には、前述の通り昇圧期の 6 週齢に比較して面積が有意に増加していた。この所見は網膜毛細血管の管腔閉塞または血管自体の脱落過程を示すものと考えられ、同時に高血圧の持続が毛細血管の構築と網膜循環に影響を与えているという証拠になり得ると考えられた。しかし、これまでの高血圧ラットに関する報告では、昇圧後 8 週位の段階での閉塞毛細血管は報告されていない。これらの報告と今回の結果の相違に関して以下の原因が考えられる。第 1 に、高血圧性の内皮障害により、部分的でなおかつ不可逆的な毛細血管の閉塞が生じた可能性があげられる。事実、15 週齢のSHRSP(図 2)および 20 週齢のSHRSR

(図 3)では、15 週齢のWKY(図 1)にみられなかった毛細血管の途切れや蛇行など、血流抵抗の増加を示唆する所見が認められた。従来の報告の検索法はあくまでも準超および超薄切片法であるため、検索範囲が非常に狭いことからピンポイントの閉塞部位を見落とした可能性も否定できないように思える。第 2 に、動脈の狭細所見が認められることから(図 4)、細動脈からの流入障害により狭細部以下では逆に低圧となっている可能性が示される。

おそらくは、毛細血管の部分的閉塞および流入障害の両者が、今回の網目 1 個当たりの面積の拡大、すなわち、毛細血管床の減少に主役を演じているものと考えられるが、そのいずれかが重要であるかについては今後 IVGFP の切片標本を作製し、さらに検討する必要がある。

今回見られた毛細血管網の網目 1 個当たりの面積の拡大は、高血圧症の持続時間が影響していると考えられた。すなわち、高血圧症の持続は毛細血管構築を変えて毛細血管床を減少させると考えられる。もし、この毛細血管病変が局所的なものであるとすれば全身の血圧には影響はないと思われるが、今までに、多少の臓器特異性が認められるが、網膜血管、腎血管および脳血管などでは、同様な閉塞性変化が認められたと報告³⁰⁾³¹⁾されている。このため、高血圧の持続は、全身的に網膜血管床を減少させ、末梢血管抵抗を増大させている可能性が示唆され、同時に、逆にこのような毛細血管床の減少が全身的に起きることにより、毛細血管抵抗が増大し、高血圧の維持機構の一端を担っているものと推測された。

本論文の要旨は、第 100 回日本眼科学会総会で発表した。稿を終えるに当たり、ご指導ご校閲いただきました弘前大学医学部眼科学講座松山秀一教授、ご校閲ならびにご助言下さいました同大学病理生理部門高松 滋教授および同放射線科竹川鉦一教授に深謝いたします。また、実験を終始手伝って下さった菊池美和子氏および川村英治氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 吉本弘志: 実験的高血圧症の研究 第 1 報 腎性高血圧ラットの検眼鏡および光学顕微鏡による観察. 日眼会誌 77: 1951—1961, 1973.
- 2) 吉本弘志: 実験的高血圧症の研究 第 2 報 腎性高血圧ラット網膜細動脈の電子顕微鏡的観察. 日眼会誌 78: 649—663, 1974.
- 3) 宇山昌延: 実験的高血圧の眼科的研究 第 1 篇 腎性高血圧ラットの眼底所見. 日眼会誌 70: 132—149, 1966.
- 4) 宇山昌延: 実験的高血圧の眼科的研究 第 2 篇 腎性高血圧ラットの眼球の病理組織所見. 日眼会誌 71: 303—319, 1967.
- 5) 浜田 陽: 悪性高血圧自然発症ラットにおける眼底変化—(2) 蛍光眼底写真と網膜血管. 日眼会誌 97: 690—697, 1993.
- 6) 松山秀一: 高血圧の眼底所見の把握と臨床的意義. あたらしい眼科 5: 3—10, 1988.

- 7) 吉本弘志: 高血圧眼底病変の病理, あたらしい眼科 5: 11—20, 1988.
- 8) Simionescu M, Simionescu N, Palade GE: Segmental differentiation of cell junctions in vascular endothelium. *J Cell Biol* 67: 863—885, 1975.
- 9) 吉本弘志: 循環障害, 谷口慶晃, 他(編): 眼科 MOOK 28 眼病理学, 金原出版, 東京, 66—81, 1986.
- 10) 阿部百子, 三上 規, 吉本弘志: 細動脈硬化性網膜症の3例, *Ther Res* 7: 828—834, 1987.
- 11) 吉本弘志, 松山秀一: 実験的腎性高血圧ラットにおける末期重症脈絡膜症の研究, *日眼会誌* 91: 756—770, 1987.
- 12) 三上 規, 松橋英昭, 一戸 敏, 吉本弘志, 松山秀一: ゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本法によるラットおよび家兎網膜血管の観察, *日眼会誌* 91: 353—359, 1987.
- 13) 三上 規: 高血圧自然発症ラットにおける網膜細動脈口径不同の微細構造, *日眼会誌* 92: 1712—1721, 1988.
- 14) 熱海 治: 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットにおける網膜細動脈口径不同の微細構造, *日眼会誌* 97: 483—493, 1993.
- 15) 関 伶子, 福地健郎, 江口功一: ラット網膜血管の立体構築, *Ther Res* 7: 799—802, 1987.
- 16) 関 伶子: ラット網膜血管の立体構築 後極部と周辺部の違い, *日眼会誌* 91: 1281—1285, 1987.
- 17) Shigenori O, Yoshikuni O: Microvascular architecture of the retina in the Japanese monkey. *Anthropol Sci* 102: 139—154, 1994.
- 18) 吉田恒一, 吉本弘志: 高血圧性網膜症例における脈絡膜血管障害と毛細血管再生過程について, *眼紀* 37: 1477—1483, 1986.
- 19) 氏家宣和: 網膜血管の三次元的構築, *日眼会誌* 80: 634—644, 1976.
- 20) 松尾信彦: 毛様体血管の樹脂鋳型標本の走査電子顕微鏡的研究, *日眼会誌* 77: 928—935, 1973.
- 21) 松坂利彦: 脈絡膜血管の解剖, *眼紀* 26: 811—824, 1975.
- 22) Kuwabara T, Cogan DG: Retinal vascular patterns. Part I. Normal architecture. *Arch Ophthalmol* 64: 904—911, 1960.
- 23) Kuwabara T, Cogan DG: Retinal vascular patterns. Part II. Human retinal vessels studied in three dimensions. *Arch Ophthalmol* 65: 575—587, 1961.
- 24) Kuwabara T, Cogan DG: Retinal vascular patterns. Part III. Age, hypertension, absolute glaucoma, injury. *Arch Ophthalmol* 65: 708—716, 1961.
- 25) 杉 健児: トリプシン消化法を以てした人眼網膜血管の研究, *日眼会誌* 70: 1169—1187, 1966.
- 26) 中沢妙子: 実験的高血圧ラットの網膜血管の病理学的観察, *日眼会誌* 85: 417—432, 1981.
- 27) Suzuki Y, Kimura S, Yoshimoto H, Matsuyama S: Micromorphological estimation of trypsin digestion technique for the study of retinal vessels. *Microcirculation Annual* 10: 201—202, 1994.
- 28) Robison WG Jr, Laver N, Jacot J, Glover J: Sorbinil prevention of diabetic-like retinopathy in the galactose-fed rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2368—2380, 1995.
- 29) 鈴木幸彦, 松本光生, 加藤智博, 水谷英之, 桜庭知己, 吉本弘志: 実験的網膜血管閉塞症における薬物療法の可能性, *日眼会誌* 100: 27—33, 1996.
- 30) Hazama F, Yamada E, Yukioka N: Blood-brain barrier dysfunction as a pathogenetic factor in chronic hypertensive lesion. In: Johansson, BB et al (Eds): *Pathophysiology of the blood-brain barrier*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford, 297—310, 1990.
- 31) 浜田 陽, 浜田路子, 宇山孝司, 宇山令司, 米本寿史, 池村英則, 他: SHRSP の網膜血管, 脳血管, 腎血管における Fluorescein Microscopy の観察, *近大医誌* 9: 647—648, 1984.