

実験的網膜静脈閉塞症モデルにおける走査型レーザー 検眼鏡を用いた網膜血流速度の測定

加藤 智博

弘前大学医学部眼科学教室

要 約

経外膜のトロンビン投与により作製した実験的網膜静脈閉塞症モデルの白色家兎に、走査型レーザー検眼鏡を用いてフルオレセイン蛍光眼底撮影を行い、網膜静脈の閉塞過程を血行動態的に検討した。18 匹の無処置対照群と 23 匹の実験群に、動脈血流速度および静脈充盈時間の測定を行った。対照群では、動脈血流速度および静脈充盈時間はそれぞれ 5.3 ± 1.1 mm/sec (平均値 $\pm$ 標準偏差) および 6.2 ± 1.2 sec であり、左右差は認められなかった。実験群では、トロンビン投与前の動脈血流速度および静脈充盈時間はそれぞれ 5.7 ± 1.3 mm/sec および

5.8 ± 1.0 sec であった。動脈血流速度はトロンビン投与後 24 時間に 3.0 ± 0.9 mm/sec と低下し、投与後 48 時間に 4.0 ± 1.5 mm/sec と回復傾向にあった。静脈充盈時間は、投与後 24 時間では 5.7 ± 2.0 sec と変わらず、投与後 48 時間に 4.5 ± 1.4 sec と短縮傾向を示した。網膜静脈の閉塞に動脈血流速度の低下が関与していることが示された。(日眼会誌 102: 307—311, 1998)

キーワード：実験的網膜静脈閉塞症，フルオレセイン蛍光眼底撮影，動脈血流速度，静脈充盈時間

Measurement of Retinal Blood Flow Velocity by Scanning Laser Ophthalmoscopic Fluorescein Fundus Angiography in Experimental Retinal Vein Obstruction

Chihiro Katoh

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

Abstract

To study the role of arterial blood dynamics in the thrombogenesis of thrombin-induced experimental retinal vein obstruction, the retinal blood flow velocity was evaluated using scanning laser ophthalmoscopic fluorescein videoangiography in an experimental rabbit retinal vein obstruction model. Retinal vein obstruction was made by transadventitial direct instillation of thrombin to the retinal vessels from the vitreous side. The blood flow velocity in the retinal artery and vein was estimated by measuring the passing velocity of the flow head of the dye bolus and venous filling time, respectively. 23 animals were treated with thrombin and compared with 18 controls not treated. In the control group retinal artery blood flow velocity and retinal venous fluorescein filling time was 5.3 ± 1.1 mm/sec (mean $\pm$ stan-

dard deviation) and 6.2 ± 1.2 sec, respectively. In the treated group the values were 5.7 ± 1.3 mm/sec and 5.8 ± 1.0 sec before the thrombin administration, and 3.0 ± 0.9 mm/sec at 24 hours after its administration, and 5.7 ± 2.0 sec and 4.0 ± 1.5 mm/sec and 4.5 ± 1.4 sec at 48 hours after the administration. These results indicate that a decrease in retinal artery blood flow velocity is strongly involved in the thrombogenesis in thrombin-induced experimental retinal vein obstruction. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 307—311, 1998)

Key words: Experimental retinal vein obstruction, Fluorescein fundus videoangiography, Retinal arterial blood flow velocity, Retinal venous filling time

I 緒 言

網膜静脈閉塞症は、眼底出血を来し日常診療でもよく

遭遇する疾患である¹⁾²⁾。本症の疾患モデルに関しては、これまでも様々な作製方法が試みられてきたが、それらの多くは結紮、熱凝固、光凝固などの機械的な力で血管を損

別刷請求先：036-8216 青森県弘前市在府町 5 弘前大学医学部眼科学教室 加藤 智博
(平成 9 年 4 月 15 日受付, 平成 9 年 12 月 17 日改訂受理)

Reprint requests to: Chihiro Katoh M.D. Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine,
5 Zaifu-cho, Hirosaki-shi, Aomori-ken 036-8216, Japan

(Received April 15, 1997 and accepted in revised form December 17, 1997)

傷する方法をとっており、いずれも人眼における網膜静脈閉塞症とは発生の機序、病態において明らかに異なるものであった³⁻⁷。その点、桜庭⁸の報告した経外膜のトロンビン投与による実験的網膜血管閉塞症モデルは、ヒト生体内で起きている網膜静脈閉塞症により近い実験モデルといえる^{9,10}。しかし、その閉塞過程を動的に捕え検討を加えた報告は皆無であった。今回、この実験系を用いて走査型レーザー検眼鏡(scanning laser ophthalmoscope: 以下、SLO)による蛍光眼底造影を行い、時間の経過とともに変化する網膜静脈の閉塞過程を血行動態的に検討した。

II 実験材料および方法

無処置対照群として、月齢約5か月、体重約3kgの白色家兎18匹を用いた。これらの家兎は、ミドリンP[®](参天製薬)で片眼を散瞳し、体重1kg当たり25mgのペントバルビタールナトリウム(ネプタール[®])を耳介静脈から注入して麻酔を行った。次いで、SLO(SLO-101型、ローデンシュトック社、ミュンヘン)を用いて蛍光眼底撮影を行い、S-VHSビデオレコーダー(SVO-9500 MD、ソニー)で記録を行った。光源としてはアルゴン・ブルー(488 nm)を用い、撮影条件はレーザー強度B3(190 μ W)ビデオ感度A(自動調節)画角40度に設定、造影剤には1%フルオレセインナトリウム(フルオレサイト[®])を用い1mlを耳介静脈に1秒で急速注入した。また、日を変えて他眼の測定を行った。次に、月齢約5か月、体重約3kgの白色家兎23匹の実験群に蛍光眼底撮影を同様に行った後、前述の経外膜トロンビン投与により実験的網膜静脈閉塞症⁸を作製した。すなわち、体重1kg当たり25mgのペントバルビタールナトリウム(ネプタール[®])を耳介静脈から注入して麻酔を行い、Goldmann型眼底観察用コンタクトレンズを角膜上にのせて、手術用顕微鏡で眼球内を観察しながら毛様体偏平部から硝子体腔内に27G針を刺入し、直視下に網膜静脈壁上へ5単位のトロンビンを含む溶液0.01mlを滴下した。トロンビン溶液はトロンビン凍結乾燥剤(トロンビン[®]、持田製薬)5,000単位を生理的食塩水10mlで溶解したものをを用いた。以後、5匹はトロンビン滴下の1, 3, 6, 12, 24時間後に眼底観察を行い、SLOによる蛍光眼底撮影を行った。また、18匹は24, 48時間後に眼底観察を行い、SLOによる蛍光眼底撮影を行った。測定は羽鳥ら¹¹の方法に準じて、主幹動脈の同一の部位で行い、ビデオテープを再生し1/30秒ごとにコマ送りをしてビデオモニター上で移動する蛍光色素塊(dye bolus)の先端位置を計測し、蛍光色素流の速度を血流速度とした。具体的には、視神経乳頭から予め実測で得た3mmの位置まで蛍光色素塊が移動するのに要した時間から求めた。なお、この単位長は、摘出家兎眼59眼の視神経乳頭横径を実測して計算した。視神経乳頭横径は 0.79 ± 0.07 (平均値 $\pm$ 標準偏差)mmであっ

た。屈曲した血管の長さは、細かく血管を分割しそれぞれの線分の長さの和で求めた。また、3mmよりも乳頭側で閉塞を起こした場合は、閉塞端までの距離で測定した。一方、静脈は動脈と違い蛍光色素塊の先端が捕え難いので、フルオレセイン注入後に網膜主幹動脈へ蛍光色素塊が現われてから静脈充盈完了までの時間を測定した。得られたデータは一元配置分散分析で有意差が得られたものについてScheffeの多重比較を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

III 結 果

1. SLO所見

トロンビン投与前に比して、トロンビン滴下6時間後のSLO所見上では細静脈分岐において蛍光色素流の狭細化と流入障害が観察された。12時間後には主幹動脈および静脈の両者において蛍光色素流の狭細化が観察された。また、この蛍光色素流は管径不同様所見を呈した。トロンビン滴下24時間後では動静脈蛍光色素流はいっそう狭細となり、管径不同様所見もより強く認められた。この時点では、フルオレセインが流入しない部分、すなわち、動静脈の完全閉塞が確認された。トロンビン滴下48時間後には、さらに近位端で閉塞していた(図1)。

2. 動脈血流速度および静脈充盈時間

1) 無処置対照群

18匹36眼で動脈血流速度は 5.3 ± 1.1 (平均値 $\pm$ 標準偏差)mm/sec。右眼 5.3 ± 1.3 mm/sec、左眼 5.2 ± 1.0 mm/secであり、静脈充盈時間は 6.2 ± 1.2 (平均値 $\pm$ 標準偏差)sec。右眼 6.0 ± 0.9 sec、左眼 6.3 ± 1.5 secであり、左右で有意差はなかった。

2) トロンビン投与実験群

投与前、1, 3, 6, 12, 24時間後と連続して測定した5匹5眼では、動脈血流速度は時間とともに低下したが、有意差は認められなかった。静脈充盈時間でも有意差は認められなかった(表1)。次いで、投与前、24, 48時間後の3回連続でSLOで測定した18匹18眼について経時の変化をみると、動脈血流速度は24時間後に低下し、48時間後には回復傾向を示した。投与前と24時間後の間に有意差を認めた。静脈充盈時間は、投与48時間後の間で短縮傾向があったが、有意差は認められなかった(表2)。

IV 考 按

網膜静脈閉塞症の発症原因については、Greenら¹²は病期ごとに病理組織学的検討を行い、血栓説を強調している。すなわち、全例に強膜篩状板部網膜中心静脈に血栓を、症例の半数に内皮細胞増殖や慢性炎症性細胞浸潤を認めた。彼らは最初に静脈壁の内皮細胞の剥脱部に血栓が形成され、時間の経過とともに器質化し、さらに時間を経てのち、血管再疎通すると考えた。内皮細胞増殖は、この過程において二次的に生じるものであって、発症後数

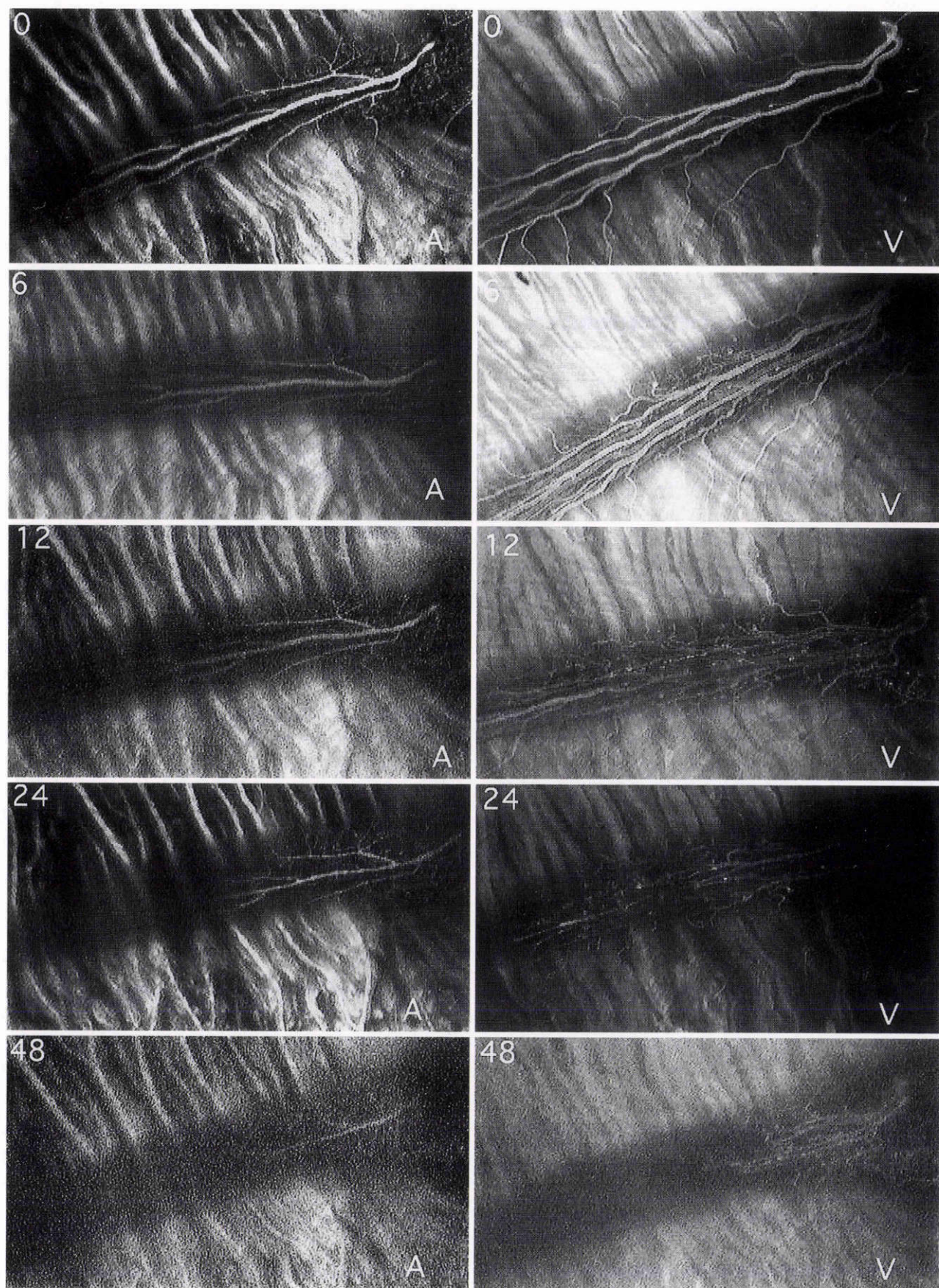


図1 トロンビン投与前, 6, 12, 24, 48 時間後の走査型レーザー検眼鏡所見.

A: 動脈相(網膜動脈に蛍光色素が流入してから 20/30 秒後), V: 静脈相(網膜動脈に蛍光色素が流入してから 5 秒後), 数字はトロンビン投与後の時間. ただし, 0 は投与前.

表1 トロンビン投与前および投与後における動脈血流速度と静脈充盈時間

測定時期	眼数	動脈血流速度 (mm/sec)	静脈充盈時間 (sec)
投与前	5	5.8±1.0	5.4±1.0
1時間	5	4.4±1.0	5.5±1.1
3時間	5	4.8±1.1	4.1±0.7
6時間	5	4.4±1.6	5.8±2.1
12時間	5	3.8±0.8	6.2±1.4
24時間	5	3.2±1.4	5.6±2.0

(平均値±標準偏差)

表2 トロンビン投与前, 24, 48 時間後の動脈血流速度と静脈充盈時間

測定時期	眼数	動脈血流速度 (mm/sec)	静脈充盈時間 (sec)
投与前	18	5.7±1.4	5.9±1.0
24時間	18	3.0±0.9	5.7±2.0
48時間	18	4.0±1.5	4.5±1.4

*: p<0.05

日してからみられ、同様に炎症性細胞浸潤も血栓の器質化過程における二次的な変化であり、さらに、長期間経過した再疎通血管では血管壁の肥厚がみられ静脈硬化症を呈するが、これらの所見はすべて血栓形成の連続的な過程として説明が可能であると述べている。血栓形成の要因としては、従来から血流の変化、血管壁の変化、血液性状の変化があげられている。網膜静脈血栓の場合は血流の変化がより重要な因子と考えられている。すなわち、強膜篩状板では狭い孔を網膜中心静脈と動脈が並んで通過しており、また、網膜内の動静脈交差部でも動静脈が血管外膜を共有しており、硬化性病変などによって肥厚した動脈によって圧迫される。このような部分では血流の緩徐化や渦流が起こり、さらに、血管内皮の障害も頻発して血栓形成の好発部位になってしまうことが推定されている。本実験に用いた経外膜のトロンビン投与法は、血管周囲の結合織中に存在するトロンボプラスチンが外因性凝固機転に関与していることから、血管外からの投与によっても血管内に血栓形成をもたらす可能性があることに着目したもので、家兎の網膜血管にヒト網膜静脈閉塞症類似の眼底出血を伴う血栓形成を可能としたモデルである⁹⁾¹⁰⁾。実験的網膜静脈閉塞症モデルの出血発現の機序は以下のように説明されている。トロンビンが静脈と同時に細動脈にも作用し、血小板凝集と血管壁の収縮を来し⁹⁾、その結果、末梢の細静脈血流低下を引き起こし血流停滞を起こす。この停滞が細静脈の血小板凝集ならびに凝固亢進をさらに促進する。しかし、細動脈では線溶素の作用を受け血栓が縮小あるいは消失することにより、血流が再開する。その結果として、すでにトロンビンの作用によって完全閉塞に近い状態に陥っている静脈内圧を急激に上昇させ破綻性の出血を生じせしめるものと推測さ

れている。実験群では、短時間繰り返し測定した5眼では眼数が少ないこともあって、有意差は得られなかったが、3回測定の18眼では動脈血流速度は投与前から24時間後に向かって有意に低下しており、24時間後から48時間後に向かっては回復傾向を示した。このことは、3時間後の光学顕微鏡所見でも細動脈管腔内に赤血球の連鎖形成が認められることから、細動脈に血流の低下を来しているという松本⁹⁾の報告を支持する。ただ、松本が述べているような細動脈の狭細や血小板の凝集塊によるフルオレセインの不均等は確認できなかった。このような差異の原因としては、SLOはゼラチン加フルオレセイン静注固定標本法に比べて拡大率が小さいこと、光学顕微鏡に比べて解像度が低いこと、などが推測されよう。よって、初期における動脈血流速度低下は、細動脈の変化に起因するものと推測された。しかし、6時間を超えてもさらに動脈血流速度は低下しており、松本⁹⁾の報告した6時間後に静脈血栓形成が進み、一方、動脈では線溶素の作用により血栓の消失による血流の回復があるとの推測とは異なった結果を示した。今回なぜこのような差異が生じたのかは不明だが、24時間後まで動脈血流速度の低下があることは事実であり、今後、組織学的検索も同時に行い解明しなくてはならないと思われる。松本の報告とは時間的なずれはあるが、トロンビンの作用を受けて細動脈に起きた血小板凝集と凝固亢進および動脈収縮が動脈血流速度低下を引き起こし、これが末梢の細静脈の閉塞に助長的に働き、その後、線溶素の作用を受けて動脈血流速度が改善するとした松本⁹⁾の推定を支持するものと思われる。静脈充盈時間は、網膜静脈閉塞症において文献的には遅延するとされている¹³⁾。しかし、本実験においては遅延するという結果は得られず、トロンビン投与48時間後に短縮傾向を示した。48時間後の静脈充盈時間の短縮は、24時間後以降SLOで観察された細静脈閉塞による灌流域の縮小による短絡と48時間後における動脈血流速度の改善とから説明できる。しかし、動脈血流速度の低下している24時間後になぜ静脈充盈時間の遅延が起らなかったのかは不明である。今回の実験で、実験的網膜静脈閉塞症モデルにおいて、トロンビンの静脈に対する作用の他に動脈血流の低下が閉塞機転に係わっていることが示された。

稿を終えるに当たり、御校閲をいただきました弘前大学医学部眼科学教室松山秀一教授および御指導頂きました同教室吉本弘志助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地美和子氏および川村英治氏に感謝いたします。

文 献

1) 益山芳正：網膜血管閉塞症。谷口慶見，他(編)：眼科 Mook 28 眼病理学。金原出版，東京，298—314，1986。
2) 松山秀一：網膜血管閉塞性疾患の病態と治療。眼紀 34：409—418，1983。

- 3) **Fujino T, Curtin VT, Norton EWD**: Experimental central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 81: 395—406, 1969.
 - 4) **Kohner EM, Dolley CT, Shakib M, Henkind P, Paterson JW, Oliveira LNF, et al**: Experimental retinal branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 69: 778—825, 1970.
 - 5) **Apple DJ, Goldberg MF, Wyhinny G**: Histopathology and ultrastructure of the argon laser lesion in human retinal and choroidal vasculatures. *Am J Ophthalmol* 75: 595—609, 1973.
 - 6) **Becker B, Post LT**: Retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 34: 677—686, 1951.
 - 7) 一戸 敏, 三上 規, 松橋英昭, 吉本弘志: 網膜血管閉塞症の新しいモデル—蛍光化学血栓を利用した網膜血管閉塞症について—. *日眼会誌* 91: 676—682, 1987.
 - 8) 桜庭知己: 経外膜的トロンビン投与による実験的網膜血管閉塞症. *日眼会誌* 93: 978—985, 1989.
 - 9) 松本光生: 実験的網膜血管閉塞症における血栓形成の初期変化について. *日眼会誌* 96: 1132—1141, 1992.
 - 10) 田村正人, 吉本弘志: 実験的家兎網膜静脈閉塞症における後期変化について. *Ther Res* 12: 99—103, 1991.
 - 11) 羽鳥 毅: 走査型レーザー検眼鏡による網膜動脈血流速度の測定. *臨眼* 46: 901—907, 1992.
 - 12) **Green WR, Chann CC, Hutchins GM, Terry JM**: Central retinal vein occlusion: A prospective histopathologic study of 29 eyes in 28 cases. *Retina* 1: 27—55, 1981.
 - 13) 戸張幾生: 網膜静脈閉塞症. 本田孔士(編): 診療プラクティス6 眼底造影写真の読み方. 文光堂, 東京, 78—81, 1993.
-