

血管内皮細胞増殖因子はサル眼での実験的脈絡膜血管新生の成長を促進する

岩下憲四郎, 高橋 寛二, 和田 光正, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

目 的：実験的脈絡膜新生血管(以下, 新生血管)を発生させ, それに血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)を投与して, 血管新生への影響を臨床的, 形態計測学的, 病理組織学的に検討する。

方 法：6 匹のカニクイザルの両眼に赤色クリプトンレーザーによる過剰凝固を行って血管新生を誘発した。ヒト VEGF 2.5 μ g を左眼硝子体内に投与した(投与眼)。右眼は対照眼とした。光凝固の 3 日から 12 週後に眼球を摘出して, 光学顕微鏡と電子顕微鏡で検索した。

結 果：VEGF 投与眼では, 光凝固 1 週後から凝固部周囲に漿液性網膜剥離が強く, 新生血管が網膜下で著明に発育した。投与眼と対照眼との間に新生血管の発生率には差はなかったが, 投与眼では新生血管からの蛍光漏

出が強く, その活動性が光凝固の 4 週後まで持続した。新生血管の面積計測で, 投与眼では光凝固 1 週後から対照眼よりも有意に大きく, その後の拡大も著しかった。組織学的には, 投与眼では光凝固早期から明らかな血管腔がある新生血管が網膜下にあった。

結 論：硝子体腔に投与した VEGF は, 実験的脈絡膜血管新生を促進する因子である。(日眼会誌 103: 415—424, 1999)

キーワード：実験的脈絡膜新生血管, 血管内皮細胞増殖因子, 脈絡膜血管新生, 形態計測, 滲出型加齢黄斑変性

Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Experimental Choroidal Neovascularization in Monkey Eyes

Kenshiro Iwashita, Kanji Takahashi, Mitsumasa Wada and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Purpose : To evaluate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on experimental choroidal neovascularization (CNV) in monkey eyes through clinical, morphometric, and histological observations.

Method : CNV was induced in both eyes of 6 rhesus monkeys by intense photocoagulation by red krypton laser. Immediately after photocoagulation, 2.5 μ g of exogenous human VEGF was injected into the vitreous of the left eye in each animal. The right eyes served as controls. The eyes were enucleated 3 days to 12 weeks after photocoagulation and were examined by light and electron microscopy.

Results : VEGF-treated eyes developed remarkable serous retinal detachment around the sites of photocoagulation with manifest CNV one week after photocoagulation. Although there was no difference in the incidence of CNV between the treated and con-

trol eyes, the treated eyes showed more intense leakage of fluorescein from the CNVs for up to 4 weeks after treatment. Morphometrically, the CNVs were significantly larger and continued to grow longer in the treated than in the control eyes after one week of photocoagulation. Histologically, newly formed vessels with a distinct lumen were present in the treated eyes after 3 days of photocoagulation.

Conclusion : Intravitreal injection of human VEGF promotes experimental choroidal neovascularization in monkey eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 415—424, 1999)

Key words : Experimental choroidal neovascularization, Vascular endothelial growth factor, Angiogenesis, Morphometry, Age-related macular degeneration

別刷請求先：570-8506 守口市文園町 10—15 関西医科大学眼科学教室 岩下憲四郎

(平成 10 年 11 月 2 日受付, 平成 11 年 1 月 18 日改訂受理)

Reprint requests to: Kenshiro Iwashita, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi 570-8506, Japan

(Received November 2, 1998 and accepted in revised form January 18, 1999)

I 緒 言

加齢黄斑変性は欧米および本邦において近年増加し、高齢者の中途失明の原因として大きな問題となっている¹⁾。この疾患の病態は、脈絡膜新生血管(新生血管)の発生であり、この現象を抑制することができれば、加齢黄斑変性や他の血管新生黄斑症による視力障害者を減少させることができる。そのためには、脈絡膜血管新生の発生機序をより詳細に明らかにする必要がある。近年、血管新生へのサイトカインの関与が注目されており、多種のサイトカインが血管新生に関与していることが示されている。そのうち、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)は、血管新生促進因子のうちで最も注目され、特に眼内血管新生において重要な働きをするとされている。VEGFは、血管透過性因子(vascular permeability factor, VPF)として当初発見され²⁾、その後、血管内皮細胞を特異的に増殖させる因子³⁾と同一であることが判明した増殖因子である⁴⁾⁵⁾。我々は脈絡膜血管新生における VEGF の関与を明らかにするため、サル眼に発生させた実験的新生血管に外因性に VEGF を投与し、血管新生への影響を臨床的、形態計測学的、病理組織学的に検討した。

II 方 法

1. 実験的新生血管作製

実験動物には、成熟カニクイザル6匹12眼を用いた。眼底後極部に1眼当たり8か所、赤色クリプトンレーザー(Coherent Radiation社製 Krypton Laser System 900 K, 波長 647 nm)で強度光凝固(凝固条件: 凝固野 100 μ m, 凝固時間 0.1 秒, 凝固出力 200 mW)を行い、新生血管を実験的に作製した。

2. VEGF 硝子体内注入

同一個体の右眼を対照眼、左眼を VEGF 投与眼(投与眼)とし、6眼を対照眼、6眼を投与眼とした。投与眼には、光凝固直後に 0.1 M リン酸緩衝液 0.1 ml に溶解したヒト VEGF (genzyme 社, 分子量 38 kDa) 2.5 μ g を硝子体腔中央に 30 G 針を用いて1回注入した。対照眼には、溶

媒である 0.1 M リン酸緩衝液 0.1 ml を硝子体注入した。

3. 新生血管の臨床的評価

光凝固後3日と以後12週まで毎週、カラー眼底撮影、フルオレセイン蛍光眼底造影(フルオ造影)を行い、新生血管の臨床像および成長状況とその活動性を評価した。新生血管の発生の有無は光凝固1週、活動性持続率は4週のフルオ造影で判定した。新生血管発生率と新生血管の活動性持続率の対照群と VEGF 投与群間の有意差検定を Fisher's exact probability test を用いて行い、 $p < 0.05$ で統計学的に有意差ありとした。

VEGF 投与群の実験スケジュールは図1のごとくである。

4. 新生血管面積の形態計測的評価

新生血管誘発後2, 4, 12週間の経過を追った3匹において、フルオ造影早期に検出された新生血管面積をコンピュータで画像解析し、視神経乳頭の面積との比(単位: 乳頭面積)で表し、形態計測学的に定量化し評価した。新生血管が融合している場合、個々の新生血管面積は全体の面積を病巣数で等分した。また、対照群と VEGF 投与群間の有意差検定を Fisher's exact probability test を用いて行い、 $p < 0.05$ で統計学的に有意差ありとした。

5. 組織学的観察

光凝固後3日、1, 2, 4および12週に眼球を摘出し、前眼部を毛様体扁平部で開き、4% グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液(pH 7.4)で前固定後、新生血管を含む病巣部を細切し、1% 四酸化オスmium・リン酸緩衝液(pH 7.4)で後固定した。型のごとくエタノール系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。網膜脈絡膜の連続切片を作製の上、新生血管を含む組織を光学顕微鏡で観察し、必要な部を電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. 新生血管発生率(光凝固1週)

VEGF 投与群は40病巣中33か所(83%)、対照群40病巣中32か所(80%)で、両群間に統計学的有意差はなかった($p = 0.774$, Fisher's exact probability test)。

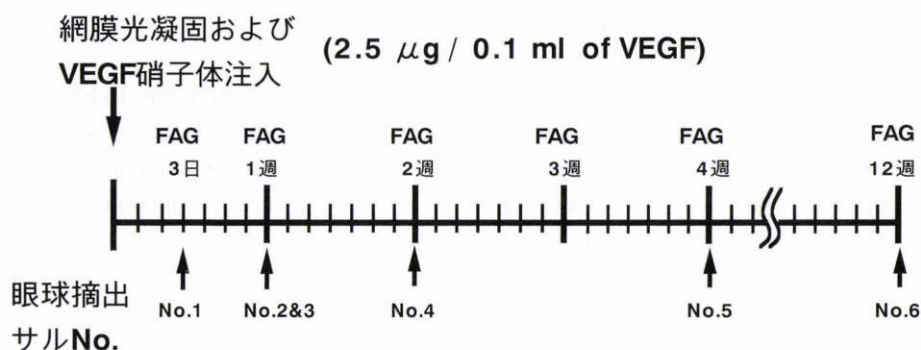


図1 Vascular endothelial growth factor(VEGF)投与群の実験スケジュール。

FAG: フルオレセイン蛍光眼底造影

2. 新生血管の活動性持続率(光凝固 4 週)

フルオ造影での蛍光漏出で新生血管の活動性を判定すると、VEGF 投与群では 12 病巣中 8 か所 (67%) で蛍光漏出が持続したが、対照群では 12 病巣中 1 か所 (8%) のみであった。両群間に統計学的有意差があった ($p=0.003$, Fisher's exact probability test)。

3. 新生血管面積の定量的評価

VEGF 投与眼では対照眼に比べ、光凝固 1 週の時点で既に新生血管面積が大きく、全経過を通して有意に大きかった。また、各眼の眼球摘出時の新生血管面積は、VEGF 投与眼は対照眼に比べ 1.5~2.0 倍と大きかった (表 1, 図 2)。

4. 眼底所見

1) 対照眼

光凝固 3 日、網膜の性状にはリン酸緩衝液によると思われる異常はみられず、光凝固 1 週、網膜下に灰白色の小さい新生血管膜がみられた (図 3 A)。光凝固 2 週になる

と新生血管膜は境界鮮明となり、病巣は融合するものもみられたが (図 3 B)、光凝固 4 週になると病巣周囲の漿液性網膜剥離は減少し、新生血管膜はより境界鮮明となった。その後、徐々に病巣は癒痕化し、12 週では病巣周囲の漿液性網膜剥離もなくなった (図 3 C)。

2) VEGF 投与眼

光凝固 3 日、網膜は浮腫状で網膜血管の拡張と蛇行があった。光凝固 1 週、新生血管膜は大きく網膜下に広がり、また、眼底後極部全体に高度の漿液性網膜剥離が広範にみられた。網膜は浮腫状でやや混濁し、網膜下の新生血管病巣周囲に自然に出血を生じていたものもあった。また、網膜血管は動脈、静脈ともに拡張、蛇行していた (図 3 D)。光凝固 2 週、新生血管膜が著明に発育し、高度の漿液性網膜剥離が広範囲に持続してみられた。病巣以外の部の網膜は、この時期になると浮腫はみられずほぼ正常で、網膜血管の蛇行や拡張はみられなくなっていた (図 3 E)。光凝固 4 週、新生血管は大きく成長し、その周囲に漿液性網膜剥離がみられた。その後、徐々に病巣は癒痕化に向かったが、光凝固 12 週においても、病巣の周囲に漿液性網膜剥離が依然みられた (図 3 F)。

5. フルオ造影所見

1) 対照眼

光凝固 3 日、新生血管網は検出できなかったが、光凝固 1 週、造影早期に新生血管網がみられた (図 4 A)。光凝固 2 週、新生血管は拡大し、蛍光漏出は増強していた (図 4 B)。その後、光凝固 4 週以降で新生血管からの蛍光漏出は減少し、光凝固 12 週にはほとんどの新生血管は退縮し、蛍光漏出は停止した (図 4 C)。

2) VEGF 投与眼

光凝固 3 日、造影早期から凝固斑の蛍光漏出が著明であったが、新生血管網は検出できなかった。造影晚期にな

表 1 新生血管面積の定量的評価

経過群	対照群	VEGF 投与群	有意差
1 週	0.096±0.010 (n=19)	0.147±0.011 (n=20)	あり ($P<0.05$)
2 週	0.143±0.038 (n=19)	0.242±0.065 (n=20)	あり ($P<0.05$)
4 週	0.138±0.023 (n=12)	0.254±0.047 (n=12)	あり ($P<0.05$)
8 週	0.129±0.014 (n=4)	0.248±0.043 (n=6)	あり ($P<0.05$)
12 週	0.121±0.014 (n=4)	0.248±0.043 (n=6)	あり ($P<0.05$)

単位：乳頭面積，VEGF：血管内皮細胞増殖因子，平均値±標準偏差

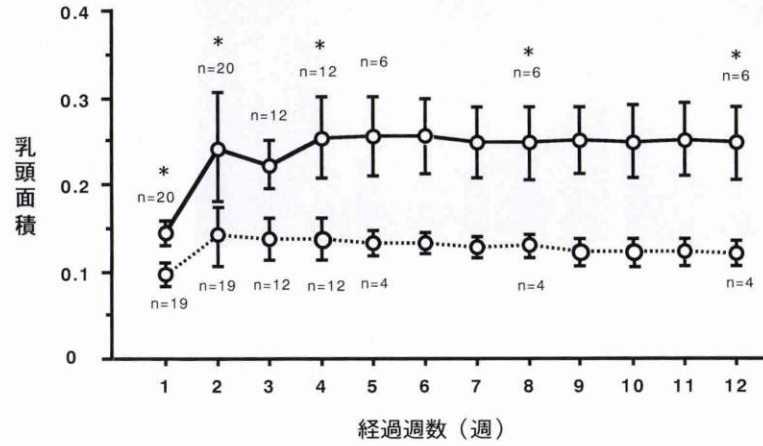


図 2 新生血管面積の定量的評価。

新生血管面積の経時的変化を定量的に計測した。対照眼に比べ VEGF 投与眼の新生血管は、光凝固 1 週の時点で既に有意に大きかった。また、1~2 週の新血管の拡大率は VEGF 投与眼の方が明らかに大きく、全経過を通して VEGF 投与眼の新血管の方が 1.5~2.0 倍と大きかった。—：VEGF 投与群，…：対照群，*：VEGF 投与群と対象群間に有意差あり

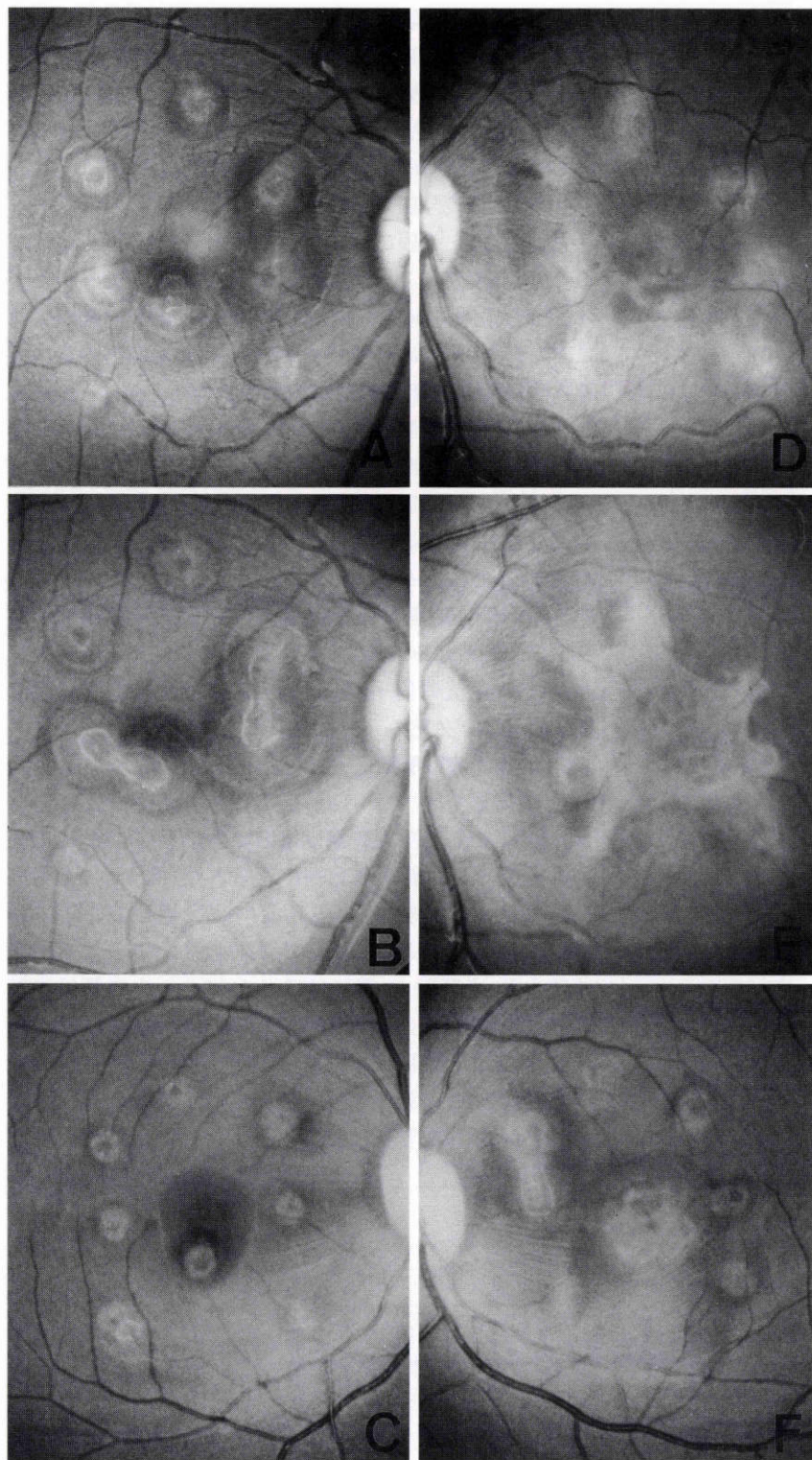


図3 対照眼および VEGF 投与眼の眼底所見(各々の時期の対照眼と VEGF 投与眼の眼底は, 同一個体の右眼と左眼).

対照眼の眼底(A~C)

A: 光凝固 1 週. 網膜下に灰白色の小さい新生血管膜がみられる(D, E と同一個体). B: 光凝固 2 週. 新生血管膜は境界鮮明で, 病巣は融合している(A と同一眼で, D, E と同一個体). C: 光凝固 12 週. 病巣は癒痕化し, 病巣周囲の漿液性網膜剥離はみられない(A, B と別の個体で, F と同一個体).

VEGF 投与眼の眼底(D~F)

D: 光凝固 1 週. 灰白色の脈絡膜新生血管膜は, 境界が不鮮明で大きく網膜下に広がり, また, 眼底後極部全体に高度の漿液性網膜剥離が広範囲にみられる. 網膜は浮腫状でやや混濁し, 網膜下に自然出血を生じている. 網膜血管は動脈, 静脈ともに拡張, 蛇行している(A, B と同一個体). E: 光凝固 2 週. 新生血管膜が著明に発育融合し, 高度の漿液性網膜剥離が後極部に広範にみられる. 網膜は, ほぼ正常で浮腫はみられず, 網膜血管の蛇行や拡張は軽減している(D と同一眼で, A, B と同一個体). F: 光凝固 12 週. 徐々に病巣は癒痕化に向かったが, 一部の病巣の周囲に漿液性網膜剥離が依然みられる(A, B と別の個体で C と同一個体).

ると眼底の造影像が不明瞭になるほど強い造影剤の前房内および硝子体への漏出がみられた. 光凝固 1 週, 造影早期に新生血管網がみられ, 対照眼に比べ新生血管の径が大きく, かつ, 蛍光漏出が旺盛であった(図 4 D). 光凝固 2 週, 新生血管膜は発育融合する傾向が強くなり, 新生血管膜全体から極めて強い蛍光漏出がみられたが, 造影剤の眼内への強い漏出はみられなかった(図 4 E). 光凝固 4, 12 週においても, 依然として旺盛な蛍光漏出を示す新生血管

がみられた(図 4 F).

6. 組織学所見

1) 光学顕微鏡所見

a) 対照眼

光凝固 3 日, 病巣中央では Bruch 膜断裂部を通して脈絡膜から進入した増殖組織がみられたが, 病巣辺縁での網膜色素上皮の増殖は少なく, 網膜下に網膜外層の壊死組織が残存していた. 網膜下に明瞭な血管腔を持った新

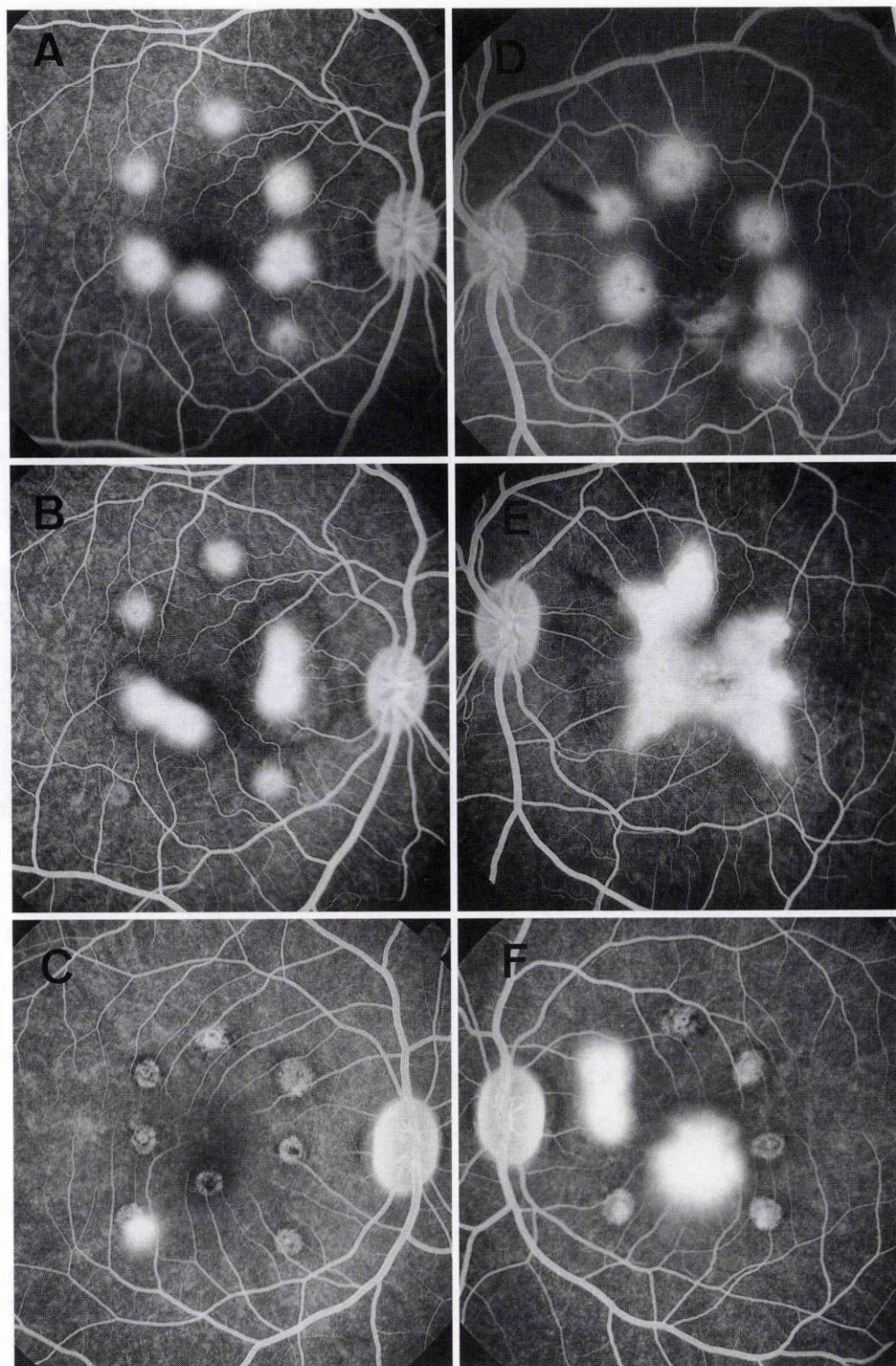


図4 対照眼と VEGF 投与眼のフルオレセイン蛍光眼底造影(フルオ造影)所見(各々の時期の対照眼と VEGF 投与眼の眼底は、同一個体の右眼と左眼)。

対照眼 (A~C)

A: 光凝固 1 週. 8 か所中 7 か所に明瞭な新生血管がみられる. B: 光凝固 2 週. 一部の新生血管は融合し, 新生血管は拡大しているが, その他の病巣からの蛍光漏出は増強していない (A と同一眼). C: 光凝固 12 週. 1 か所の病巣のみから蛍光漏出がみられ, 活動性が依然持続しているが, その他の病巣からの蛍光漏出は停止している (A, B と別の個体).

VEGF 投与眼 (D~F)

D: 光凝固 1 週. 造影早期に新生血管網がみられ, 対照眼に比べ新生血管の径が大きく, かつ蛍光漏出が旺盛である. E: 光凝固 2 週. 発育融合した新生血管膜全体から極めて強い蛍光漏出がみられる (D と同一眼). F: 光凝固 12 週. 依然旺盛な蛍光漏出を示す新生血管がみられ, 新生血管の活動性は持続している (D, E と別の個体).

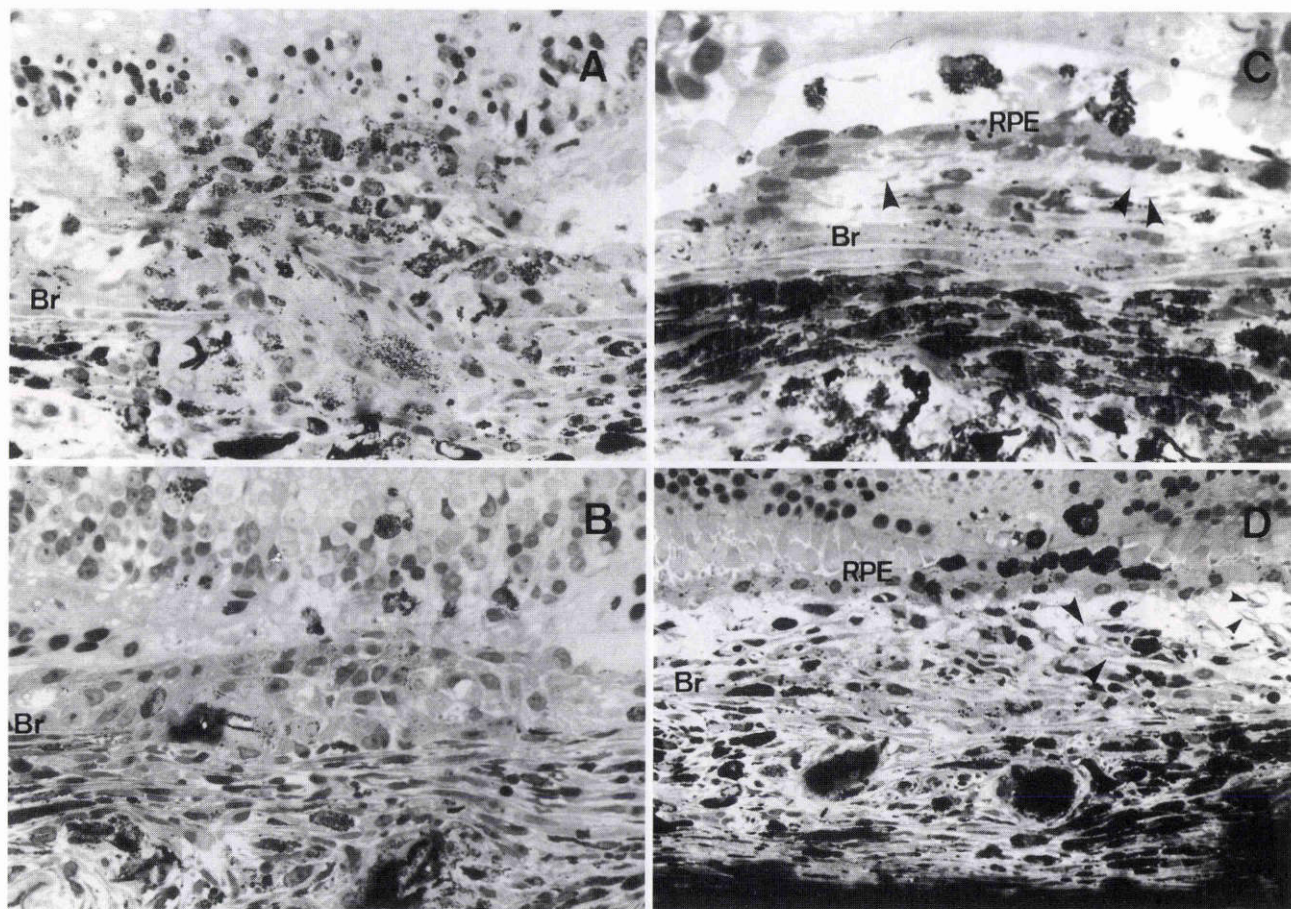


図5 対照眼の光学顕微鏡所見.

A: 光凝固3日. 病巣中央ではBruch膜断裂部を通して脈絡膜から進入した増殖組織がみられたが, 網膜下に明瞭な血管腔を有する新生血管はみられない.

B: 光凝固1週. 明瞭な管腔を持った新生血管は網膜下の増殖組織内にはみられず, メラニン顆粒をもち, 敷石状に増殖した網膜色素上皮が病巣中央まで密にみられる.

C: 光凝固2週. 病巣部には漿液性網膜剥離がみられ, 狭い管腔を持った新生血管がみられる(矢じり). 網膜色素上皮による新生血管の囲い込みが既に行われている.

D: 光凝固4週. 連続性に増殖した立方形の網膜色素上皮が新生血管の感覚網膜側を完全に覆っている. 管腔の明瞭な新生血管(矢じり)が多数みられるが, 漿液性網膜剥離は消失している.

Br: Bruch膜, RPE: 網膜色素上皮

生血管はみられなかった(図5A). 光凝固1週においても, 光学顕微鏡的には明瞭な管腔を示す新生血管は網膜下の増殖組織内には確認できず, この時期には病巣中央まで網膜色素上皮の増殖が密にみられた(図5B). 光凝固2週, 病巣部には狭いながらも管腔を持った新生血管がみられ, 網膜下に漿液の貯留がみられた(図5C). 光凝固4週, 立方形の網膜色素上皮が新生血管の感覚網膜側を完全に覆っていた. 管腔の明瞭な新生血管が多数みられたが, 漿液性網膜剥離は消失していた(図5D).

b) VEGF 投与眼

光凝固3日, Bruch膜の断裂部を通して脈絡膜から網膜下に進入した増殖組織がみられ, その周囲に旺盛に増殖した網膜色素上皮が多数みられた. 網膜下に明瞭な管腔を有する新生血管はみられなかった(図6A). 光凝固1週, Bruch膜の断裂部を通して, 脈絡膜深層の血管から

連続した内皮細胞が網膜下に直接管腔を作りながら侵入する像がみられ, 網膜下には明瞭な管腔を有する新生血管が多数みられた. Bruch膜上では, 網膜色素上皮の増殖が極めて旺盛であった(図6B). 光凝固2週, 病巣中央部では, 漿液性網膜剥離が対照眼より強くみられ, 新生血管膜内には, 細動脈, 細静脈レベルの太い血管と多数の毛細血管がみられた. 新生血管は, 扁平な形をした網膜色素上皮に不完全に覆われていた(図6C). 光凝固4週, 網膜色素上皮により病巣はほぼ覆われていたが, その囲い込みには一部不完全な部分がみられた. 新生血管膜内には管腔の広い新生血管が多数みられ, 新生血管膜の細胞間質は疎であった(図6D).

2) 電子顕微鏡所見

光凝固1週, 対照眼では多数の狭い管腔を形成した新生血管が網膜下に比較的多数みられ, これらの血管は胞

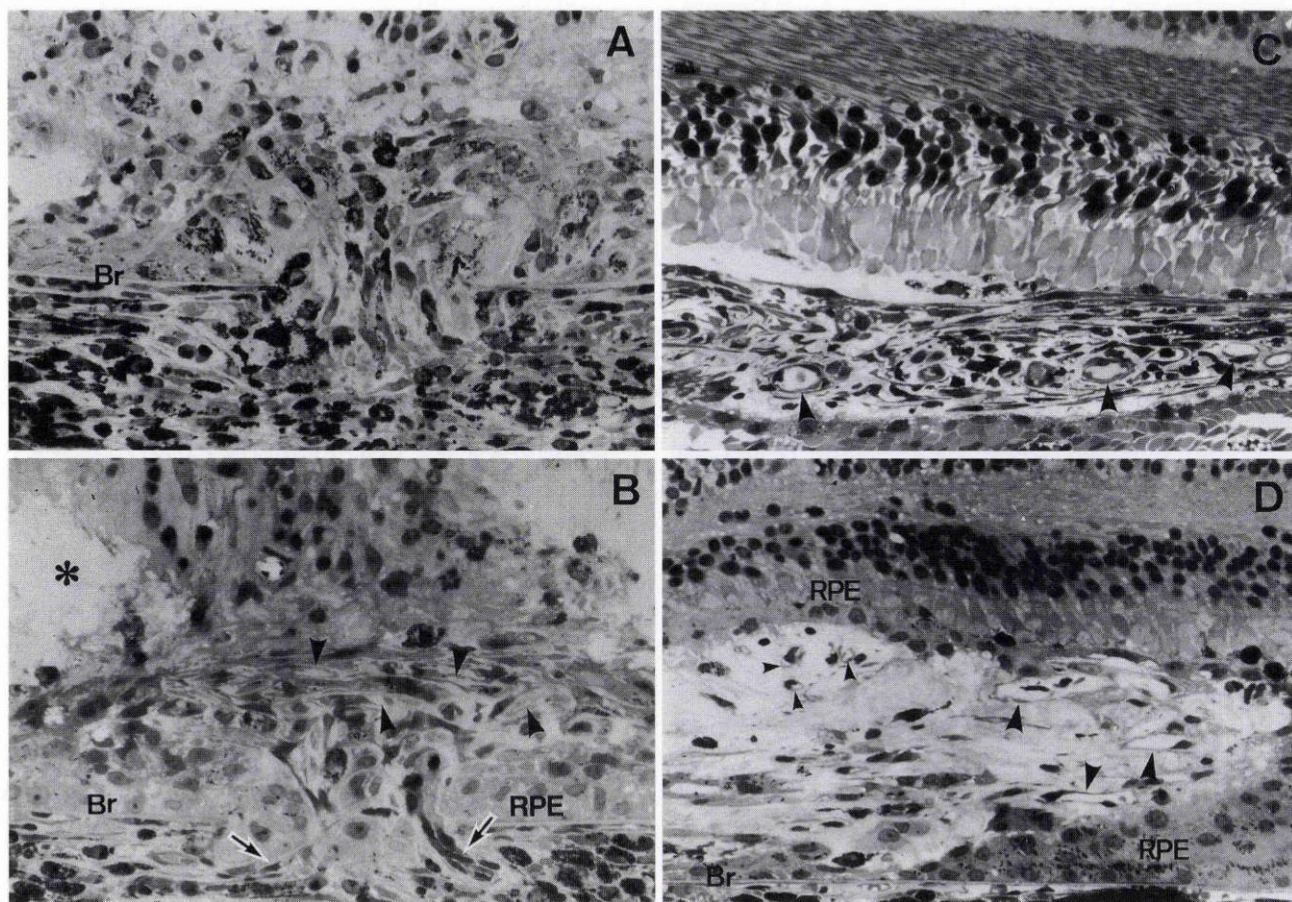


図 6 VEGF 投与眼の光学顕微鏡所見。

A：光凝固 3 日。Bruch 膜の断裂部を通して脈絡膜から網膜下に進出した増殖組織がみられ、その周りに旺盛に増殖した網膜色素上皮が多数みられる。網膜下に明瞭な新生血管腔はみられない。

B：光凝固 1 週。Bruch 膜の断裂部を通して脈絡膜のやや深層の血管から連続した内皮細胞が網膜下に直接管腔を作りながら侵入している所見がみられる(矢印)。網膜下には明瞭な管腔を持った新生血管が多数みられる(矢じり)。Bruch 膜上では、網膜色素上皮の増殖が旺盛であり、漿液性網膜剥離(*)が対照眼より強くみられる。

C：光凝固 2 週。病巣中央部では漿液性網膜剥離が対照眼より強くみられ、図のごとく辺縁部の新生血管膜内に、細動脈、細静脈レベルの太い血管(矢じり)と多数の毛細血管がみられる。新生血管膜は、扁平な形をした網膜色素上皮により不完全に覆われている。

D：光凝固 4 週。増殖した網膜色素上皮によりほぼ病巣は覆われているが、網膜色素上皮の形は扁平な部分があり、一部は不完全である。新生血管膜内には管腔の広い新生血管(矢じり)が多数みられ、新生血管膜の間質は疎である。

体が厚く未熟な形態を示していた(図 7)。同時期、VEGF 投与眼では、脈絡膜浅層から網膜下にのびる血管内皮に分裂が促進されたと思われる 2 核の細胞像がみられ、網膜下には狭い管腔を有する未熟な新生血管に加えて、内皮細胞の胞体が薄くなって明瞭な管腔を形成し、その周囲には周皮細胞を持つ新生血管がみられた(図 8, 9)。光凝固 4 週、両群とも新生血管の内皮細胞の fenestration (窓形成)が多数みられ、網膜下に管腔の広い新生血管がみられた。

IV 考 按

VEGF は、眼科領域においては、近年、網膜、虹彩、脈絡膜などにおける血管新生に最も重要な役割を果たす増殖

因子として注目を浴びている。

脈絡膜新生血管に関して、眼内組織で産生される内因性 VEGF については、滲出型加齢黄斑変性における摘出新生血管膜⁶⁾、あるいは実験的研究で明らかにされている^{7)~9)}。これらの報告において、眼内での VEGF 産生源となる細胞としてマクロファージ、網膜色素上皮、Müller 細胞などがあげられている。一方、Tolentino ら¹⁰⁾¹¹⁾はサル眼に外因性 VEGF を硝子体内投与することにより虹彩血管新生、網膜細小血管症が発生することを報告している。しかし、実験的新生血管に対する外因性 VEGF の関与についてはまだ報告されていない。

本実験では、外因性に VEGF を過量に与え、実際に脈絡膜血管新生が促進されるかどうかを検証することによ

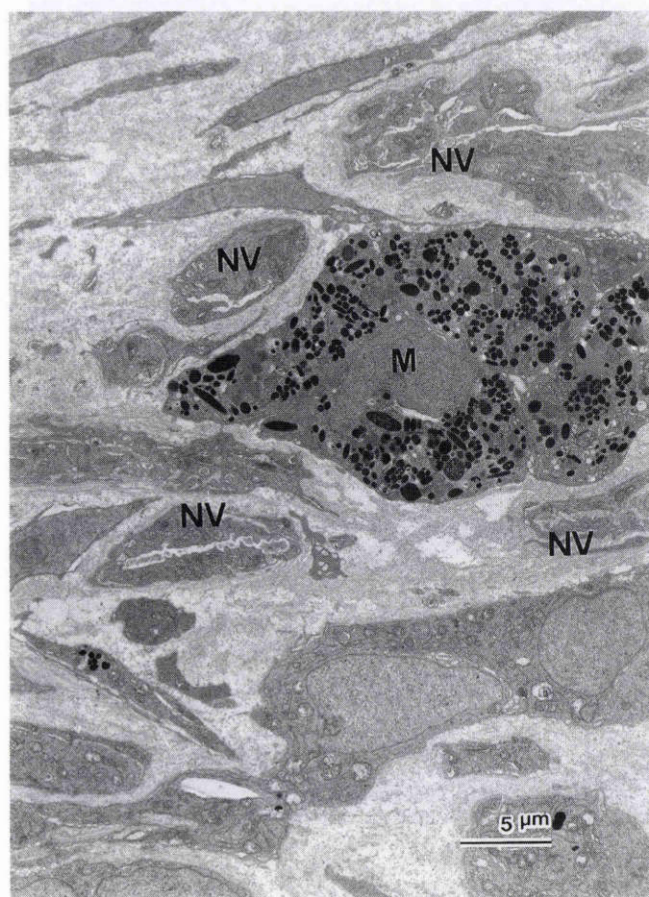


図7 光凝固1週の対照眼の電子顕微鏡所見。
狭い管腔を形成した新生血管(NV)が網膜下に比較的多数みられ、これらの血管は胞体が厚く未熟な形態を示している。M：マクロファージ

り、新生血管の発生と進展の過程に VEGF がどのように関与しているかをみることを第1の目的とした。また、我々がモデルとして用いている実験的新生血管は、Ryan¹²⁾の原法を基にした変法¹³⁾に従い作製してきたが、新生血管は光凝固1,2週で凝固部に発生し(発生期)、3~5週で網膜下に大きく発育し(進展期)、5~8週で自然退縮して臨床的に活動性が消失する(退縮期)¹¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。この自然退縮現象は、新生血管の抑制実験を行う際に、薬物による退縮なのか、自然退縮なのか判然としないというジレンマの原因となっている。本実験の第2の目的は、外因性 VEGF が脈絡膜血管新生の発生と進展の一連の過程に促進的影響を与えて、より長期持続する慢性モデルを作製することが可能かどうかをみることであった。

実験方法については、外因性 VEGF を眼内に投与した Tolentino ら¹⁰⁾の報告を参考に、投与方法、投与量を決定した。すなわち、虹彩血管新生モデルでは0.25 μg の VEGF を1回硝子体注入するより、2.5 μg の VEGF を1回硝子体注入した方が著しく虹彩血管新生が促進され、またそれより1.25 μg の VEGF を3日おきに10回硝子体注入した方が虹彩血管新生が促進したと報告されている。今回の実験では、手技を簡素化し、感染や物理的侵襲による眼への影響をできるだけ少なくするため、硝子体内への1回投与とし、血管新生への効果を確実に得るため VEGF 投与量は2.5 μg とした。

結果として、実験的新生血管の発生については、VEGF 投与群と対照群の間で新生血管の発生率に有意差がなかったことから、外因性 VEGF は新生血管の発生率には関係しないことが示された。従来のサル眼の実験的新生血管モデルにおける新生血管の発生率は50~60%とさ

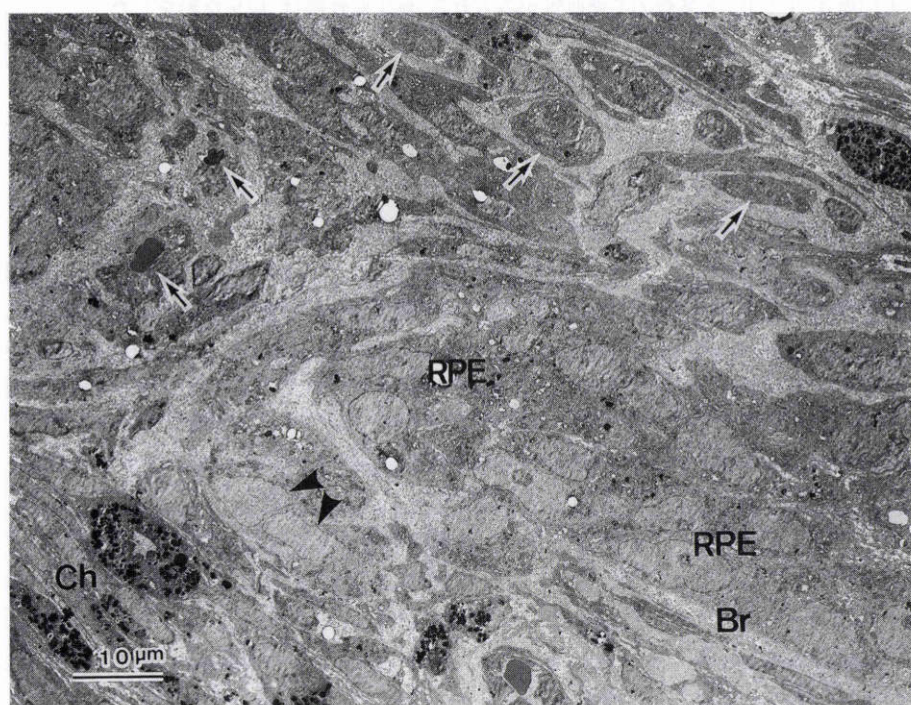


図8 光凝固1週の VEGF 投与眼の電子顕微鏡所見。

網膜下には狭い管腔を形成した新生血管(矢印)が多数みられる。Bruch 膜(Br)の断裂部直下の脈絡膜から網膜下に向かって、同一細胞内に2つの核(矢じり)を持った増殖能の旺盛な血管内皮細胞と思われる細胞がみられる。Ch：脈絡膜

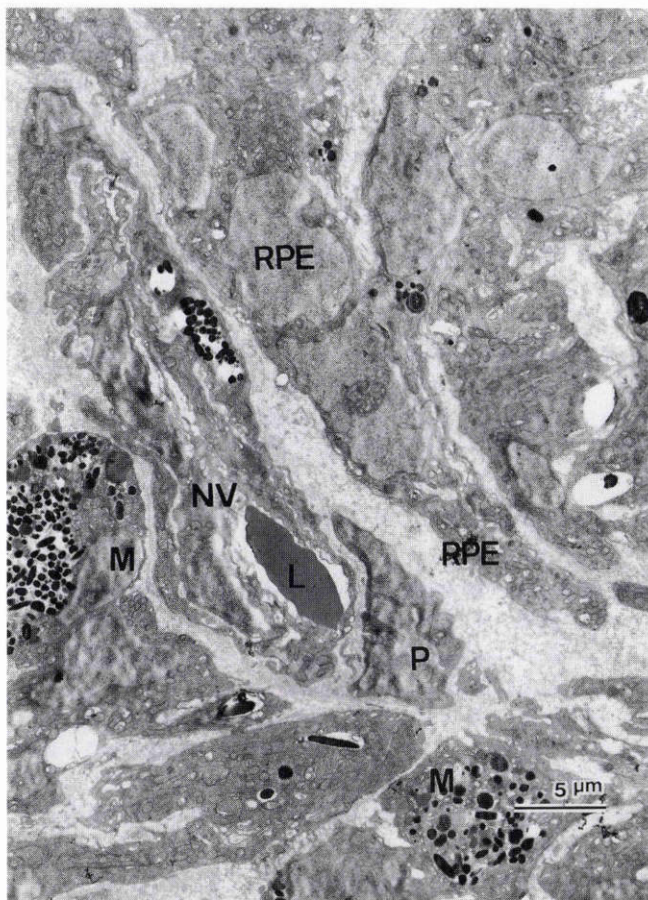


図9 光凝固1週のVEGF投与眼の電子顕微鏡所見。

Bruch膜断裂部の新生血管根部に、周皮細胞(P)を持ち、管腔内(L)に赤血球を含む内皮細胞の胞体が薄くなった新生血管(NV)がみられる。

れており、本実験では対照群の発生率が80%と高率であったことから、VEGF投与群と差が出にくかったとも思われた。また、対照群およびVEGF投与群ともに新生血管の発生率が高かったのは、新生血管の発生率には個体差が大きく、また、新生血管の発生を確認した時期が光凝固1週であったことが一因と考えられた。

新生血管面積の定量的評価では、光凝固1週から新生血管面積が常にVEGF投与群が対照群を上回っており、光凝固1週までの新生血管の発生期における血管新生過程がVEGFによって強く促進されたと考えられた。一般的に、血管新生の過程には、大きく分けて、①内皮細胞の活性化、②既存血管の基底膜および細胞外マトリックスの分解、③内皮細胞の遊走、④内皮細胞の分裂・増殖、⑤管腔形成・成熟の5段階があるが¹⁴⁾、本実験において、光凝固という血管新生のトリガーとなる強い刺激と同時にVEGFが過量に投与されたことによって、脈絡膜血管内皮細胞の分裂および増殖を促進し、その後の血管新生の過程を強力に促進したと考えられた。これらのことは、病理組織学的にみて、VEGF投与群で光凝固1週に血管内皮細胞が脈絡膜血管から網膜下に活発に侵入する像がみられ、対照群ではみられなかった管腔を形成した新生血

管が網膜下にみられたことから確認できた。

また、新生血管の進展期において、VEGF投与群で新生血管が大きく拡大したのは、VEGFが本来持つ血管内皮細胞の増殖促進作用の他に、血管透過性亢進作用により発生後の新生血管の透過性が亢進し広範囲の漿液性網膜剥離を来して網膜下の間隙が広くなり、新生血管の網膜下への進展と網膜下での増殖反応が容易になったためと思われた。このVEGFの血管透過性因子としての作用は、投与後3日のVEGF投与眼において、網膜自体が浮腫状となり、フルオ造影で眼内に強い蛍光漏出が生じたことから確認された。さらに、VEGF投与眼で新生血管の活動性が長期持続したのは、光凝固1週までの発生期に血管新生が促進され、血管の成熟が促進されたことにより早期に血管内皮にfenestration(窓形成)を多数持つ管腔の広い新生血管が完成され、また、新生血管の面積が早期より大きくなったことで、新生血管が網膜色素上皮に囲い込まれにくくなり、退縮が回避されたことが要因と考えられた。本実験では、両群の新生血管の内皮細胞の窓形成の状態を定量的に比較していないので詳細は不明であるが、VEGFは内皮細胞の窓形成を促進するという報告¹⁶⁾があり、VEGFの血管成熟への作用については、今後検討を要すると思われた。

また、病理組織学的に、脈絡膜血管新生の発生期において、VEGF投与眼は対照眼に比べて病巣辺縁部での網膜色素上皮の増殖が旺盛であった。網膜色素上皮は、実験的新生血管の発育期には促進的に、退縮期には抑制的に働くという二面性を持つとされている^{11)14)17)~20)}。また、網膜色素上皮は、数々の細胞増殖因子を産生し^{6)~9)21)~25)}、VEGFも産生することが判明しており^{6)~9)21)25)}、新生血管が網膜下に進展する際、それに随伴し増殖した網膜色素上皮が内因性VEGFを分泌し血管新生をさらに助長した可能性が推定された。さらに、網膜色素上皮の増殖が促進された原因としては、ラットの実験的新生血管の発生の際にVEGF受容体であるKDRのmRNAが増殖した網膜色素上皮に強く発現するという報告¹⁴⁾がある。外因性VEGFが直接作用を及ぼしたか、あるいは他のサイトカインネットワークを通じて増殖反応が促進された可能性が推定された。

以上、サルの実験的新生血管においてヒトVEGFを硝子体内に投与すると、臨床的、形態計測学的および組織学的に脈絡膜血管新生に促進的に働いた。VEGFは脈絡膜血管新生において、発育のトリガーとなる促進因子として重要な役割を持つことが示された。さらに、臨床に近い活動性が長期持続する実験的新生血管モデルを作製することが可能であった。今後、VEGFの投与時期、投与量を変えることによって、より確実かつ容易に臨床に近い慢性モデルの作製が可能と思われ、新生血管モデルを用いた薬物治療や放射線治療をはじめ、遺伝子治療の効果など様々な研究に寄与するものと考えられる。

本論文の要旨は第101回日本眼科学会総会(平成9年5月15日,京都)において岩下が発表した。

なお,本研究は文部省科学研究費基盤研究B-2(課題番号09470385,宇山)の援助を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) 宇山昌延: 脈絡膜新生血管, 基礎と臨床. 日眼会誌 95: 1145—1180, 1991.
- 2) Senger DR, Gall SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983—985, 1983.
- 3) Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851—858, 1989.
- 4) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306—1309, 1989.
- 5) Kech PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309—1312, 1989.
- 6) Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR: Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 855—868, 1996.
- 7) Yi X, Ogata N, Komada M, Yamamoto C, Takahashi K, Omori K, et al: Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235: 313—319, 1997.
- 8) Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H: Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235: 159—167, 1997.
- 9) Wada M, Ogata N, Otsuji T, Uyama M: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 18: in press, 1999.
- 10) Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP: Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114: 964—970, 1996.
- 11) Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, et al: Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor produces retinal ischemia and microangiography in an adult primate. *Ophthalmology* 103: 1820—1828, 1996.
- 12) Ryan SJ: Subretinal neovascularization: Natural history of an experimental model. *Arch Ophthalmol* 100: 1804—1809, 1982.
- 13) 板垣 隆, 大熊 紘, 加藤直子, 宇山昌延: クリプトンレーザーによる網膜下新生血管の発生. 眼紀 36: 1384—1391, 1985.
- 14) 高橋寛二: 網膜色素上皮と新生血管. 眼科 New Insight, メジカルビュー社, 東京, 46—58, 1994.
- 15) 高橋寛二: 網膜および脈絡膜新生血管. 眼科診療プラクティス, 17. 眼科診療に必要な生理学. 文光堂, 東京, 190—195, 1995.
- 16) Roberts WG, Paladde GE: Neovasculture induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 57: 1820—1828, 1996.
- 17) 板垣 隆, 大熊 紘, 加藤直子, 宇山昌延: 網膜下新生血管に関する実験的研究. 第1報. 実験的網膜下新生血管の発生. 日眼会誌 89: 600—610, 1985.
- 18) 板垣 隆, 大熊 紘, 加藤直子, 宇山昌延: 網膜下新生血管に関する実験的研究. 第2報. 実験的網膜下新生血管の退縮. 日眼会誌 89: 941—948, 1985.
- 19) 板垣 隆, 大熊 紘, 山岸和矢, 加藤直子, 宇山昌延: 網膜下新生血管に関する実験的研究. 第3報. 新生血管先進部と蛍光漏出停止部の比較. 日眼会誌 90: 1217—1225, 1986.
- 20) Miller H, Miller B, Ryan SJ: The role of the retinal pigment epithelium in the involution stage of subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1644—1652, 1986.
- 21) Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H, Keshet E: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular disease. *Lab Invest* 72: 638—645, 1995.
- 22) Ogata N, Matsushima M, Takada Y, Tobe T, Takahashi K, Yi X, et al: Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in developing choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 15: 1008—1018, 1996.
- 23) Matsushima M, Ogata N, Takada Y, Tobe T, Yamada H, Takahashi K, et al: FGF receptor 1 expression in experimental neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 40: 329—338, 1996.
- 24) Ogata N, Yamamoto C, Miyashiro M, Yamada H, Matsushima M, Uyama M: Expression of transforming growth factor- β mRNA in experiment choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 16: 9—18, 1997.
- 25) Ogata N, Yamanaka R, Yamamoto C, Miyashiro M, Kimoto T, Takahashi K, et al: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, following retinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Curr Eye Res* 17: 1087—1096, 1998.