

## 高コレステロール食負荷後のラット眼ブルッフ膜の変化

戸倉 敬雄, 伊東 滋雄, 西川 睦彦, 山根 淳志, 三木 弘彦

関西医科大学眼科学教室

## 要 約

**目 的** : 高コレステロール食のラット眼 Bruch (ブルッフ) 膜の加齢変化への影響を検討した。

**方 法** : 生後 3 か月の若齢 3 匹と生後 23 か月の高齢 4 匹のラットに高コレステロール食を摂取させ、ブルッフ膜の変化を超微形態学的に観察し、その所見を標準食のラットの所見と比較した。

**結 果** : コレステロール負荷の若齢ラット 1 眼では、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が重複化と断裂し肥厚して、有窓構造を含む脈絡膜毛細血管内皮細胞の細胞膜が基底膜から解離し、波状になっていた。弾性線維層の一部は不明瞭で、細線維がみられた。コレステロール負

荷の高齢ラット 1 眼では、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が肥厚したものが多く、一部では瘤状に肥厚していた。上記の変化の多くは標準食のラットの加齢変化としてもみられたが、その発現時期が早く、かつ、所見の程度が強く現れた。

**結 論** : 高コレステロール食は、ラット眼ブルッフ膜の加齢変化を促進する一因になり得ることが示唆された。(日眼会誌 103 : 85—91, 1999)

**キーワード** : 加齢変化, 高コレステロール血症, ブルッフ膜, 脈絡膜毛細血管, 肥厚

## Changes in Bruch's Membrane in Experimental Hypercholesteremia in Rats

Takao Tokura, Shigeo Ito, Mutsuhiko Nishikawa, Atsushi Yamane and Hirohiko Miki

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

## Abstract

**Purpose** : We investigated the effect of high-cholesterol diet for the aging changes in Bruch's membrane of rats.

**Methods** : After feeding a 4% cholesterol diet for 15 weeks to three young rats 3 months old and four aged rats 23 months old, we observed the morphological changes of Bruch's membrane by electron microscopy, and made a comparison with rats fed an ordinary diet.

**Results** : In one young rat fed a high-cholesterol diet, the endothelial basement membrane of the choriocapillaris formed multiple folds separated from the plasma membrane of the endothelium and showed lamellar thickening and crack in some areas. The elastic fiber layer in Bruch's membrane disappeared partly and some new microfibrils appeared.

In one aged rat fed a high-cholesterol diet, the endothelial basement membrane of the choriocapillaries showed more lamellar thickening with lumps in some parts. Compared with rats fed an ordinary diet, rats fed a high-cholesterol diet showed thickening of the basement membrane and the changes were more severe.

**Conclusions** : Our data indicated that high-cholesterol diet might promote age-related changes of Bruch's membrane. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 85—91, 1999)

**Key words** : Age-related changes, Hypercholesteremia, Bruch's membrane, Choriocapillaris, Thickening

## I 緒 言

著者らは生後 1, 6, 12, 27 か月齢のラットを用いて Bruch (ブルッフ) 膜の加齢変化を観察した<sup>1)</sup>。その結果、

加齢変化はまずブルッフ膜を構成する脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜のびまん性肥厚や重複化と断裂で始まった。加齢が進むとブルッフ膜を構成する内外の基底膜は一段と肥厚し、basal laminar deposit の出現や、弾性線維

別冊請求先 : 570-0074 守口市文園町 10-15 関西医科大学眼科学教室 戸倉敬雄

(平成 10 年 3 月 27 日受付, 平成 10 年 8 月 14 日改訂受理)

Reprint requests to: Takao Tokura, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi 570-0074, Japan

(Received March 27, 1998 and accepted in revised form August 14, 1998)

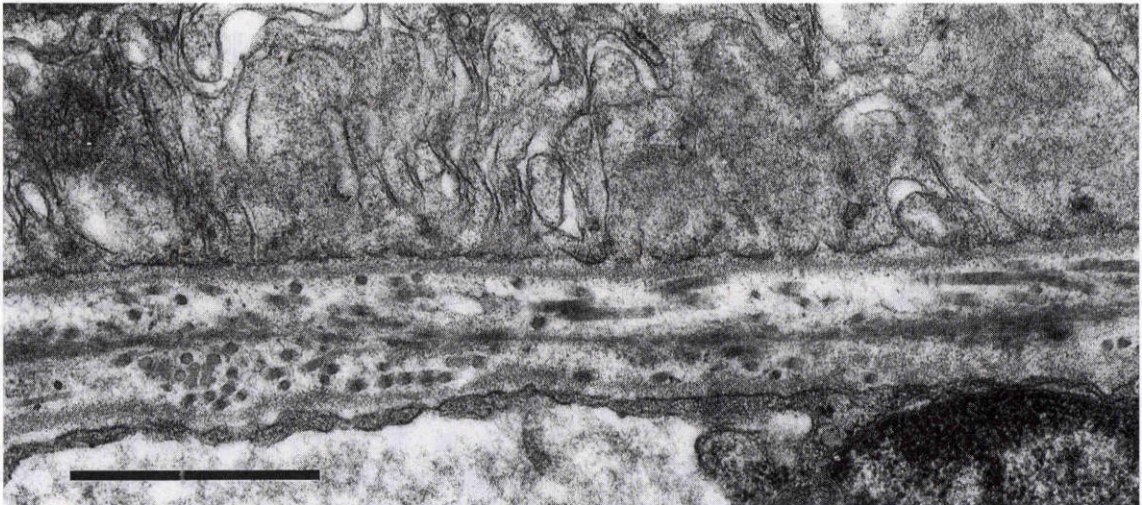


図1 標準食飼育群 6 か月齢.

網膜色素上皮細胞の基底陥入はよく保たれており, Bruch(ブルッフ)膜の5層構造は正常の構造を示している. バーは1 $\mu$ m

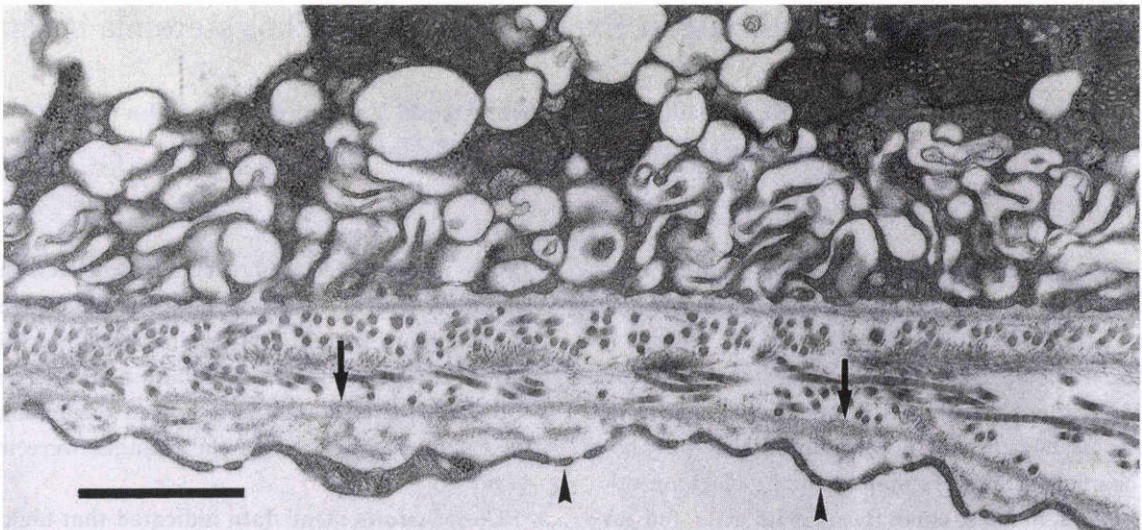


図2 コレステロール附加食飼育群 6 か月齢.

網膜色素上皮細胞の胞体内には基底部に多数の空胞がみられる. 脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が重複化と断裂し肥厚している所が多く(矢印), 有窓構造を含む脈絡膜毛細血管内皮細胞の細胞膜が基底膜から所々で解離して(矢じり), 波状になっている. バーは1 $\mu$ m

が消失し膠原線維や細線維が増加してブルッフ膜の5層構造が乱れるなどの変化がみられ, ラット眼はブルッフ膜の加齢変化の実験モデルとして用いることができることを報告した.

前報<sup>1)</sup>で述べたように, 黄斑部のブルッフ膜および網膜色素上皮細胞に加齢変化が起こると, 加齢黄斑変性が発生することがわかってきている. 加齢黄斑変性の危険因子には, 年齢<sup>2)</sup>, 性<sup>2)</sup>, 血糖<sup>3)</sup>, 高血圧症<sup>3)4)</sup>, 循環器疾患<sup>5)</sup>, 血清脂質<sup>6)~8)</sup>, 喫煙<sup>5)~7)9)</sup>などが挙げられている. これらの危険因子を併せると, 何らかの血管系の病変が関与していることが推察される. 加齢黄斑変性は欧米では多くみられ, 最近我が国でも急増<sup>10)</sup>している. これは最近の我が国

の食事の欧米化により, 脂肪摂取量が増加していること<sup>11)</sup>が一因として考えられる. 脂肪摂取量が多いと高コレステロール血症になり, 血管壁に動脈硬化症の病的変化を来す. これは大血管ばかりでなく, 毛細血管にも変化を及ぼすことが考えられる. 脈絡膜毛細血管の基底膜はブルッフ膜の構成要素の一つであり, 血中のコレステロールが脈絡膜毛細血管を通じてブルッフ膜に影響を与えることは十分に考えられる.

我々は若齢ラットと高齢ラットに高コレステロール食を摂取させ, ブルッフ膜の加齢変化にどのような影響を与えるかを検討したので報告する.

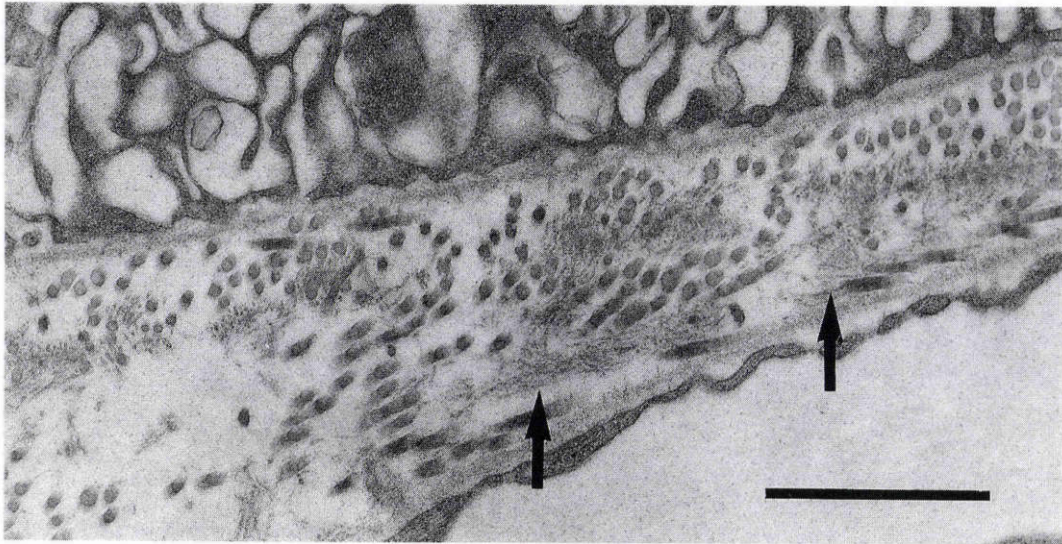


図3 コレステロール附加食飼育群 6 か月齢.

ブルッフ膜の弾性線維層が一部で不明瞭となっており、ブルッフ膜内に細線維(矢印)が多数出現している。バーは 1  $\mu$ m

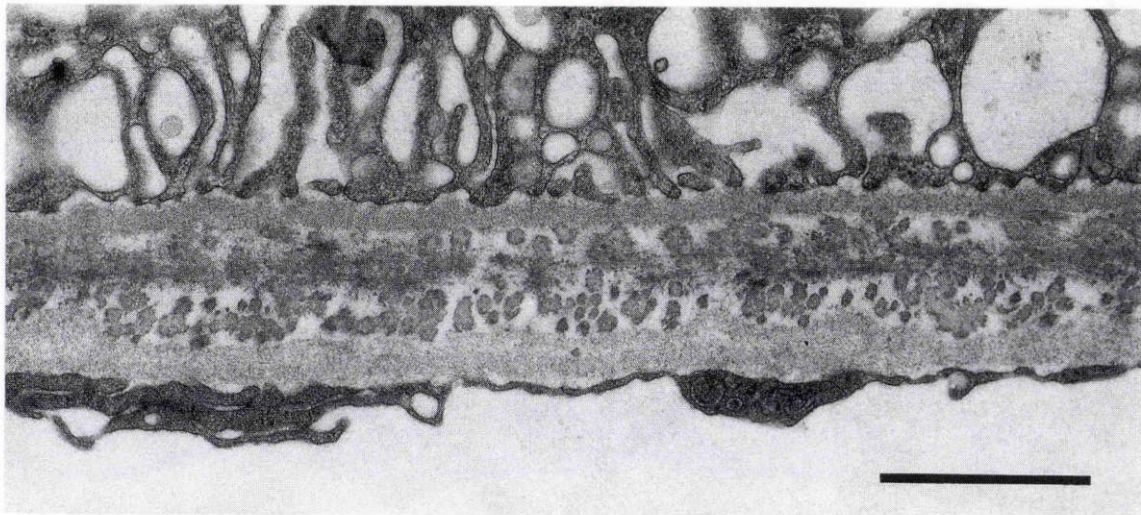


図4 標準食飼育群 27 か月齢.

網膜色素上皮細胞の胞体内には基底部に空胞が多くみられる。脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜は網膜色素上皮細胞の基底膜よりも肥厚している。バーは 1  $\mu$ m

## II 方 法

### 1. 実験動物

生後 3, 23 か月齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを標準固形飼料に 4% コレステロールを附加した飼料でさらに 15 週間 (3 か月) 飼育してコレステロール附加食飼育群とし、3 か月齢は 3 匹 6 眼、23 か月齢は 4 匹 8 眼用いた。なお、23 か月齢のラットは生後 9 か月齢のラットを購入し、動物飼育センターで標準固形飼料で 23 か月齢まで飼育したのを使用した。標準食飼育群として、我々<sup>1)</sup>が報告した標準固形飼料で育てたラットを対照として用いた。

### 2. 試料作製方法および観察方法

コレステロール附加食飼育群と標準食飼育群がそれぞれ生後 6, 27 か月齢になったところで、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム (ネンブタール<sup>®</sup>) を注射して全身麻酔を行い、各群の採血を行った後、2% パラホルムアルデヒド・カコジル酸緩衝液で灌流固定し、両眼を眼球摘出した。眼球を赤道部で前後に二分し、さらに、2.5% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒド混合燐酸緩衝液に浸漬して固定後、後半部を視神経乳頭部を頂点とする 8 小片に細切して、1% 四酸化オスミウム燐酸緩衝液で約 1 時間後固定した。その後エタノール系列で脱水、プロピレンオキサイドに置換し、スパー樹脂に包埋した。作製した試料はマイクロームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニール・タンニン酸とクエン酸鉛に

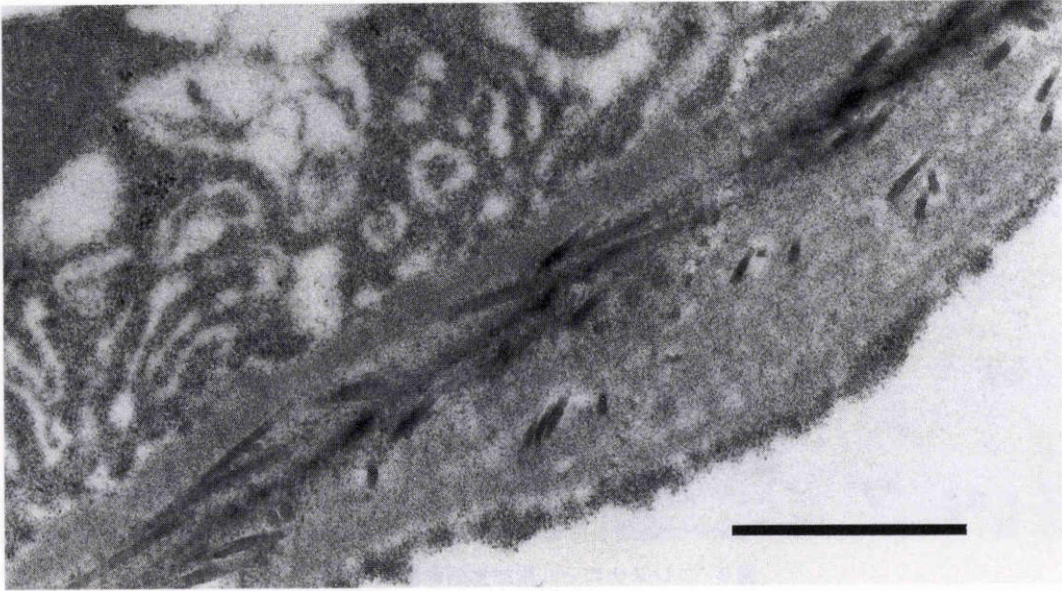


図5 コレステロール附加食飼育群 27 か月齢.

ブルッフ膜の5層構造は保たれているが、外側膠原線維層に基底膜様物質が広がって肥厚している。バーは1  $\mu\text{m}$

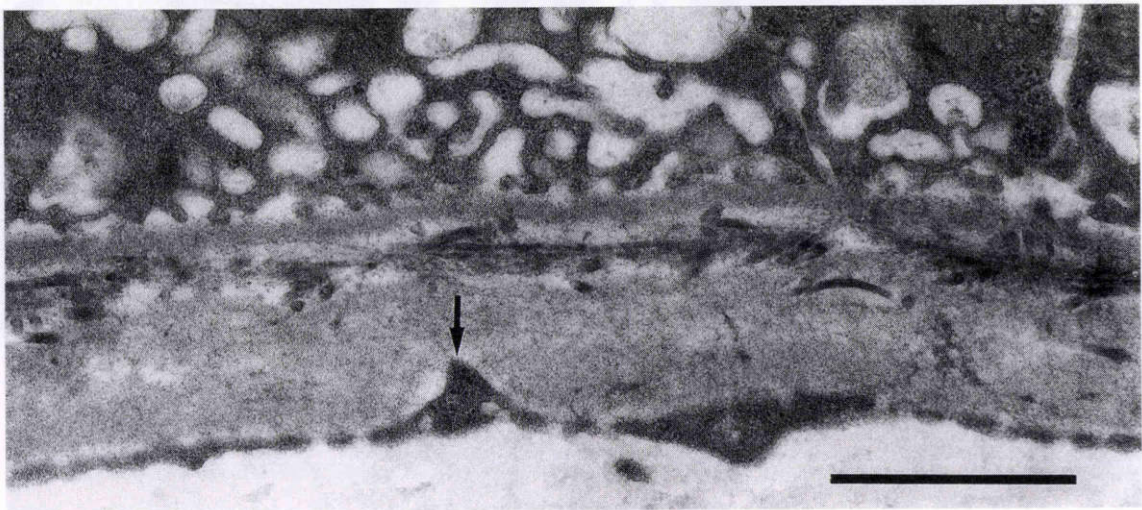


図6 コレステロール附加食飼育群 27 か月齢.

脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が広範囲に肥厚し、内皮細胞の胞体の偽足状の細胞突起が網膜色素上皮細胞側に向かって伸びている(矢印)。バーは1  $\mu\text{m}$

よる二重染色を施し、視神経乳頭近傍のブルッフ膜を透過型電子顕微鏡で観察した。

### III 結 果

#### 1. 6 か月齢(標準食で飼育)

網膜色素上皮細胞の基底陥入はよく保たれており、ブルッフ膜の5層構造にも特に変化はみられなかった(図1)。

#### 2. 6か月齢(4% コレステロール附加食で15週間飼育)

網膜色素上皮細胞の胞体内には基底部に6か月齢の標準食群にはみられなかった空胞が多数出現していた。網膜色素上皮細胞の基底膜には変化はみられなかったが、1眼に脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が重複化と断裂し

肥厚しているのが多くみられ、有窓構造を含む脈絡膜毛細血管内皮細胞の細胞膜が基底膜から所々で解離し波状になっていた(図2)。同じラット眼で、ブルッフ膜の膠原線維層には特に変化はみられなかったが、弾性線維層が一部不明瞭になり、細線維が多数出現していた(図3)。

#### 3. 27 か月齢(標準食で飼育)

網膜色素上皮細胞の胞体内には基底部に空胞が多数みられた。ブルッフ膜の5層構造には特に変化はみられなかったが、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜は網膜色素上皮細胞のそれよりも肥厚していた(図4)。

#### 4. 27 か月齢(4% コレステロール附加食で15週間飼育)

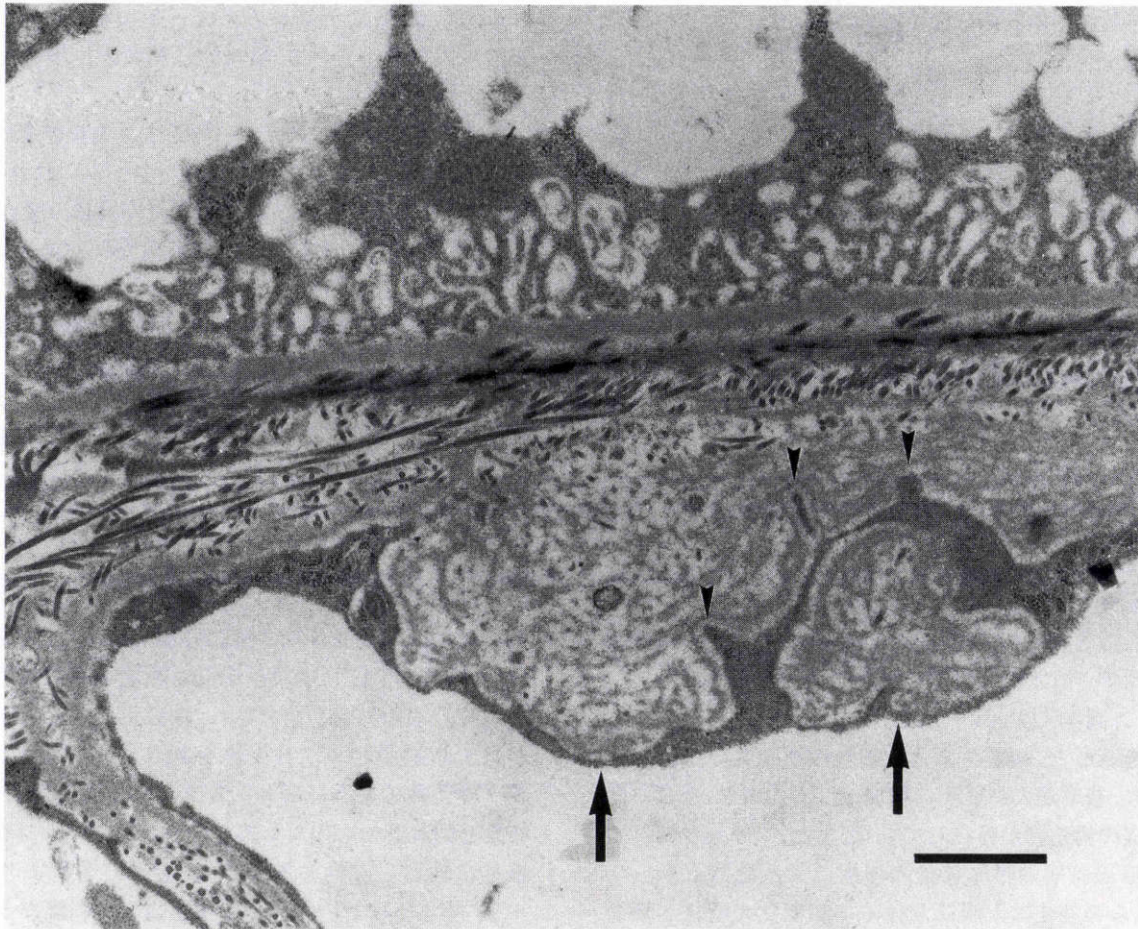
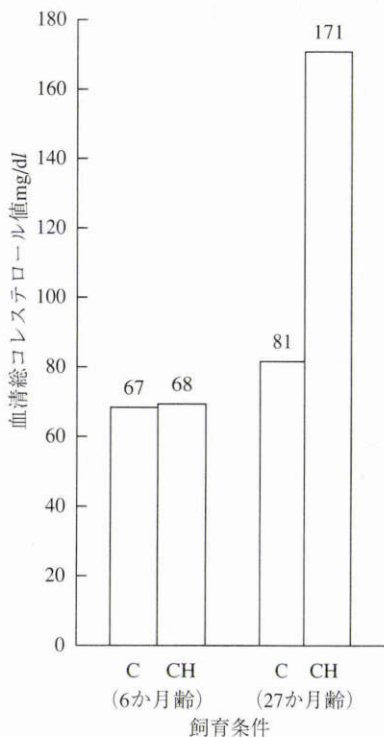


図7 コレステロール附加食飼育群 27 か月齢.

網膜色素上皮細胞の胞体内には基底部に大きな空胞がみられる。脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜は瘤状(矢印)に肥厚し、内皮細胞の胞体の偽足状の細胞突起(矢じり)が網膜色素上皮細胞側に向かって伸びている。脈絡膜毛細血管の有窓構造は消失している。バーは1μm



ブルッフ膜の5層構造は保たれていたが、1眼で外側膠原線維層に基底膜様物質が広がって肥厚していた(図5)。また、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が広範囲に肥厚している所があり、そこでは内皮細胞の胞体の偽足状の細胞突起が網膜色素上皮細胞側に伸びていた(図6)。中には脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜が瘤状を呈している所があり、同部の有窓構造は消失し、脈絡膜毛細血管内皮細胞の胞体の偽足状の細胞突起が網膜色素上皮細胞側に向かって伸びていた(図7)。

5. 血清総コレステロール値(図8)

6か月齢のラットでは、標準食飼育群とコレステロール附加食飼育群とは差がみられなかった。27か月齢のラットでは、コレステロール附加食飼育群は標準食飼育

図8 標準食飼育群とコレステロール附加食飼育群の血清総コレステロール値。(6か月若齢ラットと27か月高齢ラット)

27か月齢のコレステロール附加食飼育群の血清総コレステロール値は、標準食飼育群に比べ高値である。飼育条件 C：標準食飼育群 CH：コレステロール附加食飼育群

群と比べて2倍の高値になっていた。

#### IV 考 按

動物をコレステロール含有飼料で飼育してブルッフ膜と、その周囲組織の変化をみた報告は今までにいくつかある<sup>12)~14)</sup>。岡本<sup>12)</sup>は体重2~2.5 kgの家兎を用いて1%コレステロール添加固形飼料で21~149日間飼育したところ、血中コレステロール値は全例1,000 mg/dlを超えていた。網膜ならびに網膜血管にはほとんど変化がみられず、網膜色素上皮細胞にも脂質が増加している所見はなく、基底陥入も良く構造が保存されていた。またブルッフ膜にも変化はなく、脈絡膜毛細血管の有窓構造などの微細構造はよく保たれていた。しかし、脂質を多量に貪食した泡沫細胞が脈絡膜外層にみられ、149日飼育では脈絡膜毛細血管のすぐ近くでもみられ、泡沫細胞の浸潤が高度な家兎では脈絡膜の太い血管が減少しているのが観察されたことから、高脂血症では網膜循環よりも脈絡膜循環が障害されるのではないかと推測している。

さらに、岡本<sup>13)</sup>は201~292日間と長期のコレステロール負荷を行うと、網膜色素上皮細胞の細胞質に脂質が多数みられ、基底陥入が著明に増加、延長、開大し、そこには細線維様の構造物が存在していた。また、ブルッフ膜には外側膠原線維層の膠原線維の増加による肥厚もみられた。これらの変化は人眼における加齢変化の所見と類似していた。脈絡膜毛細血管では周辺細胞の空胞化と、内皮細胞が消失した後に基底膜のみが残存したghost様血管がみられ、その管腔内には大食細胞があり、さらに、intercapillary zoneに大食細胞様の細胞残渣物がみられた。これらの所見は脈絡膜毛細血管の変性、閉塞、消失過程を示すもので、高コレステロール血症家兎の脈絡膜毛細血管には著しい循環障害が起こっていると考えている。

Nakatakeら<sup>14)</sup>は6週齢SD系ラットに2%コレステロール添加食で6週間飼育し、最初の4日間にビタミンD<sub>2</sub>を投与したところ、血清コレステロール値は650 mg/dlと高値で、脈絡膜にはその細胞間質に脂質の沈着がみられ、多数の脂肪を含んだ大食細胞が脈絡膜外層に集積しており、ほとんどの脈絡膜毛細血管の管腔が狭窄あるいは消失していたと報告している。

これらの報告では、コレステロール附加食飼育により脈絡膜に脂質や泡沫細胞や大食細胞が出現し、物理的に脈絡膜毛細血管が圧迫閉塞され脈絡膜循環障害が起こり、網膜色素上皮細胞が二次的に障害されるとしている。

我々の実験では脈絡膜には泡沫細胞や大食細胞はみられず、脈絡膜毛細血管が狭窄あるいは閉塞している部位はみられなかった。このような結果の違いは、我々は実験動物にラットを用いたが、岡本<sup>12)13)</sup>は家兎を用いており、動物のコレステロール食に対する反応の違いと考えられる。また、同じラットでもNakatakeら<sup>14)</sup>はビタミンD<sub>2</sub>を投与しており、このためコレステロールが血中に吸収さ

れやすくなり、血清コレステロール値も650 mg/dlと非常に高値となったので、脈絡膜に脂質が出現したものと考えられる。

我々の実験のコレステロール附加食飼育群では網膜色素上皮細胞に6か月齢で胞体に空胞がみられたが、標準食飼育群においては12か月齢以降で同様の変化がみられた。すなわち、高齢でみられる所見がコレステロール負荷により早期に出現していた。

コレステロール附加食飼育群の6か月齢の1眼では、ブルッフ膜の弾性線維層の一部が不明瞭となり、細線維が多くみられた。これは、弾性線維はコレステロールと結合する能力があり、血中脂質が血管外の組織内へ侵入するのを防ぐために、閘門のような働きをしていると考えられている<sup>15)</sup>ため、ブルッフ膜の弾性線維がコレステロールにより何らかの影響を受けたと考えられる。Pauleikhoffら<sup>16)</sup>は老化した網膜色素上皮細胞から脂質に富んだ老廃物がブルッフ膜に貯溜し、その結果ブルッフ膜が疎水性となり、網膜色素上皮細胞と脈絡膜毛細血管との間の水の移動が阻害され、網膜色素上皮細胞下に水がたまり網膜色素上皮剥離を起こすと報告している。我々の実験のように高コレステロール血症があると、脈絡膜毛細血管からのコレステロールもブルッフ膜の弾性線維に結合・貯溜することで、通常の高齢より早くブルッフ膜が疎水性となり、網膜色素上皮剥離などの変化がより早く発生することが考えられる。

コレステロール附加食飼育群の6か月齢で上記と同じラット眼では、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜に重複化と断裂がみられ、有窓構造を含む細胞膜が波状を示していた。コレステロールが脈絡膜毛細血管内皮細胞の細胞膜や基底膜にも何らかの影響を及ぼしていると考えられる。前報<sup>1)</sup>で報告したように、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底膜の重複化と断裂は加齢変化でみられるが、コレステロール負荷でこれらの変化が増加したことは、コレステロールが脈絡膜毛細血管の加齢変化に促進的に働いているためと思われる。

コレステロール附加食飼育群の27か月齢でも、脈絡膜毛細血管の基底膜が肥厚していた。中でも図7に示したように、基底膜が瘤状に肥厚している所があった。この部では脈絡膜毛細血管の有窓構造が消失しており、内皮細胞の胞体の偽足状の細胞突起がみられた。これらの偽足状の細胞突起は我々の実験の標準食飼育群でも、加齢で基底膜が重複化と断裂し肥厚した所や、有窓構造がみられなくなった部位によく出現していた。偽足状の細胞突起の意味は不明であるが、新生血管発生の準備状態とも考えられている<sup>17)18)</sup>。

最近の日本人の血清コレステロール値は加齢黄斑変性が増加する以前と比べて上昇しており<sup>11)</sup>、今回の実験結果とも併せて考えると、血清コレステロール値の上昇が我が国の加齢黄斑変性の患者数増加の一因になっている

ことが考えられる。Mares-Perlmanら<sup>8)</sup>の調査結果によると、コレステロールの多量摂取が加齢黄斑変性の危険増加と関連していると報告されている。

脂質代謝回転率は加齢に伴い低下することが知られており、同じ量のコレステロール食を摂取しても若年者に比べ高年者は血清コレステロール値が顕著に増加する<sup>10)</sup>。我々のラットの実験でも、生後6か月の若齢と生後27か月の高齢の2群を比べると、高齢ラットでは血清総コレステロール値が著明に上昇していて、高コレステロール負荷の影響は高齢の方が受けやすいことがわかった。

今回の実験から、生後6か月の若齢ラットと生後27か月の高齢ラットを同量の高コレステロール食で飼育すると、その影響が若齢と高齢で違っていることがわかった。若齢ラットではブルッフ膜に通常に加齢変化と同様の変化がより早期から出現し、高齢ラットではこれらの加齢変化が一層強く現れることがわかった。高コレステロール食は、ブルッフ膜の加齢変化を促進する一因となり得ることを今回の実験結果は示しているものと解釈した。

稿を終えるに当たり、ご校閲を賜りました関西医科大学眼科学教室宇山昌延教授に深謝いたします。また、コレステロール附加食飼育ラット眼を提供して下さった京都大学第二解剖学教室小川和重氏(現、岩手大学農学部獣医学科)に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 戸倉敬雄, 伊東滋雄, 西川睦彦, 山根淳志, 三木弘彦: ラット眼ブルッフ膜の加齢変化. 日眼会誌 103: 77—84, 1999.
- 2) Maltzman BA, Mulvihill MN, Greenbaum A: Senile macular degeneration and risk factors: A case-control study. *Ann Ophthalmol* 11: 1197—1201, 1979.
- 3) Vidaurri JS, Pe'er J, Halfon S-T, Halperin G, Zauberman H: Association between drusen and some of the risk factors for coronary artery disease. *Ophthalmologica* 188: 243—247, 1984.
- 4) Delaney WV, Oates RP: Senile macular degeneration: A preliminary study. *Ann Ophthalmol* 14: 21—24, 1982.
- 5) Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris III FL, Fine SL: Senile macular degeneration: A case-control study. *Am J Epidemiol* 118: 213—227, 1983.
- 6) 白神史雄, 松尾信彦, 辻 俊彦, 三原正義, 那須好滋: 老人性円板状黄斑変性症の危険因子. *臨眼* 43: 544—548, 1989.
- 7) The Eye Disease Case-control Study Group: Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 110: 1701—1708, 1992.
- 8) Mares-Perlman JA, Brady WE, Klein R, van den Langenberg GM, Klein BEK, Palta M: Dietary fat and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 113: 743—748, 1995.
- 9) Paetkau ME, Boyd TAS, Grace M, Bach-Mills J, Winship B: Senile disciform macular degeneration and smoking. *Can J Ophthalmol* 13: 67—71, 1978.
- 10) 宇山昌延: 脈絡膜新生血管, 基礎と臨床. *日眼会誌* 95: 1145—1180, 1991.
- 11) Sekimoto H, Goto Y, Goto Y, Naito C, Yasugi T, Okido M, et al: Changes of serum total cholesterol and triglyceride levels in normal subjects in Japan in the past twenty years. *Jpn Cir J* 47: 1351—1358, 1983.
- 12) 岡本 繁: 実験的高コレステロール血症における眼組織の組織学的研究. 第1報. 網脈絡膜の変化について. *眼紀* 31: 298—307, 1980.
- 13) 岡本 繁: 実験的高コレステロール血症における眼組織の組織学的研究. 第3報. 網脈絡膜変性部の電顕所見について. *眼紀* 33: 2156—2165, 1982.
- 14) Nakatake J, Inomata H, Yamamoto T: Marked deposition of lipid materials in the choroid in experimental hypercholesterolemic rats. *J Clin Electron Microscopy* 22: 183—188, 1989.
- 15) 梶川欽一郎: 結合組織. 金原出版, 東京, 288—289, 1984.
- 16) Pauleikhoff D, Harper CA, Marshall J, Bird AC: Aging changes in Bruch's membrane. *Ophthalmology* 97: 171—178, 1990.
- 17) Heriot WJ, Henkind P, Bellhorn RW, Burns MS: Choroidal neovascularization can digest Bruch's membrane. A prior break is not essential. *Ophthalmology* 91: 1603—1608, 1984.
- 18) Yamamoto T, Yamashita H: Pseudopodia of capillary endothelium in ocular tissues. *Jpn J Ophthalmol* 34: 181—187, 1990.
- 19) 山村雄一, 武内 望: 動脈硬化の対策. 血液と脈管 8: 391—400, 1977.