

第 103 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

眼内循環

網脈絡膜循環における白血球動態評価とその意義

小 椋 祐一郎

名古屋市立大学医学部眼科学教室

共同研究者

西脇 弘一, 宮本 和明, 広芝 直子, 辻川 明孝, 浜田 宗雄, 山城 健児
 野中 淳之, 桐生 純一, 本田 孔士(京都大学大学院医学研究科視覚病態学)
 松原 明久, 松田 吉人, 富田 一之, 野崎 実穂, 尾関 年則, 木村 英也
 玉井 一司(名古屋市立大学医学部眼科学教室)
 西信 良嗣, 平林 義章, 島田 昌一(名古屋市立大学医学部第二解剖学教室)
 松原 孝, 宇山 昌延(関西医科大学眼科学教室)

要 約

核染色色素と走査型レーザー検眼鏡を応用して, 生体眼において網膜および脈絡膜循環での白血球循環動態の画像化と定量的評価方法を開発した. 網膜循環での白血球画像化にはアクリジンオレンジ, 脈絡膜循環の白血球画像化にはインドシアニングリーンを用いた. サル, ラットなどの動物において, 網脈絡膜毛細血管内の白血球速度を定量評価することが可能であった. また, 本手法を応用して, 生体眼においてローリングや白血球塞栓などの白血球-血管内皮相互作用を画像化ならびに定量化することができた.

アクリジンオレンジによる白血球造影を用いて, 1) インターフェロン網膜症, 2) 網膜虚血再灌流傷害, 3) 実験的糖尿病などの実験的網膜循環障害での白血球動態に関して, ラットを実験動物として検討した.

1) インターフェロン網膜症

インターフェロンの全身投与は, 網膜循環での白血球と血管内皮の接着を亢進させ, 網膜での白血球捕捉, 肺組織への白血球集積を容量依存的に増加させた. このようなインターフェロン投与による微小循環系での白血球集積は, 薬剤により阻害可能であった. インターフェロン網膜症や間質性肺炎などのインターフェロンによる副作用に白血球が関与している可能性が推定された.

2) 網膜虚血再灌流傷害

視神経結紮による一過性(60分)の網膜虚血の後の再

灌流時に, 網膜静脈内をローリングする白血球が多数みられ, 網膜毛細血管での白血球捕捉も著明にみられた. このような白血球-血管内皮相互作用を経時的に定量評価することが可能であり, ローリングは再灌流後12時間, 毛細血管での白血球捕捉は24時間で最高であった. 接着分子の抗体, あるいは阻害薬剤を投与することにより, このような白血球-血管内皮相互作用を抑制し, 組織傷害を軽減することが可能であった. 網膜虚血再灌流傷害に白血球が重要な意義を持つことが推定された.

3) 実験的糖尿病

薬剤誘発糖尿病および自然発症糖尿病(Otsuka Long Evans Tokushima Fatty, OLETF)ラットで, 発症早期から網膜に捕捉される白血球数が増加していた. また, アクリジンオレンジ白血球造影の後に行った蛍光眼底造影で毛細血管に捕捉された白血球が, 下流の血流障害を来していた. 糖尿病ラット網膜で血管内皮細胞の接着分子の発現亢進がみられ, 白血球の毛細血管での捕捉の一因と考えられた. 白血球の毛細血管への捕捉が, 糖尿病における網膜血管傷害に重要な役割を果たしていることが推定された.(日眼会誌 103:910-922, 1999)

キーワード: 白血球, 網膜循環, 脈絡膜循環, インターフェロン, 網膜虚血再灌流傷害, 糖尿病網膜症

別刷請求先: 〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 小椋祐一郎
 (平成11年9月13日受付, 平成11年9月20日受理)

Reprint requests to: Yuichiro Ogura, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

(Received September 13, 1999 and Accepted September 20, 1999)

In Vivo Evaluation of Leukocyte Dynamics in the Retinal and Choroidal Circulation

Yuichiro Ogura

Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

Abstract

We have developed a new method to visualize leukocytes and evaluate their kinetics in the chorioretinal microcirculation of the living eyes. Nuclear staining dyes and a scanning laser ophthalmoscope were used to image leukocytes in the fundus. Acridine orange was used to visualize leukocytes in the retinal microcirculation. For imaging leukocytes in the choroid, indocyanine green was injected intravenously. Dynamics of leukocytes in the capillaries of the retina and choroid were quantitatively estimated in monkeys and rats. This method also allowed evaluation of leukocyte-endothelial interactions, such as rolling or firm adhesion, *in vivo*.

Acridine orange leukocyte fluography was used to study leukocyte dynamics in the following experimentally induced microcirculatory disturbances of the retina: 1) interferon-associated retinopathy, 2) ischemia-reperfusion injury of the retina, and 3) experimental diabetes mellitus.

1) Interferon-associated retinopathy

Systemic administration of interferon alpha enhanced leukocyte-endothelial interactions in the retina, which resulted in leukocyte rolling and entrapment in the retinal capillary beds. Leukocyte accumulation was also detected in the lung. The entrapment or accumulation of leukocytes in the microcirculation was inhibited by simultaneous administration of corticosteroids or other agents. These results suggested that leukocytes play a major role in the development of adverse effects of interferon, such as retinopathy or interstitial pneumonia.

2) Ischemia-reperfusion injury of the retina

During reperfusion period after transient (60 min)

retinal ischemia by optic nerve ligation, the rolling of leukocytes in the retinal veins was prominent and numerous leukocytes were trapped in the retinal capillaries. The number of rolling leukocytes was at a maximum 12 hours after reperfusion. Leukocyte entrapment peaked at 24 hours after reperfusion. By blocking adhesion molecules on the vascular endothelium, these leukocyte-endothelial interactions were effectively inhibited. Postischemic retinal atrophy was also inhibited by blocking adhesion molecules. These results suggested that leukocytes may be major players in the pathophysiology of ischemia reperfusion injury of the retina.

3) Experimental diabetes mellitus

Leukocyte dynamics in the retina were studied in streptozotocin-induced diabetes and spontaneous diabetes (OLETF rats). In both diabetic models, leukocyte entrapment in the retinal capillaries was increased even in the early stages of diabetes. Fluorescein angiography revealed that trapped leukocytes disturbed the regional capillary blood flow in the downstream. Enhanced expression of adhesion molecules was observed in the capillary endothelium of the retina in the diabetic rats. Leukocyte entrapment in the retinal capillaries might cause microvascular occlusions and dysfunction, in turn causing diabetic retinopathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 910-922, 1999)

Key words: leukocyte, retinal circulation, choroidal circulation, interferon, retinal ischemia reperfusion injury, diabetic retinopathy

I 緒 言

従来、網脈絡膜の微小循環の研究手法としては、蛍光眼底造影による血漿血流の評価、あるいはレーザードップラやレーザーバックル法による赤血球血流の評価が主として用いられてきている。今回の宿題報告では、従来とは視点を変えて、白血球という観点から網脈絡膜の微小循環を捕えてみた。

白血球は血液細胞の中で最も大きく、正常微小循環においても毛細血管の通過にその細胞体の変形を要する。

血球成分の構成比では 0.1% に過ぎないが、循環抵抗では全血液の約 22% を占めている¹⁾²⁾。したがって、血管灌流圧の低下、毛細血管抵抗の増加、血管内皮細胞の変化などさまざまな病態で、白血球は毛細血管を通過しにくくなり、微小循環障害の原因となり得る^{3)~16)}。また、白血球は種々の接着分子を介して血管内皮細胞と反応し、サイトカインなどの化学物質を産生し、血管透過性の変化や局所での炎症反応に積極的に関与していることがわかってきている^{17)~21)}。以上のような事実から、微小循環における白血球の意義が注目されてきている。

しかしながら、眼科領域での白血球循環に関する研究はきわめて少なく、特に生体眼においては青色内視現象を用いた黄斑部の白血球動態定量化の研究があるのみである^{22)~25)}。この方法は青い光を直視した際に起こる内視現象を利用して、黄斑部近傍の網膜血管を流れる白血球の速度と密度を定量化する手法であるが、自覚的な検査であること、白血球の動態をマスレスポンスとしてしか捕えられないことなどの限界がある。

我々は、核染色色素であるアクリジンオレンジと走査型レーザー検眼鏡を使用して、生体眼の網膜循環において白血球を画像化することに成功した^{26)~28)}。本法は実験動物にのみ応用できるが、個々の白血球動態を画像として捕えることができ、また、その画像を解析することにより動態を定量的に評価することも可能となる利点を有している。

II 網脈絡膜循環での白血球画像化とその定量的評価

1. アクリジンオレンジによる網膜循環での白血球画像化

実験動物には、サル、有色ラット、マウスを用いた。白血球の生体染色には核染色色素であるアクリジンオレンジを用いた。アクリジンオレンジは通常蛍光を発しないが、DNA と結合したときのみ蛍光を発し、血液中では白血球のみが染色される(図1)。その波長は励起波長 492 nm、蛍光波長 533 nm とフルオレセインナトリウムの蛍光スペクトラムに近いため、蛍光眼底造影のフィルタを用いて、その蛍光を検知することが可能である。0.1% アクリジンオレンジ水溶液を静脈内に投与して、走査型レーザー検眼鏡で眼底を観察、得られた画像を S-VHS テープに記録した(毎秒 30 フレーム)。

2. インドシアニングリーンによる脈絡膜循環での白血球画像化

アクリジンオレンジによる造影では観察光源にアルゴンレーザーを用いるために、網膜循環での白血球は観察

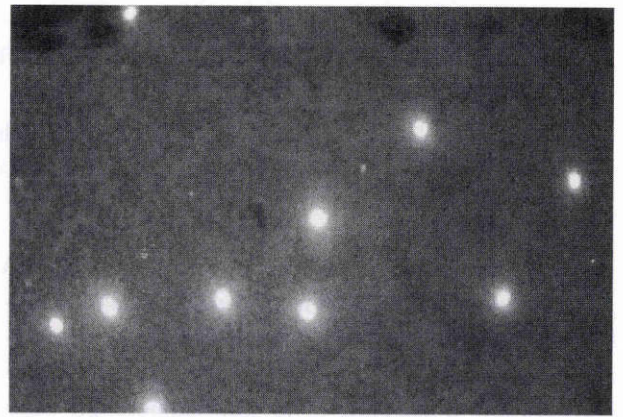


図1 アクリジンオレンジを静脈内投与したサルの末梢血液標本の蛍光顕微鏡所見。

白血球のみが強い蛍光を発している。

されるが、脈絡膜循環の白血球は励起光が到達しないために造影されない。したがって、脈絡膜の白血球画像化にはインドシアニングリーンを静脈内に投与し、赤外線レーザーによって眼底を観察した。詳細な機序は不明であるが、インドシアニンググリーンを血液内に投与すると白血球のみが染色される(図2)。当然、網膜循環の白血球も描出されるが、その動態から網膜と脈絡膜の白血球を区別することは可能であった²⁹⁾。実験動物には、白色ラットを用いた。

3. 画像解析による白血球動態の定量的評価

ビデオテープに記録された画像をビデオ入力ボードを介してコンピュータに取り込み、画像解析を行い、個々の白血球の循環動態を定量的に評価した(図3)。連続して取り込んだ画像をサブトラクションすることにより、同一の白血球の軌跡を追うことができる(図4)。フレームレートは1/30秒であるので、白血球が連続したフレームの間で移動した距離を測定することによって、白血球速度を算出することが可能となる(図5)。コンピュータ画像上で測定した距離(ピクセル)を摘出眼から実測した換算率で眼底上での距離(mm)に換算した。

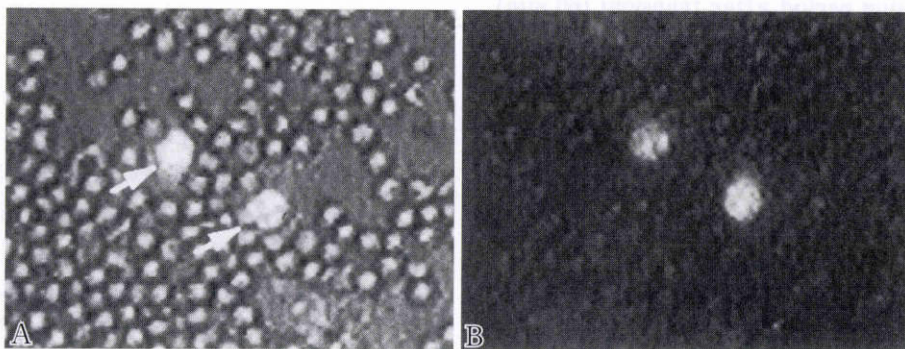


図2 インドシアニンググリーンを静脈内投与したラットの末梢血液標本の位相差顕微鏡(A), および赤外蛍光顕微鏡所見(B)。

白血球のみが染色され、蛍光を発している。

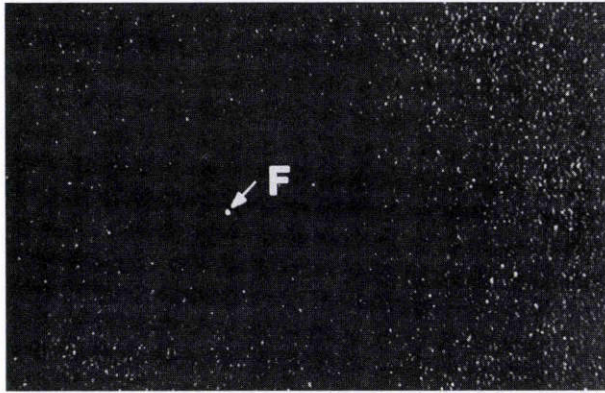


図3 サル眼黄斑部でのアクリジンオレンジ造影所見。ビデオ画像をコンピュータでデジタイズした画像。染色された白血球が蛍光点として観察される。Fは中心窩の部位を示す。

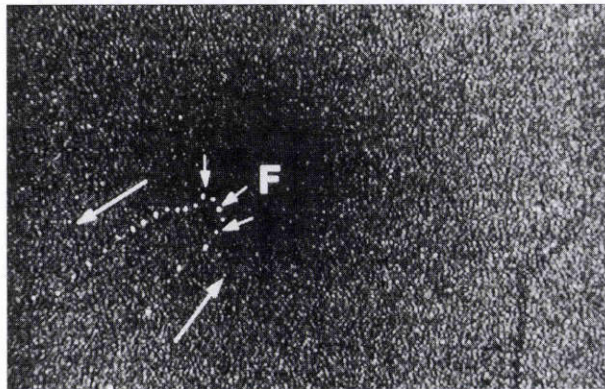


図4 連続的にデジタイズした画像をサブトラクションすることにより、一つの白血球の軌跡を画像化することができる。Fは中心窩の部位を示す。

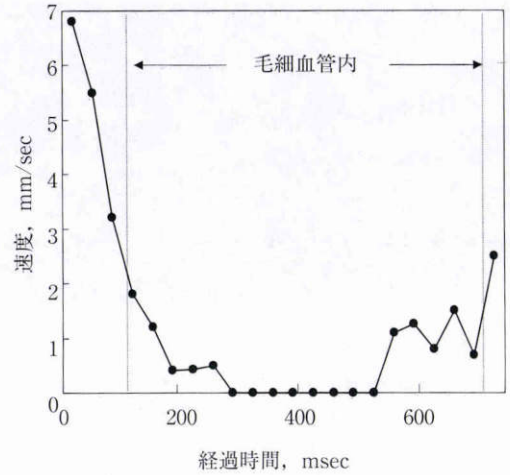


図6 毛細血管内で栓塞した白血球の速度プロファイル。数フレーム白血球速度が0となり、毛細血管内に停止している。

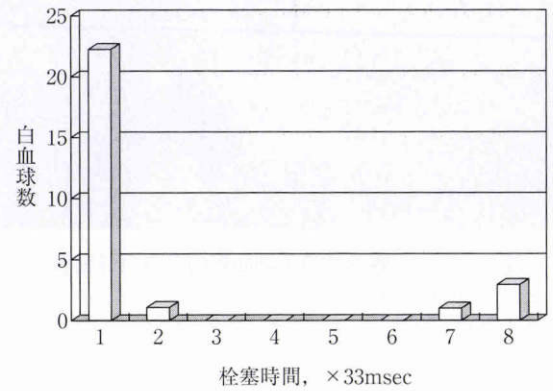


図7 毛細血管内での白血球の栓塞時間。栓塞時間は、ほとんどの白血球(81%)で1フレーム(33ミリ秒)であった。

III 正常眼での網脈絡膜白血球動態

1. サル眼網膜での白血球動態

カニクイザルの黄斑部近傍での網膜毛細血管内での白血球速度は、 $0.92 \pm .32$ (平均値±標準偏差) mm/secであった。この値は、青色内視現象を利用して算出された人眼での黄斑部近傍の白血球速度と近似しており、本手法の妥当性が推定された²⁶⁾。また、個々の白血球動態を詳細に検討すると、一時的に毛細血管内で停止する現象、すなわち白血球の栓塞(plugging)が観察された(図6)。生理的状态でも、黄斑部近傍を通過する白血球の32%に栓塞がみられた。栓塞の時間はほとんどの白血球で1/30秒以内であったが、長く栓塞する白血球もみられた(図7)。

2. ラット眼網膜での白血球動態

ラットにおいてもアクリジンオレンジ造影法を用いて、網膜循環での白血球動態を定量化することが可能であった²⁷⁾²⁸⁾。ラットでは、毛細血管だけでなく、網膜主幹

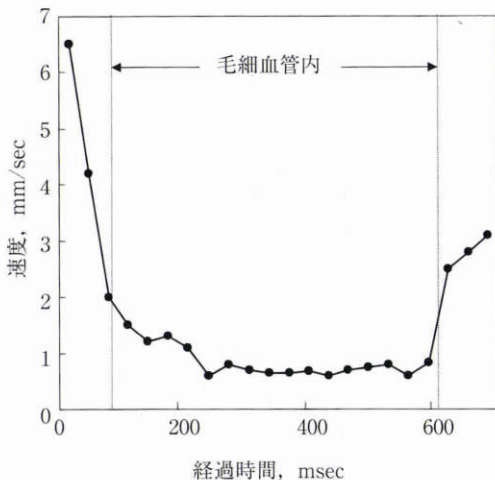


図5 図4の白血球の速度を画像解析により算出した結果。

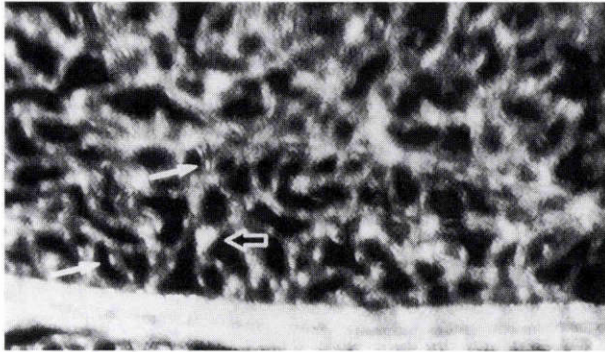


図8 ラット眼網膜でのアクリジンオレンジ造影所見。走査型レーザー検眼鏡の画角20度で撮影した画像。網細血管内皮細胞の核(白矢印)が染色されて血管構築がよくわかる。黒矢印は、毛細血管内を移動する白血球。

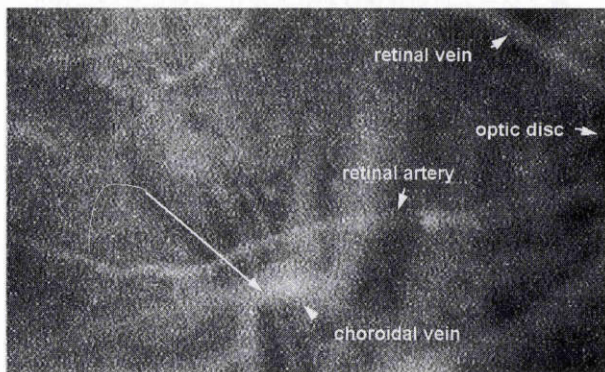


図9 ラット眼脈絡膜毛細血管内の白血球動態。ビデオを連続的にデジタイズして、サブトラクションした画像。

動静脈においても白血球速度の算出が可能であり、動脈内では平均 29.5 ± 7.3 mm/sec (53.0~15.7), 静脈内では平均 17.4 ± 5.3 mm/sec (34.9~8.1), 毛細血管内では 1.4 ± 0.4 mm/sec (2.4~0.5) であった。毛細血管内白血球速度は、サル眼と比較してやや高値であった。また、ラット眼は水晶体が大きく眼底像が拡大されるために、毛細血管を流れる白血球の詳細が観察可能であった(図8)。

3. ラット眼脈絡膜での白血球動態

インドシアニングリーン蛍光造影法により撮影した脈絡膜循環での白血球動態も、上述の方法を用いることにより、定量化が可能であった(図9)。ラットの脈絡膜毛細血管内での白血球速度は 0.74 ± 0.06 mm/sec で、網膜毛細血管内の白血球速度の約二分の一であった²⁹⁾。

IV 実験的網膜循環障害での白血球動態の評価

上述のアクリジンオレンジによる白血球選択造影法を応用して、実験的に作製した網膜循環障害での白血球動態の評価を行った。今回、検討した実験モデルは、1. インターフェロン網膜症、2. 網膜虚血再灌流、3. 実験的糖尿病である。

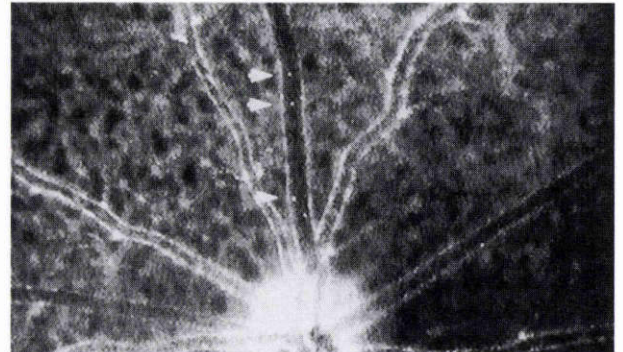


図10 インターフェロンを投与したラットでの網膜静脈内の白血球ローリング。複数の白血球(矢印)が静脈壁に沿って、ゆっくりと移動するのが観察された。

1. インターフェロン網膜症

インターフェロンは α , β , γ などのサブタイプがあるが、 α と β が臨床で薬剤として用いられている³⁰⁾³¹⁾。インターフェロンはサイトカインの一種で、抗ウイルス作用、免疫賦活作用、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用などのいろいろな作用が報告^{32)~40)}されている。臨床では、C型肝炎、悪性腫瘍に対して適応とされている。しかし、投与に際しては副作用が多く、投与直後の発熱、悪寒、消化器症状、呼吸器症状、循環器症状、あるいは肝機能、腎機能障害、皮膚症状、精神症状、血液異常など多彩な副作用が報告されている。場合によっては、間質性肺炎や重篤なうつ状態など死に至る合併症も報告されている。

眼科領域では、1993年 Guyer ら⁴¹⁾により報告されたインターフェロン網膜症があり、後極部網膜に網膜出血や綿花様白斑を来し、蛍光眼底造影で局所の毛細血管閉塞がみられる。視力障害を来すことは稀であるが、インターフェロン投与患者の40~60%にみられると報告⁴²⁾されている。しかし、毛細血管閉塞の原因は不明である。

今回は、有色ラットを対象として、インターフェロン α を体重 kg 当たり、 $10^5 \sim 10^6$ 国際単位を30分かけて静脈内投与し、その後にアクリジンオレンジ造影法により網膜循環での白血球動態を評価した。

インターフェロンを投与したラットにおいて、網膜主幹静脈内をローリングしている白血球がみられた(図10)。健常ラットでは、白血球のローリングは観察されなかった。また、アクリジンオレンジ静注30分後には血漿中の色素が消失して流液中の白血球は蛍光を発しなくなるが、毛細血管に捕捉された白血球は蛍光が持続するため、観察が容易になる(図11)。健常ラットではそのような捕捉された白血球の数は少なかったが、インターフェロンを投与した動物では用量依存性に網膜毛細血管に捕捉された白血球の数が増加していた(図12)。以上の結果から、インターフェロンの投与は網膜循環における白血球粘着性を亢進させ、白血球による網膜毛細血管閉塞を



図 11 インターフェロンを投与したラットでは、網膜毛細血管に捕捉される白血球数が増加していた。

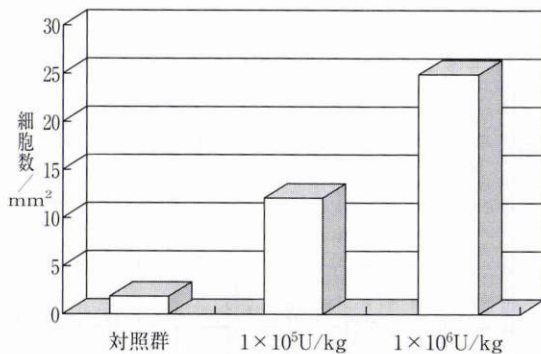


図 12 網膜毛細血管での白血球捕捉は、投与したインターフェロンの用量依存性に増加した。

惹起している可能性が推定された。また、この白血球による毛細血管閉塞がインターフェロン網膜症の本態であると推察された⁴³⁾。

次に、白血球の活性化、あるいは白血球の粘着性亢進を阻害する薬剤を投与して、インターフェロンによる網膜毛細血管での白血球捕捉に対する影響を検討した。検討した薬剤は、①プレドニゾロン、②血小板活性化因子受容体阻害剤、③スーパーオキシド・デismutase (SOD) の 3 種類である。インターフェロン α (1×10^6 国際単位/kg) を上述の実験同様、静脈内投与し、同時にいずれかの阻害剤を投与した。その後、アクリジンオレンジにより網膜の白血球動態を評価した。図 13 に結果を示すが、いずれの阻害剤も白血球による網膜毛細血管の閉塞を有意に抑制した⁴⁴⁾。これらの実験結果は、白血球の網膜毛細血管への捕捉の原因がインターフェロンによる白血球の活性化および粘着性の亢進であることを間接的に推定すると同時に、網膜症などのインターフェロンの副作用が薬剤で抑制できることを示している。

2. 網膜虚血再灌流

組織の虚血再灌流障害に白血球が関与していることは、心筋、脳などの組織では詳細に検討されている^{45)~48)}が、網膜の虚血再灌流時の白血球動態に関してはあまり解明されていない。心筋では、虚血後の再灌流時に白血球

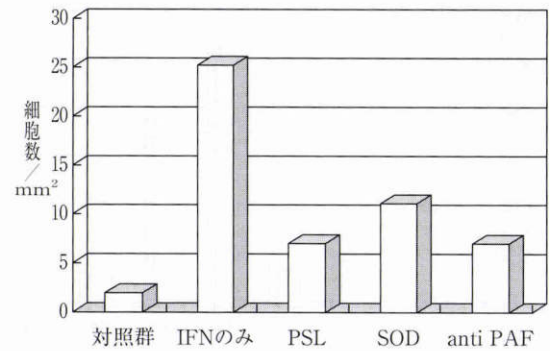


図 13 薬剤による網膜毛細血管内白血球捕捉の阻害効果。

IFN : interferon, PSL : prednisolone, SOD : superoxide dismutase, anti PAF : PAF 阻害剤(詳しくは本文参照)。

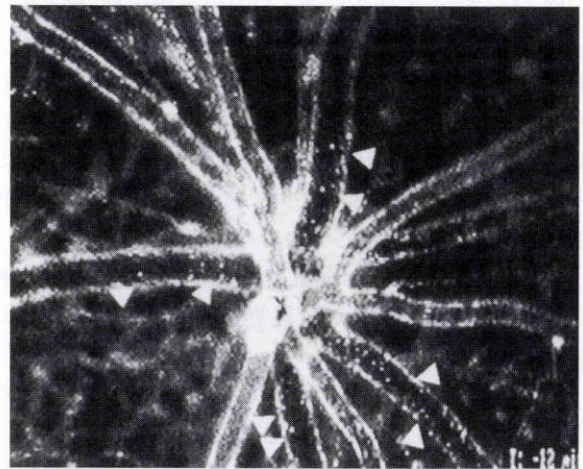


図 14 網膜虚血再灌流における網膜静脈内をローリングする白血球。

が毛細血管を閉塞し(non reflow 現象)、栓塞した白血球が血管内皮と相互に作用することにより活性化し、活性酸素などのラジカルを産生し、組織を傷害することが報告されている。また、再灌流時に循環中の白血球を減少させることにより組織傷害を減弱できることも知られている⁴⁶⁾⁴⁹⁾。脳虚血においても同様の機序が報告されている。そこで、今回は網膜に一過性の虚血を作製し、再灌流時の網膜における白血球動態について検討した。

実験動物には有色ラット(Long Evans)を使用し、網膜虚血は球後で視神経を結紮することにより作製した⁵⁰⁾⁵¹⁾。視神経の結紮後、眼底検査で網膜中心動脈の血流途絶を確認した。60分の虚血の後、結紮している縫合糸を解除して、網膜の血流を再開させた。再灌流後、1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 96, 168時間後にアクリジンオレンジにより網膜の白血球動態を評価し、虚血を行っていない健常ラットと比較した。

再灌流後4時間から、網膜主幹静脈内をローリングする多数の白血球が観察された(図 14)。その数は徐々に増加し、再灌流12時間後にピークに達し、その後は減少し

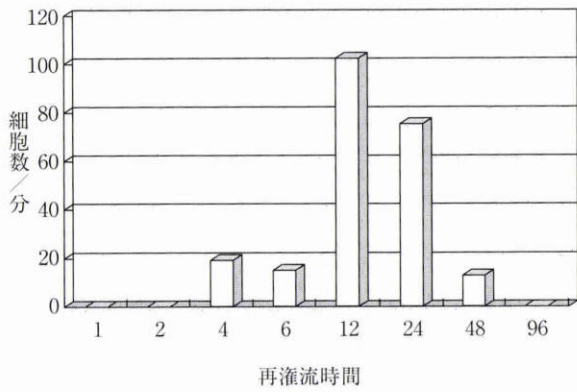


図 15 網膜虚血再灌流における網膜静脈での白血球ローリング数の経時的変化.

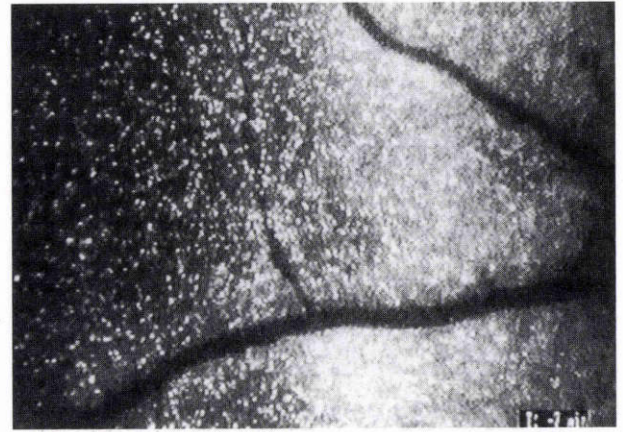


図 16 網膜虚血再灌流における網膜毛細血管に捕捉された白血球.

た(図 15). また, インターフェロンの実験同様, 網膜毛細血管に捕捉された白血球の数も再灌流後, 徐々に増加し, 24 時間で最高であった(図 16, 17). 以上の結果は, 網膜の虚血再灌流時には網膜血管内皮の傷害から白血球との反応が亢進し, 網膜循環に多数の白血球が栓塞していることを生体眼で証明した⁵²⁾. このような白血球の集積が虚血後の組織傷害に関与している可能性が推定された.

次に, 上記でみられた虚血再灌流時の白血球集積の機序を解明し, 組織傷害との関連を検討する目的で, 以下の実験を行った.

白血球と血管内皮の相互作用に関連する接着分子と呼ばれる, 白血球および血管内皮細胞の表面に存在する分子が最近の研究により, かなり解明されてきている(図 18)^{8)~11), 17)~21)}. 白血球あるいは血管内皮細胞に何らかの刺激が加わると, 白血球は血管内皮細胞の上をゆっくりと転がるようになり(rolling), ローリングしているうちに白血球は活性化し, 内皮と強固に粘着するようになる(firm adhesion). 内皮に粘着した白血球は, 次いで血管外に遊走してゆく(emigration). このような白血球血管内皮相互作用(leukocyte-endothelial interactions)に関与する接着分子が多く発見されている.

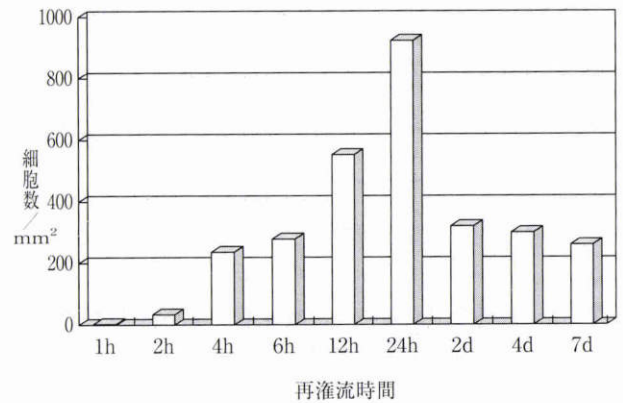


図 17 網膜虚血再灌流における網膜毛細血管に捕捉された白血球数の経時的変化.

血管内皮細胞の接着分子の中で, ローリングに関与する接着分子としては P-selectin や E-selectin などのセレクチンファミリー, 白血球の粘着に関与する因子としては intercellular adhesion molecule (ICAM) - 1, vascular cell adhesion molecule (VCAM) などがよく研究されている.

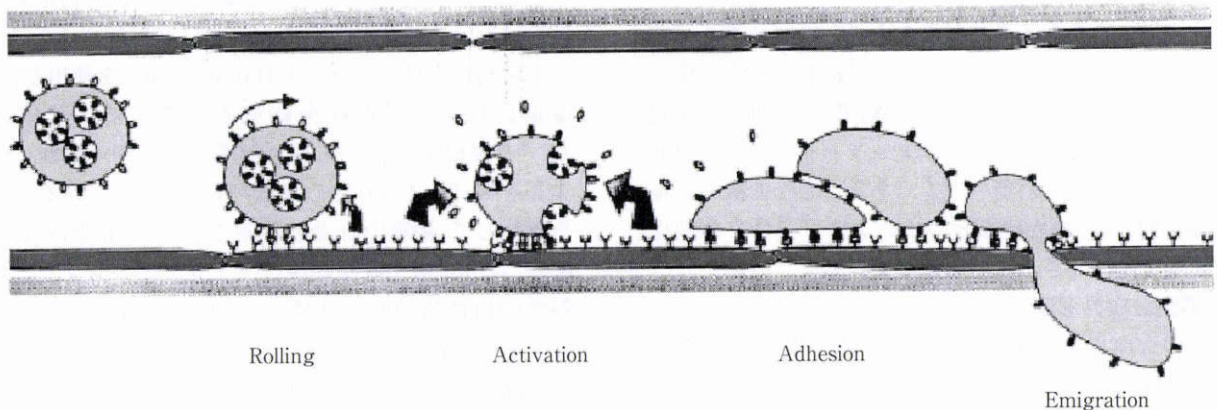


図 18 白血球—血管内皮相互作用の模式図.

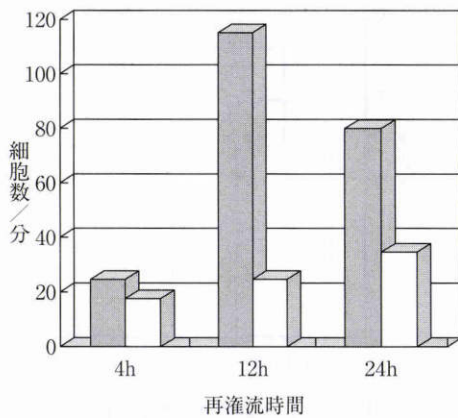


図 19 網膜虚血再灌流における白血球ローリングに対する抗 P-selectin 抗体の効果.

■：虚血無治療群 □：抗 P-selectin 抗体投与群

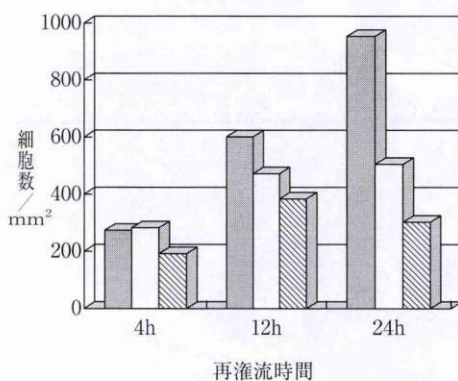


図 20 網膜虚血再灌流における網膜毛細血管白血球捕捉に対する抗 P-selectin 抗体, および抗 ICAM-1 抗体の効果.

■：虚血無治療群 □：抗 P-selectin 抗体投与群
▨：抗 ICAM-1 抗体投与群

上記の網膜虚血再灌流モデルを用いて,白血球動態に対する P-selectin および ICAM-1 モノクローナル抗体の効果を検討した.それぞれ,再灌流 5 分前に, P-selectin, ICAM-1 に対するモノクローナル抗体を静脈内に投与した.その後,再灌流させ,4,12,24 時間後にローリングしている白血球数,網膜に捕捉された白血球数を評価した.また,実験後 7,14 日に組織標本で,網膜の傷害を評価した.

抗 P-selectin 抗体を投与した群では,ローリングする白血球数は著明に減少していた(図 19).また,網膜に捕捉された白血球数も抗体投与群で抑制されていた(図 20).組織傷害は,光学的顕微鏡切片で網膜の厚さを評価したが,抗体投与群では無治療群と比較して,網膜内層の傷害が軽度であった.以上の実験結果から,網膜血管内皮の接着分子を阻害することにより,虚血後の白血球血管内皮相互作用を抑制できること,また,白血球集積の抑制は組織傷害を減弱させることが推定された⁵³⁾⁵⁴⁾.

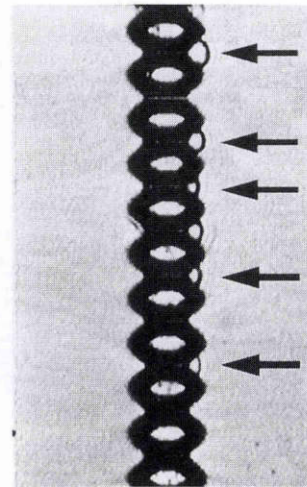


図 21 シリコン微小流路モデルにおける糖尿病白血球の通過所見.

糖尿病では白血球変形能が低下し,微小流路を閉塞している.

3. 実験的糖尿病

糖尿病における網膜毛細血管の傷害の機序に関しては,多くの研究がなされてきたが,未だに不明な点が多い.糖尿病合併症の原因となる生化学的仮説もいくつか提唱されているが,網膜血管内皮傷害との関連の詳細は解明されていない^{55)~57)}.

糖尿病での網膜循環動態に関しても,非常に多くの実験的あるいは臨床的研究が行われてきており,種々の病期における網膜血流の減少や増加が報告^{58)~70)}されている.しかしながら,網膜血流の評価の手法の違いや,対象の差などから相反する結果も報告されており,なかなか統一した見解が得られていない.一つの原因としては,恐らく糖尿病による網膜循環の変化は毛細血管のレベルで始まると考えられるが,毛細血管レベルでの網膜血流の評価は困難であり,従来多くの報告は網膜主幹血管を対象にしてきたこともあげられるであろう.今回の実験手法として用いたアクリジンオレンジによる白血球造影法は,ローリングや粘着などの白血球と血管内皮の相互作用を生体で評価できるだけでなく,白血球をマーカーとして毛細血管の血流動態を評価できるという特徴がある.

糖尿病において白血球は変形能が低下しており,活性化している比率が高く血管内皮と接着しやすくなっていることが報告⁷¹⁾⁷²⁾されている.我々も以前にシリコンの微小流路モデルを用いて,糖尿病の白血球が毛細血管血流の障害の原因となっている可能性を報告した(図 21)⁷³⁾.組織学的にも実験的糖尿病の網膜毛細血管閉塞に白血球が直接関与していることを推定する報告¹³⁾⁷⁴⁾もみられる.

今回,薬剤誘発糖尿病と自然発症糖尿病の 2 つの実験的糖尿病ラットを対象として,網膜での白血球動態を評価した.糖尿病誘発薬剤としてはストレプトゾトシンを



図 22 ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットでの網膜毛細血管内白血球捕捉.

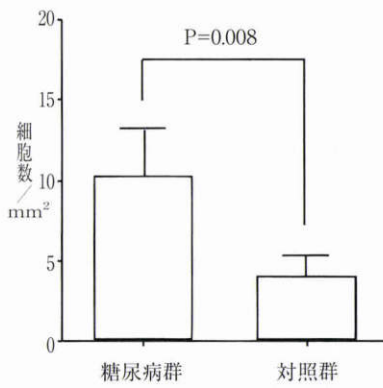


図 23 ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットと対照動物での網膜毛細血管内に捕捉された白血球数.



図 24 自然発症糖尿病 (OLETF) ラットでの網膜毛細血管内白血球捕捉.

使用した. 体重 kg 当たり 60 mg のストレプトゾトシンを静脈内に投与し, 糖尿病発症を確認後 4 週間目に実験を行った. 自然発症糖尿病としては, Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いた. このモデルは肥満, 高血糖, インスリン抵抗性などヒトの noninsulin

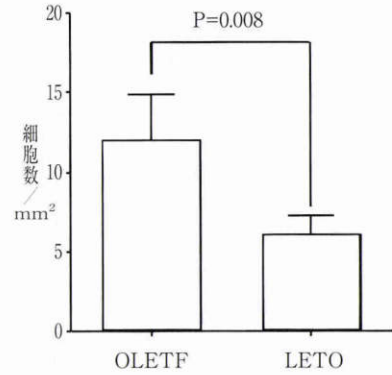


図 25 OLETF ラットと対照動物 (LETO) での網膜毛細血管内に捕捉された白血球数.

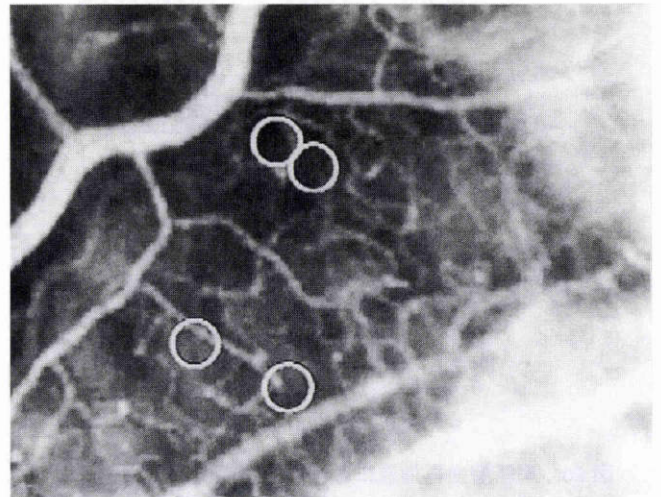


図 26 OLETF ラットでの網膜毛細血管に栓塞した白血球による毛細血管血流障害. 白い円は白血球が栓塞している部位を示す.

dependent diabetes mellitus (NIDDM) と類似した特徴を有し, 糖尿病が軽度なため白内障の発症が遅く, 眼底所見を長期間にわたって観察できる利点がある. OLETF ラットは生後 18 週目頃から高血糖を呈してくるが, 今回は糖尿病発症後 6 週目の動物を使用して実験を行った. 両者ともにアクリジンオレンジによる造影を行い, 網膜毛細血管での白血球速度, 毛細血管に捕捉された白血球数を対照の動物と比較検討した.

網膜毛細血管における白血球速度は, ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット, OLETF ラットともに対照ラットと比較して有意差はみられなかった. しかし, 網膜毛細血管に捕捉されていた白血球は, 2つのモデルともに糖尿病群で有意に増加していた (図 22~25)⁷⁵⁾. この白血球による毛細血管の栓塞は一過性のものであり, 数日で消失していた. 通常の蛍光眼底撮影を施行したところ, 網膜毛細血管瘤や網膜血管からの漏出などの糖尿病に特異的な異常所見はみられなかったが, 毛細血管に栓塞した白血球が局所の毛細血管血流を障害している所見が得られ

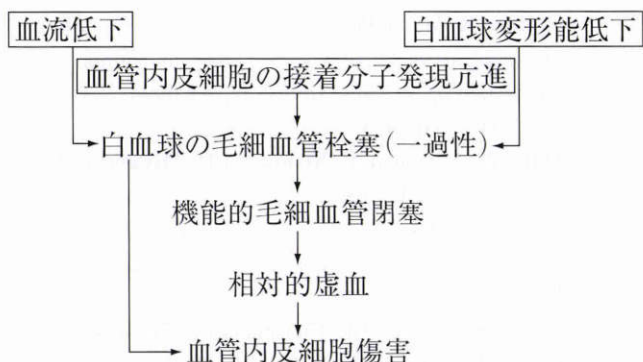


図 27 糖尿病における網膜血管内皮傷害の機序(仮説).

た(図 26).

OLETF ラットにおいて免疫組織学的に網膜での P-selectin および ICAM-1 の発現を検討したところ、両方の接着分子ともに網膜血管の部に発現亢進をみた⁷⁶⁾. Western blotting 法による発現量の評価においても、対照の LETO ラットに比べて OLETF ラットでは増加していた. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいても、ICAM-1 の発現亢進をみた⁷⁷⁾.

以上の実験結果から、糖尿病においては発症早期から、網膜微小循環において白血球の動態異常がみられ、白血球による毛細血管の一過性の血流障害が推定された(図 27). その原因としては、糖尿病による白血球変形能の低下、網膜血流減少による灌流圧低下、網膜血管内皮細胞の接着分子の発現亢進などが考えられた. このような白血球による毛細血管栓塞は、糖尿病発症初期から観察され、毛細血管瘤や血管透過性亢進に先行して起こっており、糖尿病による網膜血管内皮傷害の第 1 段階である可能性も推定された.

V おわりに

本研究では、アクリジンオレンジやインドシアニングリーンによる網膜および脈絡膜での白血球画像化の手法を開発し、それらの手法を用いて実験的網膜循環障害における白血球動態の異常を生体眼で評価した. 本稿では、インターフェロン網膜症、網膜虚血再灌流、実験的糖尿病の 3 つの網膜循環障害モデルを取り上げたが、いずれの病態においても白血球が循環障害あるいは組織傷害に積極的に関与している実験結果が得られた. その他、網膜静脈閉塞症、実験的ぶどう膜炎、高コレステロール血症などの病態においても、白血球が関与していることを確認しており、網膜微小循環を考える上で白血球は大きな役割を果たしていることが判明した.

今後、さらに網膜における白血球と血管内皮細胞との相互作用という観点から網膜微小循環障害の病態を解明し、治療ないしは発症予防につながるような研究を行ってゆきたいと考えている.

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与えていただきま

した日本眼科学会評議員各位、ならびに座長を務めていただきました宇山昌延関西西大名誉教授に心から感謝いたします. また、本研究で使用した抗 P-selectin 抗体に関しては住友製薬総合研究所東條伸一郎先生、抗 ICAM-1 抗体に関しては大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター宮坂昌之先生、慶應義塾大学医学部医化学教室の末松 誠先生からご供与いただきましたことを、記して感謝いたします. 最後に、微小循環における白血球に関して、著者が興味を持つ契機となった助言をいただきました John Hopkins 大学医学部眼科 Ran Zeimer 教授に心から感謝いたします.

本研究の一部は、文部省科学研究費の援助を受けた.

文 献

- 1) Sutton DW, Schmid-Schönbein GW: Elevation of organ resistance due to leukocyte perfusion. *Am J Physiol* 262: 1646—1650, 1992.
- 2) Schmid-Schönbein GW, Sung KLP, Tozerren H, Skalak R, Chien S: Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophys J* 36: 234—256, 1981.
- 3) Bagge U: Granulocyte rheology. *Blood Cell* 2: 481—490, 1976.
- 4) Bagge U: Branemark PI: White blood cell rheology. *Adv Microcirc* 7: 1—17, 1977.
- 5) Bagge U, Amundson B, Lauritzen C: White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Pysiol Scand* 180: 159—163, 1980.
- 6) Braide M, Blixt A, Bagge U: Leukocyte effects on the vascular resistance and glomerular filtration of the isolated rat kidney at normal and low flow states. *Circ Shock* 20: 71—80, 1986.
- 7) Engler RL, Schmid-Schönbein GW, Pavelec RS: Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 111: 98—111, 1983.
- 8) Gaegtgens P, Ley K, Pries AR, Muller R: Mutual interaction between leukocytes and microvascular blood flow. *Prog Appl Microcirc* 7: 15—28, 1985.
- 9) Harlan JM: Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 65: 513—525, 1985.
- 10) Mayrovitz HN, Wiedeman MP, Tuma RF: Factors influencing leukocyte adherence in microvessels. *Thromb Haemost* 38: 823—830, 1977.
- 11) Schmid-Schönbein GW, Skalak R, Simon SI, Engler R: The interaction between leukocytes and endothelium *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 516: 348—361, 1987.
- 12) Schmid-Schönbein GW: Leukocyte kinetics in the microcirculation. *Biorheology* 24: 139—151, 1987.
- 13) Schröder S, Palinski W, Schmid-Schönbein GW: Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 139: 71—100, 1991.

- 14) **Sheridan FM, Dauber IM, McMurtry IF, Lesnefusky EJ, Horwitz LD** : Role of leukocytes in coronary vascular endothelial injury due to ischemia and reperfusion. *Circ Res* 69 : 1566—1574, 1991.
- 15) **Wilson JW** : Leukocyte sequestration and morphologic augmentation in the pulmonary network following hemorrhagic shock and related forms of stress. *Adv Microcirc* 4 : 197—232, 1972.
- 16) **Yamakawa T, Yamaguchi S, Niimi H, Sugiyama I** : White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension. *Circ Shock* 22 : 323—332, 1987.
- 17) **Granger DN, Schmid-Schönbein GW** : Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion. Oxford University Press, Oxford, 1995.
- 18) **Butcher EC** : Leukocyte-endothelial cell recognition : Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67 : 1033—1036, 1991.
- 19) **Granger DN, Kubes P** : The microcirculation and inflammation : Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55 : 662—675, 1994.
- 20) **Korthuis RJ, Anderson DC, Granger DN** : Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. *J Crit Care* 9 : 47—71, 1994.
- 21) **Lindbom L, Xie X, Raud J, Hedqvist P** : Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium *in vivo* is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol Scand* 146 : 415—421, 1992.
- 22) **Robinson F, Petrig BL, Riva CE** : The acute effect of cigarette smoking on macular capillary blood flow in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : 609—613, 1985.
- 23) **Fallon TJ, Maxwell D, Kohner EM** : Retinal vascular autoregulation in conditions of hyperoxia and hypoxia using the blue field entoptic phenomenon. *Ophthalmology* 92 : 701—705, 1985.
- 24) **Fallon TJ, Chowienczyk P, Kohner EM** : Measurement of retinal blood flow in diabetes by the blue-light entoptic phenomenon. *Br J Ophthalmol* 70 : 43—46, 1986.
- 25) **Fallon TJ, Sleightholm MA, Merrick C, Chahal P, Kohner EM** : The effect of acute hyperglycemia on flow velocity in the macular capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1027—1030, 1987.
- 26) **Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y** : Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 123—130, 1995.
- 27) **Kimura H, Nishiwaki H, Kiryu J, Ogura Y** : A new fluorescent imaging procedure *in vivo* for evaluation of the retinal microcirculation in rats. *Curr Eye Res* 14 : 223—228, 1995.
- 28) **Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Miyamoto K, Matsuda N** : Visualization and quantitative analysis of leukocyte dynamics in retinal microcirculation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1341—1347, 1996.
- 29) **Matsuda N, Ogura Y, Nishiwaki H, Miyamoto K, Matsubara T, Kiryu J, et al** : Visualization of leukocyte dynamics in the choroid with indocyanine green. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 2228—2233, 1996.
- 30) **Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR, Coppenhaver DH, Niesel DW, Klimpel GR, et al** : The interferons : Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA* 266 : 1375—91383, 1991.
- 31) **Doane LL, Ratain MJ, Golomb HM** : Hairy cell leukemia : Current management. *Hamatol Oncol Clin North Am.* 2 : 489—502, 1990.
- 32) **Talpaz M, McCredie KB, Mavligit GM, Gutterman JU** : Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 62 : 689—692, 1983.
- 33) **de Kernion JB, Sarna G, Figlin R, Lindner A, Smith RB** : The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte interferon. *J Urol* 130 : 1063—1066, 1983.
- 34) **Sertoli MR, Bernengo MG, Ardizzoni A, Brunetti I, Falcone A, Vidili MG, et al** : Phase II trial of recombinant alpha 2b interferon in the treatment of metastatic skin melanoma. *Oncology* 46 : 96—98, 1989.
- 35) **Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, et al** : Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon : A preliminary report. *N Engl J Med* 315 : 1575—1578, 1986.
- 36) **Brouth-Boye D, Zetter B** : Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 108 : 516—518, 1980.
- 37) **Sidky Y, Borden E** : Inhibition of angiogenesis by interferons : Effects on tumor and lymphocyte-induced responses. *Cancer Res* 47 : 5155—5161, 1987.
- 38) **Miller JW, Stinson WG, Folkman J** : Regression of experimental iris neovascularization with systemic alpha-interferon. *Ophthalmology* 100 : 9—14, 1993.
- 39) **Fung WE** : Interferon alpha 2a for treatment of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 112 : 563—568, 1993.
- 40) **Chan CK, Kempin SJ, Noble SK, Palmer GA** : The treatment of choroidal neovascular membranes by alpha interferon. *Ophthalmology* 101 : 289—300, 1994.
- 41) **Guyer DR, Tiedeman J, Yannuzzi LA, Slakter JS, Parke D, Kelley J, et al** : Interferon-associated retinopathy. *Arch Ophthalmol* 111 : 350—356, 1993.
- 42) **中馬智巳, 直井信久, 澤田 惇, 河野 鐵, 重平正文** : インターフェロン投与患者にみられた眼合併症につ

- いて。日眼会誌 96:616—621, 1994.
- 43) **Nishiwaki H, Ogura Y, Miyamoto K, Matsuda N, Honda Y**: Interferon alpha induces leukocyte capillary trapping in rat retinal microcirculation. Arch Ophthalmol 114:726—730, 1996.
 - 44) **Nishiwaki H, Ogura Y, Miyamoto K, Hiroshiba N, Hamada M, Honda Y**: Prednisolone, platelet-activating factor receptor antagonist, or superoxide dismutase reduced leukocyte entrapment induced by interferon alpha in retinal microcirculation. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:811—816, 1997.
 - 45) **Ko W, Hawes AS, Lazenby WD, Calvano SE, Shin YT, Zelano JA, et al**: Myocardial reperfusion injury: Platelet-activating factor stimulates polymorphonuclear leukocyte hydrogen peroxide production during myocardial reperfusion. J Thorac Cardiovasc Surg 102:297—308, 1991.
 - 46) **Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR**: Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation. 67:1016—10, 1983.
 - 47) **Vasthare US, Heinel LA, Rosenwasser RH, Tuma RF**: Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury. Surg Neurol. 33:261—265, 1990.
 - 48) **Connolly E Jr, Winfree CJ, Springer TA, et al**: Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion: Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. J Clin Invest. 97:209—216, 1996.
 - 49) **Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN**: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in posts ischemic skeletal muscle. Am J Physiol 254: H 823—H 827, 1988.
 - 50) **Stefansson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T**: Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 29:1050—1055, 1991.
 - 51) **Hangai M, Yoshimura N, Yoshida M, Yabuuchi K, Honda Y**: Interleukin-1 gene expression in transient retinal ischemia in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:571—578, 1995.
 - 52) **Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Honda Y**: *In vivo* evaluation of leukocyte dynamics in retinal ischemia reperfusion injury. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:796—800, 1998.
 - 53) **Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Tojo S, et al**: Retinal ischemia-reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:1183—1190, 1999.
 - 54) **Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Honda Y**: Tacrolimus (FK 506) attenuates leukocyte accumulation after transient retinal ischemia. Stroke 29:1431—1438, 1998.
 - 55) **Kador PF**: The role of aldose reductase in the development of diabetic complications. Med Res Rev 8:325—352, 1988.
 - 56) **Brownlee M, Cerami A, Vlassara H**: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 318:1315—1321, 1988.
 - 57) **King GL, Kunisaki M, Nishio Y, Inoguchi T, Shiba T, Xia P**: Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. Diabetes 45:S105—108, 1996.
 - 58) **Sullivan PM, Davies GE, Caldwell G, Morris AC, Kohner EM**: Retinal blood flow during hyperglycemia. A laser Doppler velocimetry study. Invest Ophthalmol Vis Sci 31:2041—2045, 1990.
 - 59) **Feke GT, Buzney SM, Ogasawara H, Fujio N, Goger DG, Spack NP, et al**: Retinal circulatory abnormalities in type 1 diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2968—2975, 1994.
 - 60) **Yoshida A, Feke GT, Morales SJ, Collas GD, Goger DG, McMeel JW**: Retinal blood flow alterations during progression of diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 101:225—227, 1983.
 - 61) **Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA**: Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. A video fluorescein angiography study. Invest Ophthalmol Vis Sci 37:886—897, 1996.
 - 62) **Grunwald JE, Riva CE, Martin DB, Quint AR, Epstein PA**: Effect of an insulin-induced decrease in blood glucose on the human diabetic retinal circulation. Ophthalmology 94:1614—1620, 1987.
 - 63) **Patel V, Rassam S, Newsom R, Wiek J, Kohner EM**: Retinal blood flow in diabetic retinopathy. Br Med J 305:678—683, 1992.
 - 64) **Grunwald JE, DuPont J, Riva CE**: Retinal haemodynamics in patients with early diabetes mellitus. Br J Ophthalmol 8:327—331, 1996.
 - 65) **Grunwald JE, Riva CE, Baine J, Brucker AJ**: Total retinal volumetric blood flow rate in diabetic patients with poor glycemic control. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:356—363, 1992.
 - 66) **Grunwald JE, Riva CE, Sinclair SH, Brucker AJ, Petrig BL**: Laser Doppler velocimetry study of retinal circulation in diabetes mellitus. Arch Ophthalmol 104:991—996, 1986.
 - 67) **Sinclair SH**: Macular retinal capillary hemodynamics in diabetic patients. Ophthalmology 98:1580—1586, 1991.
 - 68) **Tilton RG, Chang K, Pugliese G, Eades DM, Province MA, Sherman WR, et al**: Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. Diabetes 38:1258—1270, 1989.

- 69) **Small KW, Stefansson E, Hatchell DL** : Retinal blood flow in normal and diabetic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 672—675, 1987.
- 70) **Cringle SJ, Yu DY, Alder VA, Su E-N** : Retinal blood flow by hydrogen clearance polarography in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 1716—1721, 1993.
- 71) **Ernst E, Matrai A** : Altered red and white blood cell rheology in type II diabetes. *Diabetes* 35 : 1412—1415, 1986.
- 72) **Vermes I, Steinmetz ET, Zeyen LJ, van der Veen EA** : Rheological properties of white blood cells are changed in diabetic patients with microvascular complications *Diabetologia* 30 : 434—436, 1987.
- 73) **Miyamoto K, Ogura Y, Kenmochi S, Honda Y** : Role of leukocytes in diabetic microcirculatory disturbances. *Microvas Res* 54 : 43—48, 1997.
- 74) **Lutty GA, Cao J, McLeod DS** : Relationship of polymorphonuclear leukocytes to capillary dropout in the human diabetic choroid. *Am J Pathol* 151 : 707—714, 1997.
- 75) **Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y** : *In vivo* demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 2190—2194, 1998.
- 76) **Nozaki M, Ogura Y, Saishin Y, Hirabayashi Y, Shimada S** : Enhanced expression of adhesion molecules of the retinal vascular endothelium in spontaneous diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : S607, 1999.
- 77) **Miyamoto K, Khosrof S, Bursell S-E, Rohan R, Murata T, Clermont AC, et al** : Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10836—10841, 1999.
-