

## 加齢黄斑変性のインドシアニングリーン蛍光眼底造影所見と 摘出脈絡膜新生血管膜における血管内皮増殖因子の発現

浅山 展也, 島田 宏之, 湯沢美都子

日本大学医学部附属駿河台病院眼科

### 要 約

**目 的**：加齢黄斑変性による脈絡膜新生血管膜のインドシアニングリーン蛍光眼底造影(IA)所見と血管内皮増殖因子(VEGF)の発現との相関の有無を検討した。

**対象と方法**：新生血管膜摘出術の適応となった加齢黄斑変性による脈絡膜新生血管膜 15 例を対象とした。IA の 4 型分類(I 型は造影早期, 後期にも過蛍光を示す。II 型は造影早期にのみ過蛍光を示す, III 型は造影後期にのみ過蛍光を示す, IV 型は造影早期, 後期ともに過蛍光を示さない)に基づいて術前の IA を分類し, 摘出組織の病理組織学的所見と免疫染色による VEGF の発現を比較検討した。

**結 果**：VEGF の発現は I, II, III 型で強く, 血管内皮細胞, 間質の線維芽細胞様の細胞にあった。一方, IV 型における発現は弱かった。

**結 論**：IA 所見と VEGF の発現には相関があり, IV 型の活動性は他の型と比べ低いと考えた。(日眼会誌 104 : 390—395, 2000)

**キーワード**：加齢黄斑変性, 脈絡膜新生血管膜, インドシアニングリーン蛍光眼底造影, 血管内皮増殖因子, 免疫組織化学

## Correlation of Indocyanine Green Angiography Findings and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Surgically Excised Age-related Macular Degeneration-related Choroidal Neovascular Membranes

Nobuya Asayama, Hiroyuki Shimada and Mitsuko Yuzawa

Department of Ophthalmology, Surugadai Hospital of Nihon University

### Abstract

**Purpose** : We investigated the relationship between clinical classification by indocyanine green angiography (IA) and pathologic findings including the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes.

**Subject and Methods** : The subjects were 15 patients with age-related macular degeneration who underwent surgical excision for choroidal neovascular membrane. The patients were classified into 4 types : Type I, hyperfluorescence in both early and late phases (n=7) ; Type II, hyperfluorescence in the early phase only (n=2) ; Type III, hyperfluorescence in the late phase only (n=3) ; and Type IV, no hyperfluorescence in any phase (n=3). The excised choroidal neovascular membranes were fixed and stained

by hematoxylin-eosin and azan. They were also examined by immunohistochemical staining for VEGF.

**Results** : VEGF was expressed markedly in vascular endothelial cells and fibroblast-like cells of interstitial tissue of Types I, II and III. Its expression was weak in Type IV.

**Conclusion** : Clinical classification by IA for age-related macular degeneration is consistent with the pathologic findings including the expression of VEGF.

(J Jpn Ophthalmol Soc 104 : 390—395, 2000)

**Key words** : Age-related macular degeneration, Choroidal neovascular membrane, Indocyanine green angiography, Vascular endothelial growth factor, Immunohistochemistry

別刷請求先 : 101-8309 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13 浅山 展也

(平成 11 年 9 月 9 日受付, 平成 11 年 12 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to : Nobuya Asayama, M.D. Department of Ophthalmology, Surugadai Hospital of Nihon University, 1-8-13 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8309, Japan

(Received September 9, 1999 and accepted in revised form December 27, 1999)

## I 緒 言

加齢黄斑変性の病態には不明な点が多い<sup>1)</sup>が、インドシアニングリーン蛍光眼底造影(indocyanine green angiography: 以下, IA)と、フルオレセイン蛍光眼底造影(fluorescein angiography: 以下, FA)は加齢黄斑変性の臨床的病態の検討に有用<sup>2)</sup>な検査である。近年、脈絡膜新生血管膜摘出術により得られた組織の病理所見と術前の IA 所見を比較検討した報告<sup>3)~5)</sup>から、IA による臨床的病態と病理学的検索結果との相関が明らかになってきており、IA で低蛍光を示す新生血管の活動性は比較的低いと考えられている。しかし、血管新生は本症の中心的病態に大きな役割を果たしているが、強力な血管新生作用を有する血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: 以下, VEGF)の発現と IA 所見との関連については十分に検討されていない。

VEGF は 1983 年に強い血管透過性亢進作用をもつ血管透過性因子(vascular permeability factor: 以下, VPF)として発見され<sup>6)</sup>、血管新生のすべての過程に関与することから、血管新生促進因子として最も重要な因子であると考えられている。

今回、我々は新生血管膜の活動性を示す指標として VEGF の発現に注目し、IA 所見との関連について病理組

織学的所見との比較検討を行った。

## II 方 法

加齢黄斑変性で脈絡膜新生血管膜が中心窩下に発育し、脈絡膜新生血管膜摘出術の対象となった 15 例 15 眼の摘出組織を対象とした。術前に FA と IA を行い造影所見を記録した。いずれの症例も FA では造影早期に新生血管網が存在すると考えられる過蛍光、造影後期には旺盛な色素の漏出のある典型的な造影所見を示した。IA はインドシアニンググリーン(ジアグノグリーン<sup>®</sup>, 第一製薬)を蛍光色素として、25 mg を注射用蒸留水 1 ml に溶解し、静注後、赤外蛍光ビデオ眼底造影装置(TRC-501 A, トプコン)または、走査レーザー検眼鏡(ローデンス トック)を用いて撮影した。造影写真を鮮明にするために IMAGEnet<sup>®</sup> (トプコン)を用いて画像処理を行った。得られた IA 所見を当教室で用いている 4 型<sup>3)</sup>に分類した。その内訳は、I 型(造影早期、後期にも過蛍光を示す)が 7 眼、II 型(造影早期にのみ過蛍光を示す)が 2 眼、III 型(造影後期にのみ過蛍光を示す)が 3 眼、IV 型(造影早期、後期ともに過蛍光を示さない)が 3 眼である。

脈絡膜新生血管膜摘出術の術式は<sup>7)</sup>pars plana に 3 port を作製し、後極部の硝子体を切除するとともに、後部硝子体剥離の生じていない症例ではグリザード針で人

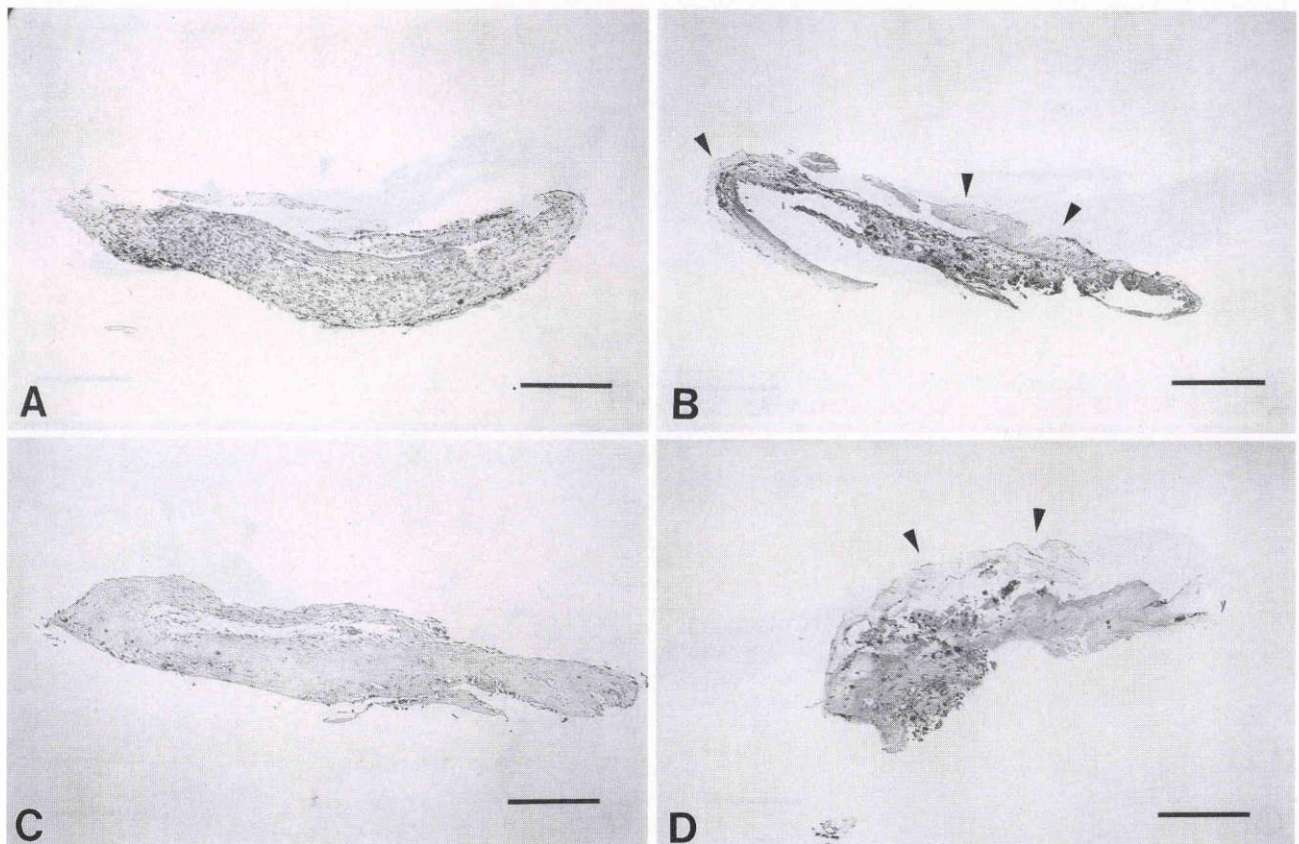


図1 ヘマトキシリン・エオジン染色光学顕微鏡写真。

A: I 型, B: II 型, C: III 型, D: IV 型の脈絡膜新生血管膜。細胞成分の乏しい組織が II 型と IV 型の新生血管膜周囲にみられる(矢じり)。バーは 300  $\mu$ m

工的に後部硝子体剥離を作製した。次いで、サブプレチナルスパーテルを用いて網膜を小切開し、サブプレチナル鉗子で新生血管膜を把持し、摘出した。摘出組織は直ちに10%ホルマリン・リン酸緩衝液(pH 7.4)で固定し、型どおりにエタノール系列で脱水し、パラフィン包埋した。包埋した組織を4 $\mu$ mに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色、アザン染色、VEGFおよびglial fibrillary acidic protein(以下、GFAP)に対する免疫組織染色を行った。

VEGFに対する免疫組織染色ではポリクローナルVEGF抗体(Santa Cruz Biotechnology, 米国)をリン酸緩衝液(0.01 M, pH 7.2)で50倍希釈し、一次抗体に用いた。反応時間は37 $^{\circ}$ Cで60分間とした。あらかじめ、組織切片に対してクエン酸緩衝液(0.01 M, pH 6.0)中でmicrowave照射(500 W, 5分間, 3回)により抗原性の賦活を行った。酵素抗体法はlabelled streptavidin biotin(LS-AB)法(Histofine<sup>®</sup>, ニチレイ)を用いた。GFAPに対する免疫染色は間接法で行い、GFAP抗体(DAKO)をリン酸緩衝液(0.01 M, pH 7.2)で50倍希釈し、一次抗体として4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。両者とも3,3'-ジアミノベンチン, 4塩酸塩(和光純薬)で発色した。発色操作は、VEGFでは3分、GFAPでは7分とした。また、Mayerのヘマトキシリン液で核染色を行った。免疫染色の陰性対照とし

ては一次抗体反応を削除し、以下は既述の手順に従った。

### III 結 果

#### 1. ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色

病理組織学的にはIA分類の違いにより特徴的な所見が得られた。ヘマトキシリン・エオジン染色光学顕微鏡写真を図1に、アザン染色光学顕微鏡写真を図2に示す。

I型での病理組織像は血管腔が多く、間質に線維芽細胞様の細胞が多くみられ、膠原線維は疎で網目状に広がっていた。

II型の病理組織像はほぼI型と同様の所見を示した。ただし、I型に比べて線維成分は少し密になり、血管膜の周囲にはアザン染色で青染しない、細胞成分の乏しい組織があった。

III型での病理組織像はI型やII型と比較して血管腔が少なく、膠原線維が豊富であった。

IV型での病理組織像はIII型と比較して血管腔が少なく、その周囲は密な膠原線維で構成されていた。II型と同様に血管膜の周囲にはアザン染色で青染しない、細胞成分の乏しい組織があった。この組織はIV型において特に豊富であった。

色素上皮細胞による血管、または、血管膜の囲い込みと

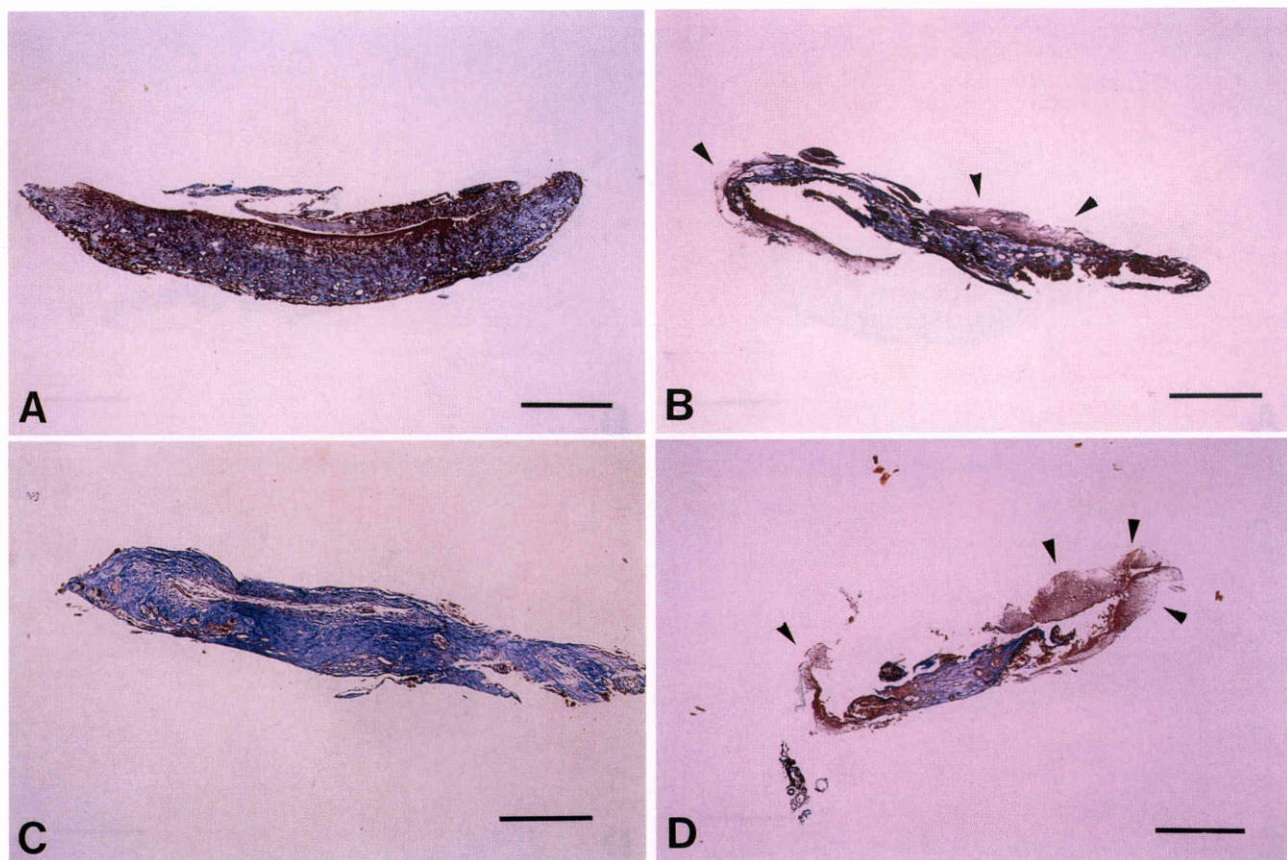


図2 アザン染色光学顕微鏡写真。

A: I型, B: II型, C: III型, D: IV型の脈絡膜新生血管膜。細胞成分の乏しい組織がII型とIV型の新生血管膜周囲にみられる。アザン染色で青染していない(矢じり)。バーは300 $\mu$ m

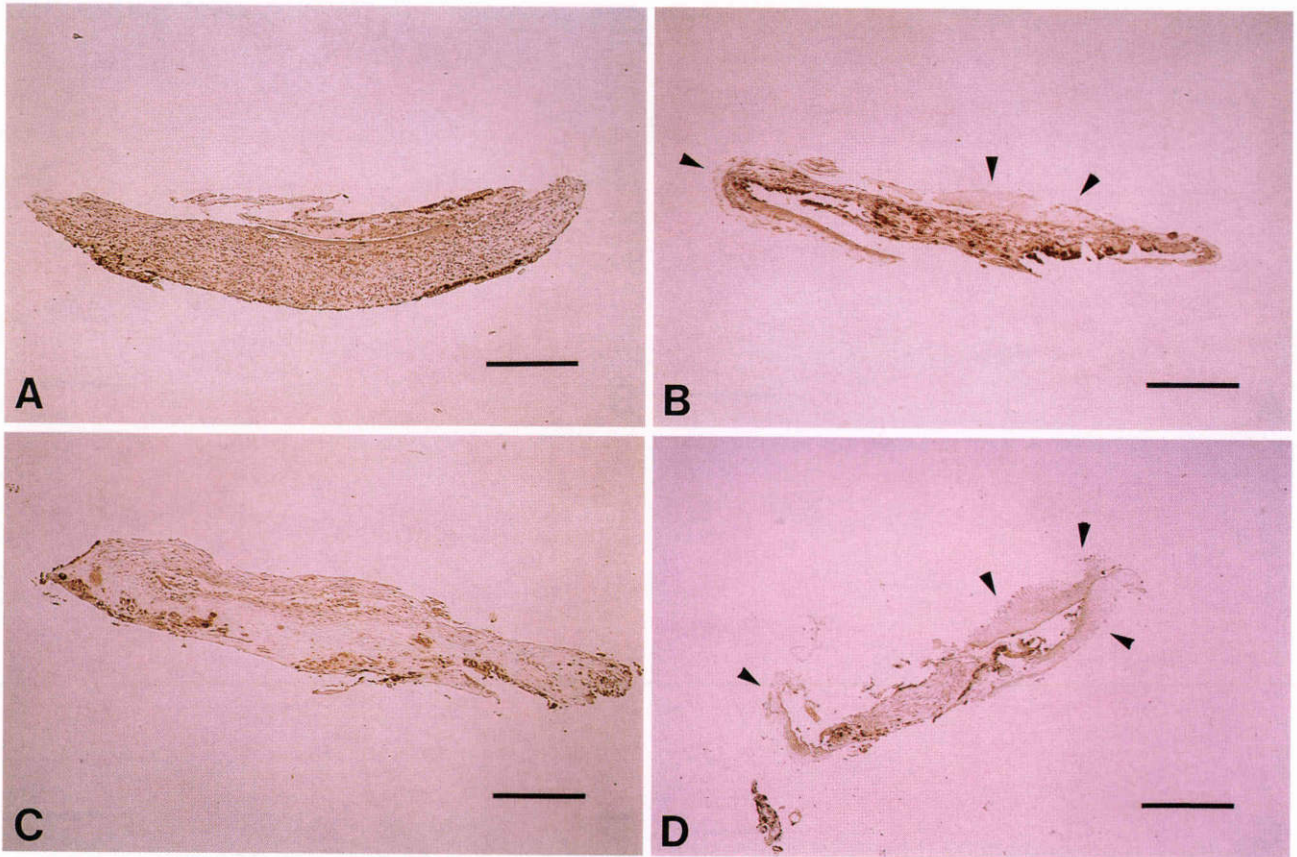


図3 Vascular endothelial growth factor(VEGF)に対する免疫染色光学顕微鏡写真。

A: I型, B: II型, C: III型, D: IV型の脈絡膜新生血管膜. 細胞成分の乏しい組織がII型とIV型の新生血管膜周囲にみられる(矢じり). バーは300 $\mu$ m

考えられる所見についてはI型ではほとんどなかった。一方、他の型では血管周囲に色素をもった細胞があった。特に、IV型では色素を有する細胞が新生血管膜を取り囲むようにみられる例があった。しかし、実際にそれらが色素上皮細胞であるか否か、また、どの程度囲い込みを完成しているのかについては、今回の結果からは明らかにできなかった。

## 2. 免疫組織染色

VEGFに対する免疫組織染色の結果は、I, II, III型では同程度の免疫染色性があった。VEGFは血管内皮細胞、間質の線維芽細胞様の細胞に発現していた。IV型ではVEGFの発現があったが、他の型に比べ染色性が弱かった。特に、血管内皮細胞におけるVEGFの発現がほとんどない部分があった(図3, 4)。

GFAPに対する免疫組織染色では、15例のうちIII型の新生血管膜1例のみでGFAP陽性であり、GFAPは感覚網膜側と考えられる組織辺縁の一部にあった(図5)。

免疫染色の陰性対照においては、いずれも特異的陽性染色はなかった。

## IV 考 按

VEGFは非常に強力な血管透過性亢進作用をもつ<sup>6)</sup>。

また、血管新生のすべての過程において促進的に働き、VEGFの発現と新生血管の活動性とは相関するとされている<sup>8)9)</sup>。このことから、VEGFの組織における発現は新生血管膜の組織レベルでの活動性を最もよく反映する指標の一つと考えられる。

今回得られた結果から、I, II, III型は病理組織所見が異なり、細胞数などに差があるが、細胞それぞれでのVEGFの発現には明らかな差がなかったことから、新生血管の活動性についても差はないことを示していると考えられた。一方、IV型におけるVEGFの発現は他のIA病型に比較して低く、新生血管の活動性も低いと考えられた。これまで、加齢黄斑変性の摘出新生血管膜に対し、IA所見とVEGFの発現を比較検討した研究には教室の中島ら<sup>5)</sup>による報告がある。この報告ではVEGFの発現とIA所見との関連は明らかにされていない。しかし、今回の結果ではIA所見とVEGFの発現との間に関連があることが示された。

また、中島ら<sup>3)</sup>は病理組織学的所見について、脈絡膜新生血管膜を今回と同様に4型に分類し、IA所見との関連を検討している。その結果、I型は血管腔が多く、線維成分が少なく、色素上皮細胞の血管膜の囲い込みはほとんどなく、IV型では血管腔が少なく、線維成分が多く、密に

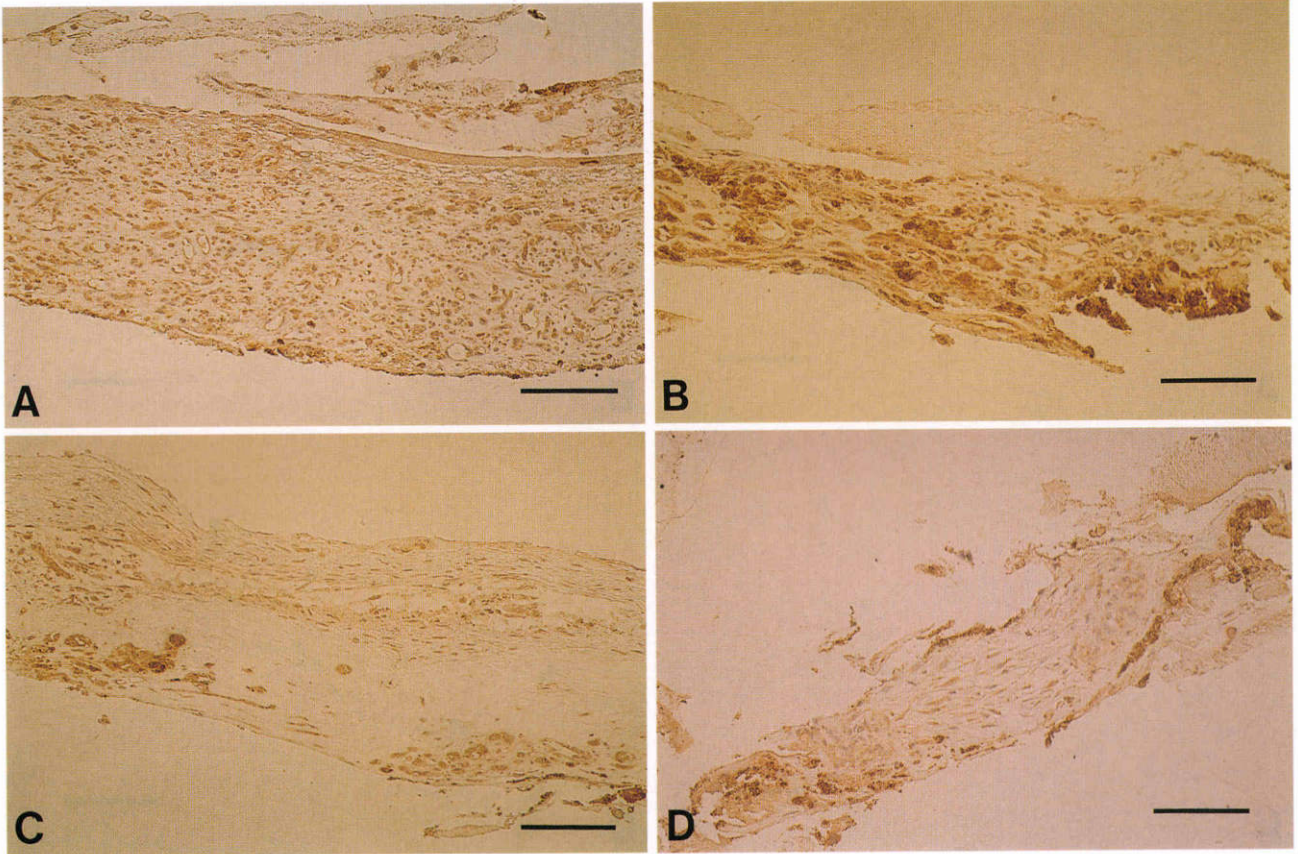


図4 図3の強拡大写真.

A: I型, B: II型, C: III型, D: IV型の脈絡膜新生血管膜. IV型では染色性が他の型に比べて弱い. バーは100  $\mu$ m

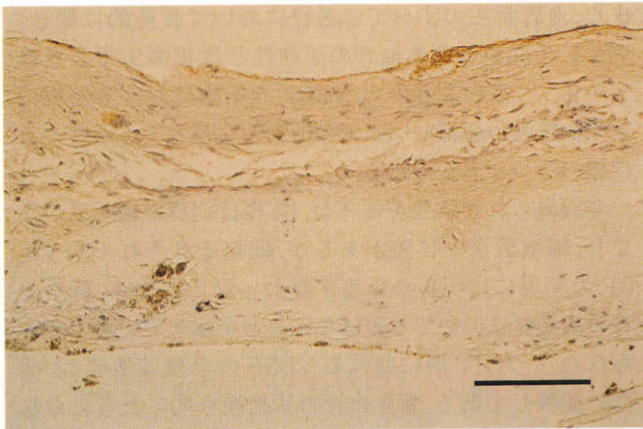


図5 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する免疫染色光学顕微鏡写真.

III型の脈絡膜新生血管膜. 組織辺縁にGFAP陽性. バーは100  $\mu$ m

配列していたと報告している. また, 石川ら<sup>4)</sup>も同様の検討を行い, 初期から過蛍光を示す部位では色素上皮の囲い込みがなく, 血管腔が多く, 後期のみ過蛍光を示す部位では血管腔は小型で, 周囲は線維化が進んでおり, 低蛍光部は血管成分に乏しく, 線維形成が進行していたと報告

している. これらの報告からもIAで過蛍光を示さない新生血管膜, すなわちIV型の活動性が低いことが推察されていたが, IV型においてVEGFの発現が比較的少ないとの今回の結果は, この推察を裏付けるものであった.

病理組織学的所見について, 今回の結果は前述の報告にほぼ一致していた. しかし, 新たな知見として, 癆痕化に近いと考えられた細胞成分の乏しい組織はアザン染色で青染せず, 膠原線維でないことが示された. この組織がグリア細胞に由来するのを確認するためにGFAPに対する免疫組織染色を行ったが, 染色されなかった. こうした構造は特にII, IV型に特徴的であり, IV型で最も多かった. 膠原線維増生による線維化以外に, 今回の検討では同定できなかった組織による蛍光遮断もIAで過蛍光を示さない原因の一つである可能性があり, 今後の課題としてより詳しい検討が必要と思われた.

血中でインドシアニンググリーン色素の98%は血漿蛋白と結合しているため, 血管の透過性に異常がなければ色素漏出を起こさないと考えられるが<sup>2)</sup>, IV型ではVEGFの発現が低いことから, 他の型の組織に比較して血管の透過性も低く, 色素漏出が少ないと考えられた. このことはIAで過蛍光を示さない原因の一つと考えられた.

色素上皮細胞の囲い込みについては、電子顕微鏡レベルでの検討や、酵素抗体法による色素上皮細胞の同定を行う必要がある。今回の検討では色素を有する細胞の血管周囲への侵入などの組織像からの推測にとどまるが、I 型では組織内に色素細胞がほとんどみられないのに対し、他の型ではよくみられた。今回の結果からも、I 型では色素上皮細胞による囲い込みが少ないと考えられた。

今回の検討では、手術適応となった症例を対象としている。そのため、今後の課題として、新生血管膜の IA 所見が実際にどのような臨床経過をとるのかを明らかにするために、手術適応とならない症例も含めて経過を追った検討が必要である。

稿を終えるに当たり、ご指導ご校閲を賜りました日本大学医学部眼科学教室澤 充教授ならびに同病理学教室根本則道教授に深謝いたします。また、標本作製にご配慮いただいた駿河台日大病院病理部の皆様に深謝いたします。

本論文の要旨は第 103 回日本眼科学総会で発表した(1999 年 4 月千葉)。

本研究は厚生省特定疾患網膜脈絡膜視神経萎縮症調査研究班の援助を受けた。記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) 松井瑞夫：老人の黄斑疾患。南山堂，東京，81—87，1997。
- 2) 川村昭之，正田美穂，湯沢美都子，松井瑞夫：ビデオ赤外蛍光眼底造影法の臨床応用，老人性円板状黄斑変性症。臨眼 45：1355—1359，1991。
- 3) 中島正巳，島田宏之，佐藤 節，湯沢美都子：加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管膜におけるインドシアニングリーン蛍光造影所見と病理組織学的所見との比較。日眼会誌 101：584—592，1997。
- 4) 石川克也，鮎沢伸介，鎌田孝一，米谷 新：摘出脈絡膜新生血管の病理組織とインドシアニングリーン蛍光眼底所見の相関。日眼会誌 102：179—188，1998。
- 5) 中島正巳，島田宏之，佐藤 節，湯沢美都子：加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管膜のインドシアニングリーン蛍光造影と免疫組織化学的所見の比較。日眼会誌 103：252—258，1999。
- 6) Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF: Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 50: 1774—1778, 1990.
- 7) 島田宏之：脈絡膜新生血管の手術療法。臨眼 51：1525—1530，1997。
- 8) Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF: Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 114: 1210—1417, 1996.
- 9) 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.