

正常ラット網膜血管内皮細胞の形態計測

鶴谷 知子, 木村 聡, 中沢 満

弘前大学医学部眼科学教室

要 約

目的：正常ラットの網膜血管内皮細胞について、血管径の違いによる形態的な差異を検討した。

対象と方法：雄 Wistar-Kyoto ラットの網膜血管内皮細胞間隙を銀染色し、光学顕微鏡で血管径、内皮細胞の長軸長および短軸長、血管軸に対する細胞の配列角度を計測した。

結果：動脈では血管径増大に伴い内皮細胞は血管の長軸方向に延長するが、静脈では形態が一定である傾向がみられた。また、内皮細胞の配列角度は血管長軸に平

行であり、動脈において特にその傾向が強かった。

結論：主幹細動脈では高いずり応力により内皮細胞は細長く歪められるが、血管径の減少とともにずり応力の低下が生じていると推測された。一方、細静脈では細胞の形態変化がほとんどみられず、その結果、常に定常流に近い状態であることが推定された。(日眼会誌 105 : 682—686, 2001)

キーワード：内皮細胞, 形態学, ずり応力, 微小循環

Morphometric Analysis of Retinal Vascular Endothelial Cells in Rats

Tomoko Tsuruya, Satoru Kimura and Mitsuru Nakazawa

Department of Ophthalmology, Hirosaki University

Abstract

Introduction : In the present study, we observed the transformation of endothelial cells in the retinal vessel of normal rats and examined the relationship between morphometrical parameters and vessel calibers.

Materials and Methods : Retinal vessels of male Wistar-Kyoto rats were stained with an en face silver staining method and the vessel caliber, the axis of the cell oriented parallel to the longitudinal axis and to the transverse plane of the vessel, and the deviation angle of endothelial cells against the vessel axis were measured under a light microscope.

Results : As the vessel caliber increased, endothelial cells showed a tendency to extend along the longitudinal axis in the arterioles, but endothelial

cells remained unchanged in the venules. The deviation angle of endothelial cells was nearly parallel to the vessel axis especially in the arterioles.

Conclusions : Change in shape of endothelial cells in the retinal arterioles suggested a high shear stress in the large arterioles, and lower shear stress in the smaller arterioles with its decrease of caliber. In the venules, however, the cell shape was unchanged, and this suggests that the blood flow is fairly steady. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 682—686, 2001)

Key words : Endothelial cells, Morphology, Shear stress, Microcirculation

I 緒 言

血管内皮細胞は血管最内腔を被覆する扁平な一層の細胞である。内皮細胞は単に血管の内張りをしているだけでなく、種々の化学因子、例えば血管拡張因子(endothelium driven relaxing factors, EDRF)¹⁾、収縮因子(endothelium driven contractile factors, EDCF²⁾、エンドセリン³⁾、血小板の粘着防止作用のプロスタサイ

クリン(PGI₂)⁴⁾、さらに、血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)⁵⁾、毛細血管拡張作用のヒスタミン⁶⁾や線維素溶解作用の組織プラスミノゲン・アクチベータ(tPA)⁷⁾などの放出により循環の調節に深く関わっていることが明らかにされている。その一方で、血流自体も物理的に内皮細胞に作用し、その形態と機能を変化させることが知られている。Levesqueら⁸⁾はイヌ大動脈を用い、実験的狭窄部におけるずり応力の変化と

別刷請求先：036-8562 弘前市在府町5 弘前大学医学部眼科学教室 鶴谷 知子
(平成12年6月8日受付, 平成13年4月9日改訂受理)

Reprint requests to: Tomoko Tsuruya, M. D. Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036-8562, Japan

(Received June 8, 2000 and accepted in revised form April 9, 2001)

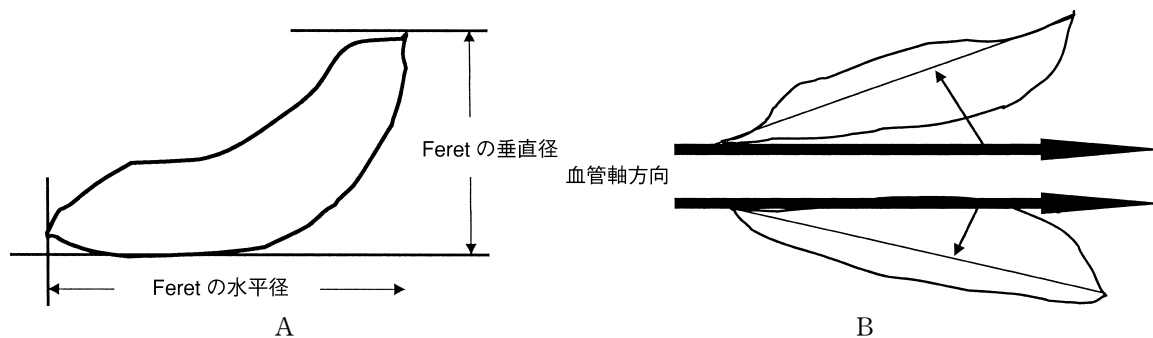


図 1 測定値の定義。

A：Ferret の水平径は血流に対して平行な方向での内皮細胞径の最大値を示し、Ferret の垂直径は Ferret の水平径に対して垂直な方向での径の最大値を示す。

B：配列角度は血管軸方向と細胞長軸方向の成す角度が反時計回りの場合を+、時計回りの場合を-で示した。

内皮細胞形態を分析している。それによると、最も高張り応力を呈する狭窄部では内皮細胞は血管軸方向に細長く引き伸ばされ、狭窄部直後の低張り応力領域では細胞の形態が血管軸方向の長さが減少し、丸みを帯びていたとされている。このように、血流と内皮細胞機能の関係性を明らかにすることは血管新生や血管修復、さらに、動脈硬化などの血管病変の発生機序を理解するうえで大切であると考えられる。にもかかわらず、内皮細胞の微小循環系における形態や機能に関しては未だ十分に解明されていない。また、微小血行動態については Gaetgens ら⁹⁾によるネコ腸間膜の血流速度や Zweifach ら^{10)~12)}によるネコ腸間膜血圧測定などの報告があるが、張り応力に関する定量的なデータは未だほとんど得られていない。しかし、もし大血管の *in vitro* で得られた理論に従って微小循環系の内皮細胞形態も変化していくとすれば、網膜血管の内皮細胞でも非常に微妙な差ではあるが部位による形態の違いが生じているはずである。そこで、正常ラット網膜血管の内皮細胞について、細動脈から細静脈まで様々な血管の種類、部位を対象に形態計測的検討を行った。

II 実験方法

1. 硝酸銀法による内皮細胞間隙の染色

Zand ら¹³⁾の方法に準拠し、網膜血管の組織染色を行った。材料として生後 28~42 週の雄 Wistar-Kyoto ラット 16 匹(体重 350~400 g)の 32 眼を用いた。これらのラットは、エーテル麻酔後、尾静脈からヘパリン硫酸 (NOVO 社製)1,000 単位を静注し開胸した。次いで、上行大動脈から 1% ニトロプルシッド (SIGMA 社製) 添加生理食塩水を 10 分間灌流(灌流圧 100~120 mmHg)し、さらに、2% グルタルアルデヒドを 10 分間、5% グルコースを 2 分間、0.5% 硝酸銀を 3 分間灌流した後、眼球摘出した。摘出眼球は、2% グルタルアルデヒドで 1 時間浸漬固定した後、角膜水晶体を除去し網膜を強膜から剝離した。この遊離網膜の周辺部に 4~5 か所の

減張切開を加えた後、スライドガラスに伸展し、光学顕微鏡 (OLYMPUS 社製, AH-2) で血管を中心に写真を撮影した。

2. 形態計測

撮影した写真をコンピュータ画像に取り込み、内皮細胞の以下に述べる 4 つの形態学的パラメータを計測した (図 1 A, B)。

1) 血管径

2) Ferret の水平径¹⁴⁾：内皮細胞投射像における血管軸に対して平行な方向の最大値。

3) Ferret の垂直径¹⁴⁾：内皮細胞投射像における Ferret の水平径に対して垂直な方向の最大値。

4) 配列角度：血管軸に対する内皮細胞配列の偏位角度を測定し、反時計回りの偏位角度を+、時計回りの偏位角度を-で表示した。

なお、血管径の計測に当たっては、管腔両側における内皮細胞基底側間を測定した。また、個々の細胞計測では、直進部分の血管の中央付近に位置するもののみを選択し、分岐部の前後 100 μm 以内に位置するものは除外した。

なお、血管の管周方向への湾曲による Ferret の垂直径の縮小を補正するために、

Feret の補正垂直径 = 血管径 \times arcsin (Ferret の垂直径 / 血管径)

を算出した。また、形態学的パラメータ Ferret の水平径、Ferret の補正垂直径、内皮細胞列角度のそれぞれの測定値はすべて平均値 \pm 標準偏差で表し、動静脈の分散間の有意差の検定には F 検定を用い、危険率 1% 以下を有意とした。さらに、血管径と Ferret の水平径、血管径と Ferret の補正垂直径についての相関係数の検定を、動脈と静脈でそれぞれ行い、危険率 1% 以下を有意とした。

III 結果

計測した内皮細胞の数は動脈で 148、静脈で 127 で、

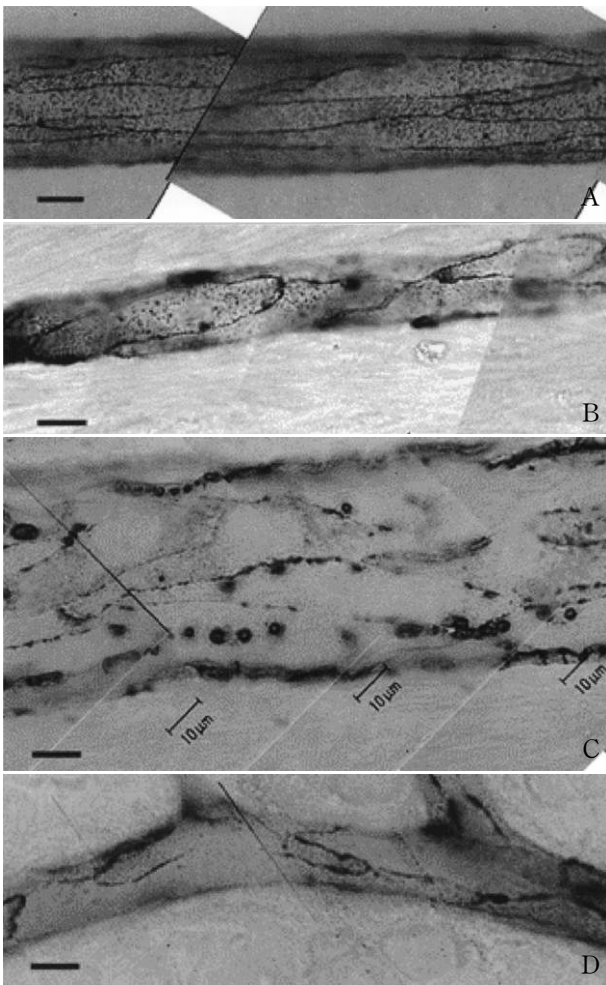


図 2 網膜血管内皮細胞の銀染色標本写真。

- A : 主幹細動脈内皮細胞の銀染色写真。バーは 10 μm
 B : 末梢細動脈内皮細胞の銀染色写真。バーは 10 μm
 C : 主幹細静脈内皮細胞の銀染色写真。バーは 10 μm
 D : 末梢細静脈内皮細胞の銀染色写真。バーは 10 μm

管径はそれぞれ 8.5~49.7, 15.2~72.1 μm であった。染色された内皮細胞形態は、動脈では個々の細胞が血管軸方向に引き伸ばされた状態で一定方向に配列し、静脈では比較的丸みを帯びた細胞が敷石状を呈し、動脈と比較して不規則に配列していた(図 2 A~C)。Ferret の水平径は、動脈では平均 93 μm 、静脈では平均 90 μm であった。また、動静脈間の分散に有意差があり(F 検定, $p < 0.01$)、動脈においてばらつきが大きかった(表 1)。動脈では血管径が小さいほど Ferret の水平径が減少し、血管径との間に正相関があり($r = 0.73$, $H_0 \neq 0$, $p < 0.01$)、静脈では Ferret の水平径に一定の傾向がなかった(図 3)。Ferret の補正垂直径は平均 9.8 μm 、静脈で平均 15 μm であった。両者の分散に有意差はなく(F 検定, $p = 0.72$) (表 1)、動脈と静脈ではともに血管径と Ferret の補正垂直径の間に有意な相関はなかった($r = 0.14$, $H_0 \neq 0$, $p < 0.01$) (図 4)。内皮細胞配列角度は、動脈では平均 1.2°, 静脈では平均 -0.4° であった。両者

表 1 細動静脈内皮細胞の測定値

	93 \pm 31	9.8 \pm 2.3	1.2 \pm 4.3
動脈	93 \pm 31	9.8 \pm 2.3	1.2 \pm 4.3
静脈	90 \pm 15	15 \pm 2.4	-0.4 \pm 6.6
F-test	<0.01	0.72	<0.01

Feret の水平径(μm), Ferret の補正垂直径(μm), 配列角度(°)
 平均値 \pm 標準偏差

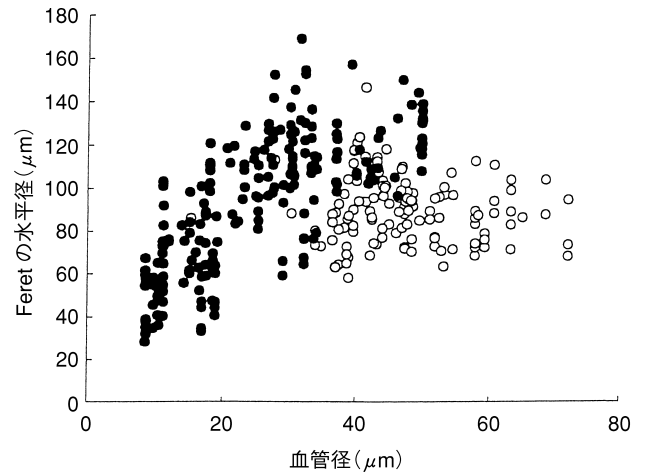


図 3 血管径と Ferret の水平径の相関関係。

● : 動脈($r = 0.73$), ○ : 静脈($r = -0.08$)。

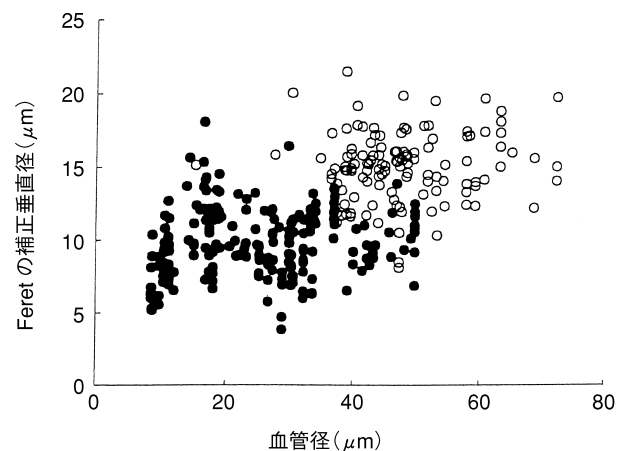


図 4 血管径と Ferret の補正垂直径の相関関係。

● : 動脈($r = 0.14$), ○ : 静脈($r = 0.11$)。

の分散に有意差があり(F 検定, $p < 0.01$)、静脈においてばらつきが大きかった(表 1)。

IV 考 按

1. 微小循環血行動態

微小循環の血流速度や血圧に関しては過去に報告があり, Gaetgens ら⁹⁾はネコ腸間膜の微小血管における血流速度を実測し, 直径 60 μm の細動脈の 30 mm/s を最高として, 直径 23 μm 以下で急激に減少し, 毛細血管では 1 mm/s 程度の定常流であるとしている。Riva ら¹⁵⁾

はレーザードップラ血流計を用い、ヒト網膜においても血管径の減少に伴う血流速度、血流量の減少を示している。また、Zweifach ら¹⁰⁻¹²⁾、Wiederhielm ら¹⁶⁾¹⁷⁾はネコの腸間膜を用いた実験で微小血管における平均血圧を測定し、細動脈における圧力降下が毛細血管、細静脈と比較して顕著であると報告している。このように、細動脈では血管径の減少とともに血流速度と血圧の急激な低下があり、その結果、血流に直接接する内皮細胞にも物理的な作用を惹き起こしている可能性がある。

2. ずり応力

ずり応力は血液粘度と血流速度勾配によって決定され、内皮細胞の形態を血流方向に歪ませる物理的要因となっている。生理的状态で内皮細胞が受けるずり応力の大きさは、大血管の動脈で 10~20 dyne/cm²、末梢の動脈で 20~40 dyne/cm²、静脈で 1.5~6 dyne/cm² であるといわれている¹⁸⁾。また、微小循環では Lipowsky ら¹⁹⁾がずり応力の理論値を計算している。それによると、細動脈は血管径 45 μ m では 75 dyne/cm²、23 μ m では 88 dyne/cm² で、血管径 7 μ m の毛細血管では 39.6 dyne/cm² であり、細静脈では血管径 17 μ m では 13.1 dyne/cm²、54 μ m では 23.3 dyne/cm² であったと報告している。以上の事実が網膜血管でもみられると仮定すると、細動脈の方が細静脈より高ずり応力下にあり、細動脈では毛細血管レベルで急激なずり応力の低下が起こることが推測される。

3. 内皮細胞の形態的变化

内皮細胞は加わったずり応力の大きさや方向を忠実に反映し、形態を変化させることが知られている。大血管内皮細胞の形態は、Isogai ら¹⁴⁾がラット大腿動脈と上胃静脈について検討している。それによると、動脈の内皮細胞は細長い紡錘形を呈し一定方向に規則正しく配列しているが、静脈では細胞形態がおしなべて丸みを帯び、細胞面積の増加もみられ、動脈と静脈における細胞形態の差異が明示されている。培養内皮細胞を用いた実験では、類円形を呈し敷き石状配列を示す細胞が、装置内で流れを負荷することにより長軸を血管軸と平行に配列を変えることが報告^{20)~22)}されている。Levesque ら⁸⁾はイヌ大動脈に実験的狭窄部を作製し、また、小林ら²³⁾はウサギ腹大動脈に約 60% の狭窄を作ることにより、血流によるずり応力を変化させ内皮細胞の形態変化を分析している。それによると、最大狭窄部での血流が層流性で高いずり応力下にあることを反映して、内皮細胞は血流方向に一致して細長い形態をとり、最大狭窄部を通過後は流れのよどみが生じてずり応力が低下するため、これと対応するように内皮細胞の形態も丸みを帯びることが示されている。以上の事実を参考にすると、網膜血管でも部位によりずり応力の違いを反映して内皮細胞の形態が変化していることが予想される。

4. 網膜血管内皮細胞の形態

ラット網膜血管内皮細胞の形態について、幸地ら²⁴⁾は走査電子顕微鏡を用いて詳細に報告している。それによると、細動脈では大きさが 50 μ m 以上 \times 2~5 μ m、細静脈では約 50 \times 10 μ m の大きさで、どちらも血管の長軸方向に細長い菱形を呈していたとされる。しかし、この方法ではアルコール脱水により細胞変形を来すなどの試料に与える影響が危惧されるという欠点があった。今回、正常ラット網膜血管について動静脈の内皮細胞形態と配列方向について検討した。個々の細胞間隙を明確にするために、網膜血管に 0.5% 硝酸銀溶液を灌流したが、この方法は以前から大血管や、毛細血管における内皮細胞の形態を観察するために用いられており、微小循環全体の観察にはほとんど用いられていない。今回、我々は Zand ら¹³⁾の方法に従いグルタル固定を用いた。この方法であると細胞の固定はほとんど瞬間的に起こると考えられるため、内皮細胞がグルタル固定により形態変化を受けないことを仮定して、今回得られた結果から細動静脈のそれぞれの血管について特徴を述べると、網膜血管の動脈系内皮細胞は血管軸方向に細長く伸ばされるような形態をとり、血管径の減少とともに細胞形態は丸みを帯びていたことがわかった。一方、静脈系では部位による形態変化がなく、動脈より幅広い紡錘形を呈していた。配列角度については、動静脈ともに血管軸にほぼ平行に配列しており、動脈の方がより一定方向に規則正しく配列していた。このように、網膜間血管の動脈と静脈で内皮細胞形態や配列に違いが生じるのはなぜであろうか。先に引用した大血管などの研究からも、内皮細胞に働き形態を変化させる因子としてずり応力が最も有力と考えられよう。

すなわち、内皮細胞が主幹の網膜血管細動脈でも高いずり応力によって血管軸方向に細長く歪められているとしても不自然ではない。一方、より小型の細動脈では血管径の減少とともに血流速度⁹⁾¹⁵⁾と血管内圧^{10)~12)16)17)}が急速に低下し、ずり応力の低下が生じているために細胞が丸みを帯び不定多角形となるものと思われる。しかし、細静脈では細胞の形態変化がほとんどみられず、その結果、常に定常流に近い状態であることが推察された。

Feret の水平径を計測した今回の研究では、細動脈では Feret の水平径にばらつきが大きく、これは細動脈径の変化に伴ってずり応力に勾配ができるために、それに相関して内皮細胞水平径に変化を生じたと考えられる。一方、細静脈では比較的定常流に近いために内皮細胞水平径もさほどばらつきを示さなかったものと考えられる。ただ、今回の方法では観察領域を限定していないため、網膜自体の厚さや血管走行の差異による測定誤差を含んでいる可能性も否定できず、今後の課題として残された。

今回の研究では正常ラットにおいての検討であるが、

網膜循環異常を来す疾患での内皮細胞形態でも同様な検討をして、その差異をみることにより病態の理解に役立つ可能性もあると考えられる。

本論文の要旨は第 104 回日本眼科学会総会で報告した。

文 献

- 1) **Runaby GM, Romero JC, Vanhoutte PM** : Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250 : 1145—1149, 1986.
- 2) **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi H, Mitsui Y, et al** : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 : 411—415, 1988.
- 3) **Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, et al** : Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161 : 859—864, 1989.
- 4) **Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL** : Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 22 : 1477—1479, 1985.
- 5) 佐藤 敬, 高松 滋, 水野成徳, **Prescott SM** : 培養内皮細胞による platelet-activating factor の産生. 田中建蔵, 他(編) : 細胞増殖と動脈硬化. 共立出版, 東京, 89—101, 1981.
- 6) **Rosen LA, Hollis TM, Sharma MG** : Alterations in bovine endothelial histidine decarboxylase activity following exposure to shearing stresses. *Exp Mol Pathol* 20 : 329—343, 1974.
- 7) **Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV** : Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 243 : 1483—1485, 1989.
- 8) **Levesque MJ, Liepsh D, Moravec S, Nerem RM** : Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis* 6 : 220—229, 1986.
- 9) **Gaetgens P, Meiselman HJ, Wayland H** : Erythrocyte flow velocities in mesenteric microvessels of the cat. *Microvas Res* 2 : 151—162, 1970.
- 10) **Zweifach BW** : Quantitative studies of microcirculatory structure and function. I. Analysis of pressure distribution in the terminal vascular bed in cat mesentery. *Circ Res* 34 : 843—857, 1974.
- 11) **Zweifach BW** : Quantitative studies of microcirculatory structure and function. II. Direct measurement of capillary pressure in splanchnic mesenteric vessels. *Circ Res* 34 : 858—866, 1974.
- 12) **Zweifach BW, Lipowsky HH** : Quantitative studies of microcirculatory structure and function. III. Microvascular hemodynamics of cat mesentery and rabbit omentum. *Circ Res* 41 : 380—390, 1977.
- 13) **Zand T, Underwood JM, Nunnari JJ, Majno G, Joris I** : Endothelium and “Silver Lines”. *Virchows Arch Pathol Anat* 395 : 133—144, 1982.
- 14) **Isogai N, Hashizume K, Uegaito K, Kamiishi H** : The observation of endothelial cells in vein-grafts by the en face silver staining method. *Microsurgery* 12 : 96—100, 1991.
- 15) **Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, Petrig BL** : Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : 1124—1132, 1985.
- 16) **Wiederhielm CA, Woodbury JW, Kirk S, Rushmer RF** : Pulsatile pressures in the microcirculation of frog's mesentery. *Am J Physiol* 207 : 173—176, 1964.
- 17) **Wiederhielm CA, Weston BV** : Microvascular, lymphatic and tissue pressures in the unanesthetized mammal. *Am J Physiol* 225 : 992—996, 1973.
- 18) **Ando J, Kamiya A** : Blood flow and vascular endothelial cell function. *Front Med Biol Eng* 5 : 245—264, 1993.
- 19) **Lipowsky HH, Zweifach BW** : Methods for the simultaneous measurement of pressure differentials and flow in single unbranched vessels of the microcirculation for rheological studies. *Microvas Res* 14 : 345—361, 1977.
- 20) **Dewey CF** : The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103 : 177—184, 1981.
- 21) **Eskin SG** : Response of cultured endothelial cells to steady flow. *Microvasc Res* 28 : 87—94, 1984.
- 22) **Levesque MJ, Nerem RM** : The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng* 107 : 341—347, 1985.
- 23) 小林正洋, 多田祐輔, 岡野光志, 舒 強, 吉田洋二 : 局所血流の変化による動脈内皮細胞の形態的, 機械的変化—第一報— : 脈管学 36 : 117—127, 1996.
- 24) 幸地賢治, 吉本弘志 : 網膜血管内面微細構造の観察法. *眼紀* 29 : 1720—1734, 1978.