

ゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本による

ラットおよび家兎網膜血管の観察(図14, 表2)

三上 規・松橋 英昭・一戸 敏 (弘前大学)
吉本 弘志・松山 秀一Observation of Rat and Rabbit Retinal Vasculature
Using Intravenously Injected Gelatin-Fluorescein
Preparation TechniqueTadashi Mikami, Hideaki Matsuhashi, Satoshi Ichinohe,
Hiroshi Yoshimoto and Shuichi Matsuyama

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

要 約

ラットおよび家兎に対しゼラチン加フルオレスセインナトリウム溶液を静注し固定網膜伸展標本を作製し蛍光顕微鏡にて観察した結果、ラット、家兎ともに蛍光眼底写真に比しより鮮明な蛍光血管樹像が得られた。特にラットにおいては、毛細血管を含めた完全な蛍光血管樹像を得ることができ、蛍光顕微鏡の焦点を移動させることにより顕微鏡レベルでの三次元的な血管構築の観察が可能であり血管内腔の微細な形態まで観察が可能であった。また、この方法で観察し終わった後、同一組織をあらためて通常の脱水、包埋、染色を行い光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察したが観察に支障を来す様な障害は認められず、観察部位の同定も容易であった。今回我々の行なった一連の実験手技は実験動物の網膜血管の研究に応用性のある実験手技と思われる。(日眼 91: 353—359, 1987)

キーワード：ゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本、蛍光顕微鏡、網膜血管構築、ラット網膜血管

Abstract

In this paper, a new technique applicable to a serial observation of the gross and fine structure of the retinal vasculature and its application in the study of retinal circulation disturbance in rat and rabbit were described. Wistar-Kyoto rats and pigmented strain rabbits were used. Ophthalmoscopy and fundus photography were carried out, as a rule, prior to the histologic study with anesthesia. The eyes were enucleated 3~7 min after a one-shot intravenous injection of 5ml/kg body weight of an 8:2 mixture of 10% gelatin and 10% fluorescein sodium, under ether inhalation anesthesia. The eyeballs were fixed in 2% glutaraldehyde for 3 min, bisected and refixed in 2% glutaraldehyde for 60 min. Then flat gelatin-fluorescein preparations (FGFP) of the retina was mounted on a holder. FGFP was once observed fluorescence-microscopically using a vertical illuminator (BH2-RFK; Olympus, Tokyo), then postfixed in 2% O_3O_4 , embedded in epoxy resin (Epok 812), and then thin-and ultrathin-sectioned to serve for light and electron microscopy. On fluorescence microscopy of FGFPs, retinal vessels were observed as a fine vascular tree of fluorescence in both rats and rabbits. The 3 dimensional structure of the retinal vasculature was more clearly observed in the rat than in the rabbit. At the side arm

別刷請求先：〒036 弘前市在府町5 弘前大学医学部眼科学教室 三上 規

Reprint requests to: Tadashi Mikami, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Hirosaki Univ. 5 Zaifucho, Hirosaki 036, Japan

(昭和61年11月10日受付) (Accepted November 10, 1986.)

branchings of arterioles, less fluorescence was found at the root of the branching. This finding is probably caused by the valve structure at the branching which has been previously reported. No leakage of dye was found on FGFP observation. Light and electron microscopic observation of the same portions revealed neither pathological nor mechanical alteration in the vascular walls. These results suggest that this technique of FGFP is useful for the study of retinal circulation and its disorder in small animals. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 353—359, 1987)

Key words: Flat gelatin-fluorescein preparation, Fluorescence microscopy, Angio-architecture of retinal vessel, Rat retinal vessel

I 緒言

網膜における血管構築の研究は、蛍光眼底撮影法による生体観察を含め、色素注入法^{1)~3)}、樹脂注入による鋳型標本⁴⁾⁵⁾やトリプシン消化標本^{6)~8)}などを用いて行われている。しかし、蛍光眼底撮影法を除く従来の方法では一旦標本を作製してしまえば数多い形態学的な他の手法（組織学的、微細構造学的手技）による同一標本の観察が不可能になってしまう。他方、実験小動物の蛍光眼底撮影は、その動物の種類によっては眼光学的機構上の問題により、良好な解像力が得られず、それに加え純系動物の多くは白色であることから脈絡膜が透見されるため、ヒトの場合ほど明瞭な画像を得ることが困難な場合も少なくない。そこで我々は、同一の実験対象をカラー眼底写真および、蛍光眼底撮影による生体観察の後、詳細な実体顕微鏡レベルでの血管構築や血管機能異常の観察を行い得、さらに準超薄および超薄切片による微細構造の観察が可能な一連の実験手技を開発したので報告する。

II 実験材料および方法

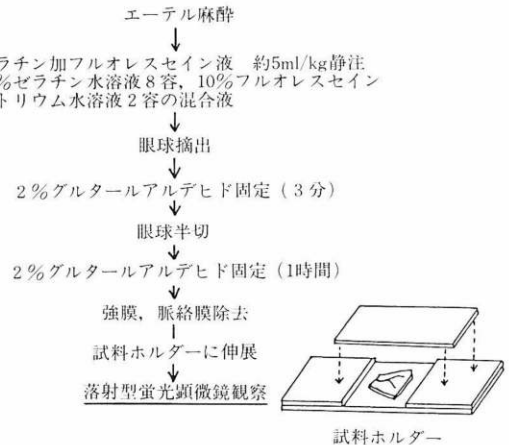
1) 実験材料

体重250g~300gのウイスター京都系ラットおよび体重約3,000gの雑種有色家兎を用いた。

2) 実験方法 (表1, 2)

予めエーテル麻酔下で眼底写真および蛍光眼底写真を撮影し、翌日エーテル麻酔下で10%フルオレスセインナトリウム溶液2容、10%ゼラチン水溶液8容の混合液5ml/kgをone-shotで静注した(ラットは尾静脈より、家兎は耳静脈より)。直ちに眼球を摘出し、2%グルタルアルデヒドにて約3分間浸漬固定した。次いで、その眼球を二分割し、杯状の後部半分をさらに約1時間2%グルタルアルデヒドにて浸漬固定を行った後、強膜ならびに脈絡膜を除去し、網膜のみとし表1に示した試料ホルダー上に伸展し、なるべく速

表1 実験方法1



やかに励起フィルター410nm (BV 励起フィルター)、吸収フィルター530nm (BV 吸収フィルター)を装着した落射型蛍光顕微鏡(オリンパス BH2-RFK)にて観察した。なお、写真撮影には全自動顕微鏡写真撮影装置(オリンパス PM-10ADS)を用いフィルムはFuji-ASA400とした(表1)。

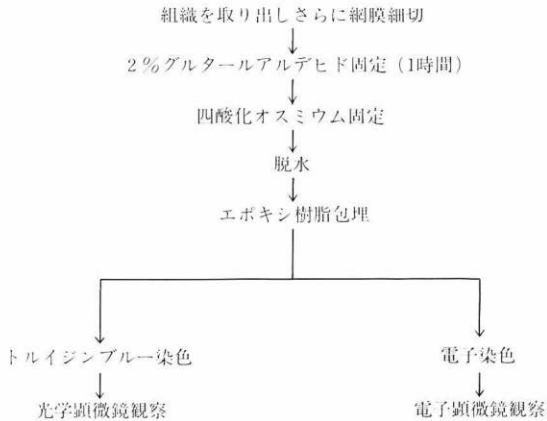
次いで、この様にして観察記録を終了した組織片を試料ホルダーより取り出し、2%グルタルアルデヒドにて再固定後、オスミウム酸にて固定しアルコール系列にて脱水し、プロピレンオキシドに浸漬し、エポキシ樹脂に包埋した。準超薄切片は、トルイジンブルー染色し蛍光顕微鏡写真の計測値をもとにして部位の同定をしつつ光学顕微鏡にて連続切片として観察した。さらに、超薄切片を作製しウラン、鉛で電子染色し透過型電子顕微鏡にて観察した(表2)。

III 結果

1) ラットにおける観察

予め行ったラットの眼底および蛍光眼底写真撮影の結果が図1, 2である。蛍光眼底撮影においては尾静脈

表2 実験方法2



より蛍光色素注入後約1秒でまず脈絡膜が充盈され始め、ほとんど同時に網膜動脈相が出現し、それから約2秒後には毛細血管相から静脈相へと移行する像が観察された(図2)。しかし、その後は脈絡膜が完全に充盈されてしまい鮮明かつ充分なコントラストでの網膜血管充盈像は得られなかった。

一方、図3は図1, 2に示したラットのゼラチン加フルオレスセイン静注・網膜伸展標本の所見を示したものであるが、網膜血管は毛細血管を含めて、鮮明な血管樹として観察された。さらに高倍率で観察すると、血管樹は焦点の深さによって全く異なった像を呈した。図4, 5, 6は、それぞれ焦点を表層から深層に移動させることにより得られた同一部位の所見である。まず、表層には主幹細動静脈と共に表層の毛細血管網が観察され(図4)、そのわずかに深層には点状に見える垂直走行の毛細血管のみが観察された(図5)、さらにわずかに深層には、もう一層の水平に分布する毛細血管網が観察された(図6)。また、眼底写真および蛍光眼底写真にて動脈と確認された血管(図7矢印A)を高倍率で観察すると細動脈側枝分岐部には必ず蛍光色素の途切れが認められた(図8矢印)。しかし、同レベルの集合細静脈流入部(分岐部)にはこの様な所見はまったく認められなかった(図9矢印)。そこで、この細動脈における蛍光色素の途切れを前述の写真計測値をもとにして検索した結果が図10Aである。即ち、図7の細動脈等径分岐部矢印Bから細動脈側枝分岐部矢印Aの間の距離は約670 μ mであり、まず細動脈等径分岐部の部位を確認後(図10B)、正確に1 μ mの連続準超薄切片を作成しつつ40 μ m毎にトルイジンプルー染色にて観察し、予定の部位に達した準超薄切片像が図10

Aである。標本は軽いトルイジンプルー難染色性を示したが光学顕微鏡観察に支障を来す様な人工的障害は認められず、図10Aにおいて血管内壁の動脈血管腔内への突出構造が認められた(矢印)。さらに、図7矢印Cの部位を同一の手法で確認しつつ超薄切片を作成し電子染色を施し電子顕微鏡にて観察したものが図11である。図に明らかな如く血管の形態は正常に保たれており、色素注入により生じたと思われる組織学的障害は認められなかった。

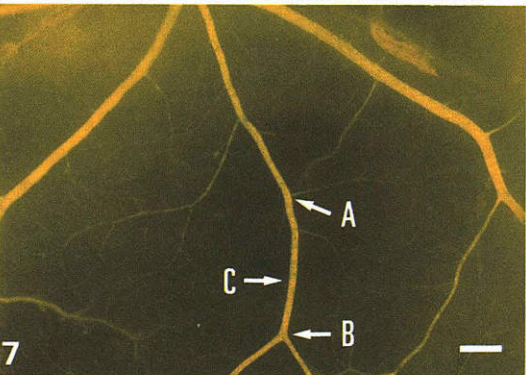
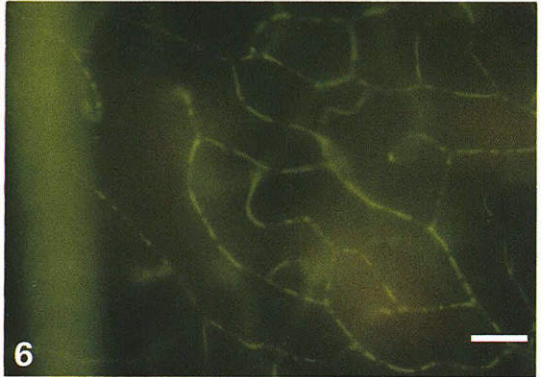
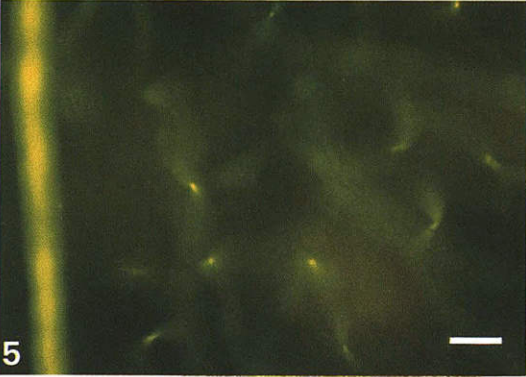
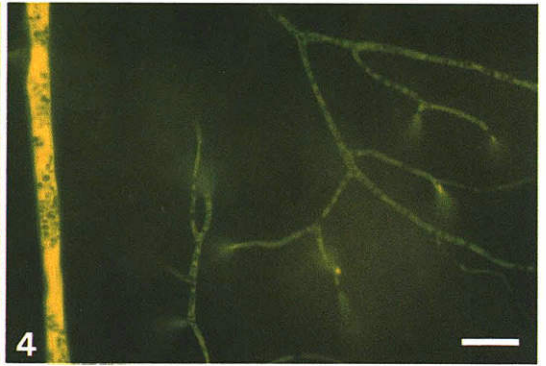
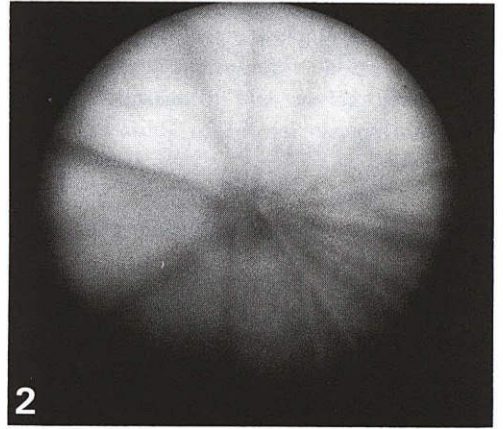
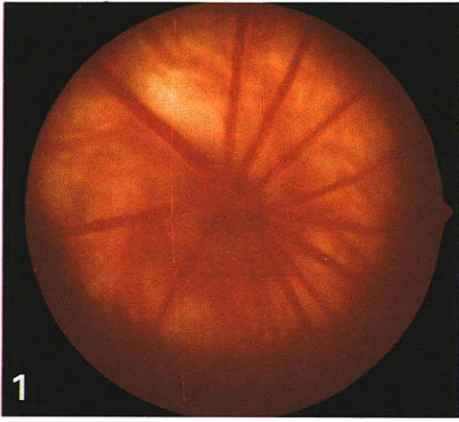
2) 家兎における観察

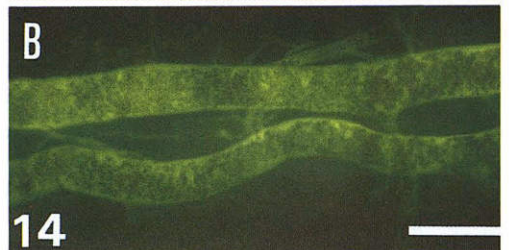
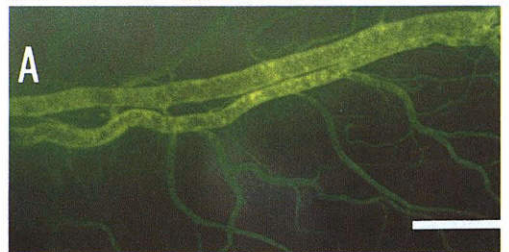
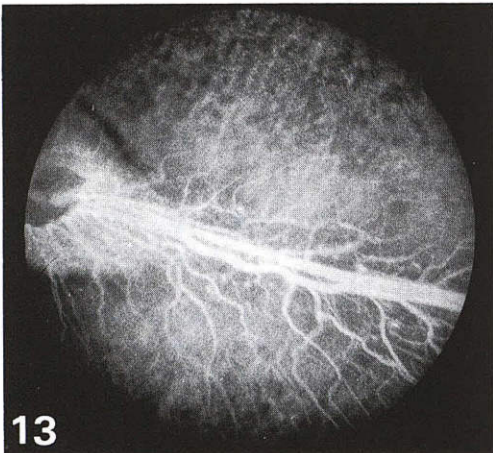
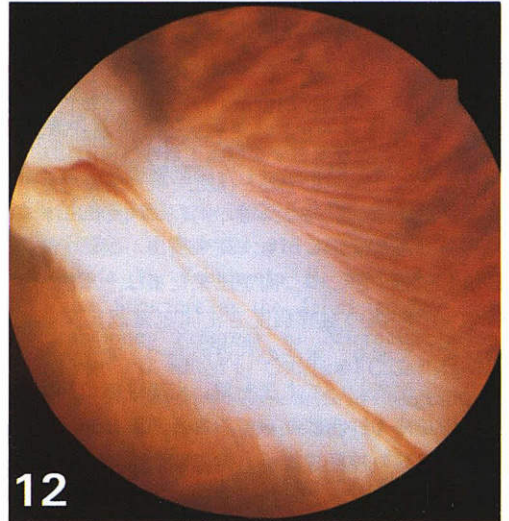
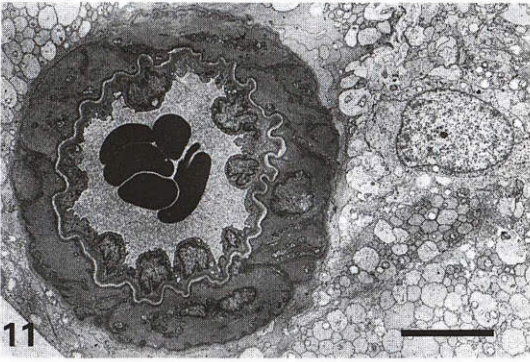
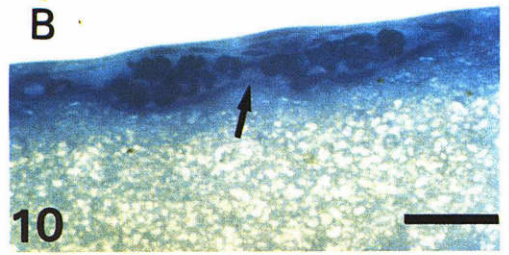
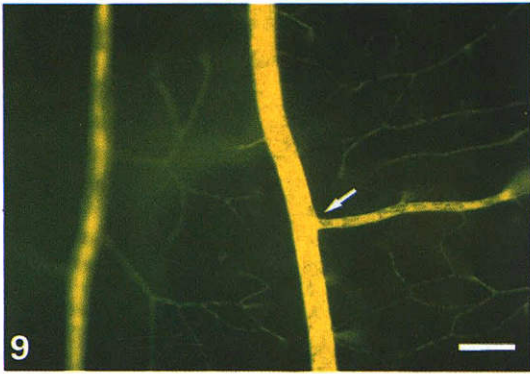
図12, 13は家兎の眼底写真と蛍光眼底写真である。図示した如く家兎の蛍光眼底においては耳一網膜時間はラットにおける尾一網膜時間よりは2~3秒遅れ、かなり鮮明な充盈像が得られた。この家兎の同一眼を本法で観察すると図14Aの如くラットの場合と同様に蛍光眼底写真よりもさらに鮮明な血管樹の蛍光像が得られた。しかし、図14Bの如く高倍率で観察すると像が少しく不鮮明となり毛細血管も含めた完全な蛍光血管樹像を得ることはできなかった。

IV 考 按

ラットの蛍光眼底撮影において血管が充盈される時間は極めて短く、充盈期の撮影にはかなりの熟練を要する事は周知であろう。さらに、ラットの蛍光眼底は循環時間や眼光学的な問題により画像が不鮮明なことは前述したごとくである。そのため、後の組織学的所見との精密な対比が困難である事は従来指摘されていたとおりである⁹⁾¹⁰⁾。

一方、フルオレスセインナトリウムが水に良く溶けるのは周知のごとくである。そのため、ただフルオレスセインナトリウム溶液のみ注入し網膜伸展標本として蛍光顕微鏡で観察したのでは蛍光色素が拡散し、観察や記録が困難となる。一方、この難点を凍結乾燥法を用いて解決した報告は数多くあり^{11)~16)}、確かに鮮明な蛍光血管充盈像が得られている¹⁵⁾。しかしながら、この様な方法では同一組織の蛍光血管樹所見と通常の光学顕微鏡、電子顕微鏡観察所見とを一致させることは、やはり不可能になってしまう。そこで、今回我々の実験では、高分子蛋白であるゼラチンと蛍光色素の混合液を注入し、組織をグルタルアルデヒドに浸漬することでゼラチンを凝固せしめ血管内に蛍光色素を閉じ込められることを期待した。その結果、以前の報告¹⁵⁾同様鮮明な蛍光血管充盈像が得られ、さらに、同一組織のその後の光学顕微鏡、電子顕微鏡観察も充分可能で





あった。

また、網膜血管樹の詳細に関しては、インク注入¹⁾²⁾、墨汁注入³⁾などの色素注入法、樹脂注入法⁴⁾⁵⁾やトリプシン消化法^{6)~8)}などにより多く報告されており、網膜毛細血管には実験動物の種および部位によって数が異なる網膜面と平行な数層の血管網と、それを連絡する垂直方向の血管よりなることが既に明らかにされている。今回我々が行った実験においては前項で述べた如く同一部位に二層の毛細血管網が確認され、それらを連絡する垂直方向の血管が点状に観察された。この結果からしても本法は、血管樹標本作成においてもかなりの信頼度を有するものであるとする事が出来よう。ラットで表層の毛細血管網は内網状層から神経節細胞層にかけて存在し、深層の毛細血管網は外網状層に存在することは、既に明らかにされている¹⁷⁾。

さらに、ラットの網膜細動脈側枝分岐部下流側に血管内腔への突出構造すなわち弁状構造が存在することは、既に当教室の幸地、Murata らによって報告されている^{18)~21)}。Murata が arteriolar valve (細動脈弁)と称した²¹⁾この構造が今回示した細動脈側枝分岐部における蛍光の途切れである事は、後の組織学的結果からも明らかであろう。しかも、従来検出が困難であった本構造を今回予測しつつ同定出来た事は、本法を用いれば数 μm 間隔の血管病変さえ同定確認出来る可能性を示唆しており、本法の利点の一つと考えられる。

なお、家兎において本法を用いて高倍率で観察すると像が少しく不鮮明になってしまう原因は、家兎の網膜神経線維層の神経線維が有髄神経である為と思われるが、蛍光眼底写真より数段鮮明な蛍光血管樹像が得られた事は、家兎においても本法が有用である事を示す結果と考えられる。

以上まとめると、

- 1) ラット、家兎ともに鮮明な血管蛍光充盈を得た。
- 2) ラットにおいては、蛍光顕微鏡の焦点を移動させることにより顕微鏡レベルでの三次元的な血管構築の観察が可能であり血管内腔の微細な形態までも観察可能であった。
- 3) 蛍光顕微鏡で観察し終わった後の同一標本の光学顕微鏡、および電子顕微鏡観察の結果は充分使用に堪えうるものであり、かつ観察部位の同定も容易であった。従って、この方法は小動物における蛍光眼底写真と組織学的所見との対比検討に有用であり、網膜血管の研究に応用性のある実験手技であると思われる。

なお、本論文の要旨は第90回日本眼科学会総会にて発表した。

図の説明

- 図1 ウイスター京都系ラットの眼底写真。
- 図2 図1のラットの蛍光眼底写真(蛍光色素注入約2秒後)。
- 図3 図1, 2の同一ラット同一眼のゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本の蛍光顕微鏡所見(低倍率)であるが毛細血管も含めた鮮明な血管樹像が得られた。Bar: 200 μm
- 図4 網膜表層には主幹細動脈と毛細血管網が観察される(高倍率)。Bar: 50 μm
- 図5 図4と同倍率同一部位で蛍光顕微鏡の焦点をやや深層に合わせると点状の蛍光色素が観察される。Bar: 50 μm
- 図6 図4, 5と同倍率同一部位で蛍光顕微鏡の焦点を図5よりもさらに深層に合わせると、もう一層の毛細血管網が観察される。Bar: 50 μm
- 図7 矢印の血管は、眼底及び蛍光眼底写真にて動脈であることが確認されている。矢印A(細動脈側枝分岐部)と矢印B(細動脈等径分岐部)の距離はこの写真より計測し約670 μm であった。Bar: 200 μm
- 図8 図7の矢印Aの部位の高倍率所見であるが、矢印の如く細動脈側枝分岐部に蛍光色素の途切れが観察される。Bar: 50 μm
- 図9 図8の細動脈側枝分岐部と同レベルの集合細動脈流入部矢印には図8のような蛍光色素の途切れはまったく認められない。Bar: 50 μm
- 図10A 図7矢印A、即ち図8矢印の部位(側枝分岐部)の準超薄切片観察(トルイジンブルー染色)では、血管腔内への突出構造が認められる(矢印)。Bar: 50 μm
- 図10B 図7矢印Bの部位(等径分岐部)の準超薄切片観察(トルイジンブルー染色)では図10矢印のような血管腔内への突出構造は認められない(矢印)。Bar: 50 μm
- 図11 図7矢印Cの部位を電子顕微鏡で観察したが、血管の構造は正常に保たれており色素注入による組織学的障害は認められない。Bar: 10 μm
- 図12 有色家兎の眼底写真。
- 図13 図12の家兎の蛍光眼底写真(蛍光色素注入約10秒後)。
- 図14A 図12, 13の同一家兎同一眼のゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本の蛍光顕微鏡所見(低倍率)であるがラット同様鮮明な血管充盈像が得られた。Bar: 500 μm
- 図14B 図15で観察された血管を高倍率で観察すると像が少しく不鮮明となりラットと異なり毛細血管も含めた完全な蛍光血管樹像を得ることは出来ない。Bar: 200 μm

文 献

- 1) **Michaelson IC, Steedman HF**: Injection of the retinal vascular system in enucleated eyes. *Brit J Ophthalmol* 33: 376—379, 1949.
- 2) **Henkind P**: New observation on the radial peripapillary capillaries. *Invest Ophthalmol* 103—108, 1967.
- 3) **Michaelson IC**: *Retinal Circulation in Man and Animals*. Springfield, Ill, Charles C Thomas Publisher, Illinois, 74—105, 1954.
- 4) **氏家 和宣**: 網膜血管の三次元的構築. *日眼* 80: 634—643, 1976.
- 5) **Simizu K, Ujii K**: Structure of Ocular Vessels. Igaku-shoin, Tokyo, 8—49, 1978.
- 6) **Kuwabara T, Cogan DG**: Studies of retinal vascular patterns. Part I. Normal architecture. *Arch Ophthalmol* 64: 904—911, 1960.
- 7) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal vascular patterns. Part II. Human retinal vessels studied in three dimensions. *Arch Ophthalmol* 65: 575—587, 1961.
- 8) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal vascular patterns. Part III. Age, hypertension, absolute glaucoma, injury. *Arch Ophthalmol* 65: 708—716, 1961.
- 9) **高橋茂樹**: Stroke-Prone SHR の眼底所見. *眼紀* 29: 1950—1958, 1978.
- 10) **高橋茂樹**: Stroke-Prone SHR 網膜血管の微細構造. *眼紀* 30: 1652—1666, 1979.
- 11) **Baurmann H**: Grundlagen der Fluoreszenzangiographie des Augenhintergrundes. *Adv Ophthal* 24: 204—263, 1971.
- 12) **Grayson MC, Laties AM**: Ocular localization of sodium fluorescein: Effects administration in rabbit and monkey. *Arch Ophthalmol* 85: 600—609, 1971.
- 13) **Mizuno K, Sasaki K, Otsuki K**: Histochemical identification of fluorescein in ocular tissue. *Proceed. ISFA Tokyo 1972*, Igaku-shoin, 221—225, 1974.
- 14) **水野勝義**: 蛍光造影法の組織化学的研究. (2)フルオレスセイン組織化学より見た網膜の透過性. *眼紀* 23: 372—378, 1972.
- 15) **佐々木一之, 大槻 潔, 水野勝義**: 正常および病的網膜における Fluorescein Sodium の組織化学. *日眼* 76: 1089—1102, 1972.
- 16) **Baurmann H, Sasaki K, Chioralia G**: Investigation on laser coagulated rat eyes by fluorescence angiography and microscopy. *Albrecht Graefes Arch Klin Exp Ophthal* 193: 245—252, 1975.
- 17) **吉本弘志**: Freeze-fracture 法によるラット網膜血管の微細構造. *眼紀* 28: 1540—1545, 1977.
- 18) **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—1725, 1978.
- 19) **幸地賢治, 吉本弘志**: 高血圧自然発症ラット (SHR) における網膜血管内皮障害の3次元的研究. *眼紀*, 30: 1638—1651, 1979.
- 20) **村田幹夫, 幸地賢治, 吉本弘志**: 動脈側枝分岐部の弁状構造. *脈管学* 22: 91—101, 1982.
- 21) **Murata M, Yoshimoto H, Matsuyama S**: Valve Structure at the Arteriolar Side-Arm Branching. *Progress in Microcirculation Research II*. edited by Courtice FC Garlick DG Perry MA, Sydney: Committee in Postgraduate Medical Education, University of NSW, 145—149, 1984.

(第90回日眼総会原著)