

網膜血管閉塞症の新しいモデル

—蛍光光化学血栓を利用した網膜血管閉塞法について—(図16)

一戸 敏・三上 規
松橋 英昭・吉本 弘志 (弘前大学医学部眼科学教室)Experimental retinal vascular obstruction
—photochemical thrombosis produced by intravascular fluorescein
sodium and laser irradiation—Satoshi Ichinohe, Tadashi Mikami, Hideaki Matsuhashi
and Hiroshi Yoshimoto

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

要 約

1. ウイスター京都系ラットにフルオレスセインナトリウムを静注しつつ、眼内へ微弱なアルゴンレーザー光線を照射することにより、網膜および脈絡膜血管を任意の部位で閉塞せしめることができた。2. この閉塞は組織学的に内皮細胞の損傷による典型的な壁在血栓によるものであった。レーザー照射による組織損傷は検眼鏡的にも組織学的にも軽微であった。3. しかしながら、この血管閉塞は検眼鏡的には照射後2～3日でほとんど消失していた。4. 組織学的にも血管の修復機転は照射後4日目にはほぼ完成しており、7日目にはおおむね終了していた。以上のことより、本実験方法は血管閉塞実験の一方法として十分利用されうるものと考えられた。また、単純な部分的壁在血栓のみでは一時的な血管閉塞症は作成できるもののやがて再開通を示すことから、ラットにおいては完全な血管閉塞症は他の要因、例えば局所線溶の異常、あるいは広範に及ぶ血管の性状変化などが伴わなければ発症しないものであろうことが推測された。(日眼 91:670-682, 1987)

キーワード：実験的網膜血管閉塞症, 光化学血栓, フルオレスセインナトリウム, アルゴンレーザー照射, ラット網膜血管

Abstract

Vascular obstruction was experimentally produced in the rat retina according to the method of Sato and Ohshima (1984) and the results were studied by light and electron microscopy. The animals used were 10 Wistar-Kyoto strain rats. They were anesthetized by ether inhalation and the pupils were dilated. Then an argon laser beam (intensity: 0.03Watt, duration 0.05sec, spot size: 200~250 μ m in diameter) was delivered 2 to 4 times to the retinal and choroidal vasculature under transvenous infusion of 0.3ml of fluorescein sodium. Narrowing and abrupton of blood columns was confirmed by ophthalmoscopy and light microscopy of a gelatin-fluorescein flat preparation of retina immediately after laser photoradiation, and the changes disappeared within several days. Electron microscopically, the endothelial cells of irradiated vessel were pale and swollen immediately after photoradiation. One hour later, retinal vessels were occluded by intramural and intraluminal thrombi which composed of fibrin, aggregated platelets and vacuolized red blood cells. Vascular endothelial cells showed severe injury. One to two days after irradiation, in most cases, no thrombus was found while vacuolar

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 一戸 敏

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

(昭和62年2月2日受付) (Accepted February 2, 1987)

changes in the perivascular retina and loss of basal infolding of the retinal pigment epithelial cells were observed. On the 4th and 7th day, the endothelial lesion was repaired and the inner surface of thrombosed vessel was covered with continuous endothelial cells, though a small amount of fibrin was observed in the lumen in some cases. Vascular damage was more severe in the choroid than in the retina. The present study revealed that minimum-doses laser photoradiation induced retinal and choroidal vascular obstruction in rats, and that, therefore, this method is thought to be useful to study vasacular occlusion not only in the retina but also in the choroid. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 670—682, 1987)

Key words: Experimental thrombosis of retinal vessels, Photochemical thrombus, Fluorescein sodium, Argon laser irradiation, Rat retinal vessels

I 緒 言

網膜血管閉塞症に関しては従来より実験病理学的にも様々な方法^{1)~4)}で検討がなされている。しかし、それらのいずれもが血管外側からの物理的作用或いは結紮などにより管腔を閉塞せしめたものであり、その結果得られる血管閉塞は、生体における血栓性の閉塞とは明らかに異なった病態を示すものと考えられる⁵⁾。即ち、網膜血管の任意の場所に局所的な血栓を作製する方法はいまだ確立されてはいないと言えよう。一方、ラットの腸間膜血管を用いた実験では蛍光物質と微弱励起光線によって生じた内皮障害に由来する蛍光光化学血栓によりその任意の部位を管腔側から閉塞させる

手技が報告されている^{6)~9)}。

そこで我々はこの光化学血栓法を応用してラット網膜血管の任意の場所に血栓を作成し、血管閉塞症を発症せしめるという新しい実験を試み、さらに励起光線照射部の組織学的検討を行ったので報告する。

II 実験動物および方法

実験には月齢9カ月のウイスター京都系ラット(WKY)10匹を用いた。方法は図1の如くであり、エーテル麻酔下にラット尾静脈より10%フルオレスセインナトリウム0.3mlを注入しながらアルゴンレーザー光線を極めて微弱な照射条件(照射野直径200~250 μ m, 照射時間0.05sec, 出力30mW)にて目的の網膜細動脈

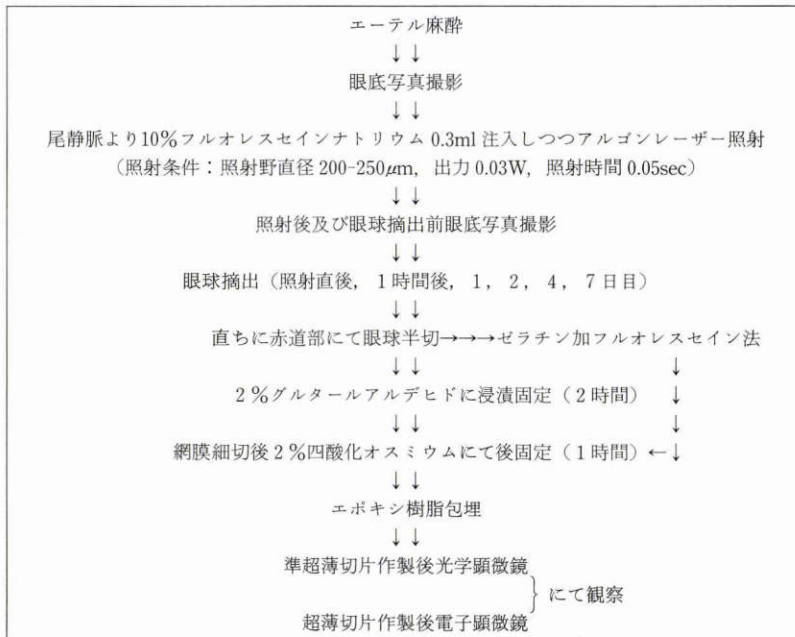


図1 実験方法

及び細静脈に軽度の血柱狭小が認められるまで、数回にわたり照射した。なお照射、観察には特殊なレンズを使用する必要はなく、平板硝子にスコピゾルを滴下し、それをラット眼球に当てがうだけで充分であった。なお対照実験としては、10匹のWKYに対しフルオレスセインは静注せず、出力を300mWに上げたレーザー照射のみで網膜血管に血柱の途絶が見られるまでの凝固を行った。

組織学的検索は眼底変化を記録しつつ、照射直後、1時間後、1日、2日、4日、及び7日目までの眼球を摘出し、通常の方法にて固定処理後光学及び電子顕微鏡を用いて観察を行なった。なお一部のものに関してはゼラチン加フルオレスセイン法⁹⁾も用いて観察した。

III 結 果

1. 検眼鏡的所見

今回の実験例では、2～3回のレーザー照射にて図2-aの如く明らかな血柱の狭小(→)が得られ、次いで速やかな血流の停止が得られた。しかし、照射後2日目頃には図2-bの如くほとんどの例で照射前の状

態に戻っていた。図2-cは照射回数を20回行った例であり、照射直後の血流途絶も図2-aの例に比しより高度となっているが、このような例でも照射7日目には図2-bの如くほぼ正常に復していた。一方、これらの照射ラットにおいて血管周囲の網膜には照射直後においても検眼鏡的にはほとんど何の変化も認められなかった。なお、図2-dにはレーザー光線のみを用い血管閉塞を生じせしめたラット眼底を示した。血柱の途絶は30回以上の照射で得られ、フルオレスセイン静注群に比較すると血管のみならず周囲の組織破壊も高度であった。

2. 組織学的所見

1) 照射直後

この時期の照射部近位における光顕所見では、同部位に存在する細動脈、静脈の如何を問わず著しく膨化した内皮細胞が認められるのみで血栓は見られなかった。なお周囲の網膜はほとんど障害されておらず、血管周囲における極めて軽度の空胞変性、軽微な内外顆粒層の配列の乱れと内顆粒層の核濃染、およびその直下の外節のやはり軽度の乱れを認めるのみであった(図3)。電顕で観察すると図4の如くで、照射された

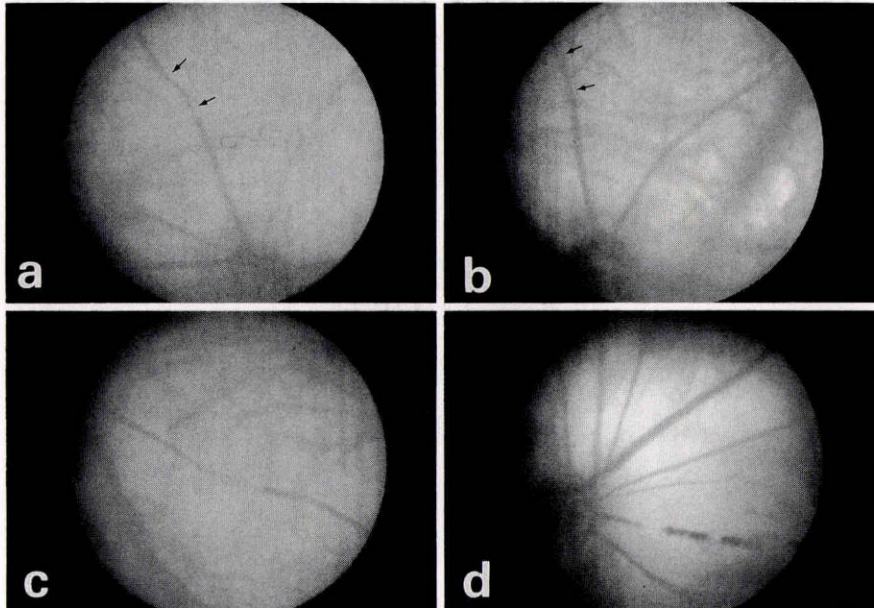


図2 aは3回の照射で血管の狭小をみた例の照射直後のもので静脈の狭小が認められる(→)。bは照射後2日目のもので血管の狭小はほとんど消失している(→)。cは照射回数の多かった例(約20回)で、照射直後の血流途絶もaに比しより高度である。dはレーザー光線照射のみで血管を閉塞させた例で血管のみならず周囲組織の破壊が顕著である。

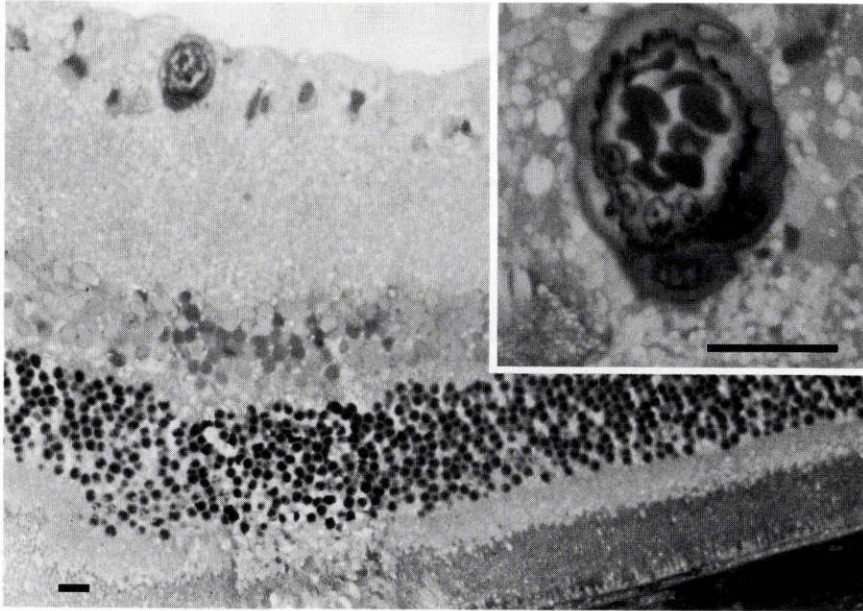


図3 照射直後の網膜細動脈。照射部よりやや離れた部位の細動脈を示しており、著しく膨化した内皮細胞が認められるものの周囲組織はほとんど障害されておらず、軽度の外節の乱れを認めるのみである。

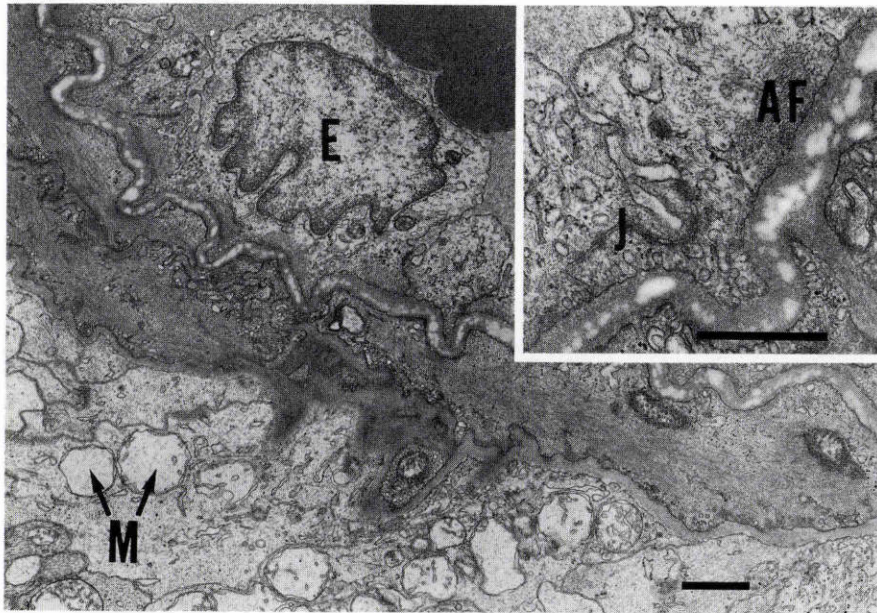


図4 照射直後の網膜細動脈。内皮細胞(E)は膨化し各細胞質はpaleであるが、中膜平滑筋層は軽度の収縮を示すものの全く intact である。血管周囲にはグリア細胞内のミトコンドリア(M)に膨化も認められるが神経線維層は正常である。高倍で観察すると挿入図の如くやはり細胞質はpaleであるが、内皮細胞の基底側のアクチンフィラメント集合部(AF)はなお正常を保っている。また細胞間結合(intercellular junction)(J)も正常所見を示している。

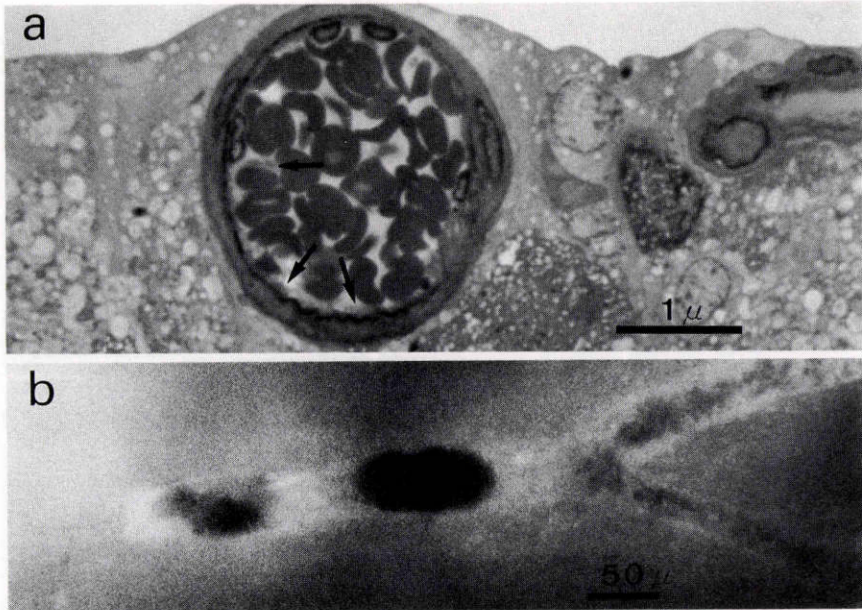


図5 照射1時間後の網膜細動脈, aの光顕所見では照射部血管に典型的な壁在性の血栓(→)が認められるが, 周囲の網膜は軽度の空胞変性を認めるのみである. bは同一標本をゼラチン加フルオレスセイン法を用いて観察したもので, 管腔内の血栓形成, さらには血管外への色素漏出が明瞭に認められる.

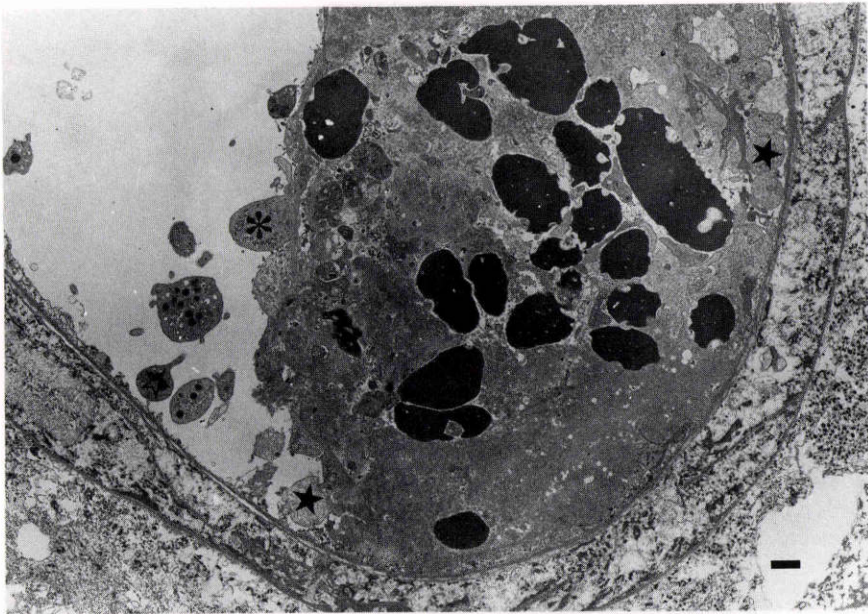


図6 照射1時間後の網膜細動脈, 明らかな壁在性血栓を示す. この部においてのみ内皮のみならず中膜にもかなりの変性を認める. 血栓表面にはなお新鮮な吸着したばかりの血小板(*)が見られる. 一方血栓基底側には完全に放出反応を終えた脱顆粒状の血小板(★)が見られ, さらに血管周囲には偽足突起を有する血小板(☆)も認められる. なおこのような部では, 血管周囲グリア, 血管壁細胞の変性が著明である.

血管の膨化した内皮細胞は細胞質の電子密度が低下し、全て pale cell となっていた。その血管が細動脈である場合、中膜平滑筋層は軽度の収縮を示すものの、ほとんど正常に保たれていた。また血管周囲には glia 内のミトコンドリアに膨化も認められたが、神経線維層は全く正常であった。また同一の標本を高倍で観察すると、内皮細胞の基底側のアクチンフィラメント集合部はなお正常を保っており、細胞間結合 (inter-cellular junction) も正常所見を示していた。

2) 照射1時間後

この時期では照射部に存在する網膜血管腔には、図5-a に示したごとく、典型的な壁在性の血栓が認められた。一方、周囲の網膜には軽度ながら直後例に比して空腔変性がより明らかになっていた。図5-b は同一標本をゼラチン加フルオレスセイン法を用いて観察したもので、管腔内の血栓形成、さらには血管外への色素漏出が明瞭に認められた。次に電顕所見では、図6の如く管腔内に著明な壁在性血栓を認めた血管の内皮はほとんど消失し、中膜平滑筋層にもかなりの変性が認められた。また血栓表面にはなお新鮮な吸着したばかりの血小板が見られ、その周囲には偽足突起を有する血小板も認められた。一方血栓基底側には完全に放出反応を終えた脱顆粒状態の血小板が見られた。なお

このような部位では血管周囲グリア (perivascular glia)、血管壁細胞の変性が著明であった。図7は完全閉塞を起こした網膜細静脈であり、このような部位では血栓の3要素であるフィブリン、血小板、空腔を有する泡立ったような多数の変性赤血球の3者が明瞭に確認できた。また、細動脈における血栓上流部では、内皮の基底側の細胞膜だけが残り細胞質がほとんど消失している部位から、さらに内皮細胞が完全に欠損して基底板が露出している部位までが認められた (図8)。

3) 照射後1日目の網膜細静脈

この時期の照射血管では、血栓がすでに消失している例も見られたが、一部のラットでは管腔内になお血栓が存在しており、血管周囲にはいっそう著明な空腔変性が認められた。

また血栓は脈絡膜血管内にも認められ、その頻度は網膜に比べてより多かった(図9)。一方、血栓が認められなかった例では、内皮細胞の崩壊変性がさらに進んでくるにもかかわらず、正常な形態を示す赤血球が認められた。しかしながらこのような血管周囲組織には浮腫を思わせる巨大空腔が多数認められた。また(*)に示す様な内皮細胞の一部と思われる円形構造物も頻回に見られた(図10)。さらに光顕に示した部位の

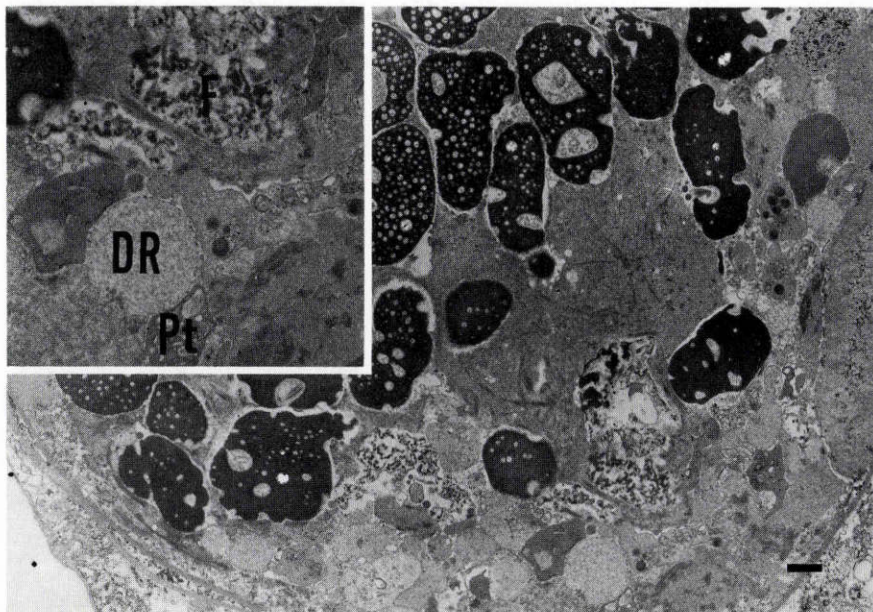


図7 照射1時間後の網膜細動脈、完全閉塞を起こした網膜細動脈を示す。血栓の3要素であるフィブリン (F)、血小板 (Pt)、変性赤血球 (DR) の3者が明瞭に確認できる。

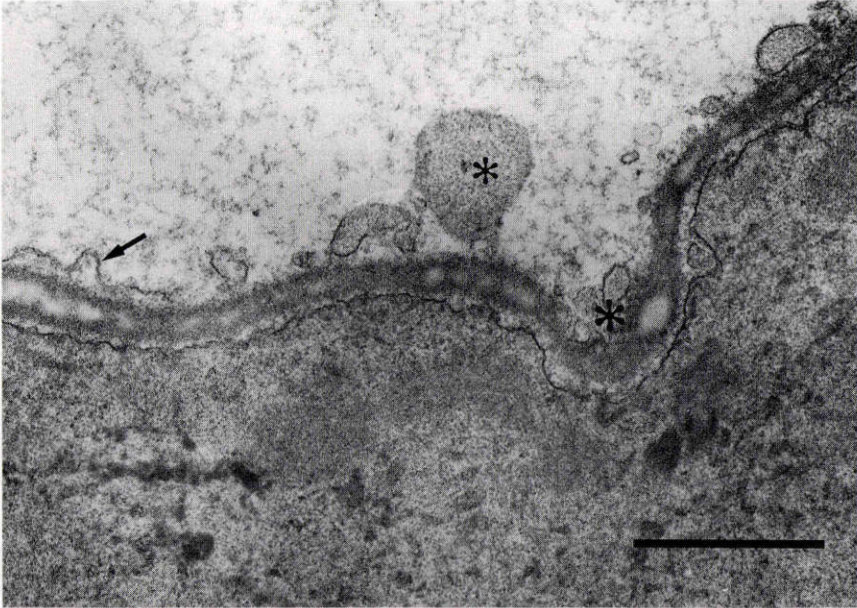


図8 照射1時間後の網膜細動脈、内皮障害が著しい部分。(※)は細胞残査を示しており、(→)には基底側の細胞膜だけが残っている。その他の部位では内皮細胞が完全に欠損している。

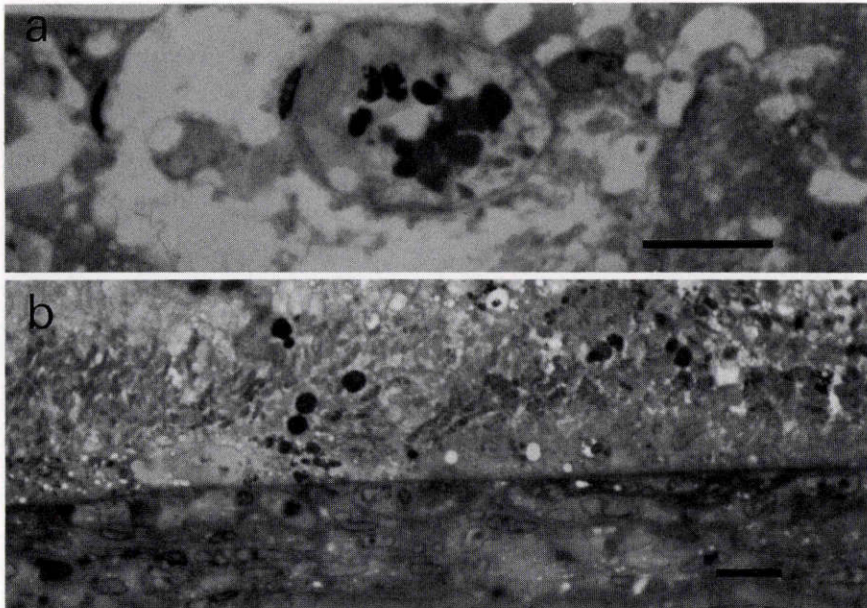


図9 照射後1日目の網膜細静脈、やや照射回数が多かった例で、管腔内はまだまだほとんど血栓で閉塞されており、血管周囲には明らかな空胞変性が認められる(a)。また脈絡膜血管内にも血栓の存在を認める(b)。

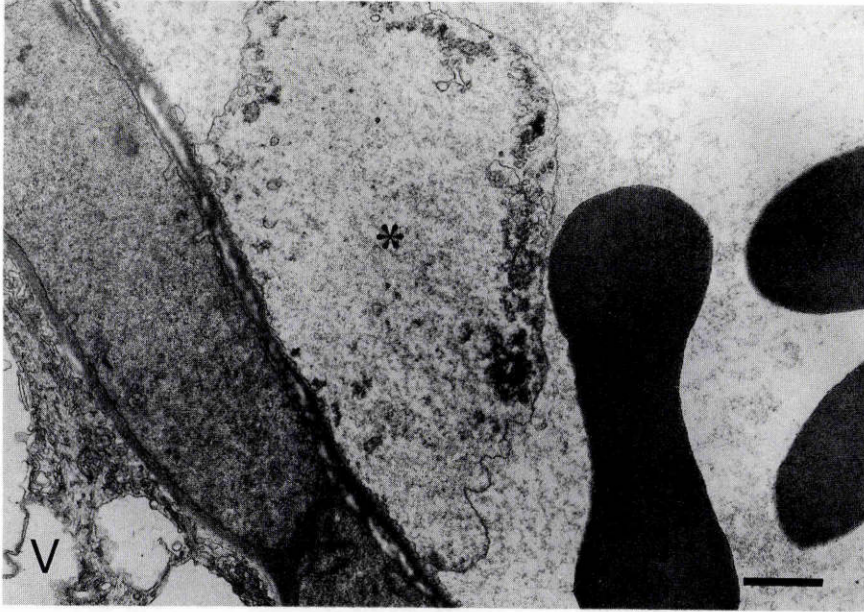


図10 照射後1日目の網膜細動脈. 内皮細胞の変性がさらに進んでいるにもかかわらず,すでに血栓は認められず,正常な形態を示す赤血球(R)が認められる.しかしながら血管周囲組織には浮腫を思わせる巨大空胞(V)が多数認められる.また(*)で示した円形構造物は内皮細胞が膨化したものと考えられる.

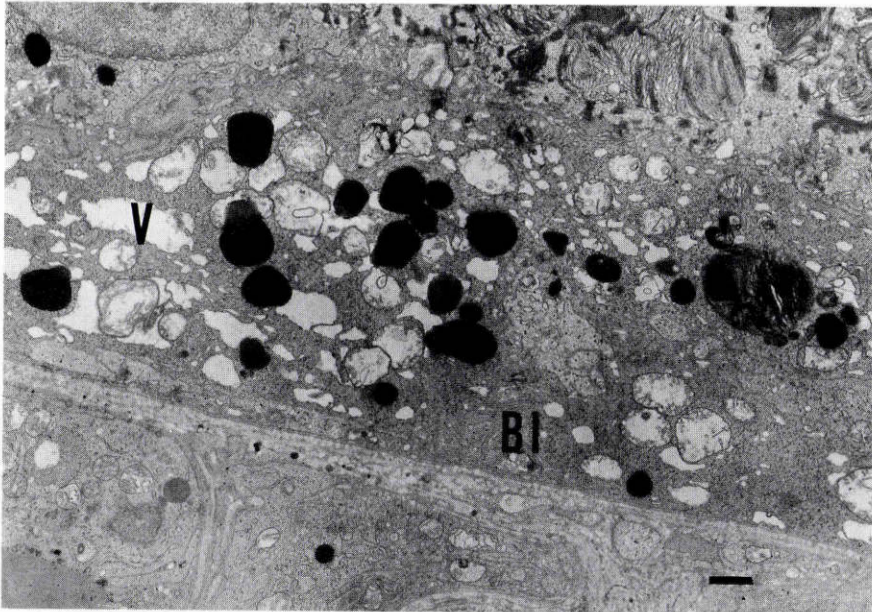


図11 照射後1日目の網膜色素上皮細胞. 検眼鏡的には図2-bの如く一見照射前の状態を呈するが,光顕に示した部位の網膜色素上皮層で,空胞変性(V)が認められbasal infolding (BI)はほとんど消失している.

網膜色素上皮層では、空胞変性が著明であり、網膜色素上皮細胞の basal infolding はほとんど消失していた(図11)。

4) 照射後2日目の網膜細動脈

この時期の網膜血管は、図2-bの如く検眼鏡的には一見照射前の状態を示し、すでに血栓は認められないもの、光顕ではいまだに血管周囲に空胞変性が認められた(図12)。電顕では1日目のものとほとんど変り

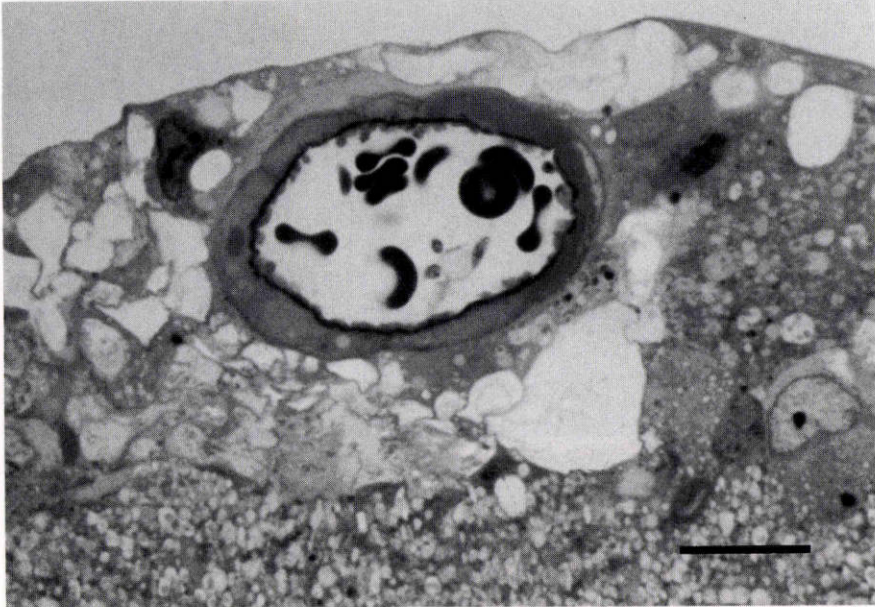


図12 照射後2日目の網膜細動脈。検眼鏡的には図2-bの如く一見照射前の状態を示すが、光顕ではいまだ血管周囲に空胞変性が認められる。

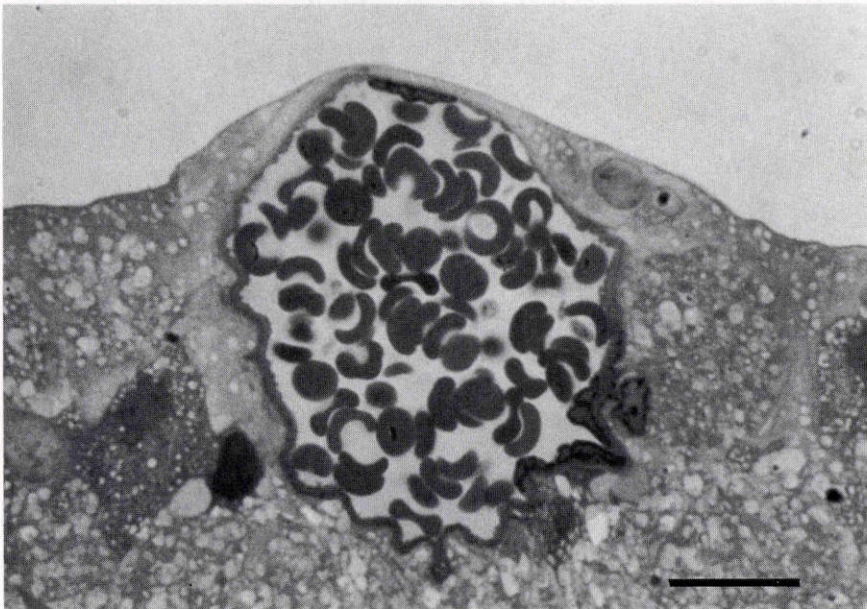


図13 照射後4日目の網膜細静脈。血管壁は表面がけぼだち、菲薄化した内皮細胞で被われ、その中に小空胞も認められるが、管腔内には明らかな血栓は認められない。



図14 照射後4日目の網膜細静脈. 内皮の修復はほぼ完了しているにもかかわらず, 管腔内にときおりフィブリンの沈着 (F) が認められる.

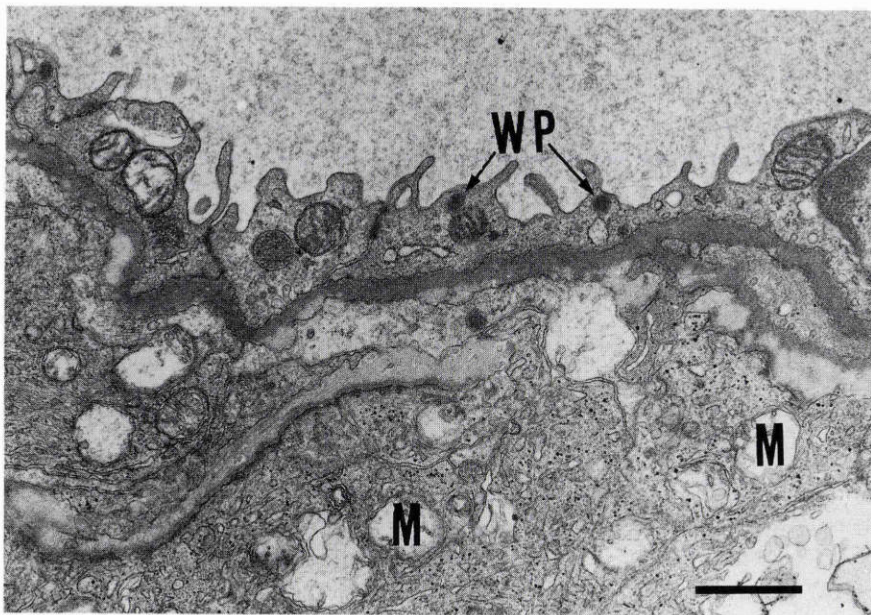


図15 照射後4日目の網膜細静脈. 典型的な内皮細胞を示しており, 内皮細胞の皺襞もしくは微絨毛と考えられる微小突起が, 特に細胞周辺部に多数認められる. その内皮細胞の細胞質内に第8因子と相関が示唆されている Weibel-Palade 小体 (WP) が高頻度に認められる. なお血管周囲グリアにはミトコンドリア (M) に空胞変性を認める.

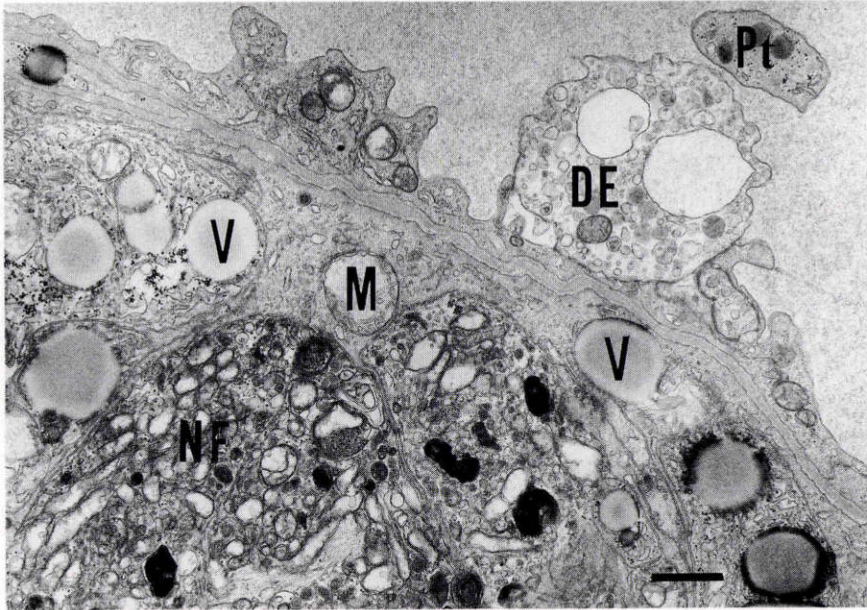


図16 照射後7日目の網膜細静脈。内皮細胞は完全に修復されているが管腔内には変性した内皮細胞 (DE) がなお遺残している。この血管周囲には著しい腫大を示す神経線維 (NF)、膨化したミトコンドリア (M)、および食細胞様の空胞 (V) が認められ、管腔には血小板 (Pt) は認めるものの血栓は存在しない。

(図5を除き、Bar は $1\mu\text{m}$ を表わす)。

ない所見を呈していた。

5) 照射後4日目の網膜細静脈

光顕では、照射血管の管腔面にけばだった様な不規則な突起を認めるものの、血栓は認められず、高倍にて観察すると、管腔は全て菲薄化した内皮細胞で完全に被われていた(図13)。電顕所見においても、内皮の欠損部は全く認められず、血管周囲の浮腫も著しく軽度であった。しかしながら一部の血管には図14の如く管腔内にときおりフィブリンの deposition を認めるものもあった。一方、光顕でけばだった様に見えた内皮には図15に示した如く皺襞 (folding) もしくは微絨毛 (microvilli) と考えられる微小突起が多数認められ、これは特に細胞周辺部に高頻度であった。またその細胞質には第8因子との相関が示唆されている Weibel-Palade 小体が数多く認められた。なお血管周囲の異常としては、血管周囲グリアにおける細胞内浮腫が主体であった。

6) 照射後7日目の網膜細静脈

内皮細胞は完全に修復されているが、管腔側の一部には変性脱落を思わせる内皮細胞がまれに見られた。また血管周囲には部分的に著しい腫大を示す神経線

維、膨化したミトコンドリア、及び食細胞様の空胞が認められた(図16)。

IV 考 按

緒言にも述べた如く、網膜血管閉塞実験に関するこれまでの方法は、いずれも血管の外側からの刺激により血管を閉塞させるものであり、図2-dの光凝固法の場合のように血管のみならず周囲の組織にもかなりの障害を及ぼす結果となっており、極言すれば、血管を焼きつぶした状態であるといえよう。このような疾患モデルは生体内すなわち臨床的にたびたび遭遇する網膜血管閉塞症とはかなり異なった病態であることは言うまでもない。今回の実験は、その問題点を克服するために佐藤等の報告した方法^{6)~8)}、すなわち血管内に蛍光物質を投与するとともに任意の微小血管に励起光線を照射することにより血栓を作成する方法を応用したものである。本法はその機序の解明がまだ十分になされていない一方、事実としてまず内皮障害が起き、次いで血栓が成長するという過程が明示されており、生体における血栓症に近い疾患モデルであることが既に証明されている。我々の成績においても、この事実は

直後例に血栓が見られなかったことから明らかであろう。また、従来の実験とは異なり、血管を焼きつづけての閉塞でないことは、組織学的検索結果に示したように血管周囲組織への侵襲もまた軽微なものとなっていることから明確である。よって、本法はこれまで困難とされていた血管を任意の部位で閉塞せしめることが可能となり、今後網膜血管閉塞実験の一つとして活用されうる有用な実験手技と考えられる。

さて今回の実験において得られた血管閉塞は附図に示した如く組織学的に内皮細胞の損傷による典型的な壁在性の血栓によるものであったが、その発症機序に関しては、前述の如くいまだ明確な知見を得ていない。L'Esperance¹⁰⁾はフルオレスセインに波長488nmのアルゴンレーザー光線を照射すると、波長が590nmのダイ・レーザーが発生し、一部は赤血球に吸収され熱に変化すると報告しており、赤血球の内でもヘモグロビン、オキシヘモグロビンへの吸収が特に高いとしている。また佐藤等⁷⁾は血栓形成の機序に関して蛍光物質が光によって励起される時に superoxide radicals という物質が血中の成分から放出される可能性を示唆しており、これが内皮および血小板に障害を加える因子として働くのではないかと考えており、またその際、白血球あるいは赤血球の介在が重要な要因となり得ると報告している。図6、7のレーザー照射1時間後の電顕所見にみられるように赤血球は泡立ち、膨化した所見を呈しているが、これはフルオレスセインと励起光線による物理化学反応により生じたダイ・レーザーが赤血球に取り込まれ、内部からの熱エネルギーにより赤血球が変性し、何等かの障害因子が放出され、それが血管内皮細胞に損傷を及ぼし、そこに血小板、フィブリンが集合し血栓が形成され、血管が閉塞したものと考えることは可能であろう。しかしながらフルオレスセインの濃度および励起光線の強さと、発生する熱エネルギーの程度との関係等についてはいまだ不明であり、また血流による冷却効果の問題もあり、詳細については今後さらに検討を要するものと考えられる。

また本実験は臨床的にも応用できる可能性もっており、事実L'Esperance¹⁰⁾は糖尿病性網膜症にみられる視神経乳頭上の新生血管に対して波長570nmのダイ・レーザーを照射し、血管を閉塞させた例を報告している。しかしながら逆に考えてみると、人眼において蛍光眼底撮影の後直ちに網膜光凝固を行なうことにより、正常な網膜血管に閉塞が生じる可能性がでてくるわけで、特に中心性網脈絡膜症の様な疾患の治療に

あたっては、この事実留意して光凝固を行なわなければならないものと考えられる。

一般に静脈閉塞症では血管閉塞後しばらくして出血を伴うことが多いが、今回の実験では眼底に検眼鏡的な出血を生じたものは1例もなかった。結果の項で述べたように、今回の実験では検眼鏡的には2~4日後に血栓は照射前の状態に戻り、また組織学的にも4日目とかなり早期にほぼ修復機転が完成しているという、旺盛な局所線溶能、及び修復能にもその一因が求められよう。即ち、従来より人眼における網膜血管閉塞症の発症因子として糖尿病や動脈硬化症などが考えられていることから、凝固能の亢進、全身的な血管異常を基礎とせず無理に作られた局所血栓は、人眼の血栓症モデルとはなり得ない可能性が考えられる。この点の解明には、今後高血圧動物や糖尿病動物を用いた実験が是非とも必要であろう。

また、図15でみられたWeibel-Palade小体は細動脈や毛細血管の内皮細胞に存在し、その中には第VIII因子関連抗原であるvon Willebrand因子が貯蔵されているといわれているが¹¹⁾、その機能的な面についてはいろいろと検討がなされているもののいまだ明らかなものとはなっておらず、今後の研究に期待するところである。

一方、今回は網膜血管の閉塞を目的として実験を行なったわけであるが、脈絡膜血管にも血栓形成による閉塞が認められ、図11に示した網膜色素上皮層の組織学的変化はこの脈絡膜の血管障害に基づくものと考えられる。しかもこの脈絡膜血管の閉塞は網膜血管の修復機転がほぼ終了する時期においてもなお存在し続けるほど強固なものであった。一般に治療量のアルゴンレーザー光では脈絡膜への影響は少ないとされているが、今回みられた脈絡膜血管の閉塞はやはり網膜血管と同様フルオレスセインとの光化学反応によりもたらされたものと考えられる。しかしながら両者の閉塞の程度の差については、血管構築上の差違や局所線溶能および血流速度の違いなども考えられるが、詳細については今後解明すべき問題と考えている。

以上のことより、本実験方法は血管閉塞実験の一方法として十分利用されうるものと考えられた。また、単純な部分的壁在血栓のみでは一時的な血管閉塞症は作成できるもののやがて再開通を示すことから、ラットにおいては完全な血管閉塞症は他の要因、例えば局所線溶の異常、あるいは広範に及ぶ血管の性状変化などが伴わなければ発症しないものであろうことが推測

された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました弘前大学医学部眼科学教室・松山秀一教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第90回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) **Fujino T, Curtin VT, Norton EWD**: Experimental central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 81: 395—406, 1969.
- 2) **Kohner EM, Dollery CT, Shakib M, Henkind P, Paterson JW, Oliveira LNF, Bulpitt CJ**: Experimental retinal branch vein occlusion. *Am j Ophthalmol* 69: 778—825, 1970.
- 3) **Apple DJ, Goldberg MF, Wyhinny G**: Histopathology and ultrastructure of the argon laser lesion in human retinal and choroidal vasculatures. *Am J Ophthalmol* 75: 595—609, 1973.
- 4) **Becker B, Post LT**: Retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 34: 677—686, 1951.
- 5) **猪俣 孟, 岩崎雅行**: 網膜静脈閉塞症—Hayreh 見解の非妥当性—。眼微小循環研究会, 特別講演, *Therapeutic Res* 2: 69—72, 1985.
- 6) **佐藤正明, 大島宣雄**: 紫外線および蛍光物質によって誘起される微小血管内血栓。微小循環研究者のつどい, 第6回研究集会抄録集, 25, 1981.
- 7) **佐藤正明, 大島宣雄**: 微小血管内血小板血栓モデルの発生機序に関する基礎的検討。第8回微小循環研究集会講演集, 19, 1983.
- 8) **Sato M, Ohshima N**: Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat. *Thrombosis Res* 35: 319—334, 1984.
- 9) **三上 規, 松橋英昭, 一戸 敏, 吉本弘志, 松山秀一**: ゼラチン加フルレスセイン静注。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。日眼, 91: 353—359, 1987.
- 10) **L'Esperance FA**: Clinical application of the organic dye laser. *Ophthalmology* 92: 1592—1600, 1985.
- 11) **Warhol MJ, Sweet JM**: The ultrastructural localization of von Willebrand factor in endothelial cells. *Am J Pathol* 117: 310—315, 1984.

(第90回日眼総会原著)