

硝子体出血に伴う網膜前増殖組織の発生機序に 関する実験病理学的研究

1) 硝子体内注入血液量と網膜硝子体病変との関係 (図9, 表1)

向 野 利 寛 (産業医科大学眼科学教室)

Pathogenesis of Preretinal Membrane Induced by Vitreous Hemorrhage in Relation to the Blood Volume Injected into the Vitreous Cavity

Toshihiro Kono

*Department of Ophthalmology, School of Medicine, University of Occupational
and Environmental Health, Japan*

要 約

硝子体出血後の網膜前増殖組織の発生機序を研究するために、まず網膜前増殖組織の実験モデルを作成する目的で白色家兎の硝子体腔内に種々の量の自家全血液を注入し、経時的に4週後まで注入血液量による硝子体、網膜病変の差異を臨床的および病理組織学的に検索した。1) 硝子体腔内には集積した硝子体線維、血液成分、マクロファージからなる混濁物が形成されたが、注入血液量による相違はみられなかった。2) 0.3ml以上の血液を注入した眼球では血液注入2週後で視神経乳頭の下方の網膜前面に網膜よりつづく増殖組織が存在し、その中に赤血球が観察された。血液注入4週後では網膜前増殖組織は肥厚し、内境界膜に沿って存在していた。以上のことから、実験的硝子体出血による網膜前増殖組織の形成には0.3ml以上の注入血液量が必要であることが結論された。(日眼 91: 853—859, 1987)

キーワード：硝子体出血，網膜前増殖組織，グリア細胞，家兎眼

Abstract

To study the pathogenesis of preretinal membrane formation following vitreous hemorrhage, various amounts of autologous whole blood (0.1ml to 0.5ml) were injected through the pars plana into the vitreous cavities of albino rabbits under an operating microscope, and preretinal membrane formation was studied clinically and histopathologically. With injections of 0.1ml or 0.2ml autologous whole blood, no preretinal membrane was formed and the blood were dispersed in the vitreous cavity. Subsequently, the vitreous bodies became condensed. Macrophages, red blood cells and vitreous fibers, were observed in the condensed vitreous bodis. When 0.3ml or more of autologous whole blood was injected into the vitreous cavity, preretinal proliferative tissues were found on the inner limiting membrane of the retina two weeks after the injection. The preretinal membranes were composed of glial cells and macrophages, together with degenerated red blood cells. These proliferative tissues of the preretinal membrane were formed by surface extension of the retinal glial cells through defects of the inner limiting membrane. It was concluded that injection of more than 0.3ml autologous whole

別刷請求先：807 北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 産業医科大学眼科学教室 向野 利寛

Reprint requests to: Toshihiro Kono, M.D. Dept. of Ophthalmol., Univ. of Occupational and Environmental Health, Japan.

1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku Kitakyushy 807, Japan

(昭和62年 4月20日受付) (Accepted April 20, 1987)

blood into the vitreous cavity of rabbit's eyes could induce preretinal proliferative reactions of glial cells in the retina two weeks after the injection. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 853—859, 1987)

Key words: Vitreous hemorrhage, Preretinal membrane, Glial cell, Rabbit's eye

I 緒 言

硝子体出血は網膜静脈閉塞症, イールズ病, 糖尿病性網膜症など種々の疾患で生じ, いったん発症すると著明な視機能障害をきたす。さらに硝子体出血後に網膜前に増殖組織が出現し, 時に牽引性網膜剝離を起して失明する。そのため硝子体出血の吸収過程^{1)~3)}, 硝子体内増殖組織^{4)~6)}の形成, 赤血球崩壊後の網膜の変化^{7)~9)}などについて多くの実験的研究が行われてきた。硝子体出血に伴う網膜前増殖組織の主体についてはグリア細胞, 網膜色素上皮細胞, 線維芽細胞など種々の説が述べられているが, 網膜前増殖組織が形成される理由は不明であり, また形成過程についての詳細な研究はない。

網膜グリア細胞は異物を貪食, 処理する働きをもつ。硝子体出血の場合も硝子体腔内へた異物としての赤血球を貪食するために網膜グリア細胞が硝子体腔内へ伸展し, 網膜前増殖組織を形成する可能性が考えられる。Algvereら¹⁰⁾は硝子体腔内に注入したカーボンが網膜前面硝子体腔内へ伸展した網膜グリア細胞により取り込まれていたと報告し, 私達¹¹⁾は硝子体出血後7年目に摘出したイールズ病眼の網膜において, 網膜前に網膜グリア細胞が伸びてきて硝子体腔内の変性赤血球をその胞体内に取り込むことを明らかにした。

過去の硝子体出血の実験的研究¹²⁾¹³⁾では, 網膜前増殖組織はうまく形成されていないという。その理由として次の2点が考えられる。1) 家兎眼では注入血液量は主に0.2mlが用いられているが, 血液量が少ないと網膜前増殖組織は必ずしも形成されない。2) これらの実験では眼球全体を光学顕微鏡で観察することがなされていない。眼球全体を観察しないと網膜前増殖組織が形成されていても観察できない。

増殖組織形成機序を検討するためには, まず網膜前増殖組織の実験モデルを作ることが第1段階である。そこで網膜前増殖組織を形成するのに必要な出血量を決定するために白色家兎の硝子体腔内に種々の量の自家全血を注入した。併せて眼球全体を光学顕微鏡で詳細に観察した。その結果, 0.3ml以上の血液を注入した場合, 網膜前増殖組織が形成されることが明らかに

なだったのでここに第1報として報告する。なお, 網膜前増殖組織の形成過程については第2報¹⁴⁾で詳細に報告する。

II 実験材料および方法

実験材料として, 体重3.0kgの白色家兎30羽, 60眼を5群に分け用いた。

ネプタール® (Abbott社)による全身麻酔下で家兎の耳静脈より血液を採取し, ヘパリンを添加し自家全血とした。トロピカミド(ミドリン®)と塩酸フェニレフリン(ネオンシネジン®)で散瞳後, 検眼鏡で眼底に異常のないことを確認した後, 手術用顕微鏡下に12時部の角膜輪部より1mm離れた部位で球結膜を切開し, カミソリ刃で強膜に小切開を加え, 27G針を用いて自家全血を硝子体腔中央に注入した。この時, 眼圧を一定に保つために前房切開を行った。5群の実験動物はそれぞれ注入量を0.1, 0.2, 0.3, 0.4および0.5mlとした。対照としては, 同様の方法でヘパリン添加生食水を硝子体腔内に注入した。各群毎に9眼に血液を, 3眼に生食水を注入した。その後, 各群毎に注入1週後, 2週後, 4週後で実験眼3眼, 対照眼1眼をそれぞれ摘出した。0.4mlまたは0.5mlの血液を注入した場合には, 時に注入した血液が前房中へ流出することがあった。血液が前房中へ流出した眼球は今回の実験から除外した。

摘出眼球は0.1M カコシル酸緩衝液を加えた4%グルタルアルデヒドに10分間浸した後, 外側赤道部の眼球壁に窓を開け, さらに24時間固定した。その後窓を少し拡大し, 実体顕微鏡下で硝子体腔内の増殖組織と水晶体や網膜との関係を観察し, 写真撮影を行った。その後3時間水洗し, 50%アルコールにて5日間, 70%アルコールにて5日間, 100%アルコールにて7日間脱水した。さらにアニリンに2日間, キシレンに24時間, パラフィンに6時間浸し, パラフィンに包埋した。眼球の前後断切片を作り, ヘマトキシリン・エオジン染色, ベルリン青鉄染色を行い, 光学顕微鏡にて観察した。

III 観察結果

検眼鏡および実体顕微鏡による観察では、どの注入量でも術後4週後までに網膜剥離は認められず、注入血液量による大きな相違はみられなかった。

1) 検眼鏡所見

注入直後には注入された血液は硝子体腔内に一塊としてみられたが、2~3日後には硝子体腔全体に拡がり、眼底の透見はできなくなった。1週後には水晶体後方に暗灰色の塊状混濁物がみられるのみであり、以後4週後までこの状態がつついた。

2) 実体顕微鏡所見

眼球壁の一部を切り落として窓を作り、その窓から眼球内を観察した。1~2週後では硝子体腔内には暗褐色の出血塊が硝子体とともに一塊となって厚い膜様混濁物を形成し、水晶体後面から網膜上に存在していた。赤血球は膜様混濁物に混じって存在していた(図1)。注入4週後になると、硝子体腔内の厚い膜様混濁物は全体にやや減少して暗灰色を呈するようになり、赤血球の存在は明らかではなくなった(図2)。硝子体腔内の膜様混濁物は視神経乳頭から漏斗状に水晶体後面までつづく例と、網膜面から分離して水晶体後面に一塊として存在して後部硝子体腔は透明で網膜が良く透見できる例とがあった。この場合、網膜面上には褐色の色素斑が散見された(図3)。

3. 光学顕微鏡所見

(1) 血液0.1ml 注入眼

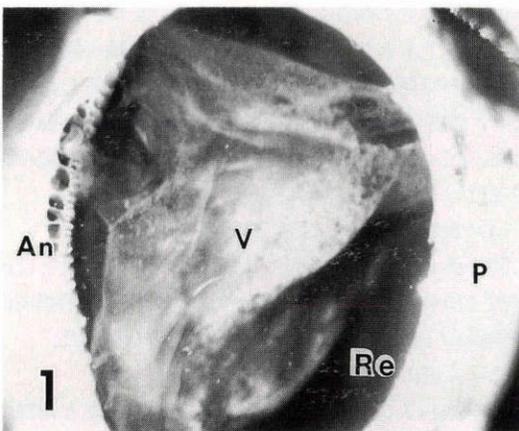


図1 血液0.3ml注入2週後の実体顕微鏡写真
血液が硝子体と一塊となって厚い膜様混濁物(V)を形成し、視神経乳頭から水晶体後方まで漏斗状につながっている。An:角膜側 Re:網膜 P:後極側×6

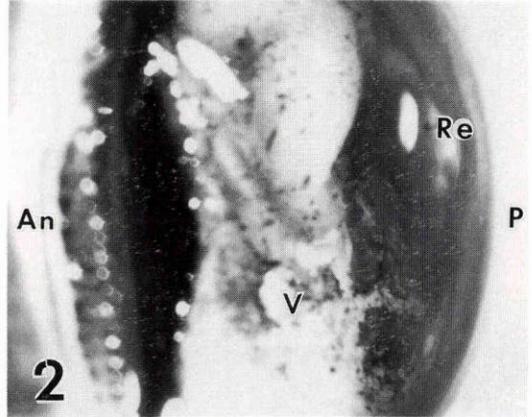


図2 血液0.3ml注入4週後の実体顕微鏡写真
厚い膜様混濁物(V)が水晶体後方に一塊となって存在している。後部硝子体腔は透明で、網膜(Re)が透見できる。An:角膜側 P:後極側×8

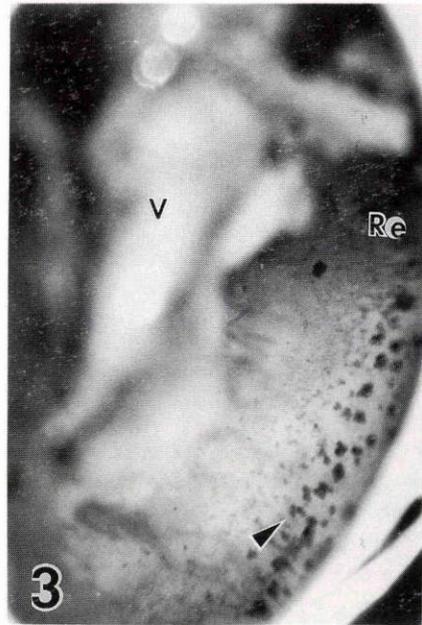


図3 血液0.3ml注入4週後の網膜面の実体顕微鏡写真(図2と同じ標本)
網膜(Re)面上に茶褐色斑(矢印)が認められる。
V:硝子体腔内膜様混濁物×16

血液注入1週後から4週後までに硝子体の状態はほとんど変化はなかった。硝子体腔内には硝子体線維と血液成分、血球成分を貪食したマクロファージを認めるのみであった。注入2週以降では血球成分やマクロファージは主に水晶体後面と視神経乳頭より下方の

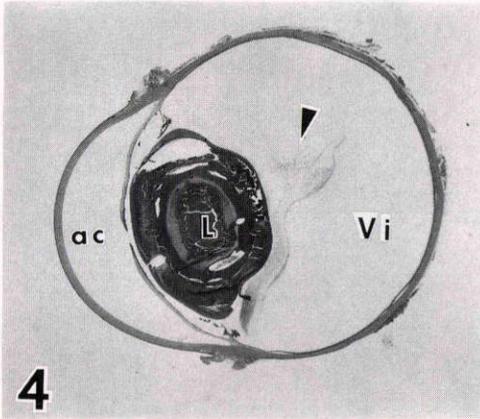


図4 血液0.3ml注入2週後の眼球光学顕微鏡写真
硝子体腔(Vi)中に水晶体(L)後面より漏斗状に網膜へつづく血液を含む収縮した硝子体(矢印)が認められる。ac:前房(ヘマトキシリン・エオジン染色×3)

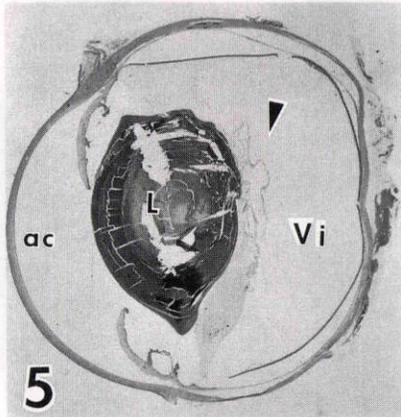


図5 血液0.3ml注入4週後の眼球光学顕微鏡写真
水晶体(L)後部に収縮した硝子体(矢印)が存在している。ac:前房 Vi:硝子体腔(ヘマトキシリン・エオジン染色×3)

網膜前に存在していた。網膜前面には増殖組織は認められなかった。

(2) 血液0.2ml 注入眼

0.1ml 注入眼とほぼ同様の状態であった。ベルリン青鉄染色を行うと、血液注入1週以降では硝子体腔内のマクロファージのみ陽性に染色された。

(3) 血液0.3ml 注入眼

硝子体の状態は0.1ml および0.2ml 注入眼とほぼ同様であった(図4, 5)。しかし、2週後には視神経乳頭の下方で網膜前面に増殖組織が認められた。この増殖組織は網膜内のグリア細胞と連続していた(図6)。

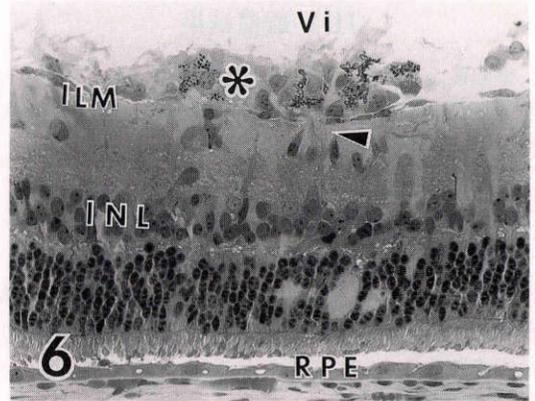


図6 血液0.3ml注入2週後の下方赤道部網膜の光学顕微鏡写真

網膜面上に増殖組織(*)が存在し、その中に血球成分が認められる。内境界膜(ILM)を貫いて網膜内よりグリア細胞が網膜前増殖組織につづいている(矢印)。Vi:硝子体腔 INL:内顆粒層 RPE:網膜色素上皮細胞(ヘマトキシリン・エオジン染色×120)

増殖組織内には血球成分と褐色の色素を含有したマクロファージが認められた。この時期のベルリン青鉄染色は硝子体内のマクロファージを除いて陰性であった。

4週後では硝子体腔内の混濁物は水晶体後面に一塊となり、硝子体線維、血球成分およびマクロファージが認められた(図7)。視神経乳頭下方の赤道部付近に形成された網膜前増殖組織は厚くなり、網膜内境界膜に沿って平行に存在していた(図8)。また、視神経乳頭の上方でもところどころ網膜前増殖組織が認められた。この時期には硝子体腔中に血球成分はみられなくなり、増殖組織内に褐色の色素を持った細胞が認められた。ベルリン青鉄染色を行うと、この色素顆粒の存在部位に一致して陽性に染色された。

(4) 血液0.4ml 注入眼

硝子体および網膜前面の状態は0.3ml 注入眼とほぼ同様であり、注入2週後で視神経乳頭下方の網膜前面に網膜から連なる網膜前増殖組織が認められた。

(5) 血液0.5ml 注入眼

硝子体および網膜前の状態は0.3ml 注入眼と同様であったが、視神経乳頭付近では硝子体腔内の増殖組織が収縮して網膜が牽引され、網膜にしわが形成された例もみられた(図9)。

以上の結果をまとめると、網膜前増殖組織の形成は

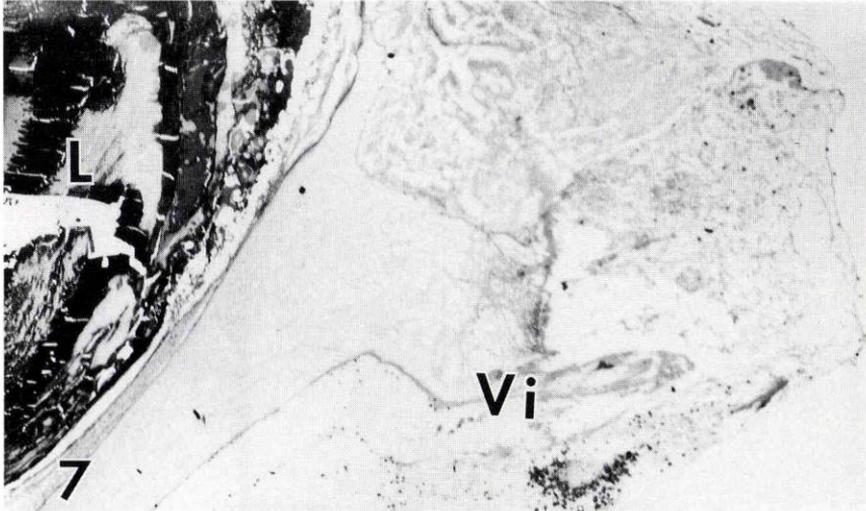


図7 血液0.3ml注入4週後の前部硝子体腔内の光学顕微鏡写真(図5の拡大)
 水晶体(L)後部の硝子体腔(Vi)には硝子体線維, 血球成分およびマクロファージが認められる。(ヘマトキシリン・エオジン染色×60)

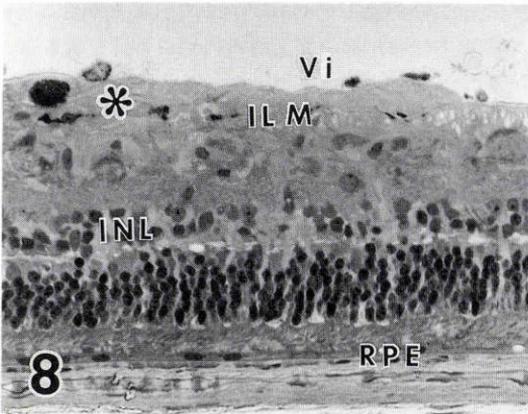


図8 血液0.3ml注入4週後の下方赤道部網膜の光学顕微鏡写真
 網膜前増殖組織(*)は内境界膜(ILM)の面上に存在し, その中に色素顆粒が認められる. Vi: 硝子体腔 INL: 内顆粒層 RPE: 網膜色素上皮細胞
 (ヘマトキシリン・エオジン染色×130)

注入血液量0.3ml以上の眼球で注入2週以降になると全例に認められた(表1).

IV 考 按

家兎硝子体中に自家全血液を注入した従来の実験報告^{1)~9)}では, 硝子体の状態の観察は硝子体腔内の組織を部分的に観察しているだけである. しかしこれでは本来の硝子体と水晶体, 毛様体, 網膜との関連は観察

できない. そこで家兎眼球を水晶体も含めて観察するために眼球全体の標本を作成した. このように眼球全体をひとつの標本で観察するのは硝子体と水晶体, 毛様体, 網膜との関係を把握するのにきわめて有用である.

硝子体腔中央に血液を注入した場合, 硝子体は全体に収縮し, 増殖性硝子体網膜症と類似の外観を呈する場合と後部硝子体剥離をきたし水晶体後面に厚く存在する場合とがあった. また, 硝子体腔内の血液成分やマクロファージの多くは水晶体後面に密集した硝子体線維と混じったり, 視神経乳頭より下方の網膜前面に存在していたが, 注入血液量の違いによる相違はみられなかった.

今回の研究では, 血液注入4週後までではどの注入血液量においても組織学的に増殖組織は網膜前を除き, 硝子体腔内には認められなかった. すなわち, 検眼鏡的に硝子体腔に認められた塊状混濁は硝子体線維と血液成分およびマクロファージが混じった物であった. このことは今までの報告⁴⁾⁶⁾と一致する.

今回の観察で最も興味深い所見は硝子体腔内への注入血液量を多くすると2週後には主に眼球下方の赤道部付近で網膜前面に網膜内のグリア細胞からつづく増殖組織が認められたことであった. この網膜前増殖組織内に赤血球が認められた. 今までの硝子体出血の実験的研究でも網膜前硝子体中にグリア細胞よりなる増殖組織がみられることが報告¹⁾¹²⁾¹³⁾されているが, その

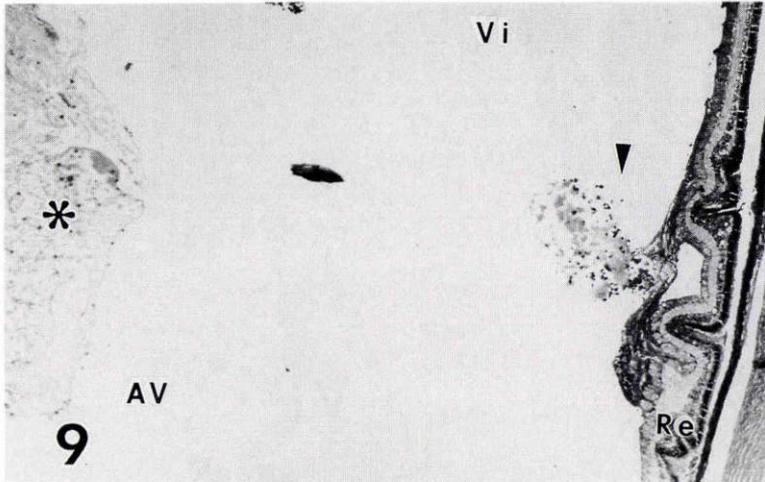


図9 血液0.5ml注入4週後の光学顕微鏡写真
 髄翼部で増殖組織(矢印)が収縮し、網膜(Re)にしわが形成されている。*印:水
 晶体後部の収縮した硝子体 AV:前部硝子体腔 Vi:硝子体腔(ヘマトキシリン・エ
 オジン染色×10)

表1 網膜前増殖組織の有無

注入血液量 (ml)

	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
1W	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2W	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
4W	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3

眼球摘出時期(週)

増殖組織中に赤血球が取り込まれていたという報告はない。一般に硝子体出血の臨床例の場合、出血量は平均で硝子体容積の17%といわれている⁷⁾。この量は家兎では0.25mlに相当する。今までの実験的硝子体出血の研究では主に0.2mlの血液注入が行われており、また眼球全体を光顕で観察する方法がとられていない。そのため網膜前増殖組織がたとえ形成されていても観察できなかったものと思われる。

また今回の研究結果から明らかなように、ある程度以上(本実験では0.3ml)の硝子体出血があると2週後には網膜前増殖組織が生じうる。硝子体出血後あたかも健常に見える眼底でも、すでに網膜に軽い増殖性病変が生じていることに注意すべきである。

このように硝子体腔内へた異物である赤血球を貪食、処理するために、網膜グリア細胞が網膜前面へ進展し網膜前増殖組織が形成されることが明らかになった。

今後、この実験モデルを用いて硝子体出血後にみられる網膜前増殖組織の発生機序について研究することが可能である。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲頂きました栗本晋二教授、九州大学猪俣 孟教授に感謝いたします。また眼球包埋の方法についてご教示いただいた産業医科大学第二病理学教室小出 紀教授並びに前門良子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 桐山豪三: 硝子体出血の吸収機転ならびに同出血の吸収促進に関する実験的研究. 日眼 42: 1773-1802, 1938.
- 2) 上野明広: 硝子体出血についての実験的研究. 第II報. 硝子体出血の吸収について. 日眼 84: 411-420, 1980.
- 3) 筑田 真, 小原喜隆, 星丘 仁: 各種病的状態における硝子体細胞の対応. 第2報. 硝子体出血の晩期吸収過程について. 眼紀 34: 771-779, 1983.
- 4) Forrester JV, Lee WR, Williamson J: The pathology of vitreous hemorrhage. I. Gross and histological appearances. Arch Ophthalmol 96: 703-710, 1978.
- 5) Forrester JV, Grierson I, Lee WR: The pathology of vitreous hemorrhage. II. Ultrastructure. Arch Ophthalmol 97: 2368-2374, 1979.
- 6) 上野明広: 硝子体出血についての実験的研究. 第I報. 硝子体内にみられる変化について. 日眼 84: 257-269, 1980.
- 7) Sanders D, Peyman GA, Fishman G, Vlachek J, Korey M: The toxicity of intravitreal whole

- blood and hemoglobin. *Albrecht v Graefes Arch klin exp Ophthalmol* 197: 225—267, 1975.
- 8) **Forrester JV, Grierson I, Lee WR**: Comparative studies of erythrophagocytosis in the rabbit and human vitreous. *Albrecht v Graefes Arch klin exp Ophthalmol* 208: 143—158, 1978.
 - 9) 福永 祐: 家兎自家血液硝子体内注入による網膜微量構造の変状. *眼紀* 26: 1475—1482, 1975.
 - 10) **Algvere P, Kock E**: Experimental epiretinal membranes induced by intravitreal carbon particles. *Amer J Ophthalmol* 96: 345—353, 1983.
 - 11) 向野利寛, 山名泰生, 栗本晋二, 猪俣 孟: イールズ病網膜の病理組織学的検索. 一主に血管の変化と網膜前増殖組織について一. *日眼* 89: 1001—1010, 1985.
 - 12) **Ehrenberg M, Thresher RJ, Machemer R**: Vitreous hemorrhage nontoxic to retina as a stimulator of glial and fibrous proliferation. *Amer J Ophthalmol* 97: 611—626, 1984.
 - 13) **Bennett TO, Peyman GA, Vlcsek JK**: Intravitreal injection of autologous blood in primates. *Canad J Ophthalmol* 10: 248—253, 1975.
 - 14) 向野利寛: 硝子体出血に伴う網膜前増殖組織の発生機序に関する実験病理学的研究. 2) 網膜グリア細胞の反応と網膜前増殖組織の形成. *日眼* (投稿予定).
-