

## レーザー汎網膜光凝固に関する研究

## 第4報 照射条件と硝子体網膜境界面の変化について

## 凍結切断による走査電顕的検討 (図11)

益山 芳正・児玉 芳久・松浦 義史 (宮崎医科大学眼科学教室)  
 児玉 芳知・萩原 忍・澤田 惇

Effects of Panretinal Photocoagulation on Vitreoretinal  
 Border Tissues: IV. Freeze-Cracking SEM of *Macaca Fuscata*

Yoshimasa Masuyama, Yoshihisa Kodama, Yoshifumi Matsuura,

Yoshitomo Kodama, Shinobu Hagihara and Atsushi Sawada

*Department of Ophthalmology, Miyazaki Medical College*

## 要 約

汎網膜光凝固が硝子体網膜境界面に影響を与えるか否かについて走査電顕で検討した。正常サル8眼を4群に分け強度の異なる照射条件で汎網膜光凝固を施行し、3カ月後の硝子体網膜境界組織の3次元構造を凍結切断法により観察した。検眼鏡的に辛うじて凝固斑の認められる弱凝固および白色の凝固斑を生じる中等凝固では、硝子体線維や内境界膜などの3次元構造に変化はみられなかった。凝固斑の周囲に輪状の浮腫を伴う強凝固では内境界膜に変化はみられなかったが、硝子体線維の集束と内境界膜に連絡する硝子体線維が欠落し後部硝子体の分離が生じた。爆発を伴う過強凝固では網膜の断裂部から厚い線維膜が硝子体中に形成された。今回の実験結果から中等凝固までの条件では硝子体網膜境界面に変化は認められないが、強凝固以上の条件では硝子体に種々の影響を与えることが明らかになった。(日眼 92:1213-1220, 1988)

キーワード：汎網膜光凝固，硝子体，内境界膜，凍結切断法，走査電顕

## Abstract

The purpose of this study is to clarify the effects of panretinal photocoagulation (PRP) at different laser powers to the vitreoretinal border tissues. Normal monkey eyes were divided into 4 groups and received PRP (0.1sec, 500 $\mu$ m, 700spots) with the following settings of argon laser power: mild PRP (75mW), moderate PRP (175mW), intensive PRP (250mW) and severe PRP, with explosion at 400mW. The eyes were enucleated 3 months after and the equatorial retina was studied with scanning electron microscopy using the freeze-cracking method. With mild and moderate PRP, no noticeable changes were seen in the inner limiting membrane (ILM) within a thickness of 40nm and the vitreous fibers within a diameter of 20nm. With intensive PRP, ILM remained normal but the vitreous fibers separated from the lamina fibroreticularis of ILM and cleavage occurred in the cortical vitreous body. With severe PRP, vitreous fibers accumulated and adhered to the retinal surface. Fibroblasts and retinal pigment epithelial cells migrated from explosive lesions and formed fibrous membranes in the vitreous cavity. The PRP at intensive settings or higher caused various degrees of

別刷請求先：889-16 宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200 宮崎医科大学眼科学教室 益山 芳正  
 (昭和63年3月18日受付)

Reprint requests to: Yoshimasa Masuyama, M.D. Dept. of Ophthalmol., Miyazaki Medical College  
 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki-gun, Miyazaki 889-16, Japan

(Accepted for publication March 18, 1988)

damage to the vitreoretinal juncture and promoted a harmful vitreoretinal traction. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 1213-1220, 1988)

**Key words :** Freeze-cracking method, Inner limiting membrane, Panretinal photocoagulation, Scanning electron microscopy, Vitreous

## I 緒 言

汎網膜光凝固は糖尿病性網膜症の有効な治療法であるが、すでに硝子体牽引を合併した増殖型網膜症は光凝固によって増悪することが臨床的に知られている。このため汎網膜光凝固が後部硝子体の分離や硝子体牽引の発生進行に関与するか否かは重大な問題であり、基礎的検討が必要である。光凝固による網膜自体の形態学的変化については多くの研究がなされている<sup>1)2)</sup>が、光凝固の硝子体網膜境界面への影響についての研究はきわめて少ない<sup>3)~5)</sup>。さらに、これについて切断法を用いて3次元的に検討した研究はこれまでにないようである。

私達は汎網膜光凝固に関する一連の基礎的研究<sup>6)~8)</sup>を行ってきたが、今回は汎網膜光凝固後の硝子体網膜境界面の変化を凍結切断法を用いて走査電顕で観察し、照射条件の強度による硝子体網膜境界面への影響について検討した。この結果、照射条件の増強に伴い硝子体網膜境界面に硝子体分離や線維膜形成などの変化が発生することが判明したので報告する。

## II 実験方法

実験動物として正常の成熟日本ザル5匹10眼を用い、アルゴンレーザー光凝固装置はCoherent Radiation社製SYSTEM-900を使用した。2眼を対照とし、8眼を2眼ずつ4群に分けレーザー汎網膜光凝固を人眼のそれと類似するように次の条件で行った。すなわち、弱凝固(75mW, 0.1sec, 500 $\mu$ m)、中等凝固(175mW, 0.1sec, 500 $\mu$ m)、強凝固(250mW, 0.1sec, 500 $\mu$ m)および過強凝固(400mW, 0.1sec, 500 $\mu$ m)で各眼約700 spotsを2回に分けて施行した。光凝固後3カ月で眼球を摘出し、タンニン酸添加2.5%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒド液による前固定および1%オスミウム酸液による後固定を行った。実体顕微鏡下に鼻側赤道部の網膜を硝子体が付着したまま切り出し、50%ジメチルスルホキシド液で置換後、液体窒素による凍結切断法を行った。なお、一部の標本は凍結切断後、さらに0.1%オスミウム酸液に20℃で

3日間浸漬し表面を侵食させた<sup>9)</sup>。切断標本はアルコールによる脱水、臨界点乾燥およびPt-Pd蒸着のち走査型電顕(H-800)で観察した。

## III 結 果

1. 正常対照：切断標本によると硝子体皮質の硝子体線維は径20~100nmで、網目状に配列し網膜内境界膜に連絡していた(図1)。硝子体線維と内境界膜との連絡様式は直接ではなく、内境界膜網状層に存在する径10nmの細線維を介して接続していた(図2)。内境界膜は走査電顕によると厚さ40nmのフェルト状の膜として観察され、ミュラー細胞に強く接着し、機械的に剥離される以外はオスミウム酸処理や切断でも剥離されなかった(図3)。

2. 弱凝固および中等凝固：凝固直後の眼底所見で弱凝固は網膜深層に境界不明の淡い白色斑として認め

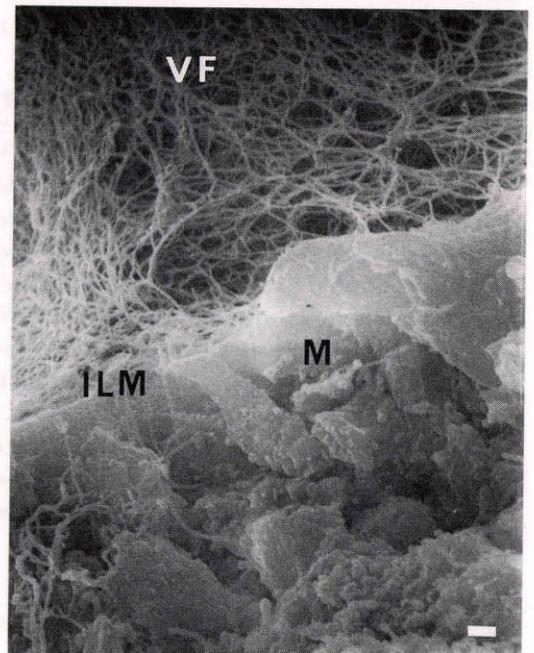


図1 正常対照：径20~100nmの硝子体線維(VF)が硝子体皮質中に網目状に配列している。ILM：内境界膜，M：ミュラー細胞(bar=1 $\mu$ m)

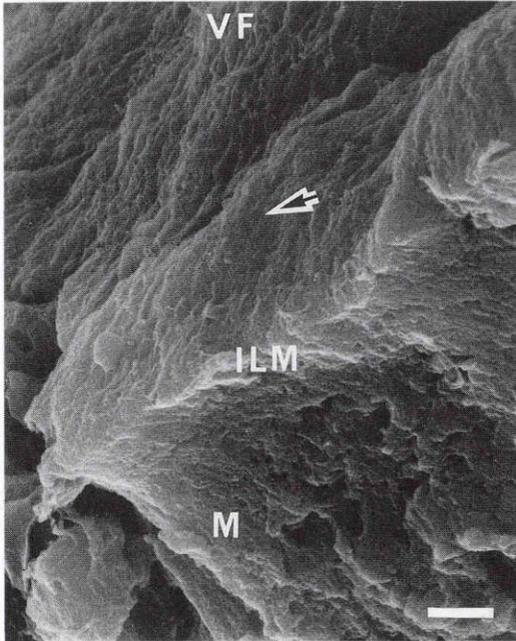


図2 正常対照：オスmium酸の長時間処理により硝子体線維は容易に網膜から分離する。硝子体線維と連絡する径10nmの細線維(矢印)が内境界膜網状層に存在し、内境界膜はフェルト状を呈する。

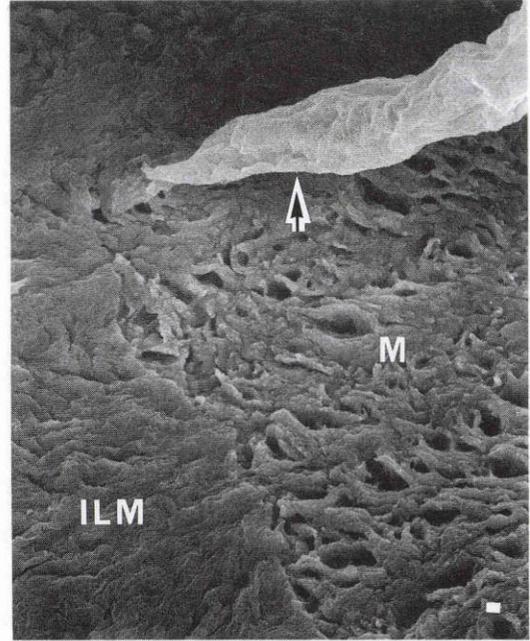


図3 正常対照：硝子体線維はオスmium酸処理により内境界膜から分離している。内境界膜は厚さ40nmの薄い膜として網膜に強く接着しており、かろうじて機械的に剝離されうる。剝離した内境界膜(矢印)の下にミュラー細胞の基底部が露出している。

られ、中等凝固は境界明瞭な白色斑として認められた(図4A, 4B)。凝固後3カ月のこれらの切断標本では硝子体線維は径20~30nmで規則的に配列し、それより分岐した径10nmの細線維よりなる内境界膜網状層と連絡していた。内境界膜は平坦で厚さ40nmで、ミュラー細胞の足突起により支持されていた。弱凝固および中等凝固では光凝固による影響は全く認められず、硝子体網膜境界面は正常であった(図5, 6)。

3. 強凝固：凝固直後の眼底所見では、凝固斑は灰白色を呈し周囲に輪状の浮腫を伴っていた(図4C)。凝固後3カ月の切断標本では硝子体線維が集束し、径200nmの太い硝子体線維が認められた。また内境界膜は凹凸不平で、内境界膜網状層に連絡する硝子体線維の配列は不均一となり、また硝子体線維が欠落し硝子体皮質の裂隙形成を示唆する所見が認められた。網膜では神経要素が消失し、ミュラー細胞によると思われる gliosis が存在した(図7, 8)。

4. 過強凝固：凝固直後の眼底所見では爆発により網膜が断裂し気泡や硝子体出血がみられた(図4D)。凝固後3カ月の切断標本では網膜の断裂部から硝子体中に厚い線維膜が形成されていた(図9)。この線維膜

は増殖した網膜色素上皮細胞および線維芽細胞と思われる細胞と大小不同の線維成分からなっていた。とくに、凝固部の周囲には径200~300nmの太い硝子体線維が多数みられた(図10, 11)。

#### IV 考 按

硝子体は99%の水分とわずか1%の有形成分からなるという特殊性のために、その微細構造を3次元的に観察することは極めて難しい。従来の走査電顕による研究の殆どは網膜の内表面の観察であり、硝子体と網膜の立体的関係を観察するには重積した硝子体のため不可能であった<sup>4)10)</sup>。このために標本作成に種々の工夫が試みられてきた<sup>11)~13)</sup>が、今回私たちは凍結切断面を走査電顕で観察し、光凝固後の硝子体と網膜との関係を走査電顕で検討した。

まず、正常眼について述べると、硝子体網膜境界面は内境界膜というミュラー細胞の基底膜を境にして硝子体と網膜という全く異なる2つの組織間の関門や構造維持の働きをしている。その主な構成要素は硝子体線維、内境界膜およびミュラー細胞である。硝子体線

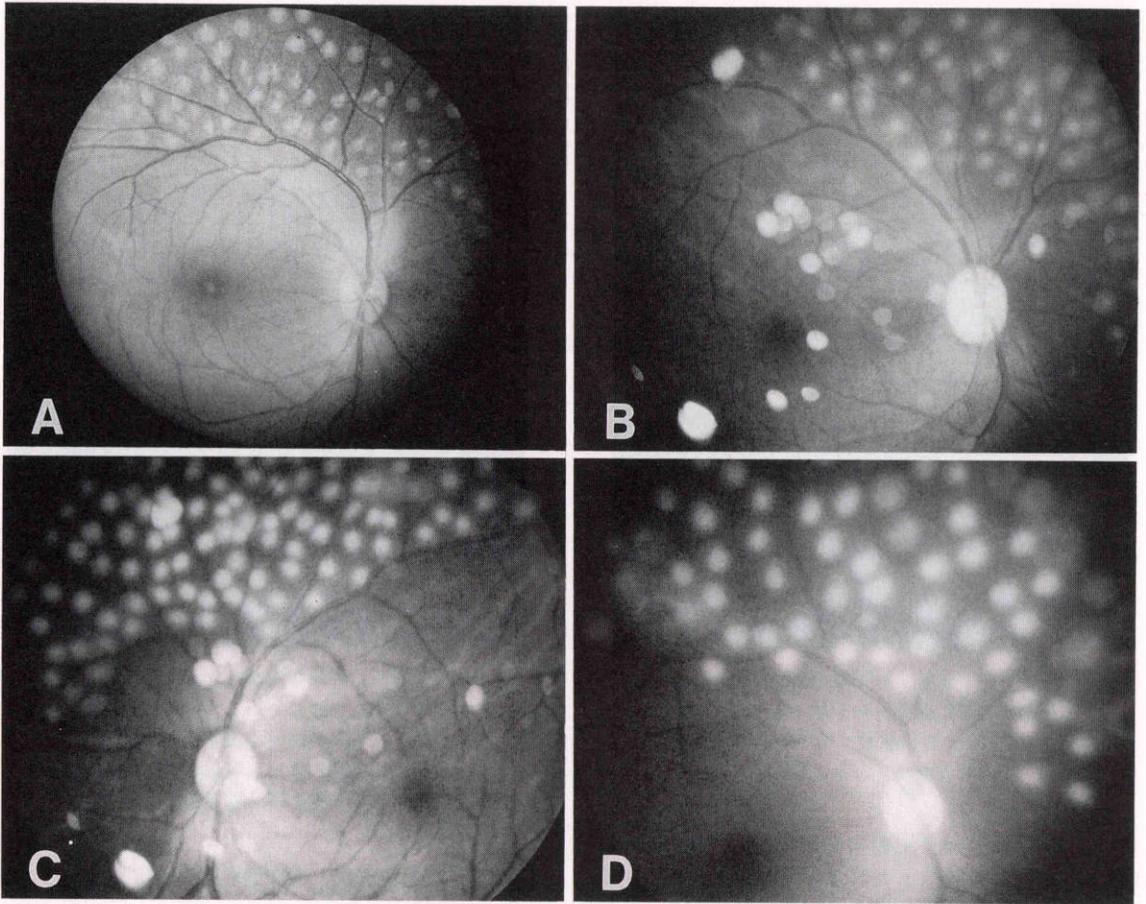


図4 A, 弱凝固の眼底所見：凝固部は境界不明の淡い白色斑として網膜深層に認められる。B, 中等凝固の眼底所見：凝固部は境界明瞭な白色斑として認められる。C, 強凝固の眼底所見：凝固斑は灰白色を呈し、周囲に halo を伴っている。D, 過強凝固の眼底所見：強裂な凝固により爆発や硝子体出血を生じている。

維は硝子体基底部から視神経乳頭に向かう方向性を有しており、家兎の硝子体線維の径については、無固定・凍結乾燥法による原ら<sup>11)</sup>や成田ら<sup>12)</sup>の走査電顕所見によればそれぞれ200~900nm および25~1,500nm (最小25nm)で、片山<sup>13)</sup>によるディープエッチング法では14~16nm であると報告されている。またサル<sup>14)</sup>の硝子体線維の径は片山<sup>14)</sup>のディープエッチング法では18~20nm であり、私たちの結果でも20nm とほぼ等しい数値であった。硝子体線維は径12~13nm のII型コラーゲンがグリコサミノグリカンなどと結合した状態で存在しており<sup>12)</sup>、同じ動物種においても報告者により硝子体線維径が若干異なる。これは無固定かあるいはアルデヒドによる固定、さらに臨界点乾燥法あるいは

凍結乾燥法などの標本作成過程の相違により硝子体中のグリコサミノグリカンなどの保存に差異が生じるためと考えられる。サルの硝子体線維径が私たちと片山<sup>13)</sup>では観察法の相違にもかかわらず、等しい数値を示したのは固定法がほぼ同一であるためと考えられる。硝子体線維と内境界膜の連絡様式については、すでにHogan<sup>15)</sup>が両者の連絡は直接でなく介在線維の存在することを人眼の透過電顕所見ですでに指摘している。今回のサル眼の結果でも硝子体線維は内境界膜網状層に存在する10nm の細線維を介して緻密層に連絡することが確認された。

内境界膜はミュラー細胞の基底膜であり、透過電顕によると他の細胞の基底膜と同様の構造からなってい

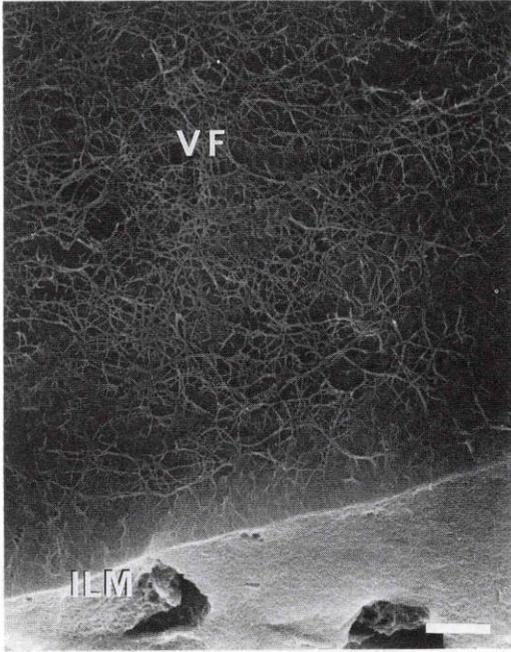


図5 弱凝固後の所見：硝子体線維の形状に異常は認められない。内境界膜(厚さ40nm)は平坦でミュラー細胞により支持されている。

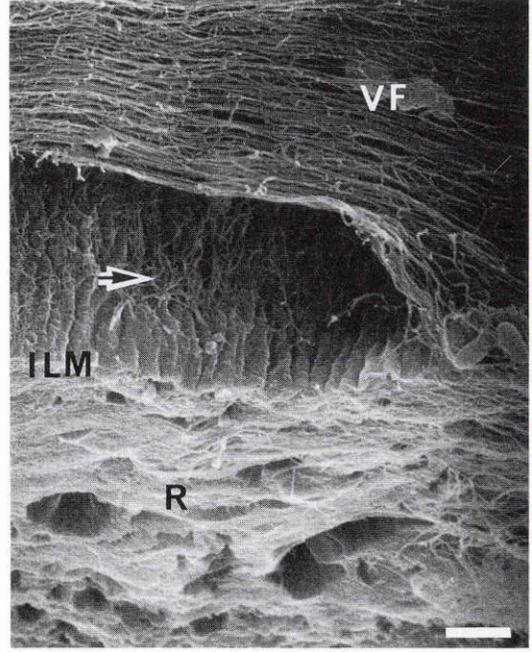


図7 強凝固後の所見：硝子体線維は集束し径200nmの太い線維を形成し、硝子体皮質に裂隙(矢印)が形成されている。内境界膜は著しく凹凸し、網膜(R)にはgliosisがみられる。

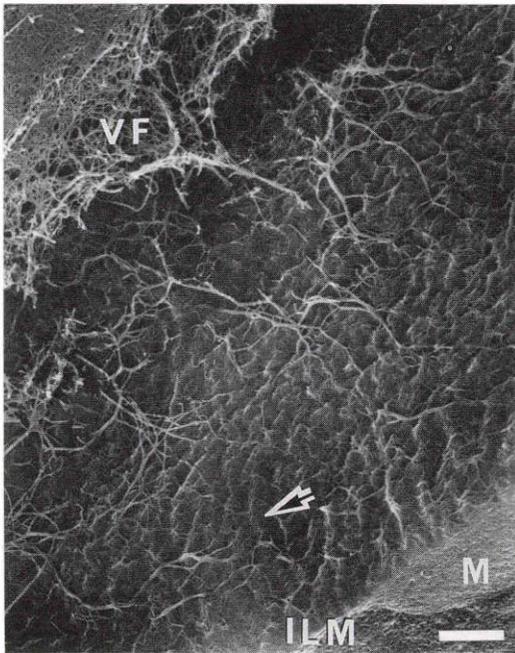


図6 中等凝固後の所見：径20~30nmの硝子体線維は内境界膜網状層の径10nmの細線維(矢印)と連絡している。硝子体網膜境界面に光凝固による変化はみられない。

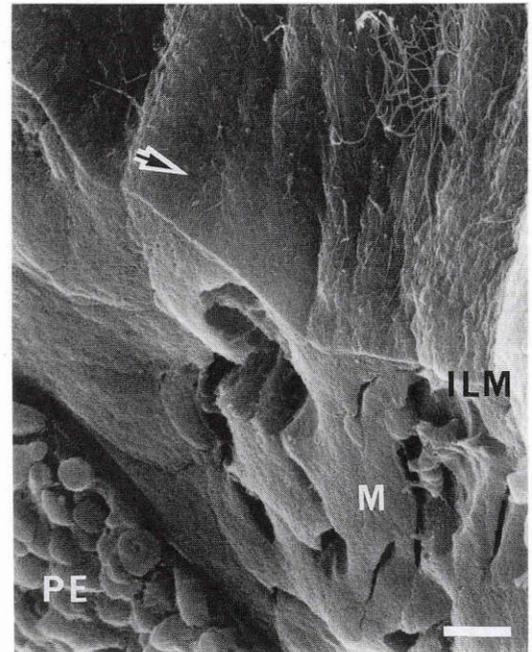


図8 強凝固後の所見：内境界膜に連絡する硝子体線維の配列は不均一となり、硝子体線維の欠落した部分もみられる。網膜内に網膜色素上皮細胞(PE)が存在する。

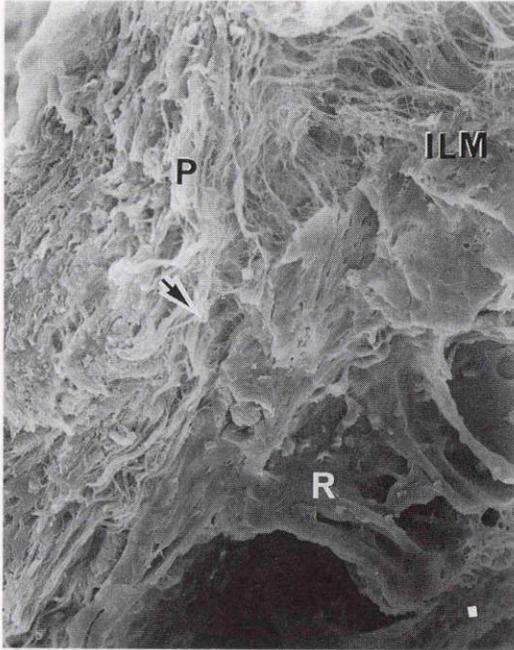


図9 過強凝固後の所見：硝子体に線維膜(P)が形成され、網膜と強固に癒着している(矢印)。網膜は菲薄化して神経要素は殆ど消失している。

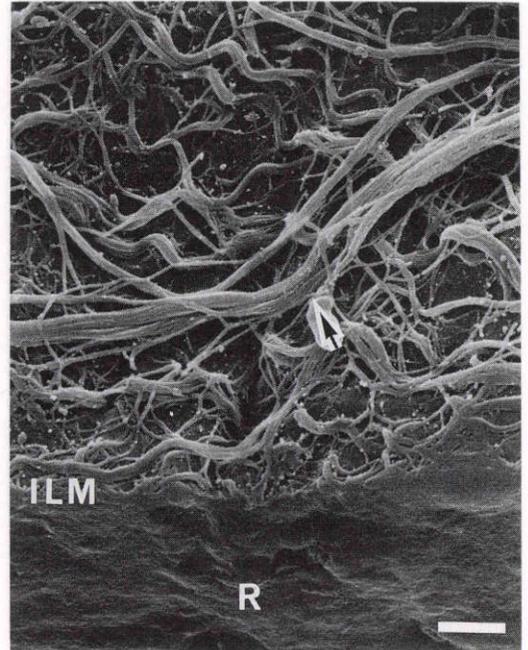


図11 過強凝固後の所見：径20nmの硝子体線維のほかにI型コラーゲンと思われる径200~300nmの太い線維(矢印)が多数みられる。

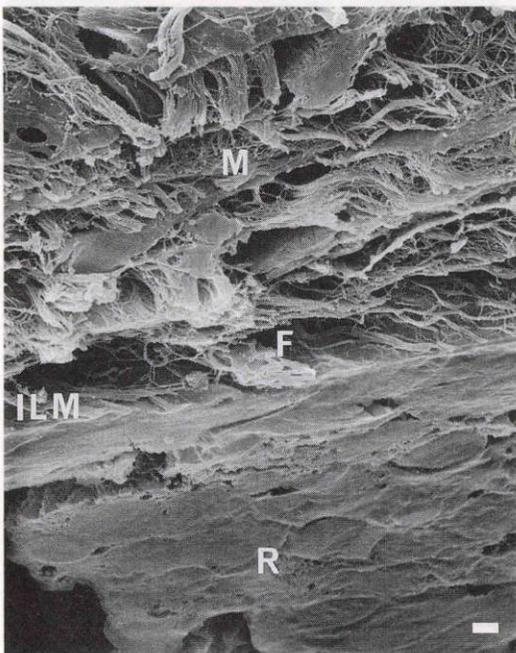


図10 過強凝固後の所見：線維膜は大小不同の硝子体線維と線維芽細胞のような細胞(F)からなっている。

る<sup>16)</sup>。すなわち、網膜側よりミュラー細胞に接する電子密度の低い透明層、電子密度の高い等質性物質とIV型コラーゲンからなる狭義の基底膜もしくは基板<sup>17)</sup>と呼ばれる緻密層および硝子体線維に連絡する細線維の網状層の3層から構成されている。内境界膜の厚さは家兎や小児では薄く均一で部位による差はみられないが、成熟したサルや成人では部位による差がみられ、周辺部では薄く後極部では厚くなり中心窩で再び薄くなる<sup>18)19)</sup>。サルの緻密層の厚さは後極部で60~300nm、周辺部で40nmであるとされており、私たちの切断標本でも赤道部の内境界膜緻密層の厚さは正常対照眼が40nmで、強凝固以下の条件ではその前後でも厚さに変化はなかった。

内境界膜とミュラー細胞との接着には attachment plaque と呼ばれる hemidesmosome が関与しているが、この attachment plaque も周辺部、赤道部および中心窩にのみ存在し、後極部にはないとされている<sup>17)</sup>。Heegaard ら<sup>20)</sup>によると赤道部の内境界膜は標本作成過程でミュラー細胞から容易に分離したとのべているが、私たちの実験結果では内境界膜とミュラー細胞との接着は強固で切断に際しても剥離は起こさず、強い

接着様式の存在が示唆された。

後部硝子体剥離の病態については硝子体と内境界膜とがどの層で剥離もしくは分離するか完全には解明されていない。家兎における観察では、硝子体皮質内での分離<sup>21)</sup>と硝子体と網膜間の分離<sup>22)</sup>の2つの説があるが、Foos<sup>23)</sup>は人眼についての観察から後者の硝子体と網膜の分離であると主張している。しかしながら、異論がないわけではない<sup>10)</sup>。サルの場合は、硝子体網膜組織を蛋白分解酵素で処理した研究<sup>20)</sup>や今回のオスミウム酸処理による研究では硝子体線維と内境界膜の間で分離したが、実験群の光凝固眼の一部では皮質硝子体内での分離がみられた。これらの所見はすべて後部硝子体分離の一連の過程と考えられ、硝子体と内境界膜が解剖学的境界で完全に分離する場合と、硝子体皮質内で裂隙が発生する場合の双方が存在すると考えるのが妥当であろう。

光凝固の凝固条件と網膜の形態学的変化についてはTsoら<sup>1)</sup>やWallowら<sup>2)</sup>によって透過型電顕による研究がある。これらの凝固条件を参考にして今回の断面の走査電顕所見をまとめると次のようになる。

弱凝固および中等凝固は病理組織所見で網膜外層に作用して内層には殆ど作用しないもので(WallowのGrade IおよびIIに相当)、今回の3次元的検索でも硝子体線維や内境界膜などの硝子体網膜境界面に全く影響を与えないことが明らかになった。強凝固は網膜全層に病理変化がおよぶもので(WallowのGrade IIIに相当)、硝子体線維の網状構造に裂隙が生じ、さらに進行すると内境界膜と硝子体線維の連絡が欠落し、凝固部に一致して後部硝子体の分離がおこった。網膜への熱作用が硝子体線維にまで波及することは十分推測されるが、今回の3次元的観察では内境界膜緻密層に明らかな変化は認められなかった。

過強凝固では網膜の断裂部より硝子体中に線維膜が作成され、この中には既存の硝子体線維と異なる径200~300nmの太い線維がみられた。この線維は増殖細胞より産生されたI型コラーゲンと推測され、著しい硝子体牽引の原因となっていた。土井ら<sup>3)</sup>や青木<sup>5)</sup>は家兎に強い光凝固を行った場合の癒着期の変化を透過電顕で検討し、内境界膜の断裂部からグリア細胞が硝子体腔へ侵入増殖している所見を確認している。硝子体網膜境界面の変化は光凝固の熱作用が網膜内層に及ぶか否かにより著しく異なる。すなわち、網膜内層まで凝固された場合は硝子体に裂隙形成や分離がおこり、さらに内境界膜の断裂のある場合はこの部よりグ

リア細胞や網膜色素上皮細胞の硝子体中への増殖が誘発されて網膜前膜形成や硝子体牽引を惹起すると考えられる。

おわりに、今回の実験結果から弱凝固および中等凝固は硝子体網膜境界組織の3次元構造に影響を与えないが、強凝固以上の光凝固は硝子体牽引の発生進展に関与することが判明した。今後、透過型電顕に特殊染色法を用いて、さらに検討する予定である。

おわりに、電顕の技術についてご指導賜りました宮崎医科大学解剖学第2講座教授相川英三先生に深謝申し上げます。

本論文は第91回日本眼科学会で発表した。

#### 文 献

- 1) Tso MOM, Wallow IHL, Elgin S: Experimental photocoagulation of the human retina. I. Correlation of physical, clinical, and pathologic data. Arch Ophthalmol 95: 1035—1040, 1977.
- 2) Wallow IHL, Tso MOM, Elgin S: Experimental photocoagulation of the human retina. II. Electron microscopic study. Arch Ophthalmol 95: 1041—1050, 1977.
- 3) 土井治道, 三木弘彦: 強度光凝固による網膜硝子体境界付近の組織学的変化。特に硝子体細胞の動態について。日眼 89: 786—796, 1985.
- 4) 三木徳郎, 三井敏子: Xenon 光凝固による家兎網膜内面の変化について。走査型電顕の観察。日眼 81: 804—817, 1977.
- 5) 青木昭彦: 有色家兎網膜に対するルビーレーザー光凝固による実験的研究。(其の4) 照射直後の走査型電顕の試み。日眼 78: 780—791, 1974.
- 6) 児玉芳久, 益山芳正, 萩原 忍他: レーザー汎網膜光凝固に関する実験的研究。第1報。照射条件の差異による血液網膜柵機能の変化について。日眼 91: 604—612, 1987.
- 7) 児玉芳久, 益山芳正, 萩原 忍他: レーザー汎網膜光凝固に関する実験的研究。第2報。照射条件の差異によるERGへの影響について。日眼 投稿予定。
- 8) 益山芳正, 児玉芳久, 松浦義史他: レーザー汎網膜光凝固に関する実験的研究。第3報。照射条件の差異による脈絡膜血管構築への影響について。日眼 投稿予定。
- 9) Tanaka K, Naguro T: High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. Biomed. Res 2(Suppl): 63—70, 1981.
- 10) Daicker B, Guggenheim R, Gywat L: Raster-elektronenmikroskopische Befunde an Netzhautinnenflaechen. II. Hintere Glaskoerperabhebung. Graefe's Arch Clin Clin Exp

- Ophthalmol 204: 19—29, 1977.
- 11) 原 彰, 清水由規: 凍結乾燥法による硝子体腔内硝子体全体の観察法. 走査電顕所見. 日眼 89: 1267—1271, 1985.
  - 12) 成田清美, 吉本弘志: 硝子体基本構造の検討. 第2報. いわゆる前部硝子体膜について. 眼紀 37: 1617—1622, 1986.
  - 13) 片山 優: 網膜硝子体境界面の超微細構造の研究. 第1報. ディープエッチング凍結割断報によるウサギ網膜内境界膜の観察. 眼紀 37: 147—155, 1986.
  - 14) 片山 優: 網膜硝子体境界面の超微細構造の研究. 第2報. ディープエッチング凍結割断法によるサル網膜内境界膜の観察. 日眼 90: 1255—1263, 1986.
  - 15) Hogan MJ: The vitreous, its structure, and relation to the ciliary and retina. Invest Ophthalmol 2: 418—445, 1963.
  - 16) 近藤尚武: 基底膜の構造と構成. 細胞 17: 379—382, 1985.
  - 17) Foos RY: Vitreoretinal juncture; topographical variations. Invest Ophthalmol 10: 801—808, 1972.
  - 18) 松尾信彦, 喜多島昌二, 長谷川栄一: 人眼網膜内境界膜の電子顕微鏡的研究. 眼紀 14: 428—441, 1963.
  - 19) Matsumoto B, Blanks JC, Ryan S: Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 71—82, 1984.
  - 20) Heegaard S, Jensen OA, Prause JU: Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. SEM on frozen resin-cracked and enzyme-digested retinas of macaca mulatta. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 224: 355—360, 1986.
  - 21) 原 彰, Lean JS, Ryan SJ 他: 後部硝子体剝離層の微細構造. 動物モデルの作成. 臨眼 39: 589—592, 1985.
  - 22) Miller B, Lean JS, Miller H, Ryan SJ: Intravitreal expanding gas bubble. A morphologic study in the rabbit eye. Arch Ophthalmol 102: 1708—1711, 1984.
  - 23) Foos RY: Ultrastructural features of posterior vitreous detachment. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 196: 103—111, 1975.

(第91回日眼総会原著)