

家兎実験的閉塞性黄疸における網膜色素上皮細胞 及び視細胞外節の組織学的検討 (図12)

岡本 勲夫 (鳥取大学医学部眼科学教室)

Histological Studies of the Retinal Pigment Epithelium and Photoreceptor in the Jaundiced Rabbit

Isao Okamoto

Department of ophthalmology, Tottori University School of Medicine

要 約

閉塞性黄疸が網膜機能に及ぼす影響について、総胆管結紮を行った家兎を用いて、透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡にて経時的に検討した。結紮後早期には網膜色素上皮細胞の障害は軽度であったが、結紮後4週間目には細胞表面の microvilli が減少し、所々大型化した細胞が現われた。結紮後2週間目で視細胞外節には finger print 様の変性を生じ、その配列が乱れていた。この変性は週を経るにつれ高度になった。以上のことより黄疸時あるいは肝障害時の網膜機能異常は網膜色素上皮細胞及び視細胞外節の形態的变化に起因することが判明した。(日眼 92:1537-1544, 1988)。

キーワード：黄疸，網膜色素上皮細胞，視細胞外節，透過型電子顕微鏡，走査型電子顕微鏡

Abstract

The outer segment of the rod visual cell and retinal pigment epithelium (RPE) of albino rabbit after ligation of the common bile duct were observed by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Finger print degeneration on the top of the rod visual cell occurred and the arrangement was irregular after 2 weeks. But degeneration on the RPE was very little. The microvilli on the RPE surface were decreased and the outer segment was bizarre in shape and varied in size after 4 weeks. This type of degenerations increased after 5 weeks. The functional abnormalities of retina in jaundice and liver disease are caused by their degeneration. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1537-1544, 1988)

Key words: Jaundice, Rod visual cell, RPE, SEM, TEM

I 緒 言

肝臓疾患に際して現われる全身症の特有なものは黄疸であり、この際の結膜・眼瞼の黄染は昔よりよく知られている。また網膜機能異常として暗順応の障害・視野の同心性狭窄・視力障害¹⁾²⁾なども報告され、実験的にも組織学的³⁾⁴⁾、電気生理学的⁵⁾に研究がなされて

いる。この網膜機能異常の原因として Vitamine A (以下 Vit. A) の欠乏がまず考えられてきた⁶⁾。しかし実験的黄疸動物の研究において肝細胞中の Vit. A に異常がないと報告され、これらの機能異常は Vit. A 欠乏という単一の原因によるものではないと考えられている²⁾。

また網膜色素上皮細胞 (以下 RPE) はレチノールを

別刷請求先：683 米子市西町86 鳥取大学医学部眼科学教室 岡本 勲夫 (昭和63年6月2日受付)

Reprint requests to: Isao Okamoto, M.D. Dept of Ophthalmol., Tottori Univ. School of Med.

86 Nishi-machi, Yonago 683, Japan

(Accepted for publication June 2, 1988)

貯蔵し視細胞との間に Vit. A 代謝サイクルを形成していることは以前より知られている事実であるが、1970年この RPE が脱落した視細胞外節を食処理していることが証明された⁸⁾。それ以来この細胞の多岐にわたる重要な機能が明らかにされ、臨床的にも非常に興味を持たれている。

そこで、成熟白色家兎に実験的閉塞性黄疸を惹起させ、RPE がどのような形態的变化を生ずるかについて、透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いて経時的に観察した。また視細胞外節(以下外節)は RPE と密接な関係を有するためあわせて観察した。

II 実験方法

1. 実験材料

検眼鏡、細隙灯顕微鏡検査、ERG 検査で異常を認めない体重2500g 前後の成熟白色家兎10羽を用い2羽を対照とした。

2. 実験方法

1) 閉塞性黄疸発生方法

術前処置として前日夕方より手術当日まで絶食とし、ネブタール(50mg/kg)を耳静脈より注射して全身麻酔を行った。上腹部を剃毛消毒後、正中で開腹を行い、肝臓及び周囲の組織を損傷しないように注意して総胆管を十二指腸開口部付近で絹糸を用いて二重結紮し閉塞性黄疸を惹起させた後、2、3、4及び5週間後に各2羽ずつ、午後4時頃に両眼球を摘出し、1眼を透過型電子顕微鏡用試料、他眼を走査型電子顕微鏡用試料として標本作製した。

2) 体重測定法及び眼部観察方法

総胆管結紮前及び結紮後1週間毎に体重を測定した。また同様に総胆管結紮前及び結紮後1週間毎にミドリンにて散瞳し、直像鏡及び細隙灯顕微鏡にて眼底・中間透光体を観察した。

3) 血清 Vit. A 値測定法

総胆管結紮前および結紮後4週間目に高速液体クロマトグラフィー法にて測定した。

4) 血清総ビリルビン値測定法

総胆管結紮前および結紮後1週間目と眼球摘出時に Jendrassik-Cleghorn 法で測定した。

5) 透過型電子顕微鏡用試料作製法

摘出した眼球をただちに1.5%グルタルアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液にて2~3分固定後赤道部で半切し、さらに同液にて15分固定後細切し、再び同液にて45分浸漬固定を行った。ついで2%オスミウム

酸-0.1M リン酸緩衝液にて2時間後固定を行い、上昇アルコール系列脱水後クエットールに包埋した。超薄切片は、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で二重染色を行った後、日立製 H-300型電子顕微鏡にて観察した。

6) 走査型電子顕微鏡用試料作製法

眼球摘出後ただちに眼球を1.5%グルタルアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液中で赤道部で2分割し、すばやく注意深く sensory retina を剥離した。ついで RPE 側と外節側をそれぞれ細切し、同液にて1時間浸漬固定を行った。その後1%オスミウム酸-0.1M リン酸緩衝液による再固定、2%タンニン酸による導電染色、1%オスミウム酸-0.1M リン酸緩衝液による再再固定(O-T-O法)を行い、上昇アルコール系列脱水、酢酸イソアミルによる透徹、CO₂臨界点乾燥、白金パラジウム蒸着を行い、日立製 S-430型電子顕微鏡にて観察した。

III 結果

1. 体重及び眼部の変化

週を経るごとに体重は減少し、5週間後には約15%の減少がみられた。検眼鏡、細隙灯顕微鏡検査では観察期間中、眼底及び中間透光体には変化はみられなかったが、結紮後3~7日目に結膜、強膜、耳介部にビリルビンによると思われる黄染が認められた。

2. 血清 Vit. A 値

結紮前の血清 Vit. A 値は平均75.8 μ g/dlであったが結紮後4週間では28.7 μ g/dlに低下していた。

3. 血清総ビリルビン値

血清総ビリルビン値は結紮後1週間で平均13.8mg/dlと最も高く、結紮後5週間には平均6.8mg/dlであった。

4. 透過型電子顕微鏡所見

対照の正常白色家兎眼の RPE は、高さ5~7 μ m の1層の細胞より成り、脈絡膜毛細血管に接する基底部と外節に対する頂部とがあり、頂部より細胞突起が及び外節の先端を取り囲み一部は外節間にのび、細胞質は主として滑面小胞体で占められ、粗面小胞体も散見され、粗面小胞体は頂部に多く存在した(Fig. 1)。

結紮後2週間では、RPE 内の核は腫大し、粗面小胞体は著しく拡張増加し、遊離リボソームも増加していた(Fig. 2)。粗面小胞体の拡張増加は RPE 頂部で特に著明であった(Fig. 3)。RPE 細胞質内には RPE に食食され消化中と思われる外節が認められ、所々空胞化した部分も認められた(Fig. 2)。また外節の先端に

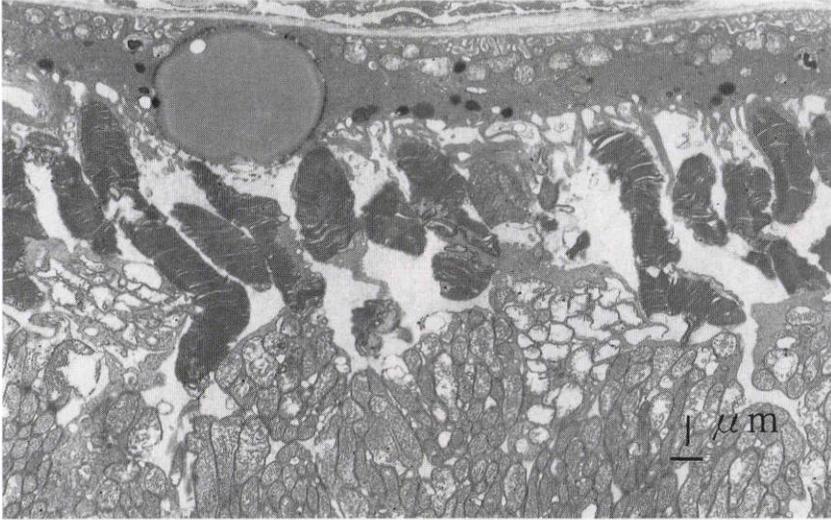


Fig. 1 対照眼のRPEと外節

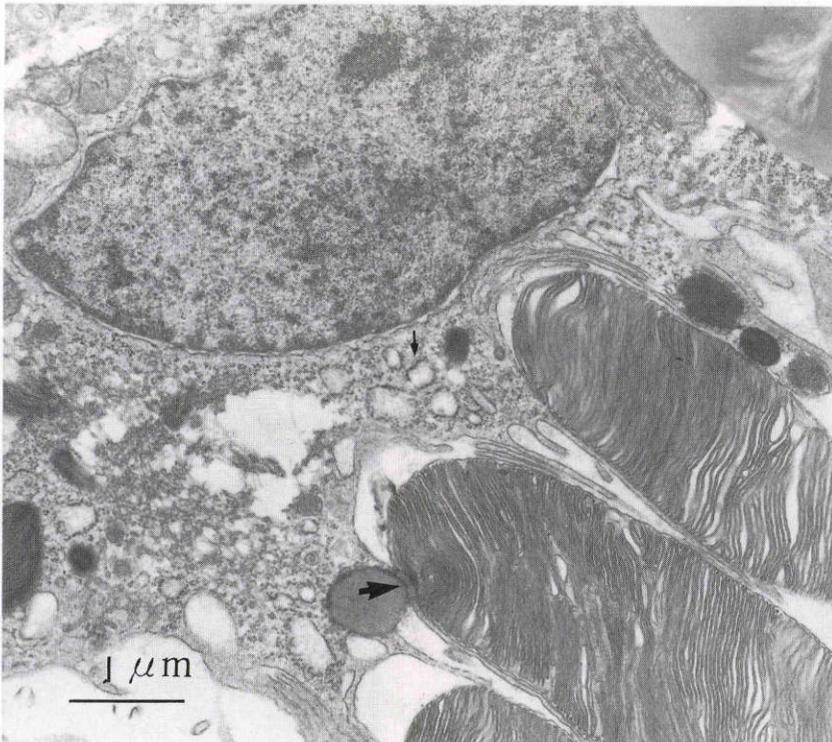


Fig. 2 結紮後2週のRPEと外節。粗面小胞体は拡張し(↑印), 外節の先にfinger print様の変性を認める(↑印)。

finger print 様の変性と思われる部分が認められた (Fig. 2)。

結紮後3週間のRPEは、核は周辺部が陥入し腫大

するとともに、2週間後と同様に粗面小胞体の拡張増加が認められた。基底部の basal infolding は変性哆開し、不明瞭な部分が認められた (Fig. 4)。

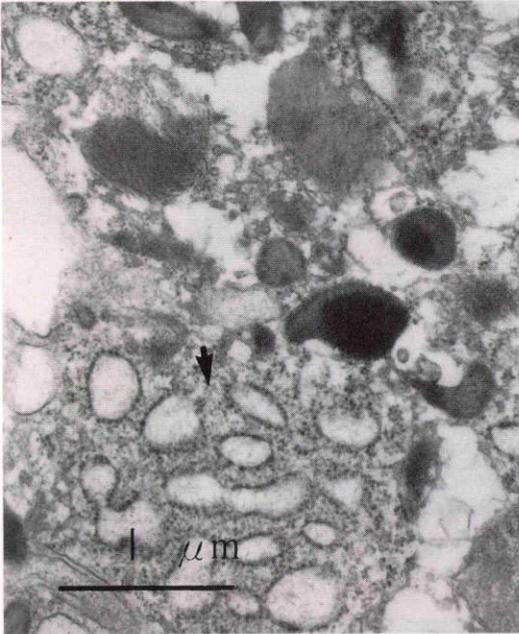


Fig. 3 結紮後2週のRPE 頂部. 粗面小胞体が拡張・増加し,遊離リボソームの増加が認められる(↑印).



Fig. 5 結紮後4週のRPE と外節, 視細胞外節の変性は著しく進行している(↑印).

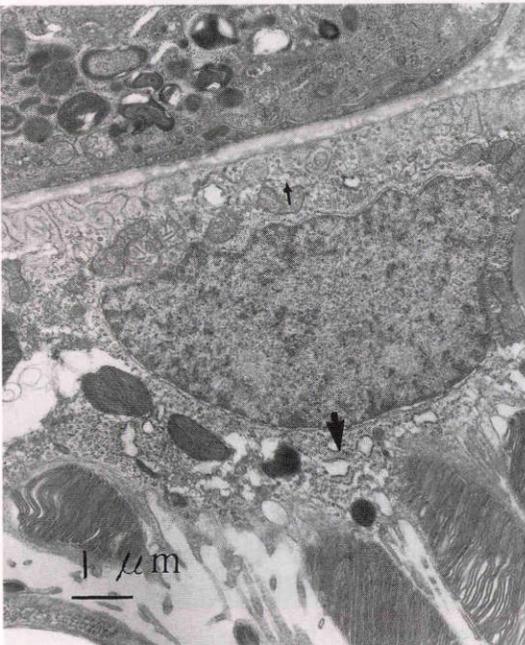


Fig. 4 結紮後3週のRPE と外節. RPEの核は腫大するとともに周辺部が陥入している. RPE 基底部の basal infolding は変性・哆開し不明瞭な部分が認められる(↑印). RPE 頂部の粗面小胞体は2週後と同様に拡張している(↑印).

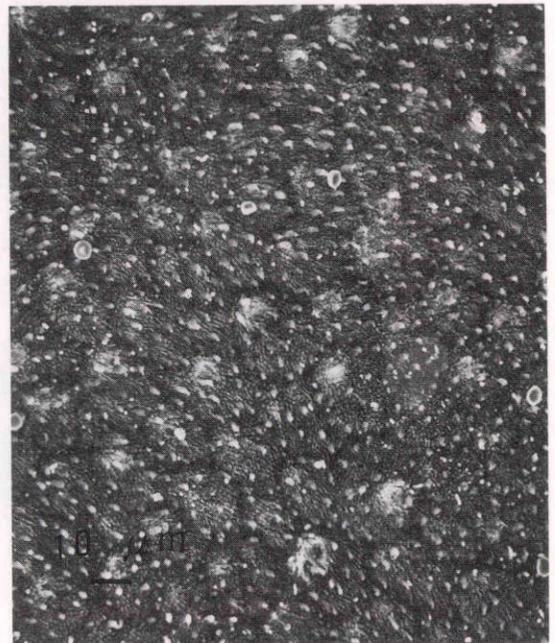


Fig. 6 対照眼のRPE

結紮後4週間のRPEは, 2週間後のものに比べ貪食されたものが増加していた. 粗面小胞体は拡張していたが, 2週間後のものほど著明ではなかった. 2~3

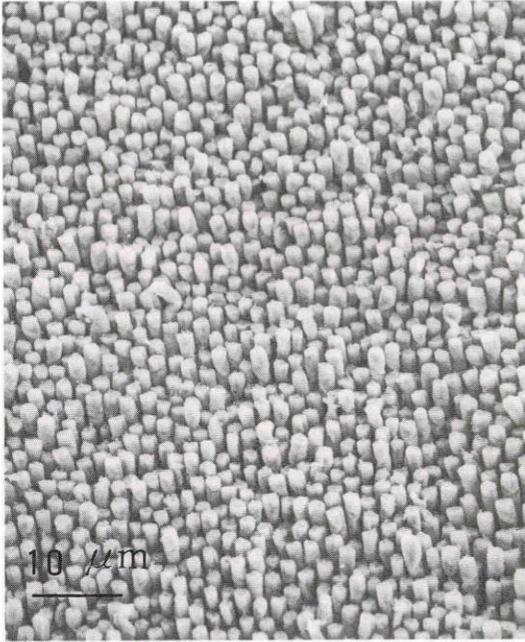


Fig. 7 対照眼の外節

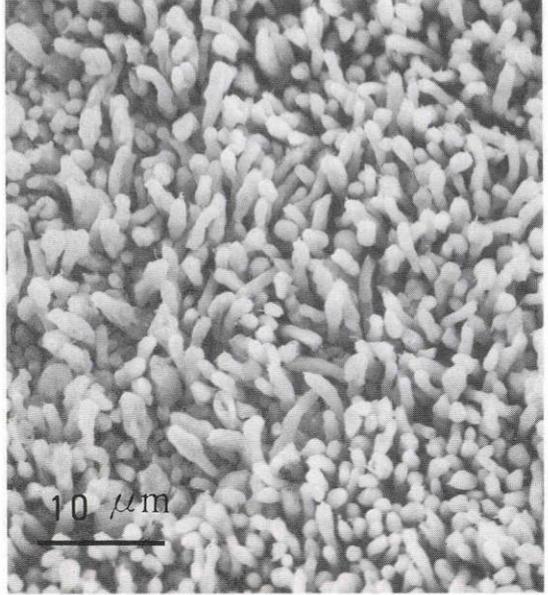


Fig. 9 結紮後2週の外節

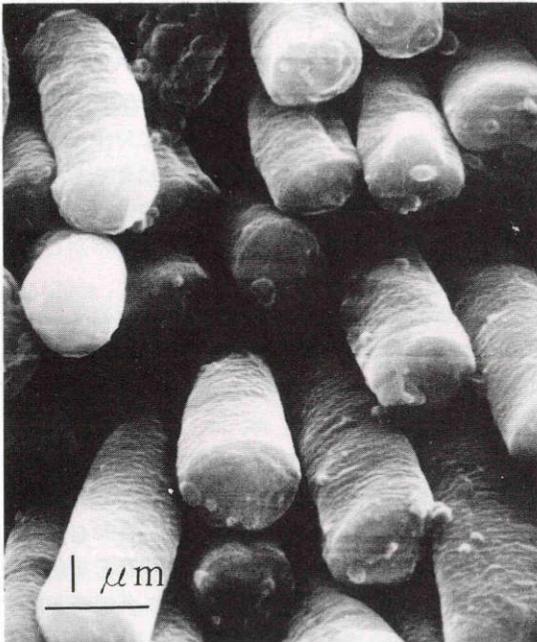


Fig. 8 対照眼の外節の強拡大像

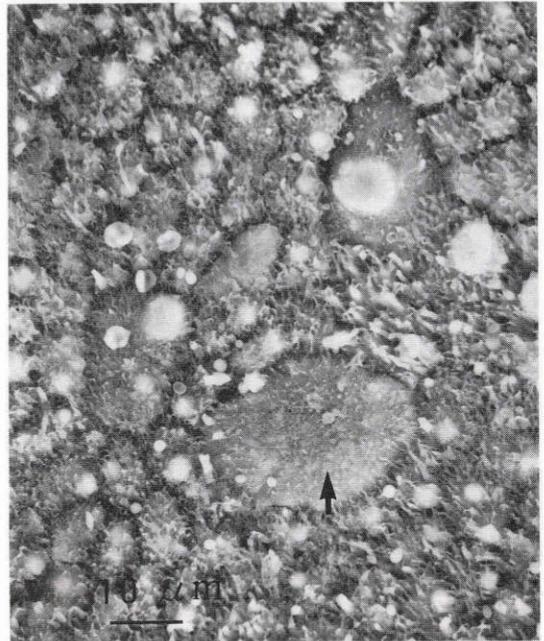


Fig. 10 結紮後4週のRPE. RPEの六角形の形態が不明瞭で、大型化した細胞が認められる(↑印).

週間後のものに比して外節の変性は著しく進行していた (Fig. 5).

5. 走査型電子顕微鏡所見

対照の白色家兎眼のRPEはほぼ同大で六角形を呈し、細胞表面には多数のmicrovilliが認められる (Fig. 6). また外節はほぼ均等な細長い円筒形で規則正しく

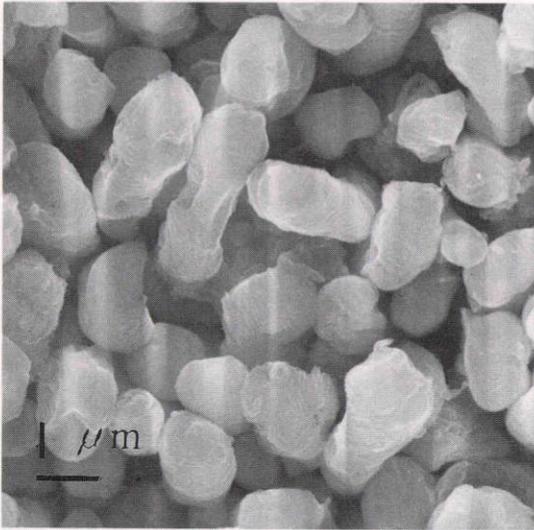


Fig. 11 結紮後4週の外節

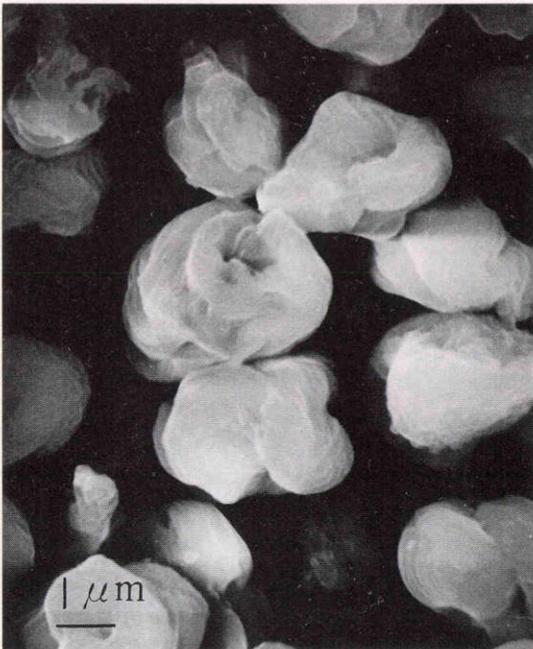


Fig. 12 結紮後5週の外節

配列し (Fig. 7), その強拡大像では外節内部の円板が長軸に直交する面上に整然と重積されているのが認められる (Fig. 8).

結紮後2週間では, 外節の配列は乱れ, その先端の大きなものが所々で見られた (Fig. 9). 結紮後4週間では, RPE側は6角形の形態が不明瞭で, 細胞表面の

突起が減少し, 所々大型化した細胞が見られた (Fig. 10). また外節の配列は著明に乱れ, その先端は非常に不規則な多角形を呈し, 大小不同が著明であった (Fig. 11).

結紮後5週間では外節の先端は4週間後のものよりさらに変形していた (Fig. 12).

IV 考 按

黄疸が長期に亘る場合あるいは肝機能障害時の夜盲は古くよりよく知られ, また視野の同心性狭窄・色覚異常・視力障害・瞳孔反応遅延¹²⁾などの報告がある.

しかし, Vit. A 欠乏を伴わない慢性閉塞性黄疸患者や急性期の閉塞性黄疸患者は自覚的に夜盲症を訴えることはなく, 臨床的にもルーチンの ERG や暗順応検査で異常を示すことは少ないため, 詳細に網膜機能を検討した報告は殆んど見当たらない. 最近船田⁹⁾が総胆管結紮後の網膜機能の電気生理学的研究において外節の機能異常として早期視細胞電位振幅および Scotopic ERG の b 波振幅の低下を報告し, 船田ら⁸⁾は各種肝疾患における血清 Vit. A 値及び血清レチノール結合蛋白値と網膜機能の関係について ERG と暗順応の結果を報告した.

しかし, 従来の実験的組織学的研究はいずれも光顕レベル^{3,4)}のもので電子顕微鏡を用いた詳細な検討はなされていない. さらに網脈絡膜疾患に対する電子顕微鏡の研究の多くは透過型電子顕微鏡によるものが殆どで, 走査型電子顕微鏡によるものは少なく, 特に外節側を走査型電子顕微鏡にて観察したものは殆ど見当たらない.

そこで今回著者は急性の黄疸及び胆汁鬱滞さらにそれらに基く代謝異常が RPE 及び外節にどのような形態的变化を及ぼすかについて透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡にて観察した.

結紮後2週間目の RPE 内の変化としては, 透過型電子顕微鏡像で核の腫大・粗面小胞体の著しい拡張増加・遊離リボゾームの増加が認められ, RPE 自体は活性化の状態にあると考えられる. また, RPE 細胞質内には RPE に貪食され消化中と思われる外節が多数認められたが, 所々に空胞化した部分も認められ, 全く正常とは考えられない. 即ち, RPE は多少の変性を生じているが, 活発に外節の貪食処理を行おうとしている状態であると考えられる. 同時期の外節の走査型電子顕微鏡像は対照に比して配列が乱れ, その先端は少し不規則な多角形を呈しており, 透過型電子顕微鏡像

ではその先端は finger print 様の変性として認められた。この所見より結紮後2週間ですでに外節の変性は始まっていることが判明した。外節の栄養はRPEを通して行われているため、外節の変性はRPEの障害なくして生じるとは思われぬが、元来RPEのような貪食能力を有する細胞は種々の障害に強いことが類推でき、そのためにRPEの変性が軽度であると考えられた。結紮後3週間になるとRPE基底部の basal infolding の変性哆開と不明瞭な部分が認められた。このことよりRPEの血液網膜柵の barrier としての機能障害および脈絡膜との物質交換の障害が生じていることが推察できる。また結紮後2週間と同様に粗面小胞体の拡張も認められた。網膜の光障害の実験においても basal infolding が不規則でほとんど認められなくなった部分と粗面小胞体の拡張が同時に認められており⁹⁾、RPEが障害されていることとRPE内が活性化の状態にあることとは矛盾しない所見であると思われる。そして粗面小胞体が拡張している原因は、変性した外節を貪食処理するためと脈絡膜からの物質供給の不足のために細胞自ら必要な物質を作り出さなくてはならなくなったためではないかと推察している。結紮後4週間ではRPEの六角形の形態が不明瞭で、細胞表面の突起は減少していた。また外節の配列は著明に乱れ、その先端は非常に不規則な多角形を呈し、大小不同が著明になっていた。この所見よりRPEの変性した外節に対する貪食処理能力は飽和状態になり、外節の変性がより進行したものと推論される。

以上の結果より閉塞性黄疸時の網膜機能異常はRPE及び外節の変性に起因することが判明した。

このような形態的变化を生ずる原因としてまずVit. Aの欠乏が考えられるが、Vit. AはRPE内の小脂肪滴と滑面小胞体に貯蔵され¹⁰⁾¹¹⁾、PREと外節とを循環し再利用されると考えられ¹²⁾、RPEのVit. A貯留力は強いと考えられる。さらに動物をVit. A欠乏状態にしても網膜中のVit. A含有量はなかなか減少しない¹³⁾といわれている。また同様の実験系の電気生理学的研究においても活性化型Vit. Aを投与した群としなかった群との間に有意差はなかったと報告されている⁵⁾。以上のことより今回の実験では2週間後ですでに変化を生じておりVit. A単独の欠乏によるものとは考えられない。

次いでVit. A同様脂溶性VitであるVit. Eの吸収障害による欠乏も考慮される。Vit. Eは生体膜の過酸化反応を防御する抗酸化剤として知られ、特に外節に

は不飽和脂肪酸が多く、Vit. Eの欠乏は網膜色素変性症の原因の1つにあげられている¹⁴⁾からである。

さらに亜鉛は網膜内の alcohol dehydrogenase を介してロドプシン合成に関係しているといわれ¹⁵⁾、この欠乏も考慮される。

次にビリルビンによる網膜細胞障害については、本研究は閉塞性黄疸を惹起させたもので、非抱合ビリルビンが神経細胞に入れば核黄疸で知られるような中毒性障害を発生するが¹⁶⁾、家兎総胆管結紮後の血清ビリルビン値は2ないし3日目が最高とされており¹⁷⁾、本実験でも週を経る毎に総量は減少していたことよりビリルビンに因る直接の細胞障害とは考えにくく、ビリルビン代謝障害に伴う肝障害による糖代謝障害に起因する解糖系の異常が関係していると思われる¹⁸⁾。

また胆汁鬱滞時には胆汁中へのレシチンを中心としたリン脂質の増加及び胆汁酸合成障害に基く脂質代謝異常も生じる。特に外節は脂質濃度が高く、その外節膜はリン脂質が豊富である¹⁹⁾。また脂質に関して最近では構築脂質と機能脂質の2つが考えられている²⁰⁾。すなわち機能脂質が不足すると機能蛋白質と結合できず、代謝回転を介する情報伝達が不能になると考えられる。このことは現在RPEの貪食活性を制御していると考えられている melatonin と taurine の異常を類推させる²¹⁾。さらに、総胆管結紮後早期に肉眼的には著変は見られないが顕微鏡的には肝臓に網状壊死巣が出現するとされている²²⁾。

これらのことより、前述したRPEと外節の組織的变化は胆汁鬱滞および肝臓障害に起因したものと考えられる。

最後に、船田⁵⁾の詳細な電気生理学的研究においても有意の振幅の低下が認められなかった結紮後2週間目にも外節には変性を生じていたことより、閉塞性黄疸時には程度の差はあれ外節に形態的变化を生じていることが示唆された。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜りました藤永豊教授および本学病理学教室第二市原岡一教授、秋吉英雄教官に深謝いたします。なお本論文の要旨は第91回日本眼科学会総会(京都市)で報告した。

文 献

- 1) Sandberg MA, Rosen JB, Berson EL: Cone and rod function in vitamin A deficiency with chronic alcoholism and in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 84: 658—665, 1977.
- 2) 神鳥文雄, 藤永 豊: 消化器疾患に伴う眼疾患. *日本眼科全書*, XII, 24—28, 金原出版, 東京, 1962.

- 3) 根本 武：家兎の総輸胆管結紮により惹起せしめ得たる網膜色素上皮細胞並びに視細胞の変化に就いて。臨眼 23: 468—469, 1928.
- 4) 杉田余三：胆汁及其組成物質の眼に及ぼす影響(実験的研究)。臨眼 20: 136—143, 1925.
- 5) 船田雅之：家兎機械的閉塞性黄疸における網膜機能の電気生理学的研究。眼紀 38: 245—257, 1987.
- 6) 八束米吉：肝臓機能障害時の光神に就いて。日眼 47: 876—882, 1943.
- 7) Young RW: Visual cell. Scien Am 233: 80—91, 1970.
- 8) 船田雅之, 魚谷 純, 岡本勲夫：各種肝疾患における網膜機能の検討。臨眼 41: 832—833, 1987.
- 9) 伊藤貴司：白色家兎網膜の光による障害について。日眼 86: 433—448, 1982.
- 10) Young RW, Bok D: Autoradiographic studies on the metabolism of the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol 9: 524—536, 1970.
- 11) Bridges CDB: Storage, distribution and utilization of vitamin A in the eyes of adult amphibians and their adpoles. Vision Res 15: 1311—1323, 1975.
- 12) Berman ER, Segal N, Schneider A: A hypothesis for vitamin A cycle in the pigment epithelium of bovine retina. Neurochem 1: 113—122, 1980.
- 13) 広沢一成：人体組織学—感覚器。165—178, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 14) 早坂征次：網膜色素変性症の成因—研究の現状と将来の展望—。眼科 Mook, 26, 92—99, 1985.
- 15) McClain CJ, van Thiel DH, P, et al: Alterations in zinc, vitamin A, and retinol-binding protein in chronic alcoholics: A possible mechanism for night blindness and hypogonadism. Alcoholism. Clin Exper Research 3: 135—141, 1979.
- 16) 古賀俊逸：ビリルビン代謝異常と黄疸。肝疾患と代謝異常。222—304, 中外医学社, 東京, 1983.
- 17) 隅田喜一：機械的黄疸の発生に関する実験的研究, 特にラットと家兎における比較的検索。米子医誌 11: 418—434, 1960.
- 18) 山中正巳, 織田敏次：全動物をもちいる代謝異常。医化学実験法講座, 2A, 代謝および酵素 I, 132—134, 中山書店, 東京, 1971.
- 19) 雨宮次生：人体組織学—感覚器。231—240, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 20) 野沢義則：細胞膜の機能脂質。科学 53: 616—623, 1983.
- 21) 塚原 勇：網膜色素上皮細胞の機能。日眼 88: 1—21, 1984.
- 22) 市原岡一：黄疸発生の及ぼす肝神経支配の影響に関する研究。米子医誌 10: 1983—1999, 1959.

(第91回日眼総会原著)