

高血圧自然発症ラットにおける網膜細動脈口径不同の微細構造

—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観察—(図14)

三上 規 (弘前大学医学部眼科学教室)

Ultrastructural Study on Retinal Arteriolar Caliber Irregularity in Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)

Tadashi Mikami

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

要 約

前報において、我々はゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本観察法について報告した(日眼会誌91:353-359,1987)。今回は、この方法の利点を生かし、従来指摘されていた高血圧自然発症ラットにおける2種類の網膜細動脈口径不同に関して検索を行った。即ち、その一つは、高血圧症発症時から見られる孤立性の部分的な狭細であり、もう一つは、重症高血圧症を示す高血圧自然発症ラットに認められる視神経乳頭付近の動脈瘤様の膨大部である。本法による正確な病変部位同定のもとに行った病理組織学的検索では、この両者の違いは明らかであり、前者では狭細部に中膜筋細胞の部分的壊死が認められ、一方、後者では膨大部の中核より膨大部全域にかけて顕著な中膜壊死が認められた。よって、前者は従来指摘されていた機能的狭細と器質的狭細との移行期を示す所見と考えられ、後者は高血圧症末期における重篤な器質的病変であると推測された。(日眼 92:1712-1721,1988)

キーワード：高血圧自然発症ラット (SHR)、網膜細動脈、口径不同、病理組織、ゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本 (IVGFP)

Abstract

Caliber irregularity of various types and degrees has been described as a characteristic ophthalmoscopic finding in SHR. In this report, ultrastructural changes in the arteriolar wall with caliber irregularity in SHR were studied using an intravenously-injected gelatin fluorescein preparation (IVGFP) technique which is useful for estimation of the degree and location of caliber change. Animals used were 21 stroke resistant SHR rats (SHRSR) aged of 10 to 15 months and 28 stroke prone SHR (SHRSP) aged 6 to 9 months. All rats were examined under ether inhalation anesthesia. Systolic blood pressure, measured by the tail cuff method, was 183.9 ± 5.7 mmHg and 231.8 ± 5.4 mmHg in SHRSR and SHRSP, respectively. Diffuse narrowing of the retinal arteriole was observed in all rats and ampullar dilatation of the arteriole was found near the optic disc in three eyes of two SHRSP rats on ophthalmoscopy carried out prior to microscopic examinations after enucleation. Fluorescence microscopy of IVGFP revealed focal narrowing of retinal arteriole in SHRSR, though the change was hardly confirmed by ophthalmoscopic observation because of cataract. Ampullar dilatation of retinal arterioles were estimated in SHRSP. On light and electron microscopy of the same materials two types of caliber irregularity were observed. In SHRSR with focal narrowing, intracellular necrosis was found in the smooth muscle cells at the narrowed portion and vacuolar degeneration was observed

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(昭和63年7月12日受付)

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

(Accepted for publication July 12, 1988)

in endothelial cells of the arteriolar wall peripheral to the focal narrowing, while deposition of lipofuscin in the smooth muscle layer was the only finding in the wall of the arteriole central to the focally narrowed portion. In SHRSR with ampullar dilatation of the retinal arteriole, smooth muscle cell necrosis and thickened media were found at the narrowed portion of the arteriole central to the ampullar dilatation. Marked necrosis of smooth muscle cell and disappearance of the inner elastic lamina were found at the ampullar portion, and slight thickening of the media and slight necrosis of smooth muscle cell were found at the narrowed portion of the arteriole peripheral to the ampullar portion. The vascular changes in SHRSR were considered likely to be the changes in an intermediate phase between functional and organic narrowing in hypertension and those in SHRSR were likely to be a lesion similar to aneurysms found in human retina with sustained severe hypertension. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1712—1721, 1988)

Key words: Spontaneously hypertensive rat (SHR), Retinal arteriole, Caliber irregularity, Intravenously injected gelatin fluorescein preparation (IVGFP), Histopathology

I 緒 言

実験動物における網膜の血管構築並びに循環動態の研究は、通常の方法による眼底検査、蛍光眼底撮影による生体観察を含め、血管内色素注入法^{1)~3)}、樹指注入による鋳型標本⁴⁾⁵⁾やトリプシン消化標本^{6)~8)}など種々の方法を用いて行われている。特に高血圧による網膜血管障害については、高血圧自然発症ラット（以下SHRと略す）を用いて多くの詳しい研究がなされている^{9)~19)}。しかし、これまでは、同一部位の眼底、蛍光眼底の臨床所見と病理組織学的所見とを精密に対比することが困難であった¹⁴⁾¹⁵⁾。また色素注入法、樹指注入による鋳型標本法やトリプシン消化標本法などでは、一旦標本を作成してしまうと他の病理組織学的検索が不可能になってしまう欠点がある。そこで今回著者は、先に著者らが考案した実体顕微鏡レベルで血管構築や血管機能異常の詳細な観察を行い得、さらに同一部位を精密に同定しつつ準超薄切片および超薄切片による微細構造の観察も可能なゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本（以下IVGFPと略す）観察法²⁰⁾を用い、口径不同を示すSHRの網膜細動脈を観察し興味ある結果を得たので報告する。

II 実験材料および方法

1) 実験材料

本実験には2群の雄性SHRを用いた。即ち、月齢10~15(11.9±1.6)カ月の脳卒中抵抗性高血圧自然発症ラット（以下SHRSRと略す）21匹と月齢6~9(7.4±1.3)カ月の脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（以下SHRSPと略す）28匹を用いた。この各群に

おける収縮期血圧は、それぞれ176~194(183.9±5.7)mmHg, 221~239(231.8±5.4)mmHgであった。収縮期血圧は、実験前1週間以内にtail cuff methodにより夏目製作所製ラット血圧計(KN-210)を用い測定した。

2) 実験方法

これらのラットの瞳孔を予め0.5%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリンの混合溶液で散瞳させ、エーテル麻酔下で検眼鏡を用いて眼底を観察し、びまん性狭細または口径不同の有無を検討した。そして口径不同のあるラットについて前報²⁰⁾に準じてIVGFPを作製した(図1)。観察には、BV(blue violet)落射型蛍光顕微鏡(オリンパスBH2-RFK;励起フィルター410nm,吸収フィルター530nm)を用いた。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を使用した。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で再固定後、2%オスミウム酸で固定しアルコール系列にて脱水し、プロピレンオキサイドに浸漬し、エポキシ樹脂に包埋し、切片を作製した。準超薄切片はトルイジンブルー染色を施し蛍光顕微鏡写真の計測値をもとにして精密な部位同定をしつつ光学顕微鏡(オリンパスAHBS-514)による観察を行い、超薄切片はウランおよび鉛で電子染色し透過型電子顕微鏡(日立12-AS,日本電子JEM-100CX)を用いて観察した(図2)。

III 結 果

SHRSRにおいては全例に、びまん性の網膜細動脈

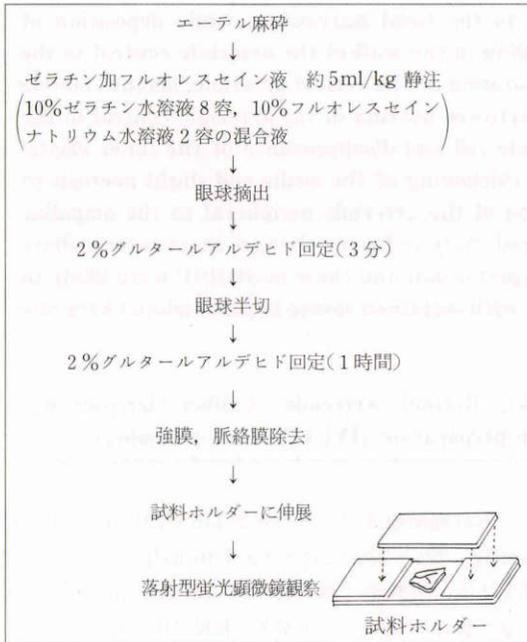


図1 方法1

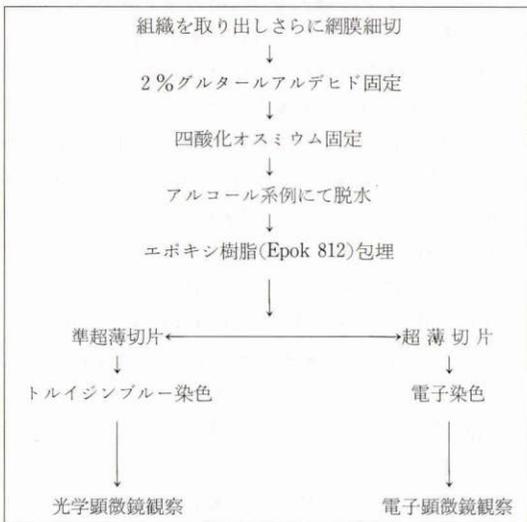


図2 方法2

狭細を認めたが口径不同の明らかなものは見られず、一部のラットで軽度の口径不同を疑わせる所見を認めたのみであった。そこで SHRSR に関しては、軽度の口径不同が疑われるラットのうち最も高齢のラットを選択し IVGFR を作製し以下の検討を行った。なお、このラットは、眼球摘出時既に水晶体の混濁が存在し、

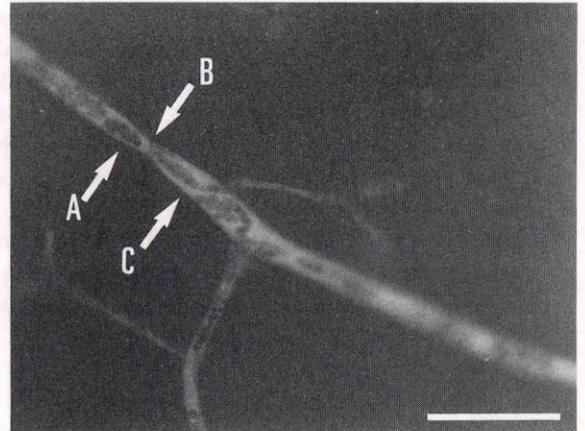


図3 月齢15カ月の SHRSR の IVGFP 像である。矢印 B に孤立性の細動脈狭細が認められ、そのわずか末梢の矢印 C にびまん性の拡張が認められる。Bar : 100 μ m

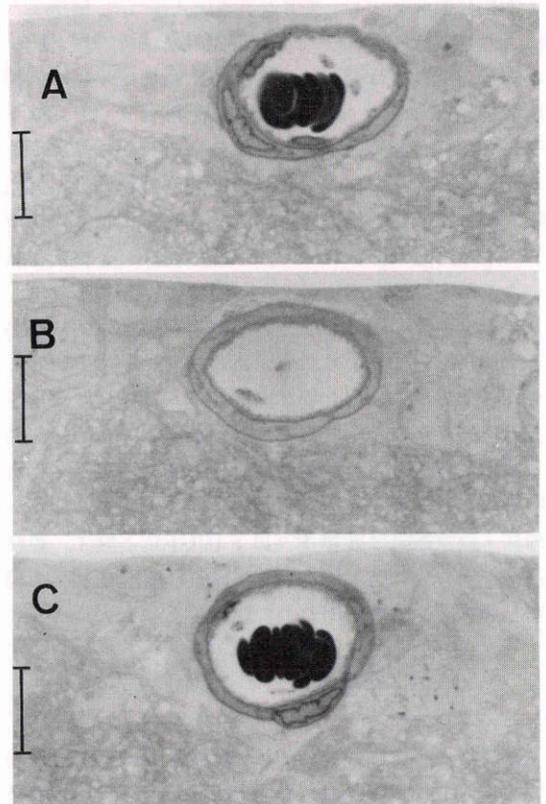


図4 図3の動脈の光学顕微鏡像である。図3矢印 A の部位が図4A、図3矢印 B の部位が図4B、図3矢印 C の部位が図4Cである。Bar : 10 μ m



図5 図3の矢印Aの部位の電子顕微鏡である。矢印の部位に消耗顆粒が認められるが他に異常所見は認められない。Bar: 1 μ m

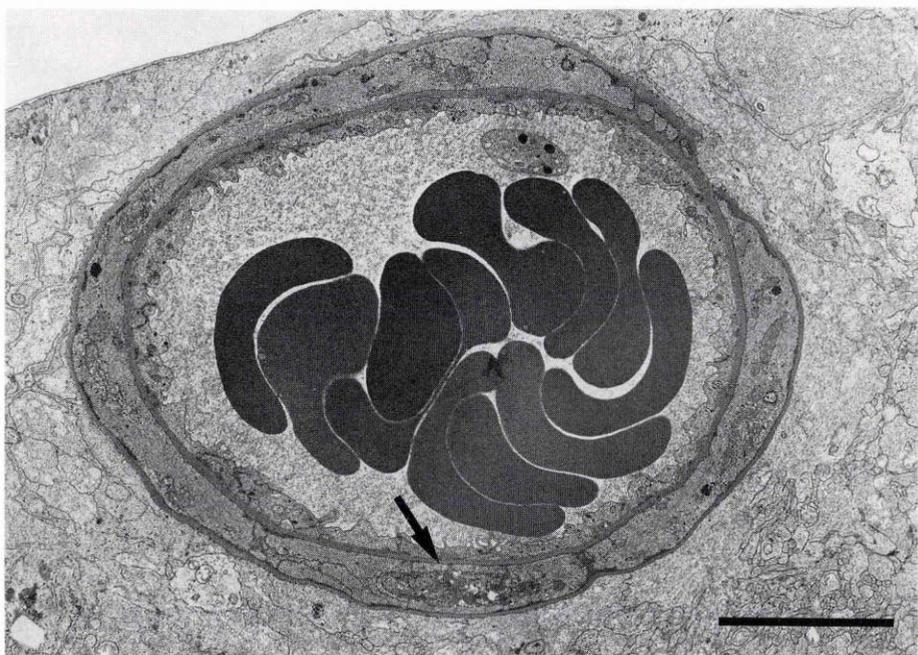


図6 図3の矢印Bの部位の電子顕微鏡である。矢印の部位に中膜を構成する筋細胞に部分的な細胞壊死が認められる。Bar: 5 μ m

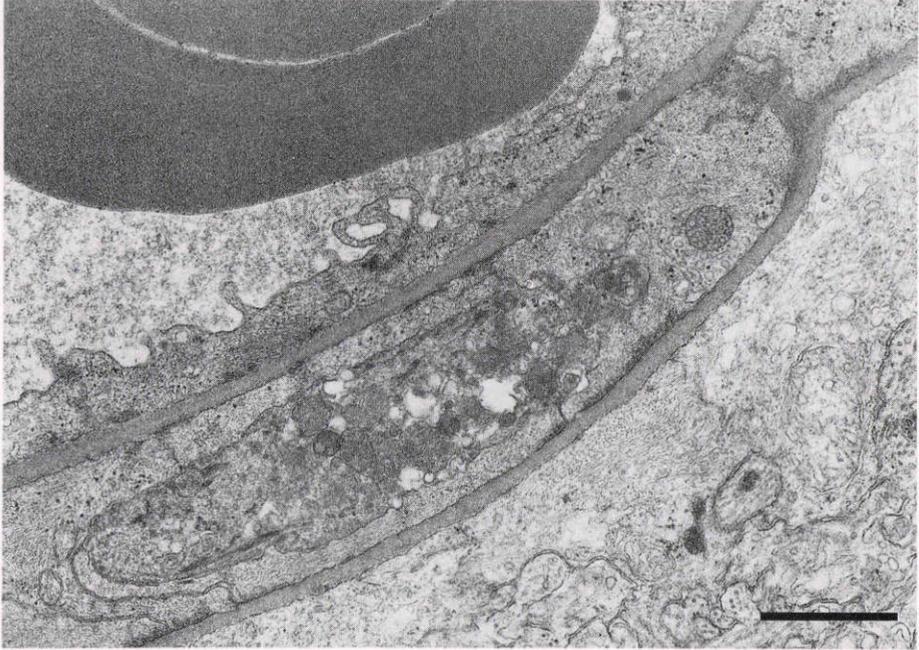


図7 図6の矢印の拡大像である。写真中央に筋細胞の部分的な細胞壊死がより一層明確に観察される。Bar: 1 μ m

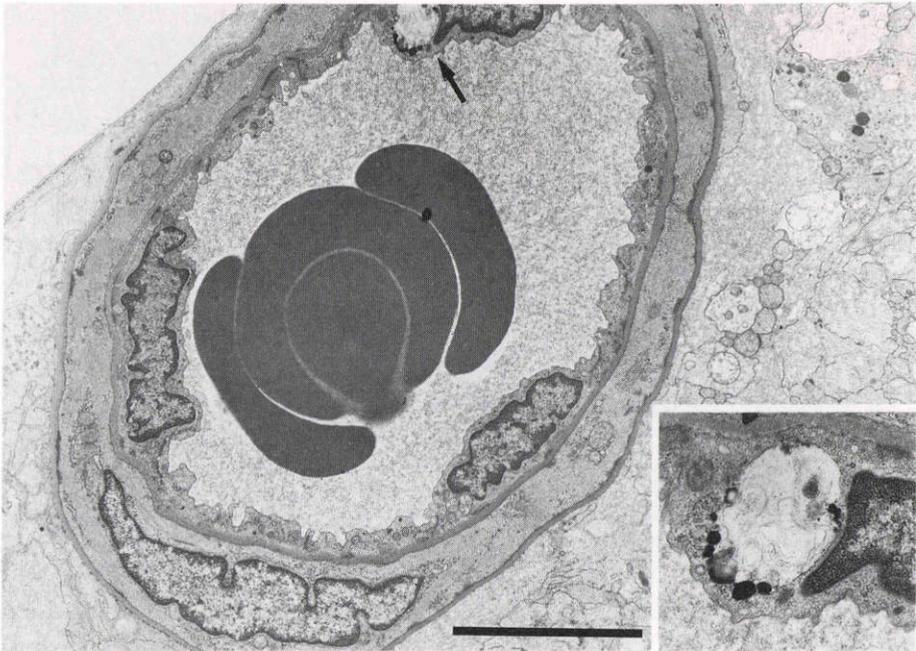


図8 図3矢印Cの部位の電子顕微鏡像である。矢印の部位に内皮細胞内の空胞変性が認められる。挿入写真は、その空胞変性の拡大像である。Bar: 5 μ m

眼底所見の詳細は不明であった。一方、SHRSPにおいては、28例中2例3眼に視神経乳頭上あるいは、視神経乳頭付近の網膜細動脈に明らかな紡錘形の膨大部を有する口径不同を認めた。しかし、そのうち2眼はこの膨大部が視神経乳頭上に存在し、その部位のIVGFP作製は技術的に不可能なため視神経乳頭より1乳頭径離れてこの膨大部が存在する1眼に対してIVGFPを作製した。

SHRSPのIVGFP観察においては、末梢の動脈に軽度ながら明らかな口径不同が認められた(図3)。この蛍光顕微鏡写真からの計測値をもとに図3の矢印A, B, Cの部位に精密に対応する準超薄切片の光学顕

微鏡的所見がそれぞれ図4のA, B, Cである。また同様にして、この図3の矢印A, B, C各々の部位の超薄切片を作製した。図5は、図3矢印A即ち孤立性の部分的狭細部(図3, 矢印B)より約 $15\mu\text{m}$ 上流の電子顕微鏡像である。矢印の部位に消耗色素顆粒が認められる以外、異常所見は認められなかった。図6は、図3矢印B, 即ち孤立性の部分的狭細部の電子顕微鏡像である。矢印の部位に中膜を構成する筋細胞に部分的な細胞壊死が認められた。図7はその拡大像である。図8は、図3矢印C即ち孤立性の部分的狭細部(図3, 矢印B)より約 $40\mu\text{m}$ 末梢の、び漫性に拡張した部位の

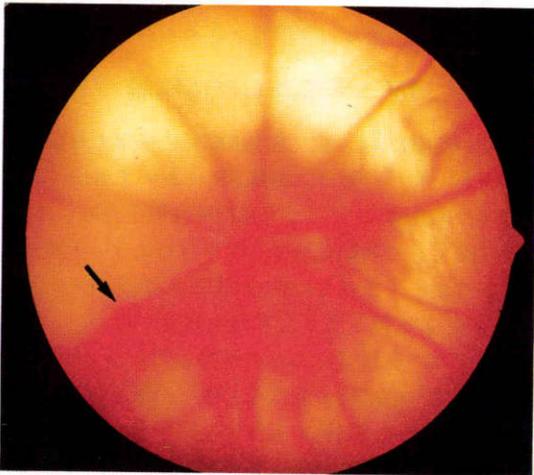


図9 月齢7カ月のSHRSPの眼底写真である。矢印の部位に紡錘形の細動脈膨大部が認められる。

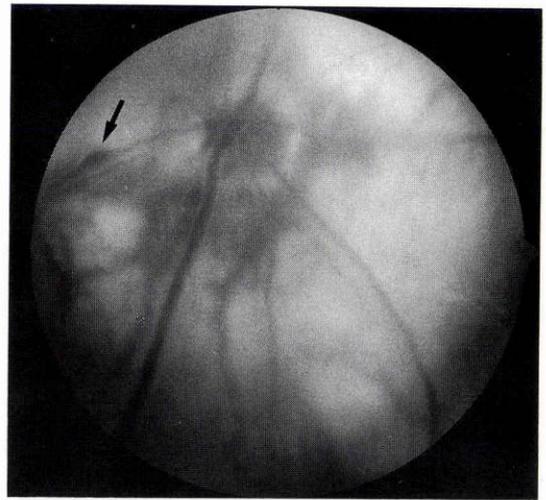


図10 図9と同一ラット同一眼の蛍光眼底写真である。矢印の部位にやはり紡錘形の細動脈膨大部が認められる。

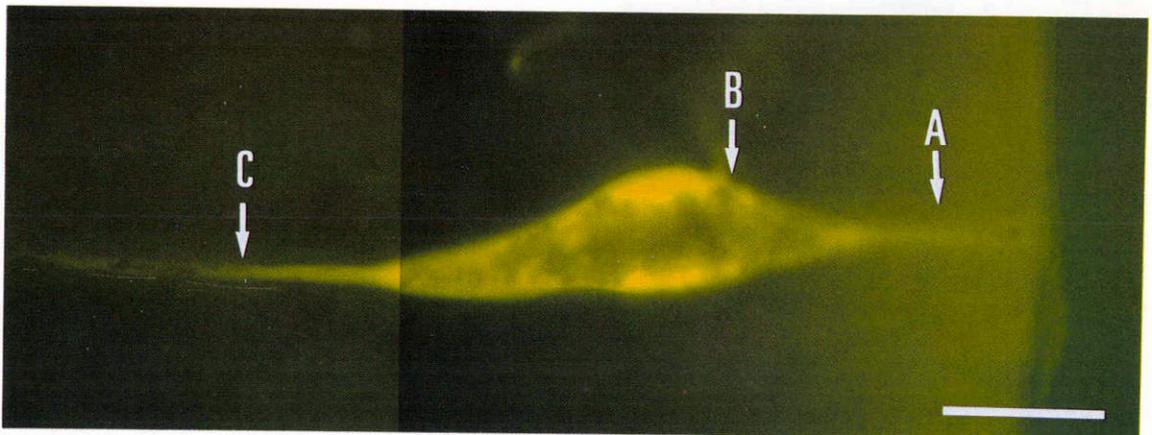


図11 図9, 10と同一ラット同一眼のIVGFP像である。図9, 10で認められた細動脈膨大部がより一層明確に観察される。Bar: $100\mu\text{m}$

電子顕微鏡像であるが、矢印の部位に内皮細胞の空胞形成が認められた。挿入写真は、その拡大像である。

一方、図9はSHRSPの眼底写真であるが、矢印の部位に紡錘形の細動脈の膨大部が認められる。また、その蛍光眼底写真では細動脈の膨大部が明瞭に認められる(図10矢印)。さらに同部位のIVGFP観察では細動脈の膨大部がより一層明瞭に観察された(図11)。この蛍光顕微鏡写真の計測値をもとにして精密な部位の同定を行い矢印A, B, Cの部位の準超薄切片および超薄切片を作成し光学顕微鏡および電子顕微鏡観察を行った。図11矢印A, 即ち紡錘形の膨大部(図11矢印,

B)より120 μm 上流部の準超薄切片像が図12Aで、その超薄切片像が図13である。図12A, 図13ともに血管腔の著しい狭小が認められ、超薄切片像では、図13矢印間に示す様な明かな筋細胞壊死を伴う高度な中膜肥厚が認められた。また、血管内皮細胞下に内膜細胞が認められた(図13, *印)。図9矢印B即ち膨大部の準超薄切片像が図12Bでその超薄切片像が図14である。図12Bの矢印間に管壁全周のほぼ1/4にわたる内弾性板の消失が認められた。超薄切片像では、高度の中膜壊死に加えて、この内弾性板の消失がより明確に観察された(図14矢印より右側)。また、基底膜の重層化が認められた(図14, *印)。図12Cは図11矢印C, 即ち紡錘形膨大部(図11矢印, B)より300 μm 末梢部の準超薄切片像であるが、中等度の中膜壊死と中膜肥厚を認めるのみで他に特筆すべき所見は認められなかった。

IV 考按ならびに結論

今回の観察において、網膜細動脈に顕著な検眼鏡鏡の異常所見を有したのは、SHRSRにおいては全く認められず、SHRSPにおいても視神経乳頭上あるいは、視神経乳頭付近の細動脈口径不同を有したラットは28匹中2匹3眼にすぎなく以前のSHRの眼底所見に関する報告⁹⁾¹⁰⁾と比較してかなり発生頻度が低い。この原因としては、当教室において維持しているSHRの高血圧に対する順応性の変化など種々の原因が考えられる。しかし、既にSHRでも血管の拡張と血圧の下降が確認されている¹⁰⁾エーテル麻酔下で眼底観察をしたことも影響を及ぼしているものと推測される。しかし、一般に推奨されているペントバルビツール剤腹腔内注入による麻酔においても血圧が下降し、眼底に生理的な高血圧状態を反映しないこともまた事実である¹⁸⁾¹⁹⁾。今回眼底異常所見の発生頻度低下の正確な原因はなお不明であるが、今回の成績は当教室のSHRにおいて眼底異常所見が出現しにくくなっている事実をある程度反映しているものと考えられ、エーテル麻酔のみに原因があるとは考えにくい。

一方、実験小動物において眼底、蛍光眼底の臨床所見と精密な同一部位の病理組織学的所見との対比が非常に困難であり、さらに色素注入法、樹脂注入による鋳型標本法やトリプシン消化標本法などでは、一旦標本を作製してしまうと病理組織学的検索が不可能になってしまうことは前述した如くである。しかし、今回の実験においては、SHRに対しIVGFP観察法²⁰⁾を用いることにより、その所見と正確に同一部位の病理

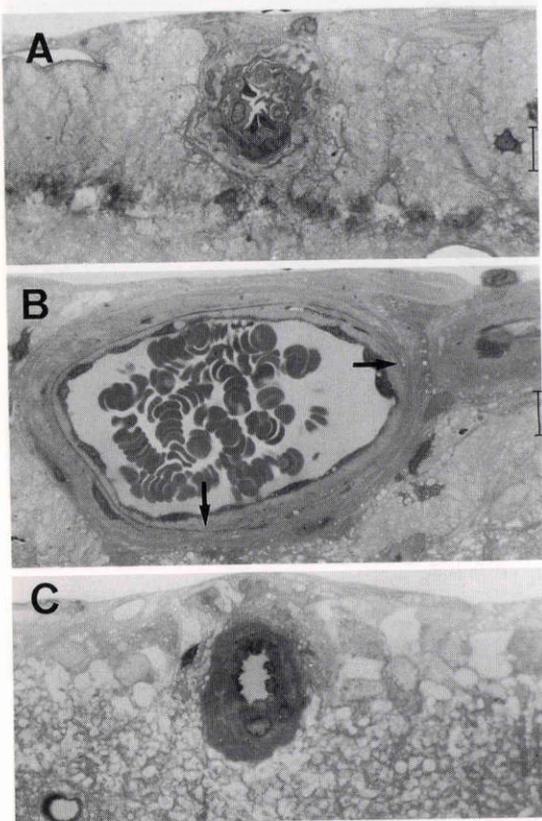


図12 図11の動脈の光学顕微鏡像である。図11矢印Aの部位が図12A, 図11矢印Bの部位が図12B, 図11矢印Cの部位が図12Cである。

図12Aでは著しい内腔の狭小が認められる。Bar: 10 μm

図12Bでは矢印間に内弾性板の消失が認められ、それは管壁全周のほぼ1/4に達している。Bar: 10 μm

図12Cでは中等度の中膜壊死と中膜肥厚を認めるが、他に目立つ異常所見は認められない。Bar: 10 μm

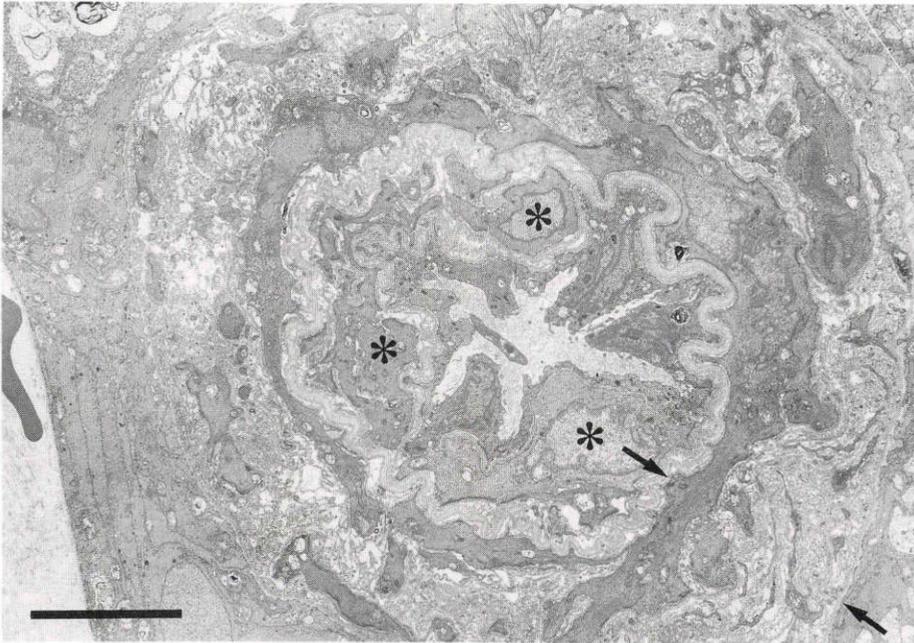


図13 図11矢印 A の部位の電子顕微鏡像である。矢印間に示す様に著明な筋細胞壊死を伴う高度な中膜肥厚が認められ、血管内皮細胞下の*の部位には厚い内膜細胞の存在を認める。Bar : 5 μ m

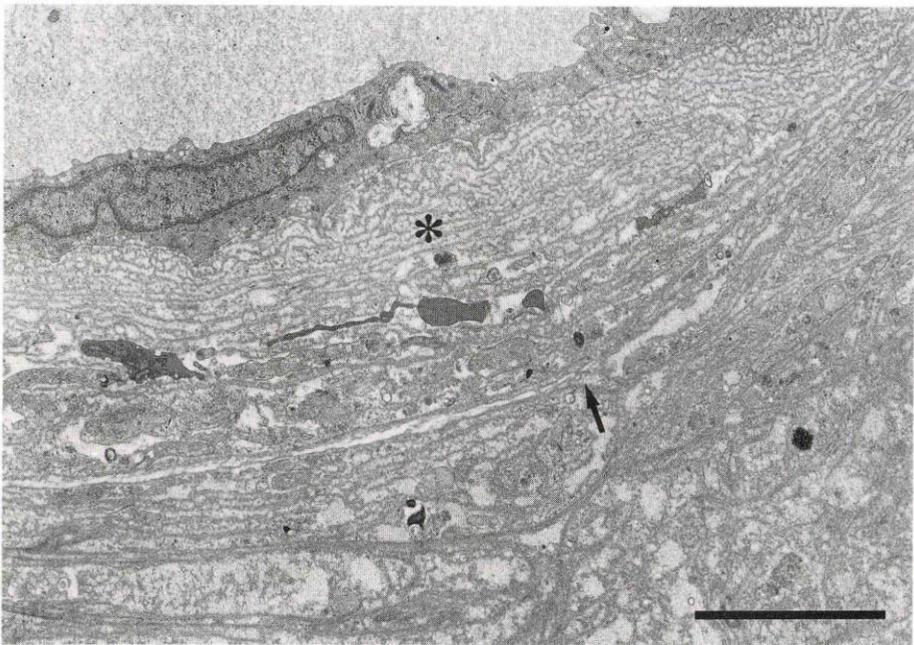


図14 図11矢印 B の部位の電子顕微鏡像である。高度の中膜壊死に加えて、矢印より右側に内弾性板の消失が明確に観察される。また、*に示す部位に基底膜の著しい重層化が認められる。Bar : 5 μ m

組織学的所見とを比較することが可能であった。

前述したように、IVGFP 観察においては SHRSR, SHRSR それぞれ異なった 2 種類の網膜細動脈口径不同が認められ、その病理組織学的所見もまた全く異なっていた。この結果からすれば、中等度の高血圧に長期間さらされた SHRSR と短期間ではあるが高度の高血圧にさらされた SHRSR とでは全く異なる細動脈病変を認めたことになる。即ち、SHRSR での動脈口径不同は末梢の孤立性の狭細として観察され、その狭細部の病理組織学的所見としては、中膜を構成する筋細胞に部分的な細胞壊死が認められ(図 6, 7)、その狭細部のすぐ上流には著しい変化は認められず(図 5)、末梢のびまん性の拡張部では内皮障害を思わせる細胞の空胞変性を認めた(図 8, 矢印)。この事實は、臨床的に動脈の器質的变化が及んでない時期の高血圧症眼底において血管反応性の降圧剤を投与によって、一旦動脈口径不同が消失しても、薬剤投与中止後血圧が再び上昇すると細動脈の拡張部、狭細部は同一部位に出現するという臨床報告¹⁰⁾を裏付ける結果と言えよう。即ち、今回観察された SHRSR の口径不同は、病理組織学的には中膜筋細胞の部分的壊死や部分的な細胞空胞変性という動脈の部分的な器質的变化を示しているが、臨床的には、種々の薬剤による動脈反応性はまだ充分あり、なお可逆的な病期としてとらえられるであろう。一方、SHRSR における動脈口径不同は、眼底、蛍光眼底所見、IVGFP 観察所見の 3 者において同様に視神経乳頭付近の紡錘形の細動脈膨大部として観察され、病理組織学的所見としては、細動脈膨大部の上流より既に顕著な筋細胞壊死を伴う高度な中膜肥厚が認められ(図 12A, 図 13)、膨大部では高度の中膜壊死に加えて管壁全周のはぼ 1/4 にまで達する内弾性板の消失が認められるものであった(図 12B, 図 14)。この眼底、蛍光眼底所見はヒトにおける重症高血圧症の細動脈硬化期(sclerotic phase)にも見られるとされている網膜細動脈瘤²¹⁾の眼底、蛍光眼底所見とよく似ておりヒトの網膜細動脈瘤と類似の病変であることが充分推測できる。事実この SHRSR の病理組織学的所見は、高度中膜壊死が病変の主体であり、ヒトにおける網膜細動脈瘤破裂前のそれ²¹⁾と類似していた。以上の如く IVGFP 観察において認められた異なる 2 種類の口径不同は病理組織学的にも全く異なる所見を呈しており、この 2 種類の高血圧性変化と考えられる口径不同は異なる機序で発生したものと推測される。また、前者は従来指摘されていた機能的狭細との移行期

を示す所見と考えられ、後者は、高血圧症の末期における重篤な器質的病変とすることができよう。

以上まとめると以下の如くである。

顕微鏡レベルでの三次元的な血管構築、さらには、局所の血管微細構造の観察までが可能なゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本法(IVGFP 法)を用い SHR 網膜細動脈における口径不同を観察し、その病理学的検索を行い以下の結果を得た。

1) 中等度高血圧が長期間持続した SHRSR 例では口径不同を示した網膜細動脈狭細部に中膜筋細胞の部分的壊死を認めた。その末梢の拡張部には、内皮細胞の空胞変性が認められた。しかし、その狭細部の上流の血管壁には病的変化はほとんど認められなかった。

2) 重症高血圧を示した SHRSR では、人眼の網膜細動脈瘤様の膨大部が見られ、その膨大部に一致して内弾性板の消失を伴った高度な中膜壊死を認めた。この高度中膜壊死は、膨大部より上流部にも認められた。また、膨大部より末梢には、中等度の中膜肥厚と中膜壊死が認められるのみであった。

以上より、SHRSR と SHRSR におけるこの口径不同は、異なる機序で発生したものと推測され、前者は従来指摘されていた機能的狭細と器質的狭細との移行期を示す所見であり、後者は高血圧症の末期における重篤な器質的病変を示す所見であることが示唆された。

稿を終えるに当たり、ご校閲を賜りました松山秀一教授に深謝し、直接ご指導いただいた吉本弘志講師に謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第 92 回日本眼科学会総会にて発表された。

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) Shimizu 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) 入野田公穂, 高橋茂樹, 山野辺隆介: 高血圧自然発症ラットの眼底所見(第1報). 日本体育学誌 31: 234—238, 1963.
 - 10) 高橋茂樹, 渡辺 仁: 高血圧自然発症ラットの眼底所見(第2報). 日眼 73: 1429—1447, 1969.
 - 11) 渡辺 仁: 高血圧自然発症ラット(SHR)網膜細動脈の微細構造. 日眼 74: 999—1011, 1970.
 - 12) 田中 洋: 高血圧自然発症ラット(SHR)網膜細動脈の走行に関する研究. 日眼 76: 819—830, 1972.
 - 13) 高橋茂樹, 関野尹夫, 吉本弘志: 高血圧自然発症ラットの眼底所見—走査型電子顕微鏡的研究(その1)—. 日眼 77: 941—961, 1973.
 - 14) 高橋茂樹: Stroke-Prone SHRの眼底所見. 眼紀 29: 1950—1958, 1978.
 - 15) 高橋茂樹: Stroke-Prone SHR 網膜血管の微細構造. 眼紀 30: 1652—1666, 1979.
 - 16) 吉本弘志, 山上 潔, 成田清美他: SHRSPにおけるCaptoprilの血圧下降作用とその網膜細動脈における抗硬化作用に関する検討. 日眼 86: 227—238, 1982.
 - 17) 山上 潔, 成田清美, 一戸 敏他: Captoprilの血圧下降作用とその網膜細動脈における抗動脈硬化作用に関する検討—統報—早期投与群と後期投与群の比較. 眼紀 34: 290—297, 1983.
 - 18) **Hamada Y, Hamada M, Yonemoto H, et al**: Fluorescein angiographic and histopathologic studies of hypertensive vascular changes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Jpn Heart J 23: 409, 1982.
 - 19) 浜田 陽, 浜田路子, 米本寿史他: 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)における網膜血管病変(蛍光眼底についての検討). 日眼 86: 1301—1307, 1982.
 - 20) 三上 規, 松橋英昭, 一戸 敏他: 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. 日眼 91: 353—359, 1987.
 - 21) **Tso MOM, Jampol LM**: Pathophysiology of hypertensive retinopathy. Ophthalmology 89: 1132—1145, 1982.

(第92回日眼総会原著)