

硝子体出血に伴う網膜前増殖組織形成後 長期の変化についての実験的研究 (図11)

向 野 利 寛・東 真千子 (産業医科大学眼科学教室)

The Pathogenesis of Long-standing Preretinal Membrane Induced by Vitreous Hemorrhage

Toshihiro Kono and Machiko Higashi

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

要 約

白色家兎硝子体腔内に自家全血液0.3mlを注入し、血液注入半年後と1年後の網膜前増殖組織の状態を観察した。1) 網膜前増殖組織は主にミュラー細胞により構成されていたが、半年後では視神経乳頭下方のみでなく上方でも形成され、1年後にはほぼ網膜と同様の厚さを呈する場合もあった。2) 網膜前面にできたミュラー細胞の構造は硝子体側と網膜側で相違があり、ミュラー細胞の成熟度による構造の変化と考えられた。3) 硝子体腔内の異物を貪食処理するために網膜前面にできたミュラー細胞は異物消失後も増殖する可能性が考えられた。(日眼 92: 857—863, 1988)

キーワード: 硝子体出血, 網膜前増殖組織, ミュラー細胞, 家兎

Abstract

In this report, long-standing changes of proliferative Mueller cells following vitreous hemorrhage were studied by light and electron microscopy. Using an operating microscope, 0.3ml autologous whole blood was injected through the pars plana into the vitreous cavity of albino rabbits. The eyes were enucleated at six months and one year. Between six months and one year after the injection, a preretinal membrane composed of Mueller cells was formed. At six months after the injection, the preretinal membrane became thicker. Macrophages were found in the vitreous cavity but no red blood cells. Mueller cells on the retinal surface had many small vesicles surrounded by basement membrane material. One year after the injection, the preretinal membranes became as thick as the retina. The proliferative Mueller cells on the retinal surface had many smooth ER, ribosomes and small vesicles. At this time, there were no macrophages in the vitreous cavity. In conclusion, there were no red blood cells or macrophages in the vitreous cavity, but Mueller cells proliferated on the retinal surface between six months and one year after the injection. Proliferative Mueller cells in the preretinal membrane showed different structures. Cells closer to the vitreous body had a more mature structure than those closer to the retina. Proliferative Mueller cells closer to the vitreous body had many smooth ER, ribosomes and outer limiting membrane-like structure. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 857—863, 1988)

Key words: Vitreous hemorrhage, Preretinal membrane, Mueller cell, Rabbit

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
(昭和63年2月17日受付)

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

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

(Accepted February 17, 1988)

I 緒 言

硝子体出血後に網膜前増殖組織が形成されることはよく知られており、硝子体出血の実験的研究においても網膜前増殖組織の形成をみた報告がある^{1)~4)}。しかし、いったん形成された網膜前増殖組織の長期の変化についての研究はみられない。私達は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ために家兎硝子体腔内に自家全血液を注入し、0.3ml以上の血液を注入した場合、注入2週後には硝子体腔内の赤血球を貪食するために網膜前面へ伸展したミュラー細胞よりなる網膜前増殖組織が形成されること、網膜前増殖組織はミュラー細胞の細胞核と突起より構成され、時間の経過と共に肥厚することを明らかにし、前報にて報告した⁵⁾⁶⁾。

今回、硝子体出血により形成された網膜前増殖組織の長期経過後の変化を観察するために、家兎眼硝子体腔内に自家全血液0.3mlを注入し、6カ月後、1年後で観察した。その結果、ミュラー細胞よりなる網膜前増殖組織が形成された場合、硝子体腔内から赤血球やマクロファージが消失した後もミュラー細胞は増殖し、網膜前増殖組織は肥厚してゆくこと、増殖ミュラー細胞は細胞の成熟度によりその細胞内小器官に相違がある可能性が明らかとなったので報告する。

II 実験材料および方法

実験材料として体重約3kgの白色家兎4羽8眼を用い、そのうち3羽6眼を実験眼、1羽2眼を対照眼とした。ネンブタール®(Abbott)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-Naを添加した。トロピカミド(ミドリン®)と塩酸フェニレフリン(ネオシネジン®)にて散瞳後、検眼鏡にて眼底に異常のないことを確認し、手術用顕微鏡下に12時部で角膜輪部より1mmの部より27G針にてヘパリン添加自家全血液0.3ml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前房切開を行った。注入直後に眼底検査を行い、血液が硝子体腔の中央にあることを確認した。その後、経時的に眼底検査を行いながら、処置後6カ月後に右眼を、1年後に左眼を摘出した。対照としてヘパリン-Na添加生理食塩水を同様に注入した。

摘出眼球は直ちに4%グルタルアルデヒド-0.1Mカコジル酸緩衝液に10分間浸した後、外側赤道部に小切開をいれ、24時間浸漬した。その後眼球外側の壁を切り落とし窓を作成し、硝子体腔内の状態を実体顕微

鏡にて観察し、写真撮影を行った。

実験眼のうち、1眼は第一報⁵⁾と同じように処理後、眼球の前後断の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。他の2眼は実体顕微鏡下に毛様体部にて眼球を前後に切半した。眼球後半分は視神経乳頭中央にて左右に分け、右半分はエタノール系列で脱水した後、パラフィンとJB4樹脂に包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびPAS染色を施して光学顕微鏡にて観察した。左半分は乳頭より8mm下方で2×2mmの範囲を細切、1%オスミウム酸-0.1Mカコジル酸緩衝液で後固定した後、エタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。エポキシ樹脂包埋試料はポーターブラムMT-2型超ミクロトームにて切片を作成し、厚めの切片はトルイジン青染色を施して光学顕微鏡で観察し、超薄切片は酢酸ウラニール、クエン酸鉛による二重染色後、日本電子100CX電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

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ひろがり、眼底は透見できなくなった。1週後には水晶体後方に暗灰色の塊状物がみられるのみであり、以後4週後までこの状態が続いた。6週後頃より硝子体混濁は減少し、眼底周辺部の透見が出来るようになってきた。12週後には硝子体腔中央に淡い混濁を認めるのみとなり、眼底では網膜面上に色素斑が認められた。以後、この状態が続いたが、半年後には硝子体混濁は認められず、網膜面上の色素斑も認められなくなっていた。

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すると、6カ月後では硝子体腔内に混濁物は認められなかった。網膜面には軽度の反射の乱れが観察された。1年後もほぼ同様の状態であった。

対照眼では検眼鏡的、実体顕微鏡的に変化は認められなかった。

3) 光学顕微鏡および電子顕微鏡所見

対照眼では6カ月後、1年後ともに網膜前増殖組織は認められなかった。実験眼で認められた視神経乳頭下方の網膜前増殖組織の厚さに実験眼による差はほとんどみられなかった。

(1) 血液注入6カ月後

光学顕微鏡で観察すると、硝子体腔内には血球成分

はみられなかったが、前部硝子体腔内と下方の網膜前増殖組織の硝子体側にマクロファージが少数ではあるが認められた。網膜はほぼ正常の層状構造を呈していたが、内顆粒層や神経節細胞層ではところどころでその細胞数を減じていた。視神経乳頭の下方には肥厚し

た網膜前増殖組織が連続して認められた(図1)。眼球前後断の標本を光学顕微鏡で詳細に観察すると、網膜前増殖組織は視神経乳頭の上方面でもところどころに存在していた(図2)。この眼球前後断の標本にPAS染色を施して観察すると、網膜内のグリア細胞とともに網膜前増殖組織も陽性に染色されていたが、部分的に

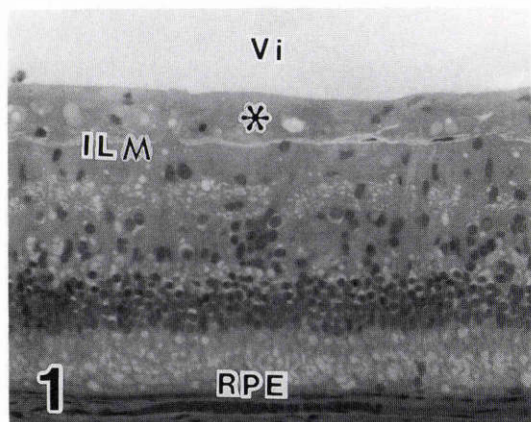


図1 血液注入半年後の視神経乳頭下方の光学顕微鏡写真。網膜前面硝子体腔(Vi)内に肥厚した網膜前増殖組織(*)が認められる。網膜内層には多数のグリア細胞が存在する。ILM:内境界膜, RPE:網膜色素上皮細胞(ヘマトキシリン・エオジン染色, ×160)

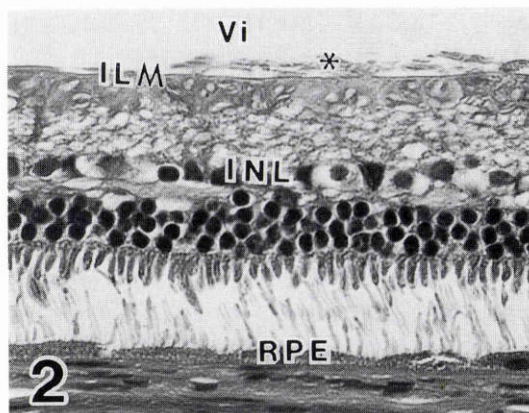


図2 血液注入半年後の視神経乳頭上方の光学顕微鏡写真。網膜前面硝子体腔(Vi)内に網膜よりつづく増殖組織(*)が認められる。ILM:内境界膜, INL:内顆粒層, RPE:網膜色素上皮細胞(ヘマトキシリン・エオジン染色, ×230)

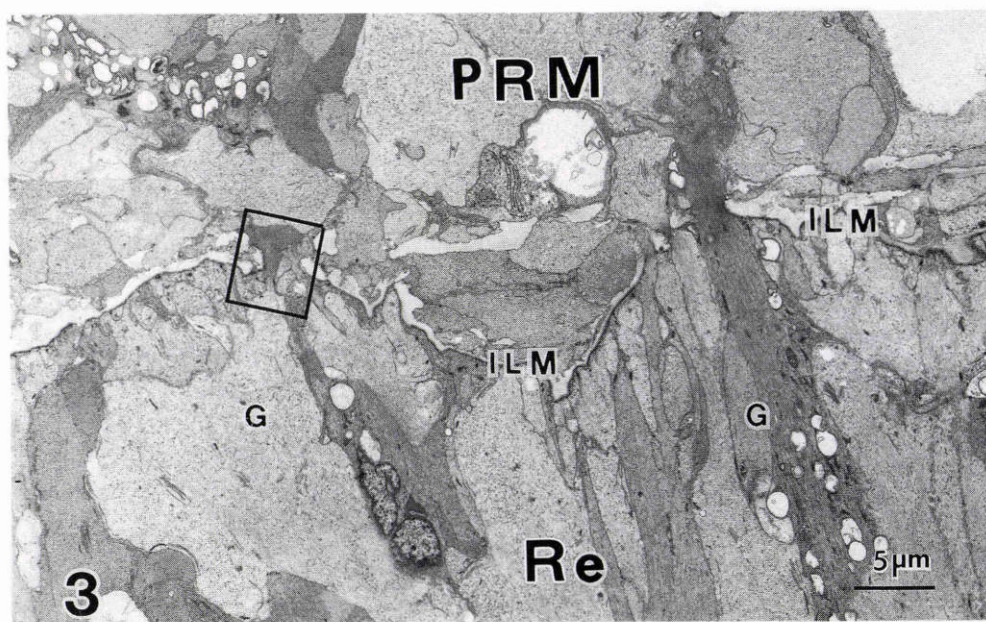


図3 血液注入半年後の電子顕微鏡写真。いたるところで網膜グリア細胞(G)が内境界膜(ILM)を貫いて網膜前面に伸展し、網膜前増殖組織(PRM)を形成している。Re:網膜, ×2,300

染色性の相違がみられた。視神経乳頭の下方に存在する網膜前増殖組織を電子顕微鏡で観察すると、網膜よりつづくグリア細胞が内境界膜を貫いて網膜前増殖組織を形成していた(図3)。グリア細胞が内境界膜を貫く部位を強拡大にて観察すると、多数のフィラメントが集積して胞体が暗い場合とフィラメントの量が少なく明るい場合が認められたが、連続する細胞の特徴からミューラー細胞と同定された。また、網膜前増殖組織と内境界膜との間には多数の線維性分が存在していた(図4)。網膜前増殖組織を構成するグリア細胞は楕円形の核を有していたが、時に不規則に湾入した核も認められた。そして硝子体側に微絨毛や接着装置をもち、時に胞体内に phagosome が認められた(図5)が、ほとんどの細胞内に多数の滑面小胞体やリボゾームを有しており、ミューラー細胞の特徴を呈していた。しかし、細胞内小器官としてフィラメントのみが存在することもあった。また、グリア細胞間にあたかも外境界膜の様に接着装置が連なる部位が観察された(図6)。この場合、一方のグリア細胞の細胞内小器官は滑面小胞体やリボゾームを有し、ミューラー細胞と同定できたが、他方のグリア細胞内には多数のフィラメントが同一方

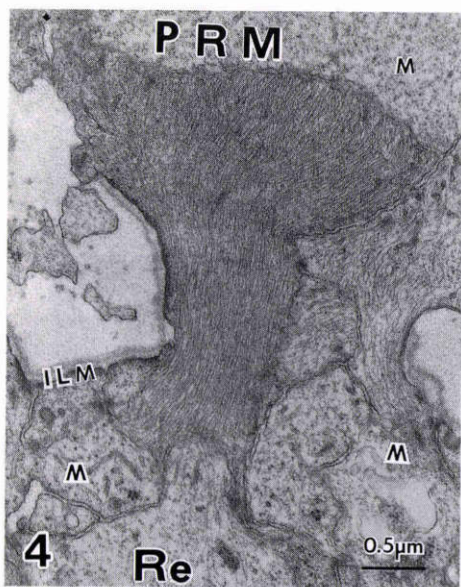


図4 図3の枠の部の拡大電子顕微鏡写真。フィラメントが集積して胞体が暗い場合とフィラメントが少なく明るい場合があるが、ともにミューラー細胞(M)と同定できる。網膜前増殖組織(PRM)と内境界膜(ILM)の間に多数の線維性分が存在している。Re: 網膜, $\times 23,000$

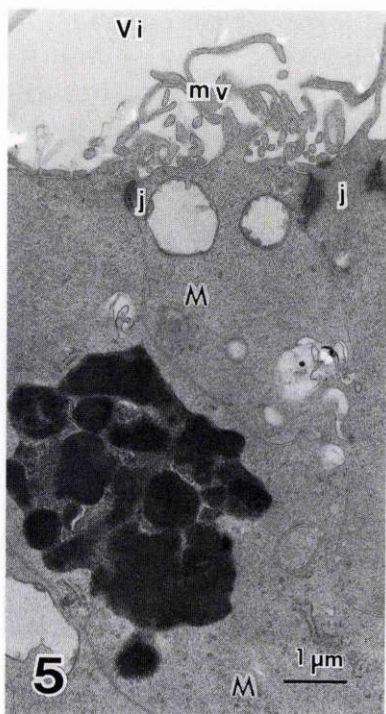


図5 血液注入半年後の電子顕微鏡写真。網膜前増殖組織の硝子体(Vi)側には多数の微絨毛(mv)と接着装置(j)が存在しており、細胞内小器官として少数の粗面小胞体とともに多数の滑面小胞体、リボゾームがあり、ミューラー細胞(M)と同定した。その胞体内には phagosome がみられる。 $\times 9,800$

向に走っており、あたかも星状膠細胞の様相を呈していた(図7)。

(2) 血液注入1年後

光学顕微鏡で観察すると、硝子体腔内には細胞成分は認められなかったが、網膜内や増殖組織内には稀に色素顆粒が観察された。網膜前増殖組織はところどころで網膜と連続していた。そしてところによっては極めて肥厚し、網膜とはほぼ同じ厚さで存在していた(図8)。眼球前後断の標本にPAS染色を施して観察すると、肥厚した網膜前増殖組織は染色性に若干の相違はみられるものの陽性に染色された。網膜内層を電子顕微鏡で観察すると、グリオーシスの状態であったが、時に管腔が認められた。この管腔内にはやや長い微絨毛が存在し、管腔に面する細胞間には接着装置が認められ、外境界膜様構造を呈していた。網膜グリア細胞が内境界膜を貫いて網膜前面に伸展する部位では多数のフィラメントが存在していた(図9)。

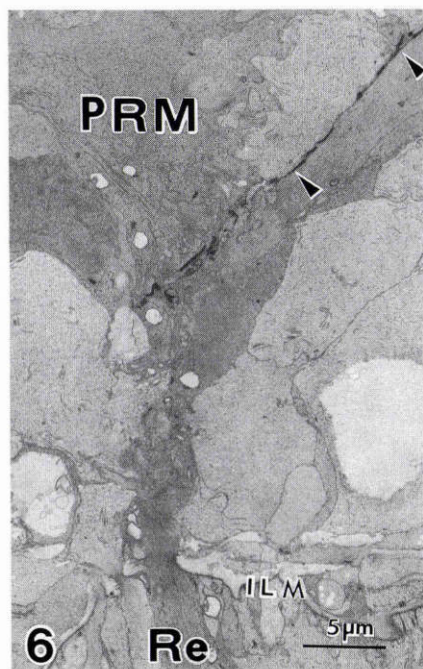


図6 血液注入半年後の電子顕微鏡写真。網膜前増殖組織 (PRM) 内に接着装置 (矢印) が連続して認められる。ILM: 内境界膜, Re: 網膜, $\times 2,700$

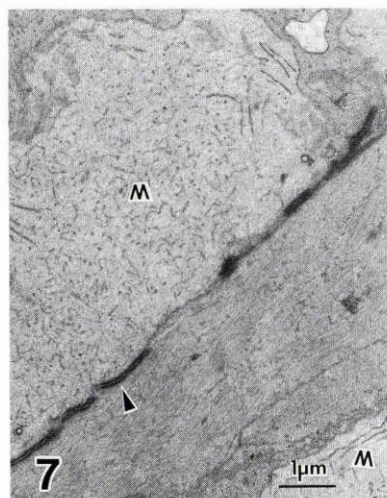


図7 図6の矢印の部の拡大電子顕微鏡写真。胞体内に多数の滑面小胞体有し、ミューラー細胞 (M) と同定できる細胞と接着装置 (矢印) を介して胞体内に多数のフィラメントを有する細胞が存在する, $\times 10,000$

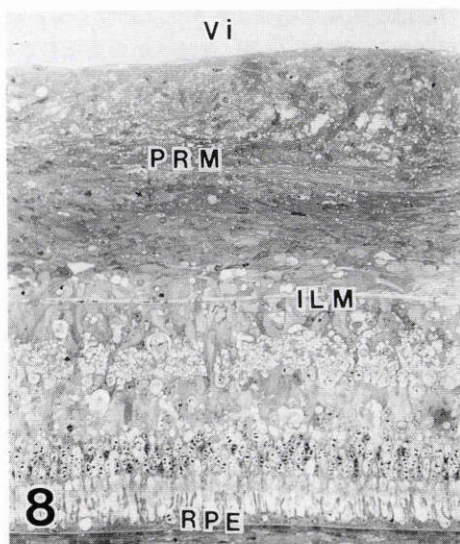


図8 血液注入1年後の光学顕微鏡写真。網膜前増殖組織 (PRM) は肥厚してほぼ網膜と同様の厚さを呈している。Vi: 硝子体腔, ILM: 内境界膜, RPE: 網膜色素上皮細胞 (トルイジン青染色, $\times 190$)

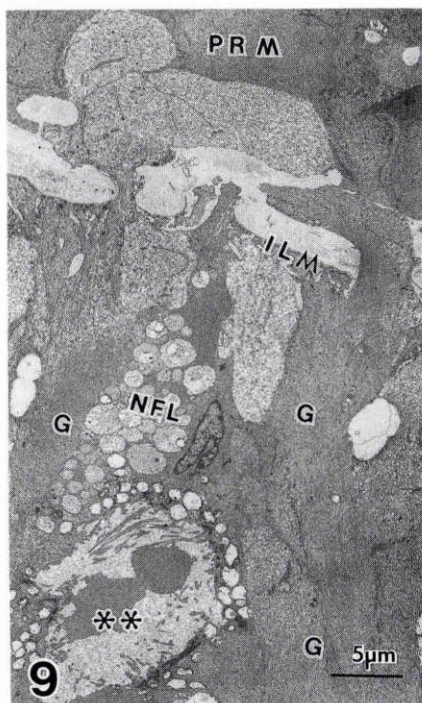


図9 血液注入1年後の電子顕微鏡写真。網膜グリア細胞 (G) が内境界膜 (ILM) を貫いて網膜前面に伸展して網膜前増殖組織 (PRM) を形成している。網膜内層に管腔 (**) があり、その周囲に外境界膜様構造が認められる。NFL: 神経線維層, $\times 2,400$

網膜前増殖組織を構成するグリア細胞を電子顕微鏡で観察すると、硝子体側では微絨毛や接着装置を持ち、その細胞内小器官として滑面小胞体やリボゾームが認められた。網膜前増殖組織の硝子体側1/3の範囲には多数の小管腔が形成されていた。この小管腔内には微絨毛があり、管腔に面する細胞間には接着装置があり、増殖ミューラー細胞の特徴を呈していた(図10)。しかし、内境界膜近くの細胞内には小管腔はほとんど認められず、細胞内小器官にも乏しかったが、連続する胞体内の特徴からミューラー細胞と同定した(図11)。網膜前増殖組織内のグリア細胞の核は楕円形を呈していたが、時に湾入した核も存在し、核小体をもつ場合もあった。1年間を通して硝子体腔内には網膜増殖組織を除き、増殖組織はみられなかった。

IV 考 按

家兎眼硝子体腔内に自家全血液0.3mlを注入して注入半年後と1年後の状態を観察し、硝子体腔内には網



図10 血液注入1年後の網膜前増殖組織内硝子体側の電子顕微鏡写真。管腔内に微絨毛があり、その周囲の細胞間には接着装置(j)が認められる。M:ミューラー細胞, ×15,000

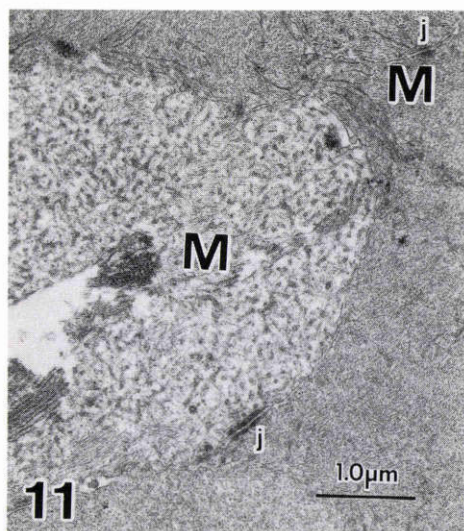


図11 血液注入1年後の網膜前増殖組織内網膜側の電子顕微鏡写真。細胞内小器官として多数のフィラメントを持つ細胞と多数の滑面小胞体を有し、ミューラー細胞(M)と同定できる細胞の間に接着装置(j)が認められる。×15,000

膜前を除き増殖組織は出現しない事、網膜前面にでたミューラー細胞は硝子体腔内から赤血球やマクロファージが消失した後も増殖し、時間の経過とともに網膜前増殖組織は肥厚して網膜内境界膜に平行に存在しつづける事が明らかになった。

硝子体出血後に網膜前増殖組織が認められた報告はあるが^{1)~4)}、今回のように長期間観察し、網膜前増殖組織が肥厚していった報告はみられない。硝子体出血が繰り返し起こり、硝子体腔内に血液が長期間存在し続ける場合は形成された網膜前増殖組織は肥厚してゆき、光を遮る可能性が考えられる。

網膜前増殖組織を構成するグリア細胞は第二報⁶⁾で述べたようにその主体はミューラー細胞であった。時に胞体内に多数のフィラメントが同一方向に密集して走っており、星状膠細胞様の細胞も認められた。しかし、明らかに星状膠細胞と同定しうる細胞は認められなかった。Norkら⁷⁾は人眼で認められたGliomaを電子顕微鏡で観察し、その中に多数の外境界膜様構造を認め、増殖したミューラー細胞と同定している。網膜内層、網膜前増殖組織内のグリア細胞は外境界膜様構造を有しており、硝子体出血長期経過後も網膜前増殖組織の主体はミューラー細胞と考えられた。しかし、肥厚した網膜前増殖組織は網膜側と硝子体側ではその構造

に若干の相違がみられた。即ち、血液注入半年後では網膜前増殖組織を構成するミュラー細胞は増殖ミュラー細胞の特徴である外境界膜様の小管腔構造は持たなかった。1年後では網膜前増殖組織の硝子体側のミュラー細胞には接装置と微絨毛で構成された外境界膜様構造が多数認められた。網膜側のミュラー細胞は外境界膜様構造を持たず、半年後の網膜前増殖組織と良く似た構造を呈していた。増殖ミュラー細胞はしだいに成熟し、より正常のミュラー細胞と似た構造を持つようになると考えられる。網膜前増殖組織内のグリア細胞の核には楕円形のものや不規則に湾入した核が認められたが、ともに核周囲の細胞内小器官の特徴からミュラー細胞の核と同定した。増殖ミュラー細胞は時に不規則に湾入した核や核小体をもつことが知られており⁸⁾、核の形態の相違は細胞活性の違いによるものと考えられる。正常網膜においてミュラー細胞は網膜外層と内層とでその細胞内小器官に相違があり、網膜内層ではフィラメントが多いことが知られている⁹⁾。今回の観察でもミュラー細胞内に多数の同一方向に走るフィラメントが認められる場合があった。また、ミュラー細胞が内境界膜を貫く部位での細胞内小器官はほとんどがフィラメントであった。第二報⁶⁾で述べたように、ミュラー細胞が内境界膜を貫く部位では血液注入2週後では滑面小胞体が主であり、6週後以降ではフィラメントの量が増していた。細胞活性の相違によると思われる。ミュラー細胞が増殖した場合、細胞の成熟度によりその細胞内小器官に違いが生じると考えられ、ミュラー細胞と星状膠細胞の区別は細胞の部分的な観察のみでは判断できないと思われる。

硝子体腔内の赤血球は第二報⁶⁾で報告したように血液注入12週後でまったく消失していた。血液注入半年後ではマクロファージはまだ存在していたが、1年後には消失していた。今までの実験の硝子体出血の研究でも硝子体腔内の赤血球は早期に消失している。Millerら¹⁰⁾は家兎を用いた網膜創傷治癒の実験的研究で網膜前増殖組織は網膜表面にマクロファージが存在することによって形成され、マクロファージが消失すると網膜前増殖組織はそれ以上増大しなかったと述べている。網膜前増殖組織の形成はMillerらが述べているようにマクロファージの存在と関係があるように思われる。しかし、今回の実験で視神経乳頭上方の硝子体腔内には血液注入半年後でマクロファージは認め

られなかったが、1年後には視神経乳頭上方の網膜前面でも増殖組織はさらに肥厚していた。硝子体腔内のマクロファージは存在していたにも関わらず観察できなかった可能性はある。しかし、網膜前増殖組織がある程度形成された後は赤血球やマクロファージの存在とは無関係に増殖してゆく可能性も考えられる。臨床的には硝子体出血は出血後数カ月は自然吸収を待つのが一般的ではあるが、硝子体出血の吸収が遅延する症例では網膜に対する刺激が常に存在する状態であり、網膜前増殖組織が肥厚している可能性を考慮して治療を考える必要がある。

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) Bennett TO, Peyman GA, Vichek JK: Intravitreal injection of autologous blood in primates. *Canad J Ophthalmol* 10: 248—253, 1975.
- 3) 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.
- 4) Miller B, Miller H, Ryan SJ: Experimental epiretinal proliferation induced by intravitreal red blood cells. *Amer J Ophthalmol* 102: 188—195, 1986.
- 5) 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。1. 硝子体内注入血液量と網膜硝子体病変との関係。日眼 91: 853—859, 1987.
- 6) 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 91: 911—922, 1987.
- 7) Nork TM, Ghobrial MW, Peyman GA, et al: Massive retinal gliosis —A reactive proliferation of mueller cells—. *Arch Ophthalmol* 104: 1383, 1989, 1986.
- 8) 石川祐二郎：クセノン光凝固が施されたサル網膜の修復機転に関する組織学的研究。2. 後期修復過程にみられた細胞反応の電子顕微鏡的研究。日眼 79: 1568—1584, 1975.
- 9) 生井 浩：グリア細胞系を中心とした網膜の病理。日眼 78: 1245—1263, 1974.
- 10) Miller B, Miller H, Patterson R, et al: Retinal wound healing —Cellular activity at the vitreoretinal interface—. *Arch Ophthalmol* 104: 281—285, 1986.