

前眼部虚血後に発生する実験的角膜 新生血管の形態学的研究 (図11)

山根 淳志・戸倉 敬雄・西川 睦彦 (関西医科大学眼科学教室)
伊東 滋雄・三木 弘彦

要 約

家兎眼の左右両側の長後毛様動脈を遮断して前眼部虚血を作成した。その後、角膜新生血管が臨床的に確認される処置3日目までの角膜及び強角膜輪部を形態学的に観察し、強角膜の変化と新生血管の発生及び進展過程について検討した。処置後12時間で強角膜輪部への多核白血球の浸潤が高度となり、輪部近隣の角膜実質細胞は線維芽細胞様に肥大し、細胞内小器官やライソゾーム様顆粒を多数認めた。血管内皮細胞に **budding** が発生し、血管腔外へ伸び出す部位にはよく多核白血球を認め、新生された血管内皮細胞は強膜膠原線維の間を縫う様に角膜実質に向って増殖伸展し、角膜実質の層葉構造の間に割って入り込む様に角膜中央に向って伸展した。新生血管伸展の場の角膜実質細胞は線維芽細胞様を呈し、そこへ多核白血球の浸潤、付着を認めた。以上より、角膜に新生血管が侵入する時には、活動性の亢進した多核白血球が重要な役割を演じていると考えた。(日眼会誌 93: 315—321, 1989)

キーワード：前眼部虚血，角膜新生血管，角膜実質細胞，多核白血球

Morphological Study of Experimental Corneal Neovascularization After Anterior Uveal Ischemia

Atsushi Yamane, Takao Tokura, Mutsuhiko Nishikawa,
Shigeo Ito and Hirohiko Miki

Department of Ophthalmology Kansai Medical University

Abstract

We morphologically investigated what kinds of inflammatory cells infiltrate the corneoscleral limbus by light and electron microscopy and what manner of keratocytes and vascular endothelial cells appear at the corneal limbus, when the corneal edema was aggravated severely and clinical corneal new vessels were found initially, i.e. until three days after anterior segmental ischemia in rabbit eyes. The majority of infiltrating inflammatory cells were polymorphonuclear leukocytes and the others were lymphocytes and histiocytes etc. Peripheral keratocytes around limbal vessels were stimulated and transformed to fibroblastic cells as a result of anterior segment ischemia. Proliferating endothelial cells of comparatively minor limbal vessels invaded between corneal lamellar layers toward the corneal center. Polymorphonuclear leukocytes were often found near activated keratocytes proliferating vascular endothelial cells, here and there. Consequently, it is considered that the stimulated polymorphonuclear leukocytes play an important role when corneal neovascularization

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 山根 淳志
(昭和63年9月14日受付，平成元年1月31日改訂受理)

Reprint requests to: Atsushi Yamane, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.
1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received September 14, 1988 and accepted in revised form January 31, 1989)

occures after anterior segmental ischemia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 315-321, 1989)

Key words: Anterior segmental ischemia, Corneal neovascularization, Keratocytes, Polymorphonuclear leukocytes

I 緒 言

白色家兎眼の左右両側の長後毛様動脈を遮断し虹彩毛様体への血流を途絶して、前部ぶどう膜を虚血状態にすると、処置翌日より角膜浮腫が発生しそれは次第に増強して、3日目頃には臨床的に全周性の角膜新生血管の発生を認めた。これらの発生及び進展には処置後房水中に高濃度に増加した内因性プロスタグランディン (PG) が関与している事を既に報告した^{1)~3)}。前部ぶどう膜虚血後に房水中の PG が高濃度になる3日まで虚血又は炎症の刺激によって角膜輪部及び角膜実質で産生された少量の chemical mediators (PG も含む) により既に病理組織学的には初期の血管新生が起っているものと考えられる。そこで今回は PG が最も高濃度となる処置3日目までの間に角膜輪部及び角膜実質内ではどのような組織学的な変化又は反応が起こり、角膜新生血管がどのように発展していったのかを形態学的に観察し、新生血管発生に対する細胞性因子の関与とその環境要因について若干の知見を得たので報告する。

II 材料と方法

実験動物には成熟白色家兎 (体重1.2~1.8kg) 9羽11眼を用いた。各家兎の耳静脈にペントバルビタール (ネプタール®) 1ml を注入し全身麻酔を施した後、左眼の球結膜を輪部に沿って切開し、内直筋、外直筋を付着部のところで切断し、その直下の長後毛様動脈を強膜貫入部から前方3mm にわたり教室の三木が開発したマイクロウェーブ凝固器を用いて凝固閉塞し、更にその中央部を切断した。直筋と結膜の縫合は特に行わず、抗生剤で洗浄し手術を終えた。そして、処置直後、4時間、12時間、24時間、48時間、72時間後にペントバルビタールで全身麻酔を施した後、眼球摘出し、2倍希釈の Karnovsky 液に浸漬固定した。そして、輪部より約4mm 離れた強膜を1/3周切開して同固定液を注射器で眼球内にも注入した。約1時間後に強膜切開部に沿って眼球を半割して水晶体を摘出し、角膜輪部と虹彩毛様体を含めて角膜を切除し4℃の低温で12時間前固定した。その後、エタノール系列で脱水、

1%Osmium 液で1時間後固定した。その後、エポン樹脂に包埋しマイクロトームで超薄切片を作成し、一部をトルイジンブルー染色液で染色して光顕で観察し、酢酸ウラニール・クエン酸鉛の二重染色の後、透過型電顕で観察した。

III 結 果

1. 経時的な強角膜輪部と角膜の変化

処置直後の角膜は透明であった。角膜輪部には手術の影響と思われる充血を認めた。光顕では手術部位に近い強角膜輪部に手術侵襲の影響と思われる形質細胞

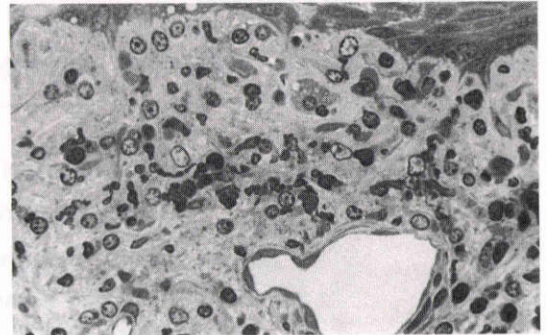


図1a 左右両側の長後毛様動脈を遮断 (前眼部虚血作成) 直後の手術部位近辺の強角膜輪部の光顕 (×250倍) : 多数の形質細胞の輪部への浸潤をみる。

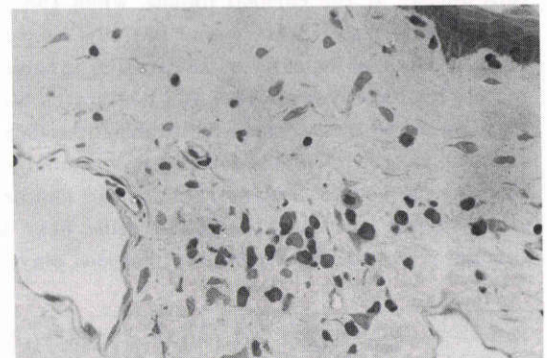


図1b 前眼部虚血直後の非手術部位の強角膜輪部の光顕 (×250倍) : 少数のリンパ球、白血球の浸潤を認める。

の反応性の増加をみた(図1a)。しかし、手術部位から離れた輪部では、少数の形質細胞、リンパ球、白血球を認めた(図1b)。

4時間目は臨床的に角膜は透明であった。光顕で観察すると角膜内皮細胞の連続性は保たれていて、実質の層葉構造の乱れもなく、輪部の炎症細胞浸潤も軽度で処置直後とほとんど変化を認めなかった。

12時間目の光顕では、角膜内皮細胞の胞体に大きな空胞形成を認めた(図2)。輪部血管に近い上皮側の角膜実質細胞が反応性に肥大し、一部の实質細胞の胞体内には多数のライソゾーム顆粒を認めた(図3a)。紡錘形を呈した角膜実質細胞は角膜中央に向かって連なる様に並び、その周囲には多核白血球を主体とした炎症細胞の浸潤をみた。輪部血管の血管壁は蛇行して不整となり、一部で連続性が失われ、そこから血管内皮細胞が角膜中央に向かって増殖し始めていた(図3b)。

24時間後に臨床的に角膜浮腫の発生をみた。光顕では浮腫により開大した強角膜輪部の膠原線維層への炎症性細胞浸潤が高度となった。電顕では、強角膜実質に幼若な血管内皮細胞から成る血管腔の形成がみられ、炎症細胞浸潤の主体は多核白血球であった(図4)。

48時間後は、電顕では角膜実質細胞の胞体は肥大して細胞内小器官が発達し、これらの周囲には多核白血球が多数浸潤し、その一部が実質細胞に付着していた(図5)。

72時間後には角膜は浮腫が増強して白色混濁し、全周性に角膜内に侵入した新生血管が肉眼的にも明瞭となった(図6)。光顕では、強角膜輪部に新生された毛細血管は層状に増殖して実質深部にまでみられたが、角膜実質内への炎症細胞浸潤は少し軽減した。角膜内

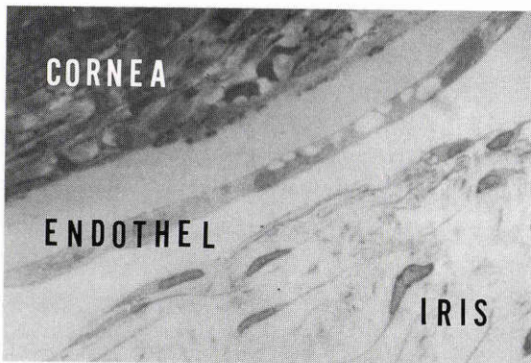


図2 前眼部虚血後12時間の光顕(×400倍):角膜内皮の胞体内に大きな空胞形成を認めたが、一層の膜構造は維持されていた。

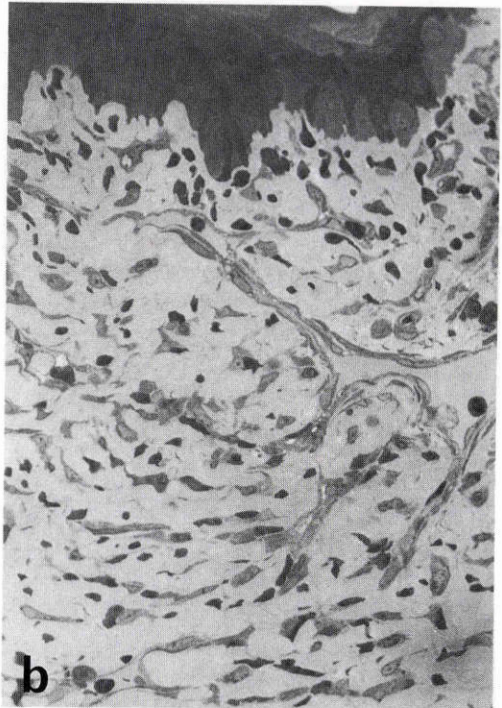
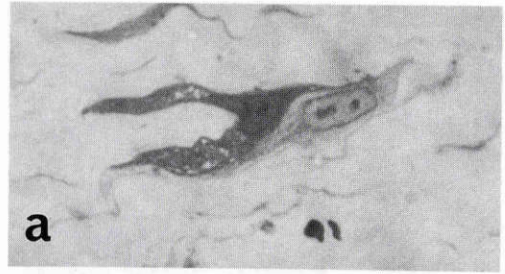


図3a 前眼部虚血後12時間の角膜の光顕(×1,500倍):刺激を受けた角膜実質細胞は胞体が肥大し、一部の細胞の胞体内に多数のライソゾーム顆粒と思われる大きな顆粒を認めた。

図3b 前眼部虚血後12時間の強角膜輪部の光顕(×200倍):紡錘形を呈した角膜実質細胞の周囲には炎症細胞が浸潤し、輪部血管の血管壁は蛇行して不整となり、一部で連続性が失われそこから血管内皮細胞が増殖し始めていた。

皮細胞は強く障害され、細胞の崩壊脱落によって内皮の連続性が失われ、前房中へ単球様の細胞が出現していた。電顕では角膜内皮細胞はミトコンドリアの変性が著しく多数のライソゾームが腫大していた。障害の強い内皮細胞の上を覆う様に周辺部の内皮細胞が増殖し重畳化していたが、それらの内皮細胞も障害され、更にその上に線維芽細胞や炎症細胞が重畳化していた(図7)。

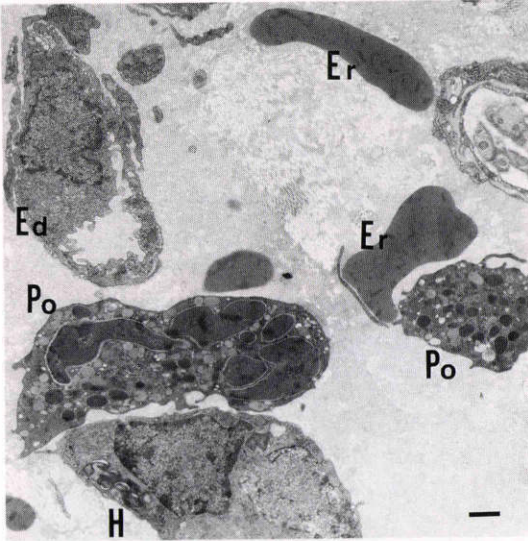


図4 前眼部虚血後24時間の輪部の電顕(バーは1 μm): 強角膜輪部には幼若な血管内皮細胞から成る血管腔の形成と多核白血球, 組織球の浸潤をみた. Po; 多核白血球, H; 組織球, Er; 赤血球, Ed; 血管内皮細胞

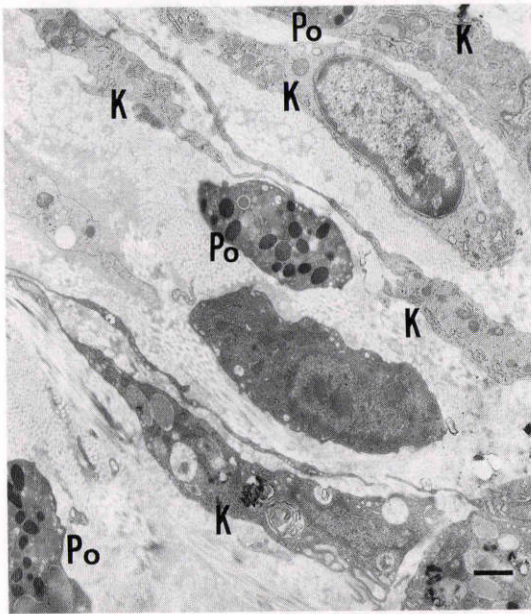


図5 前眼部虚血後48時間の角膜輪部の電顕(バーは1 μm): 線維芽細胞様を呈した角膜実質細胞の胞体は細胞内小器官が発達し, 一部にライソゾーム様顆粒を多数認めた. そういった実質細胞の周囲には多核白血球が浸潤し, 実質細胞に付着しているものも認めた. Po; 多核白血球, K; 角膜実質細胞

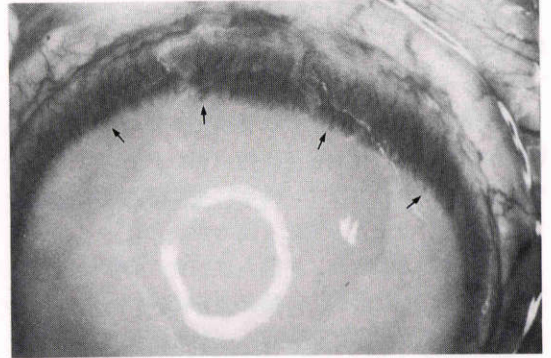


図6 前眼部虚血後72時間の前眼部写真: 浮腫混濁した角膜内に全周性に新生血管の増殖侵入を認めた. 矢印; 角膜新生血管

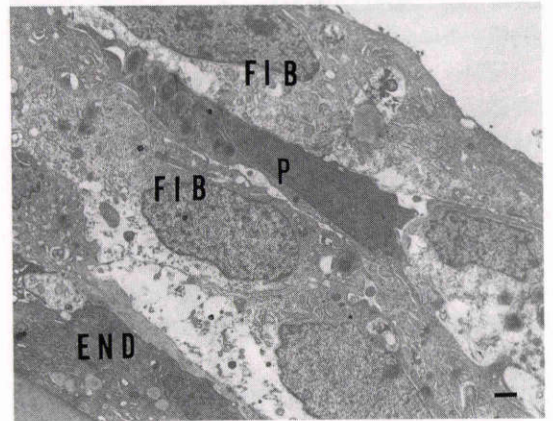


図7 前眼部虚血後72時間の角膜内皮の電顕(バーは1 μm): 障害を受けた角膜内皮細胞の上へ周辺部から内皮が重畳する様に増殖していたが, それらの細胞も障害され, 更にその上に線維芽細胞や炎症細胞が重畳していた. END; 角膜内皮細胞, FIB; 線維芽細胞, P; 多核白血球

2. 血管新生

血管新生の盛んな処置48時間から72時間後の強角膜輪部では, 血管内皮細胞の基底部に budding がみられ, それが発達した細胞内小器官の豊富な胞体の一部が血管内皮細胞の基底膜の連続性の途切れた所から, 管腔外へ舌状に伸び出していた(図8). 血管内皮細胞が管腔外へと伸び出している部位では, その近隣の管腔外にはしばしば多核白血球を認めた(図9). そして, 血管は強膜の膠原線維層の間を縫う様に増殖して行き, その先端部ではいくつもの内皮細胞に分裂して大きく広がり(図10), 増殖した血管内皮細胞は角膜実質

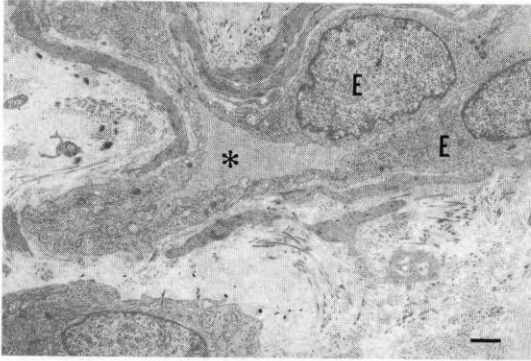


図8 前眼部虚血後12時間の強角膜輪部血管の電顕 (バーは1 μ m) : 血管内皮細胞の基底には budding がみられ、基底膜の途切れた部位から細胞内小器官の発達した胞体が舌状に伸び出していた。E ; 血管内皮細胞, * ; 血管腔

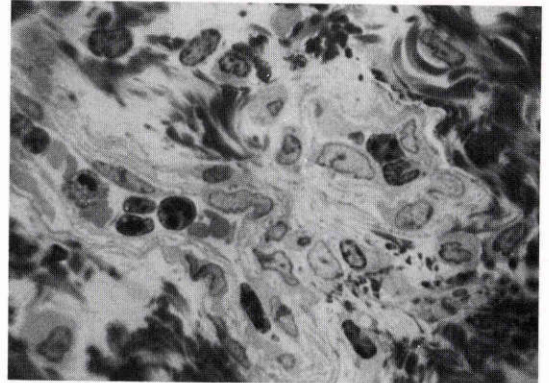
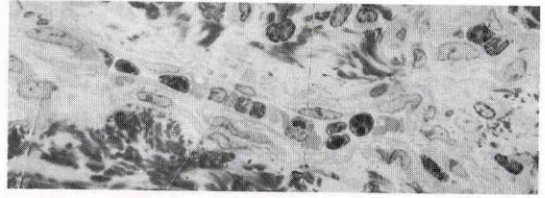


図10 前眼部虚血後48時間の角膜実質の光顕 ($\times 400$ 倍) : 強角膜実質内に侵入した新生血管腔は強角膜実質の膠原線維層の間を縫うように増殖していった。下図は上図の右端の血管内皮が分裂増殖している部の拡大図 (倍率は同上)

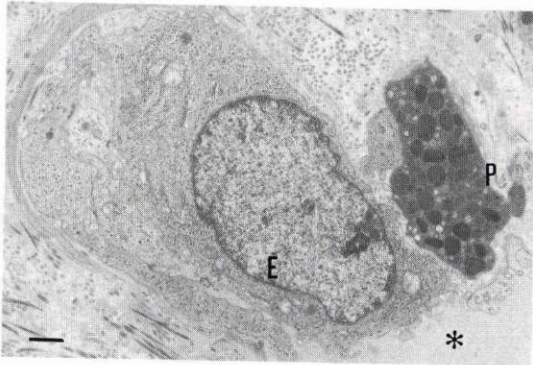


図9 前眼部虚血後24時間の強角膜輪部血管の電顕 (バーは1 μ m) : 血管内皮細胞が基底膜外に伸び出して行く部位にはしばしばその近隣に多核白血球を認めた。E ; 血管内皮細胞, P ; 多核白血球, * ; 血管腔



図11 前眼部虚血後72時間の角膜実質内の新生血管の電顕 (バーは1 μ m) : 角膜新生血管の先端部に近い部分の血管内皮細胞は胞体が大きく細胞内小器官に富んでおり比較的未熟な像を呈していた。

に入ると角膜実質の層葉構造に沿って管腔が細長く伸び角膜層葉間を割って入る様に侵入していった。新生血管の先端に近い部分で管腔を形成しているものも胞体が大きく細胞内小器官が豊富で比較的未熟な血管内皮細胞であった (図11)。

IV 考 按

前眼部虚血後の角膜新生血管の発生についての詳細な形態学的報告はない。今回の実験結果から、前眼部虚血後の血管新生について、強角膜輪部及び角膜実質への炎症細胞浸潤、角膜実質細胞の反応性の線維芽細胞様変化、角膜内皮細胞障害と血管内皮細胞の増殖の

4点を考察した。

まず、角膜への炎症細胞の浸潤であるが、最初に手術侵襲に反応したのは輪部に正常状態でも少数存在している形質細胞であった。しかし、非手術部位に浸潤してきたのはリンパ球と白血球であった。その後、引き続いて多核白血球の強い浸潤と組織球の出現をみた。これら、一連の反応は炎症の時にみられる非特異

的な細胞の浸潤様式とよく一致する。

それに角膜実質細胞が関与すると少し特殊性を帯びる。西田が報告している(第92回日眼総会)様に角膜実質細胞は互いに gap junction で連結していて網目構造となっていて、角膜に何等かの障害がもたらされると、ある一定の範囲の細胞が同時に反応できる。そこへ浸潤して付着した多核白血球は角膜実質細胞に何等かの炎症刺激の化学的情報を伝達しているものと思われる。又、刺激を受けた角膜実質細胞の反応には2つの様式が考えられる。1つは Fibroblast 様に変化して実質細胞周囲の collagen の産生と溶解を行なう場合、もう1つは Macrophage 様に変化して異物や変性細胞の処理を行なう場合で、いずれの場合でもライソゾーム顆粒の発達や色々な酵素の産生放出が関与しているものと思われる。血管内皮細胞の増殖部位周囲の角膜実質細胞は胞体が肥大して線維芽細胞様に変化しており、それから離れた部位の胞体の扁平な細長い実質細胞とは明らかに異なり、刺激された角膜実質細胞は周囲の膠原線維に作用して炎症細胞や血管内皮細胞が遊走し易い環境を作っているのかも知れない。

角膜内皮細胞の障害が形態学的に確認されたのは処置12時間後からであるが、その後急速に細胞障害が進行して、72時間後には障害された角膜内皮細胞の上に更に角膜内皮細胞が重畳しその上に更に線維芽細胞や炎症細胞が重畳していた。又、角膜中央では内皮細胞の崩壊脱落の為にデスメ膜が直接前房に接している部位も出現した。この角膜内皮細胞の障害と前回報告した¹⁾角膜浮腫の増悪化と房水中の PGE と PGF_{2α} の濃度の上昇とがそれぞれ相関して動いており、房水中の高濃度の PG が角膜内皮細胞障害の促進因子として関与していた事を示唆している。又、虚血性に障害を受けた虹彩毛様体組織からは PG 以外に早坂らが報告した⁴⁾⁵⁾種々のライソゾーム酵素も多量に房水中に放出されていると考えられ、これらも角膜内皮細胞を障害している可能性がある。更にバリアー機能を失った角膜内皮を通して房水と一緒にそういった chemical mediator が角膜実質内にも多量に流入し、既に反応性に刺激を受けていた角膜実質細胞や炎症細胞を更に刺激する事となったのかも知れない。

血管新生を起こす重要な細胞性因子には、諸家により、又その使用した動物種や実験方法の違いによってさまざまな報告がある。最も多いのは多核白血球が幼若化した血管内皮細胞を誘導しているとの報告で、Klintworth⁶⁾⁷⁾、Fromer^{8)~10)}、Burger ら¹¹⁾¹²⁾、他に

Berman¹³⁾、Srinivasan¹⁴⁾¹⁵⁾、Issekutz¹⁶⁾¹⁷⁾、Schantzin¹⁸⁾、Sholley¹⁹⁾などの報告がある。活動性のマクロファージが血管内皮細胞の幼若化と関係していると報告しているものに Polverni²⁰⁾、Hunt²¹⁾、Kaminski²²⁾がある。又、刺激を受けたリンパ球に血管新生作用があるとしたものに Epstain²³⁾、Lutty²⁴⁾がある。その他に角膜新生血管の発生に関与している細胞性因子として Yamagami²⁵⁾が角膜実質細胞を、Burger¹¹⁾が血管周細胞を、Eliason²⁶⁾が角膜上皮を候補として報告している。又、Eliason²⁶⁾は角膜新生血管の発生には炎症細胞の浸潤は必要条件ではないとも報告している。

今回の我々の実験結果からは、角膜輪部及び実質内に浸潤した活動性の高い多核白血球がしばしば幼若な血管内皮細胞と同時に観察された。又、刺激を受けて線維芽細胞様に肥大した角膜実質細胞の間にも多数みられ、一部は実質細胞に付着しており、角膜実質内に血管内皮細胞が増殖侵入してくる時に多核白血球は何等かの重要な役割を演じているものと考えた。

稿を終えるにあたり、宇山昌延教授の御指導、御校閲に深く感謝致します。

本論文は著者が第92回日眼総会で報告した。

文 献

- 1) 山根淳志, 戸倉敬雄, 佐野貴之他: 前眼部虚血後に発生する角膜新生血管とプロスタグランディンの関係(その1). 日眼 91: 993-999, 1987.
- 2) 山根淳志, 戸倉敬雄, 佐野貴之他: 前眼部虚血後の角膜浮腫および角膜新生血管の発生とプロスタグランディンの関係(その2). 眼紀 38: 1579-1584, 1987.
- 3) 山根淳志, 戸倉敬雄, 佐野貴之他: 前眼部虚血後に発生する角膜新生血管とプロスタグランディンの関係(その3). 日眼 91: 1079-1085, 1987.
- 4) 早坂征次, 増田寛次郎: 眼刺激と房水ライソゾーム酵素(その1. 前房刺激後の房水ライソゾーム酵素活性と抗炎症剤の影響). 眼紀 31: 1264-1268, 1980.
- 5) 早坂征次, 増田寛次郎: 眼刺激と房水ライソゾーム酵素(その2. 各種眼刺激による酵素活性の変動). 眼紀 31: 1269-1272, 1980.
- 6) Klintworth GK: The hamster cheek pouch. An experimental model of corneal vascularization. Am J Pathology 73: 691-710, 1973.
- 7) Klintworth GK: The contribution of morphology to our understanding of the pathogenesis of experimentally produced corneal vascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 281-285, 1977.

- 8) **Fromer CH, Klintworth GK**: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal neovascularization. I. Comparison of experimental model of corneal neovascularization. *Am J Pathology* 79: 537—554, 1975.
- 9) **Fromer CH, Klintworth GK**: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal neovascularization. II. Studies on the effect of leukocytic alimination on corneal vascularization. *Am J Pathology* 81: 531—544, 1975.
- 10) **Fromer CH, Klintworth GK**: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal neovascularization. III. Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Am J Pathology* 82: 157—170, 1976.
- 11) **Burger PC, Klintworth GK**: Autoradiographic study of corneal neovascularization induced by chemical cautery. *Lab Invest* 45: 328—335, 1981.
- 12) **Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK**: Corneal neovascularization as studied by scanning electron microscopy of vascular casts. *Lab Invest* 48: 169—180, 1983.
- 13) **Berman M, Winthrop S, Ausprunk D, et al**: Plasminogen activator (urokinase) causes vascularization on the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 191—199, 1982.
- 14) **Srinivasan DB, Kulkarni PS**: The role of arachidonic acid metabolites in the mediation of the polymorphonuclear leukocyte response following corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1087—1093, 1980.
- 15) **Srinivasan DB, Kulkarni PS**: Polymorphonuclear leukocyte response. Inhibition following corneal epithelial denudation by steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Arch Ophthalmol* 99: 1085—1089, 1981.
- 16) **Issekutz AC**: Effect of vasoactive agents on polymorphonuclear leukocyte emigration in vivo. *Lab Invest* 45: 234—240, 1981.
- 17) **Issekutz AC, Movat HZ**: The effect of vasodilator prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. *Am J Pathology* 107: 300—309, 1982.
- 18) **Schanzlin DJ, Cry RJ, Friedlaender MH**: Histopathology of corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 101: 472—474, 1983.
- 19) **Scholley MM, Gimbrone MA, Cotran RS**: The effects of leukocyte depletion on corneal neovascularization. *Lab Invest* 38: 32—40, 1978.
- 20) **Polverini PJ, Leiborich SJ**: Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest* 51: 635—642, 1984.
- 21) **Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, et al**: Studies on inflammation and wound healing: Angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 96: 48—54, 1984.
- 22) **Kaminski M, Hayari Y, Kaminska G, et al**: Macrophage-induced neovascularization in the mouse eye: Correlation with other in vivo and in vitro tests of angiogenesis. *Docum Ophthalmol Proc Series* 31: 355—359, 1987.
- 23) **Epstein RJ, Hughes WF**: Lymphocyte-induced corneal neovascularization: A morphologic assessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 87—94, 1981.
- 24) **Lutty GA, Liu SH, Prendergast RA**: Angiogenic lymphokines of activated T-cell origin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1595—1601, 1983.
- 25) **Yamagami I**: Electromicroscopic study on the cornea. 1. The mechanism of experimental new vessel formation. *Jap J Ophthalmol* 14: 41—58, 1970.
- 26) **Eliason JA**: Vasoformative factors in the corneal epithelium. *Docum Ophthalmol Proc Series* 31: 349—354, 1987.