

再生した網膜色素上皮細胞の反応態度 (図7, 表2)

—ヨード酸ソーダによる影響—

緒方奈保子・金井 清和 (関西医科大学眼科学教室)
大熊 紘・宇山 昌延

要 約

ラットにヨード酸ソーダ40mg/kgを1回静注投与すると、3日後、網膜色素上皮細胞は著しい壊死に陥り、崩壊し、一部 Bruch 膜から脱落した。2週後には、basal infolding が消失し、microvilli が短縮した扁平な再生した網膜色素上皮細胞によって Bruch 膜はおおわれていた。ヨード酸ソーダを比較的多量投与すると、網膜色素上皮は崩壊したのち、色素上皮細胞は再生されることがわかった。再生した網膜色素上皮細胞の反応態度を観察するために、このようなところの網膜下腔にポリスチレン小球を注入し、再生した網膜色素上皮のポリスチレン小球に対する貪食、増殖、化生能を観察した。貪食開始時間には対照と比べて遅れはなかった。増殖、及び線維芽細胞様細胞への化生の開始時期も対照群と比べて差はなかったが、増殖と化生の程度には著しい低下がみられた。この様に、障害を受けた後に、再生した網膜色素上皮細胞の機能は著明に低下していることが分かった。(日眼会誌 93:466-474, 1989)

キーワード：網膜色素上皮細胞, ヨード酸ソーダ, 貪食, 増殖, ラテックス小球

Pathologic response of the Regenerated retinal pigment epithelium (RPE)
—affected by sodium iodate (NaIO₃)—

Nahoko Ogata, Kiyokazu Kanai, Hiroshi Ohkuma
and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology Kansai Medical University

Abstract

Phagocytosis, proliferation and metaplasia to fibroblast-like cells in the regenerated retinal pigment epithelial cell (RPE) were examined after damage caused by administration of sodium iodate. The solution of sodium iodate (40mg/kg) was given in a single intravenous injection in rats. Three days after injection, RPE showed marked necrotic damage, but in 2 weeks flat regenerated RPE with short microvilli and no basal infolding were seen on Bruch's membrane. Polystyrene particles were then injected into the subretinal space. The rats were sacrificed 6 hours to 4 days after injection of the particles. The regenerated RPE showed phagocytosis within 6 hours. After 48 hours, they showed multilayer proliferation. After 4 days RPE transformed to spindle shaped fibroblastlike cells. However proliferation and metaplasia of RPE markedly decreased. The results showed significant decrease in the function of regenerated RPE-cells as a result of their damage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93:466-474, 1989)

Key words: Retinal pigment epithelium, Sodium iodate, Phagocytosis, Proliferation, Latex particles

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 緒方奈保子
(平成元年2月7日受付, 平成元年3月13日改訂受理)

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

(Received February 7, 1989 and accepted in revised form March 13, 1989)

I 緒 言

ヨーン酸ソーダによる網膜色素上皮の障害実験¹⁾⁻¹⁴⁾は古くから多くおこなわれているが、ヨーン酸ソーダの影響を受けた網膜色素上皮細胞の貪食能、増殖能など機能を調べた報告はない。網膜色素上皮細胞が健常な場合と障害を受けている場合とでは、網膜色素上皮の反応能力は異なる可能性がある¹⁵⁾¹⁶⁾と考えられる。網膜色素上皮細胞を障害した状態での疾患の発生経過がヨーン酸ソーダを用いて検討され¹⁷⁾¹⁸⁾、網膜色素上皮細胞の貪食、増殖、化生能に影響があるのではないかと考えられている。我々は前報では色素上皮を軽度障害するためにラットにヨーン酸ソーダを少量投与し、その24時間後に網膜下腔にポリスチレン小球を注入して、網膜色素上皮の貪食、増殖、化生能を観察した。その結果、軽度障害の早期においては、貪食開始の遅延、増殖、化生能の低下がみられることがわかった¹⁹⁾。今回は網膜色素上皮が高度に障害された後に、再生した網膜色素上皮細胞の貪食、増殖、化生能について、比較的多量のヨーン酸ソーダを投与し検討した。

II 方 法

1) 実験動物

実験動物として、体重約300gのWistar系の白色ラットを用いた。ラットは通常の人工飼料で飼育し、水分は十分に与え、照射は昼夜12時間ずつとした。

2) 薬物投与方法

3%ヨーン酸ソーダ液を用いて、ヨーン酸ソーダ40mg/kgを尾静脈より1回静注した。

3) ヨーン酸ソーダ投与後の網膜色素上皮の変化の観察

上記量のヨーン酸ソーダ投与直後から2週間まで経時的に眼球摘出し、網膜色素上皮の形態学的変化を後述の方法で顕微鏡、及び電顕にて観察した。それぞれの観察には、3匹以上用いた。

4) ポリスチレン小球の網膜下腔注入

ヨーン酸ソーダ投与2週後のラットの網膜下腔にポリスチレン小球を注入し、網膜色素上皮の反応態度を観察した。小球注入はすべて午前中に行なった。小球は既報にて貪食され易かった負荷電小球を用い²⁰⁾²¹⁾、浮遊液0.05ml(10⁹個/ml)を既報に記した方法^{19)~23)}で網膜下腔に注入した。注入後に眼底検査を行い、注入液が正しく網膜下腔に注入されたものを実験に用い

た。小球注入後6時間から4日まで網膜下腔の状態の観察を行なった。

対照として、ヨーン酸ソーダを投与せず、同様処置を行なったものも同期間観察し、対照群とした。それぞれの観察には3匹以上用いた。

5) 試料作成方法

ヨーン酸ソーダ静注直後から2週間まで経時的に、また小球注入実験では、ヨーン酸ソーダ静注2週後にポリスチレン小球を網膜下腔に注入し、その後6時間、24時間、48時間、4日に眼球摘出した。それぞれの眼球は直ちに2.5%グルタルアルデヒド(0.1M 磷酸緩衝液)にて、24時間固定後、角膜、虹彩、水晶体を除去し、網膜を切り出した。また、ポリスチレン小球を注入したものは前固定後、実体顕微鏡下に網膜剝離の範囲、ポリスチレン小球の分布状態、刺入部位、出血の有無、程度を観察し、刺入による障害が少なく、小球の分布状態が一定で、よく注入されている部位を切り出した。細切した切片は1%四酸化オスミウムにて後固定後、漸増アルコール系列にて脱水、プロピレンオキサイドに置換後、エボン包埋し、顕微鏡、電顕用観察に供した。透過型電顕による観察には、酢酸ウラニルと硝酸鉛による染色を行い、日立HU-12、H-500型電子顕微鏡にて観察した。

6) 増殖・化生反応の程度の比較

対照群とヨーン酸ソーダ投与後再生色素上皮群においてそれぞれポリスチレン小球注入4日後の色素上皮の反応を比較した。それぞれ3個体5眼の標本からそれぞれ2切片、合計10切片を作成し、1切片から無作為に5箇所を選び合計50カ所、網膜下腔に増殖して線維芽細胞様に重層した網膜色素上皮層の厚さを顕微鏡1000倍油浸下に測定し統計処理した。

III 結 果

1. ヨーン酸ソーダ投与による網膜色素上皮の変化：ヨーン酸ソーダ40mg/kgの投与量は前報¹⁹⁾の4倍量に当たった。静注後3日、顕微鏡でみると視細胞外節、網膜色素上皮細胞に強い変性がみられた(図1a)。電顕でみると網膜色素上皮の細胞内小器官は不明瞭となり、一部の色素上皮細胞は変性が強く崩壊し、Bruch膜より脱落していた(図1b)。5日よりmacrophageによる網膜下腔の清掃と残存した網膜色素上皮の増殖による修復がみられ、2週後には再生した網膜色素上皮によってBruch膜はおおわれた(図2a)。再生した網膜色素上皮は、細胞が著しく扁平で、basal infolding

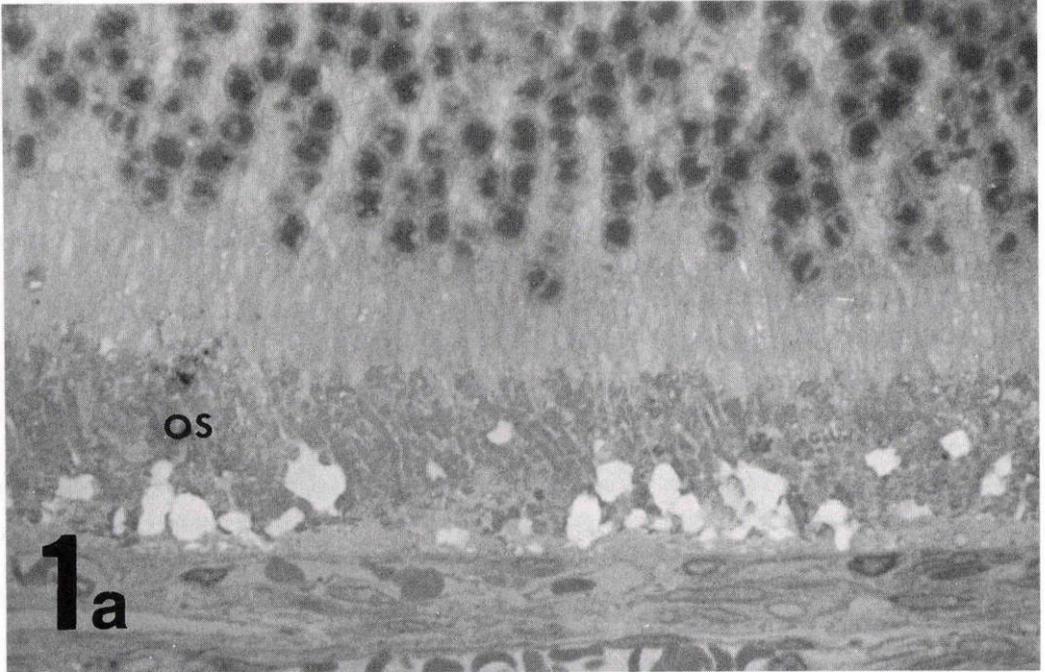


図 1a ヨーソ酸ソーダ(40mg/kg) 1回静注後3日の光顕所見(×1000油浸): 網膜色素上皮と視細胞外節の障害が著明であった。(os: 外節)

図 1b 静注3日後の電顕所見: 網膜色素上皮は強い壊死に陥り崩壊し, Bruch膜より脱落した。

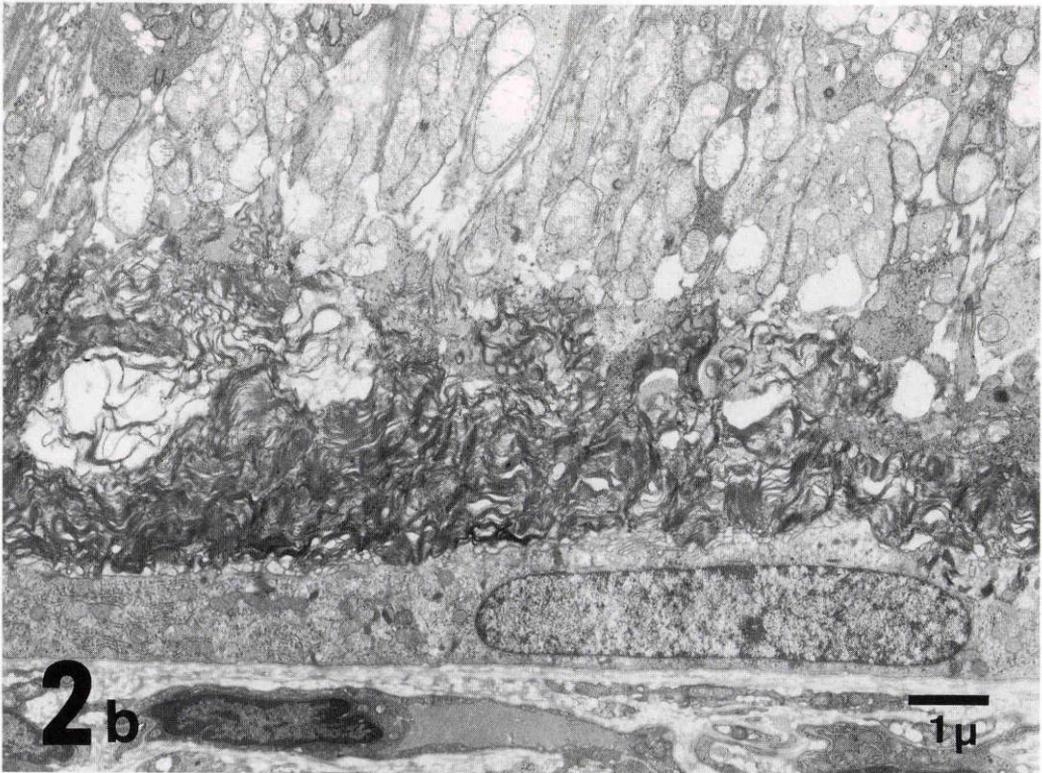
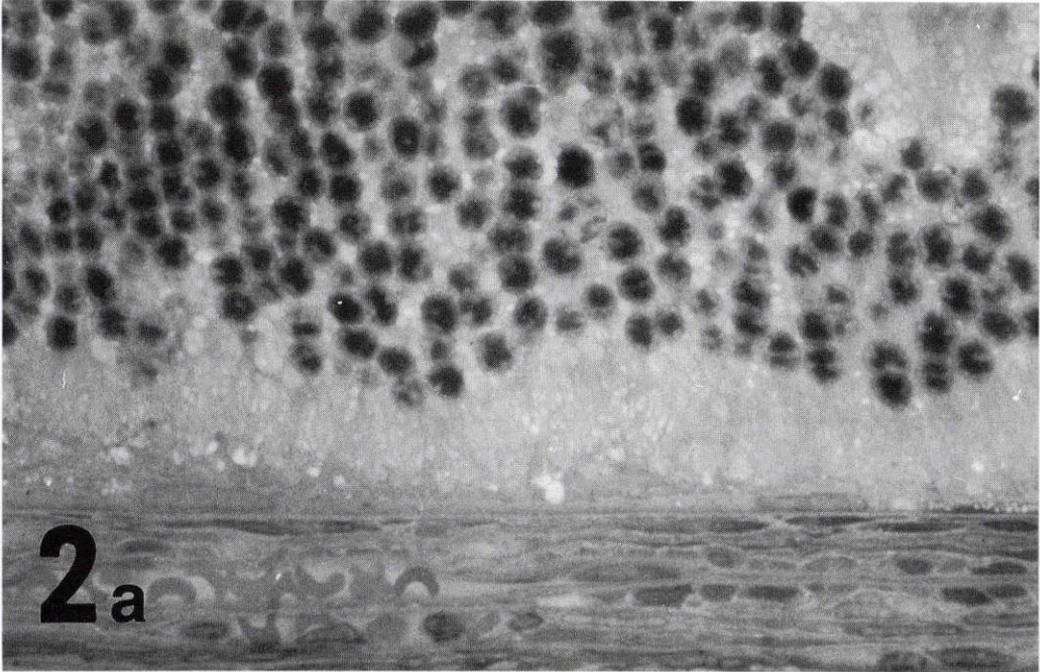


図2a ヨーソ酸ソーダ静注後2週の光顕所見：扁平な再生した網膜色素上皮細胞がBruch膜をおおっていた。

図2b 静注後2週の電顕所見：再生した網膜色素上皮細胞は、microvilliが短縮し、basal infoldingを認めなかった。

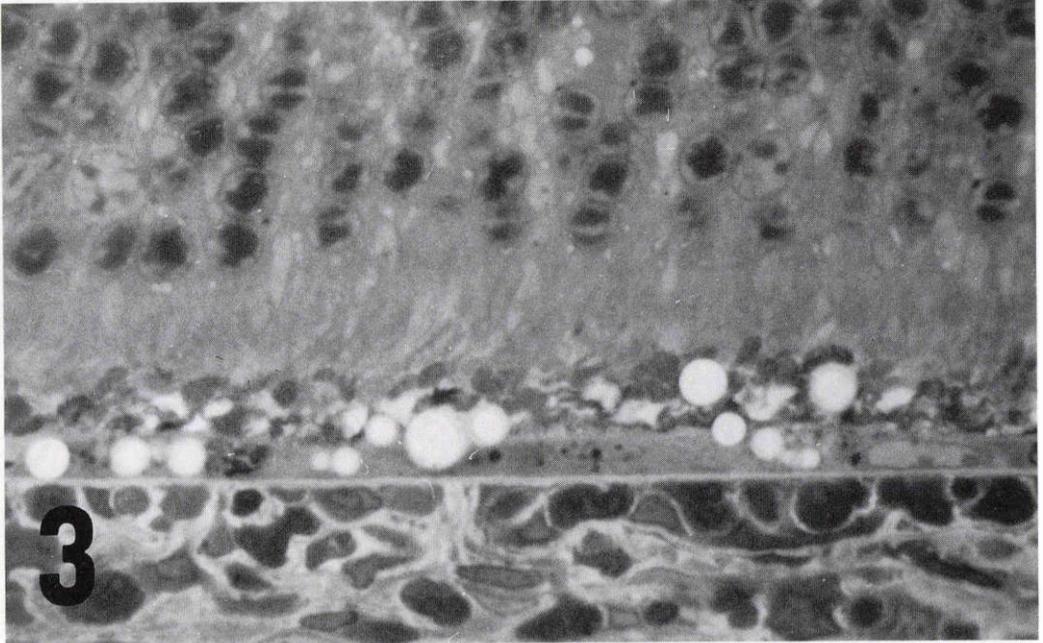


図3 ヨーソ酸ソーダ(40mg/kg) 1回静注2週後にポリスチレン小球を注入、小球注入6時間後の光顕所見(×1000油浸)：ポリスチレン小球は再生した網膜色素上皮に貪食されていた。

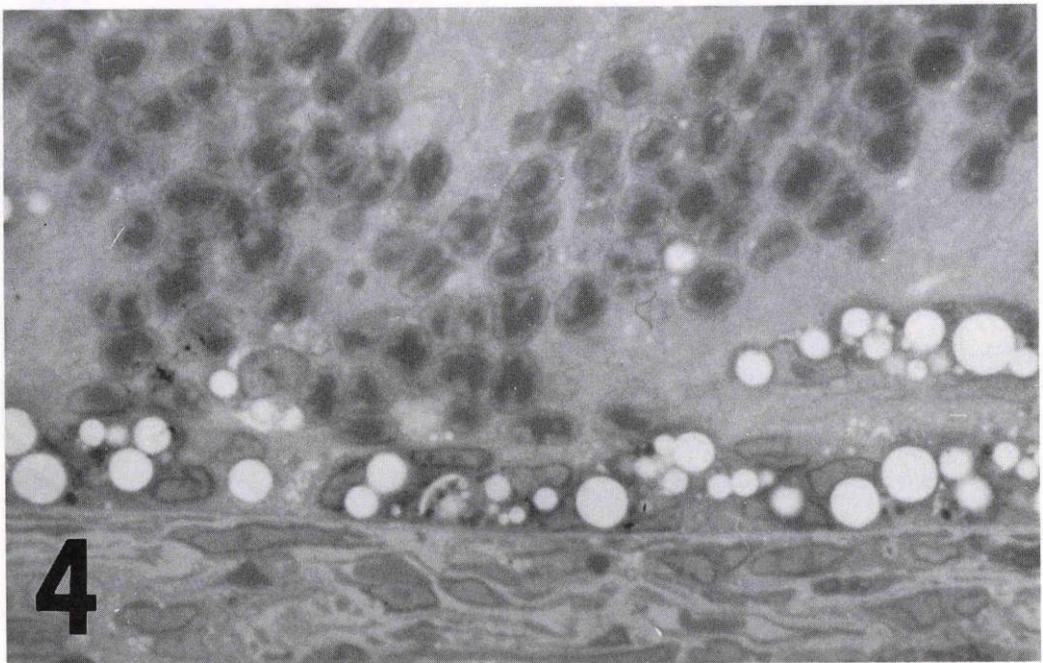


図4 小球注入48時間後の光顕所見(×1000油浸)：再生した色素上皮細胞は小球貪食と共に増殖していた。

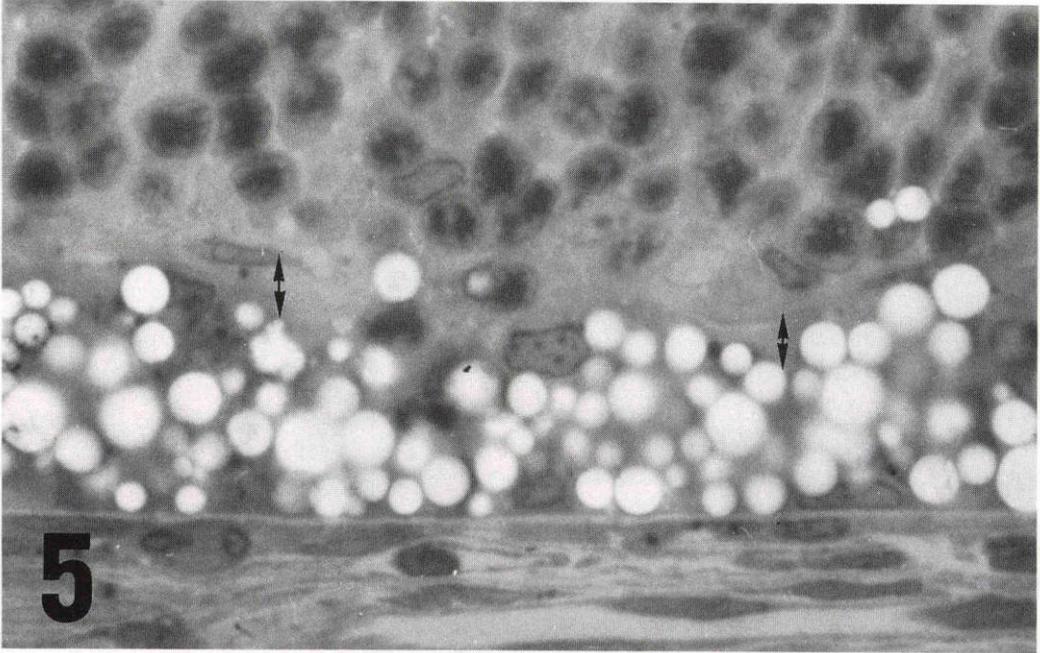


図5 小球注入4日後の光顕所見(×1000油浸)：色素上皮は増殖して重層し、一部は細長くなり線維芽細胞様に化生していた。(矢印間の距離を測定した)

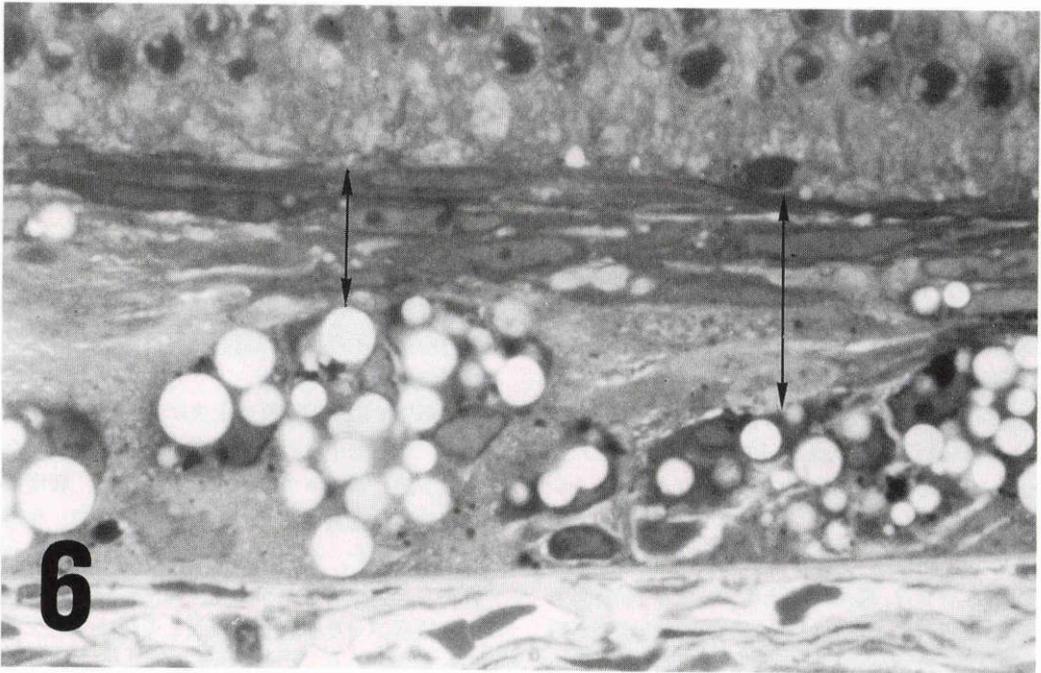


図6 無処置群にポリスチレン小球を注入、小球注入4日後の光顕所見(×1000油浸)
図5より細長く縦走した層の厚さがあつい。(矢印間の距離を測定した)

表1 増殖, 化生能の比較

	例数	平均 (μm)	SD (μm)	SE (μm)	分散分析	
					F値	P値
再生色素上皮群	50	5.35	7.37	1.04	49.52	p<0.01
対照群	50	20.55	9.57	0.78		
軽度障害色素上皮群 (前報 ¹⁹⁾ より引用)	50	14.00	5.50	1.35		

はみられず, microvilli は短縮していた (図 2b).

2. ポリスチレン小球注入実験: ヨーソ酸ソーダ投与2週後の網膜下腔にポリスチレン小球を注入した。注入6時間後, 再生した扁平な網膜色素上皮は小球を既に貪食し(図3), 網膜色素上皮の貪食能は対照群と同様に保たれていて, 貪食開始時間の遅延はなかった。

小球注入48時間後, 色素上皮は小球をより多く貪食し, 増殖が始まって一部は重層していた(図4)。対照群と比べて増殖の程度は少なかったが, 増殖の開始時期の遅れはなかった。

小球注入4日後, 色素上皮は多数の小球を胞体内に貪食して重層し, 一部は線維芽細胞様に化生していた(図5)が, 対照群(図6)と比べて, 増殖と化生の程度は少なかった。

3. 増殖, 化生反応の程度の比較: 色素上皮の増殖, 化生反応の程度は方法に述べたように, 網膜下腔に増殖し, 線維芽細胞様に重層した層の厚さ, すなわち図5, 図6の矢印間の厚さを測定した。その結果は表1, 図7に示すように, 明らかに重層した層の厚さに差が認められた。対照群の重層した層の厚さは平均20.55 μm であったが, 再生色素上皮群では5.35 μm , SDはそれぞれ9.57 μm , 7.37 μm , SEはそれぞれ1.35 μm , 1.04 μm であった。多重比較(表2)にても再生色素上皮群は危険率0.01以下で有意に, 色素上皮の増殖, 化生能が低下していることが分かった。前報¹⁹⁾のヨーソ酸ソーダ10mg/kg投与軽度障害色素上皮群と併せて比較し, 分散分析を行なうと表1に示すようにそれぞれの増殖, 化生の程度に明かな差があった。

IV 考 按

ヨーソ酸ソーダは, Noellら¹²⁾によって形態的, 電気生理学的に網膜色素上皮に対する影響と障害程度が観察されており, 選択的に網膜色素上皮細胞に障害を与えることが知られ, 網膜色素変性症の実験モデルとされている。ヨーソ酸ソーダを用いた網膜色素上皮の障

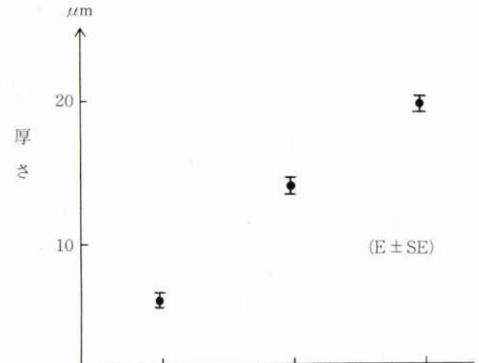
図7 再生色素上皮群, 軽度障害群¹⁹⁾, 対照群

表 2

多重比較	F値	P値
再生色素上皮群……対照群	49.15	<0.01
再生色素上皮群……軽度障害色素上皮群 ¹⁹⁾	16.29	<0.01
軽度障害色素上皮群……対照群 ¹⁹⁾	8.85	<0.01

害実験¹¹⁻¹⁴⁾は多く行なわれ, 投与後の網膜色素上皮細胞の障害について, 形態的にも観察されているが, その時の網膜色素上皮の貪食, 増殖, 化生機能を検討した報告は未だない。

前報¹⁹⁾では, 網膜色素上皮に軽度の障害を起こすために, 比較的少量のヨーソ酸ソーダを投与したのち, 網膜下腔にポリスチレン小球を注入し, 軽度に障害された網膜色素上皮細胞の貪食能, 増殖能, 化生能の状態を報告した。今回, 比較的多量のヨーソ酸ソーダを投与して網膜色素上皮細胞を高度に障害すると, 色素上皮細胞が一旦崩壊した後, 2週後には再生することがわかったので, このような再生した網膜色素上皮細胞にポリスチレン小球を与え, 再生色素上皮細胞の機能状態を観察した。

ヨーン酸ソーダを用いた網膜色素上皮の障害実験では、Anstadt ら¹⁰⁾はラットにヨーン酸ソーダ20mg/kg, 60mg/kgを投与し、60mg/kg投与した場合24時間後、網膜色素上皮細胞に高度な障害がみられ、壊死反応を示し、また、3~4日後には大きい intercellular gap, 多数の macrophage がみられ、色素上皮の崩壊がみられたとしている。Nilsson ら⁸⁾は羊にヨーン酸ソーダ30mg/kgを静注し3日後の反応を観察しているが、網膜色素上皮細胞の核膜も崩壊し、細胞内小器官は膨化して不明瞭になり、細胞内には空胞ができたと述べている。Ringvold⁹⁾も家兎にヨーン酸ソーダ静注投与し、静注3日には網膜色素上皮細胞は大きな intercellular gap がみられ、網膜下腔には多数の macrophage が現れたと報告している。我々の観察でも40mg/kg静注3日後に網膜色素上皮細胞は強い壊死に陥り崩壊した。

また、Ringvold ら⁹⁾は静注8日に、網膜色素上皮の再生がみられ、tight junction が形成され、機能的に barrier が回復し、蛍光の漏出がなくなることを観察している。Korte ら¹³⁾は家兎にヨーン酸ソーダ25mg/kgを投与し、網膜色素上皮を障害したときの choriocapillaris の萎縮を観察し、静注後1週には蛍光の漏出が認められなくなり、網膜色素上皮細胞の特徴である basal infolding や、microvilli の消失した扁平な細胞、色素の少ない色素上皮や、瘤状の色素上皮をみている。これらの細胞は崩壊後、再生した網膜色素上皮細胞であると考えられた。

我々の実験においても2週後には著しく扁平で、microvilli は短縮し、basal infolding が消失した再生した網膜色素上皮細胞がみられた。なお、白色ラットのため細胞内の色素顆粒の状態は不明であった。

さらに、羽生田¹⁴⁾は家兎にヨーン酸ソーダ30mg/kgを投与し、投与1日後に色素上皮細胞は壊死に陥るが、1週後、既に色素上皮の再生が始まっており、蛍光眼底造影では背景蛍光は著しく減弱し、硝子体蛍光測定で漏出の減少がみられ、一度破壊された網膜色素上皮は1週前後で臨床的にも組織学的にも、血液網膜柵の修復が始まり、また1回投与でも3回投与でも同程度に網膜色素上皮が破壊されたと報告している。我々は40mg/kgの1回投与で十分に網膜色素上皮を障害し、網膜色素上皮の再生がみられた。

網膜色素変性症の類似モデルとしてRCSラットについての報告^{24)~26)}のなかで、網膜色素上皮の貪食能を検討したものでは、RCSラットの色素上皮は炭素粒や、ラテックス粒子等の異物に対する貪食能は正常色

素上皮と同じであるが²⁴⁾²⁵⁾、玉井ら²⁶⁾は in vivo の交換培養でRCSラットの外節は正常色素上皮に貪食されたが、正常ラットの外節はRCSの色素上皮に貪食されなかったことから網膜色素上皮の微絨毛の貪食における認識と取り込みのうち、外節を貪食対象として認識する機構に欠陥があるのではないかと考えている。

我々が検討した再生色素上皮細胞は対照群と比較し、ポリスチレン小球の貪食開始時間には差はみられなかった。Microvilli が著しく短い変性した色素上皮細胞であったにも関わらず、ポリスチレン小球に対する認識も取り込みも障害されず貪食は行なっていた。貪食開始時間を貪食能の1つの指標として検討したところ、前報¹⁹⁾の軽度障害時には貪食開始時間は遅延していたが、再生した色素上皮細胞では正常に行なわれていた。

次に増殖と線維芽細胞様細胞への化生能の障害程度を検討比較した。増殖の開始時間、化生の開始時間は正常のものと同様であったが、増殖、化生した細胞の層の厚さは対照群と比較して明かに減少しており、前報¹⁹⁾と比較しても有意に低下していた。10mg/kg投与した軽度障害群の結果と併せて、分散分析、多重比較を行なったところ、色素上皮の障害の程度に応じて増殖、化生の機能が著しく低下していることが示された。

網膜色素上皮の障害をヨーン酸ソーダ投与によって起こし、その in vivo における機能的障害を異物に対する貪食、増殖、化生能を指標として検討した。ヨーン酸ソーダにより高度に障害を受けたのち再生した網膜色素上皮細胞において、貪食能はほぼ回復し、さらに増殖、化生の開始時間も対照群と差はなかったが、その程度は著明に低下していた。すなわち、障害された網膜色素上皮細胞はその障害程度によって機能も低下していることが示された。

本報の要旨の一部は第92回日本眼科学会総会(S.63.3.19.京都)において緒方が口演した。

文 献

- 1) Noell WK: Experimentally induced toxic effects on structure and function of visual cells and pigment epithelium. Am J Ophthalmol 36: 103-115, 1953.
- 2) Noell WK: Metabolic injuries of the visual cell. Am J Ophthalmol 40: 60-70, 1955.
- 3) Noell WK: Azide-sensitive potential difference across the eye-bulb. Am J Physiol 170: 217-238, 1952.
- 4) Noell WK: The origin of the electroretino-

- gram. *Am J Ophthalmol* 38 : 78—93, 1954.
- 5) **Sorsby A, Newhouse JP, Lucas DR**: Experimental degeneration of the retina. I. Thiol reactors as inducing agents. *Brit J Ophthalmol* 41 : 309—312, 1957.
 - 6) 須山棟一: 実験的網膜変性症の電子顕微鏡的観察. *日眼* 69 : 440—460, 1965.
 - 7) **Grignolo A, Orzalesi N, Calabria GA**: Studies on the fine structure and photopsin cycle of the rabbit retina in experimental degeneration induced by sodium iodate. *Exp Eye Res* 5 : 86—97, 1966.
 - 8) **Nilsson SEG, Knave B, Persson HE**: Changes in ultrastructure and function of the sheep pigment epithelium and retina induced by sodium iodate. III. Delayed Effects. *Acta Ophthalmol* 55 : 1027—1043, 1977.
 - 9) **Ringvold A, Olsen E, Flage T**: Transient breakdown of the retinal pigment epithelium diffusion barrier after sodium iodate: A fluorescein angiographic and morphologic study in the rabbit. *Exp Eye Res* 33 : 361—369, 1981.
 - 10) **Anstadt B, Blair N, Rusin M**, et al: Alteration of the blood-retinal barrier by sodium iodate. Kinetic vitreous fluorophotometry and horseradish peroxidase tracer studies. *Exp Eye Res* 35 : 653—662, 1982.
 - 11) **Flage T, Ribvold A**: The retinal pigment epithelium diffusion barrier in the rabbit eye after sodium iodate injection. A light and electron microscopic study using horseradish peroxidase as a tracer. *Exp Eye Res* 34 : 933—940, 1982.
 - 12) **Flage T**: Changes in the juxtapapillary pigment epithelium following intravenous injection of sodium iodate. A light and electron microscopic study using horseradish peroxidase as a tracer. *Acta Ophthalmol* 61 : 20—28, 1983.
 - 13) **Korte GE, Reppucci V, Henkind P**: RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 25 : 1135—1145, 1984.
 - 14) 羽生田俊, 沼賀哲郎, 岸 章治他: 実験的網膜色素上皮障害と硝子体蛍光. *日眼* 89 : 503—511, 1985.
 - 15) **Glaser BM, Campochiaro PA, Davis JL**, et al: Retinal pigment epithelial cells release an inhibitor of neovascularization. *Arch Ophthalmol* 103 : 1870—1875, 1985.
 - 16) **Mancini MA, Frank RN, Keirn RJ**, et al: Dose the retinal pigment epithelium polarize the choriocapillaris? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 336—345, 1986.
 - 17) 山岸和矢, 大熊 紘, 板垣 隆他: 網膜下新生血管と網膜色素上皮の関連. 第1報. *日眼* 92 : 46—56, 1988.
 - 18) 山岸和矢, 大熊 紘, 板垣 隆他: 網膜下新生血管と網膜色素上皮の関連. 第2報. *日眼* 92 : 57—64, 1988.
 - 19) 緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘他: 軽度に障害された網膜色素上皮細胞の反応態度—ヨウ酸ソーダによる影響. *日眼* 93 : 439—448, 1989.
 - 20) 緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘他: 網膜色素上皮細胞の貪食, 増殖反応. *眼紀* 39 : 31—40, 1988.
 - 21) 緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘他: 網膜色素上皮細胞の反応様式. 1. 貪食—表面性状の異なる異物に対する反応. *日眼* 92 : 1406—1413, 1988.
 - 22) 緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘他: 網膜色素上皮細胞の反応様式. 2. 遊走と有糸分裂像. *日眼* 92 : 1650—1656, 1988.
 - 23) 緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘他: 網膜色素上皮細胞の反応様式. 3. 線維芽細胞様化生. *日眼* 92 : 2029—2037, 1988.
 - 24) **Custer NV, Bok D**: Pigment epithelium—photoreceptor interaction in the normal and dystrophic rat retina. *Exp Eye Res* 21 : 153—166, 1975.
 - 25) **Reich-D'Almeida FB, Hockley DJ**: In situ reactivity of the retinal pigment epithelium. II. Phagocytosis in the dystrophic rat. *Exp Eye Res* 21 : 347—357, 1975.
 - 26) **Tamai M, O'Brien P**: Retinal dystrophy in RCS rat: In vivo and in vitro studies of phagocytic action of the pigment epithelium on shed rod outer segments. *Exp Eye Res* 28 : 399—411, 1979.