

家兎生体眼における網膜接着力の測定 (図3)

喜多美穂里・根木 昭* (京大眼科, *天理病院眼科)
河野真一郎・本田 孔士

要 約

Wiederhielm らにより開発された resistance servo-nulling 法を応用した micropressure measuring system を用いて、網膜下腔内圧を精密に測定し、生体眼における網膜の接着力を評価する新しい方法を開発した。有色家兎を用い、顕微鏡下に、マイクロペットを pars plana より挿入し、balanced salt solution を徐々に注入し、半球形の、限局性網膜剝離 (bleb) を作製。別のマイクロペットを bleb 内に刺入し、micropressure measuring system を設置する。最初のマイクロペットから液を注入し、bleb が再び伸展し始めたときの網膜下腔内圧を測定した。同時に、硝子体内圧の変化も測定した。Laplace の法則を応用して、計算することで、有色家兎正常眼における網膜接着力は、 $(1.8 \pm 0.2) \times 10^2$ dyn/cm と見積られた。今回の方法で得られた値は、in vitro peeling 法による値の約 5 倍であった。(日眼会誌 93: 631—635, 1989)

キーワード：網膜接着力，生体眼，網膜剝離，家兎

A New Method to Evaluate Retinal Adhesive Force in Living Rabbit Eye

Mihori Kita, Akira Negi*, Shinichiro Kawano, Yoshihito Honda

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

*Department of Ophthalmology, Tenri Hospital, Nara, Japan.

Abstract

A new method to evaluate the retinal adhesive force in rabbit eye in vivo is described. A small dome-shaped retinal detachment (bleb) was made in the posterior pole fundus of Dutch rabbit by injecting balanced salt solution into the subretinal space through a micropipette. The transmural pressure was directly measured with a micropressure measuring system, utilizing the resistance servo-nulling methods when the bleb started to extend again. According to Laplace's law, the retinal adhesive force of normal Dutch rabbits was calculated to be $(1.8 \pm 0.2) \times 10^2$ dyn/cm ($n=84$). This value was about 5 times larger than that previously obtained by peeling methods in vitro. Our newly developed method might resolve several problems encountered in the previous methods and allow for the measurement of the retinal adhesive force more physiologically and precisely. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 631—635, 1989)

Key Words: Retinal adhesive force, In vivo eye, Retinal detachment, Rabbit

別刷請求先：606 京都市左京区聖護院川原町54 京都大学医学部眼科学教室 喜多美穂里
(平成元年 4 月12日受付，平成元年 5 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Mihori Kita, M.D. Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.
54 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received April 12, 1989 and accepted in revised form May 1, 1989)

I 緒 言

視細胞は、網膜色素上皮（以下、RPE）を介してその栄養を脈絡膜に依存しており、正常な視機能を営むためには両層の接着が不可欠である。硝子体側からの牽引力が接着力を上回ったり、網膜裂孔周囲の接着が消失し硝子体液が網膜下腔に流入すると、両層が分離し網膜剥離が生じる。その治療には、裂孔閉鎖、硝子体牽引の除去といった外科的手段がとられるが、その後の剥離網膜全般の復位、維持は生来備わった網膜の接着力に依存している。ところが解剖学的結合を欠くこの両層にどうして強い接着が生じるのか、またなぜそれが消失するのかといった事に対する基礎的な知識は、驚くほど少ない。

網膜接着力の評価の方法としては、in vitroにおける peeling 法 (Marmor 等) が主流であり、in vivo 実験では、Zauberman らによる traction 法が報告されているが^{1)~7)}、量的評価は、行われていない。また、死後の変化、実験操作による組織障害、評価の精密さなどを考えれば、いずれも満足のいくものとはいえない。今回我々は、こうした問題点を解消し、生体眼において、網膜接着力を評価する新しい方法を開発し、正常家兎眼における網膜接着力を測定したので、ここに報告する。

II 実験方法

体重2-2.5kgの有色家兎眼、87眼を用いた。実験動物はウレタン(1g/kg、腹腔内注射)にて麻醉し、必要に応じてケタミン(20mg/kg、筋注)を追加した。瞳孔は、0.5%トロピカミド、5%塩酸フェニレフリン点眼にて散瞳した。まず、Marmor らの方法に準じて⁹⁾、手術顕微鏡下に、2時部、limbusより2mmの位置に作製した強膜創より、先端直径約20 μ mのマイクロピペットを挿入し、blanced salt solutionをマイクロインジェクターで徐々に(0.1ml/h)注入して、直径数mmの半球状の限局性網膜剥離(bleb)を作製した。11時部強膜創より、先端直径約5 μ mの別のマイクロピペットを挿入し、bleb部網膜下腔に刺入して、網膜下圧を測定するための micropressure measuring system (IPM model 5) に接続した。最初のピペットから再び液を徐々に注入し、剥離が伸展し始めたときの直径および網膜下圧を測定した。

低眼圧を保つため、強膜創は充分広くした。12時部強膜創より圧トランスデューサーに連結したポリエチ

レンチューブを挿入し、硝子体腔内圧を同時に測定した。

網膜下圧測定にここで用いた micropressure measuring system は、Wiederhielm により開発された resistance servo-nulling method⁸⁾を応用したものであり、その詳細については、精度及び反応性を含めて、Integlitta らにより報告されている⁹⁾。簡単に述べると、ピペットには体液に比して低抵抗の2M NaCl が満たされており、これが体液中に挿入されると、その部の圧に応じて NaCl と体液の境界面が移動し、ピペット内の抵抗が変化する。この時、システム内の servo pump が、ピペット抵抗を元に戻すのに必要な圧を生じさせ、これが測定部の圧に等しいというものである。

圧トランスデューサー、micropressure system は、各実験の前後でキャリブレーションした。

網膜接着力の計算には、次の式を用いた。bleb は球の一部であり、bleb 底にあたる眼球壁は平面であるとみなすと、bleb が伸展し始める瞬間には、bleb 表面にかかる力と bleb margin での網膜接着力 A がつりあっていると考えられる (図1)。

$$(P_s - P_v)\pi r^2 = A \cdot 2\pi r$$

$$A = (P_s - P_v)r/2$$

P_s ; 網膜下圧, P_v ; 硝子体腔内圧, r ; bleb 底面積半径, 以上は測定値。さらに, R ; bleb 曲率半径, T ; bleb 張力を用いてこの式を表わすと、

$$P_s - P_v = 2T/R$$

この式は、Laplace の法則を意味している。実験はこの法則が成り立つ範囲内で行った。

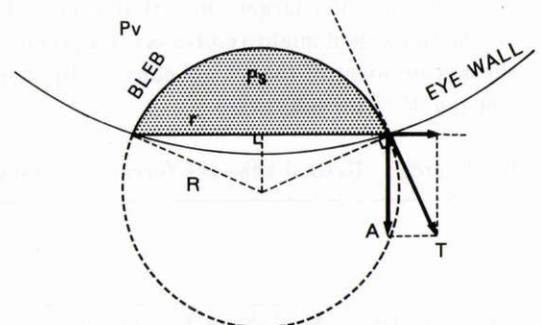


図1 網膜接着力の計算にもちいた網膜剥離作製部眼球のシェーマ。

P_s ; 網膜下圧, P_v ; 硝子体腔内圧, r ; bleb 底半径, R ; bleb 曲率半径, T ; bleb 張力, A ; 網膜接着力

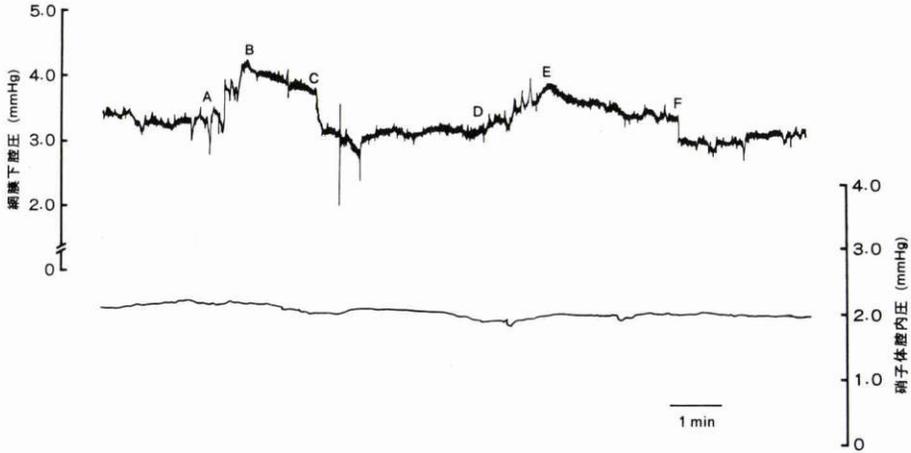


図2 網膜下腔圧(上段)および硝子体腔内圧(下段)の測定記録例。網膜下への液注入は、A-C、D-Fの間行っている。

III 結 果

典型的な、網膜下腔圧の変化を図2上段に示す。網膜下腔への液注入は、図内のAおよびD点で開始し、CおよびF点で終了した。BおよびEは、blebが伸展し始めた点である。bleb底半径の等しいC、Eでは、網膜下腔圧も同じ値を示した。一方、液の注入にかかわらず、硝子体腔内圧は、ほぼ一定に保たれていた。(図2下段)BおよびE点における網膜下腔圧、bleb底半径、硝子体腔内圧の値をデータとして用いた。同様の操作を、同一眼で数回行った。

網膜下腔圧と硝子体腔内圧の差(Ps-Pv)とbleb底半径の関係を図3に示した。この図では、横軸に半径の逆数をとっている。半径の増加に伴い網膜下-硝子体腔内圧差は、直線的に減少しており、回帰式における相関係数は、0.8と高い値を示した。これは、実験がLaplaceの法則の範囲内で行われていることを示している。前述のごとく、 $Ps-Pv=2A \times 1/r$ であるから、回帰式の傾きから計算することで、網膜接着力： $A=(1.8 \pm 0.2) \times 10^2 \text{ dyn/cm} (n=87)$ が得られた。

IV 考 按

網膜剝離の発生は、網膜の硝子体側からの牽引力とRPEとの接着力のバランスにかかっているが、前者については既に増殖性硝子体網膜症にみられるように活発な研究が進んでおり、治療手段としての硝子体手術の改良は、目をみはるものがある。ところが後者についての概念は、未だ推測の域を出ず、説得力のあるデー

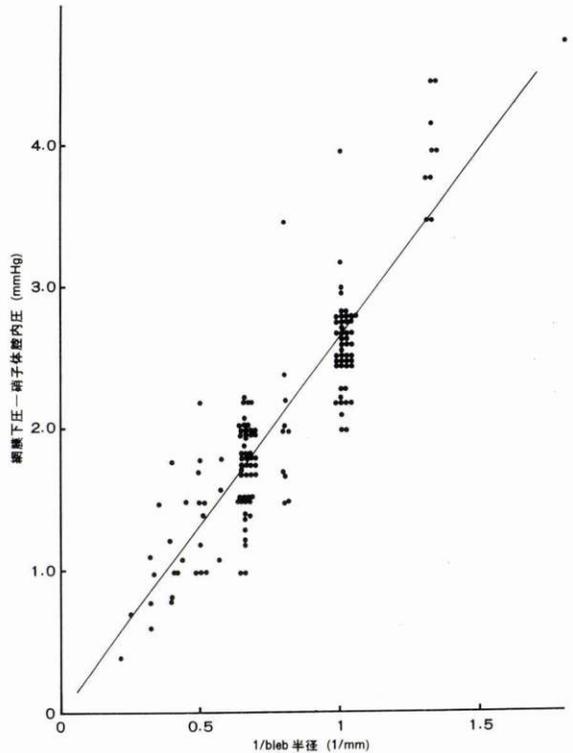


図3 網膜下-硝子体腔内圧差とbleb底半径の関係。横軸は、半径の逆数をとっていることに注意。回帰式； $Y=2.7X+0.0 (R=0.8)$

タに乏しい。その最大の原因は、in vivoにおいて網膜をRPEから一つの面として牽引剝離する技術の困難さにある。

現在、網膜接着力の評価の方法としては、*in vitro*における *peeling* 法、および *in vivo*における *traction* 法がある。

peeling 法は、1969年、Zaubermanにより始められた¹⁾。これは、摘出眼球から切り取った矩形眼盃片から網膜を牽引剝離するときに要する力を測定するものである。1971年、deGuillebonにより若干の改良が行われたが²⁾³⁾、両者とも大気中の実験であり、摘出後の組織劣化や表面張力の影響が大きく、生理的接着力を反映しているとはいえない。

1980年、Marmorは、この点を改良するため、眼盃片を培養液中に保持し、液中にて *peeling* を行う方法を報告した⁵⁾。これにより、かなりの実験誤差因子の混入が軽減されたばかりか、同時に *medium* の影響の観察も可能となり、接着力における、代謝因子の重要性を報告している⁵⁾¹¹⁾。しかし、この方法においても、眼盃片を切り出すときの組織障害や、死後の時間経過による影響を無視することはできない。

眼球摘出から実験施行までの時間を短縮した方法として、1988年、Endoは、手動にて網膜を剝離し、網膜側に付着した色素量により接着力を評価している¹²⁾。これは、簡便な方法ではあるが、手動操作によるため精密な定量化は難しく、*in vitro*における相対法にとどまっている。

Marmorらが報告しているように、網膜の接着力は代謝機能と密接に関係していると推測される以上、生体眼における実験が望ましいと考えられる。

生体眼における実験としては、1972年、Zaubermanが、*traction* 法を報告している⁷⁾。この方法は、*in vivo*で網膜表面にシアノアクリレートで固着させた金属かんを垂直に牽引し、網膜裂を生じるときの圧を測定するものである。この方法においてもいくつかの問題がある。まず、硝子体側から牽引したのでは、網膜は、その接着力に比して、脆弱であり、常に、一定面積を剝離することは困難である。また、硝子体ゲルを通じて金属かんを糊着する際、網膜を圧迫せざるを得ず、微細な網膜-RPE間のかみ合わせ構造への物理的影響は避けられない。実際、彼らの接着力の評価法は後に、裂孔面積を比較する相対法へと変化しており、精度の高い実験は、期待できない。

このように、従来の方法は、それぞれに、非生理的因子の混入が大きく、接着力の評価法として、網膜を硝子体側から牽引する技術的限界をものがたっている。

今回我々は、生体眼において網膜接着力を評価する新しい方法を開発した。我々の方法の最も特徴的な点は、接着力を網膜下腔側より測定する点にある。本方法の基本となる技術は、実験的限局性網膜剝離の作製と剝離網膜下という微小腔における圧測定である。限局性網膜剝離の作製は、Marmorの方法に準じており、この方法では、剝離網膜およびRPEは、形態学的にも、機能的にもほとんど障害なく剝離されている⁵⁾¹³⁾。1971年、Mauriceは、網膜を隔てる圧低下を検出するため、圧トランスデューサーを用いて、網膜下腔圧を測定している¹⁴⁾。このときには、先端直径約0.5mmというかなり大きいポリエチレンチューブを用いているが、我々の実験では、組織の障害を最小にするために、先端直径約5 μ mという極めて高電気抵抗のガラスピペットを用いる必要があった。これは、従来の古典的な圧トランスデューサーの反応性及び精度を越えている。そこで、今回の網膜下圧の測定には、毛細管などの微小循環圧測定のために開発された *micropressure measuring system* を用いた。

我々は、blebが伸展しはじめるときの網膜下圧と硝子体腔内圧の差を測定することから網膜の接着力を導いている。ガラスピペットによってできる二つの網膜裂孔の存在下でのこのような圧測定の妥当性には、いくつかの疑問もあろう。実際、注入液のいくらかは網膜裂孔を経て硝子体側に漏出しているかも知れない。しかし、今回の実験結果の解析には、注入液の量は、パラメータとして用いていない。また、もしも、液の漏出が多量であれば、網膜下圧の上昇は制限され、bleb半径の拡大はみられず、代わりに裂孔の拡大が観察されるはずである。今回の実験の範囲では、手術用顕微鏡観察下では、裂孔の拡大はみられず、blebは、徐々に拡大した。

deGuillebonによれば、*peeling* 法においては、*peeling rate* 42.5mm/min以下の範囲においては、viscoelasticな物質の変形にもなって、網膜を剝離するのに必要な力は *peeling rate* の対数に比例するとされている³⁾。線状に網膜を剝離していく点においては、我々の方法は、*peeling* 法に類似している。しかし、液の注入は、0.1ml/hとごく少量ずつで、これは、*peeling rate* 約0.5mm/minに相当する。さらに、我々がデータとして用いたのは、blebが伸展し始める瞬間の値であり、今回の方法は、準静的なものと考えられ、動的な *peeling* 法とは異なるものである。

我々の方法を用いて測定した正常有色家兎の網膜接

着力は、 $(1.8 \pm 0.2)10^2 \text{ dyn/cm}$ であった。Marmorは、Dutch rabbitを用い、peeling rate 24mm/minで、5 mm幅の眼盃片から網膜を剝離するのに要する力は、25mgと報告している⁵⁾。これは、49dyn/cmに相当する。また、deGuillebonは、白色家兎の6.5mm幅眼盃片を用い、peeling rate 2~42mm/minで、40~100 mg、つまり、60~150dyn/cm相当の力を要すると報告している³⁾。さらに、彼の示した片対数グラフを、低いpeeling rate方向に延長してみると、1mm/minのrateの時、38dyn/cmという値が得られる。用いている方法が異なっているため、単純に比較はできないが、我々の得た値は、従来報告されている値の約5倍であった。Marmorは、眼球摘出後の最初の20分で、peelingに要する力は、25mgから15mgと約60%に減少すると報告している⁵⁾。我々の測定値がこのように高値であったことの原因の一つは、より生理的な生体眼での実験であることによると考えられる。

この方法は、生体眼での実験であるため、硝子体、眼圧、全身の因子の影響、手術操作の経時的影響、種々の薬物の影響等をより生理的に、かつ正確に検索する応用が可能である。網膜下液の吸収においては、RPEの代謝機能が重要な役割を果たしているといわれており¹³⁾¹⁵⁾、網膜の接着に関しても、同様に推察されている。その機構の解明は、従来試みられなかった網膜剝離の薬物学的治療、さらには、予防という道を開くものとして、興味深い。生体眼における網膜接着力の測定法の確立は、その第一歩として意義あるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、結果の解析に際して、御助言くださった、京都大学教養学部物理学助教授、前川 覚先生に感謝いたします。なお本研究は、文部省科学研究補助金(A-61440075, C-63570827, C-63570828)の補助を受けた。

REFERENCES

- 1) **Zauberman H, Berman ER**: Measurement of adhesive forces between the sensory retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res* 8: 276-283, 1969.
- 2) **deGuillebon H, de la Tribonniere MM, Pomerantzzeff O**: Adhesion between retina and pigment epithelium: Measurement by peeling. *Arch Ophthalmol* 86: 679-684, 1971.
- 3) **deGuillebon H, Zauberman H**: Experimental retinal detachment: Biophysical aspects of retinal peeling and stretching. *Arch Ophthalmol* 87: 545-548, 1972.
- 4) **Owczarek FR, Marak GE, Pikerton AR**: Retinal adhesion in light-and dark-adapted rabbits. *Invest Ophthalmol* 14: 353-358, 1975.
- 5) **Marmor MF, Abdul-Rahim AS, Cohen DS**: The effect of metabolic inhibitors on retinal adhesion and subretinal fluid resorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 893-903, 1980.
- 6) **Zauberman H, deGuillebon H, Holly F**: Retinal traction in vitro: Biophysical aspects. *Invest Ophthalmol* 11: 46-55, 1972.
- 7) **Zauberman H, deGuillebon H**: Retinal traction in vivo and postmortem. *Arch Ophthalmol* 87: 549-554, 1972.
- 8) **Wiederhielm CA, Woodbury JW, Kirk S, et al**: Pulsatile pressures in the microcirculation of the frog's mesentery. *Amer J Physiol* 207: 173-176, 1964.
- 9) **Integlitta M, Pawula RF, Tompkins WR**: Pressure measurements in the mammalian microvasculature. *Microvas Res* 2: 212-220, 1970.
- 10) **Marmor MF, Maack T**: Local environmental factors and retinal adhesion in the rabbit. *Exp Eye Res* 34: 727-733, 1982.
- 11) **Yoon HY, Marmor MF**: Effects on retinal adhesion of temperature, cyclic AMP, cytochalasin, and enzymes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 910-914, 1988.
- 12) **Endo EG, Yoo XY, Marmor MF**: Pigment adherence as a measure of retinal adhesion: Dependence on temperature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1390-1394, 1988.
- 13) **Maurice DM, Salmon J, Zauberman H**: Subretinal pressure and retinal adhesion. *Exp Eye Res* 12: 212-217, 1971.
- 14) **Frambach DA, Marmor MF**: The rate and route of fluid resorption from the subretinal space of the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 292-302, 1982.
- 15) **Negi A, Marmor MF**: Quantitative estimation of metabolic transport of subretinal fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1564-1568, 1986.