

家兎渦静脈結紮眼における網膜色素上皮細胞と 視細胞外節の微細構造 (図 9)

加 登 本 拓 (広島大学医学部眼科学教室)

要 約

渦静脈を結紮して脈絡膜循環障害を起こした家兎の網膜色素上皮細胞 (RPE) と視細胞外節の微細構造を、経時的に観察して検討した。白色家兎の渦静脈を左眼は 3 本、右眼は 2 本結紮した後、24 時間後、1、2、4 週後に両眼球を摘出した。ただちに神経網膜を剝離し、試料作成後、RPE と視細胞外節を走査型電子顕微鏡で観察した。RPE の経時的变化は、渦静脈 3 本結紮眼と渦静脈 2 本結紮眼との間に差はなかった。渦静脈を結紮して 1 週後から RPE に変化が出始め、2 週後が最も強く、4 週後には回復傾向がみられた。視細胞外節は、渦静脈の 2 本結紮では 4 週後まで変化が認められなかった。渦静脈を 3 本結紮すると 1 週後から視細胞外節に変化が出始め、2 週後が最も強く、4 週後には回復傾向がみられた。この RPE と視細胞外節の形態的变化は、脈絡膜循環血流量の低下が関与しているものと思われた。(日眼会誌 93: 817—822, 1989)

キーワード：渦静脈結紮，網膜色素上皮細胞，視細胞外節，網膜剝離，走査型電子顕微鏡

Ultrastructural Observations of the Retinal Pigment Epithelial Cells and the Outer Segments of the Rod Visual Cells after Vortex Vein Occlusion in Rabbit Eyes

Hiroshi Kadomoto

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

Abstract

The effect of occlusion of the vortex vein to the retinal pigment epithelial cells (RPE) and the outer segments of the rod visual cells (OS) of albino rabbits was observed by scanning electron microscopy. Three vortex veins of the left eye and two vortex veins of the right eye in each rabbit were ligated with 6—0 silk suture. The morphological changes were observed at 24 hours, 1, 2, and 4 weeks after the ligation. The changes of RPE showed no significant difference between ligation of 2 and 3 vortex veins. The RPE showed degenerative changes 1 week after the ligation and the degenerative changes became severe after 2 weeks. The OS, showed no change after 2 vortex veins occlusion, while after occlusion of 3 vortex veins OS revealed degenerative changes after 1 week and the degenerative changes reached a maximum after 2 weeks. The changes of both RPE and OS tended to return to normal at 4 weeks. The changes of both RPE and OS may be caused by reduction of the blood flow in the choroidal circulation. (*acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 817—822, 1989)

Key words: Vortex vein occlusion, Retinal pigment epithelium, Outer segment of rod visual cells, Retinal detachment, Scanning electron microscopy

別刷請求先：734 広島市南区霞 1—2—3 広島大学医学部眼科学教室 加登本 拓

(平成元年 5 月 24 日受付，平成元年 6 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Kadomoto, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hiroshima Univ. School of Med.

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(Received May 24, 1989 and accepted in revised form June 28, 1989)

I 緒 言

網膜剥離手術に際して、裂孔の位置などから、やむをえず渦静脈を圧迫または切断しなければならないことがあり、そのような場合、脈絡膜の循環障害を生じ種々の合併症をおこすことは良く知られている^{1)~3)}。前回⁴⁾⁵⁾、渦静脈の循環障害が、網膜色素上皮細胞層の網膜下液吸収能におよぼす影響について調べ、渦静脈を2本結紮してから1週までは網膜下液吸収能が低下するが、2週以降は網膜下液吸収能が回復してくることと、この網膜下液吸収能の低下の原因の一つとして、網膜色素上皮細胞層に代表される水分、イオン等の輸送機構の障害が関与している可能性があることを報告した。また、渦静脈を結紮することにより網膜色素上皮細胞(以下RPEと略す)と神経網膜間の接着力が低下する可能性が強いことを報告した。

これまで実験的に、渦静脈を結紮した後の臨床的検査所見⁶⁾、蛍光眼底撮影所見と透過型電子顕微鏡学的所見⁷⁾、vitreous fluorophotometryによる血液網膜閉門障害⁸⁾、脈絡膜組織血液量の測定⁹⁾などの報告はあるが、走査型電子顕微鏡を用いた形態学的変化についての報告はみられない。そこで、渦静脈結紮によるRPEと神経網膜の間の接着力の低下に、RPEと視細胞外節の形態学的変化が関与しているのではないかと考え、渦静脈を結紮して循環障害を起こした家兎の網膜色素上皮細胞と視細胞外節の表面微細構造を、走査型電子顕微鏡を用いて経時的に観察し検討を加えたので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物：実験動物には体重2.5~3kgの健常成熟白色家兎25羽を用いた。20羽の家兎は、渦静脈を結紮した後、24時間後、1、2、4週間後に両眼球を摘出した。残りの5羽は、対照として両眼の球結膜を切開して渦静脈を露出し渦静脈を結紮しないで両眼球を摘出した。

2. 渦静脈結紮眼の作成法：家兎にペントバルビタール(ソムノベンチル®)を25mg/kg静脈注射し、塩酸オキシプロカイン(ペノキシール®)による点眼麻酔を追加した後、手術用顕微鏡(Carl Zeiss社製)下で両眼の球結膜を切開して渦静脈を露出した。左眼は、上直筋の耳側と下直筋の両側にある渦静脈3本を6-0絹糸で結紮した。右眼は、上直筋と下直筋の耳側にある渦静脈2本を6-0絹糸で結紮した。術後、硫酸

マイクロマイシン(サンテマイシン®)とオフロキサシン(タリビッド®眼軟膏)の点眼を両眼に1日1回、3日間行った。

3. 試料作成および観察方法：対照群および渦静脈結紮群の家兎は処置後、24時間、1、2、4週間後に両眼球を摘出した。摘出眼球は、摘出直後に赤道部で強膜全周を切開して開き、生理的食塩液中ですばやく注意深く神経網膜を剥離した。なお、この神経網膜を剥離する際にHanks液中、2.5%グルタルアルデヒド液中、0.1Mリン酸緩衝液中でも剥離してみた。つぎに2.5%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中で渦静脈結紮領域の神経網膜側とRPE側の試料をそれぞれ細切し、同液にて2時間浸漬固定を行った。その後2%タンニン酸と2%オスミウム酸による導電染色を行い、上昇エタノール系列で脱水後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥(CO₂)後白金のスパッタコーティングを行い、走査型電子顕微鏡用試料とした。なお、観察にはJEOL製T-200型および日立製S-800形走査電子顕微鏡を使用した。

III 結 果

1. 神経網膜とRPEの剥離方法

摘出した眼球を半切後、直ちにHanks液中、2.5%グルタルアルデヒド液中、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中、生理的食塩液中で神経網膜を剥離して観察したところ、Hanks液中で剥離したものは、微絨毛が完全に消失し、細胞壁が障害され小孔や亀裂が生じ、一部で核が露出していた(図1)。2.5%グルタルアルデヒド液中で剥離したものは、視細胞外節がRPEと完全に剥離されずにRPEの表面をおおい表面構造をみる事ができなかった。0.1Mリン酸緩衝液中や生理的食塩液中では一部外節が付着しているところがあったが、RPEの表面構造を観察することができた。このうち生理的食塩液中での剥離がもっとも良好にRPEの表面構造を保つことができた。

2. 渦静脈結紮による網膜色素上皮細胞の変化

1) 渦静脈非結紮眼(対照眼)

対照眼のRPEの表面は形態学的変化は認められず、細胞表面は多数の微絨毛でおおわれ、個々のRPEの境界は不鮮明であった(図2)。

2) 渦静脈結紮眼

渦静脈結紮領域のRPEには以下の変化が認められたが、渦静脈2本結紮眼と渦静脈3本結紮眼との間に差はなかったので一括して述べる。

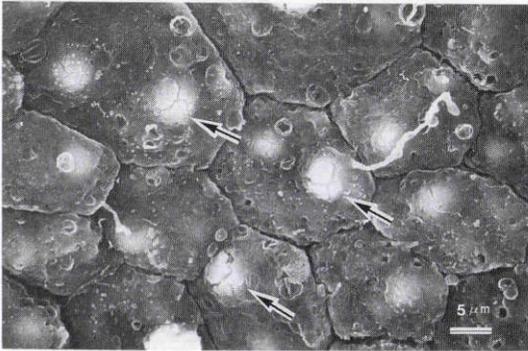


図1 Hanks 液中での神経網膜剝離後の RPE, 微絨毛が完全に消失し, 細胞壁が障害され小孔や亀裂が生じ, 一部で核が露出している (矢印).

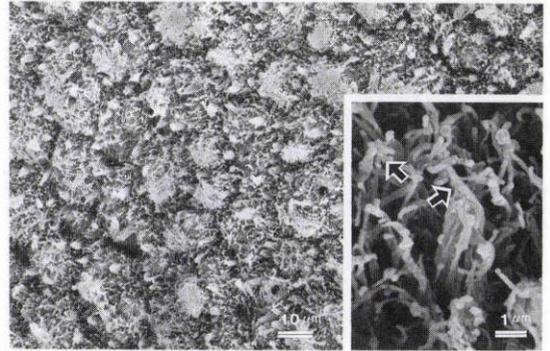


図3 渦静脈結紮 1 週後の RPE, 細胞表面が膨隆し, 細胞境界が明瞭となり, 微絨毛は減少あるいは先端が融合しているものもみられる (矢印).

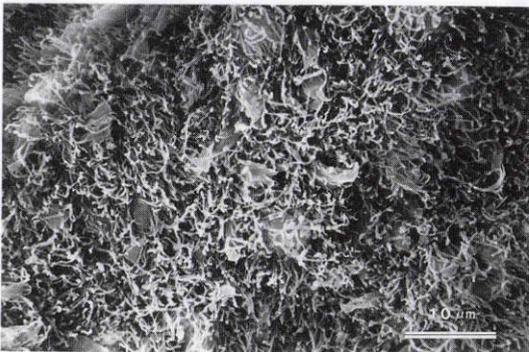


図2 渦静脈非結紮眼の RPE, RPE の表面は多数の微絨毛でおおわれ, 細胞境界は不鮮明である.

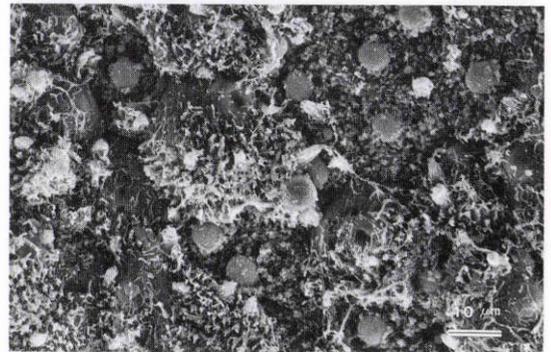


図4 渦静脈結紮 2 週後の RPE, 微絨毛はさらに減少し, RPE 尖端部が脱落して細胞質や核が露出しているところがみられる.

渦静脈を結紮して24時間後までの RPE に特に変化は認められなかったが, 1 週後には, 細胞表面が膨隆し, 細胞境界が明瞭になり, ほぼ同じ大きさで多角形をしていた. さらに, 微絨毛は部分的脱落あるいは先端が融合しているものも見られた(図3). 2 週後には, 微絨毛はさらに減少し, 微絨毛が完全に消失して細胞質や核が露出しているところも見られた(図4). 4 週後には, 微絨毛の変化は軽度となり完全に消失している細胞数は2 週後のものよりは少なくなっていた(図5).



図5 渦静脈結紮 4 週後の RPE, 微絨毛が完全に消失しているところは2 週後よりは少なくなっている.

3. 渦静脈結紮による視細胞外節の変化

1) 渦静脈非結紮眼 (対照眼)

対照眼の外節は正常形態を呈し, その形は円筒形で, 先端はほぼ平坦であった. また細胞表面は平滑で, 外節内部の層板構造が透見された(図6).

2) 渦静脈 2 本結紮眼

渦静脈 2 本結紮眼では結紮 4 週後まで, 外節の形態

学的変化は認められなかった.

3) 渦静脈 3 本結紮眼

渦静脈を 3 本結紮して24時間後までの外節には変化

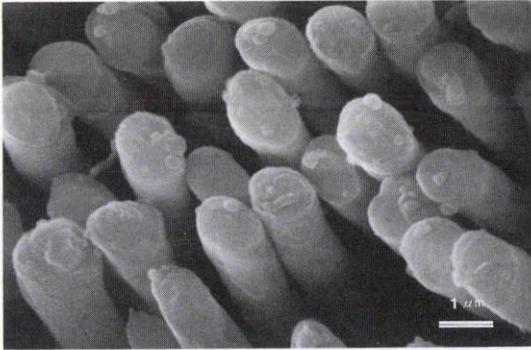


図6 渦静脈非結紮眼の視細胞外節。外節は円筒形で、先端は平坦で、表面は平滑で、外節内部の層板構造が透見される。

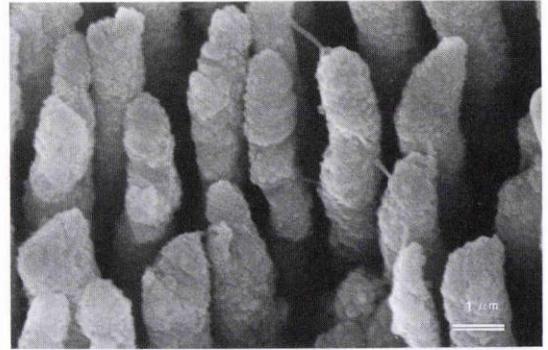


図8 渦静脈3本結紮2週後の視細胞外節。表面が凹凸不整で、全体が細くなったものや先端が槍状になったものが認められる。

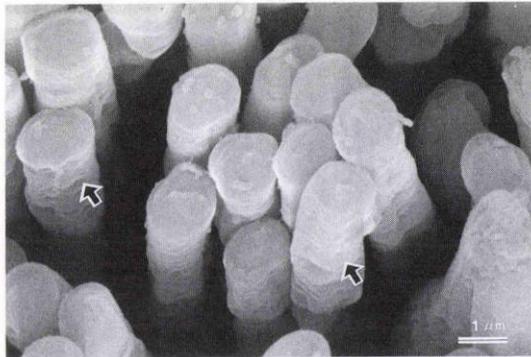


図7 渦静脈3本結紮1週後の視細胞外節。外節の太さは渦静脈非結紮眼とほぼ同じで表面は平滑だが、表面の陥凹している部分が認められる(矢印)。

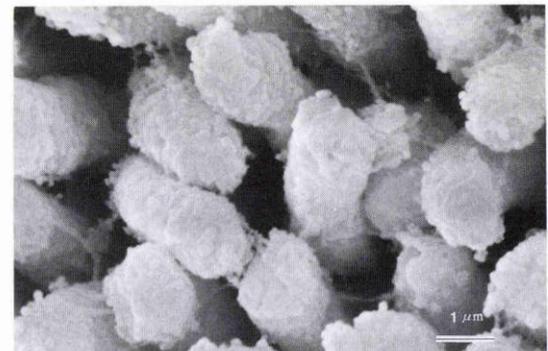


図9 渦静脈3本結紮4週後の視細胞外節。視細胞外節の太さは正常に回復しているが、表面の粗造性はまだ認められる。

が認められなかった。1週後には、外節の太さは対照眼とほぼ同じで、表面はほぼ平滑であったが、一部で表面の陥凹している部分が認められた(図7)。2週後には、表面が凹凸不整となり、外節全体が細くなったものや先端が槍状になったものが認められた(図8)。4週後には、外節の太さは正常に回復し、先端もほぼ平坦になっていたが、細胞表面の粗造性はまだ残存していた(図9)。

IV 考 按

RPEの表面微細構造を走査型電子顕微鏡を用いて観察する際に、RPEの表面構造を傷めることなく神経網膜を剥離する方法として、浦口¹⁰⁾、Sakuragawaら¹¹⁾の報告がある。今回、摘出した眼球を半切後、直ちにHanks液中、2.5%グルタルアルデヒド液中、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中、生理的食塩液中で神経網膜

を剥離して観察したところ、生理的食塩液中での剥離がもっとも良好にRPEの表面構造を保つことができた。一方、Hanks液中での神経網膜の剥離では微絨毛など細胞の変性などが強く、剥離の方法としては用いられなかった。また、グルタルアルデヒド液中のものでは、RPEと視細胞外節の結合が強く2つを分離することが困難であった。RPEと視細胞外節の結合にはinterphotoreceptor matrix(以下IPMと略す)の関与があるとされており¹²⁾、グルタルアルデヒドはIPMを強く固定するという性質があり、そのために剥離しにくいものと考えられた。また、浦口¹⁰⁾の方法では生理的食塩液中で硝子体をつけたままで剥離しているが、硝子体を除去して剥離してもRPEの表面構造はよく保たれており、神経網膜をRPEから剥離する方法としては、今回の生理的食塩液中で剥離する方法はもっとも良い方法であった。

正常 RPE 表面は、平坦で、個々の細胞の境界は不明瞭で、その大きさも区別がつかないという報告¹¹⁾¹³⁾と、個々の細胞の輪郭が区別でき、ほぼ同じ大きさをしていているという報告¹⁰⁾がある。今回の実験では、正常 RPE と渦静脈を結紮して24時間後の RPE は、個々の細胞の境界は不明瞭であった。稲原は¹⁴⁾、実験的網膜剝離作製直後の家兎の RPE 表面は個々の細胞の境界は判然としないが、試料の脱水乾燥の過程で人工的修飾を受けると細胞の境界が判別できるようになると述べており、今回の結果ともあわせて、試料作製の過程で人工的修飾を受けなければ、正常家兎眼では RPE 表面の個々の細胞の境界は不明瞭であると思われた。

渦静脈結紮領域の RPE の変化は、渦静脈 2 本結紮眼と渦静脈 3 本結紮眼との間に差が認められなかった。渦静脈を結紮して24時間後では RPE に変化はみられなかったが、1 週後から変化が始め、2 週後が最も強く、4 週後には回復傾向がみられた。今回の観察で認められた RPE の変化の主なものは、細胞の膨隆、細胞境界の明瞭化および微絨毛の変化であった。Gaudric ら⁷⁾は、透過型電子顕微鏡による観察で渦静脈を結紮した後、RPE は空腔変性を起こし、腫脹していると述べており、この変化により RPE 表面が膨隆し、細胞の境界が明瞭になったと思われた。一般に、水分輸送上皮での微絨毛は表面の面積を増大させ、大きな分子の透過を調節するフィルターの役目を果たしており、水分移動の調節に関与している¹⁵⁾。したがって、今回認められた微絨毛の変性あるいは細胞内部構造の変性は、正常の水輸送機能を障害しているものと考えられる。高橋⁹⁾は、渦静脈 2 本結紮時には脈絡膜組織血流量は結紮前の73.0%に、3 本結紮時には49.2%に、4 本結紮時には4.4%に減少すると報告していることから、今回認められた1 週後、2 週後の RPE の変化は渦静脈結紮による脈絡膜組織血流量の減少が原因で起き、4 週後に認められた回復傾向は岡田ら¹⁶⁾が報告したように側副血行路が形成されて脈絡膜組織血流量が改善してくるためと思われた。一般に、RPE は血行障害に対してある程度までは耐えることが出来るが、酸素不足に耐える限界も存在するとされている¹⁰⁾。これに従えば、渦静脈を2 本結紮した時点でこの限界を越えたために RPE に変化が起きたものと思われた。

視細胞外節には、渦静脈を2 本結紮しても4 週後まで変化が認められず、渦静脈を3 本結紮すると24時間後では変化はみられなかったが、1 週後から変化が出

始め、2 週後が最も強く、4 週後には回復傾向がみられた。視細胞外節は血液の供給を脈絡膜毛細血管からの滲透拡散によってうけている¹⁷⁾ので、この視細胞外節の変化は、RPE と同様に渦静脈結紮による脈絡膜組織血流量の減少によって起き、側副血行路の形成によって脈絡膜組織血流量が改善するにつれて変化も回復してくると思われるが、その他に、RPE には貪食機能などの視細胞外節を支持する機能があり、RPE の障害によりその機能が低下して、変化した視細胞外節を処理しきれなくなったために視細胞外節が変化した可能性もある。また、渦静脈結紮2 本と3 本の差の原因として、視細胞外節にも RPE と同様に酸素不足に耐える限界が存在すると考えれば、渦静脈を2 本結紮して起こる脈絡膜組織血流量の減少ではこの限界を越えず変化が起きなかったが、渦静脈を3 本結紮することにより限界を越えて視細胞外節に変化が起こったと推察される。さらに、今回認められた細胞膜の先端の狭小化や粗造性に関しても、酸素供給低下による細胞内代謝の低下あるいは細胞膜自体の変性が関与していると思われた。

前回、網膜下液吸収能は、渦静脈を結紮して1 週後までは有意に低下するが2 週後以降は回復してくると報告し⁴⁾、この網膜下液吸収能の回復は、側副血行路の形成により脈絡膜循環が改善され、血液網膜関門と RPE の代謝性水輸送機能が回復したためと報告した。今回の実験では、RPE の変化は結紮後早期よりも2 週後の方が強く、前回の報告と食い違いがみられた。この理由として、根木ら¹⁸⁾はアルゴンレーザー光凝固後の網膜下液吸収促進効果と RPE 修復の関係の観察から、RPE の障害が強いときほど網膜下液吸収促進効果は大きく、修復されるにしたがい網膜下液吸収促進効果はなくなってくると述べており、この促進効果は RPE が障害されて RPE の流水抵抗が減少して、浸透圧効果による網膜下液吸収量が増大したためと報告している。今回の実験結果から、前回⁴⁾報告した渦静脈を結紮してから2 週後以降に生じる網膜下液吸収能の回復は、渦静脈を結紮してから2 週後までは RPE の障害により代謝性水輸送機能が低下して来るものの、渦静脈結紮1 週後から生じる RPE の空腔変性や細胞間隙の開大などにより、細胞の流水抵抗が減少して浸透圧効果による硝子体側から脈絡膜側へ向かう水の流れが増大したために起こったものと思われる。しかし、渦静脈を結紮してから4 週後には細胞障害も修復されてきており、代謝性水輸送機能も回復して来るものと

思われる。したがって、すくなくとも渦静脈を結紮してから4週後に認められた網膜下液吸収能の回復は、血液網膜関門とRPEの代謝性水輸送機能が回復したためと考えられた。

神経網膜とRPEの間には特別な結合装置は存在しないが、1) RPEの微絨毛と視細胞外節の噛み合わせ¹⁹⁾、2) 粘稠性のあるIPMの存在¹²⁾、3) RPEの代謝性水輸送機構²⁰⁾²¹⁾などにより接着しており、この接着力が低下すると網膜剝離を起しやすくなる。

渦静脈を結紮した後の神経網膜とRPE間の接着力の低下と原因は、前回報告した⁴⁾RPEの水輸送機構の障害だけでなく、今回の実験からRPE表面にある微絨毛の減少や視細胞外節の狭細化などによる噛み合わせの悪化、あるいは接着面積が減少しているため、IPMの接着剤としての働きが低下していることも考えられる。また、今回の実験ではわからなかったが、RPEの障害によるIPM生合成の低下による接着力の減少も関与しているかも知れない。

稿を終えるに当たり、ご指導ならびにご校閲いただきました調枝寛治教授に深謝いたします。また、ご指導ご協力いただきました広島大学耳鼻咽喉科学教室、原田康夫教授、工田昌也先生、安佐市民病院眼科、藤武俊治先生に感謝いたします。

本研究は文部省科学研究費62570800の援助をうけた。

本論文の要旨は、第93回眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 出田秀尚, 石川美智子: 網膜剝離手術時の渦静脈障害によっておこる合併症. 臨眼 37: 407-411, 1983.
- 2) 内野 允, 奥野広子, 成味知子他: 網膜剝離術後合併症と渦静脈の関係. 眼紀 34: 2290-2295, 1983.
- 3) Aaberg TM, Pawlowski GJ: Exudative retinal detachments following scleral buckling with cryotherapy. Am J Ophthalmol 74: 245-251, 1972.
- 4) 加登本 弘: 家兎渦静脈結紮眼における網膜下液吸収能について. 日眼会誌 92: 1248-1254, 1988.
- 5) 加登本 弘: 家兎渦静脈結紮眼のVitreous Fluorophotometry. 日眼会誌 93: 276-280, 1989.
- 6) Hayreh SS, Baines JAB: Occlusion of the vortex veins, an experimental study. Br J Ophthalmol 57: 217-238, 1973.
- 7) Gaudric A, Sterkers M, Coscas G: Retinal detachment after choroidal ischemia. Am J Ophthalmol 104: 364-372, 1987.
- 8) 小林求美子, 安藤文隆: 家兎眼渦静脈結紮による眼障害 1. Vitreous Fluorophotometry による研究. 眼紀 36: 1008-1012, 1985.
- 9) 高橋節夫: 脈絡膜組織血流量に関する研究. 第3報. 渦静脈結紮による影響. 眼紀 33: 958-961, 1982.
- 10) 浦口敬治: 脈絡膜循環障害による網膜色素上皮の走査型電子顕微鏡による観察. 第1報. 正常像と初期変化. 日眼会誌 84: 438-448, 1980.
- 11) Sakuragawa M, Kuwabara T: The pigment epithelium of the monkey. Geographic study by scanning and transmission electron microscopy. Arch. Ophthalmol 94: 285-292, 1976.
- 12) De Guillebon H, Zauberman H: Experimental retinal detachment. Biophysical aspects of retinal peeling and stretching. Arch. Ophthalmol 87: 545-548, 1972.
- 13) 大熊正人: 実験的網膜剝離に於ける脈絡膜及び色素上皮の微細構造. 第3報. 網膜色素上皮の走査型電子顕微鏡的観察. 日眼会誌 76: 377-384, 1972.
- 14) 稲原明律: 実験的網膜剝離の剝離面の微細構造に関する研究. 第1報. 色素上皮の変化. 日眼会誌 77: 1002-1019, 1973.
- 15) 山元寅男: 細胞学各論 3. 吸収細胞. 小川和朗 他編, 細胞学大系 7, 107-140, 朝倉書店, 東京, 1971.
- 16) 岡田寿夫, 佐野貴之, 米田宗道他: 前眼部循環障害における側副血行路の形成 2. 渦静脈閉塞実験. 日眼会誌 89: 885-894, 1985.
- 17) 沖坂重邦: 網膜脈絡膜の解剖・組織学. 三島濟一他編, 眼科 Mook, 26. 網膜脈絡膜の変性疾患, 1-11, 金原出版, 東京, 1985.
- 18) Negi A, Marmor MF: Healing of photocoagulation lesions affects the rate of subretinal fluid resorption. Ophthalmology 91: 1678-1683, 1984.
- 19) Spitznas M, Hogan MJ: Outer segments of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. Interrelationship in the human eye. Arch. Ophthalmol. 84: 810-819, 1970.
- 20) 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.
- 21) 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.

(第93回日眼総会原著)