

経外膜的トロンビン投与による実験的網膜血管閉塞 (図11)

桜庭 知己 (弘前大学)

要 約

経外膜的血栓が網膜血管に形成されるか否かを知る目的で、トロンビンを家兎網膜血管に滴下し、その結果、任意の位置に典型的な火焰状出血を伴う血栓の作成に成功した。網膜出血はトロンビン滴下後8～9時間の間に、まず斑状もしくはしみ状の散在性のそれとして始まり、次第に増加しつつ24時間後に火焰状出血となっていた。組織学的には、内皮下に存在するフィブリン塊として滴下部における静脈の血栓形成がみられ、それはおよそ6時間後から始めて24時間後にはほとんど管腔を閉塞するまでに成長していった。尚、管腔側にみられた血小板血栓はより広範な範囲に分布し、これは成長と消退を繰り返しているように思われた。但し、滴下後12時間までは、いずれの血管にも内皮欠損を全く認めなかった。一方、伴行する細静脈には、6時間ほどのむしろ早期例において滴下部末梢にのみ、管腔閉塞には至らない複数の小血栓が認められた。以上から、血管外より投与されたトロンビンは管壁を通過し、血中フィブリノーゲンに作用して血栓形成にいたると考えられ、同時に、本実験系は人眼の網膜静脈閉塞症における発症機転の解明に、動脈側の関与も含めて多くの示唆を与えるものである。(日眼会誌 93:978-985, 1989)

キーワード：実験的静脈閉塞症，内皮下血栓，火焰状出血，トロンビン，家兎網膜

Experimental Retinal Vein Obstruction Induced by Transadventitial Administration of Thrombin in the Rabbit

Tomoki Sakuraba

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

Abstract

Retinal venous obstruction with typical flame-shaped hemorrhage was experimentally produced in the rabbit by transadventitial dropping of thrombin on target vessels by vitreous surgery techniques. The changes were studied ophthalmoscopically, light and electron microscopically. Flame-shaped retinal hemorrhage appeared within 24hr after the maneuver of thrombin dropping, following the initial appearance of small hemorrhage during the first 8 to 12hr of the experiment. Microscopic study revealed the process of subendothelial fibrin-thrombus formation in the target venules. Thrombus formation began 6hr after dropping of thrombin and vascular lumina were markedly narrowed by 24hr. No endothelial defect was found in the target venule between 6 and 12hrs after thrombin dropping, though fibrin-platelet thrombi were often found in the lumina of the venules. In the arteriole, on the other hand, intramural thrombus was seen only in the earlier stage, not later than 6hr after dropping of thrombin, in the area peripheral to the site of dropping. These findings suggested the possibility of transmural effects of thrombin as well as participation of arterioles in thrombogenesis, and supports the usefulness of this experimental model for the study of retinal venous

別刷請求先：036 弘前市在府町5 弘前大学医学部眼科学教室 桜庭 知己
(平成元年6月16日受付，平成元年7月14日改訂受理)

Reprint requests to: Tomoki Sakuraba, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Hirosaki Univ.
5 Zaifucho, Hirosaki 036, Japan

(Received June 16, 1989 and accepted in revised form July 14, 1989)

obstruction. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 978—985, 1989)

Key words: Thrombin, Experimental vein obstruction, Rabbit, Subendothelial thrombus, Retinal hemorrhage

I 緒 言

網膜血管閉塞症に関しては従来より実験病理学的にいろいろな方法で検討されてきた。しかしながら、そのほとんどは、結紮や光凝固など、血管壁に機械的もしくは物理的な障害を起すことにより、閉塞を生ぜしめるものであった^{1)~4)}。従って、得られた血管閉塞は、生体における血栓性の閉塞とは明らかに異なった病態を示す可能性があり⁵⁾、ヒト生体内での疾病としての血栓性閉塞とは発生機転・病態の上で明らかに異なる可能性が否めず、疾病モデルとしての局在性血栓を、網膜血管の任意の部分に作成する方法は未だ確立されていない。

血管壁の全層に及ぶ破壊を伴わない手技として教室の一戸ら⁶⁾は、網膜血管閉塞症が内皮障害に伴う血栓形成によって生じるとする説から、蛍光物質注入下でラットの網膜血管に、微弱励起光線を照射して内皮を障害せしめ、その結果生じる蛍光化学血栓により、網膜血管の任意の部分で管腔側から閉塞できることを報告した。しかしながら、このような新しい疾患モデルにおいてさえ、レーザーや蛍光物質など、生理的に生体内に存在しないものを血栓形成の形成機転としている点に大きな問題があり、しかも微弱とはいえレーザーを用いていることから、網膜出血も、血管の破壊によるものか否かの同定に困難である。更に、臨床的に知られている血液凝固系の異常に関する配慮はなお欠落しており、問題の解決には至っていない。

他方、血管内血栓形成に関しては、内皮障害性機序の他に、血管周囲の結合織中に存在するトロンボプラスチンが外因系凝固に関与していることから、血管外の因子によっても血管内に血栓形成をもたらすことの可能性が示唆されるようになった⁷⁾。畑中ら⁸⁾は、後者の血栓形成機転に注目し、トロンビンをマウスの腸管膜血管に滴下するだけで血栓形成が起こり、この際、血管内皮細胞は全周に認められ、剝離していることはなかったと報告した。

今回、著者は、同様の方法により、家兎の網膜血管に網膜静脈閉塞症類似の眼底出血を伴う血栓作成に成功したので、その過程を組織学的検討と共に報告する。

II 実験材料及び方法

1) 実験材料

本実験には予め眼底検査を行い、異常のないことを確認した月齢3カ月の体重1.8kg前後の白色家兎15匹を用いた。滴下トロンビン液は、持田製薬社製のトロンビン凍結乾燥剤5,000単位を、実験時に生食10mlで溶解して作成した。なお、一部トレーサー実験を行ったが、この追跡物質としてはHRP (horse radish peroxidase, SIGMA 社製)を用いた。

(2) 実験方法

これらの家兎の瞳孔を予め0.5%トロピキミドと0.5%塩酸フェニレフリンの混合液にて散瞳させ、家兎の体重1kgあたり25mgのペントバルビタールを耳介静脈を介して麻酔したのち、ゴールドマン型眼底観察用コンタクトレンズを角膜上に乗せ、手術用顕微鏡下に眼底を観察しながら、毛様体扁平部より27G針を刺入し、直視下にトロンビンを0.01ml(5単位)滴下した。なお、3匹の対照にはトロンビンを用いず、生理

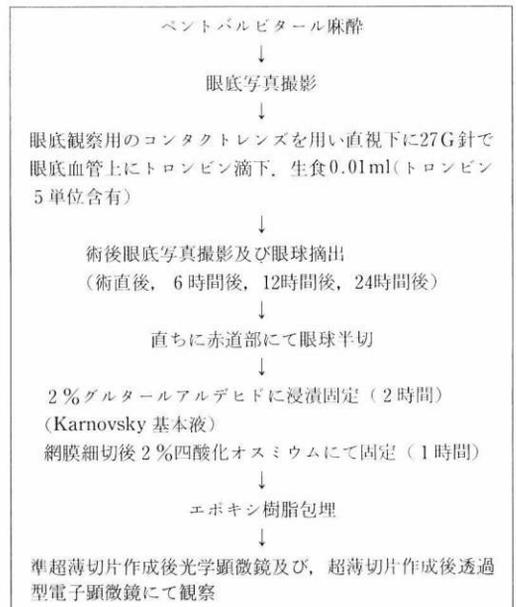


図1 本実験の方法

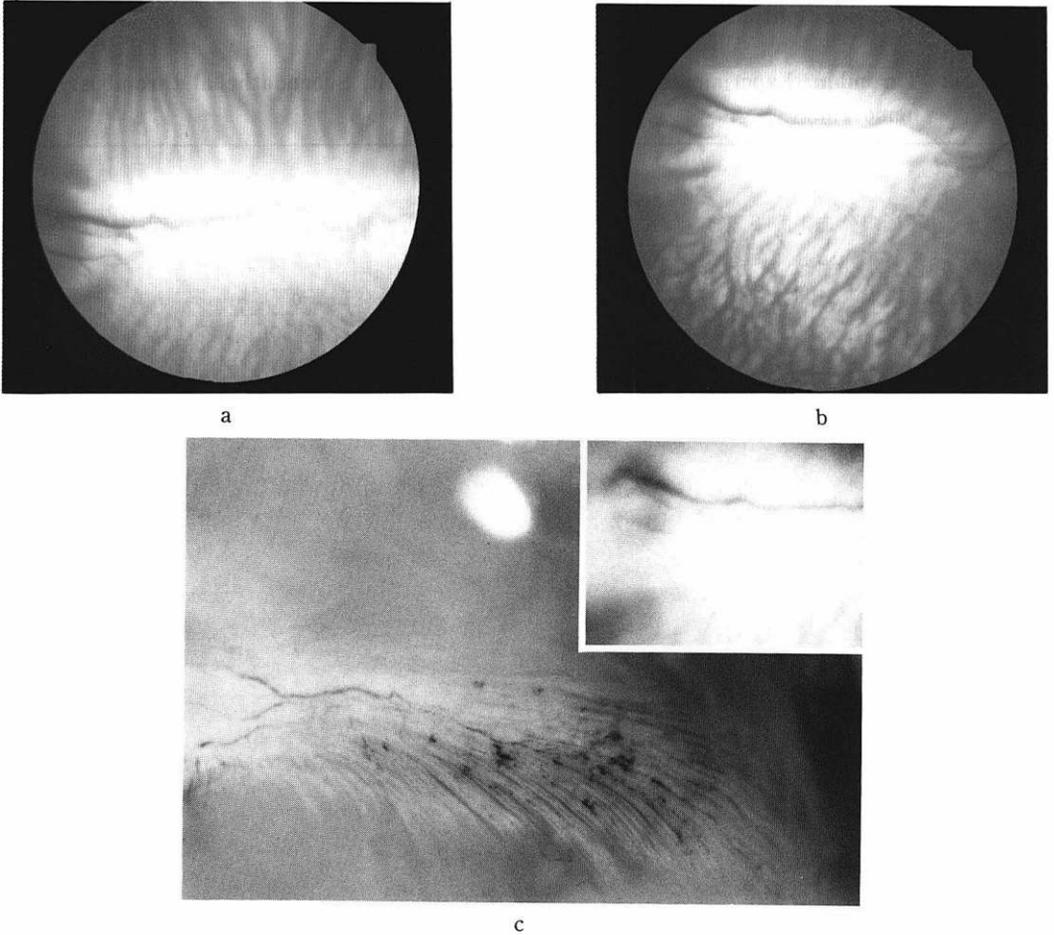
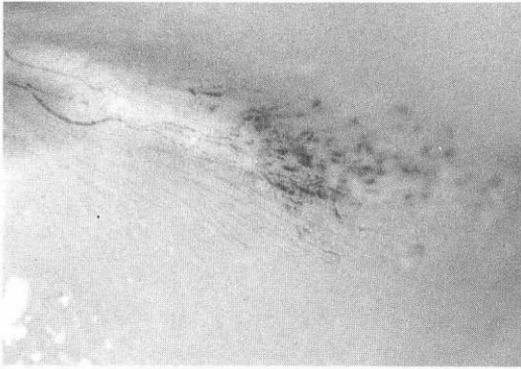


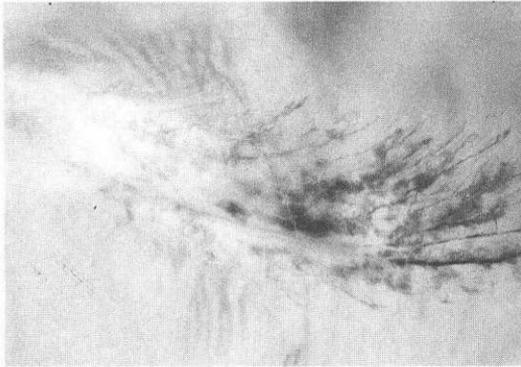
図2 トロンビン滴下例
 滴下前 (a), 滴下後 (b) の眼底写真. 点状出血が確認できた滴下後6時間目の眼底写真及びその実体顕微鏡写真 (c)



図7 セラチン加フルオレスセイン法による光顕像(6時間後). 眼底写真との比較で細動脈に半球状の血栓が認められる. Bar: 500 μ m



a



b

図3 滴下後12時間目の摘出実体顕微鏡写真(a)点状、斑状の網膜出血が認められる。滴下24時間目の摘出実体顕微鏡写真(b)扇状の出血が認められる。

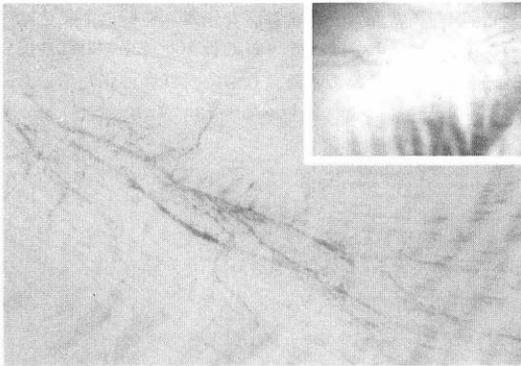
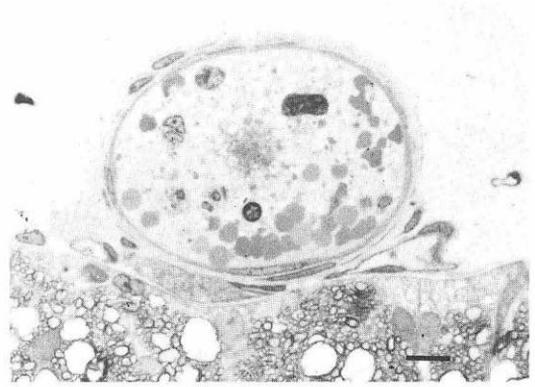
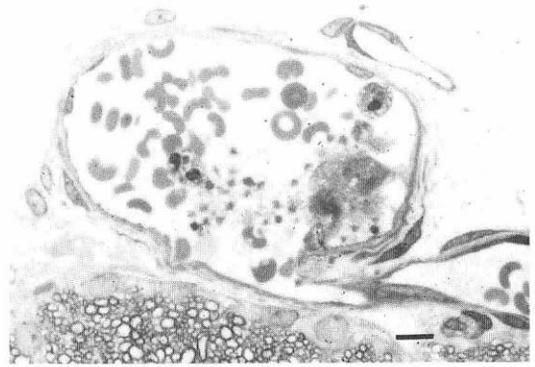


図4 滴下3日目の眼底写真と摘出実体顕微鏡写真。ほとんど出血は吸収されている。実体顕微鏡写真ではわずかに出血が血管壁に認められる。



a



b

図5 6時間後の光顕所見

(a) 赤血球の凝集とフィブリンの析出が認められる。Bar: 10 μ m. (b) 血栓形成は認められるものの赤血球の凝集は少ない。血液は十分に流れているものと考えられる。Bar: 10 μ m

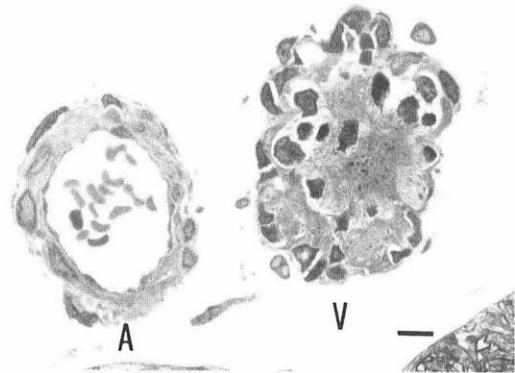
24時間後に行った。同時に組織学的検討を目的として眼球を摘出し、通常の方法にて固定処理後、準超薄切片はトルイジンブルー染色し、光学顕微鏡を用いて観察した。さらに、超薄切片を作成しウラン、鉛で電子染色し、透過型電子顕微鏡にて観察した。一部の家兎はゼラチン加フルオレスセイン静注、固定伸展標本法も用いて観察した⁹⁾、また、トロンビンの追跡実験では、5,000単位のトロンビンに10mgのHRPを混入したものを、生食10mlで溶解し、0.01mlを滴下した。滴下後6時間後に眼球摘出し、グルタルアルデヒドで固定後、Karnovskyの基本液に25分間浸漬し、蒸留水で洗浄したのち後固定を行った(図1)。

的食塩水(以下、生食)0.01mlのみを滴下した。

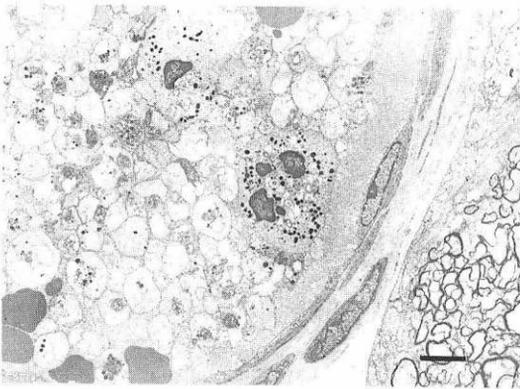
眼底観察は、術後から7日目まで行い、その写真記録は手術前、直後、6時間後、8時間後、12時間後、



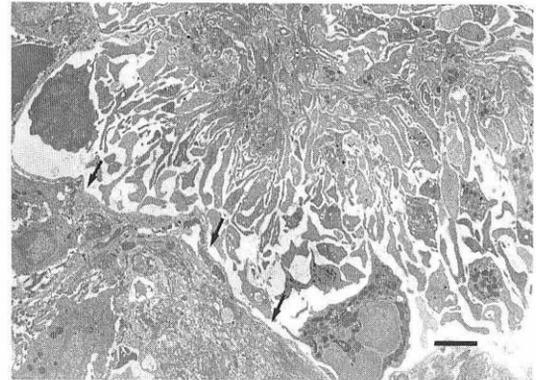
a



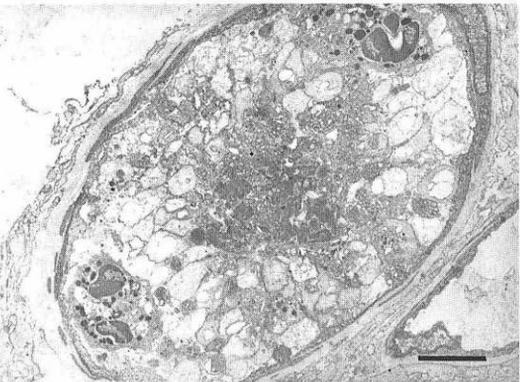
a



b



b



c

図6 6時間後の電顕所見

(a) 赤血球の凝集及び、血小板の吸着が認められる。Bar: 1 μ m. (b) 管腔の大部分は、脱顆粒した血小板塊、即ち血小板血栓によって占められている。Bar: 5 μ m. (c) ほぼ閉塞された細静脈、血栓の構成成分は血小板、白血球、フィブリンとなっている。Bar: 5 μ m

図8 滴下後、8時間目の滴下部細動脈(A)および細脈(V)を示す。この部での細動脈には血栓を認めず、血栓は細静脈のみにみられる(a)。Bar: 10 μ m. (b) は同部の電顕写真で細静脈を示す。血栓の主成分は血小板であり、フィブリンの析出を認めるのは内皮(矢印)下の部位である。なお内皮は菲薄化しているが断裂は認められなかった。Bar: 2 μ m

III 結 果

1. 検眼鏡的所見

対照例では3匹とも全経過を通じて特別な変化は認められなかった。トロンピン滴下例では、滴下直後に網膜静脈の狭細を認めたが、この狭細は数分程度で、消失した。この時点ではまだ出血などの変化は認められなかった(図2a, b)。6時間後も検眼鏡的には、軽い細静脈の拡張を認めるのみとなっていたが、摘出した実体顕微鏡では一部の例に点状の出血斑を認めた(図2c)。

8~12時間後にはほとんどの例で斑状もしくはしみ

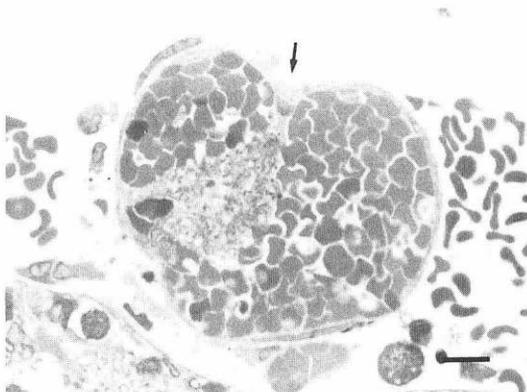


図9 著明な出血がみられた12時間後の光顕所見。一部で管壁に連続している血栓（矢印に示す）と同血管周囲の脱出赤血球を示す。Bar: 10 μ m

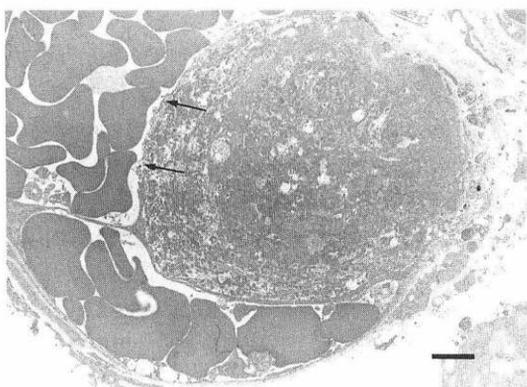


図10 24時間後の電顕所見。血栓は内皮下に析出したフィブリン塊であることがわかる。なお、矢印間に表示するように一部に内皮の欠損を認める。Bar: 2 μ m

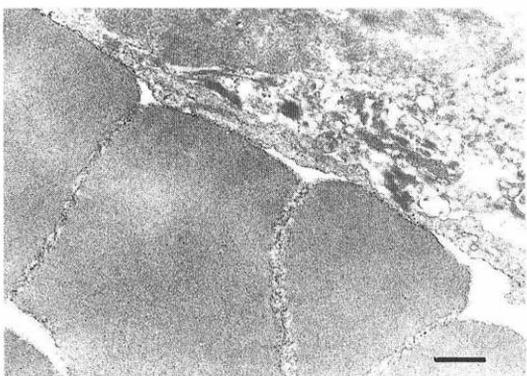


図11 トロンビンにHRP (horse radish peroxidase)を混入し滴下した例の電顕所見。管腔内の赤血球の細胞膜にHRP反応産物の付着が認められる。Bar: 5 μ m

状の出血が起こり始め(図3a),これが徐々に増加し,24時間後には検眼鏡的に滴下部末梢に人眼の網膜中心静脈閉塞症に類似する扇状の出血を認めた(図3b),

これらの眼底出血は,3日後にほぼ消失し(図4),7日目後には,完全に消失していた。

2. 組織学的所見

対照例に関しては同様の時間経過中いかなる変化も認めなかったが,トロンビン滴下例では,以下の如く血栓形成過程と出血の組織像が得られた。

1) 6時間後の所見

すでに血栓形成が認められた。この血栓形成は完成されたものでなく,主に血小板の凝集であった。しかもこの病態は必ずしも滴下部付近の全ての血管に共通するものではなく,血小板が凝集し,フィブリン蛋白の析出する時期(図5a)と,逆に血栓と管壁との間隙形成から先の凝集の融解したと考えられる時期(図5b)の2つが同一標本中にも認められた。

更に,電顕の所見として,この血栓形成の時間的推移は光顕よりも明瞭に捉えることができた。即ち,新鮮な血小板血栓と同時にその隣接部において血小板血栓の崩壊,退縮過程が確認出来た。即ち,赤血球の凝集及び,血小板の吸着の認められる時期(図6a),管腔が,脱顆粒した血小板塊,即ち血小板血栓によって占められている時期(図6b)さらに,血栓により閉塞された細静脈(図6c)が認められた。なお,この時期の細静脈における血小板血栓は滴下部位外にも様々な大きさのものを認めた。

一方,より広範囲な観察が出来るゼラチン加フルオレスセイン法での観察では,滴下部の細静脈のみならず,同部上流の細動脈中に半球状を呈する血栓形成が多数認められた(図7)。

2) 8時間後の所見

この時期では既に集塊状のフィブリン析出も認められ,既に完成された血栓形成の状態を示していた。また,管腔外に少数の赤血球脱出が認められた。フィブリン析出部は主に内皮下層であり(図8a, b),この内皮下血栓の存在により管腔は著しく狭くなり,その管腔が更に血小板血栓により閉塞されているという所見は全例に共通であった。なお,血管周囲及び外膜付近には,多核白血球の存在も認められた。なお,血管内皮細胞に脱落,変性は認められず,内皮下血栓部の菲薄化した内皮細胞も切れ目なく存在した。

3) 12時間後の所見

図9に示すごとく,多数の脱出赤血球が滴下部細静

脈周囲に認められ、内皮下血栓は更に大きくなっていた。しかし、この時期では既に管腔内の血小板血栓は、消失しているものが大部分であった。

4) 24時間後の所見

この時期の血栓は内皮下に析出したフィブリン塊が主体でありほとんど管腔を塞ぐまでに成長していた。この様な血栓の成長によって管腔側へ持ち上げられ菲薄化した内皮には、その頂点付近に部分的な欠損を認めた(図10)。

図11の電顕写真は、トロンビン液にHRPを混入し、静脈に滴下したものであるが、血管外から投与されたHRP反応産物は、血管内腔の赤血球に付着している状態が確認できた。しかし、その進入通過経路を示す明確な所見の確認はできなかった。

IV 考 案

緒言にも述べたように、網膜血管の任意の部分に血栓を作成することは、臨床における網膜出血の病態解明に大きな意味を持つと考えられるが、未だに満足のいく方法が開発されていない。従来^{7)~9)}の方法では、発生機序も大きく異なり、従って臨床的に遭遇する血管閉塞症とはかなり異なった病態を示すことは言うまでもない。

今回著者は、先の畑中らの報告に基づいて、より微小な血管、即ち、網膜血管にもこのような経外膜的血栓が生じるかどうかについて実験を行い、出血を伴った血栓の作成に成功した。

本実験が、これまでの実験的血栓形成と異なる点は、まず、第一に血栓が完成するまでにある程度の時間が必要であることである。即ち、トロンビン滴下後から、血栓が完成し、出血の起こるまでに12時間ほどの時間のずれがある。

従来^{7)~9)}の方法では、血管に直接、レーザーなり、電気刺激なりの生理的刺激を加えているため、本実験の如き時間的推移を取り得ない。

本実験のこの時間経過に関しては、次のように理解されるものと考えられる。即ち、滴下後6時間目の組織所見からもある程度推測されるが、生体内においては、血栓は一元的に形成されるのではなく、ある部位に血栓が出来れば、同時に線溶系の働きにより血栓は溶解され、更に細動脈にも見られる部分的な小血栓などによる血流の低下も加わってこの過程が繰り返され、やがて静脈血栓が完成していくものと推測される。

このことは、生体内における血栓形成を考えると、

きわめて理解し易い所見であるし、生体内の血栓形成にかなり近いモデルであるといえよう。

第二に、完成した血栓は、血管の内皮下に形成されている所見である。従来、このような所見は、血栓により閉塞した血管が再疎通する場合にみられるとされていた。即ち、内皮が傷害された部分に血小板が吸着し、やがてフィブリンによる血栓が完成すると、傷害された内皮は血栓を覆うように、再構築されるという過程である。しかし、この内皮が再構築されるには、数日間から数週間かかるとされている⁹⁾。従って、この時間的条件と経時的に増大した事実から、本実験における内皮下血栓の所見は、血栓形成が当初から内皮下に形成されたと考えらるべきであろう。

この現象に関してはいくつかの説明が可能であるが¹¹⁾、著者は次のよう解釈したい。まず、血管外から投与されたトロンビンが血管外膜を通過し、血管内皮下に到達する。トロンビンの一部は、血管内腔にはいり、血漿凝固系を活性化し、血管内で血栓を形成する。しかし、これは血液の流れによって移動し、また移動しながら、先に述べた線溶系の働きで溶かされていく。一方、血管内膜下にあるトロンビンが血管内膜を透過してきた血漿中の血液凝固因子と反応し、血管内膜下に血栓形成が起こる。この血栓は直接血液の流れを受けることがなく、内膜下に成長し、やがて、この血栓は内膜を押し上げるように成長し、管腔内を塞ぐようになる。この内腔の完全閉塞が完成された時点で細静脈は破綻性の出血を来すようになる。

以上が今回の実験から得られた推論である。しかし、出血機転のみに関しては、血小板血栓の消長から、血流再開との相互作用も無視できない問題である。その解明にはなお、時間的経過を詳細に追求する必要がある。

最後に、本実験の重要な点であるトロンビンの管壁通過性に関しては、その通過経路を明らかにすることはできなかったが、HRPの実験で示したように、トロンビンと共に滴下したHRPが管腔の赤血球膜に反応産物として認められたこと、また、トロンビンとHRPの分子量がほとんど近いことから¹²⁾、ほぼ明らかであろう。

さらに、フィブリンが特殊な状況下では、血管外腔にも出現するいくつかの報告も知られている¹³⁾。以上の事実は、内皮障害性血栓形成に関しても、内皮の機能が傷害され内皮が血漿性分、特にフィブリノーゲンを内皮下に通すようになり、内皮下に血栓が完成され

る可能性が十分ある事を示唆していると思われる。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました松山秀一教授並びに吉本弘志講師に深甚の謝意を表す。尚、本論文の要旨は平成元年5月11日第93回日本眼科学会総会で講演発表した。

文 献

- 1) **Fujino T, Curtin VT, Norton EWD**: Experimental central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 81: 395—406, 1969.
- 2) **Kohner EM, Dollery CT, Shakib M, et al**: Experimental retinal branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 69: 778—825, 1970.
- 3) **Apple DJ, Goldberg MF, Wyhinny G**: Histopathology and ultrastructure of the argon laser lesion in human retinal and choroidal vasculatures. *Am J Ophthalmol* 75: 595—609, 1973.
- 4) **Becker B, Post LT**: Retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 34: 677—686, 1951.
- 5) 猪俣 孟, 岩崎雅行: 網膜静脈閉塞症—Hayreh 見解の非妥当性—. *Therapeutic Res* 2: 69—72, 1985.
- 6) 一戸 敏, 三上 規, 松橋英昭他: 網膜血管閉塞症の新しいモデル—蛍光化学血栓を利用した網膜血管閉塞症について—. *日眼会誌* 91: 676—682, 1987.
- 7) 畑中 薫, 山本 章: 血管周囲の結合組織が血管内に及ぼす作用について. *血管* 9: 169—175, 1986.
- 8) **Hatanaka K, Minamiyama M, Takaichi S, et al**: Thrombus formation by the application of thrombin to the outer surface of mouse mesenteric vein. *Thrombosis Res* 40: 731—743, 1985.
- 9) 三上 規, 松橋英昭, 一戸 敏, 他: ゼラチン加フルオレセイン静注. 固定網膜伸展標本によるラット及び家兎網膜血管の観察. *日眼会誌* 91: 353—359, 1987.
- 10) 佐野正明, 大島宣雄: 微小血管血小板血栓形成の新しい実験モデルとその応用に関する 2, 3 の基礎的研究. *血液と脈管* 15: 36—44, 1984.
- 11) **Tagami M, Nara Y, Kunota A, et al**: Ultrastructural characteristics of occluded perforating arteries in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 18: 733—740, 1987.
- 12) **Morris JK**: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 35: 212—236, 1967.
- 13) **Raymond AS, Eveline ES, Robert B**: The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* 131: 547—558, 1988.