

(平成2年度 第94回総会)

# 宿題報告 眼内血管新生

## 眼内血管新生の病態

堀 貞 夫

東京女子医科大学糖尿病センター眼科

### 研究協力者

北野 滋彦・早川 和久・荻野 公嗣・赤星 隆幸・高橋 貴子・須藤 史子  
野中 千晶・小関 義之・石井 康雄・木戸口 裕・山下 英俊・岩永 敏彦  
河上 牧夫・須藤 勝一・堀 哲夫

### 要 約

眼内血管新生の病態を、ヒトおよび実験動物眼、培養網膜血管内皮細胞により病理組織学的に検討した。新生血管は、それが派生するもとの血管と形態を異にし、これが臨床的にみられる検査所見や二次的病変の原因となる。ヒト硝子体新生血管では **tight junction** の欠如、内皮細胞の窓形成、内皮細胞内のアクチン様細線維などの所見が、新生血管の透過性が高いことの組織学的裏付けとなる。動物実験では、塩基性線維芽細胞成長因子を用いて硝子体や角膜に新生血管を作り、新生血管が発生し、消退するときの周囲環境の変化を組織化学的手法を用いて観察した。新生血管が侵入していくときには、周囲組織に対する大きな侵襲があり、とくに組織の境界を越えて血管が新生する背景には、ライソゾーム酵素による組織融解が関与するものと推測された。血管が新生する背景には、血管新生因子の存在とともに、血管新生を抑制する因子の不活化や、血管が新生するための組織境界の破壊などの基本的条件が必要であると推測された。血管が新生するときには、フィブロネクチンが内皮細胞の増殖や遊走、組織附着に大きく貢献し、基底膜が内皮細胞の成熟にもなって形成され、完成した血管の内皮細胞には血液凝固第 VIII 因子が検出された。逆に新生した血管が消退するときにはフィブロネクチンの活性は速やかに消失した。その消褪過程では、内皮細胞がまず消失し、血液凝固第 VIII 因子は血管壁に虫喰い状に検出されるようになった。基底膜に関連するラミニンやIV型コラーゲンは内皮細胞が消失した後にも残存していた。(日眼会誌 94:1103-1121, 1990)

キーワード：血管新生，組織病理学，組織化学，培養網膜血管内皮細胞，塩基性線維芽細胞成長因子

別刷請求先：162 東京都新宿区河田町8-1 東京女子医科大学糖尿病センター 堀 貞夫  
(平成2年9月6日受付，平成2年9月6日受理)

Reprint requests to: Sadao Hori, M.D. Department of Ophthalmology, Diabetes Center, Tokyo Women's Medical College

8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(Received September 6, 1990 and accepted September 6, 1990)

## Pathophysiology of Intraocular Neovascularization

Sadao Hori

Department of Ophthalmology, Diabetes Center, Tokyo Women's Medical College

## Abstract

The pathology of intraocular neovascularization was studied in human and animal eyes by means of electron microscopy and histochemistry, and also by tissue culture of bovine retinal small vessels.

The newly formed vessels in the vitreous obtained at the time of vitrectomy from the eyes with proliferative diabetic retinopathy and retinal vein occlusion lacked tight junction and formed fenestration in the endothelial cells.

When  $1\mu\text{g}$  of the basic fibroblast growth factor (b-FGF) enveloped in ethylene vinyl acetate copolymer was implanted into the vitreous of monkey eyes, new vessels were formed in the iris in all eyes and in the vitreous in 12 eyes out of 14 experimental eyes. The origins of new vessels were the iris vessels in the iris, and both stromal vessels of the ciliary body and retinal vessels in the vitreous. These vessels showed fenestration in the endothelial cells. The activity of the lysosomal enzyme detected by acid phosphatase increased in the epithelial layer of the ciliary body. The new vessels in the vitreous of rabbits were seen in 9 out of 10 eyes when b-FGF was implanted in the vitreous with an intravitreal injection of amino adipic acid solution ( $1\text{mg}$  in  $0.2\text{ml}$  of physical saline), although none of the 8 eyes formed new vessels when sodium iodate was injected intravenously after implantation of b-FGF with amino adipic acid. Corneal neovascularization was formed by implantation of  $250\text{ng}$  of b-FGF into the corneal micropockets of the guinea pigs, and regressed after the b-FGF was removed. The endothelial budding and protrusion were frequently seen during the course of neovascularization. Immunohistochemical detections showed positive stainings for fibronectin in most front-end lesions, for laminine and type 4 collagen associated with the endothelial cells, and for factor VIII only on the endothelial cells which formed the vascular lumen. The acid phosphatase activity was detected on the leucocytes infiltrating in the corneal stroma. In the course of regression of corneal neovascularization, initial pathological change was thrombus formation followed by disappearance of endothelial cells, although the basement membrane of the endothelial cells remained. Fibronectin reduced its activity in the early stage of regression, laminine and type 4 collagen remained even after the vascular lumen had subsided, and factor VIII was stained in a geographically irregular manner. Migrating activity of the cultured-bovine retinal small vessels was accelerated by fibronectin and fetal bovine serum. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94: 1103-1121, 1990)

**Key words:** Neovascularization, Histopathology, Histochemistry, Cultured retinal endothelial cells, Basic fibroblast growth factor

## I 緒 言

眼組織における血管新生は、局所のみでなく全身の生理学的異常の一端としても現われ、角膜、虹彩、毛様体、硝子体、網膜など眼のほぼどの部位にも形成される。それらの新生血管は、おそらく眼内に生じた生理学的異常を是正するためのなんらかの目的を有するものであろうが、ほとんどの場合新生血管の形成によって続発する合併症により、重大な視機能障害をもたらす。それ故、眼科領域の新生血管に関連する種々

の疾患においては、その発生をいかに予防し、また生じてしまった新生血管をいかに消退させるかが大きな課題となる<sup>1)~3)</sup>。

近年の基礎的な研究によりその病態、ことに新生血管の病理形態学や血管が新生するときに関与する因子(血管新生因子)が判明しつつある<sup>4)5)</sup>。血管の内皮細胞成長因子の一つである塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor: b-FGF)は、人眼における血管新生に大きく関与する可能性があることが示唆されている<sup>6)</sup>。また、抽出、精製されたb-FGFは

再現性のある新生血管を角膜に作る事ができ、血管新生を抑制する薬剤の定性ないしは定量をするための実験系として実用化されている<sup>7)</sup>。眼内血管新生で最も注目される硝子体内新生血管は、網膜血管から派生するがこの発生基盤には網膜組織での虚血が関与することが示唆され、近年の研究では虚血状態になった網膜組織が壊死傾向に陥り、その壊死に陥った網膜組織から様々な成長因子や抑制因子が放出され、その影響下に最終的に硝子体内に新生血管が発生するという考えが受け入れられつつあり、新生血管発生の本態の解明に近づきつつある感が抱かれる<sup>2)4)5)</sup>。しかし、新生血管の発生・進展において、どの様な細胞や周囲環境の変化があるのか、消退してゆく過程でどの様な変化が起こるのかは未だ不明のところが多い。本研究では、血管新生の病態を血管自体だけでなく、その周囲環境の変化も含めて検討した。

## II 材料と方法

### 1. ヒト硝子体新生血管の形態

人眼における眼内新生血管の代表として、硝子体新生血管の形態を観察した。硝子体手術時に採取した、増殖糖尿病網膜症および網膜静脈血栓症における新生血管を含む増殖膜を観察した。

### 2. 動物実験での血管新生

1) サル眼：アカゲザル4頭(3~5kg)およびニホンザル5頭(6~12kg)をケタラル麻酔し、vitreous cutterにより硝子体切除術を行った。硝子体切除後、ethylene vinyl acetate copolymer<sup>8)</sup>(EVA)にpellet状に包んだ1 $\mu$ gのb-FGF(R&D, USA)を硝子体内に移植し、4~8週後に眼球を摘出した。硝子体手術のみを行ったもの、およびb-FGFを含まないEVAのみを硝子体内に移植したものを対照とした。

2) ウサギ眼：0.2mlの滅菌空気を硝子体に注入し、1~2週後に後部硝子体剝離が形成された時点で、EVAに包んだ1 $\mu$ gのb-FGFを後部硝子体下腔に移植した。移植と同時にMüller細胞に対する毒性を持つアミノアジピン酸<sup>9)10)</sup>1mgを0.2mlの生理食塩水に溶解して硝子体中に注入した。さらに一部の家兎眼には、網膜色素上皮細胞に毒性を有するヨウ素酸ナトリウム<sup>11)</sup>3mg/kgをも同時に耳静脈より注入した。b-FGFを含まないEVAを移植し、他は同様に処置したものを対照とした。

3) モルモット眼：ネブタール麻酔下にてモルモット(Hartley:500-700g)の角膜に22G注射針を

用いて半層切開を加えmicropocketを作成し、EVAに包んだ250ngのb-FGFをその中に移植した。一部の眼球においては、b-FGF移植後4~7日で角膜に新生血管が形成されているのを確認したのちに、移植したb-FGFを摘除し、形成された新生血管の消長を観察した。移植後2~14日のb-FGFが入っている眼球、およびb-FGF摘除後2~7日の眼球を摘出した。b-FGFを含まないEVAを移植したもの、および半層切開を加えただけのものを対照とした。

以上の材料を下記の各目的に応じて、0.1M 磷酸緩衝液加4%パラホルムアルデヒド、および0.1M 磷酸緩衝液加または0.2M カコジル酸緩衝液加2.5%グルタルアルデヒドで固定した。一部は組織化学のために凍結切片を作成した。通常のパラフィン切片の他に、凍結切片においてナフトールAS-BIを基質にしパラロザニンで発色させた、酸性フォスファターゼ法によるライソゾーム酵素の検出を行って光学顕微鏡で観察した。

20 $\mu$ のパラフィン切片または凍結切片にて、免疫組織化学的に血液凝固第VIII因子(factor VIII)、ラミニン(laminine)、IV型コラーゲン(type-4 collagen)およびフィブロネクチン(fibronectin)の検出を行った。各抗原に対する1次抗体はDAKO社から購入した。2次抗体以下の反応は、DAKO社のUniversal kit<sup>®</sup>を用いperoxidase-antiperoxidase(PAP)法により行い、光学顕微鏡下にて観察した。

電子顕微鏡用にエポキシ樹脂に包埋した標本は、1 $\mu$ の厚切り切片にトルイジン青染色を施し光学顕微鏡で観察した。超薄切片は通常のウラン・鉛染色とともに、 $\beta$ -グリセロリン酸を基質にした酸性フォスファターゼ反応を行って電子顕微鏡下に観察した。

### 3. 網膜血管の組織培養

Buzneyの方法<sup>12)</sup>に従い、ウシ網膜組織からコラーゲナーゼ(Sigma)処理により網膜細小血管細胞を分離して採取し、ゼラチン処理したプラスチック培養皿にて37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。培養液はEagle培地(Dulbecco 改変)に、15%ウシ胎児血清と内皮細胞増殖因子300 $\mu$ g(Sigma)を加えて用いた。培養開始後2週で、ほぼ均一に培養細胞が増殖したところでトリプシン処理をして培養細胞を浮遊させ、Hank's balanced buffer solution(Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> free: HBBS)で洗い5 $\times$ 10<sup>5</sup>個の培養細胞浮遊液を作った。Chemotaxis Chamber(Neuroprobe)を用いて、小室の上部には細胞浮遊液を、小室の下部にはウシ胎児血清(fetal

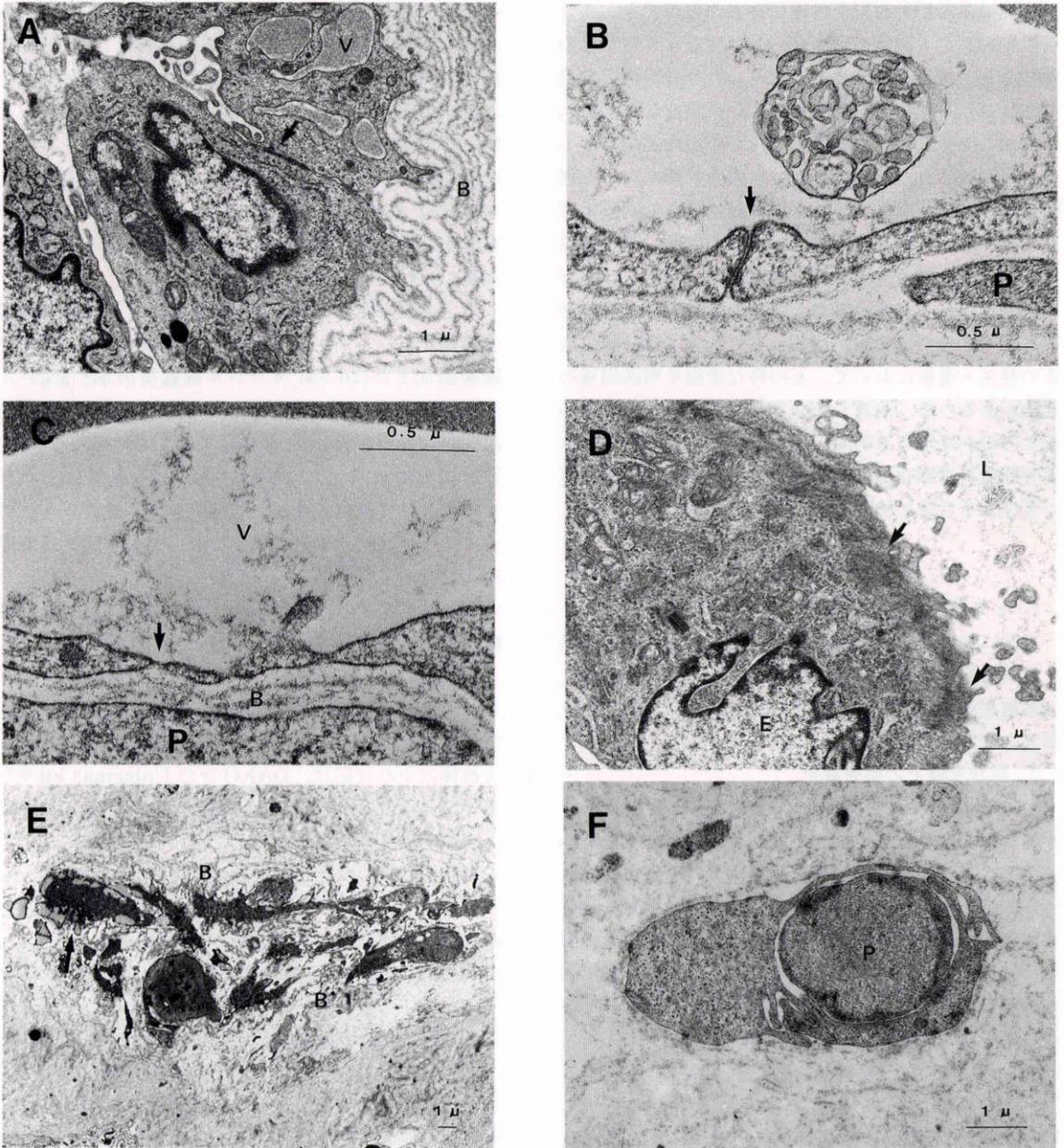


図1 ヒト硝子体新生血管の電子顕微鏡像。A：内皮細胞の空胞形成(V)と基底膜の層状肥厚(B)を見、内皮細胞間はoccludens型の接合(矢印)を示す。×11,500, B：adherens型の内皮間細胞接合。細胞間に間隙を認める(矢印)。P：壁細胞×31,700, C：内皮細胞の窓形成。血管腔(V)側の細胞膜と基底膜(B)側の細胞膜が融合し一枚の細胞膜となっている(矢印)。P：壁細胞×32,500, D：内皮細胞のアクチン様細線維。内腔(L)に面する内皮細胞(E)の細胞質内に、細線維の集合を認める(矢印)。×9,100, E：白線化血管。空胞変性を示す細胞(矢印)が輪状に配列し、あたかももとの血管腔を囲むように見える。基底膜様物質(B)が層状に肥厚している。×2,700, F：内腔が閉塞した小血管。内腔は中間径線維を有する細胞の突起(P)により閉塞されている。×9,400。

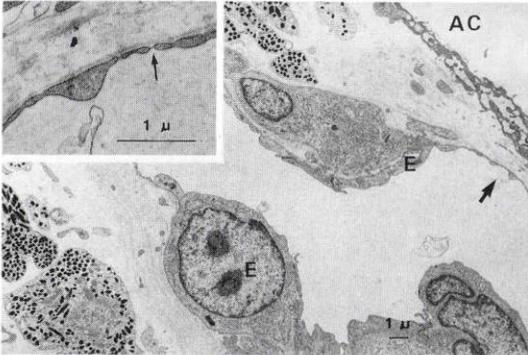


図4 虹彩新生血管の電子顕微鏡像。虹彩の前房(AC)側に形成され、内皮細胞(E)の細胞質が薄いところがめだつ(太い矢印)。 $\times 2,500$ 、挿図：矢印の部の拡大図で窓(細い矢印)が見られる。 $\times 10,800$ 。

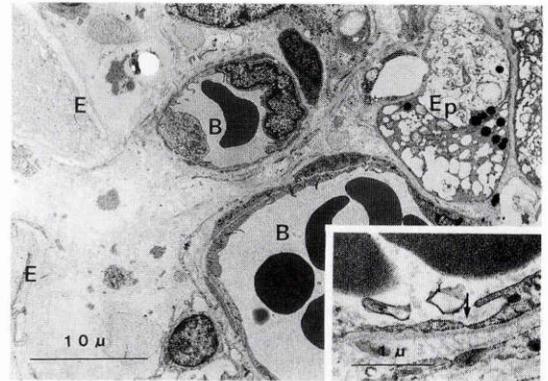


図7 毛様体偏平部の電子顕微鏡像。Bruch 膜の弾性板(E)が断裂した部位の付近の毛様体上皮層内に新生血管(B)を認める。上皮細胞(Ep)の極性は乱れ、空胞形成を認める。 $\times 1,600$ 、挿図：上皮層内にみられた新生血管の内皮細胞には窓(矢印)が見られる。 $\times 11,300$ 。

bovine serum : Sigma), フィブロネクチン (porcine fibronectin : Bioprocessing), 血小板由来成長因子 (porcine platelet derived growth factor : Bioprocessing), プロスタグランジン ( $PGD_2$ ,  $E_2$ ,  $F_2$  : Advance Magnetics) をいれて  $38^\circ C$ ,  $5\% CO_2$  下で 9 時間浸漬し、各薬剤の培養細胞の遊走能に対する影響について検討した。Chemotaxis Chamber は、1 枚に 48 個の Boyden chamber 型の小室を有する市販の生物分析装置で、上部と下部を境する隔壁 (porous polycarbonate membrane : Nucleopore) には直径  $8\mu$  の小孔が多数あいていて、その小孔を通して細胞が上部から下部に遊走する<sup>13)</sup>。遊走した細胞は隔壁の下面に付着するので、光学顕微鏡で 400 倍に拡大し、1 視野あたりの細胞数を計測した。1 つの小室につき 10 視野計測し、合計細胞数を求めた。

### III 結 果

#### 1. ヒト硝子体新生血管の形態

糖尿病網膜症や網膜静脈血栓症における硝子体の新生血管の形態は基本的には差がなく、内皮細胞と壁細胞から構成され、内皮細胞には空胞が形成されたり、基底膜が層状に肥厚することが多い。時に occludens 型の内皮細胞間接合がみられたが (図 1A), 多くの場合内皮細胞間は adherens 型の接合を示し (図 1B), 明らかに細胞間が離解することもあった。内皮細胞には窓 (fenestration) を見ることもあった (図 1C)。また、内皮細胞の内腔に面する細胞質に actin 様の細線維を認めることがあった (図 1D)。

一方、陳旧化した増殖膜にはしばしば白線化血管を

認めるが、このような血管を観察すると、血管内腔はないが内皮細胞や壁細胞に類似した細胞が、空胞変性を示しながら、もと管腔があったと思われる部位を囲むように輪状に配列し、さらにこれらを取り囲んで基底膜様物質が層状に観察された (図 1E)。また、ときには小血管の内腔が、中間径線維を含む細胞突起により閉塞される像も見られた (図 1F)。

#### 2. 動物実験での新生血管

1) サル眼において、硝子体手術操作と b-FGF 移植を行ってから 1 週間には虹彩と前部硝子体に新生血管の形成を認めた (図 2)。

A) 虹彩新生血管：本来の虹彩血管は、内皮細胞、壁細胞、基底膜で構成され、内皮細胞間には gap junction 様構造を認めた。基底膜は数層に肥厚していた。虹彩の新生血管は実験眼 14 眼の全例に認められ、虹彩実質にある本来の虹彩血管から派生し、大小の管腔を形成していた (図 3)。本来の虹彩血管にはみられなかった窓がしばしば見られ、また新生血管の周囲には 1 層の基底膜を認めたが、本来ある虹彩血管のような層状に肥厚した基底膜はほとんどなかった (図 4)。

B) 硝子体新生血管：前部硝子体の新生血管は、実験眼 14 眼中 12 眼にみられ、白色の線維性結合織をともなって認められた。b-FGF を含まない EVA のみのものと、硝子体切除を行っただけのものには検出されなかった。ほとんどの場合は広範な網膜剝離をともない、増殖組織を形成した 12 眼のうち広範な剝離を示さな

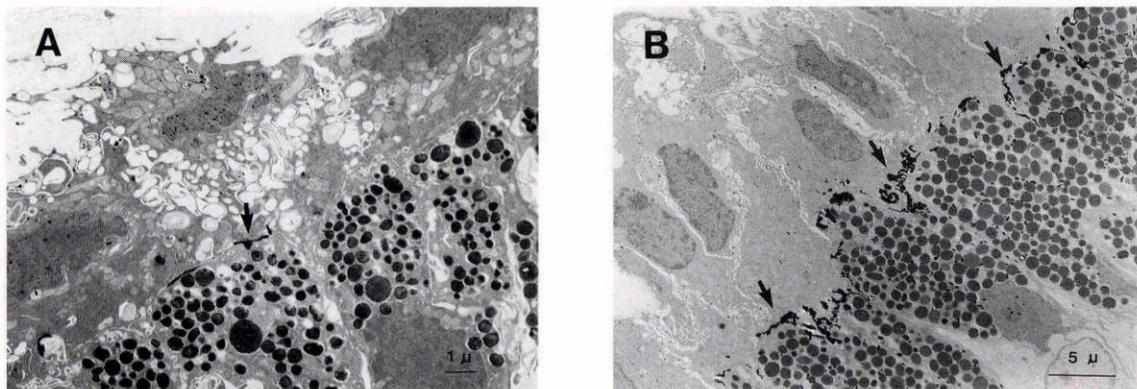


図8 毛様体扁平部色素上皮層の酸性フォスファターゼ反応の電子顕微鏡像。A：正常対照眼では、色素上皮細胞の最表層にわずかに反応物質の沈着を認める（矢印）。×3,800, B：実験眼で血管侵入のほとんどない部位にも、正常と比べて明らかに強い反応物質を認める（矢印）。×1,900.

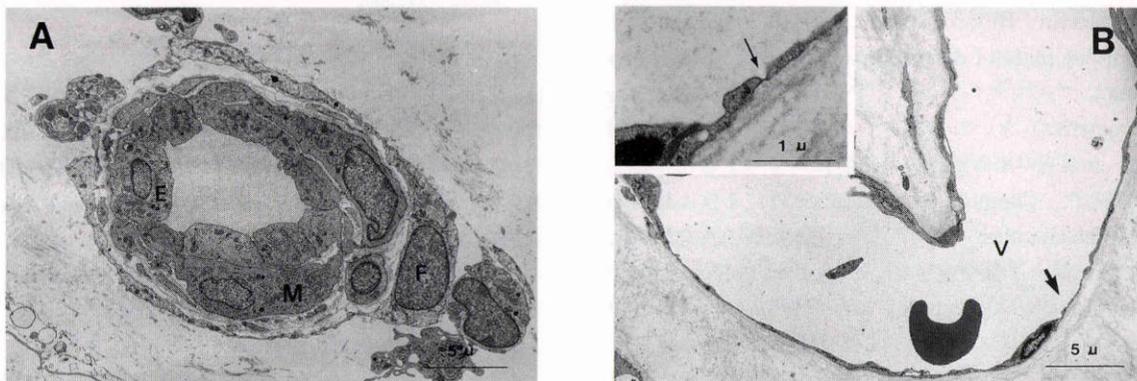


図10 硝子体新生血管の電子顕微鏡像。A：内皮細胞(E)を1層の中膜細胞(M)が囲み、さらにその外側を外膜の線維芽細胞(F)が囲む動脈様の血管。×2,200, B：薄い内皮細胞(太い矢印)で囲まれた静脈様の血管(V)。×2,200, 挿図：太い矢印の部の拡大図で内皮細胞に窓(細い矢印)を認める。×10,800.

かったものは1眼だけであった(図5)。新生血管は大小の管腔を形成し、線維性結合織の中に認められた。新生血管の発生する根源を観察すると、強膜切開創の瘢痕組織が硝子体に向かって侵入し、この瘢痕組織にともなわれて毛様体実質の血管が硝子体中に侵入するようにみられたが、強膜切開創から離れた部位にも毛様体実質の血管が硝子体に侵入する像が捉えられた。連続切片で観察すると、毛様体実質側にある血管と毛様体上皮層または硝子体内にある血管が連絡していることが確認された(図6A, B)。これらの部位を電子顕微鏡で観察すると Bruch 膜の断裂を認め、断裂部に近い毛様体扁平部の上皮層内に、毛様体実質血管と同様

な窓を形成する内皮細胞に囲まれた血管腔が観察された(図7)、その付近の硝子体内には多数の血管腔が見られた。このような血管が侵入する毛様体扁平部の上皮細胞には空胞形成や浮腫傾向がみられ、その極性が乱れていた。このような部位を含めて、毛様体扁平部の色素上皮層に正常と比べて明らかに亢進した酸性フォスファターゼ反応陽性の沈着物が検出された(図8A, B)。

また、網膜と硝子体増殖組織の接点で見ると、明かな網膜内血管が増殖組織内の血管とつながっている像が連続切片で観察された(図9A, B)。

硝子体内の血管は、内皮細胞と平滑筋様細胞で構成

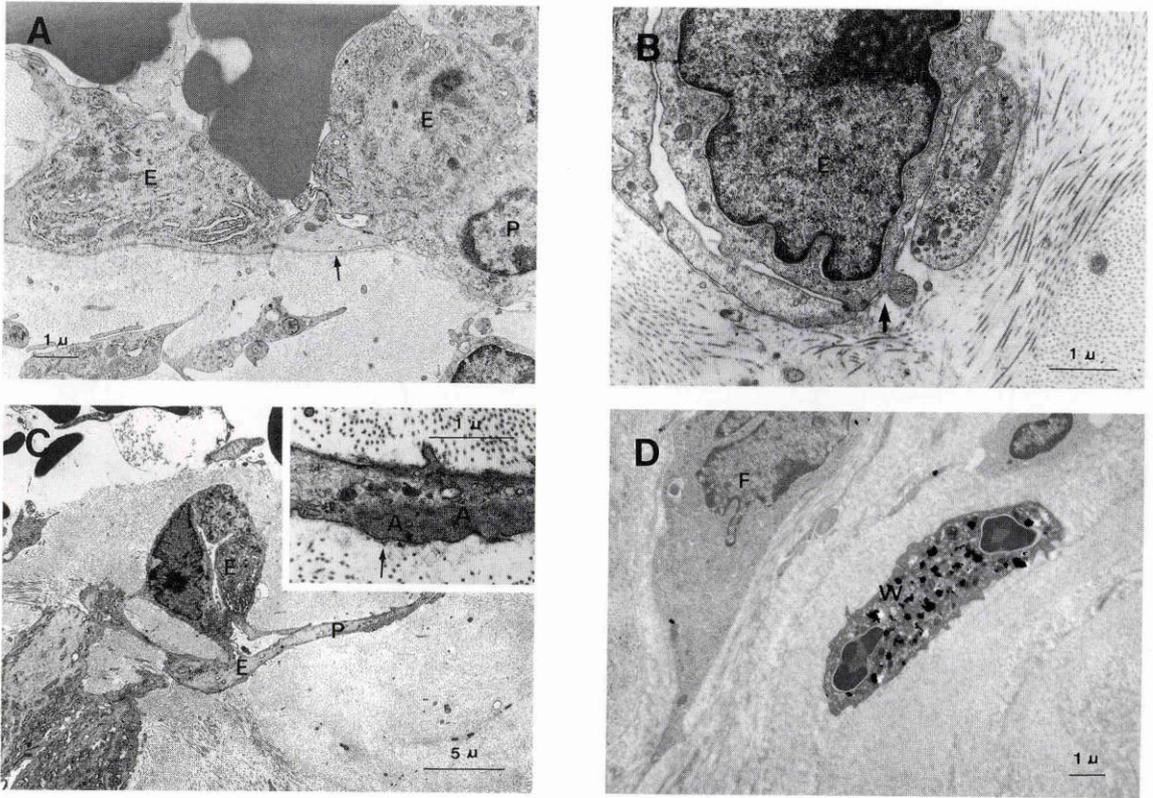


図16 b-FGFを移植した角膜の電子顕微鏡像。A：新生血管は内皮細胞(E)、壁細胞(P)および基底膜(矢印)で構成され、疎面小胞体やリボゾームが増加した内皮細胞を見ることがある。 $\times 5,900$ 、B：内皮細胞(E)の発芽の部分では基底膜が断裂している(矢印)。 $\times 8,800$ 、C：内皮細胞(E)の細胞質の突出する部位(P)。 $\times 2,200$ 、挿図：突出した細胞質にはアクチン様の細線維(A)を認め、部分的に基底膜様構造(矢印)が形成されている。 $\times 11,000$ 、D：酸性フォスファターゼ反応を行うと、浸潤した白血球(W)は陽性であるが、線維芽細胞(F)を含む他の細胞は陰性である。 $\times 4,800$ 。

される動脈様のもの(図10A)、管腔は大きい内皮細胞の外側は断続的な壁細胞が囲む静脈様のもの(図10B)、および毛細血管様の小管腔を形成するものがあった。このうち静脈様のものと毛細血管様のものには、内皮細胞に窓がしばしば認められた(図10B、挿図)。これらの新生血管は、実験期間を通じ形態学的に大きな変化はなく、実験期間が長くなると血管の密度または数が減少し、線維性結合織の占める割合が増加する傾向にあった。

2) 空気注入により形成された後部硝子体剥離を示すウサギ眼において、網膜と後部硝子体膜の間にある後部硝子体下腔にb-FGFを移植すると、1~2週後には、アミノアジピン酸処置をした10眼のうち9眼に網

膜前に線維性増殖組織が形成され増殖組織の表面に血管の侵入を認めた(図11A)。これに蛍光眼底撮影を行うと、びまん性に蛍光剤の漏出が認められた(図11B)。アミノアジピン酸に加えてヨウ素酸ナトリウムをも静注した8眼には、線維性増殖組織はあるものの、蛍光剤の漏出を示す新生血管は認められなかった。

蛍光剤の漏出を示す増殖組織には、小管腔を示す血管組織が含まれており、その周囲には線維芽細胞やときには網膜色素上皮細胞が見られた(図12A)。小血管は内皮細胞と壁細胞から構成され、内皮細胞には窓が観察された(図12B)。これらの血管を含む増殖組織の由来を観察すると、b-FGFを硝子体に移植した時に形成された強膜切開創から線維性組織が硝子体中に侵入

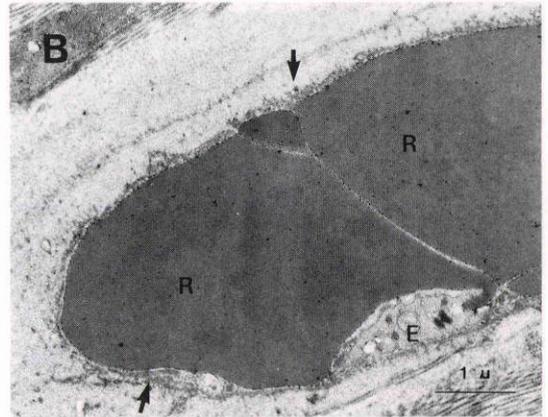
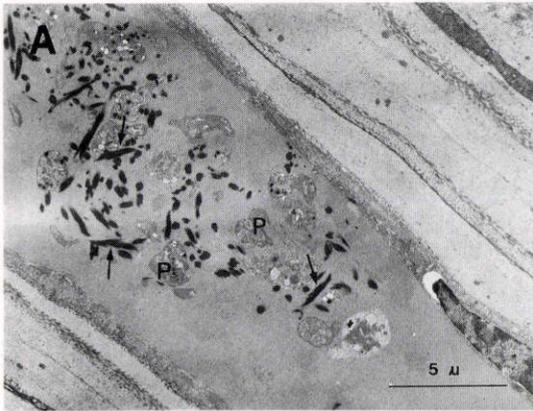


図18 一度移植した b-FGF を 4 日目に除去した後の角膜の電子顕微鏡像。A: 除去後 3 日目では血管内に血小板 (P) が集積し、線維素が析出している (矢印),  $\times 3,100$ , B: 除去後 3 日目の血管で、内皮細胞 (E) の一部は残されているが大部分の内皮細胞が消失し、もとの管腔に残された赤血球 (R) を囲んで直接接する基底膜 (矢印) が観察される,  $\times 10,700$ , C: 除去後 7 日目の角膜には、基底膜を持つ壁細胞と思われる細胞 (P) が見られ、それに連続してあたかも管腔を囲むように基底膜様物質 (矢印) が観察される,  $\times 5,100$ .

し、脈絡膜血管から由来する血管が硝子体中に派生する像が捉えられた (図 13)。

3) モルモットの角膜に作った micropocket に b-FGF を移植すると、2 日目には網膜が浮腫傾向を示し、3~4 日目には角膜輪部から角膜中央に向かって細い血管が直線的に侵入し、全体像として花輪のような外観を呈した。7~10 日目には血管の侵入はその極に達し (図 14A)、角膜中央の b-FGF の pellet の部分にまで達した。14 日目には浮腫はむしろ軽減し、細い径の血管は少なくなり太い径の血管が目立つようになった (図 14B)。2~3 カ月後の長期後にも新生血管は残っていたが、径が細く長いもののみが疎に観察され、角膜の浮腫は軽微となっていた。b-FGF を含まない EVA の pellet のみを移植した場合には、血管新生はみられなかった (図 14C)。

b-FGF を移植して 4~7 日後に角膜に新生血管が形成されたのを確認し、b-FGF を除去すると、浮腫の消退とともに新生血管は徐々に消失していった。初期

の段階で除去すると、角膜の半層切開創の部分に瘢痕が残るのみではほぼ透明となったが、7 日で除去したものでは角膜 micropocket による瘢痕の混濁とともにわずかに血管の残存を認めた (図 14D)。

これらの血管の形成過程を観察すると、新生血管は複雑な走行と分枝を示しながら角膜輪部から角膜中央に向かって樹枝状に伸びていった (図 15)。血管は内皮細胞と壁細胞で構成され、基底膜をともなっていた。内皮細胞はしばしば細胞質内の粗面小胞体やリボソームが増加し、細胞活性が高いことを窺わせた (図 16A)。基底膜は内皮細胞の細胞質が発芽 (budding) を形成するところでは断裂し (図 16B)、また細胞質が突出して (protrusion) 侵入するところでは部分的に形成されているのみであった (図 16C)。この protrusion を示す内皮細胞には、細胞質の中に部分的にアクチン様の細線維を認めた (図 16C, 挿図)。これらの budding や protrusion を示す部位以外の新生血管は、形態学的にはほぼ正常の血管構造を示しており、窓はほとんど認



図2 b-FGFを移植して1週後のサル眼、前部硝子体に白色の線維増生をともなった新生血管(細い矢印)があり、虹彩面上には虹彩新生血管からの出血(太い矢印)を認める。

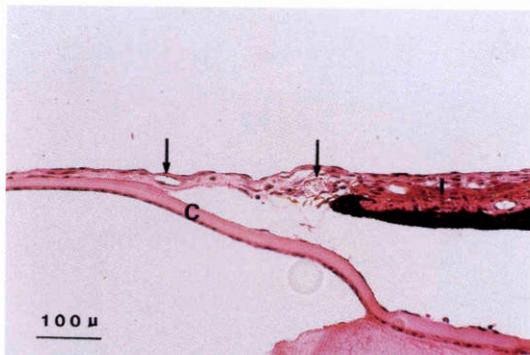


図3 虹彩新生血管の光学顕微鏡像。虹彩(I)の表面から水晶体前囊(C)の表面に薄い線維性の膜を形成し、その中に血管腔(矢印)が見られる。HE染色、 $\times 140$ 。

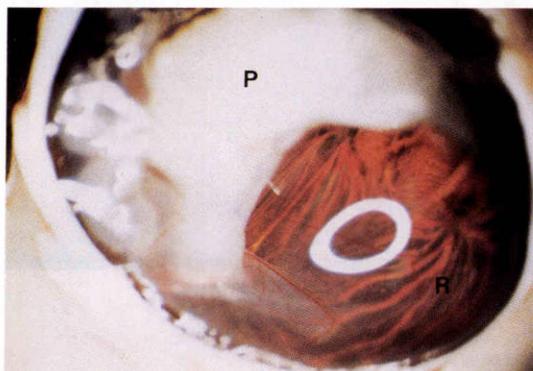


図5 サル眼の前部硝子体増殖組織。白色の線維性増殖組織(P)がおもに前部硝子体に形成され、後極側には剥離していない網膜(R)がみられる。増殖組織を形成した12眼のうち、広範な網膜剥離を起こさなかったのはこの1眼のみである。

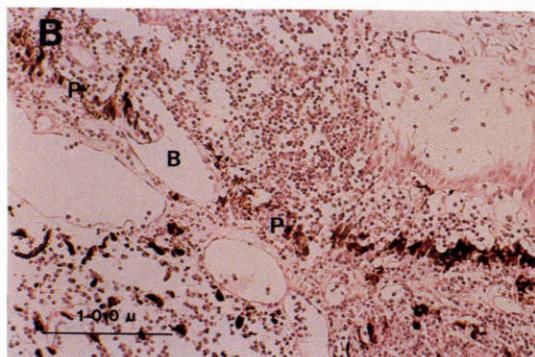
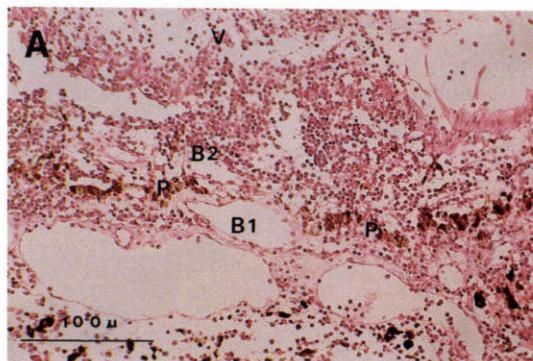


図6 毛様体扁平部からの新生血管の光学顕微鏡像。A：色素上皮(P)をはさんで毛様体実質の血管(B1)と毛様体上皮内にある血管(B2)が見られる。硝子体内(V)には炎症細胞をともなった増殖組織を認める。HE染色、 $\times 270$ 、B：連続切片でみると図Aの血管B1とB2は、連続した血管(B)であることが判る。PAS染色、 $\times 270$ 。

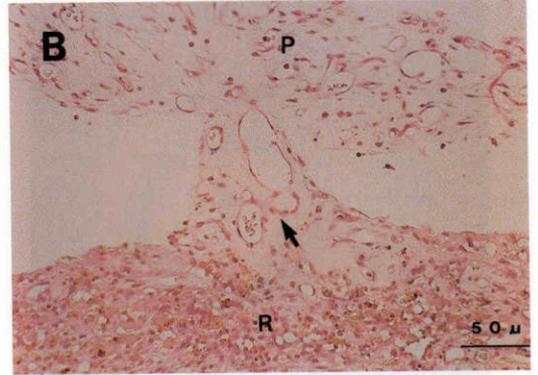
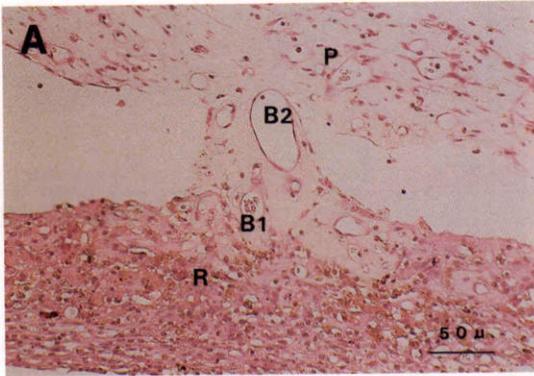


図9 網膜からの新生血管の光学顕微鏡像。A：剥離した網膜(R)内の血管(B1)と硝子体内増殖組織(P)の中にある血管(B2)が見られる。HE染色， $\times 270$ ，B：連続切片で観察するとB1とB2は連続していることが判る(矢印)。HE染色， $\times 270$ 。

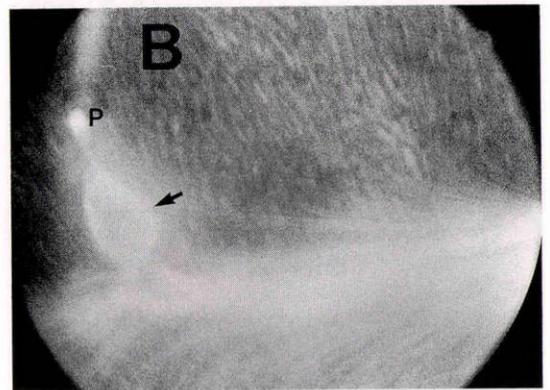
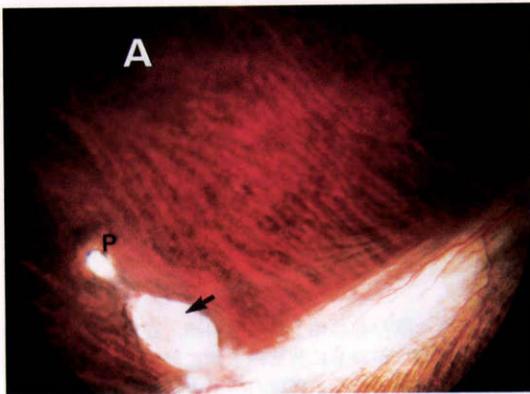


図11 ウサギ硝子体内新生血管。A：硝子体内に移植したb-FGF pelletの表面に、線維の増殖をともなった新生血管を認める(矢印)。B：蛍光眼底撮影を行うと、pelletに一致して蛍光の漏出を認める(矢印)。Pは強膜穿孔部。

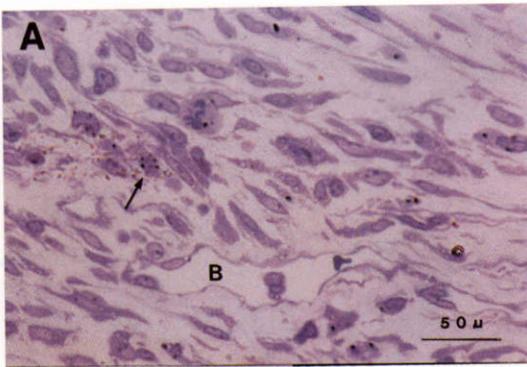


図12 ウサギ硝子体内増殖組織像。A：光学顕微鏡像。新生血管の血管腔(B)を認め、周囲は線維芽細胞様細胞の他にメラニン色素を持つ細胞も見られる(矢印)。トルイジンブルー染色， $\times 340$ ，B：電子顕微鏡像。新生血管の内皮細胞には窓を認める(矢印)。 $\times 11,300$ 。



図13 ウサギ強膜穿孔部の光学顕微鏡像。穿孔部付近の脈絡膜血管が拡張し、硝子体増殖組織(P)内に入り込んでいる(矢印)。トルイジンブルー染色, ×34.

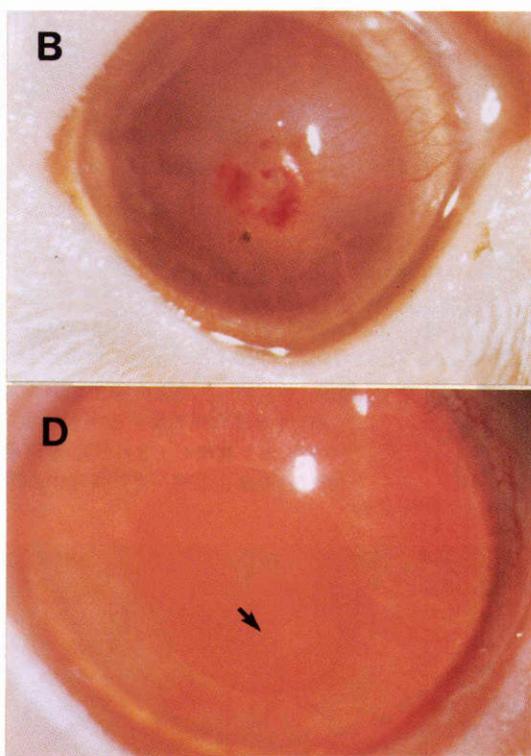
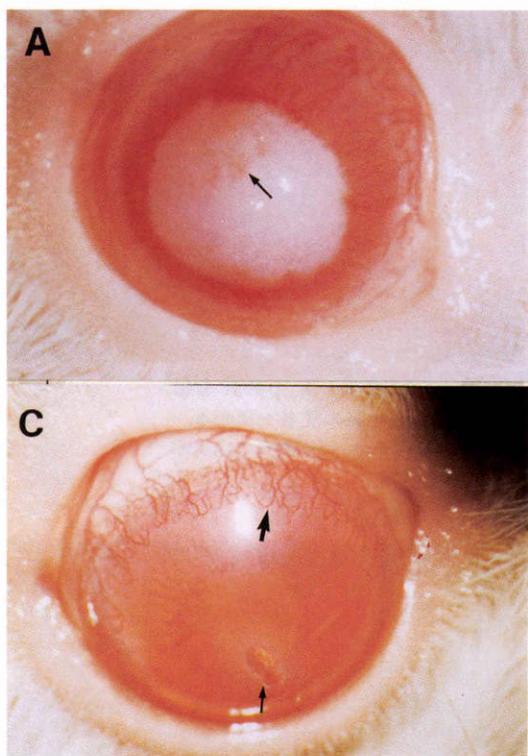


図14 b-FGF移植によるモルモット角膜の新生血管。A：移植7日目の輪部付近では新生血管が花冠様に見られ、浮腫となった角膜中央にも細い血管が侵入している(矢印)。B：移植14日目には浮腫は軽減し、太い血管が角膜中央の pellet にまで達してその周りには出血がみられる。C：b-FGF を含まない EVA pellet (細い矢印) のみを移植して7日目の角膜には、もともとある輪部血管(太い矢印)を認めるのみで新生血管の形成はない。D：移植して7日目にb-FGFを除去し、7日後の角膜には micro-pocket の軽度の癒痕と、わずかな新生血管の残存(矢印)を認める。

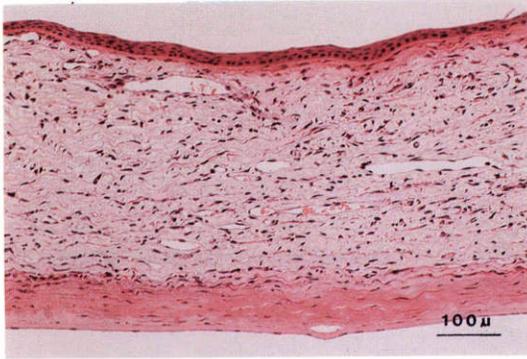


図15 b-FGF 移植7日目の角膜。角膜の表層から4/5にいたる実質は浮腫に陥り、大小の血管腔と細胞浸潤を認める。HE染色, ×140。

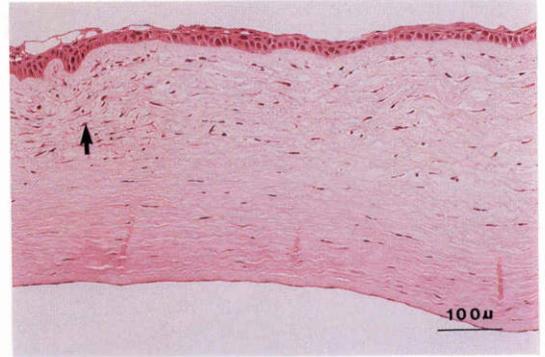


図17 移植して7日目にb-FGFを除去し7日目の角膜。新生血管は殆ど消失し、b-FGFを挿入した部位に、角膜上皮の乱れと細胞の集合がみられる(矢印)。HE染色, ×140。

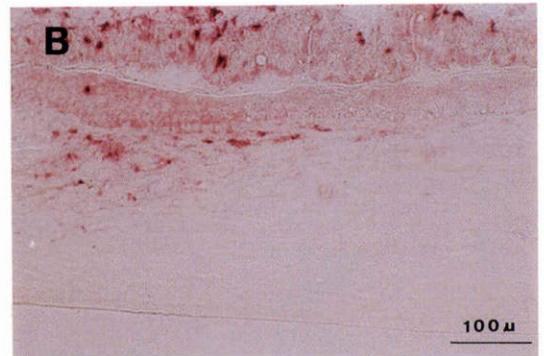
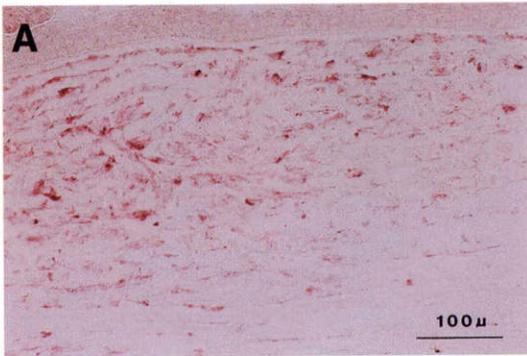


図19 モルモット角膜の酸性フォスファターゼ反応の光学顕微鏡像。A: b-FGF 移植7日目では角膜表層から中層の広い範囲で赤く染まる反応物質の沈着を認める。×170, B: 移植して3日目にb-FGFを除去し4日目の角膜では、反応物質は角膜輪部付近の新生血管が未だ残存する部位にのみ見られる。×170。

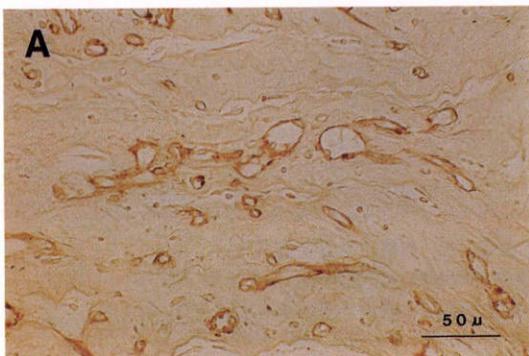


図20 角膜新生血管のラミニン染色, A: b-FGF 移植7日目では新生した血管の管腔を囲むように、またそれに連続して紐状に染色される。×340, B: 移植して3日後にb-FGFを除去し4日目では、残っている血管腔を囲むように染色されるのが観察されるとともに、紐状の染色像がめだつ(矢印)。×170。

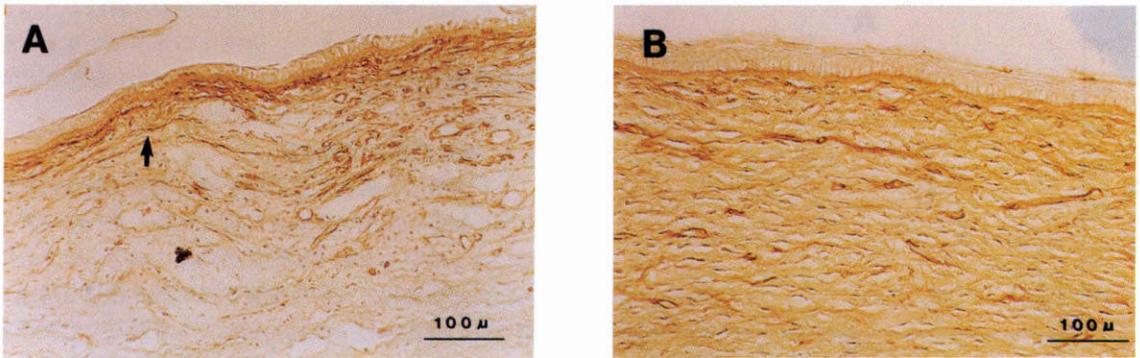


図21 角膜新生血管のフィブネクチン染色。A：b-FGF 移植7日目の角膜では、既に形成された血管腔を囲むように染色されるとともに、さらに角膜中央の未だ血管腔がない部位にも紐状に検出される(矢印)。×170, B：移植して3日目にb-FGFを除去し4日目では染色性は減少し、ほぼ管腔を形成する血管のみに検出される。×170。

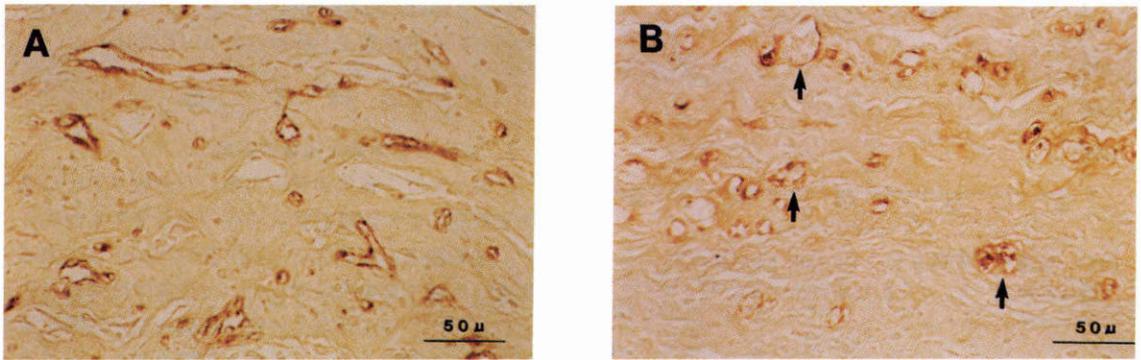


図22 角膜新生血管の血液凝固第Ⅷ因子染色。A：b-FGF 7日目の角膜では、管腔を形成する血管の内皮細胞に限局して染色される。×340, B：移植して3日目にb-FGFを除去し4日目では、血管内皮細胞に限局して染色されるが染色性は低下し、虫喰状に部分的に染色される血管が目立つ(矢印)。×340。

められなかった。新生血管の周囲は浮腫が強く、角膜実質の膠原線維束の乱れと白血球の浸潤を認めた。浸潤した白血球には酸性フォスファターゼ反応陽性の沈着物が観察されたが(図16D)、他の血管や角膜実質を構成する細胞には反応産物はほとんど検出されなかった。b-FGF移植後2週になると浮腫や白血球の浸潤は少なくなり、血管は大きな管腔を示すものが目立ち、内皮細胞と壁細胞で構成される血管は、壁が厚いものが多くみられた。

b-FGFを除去した後の角膜の新生血管は、角膜中央から輪部に向かって徐々に消退したが、b-FGFの入っていた付近は最後まで小血管が残存し、細胞増生が残った(図17)。その初期には血液が鬱滞し、血管内で

血小板が凝集したり線維素が析出して生じる血漿血栓がしばしば観察された(図18A)。b-FGFを除去して時間が経過すると内皮細胞が消失する傾向を示し、その際内皮細胞の基底膜は取り残され、赤血球がもとの管腔に留まったり(図18B)、残った内皮細胞と思われる細胞の周囲にもとの管腔を囲む形で基底膜様物質が取り残されている像が観察された(図18C)。

酸性フォスファターゼ反応を行うと、b-FGFを移植して7日目の血管新生が盛んな時期には、角膜表層から中層の広い範囲に反応陽性物質の沈着を認めたが(図19A)、b-FGFを除去した角膜では、角膜輪部付近の新生血管が未だ残存する部位にわずかに反応物質を認めるのみであった(図19B)。

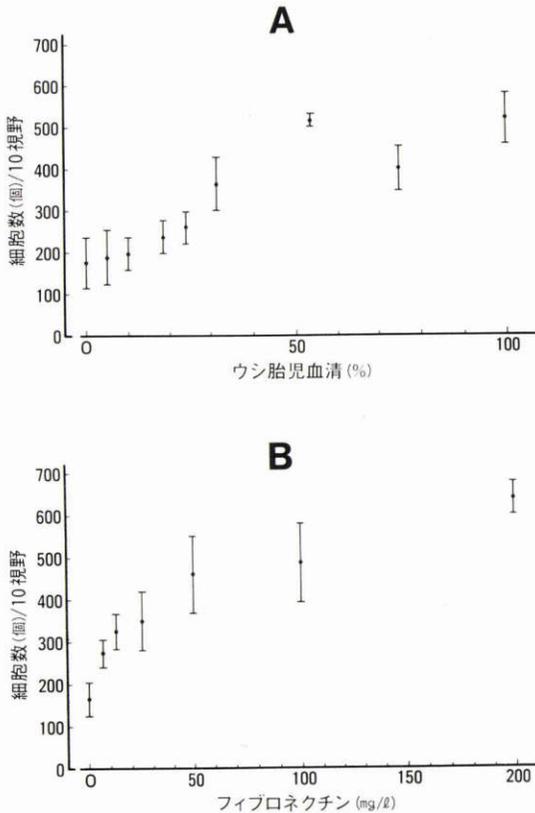


図23 培養ウシ網膜血管の Boyden Chamber による遊走能検定。A: ウシ胎児血清 (n=5)。B: フィブロネクチン (n=5)。

これらの血管形成過程と消退過程における免疫組織化学を行うと、ラミニンとIV型コラーゲンは新生した血管にもなって管状に、またはそれに連続する新生血管の最先端で紐状となって検出され(図20A)、消退する過程では血管腔としての構造が完全に消失してしまった部分にも紐状に検出された(図20B)。

フィブロネクチンは新生血管の血管腔に沿って検出されたが、血管が新生される過程で血管腔がまだ形成されていない、もっと角膜中央に近いところにも紐状に認められた(図21A)。血管新生が完成するb-FGF移植後2週では、ほぼ血管周囲のみに限って検出された。b-FGFを除去した後の消退過程では、明かな血管腔を形成して残っている血管のみに陽性で、それ以外の部位には検出されなかった(図21B)。

血液凝固第VIII因子は、血管新生過程にある角膜では新生血管腔を取り囲んで均一に検出され、管腔を形成する部位以外には陰性であった(図22A)。一方、消退

過程にある角膜では、やはり管腔を取り囲むように検出されたが均一ではなく、染色性が低かったり、管腔を取り囲む細胞の一部のみが虫喰い状に染色された(図22B)。

### 3. 網膜血管の組織培養

ウシ網膜より採取した血管片は、培養4週目には数石状に細胞が配列するようになったが、さらに培養を続けると重層化を示す線維芽細胞様の細胞が出現始めた。そのため、今回の実験には培養2週目の時点で遊走能の検定を行ったが、それでも実験系の培養細胞には、内皮細胞とともに一部線維芽細胞様細胞が含まれていた。

培養内皮細胞の遊走を促進したものはウシ胎児血清とフィブロネクチンだけで、血小板由来成長因子、プロスタグランジンには遊走能の促進はみられなかった。濃度依存性については、ウシ胎児血清50%にて対照の約3倍(図23A)、フィブロネクチン200mg/lにて対照の約4倍の遊走が認められた(図23B)。

## IV 考 按

### 1. ヒト硝子体新生血管の形態

人眼における新生血管のうち、今回取り上げた増殖糖尿病網膜症や網膜静脈血栓症の硝子体新生血管の中で、増殖糖尿病網膜症では摘出眼球や硝子体手術時に採取した硝子体増殖組織において形態学的に検討されている<sup>14)~17)</sup>。硝子体新生血管は網膜血管から派生するが、元来の網膜血管とは異なり網膜血管における血液網膜柵の組織学的基盤になる血管内皮細胞のtight junction (zonula occludens)が欠如し、しかも脈絡膜血管にみられる窓 (fenestration)が検出されることが報告されている。これらの形態学的特徴は、新生血管は網膜血管と違って血液網膜柵を欠き、血液中の比較的大きい蛋白粒子をも血管外に漏出させることを意味し、蛍光眼底撮影を行った際に造影剤が血管外に漏出し、新生血管の周囲に綿花様の蛍光が検出される組織学的な裏付けとなる<sup>18)</sup>。

新生血管の内皮細胞にアクチン様の細線維が認められたが、これは新生血管の内皮細胞が収縮する可能性を示唆する。高血圧などの病的状況下では、内皮細胞に平滑筋にみられるのと同様な筋原線維が集積し、この線維の収縮により内皮細胞が収縮して隣合う内皮細胞間の接合が離解し、このために血管内腔の血漿成分が血管外に漏出すると考えられている<sup>19)</sup>。今回検出されたアクチン様線維も、内皮細胞の収縮を促しさら

に内皮細胞間を離解させて、新生血管が内腔の血液成分を血管外に漏出するという特徴を助長させている可能性がある。

自然経過の中で、あるいは光凝固などの治療を加えた後で、新生血管がその勢いを減じて白線化し、消退するのがしばしば見られる。新生血管の白線化は、本来の血管内腔に赤血球がなくなり、他の細胞や線維を主体とした結合織で置き替わったために観察される現象と考えられる。血管内腔の閉塞は、硝子体新生血管で見られる限り、血小板を主体とした血栓の形成によるのみでなく、中間線維を細胞質に持つグリア細胞の細胞突起によるものもあることが観察された<sup>14)</sup>。グリア細胞がどこから血管壁を破壊して血管腔に入り込み、なぜ血管を閉塞するような動態を取るのかは不明である。閉塞した血管は、最終的にはわずかな線維性結合織を残して消失するものと思われるが、消退する経過の中で血管内腔がなくなった後も基底膜様物質や空胞変性を示す壁細胞様の細胞が観察され、血管壁を構成する成分はある程度の期間残されることがわかった。

## 2. 眼内血管新生の実験モデル

サル、ウサギ、イヌ等の動物を用いた眼内新生血管モデルの試みは多数行われており、臨床でみる人眼の新生血管の原因や病態の解明と治療方法の開発に大きく貢献している<sup>21)8)20)~25)</sup>。ことに硝子体の新生血管においては糖尿病病態、網膜血管の閉塞、酸素濃度の調節、外傷、眼圧、硝子体内細胞移植など様々な方法により新生血管を作成する試みがされている。虹彩新生血管はサル眼において比較的普遍的に作ることが出来ることが知られており、内皮細胞の分裂能を含めた生物学的解析も行われている<sup>26)</sup>。また、網膜下新生血管は網脈絡膜境界を破壊するような組織破壊を加えた後に発生することが確かめられており、この新生血管の病態はかなり深く追及されている<sup>27)28)</sup>。

血管新生因子である b-FGF は、角膜に移植することにより、かなり再現性のある新生血管を形成することが知られており<sup>7)</sup>、鶏卵の漿尿膜<sup>29)</sup>と同様に血管新生の生物学的解析に応用されている。そこで今回行った動物実験において、硝子体にも b-FGF の移植を試みた。硝子体に移植する b-FGF の量については、ウサギを用いた予備実験で 250ng, 500ng, 1 $\mu$ g のそれぞれを移植して血管新生の再現性を検討した結果、1 $\mu$ g が最も安定した結果が得られることが確認され（未発表成績）、硝子体移植には統一して 1 $\mu$ g を用いた。

b-FGF を移植したサル眼には、虹彩新生血管と硝子

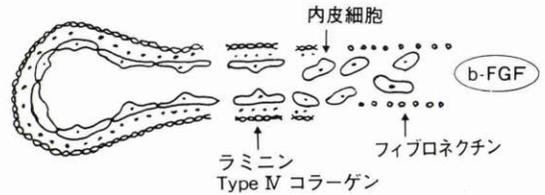


図24 血管新生過程の模式図。b-FGF を含めた血管新生の刺激があると、フィブロネクチンは血管新生の現場の最先端にあって内皮細胞の増殖と遊走を促す。ラミニンやIV型コラーゲンは、血管として完成したもの、または完成しつつある内皮細胞に付随して見られる。(Form DM, Pratt BM, Madri JA. Lab Invest, 55: 521-530, 1986.<sup>40)</sup>を改変)

体新生血管が形成された。虹彩新生血管は実験眼全てに生じ、実験モデルとしてはかなり均一な普遍的なものである印象を受けた。硝子体新生血管は、膠原線維の強い増生をとまなっており、肉眼的所見からは増殖糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症に見られるような、硝子体中に樹枝状の新生血管樹（いわゆる vascular frond）を作ることはなく、臨床でしばしば見る第一次硝子体過形成遺残（前部型）に類似していた。前房に面した虹彩新生血管の周囲には、本来ある虹彩血管以外に新生血管の起源となる血管がないという位置的關係から、虹彩新生血管の起源は虹彩血管であると推測される。一方、硝子体新生血管の起源は、連続切片により光学顕微鏡的に網膜血管と毛様体扁平部に近い毛様体実質血管の両方にあることが証明された。高度の線維性増殖組織を伴った新生血管なので、どちらが優位であったのか、どちらが先に現われたのかは今回の実験では明かではないが、網膜がある後極部側では網膜血管が、鋸状縁より前方の網膜がない部位では脈絡膜血管が、それぞれ硝子体新生血管の起源となることを示唆するものと思われる。虹彩新生血管と硝子体新生血管の形態は、人眼の硝子体新生血管とほぼ同様な、内皮細胞と壁細胞から構成され、壁が薄い血管には窓を認める共通の所見があり、今までの報告と相違はない<sup>25)</sup>。

ウサギの硝子体にサルと同様の b-FGF を移植し、新生血管の発生を観察したところ b-FGF に加えて Müller 細胞に毒性を持つアミノやアジピン酸を負荷した場合に硝子体新生血管の発生がみられた。ウサギはヒトやサルと網膜血管の分布が大いに異なり、しかも硝子体内に侵入した血管の起源が脈絡膜血管であると想像されるために、ヒトでみる新生血管の純粋なモデル

とは言い切れないかも知れないが、硝子体に血管が侵入する背景に、Müller細胞自体、あるいはMüller細胞の基底膜である内境界膜の障害があると考えられることは興味深い。さらに、網膜色素上皮細胞を障害するヨウ素酸ソーダを負荷すると、新生血管の発生が抑制されることは、網膜色素上皮細胞が血管新生抑制因子を放出するという基礎的報告や<sup>30)</sup>、糖尿病網膜症において色素上皮細胞を含めた網膜を光凝固すると増殖網膜症への進行が抑制されるという臨床報告<sup>31)</sup>とあわせて考えると、その理由が理解しやすい。

モルモットの角膜に作成した新生血管は、本来の眼内新生血管とは言い難いかも知れないが、血管新生の実験モデルとして既に確立された方法で、腫瘍細胞、化学物質、化学走性物質、成長因子などによって形成される血管新生過程を細胞の伸展、周囲環境の変化、血管退縮過程の病態などについて深く研究されている<sup>32)~39)</sup>。今回は、新生血管の形成過程と退縮過程にある環境の様態を解明するために、あえて角膜新生血管を用いて研究した。もともと血管のない角膜に血管が侵入すると、臨床的には角膜混濁を伴うことが多く、治療をする立場からは頭を悩ませる問題となるが、新生血管を研究する立場からすると肉眼的につぶさに見える角膜は研究の格好の材料となる。腫瘍細胞を初めとして、外傷や薬物による刺激で角膜に新生血管を作り、*in vivo*での新生血管に関連する諸問題を解明した報告は紙面に埋め尽くせない。我々は、通常の光学顕微鏡と電子顕微鏡に加えて免疫組織化学の手法を用い、血管内皮細胞とそれに付随する細胞周囲の物質について検討を加えた。

### 3. 血管新生とその進展

血管新生には、血管内皮細胞の増殖と遊走が必須である。その引金となる血管内皮細胞の基底膜の破壊が必要であり、増殖し遊走した内皮細胞が基底膜を再生し、新たな血管腔を形成して血管新生が完成する<sup>40)41)</sup>。しかし、血管新生の行程は上記の言葉で現わされるほど単純なものではなく、その各々の過程に様々な蛋白を主体とした促進因子と抑制因子が絡み合っているとされている<sup>45)</sup>。内皮細胞の増殖因子がどのようなものであり、抑制因子とどの様に絡み合っているかという生物学的な問題については、今回の報告で取り上げず、おもに血管が新生してくる過程で起こる周囲の環境の変化について検討した(図24)。

新生した血管の形態は、壁が薄く内皮細胞に窓の形

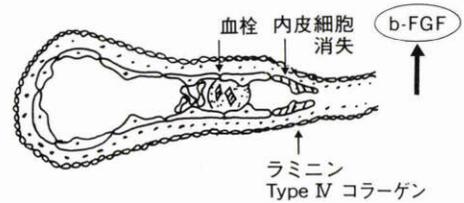


図25 新生血管の退縮過程の模式図。b-FGFなどの血管新生因子が除去されると、血管内には血栓が形成され内皮細胞は消失する。このとき、フィブロネクチンは早期から活性がなくなり、ラミニンやIV型コラーゲンは内皮細胞が消失した後も残存する。

成を認めるなど、血管の構造に関する限りヒトにおける新生血管と類似していた。ただし、モルモットの角膜においては、他の報告にみられるような<sup>36)</sup>窓構造は認められなかった。血管が新生する過程で、内皮細胞にみられる発芽(budding)や細胞突起(protrusion)、細胞内小器官の発達した活性の高い内皮細胞などの形態は、既に報告されているものと同様の内容である<sup>35)</sup>。

血管の新生に際して、基底膜を破壊するための蛋白融解酵素であるコラーゲナーゼやプラスミノゲンアクチペーターが、内皮細胞から分泌されることが知られている<sup>42)43)</sup>。これらの酵素の基底膜を融解する機構については、抑制因子をも含めてかなり詳細にわたり検討されている。今回の動物実験で、ライソゾーム酵素の分布について検索したところ、サル眼では組織間の境界であるBruch膜や内境界膜などのさらに大きな単位としての周囲組織が破壊される際に、またモルモット角膜においても実質の膠原線維層に大きな障害が加えられる際に、酵素活性が亢進していることが明らかとなった。眼内のライソゾーム活性についてのいくつかの研究があるが、多くは病的侵襲を加えた際に活性が上昇する事が判っており<sup>44)~46)</sup>、少なくともこの実験系に関する限り、血管新生の過程においては周囲組織に対する侵襲が伴われているものと解釈される。

増殖した内皮細胞が遊走し、遊走した先で周囲にある結合織と親和することを促す物質として、フィブロネクチンが注目されている<sup>47)</sup>。この物質は、血管内皮細胞のDNA合成を刺激し、内皮細胞の増殖や接着を促進することが知られており、眼科臨床においては角膜上皮障害をもたらす種々の疾患に対して実際に応用されている<sup>48)</sup>。今回、角膜での検索では、フィブロネクチンは明らかに管腔を形成する新生血管の周囲に検出されたが、さらに角膜中央のまだ血管腔が形成されてい

ない部位にも活性がみられた。このことは、フィブロネクチンは遊走した内皮細胞、つまりまだ血管としての形態を作らず、機能を発揮するにいたらない段階の細胞を組織間に引き留めておくという作用があり、血管新生の最前線で大きな役割を演じていることを示唆する。このような血管内皮細胞に対するフィブロネクチンの遊走能に関する検討は、おもに大動脈内皮細胞を使った実験で行われており、網膜血管に対して同様な作用があるか否かは不明であった。今回のウシ培養網膜血管内皮細胞による遊走能の検討により、フィブロネクチンは他の薬剤にみられない促進効果を有することが証明され、眼内血管新生、ことに網膜から派生する硝子体新生血管の発生に、フィブロネクチンが関与する可能性が強く示唆された。

遊走した内皮細胞が、血管壁を構成する成分としての形態または機能の上で分化しているか否かを間接的に検討する手段として、基底膜に関連する蛋白成分であるラミニンとIV型コラーゲンとの関連性を調べた。両者とも血管腔を形成する新生血管に沿って、またはそれから枝別れして検出された。完全に血管腔を形成するものには基底膜が全周を囲むのに対し、遊走しつつある内皮細胞では部分的に基底膜が形成されていた。電子顕微鏡の所見に見合うものである。これらの基底膜に関連する蛋白を、*in vitro*の実験系で内皮細胞の遊走に着目して観察すると、ラミニンが最も内皮細胞と密接な関連にある蛋白であるという報告が<sup>49)</sup>、また逆にIV型コラーゲンが遊走や成長に最も関連するという報告があるが<sup>50)</sup>、今回の *in vivo* の観察においてはラミニンとIV型コラーゲンとの間に明確な差は見られなかった。

血液第VIII因子は、分化した血管内皮細胞の表面に標識される蛋白で、明らかに血管腔を形成する細胞のみに検出され、まだ血管腔を形成しない遊走しつつある細胞には、この蛋白はないものと解釈された。

#### 4. 新生血管の退縮

一度形成された血管が退縮する過程で起こる一連の形態学的変化として、内皮細胞障害、血小板凝集、血流の鬱滞、単球の血管周囲集合、血管壁細胞の変性、大食細胞による血管残渣の除去、が起こることが報告されている<sup>36)</sup>。今回の角膜における新生血管の消退過程も、電子顕微鏡での所見はこれと一致している。ライソゾーム酵素は、b-FGF 除去後は活性が低下していたが、血管がまだ残っている部位には検出され、大食細胞の機能である変性・壊死に陥った組織を清掃する

ことは、このライソゾーム内の酵素に依存するものと想像される。

新生血管が消失する過程で見られた周囲環境、および細胞特性の変化は以下のごとくであった(図25)。

内皮細胞の分裂と遊走に関連するフィブロネクチンは、b-FGF を除去して血管が退縮をはじめると、明かな血管腔を形成するものみに検出され、他の部位には見られなかった。これは、血管が新生する時期の所見とは大いに異なり、血管が新生する時期には高い活性を持つフィブロネクチンが、血管新生の原因が除去され退縮をはじめると、速やかにその活性を失っていくものと考えられた。

ラミニンとIV型コラーゲンは管腔を形成する細胞の周囲には明らかに検出されたが、それ以外にも管腔に連続して紐状に認められた。これは、電子顕微鏡で血管としての構造はほとんど消失しているにもかかわらず、血管壁を構成していたと思われる細胞が残存し、その周囲に基底膜様の物質が残っていた所見と一致する。つまり、血管の消失過程では細胞成分、ことに内皮細胞は早い時期から消失し、線維性結合織の部類にはいる基底膜は比較的長く残存するものと考えられる。

血液凝固第VIII因子は、b-FGF を除去すると、もちろん血管腔を形成する細胞のみに検出されるが、血管が新生される時期のものとの違いは、染色が虫喰い状、つまり同じ血管でも染色される部位と染色されない部位とがあることであった。電子顕微鏡でみると、明らかに赤血球を含む管腔はあるものの、内皮細胞は部分的にしか認められず、内皮細胞が脱落した所見があり、これが虫喰い状に見える血液第VIII因子の異常染色様態の裏付けになるものと思われる。

稿を終えるにあたり、今研究にご協力とご助言をいただいた先生方に深く感謝致します。また、研究を進めるにあたり、終始あたたかいご支援をいただいた東京大学眼科教授増田寛次郎先生、東京女子医科大学糖尿病センター所長平田幸正先生、東京女子医科大学眼科教授(病院長)内田幸男先生に深謝致します。さらに、研究に多大なご援助を下さいました京都府立医科大学教授糸井素一先生、オリンピッククリック井上洋一先生に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Henkind P: Ocular neovascularization. 85: 287-301, 1978.

- 2) **Patz A** : Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 94 : 715—743, 1982.
- 3) **Archer DB** : Retinal neovascularization. *Trans Ophthalm Soc UK* 103 : 2—27, 1983.
- 4) **Folkman J, Klagsbrun M** : Angiogenic factors. *Science* 235 : 442—447, 1987.
- 5) **Glaser BM** : Extracellular modulating factors and the control of intraocular neovascularization. *Arch Ophthalmol* 106 : 603—607, 1988.
- 6) **Sivelingam A, Kenny J, Brown GC, et al** : Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108 : 869—872, 1990.
- 7) 須藤勝一, 藤田 剛 : 新生血管とその制御—新薬開発研究の立場から—, *眼紀* 40 : 1431—1443, 1989.
- 8) **Langer R, Folkman J** : Polymers for the sustained release of proteins and other molecules. *Nature* 263 : 797—799, 1976.
- 9) 橋本 恵, 根木 昭, 河野真一郎, 他 : Amino adipic acid の家兎網膜における作用点は Müller 細胞か Synapse か—組織学的検討—, *日眼会誌* 96 : 348—352, 1982.
- 10) 石川祐二郎, 三根 茂 : アミノアジピン酸の網膜グリア細胞毒性に関する形態学的研究, *日眼会誌* 86 : 810—820, 1982.
- 11) **Kitano S, Hori S, Nagataki S** : Transport of fluorescein in the rabbit eye after treatment with sodium iodate. *Exp Eye Res* 46 : 863—870, 1988.
- 12) **Buzney SM, Massicotte SJ, Hetu N, et al** : Retinal vascular endothelial cell and pericytes. Differential growth characteristics in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 470—480, 1983.
- 13) **Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ** : A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Meth* 33 : 239—247, 1980.
- 14) **Taniguchi Y** : Ultrastructure of newly formed blood vessels in diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 20 : 19—31, 1976.
- 15) **Wallow IH, Geldner PS** : Endothelial fenestration in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 1176—1183, 1980.
- 16) 堀 貞夫, 箕田健生, 田野保雄, 他 : 増殖性糖尿病性網膜症における新生血管の微細構造, *眼紀* 33 : 439—444, 1982.
- 17) **Williams JN, de Juan E, Machemer R** : Ultrastructural characteristics of new vessels in proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 105 : 491—499, 1988.
- 18) **de Juan E Jr, Willson D, Hatchell D** : Breakdown of the blood-retinal barrier in a model of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1108—1115, 1987.
- 19) **Suzuki K, Ookawara S, Ooneda G** : Increased permeability of the arteries in hypertensive rats. An electron microscopic study. *Exp Mol Path* 15 : 198—208, 1971.
- 20) **Shabo AL, Maxwell DS** : Insulin-induced immunogenic retinopathy resembling the retinitis proliferans of diabetes. *Tr Am Acad Ophthalmol* 81 : OP497—496, 1976.
- 21) **Tano Y, Chandler D, Machemer R** : Retinal neovascularization after intravitreal fibroblast injection. *Am J Ophthalmol* 92 : 103—109, 1981.
- 22) **Algvère P, Martini B** : Experimental intravitreal proliferation and neovascularization in the cynomolgus monkey. *Geaefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 224 : 69—75, 1986.
- 23) **Shiraki K, Burns MS** : Neovascularization in urethane rat retinopathy by thymidine labeling. *Cur Eye Res* 5 : 683—695, 1986.
- 24) **Zhu ZR, Goodnight R, Sorgente N, et al** : Morphologic observations of retinal pigment epithelial proliferation and neovascularization in the rabbit. *Retina* 9 : 319—327, 1989.
- 25) 佐野貴之, 山根淳志, 戸倉敬雄, 他 : 実験的網内組織増殖に関する形態学的研究, *日眼会誌*(印刷中).
- 26) **Gu XQ, Fry GL, Lata GF, et al** : Ocular neovascularization. Tissue culture studies. *Arch Ophthalmol* 103 : 111—117, 1985.
- 27) **Ishabashi T, Miller H, Orr G, et al** : Morphologic observation on experimental subretinal neovascularization in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1116—1130, 1987.
- 28) 沖坂重邦 : 黄斑部疾患の基礎と臨床 1. 老人性黄斑変性症の形態学的研究, *日眼会誌* 92 : 1261—1286, 1988.
- 29) **Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J** : Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Path* 79 : 597—618, 1975.
- 30) **Glaser BM, Campochiaro PA, Davis JL, et al** : Retinal pigment epithelial cells release an in-

- hibitors of neovascularization. *Arch Ophthalmol* 103: 1870—1875, 1985.
- 31) **Diabetic Retinopathy Study Group**: Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: Clinical application of diabetic retinopathy findings (DRS report No 8). *Ophthalmology* 88: 583—600, 1981.
- 32) **Yamagami I**: Electron microscopic study of the cornea. I. The mechanism of experimental new vessel formation. *Jpn J Ophthalmol* 14: 41—58, 1970.
- 33) **Gimbrone MA, Cotran RS, Leapman SB, et al**: Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52: 413—527, 1974.
- 34) **Former CH, Klintworth GK**: An evaluation of the role of leucocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. I. Comparison of experimental models of corneal vascularization. *Am J Path* 79: 537—554, 1975.
- 35) **Ausprunk DH, Folkman J**: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53—65, 1977.
- 36) **Ausprunk DH, Falterman K, Folkman J**: The sequence of events in the regression of corneal capillaries. *Lab Invest* 38: 284—294, 1978.
- 37) **Muthukkaruppan Vr, Auerbach R**: Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 205: 1416—1418, 1979.
- 38) **Berman M, Winthrop S, Ausprunk D, et al**: Plasminogen activator (urokinase) causes vascularization of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 191—199, 1982.
- 39) **Schanzlin DJ, Cyr RJ, Friedlaender MH**: Histopathology of corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 101: 472—474, 1983.
- 40) **Form DM, Pratt BM, Madri JA**: Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest* 55: 521—530, 1986.
- 41) **菅 幹雄**: 血管内皮細胞と血管新生. *代謝* 25: 895—901, 1988.
- 42) **Gross JL, Moscatelli D, Jaffe EA, et al**: Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 95: 974—981, 1982.
- 43) **Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, et al**: Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105: 2535—2541, 1987.
- 44) **Hori S, Nishida T, Mukai N**: Ultrastructural studies on lysosomes in retinal Müller cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1295—1300, 1980.
- 45) **Hori S, Yamashita H**: Histochemical studies of lysosomes in proliferative vitreoretinopathy. In *Excerpta Medica International Congress Series No 671*, 73—80, Elsevier Sci Pub BV Ophthalmology, 1984.
- 46) **北野滋彦, 山下英俊, 石雄康雄, 他**: 実験的網膜剝離における網膜色素上皮細胞—ライソゾーム酵素の組織化学的研究—, *あたらしい眼科* 4: 427—432, 1987.
- 47) **Maciag T, Hoover GA, Stemeran MB, et al**: Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 91: 420—426, 1981.
- 48) **西田輝夫**: フィブネクチンの眼科応用. *眼科* 27: 1113—1118, 1985.
- 49) **Form DM, Pratt BM, Madri JA**: Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest* 55: 521—530, 1986.
- 50) **Roberts JM, Forrester JV**: Factors affecting migration and growth of endothelial cell from microvessels of bovine retina. *Exp Eye Res* 50: 165—172, 1990.