

網膜外層障害モデルにおける脈絡膜循環の研究

第2報 モノヨード酢酸投与による慢性期の変化について

那 須 好 滋

岡山大学医学部眼科学教室

要 約

網膜外層の選択的障害後の脈絡膜循環を検討するために、モノヨード酢酸を白色ウサギに40mg/kg 静注して実験モデルを作成した。静注3カ月後、6カ月後に水素クリアランス法を用いて脈絡膜組織血流量を測定し、光学顕微鏡と電子顕微鏡で組織学的に対比して検討した。脈絡膜組織血流量はモノヨード酢酸静注3カ月後、6カ月後でそれぞれ対照に比して約19%、約22%の有意な減少が認められた。組織学的には3カ月後と6カ月後では明らかな違いはみられず、いずれの群においても、視細胞層は完全にグリア組織に置き換えられていたが、網膜色素上皮細胞はほぼ正常なもの、増殖性の変化を示すもの、崩壊しつつあるもの、完全に消失してしまったものなど様々であった。脈絡膜毛細血管は色素上皮細胞の残存しているところでは管腔が認められたが、色素上皮細胞が消失しているところでは管腔は閉塞、消失していた。また網膜色素上皮細胞が残存している急性期と比較すると色素上皮細胞が消失しているものでは脈絡膜組織血流量は有意に減少していた。以上のことより網膜外層障害モデルの慢性期の脈絡膜組織血流量は、網膜外層の変性消失に続発した脈絡膜の器質的な変化を伴って減少すると結論した。(日眼会誌 94:152-159, 1990)

キーワード：網膜外層障害モデル、水素クリアランス法、脈絡膜組織血流量、モノヨード酢酸

Choroidal Blood Flow in Chronic Stage of Selective Retinal Damage after Monoiodoacetic Acid Injection

Koji Nasu

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

The present study was carried out to determine changes in the choroidal circulation after a long period following selective damage of the outer layer of the retina. Monoiodoacetic acid was given to rabbits via an ear vein at a dosage of 40mg/kg. The choroidal blood flow (CBF) at three and six months after selective damage was measured by the hydrogen clearance method and histological change was studied by light and electron microscopy. CBF decreased by 19% at three months and 22% at six months, the values in the experimental groups being significantly less than those of controls. Histological findings at six months were essentially the same as those at three months. The outer layer of the retina was totally replaced by glial cells. Some retinal pigment epithelial cells (RPE) had disappeared. The remaining RPE indicated proliferative or atrophic changes. At the site where RPE had disappeared, fibrous changes were evident in the inner layer of the choroid and choriocapillaris

別刷請求先：700 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 那須 好滋

(平成元年7月10日受付, 平成元年9月11日改訂受理)

Reprint requests to: Koji Nasu, M.D. Dept. of Ophthalmol., Okayama Univ. Medical School
2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(Received July 10, 1989 and accepted in revised form September 11, 1989)

were lost. CBF at this site decreased significantly compared to that of the acute stage following monoiodoacetic acid administration. The outer layer of the retina, particularly RPE, may be reciprocally related to CBF and modulate choroidal angio-architecture. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 152-159, 1990)

Key words: Outer layer of the retina, Monoiodoacetic acid, Choroidal blood flow, Retinal pigment epithelial cells

I 緒 言

網膜外層は脈絡膜循環によって栄養されているので、脈絡膜の循環障害により網膜変性が生じるのは周知である¹⁾。しかし逆に網膜外層の選択的障害により脈絡膜循環がどのように変化するかについてはよく知られていない。そこで著者は前報²⁾においてモノヨード酢酸を白色ウサギに静注することにより作成した網膜外層障害モデルについて静注1日後から21日後の比較的急性期の脈絡膜組織血流量を水素クリアランス法を用いて測定し組織所見と対比して検討した。その結果、脈絡膜組織血流量はモノヨード酢酸静注1日後より有意に減少した。そしてその原因は視細胞の変性、消失に伴う血液需要の低下によると推測した。また網膜色素上皮細胞が脈絡膜循環に関与していることが示唆された。そこで網膜外層と脈絡膜循環の関係をさらに明確にするために今回は静注3カ月後、6カ月後の慢性期について検討した。

II 実験方法

1. 実験材料

実験材料としては、眼底検査および網膜電図で異常の認められない体重2.5kg~4.3kgの成熟白色ウサギを対照群に6匹8眼、3カ月群(モノヨード酢酸を静注して3カ月経過したもの)に4匹8眼、6カ月群(モノヨード酢酸を静注して6カ月経過したもの)に5匹10眼の15匹26眼を用いた。

2. 脈絡膜組織血流量の測定

1) 網膜外層障害モデルの作成

モノヨード酢酸(片山化学)を生理食塩水で3%に希釈し、40mg/kgを耳静脈より静注した。そして約24時間後に網膜電図(ERG)がnonrecordableになったことを確認したのち3カ月および6カ月経過したものを対象とした。そして3カ月後および6カ月後にもERGを測定した。なおERGの測定は20分間の暗順応を行なった後、ポータブルERG(PE-200, 東洋メディ

カル社)を用いて測定した。関電極は動物実験用電極(興和)を角膜上に装着し、不関電極および接地電極は鋼鉄針を用い、前額部と片側の耳の皮下に刺入した。

2) 麻酔方法

耳静脈に22G エラスター針を挿入留置し、pentobarbital sodium 25.9mg/kg (Somnopenyl® 0.4ml/kg)を3分間かけて静注し、以後適宜追加した。

3) 手術

下眼瞼を切除し結膜、下直筋、下斜筋を切離した。制御糸にて眼球を上転させ下部強膜を露出した。手術用顕微鏡観察下に下鼻側、下耳側の2本の渦静脈の間で、輪部から13mmの部に剃刃にて強膜にほぼ全層にわたる小切開を加えた。この部より脈絡膜に接するように直径300 μ mの針状電極(UHE100, ユニークメディカル)を刺入し脈絡膜に留置した。また血型不関電極(UHE-001, ユニークメディカル)を背部皮下に埋没させた。

4) 脈絡膜組織血流量の測定方法

血流量の測定には水素クリアランス組織血流計(デジタルUHメーターMHG-D1, ユニークメディカル)を使用した。呼吸が安定していることを確認したのちに、Fig. 1に示すように水素ガス0.3~0.6l/minを開放的に20秒~1分間経鼻的に投与し、連続的にデジタル表示される数値で最も安定したものを採用した。同時にUHメーター用LOG-AMP(LOG-100, ユニークメディカル)を用いて、卓上型自動平衡記録計(U-228, 日本電子科学)に記録してクリアランス曲線が安定していることを確認した。測定は水素クリアランス曲線の基線が安定した後、10分間隔で7回(1時間)測定し、最大値、最小値を除いて平均値を求め代表値とした。

3. パラメーターの測定

1) 血圧、脈拍の測定: 各群2匹ずつ脈絡膜組織血流量測定後に、22G エラスター針を大腿動脈に挿入し、圧力トランスデューサー(MPU-0.5A, 日本光電)に接続し、ペンレコーダー(VP6523A, ナショナル)で

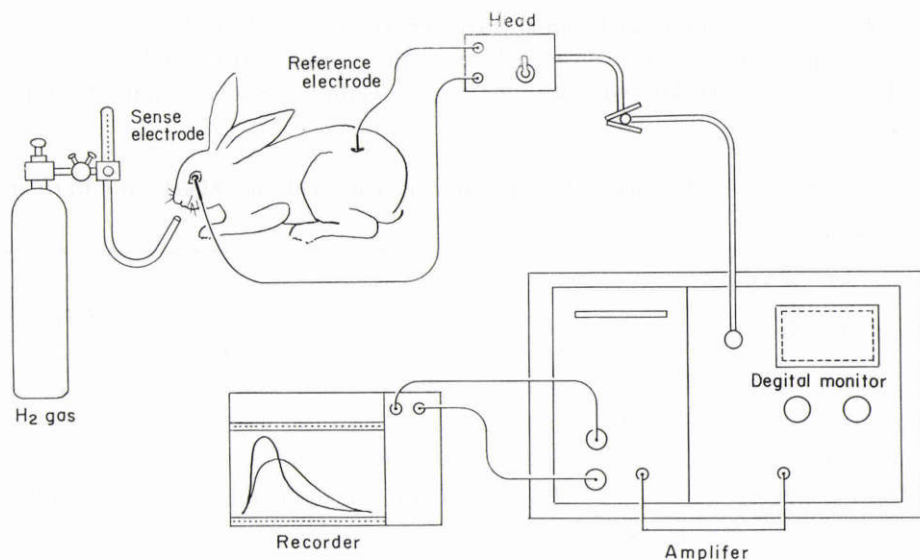


Fig. 1 Schematic diagram of choroidal blood flow measurement by the hydrogen clearance method.

記録した。

2) 眼圧の測定：脈絡膜組織血流量測定前にハンドアプラーネーションノメーター（HA-1, 興和）にて測定し、その値をウサギの眼圧³⁾に換算した。

4. 病理組織学的観察

1) 光学顕微鏡標本の作成

血流量測定後に眼球を摘出し Zenker 液に固定した。その後パラフィンに包埋しマッソン染色を行った。

2) 電子顕微鏡標本の作成

血流量測定後に摘出した眼球をただちに2.5%グルタルアルデヒド（pH 7.4, 0.1M 磷酸緩衝液にて希釈）で30分間固定したのちに眼球を2分割し、さらに同液で3時間固定した。実体顕微鏡下で関電極の刺入部位を確認したのち、その部位を切り出し、1%四酸化オスミウム（pH 7.4, 0.1M 磷酸緩衝液にて希釈）で2.5時間固定した。その後エタノール系列で脱水しエポンに包埋後超薄切片を作成し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色をおこない、HS-9型電子顕微鏡（日立）で観察した。

III 結 果

1. 網膜電図

3カ月群および6カ月群ともすべて nonrecordable であった (Fig. 2)。

2. 脈絡膜組織血流量

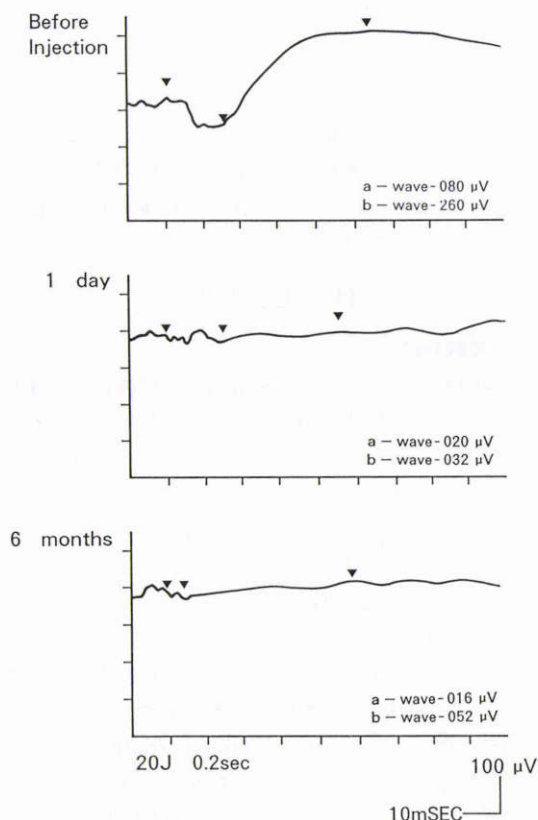


Fig. 2 Change in ERG following moniodoacetic acid administration.

Table 1 Change in choroidal blood flow.

	n	choroidal blood flow (ml/min/100 g) Mean±SD
Control	8	224.1±16.8
3 months	8	*182.0±36.6
6 months	10	****173.8±30.6

n : Number of samples.
*,**** : Statistically significant change.
* p<0.02 **** p<0.002

Table 2 Change in parameter. Figures indicate mean values.

	Control	3 months	6 months
blood pressure (mmHg)	96	111.0	103.0
pulse (/min)	264	268.0	288.0
intraocular pressure (mmHg)	17	17.5	17.9

脈絡膜組織血流量は、対照群 (n=8) : 224.1±16.8(ml/min/100g, 平均±標準偏差), 3 カ月群(n=8) : 182.0±36.6, 6 カ月群 (n=10) : 173.8±30.6, と3 カ月群, 6 カ月群ともに対照群に比して, それぞれ約19%, 約22%の有意な減少が認められた (Table 1).

なお, 統計学的処理はまず比較する2群の等分散検定を行い, 2群の母分散が等しい場合には通常対応のない平均値の差の検定を, 母分散が等しいとはいえない場合には Welch の方法を用いて平均値の差の検定を行った.

3. パラメーター

血圧, 脈拍, 眼圧において, 3 カ月群, 6 カ月群ともに対照に比してモノヨード酢酸静注による有意な変化は認められなかった (Table 2).

4. 病理組織学的所見

1) 3 カ月群と6 カ月群の間には明らかな違いはみられず, いずれの群も網膜色素上皮細胞と脈絡膜内層の変化の程度は様々であった. 顕微鏡で観察すると, 後極部を中心に網膜外層の変性, 消失が著明に認められ, 周辺部へ行くにしたがって変性の程度は軽くなっていた. 変化の著明な部位では視細胞は完全に消失し, 内顆粒層さえも消失しているところもあった. 網膜色素上皮細胞および脈絡膜内層の変化の少ないものでは,

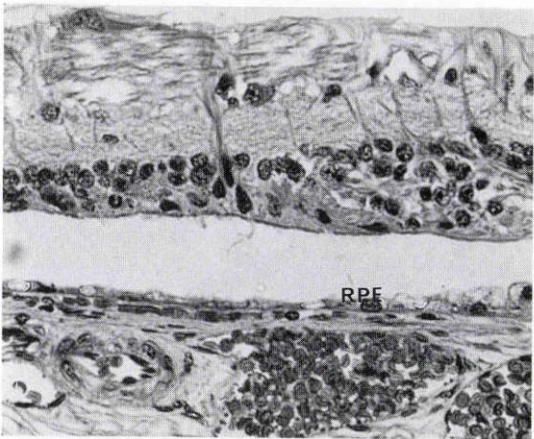


Fig. 3 Light micrograph of the retina and the choroid, six months after moniodoacetic acid injection. Visual cells are absent. Retinal pigment epithelial cells (RPE) and choriocapillaris (CC) still remain. (Masson stain original magnification ×132)

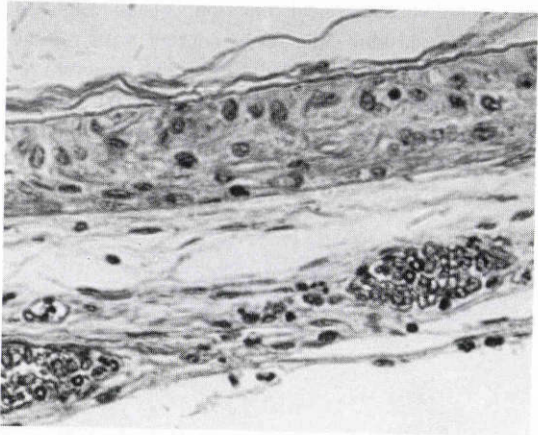


Fig. 4 Light micrograph of the retina and choroid, three months after moniodoacetic acid injection. Visual cells are absent. Retinal pigment epithelial cells (RPE) and Choriocapillaris (CC) are absent. (Masson stain original magnification ×132)

網膜色素上皮細胞は残存し脈絡膜毛細血管を認めた (Fig. 3). また変化の強いものでは網膜色素上皮細胞は消失し, 脈絡膜毛細血管はほとんど認められなかった (Fig. 4). 脈絡膜の中大血管はいずれもよく保存されていた.

また顕微鏡で観察すると変化の少ないものでは網膜色

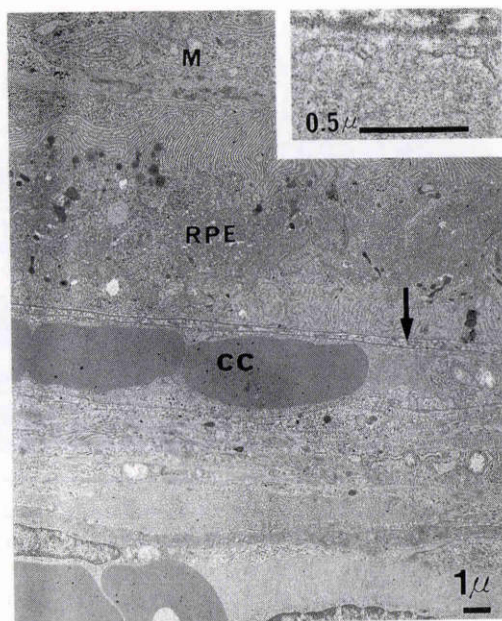


Fig. 5 Electron micrograph of the outer layers of the retina and choroid, three months after moniodoacetic acid injection. Visual cells are absent. Müller cells lie in contact with retinal pigment epithelial cells (RPE). The structure of choriocapillaris (CC) is kept normal with fenestrations. (Inset shows high magnification at the site of arrow). Bar: $1\mu\text{m}$, $\times 2,000$

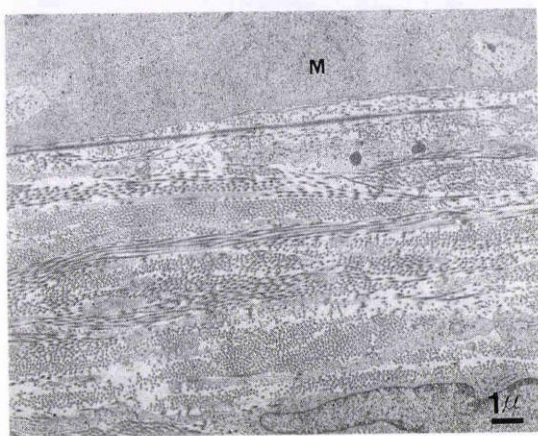


Fig. 6 Electron micrograph of the retina and choroid, six months after moniodoacetic acid injection. Visual cells and retinal pigment epithelial cells have completely disappeared and have been replaced by Müller cells (M). The choriocapillaris is replaced by fibrous tissue. Bar: $1\mu\text{m}$, $\times 2,000$

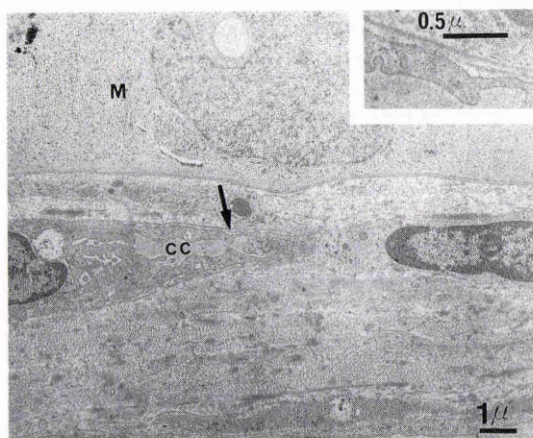


Fig. 7 Electron micrograph of the retina and choroid, six months after moniodoacetic acid injection. Visual cells and retinal pigment epithelial cells have completely disappeared. Narrow choriocapillaris (CC) is seen, but the cytoplasm of the endothelial cell is thick and fenestrations are disappeared. (Inset shows high magnification at the site of arrow). Bar: $1\mu\text{m}$, $\times 5,000$

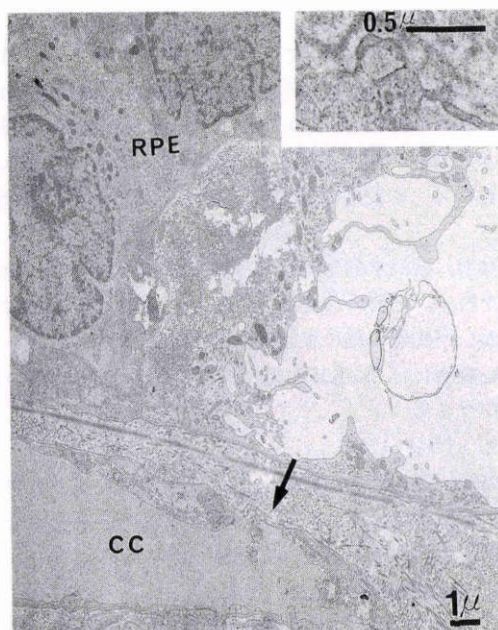


Fig. 8 Electron micrograph of the retina and choroid, six months after moniodoacetic acid injection. Visual cells have completely disappeared. The migration and collapse of retinal pigment epithelial cells (RPE) are evident. Choriocapillaris (CC) can be seen but endothelial cells are thick and there is few fenestrations. (Inset shows high magnification at the site of arrow). Bar: $1\mu\text{m}$, $\times 2,000$

素上皮細胞は扁平で microvilli がミューラー細胞の突起と interdigitation を形成していた。リソゾーム、ファゴゾームは認められなかったが、ミトコンドリアなどの細胞内小器官は認められた。脈絡膜毛細血管は保存され fenestration を認めた (Fig. 5)。変化が強いものでは網膜色素上皮細胞は完全に消失しミューラー細胞が直接ブルッフ膜に接していた。脈絡膜毛細血管は消失し増殖した膠原線維に置き変わっていた (Fig. 6)。また網膜色素上皮細胞が消失した部位で脈絡膜毛細血管は認められるものの内皮細胞の胞体は厚く管腔が狭いものもみられた (Fig. 7)。また網膜色素上皮細胞が網膜下へ増殖し重層する一方で崩壊している部位もみられた。その部位の脈絡膜毛細血管の管腔は開いている

ものの fenestration は少数認められるのみであった (Fig. 8)。

IV 考 按

モノヨード酢酸は解糖系の酵素阻害作用など³⁾により視細胞を選択的に障害し、主に網膜外層を障害する⁴⁾⁵⁾。今回の実験においてもモノヨード酢酸静注3カ月後、6カ月後とも障害の強い後極部には完全な視細胞の消失が認められた。網膜色素上皮細胞は消失、崩壊、残存など様々な所見を呈しており、増殖したり崩壊している所見は一次的な視細胞の消失に対する続発的な変化と考えられた。3カ月後と6カ月後との組織所見に差はなく、少なくとも3カ月以降はモノヨード

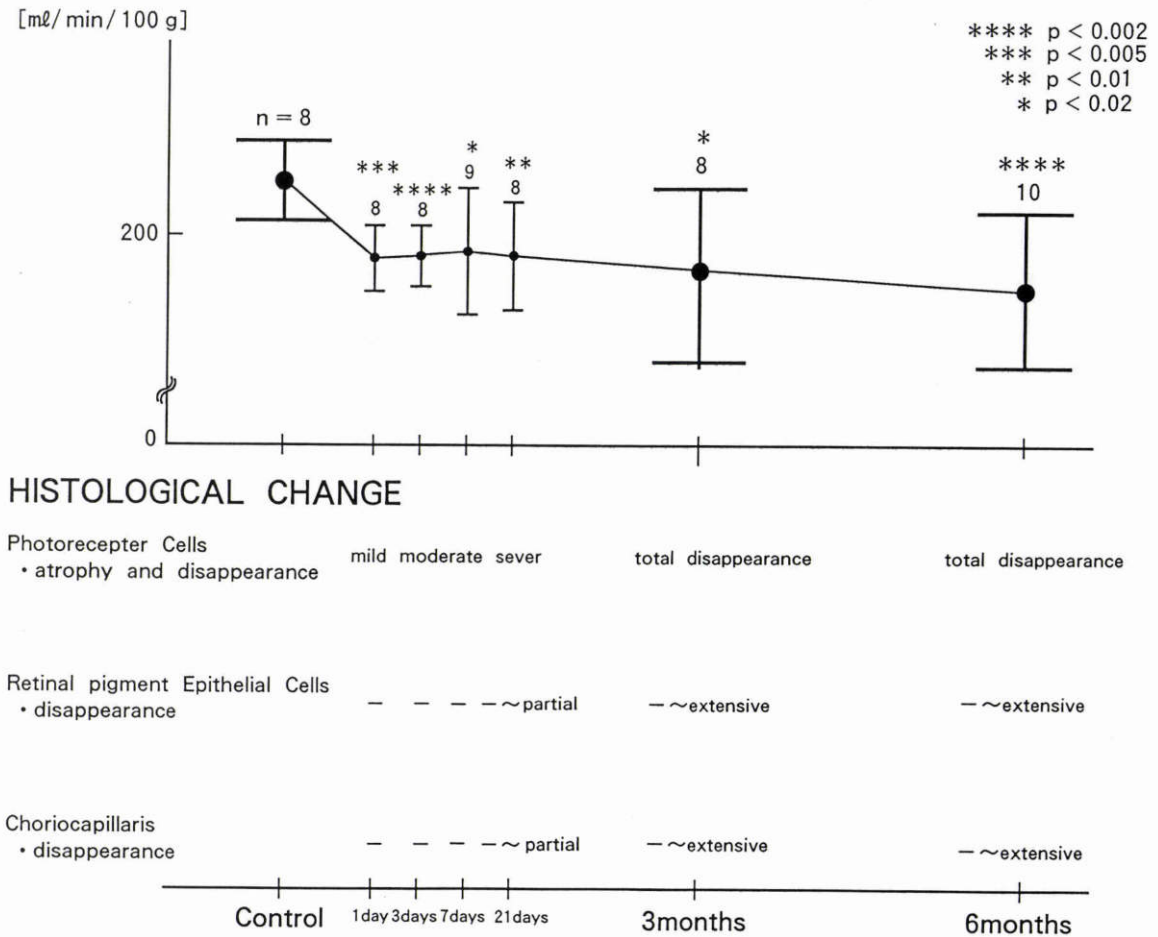


Fig. 9 Change in choroidal blood flow and the histological findings. n : Number of samples.

*, **, ***, **** : Statistically significant change.

酢酸静注による進行性の変化はないと思われた。

脈絡膜組織血流量はモノヨード酢酸静注3カ月後、6カ月後のいずれについても対照に比して有意に減少していた。この減少の原因を組織所見と対比して推測すると、一つには栄養の供給先である視細胞および網膜色素上皮細胞の変性、消失により血液需要が減少したことによると考えた。このことは前報¹⁾において視細胞に変化が認められるが脈絡膜にはなんの変化も認められない時期においてすでに脈絡膜組織血流量の減少が認められたことより推測した。また一つには網膜外層の変化に続発したと考えられる脈絡膜毛細血管の管腔の狭窄、閉塞および血管の間質の線維成分の増殖が見られ、これらの器質的な変化により脈絡膜血管が減少し、脈絡膜血管抵抗の増大したためと考えた。

つぎに前報、すなわち急性期と今回の慢性期を比較する。前報の急性期の変化を含めた脈絡膜組織血流量の経時的変化をFig. 9に示す。慢性期は急性期に対して減少傾向は認められるものの有意な差は認められなかった。組織学的には慢性期には前述したごとく脈絡膜毛細血管の管腔の狭窄、閉塞および血管の間質の線維成分の増殖など脈絡膜内層に器質的な変化が見られた。網膜色素上皮細胞も急性期に比して多彩な変化が見られ、増殖性の変化を示すもの、崩壊しつつあるもの、完全に消失したものと様々であった。また網膜色素上皮細胞と脈絡膜毛細血管との関連をみると、脈絡膜毛細血管は網膜色素上皮細胞が存在するところでは認められたが、網膜色素上皮細胞が消失しているところでは閉塞、消失しており、組織学的に網膜色素上皮細胞が脈絡膜循環に関与している可能性が示唆された。つまり脈絡膜毛細血管の閉塞や消失は、モノヨード酢酸の直接作用ではなく、網膜色素上皮細胞の消失に続発した変化であると考えた。Henkindら⁷⁾やKorteら⁸⁾⁹⁾はヨウ素酸ソーダを用いて網膜色素上皮細胞に選択的変性を起こさせ脈絡膜毛細血管の萎縮が続発することから、脈絡膜毛細血管の構築には網膜色素上皮細胞が深く関与することを報告しているし、また網膜色素変性症でも脈絡膜毛細血管の変性、消失が網膜色素上皮細胞の消失に続発することが報告されており¹⁰⁾、今回の結果と一致する。

そこで網膜色素上皮細胞と脈絡膜毛細血管の関係を注目して、慢性期のものを閃電極刺入部の組織所見により網膜色素上皮細胞の残存する群と消失した群に分けてその脈絡膜組織血流量を比較した。その結果、色素上皮細胞消失群では残存群に比べて減少傾向がみら

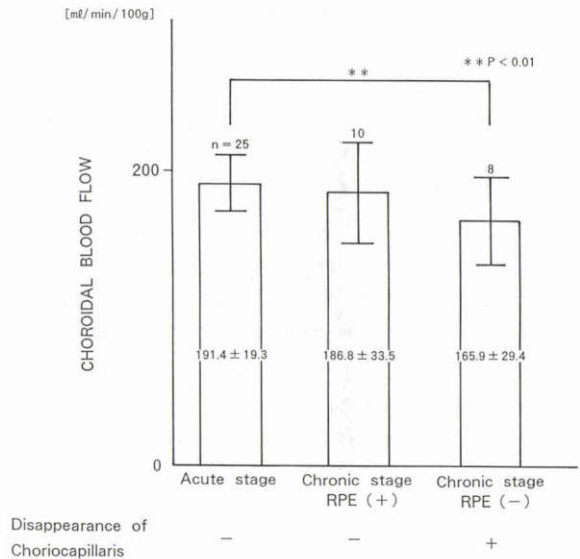


Fig. 10 Relation between retinal pigment epithelial cells and choroidal blood flow. n: Number of samples.

*: Statistically significant change.

れるものの有意差は認められなかった。また前報のモノヨード酢酸静注1日後から7日後までは色素上皮細胞の消失が認められないのでこれを一括したものを急性期群として比較すると、網膜色素上皮細胞が存在する群は急性期群との間に有意差は認められなかったが、網膜色素上皮細胞が存在しない群では急性期群との間に有意な減少傾向が認められた。これらの結果をまとめるとFig. 10のようになり、慢性期色素上皮細胞消失群が急性期群より有意に減少していたことから、網膜色素上皮細胞の消失による脈絡膜毛細血管の閉塞、消失などの組織学的変化に伴い実際の脈絡膜組織血流量も減少したことが示された。

以上より網膜外層と脈絡膜との間には、脈絡膜循環による網膜外層への栄養の供給という一方的な作用のみならず網膜色素上皮細胞を含む網膜外層が脈絡膜循環に関与している可能性が示唆された。今後網膜色素上皮細胞が選択的に障害されたモデルを作成し検討することによりさらに明確な結果が得られるのではないと思われる。

稿を終えるに当たり、ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました恩師松尾信彦教授に深謝いたします。また、ご協力いただきました教室の諸兄姉ならびに細田 彰、光岡建之、進輝子の諸氏に感謝いたします。本論文の要旨は第93回日本

眼科学会総会にて発表した。

なお、本研究には文部省科学研究費補助金（課題番号 63570831, 研究代表者白神史雄）の補助を受けた。付記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 松尾信彦：脈絡膜循環の特異性。日眼会誌 84：2147, 1980.
- 2) 那須好滋：網膜外層障害モデルにおける脈絡膜循環の研究。第1報。モノヨード酢酸投与による急性期の変化について。眼紀。40：1659—1668, 1989.
- 3) 間野ともえ：赤道部強膜全周締結術の脈絡膜循環への影響。第1報。術後早期について。眼紀 33：460—467, 1982.
- 4) 水野勝義：宿題報告(III)。視細胞外節脆弱性基礎的研究。網膜色素変性症成因究明のために。日眼会誌 73：246—281, 1969.
- 5) 中川 修：実験的網膜変性症に就て。日眼会誌 63：2530—2537, 1957.

- 6) 秋谷 忍：網膜の電子顕微鏡的研究。第4報。家兎実験的網膜変性症の網膜について。日眼会誌 68：28—47, 1964.
- 7) Henkind P, Gartner S: The relationship between retinal pigment epithelium and the choriocapillaris. Trans Ophthal Soc UK 103: 444—447, 1983.
- 8) Korte GE, Reppucci V, Henkind P: RPE destruction causes choriocapillary atrophy. Invest. Ophthalmol. Vis Sci 25: 1135—1145, 1984.
- 9) Korte GE, Gerszberg T, Pua F, et al: Choriocapillaris atrophy after experimental destruction of the retinal pigment epithelium in rat. Acta Anat 127: 171—175, 1986.
- 10) Gartner S, Henkind P: Patholgy of retinitis pigmentosa. Ophthalmology 90: 1425—1432, 1982.