

実験的腎性高血圧ラットにおける網膜内新生血管

木村 聡, 吉本 弘志

弘前大学医学部眼科学教室

要 約

実験的に作成した腎性高血圧ラットの網膜内に発生した新生血管を病理組織学的に検索し、以下の結果を得た。これらのラットでは、高血圧持続期間に平行して網膜外層の変性と網膜毛細血管の消失が進行していく様子が観察された。特に高血圧持続期間が6カ月以上の重症例では変性が著しく、多数の微小血管を伴った色素上皮細胞の網膜内への増殖を認めた。これらの血管はその殆どが、大型内皮細胞の核を有し、管腔が非常に狭くなっているという特徴を示した。同様の所見を示す血管は増殖組織に隣接した色素上皮細胞層間にも多数認められた。これらの血管においては、内皮細胞の fenestration が高頻度に認められたが、脈絡膜側より Bruch 膜を破って侵入する血管は認められなかった。類似の血管は内網状層と稀ではあるが神経線維層にも認められ、色素上皮細胞の basal infolding 様の突起構造に取囲まれていた。しかしこれらの血管においては内皮細胞の fenestration は認められなかった。(日眼会誌 94:18-24, 1990)

キーワード：実験的高血圧ラット，色素上皮細胞，新生血管

Intraretinal Neovascularization in Rats with Experimental Renovascular Hypertension

Satoru Kimura and Hiroshi Yoshimoto

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

Abstract

Newly formed intraretinal vessels caused by experimental renovascular hypertension were studied histopathologically in rats. In these rats, dystrophy of the outer retinal layer and disappearance of retinal small capillaries were found in correlation with the duration of hypertensive state. In particular, retina obtained from rats with severe hypertension maintained for 6 months or more showed marked tissue damage and intraretinal proliferation of pigment epithelial cell with numerous microvessels. Most of these vessels were characterized by endothelial cell with large nuclei and slit-like narrowed lumina. Similar microvessels were also frequently observed in neighboring pigment epithelial cell layer. Endothelial fenestrations were observed in these vessels, although no findings were observed suggesting vessels penetrating through Bruch's membrane from the choroid. Similar vessels were also found in the inner plexiform layer and rarely in the nerve fiber layer. They were surrounded by processes resembling basal infolding of pigment epithelial cell. However, no fenestration of endothelial cells was found in these vessels. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94: 18-24, 1990)

Key words: Experimental hypertension rat, Pigment epithelial cell, Neovascularization

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 木村 聡

(平成元年5月24日受付，平成元年8月3日改訂受理)

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

(Received May 24, 1989 and accepted in revised form August 3, 1989)

I 緒 言

眼内新生血管は糖尿病性網膜症, 老人性黄斑変性症, 動脈硬化性網膜症などの難治性眼疾患との関連から, 臨床的に興味ある病態である。しかし, その基礎的研究は網脈絡膜新生血管に関係するもの¹⁷⁾¹⁸⁾を除けば必ずしも多くなく, 不明な点も多い。特に高血圧症に起因する網膜新生血管に関しては, 少数の臨床報告²³⁾と本態性高血圧モデル動物 SHR (Spontaneously Hypertensive Rat)¹⁰⁾¹¹⁾の報告があるのみであり, その意義については, 吉本ら³⁾の腎性高血圧ラットの研究で論じられているにすぎない。今回はその続報として, 実験的に作成した腎性高血圧ラットの網膜内に発生した多数の異常微小新生血管を形態学的に検討し, その発生と分化の機序について若干の知見を得たので報告する。

II 実験材料及び方法

Goldblatt-Drury に準拠し, ウイスター京都系 (WKY) ラットに腎血管性高血圧を生じせしめ, これらのラットのうち200mmHg以上の高血圧を長期間持続し, 無治療のまま6~8カ月生存し得たものを対象とした。なお, これらの動物における昇圧期の詳細は, 先に発表した一連の報告に述べてある如くである^{1)~3)}。

この時期に達したラットは眼球を摘出し直ちに2%グルタルアルデヒドに浸漬した。全眼球壁を組織片として作成し, 2%OsO₄による後固定を行い, エポキシ樹脂に包埋した。なお, 以後に細切した準超薄切片に対してはトルイジンブルー単染色, 超薄切片に対してはウラン鉛二重染色を施して観察を行った。

III 結 果

1. 光顕所見

末期重症高血圧ラットの所見として, 前報で³⁾報告した様に, 高血圧の持続期間に平行して網膜毛細血管の閉塞, 網膜外層構成要素の変性消失が進行していく様子が観察された。このうちで特に変性の著しい症例では, 所々で網膜色素上皮細胞層からの増殖組織が萎縮空胞化を示す神経網膜構成要素内に突出するように生じており, 一部では網膜全層に及んでいた。萎縮に陥った網膜毛細血管及び脈絡膜毛細血管板は, 大部分が閉塞あるいは変性消失していた。増殖組織内と周辺の色素上皮細胞層の間に多数の微小新生血管が認めら

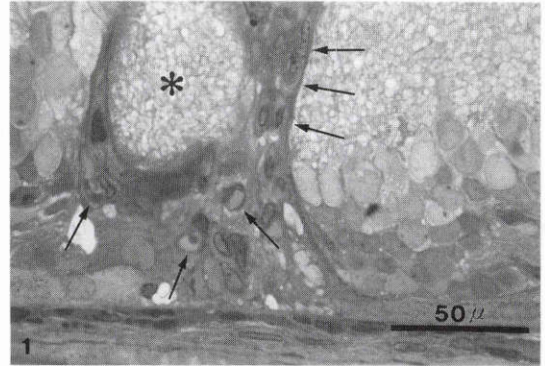


図1 8カ月の高血圧ラットに見られた網膜全層に及ぶ増殖組織(*). 網膜外層は完全に変性し, 周囲の毛細血管も消失している。増殖組織内には多数の微小血管を認める(↑)。

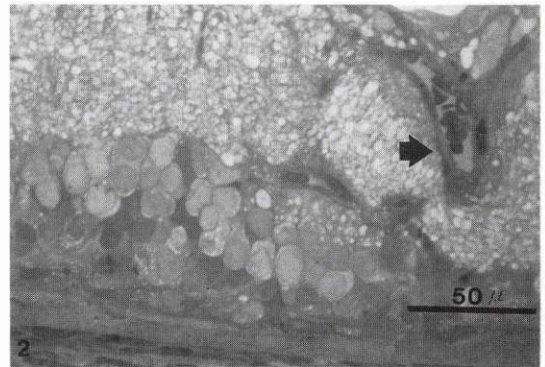


図2 6カ月例に認められた組織所見。網膜血管が脈絡膜側に陥入している(↑)。

れ(図1), また変性した網膜内においても増殖組織と接する部位に多く認められた。また, 網膜全層が菲薄となった変性部で, 正常では存在しない垂直方向に走行する主幹レベルの太さの網膜血管, すなわち内境界膜直下から脈絡膜側に及ぶ新生血管も認められた(図2)。

2. 電顕所見

上述の増殖組織中央部下方では, 毛細血管よりやや太い血管が多数存在し, その殆どは増殖組織内を垂直方向に走行しており, 下方の脈絡膜側では基底膜を介して色素上皮に囲まれ, 上方の一部でも基底膜を介してグリア細胞に接していた(図3)。硝子体側の増殖組織辺縁部と変性網膜との間にまたがって微小な新生血管を認め, 内皮細胞の核は大きく0.1~0.2μmの厚い基底膜を介し色素上皮およびグリア細胞と接していた

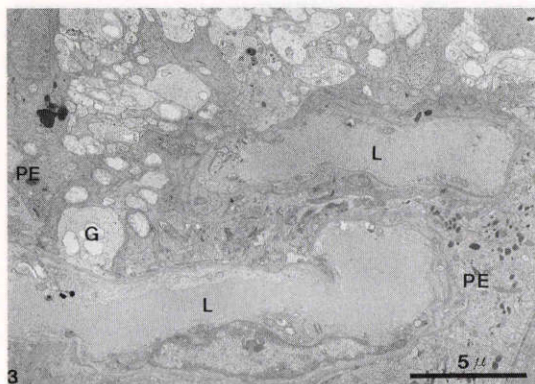


図3 図1に示した増殖組織中央部で脈絡膜直上に存在する微小血管。毛細血管よりやや大型で増殖組織内を垂直方向に走行しており、比較的広い管腔(L)を有する。下方は基底膜を介して色素上皮(PE)に囲まれ、上方は一部グリア(G)に接している。内皮細胞に fenestration は認めない。

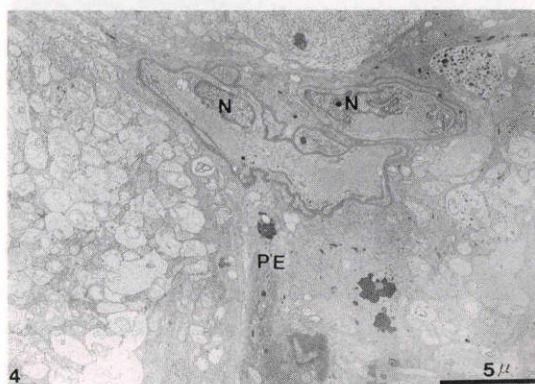


図4 図3よりやや硝子体側にみられた微小血管。大きな内皮細胞の核(N)を有し、厚い基底膜を介し色素上皮(PE)と接している。

(図4)。なおこれらの両方の新生血管はともに、充分に発達した厚い基底膜を有し、管腔が広く保たれ、内皮細胞は完全に連続し、fenestrationなどの構造は認められなかった。

増殖組織の基底部では、重層化した色素上皮細胞間を病巣中心より、四方に向かって眼球壁と平行に走行する多数の微小な新生血管を認めた。すなわち前述の主幹血管と直交する走行を示すこれらの血管においては、内皮細胞は大型の核を有し、豊富な細胞内小器官を有する一方、管腔は非常に狭小でスリット状を呈する特徴的な形態を示していた(図5)。またこの様な血管に近接して、小数ではあるが管腔が円形に近い開存

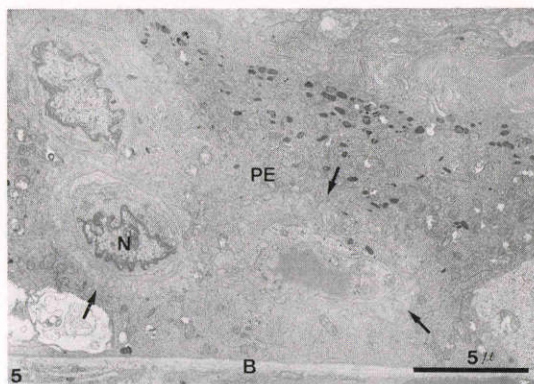


図5 増殖組織の基底部から離れた部位に認められた、重層化した色素上皮細胞間を水平に走行する微小血管の縦断所見。内皮細胞の核(N)が大きく、管腔は非常に狭まっている。血管は周囲を完全に色素上皮(PE)に取囲まれており、基底膜に接するように basal infolding 様の突起構造(↑)を認める。B: Bruch 膜。

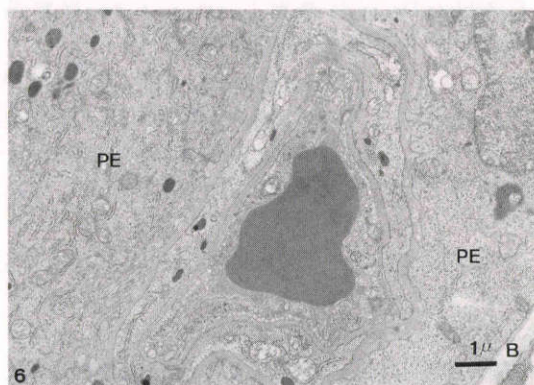


図6 図5と同様に重層化した色素上皮細胞間に存在する血管。比較的管腔が保たれており、赤血球を含む。外周の色素上皮細胞にはやはり basal infolding を認める。

を示すものもあり、これら血管の一部では内皮細胞の菲薄部に fenestration を有するものも認めた(図6, 7)。しかし、この fenestration の存在部は、脈絡膜血管の様に一定の規則性をもたず孤立性であり、その集合が見られても数個にすぎなかった。なお、これらの血管と前述の増殖組織中央部に認めた血管との連続性は確認出来なかったが、全領域にわたり Bruch 膜を越えて脈絡膜毛細血管が侵入してくる所見は認められなかった。

一方、増殖組織からかなり離れた単層の色素上皮細胞

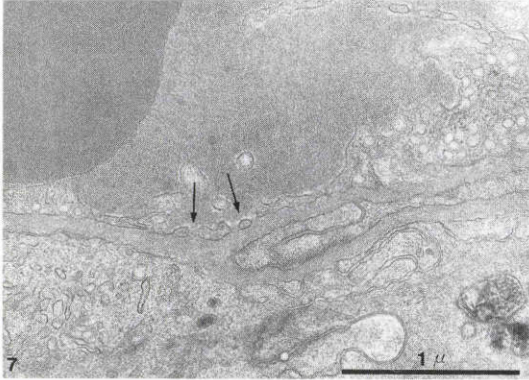


図7 図6に示した血管の連続切片の強拡大，内皮細胞に fenestration (↑) を認める。

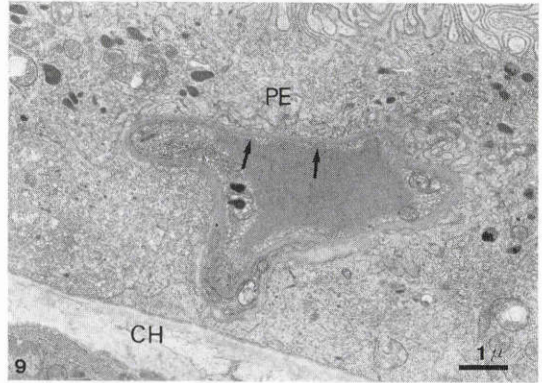


図9 図8と同様の部位に存在する開存型の新生血管，全周を色素上皮 (PE) に取囲まれており，多数の fenestration (↑) を認める．脈絡膜 (CH) に近接しているが，Bruch 膜は保たれている。

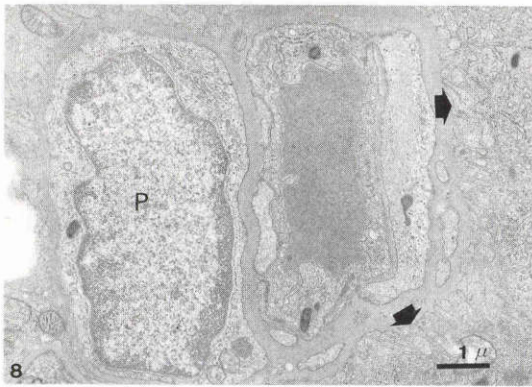


図8 増殖組織よりかなり離れた単層の色素上皮細胞層の間に存在する微小血管，色素上皮が血管に接している面には特有の basal infolding 様の襞 (↑) を認める．巨大な内皮細胞の核を有し，管腔は殆どない，隣接しているのは周辺細胞 (P)。

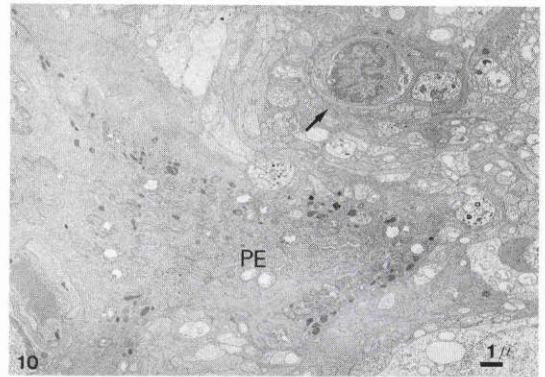


図10 変性した内網状層にみられた色素上皮の増殖 (PE) とこれに隣接する新生血管 (↑)。

胞層の間にも，上述の増殖組織内と全く同様の2種類の血管がそれぞれ孤立性に認められ，血管の外周を囲む色素上皮細胞には basal infolding 様の突起様構造が認められた (図8，9)。

一方神経網膜側では，増殖組織周囲の基本構造が著しく乱れており，増殖組織のない本来の網膜組織には開存毛細血管が少ないという特徴を有していたが，一部には増殖組織から突出する様に微小血管および色素上皮細胞の突起を認めた。さらにその近傍では，おそらく内網状層と思われる部位に一致して微小血管が観察され，その管腔は前述の色素上皮間の微小血管よりさらに狭く，殆ど細胞間隙にすぎないような状態であった。これらの血管の内皮細胞はやはり大型の核と

豊富な細胞内小器官を有し，tight junction を形成していた。しかし血管外周の構成要素は一様でなく，0.2 μm の厚さを有する基底膜を介して basal infolding 様の突起構造を持つ色素上皮とグリア要素の両者を認めた (図10，図11)。

同様の血管は低頻度ではあるが，さらに上方の神経節細胞層内にも認められた。やはり外周は基底膜を介して，色素顆粒を有する細胞に取り囲まれており，これらの外周細胞が神経要素と接する部位には色素上皮細胞の apical process に酷似した突起構造を認めた (図12)。一方，膨化変性が著明な神経線維層には，まれではあるが基底膜に全周を取囲まれ周辺細胞と内皮細胞との区別はつくものの，管腔が殆ど確認できないような不定型の微小血管のみを認めた (図13)。

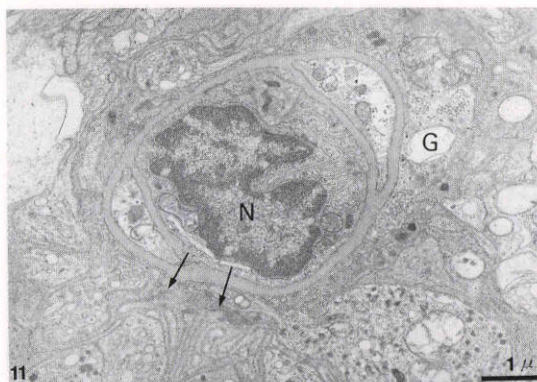


図11 図10の強拡大。管腔はスリット状に狭まり、内皮細胞は大型の核(N)と豊富な細胞内小器官を有し、tight junctionを認める。基底膜の周囲には色素上皮の basal infolding 様の突起構造(↑)を認めるが、上方はグリア要素(G)に接している。

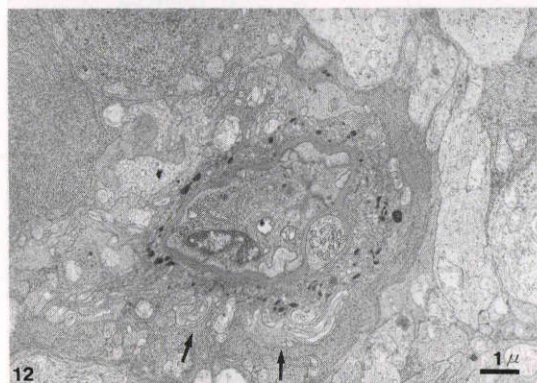


図12 神経節細胞層にも認められた異常血管。基底膜外周に色素顆粒を有する細胞に取り囲まれている。この外周細胞が神経要素と接する部位には色素上皮細胞の apical process とよく似た突起構造(↑)を認める。

III 考 按

本実験で観察された網膜内への網膜色素上皮細胞の増殖を伴った、多数の新生血管の病理組織学的変化は、新生血管の発生機序を考える上で興味深い所見である。今回の実験で認められた新生血管と類似の所見は、現在までも幾つか見受けられるが^{4)~17)}、このような網膜病変を生じせしめる方法、あるいは実験材料は多岐にわたり、一見、何の共通点もないように思われる。しかしあえて大別すると、1) 実験病理学的な操作によって発生させたもの^{4)~9)}、2) 遺伝的負荷の加わった

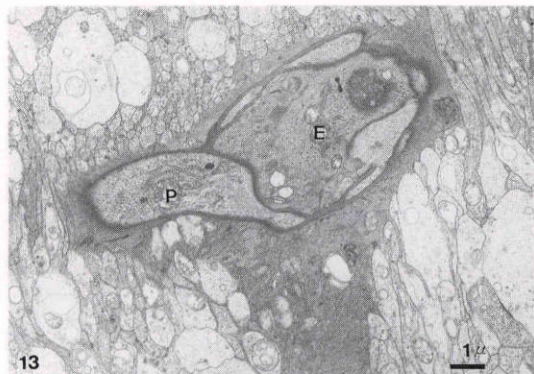


図13 変性が著明な神経線維層に認められた微小血管。内皮細胞(E)と周辺細胞(P)と思われる2種類の細胞を認めるが、管腔は殆ど確認できない。

新種を材料として用いたもの^{10)~17)}、以上2種類の方法であるとする事が出来よう。前者の代表は phototoxic retinopathy^{4)~6)}と urethane-induced retinopathy^{7)~9)}である。現在も両者における網膜変性の明らかな原因は不明であるが、urethane-induced retinopathy においては色素上皮細胞の変化が⁷⁾、phototoxic retinopathy においては網膜外層の消失が、毛細血管の変化に先行するという説が提示されている⁶⁾。後者としては SHR に耐糖能負荷を加えたもの¹⁰⁾¹¹⁾と、RCS (Royal College of Surgeons rat), PETH (tan-hooded, pink-eyed, dystrophic rat) ラットといった一連のヒトの網膜色素変性症モデルが知られている^{12)~17)}が、やはり視細胞層を中心とし網膜外層の変化が最も早期に出現し、両者の間に病理組織学的な差異を認めないとする報告もある¹⁷⁾。以上の報告中、最も詳細に血管系の変化を検討している Gerstein らの報告¹³⁾によれば、網膜構成要素の減少が網膜病変の進行を考える上で主な論点になっており、毛細血管床の減少はあくまでこれに付随する変化として捉えられており、現在までこの意見に反駁している報告はない。

これに対し、本実験の重症高血圧による網脈絡膜の虚血性変化が、網膜病変最初の発生機転として働いていることは、既報^{1)~9)}において述べた網膜脈絡膜における固有毛細血管の著明な減少という事実からしても明らかと思われる。つまり網膜内新生血管の発生という特異的な病変の前段階として、著者らが推測できる機転は従来とは異なり網膜毛細血管床の閉塞が全てに共通し、且つ必須の条件であろうとするものである。

このような新生血管の由来は従来より議論的的で

あったが、PETH ラット¹⁵⁾と phototoxic retinopathy ラット⁶⁾においては詳細な形態学的検討より網膜固有血管由来である事が既に証明されており、urethane-induced retinopathy においても脈絡膜血管との交通は認められないとされている⁹⁾。本実験の場合も、新生血管の発生している領域では Bruch 膜は形態学上完全に保たれており、脈絡膜より侵入する血管も認められなかった。よって、今回報告した新生血管もまた網膜血管由来のものと考えて間違いないと思われるが、確定するためにはさらに、網膜鋳型標本による観察が必要であると思われる。新生血管自体の性格として、未分化なものから比較的分化の進んだものが混在していることは、管腔の形状、fenestration の有無などからしても明らかであろう。しかし、どのような機転でこのような成熟度の差異が生じるのか、またどのような条件により、同一の網膜血管から発生したものが中枢型毛細血管と有窓型毛細血管という異なった性質への分化傾向をたどるのかは、なお明らかにすることはできなかった。

一方、近年行なわれている脈絡膜血管由来の網膜下新生血管に関する実験¹⁷⁾¹⁸⁾や、in vitro における色素上皮と網膜血管内皮細胞の相互作用に関する実験^{20)~22)}からも、新生血管の発生と消退には色素上皮細胞が大きく影響する事は明らかである。ことに内皮細胞における fenestration の発生に関し、Mancini¹⁰⁾や Bellhorn⁴⁾⁵⁾は、色素上皮細胞下に存在する新生血管のみ認められ、神経節細胞層内あるいは内顆粒層内に存在する新生血管は中枢型であると述べているが、この所見は今回の我々の結果と殆ど同様である(図10, 11)。しかしながら前述の如く我々の成績では、1) 色素上皮細胞間に存在しかなり分化の進んだ血管でも fenestration を認めないものもある(図3, 4)、2) 逆に神経節細胞内における中枢型新生血管でも周囲を色素上皮細胞の突起に取囲まれているものもある(図10, 11)ことが明らかとなった。以上の2点より、網膜下新生血管の場合¹⁸⁾¹⁹⁾と異なり、網膜内に生じた新生血管の発生分化に関して、色素上皮細胞の機能のみで一元的に論ずることには疑問が持たれる。今回の実験において観察された、比較的分化傾向を示しながらも fenestration を有さない血管群に共通している所見は、一部においてグリア細胞と基底膜を介して接しているということである。すなわち、新生血管における fenestration の発生に関して、色素上皮細胞の存在は確かに誘因となる一方、グリア細胞の介在が何等かの抑制的な

役割を演じているという、二元的な調節機構の可能性が示唆されよう。

文 献

- 1) 吉本弘志：実験的高血圧の研究。第I報。腎性高血圧ラットの検眼鏡および光学顕微鏡による観察。日眼会誌 77: 1951—1961, 1973.
- 2) 吉本弘志：実験的高血圧の研究。第II報。腎性高血圧ラット網膜細動脈の電子顕微鏡的観察。日眼会誌 78: 649—663, 1974.
- 3) 吉本弘志，松山秀一：実験的腎性高血圧ラットにおける末期重症高血圧の研究。日眼会誌 91: 756—770, 1987.
- 4) Bellhorn RW, Burns MS, Benjamin JV: Retinal vessel abnormalities of phototoxic retinopathy in rats. Invest Ophthalmol Visual Sci 19: 584—595, 1980.
- 5) Korte GE, Bellhorn RW, Burns MS: Ultrastructure of blood-retinal barrier permeability in rat phototoxic retinopathy. Invest Ophthalmol Visual Sci 24: 962—971, 1983.
- 6) Koch F, El-Hifnawi ES, Spitznas M: The effect of long-term irradiation with fluorescent light on the rat fundus. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 225: 226—234, 1987.
- 7) Amemiya T: Electron microscopic study of retina of rats repeatedly treated with urethane. Acta Soc Ophthalmol Jap 72: 293—297, 1968.
- 8) Bellhorn RW, Bellhorn M, Friedman AH, et al: Urethane-induced retinopathy in pigmented rats. Invest Ophthalmol Visual Sci 12: 65—76, 1973.
- 9) Korte GE, Bellhorn RW, Burns MS: Urethane-induced rat retinopathy. Plasticity of blood-retinal barrier in disease. Invest Ophthalmol Visual Sci 25: 1027—1034, 1984.
- 10) Mancini MA, Frank RN, Keirn RJ, et al: Does the retinal pigment epithelium polarize the choriocapillaris? Invest Ophthalmol Visual Sci 27: 336—345, 1986.
- 11) Frank RN, Mancini MA: Presumed retinovitreal neovascularization in dystrophic retinas of spontaneously hypertensive rat. Invest Ophthalmol Visual Sci 27: 346—355, 1986.
- 12) Dowling JE, Sidman RL: Inherited retinal dystrophy in the rat. J Cell Biol 14: 73—109, 1962.
- 13) Gerstein DD, Dantzker DR: Retinal vascular changes in hereditary visual cell degeneration. Arch Ophthalmol 81: 99—105, 1969.
- 14) LaVail MM: Analysis of neurological

- mutants with inherited degeneration. Friedenwald lecture. Invest Ophthalmol Visual Sci 21: 638-657, 1981.
- 15) **Lai Y-K, Jacoby RO, Jones AM, Papermaster DS**: A new form of hereditary retinal degeneration in Wag/Rij rats. Invest Ophthalmol Visual Sci 14: 62-67, 1975.
- 16) **Diaina van Driel, Provis JM, Billson FA**: Morphology of intraretinal new vessels in the PETH rat. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 226: 576-582, 1988.
- 17) **Von Sallman L and Grimes P**: Retinal degeneration in mature rats. Comparison of the disease in an Osborne-Mendel and a spontaneously hypertensive Wistar strain. Invest Ophthalmol Visual Sci 13: 1010-1015, 1974.
- 18) **山岸和夫他**: 網膜下新生血管網膜色素上皮の関連. 第1報. 新生血管退縮期における関連. 日眼会誌 92: 1618-1628, 1988.
- 19) **山岸和夫他**: 網膜下新生血管網膜色素上皮の関連. 第2報. 新生血管発育期における関連. 日眼会誌 92: 1629-1636, 1988.
- 20) **Glaser BM, Campochiaro PA, Davis JL, et al**: Retinal pigment epithelial cells release an inhibitor of neovascularization. Arch Ophthalmol 103: 1870-1875, 1985.
- 21) **Campochiaro PA, Glaser BM**: Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. Arch Ophthalmol 103: 1876-1880, 1985.
- 22) **Wong HC, Boulton M, Mcload D, et al**: Retinal pigment epithelial cells culture produce retinal vascular mitogens. Arch Ophthalmol 106: 1439-1443, 1988.
- 23) **白川弘泰, 内田 環**: 人口透析中に進行性網膜変性をきたした3症例. 眼紀 33: 277-283, 1982.