

## 外側血液網膜関門障害の陰性荷電状態の検索

—第1報 ヨウ素酸ナトリウムによる早期障害—

岸本 伸子, 大熊 紘, 山岸 和矢, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

## 要 約

ヨウ素酸ナトリウム ( $\text{NaIO}_3$ ) は網膜色素上皮細胞を障害するが、その際の早期変化を明かにするため、網膜色素上皮細胞、Bruch 膜、脈絡膜毛細血管の陰性荷電の変化を陽イオン剤 polyethyleneimine (PEI) を用いて検索した。有色家兎眼に3%  $\text{NaIO}_3$  10 $\mu\text{l}$  を硝子体内注入し、30分、1時間後に0.5% PEI を耳静脈より静注した。対照として無処置および生食水10 $\mu\text{l}$  を硝子体内注入した。対照では脈絡膜毛細血管内皮細胞の表層および基底膜、Bruch 膜の内外膠原線維層の膠原線維、網膜色素上皮細胞膜表層及び基底膜に PEI 粒子の付着を認めた。  $\text{NaIO}_3$  注入眼では PEI 付着は網膜色素上皮細胞膜、基底膜で減少していた。一般に細胞の表層および基底膜は陰性に荷電して電気的関門を形成するので、荷電状態の検索には陽イオン剤を用いる。  $\text{NaIO}_3$  注入眼では網膜色素上皮の細胞膜および基底膜に付着する PEI 粒子が注入30分後から減少し、陽イオン剤を用いて、網膜色素上皮の障害を早期から検出できた。(日眼会誌 94: 25-32, 1990)

キーワード：外側血液網膜関門，陰性荷電部位，網膜色素上皮障害，ヨウ素酸ナトリウム，陽イオン剤

## Early Effects of Sodium Iodate Shown by Detection of the Destruction of Anionic Sites in Outer Blood-retinal Barrier

Nobuko Kishimoto, Hiroshi Ohkuma, Kazuya Yamagishi and Masanobu Uyama

*Department of Ophthalmology, Kansai Medical University*

## Abstract

In order to demonstrate the early effect of sodium iodate ( $\text{NaIO}_3$ ) on retinal pigment epithelium (RPE), Bruch's membrane and choriocapillaries, we examined the alteration of their anionic sites using a cationic probe, polyethyleneimine (PEI). We injected 10 $\mu\text{l}$  of 3%  $\text{NaIO}_3$  solution into the vitreous of pigmented rabbits and after thirty minutes or one hour, administered 0.5% PEI intravenously. In the eyes injected with intravitreally saline solution or without injection, PEI-positive particles (diameter 15-20nm) were located in a row on both sides of the basement membrane of the RPE and choriocapillaries and periodically at the collagen fiber of inner and outer collagenous zone of Bruch's membrane. However no particle was observed on the cell membrane of the basal infolding of the RPE. Thirty minutes after injection of  $\text{NaIO}_3$ , PEI particle positive sites were reduced at the basement membrane of the RPE. One hour after injection they reduced in number but remained at the basement membrane of choriocapillaris and collagens in Bruch's membrane. We showed the

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 岸本 伸子

(平成元年6月19日受付，平成元年8月4日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuko Kishimoto, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.

1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received June 19, 1989 and accepted in revised form August 4, 1989)

early effect of  $\text{NaIO}_3$  to the RPE by examining the alterations of the anionic sites. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 25-32, 1990)

**Key words:** Outer blood-retinal barrier, Anionic sites, Retinal pigment epithelial destruction, Sodium iodate, Cationic probe

## I 緒 言

ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_3$ )は網膜色素上皮細胞を選択的に障害する薬剤として形態的, 電気生理学的, 生化学的に研究されてきた。網膜色素上皮細胞の障害を確認する手段としてはERG<sup>1)~4)</sup>, フルオロフォトメトリー<sup>5)6)</sup>, 蛍光眼底造影<sup>5)7)8)</sup>, 網膜-網膜色素上皮細胞間の接着力測定<sup>9)</sup>, 電子顕微鏡による形態的観察<sup>2)5)8)10)~12)</sup>など様々な方法が用いられている。今回我々は $\text{NaIO}_3$ 投与後早期に網膜色素上皮細胞の細胞膜および基底膜に荷電状態の変化が生じるのではないかと考え, 網膜色素上皮細胞-Bruch膜-脈絡膜毛細血管の陰性荷電の変化をしらべるため, 陽イオン剤を用いて透過電顕で観察した。

## II 実験方法

### 1. 予備実験

実験動物として有色家兎4羽8眼を用いた。3羽6眼には3% $\text{NaIO}_3$ ・蓄留水溶解液10 $\mu\text{l}$ (浸透圧248 mOsm, pH 6.18)をハミルトンマイクロシリンジを用いて, 角膜輪部の約1mm後方から硝子体中央へ注入した。1眼には生食水(浸透圧249mOsm, pH 7.0)を注入, 1眼は無処置で対照とした。注入から7日後まで経時的に眼底検査, 蛍光眼底造影を施行後, 眼球摘出し, グルタルアルデヒドおよびオスミウム酸で固定, エタノール系列にて脱水, エポキシ樹脂に包埋し, 通常の光顕および電顕で観察した。

### 2. 陰性荷電部位検索実験

#### 1) 実験動物

体重1.2kg~1.5kgの有色家兎5羽10眼を用いた。

#### 2) $\text{NaIO}_3$ 注入法

5眼には3% $\text{NaIO}_3$ ・蒸留水溶解液10 $\mu\text{l}$ , 2眼には生食水を予備実験と同様に注入, 3眼は無処置で対照とした。

#### 3) 陰性荷電部位検索方法(表1)

0.5% polyethyleneimine (PEI, 分子量50,000-60,000, SIGMA Chem. Comp.) 生食水溶解液3mlを $\text{NaIO}_3$ 硝子体注入眼のうち, 3眼は30分後

表1 実験の眼数

硝子体内 注入薬剤 (10 $\mu\text{l}$ )	PEI 静注時間	眼 数
$\text{NaIO}_3$	30分後	3
	60分後	2
生理食塩水	30分後	2
対 照	30分後	3

に, 2眼には1時間後に耳静脈より注入した。5ないし10分後頸動脈より2%グルタルアルデヒド-2%パラフォルムアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液(pH 7.3)で灌流固定(11~14ml/min)し, 15分後に眼球摘出した。更に同固定液で浸漬固定を追加し, エタノール系列で脱水, エポキシ樹脂包埋を行った。生食水硝子体注入眼は30分後にPEIを静注し同様に灌流固定を行った。1 $\mu\text{m}$ の切片はトルイジンブルーで染色して光顕的に, 超薄切片は酢酸ウラニル, クエン酸鉛にて2重染色を行い, 日立HU-12型透過電子顕微鏡にて観察した。

## III 結 果

### 1. 予備実験

$\text{NaIO}_3$ 注入眼は7日間の観察期間中蛍光眼底造影では変化を示さなかった(図1)。形態学的には1日目より変化がみられた。光顕像では視細胞外節の配列が乱れ, 網膜色素上皮細胞が重積した部と消失した部が混在して, 胞体基底部には小空胞が見られた(図2A)。電顕像では視細胞外節に崩壊と断裂がみられ, 網膜色素上皮細胞ではミトコンドリアは膨化, 空胞化しており, 光顕像での小空胞に相当した。また粗面小胞体の開大など細胞内小器官は障害され, 胞体内に小空胞が散在していた(図2B)。

### 2. 陰性荷電部位検索実験

#### 1) 光学顕微鏡の所見

3% $\text{NaIO}_3$ 硝子体注入後1時間では灌流固定による脈絡膜毛細血管の拡大をみた他には, 対照と比較して変化はなかった(図3A-D)。

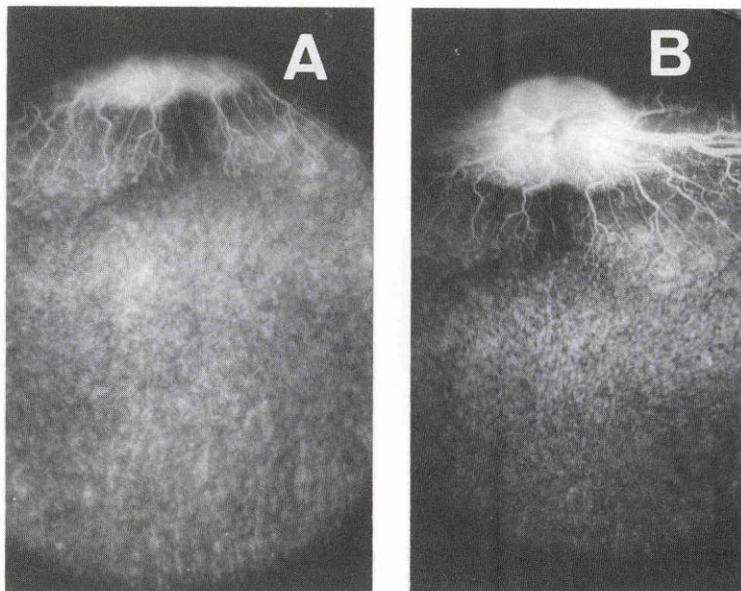


図1 蛍光眼底造影写真(フルオレスセイン静注後約1分)A. 対照. B. NaIO<sub>3</sub>投与2日

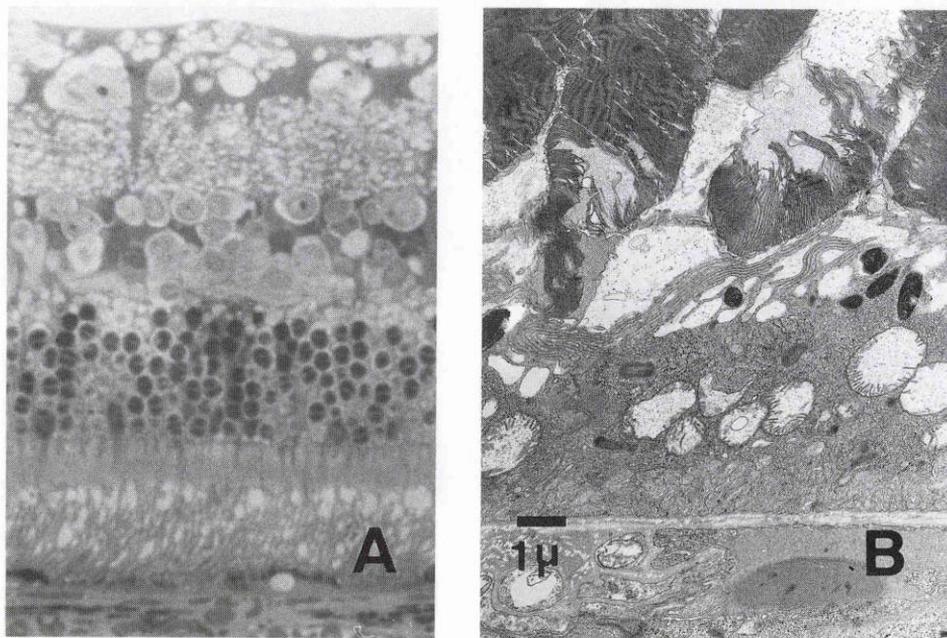


図2 予備実験, NaIO<sub>3</sub>投与1日後. A. 視細胞外節の乱れ, 網膜色素上皮細胞のメラニン顆粒の乱れ, 胞体底部に小空胞がみられた. (トルイジンブルー染色, ×132). B. 網膜色素上皮細胞にはミトコンドリアの空胞化, 小胞体の開大など細胞内小器官が障害され, 小空胞が散在した.

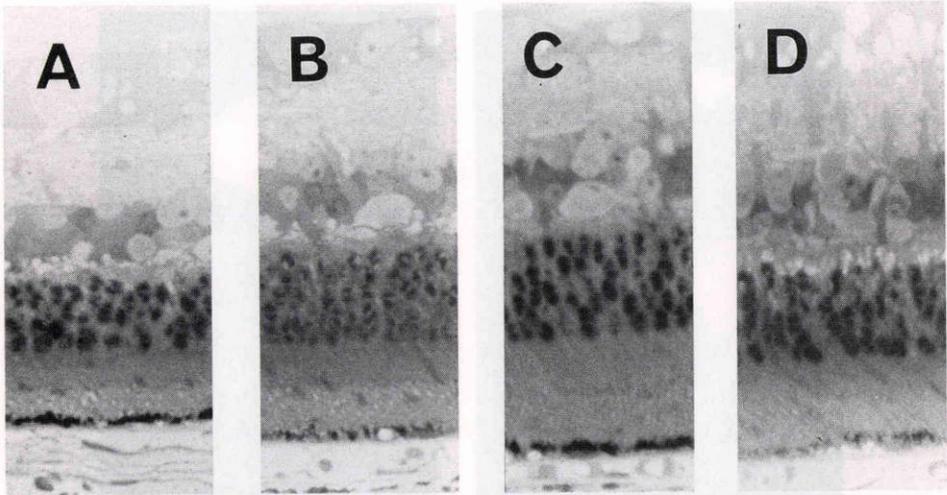


図3 A. 無投与, B. 生食水投与30分後, C.  $\text{NaIO}_3$ 投与30分後, D.  $\text{NaIO}_3$ 投与1時間後. 灌流固定による脈絡膜毛細血管腔の拡大を認める他は対照として変化がない. (トルイジンブルー染色,  $\times 132$ )



図4 対照, PEI 処置, 網膜色素上皮細胞基底膜と脈絡膜毛細血管基底膜の内側および外側に PEI 粒子が列を作って付着していた.

## 2) 電子顕微鏡の所見

### (1) 対照

電子密度の高い PEI 小粒子 (15~20nm) が網膜色素上皮細胞基底膜と脈絡膜毛細血管基底膜の内側および

外側に列を作って付着しており, Bruch 膜の内膠原線維層, 外膠原線維層の膠原線維にも周期的な付着が見られた. 脈絡膜毛細血管壁の内皮細胞の細胞膜には豊富に付着していたが, 網膜色素上皮細胞の basal infol-

dingの細胞膜への付着はほとんどみられなかった(図4). 生食水注入眼においてもPEI粒子の付着は無注入眼と変化はなく同様に見られた(図5).

(2) 3%NaIO<sub>3</sub>硝子体内注入後30分  
網膜色素上皮細胞, Bruch膜, 脈絡膜毛細血管の形態は対照と変化なく, 網膜色素上皮細胞のミトコンド

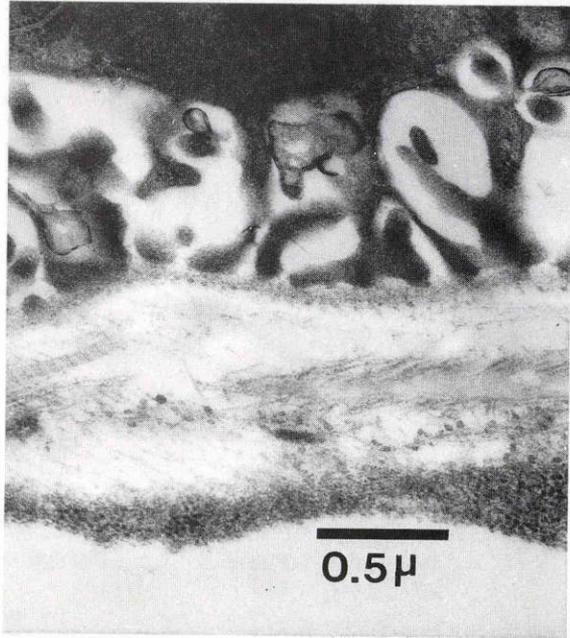
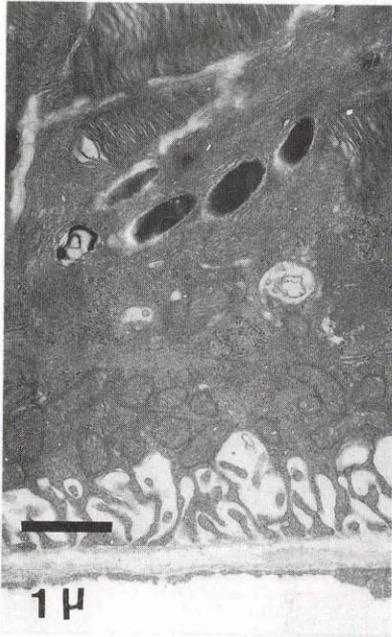


図5 生食水投与, PEI 処置, 対照と較べて変化がない.

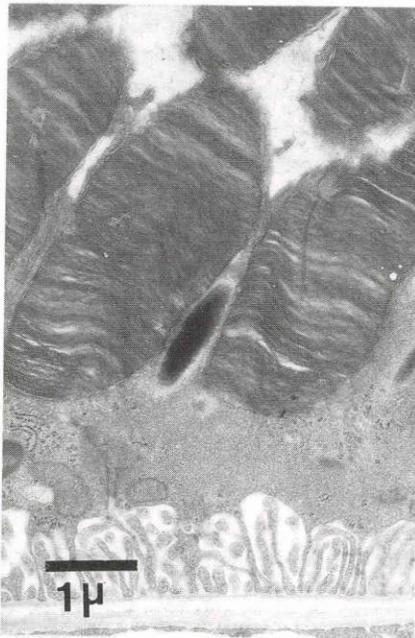


図6 NaIO<sub>3</sub>投与30分, PEI 処置, 網膜色素上皮細胞基底膜でのPEI粒子の付着は減少していた.

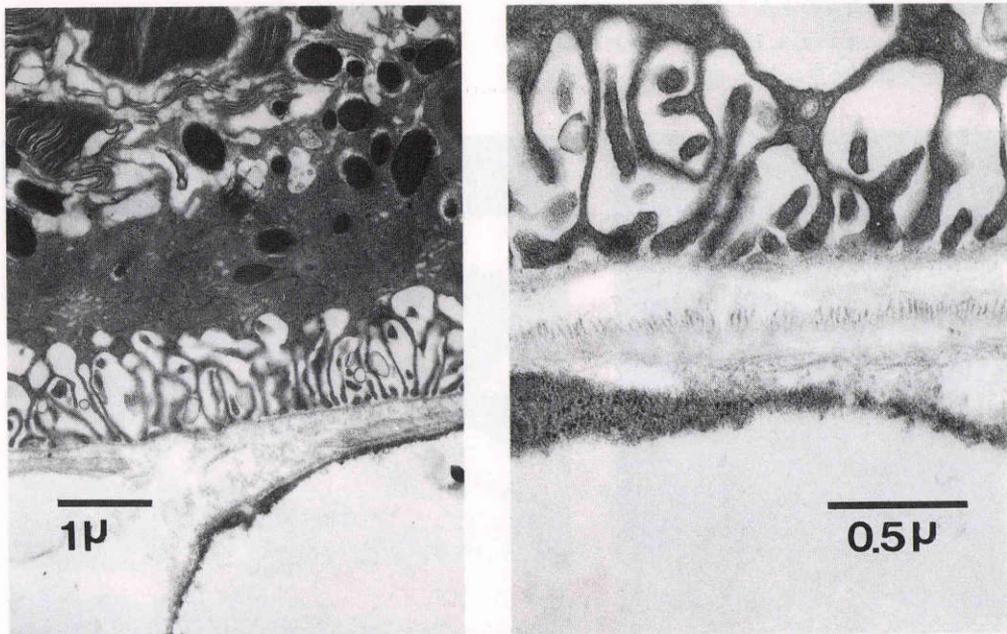


図7 NaIO<sub>3</sub>投与1時間後, PEI 処置, 網膜色素上皮細胞は basal infolding の配列が乱れ, 胞体内に小空胞が散在した. 網膜色素上皮細胞の基底膜の粒子の付着は更に減少していた.

リアなどの細胞内小器官の構造は正常であったが, 対照でみられた PEI 粒子の付着は減少し, 特に網膜色素上皮基底膜の PEI 粒子は著明に減少していた (図6).

### (3) 3%NaIO<sub>3</sub>硝子体内注入後1時間

網膜色素上皮細胞は basal infolding の配列が乱れ, 細胞質内に小空胞が散在しており, NaIO<sub>3</sub>障害の初期像と考えられた. PEI 粒子の網膜色素上皮細胞膜への付着はわずかとなっていたが, 脈絡膜毛細血管基底膜と膠原線維では残存していた (図7).

## IV 考 按

Simmel, Sheere (1926)は消毒薬 Pregl ヨード液による網膜障害を報告し, Vito (1935)が Pregl 液中の NaIO<sub>3</sub>が網膜障害の原因であると発表して以来 NaIO<sub>3</sub>は網膜色素上皮細胞を障害する薬剤として研究されてきた.

NaIO<sub>3</sub>による網膜色素上皮細胞障害の検索方法は, ERG, フルオロフォトメトリー, 蛍光眼底造影, 形態的観察, 網膜—網膜色素上皮間の接着力測定等様々な報告がある. ERG によっては Welinder<sup>1)</sup>が NaIO<sub>3</sub>静注後5分, 吉田<sup>2)</sup>が6.5分, Naoi<sup>3)</sup>が20分, Nilsson<sup>4)</sup>が2時間と比較的早期に変化がみられたと報告してい

る. フルオロフォトメトリーによっては羽生田<sup>5)</sup>の15分後, Anstadt<sup>6)</sup>の6~7時間後に変化をみたとの報告がある. 蛍光眼底造影での変化は霜島<sup>7)</sup>2時間後, 羽生田<sup>5)</sup>2時間, Ringvold<sup>8)</sup>は24時間でみられたと述べている. また Ashburn<sup>9)</sup>は網膜と網膜色素上皮細胞間の牽引力を測定し, 1時間後には両者間の接着力の低下を認めている. 形態的に変化が現れるのは比較的遅く, 透過電顕的観察では吉岡<sup>2)</sup>13分, 羽生田<sup>5)</sup>1時間, Nilson<sup>10)</sup>2.5時間, 須山<sup>11)</sup>24時間, Korte<sup>12)</sup>1週間と報告されている.

今回の実験では3%NaIO<sub>3</sub>を硝子体内注入後1時間で細胞の構造に変化を認めたが, 通常のエレクトロでは変化のみみられなかった30分後に, PEI 法によっては網膜色素上皮基底膜に付着する PEI 粒子は減少していた. また脈絡膜毛細血管の基底膜, 細胞膜の PEI 粒子の変化は少なく, 脈絡膜毛細血管の障害は軽度であると思われた.

生理的条件下では一般に細胞の表面は複合糖質を含むため陰性に荷電している. また上皮細胞, 内皮細胞の基底膜はグルコサミノグリカン (ムコ多糖) を含むプロテオグリカンで構成されるために陰性荷電をもち, 陰性荷電の物質に対する電気的な通過バリアー機

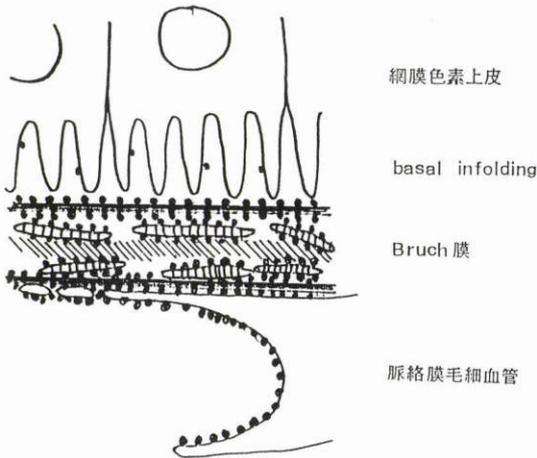


図8 陰性荷電部位を示す模式図・点はその部位を示す。

表2 陰性荷電検索に用いられるイオン剤

アルシアンブルー
カチオン化フェリチン
クプロニックブルー
コロイド鉄
硝酸ランタン
ポリエチレンイミン
ルテニウムレッド

能を持つ。また膠原線維はトロポコラーゲンの acid endogroup が陰性荷電を作ると言われている(図8)。陽イオン剤でバリアー機能をみる方法は腎糸球体で行われており、陽イオン剤も各種用いられている(表2)が、今回は静注可能で顕微鏡観察のできるポリエチレンイミンを使用した。陽イオン剤を使って網膜色素上皮細胞—Bruch膜—脈絡膜毛細血管の陰性荷電部位の検索の報告は数例あり、Pino<sup>13)</sup>(1982)はラット Bruch膜の基底膜を酵素消化により検索し、Essner<sup>14)</sup>(1982)は兎 Bruch膜の陰性荷電部位を検索している。Caldwell<sup>15)</sup>(1986)はストレプトゾトシン(Streptozotocin)を投与して作ったDMラットでは網膜色素上皮、脈絡膜毛細血管の基底膜の陰性荷電部位は減少したと述べている。

以上、今回の実験から陽イオン剤を用いることにより、 $\text{NaIO}_3$ の硝子体内注入後30分ですでに網膜色素上皮の基底膜に陰性荷電の変化がみられ、これは網膜色素上皮細胞・Bruch膜・脈絡膜毛細血管間の電氣的バリアーが変調を来たしていることを示しており、早期

の網膜色素上皮の障害を確認することが可能であった。

本論文の要旨は第54回日本中部眼科学会(昭和63年12月3日)において岸本が報告した。

#### 文 献

- 1) Welinder E, Textorius O: Early effects of sodium iodate on the slow off-effects, particularly the h-wave, and on the c-wave of the DC recorded electroretinogram in rabbit. *Acta Ophthalmol* 60: 305—312, 1982.
- 2) 吉田英一: 諸要約下に於ける網膜色素上皮の電子顕微鏡的態度。第1報。ヨード酸曹達による影響。日眼会誌 64: 1658—1681, 1960.
- 3) Nao-i N, Kim S, Honda Y: Paradoxical enhancement of the ERG c-wave by a small dose of sodium iodate. *Acta Ophthalmol* 64: 206—211, 1986.
- 4) Nilsson SEG: Interactions between PI and slow PIII in the generation of the electroretinogram c-wave. *Dev. Ophthalmol.* 9: 53—58, 1984.
- 5) 羽生田俊, 沼賀哲郎, 岸 章治他: 実験的網膜色素上皮障害と硝子体蛍光。日眼会誌 89: 503—511, 1985.
- 6) Anstadt B, Blair NP, Rusin M, et al: Alteration of the blood-retinal barrier by sodium iodate: Kinetic vitreous fluorophotometry and horseradish peroxidase tracer studies. *Exp Eye Res* 35: 653—662, 1982.
- 7) 霜島政光: 実験的網膜変性症の蛍光眼底所見。第1報。ヨード酸ソーダ投与家兎(1)。日眼会誌 71: 2030—2036, 1967.
- 8) Ringvold A: The effect of sodium iodate on the ciliary body/iris in rabbits. *Exp Eye Res* 27: 87—100, 1978.
- 9) Ashburn FS Jr, Pilkerton AR, Rao NA, et al: The effects of iodate and iodoactate on the retinal adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1427—1432, 1980.
- 10) Nilsson SEG, Knave B, Persson E: Changes in ultrastructure and function of the sheep pigment epithelium and retina induced by sodium iodate. *Acta Ophthalmologica* 55: 994—1006, 1977.
- 11) 須山棟一: 実験的網膜変性症の電子顕微鏡的観察。日眼会誌 69: 440—460, 1965.
- 12) Korte GE, Reppucci V, Henkind P: RPE destruction caused choriocapillary atrophy. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 25: 1135—1145, 1984.
- 13) Pino RM, Essner E, Pino LAC: Location and chemical composition of anionic sites in Bruch'

- s membrane of the rat. *J Histochem Cytochem* 30 : 245—252, 1982.
- 14) **Essner E**: Distribution of anionic sites in Bruch's membrane of the rabbit eye. *Euro J Cell Biology* 27 : 251—255, 1982.
- 15) **Caldwell RB, Slapnick SM, McLaughlin BJ**: Decreased anionic sites in Bruch's membrane of spontaneous and drug-induced diabetes. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 27 : 1691—1697, 1986.

