

網膜下新生血管の発育初期における網膜色素上皮の役割

—オルニチンによる網膜色素上皮障害実験—

高橋 寛二, 板垣 隆, 山岸 和矢, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

網膜下新生血管の発育初期において網膜色素上皮細胞が新生血管発育に関与していることを明らかにするため、サル眼であらかじめ網膜色素上皮を選択的に障害しておいて眼底後極部に強度光凝固を行い、網膜下新生血管の発生、進展状況を検索した。実験にはカニクイザルおよびニホンザル3頭4眼を用い、1M/l *L*-ornithine hydrochloride 0.03ml を硝子体内に注入し、網膜色素上皮を選択的に障害させた。注入2週後、眼底後極部にクリプトンレーザー強度凝固を行い、光凝固後1日から28日まで臨床的、形態学的に観察を行った。臨床的には、このようにあらかじめ網膜色素上皮を障害しておくこと、全経過を通じて網膜下新生血管の発生は全く見られなかった。形態学的には、光凝固後早期から凝固部には網膜下に多核白血球やマクロファージの遊走、線維芽細胞の増殖が見られたが、網膜色素上皮の反応性増殖は少なかった。光凝固3日から7日後に、脈絡膜内で新生血管が発生したが、その後新生血管がBruch膜をこえて網膜下腔に進展することはなかった。この実験結果から、網膜色素上皮が障害されて増殖がおこらないと、脈絡膜新生血管が網膜下腔に進展しないことがわかり、新生血管の発育初期には増殖した色素上皮細胞が誘導的に働いているとの作業仮説を確認することが出来た。(日眼会誌 94: 3-17, 1990)

キーワード：網膜下新生血管，網膜色素上皮，オルニチン，光凝固，新生血管黄斑症

The Role of Retinal Pigment Epithelium in the Early Stage of Development of Subretinal Neovascularization

Kanji Takahashi, Takashi Itagaki, Kazuya Yamagishi, Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

In order to evaluate the role of retinal pigment epithelium (RPE) in the early stage of experimental subretinal neovascularization, we severely damaged RPE cells before the development of subretinal neovascularization. Three adult rhesus monkeys were used in this study. One mol/l *L*-ornithine hydrochloride saline solution was injected intravitreally at 2 weeks before intense krypton laser photocoagulation on the retina at the posterior pole, and clinical and histopathological course were studied at 1 to 28 days after photocoagulation. As a result, no evidence of new vessel formation could be observed clinically throughout the entire course. Histopathologically, at 3 days after photocoagulation, slight proliferation of RPE cells was identified by electron microscopy at 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 高橋 寛二
(平成元年2月7日受付，平成元年8月8日改訂受理)

Reprint requests to: Kanji Takahashi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.
1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received February 7, 1989 and accepted in revised form August 8, 1989)

margin of the laser lesions, and budding of vascular endothelial cells derived from choroidal microvessels was observed in the choroid. However, no newly-formed vessels extended into the subretinal space at 7 days or more after photocoagulation. These results confirmed our hypothesis that proliferated RPE cells had inductive effect on the growth of endothelial cells in the early stage of development of subretinal neovascularization. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 3-17, 1990)

Key words: Subretinal neovascularization, Retinal pigment epithelium, Ornithine, Photocoagulation, Neovascular maculopathy

I 緒 言

網膜下新生血管は、老人性円板状黄斑変性症をはじめとする新生血管黄斑症の病因であり、社会的失明の一原因となりつつある。特に老人性円板状黄斑変性症は、最近本邦でも著しく増加し、高齢化社会をむかえ、今後ますます増加していくと思われる。

眼内新生血管は様々な疾患において見られ、新生血管の発育に関与する因子について最近研究が盛んである。網膜下という特殊環境における脈絡膜血管由来の新生血管の発育には、様々な因子が複雑に絡み合って調整されているものと思われるが^{1)~3)}、網膜色素上皮が新生血管にどのような働きかけをしているかは十分明らかにはされていない。我々は、オルニチン投与により網膜色素上皮を障害しておくこと、光凝固よりサル眼に発生させた実験的網膜下新生血管に、どのような影響を与えるかを形態学的に検討した結果、網膜色素上皮が、新生血管発生の初期に深く関連していることを確認したので報告する。

II 方 法

実験動物には体重1.5kgから3kgまでの成熟カニクイザルおよびニホンザル3頭4眼を用いた。塩酸ケタミン(ケタラル®) 25mg/kgにて筋注麻酔を施し、ミドリリンP®にて散瞳したのち、1M/l l-ornithine hydrochloride 水溶液0.03ml(浸透圧1,850mOsm, pHは1M-NaOHを用いて7.2に調整)を、毛様体扁平部よりHamiltonのマイクロシリンジと27ゲージ注射針を用いて硝子体腔内中央に注入した。注入1週後、眼底検査、蛍光眼底造影を行い、眼底後極部に網膜色素上皮障害がおこっていることを確認した。

注入2週後、Goldmann型眼底コンタクトレンズを用いて、Ryanらの方法⁴⁾に従って眼底後極部にクリプトンレーザーで格子状(鼻側、耳側各8カ所、合計64カ所)に光凝固を行った。光凝固後、眼底検査、蛍光

眼底造影を行い、網膜下新生血管の発生状態を臨床的に観察し、光凝固1, 3, 7, 28日後に眼球摘出を行った。

摘出眼球は4%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液にて24時間前固定を行った後、0.1M 燐酸緩衝液にて水洗、1%四酸化オスミウム燐酸緩衝液にて後固定を行い、型のごとくエタノール系列にて脱水後、プロピレンオキシドに置換、エポキシ樹脂に包埋した。作成した試料は、ミクロトームにて1 μ mの連続切片を作成し、光凝固部をトルイジンブルー染色光顕像にて観察した。また超薄切片を作成し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で2重染色の上、透過型電子顕微鏡(日立12型あるいは500型)にて電顕的観察を行った。

III 結 果

(1) 臨床経過

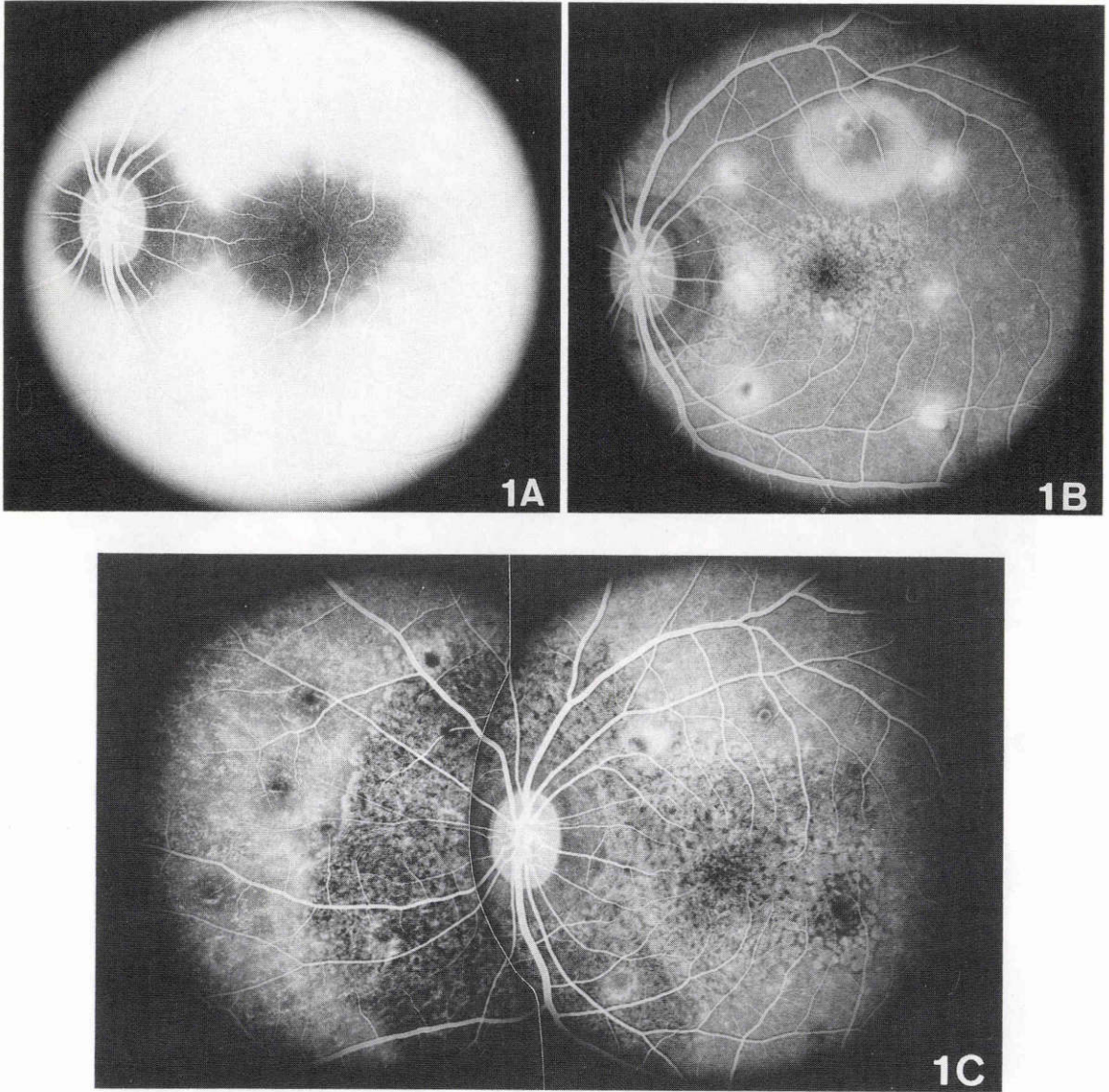
オルニチン注入後1週、眼底には眼底周辺部から後極部までびまん性に、網膜深層に灰白色の浮腫状混濁が見られ、蛍光眼底造影では乳頭から中心窩の小領域を除いて、網膜の浮腫状混濁に一致してびまん性の著明な過蛍光が見られた(図1A)。

注入後2週になると浮腫状混濁は消失し、この部には変わって色素上皮の変性を示す色素むらを生じた。蛍光眼底造影では病変部は顆粒状の強い過蛍光が見られ、これは色素上皮の変性による window defect と思われた。このような所見は眼底後極部よりも赤道部、周辺部に強く見られた。

注入後2週に光凝固を行った直後の蛍光眼底造影では、光凝固からにじむような蛍光漏出が見られた(図1B)。

光凝固後1週で凝固斑は薄い褐色の癍痕となり、蛍光眼底造影ではどの凝固斑にも蛍光漏出は見られなかった。

光凝固後4週、オルニチンの障害による眼底の色素むらは一層著明となり、眼底周辺部では黒褐色の色素



沈着が見られた。凝固斑は色素沈着を伴って瘢痕化し、凝固部の浮腫、漿液性網膜剝離は全く見られなかった。蛍光造影でも光凝固部に蛍光漏出や、過蛍光は見られなかった(図 1C)。すなわち、臨床的には光凝固部に網膜下新生血管の発育、進展は全く見られなかった。

(2) 病理組織学的所見

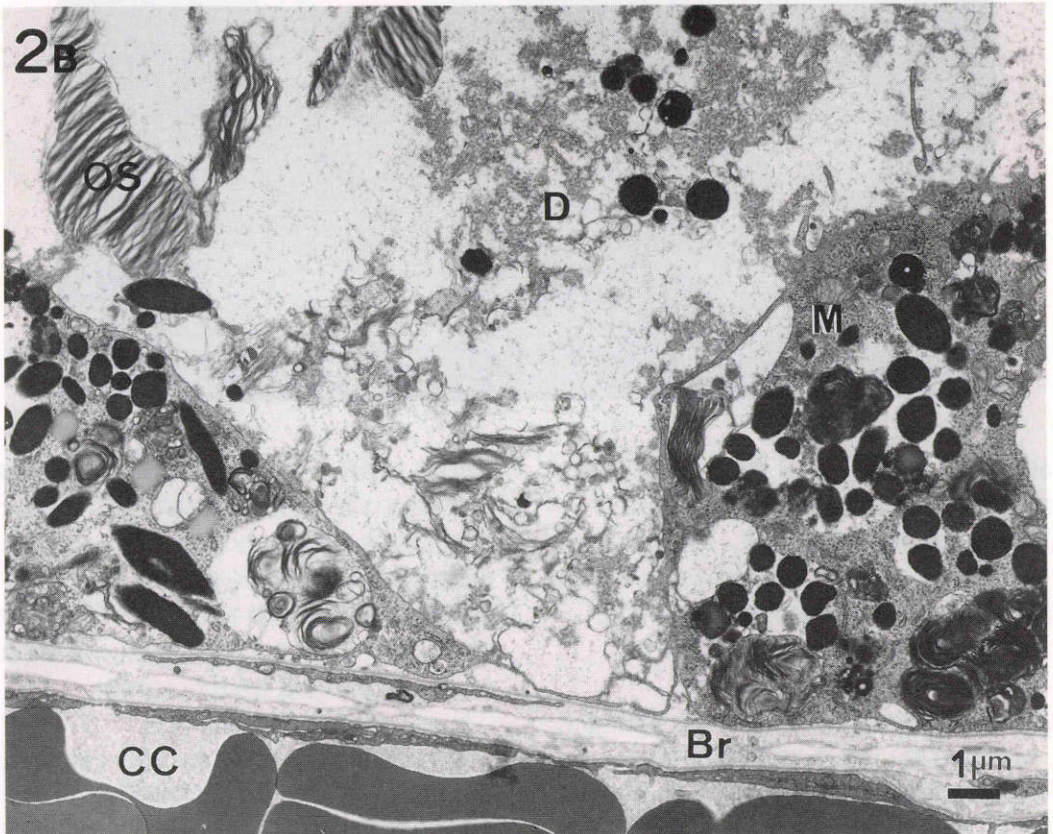
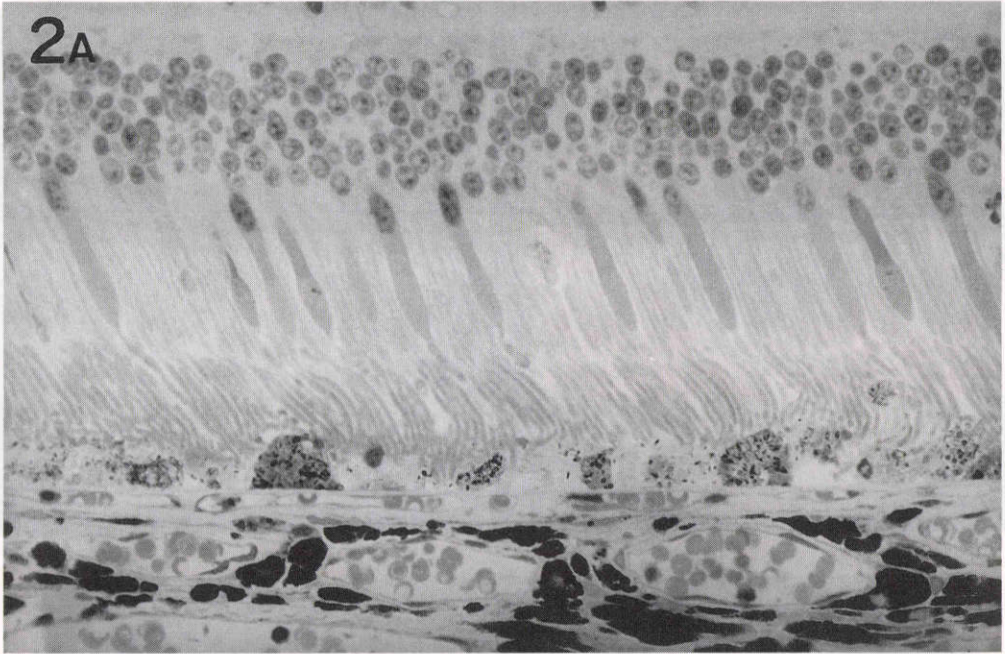
1. オルニチン注入後 1 週の所見

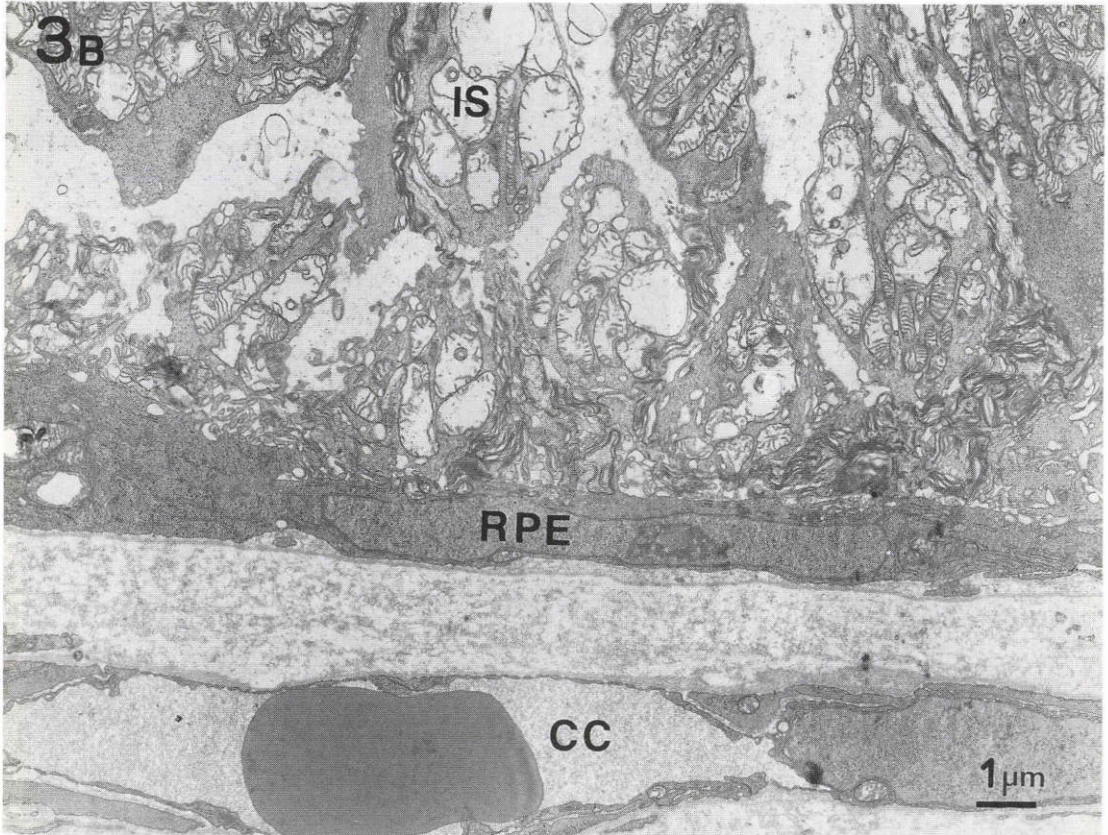
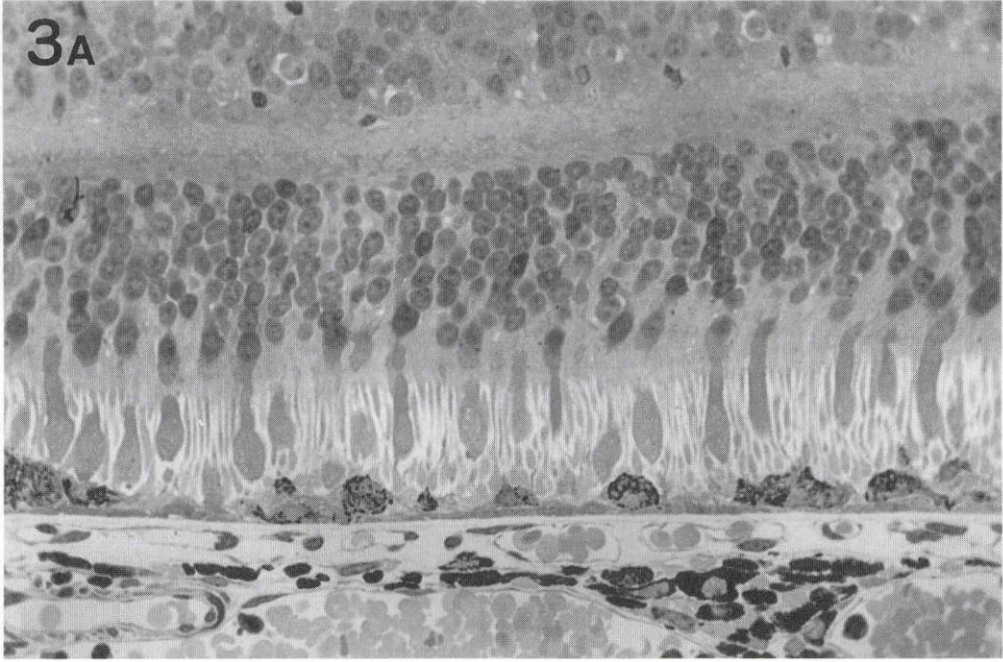
網膜深層に浮腫状混濁が見られた部位の網膜色素上皮は、融解壊死に陥っており、大多数が消失していた。網膜下腔には色素顆粒を持ったマクロファージ様細胞が見られた。視細胞外節には軽度の配列の乱れが見

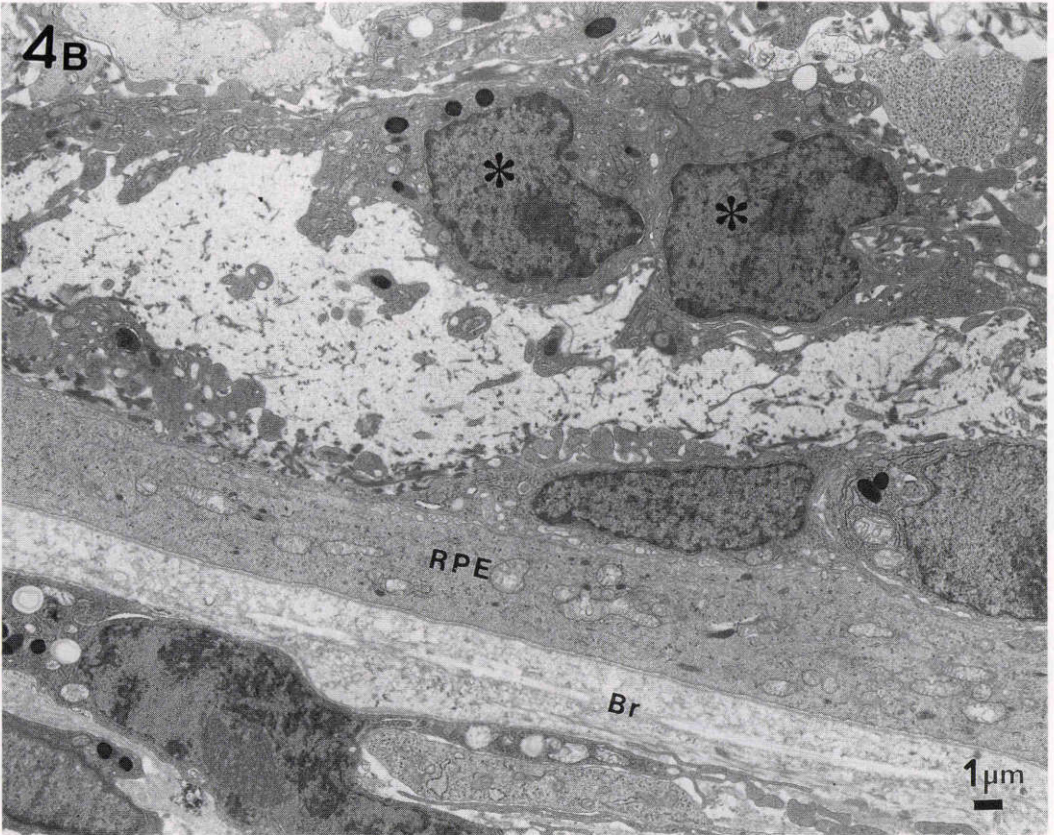
れたが、外顆粒より内層の神経網膜および脈絡膜血管に異常所見は見られなかった(図 2A)。電顕的には、色素上皮細胞が融解壊死に陥って消失した部分には、無構造の細胞崩壊物が見られ、Bruch 膜が網膜下腔に直接露出していた。網膜下のマクロファージ様細胞の胞体内にはメラニン色素顆粒と脱落した外節を貪食した phagosome が多数見られた(図 2B)。

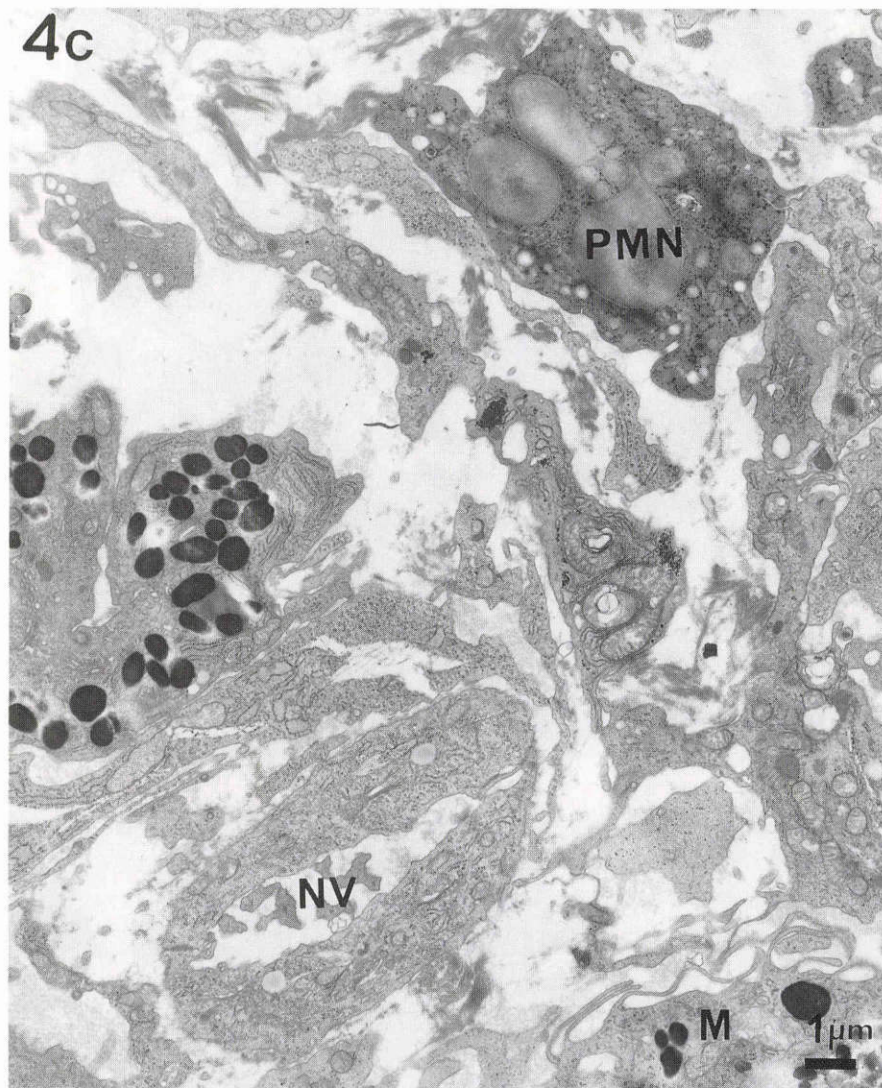
2. オルニチン注入後 2 週の所見

眼底後極部の網膜色素上皮は著しく扁平になって Bruch 膜上を覆っていた。単位面積当たりの色素上皮細胞の核数が減少し、胞体内のメラニン色素は少なく









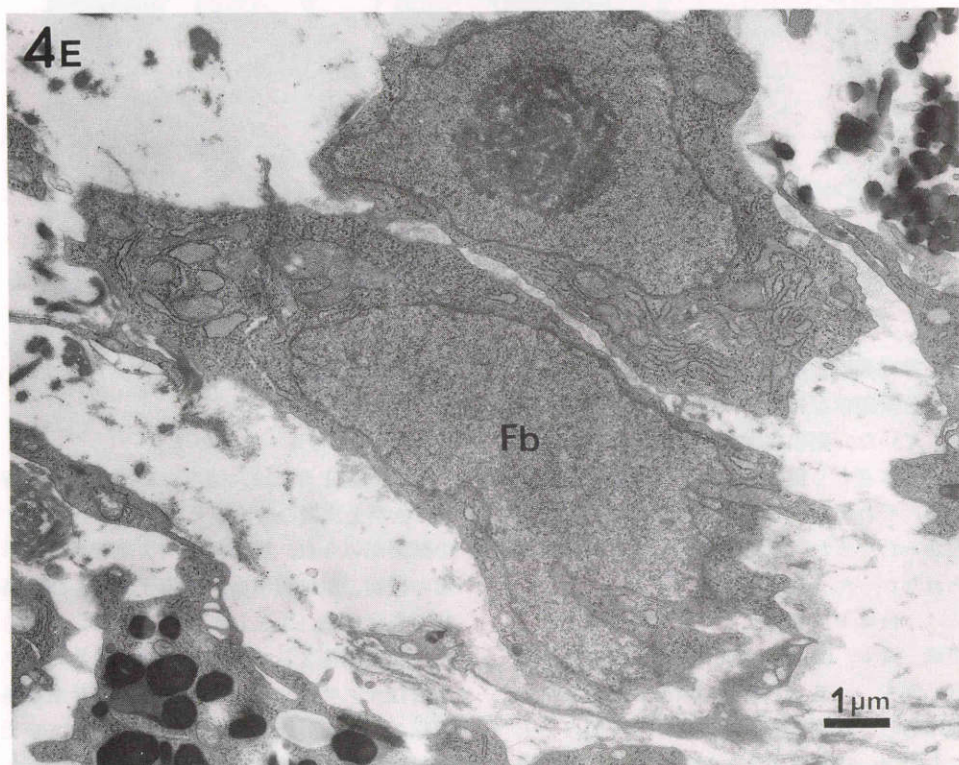
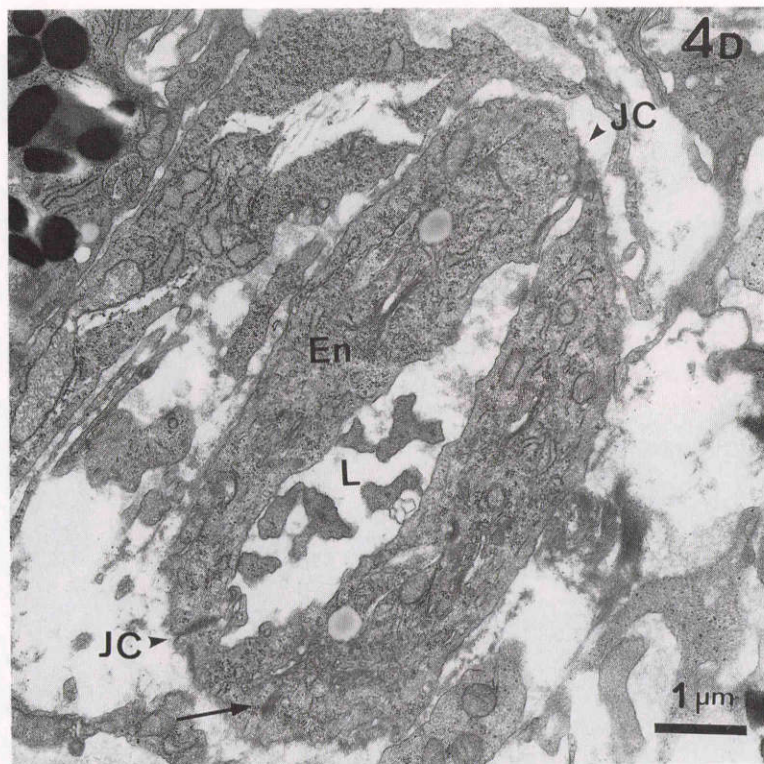
なっていた。神経網膜と網膜色素上皮層の間には、胞体内に大量の色素顆粒を持ったマクロファージ様細胞が多数遊走していた。網膜色素上皮の変性の強い部では、視細胞外節は著しく短縮し、内節の下方への移動がみられたが、それより内層の神経網膜には異常所見は見られなかった。また、脈絡膜血管の内皮細胞には異常は見られなかった（図3A）。

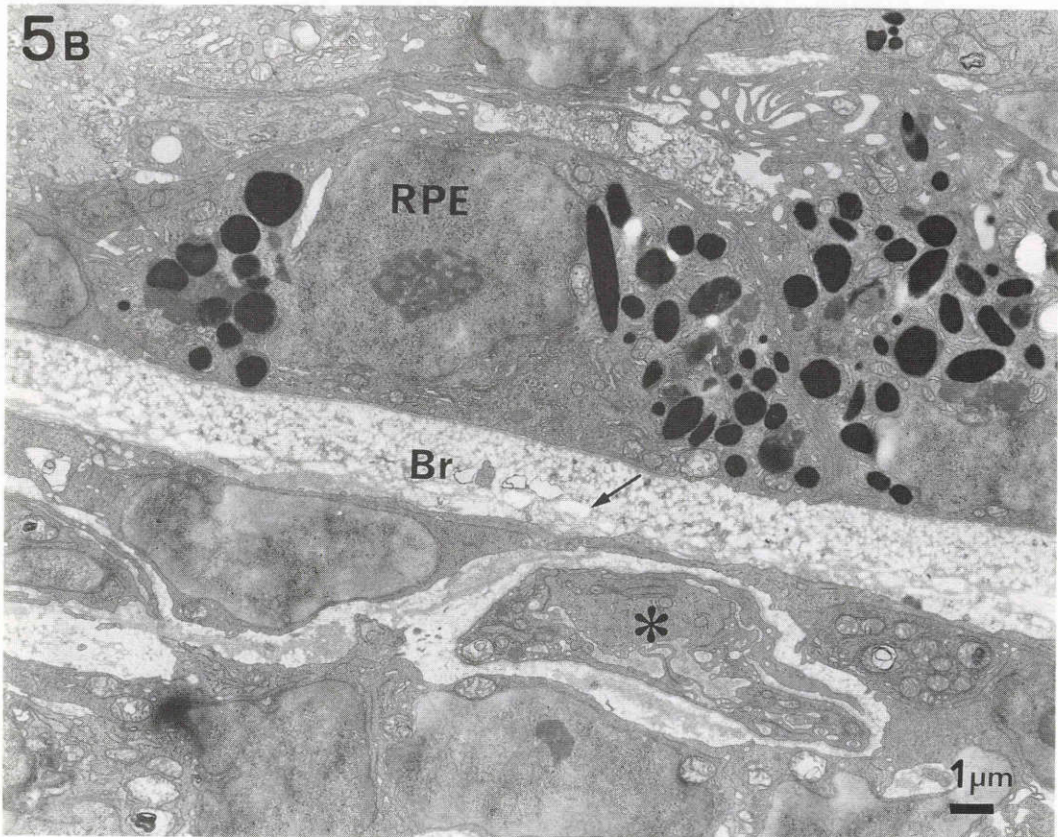
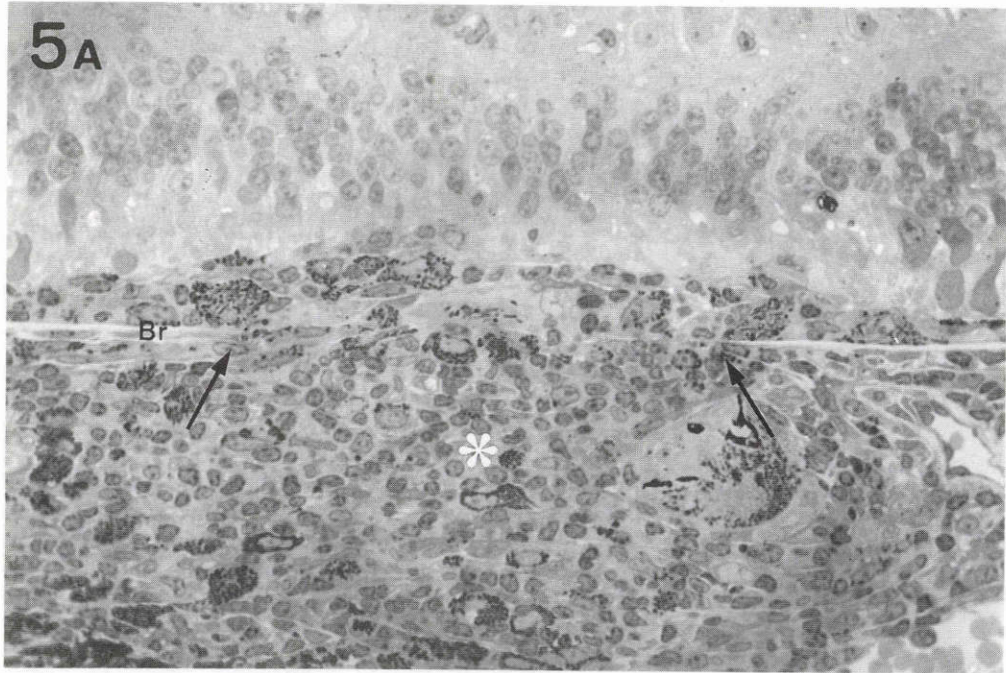
電顕的には、色素上皮細胞はきわめて扁平になり、微絨毛の短縮、減少、basal infoldingの不明瞭化、細胞内小器官の減少、メラニン顆粒の減少が見られた。視細胞外節は著しく短縮あるいは消失し、内節のミトコンドリアの膨化、空胞化が見られた。一方、脈絡膜

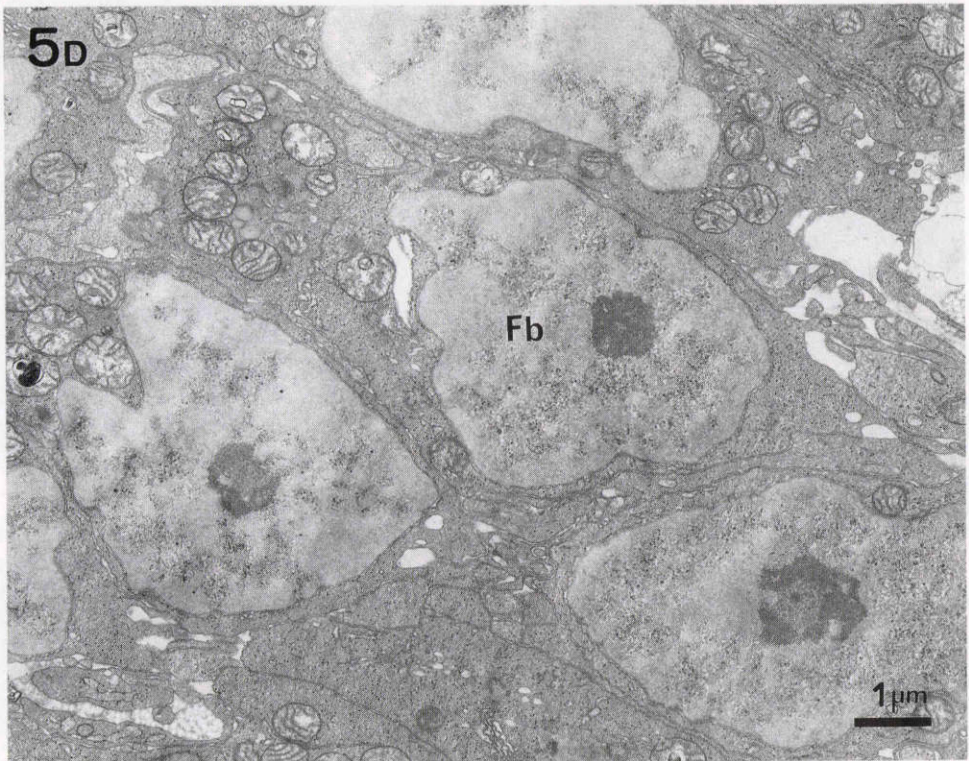
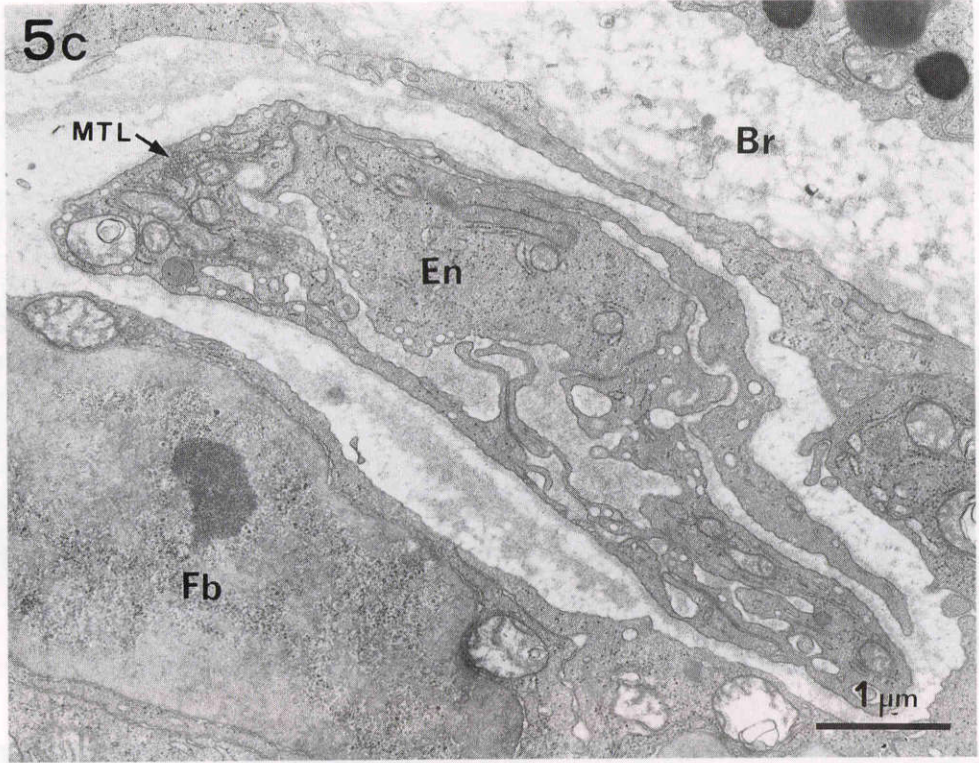
血管の内皮細胞には異常所見は見られなかった（図3B）。

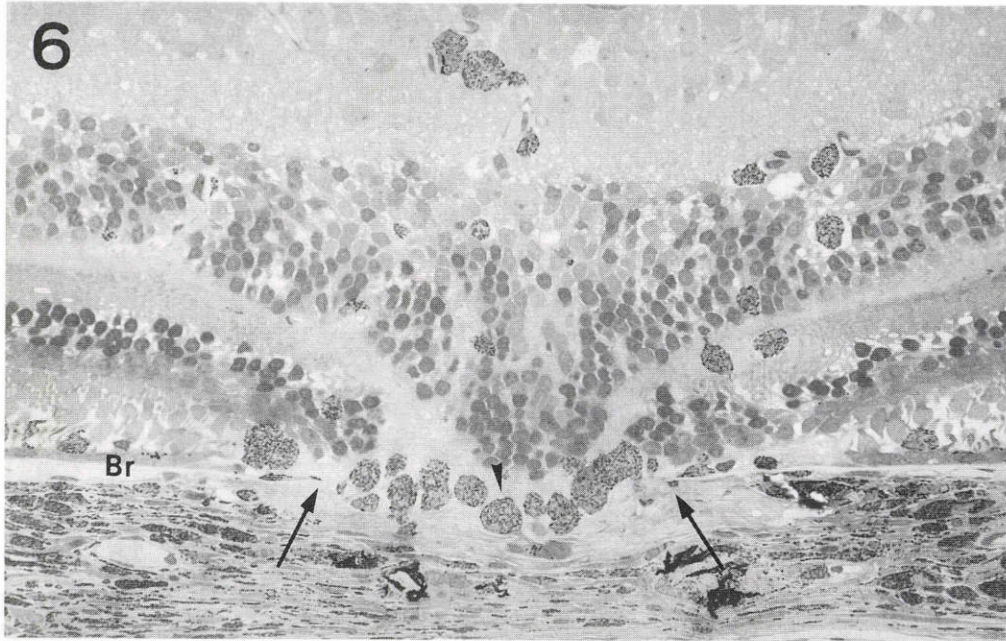
3. 光凝固後1～3日の所見

光凝固後1日には、強度の凝固により、神経網膜外層、色素上皮層の凝固壊死、凝固部中央でのBruch膜の断裂がみられ、脈絡膜中、大血管に血栓形成、血管壁の破綻、脈絡膜出血、網膜下腔および脈絡膜への多数の炎症細胞（主として多核白血球）の遊走が見られた。光凝固後3日、網膜下腔には大量のメラニン色素を含むマクロファージ様細胞と線維芽細胞様の紡錘型細胞が、Bruch膜断裂部付近に集まっていた。Bruch膜断裂部付近の脈絡膜の深層には異物型の多核巨細胞









が見られ、その周囲の中等大の脈絡膜血管には血栓が形成されていたが、一部の血管腔内の血栓は消失し、内腔に明るい核と明瞭な核小体を持つ細胞が見られた(図4A)。

電顕的には、網膜下腔に存在するメラニン色素を含む細胞は、明瞭な細胞間結合装置を持たず、細胞極性を示さないことから、マクロファージと思われた。一方、紡錘型細胞には、細胞間結合装置を持つ網膜色素上皮と思われる細胞が少数含まれていたが、大多数はそのような特徴を持たない脈絡膜由来の線維芽細胞と思われた。また凝固部辺縁にも、増殖した色素上皮細胞と同定される細胞は少数であった(図4B)。一方、凝固部の脈絡膜内層には、細胞内小器官の豊富な、幼若な血管内皮細胞が狭い管腔を作っている所見が見られた。この内皮細胞の周囲には、明瞭な基底膜は確認されなかった(図4C, 4D)。このような幼若な血管内皮細胞の周辺には多核白血球や、マクロファージの遊走(図4C)、線維芽細胞の増殖(図4E)などが見られた。

4. 光凝固後7日の所見

光顕的に、光凝固後7日には網膜下の色素顆粒を含む細胞、紡錘型細胞の数は減少していた。網膜色素上皮細胞と思われる細胞の増殖は少なく、網膜下腔への新生血管の進展発育は見られなかった。凝固部の脈絡

膜には、明るい核と細胞質を持つ中型の細胞が多数集まっていた。凝固部辺縁の脈絡膜血管の大部分は血栓が消失し、脈絡膜毛細血管には小さい管腔を再形成しているところが見られた(図5A)。電顕的に、凝固部辺縁では色素上皮細胞と同定される細胞の増殖が少なかった。また、Bruch膜の弾力線維層の外層に、幼若な血管内皮細胞が、小さい管腔を作っている像が見られた(図5B, 5C)。しかし、網膜下腔への新生血管の発育、進展は見られなかった。光顕的に見られた脈絡膜に集まった明るい核を持つ細胞は、細胞間結合装置を持たず周囲に膠原線維がみられたことから、増殖した線維芽細胞と思われた(図5D)。

5. 光凝固後28日の所見

光凝固部の網膜下には色素顆粒を含む少数のマクロファージが見られたが、色素上皮細胞の増殖や新生血管の発育は全く見られなかった。凝固部中央の脈絡膜血管は消失したままで、線維性瘢痕組織となり、その中には扁平で細長い線維芽細胞と思われる細胞が見られた(図6)。

IV 考 按

網膜下新生血管の発生、発育、網膜下への進展、退縮は、種々の要因が複合して行われるものと思われる。最近では、新生血管の発生過程には、基底膜分解、血

管内皮細胞の遊走および増殖の各過程があり、この過程を調節する様々な因子（促進因子、抑制因子）の存在が明らかにされつつある¹¹⁻¹³。すなわち、新生血管の発育は、このような促進因子と抑制因子によって調節されているとの考え方が支配的である。

Archerら(1981)⁵)は、強度の光凝固によりサル眼に実験的に作成した網膜下新生血管において、発育した新生血管網には網膜色素上皮細胞が同伴していることを電顕的に示した。また、我々(1985)⁶)は、Ryanら⁴)によって確立された実験的網膜下新生血管のモデルについて、その自然経過の形態学的観察から、網膜下に進展した新生血管は常に増殖した網膜色素上皮細胞を伴っていることを報告した。しかし、色素上皮の新生血管への作用内容は不明であった。そこで我々は、実験的網膜下新生血管の発育初期に、網膜色素上皮がどのような役割を果たしているかを明らかにするために、新生血管の発育前に色素上皮を障害させる実験を行った⁷⁻¹⁰。

1. オルニチンによる網膜色素上皮障害

本実験では、網膜色素上皮を選択的に障害するために、オルニチンの硝子体内注入を行った。Kuwabaraら(1982)は、1M-オルニチン水溶液0.1mlを硝子体内に注入して、サルの網膜色素上皮が選択的に障害されることを報告した¹¹⁻¹³。また、最近では培養した網膜色素上皮細胞でも、オルニチンはプロリン、タウリンらに比べて低濃度で選択的毒性を示したとの報告がある¹⁴。我々は、このようなKuwabaraらの方法を用いて種々の量、濃度の硝子体内オルニチン注入実験を行った結果、彼らの約1/3の少量のオルニチンによって、感覚網膜にはほとんど障害を生じないで網膜色素上皮を選択的に障害することを確認した¹⁵。この障害は、オルニチンに特異的な毒性による障害ではないという報告¹⁶)や、高浸透圧による障害であると述べる考え¹⁶⁾¹⁹)もあるが、我々の実験では、前述のような少量のオルニチンの注入によって、注入1週間後には網膜色素上皮のみに選択的障害が見られ、ほとんどの色素上皮細胞が融解壊死に陥った。他方、神経網膜、脈絡膜には組織学的に異常を見なかった。注入2週間後には、再生した扁平な色素上皮細胞がBruch膜上を覆っていたが、その数は少なく、電顕像から細胞の障害が著明であった。この時期には、色素上皮の変性による2次的と思われる視細胞外節、内節の障害が見られたが、その他の感覚網膜や脈絡膜血管には、形態学的にオルニチンの直接毒性によるとと思われる変性は見られな

かった¹⁵。今までの報告では、アミノ酸が高濃度かつ多量投与され¹¹⁾⁻¹³⁾¹⁶⁾、その結果きわめて高張の浸透圧であったが、我々は低濃度かつ少量の投与を行ない、変性が網膜色素上皮に選択的に生じたと思われた。

2. 網膜下新生血管の発生率

本実験では、このような色素上皮障害のもとで、新生血管発生のための光凝固を行なった。我々は、すでに光凝固直後に1M/l オルニチン溶解液0.05mlを硝子体内に注入する実験をカニクイザル5眼(凝固斑80カ所)で行ない、この場合にはどの凝固部位からも網膜下新生血管が全く発生しなかった⁷。しかし、この実験は光凝固直後にオルニチンを投与したのでオルニチンが直接に血管新生を抑制したとの考えを否定できないため、本報では色素上皮が障害され、かつ薬物が眼内から消失して、その直接的影響がないと思われる注入後2週の時期を選んで、新生血管発生のための光凝固を行った。その結果、32カ所の凝固部位から網膜下新生血管は全く発生しなかった。すなわち、新生血管発生率は0%であって、板垣ら⁹)による自然経過観察群の新生血管発生率(47.0~25.6%)と比べて、個体差ないし種差をこえた結果であり、この実験からオルニチン投与による色素上皮障害の存在下では光凝固を行っても新生血管は発育しないことが確認された。

3. 網膜下新生血管発生初期における網膜色素上皮の役割

このような新生血管が発育しないという事実を解明するために、光凝固後早期の組織学的変化を重点的に観察した。Ishibashiら(1987)¹⁸)は、サル眼の実験的網膜下新生血管の発生初期を形態学的に観察し、光凝固後2~3日以降に、既存の脈絡膜血管に再内皮形成(re-endothelialization)と新生血管の発芽が起こる所見を報告した。彼らは光凝固後1日には多核白血球、光凝固2~3日以降にはマクロファージが、発芽、進展する血管内皮細胞の周囲に多数観察されたとし、網膜下新生血管の発生、発育には局所の炎症が直接的な引き金(促進因子)になっていることを強く示唆した。またSarks, Penfoldら¹⁹⁾²⁰⁾は人眼の病理組織学的研究において、加齢性変化によりBruch膜に沈着した多形性物質に向かって遊走した慢性炎症細胞が、老人性黄斑変性症の発生に関与するとの可能性を示している。このように炎症細胞が網膜下新生血管の発生に関与していることが明らかになってきている。

本報の我々の実験では、網膜色素上皮は新生血管発生に関与する因子の1つであるとの仮説のもとに実験

を行った。網膜色素上皮をオルニチンによってあらかじめ障害した状態で光凝固を行なうと、光凝固によって生じる通常の網膜色素上皮細胞の反応性増殖が殆ど見られなかった。通常、健全な網膜色素上皮は、光凝固後3~4日目から凝固部辺縁で盛んに有糸分裂して増殖し、光凝固により障害された部の修復を始める²¹⁾²²⁾。本実験では、光凝固後、網膜下腔や凝固部辺縁に増殖した紡錘型細胞の一部は、電顕的に網膜色素上皮細胞と思われたが、その数は少なく、むしろ線維芽細胞と思われる細胞が多く見られ、通常の光凝固にみられるような色素上皮細胞の反応性増殖を見なかった。一方、光凝固後3日には、電顕的に脈絡膜内に血管周囲に基底膜を持たない幼若な新生血管と思われる組織像が見られ、7日にはBruch膜下には新生血管が形成されていたが、それがBruch膜を超えて網膜下に進展することはなかった。また、臨床的にも網膜下新生血管の発生は全く見られなかった。すなわち、光凝固前にあらかじめ網膜色素上皮を障害しておく、新生血管は脈絡膜内で発芽し発育しても、その後Bruch膜を超えて網膜下腔に向かって進展しないことが明らかになった。この事実から、脈絡膜に発生した新生血管が、発生初期に網膜側に向かって進展する段階、すなわち網膜下腔への新生血管の誘導には、増殖した網膜色素上皮細胞が必要であると思われた。

最近、Morseら²³⁾は、培養したウシの網膜色素上皮細胞と脈絡膜血管内皮細胞との相互作用を観察し、継代培養を受けない若い培養網膜色素上皮が脈絡膜血管内皮細胞の増殖を促すことを報告した。またGlaserらは、血管内皮細胞が色素上皮細胞の遊走因子を産生するというデータ²⁴⁾や、ヒト培養網膜色素上皮細胞が、ヒト網膜細小血管の内皮細胞の増殖を刺激あるいは抑制する調節因子を放出すると報告している。さらにMarshallら²⁶⁾²⁷⁾は、網膜色素上皮細胞は網膜の細小血管内皮細胞の遊走因子を産生する²⁵⁾と報告している。またSchweigererら²⁸⁾は、培養網膜色素上皮細胞が線維芽細胞成長因子を合成し、これは毛細血管の内皮細胞の増殖を促進すると報告している。これらの培養網膜色素上皮細胞を用いた *in vitro* の研究では、刺激を与える細胞は網膜血管の血管内皮細胞を用いたものが多く、脈絡膜血管の内皮細胞を用いたものは少ないが、網膜色素上皮細胞が血管内皮細胞の遊走や増殖に、ある場合には促進的に働くことが明らかにされている。

また本実験で、脈絡膜内に発芽した新生血管の内皮

細胞の周囲には、多核白血球、マクロファージが見られ、このような所見は、Ishibashiら¹⁸⁾がのべる健全な網膜色素上皮存在のもとでの光凝固後の反応と大差なかった。また、光凝固3日から7日には網膜下や脈絡膜に多数の線維芽細胞の増殖が見られた。活性化された線維芽細胞は、血管内皮細胞の増殖因子を放出する細胞の1つであるとされており、血管新生に重要な役割を果たしていると考えられている³⁾。このような多核白血球や、マクロファージ、線維芽細胞がどのような働きを新生血管に及ぼしているかは今回の形態学的観察からは不明であるが、網膜色素上皮を障害しておく、このような血管新生促進因子を放出しうる細胞が脈絡膜や網膜下腔に見られたにもかかわらず、新生血管が網膜下腔に向かって発育しなかった。

最近、山岸ら⁷⁾⁸⁾¹⁰⁾はヨード酸ソーダの静脈内投与によりサル目の網膜色素上皮を障害して、我々と同様の研究を行ない、ヨード酸ソーダで色素上皮をあらかじめ障害しておく、網膜下新生血管が発生しなかったことから、網膜色素上皮は網膜下新生血管の発生進展に促進的に働くことを報告した。これは、今回の実験結果と一致し、異なる薬物による網膜色素上皮の障害によっても同様の結果が得られることが示された。

以上の形態学的観察から、脈絡膜血管から新生血管が形成され、網膜下へ進展する過程には、様々な細胞の反応が惹起されていることがわかり、そのうち網膜色素上皮細胞は網膜下腔で増殖して、脈絡膜新生血管がBruch膜を超えて網膜下へ進展するのに誘導的に働いているとの我々の考えを確認することができた。

本稿の要旨は第92回日本眼科学会総会（昭和63年3月24日）において高橋が報告した。本研究は文部省科学研究費補助金一般研究B(63480401, 宇山)、奨励研究A(62771401, 板垣, 63771429, 山本)によって援助を受けた。記して謝意を表します。

付図説明

図1：蛍光眼底造影写真

1A：オルニチン注入後1週：乳頭中心窩周囲の小領域を除いて、眼底全体がびまん性の著明な過蛍光を示した。網膜色素上皮の急性の強い障害を示していた。

1B：オルニチン注入後2週：眼底のびまん性の過蛍光は消失し、顆粒状の過蛍光となった。中心窩領域にも色素上皮の変性を表わす顆粒状の過蛍光が及んでいた。このような眼底の状態で光凝固を行った直後の写真で、凝固斑からにじむような蛍光漏出が見られた。

1C: 光凝固後4週, オルニチン注入後6週: 眼底後極部は強い顆粒状の過蛍光を示し, それより周辺部はより細かい顆粒状の過蛍光を示した. 両者の間には比較的鮮明な境界線が見られた. 光凝固部には蛍光漏出が見られず, 臨床的に網膜下新生血管は発生しなかった.

図2: オルニチン注入後1週の組織学的所見

2A: 光顕所見: 網膜色素上皮は選択的に融解壊死に陥って消失し, Bruch膜は所々に網膜下腔に露出していた. Bruch膜上にはメラニン色素を胞体内に大量に含むマクロファージ様細胞が散在性に見られた. 視細胞外節より内層の神経網膜, 脈絡膜には著変は見られなかった(×150, トルイジンブルー染色).
2B: 電顕所見: 網膜色素上皮は融解壊死に陥り, 網膜下腔にはメラニン顆粒を含む細胞崩壊物(D)が見られた. 色素上皮の基底膜は残存しており, Bruch膜(Br)上には細胞極性がなく, メラニン顆粒やphagosomeを豊富に含むマクロファージ(M)と思われる細胞が見られた. 脈絡膜毛細血管(CC)の内皮細胞には障害は見られなかった(OS: 視細胞外節).

図3: オルニチン注入後2週の組織学的所見

3A: 光顕所見: 網膜色素上皮は著しく扁平となってBruch膜上を覆い, 網膜下腔にはマクロファージ様細胞が多く見られた. 視細胞外節は短縮しているが, 外顆粒層より内層の網膜には障害は見られず, 脈絡膜毛細血管にも異常は見られなかった(×150, トルイジンブルー染色).

3B: 電顕所見: 網膜色素上皮は著しく扁平で, 細胞内小器官, 胞体内のメラニン顆粒は著明に減少していた. 視細胞外節は脱落し, 内節(IS)が下降し, ミトコンドリアの膨化が見られた. 脈絡膜毛細血管(CC)に異常は見られなかった.

図4: 光凝固後3日の組織学的所見

4A: 光凝固部の光顕所見: Bruch膜の断裂部付近の網膜下腔には, メラニン顆粒を豊富に含む類円形のマクロファージ様細胞と, 線維芽細胞様の紡錘型細胞が見られた. 脈絡膜深層には巨細胞が見られ, 既存の脈絡膜血管内には明るい核を持つ細胞(白い矢印)が見られた(×150, トルイジンブルー染色, 黒い矢印はBruch膜の断裂部を示す).

4B: 光凝固部辺縁の電顕所見: Bruch膜上には扁平な胞体を持つ網膜色素上皮細胞(RPE)と, 網膜下腔に遊走したマクロファージと思われる細胞(*)が見られた. 全体として網膜色素上皮細胞と同定しうる細胞の反応性増殖は少なかった. (barは1 μ m)

4C: 光凝固部辺縁, 脈絡膜内層の電顕所見: 管腔を形成した新生血管(NV)が見られ, その周囲には多核白血球(PMN), マクロファージ(M)が見られた.

4D: 4Cの新生血管の拡大像: 血管内皮細胞(En)は幼若で, 細胞内小器官が豊富であり, 未熟な細胞間結合装置(JC)によって接合していた. 細胞周囲には

明瞭な基底膜は見られなかった. 狭い内腔(L)を形成していた. (矢印: Weibel-Palade body.).

4E: 脈絡膜線維芽細胞の増殖: 脈絡膜内層の間質には, 発達した粗面小胞体を持つ線維芽細胞(Fb)が多数見られた.

図5: 光凝固後7日の組織学的所見

5A: 光顕所見: 網膜下腔の細胞はやや減少し, 脈絡膜内層には明るい核を持つ細胞(*)が多数集簇していた(×150, トルイジンブルー染色, 黒い矢印はBruch膜の断裂部を示す).

5B: 光凝固部辺縁の電顕像: Bruch膜(Br)弾力線維層(矢印)の下に, 狭い内腔を持つ幼若な血管(*)が見られたが, 網膜下腔へは新生血管は進展していなかった. 網膜色素上皮細胞(RPE)は基底陥入が消失し, 微絨毛も減少していた.

5C: Bruch膜下に見られた新生血管の拡大像: 血管内皮細胞(En)は幼若で, pinocytotic vesicleを多く含んでおり, fenestrationはほとんど見られなかった. 周囲には菲薄な基底膜がみられ, さらにその周囲には膠原線維が見られた. (MTL: multitubular lattice, Fb: 線維芽細胞).

5D: 脈絡膜にみられた線維芽細胞の電顕像: 5Aで見られた明るい細胞は, ミトコンドリアと粗面小胞体の目立つ線維芽細胞(Fb)であって, 密な増殖を示していた.

図6: 光凝固後28日の組織学的所見: 凝固部脈絡膜は線維化し, 網膜下腔には新生血管は見られなかった. Bruch膜断裂部にはマクロファージ(矢印の先)がみられたが, 色素上皮の増殖は見られなかった(×150, トルイジンブルー染色, 黒い矢印はBruch膜の断裂部を示す).

文 献

- 1) Glaser BM: Cell biology and biochemistry of endothelial cells and the phenomenon of intraocular neovascularization. Adler R, Farber D: The Retina part II. Orlando, Academic press: 215-243, 1986.
- 2) Glaser BM: Extracellular modulating factors and the control of intraocular neovascularization. Arch Ophthalmol 106: 603-607, 1988.
- 3) 菅 幹雄: 血管内皮細胞と新生血管. 代謝 25: 895-901, 1988.
- 4) Ryan SJ: Subretinal neovascularization. Natural history of an experimental model. Arch Ophthalmol 100: 1804-1809, 1982.
- 5) Archer DB, Gardiner TA: Electron microscopic features of experimental choroidal neovascularization. Am J Ophthalmol 91: 433-457, 1981.
- 6) 板垣 隆, 大熊 紘, 加藤直子他: 網膜下新生血管に関する実験的研究, 第1報: 実験的網膜下新生血管の発生, 日眼会誌 89: 600-610, 1985.

- 7) 板垣 隆, 大熊 紘, 山岸和矢他: 網膜下新生血管に関する実験的研究—新生血管発生, 進展における網膜色素上皮の関与—, *Therapeutic Research* 5: 665—670, 1986.
- 8) **Uyama M, Ohkuma H, Itagaki T, et al:** Choroidal neovascularization and the retinal pigment epithelium, Ben Ezra D (ed), *Doc. Ophthalmol. Proceeding series 50, Ocular circulation and neovascularization: 451—459*, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 1987.
- 9) 高橋寛二, 板垣 隆, 山岸和矢他: 実験的網膜下新生血管と網膜色素上皮の関連性—オルニチンによる網膜色素上皮障害実験, *眼紀* 39: 1444—1450, 1988.
- 10) 山岸和矢, 大熊 紘, 板垣 隆他: 網膜下新生血管と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.
- 11) **Kuwabara T, Ishikawa Y, Kaiser-Kupfer MI:** Experimental model of gyrate atrophy in animals. *Ophthalmology* 88: 331—334, 1981.
- 12) **Ishikawa Y, Kuwabara T, Kaiser-Kupfer MI:** Toxic effects of ornithine and its related compounds on the retina. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 153. *Urea Cycle Diseases*. Ed. Lowenthal A, Mori A, Marescau B, Plenum Press, New York, 1982.
- 13) 石川祐二郎, 向野利寛: 網膜変性疾患. 谷口慶晃, 猪俣 孟編: *眼科MOOK28, 眼病理学*, 東京, 金原出版, 274—285, 1986.
- 14) 植村恭夫, 田中靖彦, 気賀沢一輝: 培養網膜色素上皮細胞に及ぼすオルニチン, タウリンの影響, 厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究班, 昭和61年度報告書, 132—134, 1987.
- 15) 板垣 隆, 大熊 紘, 高橋寛二他: オルニチン網膜変性症, 厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究班, 昭和62年度報告書: 114—117, 1988, および第92回日眼総会, 一般講演にて発表(抄録集 p177)
- 16) 中島久雄, 水野勝義: 硝子体内アミノ酸注入における網膜変化, *日眼会誌* 87: 903—910, 1983.
- 17) **Marmor MF, Martin LJ, Tharpe S:** Osmotically induced retinal detachment in the rabbit and primate. *Electron microscopy of the pigment epithelium*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1016—1029, 1980.
- 18) **Ishibashi T, Miller H, Orr G, et al:** Morphologic observations on experimental subretinal neovascularization in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1116—1130, 1987.
- 19) **Penfold P, Killingsworth M, Sarks S:** An ultrastructural study of the role of leukocytes and fibroblasts in the breakdown of Bruch's membrane. *Aust J Ophthalmol* 12: 23—31, 1984.
- 20) **Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH:** Senile macular degeneration: The involvement of immunocompetent cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 223: 69—76, 1985.
- 21) **Wallow IHL, Tso MOM:** Repair after xenon arc photocoagulation 2. A clinical and light microscopic study of evolution of retinal lesions in rhesus monkeys. *Am J Ophthalmol* 75: 610—626, 1973.
- 22) 石川祐二郎: クセノン光凝固が旋されたサル網膜の修復機転に関する組織学的研究, *日眼会誌* 78: 606—622, 1974.
- 23) **Morse LS, Sidikaro Y, Terrel J:** Retinal pigment epithelium promotes proliferation of choroidal microvessels in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 27: 327, 1986.
- 24) **Campochiaro PA, Glaser BM:** Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. *Arch Ophthalmol* 103: 1876—1880, 1985.
- 25) **Conner T, Glaser BM:** RPE cells can simultaneously release inhibitors and stimulators of endothelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(Suppl): 203, 1987.
- 26) **Wong HC, Boulton ME, Clark P, et al:** Retinal pigment epithelial cells produce mitogenic factors for retinal microvascular cells in culture: A preliminary report, *Eye* 1: 754—756, 1987.
- 27) **Wong HC, Boulton M, McLeod D, et al:** Retinal pigment epithelial cells in culture produce retinal vascular mitogens. *Arch Ophthalmol* 106: 1439—1443, 1988.
- 28) **Schweigerer L, Malerstein B, Neufeld G:** Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. *Biochem and Biophysic Research Comm* 143: 934—940, 1987.