

硝子体出血に伴う網膜グリア細胞の初期動態に 関する実験的研究

向野 利寛*, 古川 博*, 東 真千子*, 秋谷 忍*, 向野 利彦**

*産業医科大学眼科学教室, **九州大学医学部眼科学教室

要 約

硝子体出血に伴う網膜上増殖組織の発生に関与するグリア細胞の網膜表面への伸展過程と内境界膜の変化を観察するために、白色家兎硝子体腔内に自家全血液0.3mlを注入し、血液注入3日後から28日後まで光学顕微鏡、透過型および走査型電子顕微鏡で観察した。1) 血液注入7日後に赤血球成分は網膜表面に達し、その部位ではグリア細胞が隆起し、内境界膜の lamina rara が菲薄化した。2) その後、グリア細胞が内境界膜を貫通して網膜表面に伸展増殖し、赤血球残渣を貪食した。3) 血液注入28日後ではグリア細胞が内境界膜を貫く部位以外では内境界膜は正常構造を呈していた。4) 網膜近くの硝子体線維は血液注入後しだいに粗造となり、その量が減少した。以上より、赤血球が内境界膜上に到達した部位ではグリア細胞は内境界膜を積極的に貫き、網膜表面へ伸展増殖して赤血球を貪食すると考えられた。(日眼会誌 94:333-339, 1990)

キーワード：硝子体出血, グリア細胞, 赤血球, 家兎眼, 電子顕微鏡

Experimental Studies of Retinal Glial Cell Proliferation on Retinal Surface

Toshihiro Kono*, Hiroshi Hurukawa*, Machiko Higashi*
Shinobu Akiya* and Toshihiko Kohno**

*Department of Ophthalmology, University of Occupational and Environmental Health, Japan

**Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

Our previous reports described the formation processes of epiretinal membranes composed of retinal glial cells in the experimental vitreous hemorrhage. This report presents the pathological changes of retinal glial cells, inner limiting membranes and vitreous body in the early stage of experimental vitreous hemorrhage. Using an operating microscope, 0.3ml of autologous whole blood was injected through the pars plana into the vitreous cavity of albino rabbits. The eyes were enucleated at 3, 7, 10, 14 and 28 days after injection. Three days after injection, normal vitreous structure disappeared and vitreous fibers condensed. Seven days after injection, red blood cells were found on the retinal surface. The inner limiting membrane, composed of lamina rara and lamina densa, had a normal appearance. Where the red blood cell were present on the retinal surface, the lamina rara of the inner limiting membrane became thin. Fourteen days after injection, where glial

別刷請求先：807 北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 産業医科大学眼科学教室 向野 利寛
(平成元年6月19日受付, 平成元年10月4日改訂受理)

Reprint requests to: Toshihiro Kono, M.D. Dept. of Ophthalmol., Univ. of Occupational and Environmental Health, Japan

1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyusyu 807, Japan

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

cells showed upheaval, lamina rara disappeared and lamina densa became thin. Afterward, glial cells extruded their cytoplasmic processes onto the retinal surface. Twenty-eight days after injection, the inner limiting membranes were normal in appearance except for the area of glial cells penetrating the inner limiting membranes. The results suggested that, in vitreous hemorrhage, glial cell proliferation onto the retinal surface is an active reaction in order to engulf the debris of the red blood cells. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94 : 333—339, 1990)

Key words: Vitreous hemorrhage, Glial cell, Red blood cell, Rabbit's eye, Electron microscope

I 緒 言

硝子体出血後に内境界膜上に増殖組織が形成されることはよく知られており、実験的硝子体出血においてもグリア細胞などからなる網膜上増殖組織がみられる^{1)~3)}。

私達は白色家兎を用いて自家全血液0.3mlを硝子体腔内へ注入し、血液注入2週後にはグリア細胞からなる網膜上増殖組織が形成され、時間の経過と共に網膜上増殖組織は肥厚してゆくことを観察し報告した⁴⁾⁵⁾。しかし、グリア細胞が網膜表面へ伸展する際の内境界膜の変化や、グリア細胞が増殖する場合の硝子体線維との関連は不明である。そこで今回、同じ実験モデルを用いて網膜上増殖組織の発生初期における内境界膜とグリア細胞の変化および硝子体との関係を観察し、興味ある知見をえたので報告する。

II 実験材料および実験方法

実験材料として、体重約3kgの白色家兎10羽20眼を用いた。実験モデルの作成は既報⁴⁾のごとく硝子体腔内に自家全血0.3mlを注入し、3, 7, 10, 14, 28日後に眼球摘出を行なった。各時期毎に実験眼3眼、対照眼1眼とした。摘出眼球は直ちに4%グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液に約10分間浸した後、12時部毛様体部に窓を開け、さらに24時間浸した。その後、毛様体部で眼球を前後に折半し、実体顕微鏡で観察後、視神経乳頭中央で左右に半切した。左半分は10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋して光学顕微鏡用切片を作成し、アルシアン青・PAS染色を施して光学顕微鏡観察に供し、右半分は視神経乳頭下縁より2mmごとに細切し、4%グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液に浸した。一部の試料は前固定時にアルシアン青を添加した4%グルタルアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液を用いた。その後、1%オスミウム酸・0.1M カコジル酸緩衝液で後固定し、アル

コール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。切片はポーターブラムMT2型超マイクロトームで作成し、厚めの切片はトルイジン青染色液で染色後、光学顕微鏡観察に供し、超薄切片は酢酸ウラニールとクエン酸鉛で2重染色を行なった後、日本電子100EX電子顕微鏡で観察した。実験眼3眼のうち1眼では視神経乳頭より下方約4mmから12mmの部位で、幅5mmの切片を切り出して、型の如く固定脱水した後、臨界点乾燥を行ない白金を蒸着して走査型電子顕微鏡用試料を作成、観察した。

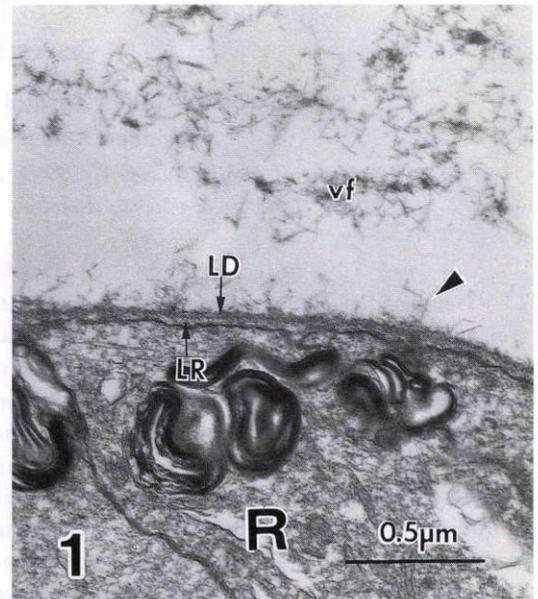


図1 正常家兎眼の網膜内境界膜の透過型電子顕微鏡写真。内境界膜は電子密度の低い lamina rara (LR) と電子密度の高い lamina densa (LD) から構成されている。lamina densa に斜めに接触する硝子体の微細な線維 (矢印) がみられる。

R: 網膜 (アルシアン青処理, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 28,000$)

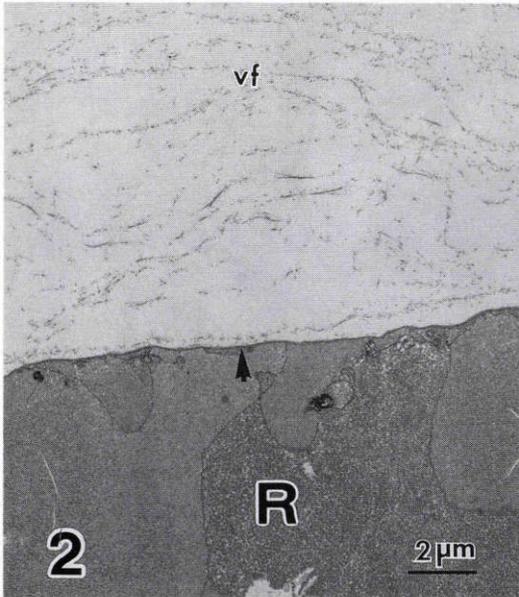


図2 生理食塩水注入14日後の家兎眼網膜硝子体境界の透過型電子顕微鏡写真。硝子体線維(vf)は内境界膜(矢印)にはほぼ平行に走行している。内境界膜は正常構造を呈している。

R: 網膜(アルシアン青処理, 酢酸ウラニール, クエン酸鉛染色, $\times 4,500$)

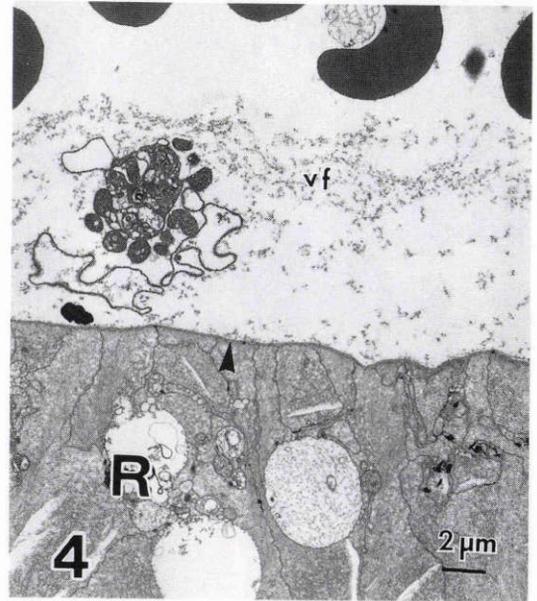


図4 血液注入7日後の家兎眼網膜硝子体境界の透過型電子顕微鏡写真。硝子体線維(vf)は連続性を失って粗造になり、その中に赤血球やその残渣が認められる。内境界膜(矢印)に異常はみられない。

R: 網膜(アルシアン青処理, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 3,400$)

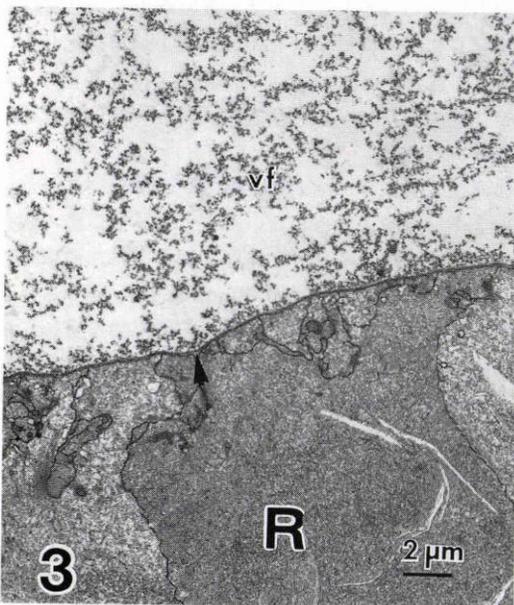


図3 血液注入3日後の家兎眼網膜硝子体境界の透過型電子顕微鏡写真。硝子体線維(vf)はやや濃縮し、線維構造に乱れがある。赤血球は内境界膜(矢印)近傍にはみられない。

R: 網膜(アルシアン青処理, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 4,600$)

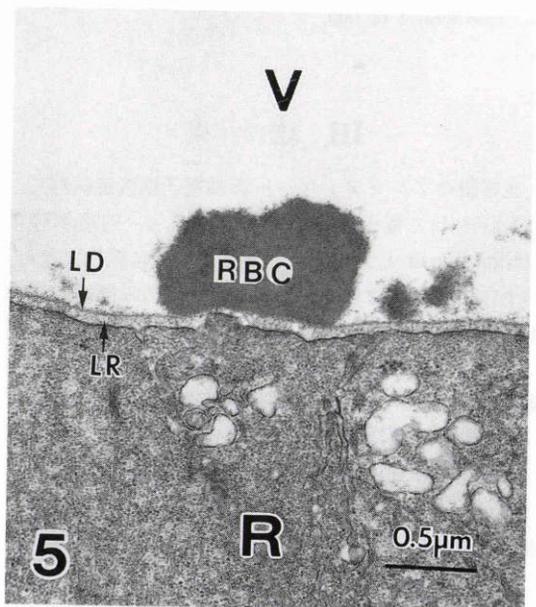


図5 血液注入7日後の家兎眼網膜硝子体境界の透過型電子顕微鏡写真。内境界膜上に赤血球(RBC)が存在する部位ではlamina rara(LR)が非薄化し、グリア細胞が隆起している所見が観察される。

V: 硝子体腔, LD: lamina densa, R: 網膜(酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 23,000$)

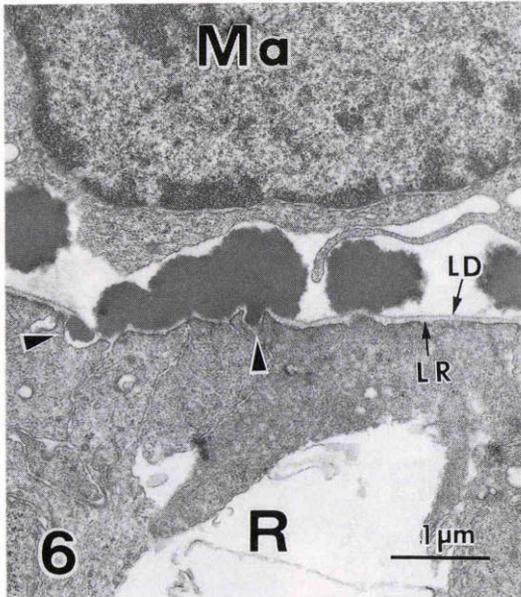


図6 血液注入14日後の家兎眼網膜硝子体境界の透過型電子顕微鏡写真。内境界膜が一部消失して、赤血球残渣が網膜内のグリア細胞に取り込まれたり(矢頭), グリア細胞が隆起して lamina densa (LD) や lamina rara (LR) が非薄化した部位が認められる。

Ma: 貪食細胞, R: 網膜(酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 12,500$)

III 結果

正常眼のアルシアンブルー添加電子顕微鏡試料で切片を作成して電子顕微鏡で観察すると, 内境界膜の lamina densa と lamina rara とは明瞭に区別できた。硝子体の微細な線維が lamina densa にはほぼ垂直に付着していた(図1)。硝子体腔内に生理食塩水を注入した対照眼では, 硝子体線維は正常眼よりやや濃縮して観察されたが, 内境界膜やその近くの硝子体線維の走行は正常眼と同様であった(図2)。

血液注入3日後では, 赤血球集塊はまだ内境界膜から離れた硝子体中央にあり, 網膜近くの硝子体線維は層構造が壊れてやや濃縮していた。しかし, 内境界膜に変化は認められなかった(図3)。

血液注入7日後では硝子体線維はさらに粗造となり, 内境界膜に平行な走行はまったくみられず, 赤血球は内境界膜近くに達していた。しかし, 内境界膜はほぼ正常構造を呈していた(図4)。赤血球残渣が内境

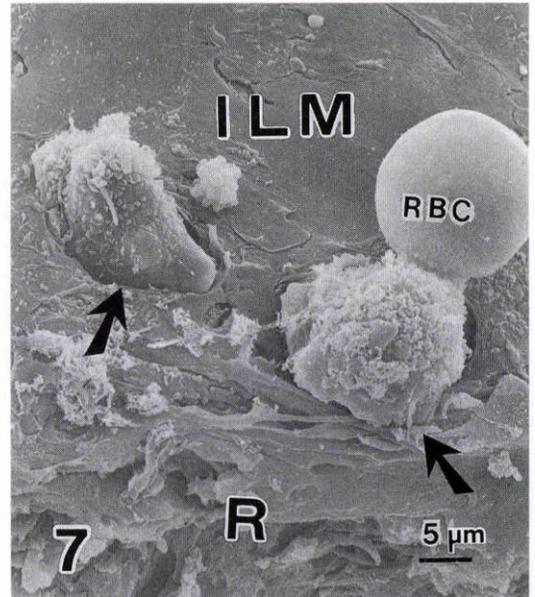


図7 血液注入14日後の家兎眼網膜硝子体境界の走査型電子顕微鏡写真。内境界膜(ILM)の孔からグリア細胞の突起(矢印)が網膜(R)表面へ伸展している。

RBC: 赤血球

界膜上にみられるところでは, その直下のグリア細胞が隆起して, 内境界膜の lamina rara が非薄化している所見が観察された(図5)。血液注入10日後もほぼ同様の状態であり, グリア細胞の網膜上への伸展は観察されなかった。

血液注入14日後には網膜上増殖組織が観察された。網膜上増殖組織がみられない部位を電子顕微鏡で観察すると, 血液注入7日後と同様に網膜上に赤血球残渣がある部位では, 内境界膜の lamina rara が非薄化している部位やグリア細胞の突起が内境界膜を貫いて網膜上へ伸展している所見が観察された。また, 内境界膜が消失して赤血球残渣が網膜内のグリア細胞に取り込まれている所見が観察された(図6)。走査型電子顕微鏡で観察すると, 内境界膜の孔よりグリア細胞が網膜表面に突起をだしている所見が観察された(図7)。透過型電子顕微鏡試料の連続切片を作成して観察すると, 赤血球残渣が内境界膜上に存在するところではグリア細胞が隆起して内境界膜の lamina rara は非薄化し(図8a), さらに消失した(図8b)。その後 lamina densa も非薄化して, ついには lamina densa を突き破ってグリア細胞は網膜表面に伸展した(図8c)。そし

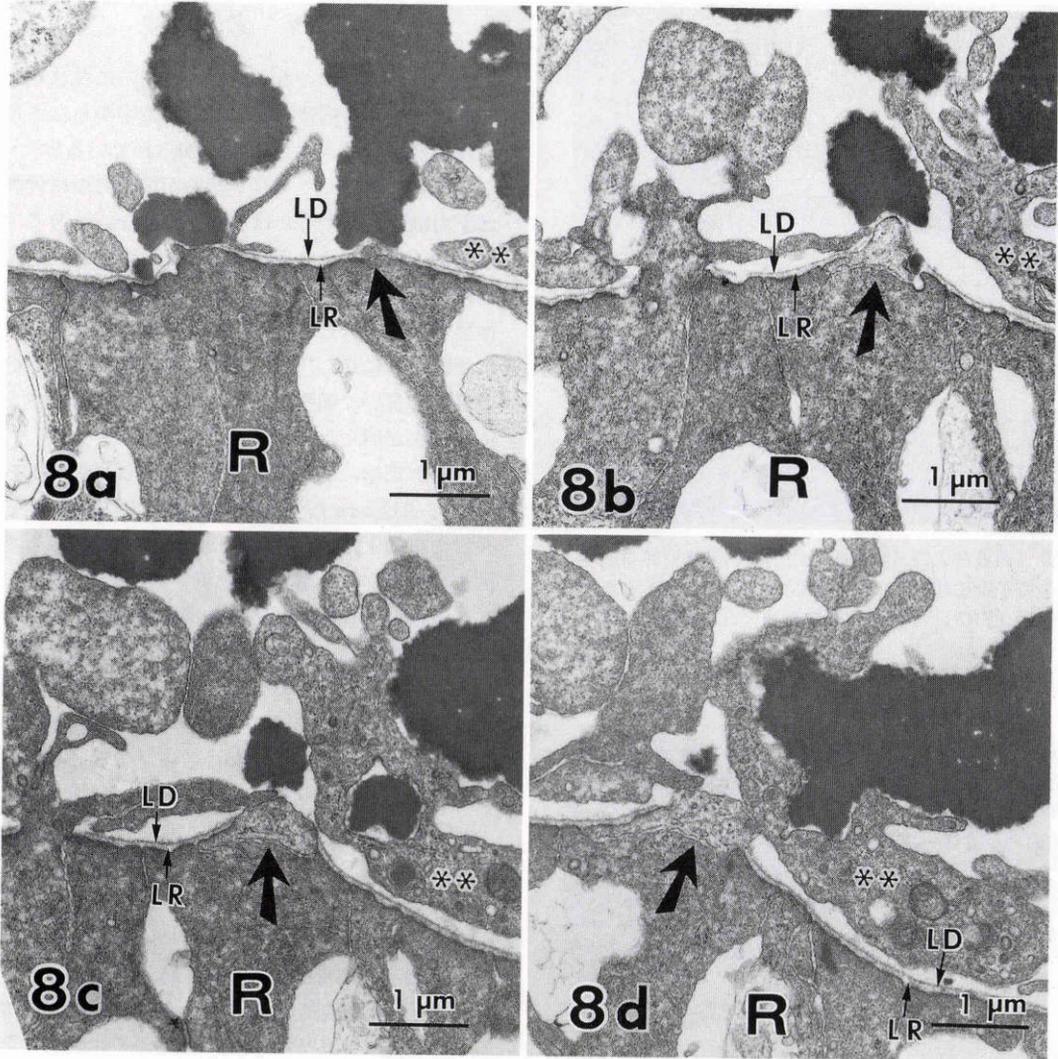


図8 血液注入14日後の家兎眼網膜硝子体境界の連続切片透過型電子顕微鏡写真。グリア細胞がやや隆起し(矢印)、その部の lamina rara (LR) が菲薄化している (a)。グリア細胞の隆起につれて lamina rara が消失し、lamina densa (LD) も菲薄化し (b)、lamina densa を突き破ってグリア細胞が網膜表面に伸展している (c)。そして、赤血球を取り込んだ網膜上増殖組織 (**) と連続している (d)。R: 網膜 (酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 12,600$)

て、赤血球残渣を取り込んだ網膜表面のグリア細胞と連続していた(図8d)。すなわちグリア細胞は赤血球残渣のあるところで内境界膜を破り網膜表面に伸展していた。また硝子体線維は内境界膜近くにわずかに認められるのみとなっていた。

血液注入28日後では光学顕微鏡で観察すると、時に肥厚した網膜上増殖組織が内境界膜近くに残った硝子体線維に沿って伸びている所見が観察された。電子顕

微鏡で観察すると、硝子体線維は内境界膜と網膜上増殖組織の間に帯状に存在していた(図9)。しかし、硝子体線維が内境界膜近くや網膜上増殖組織の間にわずかに存在する所見も観察され(図10)、硝子体線維と網膜上増殖組織とのはっきりした関係は不明であった。内境界膜はグリア細胞が内境界膜を貫いて網膜表面に伸展している部位以外は正常構造を呈していた(図9, 10)。

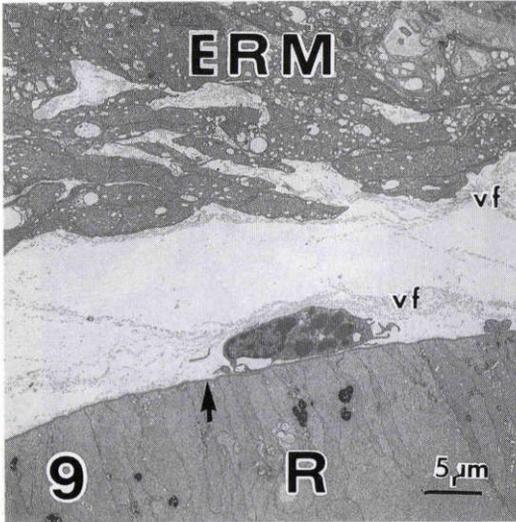


図9 血液注入28日後の家兎眼網膜硝子体境界の透過型電子顕微鏡写真。内境界膜(矢印)と網膜上増殖組織(ERM)の間に硝子体線維(vf)が带状に認められる。

R: 網膜(アルシアン青処理, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 1,700$)

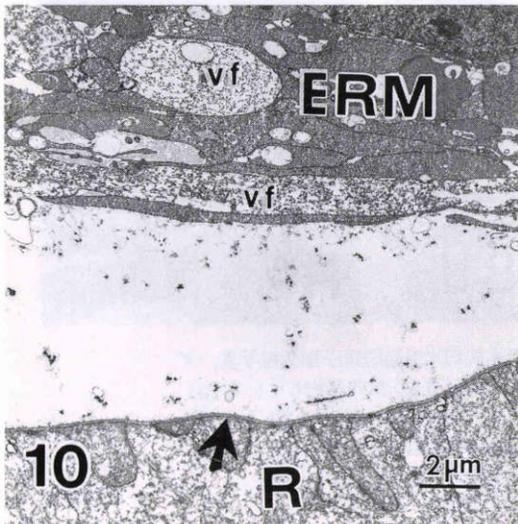


図10 血液注入28日後の透過型電子顕微鏡写真。内境界膜(矢印)と網膜上増殖組織(ERM)の間や網膜上増殖組織内に変性した硝子体線維(vf)がみられる。内境界膜は正常構造を呈している。

R: 網膜(アルシアン青処理, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛染色, $\times 4,200$)

IV 考 按

硝子体出血が起こると、硝子体腔内に塊状物を形成するとともに、網膜表面にグリア細胞からなる網膜上増殖組織が形成されることが知られている¹¹⁻¹⁴⁾。しかし、どのようにしてグリア細胞が網膜表面に伸展して増殖組織を形成するかは明らかではない。そこで白色家兎硝子体腔内に自家全血0.3mlを注入し、網膜上増殖組織を形成するにいたるグリア細胞の網膜表面への伸展過程を検討した。その結果、赤血球は注入7日後に網膜表面に達し、その部でグリア細胞が積極的に内境界膜を貫いて網膜表面に伸展し、赤血球残渣を取り込むことが明らかとなった。

グリア細胞には異物貪食作用があることが知られている⁶⁾。Algereveら⁷⁾は硝子体腔内にカーボン粒子を注入して網膜上増殖組織を形成した。この場合も網膜表面にいたグリア細胞はカーボン粒子を取り込んでいた。すなわち網膜グリア細胞は網膜内や網膜下のみでなく、網膜表面へも積極的に伸展しうることを示している。硝子体腔内へた赤血球ははだいに自己崩壊する⁸⁾。硝子体腔内の赤血球は異物であり、硝子体出血の初期にはマクロファージが多数出現する。この異物である赤血球や赤血球残渣が網膜近くに到達することにより、グリア細胞が異物反応を起こして網膜表面に伸展すると考えられる。

硝子体出血の約2週間後には後部硝子体剥離が引き起こされることが知られている¹⁰⁾。網膜上増殖組織の形成は何らかの理由で後部硝子体剥離が起こり、その時内境界膜も剥離してその部からグリア細胞が増殖するとの意見がある¹¹⁾。しかし、後部硝子体剥離が形態学的にどのような状態なのかは明らかでない。今回の実験モデルでは血液注入14日後の内境界膜は種々の形態を呈していたが、グリア細胞による内境界膜の穿破部以外に明かな欠損は観察されなかった。血液注入28日後には内境界膜はほぼ正常構造を呈していた。グリア細胞による網膜上増殖組織の形成は後部硝子体剥離とは無関係と考えられた。

網膜上増殖組織と硝子体線維の関係は今回の観察では明らかにできなかった。網膜上増殖組織と硝子体の関係については、後部硝子体膜に沿って増殖組織が伸展するか、後部硝子体剥離がある場合には網膜内境界膜に沿って伸展増殖すると考えられている。しかし、向野⁹⁾は人眼において網膜グリア細胞は後部硝子体膜に沿って伸展するだけでなく、硝子体の中へも伸展する

ことを観察している。今回の実験モデルでは出血によって硝子体は正常構造を失い硝子体線維が粗造になり、硝子体後部と網膜との関係は明瞭ではなかったが、網膜上増殖組織はもっぱら内境界膜上に形成されていた。しかし、血液注入28日後では硝子体線維が肥厚した網膜上増殖組織の間に観察されており、硝子体の中へ増殖組織が伸展してゆく可能性も考えられた。

文 献

- 1) 桐山豪三：硝子体出血の吸収機転ならびに同出血の吸収促進に関する実験的研究。日眼会誌 42：1773—1802, 1938.
- 2) Bennet TO, Peyman GA, Vlcek JK：Intravitreal injection of autologous blood in primates. *Canad J Ophthalmol* 10：248—253, 1975.
- 3) Ehrenberg M, Thresher RJ, Macherer R：Vitreous hemorrhage nontoxic to retina as a stimulator of glial and fibrous proliferation. *Am J Ophthalmol* 97：611—626, 1984.
- 4) 向野利寛：硝子体出血に伴う網膜前増殖組織の発生機序に関する実験病理学的研究。日眼会誌 91：911—922, 1987.
- 5) 向野利寛, 東真千子：硝子体出血に伴う網膜前増殖組織形成後長期の変化についての実験的研究。日眼会誌 92：857—863, 1988.
- 6) 生井 浩：グリア細胞系を中心とした網膜の病理。日眼会誌 78：1245—1263, 1974.
- 7) Algreve P, Kock E：Experimental epiretinal membranes induced by intravitreal carbon particles. *Am J Ophthalmol* 96：345—353, 1983.
- 8) Forrester JV, Grierson I, Lee WR：Comparative studies of erythrophagocytosis in the rabbit and human vitreous. *Albrecht v Graefes Arch exp Ophthalmol* 208：143—158, 1975.
- 9) 向野利彦：網膜硝子体病変の病理—網膜硝子体境界におけるグリア細胞の増殖—。あたらしい眼科 5：1569—1578, 1988.
- 10) Forrester JV, Lee WR, Williamson J：The pathology of vitreous hemorrhage I. Gross and histological appearance. *Arch Ophthalmol* 96：703—710, 1978.
- 11) Foos RY：Vitreoretinal juncture—Simple epiretinal membranes—。Albrecht v Graefes *Arch Klin Exp Ophthalmol* 189：231—250, 1974.