

有色家兎による実験的増殖性硝子体網膜症 モデルの作成とその評価

栗山 晶治, 大内 晶代, 岡田 守生, 山川 良治, 吉村 長久, 本田 孔士

京都大学医学部眼科学教室

要 約

増殖性硝子体網膜症（以下 PVR）の治療（硝子体内薬物，放射線等），発生病理の解明等の為に，培養細胞を使って PVR の病態を反映する有効な動物モデルを確立した。有色家兎の硝子体中に SF_6 ガスを注入し後部硝子体剝離を作った後，培養細胞を硝子体内に注入散布した。経過観察期間は 4 週間で，PVR の STAGE 分類は Hida らの分類に従った。注入培養細胞は家兎皮膚線維芽細胞（ 5×10^4 と 10×10^4 個）及びヒト網膜色素上皮細胞（ 5×10^4 個）を用いた。4 週間目で STAGE 5~7（牽引性網膜剝離）となったのは家兎線維芽細胞で， 5×10^4 個注入（41 眼）では 37% であり， 10×10^4 個注入（14 眼）では 86% という高率であった。ヒト網膜色素上皮細胞注入（10 眼）はいずれも 4 週間を越えても STAGE 2 以上の進行を示さなかった。以上より，今回の我々の PVR モデルでは線維芽細胞を 10×10^4 個注入するのが最も良いとわかった。（日眼会誌 94：792-798，1990）

キーワード：増殖性硝子体網膜症，PVR モデル，家兎線維芽細胞，ヒト網膜色素上皮細胞， SF_6 ガス

Evaluation of Experimental Proliferative Vitreoretinopathy in Rabbits

Shoji Kuriyama, Teruyo Ohuchi, Morio Okada

Ryoji Yamakawa, Nagahisa Yoshimura and Yoshihito Honda

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Abstract

We established an effective animal experimental model for proliferative vitreoretinopathy (PVR) by intravitreally injecting cultured cells in order to investigate therapies for PVR, including intravitreal drugs, radiation and hyperthermia. After making posterior vitreal separation by injecting SF_6 gas into the rabbit's vitreous body, cultured cells were intravitreally injected. Fundus changes were followed up for 4 weeks and PVR stage was recorded according to the classification described by Hida et al. The cultured cells injected were rabbit dermal fibroblasts (5×10^4 and 10×10^4) and human retinal pigment epithelial (RPE) cells (5×10^4). A total of 37% of animals reached STAGE 5~7 (traction retinal detachment) in 4 weeks in 41 eyes injected with 5×10^4 rabbit fibroblasts and were 86% in 14 eyes injected with 10×10^4 rabbit fibroblasts. The 10 eyes injected with human RPE cells showed STAGE 2 or less in 4 weeks. Consequently, we selected the experimental PVR model using injecting of 10×10^4 rabbit fibroblasts as the most effective method. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94:792-798, 1990)

Key words: Proliferative vitreoretinopathy (PVR), Experimental PVR model, Rabbit fibroblasts, Human retinal pigment epithelial cells, SF_6 gas

別刷請求先：606 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学医学部眼科学教室 栗山 晶治
(平成元年11月7日受付，平成2年1月29日改訂受理)

Reprint requests to: Shoji Kuriyama, MD Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.
53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received November 7, 1989 and accepted in revised form January 29, 1990)

I 緒 言

増殖性硝子体網膜症(以下PVR)は網膜剥離術後に起こる難治性疾患であり、外科的アプローチをはじめとして、薬物療法、放射線療法等の様々な治療法が現在に至るまでに試みられ、一定の成果が示されてきた。このPVRに対する治療法のin vivoでの有効性を評価する為に開発されたのが、有色家兎をはじめとした動物の眼内に培養細胞を注入し実験的増殖性硝子体網膜症を発生させた、いわゆるPVRモデルである。今回、我々は新たなPVR治療法を開発するに当たって、その土台となるべくPVRモデルをより適確なものにする為、2種類の培養細胞を使い、そのPVRモデルを比較検討してみた。

II 実験方法

1) ガスコンプレッション

有色家兎(体重1.5~2.5kg)をketamine hydrochloride(30mg/kg)筋注にて麻酔した。0.5%xylocaineを点眼後、強角膜輪部より4mm後方6時方向から26ゲージ針を硝子体中に挿入し、SF₆ガスを0.3ml注入した。この1週間後、同様の方法にてSF₆ガスを0.5ml硝子体中に追加注入した。

2) 培養細胞

家兎皮膚線維芽細胞:有色家兎臀部皮膚より、5mm×5mmの皮膚組織片を切り取り、penicillin(1,000 IU/ml), streptomycin(1,000μg/ml), amphotericin B(2.5μg/ml)を含むcalcium, magnesium free phosphate buffered saline(PBS)で3時間洗浄後、組織片を細切し少量のFBS(fetal bovine serum)に1~2日浸した後、徐々にDulbecco's modified minimum essential medium(DMEM)(15%FBS, penicillin(100 IU/ml), streptomycin(100μg/ml), amphotericin B(0.25μg/ml)を含む)を加えていき培養した。

ヒト網膜色素上皮細胞:摘出眼球をpenicillin(1,000 IU/ml), streptomycin(1,000μg/ml), amphotericin B(2.5μg/ml)を含むPBSで洗浄後、前眼部、硝子体を除去、感覚網膜を剥離し眼杯に0.25% trypsinを加え、37℃, 5%CO₂ incubator内で10分間定温培養した。その後、DMEMを眼杯に加えビベッティングにて網膜色素上皮細胞を脈絡膜より分離し、遠沈(800rpm, 5分間)後、DMEMで培養した。

両細胞共に3~6代目のものを細胞注入の為に使用した。

3) 細胞注入

培養細胞をPBSで洗浄後、0.25%trypsin(Difco)と0.02%EDTA中にて5分間37℃定温培養した後、DMEMを加えビベッティングにて採取し、遠沈(800rpm, 5分間)後PBS中に浮遊させた。細胞数測定とtrypan blueによるcell viability測定の後、細胞を、0.1mlのPBS中に各々の数(家兎皮膚線維芽細胞:5×10⁴個と10×10⁴個、ヒト網膜色素上皮細胞:5×10⁴個)だけ調製した。

2回目のガス注入1週間後、家兎を同様の方法にて麻酔し、Mydrin P®点眼にて散瞳した。各細胞数を含んだPBS 0.1mlを角膜輪部より4mm後方上耳側方向より27ゲージ針を使って硝子体中に注入した。針先を手術用顕微鏡を通して、髓翼上に位置するように操作し、細胞を網膜に損傷を与えないように緩やかに注入した。この直後、家兎を細胞が網膜髓翼上に落ち着くように1時間仰臥位に保った。対照には細胞の代わりにPBSのみ0.1ml注入した。

4) 経過観察

眼底観察は手術用顕微鏡と硝子体手術用コンタクトレンズを使って、細胞注入後2, 4日目, 1, 2, 3, 4週間目に行った。PVRのステージ分類はHidaらの分類(表1)に従った。28日目に家兎を過剰量のphenobarbitalの静注により屠殺し、家兎眼をすぐに4%glutaraldehydeにより固定し、型のごとく光顕用標本とした。

III 結 果

家兎線維芽細胞5×10⁴個を注入した41眼中、STAGE 7を示したのは1週後で4眼、4週後で9眼であった。一方、6眼が4週間を経過しても何ら変化を示さなかった(表2)。STAGE 5~7つまり牽引性網膜剥離を示したのは2週後で11眼(27%)、4週後で15眼(37%)であった(表5)。

家兎線維芽細胞10×10⁴個を注入した14眼は、4日後で全眼がSTAGE 2以上を示し、4週後には9眼がSTAGE 7を示した(表3)。STAGE 5~7を示したのは2週後で10眼(71%)、4週後で12眼(86%)であった(表5)。

家兎線維芽細胞に関し、5×10⁴個注入と10×10⁴個注入で、その牽引性網膜剥離発生率を比較すると2週後以降、有意差が認められた(χ^2 検定, $p < 0.01$)(表5)。

ヒト網膜色素上皮細胞5×10⁴個を注入した10眼は4週間を経過してもいずれもSTAGE 2以上を示さな

表1 PVR の STAGE 分類 (Hida らによる)

Stage	Proposed definition
0	Normal retina : occasional fine strands in the vitreous
1	Surface wrinkling : cellophane retinopathy, beaten metal appearance on wing
2	Mild pucker : small focal contraction (s) on wing (s) not elevated
3	Severe pucker : contraction of whole wing (s). Retina may be tented up (but not by strand)
4	Elevated pucker : pucker elevated by vitreous strand
5	Partial retinal detachment : involving on wing, with or without vitreous strands
6	Low retinal detachment : involving both wings, avascular retina attached
7	Total retinal detachment : usually closed funnel, with retinal holes

(Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol (1987) 225)

かった(表4)。

対照(10眼)はすべて増殖性変化を全く示さなかった。

PVR の光顕像では, STAGE 5~7では網膜は剝離し視神経乳頭の方へ引っ張られており, 乳頭の上で密な組織塊を形成しているのが観察された。STAGE 2~4では網膜髄翼上にパッカーが形成され(図1), 線維芽

細胞の薄い膜がしばしば血管網膜の表面に見られた(図2)。

IV 考 按

牽引性網膜剝離を実験的に生じさせた動物モデルは1968年の Machemer の owl monkey を使ったモデル¹⁾に遡ることになるが, 以来, PVR に関する様々な動物モデルが考案され, PVR 治療の為の評価対象として利用されてきた。その大多数^{2)~12)}は家兎を使ったものであるが, これは, 家兎眼底はヒト眼底とはその血管網膜の少なさから多少異なるといった形態学の問題を考慮にいれても, 実用的な問題つまり経済的問題, 取り扱い易さ等からして妥当な線であろう。

ガスコンプレッションを初めに行ったのは Chandler ら²⁾であり, それ以前はすべて無傷な硝子体中に細胞が注入されていた。ガスコンプレッションなしでは注入細胞の多くは硝子体ゲルに包埋されてしまい, 網膜髄翼上に散布される細胞数はわずかでありそれ故, 高率の牽引性網膜剝離を発生させるための注入細胞数は 20×10^4 以上という大量なものとなっていた。また, 無傷な硝子体中に細胞注入したものはあくまでも外傷性の PVR を表すものであり, 一般の網膜剝離術後に起こる PVR とは性格を異にするものであることを忘れてはならない。今回, 我々はガスコンプレッションの為に SF_6 ガスを使用した。2回のガス注入により後部硝子体剝離は髄翼周辺に部分的に形成され, 細胞注入の際, 細胞がこの後部硝子体腔に散乱するのが観

表2 家兎線維芽細胞 5×10^4 個注入における PVR 発生分布

S T A G E		2日後	4日後	1週後	2週後	3週後	4週後
	0	***** *****	*****	*****	*****	*****	*****
	1	***** ****	*****	*****	*****	*****	*****
	2	*****	*****	*****	*****	*****	****
	3		*****	*****	***	****	****
	4		***	*****	*****	*****	*****
	5			*	*	***	***
	6		*	**	***	***	***
	7			****	*****	*****	*****

* ; one eye

表 3 家兎線維芽細胞 10×10^4 個注入における PVR 発生分布

S T A G E		2 日後	4 日後	1 週後	2 週後	3 週後	4 週後
	0	***					
	1	****					
	2	*****	*****	**	**	**	**
	3		***	***	*		
	4		*	*****	*	**	
	5				***	**	***
	6		*				
	7		*	****	*****	*****	*****

* ; one eye

表 4 ヒト網膜色素上皮細胞 5×10^4 個注入における PVR 発生分布

S T A G E		2 日後	4 日後	1 週後	2 週後	3 週後	4 週後
	0	*****	*****	***	***	***	*****
	1	*****	*****	*****	*****	*****	**
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						

* ; one eye

察された. Chandler らは針刺入部位を事前に冷凍凝固をあて, 刺入部位よりの網膜剝離を防いでおり, また, gas-fluid exchange も行っているが, 我々は操作の煩雑さとそれによる眼球に対する侵襲の増大を避けるために以上の操作は敢えて行わなかった. しかし, 行わないことによると考えられる不利な点は認められなかった. 以上, 注入細胞数を少なくし, また, できるだけ本当の PVR の臨床像に近づける為にガスコンプレッションは必要不可欠な操作であるといえる.

PVR 形成に関与すると考えられる細胞には, 網膜色素上皮細胞(RPE), 線維芽細胞, マクロファージ, グリア細胞, myofibroblast-like cell^{(13)~(16)}等があげられるが, 大多数の PVR モデルが注入細胞として線維芽細胞を用いている^{2)~11)}. 今回, 我々は家兎線維芽細胞とヒト RPE を用いたが, 家兎線維芽細胞が良好な増殖性変化を示したのに比し, ヒト RPE は殆ど増殖性変化を示さなかった. これは家兎とヒトといった細胞の種差よりも線維芽細胞と RPE という細胞差に帰さ

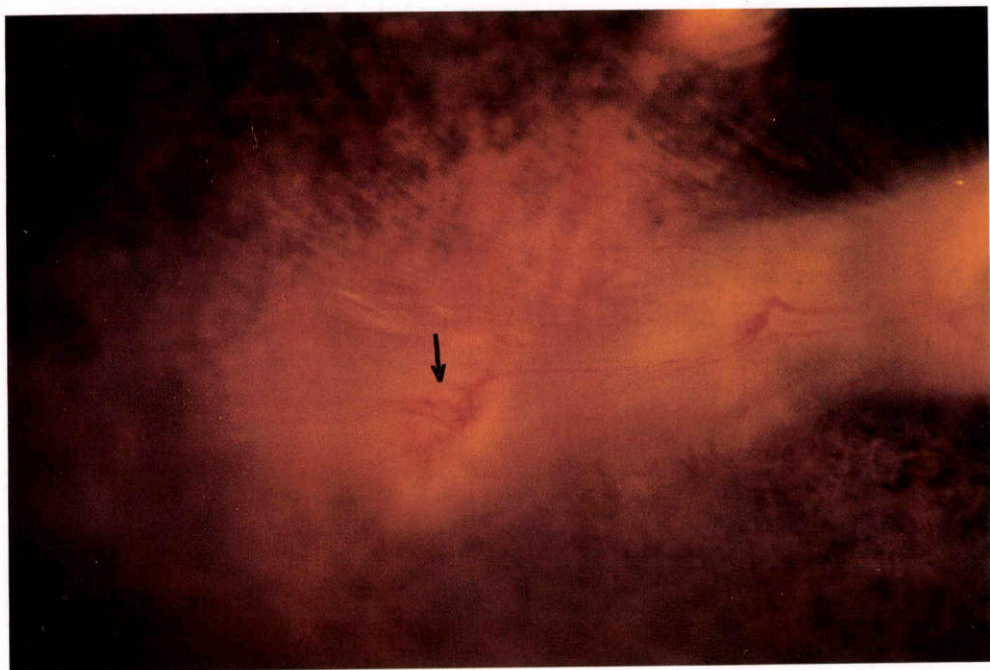


図1 家兎線維芽細胞注入により生じた PVR (STAGE 3) の眼底写真 網膜髄翼上にパッカー (矢印) が認められる。

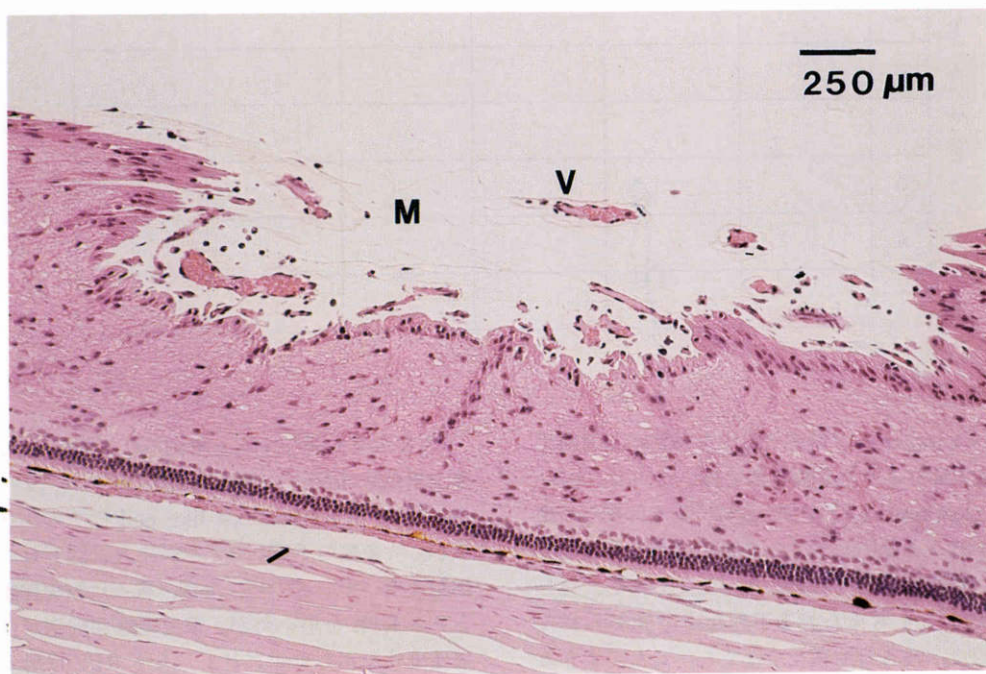


図2 家兎線維芽細胞注入により生じた PVR (STAGE 3) の組織光顕像 網膜上組織 (M) の中に血管 (V) が観察される。(HE 染色, $\times 40$)

表5 各モデルにおける STAGE ごとの発生率比較

	2 日後	4 日後	1 週後	2 週後	3 週後	4 週後
S	0	76%	49%	32%	29%	29%
	1	50%				
	1	73%	8%	2%	1%	
T	2	24%	49%	51%	44%	37%
	3	50%	86%	71%	29%	14%
	4	28%	69%	26%	14%	11%
A	5		2%	17%	27%*	34%*
	6		14%	29%	71%	86%
	7		22%	71%	84%	88%

上段；家兎線維芽細胞 5×10^4 中段；家兎線維芽細胞 10×10^4 下段；家兎線維芽細胞 2.5×10^4 (Hida et al)* ; $p < 0.01$

れる問題であり、RPE 単独では増殖性変化は示しにくいと考えられる。勿論、RPE 単独でもその注入細胞数を大幅に増やせば増殖性変化は現れる⁹⁾のであるが、やはり実際のヒトにおける PVR 形成において RPE が増殖性変化を示すには何等かの誘発が必要なのではないかと考えられる。

次に、注入細胞数の問題であるが、これは Hida ら⁸⁾の 2.5×10^4 個を最小として初期の PVR モデルである Sugita ら³⁾の 10^7 個という数までに渡っており、最も頻用されているのは 25×10^4 個である。同じ程度の増殖性変化を示すなら、細胞注入による硝子体混濁や培養細胞の供給問題を考慮するとその細胞数は少ないに越したことはない。今回、我々は家兎線維芽細胞に関して、 5×10^4 個と 10×10^4 個という細胞数を注入してみたわけであるが、2 週後よりその牽引性網膜剝離の発生率に有意差が見られた。 5×10^4 個注入では 4 週目で牽引性網膜剝離は 37% しか発生しておらず、これでは PVR に対する治療効果判定において有用とはいえない。 10×10^4 個注入では 4 週目で 86% という牽引性網膜剝離発生率を示しており、これは Hida らの成績と比べても遜色無い。 10×10^4 個程度の細胞数では、その注入により硝子体混濁は起こり得ず、また、細胞供給という面においても全く問題は認められなかった。以上の事由より、我々は今回の実験より家兎線維芽細胞を 10×10^4 個注入するのが最も PVR モデルとして適しているという結論に達した。

基礎となる PVR モデルの完成度いかにによって、治療効果判定に異なった結果がもたらされることも有り得る¹⁷⁾¹⁸⁾。今後、我々は、この有色家兎を使ったガス

コンプレッションと家兎線維芽細胞注入による PVR モデルを土台として、硝子体内薬物療法、放射線療法及び加温療法等の PVR に対する有効性を評価していく予定である。

本研究は文部省科学研究費補助金(課題番号 61440075, 研究代表者 本田孔士)の補助を受けた。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Machemer R, Norton EWD: Experimental retinal detachment in the owl monkey. I. Methods of production and clinical picture. Am J Ophthalmol 66: 388—000, 1968.
- 2) Chandler DB, Quansah FA, Hida T, et al: A refined experimental model for proliferative vitreoretinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 224: 86—91, 1986.
- 3) Sugita G, Tano Y, Machemer R: Intravitreal autotransplantation of fibroblasts. Am J Ophthalmol 89: 121—130, 1980.
- 4) Fastenberg DM, Diddie KR, Dorey K, et al: The role of cellular proliferation in a experimental model of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 93: 565—572, 1982.
- 5) Joondeph BC, Khoobehi B, Peyman GA, et al: Liposomencapsulated 5-fluorouracil in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. Ophthalmic Surg 19: 252—256, 1988.
- 6) Sunalp M, Wiedemann P, Sorgente N, et al: Effects of cytotoxic drugs on proliferative vitreoretinopathy in the rabbit cell injection models. Curr Eye Res 3: 619—623, 1984.
- 7) Binder S, Riss B, Skorpik Ch, et al: Inhibition of experimental intraocular proliferation with intravitreal 5-fluorouracil. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 221: 126—129, 1983.
- 8) Hida T, Chandler DB, Sheta SM: Classification of the stages of proliferative vitreoretinopathy in a refined experimental model in the rabbit eye. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 225: 303—307, 1987.
- 9) Kirmani M, Santana M, Sorgente N, et al: Antiproliferative drugs in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Retina 3: 269—272, 1983.
- 10) Wiedemann P, Sorgente N, Bekhar C: Daunomycin in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 719—725, 1985.
- 11) Wiedemann P, Sorgente N, Ryan SJ: Proliferative vitreoretinopathy: The rabbit cell injection model for screening of antiprolifer-

- ative drugs. *J Pharmacol Methods* 12: 69—78, 1984.
- 12) **Stern WH, Lewis GP, Erickson Pa, et al:** Fluorouracil therapy for proliferative vitreoretinopathy after vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 96: 33—42, 1983.
- 13) **Laqua H, Machemer R:** Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 602—618, 1975.
- 14) **Lemor M, de Bustros S, Glaser BM:** Low-dose colchicine inhibits astrocyte, fibroblast, and retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. *Arch Ophthalmol* 104: 1223—1225, 1986.
- 15) **Machemer R, Van Horn D, Aaberg TM:** Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive preretinal retraction. *Am J Ophthalmol* 85: 181—191, 1978.
- 16) **Newsome DA, Rodrigues MM, Machemer R:** Human massive periretinal proliferation: In vitro characteristics of cellular components. *Arch Ophthalmol* 99: 873—880, 1981.
- 17) **Chandler DB, Hida T, Sheta S, et al:** Improvement in efficacy of corticosteroid therapy in an animal model of proliferative vitreoretinopathy by pretreatment. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 225: 259—265, 1987.
- 18) **Tano Y, Sugita G, Abrams G, et al:** Inhibition of intraocular proliferation with intravitreal corticosteroids. *Am J Ophthalmol* 89: 131, 1980.
-