

実験的網膜下新生血管に対する色素レーザーによる光凝固治療

2. 光凝固の奏効しなかった病巣の組織学的検索

高橋 寛二, 板垣 隆, 山岸 和矢, 大熊 紘, 西村 哲哉, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

サル眼に作成した実験的網膜下新生血管に対して光凝固治療を行った後、光凝固の奏効しなかった病巣について組織学的検索を行った。実験にはカニクイザル3頭4眼を使用し、クリプトンレーザーによる強度光凝固とオルニチンの硝子体内注入によって作成した長期間持続する実験的網膜下新生血管に対して、色素レーザー590nmによる光凝固治療を行い、凝固後2週、1カ月、3カ月に病理組織学的観察を行った。光凝固の奏効しなかった病巣では網膜下腔に新生血管が残存しており、さらに網膜下腔には網膜色素上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージなどの細胞反応が旺盛にみられた。特に網膜色素上皮細胞は線維芽細胞様に増殖化生し、その周囲に基底膜や膠原線維を作り、光凝固後3カ月には、多量の膠原線維が新生血管周囲に形成されていた。網膜下新生血管に対する不十分な光凝固治療では、新生血管は閉塞しないで残存し、かつ網膜下の細胞増殖をおこし、線維性結合組織増殖を促進させることが示された。(日眼会誌 94:810-819, 1990)

キーワード：網膜下新生血管，レーザー光凝固，新生血管黄斑症，色素レーザー，網膜色素上皮細胞

Dye Laser Photocoagulation Treatment for Experimental Subretinal Neovascularization

2. Histopathological Findings of Unsuccess Lesions

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

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

We observed the histopathological process in unhealed lesions following photocoagulation treatment for experimental subretinal neovascularization (SRN) in rhesus monkey eyes. Long-lasting SRNs were produced experimentally by the method which we previously reported. These SRNs were treated by a 590nm dye laser beam, and were examined clinically and histopathologically. Lesions in which insufficient photocoagulation treatment was performed showed serous fluid accumulation and fluorescein angiography revealed remaining neovascularization. In these lesions abundant patent neovascularization was seen with proliferation of spindle-shaped fibroblast-like retinal pigment epithelial (RPE) cells in the subretinal space. These metaplastic RPE cells produced matrix and abundant collagen fiber around the cells. The above results showed that insufficient photocoagulation induced neovascularization and proliferation of RPE cells in the subretinal space and promoted the formation of fibrovascular membrane. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94: 810-819, 1990)

Key words: Subretinal neovascularization, Laser photocoagulation, Neovascular maculopathy, Dye laser, Retinal pigment epithelium

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12月4日受付，平成2年1月25日受理)

Reprint requests to: Kanji Takahashi, MD Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.

1 Fumizono-cho, Moriguchi Osaka 570, Japan

(Received December 4, 1989 and accepted January 25, 1990)

I 緒 言

老人性円板状黄斑変性症の原因である網膜下新生血管の治療としてレーザー光凝固が行われる。臨床的には、光凝固治療によって治癒する病巣もあるが、光凝固治療後に新生血管の増大、再燃がしばしば見られ、治療後にむしろ増悪することがあり、治療を困難にしている。しかし、そのような悪化例において、局所どのような組織反応がおこっているかは明らかにされていない。我々はサル眼に発生させた持続する網膜下新生血管¹⁾²⁾に対して色素レーザーの590nm 橙色波長を用いて中等度の凝固条件で光凝固治療を行い、治癒病巣における組織反応を前報³⁾で報告した。本邦では、光凝固治療の奏効しなかった病巣を病理組織学的に検索したので報告する。

II 方 法

実験動物は前報で用いた成熟カニクイザル3頭4眼と同じである。既報の方法¹⁾²⁾を用いて作成した長期持続する網膜下新生血管11病巣(図1, 2)に対し、Coherent Radiation社製 Argon/Dye laser System 920の590nm(橙色波長)を用いて、中等度凝固による治療を行った。凝固条件はスポットサイズ200 μ m、凝固時間0.2秒、出力150mWを標準として、網膜深層に明瞭な灰白色の凝固斑がでる程度の強さで、蛍光造影でみられた新生血管網を凝固斑の辺縁が互いに重なるように均一に凝固した。新生血管網が中心窩の下におよんで

いた5病巣は、中心窩を直接凝固することは避け、凝固をやや弱くした。

その後、眼底検査、蛍光眼底造影により臨床経過を観察し、光凝固後2週、1カ月、3カ月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で前固定した後、病巣部のトリミングを行い、1%四酸化オスミウムにて後固定、型のごとくエタノール系列にて脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。ミクロトームにて1 μ m連続切片を作成し、トルイジンブルー染色にて光学顕微鏡で観察した後、必要により超薄切片を作成し、酢酸ウラン(場合によりタンニン酸混合)及びクエン酸鉛で2重染色を施した上、日立HU-12型、H-300型、H-500型透過型電子顕微鏡にて観察した。

III 結 果

1. 臨床経過

光凝固の奏効しなかった病巣は、新生血管が中心窩に近かったため凝固が弱かったり、新生血管が中心窩の直下にあったため中心窩を避けて凝固を行った結果、新生血管網全体をおおって完全な光凝固治療が行われなかった5病巣があった。

このような病巣では、検眼鏡的に光凝固2週後に凝固斑の一部は癒着化した⁴⁾が、病巣の漿液性網膜剝離が存続し、網膜深層に灰白色の病巣が残存あるいは増大した(図3)。光凝固後3カ月には周囲の漿液性網膜剝離は減少していたが、中心窩網膜下には硬い白色の結合組織増殖がみられた。

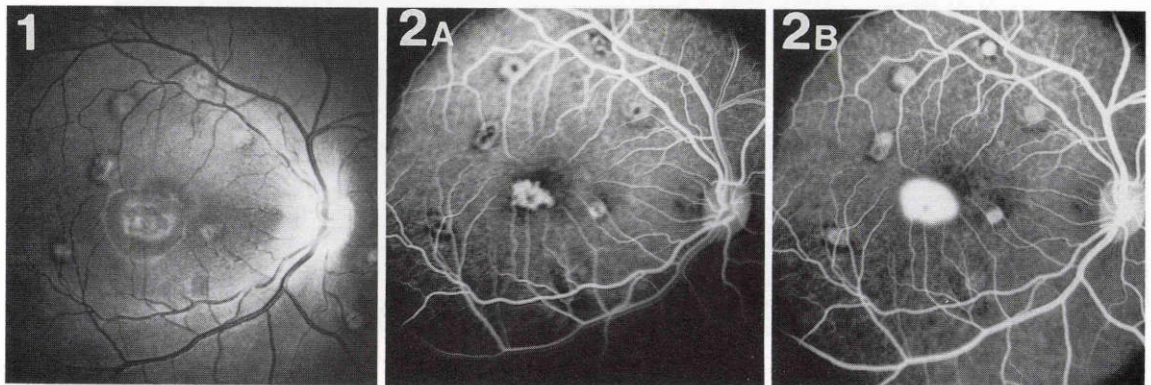


図1 光凝固治療前の眼底写真。クリプトンレーザー光凝固8週後、オルニチン注入後6週、中心窩の外下方に1.5乳頭径大の漿液性網膜剝離と網膜深層の灰白色病巣がみられた。

図2 光凝固治療前の蛍光造影写真。網膜下新生血管は網目状を示し、中心窩下に及んでおり、後期には著しい血管外漏出がみられた(A:造影早期, B:造影後期)。

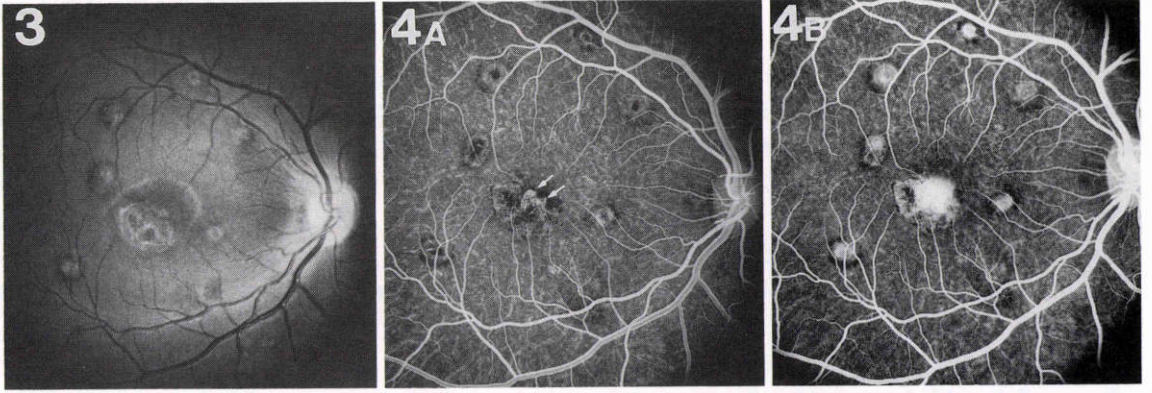


図3 光凝固治療後1ヵ月、凝固部は大部分が瘢痕化した。中心窩側に漿液性網膜剝離が残っていた。

図4 光凝固治療後1ヵ月の蛍光造影写真。網膜下新生血管の大部分は閉塞したが、中心窩側に新生血管が残存し(図A、矢印)造影後期には旺盛な蛍光漏出を示した。(A:造影早期, B:造影後期)

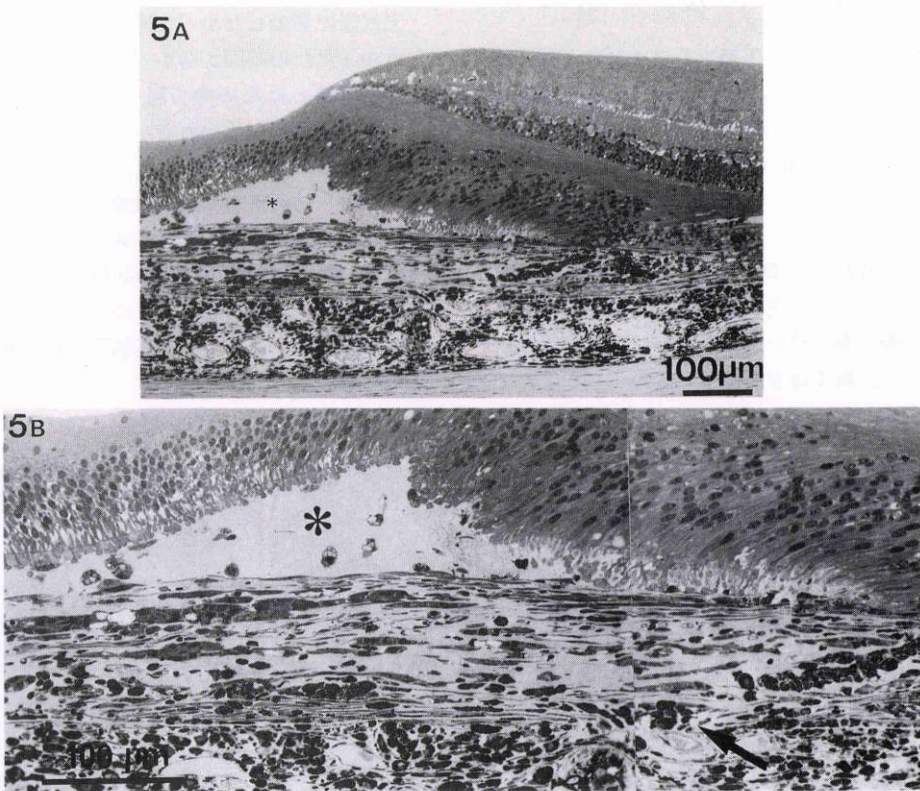


図5 光凝固治療後2週の光顕像

A: 弱拡大; 網膜下には新生血管を含む厚い増殖組織がみられ、中心窩下に及んでいた。網膜下液の貯留(*)によって神経網膜は扁平に剝離していた。神経網膜内層には障害はみられなかった(トルイジンブルー染色, $\times 115$)。B: 強拡大; 増殖組織中には新生血管および細長い紡錘型の線維芽細胞様の細胞が多数みられ、増殖した色素上皮細胞の集団や、類円形のマクロファージが多数見られた。神経網膜は視細胞外節は消失していたが、それより内層には障害は見られなかった(トルイジンブルー染色, $\times 230$)。

蛍光造影では、凝固部の辺縁あるいは中心窩側に新生血管が残存し(図4)、一部の病巣では新生血管が凝固前より拡大したものもあった。蛍光造影後期には、このような残存した新生血管から旺盛な蛍光漏出がみられ、凝固後3カ月にも蛍光漏出は軽減したが持続していた。

2. 病理組織学的所見

(1) 光凝固後2週と1カ月の所見

光顕的に、光凝固後2週と1カ月には、網膜下腔に多数の拡張した新生血管と増殖組織が見られ、神経網膜は貯留した網膜下液によって扁平に剝離していた。網膜下の増殖組織内には、線維芽細胞様の紡錘型細胞が著しく多くみられ、重層化して存在していた。また類円形でメラニン色素を持つマクロファージと思われる細胞が豊富にみられ、新生血管はこれらの細胞間に多数みられた。病巣の周辺部には、凝固部の周囲から立方形の網膜色素上皮細胞が連続性に増殖し、病巣を囲い込む傾向が見られたが、囲い込みは極めて不完全であった。剝離した神経網膜には障害はみられず、また脈絡膜毛細血管板はほぼ完全に閉塞消失していたが、それより深層の脈絡膜の中血管は開存していた(図5A, B, B6)。

電顕的に観察すると、光顕で見られた線維芽細胞様の紡錘型細胞には2種類の細胞があった。すなわち、少数のメラニン顆粒、基底膜様構造物、短い微絨毛や細胞間結合装置を持ち、細胞質内にミトコンドリアが豊富に見られた網膜色素上皮細胞と思われる細胞(図7, 9, 9)と、細胞周囲に膜様構造物、細胞間結合装置を持たず、細胞質内に粗面小胞体の多くみられる線維芽細胞と思われる細胞(図10)である。この2種の細胞のうち、網膜色素上皮細胞が圧倒的に多く、管腔を作って腺様に増殖する傾向を強く示した。線維芽細胞の数は網膜色素上皮と比べて少なく、病巣のうちでも特に Bruch 膜に近い部位にみられ、孤立して存在することが多かった。

(2) 光凝固後3カ月の所見

凝固後3カ月の光顕像では、新生血管を豊富に含み、線維芽細胞様の紡錘型細胞を多数含む網膜下の増殖組織の上を覆うように、神経網膜との間に単層の扁平な網膜色素上皮細胞の層がみられた(図12A, B)。

電顕的に、このような増殖組織中にみられた紡錘型細胞には、線維芽細胞が少数含まれていたが、大部分は増殖した網膜色素上皮細胞であり、このことは光凝固後2週、1カ月の組織と変化なかった(図13)。これ

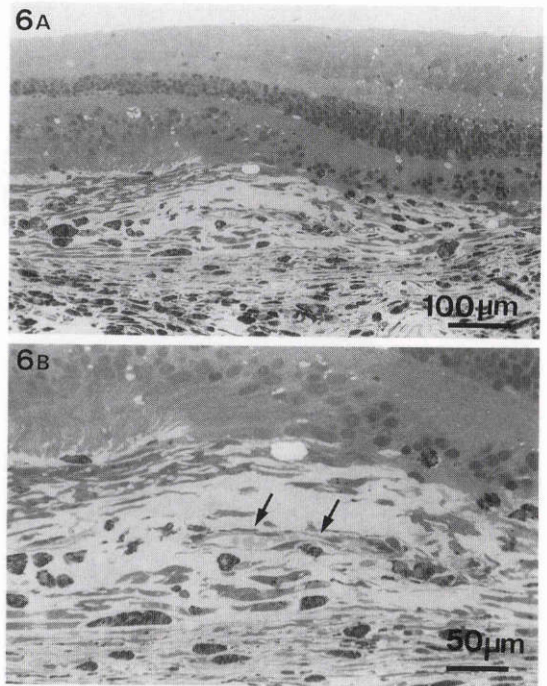


図6 光凝固治療後1カ月の光顕像

A: 弱拡大; 網膜下には口径の太い新生血管を含む増殖組織がみられた。神経網膜は扁平に剝離していたが、内層の障害は少なかった(トルイジンブルー染色, $\times 115$)。B: 強拡大; 網膜下には口径の太い新生血管(矢印)がみられ、新生血管周囲にはメラニン顆粒を持つ類円形のマクロファージと、細長い紡錘型の線維芽細胞様の細胞が多数見られた(トルイジンブルー染色, $\times 300$)。

らの網膜色素上皮細胞は、細胞の両側に基底膜を持ち、細胞質内には多数のミトコンドリアと少数のメラニン顆粒を含み、短い微絨毛、細胞間結合装置がみられた。

このような網膜色素上皮細胞に富む網膜下増殖組織の間質をタンニン酸染色でみると、約40nmの周期性を持つ膠原線維と思われる線維状の構造物が、細胞周囲や新生血管の周囲に密に観察され、特に凝固後3カ月の病巣ではその量は極めて多くみられた(図14)。

IV 考 按

網膜下新生血管の光凝固治療は、老人性円板状黄斑変性症の唯一の確実な治療法であるが、その成功率は60~70%である⁴⁾。すなわち、光凝固後にも新生血管が残存あるいは再燃、再発して、新生血管による滲出性変化や結合組織増殖の進行をみる例も多い。しかし、こ

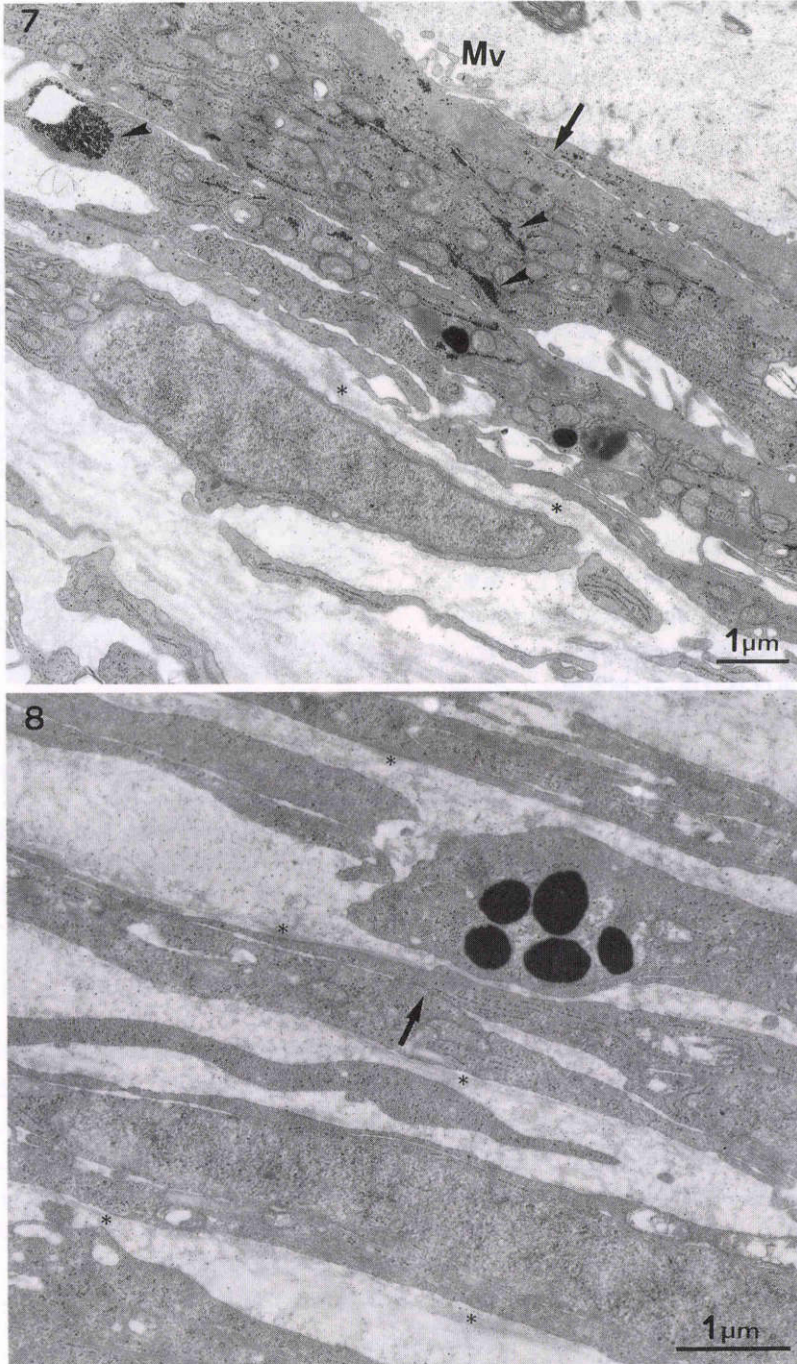


図7 光凝固治療後2週，網膜下腔にみられた紡錘型細胞の電顕像。少数の短い微絨毛(Mv)，基底膜(*)，細胞間結合装置(矢印)を持ち，細胞内にはミトコンドリアが豊富で，グリコーゲン顆粒(矢尻)を含んでいたことから，この細胞は幼若な網膜色素上皮細胞であると思われた。

図8 光凝固治療後2週，網膜下増殖組織中にみられた紡錘型細胞の電顕像。少数のメラニン顆粒と，細胞周囲に幅はせまいが基底膜様構造物(*)を持ち，所々に細胞間に結合装置(矢印)がみられたことから，未分化な網膜色素上皮細胞であると考えられた。

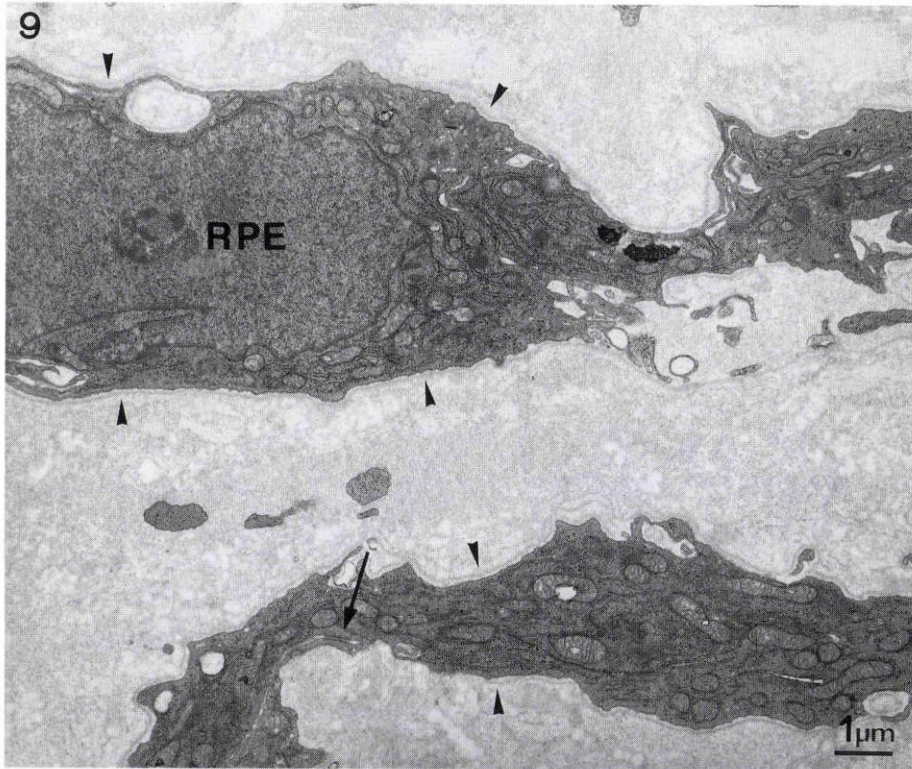


図9 光凝固治療後1カ月，網膜下腔にみられた紡錘型細胞の電顕像。細胞の両側に基底膜（矢尻）を持ち，細胞質内にはミトコンドリアが豊富であった。細胞間には結合装置（矢印）がみられ，網膜色素上皮と思われた。

のような症例において，網膜下でどのような細胞反応が起こっているのかは明らかにされていない。我々は，前報において²⁾サル眼に作成した網膜下新生血管に対して光凝固治療を行い，光凝固の奏効した病巣について組織学的経過を報告した。本報では，光凝固治療後も臨床的に新生血管の残っていた病巣について組織学的検索を行った。

本実験において光凝固の奏効しなかった病巣は，中心窩に極めて近いか，中心窩を含んでいたため，新生血管網全体を十分に凝固しなかったり，凝固が弱かった，不十分な光凝固治療が行われた病巣であった。このような病巣では，臨床的に光凝固後も漿液性網膜剝離が消褪せず，蛍光造影によって新生血管が確認され，旺盛な血管外漏出がみられた。これらの所見は，臨床経験する光凝固治療後の新生血管残存，再燃例と極めてよく似ていた⁴⁾⁵⁾。

組織学的観察によって，光凝固後に治癒しなかった病巣では，網膜下に新生血管が多数みられ，さらに網

膜下の細胞増殖が著明であった。新生血管の周囲には多数の紡錘型細胞が存在し，線維芽細胞様にみえたが，微絨毛，胞体周囲の基底膜様構造物，細胞間結合装置を持っていたことから，網膜色素上皮細胞と判断した。このように，治癒しなかった病巣では，線維芽細胞様に化生した網膜色素上皮細胞が過剰増殖していることが最も特徴的であった。

実験的網膜下新生血管の自然治癒病巣の組織学的研究^{6)~8)}から，新生血管が臨床的に自然退縮するのは，連続性に増殖した網膜色素上皮細胞が新生血管を含む増殖組織を囲い込むことによると報告されてきた。本実験でみられた網膜色素上皮細胞の増殖形態は，新生血管の自然退縮期の網膜色素上皮細胞が単層で連続性に増殖して層を作ったのとは異なり，線維芽細胞様に化生するか，腺様の増殖を示していた。また新生血管からの漏出液によって，増殖した網膜色素上皮細胞間の間質は強い浮腫状態にあり，細胞間の間隙は広がった。

凝固後3カ月になると，増殖した線維芽細胞様色素

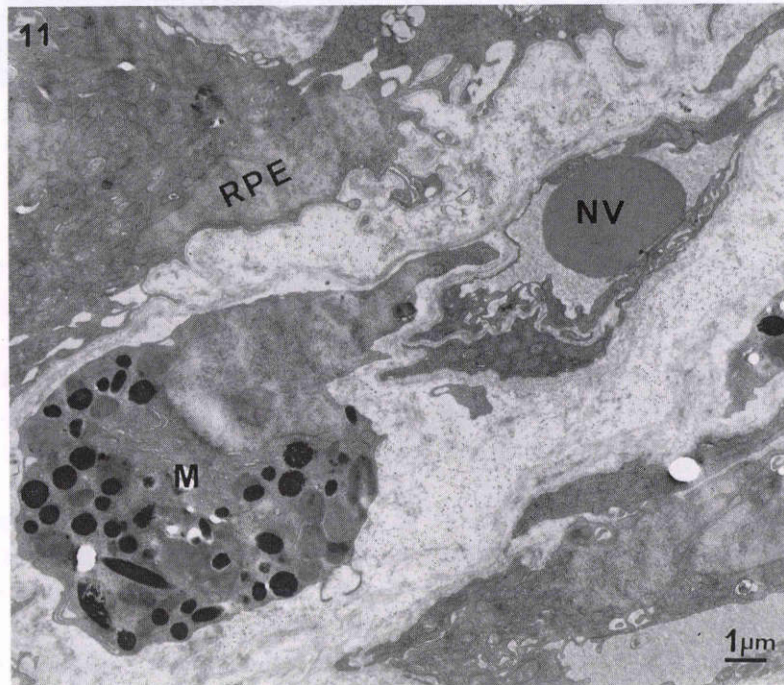
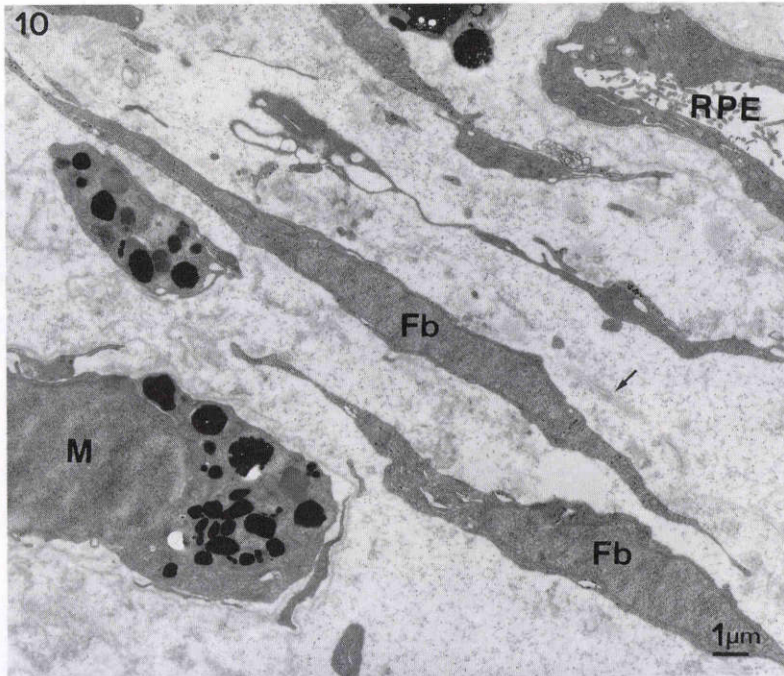


図10 光凝固治療後1カ月，網膜下腔にみられた紡錘型細胞の電顕像。細胞周囲に基底膜がみられず，細胞質は乏しく，線維芽細胞 (Fb) と思われた。細胞周囲には少量の膠原線維 (矢印) がみられた (M: マクロファージ, RPE: 網膜色素上皮細胞)。
 図11 光凝固治療後1カ月，網膜下新生血管とマクロファージの電顕像。新生血管 (NV) 近傍にマクロファージ (M) がみられることが多かった (RPE: 網膜色素上皮細胞)。

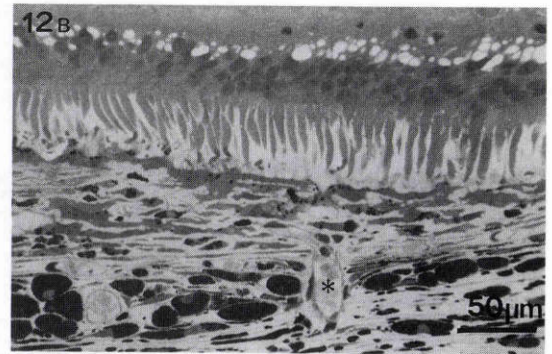
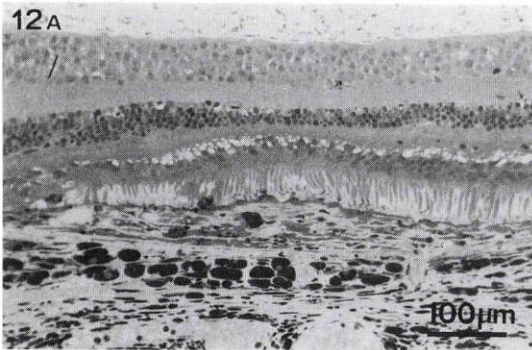


図12 光凝固治療後3カ月の光顕像

A：弱拡大；網膜下の増殖組織の上をおおって単層の扁平な網膜色素上皮の層がみられた。増殖組織内には紡錘型の線維芽細胞様細胞が豊富にみられた（トルイジンブルー染色，×150）。B：強拡大；Bruch膜の断裂部を通して，脈絡膜から網膜下に太い新生血管（*）が，侵入していた（トルイジンブルー染色，×300）。

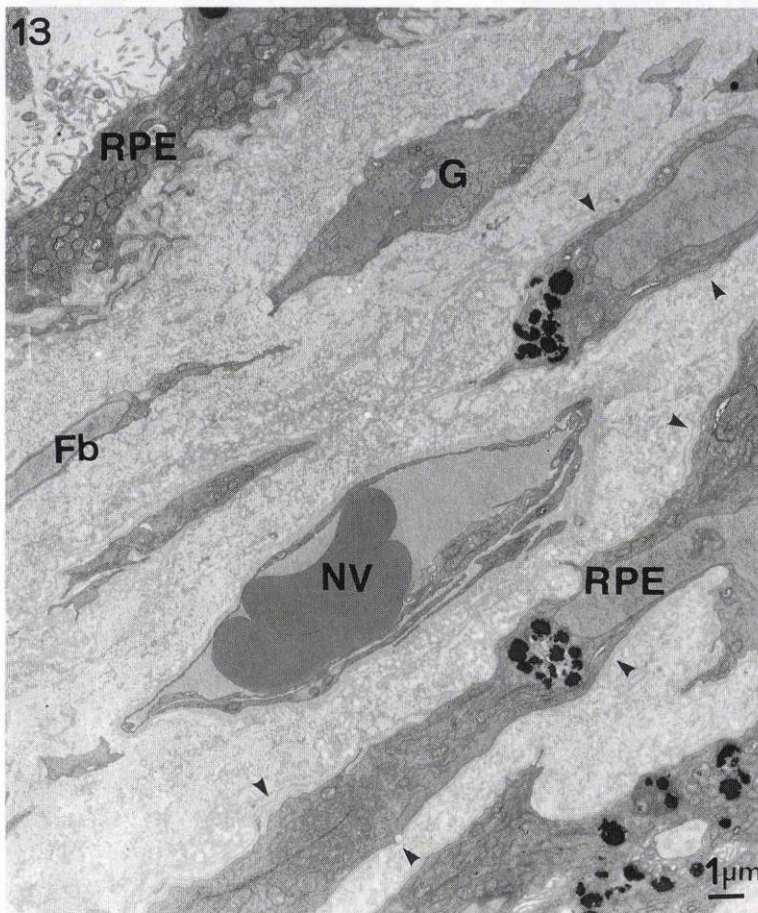


図13 光凝固治療後3カ月の電顕像。網膜下腔の結核型細胞は，大部分が網膜色素上皮細胞（RPE）であり，時として線維芽細胞（Fb）や，グリア細胞（G）がみられた。新生血管（NV）は，fenestrationを多くもつ。成熟した血管の像を示した。新生血管や他の細胞の間質には，膠原細胞が豊富にみられた（矢尻は網膜色素上皮の基底膜）。

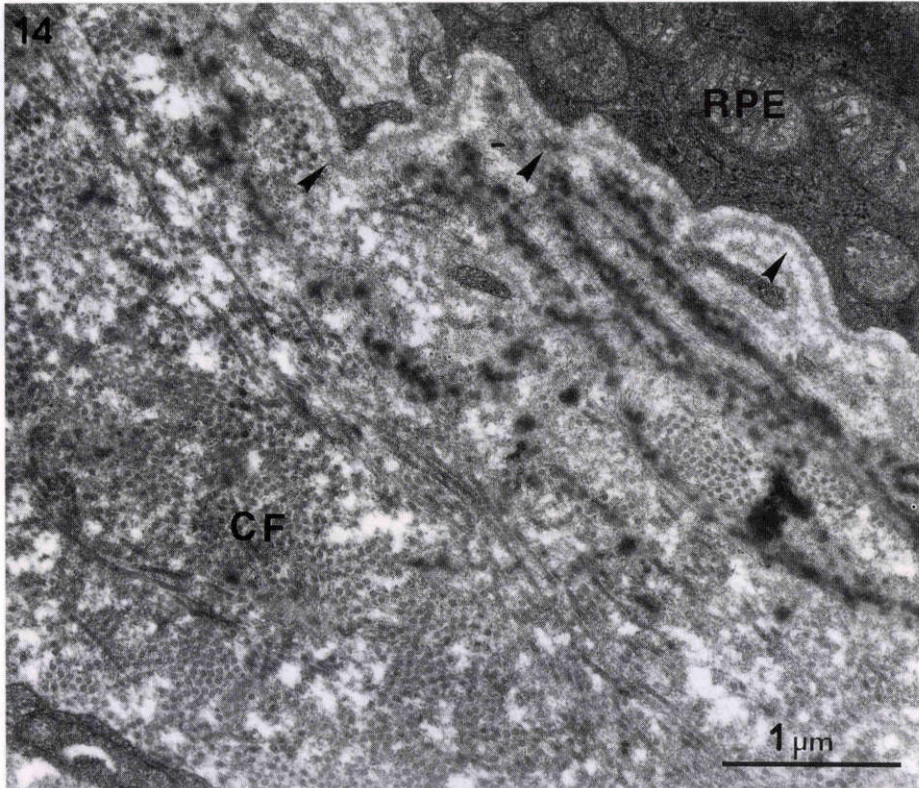


図14 光凝固治療後3カ月の電顕像。増殖組織内の網膜色素細胞(RPE)の周囲には、不規則な配列をした膠原線維(CF)が密にみられた(タンニン酸染色, 矢尻はRPEの基底膜)

上皮細胞の周囲には、膠原線維が大量に形成されていた。光凝固治療後に治癒した病巣では、新生血管を含まない無構造な瘢痕組織が網膜下腔に形成されることを前報⁹⁾で述べたが、このような瘢痕組織では電顕的にみて膠原線維が少ないのに対して、新生血管が残存した病巣では経時的に膠原線維が増加していくことが特徴であった。網膜色素上皮細胞は、種々の病的条件下で膠原線維を産生することが知られているが、本実験でも線維芽細胞様に化生した網膜色素上皮細胞は、光凝固長期経過後には網膜下腔に大量の膠原線維を産生し、網膜下の線維性結合織の形成に関与していることが示された。このような網膜下腔での網膜色素上皮細胞の増殖と膠原線維産生については、人眼では老人性円板状黄斑変性症の病理組織標本⁹⁾¹⁰⁾、脈絡膜悪性腫瘍を持つ眼¹¹⁾、動物実験では実験的網膜剝離¹²⁾や実験的光毒性黄斑症¹³⁾、網膜下腔への異物注入実験¹⁴⁾¹⁵⁾などで病理組織学的に報告されており、本実験でみられたのと類似した紡錘型の網膜色素上皮細胞が網膜下腔に観察されている。また、Meyerら¹⁶⁾は特発性脈絡

膜新生血管の症例をアルゴンレーザーで光凝固治療を行った後の病理組織像を電顕的に示し、本実験と同様の網膜色素上皮細胞の増殖と膠原線維の形成を観察した。これらの報告では線維芽細胞様に化生した網膜色素上皮細胞は、基底膜を作るのと同じ機能によって膠原線維を産生しようと指摘されている。

最近、Campochiaroら(1986)¹⁷⁾は、免疫組織化学的手法を用いて、網膜色素上皮細胞が細胞周囲の細胞外基質、とくにコラーゲンや糖蛋白を産生することを *in vivo* において証明し、これらの物質が生体内においては網膜下新生血管の侵入に対して柵となり得ることを示唆した。本実験でも、凝固後3カ月には蛍光造影で新生血管からの漏出傾向は少なくなっていた。これは新生血管の自然退縮時と同様に、増殖組織の網膜側に新しい単層の網膜色素上皮細胞層が形成されたのが主因と思われるが、新生血管の周囲には大量の膠原線維が形成され、それが新生血管の発育に抑制的に働いている可能性があると考えられた。老人性円板状黄斑変性症の臨床例において、網膜下に線維性結合組織が

形成されたのちに新生血管からの漏出傾向が自然に消滅し、いわゆる線維性瘢痕に移行することが経験されるが¹⁸⁾、このような症例では増殖組織中に形成された膠原線維が新生血管の発育を抑制している可能性があると考えられた。

なお、本実験において網膜下の増殖組織中には、マクロファージが豊富にみられ、特に新生血管の近くに多く見られた。マクロファージ、多核白血球をはじめとする炎症細胞は、新生血管の発育を促進させる可能性が示されており^{19)~21)}、光凝固による組織の炎症細胞の浸潤が、新生血管の持続に作用していると思われる。

本実験の結果より、網膜下新生血管網の全体をおおわなかったり、凝固の弱い不十分な光凝固治療では、新生血管の完全な閉塞が行われず、新生血管が残存すること、さらに網膜下に細胞増殖、特に網膜色素上皮細胞の増殖を誘発し、網膜下の線維性結合組織形成を促進することが明らかにされた。

本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会（平成元年5月12日、京都）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(02454412、宇山)、奨励研究A(01771449、西村)の補助によって行なわれた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) 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.
- 2) 高橋寛二, 板垣 隆, 山岸和矢, 他: 実験的網膜下新生血管の退縮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—, 日眼会誌 94: 340—351, 1990.
- 3) 高橋寛二, 板垣 隆, 大熊 紘, 他: 実験的網膜下新生血管に対する色素レーザーによる光凝固治療. 1. 光凝固による治癒過程の組織学的検索, 日眼会誌 94: 799—809, 1990.
- 4) 高橋寛二: 老人性円板状黄斑変性症の光凝固治療, 眼科 31: 1023—1035, 1989.
- 5) Bressler MN, Bressler SB, Fine SL: Age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 32: 375—413, 1988.
- 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2報. 実験的網膜下新生血管の退縮, 日眼会誌 89: 941—948, 1985.
- 7) Miller H, Miller B, Ryan SJ: The role of the retinal pigment epithelium in the involution stage of subretinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1644—1652, 1986.
- 8) Miller H, Miller B, Ishibashi T, et al: Involution of subretinal neovascularization. Doc

Ophthalmol Proceeding series 50, Ocular Circulation and Neovascularization: 467—474, Martinus Nijhoff/DrW. Junk Publishers, Dordrecht, 1987.

- 9) Morris DA, Henkind P: Pathological Responses of the Human Retinal Pigment Epithelium, Zinn KM, Marmor MF, (ed): The Retinal Pigment Epithelium. Cambridge, Harvard University Press, 247—266, 1979.
- 10) Tso MOM: Developmental, reactive, and Neoplastic Proliferation of Retinal Pigment Epithelium, Zinn KM, Marmor MF, (ed): Retinal Pigment Epithelium. Cambridge, Harvard University Press, 267—276, 1979.
- 11) Wallow IHL, Tso MOM: Proliferation of the retinal pigment epithelium over malignant choroidal tumors, a light and electron microscopic study. Am J Ophthalmol 73: 914—926, 1972, 1973.
- 12) Macherer R, Laqua H: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). Am J Ophthalmol 80: 1—23, 1975.
- 13) Tso MOM: Photic maculopathy in rhesus monkey, a light and electron microscopic study. Invest Ophthalmol 12: 17—34, 1973.
- 14) Zhu ZR, Goodnight R, Sorgente N, et al: Cellular proliferation induced by subretinal injection of vitreous in the rabbit. Arch Ophthalmol 106: 406—411, 1988.
- 15) 緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘, 他: 網膜色素上皮細胞の反応様式, 日眼会誌 92: 2029—2037, 1988.
- 16) Meyer D, Harris WP, Fine SL, et al: Clinicopathologic correlation of argon laser photocoagulation of an idiopathic choroidal neovascular membrane in the macula. Retina 4: 107—114, 1984.
- 17) Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM: The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1615—1621, 1986.
- 18) 宇山昌延: 中心性網膜炎と類縁疾患, 東京, ライフサイエンス出版, 54—67, 1986.
- 19) Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH: Senile macular degeneration: The involvement of immunocompetent cells. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 223: 69—76, 1985.
- 20) 石橋達朗: 老人性円盤状黄斑変性症の病態, 臨眼 42: 87—92, 1988.
- 21) Glaser BM: Cell Biology and Biochemistry of Endothelial Cells and the Phenomenon of Intraocular Neovascularization, Adler R, Farber D(ed.): The Retina Part II, Orlando, Academic Press, 215—243, 1986.