

## 実験的網膜静脈分枝閉塞症

—第2報 早期の組織病理学的変化—

南川美登里, 山本 起義, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

### 要 約

色素レーザーの黄色波長(577nm)を用いて、カニクイザル網膜の主幹分枝静脈を直接凝固することによって、実験的に網膜静脈分枝閉塞症を高頻度で作ることができた。このようにして発生させた静脈閉塞症には、光凝固直後より凝固部より遠位部の静脈の拡張蛇行、浮腫、出血などの眼底病変が出現した。組織病理学的に凝固直後は、後毛細血管細静脈から、後には太い静脈から血管外漏出がみられた。早い時期には細い血管の内皮細胞間隙の離解がみられ、ついで血管内血栓形成とともに血管内皮細胞の変性、一部は脱落を生じ、これらの血管から血液成分が血管外に漏出していた。(日眼会誌 95:123-129, 1991)

キーワード：網膜静脈閉塞症, レーザー光凝固, 網膜血管, 網膜血管閉塞, 血液網膜関門

---

## Experimental Retinal Branch Vein Occlusion

Midori Minamikawa, Kiyoshi Yamamoto, Hiroshi Okuma  
and Masanobu Uyama

*Department of Ophthalmology, Kansai Medical University*

### Abstract

Experimental retinal branch vein occlusion in monkeys (*macaca irus*) were produced by yellow wavelength (577nm) dye laser photocoagulation. The clinical sequence was observed in terms of the structural and ultrastructural findings occurring during the natural history of experimental branch vein occlusion, particularly in the early stage. Immediately after the occlusion, venous dilatation and retinal edema and hemorrhage appeared. Extravascular leakage of dye in fluorescein angiography and hemorrhage appeared from small venules at an early stage. Leakage from the larger vessels was observed later. Opening of the intercellular junctional complexes, which signifies breakdown of the blood-retinal barrier was detected by electron microscopy. Subsequently degenerative or necrotic changes in endothelial cells appeared with the formation of intravascular thrombi and extravascular leakage of blood components appeared from these vessels. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 123-129, 1991)

**Key words:** Retinal vein occlusion, Laser photocoagulation, Retinal vessel, Occlusion of retinal vessels, Blood-retinal barrier

---

別刷請求先：570 守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 南川美登里

(平成2年3月9日受付, 平成2年7月24日改訂受理)

Reprint requests to: Midori Minamikawa, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University,  
1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received March 9, 1990 and accepted in revised form July 24, 1990)

## I 緒 言

網膜静脈閉塞症には、多数の臨床研究があるが実験的な網膜静脈閉塞症の報告は少なく不明な点も多い。

我々はヘモグロビンへの吸収率のよい色素レーザーの黄色波長を用いて、サル網膜の主幹分枝静脈を直接凝固することで、実験的に高頻度に網膜静脈分枝閉塞症を作り得た<sup>1)</sup>。第1報では、その実験モデルの臨床経過について報告した<sup>2)</sup>。今回、このようにして発生させた網膜静脈閉塞症の早期の変化を病理組織学的に観察したので報告する。

## II 方 法

実験動物として、前報<sup>1)2)</sup>と同一の、体重1.6~2.3kgのカニクイ猿 (*Macaca irus*) 8頭16眼を使用し、塩酸ケタミン (ケタラルール50<sup>®</sup>) 50mg/kgの筋注による全麻下にて、網膜主幹静脈の1または2本に直接、色素レーザー光凝固を行った。光凝固装置は、Coherent Radiation社製アルゴン/ダイレーザー-system 920を用い、色素レーザーの黄色波長(577nm)にて、凝固出力200~300mW、凝固野の大きさ200~300 $\mu$ m、凝固時間0.2~0.5秒で、耳上側または耳下側の網膜主幹静脈を、血管狭細ないし途絶が認められるまで、血管壁に沿って3~5乳頭径の長さ凝固し、さらにその部の血管に直接凝固を加えた。また同伴動脈も同様に凝固した。光凝固直後より1年まで眼底検査、蛍光眼底造影にて経過観察を行った。なお、光凝固前に全麻下にミドリンP<sup>®</sup>にて充分散瞳し、検眼鏡的に異常のないことを確認し、また、蛍光眼底造影を行い光凝固後の写真との対照とした。

凝固後3, 7, 20時間, 1, 2, 4日後に眼球摘出を行い、光顕および電顕にて観察した。また、実験動物の一部は、予め眼球摘出の30分前にトレーサーである horseradish peroxidase (HRP, Sigma社製 type II) 200mg/kgを肘静注しておいた。

摘出眼球は、摘出直後に毛様体部を角膜輪部に平行に切開を加え、4%ホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒド固定液 (pH 7.4, 176 Osm) で12時間前固定した後、試料を0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) で24時間洗浄し、試料を細切した。HRP投与例の一部は強膜および脈絡膜を分離して網膜の伸展標本を作り、0.1Mトリス塩酸緩衝液に置換し、3-3ジアミノベンチジンによるHRP反応液<sup>3)</sup>に37 $^{\circ}$ C 1時間浸漬し、検鏡した。その他のHRP処理試料は、洗浄後クリオスタット

で約30 $\mu$ mの凍結切片を作製し、上述の方法でHRP反応液に37 $^{\circ}$ C 1時間浸漬した。

これらはHRP処理、非処理試料とともにPaladeの固定液 (1%四酸化オスミウム) で1時間、後固定を行い、型のごとくエタノール系列で脱水後、Ouetol-812<sup>®</sup>にて包埋し、LKB ultramicrotome Vにて1 $\mu$ mの切片を作製して無染色ならびにトリジンブルー染色にて光学顕微鏡で観察した。トリミングを行い、作製した超薄切片を酢酸ウラニール、クエン酸鉛の二重染色を行って日立HU12型、H500型透過型電子顕微鏡で観察した。

## III 結 果

8頭16眼31カ所に光凝固を行い、光凝固によって24カ所 (77.4%)の網膜静脈分枝閉塞症の発生を、検眼鏡および蛍光眼底造影にて認めた。残り7カ所は光凝固後、凝固部より遠位部静脈の軽度拡張などの軽い変化しか見られなかったものや凝固直後は静脈の拡張蛇行や散在性の点状および斑状の網膜出血や浮腫が見られたが翌日には軽減したもので、3~4日目には蛍光造影でも網膜循環は改善した。このような症例は静脈閉塞症非発症例として実験から除いた。これに対して4日から1週間まで閉塞が続いたものは、その後も閉塞が持続し、光凝固後10日を過ぎると蛍光造影にて閉塞領域の毛細血管床に蛍光充盈のない部がみられ、この所見は光凝固後1年後も続いていた<sup>2)</sup>。このような臨床経過を辿った実験動物の早期の病理組織学的変化を観察した。なお観察は凝固による直接の影響を避けるため凝固部より2乳頭径以上離れた遠位部について行った。

### 1. 光凝固直後から20時間

凝固後3時間の凝固部の静脈血管の内腔は赤血球、血小板やfibrinによる血栓が充満して閉塞していた。また凝固部の動脈血管は、凝固による血管壁の障害を認めたが、内腔の閉塞は認めなかった。

凝固部より遠位部の網膜では、光顕にて静脈と細静脈に血管の拡張がみられ、血管内腔は赤血球で充満し、網膜内層に軽度の網膜出血がみられた。HRP反応産物は血管内に濃い物質として見られ、同様の物質は血管外の外網状層にも見られた。しかし、網膜外層および脈絡膜は正常であった。網膜色素上皮は規則正しく並び、細胞内にはHRP反応産物は見られず、網膜下腔にもHRP反応産物は見られなかった (図1)。また、神経線維層から内顆粒層の細静脈、後毛細血管細静脈

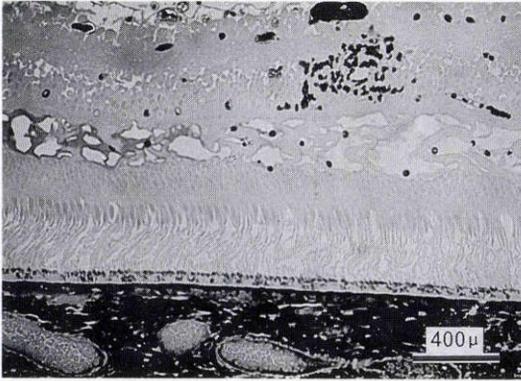


図1 閉塞後3時間のHRP投与標本, 光顕所見. HRP反応産物は濃い物質として血管内に見られ, 網膜内の大小の血管には著しい拡張と鬱滞が見られ, 網膜外網状層にHRP反応産物の血管外漏出, 網膜内層に出血を見た. しかし, 網膜外層, 網膜色素上皮および脈絡膜は正常であった.(無染色, ×100)

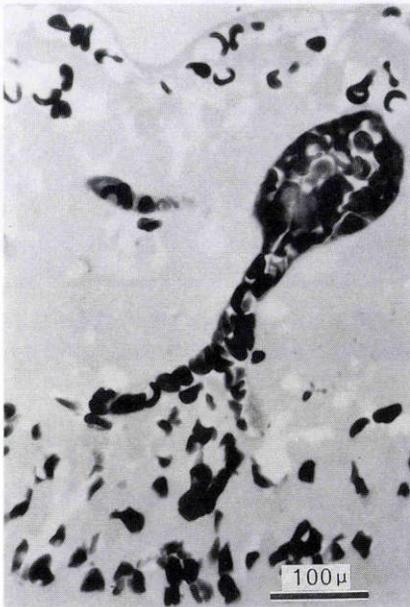


図2 閉塞後3時間のHRP投与標本, 光顕所見. 神経線維層の細静脈, 網膜内網状層の後毛細血管細静脈は拡張し, 赤血球で充満していた. 内顆粒層の毛細血管ないし後毛細血管細静脈の周囲に網膜出血が見られた.(トルイジンブルー染色, ×400)

は拡張して赤血球で充満していた. 内顆粒層の毛細血管ないし後毛細血管細静脈の周囲に, 血管外に脱出した赤血球が見られた(図2). 網膜伸展標本においても

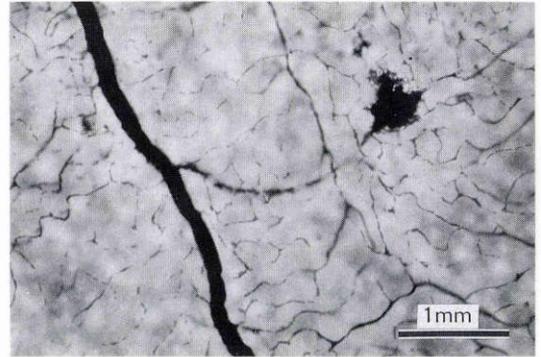


図3 閉塞後3時間のHRP投与網膜伸展標本. 後毛細血管細静脈から, 出血が見られた.(×25)

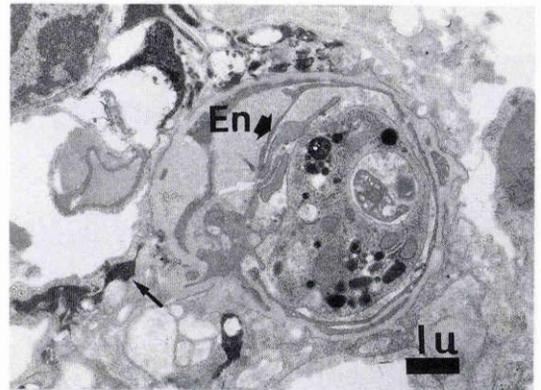


図4 閉塞後3時間のHRP投与標本, 電顕所見. 凝固部より遠位の網膜細静脈. 管腔には内皮細胞(En)の間隙は離解し(白矢印), 血管周囲に漏出したHRP反応産物が見られた(黒矢印).(二重染色, ×7,000)

同様に後毛細血管細静脈から出血が見られた(図3).

また, 凝固部より遠位の細静脈を電顕にて観察すると, 凝固3時間後には細い血管では血管内皮細胞間隙の離解がみられ, 血管周囲に漏出したHRP反応産物が見られた(図4). 血管壁には血小板, fibrinなどの白色血栓の付着が見られ, 壁に血栓付着部では, 一部血管内皮細胞は見られなかった(図5),

## 2. 光凝固後1日から4日

光顕では, 閉塞領域の網膜出血と浮腫は凝固直後より増強し, 凝固後2日には主に網膜神経線維層から外網膜層にかけて広汎に見られた. しかし, 内境界膜には異常がなく, また網膜の外顆粒層から外側の網膜は比較的正常に保たれていた. 検眼鏡的に拡張蛇行が観察された網膜血管の管腔内には, 赤血球の充満と血栓

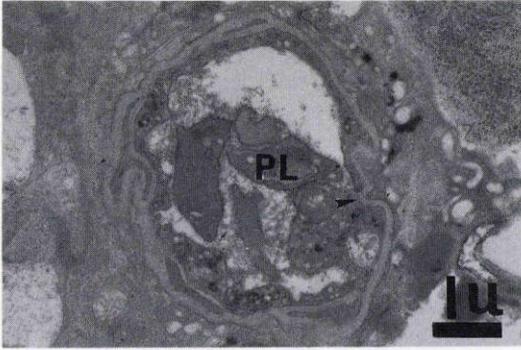


図5 閉塞後3時間のHRP投与標本, 電顕所見. 凝固部遠位部網膜内顆粒層の毛細血管, 血管内皮細胞剥離部(矢印)に血小板(PL)などの壁在血栓を認める。(二重染色, ×9,000)

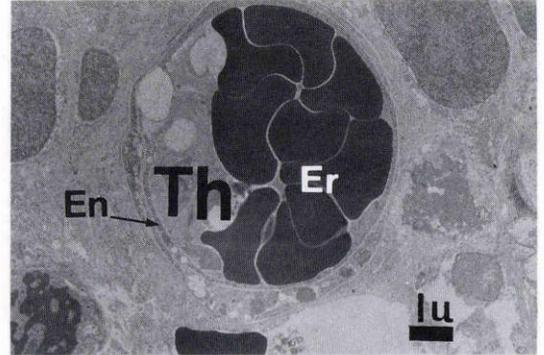


図7 閉塞後2日の電顕所見, 凝固部遠位部の網膜内顆粒層の静脈, 管腔は赤血球(Er)と血栓(Th)で充満し血管内皮細胞(En)は引き伸ばされ, 細胞内には空胞が見られた。(二重染色, ×6,000)

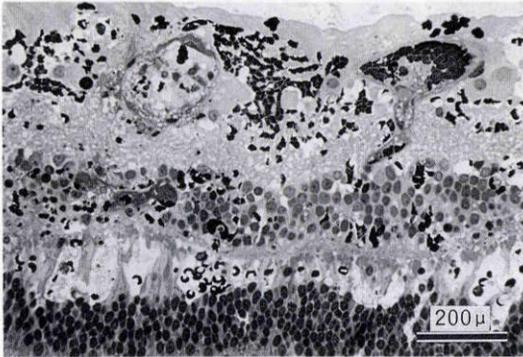


図6 閉塞後2日のHRP投与標本, 光顕所見. 凝固部より遠位の網膜の血管腔は赤血球と血栓で充満し, 血管は拡張していた. また網膜出血と浮腫が網膜神経線維層から網膜外網状層までに見られた. 網膜の外顆粒層より外層は正常に保たれていた。(トルジンプルー染色, ×200)

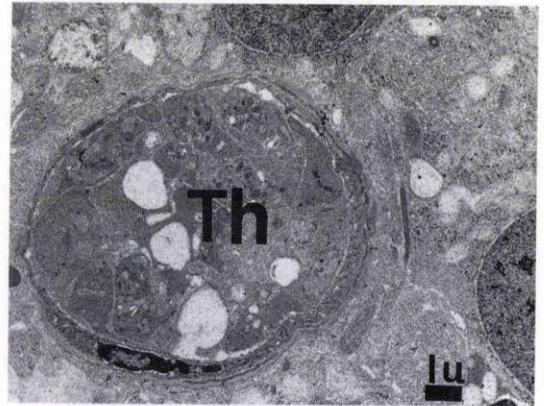


図8 閉塞後2日のHRP投与標本, 電顕所見. 閉塞領域網膜の細い静脈腔内は血栓で完全に閉塞されていた。(二重染色, ×5,000)

形成が見られた(図6). このような所見は光凝固後3~4日に最も強く見られた.

電顕にて凝固部より遠位の網膜静脈を観察すると, 凝固後2日には細い静脈では血管腔が赤血球と血栓で充満し, 血管内皮細胞は薄くなり, 細胞内に空胞を認めた(図7). また, 細い静脈の管腔は血栓ではほぼ完全に閉塞していた(図8).

光凝固直後に見られた毛細血管ないし後毛細血管細静脈からの出血は, 凝固後4日には凝固直後に比して大きい出血巣を認め, 蛍光眼底造影でみられたように<sup>2)</sup>, 網膜伸展標本でも比較的大きな静脈の周囲にも出血が見られた(図9). 赤血球が充満している比較的

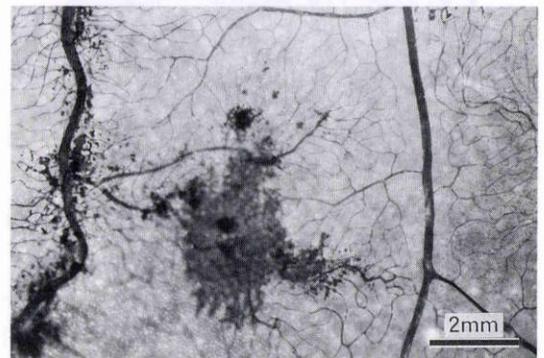


図9 閉塞後4日のHRP投与網膜伸展標本, 後毛細血管細静脈からの出血は, 凝固直後に比して大きい出血巣を認め, また比較的大きな静脈の周囲にも出血がみられた。(×10)

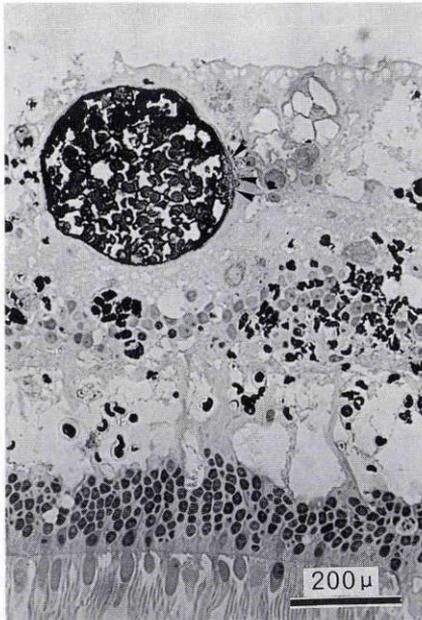


図10 閉塞後4日のHRP投与標本, 光顕所見. 比較的大きな静脈の内腔は赤血球で充満していた. また, 血管壁の一部がHRP反応産物で濃く染まって見え(矢印), その周囲の網膜にHRP反応産物と出血を見た. 外網状層, 神経線維層に強い浮腫が見られた.(トルイジンブルー染色,  $\times 200$ )

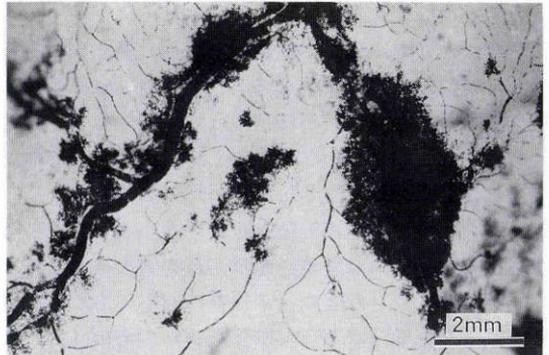


図12 閉塞後2日のHRP投与網膜伸展標本, 閉塞領域の周辺部では細静脈および大きな静脈の周囲に出血が見られた. 毛細血管床へのHRPの充填は, 不十分であった. ( $\times 10$ )

より遠位部の網膜静脈では, 管腔内に血栓を認め, 一部には内皮細胞および基底膜が消失し, fibrinが血管外に認められた(図11).

この時期に, すでに毛細血管にHRP反応産物の見られない症例があった(図12).

#### IV 考 按

我々はヘモグロビンへの吸収率の良い色素レーザーの黄色波長を用いて, サルの網膜の主幹分枝静脈を直接凝固して, 網膜静脈分枝閉塞症を作り得た<sup>1)</sup>. この実験の臨床経過を観察し, 光凝固後2カ月を過ぎても蛍光眼底造影で毛細血管床の充盈欠損が持続するようなヒト類似の網膜静脈分枝閉塞症が, 従来の実験に比較して高頻度で得られたことがわかった<sup>2)</sup>. 今回はこの実験動物の早期の病理組織学的変化を, 光凝固による網膜の直接影響のない2乳頭径以上離れた部位を中心に観察した.

光凝固を行うと, 臨牀的には凝固直後より凝固部遠位の静脈に拡張蛇行がみられ, 細い血管から点状出血が出現し, 蛍光眼底造影にても後毛細血管細静脈からの蛍光色素の著明な血管外漏出を見た<sup>2)</sup>. これは, 今回の病理組織学的所見でも確かめられた. 静脈が閉塞すると, 閉塞領域の静脈内圧は上昇し, 管壁は著しく拡張し壁の構成組織は引き伸ばされる. 後毛細血管細静脈は, 口径 $8\mu\text{m}$ 前後の毛細血管よりやや太い静脈で, 血管の壁にある平滑筋が全く出現しないことは珍しくなく, 一般の平滑筋のない毛細血管との境界は定めがたいといわれる. このように血管壁が毛細血管とほとんど同じ構築でありながら後毛細血管細静脈には網目

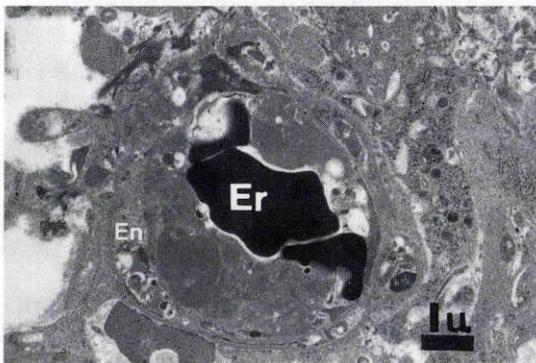


図11 閉塞後4日のHRP投与標本, 電顕所見. 凝固部より遠位部の網膜静脈の管腔内に血栓形成を認め, 血管内皮細胞内に多数の空胞がみられ, 一部には内皮細胞および基底膜が消失し, fibrinが血管外に認められた.(二重染色,  $\times 6,500$ )

大きな静脈の血管壁の一部がHRP反応産物で濃く染まって見え, その周囲の網膜にHRP反応産物と出血を見た(図10). さらに電顕にて, 凝固後4日の凝固部

状の毛細血管床から血液が流入することになり、その部にまず血管内圧上昇の影響が最も加わりやすいと考えられる。Kohner<sup>4)</sup>によると、口径15 $\mu$ m程度の毛細血管の血管壁と構築がほとんど同じ細静脈が、最も血管内圧上昇の影響をうけやすく、最初に蛍光造影にて蛍光色素の漏出を生じ、出血が見られるという。一方、この管壁の構造が毛細血管とほとんど差異がない小さな細静脈は、血管透過性の亢進物質であるヒスタミンやセロトニンなどの化学物質に対しても最も感受性が高く、毛細血管からも血管壁からの漏出は見られるがこの細静脈からの漏出は最大であるといわれている<sup>5)</sup>。我々の観察でも後毛細血管細静脈は、毛細血管や太い血管よりも先に、まず最初に血管外漏出が起こった。さらに静脈閉塞が持続すると、血管壁に平滑筋が存在する太い静脈も内圧上昇の影響をうけ、太い静脈からも血管外漏出や出血がおこった。

次に血管外漏出や出血の発生機序を調べた。近年、Ashton および Cunha-Vaz<sup>6)-8)</sup>による血液網膜関門の考えがある。正常な網膜血管では、蛍光色素の血管外漏出は見られず、網膜血管の隣接する内皮細胞間には tight junction がある。Ryan および Majno<sup>9)</sup>は、内皮細胞が保たれた状態での血管外漏出の機構は、内皮細胞間の junction の障害であると述べている。Hockley<sup>10)</sup>はサルにアルゴンレーザー光凝固を行って網膜静脈分枝閉塞症を発生させ、HRP を静注して検索し、網膜外網状層に HRP 反応産物を認めている。また高橋<sup>11)</sup>もラット網膜静脈にクセノン光凝固を行って、網膜静脈閉塞症を発生させ、フェリチンが junction を通過していると思われる所見を示している。今回、網膜静脈閉塞症を発生した実験動物では、静脈閉塞直後には HRP 反応産物が網膜外網状層を中心に見られ、また光凝固部遠位部の細い網膜血管内皮細胞に、形態学的に明らかな変性像が見られないものでも、細胞間隙の離開を認め、HRP 反応産物が血管外に見られた。また、静脈閉塞後4日には大きい血管で血管壁の一部が HRP 反応産物で濃く染まって見え、その周囲の網膜に HRP 反応産物を見た。これらの結果から閉塞後に網膜外網状層などに見られた浮腫は、網膜血管内皮細胞の細胞間隙の離解によって血管外に漏出した血漿成分からなることがわかった。

光凝固により、静脈に閉塞が発生すると、まず見られたのが光凝固遠位部の静脈血管の拡張蛇行であり、さらに血管内皮細胞の細胞間隙の離解をみた。静脈閉塞がさらに持続すると凝固部遠位部の血管には組織学

的にどのような変化がおこってくるのであろうか。

今回の実験で血管内腔が血栓と赤血球で充満している所見を顕微鏡や電顕にて見た。さらに細い血管腔は、血栓ではほぼ完全に閉塞している所見も見られた。また静脈閉塞が持続して血流障害が続くことにより、内皮細胞への酸素の供給の減少や代謝産物の蓄積を生じ、内皮細胞は変性、壊死に陥ると思われた。我々の実験でも電顕にて内皮細胞に多数の空胞を認め、また内皮細胞が壊死脱落し、その脱落部に壁血栓が形成されている所見や内皮細胞および基底膜が一部消失し、血管外に血液成分を認めた。

これらのことから、静脈閉塞が起こって環流障害が生じ、静脈内圧が上昇すると、血管内皮細胞の障害が起こり、障害のごく初期には内皮細胞間隙の離解となって現れ、血管外漏出として観察された。さらに内皮細胞の障害が続くと内皮細胞が変性して脱落し、壁血栓が形成され、閉塞領域の細い静脈の血管腔は血栓で閉塞される。このような変性脱落した血管壁からは、血液成分が血管外に著しく脱出すると考えられた。

次に、蛍光造影では光凝固10日後過ぎから閉塞領域の毛細血管床への充盈欠損が見られた<sup>2)</sup>が、網膜伸展標本によって早いものでは光凝固後2日に閉塞領域網膜周辺部の毛細血管床への HRP 反応産物の充填がみられなかった。これは静脈閉塞の初期には、前述のごとく血管内圧は毛細血管ないし後毛細血管細静脈の部分で最も上昇すると考えられるため、血流が毛細血管床から細静脈の方向に流れなくなったからと思われる。

本論文の要旨は第92回日本眼科学会総会（昭和63年、京都）にて南川が発表した。本研究は文部省科学研究費奨励研究（A）（63771428）の援助を受けた。記して謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 南川美登里, 山本起義, 大熊 紘, 他: 実験的網膜静脈分枝閉塞症. 予報. 眼紀 39: 1438-1443, 1988.
- 2) 南川美登里, 山本起義, 大熊 紘, 他: 実験的網膜静脈分枝閉塞症. 第1報. 臨床経過. 日眼会誌 93: 691-697, 1989.
- 3) Graham RC, Karnovsky MJ: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14: 291-302, 1966.
- 4) Kohner EM, Dollery CT, Shakib M, et al:

- Experimental retinal branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 69: 776—825, 1970.
- 5) 山田英智, 市川 厚, 黒住一昌 監訳: ブルーム・フォーセット組織学 I. 東京, 廣川書店, 435—444, 1968.
  - 6) **Ashton N**: The blood retinal barrier and vascular relationships in retinal disease. *Trans Ophthalmol Soc UK* 85: 199—230, 1965.
  - 7) **Ashton N, Cunha-Vaz JG**: Effect of histamine on the permeability of the ocular vessels. *Arch Ophthalmol* 73: 211—223, 1965.
  - 8) **Cunha-Vaz JG, Shakib M**: Ultrastructure mechanisms of breakdown of the blood-retina barrier. *J Pathol Bacteriol* 93: 645—652, 1967.
  - 9) **Ryan GB, Majno G**: Acute inflammation. *Am J Pathol* 86: 185—276, 1977.
  - 10) **Hockley DJ, Tripathi RC, Ashton N**: Experimental retinal branch vein occlusion in the monkey. *Trans ophthalmol Soc UK* 96: 202—209, 1976.
  - 11) 高橋茂樹: 眼底出血の研究. 第2報. ラット網膜血管の血管外漏出について. *日眼会誌* 81: 609—623, 1977.