

外側血液網膜関門障害の陰性荷電状態の検索

第4報 鉄による障害

岸本 伸子, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

家兎眼に鉄粉を注入して実験的眼球鉄症を作成し、脈絡膜網膜間の陰性荷電関門の変化を陽イオン剤を用いて電顕的に観察した。鉄粉注入4日では網膜の構造は正常で、対照と同様に網膜色素上皮細胞の基底膜、Bruch膜の内外膠原線維層、脈絡膜毛細血管の基底膜に陽イオン剤が豊富に付着し、陰性荷電関門は保たれていた。7日には組織学的に変化なかったが、網膜色素上皮細胞の基底膜の陰性荷電は減少した。14日には網膜外層は変性消失して色素を含むマクロファージとミュラー細胞が充填し、マクロファージと網膜色素上皮細胞の一部は鉄反応陽性となり、陰性荷電は更に脈絡膜毛細血管の基底膜でも低下した。28日には網膜は菲薄化し、網膜色素上皮細胞は重層した部と変性した部が混在して陰性荷電は全部位で僅かとなった。鉄反応陰性の鉄粉注入7日に、組織的に変化ないが、脈絡膜網膜間の陰性荷電は減少し、眼球鉄症早期に組織学的変化に先行して脈絡膜網膜間の陰性荷電関門の低下が示された。(日眼会誌 95:130-139, 1991)

キーワード：眼球鉄症，外側血液網膜関門，陰性荷電，陽イオン剤，網膜色素上皮細胞

Detect of Destruction of Anionic Sites in the Outer Blood-Retinal Barrier and Damage Caused by Iron

Nobuko Kishimoto, Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

We studied the alteration of the anionic charge in the outer blood-retinal barrier in ocular siderosis by electron microscopy using the cationic probe, polyethyleneimine (PEI). The eyes of four days after injection of iron powder and control rabbit eyes demonstrated numerous PEI-positive sites at the basement membrane of the retinal pigment epithelium, collagen fiber of Bruch's membrane, and the basement membrane of the choriocapillaris. Seven days after injection of iron powder, no change was observed in the retina by light microscopy, but PEI positive sites at the basement membrane of the retinal pigment epithelium were decreased. At 14 days, it was seen that the outer layer of the retina disappeared and was replaced by pigment containing macrophages and Müller cells. Berlin blue reaction became positive in some of those macrophages and retinal pigment epithelia. PEI positive sites decreased. At 28 days, the retina was completely disorganized, and became thin, while the retinal pigment epithelium proliferated and became double layered. Berlin blue reaction was strongly positive in pigment-laden macrophages and retinal pigment epithelium. PEI-positive sites became scarce. As

別刷請求先：570 守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 岸本 伸子

(平成2年6月15日受付，平成2年8月30日改訂受理)

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

(Received June 15, 1990 and accepted in revised form August 30, 1990)

a result of these methods, anionic sites decreased, despite negative iron reaction of 7days after injection of iron powder. It was shown that in ocular siderosis at an early stage, the barrier function of anionic sites between choroid and retina decreased before histological change. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 130-139, 1991)

Key words: Ocular siderosis, Outer blood-retinal barrier, Anionic sites, Cationic probe, Retinal pigment epithelium

I 緒 言

眼球鉄症は眼内に停留する鉄成分により、角膜変性、白内障、網膜変性、網膜剥離、緑内障などを発症する疾患である。実験的 eyeball siderosis の研究には多くの報告があり、組織学的¹⁾⁻⁶⁾、生化学的¹⁾²⁾⁷⁾⁻⁹⁾、電気生理学的¹⁾³⁾⁶⁾⁸⁾¹⁰⁾に、鉄による網膜変性の発生機序や組織学的変化が示されている。

我々は陰性荷電による外側血液網膜関門を様々の状態における変化について観察した¹¹⁾⁻¹³⁾。本実験では有色家兎眼に鉄粉を注入して眼球鉄症を作成し、鉄成分による網膜の外側血液網膜関門機能を検索するため、陽イオン剤をトレーサーとして陰性荷電状態の変化を検索したので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

体重1.2~1.5kgの有色家兎7匹14眼を使用した。

2. 実験的 eyeball siderosis 作成法

鉄粉(iron powder, 純度99.99%, 径150 μ m, Aldrich Chem. Comp.)一蒸留水懸濁液10mg/0.1mlを26ゲージ針を用いて、角膜輪部の1mm後方から硝子体中央へ0.1ml注入した。鉄粉懸濁液はpH7.0, 浸透圧は1 mOsmであった。1匹2眼は無処置で対照とした。

3. 陰性荷電部位検索方法

硝子体内へ鉄粉注入、4日、7日、14日、28日に前眼部および眼底検査、蛍光眼底造影の後、既報の如く¹¹⁾⁻¹³⁾、両側の頸動脈にそれぞれカテーテルを留置して、0.5% polyethyleneimine (PEI, 分子量50,000~60,000, SIGMA Chem. Comp)一食水溶解液3mlを左右のカテーテルより1.5mlずつ注入して約10分間灌流した後、2% グルタルアルデヒド・2% パラフォルムアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液(pH 7.3)で灌流固定し、15分後眼球摘出した。更に浸漬固定を8時間追加した後、眼球を半割し、半分をパラフィン包埋して光顕材料に、残る半分はエタノール

系列で脱水の上、エポキシ樹脂包埋し、電顕材料とした。

パラフィン切片は鉄染色(ベルリン青法)を行った。電顕材料は一部トルイジンブルー染色をして光顕用に、また超薄切片を作成し、酢酸ウラニール、クエン酸鉛にて二重染色を行い、日立HU-12型透過電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. 臨床所見

眼球内に注入した鉄粉懸濁液は注入部位から硝子体中央に拡散した。注入4日には硝子体中央から注入部に向い半透明の灰白色の硝子体索が形成され、鉄粉がこれに含まれ、7日には鉄粉を含むこの索状物は更に濃厚となった。前眼部及び眼底には変化なく、蛍光眼底造影では異常はみられなかった(図1B, C)。14日には前眼部、中間透光体には変化なかったが、網膜に淡白色及び茶色を呈する色素むらが眼底周辺部に出現し、蛍光眼底造影では変性部は淡い顆粒状の過蛍光を示した(図1D)。28日には濃厚な硝子体混濁は硝子体腔中央から刺入部へ広がり、色素むらを示していた眼底周辺部の網膜変性部は黒褐色の色素沈着を伴う萎縮巣となり、蛍光眼底造影では背景蛍光に顆粒状の過蛍光部と色素沈着による低蛍光部が混在していた(図1E)。

2. 組織病理学的所見

網膜はすべて有髄神経線維部を除いた後極部のもっとも変性の強い部位を観察した。

1) 光学顕微鏡的所見

無処置の対照(図2A)では灌流固定による脈絡膜毛細血管腔の拡大を認めた他は異常をみなかった。鉄粉注入4日及び7日には光顕的には変化をみなかった(図2B, C)。ベルリン青による鉄反応は網膜各層で陰性であった(図3A)。14日には内網状層に空胞が形成され、外顆粒層は変性して完全に消失し、色素を貪食したマクロファージやミューラー細胞の増殖がその部を

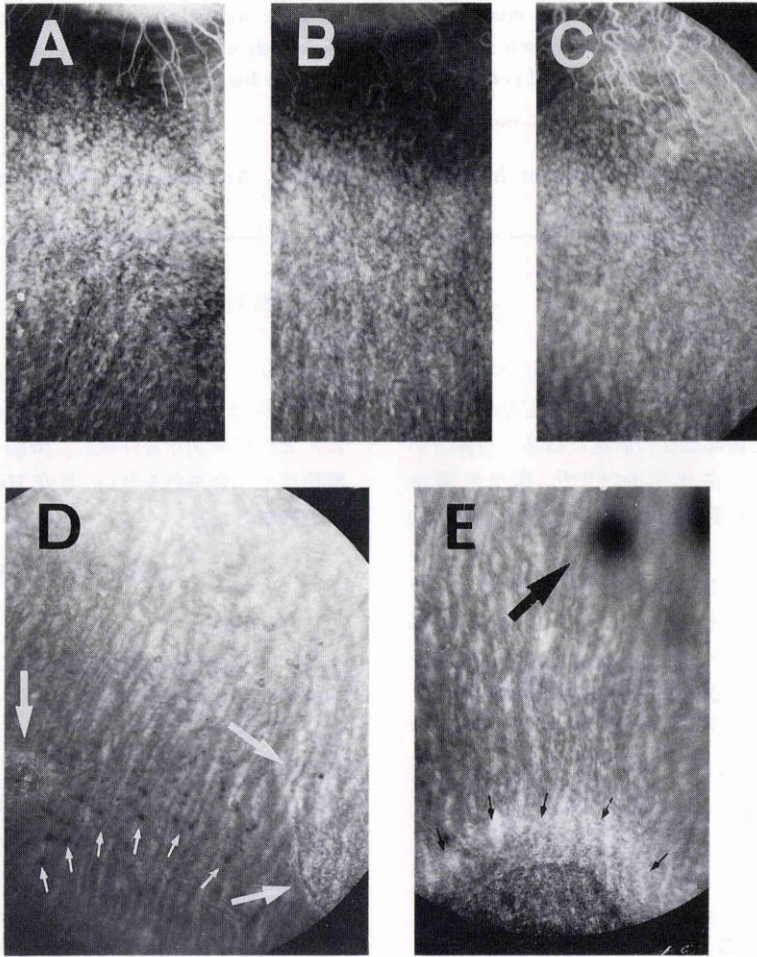


図1 鉄粉懸濁液硝子体内注入後の蛍光眼底造影。

A: 注入前, B: 注入後4日, 変化をみない, C: 注入後7日, 変化をみない, D: 注入後14日, 網膜に斑状に色素むらが出現し, 淡い顆粒状の過蛍光を示した(大矢印), 硝子体中に浮遊する鉄粉が黒い斑点状にみられる(小矢印), E: 注入14日, 網膜変性部は黒褐色の色素沈着(小矢印)を伴う萎縮巣となった, 変性巣の中央には顆粒状の過蛍光部と色素沈着による低蛍光部が混在した, 萎縮巣の周辺はびまん性に過蛍光を示した, 大矢印は硝子体混濁。

充填して網膜色素上皮細胞に接していた。内顆粒層は比較的良好に保たれていた。網膜各層に色素を含んだマクロファージが散在していた。網膜色素上皮細胞は増殖して、重層がみられた部位と、変性消失した部位とが混在していた(図2D)。ベルリン青による鉄染色では、網膜色素上皮細胞層から神経節細胞層の全層にわたってみられた色素を含んだマクロファージ及び網膜色素上皮細胞の胞体が青色に淡く染色され、鉄成分の存在を示した(図3B)。

28日になると網膜は全体に薄くなり、網膜全層の構

造が失われた。内顆粒層の核は少数残っていた。色素を含んだマクロファージは網膜全層にみられた。網膜色素上皮細胞は増殖して、重層した部位と、変性消失した部位が混在していた(図2E)。鉄染色によって、変性網膜内のマクロファージと網膜色素上皮細胞の一部が強染された(図3C)。

2) 電子顕微鏡の所見

陽イオン剤 PEI 粒子の付着による陰性荷電部位を観察した。対照(図4A)では電子密度の高い PEI 粒子(15~20nm)が網膜色素上皮細胞の基底膜と脈絡膜毛

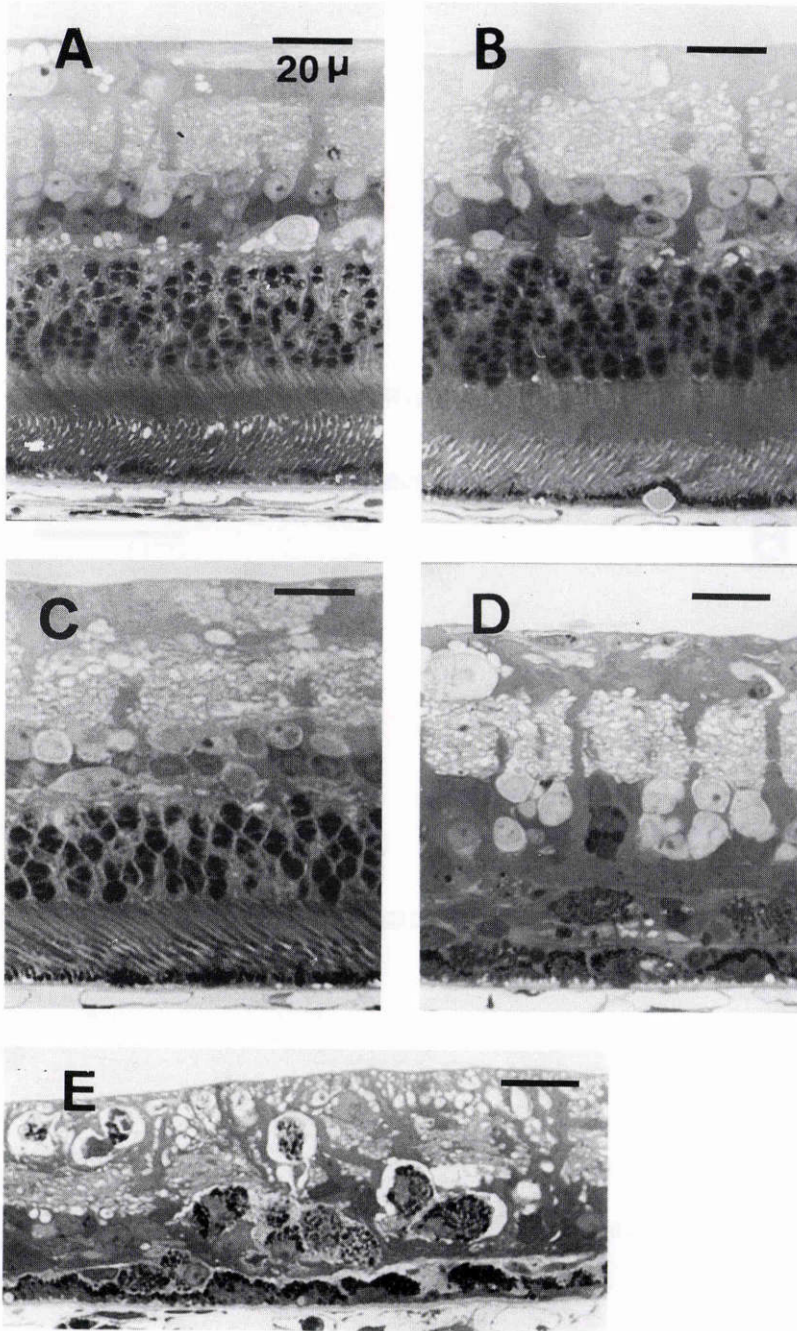


図2 光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色, $\times 600$).

A: 無処置の対照, 灌流固定により, 脈絡膜毛細血管腔の拡大をみる. B: 注入後4日, 変化をみない. C: 注入後7日, 変化をみない. D: 注入後14日, 外顆粒層及び視細胞層は完全に消失し, 代わって色素を含んだマクロファージとミュラー細胞で置きかわっていた. 網膜色素上皮細胞は増殖して, 重層がみられた部位と, 変性脱落した部位がみられた. E: 注入後28日, 網膜の全層の構造は失われて薄くなり, 内顆粒層の核の一部のみが残った. 変性した網膜内には黒褐色の色素を含んだマクロファージが全層にわたってみられた.

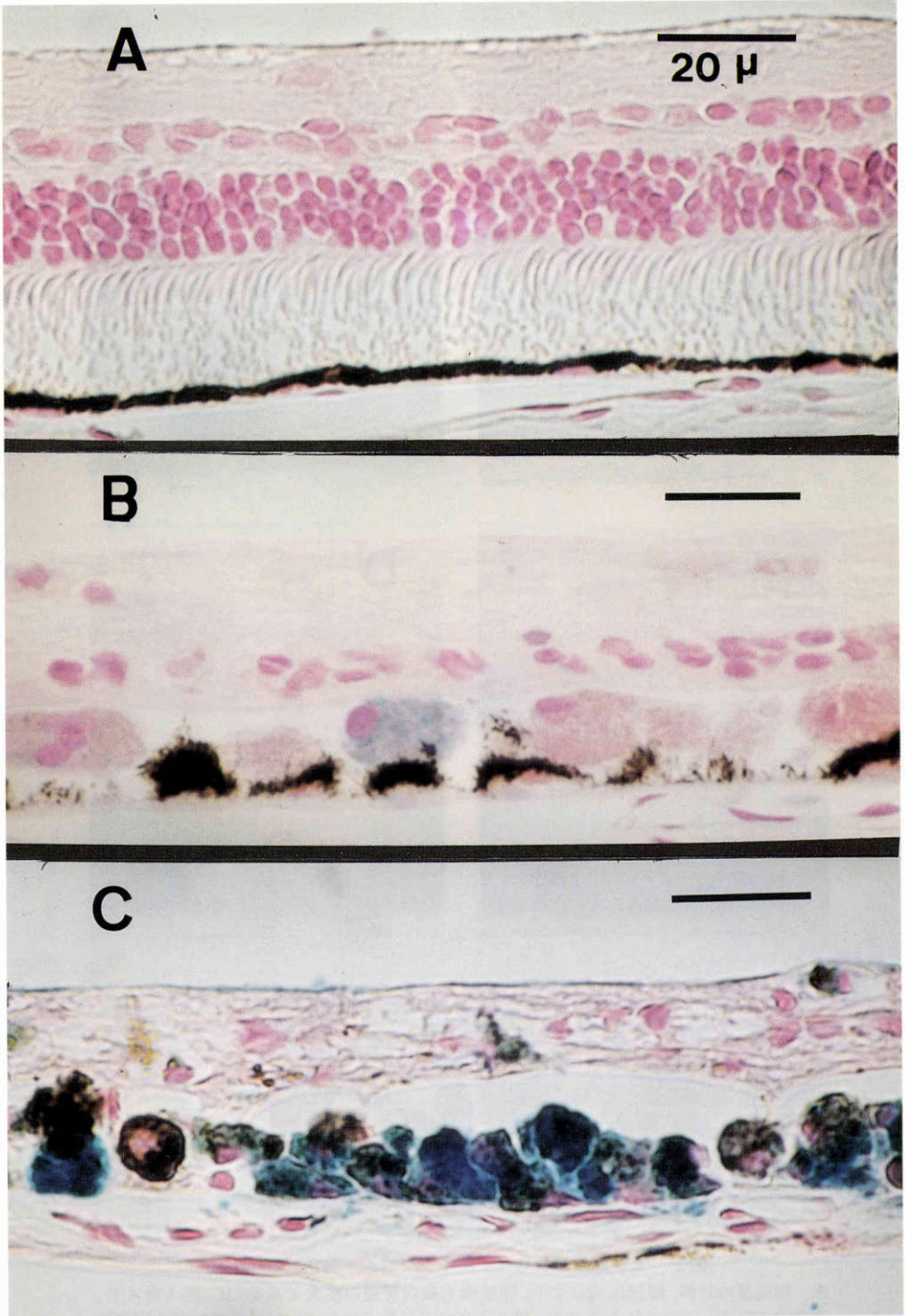


図3 光学顕微鏡所見。(ベルリン青染色, $\times 1000$).

A: 注入7日, 網膜各層には染色はなく鉄反応は陰性であった, B: 注入14日, マクロファージ及び網膜色素上皮細胞の胞体は青色に染色され, 鉄成分の存在を示した, C: 注入28日, 変性した網膜内のマクロファージと網膜色素上皮細胞は強染された.

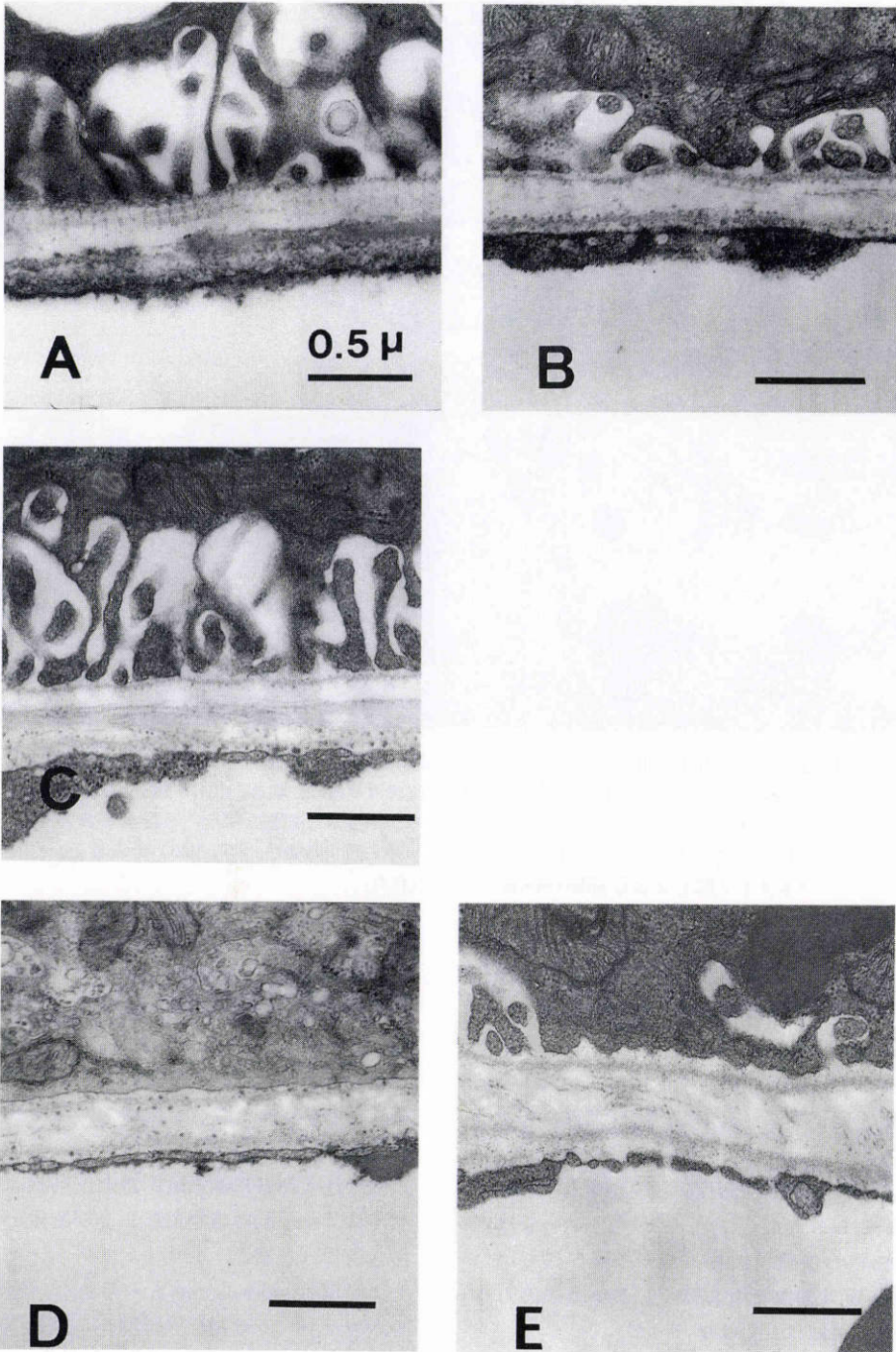


図4 電子顕微鏡所見。網膜色素上皮細胞基底膜, Bruch膜膠原線維, 脈絡膜毛細血管基底膜による陰性荷電部位。(クエン酸鉛, ウラニル酢酸染色, $\times 30,000$)
A: 無注入の対照。網膜色素上皮細胞基底膜, Bruch膜膠原線維, 脈絡膜毛細血管基底膜のそれぞれに電子密度の高いPEI粒子(15~20nm)が豊富に付着していた。B: 注入4日。PEI粒子の付着状態に変化はなかった。C: 注入7日。網膜色素上皮細胞基底膜でPEI粒子の付着はやや減少していた。D: 注入14日。PEI粒子の付着は網膜色素上皮細胞基底膜のみならず, 脈絡膜毛細血管基底膜, Bruch膜膠原線維においても減少していた。E: 注入28日。PEI粒子の付着はわずかとなった。

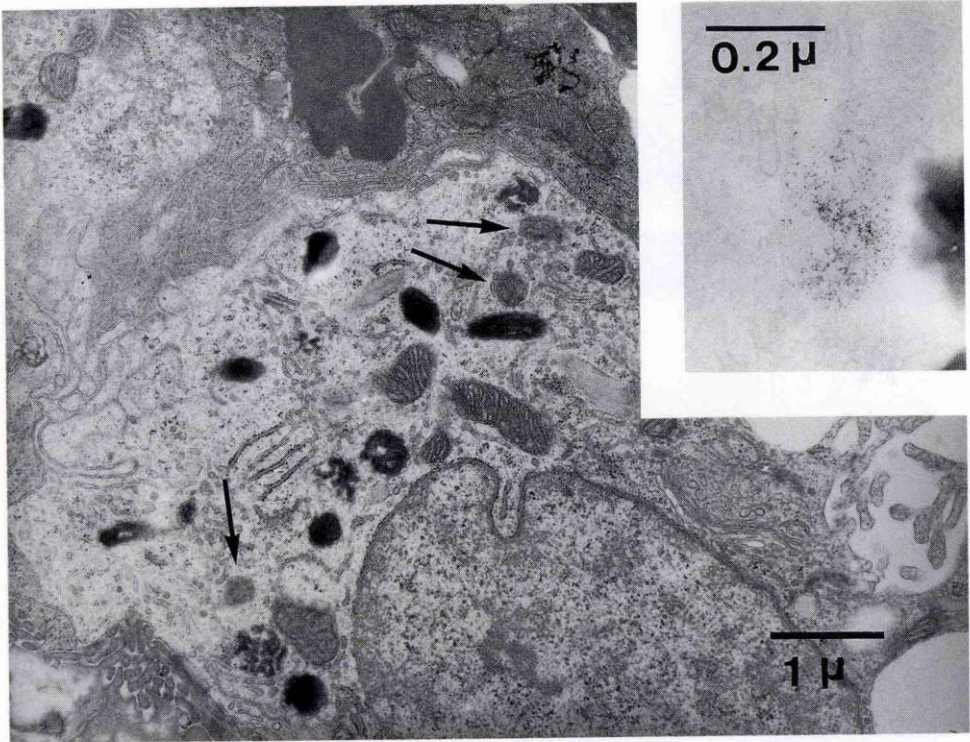


図5 電子顕微鏡所見。注入14日、重層した網膜色素上皮細胞。(クエン酸鉛, ウラニル酢酸染色, $\times 15,000$) 網膜色素上皮細胞の胞体は明るく, 胞体内には, 粗面小胞体, ゴルジ体, ミトコンドリア, 2次ライソゾーム等豊富な細胞内小器官がみられた。2次ライソゾーム(矢印)は強拡大(挿入図, 無染色, $\times 75,000$)でみると, フェリチン粒子を含む siderosome と考えられた。

細血管の基底膜の内側および外側に列をなして附着しており, Bruch膜の内膠原線維層, 外膠原線維層にも周期的な附着がみられた。

鉄粉注入4日では網膜の構造は変化なく, PEI粒子の附着は対照と変化なく(図4B), 陰性荷電の低下はみられなかった。

7日になると, 視細胞外節及び網膜色素上皮細胞の構造に異常はみられなかったが, PEI粒子の附着は網膜色素上皮細胞の基底膜においてやや減少していた(図4C), 脈絡膜毛細血管の基底膜とBruch膜内外膠原線維層への附着には変化はなかった。

14日では視細胞の内, 外節, 核は完全に消失して, その後にミューラー細胞の増殖がみられ, 網膜色素上皮細胞はそれと直接に接していた。網膜色素上皮細胞は, 滑面小胞体, ミトコンドリア等の細胞内小器官の空胞変性, 消失がみられた。また胞体内に2次 lysosome がみられ, これは強拡大でみると, フェリチン粒子を含

む siderosome であった(図5)。一部では網膜色素上皮細胞は増殖し, 変性した網膜色素上皮細胞の上を覆って重層していた。陰性荷電を示す PEI 粒子の附着は網膜色素上皮細胞の基底膜で更に減少し, 脈絡膜毛細血管の基底膜と膠原線維層でもやや減少がみられた(図4D)。

鉄粉注入28日には網膜色素上皮細胞は増殖, 重層してミューラー細胞の細胞突起および胞体と接していた。胞体内には豊富なミトコンドリア, メラニン顆粒, そして数個の siderosome もみられた。色素顆粒を含むマクロファージは神経線維層から網膜下腔にいたる網膜全層にみられるようになり, 胞体内には siderosome を含んでいた(図6)。陰性荷電を示す PEI 粒子の附着は網膜色素上皮細胞の基底膜と脈絡膜毛細血管の基底膜で著明に減少し, 膠原線維層にわずかな附着をみるのみとなった(図4E)。

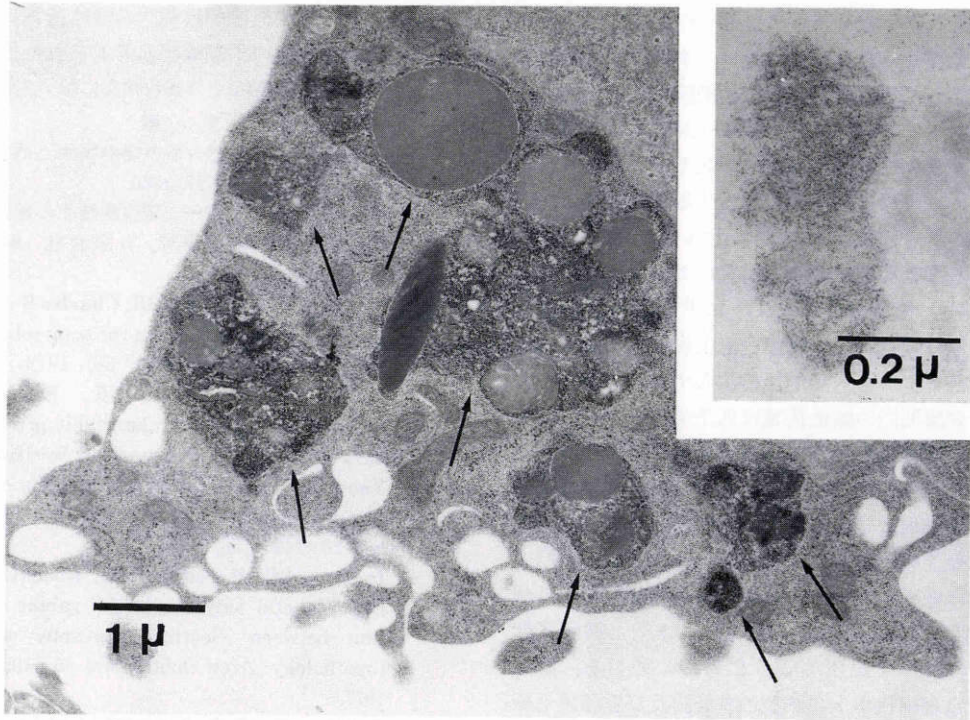


図6 電子顕微鏡所見. 注入28日, 変性した網膜内にみられたマクロファージ. (クエン酸鉛, ウラニル酢酸染色, $\times 15,000$) マクロファージの胞体内には大型の siderosome (矢印) が多数みられた. 挿入図: siderosome (無染色, $\times 75,000$) 多数のフェリチン粒子を含んでいた.

IV 考 按

実験的眼球鉄症に関しては, 組織学的変化や発生機序について多数の報告がある. 組織内の鉄成分の証明方法はベルリン青法¹⁴⁾¹⁵⁾, ゴモリ染色変法¹⁶⁾, プルシアン青, タンプル青を用いる方法³⁾¹⁷⁾, Perls 法¹⁴⁾, そして電顕により組織内の siderosome やフェリチン粒子を証明する方法²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾¹⁵⁾がある. 本実験ではベルリン青染色による Fe^{3+} の検出, 及び電顕的に細胞内の siderosome の検索を行った. ベルリン青法でも電顕的にも鉄成分を検出できたのは鉄粉注入14日であった. これは鉄イオンが網膜組織内に浸透して, ライソゾーム内に貯留されれば電顕的にも鉄成分を含んだ2次ライソゾーム, 即ち, siderosome として認められるようになり, また速やかにベルリン青法でも検出されるようになったものと思われた. 鉄による網膜障害の発生機序は鉄イオンによるフリーラジカル形成と考えられている^{4)7)8)~10)18)}. 不飽和脂肪酸にフリーラジカルが作用すると, 過酸化脂質が形成され, ついで生成された過酸

化脂質からフリーラジカルが形成され, 連鎖反応が進行していく. 網膜組織内で不飽和脂肪酸の豊富な視細胞外節や, 視細胞内節及びグリア細胞内のミトコンドリアの膜成分はその標的となり, 過酸化脂質が形成され, 変性が生じる. 本実験においても最初に見られた変化は網膜色素上皮の基底膜の PEI 粒子着の低下であり, 過酸化脂質形成の影響が網膜色素上皮細胞の細胞膜および基底膜まで影響を及んでいるものと思われた.

鉄粉注入眼では注入後14日で組織学的に鉄反応が陽性となり, 眼球鉄症の発症が確実となったが, 注入7日では光顕的には変化なく, ベルリン青による鉄染色も陰性であった. 電顕的にも通常の観察では網膜色素上皮に形態的な変化はみられなかったが, PEI を用いた陽イオン剤トレーサーの検査法によって, 基底膜の陰性荷電が既に低下していた. すなわち鉄粉注入後7日で外側血液網膜関門の陰性荷電が低下し始め, 28日ではわずかに残るのみであった. これは電気的関門機能の低下を示し, 特に28日ではその障害は高度である

ことが示された。鉄イオンにより変性し、基底膜の陰性荷電が低下した網膜色素上皮は、すべての細胞膜で荷電が低下していると考えられ、網膜色素上皮細胞と接しているミュラー細胞との接着性が低下し、感覚網膜と網膜色素上皮細胞の接着力の低下があると思われた。臨床的に眼球鉄症末期に発生する網膜剥離はこの様な網膜の接着性の低下も原因していると思われる。

外側血液網膜関門には陰性荷電による電気的関門が存在^{19)~22)}し、既報で述べたように^{11)~13)}様々の病態下で荷電状態は変化する。網膜色素上皮変性を発生させるヨウ素酸ナトリウムを硝子体注入すると、早期から外側血液網膜関門の陰性荷電は低下する¹¹⁾。網膜光凝固定後は外側血液網膜関門の陰性荷電は消失するが、凝固巣が癒着化するにつれ網膜色素上皮細胞の増殖と細胞外物質が増加し、陰性荷電は増加する¹²⁾。また硝子体に気体を注入すると、一時的に外側血液網膜関門の陰性荷電は低下する¹³⁾。Caldwell は病的状態での外側血液網膜関門の陰性荷電を糖尿ラット²³⁾と網膜変性ラット²⁴⁾において以下のように報告している。糖尿ラットでは網膜色素上皮細胞の基底膜及び脈絡膜毛細血管の基底膜の肥厚がみられ、これに伴い陰性荷電が低下する²³⁾。また網膜変性を自然発生する RCS ラットでは網膜色素上皮細胞の増殖に伴って陰性荷電を示す細胞外物質は産生され、陰性荷電が増加する²⁴⁾。以上から推察すると、網膜色素上皮細胞の増殖及び細胞外物質の産生を伴う病態下では増殖した網膜色素上皮細胞や豊富な細胞外物質が陰性に荷電し、陰性荷電は増加する。即ち、光凝固の癒着巣、眼球鉄症における網膜色素上皮細胞増殖部、及び網膜変性ラットの網膜色素上皮細胞の増殖部では陰性荷電が増加するが、これに対して、網膜色素上皮細胞は障害されるが、増殖を来さない病態下、即ちヨウ素酸ナトリウムによる障害や糖尿病における外側血液網膜関門の陰性荷電は低下する。つまり、荷電状態の増加は網膜色素上皮細胞と網膜色素上皮細胞が産生する細胞外物質に依存すると考えられる。Caldwell はこの陰性荷電を示す細胞外物質には血管新生因子が含まれるのではないかと推測²⁴⁾しており、今後臨床的に多くみられる網膜新生血管、脈絡膜新生血管と網膜色素上皮細胞増殖、及び細胞外物質の関連性を追求してゆく予定である。

以上、家兎硝子体内に鉄粉懸濁液を注入して、実験的 eyeball iron 症を作成し、その外側血液網膜関門における陰性荷電の変化を検索した。組織学的に網膜内に鉄イオンが証明され、眼球鉄症が確認できたのは注入14日

であったが、外側血液網膜関門の陰性荷電は7日より低下し、眼球鉄症の早期障害と考えられた。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会において発表した。

文 献

- 1) 牧内正一：穿孔性鉄片眼外傷の臨床と病理。日眼会誌 64：2234—2257, 1960.
- 2) 松尾信彦, 長谷川栄一：網膜鉄錆症の組織化学並びに電子顕微鏡的研究。日眼会誌 64：2234—2257, 1960.
- 3) Masciulli L, Anderson DR, Charles S: Experimental ocular siderosis in the squirrel monkey. Am J Ophthalmol 74: 638—661, 1972.
- 4) Burger PC, Klintworth GK: Experimental retinal degeneration in the rabbit produced by intraocular iron. Lab Invest 30: 9—19, 1974.
- 5) Yoo JH: Responses of Müller cells of rabbit retina in experimental siderosis. Jpn J Ophthalmol 20: 149—158, 1976.
- 6) Declercq SS, Meredith PCA, Rosenthal AR: Experimental siderosis in the rabbit. Correlation between electroretinography and histopathology. Arch Ophthalmol 95: 1051—1058, 1977.
- 7) 平光忠久, 馬嶋慶直, 長谷川康紀：網膜鉄錆症の発症と過酸化脂質。日眼会誌 79: 1468—1473, 1975.
- 8) 平光忠久, 加藤 勝, 森岡清史：網膜鉄錆症における superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase. 日眼会誌 87: 1362—1370, 1983.
- 9) Anderson RE, Rapp LM, Wiegand RD: Lipid peroxidation and retinal degeneration. Curr Eye Res 3: 223—227, 1984.
- 10) Doly M, Braquet P, Bonhomme B, et al: Effect of lipid peroxidation on the isolated rat retina. Ophthalmic Res 16: 292—296, 1984.
- 11) 岸本伸子, 大熊 紘, 山岸和矢：外側血液網膜関門障害の陰性荷電状態の検索。一第1報。ヨウ素酸ナトリウムによる早期障害一。日眼会誌 94: 25—32, 1990.
- 12) 岸本伸子, 大熊 紘, 宇山昌延：外側血液網膜関門障害の陰性荷電状態の検索。一第2報。光凝固後の変化一。日眼会誌 94: 645—653, 1990.
- 13) 岸本伸子, 大熊 紘, 宇山昌延：外側血液網膜関門障害の陰性荷電状態の検索。一第3報。硝子体気体注入による障害一。日眼会誌 94: 654—662, 1990.
- 14) 松戸武夫, 玉井嗣彦, 松浦啓之, 他：眼球鉄錆症の1例。一電気生理学的, 組織学的検査所見一。眼臨 70: 24—29, 1976.
- 15) 浜井保名, 高橋茂樹, 柳田 泰, 他：鉄錆症による白内障の電子顕微鏡的観察。臨眼 32: 119—127, 1978.
- 16) Appel I, Barishak YR: Histopathological

- changes in siderosis bulbi. *Ophthalmologica* 176: 205-210, 1978.
- 17) **Talamo JH, Topping TM, Maumenee AE**, et al: Ultrastructural studies of cornea, iris and lens in a case of siderosis bulbi. *Ophthalmology* 92: 1675-1680, 1985.
- 18) 平光忠久: 眼疾患とフリーラジカル. *眼紀* 9: 1911-1926, 1988.
- 19) **Schurer JW, Kalicharan D, Hoedemaeker J**, et al: The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. *J Histochem Cytochem* 26: 688-689, 1978.
- 20) **Essner E, Pino RM**: Distribution of anionic sites in Bruch's membrane of the rabbit eye. *Eur J Cell Biol* 27: 251-255, 1982.
- 21) **Pino RM, Essner E, Pino LC**: Location and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. *J Histochem Cytochem* 30: 245-252, 1982.
- 22) 上野聡樹, 石郷岡均, 安瀨幸男, 他: 血液眼関門についての研究—機能と形態の接点, その研究法の開発—. 第1部. 血液—網膜関門構成細胞における機能関連酵素の局在および細胞膜表面荷電の barrier 機能の関与について. *日眼会誌* 92: 1913-1960, 1988.
- 23) **Caldwell RB, Slapnik SM, McLaughlin BJ**: Decreased anionic sites in Bruch's membrane of spontaneous and drug-induced diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1961-1967, 1986.
- 24) **Caldwell RB**: Extracellular matrix alterations precede vascularization of the retinal pigment epithelium in dystrophic rats. *Curr Eye Res* 8: 907-921, 1989.
-