

## 実験的眼内組織増殖に関する形態学的研究

佐野 貴之, 山根 淳志, 戸倉 敬雄, 三木 弘彦

関西医科大学眼科学教室

### 要 約

家兎の眼球壁を開窓して硝子体を吸収する方法を用い、実験的に眼内増殖組織による牽引性網膜剥離を作成した。組織増殖の強さはおもに硝子体喪失量、硝子体出血の量に左右されることが示唆された。眼内増殖組織は主に視神経乳頭から増殖した線維芽細胞によって構成され、小数の網膜色素上皮細胞、マクロファージやその他の細胞も周囲にみられた。この硝子体内増殖組織には新生血管が存在していた。(日眼会誌 95: 140-146, 1991)

キーワード：実験的網膜剥離、硝子体新生血管、眼内増殖組織、家兎

## A Morphological Study of Experimental Intravitreal Proliferative Tissues

Takayuki Sano, Atsusi Yamane, Takao Tokura  
and Hirohiko Miki

*Department of Ophthalmology, Kansai Medical University*

### Abstract

Experimental tractional retinal detachments in rabbits' eyes was produced several weeks following aspiration of vitreous gels through a posterior small window of the eye wall. Histological examination showed that intravitreal proliferative tissues contained many fibroblasts, derived from the optic disc a small amount of migrated RPE, macrophages and other cells associated with proliferative tissues. Glial cells also grew especially at the epi-retina, causing shrinkage of the sensory retina. Vitreous neovascularization deriving from the retinal vessels, was also found in these proliferative tissues.

Our experimental data indicated that the extent of proliferative tissues mainly depend upon the amount of vitreous loss and vitreous hemorrhage, and the duration of retinal detachment. This experiment may be useful as an animal model of vitreous neovascularization (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 140-146, 1991)

**Key words:** Experimental retinal detachment, Vitreous neovascularization, Intraocular proliferative tissue, Rabbit

別刷請求先：570 守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 佐野 貴之  
(平成2年1月9日受付, 平成2年7月2日改訂受理)

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

(Received January 9, 1990 and accepted in revised form July 2, 1990)

## I 緒 言

種々の原因によって網膜表面から硝子体用に組織増殖が発生し、この硝子体内増殖組織はやがて瘢痕性収縮を生じて牽引性網膜剝離を発生させ、放置すれば失明にいたる。

硝子体内増殖組織を組織学的に検索した臨床研究には、硝子体手術時に採取した増殖組織片を観察したものや、採取した硝子体内増殖組織を組織培養して構成細胞を調べたものがある<sup>1)2)</sup>。

動物眼に硝子体内増殖組織を作成することに成功した従来の実験には、線維芽細胞、網膜色素上皮細胞など各種の細胞を硝子体腔内に直接注入して眼内で増殖させる方法が行われている<sup>3)~7)</sup>。これらの実験では充分な量の細胞を注入さえすれば、硝子体内に注入した細胞の種類が何であっても、やがて変化して線維芽細胞様細胞や筋線維芽細胞となって眼内で増殖して、最終的にはいわゆる増殖性硝子体網膜症を起こすことが報告されている。また実験的に穿孔性眼外傷を作成すると穿孔創周囲から硝子体に向かって線維芽細胞の増殖が起こり<sup>8)</sup>、二重穿孔外傷では刺出入部の間だけでなく、さらに創口から視神経乳頭と硝子体基部に向かう硝子体増殖が形成される<sup>9)</sup>。

以上の研究は眼球外や眼球壁の細胞を眼内に散布して、増殖させたものであるが、臨床的に問題となる糖尿病性網膜症や増殖性硝子体網膜症による牽引性網膜剝離は、眼球外の細胞ではなくて眼内の細胞が網膜表面や硝子体内で増殖したものである。眼内に存在する細胞が増殖をおこす要因や諸条件を知ることは硝子体内増殖の発生機序を解明する上で重要である。このような報告には、ヒアルロニダーゼによって硝子体を融解させて、裂孔原性網膜剝離を起こした場合や、硝子体中に血液を注入した場合などでみられるが、報告は少ない<sup>10)</sup>。

筆者らも前報<sup>11)</sup>では硝子体内および網膜表面に元来存在する眼内細胞を増殖させることが出来た。本報ではこのようにして発生した硝子体内増殖を電子顕微鏡を用いて形態学的に詳細に検索したので報告する。

## II 実験方法

実験動物には成熟有色家兎5匹7眼を使用し、前報<sup>11)</sup>と同様、球結膜切開の上、赤道部より後方で強膜半層弁を作り、その底部で2mm×3mm大の眼球壁を切除し、網脈絡膜欠損部を作成した。更にそこから18G輪

血針の外筒を入れて、眼球内壁に触れないように硝子体ゲルを吸引した。吸引量は1~1.5mlになった。これにより網膜が牽引されて人為的に網膜剝離ができた。次いで強膜弁を密に縫合閉鎖し、球結膜を縫合して手術を終えた。

このような処置をした眼球を検眼鏡により臨床的に観察し、1~6週間の間に眼球摘出した。摘出後直ちに実体顕微鏡下で眼球を割断して観察を行った。眼球摘出による検索は処置後1週に1眼、2週に2眼、3週に1眼、4週に2眼、6週に1眼、計7眼であった。

眼球は2倍希釈のカルノフスキー液で6時間前固定を行い、リン酸緩衝液で洗滌後、1%オスミウム酸で1時間後固定を行い、これをアルコール系列で脱水して、エボン817樹脂に包埋し、LKBミクロトームにて薄切した。この標本にウラニルおよび鉛による二重電子染色を行い、電子顕微鏡にて観察した。

## III 結 果

### 1. 検眼鏡所見

処置直後には全例に網膜剝離が生じた。その後は視神経乳頭の発赤と浮腫を伴った胞状網膜剝離が続いた後、1週頃から網膜剝離の程度、範囲は減少する傾向を示した。眼球壁開窓部付近の網膜は処置後早期に復位し、創孔縁から前報<sup>12)</sup>の様に結合組織の増殖が発生して、網膜の欠損部を1週間で被覆した。

処置時に硝子体吸引を多く行なったものでは、開窓部から周囲の硝子体中に出血が起こることが多く、7眼のうち特に多量に起こって眼底が見えなくなった2眼では、1から2週後に眼底が見えるようになった時には、開窓部からの増殖組織が著明で後極部に広がっていた。別の1眼では処置時に硝子体出血が少なく、1週後にはほとんど吸収されていた。この眼では検眼鏡では乳頭の浮腫と剝離した網膜の牽引性皺襞のほかには乳頭からの増殖性組織はみいだせなかった。

7眼のうち残る4眼では硝子体出血が創孔周囲から前部硝子体のみひろがったが、検眼鏡では増殖組織はめだたず、4週後に眼底の透見度が回復したのもでも器質化した硝子体出血が存在したため組織増殖は検眼鏡では確認できなかった。

### 2. 組織所見

本報では組織検査の結果、眼球壁開窓部とは別に乳頭部付近に独立して発生した硝子体内増殖膜を形成した4眼についての組織所見を述べる。

眼球割断面でみると網膜は漏斗状に剝離していた

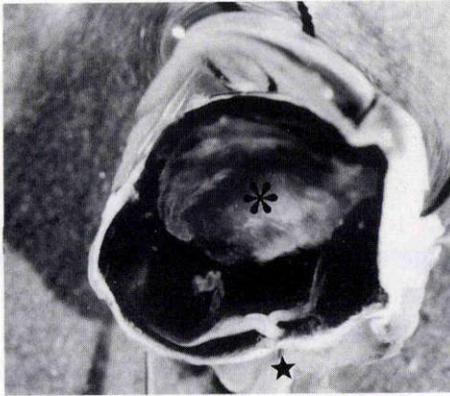


図1 摘出した兎眼球の切断。網膜は漏斗状に剥離していた。★—視神経乳頭部、\*—水晶体。

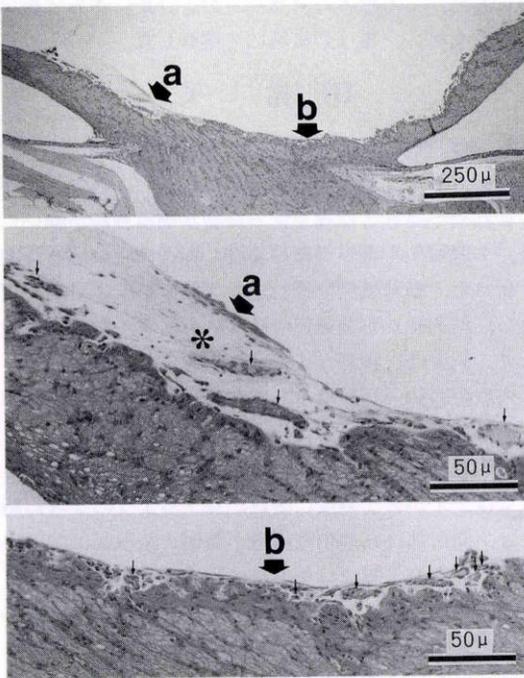


図2 視神経乳頭部の光顕写真。網膜は乳頭縁から剥離している。(×10, H-E染色)

中図はa部の拡大。\*—細胞の疎な増殖組織。小矢印—血管。(×50)、下図はb部の拡大。小矢印—乳頭表面の血管。(×50)

(図1)。光学顕微鏡で観察すると、視神経乳頭部では表面に血管が多く認められるとともに、乳頭周囲から増殖組織が硝子体に向かって存在していた(図2)。特に乳頭周囲から髓翼部の網膜にかけて硝子体内増殖組織により牽引されて漏斗状の剥離を起こしていた(図



図3 剥離した網膜の髓翼部の光顕写真。硝子体内増殖組織(\*)によって牽引性網膜剥離を起こしていた。★—網膜下腔。(×15, トルイジンプルー染色)

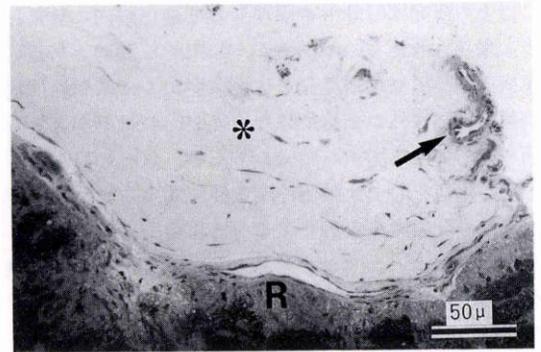


図4 硝子体増殖組織(\*)の内部には血管が見られた(矢印)。R—網膜。(×50, トルイジンプルー染色)

3)。増殖組織中には新生血管が見られた(図4)。

この増殖組織を電子顕微鏡で観察すると、この部を構成する細胞は、周囲に膠原線維があり、紡錘形の傾向を持った不規則な外形で、基底膜はなく、小胞体やリボソームを多く含んでいるため線維芽細胞と思われた(図5, 図6a)。また紡錘形をした細胞質内に細線維が充満しているのがみられ、筋線維芽細胞ではないか

と思われた(図6, 図6b).

図3の剥離した網膜髄翼表面には大型血管にまじって多数の血管が存在していた(図7). これらの血管の内径は15ないし40 $\mu\text{m}$ で, 数個の内皮細胞によって不規則な形の管腔を形成していた. 内皮細胞の胞体は比較的厚く, 隣接する内皮細胞は互いに tight junction

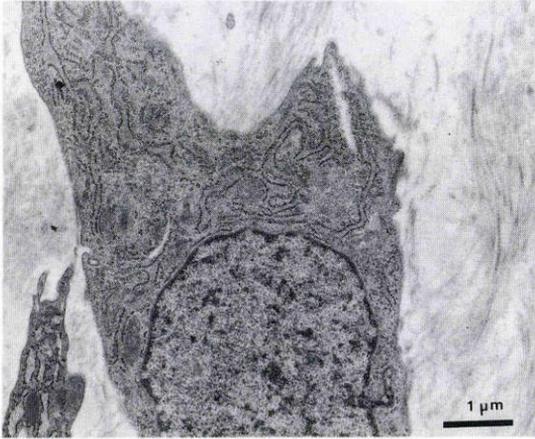


図5 硝子体内の増殖組織の線維芽細胞。(×8,500)

によって接合されていたが, 有窓孔が所々に存在しており, 幼若な血管と考えた. 血管周囲は間質により構成されて, 多数のマクロファージがみられた.

乳頭から硝子体内へのびた増殖組織の周囲には数種類の遊走細胞が散在していた. 多くの遊走細胞は空胞やライソゾーム顆粒を持ったマクロファージであり, これらは特に血管の周囲に多くみられ, 血液由来のものと思われた(図8). 細胞内にメラニン色素を含んでおり, 極性を残しているため, 網膜色素上皮由来と思われるものもあった(図9). 他には少数ながら赤血球, リンパ球, 形質細胞もみられた.

また所々では剥離網膜内面に増殖膜形成がみられ, 網膜が収縮したために網膜内境界膜が波形になっている所見がみられた(図10). この部分は乳頭周囲の増殖組織と離れて存在しており, 膠原線維や線維芽細胞はみられず, 一層のグリア細胞が網膜内面に沿って存在していた.

#### IV 考 按

本報の実験より明らかにされた知見は, 眼内に元来存在している細胞が視神経乳頭上から硝子体内に向

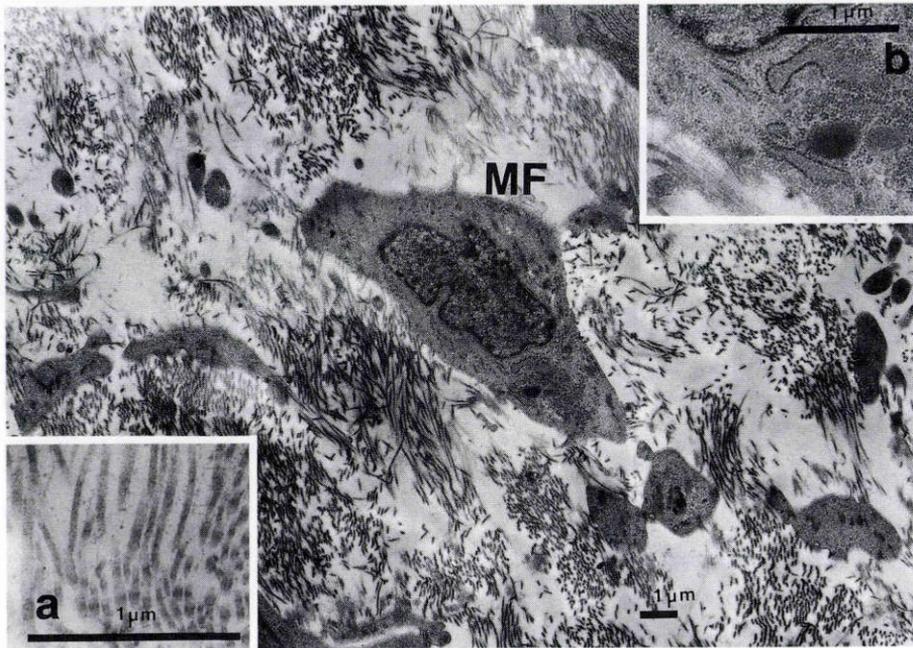


図6 増殖組織中に見られた筋線維芽細胞の様な細胞 (MF), (×5,000)

左下枠内(図6a)はこの部の間質の膠原線維であり, 約60nmの直径で70nmの周期を示していた。(×40,000), 右上枠内(図6b)はこの細胞の内部。(×16,000)

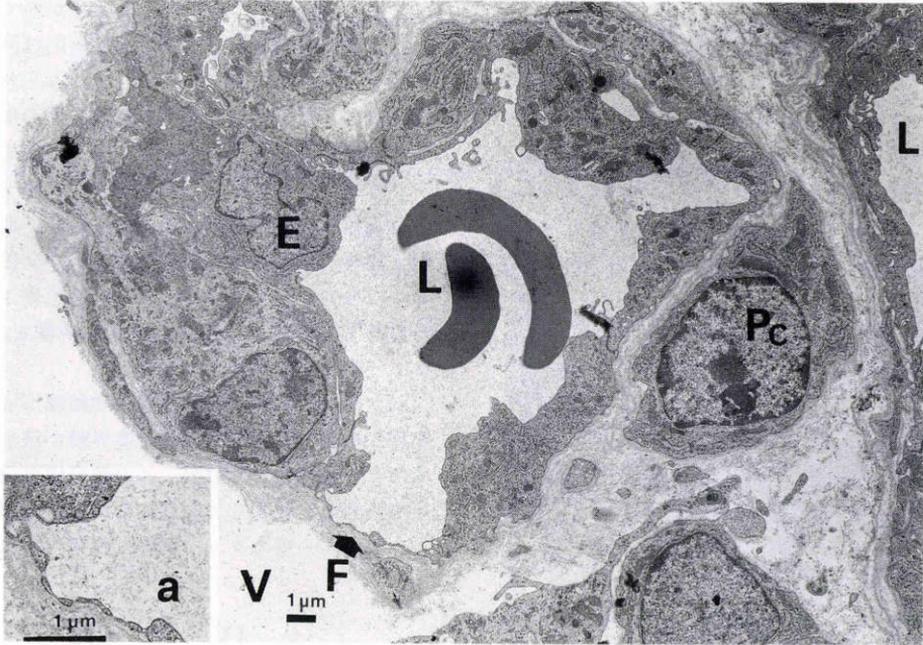


図7 網膜髄翼表面の血管。管径は大きい、有窓孔もみられた、E—内皮細胞、Pc—pericyte、L—血管腔、V—硝子体腔、(×4,000)  
 枠内(図6a)は(F)部の拡大で、有窓孔がみられる。(×10,000)

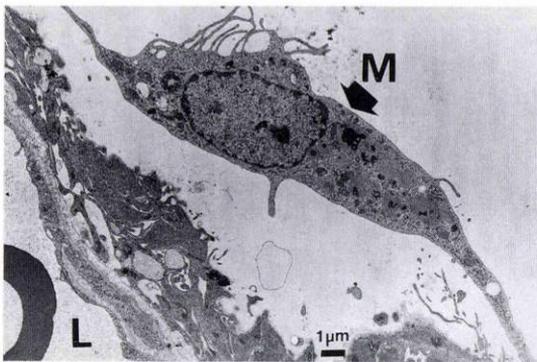


図8 遊走細胞の多くはマクロファージ(M)であった(×3,000)

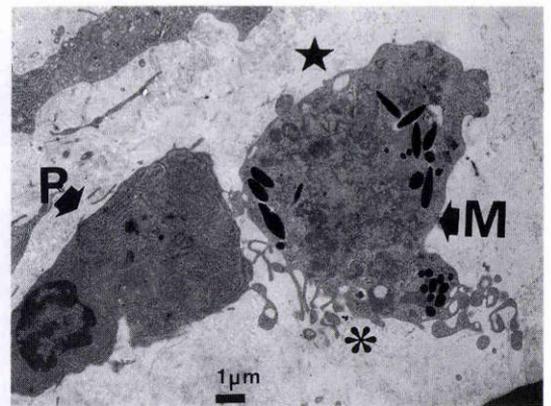


図9 なかには網膜色素上皮由来と思われるものもあった。★—基底側、\*—頂側、P—形質細胞(×4,000)

かって増殖して膜状の硝子体内増殖組織を形成したこと、それと乳頭部血管から新生血管が発生したことの2つである。

#### 1. 視神経乳頭周囲の眼内増殖組織について

眼球壁開窓を行ない、少量の硝子体切除と硝子体出血だけが生じた場合には、創孔部周囲の組織増殖しか起こらないことをすでに報告したが<sup>12)</sup>、これに今回の実験のように硝子体吸引を加えて網膜剝離まで至らせると、後に視神経乳頭から後部硝子体膜にひろがる組

織増殖がみられた。すなわち硝子体の喪失と硝子体出血は後部硝子膜剝離をおこして組織増殖の足場を与える要因になったものと考えた。

乳頭上の硝子体内増殖組織の主な構成細胞は線維芽細胞であった。硝子体内増殖が開窓部とつながっていない眼に限ったため、創孔部から強膜の線維芽細胞を

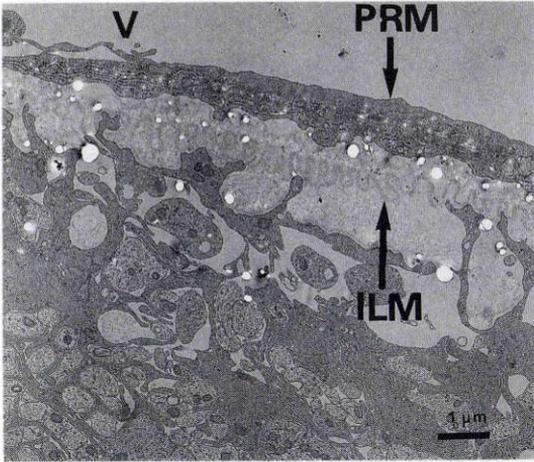


図10 網膜上膜(PRM), 網膜の内境界膜は屈曲して短縮していた, ILM—内境界膜, V—硝子体腔(7,000)

増殖して後極部におよんだことは否定できると考えた。そしてこの線維芽細胞は、乳頭表面や網膜表面の血管の周囲に元来存在した線維芽細胞が増殖し、硝子体内へ移動して増殖膜を形成したものと思われた。

また乳頭上、網膜表面および硝子体用形成された血管周囲には線維芽細胞が著しく増加し、この線維芽細胞は形態上、周辺細胞に類似した構造を示した。周辺細胞には膠原線維の産生能があり、条件によっては突起を縮めて血管壁を離れ、周囲の結合組織内に遊出し、極めて線維芽細胞に近い形態を示す<sup>13)</sup>ことから、この様な結合組織の増殖膜を形成する可能性も考えられる。また内皮細胞にも周辺細胞と同様の能力があることが指摘されている<sup>14)</sup>から、今回の結合組織の増殖膜を構成している線維芽細胞の一部はこのような周辺細胞や内皮細胞より由来した可能性も否定できない<sup>15)</sup>。

また硝子体内には多数のマクロファージが遊走していた。これらのマクロファージから線維芽細胞様に変化したような所見はみられなかったが、マクロファージは炎症や組織の崩壊に際し集まって、貪食作用を営むだけでなく細胞外へ各種物質の分泌も行っており、例えばコラゲナーゼ、エラスターゼなどの酵素や線維芽細胞増殖因子をも放出して<sup>16)</sup>、硝子体内増殖組織の形成に促進的に働いていることが推察される。

グリア細胞については線維芽細胞に類似した形態を示すこともあるが、線維芽細胞に変化することは示されていない<sup>14)</sup>。

そのほか一般には増殖性硝子体網膜症について網膜色素上皮の重要性が指摘されており、血漿中の網膜色

素上皮増殖刺激因子(フィブネクチン<sup>17)</sup>、血小板由来因子<sup>18)</sup>)および網膜色素上皮の持つグリア増殖刺激因子が判明している。網膜色素上皮が組織学的にみつからない増殖性硝子体網膜症の症例においても、硝子体から網膜色素上皮増殖刺激因子が検出され、網膜色素上皮の増殖が先に起こっているとされている<sup>19)</sup>。しかし本実験においては網膜色素上皮細胞の関与は少ないと思われた。

## 2. 視神経乳頭周囲の網膜から発生した硝子体内新生血管

動物眼では眼内の血管のうち、網膜血管からの新生血管は実験的に最も発生させにくいものと思われ、犬、猫、猿などの動物眼に増殖性硝子体網膜症を発症させた今までの報告でも硝子体内新生血管が発生していない<sup>20-27)</sup>。本実験では硝子体内増殖組織中に新生血管が発生しており、硝子体新生血管発生モデル動物眼としても有用である。これは剥離して虚血状態にある網膜に血管新生因子が産生され、最も反応しやすい視神経乳頭周囲の線維芽細胞、内皮細胞、周辺細胞が刺激されたため、硝子体内に向かって増殖したものと考えられた。

以上今までの一連の実験研究でみられた眼内組織の硝子体内増殖についての結果をまとめると、硝子体内増殖組織は視神経乳頭部から発生し、網膜表面に沿って増殖していた。先進部は主に線維芽細胞から成っていた。この増殖組織内には新生血管が含まれていた。しかもこのような組織増殖は硝子体の喪失、硝子体出血が多い眼に発生した。そのため臨床的に硝子体新生血管の発生を予防するには、硝子体の傷害や出血を少なくすること、視神経乳頭や網膜血管に連なる後部硝子膜を存在させないことが重要であると示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました教室主任宇山昌延教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Clarkson JG, Green WR, Massof D: A histopathologic review of 168 cases of preretinal membrane. *Am J Ophthalmol* 84: 1-17, 1977.
- 2) Hiscott PS, Grierson I, Hitchins CA, et al: Epiretinal membranes in vitro. *Trans Ophthalm Soc UK* 103: 89-102, 1983.
- 3) Sugita G, Tano Y, Machelmer R, et al: Intravitreal autotransplantation of fibroblasts. *Am J Ophthalmol* 89: 121-130, 1980.
- 4) Radtke ND, Tano Y, Chandler D, et al: Simulation of massive periretinal proliferation

- by autotransplantation of retinal pigment epithelial cells in rabbits. *Am J Ophthalmol* 91: 76—87, 1981.
- 5) **Fastenberg DM, Diddie KR, Sorgente NS, et al**: A comparison of different celler inocula in an experimental model of massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 93: 559—564, 1982.
  - 6) **Thresher RJ, Ehrenberg M, Machemer R**: Gas-mediated vitreous compression: An experimental alternative to mechanized vitrectomy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 221: 192—198, 1984.
  - 7) **Chandler DB, Rozakis G, Juan E, et al**: The effect of triamcinolone acetonide on a refined experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 99: 686—690, 1985.
  - 8) **Cleary PE, Ryan SJ**: Method of production and natural history of experimental posterior penetrating eye injury in the rhesus monkey. *Am J Ophthalmol* 88: 212—220, 1979.
  - 9) **Topping TM, Abrams GW, Machemer R**: Experimental double-perforating injury of the posterior segment in rabbits eyes—The natural history of intraocular proliferation. *Arch Ophthalmol* 97: 735—742, 1979.
  - 10) **Constable IJ**: Pathology of vitreous membranes and the effect of haemorrhage and new vessels on the vitreous. *Trans Ophthal Soc UK* 95: 382—386, 1975.
  - 11) 佐野貴之, 岡田寿夫, 米田宗道, 他: 眼内における各眼組織の増殖能についての実験的研究—2. 実験的網膜剝離に生じた視神経乳頭部の増殖組織. *眼紀* 36: 1957—1964, 1985.
  - 12) 佐野貴之, 岡田寿夫, 米田宗道, 他: 眼内における各眼組織の増殖能についての実験的研究. *眼紀* 35: 1161—1165, 1984.
  - 13) **Li W, Shen S, et al**: Increased solubility of newly synthesized collagen in retinal capillary pericyte culture by nonenzymatic glycosylation. *Ophthalmic Res* 16: 315—321, 1984.
  - 14) **Kampic A, Kenyon KR, Michels RG, et al**: Epiretinal and vitreous membrane—comparative study of 56 cases. *Arch Ophthalmol* 99: 1445—1454, 1981.
  - 15) **Archer DB, Gardinar TA**: Electron microscopic features of experimental choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 91: 433—457, 1981.
  - 16) 梶井欽一朗: 結合組織. 金原出版, 35, 1984.
  - 17) **Compochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM**: Serum contain chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 102: 1830—1833, 1984.
  - 18) **Compochiaro PA, Glaser BM**: Platelet-derived growth factor is chemotactic for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 103: 576—579, 1985.
  - 19) **Compochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM, et al**: Vitreous aspirates from patients with proliferative vitreoretinopathy stimulate retinal pigment epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol* 103: 1403—1405, 1985.
  - 20) **Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, et al**: The onset of pigment epithelial proliferation after retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 10—16, 1981.
  - 21) **Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, et al**: Retinal detachment in the cat; the pigment epithelial—photoreceptor interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 906—926, 1983.
  - 22) **Blair NP, Dodge JT, Schmidt GM**: Rhegmatogenous retinal detachment in labrador retrievers. II. Proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 103: 848—854, 1985.
  - 23) **Laqua H, Machemer R**: Clinical-pathological correlation in massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 80: 913—929, 1973.
  - 24) **Laqua H, Machemer R**: Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 82: 602—618, 1975.
  - 25) **Machemer R, Laqua H**: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 82: 1—23, 1975.
  - 26) **Van Horn DL, Aaberg TM, Machemer R, et al**: Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 84: 383—393, 1975.
  - 27) **Machemer R, Buettner H**: Experimental retinal detachment in the owl monkey. IV. Radioautographic study of protein metabolism. *Am J Ophthalmol* 73: 377—389, 1972.