

蛍光造影による網膜色素上皮細胞の観察

飯田 知弘, 米谷 新, 余 楊桂, 沼賀 哲郎, 林 直樹, 阿部 友厚, 高橋 直人

群馬大学医学部眼科学教室

要 約

蛍光眼底造影法を用いて、有色家兎眼の網膜色素上皮細胞を生体で観察した。有色家兎31羽62眼に蛍光造影を行い、そのネガフィルムをプリントおよび光学顕微鏡で拡大観察し、その観察結果を、走査型電子顕微鏡および蛍光組織標本による網膜色素上皮細胞の所見と比較、検討した。58眼の蛍光写真で、中央に低蛍光をもつ、ほぼ六角形の蛍光像が観察できた。これは髄翼より3乳頭径以上離れた部位で明瞭で、眼底周辺部では後極部に比し大型であった。また、この蛍光像は蛍光色素静注後、脈絡膜相から見られたが、静注後5～15分の造影後期で観察がいっそう容易であった。以上の所見は、走査電顕および蛍光組織標本で観察した網膜色素上皮細胞の形態と配列に一致していた。しかし、白色家兎2羽4眼の蛍光造影では有色家兎で見られたような六角形の蛍光像は観察できず、これは網膜色素上皮細胞内の色素の差異によるものと考えられた。(日眼会誌 95: 421-427, 1991)

キーワード：網膜色素上皮細胞, 蛍光眼底造影法, 有色家兎, 蛍光組織標本

Morphology of Live Retinal Pigment Epithelial Cells

Tomohiro Iida, Shin Yoneya, Youkei Yo, Tetsuro Numaga,
Naoki Hayashi, Tomoatsu Abe and Naoto Takahashi

Department of Ophthalmology, Gunma University School of Medicine

Abstract

We attempted to observe, by means of fluorescein angiography, the retinal pigment epithelial cells in pigmented rabbits. Fluorescein angiography was performed in 31 pigmented rabbits, after intravenous injection of 14mg/kg fluorescein sodium. The angiograms were evaluated as prints and as negative film under a light microscope. Animals were sacrificed and submitted to studies by scanning electron microscopy and fluorescein light microscopy. On fluorescein angiograms, we observed mosaic pattern which consisted of numerous polygonal spots overlying choroidal vasculature. Each polygonal spot showed central hypofluorescent area surrounded by hyperfluorescent rim. They were seen in all the eyes except 4 lightly pigmented eyes. They seemed to correspond, in size, to each retinal pigment epithelial cell. This pattern appeared from the early choroidal phase on, to become more distinct 5 to 15 minutes after dye injection. A hexagonal pattern was regularly seen away from the medullary rays by 3 or more disc diameters. The pattern became larger in the periphery than in the posterior pole. These angiographic findings closely matched those of retinal pigment epithelial cells as seen by scanning electron microscopy and fluorescein light microscopy in sizes and shapes. The findings indicate that it is possible to identify retinal pigment epithelial cells in pigmented rabbits by conventional fluorescein angiography. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 421-427, 1991)

Key words: Retinal pigment epithelial cell, Fluorescein angiography, Pigmented rabbit, Fluorescein microscopy

別刷請求先：371 前橋市昭和町3-39-15 群馬大学医学部眼科学教室 飯田 知弘

(平成元年12月18日受付, 平成2年10月12日改訂受理)

Reprint requests to: Tomohiro Iida, M.D. Department of Ophthalmology, Gunma University School of Medicine.

3-39-15 Showa-machi, Maebashi 371, Japan

(Received December 18, 1989 and accepted in revised form October 12, 1990)

I 緒 言

蛍光眼底造影法は眼科臨床において安全かつ有用な検査法であり、主に網膜および脈絡膜疾患の検索に用いられている。蛍光眼底造影上、網膜色素上皮は重要な役割を果たしており、その色素の多寡は背景蛍光像に影響を与えている一方、脈絡毛細血管より漏出した蛍光色素は網膜色素上皮の柵機能 (outer blood-retinal barrier) により遮断される。この破綻は種々の疾患で蛍光漏出として捕らえることができ、さらに硝子体蛍光測定法により定量的に検索することが可能である。

一方、網膜色素上皮では生理的な加齢変化として細胞の多形性 pleomorphism^{1)~3)}があり、これは老人性黄斑変性症などと関係する所見として注目されている⁴⁾。このような subclinical なレベルでの網膜色素上皮細胞の形態学的変化を、臨床的に検索する手段は現在のところ皆無とあってよく、これを可能にすることは、眼科临床上、多大な有用性があると考えられる。

蛍光眼底造影法では、その解像力は網膜の毛細血管レベルでの検索が可能であるが、このようなレベルで背景蛍光を観察することに関しては十分な注意が払われていなかった。われわれは、臨床的に網膜色素上皮を形態学的に検索することを究極の目的として、まず、網膜血管のない家兎眼を用い、詳細な蛍光眼底造影を行った。その結果、網膜色素上皮細胞を *in vivo* で観察できる可能性を示唆する所見が得られたので報告する。

II 実験方法

実験動物として正常有色家兎31羽62眼、白色家兎2羽4眼を用い、蛍光眼底造影を行った。

全例実験前に、tropicamide+phenylephrine (Mydrin P[®])で散瞳し、pentobarbital Na(Nembutal[®]) 25mg/kgを投与して麻酔した。

耳静脈よりフルオレセインナトリウム14mg/kgを静注し、蛍光眼底カメラ(キャノン CF-60U および CF-60Z)で網膜色素上皮のレベルに焦点を合せ、静注直後から30分まで、経時的に観察と撮影を行った。撮影フィルムには Kodak Tri-X を用い、2倍の増感現象をしたネガフィルムを光学顕微鏡(オリンパス Vanox AH-2)を用いて20倍と40倍で拡大観察し、さらにそのネガフィルムをキャビネサイズから全紙大のプリンの拡大して検討した。

組織学的検索として走査型電子顕微鏡と蛍光顕微鏡による観察を行った。走査型顕微鏡標本作成の目的で、有色家兎2羽4眼の眼球を摘出した。摘出眼球は、Trumpの固定液(4%formalinと1%glutaraldehydeの混合液)にて固定後、赤道部で半割した。さらに1cm角の組織片に細切し、その組織片より感覚上皮を除去して網膜色素上皮を露出した。これをエタノール系列で脱水した後、臨界点乾燥の上、白金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡(日立 S-800)で網膜色素上皮を硝子体側から観察した。

蛍光組織標本は Grayson, Laties らの方法⁵⁾⁶⁾に従って作成した。これには有色家兎2羽4眼を用い、眼球摘出5分前にフルオレセインナトリウム14mg/kgを耳静脈より投与した。眼球摘出後直ちに液体窒素に浸漬したイソペンタンで固定した後、真空凍結乾燥機(FTS[®] Systems. TIS-U-DRY)で7日間乾燥後、真空下でパラフィン包埋を行った。組織切片は網膜面に対して垂直および平行に近く斜めに作成し、キシレンで封入し、透過型蛍光顕微鏡(オリンパス Vanox AH-2)で観察した^{5)~10)}。

III 結 果

1. 蛍光眼底造影所見

有色家兎62眼中58眼で網膜色素上皮のレベルに良好な焦点の得られている蛍光写真を撮影することができた。キャビネサイズのプリントでは、焦点の合っている20%から70%の範囲で点状の低蛍光像がびまん性に見られた(図 1a, 2a)。この点状の低蛍光像の部位をさらに拡大率の大きいプリントと光学顕微鏡により検討すると、中央の低蛍光部は明るい蛍光でふちどりされ、ほぼ六角形の網目状の蛍光像としてすまなく配列していた(図 1b)。また、中央に低蛍光部を持たない、同程度の大きさの蛍光染として観察されるものも散在していた(図 1b 矢印)。以上の所見は、髄翼から3乳頭径以上離れ、脈絡膜血管が縦に走行している部位で良く観察でき、眼底周辺部ではことに明瞭であった。これに対し、髄翼に近接した顆粒状の背景蛍光を示す部位で同様な所見が観察できたのは62眼中4眼のみであった。また、62眼中、六角形の蛍光像が観察できなかった4眼は、色素の乏しい眼底であった。

この六角形の蛍光像の大きさは均一ではなく、眼底の部位により差があり、眼底周辺部では、髄翼に近い眼底後極部に比べ大型の蛍光像を呈した(図 2b, c)。同一の眼底部位でも、蛍光像の大きさにはバラツキが

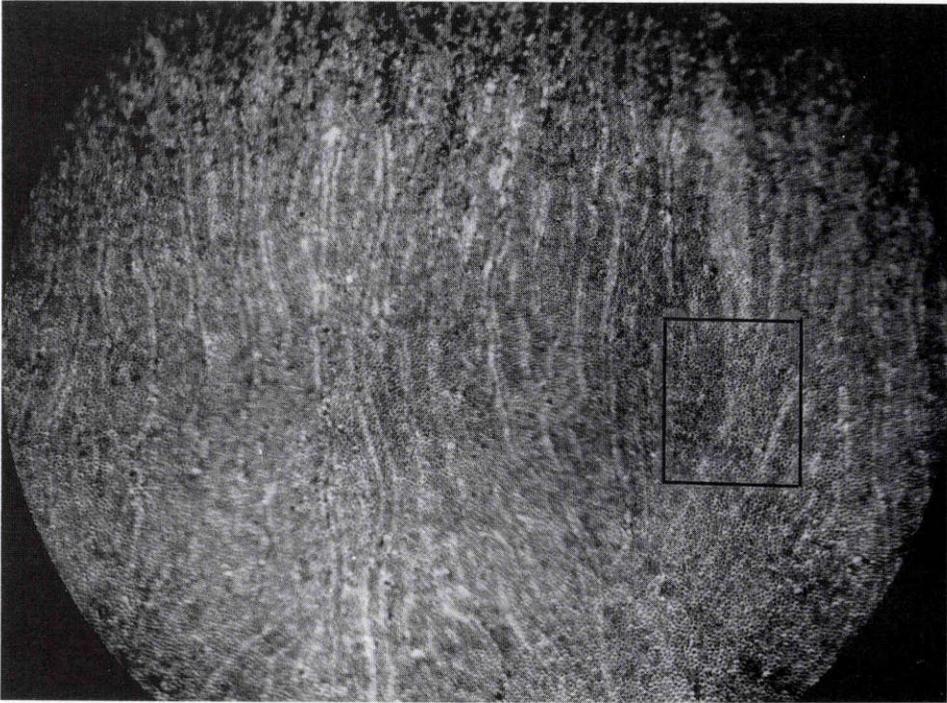


図 1a 有色家兎蛍光造影写真, 蛍光色素静注後14分. 乳頭, 髄翼より下方の眼底所見. 点状の低蛍光像がびまん性に見られる.

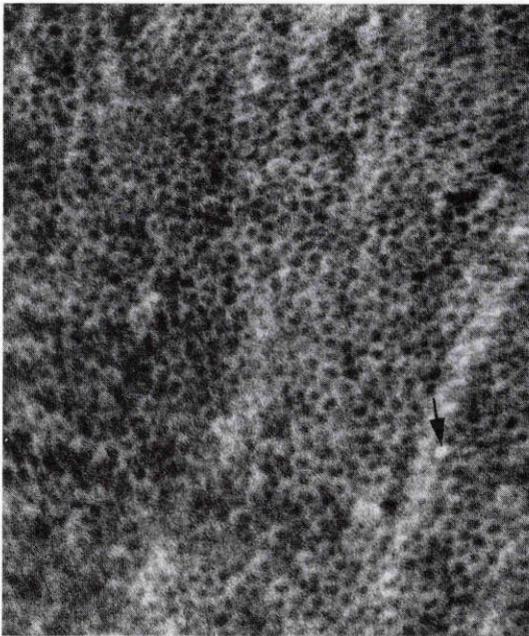


図 1b 図 1a 中の□の拡大, 中央に低蛍光, 周囲に過蛍光を示すほぼ六角形の網目状の蛍光像がすきまなく配列している. また, 中央に低蛍光を持たない蛍光染も存在する (矢印).

あり, 均一ではなかった.

また, この蛍光像は, フルオレセイン静注後初期の脈絡膜造影相から, 遅くは30分後まで見られたが, 特に静注後5~15分の造影後期で観察が容易であった. この蛍光像は造影時間による変化は見られず, 全経過を通して, 中央に低蛍光部を持つ六角形の蛍光像として観察された.

一方, 白色家兎を用いた蛍光眼底造影では, 4眼全例で, 有色家兎で観察されたような点状の低蛍光像は見られず, 拡大像でも六角形の蛍光像を観察, 確認することはできなかった (図3).

2. 組織学的所見

走査型電子顕微鏡による網膜色素上皮の硝子体側からの観察では, 網膜色素上皮細胞は五角形から七角形をなし, 互いに接して配列していた (図4a, b). その細胞表面は微絨毛に覆われ, 視細胞外節の残渣も見られた. 個々の網膜色素上皮細胞の大きさには大小不同があり, その径の平均値は, 眼底後極部で $22\mu\text{m}$, 周辺部では $27\mu\text{m}$ であり, 全体として, 周辺部の網膜色素上皮細胞は後極部に比べ大型であった.

網膜面に対して垂直に切片を作成した蛍光組織標本

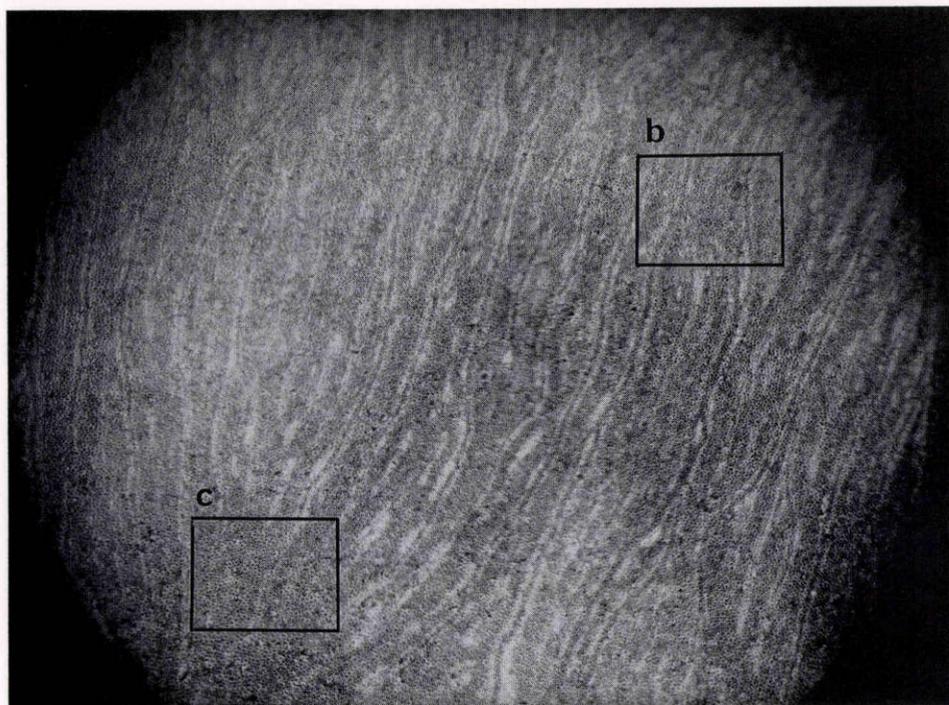


図2a 有色家兎蛍光造影写真. 蛍光色素静注後7分. 乳頭, 髄翼より下方の眼底所見. 点状の低蛍光像が広範囲にある.

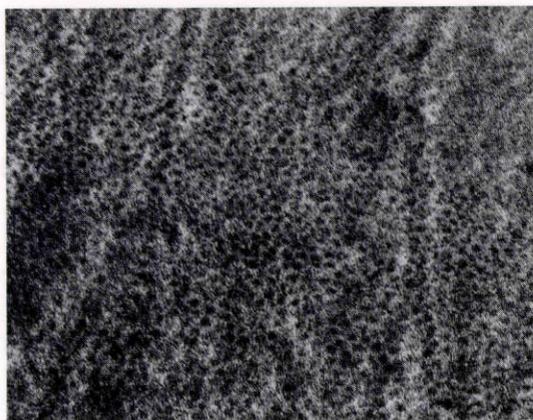


図2b 図2a中の□bの拡大(髄翼に近い眼底後極部). 髄翼に近い眼底後極部では, 小型の六角形の蛍光像が観察される.

の蛍光顕微鏡による観察では, 蛍光色素は脈絡膜には見られるが, 網膜色素上皮, 感覚網膜には認められなかった. これに対し, 網膜面に対して平行に近く斜めに切片を作成した蛍光組織標本では, 脈絡膜の蛍光と無蛍光の感覚上皮の間に, 蛍光により境界される六角

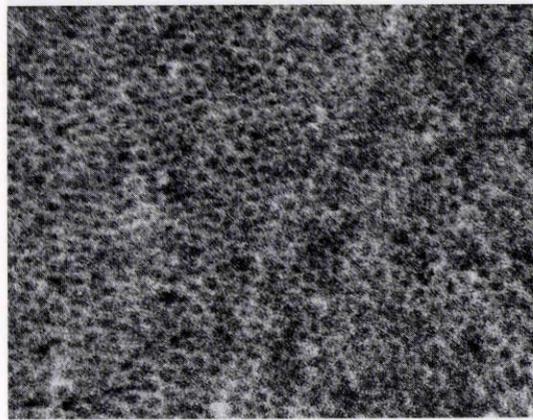


図2c 図2a中の□cの拡大(眼底周辺部). 眼底周辺部では後極部(図2b)に比べ大型の蛍光像である.

形の形状が明瞭な網膜色素上皮細胞が2~3列に配列している所見が観察された(図5). この径はマイクロメーターによる計測でおよそ20 μ mであった. また, 蛍光により取囲まれた細胞の中央は色素のため暗く, 点状の蛍光が散在していた.

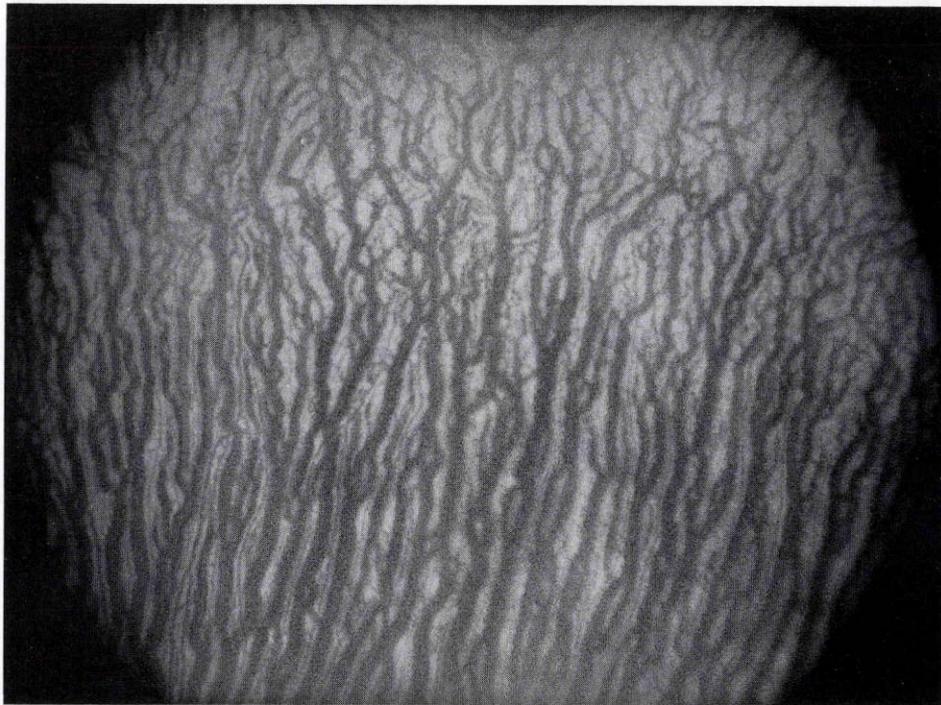


図3 白色家兎蛍光造影写真。蛍光色素静注後2分。有色家兎で観察されたような点状の低蛍光像は見られない。

IV 考 按

今回、家兎の蛍光眼底造影法により六角形の網目状の蛍光像を観察した。この網目状の蛍光像はネガフィルムを光学顕微鏡で拡大し、はじめてその存在が明らかとなり、拡大プリント写真によって観察、検討された。この六角形の網目状の蛍光像は部位によりその大きさが異なり、周辺部ではその径は大きく、また髄翼近くでは小さいことが特徴であった。蛍光眼底造影上、フィルムひとこまの中でその中央と周辺部では収差があるので、フィルム面上での径の測定は実際的ではない。しかし、背景の脈絡膜血管の血管径との比較によりこの六角形の蛍光像の径を推測することは可能である。Princeの家兎眼の解剖についてのモノグラフ¹¹⁾によれば脈絡膜血管の径は50~75 μm であり、蛍光写真で1本の脈絡膜血管の中には2~3個の六角形の蛍光像が存在していることより、六角形の蛍光像の径はほぼ20~30 μm であると推測される。一方Tsoら¹²⁾の比較解剖による網膜色素上皮の詳細な検索によれば、家兎の網膜色素上皮細胞の大きさの平均は、後極部では22 μm であるとしている。我々の行った蛍光組織の

検索でも、個々の網膜色素上皮細胞の径はマイクロメーターによる計測でおよそ20 μm であった。また、人眼については網膜色素上皮細胞の部位による形状の変化^{12)~14)}は知られているが、家兎についての報告はほとんどなく、改めて、家兎眼についても我々が走査型電子顕微鏡を用いて検索した。その結果、髄翼近くの、いわゆる後極部では、網膜色素上皮細胞は5~7の多角形であり、その径の平均値は22 μm であった。また周辺部では、網膜色素上皮細胞は後極部のそれと同様5~7の多角形であったが、その径は27 μm で、後極部のそれよりも大きいことが確認された。組織標本作成の過程で組織収縮を生じるため、検索結果にバラツキを生じるので正確な数値での比較は出来ないが、しかし、以上の結果より、我々が蛍光眼底造影で捕らえた六角形の蛍光像は、網膜色素上皮そのものを観察している可能性が高いものと結論される。

蛍光眼底造影法がNovotnyら¹⁵⁾により眼科臨床に導入されて以来、網膜色素上皮細胞を個々に観察したとの報告はない。しかし、本法は網膜血管を毛細血管のレベルで観察することが可能であり、精度的には、網膜色素上皮を個々の細胞レベルで観察することは、

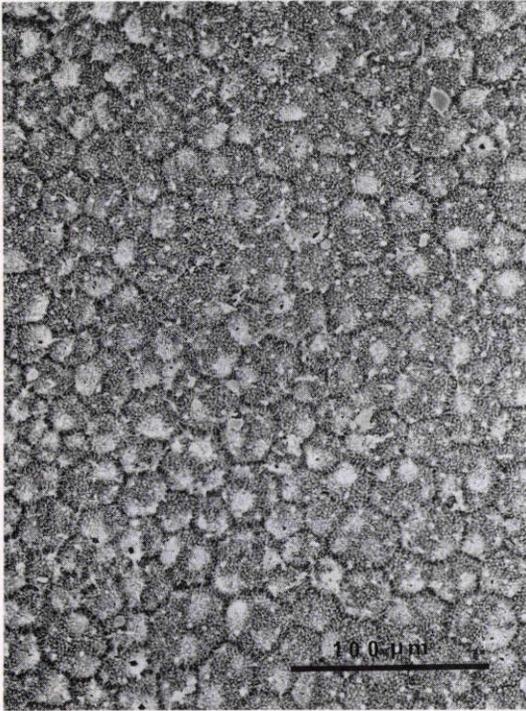


図 4a 眼底後極部の走査電顕像, 五角形から七角形の網膜色素上皮細胞が配列している. 個々の細胞の大きさには大小不同がある(オリジナルネガサイズ, ×300)

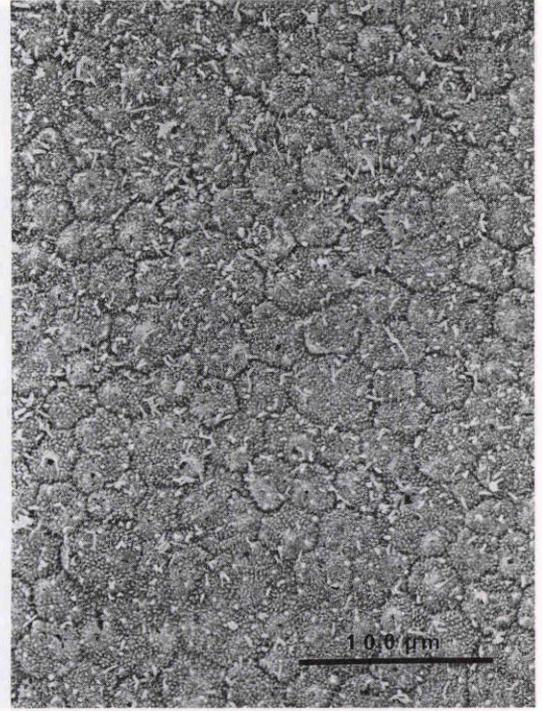


図 4b 眼底周辺部の走査電顕像, 網膜色素上皮細胞の大きさには大小不同があるが, 図 4a に比べ大型である(オリジナルネガサイズ, ×300)



図 5 蛍光組織標本, 網膜面に対し斜めの切片. 脈絡膜の蛍光と無蛍光の感覚上皮の間に, 2列の網膜色素上皮細胞がある.
RPE: 網膜色素上皮, C: 脈絡膜. (オリジナルネガサイズ, ×100)

その条件が整えば十分可能な検査法であるといえる。有色家兎眼の網膜色素上皮細胞は、人眼のそれに比べ薄く、また中央部がドーム状に厚く、メラニン色素が中央に多く配列しているという特異な形状を持ち、このことが本実験結果に大きく影響していると推測される。そして、メラニン色素を持たない白色家兎で蛍光眼底造影を行った結果では、多角形の網目状の蛍光像は観察されておらず、さらに、有色家兎62眼中、網膜色素上皮細胞の観察ができなかった4眼は、すべて色素に乏しい眼底であった。以上の事実より、脈絡膜からの蛍光を、網膜色素上皮細胞中のメラニン色素がblockする結果低蛍光となり、また色素の少ない部位では蛍光がblockされずに観察されるため、六角形の蛍光像として捕えられるものと推測される。また、蛍光組織標本の検索結果では、色素上皮細胞間に蛍光色素が入り込んでいるという所見はなく、本観察結果へのメラニン色素の関与を支持するものである。一方、低蛍光を持たない蛍光染として観察された細胞も存在していたが、これについては、メラニン色素の含有量が少ないか、あるいはoil dropletを持った網膜色素上皮細胞の可能性を考えている。

以上のように、本実験結果は家兎の網膜色素上皮の解剖学的な特徴に大きく関与しているものであり、厚くて、メラニン色素が多く、その配列が均一な網膜色素上皮を持つ人眼で同様の結果を得ることが難しいことは、蛍光眼底造影法が導入されて以来の歴史が物語っている。しかし、本実験結果は、一方で、蛍光眼底造影法の精度の高いことを改めて証明しているものであり、適切な方法をとれば、臨床的にも網膜色素上皮を個々の細胞レベルで観察出来得る事を示唆しているものと考えられる。

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導、ご校閲を賜りました教室主任清水弘一教授に深謝致します。尚、本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会で報告した。

文 献

- 1) **Friedman E, Tso MOM**: The retinal pigment epithelium. II. Histologic changes associated with age. *Arch Ophthalmol* 79: 315—320, 1968.
- 2) **Mishima H, Hasebe H, Kondo K**: Age changes in the fine structure of the human retinal pigment epithelium. *Jpn J Ophthalmol* 22: 476—485, 1978.
- 3) **Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S**: Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 195—200, 1984.
- 4) **Kornzweig AL**: Aging of the retinal pigment epithelium, In: Zinn KM, Marmor MF: *The Retinal Pigment Epithelium*, Cambridge, Harvard University Press, 478—495, 1979.
- 5) **Grayson MC, Laties AM**: Ocular localization of sodium fluorescein. *Arch Ophthalmol* 85: 600—609, 1971.
- 6) **Grayson MC, Tsukahara S, Laties AM**: Tissue localization in rabbit and monkey eye of intravenously-administered fluorescein, In: Shimizu K: *Fluorescein Angiography*, Tokyo, Igaku Shoin, 235—246, 1974.
- 7) **大田 実, 塚原 勇**: 蛍光眼底撮影に関する基礎的研究 I. *日眼会誌* 75: 1856—1862, 1971.
- 8) **Tsukahara I, Ota M**: Angiographic-histologic study on the localization of sodium fluorescein in the fundus, In: Shimizu K: *Fluorescein Angiography*, Tokyo, Igaku-Shoin, 230—234, 1974.
- 9) **水野勝義**: 蛍光造影法の組織化学的研究. (2) フルオレスセイン組織化学より見た網膜の透過性. *眼紀* 23: 372—378, 1972.
- 10) **Mizuno K, Sasaki K, Ohtsuki K**: Histochemical identification of fluorescein in ocular tissue, In: Shimizu K: *Fluorescein Angiography*, Tokyo, Igaku-Shoin, 221—225, 1974.
- 11) **Prince JH, Eglitis I**: The uvea, In: Prince JH: *The Rabbit in Eye Research*, Springfield, Charles C Thomas, 140—146, 1964.
- 12) **Tso MOM, Friedman E**: The retinal pigment epithelium. I. Comparative histology. *Arch Ophthalmol* 78: 641—649, 1967.
- 13) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE**: The retina, In: Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: *Histology of the Human Eye*, Philadelphia, WB Saunders, 393—522, 1971.
- 14) **Zinn KM, Benjamin-Henkind JV**: Anatomy of the human retinal pigment epithelium, In: Zinn KM, Marmor MF: *The Retinal Pigment Epithelium*, Cambridge, Harvard University Press, 3—31, 1979.
- 15) **Novotny HR, Alvis DL**: A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* 24: 82—86, 1961.