

実験的オルニチン網膜症

第2報 注入長期の変化

竹内 正光, 板垣 隆, 大熊 紘, 高橋 寛二, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

微量のオルニチンをサル眼の硝子体内に注入し、その後の網脈絡膜の組織学的変化について検討した。前報において、注入早期には網膜色素上皮が選択的に障害され、1週後には赤道部を中心として網膜色素上皮は融解壊死に陥り、崩壊することを報告した。本報では、その長期後の網脈絡膜の変化を観察した。カニクイサルに、*l*-ornithine hydrochloride の0.5 M 溶液(浸透圧1,025 mOsm) 30 μ l を、硝子体中央に注入した。1年後、眼底には赤道部に、境界明瞭な網脈絡膜萎縮がみられた。この部位は、オルニチン注入1週後に網膜色素上皮が強く障害された部位に一致していた。組織学的には、視細胞、網膜色素上皮、脈絡膜毛細血管板が消失し、網膜内層は、増殖したミューラー線維を介してブルッフ膜と直接接していた。一方、後極部網膜は、ほぼ正常構造を保っていた。オルニチンにより網膜色素上皮が障害されて壊死に陥って消失すると、長期後にはその部位の視細胞、脈絡膜毛細血管板に萎縮消失が起こることを示した。(日眼会誌 96:161-168, 1992)

キーワード: オルニチン, 網膜色素上皮, 網脈絡膜萎縮, 硝子体注入, 脳回転状網脈絡膜萎縮症

Retinal Degeneration after Intravitreal Injection of Ornithine

2. Late Change after Administration

Masamitsu Takeuchi, Takashi Itagaki, Hiroshi Okuma,

Kanji Takahashi and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

The influence of intravitreal injection of a small amount of *l*-ornithine hydrochloride in monkey eyes has been investigated morphologically. In a previous paper, the author demonstrated that acute selective damage was caused in the retinal pigment epithelium (RPE) by ornithine. This paper will demonstrate retinal degeneration at the late stage by intravitreal injection of ornithine. At one year after administration, sharply demarcated chorioretinal atrophy was seen ophthalmoscopically from the equator to the peripheral retina. These areas corresponded to those where RPE became necrosis at early stage following administration of ornithine. Histopathologically, the photoreceptor cells, RPE, and choriocapillaris disappeared completely in these areas, and the inner retina was directly contact with the Bruch membrane with the proliferating Müller fibers. On the other hand at the posterior pole, the photoreceptor cells, RPE, and the choriocapillaris maintained intact. This study demonstrated that necrosis of RPE by intravitreal injection of ornithine leads to complete loss of the visul cells and choriocapillaris, at the late stage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 161-168, 1992)

Key words: Ornithine, Retinal pigment epithelium (RPE), Chorioretinal atrophy, Intravitreal injection, Gyrate atrophy of the choroid and retina

別刷請求先: 〒570 守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 竹内 正光

(平成2年8月31日受付, 平成3年7月9日改訂受理)

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

(Received August 31, 1990 and accepted in revised form July 9, 1991)

I 緒 言

網膜変性症の多くは原因不明で、発病の原発部位は、視細胞、網膜色素上皮、或いは脈絡膜毛細血管板と推測されているが、明確ではない。例えば、網膜色素変性症では原発性病変は視細胞と考えられ¹⁾、また脳回転状脈絡網膜萎縮症では、網膜色素上皮の障害が原発と考えられている²⁾。コロイデミアや脳回転状脈絡膜萎縮症では、眼球の病理組織検索により、網膜外層の消失と共に脈絡膜毛細血管板の萎縮消失をみる事が注目されている³⁾⁴⁾。それゆえこれらの疾患では、その原発部位は脈絡膜血管であろうとする考えがある。Henkindら⁵⁾⁷⁾は、ヨード酸ソーダをウサギに全身投与し、網膜色素上皮の障害に続発して、脈絡膜毛細血管が萎縮消失することを報告し、網膜色素上皮-脈絡膜毛細血管間に密接な関係が存在すると述べている。我々は微量のオルニチンを硝子体内に注入すると網膜色素上皮を選択的に障害し、色素上皮の壊死消失から網脈絡膜萎縮が発生することをすでに報告した⁸⁾。

我々は前報⁹⁾において、微量のオルニチンをサルの硝子体内に注入すると、網膜色素上皮が選択的に障害されて強く変性し、1週間後には赤道部を中心として網膜色素上皮は融解壊死して脱落することを報告した。今回は前報の実験のさらに1年後を観察し、これらの病変部の検眼鏡および蛍光眼底造影法による臨床所見と、光顕、電顕による病理組織学的所見とを対比した。その長期後の網膜脈絡膜の変化を観察すると、色素上皮細胞が消失した部位では視細胞および脈絡膜毛細血管板も消失する興味ある知見を得たので報告する。

II 実験方法

実験動物には、体重1.6~2.0 kgのカニクイサル2頭4眼を用いた。塩酸ケタミン(Ketalar®)50 mg/kgの筋注による全身麻酔を行い、0.5 Mの *l*-ornithine hydrochloride (SIGMA St. Louis USA) の生理的食塩水溶解液(1M-NaOHを用いてpH 7.2に調整した。浸透圧は1,025 mOsm:以下オルニチンと略す)を0.03 ml、毛様体扁平部より、ハミルトンマイクロシリンジと27 G注射針を用いて、硝子体中央部にゆっくりと注入した。

オルニチンの硝子体内注入後1年経過した網脈絡膜を、同様の全身麻酔下で眼底検査、蛍光眼底造影にて

観察を行った後、眼球を摘出し、4眼の網脈絡膜を通常の方法にて光顕・電顕にて観察した。

III 結 果

病理組織学的に4眼を検査したが、臨床的にまた組織学的にはほぼ同様の所見であった。

1. 臨床所見

1) 検眼鏡所見: 視神経や網膜血管には異常をみなかった。網膜は後極部には異常をみなかった。赤道部から周辺の網膜には全周に境界鮮明な網脈絡膜萎縮がみられ、この部位では脈絡膜の中大血管が透見された。その中間部は全周に顆粒状の色素沈着をしめした(図1)。

2) 蛍光眼底造影: 視神経や網膜血管には異常をみなかった。後極部には異常をみなかった。中間部は色素沈着部位に一致して低蛍光を示し、window defectによる顆粒状の過蛍光の部位も無数に散在した。赤道部は境界鮮明な網脈絡膜萎縮となり、脈絡膜毛細血管由来の均質な背景蛍光は見られないで暗く、その中に脈絡膜の中・大血管が造影された。網脈絡膜萎縮の境界では網膜下へ軽い蛍光漏出がみられた(図2)。

このように臨床的に眼底は、後極部、中間部、赤道・周辺部の3部位は異なった所見を示した。

2. 組織学的所見

1) 後極部

後極部の感覚網膜には光顕では異常はみられなかった。網膜色素上皮の大きさや形は殆ど正常とかわらなかったが、胞体内のメラニン色素の含量には、細胞により多いものと少ないものがあった。脈絡膜には異常をみなかった(図3)。

電顕でみると、視細胞外節の配列には軽い乱れがあり、網膜色素上皮の胞体はやや扁平で、微絨毛は軽度短縮し、基底膜陥入はやや不正になっていた。ミトコンドリアは一部に膨化がみられたが、殆どは正常であった。ファゴソームもやや増加していた。滑面小胞体、粗面小胞体、結合装置には異常をみなかった。視細胞、ブルッフ膜、脈絡膜毛細血管板には異常をみなかった(図4)。

2) 中間部

中間部で眼底に顆粒状の色素沈着がみられた部位では、感覚網膜は視細胞内節、外節を含めて異常をみなかった。網膜色素上皮の大きさや形はほぼ正常であったが、胞体内に多数のメラニン顆粒を含んだもの、通常量のメラニン色素を含んだものと、紡錘形の色素顆

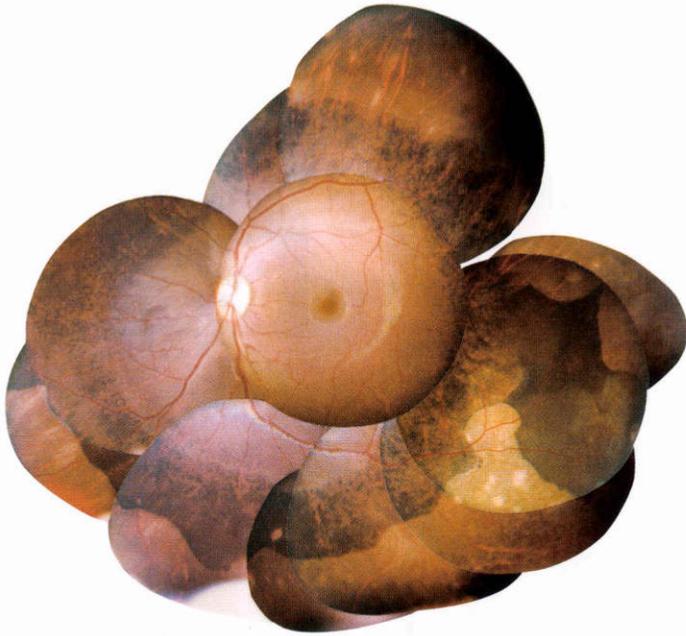


図1 オルニチン注入1年後の眼底写真。
後極部網膜にほとんど異常はみられないが、中間部に顆粒状の色素沈着がみられ、赤道部より周辺の網膜に境界鮮明な網脈絡膜萎縮がみられる。

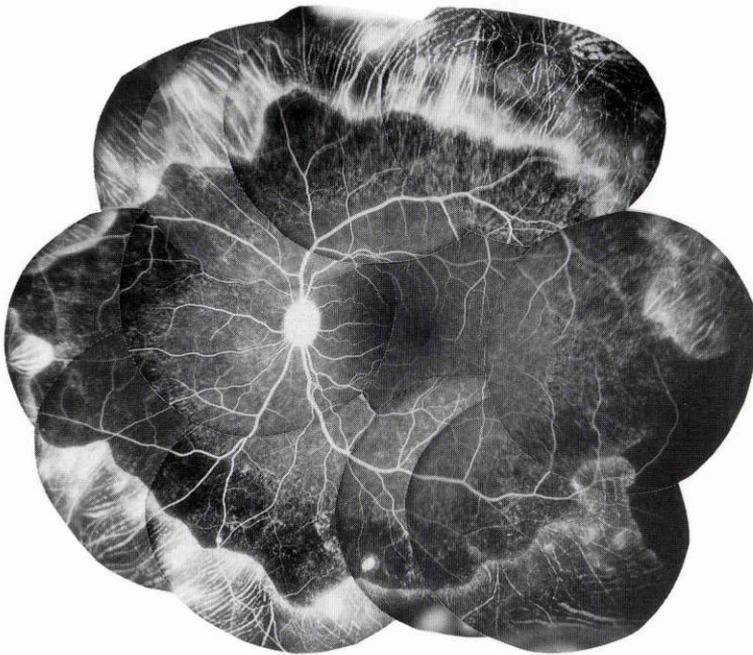


図2 オルニチン注入1年後の蛍光眼底造影写真。
赤道部から周辺の網脈絡膜萎縮では、脈絡膜の中・大血管が造影される。中間部は window defect による顆粒状の過蛍光と低蛍光がみられる。後極部に異常はみられない。

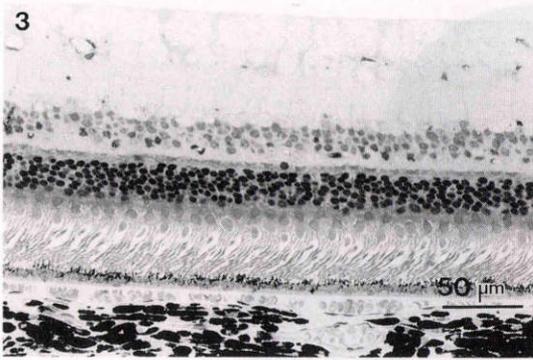


図3 オルニチン注入1年後の組織所見，後極部。感覚網膜に異常はみられない。網膜色素上皮細胞の胞体内の色素顆粒の量が細胞により差がみられる(×200)。

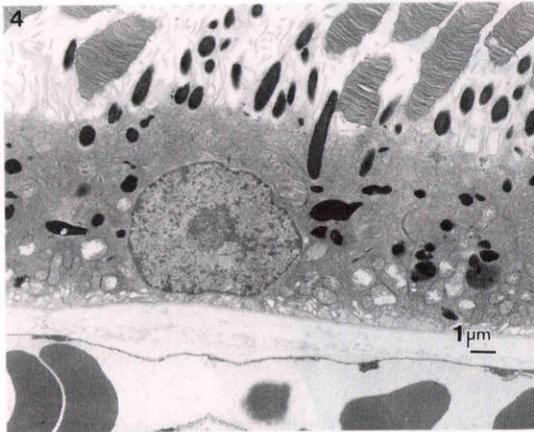


図4 後極部の電顕所見。

網膜色素上皮は扁平であるが、その他に異常はみられない。ブルッフ膜や脈絡膜毛細血管板に異常はみられない(×3000)。

粒は殆どみられないで、類円形の色素顆粒がごく少数みられたものなど、メラニン色素顆粒の量に様々な程度がみられた。脈絡膜には異常を見なかった(図5)。

電顕でみると、多数のメラニン顆粒やファゴソームを胞体内全域に含んだ網膜色素上皮(図6)や、紡錘形のメラニン顆粒は見られず、少量の類円形の色素顆粒がみられるのみの網膜色素上皮細胞(図7)とが見られたが、いずれも他の細胞内小器官には異常をみなかった。

3) 赤道部

赤道部の網脈絡膜萎縮巣の部位では、網膜色素上皮は完全に消失し、視細胞は完全に消失して網膜内層は

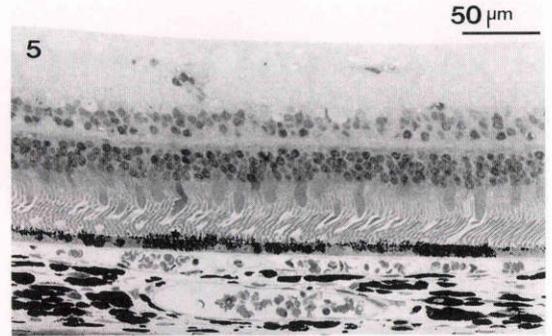


図5 中間部。

網膜色素上皮細胞はほぼ正常の形を示すが、胞体内の色素顆粒は、細胞による差が大きい。頂部にメラニン色素顆粒が存在するほぼ正常な細胞や、胞体内が色素顆粒で充満している細胞、円形の小型の色素顆粒がごく僅かにみられる細胞がある。視細胞、網膜内層、脈絡膜毛細血管、脈絡膜に異常はみられない(×200)。

菲薄化し、内顆粒層が直接ブルッフ膜に接していた(図8)。網膜血管には異常をみなかった。脈絡膜毛細血管板は消失し、さらに脈絡膜の中大血管も減少していた。

電顕でみると、視細胞、網膜色素上皮、脈絡膜毛細血管は完全に消失していた。視細胞、網膜色素上皮消失部位は、形態学的特徴の多数のフィラメント、グリコーゲン顆粒、滑面小胞体の存在からミユラー線維と思われるグリア細胞で置換され、この細胞は、脈絡膜毛細血管の消失した脈絡膜にも侵入していた(図9)。

4) 境界部

網脈絡膜萎縮の境界部では、後極側は、網膜色素上皮は扁平で不規則な形となり、含有するメラニン色素は少なく、網膜色素上皮が存在する部位では、視細胞がみられたが、外節は殆どみられず、内節は延長しており、外顆粒層の核は少なくなっていた。網膜色素上皮が残っている部位では、脈絡膜毛細血管がみられた(図10)。境界の周辺側では、網膜色素上皮が消失し、そこでは視細胞も完全に消失して、網膜色素上皮と視細胞の消失部には、グリア細胞がみられた。網膜色素上皮が消失した部には、脈絡膜毛細血管板はみられなかった(図10)。

電顕では、境界部の後極側の網膜色素上皮は扁平で、基底膜陥入及び微絨毛は不良であった。また、胞体内には、類円形の高電子密度の顆粒状物質が少数みられるのみで、紡錘形のメラニン顆粒は全くみられなかった。ブルッフ膜は不規則な厚さとなり、しばしばその

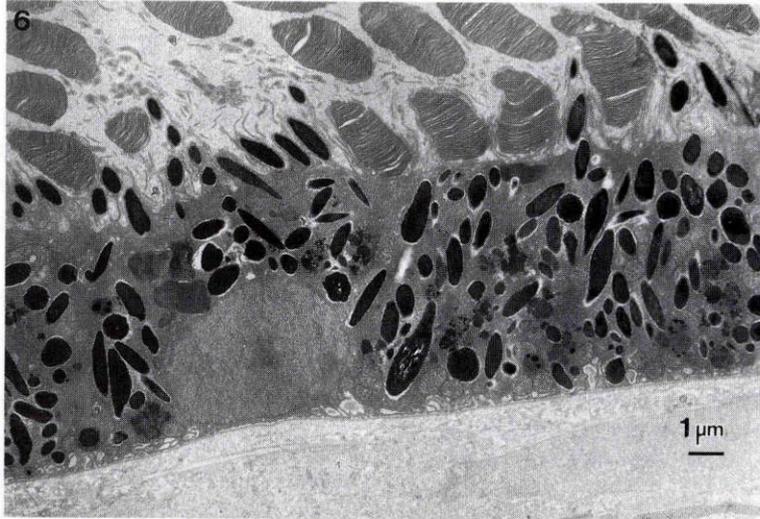


図6 中間部の電顕写真(色素の多い網膜色素上皮).
網膜色素上皮は扁平で, 胞体内いっぱい紡錘型や円形のメラニン顆粒や様々な電子密度のファゴソームを含んでいる. また未分化の外節もみられる(×4500).

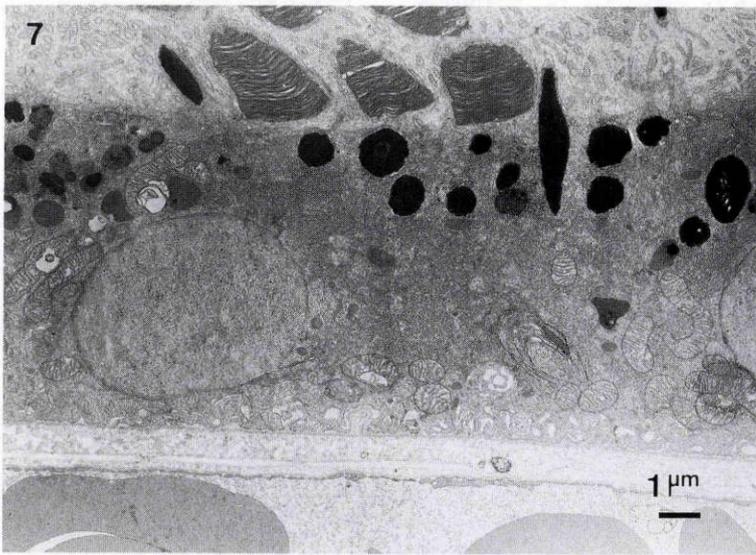


図7 中間部位の電顕写真(色素の少ない網膜色素上皮).
網膜色素上皮は扁平で, 頂部に円形小型のメラニン顆粒とファゴソームが少数みられる(×5500).

中に隣接した網膜色素上皮細胞の基底部の一部がみられた。視細胞外節は部位によって消失した。脈絡膜毛細血管板の管腔は不規則な形をしていたが、内皮細胞はほぼ正常の形態を保っていた(図11)。

境界部の周辺側では、視細胞、網膜色素上皮は消失し、多数のフィラメントとグリコーゲン顆粒と滑面小

胞体の存在からミューラー線維と思われるグリア細胞がみられた。脈絡膜毛細血管は消失し、網膜に近い部位に脈絡膜の中血管がみられた(図12)。

IV 考 按

前報⁹⁾に於いて、微量のオルニチンを硝子体内注入

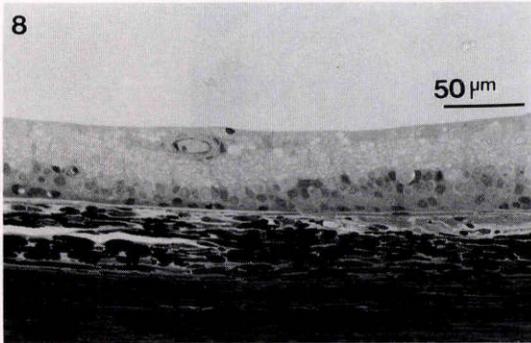


図8 赤道部。

赤道部の脈絡膜網膜萎縮部位では網膜色素上皮、視細胞、脈絡膜毛細血管板は完全に消失し、内顆粒層が直接ブルッフ膜に接している。網膜内層もかなり非薄化している(×200)。

すると、赤道部を中心に網膜色素上皮が強く障害され、注入24時間後には色素上皮の胞体内は、滑面小胞体が崩壊し微細顆粒状となり、二次ライソゾームの増加など、強い障害がみられ、1週間後にはこれらの細胞は壊死に陥って崩壊、脱落する事を報告した。

本報は、このような網膜色素上皮への強い障害が、

長期後にどのようになるか調べた。オルニチン投与1年後には赤道部は、境界鮮明な網脈絡膜萎縮となって、脈絡膜血管が透見された。後極部は正常にみえ、その中間部位の網膜は顆粒状の色素沈着がみられた。

組織学的には、後極部の感覚網膜は正常で、網膜色素上皮のメラニン色素の量に軽度の多寡がみられ、中間部では感覚網膜は正常であったが、網膜色素上皮のメラニン色素の量の多寡が著しく、これが眼底の色素沈着に相当し、蛍光眼底造影による window defect に相当する所見と思われた。中間部は、オルニチンにより壊死した網膜色素上皮が所々生じた結果、生き残ってそれを貪食した細胞は、ファゴソームとなったメラニン色素を大量に含んだ網膜色素上皮となり、色素が非常に乏しい細胞は再生した網膜色素上皮細胞と思われ¹⁰⁾、このようにいろいろのメラニン顆粒を示す網膜色素上皮細胞が混在したと思われた。中間部の網膜のように、細胞の壊死、脱落が一部の細胞に生じたところは、網膜色素上皮は再生修復されて、網脈絡膜萎縮にならなかった。

赤道部では、網脈絡膜萎縮となり、視細胞、網膜色素上皮、脈絡膜毛細血管は消失していた。この部では、オルニチンにより、広範囲の網膜色素上皮が壊死に陥



図9 赤道部の電顕写真。

赤道部では、視細胞、網膜色素上皮、脈絡膜毛細血管は完全に消失し、視細胞、網膜色素上皮消失部位は、形態学的特徴の多数のフィラメント、グリコーゲン顆粒、滑面小胞体の存在からミューラー線維(M)と思われるグリア細胞で置換され、この細胞は、脈絡膜毛細血管の消失した脈絡膜にも侵入している(×5500)。

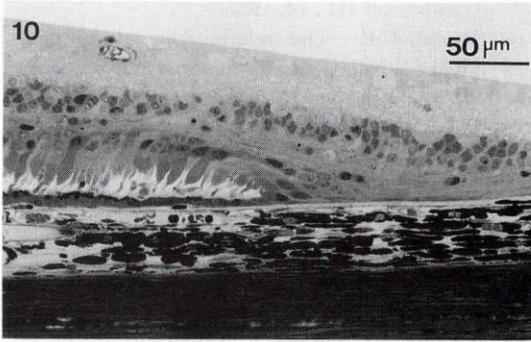


図10 網脈絡膜萎縮の境界。

網脈絡膜萎縮の境界では、写真右半分の網膜色素上皮が消失している部位では、視細胞と脈絡膜毛細血管板は消失している。写真左半分には、扁平で不規則な形をした網膜色素上皮がみられ、類円形の色素顆粒は少数みられる。この部位では、視細胞、脈絡膜毛細血管もみられる(×200)。

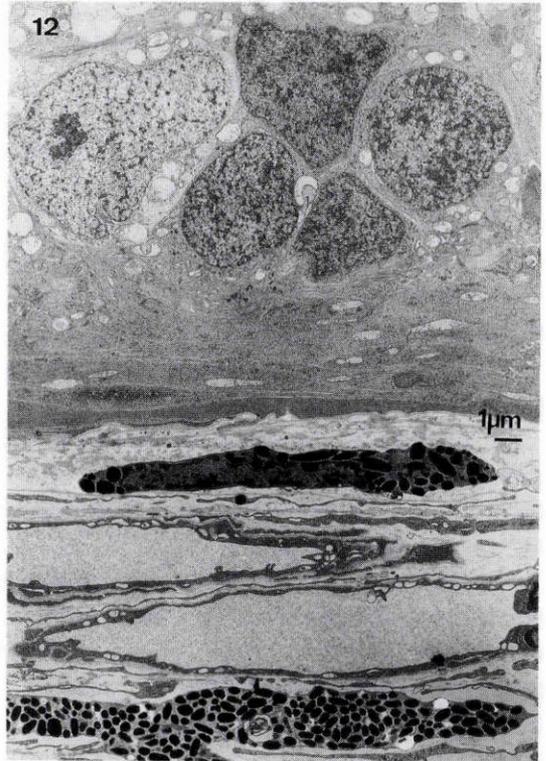


図12 境界部の周辺部側の電顕写真。

網膜色素上皮、視細胞、脈絡膜毛細血管板は完全に消失している。内顆粒層より外層の網膜は、ミューラー線維とみなされるグリア細胞で補填されている(×3500)。

るため、中間部のように再生したと思われる網膜色素上皮はみられず、1年後には網脈絡膜萎縮となったと思われた。

広範囲にわたり網膜色素上皮が壊死、脱落したところでは、長期後には、2次的に視細胞と脈絡膜毛細血管板の萎縮消失を来すことが示された。

Kuwabaraら¹¹⁾は、オルニチンの硝子体内注入によって網膜色素上皮が選択的に障害され、網膜色素上皮の欠損部では脈絡膜毛細血管板の萎縮がみられることを明らかにし、脳回転状脈絡網膜萎縮症の実験モデルとした。しかし、このモデルでは、高浸透圧の影響が考慮されておらず、批判が多かった¹²⁾。我々は、注入するオルニチンの量を微量にして高浸透圧の程度を少なくし(1,025 mOsm)、またそれと同じ浸透圧の食塩水注入の対照実験を行い、我々の実験方法では、高浸透圧による影響がきわめて少ないことを確認した⁹⁾。

Henkindら^{5)~7)}は、ヨード酸ソーダをウサギとラッ

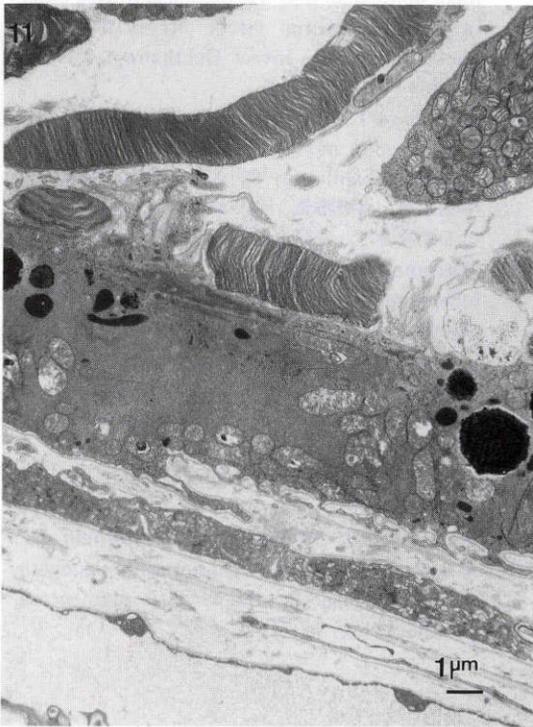


図11 境界部の後極側の電顕写真。

網膜色素上皮は扁平で大きくなり、紡錘形のメラニン色素はみられず、大きさの不揃いな類円形の高電子密度の顆粒状物質がみられる。基底膜陥入は不鮮明となり、細胞内への大きな湾入となっている。脈絡膜毛細血管板の管腔はやや不規則な形を示すが、内皮細胞には窓形成がみられる(×4500)。

トに全身投与して、網膜色素上皮の消失に続発して脈絡膜毛細血管の消失をみることを示し、網膜色素上皮が脈絡膜毛細血管板の機能や構造を制御していることを示した。

Wilson⁴⁾は、脳回転状脈絡網膜萎縮症の組織病理学的検索において、後極部の網膜・脈絡膜はほぼ正常の組織構造を保っているが、中間周辺部の網膜色素上皮消失部位においてのみ、脈絡膜毛細血管板や脈絡膜の中・大血管が消失していたと報告している。また、網膜色素変性症の組織病理学的検索に於いても^{14)~16)}、脈絡膜毛細血管板の萎縮が網膜色素上皮の変性に続発することが、示唆されている。

我々も本実験において、網膜色素上皮細胞が消失した部では、視細胞と脈絡膜毛細血管が消失することを確認した。またこの部位が検眼鏡的には脈絡膜網膜萎縮としてみえる部位に一致した。

このように網膜色素上皮と視細胞、脈絡膜毛細血管板の間には、密接な関係があり、特に網膜色素上皮は、他の2つの細胞の存在に大きく働いている。今回、網膜色素上皮を選択的に障害する実験モデルにおいて、網膜色素上皮の消失は、二次的に脈絡膜毛細血管板や視細胞の萎縮・消失を引き起こすことが示された。

本論文の要旨は、第55回日本中部眼科学会(1989年9月)において、竹内が発表した。本研究は文部省科学研究費(一般研究B 63480401, 宇山昌延)の援助を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) 早坂征次：網膜色素変性症の成因一研究の現状と将来の展望一。窪田靖夫編：眼科Mook 26 網脈絡膜萎縮の変性疾患。東京，金原出版，92—99，1985。
- 2) Takki K： Gyrate atrophy of the choroid and retina associated with hyperornithinemia. *Brit J Ophthalmol* 58： 3—23，1974。
- 3) Rafuse EV, MuCulloch C： Choroideremia. A pathological report. *Can J Ophthalmol* 3： 347—352，1968。
- 4) Wilson DJ, Weleber RG, Green WR： Ocular clinicopathologic study of gyrate atrophy. *Am J Ophthalmol* 111： 24，1991。
- 5) Henkind P： The relationship retinal pigment epithelium and the choriocapillaris. *Trans Ophthalmol Soc UK* 103： 444，1983。
- 6) Korte GE, Reppucci V, Henkind P： RPE Destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25： 1135，1984。
- 7) Korte ge, Gerzberg T, Pua F, et al： Choriocapillaris atrophy after experimental destruction of the retinal pigment epithelium in the rat. *Acta Anat* 127： 171，1986。
- 8) Uyama M, Itagaki T, Takahashi K, et al： Experimental Ornithine-induced retinopathy, in Zingirian M, Piccolino FC (eds)： *Retinal Pigment Epithelium*, Kugler & Ghedini Publication, Amsterdam, 45—52，1989。
- 9) 竹内正光, 板垣 隆, 高橋寛二, 他：実験的オルニチン網膜症—注入早期の変化。日眼会誌 94： 1012—1023，1990。
- 10) Pollack A, Korte GE： Repair of retinal pigment epithelium and its relationship with capillary endothelium after krypton laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31： 890—898，1990。
- 11) Kuwabara T, Ishikawa Y, Kaiser-Kupfer MI： Experimental model of gyrate atrophy in animals. *Ophthalmology* 88： 331—334，1984。
- 12) 中島久雄, 水野勝義：硝子体内アミノ酸注入における網膜変化。日眼会誌 87： 153—160，1983。
- 13) Marmor MF： Retinal detachment from hyperosmotic intravitreal injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18： 1237—1244，1979。
- 14) Gartner S, Henkind P： Pathology of retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 89： 1425，1982。
- 15) Mayer KT, Heckenlively JR, Spitznas M, et al： Dominant retinitis pigmentosa. A clinicopathologic correlation. *Ophthalmology* 89： 1414，1982。
- 16) Rayborn ME, Moorhead LC, Hollyfield JG： A dominantly inherited chorioretinal degeneration resembling sectorial retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 89： 1441，1982。