

レーザー光凝固後における網膜色素上皮の蛍光眼底造影観察

林 直樹, 余 楊桂, 飯田 知弘
阿部 友厚, 高橋 直人, 米谷 新

群馬大学医学部眼科学教室

要 約

実験的に作成した網膜病変に対する、網膜色素上皮レベルに焦点を合わせた精密な蛍光眼底造影の有用性につき検討した。有色家兎 16羽に色素レーザーで網膜光凝固を行い、蛍光眼底造影により経時的に観察した。凝固斑の蛍光像は、3つの異なる程度の蛍光漏出像が、同心円状に配列していた。外側の部分には蛍光漏出はなく、幅の広い網目状の過蛍光で境された低蛍光像が観察された。7日後では2日後に比して同部の網目状の過蛍光の幅が細くなるが、全体的には過蛍光として捕えられた。30日後には蛍光輝度はさらに低下するが、周囲組織よりはなお過蛍光だった。全経過中、この凝固斑に相当する変化の範囲は変化しなかった。同時に行った走査電子顕微鏡による観察で、これらの蛍光像は網膜色素上皮の形状と配列に対応していた。蛍光眼底造影で、網膜色素上皮を細胞レベルで、その形態のみならず機能の側面から同時に検索することができた。(日眼会誌 96:190-196, 1992)

キーワード：蛍光眼底造影，網膜色素上皮細胞，ダイレーザー網膜光凝固

Fluorescein Angiographic Observation of Cellular Change of the Retinal Pigment Epithelium after Laser Photocoagulation

Naoki Hayashi, Yokei Yo, Tomohiro Iida, Tomoatsu Abe
Naoto Takahashi and Shin Yoneya

Department of Ophthalmology, Gunma University School of Medicine

Abstract

Lesions in the retinal pigment epithelium (RPE) of 16 pigmented rabbits were produced by dye laser photocoagulation using with three different wavelengths: 514, 577 and 630 nm. The power setting and exposure time was the same throughout. The size of the coagulation spot was set either at 500 or 1,000 μ m. The retinal lesions were examined by high-resolution fluorescein angiography on day 2, 7 and 30 after photocoagulation. Scanning electron microscopic examination of RPE was also performed in selected cases. On fluorescein angiography, the damaged RPE cells appeared as negative fluorescent spots with intense fluorescent margins, throughout the period of observation. The size of the lesion also remained constant. There were no difference in the damage or recovery of RPE cells in relation to the 3 different laser wavelengths. In some area of lesion, the fluorescein angiographic

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 林 直樹
(平成3年2月8日受付，平成3年6月28日改訂受理)

Reprint requests to: Naoki Hayashi, M.D. Department of Ophthalmology, Gunma University School of Medicine.

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

(Received February 8, 1991 and accepted in revised form June 28, 1991)

findings closely matched those observed by scanning electron microscopy. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 190-196, 1992)

Key words: High-resolution fluorescein angiography, Retinal pigment epithelium, Dye laser Photocoagulation

I 緒 言

蛍光眼底造影法は眼科臨床において、網膜や脈絡膜疾患の検索を行うために、すでに確立された有意義な検査法である。著者らは、この検査法が、生体での網膜色素上皮(以下RPEと略)細胞を観察し得る事実について既に報告した¹⁾。従来の蛍光眼底造影法では、蛍光色素の漏出、組織染色またはwindow defectなどとして観察していたRPEの病変を、RPE細胞レベルでの観察の可能性を検討するために、今回の実験を行った。

色素レーザーを用いた網膜光凝固により生じるRPE細胞の急性壊死、その後に見られる組織修復の中でのRPE細胞の新生と増殖、また凝固斑周囲のRPE細胞について、蛍光眼底造影法により細胞レベルで詳細に観察することに成功し、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2~3kgの成熟有色家兎16羽26眼を用い、網膜光凝固前に蛍光眼底造影を全例に行った。Pentobarbital sodium (Nembutal®)を耳静脈より投与し全身麻酔下で、Mydrin P®点眼にて十分散瞳した後、fluorescein sodium (Fluorescite®) 14 mg/kgを耳静脈より静注し、RPE細胞のレベルに焦点を合わせ、蛍光眼底造影を行った。撮影にはコダック社Tri-Xフィルムを使用し、2倍増感で現像した。光学顕微鏡でネガフィルムを詳細に観察し、四切大の紙焼きにて、背景蛍光の中にRPE細胞と推定される、五ないし六角形の蛍光像を検索した。

前述の蛍光像を確認できた全例に、色素レーザー(コヒレント社)で光凝固を施行した。凝固条件は表1に示した通りで、乳頭部より3乳頭径以上離れた、眼底の下方に凝固斑どうしが互いに干渉しないように間隔を開け、1眼に4ないし6個の凝固斑を置いた。一個体内ではいずれの波長についても同一出力を用いるようにした。また、個体差による影響をより小さくして、各波長のRPE細胞に及ぼす影響の差異を検討する目

表1 凝固条件

波長	514 nm, 577 nm, 630 nm
凝固径	500 μ m, 1000 μ m
凝固時間	0.5 sec
出力	100 mw~200 mw

的で、同一眼に複数の波長で光凝固を施行した。11眼にはスポットサイズ1,000 μ mで、1眼に3波長のうち1波長を選び4スポット凝固した。2眼にはスポットサイズ1,000 μ m, 6眼には500 μ mで3つの波長をそれぞれ2スポットずつ、計6スポット凝固した。また10眼にはスポットサイズ1,000 μ mで、1眼に3波長のうち2波長を2スポットずつ計4スポット、波長の組み合わせを変えながら凝固した。凝固2日、7日、30日後に前述の方法にて蛍光眼底撮影を施行し、ネガフィルムを光学顕微鏡および拡大プリントにてRPE細胞の変化を経時的に比較し、検索を行った。

また走査型電子顕微鏡観察のため、光凝固の2日、7日、30日後にそれぞれ2眼を摘出した。トランプの固定液(4%グルタルアルデヒド+1%フォルムアルデヒド)にて固定した後、赤道部にて半割した。感覚上皮を硝子体と共にRPEより慎重に剝離し、エタノール系列にて脱水、一辺が1cmの正方形に切り出し、臨界点乾燥、白金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡(日立S-800)にて観察した。

III 結 果

光凝固2日後、514 nm, スポットサイズ1,000 μ mでの凝固斑の蛍光像は、輝度の異なる3層が同心円状に配列していた(図1)。同心円の中心部(A)は、ほぼ一様な面状の強い蛍光漏出を示した。中間層(B)は、中心部より軽度な蛍光漏出があり、細かな蛍光像は、はっきりしなかった。外側層(C)は、蛍光漏出はなく、太く明瞭な網目状の過蛍光に境界された、大小様々な低蛍光斑が観察された。過蛍光の幅は、部位により差がみられ、背景蛍光の明るい脈絡膜血管の部分には、より太くはっきりしていた。凝固斑の外側には、コントロールと同様の、細い網目状の過蛍光に境された低蛍

光斑があった。この配列は、他の波長でも変わりなかった。

走査電子顕微鏡所見では、光凝固による RPE 細胞の変化は、ほぼ同心円状の 3 層の変化を示した(図 2, 3)。中心部では、強い凝固壊死の結果、大部分のブルッフ膜が露出し、その中にわずかな扁平化した RPE 細胞があった。中間層は、RPE 細胞が押し潰されたように大きくなっているが、中央はやや膨隆していた。この部の RPE 細胞の微絨毛は、ほとんど消失していた。外側層では、大小不同で、中央部の隆起した RPE 細胞があり、微絨毛は背が低いかまたは消失していた。RPE 細胞の上に、より小さな球状の細胞も見られる部分や、けばだった膜状物があり、RPE 細胞がはっきり見えない部分もあった。凝固斑の外側と考えられる部分では、微絨毛が多く、RPE 細胞一つ一つの形態は分かりにくかった。同一眼の蛍光眼底所見(図 4)と走査電子顕微鏡所見(図 3)を比較すると、特に低蛍光像が明瞭な外側層で、低蛍光斑が RPE 細胞と一体一で対応していた。(白枠内矢印)。

光凝固 7 日後の蛍光眼底所見では、すでに蛍光漏出はなく、凝固中央部に大きな蛍光陰影があった。その周囲には点状の陰影欠損が播種状に散在し、その間の過蛍光が、網目状に観察された。この網目は周辺部にいくほど細かくなった。中心部では、陰影欠損のため、網目状の過蛍光はわからなかった(図 5)。網目状の過蛍光が観察される部分には、放射状方向に長い楕円形の陰影もあった(矢印)。走査電子顕微鏡所見では、凝固斑の中心部は、不整な形を持つ組織や、マクロファージと考えられる細胞があり、その周囲は、はっきりと

した RPE 細胞はなかった。さらに外側には、中央部に向かって伸びて行くようにみえる細長い RPE 細胞や、分裂直後と考えられる小さな RPE 細胞があった。この部の RPE 細胞は、微絨毛が減少していた(図 6)。光凝固 30 日後の蛍光眼底造影所見では、中心部の蛍光陰影の範囲が広がった。凝固斑周辺部は、7 日後と同様、太い網目状の過蛍光により、低蛍光斑が境されていた。過蛍光部分と低蛍光斑の輝度の差は、7 日後よりも小さく、全体的にはやや過蛍光だった。この RPE 細胞が変化している範囲の大きさは、2 日後とほとんど差がなかった(図 7)。走査電子顕微鏡所見では、中心部はマクロファージと考えられる、小さな球状物の集積があった。その回りでは、外側の正常と考えられる部分に比べ、明らかに RPE 細胞が大きく、微絨毛が減少していた。その外側は 7 日後で見られた所見と同様、中心部に向かって細長い RPE 細胞があった。正常と考えられる部分では微絨毛が多く、RPE 細胞一つ一つの細かな形態は不明瞭であった(図 8)。

スポットサイズ $500\ \mu\text{m}$ の凝固斑では、大きさは $1,000\ \mu\text{m}$ に比して小さいが、その 3 層構造は基本的には同様であった。それぞれの層についてみると、中心部(A)は $1,000\ \mu\text{m}$ に比べて狭いが、中間の層(B)、外側の層(C)はその幅に明らかな差がなかった(図 9)。

IV 考 按

有色家兎眼に網膜光凝固を行うことで、網膜色素上皮病変を実験的に作成した。光凝固後の蛍光造影所見による RPE 細胞の形態や蛍光漏出は、走査電子顕微鏡所見

図 1 波長 $514\ \text{nm}$ 、スポットサイズ $1,000\ \mu\text{m}$ 凝固 2 日後の蛍光眼底所見凝固部分は蛍光輝度を異にする 3 層が同一円状に配列している。

中心部(A)は面状の強い蛍光漏出、中間の層(B)は軽度の蛍光漏出があり、細胞の形態は不明瞭、外側の層(C)は蛍光漏出はなく、網目状の太く明瞭な過蛍光に境界された低蛍光帯を示す。

図 2 波長 $577\ \text{nm}$ 、スポットサイズ $1,000\ \mu\text{m}$ の走査電子顕微鏡所見 ($\times 40$)

図 3 図 2 の強拡大 ($\times 70$)、ほぼ同心円状に 3 層が配列し、中心部では強い凝固壊死の結果、大部分のブルッフ膜が露出、所々に扁平化した RPE 細胞が見られ、中間層は、RPE 細胞がおし潰されたように大きくなっているが、中央はやや膨隆し、微絨毛はほとんど消失している。外側の層は、大小不同で、中央部の隆起した RPE 細胞があり、微絨毛も少くなっている。さらに外側の光凝固の影響がないと考えられる部分は網膜色素上皮細胞一つ一つがはっきりしない。

図 4 光凝固 2 日後の走査電子顕微鏡所見(図 3)と同じ部分の蛍光眼底所見、両者の白枠内の過蛍光に境された部分で、蛍光眼底所見の低蛍光斑と走査電子顕微鏡所見の RPE 細胞が 1 体 1 で対応している(枠内矢印)

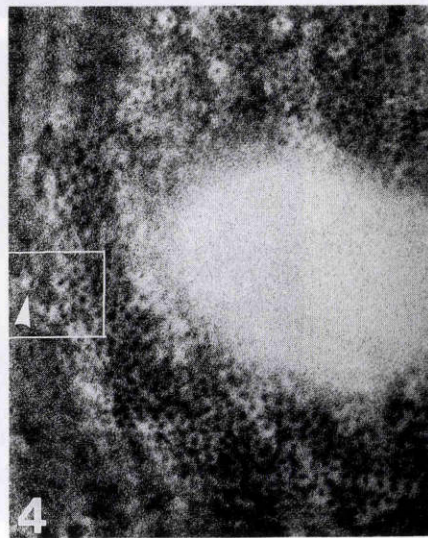
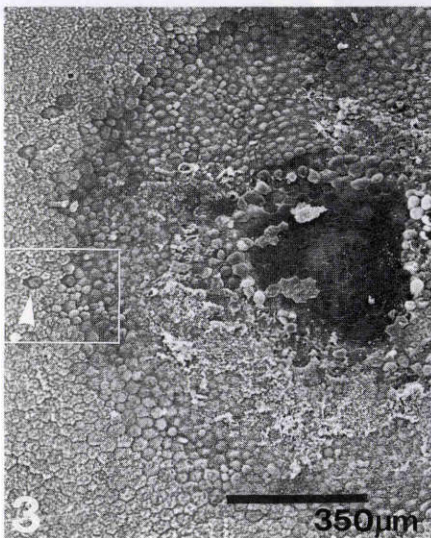
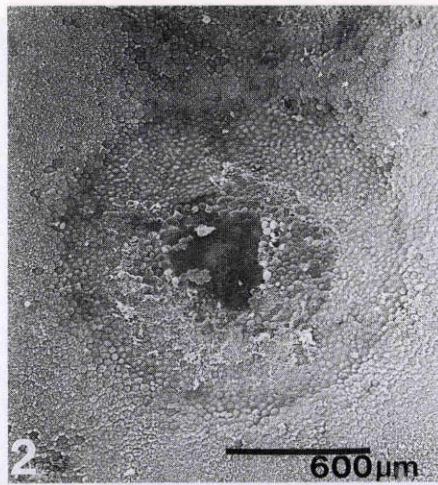
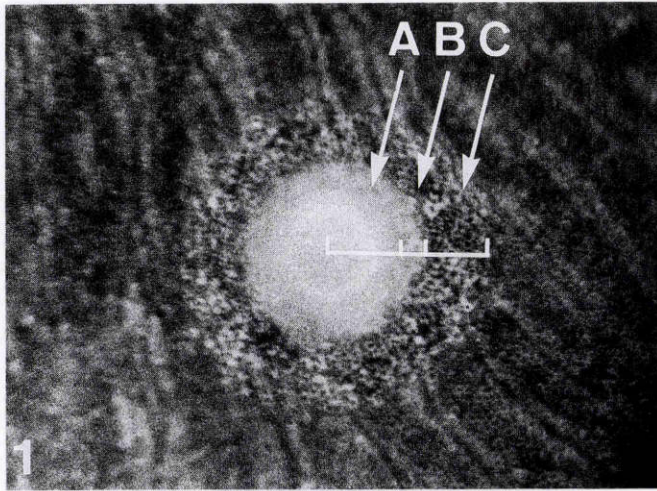


図1~4

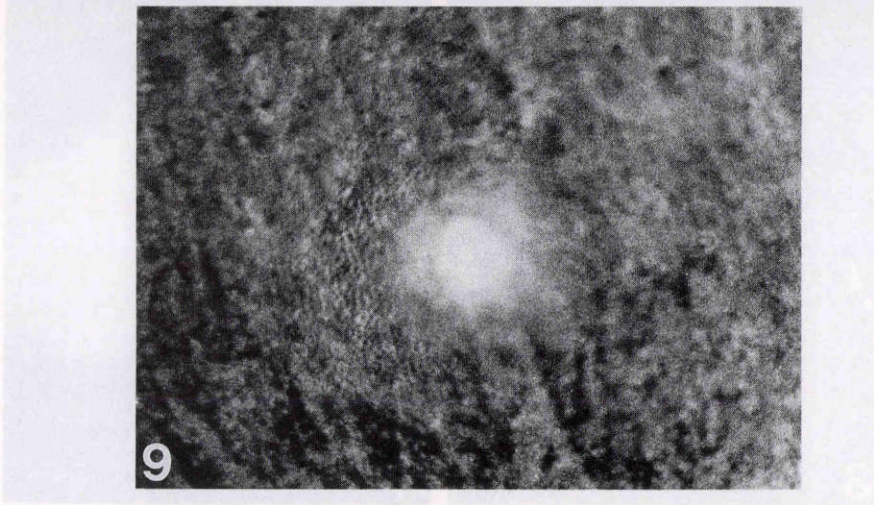
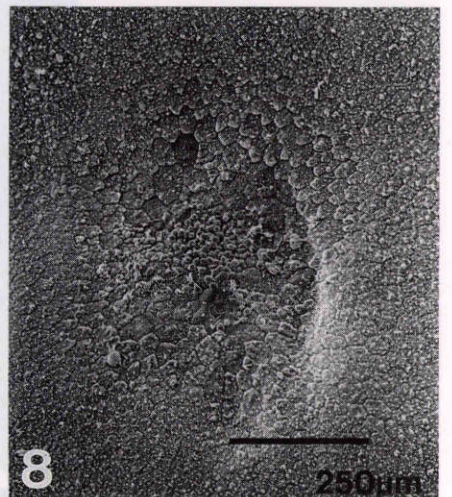
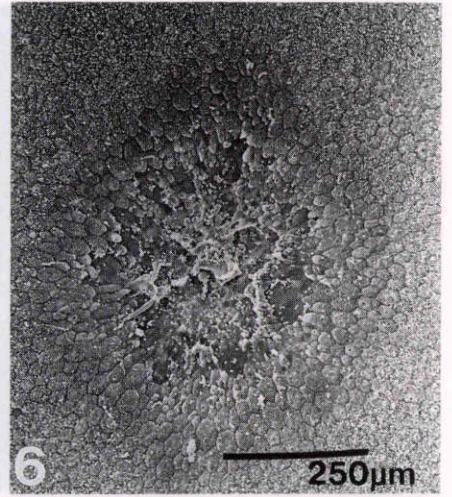
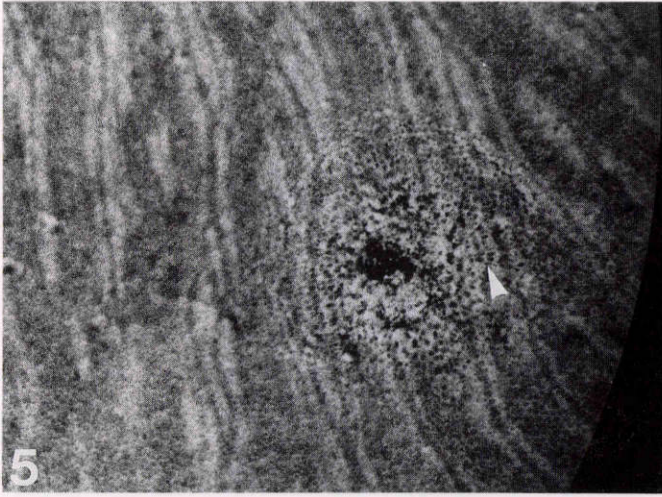


図 5 ~ 9

と非常によく対応していた。

著者らは蛍光眼底造影により、正常 RPE 細胞を生体で観察する可能性について、有色家兎眼を用いてすでに検索を行っている¹⁾が、本実験により、背景蛍光に見られる五ないし六角形の低蛍光像が、RPE 細胞そのものである事が確認された。そして、光凝固により惹起された、RPE 細胞の壊死と組織修復の過程が、蛍光造影ではっきりと記録されていた。凝固斑中心の壊死部では、個々の細胞の形態観察は出来ないが、その壊死の程度に応じて蛍光漏出が生じていた。一方、その周囲の熱エネルギーによって、軽度の障害を受けているが蛍光漏出のない部分では、過蛍光を示し、個々の細胞の観察が可能であった。そして、組織修復に当たって、新生または凝固斑周囲の健常部より滑り込んでくる RPE 細胞は、凝固中央部にいくほど大型になっていくが、7日、30日の蛍光像では、これに対応して過蛍光の網目が大きくなっていった。また、この網目の大きい、組織修復の行われているところでは、網目が不明瞭で、過蛍光斑として観察されるものもあった。これは、RPE の蛍光像が、RPE の色素の有無に大きく関係していることと関係して、新生した RPE 細胞の色素の多寡によるものと理解される。そして、この明瞭な網目を示す RPE 細胞の形態の特徴として、微絨毛の消失を挙げることができる。凝固中央部では、色素を豊富にもったマクロファージと考えられる細胞が集簇しているため、蛍光像では陰影欠損として観察された。

このように蛍光眼底造影の精度を上げることによ

り、RPE 細胞の経時的变化を生体内で観察することが可能となった。また RPE 細胞のバリアー機能を半定量的に評価することも可能である。ヒト眼でも RPE 細胞の観察が可能になれば、眼科臨床に多大の貢献をするものと期待される。

ここで、なぜ家兎眼でこのような RPE 細胞の形態を示す蛍光パターンが観察されるのかをもう一度検討し、臨床応用への可能性について論じたい。

すでに、共著者の一人¹⁾が報告したように、この RPE の蛍光像は、有色家兎にのみ観察可能であって、白色家兎では観察できなかった。また、Wallow ら²⁾はサル眼と家兎眼の RPE 細胞の形態の違いに触れ、サル眼では色素が均一に分布しているのに対して、家兎眼の特徴として、色素が遍在していることをあげている。有色家兎でこの RPE の蛍光像が容易に観察されるのは、この事実が関与していると推測される。また、組織修復された部位での RPE 細胞は、健常な RPE 細胞に比し、蛍光造影で容易に観察されている。走査電顕による観察では、この部位の RPE 細胞は大型で扁平、そして微絨毛を欠いている³⁾。これらの細胞の形態は、RPE 細胞の蛍光像を捕らえる上で重要な因子となっているものと理解される。一方、ヒト眼での RPE 細胞の形態は、径、高さ、色素の分布等が家兎眼のそれと異なっている⁴⁾。さらに、ヒト眼では網膜血管が密に存在している事実が関係して、本法での RPE 細胞の観察を難しいものとしている。しかし、今後、組織の吸光特性を利用して、撮影装置の光源の波長を、白色光

図5 光凝固2日後(図1)と同一スポットの凝固7日後の蛍光眼底所見、蛍光漏出はなく、中心部は蛍光陰影となりその周囲には播種状の陰影欠損があり、その間の過蛍光は網目状である。これは周辺部に行くほど細くなっており、網目状の過蛍光がよく観察される。中間の部分では、放射状方向に長い陰影もある(矢印)。

図6 凝固7日後の走査型電子顕微鏡所見($\times 100$)、波長577nm、スポットサイズ500 μm のもので、凝固中心部では、不整形な形をもつ組織や、マクロファージと考えられる。小さな球状物の集積がある。その外側では、正常と考えられる部分に比べ、明らかにRPE細胞が大きく、微絨毛も減少している。中には図5の蛍光眼底所見で見られたのと同じような放射状方向に長いRPE細胞もある。

図7 凝固2日後(図1)と同一スポットの凝固30日後の蛍光眼底所見、凝固中心部は蛍光陰影が拡大し、周辺部は全体的に過蛍光となっている。蛍光所見にて変化を生じている部分の大きさは、2日後、7日後に比べ縮小傾向はない。

図8 凝固30日後の走査型電子顕微鏡所見($\times 100$)、577nm、スポットサイズ500 μm 中心部は小さな球状物の集積があり、その周囲は正常RPE細胞に比して明らかに大きな細胞がある。その外側は中心部に向かって細長いRPE細胞があり、さらに外側では微絨毛が多くRPEの形態ははっきりとしない。

図9 スポットサイズ500 μm の2日後、凝固斑の大きさは異なるがその基本的構造は変わらない。

でなく任意のものとし、厳密な焦点設定が可能な装置が開発されれば、RPE細胞を直接観察することは可能であると考えられる。この点からは、近年開発されたレーザー走査検眼鏡 scanning laser ophthalmoscope がこれに最も近い装置といえることができるが、これによる解像力が蛍光眼底造影に匹敵するかどうかは最も問題となるところである。

本検査法では、障害されたRPE細胞とその周囲の健常なRPE細胞とは、明瞭に区別されたものとして観察された。そして、凝固2日後と30日後では、この凝固斑の径は変わっていなかった。これは光凝固後、経過と共に凝固斑が小さくなるとの従来の報告⁵⁾と異なるが、これも、ヒト眼やサル眼と、家兎眼のRPE細胞の形態的特徴が異なっていることと関係していると考えられる。30日後の凝固斑の外側部分は、蛍光造影では過蛍光網として観察されるが、組織学的な検索ではRPE細胞は修復しており⁶⁾、この事実は、RPE細胞の機能が、生理的範囲内でも、形態の変化があれば本法によって検索可能であることを示唆するものとして重要である。

本実験では、光凝固にあたって、異なる波長を用いて行ったが、RPE細胞の壊死から再生、凝固斑周囲の健常なRPE細胞の態度など、いずれの点においても波長による違いはなかった。RPE細胞は、光を熱エネルギーに変換する場所の1つであり、メラニンの波長

による透過性の違いは、この結果には大きく影響しないことが結論される。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲いただきました清水弘一教授に深謝いたします。本論文の要旨は、第93回日本眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 飯田知弘, 余 楊桂, 米谷 新, 他: 蛍光造影による網膜色素上皮細胞の観察. 日眼会誌 95: 421-427, 1991.
- 2) Wallow HL, Tso OM, Fine S: Retinal repair after experimental xenon arc photocoagulation. 1. A comparison between rhesus monkey and rabbit. Am J Ophthalmol 75: 32-52, 1973.
- 3) 三井敏子, 三木徳彦: 実験的網膜剥離眼 Xenon 光凝固における網膜色素上皮の走査型電子顕微鏡的観察. 日眼会誌 80: 40-50, 1976.
- 4) Kuwabara T: Species differences in the retinal pigment epithelium, in Marmor MF, Zinn KM (eds): The Retinal Pigment Epithelium. Cambridge, Harvard University Press, 58-82, 1979.
- 5) 岡野 正, 赤羽信雄, 氏家和宣, 他: 脈絡毛細管板に及ぼす光凝固の影響. 日眼会誌 79: 952-968, 1975.
- 6) 吉田秀彦: 損傷された網膜視細胞の変性および再生に関する組織学的研究. 日眼会誌 79: 26-37, 1975.