

虹彩ルベオーシス発生のモデル動物眼の作成と その形態学的研究

西川 睦彦, 伊東 滋雄, 戸倉 敬雄, 山根 淳志, 三木 弘彦
関西医科大学眼科学教室

要 約

猿眼の網膜の主幹動静脈をマイクロ波にて直接凝固閉塞し、さらに強膜開窓により低眼圧状態を持続すると虹彩ルベオーシスを確実に発生させることができた。臨床的観察では、処置後5日に虹彩ルベオーシスがみられた。病理組織学的には、これらの血管は虹彩面上に突出していて、内皮細胞の壁には多数の fenestration が存在していることから新生血管であると考えられた。新生血管の内皮細胞は管腔に向かって突出し、活動性の高い所見がみられ、既存血管から派生していた。本方法は、虹彩ルベオーシスの実験モデルになりうる。(日眼会誌 96:447-454, 1992)

キーワード：虹彩ルベオーシス, 血管新生, 網膜虚血, 網膜動静脈閉塞, 低眼圧

Morphological Study of Rubeosis Iridis Induced in Animal Eyes

Mutsuhiko Nishikawa, Sigeo Ito, Takao Tokura, Atsushi Yamane
and Hirohiko Miki

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Rubeosis iridis was produced experimentally in rhesus monkey eyes, by means of occlusion of the major retinal vessels of the retina and persistent ocular hypotony. Clinically, rubeosis iridis was recognized 5 days after the procedure. Histopathologically, these vessels developed anteriorly to the iris surface and endothelial fenestrations showed evidence of iris neovascularization. Endothelial cells of the vessels projected toward the internal lumen and showed immaturity. Newly formed vessels originated from the stromal vessels in the iris. This method is an effective experimental model for the induction of rubeosis iridis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:447-454, 1992)

Key words: Rubeosis iridis, Neovascularization, Retinal ischemia, Retinal arterial-venous occlusion, Hypotony

I 緒 言

虹彩ルベオーシスは糖尿病網膜症、網膜中心静脈閉

塞症、網膜剝離などの疾患に続発して発生し、血管新生緑内障へと進展する。一旦発生すると、確実な治療法がなく予後不良の病変である。これまでに実験的に、

刷請求先：570 守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 西川 睦彦
(平成3年7月17日受付, 平成3年9月5日改訂受理)

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

(Received July 17, 1991 and accepted in revised form September 5, 1991)

虹彩ルペオースを作成した報告^{1)~6)}はあるが、生体に近い状態で虹彩ルペオースを動物眼に発生させる方法には確実なものはない。今回、我々は虹彩ルペオースを確実に動物眼に発生させることができたので報告する。

II 方 法

実験動物には、体重 1.5 kg から 2.5 kg までのカニクイ猿 3 頭 4 眼を用いた。塩酸ケタミン (ケタラルール®) 25 mg/kg 筋注による全身麻酔後、手術用顕微鏡下で球結膜切開をして角膜輪部に平行に輪部から 3

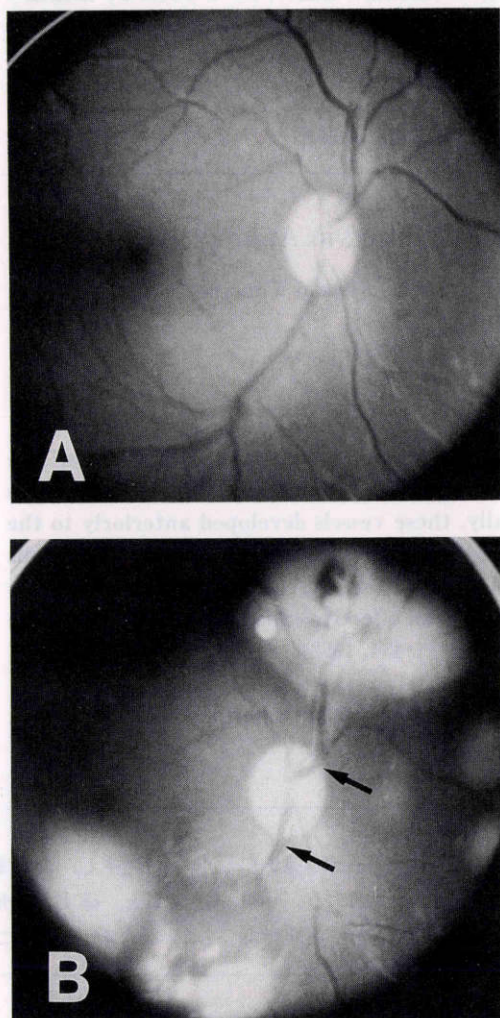


図1 眼底写真 A: 処置前, 眼底写真 B: マイクロ波にて網膜血管を熱凝固した処置直後, 矢印: 網膜静脈の著明な拡張がみられる。

mm, 10 時の毛様体扁平部の強膜を尖刃刀にて 3 mm 切開した。創孔よりマイクロ波凝固装置のチップを硝子体内に挿入し、後極部用硝子体コンタクトレンズ (京都コンタクト社製) を角膜上に装着させて、直視下に網膜の主幹動静脈を 2 本、1 乳頭径離れた所で熱凝固閉塞した (図 1)。強膜切開創はそのまま開放して放置し、球結膜創のみを縫合して、低眼圧状態とした。

処置後、経時的に細隙灯顕微鏡検査、眼圧測定 (Alcon Applanation Pneumatograph®), 前眼部撮影、虹彩蛍光造影などの臨床検査を行って虹彩ルペオースの発生を臨床的に観察した。12 日目に眼球摘出して細切し、2 倍希釈 Karnovsky 液にて 24 時間前固定を行った。その後、0.1 M 磷酸緩衝液にて水洗して、2% osmium 液で後固定を行い、エタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドに置換後 Epon 812 に包埋して標本を作成した。その後、虹彩部の薄片を作成し、トルイジンブルー染色液で染色して顕微鏡で観察した。さらに、超薄切片を酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色の後、透過型電子顕微鏡 (日立 HU-12 型) にて観察した。

III 結 果

1. 臨床経過

処置直後、閉塞部から視神経乳頭側の網膜静脈は拡張し、3 日から虹彩血管の拡張があらわれ、その後増強した。5 日から 7 日には虹彩表面に赤く突出した拡張した血管があらわれた。その後 7 日から 12 日まで虹彩血管の拡張とともに虹彩表面に突出した血管に変化はなく、そのままみられた。12 日頃から虹彩血管の拡張と虹彩表面の突出した血管は消退に向かった (図 2)。虹彩蛍光造影では、これらの拡張血管に一致して瞳孔縁および虹彩面上に著明な色素の血管外漏出がみられた (図 3)。これらの血管外漏出は無処置眼虹彩ではみられなかった。また、虹彩血管の拡張が緩和されるとともに血管外漏出も軽減していた。さらに、7 日の蛍光眼底造影で網膜血管凝固閉塞部の周辺側に 180°以上の範囲で無血管野がみられた。しかし、網膜全体に占める虚血の程度について不明であった。眼圧は処置後から 12 日までの経過中 3 mmHg 以下の低眼圧を持続していた。また、拡張血管の消退時期に一致して低眼圧は回復し、正常眼圧に戻る傾向があった。

2. 組織学的所見

処置後 12 日の虹彩の光学顕微鏡所見では、虹彩表面の前境界層をやぶり、虹彩内から前房側へ突出した異

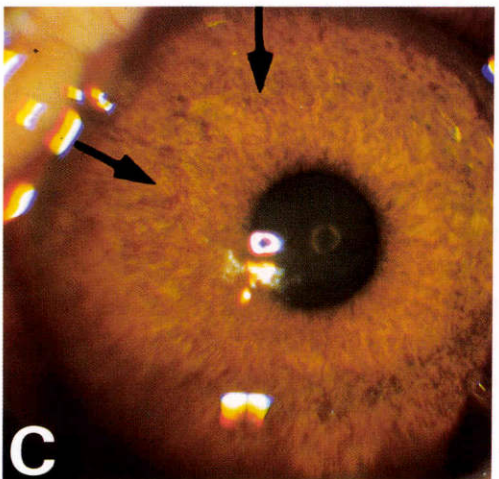
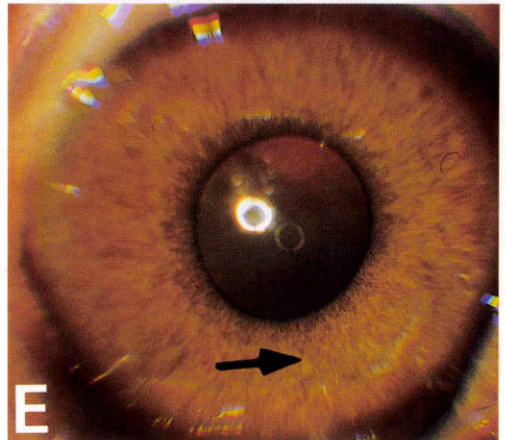
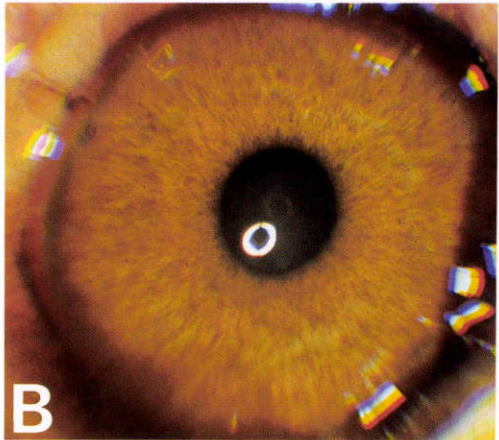
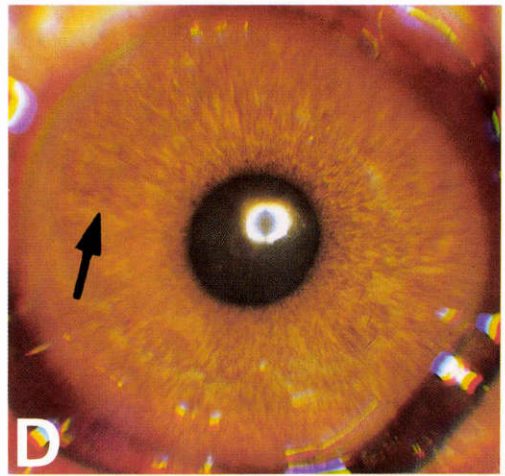
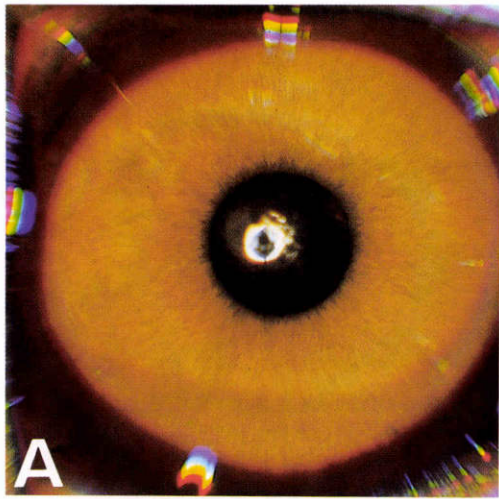


図2 虹彩の所見。
A: 処置前, B: 3日, C: 5日,
D: 7日, E: 11日後。
矢印: 虹彩ルベオースを示す。

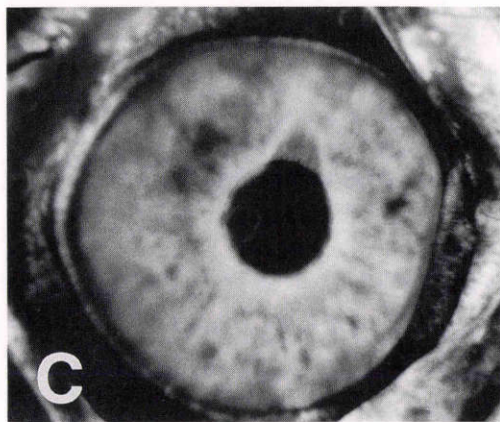
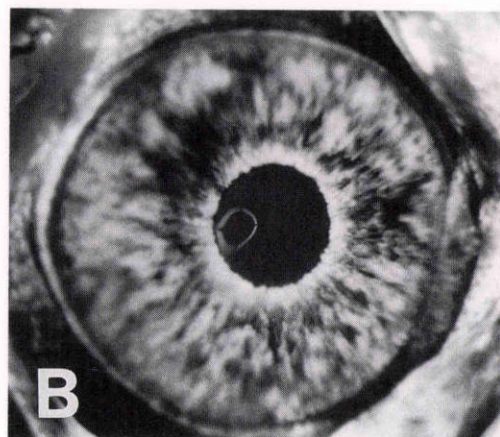
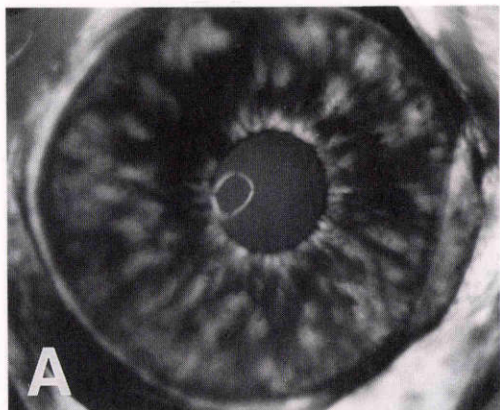


図3 虹彩の蛍光造影像(処置後7日)。瞳孔縁を中心に虹彩全面から蛍光の血管外漏出がみられる。
A: 6秒, B: 10秒, C: 22秒

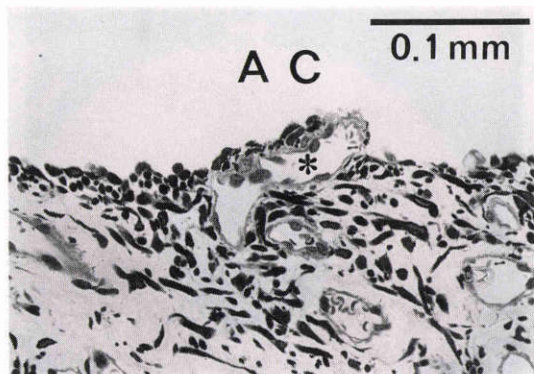


図4 虹彩の瞳孔縁の光顕像(処置後12日)。虹彩内から前房内へのびた新生血管がみられる。前境界層下の毛細血管は拡張している。(*: 新生血管, AC: 前房)(トルイジンブルー染色, $\times 200$)

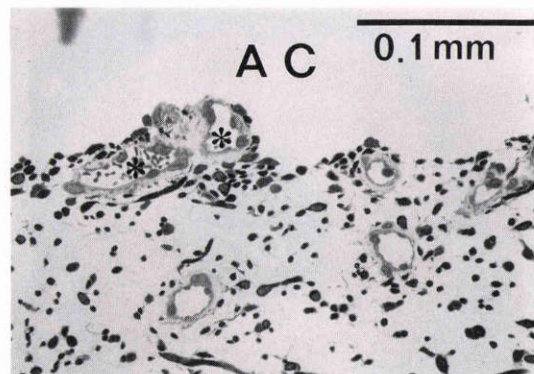


図5 虹彩の周辺部の光顕像(処置後12日)。虹彩内から前房側にのびた新生血管がみられる。また、無処置眼の虹彩と比べて melanocyte や線維芽細胞の配列は虹彩実質内の浮腫のため乱れている。(トルイジンブルー染色, $\times 200$)

常血管が瞳孔縁から虹彩根部にかけての全面に見られた(図4, 図5)。しかし、前房隅角には新生血管や増殖組織をみなかった(図6)。虹彩内の既存の毛細血管および細静脈は拡張しており、虹彩実質は浮腫のため線維芽細胞は疎になっていた。これは、無処置眼の虹彩と比較すると明確であった。無処置眼の虹彩では、前境界層付近に melanocyte が密にあり、その間隙を埋めるように線維芽細胞が存在していた。その下に毛細血管、さらに細静脈が存在していた(図7A)。電顕でこれらの毛細血管を観察すると内皮細胞の核は扁平になりクロマチンは濃縮し成熟した血管であり、血管壁の tight junction は密接で閉鎖腔となっていた(図7

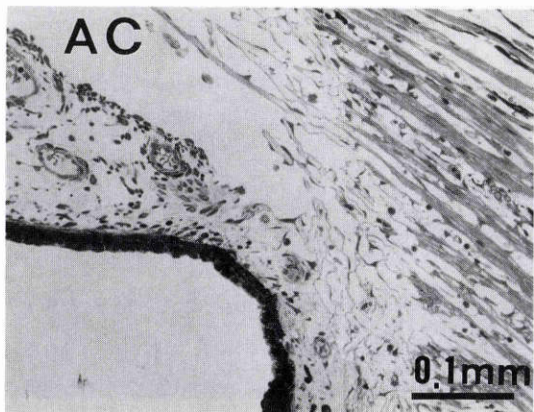


図6 虹彩の隅角部の光顕像（処置後 12 日）。線維性血管膜や隅角癒着はみられない。（トルイジンブルー染色，×100）

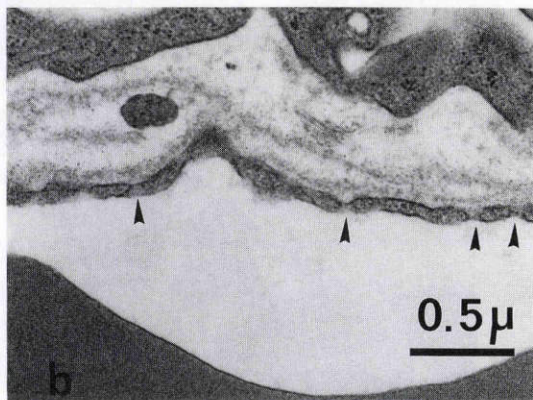
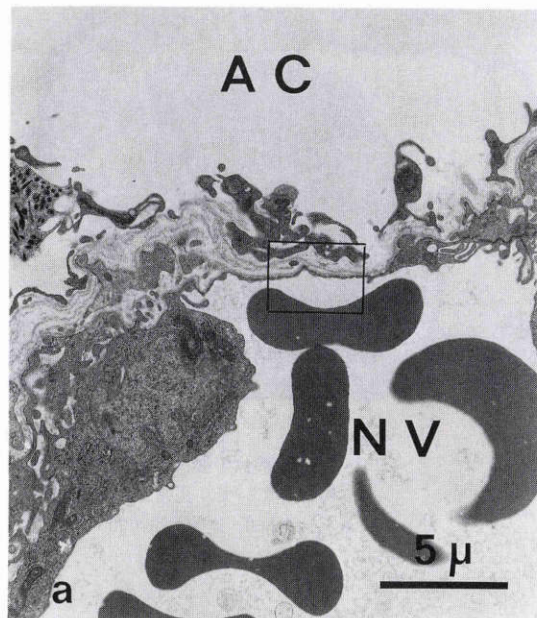


図8 虹彩瞳孔縁にみられた新生血管の電顕像（処置後 12 日）。

b: a の□部分の拡大。内皮細胞の前房側には fenestration (矢じり) がみられる。(NV: 新生血管, AC: 前房) (a: ×3,000, b: ×20,000)

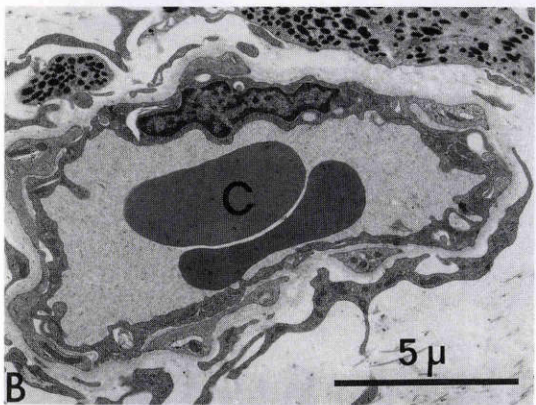
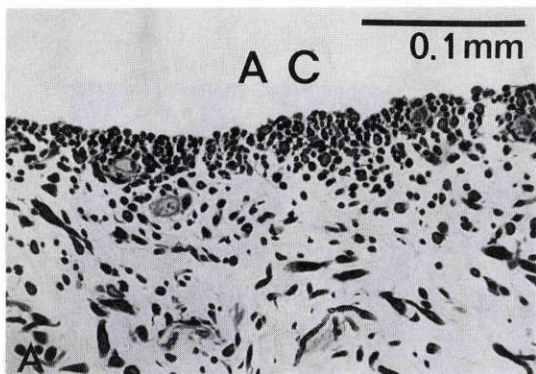


図7 無処置眼の虹彩の光顕(7A)および電顕(7B)像。
A: 光顕で見ると、前境界膜の下には melanocyte や線維芽細胞が密に配列し、その下方に毛細血管がみられる。(AC: 前房) (トルイジンブルー染色，×200)。
B: 電顕で見ると、虹彩実質内の毛細血管は内皮細胞は扁平で、血管壁の tight junction は密であり閉鎖腔となっている。(C: 毛細血管) (×4,800)

B).

一方、虹彩表面の異常血管を電子顕微鏡で観察すると、内皮細胞の血管壁の基底膜は薄く、胞体には fenestration がみられた。また、これらの fenestration は前房側に向かった部位に多数存在していた(図8)。この新生血管の内皮細胞には多数のミトコンドリアや粗面小胞体が見られ、既存の他の血管の内皮細胞と比較して高い活動性を示していた(図9)。また、新生血管は虹彩内の既存の血管と連絡していた(図10)。

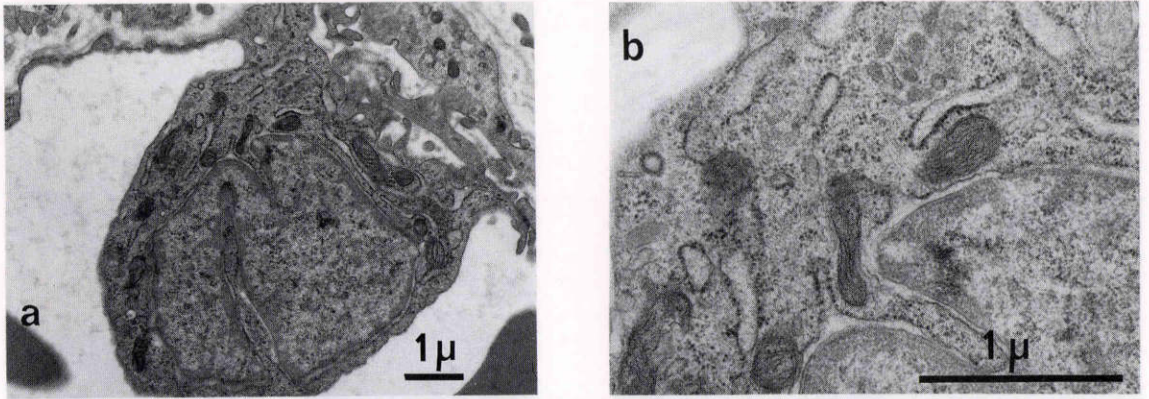


図9 虹彩瞳孔縁の新生血管の電顕像(処置後12日)。

b: aの一部分の拡大。内皮細胞は楕円形で一部突起を持ち、新生血管の内腔に向かって突出している。正常虹彩に比べてミトコンドリアや粗面小胞体が明瞭にみられる。(a: $\times 7,800$, b: $\times 23,000$)

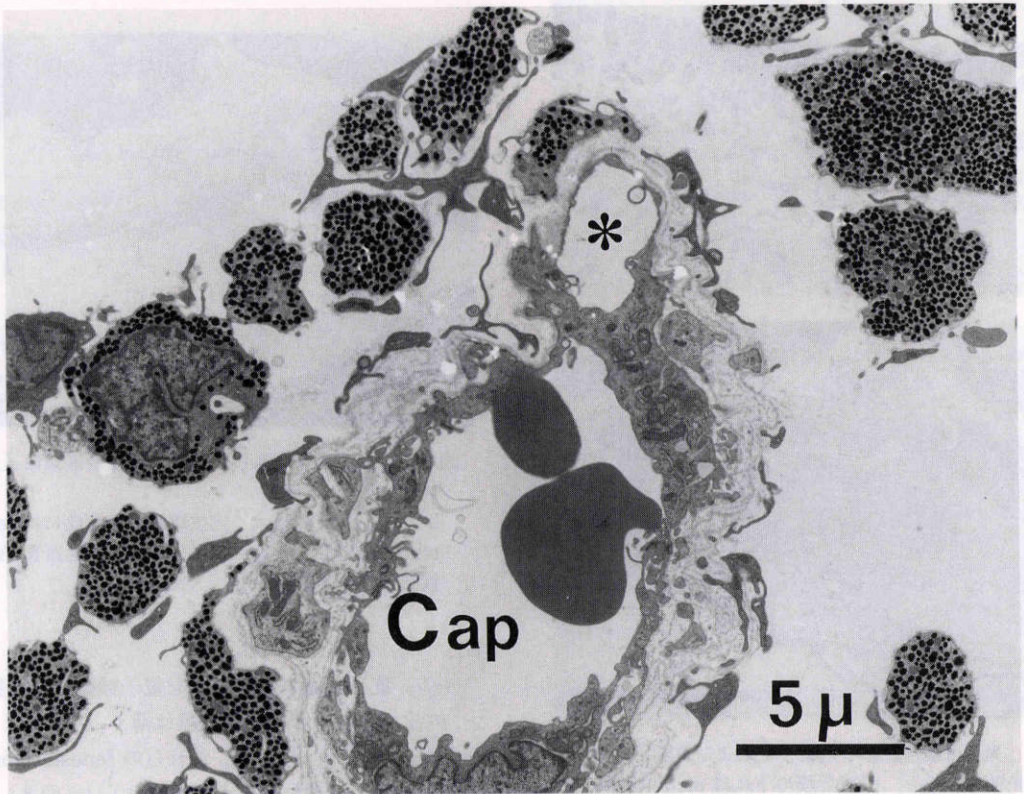


図10 虹彩電顕像(処置後12日)。新生血管は虹彩実質内の拡張した毛細血管に連絡しているのがみられる。(*: 新生血管, Cap: 毛細血管), ($\times 4,500$)

IV 考 按

今回、我々は猿眼網膜の主幹動静脈の閉塞および強膜側の開放による低眼圧により5日には虹彩ルペオースの発生をみる事ができた。組織学的には、元来正常の虹彩血管は厚い膠原線維の外膜で被われており、毛細血管の内皮細胞は扁平で閉鎖型の tight junction で連なっており、胞体には fenestration を持たないとされているが、実験的に我々が作成したこれらの異常血管では内皮細胞の血管壁は薄く、胞体には fenestration をもっていることから新生した血管と考えられた。また、これら新生血管と思われた血管の内皮細胞は大型の楕円形の粗面小胞体などを多数持ち活動性の高い細胞と考えられた。さらに、一部の新生血管は毛細血管腔と連絡していることがわかった。

虹彩ルペオースを発生させる実験は、従来は猿眼の網膜静脈を光凝固を用いて閉塞させる方法がとられていた^{1)~4)}。しかし、その閉塞は不完全であって、山秋¹⁾によれば10眼中1眼に、Virdi²⁾によっても6眼中3眼にしか虹彩ルペオースが発生しなかったという。さらに追加凝固を加えれば10眼中8眼に、6眼中6眼に虹彩新生血管をみたとしている。また、lensectomy や vitrectomy の操作を加えておけば、その発生までの期間が短縮され、その存続期間も長くなると言われている³⁾。Gu⁴⁾の報告でも、網膜静脈の閉塞に lensectomy や vitrectomy の操作をした眼では、虹彩新生血管の発生は平均3.1日であるのに対して、lensectomy や vitrectomy の操作をしなかった眼では、発生までに平均5.8日と延長していた。これは、我々の実験の5日とほぼ一致するものであった。一方、Peyman⁵⁾によれば、猿眼に低眼圧状態を持続させるために、0.45~0.60 ml の硝子体液の吸引を行った操作では6眼中0眼に、また毛様体扁平部の強膜切除を行ったうえ硝子体穿刺し、角膜が陥凹するまでに硝子体液の排除をおこなえば、6眼中6眼のいずれにも虹彩ルペオースが発生したとされている。猫眼を用いた実験では、lensectomy や vitrectomy を行った後に、裂孔原性網膜剝離を作ったものには、8眼中8眼に虹彩ルペオースが発生したが、lensectomy や vitrectomy を行っても網膜剝離ができなかったもの9眼では、いずれにも虹彩ルペオースは発生しなかったという⁶⁾。この他に、前眼部の循環不全を作成するために長後毛様動脈を閉塞する方法⁷⁾もあるが、この方法では高度の前眼部虚血により角膜新生血管発生

のため前房内の観察ができないことから良い実験モデルにはならなかった。

今回、我々はこれらの報告に基づいて網膜の血管閉塞を確実にさせるためにマイクロ波凝固装置で直接に網膜血管を閉塞した。これは、過去の実験では、網膜静脈の閉塞により虚血網膜を作成していたが、我々は動静脈閉塞によって、より高度の虚血網膜を作り得た。また、アルゴンレーザー光凝固で間接的に血管閉塞をおこすより、マイクロ波凝固装置を用いて直接に血管を熱凝固させた方が網膜血管の閉塞と同時に硝子体変性および融解を促進させることができたと考えられた。ヒアルロン酸の場合、分解された低分子のヒアルロン酸は血管新生に促進的に働くともいわれており⁸⁾、硝子体を熱変性させたことは、成分であるヒアルロン酸の分解にもなり、虹彩ルペオースの発生に有利な条件と考えられた。

さらに Peyman⁵⁾によれば、低眼圧になれば虹彩血管の拡張がおこり、前房内への蛋白の流出、プロスタグランジンの放出があるという。その上に、循環の不全により虹彩や前房内に代謝産物が集積し、低眼圧により排除されにくくなり新生血管が発生するという考え方から、我々の実験でも低眼圧になるような操作を追加した。この結果、我々は lensectomy や vitrectomy の操作を行わないで4眼中4眼100%に虹彩ルペオースをみた。一般に臨床的には、虹彩ルペオースが発生すると虹彩表面から隅角部にかけて線維性血管膜が形成されて眼圧が上昇して血管新生緑内障へと進展していく。しかし、我々が作成した虹彩ルペオースでは、隅角部には何ら変化はなく眼圧上昇には至らなかった。低眼圧という状況下におかれたため、既存の毛細血管の拡張や虹彩実質の浮腫があり、より虹彩ルペオースが誇張されたものと思われた。しかし、強膜切開部位の創閉鎖により眼圧が正常化すると既存の毛細血管の拡張や虹彩実質の浮腫も軽減し、虹彩表面のルペオースは前境界層下に後退していったものと考えられた。

Nork³⁾の実験では、予め lensectomy や vitrectomy をしておき主幹網膜静脈を3本閉塞させる方法にて、5日後には虹彩実質血管の著明な拡張があり、内皮細胞には fenestration がみられたとされている。しかし、27日をすぎれば、それらの所見は明確でなくなるが、器質的な変化として著明なぶどう膜外反や虹彩面上に厚い線維性血管膜が形成したという。また、膜表面はなめらかで、主に虹彩実質細胞、メラ

ノサイト, 色素を含んだマクロファージ, コラーゲン基質で形成されており, その下方に壁の薄い血管がみられたとされている。一方, 強膜切除をおこない低眼圧下におかれた虹彩⁹⁾では, 変化をおこすまでの期間が7~8週と比較的遅く, 内皮細胞には多数の fenestration が存在していた。しかし, 隅角や虹彩面上にはぶどう膜外反や線維性血管膜などの変化はみられなかったという。

本報で, 我々が作成した虹彩新生血管の発生時期についても過去の実験報告と比較してもほぼ同時期に発生をみた。これまでに, 新生血管の発生には, 高度な網膜虚血を作成することが必要であり, また lensectomy や vitrectomy を追加した実験では, より早期に血管新生を来すといわれており, 虚血網膜からの血管新生因子が前眼部の虹彩に到達しやすいとも考えられていた。我々は, 形態的に観察しているのでそれらの生物活性因子の議論はできないが, 今回の実験方法では, マイクロ波凝固装置で硝子体にも熱変性を加えながら, 高度な網膜虚血の条件を作成すれば, lensectomy や vitrectomy をしなくても 100%虹彩新生血管を作成することができた。また, 組織学的には, 虹彩新生血管は既存の毛細血管と連絡しており, 新生血管の血管内皮細胞は活動性をしめしていた。

本論文の要旨は, 第94回日本眼科学会総会において西川

が報告した。稿を終えるにあたり, 宇山昌延教授の御校閲に深謝いたします。

文 献

- 1) 山秋 久: 猿眼における実験的虹彩新生血管の進展に関する検討。日眼会誌 89: 263-269, 1985.
- 2) Virdi PS, Hayreh SS: Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. Arch Ophthalmol 100: 331-341, 1982.
- 3) Nork TM, Tso MOM, Hayreh SS: Cellular mechanism of iris neovascularization secondary to retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol 107: 581-586, 1989.
- 4) Gu XQ, Packer AJ, Hoak JC, et al: Ocular neovascularization. Arch Ophthalmol 103: 111-117, 1985.
- 5) Peyman GA, Raichand M, Juarez CP, et al: Hypotony and experimental rubeosis in primate eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 224: 435-442, 1986.
- 6) Stefansson E, Landers MB, Wolbarsht ML, et al: Neovascularization of the iris: Experimental model in cats. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 361-364, 1984.
- 7) Anderson DM, Morin JD: Experimental anterior segment necrosis and rubeosis iridis. Canad J Ophthalmol 6: 196-201, 1971.
- 8) 三井洋司: 細胞増殖因子と血管新生。代謝 27: 1057-1063, 1990.