

実験的硝子体内血管新生モデル

須藤 史子, 北野 滋彦, 堀 貞夫

東京女子医科大学糖尿病センター眼科

要 約

有色家兎を用いて、硝子体内血管新生の実験モデルの作製を試みた。前処置として、滅菌空気0.3 mlを硝子体に注入して後部硝子体剝離を作製した。1週間後、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)を徐放剤である ethylene vinyl acetate copolymer (EVA)に包んでペレット状にしたものを、経強膜的に硝子体下腔に挿入した。同時に、Müller細胞に選択的毒性をもつDL- α -アミノアジピン酸(AA)2 mgを、硝子体へ注入した。2週間後には、検眼鏡的に、強膜穿孔創から硝子体内に挿入したb-FGFペレットを包み込むように形成された線維性増殖膜内に新生血管を認め、蛍光眼底造影では早期からペレットの周囲に蛍光色素の漏出をみた。病理組織学的には、電顕的観察において、新生血管の内皮細胞にfenestrationをみとめた。この方法は簡便であり、かつ再現性が高く、実験的硝子体内血管新生モデルとして有用である。(日眼会誌 96: 959-966, 1992)

キーワード：硝子体内血管新生、塩基性線維芽細胞成長因子、後部硝子体剝離、DL- α -アミノアジピン酸

An Experimental Model of Intravitreal Neovascularization in Rabbits

Chikako Suto, Shigehiko Kitano and Sadao Hori

Department of Ophthalmology, Diabetes Center, Tokyo Women's Medical College

Abstract

The author developed a consistent model of intravitreal neovascularization in the eyes of pigmented rabbits by incomplete posterior vitreous detachment after air injection followed by implantation of basic fibroblast growth factor (b-FGF; 250 ng or 1 μ g) in the vitreous and simultaneous intravitreal injection of DL- α -aminoadipic acid in physical saline solution (1 mg/kg). Newly formed vessels were observed in the proliferative fibrous membrane that surrounded the b-FGF pellet. In fluorescein angiography, we observed fluorescein leakage from the newly formed vessels. Histologically, the newly formed vessels showed fenestration of endothelial cells. This method provides an easy and consistent model to study neovascularization. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 959-966, 1992)

Key words: Intravitreal neovascularization, Basic fibroblast growth factor, Posterior vitreous detachment, DL- α -aminoadipic acid

I 緒 言

糖尿病網膜症をはじめとする網膜硝子体疾患におい

て、新生血管の発生は、新生血管および新生血管から続発する合併症によって視機能障害をもたらし、最終的には失明に至る重篤な状態である。したがって血管

別刷請求先：162 新宿区河田町8-1 東京女子医科大学糖尿病センター眼科 須藤 史子

(平成4年1月31日受付, 平成4年3月18日改訂受理)

Reprint requests to: Chikako Suto, M.D. Department of Ophthalmology, Diabetes Center, Tokyo Women's Medical College, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku 162, Japan

(Received January 31, 1992 and accepted in revised form March 18, 1992)

新生の発生機序に基づいて、新生血管の発生を阻止することは、視力予後を向上させる上で重要な課題である。

血管新生の発生機序は、血管内皮細胞基底膜の離断、血管内皮細胞の遊走増殖及び成熟化の各過程があり¹⁾²⁾、各過程にそれぞれ促進因子と抑制因子が存在することが明らかになってきている³⁾。また、血管新生の基礎研究は、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF)^{4)~7)}をはじめとする血管新生因子が同定、精製されたことから大きく進展した。b-FGFは、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成のいずれの段階も促進する強力な血管新生因子である。

一方、発生する血管新生の抑制を検討する上で、実験的に硝子体内血管新生の動物モデルを作製する必要がある。様々な方法での作製が試みられているが^{8)~14)}、容易に再現性の良い硝子体内新生血管を作製する方法は現在のところ確立されていない。今回我々は、網膜・硝子体血管新生に関与する因子を個別に検討し、有色家兎に、b-FGFを網膜前に挿入して、実験的硝子体内新生血管を容易に作製する方法を検討した。

II 実験方法

実験動物には体重2.5 kgから3.0 kgまでの有色家兎22匹44眼を用いた。ベレットは、250 ngと1 μ gのb-FGF (R & D社)を、徐放剤であるethylene vinyl acetate copolymer (EVA)で包んで作製した(以下250 ng b-FGF, 1 μ g b-FGFと略)。DL- α -アミノアジピン酸 (aminoadipic acid 以下AAと略)¹⁵⁾¹⁶⁾ (Sigma社)は、生理食塩水に溶解させた後、水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整し、投与量を1 mg/kgとした。有色家兎をベントバルビタールナトリウム (ネプタール®)麻酔 (20 mg/kg)し、さらに塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール®)にて点眼麻酔した。散瞳にはミドリンP®の点眼を行い、0.02%希釈のグルコン酸クロ

ルヘキシジン液 (ヒピテン®・グルコネート液)にて洗眼消毒したのち、表1に示す実験群にわけて実験した。

前処置として、全群に、後部硝子体剥離の作製を目的に、12時の毛様体扁平部に27 G針を用いて硝子体中に滅菌空気0.3 mlを注入した。気体の性質上、上方に後部硝子体剥離がしやすいため、1週間後に、検眼鏡的に確認したのち、12時の角膜輪部から約10 mm後方の強膜を18 G針にて穿孔したが、そのとき大量の硝子体下液が流出し、不完全ながらも後部硝子体剥離が出来ていることが確認された。穿孔部より、摂子を用いて表1に示した各ベレットを挿入した。また、毛様体扁平部から26 G針を用いて生理食塩水0.2 mlを注入することにより、ベレットを後部硝子体と網膜の間に挟まれるように固定した。AA投与群は、ベレット挿入後注入する生理食塩水0.2 mlに代わって、同量のAAを硝子体注入した。

予備実験として、1 μ g b-FGFの徐放性を確認するために長期観察したところ、血管新生発生例の経過は、1 μ g b-FGF固定後10日から2週後に新生血管が出現し、4週以降に退縮傾向を示した。したがって、各群は2週間眼底検査を行い、必要に応じて蛍光眼底検査を施行した。また各群の動物は観察終了時に屠殺し、眼球を摘出した。摘出眼球は毛様体部を角膜輪部に平行に切開を加え試料を細切した。網膜前増殖組織を2.5%グルタルアルデヒド及び1%四酸化オスミウムで型の通り固定後、エタノール系列にて脱水、エポキシ樹脂にて包埋した。厚切り切片はトルイジンブルー染色によるものを光学顕微鏡下にて観察した。超薄切片は、酢酸ウラニール、クエン酸鉛の二重染色を

表2 各実験群における網膜剥離、増殖膜および新生血管の観察結果

実験群	網膜剥離	線維性増殖膜	新生血管(発生率)
I	0/4眼	0/4眼	0/4眼 (0%)
II	0/4	0/4	0/4 (0%)
III	0/9	9/9	0/9 (0%)
IV	1/9	9/9	3/9 (33.3%)
V	0/8	8/8	1/8 (12.5%)
VI	4/10	10/10	9/10 (90.0%)

表3 アミノアジピン酸 (AA) 注入群と非注入群の比較

実験群	AA	新生血管	(発生率)
III・V	AA(-)	1/17眼	(5.9%)
IV・VI	AA(+)	12/19	(63.2%)

表1 各実験群

実験群	血管新生因子	硝子体注入
I	EVAのみ	生理食塩水
II	EVAのみ	AA
III	EVA+b-FGF 250 ng	生理食塩水
IV	EVA+b-FGF 250 ng	AA
V	EVA+b-FGF 1 μ g	生理食塩水
VI	EVA+b-FGF 1 μ g	AA

AA: DL- α -アミノアジピン酸

施して透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7000) にて観察した。

III 結 果

各群の観察結果を表2・表3に示した。挿入したb-FGFのペレットは、髄翼上にのるかあるいはかなり髄翼に近い位置におさまリ、観察期間中を通じて挿入時と同様の位置に確認された。硝子体内新生血管は、眼底検査において、網膜前の線維性増殖膜に血管を明らかに認めるものとしたが、線維性増殖膜のみと思われたものは、蛍光眼底検査を施行し、増殖膜からの、静注早期での蛍光色素のびまん性漏出の有無を検討した。さらに病理組織学的に観察し最終結果を判定した。

I群とII群は血管新生因子を含まない対照群であり、眼底・蛍光眼底検査において、全例とも線維性増殖膜および新生血管の発生をみなかった。AAを硝子体注入したII群は、AAの影響で翌日から2週間後まで、髄翼内の血管の拡張および蛇行がみられ、網膜の色調がやや白濁していた。

III群とIV群は、250 ng b-FGFを血管新生因子として用いたものであり、生理食塩水を硝子体注入したIII群では、9眼中全例に強膜穿孔創からペレットの根元までの軽度の線維性増殖膜がみられたが、新生血管の発

生は確認されなかった。AAを硝子体注入したIV群では、9眼中全例に同様の線維性増殖膜がみられ、そのうち3眼(33.3%)に新生血管の発生を確認した。

V群とVI群は、1 μ g b-FGFを血管新生因子として用いたものであり、生理食塩水を硝子体注入したV群では、同様の線維性増殖膜が全例にみられ、8眼中1眼(12.5%)に新生血管の発生を認めた。AAを硝子体注入したVI群では、全例に強膜穿孔創からペレットを包み込む様に線維性増殖膜がみられ、10眼中9眼(90.0%)と高率に新生血管を確認した。新生血管の発生をみなかった1眼は、髄翼血管の拡張や網膜の白濁など、検眼鏡的にAAの変化がみられないものであった。

AA注入について比較してみると、AAを硝子体注入しなかったIII群・V群は17眼中1眼(5.9%)にしかな新生血管を確認できなかったのに対し、注入したIV群・VI群では、19眼中12眼(63.2%)とAAの注入により新生血管の発生率を高めることが出来た。

経過観察中、限局性の網膜剝離を44眼中5眼にみたが、網膜剝離の有無は血管新生の程度に相違を見ることはなかった。また検眼鏡的に上記した以外に、前房や硝子体に炎症細胞の浮遊などの炎症所見は観察されなかった。

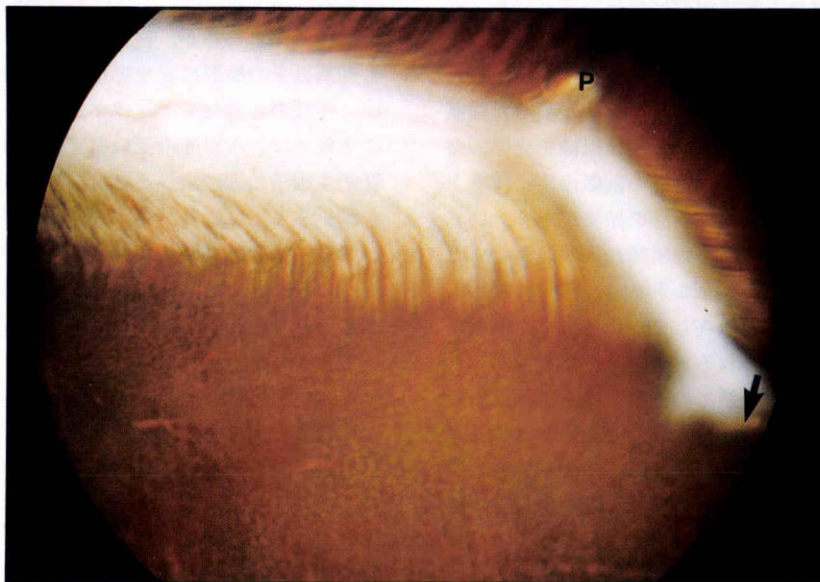


図1A 家兎の眼底写真。

アミノアジピン酸注入後の反応である髄翼内血管の拡張・蛇行および強膜穿孔創(p)と髄翼上のペレット(b-FGF 1 μ g)(矢印)および髄翼部にかけて線維性の増殖膜の形成を認める。

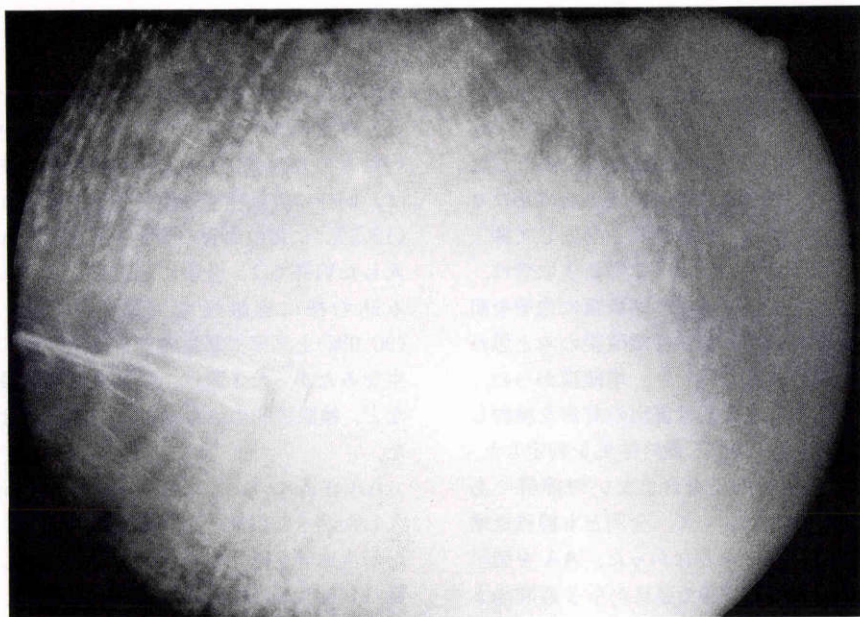


図1B 蛍光眼底検査早期（静注 97 秒後）像。
ペレットと線維性増殖膜に蛍光剤の漏出を認める。

これら硝子体内新生血管が明らかになった検査所見を示す。眼底検査では、強膜穿孔創からペレットを包み込むように薄い線維性増殖膜が形成されていた（図1A）。増殖膜に隠れて新生血管は確認できないが、蛍光眼底検査において、ペレットの回りの増殖膜に一致して、静注早期からびまん性の蛍光色素の漏出がみられた（図1B）。ペレットを挿入した際に作製した強膜穿孔創から硝子体中に立ち上がる増殖組織を光学顕微鏡で観察したところ、穿孔部付近の創傷治癒に伴う上強膜血管の侵入および脈絡膜血管の拡張があり、いくつかの小血管が硝子体中の増殖組織に入り込んでいた（図2A）。この増殖組織は線維芽細胞と膠原線維からなり、その中に小血管が散在していた。また、網膜色素上皮細胞によると思われるメラニン色素顆粒がみられた（図2B）。電子顕微鏡での観察では、新生血管は内皮細胞と不連続にこれを取り囲む壁細胞および基底膜で構成されていた（図3A）。また、内皮細胞には窓（fenestration）がみられ、脈絡膜血管と類似した形態を示していた（図3B）。

IV 考 按

1. 実験モデル

眼内血管新生の研究を行うのに、網膜硝子体内血管

新生の動物実験モデルは非常に重要かつ必要であるため、古くから化学刺激⁸⁾、外傷⁹⁾、網膜血管の閉塞¹⁰⁾、大量の酸素投与¹¹⁾、硝子体内腫瘍細胞片移植¹²⁾、硝子体内培養線維芽細胞注入¹³⁾¹⁴⁾による実験モデルが報告されている。ところが、組織への侵襲が大きく、血管新生抑制効果の検討にまで応用できるほどの再現性の高い、手技の容易なモデルはまだ報告されていない。そこで我々は、再現性の高い血管新生因子、理想的な血管新生因子の固定法、そして血管新生を促進する条件を揃えることにより、効率よく網膜硝子体内血管新生がおこり、実験モデルが作製できると考えた。これら三つの因子として、b-FGFの挿入、後部硝子体剝離の利用、AAの硝子体注入を選び、実験モデルの作製について検討した。

2. 血管新生因子

血管新生因子として用いたb-FGF^{4)~7)}は、既に、角膜において、250 ng b-FGF ペレットを半層切開を加えた角膜に挿入することにより、再現性のある新生血管を作製することができるため、血管新生を抑制する薬剤の定性や定量に応用されている⁵⁾。また、糖尿病網膜症をはじめとする硝子体内新生血管を来す疾患において、b-FGFは網膜血管の基底膜に存在することが免疫組織化学的に確認されており⁶⁾、実験的に網膜血管の

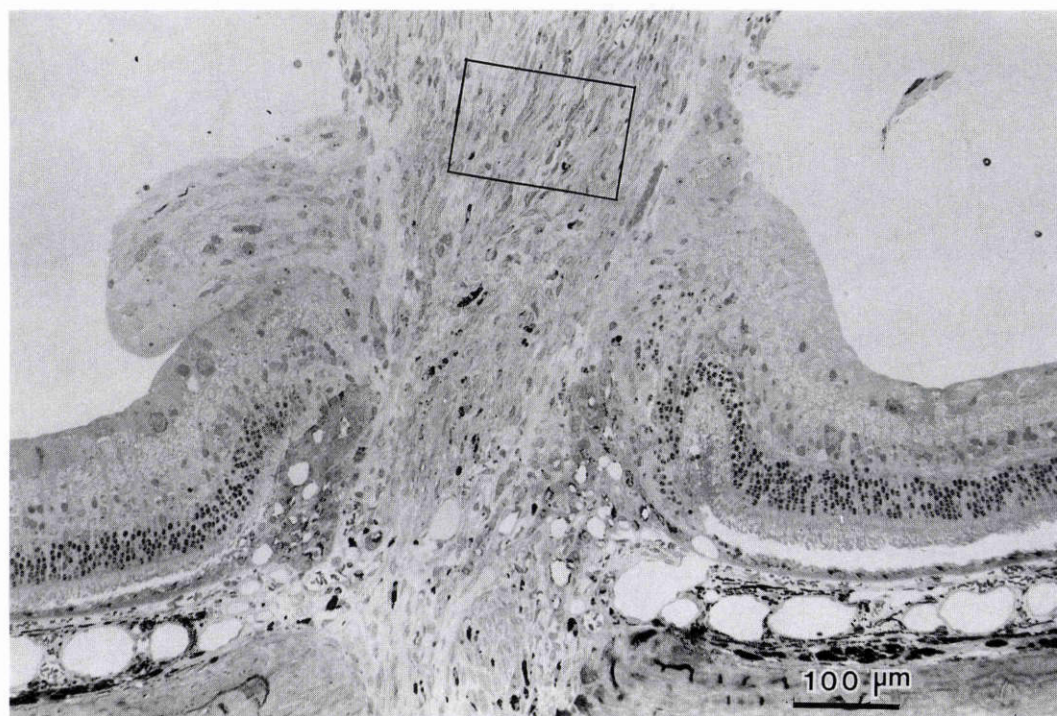


図2A 強膜穿孔部の光顕像。

穿孔部の脈絡膜血管が拡張し硝子体内増殖組織中に入り込んでいる。トルイジンブルー染色(×130)。

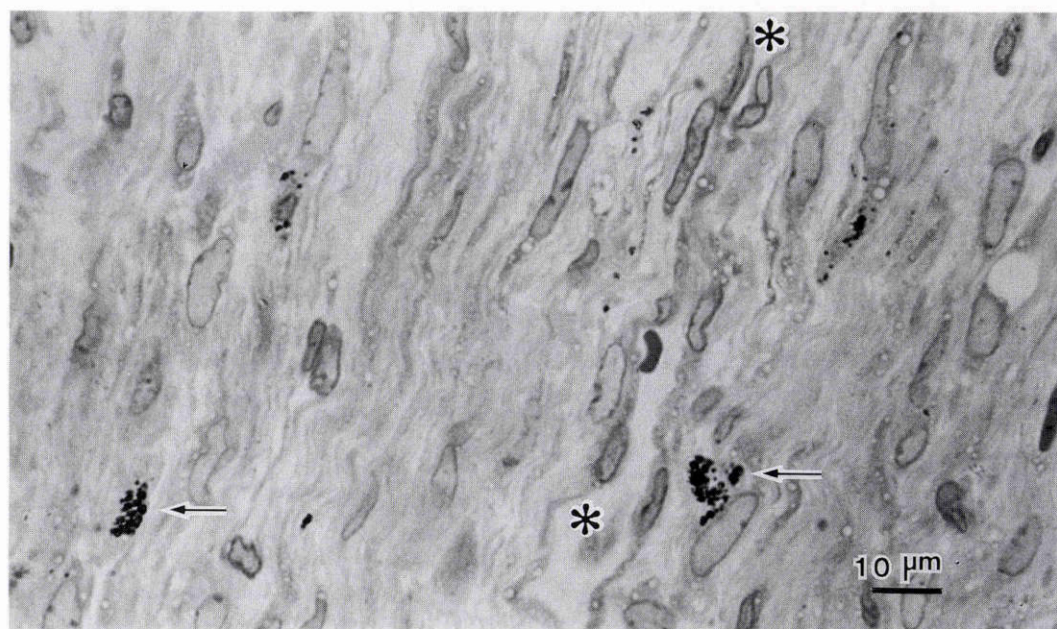


図2B 硝子体内増殖組織の光顕像。

図2Aの枠内の強拡大、線維芽細胞と膠原組織から成る増殖組織内に血管腔(*)が認められる。組織内にはメラニン色素顆粒がみられる。(矢印)。トルイジンブルー染色(×840)。



図3A 硝子体内増殖組織の電顕像。
薄い内皮細胞と壁細胞から構成された小血管が認められる (×2,700)。

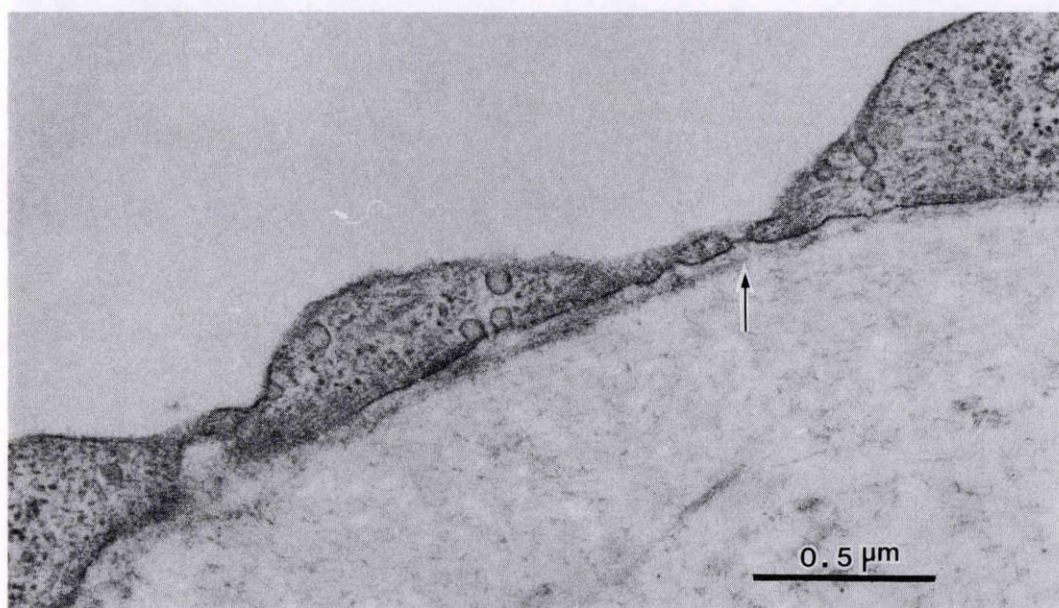


図3B 図3Aの枠内の強拡大。
新生血管の内皮細胞には、窓 (fenestration) (矢印) を認める (×47,400)。

増殖に b-FGF が関与しているという報告⁷⁾がある。もし、b-FGF が硝子体内新生血管における血管新生因子の一つとして存在するのなら、b-FGF を眼内に投与して硝子体内新生血管を作製することが可能と考えた。しかしながら、b-FGF ベレットの単独投与のみでは、硝子体内新生血管の発生はみられなかった。その一因に、これらの実験モデルでの新生血管の発現は、b-FGF、腫瘍細胞片および培養線維芽細胞などの血管新生促進因子が網膜血管に直接接触する必要があることがあげられる。この条件を満たすために、我々は次に述べる後部硝子体剥離を利用した。さらに、血管新生因子の容量については、角膜モデルでの 250 ng と 4 倍量の 1 μ g とを用い比較してみた。III群・IV群とV群・VI群を比較して明らかのように、1 μ g のベレットを用いたV群・VI群に血管新生が起こる確率が高かった。従って、血管新生因子の作用には容量依存性があることが示唆された。

3. 後部硝子体剥離

血管促進因子の理想的な固定法として、我々は後部硝子体剥離を利用した。家兎の視神経乳頭は硝子体癒着が強固で、気体のみではこれを剥離できないため、Miller ら¹⁷⁾や Thresher ら¹⁸⁾の報告にあるように、実際は不完全後部硝子体剥離となっていたが、空気注入により人工的に後部硝子体剥離を作製し、b-FGF ベレットを後部硝子体と網膜の間に挿入し、硝子体液を排液後に、毛様体扁平部から生理食塩水を注入して網膜面と後部硝子体面に挟まれるように固定する方法を試みた。血管新生因子の固定法については、網膜血管との直接接触が必要であるために、b-FGF ベレットを網膜鉗や 8-0 ナイロン糸の縫着による固定法が報告されているが¹⁹⁾、手技が煩雑であり、経硝子体的に固定するため眼内炎の危険性が増す。その点、後部硝子体剥離の作製は、空気注入時に白内障を併発することがあるが、前者に比較して手技が単純であること、また b-FGF ベレットを血管と直接接触させておくのに充分であり、理想的な血管新生因子固定法と思われた。

4. DL- α -アミノアジピン酸 (AA)

生理食塩水を注入したIII群・V群では、b-FGF ベレットを網膜上に固定でき、強膜穿孔創からベレットにかけて線維性増殖膜を全例に認めたのに対し、17 眼中 1 眼 (5.9%) にしか新生血管の発生を認めなかった。このことから、血管新生の発生機序のうち、血管内皮細胞の基底膜融解、遊走の段階での障害を想定し、網膜に毒性を持つアミノ酸のうち Müller 細胞に選択的

毒性を持つ AA を選び、AA 2 mg をベレット挿入後の生理食塩水に代えて、硝子体内注入した。AA を注入したIV群・VI群は 19 眼中 12 眼 (63.2%) と、血管新生因子と AA の併用で新生血管の発生率をかなり高めることができた。AA の作用については、AA を 10 mg/ml の濃度で硝子体内へ注入すると、Müller 細胞に著明な浮腫がおこる。特に無髄神経線維部の網膜では、Müller 細胞の核染色性の低下、クロマチンの凝集、胞体とその突起の腫脹がみられ、腫脹は特に神経線維層と神経節細胞層において顕著であり、有髄神経線維部の網膜では Müller 細胞に加えて乏突起神経膠細胞にも変化が及ぶことが知られている¹⁵⁾。他のアミノ酸と比較しても、AA が組織学的に Müller 細胞に選択的毒性をもつことが確認されている¹⁶⁾。Müller 細胞は、感覚網膜において基底部を内境界膜にもち、その先端部は視細胞にまで達する網膜固有のグリア細胞である。グリア細胞は、血管内皮細胞間の tight junction 形成に関与することから²⁰⁾、Müller 細胞が網膜血管内皮細胞の血管形成に何らかの役割を果たしていることが示唆される。Müller 細胞の変化が可逆的か不可逆的かは、今回の実験においては明らかなことはわからないが、硝子体へ血管が進入するためには、Müller 細胞自体、Müller 細胞の基底膜である内境界膜や網膜血管の基底膜への障害が必要であり、新生血管の形成には健全な Müller 細胞を一過性にでも損傷することが条件の一つと考えられた。

5. 実験モデルでの新生血管の検討

b-FGF を挿入した時に作られた強膜穿孔創から、髄翼上のベレットにかけて線維性増殖膜がみられ、その中に新生血管の発生が認められたが、この新生血管の起源について検討した。家兎はヒトと網膜血管の分布が異なり、髄翼部を除いては網膜は無血管であることから、穿孔した部位を介して脈絡膜由来の血管が増殖膜に伸展した場合と、髄翼部の網膜血管が増殖膜により牽引され伸展してきた場合とがある。b-FGF を挿入するときに作られた強膜穿孔部における創傷治療作用として、上強膜血管が、結合織とともに侵入した可能性も否定できないが、今回の病理組織学的検索では、連続切片での観察から、脈絡膜血管が強膜穿孔創を通じ、周囲の細胞線維性結合織とともに硝子体中に増殖侵入してきたものと考えられた。

また、網膜下新生血管の発育、発生には、局所の炎症が直接的な引金（促進因子）になっているという報告がある²¹⁾。AA を硝子体注入すると、検眼鏡的に髄翼

血管の拡張と蛇行および網膜の白濁化が観察された。このモデルにおいても、薬物による炎症性反応は否定できないが、今回の実験（II群）からでは、局所の炎症が血管新生の直接的原因となったとは言い難いと考えられた。

このように、網膜硝子体内血管新生を容易にかつ効率よく作成する方法として、血管新生因子である b-FGF の挿入、後部硝子体剥離によるペレットの固定、Müller 細胞に選択的毒性を持つ AA の硝子体注入、と三つの過程を試作したところ、高率に硝子体内新生血管の発生が認められた。AA と硝子体内血管新生の因果関係は、今後の検討が必要であると思われるが、このモデルは、方法も簡便であり、再現性も高く、血管新生に対する抑制効果判定の検討にも有用なモデルであると思われる。

本論文の要旨は第 94 回日本眼科学会（平成 2 年 5 月、岡山）にて口演した。

文 献

- 1) Glaser BM: Cell biology and the phenomenon of intraocular neovascularization, in Alder R, Farber D (eds): The Retina part II, Orlando, Academic press, 215—243, 1986.
- 2) 菅 幹雄: 血管内皮細胞と新生血管. 代謝 25: 895—901, 1988.
- 3) Glaser BM: Extracellular modulating factors and the control of intraocular neovascularization. Arch Ophthalmol 106: 603—607, 1988.
- 4) Sommer A, Brewer MT, Thompson RC, et al: A form of basic fibroblast growth factor with an extended amino terminus. Biochem Biophys Res Comm 144: 543—550, 1987.
- 5) 須藤勝一, 藤田 剛: 新生血管とその制御—新薬開発研究の立場から—. 眼紀 40: 1431—1443, 1989.
- 6) Hanneken A, Luty GA, Mcleod DS, et al: Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. J Cell Phys 138: 115—120, 1989.
- 7) de Juan E, Stefansson E, Ohira A, : Basic fibroblast growth factor stimulates ³H-thymidine uptake in retinal venular and capillary endothelial cells in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1238—1244, 1990.
- 8) Imre G: Studies on the mechanism of retinal neovascularization. Br J Ophthalmol 48: 75—82, 1964.
- 9) Deem CW, Futterman S, Kalina RE: Induction of endothelial cell proliferation in rat retinal venules by chemical and indirect physical trauma. Invest Ophthalmol 13: 580—585, 1974.
- 10) Hamilton AM, Marshall J, Kohner EM, et al: Retinal new vessel formation following experimental vein occlusion. Exp Eye Res 20: 493—497, 1975.
- 11) Ashton N, Ward B, Serpell G: Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. Br J Ophthalmol 38: 397—432, 1954.
- 12) Finklestein D, Brem S, Patz A, et al: Experimental retinal neovascularization induced by intravitreal tumors. Am J Ophthalmol 83: 660—664, 1977.
- 13) Tano Y, Chandler DB, Machemer R: Retinal neovascularization after intravitreal fibroblast injection. Am J Ophthalmol 92: 103—109, 1981.
- 14) Hida T, Chandler DB, Sheta M: Classification of the stages of proliferative vitreoretinopathy in a refined experimental model in the rabbit eye. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 225: 303—307, 1987.
- 15) 石川祐二郎, 三根 茂: アミノアジピン酸の網膜グリア細胞毒性に関する形態学的研究. 日眼会誌 86: 810—820, 1982.
- 16) 橋本 恵, 根本 昭, 河野真一郎, 他: Amino adipic acid の家兎網膜における作用点は Müller 細胞か Synapse か—組織学的検討—. 日眼会誌 86: 348—352, 1982.
- 17) Miller B, Lean JS, Miller H, et al: Intravitreal expanding gas bubble. A morphologic study in the rabbit eye. Arch Ophthalmol 102: 1708—1711, 1984.
- 18) Therasher RJ, Ehrenberg M, Machmer R: Gas-mediated vitreous compression: An experimental alternative to mechanized vitrectomy. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 221: 192—198, 1984.
- 19) 田野保雄: 血管新生と手術. 日眼会誌 94: 1122—1147, 1990.
- 20) Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW: Tight junction of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. J Neuroscience 7: 3293—3299, 1987.
- 21) Ishibashi T, Miller H, Orr G, et al: Morphologic observations on experimental subretinal neovascularization in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1116—1130, 1987.