実験的家兎網膜血管閉塞症における後期病変

田 村 正 人
弘前大学医学部眼科学教室

要 約

家兎網膜血管に経外膜的トロンビン滴下法により実験的網膜血管閉塞症を作成し，その後期変化を病理組織学的に検索した．3か月後には奇網状を呈する血管や動静脈吻合が観察され，ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本では毛細血管床の閉塞，血管から色素の漏出および新生血管の発生がみられた．また，光学顕微鏡においてトロンビン滴下後狭細を示した細静脈は，3か月後にはほぼ正常に回復しているものの，細動脈には著しい狭細がなおも存在し，管腔内には閉塞性病変を認めた．透過型電子顕微鏡による観察では，新生血管が確認された．すなわち内皮細胞が大型の核を有し，多数のリボゾームを含み，基底膜が薄く不連続である血管が確認された．さらに増殖性の変化として，グリア細胞が抜け殻様血管の基底膜を破り侵入している所見もみられた．以上により長期経過観察を行うと，増殖性の変化や新生血管の発生を来すことが確認された．（日眼会誌 98：175—182, 1994）

キーワード：実験的網膜血管閉塞症，新生血管，増殖性変化，トロンビン，長期経過観察

Neovascularization in Experimental Retinal Venous Obstruction in Rabbit

Masato Tamura
Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

Abstract

Experimental retinal venous obstruction was produced in rabbit eyes by transadventitial instillation of thrombin for the purpose of studying the late stage of histopathological changes in the retina. Three months after the instillation, abnormal vessels and compensatory shunt vessels were observed by ophthalmoscopy. Capillary obstruction, blood leakage from venules and neovascularization were observed on gelatin-fluorescein injected flat preparations of the retina three months after the thrombus formation. Although venular lumina were first narrowed and restored to normal three months after thrombin instillation, the lumina of arterioles remained narrow and intraluminal fibrin thrombi were present in the arterioles more than three months later in light microscopy. In electron microscopy many ribosomes and large nuclei were observed in newly formed retinal vessels, and their basement membranes were thin and discontinuous. Ghost vessels penetrated by glial cell processes were also found in the proliferative tissues. These results suggest that neovascularization occurs when the intraretinal damages last more than 3 months after the onset of thrombogenesis. (J Jpn Ophthalmol Soc 98 : 175—182, 1994)

Key words: Experimental retinal venous obstruction, Newly formed vessel, Proliferative changes, Thrombin, Long course observation

I 緒 言

網膜中心静脈閉塞症は，臨床的にも遭遇頻度の高い眼循環障害の一つであり，放置すると，末期には増殖性の変化や新生血管の出現を来す疾患である．しかし，1878年にMichel[1]によりはじめて記載された本疾患に対する確実な治療法は，現在なお確立されたとはいい得ない状況である．その原因の一つとしては，本疾患の研究に役

別刷請求先：036 青森県弘前市在府町5 弘前大学医学部眼科学教室 田村 正人
（平成5年7月19日受付，平成5年9月17日改訂受理）
Reprint requests to: Masato Tamura, M.D. Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine. 5 Zaifucho, Hirosaki-shi, Aomori-ken 036, Japan
(Received July 19, 1993 and accepted in revised form September 17, 1993)

立つ適当な動物疾患モデルの開発が不十分であり，その結果，実験病理組織学的な検索もまた不十分であることがあげられる．すなわち，現在まで試みられた実験的網膜静脈閉塞症の手法は，そのいずれもがレーザー光線を用いたり[2)~6)]，機械的に結紮する[7)]などの血管壁全体を損傷してしまうような物理的手段を用いており，本症の初期主症状である網膜出血の発現機序や吸収機転の研究には不向きなものばかりであるといえる．

一方，桜庭[8)]は，血管周囲の結合織中に存在するトロンボプラスチンが外因性凝固機転の発動に関与していることから，家兎網膜静脈壁にトロンビンを滴下して，血管や組織に機械的損傷を与えることなく血栓形成が可能であることを報告した．この新しい実験系の初期病変については，桜庭[8)]の他，松本[9)]による報告を認めるが，長期にわたる観察は十分になされておらず，著者ら[10)]の報告があるのみである．そこで今回は，この新しい疾患モデルが果たして人眼のように後期病変としての増殖性変化や新生血管の発芽を来すかどうかを確認することを目的にし，さらに長期にわたる病理組織学的ならびに電子顕微鏡的検索を行ったので以下に報告する．

II 実験材料および方法

本実験には予め眼底検査を行って，異常のないことを確認した月齢5か月前後の体重約2.5 kgの白色家兎10匹を用いた．実験手技は，これらの家兎に対し，桜庭[8)]の方法により，まずミドリンP®の点眼にて散瞳を行い，次いで体重1 kgあたり25 mgのペントバルビタールナトリウム（ネンブタール®）をその耳介静脈内注入により麻酔した後にGoldmann型眼底観察用コンタクトレンズを角膜上に装着し，手術用顕微鏡下に眼底を観察しながら毛様体扁平部から27 G針を硝子体腔内に刺入し，直視下に前述のトロンビン溶液0.01 ml（5単位）を網膜血管

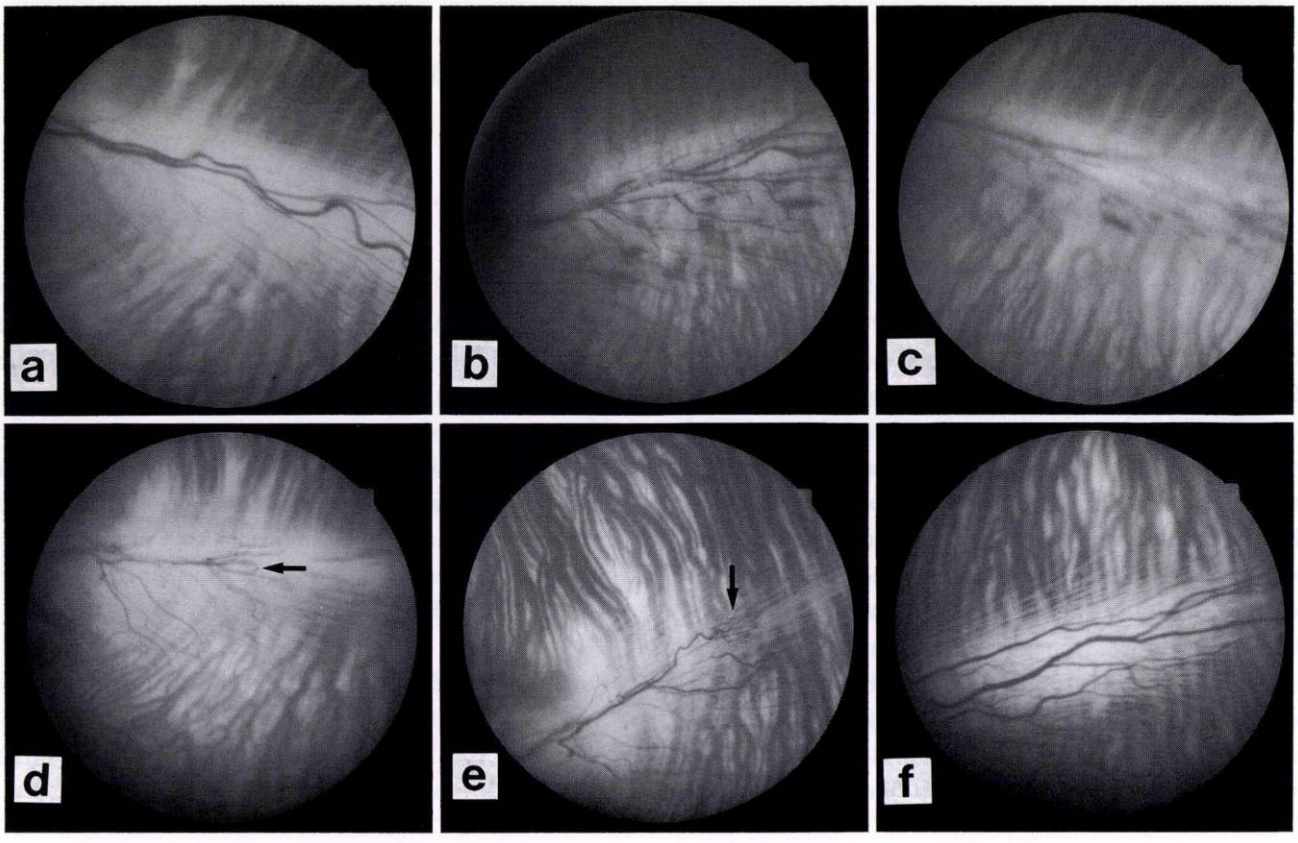

図1a トロンビン滴下前の眼底写真．

図1b トロンビン滴下24時間後の眼底写真．
細静脈は拡張し，血管翼に沿った点状，線状ならびに火焔状出血をみる．

図1c トロンビン滴下1週間後の眼底写真．
出血は減少している．

図1d トロンビン滴下1か月後の眼底写真．
トロンビン滴下後にみられた網膜出血は完全に吸収され，細静脈は収縮し，代わってループ状の動静脈吻合の発達がみられる（矢印）．

図1e トロンビン滴下3か月後の眼底写真．
血管翼の末梢の先端部に奇網状を呈する血管がみられる（矢印）．

図1f 対照例．
生理的食塩水滴下3か月後の眼底写真．異常所見はみられない．

上に滴下した．トロンビン溶液は，持田製薬社製のトロンビン乾燥凍結剤5,000単位を実験時に生理的食塩水10 mlで溶解して作成した．対照には別の家兎2匹を用い，生理的食塩水0.01 mlのみを滴下した．

これらの家兎に対する眼底観察および眼底写真撮影は，それぞれトロンビン滴下前，24時間後，1週間後，1か月後，3か月または1年後に行い，5匹10眼は3か月，5匹7眼は1年に達した時点で，ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展法[11]に始まる一連の組織学的な検索を行った．すなわち，10%ゼラチン水溶液4 ml，10%フルオレセインナトリウム（フルオレサイト®）溶液1 mlの混合液を静注して眼球への到達を確認した後，ペントバルビタールナトリウムを過剰投与し，心停止を待って直ちに眼球を摘出して2分割し，その後部半分を2%グルタールアルデヒド中へ浸漬しつつ脈絡膜を除去し，網膜のみを細切して螢光顕微鏡で観察した．次いで，さらに2%グルタールアルデヒドでの浸漬固定を追加した後に2%四酸化オスミウムにて後固定を行い，アルコール系列脱水，プロピレンオキサイド浸漬を経てエポキシ樹脂に包埋した．これらの包埋試料は，まず準超薄切片を作成してトルイジンブルー染色下に光学顕微鏡で観察，さらに超薄切片として後ウラン鉛二重染色を行って透過型電子顕微鏡による観察を行った．

III 結　果

1. 検眼鏡的所見

トロンビン滴下24時間後には，滴下部上流の主幹細静脈は滴下前（図1a）に比べて明らかに拡張し，同側の血管翼に沿った点状，線状の火焔状出血を全例で確認した（図1b）．このトロンビン滴下後にみられた網膜出血は，2～3日後から次第に減少しはじめ，1か月後には完全に吸収された．また，24時間後にみられた主幹細静脈の

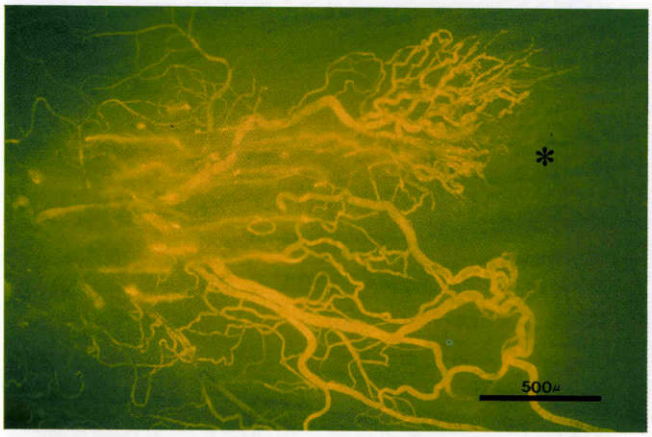

図2　トロンビン滴下3か月後の組織所見．
末梢に無血管閉塞野（＊印）と見なせる無灌流領域が広範にみられ，奇網状を呈する異常血管をみる．ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本．螢光顕微鏡写真．

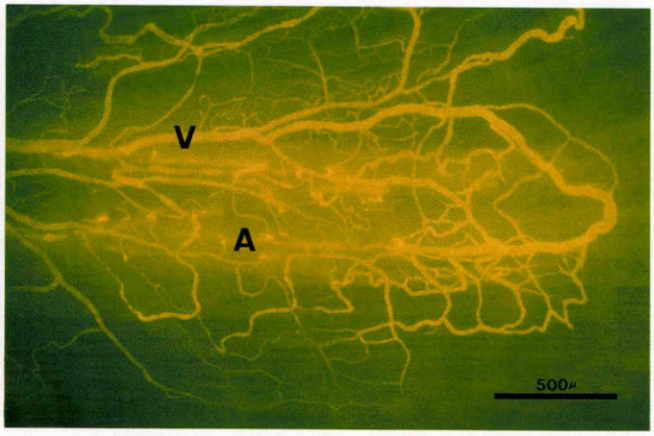

図3　トロンビン滴下3か月後の組織所見．
細静脈管径（V）はほぼ正常に回復しているものの，伴行細動脈（A）には著しい狭細がなおも存在している．ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本．螢光顕微鏡写真．

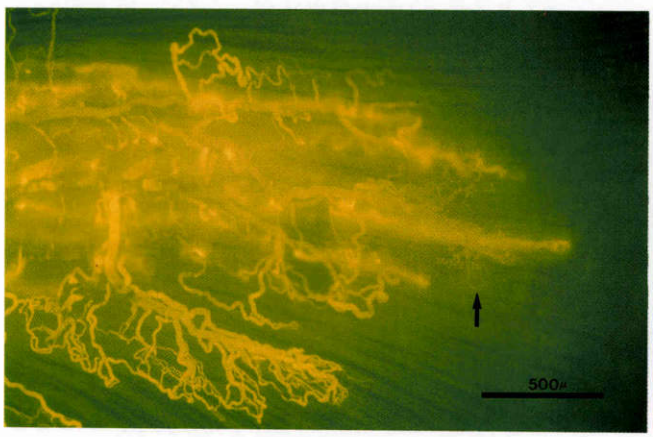

図4　トロンビン滴下3か月後の組織所見．
血管翼末梢の先端部に奇網状を呈する新生血管の発生をみる（矢印）．ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本．螢光顕微鏡写真．

図5　トロンビン滴下1年後の組織所見．
末梢で毛細血管の拡張（矢印）のみがみられ，新生血管の発生はみられない．ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本．螢光顕微鏡写真．

拡張は1週間後に消失し（図1c），1か月後では逆に収縮していた（図1d）．さらに，この1か月後から側副血行路と思われるループ状の動静脈吻合が次第に発達しはじめ，それと平行して，収縮していた細静脈の管径の回復がみられ出し，3か月後には静脈血柱はほぼトロンビン滴下前の状態に復していた（図1e）．この時期には，血管翼の末梢端に出現した奇網状を示す血管が10眼中6眼に確認された（図1e）．この奇網状の血管は1年後のものにもみられ（7眼中4眼），その大きさや形態には，3か月の例とほとんど差がなかった．対照群では全経過を通じて異常所見は観察されなかった（図1f）．

2．ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本所見

トロンビン滴下3か月後の所見では末梢での血管閉塞野とみなされる無灌流領域が広範にみられ，その周囲に動静脈吻合など，本来は存在しない異常血管が必ず観察された（図2）．一方，細静脈管径はすでに対照群と大差がない状態に回復していたが，伴行細動脈にはなお著しい狭細が存在していた（図3）．さらに，末梢では血管から明らかなゼラチン加フルオレセインの漏出がみられ，そのような血管からは，微細ながら，奇網状を示す新生血管の発生が確認された（図4）．しかし，末梢で毛細血管の拡張をみたものには1年の経過後も奇網状の血管はみられなかった（図5）．対照群では，類似の異常所見は全くみられなかった．

3．光学顕微鏡および電子顕微鏡所見

前項のゼラチン加フルオレセインの漏出がみられた部位には，前報[9][10]のような基底膜と内皮とが解離した状態や，内皮細胞を欠く抜け殻様血管が高頻度にみられ，そのような血管の近位には，内腔の閉塞した細動脈をみることが多かった（図6a）．また漏出血管の周囲網膜には，硝子体側から網膜神経線維層内へ深く入り込む比較的管腔の広い血管がみられ（図6b），さらには逆に網膜側から硝子体へ向かう増殖組織も確認された（図6c）．

電子顕微鏡による観察では，螢光漏出部に一致して，顆粒の消失した血小板の凝集塊が管腔内にみられた血管（図7）や，内皮細胞が消失した抜け殻様血管の両者が存在していた．なお，この抜け殻様血管の一部では，残存基底膜を破ったグリア細胞が血管内腔へ進入している所見も観察された（図8）．また，図4cのような奇網状を呈する血管の内皮細胞は核対細胞質比が非常に大きく，細胞質内に多数の粗面小胞体を含んでおり，その基底膜は非常に菲薄で，一部には明らかな不連続部をも認めた（図9）．さらに別の例では，網膜面上に内境界膜を破ってグリア細胞が硝子体腔内に増殖している所見も観察された（図10）．

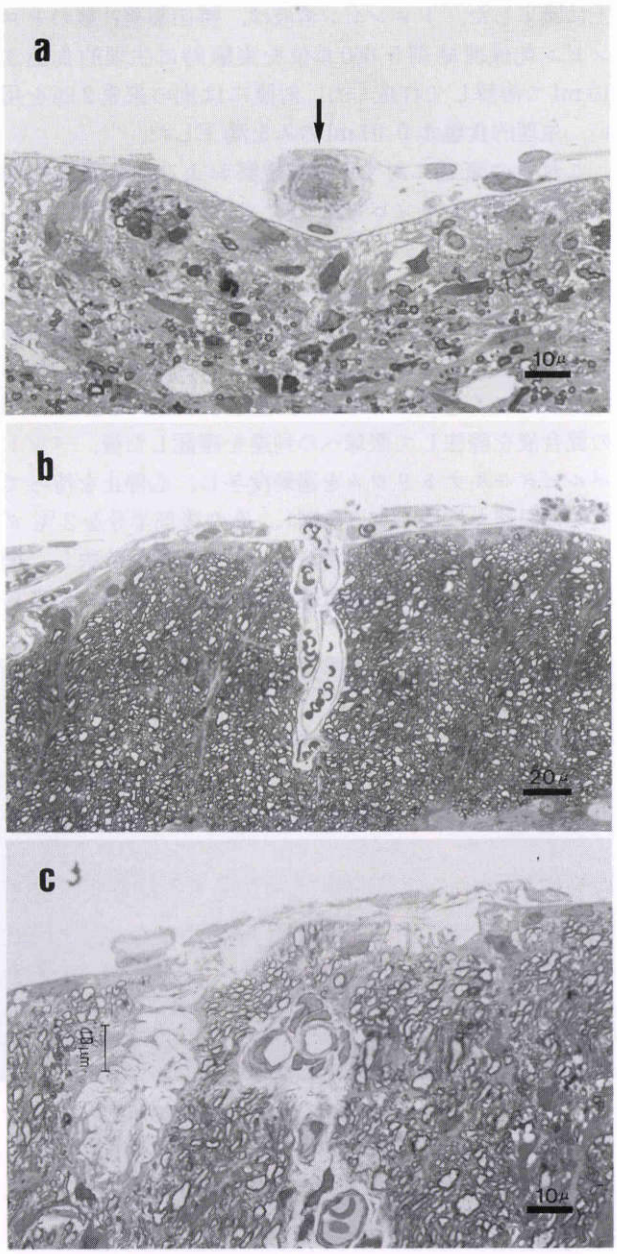

図6a トロンビン滴下3か月後の網膜所見．
3か月を経ても細動脈内にはフィブリン塊がみられ，閉塞性病変を有していた（矢印）．トルイジン青染色．光学顕微鏡写真．

図6b トロンビン滴下3か月後の組織所見．
硝子体側より網膜神経線維層内に深く入り込む管腔の広い血管が観察された．トルイジン青染色．光学顕微鏡写真．

図6c トロンビン滴下3か月後の網膜所見．
網膜神経線維層内から硝子体腔内へ向かう増殖組織を認める．トルイジン青染色．光学顕微鏡写真．

IV 考 按

本実験系は，緒言でも述べたとおり，管壁あるいは周囲組織を損傷させることなく家兎網膜静脈に血栓性の閉塞を生ぜしめ，しかも，確実に出血にまで至らしめ得ることから，人眼の網膜静脈閉塞症の発生機序，および臨床経過にきわめて近い優れたものである．前回，我々はこのモデルについて以下の結果を報告した[10]．すなわち，実験的静脈閉塞症の後期病変の主な所見として，内皮を失った基底板のみがみられる，いわゆる抜け殻様血管

図7　トロンビン滴下3か月後.
閉塞部血管管腔内には顆粒の消失した血小板の凝集塊を認める．P：血小板，L：管腔，電子顕微鏡写真

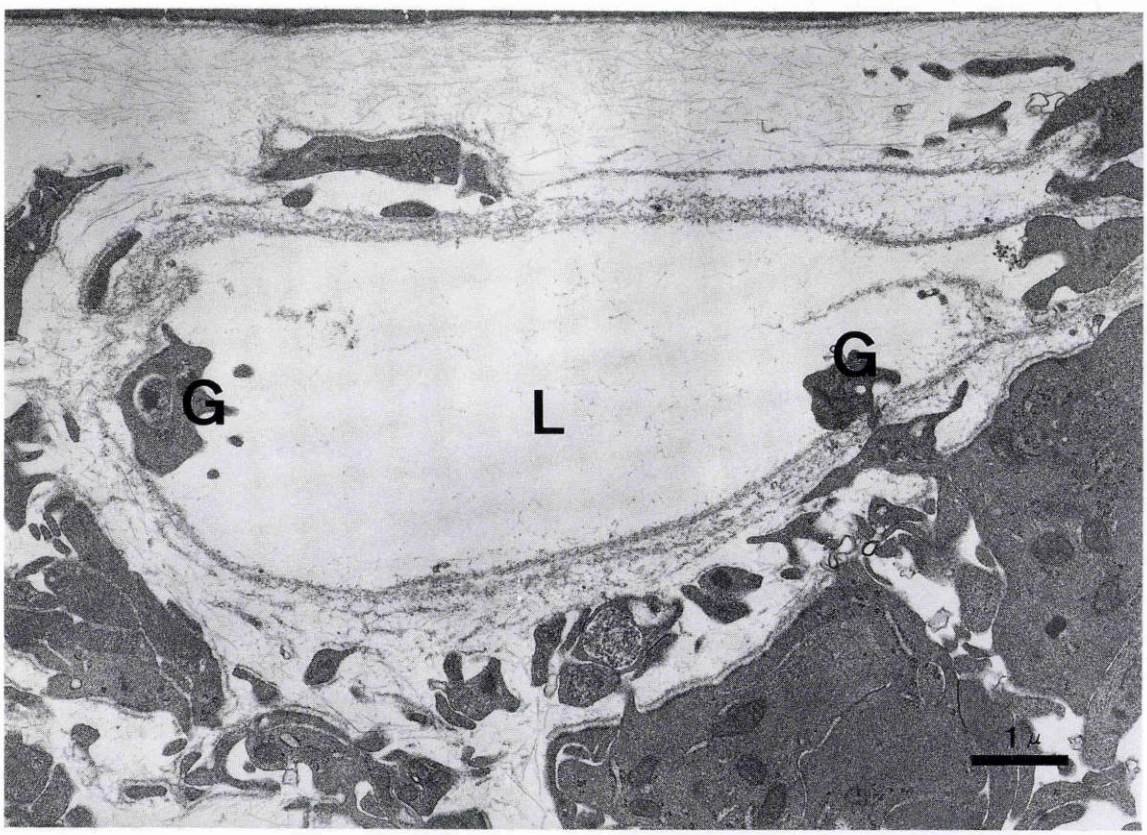

図8　トロンビン滴下3か月後.
内皮細胞を失った抜け殻様血管の管腔内に，基底膜を破って増殖したグリア細胞が侵入している．G：グリア細胞，L：管腔，電子顕微鏡写真

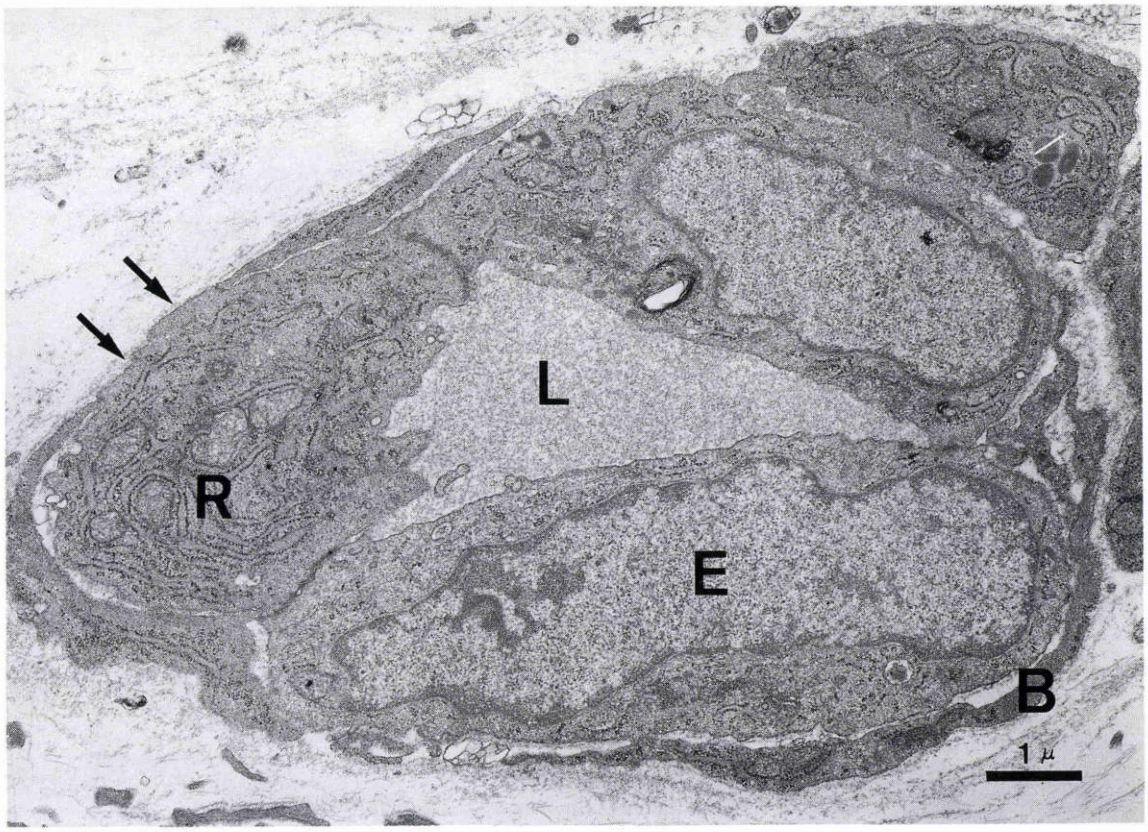

図9 トロンビン滴下3か月後.
図4にみられた奇網の所見．核対細胞質比が非常に大きく，細胞質内には多数の粗面小胞体を含んでいた．また基底膜は非常に菲薄で，一部には明らかな不連続部（矢印）を認めた．E：血管内皮細胞，R：粗面小胞体，L：管腔，B：基底膜，電子顕微鏡写真

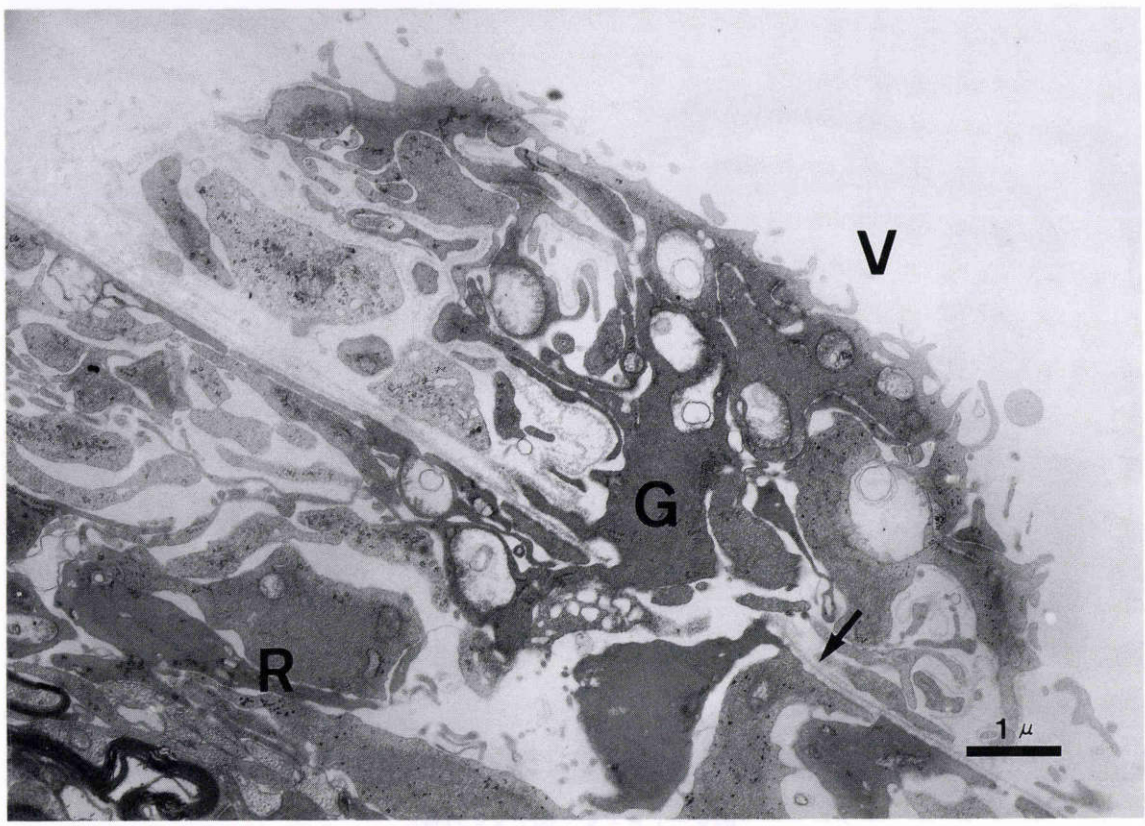

図10 トロンビン滴下3か月後.
静脈閉塞部網膜の病変．網膜神経細胞層内で増殖したグリア細胞が，網膜面上の内境界膜（矢印）を破って硝子体腔内に突出している．G：グリア細胞，V：硝子体腔，R：網膜神経線維層，電子顕微鏡写真

(ghost vessel)，および基底膜と内皮とが大きく解離している血管がみられた．これら2種類の異常血管の併存は，閉塞して壊死に陥った主幹細静脈が再度管腔構築をしつつ，再疎通を果たしたことを示すものであり，3か月という時点でもなお病状は固定していないことを示唆する所見と考えられる．

このような治癒機転ともみなされる所見に加えて，今回の3か月および1年の末期例を含む検索では，血管病変として，まず抜け殻様血管管腔内にグリア細胞が進入し，増殖している所をみることができた．類似の所見は，Hockley ら[3]もレーザー照射で血管閉塞後5週間の例で報告している．血管の閉塞性病変の最終段階と考えられている[12]この所見は，Bloodworth ら[13]も血管の閉塞性病変を有する糖尿病網膜症の最終段階で確認しており，これはグリア細胞が変性した毛細血管壁を貪食しようとしている所見だとしている．以上から，たとえ一部には再疎通がみられるとしても，本実験系では自然経過に任せる限り完全な治癒は期待できないことが示唆された．

次いで，やはり治癒機転と考えられる側副血管に関しては，前回[10]もトロンビン滴下1か月後から滴下部の閉塞血管周囲にその発生を確認している．この側副血行路の形成は，本疾患のほとんどの実験モデルでみられており[2)4)14)~16)]，既存の血管から発生し，閉塞側周囲から虚血領域への新しい流路として示されている．一般に網膜中心静脈閉塞症における側副血管は，しばしばみられる蛇行などによって検眼鏡的に新生血管との鑑別が困難であることは周知であり，このような場合には螢光眼底撮影がその鑑別に有用であることが知られている．その理由としては，新生血管の先端では内皮細胞間接合部に間隙があって著しい螢光漏出が起こる一方，側副路からはそのような漏出がみられないためと証明されている[17]．しかし，本実験で用いた白色家兎では網膜色素上皮の色素が乏しくて脈絡膜背景螢光が非常に強いため，螢光眼底撮影での判断が困難であるという難点があった．他方，この判別と血管の詳細な走行をみるには，ゼラチン加フルオレセイン静注固定伸展標本がいっそう有用であった．この方法で観察を行うと，血管の走行や内腔の状態，またゼラチンと結合したフルオレセインをトレーサーとして柵機能の破綻の有無などを知り得ることは，すでに三上ら[11]が報告している．事実，今回の実験では，やはり走行上から側副血管とみなされる部位にはゼラチン加フルオレセインの漏出はみられず，その判定は比較的容易であった．なお，前述のとおり最も著明な漏出は，軽度の漏出を示す奇網状の新生血管を発芽させている血管翼末梢の血管にみられた．

一方，今回新たに明らかになった注目すべき所見は，増殖性変化の他，新生血管の発芽である．実際，実験動物にて網膜の虚血時にグリア細胞の突起が網膜面の内境界膜を破って硝子体腔に増殖することは既に確認されており[13)18)]，臨床的にも吉本[19]が網膜静脈閉塞症を分類した時の増殖性病変と同意義の病変が本実験系において確認されたことの意義は大きい．新生血管の形態学的特徴について，Archer[18]や対馬ら[20]は次のように述べている．すなわち，構成する細胞の幼若性，特に内皮細胞に関しては細胞自体が大きく，細胞質には，大型で明瞭な核小体を有する核を持つこと，リボゾームの集合体であるポリゾームが多く，細胞内小器官がよく発達していること，基底膜に関してはその菲薄性，不連続性であることなどがあげられるとしている．また，血管の先端の方になると内皮細胞はさらに大きくなり，管腔は狭くなり，細胞内には多くのゴルジ体，ミトコンドリア，ライソゾームがみられるとしている．以上の所見は，今回の我々の実験で得られた電子顕微鏡所見とほぼ一致するものであった．

臨床的にもよく知られている新生血管の出現は，実験動物においてはほとんど報告されていない．唯一組織学的に新生血管の発生を確認した Hamilton ら[21]や Virdi ら[16]の報告においても，静脈が永久に閉塞されるまで数度にわたり静脈をレーザーで照射を繰り返しており，その発生原因から火傷による反応性の要素を除外できないことは明らかである．その点で経外膜的トロンビン滴下法は，血管に機械的な操作を加えぬまま純粋に静脈閉塞症に由来する出血を惹起させた後，しかも長期経過観察で初めてその発生を確認しており，人眼の網膜中心静脈閉塞症に経過が非常によく似ているといい得よう．この事実は，以後の治療実験において新生血管発生の有無を効果判定の目安として利用できることを示しているものと考えられる．

しかし，前項にも述べた如く，このような新生血管の出現は，実験例のほぼ半数に認められ，残りの半数には末梢も細血管の拡張のみで明らかな新生血管は認めなかった．類似の所見は，人眼の網膜中心静脈分枝閉塞症を2～4年追跡調査した Shilling ら[22]の報告に示されている．すなわち，これらの長期観察例は，毛細血管の永続的な拡張を示したものと，閉塞を示したものの2型に分けられ，そのうち前者では新生血管の発生したものはなく，毛細血管の永続的な閉塞を来したものの中にのみ62%の頻度で新生血管がみられたと述べられている．このことから，本実験でみられた毛細血管の拡張は治癒傾向の一所見とみなすことも可能であろう．

稿を終えるにあたり，ご校閲頂きました弘前大学医学部眼科学講座松山秀一教授およびご指導頂きました同講座吉本弘志助教授に深謝いたします．また，終始実験を手伝って下さった菊池美和子氏，川村英治氏に感謝いたします．

本論文の要旨は，第97回日本眼科学会総会（札幌，1993）において発表した．

文 献

1) **Michel J**: Die spontane Thrombose der Vena centralis des Opticus. Albrecht von Graefe's Arch Ophthalmol 24: 37—70, 1878.
2) **Hayreh SS, Heuven WAJ, Hayreh MS**: Experimental retinal vascular occlusion. Arch Ophthalmol 96: 311—323, 1978.
3) **Hockley DJ, Tripathi RC, Ashton N**: Experimental retinal branch vein occlusion in the monkey. Trans Ophthal Soc UK 96: 202—209, 1976.
4) **Kohner EM, Dollery CT, Shakib M, Henkind P, Paterson JW, Oliveira LNF,** et al: Experimental retinal branch vein occlusion. Am J Ophthalmol 69: 778—825, 1970.
5) **Voipio H, Raitta C**: Branch vein occlusion by photocoagulation in the rabbit eye. Acta Ophthalmol 42: 544—549, 1964.
6) **南川美登里, 山本起義, 大熊 紘, 宇山昌延**：実験的網膜静脈閉塞症—第1報. 臨床経過—. 日眼会誌 93: 691—697, 1989.
7) **Fujino T, Curtin VT, Norton EWD**: Experimental central retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol 81: 395—406, 1969.
8) **桜庭知己**：経外膜的トロンビン滴下法による実験的網膜血管閉塞. 日眼会誌 93: 978—985, 1989.
9) **松本光生**：実験的網膜血管閉塞症における血栓形成の初期変化について. 日眼会誌 96: 1132—1141, 1992.
10) **田村正人, 吉本弘志**：実験的家兎網膜静脈閉塞症における後期変化について. Ther Res 12: 3915—3919, 1991.
11) **三上 規, 松橋英昭, 一戸 敏, 吉本弘志, 松山秀一**：ゼラチン加フルオレセイン静注・固定網膜伸展標本によるラットおよび家兎網膜血管の観察. 日眼会誌 91: 353—359, 1987.
12) **Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y**: Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. Diabetes 30: 601—606, 1981.
13) **Bloodworth JMB, Molitor DL**: Ultrastructural aspects of human and canine diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol 4: 1037—1048, 1965.
14) **Nanda SK, Hatchell DL, Tiedeman JS, Dutton JJ, Hatchell MC, McAdoo T**: A new method for vascular occlusion. Arch Ophthalmol 105: 1121—1124, 1987.
15) **Hamilton AM, Kohner EM, Rosen D, Bird AC, Dollery CT**: Experimental retinal branch vein occlusion in rhesus monkeys. Br J Ophthalmol 63: 377—387, 1979.
16) **Virdi PS, Hayreh SS**: Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. Arch Ophthalmol 100: 331—341, 1982.
17) **Finkelstein D**: Retinal branch vein occlusion. In: Ryan SJ (Ed): Retina Vol 2. CV Mosby, St. Louis, 427—432, 1989.
18) **Archer DB**: Neovascularization of the retina. Trans Ophthalmol Soc UK 96: 471—493, 1976.
19) **吉本弘志**：網膜静脈閉塞症の治療. 臨眼 43: 891—896, 1989.
20) **対馬敬子, 吉本弘志**：網膜血管由来の新生血管の微細構造. 眼紀 29: 1678—1687, 1978.
21) **Hamilton AM, Kohner EM, Rosen D, Bowbyes JA**: Retinal and choroidal blood flow problem. Proc Roy Soc Med 67: 1045—1048, 1974.
22) **Shilling JS, Kohner EM**: New vessel formation in retinal branch vein occlusion. Br J Ophthalmol 60: 810—815, 1976.