

実験的剝離網膜に及ぼす網膜下液の影響

阿部 友厚¹⁾, 米谷 新²⁾, 森 圭介¹⁾, 林 直樹¹⁾, 磯野 博明¹⁾¹⁾群馬大学医学部眼科学教室, ²⁾埼玉医科大学眼科学教室

要 約

有色家兎 12 匹 12 眼を使い, 実験的網膜剝離を作成した。漏出性網膜下液の代用として他眼の前房水を, 滲出性網膜下液の代用として自家血清を, 硝子体液の代用として他眼の硝子体をそれぞれ網膜下に注入した。網膜剝離は全例で 24 時間以内に消失した。7 日後に眼球摘出を行い, 組織学的に比較検討した。血清では, 網膜に対する障害は最も強く, 視細胞内節と外節の変性に加え, 外顆粒層の核も減少していた。また, マクロファージや線維芽細胞様の細胞が網膜下に遊走していた。硝子体液で

は, 網膜に対する障害は血清に比べ軽度であったが, 外顆粒層の核の脱落した部分をミュラー細胞が反応し, 補充していた。前房水では, 血清と硝子体に比べ, その網膜に対する影響は最も軽度であった。異なる網膜下液に対する網膜の反応がそれぞれ異なることが実験的に明らかになった。(日眼会誌 98:453-462, 1994)

キーワード: 網膜剝離, 網膜下液, 血液, 硝子体, 前房水

Reaction of the Retina to Injected Subretinal Fluids

Tomoatsu Abe¹⁾, Shin Yoneya²⁾, Keisuke Mori¹⁾,
Naoki Hayashi¹⁾ and Hiroaki Isono¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Gunma University School of Medicine²⁾Department of Ophthalmology, Saitama Medical School

Abstract

Experimental retinal detachment was produced by injecting various fluids into the subretinal space in pigmented rabbits. We selected autologous aqueous humor, autologous vitreous, and autoserum as substitutes for subretinal fluid. Retinal detachment disappeared within 24 hours. The eyes were enucleated 7 days after surgery for histopathological study. Destructive changes in photoreceptor layer occurred most severely when the eye was treated with serum. There was a decrease in the number of outer nuclear layer cells. Macrophages and fibroblastic cells had migrated into the subretinal space. Histopathological changes with vitreous were less

pronounced than with serum. The cytoplasm of Mueller cells appeared to compensate for the loss of photoreceptor cells in the outer nuclear layer. Mild decrease in the number of photoreceptor cells was the sole pathological feature when the eye was treated with aqueous humor. The retina thus showed different reactions to the subretinal fluids of differing nature. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:453-462, 1994)

Key words: Retinal detachment, Subretinal fluids, Serum, Vitreous, Aqueous humor

I 緒 言

裂孔原性網膜剝離では, その発症からの期間や程度により, 網膜下液の性状, とくに蛋白の濃度が異なることが指摘されている¹⁾。裂孔原性網膜剝離だけでなく, 続発

性網膜剝離でも網膜下液の蛋白濃度などが時間の経過とともに変化し, その網膜下液の性状の違いが臨床経過や視力予後に関与することが推測できる。一方, 続発性網膜剝離では蛋白濃度が異なる漏出液や滲出液だけでなく, 血液または硝子体などが想定され, 蛋白の濃度の違

別刷請求先: 371 群馬県前橋市昭和町 3-39-15 群馬大学医学部眼科学教室 阿部 友厚
(平成 5 年 11 月 9 日受付, 平成 5 年 12 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Tomoatsu Abe, M.D. Department of Ophthalmology, Gunma University School of Medicine,
3-19-15 Showa-machi, Maebashi-shi, Gunma-ken 371, Japan

(Received November 9, 1993 and accepted in revised form December 27, 1993)

いだけでなく、網膜下液自体の性状の違いが網膜に直接影響する可能性がある。

裂孔性網膜剥離における網膜下液の性状を分析した結果では、主に硝子体液と脈絡膜由来の液から構成されているとの報告がある²⁾。しかし、1988年にZhuら³⁾が実験的に家兎網膜下に硝子体液のみを注入したところ、網膜色素上皮(RPE)細胞の増殖だけでなく、網膜下新生血管を伴った反応が特異的に観察されたとの報告がある。この例のように、網膜下液の性状が異なることにより、視細胞内外節やRPE細胞だけでなく、さらに、網膜に特異的な細胞反応を惹起することが推測される。しかし、これらの異なる網膜下液の網膜へ及ぼす影響、具体的には視細胞に対する毒性、また、これらの物質に対する網膜の細胞レベルでの応答などについて、比較検討した報告はほとんどない。我々は、この問題を明らかにする目的で、Marmorら⁴⁾の開発した網膜剥離の実験モデルに、新たに生理的で、性状の異なる代用網膜下液を考案し、実験的網膜剥離を作成し、網膜感覚上皮とRPEのそれぞれの反応を検索した。

II 実験動物および方法

実験動物には有色家兎12匹12眼を用いた。

実験にあたって、塩酸ケタミン(ケタラル®)とキシラジン塩酸塩(セラクター®)を用い、両者を7:1に混合して筋注し、全身麻酔下に実験を行った。

散瞳はミドリンP®点眼で行い、網膜下への物質の注入は、手術用顕微鏡下に角膜輪部から1mmの部位から経強膜的に行った。マイクロピペットで代用網膜下液を髄翼下方の網膜下に約0.1ml注入し、約1.5乳頭径の円形の網膜剥離を作成した(図1)。マイクロピペットは加熱して伸長し、先端径が約100 μ mのものを使用した。網膜下注入物質として、臨床上的網膜下液の性状を考慮し、漏出性網膜下液の代用として前房水を、滲出性網膜下液

の代用として自己血清を、また、硝子体液の代用として他眼の硝子体を使用した。

前房水は他眼から採取した。血清は耳静脈から採取した自己血液を遠心分離した後、人工房水(オベガード®)で25%に希釈した。また、硝子体液は他眼を摘出した後、眼球を半割し、ただちに採取した自己硝子体を約5分間ホモジナイズしたものを使用した。

注入2日と7日後の所見を検眼鏡で観察し、眼底写真および蛍光眼底造影で観察記録した。注入後7日に、それぞれの代用網膜下液につき3匹3眼ずつ眼球摘出を行い、組織学的検索を行った。

眼球摘出後の組織は4%ホルムアルデヒドおよび1%グルタルアルデヒドで前固定、1%オスミウム酸で後固定を行い、型のごとくエタノール系列で脱水し、プロビレンオキシドを経て、エポキシ樹脂に包埋した。包埋試料はマイクロームで1 μ mの切片を作成し、トルイジンブルー染色し、光学顕微鏡(光頭)で観察した。さらに超薄切片を作成し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛による二重染色を行い、電子顕微鏡(電頭)で観察した。組織採取にあたっては網膜剥離のあった部位とその周囲の網膜全体を組織標本としたが、その観察は注入による影響をさけるために、注入部位から離れた網膜剥離辺縁部の変化を中心に行った。

III 結果

1. 臨床所見

網膜剥離は検眼鏡的には、いずれの性状の網膜下液でも、全例で注入後24時間以内に消失していた。注入後7日の眼底検査では、網膜下液注入部に一致して網膜萎縮が観察されたが、それ以外の部位では健常網膜に比べ特異的な変化はなかった(図2)。

蛍光眼底造影では、網膜下液注入部に一致して過蛍光



図1 網膜下注入直後の眼底所見。
代用網膜下液を髄翼下方の網膜下に注入、約1.5乳頭径の円形の網膜剥離を作成。



図2 網膜下注入後7日の眼底所見。
円形の網膜剥離のあった部位は復位している。網膜下液注入部に一致して網膜萎縮がある。それ以外の部位では特異的な変化はない。

があったが、他の復位した部位では蛍光漏出などはない。また、網膜下液の違いによる異なった所見は観察されなかった(図 3)。

2. 組織所見

1) 前房水

光顕所見：外顆粒層には散在性に視細胞核間の開大があり、軽度の核の減少があった。また、視細胞外節の配列に軽度の乱れが見られたが、短小化や変性などはない。網膜内層の構造は光顕上、ほぼ健常に保たれていた(図 4)。

電顕所見：外顆粒層から視細胞内節にかけてはほぼ健常であった(図 5 a)。一部視細胞内節が変性し、網膜下腔に伸展または脱落しているものが観察できた。RPE はほぼ正常な所見であった(図 5 b)。

2) 25% 血清

光顕所見：内境界膜から内網状層まで、腫大して濃染



図 3 網膜下注入後 7 日の蛍光眼底所見。

網膜下液注入部に過蛍光がある。他の復位した部位では蛍光漏出などはない。

されたミュラー細胞の胞体が観察された。外顆粒層の核は減少していた。視細胞層では内節は正常な構造を保っていたが、外節は短小化しているかまたは消失していた。また、網膜下腔に遊走した細胞が存在していた(図 6)。

電顕所見：内節は変性し、浮腫状に膨化していた。外節はほとんど消失していたが、残存している外節は配列が乱れ、また、その層状構造は失われて破壊的な変化が観察できた。RPE に接して、胞体が少なく、また、色素の少ない紡錘形の核で核小体の発達した細胞が観察された(図 7 a)。さらに、色素やファゴゾームを持ったマクロファージや(図 7 b)、線維芽細胞様の細胞が網膜下腔に遊走していた(図 7 c)。

3) 硝子体液

光顕所見：内境界膜から内網状層まで、正常に近い構造に保たれていた。外顆粒層では散在性に視細胞核間が開大していた。視細胞層は変性しており、内節は配列が乱れ、空胞化が観察できた。外節では配列が乱れ、また、網膜下腔に濃染性の組織破壊物と思われる物質が存在していた。RPE については、特に変化はなかった(図 8)。

電顕所見：外顆粒層では核の脱落に伴い、ミュラー細胞の胞体が目立って観察されるようになった。内節に変性があり、空胞化したミトコンドリアが多数存在していた。ミュラー細胞が網膜下に伸展し、腫大しているのが内節の間で顕著に観察できた(図 9 a, b)。光顕で網膜下に濃染性物質として観察されたものは形質膜を持ち、胞体は粗で、グリコーゲン顆粒を持っていた。また、一部ミトコンドリアの集簇したものも存在していた。RPE では基底陥入の開大が見られた(図 9 c)。

4) 人工房水

光顕所見：内境界膜から内節にかけて、ほぼ正常構造に保たれていた。外節の配列が乱れていたが、RPE は光顕上では変化はなかった(図 10)。

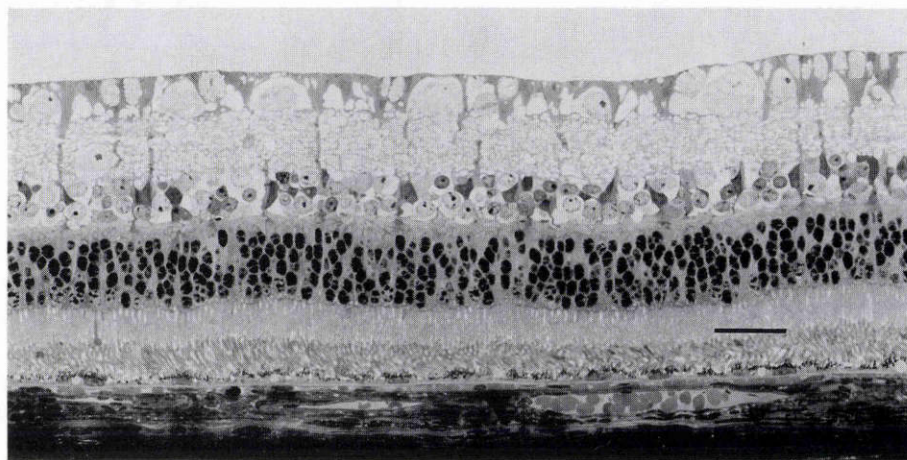


図 4 前房水注入後 7 日の光学顕微鏡所見。

外顆粒層で散在性に視細胞核間の開大があり、軽度の核の減少がある。視細胞外節の配列に軽度の乱れがあるが、短小化や変性などはない。網膜内層の構造はほぼ健常に保たれている。トルイジンブルー染色、バーは 20 μm

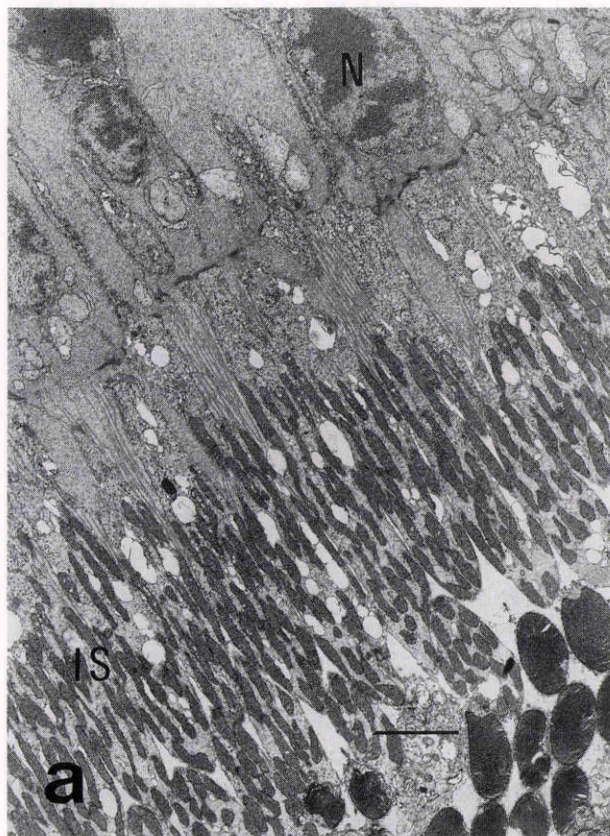


図5a 前房水注入後7日の電子顕微鏡所見。
視細胞内節が変性し、網膜下腔に伸展または脱落しているものがある。バーは2 μ m
N：視細胞核、IS：内節

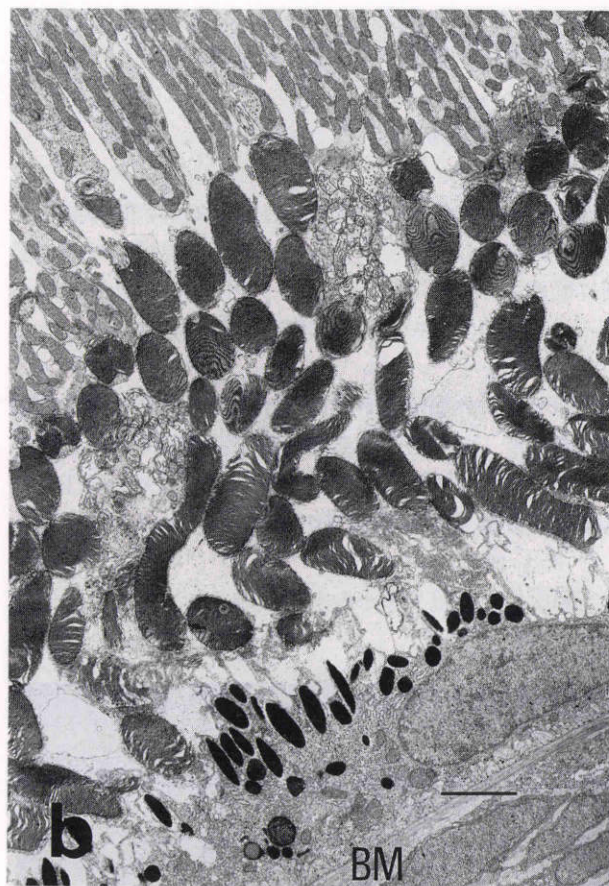


図5b 前房水注入後7日の電子顕微鏡所見。
網膜色素上皮はほぼ正常である。バーは2 μ m
BM：Bruch膜

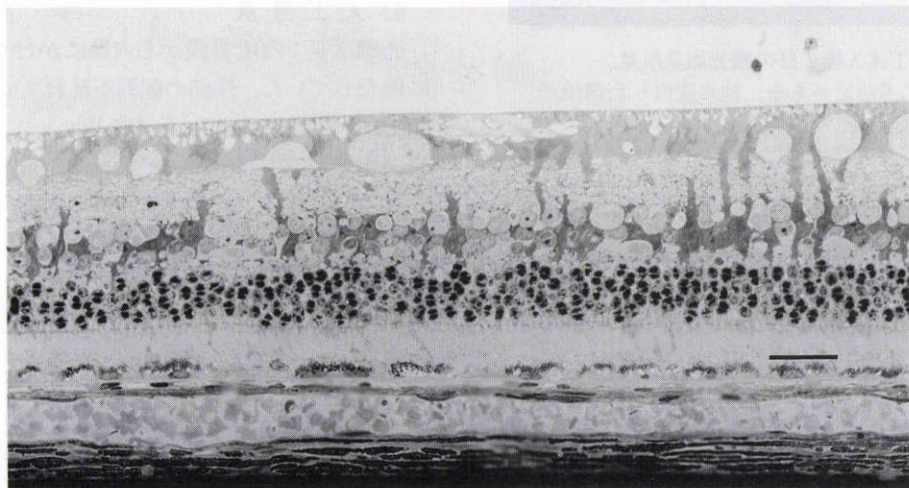


図6 血清注入後7日の光学顕微鏡所見。
内境界膜から内網状層まで、腫大して濃染されたミュラー細胞体が目立って観察される。外顆粒層の核は減少している。視細胞層では、内節は正常な構造を保っているが、外節は短小化しており、一部は消失している。網膜下腔に遊走した細胞が存在する。トルイジンブルー染色、バーは20 μ m

電顕所見：外顆粒層から内節にかけてはほぼ正常であった(図11a)。外節の構造が軽度にな乱れているのみであった(図11b)。

IV 考 按

網膜下に注入された代用網膜下液による網膜への障害

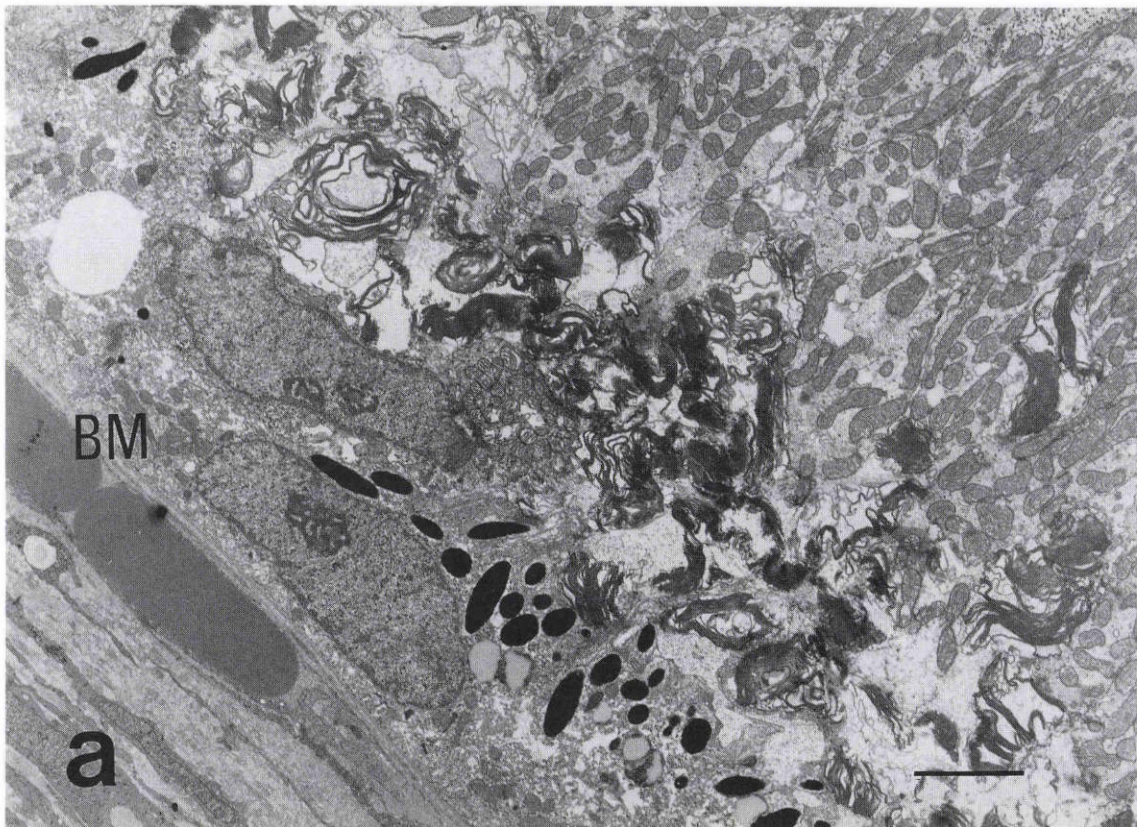


図 7a 血清注入後 7 日の電子顕微鏡所見。

内節は変性し、浮腫状に膨化している。外節はほとんど消失している。残存している外節は配列が乱れ、層状構造は失われている。網膜色素上皮に接して、胞体が少なく、また、色素の少ない紡錘形の核を持ち、核小体の発達した細胞が存在する。バーは 2 μ m BM: Bruch 膜



図 7b 血清注入後 7 日の電子顕微鏡所見。

胞体中に色素やファゴゾームを多く持ったマクロファージが網膜下腔に存在している。バーは 2 μ m
N: 視細胞核, BM: Bruch 膜

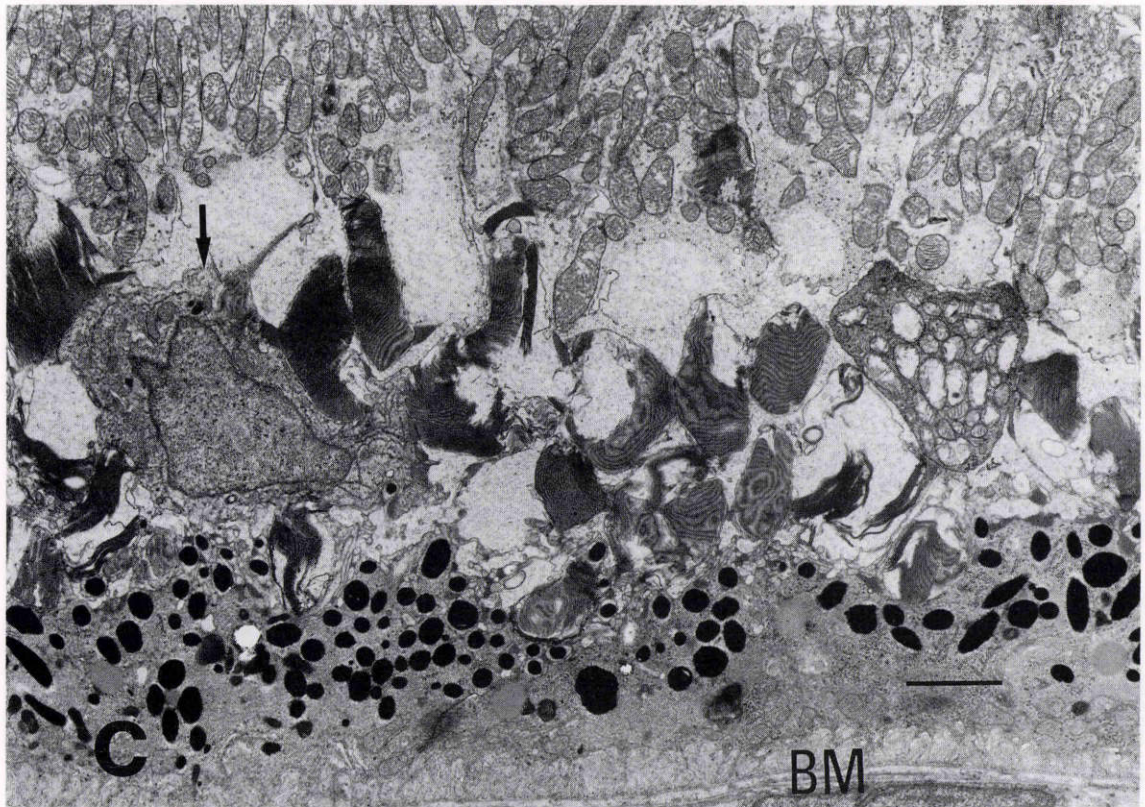


図7c 血清注入後7日の電子顕微鏡所見。
線維芽細胞様の細胞が網膜下腔に遊走している(矢印)。バーは2 μ m BM: Bruch膜

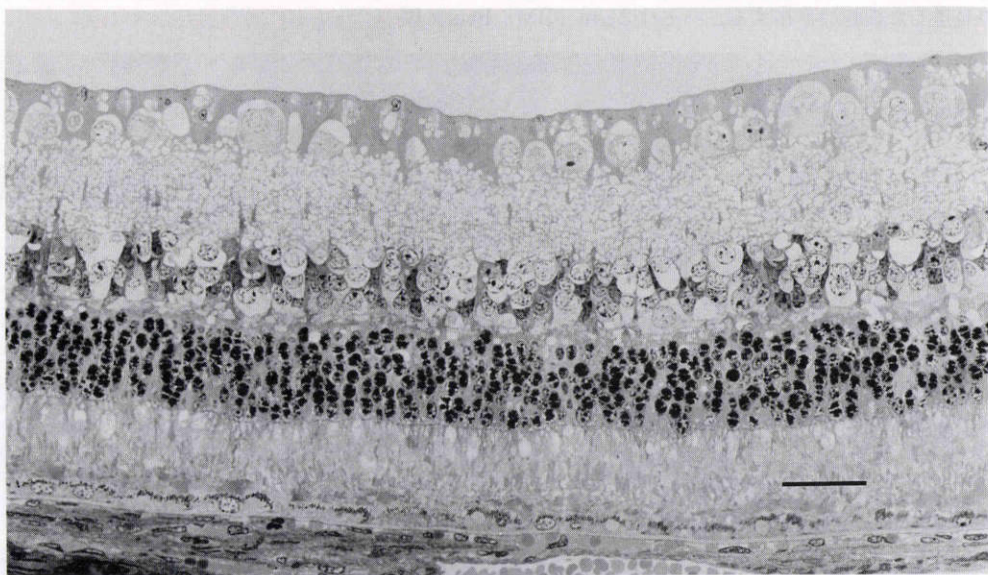


図8 硝子体注入後7日の電子顕微鏡所見。
内境界膜から内網状層まで、正常に近い構造である。外顆粒層では散在性に視細胞核間が開大している。視細胞層は変性しており、内節は配列が乱れ、空胞化がある。外節では配列が乱れ、また、網膜下腔に濃染性の組織破壊物と思われる物質が存在している。トルイジンブルー染色、バーは20 μ m

は、前房水と硝子体に比べ、血清で最も強く観察された。血清注入眼では視細胞に対して障害が強く、外顆粒層の核の減少と、内節の変性および外節の崩壊変性や消失が見られた。Machemer⁵⁾は家兎網膜下に全血を注入した結果、血液の網膜に対する障害が強く、24時間以内に

著しく視細胞層と視細胞核が破壊される不可逆的な変化が起こったと報告している。このような網膜に対する毒性として、感覚網膜とRPEの代謝を遮断する凝固血液によるバリア効果、視細胞層に接着した凝固血液の収縮と移動により生ずる牽引、ヘモグロビン由来の鉄の毒性

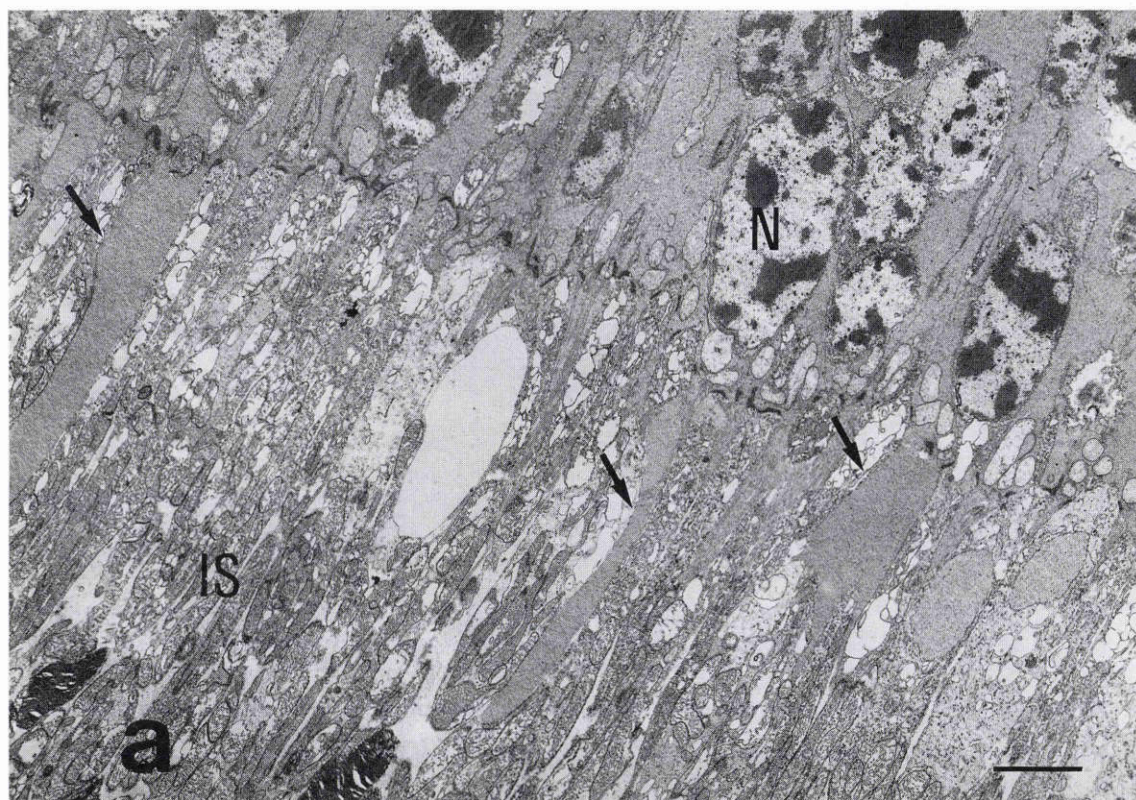


図9a 硝子体注入後7日の電子顕微鏡所見.

内節に変性があり、ミトコンドリアの空胞化が顕著である。ミュラー細胞体が網膜下に伸び、また、腫大しているのが内節の間で観察できる(矢印)。バーは2 μ m N:視細胞核, IS:内節



図9b 硝子体注入後7日の電子顕微鏡所見.

変性した内節の間をミュラー細胞体が網膜下に伸展している(矢印)。バーは2 μ m IS:内節, OS:外節

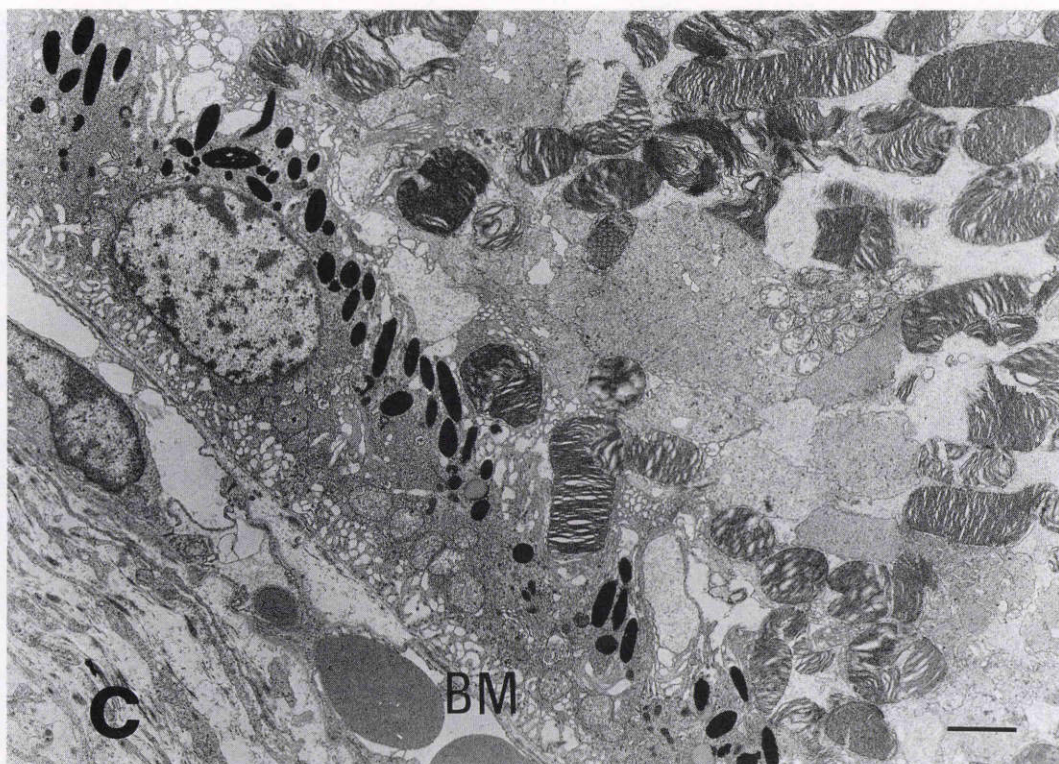


図9c 硝子体注入後7日の電子顕微鏡所見。

光顕で網膜下に濃染性物質として観察されたものは形質膜を持ち、胞体は粗で、一部グリコーゲン顆粒を持っている。ミトコンドリアの集簇したものも存在している。網膜色素上皮に基底陥入の開大が見られる。バーは2 μ m BM: Bruch膜

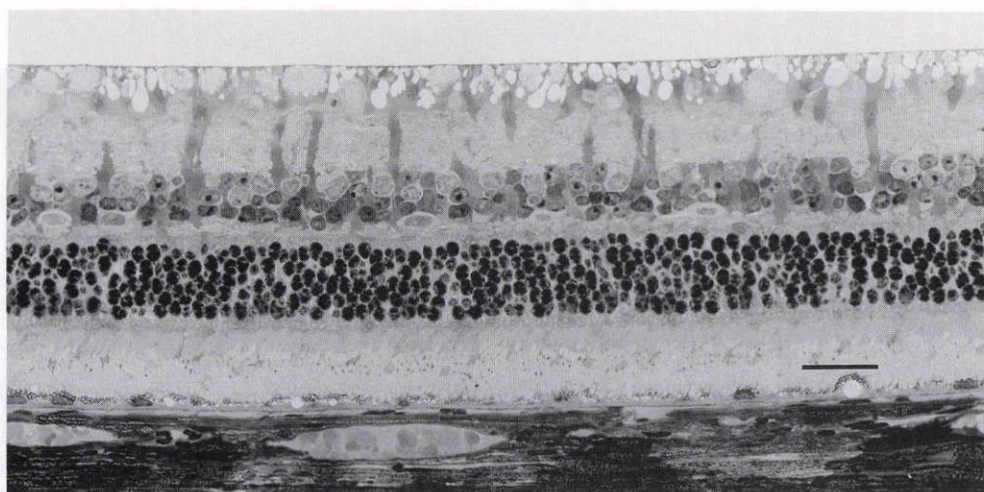


図10 人工房水注入後7日の電子顕微鏡所見。

内境界膜から内節にかけてはほぼ正常構造が保たれている。外節では配列の乱れがある。網膜色素上皮に変化はない。トルイジンブルー染色、バーは20 μ m

などを挙げている。バリア効果については、シリコンオイルを網膜下に注入し、網膜に対して直接毒性のないものでも、網膜下に存在する場合、そのバリア効果により代謝を障害し、網膜に影響を与えることを説明している。また、越生ら⁶⁾は血液を希釈して網膜下に注入し、2日目までに視細胞層や視細胞核の変性が起き、さらに、5か月後には鉄の毒性により網膜全層の著しい変性が起こったと報告している。これらの報告に比べると、我々

の血清注入眼での網膜に対する障害は軽度であった。これは、全血を注入した時に比べ、血球成分がなく、これによるバリア効果は弱く、他の血球成分に関係した毒性も低くなったため、著しく視細胞層や視細胞核が破壊されるということとはなかったと考えられる。

一方、Greenら⁷⁾の人眼176眼の黄斑変性を検索した臨床的な結果では、血清が網膜下に存在する場合、外顆粒層の視細胞核の脱落による網膜の菲薄化、内節や外節

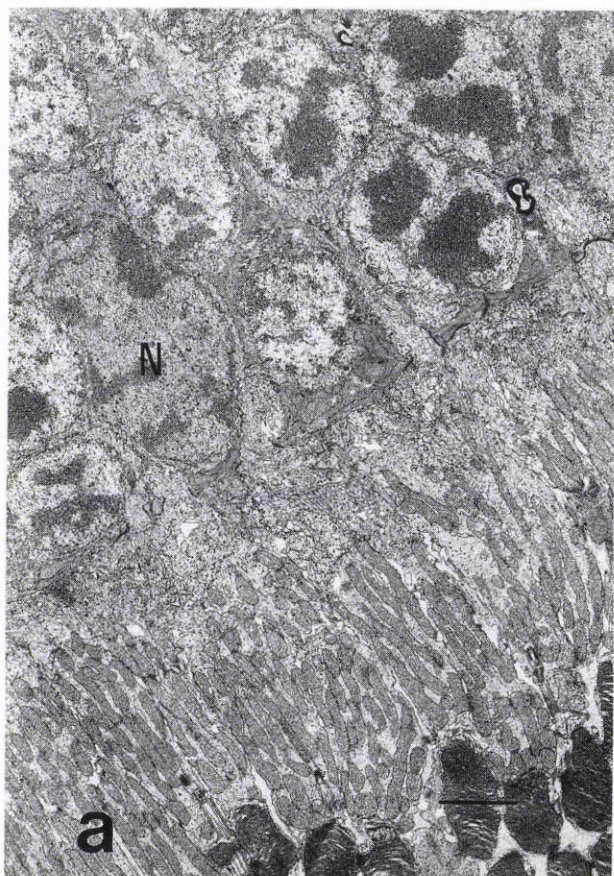


図 11 a 人工房水注入後 7 日の電子顕微鏡所見。
外顆粒層から内節にかけてはほぼ正常である。バーは
2 μ m N: 視細胞核

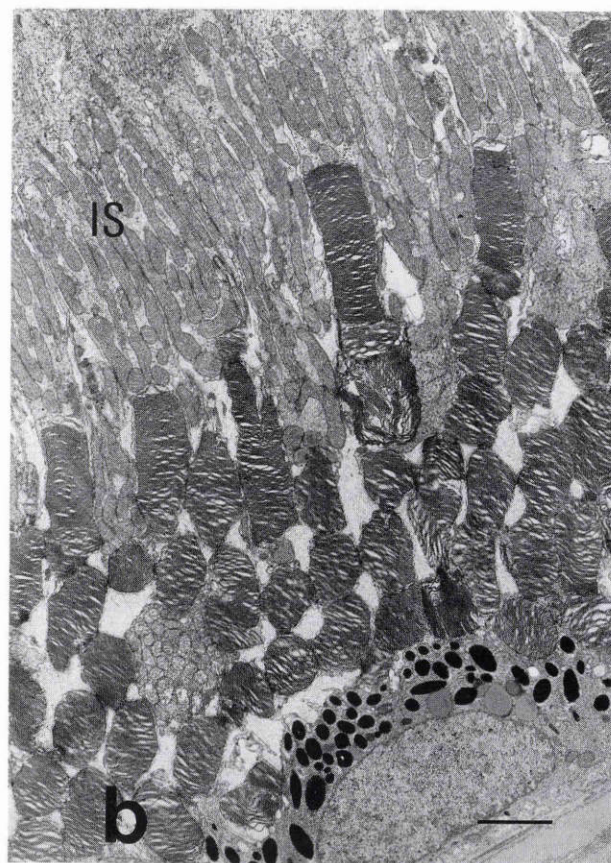


図 11 b 人工房水注入後 7 日の電子顕微鏡所見。
外節の構造が軽度には乱れている。バーは 2 μ m
IS: 内節

の消失があり、我々の血清注入眼と同程度の障害が報告されている。このように、血清成分のみでも、それが網膜下に存在する場合には、視細胞層と RPE の代謝を阻害することが考えられる。赤血球のように、ヘモグロビンに由来する鉄イオンが直接網膜を障害するだけでなく、従来重要視されていなかった血清成分のみでも、視細胞層ないし視細胞核に対しての障害が考えられ、さらに、これに血球成分が加わる全血では、網膜への障害は血清以上に強くなると考えられる。

血清と他の 2 つの網膜下液とを成分的に比較した場合、蛋白濃度が前房水や硝子体と大きく異なる。蛋白濃度に関しては、裂孔原性網膜剝離に加え、胞状網膜剝離や uveal effusion などの網膜下液を分析した結果が報告されており、剝離期間や視力との関係が述べられている¹¹⁾⁹⁾。我々の実験でも網膜に対する障害は、蛋白濃度の高い血清で最も強く観察された。これは蛋白の網膜に対する毒性でなく、このような液が網膜下に存在する場合、代謝に対するバリア効果による間接的な障害であると推測される。

一方、血清注入眼での細胞の反応では、網膜下へのマクロファージや線維芽細胞などの遊走が特異的に観察され、RPE 細胞の重層化も観察された。これらは前房水や

硝子体では見られなかった反応であり、血清でのみ観察された。これは血清中の成分であるフィブロンectin や血小板由来の増殖因子などが、RPE 細胞の増殖や線維芽細胞などを遊走させるとの *in vitro* での報告¹⁰⁾¹¹⁾があり、我々の有色家兎における *in vivo* の実験でも、血清注入眼のみにこのような細胞の反応が見られた。このような細胞の反応は、実験の臨床でマクロファージ、RPE 細胞、線維芽細胞、グリア細胞などで、増殖性硝子体網膜症 (PVR) の病態を形成していることを考えると¹²⁾¹³⁾、PVR の発症過程を考える上で重要な網膜の反応であると考えられる。

硝子体注入眼では、血清注入眼と同様に視細胞核の減少があった。視細胞層の障害では外節の消失はなかったが、内節と外節の変性が観察された。しかし、いずれの障害も血清注入眼に比べ軽度であった。一方、外顆粒層で視細胞核の脱落した部分を補充しているミュラー細胞の反応が強く、ミュラー細胞の胞体が大きく網膜下に伸展している状態が観察された。また、RPE の反応として基底陥入の開大が見られた。Zhu ら³⁾¹⁴⁾は、同じ有色家兎を用いて、硝子体の網膜下への注入により、網膜下の細胞増殖と新生血管があったと報告している。これは、我々の結果に比べ、はるかに強い細胞反応である。硝子体に

については、その組成の99%が水であるにもかかわらず、血清や前房水に比べ、粘度が高いという特徴がある¹⁵⁾¹⁶⁾。我々は、この粘性の高い硝子体をホモジナイズしてから注入した。このため硝子体の粘性が小さくなり、この粘性の低下が硝子体を直接注入したものに比べ、網膜の反応が弱くなった原因と推測される。硝子体のような粘性の大きいものが網膜下に存在する場合、感覚網膜とRPEの代謝の遮断とともに、粘性自体が網膜に及ぼす影響を検討する必要がある。

前房水注入眼では、網膜への障害が3つの下液の中で最も軽度であった。このことから、前房水のように血清に比べ蛋白濃度も高くなく、硝子体や血清と違い粘性も低い液が網膜下に存在しても、網膜にそれほど障害を与えないことが考えられる。

以上、性状の異なる網膜下液に対して、網膜の反応がそれぞれ異なることが実験的に明らかになった。異なる性状の網膜下物質は、網膜に対する障害だけでなく、それぞれ異なった細胞の反応を惹起することが明らかになった。

摘筆にあたり、御指導、御校閲を賜りました教室主任清水弘一教授に深謝いたします。また、実験に際し、御指導、御協力を賜りました第二解剖学教室石川春律教授に深謝いたします。なお、本論文の要旨は、第95回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) Weber JC, Wilson FM: Biochemical studies of subretinal fluid. *Arch Ophthalmol* 69: 363—369, 1963.
- 2) Chignell AH, Carruthers M, Rohi AHS: Clinical, biochemical, and immunoelectrophoretic study of subretinal fluid. *Br J Ophthalmol* 55: 525—532, 1971.
- 3) Zhu ZR, Goodnight R, Ishibashi T, Sorgente N, Ogden TE, Ryan SJ: Breakdown of Bruch's membrane after subretinal injection of vitreous. *Ophthalmology* 95: 925—929, 1988.
- 4) Marmor MF, Abdul-Rahim AS, Cohen DS: The effect of metabolic inhibitors on retinal adhesion and subretinal fluid resorption. *Invest Ophthalmol* 19: 893—903, 1980.
- 5) Glatt H, Machemer R: Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *Am J Ophthalmol* 94: 762—773, 1982.
- 6) 越生 晶: 網膜下出血の吸収過程に関する実験的研究. 第3報. 出血後, 末期における赤血球の分解・吸収と網膜の変性 (hemosiderosis) について. *日眼会誌* 83: 386—399, 1979.
- 7) Green WR, Key SN III: Senile macular degeneration: A histopathologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 75: 180—254, 1977.
- 8) Brockhurst RJ, Lam KW: Uveal effusion. II. Report of a case with analysis of subretinal fluid. *Arch Ophthalmol* 90: 399—401, 1973.
- 9) Yoshino Y, Toshida K, Akazawa Y, Funata M: An analysis of subretinal fluid in bullous retinal detachment. *Ophthalmologica* 200: 123—127, 1990.
- 10) Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM: Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 102: 1830—1833, 1984.
- 11) Kirchhof B, Kirchhof E, Ryan SJ, Sorgente N: Vitreous modulation of migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol* 30: 1951—1957, 1989.
- 12) Sternberg P Jr, Machemer R: Subretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 98: 456—462, 1984.
- 13) Machemer R, Laqua H: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 1—23, 1975.
- 14) Zhu ZR, Goodnight R, Sorgente N, Blanks JC, Ogden TE, Ryan SJ: Cellular proliferation induced by subretinal injection of vitreous in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 106: 406—411, 1988.
- 15) Hammer ME, Burch TG, Rinder D: Viscosity of subretinal fluid and its clinical correlations. *Retina* 6: 234—238, 1986.
- 16) 松田久美子: 網膜下液の粘度. 成分および臨床所見との関連について. *日眼会誌* 92: 611—618, 1986.