

網膜光凝固における局所血液網膜柵の破綻

志賀 宗祐, 林 英之, 大島 健司

福岡大学医学部眼科学教室

要 約

網膜に光凝固を行うと血液網膜柵に破綻が生じる。しかし、光凝固による局所血液網膜柵の破綻部位ははっきりしていない。今回我々は、光凝固後1時間から4週間まで光凝固による局所血液網膜柵の破綻部位と、その経時的变化を血清アルブミンを指標として免疫組織化学的に検討した。正常サル網膜では、一部の網膜血管内に血清アルブミンを認めしたが、その他の網膜には血清アルブミンを認めなかった。しかし、正常サル網膜にアルゴンレーザーで中等度の網膜光凝固を行うと、光凝固3日後をピークに光凝固部の外網状層、外顆粒層、視細胞層、色素上皮層に血清アルブミンが出現したが、光凝固部の

網膜内層および網膜血管周囲に血清アルブミンの漏出はみられなかった。光凝固後2・4週後の組織像では網膜外層の血清アルブミンの染色はほとんどみられなかった。以上から、中等度アルゴンレーザー網膜光凝固による血液網膜柵の破綻は、外側血液網膜柵に生じ2週間後には修復されることが明らかとなった。(日眼会誌 98: 463—468, 1994)

キーワード：レーザー光凝固、血液網膜柵、免疫組織化学、血清アルブミン

Immunohistochemical Localization of Blood-retinal Barrier Breakdown after Argon Laser Photocoagulation in the Monkey Retina

Sousuke Shiga, Hideyuki Hayashi and Kenji Oshima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University

Abstract

Retinal photocoagulation induces breakdown of the blood-retinal barrier (BRB), but the site of the breakdown is not precisely known. The breakdown and repair of BRB following argon laser photocoagulation were studied in the monkey retina by immunohistochemical localization of serum albumin. Argon laser photocoagulation was performed to obtain ordinary burns as in human use. 1, 3, and 7 days after photocoagulation, serum albumin was observed in the outer retina and retinal pigment epithelium, but not around the retinal blood vessels.

The immunostaining disappeared within 14 and 28 days after photocoagulation. The results of this study suggest that photocoagulation induces local breakdown of the outer BRB and that the breakdown is repaired within 14 days. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 463—468, 1994)

Key words: Laser photocoagulation, Blood-retinal barrier, Immunohistochemistry, Serum albumin

I 緒 言

糖尿病網膜症、増殖性硝子体網膜症、ぶどう膜炎などの疾患は、進行するとしばしば失明に至ることがあり、今日においても眼科診療において重篤な疾患の1つである。これらの疾患では、組織の恒常性を維持するための血液網膜柵機能が障害されているといわれている¹⁾。ま

た、病態と血液網膜柵の障害との間に相関関係がみられるという報告もあり²⁾、血液網膜柵の重要性が認識されている。血液網膜柵としては、網膜血管内皮細胞間の tight junction から構成される内側血液網膜柵と網膜色素上皮細胞間の tight junction から成る外側血液網膜柵の2つが知られている³⁾。

一方、網膜光凝固療法は糖尿病網膜症や網膜血管閉塞

別刷請求先：814-01 福岡県福岡市城南区七隈7-45-1 福岡大学医学部眼科学教室 志賀 宗祐
(平成5年12月21日受付, 平成6年1月18日改訂受理)

Reprint requests to: Sousuke Shiga, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University,
7-45-1 Nanakuma, Jounan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 814-01, Japan

(Received December 21, 1993 and accepted in revised form January 18, 1994)

症などの網膜病変の治療に広く用いられているが、正常網膜に光凝固を行うと血液網膜柵に破綻を生じることがペルオキシダーゼ^{4)~6)}やランタン⁷⁾あるいはフルオレスチン⁸⁾などのトレーサーを用いて形態学的に証明されている。しかしながら、従来の報告は外側血液網膜柵を主として検索しており、内側血液網膜柵について光凝固の影響はほとんど検索されていない。また、硝子体フルオロフォトメトリー^{9)~11)}を用いて光凝固による血液網膜柵の破綻が定量的に検索されているが、硝子体フルオロフォトメトリーの検索では内側血液網膜柵と外側血液網膜柵との透過性機能を別々に測定することができない³⁾。最近、Vinoresら^{10)~11)}は血清アルブミンを指標とする免疫組織化学的手法を用いて血液網膜柵の破綻の部位を確認する方法を報告した。この方法はトレーサーを用いず、ヒト組織標本上で検索が可能であるだけでなく、血清蛋白であるアルブミンを指標とするので、より本来の血液網膜柵を反映すると考えられる。また、光学顕微鏡下での観察が可能であり、全体像を検索することができる。今回我々は、この方法を用いサル網膜光凝固における局所血液網膜柵の破綻部位と、その経時的变化について検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

体重2.8~3.4kgのカニクイザル5匹を用いた。塩酸ケタミン(ケタラル®)0.2ml/kgとキシラジン塩酸塩(セラクタール®)0.1ml/kgを筋注して全身麻酔下でアルゴンブルー・グリーンレーザー波長488, 514nm(Coherent社製SYSTEM 900)を用いて光凝固を行った。光凝固は、スポットサイズ200~250 μ m、凝固時間0.2秒、強さ0.1Wを基準に凝固斑が淡く白くなる程度に約200発施行した。照射後1時間、1, 3, 7日および2, 4週後に(各1, 1, 2, 1, 2, 1眼、2眼は

光凝固未施行の正常対照)ペントバルビタールナトリウム(ネプター®)過量静注し安楽死させ眼球摘出した。

2. ウエスタンブロッティング

ポリクローナル抗体のヤギ抗ヒト血清アルブミン抗体(Cappel社)がサル血清アルブミンにも反応することを確かめるため、ウエスタンブロッティングを行った。サルおよびヒト血清を0.01M 燐酸緩衝液で10,000倍希釈して7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動

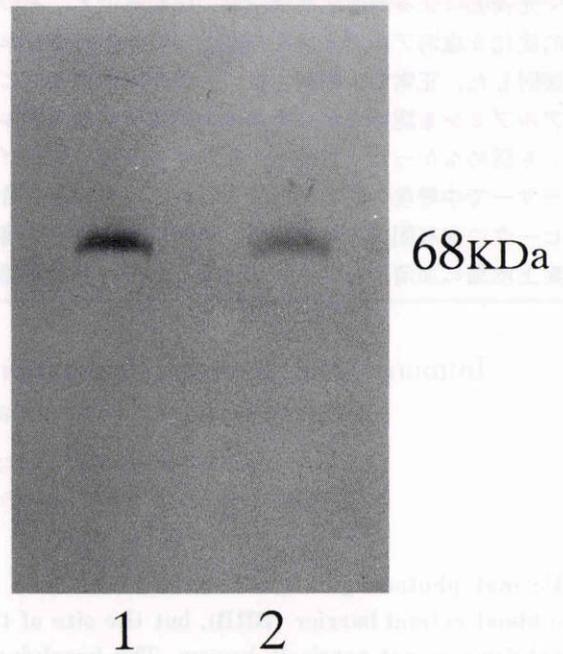


図1 ヒトおよびサル血清のウエスタンブロッティング。

ヤギ抗ヒト血清アルブミン抗体は、ヒト血清アルブミン(分子量68K)のみならず、サル血清アルブミンにも交叉反応した。

1:ヒト血清, 2:サル血清

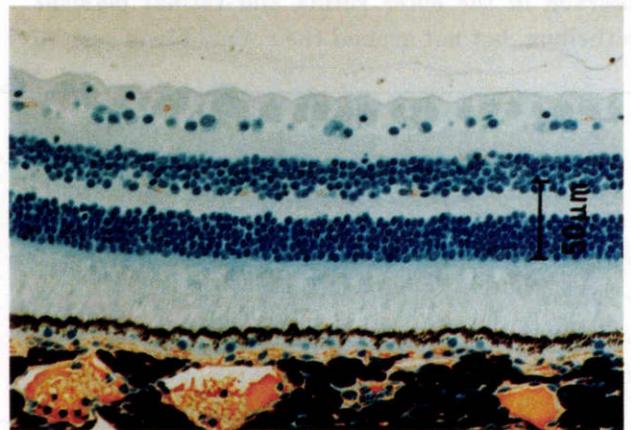
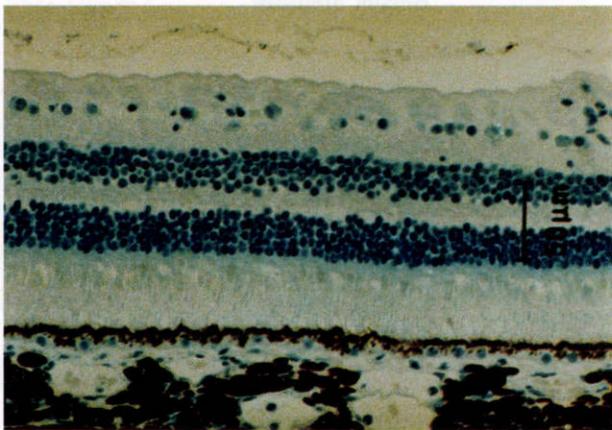
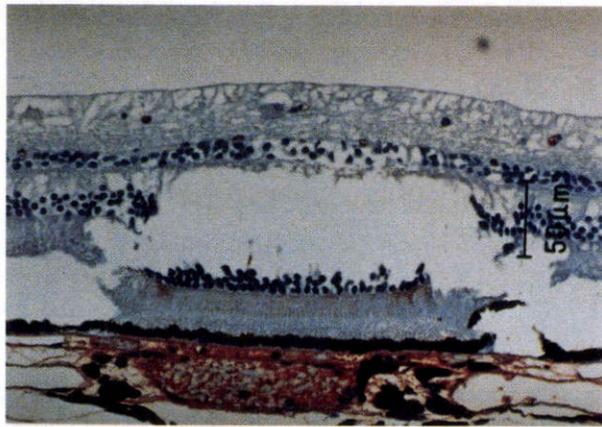


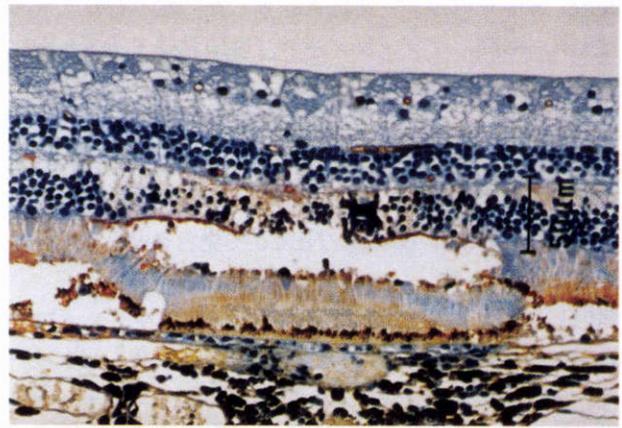
図2 抗血清アルブミン抗体による免疫染色の結果。

a: 正常網膜。免疫染色の対照。3-amino-9-ethylcarbazoleの産生物質(赤色)はみられない。

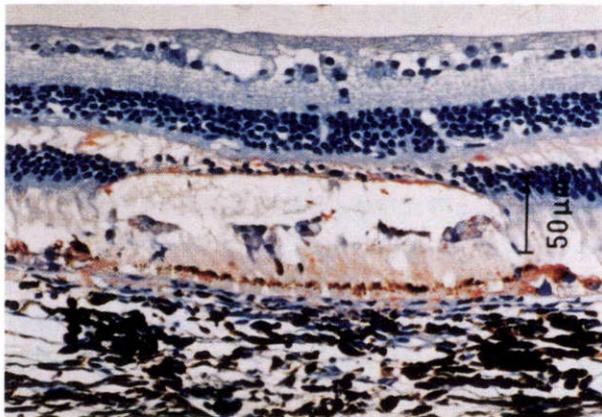
b: 正常網膜。網膜血管内および脈絡膜に抗血清アルブミン抗体の陽性所見がみられる。しかし、網膜色素上皮には陽性所見はみられない。



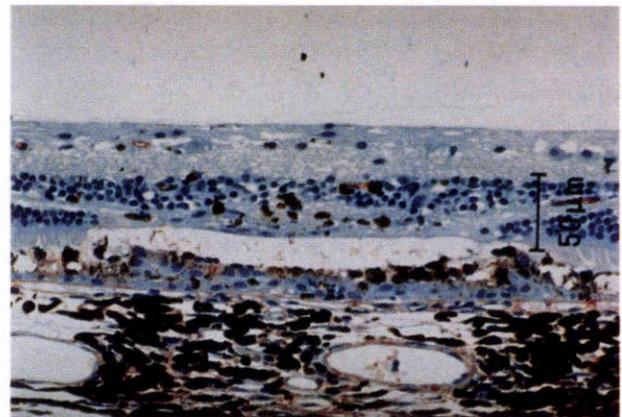
(a)



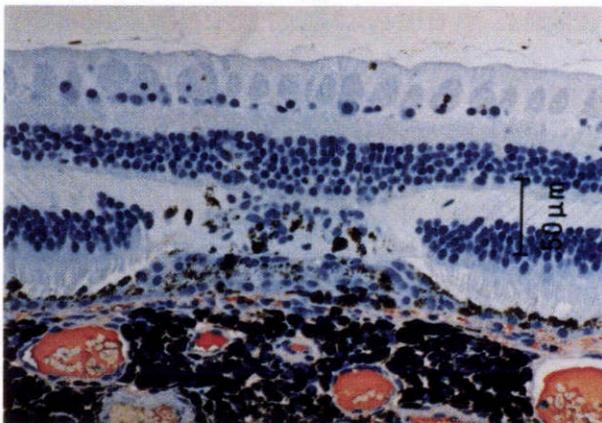
(b)



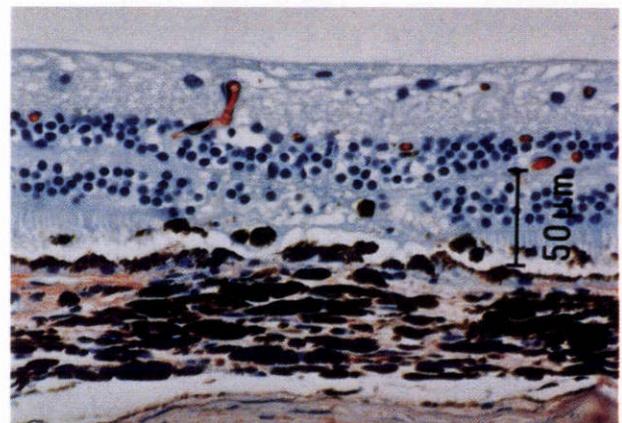
(c)



(d)



(e)



(f)

図3 抗血清アルブミン抗体による免疫染色の結果.

a: 光凝固1時間後, 網膜血管内に陽性所見を認めるが, 網膜血管周囲に抗血清アルブミン抗体の陽性所見はみられない. 光凝固部の視細胞層, 網膜色素上皮細胞, 脈絡膜に陽性所見がみられる. 脈絡膜には血栓がみられ, その部に強い抗血清アルブミン抗体の陽性所見がみられる. 光凝固部の網膜色素上皮細胞に核が認められる.

b: 光凝固1日後. 光凝固斑の外網状層, 外顆粒層, 視細胞層, 網膜色素上皮細胞および脈絡膜に陽性所見がみられる. 光凝固1時間後に比べ網膜外層の抗血清アルブミン抗体の陽性所見が強い. また, 光凝固部の網膜色素上皮細胞に核が認められない.

c: 光凝固3日後. 光凝固斑の外網状層, 外顆粒層, 視細胞層, 網膜色素上皮細胞および脈絡膜に陽性所見がみられる. 網膜外層の抗血清アルブミン抗体の陽性所見は光凝固1日後と変わらない. また, 光凝固部の網膜色素上皮細胞に核が認められない.

d: 光凝固7日後. 網膜外層の抗血清アルブミン抗体の陽性所見は減少している. 網膜色素上皮細胞は増殖重層化し, 網膜色素上皮細胞に抗血清アルブミン抗体の陽性所見が認められないものが増えている.

e: 光凝固2週後. 網膜外層に抗血清アルブミン抗体の陽性所見はほとんど認めない.

f: 光凝固4週後. 光凝固4週後でもわずかながら網膜色素上皮細胞に抗血清アルブミン抗体の陽性所見を認めるものがまれにある.

を行い、ニトロセルロース膜に転写した。転写したニトロセルロース膜にブロックエース（雪印乳業 1 : 1）を室温 20 分間反応させた後、ヤギ抗ヒト血清アルブミン抗体（Cappel 社 1 : 2,000）を室温 30 分間反応させた。次に、ペルオキシダーゼ標識ブタ抗ヤギ IgG 抗体（TAGO 社 1 : 2,000）と室温 30 分間反応させた。その後、3,3'-diaminobenzidin (DAB)/Ni/Co で発色させた。

3. 免疫染色法

摘出した眼球は直ちに 4% パラホルムアルデヒドで室温 10 分固定した。輪部に開窓口を作成した後、4% パラホルムアルデヒドで再固定した。細切しパラフィン包埋後、3~5 μm の切片を作成した。光凝固部切片を脱パラフィンした後、内因性ペルオキシダーゼを阻止するため、0.3% H_2O_2 加メタノール 4 $^\circ\text{C}$ 20 分で処理した。非特異的な反応を低減するため、2% スキムミルク（雪印乳業）で室温 20 分間ブロッキングした。その後、一次抗体としてヤギ抗ヒト血清アルブミン抗体（Cappel 社 1 : 1,000）を用いて室温 60 分間反応させた。次に、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ブタ抗ヤギ IgG 抗体（TAGO 社 1 : 400）と室温 40 分間反応させた。3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) を用いて発色させ、ヘマトキシリンで核染した。免疫染色の対照としては、一次抗体の代わりに一次抗体と同一 IgG 濃度の非免疫正常ヤギ IgG (DAKO 社) を用いた。

III 結 果

1. ウェスタンブロッティングの結果

一次抗体のヤギ抗ヒト血清アルブミン抗体は、サル血清アルブミンに交叉反応を示した（図 1）。

2. 免疫染色の結果

免疫染色の対照は正常網膜についてのみ示すが、他の組織でも AEC の産生物質はみられなかった（図 2 a）。

正常網膜では一部の網膜血管内に抗血清アルブミン抗体の陽性所見を認めたが、その他の網膜内には陽性所見を認めなかった。また、脈絡膜では脈絡膜血管内および間質にも陽性所見がみられた（図 2 b）。

光凝固後の全経過を通じて、網膜血管の周囲の網膜に抗血清アルブミン抗体の陽性所見はみられなかった。

光凝固 1 時間後では、網膜血管内、脈絡膜、および光凝固部視細胞、色素上皮細胞に抗血清アルブミン抗体の陽性所見を認めた。光凝固部脈絡膜には血栓がみられ、その部に抗血清アルブミン抗体の強い陽性所見がみられた（図 3 a）。

光凝固 1, 3 日後の凝固斑においては光凝固に対応した外網状層、外顆粒層、視細胞層、色素上皮細胞および脈絡膜に抗血清アルブミン抗体の陽性所見がみられた。光凝固 1 時間後に比べ網膜外層の抗血清アルブミン抗体の陽性所見が増加している（図 3 b, c）。

光凝固 7 日後の凝固斑では、網膜外層の抗血清アルブ

ミン抗体の陽性所見は減少している。色素上皮細胞は増殖、重層化し、陽性所見が認められないものが増えている（図 3 d）。

光凝固 2, 4 週後の網膜の凝固斑では色素上皮細胞および網膜外層に抗血清アルブミン抗体の陽性所見はほとんど認めない（図 3 e）。光凝固 4 週後の凝固斑でもまれに色素上皮に抗血清アルブミン抗体の陽性所見が認められるものがあった（図 3 f）。

IV 考 按

今回の結果から、中等度網膜光凝固による血液網膜柵の破綻部位は、網膜に出現した血清アルブミンの推移が色素上皮の修復過程とよく相関すること、光凝固により血清アルブミンが観察された網膜外層には元来網膜血管がないこと、また、光凝固部の網膜血管周囲に血清アルブミンの漏出がみられなかったことから、光凝固により出現した血清アルブミンの起源は、網膜血管ではなく脈絡膜であると考えられ、外側血液網膜柵が破綻したものと結論した。

網膜血清アルブミンと網膜色素上皮細胞の形態学的変化との相関関係をみてみると、網膜光凝固 1 時間後の網膜アルブミンは脈絡膜に比べわずかであり、同時期の網膜色素上皮細胞の核はヘマトキシリンで染色されている。網膜外層の血清アルブミンの染色が強く認められた光凝固 1, 3 日後では、網膜色素上皮細胞の核はヘマトキシリンで染色されず、壊死に陥っていると思われた。網膜色素上皮細胞が増殖し重層化した光凝固 7 日後では、網膜外層の血清アルブミンは光凝固 1, 3 日後に比べ減少し、網膜色素上皮細胞の修復が完了したと考えられる¹²⁾光凝固 2 週後以降では、網膜色素上皮細胞に血清アルブミンはほとんど観察されず、網膜外層の血清アルブミンもほぼ消失した。このように、網膜外層に出現した血清アルブミンの推移が網膜色素上皮細胞の修復過程とよく相関した。また、今回我々が行った網膜光凝固による網膜組織の破壊は色素上皮層から外網状層あるいは内顆粒層の一部にまで及んでおり、組織学的には Tso¹³⁾ の分類で grade II から mild grade III に相当する。したがって、臨床で用いられる強度の網膜光凝固による血液網膜柵の破綻は内側血液網膜柵ではなく、外側血液網膜柵に生じると結論された。

これまでに、ペルオキシダーゼ^{4)~6)}やその他のトレーサー⁶⁾⁷⁾を用いた実験で、光凝固により網膜色素上皮細胞が障害されると外側血液網膜柵の破綻を生じるとは証明されている。しかし、これらの報告では内側血液網膜柵に対する影響はほとんど検索されていない。我々が行った抗血清アルブミン抗体を用いた免疫組織化学的方法は、従来、血液脳関門の破綻を検索するために用いられた方法であるが、それが眼科領域に導入されたものである¹⁰⁾¹¹⁾。この方法はトレーサーを用いないので前処置

が不要であるばかりか、血清蛋白であるアルブミンを指標とするので、トレーサーの性質による血液網膜柵への影響を無視でき、より本来の血液網膜柵機能を反映すると考えられる。

ヒト網膜血管にアルゴン光凝固を行い、48時間後光凝固による網膜血管の影響を形態学的に検索した報告¹⁴⁾では、光凝固条件が強くなるほど光凝固による網膜血管の影響が著しいと述べている。しかし、弱い凝固条件では電子顕微鏡的に内皮細胞核の萎縮、平滑筋細胞の変性および破壊がみられるものの、光学顕微鏡レベルでは血管への影響は認められないといわれている。今回の我々の実験でも内側血液網膜柵に変化はみられず、形態のみならず機能的にも光凝固部の網膜血管に光凝固の影響は少ないと考えられた。また、予備実験において光凝固3日後の組織で網膜内層にまで組織の破壊がみられた凝固斑では、網膜内層の浮腫に一致して血清アルブミンが観察された。しかし、組織の壊死が強くアルブミンの由来は同定できず、強度の網膜光凝固では内側血液網膜柵に破綻が生じている可能性も否定できない。

有色家兎眼にキセノン光凝固を行い、硝子体フルオロフォトメトリーを用いて検討すると、光凝固1日目から硝子体内に多数の蛍光を生じるが、10~14日後には回復する⁹⁾。この結果はレーザーの線種や実験動物の違いはあるが、今回の我々が明らかにした局所での血管網膜柵の破綻の経時変化とよく一致する。渡辺ら⁹⁾は、サル眼網膜にアルゴンレーザー光凝固を施行し、術前後に硝子体フルオロフォトメトリーを行い、血液網膜柵の破壊、修復を検討して、中凝固では術後18週で術前のレベルに回復するが、強凝固ではなおかつ高値を示すと述べており、我々の結果に比べ血液網膜柵の修復に時間を要している。渡辺ら⁹⁾のいう中凝固は内境界膜は保たれているが、内顆粒層が消失するような光凝固をいい、強凝固は網膜全層が破壊されたものをいう。また、強凝固を施行した4眼中1眼に網膜下新生血管を認めており、我々の行った光凝固に比べ明らかに強凝固となっており、そのため血液網膜柵の修復が遅れた可能性がある。また、我々の結果では光凝固2週以降では網膜外層の血清アルブミンはほぼ消失するが、図3fに示すように光凝固4週後でもわずかながら色素上皮細胞に血清アルブミンを認めるものがまれにあり、このような凝固斑が硝子体フルオロフォトメトリー値に影響しているのかも知れないと考えられた。

我々と同様の方法で、糖尿病網膜症における血液網膜柵の破綻について人眼組織を対象に免疫組織化学的に検索した結果、糖尿病網膜症では主に内側血液網膜柵が破綻している¹⁰⁾とされている。それでは光凝固により外側血液網膜柵に影響を及ぼすと、なぜ内側血液網膜柵の異常に起因する疾患に治療効果が生じるのだろうかという疑問が生じる。その理由として、① Peymanら⁴⁾⁵⁾が提唱

するように、光凝固で外側血液網膜柵が破壊され、光凝固部を通して内側網膜の浮腫が吸収される。②再構築させた外側血液網膜柵から障害された内側血液網膜柵に対して何らかの信号が送られ、内側血液網膜柵に影響を及ぼす。③正常網膜において中等度光凝固は内側血液網膜柵に影響しないが、病的状態だと内側血液網膜柵に影響を与える可能性などが考えられる。今回の実験は、正常サル眼網膜に対して光凝固を行ったものであり、血液網膜柵の破綻を生じた眼に対する光凝固の影響をみていない。今後は、病的状態において血液網膜柵に対する光凝固の影響を検討する必要があると思われる。

今回の実験で、我々はアルブミンが光凝固後網膜外層に漏出することを確認した。網膜光凝固後の組織の修復に血小板由来成長因子やフィブロネクチンなどの血液成分が関与すると考えられており¹⁵⁾、血液成分であるアルブミンが網膜に漏出することは、血小板由来成長因子やフィブロネクチンなどの血液成分がアルブミンとともに網膜内に漏出している可能性が示唆され、光凝固の奏効機序の1つとして光凝固後にみられる血液成分が何らかの役割を演じていると考えられた。

文 献

- 1) 塩瀬芳彦：眼内 barrier 機構とその臨床的意義。臨眼 31：875—887, 1977.
- 2) 小椋祐一郎, 高橋佳子, 塚原陽子, 三木正毅, 近藤武久：糖尿病性網膜症の Vitreous fluorophotometry (1) 年齢, 罹患期間, 網膜症との関係について。日眼会誌 87：253—258, 1983.
- 3) 吉田晃敏：血液網膜関門の基礎。眼科 31：1227—1232, 1989.
- 4) Peyman GA, Spitznas M, Straatsma BR: Chorioretinal diffusion of peroxidase before and after photocoagulation. Invest Ophthalmol 10: 489—495, 1971.
- 5) Peyman GA, Bok D: Peroxidase diffusion in the normal and laser-coagulated primate retina. Invest Ophthalmol 11: 35—45, 1972.
- 6) Wallow IH: Repair of the pigment epithelial barrier following photocoagulation. Arch Ophthalmol 102: 126—135, 1984.
- 7) 大熊正人：光凝固による網膜色素上皮細胞間結合の破壊と修復。日眼会誌 79：258—268, 1975.
- 8) Noth JM, Vygantas C, Cunha-Vaz JGF: Vitreous fluorophotometry evaluation of xenon photocoagulation. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 1206—1209, 1978.
- 9) 渡辺正樹, 能美俊典, 藤井正満, 渋谷勇三, 瀬戸川朝一：サル眼網膜に対するアルゴンレーザー光凝固後の Vitreous Fluorophotometry. 日眼会誌 89: 323—334, 1985.
- 10) Viores SA, Gadegbeku C, Campochiaro PA, Green WR: Immunohistochemical localization of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics. Am J Pathol 134: 231—235, 1989.

- 11) **Vinore SA, Campochiaro PA, Lee A, McGehee R, Gadegbeku C, Green WR**: Localization of blood-retinal barrier breakdown in human pathologic specimens by immunohistochemical staining for albumin. *Lab Invest* 62: 742-750, 1990.
- 12) 石郷岡均, 上野聡樹, 本田孔士: アルゴンレーザー光凝固による瘢痕形成過程のミュラー細胞動態について一組織化学的検索一. 網膜脈絡膜萎縮調査研究班, 昭和60年度報告書: 132-136, 1986.
- 13) **Tso MOM**: Retinal photocoagulation therapy: Clinical application and biological basis of therapeutic effects. In: Tso MOM (Ed): *Retinal diseases*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 247-262, 1988.
- 14) 浜井保名, 佐藤佐内, 柳田 泰, 筑田富士雄, 高橋茂樹: アルゴンレーザー光凝固のヒト網膜血管におよぼす影響. *眼紀* 30: 1630-1637, 1979.
- 15) 林 英之, 加藤 整: ミュラー細胞と光凝固. *眼科* 32: 691-695, 1990.