

沃素酸ナトリウム投与ラットにおける脈絡膜毛細血管内皮細胞 有窓構造の変化

—スチレン樹脂割断法による走査型電子顕微鏡的観察—

白木 邦彦, 森脇 光康, 河野 剛也, 阪本 卓司, 三木 徳彦

大阪市立大学医学部眼科学教室

要 約

脈絡膜毛細血管の有窓構造は様々な眼の病態において喪失, 再生し得る. 今回, 走査型電子顕微鏡で有窓構造の減少・喪失の過程を明らかにすることを試みた. 有色ラットを用い, 沃素酸ナトリウムを静脈注射することによって網膜色素上皮を障害し, 3, 5, 7日目にスチレン樹脂割断法に基づいて眼球を処理した. 3日目では, 脈絡膜毛細血管の網膜側内腔表面に有窓構造の密な集合がみられ, これら集合は細胞質突起によって囲まれていた. 5, 7日目には, 有窓構造の集合は小さく, かつその大きさは不同となり, 集合間の細胞質突起は平坦かつ幅広になっていた. また, 一部の細胞は平坦な細胞表面

を呈し, 有窓構造のごく小さい集合を有していた. 以上から, 有窓構造の喪失過程では有窓構造の集合の大きさが小さくなり, 集合程度に不同がみられた. しかし, 集合として存在する傾向は, 光凝固後の脈絡膜毛細血管有窓構造の再生過程におけると同様に, 維持されていた. (日眼会誌 98: 558—565, 1994)

キーワード: 走査型電子顕微鏡, 沃素酸ナトリウム, 脈絡膜毛細血管, 有窓構造, スチレン樹脂割断法

Scanning Electron Microscopic Observation on Altered Fenestration of the Choriocapillaris in Sodium Iodate-treated Rats

Kunihiko Shiraki, Mitsuyasu Moriwaki, Takashi Sakamoto,
Takeya Khono and Tokuhiko Miki

Department of Ophthalmology, Osaka City University Medical School

Abstract

Fenestration of the choriocapillaris may be lost and regained in various pathologic conditions. The purpose of this study was to observe the gradual disappearance of fenestrae with the scanning electron microscope. Pigmented rats were treated with an intravenous injection of sodium iodate. Changes in the choriocapillaris were produced by damaging retinal pigment epithelium. The eyes were processed for styrene embedded cracking on the third, fifth, and seventh days. Dense clusters of fenestrae were seen at the luminal surface facing retina on the third day. These clusters were surrounded by protrusion of cellular surface. The clusters of fenestrae were smaller with some variation in size on the fifth

and seventh days. The protrusion between the clusters became flatter and wider. Some endothelial cells had a flat surface with tiny clusters of fenestrae. Although there was loss of fenestrae with smaller clusters and some variation in size, the tendency of the fenestrae to cluster was sustained in the same way as during the reformation of fenestrae in the choriocapillaris after laser photocoagulation. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 558—565, 1994)

Key words: Choriocapillaris, Fenestration, Sodium iodate, Scanning electron microscope, Styrene cracking method

別刷請求先: 545 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-5-7 大阪市立大学医学部眼科学教室 白木 邦彦
(平成5年12月21日受付, 平成6年2月16日改訂受理)

Reprint requests to: Kunihiko Shiraki, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka City University Medical School, Asahi-machi, 1-5-7, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

(Received December 21, 1993 and accepted in revised form February 16, 1994)

I 緒 言

網膜色素上皮(以下, RPE)細胞と視細胞における旺盛な代謝ともかかわって, 脈絡膜毛細血管内皮細胞には有窓構造が存在する¹⁾²⁾。血管内皮細胞の有窓構造変化に関して, レーザー光凝固部での脈絡膜毛細血管における有窓構造の再形成過程を, また, ウレタン網膜症において網膜色素上皮により包埋された網膜血管内皮細胞の有窓構造形成過程を, スチレン樹脂切断法を用い走査型電子顕微鏡(以下, 走査型電顕)で明らかにしてきた³⁾⁴⁾。また, これら内皮細胞での有窓構造の形成とは逆に, 有窓構造が消失する病態も報告されている。すなわち, 沃素酸ナトリウム(以下, 沃素酸)投与によりRPEが障害された場合, 脈絡膜毛細血管内皮細胞の有窓構造が減少・消失し, 細胞質が肥厚化することが透過型電子顕微鏡(以下, 透過型電顕)により明らかにされている⁵⁾⁶⁾。今回我々は, 沃素酸投与ラットでの, 脈絡膜毛細血管内皮細胞における有窓構造の減少・消失について三次元的に明らかにするために, 前回と同様スチレン樹脂切断法⁷⁾を用い走査型電顕で観察した。

II 実験材料ならびに方法

ロングエバンストラットを用い, 塩酸ケタミン(ケタラール[®] 30 mg/kg 体重)およびベントバルビタールナトリウム(ネプタール[®], 30 mg/kg 体重)の腹腔内注射で全身麻酔した。下腿静脈を露出後, 26 ゲージカテーテルを留置し, 生理食塩水に溶解した沃素酸ナトリウム(50 mg/kg 体重)を4, 5 時間の間隔をあけて2回静脈注射した。沃素酸ナトリウム投与後, 3日目, 5日目, 7日目に再度同様に全身麻酔を施行し, 左心室から18 ゲージカテーテルを挿入し, 上行大動脈に留置した。そして, 前回の報告⁷⁾のように, ヘパリン加リンゲル液によって血液を洗い出し, Karnovsky液(0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.4)で灌流固定した。その後, 眼球を摘出, 赤道部で眼球を2分割し, 後極側の眼球を細切後, 再度Karnovsky液中で浸漬固定した。そして, 2% オスミウム酸で後固定し, エタノール系列で脱水後, 強膜が切り出し面となるように, スチレン樹脂に包埋し, 重合させた。強膜側から脈絡膜毛細血管に向かってRPEに平行な方向で超ミクロトームで切削し, 光学顕微鏡(以下, 光顕)標本を作成した。切片は順次トルイジンブルーで染色しながら切削面の位置を確認し, 脈絡膜毛細血管内腔が観察されるまで切削した。それらの標本をプロピレンオキサイドで脱スチレンし, 酢酸アミルに置換, 臨界点乾燥後, 金・白金でスパッター蒸着し, 脈絡膜毛細血管内皮細胞の網膜側内腔表面を走査型電顕で観察した。なお, 沃素酸による障害は乳頭近傍で強く, また周辺部では少ないため, 乳頭と赤道部の中間に位置する部位を観察の対象とした。また, 沃素酸によるRPEの障害程度を確認する

ため, エポキシ樹脂包埋で光顕切片も型のごとく作成し, トルイジンブルーで染色, 観察した。

III 結 果

1. 光顕所見

沃素酸投与後3日目, エポキシ包埋切片では視細胞外節の配列の乱れがみられ, RPEはメラニン色素を有する一層の細胞層として認められた(図1)。一部の切片では, メラニン顆粒を含む不整形なマクロファージ様の細胞がBruch膜上に認められた。また, スチレン包埋切片では, RPE細胞は色素をもつ細胞として均一な配列を維持していた(図2)。

投与後5日目, エポキシ包埋切片では外節の配列の乱れに加えて, 外節の部分的な消失, 外節ならびにBruch膜上にメラニン色素を持った多数のマクロファージ様細胞が存在し, RPE細胞の部分的消失がみられた(図3)。スチレン包埋切片では, RPE細胞の配列が認められる部位と, 認められない部位が存在した。

投与後7日目では, エポキシ包埋切片(図4)およびスチレン包埋切片(図5)とも, Bruch膜上およびその網膜側では顆粒状の物質とメラニン顆粒をもつマクロファージ様細胞が主体となっており, スチレン包埋切片でもRPE細胞の配列は認められなかった。ただし, 一部の切片では軽度の外節の変化にとどまる部位も存在した。

2. 脈絡膜毛細血管内皮細胞の走査型電顕所見

投与後3日目, スチレン包埋切片上RPE細胞が均一な配列を示す部位を観察すると, 脈絡膜毛細血管内皮細胞の網膜側内腔面に, 細胞質隆起で囲まれた有窓構造の密な集合が広範囲にみられた(図6)。

投与後5日目および7日目, RPE細胞の配列が明確に認められず, 顆粒状の物質とメラニン顆粒をもつマクロファージ様細胞が主体となっている部位を観察すると, 有窓構造の集合は次第に小さな島状となり, 各集合の大きさは不均一に, そして, これら集合間の細胞表面は管腔側に幅広く隆起していた(図7)。また, 隣接する内皮細胞間で有窓構造の集合程度に差がみられた(図8)。さらに, 平坦な細胞表面を呈し, 有窓構造の集合がほとんどみられない細胞も存在した(図9)。なお, これらの所見は, 投与後7日目で著しかった。また, 部位によっては以上の所見に多少のばらつきがみられた。

IV 考 按

個体および観察部位により多少の差異はみられるが, 沃素酸ナトリウムでRPEを障害した今回の実験では, 沃素酸投与3日目以降, 時間の経過とともにRPEおよび外節の変性・消失が光顕切片にみられるように高度になった。そして, 5日目と7日目にはRPE細胞の配列が消失し, Bruch膜上およびその網膜側に顆粒状物質とマ

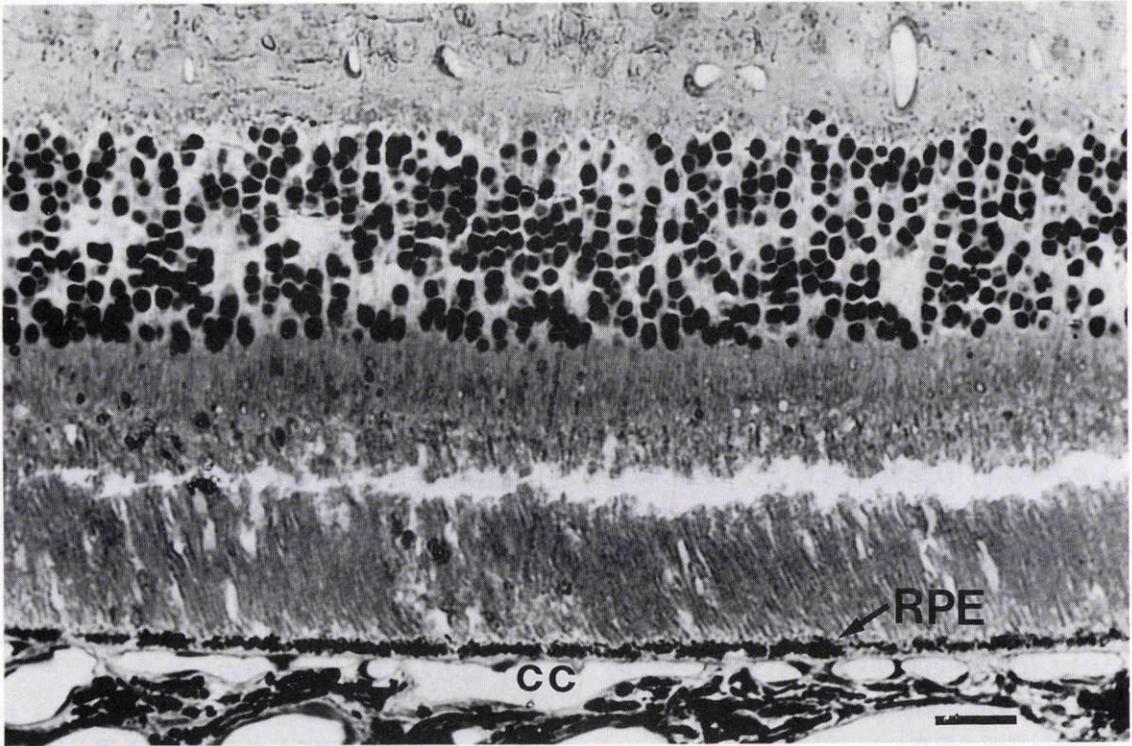


図1 沃素酸ナトリウム投与3日目の網膜脈絡膜の光学顕微鏡写真(エポソ包埋切片)。
網膜色素上皮は一層の細胞層を維持している。RPE: 網膜色素上皮, cc: 脈絡膜毛細血管, バーは20 μ m

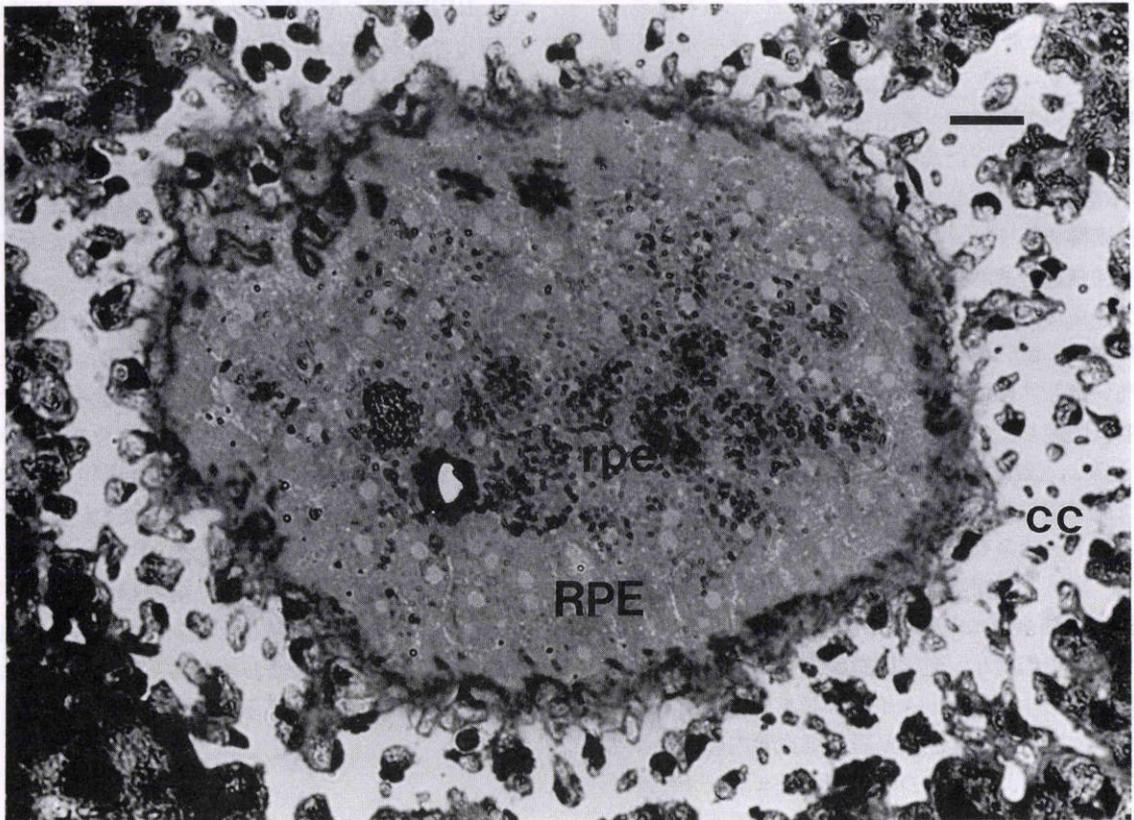


図2 沃素酸ナトリウム投与3日目の網膜色素上皮および脈絡膜毛細血管の光学顕微鏡写真(網膜色素上皮および脈絡膜毛細血管層に平行な切片, スチレン包埋)。
網膜色素上皮細胞の均一な配列が認められる。なお, メラニン色素顆粒は網膜色素上皮細胞のapical側に位置するため, 脈絡膜毛細血管に近い網膜色素上皮細胞(RPE)にはメラニン色素顆粒は少なく, 脈絡膜毛細血管で囲まれた領域の中心側に位置する網膜色素上皮細胞(rpe)にはメラニン色素顆粒が多く認められる。RPE, rpe: 網膜色素上皮, cc: 脈絡膜毛細血管, バーは20 μ m

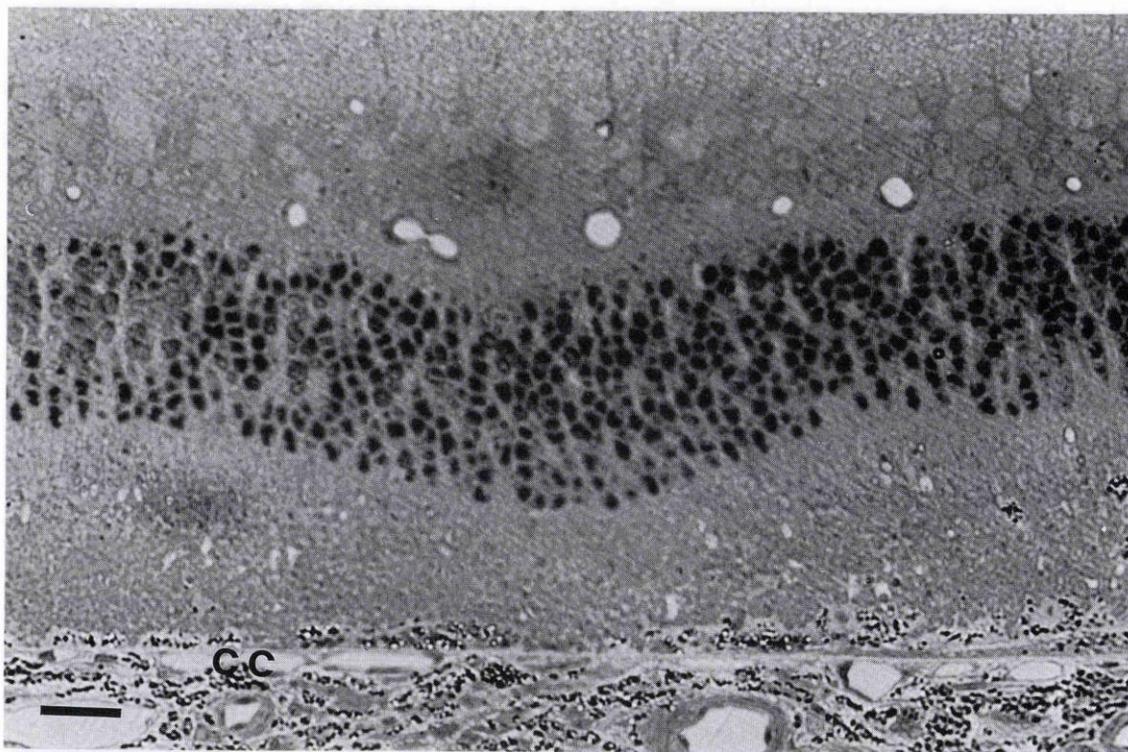


図3 沃素酸ナトリウム投与5日目の網膜脈絡膜の光学顕微鏡写真(エポソ包埋切片).
視細胞外節の配列が乱れ, さらに一部では外節の消失に至っている. 外節の部位および Bruch 膜上にメラニン色素を持った多数のマクロファージ様細胞が存在し, 網膜色素上皮は一部で消失している. cc: 脈絡膜毛細血管, バーは 20 μ m

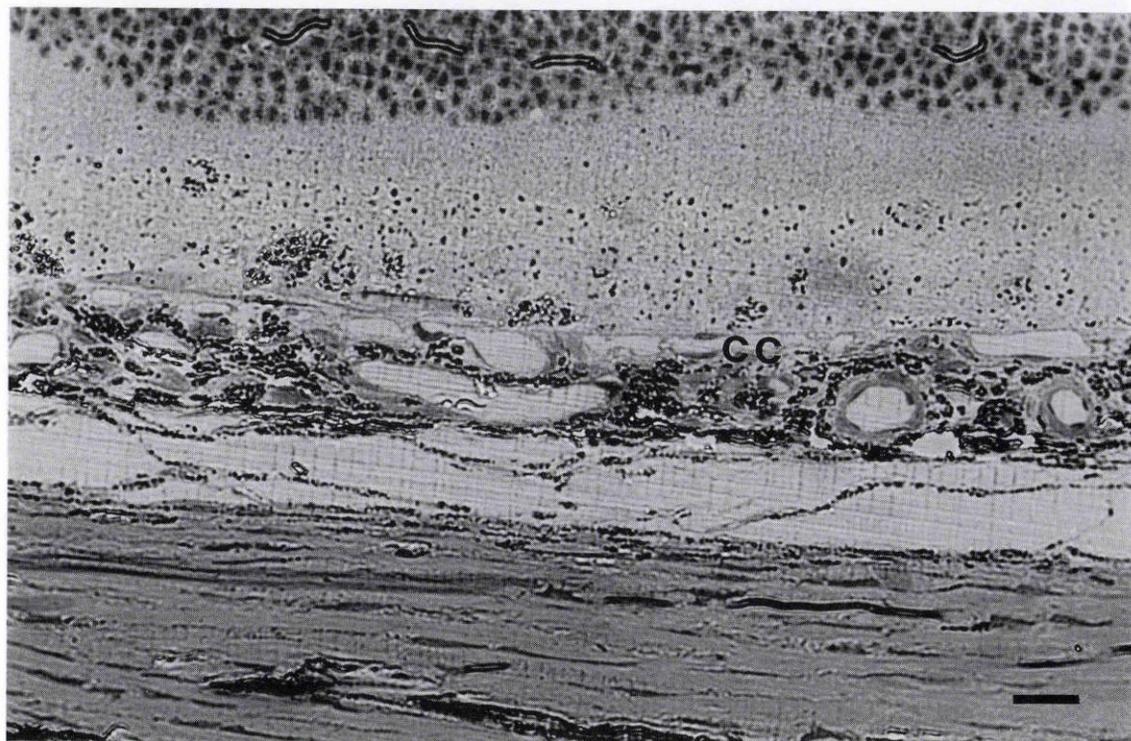


図4 沃素酸ナトリウム投与7日目の網膜脈絡膜の光学顕微鏡写真(エポソ包埋切片).
Bruch 膜上およびその網膜側では顆粒状の物質とメラニン顆粒を有したマクロファージ様細胞が主体となっている. cc: 脈絡膜毛細血管, バーは 20 μ m

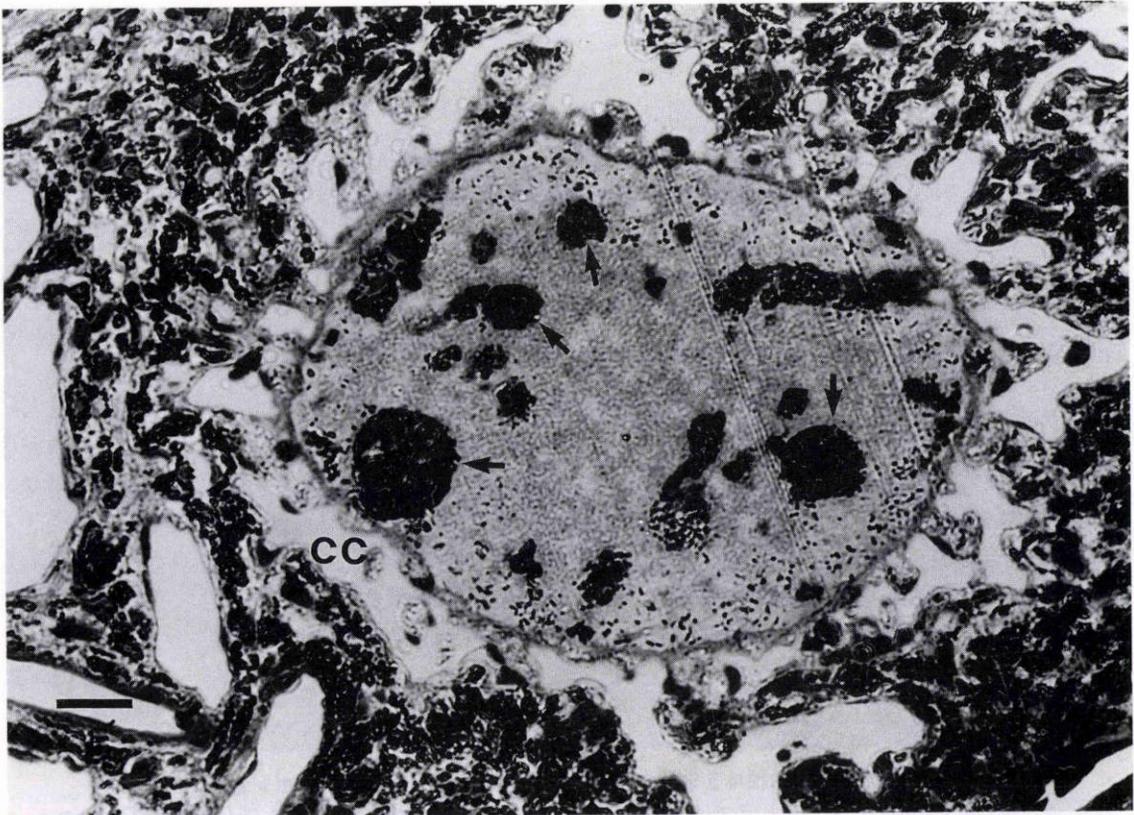


図5 沃素酸ナトリウム投与7日目の網膜脈絡膜の光学顕微鏡写真（網膜色素上皮および脈絡膜毛細血管層に平行な切片，スチレン包埋）。

Bruch膜に隣接した領域に網膜色素上皮の配列は認められず，エボン包埋切片と同様 Bruch膜上およびその網膜側では顆粒状の物質とメラニン顆粒を有したマクロファージ様細胞（矢印）が主体となっている。
cc：脈絡膜毛細血管，バーは20 μm

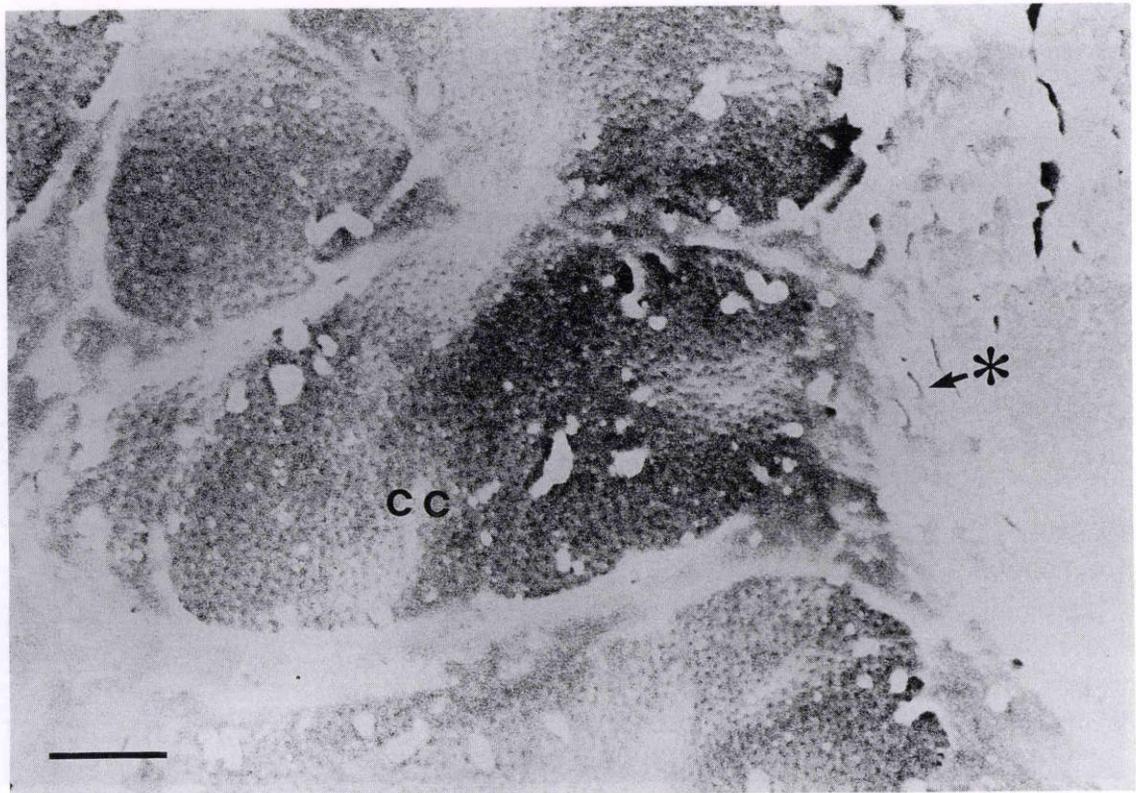


図6 沃素酸ナトリウム投与3日目の走査型電子顕微鏡写真（脈絡膜毛細血管内皮細胞の網膜側内腔面）。細胞質隆起に囲まれて存在する有窓構造の密な集合が広範囲にみられる。*：網膜色素上皮側，cc：脈絡膜毛細血管，バーは1 μm

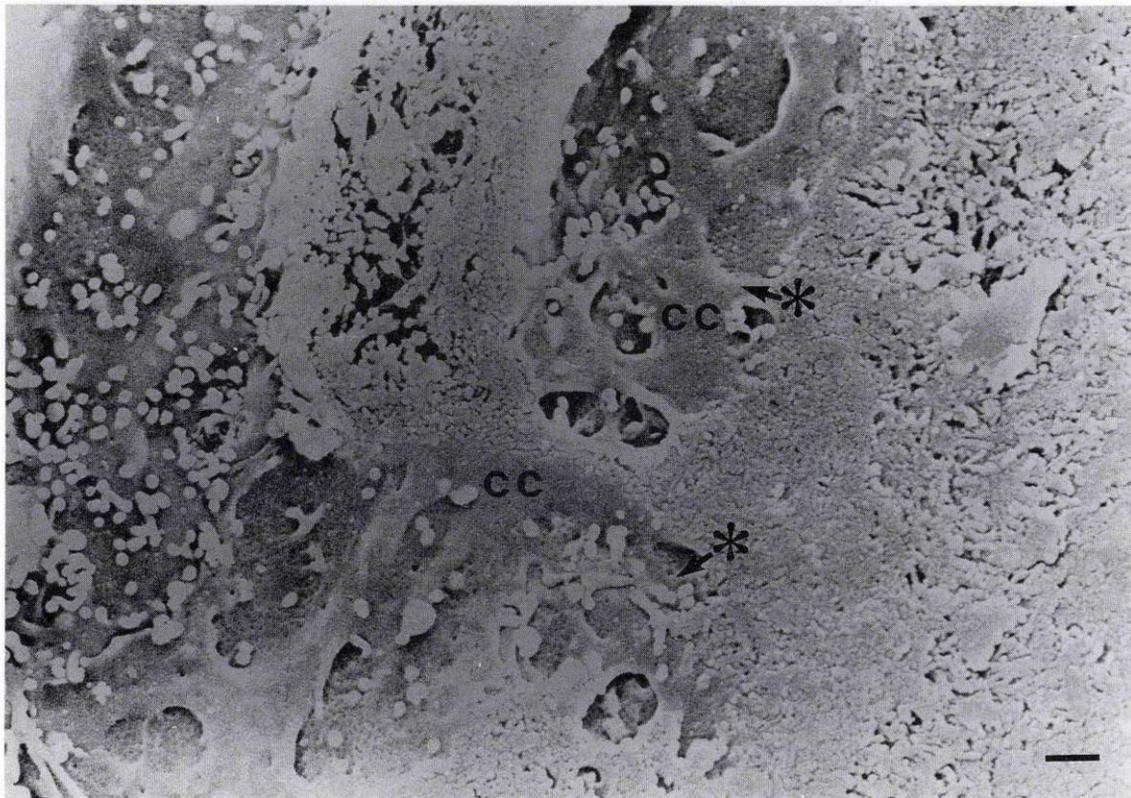


図7 沃素酸ナトリウム投与7日目の走査型電子顕微鏡写真(脈絡膜毛細血管内皮細胞の網膜側内腔面). 有窓構造の各集合は小さく島状に存在し, その大きさは不均一である. また, 集合間の細胞質は管腔側に幅広く隆起している. *: 網膜色素上皮側, cc: 脈絡膜毛細血管, バーは1 μ m

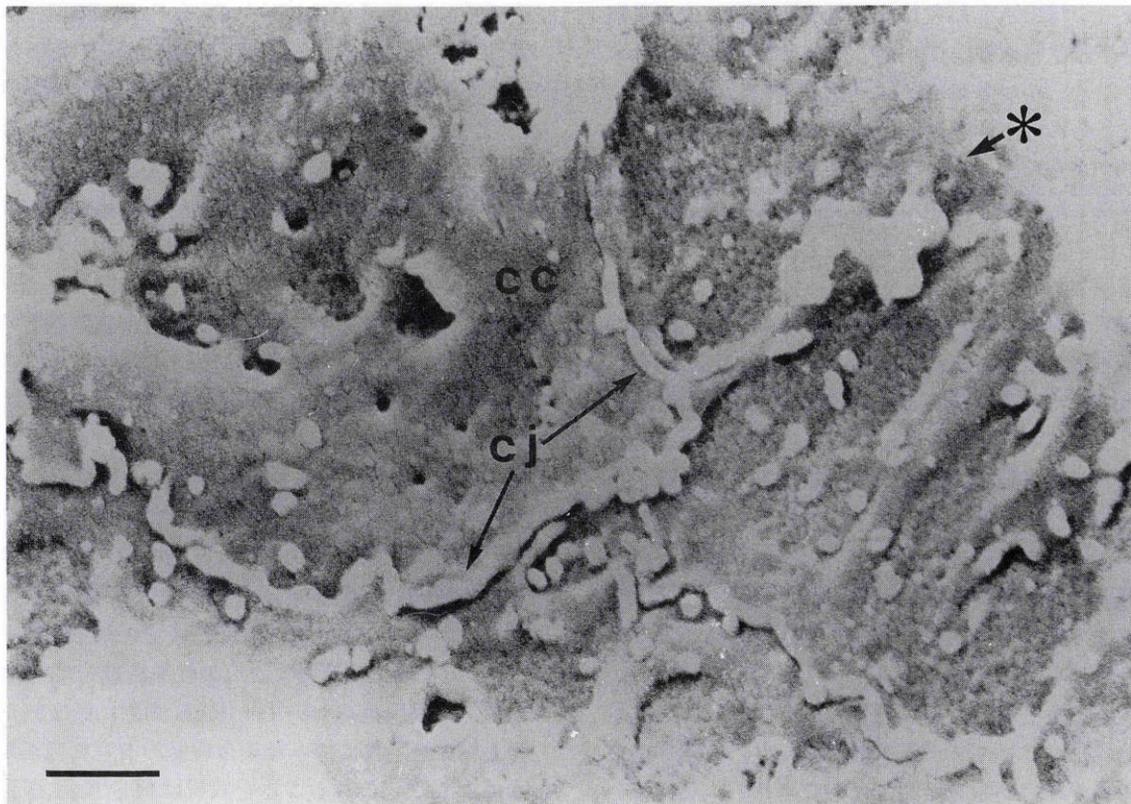


図8 沃素酸ナトリウム投与7日目の走査型電子顕微鏡写真(脈絡膜毛細血管内皮細胞の網膜側内腔面). 隣接する内皮細胞間において, 細胞間結合部を境界に有窓構造の集合の程度が異なる. *: 網膜色素上皮側, cc: 脈絡膜毛細血管, cj: 細胞間結合部, バーは1 μ m

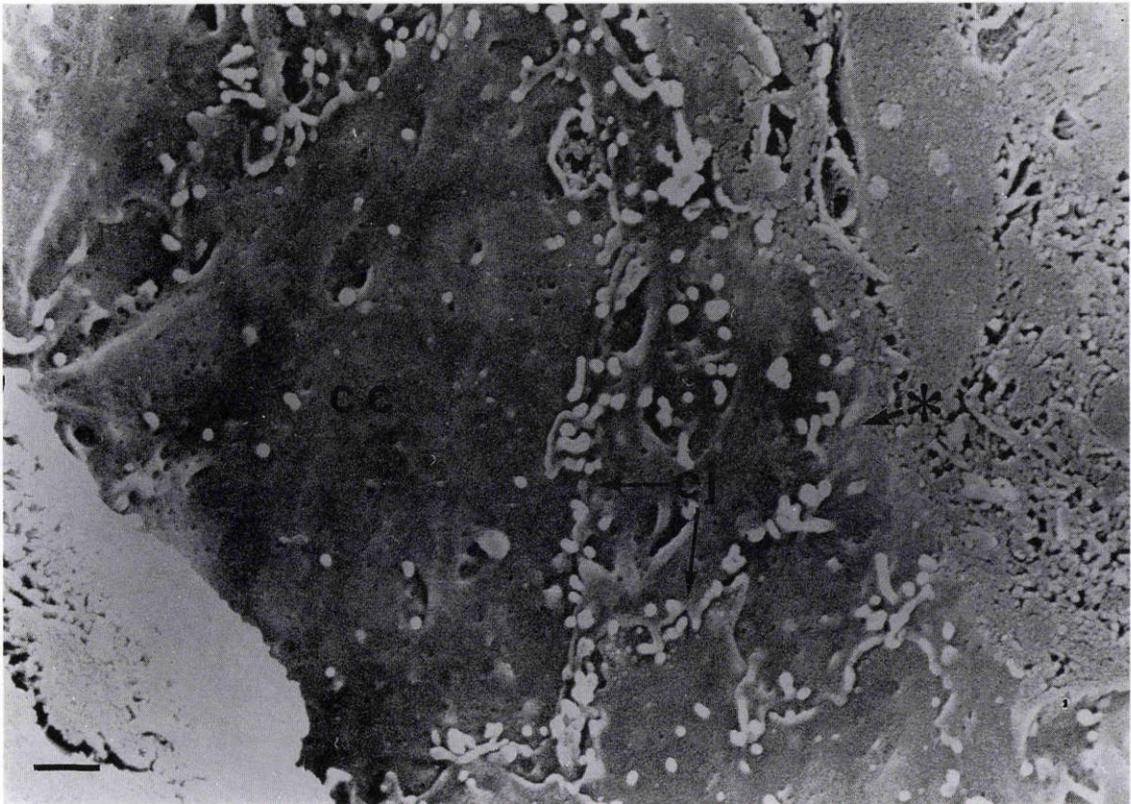


図9 沃素酸ナトリウム投与7日目の走査型電子顕微鏡写真(脈絡膜毛細血管内皮細胞の網膜側内腔面)。中央部を縦に走る細胞間結合部の左側に位置する内皮細胞には、細胞表面が比較的平坦で、細胞有窓構造の集合があまりみられない。*：網膜色素上皮側，cc：脈絡膜毛細血管，cj：細胞間結合部，バーは1 μ m

クロファージ様細胞が存在した。走査型電顕による観察では、脈絡膜毛細血管内皮細胞の有窓構造の集合は次第に小さくなり、かつ各集合間の細胞質隆起が幅広くなっていた。さらには、有窓構造の集合のほとんどみられない部位が存在した。これらの細胞は、Korteら⁶⁾が透過型電顕で観察した、有窓構造の減少・消失および細胞質の肥厚化を伴った内皮細胞に相当すると思われる。また、脈絡膜毛細血管の消失⁶⁾もみられると報告していることから、今回の実験で有窓構造の減少・消失した内皮細胞は、変性・消失に至る細胞であるとも考えられる。しかし、Korteら⁶⁾は、RPE細胞と脈絡膜毛細血管との間の相互作用、すなわち、脈絡膜毛細血管内皮細胞およびその有窓構造の形成・維持に関して、RPE細胞が成長因子のような可溶性因子や細胞間物質を産生していると想定している。このような仮説に立てば、今回の実験にみられた有窓構造の集合単位の縮小は、RPE・脈絡膜毛細血管間に存在する何らかの因子のRPE細胞の障害による減少を反映するものと考えられる。

また、脈絡膜毛細血管内皮細胞の有窓構造について形成過程を観察したレーザー光凝固実験では、有窓構造の小さい集合が細胞表面の陥凹部に形成され、次第に集合の大きさが大きくなり、さらには細胞質隆起に囲まれた有窓構造の広範な集合が形成される。この際、凝固部中心部から周辺部に向かうほど、脈絡膜毛細血管内皮の有

窓構造の集合が大きくなっていった³⁾。光凝固部位では、凝固壊死に陥ったRPE細胞が周囲のRPE細胞の増殖により置き換えられ、同時に凝固壊死となった脈絡膜毛細血管内皮も凝固部周囲から再生した内皮に置き換えられる。したがって、有窓構造の集合度を内皮細胞の成熟度と考えた場合、凝固部周辺部に位置する血管内皮ほど成熟している。この内皮細胞の成熟は、RPE細胞の存在の有無にかかわらず、細胞の再生後、時間の経過とともに必然的に発現する脈絡膜毛細血管内皮細胞固有の性質とも思われるが、同時にRPE細胞も再生していることから、Korteら⁶⁾のいうRPE細胞由来の因子が有窓構造の成熟に関与していることも考えられる。また、Bellhornら^{9)~11)}は、網膜変性を生じるウレタン網膜症ならびに同様の病態がみられる光毒性網膜症において、RPE細胞に囲まれた網膜血管内皮細胞到有窓構造の出現を透過型電顕的に観察し、網膜血管内皮細胞はRPE細胞に囲まると、周囲の環境変化に対応してその微細形態を変え得る。すなわち、網膜血管の可塑性を指摘している。また、ウレタン網膜症においてもRPE細胞に囲まれた網膜血管毛細血管内皮に様々な集合程度の有窓構造が走査型電顕により認められることを我々は報告⁴⁾してきた。すなわち、ウレタン網膜症では、網膜毛細血管網のなかでも、最も脈絡膜側に位置する内顆粒層の網膜血管が最も早くRPE細胞に接する。脈絡膜側に位置する血管ほど有窓構

造の集合は大きく、逆に硝子体側に位置する血管ほど有窓構造の集合は小さい傾向にあり、さらに、硝子体側に位置しRPE細胞に囲まれていない血管では内皮に有窓構造がみられなかった。このことから、Korteらのいう細胞由来の有窓構造形成・成熟促進因子が、脈絡膜側に位置する網膜毛細血管に最も早く、したがって、長期に作用して、密な有窓構造の集合を形成させたと考えられる。

これらのことを考慮すれば、今回の沃素酸投与ラットにおいても、RPE細胞が障害・消失することにより、RPE細胞由来の有窓構造形成・成熟促進因子が減少・消失し、脈絡膜毛細血管内皮細胞にみられる有窓構造の集合が次第に小さくなり、ついにはほとんど消失するに至ったと推論される。RPE細胞によってbasic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factorなどの成長因子およびtransforming growth factor- β などの産生が指摘されていることから^{12)~15)}、RPE細胞が様々な生物活性因子を産生している可能性も考えられ、その一つとして有窓構造形成・成熟促進因子の存在が推測される。

本論文は、第94回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) **Bernstein MH, Hollenberg MJ**: Fine structure of the choriocapillaris and retinal capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 4: 1016-1025, 1965.
- 2) **Spitznas M, Reale E**: Fracture faces of fenestrations and junctions of endothelial cells in human choroidal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14: 98-107, 1975.
- 3) **河野剛也, 杉野公彦, 白木邦彦, 三木徳彦**: 眼組織の切断法による観察. 第6報. 光凝固後の脈絡膜毛細血管内皮細胞における Fenestration の分布状態の変化について. *眼紀* 39: 2180-2185, 1988.
- 4) **Khono T**: Development of the clustered fenestrae in pathologic conditions. *Osaka City Med J* 39: 151-166, 1993.
- 5) **Ringvold A**: Transient breakdown of the retinal pigment epithelium diffusion barrier after sodium iodate: A fluorescein angiographic and morphologic study in the rabbit. *Exp Eye Res* 33: 361-369, 1981.
- 6) **Korte GE, Reppucci V, Henkind JP**: RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1135-1145, 1984.
- 7) **松島三夫, 三木徳彦**: 眼組織の切断法による観察. (第1報) Styrene 樹脂切断法による家兎脈絡膜血管内面の光顕的走査電顕的観察. *眼紀* 31: 280-292, 1980.
- 8) **Korte GE, Burns MS, Bellhorn RW**: Epithelium-capillary interactions in the eye. The retinal pigment epithelium and the choriocapillaris. *Int Rev Cyt* 114: 221-248, 1989.
- 9) **Bellhorn RW, Bellhorn MS, Friedman AH, Henkind P**: Urethane induced retinopathy in pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 65-76, 1973.
- 10) **Bellhorn RW, Burns MS, Benjamine JV**: Retinal vessel abnormalities of phototoxic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 584-595, 1980.
- 11) **Burns MS, Bellhorn RW, Korte GE, Heriot WJ**: Plasticity of the retinal vasculature. In: Osborne N, et al (Eds): *Progress In Retinal Research* 5: 253-307. Pergamon Press, Oxford, 1986.
- 12) **Schweigerer L, Malerstein B, Neufeld G, Gospodarowicz D**: Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 934-940, 1987.
- 13) **Sternfeld MD, Robertson JE, Sahipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT**: Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factors and its receptors. *Curr Eye Res* 8: 1029-1037, 1989.
- 14) **Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, Hjelmeland LM**: Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. *Exp Eye Res* 49: 217-227, 1989.
- 15) **Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N**: Identification of transforming growth factor- β expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 413-419, 1993.