

## ラット網膜における実験的脈絡膜新生血管の発生

戸部 隆雄, 高橋 寛二, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

## 要 約

有色ラットの眼底後極部に半導体レーザーで強度の光凝固を行い、78%の高率に脈絡膜新生血管を発生し得た。光凝固後、ラット眼では網膜色素上皮の増殖が旺盛で、網膜下に新生血管が光凝固後3日の早期に発生した。新生血管からの蛍光漏出は少なく、漿液性網膜剝離はほとんどみられなかった。今後、実験的脈絡膜新生血管の

発生モデルとして、本法は有用である。(日眼会誌 98: 837-845, 1994)

キーワード: 脈絡膜新生血管, 網膜, 網膜色素上皮, レーザー光凝固, 動物モデル

## Experimental Choroidal Neovascularization In the Rat

Takao Tobe, Kanji Takahashi, Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

## Abstract

We successfully produced, highly (78%) reproducible experimental choroidal neovascularization (ChNV) in the subretinal space of pigmented rats with intense diode laser photocoagulation. ChNV in the pigmented rat was characterized by rapid development of neovascular membrane and proliferation of retinal pigment epithelium in the subretinal

space. This procedure may be useful as an experimental model for ChNV. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 837-845, 1994)

Key words: Choroidal neovascularization, Retina, Retinal pigment epithelium, Laser photocoagulation, Animal model

## I 緒 言

近年、老人性円板状黄斑変性が急増し、その原因となる脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization) の発生や治療について、実験的、臨床的研究が進められている<sup>1)</sup>。

我々は、Ryan<sup>2)</sup>の方法を一部修正し、サル眼にレーザー光凝固を行って、実験的脈絡膜新生血管を発生させ、その進展と退縮を形態学的に観察してきた<sup>3)-6)</sup>。また、実験的脈絡膜新生血管に対して、レーザー光凝固治療を行い、その奏功機序を明らかにしてきた<sup>7)-8)</sup>。

サル眼は人眼に類似している利点があるが、一方、入手は困難であり、動物保護の上からも多数例を扱うことが難しい。さらに、処置後、新生血管発生の時期が長く、新生血管発生率が約50%と低い欠点があった<sup>3)</sup>。このような観点から、小動物に実験的脈絡膜新生血管の発生が可能なら有用であり、今までもラットを用いた報告が

ある<sup>9)10)</sup>。

今回、筆者らはサル、ヒトと同様に網膜血管の発達した有色ラットに、半導体レーザー光凝固を行って高率に、再現性のある脈絡膜新生血管を発生させ、その発生過程を詳細に検討し得たので報告する。

## II 実験方法

実験動物として、体重200~300gの雄の有色ラット (Brown-Norway系) 18匹34眼を使用した。塩酸ケタミン (ケタラル®) 筋注とペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) の腹腔内注射による全身麻酔下に、眼底後極部に半導体レーザー光凝固を行った。

光凝固は、ミドリリンP®の点眼による散瞳の後、ニデック社製半導体レーザー光凝固装置DC-3000 (波長805nm)を使用した。凝固条件は、照射野100 $\mu$ m、出力100mW、凝固時間0.1秒とし、組織観察用カバーガラスをコンタクトレンズとして用いて、細隙灯顕微鏡で眼底を観

別刷請求先: 570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 戸部 隆雄  
(平成5年12月21日受付, 平成6年5月11日改訂受理)

Reprint requests to: Takao Tobe, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 1 Fumizonochō, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received December 21, 1993 and accepted in revised form May 11, 1994)

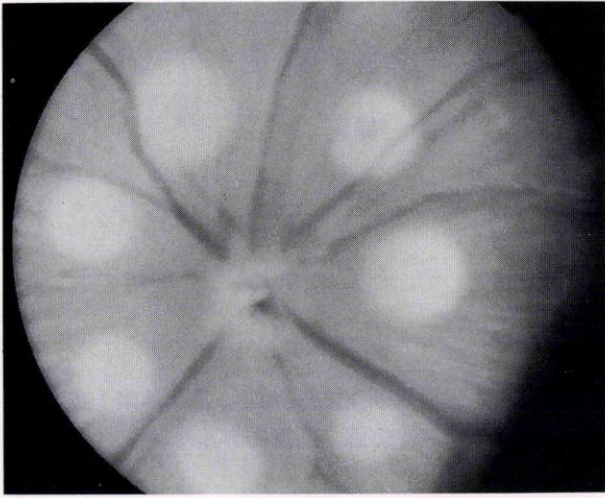


図1 光凝固直後の眼底写真。

凝固が成功すると、網膜深層に気泡を生じ、数秒後に網膜浮腫、混濁が拡大した。少量の網膜下出血もみられる。

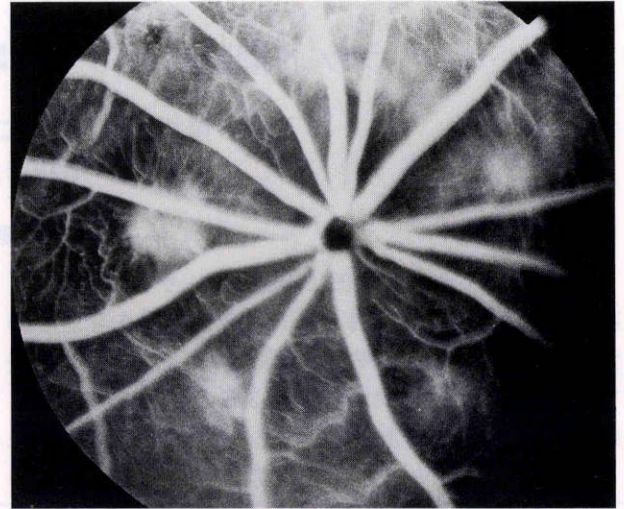


図2 光凝固後2週の蛍光眼底造影写真。

脈絡膜新生血管は網目状の過蛍光を示し、軽度の滲むような蛍光漏出がみられる。

察し、眼底後極部へ散在性に8~10個の光凝固を行った。

光凝固は、サル眼の場合<sup>3)</sup>と同様に、Bruch(ブルッフ)膜の断裂を目的に、焦点を網膜深層に合わせて行った。凝固が成功すると、網膜深層に気泡を生じ、凝固数秒後に網膜浮腫、混濁が広がり、少量の網膜出血もみられた(図1)。凝固が不成功な場合には、通常的光凝固と同じく、小さい白色の凝固斑を生じ、拡大傾向はなかった。

光凝固直後から、3日、5日、1週、2週に眼底検査、および10%フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)0.1mlを尾静脈から注入し蛍光眼底造影を行い、眼球摘出を行った。

眼球摘出後、4%グルタルアルデヒド固定後(0.1Mリン酸緩衝液)で24時間固定した。0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で24時間洗浄後、毛様体部に角膜輪部と平行に切開を加えて前眼部を除去し、網膜を細切した。この切片を1%四酸化オスミウム(0.1Mリン酸緩衝液)で、後固定を1時間行い、型の如くエタノール系列で脱水した後、エボン812に包埋した。

試料は、LKB ultramicrotome Vで1 $\mu$ mの切片を作成し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で観察した。また、超薄切片を作成し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛の二重染色後、日立500型透過型電子顕微鏡で観察した。

また、光凝固後2週に、上行大動脈から大日本インキ社製メルコックス樹脂を注入し、従来の教室の方法<sup>5)</sup>により脈絡膜の血管鋳型標本を作成し、走査型電子顕微鏡で観察した。

### III 結 果

#### 1. 光凝固成功率および新生血管発生率

光凝固を行った時に網膜深層に気泡を生じ、凝固数秒後

に網膜混濁が広がり、光凝固が成功したのは、全凝固数291発中144発(49%)であった。

光凝固後2週での脈絡膜新生血管の発生率を、蛍光眼底造影で臨床的に判定し、光凝固が成功した144病巣中113個(78%)で網目状の蛍光漏出がみられ、新生血管の発生を確認した。

#### 2. 臨床経過

光凝固直後に生じた凝固部の網膜浮腫、混濁は光凝固3日頃から日とともに次第に軽減し、光凝固後7日には網膜深層に灰白色の滲出物を残した。全経過を通じて明らかな漿液性網膜剝離をみなかった。

蛍光眼底造影では、凝固部は光凝固直後には強い蛍光漏出を示したが、光凝固後3日には淡い過蛍光となり、光凝固1週以降になると網目状の過蛍光を示した。全経過を通じて、凝固部には新生血管によると思われる蛍光漏出を軽度にするのみであった(図2)。

#### 3. 組織所見

##### 1) 光凝固直後

光学顕微鏡(光顕)的に、光凝固部では網膜色素上皮、ブルッフ膜は断裂し、網膜外顆粒層、内顆粒層の核は凝固壊死に陥って、核の消失、濃縮をみ、凝固部の脈絡膜毛細血管板は閉塞していた。網膜内層に出血がみられ、凝固効果は内顆粒層までみられた(図3)。

##### 2) 光凝固後3日

光顕的には、ブルッフ膜の断裂部を通して、円形や紡錘型の細胞が脈絡膜から網膜下へ向かって遊走し、網膜下腔には多種の細胞がみられた。しかし、明らかに管腔の形成された新生血管はまだ網膜下腔にはみられなかった。色素を持ったマクロファージが網膜下に多数みられた。凝固斑周辺部には扁平な網膜色素上皮が旺盛に増殖し、重層していた。凝固斑の周辺部では、脈絡膜毛細血

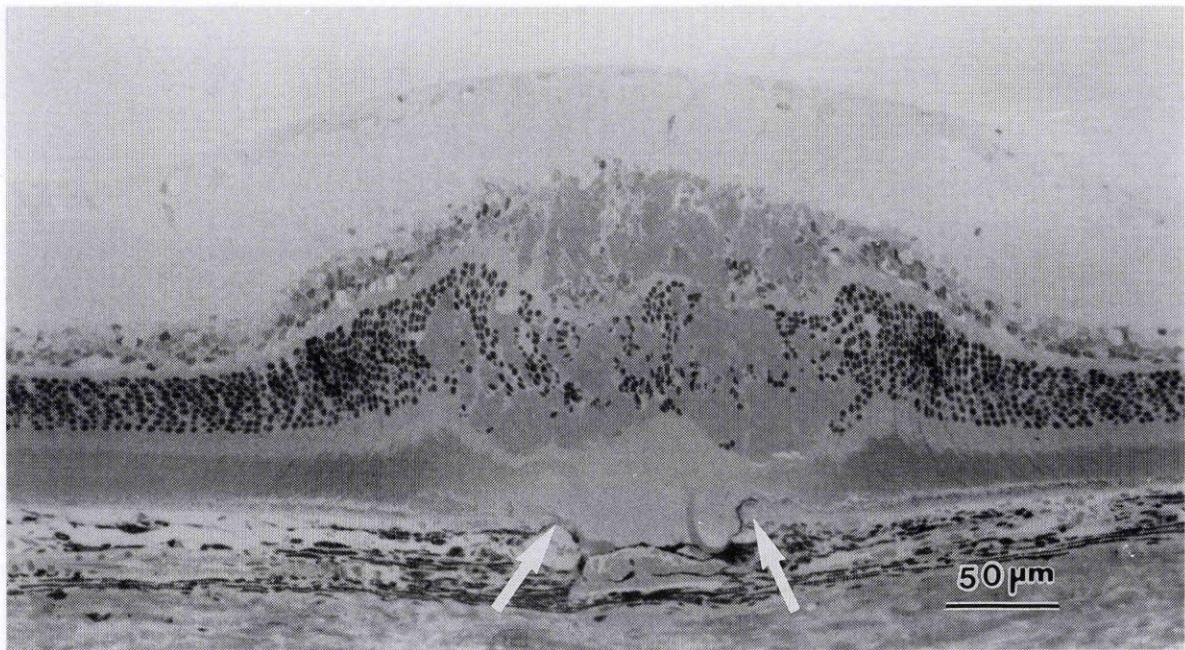


図3 光凝固直後の光学顕微鏡（光顕）写真（トルイジンブルー染色）。  
網膜色素上皮，Bruch（ブルッフ）膜は断裂し（矢印），凝固部の脈絡膜毛細血管板は消失し，脈絡膜大血管の破綻がみられる。網膜外層は凝固壊死に陥っており，網膜内顆粒層に至る網膜内層に出血がみられる。

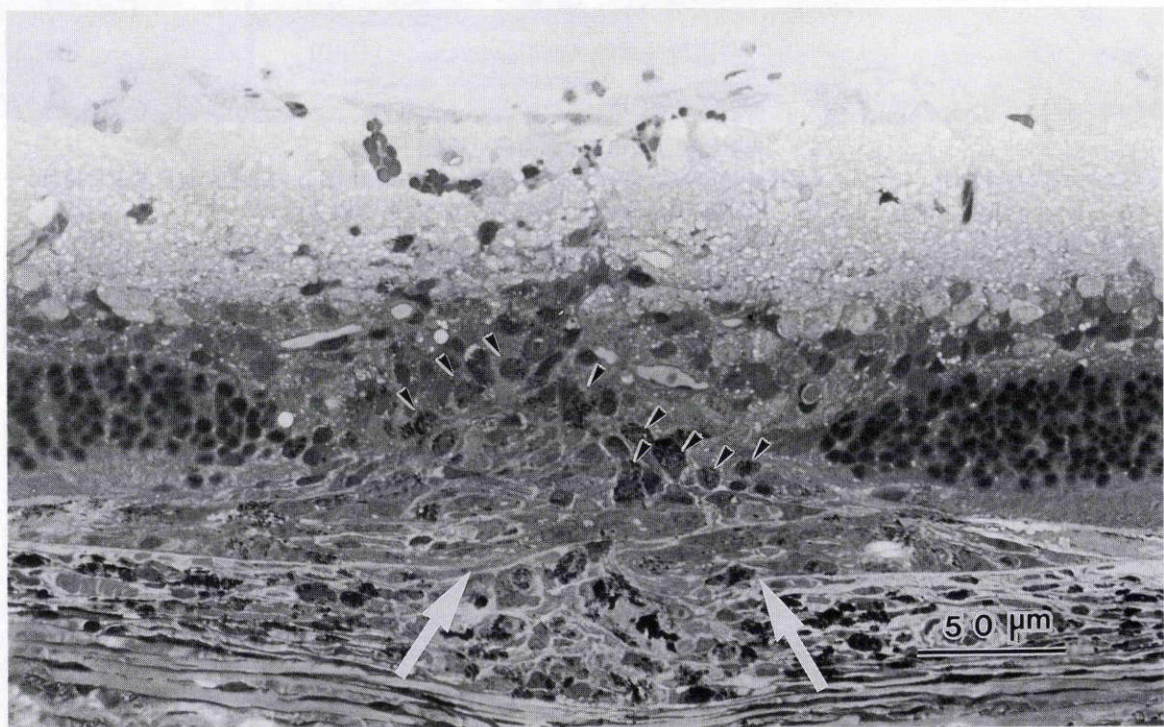


図4 光凝固後3日の光顕写真（トルイジンブルー染色）。  
ブルッフ膜の断裂部（矢印）を通して，脈絡膜から細胞成分に富んだ細胞が網膜下に侵入している。色素を持ったマクロファージ（矢じり）が網膜下に多数みられ，凝固巣周辺部には扁平な網膜色素上皮が重層して増殖している。凝固斑の周辺では脈絡膜毛細血管の閉塞がみられる。

管の閉塞をみた（図4）。

電子顕微鏡（電顕）的には，光顕でみられた脈絡膜からブルッフ膜を通して網膜下に向かう紡錘型の細胞は，細胞質内に粗面小胞体が層板状に発達したミトコンドリ

アがみられ，線維芽細胞と思われた。網膜下腔には，すでに細胞内小器官に富む内皮細胞が非常に狭い管腔を形成していた（図5）。

3) 光凝固後5日

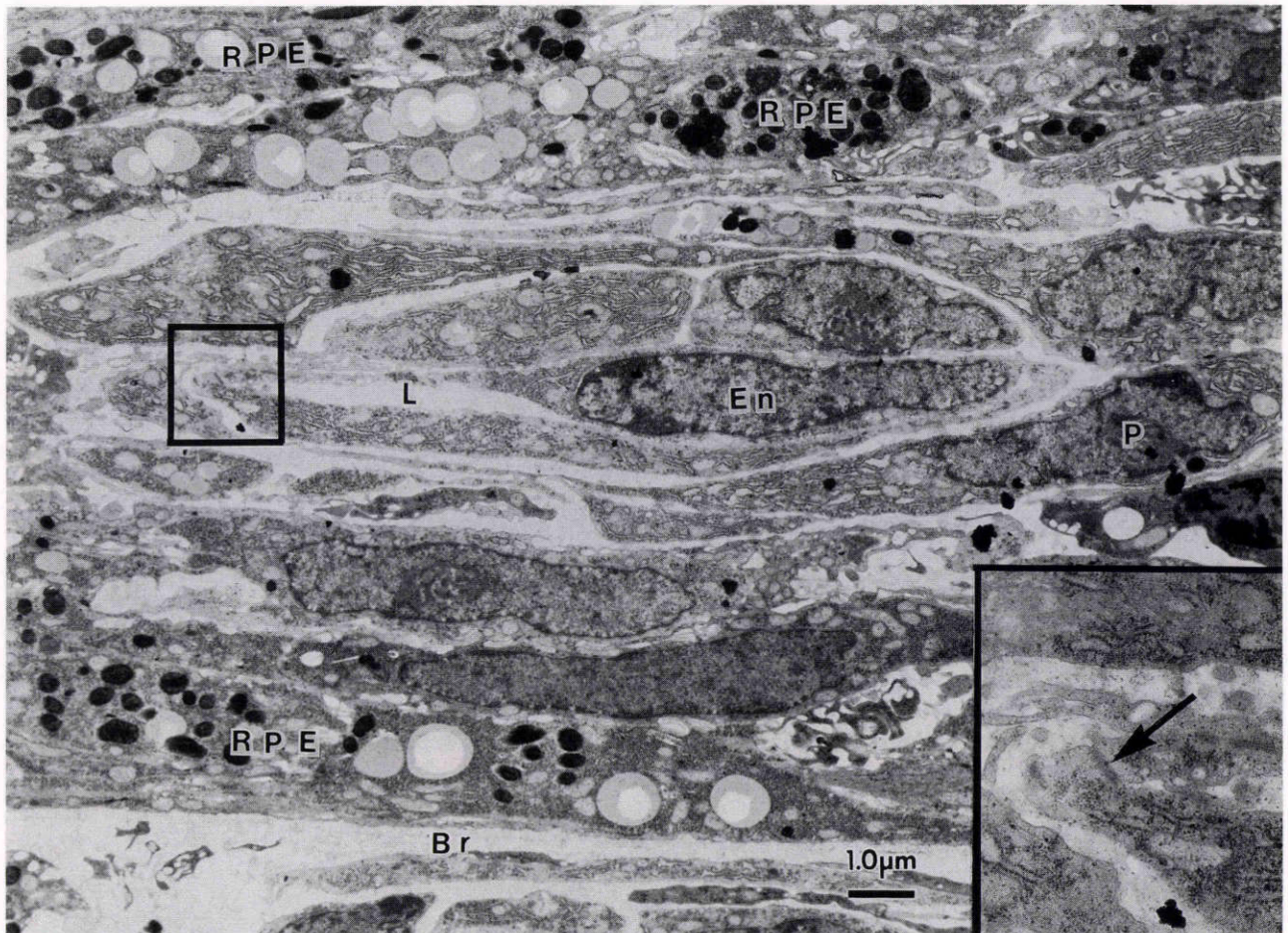


図5 光凝固後3日の電子顕微鏡（電顕）写真。

非常に狭い内腔(L)を持つ脈絡膜新生血管が網膜下腔にみられる。内皮細胞(En)は細胞間接合装置で接着しており(矢印), 周囲には増殖した紡錘型の網膜色素上皮細胞(RPE)が多数みられる。Br: プルッフ膜, P: 周皮細胞

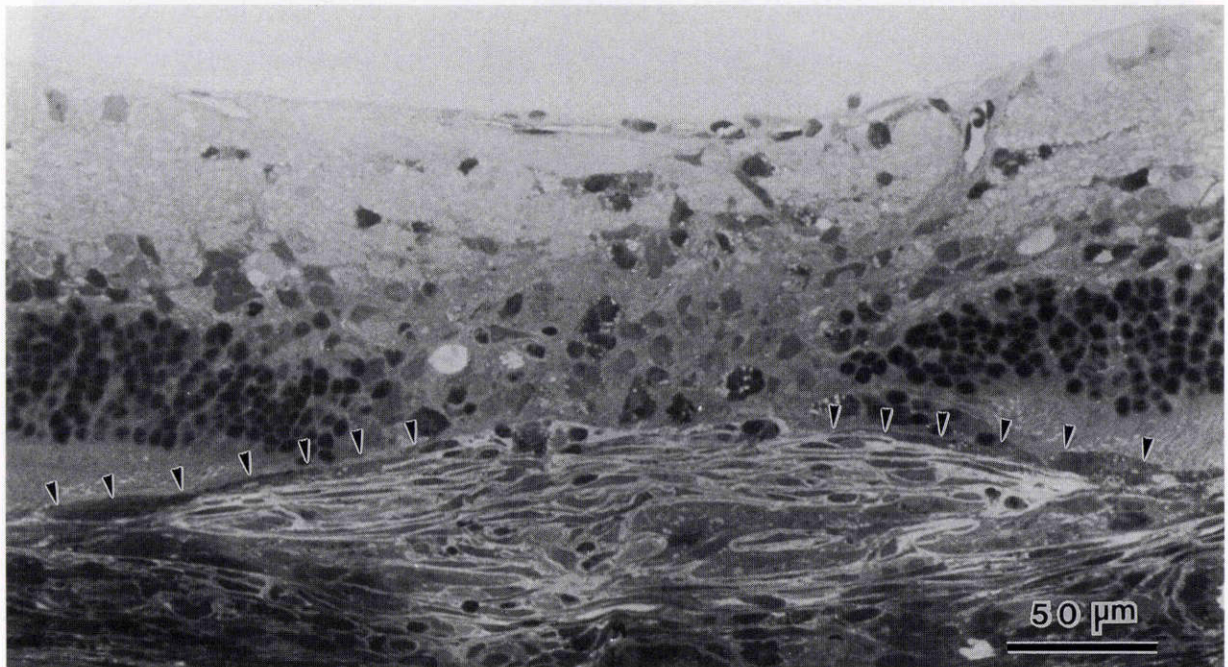


図6 光凝固後5日の光顕写真(トルイジンブルー染色)。

網膜下腔には少数の新生血管がみられ, 線維芽細胞と思われる紡錘型細胞や増殖した網膜色素上皮が多数みられる。凝固部周辺から増殖した網膜色素上皮が新生血管網全体を覆うように一層になって増殖しているが(矢じり), 囲い込みは不十分である。

光顕的には、網膜下腔に管腔の形成された新生血管が少数みられ、線維芽細胞と思われる紡錘型の細胞や細長くなった網膜色素上皮細胞が多数みられた。凝固部周辺から増殖した網膜色素上皮細胞が一層になって、病巣部を全体として覆うように増殖していたが、囲い込みはまだ不十分であった(図6)。

電顕的には、網膜下腔に狭い管腔を持つ新生血管が多数みられたが、その基底膜は未発達で、細胞間結合装置も未熟であった。その周囲には紡錘型の網膜色素上皮細胞が多数みられたが、細胞間結合装置は未発達で、細胞極性は明らかではなかった。膠原線維が新生血管の周囲に多数みられた(図7)。

#### 4) 光凝固後1週

光顕的には、網膜下腔に管腔の大きい新生血管が多数確認できた。この時期になると、増殖した扁平な網膜色素上皮が新生血管の上を囲い込む傾向を示した(図8)。

電顕では、網膜下腔にさらに管腔の発達した新生血管がみられ、周囲には常に網膜色素上皮細胞を伴っていた。また、新生血管の周囲には、膠原線維が次第に増えてい

た(図9)。

#### 5) 光凝固後2週

光顕的には、網膜下腔には管腔の発達した新生血管が重層した扁平な網膜色素上皮の間に多数みられた。感覚網膜の下を一層の網膜色素上皮が完全に覆っていた。この時期になると、網膜下腔で増殖した網膜色素上皮の数は減少傾向にあった(図10)。

電顕的に、網膜下腔には有窓構造を持つ血管内皮細胞によって形成された大きな管腔を持つ新生血管が多数みられた。網膜色素上皮細胞は、基底膜と微絨毛により極性が明らかになりつつあり、新生血管は、常に増殖して重層化した網膜色素上皮の基底側に存在していた。新生血管の周囲には、膠原線維がさらに増えていた(図11)。

この時期に血管鋳型標本を作成すると、脈絡膜の比較的深層の太い血管から生じた、ヒトデ状に網膜下に伸びる新生血管が明瞭にみられた(図12)。

なお、蛍光眼底造影で新生血管が発生したと判断した光凝固部には、病理組織学的に、または血管鋳型標本によって、37部位中32部位(86%)の一致率で新生血管の

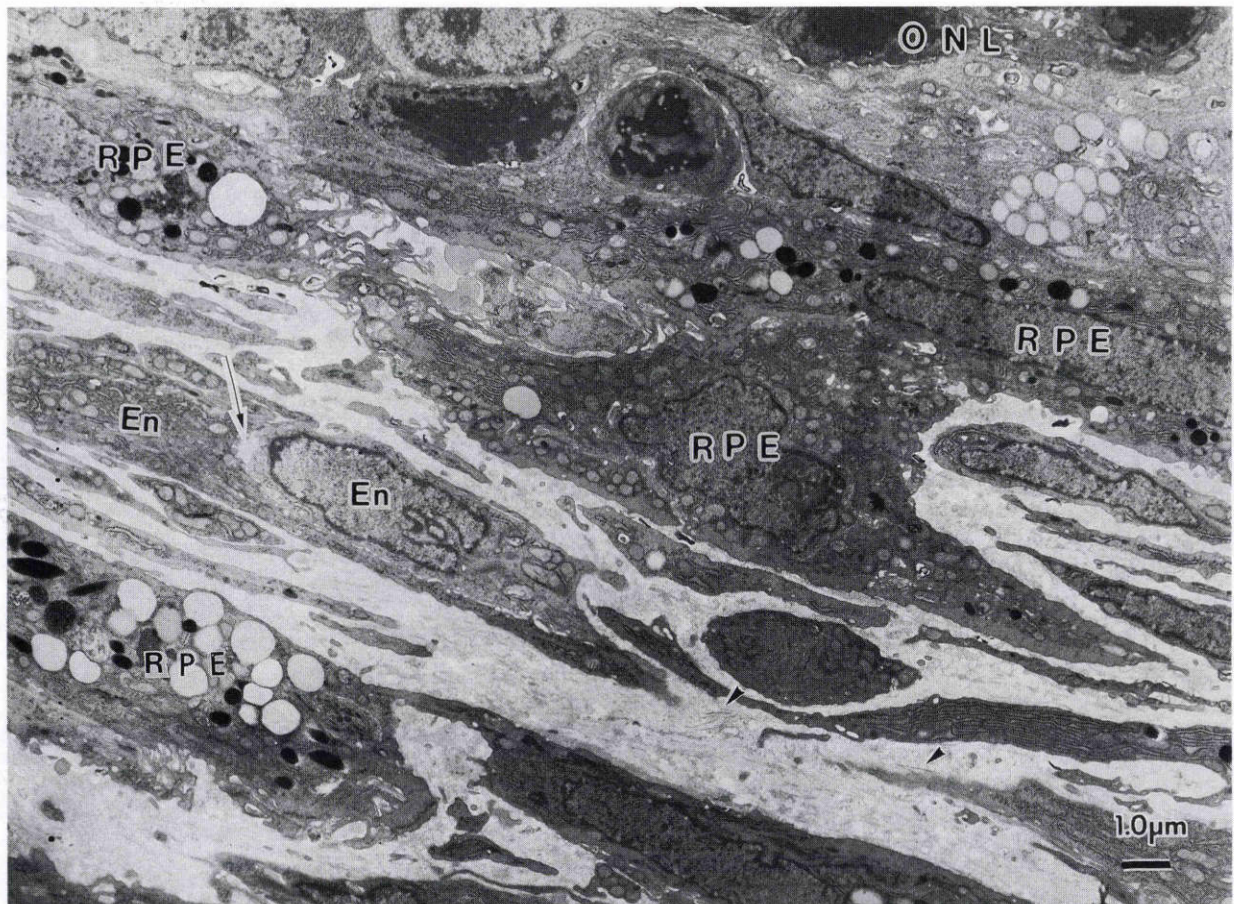


図7 光凝固後5日の電顕写真。

網膜下腔に狭い管腔(矢印)を持つ新生血管がみられ、その周囲には紡錘型の網膜色素上皮細胞(RPE)が多数みられるが、細胞極性はまだ明らかでない。新生血管周囲には膠原線維(矢じり)が多数みられる。ONL: 外顆粒層, En: 血管内皮細胞

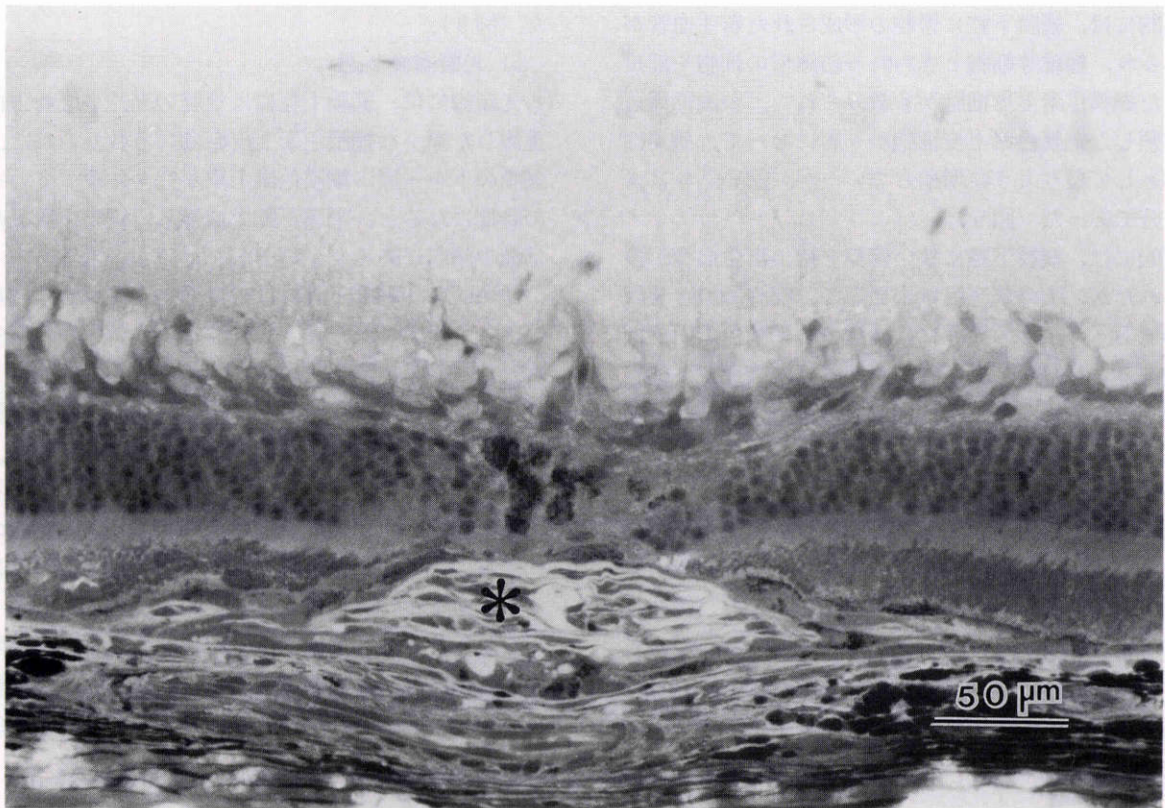


図8 光凝固後1週の光顕写真(トルイジンブルー染色)。

管腔の発達した新生血管(\*)が網膜下にみられる。増殖した扁平な網膜色素上皮が新生血管網全体をほぼ囲い込んでいる。

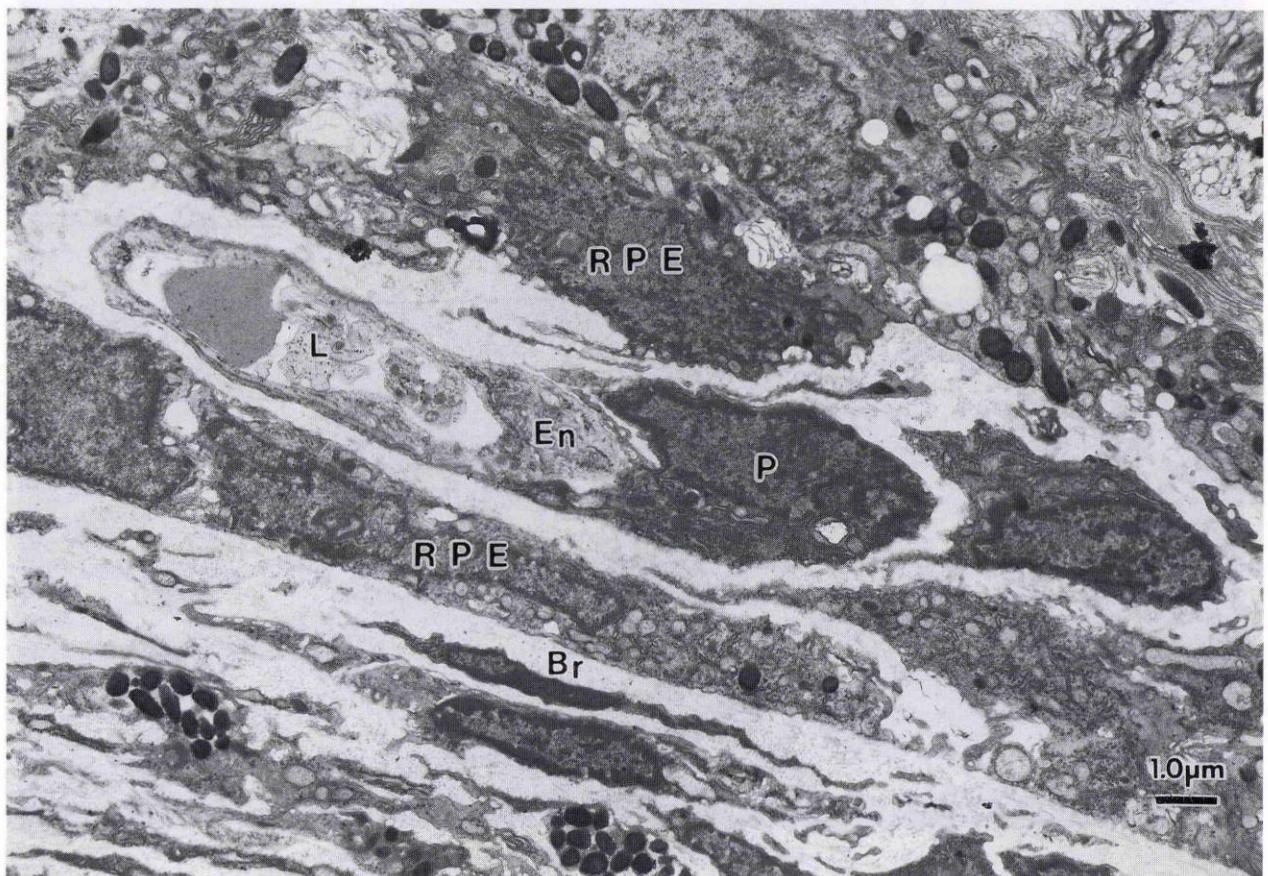


図9 光凝固後1週の電顕写真。

さらに広い管腔(L)を持つ新生血管が網膜色素上皮細胞(RPE)を伴って網膜下腔にみられる。新生血管の周囲には膠原線維がみられる。Br: プルッフ膜, En: 血管内皮細胞, P: 周皮細胞

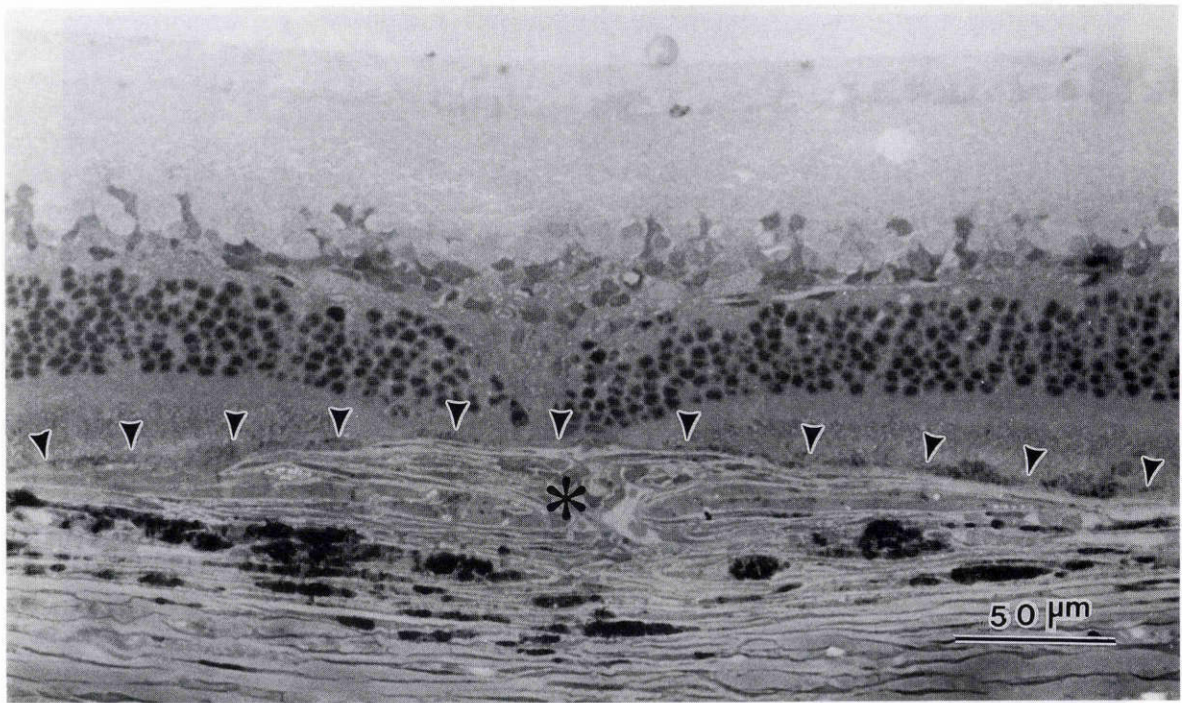


図10 光凝固後2週の光顕写真(トルイジンブルー染色)。  
 管腔の発達した新生血管(\*)が重層した扁平な網膜色素上皮の間に多数みられる。その上を一層の扁平な網膜色素上皮が完全に覆っている(矢じり)。

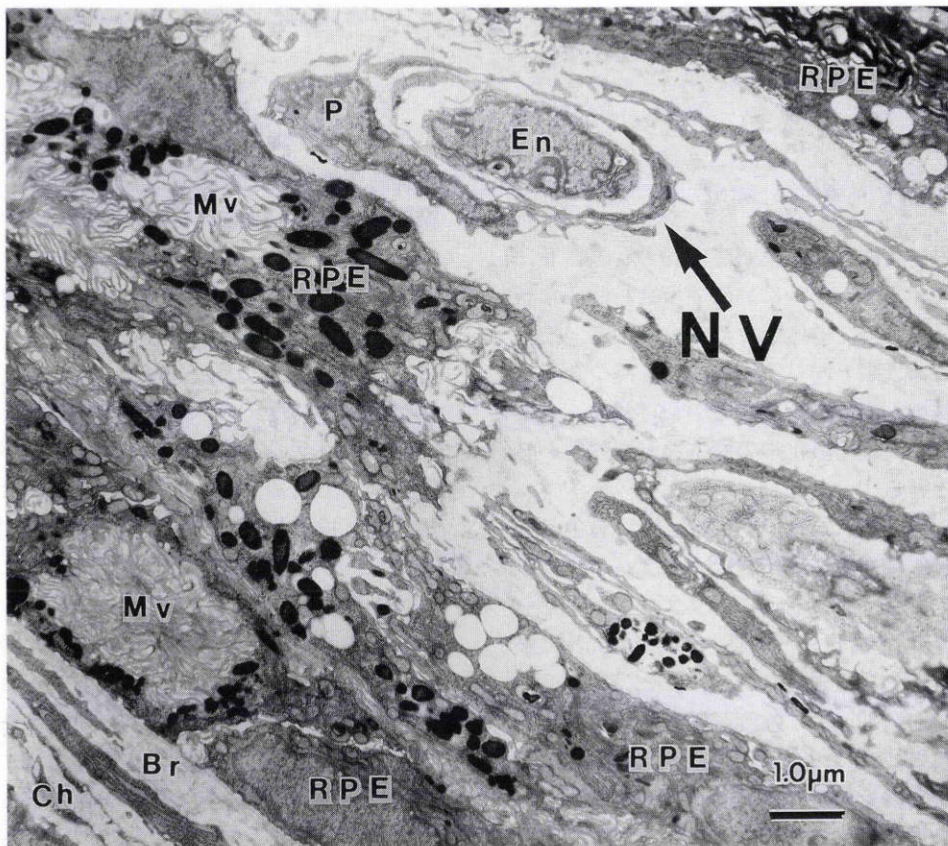


図11 光凝固後2週の電顕写真。  
 基底膜と微絨毛(Mv)を持った網膜色素上皮細胞(RPE)の極性が明らかになりつつある。新生血管(NV)は、常に増殖して重層した網膜色素上皮の基底側に存在する。新生血管の周囲には多量の膠原線維がみられる。Br: ブルッフ膜, Ch: 脈絡膜, P: 周皮細胞

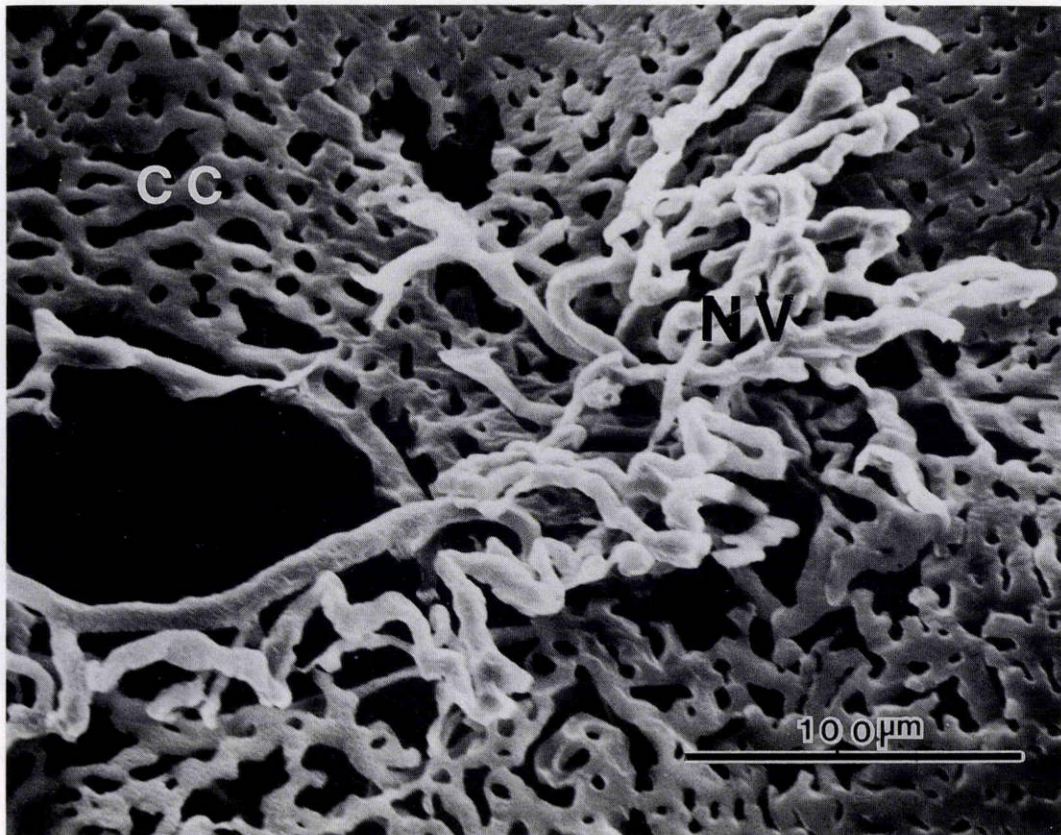


図12 光凝固後2週の血管鋳型標本。

新生血管(NV)は、脈絡膜の比較的深層の血管から生じ、ヒトデ状に網膜下へ伸びている。先端部は盲端となり、拡張している。CC:脈絡膜毛細血管板

存在が確認された。

#### IV 考 按

我々は、サル眼に実験的脈絡膜新生血管を発生させ、実験研究を行ってきたが、サルは高価で多数が使えないことや、取り扱いが煩雑であるなどの欠点がある。それに比べて、ラットは人眼と同じく網膜血管を持つとともに取り扱いが容易で、安価であるなどの利点が多く、薬物スクリーニングや免疫組織化学の標本など個体数が必要な実験に適している。

最近、欧米でもクリプトンレーザーを用いて、有色ラットに実験的脈絡膜新生血管を発生させたモデルが作成されている。Frankら<sup>9)</sup>は、ラット眼にクリプトンレーザーの弱度から中等度凝固を行い、13眼中6眼(46%)に脈絡膜新生血管が生じたと報告している。また、Dobiら<sup>10)</sup>は、クリプトンレーザーにより強度凝固を行い、臨床的に86病巣中24病巣(28%)、病理学的に42病巣中25病巣(60%)に脈絡膜新生血管の発生をみたと報告した。しかし、脈絡膜新生血管の発生時期について、Frankらは光凝固後1月以降であると報告し、Dobiらは明らかにしていない。今回、筆者らは、光凝固後、脈絡膜新生血管発生までの過程を詳細に検討し、形態学的に明らかにした。

筆者らは半導体レーザーを用いて、強度凝固による脈絡膜新生血管発生実験を行い、臨床的に78%の高率に脈絡膜新生血管の発生をみた。半導体レーザーは800~810nmの赤外波長のため、理論的にクリプトン・レーザーよりも組織深達性があり<sup>11)12)</sup>、ブルッフ膜を効果的に断裂できる。すなわち、臨床的に78%と高率に脈絡膜新生血管を発生し得た原因の一つに、半導体レーザーの波長特性が考えられた。

我々が、ラット眼で作成した実験的脈絡膜新生血管の特徴は、①光凝固後、その部位で網膜色素上皮、血管内皮細胞、線維芽細胞などの反応性細胞増殖が早く、多数であり、②さらに光凝固後3日の非常に早期から未熟な脈絡膜新生血管が網膜下腔にみられ、③網膜色素上皮の増殖による新生血管の囲い込みは、光凝固後1週から始まり、2週では完成し、④新生血管からの漿液性網膜剝離がほとんどみられなかった。すなわち、新生血管の発生およびその周囲の細胞増殖が非常に早かった。

Ishibashiら<sup>13)</sup>は、サル眼における実験的脈絡膜新生血管は光凝固後5~8日に網膜下腔に進展していたと報告しているが、ラットの実験的脈絡膜新生血管は光凝固後3日の非常に早期から網膜下腔にみられた。高橋ら<sup>14)</sup>は、脈絡膜に発生した新生血管が網膜下腔へ誘導されるには、増殖した網膜色素上皮細胞が必要であると報告して



いるが、ラットで脈絡膜新生血管が早期からみられた理由は、網膜色素上皮細胞を含む反応性細胞増殖が早いいため、網膜下腔への誘導も早期からみられたものと考えられる。

高橋ら<sup>15)</sup>は、線維芽細胞様に化生した網膜色素上皮細胞は膠原線維を産生し、新生血管の周囲に形成された大量の膠原線維は、新生血管の発育に抑制的に働く可能性を示唆している。本モデルでも、新生血管の周囲には早期から、網膜色素上皮細胞が産生したと思われる膠原線維が多量にみられた。本モデルで漿液性網膜剥離がほとんどみられなかった理由は、新生血管が完成し、内腔が大きくなり、漏出が旺盛になる光凝固後1週には、すでに網膜色素上皮が新生血管網全体を覆っていたことと、早期から新生血管の周囲に網膜色素上皮細胞が産生した膠原線維が多いため漏出が起こりにくかったと思われる。

最近、新生血管の発生に basic fibroblast growth factor (b-FGF), transforming growth factor, type beta (TGF- $\beta$ )などの細胞増殖因子の関与が報告されている<sup>16)~18)</sup>。これらの研究では、免疫組織学的な手法の確立が必要で、その抗体濃度の決定には多数の組織標本数が必要である。サルは入手が困難で、多くの眼球が扱えず、脈絡膜新生血管の発生率も低い。ラットのモデルは、漿液性網膜剥離が少ない特徴はあるが、比較的多くの眼数を使用でき、取り扱いも容易で、脈絡膜新生血管が非常に早期から、確実に発生する利点があり、今後、実験的脈絡膜新生血管のモデルとして、本法は有用である。

本論文の要旨は、第58回日本中部眼科学会(1992年、大阪)で戸部が報告した。

なお、本研究は平成5年度文部省科学研究費補助金奨励研究(A)(課題番号05771452)の補助を受けた。付記して感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 宇山昌延：脈絡膜新生血管，基礎と臨床。日眼会誌 95：1145—1180，1991。
- 2) Ryan SJ：Subretinal neovascularization；natural history of an experimental model. Arch Ophthalmol 100：1804—1809，1982。
- 3) 板垣 隆，大熊 紘，加藤直子，宇山昌延：網膜下新生血管に関する実験的研究。第1報。実験的網膜下新生血管の発生。日眼会誌 89：600—610，1985。
- 4) 板垣 隆，大熊 紘，加藤直子，宇山昌延：網膜下新生血管に関する実験的研究。第2報。実験的網膜下新生血管の退縮。日眼会誌 89：941—948，1985。
- 5) 山岸和矢，大熊 紘，板垣 隆，加藤直子，宇山昌延：網膜下新生血管と網膜色素上皮の関連—第1報。新生血管退縮期における関連。日眼会誌 92：1618—1628，1988。
- 6) 山岸和矢，大熊 紘，板垣 隆，加藤直子，高橋寛二，宇山昌延：網膜下新生血管と網膜色素上皮の関連—第2報。新生血管発育期における関連。日眼会誌 92：1629—1636，1988。
- 7) 高橋寛二，板垣 隆，山岸和矢，大熊 紘，西村哲哉，宇山昌延：実験的網膜下新生血管に対する色素レーザーによる光凝固治療 1. 光凝固による治療過程の組織学的検索。日眼会誌 94：799—809，1990。
- 8) 山田佳苗，高橋寛二，大熊 紘，板垣 隆，西村哲哉，山岸和矢，他：実験的脈絡膜新生血管に対するレーザー光凝固。第1報。弱凝固による新生血管の凝固効果。日眼会誌 96：169—179，1992。
- 9) Frank RN, Das A, Weber ML：A model of subretinal neovascularization in the pigmented rat. Curr Eye Res 8：239—247，1989。
- 10) Dobi ET, Puliafito CA, Destro M：A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. Arch Ophthalmol 107：264—269，1989。
- 11) 水川 淳，沖坂重邦，Jing LG：半導体レーザー眼内光凝固の網膜脈絡膜に及ぼす影響に関する組織病理学的研究。日眼会誌 95：114—122，1991。
- 12) 野寄 忍，飯島正法，大木隆太郎，野寄喜美春，米谷新：半導体レーザー経瞳孔網膜脈絡膜光凝固の効果。日眼会誌 95：758—766，1991。
- 13) Ishibashi T, Miller H, Orr G, Sorgente N, Ryan SJ：Morphologic observations on experimental subretinal neovascularization in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 28：1116—1130，1987。
- 14) 高橋寛二，板垣 隆，山岸和矢，大熊 紘，宇山昌延：網膜下新生血管の発育初期における網膜色素上皮の役割—オルニチンによる網膜色素上皮障害実験—。日眼会誌 94：3—17，1990。
- 15) 高橋寛二，板垣 隆，山岸和矢，大熊 紘，西村哲哉，宇山昌延：実験的網膜下新生血管に対する色素レーザーによる光凝固治療 2. 光凝固の奏功しなかった病巣の組織学的検索。日眼会誌 94：810—819，1990。
- 16) Claer BM：Cell biology and biochemistry of endothelial cells and the phenomenon of intraocular neovascularization. The Retina, Part II, 215—243，1986。
- 17) Glaser BM：Extracellular modulating factors and the control of intraocular neovascularization. An overview. Arch Ophthalmol 106：603—607，1988。
- 18) Wiedemann P：Growth factor in retinal diseases：proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. Surg Ophthalmol 36：373—384，1992。