

網膜外層の虚血への局所低温による防御効果

森 圭介¹⁾, 林 直樹¹⁾, 阿部 友厚¹⁾, 米谷 新²⁾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

虚血への低温による防御効果を網膜外層において組織学的に検索した。実験動物には白色家兎 16 匹 16 眼を 4 眼ずつ 4 群に分けて実験をした。内訳は、虚血単独群、虚血中 29°C に冷却した群、虚血中 32°C に冷却した群、および対照群である。比較検討はモルフメトリーで行った。虚血単独群では、網膜全層が障害されていたが、特に視細胞と色素上皮細胞の障害が強かった。また、冷却した群では、網膜の形態は比較的よく保たれていた。特に、29°C に冷却した群では、外顆粒層の核数および視細胞層と色素上皮層の厚さは正常群と有意差はなかった。

一方、32°C に冷却した群では、視細胞層と色素上皮層の厚さはよく保たれていたが、外顆粒層の核数は正常群に比べ有意に減少していた ($p < 0.001$)。これらの事実から、局所低温が虚血による網膜外層の障害を防御し得ること、また、その十分条件は 29°C 以下であると結論された。(日眼会誌 99:1005-1011, 1995)

キーワード：虚血，低温，網膜，白色家兎

Fundus Hypothermia at 29°C Prevents Ischemic Injury of the Outer Retina

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

Abstract

We evaluated quantitatively the protective effect of local fundus hypothermia under pressure-induced ischemia using morphometric analysis. Retinohemorrhoidal ischemia was produced in albino rabbit eyes by increasing the intraocular pressure for 60 minutes. During the ischemic procedure, a copper plate was inserted behind the eyeball. The retinal temperature in the posterior pole was thus reduced to 29°C by placing solid carbon dioxide, and to 32°C by placing an ice cube at the anterior end of the plate. Histopathological changes in the group with ischemia alone were obvious in visual cells and retinal pigment epithelial cells (RPE), but the retina treated with additional hypothermia was well preserved. In the retina with hypothermia at 29°C, there was no significant difference from the controls in the mean

thickness of the photoreceptor layer (PRL) and the RPE, and the average count of nuclei in the outer nuclear layer (ONL). In the retina with hypothermia at 32°C, there was also no significant difference from the controls in the thickness of the PRL and the RPE. Otherwise, the count of nuclei in the ONL decreased significantly when compared to that of controls ($p < 0.001$). These findings indicate that even mild hypothermia at 29°C preserves the outer retina from ischemic damage and that the protective effect of hypothermia at 32°C is insufficient. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:1005-1011, 1995)

Key words: Ischemia, Hypothermia, Retina, Albino rabbit

I 緒 言

網膜の虚血は、さまざまな網膜血管病において病態を形成する主軸となる¹⁾。虚血による網膜の障害機序を解

明²⁾し、障害を回避することは眼科臨床上重要である。これに関し、既にいくつかの方法について研究がなされており³⁾⁻⁷⁾、その一つに低温による防御効果があげられる⁷⁾。網膜と同じ神経組織である脳は、34°Cに局所の温度

別刷請求先：350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38 埼玉医科大学眼科学教室 森 圭介
(平成7年3月16日受付，平成7年4月25日改訂受理)

Reprint requests to: Keisuke Mori, M.D. Department of Ophthalmology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama-ken 350-04, Japan

(Received March 16, 1995 and accepted in revised form April 25, 1995)

を下げるだけで虚血による障害を回避できるとされ⁸⁾、既に臨床応用されている。一方、網膜はグルコースや酸素を豊富に含む硝子体に隣接している⁹⁾など、脳とは異なった環境にあるため、単純にこれらの結果を網膜に適用することはできない。また、網膜に関して局所低温による防御効果の定量的検索については我々の知る限りなされていない。

我々は、既に網膜を眼球外側から任意の局所を冷却する実験モデルを作製し、網膜光障害を30°C程度の低温で減弱できることを報告¹⁰⁾した。今回はこの方法を応用し、虚血に対しどの程度の低温でどのような防御効果があるかを、網膜外層についてモルフォメトリー的手法を用いて定量的に検索したので以下に報告する。

II 実験方法

実験動物として体重2.5~3.5 kgの成熟白色家兎16匹16眼を、4眼ずつ4群に分け実験をした。網脈絡膜を虚血にするため、人工眼内灌流液(オペガードMA[®], 千寿)につないだ27 G針を家兎12眼の前房内に挿入し、眼圧を130 mmHg以上にコントロールした。前房からの房水の漏れがないよう、27 G針の刺入部をシアノアクリレート系接着剤(アロンアルファ[®])で固定し、60分間網脈絡膜の虚血を持続させた。この時、検眼鏡で血流の停止を確認した。また、虚血操作中に網膜局所の温度を下げるため、既報¹⁰⁾に準じ、上記12眼のうち4眼に対し以下の操作を行った。眼球下方の結膜を切開し、幅5 mmの銅板を眼球後方に挿入した。この時、組織標本を細切するときの参考にするため、挿入した銅板で眼底を圧迫し、その位置を確認した。この銅板の他端を8×6 cmのプレート状にし、その全面に固体二酸化炭素(ドライアイス[®])

をのせ、虚血操作を開始すると同時に4眼の眼底局所を冷却した。また、ドライアイス[®]の代わりに氷を用い、同様な方法で上記12眼のうち4眼を虚血操作中冷却した(図1)。

これら16眼の他に、白色家兎10眼を用いて血流が停止している眼底の温度が、これら2つの冷却操作でどの程度下がるかを検討した。熱電対温度計(サーミスター温度計MGA III-219 N[®], 東芝)を毛様体扁平部から挿入し、冷却部位の網膜の温度を測定した。この時、眼圧が下がらないよう、温度計はシアノアクリレート系接着剤で強膜に固定した。

60分間の虚血および冷却操作の終了から2時間後、これらの操作をした12眼を摘出し、組織標本作製した。この間、検眼鏡で眼底を観察し、血流が十分に回復していることを確認した。対照として正常眼4眼も併せて摘出した。

摘出した眼球を細切し、視神経乳頭から2~3 mm離れた眼底後極部をTrumpの固定液で前固定した後、1%オスミウム酸磷酸緩衝液で本固定をした。エタノール系列で脱水後、アラルダイト・エポンに包埋した。2 μmの連続切片を作製し、トルイジンブルーで染色した。その中から各標本ごとに5切片を無作為に抽出し、光学顕微鏡(Vannox AH-2[®], オリンパス)で、モルフォメトリー的手法を用いて視細胞の核数および網膜外層の浮腫の程度を計測、解析した。具体的には、各切片ごとに幅100 μm内の外顆粒層の核の数および100 μm間隔で5か所の視細胞層と色素上皮層の合計の厚さを計測した(図2)。統計学的な解析にはstudent t-testを用いた。

なお、すべての家兎はヘルシンキ宣言に基づいて取り扱い、塩酸ケタミン(ケタラール50[®])とキシラジン塩

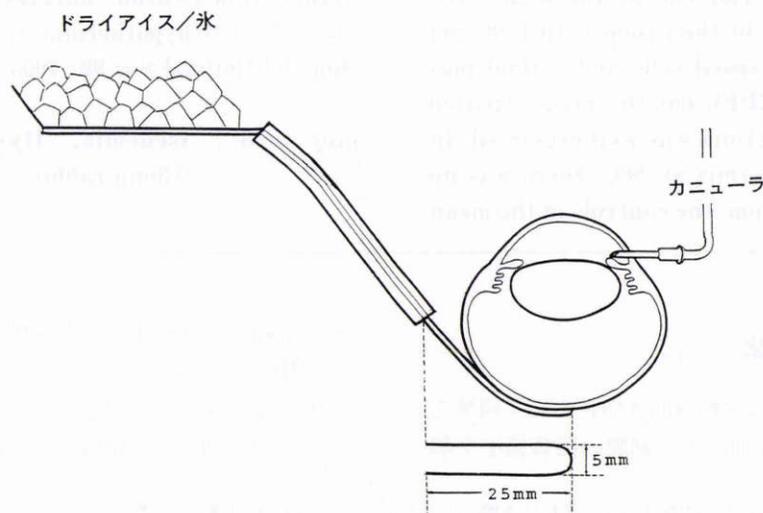


図1 虚血の作成方法および冷却方法。

前房内にカニューラを挿入し、眼圧を130 mmHg以上にすることで網脈絡膜の虚血を作成した。また、眼底局所の冷却方法は、下方の結膜を切開後、幅5 mmの銅板を眼球後方に挿入し、その他端をドライアイス[®]および氷で冷却した。

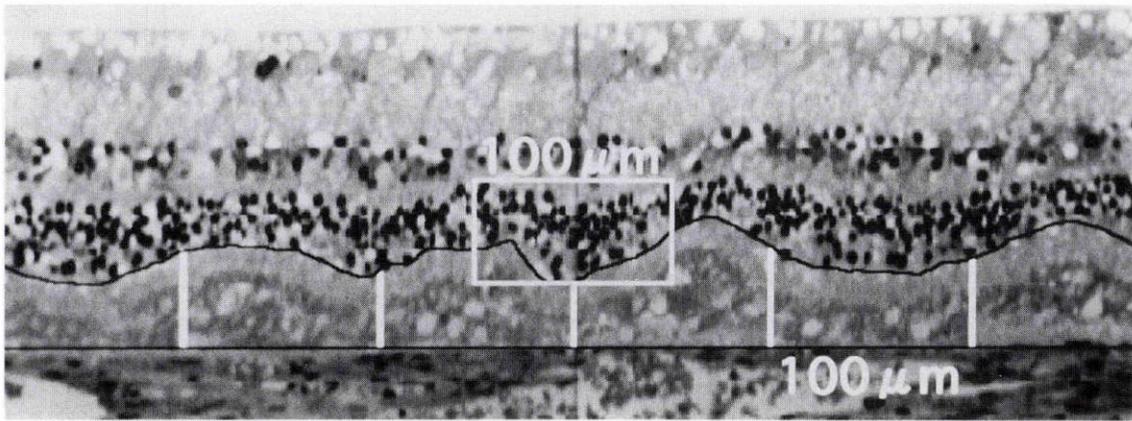


図2 モルフォメトリーによる解析法.

各標本ごとに5切片を無作為に抽出し、各切片ごとに幅100 μm 内の外顆粒層の核の数(白枠内),および100 μm 間隔で5か所の視細胞層と色素上皮層の合計の厚さ(白バー)を計測した.

酸塩(セラクター®)7:1混合液の筋注による全身麻酔下で実験した. また, 全実験経過中, 室温は約25°Cに設定した.

III 実験結果

虚血・冷却操作を行った群での網膜の温度は, ドライアイス®で冷却した場合, 約29°Cに(以下, 29°C冷却虚血群), 氷で冷却した群では約32°Cに低下した(以下, 32°C冷却虚血群, 図3).

組織学的な変化は, 虚血操作のみを行った群(以下, 虚血単独群)ではほぼ網膜全層に観察された. 特に, 内・外顆粒層の核濃縮と核数の減少がみられ, 視細胞層には内・外節の破碎, 配列の乱れ, 空隙形成などが観察された. また, 色素上皮細胞では浮腫性変化がみられた. これに対し, 脈絡膜では毛細血管・大血管ともに開存していた(図4). モルフォメトリーの結果では, 視細胞層と色素上皮層の合計の厚さは $48.6 \pm 5.4 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準偏差)で, 幅100 μm の内外顆粒層の核数は 58.9 ± 8.5 であった.

32°C冷却虚血群では, 網膜内層に軽度の浮腫性変化がみられ, また, 内顆粒層では核濃縮が散在性にみられた. 外顆粒層では濃縮した核がわずかに散見され, 視細胞層では配列は保たれているものの, 外節の間隙に濃染性を示す残査様物質が多数分布していた. 脈絡膜では, 虚血単独群と同様に, 毛細血管・大血管ともに変化はなかった(図5). モルフォメトリーでは, 視細胞層と色素上皮層の厚さは $34.6 \pm 1.7 \mu\text{m}$ で, 外顆粒層の核数は 89.4 ± 11.0 であった.

29°C冷却虚血群でも, 網膜内層の変化は32°C冷却虚血群とほぼ同様であった. 外顆粒層では軽度の浮腫性の変化が観察されるものの, 核の濃染化はみられなかった. 脈絡膜には変化はなく(図6), モルフォメトリーでは視細胞層と色素上皮層の厚さは $34.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ で, 外顆粒

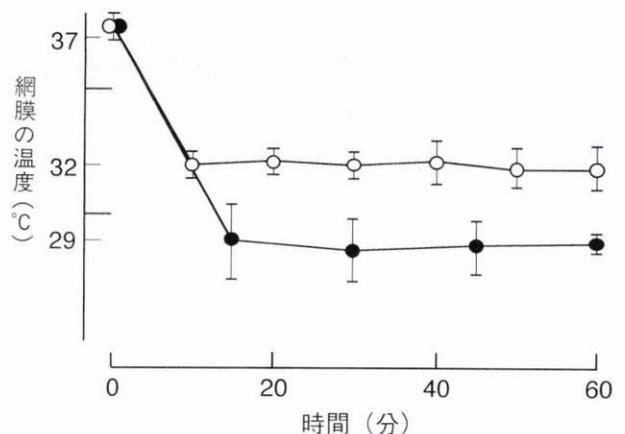


図3 冷却・虚血操作中の網膜の温度.

ドライアイスで冷却した群では約29°Cに, 氷で冷却した群では約32°Cに低下した.

白丸: 氷で冷却した群 (n=5), 黒丸: ドライアイスで冷却した群 (n=5)

層の核数は 116.0 ± 9.9 であった. 一方, 正常対照群では, 視細胞層と色素上皮層の厚さは $36.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ で, 外顆粒層の核数は 105.3 ± 8.7 であった(図7).

これら3群と正常対照群との間で, 視細胞層・色素上皮層の厚さと外顆粒層の核数に有意差があるか, student t-testを用いて比較検討した. 視細胞層と色素上皮層の合計の厚さは, 虚血単独群では有意に増加していたが, 29°C冷却虚血群および32°C冷却虚血群では正常群と有意差はなかった(図8). 一方, 外顆粒層の核数は, 29°C冷却虚血群では正常群と差はなかったが, 虚血単独群および32°C冷却虚血群では有意に減少していた(図9).

IV 考 按

今回の結果から, 局所低温で虚血による網膜障害を防御し得ること, そして, モルフォメトリーを用いた定量的な検索から, 60分間の虚血の条件では29°Cという具

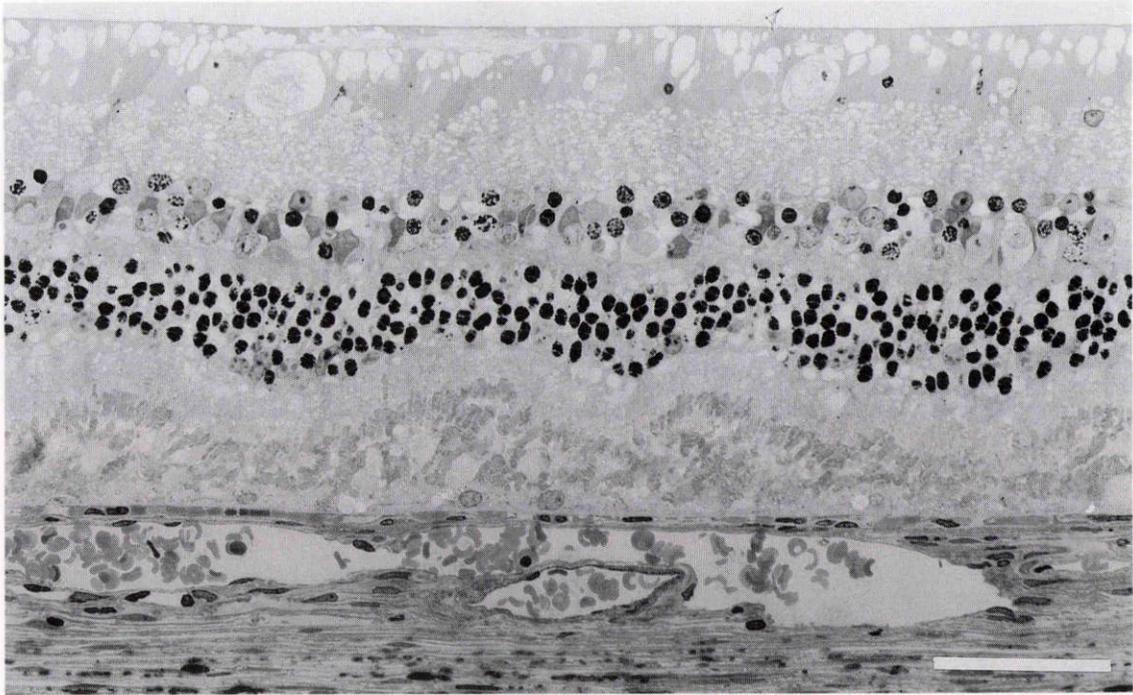


図4 虚血単独群の組織所見.

網膜全層に壊死性および浮腫性変化が観察された。脈絡膜では毛細血管・大血管ともに開存していた。モルフォメトリーの結果では、視細胞層と色素上皮層の合計の厚さは $48.6 \pm 5.4 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準偏差) で、幅 $100 \mu\text{m}$ 内の外顆粒層の核数は 58.9 ± 8.5 であった。バーは $50 \mu\text{m}$ 。

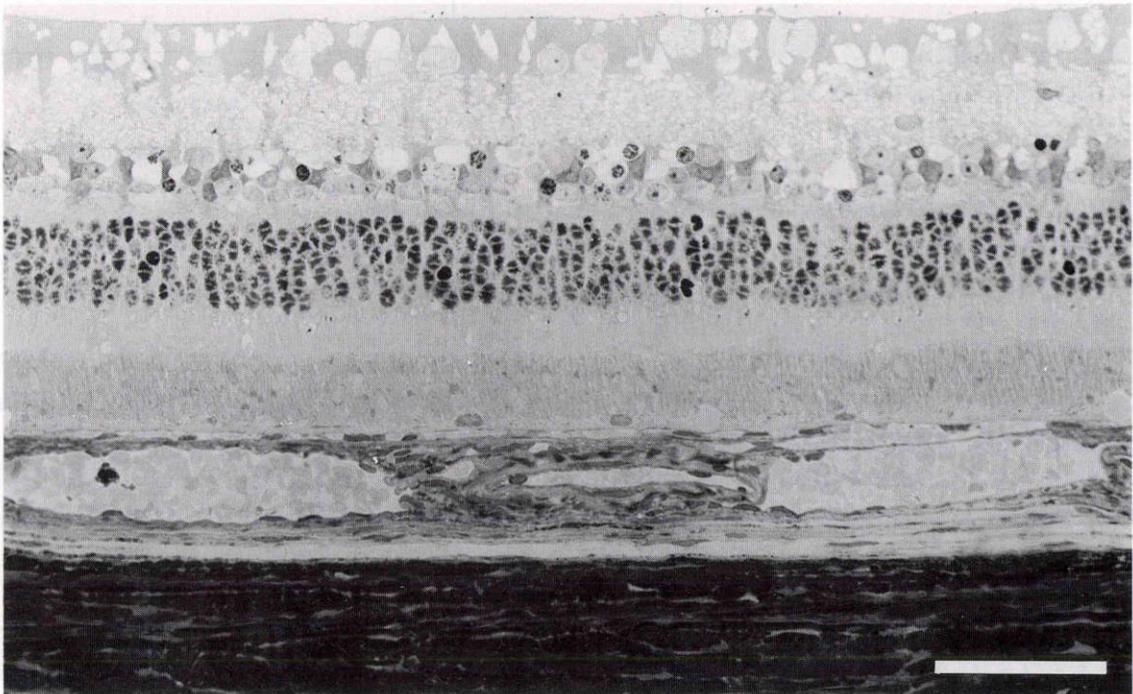


図5 32°C冷却虚血群の組織所見.

網膜内層に軽度の浮腫性変化がみられ、内顆粒層では核濃縮が散在性に観察された。外顆粒層では濃縮した核はわずかに散見され、視細胞層では外節の間隙に細胞の破砕物が多数分布していた。脈絡膜では虚血単独群と同様に、毛細血管・大血管ともに変化はなかった。モルフォメトリーでは、視細胞層と色素上皮層の厚さは $34.6 \pm 1.7 \mu\text{m}$ で、外顆粒層の核数は 89.4 ± 11.0 であった。バーは $50 \mu\text{m}$ 。

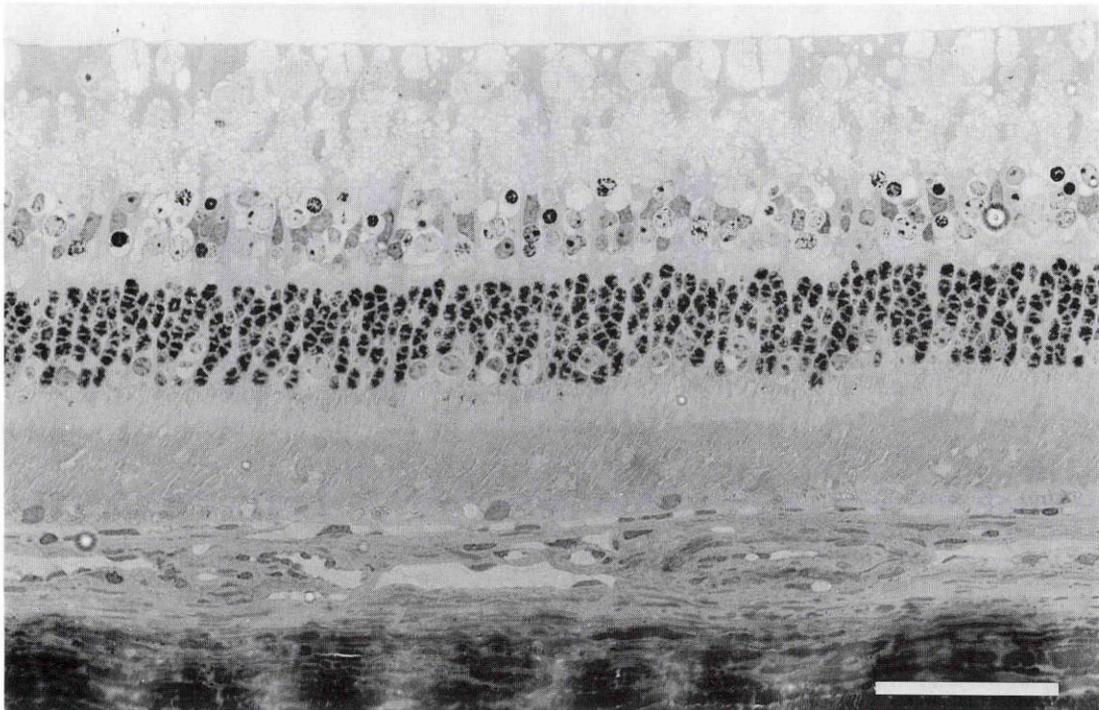


図6 29°C冷却虚血群の組織所見.

網膜内層の変化は32°C冷却虚血群とほぼ同様に軽度の浮腫性変化がみられたが、内顆粒層にわずかな核濃縮がみられるのみであった。外顆粒層では核の濃染化はなかった。脈絡膜にも変化はなく、モルフォメトリーでは、視細胞と色素上皮層の厚さは $34.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ で、外顆粒層の核数は 116.0 ± 9.9 であった。バーは $50 \mu\text{m}$

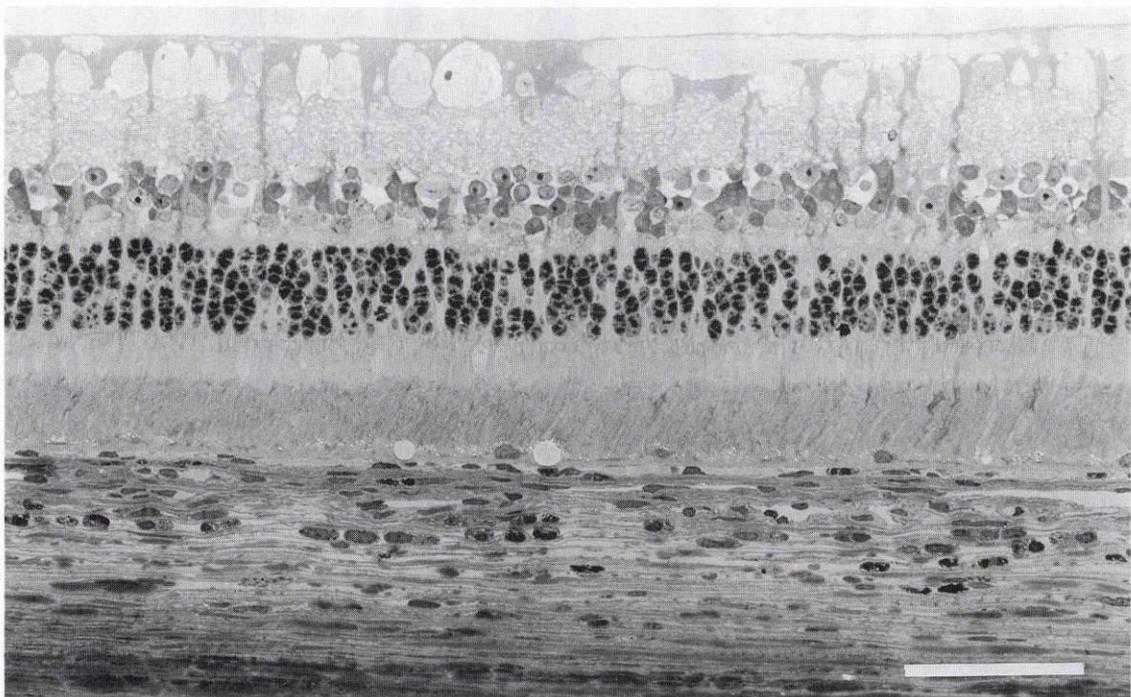


図7 正常対照群の組織所見.

モルフォメトリーでは、視細胞層と色素上皮層の厚さは $36.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ で、外顆粒層の核数は 105.3 ± 8.7 であった。バーは $50 \mu\text{m}$

体的な閾値が設定できることが明らかとなった。

局所低温の防御効果について、網膜と同じ神経組織である脳において検討されているが、わずかの温度差でも

防御効果が鋭敏に変わるとされ⁸⁾、臨床応用する場合には慎重な温度管理が必要であると考えられている。網膜に関しては、Faberowskiら⁷⁾によりアイスパックを用い

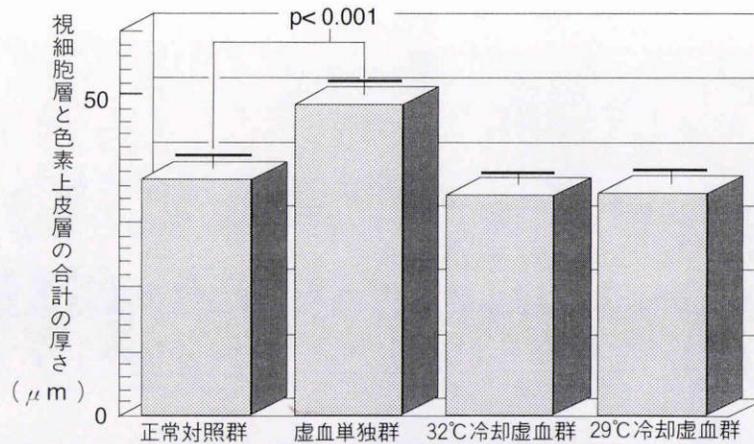


図8 各群での視細胞層と色素細胞層の合計の厚さ。

視細胞層と色素細胞層の合計の厚さは、虚血単独群では有意に増加していたが、29°C冷却虚血群および32°C冷却虚血群では正常群と有意差はなかった。

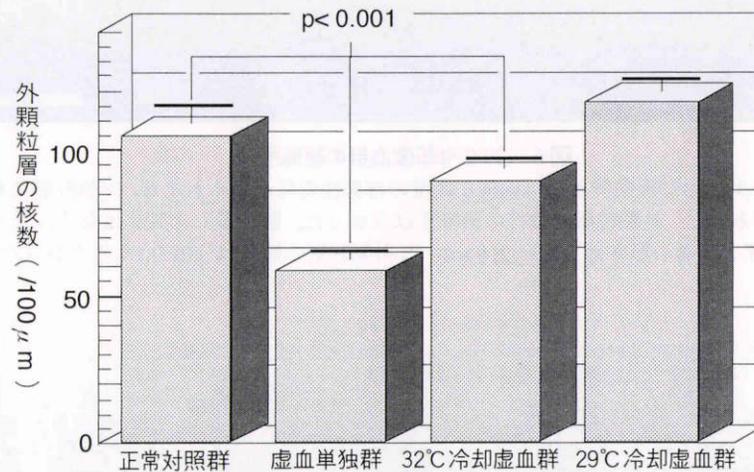


図9 各群での外顆粒層の核数。

幅100 μmあたりの外顆粒層の核数は、29°C冷却虚血群では正常群と差はなかったが、虚血単独群および32°C冷却虚血群では有意に減少していた。

て眼球を前方から冷却すると、虚血による障害を防御できることが報告されている。このアイスパックを用いた方法の欠点は、眼底の温度を正確に測定することは困難である上、一定の冷却効果を得られない¹¹⁾ことである。そのため、温度と虚血に対する防御効果の定量的な解析は不可能であった。我々は、眼球後方から網膜局所を冷却する方法を新たに開発し、既に報告¹⁰⁾した。この方法の利点は、下方の結膜を切開し、プレートを挿入するだけなので、経強膜的に毛様体扁平部から温度計を挿入の上、検眼鏡で観察しながら眼底の任意の部位の温度を測定できることである。これにより、今回の温度と組織変化の定量的な検索が可能となった。

眼球と眼窩の位置関係から、我々の冷却法を応用するには家兎が最も適していたが、家兎眼には事実上網膜血管の役割が少なく、網膜内層への栄養はヒト眼などとは異なっている。したがって、虚血に対する家兎の網膜内層の反応も、血管を有する網膜とは異なるものと推測さ

れる。今回の虚血単独群での組織変化は網膜外層で強かったが、一方、網膜血管のある眼では、網膜内層の障害がより強いとされている¹²⁾ことからこの事実が理解できる。この理由として、家兎眼では網膜血管が乏しいためか、網膜内層にグリコーゲンが多量に含まれている¹³⁾。そのため、虚血になると嫌気性の解糖がより多く働き、内層の障害は軽微で済んだものと推察される。

この事実から、今回のモルフォメトリーによる検索は、網膜外層、特に外顆粒層、視細胞層、色素上皮層を対象とした。その結果、29°Cに冷却すると網膜外層は障害からほぼ防御されたが、32°Cでの防御効果は不十分と判断された。一方、アレチネズミの海馬では、32°Cで5分間の虚血による障害から完全に回避できるとしている¹⁴⁾。この虚血時間と冷却温度の組織障害に対する関係を考察する上で、まず、網膜と脳との虚血に対する時間的閾値の相違を考え合わせなければならない。Hayrehら¹⁵⁾は網膜の虚血への時間的な障害閾値を臨床と基礎の両面か

ら解析し、脳の障害時間より数倍長いとした。その理由として、彼らは網膜と脳とはニューロンのタイプが違ふことや、硝子体からの酸素の供給があることをあげている。また、これ以外の重要な因子として、眼組織と脳組織のグルコースやグリコーゲンの含有量の違いが考えられる。脳細胞内にはほとんどグルコースは含まれておらず、需要のほぼすべてを血液からの供給に頼っている。一方、Weiss⁹⁾によれば、正常家兎網膜には0.05 mgのグルコースと0.35 mgのグリコーゲンが含まれており、硝子体には1.1 mgのグルコースが含まれているとされている。また、彼は本実験と同様な高眼圧による網膜虚血の実験も併せて行い、グルコースとグリコーゲンの量を経時的に測定している。その結果、1時間の虚血で網膜のグリコーゲンは0.15 mgに、硝子体のグルコースは0.6 mgに減少していることから、これらのグルコースやグリコーゲンは嫌気性に解糖され、adenosine triphosphate (ATP) の産生に役立っているとした⁹⁾。ATPは、細胞の形態やホメオスタシスを保つのに重要な役割を果たしているが、虚血状態では需要と供給のバランスからどんどん減少していく。組織を低温にすることで、このATPの消費を抑制できるが、32°CではこのATPの消費を停止させることはできない¹⁴⁾とされている。このため、網膜は32°Cの低温下でも、時間が長くなればATPの不足が蓄積され、網膜の形態を保つことができなくなると解釈される。一方、網膜の温度が30°C程度までは、網膜電位図は比較的良好に保たれているが、25~27°C以下になると平坦化するとされており¹⁶⁾¹⁷⁾、29°Cでは網膜のATPの需要はかなり少なくなっていることが予想される。これらの事実から、我々の設定した1時間の虚血に対する29°Cという温度は、網膜の生理的機能のある程度保持しながら、網膜の形態を維持する境界に近い温度であることが推定された。

擧筆にあたり、本研究の全過程にわたる御指導、および御校閲を賜りました教室主任清水弘一教授に深謝致します。なお、本論文の要旨は第97回日本眼科学会総会、および1993年 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) において報告した。

文 献

- 1) Kohner EM: Retinal ischemia. In: Ryan SJ, et al (Eds): Retina vol II. CV Mosby, St. Louis, 89—105, 1989.
- 2) Stefansson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T: Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1050—1055, 1988.
- 3) Yoon YH, Marmor MF: Dextromethorphan protects retina against ischemic injury *in vivo*.

- Arch Ophthalmol 107: 409—411, 1989.
- 4) Blair NP, Baker DS, Rhode JP, Solomon M: Vitreoperfusion. A new approach to ocular ischemia. Arch Ophthalmol 107: 417—423, 1989.
- 5) Blair NP, Shaw WE, Dunn R Jr, Tsukahara Y, Floro C, Rusin MM: Limitation of retinal injury by vitreoperfusion initiated after onset of ischemia. Arch Ophthalmol 109: 113—118, 1991.
- 6) Ben-Nun J, Alder VA, Cringle SJ, Constable IJ: A new method for oxygen supply to acute ischemic retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 298—304, 1988.
- 7) Faberowski N, Stefansson E, Davidson RC: Local hypothermia protects the retina from ischemia. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2309—2313, 1989.
- 8) Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD: Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. J Cereb Blood flow Metab 7: 729—738, 1987.
- 9) Weiss H: The carbohydrate reserve in the vitreous body and retina of the rabbit's eye during and after pressure ischemia and insulin hypoglycaemia. Ophthalmic Res 1: 360—371, 1972.
- 10) Mori K, Yoneya S, Takahashi N, Hayashi N, Abe T: Fundus hypothermia inhibits photic injury. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 1096, 1991.
- 11) Stiel WL, Gonzalez-Lima F, Carrera A, Cuebas LM: Active defence of retinal temperature during hypothermia of the eye in cats. J Physiol 81: 26—33, 1986.
- 12) Ashton N, Dollery CT, Henkind P, Hill DW, Paterson JW, Ramalho PS, et al: Focal retinal ischemia. Br J Ophthalmol 50: 283—384, 1966.
- 13) Magalhaes MM, Coimbra A: Electron microscope radioautographic study of glycogen synthesis in the rabbit retina. J Cell Biol 47: 263—275, 1970.
- 14) Welsh FA, Sim R, Harris VA: Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. J Cereb Blood Flow Metab 10: 557—563, 1990.
- 15) Hayreh SS, Weingeist TA: Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischemia. Br J Ophthalmol 64: 818—825, 1980.
- 16) Tazawa Y, Seaman AJ: The electroretinogram of the living extracorporeal bovine eye. The influence of anoxia and hypothermia. Invest Ophthalmol Vis Sci 11: 691—698, 1972.
- 17) Wolin LR, Massopust LC: Selective cooling of the eye. Effects on evoked potentials of the visual system. Arch Ophthalmol 76: 723, 1966.