

## インドシアニングリーン蛍光眼底造影でみられる 脈絡膜新生血管周囲の低蛍光輪

福島伊知郎, 高橋 寛二, 西村 哲哉, 大熊 紘, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

### 要 約

サル眼に実験的脈絡膜新生血管(新生血管)を作成し、インドシアニンググリーン蛍光眼底造影(ICG 蛍光造影)を行って、新生血管周囲に輪状に低蛍光がみられた病巣を病理組織学的に検討した。新生血管周囲の低蛍光輪は、光凝固2週以後にICG 蛍光造影で検出された新生血管の28%にみられた。新生血管の活動期には周囲の低蛍光は造影早期に明瞭にみられたが、造影後期には新生血管からの色素漏出によってみられなくなった。新生血管が退縮期になると、周囲の低蛍光は全造影時期でみられたが、特に造影後期に明瞭であった。病理組織学的には、い

ずれの時期においても網膜下に広がった新生血管の周辺部に網膜色素上皮が重層していた。これらの所見から、新生血管周囲の低蛍光は新生血管周囲に増殖し重層した網膜色素上皮による背景蛍光の遮断によって生じることが示され、新生血管の補助的診断となる所見であった。(日眼会誌 99:1262-1270, 1995)

キーワード：脈絡膜新生血管, 網膜色素上皮, インドシアニンググリーン蛍光眼底造影, 蛍光眼底造影, 老人性円板状黄斑変性

## Dark Rim around Choroidal Neovascularization in Indocyanine Green Angiography

Ichiro Fukushima, Kanji Takahashi, Tetsuya Nishimura,  
Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

### Abstract

Experimentally produced choroidal neovascularization (ChNV) surrounded by a dark rim in indocyanine green (ICG) angiography was studied histopathologically. Dark rims were seen in 28% of ChNVs which were detected with ICG angiography 2 weeks after photocoagulation. During the developing stage of ChNV, the dark rim around it was seen in the early phase of ICG angiography, but in the late phase, the dark rim became unclear because of extravascular dye leakage. During the regressive stage, the dark rim was seen in all phases of angiography. It was especially clear in the late phase. Histopathologically, at the site of the dark rim the

retinal pigment epithelial cells proliferated to surround the ChNV in the subretinal space during both stages. These results show that proliferated retinal pigment epithelium surrounding ChNV blocks the fluorescence of the choroid, and causes the dark rim. The dark rim is helpful for diagnosis of ChNV. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:1262-1270, 1995)

Key words: Choroidal neovascularization, Retinal pigment epithelium, Indocyanine green angiography, Fluorescence fundus angiography, Age-related macular degeneration

### I 緒 言

我々は第1報<sup>1)</sup>で、インドシアニンググリーン蛍光眼底造影(ICG 蛍光造影)がサル眼に作成した実験的脈絡膜

新生血管(新生血管)の検出に有効であったことを報告した。しかし、小さい新生血管の検出はフルオレセイン蛍光眼底造影(フルオ蛍光造影)と比べるとICG 蛍光造影の方が不明瞭であり、その理由の1つは、ICG 蛍光造影で

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学眼科学教室 福島伊知郎

(平成6年12月28日受付, 平成7年7月19日改訂受理)

Reprint requests to: Ichiro Fukushima, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received December 28, 1994 and accepted in revised form July 19, 1995)

は造影早期に新生血管と脈絡膜血管の区別ができにくいことよって<sup>1)</sup>, Sheider ら<sup>2)</sup>は, 新生血管を検出する所見として新生血管周囲の低蛍光輪(dark rim)を報告し, これが非典型的な新生血管の補助的診断となることを指摘している. そこで, 実験的に作った新生血管に dark rim がみられるか否か, みられる場合にはそれはなぜかを病理組織学的に検討した.

## II 実験方法

実験動物として, 体重 2.5~3.5 kg の成熟カニクイザル (*Macaca irus*) 14 匹 18 眼を使用し, 9 匹 13 眼は ICG 蛍光造影と脈絡膜血管鑄型標本による新生血管の判定を行った(既報<sup>1)</sup>). また, 5 匹 5 眼については組織切片によって病理組織学的検討を行った. 既報<sup>1)</sup>に述べた方法によって後極部網膜にクリプトンレーザーによる強い光凝固を 288 か所行い, 新生血管を発生させた. すなわち, 光凝固の凝固条件は, 照射出力 200 mW, 照射野 100  $\mu$ m, 照射時間 0.1 秒とした. 光凝固後 1 週毎に眼底検査, フルオ蛍光造影, ICG 蛍光造影を行った. 眼底造影は, トプコン社製 TRC-50 IA を用いて撮影, 記録した. まず, 10% フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®) 1 ml を大伏在静脈から静注し, フルオ蛍光造影を行った後, 2.5% ICG 5 mg/kg を静注し, ICG 蛍光造影を行った. 蛍光造影と光凝固は塩酸ケタミン(ケタラール®)筋注による全身麻酔下で行った. 光凝固後 1~16 週の間には眼球摘出を行い, 摘出眼球は直後に毛様体部で角膜輪部に平行に切開を加え, 4% グルタルアルデヒド固定液で 24 時間固定した後, 0.1 M 磷酸緩衝 1% 四酸化オスミウムで 1 時間後固定を行い, 型のごとくエタノール系列で脱水後, エポン 812 に包埋した. 試料は, 1  $\mu$ m の切

片を作成し, トルイジンブルー染色で光学顕微鏡で観察した. また, トリミングを行い, 超薄切片を作成し, 酢酸ウラニール, クエン酸鉛の二重染色を行って, 日立 H 500 または HU 500 型透過型電子顕微鏡で観察した.

## III 実験結果

### 1. 新生血管の発生とその検出

全光凝固部 288 か所のうち, 新生血管の発生を血管鑄型標本, または組織切片で確認できたのは 149 か所 (51.7%) で, このうち ICG 蛍光造影で新生血管が検出されたのは 94 か所 (63.1%) であった. 光凝固後, 新生血管の確認時期は 1 週 6 か所, 2~3 週 28 か所, 4 週以降 60 か所であった.

### 2. Dark rim の検出率

ICG 蛍光造影の造影早期から造影中期において, 網目状または結節状の新生血管の周囲に, 脈絡膜血管と新生血管を隔てるようにみられた低蛍光輪を dark rim と定義した.

ICG 蛍光造影で新生血管が検出された 94 か所中, dark rim がみられたのは光凝固 1 週には 0 か所, 光凝固後 2~3 週に 4 か所, 光凝固後 4 週以後 22 か所, 延べ 26 か所で検出率は 28% であった.

### 3. 色素漏出が旺盛な新生血管の dark rim (光凝固後 2 週)

新生血管活動期には, フルオ蛍光造影では, 造影早期に周囲に dark rim を伴って網目状の新生血管がみられ, 造影後期には新生血管から著しい色素漏出がみられた(図 1). このような病巣では, ICG 蛍光造影でも造影早期に網目状の過蛍光として新生血管網がみられ, その周囲に dark rim がみられたものと(図 2 矢印), dark rim

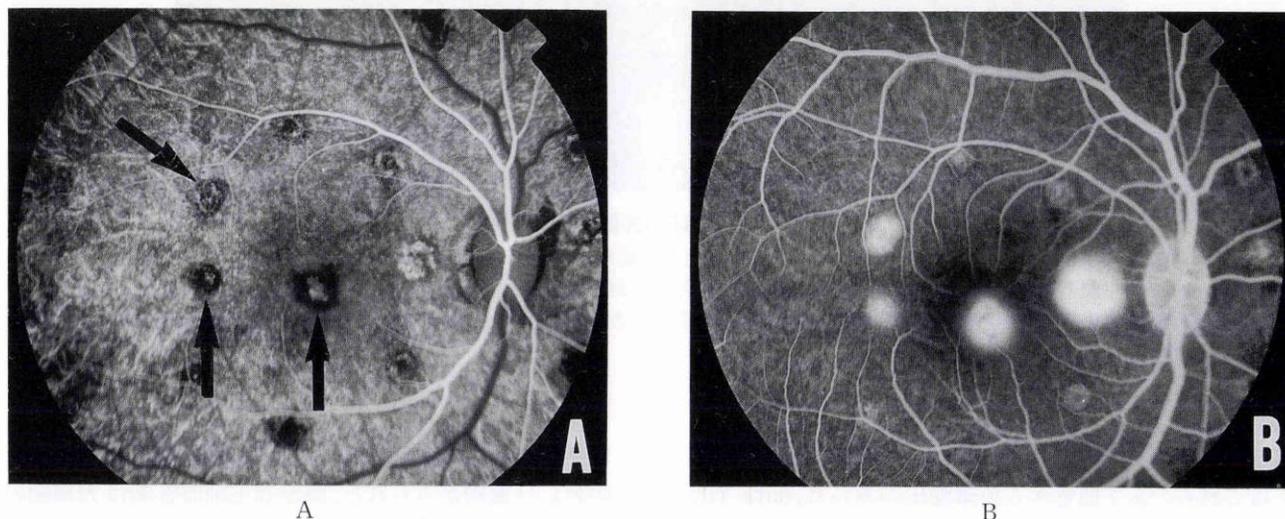


図 1 光凝固後 2 週のフルオレセイン(フルオ)蛍光造影(新生血管活動期).

A は早期, 6 秒後, B は後期, 340 秒後.

4 か所に新生血管がみられ, うち 3 か所(矢印)には, 早期には周囲に低蛍光を伴って網目状の新生血管がみられ, 造影後期には新生血管から著しい色素漏出がみられる.

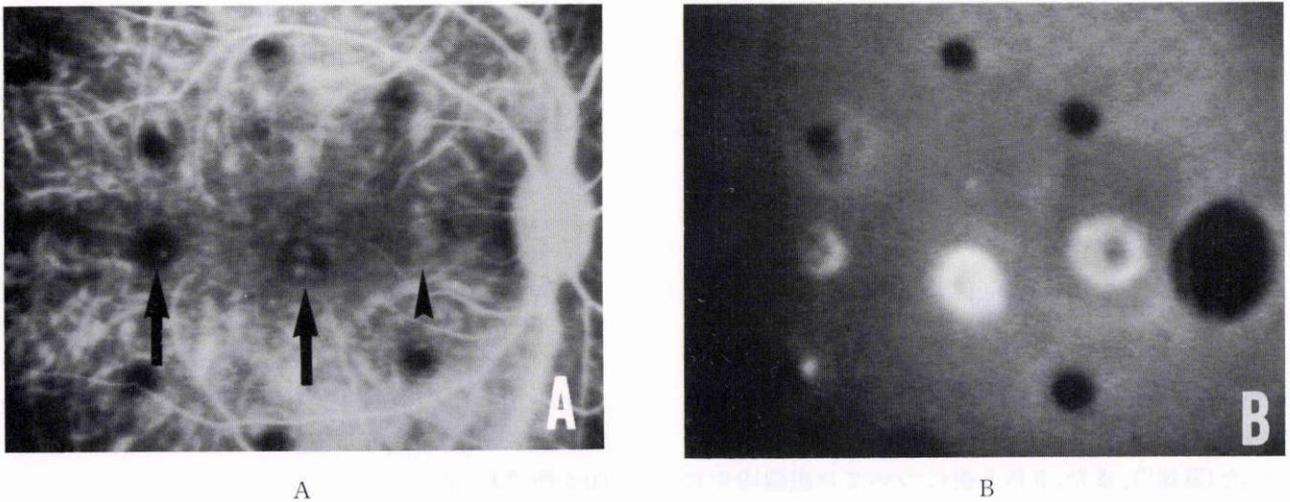


図2 図1と同時期のインドシアニンググリーン(ICG)蛍光造影.

Aは造影早期, 8秒後, Bは造影後期, 30分後.

造影早期に網目状の過蛍光として新生血管がみられ, その周囲に dark rim がみられるものと(2か所, 矢印), みられないものがある(矢じり). Dark rim は特に中央のもので明瞭である. 造影後期にはこれらの新生血管から色素漏出がみられ, dark rim はみられない.

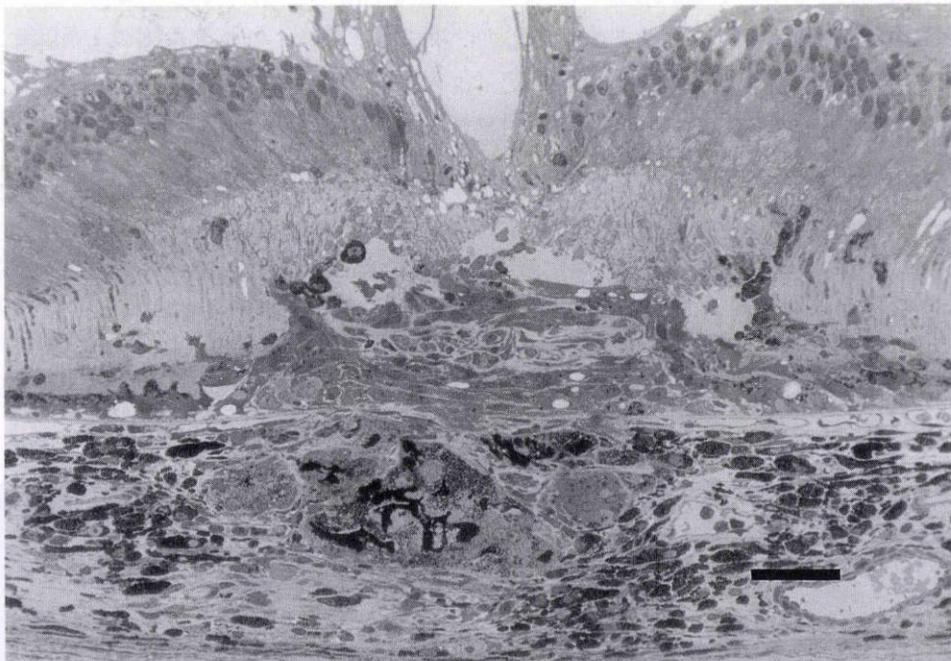


図3 図2の矢印の部位の光学顕微鏡.

新生血管は網膜下に広がり, 周囲に漿液性網膜剝離と網膜浮腫を伴っている. 網膜色素上皮細胞が著しく増殖して新生血管を周囲から囲い込んでおり, 特に周辺部では網膜色素上皮の著しい重層がみられる. 脈絡膜毛細血管網は光凝固の中心部では閉塞しているが, 周辺部では閉塞はみられない. トルイジンブルー染色. バーは  $50\mu\text{m}$

がみられなかったものがあった(図2矢じり). 造影後期にはこれらの新生血管から色素漏出がみられ, dark rim は不明瞭になった.

光学顕微鏡でみると, dark rim がみられた新生血管は網膜下に広がり, 周囲に漿液性網膜剝離と網膜浮腫を伴っていた. 新生血管の周囲には網膜色素上皮が著しく

増殖して囲い込んでおり, 特に周辺部では網膜色素上皮の著しい重層がみられた. 脈絡膜毛細血管網は光凝固の中心部では閉塞していたが, 周辺部では再開通しており, 閉塞はみられなかった(図3).

電子顕微鏡では, 重層した網膜色素上皮細胞は紡錘型で多数の微絨毛を持ち, 細胞内にはメラニン顆粒は少な

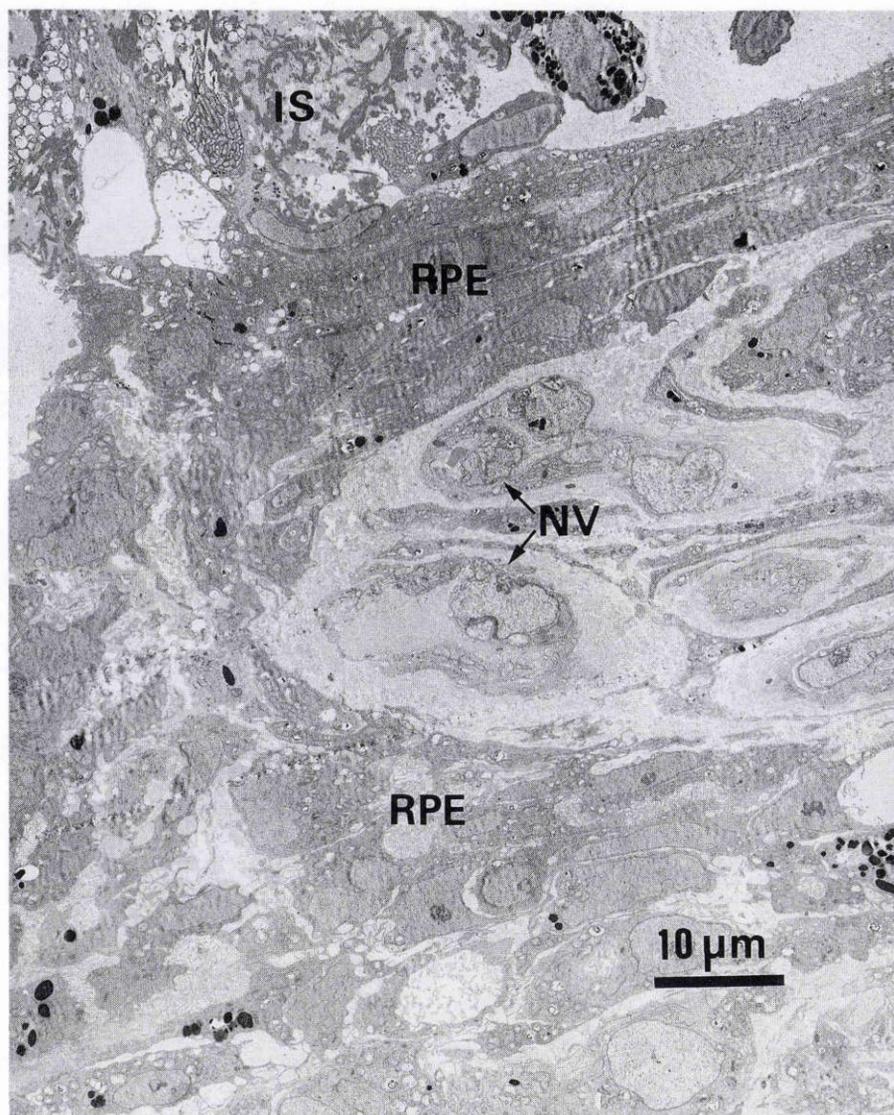


図4 図2の矢印の部位の電子顕微鏡写真.

紡錘形の網膜色素上皮細胞が重層し新生血管を取り込んでいるが、細胞間には間隙がみられる。網膜色素上皮細胞内のメラニンは少数である。RPE：網膜色素変性、NV：新生血管

かった(図4)。新生血管の内皮細胞周囲の基底膜は薄く、胞体は一部菲薄な部位もみられた。細胞内器官に富み、細胞間の接合装置は少数で、血管は未熟であった(図5)。

Dark rim がみられなかった新生血管は、光学顕微鏡では、新生血管は網膜下に広がり、周囲に網膜剝離と網膜浮腫を伴っていた。網膜色素上皮細胞は新生血管に沿って伸びていたが、新生血管周囲の重層は軽度であった(図6)。

4. 色素漏出がわずかしみられなかった新生血管の dark rim(光凝固後16週)

臨床的に自然退縮した新生血管の病巣では、フルオ蛍光造影で早期に網目状の新生血管がみられ、後期にわずかに色素漏出がみられた(図7)。ICG 蛍光造影では、造影早期から網目状の新生血管がみられ、その周囲に dark rim がみられた。しかし、造影後期には新生血管からの色素漏出はわずかで、この時期にも新生血管を取り巻いて

明瞭な dark rim がみられた。脈絡膜充盈欠損による低蛍光はみられなかった(図8)。

このような病巣は光学顕微鏡では、新生血管は網膜下に広がっていたが、漿液性網膜剝離はほぼ吸収されていた。新生血管は増殖した網膜色素上皮によって完全に囲い込まれていた。特に、新生血管の周辺部は網膜色素上皮が数層に重層していた。その下の脈絡膜毛細血管網は病巣の周辺部では再形成されていて、閉塞をみなかった(図9)。

電子顕微鏡では、Bruch膜のすぐ上の網膜色素上皮細胞はメラニン顆粒を多数胞体内にもっていたが、重層したその上の細胞には胞体内にメラニン顆粒は少数であった。この部の脈絡膜毛細血管は完全に再形成され、管腔は大きく、窓構造が多数みられ、電子顕微鏡的に異常はみられなかった(図10)。新生血管の管腔は大きく、薄い基底膜に囲まれ、内皮細胞は扁平で多くの窓構造がみられ、成

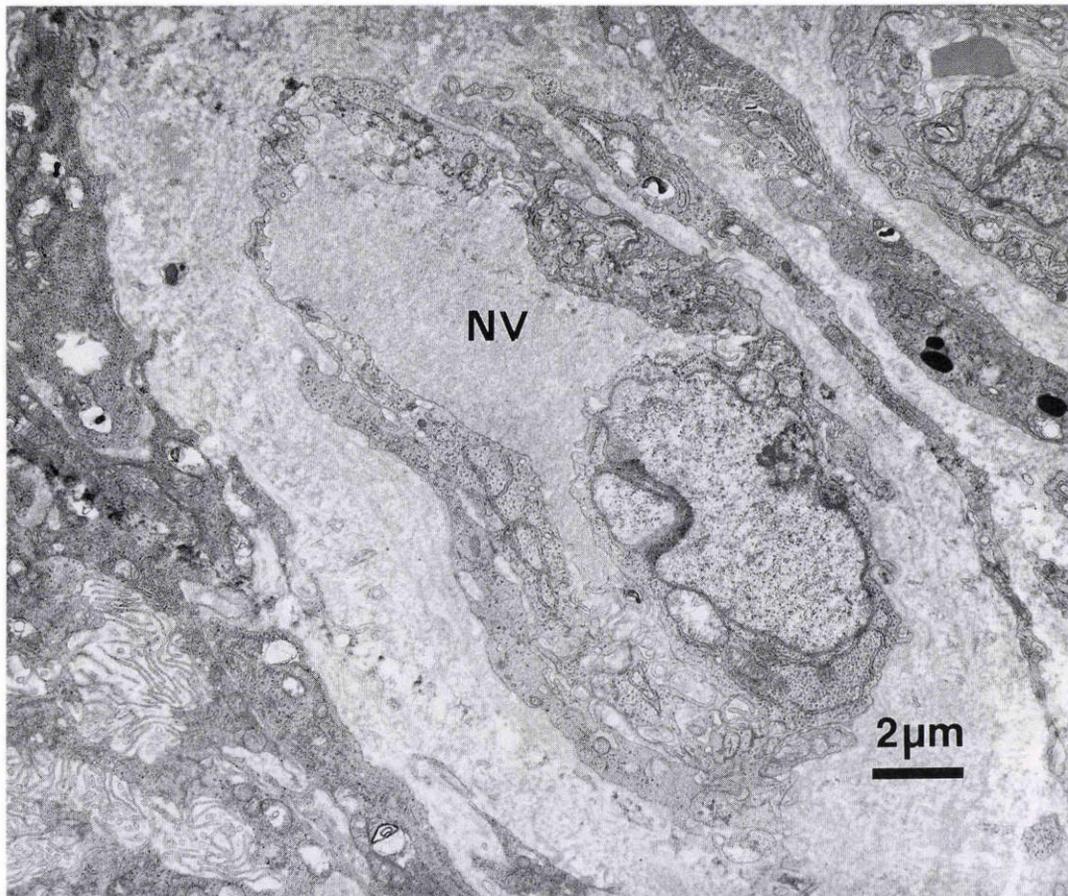


図5 図3の新生血管の電子顕微鏡写真.

新生血管の内皮細胞周囲の基底膜は薄く、胞体は厚く細胞内器官に富み、細胞間結合装置は少数で未熟な血管である。

熟した血管になっていた(図11)。

#### IV 考 按

ICG 蛍光造影は、フルオ蛍光造影で検出できない新生血管、いわゆる occult vessel の検出に優れているが<sup>3)~8)</sup>、すべての症例で新生血管が検出できるわけではないことは臨床的に知られている<sup>5)6)9)</sup>。この理由の1つに、新生血管と脈絡膜血管を区別できないことがあることがあげられている<sup>1)2)</sup>。Sheider ら<sup>2)</sup>はこれらを区別する所見として、新生血管周囲に dark rim があることを指摘したが、厳格な定義はなく、また、その成因も解明されていない。そこで前述した定義に基づき、その病理組織学的所見を検討した。

その結果、ICG 蛍光造影でみられた dark rim は、新生血管からの色素漏出によって違いがみられた。すなわち、光凝固後2~3週の色素漏出が著明な時期には、ICG 蛍光造影の造影早期に新生血管網の周囲に dark rim がみられたが、後期には新生血管から色素漏出が起り、dark rim は漏出した色素によって隠されみられなくなった。新生血管が退縮すると、ICG 蛍光造影では、造影の早期も後期もともに新生血管網を取り囲むように dark rim がみられた。特に、造影後期になると脈絡膜の

背景蛍光が弱くなり dark rim は一層明瞭にみられた。このように、dark rim は造影早期のみに明らかにみられるものと、造影早期、造影後期に明らかにみられるものがあり、これについては Sheider ら<sup>2)</sup>は報告していなかった。

組織学的にみると、新生血管から色素漏出が盛んな時期には、新生血管が網膜色素上皮細胞に囲い込まれ始め、新生血管の辺縁で網膜色素上皮細胞の重層がみられたものと、新生血管に沿って網膜色素上皮細胞が伸びてはいるが、新生血管の辺縁で網膜色素上皮細胞の重層がみられなかったものがあった。この組織所見を ICG 蛍光造影の造影早期の所見と照らし合わせてみると、網膜色素上皮細胞の重層がみられた新生血管では dark rim が必ずみられ、一方、網膜色素上皮細胞の重層がみられなかったものでは、dark rim はみられなかった。さらに、ICG 蛍光造影上の dark rim の存在部位を組織でみると、その部位の脈絡膜毛細血管は再開通しており、正常に近い形態を有していた。これらのことから、造影早期の dark rim は重層した網膜色素上皮が背景蛍光を遮断したために生じたと考えられた。また、このような新生血管の活動期には造影後期になると、新生血管から漏出した大量の色素が網膜下に拡散し、dark rim はみられなくなった。

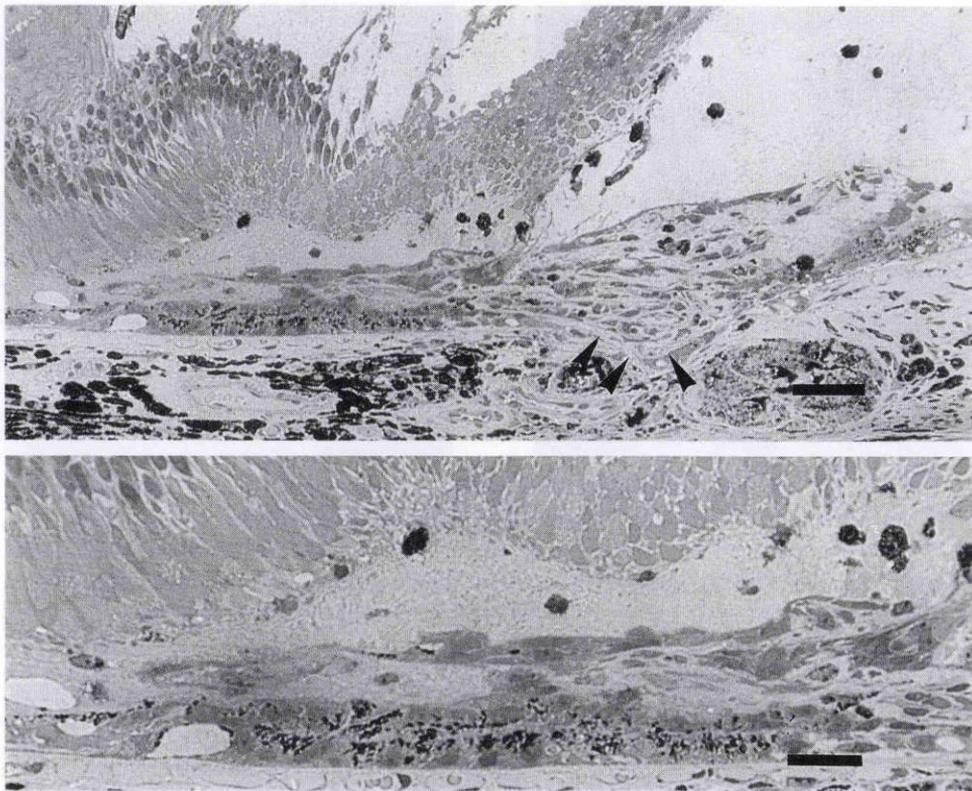


図6 図2の矢じりの部位の光学顕微鏡.

新生血管は Bruch 膜の断裂部を通過して網膜下に広がり(矢印), 周囲に網膜剥離と網膜浮腫を伴っている. 網膜色素上皮細胞は新生血管に伴って増殖しているが, 新生血管周囲では色素上皮細胞の重層は軽度である. 上段は弱拡大: パーは 50 μm, 下段は強拡大: パーは 25 μm, トルイジンブルー染色

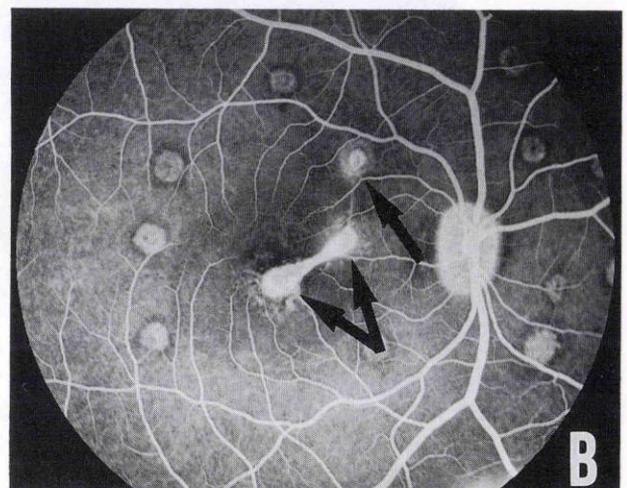
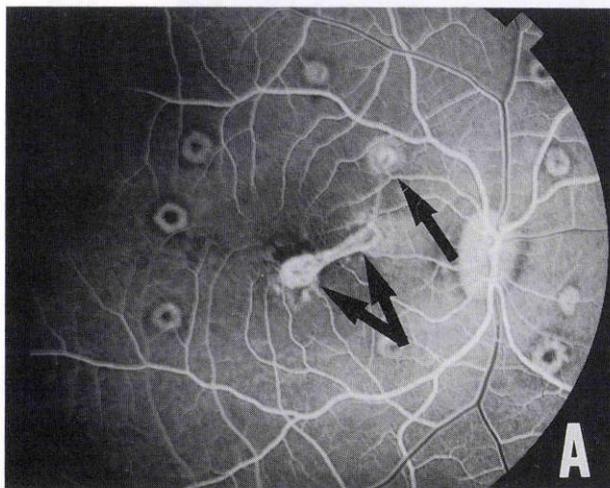


図7 光凝固後 16 週のフルオ蛍光造影(新生血管の退縮期).

A は早期, 7 秒後, B は後期, 230 秒後

早期には網目状の新生血管がみられ, 後期にはわずかに色素漏出がみられる(矢印).

新生血管が自然退縮し色素漏出がわずかしみられない時期になると, 新生血管は単層の網膜色素上皮細胞に囲い込まれ, 漿液性網膜剥離はみられなくなった. この時期には, 病巣辺縁部では網膜色素上皮細胞は数層に重層しており, それによって dark rim は全造影時期でみら

れるようになったと考えられた. さらに, 造影後期となると ICG の背景蛍光が弱くなって網膜色素上皮による遮断効果が顕著になるため, dark rim が明瞭にみられるようになったと考えられた.

ICG の蛍光はメラニン色素に対する透過性がよいの

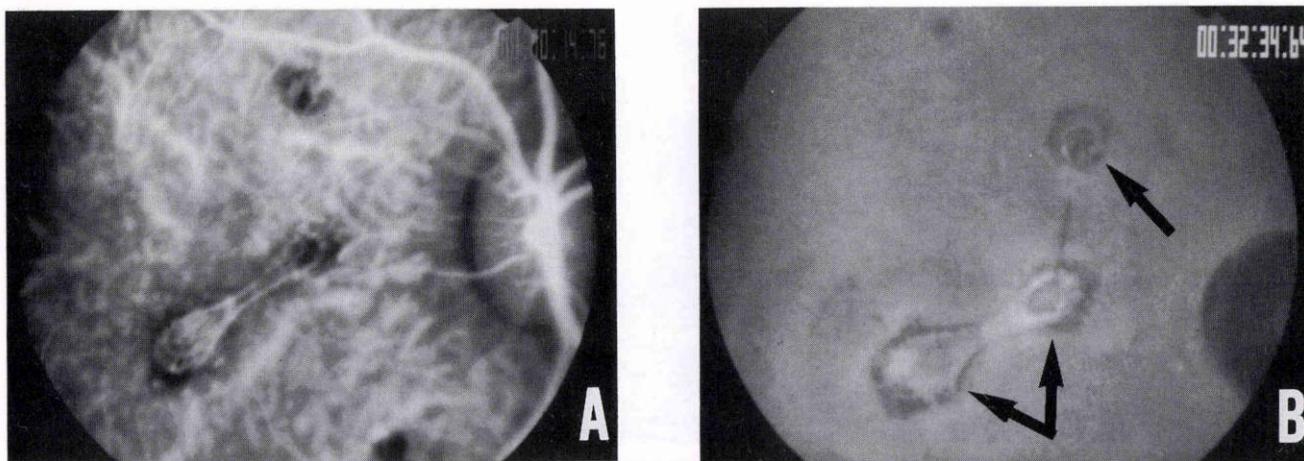


図8 図7と同時期のインドシアニングリーン蛍光造影.

Aは造影早期,18秒後. Bは造影後期,32分後

造影早期から網目状の新生血管がみられるが, dark rimは不明瞭である. しかし, 造影後期には新生血管からの色素漏出はわずかで, この時期には新生血管を取り巻いて明瞭な dark rimがみられる(矢印).

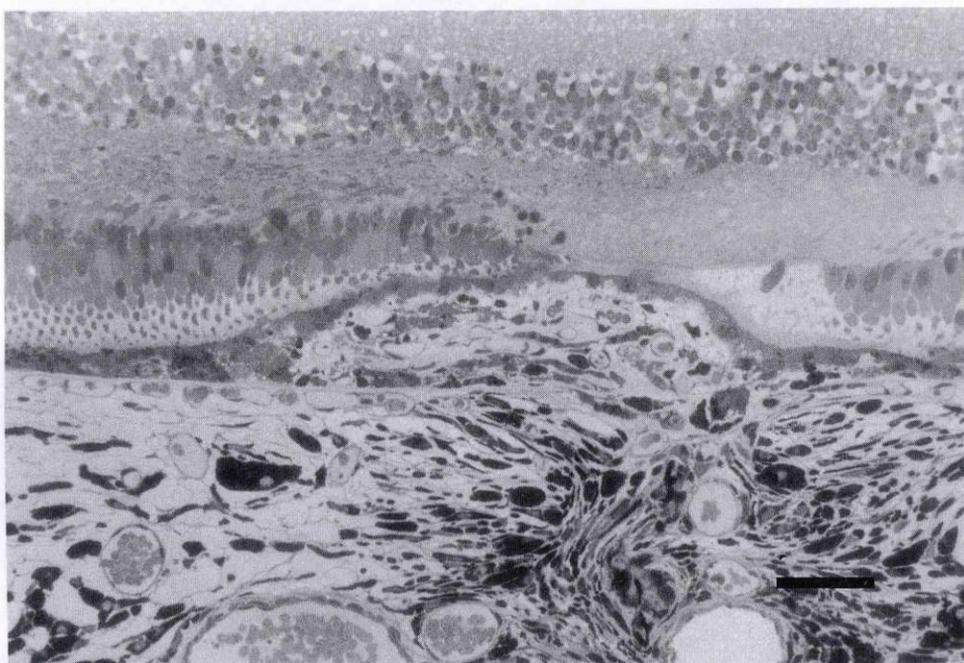


図9 図7, 8の矢印の光学顕微鏡.

脈絡膜新生血管は網膜下に広がっているが, 漿液性網膜剥離はほぼ吸収されている. 増殖した網膜色素上皮細胞は新生血管を完全に囲い込んでいる. 特に, 新生血管の周辺部は網膜色素上皮細胞が数層に重層している. 脈絡膜毛細血管網は病巣の周辺部では再形成され, 閉塞はみられない. トルイジンブルー染色, パーは 25  $\mu\text{m}$

で, 正常の網膜色素上皮細胞が ICG の蛍光を遮断する効果はわずかであると考えられている<sup>10)</sup>. このことを考えると, 増殖した網膜色素上皮細胞のようにメラニン顆粒の含有量が少ない細胞では, それらが ICG の蛍光を遮断する効果はさらに小さくなると考えられる. しかし, そのような色素の少ない細胞であっても, 重層すると個々の網膜色素上皮細胞が ICG の蛍光を遮断する効果が加算され, 蛍光の遮断効果が強くなり, その結果として, ICG 蛍光造影で新生血管周囲の dark rim としてみられるよ

うになったと考えられた.

このように dark rim がみられた部位では, 2~8 層までの網膜色素上皮細胞が重層していたが, 本研究の結果からは増殖した網膜色素上皮細胞が何層まで重層すれば, ICG 蛍光造影で低蛍光として現れるかは判断できなかった.

ICG 蛍光造影で dark rim のように低蛍光としてみられる原因としては, 網膜色素上皮以外には, ①脈絡膜充盈欠損, ②脈絡膜内巨細胞, ③滲出斑や網膜下血腫, ④

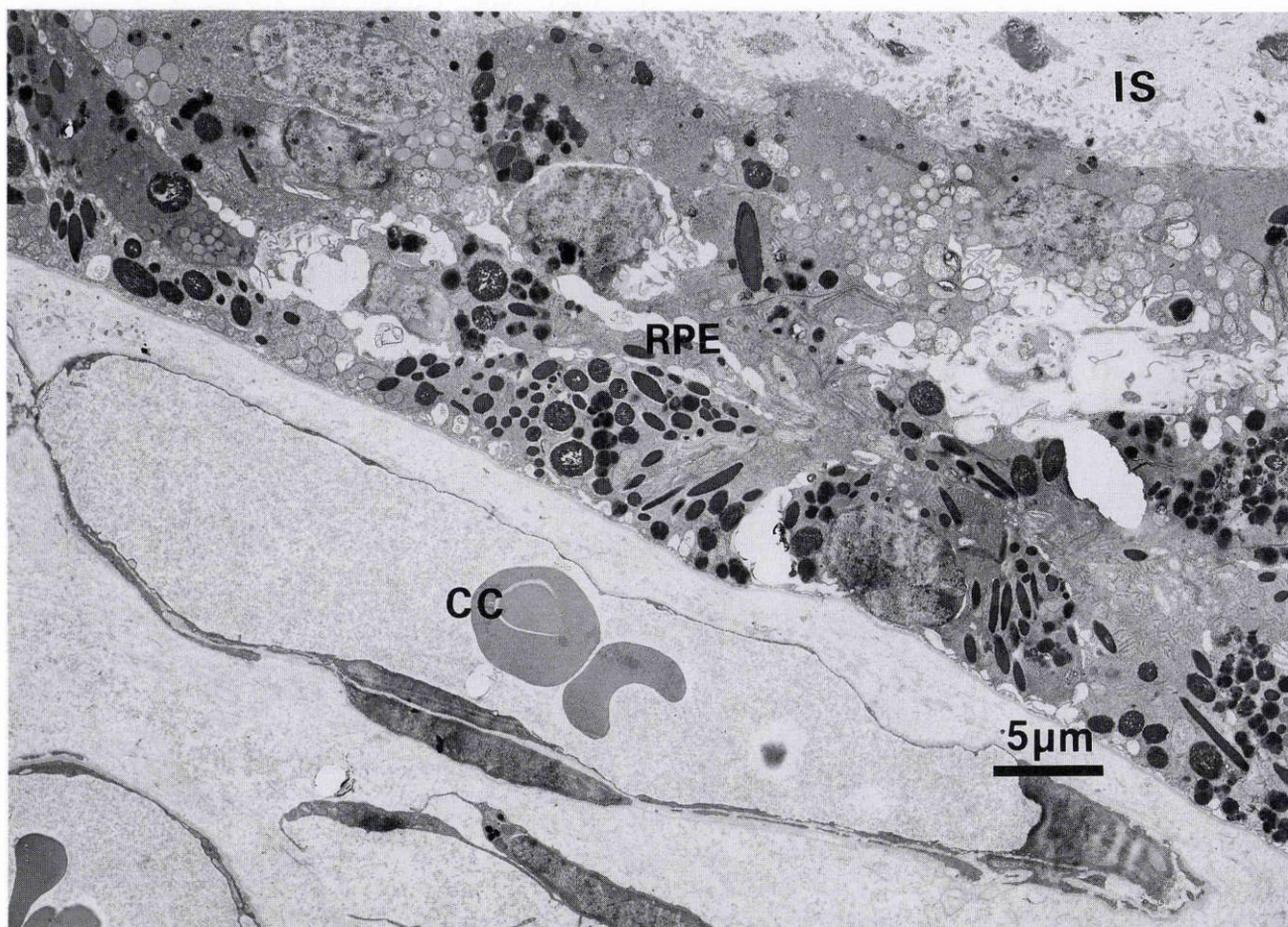


図10 図9の電子顕微鏡写真。

Bruch膜のすぐ上の網膜色素上皮細胞は単層に並び、メラニン顆粒を多数胞体内にもつが、感覚網膜側の網膜色素上皮細胞は数層に重層し、形態はやや扁平でメラニン顆粒は少数しかみられない。脈絡膜毛細血管は完全に再形成し、管腔は大きく、窓構造が多数みられる。CC：脈絡膜毛細血管板、IS：視細胞内節

光凝固の瘢痕病巣があげられる。しかし、脈絡膜充盈欠損は、新生血管辺縁部の重層した網膜色素上皮細胞の後方にみられた脈絡膜毛細血管は再開通しており、管腔が大きく、窓構造がみられ、その密度は正常脈絡膜毛細血管と違いはなかったので Sheider ら<sup>2)</sup>の報告と同様、dark rimの原因とは考えられなかった。脈絡膜内の巨細胞は図3、6で示すように、常に新生血管発生病巣の中心部付近に現れることから、病巣部周辺にみられる dark rimとは関連がないと考えられた。また、網膜下血腫や滲出物も、眼底検査でこれらの所見がみられない場合でも ICG 蛍光造影で dark rim がみられたことから、これらも関連がないと思われた。光凝固の瘢痕病巣については円形の低蛍光部としてみられるため、それよりも新生血管が小さいときには網膜色素上皮細胞による低蛍光か瘢痕によるものか鑑別できなかった。しかし、新生血管がそれよりも大きい場合にも明瞭な dark rim がみられたことから、光凝固の瘢痕病巣も関連はないと考えられた。

臨床的に ICG 蛍光造影で dark rim がみられる場合、新生血管周囲の網膜下血腫や、網膜色素上皮剥離が低蛍光を示す場合があり<sup>7)</sup>、臨床的にはこれらによる低蛍光

との鑑別が困難な場合があると思われた。

また、本実験の dark rim の検出率が低い理由として、ICG 蛍光造影で新生血管が光凝固瘢痕よりも小さい場合は、新生血管周囲の低蛍光が光凝固瘢痕によるものなのか、または dark rim なのか区別できないため、このような例は dark rim として扱わなかったことがあげられた。

以上の結果から、ICG 蛍光造影による dark rim は、ICG 蛍光造影の早期、後期いずれかの時期に、新生血管と背景の脈絡膜蛍光とを分割する低蛍光輪と定義された。新生血管周囲の dark rim は、病理組織学的には新生血管を囲い込むように重層した網膜色素上皮細胞による脈絡膜の背景蛍光の遮断による所見であり、新生血管の補助的診断となり得ることがわかった。

本論文の要旨は第59回日本中部眼科学会総会において福島が報告した。本研究は厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究班および文部省科学研究費一般研究B(課題番号05454478, 宇山)および一般研究C(課題番号05671483, 西村)の援助を受けた。記して謝意を表します。

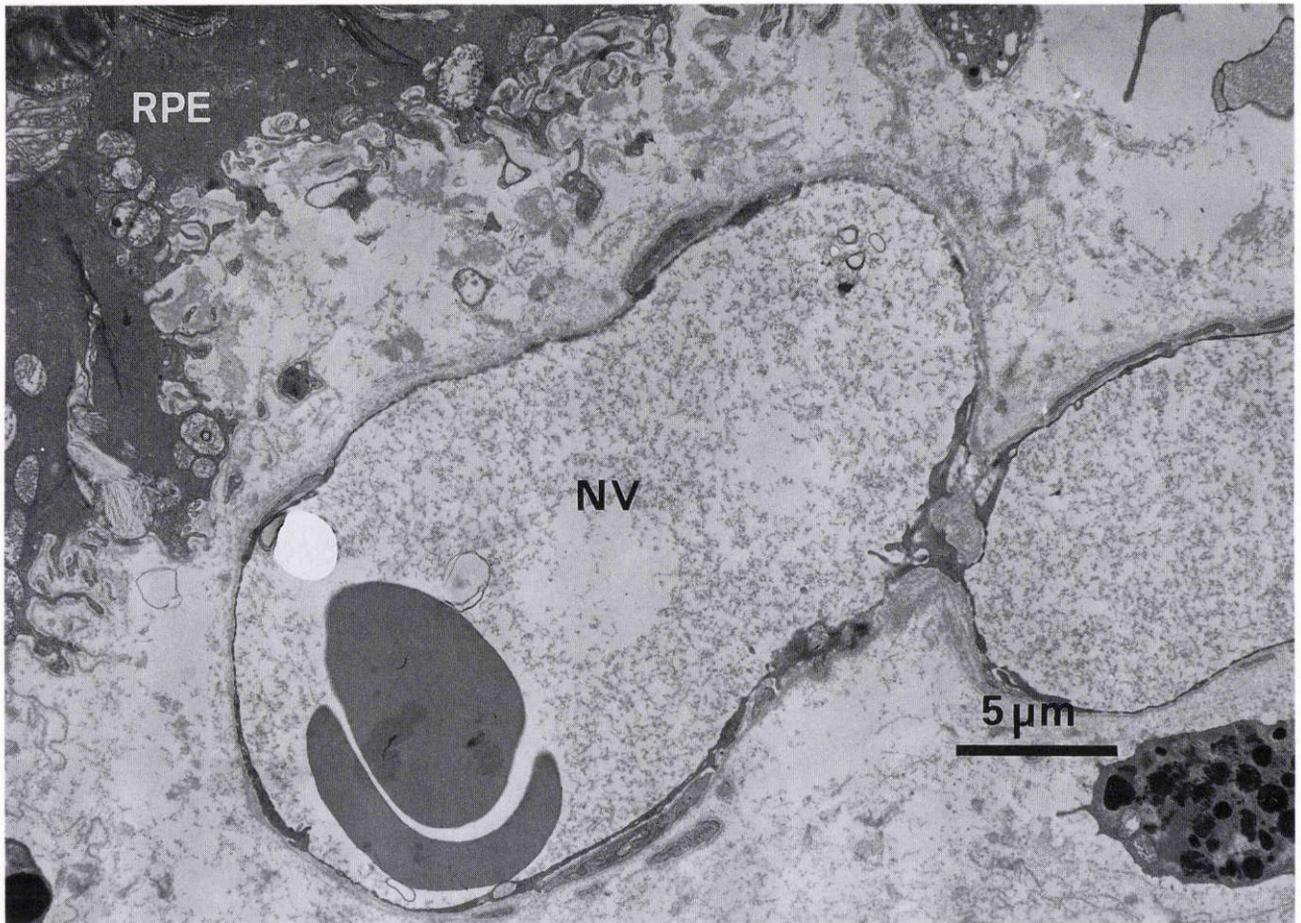


図11 図9の新生血管の電子顕微鏡写真。

新生血管の管腔は大きく、薄い基底膜に囲まれ、内皮細胞は扁平で多くの窓構造がみられ、成熟している。

#### 文 献

- 1) 福島伊知郎, 日下佳苗, 高橋寛二, 岸本直子, 西村哲哉, 大熊 紘, 宇山昌延: 実験的脈絡膜新生血管の赤外蛍光眼底造影による検出, 血管鑄型標本との検討. 日眼会誌 99: 47-58, 1995.
- 2) Sheider A, Kaboth A, Leuhauser L: Detection of subretinal neovascular membranes with indocyanine green and an infrared scanning laser ophthalmoscope. *Am J Ophthalmol* 113: 45-51, 1992.
- 3) 林 一彦, 長谷川豊, 所 敬, 田澤 豊: Hidden choroidal neovascular membranes における赤外蛍光眼底造影法の診断的価値. 臨眼 42: 827-829, 1988.
- 4) Hayashi K, Hasegawa Y, Tazawa Y, Laey JJ: Clinical application of indocyanine green angiography to choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 33: 57-65, 1989.
- 5) 林 一彦, 長谷川豊, 田澤 豊, 志和利彦: 老人性円板状黄斑変性症の診断におけるビデオ赤外蛍光眼底造影法の役割. 臨眼 44: 1189-1193, 1990.
- 6) 川村昭之, 湯沢美都子, 正田美浦, 松井瑞夫: ビデオ赤外蛍光眼底造影法の臨床応用. 老人性円板状黄斑変性症. 臨眼 45: 1355-1359, 1991.
- 7) 奥芝詩子, 竹田宗泰, 宮部靖子: インドシアニングリーン赤外蛍光眼底造影による脈絡膜新生血管の検出. 臨眼 46: 631-635, 1992.
- 8) Yannuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA: Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *Retina* 12: 191-223, 1992.
- 9) 長谷川豊: 新生血管黄斑症への応用. 眼科 36: 143-149, 1994.
- 10) Flower RW, Hochheimer BF: A clinical technique and apparatus for simultaneous angiography of the separate retinal and choroidal circulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 248-261, 1973.