

Bis-benzimide を用いた実験的高血圧ラット網膜血管の観察

山田 亜紀

弘前大学医学部眼科学教室

要 約

実験的腎性高血圧ラット(RHR), 高血圧自然発症ラット(SHR)および対照群として正常血圧を有する Wistar 京都系ラット(WKY)に対し, 生細胞の核のみを染色する bis-benzimide 法を用いて網膜血管の観察を行った。蛍光顕微鏡観察では血圧上昇の緩やかであった SHR では内皮細胞の核の伸展, 核配列の不規則性が認められたのみであった。一方, 急激な血圧上昇のみられた RHR では, 内皮細胞の核は伸展し, 核配列は不規則性が進み, 特に口径不同の強い部分において内皮細胞の核が消失し

ていた。また, 対照群ではみられなかった血管の透過性亢進を示唆する血管平滑筋細胞の核染色, さらに血管周囲組織の核染色がみられた。電子顕微鏡観察で退行変性期にあると考えられた RHR においてもこのような透過性亢進が証明された。(日眼会誌 99:154-160, 1995)

キーワード: Bis-benzimide, 実験的腎性高血圧ラット, 網膜血管, 血管内皮細胞, 透過性亢進

Observation of Retinal Vasculature in Experimental Renal Hypertension Rat Using Bis-Benzimide

Aki Yamada

Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

Abstract

The retinal vessels of experimental renal hypertensive rats (RHRS), spontaneously hypertensive rats (SHRS), and normotensive Wistar-Kyoto rats (WKYS) were studied using bis-benzimide vital staining. In the bis-benzimide stained flat retinal preparations (B-FRP) of SHRS, it was only observed that the endothelial nuclei were elongated and their arrangement was irregular. In B-FRPS of RHRS, the arrangement was more irregular and the nuclei disappeared at the point where the caliber irregularity was marked. The nuclei of smooth muscle cells, which were arranged circumferential-

ly, and the perivascular tissues were clearly identified. This finding suggests that hyperpermeability or disruption of the blood-retinal barrier did not occur in the mild hypertension but in the severe hypertension. The retinal vessels of RHRS in the regressive stage also showed several the same kinds of findings in electron microscopy. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:154-160, 1995)

Key words: Bis-benzimide, Experimental renal hypertension rats, Retinal vessels, Endothelial cells, Hyperpermeability

I 緒 言

網膜における血管構築の観察法としては, 従来, トリプシン消化法や樹脂注入鋳型法などが用いられてきた。しかし, これら, 特にトリプシン消化法においては, 重大な人工的組織傷害が加わることが示されており, しかも一度標本を作成してしまえば, さらに精密な電子顕微鏡的観察などの病理組織学的検索が不可能であるという弱点が知られていた。この弱点を克服したのは, 三上ら¹⁾

の報告した, ゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜伸展標本の手技である。この方法では, 同一の実験対象を眼底写真などの生体観察の後, 詳細な実体顕微鏡レベルでの血管構築や血管機能異常の観察を行い得, さらに準超薄切片や超薄切片による微細構造の観察までが可能である。

一方, 血管構築の観察には多少の難はあるものの, 血管の柵機能をも含めたより詳細な内皮機能の観察の可能性をもった手法として, 生体細胞の核のみを染色する

別刷請求先: 036 青森県弘前市在府町5 弘前大学医学部眼科学教室 山田 亜紀
(平成5年10月25日受付, 平成6年9月3日改訂受理)

Reprint requests to: Aki Yamada, M.D. Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine,
5 Zaifucho, Hirosaki-shi, Aomori-ken 036, Japan

(Received October 25, 1993 and accepted in revised form September 3, 1994)

bis-benzimide 法が知られるようになった²⁾³⁾。今回我々は、この bis-benzimide 法を用いて2種類の高血圧ラットの網膜血管の染色を試みたので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

生後10~15週の正常血圧を有するWistar京都系ラット(WKY)に対し、Grollmanの方法⁴⁾に準じて腎性高血圧を発症させ得た実験的腎性高血圧ラット(RHR)10匹を用いた。片腎の手術後血圧上昇の見られないものに対しては、後日、対側の腎臓を同様に8の字に結紮するか、摘出した。また、生後6か月、12か月の高血圧自然発症ラット(SHR)をそれぞれ5匹ずつ、および対照群として生後6か月、12か月のWKYをそれぞれ5匹ずつ用いた。

2. 実験方法

眼底撮影は塩酸ケタミン(ケタラール®)麻酔下に手持ち眼底カメラ(コーワRC型)で行った。血圧はラット血圧計(KN-210, 夏目製作所)を用い、無麻酔下に尾静脈で手術前、術翌日、以後は術後1週間毎に経時的に収縮期血圧を測定した。

塩酸ケタミン(ケタラール®)麻酔下に0.5% bis-benzimide (Hoechst 33342)液2 ml/kgを静脈内に注入し、3分後に眼球を摘出し、2% グルタルアルデヒドで15分間浸漬固定した。次いで、三上らの手技と同様に網膜標本を作成し、2% グルタルアルデヒドに浸漬状態のまま試料ホルダー上に伸展し、速やかに励起フィルター490 nm, 吸収フィルター530 nmを装着した落射型蛍光顕微鏡(オリンパスBH2-RFK)で観察した。

次いで、このようにして観察を終えた組織片を試料ホルダーから取り出し、2% グルタルアルデヒドで再固定後、オスミウム酸で固定しアルコール系列で脱水し、プロピレンオキサイドへの浸漬を経て、エポキシ樹脂に包埋した。RHRおよび対照群のWKYについては、準超薄切片をトルイジンブルー染色し光学顕微鏡で観察し、さらに超薄切片を作成し、鉛で電子染色し透過型電子顕微鏡で観察した。

III 実験成績

1. 血圧の変化

対照群であるWKYの収縮期血圧は110~130 mmHgを示し、生長加齢による血圧上昇はみられなかった。すなわち、正常ラットの血圧は150 mmHg以下であり、したがって、血圧150 mmHg以上に上昇した例を高血圧発症とみなした。今回の実験では中等度以上の高血圧と考えられる180 mmHg以上を示したRHRを使用した。

RHRでは血圧は手術後1, 2週間後には200 mmHgを超える急激な上昇を示すものがほとんどであった。血圧上昇のみられなかった例や、いったん上昇した後血圧

の下降傾向がみられた例に対しては対側の腎の処理を施し、その後は180 mmHg以上の血圧を持続した。なお手術後、長期間観察し得たラットは徐々に血圧が下降する傾向にあった。

SHRでは、生後3か月頃から200 mmHgを超える高血圧が持続した。

2. 検眼鏡的所見

RHRでは、血圧上昇後の所見は網膜細動脈の変化と網膜浮腫が主であった。網膜細動脈は昇圧とともに狭細を認めるようになり、4~5週間後には動静脈比(A/V比)が1/2, 6~8週間後には1/3程度にまでなった。この間、口径不同を認めるものもみられ、さらに、数週間後には一部念珠様動脈の所見を示していた(図1)。高血圧持続は1か月であったが、2回目の手術後に初めて急激な血圧の上昇をみたラットでは、昇圧後から網膜全体にわたる

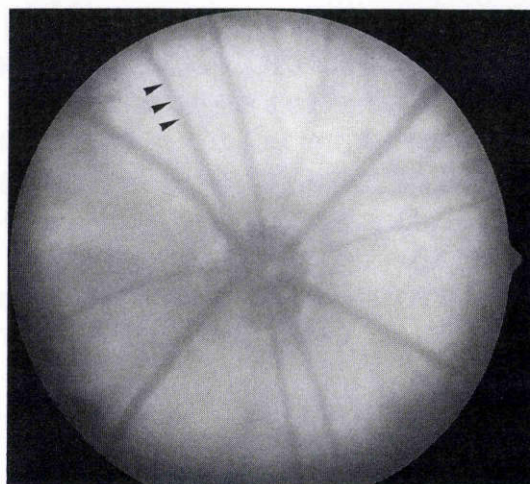


図1 昇圧後3か月の実験的腎性高血圧ラット(以下、RHR)の眼底写真。

細動脈には一部念珠様の強い口径不同(矢じり)を認める。収縮期血圧230 mmHg。

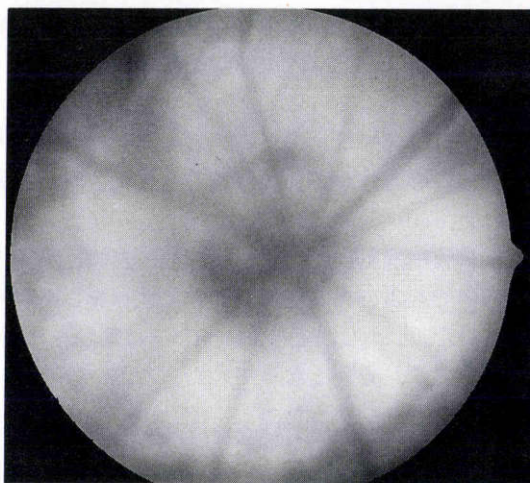


図2 昇圧後1か月のRHRの眼底写真。

浮腫のため、眼底は蒼白である。収縮期血圧220 mmHg。

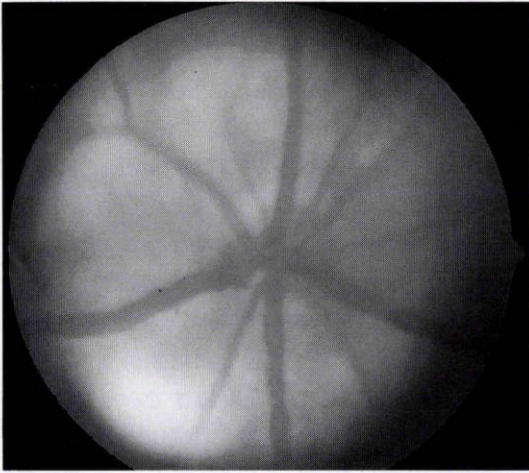


図3 昇圧後2週間のRHRの眼底写真。
細静脈の拡張が強い、収縮期血圧 230 mmHg.

浮腫性の混濁が認められた(図2)。高血圧が5か月持続し、血圧の下降傾向がみられたラットでは4か月を過ぎた頃から細動脈の狭細はむしろ回復傾向にあった。

また、全経過を通じてこれらのラットの眼底には明らかな網膜出血や網膜剥離はみられなかった。網膜細静脈は手術後一過性に拡張するものもみられたが、徐々に回復した(図3)。

一方、本実験に用いたSHRでは網膜細動脈のびまん性の狭細はみられたものの、明らかな口径不同はみられなかった。

3. Bis-benzimide 静注・網膜伸展標本の所見

1) 正常WKYにおける所見

Bis-benzimideを静注したWKY網膜では、血管にのみ核の染色蛍光が観察され、楕円の形状や長軸方向が血管の走行と一致していることなどから、それらは明らかに内皮細胞の核と判定できた(図4, 5)。網膜主幹細動脈においては、図5に示したごとく細長い紡錘形の核が血管の長軸方向に整然と5, 6列に配列していた。また、小数ではあるが所々に血球のものとみなされる小円形の核も認められた。なお、内皮細胞の核の短径・長径比は約1:4であった。

動脈側枝分岐部では、内皮細胞のものとは異なる円形あるいは楕円形の核が1, 2個、ときには数個から強く染色された。

一方、網膜細静脈においては、短径・長径比が約1:2の楕円形で丸みのある核が細動脈に比べ少し不規則に配列していた。しかし、配列数に関しては細動脈と同様、主幹の部位で5, 6列となっていた。なお、分岐部での核の濃染はみられなかった。

2) RHRにおける所見

高血圧持続期間が2週間のラットでは、細動脈には核の明らかな変化はみられなかった。しかし、1か月例(図2に示すラット)では、核の伸展がわずかにみられ、さ

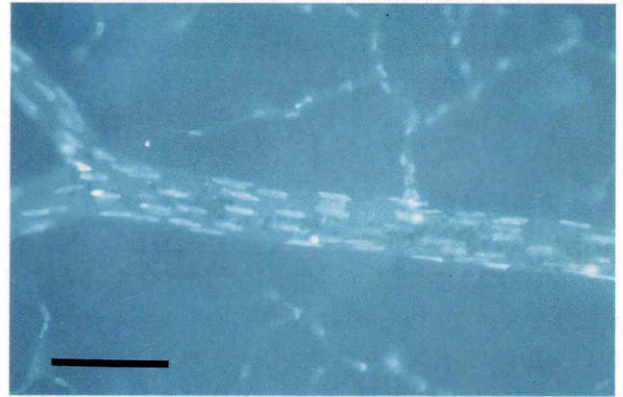


図4 生後6か月のWistar京都系ラット(以下、WKY)のbis-benzimide標本写真。
細動脈の内皮細胞の核が整然と配列している。収縮期血圧 130 mmHg。バーは 100 μ m

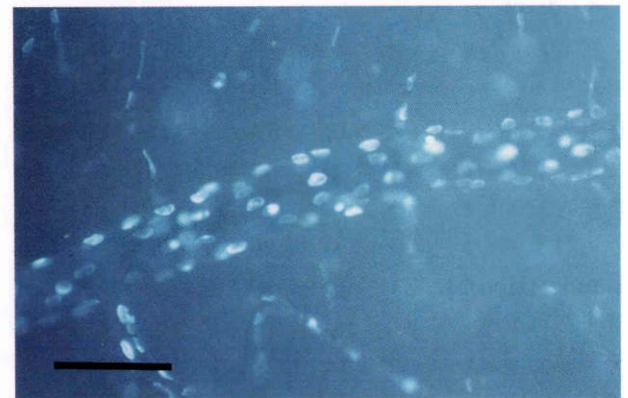


図5 生後6か月のWKYのbis-benzimide標本写真。
細静脈の内皮細胞の核はやや不規則に配列している。バーは 100 μ m

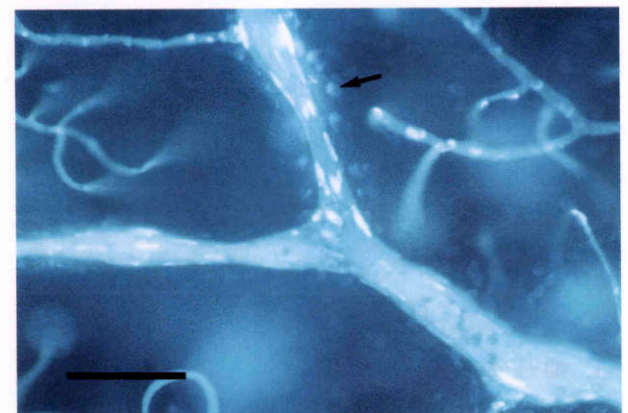


図6 1か月例のRHRのbis-benzimide標本写真。
血管周囲組織の核の染色(矢印)を認める。収縮期血圧 220 mmHg。バーは 100 μ m

らに、細動脈の口径不同が著明で、ほとんど核がみられない部分や逆に核の集中している部分がみられるなど核の配列が非常に不規則となっていた。また、血管拡張部分を中心に血管周囲組織の核までもが染色されていた

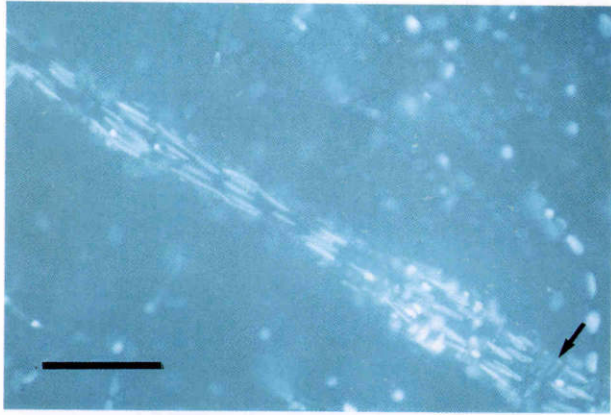


図7 3か月例のRHRのbis-benzimide標本写真。平滑筋細胞(矢印)および血管周囲組織の核染色を認める。収縮期血圧230 mmHg。バーは100 μm

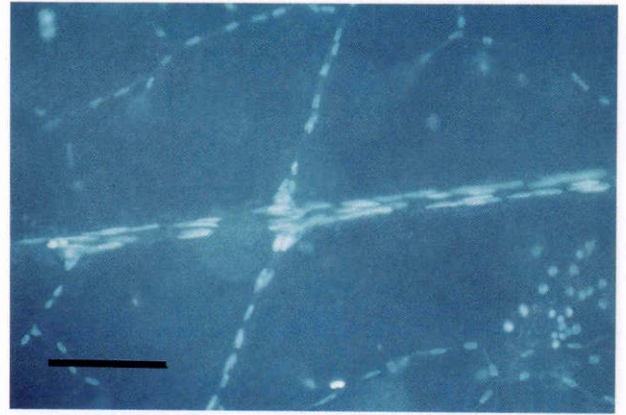


図10 5か月例のRHRのbis-benzimide標本写真。細動脈の狭細。内皮細胞の核の伸張が著明である。収縮期血圧180 mmHg。バーは100 μm

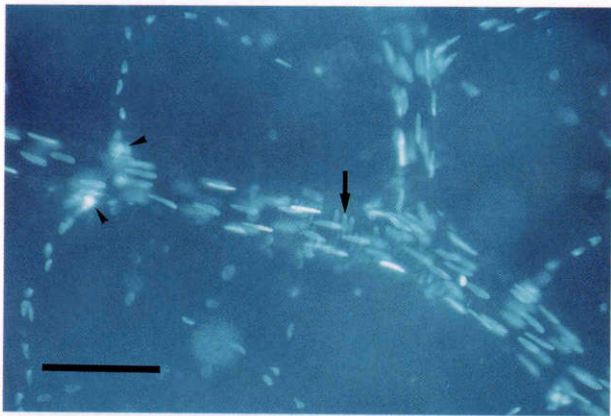


図8 4か月例のRHRのbis-benzimide標本写真。平滑筋細胞の核染色(矢印)および分岐部の細胞の核の濃染(矢じり)を認める。収縮期血圧230 mmHg。バーは100 μm

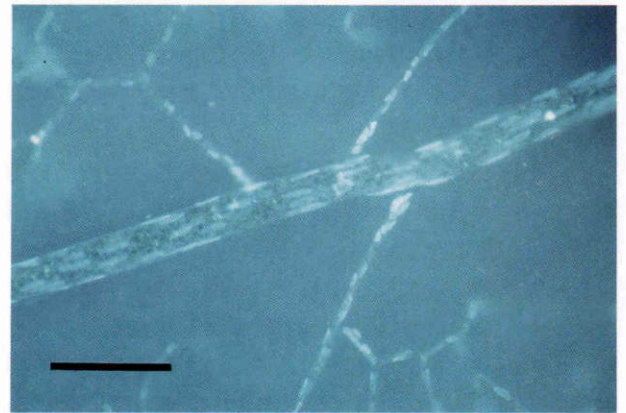


図11 生後6か月の高血圧自然発症ラット(以下、SHR)のbis-benzimide標本写真。核の伸張と核配列の乱れのみを認める。収縮期血圧210 mmHg。バーは100 μm

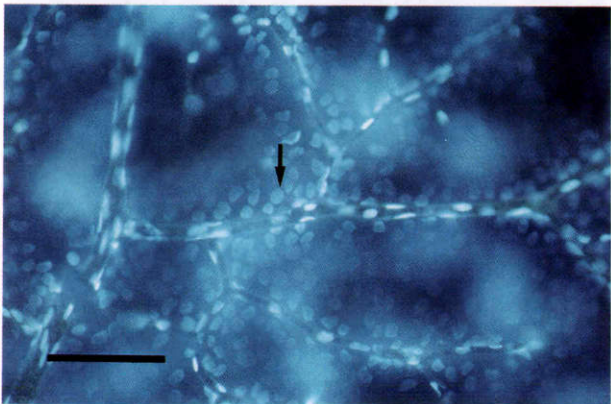


図9 5か月例のRHRのbis-benzimide標本写真。網膜毛細血管周囲組織の核まで染色(矢印)されている。収縮期血圧220 mmHg。バーは100 μm

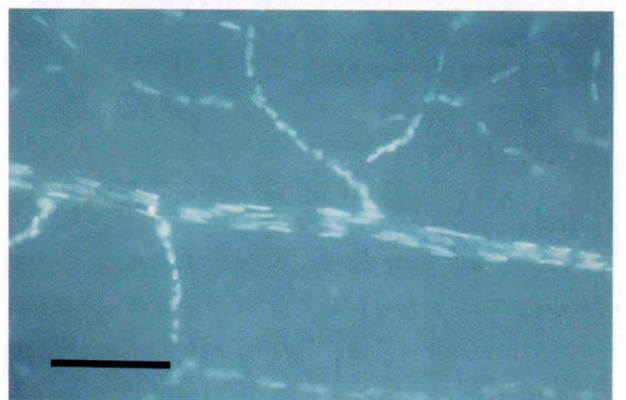


図12 生後12か月のSHRのbis-benzimide標本写真。6か月同様、内皮以外の核染色はみられない。収縮期血圧230 mmHg。バーは100 μm

(図6)。

高血圧持続期間が3~4か月のラットでは、核の伸張と内皮細胞以外の核の染色がより明らかであった。すなわち、3か月例では核の伸張が顕著で核の短径・長径比

は約1:4~1:5と減少していた。また、核の視神経乳頭に近い細動脈基幹部では特に拡張部において、対照群ではみられなかった、輪状の配列から明らかに平滑筋細胞とわかる細胞の核染色と、さらに周囲の組織の核ま

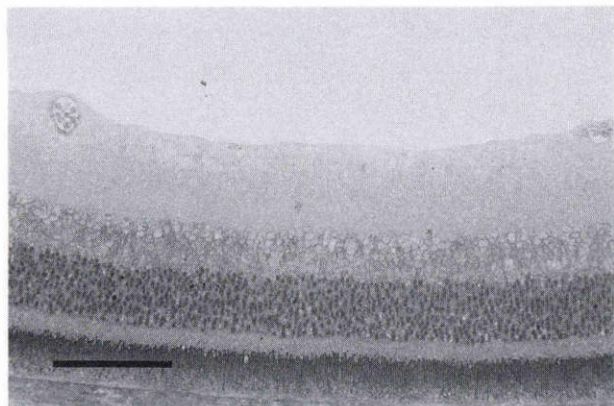


図13 生後6か月のWKYのトルイジンブルー染色による光学顕微鏡(光顕)写真。
収縮期血圧130 mmHg. パーは100 μ m

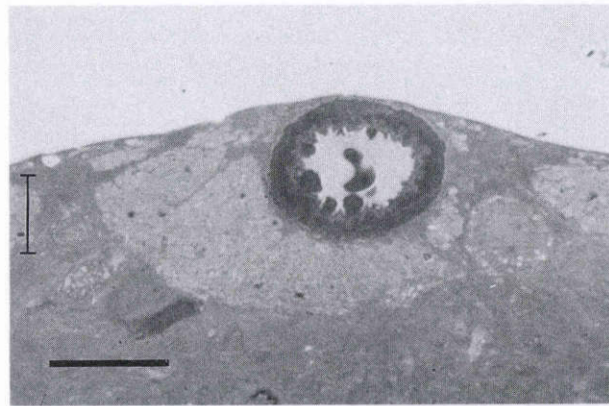


図14 5か月例のRHRの光顕写真。
網膜細動脈の血管腔の狭小化を認める。収縮期血圧220 mmHg. パーは10 μ m

でが染色されていた(図7)。4か月例では、細動脈側枝分岐部の円形の核の濃染がいつそう顕著であった。また、主幹細動脈ではやはり平滑筋細胞が多数染色されていた(図8)。

高血圧持続期間が4.5か月のラットでは、平滑筋細胞のみならず網膜毛細血管周囲組織、すなわち内外顆粒層の核までが標本全体にわたって染色されていた(図9)。

細動脈狭細が軽快傾向にあった高血圧持続期間5か月のラットでは、内皮細胞の核の伸展はやはり顕著であった。一方、同ラットの末梢細動脈では薄いものの、平滑筋細胞の核が染色され、周囲組織内の細胞の核染色も所々にみられた(図10)。

3) SHRにおける所見

月齢6か月、12か月ともに細動脈の核の伸展と配列の乱れが認められた。また、平滑筋細胞がわずかに染色されている部分もみられたが、血管周囲の細胞の核の染色は認められなかった(図11, 12)。

4. 光学顕微鏡による観察

1) 対照群における所見

観察に支障を来すような人工的な組織学的傷害は認められず、また病的所見も認められなかった(図13)。

2) RHRにおける所見

細動脈の血管内腔に向かい内弾性板が屈曲し、血管腔の狭小化がみられた(図14)。一方、網膜神経線維層には高血圧の血管透過性亢進に由来する細胞間浮腫と思われる空隙、毛細血管の拡張が認められた(図15)。

5. 透過型電子顕微鏡による観察

1) 対照群における所見

観察に支障を来すような人工的な組織傷害は認められなかった(図16)。

2) RHRにおける所見

高血圧持続4か月例では、細動脈平滑筋の収縮による内皮細胞の管腔への膨隆、内弾性板の屈曲がみられた。このため、細動脈の管腔は狭小化していた。また、平滑

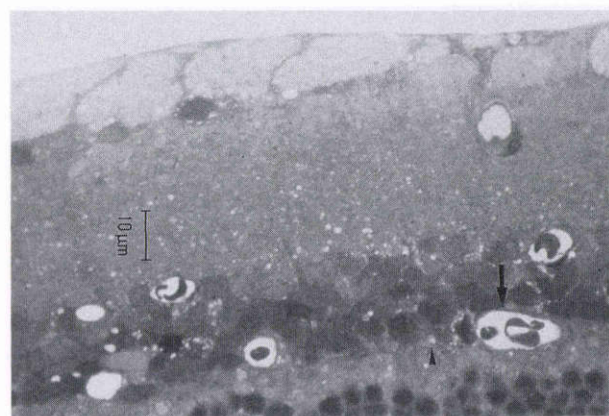


図15 図14のRHRの網膜神経線維層。
毛細血管の拡張(矢印)と空隙(矢じり)を認める。

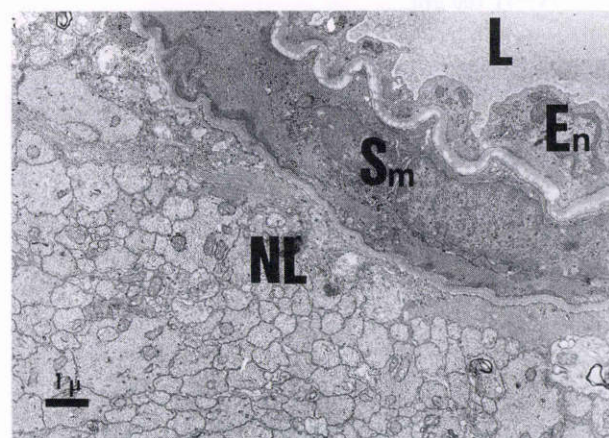


図16 生後6か月のWKYの透過型電子顕微鏡写真。
収縮期血圧130 mmHg. L:管腔, En:内皮細胞,
Sm:平滑筋細胞, NL:神経線維層。

筋の細胞外周が不規則となり、一部には退行変性期の変化である細胞質の分断がみられた(図17)。高血圧持続5か月例では、毛細血管における基板の著明な肥厚、透過性亢進を示す pinocytotic vesicle の増加や血管周囲

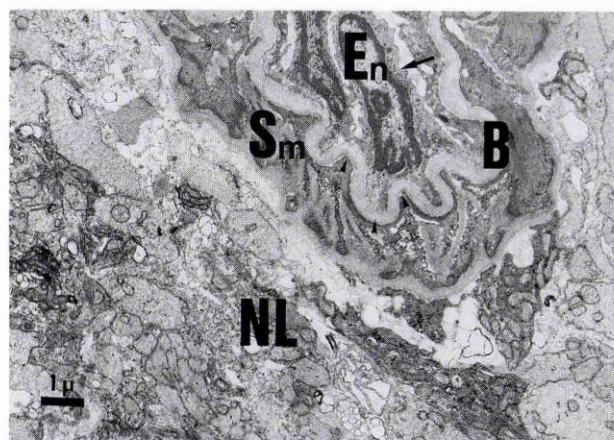


図17 4か月例 RHR の電子顕微鏡 (電顕) 写真。細動脈内皮細胞の膨隆 (矢印), 内弾性板の屈曲 (矢頭), 平滑筋細胞質の分断 (星印) を認める。収縮期血圧 230 mmHg. B: 基底板, En: 内皮細胞, Sm: 平滑筋細胞, NL: 神経線維層。

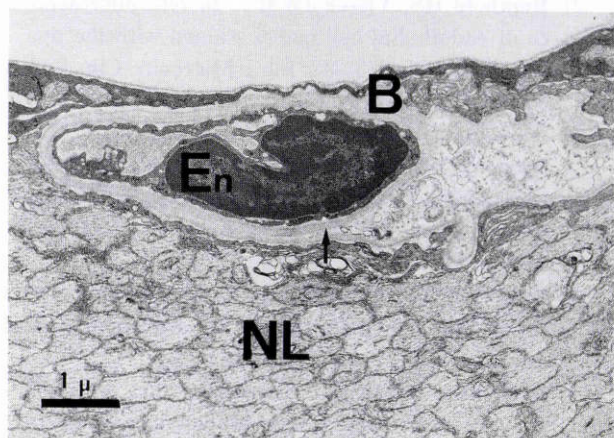


図18 5か月例 RHR の電顕写真。毛細血管の基底板の著明な肥厚 (矢印) を認める。収縮期血圧 220 mmHg. B: 基底板, En: 内皮細胞, NL: 神経線維層。

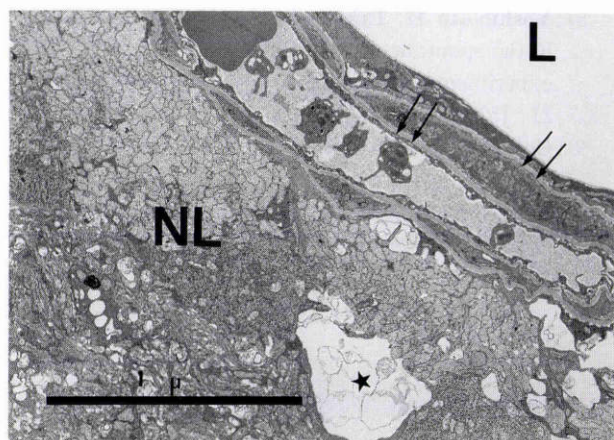


図19 図18の RHR の網膜細静脈。pinocytotic vesicle の増加 (矢印), 血管周囲の空隙形成 (星印) を認める。L: 血管腔, NL: 神経線維層。

の空隙形成, および血管腔内の血小板凝集などが認められた (図18, 19)。

IV 考 按

1. 本法の特徴に関して

Bis-benzimide H 33342 は benzimidazole 系の化合物で, DNA の adenine-thymidine 部に特異的に結合し, 細胞毒性が低く生細胞の活性を阻害することが少ないため, フローサイトメトリーに用いられている黄色の蛍光色素である⁵⁾。In vivo では既にラットの横紋筋肉腫の観察に使用され, 血管構築の観察に有用であったとの報告²⁾がある。

本法の最大の利点は前述の通り, 同一組織を実体顕微鏡レベルで観察した後にも, 光学顕微鏡, 電子顕微鏡観察が十分可能なことである。同様の理由から用いられているゼラチン加フルオレスセイン静注・網膜伸展標本では, 蛍光眼底撮影に対応する蛍光血管樹所見と通常の光学顕微鏡, 電子顕微鏡観察所見とを対比させることが可能であり, 顕微鏡レベルでの三次元的な血管構築や, 口径不同などの血管内腔の形態変化を観察することができる。しかし, 血管壁の細胞の質的な情報を得ることはできないとされていた¹⁾。本法ではそれとは対照的に血管内腔の変化も観察可能で, また bis-benzimide により染色された核の形態変化から細胞の形態を推測できる。しかも, 色素が分子量約 450 と小さく血漿蛋白と結合しないため, 非常に低分子のトレーサーとしても働き, 内皮細胞以外の核の染色により柵機能の傷害も知ることができると考えられる。正常な内皮機能を有する対照群において, 内皮細胞の核以外の染色がみられなかったことから明らかであろう。

以上の推測に基づいて行われた本実験では, まず完全な柵機能を有している WKY 網膜血管においては, 管腔内にある血球の核を除いて染色されたのは, すべて内皮細胞の核であったことは前述のごとくである。

その一方で, すでに血管透過性の亢進, すなわち柵機能の低下が知られている⁶⁾高血圧ラットでは, 中膜平滑筋細胞や血管周囲の神経要素の核までが染色されていた。以上の事実は, 本色素が低分子のトレーサーとしても十分有用であることを示す証拠といえる。

なお, 動脈側枝分岐部において染色された円形あるいは楕円形の核は, 村田ら⁷⁾が報告した動脈側枝分岐部の弁状隆起の細胞 (弁基底細胞) に相当すると考えられ, 正常ラットにおいても脆弱な壁の側枝血管に高圧の血流を送り込むための生体防御機構である弁基底細胞には時に核染色が起こることを示すものであろう。

2. Bis-benzimide 標本と従来の病理組織学的観察との対比に関して

ラット網膜の高血圧性変化としては, 最初に網膜細動脈のびまん性の狭細が起こり, 次いで細動脈の口径不同,

やや遅れて細動脈の蛇行、さらには念珠様変化、網膜の浮腫、網膜出血などが起こるとされている⁸⁾。今回観察したRHRでは網膜出血に至ったものはみられなかったが、他は同様の所見が得られた。これらの変化を報告されている病理組織学的所見と bis-benzimide 標本とで対比してみると非常に良く対応している。

まず、細動脈の狭細は病理組織学的にみると、肥大期 (hypertrophic stage)⁸⁾の特徴である中膜平滑筋細胞の強い収縮の結果、内皮細胞は互いに圧迫されて管腔へ膨隆し、同時に核も伸展される。このことは血圧上昇後1.5か月以上の全RHRの bis-benzimide 標本上で、内皮細胞が正常よりも細長い核として染色されていたことと一致する。

次に細動脈の口径不同はRHRの半数に見られたが、これは退行変性期 (regressive stage)⁸⁾に一致し、中膜平滑筋細胞の分断が起こり始めた時期に相当すると考えられる。Bis-benzimide 標本で確認された新しい所見は、口径不同が確認されるだけでなく、狭細部分の内皮細胞の核の密度が減少し配列が不規則になっていたことである。これが細胞の消失を意味するのかは、なお明らかではない。

しかし、少なくとも図2のラットのように口径不同が強く念珠様の変化を起し、bis-benzimide 標本では内皮細胞が著明に減少し核が全く染色されないようなラットでは、急激すぎる血圧の上昇に伴って細動脈の硬化性病変が急速に壊死期 (necrotic stage)⁸⁾にまで進行したことを示唆していると考えられた。

高血圧ラットにおいて網膜血管の透過性亢進をトレーサーを用いて証明した報告は少ないが、それによると、壊死期にのみトレーサーの漏出が報告されている⁷⁾。今回、電子顕微鏡的観察で退行変性期と考えられた4か月例のRHR(図8, 15に示す)においても透過性亢進が証明されたのは、bis-benzimide がこれまで研究で使用されたペルオキシダーゼやフェリチンなどのトレーサー物質に比べ分子量が小さいため、この物質が pinocytotic vesicle からの通過や tight junction のより微小な傷害部を容易に通過できたことが原因であると考えられた。

高血圧持続期間が最も長かった5か月例では検眼鏡的には強い細動脈の狭細が認められたが、bis-benzimide 標本では細動脈の内皮細胞の核の伸展のみがみられ、透過性亢進を示す所見は得られなかった。しかし、高血圧持続期間が3~4か月たつと全例透過性亢進を示したこ

とを考えると、5か月例においても細動脈狭細が強くみられた4か月前後では同様の所見が得られたと推察される。その後、狭細は徐々にわずかながら軽快しており、これとともに傷害されていた tight junction の修復が起こったとの推測も可能であろう。その原因は不明であるが、本実験の腎性高血圧が腎動脈を永続的に狭窄せしめる、いわゆる Goldblatt 型⁹⁾ではない腎梗塞型のため、高血圧の寛解が起きたことの可能性も否定できない。

本論文の要旨は第97回日本眼科学会総会において報告した。稿を終えるにあたり御指導、御校閲下さいました松山秀一教授ならびに吉本弘志助教授に深謝いたします。また、実験にあたり御援助下さいました菊池美和子、川村英治両氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 三上 規, 松橋英昭, 一戸 敏, 吉本弘志: ゼラチン加フルオレスセイン静注・固定網膜進展標本によるラットおよび家兎網膜血管の観察. 日眼 91: 353—359, 1987.
- 2) Reinhold HS, Visser JWM: *In vivo* fluorescence of endothelial cell nuclei stained with the dye Bis-benzamide H33342. Int J Microcirc Clin Exp 2: 143—146, 1983.
- 3) Nakayama A, Kimura S, Yoshimoto H, Matsuyama S: Fluorescence-microscopic observation of retinal vasculature in experimental renal hypertension. Microcirculation Annual 8: 163—164, 1992.
- 4) Grollman A: Simplified procedure for inducing chronic renal hypertension in the mammal. Proc Soc Exp Biol Med 57: 102, 1944.
- 5) Latt SA, Stetten G: Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. J Histochem Cytochem 24: 24—33, 1976.
- 6) Yoshimoto H, Murata M: Permeability of retinal blood vessels of spontaneously hypertensive rats. Jpn J Ophthalmol 21: 143—156, 1977.
- 7) 村田幹夫, 幸地賢治, 吉本弘志: 動脈側枝分子部の弁状構造. 脈管学 22: 91—101, 1982.
- 8) Yoshimoto H, Takahashi S: Retinal arterioles in the spontaneously hypertensive rats and other experimental hypertensive rats. Jpn J Ophthalmol 21: 157—175, 1977.
- 9) Goldblatt H, Lynch J, Hanzel RF, Summerville WW: Studies on experimental hypertension I. The production of persistent elevation of systolic pressure by means of renal ischemia. J Exp Med 59: 347, 1934.