

ラットにおける実験的脈絡膜新生血管の長期経過

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

ラット眼の後極部網膜に、クリプトンレーザーを用いて脈絡膜新生血管を発生させて、その長期経過を観察した。光凝固後52週には、脈絡膜新生血管は網膜色素上皮によって完全に囲い込まれていた。しかし、脈絡膜新生血管の血管内皮細胞の胞体は薄く、fenestrationが多数みられ、脈絡膜毛細血管と類似した形態をもつ、成熟した漏出型毛細血管の形態学的特徴を維持していた。新生血管の管腔は、網膜色素上皮細胞が産生したと思われる多量の膠原線維に圧迫されて狭くなる傾向がみられた。

ラット眼における実験的脈絡膜新生血管は、サル眼とは異なった経過をとり、発生後、長期にわたって漏出型毛細血管の形態学的特徴を維持することが明らかになった。(日眼会誌 99:784-791, 1995)

キーワード：脈絡膜新生血管, クリプトンレーザー, 網膜色素上皮, 漏出型毛細血管, 老人性円板状黄斑変性

A Long-term Course of Experimentally Produced Choroidal Neovascularization in the Rat

Takao Tobe, Kanji Takahashi, Hiroshi Ohkuma
and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

We studied morphologically a long-term course of experimental choroidal neovascularization (ChNV) induced by krypton laser photocoagulation in the rat retina. Fifty-two weeks after photocoagulation, ChNV was enveloped completely by the retinal pigment epithelium. Vascular endothelial cells of ChNV were thin, with many fenestrations and wide lumen. The ChNV maintained the morphological characteristics of mature leaky capillaries similar to choriocapillaris. The lumen of the neovascularizations tended to be compressed by massive collagen

fibers produced by the retinal pigmented epithelium. We found that experimental ChNV in the rat retina retains the characteristics of leaky capillaries for a long time unlike that in the monkey ChNV. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:784-791, 1995)

Key words: Choroidal neovascularization, Krypton laser photocoagulation, Retinal pigment epithelium, Leaky capillary, Age-related macular degeneration

I 緒 言

近年、老人性円板状黄斑変性が急増し、高齢者の失明原因として注目されている。著者らは、その原因となる脈絡膜新生血管の発生や治療について実験的、臨床的研究を進めてきた¹⁾。

著者らは、従来、Ryan²⁾の原法に準じて、サル眼に実験

的脈絡膜新生血管を作成し、その進展と退縮を形態学的に観察してきた^{3)~6)}。

しかし、動物保護上の立場から、サルは動物数の確保が必要であり、また、取り扱いも煩雑で、実験的脈絡膜新生血管の発生率が低いなどの欠点があった³⁾。そこで著者らは、取り扱いが容易で、ヒトに似た有血管網膜を持つ有色ラットの眼底網膜に半導体レーザー⁷⁾、あるい

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 戸部 隆雄
(平成6年12月20日受付, 平成7年2月8日改訂受理)

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

(Received December 20, 1994 and accepted in revised form February 8, 1995)

はクリプトンレーザー⁸⁾を用いて強度凝固を行い、高率に脈絡膜新生血管を発生させることができた。

サル眼における実験的脈絡膜新生血管の長期経過は既に報告^{9)~11)}されているが、ラット眼に発生した脈絡膜新生血管の長期経過は未だ明らかではない。そこで今回、著者らは、ラット網膜にクリプトンレーザーを用いて作成した実験的脈絡膜新生血管の長期経過を形態学的に観察したので報告する。

II 方 法

実験的脈絡膜新生血管は、既報⁸⁾のごとく作成した。実験動物として、体重200~300gの有色ラット(Brown-Norway系)31匹60眼を使用し、塩酸ケタミン(ケタラル[®])の筋注による全身麻酔下に、眼底後極部に強度の光凝固を行った。

光凝固はミドリリンP[®]による散瞳後に、Coherent Radiation社製System 900 K赤色クリプトンレーザー光凝固装置(波長647nm)を使用した。凝固条件は、照射野100 μ m、出血100mW、凝固時間0.1秒とした。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眼底後極部へ、太い網膜血管を避けて散在性に8~10個の光凝固を行った。光凝固は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。光凝固により、網膜深層に気泡を生じ、凝固数秒後に網膜浮腫、混濁が広がった。網膜下出血はみられなかった。光凝固の焦点合わせが不十分であると、通常的光凝固斑と同じく、網膜深層に気泡を生じず、凝固斑は拡大しなかった。

光凝固後から4週、12週、24週、52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て蛍光眼底造影を行った後、眼球を摘出した。

眼球摘出後、4%グルタルアルデヒド固定液(0.1Mリン酸緩衝液)で前固定を24時間行った。0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で24時間洗浄した後、前眼部を除去し、網膜を細切した。細切した切片を1%四酸化オスミウム(0.1Mリン酸緩衝液)で1時間、後固定した後、型のごとくエタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。

試料はマイクロームで1 μ mの切片を作成し、トルイジンブルー染色を行い、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で二重染色した後、透過型電子顕微鏡(日立H-500型)で観察した。

III 結 果

1. 臨床経過

全経過を通じて、光凝固部に発生した脈絡膜新生血管は、白色調の網膜下結合織として観察された。経過とともに白色の色調は次第に強くなった。全経過を通じて、

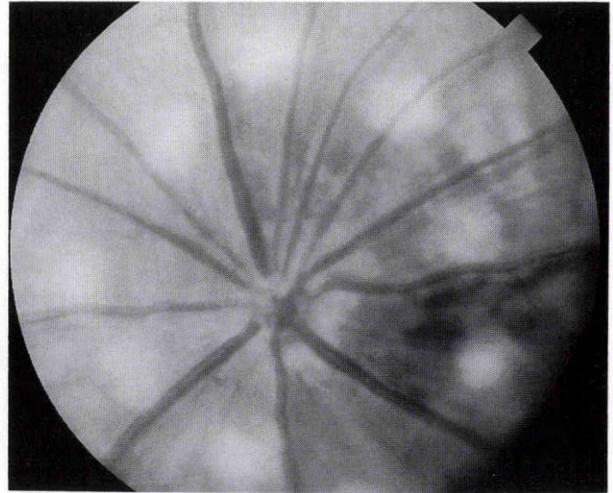


図1 光凝固後52週の眼底写真。

脈絡膜新生血管は、白色調の硬い感じの網膜下結合織としてみられる。その周囲に漿液性網膜剥離をみない。

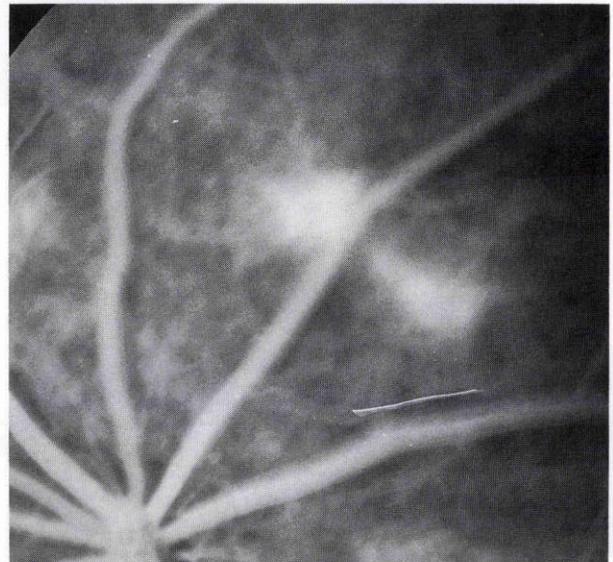


図2 光凝固後52週の蛍光眼底造影。

脈絡膜新生血管は強い過蛍光を示すが、血管外漏出はほとんどない。

その周囲に漿液性網膜剥離をみなかった(図1)。

蛍光眼底造影では、新生血管は組織染と思われる強い過蛍光を示したが、血管外漏出はほとんどみられなかった(図2)。

2. 組織所見

1) 光凝固後4週

光学顕微鏡(光頭)でみると、網膜下腔には網膜色素上皮の間に広い管腔を持った新生血管がみられた。細胞間は無定型物質で埋められていた。新生血管網全体を増殖して単層となった厚い網膜色素上皮が完全に覆っていた(図3)。

電子顕微鏡(電頭)でみると、網膜下腔にある新生血管の内皮細胞の胞体は薄く、管腔は広く、fenestrationの数

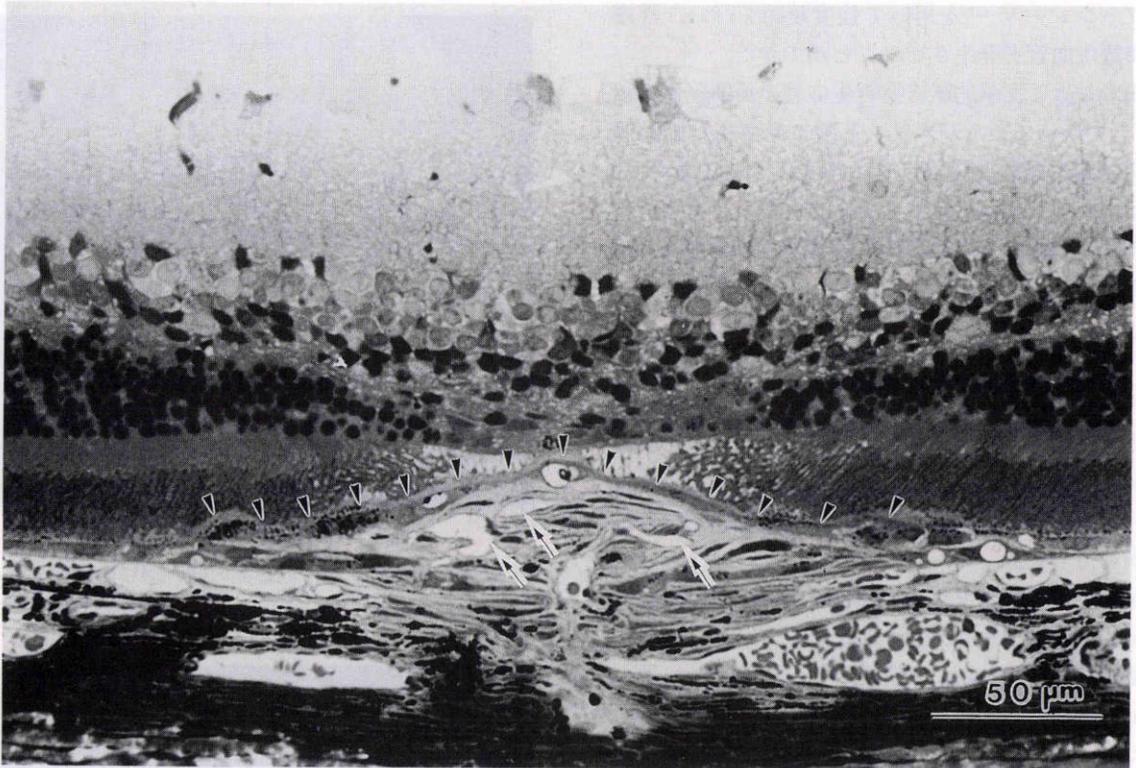


図3 光凝固後4週の光学顕微鏡(光頭)写真(トルイジンブルー染色)

網膜下腔に広い管腔を持つ新生血管(矢印)がみられる。新生血管網全体を単層の厚い網膜色素上皮が完全に囲い込んでいる(矢じり)。

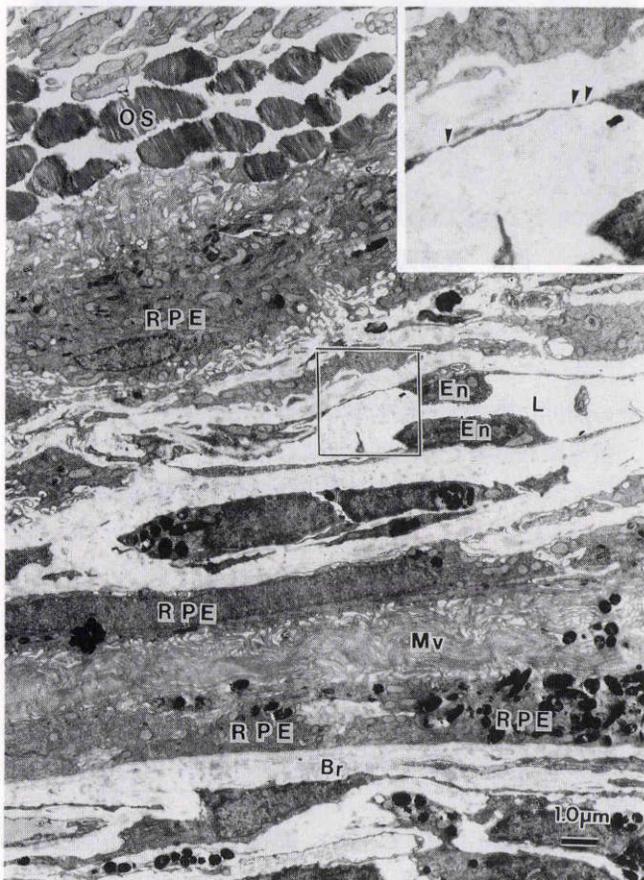


図4 光凝固後4週の電子顕微鏡(電頭)写真。

網膜下腔に胞体の薄い血管内皮細胞(En)によって広い管腔(L)を形成した新生血管がみられる。多数のfenestration(矢じり)をもっている。周囲にみられる網膜色素上皮細胞(RPE)の極性は明らかで、新生血管は常に網膜色素上皮細胞の基底膜側に存在する。OS: 視細胞外節, Mv: 微絨毛, Br: ブルッフ膜

も多かった。新生血管を囲い込んだ網膜色素上皮細胞の極性は明らかで、新生血管は常に網膜色素上皮細胞の基底側に存在した(図4)。新生血管周囲の細胞外基質には、基底膜様物質と少量の膠原線維がみられた。

2) 光凝固後12週

光顕的には、網膜下腔には増殖して単層の膜を作った網膜色素上皮で完全に覆われた新生血管網がみられたが、網膜色素上皮の間にみられた新生血管は管腔が狭くなっていた。新生血管と網膜色素上皮間の細胞間基質が増加し、新生血管を圧迫していた(図5)。

電顕的には、新生血管の内皮細胞の胞体は薄く、管腔は広く、fenestrationの数も多くみられた。網膜色素上皮細胞の数には余り変化はなかったが、細胞間基質中の基底膜様物質および膠原線維は増加していた(図6)。

3) 光凝固後24週

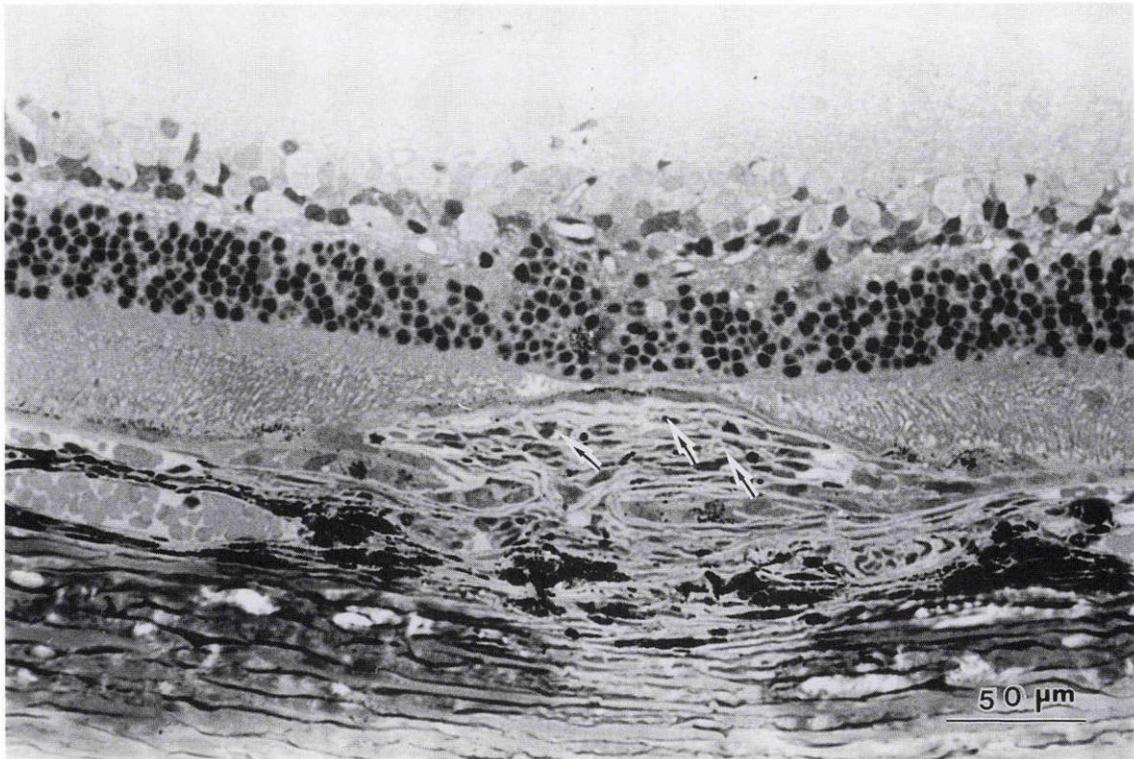


図5 光凝固後12週の顕微鏡写真(トルイジンブルー染色)。

網膜下腔に単層の網膜色素上皮で完全に覆われた新生血管(矢印)がみられるが、周囲の無定型物質により圧迫されて内腔が狭くなっている。

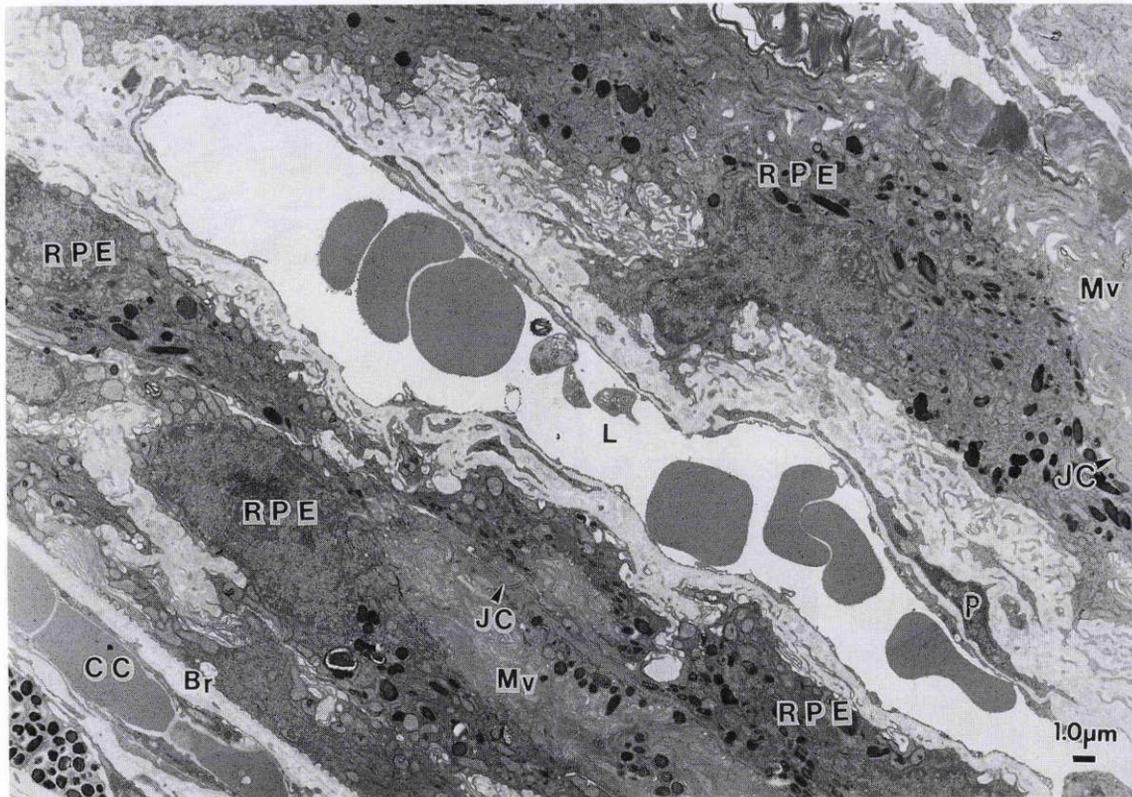


図6 光凝固後12週の電顕写真。

網膜下腔には増殖した網膜色素上皮細胞(RPE)の間に管腔(L)の広い、多数のfenestrationをもった新生血管がみられる。細胞間基質中に基底膜様物質が多量にみられる。Mv:微絨毛, Br:ブルッフ膜, CC:脈絡膜毛細血管, JC:細胞間結合装置, P:周皮細胞

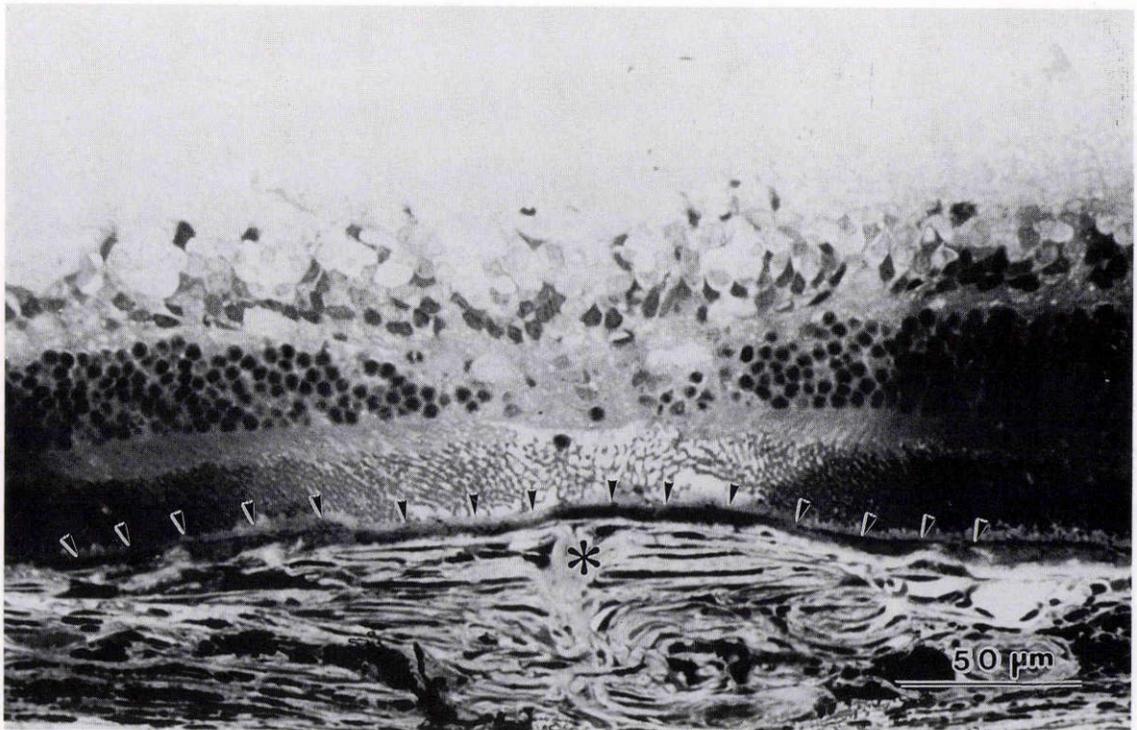


図7 光凝固後24週の顕微鏡写真(トルイジンブルー染色)。

厚い単層の網膜色素上皮(矢じり)に囲い込まれた新生血管網(*印)がみられるが、新生血管の管腔ははっきりしない。さらに無定型物質が増加している。

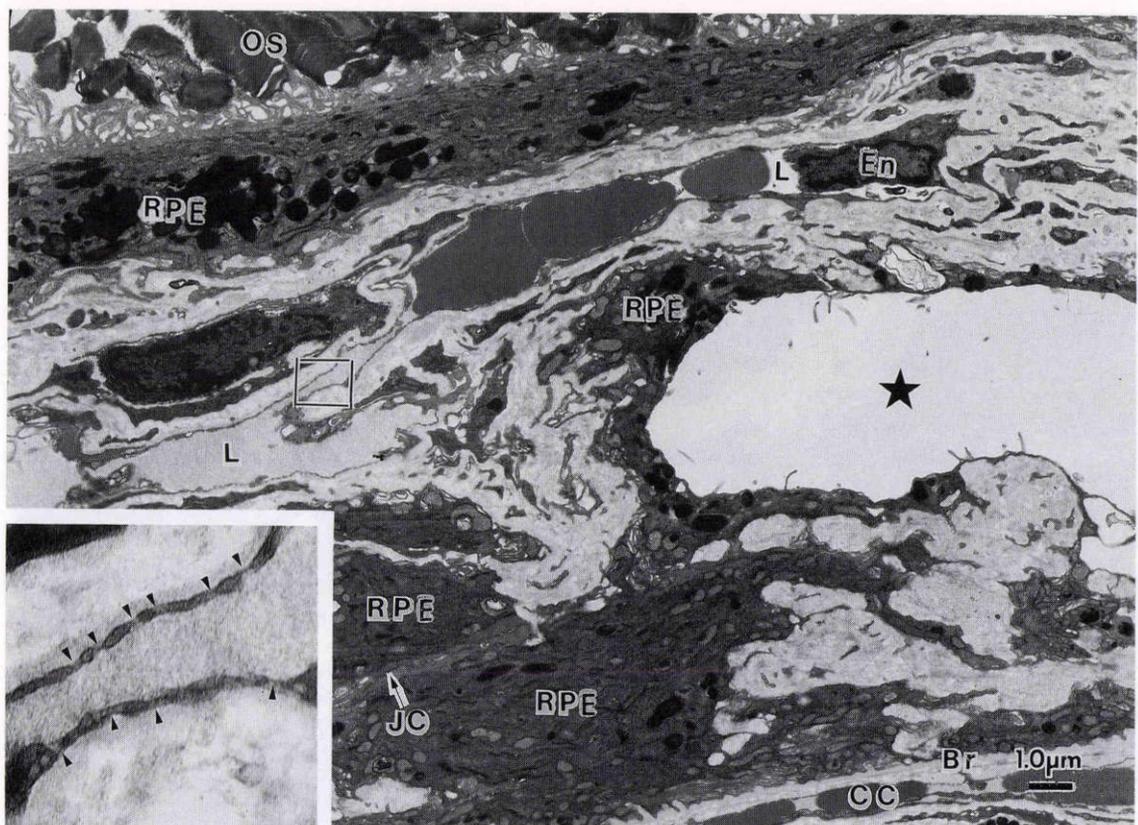


図8 光凝固後24週の電顕写真。

新生血管の管腔(L)は広いが、周囲の膠原線維が増加し、圧迫されている。血管内皮細胞(En)の胞体は薄く、fenestration(矢じり)が多数みられる。網膜色素上皮細胞による管腔形成(星印)がみられる。OS: 視細胞外節, RPE: 網膜色素上皮細胞, JC: 細胞間結合装置, Br: ブルッフ膜, CC: 脈絡膜毛細血管

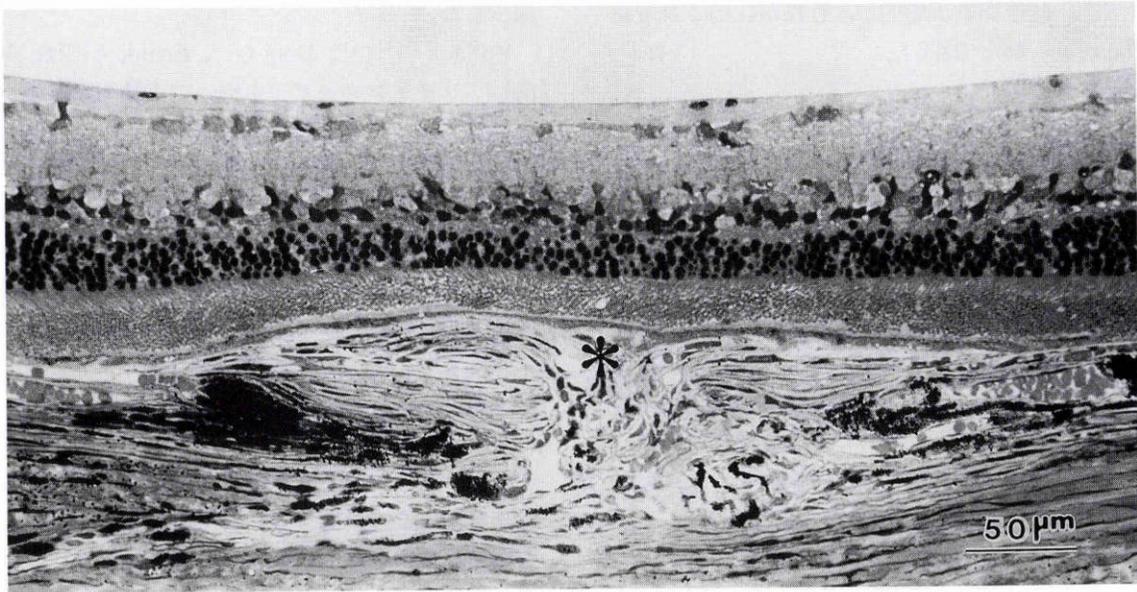


図9 光凝固後52週の光顕写真(トルイジンブルー染色)。

厚い単層の網膜色素上皮により、完全に感覚網膜と隔絶された新生血管網(*印)がみられる。新生血管の周囲にはさらに無定型物質が増加している。

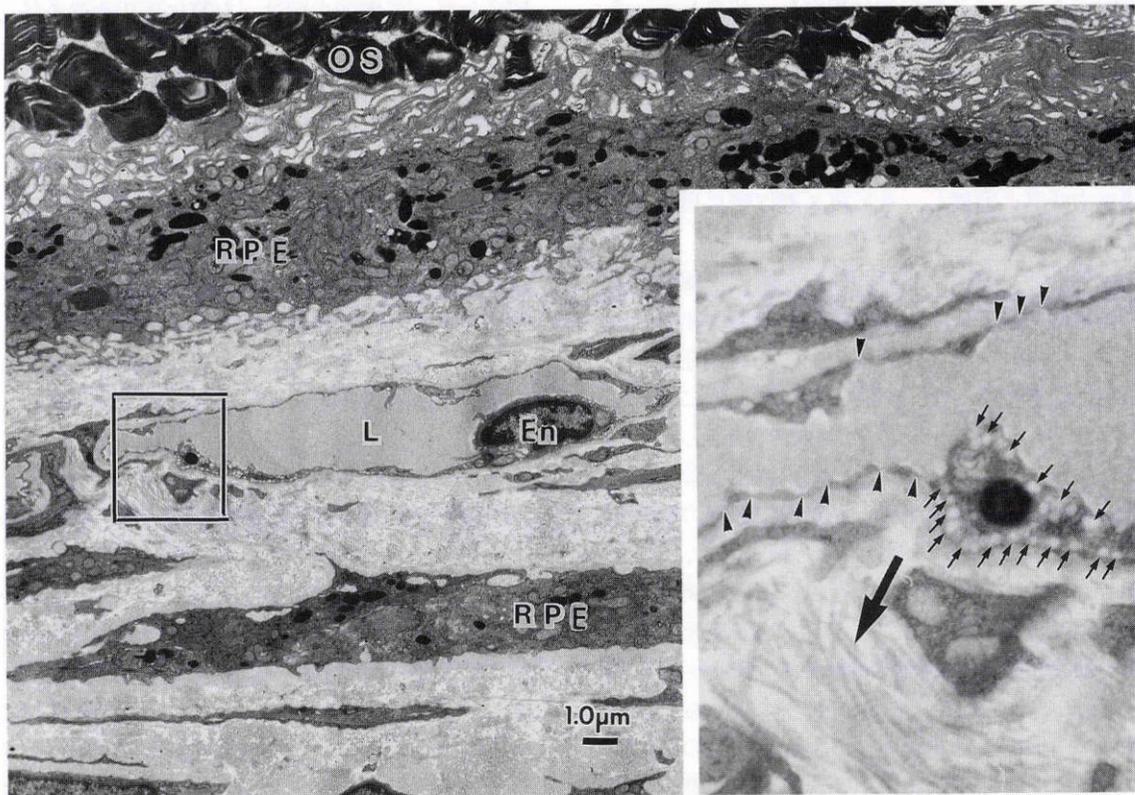


図10 光凝固後52週の電顕写真。

胞体が薄い血管内皮細胞(En)によって管腔(L)を形成している新生血管がみられる。血管内皮細胞にはfenestration(矢じり)が多数みられ、胞体には多数の微小胞飲水胞(小さな矢印)がみられる。新生血管の周囲には、多量の膠原線維(大きな矢印)がみられる。OS:視細胞外節,RPE:網膜色素上皮細胞

光顕的には、網膜下腔に新生血管網を覆う単層の網膜色素上皮の膜がみられ、その内部に新生血管は残っていた。しかし、その周囲の緻密な細胞間基質が増加し、そ

れによって新生血管は圧迫され、管腔は一層狭くなっていた(図7)。

電顕的には、新生血管のfenestrationは多数みられた

が、血管周囲の膠原線維が増加し、管腔が圧迫されて狭くなる傾向がみられた(図8)。

4) 光凝固後52週

光顕的には、網膜下腔には単層の増殖した網膜色素上皮の膜に覆われた新生血管網が明瞭にみられた。細胞間基質はさらに緻密となり、それにより新生血管の管腔は圧迫されていた(図9)。

電顕的には、新生血管の血管内皮細胞の胞体は薄く、fenestrationの数は多かった。血管内皮細胞の胞体には多数の微小胞飲小胞(micropinocytotic vesicle)がみられた。新生血管の周囲に、約50nmの周期性縞状構造を示す膠原線維の増加がさらに著明であった。膠原線維の増加により新生血管は圧迫されて、管腔が狭くなっている部位が多くみられた(図10)。

IV 考 按

著者らは、有色ラットの後極部網膜に半導体レーザー⁷⁾、あるいはクリプトンレーザー⁸⁾で強度凝固を行って、実験的脈絡膜新生血管を約80%の高率に作成できることを報告した。前報⁷⁾⁸⁾では、脈絡膜新生血管の発生過程を光凝固後2週まで形態学的に観察し、報告した。今回は、その後の脈絡膜新生血管の長期経過を光凝固後1年まで観察した。

従来、著者らが実験に用いてきたサル眼では、実験的脈絡膜新生血管は光凝固後1~2週で発生し、光凝固後3~5週まで旺盛に進展し、その後8週以降に自然に退縮した¹⁾。

Ohkuma⁹⁾は、サル眼で、光凝固後158週の退縮期において、蛍光眼底造影で蛍光漏出が停止しても、粗で、細くて、萎縮したループ状の脈絡膜新生血管が存在することを血管鋳型標本で示した。板垣ら⁴⁾は、サル眼における退縮期の実験的脈絡膜新生血管を形態的に観察し、光凝固後3か月の蛍光漏出が止まった脈絡膜新生血管では、新生血管の管腔が非常に扁平で、血管内皮細胞の胞体が薄く、fenestrationの減少がみられたと報告した。大熊¹⁰⁾は、同様にサル眼で、光凝固後42週の退縮期の実験的脈絡膜新生血管を電顕的に観察し、新生血管の管腔がスリット状に細く、血管内皮細胞にfenestrationがないことを明らかにした。また、Ohkuma¹¹⁾は、horseradish peroxidaseを用いて、サル眼の脈絡膜新生血管の透過性を検討し、新生血管発生確認後102週の新生血管の血管内皮細胞にfenestrationがなく、血管内皮細胞に微小胞飲小胞がみられたと報告した。一方、Millerら¹²⁾は、サル眼で、光凝固後45週、蛍光漏出がない退縮期における脈絡膜新生血管に多数のfenestrationが存在していることを示した。しかし、さらに長期に経過した新生血管では、fenestrationの減少が起こる可能性を示唆している。このようにサル眼における脈絡膜新生血管は、退縮期には管腔が狭くなり、血管内皮細胞のfenestrationが

減少した。

Pollackら^{13)~17)}、Dobiら¹⁸⁾、Frankら¹⁹⁾は、有色ラットにクリプトンレーザーを用いて実験的脈絡膜新生血管を作成できることを報告している。しかし、Dobiらは光凝固後28日、Frankらは光凝固後3か月までしか経過を観察しておらず、その後に新生血管がサルの場合と同様に退縮するのかどうか不明であると述べており¹⁹⁾、ラット眼における実験的脈絡膜新生血管の長期経過は、今まで明らかにされていなかった。

今回著者らは、光凝固後52週においても、ラットの脈絡膜新生血管は退縮しないで存在していることを明らかにした。電顕的に、光凝固後52週にも新生血管の血管内皮細胞の胞体は薄く、多数のfenestrationがみられ、漏出型毛細血管の形態を示していた。しかし、新生血管の周囲には網膜色素上皮細胞が産生したと思われる膠原線維が大量にみられ、これによって新生血管が次第に圧迫されて、管腔が狭くなる傾向がみられた。ラット眼の脈絡膜新生血管は、その周囲に発生の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、蛍光漏出が起こりにくかったが⁷⁾、膠原線維は発生後長期にわたって増加を続け、次第に新生血管を圧迫していた。高橋ら²⁰⁾は、サル眼の脈絡膜新生血管に対して光凝固治療を行い、光凝固で治癒しなかった新生血管の周囲には経時的に膠原線維が増加すると報告し、線維芽細胞様に化生した網膜色素上皮細胞が産生した膠原線維は、新生血管の発育を抑制するように働く可能性を示唆している。ラット眼では、新生血管周囲に産生された膠原線維は非常に多量で、新生血管を物理的に圧迫し、その発育を抑制するように働いていると思われた。

また、著者ら⁷⁾⁸⁾は既に、単層に増殖した網膜色素上皮細胞が光凝固後2週から新生血管網全体を囲い込むことを明らかにしたが、光凝固後1か月以降には、その囲い込みはより強固となった。光凝固後1か月以降には、網膜色素上皮細胞が外側血液網膜層を再形成し、脈絡膜新生血管はブルッフ膜を越えて網膜下腔に発育していたが、形態学的に網膜色素上皮層によって完全に感覚網膜とは隔絶されていた。また、新生血管の感覚網膜側の胞体にはfenestrationが多く存在し、脈絡膜毛細血管の形態と似ていた。Millerら¹²⁾は、サル眼の脈絡膜新生血管が成熟すると、脈絡膜毛細血管の形態学的特徴を保つと報告しているが、ラット眼における脈絡膜新生血管も発生後長期にわたって脈絡膜新生血管の形態学的特徴を保ち続けていた。

光凝固後4週以降の新生血管には、その胞体に多数のfenestrationが存在したのに、蛍光眼底造影で蛍光漏出が全経過を通してみられなかったのは、単層の網膜色素上皮細胞が増殖して新生血管網全体を完全に囲い込んだため、網膜下腔に蛍光色素が漏出しなかったと思われた。

以上、ラット眼に作成した実験的脈絡膜新生血管は、

サル眼と違った経過をとり、新生血管発生後長期にわたって単層の増殖した網膜色素上皮が囲い込んでいるが、新生血管の管腔は広く、血管内皮細胞の胞体は薄く、fenestrationが多数存在し、漏出型毛細血管の形態学的特徴を保っていた。

本論文の要旨は第97回日本眼科学会総会(1993年6月17日、札幌)で戸部が講演した。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、高橋)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) 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。光凝固による治癒過程の組織学的検索。日眼会誌 94：799—809, 1990.
- 6) 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光凝固。第1報。弱度凝固による新生血管の凝固効果。日眼会誌 96：169—179, 1992.
- 7) 戸部隆雄，高橋寛二，大熊 紘，宇山昌延：ラット網膜における実験的脈絡膜新生血管の発生。日眼会誌 98：837—845, 1994.
- 8) 戸部隆雄，高橋寛二，大熊 紘，宇山昌延：ラットにおけるクリプトンレーザーによる実験的脈絡膜新生血管の発生。眼紀 45：853—856, 1994.
- 9) Ohkuma H, Ryan SJ：Vascular casts of experimental subretinal neovascularization in monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci 24：481—490, 1983.
- 10) 大熊 紘：実験的網膜下新生血管。塚原 勇(編)：The latest medical book「眼科領域における最新の進歩」医学教育出版社，東京，271—287, 1985.
- 11) Ohkuma H, Ryan SJ：Experimental subretinal-neovascularization in the monkey. Permeability of new vessels. Arch Ophthalmol 101：1102—1110, 1983.
- 12) Miller H, Miller B, Ryan SJ：Newly-formed subretinal vessels. Fine structure and fluorescein leakage. Invest Ophthalmol Vis Sci 27：204—213, 1986.
- 13) Pollack A, Heriot WJ, Henkind P：Cellular process causing defects in Bruch's membrane following krypton laser photocoagulation. Ophthalmology 93：1113—1119, 1986.
- 14) Pollack A, Korte GE, Weitzer AL, Henkind P：Ultrastructure of Bruch's membrane after krypton laser photocoagulation I. Breakdown of Bruch's membrane. Arch Ophthalmol 104：1372—1376, 1986.
- 15) Pollack A, Korte GE, Heriot WJ, Henkind P：Ultrastructure of Bruch's membrane after krypton laser photocoagulation II. Repair of Bruch's membrane and the role of macrophages. Arch Ophthalmol 104：1377—1382, 1986.
- 16) Pollack A, Korte GE：Repair of retinal pigment epithelium and its relationship with capillary endothelium after krypton laser photocoagulation. Invest Ophthalmol Vis Sci 31：890—898, 1990.
- 17) Pollack A, Korte GE：Choroidal vascular repair：Scanning and transmission electron microscopy. Experientia 48：219—225, 1992.
- 18) Dobi ET, Puliafito CA, Destro M：A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. Arch Ophthalmol 107：264—269, 1989.
- 19) Frank RN, Das A, Weber ML：A model of subretinal neovascularization in the pigmented rat. Curr Eye Res 8：239—247, 1989.
- 20) 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。光凝固の奏効しなかった病巣の組織学的検索。日眼会誌 94：810—819, 1990.