

I 網膜血管の増殖と硝子体可溶性蛋白との関連についての実験的研究

II 幼若家兎網膜血管の組織培養に関する研究

慶應義塾大学医学部眼科

植村恭夫
桂弘子
満尾京子

I 網膜血管の増殖と硝子体可溶性蛋白との関連についての実験的研究

研究目的

幼若動物の硝子体可溶性蛋白濃度は、発達とともに減少するが、実験的酸素誘導網膜症においては、正常に比して、減少が緩徐となり、高濃度を示すことなどより、網膜血管増殖との関連が示唆されている。著者は、ステロイド誘導網膜症における硝子体可溶性蛋白について追求し、酸素誘導網膜症における結果と比較しつつ、網膜血管増殖との関連を明らかにする目的で本研究を施行した。

研究方法

実験材料：幼若ウサギ（日本白色種）生後13～64日の各日齢のものを用いた。

実験方法：正常群、ステロイド投与群、酸素投与群の3群の各々において、硝子体を採取した。

ステロイド投与群は、生後5日目より10日間、Dexamethazone sodium phosphateを1mg/kg大腿部に筋注したものであり、酸素投与群は、生後8日目より4日間、80～90%環境酸素濃度下で飼育したものである。

上記各群の各日齢において、まず、ネンブタールを腹腔内または耳静脈注射し、死亡後ただちに注射針にて硝子体を吸引した。採取した硝子体は、homogenize後、150,000g、20分、4℃で遠心分離を行なった。得られた上清を用いて、Lowry法により、蛋白を比色定量した。なお、standardとしては、牛血清アルブミンを用い、Benzidine法またはOrthotolidine法により、潜血反応陽性を示したものは除外した。

研究結果

正常群における硝子体可溶性蛋白濃度は、日齢とともに、生後29日目まで急速に減少するが、その後緩徐となり、生後48日目以後、ほぼ一定濃度となった。ステロイド投与群でも、日齢とともに減少するが、生後14日目および22日目で、正常群に比して、低濃度を示し、生後29日目以後、正常群とほぼ同濃度となった。酸素投与群でも、日齢とともに減少したが、生後13日目では、正常群に比して、高濃度を示し、生後29日目で、正常群とほぼ同濃度となった。

考察

本実験結果と網膜血管の発育過程とを対応させてみると、正常群では、硝子体可溶性蛋白濃度は、網膜血管発育が旺盛な時期に急速に減少し、発育が緩徐になるにつれて、一定濃度になっていく。ステロイド投与群では、血管新生が始まっている生後14日に、可溶性蛋白濃度は正常群より低濃度を示しており、酸素投与群では、血管閉塞期にあたる時期に可溶性蛋白濃度は正常群より高濃度を示している。この事実より、硝子体可溶性蛋白濃度の日齢とともに減少していく過程が、ステロイドまたは酸素投与により、影響を受けることは明らかにされた。しかし、ステロイドそのものが持つ蛋白合成抑制作用や硝子体血管組織の消褪過程との関連が明らかにされていない現在、硝子体可溶性蛋白と網膜血管増殖とを直接関連づけることは、早計であると考える。

要約

幼若ウサギの硝子体可溶性蛋白濃度を、正常群、

ステロイド投与群、酸素投与群の各群、各日齢において測定し、次の結果を得た。

(1)各群とも、硝子体可溶性蛋白濃度は日齢とともに減少する傾向を示した。

(2)正常群と比較すると、ステロイド投与群では生後2～3週目で低濃度を示し、酸素投与群では生後2週目で高濃度を示した。

(3)以上の成績より、ステロイドまたは酸素が、幼若ウサギの発達に伴う硝子体可溶性蛋白濃度の減少過程に影響を与えることを確認したが、網膜血管増殖との関連性については確認できなかった。

II 幼若家兎網膜血管の組織培養に関する研究

目的

発達途上の網膜血管の特異性を明らかにする目的の1つとして、今回は、組織培養下における幼若家兎の網膜血管の発育過程を、位相差顕微鏡及び、光学顕微鏡で追求した。

方 法

生後7日、8日、10日目の白色家兎(189羽)をネンブタールの胸腔内注射にて屠殺し、直ちに眼球を摘出し、1時間以内に、無菌的に、実体顕微鏡下で、その網膜血管のみを乳頭側より剥離摘出し、直ちに培養シャーレに移す。まずmedium選択として1) Hanks' 2) Hanks' + 5% F.C.S. 3) Hanks' + 15% F.C.S. 4) 199+15% F.C.S. 5) MEM 6) M EM+15% F.C.S. 7) DM-170+15% F.C.S. の各種を用い、37°C炭酸ガス培養器にて、網膜血管の発育状態を比較検討した結果、発育状態が最も良好であったMEM+15%F.C.S., DM-170+15%F.C.S.に培養液を決定した。次いで培養シャーレに、網膜血管を植え込み、その発育過程を、培養10時間目より以後67日間、経時的に、位相差顕微鏡を用い観察した。その各々に、適宜HE-PAS染色、コロイド鉄法、アルーシャンブルー染色、放線菌ヒアルロン酸消化試験、喰作用試験を行い、光学的検索を行った。

結果

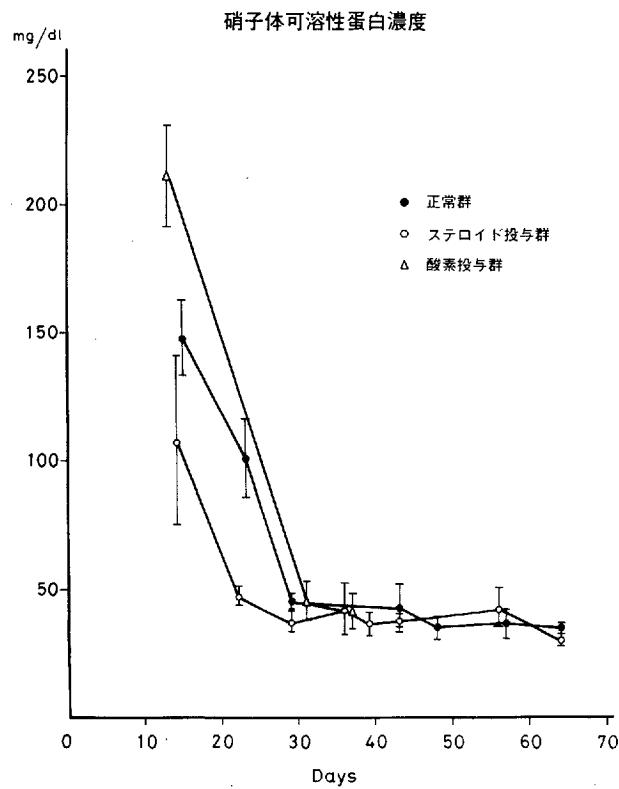
位相差顕微鏡下で、培養した網膜血管は次の2つの状態に分かれた。1つは培養した時と網膜血管及びその周囲組織に全く変化が見られないものと、他方では、網膜血管上、及びその周囲に著明な4種の細胞増殖(第1図表参照) 1. fibroblast like cells 2. round cells 3. irregular cells 4. neural cells が見られた。これ等細胞のうち、round cells irregular cellsのみが、PAS染色、コロイド染色、アルーシャンブルー染色、放線菌ヒアルロン酸消化試験、喰作用試験に陽性を呈した。

考察

幼若家兎網膜血管の組織培養における研究は、1961年来、Ashton等により度々報告され、彼らは、網膜血管培養中に増殖傾向をみせる細胞を(図表2を参照) 1.mesenchymal-like c. 2. endothelial c. 3. macrophages 4. undifferentiated c. とし、1, 2を血管由来、3, 4を、hyalocyteに近い細胞で、PAS陽性顆粒を有すると報告している。今回、著者等は、Ashton等のmacrophage, undifferentiated c. が、図表2のごとく、著者等におけるround cells, irregular c.に相当すると考え、彼等の行ったPAS染色に加え、コロイド鉄法、アルーシャンブルー染色、放線菌ヒアルロン酸消化試験、喰作用試験を行い、Ashton等の報告に加え、これ等細胞に、ヒアルロン酸、その他のムコ多糖類を含んでいる事を確認した。

要約

今回、著者等は、幼若家兎網膜血管の組織培養に関する1研究として、血管周囲に増殖する4種類の細胞につき、位相差顕微鏡及び、光学顕微鏡を用い、PAS染色、コロイド鉄法、アルーシャンブルー染色、放線菌ヒアルロン酸消化試験、喰作用試験を行い、そのうちの2種の細胞に、上記検査すべてに陽性所見を得た。



Proliferation cells in our results

	fibroblast like c.	round c.	irregular c.	neural c.
Strand formation	(+)	(-)	(-)	
Capillary structure	(-)	(-)	(-)	
Vascular colony	(-)	(-)	(-)	
Pinocytosis	(-)	(+)	(+)	
PAS	(-)	(+)	(+)	
Colloid iron	(-)	(+)	(+)	
Alcian blue	(-)	(+)	(+)	
Hyaluronidase digestion	(-)	(+)(-)	(+) (-)	

(図表 1)

増殖細胞に関する本研究結果と Ashton との比較

[Mitsuo & Uemura]

[Ashton et al.]

fibroblast-like c. ===== mesenchymal-like c.

endothelial c.

round c.

===== macrophages

irregular forms c.

un. differentiated c.

neural c.

検索用テキスト OCR(光学的文書認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

要約

幼若ウサギの硝子体可溶性蛋白濃度を、正常群、ステロイド投与群、酸素投与群の各群、各日齢において測定し、次の結果を得た。

- (1)各群とも、硝子体可溶性蛋白濃度は日齢とともに減少する傾向を示した。
- (2)正常群と比較すると、ステロイド投与群では生後2~3週目で低濃度を示し、酸素投与群では生後2週目で高濃度を示した。
- (3)以上の成績より、ステロイドまたは酸素が、幼若ウサギの発達に伴う硝子体可溶性蛋白濃度の減少過程に影響を与えることを確認したが、網膜血管増殖との関連性については確認できなかった。

要約

今回、著者等は、幼若家兎網膜血管の組織培養に関する1研究として、血管周囲に増殖する4種類の細胞につき、位相差顕微鏡及び、光学顕微鏡を用い、PAS染色、コロイド鉄法、アルーサンブルー染色、放線菌ヒアルロニダーゼ消化試験、喰作用試験を行い、そのうちの2種の細胞に、上記検査すべてに陽性所見を得た。