

幼若ラットの網膜血管に及ぼす二酸化炭素の影響

慶応義塾大学医学部眼科学教室

植村 恭夫, 宇津見 義一

緒 言

近年, 実験的酸素誘導網膜症の研究で網膜血管増殖性病変の発症機序に血管拡張が強く関与することが示唆されている。Flower(1981)ら¹⁾は, 酸素による網膜血管の収縮は, 生理的防御機構であり, これが不適当な場合には, 酸素濃度が正常でも血管内皮細胞に対する酸素の毒性が強くとられるとしている。

我々は, 二酸化炭素が血管拡張をもたらすことに着目し, 二酸化炭素がこの生理的防御機構を障害し, 網膜血管増殖性病変を導く病態に関与するか否かを病理組織学的に検討し若干の知見を得たのでここに報告する。

実験方法

1. 実験材料

Wistar系幼若ラット生後0~15日の各日齢のものを使用した。これらの幼若ラットは妊娠14日の親ラット(東京都, 三協ラボサービス株式会社)より慶大医学部実験動物センター飼育室にて出産, 飼育されたものである。飼料は自由に摂取させ, 照明は交互照明, 飼育温度, 微生物感染面の飼育条件としては conventional animal である。

2. 二酸化炭素投与方法

1) 二酸化炭素投与群: 同産群の幼若ラットを生後3日より5日の間, 1日3時間(ほぼ毎日同時刻)親から離し二酸化炭素(CO₂)を20%, 酸素(O₂)を21%の一定濃度に調節した吸入箱(inhalation box)に入れた。吸入箱に入れている間は餌・水は与えなかった。吸入箱から出した後は, 動物飼育室にて親と共に飼育した。

CO₂及びO₂の供給は次のように行った。吸入箱の中に幼若ラットを入れて完全に密封したのち, CO₂及びO₂ポンペを流量計に繋ぎチェンバー内のCO₂及びO₂濃度が20%及び21%となるように流量を一定にした混合気体を供給した。

CO₂濃度は検知管法「北沢産業, ガステック(炭酸ガス2H)」にて, 酸素濃度は「アトム酸素濃度計OX-30」にて, 15分毎に測定した。

吸入箱は動物を中に置いて暴露を行う全身暴露型吸入箱で換気状況からみて流動型(dynamic flow system)である。給気の吸入箱への吹出し口には多数の穴のあいたじゃま板を置いてガスを拡散させ濃度分布が均一で一定に維持されるよう工夫した。吸入箱内は2段に分けて動物は上段に, つまり吸入箱の中段位に置いた。給気の反対側に排気口をつけ排気口からは塩化ビニールのチューブを使用し屋外に排気した。

吸入箱は塩化ビニール製で透明であり動物を観察できる。又, 吸入箱内には温度計を入れ室温を調整し20℃に保った。

2) 対照群: CO₂投与群の投与時間に一致させ同産群の一部を大気環境下に置き, 投与時間以外はCO₂投与群と共に飼育した。

3. 観察方法: 二酸化炭素投与群, 対照群について継続的に次の観察を行った。

1) 体重測定

2) 墨汁注入標本作製・固定・観察

生後14~15日の幼若ラットをエーテル麻酔下に開胸し, 注射器により心臓から5%ゼラチン加墨汁(Pelikan Fount India Black)を手圧にて注入し, 30分冷却後, 眼球を摘出し10%中性緩衝ホルマリンに3日間固定した。その後, 角膜・虹彩・水晶体を切除し, 実体顕微鏡にて網膜を観察した。

3) 光学顕微鏡の観察

エタノール系列およびプロピレンオキサイドにて脱水後, Epok 812(応研商事)に包埋し, JB-4ミクロトームにて3 μ の完全な連続切片を作製した。水酸化カリウム・アルコール溶液にて脱樹脂後, ヘマトキシリン・エオジン染色²⁾およびPAS・ヘマトキシリン染色を施行し, 光学顕

顕微鏡にて観察した。

- 4) 肺・肝・心・腎などの肉眼的観察
なお、 $PO_2 \cdot Pco_2$ は測定していない。

実験結果

1. 体重の変動

CO_2 投与群では投与期間中の生後4日から7日まで、対照群に比較しわずかに停滞する傾向があったが有意差を認めなかった ($P > 0.05$) (Fig. 1)。

2. 墨汁注入標本による観察

1) 対照群：52眼中網膜血管増殖性病変などの血管の異常は認めなかった。但し、8眼に網膜硝子体出血を認めたがこれらはいずれも血管の異常は認めなかった (Fig. 2)。

2) 二酸化炭素投与群：156眼中12眼に網膜血管異常を認めた。生後15日のものは硝子体出血を認めたがその他の血管異常は呈さなかった。13眼に網膜硝子体出血を認めた (Fig. 2)。 CO_2 を投与した生後14日の網膜では、下側網膜周辺部に異常なパターンを示す血管構築が認められた。すなわち、無血管帯をとり囲む血管の先端附近は迂曲蛇行し、やや拡張していた。一部硝子体内に発芽していると思われる変化も認められた (Fig. 3)。 CO_2 を投与した生後15日の網膜では、上側網膜周辺部に無血管帯をとり囲む迂曲、蛇行した血管および硝子体出血が認められた (Fig. 4)。同一眼の下側網膜周辺部には明瞭な無血管帯が存在し、無血管帯を取り囲む血管は vascular arcade を示していた (Fig. 5)。いずれの標本にも網膜血管の狭窄ないし閉塞の所見は認められなかった。

3. 光学顕微鏡的観察

1) 対照群：生後14~15日の同産群ラットを使用した。網膜浅層血管は鋸状縁まで達していたが、網膜深層血管は乳頭鋸状縁間の距離の約 $3/4$ までであった。網膜内層部に浮腫は認められなかった。

2) 二酸化炭素投与による発症眼： CO_2 を投与した生後14日のものでは、網膜浅層血管はやや拡張し、その先端部網膜血管が内境界膜を破り硝子体内へ進入していた。その血管の内皮細胞に核の分裂像及び PAS 陽性物質を認めた。その周囲網膜内層には PAS 陽性顆粒を有する細胞を認め、網膜神経線維層の著明な浮腫と出血を認めた (Fig. 6, 7)。

CO_2 を投与した生後15日のものでは、上側及び下側網膜浅層血管は拡張し、網膜血管が内境界膜を破り硝子体内へ進入していた。網膜神経線維層の軽度の浮腫を認めた (Fig. 8, 9)。

以上の CO_2 投与による発症眼において、網膜深層血管はいずれも浅層血管よりも発達が遅延していた。又、網膜表面に接する硝子体内にみられる PAS 陽性細胞 (いわゆる hyalocyte) については特に増殖血管との密接な関連は認められなかった (Fig. 6) が、標本全体を見た場合、対照眼に比較して数が多い傾向がみられた。

4. 肺・肝・心・腎などの肉眼的観察

CO_2 投与による発症眼をもつラットにおいて、肺に一部白色に変性した部分を認めた。

文 献

- 1) Flower, R.W.: A new perspective on the pathogenesis of retrolental fibroplasia: The influence of elevated arterial pCO_2 , Proceedings of the Ross conference on Retrolental Fibroplasia. Vol. 1, : 20-45, Ross Laboratories, Columbus, Ohio 1981.
- 2) 土屋清一: エポキシ樹脂包埋された眼組織のヘマトキシリン・エオジン染色について. 日眼, 82: 555-560, 1978.

写真の説明

Fig. 3 二酸化炭素を投与した生後14日のラットの实体顕微鏡写真。下側網膜無血管帯と硝子体中へ増殖していると思われる血管 (矢印) が見られる。二重の矢印; 硝子体血管, AV; 無血管帯, OS; 鋸状縁 (墨汁注入標本, $\times 28$)

Fig. 4 二酸化炭素を投与した生後15日のラットの实体顕微鏡写真。上側網膜の異常血管構築と硝子体出血が見られる。A; 無血管帯, OS; 鋸状縁 (墨汁注入標本, $\times 18$)

Fig. 5 二酸化炭素を投与した生後15日のラットの实体顕微鏡写真。下側無血管帯と vascular arcade (矢印) が見られる。AV; 無血管帯, OS; 鋸状縁 (墨汁注入標本, $\times 11$)

Fig. 6 二酸化炭素を投与した生後14日の下側

網膜。神経線維層の網膜血管が硝子体中へ進入している。拡張した血管が神経線維層に見られる。いわゆる hyalocyte (矢印) が網膜表面に見られ、PAS 陽性細胞 (二重の矢印) が神経線維層に見られる。神経線維層に小出血と浮腫性変化が見られる (三重の矢印)。外網状層の網膜血管は神経線維層の血管より周辺に延びてなく、両者の血管は鋸状縁には達していない (墨汁注入標本, PAS・ヘマトキシリン染色, $\times 400$)。

Fig. 7 Fig. 6の強拡大図。PAS 陽性細胞 (矢印) と核分裂像 (二重の矢印) が硝子体内へ進入している血管の内皮細胞に見られる (墨汁注

入標本, PAS・ヘマトキシリン染色, $\times 800$)。Fig. 8 二酸化炭素を投与した生後15日のラットの上側網膜。神経線維層の網膜血管が硝子体内へ進入している。神経線維層に浮腫性変化と拡張した血管が見られる (墨汁注入標本, ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 400$)。

Fig. 9 二酸化炭素を投与した生後15日のラットの下側網膜。神経線維層の網膜血管が硝子体内へ進入している。神経線維層に浮腫性変化と拡張した血管が見られる (墨汁注入標本, ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 400$)

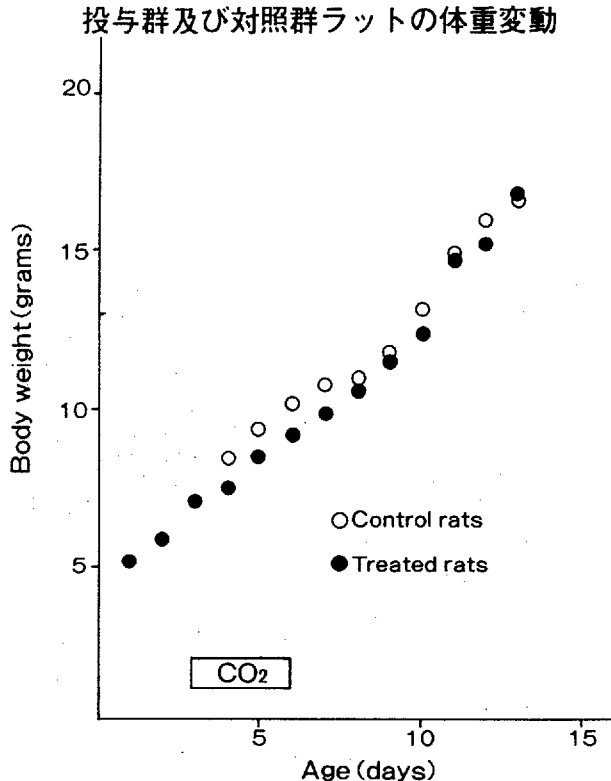


Fig. 1

ラット二酸化炭素投与による網膜症 の発症頻度

| | 眼数 | 死亡 | 判定 (14~15日) | 発症 | 発症率 (%) | その他 |
|-----|--------------|-------------|----------------|----|------------|------------------|
| 投与群 | 280 (140) | 124 (62) | 156 | 2 | 1.3 | 網膜硝子体 出血 14 眼 |
| 対照群 | 86 (43) | 34 (17) | 52 | 0 | 0 | 網膜硝子体 出血 8 眼 |

(): 匹数

Fig. 2

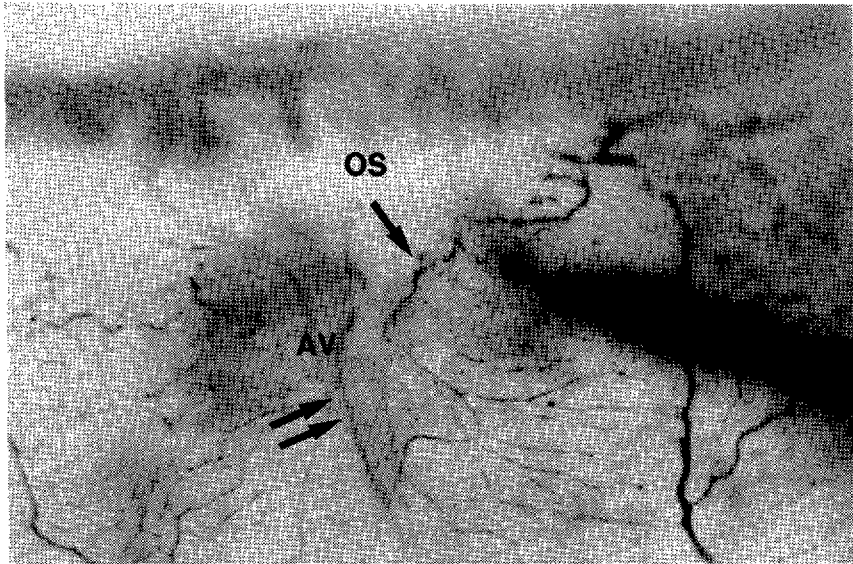


Fig. 3

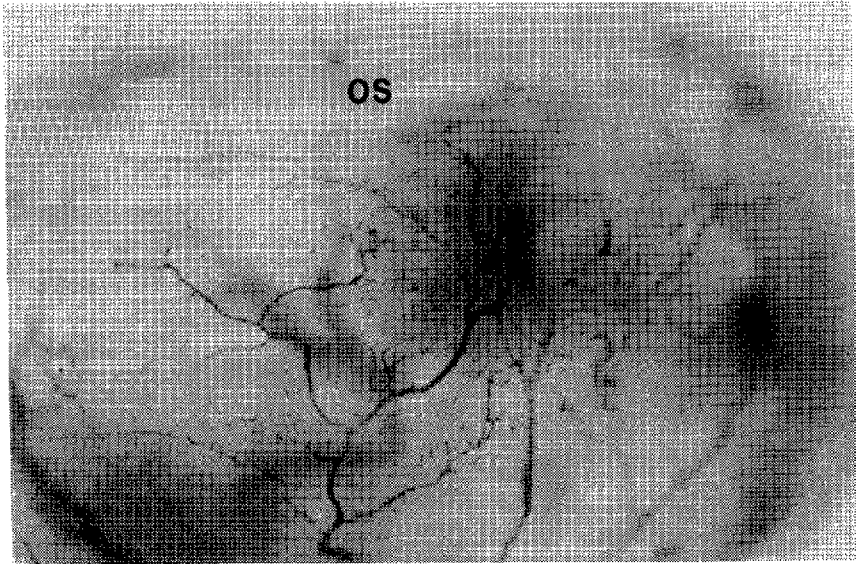


Fig. 4

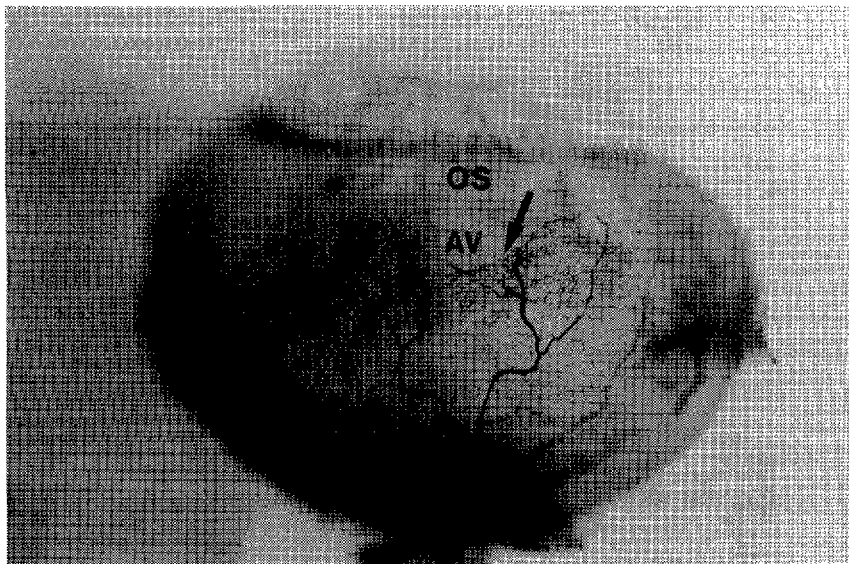


Fig. 5

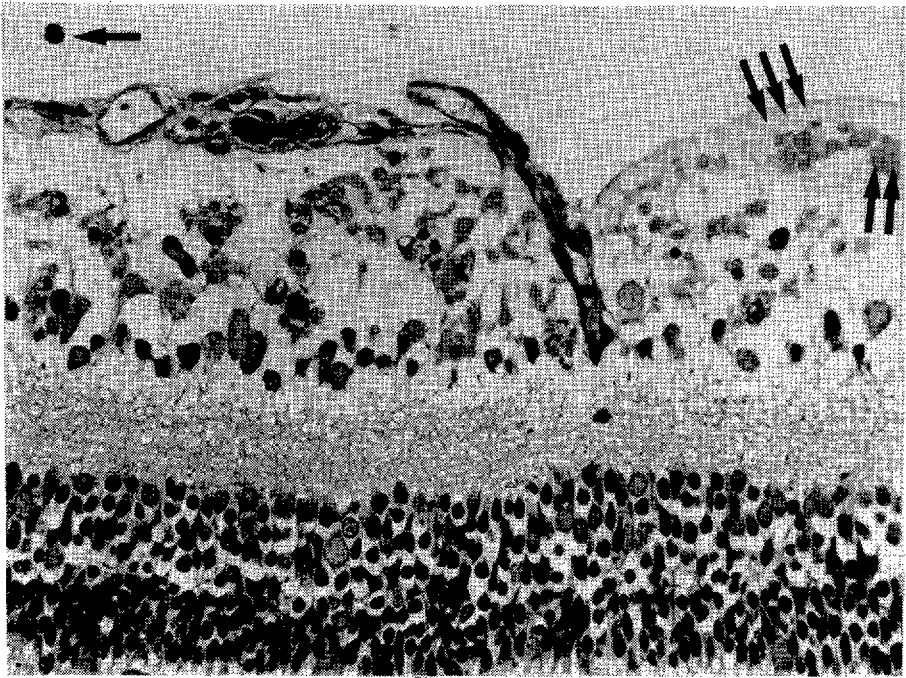


Fig. 6

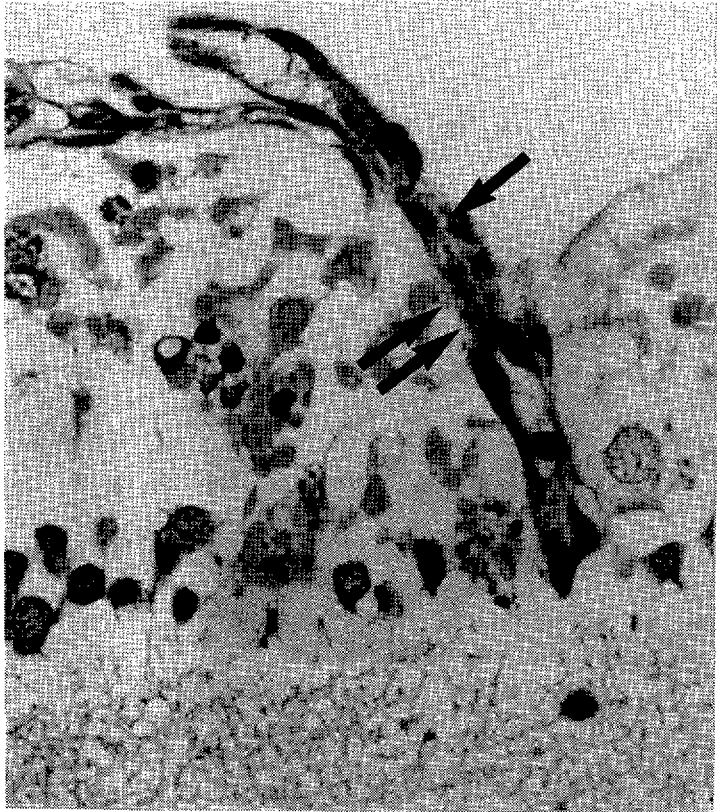


Fig. 7



Fig. 8

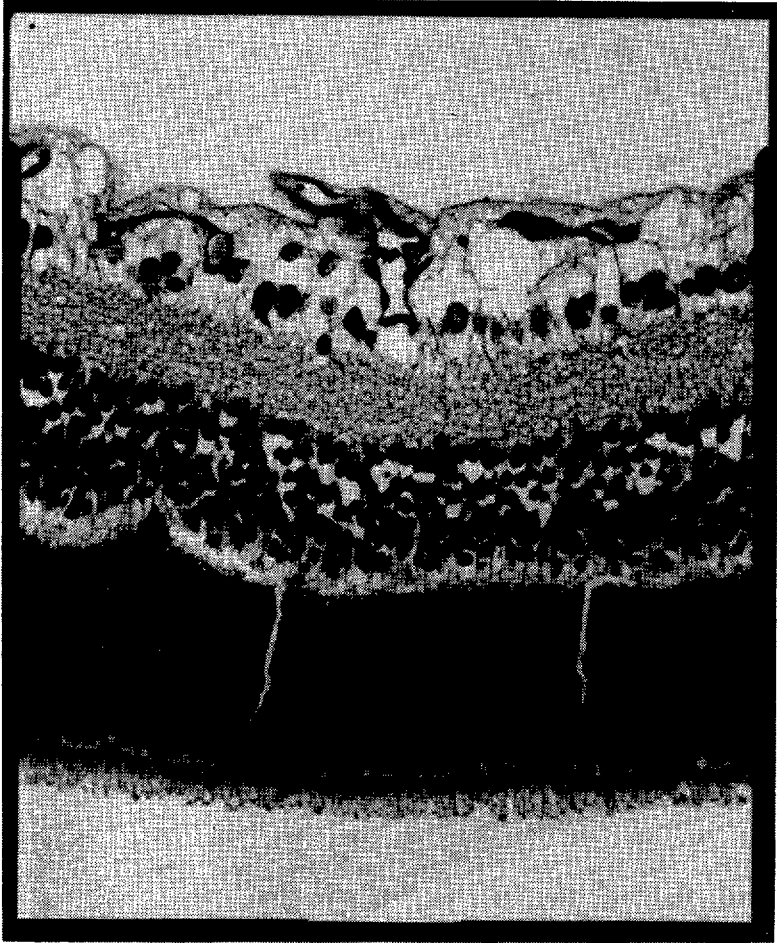
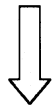
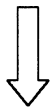


Fig. 9



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)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



緒言

近年,実験的酸素誘導網膜症の研究で網膜血管増殖性病変の発症機序に血管拡張が強く関与することが示唆されている。Flower(1981)ら(1)は,酸素による網膜血管の収縮は,生理的防御機構であり,これが不適當な場合には,酸素濃度が正常でも血管内皮細胞に対する酸素の毒性が強くあらわれるとしている。我々は,二酸化炭素が血管拡張をもたらすことに着目し,二酸化炭素がこの生理的防御機構を障害し,網膜血管増殖性病変を導く病態に関与するか否かを病理組織学的に検討し若干の知見を得たのでここに報告する。