

原著

ラット高眼圧モデルの網膜神経節細胞変化

伊藤 忠¹⁾ 大黒 浩¹⁾ 大黒 幾代¹⁾ 間宮 和久¹⁾
石川 太¹⁾ 目時 友美¹⁾ 山崎 仁志¹⁾ 高野 淑子¹⁾
中澤 満¹⁾ 正村 和彦²⁾

抄録 ラットの上強膜静脈を焼灼して眼圧を上昇させ、高眼圧状態を保持することにより、高眼圧モデルを作成した。6ヶ月間高眼圧状態を保持したラット (n=6)、及びコントロールラット (n=6) の網膜神経節細胞数をDiI蛍光色素を用いて逆行性にラベルして測定し比較検討した。上強膜静脈を焼灼したラット (n=22) の眼圧は無処置ラット (n=10) の眼圧と比較して有意に上昇していた。網膜神経節細胞数は、高眼圧モデルではコントロールと比べて有意に減少していた。ラットの高眼圧モデルは緑内障モデルとなりうると考えられる。

弘前医学 56:15-20, 2004

キーワード: 緑内障; ラット; 網膜神経節細胞.

ORIGINAL ARTICLE

CHANGE OF RETINAL GANGLION CELLS IN THE OCULAR HYERTENSION MODEL RAT

Tadashi Ito¹⁾, Hiroshi Ohguro¹⁾, Ikuyo Ohguro¹⁾, Kazuhisa Mamiya¹⁾,
Futoshi Ishikawa¹⁾, Tomomi Metoki¹⁾, Hitoshi Yamazaki¹⁾, Yoshiko Takano¹⁾
Mitsuru Nakazawa¹⁾, Kazuhiko Shoumura²⁾

Abstract It is known that glaucomatous optic neuropathy is caused by selective cell death of retinal ganglion cells (RGC) by elevated intraocular pressure (IOP) and other causes. In the present study, we investigated RGC death in experimental glaucoma model rats (22 rat eyes) produced by cautery of three episcleral/limbal veins. As controls, 10 rat eyes with normal IOP were used. After cautery of episcleral veins, the average of IOP was significantly higher as compared with controls during 6 months after the operation. The number of retrograde labeled RGCs was significantly decreased in high IOP eyes as compared with normal IOP eyes. Therefore the episcleral/limbal veins occlusion model gave a consistence that long-term elevation of IOP leads to loss of RGCs and is useful as an experimental glaucoma model.

Hirosaki Med. J. 56:15-20, 2004

Key words: glaucoma; rat; retinal ganglion cell.

緒 言

緑内障は成人における失明の主要な原因のひとつである。本症の主体は特異な緑内障性視神経障

害であるが、これには眼圧上昇に伴う原発および続発緑内障と眼圧が正常範囲内である正常眼圧緑内障の2種類がある。最近の研究によれば視神経障害の原因として網膜神経節細胞のアポトーシス

¹⁾ Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

²⁾ The First Department of Anatomy, Hirosaki University School of Medicine

Correspondence: T. Ito

Received for publication, March 26, 2004

Accepted for publication, September 6, 2004

¹⁾ 弘前大学医学部眼科

²⁾ 弘前大学医学部解剖学第一

別刷請求先: 伊藤 忠

平成16年3月26日受付

平成16年9月6日受理

が関与することが知られている¹⁻⁵⁾。この網膜神経節細胞のアポトーシスを引き起こす機序として神経栄養因子の枯渇、虚血⁶⁻⁸⁾、硝子体中のグルタミン酸濃度の上昇^{9,10)}および、自己免疫等の関与^{11,12)}が示唆されている。

しかしながら、緑内障のメカニズムの全貌は依然明らかにされておらず、その解明と治療研究は今後の課題である。緑内障の病態の一端を明らかにするためには、動物の緑内障モデルの作成は重要な手がかりを与えるものと期待される。今回我々は眼圧による網膜神経節細胞の障害に着目し、ラットの高眼圧モデルを作成してその高眼圧による網膜変化について検討したので報告する。

目 的

ラットの眼圧を上昇させ、高眼圧状態を保持することにより、緑内障モデルを作成する。6ヶ月間高眼圧状態を保持したラットの網膜神経節細胞数を測定し、眼圧上昇前後の網膜神経節細胞の変化を比較検討する。

方 法

雄のウイスターラット(200-250g, 週齢およそ7~8週齢)32匹を使用した。飼育中は室温を22~23℃に保ち、照明は12時間毎の明暗サイクル(明:8時~20時, 暗:20時~8時)とし、食餌及び水は自由に摂取できるようにした。麻酔は塩酸ケタミン60mg/kg及びキシラジン塩酸塩24mg/kgを腹腔内注射して、麻酔下にて眼球を十分に露出した上で、眼科手術用パクレン(はんだや製)を用いて上強膜静脈を3本焼灼して眼圧を上昇させた。眼圧の測定は、同様に麻酔下にて眼圧計(TonoPen XL)を用いて測定した。眼圧日内変動による差を考慮して測定時間帯を18時前後に統一した。測定はすべて同一検査者が行った。眼圧は1ヶ月毎に測定した。眼圧が下降していた場合は上強膜静脈の焼灼を追加し、高眼圧状態を保持するようにした。対照として正常眼圧ラットの眼圧も1ヶ月毎に測定した。経過観察中に死亡した個体は除外した。

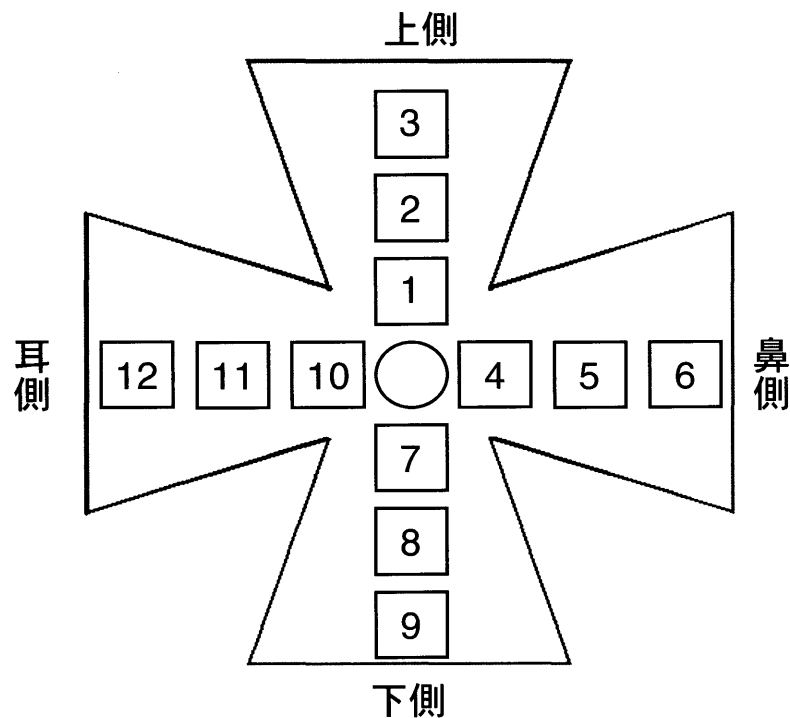


図1 網膜伸展標本の略図と網膜神経節細胞数(RGCs)の計測部位。眼球に割を入れ、網膜を図のように上側、耳側、下側および鼻側の4象限に分かれるように伸展した。丸印は視神経乳頭を、四角内の数字は12ヶ所の計測部位を示す。

6ヵ月後に麻酔下にて左右の頭頂部の頭蓋骨をはずし、マイクロシリンジを用いて上丘より1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (以下, DiI蛍光色素) をN,N-dimethylformamideで0.25mg/ μ lに溶解して注入した. DiI蛍光色素は軸索輸送により神経線維を伝わって網膜神経節細胞に到達する. 72時間後にジエチルエーテルによる深麻酔で死亡させた直後に眼球を摘出し, 4%パラホルムアルデヒドで固定後に網膜伸展標本を作成して蛍光顕微鏡(Carl Zeiss社製)下で観察した. DiI蛍光色素により, 神経線維およびそれに連なる網膜神経節細胞の細胞質が染色されることで網膜神経節細胞が観察できる. 染色された網膜神経節細胞の数を測定した. 測定は図1のように, 4象限それぞれについて55000 μ m²の領域を決め, 1象限につきそれぞれ中心側, 中間周辺部および周辺部の3箇所, 計12箇所を網膜神経節細胞数を測定し, それぞれを1mm²当りの数に換算した. 対照として, 同齢の正常眼圧ラットに対して同様の操作を行い網膜神経節細胞数を測定した. 有意差検定には

Student-t検定法を用い, 危険率0.05未満を有意とした.

結 果

DiI蛍光色素にて染色された網膜神経節細胞は神経線維およびそれに連なる細胞体の細胞質が赤色に染色され同定は容易であり, 組織計測上とくに問題となることはなかった. 高眼圧ラットの眼圧は平均31.95 \pm 5.71mmHg (平均値 \pm 標準偏差) (n=22) で経過した. それに対して, 正常眼圧ラットの眼圧は13.69 \pm 3.43mmHg (n=10) で経過した(図2). 高眼圧ラットの上強膜静脈焼灼前後では焼灼後の方が焼灼前と比べて有意に眼圧が上昇していた (p<0.001).

網膜神経節細胞数の変化の検討については, 正常眼圧ラットの平均網膜神経節細胞数が1918.5 \pm 892.1個/mm² (n=6) であったのに対し, 高眼圧状態を6ヶ月間保持したラットの平均網膜神経節細胞数は961.5 \pm 550.1個/mm² (n=6) と有意に低下していた (p<0.05) (図3). 測定部位による有意差は認めなかった.

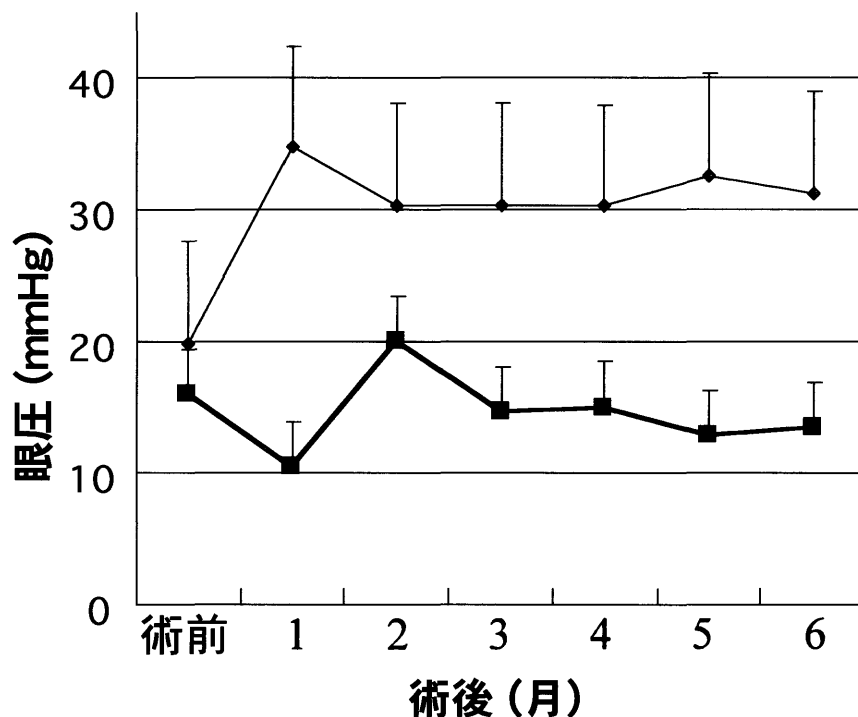


図2 上強膜静脈焼灼後の眼圧経過. 細線は高眼圧モデルラットを, 太線は対照ラットを表す. 各測定点には平均値+標準偏差を示した.

考 察

ラットの上強膜静脈を焼灼して眼圧を上昇させた報告は過去にもいくつかある。それらはいずれも2週間から4ヶ月程度の観察であったが、今回我々は6ヶ月間と、比較的長期にわたって高眼圧状態を保持することができた。ラットの高眼圧モデルを作成する方法として、主に上強膜静脈を焼灼する方法¹³⁻¹⁶⁾と、角膜輪部付近を光凝固することで繊維柱帯の房水流出を抑制する方法^{5,17-20)}などがある。Lamら²⁰⁾は角膜輪部の光凝固により、対照と比べて平均して56%程度の眼圧上昇を得られたと述べている。また、Levkovitch-Verhinら¹⁹⁾は角膜輪部の光凝固と上強膜静脈の直接光凝固を併用した群と、角膜輪部の光凝固のみを行った群での比較をおこなっており、2つの方法を併用した群では対照と比べて約1.8倍の眼圧上昇を得られているのに対して、角膜輪部の光凝固のみを行った群では約1.4倍の眼圧上昇にとどまっていた。Mittagら¹³⁾は、高眼圧を保持する方法として5-fluorouracil(5-FU)を使用することにより、

流出路の再開通を阻害する方法を用いている。しかし今回我々の行った上強膜静脈を焼灼する方法のみでも、上強膜静脈の焼灼を随時追加したことにより、十分高眼圧を保持することが可能であった。ラットの眼圧測定の問題点としては、ヒトの場合と比べて眼球自体の前後の可動性が大きいために、眼圧計を眼球に接触させた際に、眼球自体が眼窩の奥に移動してしまうことである。そのため、厳密には眼圧の値そのものは正確とはいえないが正常眼圧および高眼圧の2群間を比較するという意味では有用であると考えられた。また、眼圧測定の際の誤差を極力避けるため、すべて同一検者が測定し、値にばらつきが出た場合は繰り返し測定し、一番高い値と一番低い値を除外した上で平均値をとった。

眼圧上昇に伴う網膜神経節細胞数の減少について、WoldeMussieら²¹⁾は、眼圧を上昇させてから最初の3週間までは毎週12%減少し、3週間以降から2ヶ月までは減少率が毎週2%ずつ減少し、2ヶ月間で平均すると網膜神経節細胞数が毎週5%ずつ減少したと述べている。また、Lam

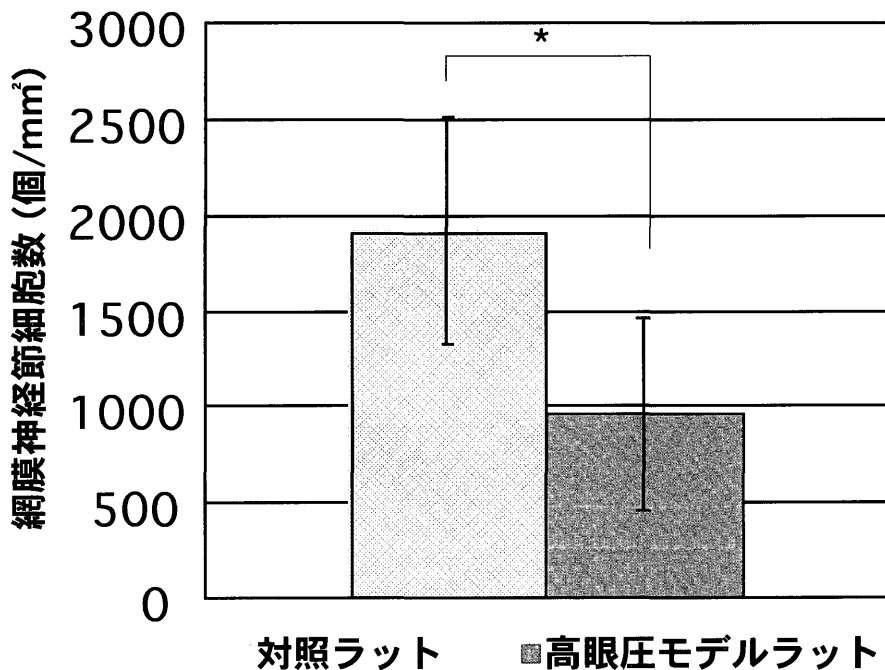


図3 網膜神経節細胞数。高眼圧モデルラットでは対照ラットに比較して有意に細胞数が減少している。* $P < 0.05$ 。

ら²⁰⁾は網膜神経節細胞層の細胞数が、眼圧上昇から3日後には約20%の減少を認めたと報告している。いずれの報告でも眼圧上昇から比較的短い期間で大きな減少がみられ、時間経過と共にその減少率が小さくなっている。今回の我々の実験では6ヵ月間で平均すると網膜神経節細胞数が毎週2.1%ずつ減少していた。このことから、6ヶ月間という長期間でさらにその後半で減少率が小さくなっている可能性があると思われた。このことを立証するためにはより短期間での網膜神経節細胞数の測定を追加する必要がある。

今回の実験で、ラットの高眼圧モデルにおいて、網膜神経節細胞数が有意に減少していたことより、高眼圧ラットの網膜に緑内障性の変化が起こっていることが推測された。このことから、ラットの高眼圧モデルが緑内障モデルとなりうると考えられた。

ラットの緑内障モデルを確立することにより、今後それらを使用して緑内障のメカニズムや網膜の緑内障性変化、及び緑内障治療薬の開発等の研究に有用となりうることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1031-5.
- 2) Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, Ito J. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jpn J Ophthalmol* 1997;41:84-8.
- 3) Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med* 2003;49:90-5.
- 4) Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:774-86.
- 5) McKinnon SJ, Lebman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, et al. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1077-87.
- 6) Chung HS, Harris A, Evans DW, Kagemann L, Garzoni HJ, Martin B. Vascular aspects in the pathophysiology of glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 1999;43(Suppl 1):S43-50.
- 7) Yamamoto T, Kitazawa Y. Vascular pathogenesis of normal-tension glaucoma: a possible pathogenetic factor, other than intraocular pressure, of glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res*. 1998;17:127-43.
- 8) Flammer J. The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994;38(Suppl):S3-6.
- 9) Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1618-24.
- 10) Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ. Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:972-81.
- 11) Wax MB, Barrett DA, Pestronk A. Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1994;117:561-8.
- 12) Cartwright MJ, Grajewski AL, Friedberg ML, Anderson DR, Richards DW. Immune-related disease and normal-tension glaucoma. A case-control study. *Arch Ophthalmol* 1992;110:500-2.
- 13) Mittag TW, Danias J, Pohorelec G, Yuan HM, Buradgazi E, Redman RC, Podos SM. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3451-59.
- 14) WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2849-55.
- 15) Ahmed F, Torrado M, Johnson E, Morrison

- J, Tomarev SI. Changes in mRNA levels of the myoc/tigr gene in the rat eye after experimental elevation of intraocular pressure or optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3165-72.
- 16) Bakalash S, Kessler A, Mizrahi T, Nussenblatt R, Schwartz M. Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3374-81.
- 17) Mabuchi F, Aibara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN. Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4321-30.
- 18) Martin KRG, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: Retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4357-65.
- 19) Levkovitch-Verhin H, Quigley HA, Martin KRG, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:402-10.
- 20) Lam TT, Kwong JMK, Tso MOM. Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:638-45.
- 21) WoldeMussie E, Ruitz G, Wijono M. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2849-55.