

## 網膜微小循環と白血球

桐生 純一

白血球は炎症性サイトカインや接着分子などを介して血管内皮細胞と相互作用を生じ、網膜微小循環障害に関与する。近年、非侵襲的微小循環観察法の開発や分子生物学の進歩により、微小循環レベルにおける白血球-血管内皮相互作用に関する知見が蓄積してきている。われわれは生体眼における白血球の網膜循環動態の観察に成功し、この方法の動物モデルへの応用によって興味深い知見が数多く得られつつある。

### Retinal Microcirculation and Leukocyte

Junichi KIRYU

Leukocytes play an important role in the pathogenesis of disorders of retinal microcirculation through interaction with vascular endothelial cells mediated by inflammatory cytokines and adhesion molecules. Recent development of techniques to non-invasively visualize the microcirculation and advances in molecular biology has revealed fruitful information on the leukocyte-endothelial interaction in the retinal microcirculation. We have developed a method capable of visualizing the dynamic behavior of leukocytes in vivo in the retinal vasculature. With the use of this method in various animal models we demonstrated numbers of interesting results.

**Key Words** ① Leukocyte-endothelial interaction

② Retinal microcirculation

③ Non-invasive method

### 緒 言

眼科領域における循環の研究は、眼全体の血流量や網膜大血管の血流量や速度を計測することで評価されてきた。しかし実際に様々なイベントが起こっているのは、血管壁を構成する内皮細胞と血球や血液成分の間であり、身体の全血管の90%以上を占め、細胞組織への栄養運搬、酸素運搬、代謝産物の清浄化など生体のホメオスタシスを担っている毛細血管レベルでの評価が重要視されるようになってきた。とくに血球成分の中でも白血球は血管内皮との間で接着

分子やサイトカインなどの作用を介して、微小循環に大きな影響を及ぼすことが知られている。近年の観察技術の進歩により、白血球が毛細血管の内壁に付着し、血管外に遊走していく像を微小循環の観察や電子顕微鏡下にも見られるようになったが、我々は独自の方法で白血球を選択的に染色することにより、網膜微小循環を白血球と内皮の相互作用という面から観察してきた。本稿では今まで得られた知見を中心に網膜微小循環を考えてみたい。

### I. 白血球の特性

血行力学的には微小循環では、個々の血球の

及ぼす影響が大きくなっていく。赤血球は中央が折れ曲がる形で変形し抵抗が少なくなり、その量に比べて毛細血管ではそれほど大きな影響を持たない。一方、白血球の大部分を占める好中球は球面で直径が約8 $\mu$ mで、真性毛細血管の直径の5 $\mu$ mよりも大きく、毛細血管では変形が必要となる。しかし白血球は変形能が低く(赤血球の約1/2000)、毛細血管での抵抗に大きく関与し、血球成分の構成比では0.1%なのに、全血の抵抗の22%近くを占めるといわれている<sup>1)</sup>。さらに白血球は様々な刺激に対し活性化し、活性化時には変形能が更に低下し血管内皮への粘着性も上昇する。活性化させる物質としては活性酸素、フォスホリパーゼを介した血小板活性因子(PAF)やロイコトルエンB4があげられる。このように白血球自体が微小循環障害の原因となっている可能性がある。

## II. 炎症における接着分子のはたらき

急性炎症の病巣に白血球が集積する現象は古くから観察されている。炎症巣への細胞浸潤において血中の白血球はtethering $\rightarrow$ rolling $\rightarrow$ adhesion $\rightarrow$ transmigrationというステップを踏んで組織へ移行する(Fig. 1)<sup>2)</sup>。エンドトキシンであるリポポリサッカライドを投与すると、マクロファージが活性化されてヒスタミン、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-8などの液性因子を放出し、血管拡張、透過性亢進が始まるとともに血管内皮細胞が活性化される。tetheringからrollingまでのプロセスに関与するのはセレクトリンファミリーとそのリガンドである。炎症反応開始か

ら数分以内に血管内皮細胞上P-セレクトリンが発現し、白血球上の糖鎖抗原と結合し弱い接着を生じる。白血球は一時的に血管壁上にトラップされてはすぐに離れていく(tethering)ようになり、しばらくすると粘着性が上昇してきて血管壁を転がるように移動しはじめる(rolling)。炎症反応開始から数時間経つと、内皮細胞上にE-セレクトリンが出現し、白血球表面の異なる糖鎖抗原との間でrollingを媒介するようになる。また白血球表面にもL-セレクトリンが発現し、内皮細胞上の数種類の糖蛋白との間でrollingを媒介する。白血球がrollingしている間に、炎症局所から分泌される種々のchemotactic cytokine (chemokine)により白血球表面上のインテグリンが活性化され、血管内皮細胞上の接着分子(ICAM-1, VCAM-1)との間に強固な接着が生じる。この結果、rollingしていた白血球は血管内皮上に結合し、血管壁に付着する(adhesion)。接着した白血球は内皮細胞層を通り抜け、血管外の組織へ遊走をはじめる(transmigration)。

## III. Acridine Orange Digital Fluorography (AODF)

アクリジンオレンジ(AO)は古くから用いられている蛍光色素であり、細胞内では主にDNA、またはRNAと結合して蛍光を発する。DNAとAOの複合体ではフルオレセインナトリウムと蛍光特性はほぼ同じであり、492 nmに励起、533 nmに蛍光のピークが存在する。AOを静注すると血球成分では唯一核を持つ白血球のみが蛍光染色される。AOを用いた白血球動態の生体観察は、生体顕微鏡と組み合わせ、様々な臓器で多くの研究<sup>2)</sup>がなされてきた。しかし毒性があり人への使用は無理である。我々は、このような特性に着目し、ビデオ蛍光眼底造影の手法を応用した生体眼における白血球の網膜循環動態の観察に

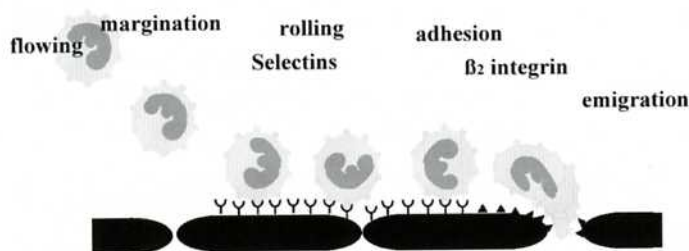


Fig. 1. 炎症巣への細胞浸潤における接着分子の関与。tethering $\rightarrow$ rolling $\rightarrow$ adhesion $\rightarrow$ transmigrationのステップを踏んで白血球は血管外へ遊走する。(文献2より改変)



成功した<sup>3),4)</sup>。SLOが血流研究に適している点は、ある一点を走査する速度が100 nsと非常に速く、血管内を速く通過する血球一個一個の動きを捉えることができることである。得られた画像はS-VHSテープに録画し、後にビデオボードを通してデジタル化し、コンピュータで画像解析を行っている。

#### IV. 白血球による血流の評価

最初に行ったのはカニクイザルを用いた、黄斑部周囲の白血球動態解析である。連続するフレームをサブトラクション法にて、動いたものだけ表示し一個の白血球の動きを追った。次にその距離を画像ソフト (NIH Image) で計測し、実測値に変換するとフレームごとの白血球の速度の変化をみる事ができる。これで求めた黄斑周囲の白血球の平均毛細血管速度は $0.92 \pm 0.32$  mm/secであった。これは、青色内視現象法を用いて計測したヒトの黄斑周囲の毛細血管速度と近似した値であった。

毛細血管における白血球の動きは常にスムーズではなく、一過性のpluggingを起こしながら流れている。これは病的状態だけではなく、生理的状态でも起こっているが、十分な血流があれば白血球が長時間にわたり栓塞することはない。しかし、ショックのように血流が十分でない状態では、白血球が毛細血管を閉塞 (capillary plugging) しているのが実験的に示されている。その他、白血球が活性化された状態、血管内皮が障害された状態では、白血球の血管内皮への粘着性が上昇しており、血流障害を起こしやすくなる。

AODFで毛細血管の内皮細胞や周皮細胞の核を観察することもできる。画角20度で白血球の流れを観察すると、毛細血管の屈曲部では速度が低下し、細胞が変形するのを観察することができる。白血球の毛細血管網での特徴のひとつとして不均等性があげられる。即ち、白血球が多く通る場所と、殆ど通らない場所がある。白血球は炎症などが無いときには、毛細血管にとっては大きな抵抗であり、できれば抵抗の少

ないルートを通っているのが望ましい。以前より白血球が通りやすいルートである Preferential Channel があると言われてきたが、網膜では証明されていなかった。AODFで観察してみると、白血球は抵抗が少なく速度の速いルートを通り、抵抗が高く速度の遅いルートを通りにくく、自然の防御機構が働いている。しかし、血流量が低下するとこの防御機構が崩れ、抵抗の高い血管に白血球が多く流れやすくなり、循環障害の原因となりうる。

#### V. 糖尿病網膜症

糖尿病網膜症の発症進展のプロセスの1つに毛細血管の閉塞があるが、その発生機転として、先行する毛細血管の機能低下だけでなく、白血球による毛細血管の栓塞も深く関わっていると考えられている。糖尿病になると白血球が活性化され変形能が低下することが知られており、また実験的糖尿病ラットで組織学的に白血球が毛細血管を栓塞していることが示されている。活性化された白血球は物理的に毛細血管を栓塞するのみでなく、活性酸素やサイトカインを介して局所の血管内皮を障害して、さらに毛細血管の閉塞が起こりやすい状態になる。われわれのAODFによる検討では、自然発症糖尿病ラットやストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいて、白血球が網膜循環に捕捉され (leukostasis)、一部の毛細血管を閉塞して血管透過性を亢進 (vascular leakage) させていることを示した<sup>5)~7)</sup> (Fig. 2)。このleukostasisとvascular leakageは接着分子のICAM-1をモノクローナル抗体でブロックすると抑制される。

血管内皮増殖因子 (VEGF) は毛細血管の閉塞や血管透過性の亢進を生じさせ、糖尿病網膜症の発症に重要な役割を果たしていると考えられているが、その作用機序は血管そのものを介したものだけでなく、白血球と血管内皮の相互作用も深く関わっている。サルの硝子体内にVEGFを投与すると毛細血管瘤や毛細血管閉塞、網膜浮腫、新生血管などの糖尿病網膜症に特有の血管の変化がみられる<sup>8)</sup>。ラットの硝子

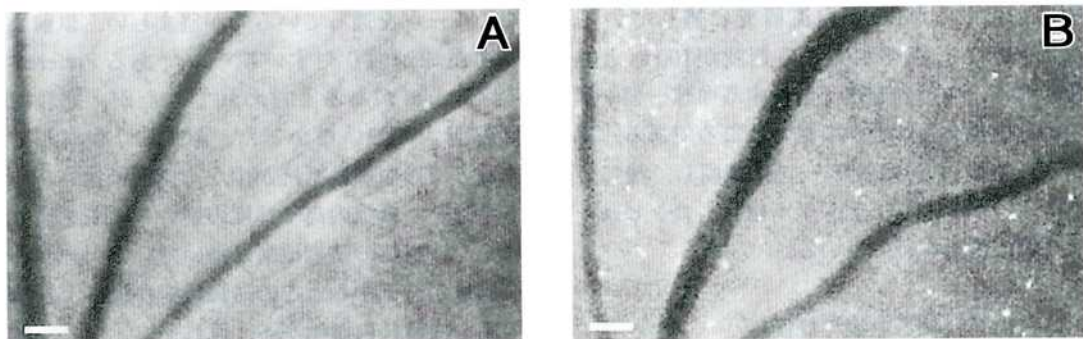


Fig. 2. In vivo retinal leukostasis. Representative retinal leukostasis observed with AOLF in nondiabetic (A) and diabetic (B). (Bars = 100  $\mu$ m)

体内に VEGF を投与して AODF で観察すると、糖尿病モデルと同等の leukostasis と vascular leakage が認められる<sup>9)</sup>。網膜内の ICAM-1 の発現は増加しており、抗 ICAM-1 抗体の投与により、leukostasis と vascular leakage は、有意に抑制された。

プロテインキナーゼ C- $\beta$  (PKC- $\beta$ ) は、糖尿病の初期における網膜血管の機能障害や虚血の誘導、VEGF の発現を引き起こし、網膜症の発症に深く関わっている。ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに PKC- $\beta$  阻害剤 (LY 333531) を投与すると、leukostasis は濃度依存性に抑制される<sup>10)</sup>。近年、糖尿病網膜症の進展予防に対する LY333531 の有効性が一部示された<sup>11)</sup>。

高脂血症は糖尿病腎症の危険因子であるが、網膜症においては一定の見解を得られていない。ETDRS のコホート研究では、総コレステロール値、LDL 値、VLDL 値の増加は、黄斑部の硬性白斑の発症・進展や視力低下と相関する<sup>12)</sup>。われわれは、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに simvastatin を投与し、VEGF の発現を濃度依存性に抑制することを見出した<sup>13)</sup>。網膜症に対する高脂血症治療の有効性については、現在大規模臨床試験が完了していないため、まだ不明であるが、動脈硬化性疾患の予防として高脂血症治療が重要視されており、網膜症管理のうえでも治療を考慮することが必要となるであろう。

ステロイドの全身投与は糖尿病発症の危険因

子であるが、局所投与は網膜症の透過性亢進を治療する目的で有用であることが近年わかってきた。ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに トリアムシノロン・アセトニドを投与すると、vascular leakage は濃度依存性に抑制される<sup>14)</sup>。

#### VI. エンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU)

##### (Fig. 3)

前眼部ぶどう膜炎のモデルとして使われてきた EIU であるが、実は後眼部にも炎症は起こっており、われわれは炎症時の網膜血管での白血球の動態をみる系として用いている。作製方法は白色ラットの足にリポポリサッカライドを皮下注射する。前房の炎症のピークは 24 時間後であるが、AODF で観察される白血球の rolling のピークは 12 時間後に起こることがわかった<sup>15)</sup>。

AODF で硝子体に焦点を合わせると、硝子体内に遊走した白血球を観察することができ、そのピークは 48 時間後に遅れてくる。従来われわれは、この白血球は網膜血管を transmigration したものと考えていたが、最近開発した共焦点顕微鏡と毛細血管染色法を組み合わせた網膜内の白血球の動きの経時変化を 3 次元的に捉えることのできる方法を EIU に適用すると、網膜血管を transmigration した白血球は硝子体方向ではなく、逆に脈絡膜方向へ移動していることが判明した<sup>16)</sup>。したがって、EIU で観察される硝子体内の白血球は網膜由来でなく、別の場所、おそらく毛様体の血管から遊走してき



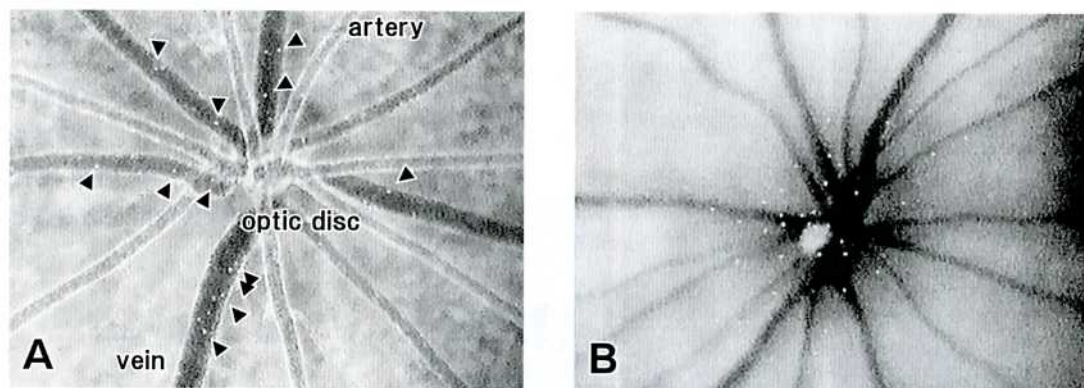


Fig. 3. Endotoxin-induced uveitis. A: LPS 投与12時間後のWKYのAcridine Orange Digital Fluorographyによる眼底像。矢頭がrollingしている白血球。B: LPS 投与48時間後のWKYのAcridine Orange Digital Fluorographyによる眼底像。硝子体に浸潤した白血球が観察できる。

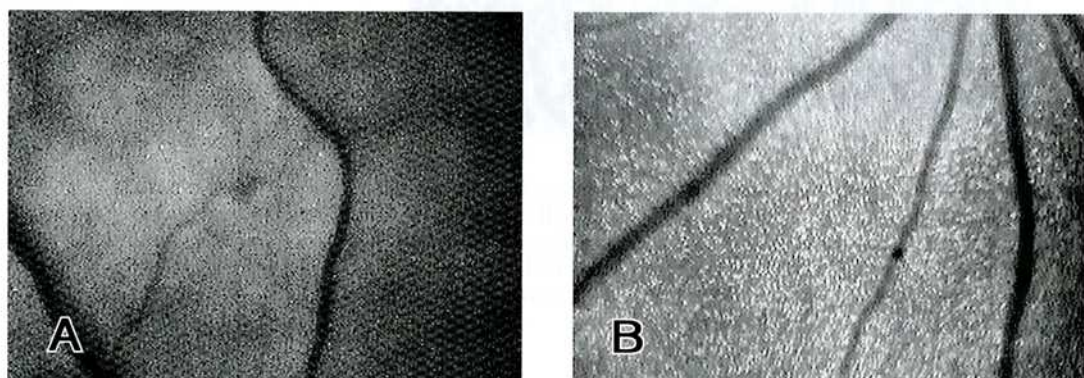


Fig. 4. Retinal ischemia-reperfusion injury. Leukocytes accumulated in the retina were observed as fluorescent dots at 30 minutes after AO injection. A small number of leukocytes could be found in control rats (A). Increasing numbers of leukocytes accumulated at 12 hours after reperfusion (B).

たものと考えられる。

炎症に関わる接着分子のうち、P-セレクチンに対するモノクローナル抗体を投与すると、rolling 白血球数と硝子体内浸潤白血球数とは大幅に抑制されていた<sup>17)</sup>。このことは、EIUの炎症機転にP-セレクチンが深く関与していることを示すと同時に、ぶどう膜炎の治療として接着分子の制御が有効である可能性を示唆するものである。セレクチン類を非特異的に阻害する薬物 (SKK-60060) の投与は、P-セレクチン抗体のみの治療よりも大きな抑制効果を示した<sup>18)</sup>。また、酸化LDLのレセプター (LOX-1) がEIUにおいて接着分子としてふるまうことをはじめて見出し、LOX-1の制御によっても、炎症をコントロールできることも報告した<sup>19)</sup>。

また sepsis の治療薬として用いられている antithrombin III が炎症眼における白血球の rolling や硝子体内浸潤を抑制することも見出し、治療としての可能性を提唱した<sup>20)</sup>。

#### Ⅶ. 虚血再灌流障害と網膜神経保護

血流が途絶した後、再灌流するとき組織障害の拡大を起こすことが知られており、脳、肝臓、心臓などで注目されている。一方、網膜の虚血再灌流障害は主として内層網膜に強い萎縮を招来し、緑内障などの神経線維が侵される疾患群のモデルとして、神経保護の観点から注目を集めている。われわれは、有色ラットの視神経を一時的に結紮した後、再灌流して、AODFで観察すると、白血球の rolling と ent-

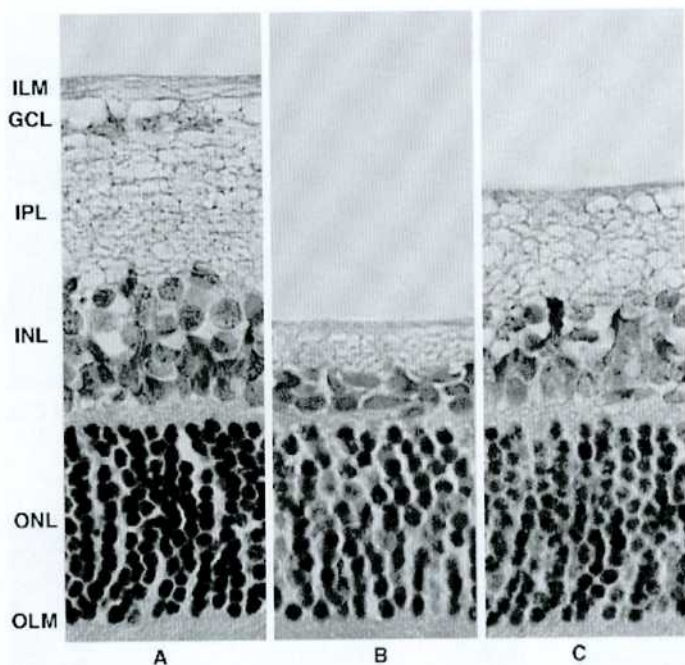


Fig. 5. Light micrographs of the retina at a distance of 1.5 mm from the center of the optic nerve head. (A) Nonoperated control rat. (B) Vehicle-treated rat at 168 hours after reperfusion. (C) 17 $\beta$ -estradiol-treated rat at 7 days after reperfusion. ILM, inner limiting membrane; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; OLM, outer limiting membrane.

rapment (Fig. 4) が観察され、これが1週間後の網膜内層の萎縮と相関することを見出した<sup>21)</sup>。この系では、抗P-セレクチン抗体、抗ICAM-1抗体、pravastatin、17- $\beta$  estradiol、FK 506などに神経保護効果があることがわかった<sup>22)~25)</sup> (Fig. 5)。また抗血小板抗体を投与し

て血小板数を減らすと、白血球と血管内皮の相互作用が抑制され、神経保護効果があることが判明した<sup>26)</sup>。同様に抗トロンビン効果をもつ argatroban も、虚血再灌流障害に対して保護作用があることがわかった<sup>27)</sup>。

## 最 後 に

以上のように白血球を通して網膜微小循環を観察すると、様々な循環障害が白血球と血管内皮障害により惹起されることがわかる。今までのように血流速度や血流量だけでは測れない色々な出来事が血管内で起こっている。特に網膜循環は他の器官にない特色を持ち、わずかな変化が鋭敏な視機能に影響する。最近の分子生物学の進歩により、インテグリンなどの接着分子や様々なサイトカインが

明らかになり、白血球と血管内皮細胞との相互関係が分かってきている。そのような *in vitro* で得られた知見が、実際に *in vivo* でどのように起こっているかを観察できる点で、我々の方法は今後も様々な知見を得ることができると確信している。

## 文 献

- 1) Sutton Dw, Havstad PK, Kemp JD: Elevation of organ resistance due to leukocyte perfusion. *Am J Physiol* 262: 1646-1650, 1992
- 2) 宮坂昌之. 接着分子の機能制御と抗炎症. 現在の到達点と展望. *炎症* 17: 459-467, 1997
- 3) Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, et al: Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 123-130, 1995
- 4) Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, et al: Visualization and quantitative analysis of leukocyte dynamics in retinal microcirculation of rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1341-1347, 1996
- 5) Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, et al: *In vivo* demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2190-2194, 1998
- 6) Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al: Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10836-



10841, 1999

- 7) Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, et al : Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1153–8, 2000
- 8) Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, et al : Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol* 133 : 373–85, 2002
- 9) Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) - induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol* 156 : 1733–9, 2000
- 10) Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, et al : PKC-beta inhibitor (LY333531) attenuates leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2702–6, 2000
- 11) The PKC-DRS study group : The effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with moderately severe to very severe nonproliferative diabetic retinopathy : initial results of the Protein Kinase C beta Inhibitor Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS) multicenter randomized clinical trial. *Diabetes* 54 : 2188–97, 2005
- 12) Miljanovic B, Glynn RJ, Nathan DM, et al : A prospective study of serum lipids and risk of diabetic macular edema in type I diabetes. *Diabetes* 53 : 2883–2892, 2004
- 13) Miyahara S, Kiryu J, Yamashiro K, et al : Simvastatin inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Pathol* 164 : 1697–706, 2004
- 14) Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, et al : Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1440–4, 2005
- 15) Miyamoto K, Ogura Y, Hamada M, et al : In vivo quantification of leukocyte behavior in the retina during endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 2708–15, 1996
- 16) Miyahara S, Kiryu J, Miyamoto K, et al : In vivo three-dimensional evaluation of leukocyte behavior in retinal microcirculation of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 4197–201, 2004
- 17) Miyamoto K, Ogura Y, Hamada M, et al : In vivo neutralization of P-selectin inhibits leukocyte-endothelial interactions in retinal microcirculation during ocular inflammation. *Microvasc Res* 55 : 230–40, 1998
- 18) Yamashiro K, Kiryu J, Tsujikawa A, et al : Suppressive effects of selectin inhibitor SKK-60060 on the leukocyte infiltration during endotoxin induced uveitis. *Br J Ophthalmol* 87 : 476–80, 2003
- 19) Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, et al : Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (3) : 1274–9, 2003
- 20) Yamashiro K, Kiryu J, Tsujikawa A, et al : Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1553–60, 2001
- 21) Tsujikawa A et al. In vivo evaluation of leukocyte dynamics in retinal ischemia reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 793–800, 1998
- 22) Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, et al : Retinal ischemia-reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1183–90, 1999
- 23) Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, et al : Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 120 : 1707–13, 2002
- 24) Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, et al : Administration of 17beta-estradiol attenuates retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2689–96, 2000
- 25) Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, et al : Tacrolimus (FK506) attenuates leukocyte accumulation after transient retinal ischemia. *Stroke* 29 : 1431–7, 1998
- 26) Nishijima K, Kiryu J, Tsujikawa A, et al : Platelets adhering to the vascular wall mediate postischemic leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 977–84, 2004
- 27) Miyahara S, Kiryu J, Tsujikawa A, et al : Argatroban attenuates leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions after transient retinal ischemia. *Stroke* 34 : 2043–9, 2003