

実験動物に対するフルオロフォトメトリーの検討

石子 智士¹⁾, 吉田 晃敏¹⁾, 北谷 智彦¹⁾, 安孫子 徹¹⁾
森 文彦¹⁾, 門 正則¹⁾, 高橋 正年¹⁾, 斉藤 敬司²⁾

¹⁾旭川医科大学眼科学教室, ²⁾CSK リサーチパーク

要 約

小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロフォトメーター(フルオロトロンマスター®)の有用性をラット眼で検討した。さらに、この装置を実験動物として有望な霊長類ツパイに応用するための測定条件を検討した。希釈した数種類のフルオレセインの測定から、この装置の最適測定領域は $0.5 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ と判明したので、血液眼柵透過性機能を評価するためのフルオロフォトメトリーの条件として、ツパイを用いる場合、蛍光強度測定時期は蛍光色素静注30分後、そして蛍光色素の静注量は2 mg/kgが適当と判断された。また、血漿中非

蛋白結合フルオレセイン濃度を測定するに当たり、ヘマトクリット管を用いた少量の採血でも限外濾過が十分可能であり、採血により実験動物に与える侵襲を最小限にできることが判明し、この測定法は、実験動物を用いた各種疾患モデルにおける血液眼柵透過性機能の変化をとらえるために有用であることが示唆された。(日眼会誌 100: 257-261, 1996)

キーワード: フルオロフォトメーター, 小動物眼測定用アダプター, 血液眼柵透過性機能, ツパイ

Fluorophotometry of the Animal Eye

Satoshi Ishiko¹⁾, Akitoshi Yoshida¹⁾, Norihiko Kitaya¹⁾,
Tohru Abiko¹⁾, Fumihiko Mori¹⁾, Masanori Kado¹⁾,
Masatoshi Takahashi¹⁾ and Keiji Saito²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College

²⁾CSK Research Park

Abstract

We assessed the usefulness of the Fluorotron Master® fitted with a small animal adapter. We also discuss the measurement conditions for the tupai, which is a promising experimental mammal. A good concentration for measurements with this instrument ranged from 0.5×10^{-8} to $1.0 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$. A suitable time for fluorophotometry of the tupai was 30 min. after injection of fluorescein-Na, and a suitable dose of the fluorescein-Na was 2 mg/kg. We could do ultrafiltration for measurement of the

protein unbound fluorescein concentration from a minimal sample of the blood using a hematocrit tube, and thus could reduce the deleterious effects of blood sampling on the animal. This instrument is useful for the estimation of the blood-ocular barrier permeability of animal models. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 257-261, 1996)

Key words: Fluorophotometer, Small animal adapter, Blood-ocular barrier, Tupai

I 緒 言

フルオロフォトメトリーは、各種疾患における血液眼柵透過性機能を評価する方法として臨床的に^{1)~6)}、あるいは基礎的研究に^{7)~12)}用いられている。中でもフルオロトロンマスター®(OcuMetrics社製, USA)は、汎用型フ

ルオロフォトメーターとして臨床的に用いられてきたが^{13)~15)}、近年、小動物眼測定用の専用アダプターが開発され、これを本体に装着することにより、小動物眼の眼内蛍光測定が可能となった。しかしながら、実際にこの装置を用いて小動物の眼内蛍光強度を測定した報告は、今日までにVineら¹⁶⁾の報告のみである。

別刷請求先: 078 北海道旭川市西神楽4線5号 旭川医科大学眼科学教室 石子 智士
(平成7年9月19日受付, 平成7年11月17日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Ishiko, M.D. Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, 4-5 Nishikagura, Asahikawa-shi, Hokkaido 078, Japan

(Received September 19, 1995 and accepted in revised form November 17, 1995)

そこで今回我々は、動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®の有用性について、これまで報告のあったラットを用いて評価した。さらに、この装置を霊長類の実験動物として有望なツパイ^{17)~19)}に用いるための条件を検討した。

II 実験方法

本実験を行うに当たり、動物を用いた測定に際しては、塩酸ケタミン(ケタラール®)の筋注およびペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)の腹腔内注射で麻酔を行い、アトロピン0.1mgを腹腔内注射した。さらに、1%アトロピン点眼により調節を麻痺させ、ミドリリンP®, 5%塩酸フェニレフリン(ネオシネジン®)を用いて散瞳させた後測定を行った。

なお、動物を扱うに当たり倫理的問題に十分配慮し、総理府告示の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に準じて実験を行った。

1. 小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®の有用性の検討

フルオロトロンマスター®に小動物眼測定用アダプターを装着することにより、小動物の眼内蛍光強度の測定が可能であることを確認するため、これまで報告のあるラットを対象として測定した¹⁶⁾。はじめに1%アトロピンを点眼し、1時間後に眼内自然蛍光を測定した。次に、過去の報告に従い、10%フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®, 日本アルコン社製)14mg/kgを尾静脈から静注し、その1時間後に小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®を用いて眼内蛍光強度を測定した。

2. フルオロトロンマスター®の最適測定領域の検討

フルオロトロンマスター®を用いて血漿中の蛍光強度を測定する場合、蛍光測定用セルに検体を入れ、血漿蛍光測定用アダプターを装着して測定を行う。そこで、はじめに蛍光測定用セル自体の蛍光強度を2回測定した。次に、フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)を 1.0×10^{-5} g/mlから10倍ずつ希釈し、 1.0×10^{-10} g/mlまでの溶液を9種類作製し、これを蛍光測定用セルに入れ、それぞれの濃度を2回測定した。この蛍光測定は、フルオロトロンマスター®に血漿蛍光測定用アダプターを装着して行った。

3. 蛍光強度測定時期の検討

血液網膜透過性機能の評価をするのに際し、取り分けコンピューターシミュレーション法で解析する場合には、網膜直前から硝子体中の蛍光強度が最も重要である²⁰⁾²¹⁾。したがって、眼内蛍光強度測定を行うに当たり、この領域の蛍光強度の値が使用するフルオロフォトメーターの最適蛍光測定領域にあることが必要である。この蛍光値は時間とともに変化し、平衡状態に達するまでは、網膜中の蛍光強度は減弱し硝子体中の蛍光強度は増強す

る。この硝子体中の蛍光強度が強くなり、網膜側から硝子体側への勾配がなくなると、コンピューターシミュレーションに大きな誤差が生じることになる。そのため、硝子体中には測定可能な蛍光色素が漏出するように、蛍光強度測定のタイミングと静注する蛍光色素の濃度を設定する必要がある。そこで、まず蛍光色素静注後の時間経過に伴う眼内蛍光の変化を検討した。

対象として、成熟ツパイ1匹を用いた。眼内蛍光強度測定には、小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®を用いた。ヒトで用いられているフルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)の静注量7mg/kgを尾静脈から静注し、静注後の眼内蛍光強度の変化を経時的に記録した。静注後3分から1分毎に10回測定し、その後30分まで5分毎に、30分以降は5~10分の間隔をあけて65分まで測定した。

4. 蛍光色素静注量の検討

静注後のフルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)の動態や血液眼網透過性機能は、動物の種族による差がある可能性がある。したがって、ツパイにフルオロフォトメトリーを行うに当たり、蛍光色素の静注量をヒトと同じ量で可能か否かは不明である。そこで、蛍光色素静注後30分における網膜から硝子体中の蛍光強度が、フルオロトロンマスター®の最適蛍光測定領域にあるように静注量を検討した。

対象として、成熟ツパイ8匹を用いた。眼内蛍光強度測定には、小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®を用いた。ツパイの尾静脈から、それぞれ1, 2, 5, 7mg/kgのフルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)を静注し、30分後の眼内蛍光強度を測定した。蛍光色素は1mg/kgおよび2mg/kgのものは生理食塩水で2倍希釈し、それ以外は原液を用いた。それぞれ、マイクロピペットで必要量を採取し、27G針付きの注射器で静注した。

5. 血漿中非蛋白結合フルオレセイン(PUF)濃度測定における検体量による影響の検討

これまで、血漿中の非タンパク結合フルオレセイン(protein unbound fluorescein, PUF)濃度の測定に際しては十分な血液量を必要とした。そのため、ラットなど小動物のフルオロフォトメトリーに関しては、ときとして頸静脈などからの採血もせざるを得ず、結果的に実験動物を死亡させることもあった。このため、コンピューターシミュレーションに必要なPUF濃度は、ヒトで用いられていたように各実験毎に限外濾過を行うことは容易ではなく、あらかじめ求めた全血中のフルオレセイン濃度とPUFとの回帰式から推定して用いていた²²⁾。しかしながら、各種条件下での経時的な変化をとらえることを目的とした場合、各個体において数回のフルオロフォトメトリーを行う必要が生じる。そのため、PUF濃度の測定に際し、その採血量は必要最小限に抑える必要がある。

そこで、限外濾過前の検体量による影響を検討した。

対象は、糖尿病患者 2 名とした。蛍光眼底写真撮影時にインフォームド・コンセントを得て、蛍光色素静注後 10 分の血液を採取した。採血した血液を遠心分離 (1,500 G, 10 分) によって血漿を分離した。これを同一検体から 30, 40, 50, 100, 150, そして 300 μ l をマイクロピペットで取り出し、この血漿をそれぞれ MPS-II filter (Amicon Co, USA) によって限外濾過 (2,000 G, 15 分) した。このようにして得られた血漿を 100 倍の濃度に薄めて、その蛍光強度すなわち PUF 濃度を比較した。

なお、この蛍光測定は、フルオロトロンマスター® に血漿蛍光測定用アダプターを装着して行った。

III 結 果

1. 小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター® の有用性の検討

眼内蛍光強度曲線は、蛍光色素静注前では、網脈絡膜および水晶体に相当して高い蛍光強度を示した。蛍光色素静注後には、網脈絡膜に相当してピークを作り、硝子体内には中に漏出したフルオレセインを反映して、網脈絡膜ピークからなだらかな傾きを示した。また、水晶体で蛍光強度が増強し、前房で最も高い値を示した (図 1)。これらの蛍光色素静注前および静注後の蛍光強度曲線のパターンは、ヒトおよびサルを用いて得られたものと同様であった。

2. フルオロトロンマスター® の最適測定領域の検討

2 回測定した蛍光測定用セル自体の蛍光強度は、 5.7×10^{-9} および 3.8×10^{-9} g/ml であった。したがって、 1.0×10^{-9} g/ml と 1.0×10^{-10} g/ml のフルオレセイン溶液の蛍光強度は、蛍光測定用セル自体の蛍光強度に著しい影響を受けるため、この濃度での測定結果は除外して考える

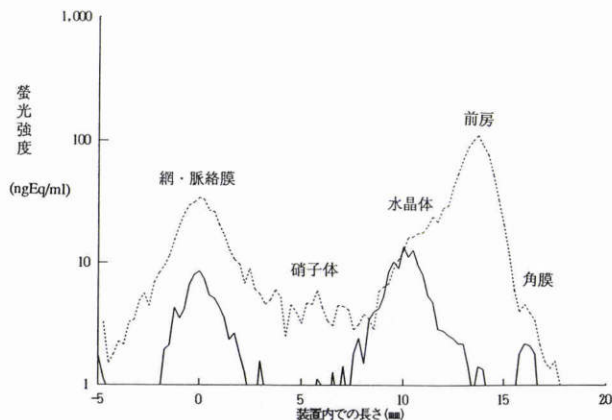


図 1 ラットの眼内蛍光強度曲線。

横軸は装置内の長さ (mm)、縦軸は蛍光強度 (ngEq/ml)。蛍光色素静注前の眼内自然蛍光強度曲線 (—) では、網脈絡膜と水晶体に相当して高い蛍光強度を示す。蛍光色素静注 1 時間後の眼内蛍光強度曲線 (----) では、硝子体および前房中に蛍光色素の漏出が認められる。

必要があることが判明した。図 2 に、希釈したフルオレセインの濃度とフルオロトロンマスター® で測った測定値との関係を示す。両者は、上記の濃度を除外した $0.5 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ g/ml までは直線的に変化しており、この範囲における両者の相関を調べると、有意な正の相関関係を認めた ($r=0.99, p<0.01$)。

3. 蛍光強度測定時期の検討

ツパイを用いて得られた経時的な蛍光強度曲線の変化のうち、代表例として図 3 に静注後 3 分、30 分、そして 60 分のデータを示す。静注後 3 分ではまだ蛍光色素の硝子体内への漏出は十分ではないが、時間の経過とともに網脈絡膜ピークから硝子体内への蛍光強度曲線がなだらかに形成された。しかし、静注後 60 分では蛍光強度曲線は

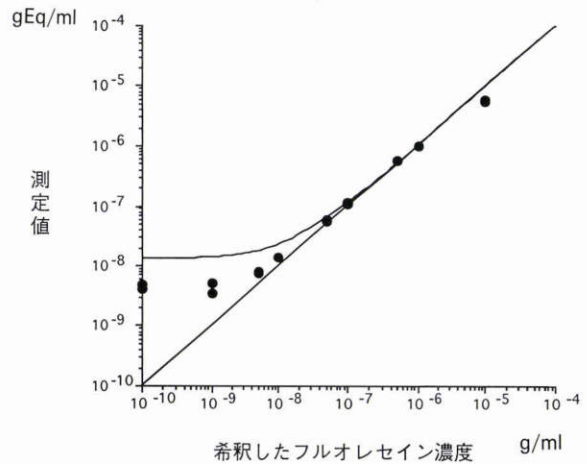


図 2 希釈したフルオレセインの濃度とフルオロトロンマスター® で測定した蛍光強度との関係。
 $0.5 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ の範囲では、両者は直線的に変化していた ($y=0.997x+1.29e-8, r=0.99$)。

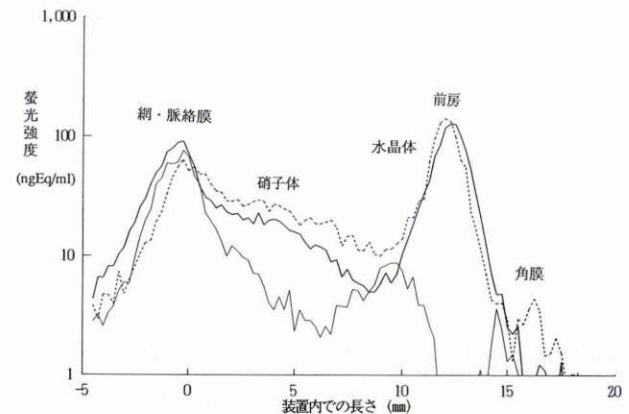


図 3 ツパイにおける蛍光色素静注後の眼内蛍光強度曲線の変化。

横軸は装置内の長さ (mm)、縦軸は蛍光強度 (ngEq/ml)。—, —, 及び --- は、それぞれ蛍光色素静注後、3 分、30 分、そして 60 分を表す。静注後 3 分では硝子体腔への蛍光漏出は小さく、静注後 60 分では硝子体中の蛍光漏出が増大し、蛍光強度曲線がなだらかとなっている。

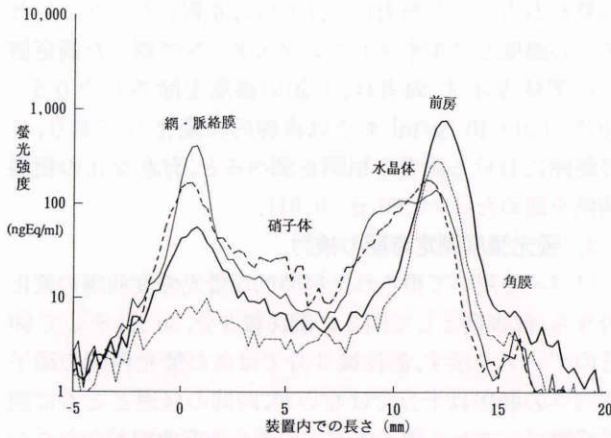


図4 蛍光色素静注量によるツパイの眼内蛍光強度曲線の変化。

横軸は装置内での長さ(mm),縦軸は蛍光強度(ngEq/ml)。—,---,---そして---は,それぞれ体重kgあたりの蛍光色素静注量が7,5,2,そして1mgを表す。7および5mg/kg静注では眼内蛍光強度が強く,網膜ピークも高く,1mg/kg静注ではフルオロトロンマスター®の最適測定領域の下限に迫っている。2mg/kg静注では網膜ピークが最適測定領域におさまっている。

表1 採取血液量による蛍光強度の変化

採取血液量(μl)	蛍光強度(×10 ⁻⁶ mg/ml)	
	対象1	対象2
30	10.9	14.8
40	11.1	13.5
50	12.2	10.2
100	12.3	13.4
150	11.5	13.4
300	10.9	12.8

平坦に近く,コンピューターシミュレーションを行う上で誤差が生じやすくなっていることが判明した。したがって,ツパイ眼の眼内蛍光強度測定は蛍光色素静注後30分が適当と考えた。

4. 蛍光色素静注量の検討

図4に,それぞれの静注量で得られた,ツパイにおける30分後の蛍光強度曲線を示す。静注量が7mg/kgと5mg/kgでは眼内蛍光強度が強く,フルオロトロンマスター®の最適測定領域を越え,静注量1mg/kgでは最適測定領域を下回る傾向にあった。ここで,高値を示す網脈絡膜ピークからの硝子体側への影響,いわゆる tailing effect を考えると,できるだけ網脈絡膜ピークが最小になる濃度の方が好ましい。したがって,網膜付近の蛍光強度がフルオロトロンマスター®の最適蛍光測定領域にあった2mg/kgが静注量として適当と考えられた。

5. 血漿中 PUF 濃度測定における検体量による影響の検討

表1に,同一検体から得られた血漿の採血量と PUF

濃度との関係を示す。測定した PUF 濃度は,採取した血漿量に依存せず,少量(30 μl)の検体量でも測定が可能であることが示唆された。

IV 考 按

臨床的に用いられているヒトを対象としたフルオロトロンマスター®の測光領域(focal diamond)の前後径は850 μmmであるが,小動物用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®で測定した focal diamond の大きさは,OcuMetrics社の測定結果によると466 μmであり,したがってこの装置を用いることにより,1mm程度の硝子体腔長しか持たないラットにおいても計算上眼内蛍光の測定が可能である。本研究により,ラットのような眼球の小さい小動物においても,ヒトから得られたと同様に眼内蛍光強度を測定し,解析出来ることを実際に確認した。したがって,小動物を用いた眼科領域の実験モデルにおいて,フルオロトロンマスター®に動物眼測定用アダプターを装着すれば,血液眼網透過性機能の変化を検討することをできることが示唆された。

一方,ツパイは成熟体でも150g程度の小動物であるが,霊長類に属すると考えられている。成長が速く3か月で成熟する一方で,寿命も約7年と長いこと各種の実験動物として期待されるが,取り分け錐体が発達し色覚を有すること,立体視が可能なこと,そして視覚領が発達していることなど,眼科領域の実験動物として有望である¹⁷⁾¹⁸⁾。しかしながら,今日までツパイの眼内蛍光強度を測定した報告はなく,したがって,ツパイにフルオロフォトメトリーを行うに当たり,その測定条件を検討する必要があった。そこでまず,この装置の最適蛍光強度測定領域を検討し,血液網膜網透過性機能の評価に用いられるコンピューターシミュレーションに重要な網膜直前から硝子体中の蛍光強度がこの領域に含まれるように蛍光強度測定の時期と静注する蛍光色素の量を検討した。その結果,ツパイでは2mg/kgのフルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)を静注し,静注前および静注30分後に眼内蛍光強度を測定することが適当であると考えられた。

また,血漿中の PUF 濃度は,コンピューターシミュレーション法を用いるか否かにかかわらず,得られた眼内蛍光強度の補正のために重要である。しかしながら,小動物において頻回または大量の採血をすることは容易ではなく,可能な限り少ない回数で,しかも少量の採血での方法が望まれる。今回の我々の結果から,採血量の違いによる蛍光強度の著しい変化は認めず,30 μlの血漿が得られれば血漿中非蛋白結合フルオレセイン濃度を測定できることが判明した。そこで我々は,採血部位から27G針で採血し,その血液をヘパリン加工したヘマトクリット管(Capillary Tube, Drummond Scientific Co, USA)数本に採取する方法を用いることにした。このヘマトク

リット管1本で約50 μ lの血液を採取することができ、ツパイのHtが約50%であることから、2本採血できれば少なくとも40 μ l以上の血漿を得ることが出来るため、少ない採血量で十分測定が可能と考えられた。さらに、この採血量であれば2回の採血でもツパイに与える侵襲は少なく、全身状態を良好に保ちながら実験を継続することが可能と考えられた。

以上から、小動物眼測定用アダプターを装着したフルオロトロンマスター®を用いることにより実験小動物、取り分けツパイの眼内蛍光強度を測定できることが示唆された。今後、この方法を用いて、ツパイを用いた各種実験モデルにおける血液眼内透過性機能変化を解析していきたい。

稿を終えるに当たり、貴重な御助言をいただきましたCopenhagen大学Michael Larsen博士に深謝いたします。

本研究は、文部省科学研究費(一般研究B 05454466, 奨励研究A 06771477), 千代田生命健康開発事業団社会厚生事業助成, および秋山財団研究助成の補助を得て行われた。

文 献

- 1) Cunha-Vaz JG, de Abreu JRF, Campos AJ: Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol* 59: 649-656, 1975.
- 2) Bursell SE, Delori FC, Yoshida A, Parker JS, Collas G, McMeel JW: Vitreous fluorophotometric evaluation of diabetics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 703-710, 1984.
- 3) Yoshida A, Ishiko S, Kojima M, Ogasawara H: Permeability of the blood-ocular barrier in adolescent and adult diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 77: 158-161, 1993.
- 4) Yoshida A, Kojima M, Ogasawara H, Ishiko S: Oscillatory potentials and permeability of the blood-retinal barrier in noninsulin-dependent diabetic patients without retinopathy. *Ophthalmology* 98: 1266-1271, 1991.
- 5) 石子智士, 吉田晃敏, 高橋正年, 横山哲朗, 福井勝彦: 網膜症発現前の若年糖尿病患者における水晶体自然蛍光と血液眼内透過性機能. *臨眼* 46: 203-206, 1992.
- 6) 萱澤文男, 三宅謙作: Fluorophotometryの臨床. *眼紀* 38: 1079-1094, 1987.
- 7) Yoshida A, Ishiko S, Kojima M, Lipsky SN: Blood-ocular barrier permeability in Monkeys. *Br J Ophthalmol* 76: 84-87, 1992.
- 8) Yoshida A, Ishiko S, Kojima M: Outward permeability of the blood-retinal barrier. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230: 78-83, 1992.
- 9) Yoshida A, Ishiko S, Kojima M, Hosaka A: Perméabilité de la barrière hémato-oculaire dans la myopie expérimentale. *J Fr Ophthalmol* 13: 481-488, 1990.
- 10) 石子智士, 吉田晃敏, 保坂明郎: 猿を用いた実験近視における屈折および血液眼内透過性機能の変化. *日眼会誌* 95: 522-529, 1991.
- 11) Jones GW, Cunha-Vaz J, Zweig KO, Stein M: Kinetic vitreous fluorophotometry in experimental diabetes. *Arch Ophthalmol* 97: 1941-1943, 1979.
- 12) 渡辺正樹, 能美俊典, 藤井正満, 渋谷勇三: サル眼網膜に対するアルゴンレーザー光凝固後のVitreous Fluorophotometry. *日眼会誌* 85: 323-334, 1985.
- 13) Bek T, Lund-Anderson H: Localized blood-retinal barrier leakage and retinal light sensitivity in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 74: 388-392, 1990.
- 14) Jackson WE, Chase P, Garg SK, Barlett DA, Hoops S, Harris S, et al: Vitreous fluorophotometry in insulin-dependent diabetes mellitus. Correlation with microalbuminuria and diastolic blood-pressure. *Arch Ophthalmol* 108: 1733-1735, 1990.
- 15) 山本文昭, 田中利和, 小椋祐一郎: 自発蛍光測定による水晶体透過性の検討—糖尿病患者について—. *日眼会誌* 92: 1171-1176, 1988.
- 16) Vine AK, Kisly AM, Betz L, Howatt WF: Vitreous fluorophotometry in rats with streptozocin-induced diabetes. *Arch Ophthalmol* 102: 1083-1085, 1994.
- 17) Luckett WP: Comparative Biology and Evolutionary Relationship of Tree Shrews. Plenum Press, New York, USA, 3-29, 1980.
- 18) 辻紘一郎: 実験動物としてのツパイ(Tupaia glis). *実験医学* 1: 183-187, 1983.
- 19) 堤 秀樹, 萬 啓悟, 斉藤敬司: ツパイ. *アニテック* 7: 207-210, 1995.
- 20) 吉田晃敏, 保坂明郎: 近視眼におけるBlood-Retinal Barrierの研究—Vitreous FluorophotometryとComputer Simulation法を用いた解析—. *日眼会誌* 90: 527-533, 1986.
- 21) 吉田晃敏, 村上喜三雄, 小島 満: Vitreo-Retino-Ciliary Barrierの研究5. 正常眼における網膜内方透過性係数及び硝子体内拡散係数の加齢による変化. *日眼会誌* 90: 589-594, 1986.
- 22) 福井康夫, 吉田晃敏, 野見山豪, 高橋正年, 小島 満: 自然発症糖尿病チャイニーズハムスターにおける血液眼内透過性機能. *日眼会誌* 96: 328-334, 1992.