

# Fluorescein isothiocyanate 標識血小板による 網膜血管内皮障害の観察 (図 5)

白木 邦彦・森脇 光康・三木 徳彦 (大阪市立大学医学部眼科学教室)

## 要 約

白色ラットにおいて Fluorescein isothiocyanate を用いて標識した血小板 (以下 FITC 標識血小板) による網膜血管内皮障害部位検出の可能性について、網膜伸展標本を用いて蛍光顕微鏡下に検討した。光凝固により凝固閉塞した網膜主幹血管を血管障害モデルとし、標識血小板の集積の有無を凍結切片標本をも併せて観察した。さらにダイ・レーザーの黄色 (577nm) および赤橙色 (600nm) 光を用いて、ヘモグロビンによる吸収率の差によって生じる血管直接光凝固効果の差が標識血小板の集積の差として生じるかどうか検討した。凝固閉塞に至らしめた血管では標識血小板の集積が伸展標本・凍結切片標本ともにみられた。またダイ黄色光レーザーでの光凝固部位では標識血小板の集積が見られたが、赤橙色光では集積が見られず、凝固効果の差が標識血小板の集積の差として認められ、本方法の有用性が確認された。(日眼会誌 93: 339—345, 1989)

キーワード: Fluorescein isothiocyanate, 血小板, 網膜血管内皮障害, ダイ・レーザー光凝固, 網膜伸展標本

---

## Detection of Retinal Vascular Endothelial Damage by Fluorescein Isothiocyanate-labelled Platelet

Kunihiko Shiraki, Mitsuyasu Moriwaki, Tokuhiko Miki

*Osaka City University Medical School, Department of Ophthalmology*

### Abstract

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled platelets were prepared in Sprague Dawley rats, and brought back into the rat through their femoral veins. Their ability to detect the photocoagulation-induced damage in the occluded retinal vessels was examined by epifluorescence microscopy in whole mount retinal specimens and cryostat specimens. The photocoagulation effects on the major retinal vessels by yellow dye (577nm) and orange red (600nm) laser, with parameters of 100 $\mu$ , 0.05sec, 70mW and 3 exposures were compared. The occluded vessels showed extensive accumulation of labelled platelets in the specimens. The portions photocoagulated by the yellow laser also showed accumulation, but not those by the orange red laser. This difference was considered to be due to the difference of hemoglobin absorption at each wavelength. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 339—345, 1989)

**Key words:** Fluorescein isothiocyanate, Platelet, Retinal vessel, Dye laser photocoagulation, Retinal whole mount specimen

---

別刷請求先: 545 大阪市阿倍野区旭町 1—5—7 大阪市立大学医学部眼科学教室 白木 邦彦  
(平成元年 1 月 13 日受付, 平成元年 1 月 31 日受理)

Reprint requests: Kunihiko Shiraki, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka City  
University Medical School

1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

(Received January 13, 1989 and accepted January 31, 1989)

## I 緒 言

網膜血管網を広範囲にわたって検索する場合、in vivo での蛍光眼底造影検査、in vitro での HRP<sup>1)</sup> 注入網膜伸展標本、トリプシン消化網膜血管伸展標本<sup>2)</sup>、樹脂注入血管鋳型標本<sup>3)</sup>などがあげられる。今回広範囲にわたって検索できる網膜伸展標本を用い、かつ Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC) によって標識した血小板 (以下標識血小板) を作成し、血管内皮の障害部位に標識血小板が付着することを応用して、網膜血管内皮障害検出の可能性について検討した。実験方法としては、ラット網膜血管を光凝固し凝固閉塞部位に標識血小板の集積を確認した後、本法の応用例としてダイ・レーザーの黄色光 (577nm) と赤橙色光 (600nm) とによる網膜血管直接光凝固の際に、両者の凝固効果の差として標識血小板集積の差が現れうるかを検討した。

## II 実験方法

### 1) Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC) によって標識した血小板の作成方法

2匹の Sprague Dawley rat (白色ラット, 雄, 約体重 300g) を ketamine hydrochloride (20mg/体重 kg) および pentobarbital Na (20mg/体重 kg) にて腹腔内麻酔し、1匹のラットから13から15mlを、また他方のラットから5mlを大腿動脈より採血した。採取した血液には容積率10%分の3.1% sodium citrate を混入した。血小板への FITC 標識に際しては Klaverkamp らの方法<sup>4)</sup>に概ねしたが、FITC 4mg (Sigma 社) を RCD 溶液 (Ringer 液: 3.1% sodium citrate: 5% glucose 液 = 7: 2: 1) 100ml に溶解し pH 7.2 に調整し、FITC 染色溶液として使用した。採取血液を 200g にて 20°C 10 分間遠沈して platelet rich plasma を作成、さらに 430g にて 20°C 10 分間遠沈し血小板を分離し、得られた血小板沈渣に FITC 溶液 5ml を加え、37°C にて 10 分間 incubate した。その後 20°C 430g にて遠沈し、血小板沈渣に RCD 溶液 5ml を加えて FITC 標識血小板液とした。これらの血小板の fluorescein の蛍光を確認するため、落射型蛍光顕微鏡 (Olympus model BHS-RFK, 光源: 100W 超高圧水銀灯) にて観察し、Fuji chrome P1600 を用いて撮影した。なお fluorescein の蛍光観察に際し、BP490 励起フィルター-EY455 補助励起フィルター-OM500 吸収フィルター (0515) G520 補助吸収フィルターを用いた。

### 2) ダイ・レーザーによる光凝固実験への応用

#### ① ラット網膜血管を凝固閉塞した場合

1) の 5ml の血液を採取した方のラットにおいて、platelet rich plasma を採取した残りの自己血球成分を下腿静脈よりもどし、さらに用意した 5ml の FITC 標識血小板液を緩徐に静脈注射した。あらかじめミドリリン-P にて散瞳させておいたラット眼を直ちに、Coherent 社製 920 型アルゴン/ダイ・レーザー光凝固装置にて 577nm の黄色光を用い、スポットサイズ 100  $\mu\text{m}$ ・照射時間 0.1 秒・強さ 80mW の条件で網膜主幹動静脈を painting technique にて凝固閉塞させた。光凝固部の血管透過性亢進を応用して光凝固部位を確認するため、光凝固後 Rhodamine isothiocyanate dextran 70s (Sigma 社) 0.07g を 0.1M 磷酸緩衝液 0.4ml (pH 7.4) に溶解して静注した後眼球を摘出した。網膜の伸展標本を作成してグリセリンに封入後、前述の落射型蛍光顕微鏡にて観察・撮影した。凝固閉塞血管の凍結切片標本の観察に際しては、眼摘後角膜に割を入れ 10% 緩衝ホルマリン液にて 1 時間固定後前眼部を除去し、眼球を乳頭を通して 2 分割した後、0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄、O.C.T. compound (TISSUE-TEK, Miles Scientific 社) に包埋後、クライオスタット (Bright 社製, OT/FAS 型) にて 10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡にて観察・撮影した。なお Rhodamine の蛍光観察に際しては励起フィルター-BP545 補助励起フィルター-EY475 吸収フィルター-DM500 (0590) 補助吸収フィルター-0530 を用いた。なお光凝固していない他眼を対照とした。

② 黄色 (577nm)・赤橙色 (600nm) の各波長のダイ・レーザー光凝固によるラット網膜血管障害の FITC 標識血小板による比較

同様に FITC 標識血小板を投与した Sprague Dawley rat を用意し、同ダイ・レーザー光凝固装置を用いスポットサイズ 100  $\mu\text{m}$ ・照射時間 0.05 秒・強さ 70mW の条件にて、一眼を黄色 (577nm) の波長また他眼を赤橙色 (600nm) の波長にて、網膜主幹血管を光凝固した。なお凝固の際焦点の誤差によるスポットサイズの変化を平均化するため同一部位を連続して 3 回照射した。光凝固後前述の Rhodamine isothiocyanate dextran 70s 溶液を静注した後眼球摘出し、前述のごとく網膜伸展標本を作成し蛍光顕微鏡にて観察・撮影した。

### III 結 果

#### 1) FITC 標識血小板の蛍光

FITC で標識された血小板からは fluorescein による明るい黄緑色の蛍光が観察された (Fig. 1).

#### 2) ダイ・レーザーによる光凝固実験への応用

##### ① ラット網膜血管を凝固閉塞した場合

対象眼：FITC 標識血小板および Rhodamine 色素をラットに静注し正常眼の網膜伸展標本において観察した場合、Rhodamine 色素は網膜血管内に留り血管外への明らかな漏出は認められず、かつ Rhodamine 色素により網膜血管網を毛細血管レベルまで確認できた (Fig. 2-1)。また網膜血管網中には孤立散在性に標識血小板と思われる fluorescein の黄緑色の蛍光を有し

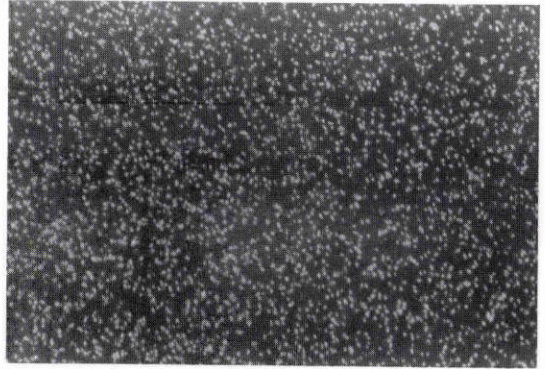


Fig. 1 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled platelet. (originally,  $\times 25$ )  
The labelled platelets showed bright yellowish green fluorescence.

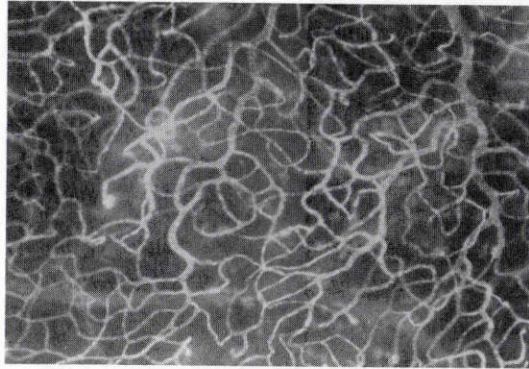


Fig. 2-1

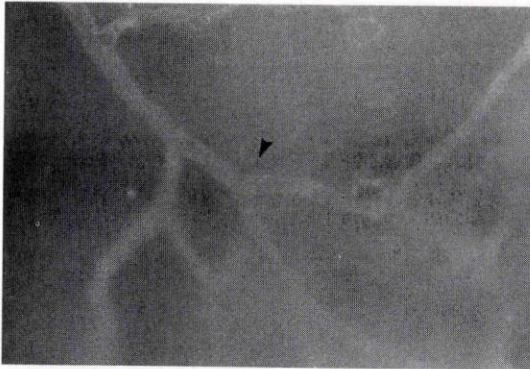


Fig. 2-2a

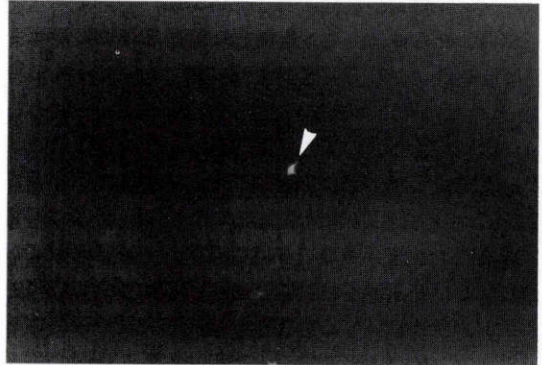


Fig. 2-2b

Fig. 2 Normal retinal vascular network seen in the whole mount specimen.

Fig. 2-1 Rhodamine isothiocyanate 70s dextran clearly delineated the retinal vascular bed up to the capillary level, and stayed in the vascular lumen. (originally,  $\times 50$ )

Fig. 2-2 A yellow green particle of FITC-labelled platelet (Fig. 2-2b, arrow head) was localized at a capillary in the Rhodamine-fluoresced specimen (Fig. 2-2a, arrow head). (originally,  $\times 100$ )

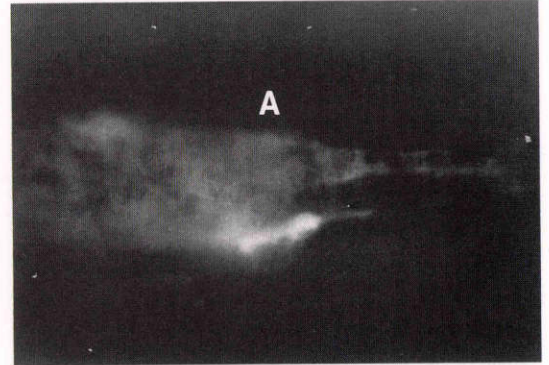
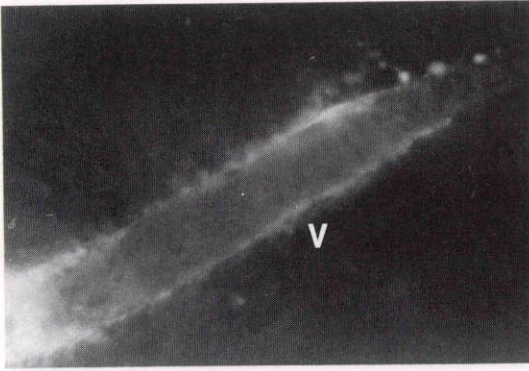


Fig. 3a

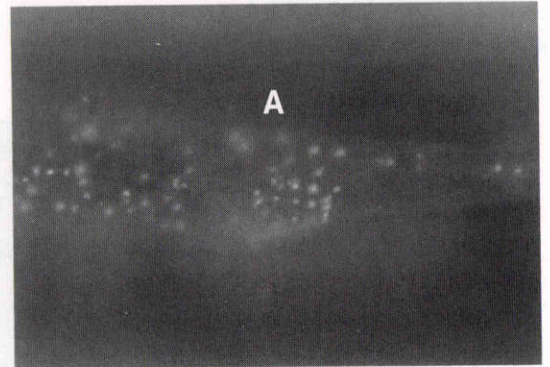
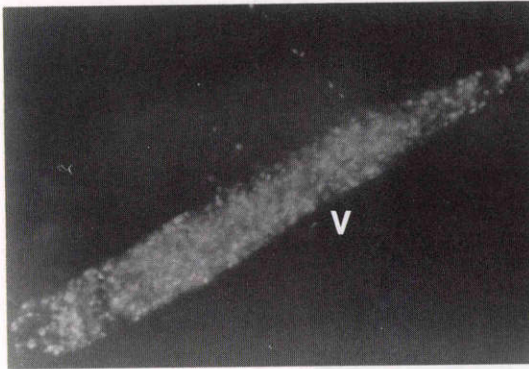


Fig. 3b

**Fig. 3** Retinal major venule and arteriole photocoagulated heavily until their occlusion (whole mount specimen, originally,  $\times 100$ )

Fig. 3a Rhodamine fluorescence was seen outside the vascular lumen, indicating the increased permeability produced by the photocoagulation. (V : venule, A : arteriole)

Fig. 3b Numerous yellowish green particles of FITC-labelled platelets were seen in the vascular lumen. (V : venule, A : arteriole)

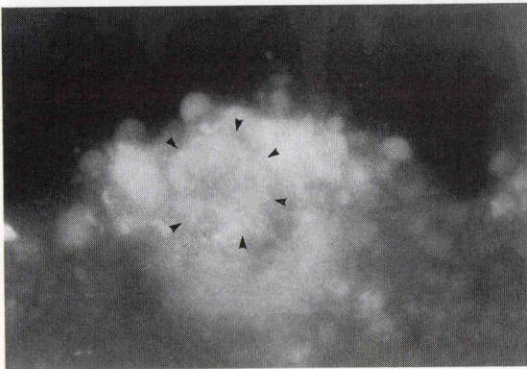


Fig. 4a

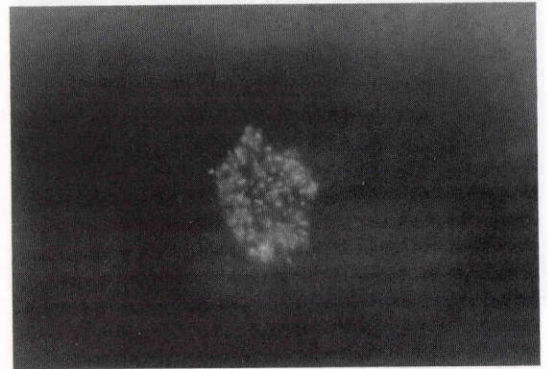


Fig. 4b

**Fig. 4** Heavily photocoagulated retinal major vessel. (10micron thick cryostat section specimen, originally  $\times 100$ ). The vessel was photocoagulated with yellow dye laser (577nm) until their occlusion.

Fig. 4a Heavy Rhodamine fluorescence was seen around the vessel with some Rhodamine-fluorescent precipitates. (Arrow heads delineate the border of the vessel.)

Fig. 4b Yellowish green particles of FITC-labelled platelets were seen in the vascular lumen.

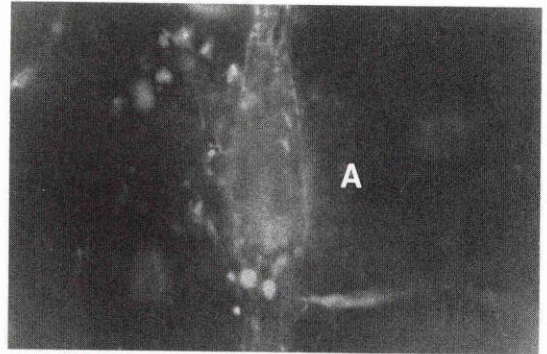
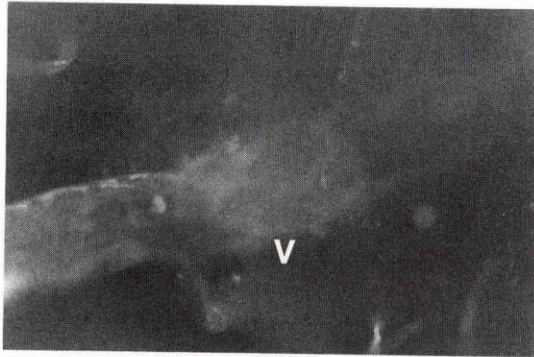


Fig. 5a

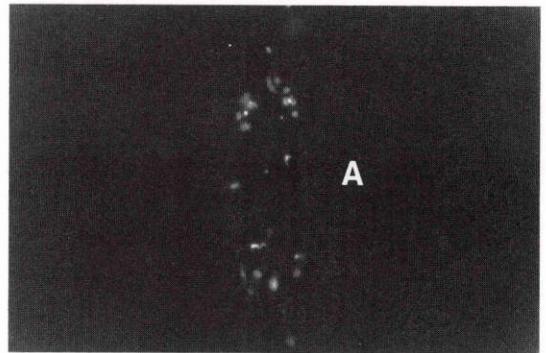
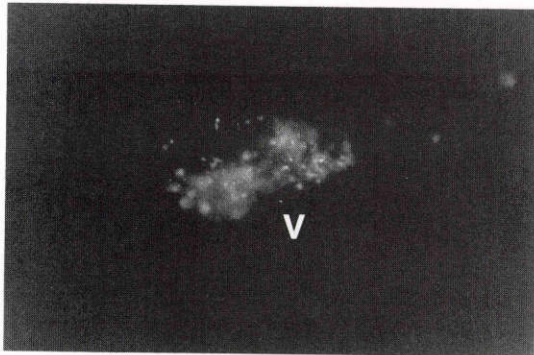


Fig. 5b

**Fig. 5** Retinal major vessel photocoagulated with yellow (577nm) dye laser. (photocoagulation parameters: 100micron spot size, 0.1second exposure time, 100mW, 3exposures, originally,  $\times 100$ )

Fig. 5a Rhodamine fluorescence was seen outside the vascular lumen, indicating the increased permeability by photocoagulation. (V: venule, A: arteriole)

Fig. 5b Yellowish green particles of FITC-labelled platelets were seen in the vascular lumen. They were seen more numerous in the venule than in the arteriole. (V: venule, A: arteriole)

た粒子が認められた (Fig. 2-2)。しかしながら主幹血管から毛細血管のレベルに至るまで蛍光粒子の集積は認められなかった。

光凝固眼：ラット網膜主幹血管を凝固閉塞に至るまで光凝固した場合、その部位の血管の周囲には Rhodamine の赤色蛍光色素の漏出がみられ (Fig. 3a)、血管内には標識血小板によると思われる fluorescein の黄緑色の蛍光を有する粒子が充満していた (Fig. 3b)。凍結切片標本の観察においても光凝固血管周囲に Rhodamine の赤色蛍光色素の漏出がみられ (Fig. 4a)、血管内には FITC 標識血小板によると思われる黄緑色の蛍光を有する粒子がみられた (Fig. 4b)。なお凍結切片標本においても、光凝固されていない主

幹血管では Rhodamine の血管外漏出も標識血小板による蛍光粒子の集積も見られなかった。

② 黄色 (577nm)・赤橙色 (600nm) 光によるダイレーザー光凝固のラット網膜血管への障害。

黄色光 (577nm)・赤色光 (600nm) の各波長にて網膜主幹血管を光凝固した場合、黄色光 (577nm) では Rhodamine 蛍光色素の血管外漏出がみられる凝固部位 (Fig. 5a) に FITC 標識血小板によると思われる黄緑色の蛍光を有する粒子の集積がみられた (Fig. 5b)。赤色光 (600nm) では光凝固したと思われる部位に Rhodamine 蛍光色素の漏出を認めず、また FITC 血小板によると思われる黄緑色蛍光を有する粒子もみられなかった。

#### IV 考 按

Rhodamine 色素を生理的な状態で静注することにより、網膜血管網への色素注入のムラや、注入時の加圧による人工的な血管の拡張を生じることなく、HRP 注入網膜伸展標本においてみられるように網膜血管網を毛細血管レベルまで詳細にかつ生理的な状態で観察することができた。他方、光凝固部のように血管透過性が亢進している部位では、血管外への Rhodamine 色素の漏出として透過性亢進部位が確認できた。しかし血管の透過性亢進の視標として Rhodamine 色素を使用する場合においては、Rhodamine isothiocyanate 70s の分子量が71,200であることおよび光顕的観察のレベルでの判断であることを留意しておく必要がある。ラット網膜主幹血管を凝固閉塞に至るまで直接光凝固した場合、細隙灯顕微鏡下においても光凝固血管内に血栓が生じて血流の途絶しているのが観察できるが、このような部位に FITC 標識血小板の顕著な集積がみられ、Klaverkamp ら<sup>4)</sup>が *in vitro* で指摘したごとく *in vivo* においても FITC 標識血小板の機能は保持されていると考えられた。また遠沈による血小板分離操作により幾分か血小板の活性化が指摘されているが<sup>5)</sup>、今回の網膜伸展標本での広範な検索では光凝固部位以外の血管内には標識血小板の集積は全く認められず、FITC 標識血小板血栓の発生は認められなかった。

網膜血管への直接光凝固の際には、レーザー光の波長に対するヘモグロビン吸収率が凝固効果に影響するといわれている<sup>6)</sup>。今回の凝固条件では、ヘモグロビンに吸収されやすい黄色光(577nm)において、光凝固部位に Rhodamine 色素の血管外漏出および標識血小板の明らかな集積が認められた。黄色光に比べてヘモグロビンに吸収されにくい赤橙色光(600nm)では Rhodamine 色素の血管外漏出も標識血小板集積も全く認められなかった。すなわち、各波長によるヘモグロビン吸収曲線<sup>6)</sup>にみられるように、両波長間でのヘモグロビンによる吸収の差に起因した発生熱量の差が、網膜血管内皮への障害の差となって現れたものと思われる。

最後に、細胞の FITC による標識は Fluorophotometry などにおいて広く使用されている手法であるが、標識した細胞を再度生体に戻す *in vivo* での使用は標識リンパ球のリンパ節における局在<sup>7)</sup>や標識病的血小板の血液中よりの消退程度の観察<sup>8)</sup>などで報

告されているのみである。また同様の手法として、血小板を放射性同位元素にてラベルして体内に戻す方法は血小板シンチグラム<sup>9)10)</sup>として臨床的に血栓症の診断に利用されている。しかし細動静脈レベルの微小血管傷害部位に集積した血小板からの微小な放射線活性検出は困難であり、また *in vitro* での使用においても放射性物質の使用に関わる制限やオートラジオグラフィによる局在の同定に暴露時間を要することなど、臨床および実験に関わらず眼科領域において応用するには困難が予想される。しかし今回の実験のごとく FITC による血小板標識法を用いれば、*in vitro* においては細動静脈レベルにある網膜血管においても障害部位検出が比較的容易であり、さらに今後臨床検査機器において微小な蛍光物質の検出が可能となれば *in vivo* での応用も可能性があるものと考えられる。

最後に、御指導御校閲頂きました松山道郎教授に感謝いたします。なお本論文は、第92回日本眼科学会総会にて発表した。

#### 文 献

- 1) Raviola G, Fredde TF: A simple staining method for blood vessels in flat preparations of ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1518, 1980.
- 2) Shiraki K, Burns MS: Neovascularization in urethane rat retinopathy demonstrated by thymidine labelling. *Curr Eye Res* 5: 683-695, 1986.
- 3) Shiraki K, Burns MS, Bellhorn RW: Abnormal vessel patterns in phototoxic rat retinopathy studied by vascular replicas. *Curr Eye Res* 2: 545-551, 1982/1983.
- 4) Klaverkamp J, Volkl KP: Maintenance of platelet viability after platelet-labelling with fluorescein isothiocyanate. *Haemostasis* 14: 337-346, 1984.
- 5) Groscurth P, Cheng S, Vollenweider I, et al: Effect of washing and Gel filtration on the ultrastructure of human platelet. *Acta Haematologica* 77: 150-155, 1987.
- 6) L'Esperance FA: Clinical applications of the organic dye laser. *Ophthalmology* 92: 1592-1600, 1985.
- 7) Butcher EC, Scollay RG, Weissman IL: Lymphocyte adherence to high endothelial venules: Characterization of a modified *in vitro* assay, and examination of the binding of syngeneic and allogeneic lymphocyte populations. *J Immunology* 123: 1996-2003, 1979.

- 8) **Jacobs RM, Boyce JT, Kociba GJ**: Flow cytometric and radioisotopic determinations of platelet survival time in normal cats and feline leukemia virus-infected cats. *Cytometry* 7: 64-69, 1986.
- 9) **内田立身, 油井徳雄**: シンポジウム, 血栓症の病態

生理と治療 2. (5) RI 標識血小板による血栓症診断への応用. *日内会誌* 76: 38-42, 1986.

- 10) **永島淳一, 山田英夫, 西野英男**他: 老年者における<sup>111</sup>In 標識血小板によるシンチグラフィーの臨床的有用性の検討. *日老会誌* 24: 1-9, 1987.

(第92回日眼総会原著)

---