

家兎網膜色素上皮—脈絡膜におけるフルオレセイン移送の速度論的解析

小谷野 聡, 江口秀一郎, 新家 真

東京大学医学部眼科学教室

要 約

Ussing 型チャンバーを用いて、家兎網膜色素上皮 (RPE) —脈絡膜におけるフルオレセイン (F) の移送を検討した。F の外向き (硝子体側→脈絡膜側) の移送は3種の競合阻害剤、Probenecid (10^{-4} M), Hippurate (30mM), Iodipamide (5mM) によりそれぞれコントロールの約41%, 45%, 39%となり有意に抑制されたが、内向き (脈絡膜側→硝子体側) の移送はそのいずれの阻害剤によっても抑制されなかった。投与する F の濃度を上げていくと、それに比例して内向きの移送はほぼ直線的に上昇したが、外向きの移送は飽和状態に達する傾向を示した。阻害実験の結果より実際に能動輸送されている部分即ち実移送=外向きの移送-内向きの移送と仮定すると実移送速度は F の濃度上昇とともに上昇するがやがて飽和状態に達し、Lineweaver-Burk の plot よりそのみかけの $K_m = 4.5 \times 10^{-5}$ M, $V_{max} = 2.27$ nmol/hr/cm² という値が得られた。この値より F の RPE—脈絡膜における移送系は虹彩毛様体における F 或いは Ascorbate の移送系に比べ基質に対する親和性は高いが、最高移送速度は低いと推定された。(日眼会誌 95: 428—433, 1991)

キーワード: Ussing 型チャンバー, 家兎網膜色素上皮—脈絡膜, フルオレセイン, 能動輸送

Kinetic Study of Movement of Fluorescein Across the Isolated Rabbit Retinal Pigment Epithelium—Choroid

Satoshi Koyano, Shuichiro Eguchi and Makoto Araie

Department of Ophthalmology, University of Tokyo, School of Medicine

Abstract

Using an Ussing-type chamber, the transport of fluorescein (F) across the isolated retinal pigment epithelium (RPE)-choroid of the rabbit was studied. The outward movement (from the vitreous to the choroidal side) of F was significantly greater than the inward movement (from the choroidal to the vitreous side) and was suppressed by the application of 10^{-4} M probenecid, 30mM hippurate or 5mM iodipamide to 41%, 45% or 39% of the control, respectively, while the inward movement was not affected by any of these agents. As the F concentration in the chamber increased, the inward movement of F also increased in a linear fashion, but the outward movement showed nonlinearity. The difference between the outward and inward movement of F was thought to represent the net flux of F across the RPE-Choroid and this value showed nonlinearity and saturation as the F concentration increased. The Lineweaver-Burk plot of the reciprocals of the net flux of F

別刷請求先: 113 文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 小谷野 聡
(平成 2 年 4 月 3 日受付, 平成 2 年 10 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Koyano, M.D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo, School of Medicine.

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

(Received April 3, 1990 and accepted in revised form October 25, 1990)

concentration gave the apparent K_m of $4.5 \times 10^{-5} M$ and apparent V_{max} of $2.27 \text{ nmol/hr/cm}^2$, which suggested that the F transport system in the rabbit RPE-Choroid had a greater affinity to the substrate but lower transporting capacity as compared with the F transport system in the rabbit iris-ciliary body or the ascorbate transport system in the iris-ciliary body. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 428-433, 1991)

Key words: Ussing-type chamber, Retinal pigment epithelium-choroid, Fluorescein, Active transport

I 緒 言

我々は前報で家兎網膜色素上皮-脈絡膜を摘出、Ussing型チャンパーに固定して安定した電位を得る方法を報告し、その系が網膜色素上皮-脈絡膜を介しての物質移送の解析に有用であることをフルオレセインを用いて証明した。フルオレセインが毛様体上皮あるいは網膜色素上皮を介して眼内から眼外へと移送され、その移送に能動輸送が関与している可能性については従来よりいくつかの報告があり^{1)~4)}、前回の我々の実験もその仮説を支持する結果となった。従来よりOrganic anionの移送系には少なくとも2種以上の系があることが知られている。すなわち腎尿細管におけるHippurateの移送系に代表されるH(Hippurate-sensitive)ーシステムと肝胆管系におけるIodipamideの移送系に代表されるL(Liver-like)ーシステム群であり、種々のOrganic anionの移送系はこのような移送系が複雑に絡み合っているといわれている^{5)~7)}。しかしフルオレセインの眼における移送系がHまたはLシステムとどう関連しているのか、またこの移送系の特性、即ちフルオレセインに対する親和性、最高移送速度等を検討する速度論的解析は現在まで全くなされていない。今回我々はUssing型チャンパーに固定された摘出家兎網膜色素上皮-脈絡膜を介してのフルオレセインの移送に対するHまたはLシステムの代表的阻害剤Hippurate⁵⁾、Iodipamide⁷⁾の影響を検討し、また種々のフルオレセイン濃度下での移送速度を検討することにより速度論的解析を行ったのでここに報告する。

II 実験方法

1. 網膜色素上皮-脈絡膜の固定法

方法は前報と同じく、成熟白色家兎(体重3kg)をベントバルビタール過量投与にて安楽死せしめた後速やかに眼球摘出し網膜色素上皮-脈絡膜を取り出して

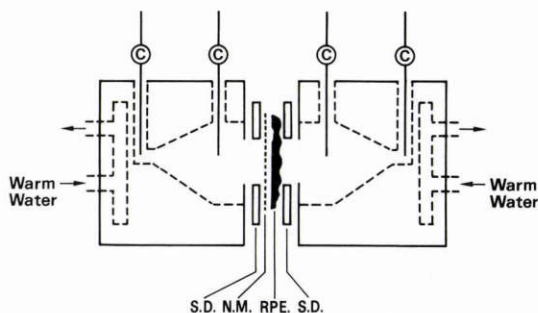


図1 Ussing型チャンパーの略図

C: カロメル電極, NM: ナイロン膜, SD: シリコンディスク, RPE: 網膜色素上皮-脈絡膜

Ussing型チャンパーに固定した。チャンパーの略図を図1に示す。両側チャンパー内はKrebs' bicarbonate Ringer液で満たされ、95%O₂+5%CO₂の混合ガスにより通気攪拌され、また系の温度は37℃に保たれている。Krebs' bicarbonate Ringer液の組成を以下に示す。NaCl 118.05 KCl 4.69 CaCl₂·2H₂O 2.51 MgCl₂·6H₂O 0.54 NaH₂PO₄·H₂O 1.01 glucose 11.10 NaHCO₃ 25.01 (mM)。チャンパー内の容積はそれぞれ7mlで両側チャンパーは0.14cm²の開窓部にて交通している。系の電気的現象は、3%agar 3MKCl bridgeを用いてチャンパーからカロメル電極に導き、自動膜電位固定装置(ボルテージクランプ装置、日本光電工業株式会社、東京)を用いて、経上皮電位、及び短絡電流を計測し、その両者より経上皮電気抵抗を算出した。系の電気的性質が安定した後、一侧チャンパーに、フルオレセイン・ナトリウムをチャンパー内濃度が、15μMとなるように投与し、その後15分毎に対側チャンパーから50μlのサンプルを採取、そのつど同量のKrebs' bicarbonate Ringer液を補充した。採取したサンプルは、pH 7.4のリン酸緩衝液にて9倍に希釈し、そのフルオレセイン濃度をフルオロメーター(東京光学株式会社、東京)にて計測した。フルオレセインを

硝子体側に投与することにより外向き、即ち硝子体側から脈絡膜側へのフルオレセインの移送を、逆に脈絡膜側に投与することにより内向きすなわち脈絡膜側から硝子体側へのフルオレセインの移送を検討した。

2. 透過係数の算出

フルオレセインに対する網膜色素上皮-脈絡膜の透過係数は Fick の第一法則

$$J = -AP(C_1 - C_0) \dots\dots\dots (1)$$

を用いて算出した。ここで J はフルオレセインの単位時間あたりの移行量 (ng/sec), C_0 はフルオレセインが移送されてくる側のチャンパー内のフルオレセインの濃度 (ng/ml), C_1 はフルオレセインを投与した側のチャンパー内のフルオレセインの濃度 (ng/ml), A は開窓部の面積 (cm^2), P は透過係数 (cm/sec) を表す。 C_0 は C_1 に比べ非常に小さく無視できる。P の値は、 C_0 の時間的経過より最小自乗法を用いて算出した。

3. 阻害剤の影響

フルオレセイン投与と同時に H システムの代表的阻害剤 Hippurate⁵⁾ または L システムの代表的阻害剤 Iodipamide⁷⁾ をチャンパー内濃度がそれぞれ 30mM, 5mM となるよう両側チャンパーに投与し、そのフルオレセインの外向きおよび内向きの移送に与える影響を検討した。

4. 速度論的解析

投与するフルオレセインの濃度を上げていきチャンパー内濃度が、それぞれ 15, 45, 75, 150 μM となるように設定したときの外向きおよび内向きのフルオレセインの移送を検討した。

III 結 果

経上皮電位は実験開始約 40 分後平均約 1.95mV で、以後約 3 時間安定した状態を保ち、短絡電流、経上皮電気抵抗もそれぞれ平均約 12.6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, 180.6 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ で安定していた。また前報にも記したごとくフルオレセインの移送速度はフルオレセイン投与後 30 分までと 30 分以降では有意の差が認められ、これはフルオレセインが組織内に浸透し、あるいは組織内から対側チャンパーに流出し十分拡散するのにある程度時間を要するためと考えられたので 30 分以降の安定した状態での移送速度をもとに以下の解析を進めた。

阻害剤を投与した実験では、probenecid (前回実験を行っておりその値を引用した²⁰⁾), または Hippurate または Iodipamide を投与することにより網膜色素上皮-脈絡膜のフルオレセインに対する透過係数は、外向

表 1 網膜色素上皮-脈絡膜のフルオレセインに対する透過係数。

* コントロールに比し有意差あり, $p < 0.01$ (unpaired T-test)

Mean $\pm$ SE ($\times 10^{-5} \text{cm/sec}$)

() 内は実験数

	外 向 き	内 向 き
Control	1.63 $\pm$ 0.20 (8)	0.44 $\pm$ 0.13 (8)
Probenecid	0.67 $\pm$ 0.11 (6)*	0.42 $\pm$ 0.10 (5)
Hippurate	0.73 $\pm$ 0.10 (5)*	0.51 $\pm$ 0.07 (5)
Iodipamide	0.64 $\pm$ 0.13 (5)*	0.52 $\pm$ 0.13 (5)

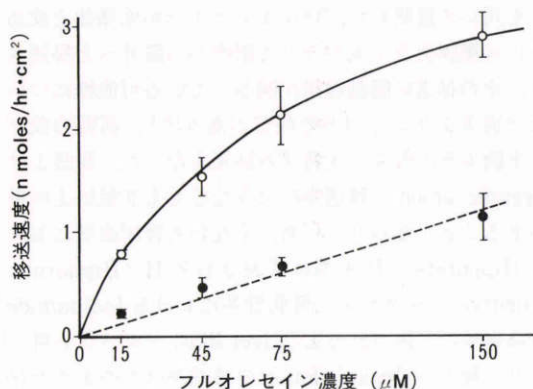


図 2 外向き及び内向きの移送速度のフルオレセイン濃度に伴う変化 (Mean $\pm$ SE, N=5)

—: 外向き, ---: 内向き

きの透過係数がそれぞれ 0.67 $\pm$ 0.11, 0.73 $\pm$ 0.10, 0.64 $\pm$ 0.13 ($\times 10^{-5} \text{cm/sec}$) となり三者とも前報で述べたコントロール値外向き 1.63 $\pm$ 0.20 ($\times 10^{-5} \text{cm/sec}$) の各々 41%, 45%, 39% と有意に低下したが、内向きの透過性はそれぞれ 0.42 $\pm$ 0.10, 0.51 $\pm$ 0.07, 0.52 $\pm$ 0.13 ($\times 10^{-5} \text{cm/sec}$) となりコントロール値 0.44 $\pm$ 0.13 ($\times 10^{-5} \text{cm/sec}$) に対し有意な差は認められなかった。以上の結果をまとめたものを表 1 に示す (外向き、内向きのコントロール値及び probenecid の値は前報の値を引用した²⁰⁾。

投与するフルオレセインの濃度を変えていき網膜色素上皮-脈絡膜のフルオレセインに対する移送速度の変化を検討した実験の結果を図 2 に示した。外向きの移送速度はフルオレセインの濃度を上げていくにつれ

上昇していくが、さらに濃度を上げると飽和状態に近づいていく傾向を示した。これに対し内向きの移送速度はフルオレセインの濃度を上げるとそれにほぼ比例する形で直線的に上昇した(図2)。

IV 考 按

網膜色素上皮を介してフルオレセインが眼内から眼外へと積極的に移送されている可能性については、現在まで *in vivo* あるいは *in vitro* の実験でその仮説を支持する報告が幾つかなされており¹¹⁻¹⁴⁾、前回、我々の家兎網膜色素上皮を用いた実験でも同様の結果が得られている。ここで organic anion の移送系には H-システムおよび L-システム群と少なくとも2種以上の系があることが知られており種々の Organic anion の移送系はこれらのシステムが複雑に絡み合って構成されているといわれる⁵¹⁻⁷⁾。我々の実験でフルオレセインの外向きの移送は、それぞれの系の代表的な競合阻害剤 Hippurate, Iodipamide そして網膜色素上皮におけるフルオレセイン移送の競合的阻害剤である probenecid により同様に阻害された。虹彩毛様体においてもフルオレセインを眼外へと積極的に移送する系が存在することが従来より知られており⁸⁾⁹⁾、Stone らはそれぞれ H システム及び L システムの代表的な test substrate である PAH⁶⁾¹⁰⁾、Cholic acid⁷⁾¹¹⁾、そしてフルオレセインの虹彩毛様体における移送を競合阻害剤を用いて比較検討している。その結果まずフルオレセインが Cholic acid の移送より PAH の移送をより強く抑制すること、さらに Hippurate によりフルオレセインの移送が PAH の移送とほぼ同様に抑制されることから虹彩毛様体におけるフルオレセインの移送系が H システムに近いことがわかった。しかし高濃度(10^{-3} M 以上)の Iodipamide により PAH の移送はフルオレセインの移送に比べより強く抑制されることからこの移送系が H システムと同一ではないことを報告している⁸⁾。今回我々が使用した Hippurate 及び Iodipamide は十分高濃度でありこの濃度で両者の抑制度に差が出なかったことから、網膜色素上皮におけるフルオレセインの移送系は、虹彩毛様体と異なり H および L のいずれにも極端に偏らない両者を合わせ持つ系である事が推察された。また内向きの移送はこれら2種の阻害剤及び Probenecid のいずれによっても抑制されず、フルオレセインが内向きにはほとんど受動的な拡散によって動いている事が示唆された。

次に、投与するフルオレセインの濃度を変えてその

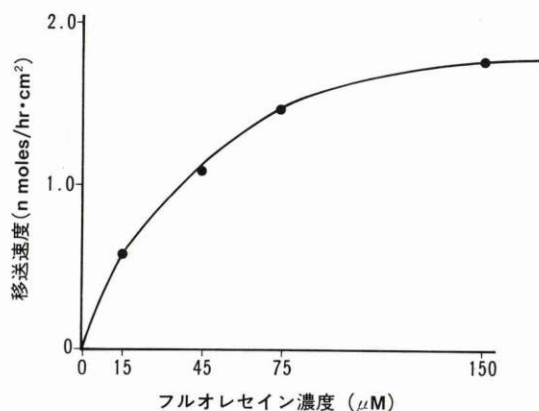


図3 実移送速度のフルオレセイン濃度に伴う変化。

移送速度の変化を検討した実験では、内向きの移送はフルオレセインの濃度の上昇とともに直線的に上昇したが、外向きの移送は飽和状態に達する傾向を示した。この事実もフルオレセインの内向きの移送はほとんど受動的な拡散によっており、逆に外向きの移送は、前述の阻害実験の結果及び前回の我々の温度或は阻害剤による影響を検討した実験結果²⁰⁾とあわせて担体による能動輸送である事を強く示唆する。以上の結果から実際に能動的に移送されている部分(実移送)を外向きの移送(能動輸送+受動輸送)からの内向きの移送(受動輸送)を減じたものと仮定した。こうして得られた実移送の値は純粋にフルオレセインの能動輸送を表していると考えられる。この実移送速度のフルオレセインの濃度による変化を図3に示す。実移送速度はフルオレセインの濃度上昇と共に上昇し、やがて飽和状態に達した。ここで得られた結果に酵素反応における速度論を適用し、Lineweaver-Burk のプロット¹²⁾を用いてみかけの Halfsaturation concentration (K_m) 及び Maximum velocity (V_{max}) を算出し、 $K_m = 4.5 \times 10^{-5}$ M, $V_{max} = 2.27$ nmol/hr/cm² という値が得られた(図4)。

現在まで虹彩毛様体および網膜色素上皮における種々の物質の K_m , V_{max} の値が報告されているが、そのほとんどが組織を目的とする物質の入った培養液中に一定時間培養し、組織に集積した物質の濃度と培養液中の濃度の比から移送速度を出して K_m , V_{max} を算出したもの(以下集積法)であり¹³⁾⁻¹⁵⁾、組織を介する物質の移送を直接計測しているとはいいがたい。これに対し今回の我々の実験のように Ussing 型チャンパーを用いて組織の一侧から対側への物質の動きか

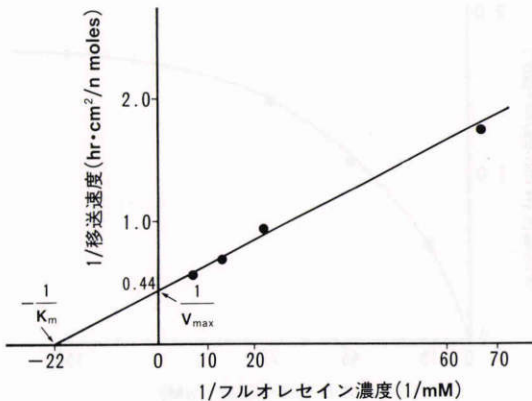


図4 Lineweaver-Burk のプロット

$K_m = 4.5 \times 10^{-5} M$, $V_{max} = 2.27 \text{ nmol/hr/cm}^2$

ら K_m , V_{max} を算出する方法 (以下 Ussing 法) は, その組織を介する物質の移送をほぼ直接的に計測する非常に有用な方法であるがその報告は未だ少なく, ascorbate の虹彩毛様体における移送¹⁶⁾と glucose の網膜色素上皮における移送等があるのみである¹⁷⁾¹⁸⁾が, このうち glucose は能動輸送ではなく, 両方向への促進拡散により移送されていると報告されている¹⁷⁾. ascorbate の虹彩毛様体における K_m , V_{max} の値はそれぞれ $37 \times 10^{-5} M$, $83 \text{ nmol/hr/ICB} = 111 \text{ nmol/hr/cm}^2$ とされており¹⁶⁾¹⁹⁾, 両者とも今回のフルオレセインの網膜色素上皮一脈絡膜における値より大きい値を示している

一方フルオレセインの虹彩毛様体における K_m , V_{max} の値は集積法で $K_m = 12 \times 10^{-5} M$, $V_{max} = 23 \times 10^{-7} \text{ mol/g/hr}$ と報告されている⁸⁾. 但し集積法で計測しているのはその組織への物質の集積であり Ussing 法のように毛様体あるいは網膜色素上皮を介した物質の移送, すなわち物質の流れを直接測っているとは言えない. そのためこの値を Ussing 法での値と直接比較することは困難である. そこでこの両方法で得られた値はどのように異なっているのかということ Ascorbate を例にとって比較してみた. Ascorbate の虹彩毛様体における移送は両方法で検討されておりその K_m , V_{max} の値をみると以下の通りである¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁹⁾.

K_m : 集積法: $5.5 \times 10^{-5} M$, Ussing 法: $37 \times 10^{-5} M$

V_{max} : 集積法: 20 nmol/hr/ICB , Ussing 法: $111 \text{ nmol/hr/cm}^2 = 83 \text{ nmol/hr/ICB}$

この結果をみると K_m , V_{max} とともに Ussing 法が

集積法に比べ 4 ~ 6 倍高い値を示している. よって, もし仮に Ussing 法で虹彩毛様体におけるフルオレセインの移送を検討し, その K_m , V_{max} の値を算出したとしても集積法と少なくとも同じかあるいはより大きな値が得られると推定される. 今回の網膜色素上皮でのフルオレセイン移送の K_m , V_{max} の値を集積法で得られた虹彩毛様体での値と比較すると, K_m は虹彩毛様体の値がやや高く, V_{max} も単位が異なるため比較が困難であるが, Ascorbate の値の単位による差異より類推してこれも虹彩毛様体の値が高いと考えられる. 前述のように, 虹彩毛様体での値は Ussing 法ではさらに高くなると推定され, 網膜色素上皮との差はさらに広がるものと考えられる.

ここで K_m は物質と担体の親和性をあらわすとされ, K_m が小さいほどその親和性は高いと考えられる. また V_{max} は物質と担体との最高反応速度を示すとされ担体の密度や担体の移送速度を反映していると考えられる. 即ち以上の速度論的解析の結果をまとめると, フルオレセインの網膜色素上皮一脈絡膜における移送系は, 虹彩毛様体における移送系に比し, 親和性は高いが最高移送速度は低いと推定される. この様に虹彩毛様体と網膜色素上皮ではフルオレセインの移送系が異なることが示唆され, 先に述べた H 及び L システムの検討での違いと併せて考えると, 同じ眼で同じ基質に対する能動輸送形態が虹彩毛様体と網膜色素上皮で異なっていることを示しており, 興味深い結果と言える.

以上, フルオレセインの網膜色素上皮一脈絡膜における移送系の特性につき, 家兎眼を用いて解析を加えた. フルオレセインは網膜色素上皮一脈絡膜において外向き即ち硝子体側から脈絡膜側に能動的に輸送されその移送系は, H 及び L 両 system をほぼ同様に併せもち, そのみかけの K_m は $4.5 \times 10^{-5} M$, みかけの V_{max} は $2.27 \text{ nmol/hr/cm}^2$ であった.

文 献

- 1) Tsuboi S, Fujimoto T, Uchihori Y, et al: Measurement of retinal permeability to sodium fluorescein in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1146-1150, 1984.
- 2) Cunha-Vas JG, Maurice DM: The active transport of fluorescein by the retinal vessels and the retina. J Physiol 191: 467-486, 1967.
- 3) Cunha-Vas JG, Maurice DM: Fluorescein dynamics in the eye. Doc Ophthalmol 26: 61-72, 1969.

- 4) **Ogura Y, Tsukahara Y, Saito I, et al**: Estimation of the permeability of the blood-retinal barrier in normal individuals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 969—976, 1985.
- 5) **Barany EH**: Inhibition by hippurate and probenecid of in vitro uptake of iodipamide and o-iodohippurate. A composite uptake system for iodipamide in choroid plexus, kidney cortex and anterior uvea of several species. *Acta Physiol Scand* 86: 12—27, 1972.
- 6) **Barany EH**: The liver-like anion transport system in rabbit kidney, uvea and choroid plexes. I. Selectivity of some inhibitors, direction of transport, possible physiological substrates. *Acta Physiol Scand* 88: 412—429, 1973.
- 7) **Barany EH**: In vitro uptake of bile acids by choroid plexus, kidney cortex and anterior uvea. I. The iodipamide-sensitive transport systems in the rabbit. *Acta Physiol Scand* 93: 250—268, 1975.
- 8) **Stone R, Wilson C**: Fluorescein transport in the anterior uvea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 303—309, 1982.
- 9) **Eguchi S, Araie M, Takase M**: Movement of fluorescein and fluorescein glucuronide across the isolated rabbit iris-ciliary body. *Jpn J Ophthalmol* 31: 440—454, 1987.
- 10) **Stone R**: The transport of para-amino-hippuric acid by the ciliary body and by the iris of the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 807—818, 1979.
- 11) **Stone R**: Choric acid accumulation by the ciliary body and by the iris of the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 819—826, 1979.
- 12) **Lineweaver H, Burk D**: The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56: 658—666, 1934.
- 13) **Becker B**: The transport of organic anions by the rabbit eye I in vitro iodopyracet (diodrast) accumulation by ciliary body-iris preparations. *Am J Ophthalmol* 50: 862—867, 1968.
- 14) **Forbes M, Becker B**: The transport of organic anions by the rabbit eye II in vivo transport of iodopyracet (diodrast). *Am J Ophthalmol* 50: 867—875, 1968.
- 15) **Becker B**: Ascorbate transport in guinea pig eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 6: 410—415, 1967.
- 16) **Chu TC, Candia OA**: Active transport of ascorbate across the isolated rabbit ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 594—599, 1988.
- 17) **DiMattio J, Streitman J**: Facilitated glucose transport across the retinal pigment epithelium of the bullfrog (*Rana catesbiana*). *Exp Eye Res* 43: 15—28, 1986.
- 18) **Crosson CE, Pautler EL**: Glucose transport across the isolated bovine pigment epithelium. *Exp Eye Res* 35: 371—377, 1982.
- 19) **Krupin T, Reinach PS, Candia OA, et al**: Transepithelial electrical measurements on the isolated rabbit iris-ciliary body. *Exp Eye Res* 38: 115—123, 1984.
- 20) **小谷野聡, 江口秀一郎, 新家 真**: 家兎網膜色素上皮—脈絡膜におけるフルオレセインの移送—Ussing 型チャンバーを用いた解析. *日眼会誌* 95: 434—440, 1991.