

健常者における涙液中のシアル酸測定

中村 葉¹⁾, 横井 則彦¹⁾, 徳重 秀樹²⁾, 木下 茂¹⁾¹⁾京都府立医科大学眼科学教室, ²⁾千寿製薬株式会社

要 約

目的: ムチンの糖鎖の一部を構成しているシアル酸の健常者涙液中での測定を行った。

対象と方法: 対象は眼疾患の既往のない健常者(平均年齢 50.7 歳)31 例 41 眼である。生理食塩水 50 μ l を点眼後採取した希釈涙液を 1 サンプルとし, ① 同一対象眼での糖蛋白濃度とシアル酸濃度の相関, ② 同一個体でのシアル酸濃度の左右差, ③ 同一対象眼でのシアル酸濃度の再現性についての検討を行った。

結果: 同一対象眼での糖蛋白濃度とシアル酸濃度には有意な相関があった(右眼: $r=0.989$, $p<0.0001$; 左眼: $r=0.988$, $p<0.0001$)。同一個体でのシアル酸濃度に

左右差はなかった。また, 3 回測定における同一対象眼でのシアル酸濃度の再現性は良好であった。健常者の希釈涙液中のシアル酸濃度は 37.1 μ g/ml(平均値)であった。

結論: 今回の方法により再現性よく涙液中のシアル酸を測定できた。希釈涙液(正確な希釈倍率は不明である)中のシアル酸濃度は涙液中の糖蛋白濃度を反映しており, ムチン量に異常を来す疾患の評価に応用可能であると考えられた。(日眼会誌 104: 621-625, 2000)

キーワード: シアル酸, 涙液, 過ヨウ素酸/シッフ比色定量法, 糖蛋白, ムチン

Sialic Acid in Normal Human Tears

Yo Nakamura¹⁾, Norihiko Yokoi¹⁾, Hideki Tokushige²⁾ and Shigeru Kinoshita¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine²⁾Senju Pharmaceutical Co. Ltd.

Abstract

Purpose: We measured the concentration of sialic acid, the terminal component of mucin, in normal human tears.

Subjects and Methods: Tear samples were collected from 31 healthy volunteers (50.7 years old on average) using micropipett after instillation of saline. We investigated the correlation of concentration between glycoprotein and sialic acid, the difference between these in the right eye and left eye, and the reproducibility of the sampling procedure.

Results: There was significant correlation of concentration between glycoprotein and sialic acid (right eye: $r=0.989$, $p<0.0001$; left eye: $r=0.988$, $p<0.0001$). There was no significant difference between these in

the right and left eye. Also, the reproducibility was considered acceptable in three measurements of sialic acid with the present procedure. The concentration of sialic acid in normal diluted tears was 37.1 μ g/ml on average.

Conclusion: Our data indicates that concentration of sialic acid reflects that of glycoprotein and this method of measurement is applicable to the analysis of disorders with mucin deficiency. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 621-625, 2000)

Key words: Sialic acid, Tear fluid, Periodic acid/Schiff stain, Glycoprotein, Mucin

I 緒 言

涙液層はその表面から油層, 水層, ムコイド層の 3 層から成るとされ¹⁾, 眼表面上皮を保護している。ムコイド層はムチン, 免疫グロブリン, 蛋白質などから構成されてい

るが²⁾, 中でもムチンはムコイド層の主要構成成分であり, 涙液の粘稠性を保ちながら涙液の安定性を維持する役割を果たしていると考えられており³⁾, ドライアイの病態を考える上で重要である。ムチンは 250 kD 以上の分子量を持ち, その 50% 以上が糖鎖によって占められて

別刷請求先: 602-0841 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 横井 則彦
(平成 11 年 10 月 4 日受付, 平成 12 年 3 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to: Norihiko Yokoi, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajicho, Hirokoji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received October 4, 1999 and accepted in revised form March 28, 2000)

おり⁴⁾,その糖鎖の末端にはシアル酸やラクトースなどが含まれていることが知られているが,その構造の詳細については未だ明らかではない²⁾。

シアル酸の一つである N-アセチルノイラミン酸は,ムチンの粘稠度を増加させる役割を担っているといわれており⁵⁾,涙液の安定性維持に貢献していると推察される。ムチンは高分子であるため,その定量が困難であるが,糖を大量に含有することを利用して胃や小腸では過ヨウ素酸/シッフ (periodic acid/Schiff, PAS) 比色定量法を用いて,その量を定量する試みが報告⁶⁾されている。また,唾液などのムチンではシアル酸が大量に含まれていることが知られており,シアル酸量でムチン量の評価を行う試みがなされている⁷⁾。そこで今回,健常者の希釈涙液中の糖蛋白濃度とシアル酸濃度の相関を調べ,シアル酸濃度で涙液のムチン量を評価し得るか否かについて検討を試みたので報告する。

II 対象および方法

1. 対 象

健常成人 31 例 41 眼(男性 17 例,女性 14 例,年齢 50.7 ± 16.0 歳,平均値 ± 標準偏差)を対象とし,被験者に十分なインフォームド・コンセントを得た上で以下の検査を行った。健常者の基準は,眼疾患の既往がなく,シルマー I 法,綿糸法,フルオレセイン break up time of tearfilm (BUT) で異常値(それぞれ 5 mm 以下,10 mm 以下,5 s 以下)を示さず,フルオレセインおよびローズベンガル染色で角結膜に染色所見のないものとした。

2. 涙 液 採 取

被験者を仰臥位にさせ,点眼麻酔を行わず,35°C に温めた生理食塩水 50 μl をマイクロピペット (Eppendorf) で点眼し,自然瞬目を 3 回行わせた。次いで,別のマイクロピペットで耳側眼瞼裂から眼表面を刺激しないように注意しながら希釈涙液を 20 μl 採取した。採取した涙液はサンプルチューブに入れ,測定時まで -80°C で保存した。なお,以下に述べる糖蛋白濃度とシアル酸濃度の相関の検討においては同一眼でのサンプルを得るため,上記と同一条件下で生理食塩水を 100 μl 点眼し,50 μl の希釈涙液を採取し,そのうち 20 μl を PAS 比色定量に,残りのうち 20 μl をシアル酸測定に使用した。

3. 測 定 法

1) PAS 比色定量⁶⁾

96 ウェルのプレートに涙液サンプルを入れ,その全量が 100 μl になるように脱イオン水を添加し,さらに,0.05% 過ヨウ素酸含有 7% 酢酸溶液を 10 μl 加え,37°C で 2 時間インキュベートした。その後,シッフ試薬 (Merck, Darmstadt, ドイツ) を 10 μl 添加して室温で 30 分間放置し,540 nm の波長で吸光度を測定した。なお,検量線に bovine submaxillary gland mucin (BSM) を使用し,希釈涙液中の PAS 陽性糖蛋白濃度を BSM 相当量と

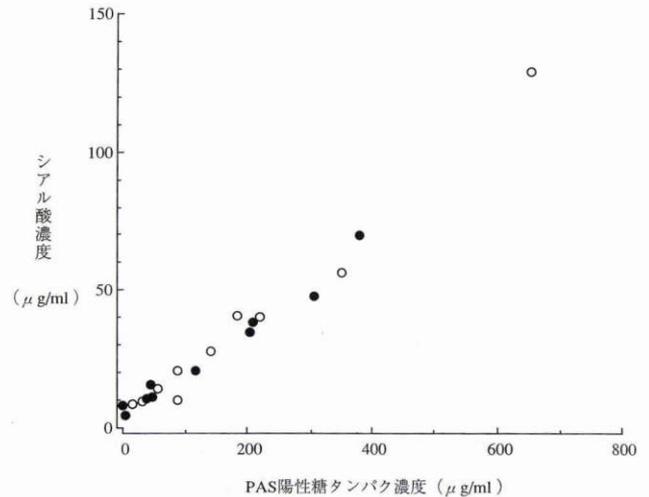


図1 糖蛋白濃度とシアル酸濃度の相関。

右眼,左眼ともに有意な一次相関があった(それぞれ, $r = 0.989$, $p < 0.0001$, $r = 0.988$, $p < 0.0001$, Pearson の相関係数)。periodic acid/Schiff (PAS) 陽性糖蛋白濃度は bovine submaxillary gland mucin (BSM) 相当量として表した。○: 右眼, ●: 左眼

して表した。

2) シアル酸定量⁸⁾⁹⁾

涙液サンプルと 1 ml の硫酸 (25 mM) を 15 ml の遮光バイアルに入れ,密閉後 95°C で 1 時間加熱処理を行い,糖蛋白中のシアル酸を遊離させた。1 M メルカプトエタノールおよび 18 mM ハイドロサルファイトナトリウムを含む 7 mM 1, 2 - ジアミノ - 4, 5 - メチレンジオキシベンゼン二塩酸塩 (1, 2 - Diamino - 4, 5 - methylenedioxybenzene dihydrochloride, DMB) (同仁化学研究所) 溶液 1 ml を注入し,遮光しながら 60°C で 2.5 時間加熱処理を行い,蛍光誘導体を形成させた。その後,移動層を 10% アセトニトリル含有 0.04 M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH 7.0) とし,励起波長 373 nm, 蛍光波長 448 nm に設定した蛍光検出器 (RF-10 AXL, 島津製作所) を用いた逆相の液体高速クロマトグラフィ (LC-10 AD, 島津製作所) でシアル酸の分離および定量を行った。

4. 検 討 項 目

1) 糖蛋白濃度とシアル酸濃度の相関

健常対象 10 例の右眼 (10 眼) および左眼 (10 眼) について,方法で述べた希釈涙液中の糖蛋白濃度とシアル酸濃度との相関,および同一個体でのこれらの左右差の有無を検討した。反射性涙液分泌の影響を避けるために右眼の涙液採取 10 分後に左眼の涙液の採取を行った。相関の検討は Pearson の相関係数を,左右差の検討には paired t test を用いた。

2) シアル酸濃度測定の実験的再現性の検討

健常対象 7 例 7 眼の左眼を対象とし,同一験者によって日を変えて 3 回採取された希釈涙液中のシアル酸濃度を測定した。各個体の分散を Leven の分散分析法を用い

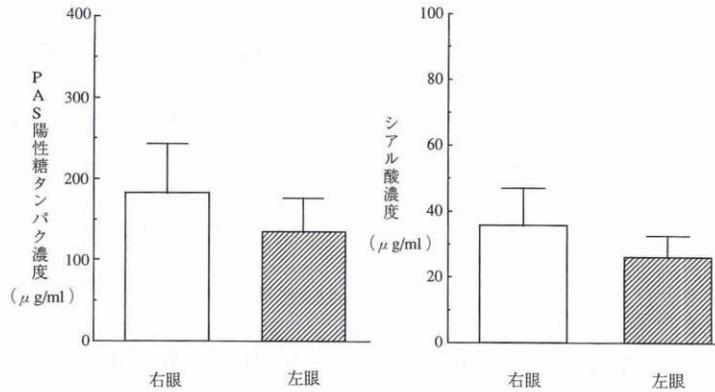


図2 糖蛋白濃度およびシアル酸濃度の左右差の比較.

PAS 陽性糖蛋白濃度, シアル酸濃度いずれにおいても有意な左右の差はなかった(それぞれ, $p=0.386$, $p=0.375$, paired t test). PAS 陽性糖蛋白濃度は BSM 相当量として表した.

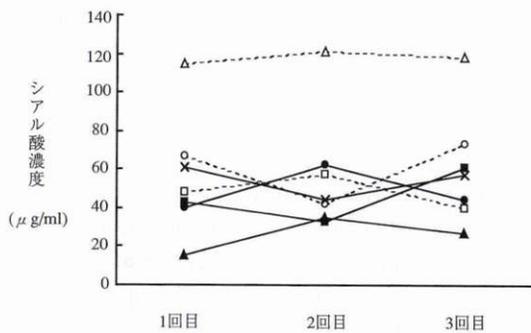


図3 シアル酸測定での再現性の検討.

健常者 7 例 7 眼全例左眼において日を変えて 3 回採取した涙液中のシアル酸濃度の比較. 各回の測定値に有意差はなかった ($F=1.37$, $p=0.293$, Leven の分散分析). 各マークはそれぞれ異なる個体を示す.

て比較し, 測定法の再現性について検討した.

3) 健常者における希釈涙液中のシアル酸濃度測定

健常対象 14 例 14 眼(全例女性, 年齢 61.1 ± 9.0 歳, 平均値 \pm 標準偏差)の左眼を対象とし, 希釈涙液中のシアル酸濃度を測定した.

III 結 果

1. 糖蛋白濃度とシアル酸濃度の相関

希釈涙液中の糖蛋白濃度とシアル酸濃度は, 個体による違いは大きいが右眼, 左眼のそれぞれにおいて糖蛋白濃度とシアル酸濃度に有意な正の一次相関があった(右眼 $r=0.989$, $p<0.0001$; 左眼 $r=0.988$, $p<0.0001$) (図 1). また, 左右眼の比較では糖蛋白濃度とシアル酸濃度のいずれにおいても有意差はなかった(それぞれ $p=0.386$, 0.375 , paired t test) (図 2).

2. シアル酸濃度測定での再現性の検討

3 回測定におけるシアル酸濃度は, 1 回目 55.5 ± 31.0 (平均値 \pm 標準偏差) $\mu\text{g/ml}$, 2 回目 56.3 ± 30.6 , 3 回目 60.1 ± 29.8 $\mu\text{g/ml}$ であり, 個体間の分散に差はな

く, 再現性は良好と考えられた(図 3).

3. 健常者における希釈涙液中のシアル酸濃度測定

健常者の希釈涙液中のシアル酸濃度は 37.1 ± 28.3 $\mu\text{g/ml}$ であった.

IV 考 按

涙液中のムチンは涙液の安定性維持に重要な役割を演じているため³⁾, *in vivo* におけるムチンの評価法があればドライアイなどの眼表面疾患の病態の解析に有用であると考えられる. これまでムチンの評価法として各種の方法が報告されている. すなわち, ムチンの異常を示す疾患の病態を impression cytology の手法で結膜の杯細胞の観点から評価しようとするもの¹⁰⁾¹¹⁾, 粘膜上皮でのムチン発現をローズベンガル染色を用いて評価しようとするもの¹²⁾, ムチン量の減少を BUT で評価しようとするものなどがある³⁾. さらに, 涙液中ムチンの量的変化の評価法として ferning test¹³⁾が報告されており, この方法では涙液蛋白とムチンの比をみることにより相対的にムチン量の変化をとらえているのではないかと考えられている¹⁴⁾¹⁵⁾. *In vivo* でのムチンの評価法には, このようにさまざまな方法が報告されているが, いずれの方法も定量性のある検査とはいえない.

今回は, 涙液中のシアル酸測定がムチンの評価法となり得るかどうかについて検討を行った. そこでまず, ムチンの指標として, PAS 染色法を用いて涙液中の糖蛋白濃度の測定を行った. これは, PAS 染色が一般に糖の染色法であり, 胃⁶⁾¹⁶⁾, 小腸⁶⁾, 結膜¹⁷⁾において, PAS 陽性糖蛋白をムチンの指標として一般に用いているためである. また, 涙液中には, ムチン以外の糖蛋白は微量しか含まれておらず, PAS 陽性の糖蛋白はほぼムチンと考えられるとの報告²⁾もある. 今回の検討の結果, 涙液中のシアル酸濃度と, PAS 陽性糖蛋白濃度との間には強い正の相関があった. このことは, 涙液中のシアル酸濃度測定がムチンの評価法として利用できることを意味していると考えら

れる。

今回の検討では、希釈涙液を採取したため、過去の報告にある毛細管によるものとは涙液の採取法が異なっている。そこで、今回の涙液採取法の妥当性について検討するために、同一人(5名)から非刺激性に毛細管で涙液を採取した場合と、今回の希釈法で涙液を採取した場合についてシアル酸濃度の違いについて検討した。その結果、平均的な涙液量を $7\mu\text{l}$ ²⁰⁾ とすると、希釈法では涙液は約8倍に希釈されていると考えられるため、シアル酸濃度は、毛細管法では $85.2 \pm 45.5\mu\text{g/ml}$ 、希釈法では $60.8 \pm 44.9\mu\text{g/ml}$ と換算され、よく似た値をとることが明らかとなった。したがって、今回の涙液採取法は従来の毛細管法と比べ、涙液採取法としての問題はないと考えられる。しかし、涙液中のシアル酸濃度の絶対値については、過去の報告では Cebezas ら¹⁸⁾ は 1.14 mmol/l 、Kuizenga ら¹⁹⁾ は $0.9 \sim 1.8\text{ mmol/l}$ と報告しているが、今回の結果では、 0.12 mmol/l と低値を示した。この理由は不明であるが、過去の報告が刺激性に分泌された涙液を採取していることや、シアル酸の測定法に違いがあることなどを考えると、容易に比較できるものではないと思われる。

Kuizenga ら¹⁹⁾ の用いたノイラミニダーゼによる測定法では、涙液中の主な蛋白質であるラクトフェリンや分泌型 IgA などの中にはシアル酸が検出されなかったため、涙液中のシアル酸は主にムチンなどの糖蛋白由来であると論じられている。今回の DMB 法は検出感度が高いために、彼らの報告をそのまま採用できるとは限らないが、PAS 陽性糖蛋白濃度との高い相関性を考えると、涙液中のシアル酸濃度は、糖蛋白であるムチン濃度を反映しているとしてよいと思われる。また、同一個体における再現性もよいことから、同一個体では一定濃度のシアル酸が産生されていることや、今回の測定法が再現性の点においてもよいことがわかる。さらに今回、希釈涙液においてもシアル酸の検出が可能であったのは、検出感度の高い DMB 法を用いたためであると考えられ、本法はシアル酸濃度の低いことが予想されるドライアイにも適応可能であると思われる。我々の予備的な検討では、PAS 比色定量法に比べシアル酸測定法は 10 倍以上感度が高く、特に PAS 比色定量法では評価の難しい低濃度でも測定可能であるため、本法は涙液の著明に減少した重症のドライアイにも適応可能であると思われる。現在、ドライアイを含めた疾患眼におけるムチンと病態との関連について本法を用いて検討中である。

文 献

- 1) Wolff E: The muco-cutaneous junction of the lid-margin and the distribution of the tear fluid. *Trans Ophthalmol Soc UK* 66: 291—308, 1946.
- 2) Tiffany JM: Tears and conjunctiva. In: Harding JJ (Ed): *Biochemistry of the Eye*. Chapman & Hall, London, 6—8, 1997.
- 3) Holly FJ, Lemp MA: Wettability and wetting of corneal epithelium. *Exp Eye Res* 11: 239—250, 1971.
- 4) Moore JC, Tiffany JM: Human ocular mucus. Origins and preliminary characterization. *Exp Eye Res* 29: 291—301, 1979.
- 5) Raju TS, Davidson EA: Role of sialic acid on the viscosity of canine tracheal mucin glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 402—409, 1994.
- 6) Mantle M, Allen A: A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain. *Biochem Soc Trans* 6: 607—609, 1978.
- 7) 水島愛子, 藤沢隆一, 久保木芳徳: 唾液ムチンのシアル酸定量による簡易測定法とその臨床検査への応用. *唾液腺シンポジウム* 27: 17—18, 1986.
- 8) Hara S, Yamaguchi M, Takemori Y, Furuhashi K, Ogura H, Nakamura M: Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 179: 162—166, 1989.
- 9) Manzi AE, Diaz S, Varki A: High-pressure liquid chromatography of sialic acids on a pellicular resin anion-exchange column with pulsed amperometric detection: A comparison with six other systems. *Anal Biochem* 188: 20—32, 1990.
- 10) Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA: Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol* 101: 1284—1287, 1983.
- 11) Friend J, Kiorpes TC, Thoft RA: Conjunctival goblet cell frequency after alkali injury is not accurately reflected by aqueous tear mucin content. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 612—618, 1983.
- 12) Pflugfelder SC, Tseng SCG, Yoshino K, Monroy D, Felix C, Reis BL: Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology* 104: 223—235, 1997.
- 13) Tabbara KF, Okumoto M: Ocular ferning test. A qualitative test for mucus deficiency. *Ophthalmology* 89: 712—714, 1982.
- 14) Kogbe O, Liotet S, Tiffany JM: Factors responsible for tear ferning. *Cornea* 10: 433—444, 1991.
- 15) Maragou M, Vaikousis E, Ntre A, Koronis N, Georgiou P, Hatzidimitriou E, et al: Tear and saliva ferning tests in Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 15: 125—132, 1996.
- 16) Huang AJW, Belldebrun R, Hanninen L, Kenyon KR, Tseng SCG, Refojo MF: Effects of hypertonic solutions on conjunctival epithelium and mucinlike glycoprotein discharge. *Cornea* 8: 15—20, 1989.

- 17) **Kessing SV**: Investigations of the conjunctival mucin. *Acta Ophthalmol* 44: 439—453, 1966.
 - 18) **Cebezas JA, Porto JV, Frois MD, Marino C, Arzua J**: Acide sialique dans les larmes humaines. *Biochem Biophys Acta* 83: 318—325, 1964.
 - 19) **Kuizenga AB, van Agtmaal EJ, van Haeringen NJ, Kijlstra A**: Sialic acid in human tear fluid. *Exp Eye Res* 50: 45—50, 1990.
 - 20) **Mishima S, Gasset A, Klyce SD, Baum IL**: Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol* 5: 264—276, 1966.
-