

第 114 回 日本眼科学会総会 特別講演 I

非侵襲的前眼部検査法の開発とその臨床的意義

澤 充

日本大学医学部視覚科学系眼科学分野

研究協力者

庄司 純, 稲田 紀子, 崎元 暢, 忍田 太紀, 高浦 典子, 菅谷 哲史

崎元 丹, 堀 眞輔, 大西 貴子, 及川 亜希, 石森 秋子

(日本大学医学部視覚科学系眼科学分野)

廣野 泰亮(興和株式会社)

要 約

1. 目 的

細隙灯顕微鏡検査は非侵襲的に眼所見を全体的に把握できる優れた検査法であり、眼科臨床の基本であるが、定性的検査であるため、病態所見の評価は検査者の技量に依存する。また、形態的所見は捉えられるが機能的評価には問題がある。我々は細隙灯顕微鏡検査を補完し、病態の解明、診断、治療効果の評価を目的に、血液房水関門機能の定量的検査法の開発と涙液を対象にした眼表面臨床検査法の確立とを行ってきた。本論文ではこれらの研究内容の総括を行う。

2. フレアセルフォトメトリによる血液房水関門機能検査とその臨床的意義の検討

血液房水関門の破綻は細隙灯顕微鏡検査では光散乱現象による房水蛋白(フレア)、細胞(セル)として観察できる。溶液での光散乱は Debye により、照射光の強さと波長、対象の分子量および照射系と観察系との角度などで規定される。これをもとに細隙灯顕微鏡装置に照射光用のレーザー光源と散乱光量測定用の光電子増倍管の組み込み、および測定散乱光分析用のソフトプログラムを開発し、コンピュータ解析によるフレアとセルの定量的測定を可能とする装置(フレアセルフォトメーター)の開発を行った。

本装置はフレア、セル測定において、① 1 秒程度の測定時間、② 広いダイナミックレンジ、③ 良好な精度、④ 非侵襲的検査、を可能にした。したがって、同一個体での反復検査が可能であり、① 前眼部手術の術後炎症および眼内レンズならびに非ステロイド性抗炎症薬の薬効臨床試験を含む治療効果の評価、② 内因性内眼炎における炎症の重症度の評価、また③ 動物実験では同一個体での経時的検査による個体間の変動の最小化と精度の向上を図ることができた。さらに一定条件下での房水動態の評価、抗緑内障薬の効果の評価も可能とした。

3. 涙液を用いた眼表面の病態検査法とその臨床的意義の検討

涙液を対象とした検査では、検体が微量のため、① 目的とする病態に合致するバイオマーカーの探索、② バイオマーカー測定法の開発、③ 臨床例での評価(診断、疾患重症度の評価、治療効果判定、病態解明)に基づく有用性の検討などが重要である。

我々は、① アレルギー性結膜疾患におけるアレルギー関連因子(eosinophil cationic protein, アレルゲン特異的 IgE 抗体など)を用いた簡易迅速診断法および重症度判定キットの開発、② 単純ヘルペスウイルス(HSV)角膜炎における HSV 特異的分泌型 IgA 抗体価および HSV-DNA 量測定法の確立と診断・治療効果判定への応用、③ 感染性・非感染性角結膜疾患におけるサイトカイン・ケモカインプロファイル測定法の開発と治療ターゲット分子の検索について、イムノクロマトグラフィ、抗体アレイ法などをもとに、定量的評価法を検討した。

その結果、涙液を用いた検査法によりアレルギー性結膜疾患および感染性・非感染性角結膜疾患などの眼表面疾患の病態生理の解明、診断が可能になり、臨床的微量検体検査法としての有用性が確立できた。

4. 結 論

フレアセルフォトメトリによる房水検査および涙液を用いた眼表面の臨床検査は定量的かつ非侵襲的に前眼部病変の病態生理の解明を可能とし、細隙灯顕微鏡検査を補完する臨床検査法として高い意義を有する。(日眼会誌 115: 177-212, 2011)

キーワード: 臨床検査法, 非侵襲検査, 前眼部, 眼表面, 前房蛋白細胞測定装置, 涙液, 非ステロイド性抗炎症薬

別刷請求先: 173-8610 東京都板橋区大谷口上町 375-1 日本大学医学部視覚科学系眼科学分野 澤 充

(平成 22 年 10 月 22 日受付, 平成 23 年 1 月 6 日改訂受理) E-mail: masawa@med.nihon-u.ac.jp

Reprint requests to: Mitsuru Sawa, M. D., Ph. D. Division of Ophthalmology, Department of Visual Sciences, Nihon University School of Medicine, Oyaguchi-kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received October 22, 2010 and accepted in revised form January 6, 2011)

A Review

Development of Non-Invasive Clinical Examination Methods for the Anterior Segment of the Eye and their Clinical Significance

Mitsuru Sawa

Division of Ophthalmology, Department of Visual Sciences, Nihon University School of Medicine

Abstract

1. Purpose

Slit-lamp microscopy is a principal ophthalmic clinical method, because it provides microscopic findings of the anterior segment of the eye non-invasively. Its findings, however, are qualitative and there are large inter-observer variations in their evaluation. Furthermore, slit-lamp microscopy provides morphological findings, but a functional evaluation is difficult. We developed two novel methods that establish a qualitative methodology of the slit-lamp microscope and the pathophysiology of the anterior segment of the eye. One is the flare-cell photometer to evaluate flare and cells in the aqueous humor of the eye and the other is an immunohistochemical examination method using tear fluid to evaluate ocular surface disorders. The comprehensive evaluation of these studies is herein overviewed.

2. Innovation of the flare-cell photometer and its clinical significance

The breakdown of the blood-aqueous barrier (BAB) causes an increase in protein (flare) and leakage of blood cells (cell) into the aqueous humor of the eye and the severity of BAB breakdown has a positive correlation with the intensity of flare and cells. The flare and cells in the aqueous can be observed qualitatively by slit-lamp microscopy. These findings are primarily distinguished in optics by light scattering. Therefore, detection of the intensity of light scattering due to flare and cells can evaluate the BAB function. The flare-cell photometer comprises 3 novel components : a laser beam system as an incident light, a photomultiplier to detect scattered light intensity and a computer-assisted system to operate the whole system and analyze detected scattered light signals due to flare and cells. The instrument enables us to quantitatively analyze the flare and cells non-invasively and accurately with a wide dynamic measurement range, resulting in a repeated examination of each individual case. It also enables the evaluation of inflammation in the aqueous not only postoperatively but also in endogenous uveitis, evaluation of the effects of anti-inflammatory drugs on BAB and evaluation of aqueous

humor dynamics. Furthermore, repeating the examination can minimize inter-individual variations and reduce the number of animals in animal experiments.

3. Pathophysiological evaluation methods of ocular surface using tear fluid

Sampling of tears can be performed noninvasively, but the obtainable volume is limited. Therefore, a determination of targeting biomarkers and a development of their micro-volume analysis methods play a crucial role in pathophysiological studies of the ocular surface. Targeting biomarkers should be determined according to the various specified bioactive substances such as eosinophil cationic protein (ECP), cytokines and others. A number of micro-volume analysis methods, such as chemiluminescent enzyme immunoassay, immunochromatography, micro-array system and polymerase chain reaction method are used. Objective disorders in the studies include allergic conjunctivitis and infectious diseases such as herpetic keratitis. Quantitative evaluation methods for ECP concentration, antigen-specific secretory IgA in allergic diseases and herpetic keratitis, herpes simplex virus-DNA and cytokine and chemokine profile in tear fluid sampled by filter paper method were investigated. We developed a clinically applicable quantitative immunochemical method for ECP concentration in tear fluid. The results revealed that tear fluid analysis using the above mentioned methods is a clinically useful to investigate the pathophysiology of the ocular surface.

4. Conclusion

Laser flare-cell photometer and tear fluid analysis are potent clinical quantitative methods to investigate the pathophysiology of the anterior segment of the eye.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 115 : 177—212, 2011)

Key words : Clinical examination, Non-invasive method, Anterior segment, Ocular surface, Flare-cell photometer, Tear fluid, Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)

I 緒 言

前眼部の定義は後眼部に比し、その範囲が研究目的により異なる傾向がみられる。これは前眼部を構成する組織が複雑であることに由来すると考えられる。従来、前眼部は解剖学的には角膜、結膜、前房および水晶体を中心とした無血管組織(除く結膜・前部強膜)、機能的には結像系および眼表面の恒常性の維持機能を中心とした透明性にかかわる諸問題の研究が推進されてきたといえる。これら前眼部の解剖学的、機能的側面は他の体組織とは多くの異なる点を有しているため、その特徴として眼科学独自の研究として発展してきた。一方、眼表面の恒常性に関しては代謝のみならず粘膜免疫機構を含む他の体組織とは異なる特徴を活用した光学的検査法が開発、応用されてきている。また、結膜などは再生能、予備力に優れているために生検などによる組織学的研究が行われてきている。一方で、涙液は採取が容易であるため、研究対象として有用であるが、検体量が微量であるための制約があった。

病態生理の研究は正常および病的な組織・機能の解明に加えて治療法の開発に不可欠であり、さまざまな検討方法により基礎的、臨床的検討がなされてきている。前眼部においては透明性および無血管組織を含むことなど他の体組織にはない特徴を活用した光学的検査法が開発、応用されてきている。また、結膜などは再生能、予備力に優れているために生検などによる組織学的研究が行われてきている。一方で、涙液は採取が容易であるため、研究対象として有用であるが、検体量が微量であるための制約があった。

病態生理の研究法としては基礎研究で解明された知識をもとに病態・病像そのものを修飾せずに評価する方法が好ましい。すなわち、臨床応用可能な検査法の開発が重要である。細隙灯顕微鏡検査はこうした観点から、最も優れた眼科的検査法の一つであるといえるが、定量的・客観的検査法としての問題が挙げられる。また、結膜生検は反復実施するうえでの問題があり、涙液検査がその代替としての意義を有するのには十分な検討がなされていない。

そこで我々は臨床応用可能でかつ定量性を有する前眼部検査法として房水蛋白・細胞測定法¹⁾²⁾および涙液を対象とした免疫化学的手法を用いた微量分析法の開発を行い、その臨床的意義の検討を行った。

本稿の研究対象のうち、平成 18 年以降の研究については日本大学医学部院内臨床研究倫理審査委員会、動物実験審査委員会の承認を得て行った。

II 房水蛋白・細胞の臨床的定量的検査法の開発

1. 血液房水関門

眼組織には血液眼関門(blood-ocular barrier)が存在する。血液眼関門は血液房水関門(blood-aqueous barrier)

と血液網膜関門(blood-retinal barrier)とに分けられ、血液房水関門は毛様体無色素上皮細胞と虹彩毛細血管壁とに存在する。

毛様体上皮は網膜色素上皮細胞に連なる色素上皮細胞と網膜神経細胞層につながる無色素上皮細胞が接して存在し、両者の角膜側は融合している。色素上皮細胞の基底膜は毛様体実質と接し、無色素上皮細胞の基底膜は後房側に存在する。毛様体内の血管壁は有窓構造を有し血液成分は実質内に漏出する。無色素細胞は能動輸送機能と細胞間接着構造としてデスモゾーム、tight junctionを有し、房水産生およびその成分の選択的調整機能を有し、血液房水関門機能を担っている³⁾⁴⁾。ウアバイン投与により房水産生が低下することから、能動輸送機能の主体はNa-K ATPであることが報告されている。血管内にHorse radish peroxidase(HRP)(分子量40,000,分子径2~4 nm)を注入するとHRPは毛様体実質内に漏出し、色素上皮細胞間隙を通過できるが無色素上皮細胞のtight junctionで阻害されることから無色素上皮細胞は生体分子篩の構造、役割を担っている⁵⁾⁶⁾。

一方、虹彩の毛細血管壁は有窓構造を持たず、内皮細胞間隙にはtight junctionが存在する。毛様体無色素上皮細胞と同様に血管内に注入したHRPはこのtight junctionを通過できない。

こうした血液房水関門機能により房水の組成はアスコルビン酸などの一部を除いて血液の組成と比較して、濃度が低い。すなわち、正常房水(一次房水)の蛋白濃度はヒトでは50~80 mg/dl、家兎で20~60 mg/dlとされ、蛋白成分の主なものprealbuminとされる^{7)~10)}。血球成分はヒト、家兎房水中にはない。

血液房水関門の破綻は細胞機能の低下、組織篩の開大を生じ、その開大の程度は破綻の強さに比例する。また、結果として房水(二次房水)内の蛋白濃度の増加と血球成分の漏出を生じる。蛋白濃度が700 mg/dl以上になると血漿中のグロブリンの漏出が生じる^{11)~12)}。

血液房水関門の破綻を生じる原因としては前房穿刺^{13)~14)}、内眼手術操作などに惹起される炎症、内膜炎などの内因性炎症¹⁵⁾、エンドトキシン(Endotoxin)¹⁶⁾などの炎症惹起物がある。生体内の炎症に関与する物質は化学伝達物質(chemical mediator)としてまとめられており、代表的なものとしてアラキドン酸カスケードによる生体反応がある。

したがって、前眼部炎症の病態の研究には炎症惹起物質、その阻害薬ならびに臨床的な評価法の開発が重要であり、本稿においては現在までの我々の研究成果を中心に以下にまとめる。

2. 血液房水関門の臨床的検査法

細隙灯顕微鏡検査は血液房水関門の破綻による房水蛋白の増加をフレア(光梁)、細胞の増加をセル(微塵)として非侵襲的に観察することが可能であり(図1)、最も優

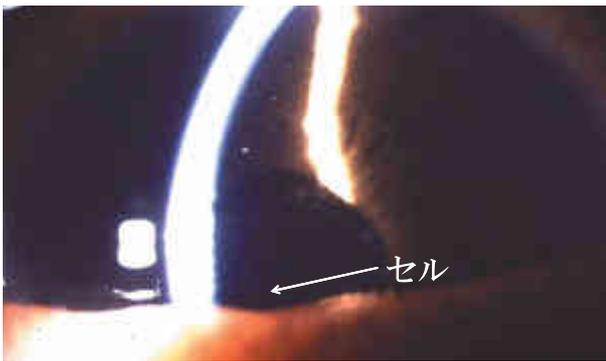


図 1 細隙灯顕微鏡写真による前房フレア、セル像。矢印はセルを示す。

れた臨床的検査法である。細隙灯顕微鏡所見をもとに炎症の程度を評価する方法としてはスリット幅を規定し、観察光の強さ(装置内のNDフィルタを使用)を変更することでフレアを視認できるか否かで評価する方法¹⁷⁾が準用されている。しかし、基本的に細隙灯顕微鏡検査によるフレア、セルの評価は定性的であるため、Hoganらの基準も半定性的評価の域を出ない。

前房穿刺により房水を採取し、蛋白濃度さらに房水内に含まれる成分、病原体を polymerase chain reaction (PCR)法などを用い検査する方法は個々の症例での病因を検討するのに有用な方法であるが、侵襲的検査法であること、前房穿刺後は血液房水関門の破綻を生じ、その後の二次房水は修飾された病的組成となる¹³⁾¹⁴⁾。

細隙灯顕微鏡検査におけるフレア(セル)の検出は房水内での光の散乱現象がその基本である。したがって、この房水内での散乱光強度を測定する方法として、写真計測法¹⁸⁾¹⁹⁾、光電子増倍管を用いた光学的測定法²⁰⁾²¹⁾、イメージンテンシファイアーと撮像管による画像解析法²²⁾が開発、報告された。これらの方法は安定した散乱光強度および良好な測定精度を得ることに問題があった。その理由として光学的測定法では刺激光源(励起光)が白色光または水銀光源であったために広い波長の散乱光を生じ、散乱光測定系での測定に問題があった。すなわち、散乱光測定の測定装置(光電子増倍管の有無、性能)、測定された散乱光の解析方法、また眼内での散乱ノイズの処理などが挙げられ、*in vitro*での測定においては散乱光の測定が可能であっても生体での測定には十分な精度、再現性が得られず臨床応用に至らなかった。また、写真測定、画像解析法では良好な画像を得るための条件が一定にできず、撮像管の飽和およびノイズ処理の問題に加えて、細胞数測定のための画像処理にも問題があった。

フルオロフォトメトリ (fluorophotometry) はフルオレセインナトリウム(フルオレセイン)を経角膜²³⁾または静脈²⁴⁾、内服²⁵⁾により投与し、房水内へのフルオレセイン移行濃度を測定することで房水の動態の検討²⁵⁾²⁶⁾、血液

房水関門²⁷⁾²⁸⁾、血液網膜関門²⁹⁾の定量的測定法として開発された。本法は眼内のフルオレセインを励起光(主な波長 490 nm)で励起し、蛍光強度(主な波長 520 nm)を光電子増倍管で測定するシステムである。房水内フルオレセイン濃度は血液房水関門機能に比例し、かつ外来色素であるために眼内散乱ノイズは房水内フルオレセイン濃度と比較すると無視できる程度であるために定量性および精度の点で有用な方法である。しかし、本法に共通する課題としては房水内蛋白濃度を直接測定するものではなく、あくまでもフルオレセイン色素をマーカーとする血液房水関門機能の一指数であることに加えて、細胞数の測定ができない、短時間内での反復測定が不可能、侵襲的色素投与または色素に対する不具合反応などの課題が存在する。またフルオレセイン全身投与の場合は、フルオレセインの肝臓での代謝の問題があり、肝臓で代謝されて生じるフルオレセイングルクロナイドの蛍光強度は未代謝フルオレセインと比較して 1/10 程度である。したがって、房水内でフルオレセイングルクロナイドと未代謝フルオレセインとが混在している状態ではフルオレセイン強度とフルオレセイン濃度との関係は不明となる問題がある。フルオロフォトメトリでのフルオレセイン投与法の違いによる各々の特徴としては表 1 に示すようなものが挙げられる。

フルオロフォトメトリの臨床応用、特に術後または内因性ぶどう膜炎での炎症度の評価に関してはフルオレセイン静注法が有用であるが、フルオロフォトメトリに共通する問題に加えて薬剤ショックなどの問題がある。

3. フレアセルフォトメーターの開発

細隙灯顕微鏡によるフレア、セルの観察は光散乱現象に基づくものである。光散乱は気相ではレーレー散乱で規定される。液体中での光散乱はレーレー散乱の変形による Debye の式で示される。

$$\frac{I_s}{I_o} = \frac{2\pi^2\eta_0^2(d\eta/dc)^2(1+\cos^2\theta)C}{N_o\lambda^4r^2[(1/M)+2Bc+3Cc^2+\dots]}$$

この式において、 I_o 、 I_s ：照射光/散乱光強度、 η_0 、 η ：溶媒と溶質の屈折率、 θ ：散乱光の角度、 C 、 M ：溶媒の濃度と分子量、 N_o ：アボガドロ定数、 λ ：照射光の波長、 r ：散乱光と測定ウインドーとの距離、である。

これらをもとに、細隙灯顕微鏡による前眼部炎症の評価、フルオロフォトメトリの研究に加えてレーザーによる霧の濃度測定装置の原理を踏まえて前房内蛋白濃度・細胞数測定装置の開発を科学研究費(課題番号 61870070)の補助を受けて着手した³⁰⁾³¹⁾。開発のステップとしては、① 機械的部分の開発を含む装置の開発、② 測定光学系の制御と測定散乱光シグナルの解析のためのソフトウェアの開発、③ 基礎実験および動物ならびに臨床での検証、の 3 部構成からなる。これらは以下に示すように予備実験から臨床応用装置の開発に至るまでを並行して進めた。

表 1 フルオロフォトメトリでのフルオレセイン投与方法による相違

	経角膜法	経静脈法	内服法
投与方法	角膜へのイオントフォーシス	静脈注射	内服での吸収を高めるために空腹時投与が望ましい
フルオレセインの代謝	代謝は受けない	注射後早期の房水内フルオレセインは未代謝. その後, フルオレセイングルクロナイドが増加	房水内へのフルオレセインは投与後 30 分以降では測定対象の多くはフルオレセイングルクロナイド
臨床応用	角膜へのイオントフォーシスは術後例などには応用不能. 生理学的基礎研究が主体	応用可能. 解析法によっては短時間での検査が可能	経時的な測定が必要で臨床応用には向かない
不具合	角膜上皮障害の可能性	アナフィラキシーショックのリスク	特段なし. フルオレセイン液は無味無臭

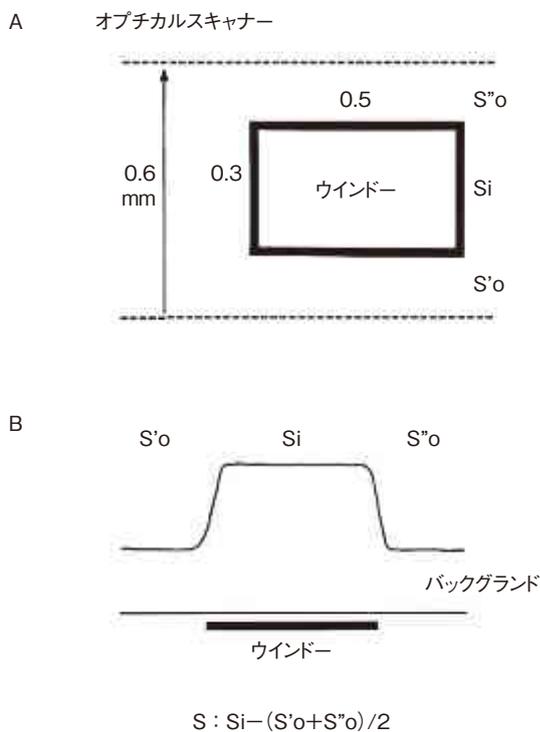


図 2 フレア測定でのレーザービームスキャンとバックグラウンドノイズの処理.

- A : ウインドー (0.3×0.5 mm) を中心にレーザービームが垂直に 0.6 mm スキャンされる.
 - B : レーザービームがウインドーの外にあるときの散乱光 (バックグラウンド) の相加平均値をビームがウインドー内にあるときの散乱光強度から除すことでフレア値を算出する.
- (文献 1, 31 から許可を得て転載のうえ改変)

1) 機械的部分の開発を含む装置の開発

眼内に He-Ne レーザーを照射し, その散乱光強度で白内障の評価を行う目的の装置 (クリード 1000, 興和, 名古屋)³²⁾ を参考に, 前房フレアの測定の可否を行った (予備実験). 家兔を用い, 一次, 二次房水を対象に測定ウインドーサイズ (空气中, 以下同じ) は 0.3×0.5 mm,

レーザー出力は 100 μW とし, 測定散乱光強度を 8 ビットパソコンに取り込み, その総和を測定時間 (平均 2 秒) で除し散乱光強度とした. 次いで家兔の房水蛋白濃度を Lowry 法で測定し, 散乱光強度と Lowry 法による蛋白濃度との間に良好な相関を得た. しかし, 装置そのものはビームが固定であるために虹彩, 角膜などで生じる前房内バックグラウンドノイズ (背景ノイズ) の処理が未解決であった.

(1) 実験機 I

背景ノイズの処理による測定精度の向上を目的に結果として測定用ウインドー 0.3×0.5 mm を挟んでレーザービームを 0.6 mm 垂直にスキャンする方法を開発した (図 2 A). レーザービームがウインドー外にある場合に測定される散乱光強度を背景ノイズと規定し, かつウインドー外の上部和下部にビームがあるときの散乱光強度を比較し, 両者の差により, 背景ノイズを含めて前房内での測定部位の適正度を評価する指標とすることとした. そのうえで, 前房フレア強度 (散乱光強度) としてはビームがウインドー内にある場合の散乱光強度からウインドー外の上下にビームがあるときの散乱光強度の相加平均を減らすことで算出することとした (図 2 B). この結果, 前房フレア (蛋白濃度) の測定精度を飛躍的に向上させることができた³³⁾ (図 3).

(2) 実験機 II

房水内セル (細胞数) の測定法の開発を本装置で行った. フレア測定と基本的に異なる点はセル測定では一定の体積内を測定対象とすることと, セルからの散乱光をどのように規定するかが挙げられる. 測定対象体積としてはフレア測定ではレーザービームをウインドー (0.3×0.5 mm) に対して垂直に一次元スキャンしていたのに対し, ウインドー内にアライメントさせて光源系軸内に組み込まれた対向するガルバノミラーを用いて二次元 (0.25 mm×0.6 mm) にビームをスキャンする方法を開発した (図 4). すなわち, ウインドーサイズの内側に 0.5 秒間で 0.25×0.6×0.5 mm の光学的スキャンスペースを設

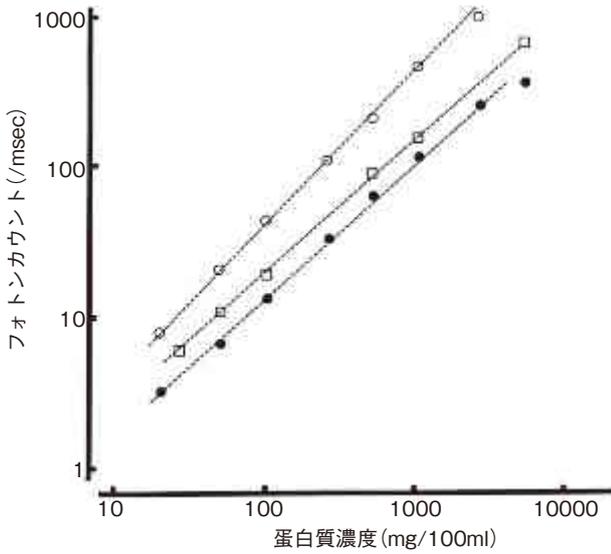


図 3 *In vitro* での既知濃度のアルブミン、グロブリン溶液とフレア値(光子カウント, PC/msec)との関係.

アルブミン、グロブリン溶液とフレア値(光子カウント, PC/msec)との間に良好な直線関係が得られている.

- : アルブミン. $y=0.93x-0.75$
- : アルブミン:グロブリン=2:1. $y=0.89x-0.47$
- : グロブリン. $y=1.0x-0.39$

(文献 31 から許可を得て転載)

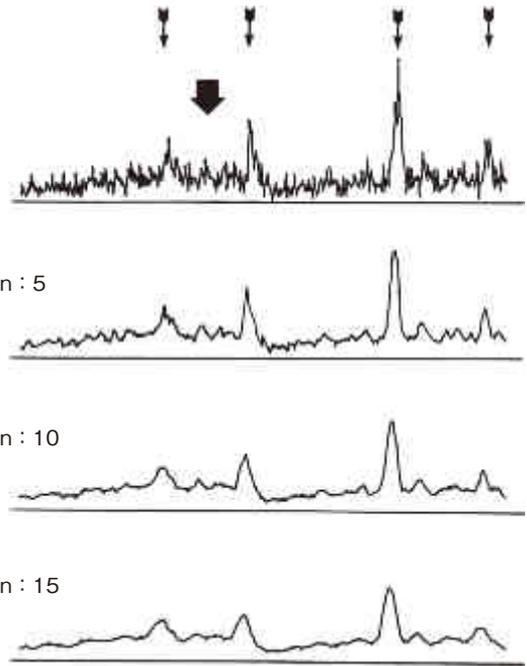
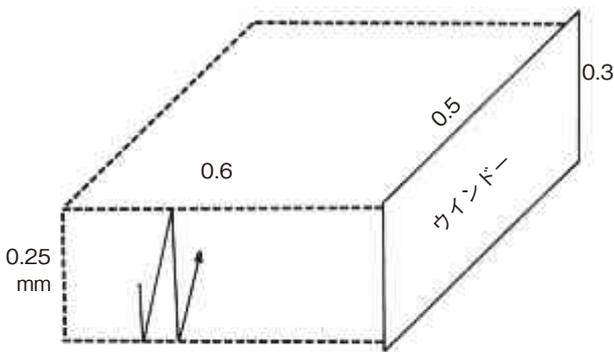


図 5 移動平均法による波形処理.

散乱波形について移動平均処理(nは移動平均幅を示す)を行い、セルによる波形(細い矢印)とノイズ波形(太い矢印)とを分離、判別処理を行う. 細い矢印の波形をセルによる散乱と認識する.

(文献 31 から許可を得て転載)

細胞数測定



オプティカルスキャナー

図 4 セル測定でのビームスキャンと測定波形.

レーザービームをウインドー内にアライメントさせ、光源系内の対向するガルバノミラーを用いて二次元(0.25 mm×0.6 mm)にビームがスキャンされる.

(文献 1, 31 から許可を得て転載のうえ改変)

定する方法である. セルからの散乱光の認識条件としては最終的にガスクロマトグラフィでのピーク波の検出法を参考に光電子増倍管で測定された散乱光の時系列データ波形を移動平均による平滑化処理を行った後に、全データを対象に目視でセルによる波形と認識した波形について基線に対して一定のピーク値(強さ)と 4 photon counts/400 μsec 以上の立ち上がり勾配と下降勾配を有

するピーク波形をセルとして認識する条件を設定した(図 5). これに基づいて既知のヒト血球密度溶液を用いてセル測定モードで測定し、セルカウント値との間に良好な直線関係 [(セル数: 単位は (/0.075 mm³/0.5 sec)] を得た(図 6).

上記の装置の開発の結果、照明光学系にガルバノミラー、観察光学系に光電子増倍管を組み込むこととし、ガルバノミラーのコントロール、セル認識演算ソフトウェアと処理速度の向上を目的に 16 ビットパソコンへの全面変更を行った. ただし、本装置の段階ではセル認識条件の設定を目的としていたためにフレアとセル測定は手動で独立した状態であった³⁴⁾³⁵⁾.

(3) 実験機Ⅲ

実験機Ⅱで得られたフレア、セルの測定条件、コントロールを自動化すること、臨床的応用に向けてフレア、セル測定の両モードともにレーザー出力を 25 μW、ビーム径 15 μm、測定時間各 0.5 秒(合計 1.0 秒)とするためのソフトウェアおよび装置各部の変更を行った. ただし、測定データはすべて保存し、測定結果の検証を行った¹⁾²⁾.

(4) 市販機

市販機ではレーザー出力をモニターし、レーザー出力の変動に対応して光電子増倍管での測定結果を補正するプログラムに加えて、測定装置として必要な装置間での測定値の規格化(標準化: 15% 以内)を図るためにレー

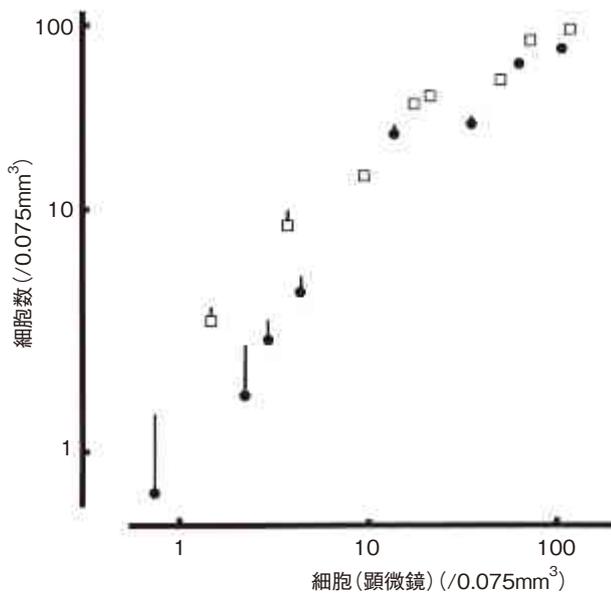


図 6 セル測定モードでの既知血球密度溶液とセルカウント数.

既知血球密度溶液とセルカウント数〔単位は(/0.075 mm³/0.5 sec)〕との間に良好な直線関係が得られている。

□：血球，●：リンパ球.

(文献 1 から許可を得て転載のうえ改変)

ザー出力と光電子増倍管の感度の初期調整方式を設定するとともに、使用中の装置のキャリブレーション器具の開発を行った。これらをもとに多施設臨床試験を実施し、医療機器としての承認を得た(FC-1000, 興和：図 7)。その後、さらに細隙灯顕微鏡と同様の構造を有する装置(FM-500, FC-2000, 興和)の開発がなされた³⁶⁾³⁷⁾。

(5) 装置・測定値の解釈

ぶどう膜炎を対象に本装置と細隙灯顕微鏡検査装置との比較結果を示したものが図 8 である³⁸⁾。ただし、本装置は細隙灯顕微鏡検査での定性的検査法を補完するものであり、房水の臨床的評価には必ず、細隙灯顕微鏡所見を常に参照する必要がある³⁹⁾⁴⁰⁾。本装置についての有用性を評価する一方で個別の疾患の診断には現状では無理であるとの指摘がある⁴¹⁾。本装置の開発目的、特性を考慮すればこうした指摘は明らかに過大な評価、期待感である。

本装置の開発の当初からフレアについては、散乱光強度は測定対象の分子量に比例するために(図 3)、フレア値(photon counts/msec)として扱う場合は細隙灯顕微鏡でのフレアの定量的指標として問題ない。一方で房水蛋白濃度としてアルブミン等量換算する場合は、血液房水関門機能の破綻が強い場合は血漿中のグロブリンの漏出も生じているために過大評価となることに留意する必要がある。また、測定ウインドーに対してレーザービームをスキャンすることでの背景ノイズに対する処理機能があるが、眼内色素が少ないまたは欠損(白色家兎)例では

A



B

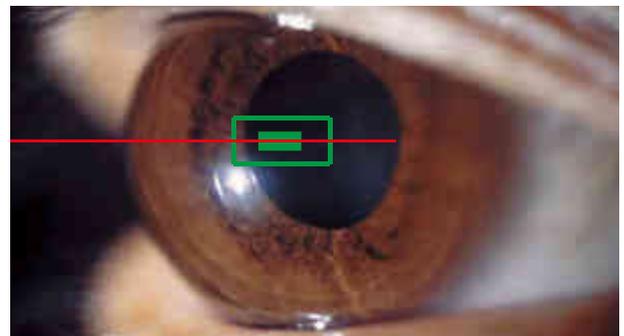


図 7 市販装置(FC-1000)。

A：装置の全体像。

B：前房内でのウインドーのアライメントのシェーマ。中央の緑の枠が測定用ウインドー、赤の直線はレーザービームを示す。

ノイズが大きい。さらに浅前房、前房レンズを中心に背景散乱が測定ウインドーに混入する例では測定に工夫を要する。

セル測定値の解釈では測定が一定の光学的体積・測定時間(FC-1000では0.075 mm³・0.5 sec, FC-2000では0.5 mm³・0.5 sec)であること、虹彩色素などの前房内浮遊物であってもセル認識条件に合致する場合はカウントされることが挙げられる。このセル測定について、細隙灯顕微鏡検査では長径1.0~8.0 mmの細隙光と前房深度とで形成される体積を対象とし、観察時間は任意であるためにセル測定値と細隙灯顕微鏡検査所見の評価とが合致しにくいことに留意する必要がある。

2) レーザーフレアセルフォトメーターの臨床応用とその意義

レーザーフレアセルフォトメーターの臨床応用により、白内障術後炎症の評価³⁴⁾³⁵⁾⁴²⁾、抗炎症薬および眼内レンズの評価^{43)~49)}、生理学的房水動態の評価⁵⁰⁾、抗緑内

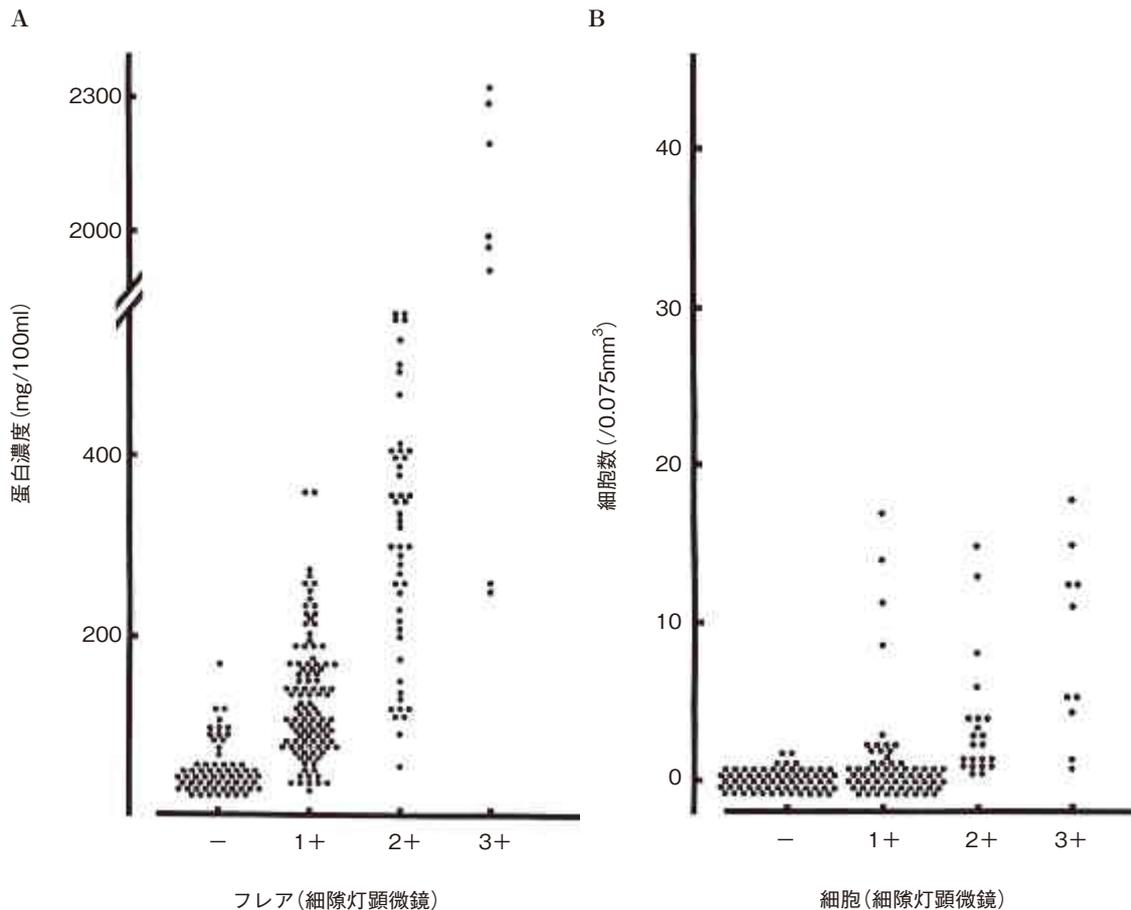


図 8 フレアセルフオートメーターと細隙灯顕微鏡検査所見との比較。

A：フレア測定. 細隙灯顕微鏡検査でのフレアグレーディングは、測定者評価での変動が大きい。

B：セル測定. セル測定モードでは細隙灯顕微鏡でのセルグレーディングが低い場合にはカウントされない例が多い。

(文献 38 から許可を得て転載のうえ改変)

障薬の房水動態への効果と副反応の評価^{51)~53)}、緑内障に対するレーザー虹彩処置後の病態⁵⁴⁾、内眼炎の臨床経過の評価³⁸⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、糖尿病眼症などの網膜血管性病変^{56)~60)}、網膜非炎症性疾患⁶¹⁾⁶²⁾での房水組成への影響などの研究がなされた。また、動物実験においては有色家兎に限定されるが、非侵襲的に房水動態を評価することが可能となり、同一個体での経時的データを解析することで個体差を最小にすることにより、実験精度の向上のみならず、必要とする動物数を最少限にすることを可能とした。

本稿では非ステロイド性抗炎症薬の開発・白内障術後炎症の評価ならびにエンドキシンの許容濃度に関する炎症最小惹起濃度の動物実験について述べる。

(1) 非ステロイド性抗炎症薬の開発・白内障術後炎症の評価

前眼部炎症において充血、縮瞳、房水フレア、セルの増強に関与する物質としては虹彩で産生されることなどから irin として報告された。その後、この irin は体内のさまざまな炎症の場で作用するアラキドン酸カスケ-

ードにおけるプロスタグランジン (PGs) の一部と同一であるとされた^{63)~65)}。アラキドン酸カスケードが明らかにされるに従い、軟性白内障に対する白内障吸引術での縮瞳の抑制を目的に非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の臨床応用の可能性の検討を行った。代表的な NSAID であるアセチルサリチル酸の術前内服療法を行ったが、その効果は不十分で有用性の結果は得られなかった。難水溶性のインドメタシンの懸濁液を院内調製し、以下の検討を行った。

a. 対象と方法

対象は軟性白内障 69 眼である⁶⁶⁾。術前 3, 2, 1, 0.5 時間にトロピカミド+ネオシネフリン (ミドリリン[®], 参天製薬), 1.0% アトロピン点眼に加えて 0.5% インドメタシン点眼を行った (インドメタシン群, n=23 眼, 先天白内障 17 眼, 併発白内障 4 眼, 外傷性白内障 2 眼)。インドメタシン非点眼で手術が行われた 46 眼を対照とした (非インドメタシン群, 先天白内障 25 眼, 併発白内障 13 眼, 外傷性白内障 8 眼)。手術は全身麻酔下で、手術用顕微鏡を用い三島式水晶体吸引装置を使用して行っ

表 2 軟性白内障に対するインドメタシン術前点眼，非点眼群の比較

	インドメタシン群 (n=23)	対照群 (n=46)
術前アトロピン・ミドリン®点眼	+	+
0.5% インドメタシン 術前点眼	+	-
術中縮瞳	0	26**
術後虹彩変形	4	26*
水晶体皮質遺残	2	16*

術前点眼：3, 2, 1, 0.5 時間。*： $p<0.05$ ，**： $p<0.001$ 。
(文献 66 から許可を得て転載のうえ改変)

た。評価項目として術中の縮瞳の程度，術後の虹彩後癒着を含む虹彩の変形，水晶体残留皮質の程度とした。

b. 結果とまとめ

表 2 に示すごとくインドメタシン点眼療法群では良好な手術成績が得られた。本臨床研究は二重盲検法，症例割付けと対照のとり方などの点で現在の臨床研究法のレベルに適うものではないともいえる。しかし，最初の NSAID 点眼薬の安全性を含む臨床導入としての意義は大きいと考えている。

(2) 加齢白内障に対する術後炎症の抑制効果の検討

本臨床研究では軟性白内障手術に対するインドメタシン点眼薬の有用性を踏まえて水晶体嚢内摘出術を対象に以下の研究が行われた⁶⁷⁾。

a. 対象と方法

対象は 69 例の加齢白内障(年齢 54~89 歳)であった。これらの症例は術前点眼療法によって 4 群に分けられた。① 0.1% 油性デキサメタゾン点眼群(17 例：デキサメタゾン群)，② 0.1% 油性インドメタシン点眼群(17 例：0.1% インドメタシン群)，③ 0.5% 油性インドメタシン点眼群(18 例：0.5% インドメタシン群)，④ 対照：プラセボ点眼群(17 例：対照群)である。各油性点眼薬は溶媒としてセサミオイルを使用し院内薬剤部において調剤された。各点眼薬を無作為に割り付けし，術前 3, 2, 1, 0.5 時間に点眼を行った。術後療法は全例，同じとし，1.0% アトロピン点眼，0.1% デキサメタゾン点眼 3 回/日と 3 日間抗菌薬の内服を行った。手術は全例，局所麻酔で手術用顕微鏡下で行った。

b. 炎症の評価

術後 2 日から 7 日まで以下の項目，方法で評価を行った。

前房内炎症：Hogan らの方法¹⁷⁾に準拠し，細隙灯顕微鏡でフレア，セルの測定を行った。フレアはフレアが観察可能な細隙灯顕微鏡の光源電圧 7.5, 6.0, 5.0 V をそれぞれフレア +1, +2, +3 とし，7.5 V でもフレアを認識できない場合を 0 とした。セルは細隙灯光源の幅 0.3 mm，長さ 1 mm，光源電圧は 7.5 V とし，光源系と観察系との角度は 30 度，観察系の倍率は 16 倍とし，

照明された前房内のセル数をカウントした。

瞳孔径：赤外線フィルムで瞳孔撮影を行い，コンパレータで計測した。

角膜厚：Mishima-Hedbys 法で測定した。

c. 結果

i) セル

術後の前房内セル数の経過は図 9 B に示すように術後経過とともに減少したが，対照群との有意差はデキサメタゾン群では術後 4 日まで($p<0.05$)，0.1% インドメタシン群は術後 5 日目を除く術後日($p<0.05$)，0.5% インドメタシン群は術後日のすべてで有意差($p<0.01$)がみられた。また，デキサメタゾン群と 0.1% インドメタシン群との間にはすべての術後日で有意差がなく，0.5% インドメタシン群とは術後 6 日まで有意差($p<0.02$)があった。0.1%，0.5% インドメタシン群間では術後 5 日まで有意差($p<0.05$)ありとの結果であった。

ii) フレア

フレア強度の経過は図 9 A に示すごとく，0.5% インドメタシン群はすべての術後日で他の群よりも有意に低値を示した。しかし，フレア強度は 4 段階評価であるため統計的評価が難しく，対照群との有意差は 0.1% インドメタシン群の術後 6, 7 日($p<0.05$)，0.5% インドメタシン群ですべての術後日($p<0.05$)，デキサメタゾン群と 0.5% インドメタシン群間では術後 2, 3, 4, 6 日($p<0.05$)，0.1% と 0.5% インドメタシン群間では術後 2, 3, 4, 7 日($p<0.05$)にあり，デキサメタゾン群と 0.1% インドメタシン群との間には有意差がみられなかった。

iii) 瞳孔径

瞳孔径の術後経過を図 10 A に示す。瞳孔径データは現像処理などの問題で全例の経過観察は行えなかった。例数などの問題から有意差がみられたのは対照群と 0.5% インドメタシン群との間で術後 2, 3, 4 日($p<0.02$)であり，残りは散発的であった。

iv) 角膜厚

角膜厚の術後経過を図 10 B に示す。角膜厚は術後 5 日以後数例の欠損値があるが統計学的処理は十分に可能であった。0.5% インドメタシン群は対照群と術後 2~5 日に有意差($p<0.05$)，デキサメタゾン群および 0.1% インドメタシン群との間には術後 2, 4, 5 日に有意差($p<0.05$)があった。しかし，デキサメタゾン群と 0.1% インドメタシン群との間にはすべての術後日において有意差がみられなかった。

d. 考按とまとめ

0.5% インドメタシン術前 4 回点眼は従来の術後デキサメタゾン，アトロピン療法を上回る術後炎症抑制効果を有することが前房セル，フレア，瞳孔径，角膜厚測定で明らかにされた。本臨床研究は NSAID 点眼療法が白内障術後炎症抑制効果を有することを確立するもので

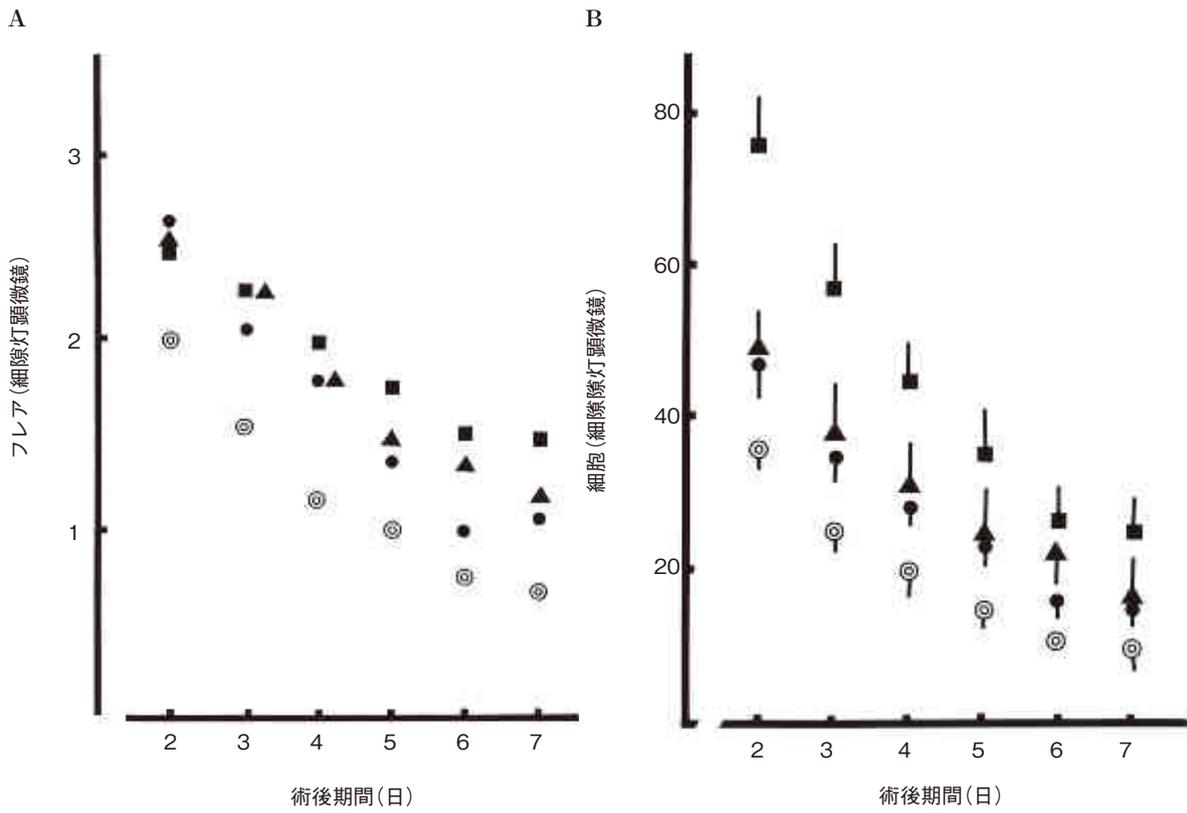


図 9 水晶体嚢内摘出術後の炎症評価.

A: フレアの経時的变化, B: セルの経時的变化.

○: 0.5% インドメタシン, ●: 0.1% インドメタシン, ▲: 0.1% デキサメタゾン, ■: 対照(基剤).

(文献 67 から許可を得て転載のうえ改変)

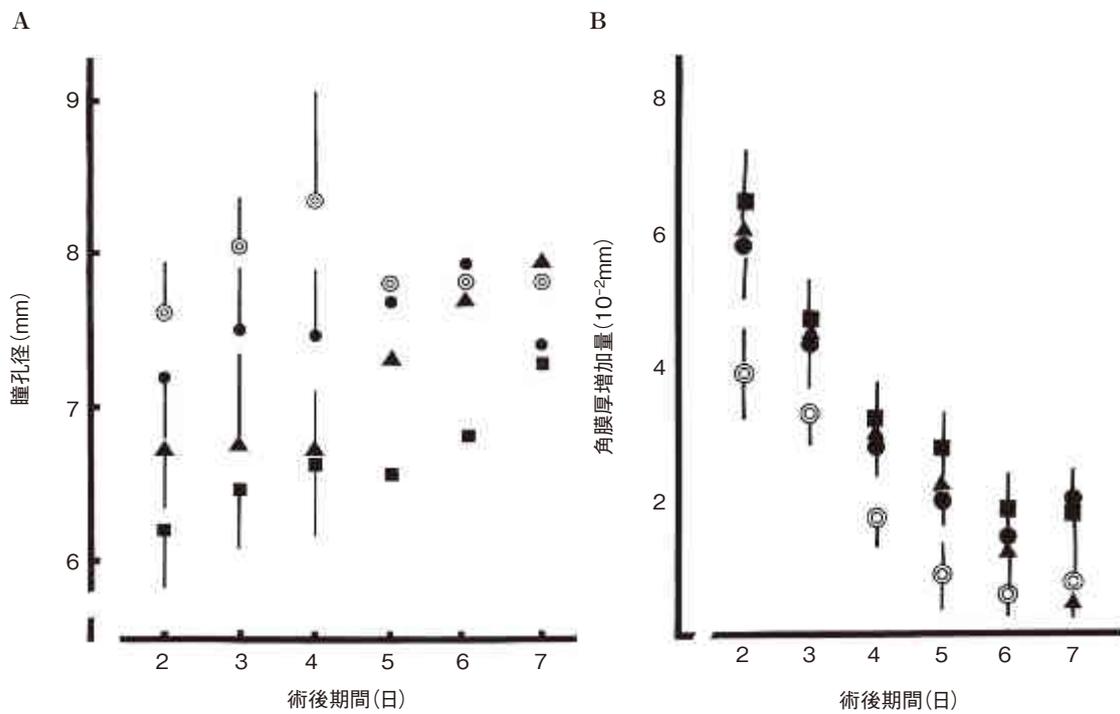


図 10 水晶体嚢内摘出術後の炎症評価.

A: 瞳孔径の経時的变化, B: 角膜厚の経時的变化.

○: 0.5% インドメタシン, ●: 0.1% インドメタシン, ▲: 0.1% デキサメタゾン, ■: 対照(基剤).

(文献 67 から許可を得て転載のうえ改変)

あった。一方、細隙灯顕微鏡検査での半定量的検査法、瞳孔径測定、角膜厚測定の組み合わせは前眼部炎症の非侵襲的臨床検査法としての意義を有することが明らかにされた。

ただし、個々の検査法としては以下の問題点があった。一定条件下での細隙灯顕微鏡によるセル、フレア評価には限界があることが挙げられる。すなわち、セルについては、NSAID 点眼薬は抑制効果が弱いことがその後のフレアセルフオトメトリで明確にされることになった。またフレアについても 4 段階の強度評価では主観的かつ精度が不良で NSAID 点眼薬の有用性を評価するために有意差を示すことが難しく、このことはその後の多くの臨床試験でも明らかになった。瞳孔径測定は赤外線フィルムを使用し、暗室において赤色照明下で測定することで定量的な測定が可能であるが、フィルム処理などが必要でリアルタイムでのデータ集積ができない問題がある。角膜厚測定は角膜内皮細胞の総合的機能を評価するうえで有用な非侵襲的検査法である。また、Mishima-Hedbys 法は角膜中央の厚み測定の再現性に優れた方法であるが、白内障手術のように手術切開創が角膜周辺にある場合は角膜実質内での水の移動と関係する問題が挙げられる。すなわち、角膜実質内での水の移動に関して、膠原線維のラメラ構造に沿っての動きは、上皮層と内皮層の間の垂直方向の動きよりも遅いとされる⁶⁸⁾。このことは、角膜中心厚測定は白内障手術の場合のように切開創が角膜周辺にある場合は切開創部の影響を受けにくく評価が難しいことを意味する。さらに、角膜内皮細胞機能は代償機能が大きく、前房内炎症を反映しにくいことなどから角膜中心厚測定は角膜移植術後の評価には有用ではあるが、前房内炎症の評価には有用性が低いとの問題がある。

NSAID 点眼療法の基礎概念は炎症における化学伝達物質としてその役割、意義が明らかにされてきたプロスタグランジン (PGs) の阻害薬としての意義が大きい。眼内でアラキドン酸カスケードにより産生される PGs の関与は前眼部の病態だけではなく、血液網膜関門にも関与し、水晶体嚢内摘出術後に高い頻度で生じかつ視力低下を生じる術後嚢胞様黄斑浮腫 (CME) の病態生理について三宅が蛍光眼底検査を用いた詳細な研究で明らかにした⁶⁹⁾。こうした臨床研究を通じて、術後炎症抑制療法は従来の副腎皮質ステロイド薬、アトロピン点眼に加えて NSAID の術前・術後療法追加が主体となった。これはステロイドの副作用である眼圧上昇、易感染性を考慮した場合に NSAID が主要な代替薬となり得ること、さらに、術後 CME の予防としては副腎皮質ステロイド薬ではなく NSAID の長期点眼が有効であるとの研究に大きく貢献した。

これらの研究は無血管組織としての組織学的特性、光学的特性を有する眼科領域では、その後の角膜厚測定、

角膜内皮細胞に対するスペキュラーマイクロスコープなどの臨床への導入とともに^{70)~73)}、手術という外傷の病態生理の検討があらたな研究領域として確立されることに貢献した。こうした手術の病態生理の研究は前房 (虹彩支持) 眼内レンズの眼組織傷害を明らかにし、我が国での前房レンズによる白内障術後水疱性角膜症の発症を最少限に抑えることができた。また、本研究で示したような前眼部炎症の非侵襲的臨床検査法はあらたな内眼手術術式、眼内レンズ、抗炎症薬を中心とする薬物の効果と副作用の評価プロトコルにおいて重要な項目の一つとされることとなった。

(3) NSAID 点眼薬の薬理効果の再評価

フレアセルフオトメーターの開発、臨床導入において、その有用性の検討は前述のごとく、主に細隙灯顕微鏡によるそれまでの臨床評価との比較で行われた¹⁾。NSAID の臨床導入以降、フレアセルフオトメーターの開発に至るまでの期間に、白内障手術術式は水晶体嚢内摘出術から計画的な水晶体嚢外摘出術 (P-ECCE) + 後房眼内レンズ (PC-IOL: 主にポリメチルメタクリレート製)、薬物療法は術前術後 NSAID 4 回/日点眼、術前散瞳薬 (アトロピン、ミドリン[®]) 点眼、術後副腎皮質ステロイド薬、抗菌薬、散瞳薬 (ミドリン[®]) 4 回/日へと移行していた。また、炎症度に関する臨床検査法としてはフルオロフォトメトリが行われていた。白内障術後の問題としてはフィブリン反応を含む術後炎症、後発白内障が挙げられる。

P-ECCE+PC-IOL 手術術後の経過例では図 11 に示すようにセル、フレアが順調に低下するデータが得られた²⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。ただし、相対的にセルの変動は大きい。一方、術後フィブリンは術後 4、5 日前後に瞳孔縁を中心に PC-IOL との間に多くみられるものである。フィブリン反応発症症例の術後経過を図 12 に示す。本例では術 5 日後に細隙灯顕微鏡でフィブリン反応が観察された。術後 2 日まで減少したフレアが、術後 3 日から増加に転じている。またセルについては術翌日のセル数がそれほど減少せず、術後 5 日から増加している。すなわち、細隙灯顕微鏡でフィブリンが観察される前に血液房水関門の再破綻が生じていると考えられる。

NSAID 点眼の有用性をフレアセルフオトメトリを用い以下の方法で検討した。

a. 対象と方法

対象は加齢白内障に対し計画的な水晶体嚢外摘出術 (P-ECCE) + 後房眼内レンズ (PC-IOL) を行った 79 例である。これらを、0.5% インドメタシン (インドメロール[®]) 術前 4 回 (3, 2, 1, 0.5 時間)、術後 4 回/日点眼群 (インドメタシン群, 30 例)、対照として 0.5% インドメタシン術前 4 回点眼のみ (対照群, 49 例)、の 2 群に分けた。術後療法はすべて 0.1% ベタメタゾン (リンデロン[®])、トロピカミド (ミドリン P[®])、抗菌薬点眼を行った。フ

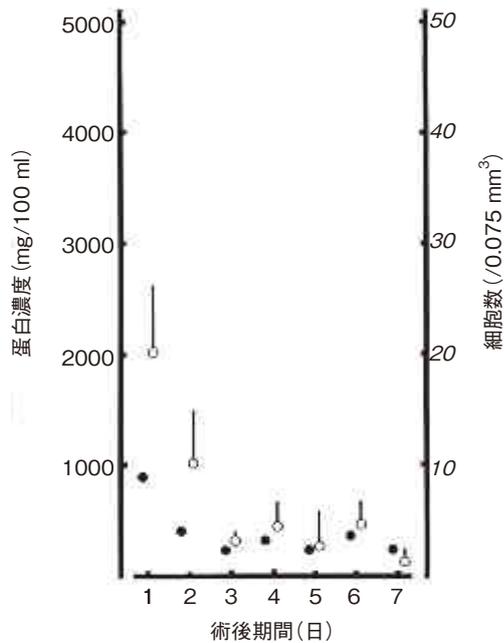


図 11 計画的な水晶体囊外摘出術(P-ECCE) + 後房眼内レンズ(PC-IOL)の順調な症例での術後経過。

●：蛋白濃度，○：細胞数。

(文献 2 から許可を得て転載のうえ改変)

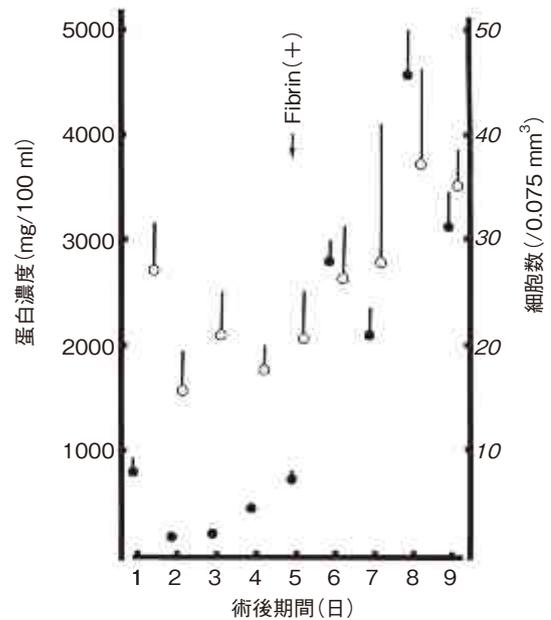


図 12 計画的な水晶体囊外摘出術(P-ECCE) + 後房眼内レンズ(PC-IOL)でのフィブリン反応発症症例での術後経過。

●：蛋白濃度，○：細胞数。

レアセルフフォトメトリは術翌日から7日までとした。

b. 結果

対照群では術後フィブリン発症例があり、それらをフィブリン(+)群(n=14)と(-)群(n=35)とにさらに区分した。図 13 B はセルの測定結果である。インドメタシン群は術後の全日を通してセルの平均値は低値を示したが、対照群のフィブリン(-)群との間に有意差はなかった。しかし、フィブリン(+)群とは術5日後以降で有意差(p<0.05)があった。一方、フレア(アルブミン等量濃度換算)に関しては、インドメタシン群は対照群のフィブリン(-)群との間に術2日後以降有意差(p<0.01)を示した。フィブリン(+)群は術3日後から蛋白濃度の増加がみられ、術5日にピークを示した(図 13 A)。

c. 考按とまとめ

術後セル、フレアについて、フレアセルフフォトメトリの結果は加齢白内障手術に対する NSAID 点眼の臨床研究における細隙灯顕微鏡による既報の結果⁶⁷⁾と異なるものとなった。両者の相違としては術式と薬物療法の相違、すなわち水晶体囊内摘出術(ICCE)と P-ECCE+PC-IOL および NSAID 術前・術後点眼の導入などが挙げられる。術後反応の相違としては ICCE ではフィブリン反応がないのに対して PECCE+PC-IOL ではフィブリン反応を呈する症例があること、セルに関してインドメタシン群と対照群[フィブリン(-)群]との間に有意差がみられなかったことである。特に、フレアとセルとでの乖離に関しての解釈が問題となった。測定方法、精度以外に NSAID の炎症抑制効果に関してはアラキドン酸カス

ケードと生体反応との関係で解釈することが可能であると考えられた。図 14 は基本的なアラキドン酸カスケードを示したものである。炎症担当細胞膜からホスホリパーゼ A の作用でアラキドン酸が産生される。この経路に副腎皮質ステロイド薬は作用し、抗炎症作用を有する。一方、アラキドン酸にシクロオキシゲナーゼ(COX)が作用するとプロスタグランジン(PGs)などのいわば、液性の血管拡張作用を有する炎症化学伝達物質が産生され、リポキシゲナーゼが作用するとロイコトリエン(LT)など細胞の好中球遊走活性などを有する物質、特にLTB₄などが産生される。NSAID は主にこの COX 阻害作用を有し、リポキシゲナーゼ阻害作用はないとされる。したがって、白内障術後のフレアとセルの反応に乖離を生じるのは妥当であると考えられた。すなわち、前房フレア、セルを独立して定量的に測定できるフレアセルフフォトメーターは NSAID の薬理効果を臨床的に証明することができた。

一方で、NSAID 点眼の角膜上皮障害例が報告されるようになった。これに関しては胃粘膜上皮での細胞サイクルと COX の役割についての検討がなされた。胃粘膜上皮細胞の再生に関しては COX 1 が重要な役割をしており、インドメタシンは COX 1, 2 の両者を抑制するために胃粘膜上皮細胞の再生を阻害する結果、胃潰瘍を発症するとの機序が考えられてきている。すなわち、従来から副腎皮質ステロイド薬は副作用として胃潰瘍を発症することが知られていたが、NSAID との併用はさらに胃潰瘍発症のリスクを高くする可能性が明らかにされ

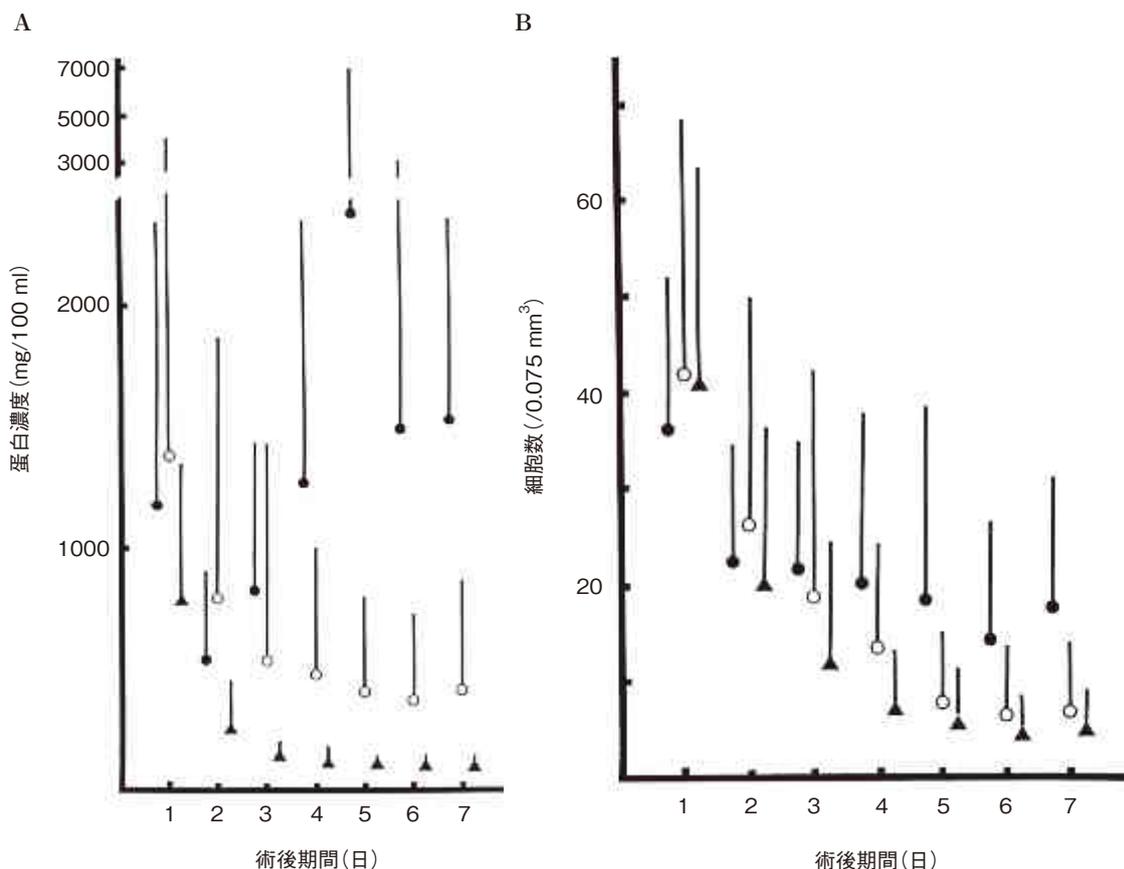


図 13 P-ECCE+PC-IOL 術後の炎症経過.

- A : セル測定結果. インドメタシン群は術後の全日を通してセルの平均値は低値を示すが, 対照群のフィブリン(-)群との間に有意差はない. しかし, フィブリン(+)群とは術 5 日後以降で有意差(p<0.05)がある.
 - B : フレア測定結果. インドメタシン群は対照群のフィブリン(-)群との間に術 2 日後以降有意差(p<0.01)がある. フィブリン(+)群は術 3 日後から蛋白濃度の増加がみられ, 術 5 日にピークがみられる.
- ▲ : インドメタシン群, ○ : 対照群 [フィブリン(-)], ● : 対照群 [フィブリン(+)].

(文献 2 から許可を得て転載のうえ改変)

た. こうした結果から, NSAID において選択的 COX 阻害薬理効果の研究が眼科臨床研究とは別に進み, それらの点眼薬製剤の眼科領域への導入および臨床治験においてフレアセルフォトメーターは重要な役割を担った. 図 15 はケトロラック点眼薬の至適濃度決定に関する臨床試験結果である.

術式として P-ECCE を主体とする期間にあつては closed eye surgery とも称される現在の小切開, 超音波乳化吸引術よりも術後炎症が強いために, 特に内因性内眼炎合併例を中心に眼内レンズ挿入の適応および眼内レンズの選択に関する検討が必要とされた. 図 16 はポリメチルアクリレート (PMMA) 製 IOL での眼内レンズ表面処理 (ヘパリン処理) レンズと多焦点眼内レンズとの比較検討結果である. 3 種類の IOL 間での術後炎症には差がないとの結果であった.

4) エンドトキシン許容濃度の検討

眼内炎症の抑制は良好な視機能の維持に重要な役割を

担っているが, 眼内炎症の惹起物質の一つにエンドトキシン (Endotoxin) がある¹⁶⁾. 近年, 白内障術後早期の強い前眼部炎症の臨床報告が欧米でみられ toxic anterior segment syndrome (TASS) の病態で位置づけられている^{74)~78)}. TASS の原因としては粘弾性物質, 眼内レンズなどに含まれるエンドトキシンが一因として考えられている. 眼内レンズ, 粘弾性物質の基準に関する国際標準化機構 (ISO) TC172SC7WG7 では米国医薬食品局 (FDA) を中心にこれら眼内医療機器の含有エンドトキシン許容濃度 (現行 2.0 EU : endotoxin unit) の引き下げ改正を提起し, 検討に入った. この SC7WG7 内にエンドトキシンタスクフォースが設けられ著者も参加することとなった. 当初, FDA の実験プロトコルは家兎を対象に細隙灯顕微鏡による評価実験であったため, 我々としては実験計画の精度の問題で同一実験を実施することは見合わせることにした. 2008 年 5 月に FDA の実験結果が委員会に提出 (書類番号 SC7WG7N638) されたが,

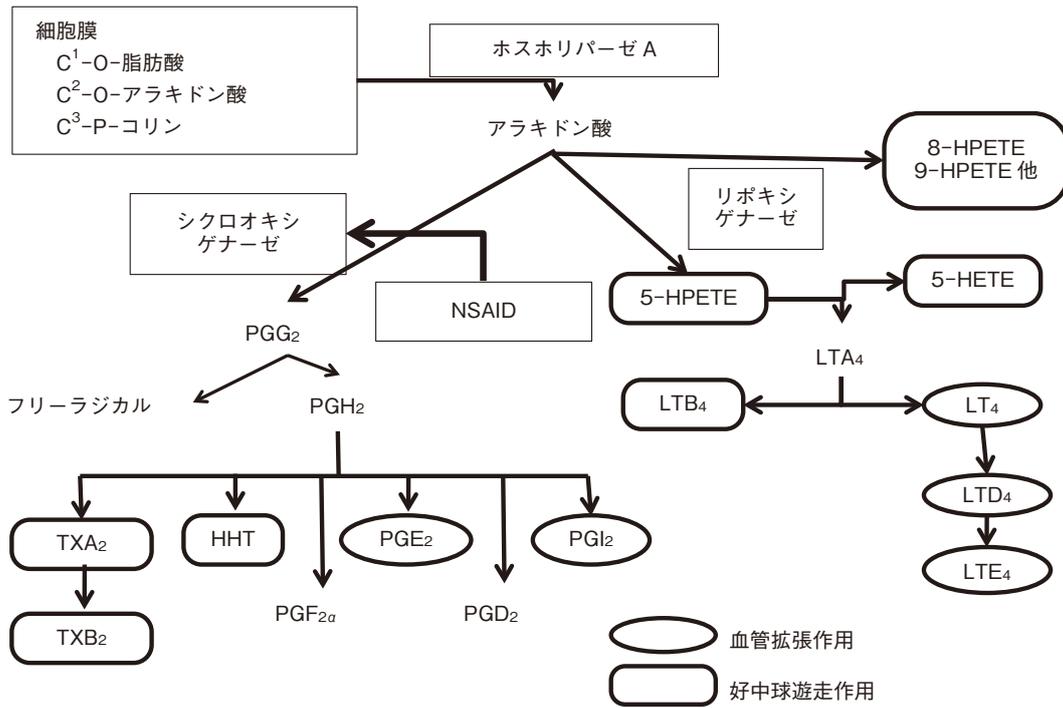


図 14 アラキドン酸カスケードと炎症.

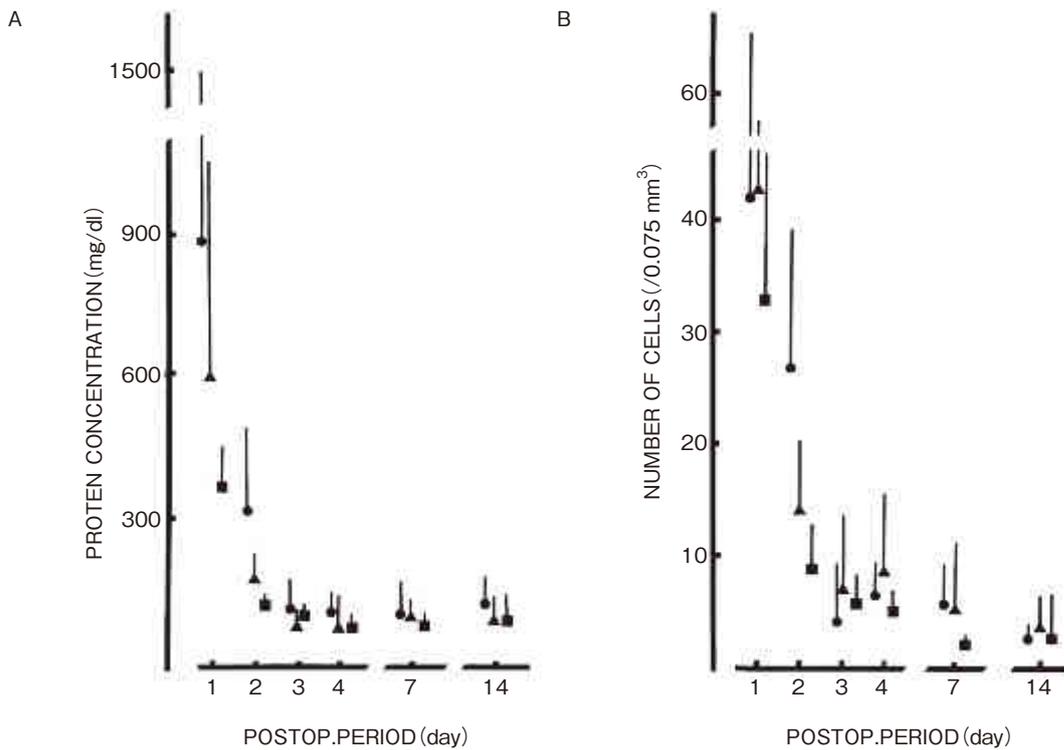


図 15 ケトロラック点眼薬の術後炎症抑性効果に関する濃度の検討.
0.5% ケトロラック溶液が有用であると結論された結果を示している.
A: 蛋白濃度. B: 細胞数.
●: 溶媒のみ, ▲: ケトロラック 0.1%, ■: ケトロラック 0.5%.

(文献 45 から許可を得て転載)

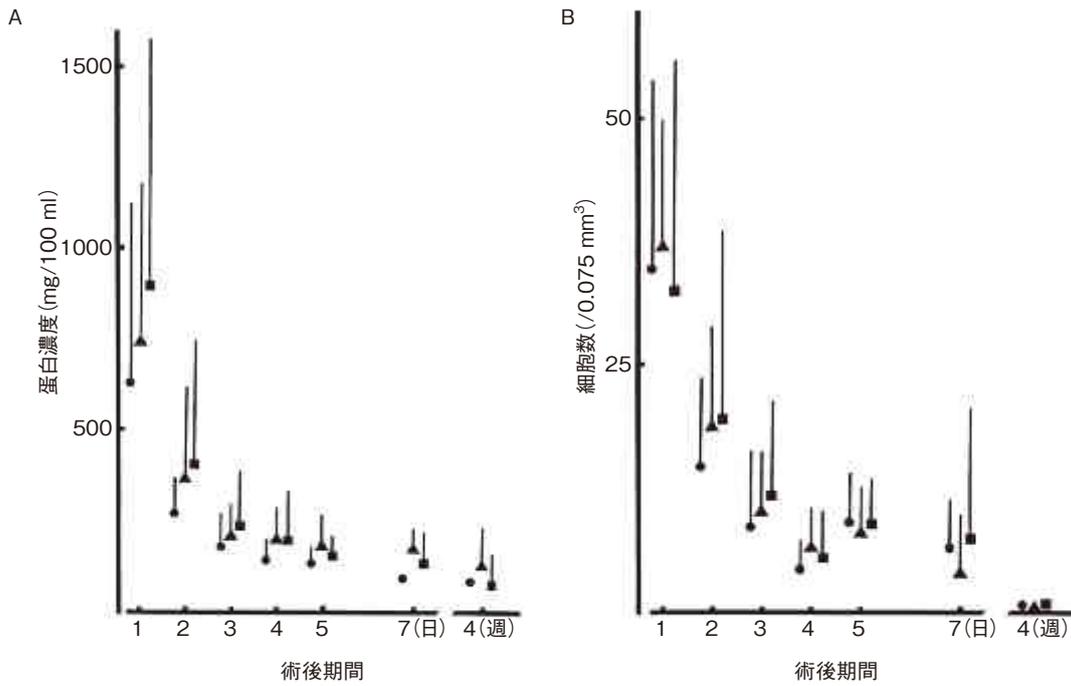


図 16 IOL 素材の相違による術後炎症の検討.

3 種類の IOL 間での術後炎症には差がないとの結果である.

A: 蛋白濃度. B: 細胞数.

▲: ヘパリンコート IOL, ■: 多焦点 IOL, ●: ポリメチルアクリレート IOL.

委員会から定性的評価による実験精度，統計処理などの問題の指摘がなされ，我々の教室で新たに実験を行い 2008 年 10 月の委員会で報告した(書類番号 SC7WG7 N672)．以下がその実験の概要である⁷⁹⁾．

有色家兎を対象に既知の濃度のエンドトキシン溶液 50 μ l，その僚眼に溶媒のみ 50 μ l(シャーム)を 30 G 針で全身および局所麻酔下で前房内に注射した．前房内への注射エンドトキシン量は注射前後での注射筒の重さを測定し，実エンドトキシン量を決定した．エンドトキシン注射前後，無麻酔でフレアセルフオトメトリおよび細隙灯顕微鏡検査を行った．図 17 は既知エンドトキシン濃度溶液別のフレア値の経過である．前房内注射後 30 分にフレア値のピークがみられる．ただし，この変化では濃度別の炎症度の比較結果は得られていない．溶媒のみの注射によっても注射後の前房内炎症は生じていることも確認できた．そこで前房内実エンドトキシン量に従って，フレア値の変化をもとに area under the curve (AUC)解析法を用いてエンドトキシン量とフレア値との関係をプロットしたものが図 18 A である．溶媒のみの注射による前房フレア値の AUC 解析値の平均値 +2 σ (標準偏差)および 3 σ をもとに炎症惹起最小エンドトキシン濃度を算出した．セルに関しては術後 6 時間以内ではセル測定が行えない例が多く，9 時間以降は多くの例でセル測定が行えた．これは細隙灯顕微鏡検査の評価でも同様であった．図 18 B は注射後 24 時間でのセル値である．表 3 は炎症惹起最小エンドトキシン濃度に関する

フレア値およびセル値のまとめである．溶媒のみの注射の対照僚眼での測定結果をもとに平均値 +2 σ を炎症惹起最小エンドトキシン濃度とするとフレア値からは 0.60 EU，セル値からは 0.23 EU と結論された．

今回の研究はエンドトキシン前房内注射前後のフレア，セルを同一家兎で経時的に測定することで個体差を無視することが可能となり良好な実験精度を得ることができた．また前房内注入エンドトキシン量を注入前後の注射筒の重さを測定することで実際の注入エンドトキシン量を測定し，かつ AUC 解析法の概念によってフレア炎症総量を算定，解析することによりエンドトキシン前房内注射時間からの実際のフレアセルフオトメーターでの測定時間に基づく炎症強度を測定することが可能となり，良好な解析精度となった．また前房内に注射されたエンドトキシン溶液の濃度測定法としては比濁法と比色法(kinetic chromogenic method)とが一般的に使用されているが，定量法としては比色法が使用されている．しかし，比色法は至適測定範囲が狭く，既存のエンドトキシン濃度の測定は可能であるが，対象物の測定至適濃度への調整に問題があった．今回の研究では光散乱法によるエンドトキシン濃度測定法を併用することで従来の比色法の問題点を検証しつつエンドトキシン濃度の測定を行うことができた．

今回の研究により，エンドトキシンの前房内炎症惹起最小濃度はフレアからは 0.60 EU，セルからは 0.23 EU との結果が得られた．この乖離は NSAID 点眼薬の薬理

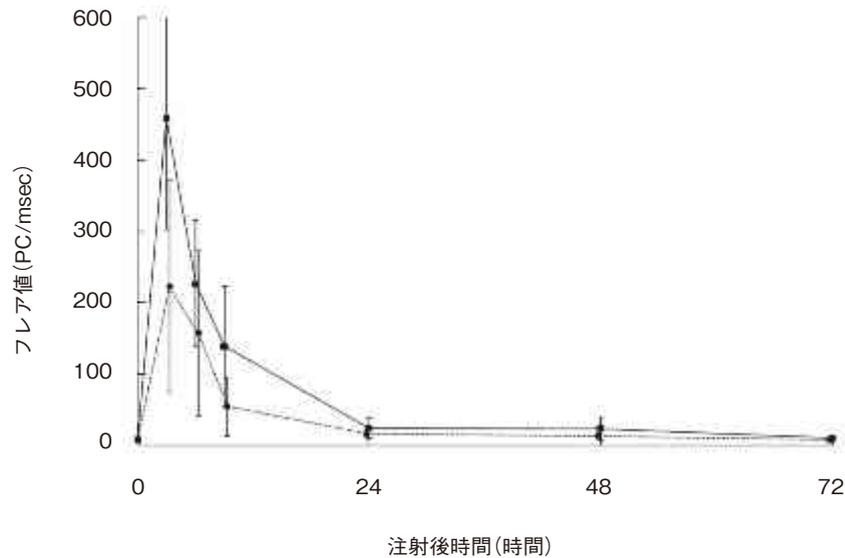


図 17 前房内エンドトキシン溶液注射後のフレア値の変化。

既知のエンドトキシン濃度溶液を前房内に注射し、その傍眼に溶媒を注射(シャーム)。注射後30分のところでフレア濃度はピーク値を示し、その後減少を示す。

■: エンドトキシン(5.0 EU/ml, 50 µl)注射眼, ●: 対照(溶媒注射: シャーム)。

(文献 79 から許可を得て転載のうえ改変)

効果と同様、フレア、セルに関する前眼部炎症機序の相違が関与していると考えられる。このデータからは安全域(通常10倍、狭くてもよい場合は2倍)を2倍とした場合、セルのデータから0.1 EUが妥当であるとする結果である。0.1 EUはFDAが彼らの実験を通して主張していたデータと一致するものであった。企業としては従来の許容濃度2.0 EUに比し、新たな規制値は20倍厳しいものとなっている。こうした状況下にあって眼内レンズでのエンドトキシン許容濃度として0.5 EUの提案(ISO 11979-8DIS)が主要メンバー国になされ、日本のみがこの規制値に対して「否」の投票を行った。米国ではFDAと米国基準局(ANSI)との連絡不足で「諾」との投票を行った。その後、各国での投票となり、今回は日・米に加えて数か国が「否」としたため現在、許容濃度0.5 EUについて再度、検討を要するとの状況になっている。

4. 小 括

フレアセルフオートメーターは細隙灯顕微鏡による前眼部炎症の重要な所見である房水蛋白濃度(フレア)、細胞(セル)について高い精度と再現性特性とをもとに非侵襲かつ定量的測定を可能とした。本検査法は、我が国で導入され白内障手術における抗炎症薬として広く使用されているインドメタシンを中心とするNSAIDの薬効評価、および炎症ならびにさまざまな眼内疾患の病態生理の解明を臨床的に可能にした。さらに、高い測定精度を有することから房水動態の解明も可能とした。また、炎症の病態に関する動物実験では同一個体を経時的に評価することが可能になり、実験精度の向上のみならず、犠

牲となる動物数を最少にすることも可能とした。

III 涙液を用いた臨床検査法

1. 眼表面の防御機構

眼表面は角膜、結膜および涙液で構成され、その他の体組織と解剖学的、機能的に大きく異なるのみならず、これら3成分各々が異なる一方で他の体組織で行われている生体活動を凝縮した形で役割分担を果たすことにより眼表面の恒常性を維持している。すなわち、個々の構成体が独自の構造、機能を有する一方で相互に密接な関係を維持することで眼表面の恒常性が維持されている。したがって、構成組織の個々の構造、機能を解明するのみならず相互作用について総合的に解明することが必要とされる。角膜は結像系として重要な役割を担っているためにその透明性の機序に多くの研究がなされた。一方で角膜はこれを構成する細胞としては比較的単純であるが、角膜の創傷治癒、角膜炎の病態生理について未解決の問題もあり、病態の基本を常に念頭におく必要がある⁸⁰⁾。結膜は涙液とともに角膜の透明性を維持する役割に関する研究がなされる一方で、眼表面の生体防御反応に関しての研究もなされてきた。こうした研究の進歩において腸管粘膜における局所免疫機構の解明が結膜の局所免疫機能の解明にも大きな発展をもたらすこととなった。また、涙液は眼表面の光学的特性と保湿性の維持の役割以外に眼表面における血液としての役割に関する研究がなされてきたが、微量分析法の進歩に伴い局所免疫機構としての役割の解明が進んできている。我々は眼表面の生体防御反応について、従来は、微量なために分析

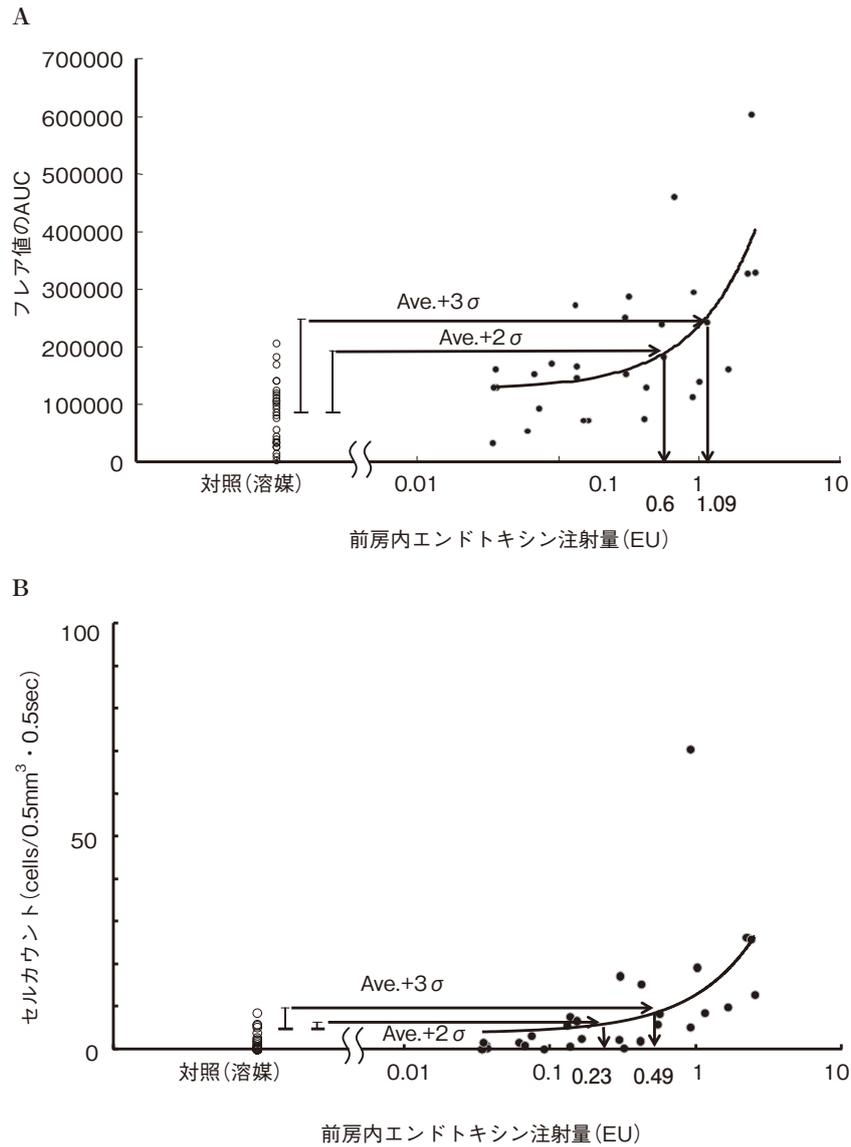


図 18 エンドトキシン前房内注射後炎症と炎症惹起最小濃度の検討.

A : Area under the curve(AUC)解析法を用いたエンドトキシン量とフレア値との関係.
 ● : エンドトキシン注射眼, ○ : 対照(シャーム) (50 μ l), 実線 : 回帰曲線 ($y = 110175x + 127126$, $R^2 = 0.4153$, $p = 0.000161$).
 B : セル測定 : 前房内注射 24 時間.
 ● : エンドトキシン注射眼, ○ : 対照(シャーム) (50 μ l), 実線 : 回帰曲線 ($y = 9.1099x + 3.9383$, $R^2 = 0.2277$, $p = 0.010235$).

(文献 79 から許可を得て転載のうえ改変)

表 3 炎症惹起最小エンドトキシン濃度に関するフレア値およびセル値のまとめ

(EU : endotoxin unit)

	Mean + 2 S. D.	Mean + 3 S. D.
フレア		
AUC 解析	0.60	1.09
セル		
9 時間*	0.01	0.06
24 時間	0.23	0.49

AUC : area under the curve. * : 8 眼ではセル測定はフレア強度が強かったために不能であった. S. D. : 標準偏差.

(文献 79 から許可を得て転載のうえ改変)

に制約があった涙液を対象に, 微量分析法による眼表面の研究を行ってきた. 本稿では, 現在までの眼表面の生体防御反応システムとそれを利用した涙液に関する我々の研究結果中心に総括を行う.

1) 涙液の組成

涙液は, 角膜表面では precorneal tear film と呼ばれ, 最表層から脂質層, 液層, 粘液層の 3 層構造となっている.

涙液の平均 pH は 7.0~8.24, 浸透圧は 0.9~1.0% の生理食塩水 (0.9% 生理食塩水は 289 mOsm/kg) と同等とされる⁸¹⁾. 涙液中には, 多くの生理活性物質が含まれ

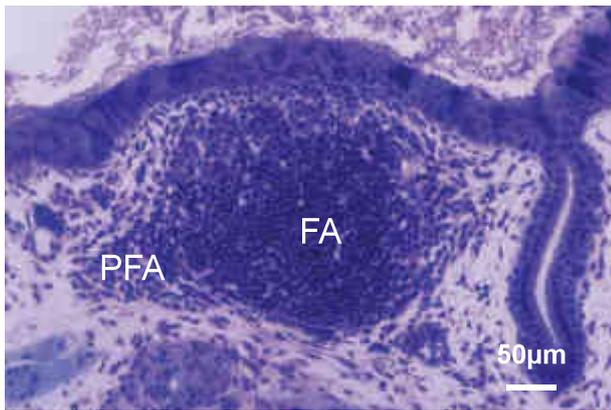


図 19 マウスの結膜関連リンパ組織.

瞬膜に存在し、結膜下組織に濾胞域 (FA)、傍濾胞域 (PFA) が区別できるリンパ球の集簇がみられる (トルイジンブルー染色).

(文献 86 から許可を得て転載のうえ改変)

ており、代表的な物質としては、① アルブミン、② グロブリン：分泌型免疫グロブリン A (secretory IgA)、免疫グロブリン G、③ ラクトフェリン、④ リゾチーム、⑤ β -リジン、⑥ トランスフェリン、⑦ Angiotensin converting enzyme (ACE)、⑧ Prostaglandin F、⑨ 抗菌ペプチドなどである。微量分析法の進歩によりさらに多くの生理活性物質が含まれていることが報告されてきている⁸²⁾。

2) 眼表面の生体防御系としての組織と機能

眼表面は、外界と接し、かつ常に外界からさまざまな刺激・侵襲を受けつつその恒常性の維持と病的反応を担っている。すなわち、眼表面には、外界の影響 (ocular surface-environmental interface) に対する生体防御機構が存在し、外界からの異物、抗原および微生物などによる免疫・アレルギー疾患、感染症に対応している。したがって、涙液および角結膜上皮の病理学的検討は眼表面疾患の病態検索に不可欠な要素であると考えられる。

眼表面の生体防御機構は、非特異的防御機構と特異的防御機構とに大別される⁸³⁾⁸⁴⁾。非特異的防御機構としては、瞬目や涙液に代表される機械的防御、ラクトフェリン、リゾチーム、補体などに代表される生理活性物質などがある。また、近年は Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) やデフェンシン (Defensin) に加えて、上述のようにさまざまな生理活性作用を有する物質の存在が報告されている⁸²⁾。これらの非特異的防御反応は自然免疫 (innate immunity) と総称されている。

一方、結膜組織での特異的防御機構の中心は、粘膜免疫 (mucosal immunity) である。粘膜免疫は全身免疫系とは異なる免疫系であり、分泌型 IgA (secretory IgA: sIgA) と sIgA を誘導するリンパ組織である粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT) とで構成され、腸管での Peyer 氏板を中心に多くの研

究がなされてきている。結膜で MALT に相当するリンパ組織は結膜関連リンパ組織 (conjunctiva-associated lymphoid tissue: CALT) と呼ばれ、ヒトでは下眼瞼円蓋部にあることが報告された⁸⁵⁾。我々はマウスの MALT は瞬膜⁸⁶⁾ (図 19)、モルモットでは上眼瞼から下眼瞼にかけての内側円蓋部に存在することを報告した⁸⁷⁾ (図 20)。すなわち、MALT は動物種により局在部位や形態が異なることが明らかにされた。

(1) CALT に関する研究

MALT は通常のリンパ組織とは異なり、輸入リンパ管を持たず、粘膜上皮で被われた節外性リンパ組織である。したがって、MALT は抗原を輸入リンパ管の役割を果たす特殊な上皮 (リンパ上皮) から取り込み、リンパ組織内で抗原提示後、特異的 sIgA 抗体産生のための IgA 産生前駆 B リンパ球を産生し、輸出リンパ管から排出する機能を有する組織である。このリンパ組織で産生された IgA 産生前駆 B リンパ球は、リンパ管、胸管を経由して大動脈から血液の中に入り、血液循環により全身を循環する。この IgA 産生前駆 B リンパ球は、再び抗原が侵入した際には高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) を介して粘膜組織中に分布 (ホーミング現象) し、そこで IgA 産生形質細胞に分化し、抗原特異的 sIgA 抗体を産生するとされる。すなわち、粘膜組織は血管を介して全身の局所粘膜免疫系が共有されていることになり、common mucosal immune system (CMIS) と呼ばれている⁸⁸⁾。

上述の粘膜免疫機構に関して、組織学的検討によって CALT では中心に B 細胞領域の濾胞域である胚中心とその周囲には T 細胞領域である傍濾胞域および円蓋域があり、表面はリンパ上皮で被われた構造をしていることを我々は報告してきた。すなわち、リンパ上皮には microfold cell (M 細胞) と呼ばれる抗原取り込み能を有する上皮が存在する⁸⁹⁾。濾胞域には B 細胞への抗原提示能を有する濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC)⁹⁰⁾ (図 20)、傍濾胞域には、リンパ球ホーミングに必要な高内皮細静脈が存在し、リンパ球のホーミング現象がみられることを報告した⁹¹⁾ (図 21)。したがって、結膜組織内にみられる CALT は MALT と同様の組織学的形態を有し、結膜組織も CMIS の構成組織であると結論された。

(2) 分泌型 IgA (sIgA) に関する研究

涙液中に存在する免疫グロブリンの代表としては s-IgA が挙げられる。sIgA は、二量体の IgA に J 鎖 (joining chain) および分泌成分 (secretory component: SC) が結合した $[(\text{IgA})_2 \cdot \text{J} \cdot \text{SC}]$ との構造をしている。SC は上皮で産生されるため、涙液中の sIgA の由来について涙腺上皮や結膜、角膜上皮の SC が検討された。その結果、SC は涙腺上皮と結膜上皮に発現するが、角膜上皮には発現されていないことが報告された⁹²⁾⁹³⁾。したが

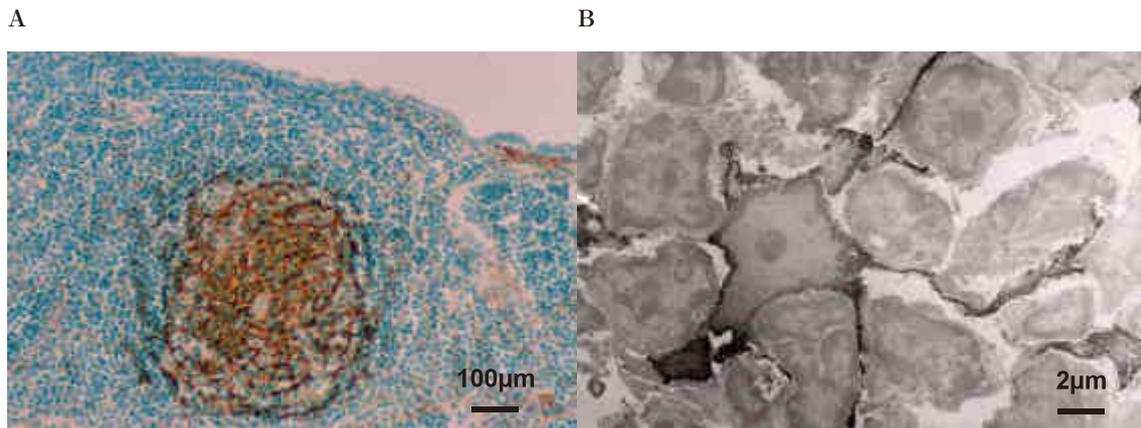


図 20 結膜関連リンパ組織(CALT)と濾胞樹状細胞(FDC)(モルモット).

A : CALT の濾胞域は, S-100 蛋白陽性の濾胞樹状細胞により網目状に染色される(モルモット, 免疫組織化学).

B : 濾胞樹状細胞は細胞質が S-100 蛋白陽性に染色される(モルモット, 免疫電子顕微鏡).

(文献 87 から許可を得て転載のうえ改変)

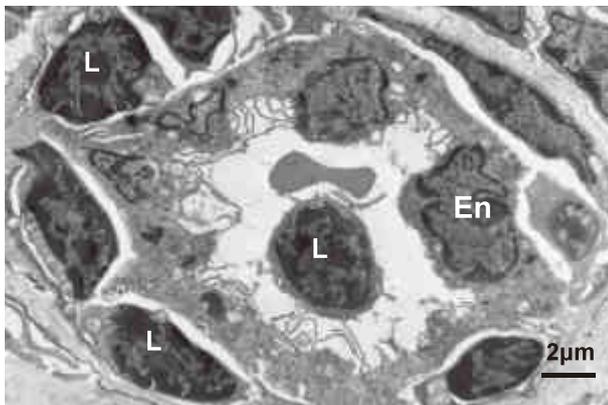


図 21 高内皮細静脈(HEV)とリンパ球ホーミング.

HEV では丈の高い血管内皮細胞(En)がみられる. HEV ではリンパ球(L)が能動的に取り込まれるホーミング現象が観察される.

(文献 91 から許可を得て転載のうえ改変)

って, sIgA は主に涙腺から分泌され, 一部は結膜からも分泌されると考えられている. また, sIgA は上皮で SC と結合して外分泌液中に分泌されるため, 血清中には存在しない免疫グロブリンであるとの特徴を有している. 一方で, 粘膜局所の恒常性維持や疾患の病態に sIgA が深く関与していることが考えられている.

我々が行った涙液中 total sIgA 値の検討では, 健常対照群 (n=42) $1,249.0 \pm 1,025.0$ (平均値 \pm 標準偏差) $\mu\text{g}/\text{ml}$, コンタクトレンズ装用者群 (n=15) $1,057.4 \pm 1,583.3$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, ドライアイ群 (n=13) 197.8 ± 91.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 単純ヘルペス角膜炎(ヘルペス)群 (n=6) 759.7 ± 467.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, 健常対照群とコンタクトレンズ装用群およびヘルペス群との間に有意差はなかったが(図 22, 23), 健常対照群とドライアイ群との間には有意差があった(p < 0.0001)(図 23). これらの結果から, 涙液中 sIgA は,

涙腺組織の炎症により左右され, 角膜炎や結膜炎の影響を受けにくいと考えられた⁹⁴⁾.

アレルギー性結膜疾患での検討では, 健常対照群と比較して, 通年性アレルギー性結膜炎, アトピー性角結膜炎および春季カタルのいずれにおいても, 有意に涙液中 sIgA が低下していた(図 24). これらの結果は, アレルギー性結膜疾患において, 結膜組織のアレルギー炎症は涙腺のアレルギー炎症を合併するために, 涙液中 sIgA が低下する可能性が考えられた⁹⁵⁾. また, 涙液中には抗原特異的 sIgA が存在しており, アレルギー性結膜疾患症例では, 涙液中 IgE の他に, ダニ抗原特異的 sIgA 抗体価が上昇していることを報告し⁹⁵⁾, 粘膜免疫系とアレルギー反応との間の関連を示唆する結果を得た.

眼表面の恒常性維持のために, 涙液中にはどのような特異的 sIgA が産生されているのか, またそれらの特異的 sIgA の増減が, 疾患の病態にどのように関与しているかについては, 今後の興味深い問題であると考えられる. さらに, 粘膜免疫系の臨床応用として, インフルエンザなどに対する粘膜ワクチンが検討されている. 我々は, アレルギー性結膜疾患に対する免疫療法として, 粘膜ワクチンの技術を応用した点眼免疫療法を実験的アレルギー性結膜炎動物モデルにより検討した. 点眼免疫療法により実験的アレルギー性結膜炎の臨床スコアおよび好酸球と CD4 陽性リンパ球の結膜組織内浸潤が有意に抑制されたことを報告し, 粘膜免疫を応用した粘膜ワクチンや点眼免疫療法の臨床応用に関する検討を継続して行っている⁹⁶⁾⁹⁷⁾.

(3) 非特異的防御機構・自然免疫

近年, 自然免疫に関する検討が進む中で, 皮膚および粘膜組織の上皮細胞に発現されている抗菌ペプチドが注目されている. 抗菌ペプチドは, 20~40 個程度のアミノ酸からなる短いペプチドであり, グラム陽性菌, グラ

ム陰性菌以外に真菌やウイルスなどに対する広範囲の抗微生物作用を有する。細菌に対する抗菌作用は抗菌薬と異なり、作用が早く耐性を作りにくいことが特徴とされている。抗菌ペプチドには数種類が報告されているが、デフェンシンおよび cathelicidin(LL-37)が特に重要な作用を有していると考えられている。

デフェンシンは、好中球に存在する α -デフェンシン

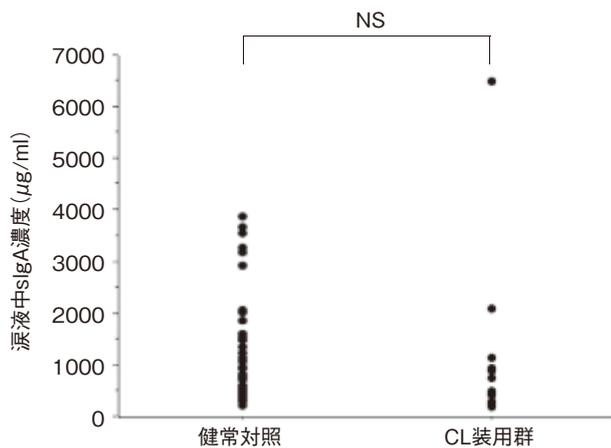


図 22 涙液中分泌型 IgA 値：健常対照とコンタクトレンズ装用者との比較。

涙液中 sIgA 濃度は、健常対照群で $1,249.0 \pm 1,025.0$ (平均値 \pm 標準偏差) $\mu\text{g/ml}$ 、コンタクトレンズ (CL) 装用群で $1,057.4 \pm 1,583.3 \mu\text{g/ml}$ であり、両群間に有意差はみられない。NS : no significant difference.

(文献 94 から許可を得て転載のうえ改変)

(human neutrophil peptide : HNP) および上皮に存在する β -デフェンシン (human beta-defensin : HBD) とに大別される。我々は、眼表面には、HNP 1~3 および HBD-1 が恒常的に発現していることを報告した⁹⁸⁾。また、HBD-2 は眼表面の環境や病態により影響を受けやすいとされることから、実験的アレルギー性結膜炎モデルマウスを用いて検討し、結膜上皮中の HBD-2 mRNA の発現が対照と比較して低下していたことを報告した⁹⁹⁾。

2. 涙液検査法の開発

1) 涙液 eosinophil cationic protein (ECP) 値の検討

好酸球は、即時型アレルギー反応の遅発相で見られる主要な炎症細胞で、細胞質内には好酸性の特異顆粒を有する。特異顆粒中には、MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein), EPO (eosinophil peroxidase), EDN (eosinophil-derived neurotoxin) の 4 種類の塩基性蛋白の存在が知られており、脱顆粒により好酸球から放出される。したがって、涙液中の ECP 値は、アレルギー性結膜疾患におけるアレルギー炎症の重要なバイオマーカーとなり得ると考えられ、臨床応用も期待できる (図 25)。涙液 ECP 値を涙液検査として確立するまでの我々の研究結果を以下に述べる。

(1) 涙液検体の作製

a. 涙液採取

涙液の採取方法としては、マイクロピペット法¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾、ガラス毛細管法^{102)~104)}、濾紙法¹⁰⁵⁾、メチルセルロース膜法¹⁰⁶⁾などが報告され、それらの特性の検討がなされている¹⁰⁷⁾¹⁰⁸⁾。

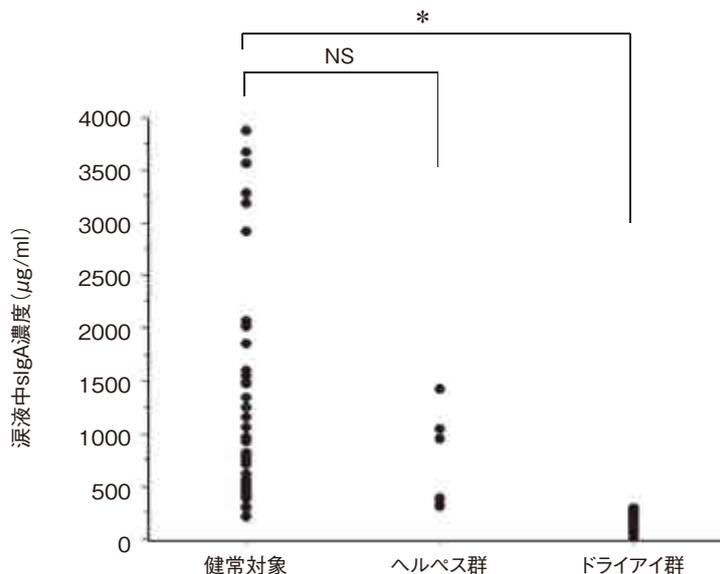


図 23 涙液中分泌型 IgA 値：健常対照とドライアイ群・ヘルベス群との比較。

涙液中 sIgA 値は、健常対照群 $1,249.0 \pm 1,025.0$ (平均値 \pm 標準偏差) $\mu\text{g/ml}$ 、ヘルベス群 $759.7 \pm 467.8 \mu\text{g/ml}$ 、ドライアイ群 $197.8 \pm 91.3 \mu\text{g/ml}$ であり、健常対照と比較してドライアイ群で有意に低値を示す。

* : $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis H test. NS : no significant difference.

(文献 94 から許可を得て転載のうえ改変)

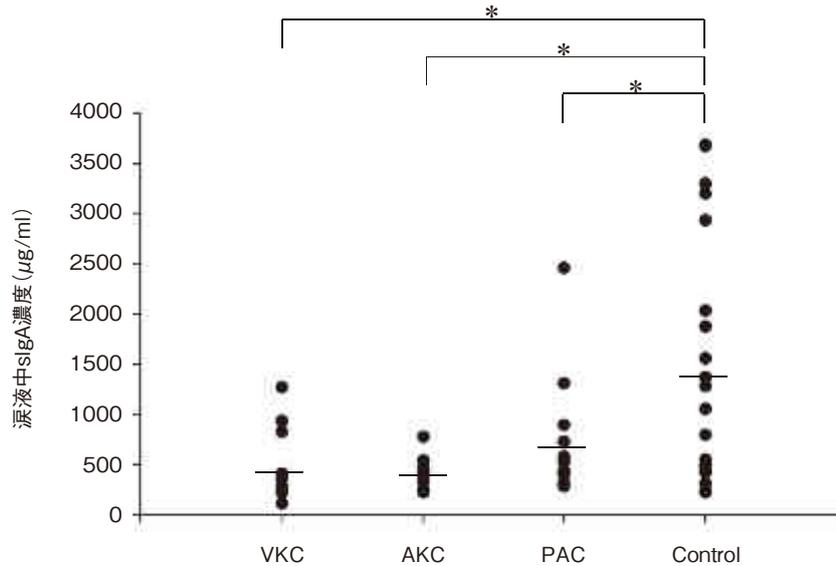


図 24 涙液中分泌型 IgA 値：健常対照とアレルギー性結膜疾患との比較。

涙液中 sIgA 値は、健常対照 (Control) 群 $1,446.7 \pm 1,220.1$ (平均値 \pm 標準偏差) $\mu\text{g/ml}$ 、通年性アレルギー性結膜炎 (PAC) 群 $650.3 \pm 480.6 \mu\text{g/ml}$ 、アトピー性角結膜炎 (AKC) 群 $431.2 \pm 166.3 \mu\text{g/ml}$ 、春季カタル (VKC) 群 $460.8 \pm 340.6 \mu\text{g/ml}$ であり、健常対照群と比較して、PAC 群、AKC 群および VKC 群ともに有意に低値を示す。—：中央値。

* : $p < 0.01$, Kruskal-Wallis H test.

(文献 95 から許可を得て転載)

我々は、Schirmer 第 1 法に基づいて、Schirmer 試験紙 (Schirmer Tear Production Measuring Strips[®], 昭和薬品化工, 東京) を用いた濾紙法による涙液採取法を検討した¹⁰⁹⁾。本法は、眼科医が日常診療で頻用している Schirmer 第 1 法に基づいているため、① 操作に慣れていること、② 方法が簡便であること、③ 再現性に優れていること、などが利点として挙げられる。しかし、涙液検体を作製する際には濾紙からの溶出を必要とし、検体が希釈されることと測定感度が低下することが欠点であると考えられる。濾紙法の定量性に関しては、緩衝液を濾紙である Schirmer 試験紙に吸収させ、重量を測定して濾紙に含まれる緩衝液の量を測定した。その結果、濾紙の吸収量は再現性に優れ、Schirmer 紙 1 mm 中には $1 \mu\text{l}$ の緩衝液が含まれることを確認した。この基礎的検討により、濾紙法での涙液採取量を定量化することが可能となり、Schirmer 試験紙を用いた涙液採取により、涙液中の物質を定量的に測定できると結論した。

b. 涙液の溶出方法

涙液検体を作製する場合、涙液検査の精度を高めるうえで重要な課題としていかに効率よく濾紙から涙液を溶出して涙液検体とするかが挙げられる。そこで、涙液溶出のための溶出液について検討した。この検討においては図 26 に示す 13 種類の溶出液を対象とした。すなわち、緩衝液 (0.01 M phosphate buffered solution : PBS) に塩である NaCl, 蛋白である bovine serum albumin

(BSA), 界面活性剤である Tween 20 を各種濃度で混合した溶出液での溶出率を検討した。結果として、塩と界面活性剤を添加することにより、溶出率が向上することが判明し、最終的に涙液検体作製用の溶出液として 0.5 M NaCl + 0.5% Tween 20 添加 0.01 M リン酸緩衝液が最も良好であると結論した。

c. 涙液の溶出時間

涙液検体を作製する際の溶出時間について検討した。2 種類の既知濃度の ECP 溶液 (低濃度溶液および高濃度溶液) を準備し、各溶液を溶出液 $300 \mu\text{l}$ 中に $10 \mu\text{l}$ 滴下した検体を対照検体とした。また、Vortex 群として、ECP 溶液 (低濃度溶液および高濃度溶液) 各 $10 \mu\text{l}$ を吸収させた濾紙に緩衝液 $300 \mu\text{l}$ を添加し、ボルテックス・ミキサー (Vortex genie 2) を用いて、直後、10 秒、20 秒、30 秒攪拌した検体を準備した。また静置群として、ECP 溶液 (低濃度溶液および高濃度溶液) 各 $10 \mu\text{l}$ を吸収させた濾紙に緩衝液 $300 \mu\text{l}$ を添加した直後、1 分、5 分、10 分、20 分、30 分および 1 時間、2 時間、3 時間、6 時間静置させた検体を準備した。すべての検体を下記に示す ECP 測定法により測定した。

結果は図 27 に示すように、溶出に適した時間は Vortex 群で 20 秒以上、静置群で 10 分以上であることが判明した。また、3 時間以上静置した検体では、溶出率の軽度低下がみられており、長時間の放置により ECP の分解が生じる可能性が考えられた。

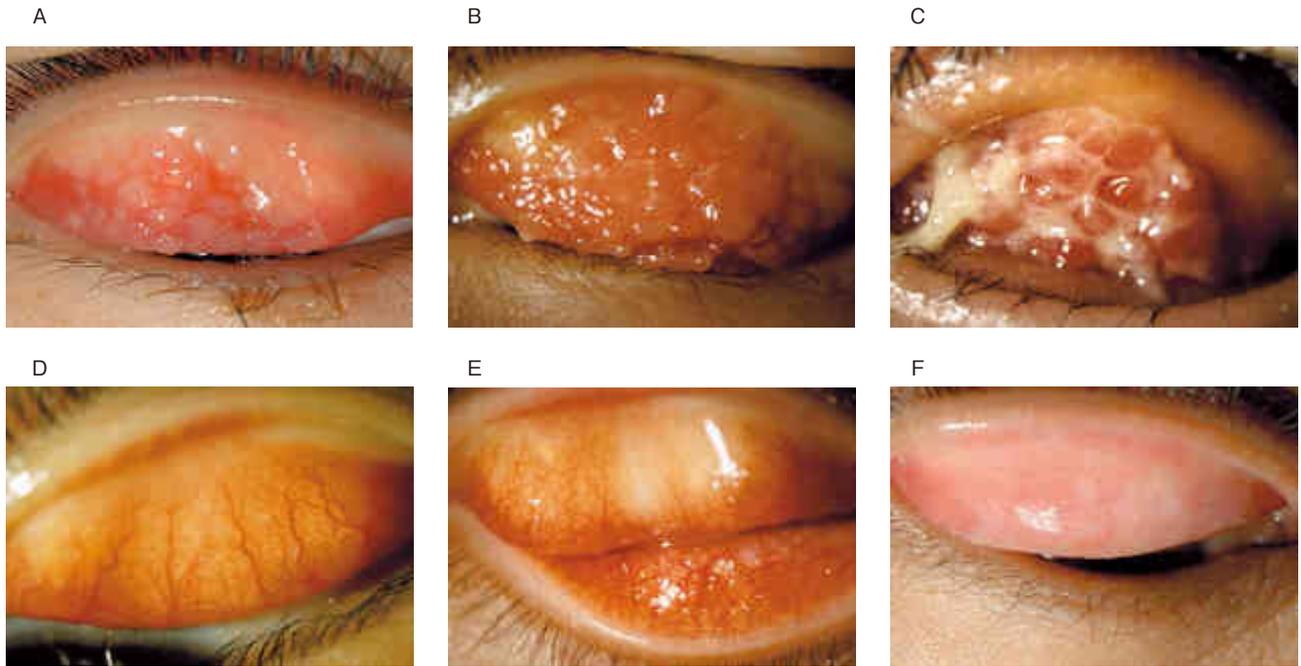


図 25 病型・病期による涙液 eosinophil cationic protein (ECP) 値.

健常対照者の涙液 ECP 値は、0~20 ng/ml である。各症例での涙液 ECP 値は春季カタル(A)8,630 ng/ml、春季カタル(B)10,873 ng/ml、春季カタル(C)58,880 ng/ml、通年性アレルギー性結膜炎(D)26 ng/ml、通年性アレルギー性結膜炎(E)328 ng/ml、アトピー性角結膜炎(F)15,678 ng/ml である。

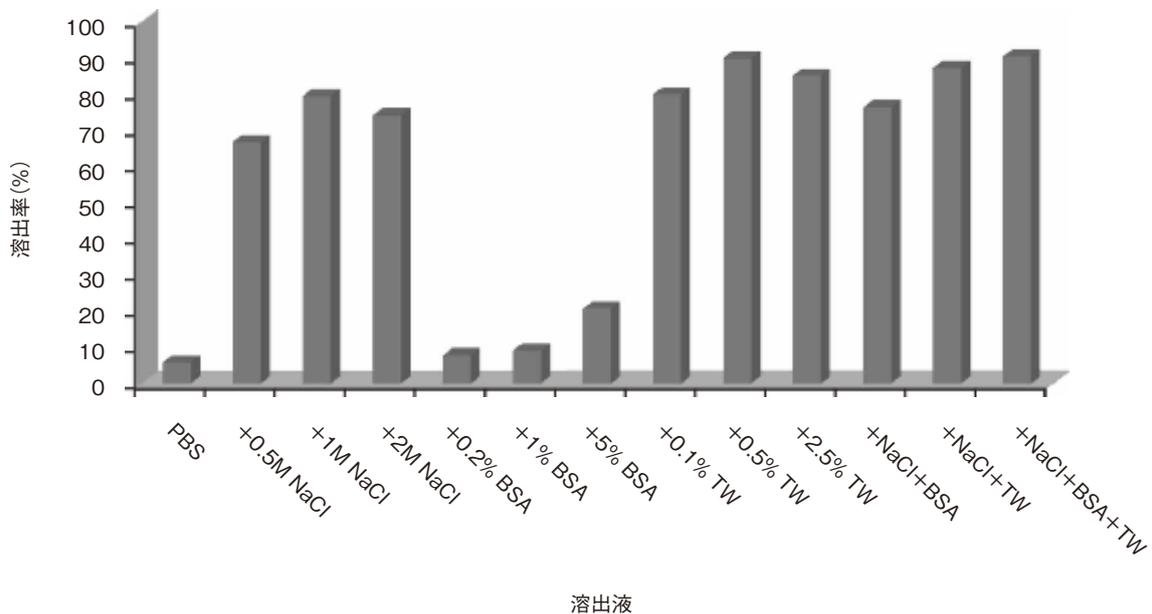


図 26 涙液の溶出 I : 溶出液の選択と溶出率.

溶出液に界面活性剤である Tween 20 および塩である NaCl を加えることにより、溶出率が向上し安定する。0.5 M NaCl+0.5% Tween 20 添加 0.01 M リン酸緩衝液が最も溶出率が高い。

NaCl : sodium chloride, BSA : ウシ血清アルブミン, TW : Tween 20, PBS : リン酸緩衝液。

(2) 涙液 ECP 値の測定

涙液検体を用いた ECP 値の測定は、イムライズ[®](三菱化学ヤトロン, 東京)を用いた化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescent enzyme immunoassay : CLEIA) で行った。

アレルギー性結膜疾患 24 例, 非アレルギー性結膜疾患である Sjögren 症候群 12 例および健常対照 19 例を対象として涙液 ECP 値を測定した。結果を図 28 に示す。アレルギー性結膜疾患での涙液 ECP 値は, Sjögren 群 ($p < 0.01$) および健常対照 ($p < 0.001$) と比較して有意に

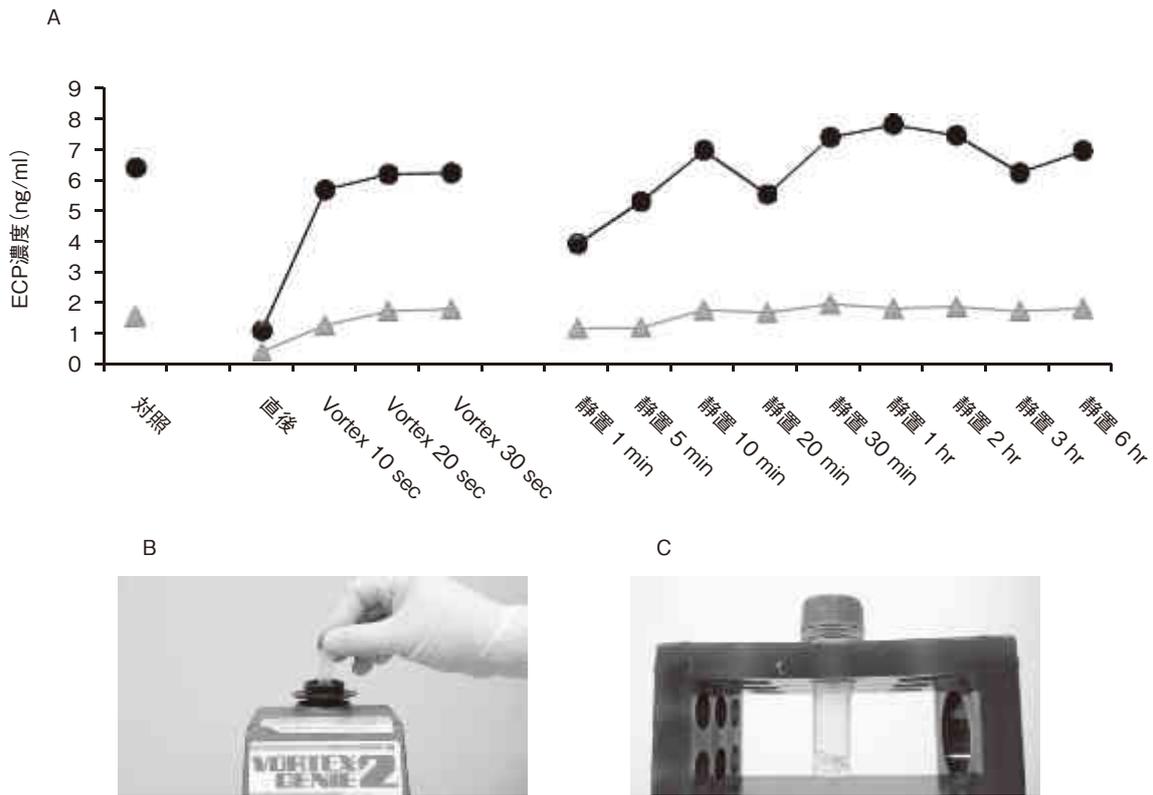


図 27 涙液の溶出 2：溶出時間の検討。

溶出方法は、ボルテックス・ミキサー (Vortex genie 2 使用) による攪拌と静置とで経時的に検討した結果、濾紙からの溶出は、Vortex で 20 秒、静置で 10 分ではほぼフラットになる。

A：検体から溶出後の ECP 濃度。●：高濃度 ECP 溶液，▲：低濃度 ECP 溶液。B：検体のボルテックス・ミキサーによる攪拌。C：検体の静置。

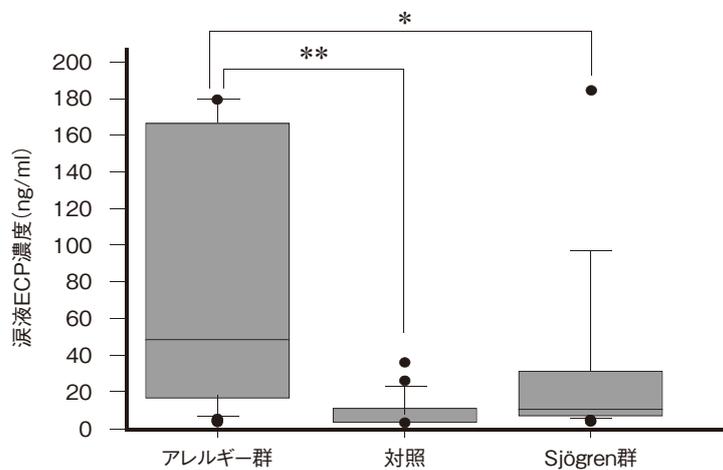


図 28 涙液 ECP 値。

アレルギー群 (n=24, 中央値 46 ng/ml) の涙液 ECP 値は、対照 (n=19, 中央値 7.4 ng/ml) および非アレルギー性結膜疾患である Sjögren 群 (n=12, 中央値 10.3 ng/ml) と比較して有意に高値を示す。

* : p<0.01, ** : p<0.001, Mann-Whitney U-test.

(文献 109 から許可を得て転載のうえ改変)

高値を示した¹⁰⁹⁾。これらの結果から涙液 ECP 値は、アレルギー性結膜疾患のバイオマーカーとなりうると考えられた。また、アレルギー性結膜疾患の病型別の陽性率と測定値を示したものが表 4 である。重症とされる春季カタルでは、涙液 ECP 値の陽性率および測定値ともに

高値であるのに対して、季節性アレルギー性結膜炎では陽性率および測定値が低値を示したことから、アレルギー性結膜疾患の病型により好酸球炎症の程度が異なると結論できた。

表 4 アレルギー性結膜疾患の病型別の涙液 ECP 値

	健常対照	SAC	PAC	AKC	VKC
対照症例数 (眼)	37	45	14	26	22
Cut-off 値以上 (≥ 19.4 ng/ml)	1	14	11	14	22
陽性率		30.1%	78.6%	53.8%	100%
平均値 \pm 標準偏差 (ng/ml)	7.4 \pm 7.2	30.0 \pm 60.4	147.0 \pm 249.8	172.8 \pm 667.1	4,687.6 \pm 6,981.9

Cut-off 値：健常対照の 95 パーセンタイル値 = 19.4 ng/ml. SAC：季節性アレルギー性結膜炎, PAC：通年性アレルギー性結膜炎, AKC：アトピー性角結膜炎, VKC：春季カタル.

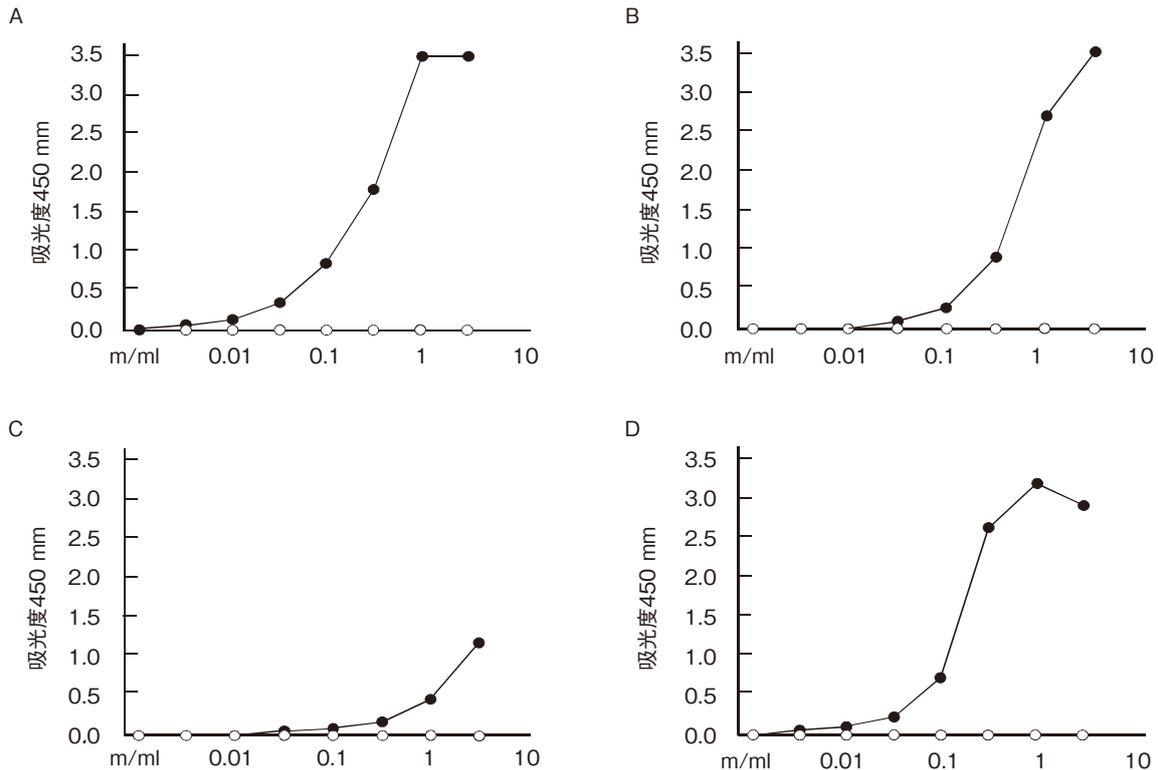


図 29 抗ヒト ECP マウスモノクローナル抗体の binding titration assay.

A：NMSS0101, B：NMSS0201, C：NMSS0301, D：NMSS0401.

NMSS0101 および NMSS0201 が低濃度から高濃度まで反応が良い抗体であることを示している.

●：ECP, ○：抗 ECP 抗体(-).

(3) 涙液 ECP 値の迅速検査法の開発

微量検体である涙液を用いて、迅速検査を行うための手法としては、イムノクロマト法 (Immunochromatography) が適している。イムノクロマト法の原理はセルロース膜上に被検体が試薬を溶解しながらゆっくりと流れる性質 (毛細管現象) を応用した免疫測定法である。すなわち、検体中の抗原は、金コロイドなどで標識した標識抗体と免疫複合体を形成しながらセルロース膜上を移動するが、テストラインとして、あらかじめ塗られているキャプチャー抗体 (固相化抗体) により免疫複合体が捕捉されると、テストラインが発色するとの原理である。したがって、涙液 ECP 測定用のイムノクロマト法の開発には、① 標識抗体および固相化抗体としての抗 ECP

特異的抗体の開発および、② イムノクロマトデバイスの試作、臨床評価が必要である。

a. 抗ヒト ECP 特異的抗体の作製

抗原として eosinophil cationic protein (ECP) (LEE BIO-SOLUTIONS, Missouri, USA) を用いて、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の作製を行った。モノクローナル抗体の作製は、BALB/c マウスに免疫し、細胞融合とクローニングにより抗ヒト ECP モノクローナル抗体を産生するクローンを樹立した。腹水から抗ヒト ECP マウスモノクローナル抗体を回収した。ポリクローナル抗体の作製には、免疫動物に白色家兎 (ニュージージーランドホワイト種) を用い、皮下にアジュバントとともに ECP 抗原を皮下注射し、血清中の抗ヒト ECP ウ

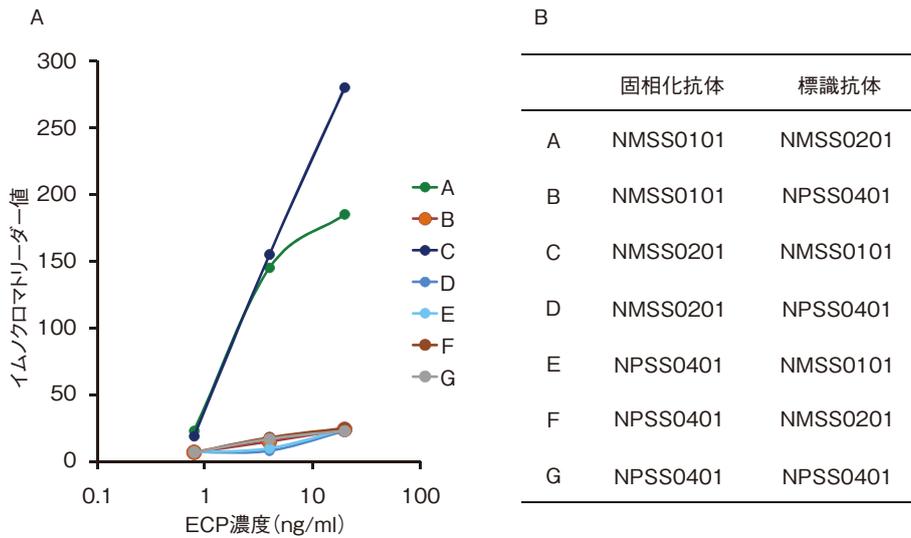


図 30 標識抗体と固相化抗体の最適な組み合わせの検討.

A : 各固相化抗体と標識抗体との組み合わせと ECP に対する反応性.

B : 固相化抗体と標識抗体との組み合わせ.

抗 ECP マウスモノクローナル NMSS0201 を固相化抗体, 抗 ECP マウスモノクローナル NMSS0101 を標識抗体とする組み合わせが最適である.

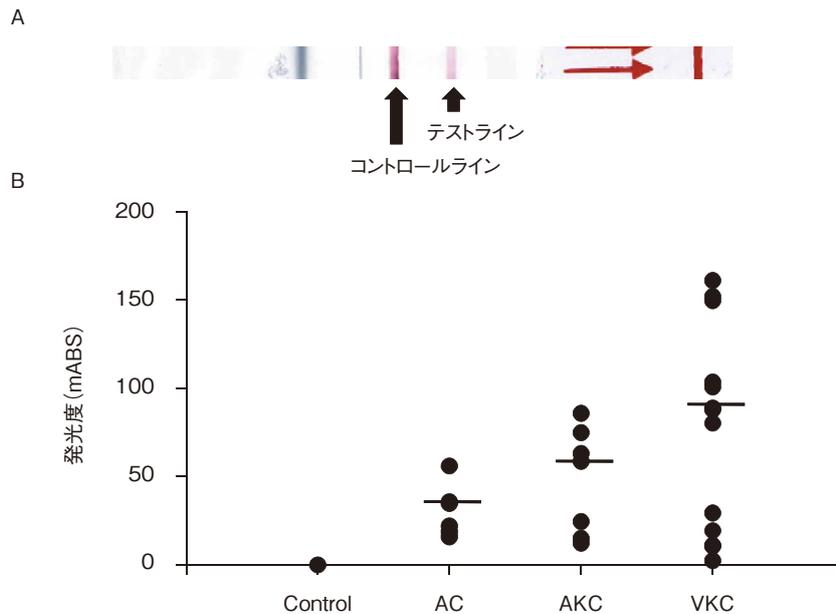


図 31 涙液 ECP 値のイムノクロマト法(試作 1)による測定.

A : イムノクロマト法の陽性所見. コントロールラインとテストラインの両者とも赤色のラインが出現している.

B : 涙液中 ECP 値をイムノクロマト法とイムノクロマトリーダーにより測定した結果. アレルギー性結膜炎(AC)で 30.6 ± 15.0 mABS, アトピー性角結膜炎(AKC)で 47.7 ± 30.0 , 春季カタル(VKC)で 76.6 ± 57.2 となり, AC では低値, VKC では高値を示す. — : 中央値.

サギポリクローナル抗体を回収した.

抗ヒト ECP 抗体として, 4 種類の抗ヒト ECP マウスモノクローナル抗体(NMSS0101, 0201, 0301, 0401)および 4 種類の抗ヒト ECP ウサギポリクローナル抗体(NPSS0101, 0201, 0301, 0401)を得た. 抗ヒト ECP マウスモノクローナル抗体の binding titration assay の

結果を図 29 に示す.

これらの抗体を用いて, 標識抗体と固相化抗体の最適な組み合わせを検討したものが図 30 である. 検討結果から, 抗 ECP マウスモノクローナル NMSS0201 を固相化抗体, 抗 ECP マウスモノクローナル NMSS0101 を標識抗体とする組み合わせが最適であることが判明し, こ

の組み合わせの抗体を用いてイムノクロマトデバイスの作製を行った。

b. イムノクロマト試作1による臨床評価

イムノクロマト試作1は、ディップスティックタイプのデバイスで行った。測定法は、① Schirmer 試験紙 (Schirmer Tear Production Measuring Strips[®]) を5分間結膜嚢内に挿入して涙液を採取、② Schirmer 試験紙を先端から10 mm(目盛り5 mm)で切断し、緩衝液130 μ l を試験管に入れ、試験管内で10分間溶出、③ イムノクロマトのスティックを試験管に挿入して20分間反応、④ コントロールラインを確認した後、テストラインを目視で観察、⑤ コントロールラインとテストラインをイムノクロマトリーダー(浜松ホトニクス, 浜松)を使って数値化、からなる。

臨床評価は、アレルギー性結膜疾患39例および健常対照8例を対象に行った。アレルギー性結膜疾患の内訳はアレルギー性結膜炎(allergic conjunctivitis: AC)15例、アトピー性角結膜炎(atopic keratoconjunctivitis: AKC)11例および春季カタル(vernal keratoconjunctivitis: VKC)13例である。測定結果を図31に示す。陽性率は、アレルギー性結膜疾患で39例中26例、健常対照

表5 病型別涙液 ECP 値の陽性率

	AC	AKC	VKC
ECP-IC*	6/15 (40%)	7/11 (63.6%)	13/13 (100%)
ECP-CLEIA* (≥ 19.4 ng/ml)	25/59 (42.4%)	14/26 (53.8%)	22/22 (100%)

*測定法: ① イムノクロマト法(IC), ② 化学発光酵素免疫測定法(CLEIA).

では全例陰性であった。これらの結果から、本検査法の感度は66.7%, 特異度100%と算出された。アレルギー性結膜疾患の病型別陽性率について、イムノクロマト法と化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)とを比較したものが表5であるが、両者は同様の結果を示し、イムノクロマト法を用いた涙液 ECP 値の迅速診断キットは、臨床検査として有用な測定法であると結論できた。

c. イムノクロマト試作2による臨床評価

イムノクロマト試作2では、簡易イムノクロマトリーダーを用いたイムノクロマト法の評価を行った。試作したキットを図32Aに示す。方法は、① Schirmer 試験紙を5分間結膜嚢内に挿入して涙液を採取、② Schirmer 試験紙を先端から10 mm(目盛り5 mm)で切断し、展開液200 μ l の入ったミニチューブに入れ10分間溶出、③ 涙液を溶出した展開液75 μ l を展開液注入口に注入し20分間反応、④ コントロールラインを確認後、テストラインを目視で観察、⑤ テストラインを簡易イムノクロマトリーダーを使って数値化、からなる。

本検査キットを使用して涙液 ECP 値を定量するための検量線を図32Bに、症例を図33に示す。臨床評価は、アレルギー性結膜疾患27例および健常対照6例を対象に行った。アレルギー性結膜疾患の内訳はアレルギー性結膜炎(allergic conjunctivitis: AC)13例、アトピー性角結膜炎(atopic keratoconjunctivitis: AKC)3例および春季カタル(vernal keratoconjunctivitis: VKC)11例である。測定結果を図34に示す。健常対照と比較して、アレルギー性結膜疾患では高値を示し、特に春季カタルでは、測定上限値よりも高値を示す症例が多数みられた。

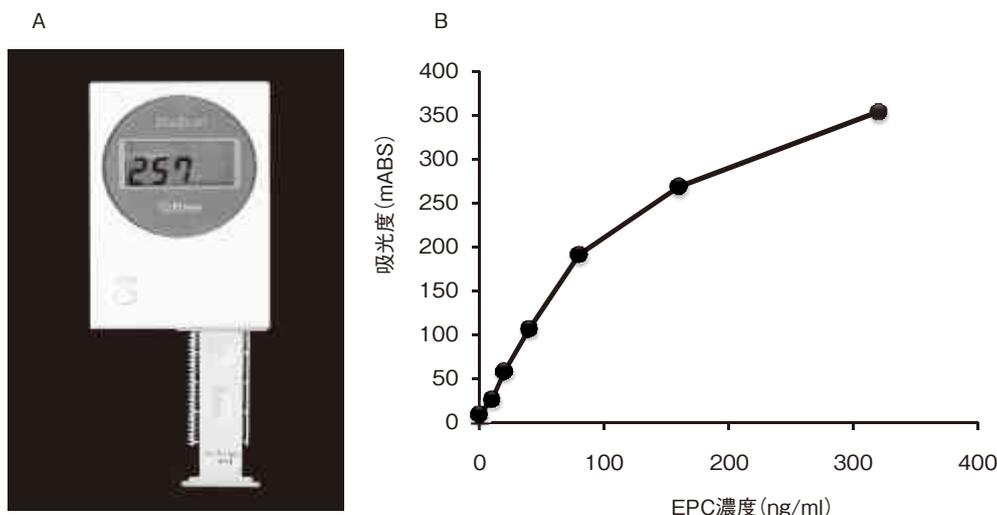


図32 イムノクロマトリーダーを用いた涙液 ECP 値の測定。

イムノクロマト法のテストラインを簡易イムノクロマトリーダーで読み取ることで定量化を行う。

A: 簡易イムノクロマトリーダー。

B: イムノクロマトリーダーを用いて ECP 濃度に換算する際の検量線。

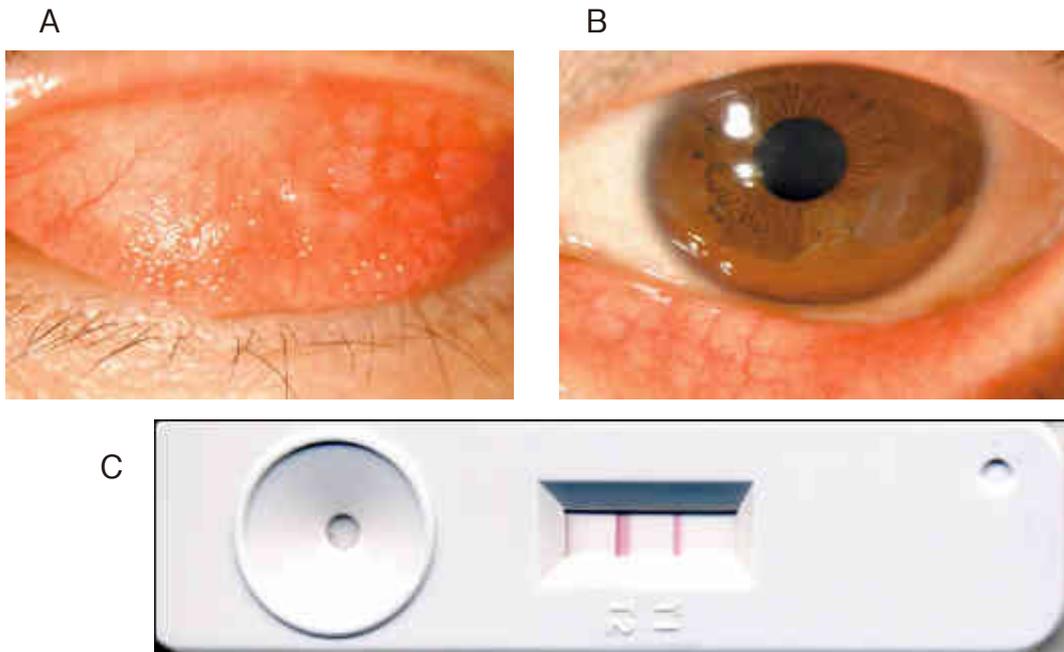


図 33 涙液 ECP 値の簡易測定キットで測定した代表症例。

症例は 29 歳，男性で，春季カタルの急性増悪に対して，タクロリムス点眼液とクロモグリク酸ナトリウム点眼との併用で治療を行った。経過中のアレルギー炎症の程度を測定するために涙液 ECP 値を測定した。

A： 瞼結膜所見。瞼結膜には巨大乳頭がみられるが，一部は扁平化しており，軽快途中の巨大乳頭所見を示す。

B： 角膜所見。角膜 4 時方向にシールド潰瘍がみられる。一部に上皮欠損があり，一部は上皮が再生している。治癒過程のシールド潰瘍である。

C： 涙液 ECP 値のイムノクロマト法。イムノクロマトリーダーでの測定値は 257 mABS であり，ECP 濃度に換算すると 143 ng/ml である。

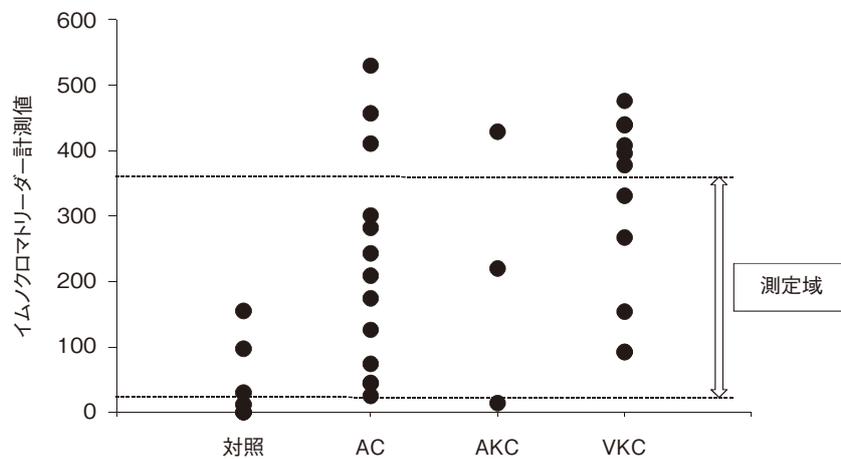


図 34 イムノクロマト法を用いた涙液 ECP 値の測定。

涙液 ECP 値は，対照と比較して，アレルギー性結膜疾患で増加している。
 AC：アレルギー性結膜炎，AKC：アトピー性角結膜炎，VKC：春季カタル。

2) アトピー性角結膜炎モデルマウスの作製と結膜内の好酸球炎症の評価

アトピー性角結膜炎やアトピー性皮膚炎を合併した春季カタルでは，涙液 ECP 値が著しく高値を示し，結膜擦過塗抹標本で多数の好酸球が観察される症例がみられる。結膜組織中の好酸球浸潤の増加は，I 型(即時型)アレルギー反応の遅発相，すなわちアレルギー炎症により

生じると考えられている。しかし，アレルギー性結膜炎と春季カタルとを比較した場合，春季カタルの好酸球浸潤の方が，はるかに高度である。これを単なる重症度の相違と考えるのか，好酸球浸潤を生じる病態が I 型(即時型)アレルギー反応以外に存在するか否か，については不明である。そこで我々は好酸球浸潤の機序を解明するためにアトピー性角結膜炎類似の動物モデルの作製を

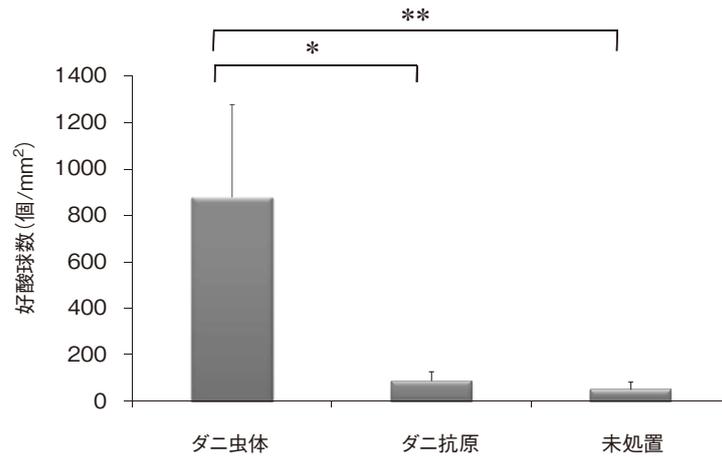


図 35 ダニ虫体群・ダニ抗原群・未処置群の結膜下組織中好酸球数.

ダニ虫体群の結膜下好酸球数はダニ抗原群および未処置群と比較して有意に増加している.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$, Kruskal-Wallis H test.

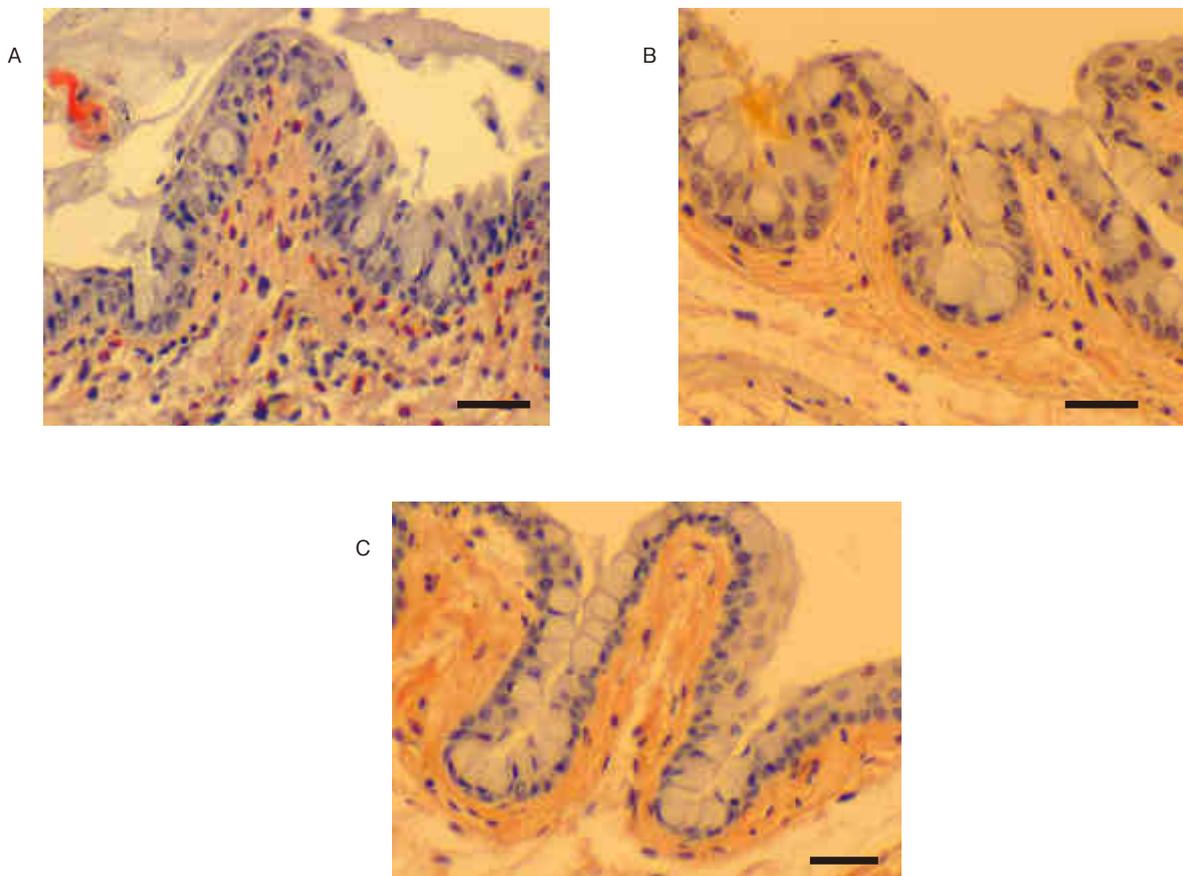


図 36 ダニ虫体群・ダニ抗原群・未処置群の結膜組織所見.

ダニ虫体群(A), ダニ抗原群(B)では, 未処置群(C)と比較して, 結膜下組織中の好酸球浸潤が増加している. ダニ虫体群(A)では, ダニ抗原群(B)と比較して著しく浸潤好酸球が増加している. スケールバー: 50 μm .

試みた.

アトピー性角結膜炎モデルマウスには, NC/Nga TndCrj マウス(日本チャールス・リバー, 横浜)を用いた. マウスの背部および耳介部を除毛後, アトピー性皮膚炎誘発試薬として販売されているダニ虫体入り軟膏

(ビオスタ[®]AD, ビオスタ, 神戸)100 mg/mouse を週2回, 3週間塗付した. アトピー性皮膚炎様皮膚炎の発症を確認後, 追加処置により対象を3群に分けた. すなわち, ダニ虫体と白色ワセリンで作製したダニ虫体入り眼軟膏を1日1回, 3日間点眼したダニ虫体群, ダニ抗原

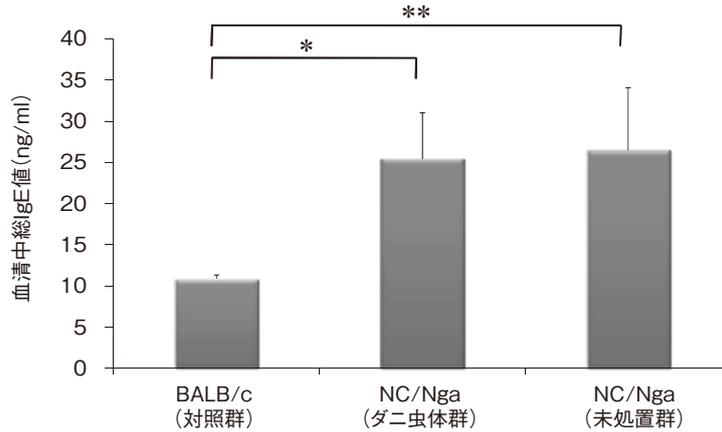


図 37 マウスの血清中総 IgE 値.

NC/Nga マウスのダニ虫体群および未処置群では、血清中総 IgE 値が対照の BALB/c と比較して有意な高値を示す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, Kruskal-Wallis H test.

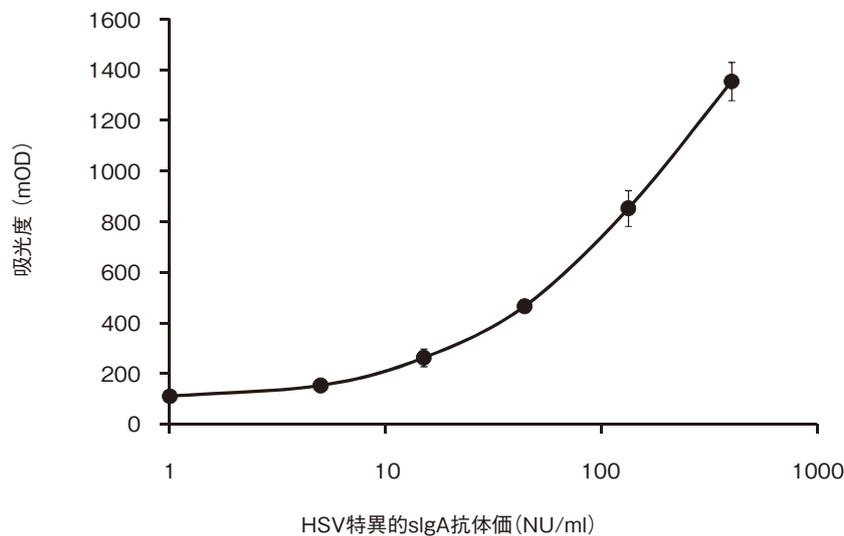


図 38 単純ヘルペスウイルス (HSV)-sIgA 抗体価の検量線.

表 6 単純ヘルペス角膜炎での検討：対象症例の内訳

		症例数(人)	男性：女性	年齢(歳) (平均値±標準偏差)
単純ヘルペス 角膜炎群	上皮型(EK)	27	16：11	53.3±19.8
	実質型(SK)	14	10：4	55.3±21.5
非単純ヘルペス角膜炎群(NH)		42	21：19	42.6±19.9
対照群		19	9：14	31.0±6.9

液(鳥居薬品, 東京)を1日1回, 3日間点眼したダニ抗原群, および点眼処置を行わない未処置群とした。最終点眼 24 時間後に眼瞼および眼球を摘出した。摘出組織は、直ちに中性ホルマリンで固定後, パラフィン包埋し, 薄切切片を作製した。パラフィン切片は, direct fast scarlet(DFS)染色をして好酸球数をカウントした。

また, 眼球摘出時に採血を行い, 血清中総 IgE 値を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。血清中総 IgE 値は, アトピー性角結膜炎モデルマウスのダニ虫体群と未処置群 NC/Nga を, BALB/c マウスを対照として比較した。

アトピー性角結膜炎モデルマウスの結膜組織中の好酸

球数は、未処置群と比較して有意にダニ虫体群で増加した(図 35, 図 36). また、血清中総 IgE 値は対照の BALB/c マウスと比較してダニ虫体群で有意に高値を示した(図 37). これらの結果から、アトピー性角結膜炎モデルマウスは、①アトピー性皮膚炎様皮膚炎、②高血清総 IgE 値、③高度の好酸球浸潤を伴うアレルギー性結膜炎を発症するマウスであり、アトピー性角結膜炎の類似マウスモデルであると結論した。

表 7 非ヘルペス性角膜炎症例群の内訳

疾患名	症例数(例)
点状表層角膜炎	4
角膜上皮びらん	8
糸状角膜炎	1
角膜炎・角膜潰瘍	14
コンタクトレンズ関連角膜上皮障害	4
アレルギー性結膜疾患	11

3) 涙液中単純ヘルペスウイルス特異的分泌型 IgA 抗体価(HSV-sIgA)の測定

(1) 涙液採取と涙液検体の作製

涙液検体は、涙液 ECP 値測定と同様に、Schirmer 試験紙を用いて涙液を採取した。Schirmer 試験紙の一部を使用して DNA を抽出して HSV-DNA を PCR 法を用いて検出した。残りの Schirmer 試験紙は、-80°C で冷凍保存し、使用時に 0.5 M NaCl+0.5% Tween 20 添加 0.01 M リン酸緩衝液で溶出し、HSV-sIgA 抗体価測定用検体として用いた。

(2) 涙液 HSV-sIgA の測定と測定単位

涙液中の総 sIgA 測定のために、抗ヒト sIgA マウスモノクローナル抗体(特殊免疫研究所, 東京)を固相化した涙液総 sIgA 測定用 ELISA プレート(Stripwell Plate 1×8 well Flat Bottom High Binding type®; Corning, N-Y, USA)を作製した。ヒト sIgA 標準液(purified human secretory IgA; Cappel Research Products, Aurora, OH, USA)の 3 倍希釈系列を用いて検量線(レン

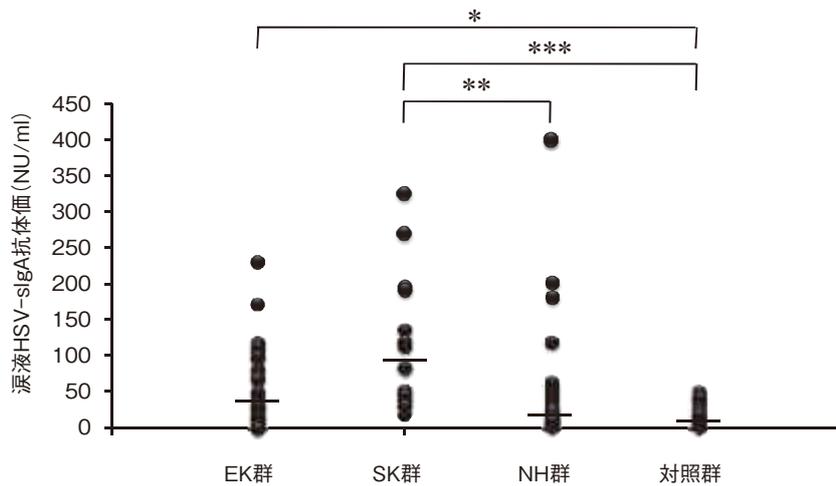


図 39 単純ヘルペス角膜炎(herpes simplex keratitis : HSK)症例における涙液 HSV-sIgA の測定。

EK 群 : HSK 上皮型群, SK 群 : HSK 実質型群, NH 群 : 非 HSK 群.

SK 群は, NH 群および対照群と比較して有意に高値を示す(** : p<0.01, *** : p<0.001, Kruskal-Wallis H test). また, EK 群は, 対照群と比較して有意に高値である(* : p<0.05, Kruskal-Wallis H test).

— : 中央値.

表 8 涙液 HSV-sIgA 抗体価 : 陽性率

	単純ヘルペス角膜炎群		NH 群	対照群
	EK 群	SK 群		
涙液 HSV 特異的 sIgA 抗体価				
症例数	27	14	42	19
陽性数 (>43 NU/ml)	14	11	13	1
陽性率(%)	51.9	78.6	31.0	5.3
涙液中 HSV-DNA (PCR 法)				
症例数	27	14	42	NT
陽性数	16	2	0	NT
陽性率(%)	59.3	14.3	0	NT

NT : not tested.

ジ：10.5~2,500 ng/ml)を作製した。すなわち、涙液総 sIgA 測定用 ELISA プレートにヒト sIgA 標準液 50 μl を加えて、室温 60 分間反応させ、次にペルオキシダーゼ標識化抗ヒト sIgA ヤギ抗体 (CAPPEL Research Product, Durham, NC, USA) と 60 分反応後、テトラメチルベンジジン溶液で発色した。1 N H₂SO₄ で反応を停止させた後、450 nm の波長での吸光度をプレートリーダー (TOSOH, 東京) で測定した。

次に、HSV 抗原 (herpes simplex antigen : Vircell, Granada, Spain) を固相化した涙液 HSV-sIgA 抗体測定用 ELISA プレートを作製し、総 sIgA 測定と同様の方法でプール涙液の HSV-sIgA 抗体価を測定した。測定したプール涙液の中から、ELISA 法の測定レンジ (2,000

mAbs) を超える測定値高値の涙液検体をプールして HSV-sIgA 抗体価用標準液として用いた。この HSV-sIgA 抗体価用標準液の総 sIgA 値は 41,250 ng/ml であり、その 1/100 倍希釈液の HSV-sIgA 測定用標準液濃度を 400 として、HSV-sIgA 抗体価の単位を NU/ml に設定した。続いて、HSV-sIgA 測定用標準液の 3 倍希釈系列を作製して HSV-sIgA 抗体価の検量線 (図 38) を作製し、被検者涙液の HSV-sIgA 抗体価を求めた。

(3) 角膜炎症例での涙液 HSV-sIgA の測定

涙液 HSV-sIgA の測定対象は角膜炎症例 83 例で、その内訳は、単純ヘルペス角膜炎 (herpes simplex keratitis : HSK) のうち、上皮型群 (EK 群) 27 例、HSK 実質型群 (SK 群) 14 例および、非 HSK 群 (NH 群) 42 例である。対照群は、単純ヘルペスウイルスに起因する眼科的疾患の既往がない健常成人ボランティア 19 例である (表 6, 7)。

結果を図 39 に示す。涙液 HSV-sIgA 抗体価の中央値は、EK 群 39 NU/ml, SK 群 98 NU/ml, NH 群 22 NU/ml, 対照群 18 NU/ml であった。SK 群は、NH 群および対照群と比較して有意に高値を示した (Kruskal-Wallis H test : p<0.01, p<0.001)。また、EK 群は、対照群

表 9 涙液 HSV-sIgA 抗体価：感度・特異度

		ヘルペス病変		p 値*	感度	特異度
		あり	なし			
HSV-sIgA 抗体価	陽性	25	14	<0.001	61.0%	83.6%
	陰性	16	47			

* : χ²検定

表 10 涙液中 HSV-sIgA 抗体価と PCR 法による HSV-DNA との一致率

		HSV-DNA (PCR 法)			陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)	全体一致率 (%)
		陽性	陰性	合計			
ヘルペス群							
HSV-sIgA 抗体価	陽性	12	13	25	48.0	62.5	53.7
	陰性	6	10	16			
非ヘルペス群							
HSV-sIgA 抗体価	陽性	0	13	13	0	100	70.7
	陰性	0	29	29			



図 40 涙液 HSV-sIgA 抗体価測定 of 臨床応用例。

- A : 症例 1・72 歳・男性。陈旧性実質炎による角膜白斑およびヘルペス性ぶどう膜炎がみられる。HSV-sIgA 抗体価は 30.5 NU/ml, HSV-DNA (PCR 法) 陰性であり、活動性炎症は前房が主体であると考えられる。
- B : 症例 2・58 歳・男性。実質型単純ヘルペス角膜炎がみられる。HSV-sIgA 抗体価は 325.0 NU/ml, HSV-DNA (PCR 法) 陰性であり、活動性炎症は角膜が主体であると考えられる。

と比較して有意に高値であった(Kruskal-Wallis H test : $p < 0.05$).

対照群の涙液 HSV-sIgA 抗体価の測定結果をもとに、5 パーセント値から 95 パーセント値を健常域としたところ、健常域の涙液 HSV-sIgA 抗体価は 43 NU/ml 以下であった。涙液 HSV-sIgA 抗体価が 43 NU/ml よりも高値の症例を陽性、43 NU/ml 以下の症例を陰性として陽性率を算出した結果を表 8 に示す。また、EK 群および SK 群をヘルペス群、NH 群および対照群を非ヘルペス群として陽性率を比較したところ、ヘルペス群と非ヘルペス群との間には有意差があった(χ^2 検定 : $p < 0.001$)。また、本検査法の感度は 61.0%、特異度は 83.6% と算出された(表 9)。また、涙液中 HSV-sIgA 抗体価と PCR 法による HSV-DNA との一致率を検討した結果を表 10 および症例を図 40 に示す。今回の涙液中 HSV-sIgA 抗体価と PCR 法による HSV-DNA との乖離は、上皮型 HSK では HSV-sIgA 抗体価で偽陰性が多く、実質型 HSK では PCR 法による HSV-DNA 陽性例が少ないことが原因であると推定された。

3. 小 括

結膜組織は眼局所免疫機構として重要な役割を担っている。涙液は眼表面での免疫および生理活性物質を含有し、結膜組織とともに生体防御機能を担っている。したがって、涙液内の生理活性物質の臨床検査法の開発は眼表面の病態生理を理解し、かつ診断および治療に有用である。我々は免疫化学的方法を用いて涙液内の ECP、抗原特異的分泌型 IgA を測定する方法を開発した。涙液内 ECP 濃度検査法を確立することにより、アレルギー眼表面疾患の病態生理、臨床的評価に有用であることを示すことができた。また、抗原特異的分泌型 IgA の測定はヘルペス性角膜炎の診断に有用であるとの結論を得ることができた。

利益相反：澤 充(カテゴリー F : HOYA)

文 献

- 1) Sawa M, Tsurimaki Y, Tsuru T, Shimizu H : New quantitative method to determine protein concentration and cell number in aqueous *in vivo*. Jpn J Ophthalmol 32 : 132—142, 1988.
- 2) Sawa M : Clinical application of laser flare-cell meter. Jpn J Ophthalmol 34 : 346—363, 1990.
- 3) Shields MB : Aqueous humor dynamics I. Anatomy and physiology. In : Textbook of Glaucoma (3rd ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, 5—36, 1992.
- 4) Caprioli J : The ciliary epithelia and aqueous humor. In : Adler's Physiology of the Eye (8th ed.). CV Mosby, St Louis, 204—222, 1987.
- 5) Smith RS, Rudt LA : Ultrastructural studies of

- the blood-aqueous barrier. 2. The barrier to horseradish peroxidase in primates. Am J Ophthalmol 76 : 937—947, 1973.
- 6) Karim M, Biswas S, Bhattacharjee P, Paterson C : Comparison of tight junction protein expression in the ciliary epithelia of mouse, rabbit, cat and human eyes. Biotech Histochem 2010 : doi:10.3109/10520290903504340.
- 7) Davson H : Physiology of the eye. 4th Edition. Churchill Livingstone, London, 9—81, 1980.
- 8) Dernouchamps JP : The proteins of the aqueous humor. Doc Ophthalmol 53 : 193—248, 1982.
- 9) Kronfeld PC, Lin CK, Luo TH : The protein content of the reformed aqueous humor in man. Trans Am Ophthalmol Soc 38 : 192—213, 1940.
- 10) Zirm M : Proteins in aqueous humor. Adv Ophthalmol 40 : 100—172, 1980.
- 11) Krause U, Raunio V : The proteins of the pathologic human aqueous humor. An *in vivo* investigation. Ophthalmologica 160 : 280—287, 1970.
- 12) 中沢 昭 : 房水蛋白の分析 血液房水柵の検討. 日眼会誌 89 : 631—637, 1985.
- 13) Stjernschantz J, Uusitalo R, Palkama A : The aqueous proteins of the rat in normal eye and after aqueous withdrawal. Exp Eye Res 16 : 215—221, 1973.
- 14) Unger WG, Cole DF, Hammond B : Disruption of the blood—aqueous barrier following paracentesis in the rabbit. Exp Eye Res 20 : 255—270, 1975.
- 15) Goodner EK : Aqueous humor studies in uveitis. In : Aronson SB, et al (Eds) : Clinical Methods in Uveitis. CV Mosby, St Louis, 197—199, 1988.
- 16) Cousins SW, Rosenbaum JT, Guss RB, Egbert PR : Ocular albumin fluorophotometric quantitation of endotoxin-induced vascular permeability. Infect Immun 36 : 730—736, 1982.
- 17) Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P : Signs and symptoms of uveitis. I. Anterior uveitis. Am J Ophthalmol 47 : 155—170, 1959.
- 18) Anjou CI, Krakau CE : A photographic method for measuring the aqueous flare of the eye in normal and pathological conditions. Acta Ophthalmol 38 : 178—224, 1960.
- 19) Anjou CI, Krakau CE : Aqueous flare and protein content in the anterior chamber of normal rabbits' eyes. Acta Ophthalmol 39 : 95—101, 1961.
- 20) Dyster-Aas HK, Krakau CE : A photo-electric instrument for measuring the aqueous flare in the intact eye. Ophthalmologica 146 : 48—56, 1963.
- 21) 高瀬正弥 : 家兎全房蛋白動態に関する研究. 第一報. slit lamp microphotometer の試作とその対応について. 日眼会誌 73 : 2649—2658, 1969.
- 22) 小室優一, 松元 俊, 白土城照, 三島濟一 : 前房内浮遊物の自動計測装置の開発. 日眼会誌 89 : 556—561, 1985.
- 23) Jones RF, Maurice DM : New methods of meas-

- uring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res* 5 : 208—220, 1966.
- 24) 新家 真, 松元 俊 : 静注後フルオレセインの血漿内動態の解析及び血液房水柵透過性の算出. *日眼会誌* 87 : 403—409, 1983.
 - 25) Araie M, Sawa M, Nagataki S, Mishima S : Aqueous-humor dynamics in man as studied by oral fluorescein. *Jpn J Ophthalmol* 24 : 346—362, 1980.
 - 26) Coakes RL, Brubaker RF : Method of measuring aqueous humor flow and corneal endothelial permeability using a fluorophotometry nomogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18 : 288—302, 1979.
 - 27) 坂西良彦, 澤 充, 新家 真, 清水昊幸 : 各種白内障手術の血液房水柵に及ぼす影響について. *臨眼* 38 : 115—120, 1984.
 - 28) 澤 充, 坂西良彦, 奥野幸雄, 清水昊幸 : 後房人工水晶体移植術(PC-IOL)の前眼部組織への影響—フルオロフォトメトリーによる計画的な水晶体囊外摘出術(ECCE)との比較検討—. *眼臨* 80 : 2186—2189, 1986.
 - 29) Zeimer RC, Cunha-Vaz JG : Evaluation and comparison of commercial vitreous fluorophotometers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 : 865—868, 1981.
 - 30) 澤 充 : レーザーフレア・セルメーター開発経緯. 清水昊幸, 他(編) : *眼科 Mook* 42 レーザーフレア・セル測定. 金原出版, 東京, 19—26, 1990.
 - 31) 澤 充 : レーザーフレア・セルメーターの特性. 清水昊幸, 他(編) : *眼科 Mook* 42 レーザーフレア・セル測定. 金原出版, 東京, 27—44, 1990.
 - 32) 馬嶋慶直, 湯浅英治, 田中豊一, 西尾 泉 : レーザー散乱によるヒト水晶体核蛋白質粒子の直径計測. *臨眼* 36 : 709—712, 1982.
 - 33) 澤 充, 大久保彰, 奥野幸雄, 清水昊幸 : レーザー細隙燈顕微鏡による前房内蛋白濃度測定法. *日眼会誌* 91 : 102—106, 1987.
 - 34) 澤 充, 釣巻 穰, 水流忠彦, 清水昊幸 : レーザー前房蛋白・細胞測定装置. 一試作 II 号機—. *臨眼* 42 : 660—664, 1988.
 - 35) 澤 充, 釣巻 穰, 水流忠彦, 清水昊幸 : レーザー前房蛋白・細胞測定装置による眼内レンズ挿入術後炎症の臨床的検討. *臨眼* 42 : 665—668, 1988.
 - 36) 清水昊幸, 釣巻 穰, 澤 充, 中西徳昌, 臼井正彦, 小山内卓哉, 他 : レーザーフレアメーター(FM-500)の臨床評価—レーザーフレアセルメーター(FC-1000)との比較試験成績—. *眼臨* 87 : 543—547, 1993.
 - 37) 澤 充, 嘉村由美, 増田寛次郎, 藤野雄次郎, Merino G, 清水昊幸, 他 : フレアセルメーターマーク II (FC-2000)の臨床評価. *眼臨* 91 : 1194—1198, 1997.
 - 38) Oshika T, Nishi M, Mochizuki M, Nakamura M, Kawashima H, Iwase K, et al : Quantitative assessment of aqueous flare and cells in uveitis. *Jpn J Ophthalmol* 33 : 279—287, 1989.
 - 39) 澤 充 : 前房蛋白および前房細胞測定法と装置. *臨眼* 41 : 1139—1143, 1987.
 - 40) 釣巻 穰, 澤 充, 清水昊幸 : 後房眼内レンズ挿入術後の前房内蛋白濃度と細胞数について フィブリン反応発症との関係. *日眼会誌* 92 : 1690—1695, 1988.
 - 41) Ladas JG, Wheeler NC, Morhun PJ, Rimmer SO, Holland GN : Laser flare-cell photometry : methodology and clinical applications. *Surv Ophthalmol* 50 : 27—47, 2005.
 - 42) Findl O, Amon M, Petternel V, Kruger A : Early objective assessment of intraocular inflammation after phacoemulsification cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 29 : 2143—2147, 2003.
 - 43) 澤 充, 釣巻 穰, 水流忠彦, 清水昊幸, 市橋 直, 梅沢弘一郎, 他 : レーザー前房蛋白・細胞測定装置とその薬理効果実験への対用. *あたらしい眼科* 4 : 1441—1446, 1987.
 - 44) 水流忠彦, 釣巻 穰, 坂西良彦, 澤 充, 清水昊幸 : 後房レンズ移植後のフィブリン析出と房水蛋白および血液房水柵 He-Ne レーザー前房蛋白測定法およびフルオロフォトメトリーによる研究. *眼臨* 82 : 210—216, 1988.
 - 45) 澤 充, 増田寛次郎, 清水昊幸, 臼井正彦, 北沢克明, 高柳 一成 : Ketorolac trometamol (RS-37619)点眼液の白内障術後炎症に対する後期第Ⅱ相試験—二重盲検比較試験による至適用量の検討—. *眼臨* 87 : 2648—2659, 1993.
 - 46) 澤 充, 増田寛次郎, 清水昊幸, 臼井正彦, 北沢克明, 高柳 一成 : Keratorolac trometamol (RS-37619)点眼液の白内障術後炎症に対する後期第Ⅲ相試験—Diclofenac sodium 点眼液を対照とした二重盲検群間比較試験—. *眼臨* 88 : 71—80, 1994.
 - 47) 澤 充, 増田寛次郎, 中島光好 : ジクロロフェナクナトリウム点眼液の白内障術後炎症に対する効果—プラノプロフェン点眼液を対照とした二重盲検法による検討—. *IOL & RS* 13 : 193—200, 1999.
 - 48) Saari KM, Nelimarkka L, Ahola V, Loftsson T, Stefánsson E : Comparison of topical 0.7% dexamethasone-cyclodextrin with 0.1% dexamethasone sodium phosphate for postcataract inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244 : 620—626, 2006.
 - 49) Asano S, Miyake K, Ota I, Sugita G, Kimura W, Sakka Y, et al : Reducing angiographic cystoid macular edema and blood-aqueous barrier disruption after small-incision phacoemulsification and foldable intraocular lens implantation : multicenter prospective randomized comparison of topical diclofenac 0.1% and betamethasone 0.1%. *J Cataract Refract Surg* 34 : 57—63, 2008.
 - 50) Oshika T, Kato S, Sawa M, Masuda K : Aqueous flare intensity and age. *Jpn J Ophthalmol* 33 : 237—242, 1989.
 - 51) Mori M, Araie M : A simple method of determining the time course of timolol's effects on aqueous flow in humans. *Arch Ophthalmol* 109 : 1099—

- 1103, 1991.
- 52) **Cellini M, Caramazza R, Bonsanto D, Bernabini B, Campos EC** : Prostaglandin analogs and blood-aqueous barrier integrity : a flare cell meter study. *Ophthalmologica* 218 : 312—317, 2004.
 - 53) 水流忠彦, 釣巻 穰, 澤 充 : Argon laser trabeculoplasty の前房蛋白濃度と細胞数に及ぼす影響. *臨眼* 45 : 73—76, 1991.
 - 54) **Fang W, Zhou H, Yang P, Huang X, Wang L, Kijlstra A** : Longitudinal quantification of aqueous flare and cells in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Br J Ophthalmol* 92 : 182—185, 2008.
 - 55) **Nguyen NX, Kuchle M, Naumann GO** : Quantification of blood-aqueous barrier breakdown after phacoemulsification in Fuchs' heterochromic uveitis. *Ophthalmologica* 219 : 21—25, 2005.
 - 56) 加藤 聡, 大鹿哲郎, 船津英陽, 国定勝郎, 山下英俊, 澤 充 : 糖尿病と前房蛋白濃度. 3. 糖尿病患者の前房蛋白濃度と全身背景因子との関連. *臨眼* 44 : 1288—1289, 1990.
 - 57) 加藤 聡, 大鹿哲郎, 船津英陽, 国定勝郎, 山下英俊, 澤 充 : 糖尿病と前房蛋白濃度. 5. 前房蛋白濃度の上昇と虹彩血管障害の関係. *日眼会誌* 96 : 1000—1006, 1992.
 - 58) **Miyake K, Miyake T, Kayazawa F** : Blood-aqueous barrier in eyes with retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 99 : 906—910, 1992.
 - 59) **Eter N, Spitznas M, Sbeity Z, Vogel A** : Evaluation of the blood-aqueous barrier by laser flare cell photometry following retinal cryocoagulation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242 : 120—124, 2004.
 - 60) **Asano S, Miyake K, Miyake S, Ota I** : Relationship between blood-aqueous barrier disruption and ischemic macular edema in patients with branch or central retinal vein occlusion : effects of sub-tenon triamcinolone acetate injection. *J Ocul Pharmacol Ther* 23 : 577—584, 2007.
 - 61) **Oshika T** : Aqueous protein concentration in rhegmatogenous retinal detachment. *Jpn J Ophthalmol* 34 : 63—71, 1990.
 - 62) 松井美貴, 十蔵寺寿子, 佐藤和子, 岩崎琢也, 白井正彦 : 網膜色素変性症の血液眼関門障害. *眼臨* 85 : 130—133, 1991.
 - 63) **Masuda K, Izawa Y, Mishima S** : Prostaglandins and uveitis. A preliminary report. *Jpn J Ophthalmol* 17 : 166—170, 1973.
 - 64) **Vegge T, Neufeld AH, Sears ML** : Morphology of the breakdown of the blood-aqueous barrier in the ciliary processes of the rabbit eye after prostaglandin E₂. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14 : 33—36, 1975.
 - 65) **Pedersen OO** : Electron microscopic studies on the blood-aqueous barrier of prostaglandin-treated rabbit eyes. I. Iridial and ciliary processes. *Acta Ophthalmol* 53 : 685—698, 1975.
 - 66) **Sawa M, Masuda K** : Topical indomethacin in soft cataract aspiration. *Jpn J Ophthalmol* 20 : 514—519, 1976.
 - 67) **Mochizuki M, Sawa M, Masuda K** : Topical Indomethacin in Intracapsular Extraction of Senile Cataract. *Jpn J Ophthalmol* 21 : 215—226, 1977.
 - 68) **Mishima S** : Corneal thickness. *Surv Ophthalmol* 13 : 57—96, 1968.
 - 69) **Miyake K** : Vitreous fluorophotometry in aphakic or pseudophakic eyes with persistent cystoid macular edema. *Jpn J Ophthalmol* 29 : 146—152, 1985.
 - 70) **Maurice DM** : Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia* 24 : 1094—1095, 1968.
 - 71) **Sato T** : Studies on endothelium of corneal graft. *Jpn J Ophthalmol* 22 : 114—126, 1978.
 - 72) 澤 充, 崎元 卓 : ヒト角膜内皮細胞の傷害に対する治癒過程. —Specular microscope, Image analyzer による解析—. *日眼会誌* 83 : 947—952, 1979.
 - 73) **Sawa M, Tanishima T** : Morphometry of the human corneal endothelium and follow-up of post-operative changes. *Jpn J Ophthalmol* 23 : 337—350, 1979.
 - 74) **Kutty PK, Forster TS, Wood-Koob C, Thayer N, Nelson RB, Berke SJ, et al** : Multistate outbreak of toxic anterior segment syndrome, 2005. *J Cataract Refract Surg* 34 : 585—590, 2008.
 - 75) **Mamalis N** : Toxic anterior segment syndrome. *J Cataract Refract Surg* 32 : 181—182, 2006.
 - 76) **Werner L, Sher JH, Taylor JR, Mamalis N, Nash WA, Csordas JE, et al** : Toxic anterior segment syndrome and possible association with ointment in the anterior chamber following cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 32 : 227—235, 2006.
 - 77) **Mamalis N, Edelhauser HF, Dawson DG, Chew J, LeBoyer RM, Werner L** : Toxic anterior segment syndrome. *J Cataract Refract Surg* 32 : 324—333, 2006.
 - 78) **Holland SP, Morck DW, Lee TL** : Update on toxic anterior segment syndrome. *Curr Opin Ophthalmol* 18 : 4—8, 2007.
 - 79) **Sakimoto A, Sawa M, Oshida T, Sugaya S, Hirono T, Ishimori A** : Minimum endotoxin concentration causing inflammation in the anterior segment of rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 53 : 425—432, 2009.
 - 80) **Duke-Elder S, Leigh AG** : V. General pathological consideration, VI. Inflammations of the cornea keratitis in diseases of the outer eye part 2. In : Duke-Elder S, et al (Eds) : *System of Ophthalmology*. Henry Kimpton, London, 601—861, 1965.
 - 81) 澤 充 : 涙液と点眼薬. *眼科* 27 : 925—934, 1985.
 - 82) **Jacob JT, Ham B** : Compositional profiling and biomarker identification of the tear film. *Ocul Surf* 6 : 175—185, 2008.
 - 83) **Lemp MA, Blackman HJ** : Ocular surface defense mechanisms. *Ann Ophthalmol* 13 : 61—63, 1981.

- 84) **Bron AJ, Seal DV** : The defences of the ocular surface. *Trans Ophthalmol Soc U K* 105 (Pt 1) : 18—25, 1986.
- 85) **Knop N, Knop E** : Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1270—1279, 2000.
- 86) **Sakimoto T, Shoji J, Inada N, Saito K, Iwasaki Y, Sawa M** : Histological study of conjunctiva-associated lymphoid tissue in mouse. *Jpn J Ophthalmol* 46 : 364—369, 2002.
- 87) 庄司 純, 稲田紀子, 斎藤圭子, 高浦典子, 岩崎隆, 澤 充 : モルモット結膜関連リンパ装置におけるリンパ濾胞の組織学的検討. 第 1 報 濾胞樹状細胞の組織学的検討. *日眼会誌* 101 : 794—800, 1997.
- 88) **Tomasi TB Jr, Larson L, Challacombe S, McNabb P** : Mucosal immunity : The origin and migration patterns of cells in the secretory system. *J Allergy Clin Immunol* 65 : 12—19, 1980.
- 89) 庄司 純, 稲田紀子, 葛西 浩, 石井康雄, 北野周作 : 外来抗原に対する結膜リンパ装置の反応. *日眼会誌* 96 : 432—439, 1992.
- 90) **Shoji J, Inada N, Saito K, Takaura N, Iwasaki Y, Sawa M** : Immunohistochemical study on follicular dendritic cell of conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 1—7, 1998.
- 91) 稲田紀子, 庄司 純, 高浦典子, 澤 充 : 結膜関連リンパ装置におけるリンパ球ホーミングの形態学的検討. *日眼会誌* 99 : 1111—1118, 1995.
- 92) **Liu SH, Tagawa Y, Prendergast RA, Franklin RM, Silverstein AM** : Secretory component of IgA : a marker for differentiation of ocular epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20 : 100—109, 1981.
- 93) **Gudmundsson OG, Sullivan DA, Bloch KJ, Allansmith MR** : The ocular secretory immune system of the rat. *Exp Eye Res* 40 : 231—238, 1985.
- 94) 星野 舞, 庄司 純, 稲田紀子, 澤 充, 加藤博司 : 濾紙採取法を用いた涙液中分泌型 IgA の測定. *日眼会誌* 110 : 276—281, 2006.
- 95) **Inada N, Shoji J, Hoshino M, Sawa M** : Evaluation of total and allergen-specific secretory IgA in tears of allergic conjunctival disease patients. *Jpn J Ophthalmol* 51 : 338—342, 2007.
- 96) **Saito K, Shoji J, Inada N, Iwasaki Y, Sawa M** : Immunosuppressive effect of cholera toxin B on allergic conjunctivitis model in guinea pig. *Jpn J Ophthalmol* 45 : 332—338, 2001.
- 97) **Oikawa A, Shoji J, Inada N, Sawa M** : Study of transconjunctival immunotherapy using cholera toxin B for treatment of experimental allergic conjunctivitis in mouse model. *Jpn J Ophthalmol* 2010 (in press).
- 98) **Ikeda A, Sakimoto T, Shoji J, Sawa M** : Expression of α - and β -defensins in human ocular surface tissue. *Jpn J Ophthalmol* 49 : 73—78, 2005.
- 99) **Ikeda A, Nakanishi Y, Sakimoto T, Shoji J, Sawa M, Nemoto N** : Expression of β defensins in ocular surface tissue of experimentally developed allergic conjunctivitis mouse model. *Jpn J Ophthalmol* 50 : 1—6, 2006.
- 100) **Vinding T, Eriksen JS, Nielsen NV** : The concentration of lysozyme and secretory IgA in tears from healthy persons with and without contact lens use. *Acta Ophthalmol* 65 : 23—26, 1987.
- 101) **Saini JS, Dhar S, Sharma A** : Role of tear secretory IgA in hard contact lens-related changes in the tarsal conjunctiva. *Can J Ophthalmol* 27 : 299—301, 1992.
- 102) **Pearce DJ, Demirci G, Willcox MD** : Secretory IgA epitopes in basal tears of extended-wear soft contact lens wearers and in non-lens wearers. *Aust N Z J Ophthalmol* 27 : 221—223, 1999.
- 103) **McClellan KA, Cripps AW, Clancy RL, Billson FA** : The effect of successful contact lens wear on mucosal immunity of the eye. *Ophthalmology* 105 : 1471—1477, 1998.
- 104) **Pramod NP, Dhevahi E, Sudhamathi K, Kannan K, Thyagarajan SP** : Tear secretory IgA : evaluation of usefulness as a diagnostic marker in herpetic keratitis. *Ocul Immunol Inflamm* 7 : 61—67, 1999.
- 105) **Kijlstra A, Polak BC, Luyendijk L** : Transient decrease of secretory IgA in tears during rigid gas permeable contact lens wear. *Curr Eye Res* 11 : 123—126, 1992.
- 106) **Toshitani A, Imayama S, Shimozone Y, Yoshinaga T, Furue M, Hori Y** : Reduced amount of secretory component of IgA secretion in tears of patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 19 : 134—138, 1999.
- 107) **Stuchell RN, Feldman JJ, Farris RL, Mandel ID** : The effect of collection technique on tear composition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 374—377, 1984.
- 108) **Fullard R** : Tear proteins arising from lacrimal tissue. In : Saunders WB (Ed) : Principles and Practice of Ophthalmology. Basic Sciences, Philadelphia, 473—479, 1994.
- 109) **Shoji J, Kitazawa M, Inada N, Sawa M, Ono T, Kawamura M, et al** : Efficacy of tear eosinophil cationic protein level measurement using filter paper for diagnosing allergic conjunctival disorders. *Jpn J Ophthalmol* 47 : 64—68, 2003.

Comment : 臼井 正彦

著者が長年手がけてきた前眼部疾患への非侵襲的検査について、総括的にまとめた論文で、大きく二つのテーマに分けられている。その一つは著者らが開発したフレアセルフオトメトリの製作の経緯と臨床治験の報告であり、もう一つは微量な涙液を試料として、目的とする病態を突き止めるバイオマーカーの検索とその測定方法の開発ならびに臨床応用の報告である。両者とも眼科臨床に有益な情報をもたらす非侵襲的前眼部検査法であり、これらを開発し臨床応用を可能にした著者らの熱意と努力に対し心から敬意を表するものである。

まず房水蛋白・細胞に対する定量的検査法の開発では、血液眼関門の一つである血液房水柵の破綻を観察でき、今日眼科臨床で頻繁に使用されているレーザーフレアセルメーターの作製経緯が主に述べられている。血液房水柵が破綻すると前房内蛋白濃度が増加するので、レーザービームを前房に当てて生じる散乱光強度を光電子増倍管で捉え、これを前房フレア強度としフレア値 (photon counts/msec) で表した。また、前房内のセル値は一定の体積内における細胞からの散乱光をガルバノミラーで二次元的なビームとし、これをスキャンし光電子増倍管を通すことにより測定が可能となった。このような前房フレア値とセル値の測定は、白内障術後炎症の評価、抗炎症薬および眼内レンズの評価、内眼炎の臨床経過や治療薬の評価、抗緑内障薬の房水動態への効果と副反応の評価を可能にした。また、糖尿病眼症などの網膜血管病変や網膜色素変性における血液房水柵の異常を検索できるようになった。さらに、ぶどう膜炎に合併する白内障などに内眼手術を施行する際の視標として前房フレア値の測定が有用な情報を提供してくれている。したがって、この検査は手術侵襲や炎症疾患による血液房水柵の破綻ばかりでなく非炎症疾患のその異常についても検出できる、まさに日本発の画期的な眼科临床上重要な非侵襲的検査となった。

一方、涙液を用いた検査法では、眼表面を潤す涙液に含まれる分泌型 IgA や化学伝達物質が生体防御反応システムに関与しているので、著者はここに注目し、アレルギー性結膜疾患や角膜ヘルペスの病態と密接する情報が種々のバイオマーカーを通して得られるか否かについて検討した。

アレルギー性結膜疾患では、即時型アレルギー反応で炎症細胞となる好酸球の eosinophil cationic protein (ECP) に着目し、これをバイオマーカーとする検査法を開発した。抗 ECP モノクローナル抗体を用いたイムノクロマトデバイスの作製により、感度、特異度とも良好な迅速診断キットが完成された。また、ヘルペス性角膜炎診断のためのバイオマーカーとして涙液中の単純ヘルペスウイルス特異的分泌型 IgA (HSV-sIgA) 抗体を測定する ELISA プレートを作製した。これを用いた検査では、実質型と上皮型のヘルペス性角膜炎群は、非ヘルペス群や対照群に比して涙液 HSV-sIgA 抗体価が有意に高値であった。また実質型群は両者に対して、上皮型群は対照群のみに対して有意差が得られた。この検査の感度と特異度については今後さらに検討の余地がある。

いずれにせよ微量な涙液でアレルギー性結膜疾患やヘルペス性角膜炎の診断に有用な検査法が確立されたことは、今後の眼科臨床においてきわめて意義のあることである。