

レーザー細隙燈顕微鏡による前房内蛋白濃度測定法 (図4)

澤 充・大久保 彰 (自治医科大学眼科)
 奥野 幸雄・清水 昊幸

Method to determine aqueous protein concentration in vivo

Mitsuru Sawa, Yukio Okuno, Akira Okubo & Hiroyuki Shimizu

Department of Ophthalmology, Jichi Medical School

要 約

He-Ne レーザー光を光源とし前房内に集光したレーザー光の散乱光強度をフォトンカウント光電子増倍管によりおこなう装置により前房内蛋白濃度を生体で定量的に測定する方法についての検討をおこなった。レーザー光の出力は1.5mW で空中での集光径は50 μ m である。サンプル時間は 2×10^{-5} 秒で総サンプル時間を2秒とし(総フォトンカウン数/総サンプル回数)をユニットフォトン量として蛋白濃度の指数として使用した。牛血清アルブミン、ヒト血漿希釈液を用いた In vitro 実験では各々1~100mg/ml, 250倍希釈迄ユニットフォトン量は直線関係が得られた。家兎眼をもちい、前房穿刺による人工的血液房水柵破壊実験において、Lowry 法による一次及び、二次房水中の蛋白濃度とユニットフォトン量との間にも良好な関係が得られた。今回の測定結果と従来の前房内蛋白濃度測定法についての報告をもとにレーザーをもちいた前房内蛋白濃度の定量法についての検討をおこなった。(日眼 91:102—106, 1987)

キーワード: He-Ne レーザー, 前房内蛋白濃度, 生体, 定量測定, 血液房水柵

Abstract

We developed a new method to determine aqueous protein concentration in vivo. The instrument consisted of a light beam system with He-Ne laser tube and a biomicroscope with a photomultiplier. The laser power was 1.5 mW. We focussed the laser beam at a diameter of 50 μ m in the air and measured the intensity of the scattered light at the focussing area using photon counting method. Sampling time was 2×10^{-5} sec and total measurement time was 2 sec. We calculated the average photon counts per sampling times and defined it unit photon, which was treated as an index of protein concentration. In vitro study using bovine serum albumine and diluted human plasma solution, we had good correlation between the value for unit photon and albumine concentration ranging from 1 to 100mg/ml and plasma diluting factors ranging from 250 to 10 times. In vivo study using rabbit eyes, we determined aqueous protein concentration before and after the paracentesis with both our method and Lowry's method. Secondary aqueous showed an increased protein concentration and their values determined by the two methods showed good accordance. We concluded that our method with laser beam to determine aqueous protein concentration in vivo was superior to other previous methods and useful in clinical application. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 102—106, 1987)

Key words: He-Ne laser, aqueous protein, quantitative measurement, in vivo, blood-aqueous barrier

別刷請求先: 329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 自治医科大学眼科学教室 澤 充

Reprint requests to: Mitsuru Sawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Jichi Medical School

3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04, Japan

(昭和61年7月19日受付) (Accepted July 19, 1986.)

緒 論

前房内蛋白濃度測定は眼内炎症即ち血液房水柵機能を判定する上で極めて重要であり、その定量的方法としては写真計測法¹⁾²⁾、光電子増倍管による光学的測定法^{3)~5)}が報告されているが容易な方法ではなく、日常臨床においては細隙燈顕微鏡を用いての grading による半定量的判定法⁶⁾が使用されているのが現状で、房水内蛋白濃度の定量的測定法として臨床的に応用出来る方法としては未だ確立したものが無い。今回我々は He-Ne レーザーを光源とする細隙燈顕微鏡装置を用い、前房内に集光したレーザー光が前房内蛋白により散乱される光量を光電子増倍管で測定する方法による前房内蛋白濃度の定量的生体測定方法の開発、およびその基礎的検討をおこなった結果について報告する。

装置及びその測定方法

今回の研究の目的には光源系として He-Ne レーザー、レーザー散乱光強度測定系として光電子増倍管を必要とする事又、研究の基礎的データを得ることを実験課題とした為に、上記条件を満す装置として装置本来の対象目的⁷⁾⁸⁾とは異なるが興和社製クリード1000を転用した。今回の使用目的に則した本装置(以下、レーザー細隙燈測定装置と称す)の概略を図1に示す。He-Ne レーザー管の出力は1.5mW でありレーザー光は集光レンズにより空中で直径50 μ m に焦点を結ぶ。測定系はレーザー散乱光強度測定系と測定系の制御、データ処理をおこなうパーソナルコンピュー

ター部分からなる。散乱光強度測定は単眼観察系内に組み込まれた測定用ウィンドー(1,000 \times 500 μ m)とフォトンカウント用光電子増倍管、増幅器及びフォトンカウンターシステムによりなされる。ウィンドーと光電子増倍管はガラスファイバーにより結ばれている。今回は装置の制約からレーザー光源系と測定系を80°に設定し、1回のサンプル時間2 \times 10⁻⁵秒とし、全体のサンプル時間が2秒に達すると測定を終了する条件にて測定をおこなった。総フォトンパルス数と総サンプル回数はコンピューターに記録され、今回は(総フォトンパルス数/総サンプル回数)、即ち、各サンプルにおける平均フォトンパルス数を Unit photon と名付け、Unit photon 量及び測定対象物の濃度を両対数グラフにプロットし、両者の関係の検討をおこなった。

方 法

実験内容は以下のごとくである。

1. In vitro 蛋白濃度測定

a. 牛アルブミン

燐酸緩衝液(0.1M, pH 7.33)を用い牛血清アルブミン(SIGMA 製)溶液100mg/ml 3本作製し、その各々から希釈液(100, 10, 1, 0.1mg/ml)を作製した。各溶液を無蛍光ガラスセル(10 \times 10 \times 50mm)に入れレーザー細隙燈測定装置にて5回測定しその平均を求めた。

b. ヒト血漿蛋白

同一の正常人(M.S.)から異なる日に、3回、空腹状態でヘパリン採血後、遠沈、血漿を分離後、前述の燐酸緩衝液をもちい10, 50, 100, 250倍血漿希釈溶液を作製、la 同様の方法にて測定した。

2. In vivo 前房内蛋白濃度測定

有色家兎(体重2~3kg, n=8)を用い、測定前1.0%アトロピン、0.5%トロピカマイド、0.5%塩酸フェニレフリン数回点眼による散瞳。ケタミン(50mg/体重kg)塩酸クロルプロマジン(10mg/体重kg)混合液筋注麻酔後、ヘパリン(1,000単位/体重kg)静注30分後から測定を開始した。

測定は両眼をまずレーザー細隙燈測定装置にて測定。測定後両眼、ベノキシネート点眼麻酔下にてツベルクリン注射筒(26ゲージ針)にて輪部から前房水採取。この際、眼内組織を損傷しないよう又、採取房水量は200 μ lを超えないように注意した。採取房水は直後に-70℃にて保存。第1回房水採取後90分及び180分後に全身麻酔を追加しつつ、同様にレーザー細隙燈測

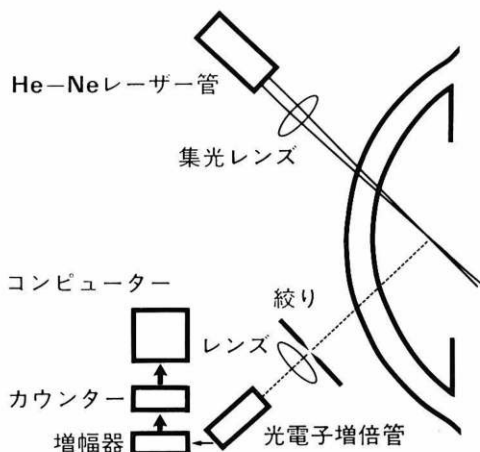


図1 装置の概略

定及び、それに続いて房水採取をおこなった。

採取した房水は後日、室温にて解凍、前述の磷酸緩衝液を使用し1次房水は11倍、二次房水は、101倍希釈し、Lowry法にて、Spectrophotometer(日立製、波長：660nm)をもちいて蛋白濃度の測定をおこなった。

結 果

1. In vitro 蛋白濃度測定

a. 牛アルブミン

3希釈列相互の測定結果に変動はみられたものの1測定内の変動は良く一致した。そのうちの1希釈列についての測定結果を濃度を横軸、ユニットフォトン量を縦軸に両対数で示したものが図2である。0.1mg/mlではやや10~1mg/mlの関係からのずれが見られたが牛血清アルブミン濃度とユニットフォトンのあいだには直線関係が得られた ($r=0.999, p=0.000$)。

b. ヒト血漿

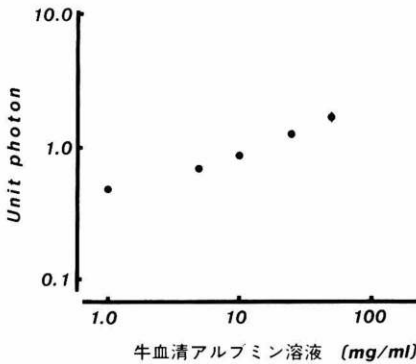


図2 In vitro, 牛アルブミン溶液の測定結果。(バーは標準偏差)

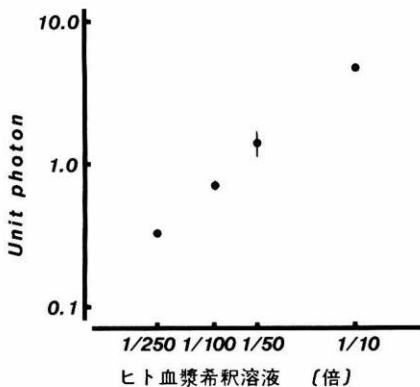


図3 In vitro, 血漿希釈液の測定結果。(バーは標準偏差)

今回使用した血液の通常の臨床検査法による血漿総蛋白量は8.0, 8.2, 8.6g/dlであった。血漿総蛋白量8.0g/dlの血漿をもちいその10~250倍希釈溶液での測定結果を1aと同様に両対数スケールで示したものが図3である。各測定点は直線関係にあることが認められた ($r=0.999, p<0.002$)。

2. In vivo 前房内蛋白濃度測定

レーザー細隙燈装置による測定結果を縦軸、Lowry法による蛋白濃度測定結果を横軸に各々対数でプロットしたものが図4である。1次房水については同一個体でもLowry法による蛋白濃度測定で左右差を認め、同様の左右差がレーザー細隙燈装置による測定結果においても認められた。二次房水については一次房水より有意の蛋白濃度の上昇がみられたが、二回目、三回目採取房水間には大きな差を認めなかった。Lowry法による房水蛋白濃度測定値に対応してレーザー散乱光強度測定によるユニットフォトン値も上昇を示し、両測定法による一次房水と二次房水の測定値は有意の相関をしめした ($r=0.980, p=0.000$)。

考 案

1. 装置と方法について

血液房水柵機能の破壊、低下により前房内蛋白量の増加⁹⁾¹⁰⁾及び組成の変化¹¹⁾が生じることは種々の基礎的研究¹²⁾¹³⁾により明らかにされており、臨床的にも細隙燈顕微鏡を用いて前房内蛋白の存在、増加が認められ、細隙燈顕微鏡による半定量的房水蛋白量の測定が臨床的薬効、術後炎症の検討¹⁴⁾におこなわれている。しかし前房内蛋白量の非侵襲的定量測定法は写真測光、光電子増倍管をもちいた光学的測定等が報告されてい

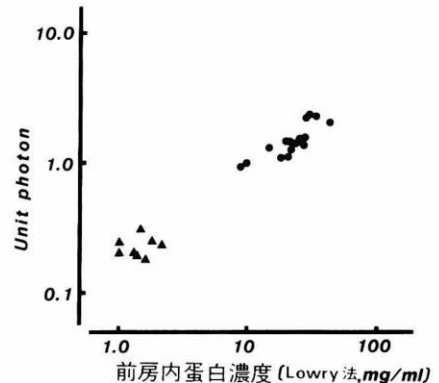


図4 In vivo, 家兎前房穿刺実験。▲：一次房水、●：二次房水

るが、応用手技、精度の点で広く利用されるには到っていない。しかし後者の方法と今回の方法は基本的には前房内での入射光の散乱光強度を測定する点で共通したものである。即ち、房水という溶液中における入射光の強さ (I_0) と散乱光 (I_s) の間には次の Debye の理論式が成り立つ¹⁵⁾。

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 \eta_0^2 (dn/dc)(1 + \cos^2 \theta)c}{No\lambda^4 \gamma^2 [(1/M) + 2Bc + 3C_2c^2 + \dots]}$$

ここで η_0 , η は溶媒及び、溶液の屈折率, θ は散乱角, c , M は溶質の濃度と分子量, No はアボガドロ数, λ は媒質中の光の波長, γ は測定点と散乱中心との距離である。

上式から明らかなように散乱光強度は入射光 (I_0) の強さに比例し、測定誤差の大きな要因となる¹⁾。今回のレーザー出力の変動は別の計測結果によれば6%であり¹⁶⁾、場合によっては出力系のモニター装置が必要になると考えられる³⁾。又、測定に必要な入射光量は使用する光電子増倍管の検出能と関係しており光電子増倍管での検出を良くするためには入射光量をあげる必要がある。しかし、高瀬⁴⁾は水銀灯を光源とする装置で一定以上の面積サイズの入射光では測定精度の低下を生じると報告しており、生体眼においては前房水以外の組織、特に角膜での散乱=ノイズの増加することが考えられる。この点、レーザー光は細い光束で十分な輝度の入射光を得る上での利点をもっている。又もうひとつのレーザー光の特徴である単一波長光の場合、白色光、水銀光等一定の波長巾を有する光源より媒質中において散乱光の波長巾が狭く散乱強度測定に有利である。入射光と測定系の角度について Anjou 等¹⁾は45度としているが、90度にすると入射レーザー光束の観察、測定部位の再現性に有利だけでなく、上記式から、前房以外の角膜等からの散乱光量も含めての減少となる為、微量の散乱光を測定する際に測定精度の向上にもつながることが考えられる。この事は高瀬の実験でも報告されている。又、測定点と散乱中心との距離の変化は二乗で I_s に寄与することから測定に際しては常にこの点、即ち測定部位の再現性に留意する必要がある。以上の散乱光の問題は今回の対象の前房水以外これを取り囲む組織、角膜、虹彩、水晶体についてもあてはまる問題である。これ等からの散乱光はすべて今回の測定法におけるノイズとなる為、極力低下させる必要がある。角膜は特に問題であり角膜表面が不整であったり汚れが附着していると散乱光量の増加=ノイズの増加となり不良な測定結果となることが

わかった。水晶体については透明な若年者の場合と白内障では房水内蛋白測定の際のバックグラウンドとして測定値に差の出る可能性があり臨床応用にあたっては注意を要する。現在この点について検討を行なっている。虹彩については色素の多寡によって測定値が異なることが考えられたのでは今回は、散瞳し虹彩からの散乱が混入しないような条件での測定をおこなった。

散乱光強度測定における測定系の問題としては、対象物の波長特異性の問題があげられる¹⁾。対象が蛋白である場合、高瀬⁴⁾は436nmのフィルターが最も効率が良くと報告している。今回の光電子増倍管のピーク波長は約400nmにある。一方、He-Ne レーザーの波長は633nmであり、散乱光の波長はこの前後にあると考えられる点から必ずしも上記条件に近くない。この点からは455~515nmに波長をもつ Ar レーザーの方が有利であると考えられる。我々は今回と同様の装置で光源を Ar レーザーにした場合 He-Ne レーザーの場合より散乱光量測定効率の増加することを、In vitro 実験で得ている。しかし生体眼に適用した場合角膜での散乱光量も増加することが考えられ、こうした点が今後の課題である。

2. 測定結果について

正常前房内蛋白濃度はヒトでは0.05~0.16mg/ml、家兎は約10倍の0.5mg/ml前後とされている¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。今回の装置では牛アルブミンでは1mg/ml以上、ヒト血漿では10~250倍希釈で濃度との間に直線関係を得たが、この濃度より低い場合の前房内蛋白濃度測定には問題があると考えられた。この点を解決する方法としてレーザー管の出力をあげる又は測定系の精度をあげることが考えられる。実際問題として現在我々は前房内蛋白濃度測定専用の装置の開発をすすめており、その装置では牛血清アルブミンを注射用精製蒸留水で溶解した増倍10 μ g~100mg/mlにおいて測定が可能になってきている。又、アルブミン溶液と血漿希釈液では直線の傾きが異なっているが、これは前述の式におけるMが異なることから説明し得る。高瀬⁴⁾は同一装置においてアルブミンとグロブリンでの測定値の差は12%以内と報告し、前房内蛋白濃度測定に際し、牛血清アルブミン濃度に換算することの妥当性を述べている。我々も今回牛血清アルブミンと血漿希釈液での測定結果に相違を得たが In vivo 実験において前房内蛋白濃度を牛血清アルブミン濃度に換算する方法をとった。血液房水柵破壊下では正常房水の構成蛋白成分以

外に、種々の蛋白が前房内に出現してくることが報告されている¹¹⁾¹²⁾²⁰⁾。しかしその成分を散乱光強度測定で分離することは不可能とされており²¹⁾、血液房水柵破壊下においても房水内蛋白濃度を牛血清アルブミン当量として求めることとした。家兎眼の一次房水における蛋白濃度の左右差の原因は不明であるが、人眼においても同様の結果が報告されている¹⁸⁾。一方、二次房水内蛋白濃度は二、三回目穿刺間で大きな差がなく、この前房内蛋白濃度上昇範囲は実験1での測定可能範囲に存在していた。従って前房穿刺を刺激とする血液房水柵機能破壊モデル実験に本装置は有用と考えられた。しかし現実の血液房水柵破壊炎症時には前房内に細胞成分と蛋白質の遊出があり、本装置の現状では実際の炎症状態の測定応用には未だ不十分である。前房内蛋白及び細胞の粒子径の測定はぶどう膜炎の診断に直接結びつく情報であり²²⁾、本装置の最終的目標と考えられる。今後この点についての装置の改善、開発が必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、協力戴いた興和株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) **Anjou CIN, Krakau CET:** A photographic method for measuring the aqueous flare of the eye in normal and pathological conditions. *Acta Ophthalmol* 38: 178—224, 1960.
- 2) **Anjou CIN, Krakau CET:** Aqueous flare and protein content in the anterior chamber of normal rabbits' eyes. *Acta Ophthalmol* 39: 95—101, 1961.
- 3) **Dyster-Aas HK, Krakau CET:** A photo-electric instrument for measuring the aqueous flare in the intact eye. *Ophthalmologica*, 146: 48—56, 1963.
- 4) 高瀬正彌: 家兎前房蛋白動態に関する研究. 第1報. slit-lamp microphotometer の試作とその応用について. *日眼* 73: 2649—2658, 1969.
- 5) **Bengtsson EK, Krakau CET, Ohman R:** The inhibiting effect of indomethacin on the disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit eye. With a technical note. *Invest Ophthalmol* 14: 306—312, 1975
- 6) **Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P:** Signs and symptoms of uveitis. I. Anterior uveitis. *Am J Ophthalmol* 47: 155—170, 1959.
- 7) **Tanaka T, Benedek GB:** Observation of protein diffusivity in intact human and bovine lenses with application to cataract. *Invest*

- Ophthalmol* 14: 449—456, 1975.
- 8) 馬嶋慶直, 湯浅英治, 田中豊一, 西尾 泉: レーザー散乱光によるヒト水晶体核蛋白粒子の直径計測. *臨眼* 36: 709—712, 1982.
- 9) **Neufeld AH, Jampol LM, Sears ML:** Aspirin prevents the disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit eye. *Nature*, 239: 158—159, 1972.
- 10) **Eakins KE:** Prostaglandins and prostaglandin synthetase inhibitors: Actions in ocular disease. *Prostaglandin synthetase inhibitors*, ed. Robinson HJ, Vane JR, pp343—352, 1974, Raven Press, New York.
- 11) **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.
- 12) **Zirm M:** Proteins in aqueous humor. *Adv Ophthalmol* 40: 100—172, 1980.
- 13) **Stjernschantz J:** Autacoids and neuropeptides. *Pharmacology of the eye*. ed. Sears ML, pp311—365, 1984, Springer Verlag, Berlin.
- 14) **Mochizuki M, Sawa M, Masuda K:** Topical indomethacin in intracapsular extraction of senile cataract. *Jpn J Ophthalmol* 21: 215—226, 1977.
- 15) 柴田和雄: スペクトル測光と分光光度計. 1974, 講談社.
- 16) SPECTRA-PHYSICS Co. (Mountain View, CA, U.S.A.): He-Ne レーザーカタログ.
- 17) **Davson H:** *Physiology of the eye*. pp9—81, 1980, Churchill Livingstone, London.
- 18) **Kronfeld PC:** The protein content of the aqueous humor in man. *Am J Ophthalmol* 24: 1121—1131, 1941.
- 19) **Kadin M:** Studies on total protein and radioiodinated serum albumin (RISA) content of primary aqueous humor. Following treatment with anticholinesterase drugs as eye drops. *Am J Ophthalmol* 55: 93—99, 1963
- 20) **Moore E, Scheie HG, Adler FH:** Chemical equilibrium between blood and aqueous humor. Further studies. *Arch Ophthalmol* 27: 317—329, 1942
- 21) 中谷 一, 佐藤秀朗, 鈴木範人, 山本祐二郎: 水晶体のレーザー散乱分光(第2報). *日本眼科学会誌* 55—58, 1981.
- 22) **Goodner EK:** *Aqueous humor studies in uveitis. Clinical methods in uveitis*. ed. Aronson SB, Gamble CN, Goodner EK, O'Connor GR, pp197—199, 1968, Mosby, Saint Louis.