

涙液の採取法に関する研究 (図9, 表2)

石田 俊郎・開 繁義・中村 泰久 (富山医科薬科大学医学部眼科学教室)

The Study of Tear Sampling Method
—Comparison of the Components of Meniscus Tears
and Lacrimal Duct Tears—

Toshio Ishida, Shigeyoshi Hiraki and Yasuhisa Nakamura

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University*

要 約

涙液内成分の検討はかなりされているが、報告者により結果が一定しない。この原因は涙液の採取法自体にあると考えられたので、種々の方法を用いて涙液を採取し、得られた試料中のアルブミン、アスコルビン酸、グルタチオン、涙液特異タンパク、また経静脈的に投与した抗生剤 (CTM) 濃度を高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) で測定した。また、これらの結果を主涙腺導管内涙液や、切除して得た結膜組織内の濃度と比較検討した。その結果、涙液を結膜や角膜に接触しないで採取可能なガラス毛细管法が最良の採取方法であり、濾紙を用いた方法では眼組織との接触の影響が大きいことがわかった。また、グルタチオンは主涙腺からは分泌されず、CTM は正常な結膜からは殆ど出現せず、主涙腺に由来することがわかった。結膜組織にはみられない涙液特異タンパクは、涙液の採取方法の如何によらず濃度に有意な差はみられなかった。(日眼 91: 473—480, 1987)

キーワード: 採取法, メニスカス涙液, 主涙腺涙液, ガラス毛细管, 高速液体クロマトグラフィー

Abstract

Glutathione (GSH), ascorbic acid (AsA), Albumin, tear-specific proteins and CTM (administered into the vein) in the meniscus tear of rabbits were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The meniscus tear samples were collected by four sampling methods, the glass microcapillary method (MC), the meniscus filter paper method (the method of collecting the meniscus tear without contacting with conjunctival tissue: mFP), Schirmer's method (SMR), the filter paper disc method (the method of collecting the tear by inserting into the conjunctival sac a filter paper disc 5mm in diameter: FPD). The concentration of each component in the conjunctival tissue and the tear in the lacrimal gland duct was measured by HPLC in order to examine the origin. The concentrations of GSH, AsA and albumin in the meniscus tear collected by MC were low, but the concentration of each component in the meniscus tear collected by filter paper increased in the order of mFP, SMR and FPD and gradually approached the concentration in the conjunctival tissue. GSH was zero in the tear of the lacrimal gland duct and the source of GSH in the meniscus tear was considered to be conjunctival tissue. There was no difference between the tear in the lacrimal gland duct and the meniscus tear collected by MC in the concentration of CTM, but CTM concentration in the meniscus tear

別刷請求先: 930-01 富山市杉谷2630 富山医科薬科大学医学部眼科 石田 俊郎

Reprint requests to: Toshio Ishida, M.D. Dept. of Ophthalmol., Faculty of Medicine, Toyama Med. and Pharmaceutical Univ.

2630 Sugitani, Toyama-shi 930-01, Japan

(昭和61年12月8日受付) (Accepted December 8, 1986.)

collected by filter paper was higher. Therefore, the origin of CTM in the meniscus tear was considered to be the lacrimal gland tissue. There was no difference among the four sampling methods in the concentration of tear specific protein. These results suggested that tear sampling method by the filter paper method caused damage to the conjunctival surface. Therefore, in sampling meniscus tear, the glass microcapillary method should be used in order to avoid inclusion of materials produced by stimulus of or damage to the conjunctiva at tear sampling. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 473—480, 1987)

Key words: sampling method, meniscus tear, lacrimal duct tear, glass microcapillary, high performance liquid chromatography (HPLC)

I 緒 言

涙液は角膜・結膜表面の乾燥防止、角膜の光学的整面の形成、微生物を含む異物に対する防御などに重要な役割を有しているが、最近では特に免疫学的重要性から注目され、多くの成分分析の報告^{1)~3)}がみられる。しかし、正常状態で存在する涙液量はヒトで、約 $7\mu\text{l}$ ⁴⁾⁵⁾と非常に少ないため、種々の採取法を用いて報告されている涙液成分の濃度には著しい差異がみられる。このことは主として涙液採取の方法自体に問題があると考えられ、この点をあきらかにするために本研究を行った。

II 実験方法

1. 実験動物には体重2.5~3.5kgの正常な成熟雄性白色家兎を用いた。

2. 対象とした試料は、以下に示す各種の方法で採取した5種の涙液と、切除して得た結膜組織である(図1)。

試料①

内径2mmのDrummond Scientific Company製100 μl disposable micropipetteを火焰中で熱し、内径約0.2~0.3mmに細工したガラス毛细管を作成し、その先端を眼瞼メニスカスに接触させ、毛管現象を利用して得られる涙液(microcapillary method: MC法)。採取に要する時間は数秒である。

試料②

Alcon Laboratory製のシルマー試験紙の先端8mmを用い、できる限り角膜、結膜との接触を避けるようにして得られる涙液(メニスカス濾紙法)。採取に要する時間は数秒である。

試料③

シルマー法に準じてシルマー試験紙を15秒間静置して得られる涙液(「シルマー法」)。

試料④

東洋濾紙No. 5Aから作成した直径5mmの円形濾紙を下眼瞼結膜嚢内へ15秒間挿入して得られる涙液(結膜嚢内濾紙挿入法)。

試料⑤

MC法で用いたガラス毛细管を約7mmの長さにし、その先端をシアノアクリレート系の瞬間接着剤でrib加工し、反応側には内径約1mmのIntramedic製ポリエチレンチューブを約1cm接続したtubingを作成し、主涙腺導管内に挿入して自然流出する涙液(導管法)。

試料⑥(結膜組織)

家兎球結膜組織を手術用顕微鏡下にて約1mg(湿重量)採取し、100 μl の生理食塩水中でhomogenizeした試料。

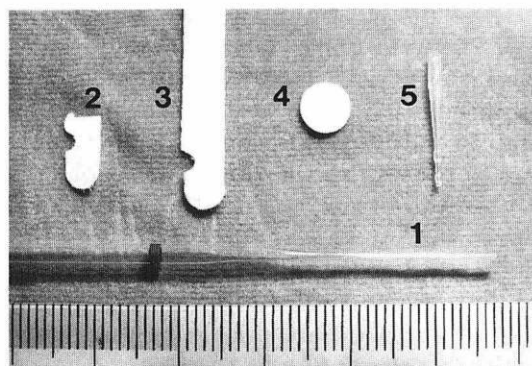


図1 涙液採取器具。1はMC法用 microcapillary tube, 2はメニスカス濾紙法用 Shirmmer paper strip, 3は「シルマー法」用 Schirmmer paper strip, 4は結膜嚢内濾紙挿入法用 filter paper disc, 5は導管挿入用 microcapillary tube

表1 各成分測定のための高速液体クロマトグラフィー条件

成分	カラム	流速(ml/min) 温度	移 動 相
1) GSH	Zorbax NH ₂ (4.6mm×15cm)	1.0 (40°C)	0.035M-CH ₃ COONa・HCl Buffer (PH 3.5) : 15 Methyl Alcohol : 4 Acetonitrile : 1
2) AsA	Zorbax NH ₂ (4.6mm×15cm)	1.0 (25°C)	1mM-KH ₂ PO ₄ , 0.1mM-Homocysteine 水溶液 : 20 Methyl Alcohol (PH 4.5) : 4 Acetonitrile : 1
3) 蛋白	Shim-pack Diol-150 (7.9mm×25cm)	1.0 (35°C)	0.1M-Na ₂ SO ₄ 0.02M-KH ₂ PO ₄ 0.01M-Na ₂ HPO ₄ (PH 6.5)
4) CTM	Shim-pack (6.0mm×15cm)	0.8 (35°C)	6mM-KH ₂ PO ₄ , 2.3mM-Na ₂ HPO ₄ 水溶液 0.3mM-EDTA・2Na, 3mM-TEABr (PH 7.4) : 14 Methyl Alcohol : 5 Acetonitrile : 1

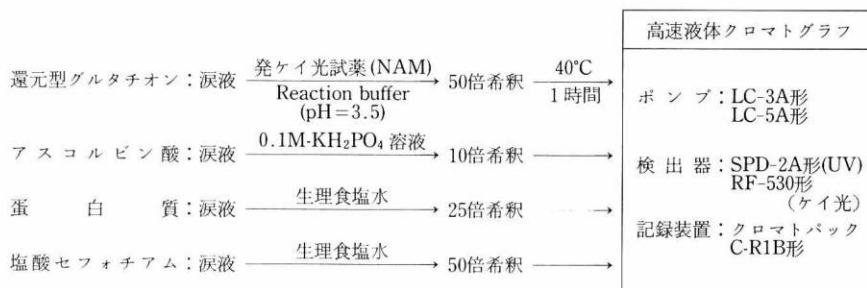


図2 実験の手順

表2 結果のまとめ。MC：microcapillary method, mFP：メニスカス濾紙法, SMR：「シルマー法」, FPD：結膜囊内濾紙挿入法。*は既報。

	主涙腺導管	眼瞼メニスカス				球結膜
		MC 法	mFP	SMR	FPD	
albumin	1.77×10 ³	1.41×10	6.87×10	1.82×10 ²	2.12×10 ²	1.98×10 ⁴
涙液蛋白	1.81×10 ⁴	1.43×10 ⁴	1.35×10 ⁴	1.42×10 ⁴	1.28×10 ⁴	2.17×10 ³
GSH	non-detect	1.06*	9.37*	4.48×10*	8.56×10*	2.04×10 ²
AA	1.27	2.01			4.44×10	5.92×10
CTM	3.77	3.20			9.87	9.55×10

(μg/ml)

3. 採取した試料中の、還元型グルタチオン(GSH)、アスコルビン酸(AsA)、蛋白および静脈内に投与した抗生剤(塩酸セフォチアム：CTM)を経時的に測定した。なおCTMは家兎耳静脈より、体重1kgあたり100mgをone shotで投与した。

4. 濃度測定方法

成分の測定はすべて高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により行った。各成分のHPLC法での測定

条件^{9)~10)}は表1に示すとおりである。

実験の手順は図2に示すとおりである。

III 結 果

1. 試料の採取量

各種の方法で採取し得た涙液量は、MC法で2~3μl、メニスカス濾紙法で約3μl、「シルマー法」で5~7μl、結膜囊内濾紙挿入法で5~10μlであった。導管法では1

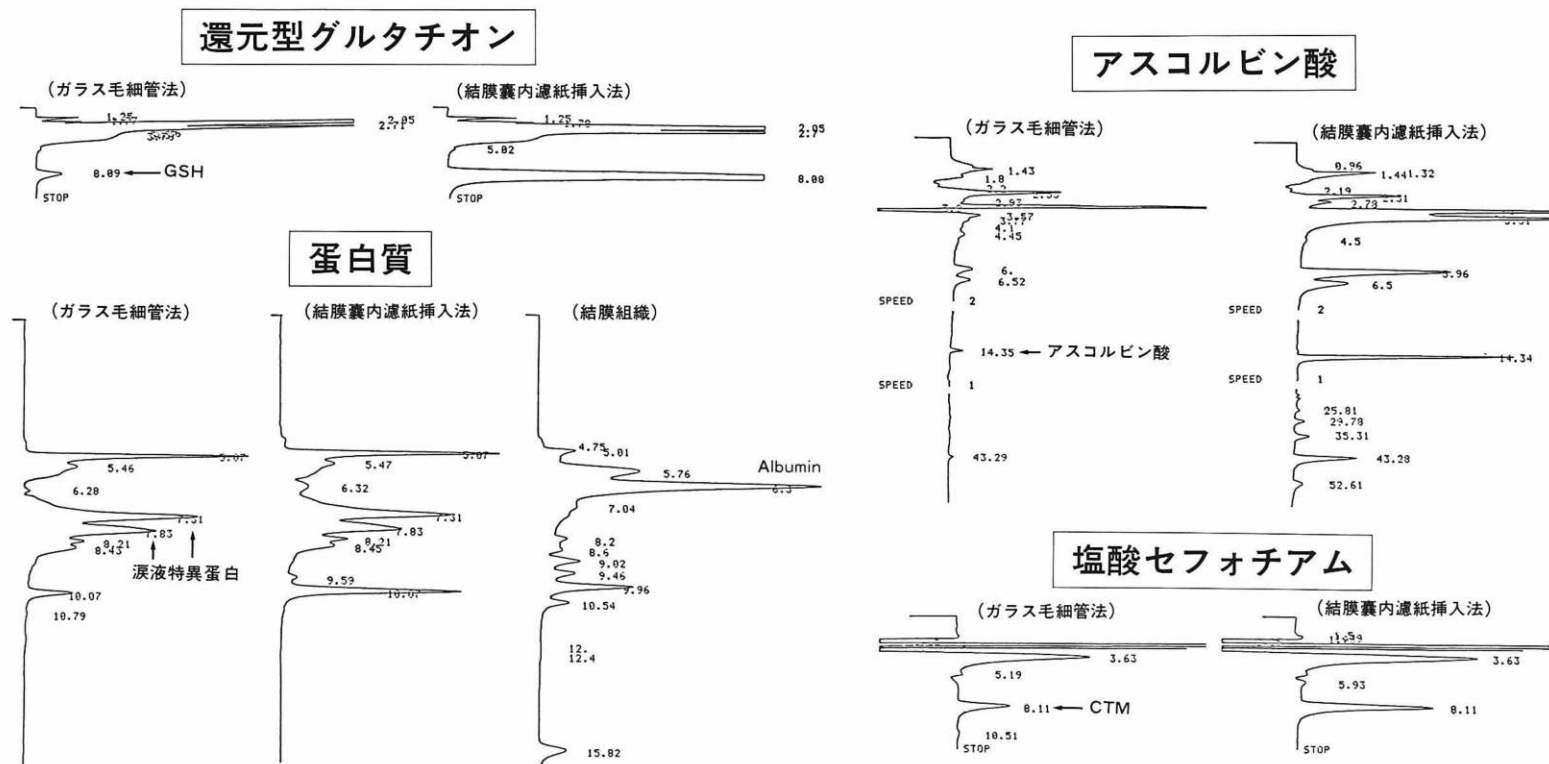


図3 グルタチオン、アスコルビン酸、アルブミン、涙液特異蛋白、塩酸セフトラムのクロマトグラフ。結膜組織の試料にはMC法および結膜囊内濾紙挿入法による涙液にみられる、retention time 7.21, 7.83, 8.21に相当する大きな3つのpeakがなく、アルブミンのpeakが際立っている。

分間に約 $1\mu\text{l}$ が自然流出した。

2. 測定結果

図 3 に HPLC 法で得られた各成分のクロマトグラフを示す。

表 2 および図 4 ~ 9 に各種の採取法で得られた各成

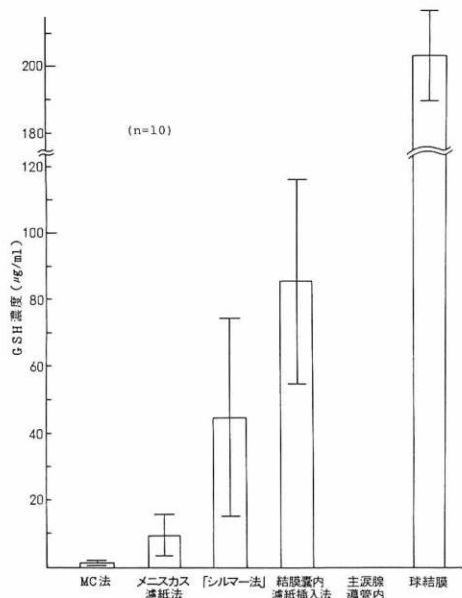


図 4 試料中の GSH 濃度。主涙腺導管内涙液には GSH は検出されなかった。

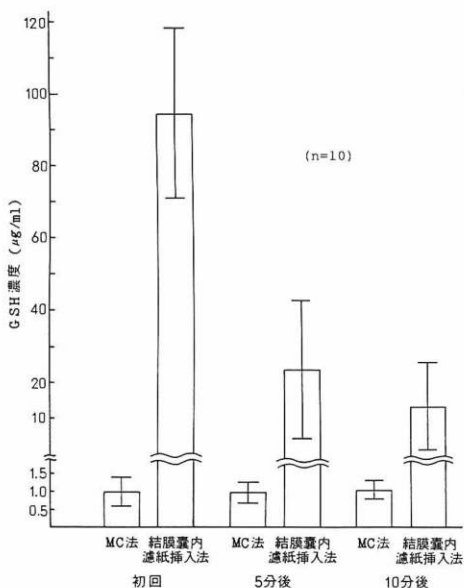


図 5 MC 法と結膜嚢内濾紙挿入法の連続採取による GSH 濃度の比較。

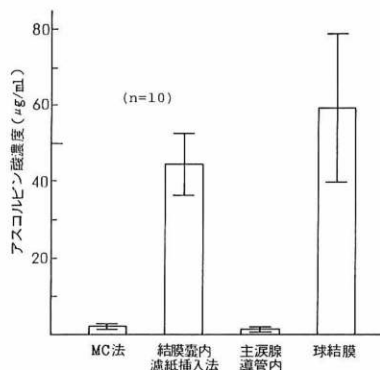


図 6 試料中の AsA 濃度。

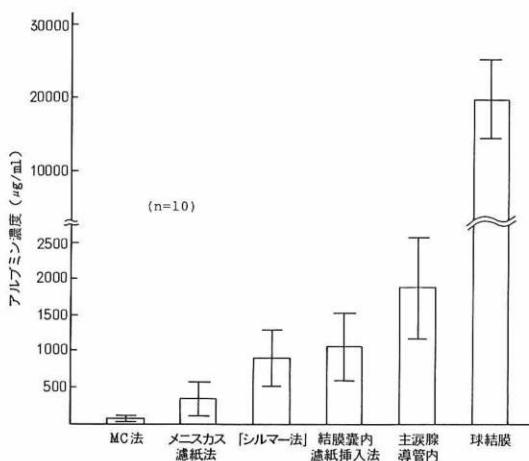


図 7 試料中のアルブミン濃度。MC 法では約 1/3 の場合に検出されなかった。

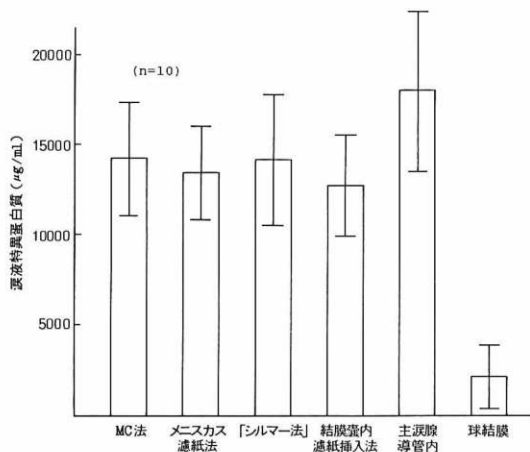


図 8 試料中の涙液特異蛋白濃度。濃度はアルブミン濃度に換算した。

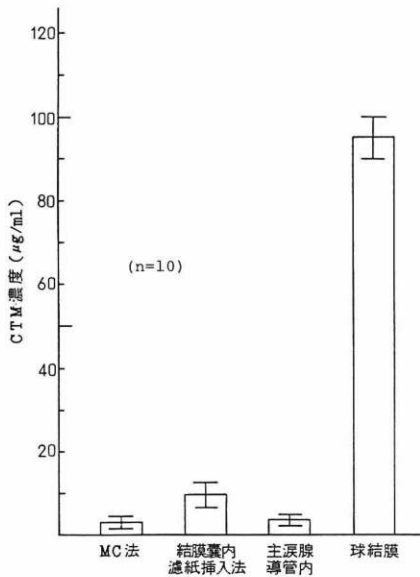


図9 試料中のCTM濃度。CTM 静脈内投与後20分での濃度。

分の測定結果を示す。

1) 各成分の採取方法による濃度の変動

i) GSH (図4)

球結膜組織には大量のGSHが検出されたが、導管法で得られた涙液には全く検出されず、MC法、メニスカス濾紙法、「シルマー法」、結膜嚢内濾紙挿入法の順で、検出濃度が増加した。

ii) AsA (図6)

球結膜組織内濃度と結膜嚢内濾紙挿入法、導管法とMC法は、それぞれ近似した値が得られた。

iii) 涙液蛋白 (図7, 8)

涙液蛋白のうちアルブミン濃度は採取方法によって大きな差異を認め、特にMC法ではほとんどその存在を認めなかった。しかし、涙液特異蛋白は4法いずれの採取法でもその濃度にほとんど差異がなかった。

iv) CTM (図9)

CTM投与後20分で、球結膜組織内濃度は95.5μg/mlを示したが、結膜嚢内濾紙挿入法では9.87μg/mlで球結膜組織内濃度の約十分の一であった。導管内涙液では、3.77μg/ml、MC法では3.20μg/mlで有意差がなかった。

2) 涙液の連続採取によるGSH濃度の変動 (図5)

5分毎に涙液の連続採取を行うと、MC法では初回の値と比較し、2回目、3回目でもほとんど濃度の変動がなく、約1μg/mlであった。結膜嚢内濾紙挿入法で

は、初回値に比較し2回目、3回目では顕著に濃度が低下した。

IV 考 按

涙液の採取法の違いにより成分濃度の測定結果に差異が生じることは、Haeringen¹¹⁾の酵素に関する報告で指摘されている。涙液の浸透圧⁹⁾に関しても、採取時の刺激により変化することが知られており、涙液採取時に刺激や眼組織に対する損傷を与えないようにすることは、涙液成分の分析にあたっては最も重要な課題であると考えられる。

従来の涙液の採取法には、capillary tube^{7)9)11)~15)}やmicrocapillary pipette^{16)~18)}により涙液を直接採取する方法、filter paper disc¹⁰⁾¹⁹⁾²⁰⁾やSchirmer試験紙などの濾紙^{21)~23)}を用いる方法、dry surgical sponge²⁴⁾²⁵⁾を用いる方法などがある。また、採取を容易にするために、時間をかけたり、刺激を加えたり⁴⁾¹²⁾、生理食塩水を点眼¹⁶⁾して液量を増加したりする方法なども行われているが、それらの中には生理的環境を変化させる危険性のあるものも多くみられる。

例えば稲田ら¹⁶⁾の報告したタマネギ法、濾紙法、生食点眼法の結果をみると、生食点眼法ではほとんどアルブミンがみられないのに対し、角結膜に対して刺激や損傷を与えらると思われるタマネギ法や濾紙法では高濃度のアルブミンが検出されている。これは角膜・結膜に対する刺激や損傷のために、結膜表面のbarrierが破壊された結果であると考えられる。また、生食点眼法は、点眼量を一定にしても、点眼前に結膜嚢内に存在している涙液量が不明のため、正確な濃度を知ることができないという問題が残る。

今回用いた採取方法のうち、MC法は涙液以外の眼組織に対する接触をほとんど完全に避けうる方法であるが、メニスカス濾紙法、「シルマー法」および結膜嚢内濾紙挿入法は、それぞれある程度眼組織との接触を避けえない方法である。

MC法で涙液を採取した場合には、GSHは約1μg/mlであるが、結膜嚢内濾紙挿入法では85.6μg/mlとなること⁷⁾、また、CTM濃度に関しても、静注後20分の時点で、MC法では3.2μg/mlに対して、結膜嚢内濾紙挿入法では9.87μg/mlとなる⁹⁾ことを既に報告したが、今回の結果と合せ考えると、GSH、AsA、アルブミンおよび静脈内に投与したCTMは、採取材料の眼組織との接触度が増すにつれて増加した。さらに、これらの物質は球結膜組織内に大量に存在していることが

今回の実験から明らかであった、このことは Haerigen が指摘しているように角膜や結膜内成分が濾紙に吸着されたためであると考えられる。

しかしながら、涙液特異蛋白のように球結膜組織には由来しない成分では、涙液採取法の如何によらず、ほぼ同程度の値が得られた、Stuchell RN¹²⁾は、Schirmer filter paper strip を用いて涙液を採取した場合と、ammonia を用いて鼻粘膜刺激後に流涙を生じさせ、capillary tube で涙液を採取した場合を比較し、いずれの場合でも lysozyme, lactoferrin などの涙液特異蛋白濃度には差異はみられなかったが、albumin, transferrin, IgG などの血清由来の蛋白濃度は、前者の方法では非常に高く、後者の方法では低く、顕著な差がみられたと報告している、今回のアルブミンと涙液特異蛋白の結果は、この事実を支持するものである。

導管法では、AsA、涙液特異蛋白、CTM は MC 法によって採取された涙液中の濃度とほぼ同程度であったが、GSH は全く検出されず、アルブミンは結膜囊内濾紙挿入法で得られた濃度よりも高値であった。

主涙腺導管内涙液中のアルブミン濃度が、かなり高値を示したのは、MC 法による涙液中にはアルブミンがほとんど存在しないことより、導管への挿入の際に tube で導管壁を損傷し、組織のアルブミンが混入したためであると考えられる。従って、導管挿入による涙液採取が、Thörig and Haeringen¹³⁾の指摘するほど、主涙腺分泌液のみを採取する有用な手段とは、必ずしも考え難い。

GSH は、従来の報告どおり角膜上皮には多量に存在するが、結膜組織内には多量に存在することが、今回の結果から明らかであり、しかも導管法では全く検出されなかったことより、角結膜表面の障害を示す parameter となりうると思われる。

GSH と同様の議論が、AsA についても考えられるが、結膜囊内濾紙挿入法と結膜組織中の濃度が近似したことより、AsA は GSH とやや異なり、結膜の表層にのみ存在すると考えられる。

また、今回の実験にみられるように、MC 法で採取した涙液中の CTM 濃度と、主涙腺導管内涙液中の CTM 濃度の値とがほぼ一致することから、正常な状態で、CTM は結膜面からは分泌されるのではなく、主涙腺から分泌されると考えることができる。

従来の報告にみられる microcapillary pipette 法や capillary tube 法では、多量の試料を確保するために、

何らかの刺激を加えて流涙を起こさせるものがほとんどであり、そのような方法で得られた涙液は必ずしも生理的に存在する涙液とはいえない、今日では HPLC 法により 1~2 μ l というごく微量の試料の分析が可能となってきた^{9)~10)}ので、眼瞼メニスカスの涙液量で十分に成分分析が可能である。また、MC 法は、毛細管現象を利用するので瞬時に涙液の採取が可能であり、連続採取の実験でも GSH 濃度にほとんど変動がみられず、涙液採取に際して眼組織に対する刺激のほとんどない、すぐれた採取法であると考えられる。従って、眼組織に対し刺激や損傷を与えず涙液を採取する方法としては、今回用いた MC 法が最良な方法であると思われる。

V 要 約

1. 涙液を、MC 法、メニスカス濾紙法、「シルマー法」、および結膜囊内濾紙挿入法の 4 種の方法で採取し、涙液中の GSH、AsA、タンパク、および CTM の濃度を、主涙腺導管内および結膜組織内のそれらの値と比較することにより、涙液の採取法に関する検討を行った。

2. GSH、AsA、アルブミンなどの結膜組織中に多量に含まれる成分は、MC 法では殆ど認められなかったが、メニスカス濾紙法、「シルマー法」、結膜囊内濾紙挿入法では、濾紙と角・結膜との接触の程度が増すにつれて高濃度の結果が得られた。

3. MC 法による 5 分毎の連続採取では、GSH 濃度は一定値を示したが、結膜囊内濾紙挿入法では、初回と 5 分後、10 分後では大きな濃度差がみられ、MC 法の再現性が確認された。

4. 主涙腺導管からの涙液には GSH は検出されず、また、CTM 濃度は MC 法によるメニスカス涙液内の CTM 濃度の値とほぼ一致し、GSH の起源は結膜・角膜であり、CTM は主涙腺由来であろうと考えられた。

5. 以上のことから、濾紙による涙液の採取では、濾紙と角結膜との接触は避けがたく、接触の程度によっては、それらの組織を損傷する結果となる。そのため、組織の成分を採取することにより、純粋な涙液とはいえない。

従って、涙液の研究においては、ガラス毛細管を用いて、採取時の刺激や損傷によって生じる成分を混入しない涙液を採取すべきであると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました、窪田靖夫教授に深謝致します。

また、本実験の一部は、文部省科学研究費奨励研究A、課題番号61771347の援助を頂いた。

文 献

- 1) **Kijlstra A, Veerhuis R**: The effect of an complementary factor on normal human tears. *Am J Ophthalmol* 92: 24—27, 1981.
- 2) **Pedersen B, Andersen SM, Klauber A, Ottovay E, Prause JU, Zhong C, Norrild B**: Secretory IgA specific for herpes simplex virus in lacrimal fluid from patients with herpes keratitis—A possible diagnostic parameter. *Br J Ophthalmol* 66: 648—653, 1982.
- 3) **Gachon AM, Verrelle P, Betail G, Dastugue B**: Immunological and electrophoretic studies of human tear proteins. *Exp Eye Res* 29: 539—553, 1979.
- 4) **Andras B**: Collection of tear samples with or without stimulation. *Am J Ophthalmol* 96: 115—116, 1983.
- 5) **三島清一**: 涙液分泌の生理と病理. *眼臨* 64: 89—99, 1970.
- 6) **開 繁義, 山田祐司, 中村泰久**: 眼組織中の遷元型グルタチオンの高速液体クロマトグラフィー (蛍光検出法)による定量法. *あたらしい眼科* 2: 294—298, 1985.
- 7) **開 繁義, 石田俊郎, 山田祐司, 中村泰久**: 涙液グルタチオンの分析に関する研究. *あたらしい眼科* 2: 990—993, 1985.
- 8) **開 繁義, 山田祐司, 石田俊郎, 中村泰久, 本瀬賢治**: 高速液体クロマトグラフィーによる房水成分の分析 (第1報). *眼紀* 35: 393—398, 1984.
- 9) **石田俊郎, 開 繁義, 山田祐司, 中村泰久**: 抗生剤 (CTM)の涙液内移行濃度—採取法による差異—. *あたらしい眼科* 2: 1130—1132, 1985.
- 10) **石田俊郎, 山田祐司, 尾崎真由美, 開 繁義, 中村泰久**: 高速液体クロマトグラフィーによる涙液内抗生剤移行濃度の測定. *眼紀* 35: 157—163, 1984.
- 11) **van Haeringen NJ, Glasius E**: The origin of some enzymes in tear fluid, determined by comparative investigation with two collection methods. *Exp Eye Res* 22: 267—272, 1976.
- 12) **Stuchell RN, Feldman JJ, et al**: The effect of collection technique on tear composition. *Invest Ophthalmol* 25: 374—377, 1984.
- 13) **Thörig J, van Haeringen NJ, Wijngaards G**: Comparison of enzymes of tears, lacrimal fluid and lacrimal gland tissue in the rat. *Exp Eye Res* 38: 605—609, 1984.
- 14) **Gachon AM, Lambin P, Dastugue B**: Human tears: Electrophoretic characteristics of specific proteins. *Ophthalmic Res* 12: 277—285, 1980.
- 15) **Zavaro A, Samra Z, Baryishak R, Sompolinsky D**: Proteins in tears from healthy and diseased eyes. *Doc Ophthalmol* 50: 185—199, 1980.
- 16) **稲田晃一郎, 馬場裕行, 岡村良一**: ヒト涙液蛋白の研究—涙液採取法の検討—. *日眼* 87: 482—489, 1983.
- 17) **Dohlman CH, Friend J, Kalevar V, Yagoda D, Balazs E**: The glycoprotein (mucus) content of tears from normals and dry eye patients. *Exp Eye Res* 22: 359—365, 1976.
- 18) **Puck A, Liappis N, Hildenbrand G**: Ion exchange column chromatographic investigation of free amino acids in tears of healthy adults. *Ophthalmic Res* 16: 284—288, 1984.
- 19) **Hypher TJ**: Uptake and loss of tears from filter paper discs employed in lysozyme test. *Br J Ophthalmol* 63: 251—255, 1979.
- 20) **Grabner G, Formanek I, Dorda W, Luger T**: Human tear lysozyme. A comparison of electro-immunodiffusion, radial immunodiffusion and a spectrophotometric assay. *Grafe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 265—270, 1982.
- 21) **Bonavida B, Sapse AT**: Human tear lysozyme. II. Quantitative determination with standard Schirmer strips. *Am J Ophthalmol* 66: 70—75, 1968.
- 22) **Prause JU**: Immunoelectrophoretic determination of tear fluid proteins collected by the Schirmer 1 test. *Acta Ophthalmol* 57: 959—967, 1979.
- 23) **Hypher, T.J**: Fluid uptake in Schirmer papers and its relevance to their employment in tear collection for lysozyme tests. *Br J Ophthalmol* 64: 696—699, 1980.
- 24) **Yamamoto GK, Allansmith MR**: Complement in tears from normal humans. *Am J Ophthalmol* 88: 758—763, 1979.
- 25) **McClellan BH, Bettman JW, Allansmith MR**: Tear and serum immunoglobulin levels in Navajo children with trachoma. *Am J Ophthalmol* 78: 106—109, 1974.