

## レーザー散乱分光法を用いたヒト水晶体

## 蛋白粒子の多成分解析 (図5, 表9)

芳賀 鉄也・馬嶋 慶直 (藤田学園保健衛生大学医学部眼科)  
湯 浅 英 治 (豊川市民病院眼科)

Multi-Component Analysis of Human Lens Protein Particles  
by Laser Scattering Spectroscopy

Tetsuya Haga, Yoshinao Majima

*Department of Ophthalmology, Fujita Gakuen University School of Medicine*

Eiji Yuasa

*Toyokawa City Hospital*

## 要 約

レーザー散乱分光法を用い水晶体蛋白粒子の多成分解析を試みた。1. 初めに既知の polystyrene latex 粒子混合試料にて多成分解析を試みた。測定時間2sec. sample time 20 $\mu$ sec. の条件では、上限2 $\mu$ m までの粒子径測定が可能であった。2. 透明水晶体核蛋白粒子は、平均0.021 $\mu$ m, 0.583 $\mu$ m, 1.699 $\mu$ m の3成分に分けられた。3. 透明水晶体核で、Small particle とそれより大きい particle の散乱強度の比 (散乱強度比) をとり加齢との関係を見ると、加齢に伴い指数関数的に増加した。また60歳以上で、急激に増加する傾向が認められた。4. 混濁のない若年性糖尿病患者と正常者の水晶体を比較した所、散乱強度比は核及び後皮質で若年性糖尿病患者の方が有意に大きかった (日眼 91:481-486, 1987)

キーワード: レーザー散乱分光法, 水晶体, 生体計測, IDDM

## Abstract

Laser scattering spectroscopy was employed to analyze human lenses. We examined age-related changes of the lens nucleus, and compared the nucleus, anterior cortex and posterior cortex of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients with those of normal humans. 1. Polystyrene latex particles were examined by multi-component analysis. The results show we can accurately measure particle diameters up to 2.0 $\mu$ m. 2. By this method of analysis, lens proteins could be divided into three groups of protein according to size-small, medium and large. 3. The ratio of scattered light intensity of medium and large particles versus small particles in the transparent lens increased exponentially with age. 4. The scattered light intensity ratio of IDDM patients was larger than that of normal humans in the nucleus and posterior cortex. We propose this technique in order to decipher the early phase of cataract formation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 481-486, 1987)

Key words: Laser scattering spectroscopy, Lens, Biometry, IDDM

# I 緒 言

水晶体蛋白質の変化を研究するために従来用いられた多くの方法は、水晶体を眼球より摘出して試料とするものであったが、その過程で組織及び細胞構造の破壊を伴うために、得られる情報は修飾を受ける可能性がある。レーザー散乱分光法は、生体内の水晶体より直接的に蛋白質に関する情報を得られるという点で有利な方法であると考えられる。最初に本法を適用したのは1975年 Benedek, 田中ら<sup>1)</sup>で、摘出ヒト及びウシの水晶体に行われた。本邦においては、1980年、中谷, 佐藤ら<sup>2)</sup>が摘出ヒト及びブタ水晶体に本法を用いた報告を行っているが、1982年、馬嶋, 湯浅ら<sup>3)</sup>がヒト水晶体において本法により生体から直接情報を得た事を報告したのを初め多くの発表がみられる<sup>4)-9)</sup>。今回、既知の Letex 粒子ならびにヒト水晶体に本法での計測を施行し、多成分解析法を試みた所、興味ある結果を得たので報告する。

## II 原理ならびに対象

1. 測定原理：レーザー散乱光のゆらぎを電気記号に換え correlator にて計測すると時間相関関数が得られる。この時間相関関数より緩和時間  $\tau$  が求まる。この  $\tau$  より図1に示す式で粒子径が知れる。図2は多成分解析法の一般式でN種類の粒子が存在したときの時間相関関数を示している。多成分解析法では各粒子径及び散乱強度が求まる。詳細はすでに発表済みの為参照されたい<sup>10)-12)</sup>。

$$\begin{aligned} \tau &= 1/2DK^2 \dots\dots\dots (1) \\ K &= 2\pi \sin(\theta/2) \dots\dots\dots (2) \\ D &= KT/6\pi\eta\xi \dots\dots\dots (3) \end{aligned}$$

K : Bortzman's constant     $\theta$  : observation angle  
 D : Diffusion coefficient    T : absolute temperature  
     $\eta$  : viscosity of water  
     $\xi$  : radius of protein particle

図 1

$$c(t) = \sum_{i=1}^N A_i \cdot \exp(-\Gamma_i t)$$

C (t) : 時間相関関数  
 A<sub>i</sub> : t = 0 のときの時間相関関数  
 $\Gamma_i$  : i 番目の緩和時間  $\tau_i$  の逆数

図 2 多成分解析法

表 1 Polystyrene latex particles

	粒 径	1ml中の個数
1	0.038 $\mu\text{m}$	$9.98 \times 10^{12}$
2	0.913 $\mu\text{m}$	$5.98 \times 10^8$
3	2.020 $\mu\text{m}$	$4.50 \times 10^7$
4	2.950 $\mu\text{m}$	$7.16 \times 10^6$

表 2 対 象

年 齢	6 ~ 71歳
例 数	120名
眼 数	140眼

表 3

	IDDM (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus)	Normal
No. of Cases	67	19
No. of Eyes	118	37
Mean Age (year)	13.4	12.8
	S.D. 4.15	S.D. 3.26

2. 装置：コーワ社製 CLEAD-2000を用いた。CLEAD-2000では、最大9成分まで解析可能である。

3. 対象：以下の3つの実験を試みた。

実験1：予備実験として既知の Polystyrene latex 粒子を用い多成分解析法の精度を確認した。Latex 粒子は表1に示した4種類を用い、測定条件は Sample time 200 $\mu\text{sec.}$ , 20 $\mu\text{sec.}$ , Scattering angle 140°, 室温で行った。

実験2：細隙灯顕微鏡所見にて、水晶体に混濁を認めない水晶体核の加齢変化につき検討した。対象者は表2に示す6歳から71歳までの140眼であった。

実験3：細隙灯顕微鏡所見にて水晶体に混濁を認めない若年性糖尿病患者と正常者の前皮質、核、後皮質に分け両者の間の検討を行った。対象者は表3に示し、若年性糖尿病患者は全例 Insulin dependent Diabetes Mellitus (IDDM) で他に合併症を持たないものであった。

## III 結 果

実験1：

(1) 各 latex 粒子単独に Sample time 20 $\mu\text{sec.}$ , 200  $\mu\text{sec.}$  で連続10回測定した結果を表4に示す。20 $\mu\text{sec.}$  では、各粒子径において測定可能であったが200 $\mu\text{sec.}$

表4 単一粒子解析

Sample time 20  $\mu$ sec.

Latex 粒子径	測定平均値	S.D.
0.038 $\mu$ m	0.0402 $\mu$ m	0.0057
0.913 $\mu$ m	0.9600 $\mu$ m	0.0988
2.020 $\mu$ m	2.0500 $\mu$ m	0.1739
2.950 $\mu$ m	3.0000 $\mu$ m	0.2562

Sample time 200  $\mu$ sec.

Latex 粒子径	測定平均値	S.D.
0.038 $\mu$ m	測定不能	—
0.913 $\mu$ m	0.8560 $\mu$ m	0.0390
2.020 $\mu$ m	1.9476 $\mu$ m	0.1609
2.950 $\mu$ m	2.8944 $\mu$ m	0.3234

表5 測定条件

Temperature	36°C	Total run time	2.0sec.
Viscosity	0.7085	Sample time	20 $\mu$ sec.
Scattering angle	140°		

試料

1. 0.038 $\mu$ m + 0.91 $\mu$ m	等量の混合試料
2. 0.038 $\mu$ m + 2.02 $\mu$ m	等量の混合試料
3. 0.038 $\mu$ m + 2.95 $\mu$ m	等量の混合試料

表6 多成分解析

1. 0.038  $\mu$ m + 0.91  $\mu$ m

	粒子径		散乱強度	
	平均	S.D.	平均	S.D.
small particle	0.039 $\mu$ m	0.0065	25.9%	2.283
large particle	0.824 $\mu$ m	0.1090	73.8%	2.044

2. 0.038  $\mu$ m + 2.02  $\mu$ m

	粒子径		散乱強度	
	平均	S.D.	平均	S.D.
small particle	0.046 $\mu$ m	0.0122	41.5%	7.849
large particle	1.600 $\mu$ m	0.3433	55.4%	8.514

3. 0.038  $\mu$ m + 2.95  $\mu$ m

測定不能

では最も小さい粒子の計測が不能であった。

(2) 2種類の latex 粒子を混合した試料を連続10回測定した。表5に、測定条件と混合した粒子の組合せを示す。表6は各混合試料の多成分解析結果である。0.038  $\mu$ m + 0.91  $\mu$ m の混合試料及び0.038  $\mu$ m + 2.02  $\mu$ m の混合試料においては、2成分に解析可能であつ

たが、0.038  $\mu$ m + 2.95  $\mu$ m の混合試料においては測定不能であった。

実験2 :

(1) 表7に140眼の水晶体核の年代別多成分解析結果で粒子径は Small, Middle, Large の3成分に分けられた。表8は各粒子の全体に対する出現頻度を示す。

(2) 我々は、Small particle がほぼ全症例で認められたため、Small particle の散乱強度を分母とし、それより大きな粒子の散乱強度を分子とする比をとることにより相対的な、Small particle の分布を知る指標となると考えた。(以下散乱強度比と略す)図3は、X

表7 粒子径の年代別変化(核:  $\mu$ m)

Age	Small Particle	Middle Particle	Large Particle
0-9 n=13	0.0190 (S.D. 0.0027)	0.550 (S.D. 0.296)	1.718 (S.D. 0.551)
10-19 n=43	0.0188 (S.D. 0.0039)	0.487 (S.D. 0.234)	1.847 (S.D. 0.527)
20-29 n=14	0.0150 (S.D. 0.0053)	0.635 (S.D. 0.184)	1.792 (S.D. 0.452)
30-39 n=11	0.0183 (S.D. 0.0073)	0.597 (S.D. 0.215)	1.719 (S.D. 0.526)
40-49 n=16	0.0210 (S.D. 0.0043)	0.728 (S.D. 0.256)	1.912 (S.D. 0.513)
50-59 n=23	0.0170 (S.D. 0.0057)	0.735 (S.D. 0.179)	1.764 (S.D. 0.098)
60-69 n=20	0.0180 (S.D. 0.0088)	0.652 (S.D. 0.186)	1.863 (S.D. 0.627)

表8

	出現頻度
Small particle	99.29% (139/140)
Middle particle	91.43% (128/140)
Large particle	67.87% (95/140)

(核)

(Middle + Large/small)

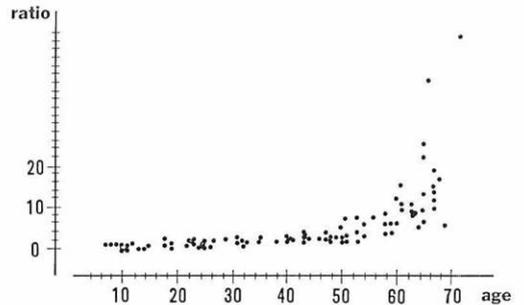


図3 より大きな粒子と最小の粒子の散乱光強度比

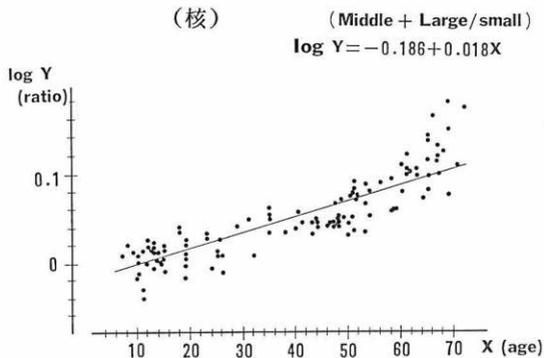


図 4

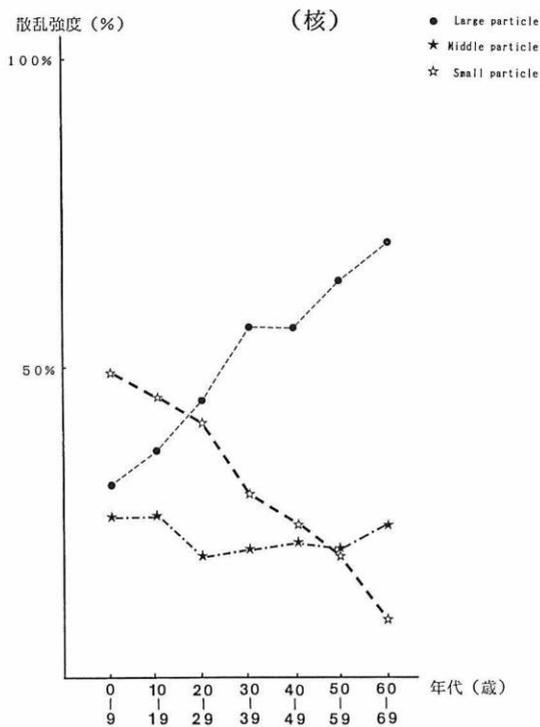


図5 各粒子群の年代別平均散乱強度

軸に年齢，Y軸に散乱強度比をとったものである。60歳をすぎると散乱強度比は急速に増加している。図4はY軸を対数としたもので、直線的に増加していることがわかる。つまり散乱強度比は指数関数的に増加している結果となった。図5はX軸に年代，Y軸に散乱強度をとったものである。Small particleは加齢とともに減少し、Middle particleはほぼ一定値をとり、Large particleは加齢とともに増加していることがわかり、散乱強度比の結果と一致した。

表9 Ratio of scattered light intensity (middle+large/small)

	若年性糖尿病患者 mean (S.D.)	正常者 mean (S.D.)	t-test P value
Ant. Cortex	2.960 (1.491)	2.956 (1.378)	NS
Nucl.	1.792 (0.907)	1.362 (0.407)	<0.01
Post. Cortex	2.798 (1.469)	2.192 (0.897)	<0.05

実験3：

表9は若年性糖尿病患者と正常者の前皮質，核，後皮質の散乱強度比の結果を示した。核及び後皮質において、若年性糖尿病患者の方が正常者に比較し散乱強度比が有意に大きい結果であった。

IV 考 按

レーザー散乱分光分析法を用いたヒト水晶体蛋白粒子分布の計測に関する報告は以前よりあるが、これらの報告では sample time を変え、2回計測を行っている。2回計測では正確に同一部位を測定することは困難であるより正確に同一部位測定を行えるという点で1回測定が望ましい。レーザー散乱分光分析法では、sample time を短くすれば、小さい粒子径計測の精度が増し、長くすれば、大きい粒子径計測の精度が増す。粒子径計測の精度を増すという点では、測定時間を長くすることも考えられるが、臨床測定時間を延ばすことは困難である。我々は実験1において既知の polystyrene latex 粒子を用い、1回計測を試みた結果、単一粒子計測においては、sample time 20μsec で、0.038μm から2.95μm まで十分な精度で測定可能であった。混合試料の多成分解析結果については、0.038μm + 2.02μm の試料も解析可能であったが、2.02μm の粒子が1.6μm、標準偏差0.3433と小さく測定された。これは、コンピューターの解析ソフトにおいて、临床上、固視微動や反射等による解析不能例を防止する目的で、crrelator 内の最後の8チャンネル成分を base line として採用しているの、後半の8チャンネルを base line の直流成分として差し引いている。このため小さく計算されたと考えられる。また、最も小さい0.038μm の成分が逆に大きく計測されている。これは小さい粒子と大きい粒子の差が大きい場合多成分解析では測定された時間相関関数曲線に、最小2乗法を用いて、fit させ各粒子径を算出するため、誤差の2乗和を最小にする方向に計算され、小さい粒子が、若干

大きく、計算されたためと考えられた。また、base lineに計算上のbase lineを用いた場合には、この誤差は小さくなった。この混合試料を細隙灯顕微鏡で観察した場合、ラテックス粒子の反射が非常に大きく白濁した様な状態であった。生体内の水晶体では、この様な大きな反射はみられない。従って実際には、sample time 20 $\mu$ secで1回計測できる粒子径の上限は2 $\mu$ m程度と考えられた。

次に、140眼の水晶体核の多成分解析結果を見ると、small particleは0.0207 $\mu$ m, middle particle 0.5832 $\mu$ m, large particle 1.6991 $\mu$ mであった。山本ら<sup>13)</sup>のX線小角散乱法によるヒト水晶体の報告によると $\alpha$ -crystallin fractionの半径は40~70 Å High Molecular Weight Protein<sup>14)</sup> (HMW) fraction半径は250~500 Åで、直径に換算すると、各々0.008~0.014 $\mu$ m, 0.05~0.1 $\mu$ mである。今回我々が測定したsmall particleは $\alpha$ -crystallinに相当すると考えられ、山本らの報告したHMWの粒子は測定できなかった。測定値はsmall particleでは若干大きく測定されているが、これは、in vivo, in vitroという測定条件及び測定方法の違いによるものであらうと考えられる。また、水晶体核における散乱強度比は加齢とともに指数関数的に増加した。散乱強度と年齢との関係を見るとsmall particle散乱強度は加齢とともに減少しlarge particle散乱強度は増加している。このことは、small particleは加齢と共に相対的に減少している事を示している。HMWや加齢と共に増加してくる不溶性蛋白質のアルブミノイドの主要構成要素は $\alpha$ -cystallinと言われている<sup>15)</sup>。故にsmall particle= $\alpha$ -crystallinとすると、small particleは加齢と共に減少してくるのではないかと推測された。

若年性糖尿病患者と正常者の水晶体において、その各々の散乱強度比を比較すると核及び後皮質において若年性糖尿病患者の方が大きい結果を得た。このことは若年性糖尿病患者では核及び後皮質において蛋白質に何らかの異常が起きていることが推測される。皮質型老人性白内障の生化学的特性の1つとしてNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratioが逆転することは、Duncan<sup>16)</sup>、岩田<sup>17)</sup>、錦織らによって報告され、このNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratioは水晶体の代謝の異常性を示すparameterであると考えられている。錦織ら<sup>18)19)</sup>は水晶体内部のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratioを測定し、前囊下より後囊下の方が大きいことを報告している。また、藤原ら<sup>20)</sup>は硝子体中のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>、glucose、ATPを測定すると水晶体後囊下のglucose及びATPは他

の硝子体の何れのブロックより高い値を示した事より、後囊では、これらのエネルギーを利用した活動を殆ど行っていないのではないかと云っている。以上の事より、後囊下、核の蛋白質は環境変化に対し容易に変性をひきおこすのではないかと考えられる。このことより若年性糖尿病患者では、後皮質、核において、より早く蛋白質の変性がひきおこされ正常者に比べ散乱強度比が大きくなってくるとのではないかと考えた。

## V 要 約

1. 既知の polystyrene latex 粒子混合試料にて多成分解析を試みた。測定時間2sec. sample time 20 $\mu$ sec. の条件では、上限2 $\mu$ mまでの粒子径測定が可能であった。

2. 透明水晶体核蛋白質粒子は、平均0.021 $\mu$ m, 0.583 $\mu$ m, 1.699 $\mu$ mの3成分に分けられた。

3. 透明水晶体核で、Small particleとそれより大きいparticleの散乱強度の比(散乱強度比)をとり加齢との関係を見ると、加齢に伴い指数関数的に増加した。また60歳以上で、急激に増加する傾向が認められた。

4. 混濁のない若年性糖尿病患者と正常者の水晶体を比較した所、散乱強度比は核及び後皮質で若年性糖尿病患者の方が有意に大きかった。

本装置で計測された水晶体蛋白質粒子は2 $\mu$ m以下で十分な精度で測定可能であると考えられた。またレーザー散乱分光分析法は水晶体に混濁を認めない段階でin vivoにて蛋白質粒子変化をとらえることが可能で有用な検査法であると考えられた。

## 文 献

- 1) Tanaka T, Benedek GB: Observation of protein diffusivity in intact human and bovine lenses with application to cataract. Invest Ophthalmol 14: 449-456, 1975.
- 2) 中谷 一, 佐藤秀明, 鈴木範人: 水晶体のレーザー散乱分光. 日本眼科学学会誌 1: 47-51, 1980.
- 3) 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質粒子の直径計測. 臨眼 36: 709-712, 1982.
- 4) 馬嶋慶直: 白内障に関する諸問題2. 最近における白内障手術の考察について. 日眼 86: 1893-1918, 1982.
- 5) 中谷 一, 吉村武晃, 佐藤秀明, 鈴木範人: 水晶体レーザー散乱分光の臨床への応用. 医用電子と生体工学 20(特別号): 92, 1982.
- 6) 湯浅英治: 水晶体硬度の物理学的アプローチ. 眼紀 34: 1849-1854, 1983.

- 7) 湯浅英治：シンポジウム：白内障の分類と診断基準，水晶体硬度の物理学的アプローチ，日本の眼科 55：11—17, 1983.
- 8) 湯浅英治：水晶体硬度測定の試み，超音波とレーザーによるアプローチ，臨眼 37：1289—1300, 1983.
- 9) 中谷 一，吉村武晃，鈴木範人：水晶体レーザー散乱分光の臨床への応用，(第2報)医用電子と生体工学 21(特別号)：297, 1983.
- 10) 湯浅英治，馬嶋慶直：ヒト正常水晶体核蛋白質の直径計測，p. 87—90，糸井素一編，眼科MEの原状と未来，金芳堂，1984.
- 11) 中谷 一，吉村武晃，東 昭人，鈴木範人：光散乱分光法による水晶体のインビボ測定，医用電子と生体工学 23：564, 1985.
- 12) 中谷 一，吉村武晃，山田雅之，鈴木範人：水晶体のレーザー散乱分極(第6報)，日本眼科学会誌 7：52—56, 1986.
- 13) 山本覚次，綿織敏治，栗本良子，花房直路：老人性白内障水晶体蛋白凝集について—X線小角散乱法を用いた解析—，眼紀 35：1789—1794, 1984.
- 14) **Dische Z, Borenfreund E, Zelmenis G** : Changes in lens proteins of rats during aging. *A M A Arch Ophthalmol* 55: 471—483, 1956.
- 15) 才野恂子：水晶体蛋白の不溶化の機構に関する研究，第1報，アルブミノイドの尿素開裂について，眼紀 26：152—162, 1975.
- 16) **Duncan G, Bushell AR** : Ion analyses of human cataractous lenses. *Exp Eye Res* 20: 223—230, 1975.
- 17) 岩田修造，竹鼻 真，中村正雄：ヒト白内障水晶体の生化学的研究，第1報，水晶体混濁状態におけるヒトと動物との陽イオン変動の比較，眼紀 29：362—368, 1978.
- 18) 綿織敏治：老人性白内障の代謝異常について，第1報，老人性白内障水晶体のNaイオン，Kイオンおよび含有について，眼紀 32：1240—1246, 1981.
- 19) 綿織敏治：老人性白内障の代謝異常について，第2報，老人性白内障水晶体のATPとNa，K，ATPase活性について，日眼 86：1373—1386, 1982.
- 20) 藤原久子，綿織敏治，津田和良：硝子体害低分子物質の分布について，眼紀 33：853—857, 1982.