

## 家兎房水総蛋白濃度とフォトンカウントの相関

小河 貴裕, 大原 國俊, 清水 昊幸

自治医科大学眼科学教室

## 要 約

レーザーフレアセルメーターによる前房フレアのフォトンカウントと前房蛋白濃度との相関を検討した。散瞳させた家兎眼で一定量の房水を採取し、フォトンカウントと縮瞳率を測定し、二次房水の総蛋白濃度とアルブミン/グロブリン(A/G)比を実測した。前房穿刺後の総蛋白濃度、フォトンカウント、縮瞳は房水採取量に依存して増加した。総蛋白濃度とA/G比、フォトンカウントとA/G比に相関は認めなかった。フォトンカウントと総蛋白濃度にはフォトンカウント500/msec以下で有意な相関( $r=0.92$ ,  $p<0.001$ )があり、 $X=Y^{1.07} \times 3.33$  (X:蛋白濃度, mg/dl, Y:フォトンカウント, /msec)の一次回帰式を得た。同一のフォトンカウントに対応する総蛋白濃度には2~3倍の差があり、A/G比の変動によると考えられた。ヒト生体眼において上記の回帰式によりフォトンカウントを総蛋白濃度に換算できるが、換算蛋白濃度の約1/2から3/2倍以内の推定誤差を考慮する必要がある。(日眼会誌 94:1001-1006, 1990)

キーワード: 家兎, 前房穿刺, 房水総蛋白濃度, レーザーフレアセルメーター, フォトンカウント

Correlation Between Total Aqueous Protein Concentrations  
and Photon Counts in Rabbits

Takahiro Ogawa, Kunitoshi Ohara and Hiroyuki Shimizu

Department of Ophthalmology, Jichi Medical School

## Abstract

We studied the correlation between photon counts of the aqueous flare and total aqueous protein concentrations in rabbit eyes. After mydriasis, a predetermined volume of the aqueous humor was aspirated and photon counts of the secondary aqueous was measured using a laser flare-cell meter. In vitro measurements of total protein concentrations showed that step-wise changes in withdrawal volume ranging from 50 to 200  $\mu$ l induced corresponding rises of the total protein concentrations in the secondary aqueous, with the mean total protein concentrations ranging from 220 to 1980mg/dl. A ratio of albumin to globulin concentrations (A/G) ranged from 1.0 to 3.6, but they did not show any significant correlation with the aqueous total protein concentrations. The mean photon counts in the secondary aqueous ranged from 40 to 343/msec. A statistical analysis showed that photon counts correlated well with the total protein concentrations. The linear regression equation was  $X=Y^{1.07} \times 3.33$  where X and Y indicate protein concentrations and photon counts, respectively ( $r=0.92$ ,  $p<0.001$ ). The regression equation might be used to estimate the total aqueous protein concentrations in laser flare-cell measurements in vivo. The variation of A/G ratio affected the photon count values, and the total protein concentration might be within 3/2 and 1/2 of the estimated value. (Acta Soc

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 小河 貴裕  
(平成2年1月14日受付, 平成2年2月28日改訂受理)

Reprint requests to: Takahiro Ogawa, M.D. Department of Ophthalmology, Jichi Medical School  
3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04, Japan

(Received January 14, 1990 and accepted in revised form February 28, 1990)

Ophthalmol Jpn 94: 1001-1006, 1990)

**Key words:** Rabbit, Paracentesis, Total protein concentration, Laser flare-cell meter, Photon counts

## I 緒 言

前房フレア強度の測定から前房蛋白濃度を推定することを目的にレーザーフレアセルメーター（以下LFCM）が開発され<sup>1)</sup>、その有用性が報告されている<sup>2)~11)</sup>。LFCMではフレア強度をレーザー光の散乱量としてフォトンカウント単位で測定するが、フォトンカウントは牛アルブミン濃度換算の前房蛋白濃度として表わされることが多い<sup>2)~11)</sup>。

正常前房水中の蛋白組成はアルブミンであるが、ぶどう膜炎などの房水蛋白上昇時にはアルブミン以外にグロブリンやその他の高分子蛋白が出現し、各蛋白の構成比は炎症強度によって変動する<sup>12)~17)</sup>。In vitro 実験においてはグロブリン溶液のフォトンカウントはアルブミン溶液の約3倍の値を示し、アルブミンとグロブリンの混合溶液のフォトンカウントは各単独溶液の検量線の間でアルブミン/グロブリン比に応じた値をとる<sup>18)</sup>。これらのことより、牛アルブミン換算蛋白濃度は各種蛋白の混合溶液である実際の前房総蛋白濃度とは必ずしも一致しないと考えられ、フォトンカウントから前房蛋白濃度を推定するためには、前房総蛋白濃度とフォトンカウントとの相関を調べる必要がある。

我々は家兎を用いた in vivo 実験で一次房水採取量をコントロールして段階的な房水蛋白上昇をおこす方法を考案し、フォトンカウントと前房総蛋白濃度の相関とフォトンカウントから前房総蛋白濃度に換算する式を求めたので報告する。

## II 対象と方法

### 1. 実験動物

体重約2kgの雄性 Dutch rabbit 23匹（清水実験材料）を室温 $24 \pm 4^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の環境下で1週間の馴化を行い、眼に異常のないことを確認して使用した。飼料は固形飼料を1日80g与え、水は水道水を自由に摂取させた。

### 2. 試験方法

#### 1) 前房穿刺

フィブリン形成防止のためヘパリン1,000U/ml/kg

を家兎の耳静脈内に注射し、同時に散瞳剤ミドリンP®（参天製薬）を50 $\mu\text{l}$ 点眼した。その30分後に塩酸オキシプロカイン（アネロカル点眼液®, 千寿製薬）10 $\mu\text{l}$ 点眼後、30G針付きシリンジで経角膜的に房水が漏れないように50, 100, 125, 150, 175あるいは200 $\mu\text{l}$ を正確に採取した。房水採取は穿刺後90分に再度行い、二次房水の全量を採取した。

#### 2) 測定項目と方法

##### a. 前房内フレア

一次房水穿刺前、穿刺5分後および90分後の二次房水採取直前にLFCM(FC-1000, 興和)で前房フレアをフォトンカウントとして測定した。各時点の測定は5回行い、その平均値をデータとした。

##### b. 蛋白濃度とA/G比

採取した二次房水の総蛋白濃度はビュレット法<sup>19)</sup>で、アルブミン濃度はBCG法<sup>20)</sup>で測定し、グロブリン濃度は総蛋白濃度からアルブミン濃度を差し引くことにより求めた。アルブミンとグロブリン比（以下A/G比）は、アルブミンとグロブリン濃度より算出した。

##### c. 瞳孔径

一次房水穿刺前、穿刺5分後に電子デジタルノギス(MAX-15, 日本測定工具)により水平方向の瞳孔径を瞳孔に影を作らないように測定した。家兎の最小瞳孔径を2mmと仮定し、穿刺前の瞳孔径を $D_0$ 、穿刺後を $D$ 、最小径を $D_{\min}$ とし、縮瞳率を

$$\% \text{response} = (D_0 - D) / (D_0 - D_{\min}) \times 100$$

として求めた<sup>21)</sup>。

各データの有意差検定はStudent's t-testにより行った。

## III 結 果

### 1. 前房フレア

一次房水穿刺前、穿刺5分後および90分後の前房フレアのフォトンカウントを図1に示した。穿刺前のフォトンカウント(/msec, mean $\pm$ S.E.)はいずれの採取量においてもほぼ同様で平均 $13 \pm 1$ であった。穿刺5分後のフォトンカウント(/msec, mean $\pm$ S.E.)は採取量50 $\mu\text{l}$ では $16 \pm 4$ で穿刺前と変わらず、100 $\mu\text{l}$ では $118 \pm 70$ の値を示し、それ以上では採取量に依存し



て高くなり、125 $\mu$ lでは $190 \pm 62$ , 150 $\mu$ lでは $273 \pm 64$ , 175 $\mu$ lでは $257 \pm 102$ , 200 $\mu$ lでは $308 \pm 84$ であった。穿刺90分後では5分後に比較していずれの採取量においてもやや増加したにすぎず、採取量50 $\mu$ lでは $40 \pm 18$ , 100 $\mu$ lでは $142 \pm 55$ , 125 $\mu$ lでは $207 \pm 37$ , 150 $\mu$ lでは $305 \pm 20$ , 175 $\mu$ lでは $353 \pm 37$ , 200 $\mu$ lでは $343 \pm 39$ となり、採取量175 $\mu$ lまでは段階的に上昇したが175 $\mu$ lから200 $\mu$ lの採取量ではほぼ同様の値を示した。

## 2. 房水蛋白濃度

一次房水穿刺90分後の二次房水の総蛋白、アルブミン、グロブリン濃度の実測値およびA/G比を図2に示した。穿刺前の総蛋白濃度(mg/dl, mean $\pm$ S.E.)はいずれの採取量においてもほぼ同様で平均 $90 \pm 7$ であった。穿刺90分後の総蛋白濃度(mg/dl, mean $\pm$ S.E.)は、採取量50 $\mu$ lでは $220 \pm 100$ と正常値の2倍強にすぎなかったが、100 $\mu$ lでは $820 \pm 350$ と有意な増加が

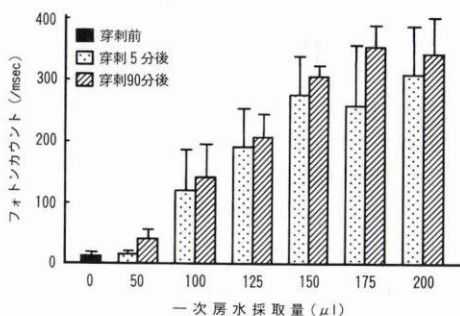


図1 房水採取量と穿刺5分後および90分後の前房フレイア・フォトンカウントの相関。各測定値は平均 $\pm$ 標準誤差(n=6-9)を示す。

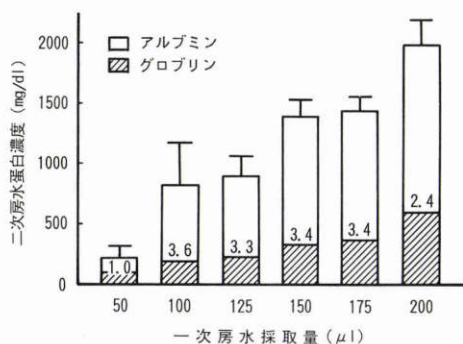


図2 房水採取量と穿刺90分後の二次房水中の総蛋白濃度、アルブミン濃度、グロブリン濃度およびアルブミン/グロブリン(A/G)比の相関。カラム内の数字はA/G比を示す。各測定値は平均 $\pm$ 標準誤差(n=6-9)を示す。

認められ、それ以上では採取量に依存して蛋白濃度は増加し、125 $\mu$ lでは $910 \pm 160$ , 150 $\mu$ lでは $1,390 \pm 140$ , 175 $\mu$ lでは $1,440 \pm 130$ となり、最大採取量の200 $\mu$ lでは $1,980 \pm 220$ であった。アルブミン、グロブリン濃度は採取量に依存して増加し、A/G比(mean $\pm$ S.E.)は採取量50 $\mu$ lで $1.0 \pm 0.3$ であったが、100 $\mu$ l以上では有意に高くなり、100 $\mu$ lでは $3.6 \pm 0.8$ , 125 $\mu$ lでは $3.3 \pm 0.5$ , 150 $\mu$ lでは $3.4 \pm 0.4$ , 175 $\mu$ lでは $3.4 \pm 0.6$ と100 $\mu$ lから175 $\mu$ lまではほぼ同じ値をとり、200 $\mu$ lでは $2.4 \pm 0.3$ とやや低下する傾向を示したが、100 $\mu$ lから175 $\mu$ lまでのそれぞれの値との間に有意差はなかった。

## 3. 縮瞳率

一次房水穿刺5分後の縮瞳率を図3に示した。穿刺前の瞳孔径(mm, mean $\pm$ S.E.)はいずれの採取量においてもほぼ同じで平均 $10.0 \pm 0.1$ であった。穿刺5分後の縮瞳率(% , mean $\pm$ S.E.)は採取量50 $\mu$ lでは $5.0 \pm 2.0$ とわずかであったが、100 $\mu$ lでは $14.5 \pm 3.5$ の値を示し、それ以上では採取量に依存して高くなる傾向を示し、125 $\mu$ lでは $17.4 \pm 2.7$ , 150 $\mu$ lでは $18.8 \pm 2.0$ , 175

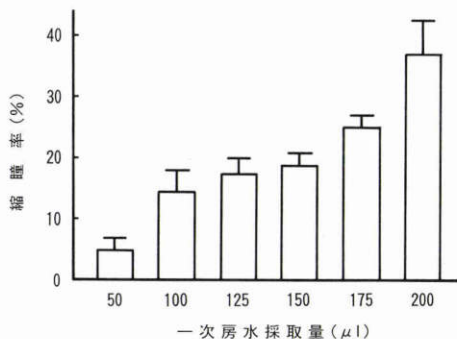


図3 房水採取量と穿刺5分後の縮瞳率の相関。各測定値は平均 $\pm$ 標準誤差(n=6-9)を示す。

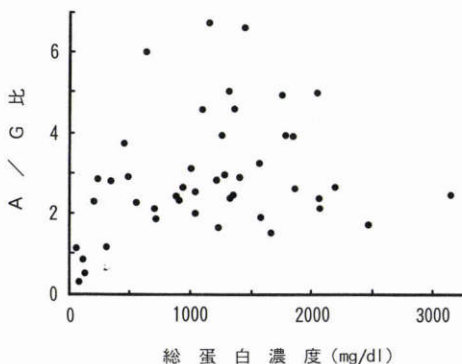


図4 総蛋白濃度とA/G比の相関性。

$\mu\text{l}$  では  $24.6 \pm 2.3$ ,  $200\mu\text{l}$  では  $37.0 \pm 5.6$  であった。

#### 4. 総蛋白濃度, A/G 比, フォトンカウントの相関性

総蛋白濃度と A/G 比の間に一次直線の相関はなく, 二次曲線でも相関は認められなかった(図4). フォトンカウントと A/G 比の間にも相関は認められなかった(図5). フォトンカウントと実測した総蛋白濃度の間には, 一次直線で有意な相関が認められ ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.92$ ), 回帰直線は  $X = Y^{1.07} \times 3.33$  ( $X$ : 蛋白濃度,  $\text{mg/dl}$ , フォトンカウント,  $/\text{msec}$ ) であった(図6). しかしながら, 総蛋白濃度の分布は回帰直線の周囲でかなり広く, 同一のフォトンカウントに対応する蛋白濃度には, 2 から 3 倍程度の差を認めた。

#### 5. 房水採取量と総蛋白濃度, フォトンカウント, 縮瞳率の相関

一次房水採取量と前房穿刺90分後の総蛋白濃度,

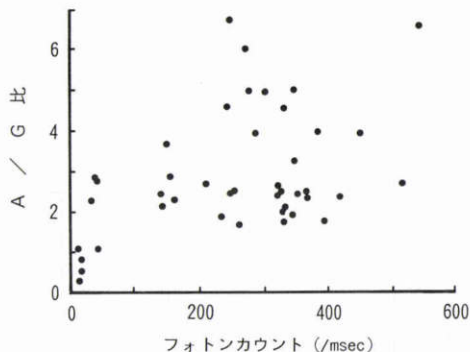


図5 フォトンカウントと A/G 比の相関性.

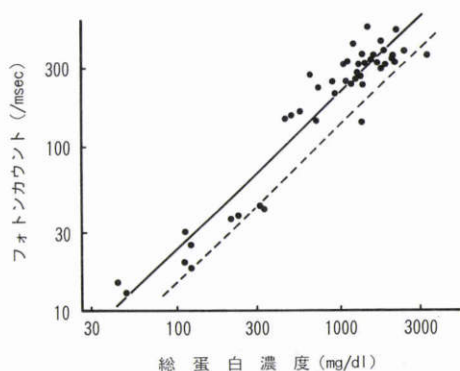


図6 フォトンカウントと総蛋白濃度の相関. 実線は一次回帰直線 ( $X = Y^{1.07} \times 3.33$ ,  $X$  は総蛋白濃度,  $Y$  はフォトンカウント,  $r = 0.92$ ), 破線は牛アルブミン (BSA) 溶液から求めた一次回帰直線 ( $X = Y^{1.05} \times 5.87$ ,  $X$  は蛋白濃度,  $Y$  はフォトンカウント,  $r = 0.99$ ) を示す。

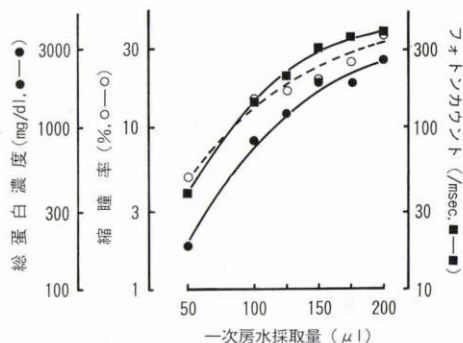


図7 房水採取量とフォトンカウント, 総蛋白濃度および縮瞳率の相関

フォトンカウントおよび穿刺5分後の縮瞳率の相関を図7に示した。各パラメーターの反応は採取量  $100\mu\text{l}$  より強くなり, 蛋白濃度, フォトンカウント, 縮瞳率とも房水採取量に依存してほぼ平行に増加した。

## IV 考 按

前房総蛋白濃度と LFCM のフォトンカウントとの相関を検討するためには, 実験動物の前房蛋白濃度のレンジを任意に設定できる実験系が必要となる。著者らは, 一次房水の採取量を変えて二次房水蛋白濃度を变化させる方法を試みた。

穿刺90分後の房水蛋白濃度は,  $50\mu\text{l}$  から  $200\mu\text{l}$  まで房水採取量に依存して  $220$  から  $1,980\text{mg/dl}$  まで増加し, 二次房水蛋白濃度のコントロールが可能であった。前房穿刺後の蛋白上昇は穿刺後15分でほぼ最大になると報告されているが<sup>22)</sup>, 今回の結果においても, 房水採取量  $50\mu\text{l}$  での値を除いて, 前房穿刺5分後のフォトンカウント値は90分後の値とほぼ同様の値を示し, 前房穿刺後の蛋白上昇が早い反応であることが示された。また, 一次房水穿刺5分後の縮瞳率も採取量に依存して強くなったことから, 房水採取量を変えることにより前房穿刺後に生じる炎症反応をコントロールできる可能性が示された。

総蛋白濃度と A/G 比の相関は一次直線, 二次曲線でも負の相関は認められなかった。血液房水柵の破壊が大きければグロブリンなどの高分子蛋白が漏出しやすくなり, A/G 比は低下すると考えられ, 前房穿刺後に A/G 比が低下すると報告するものが多い。房水採取時の吸引速度を変えて房水を採取した家兎においては, 吸引速度が早くなるに従って, 二次房水蛋白濃度は高くなり,  $3,000 \sim 4,000\text{mg/dl}$  の範囲で A/G 比は



血清以下になったとされ<sup>23)</sup>、ラットにおいても、一次房水穿刺後のA/G比は一次房水の7.2から3.6に有意に低下したと報告されている<sup>24)</sup>。ヒトにおいては、房水蛋白の組成は総蛋白濃度が約1,000から1,200mg/dlを越えると血漿蛋白に類似し、それ以下で130mg/dlまでの間でもアルブミン以外の各種の高分子蛋白が存在し<sup>12)</sup>、また1,000mg/dl以上では血液房水柵は完全に破壊されていると報告されている<sup>13)</sup>。今回の実験において房水採取量や総蛋白濃度とA/G比に相関を認めなかった理由は、二次房水の蛋白濃度が他の報告に比べて低いことより、血液房水柵破壊が弱く高分子蛋白の漏出が少なかったためと考えられた。散瞳作用に抗炎症作用があることから、今回の実験に用いた散瞳剤がグロブリン漏出を伴う血液房水柵破壊を抑制した可能性がある。

フォトンカウントと実測房水蛋白濃度には高い相関があり、LFCMのフォトンカウントが生体眼内の房水総蛋白濃度とよく相関することが明らかとなった。得られた回帰直線は、フォトンカウントを蛋白濃度に換算するために用いられている牛アルブミン溶液単独の回帰直線 $X=Y^{1.05} \times 5.87^{18)}$ と比べ、傾きはほぼ同じで低濃度側に約1/1.7倍平行移動したのとなり、実測A/G比が2.5から3.6であったことに一致して、in vitro実験より推定されるA/G比4.0の回帰直線に近似した。

図6に示したごとく、同一のフォトンカウントに対応する実測蛋白濃度は約3倍以内の範囲に分布した。同一蛋白濃度においてもA/G比が変わるとフォトンカウントは3倍以内で変動することが分かっている<sup>18)</sup>、同一フォトンカウントに対して蛋白濃度の分布がばらつく原因は、生体眼内で各蛋白濃度ごとにA/G比が異なっていたためと考えられる。

前房フレアのフォトンカウント値から多種蛋白を含む前房蛋白濃度を換算するためには、 $X=Y^{1.07} \times 3.33$ (X:蛋白濃度, mg/dl, Y:フォトンカウント, /msec)の回帰式を用いればよい。実際の総蛋白濃度は換算蛋白濃度の約1/2から3/2倍以内に分布する。アルブミン濃度換算は単独蛋白溶液でのみ成立し、またフォトンカウントが300/msec以上では成立しないのに対し、今回の換算式にはA/Gの変動を含んだ房水総蛋白濃度を推定するのに適し、成立条件はフォトンカウントで約500/msecまでと広い。換算式の成立条件は、A/G比の変動や他種蛋白の存在、蛋白濃度、測定誤差やフォトンカウントのレンジなどに影響され

る。内因性ぶどう膜炎では約500/msec以上のフォトンカウント値を示す症例がある<sup>5)6)</sup>、単独蛋白溶液においても5,500mg/dl以上の蛋白濃度でフォトンカウントが回帰直線をはずれるため<sup>18)</sup>、今回の換算式を用いるには問題が残る。今後、前房総蛋白濃度の高い炎症眼でのフォトンカウントと蛋白濃度の相関性を明らかにし、より妥当な換算式の可能性を検討する必要がある。

本論文の要旨は第9回日本眼薬理学会で発表した。

#### 文 献

- 1) Sawa M, Tsurimaki Y, Tsuru T, et al: New quantitative method to determine protein concentration and cell number in aqueous in vivo. Jpn J Ophthalmol 32: 132—142, 1988.
- 2) Oshika T, Araie M, Masuda K: Diurnal variation of aqueous flare in normal human eyes measured with laser flare-cell meter. Jpn J Ophthalmol 32: 143—150, 1988.
- 3) 釣巻 稔, 澤 充, 清水晃幸: 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。—フィブリン反応症との関係—, 日眼会誌 92: 1690—1695, 1988.
- 4) 澤 充, 釣巻 稔, 水流忠彦, 他: 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の臨床的検討。臨眼 42: 665—668, 1988.
- 5) Ohara K, Okubo A, Miyazawa A, et al: Aqueous flare and cell meter in iridocyclitis. Am J Ophthalmol 106: 487—488, 1988.
- 6) Ohara K, Okubo A, Miyazawa A, et al: Aqueous flare and cell measurement using laser in endogenous uveitis patients. Jpn J Ophthalmol 33: 265—270, 1989.
- 7) 釣巻 稔, 澤 充, 清水晃幸: インドメタシンの術後前房蛋白濃度と細胞数への影響。臨眼 43: 183—186, 1989.
- 8) 小河貴裕, 釣巻 稔, 大原國俊, 他: 術後炎症に対する水性眼液 Pranoprofen の抗炎症効果。—レーザー前房蛋白・細胞測定装置による検討—。眼紀 40: 1319—1323, 1989.
- 9) Oshika T, Nishi M, Mochizuki M, et al: Quantitative assessment of aqueous flare and cells in uveitis. Jpn J Ophthalmol 33: 279—287, 1989.
- 10) 大鹿哲郎, 加藤 聡, 林 清文, 他: 正常人眼の前房フレア強度—年齢との相関—, 日眼会誌 93: 358—362, 1989.
- 11) 加藤 聡, 大鹿哲郎, 船津英陽, 他: 糖尿病病期と前房蛋白濃度, 1. 網膜症病期との相関。臨眼 43: 1005—1008, 1989.
- 12) Krause U, Raunio V: The proteins of the

- pathologic human aqueous humour. An in vivo investigation. *Ophthalmologica* 160: 280—287, 1970.
- 13) **Dernouchamps JP, Michiels J**: Molecular sieve properties of the blood-aqueous barrier in uveitis. *Exp Eye Res* 25: 25—31, 1977.
- 14) **Grabner G, Zehetbauer G, Bettleheim H, et al**: Immediate changes in protein-concentration in aqueous humor induced by intracapsular lens extraction in human eyes, Albrecht v Graefes. *Arch Klin Exp Ophthal* 210: 275—289, 1979.
- 15) **Dias PLR**: Postinflammatory and malignant protein patterns in aqueous humour. *Br J Ophthalmol* 63: 161—164, 1979.
- 16) **Zirm M**: Protein in aqueous humor. *Adv Ophthalmol* 40: 100—172, 1980.
- 17) **Dernouchamps JP**: The proteins of the aqueous humor. *Doc Ophthalmol* 53: 193—243, 1982.
- 18) **Ogawa T, Ohara K, Shimizu H**: Photon count and protein concentration in flare-cell meter. (未発表).
- 19) **Gornall AG, Bardawill CJ, David MM**: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751—766, 1949.
- 20) **Doumas BT, Watson WA, Biggs HG**: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. *Clin Chim Acta* 31: 87—96, 1971.
- 21) 小河貴裕, 大原國俊, 大平光彦: 併用散瞳剤の pranoprofen 眼内薬物動態と抗炎症作用への影響. *日眼会誌* 92: 1510—1519, 1988.
- 22) **Neufeld AH, Sears ML**: The site of prostaglandin  $E_2$  on the disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit eye. *Exp Eye Res* 17: 445—448, 1973.
- 23) **Neupert JR, Lawrence C**: Protein release during aqueous withdrawal in rabbits. *Invest Ophthalmol* 9: 865—874, 1970.
- 24) **Stjernschantz J, Uusitalo R, Palkama A**: The aqueous proteins of rat in normal eye and after aqueous withdrawal. *Exp Eye Res* 16: 215—221, 1973.
-