

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791699

研究課題名（和文）動的光散乱法による非侵襲的前房内組成定量装置の開発

研究課題名（英文）Non-invasive measurement of aqueous humor components by dynamic light scattering technique

研究代表者

忍田 太紀（OSHIDA TAIKI）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00459885

研究成果の概要（和文）：前房内に含まれる種々のタンパク質や生体分子の組成に関する情報を、非接触・非侵襲で得るための装置を作製した。光散乱法を用いたヒアルロン酸ナトリウム製剤中の微量エンドトキシンの添加・回収試験では、測定に必要なヒアルロン酸ナトリウム製剤の最低希釈倍率はPBS（0.01M, pH 7.4）での40倍で、ヒト血清アルブミンの添加はエンドトキシンの回収率を向上させ、その測定プロトコルを確立した。

研究成果の概要（英文）：We developed a new instrument for non-invasive measurement of aqueous humor components by dynamic light scattering technique. We investigated an optimal additive to determine endotoxin concentration in the viscoelastic substances with minimal dilution factor. In the light scattering method, a 40-fold dilution with PBS（0.01M, pH 7.4）enables a determination of the endotoxin concentration in viscoelastic substances. In this condition, adding HSA can provide better recovery rates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、眼科学

キーワード：外科系臨床医学・眼科学・眼医工学・動的光散乱法・前房内組成

1. 研究開始当初の背景

（1）次世代レーザーフレアセルメーターの

開発

前房内のタンパク質は血液房水関門によって規定され恒常性を維持しているが、ぶどう膜炎や内眼手術後などの血液房水関門が破綻、あるいは機能不全をきたした状態では、アルブミンだけではなく、より分子量の大きいグロブリンが滲出する。前眼部炎症の定量的測定装置であるレーザーフレアセルメーターは、前房内のタンパク質濃度をその散乱光強度を測定することによって炎症の「程度」を測定しているが、測定対象であるフレアの実体は、前房内を浮遊するタンパク質からの散乱光強度であり、その種類についての情報は抽出できない。前房内のアルブミン/グロブリン比 (A/G 比) が測定可能になれば、炎症の「程度」だけではなく「質」を定量化することができる。これまで *in vitro* では、A/G 比を測定することができたが、*in vivo* では、光量、測定時間の不足によって、十分な S/N 比 (信号と雑音の比) が得られなかった。これは、光計測技術レベル、すなわち検出器の感度不足と自己相関解析に要する演算速度の不足が主たる原因であった。現在では、光電子増倍管の高感度化に加え、APD フォトンカウンティング・モジュール等の高感度光検出器が出現している。また、DSP (digital signal processor) や FPGA (field programmable gate array) を利用した信号処理回路の高速化が進み、自己相関解析を応用した測定法の実現化が期待できる。そこで、現在の光計測技術レベルで、動的散乱法を応用した、前房内 A/G 比の非接触・非侵襲測定法を開発する。

(2) ぶどう膜炎の新しい病態評価の必要性

ぶどう膜炎は、現在も失明につながる重要な疾患で、その病態評価は重要である。ぶどう膜炎は、3 大ぶどう膜炎として知られるサルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病、ベーチェット病をはじめ、VZV、HSV、サイトメガロウイルスによるぶどう膜炎、桐沢型ぶどう膜炎 (急性網膜壊死) などの原因が特定されるものの、約半数は原因不明で、その新しい

病態評価法の確立が望まれている。

(3) 術後眼内炎症の新しい病態評価の必要性

レーザーフレアセルメーターは、白内障をはじめとした内眼手術後の眼内炎症の定量、経過観察にも有用である。近年、米国を中心に眼灌流液や粘弾性物質のエンドトキシン汚染による白内障術後炎症である TASS (toxic anterior segment syndrome) が問題となっており、米国食品医薬品局 (FDA) では、ヒアルロン酸内エンドトキシン基準値の見直しを提起した。そこで、国際標準化機構 (ISO) における眼内レンズ・粘弾性物質に関するワーキンググループでは、ヒアルロン酸内の残留エンドトキシンによる生物学的効果の評価を再検討することとなった。我々はこれまでに FDA からの依頼を受け、エンドトキシンを家兎の前房内に注入し、前眼部炎症度をレーザーフレアセルメーターで定量的に検討し、臨床的反応を生じる最小エンドトキシン濃度を求め報告した。この結果をもとにして、本研究で行う前房内組成の研究成果は、TASS をはじめとする術後炎症のさらなる詳細な病態を検討可能とし、臨床における術後炎症の抑制ならびに手術成績の向上につながることを期待される。

2. 研究の目的

研究の全体構想は、重篤な眼疾患であるぶどう膜炎や術後炎症の病態をより詳細に把握し、最適な診断法・治療法を確立するために、人眼の前房内に含まれるタンパク質や種々の生体分子の組成に関する情報を、非接触・非侵襲で得ることである。

今回の研究では、全体構想の基礎となる、新しい光測定技術を応用した前房内アルブミンとグロブリンの比 (A/G 比) を計測する技術を開発し、前房内 A/G 比を非接触・非侵襲で測定可能な装置を開発する。その後、家兎を用いたぶどう膜炎モデルを使用し、前房内 A/G 比を測定、検証し、本装置の有効性・安全性を検証する。

3. 研究の方法

(1) レーザーフレアセルメーターを改良し、前房内のアルブミンとグロブリンの比 (A/G 比) を非接触・非侵襲で測定することのできる方法および装置を開発する。開発した装置を用いて動物実験を行い、その有効性・安全性を検証し、臨床応用 (前房内 A/G 比を活用した眼内炎症・疾患の新しい診断方法の創成) にむけた基礎データを収集する。

(2) 動物実験で使用する前房内炎症惹起物質である、エンドトキシン溶液およびエンドトキシンを溶解させたヒアルロン酸ナトリウム溶液のエンドトキシン定量実験を行った。測定には比色法、比濁法および光散乱法を用いて、ヒアルロン酸ナトリウムに含有される微量エンドトキシンの添加・回収実験を行い、この測定系における至適条件の検索を行い、測定プロトコルを確立する。

4. 研究成果

(1) 研究の全体構想である、重篤な眼疾患であるぶどう膜炎や術後炎症の病態をより詳細に把握し、最適な診断法・治療法を確立するために、人眼の前房内に含まれるタンパク質や種々の生体分子の組成に関する情報を、非接触・非侵襲で得るための装置を既存のレーザーフレアメーター FM-500 をもとに作製した。実験機と既存のレーザーフレアメーター FM-500 のフレア測定性能の比較試験を、正常眼 20 例 23 眼 (平均年齢 57.3 ± 21.6 歳)、ぶどう膜炎症例 31 例 37 眼 (白内障術後 25 例 25 眼、ぶどう膜炎 6 例 12 眼) (平均年齢 63.7 ± 16.1 歳) を対象として行った。その結果、正常眼では FM-500: 9.2 ± 5.4 PC/ms、実験機: 9.3 ± 5.4 PC/ms、ぶどう膜炎症例では FM-500: 46.5 ± 93.1 PC/ms、実験機: 63.0 ± 149.0 PC/ms と両機の高い相同性 ($y = 1.01x + 0.45$ 、 $R^2 = 0.92$) および安全性を確認した (図 1)。

(2) 光散乱法を用いたヒアルロン酸ナトリウム製剤中のエンドトキシンの添加・回収試

験では、ヒアルロン酸ナトリウム製剤を PBS で 40 倍に希釈して測定することが最も有効で、ヒト血清アルブミンの添加はその回収率を向上させた。今回の結果は、現在 ISO (国際標準化機構) で行われている、眼科手術用ヒアルロン酸ナトリウム製剤中のエンドトキシン濃度の規制値強化の検討において、その新しい規制値の根拠やその測定方法、測定精度の向上に寄与する内容である。また、この成果は、本研究における実験機をもちいた動物実験を行う際、家兎のぶどう膜炎モデル作成時に、現在米国を中心に臨床上前問題となっている、エンドトキシンによる白内障術後炎症である TASS モデルの作製、およびその病態・治療の検討に応用可能である。

(3) 本研究が臨床対象とする感染性および非感染性ぶどう膜炎疾患、術後炎症疾患および非炎症性前眼部疾患の病態や臨床像を明らかにするために、市販の非接触・非侵襲前眼部観察装置である前眼部光干渉断層計 (AS-OCT) を用いた臨床例の観察、解析を行った。AS-OCT は角膜混濁例においても前房内の観察が可能であり、病態によってはセル、フレアの観察も可能であった。しかしその定量的な測定や、セル、フレアの組成判断は不可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Oshida T, Kamura Y, Sawa M: Demographic study of expulsive hemorrhages in 3 patients with infectious keratitis. *Cornea* 査読有 30: 784-786, 2011. DOI: 10.1007/s10384-011-0039-x
- ② Oshida T, Fushimi N, Sakimoto T, Sawa M: Acute hydrops in a host cornea after penetrating keratoplasty for keratoconus. *Japanese Journal of Ophthalmology* 査読有 55: 418-419, 2011.

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 忍田太紀: 角膜裂傷の処置 (教育セミナー)

- 一：眼外傷のプライマリケア). 第 35 回日本眼科手術学会総会、福岡、2013. 1. 26
- ② Oshida T, Sugiura Y, Asano T, Hirono T, Sawa M: Determination of endotoxin concentration in hyaluronic acid by the light scattering method. 2012 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA, 5.5-10, 2012
- ③ 忍田太紀、伏見典子、崎元 卓、澤 充：全層角膜移植後にホスト角膜に急性水腫を生じた円錐角膜の 1 例. 第 64 回日本臨床眼科学会、兵庫、2010. 11. 13
- ④ 忍田太紀、崎元 暢、能谷聡子、菅谷哲史、伏見典子、崎元 卓、澤 充：DALK 後残存実質に再発した Avellino 角膜ジストロフィ(ホモ変異)の前眼部 OCT 所見. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2011. 10. 9
- ⑤ 忍田太紀、浅野 貴春、廣野 泰亮、澤 充：比濁法および光散乱法によるヒアルロン酸製剤中エンドトキシン濃度の測定. 第 45 回日本眼炎症学会、京都、2011. 7. 8
- ⑥ 忍田太紀、中安弘毅、大西貴子、中島正巳、澤 充：角膜裂傷を伴う外傷性白内障の前眼部光干涉断層像. 第 26 回日本白内障屈折矯正手術学会総会、福岡、2011. 6. 17
- ⑦ 渡辺純子、忍田太紀、大澤 彰、中島基宏、立花敦子、嘉村由美：前眼部光干涉断層計で経過観察した真性小眼球症に伴う急性緑内障発の 1 例. 第 26 回日本白内障屈折矯正手術学会総会、福岡、2011. 6. 17
- ⑧ 忍田太紀、堀 眞輔、澤 充：涙液 PCR で全層角膜移植後ヘルペス性角膜内皮炎を考えた 1 例. 第 27 回角膜移植学会、東京、2011. 2. 19
- ⑨ Oshida T, Fushimi N, Sakimoto T, Sawa M: Clinical findings of acute hydrops in a patient with keratoconus by anterior segment optical coherence

tomography. The 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, Kyoto, Japan, 12.1-3, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

忍田 太紀 (OSHIDA TAIKI)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00459885

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：