II. レーザラマン分光法による眼組織の解析

キーワード

ラマン分光法, 水晶体, 角膜, 強膜, 視神経, 近赤外レーザ, スペクトル解析

水野 有 武

慈恵医科大学・医化学教室

1. はじめに

眼は視覚に関する感覚器である。それゆえ光を通し、屈折させ、調節して焦点を網膜に合わせるといった機能に適応した、特殊な組織構造を有する。すなわち、図1のように、最初に光が入る角膜、房水を通り最大の屈折力のある水晶体、ゲル状の硝子体は透明組織であり、そして網膜は光の受容器であり、大脳と同じ中枢神経の性質を有している。カメラと同じくよい光が入らないように、眼には暗箱となる組織がある。虹彩、ぶどう膜である。眼球はその名の通り球形でゴムまりのような構造で硬い膜が外壁をなす。前面の透明組織である角膜に続く、不透明白色をした強膜がある。それに暗箱のブドウ膜に乗るように眼底に張り付いている網膜と、そこから情報を大脳中枢に伝える神経線維の束である視神経などである。このように眼組織はその性質上、高度に分化した組織とそれを支えるのに特殊化した多様な組織から構成されており、ラマン分光法を生体に応用するとき、いろいろな角度からラマン分光法の有用性と不利な点を検討できる組織がそろっている。

前掲の尾崎の総説にもあるように⁽¹⁾、レーザラマン分光の測定法は近年のレーザの発達と検出法の発達により数多くの方法が開発されてきた。生態組織に応用する場合はそれらの測定特性を考えて適用する必要がある。従来の分散型の可視光励起のラマン分光法では生体組織の不透明性、加齢や病的変化で増える蛍光物質、レーザ光そのものによる生体物質の変化、変性などの不利な点が多々ある。生体組織で比較的ラマン測定しやすいのは、それ自身が透明で可視光をよく通し、蛋白質濃度が高い水晶体である。同じ透明組織でも角膜は、蛋白質濃度があまり高くなく1ミリメートル以下と薄いので測定しにくい。それに不透明である強膜や視神経は測定不可能に近い。測定しやすい水晶体でもヒトのそれは小児のものでもかなりの蛍光の妨害で測定は不可能に近い。まして病的な白内障水晶体では蛍光物質の蓄積が増加するため測定は不可能であった。

そこで、ラマンスペクトルをこれらの生体組織から測定するため、近赤外レーザ光を使い生体に多い蛍光の影響を除外し、さらにフーリエ変換することで短時間で高感度の測定ができる近赤外励起 (NIR)-フーリエ変換 (FT) ラマン分光法を応用すると測定は可能となった。

図1 眼球の水平断面図

そこで、今回は、従来からよく行われてきた水晶体の研究をまず取り上げる。次に、角膜、強膜、そして最後に視神経と順に生体の生のままのラマンスペクトル測定法と生体結合組織の構成成分である精製コラーゲンのラマンスペクトルを供覧する。

2. 水晶体のラマンスペクトル

水晶体は眼球の中、前方に位置し、文字どおりレンズとして見えるものの焦点を網膜に合わせて投影する役をしている。毛様体筋の力を借りて、水晶体の柔軟性をともに、自ら膨らんだり扁平になったりして調節を行う。

水晶体は基底膜をなすセロファンのように薄い水晶体囊により囲まれた、透明な無血管の器官である。有核の細胞は前囊下に一層に並ぶ上皮細胞のみで、前湾曲の周辺に位置する増殖帯で分裂した細胞は水晶体囊に添って後方へ移動していく。ちょうど赤道部を過ぎたところで分化をはじめ、水晶体繊維として前後方向へ伸展していく。そして、外から巻きつくように延びてきて、前後両方向から繊維が会合するところで、水晶体の縫合を生じる (図2)。伸展した水晶体繊維は、赤道部より少し入った水晶体湾曲部 (Lens Bow) で水晶体特有の細胞脱核を起こしてくる。そこで、水晶体中央部の細胞、すなわち水晶体繊維には細胞核がない。絶えず新生した水晶体繊維は周りから巻くようにして水晶体は大きくなっていく。一生の間絶えず新生しているので、水晶体はどんどん大きくなっていくわけである。人生80年の間大きくなるとすると、眼球いっぱいになってしまうであろう。しかし、そうはならない機構が存在する。水晶体の中心部では、脱水すなわち水晶体蛋白質を濃縮して硬い水晶体核を形成して、体積があまり増えないようにしている。老眼になるのはこの硬い水晶体核ができるため、水晶体の柔軟性による調節力が落ちるためで

図 2 水晶体の断面図

図 3 水晶体の局所的微細部位からのラマンスペクトル測定法

514.5 nm アルゴンレーザで励起。横軸は波数 (wave number, cm^{-1}), 縦軸はラマン強度。

図 4 ラット水晶体中心部から全領域ラマンスペクトル

ある。

逆に水晶体核の中心には、水晶体で一番古い組織が残っていることになる。水晶体が発生したときの一次繊維の組織成分が残っているのである。水晶体は構造上無血管で、中心にいくほど代謝は極めて弱いので、古い組織が残る。増殖帯から赤道部にかけては、分裂したてで、分化を始めたばかりの本当に若い細胞と、胎生期の発生の初期からの本当に年取った細胞が、この水晶体という小宇宙のなかにトポロジカルに共存しているのである⁽²⁾。

ラット水晶体を傷つけないまま取り出して、四方石英ガラスのセルの中の器官培養メジウム中に入れる。こうすると数日間は眼球中にあるままの状態を保つことができる。そして、図3のように下方よりレーザ光を当て、90°の方向でラマン散乱光を分光器に導いて測定する。ラットの正常水晶体の中心から測定したラマンスペクトルの全領

図3の方法を用いた(a)相対水分含量 (b)相対SHとS-S含量 (c)相対SH含量の加齢変化(週齢)

図 5 中心からの水平端への距離

域を図4に示す。ピークとして現われるバンドは、主として水晶体蛋白質からのもので、 $1,003 \text{ cm}^{-1}$ にはフェニールアラニンのベンゼンリングの伸縮振動によるピークが、 $1,240 \text{ cm}^{-1}$ にアミドIII、 $1,669 \text{ cm}^{-1}$ にはアミドIによるバンドが現われる。このアミドの位置により、水晶体蛋白質の二次構造は逆平行 β 構造であることがわかる。

$3,390 \text{ cm}^{-1}$ にはOHの伸縮振動によるバンドが現われ、水晶体ではほとんど水のOHからのもので、測定部位の相対水分含量を示すことができる。 $2,579 \text{ cm}^{-1}$ と 509 cm^{-1} には、生体還元物質となる主に蛋白質のSH基とその酸化された状態のS-S結合を表すバンドが観察される。この三つのマーカを使うと、水晶体核の形成状態をみることができる。水晶体内の局所的な水の分布図5aとSH基、SS結合分布を図5b, cに示す⁽³⁾。相対的な水分含量はOHの伸縮振動のバンドの強度 I_{3395} と蛋白質のCHの伸縮振動のバンドの強度 I_{2935} との比 I_{3395}/I_{2935} で表せる。SH基の相対含量は I_{2579}/I_{2731} で、SS結合のそれは I_{509}/I_{495} で表わせる。図5よりラマンスペクトルは、直径4~5 mmというラット水晶体の局所的な部位からの分子レベルの情報を、しかも水晶体は生きたままの非破壊状態で得られる。水晶体の中心は水分が少なく、そのぶん蛋白質濃度が高く、周辺の赤道部にいくにしたがって水分が多く、蛋白質濃度が低いという結果になっている。SH基は水晶体中心が低く、だんだんと周辺にいくにしたがって相対含量は高くなり、そして赤道部近くでまた下がる。水晶体繊維の成長と加齢を示している。SS結合の相対含量は中心部が

一番高く、周辺にいくにしたがい急速に低下する。ちょうど水晶体核の形成された部位と一致している。一つの水晶体の結果からも、水晶体核の形成には脱水現象とSH基のSS結合への変換、すなわち酸化が関係していることが分かる。一番年をとった古くからある部分のSS結合の量が一番多く、一番酸化されていることになる。

加齢による変化をラット水晶体中心、すなわち核の中心で測定した結果、水分およびSH基相対含量は加齢と共に最初は急に、そしてだんだんと緩やかになりながらも減少していることがわかった。水晶体の中心部は加齢とともに、脱水現象を示すように水分含量が減る。この現象はSH基の減少とSS結合の増加と極めてよく相関する。図6に水分 I_{3395}/I_{2935} とSH基 I_{2579}/I_{2731} の相対含量の相関をグラフにするとよい相関を示す⁽⁴⁾。水晶体核の形成に、脱水すなわち蛋白質の濃縮とSH基のSS結合への変換が大きな役割をしていることがわかる。いいかえると、蛋白質のSH基がSS結合に酸化されて変換することにより、蛋白質の巨大分子化して、水晶体核の形成に結びつくのであろう。

加齢変化としてラマン分光で捉えられる上に述べた以外の変化として、チロシンとトリプトファンの微環境の変化である。チロシンとトリプトファンとも $700\sim 900\text{ cm}^{-1}$ に2本のバンドがあり、それぞれの強度比 I_{833}/I_{855} と I_{880}/I_{760} を測定する。チロシンは加齢では、わずかしき変化しないが、トリプトファンは加齢とともに、蛋白質に埋もれていたものが、表面に露出されてくるということである⁽⁴⁾⁽⁵⁾。これは露出したトリプトファンがキヌレニン系へ変化して、加齢とともに増える着色物質や蛍光物質の蓄積につながる変化と思われる。これら加齢変化は生理的变化である。次に水晶体の病的変化についてラマン分光で検索してみる。

水晶体の病的変化の場合、ほとんど水晶体は白濁化してくる。ほとんどが水晶体蛋白質の変性を伴うからで、そのように白濁した水晶体を白内障と呼ぶ。ゆえに、白内障は一つの症候群ともいうべきもので、原因はさまざまであり、むしろ原因不明のことが多い。ラマン分光により得られた知見は、病的変化としての白内障の変化は、加齢変

図6 ラット水晶体のSH基と水分含量の相関

化が病的状態で加速されたものであるといえるが、水晶体の水分含量だけは加齢変化と逆である。その例を求にあげる。

白内障のラマン分光法で捉えられる変化は加齢変化が促進されることが多い。その例を二、三あげる。中野マウスは先天性の白内障マウスである。生後3週目に水晶体の中心より混濁を生じる。ラマン分光法により検索すると、図7に示すように、加齢現象が促進されたごとく、SH基は混濁が始まるとともに急速に減入する。チロシンは混濁と共に蛋白質のなかに埋もれていくという変化を示す。逆にトリプトファンは加齢変化が促進されるように、蛋白質から顔をだして光化学変化を受けやすくなっている。しかし、水分含有量は白濁化と共に増加して、糖尿病の時とおなじく加齢変化とは逆である。白内障になると水晶体のイオンバランスがくずれて、水分含量は増えるのは当然であろう。蛋白質が相転移をおこすとき、チロシンが会合した蛋白質のなかに埋もれる現象を捉えていると思われる。

中野(cac)マウス水晶体中心部の(a)水分含量、(b)SH基、(c)チロシン残基と(d)トリプトファン残基の微環境変化⁽¹⁷⁾

図7 先天性白内障マウス

3. ヒト水晶体のラマンスペクトル

次に測定したいのは当然ヒトの水晶体である。ヒトの水晶体は白内障の手術のとき得られることが多い。白内障患者が比較的高齢なこともあり白濁しておりラマン測定を妨害する蛍光が極めて強く、従来型の分散型ラマン分光器では測定不可能に近い。Yu らが行った研究を図 8 で示すと、蛍光は年令と励起するレーザー光の波長に大きく左右される⁽⁶⁾。14 才の正常水晶体で $\lambda_{critical}$ は 514.5 nm でそれより短い波長のレーザー光では蛍光の影響が大きく過ぎてうまく測定できない。それより長波長がわでは測定可能である。特に 1,000 nm 位の近赤外の励起波長ではほとんど蛍光がでないことが予測される。

この蛍光の妨害を極力うけずにきれいなスペクトルを測定する方法にはいくつかあるが、従来型の可視光励起のラマン分光器で測定した Gijsbers らがいる。彼らは 1% パラフォームアルデヒドで固定した後 514.5 nm のレーザー光で 10 から 24 時間照射し、内在性の蛍光物質を光破壊してからラマンスペクトルを測定した。図 9 はその一例である。33 才の水晶体で 16 時間レーザー照射後スペクトル測定して

図 8 蛍光とラマンスペクトルの競合関係
14 歳ヒト正常水晶体から測定し、励起するレーザー光を λ_{exc} 406.7 nm から λ 647.1 nm まで各種変えている。波長の短いレーザー光のほうが蛍光を励起しやすい。14 歳で $\lambda_{critical}$ は 514.5 nm (文献 6 より)

図 8 蛍光とラマンスペクトルの競合関係

いる。水晶体の白濁した部分 (右) と白濁していない部分 (左) から測定している。

このように苦勞しなくとも容易にヒト水晶体から測定できる方法が、前掲の総説にある近赤外励起 (NIR)-フーリエ変換 (FT) ラマン分光法である。図 10 に示すような方法で測定する。サンプルの上方よりの Nd-YAG レーザよりの 1064 nm の近赤外励起光を照射し、180° に散乱したラマン散乱光を球面ミラーで集光して分光検出器に導く。この測定法を用いると、成熟白内障という濁りと蛍光が極めて強い白内障水晶体からも蛍光に妨害されずにきれいなスペクトルが測定ができる。

図 11 は 50 才のヒト水晶体の NIR-FT ラマンスペクトルである。眼球破壊という外傷の手術時に、無傷で得られた濁りのない正常と思われるヒト水晶体である。そのヒト水晶体の NIR-FT ラマンスペクトルは図 4 の 5 週齢のラットで得られた分散型のラマンスペクトルと同じくらい S/N 比もよい。ラットも年を取るとその内部蛍光は増えてくるが、5 週齢位では蛍光も少なくきれいなラマンスペクトルが測定できたわけで、ヒト水晶体の NIR-FT ラマンスペクトルも同じように各バンドが同定される。

Amide I が $1,672\text{ cm}^{-1}$ に、Amide III が $1,240\text{ cm}^{-1}$ に認められる。1,006 cm^{-1} にフェニールアラニンよりのバンドが、C-H 変角運動による $1,450\text{ cm}^{-1}$ のバンドがある。トリプトファンによる 761 cm^{-1} と 881 cm^{-1} 、チロシンから 836 cm^{-1} と 858 cm^{-1} にバンドが現われる。2,574 cm^{-1}

図 10 レーザ照射法とラマン散乱光の集光法

1% パラフィルム固定して、16 時間レーザー照射後測定 左は透明部分、右は白濁した部位からの測定

図 9 33 才のヒト水晶体からのラマンスペクトル (文献 7 より)

図 11 50才正常水晶体の NIR-FT ラマンスペクトル

図 12 85才成熟白内障水晶体の NIR-FT ラマンスペクトル

には蛋白質の SH 基によるバンドが認められる。

図 12 は 85 才の成熟白内障といわれる完全に白濁し、さらに老化と病的のためにかかなり濃く褐色の色素が沈着しているヒト水晶体の NIR-FT ラマンスペクトルである。図 11 の正常のヒト水晶体ラマンスペクトルと比べても鮮明で遜色ない。

4. 角膜、強膜のラマンスペクトル

角膜や強膜は、従来の分散型のラマン分光測定器では測定しにくかったが、NIR-FT ラマン分光法により測定可能となった⁽⁹⁾。

図 13 に家兎の正常角膜の NIR-FT ラマンスペクトルを示す。1,664 cm^{-1} には Amide I, 1,450 cm^{-1} には CH の変角運動によるバンド、そして 1,246 cm^{-1} には Amide III のバンドが現われる。コラーゲンに多いプロリンによるバンドが 858 cm^{-1} と 917 cm^{-1} に認められる。ヒドロキシプロリンによるバンドも 877 cm^{-1} に認められる。残念ながら SH 基により 2,570 cm^{-1} 付近にはエミッションによる

図 13 正常家兎角膜の NIR-FT ラマンスペクトル

ピークが出現しているためバンドとして確認できなかった。

図 14 に強膜のラマンスペクトルを示す。1,664 cm^{-1} には Amide I, 1,450 cm^{-1} には CH の変角運動によるバンドそして 1,246 cm^{-1} には Amide III のバンドが現われる。コラーゲンに多いプロリンによるバンドが 858 cm^{-1} と

光が角膜を素通りできるのは、コラーゲン線維が等間隔で並んでいるのでそれより波長の長い可視光はすり抜ける。

図 14 角膜コラーゲン線維の断面図

図 15 正常家兎強膜の NIR-FT ラマンスペクトル

917 cm^{-1} に認められる。ヒドロキシプロリンによるバンドも 877 cm^{-1} に認められる。角膜と強膜のラマンスペクトルが共通のバンドが多いことは、この双方のラマンスペクトルのもととなる構成成分の I 型コラーゲンであることによる。そのコラーゲンの存在様式は、角膜が透明組織で、強膜は不透明な組織であることからもうかがえる。角膜は光をよく通すために、コラーゲン線維の並び方がきわめて秩序よく 64 nm 間隔で並んでいることによる。その隙間を水を含むケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸などのムコ多糖類がうめている (図 15)。可視光 (400~760 nm) は図 15 にあるようにコラーゲンの間隔より長いので、すり抜けることができる。一方不透明な強膜はコラーゲン線維がアトランダムに、そして角膜より密におりかきになっている。

角膜はアルカリなどの化学腐食をうけたあと、その傷を修復しようとしてコラーゲン線維を再生させる。そのとき傷が深いと図 15 にあるようにきれいに再生できず強膜のように線維の並びがアトランダムになってしまう。それを角膜白斑というが、図 16 は家兎角膜にアルカリ腐食で潰

図 16 アルカリ腐食 1 週間後の角膜白斑の NIR-FT ラマンスペクトル

乾燥したコラーゲン線維より直接測定

図 17 精製したヒトコラーゲン I 型の NIR-FT ラマンスペクトル

瘍をつくって一週間目の角膜白斑の NIR-FT ラマンスペクトルである。ノイズがつよいスペクトルであって、知りたいプロリンなどはっきりしないが、アミド I や CH_2 変角振動によるバンドが観察される。現在実験を継続しているところである。

ヒトコラーゲン I 型のラマンスペクトルを図 17 に示す。1670 cm^{-1} には Amide I, 1454 cm^{-1} には CH の変角運動によるバンド、そして 1269 と 1249 cm^{-1} には Amide III のバンドが現われる。コラーゲンに多いプロリンによるバンドが 921 cm^{-1} に認められる。しかし、858 cm^{-1} にあるプロリンのバンドは小さなショルダとしてしか認められない。ヒドロキシプロリンによるバンドも 879 cm^{-1} に認められる。基本的には似ているが、この精製したヒトコラーゲン I 型は水分を含まない乾燥したものから直接ラマン測定しているので、生体にある水分を十分に含んだ形のコラーゲンとは存在様式が違うために、ラマンスペクトルの違いとして現われていることが考えられる⁽⁹⁾。

5. 視神経のラマンスペクトル

視神経は神経細胞の束に尾崎の総説中の大脳の白質、す

図 18 家兎視神経の NIR-FT ラマンスペクトル

なわち神経線維の多い部分のラマンスペクトルに似ている⁽¹⁾⁽¹⁰⁾。図 18 に家兎の視神経の NIR-FT ラマンスペクトルを示す。ピークとして現われるバンドは、主として視神経のリン脂質と蛋白質からのもので、1,662 cm⁻¹にはアミド I によるバンド、1,006 cm⁻¹にはフェニールアラニンのピークが現われ、主に蛋白質によるものである。1,303, 1,091, 1,064, 1,033 cm⁻¹にあらわれるバンドは主にリン脂質によるものである。1,442 cm⁻¹に CH₂の変角振動によるバンドが現われ、これはリン脂質と蛋白質の CH₂変角振動による。アミド I のバンドが蛋白質より、CH₂変角振動による 1,442 cm⁻¹のバンドが蛋白質と脂質よりもたらずにより、二つのバンドの強度比は蛋白質と脂質の含量を表す目安、すなわち、神経細胞集団が多い灰白質(皮質)か、神経線維が多い白質かといった区別をつけるマーカーとなる⁽¹⁰⁾。視神経のスペクトルを比較すると、本質的に神経線維の多い白質のスペクトルであるが、白質よりも蛋白質濃度がやや高いことがわかる(前掲の総説の図 1 参照)⁽¹⁾⁽¹⁰⁾。

8. 将来の展望

ラマン分光法の利点の一つは、複雑な生体組織を破壊することなくそのままの状態、分子レベルの情報が的確に得られることである。この利点を生かすには被験者の生体組織にレーザ光を当て、直接散乱してきたラマン散乱光を測定できることが望ましい。被験者を分光器の試料室に入れるのではなく、レーザ光を光ファイバで導き、目的とする組織に当て、またラマン散乱光をうまく集光し光ファイバで分光検出器に導く方法が考えられる。

眼はその性質が露出している部分も多い。また透明組織を通して光を当て、また散乱光を集光することができる。角膜は直接、強膜は薄い結膜を通して直接測定できる。水晶体は透明である角膜と房水を通して測定可能である。外科的な操作ができれば眼の奥にある視神経からも測定可能となるであろう。

ここで紹介した近赤外レーザで励起するラマン分光法は

いますぐにでも、ヒト角膜には応用できるところまできている(測定時間をもっともっと短くしないと被験者はじっとしてられないだろうが)、アルカリによる角膜白斑だけでなく、先天代謝異常症で角膜に異常物質が沈着したり、角膜そのものが遺伝的におかしくなる角膜変性症などがある。そういった沈着下異常物質や変性箇所を解析するために、破壊的にサンプルをとらずに、ラマンスペクトルだけで直接に診断をつけられる可能性がある。レーザ、光ファイバ、分光器、検出器の発達は急速に進んでおり、臨床応用への基礎的データの蓄積と解析が重要となってきた。

(平成 6 年 4 月 11 日受付)

文 献

- (1) 尾崎幸洋:「生体レーザラマン」, 電学論 C 114, 5, 508 (平 6)
- (2) 水野有武:「水晶体のラマン分光学」, 病態生理 9: 164 (平 2)
- (3) 宮崎仁志・水野有武:「ラット水晶体の部位にみたラマンスペクトル」日眼誌 91: 437 (昭 62)
- (4) Y. Ozaki, A. Mizuno, K. Itoh & K. Iriyama: "Inter-and Intramolecular disulfide bond formation and related structural changes in the lens proteins" *J. Biol. Chem.* 262: 5545 (1987)
- (5) K. Itoh, Y. Ozaki, A. Mizuno & K. Iriyama: "Structural changes in the lens proteins of hereditary cataracts monitored by Raman spectroscopy", *Biochemistry*, 22: 1773 (1983)
- (6) N. T. Yu, M. Bando & I. F. R. Kuck Jr: "Fluorescence/Raman intensity ratio for monitoring the pathologic state of human lens", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26: 97, (1985)
- (7) G. Gijsbers, G. Vrensen, B. Willekens, D. Maatman, F. De Mul & J. Greve: "Raman microspectroscopic investigation of human eye lenses", *Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects* p. 583-94, (1986) Elsevier, Prague.
- (8) 尾崎幸洋・水野有武:「近赤外励起フーリエ変換ラマン分光法による非破壊生体計測」, 応用物理 61: 596 (平 4)
- (9) A. Mizuno, M. Tsuji, K. Fujii, K. Kawauchi & Y. Ozaki: "Near-infrared Fourier Transform Raman spectroscopic study of cornea and sclera", *Jpn. J. Ophthalmol.* 38: 44 (1994)
- (10) A. Mizuno, T. Hayashi, K. Tashibu, S. Muraishi, K. Kawauchi & Y. Ozaki: "Nearinfrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues", *Neurosci. Lett.* 141: 47 (1992)

水 野 有 武 1969 年慈恵医科大学卒業。現在、慈恵医科大学化学教室助教授・眼科兼任講師。医学博士。眼と神経の生化学、ラマン分光学などの研究に従事。