ヒト内リンパ嚢内リンパの蛋白分析

—— 微量検体定量分析の試み ——

山根 雅昭*・二木 隆*・白幡 晶**・吉岡 正則***

A Quantitative Analysis of Protein in the Fluid of the Human Endolymphatic Sac

Masaaki Yamane and Takashi Futaki

(University of Tokyo)

Akira Shirahata

(Tokyo Biochemical Research Institute)

Masanori Yoshioka

(University of Tokyo)

A quantitative analysis was made of protein in three fluid samples obtained from the endolymphatic sacs of patients with Meniere's disease during epidural shunt operation utilizing the single radial immunodiffusion method. Prior to the protein analysis, the percentage of whole-blood contamination in the sample was determined using test strips for urinalysis. The concentrations of transferrin, C3, C4 in the samples could be measured quantitatively. These procedures were thought to be very useful for the analysis of inner ear fluids.

はじめに

内耳の生理, 病態を理解する上で内耳液, とりわけ内リンパの分析が重要な意義をもつことは異論のないところであるが, 採取可能な量が微量である上に血液などの混入を防ぐことが極めて困難であるため, その成分分析に支障をきたすことが多い。

今回微量検体の分析方法として, 混入血液の半定量的測定とともに蛋白成分の定量を行う方法を考案し, 内リンパ嚢内リンパの分析を試みた結果, 有用性を認めたので報告する。

対 象

メニエール病患者に対する内リンパ嚢外壁翻転術中に採取した内リンパ嚢内リンパ (以下, 嚢内リンパ), 3 症例 3 検体を対象とした。検

体量は 1~2.5 μ l であるが, いずれも淡紅色を呈しており軽度の血液混入がみられた。嚢内リンパの採取および保存の方法は既に報

*東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 野村恭也教授)

**東京生化学研究所

***東京大学薬学部分析化学教室 (主任: 田村善蔵教授)

告した¹⁾通りであり, 本稿では省略するが, これら3症例3検体について, 以下の方法により

血液混入のチェック並びに若干の蛋白成分の定量を行った。

分 析 方 法

A. 血液混入のチェック

1. 患者静脈血を sonication により血球破壊し, H₂O 稀釈により 10⁵ 倍稀釈液を調製した。

2. 嚢内リンパの検体を H₂O により稀釈し, 100倍, 300倍, 900倍, 2700倍, 8100倍等の稀釈列を調製した。

3. ガラス板上に, 血液稀釈液 (10⁵ 倍) および嚢内リンパ稀釈液 (3倍比の稀釈列) を各々 10 μ l ずつ滴下しておき, 尿検用潜血試験紙 BM テスト S (山之内製薬) を約 1×2mm 角に切断したものを各々の液中に浸し, 約1分間放置した後, 肉眼的に比色し, 10⁵ 倍稀釈血液の呈色に対応する嚢内リンパの稀釈倍率を判定した。この稀釈倍率から血液混入の割合を算定する。すなわち, この稀釈列の場合各々 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1 %になる。

B. 蛋白成分の測定

セルロースアセテート膜 (富士フィルム社製 セパラック) を用いた single radial immunodiffusion (SRID) 法によった。

抗血清は, Miles-Yeda 社の抗ヒトトランスフェリン (Goat), 抗ヒト C3 (Goat), 抗ヒト C4 (Goat) の3種類を使用した。

1. 上記の抗血清を PBS (phosphate buffered saline) バッファーにより100倍に稀釈した液中に, それぞれセルロースアセテート膜 (3.0×6.0 cm) を浸し, 約1時間静置し, 目的の抗血清が浸透した膜を作製した。

2. 抗血清が浸透したセルロースアセテート膜を液中からとり出し, 嚢内リンパ試料および, 既知濃度の標準血清 (ベーリング・インスティテュート社製, トランスフェリン標準血清 [348.0 mg/dl], C3 標準血清 [88.0 mg/dl], C4 標準血清 [23.0 mg/dl]) の4倍, 8倍, 16倍, 32倍稀釈液試料を各々 0.22 μ l ずつスポットし, これを流動パラフィン中に浸し, 24~96時間静置した。

3. 流動パラフィン中よりとり出したセルロースアセテート膜を流水中で約30分間洗浄した後, 5%トリクロル酢酸 (TCA) により蛋白を固定し, 銀コロイド染色を行なった。

4. 各試料の沈降環の直径を計測し, 既知濃度の標準血清稀釈列の値から検量線を作製しておき, これにもとづいて嚢内リンパの各蛋白成分の含有量を算定した。

結

A. 血液混入

血液混入の割合は3検体ともに 2.7 %であった。

B. 蛋白成分

トランスフェリン (Tf) の定量について図1, 図2に示した。図1は SRID 法の銀コロイド染色像である。a, b, c, d は, 各々トランスフェリン標準血清の4倍, 8倍, 16倍, 32倍稀釈液による沈降環であり, 1, 2, 3は嚢内リンパ3検体の原液による沈降環である。図2は沈降

果

環の直径の2乗を縦軸に, トランスフェリン濃度を横軸にとり, 標準血清の値をプロットして求めた検量線であり, 直線関係を示している。この検量線から嚢内リンパのトランスフェリン濃度を計測した。

同様にして C3, C4 についても定量を行った結果を表1に示した。表中の数値は計算上で得られた数値を標準血清の数値に合致させて表示したが, 実際上の有効数字は1桁である。図3に血液混入割合と合わせてグラフ表示した。

トランスフェリン

図1 SRID 法. 銀コロイド染色.

a, b, c, dはトランスフェリン標準血清の各々4, 8, 16, 32倍稀釈液, 1, 2, 3は嚢内リンパ3症例3検体の沈降環. 高濃度のもの程, 環の直径が大きくなる. 各試料は0.22 μ l.

図2 トランスフェリンの検量線. 本文参照.

考

内耳液は採取できる量が微量であるため, 分析に際して血液や他の組織液の混入が常に問題となるが, 内リンパ嚢内リンパの場合はことに微量である上に解剖学的困難も加わる.

表1 トランスフェリン, C3 C4 濃度の測定結果. 1, 2, 3は3症例3検体. 本文参照.

	標準血清	1	2	3
Tf	34.8 0(100)	37.5(10.8)	59.5(17.1)	52.8(15.2)
C3	88.0(100)	5.5(6.3)	6.6(7.5)	6.0(6.8)
C4	23.0(100)	2.8(12.2)	2.8(12.2)	2.8(12.2)

[mg/dl(%)]

図3 3症例3検体の各成分の濃度の比較.

最上段は血液混入の割合. 1の検体でトランスフェリンの濃度が低い.

按

著者らは, 既にヒトの嚢内リンパについて, Na^+/K^+ イオン濃度比が細胞外液の性状を示すこと, 蛋白濃度は脊髄液に比し相当に高く血清に近いこと, β グロブリン分画中にトランスフ

ェリン, C3, C4 の存在を認めたが β リボ蛋白は認められなかったことなどを報告した¹⁾が, 血液の混入を防ぐことが困難であり, 肉眼的に無色の検体は1割未満の症例で得られたに過ぎなかった。

今回対象とした3検体は, いずれも肉眼的に淡赤色を呈しており, 軽度の血液混入が認められたものであるが, この程度の混入が存在しても囊内リンパの蛋白成分の定量がある程度可能であるとすれば, 利用できる検体数はかなり多くなる。

Silverstein²⁾³⁾によれば, 完全に溶血した血液が0.1%以上混入していれば肉眼的に判別可能であるという。また, 溶血のない血液の場合には最大 10万/mm³ の赤血球の混入があっても肉眼的には無色に見える⁴⁾といわれている。これは約2%の全血混入に相当する。血液が混入した検体は, 採液, 凍結保存, 解凍の過程で赤血球の一部は破壊されるであろうから, 色調によって血液混入の割合を推定することは当然できない。

今回血液混入のチェックに用いた方法はヘモグロビンの半定量法である。3検体とも血液混入割合は2.7%であったが, 1.8~5.4%の間の値と考えられる。この値の範囲は稀釈倍率を小さくすれば小さくなるが, 肉眼による判定は困難になる。現段階では比色判定には若干の熟練を要することになるが, 2倍比の稀釈列でも半定量は可能であろう。今回は試料の稀釈列を3

倍比としたため, 血液混入の割合は数%程度であるという以上のことはいえないが, 本法は簡便でもあり, 微量検体の血液混入をチェックする半定量法として有用であると考ええる。

SRID 法は臨床免疫学的検査法として日常的に用いられており, 免疫グロブリンの定量, C3, トランスフェリン, CRP, α -フェトプロテインなどの測定法として確立されたものである。10%程度の測定誤差はあるがこの方法によって0.22 μ l という微量の囊内リンパの蛋白成分を定量することができた。検体中の血液混入割合が2.7%であるとする, 測定結果からトランスフェリンは血清の10数%, C3は数%, C4はおよそ10%程度の濃度で存在することになり, 成分比は血清と異なる。しかし本来, 囊内リンパ採取時に同時に本人の末梢血を採取し, この血液を基準にして血液混入のチェック並びに蛋白成分の比較を行う必要があるが, 今回は行えなかったことや, 前述した稀釈列の倍率の問題もあり結論は避けざるを得ない。

囊内リンパはもとより内耳液は採取できる検体が微量であり, また血液などの混入が避け難いこともあり, それらの分析は敬遠されてきた感がある。しかし今回の方法によれば1 μ l 程度の検体があれば血液混入の割合を半定量的にチェックし, 更に数種類の蛋白を定量することが可能であり, 今後この方面の分析方法として有用であると考ええる。

ま と め

メニエール病患者に対する内リンパ囊手術の際に採取した囊内リンパのうち, 軽度の血液混入が肉眼的に認められた3症例3検体について, 尿検用潜血試験紙を用いて血液混入の割合をチェックした上で, セルロースアセテート膜による single radial immunodiffusion 法により蛋白成分の定量を行う分析法を試みた結果, 約1 μ l の検体量で血液混入割合の半定量および β グロブリン分画中のトランスフェリン, C3, C4 の3種類の蛋白を定量することができ, 微量検体の蛋白分析法として有用であると考えた。

本研究は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究費による成果である。

文 献

- 1) 山根雅昭, 二木隆, 吉岡正則, 白幡晶: 内リンパ嚢外壁翻転術中における内リンパの採取とその分析. 耳鼻臨床, 75: 増5; 2290-2296, 1982.
- 2) Silverstein H.: Inner Ear Fluid Proteins in Acoustic Neuroma, Ménière's Disease and Otosclerosis. Ann Otol 80: 27-35 1971.
- 3) Silverstein H.: The Inner Ear Fluid in Man. Laryngoscope 83: 79-107 1973.
- 4) Zöllner F.: Discussion on Ruedi et al. Acta Otolaryng 59: 308 1965.