

## 分析対象としての涙液



砂山 博文

### 1 はじめに

現在日本の平均寿命は男性が約 81 歳、女性は約 87 歳である<sup>1)</sup>。一方で健康寿命は男性約 72 歳、女性 75 歳と「不健康な期間」が男女ともに 10 年近く存在する。社会保障制度を持続可能なものとするためには健康寿命の延伸が重要となる。それには身体の不調をできるだけ早く検知する必要があることから、日々の（定期的な）健康状態を気軽にチェックできる技術が望まれる。バイタルサインの何をモニタリングするかは目的により異なるが、比較的短い間隔でのサンプリングを基本とすることから「簡単に装着できる（ウェアラブル）」ことや「非侵襲」であることが重要となる。ウェアラブルなセンシング技術は印刷技術、ナノ加工技術等の発展とともに魅力的な技術が多数報告されている（詳細は文献参照<sup>2)3)</sup>。血液は現状のスタンダード試料ではあるが、侵襲的で何回も試料を採取するには高いハードルがある。尿や唾液も用いられるが、試料採取に心理的な抵抗や、技術が必要などの課題がある。涙液はその点、非侵襲的かつ心理的な抵抗もなく採取できることから魅力的な試料であると考えられる。本稿では涙液の分析の現況について、近年報告された論文に基に概説する。

### 2 涙液成分

涙液はその 98 % が水分で、それ以外にタンパク質や炭水化物、電解質等が含まれている<sup>4)5)</sup>。表 1 は涙液と血清の主要成分を示す。オスモル濃度はともに 300 mOsm/L 程度、pH も中性だが、総タンパク質濃度は涙液が血清の 1/10 程度低い。このことから涙液は血清よりも複雑さが低減されているといえる。近年のプロテオミクス研究から 1500 以上のタンパク質が特定されている<sup>6)</sup>。主要タンパク質は Lysozyme で IgA とともに微生物の侵入や感染を防御する役割を担っている。血清と比

表 1 涙液と血清の主要成分

	涙液	血清
Osmolarity, mOsm/L	302	300
pH	7.2~7.4	7.2~7.4
Total proteins, mg/mL	7.4	68~82
Albumin, mg/mL	0.054	35~55
Lysozyme, mg/mL	2.4	0.004~0.015
Lactoferrin, mg/mL	1.5	ND
Transferrin, mg/mL	ND	2~3
IgA, mg/mL	0.41	0.9~4.5
IgG, mg/mL	0.032	8~12
TGF-β1, ng/mL	2~10	6~50
PDGF, ng/mL	0.09~1.7	30~100
EGF, ng/mL	0.2~3	0.1~1
HGF, ng/mL	0.2~0.5	0.1~1
VEGF, ng/mL	0.019	1~5
<b>Vitamins</b>		
vitamin A, ng/mL	16~20	800~1000
vitamin C, μg/mL	117	7~20
<b>Antioxidants</b>		
tyrosine, μM	45	77
glutathione, μM	107	ND
<b>Carbohydrate</b>		
glucose, mg/mL	0.026	0.6~1.2
<b>Electrolytes</b>		
Na <sup>+</sup> , mEq/L	145	135~146
K <sup>+</sup> , mEq/L	24	3.5~5
Ca <sup>2+</sup> , mM	1.5	1
Cl <sup>-</sup> , mM	128	96~108
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mM	26	21~29
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mM	0.14	0.19
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , mM	0.22	1.42
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , mM	0.39	0.53

較して albumin が非常に少ないが、炎症反応や機械的刺激で増加することが示唆されている。鉄を運ぶ lactoferrin は血清中にはごく少量しか存在しないが、同様の機能を有する transferrin が同程度の濃度で存在する。Vitamin 類では視細胞にとって重要な vitamin A は涙液中の方が少なく、一方で抗酸化物質である vitamin C は多く存在するなど、涙液と血清で異なる点が多い。

### 3 涙液の分析

涙液の分析は眼科系疾患に関するものが多く報告されているが、近年では他の疾患と涙液成分の変化に関する報告もされている<sup>7)</sup>。例えば涙液中のグルコース濃度は糖尿病患者において有意に高くなる<sup>8)</sup>。Li らはグルコース酸化酵素と色素を含んだハイドロゲルと電極部を含んだコンタクトレンズ型のグルコースセンサを開発し、涙液中のグルコース濃度に応答し色が変化することを報告

Tear Fluid as an Analysis Object.

している<sup>9)</sup>。また、Tanらは糖尿病マーカーである糖化アルブミンについて血清中の濃度と涙液中の濃度に相関があることを報告している<sup>10)</sup>。近年、質量分析計等の分析技術の発展により涙液のプロテオミクス解析も行われている。Leeらは涙液のプロテオミクス解析からアルツハイマー病のマーカーとして adenylyl cyclase-associated protein 1 を特定し、抗体修飾磁性粒子と色素担持粒子を用いた高感度検出法を提案している<sup>11)</sup>。また、涙液中の細胞外小胞 (EV) に着目した研究も推進されている。涙液中の EV 濃度は精製法により様々な報告があるが、 $10^8 \sim 10^{10}$  particles/mL 程度含まれている<sup>12)</sup>。Huらは2枚の多孔質膜に挟まれた空間に試料を添加し、ここに周期的な負圧振動と超音波調和振動の印加によって生じる流れを利用して孔径以下の物質を除去する迅速 EV 分離技術 (EXODUS 法<sup>13)</sup>) により涙液由来 EV を 20~100 nm, 100~200 nm, 200~450 nm の三つの大きさの範囲で分画し、それぞれに含まれるタンパク質について LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析を行ったところ、各分画において含まれるタンパク質の組成は大きく異なり、中程度 (100~200 nm) の EV 群にはエンドソームを経由する経路に関連するタンパク質の搭載が確認され、アポトーシス経路関連のタンパク質は中程度および大きな粒子が含まれる画分で観察されるなど、大きさによって産生経路が異なることが示唆された。また、これらのプロテオミクス解析から、涙液中 EV には眼特異的細胞に由来するものだけでなく血液や免疫細胞など、他の臓器に関連するものが確認されたことから涙液中 EV から全身の情報を取得できることが示唆された<sup>14)</sup>。

#### 4 涙液採取

涙液の採取はシルマー試験紙と呼ばれるろ紙 (本来は涙液生産量を測定するために使用) やガラスキャピラリーを用いる方法がある。しかし、シルマー試験紙とキャピラリーによる採取法の違いにより得られる結果が異なることが示唆されている<sup>15)</sup>。シルマー試験紙は簡易に涙液を採取できるが、ろ紙の一部が角膜や結膜と接触し、機械的な刺激の誘発による影響が懸念される。これはシルマー試験紙の先端部分を分析対象から外すことである程度解消できることが示唆されているが、分子量の大きなタンパク質については先端部に残っている可能性があるため注意が必要である<sup>16)</sup>。

#### 5 おわりに

涙液中の成分分析により生体情報が得られる可能性についてこれまでの報告を基に概説してきた。血液や腹水、組織生検等とはことなり、涙液は比較的非侵襲的に採取可能な試料として魅力的ではあるが、まだまだ情報が不足している。今後高感度分析技術や多変量解析技術

の発展により各種疾患と涙液のタンパク質や脂質、代謝物の組成変化との関係について新たな知見が得られることでその真価が明らかになると期待される。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省：令和4年度簡易生命表の概況 (令和5年7月)。
- 2) 荒木徹平, 植村隆文, 関谷 毅：機能材料, **44**, 30 (2024)。
- 3) K. Mitsubayashi (Ed.)：“Wearable Biosensing in Medicine and Healthcare”. (2024), (Springer Singapore, Singapore)。
- 4) K. Tsubota, A. Higuchi：Int. Ophthalmol. Clin., **40**, 113 (2000)。
- 5) S. Rauz, V. P. Saw：Cell Tissue Bank., **11**, 13 (2010)。
- 6) C. Aass, I. Norheim, E. F. Eliksen, P. M. Thorsby, M. Pepaj：Anal. Biochem., **480**, 1 (2015)。
- 7) S. Hagan, E. Martin, A. Enriquez-de-Salamanca：EPMA Journal, **7**, 15 (2016)。
- 8) D. K. Sen, G. S. Sarin：Br. J. Ophthalmol., **64**, 693 (1980)。
- 9) Z. Li, J. Yun, X. Li, M. Kim, J. Li, D. Lee, A. Wu, S. W. Lee：Adv. Funct. Mater., **33**, 2304647 (2023)。
- 10) Y. Tan, E. De La Toba, S. S. Rubakhin, L. T. Labriola, C. Canfield, D. Pan, J. V. Sweedler：J. Am. Soc. Mass Spectrom., **35**, 106 (2024)。
- 11) S. Lee, E. Kim, C-E. Moon, C. Park, J-W Lim, M. Baek, M-K. Shin, J. Ki, H. Cho, Y. W. Ji, S. Haam：Nat Commun., **14**, 8153 (2023)。
- 12) H. Liu, W. Yuan, Q. Pang, C. Xue, X. Yan：Talanta, **239**, 123089 (2022)。
- 13) Y. Chen, Q. Zhu, L. Cheng, Y. Wang, M. Li, Q. Yang, L. Hu, D. Lou, J. Li, X. Dong, L. P. Lee, F. Liu：Nat. Methods, **18**, 212 (2021)。
- 14) L. Hu, X. Liu, Q. Zheng, W. Chen, H. Xu, H. Li, J. Luo, R. Yang, X. Mao, S. Wang, T. Chen, L. P. Lee, F. Liu：Sci. Adv., **9**, eadg1137 (2023)。
- 15) F. Bachhuber, A. Huss, M. Senel, H. Tumani：Sci. Rep., **11**, 10064 (2021)。
- 16) D. P. C. Vergouwen, A. J. Schotting, T. Endermann, H. J. G. van de Werken, D. G. B. Grashof, S. Arumugam, R. M. M. A. Nuijts, J. C. ten Berge, A. Rothova, M. W. J. Schreurs, M. Gijss：Sci. Rep., **13**, 4433 (2023)。



砂山 博文 (SUNAYAMA Hirobumi)

神戸大学大学院医学研究科 (〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1)。神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻修士。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》機能性分子集積ナノ空間の創製と高感度バイオセンシングへの展開。《趣味》旅行。

E-mail：sunayama@penguin.kobe-u.ac.jp