

Table 2. List of the Detected Proteins in Human Plasma by the 2D- $\mu$ LC/MS/MS System

	ADP, ATP carrier protein (ADP/ATP translocase)
a	$\alpha$ -1-acid glycoproteins 1 and 2 (AGP 1 and 2) (orosomucoid 1 and 2) (OMD 1 and 2)
	$\alpha$ -1-antichymotrypsin (ACT)
a	$\alpha$ -1-antitrypsin ( $\alpha$ -1 protease inhibitor) ( $\alpha$ -1-antiproteinase)
a	$\alpha$ -1B-glycoprotein ( $\alpha$ -1-B glycoprotein)
a	$\alpha$ -2-antiplasmin ( $\alpha$ -2-plasmin inhibitor) ( $\alpha$ -2-PI) ( $\alpha$ -2-AP)
a	$\alpha$ -2-HS-glycoprotein (Fetuin-A) ( $\alpha$ -2-Z-globulin) (Ba- $\alpha$ -2-glycoprotein)
a	$\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ -2-M)
a	AMBP protein [contains: $\alpha$ -1-microglobulin (-microglycoprotein); Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor light chain (ITI-LC)]
a	angiotensinogen [contains: angiotensins I, II and III (Ang I, II and III)]
	antithrombin-III (ATIII)
a	apolipoproteins A-I, A-II, A-IV, C-III, D, E and LI (Apo-AI, -AII, -AIV, -CIII, -D, -E and -LI)
a	apolipoprotein B-100 (Apo B-100) [contains: apolipoprotein B-48 (Apo B-48)]
	apolipoprotein(a) (FC 3.4.21.-) (Apo(a)) (I p(a))
	attractin (mahogany homolog) (DPPT-1)
a	biotinidase (EC 3.5.1.12).
	C4b-binding protein $\alpha$ chain (C4bp) (Proline-rich protein) (PRP)
	calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B (EC 3.1.4.17)
	carbonic anhydrase I (EC 4.2.1.1) (carbonate dehydratase I) (CA-I) (carbonic anhydrase B)
	carboxypeptidase N 83 kDa chain (carboxypeptidase N regulatory subunit) (fragment)
	CD44 antigen (phagocytic glycoprotein I) (PGP-I) (HUTCH-I)
	CD5 antigen-like (SP- $\alpha$ ) (CT-2) (IgM-associated peptide)
a	ceruloplasmin (EC 1.16.3.1) (ferroxidase)
a	clusterin (complement-associated protein SP-40,40) (complement cytotoxicity inhibitor) (CLI)
	complement C1r and C1s components [EC 3.4.21.41 and 0.42 (C1 esterase)]
	complements C3 and C4 [contains: C3a and C4A anaphylatoxins].
	complement factor H (H factor 1)
a	corticosteroid-binding globulin (CBG) (transcortin).
	cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) (SGP28 protein)
a	fibrinogen $\alpha$ / $\alpha$ -E [contains: fibrinopeptide A], $\beta$ [contains: fibrinopeptide B] and $\gamma$ chains
	fibroblast growth factor receptor BFR-2 (EC 2.7.1.112)
	fibronectin (FN) (cold-insoluble globulin) (CIG)
	ficolin 3 (collagen/fibrinogen domain-containing protein 3 or lectin 3 p35) (Hakata antigen)
	glutamate carboxypeptidase-like protein 2
a	haptoglobins-1, -2 and -related protein
a	hemoglobin $\alpha$ , $\beta$ and $\delta$ chains
a	hemopexin ( $\beta$ -1b-glycoprotein)
	histidine-rich glycoprotein (histidine-proline rich glycoprotein) (HPRG)
a	immunoglobulin $\alpha$ -1 and -2 chain C regions
	immunoglobulin $\gamma$ -1, -2, -3 (heavy chain disease protein) (IIDC) and -4 chain C regions.
	immunoglobulin heavy chain V-I and V-III regions
a	immunoglobulin $\kappa$ chain C, V-I, V-II, V-III and V-IV regions
a	immunoglobulin $\lambda$ chain C and V-III regions
a	immunoglobulin $\mu$ chain C region
	immunoglobulin J chain
	inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chains H1, H2, and H3 (ITI heavy chains H1, H2, and H3)
	kininogen ( $\alpha$ -2-thiol proteinase inhibitor) [contains: bradykinin]
a	leucine-rich $\alpha$ -2-glycoprotein (LRG)
	lumican (keratan sulfate proteoglycan lumican) (KSPG lumican)
a	myosin heavy chain, nonmuscle type A (cellular myosin heavy chain, type A)
	phosphatidylcholine-sterol acyltransferase (EC 2.3.1.43)
	plasma protease C1 inhibitor (C1 Inh) (C1Inh)
	potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5 (potassium channel KQT-like 5)
	potassium-transporting ATPase $\alpha$ chain 1 (EC 3.6.3.10) (proton pump)
	progesterone-induced blocking factor 1
	prothrombin (EC 3.4.21.5) (coagulation factor II)
a	serotransferrin (transferrin) (siderophilin) ( $\beta$ -1-metal binding globulin)
a	serum albumin
	serum amyloid P-component (SAP) (9.5S $\alpha$ -1-glycoprotein)
	serum paraoxonase/arylesterase 1 (EC 3.1.1.2) (EC 3.1.8.1) (PON 1) (serum aryl diacylphosphatase 1)
	transthyretin (Prealbumin) (TBPA) (TTR) (ATTR)
	tumor necrosis factor receptor superfamily member 8 (CD30L receptor)
	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13 (EC 3.1.2.15) (ubiquitin thiolesterase 13)
a	vitamin D-binding protein (DBP) (Group-specific component) (GC-globulin) (VDB)
	vitamin K-dependent protein S
	vitronectin (serum spreading factor) (S-protein) (V75) [contains: vitronectin V65 and V10 subunits; somatomedin B]
a	zinc- $\alpha$ -2-glycoprotein (Zn- $\alpha$ -2-glycoprotein) (Zn- $\alpha$ -2-GP)

\* The protein was also detected by 1D- $\mu$ LC/MS/MS analysis.

MS/MS system, we analyzed human plasma proteome. Plasma is one of the most complex human-derived proteomes with a wide dynamic range of over  $10^{10}$ . Proteomic analysis of plasma would be a powerful tool in clinical assessment for early detection, diagnosis, and monitoring the progression<sup>10-12</sup> of

diseases. However, human serum albumin (HSA) is a protein that is abundantly present in plasma, therefore, its depletion is essential for detecting the less abundant proteins of interest, prior to proteomic analysis.<sup>15</sup> Immunoglobulins (Ig) are also abundantly present in with variable regions which complicate

protein identification from peptide sequences.<sup>10–12</sup> Therefore, the depletion of HSA and IgG from 500  $\mu$ L of plasma was carried out before 2D-LC analysis. After in-solution digestion,<sup>13</sup> 50  $\mu$ g of the HSA- and IgG-depleted sample (corresponding to 14.25  $\mu$ L of plasma) was loaded onto the SCX column and separated into 8 fractions including the pass-through fraction. Subsequently, the fractionated samples were directly analyzed using the  $\mu$ LC/MS/MS system (1D-RP analysis). In Figure 4, the base-peak chromatograms corresponding to each SCX fractions, with analytical running time of 40 min under the gradient condition of 1% B/min, are presented in comparison to those obtained for the same amount of sample by 1D-RP analysis without SCX fractionation. The sample amount analyzed would correspond to 0.35  $\mu$ L of the original plasma sample. To improve identification results obtained through the database search, three times the volume of the previously analyzed SCX fractions were subjected to 1D-RP analysis at a running time of 80 min (gradient condition of 0.5% B/min). Additionally, acquisition was carried out by the triple MS/MS method described below. The standard MS/MS acquisition for the most intense ion in a full MS spectrum occurs data-dependently after the full MS scan. Assuming that the MS and MS/MS acquisitions were repeatedly performed with 3000 scan events, the 1500 MS/MS spectra were accumulated for 70 min. The triple MS/MS acquisition method performs MS/MS acquisitions for the three most intense ions in a single full MS spectrum, by which MS/MS spectra can be obtained within a limited analytical time. Indeed, the number of MS/MS acquisitions increased up to 1.5 times, and 2250 MS/MS spectra were accumulated within 70 min by 3000 scan events comprising one full MS and three MS/MS scans. This acquisition method was applied to the proteomic analysis of approximately 1  $\mu$ L plasma, and the resultant data was evaluated using a MASCOT database search against the Swiss-Prot database. Table 1 summarizes the numbers of MS/MS data queries and proteins listed according to the score of MS/MS spectra of each SCX fractions in comparison to those of 1D-RP analysis. When several proteins were assigned with scores over the thresholds by one MS/MS spectrum, they were counted as one protein in Table 1. To ensure the identification of individual isomeric proteins, such as apolipoproteins, complement factors, Igs, etc. their specific peptide sequence regions were utilized. Finally, it was found that the 2D-LC analysis could detect 174 proteins using 1  $\mu$ L plasma. Table 2 lists the proteins assigned by more than 2 peptide fragments with scores of MS/MS spectra higher than 20 for the 174 proteins (one peptide fragment scores higher than 30). Those proteins covered almost all proteins listed in Swiss 2D-PAGE in ExPASy,<sup>16</sup> and the 2D-LC analysis was completed in half a day. These results seem to demonstrate a considerably high performance with a reasonably high throughput of the 2D-LC/MS/MS system constructed here in this study for protein identification in clinical samples, such as human tissues and biological fluids.

#### 4. Conclusion

For high throughput proteome profiling of clinical samples, we have constructed a technically simple and mechanically

sturdy 2D-LC/MS/MS system combining SCX chromatography and  $\mu$ LC/MS/MS system based on reversed-phase chromatography. SCX separation has been optimized as an off-line system for the first dimensional chromatography. This 2D-LC/MS/MS system was evaluated in terms of detection and identification of proteins using 6-protein digests on a basis of a comparison with the 1D- $\mu$ LC/MS/MS system. The number of detected peptides and the sequence coverage in each protein was found to be more than double compared to the 1D- $\mu$ LC/MS/MS system. Furthermore, its application to plasma proteomic analysis identified 174 proteins, using an amount corresponding to only 1  $\mu$ L of plasma, and the total analysis was performed within half a day, demonstrating the high performance of this method in complex protein mixtures.

Thus, the 2D-LC/MS/MS system combined with manual SCX separation was successfully operated without the use of any introduction of complicated instruments and technologies. Fractionation processing by SCX separation is easily amenable to automation, and the construction of a fully automated on-line 2D-LC/MS/MS system is now in progress. Thus, integrated systems are applicable to not only clinical samples but also to complex protein mixtures and can be used as a technical platform for clinical proteomics in future.

**Acknowledgment.** This work was supported by the Medical ProteoScope (MPS), Co. Ltd., Tokyo, Japan. The authors are indebted to Prof. J. Patrick Barron of the International Medical Communications Center of Tokyo Medical University for his English review of this manuscript.

#### References

- (1) Tyers, M.; Mann, M. *Nature* **2003**, *422*, 193–197.
- (2) Aebersold, R.; Mann, M. *Nature* **2003**, *422*, 198–207.
- (3) Figeys, D. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2891–2905.
- (4) Hancock, W. S.; Apffel, A. J.; Chakel, J. A.; Hahnenberger, K. G.; Choudhary, G.; Trajna, J.; Pungor, E. *Anal. Chem. A-Pages* **1999**, *71*, 742A–748A.
- (5) Romijn, E. P.; Krijgsveld, J.; Heck, A. J. R. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 589–608.
- (6) Kawakami, T.; Nagata, T.; Muraguchi, A.; Nishimura, T. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1846–1852.
- (7) Kawakami, T.; Nagata, T.; Muraguchi, A.; Nishimura, T. *J. Chromatogr. B* **2003**, *787*, 223–229.
- (8) Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R., III *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 242–247.
- (9) Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R., III *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683–5690.
- (10) Wu, S.-I.; Amato, H.; Biringer, R.; Choudhary, G.; Shieh, P.; Hancock, W. S. *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 459–465.
- (11) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 845–867.
- (12) Adkins, J. N.; Varnum, S. M.; Auberry, K. J.; Moore, R. J.; Angel, N. H.; Smith, R. D.; Springer, D. L.; Pounds, J. G. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 947–955.
- (13) Fujii, K.; Wang, R. in: Proceedings of the 51th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2003, MPX476.
- (14) <http://www.matrixscience.com>.
- (15) Steel, L. F.; Trotter, M. G.; Nakajima, P. B.; Mattu, T. S.; Gonye, G.; Block, T. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 262–270.
- (16) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. *Electrophoresis* **1991**, *12*, 883–906.

PR030007Q



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY B

Journal of Chromatography B, 787 (2003) 223–229

[www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

## Proteomic approach to apoptotic thymus maturation

Takao Kawakami<sup>a</sup>, Takuya Nagata<sup>b</sup>, Atsushi Muraguchi<sup>b</sup>, Toshihide Nishimura<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Chemistry Department, Research Division, GlaxoSmithKline K.K., 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-4247, Japan

<sup>b</sup>Department of Immunology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194, Japan

### Abstract

Apoptosis is an essential process for selection of T lymphocytes specific for foreign antigen in the process of mammalian thymus maturation. Proteomics, a comprehensive study of proteins expressed in a cell, will facilitate the systematic analysis of protein molecules related to such a complicated biological system. Protein expression profiles including information about protein signatures, localization and their quantitative changes with extracellular stimulations are extremely useful to construct intracellular pathway models resulting in the apoptotic cell death.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Proteomics; Apoptotic thymus maturation

### 1. Introduction

Apoptosis is a programmed cell death depending on active participation of cellular regulation. The processing of a myriad of both external and internal impetuses leads to the apoptotic cell death, probably based on a delicate balance between them. Several mechanisms have been suggested to demonstrate the early stage of the biological processes, including Bcl-2-controlled irreversible commitment to death before so-called execution phase [1], the disruption of the inner mitochondrial transmembrane potential [2], and alteration of pH regulation mediated by mitochondria [3].

In establishment of the mammalian immune system, the apoptotic cell death is a critical process for individuals to recognize only foreign antigens. During the development of the individual, T-cell pre-

cursors in thymus undergo a complex series of differentiation steps involving the expression of two accessory molecules, called CD4 and CD8, on the cell surface, and the rearrangements of T-cell receptor (TCR) gene in the nucleus. CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> (double positive) T-cell precursors expressing low level of TCR are subjected to both positive and negative selection events [4]. Positive selection ensures the survival and differentiation of T-cells capable of recognizing a foreign antigen in the context of self-major histocompatibility complex (MHC), whereas negative selection events eliminate immature T-cell precursors expressing TCRs reacting with self-antigen by the induction of programmed cell death, apoptosis. It was demonstrated for the extracellular and cell surface events that the avidity of the interaction between their TCR and the MHC/peptide complex determines the fates of T-cell precursors for positive or negative selection [5,6]. However, the precise intracellular signaling pathway for these events is not fully understood at present.

\*Corresponding author. Tel.: +81-298-645-050; fax: +81-298-648-558.

One of the general questions on the regulation of the apoptosis mechanism is what intracellular event(s) irreversibly commit the cell to die? It is also important to understand how signals elicited by diverse apoptosis-related proteins become integrated to initiate commitment to death.

## 2. Construction of a cell-free system reproducing apoptosis

The construction of a model system is the initial step to understand such a complicated biological process. Cell-free systems that essentially reproduce all of the changes seen in intact nuclei during apoptosis of T-cell precursors have been described [7–10]. It was demonstrated that engaging the CD3/

TCR complex of immature mouse T-cell precursors with anti-CD3 antibody produces DNA degradation and cell death through the endogenous pathway of apoptosis [11,12]. We also found that intraperitoneal injection of anti-CD3 antibody induced apoptosis of cortical T-cell precursors.

Fig. 1 illustrates a cell-free system from the extract of T-cell precursors to reconstitute the signaling-pathway that induces apoptosis in T-cell precursors [13]. After the anti-CD3 was injected into peritonea of mice, T-cell precursors were isolated and disrupted to obtain the cell extract. The extract was incubated with nuclei isolated from liver of other normal mice. The incubation induced shrinkage of the nuclei, condensation of chromatin masses, and DNA degradation in the nuclei, observations which directly reflect the apoptotic cell death [13]. These

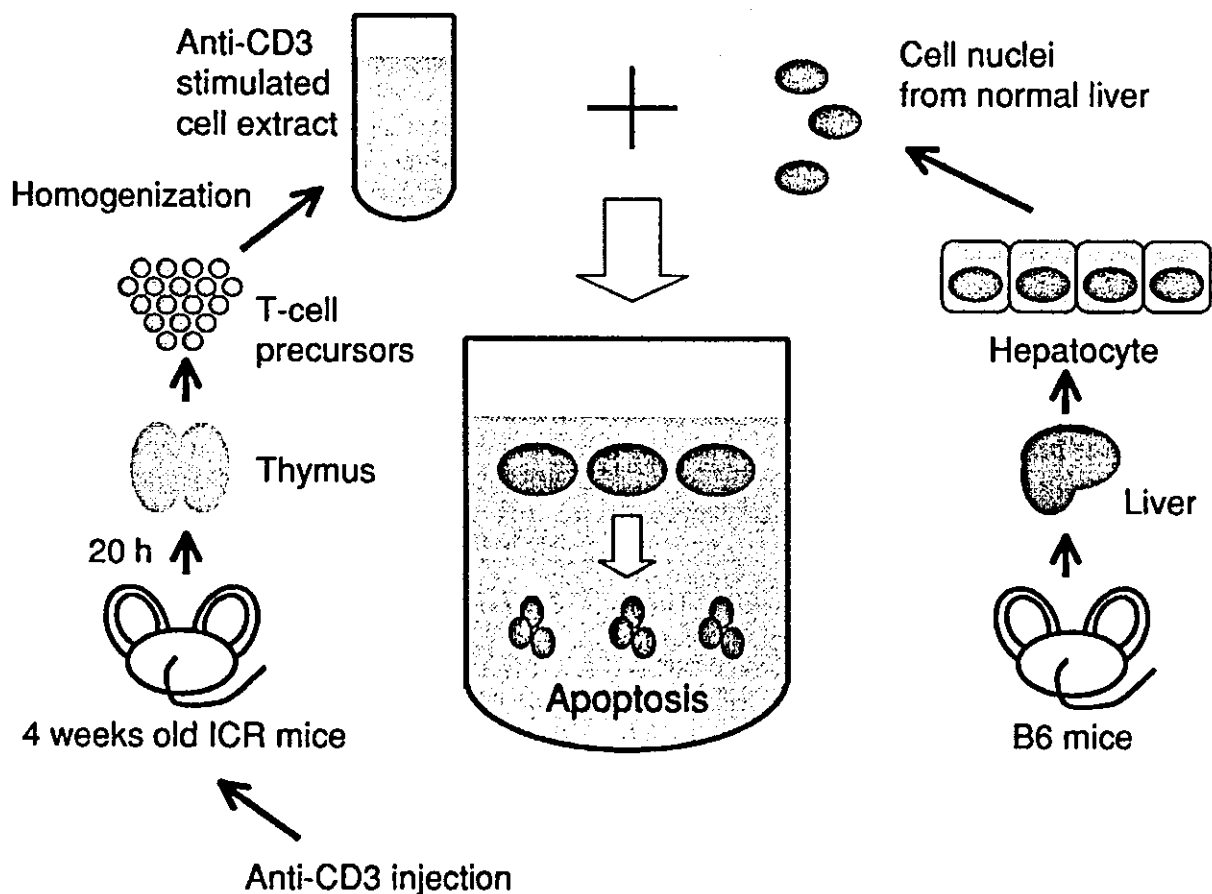


Fig. 1. Schematic representation of reconstitution of a cell-free system reproducing the changes seen in intact nuclei during apoptosis [13].

results indicate that our newly established cell-free system may reconstitute the phenomena of the death-signaling pathway of the negative selection of immature T-cell precursors *in vitro*.

### 3. Subcellular localization of apoptosis-inducing activity

The next question is in which subcellular organelles key components responsible for apoptosis-induction are localized. We separated the apoptotic cell extract by use of conventional differential centrifugation. The microsomal fraction and the high molecular mass soluble cytosolic fraction in the cell extract of anti-CD3-stimulated T-cell precursors induced DNA fragmentation in the nuclei, as found in anti-CD3-stimulated cell extract [13].

In some cases, conventional cell fractionation using a centrifuge with stepwise increasing gravity is effective to condense the protein components localized in specific organelle(s) as well as to confirm the localization of the specific biological activities. For example, when whole cell extracts are subjected to separation with two-dimensional electrophoresis (2-DE), it is difficult to identify key proteins responsible for the activity and to detect quantitative regulation of the proteins on the 2-DE gel, because such molecules exist generally in low abundance in cells. "Cell map" proteomics, focused on the localization study of a protein component, is one of the key areas in proteome research [14].

### 4. Differential display of protein expression using 2-DE gels

Without anti-CD3-stimulation, no nuclear DNA fragmentation activity was found in any fractions of the cell extract from mouse T-cell precursors. Difference of protein composition between subcellular fractions with and without stimulation by anti-CD3 should reflect the differential protein regulation by signals through TCR. Both high molecular mass cytosolic fractions from T-cell precursors with and without stimulation by anti-CD3 were compared on protein composition by 2-DE gel staining patterns (Fig. 2). After desalting with cold ethanol and

acetone and dissolving with 2-DE sample buffer, both cytosolic fractions were subjected to 2-DE. 2-DE separation was carried out according to conventional methods using Immobiline DryStrip (pH 3–10, linear gradient) for the first dimensional isoelectric focusing [15]. A total of 10 spots were observed to have significant differences on their spot intensity between both silver-stained gels. These protein spots were excised from the 2-DE gels and subjected to in-gel tryptic digestion [16], followed by analysis of the resultant peptide fragments by nanoliquid chromatography (nanoLC)/nanoelectrospray (nanoESI)/ion trap mass spectrometry (MS) to identify the protein spots. Table 1 summarizes the results of identification [13].

#### 4.1. Up-regulated proteins

The HMG2 protein was identified from four up-regulated spots (Table 1). HMG2 is one of the high mobility group proteins that associates with chromosomal DNA and induces extreme bending [17]. HMG proteins have also been observed to stimulate V(D)J cleavage by binding of RAG1 and RAG2 [18], and bind with high affinity to cisplatin-damaged DNA [19]. Toh et al. [20] reported that HMG2 enhanced the nuclease activity of DFF. We demonstrated, in apoptotic T-cell precursors, that the HMG2 was increased in the cytosolic fraction. It was also shown that the cytosolic fraction of TCR-stimulated T-cell precursors had strong nuclear DNA fragmentation-inducing activity. It is possible that the HMG2 protein is induced in cytosol by TCR-signaling and enhances the nuclease activity.

The multiple spot distribution of HMG2 may be due to the post-translational modification(s).

#### 4.2. Down-regulated proteins

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is responsible for glycolysis in cytosol. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 is one of the proteins involved with pre-mRNA processing [21]. To date, the relationship between downregulation of both proteins and apoptosis induction is not clear.

Fig. 3 shows a possible pathway leading to apoptotic DNA fragmentation, expected from our studies and reports of other groups.

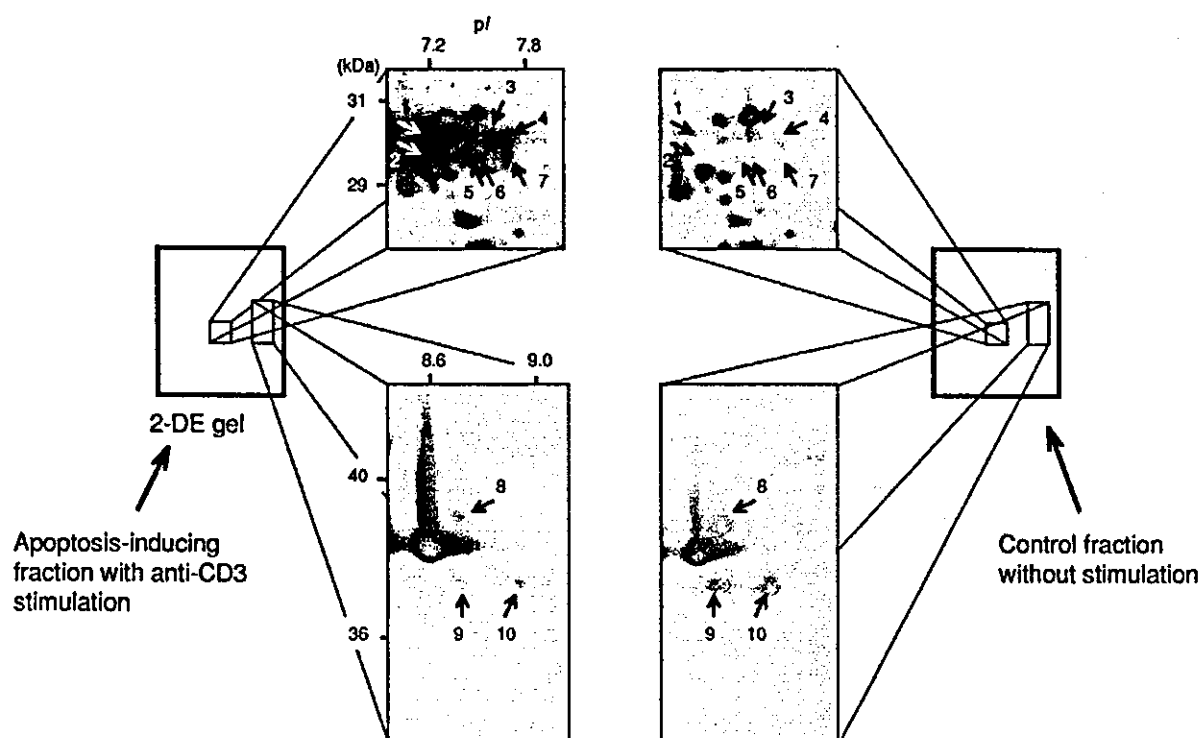


Fig. 2. Pattern comparison of 2-DE gels from both cytosolic fractions of T-cell precursors with and without anti-CD3 stimulation. This figure shows two regions of the 2-DE gels, in which protein spots with arrows were subjected to the identification process as shown in the text.

Table 1  
Identified cytosolic proteins up- or down-regulated by the external stimulation of anti-CD3 antibody

Protein name	Spot no. <sup>a</sup>	pI/Mr (kDa)		Database accession number
		2-DE spot position	Deduced values from amino acid sequence	
<b>Up-regulated proteins</b>				
High mobility group protein HMG2 (four spots)	1	7.23/30.3	7.05/24.031	P30681 (SWISS-PROT)
	2	7.20/29.5		
	3	7.58/30.2		
	4	7.72/30.2		
<b>Down-regulated proteins</b>				
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (one spot)	8	8.70/39.0	8.45/35.679	P16858 (SWISS-PROT)
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (two spots)	9	8.71/36.8	8.67/35.993	AF073993 (GenBank)
	10	8.93/36.8		

<sup>a</sup> Spots 5, 6 and 7 were not identified.

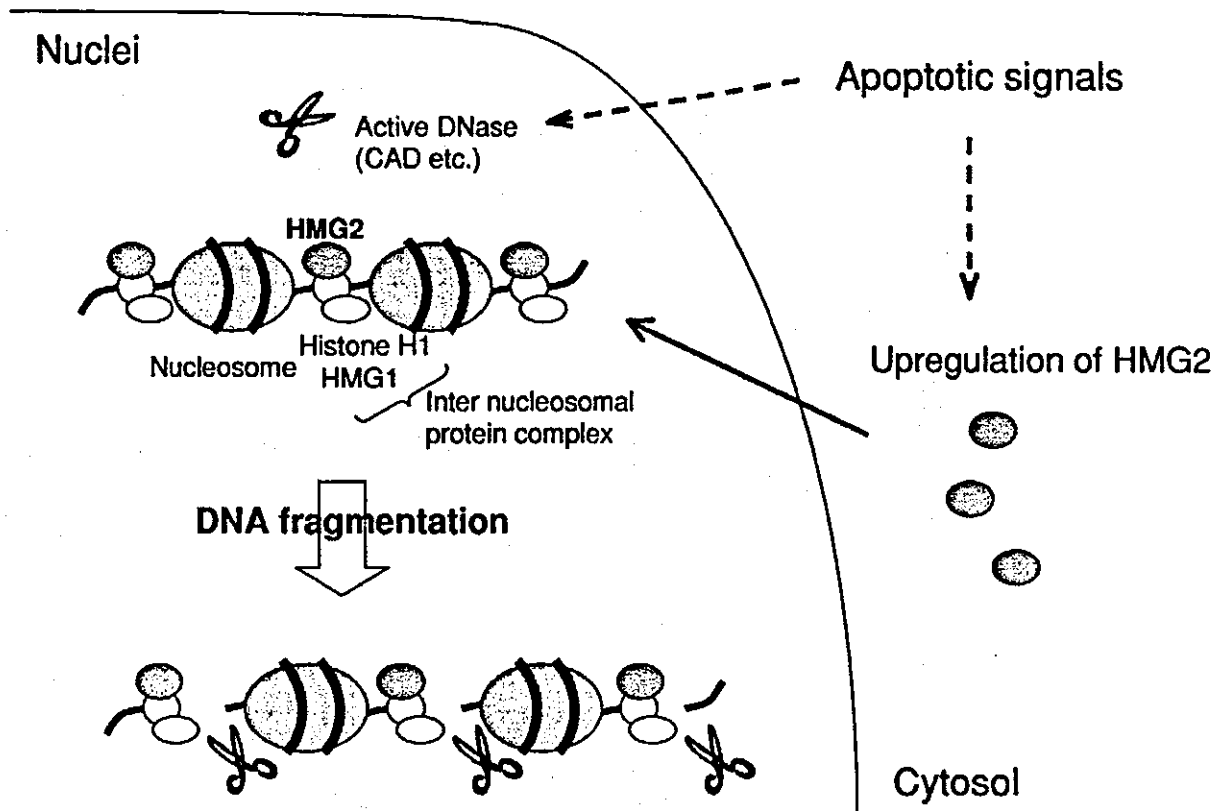


Fig. 3. Possible relationship between upregulation of HMG2 proteins in the cytosol and apoptotic DNA fragmentation in the cell nuclei.

## 5. Technical aspects on proteomics

At present proteomics usually uses 2-DE for protein separation, followed by analysis of the separated proteins by MS. It enables the comparison of subsets of expressed proteins among samples. 2-DE separates thousands of proteins on the polyacrylamide gel matrix according to their size and charge. Since O'Farrell [22] developed it and immobilized pH gradient (IPG) gel was introduced to the first dimension [15], 2-DE has been a useful technique with the highest resolution to survey protein expression and posttranslational modifications in cells or tissues. As shown above, proteomics is usually initiated by comparing protein compositions in an affected phase with those in a control one, in order to find proteins specifically up-regulated, down-regulated or structurally changed correlating to the affection [23].

In proteome analysis today, mass spectrometry is essential for high throughput and accurate detection/identification of proteins and it has opened a "digital" world in experimental biology. Many issues, including sensitivity, coverage of peptides in a protein, quantification in expression rate, and post-translational modifications such as phosphorylation, glycosylation and truncation, can be studied relating to the current proteomic mass spectrometry [24].

After the electrophoresis, proteins separated on the 2-DE gel are stained with silver nitrate or fluorescent dyes, which are currently the most sensitive detection methods. Protein spots that are different in the affected phase compared with the control phase are excised from the 2-DE gels. Excised protein spots are subjected to in situ digestion by a specific protease, usually trypsin [15]. Peptide mixtures resulting from the in-gel tryptic digestion are subjected to on-line nanoLC coupled with nanoESI/ion-trap

MS and MS/MS. The obtained peptide mass and peptide ion fragment data are searched against protein sequence databases, SWISS-PROT, PIR etc.

Proteins in a gel piece are unambiguously and simultaneously identified from peptide mass data and amino acid sequence information in the peptide ion fragments resulting from the MS/MS analysis of peptides continuously eluted from nanoLC [25].

#### 6. Limitation of the current proteomic approach using 2-DE

However, 2-DE does not display all cellular proteins partially due to poor solubility of many hydrophobic proteins, especially membrane proteins, in the current 2-DE sample buffers. Moreover, its drawbacks include its low loading capacity, being time consuming and very labor intensive [26].

Several low abundant proteins that appear at the extremely early stage of affection may be localized and related to intrinsic functions. They seem to play key roles upstream of the signal transduction pathways regarding affection. These proteins may be hidden under house-keeping proteins of huge abundance or simply not be detectable on the 2-DE gel. The detection limit is around 5 ng by fluorescent dye or silver nitrate, currently the most sensitive staining methods. One can easily imagine that those proteins are located in “white” areas on the 2-DE gel display or overlap with abundant protein spots.

On the protein solubility, protein profiling can be improved by the combination of one-dimensional sodium dodecylsulfate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and the above nanoLC/nanoESI/MS/MS [27]. Prior to electrophoresis, most proteins extracted from tissue or cell samples are dissolved and denatured in the sample buffer by the strong anionic detergent, SDS. After the electrophoresis gel is cut into slices, and peptide mixtures resulting from in-gel tryptic digestion of each slice are subjected to on-line nanoLC/MS/MS to identify authentic proteins. SDS–PAGE has been widely used for protein separation and molecular mass estimation [28], as its easy handling allows most proteins, including hydrophobic ones, to be successfully applied. These advantages mean that the combination of SDS–PAGE fractionation and nanoLC/MS/MS analysis provides a useful alternative to conventional

2-DE-based techniques. The strategy improves the identification of hydrophobic membrane proteins impossible to analyze by use of 2-DE.

#### 7. Other approaches to the apoptotic signal transduction pathway

Many investigators reported on the signaling pathway or molecules responsible for positive selection or negative selection of T-cell precursors. ZAP-70, one of the protein tyrosine kinases that is involved in the activation of T lymphocytes, was reported to be essential for both positive and negative selection [29]. It was also demonstrated that the Ras/MAP kinase pathway and the calcineurin pathway is necessary for positive selection, but not for negative selection [30–33]. An obvious interpretation emerging from these studies is that events proximal to the TCR may be needed for both positive and negative selection, but that other events further downstream of the TCR may determine the outcome of receptor engagement.

#### 8. Conclusions and future perspectives

We have established, for the first time as far as we know, a novel cell-free system in which extract of T-cell precursors that received signals through TCR molecules induces apoptotic morphological changes and DNA fragmentation in the naked nuclei.

Several proteins regulated differentially in the cytosol of T-cell precursors by a signal from TCR were identified by introduction of proteomic techniques. Such protein molecules responsible for signal transduction through cell membranes or between cells are generally few in number. Conventionally, the active fraction can be further subjected to fractionation with several steps of column-separation in order to purify the molecule(s) responsible for the activity. However, these purification procedures may cause considerable loss of the target protein(s). In the proteomics approach, it may be possible to perform all-inclusive screening of protein differential regulation and structural changes such as phosphorylation and glycosylation without loss of the proteins dissolved in the sample buffer for 2-DE separation. Moreover, using nanoLC/nanoESI/MS/MS for micro-



characterization leads to high throughput protein screening and identification. Using these techniques, several proteins were observed to be up- or down-regulated by the signals from the TCR, and an apoptosis-related HMG2 protein was identified. Although current proteomic techniques using 2-DE gels have several limitations to be overcome as shown above, the present approach is potentially useful to understand the protein regulation in the intracellular signaling pathway leading to apoptosis as well as identification of key protein(s) for apoptosis-induction.

Several proteome profiling methods, the gel-based one as shown above or a chromatography-based one [34], can be alternatives to 2-DE. Application of these to the present study may be useful for further characterization and isolation of molecules responsible for the death-signaling pathway in the self-destructive autoreactive T lymphocytes.

## 9. Nomenclature

2-DE	two-dimensional electrophoresis
MHC	major histocompatibility complex
MS	mass spectrometry
NanoESI	nano-electrospray ionization
NanoLC	nanoliquid chromatography
TCR	T-cell receptor

## References

- [1] G.J. Griffiths, L. Dubrez, C.P. Morgan, N.A. Jones, J. Whitehouse, B.M. Corfe, C. Dive, J.A. Hickman, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 903.
- [2] L. Schild, R.M. Matthias, A. Stanarius, G. Wolf, W. Augustin, W. Halangk, *Mol. Cell. Biochem.* 195 (1999) 191.
- [3] S. Matsuyama, J. Liapis, Q.L. Deveraux, R.Y. Tsien, J.C. Reed, *Nat. Cell. Biol.* 2 (2000) 318.
- [4] H. von Boehmer, P. Kisielow, *Science* 248 (1990) 1369.
- [5] E. Sebzda, V.A. Wallace, J. Mayer, R.S. Yeung, T.W. Mak, P.S. Ohashi, *Science* 263 (1994) 1615.
- [6] P.G. Ashton-Rickardt, A. Bandeira, J.R. Delaney, L. Van Kaer, H.P. Pircher, R.M. Zinkernagel, S. Tonegawa, *Cell* 76 (1994) 651.
- [7] Y.A. Lazebnik, S. Cole, C.A. Cooke, W.G. Nelson, W.C. Earnshaw, *J. Cell Biol.* 123 (1993) 7.
- [8] D.D. Newmeyer, D.M. Farschon, J.C. Reed, *Cell* 79 (1994) 353.
- [9] S.J. Martin, D.D. Newmeyer, S. Mathias, D.M. Farschon, H.G. Wang, J.C. Reed, R.N. Kolesnick, D.R. Green, *EMBO J.* 14 (1995) 5191.
- [10] M. Enari, A. Hase, S. Nagata, *EMBO J.* 14 (1995) 5201.
- [11] C.A. Smith, G.T. Williams, R. Kingston, E.J. Jenkinson, J.J. Owen, *Nature* 337 (1989) 181.
- [12] Y.F. Shi, R.P. Bissonnette, N. Parfrey, M. Szalay, R.T. Kubo, D.R. Green, *J. Immunol.* 146 (1991) 3340.
- [13] T. Kawakami, T. Nagata, A. Muraguchi, T. Nishimura, *Electrophoresis* 21 (2000) 1846.
- [14] A.W. Bell, M.A. Ward, W.P. Blackstock, H.N.M. Freeman, J.S. Choudhary, A.P. Lewis, D. Chotai, A. Fazel, J.N. Gushue, J. Paiement, S. Palcy, E. Chevet, M. Lafreniere-Roula, R. Solari, D.Y. Thomas, A. Rowley, J.J.M. Bergeron, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 5152.
- [15] A. Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss, *Electrophoresis* 21 (2000) 1037.
- [16] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850.
- [17] T.T. Paull, M.J. Haykinson, R.C. Johnson, *Genes Dev.* 7 (1993) 1521.
- [18] D.C. Van Gent, K. Hiom, T.T. Paull, M. Gellert, *EMBO J.* 16 (1997) 2665.
- [19] J.E. Cryer, S.W. Johnson, B.N. Engelsberg, P.C. Billings, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38 (1996) 163.
- [20] S.Y. Toh, X. Wang, P. Li, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (1998) 598.
- [21] <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez>
- [22] P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007.
- [23] T. Kawakami, T. Nishimura, *J. Clin. Exp. Med.* 196 (2001) 428.
- [24] T. Nishimura, T. Kawakami, Y. Maruyama, Y. Fujita, *Genes Med.* 4 (2000) 617.
- [25] T. Kawakami, F. Usui, T. Nishimura, *Jpn. J. Electrophoresis* 44 (2000) 185.
- [26] T. Kawakami, H. Anyoji, T. Nishimura, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 50 (2002) 135.
- [27] T. Kawakami, H. Anyoji, Y. Kasahara, N. Ogasawara, K.D. Nugent, F. Usui, Y. Bando, T. Nishimura, in: *Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2001*, WPI178.
- [28] U.K. Laemmli, *Nature* 277 (1970) 680.
- [29] I. Negishi, N. Motoyama, K. Nakayama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A.C. Chan, D.Y. Loh, *Nature* 376 (1995) 435.
- [30] J. Alberola-Ila, K.A. Forbush, R. Seger, E.G. Krebs, R.M. Perlmutter, *Nature* 373 (1995) 620.
- [31] J. Alberola-Ila, K.A. Hogquist, K.A. Swan, M.J. Bevan, R.M. Perlmutter, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 9.
- [32] K.A. Swan, J. Alberola-Ila, J.A. Gross, M.W. Appleby, K.A. Forbush, J.F. Thomas, R.M. Perlmutter, *EMBO J.* 14 (1995) 276.
- [33] C.R. Wang, K. Hashimoto, S. Kubo, T. Yokochi, M. Kubo, M. Suzuki, K. Suzuki, T. Tada, T. Nakayama, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 927.
- [34] T. Kawakami, H. Anyoji, T. Nishimura, *Proteome Digest*, Fall issue (2002) 14.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ハイビジョン立体映像技術を応用した細隙灯顕微鏡観察システムの開発

分担研究者 野田 徹 独立行政法人国立病院機構東京医療センター眼科  
臨床研究センター（NISO）リハビリテーション研究部  
共同研究者 望月 亮 NHKエンジニアリングサービス主幹  
春畑裕二 NISO リハビリテーション研究部 視覚障害研究室  
秋山邦彦 NISO リハビリテーション研究部 視覚障害研究室

研究趣旨：

細隙灯顕微鏡眼底観察法を応用したステレオ動画インドシアニンググリーン（ICG）眼底造影法を考案した。細隙灯顕微鏡（SL-D7, Topcon）の照明系に着脱式 ICG 励起フィルター、撮影系に濾過フィルターを設置し、ICG 静注後、前置レンズ（VOLK）を用いて幅広スリット照明による眼底観察を行った。手動 on-off 式ビデオ撮影用ビームスプリッターを 10:0 の全反射鏡に変更した上で 2 台の赤外高感度 TV カメラ（XC-EI50, SONY）を設置し、外部同期してステレオ映像出力した。左右の映像信号をハイビジョン映像 1 画面に合成した上でハイビジョン立体視ビューワーシステム（望月システム）で観察した。さらに 2 台の TV カメラの白黒信号の一方を緑信号、他方を赤信号として IMAGEnet2000 動画システムに入力し、両信号を合成表示して得られた動画映像を赤緑眼鏡を装着して立体観察を行った。正常眼において、視神経乳頭、網膜脈絡膜血管の動画 ICG 造影所見がリアルタイムで立体的に観察され、眼底周辺部までの良好な観察映像が得られた。望月式 HDTV 立体視ビューワーシステムは、自然な立体視という点で特に有用であった。本法では ICG 眼底造影所見を立体動画映像として観察でき、今後臨床面においては加齢黄斑変性症をはじめとする眼底疾患の検査診断に、また研究面においては加齢黄斑変性症動物モデルの眼底観察・撮影記録などに広く活用されることが期待される。

A. 研究目的

脈絡膜血管造影による血管形態の解析は、加齢黄斑変性症の診断の基本であり、また本症の病態解明にとっても重要である。近年、インドシアニンググリーン（以下、ICG）蛍光造影法が脈絡膜血管の造影に最も適した方法論であることが広く認識され、その普及により病態の解明がすすめられているが、現在の ICG 造影は CCD カメラや SLO による 2 次元的な撮影法に限られる。しかし、網脈絡膜血管の立体構築を描出するには 3 次元撮影が望ましい。そこで今回われわれは、細隙灯顕微鏡と前置レンズを用いた立体眼底観察法を応用し、ステレオ動画 ICG 造影を考案したので報告する。

B. 研究方法

細隙灯顕微鏡（SL-D7, Topcon）の照明系に着脱式 ICG 励起フィルター、撮影系に濾過フィルターを設置し、ICG 静注後、前置レンズ（VOLK）を用いて幅広スリット照明による眼底観察を行った。手動 on-off 式ビデオ撮影用ビームスプリッターを 10:0 の全反射鏡に変更した上で 2 台の赤外高感度 TV カメラ（XC-EI50, SONY）を設置し、外部同期してステレオ映像出力した。

立体観察は以下の 3 つの異なる方法で行った。

1) 左右の映像信号をハイビジョン映像 1 画面に合成した上でハイビジョン立体視ビューワーシステム（望月システム）で観察する。

2) 左右の映像信号(白黒信号)の一方を緑信号、他方を赤信号としてIMAGEnet2000 動画システムに入力し、両信号を合成表示して得られた動画映像を赤緑眼鏡を装着して立体観察を行う。

3) 左右の映像信号をレンダリングし、シャープ社製3D液晶モニターを用いて立体観察を行う。

<倫理面への配慮>

細隙灯顕微鏡および眼底観察用の前置レンズは臨床で一般に用いられているものであり、さらに眼底観察においては、光障害の発生が生じないように連続した同一部位の観察時間は最短時間とした。被検者には、実験に関する詳細な内容を理解いただいた上でのインフォームドコンセントを得て観察を実施した。

### C. 研究結果

正常眼における検査において、本法により網脈絡膜血管の ICG 造影所見が立体的に観察できることが確認でき、黄斑変性症患者での検査では、脈絡膜新生血管やポリープが脈絡膜中大血管レベルより網膜側に突出して観察された。また、今回用いたいずれの立体観察の方法を用いても、良好な立体視が得られることが確認された。特にハイビジョン立体ビューワーシステムは、リアルタイム観察が可能で、きわめて自然な立体観察が行えた。3D液晶モニターは、専用眼鏡を必要とせず立体観察が可能であるが、立体観察を可能とするために、モニター解像度が1/2に低下することが欠点であった。

### D. 考察

網膜硝子体疾患の診療の基本は詳細な眼底観察にあり、さまざまな眼底観察システムが開発されている。生体顕微鏡を用いた組織観察には、接眼レンズ光学系を介しての肉眼的な観察系とCCDをはじめとする光学素子を介して画像をディスプレイに表示して観察する系とが考えられる。従来、近年、画像工学技術領域においては、肉眼よりも低照度で観察可能な高解像度の映像システムが既に実用段階として開発されており、手術および診断技術としての手術顕微鏡眼底観察の基本形態が肉眼から映像系へ移行する可能性が現実的なものとなった。今回開発した立体動画 ICG 造影システムは、細隙灯顕微鏡の立体映像観察システムを応用したものであり、正常眼における検査では網脈絡膜血管の ICG 造影所見が立体的に観察できることが確認され、黄斑変性症患者での検査では、脈絡膜新生血管やポリープが脈絡膜中大血管レベルより網膜側に突出して観察されることが確認できた。

ハイビジョン立体ビューワー観察法では、左右の映像信号をハイビジョン映像1画面に合成して表示し、両眼にベースアウトに設置した2つのプリズムにより左目には左のカメラからの映像が、右目には右のカメラからの映像を見ることにより、立体観察が可能としている。この方法では撮影中にリアルタイムで観察することができ、また、自然な立体感が得られることも特長と考えられた。しかし、ハイビジョンに関する特別な機器整備を要することが一般検査として行う上では問題となる。今後のハイビジョン映像機器の普及とそれに伴う設備のローコスト化が期待される。

赤緑信号を使った立体観察法は、左右のカメラからの白黒信号をカラー映像機器のRedとGreenの端子へ入力することにより、左右の白黒信号はそれぞれ赤と緑に変換され1画面に合成されて出力されるため、赤緑眼鏡を装着して観察することにより、立体観察を可能とするものである。本法は、IMAGEnetによる電子記録システムを整備している施設では、赤緑眼鏡という特殊な観察系ではあるが、詳細な立体観察が可能であり、臨床診断上も有用な方法となりえると考えられた。

シャープ製の3D液晶モニターシステムは、専用眼鏡や特殊なビューワーを必要とせずモニター画像をそのまま正面から見ることにより3D観察が可能とするシステムである。このモニターは液晶内の視差バリアにより左目に見える画素と右目にみえる画素を分離し、視差をつけた別の映像をみせることで立体視を可能にしている。また、切り替えにより、通常の2Dモニターとして使用することもできるため、前者と同様、電子記録システムを整備している施設では、本モニターを標準整備しておくことにより、そのまま日常診療においても臨床応用可能な方法となると考えられた。しかし、立体観察を可能とするために、モニター解像度が1/2に低下させているため、血管構築に関する詳細な観察にはやや不向きである点が欠点となることが考えられた。

### E. 結論

細隙灯観察システムを応用した ICG 立体動画造影法を開発した。正常眼における検査では網脈絡膜血管の ICG 造影所見が立体的に観察できることが確認され、黄斑変性症患者での検査では、脈絡膜新生血管やポリープが脈絡膜中大血管レベルより網膜側に突出して観察されることが確認できた。3種類の異なる立体観察法を用いてみたところ、いずれの立体観察の方法でも、良好な立体視が得られた。今後、本シス

テムは、臨床面においては、加齢黄斑変性症をはじめとする眼底疾患の検査診断に、また研究面においても、加齢黄斑変性症動物モデルの病態観察・撮影記録などに広く活用されることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

2004年度 学会発表

[海外]

- 1) M.A. Gotoh, T. Tachikawa, M. Matsubara, M. Shibutani, K. Kobayashi, G. Takeuchi, K. Negishi, K. Ohnuma, K. Ohno, T. Noda: Objective Optical Function Evaluation in a Child with Crystalline Lens Dislocation Using a Point Spread Function Analysis System. The Association for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)
- 2) Y. Harutata, K. Akiyama, K. Ohno, Y. Fukuma, N. Kitajima, Y. Okazaki, H. Aeba, K. Nishio, K. Negishi, K. Ohnuma, T. Noda: Evaluation of the Quality of Macular Fundus Images Seen during Vitreous Surgery through Plano-Concave Contact Lenses Using a Surgical Microscope. The Association for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)
- 3) K. Ohno, M. Shibutani, K. Kobayashi, G. Takeuchi, K. Negishi, K. Ohnuma, T. Noda: Simulation of Retinal Images in an Eyes with Keratoconus with Asymmetric Aberrations Using the Point Spread Function Analyzer. . The Association for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)
- 4) T. Noda, K. Ohno, Y. Fukuma, N. Kitajima, Y. Okazaki, H. Aeba, T. K. Nishio, K. Negishi, K. Ohnuma. Efficacy of a Variable Aberration Correction Surgical Microscope System in Improving the Quality of Peripheral Fundus Images Seen during Vitreous Surgery through Prism-Type Contact Lenses. The Association for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)
- 5) T. Tachikawa, I. Goto, M. Matsubara, T. Nishio, T. Haraguchi, T. Hayashi, Y. Fukuma, K. Negishi, K. Ohnuma, K. Ohno, T. Noda: Study on Age-Specific Refraction Values and Amounts of Accommodation Using a Simultaneous Binocular Autorefractor. The Association

for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)

6) T. Nishio, T. Haraguchi, T. Hayashi, Y. Fukuma, T. Tachikawa, I. Goto, M. Matsubara, K. Negishi, K. Ohnuma, K. Ohno, T. Noda. Study of Subjective Refraction Values Obtained Using Simultaneous Binocular Subjective (Patient-Assisted) Autorefractor. The Association for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)

7) K. Negishi, K. Ohnuma, K. Kobayashi, M. Shibutani, G. Takeuchi, N. Ohno, T. Noda: Evaluation of Retinal Image Quality in an Eye with a Multifocal Intraocular Lens Using a New Point Spread Function Analysis System. The Association for Research in Vision and Ophthalmology :2004 Annual meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA, 2004 (April 25-29)

8) T. Noda, K. Negishi, K. Ohno, K. Ohnuma, K. Tanioka, R. Mochizuki, M. Yoshida, K. Tatsuoka, K. Miyake: Simulated Images of Edge Glare Phenomena in Pseudophakic Eyes Visualized Experimentally Using a Highly Sensitive Camera. American Academy of Ophthalmology & European Society of Ophthalmology, 2004 Joint Meeting, New Orleans, LA, USA, 2004 (October 23-26)

[国内]

1) 春畑裕二、秋山邦彦、大野建治、望月 亮、岡崎芳郎、饗庭秀剛、福間康文、大沼一彦、龍岡光一、三宅謙作、野田 徹 : 細隙灯頭微鏡ステレオ動画 ICG 眼底造影法. 第 21 回日本眼循環学会総会、於旭川、2004 (7月16日)

2) 野田 徹、秋山邦彦、春畑裕二、大野建治、三宅謙作、龍岡光一、望月亮、根岸一乃、岡崎芳郎、福間康文、大沼一彦 : 細隙灯頭微鏡観察映像の立体視ビューワーによる観察法. 第 108 回日本学科学会総会、於東京、2004 (4月15日~18日)

3) 大野建治、野田 徹、根岸一乃、渋谷雅博、竹内 楽、小林克彦、大沼一彦 : PSF アナライザーによる円錐角膜症例の網膜像シミュレーション. 第 108 回日本学科学会総会、於東京、2004 (4月15日~18日)

4) 春畑裕二、野田 徹、秋山邦彦、大野建治、饗庭秀剛、岡崎芳郎、北島延昭、福間康文、根岸一乃、大沼一彦 : 硝子体手術における手術顕微鏡を用いた黄斑部眼底観察像の光学的評価. 第 108 回日本学科学会総会、於東京、2004 (4月15日~18日)

5) 小淵輝明、島田洋臣、宇野憲治、渋谷雅博、小林克彦、大沼一彦、野田 徹：PSFアナライザーを用いた2焦点HCL装用眼の網膜像シミュレーション。第46回日本コンタクトレンズ学会総会、於札幌、2004(7月9日~11日)

6) 太刀川貴子、後藤郁子、松原正男、西尾幸治、福岡康文、根岸一乃、大野建治、野田徹：両眼同時自覚他覚検眼装置における屈折値および調節量の左右差の検討。第60回日本弱視斜視学会総会・第29回日本小児眼科学会総会合同学会。於沖縄、2004(6月18日、19日)

7) 饗庭秀剛、岡崎 芳郎、西尾 幸治、福岡 康文、春畑 裕二、秋山 邦彦、大野 建治、根岸 一乃、大沼 一彦、野田 徹：収差補正システムを用いた手術用顕微鏡観察像の評価。第40回日本眼光学学会・第19回眼科ME学会合同学会総会。於横浜、2004(9月11日、12日)

8) 渋谷雅博、竹内 楽、小林克彦、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹：PSF解析装置での位相回復による網膜像シミュレーション。第40回日本眼光学学会・第19回眼科ME学会合同学会総会。於横浜、2004(9月11日、12日)

9) 小林克彦、渋谷 雅博、大沼 一彦、野田 徹：非対称性収差に関する位相情報の有無と眼球光学系特性との関係。第40回日本眼光学学会・第19回眼科ME学会合同学会総会。於横浜、2004(9月11日、12日)

10) 大野建治、根岸一乃、渋谷雅博、竹内楽、小林克彦、大沼一彦、野田 徹：乾燥によるドライアイの網膜像シミュレーションの経時的変化。第58回日本臨床眼科学会総会、於東京、2004(11月11日~14日)

11) 五嶋摩理、太刀川貴子、松原正男、渋谷雅博、小林克彦、竹内楽、根岸一乃、大沼一彦、大野建治、野田徹：PSF解析装置を用いた小児の水晶体偏位症例の眼光学特性と網膜像に関する客観的評価。第58回日本臨床眼科学会総会、於東京、2004(11月11日~14日)

<シンポジウム・教育講演その他>

1) 野田 徹：偽水晶体眼視機能と収差。第19回日本眼内レンズ屈折手術学会シンポジウム「波面光学の眼内レンズ・屈折矯正手術への応用」、第19回日本眼内レンズ屈折手術学会総会、於福岡、2004(6月25日~29日)

2) 野田 徹：PSF解析装置—その広い臨床応用の可能性。第58回日本臨床眼科学会ランチョンセミナー「PSFはオートレフを越えて行く」。オーガナ

イザー：大沼一彦、第58回日本臨床眼科学会総会、於東京、2004(11月11日~14日)

3) Toru Noda: PSF analyzer. TOPCON booth seminar in Academy of Ophthalmology & European Society of Ophthalmology, 2004 Joint Meeting, New Orleans, LA, USA, 2004 (October 23-26)

#### 論文

1) 野田 徹：視覚光学の科学。医療:58(9) 493-498, 2004

2) 石井和彦、大沼一彦、根岸一乃、大野健司、野田 徹：水晶体の波面収差解析方法。視覚の科学 第25巻 第3号(2005)

3) 櫻井美晴、林康司、尾羽澤実、春畑裕二、秋山邦彦、細田ひろみ、大野建治、野田徹、山田昌和、田中靖彦：内眼手術術前患者の結膜囊細菌叢のレボフロキサシン耐性率。あたらしい眼科:22(1)97-100, 2005

4) Kazuno Negishi, Kazuhiko Ohnuma, Takashi Ikeda, Toru Noda, : Visual Simulation of Retinal Images through a Decentered Monofocal and a Refractive Multifocal Intraocular Lens. Japanese Journal Ophthalmology (in press)

#### 著書

1) 野田 徹：網膜硝子体疾患—スリットランプ。眼科検査ガイド p544-557。眼科診療プラクティス編集委員編、文光堂、東京、2004年11月18日

2) 野田 徹：網膜硝子体疾患—無赤色眼底検査。眼科検査ガイド p558-559。眼科診療プラクティス編集委員編、文光堂、東京、2004年11月18日

3) 野田 徹、秋山邦彦、谷瑞子：眼。手術術式の完全解説 p60-95。谷昌尚・寺島裕夫編、医学通信社

4) 野田 徹：眼球突出。今日の治療指針。p1006, 山口徹, 北原光男編, 医学書院 東京, 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

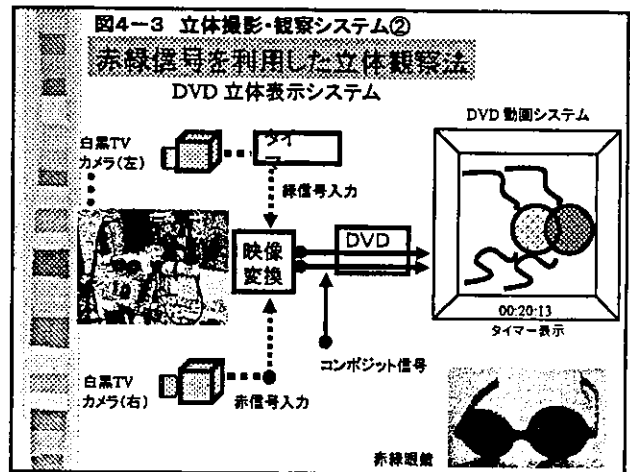
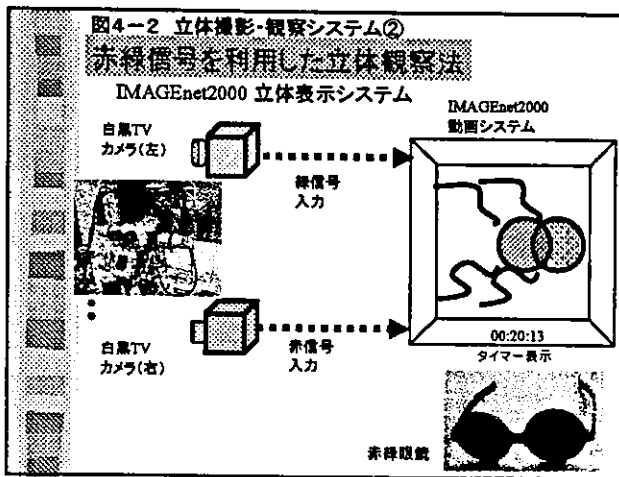
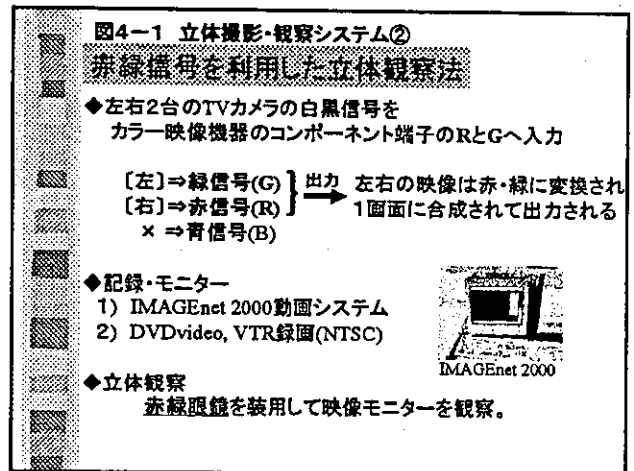
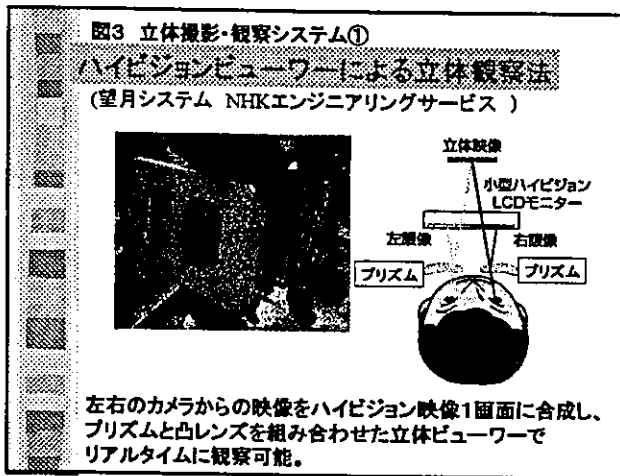
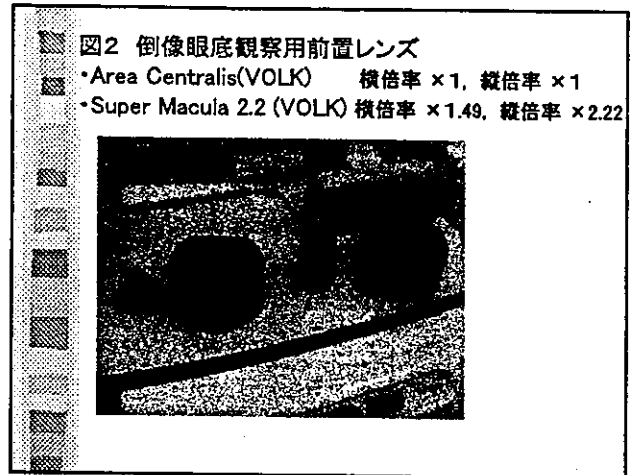


図5-1 立体撮影・観察システム③

3D液晶モニターを利用した立体観察

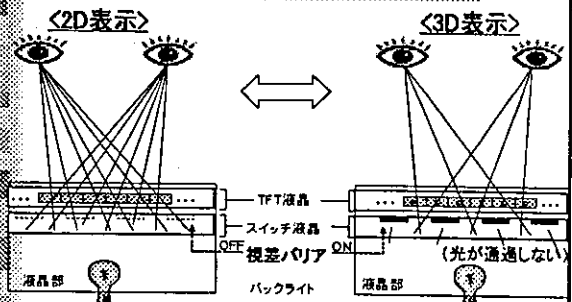
3D液晶モニター(SHARP)



- 3D液晶ディスプレイ
- 専用眼鏡は不要
- 2D/3D表示切替可能  
通常の2D液晶としても使用可能

図5-2 立体撮影・観察システム③

3D液晶モニターを利用した立体観察



液晶の画素に表示する映像の切り替えと、液晶内の視差バリアのON/OFFによって、2Dと3Dを切り替える

図6 立体撮影・観察システム③

3D液晶モニターを利用した立体観察

3D液晶モニター-IMAGEnet 2000動画システム

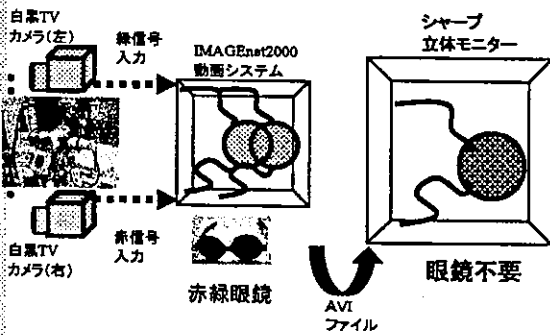
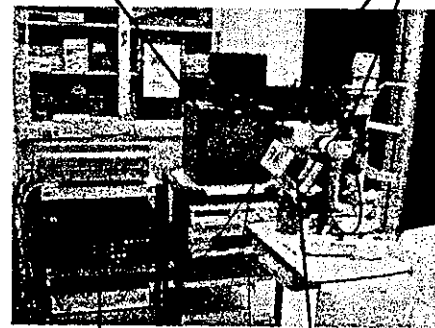


図7 ハイビジョン立体撮影・観察機器

TVモニター(撮影映像を確認) 赤外高感度カメラ



ハイビジョン記録装置 ハイビジョン立体ビューワー

原 著

## 水晶体の波面収差解析方法

石井和彦<sup>1)</sup>, 大沼一彦<sup>2)</sup>, 根岸一乃<sup>3)</sup>, 大野健司<sup>4)</sup>, 野田 徹<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>千葉大学大学院自然科学研究科, <sup>2)</sup>国立大学法人千葉大学工学部, <sup>3)</sup>慶應義塾大学医学部眼科学教室,

<sup>4)</sup>独立行政法人国立病院機構東京医療センター眼科

## Wavefront Aberration Analysis of Crystalline Lenses

Kazuhiko Ishii<sup>1)</sup>, Kazuhiko Ohnuma<sup>2)</sup>, Kazuno Negishi<sup>3)</sup>, Kenji Ohno<sup>4)</sup>, Toru Noda<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Chiba University Graduate School of Science and Technology,

<sup>2)</sup>National University Corporation Chiba University Faculty of Engineering,

<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine;

<sup>4)</sup>Department of Ophthalmology, National Hospital Organization Tokyo Medical Center

波面センサーにより眼球光学系の波面収差を測定し、また、角膜表面の形状計測データから角膜の波面収差を計算で求め、この二つのデータから眼球内部の収差解析の報告がある。眼球内部の光学特性は、角膜裏面、水晶体からなるので、それが一体となった解析である。ここでは、角膜表面の形状データに、角膜裏面の形状計測データを加えて波面収差解析を行うことで、水晶体のみの波面収差を求める方法を提案する。その方法は角膜表裏面を多項式近似し、波面センサーで得られた波面収差から光線の方向ベクトルを求め、その光線を水晶体の前面まで光線追跡し、その光路長から波面を求めるものである。この手法の精度を眼内レンズ挿入眼のデータで確認した。また、本手法を水晶体の情報が未知である有水晶体眼に適応した結果、角膜での乱視成分を水晶体が補正していることを確認した。

(視覚の科学 25: 71-77, 2004)

キーワード: 水晶体, 波面収差, 光線追跡, ゼルニケ多項式

Aberration analysis of the inner optical system of eye has been reported by using the data of wavefront sensor and the aberration analysis of the anterior surface of cornea, but crystalline lenses themselves has not yet been analyzed. Here, we propose a new method for the aberration analysis of crystalline lenses using the anterior and posterior shape of cornea and the wave front aberration of eye optics. In the method, polynomial expression approximation represents the cornea's shape. A number of rays obtained by wavefront differential are traced from the anterior surface of cornea to the crystalline lens. The accuracy of this method is tested by comparing the estimated data and the design data of intraocular lens (IOL) using eyes with IOL. Also, we show a result that the crystalline lens partially corrects the astigmatism of cornea.

(Jpn J Vis Sci 25: 71-77, 2004)

Key Words: Crystalline lenses, Wavefront aberration, Ray-tracing, Zernike polynomial

### 1. 緒 言

現在、波面センサーが眼球光学系の収差測定に利用されている。また、ビデオケラトスコブを用い

て角膜表面形状を測定し、角膜表面がもつ屈折力分布解析や、角膜表面の収差解析がなされている。この二つの収差解析から眼球光学系内部の収差解析をした報告がある<sup>1,2)</sup>。また、眼球光学系内部の解析に

別刷請求先: 263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33 国立大学法人千葉大学工学部メディカルシステム工学科 大沼一彦 (2004年11月22日受理)

Reprint requests to: Kazuhiko Ohnuma National Univ Corporation Chiba Univ Faculty of Engineering 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

(Received and accepted November 22, 2004)



は別の方法もある。それは、角膜前面での屈折をキャンセルする工夫をして、波面センサーで測定するものである。これらの方法で解析している光学特性は、角膜後面と水晶体である。

その報告のなかに、角膜前面の収差を眼球光学系内部が完全ではないが補正しているという結果がある。しかも、どの収差をも補正しているとの報告もある。また、加齢とともに補正されにくくなるようである。更に、波面センサーとビデオケラトスコプを使う実験では、照準線と瞳孔中心線のなす入角のズレが問題となり、収差解析に誤差があらわれることを指摘する報告もある。

前述したように、これらの報告では眼球光学系内部の収差解析であり、角膜後面の形状による特性から水晶体までを含めた評価方法である。ここでは、これらの報告とは異なり、水晶体のみの収差解析をする新しい方法を提案する。水晶体のみの波面収差解析が可能となれば、眼内レンズ（以下 IOL）挿入手術後におけるレンズの位置ズレ、傾きによって生じる波面の収差解析や、白内障初期で白濁前の屈折率の変化による波面収差の変化の測定などが行えるようになると考える。ここで提案する方法は視覚光学系の全波面収差、角膜前後形状のデータを用いて光線追跡を行い、水晶体の前面までの光路長から水晶体の前面での波面を求め、その収差解析を行う方法である。

## 2. 方 法

### 1) 波面センサーによる眼球光学系波面収差測定とゼルニケ多項式による表現

波面センサーを用いて眼球光学系全体の波面収差測定を行う。波面センサーでは、細いレーザー光を瞳孔中心から入射し、網膜中心から反射してくる光線をマイクロレンズアレイにより微小面ごとに結像させる。そしてその像の基準点からの移動量から眼の収差を求めることができる。この波面センサーで得られる眼の波面収差  $W(x, y)$  は、

$$W(x, y) = \sum_i C_i Z_i(x, y) \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $C_i$  はゼルニケ係数であり、 $Z_i(x, y)$  はゼルニケ多項式である。(1) 式は

$$W(x, y) = \sum_i C_i N_i Z_i(x, y) \quad \dots\dots\dots (2)$$

とあらわすこともできる。 $N_i$  は正規化定数で Optical

Society of America (OSA) より推奨されている<sup>6)</sup>が、ここでは、単純に各収差の大きさを知れば十分であるので (1) 式を使用した。また、ゼルニケ多項式は 4 次の項 ( $i=14$ ) までとした。

### 2) レイトレーシング

波面センサーによる測定から得られた眼球光学系波面収差  $W(x, y)$  より、光線の方向を求める。このとき、光線の方向ベクトルは  $W(x, y)$  を  $x, y$  方向に微分することで得られる。図 1 に示すように、この波面から求めた光線は瞳孔から出て行く光線であるが、この光線を逆に戻していき、水晶体前面まで光線をたどることを提案する。この方法で、角膜前面から水晶体前面までの光路長を求める。求めた光路長と波面収差<sup>6)</sup>の関係から波面収差を求める。各光線において、角膜前面から水晶体前面までの光路長と波面収差の関係は

$$W = -(l - l_{mean}) \quad \dots\dots\dots (3)$$

であらわされる。ここで  $l_{mean}$  は平均光路長である。このようにして求めた波面収差  $W$  をゼルニケ展開することで、水晶体の波面収差解析を行う。

この方法を行うにあたり、次のような仮定をしている。眼球光学系波面収差  $W(x, y)$  は、本来であれば眼球光学系の射出瞳の位置での値であるが、収差の値が大きくない場合は角膜前面での値として扱っても問題ない。例えば、4mm 瞳孔径で、2D の近視の

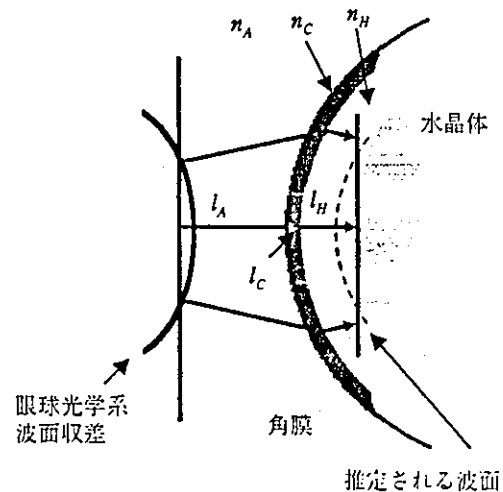


図1 レイトレーシングで求める水晶体前面での波面収差  $n_A$ : 空気の屈折率,  $n_c$ : 角膜の屈折率,  $n_H$ : 房水の屈折率,  $l_A$ : 空気中の光路長,  $l_c$ : 角膜中の光路長,  $l_H$ : 房水中の光路長

場合、 $c_1=2\mu\text{m}$ で、50 cmのところに収束する波面である。瞳と角膜間の距離約3 mmずれたところの波面は瞳面の波面と大きな変化がないことが想像できる。また、平均光路長 $l_{mean}$ をひいたのは、波面収差を考えると理想波面を無限遠に進む平行光と考えているためである。そのため、ゼルニケ展開したときの0次の値が0となる。

波面収差解析には光路長と波面の関係ではなくて、光線方向ベクトルと波面の関係を使った別の手法もある。それは、水晶体前面での光線ベクトルを求めて、その $x, y$ 成分を使って、波面を求める手法である。波面のそれぞれの方向での微分と、ゼルニケの関係は式であらわすと、次のようになる。この式で、左辺は光線の $x, y$ 方向の傾きをあらわしている。

$$\frac{\delta W(x, y)}{\delta x} = \frac{\delta(\sum_i C_i Z_i(x, y))}{\delta x}$$

$$\frac{\delta W(x, y)}{\delta y} = \frac{\delta(\sum_i C_i Z_i(x, y))}{\delta y} \dots\dots\dots (4)$$

これは波面センサーでシャック-ハルトマンセンサーのデータからゼルニケ展開をするときに用いられる方法である。ここではこの手法は用いなかった。それは、(3)式で示した光路長と波面の関係から求める波面を重回帰分析でゼルニケ展開する方が容易であるためである。

次に、光路長から波面収差を求める方法の詳細を述べる。角膜から出射したところの波面から光線を求めて、角膜の方向にレイトレーシングを行うときには、光線が角膜表裏面を通過する位置と角度を正確に求める必要があるが、角膜表裏面形状測定により得られる値は離散値である。このため、本論文では以下のような多項式による近似を行った。

$$H(x, y) = \sum_{i=0}^8 \sum_{j=0}^8 a_i b_j x^i y^j \dots\dots\dots (5)$$

ここで $H(x, y)$ は瞳孔を中心とした角膜の高さであり、 $a_i, b_j$ は係数である。本研究では近似精度を保つため8次元の多項式近似とした。これらの係数は重回帰分析を用いることで求める。8次までの式であらわすことにより、局所的に大きな変化がなければ近似としては十分な精度であると考えられる。

また、レイトレーシングを行う際には、各媒体間では光の屈折が起こるが、各媒体での屈折は

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \dots\dots\dots (6)$$

であらわされるスネルの法則により求める。 $n_1, n_2$ は入射、出射側の屈折率、 $\theta_1, \theta_2$ は入射、出射角である。水晶体前面までのレイトレーシングを行う際に光線が通過する媒体は、空気、角膜、房水である。

本手法では、まず、3次元空間で光線を追跡し、角膜前面との交点を求め、交点における法線ベクトルを求めて、法線ベクトルと入射光線を含む面で、スネルの法則を適応して屈折方向を求めている。更に同様なことを角膜後面でも行っている。

スネルの法則に従いレイトレーシングを行うことにより得られる水晶体前面までの光路長 $l$ は、

$$l = n_A \cdot l_A + n_C \cdot l_C + n_H \cdot l_H \dots\dots\dots (7)$$

で、 $n_A, n_C, n_H$ は空気、角膜、房水の屈折率、 $l_A, l_C, l_H$ は空気、角膜、房水中の光線の距離である。

水晶体前面までの光路長から(3)式の関係より、水晶体前面の波面収差を得ることが出来る。求めた光路長から式(1)のように波面 $W(x, y)$ をゼルニケ多項式によりあらわした。多項式の係数は重回帰分析の手法で求めた。

### 3. 測定装置と検証方法、および被験眼

#### 1) 測定に用いた装置と数値

眼球光学系全体の波面解析にはトプコンの波面センサー KR-9000 PW<sup>®</sup>を用いた。角膜表裏面形状測定にはオープスキャン IIz<sup>®</sup> (キヤノン販売)を用いた。オープスキャンでは、左右45°方向からスリット光を角膜に照射して、角膜表裏面における反射光を正面方向のカメラで撮影し、三角法により角膜表裏面形状を取得する。外部に取り出せるデータのサンプリング間隔は0.1 mmで、範囲は-5.0~5.0 mmである。解析には、前房深度、眼軸長が必要であるが、これらはオープスキャンの値とZeiss社のIOLMaster<sup>®</sup>を用いて測定した値を使用した。

また、レイトレーシングに用いた波長は560 nmで、空気、角膜、房水の屈折率 $n_A, n_C, n_H$ の値は、

$$n_A = 1.0, \quad n_C = 1.3782, \quad n_H = 1.3384$$

を用いた。

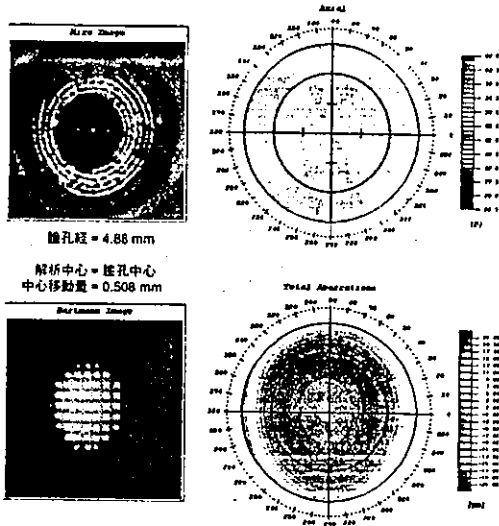


図2 (a) 被験眼1のマイヤー像(左上), 瞳孔径4mmの範囲を解析, 角膜表面屈折力マップ(右上), ハルトマン像(左下), 全波面収差マップ(右下)

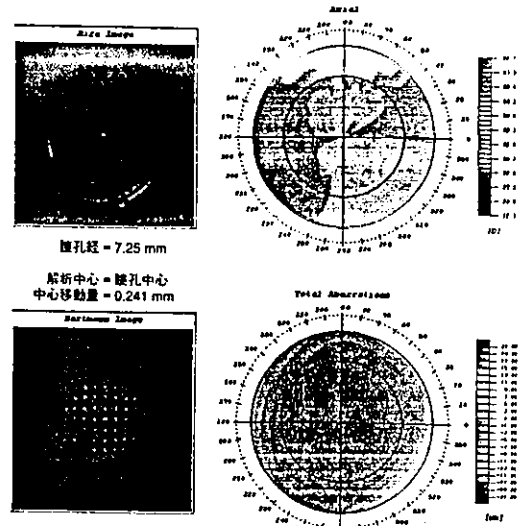


図2 (b) 被験眼2のマイヤー像(左上), 瞳孔径6mmの範囲を解析, 角膜表面屈折力マップ(右上), ハルトマン像(左下), 全波面収差マップ(右下)

## 2) 光学設計ソフトによるデフォーカス成分の比較

本手法で求めた値の精度を眼内レンズ挿入眼においては比較することができる。それは、眼内レンズが光軸上に置かれたと仮定して、測定によって得られた眼底から眼内レンズまでの距離、眼内レンズの屈折率、曲率半径を用いてIOL前面(角膜側)の波面を求めることができる。IOLの中心が光軸に置かれたと仮定すると、網膜上の点光源からの発散光がIOLを通過した波面であるので、収差は、大きなデフォーカス $Z_4$ と、わずかの球面収差 $Z_{12}$ である。それ以外の収差はあらわれない。大きなデフォーカス量となるのは、網膜に置かれた仮想の点光源から発した光のIOL通過後の波面は発散光となり、その虚像は網膜の後ろに位置するためである。IOLから虚像までの距離はディオプターであらわすと約25Dとなり、4mm瞳孔でのゼルニケ係数では $25\mu\text{m}$ となる。ここでは、市販の光学設計ソフトOPTAS-PULS<sup>®</sup>(サイバネットシステム)を用いて、IOL前面の波面を求めて、デフォーカス量をもって本提案手法との比較を行った。

### 3) 被験眼

#### (1) IOL挿入眼

IOL挿入眼の波面を被験眼として用いた。それは、2)のところでも説明したように、別のソフトを用いて、提案手法の精度を確認できるからである。

表1 被験眼1, 2の眼内レンズデータ, 前房深度, 水晶体網膜間距離

	被験眼1	被験眼2
レンズ名	AR40e	AQ110NV
術後	3ヵ月	1ヵ月
レンズパワー [D]	20	20.5
水晶体~網膜 [mm]	17.87	19.67
前房深度 [mm]	4.77	3.84

被験眼は2眼である。図2 (a), (b)に被験眼1, 2のデータを示す。この図の左上は角膜表面形状測定時のマイヤー像であり、右上は角膜表面屈折力(パワー)マップ、左下はシャッターハルトマン像、右下は全収差マップである。図2 (a)は解析範囲が瞳孔径4mmのデータで、水平方向に角膜表面屈折力が大きく角膜は倒乱視で、全収差マップをみると、中心が遅れていて近眼であることがわかるが、角膜による乱視は打ち消されている。

一方、図2 (b)で示す被験眼2は、解析の瞳孔径が6mmである。角膜の屈折力マップをみると、右下にパワーがわずかに強く、コマ収差をもつてであろうことが予想される。しかし、全収差マップをみると、収差がほとんどないことを示している。被験眼のIOLの種類、前房深度などのデータを表1に示す。また、本手法による解析は瞳孔径4mmの範囲で行っ

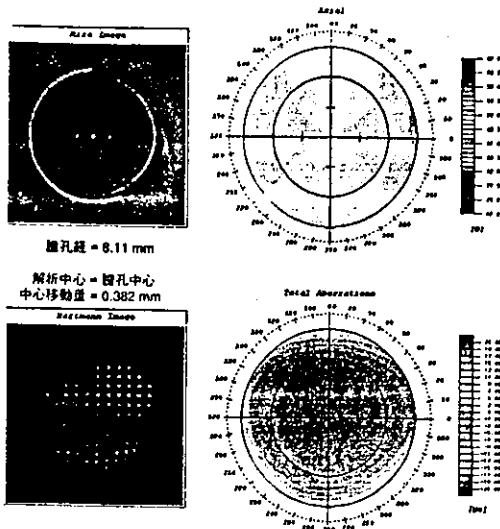


図3 有水晶体眼のマイヤー像(左上), 角膜表面屈折力マップ(右上), ハルトマン像(左下), 全波面収差マップ(右下)

た。

(2) 有水晶体眼

有水晶体眼の被験眼は1眼であり, 図3に被験者の波面センサーデータを示す。このデータの上部に示す角膜屈折力から直乱視であることがわかる。また, 波面のデータでは非点収差はみられない。これは, 眼球光学系内部で直乱視を打ち消しているからである。

4. 実験結果

本手法によって得られたIOL挿入眼のIOL前面での波面収差解析結果を図4(a), (b)に示す。同時に光学設計ソフトによる波面収差を示してあるが, ここでは, IOLのデフォーカス成分の値を比較する。

波面の特徴をあらわすために, デフォーカス成分を取り除いた波面収差マップを図5(a), (b)に示す。

図4に示すデフォーカスZ<sub>i</sub>成分で比較すると, 被験眼1では約4%, 被験眼2では約7%の誤差があることがわかる。

本手法による波面解析結果にはデフォーカス成分以外でも若干の収差がみられる。図2(a), (b)で示す波面センサーのデータと図5(a), (b)とを比較すると, 角膜表面の屈折力分布を補正するような形となっているのがわかる。この収差は先ほど述べたが, IOLの傾き, 中心ズレによるものと思われる。ただ, このデータからどれくらいIOLがずれているのかを求

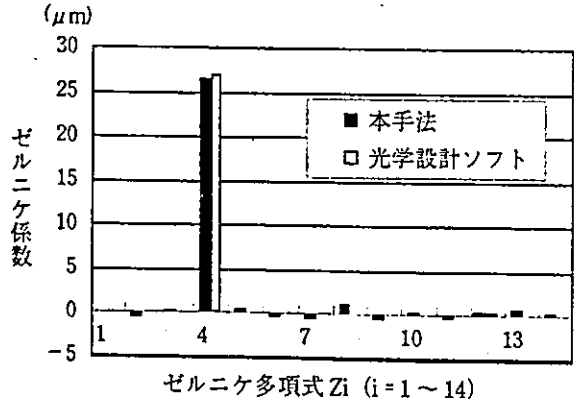


図4(a) 被験眼1の波面収差解析データ 光学設計ソフトによる解析データとの比較

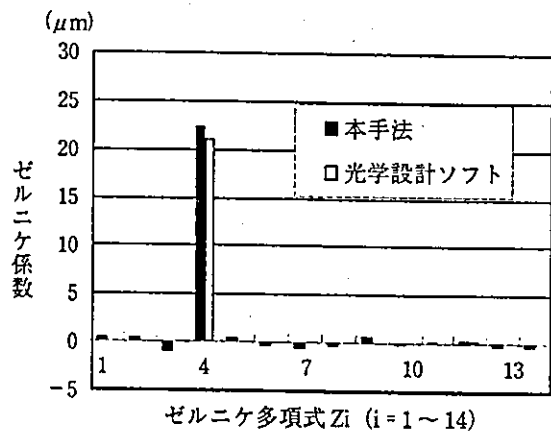


図4(b) 被験眼2の波面収差解析データ 光学設計ソフトによる解析データとの比較

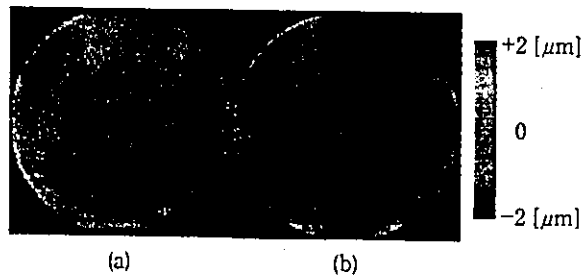


図5 デフォーカス成分を取り除いた眼内レンズ前面での波面収差 a:被験眼1, b:被験眼2

めることは難しい。それは, IOLの傾きと中心ズレはそれぞれ各収差に関係しているからである。

次に, 水晶体の情報が未知である有水晶体眼に対して波面収差解析を行った結果を図6に示す。

また, デフォーカス成分を取り除いた水晶体の波面収差マップを図7に示す。