

## 寒冷白内障に伴うラット水晶体の誘電挙動の変化

清家 恭三<sup>1)2)</sup>, 渡辺 牧夫<sup>1)2)</sup>, 上野 脩幸<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>高知医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>高知医科大学第二生理学教室

### 要 約

寒冷白内障による核混濁を電氣的に捕えることを目的とし, 100 Hz~500 MHzの周波数域にわたり, ラット摘出水晶体のインピーダンスを測定した。組織学的特徴および誘電挙動において, 温度依存的な可逆性変化を確認した。誘電測定したデータを loss tangent (誘電正接) に変換して得られた2つのピーク値 ( $P_1$  および  $P_2$ ) の変化を調べた。その結果, 幼若群ラットでは低温化 (4°C) により核混濁の原因である細胞内凝集塊を多数認め, 同時に  $P_2$  (高周波側のピーク値) が有意に低下したが, 対照群では特記すべき変化は生じなかった。 $P_2$  の低下は, 線維細

胞膜の機能的変化や細胞質の不均一性の増大, タンパク水和水の減少などを反映している可能性があり,  $P_2$  は核白内障の誘電的指標として有用である。これは核白内障に対して誘電分散法を適用した最初の報告である。皮質型/核型白内障の定量的評価に誘電的指標が有用と考えられる。(日眼会誌 100: 262-269, 1996)

キーワード: ラット水晶体, 寒冷白内障, 細胞内凝集塊, 誘電挙動, 誘電正接

## Dielectric Behavior of Rat Lens and Changes due to Cold Cataract

Kyozo Seike<sup>1)2)</sup>, Makio Watanabe<sup>1)2)</sup> and Hisayuki Ueno<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Ophthalmology, Kochi Medical School

<sup>2)</sup> Department of Physiology, Kochi Medical School

### Abstract

To correlate the formation of cold cataract with changes in the passive electrical properties of the lens, we measured impedances of isolated rat lenses in the frequency range from 100 Hz to 500 MHz. Temperature-dependent, reversible changes were confirmed in the dielectric behavior as well as in the histological characteristics. The impedance of lenses showed two separate peaks (i.e.  $P_1$  and  $P_2$ ) when expressed in terms of loss tangent. At a low temperature of 4°C, cytoplasmic "aggregates" characteristic of the cold cataract were formed inside the fiber cells of young rats with concomitant decreases in  $P_2$  (the peak value at higher frequencies), whereas no remarkable changes occurred in the control group. These results indicate that the lowering of  $P_2$  may

reflect functional changes in the lens fiber membrane, an augmented heterogeneity in cytoplasm and/or decreases of protein-bound water. We conclude that the  $P_2$  is a useful dielectric index for the assessment of the nuclear opacity. This is the first report on the application of dielectric techniques to lenses with nuclear cataract. We suggest that dielectric spectroscopy may be applicable to a quantitative evaluation of cataract, not only of the cortical type but also of the nuclear type. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 262-269, 1996)

Key words: Rat lens, Cold cataract, Cytoplasmic aggregates, Dielectric behavior, Loss tangent

## I 緒 言

“幼若”哺乳動物の水晶体核は温度条件により可逆的な混濁を生じる(寒冷白内障)<sup>1)</sup>。その理由として, 臨界温度

以下では水晶体線維細胞の細胞質にタンパク質-水系の相分離が生じ, そのために屈折率分布の不均一性が増大して, 光散乱を増強し, 混濁を招くと考えられている<sup>2)~4)</sup>。このような相分離現象は単離した細胞質や  $\gamma$ ク

別刷請求先: 783 高知県南国市岡豊町小蓮 高知医科大学眼科学教室 清家 恭三  
(平成7年10月17日受付, 平成7年12月11日改訂受理)

Reprint requests to: Kyozo Seike, M.D. Department of Ophthalmology, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku-shi, Kochi-ken 783, Japan

(Received October 17, 1995 and accepted in revised form December 11, 1995)

リスタン溶液でも確認されている<sup>5)-8)</sup>。また、光散乱因子の形成と細胞膜との関連性を示唆する報告<sup>9)10)</sup>もあるが、詳細については不明である。光散乱因子の本態や形成機序を解明するために、これまで物理学的<sup>7)-9)</sup>、生化学的<sup>5)6)11)</sup>、形態学的<sup>10)12)</sup>アプローチがなされているが、電気生理学的手法を用いた報告は見当たらない。寒冷白内障に伴う細胞質や細胞膜の変化を電気的現象と対応づけることができれば、一つの有用な情報として期待される。

誘電分散法を用いると、細胞・生体組織の内部構造を破壊することなく、膜や細胞内部の電気的特性を高速・高精度に調べることができる<sup>13)14)</sup>。我々は、この方法を摘出水晶体に適用し、組織構築を可及的忠実に反映した誘電体モデルに基づく詳細な解析を行い、カエル水晶体の誘電挙動が線維細胞の形状および生体膜の存在に強く依存することを既に報告<sup>15)</sup>している。また、マイクロ波白内障(カエル)やガラクトース白内障(ラット)などの白内障発生過程を追跡する際に、本法から得られる誘電的指標が有用であることを示した<sup>16)17)</sup>。寒冷白内障は可逆的であり、臨床的に通常認められる不可逆性の核白内障と同列に論じるには多少無理があるが、核部の混濁という意味において共通であり、皮質型だけではなく核型白内障についても、白内障化に伴う水晶体誘電挙動の変化を捕えようとする試みは、本法による白内障の定量的評価法を確立する上で、臨床的にも意義があると考えている。今回、我々はラット寒冷白内障の誘電スペクトロスコピーにより、水晶体誘電挙動の可逆的变化を確認し、誘電的指標を用いて核混濁をとらえることに成功した。本報では、このような誘電的指標と形態学的変化との関連性について検討する。

## II 実験方法

### 1. 実験材料と方法

Wistar 系雄ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)を腹腔内に過剰投与して安楽死させ、眼球を摘出した。囊を傷つけないように注意して水晶体を摘出した後、以下の実験を行った。4°Cで寒冷白内障を生ずる幼若群(6~7週齢、体重約150g)と対照成熟群(3~4か月齢、300~350g)の摘出水晶体を各5眼使用し、同一水晶体を室温(25±1°C)と低温(4±1°C)で連続測定した。幼若群の5眼は室温、低温で誘電測定した後、再び室温で測定し、誘電挙動の温度依存性を調べた。また、幼若群、成熟群および2週齢ラットのそれぞれ1匹2眼(室温用および低温用)を形態学的検討に供した。

### 2. 誘電測定

誘電測定には、コンピュータ(HP 216型)により制御されたYHP社インピーダンス・アナライザ(HP 4191 A型およびHP 4192 A型)を用い、100 Hz~500 MHzの間で、対数的に均分した135周波数点をカバーした。1回の

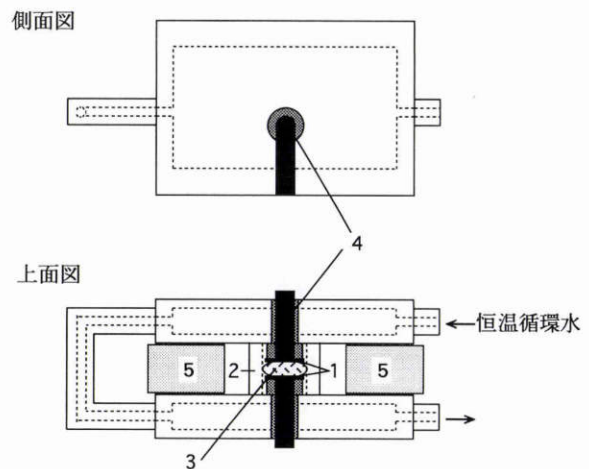


図1 恒温測定セル。

1:白金電極(直径4.3 mm), 2:外筒, 3:水晶体, 4:電極リード線, 5:スペーサー。

周波数走査に要する時間は約4分であった。加温と冷却用に2台の恒温槽を使用し、それぞれ25°Cと3°Cの純水を測定セル内に循環させた。加温・冷却実験の場合、循環開始後3分以内にセル内の水晶体中心温度がそれぞれ25±1°Cと4±1°Cになることをサーミスタ温度計によりあらかじめ確認した。加温・冷却のための待ち時間はいずれも5分とした。

ラット水晶体用の「平行板コンデンサー型」恒温セル(図1)を自作した。電極リード線としての真鍮棒は、熱交換器としての役割も兼ねており、循環水に接触する部分はエポキシ樹脂でコーティングし、電気的に絶縁した。電極分極を小さくするために、白金電極の表面を白金黒で被覆した。電極間距離は1.7 mm(幼若群用)、あるいは2.1 mm(成熟群用)とし、対向電極面の平行性を保つためにそれぞれ一定の厚さのスペーサーにより固定した。試料を平行板セルに装着する際、水晶体囊を傷つけないこと、電極面に水晶体極部が広く接触すること、電場と視軸との平行性などに注意した。スペーサー、外筒およびその他の絶縁材にはアクリル樹脂を使用した。セルの校正には純水、2種類のKCl水溶液(0.01 Nおよび0.1 N)などの標準物質を用い、それぞれ25°Cおよび4°Cにおける誘電率・導電率の文献値を採用した。その結果、幾何学的セル定数と標準物質測定から求めたセル定数との誤差は幼若用、成熟用ともに5%以内であり、特記すべき温度依存性を認めなかった。

### 3. 形態学的観察

寒冷白内障を生じる臨界温度は、週齢に依存し、成長に伴い低くなることが知られている<sup>8)</sup>。今回は幼若群と成熟群の水晶体、さらに室温(25°C)下でも混濁を来す2週齢ラット水晶体について、形態学的観察を行った。まず、4°Cの培地(TC-199, ライフテック社)の中で、幼若群と2週齢ラット水晶体は寒冷白内障を生じること、成熟群水晶体は透明のままに留まることを確認した後、次の手

順で固定を行った。2.5% グルタルアルデヒドと 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3), 50 mM L-リジン, 1% タニン酸の混合液<sup>10)</sup> で 2~4 時間前固定した。固定試料をカミソリ刃で 2 分割し, ビプラトームで薄切 (300  $\mu\text{m}$  厚) した後, 同じ固定液で 2 時間固定し, さらに 1% オスミウム酸で 1~2 時間後固定した。以上の固定操作は 4°C で行った。エタノール脱水後, 常法により Spurr 樹脂に包埋した。光学顕微鏡用試料は 0.5  $\mu\text{m}$  厚に薄切後, トルイジンブルーで染色し観察した。電子顕微鏡用には 90 nm 厚に薄切し, 酢酸ウラニル/クエン酸鉛による二重染色ののち透過型電子顕微鏡 (日立 H-700 H 型) で観察した。

### III 結 果

#### 1. 寒冷白内障の可逆性

幼若群摘出水晶体の透明度とその可逆的变化を生理食塩水中 (室温, 低温) で肉眼的に確認した。室温の生理食塩水中で透明であった水晶体を低温生理食塩水中に移し入れると, 数 10 秒で混濁を呈した (図 2 a)。しかし, 再加温によりこの混濁は消失し, 元の透明性を回復した (図 2 b)。

幼若群の同一水晶体を室温→低温→室温の順に 10 分間隔で誘電測定した実測データの典型例を図 3 に示す。比誘電率 ( $\epsilon$ ) (以下, “誘電率” とする) と導電率 ( $\kappa$ ) が周波数に依存して変化する誘電分散現象はいずれの温度においても出現し, これは緩和周波数の異なる 2 つの誘電分散が重畳したものであることを認めた。以下, 低周波側 (kHz 領域) の分散を分散 1, 高周波側 (MHz 領域) のそれを分散 2 と呼ぶ。室温における誘電挙動は, 小島ら<sup>17)</sup> のそれと同様であった (図 3 ○)。低温下では, 導電率レベルが全般的に低下し, 誘電分散は低周波側にシフトした (図 3 ●)。再加温後, 誘電挙動はほぼ元に戻り (図 3 一), 誘電挙動においても温度変化に対する可逆性が確認された。

#### 2. 低温化に伴う誘電挙動の変化

同一水晶体の“室温→低温”変化時の誘電測定データ

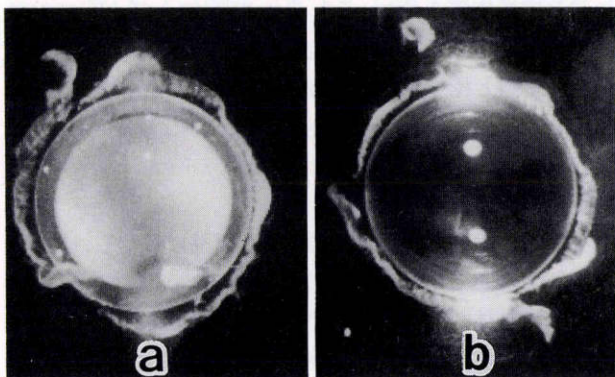


図 2 幼若群摘出水晶体のマクロ写真。

a: 4°C (寒冷白内障), b: 25°C (加温後)。いずれも生理食塩水中で観察した。

(平均値,  $n=5$ ) を図 4 (a: 成熟群, b: 幼若群) に示す。実線 (室温) および破線 (低温) は, 2 項 Cole-Cole 式<sup>18)</sup> (1) によるカーブ・フィッティングから得られる最適理論曲線であり, 低周波側および高周波側の両端を除けば, 実測挙動をかなりよく再現している。このようなカーブ・フィッティングにより確定できた誘電パラメータを表 1 に示す。

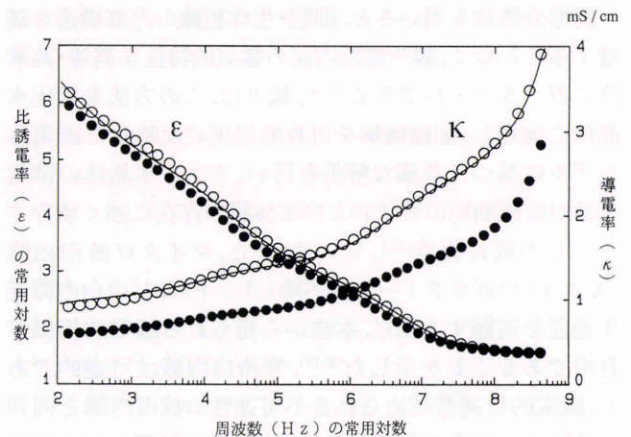


図 3 幼若群同一水晶体誘電挙動の可逆的变化 (典型例)。

室温 (○), 低温 (●), 加温後室温 (一) での実測データ。

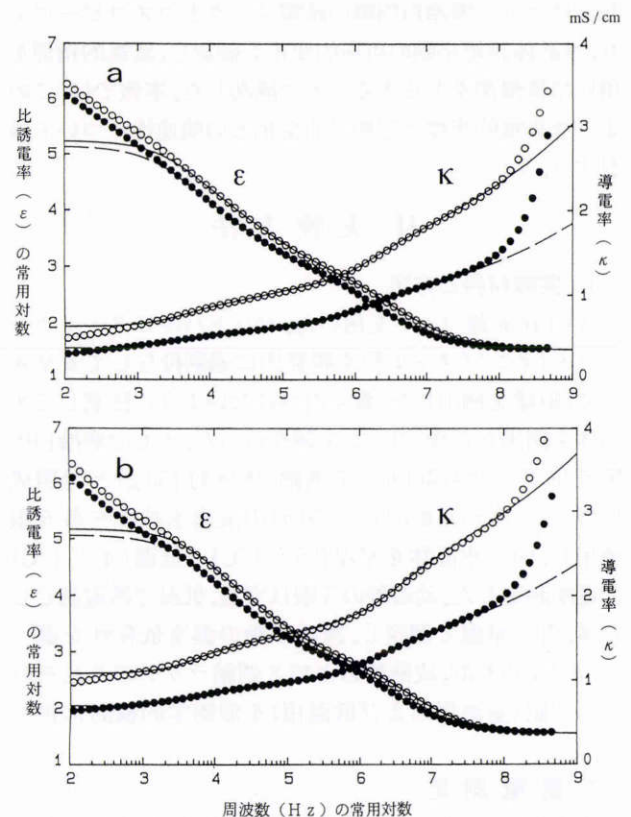


図 4 冷却による水晶体誘電挙動の変化。

a: 成熟群, b: 幼若群。室温 (○), 低温 (●) での実測データ (各群 5 眼の平均値)。一, --- は 2 項 Cole-Cole 式による最適理論曲線。

表 1 図 4 の最適理論曲線に用いた誘電パラメータ

	分散	温度 (°C)	$\epsilon_h$	$\kappa_1$ (mS/cm)	$\Delta\epsilon$	$f_c$ (Hz)	$\beta$
成熟群	分散 1	25		0.630	$1.75 \cdot 10^5$	$2.4 \cdot 10^3$	0.83
		4		0.375	$1.43 \cdot 10^5$	$1.7 \cdot 10^3$	0.83
	分散 2	25	33		255	$1.69 \cdot 10^6$	0.93
		4	32		240	$1.08 \cdot 10^6$	0.93
幼若群	分散 1	25		1.08	$1.51 \cdot 10^5$	$3.6 \cdot 10^3$	0.85
		4		0.699	$1.17 \cdot 10^5$	$2.6 \cdot 10^3$	0.84
	分散 2	25	34		300	$2.32 \cdot 10^6$	0.88
		4	35		275	$1.54 \cdot 10^6$	0.91

$\epsilon_h$  : 誘電率の高周波収斂値  $f_c$  : 緩和周波数  
 $\kappa_1$  : 導電率の低周波収斂値  $\beta$  : Cole-Cole パラメータ  
 $\Delta\epsilon$  : 誘電率増分

$$\epsilon^* = \epsilon_h + \frac{\Delta\epsilon_1}{1 + (jf/f_{c1})\beta_1} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 + (jf/f_{c2})\beta_2} + \frac{\kappa_1}{j(2\pi f)\epsilon_v} \quad (1)$$

ここで、 $\epsilon^*$ は複素誘電率、 $j = (-1)^{1/2}$ 、 $\epsilon_v = 8.854 \times 10^{-14}$ farad/cm (真空の絶対誘電率)、 $\kappa_1$ は導電率の低周波収斂値、 $\epsilon_h$ は誘電率の高周波収斂値、 $f$ は周波数、 $\Delta\epsilon$ は誘電率増分、 $f_c$ は緩和周波数、 $\beta$ は Cole-Cole パラメータであり、添え数字は分散 1 および分散 2 を意味する。

1) 水晶体の誘電挙動(室温)

室温での誘電挙動は、ラットの週齢に関係なく両群ともに誘電分散現象を示し、2つの誘電分散を認めた(図4○)。実測データのばらつきをみるために、20周波数点(横軸の常用対数1目盛り)おきに変動係数(標準偏差/平均値)を求めた。この変動係数の平均値は、誘電率・導電率の順に、幼若群では0.21と0.23、成熟群では0.16と0.15であり、幼若群の方が若干大きかった。各群内でのばらつきをもたらす要因には、個体差よりも、試料装着時の視軸のずれ、水晶体表面の水分量の多寡、電極の圧着度などがあり、図1の方式の平行板コンデンサー型セルを採用する場合には避け難い点である。成熟群の導電率の低周波収斂値( $\kappa_1 = 0.63$  mS/cm)は幼若群の $\kappa_1 = 1.08$  mS/cmに比べ約40%低かった。このように両群間で $\kappa_1$ 値の差を生じる原因としては、水晶体のサイズの違いにより、測定セル内に占める死腔の比率や水晶体中での線維細胞の体積分率が異なることがあげられる。しかし、 $\kappa_1$ の絶対値の異同は、後出の loss tangent\*値の算出に際して重大な支障となることはない。なぜなら、脚注に示すように、損失項 $\Delta\epsilon''$ は $\kappa$ でなく、“ $\kappa - \kappa_1$ ”に依存する物理量だからである。

2) 冷却による誘電パラメータの変化

低温での誘電挙動は、室温時と同様、両群ともに特徴的

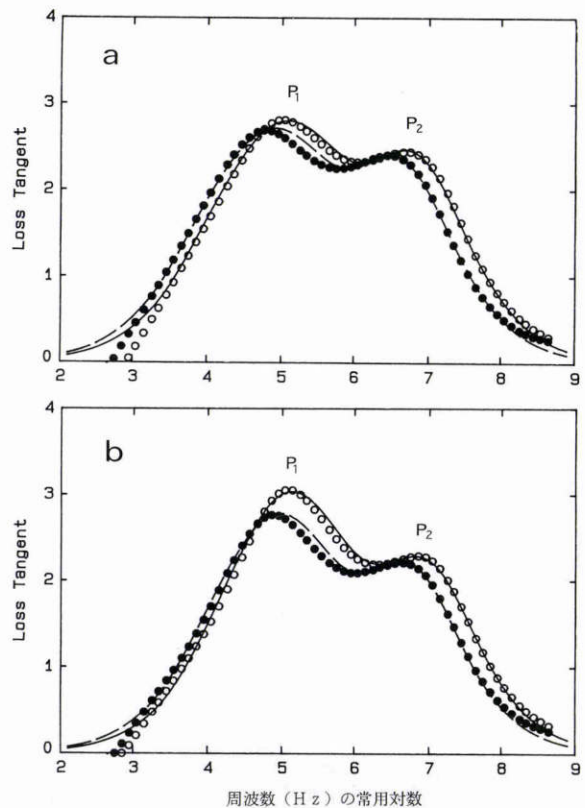


図5 Loss tangentの周波数依存性と冷却による変化。a:成熟群, b:幼若群。室温(○), 低温(●)での実測データ(各群5眼の平均値)。—, ---は2項Cole-Cole式による最適理論曲線。P<sub>1</sub>:低周波側の分散のピーク値, P<sub>2</sub>:高周波側の分散のピーク値。

な誘電分散を示し、2つの分散を認めた(図4●)。しかし、冷却により導電率レベルが低下し、誘電分散は低周波側にシフトした。さらに、分散1, 2ともに緩和周波数( $f_c$ )は低周波側に有意に変化した(対応のあるt検定で $p < 0.05$ , 表1)。これらの変化は、両群に共通に認められ

\* 複素誘電率は  $\epsilon^* = \epsilon' - j\Delta\epsilon'' + \kappa_1/j2\pi f\epsilon_v$  で表される。ここに  $\epsilon' = \epsilon$  および  $\Delta\epsilon'' = (\kappa - \kappa_1)/2\pi f\epsilon_v$  である。Loss tangent は損失項  $\Delta\epsilon''$  と誘電率(の実数部)の比、すなわち  $\Delta\epsilon''/\epsilon'$  で与えられる。

るから、冷却に伴う単純な物理的变化であり、幼若群では“核混濁に起因する変化”がこの上にさらに重畳するものと解釈される。 $\kappa_1$ 値は両群とも冷却により約40%低下した。これは塩溶液を冷却した場合に当然予想される変化(約2%/°C)と符合しており、水晶体の冷却効果を反映するものである。誘電率の高周波収斂値( $\epsilon_n$ )、Cole-Coleパラメータ( $\beta$ )については個々のデータにばらつきがあり、一定の変化傾向を認めなかった。

### 3) 核混濁に伴う loss tangent (誘電正接) の変化

Loss tangent は誘電分散現象の整理に際して有用な関数であり、これを用いると誘電分散がよりみやすく表現される<sup>19)</sup>。水晶体の loss tangent 値を周波数に対してプロットすると、2つの分散がそれぞれスペクトルのピークを描き、図4のデータの loss tangent 表示は図5のようになる。この際、分散1のピーク値を  $P_1$ 、分散2のピーク値を  $P_2$  とすれば、ガラクトース白内障などの皮質型白内障の生成過程を追跡する際に、 $P_1/P_2$ 比が白内障化の定量的指標として有用であることを我々は既に報告している<sup>16)17)</sup>。また、その理論的根拠として、水晶体を赤道部皮質、前極・後極部皮質および水晶体核の3つの部域に分け、分散1が主に赤道部皮質に、分散2が前極・後極部皮質および水晶体核に起因することを確かめている<sup>15)</sup>。そこで“核混濁による変化”を調べるために loss tangent 表示を行い、 $P_1/P_2$ 比に加え、2つのピーク値( $P_1$  および  $P_2$ )を別々に求め、両群の冷却による変化を比較検討した。まず、個々の誘電分散曲線( $\log \epsilon$  および  $\kappa$  の周

波数依存性)に対して、それぞれ2項 Cole-Cole 式(1)によるカーブ・フィッティングを行い、そこから得られた  $\kappa_1$  値を用いて loss tangent 値を算定した。この際、“ $\log \epsilon$  対  $\log f$ ”、“ $\kappa$  対  $\log f$ ”および“loss tangent 対  $\log f$ ”の3種の曲線に最適になるようにカーブ・フィッティングを行った。そのようにして得られた  $P_1$ 、 $P_2$  および  $P_1/P_2$  比の平均値±標準偏差( $n=5$ )を表2に示す。25°Cと4°Cでの値について対応のある  $t$  検定を行うと、冷却後の  $P_1$ 、 $P_2$  および  $P_1/P_2$  比は、成熟群ではいずれも有意な変化は示さなかったのに対し、幼若群ではすべてが有意に低下していた( $p < 0.05$ )。

### 3. 形態学的検討

#### 1) 光学顕微鏡による所見(図6)

室温下においても寒冷白内障を呈する2週齢ラットと幼若群(6週齢)ラットの4°Cにおける水晶体赤道部の“皮質/核”移行部(後出の図9において主に  $P_2$  に寄与する部域)を光学顕微鏡で観察した。2週齢ラット水晶体(図6a)では多数の球状凝集塊が線維細胞内に認められた。凝集塊が分布する領域を皮質側、中間部、核側に分けた場合、中間部では皮質側・核側に比べてより大きい凝集塊が認められた。また、皮質側では、表層に向かって凝集塊が次第に小さくなり、ついには消失していた。週齢の進んだ幼若群(図6b)では、凝集塊の分布様式は類似していたが、そのサイズは皮質側、中間部、核側とも図6aに比べて小さかった。また、多数の凝集塊が細胞膜と接しており、このような像は中間部で特に顕著であった。核中心

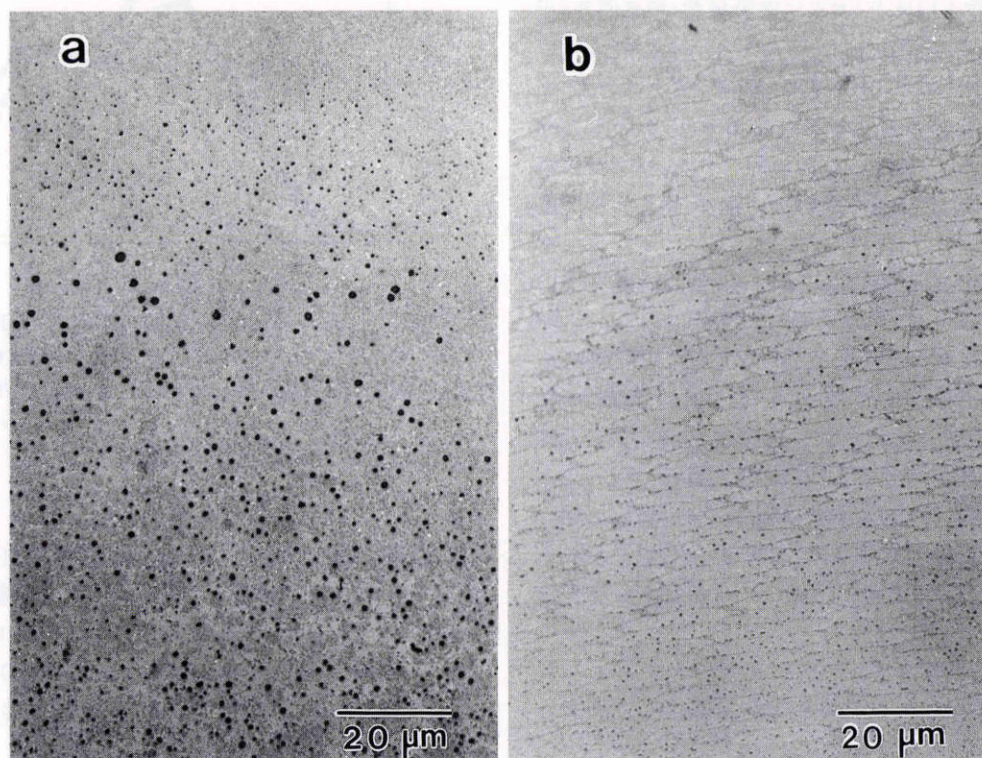


図6 水晶体の皮質/核移行部の光学顕微鏡写真(トルイジンブルー染色)。

a: 2週齢ラット, b: 幼若群(6週齢)。上が皮質側, 下が核側を示す。いずれも4°Cで固定した。

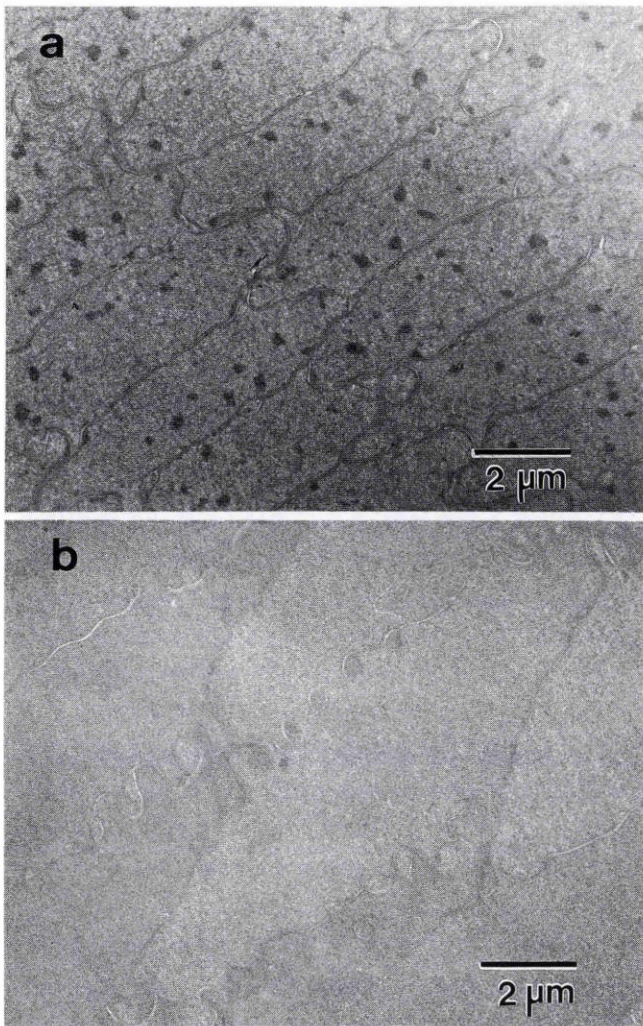


図 7 水晶体核の電子顕微鏡写真。  
a: 幼若群, b: 成熟群. いずれも 4°C で固定した。

部は固定不十分なために明瞭に観察できなかった。

2) 電子顕微鏡による所見(図 7)

幼若群と成熟群の 4°C における水晶体の核表層部を電子顕微鏡で観察した。幼若群(図 7 a)の細胞質内には、電子密度の高い凝集塊が多数認められたが、対照とした成熟群(図 7 b)の細胞質は均質無構造であった。また、幼若群の核表層部では、図 7 a のごとく、凝集塊が細胞膜とは無関係に存在している像も観察された。

IV 考 按

水晶体の核混濁を電氣的に検出する目的で、寒冷白内障を生じる幼若ラットの水晶体と対照(成熟群)について、冷却に伴う誘電挙動の変化を調べた。幼若群では“loss tangent 対 log f”図のピーク値  $P_1, P_2$  および両者の比  $P_1/P_2$  が有意に低下したが、対照群ではいずれの指標にも有意の変化は生じなかった(表 2)。また、4°C の幼若群水晶体(図 6 b, 7 a)には、線維細胞内に混濁の原因とみなされる球状凝集塊が多数認められたが、対照(図 7 b)の細胞質は均質無構造であり、したがって、 $P_1, P_2$  および

表 2 冷却による  $P_1, P_2$  および  $P_1/P_2$  比 (平均値±標準偏差) の変化

	温度	成熟群 (n=5)	幼若群 (n=5)
$P_1$	25°C	2.73±0.21	3.07±0.36
	4°C	2.58±0.21	2.75±0.35
$P_2$	25°C	2.47±0.23	2.31±0.28
	4°C	2.41±0.21	2.22±0.26
$P_1/P_2$ 比	25°C	1.11±0.05	1.33±0.07
	4°C	1.08±0.06	1.24±0.05

\* :  $p < 0.05$  (対応のある t 検定)

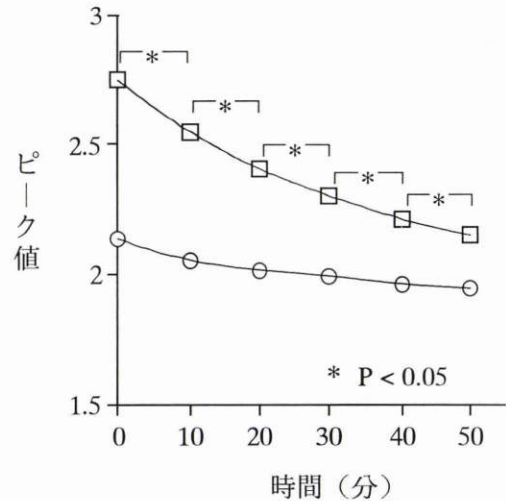


図 8  $P_1, P_2$  の経時的変化。

□ :  $P_1, \circ : P_2$ . いずれも室温で連続測定した平均値。

$P_1/P_2$  比の有意の低下と凝集塊形成との間には何らかの関連性が示唆される。まず、これら 3 種の誘電データについて、それぞれの“指標”としての信頼度あるいは有用度を比較してみよう。

幼若群水晶体(n=4)を室温で 50 分間にわたり連続測定した場合、 $P_2$  にはさしたる変化が認められないにもかかわらず、 $P_1$  は時間とともに有意に低下した(図 8)。このような  $P_1$  の低下は、水晶体のセルへの圧着による皮質表層部の障害が時間とともに進行したためではないかと思われる。同様の  $P_1$  の低下は成熟群でもみられたが、幼若群のそれに比べはるかに軽度であった。このように幼若群にその傾向が強くみられたことは、両群水晶体の含水率に有意の差(幼若群, 成熟群の順に各 4 眼の平均値(%)±標準偏差: 59.2±0.5, 56.8±0.6;  $p < 0.05$ )を認めたことと何らかの関係があるかも知れない。したがって、幼若群の  $P_1$  の有意の変化は非生理的測定条件による影響をより強く受けていると解される。 $P_1/P_2$  比についても同様であり、核混濁を忠実に表す指標としては、 $P_2$  が最も優れている。

$P_1, P_2$  の成因、すなわち水晶体の示す 2 つの誘電分散の起源に関しては、前述のごとく、“殻付き楕円体モデル”に基づく理論解析<sup>15)</sup>から、赤道部皮質が主に  $P_1$  に寄与

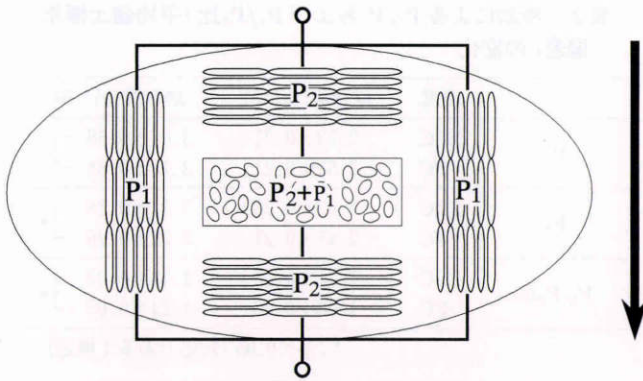


図9 水晶体線維細胞の配列モデル。

赤道部皮質(電場に対して平行に配列する部域),前後極皮質(電場に対して垂直に配列する部域),核部(電場に対してランダムに配列する部域)の3つに分けている。各部域に起因する loss tangent ピーク値( $P_1$ および $P_2$ )を付記してある。↓:電場の向き

し,前・後極部皮質と核部水晶体線維は主に $P_2$ に寄与することがわかっている(図9)。したがって,水晶体内の混濁部域が特定できる場合には,それに応じて $P_1$ , $P_2$ のいずれにより顕著な変化が生じるかが問題となるだろう。事実,皮質型白内障の1例としてのガラクトース白内障の測定では, $P_1$ は著明に低下したが, $P_2$ はほとんど変化しなかった<sup>17)</sup>。白内障にはその種類によりさまざまな混濁形態があり,その発生機序と過程は異なると考えられるが,“誘電的指標”としての $P_1$ および $P_2$ と混濁部域との関係についての議論は,そのまま寒冷白内障にも適用できるであろう。すなわち,核混濁と同時に,しかもその時に限って, $P_2$ の低下を認めたことは,核部水晶体線維が主に $P_2$ に寄与するという我々の従来の推論<sup>15)</sup>と矛盾しない。

次に, $P_2$ の低下を来す原因について考察する。いずれにせよ,これは凝集塊の形成と密接に絡む現象なので,凝集塊が,①線維細胞膜の直下あるいは近傍にある場合,および,②膜から離れて細胞質深部に認められる場合,に二大別しておく。まず①について考える。ラット水晶体の示す2つの誘電分散はMaxwell-Wagner効果,すなわち,細胞膜表面での界面分極による $\beta$ 分散<sup>17)</sup>に由来すると思われる。生体組織における界面分極は,理論的には,外相(外液)/膜相/内相(細胞質)の三相系で生じる電気的現象とみなされる。図6bに示すように,幼若群では寒冷条件下で凝集塊を認め,その多くは細胞膜と接していた。このような凝集塊と細胞膜との関係は,特に“皮質/核”移行部において顕著であった。Lo<sup>10)</sup>は寒冷白内障で生じる球状凝集塊の多くが線維細胞の膜と接していることを2週齢までのラットを用いて形態学的に観察し,その形成過程における膜の関与を示唆している。本研究でも,2週齢ラットを用いた形態観察により同様の凝集塊形成を確認した(図6a)。凝集塊の形成あるいはそれらの膜との接触という細胞質内相の変化により,形態学的

には識別不可能な何らかの変化が線維細胞膜に生じると仮定した場合, $P_2$ の低下が線維細胞膜の機能的変化による分散の減少を反映している可能性が示唆される。また,核部に局限した何らかの酵素活性の変化が,線維細胞膜の機能的変化を引き起こした可能性も否定できない。

次に,②すなわち膜が直接関与しない場合である。我々は凝集塊が膜とは無関係に細胞質に存在している像(図7a)を主に核表層部で観察した。この場合, $P_2$ 低下の主要因は,細胞質における不均一性の増強それ自体ということになる。本研究で用いた周波数域においては,水晶体の示す誘電挙動は,細胞膜のみでなく他の種々の要因からの寄与の総和を反映しているはずである。一般に,10MHz以上の高周波領域では,細胞質中の水晶体タンパクに起因する誘電分散,さらに水分子双極子の緩和による $\gamma$ 分散の一部やタンパク水和水の分散などが重畳している<sup>20)</sup>。特に,低温下の幼若群水晶体では,凝集塊の形成につれてタンパク水和水の分散が減少することが十分予想される。したがって, $P_2$ 低下が直接“膜”に起因しなくても,不均一性の増大やタンパク水和水の分散の減少といった細胞質の内部構造の変化を反映している可能性も示唆される。しかし,本研究の結果のみに限定すれば,上記①と②の可能性のうちどちらを主要因とみなすべきかとの問いに対しては,現時点での判断は差し控えるべきであろう。

以上,誘電分散法を用いて寒冷白内障の可逆性混濁を検知することができた。核白内障に対し本法を適用した例は,これがはじめてである。また, $P_2$ の変化と核混濁との間に関連があることを確認した。このように,誘電解析法を適用すれば,白内障化を定量的に,しかも混濁部域と関連づけて評価できる可能性が期待される。また,形態学的変化との対応関係をみるならば,寒冷白内障に伴う誘電挙動の変化は,線維細胞膜の機能的変化,タンパク凝集による細胞質内不均一性の増大,タンパク水和水の減少などを反映している可能性があり,そのいずれが主因であるかを解明することが新たな課題となる。今後,このような現象論的知見を踏まえ,さらに組織構築を反映する誘電体モデルによる理論解析を行い,寒冷白内障に伴う誘電分散現象の起源を明らかにしたい。

稿を終えるにあたり,御指導,御校閲を賜りました高知医科大学第二生理学教室入交昭彦教授に深謝いたします。また,特に形態学的検討に際して御助言,御協力いただきました高知医科大学第二生理学教室安藤元紀助手に心から感謝申し上げます。

本論文の要旨は,第99回日本眼科学会総会(1995年)において報告した。

#### 文 献

- 1) Zigman S, Lerman S: A cold precipitable protein in the lens. *Nature* 203: 662—663, 1964.
- 2) Benedek GB: Theory of transparency of the eye. *Appl Optics* 10: 459—473, 1971.

- 3) **Tanaka T, Benedek GB**: Observation of protein diffusibility in intact human and bovine lenses with application to cataract. *Invest Ophthalmol* 14: 449-456, 1975.
- 4) **Delaye M, Clark JI, Benedek GB**: Coexistence curves for phase separation in the calf lens cytoplasm. *Biochem Biophys Res Comm* 100: 908-914, 1981.
- 5) **Zigman S, Lerman S**: Properties of a cold-precipitable protein fraction in the lens. *Exp Eye Res* 4: 24-30, 1965.
- 6) **Lerman S, Zigman S, Forbes WF**: Properties of a cryoprotein in the ocular lens. *Biochem Biophys Res Comm* 22: 57-61, 1966.
- 7) **Siezen RJ, Fisch MR, Slingsby C, Benedek GB**: Opacification of  $\gamma$ -crystallin solutions from calf lens in relation to cold cataract formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1701-1705, 1985.
- 8) **Siezen RJ, Benedek GB**: Controlled modulation of the phase separation and opacification temperature of purified bovine  $\gamma$ IV-crystallin. *Curr Eye Res* 4: 1077-1085, 1985.
- 9) **Delaye M, Clark JI, Benedek GB**: Identification of the scattering elements responsible for lens opacification in cold cataracts. *Biophys J* 37: 647-656, 1982.
- 10) **Lo WK**: Visualization of crystallin droplets associated with cold cataract formation in young intact rat lens. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9926-9930, 1989.
- 11) **Mizuno A, Ozaki Y, Ito K, Matsushima S, Iriyama K**: Raman spectroscopic evidence for the microenvironmental change of some tyrosine residues of lens proteins in cold cataract. *Biochem Biophys Res Comm* 119: 989-994, 1984.
- 12) **Gulik-Krzywicki T, Tardieu A, Delaye M**: Spatial reorganization of low-molecular-weight proteins during cold cataract opacification. *Biochim Biophys Acta* 800: 28-32, 1984.
- 13) **入交昭彦, 渡辺牧夫**: 生体組織・細胞の誘電解析. *病態生理* 11: 372-378, 1992.
- 14) **Foster KR, Schwan HP**: Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review. *Crit Rev Biomed Eng* 17: 25-104, 1989.
- 15) **Watanabe M, Suzaki T, Irimajiri A**: Dielectric behavior of the frog lens in the 100 Hz to 500 MHz range. Simulation with an allocated ellipsoidal-shells model. *Biophys J* 59: 139-149, 1991.
- 16) **渡辺牧夫, 洲崎敏伸, 玉井嗣彦**: 水晶体の誘電挙動と実験的白内障に伴う変化. *あたらしい眼科* 6: 283-289, 1989.
- 17) **小島善治, 渡辺牧夫, 上野脩幸, 玉井嗣彦**: ガラクトース白内障に伴うラット水晶体の誘電挙動の変化. *あたらしい眼科* 8: 85-91, 1991.
- 18) **Asami K, Irimajiri A**: Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver. II. Intact mitochondria as simulated by a double-shell model. *Biochim Biophys Acta* 778: 570-578, 1984.
- 19) **Surowiec A, Stuchly SS**: Use of the loss-tangent function in dielectric spectroscopy. *Bioelectromagnetics* 7: 259-269, 1986.
- 20) **Takashima S**: *Electrical Properties of Biopolymers and Membranes*. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 109-121, 1989.