

誘電分散法を用いた線維柱帯の電気生理学的特定

渡辺 牧夫, 松岡 里佳, 目代 康子, 上野 脩幸

高知医科大学眼科学教室

要 約

線維柱帯の誘電挙動を眼球外から非侵襲的に観察し、線維柱帯における房水排出機能を定量的に評価することを目的として、白色家兎11匹、摘出22眼球の前眼部組織インピーダンスを微小同心円状表面電極を用いて測定した。前眼部5か所の連続測定では、角膜輪部から0.5 mm 強膜側で loss tangent 上のピーク値が角膜上と比較し有意に低下 ($p < 0.01$, 対応のある t 検定) した。同部における loss tangent ピーク値の低下は、直下に存在す

る線維柱帯の微細構造を反映した分散現象のブロード化によるものと考えられた。角膜・結膜上皮を剥離後に同様の測定を行っても、やはり同部で loss tangent ピーク値は最低となり、本法により線維柱帯が電気生理学的に特定可能であった。(日眼会誌 102: 265—269, 1998)

キーワード: 開放隅角緑内障, 線維柱帯, 誘電分散, 組織インピーダンス, 誘電正接

Electrophysiological Specification of Trabecular Meshwork by Dielectric Dispersion Method

Makio Watanabe, Rika Matsuoka, Yasuko Mokudai and Hisayuki Ueno

Department of Ophthalmology, Kochi Medical School

Abstract

In an attempt to observe the dielectric behavior of the trabecular meshwork and to estimate its pumping of aqueous humor quantitatively, we measured tissue impedance of the anterior portion of 22 enucleated eyeballs from 11 rabbits non-invasively with a minute coaxial surface probe. Serial measurements of five points near the limbus revealed a significant decrease of the peak value ($p < 0.05$, paired t-test) on loss tangent function at a point 0.5 mm from the limbus towards the sclera. We considered that the decrease in the peak value at the point was due to broadening of the dielectric dispersion reflecting

the microstructure of trabecular meshwork beneath the point. After removing the corneal epithelium, the limbal epithelium, and the conjunctiva, we also observed a decrease in the peak value at the same point, which reinforced our assumption that we can identify the trabecular meshwork electrophysiologically by means of dielectric dispersion. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 265—269, 1998)

Key words: Open angle glaucoma, Trabecular meshwork, Dielectric dispersion, Tissue impedance, Loss tangent

I 緒 言

緑内障は閉塞隅角型と開放隅角型に大別され、臨床的に後者の方の有病率が高く、また最近では、開放隅角型でも正常眼圧緑内障の重要性が注目されている¹⁾。開放隅角緑内障の原因は、主として線維柱帯における前房水の排出不全と考えられ、その診断は、通常は眼底検査により視神経乳頭部の形状変化を観察し、眼圧・視野などの補助的諸検査を参考にしてなされることが多い。しかし、開放隅角緑内障の本質ともいえる線維柱帯の房水排出機能の低下を調べるためには、眼球に一定時間重りを載せて眼

圧の変化率を調べる、いわば古典的方法が用いられているので、線維柱帯の機能を定量的・合理的に評価する方法は未だ確立されていない。また、緑内障に対する電気生理学的研究では、毛様体上皮における房水産生機能に関する報告²⁾³⁾があるが、線維柱帯の房水排出機能に関する報告はみあたらない。そこで今回、我々は組織インピーダンス測定⁴⁾という電気生理学的手法を用いて、線維柱帯における房水排出機能を定量的に評価することを試みた。

生体組織のインピーダンスは著しい周波数依存性を示し、組織を構成する細胞の電気的性質を反映する。広い周

別刷請求先: 783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮 高知医科大学眼科学教室 渡辺 牧夫

(平成9年7月25日受付, 平成9年12月1日改訂受理)

Reprint requests to: Makio Watanabe, M.D. Department of Ophthalmology, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku-shi, Kochi-ken 783-8505, Japan

(Received July 25, 1997 and accepted in revised form December 1, 1997)

波数範囲にわたる組織インピーダンスの測定から、組織やそれを構成する細胞の、電気を蓄える性質、電気を通過させる性質という二面性に関する多くの情報を知ることができる。こうした手法を用いて、生体組織の周波数依存性を調べ、生理的・病的な変化に伴う電気現象の変化を解析する方法を誘電分散法と呼ぶ。我々は誘電解析理論に基づく電気生理学的手法の眼部組織への適用を主体に研究を進めており⁵⁾⁶⁾、本研究では、過去に蓄積してきた誘電測定・解析技術を駆使し、線維柱帯の房水抽出機能を眼球外から非侵襲的に捕えることを目的とする。

II 方 法

1. 電極の作製

測定電極としては、水晶体や角膜など眼部組織で我々に使用経験があり⁶⁾⁷⁾、電極の特性が既知で、生体組織での測定に適している同心円状表面電極が良いと考えられた。今回、ステンレス製 20 ゲージ注射針を改造した外径約 0.9 mm の針型微小同心円状表面電極を試作し、誘電測定に用いた。図 1 に同電極の概略を示す。

2. 実験材料

白色家兎の摘出眼球を材料とし、11 匹 22 眼を誘電測定に供した。5 匹 10 眼は無処置の摘出眼球(以下、正常眼球)のまま用いた。家兎眼球には鼻側に瞬膜があるため、10 眼では上側と耳側の角膜輪部付近 5 か所の誘電測定を連続的に行った(図 2)。また、1 匹 2 眼では前房水を同量の空気に置換したのち測定し、5 匹 10 眼では角膜上皮・輪部上皮・結膜・テノン嚢を機械的に剥離する前後に誘電測定を行った。すべての実験は眼球摘出後 1 時間以内に終了し、正常眼球のうち 4 眼は光学的顕微鏡下でヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により組織学的に検討した。

3. 誘電測定

微小同心円状表面電極を用いて眼球面に直接接触させる方法で、角膜輪部付近の 5 か所の誘電測定を行った。測定には Hewlett Packard 社製インピーダンス・アナライザ(HP-4194 A)を用い、10 kHz~100 MHz の周波数域にわたり、一対のキャパシタンスとコンダクタンスを測定し、イオン交換水、空気、塩化カリウム(KCl)標準液の測定からセル定数を決め、これを誘電率(ϵ)と導電率(κ)に変換した。測定時のオシシレート・ポテンシャル(測定電圧)は 0.5 V とし、対数 1 刻み当たり 20 点、合計 101 周波数点の所要測定時間は約 40 秒であった。

4. データ解析

インピーダンスは複素数で表される。複素誘電率(ϵ^*)は $\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$, $\kappa = \epsilon'' \cdot \omega \cdot \epsilon_0$ で示され、ここで $j^2 = -1$, ϵ' は誘電率実数部、 ϵ'' は誘電率虚数部、 ω は角周波数、 ϵ_0 は真空の絶対誘電率(8.8541×10^{-14} F/cm) |、測定データの解析は ϵ と κ を loss tangent⁸⁾に変換した上で行った。Loss tangent 表示に当たっては、電極分極の影響を減じ

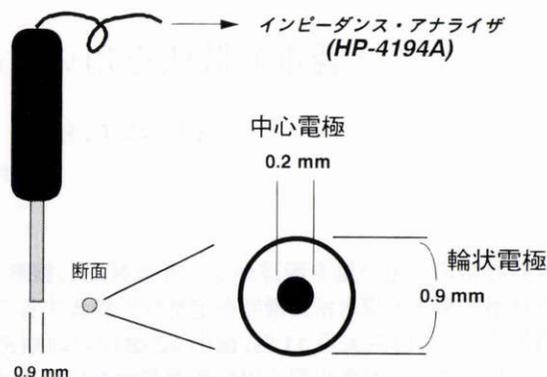


図 1 微小同心円状表面電極の模式図。

輪状電極は外径約 0.9 mm でステンレス製、中心電極は直径約 0.2 mm で真鍮製。両者間はエポキシ系の樹脂で絶縁。1.5 m のケーブルを介して、HP-4194 A の Z プロープに接続。

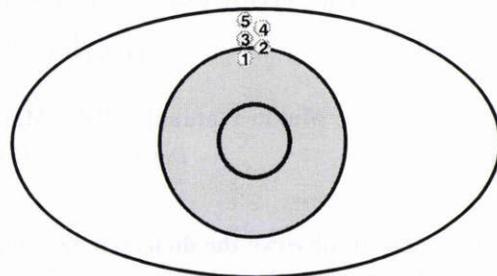


図 2 家兎前眼部の測定部位。

電極の中心が角膜輪部から角膜側約 0.5 mm の部位(①)から、図のように連続的かつ互いに重ならないように約 0.5 mm おきに 5 か所のインピーダンスを測定。

- ①: 電極の中心が輪部から角膜側約 0.5 mm
- ②: " 輪部上 (0 mm)
- ③: " 輪部から強膜側約 0.5 mm
- ④: " " 1.0 mm
- ⑤: " " 1.5 mm

るために、10 kHz の導電率の値を低周波収斂値(κ_1)として誘電損失($\epsilon'' = (\kappa - \kappa_1) / \omega \cdot \epsilon_0$)を求め、これを基に loss tangent (ϵ'' / ϵ')を計算した。

III 結 果

1. 正常角膜の誘電挙動

図 3 a に正常眼球角膜周辺部(図 2, ①の部)の誘電挙動を示す。10 kHz~100 MHz の広い周波数域にわたりインピーダンスを測定すると、組織の示す誘電率は周波数とともに低下し、導電率は反対に増加する誘電分散現象が認められた。同じデータを loss tangent 表示したものが図 3 b である。図に示すように、loss tangent 上では 10 MHz 付近にピークを持つ山となり、低周波側に電極分極の影響が若干認められた(図 3 b, 30 kHz 以下)。

2. 房水の空気置換

今回の研究では角膜輪部付近の誘電測定から、眼球内部の線維柱帯の誘電挙動を特定することを目的としてお

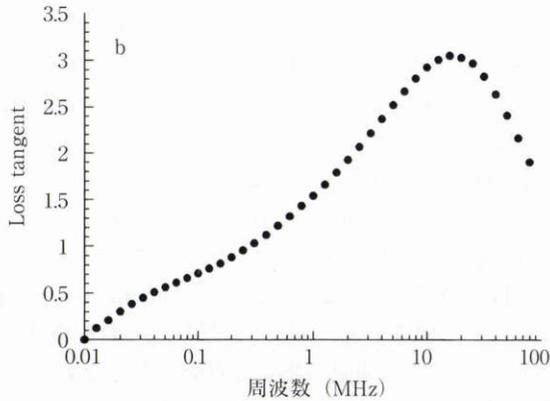
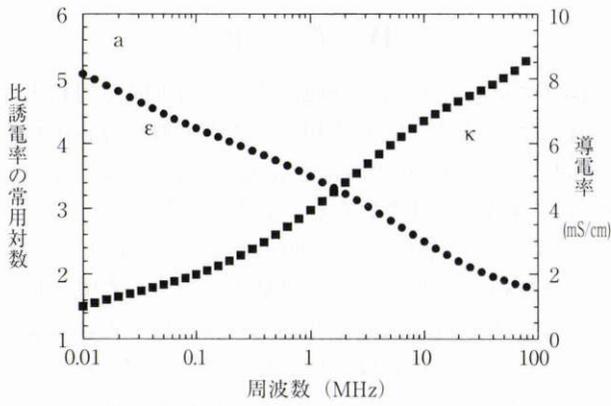


図 3 角膜上正常測定例(①の部位).

a: ϵ , κ 対周波数, b: loss tangent 対周波数の図.

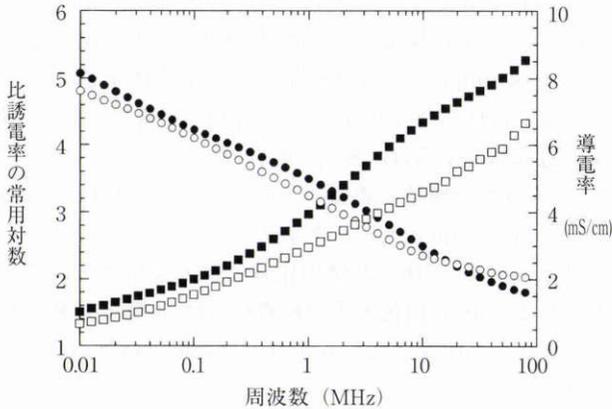


図 4 房水の空気置換の影響(①の部位).

黒塗りのシンボルは正常状態, 白抜きのシンボルは空気置換後の測定結果.

り, 本電極を用いての測定で, 線維柱帯部にまで測定時に電気力線が到達する必要がある. それを確認するため, 前房水を空気に置換する前後の①の部の測定を行った結果を図 4 に示す. 図から明らかなように, 房水の空気置換の結果, 特に高周波側 (5 MHz 以上) の導電率が著明に低下した.

3. 前眼部 5 か所の連続測定

図 2 に示した前眼部 5 か所を連続測定した結果の典型例を図 5 に示す. 電極の中心が, 角膜輪部より 0.5 mm 角膜側 (図 2, ①の部) から強膜側に移動するに従い, 分散現

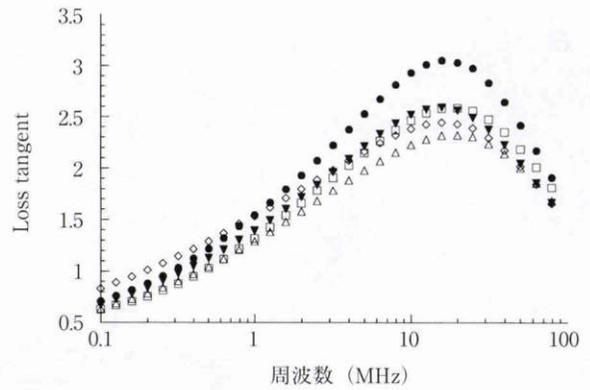


図 5 前眼部 5 か所の連続測定 (典型例).

●: ①, ◇: ②, △: ③, □: ④, ▼: ⑤, ①~⑤は図 2 の①~⑤に相当.

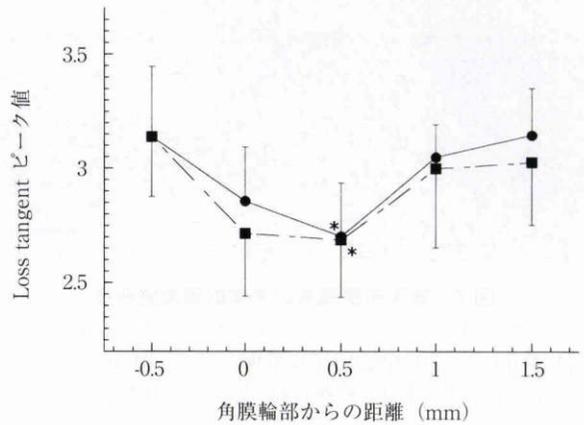


図 6 Loss tangent ピーク値と測定部位の関係.

10 眼の耳側, 上側の 5 か所をそれぞれ測定し, 角膜輪部からの距離と loss tangent ピーク値の関係を調べたもの.

●: 耳側, ■: 上側. $P < 0.01$

象のプロード化を認め, loss tangent 上のピーク値は低下し, 輪部から 0.5 mm 強膜側 (図 2, ③の部) で最低値となり, その後, 反対にピーク値は増大した. 図 6 に電極中心の輪部からの距離と loss tangent ピーク値の関係をプロットした. ここでは 10 眼の上側および耳側の平均値 ± 標準偏差について示す. 上側一耳側間では loss tangent ピーク値に差を認めなかったが, 上側, 耳側とも③の部では①の部と比較し, loss tangent ピーク値が有意に低かった ($p < 0.01$, 対応のある t 検定).

4. 光学的顕微鏡による組織学的検討

白色家兔摘出眼球の光学的顕微鏡像 (HE 染色) を図 7 に示す. 家兔の前房隅角の構造はヒトとは若干異なる⁹⁾. 図 7 a の低倍像の切片では, 隅角部は前鞅帯で Fontana 腔と仕切られ, Fontana 腔自体も隔壁で 2 つに分割されており, その角膜寄りに線維柱帯が認められた. また, 別の切片の高倍像 (図 7 b) では網目状の線維柱帯が明瞭に観察され, ヒトではシュレム管に相当する静脈叢の一部が強膜側に認められた.

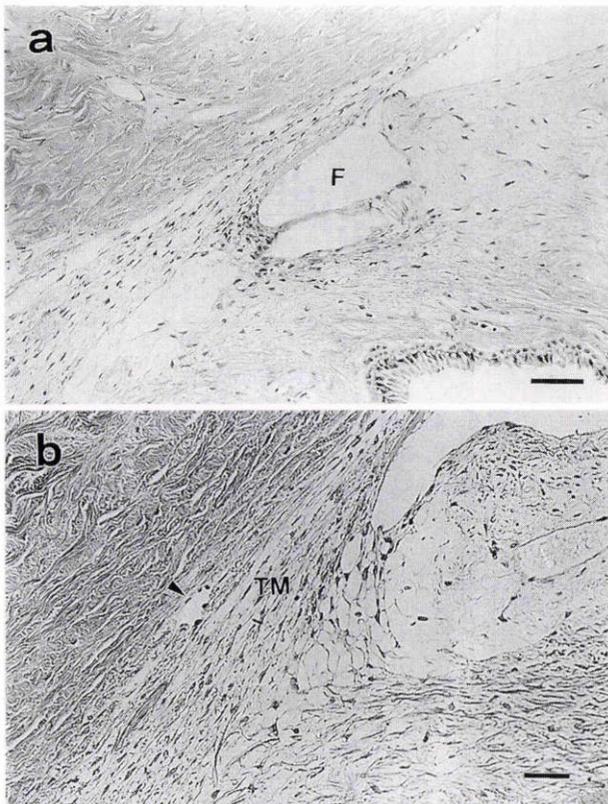


図7 家兎前房隅角の光学的顕微鏡所見.

a: ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色切片低倍像, バーは 30 μm , b: HE 染色切片高倍像, バーは 10 μm
F: Fontana 腔, TM: 線維柱帯, 矢じり: 静脈叢

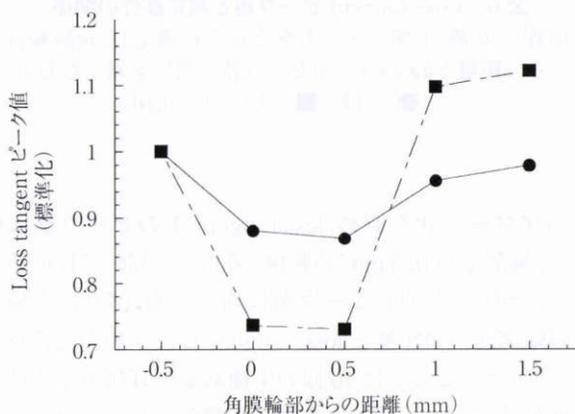


図8 上皮剥離の影響.

上皮剥離を行う前後に上側5か所を測定し, 各々①の部位の loss tangent ピーク値で標準化した10眼の平均値.

●: 正常状態, ■: 上皮剥離後.

5. 結膜・角膜上皮剥離の影響

結膜・角膜上皮剥離を作る前後の誘電測定の結果を図8に示す. 上皮剥離を行うと, loss tangent ピークの絶対値が著明に増大し(図略), 同一スケールでの比較が困難になるため, ここでは角膜上の①の部の値を基に標準化したデータを示す. 図8のごとく, 上皮系の影響を除いても loss tangent ピーク値は③の部で最低となった.

IV 考 按

図3で示したように, 今回試作した微小同心円状表面電極による測定でも, 従来用いてきた大型の同心円状表面電極⁶⁾⁷⁾とほぼ同様の誘電分散現象を認めることができた. 故に本電極は小さいながらも実用可能と考えられる. また, 房水の空気置換実験で明らかとなったように, 房水の空気置換の結果, 特に高周波側の導電率が著明に低下したことは(図4)測定時に電気力線が前房水中にまで到達し, 空気によって絶縁されたためと考えられる. このことから, 本電極により隅角深部にある線維柱帯の誘電挙動が観察可能であると考えられた. 本研究では如何にして眼球外からの測定で観察可能なはずの, すなわち測定データの中に含まれているはずの線維柱帯の誘電挙動を特定するかが最大の問題となる. 図3bでは測定データを loss tangent で表示したが, この loss tangent は交流電場中でのエネルギー消費の指標となるもので, 眼部組織の誘電分散現象を整理する上で有用な関数であることを我々は既に報告⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾している. Loss tangent 上では組織の電気を遮る働きが強いほど, すなわち組織を構成する細胞が密に存在し, 細胞の脂質2重層が丈夫であり, また, 細胞形が球形に近くサイズが均一であるほどピーク値が高くなる性質を持っている.

光学的顕微鏡所見から(図7), 線維柱帯は角膜輪部から強膜側0.5 mmの直下に存在し, 同部での loss tangent ピーク値が輪部付近5か所の中で最小であったことは, loss tangent が線維柱帯の構造的特徴を捕えたためと考えられる. 線維柱帯は複雑な網の目構造を持ち, 構成細胞は球形からほど遠く, サイズも均一とはいえないため, そうした構造が組織インピーダンスに反映されるならば, loss tangent ピーク値の低下は極めて合理的な結果といえる. 上側と耳側の比較では大きな差を認めなかったことから, 白色家兎の線維柱帯は, 上側と耳側で角膜輪部からの距離に0.5 mm以上の差を認めないと考えられた.

今回の測定は, 眼球外から表面電極を角結膜上皮に接触させて行っているため, これらの上皮の性状が測定結果に影響を及ぼしている可能性がある. 角膜輪部上皮は角膜上皮の幹細胞と考えられており, 角膜上皮や結膜上皮とは異なる電気的性質を示す可能性を持ち, また, 結膜下にはテノン囊などの結合組織が存在し, それらが誘電挙動に影響を与える可能性を調べるために上皮剥離実験を行った. 図8のごとく, これらの上皮系の影響を除いて測定しても輪部から0.5 mm強膜側の直上で loss tangent のピーク値が最低となった. 一般に上皮系には細胞が密に存在しており, 電気力線を遮る力が強いと考えられる. 剥離後の測定では, 前述のごとく全体的に loss tangent ピーク値が大きくなったが, これは上皮剥離によって導電率の増分が大きくなったためと考えられる. また,

剥離前と比較し,①~⑤の部位でのピーク値の変動が大きいことは,上皮剥離により測定時の電気力線が十分に深部に到達し,線維柱帯の微細構造をより反映しやすくなったためと考えられる.上皮系の影響を除いて測定しても,輪部から0.5mm強膜側の直上で loss tangent のピーク値が最低となることは,やはり同部での測定が線維柱帯の誘電挙動を反映するという考えを支持する.

以上,示してきたように,微小同心円状表面電極を用いて眼球外から家兎前眼部の組織インピーダンスを測定することにより,線維柱帯の誘電挙動を電気生理学的に特定することが可能であった.今回我々が得た情報は,主として線維柱帯の極めて特徴的な微細構造に由来するものと考えられる.誘電分散法を用いて線維柱帯の房水排出機能を定量的に評価する方法としては,線維柱帯の場所の特定だけでなく,房水排出に伴う線維柱帯の微細構造の変化や,高い導電率を持つ房水が線維柱帯の網の目をすり抜けるため生じる未知の変化を捕えるなどの可能性が考えられる.今後は,眼圧の変化や実験的緑内障に伴う線維柱帯部の誘電挙動の変化を観察し,さらに多くの房水排出機能に関わる情報を集め,非侵襲的・定量的に房水排出機能を検知する方法を検討していきたい.

本論文の要旨は,第100回日本眼科学会総会において発表した.なお,本研究は平成7年度文部省科学研究補助金(No.07771539)の補助を受けた.

文 献

- 1) 塩瀬芳彦:日本における緑内障疫学共同調査結果(1988-1989年). (財)日本失明予防協会,東京,1989.
- 2) Cole DF: Electrochemical changes associated with the formation of the aqueous humour. *Br J Ophthalmol* 45: 202-217, 1962.
- 3) Krupin T, Reinach PS, Candia OA, Podos SM: Transepithelial electrical measurements on the isolated rabbit iris-ciliary body. *Exp Eye Res* 38: 115-123, 1984.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 目代康子, 渡辺牧夫, 安藤元紀, 上野脩幸: 家兎角膜の誘電挙動—上皮障害の定量化および治癒過程の追跡. *日眼会誌* 98: 215-223, 1994.
- 7) 渡辺牧夫, 目代康子, 上野脩幸, 安藤元紀, 入交昭彦: 表面電極による家兎角膜の誘電測定. *日眼会誌* 97: 569-574, 1993.
- 8) Surowiec A, Stuchly SS: Use of the loss-tangent function in dielectric spectroscopy. *Bioelectromagnetics* 7: 259-269, 1986.
- 9) Tripathi RC: Comparative physiology and anatomy of the aqueous outflow pathway. In: Davson H, et al (Eds): *The Eye*. vol 5. Academic Press, New York, 163-356, 1974.
- 10) 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.