表面電極による家兎角膜の誘電測定

渡辺 牧夫[1)]，目代 康子[1)]，上野 脩幸[1)]，安藤 元紀[2)]，入交 昭彦[2)]
[1)]高知医科大学眼科学教室，[2)]同 第二生理学教室

要 約

同心円状表面電極を用いて，摘出白色家兎眼球前部の電気的インピーダンスを10 kHz—100 MHzの周波数域において，*in situ* 測定した．前房水を空気に置換したのち同様の測定を行うと，導電率は特に高周波側で著しく低下し，loss tangent表示上でも明らかな変化を伴う誘電分散を認めた．角膜上皮の機械的剝離や前房水の70%エタノール置換による角膜内皮傷害を惹起させ，その誘電挙動を2項Cole-Cole式を用いて解析した．眼球前部の示す誘電分散は2つの成分に分けられ，いずれも生体膜に由来するβ分散であることが示唆された．両者のうち，低周波側の分散については角膜内皮細胞層の存在が主要因であり，高周波側の分散は角膜上皮細胞層の影響下にあることが上記の傷害実験から判明した．（日眼会誌 97：569—574，1993）

キーワード：インピーダンス，白色家兎角膜，誘電解析，誘電正接，2項Cole-Cole式

Dielectric Measurements on the Rabbit Cornea Using a Surface Electrode

Makio Watanabe[1)], Yasuko Mokudai[1)], Hisayuki Ueno[1)]
Motonori Ando[2)] and Akihiko Irimajiri[2)]
[1)]*Department of Ophthalmology,* [2)]*Department of Physiology, Kochi Medical School*

Abstract

Using a concentric surface electrode, we measured *in situ* electrical impedance in the 10 kHz—100 MHz range for the anterior portion of eyeballs isolated from white rabbits. Replacement of fluid in the anterior chamber with an equal volume of air led to decreases in conductivity, resulting in a marked alteration of impedance behavior as expressed in a loss tangent plot. Eyeballs either with corneal erosin induced through mechanical abrasion or with endothelial injury caused by a 70% ethanol replacement in the anterior chamber were subjected to impedance measurements. Dielectric analysis based on the two-term Cole-Cole equation revealed that the observed overall dielectric dispersion could be divided into two subdispersions. Of these, the first dispersion, occurring at low frequencies was associated with the endothelial layer and the second, higher-frequency dispersion was due to the epithelial layer of the cornea. (J Jpn Ophthalmol Soc 97 : 569—574, 1993)

Key words: Impedance, Rabbit cornea, Dielectric analysis, Loss tangent, Two-term Cole-Cole equation

---

別刷請求先：783 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4年11月18日受付，平成4年12月17日改訂受理）
Reprint requests to: Makio Watanabe, M.D. Department of Ophthalmology, Kochi Medical School
Kohasu, Oko-cho, Nankoku 783, Japan
(Received November 18, 1992 and accepted in revised form December 17, 1992)

I 緒 言

生体組織のインピーダンスは，一般に，著しい周波数依存性を示す．すなわち，測定周波数に応じて試料の誘電率および導電率が変化する現象“誘電分散”が観測される[1)2)]．この現象は，組織を構成する細胞の電気的性質を反映しており，インピーダンスを広い周波数域にわたって測定すると，構成細胞（特に細胞膜）の電気的性質を知ることができる．眼組織について，我々はすでに摘出水晶体に対して誘電 shell（殻）モデルに基づく詳細な理論解析を行い，その誘電挙動が線維細胞の形状および膜の存在に由来することを報告した[3)]．また，マイクロ波白内障[4)]やガラクトース白内障[5)]などの発生過程を追跡する際の指標としてインピーダンスが有用であることを示した．このように，生体誘電解析法を適切に用いることにより，組織の生理・病理的な変化を，細胞の電気的性質の変化として，経時的かつ非破壊的に追跡・検知することが可能となる．

角膜を対象とした *in situ* の電気生理学的アプローチは，これまでほとんど報告されていない．角膜の構造は特徴的であり，旺盛な再生能力を持つ角膜上皮，膠原線維に富む強固な角膜実質，ヒトでは再生されない角膜内皮細胞層から成る．また，円形で一定の曲率を保ち，外界に露出可能な形状の故に，角膜は *in situ* 誘電測定法の好対象と考えられる．そこで我々は，生体での *in situ* 測定に向けての予備実験として，網膜電位図用角膜電極を改造した「同心円状表面電極」を用い，家兎正常眼および実験的に作製した異常眼球を対象として，10 kHz から 100 MHz にわたる誘電測定を行った．誘電理論式である 2 項 Cole-Cole 式[6)]を用いて実測データをカーブ・フィッティングすることにより，眼球前部の示す誘電挙動を 2 つの誘電分散に分解し，各々を独立した分散と仮定して解析し，角膜上皮および内皮との関連性について検討を加えた．

II 実験方法

1. 動物および被験眼の作製

白色家兎を用い，ペントバルビタールナトリウム腹腔内過剰投与により麻酔死させたのち眼球摘出，ただちに実験に供した．誘電測定時の電気力線の到達深度を知るために，26 G 針つき注射器を用いて角膜輪部から前房水を抜去し，そのあとを同量の空気で置換した．また，角膜上皮・内皮にそれぞれ傷害を与えるためスパーテルにて角膜上皮を機械的に剝離，あるいは前房水を抜去し，同量の 70% エタノールに置換する操作を行った．

2. 透過型電子顕微鏡による観察

誘電測定終了後の角膜試料をリン酸緩衝液（pH 7.4）で緩衝した 4 %グルタールアルデヒド固定液で前固定し，同緩衝液を含む 1 % O_sO_4 で後固定したのち，アルコール脱水，Spurr の樹脂に包埋し，標本を作製した．超薄切片の観察には透過型電子顕微鏡（日本電子 JEM-1200 EX）を用いた．

3. 表面電極の作製と誘電測定

網膜電位図用角膜電極の中心に 2 mm の真鍮棒を固定し，先端に 3.5 mm の円形の白金電極をつけ，両者の間隙にエポキシ樹脂を充てんした．中心電極は白金輪状電極（内径 11.5 mm）と同心円状で角膜の曲率を考慮し，輪状電極より 1 mm 低く設定した（図 1）．測定時には中心電極を角膜の中央に，輪状電極を角膜周辺部に接触させ，中心電極と周囲の輪状電極間に交流電場をかけた．通常の平行板コンデンサー型セルの場合と同様に，空気，再蒸留水，標準 KCl 溶液を用いる校正操作により誘電セル定数，残留インダクタンスなどを求め[7)]，並列要素として収録された電気容量（C）とコンダクタンス（G）を誘電率（ϵ）と導電率（κ）に変換した．C と G の周波数依存性の測定は，コンピュータ（日本電気 PC 9801）制御下のインピーダンス・アナライザ（横河—ヒューレット—パッカード

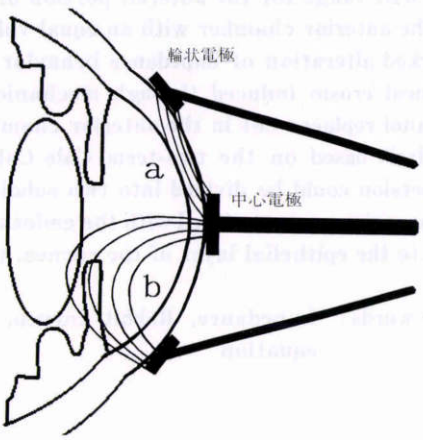

図 1 同心円状表面電極の模式図．
中心電極と輪状電極を角膜に直接接触させ，交流電場をかけて測定する．
a：測定時に電気力線が角膜のみを通過することを想定したもの．b：測定時に電気力線が（少なくとも）水晶体まで到達することを想定したもの．

4194 A 型）により，10 kHz-100 MHz 域の 81 点をカバーした．1回の周波数走査に要する時間は約 40 秒であった．すべての測定は室温（25℃）で行った．

4. 2項 Cole-Cole 式への当てはめによるパラメータの推定

誘電解析は自作のプログラムを用いた．2項 Cole-Cole 式（式1）による実測データのカーブ・フィッティングに際しては，理論曲線の示す誘電挙動を2つの分散の合成と考え，それぞれを単独の分散と仮定して loss tangent 表示した．Loss tangent は誘電正接とも呼ばれ $\Delta\epsilon''/\epsilon'$（$\Delta\epsilon''$は誘電損失，$\epsilon'$は複素誘電率の実数部）で表わされる．これは交流電場中での誘電物質のエネルギー損失の目安となり，誘電分散現象の整理に際して有用な関数となることが知られている[8]．

$$\epsilon^* = \epsilon_h + \frac{\Delta\epsilon_1}{1+(jf/f_{c1})\beta_1} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1+(jf/f_{c2})\beta_2} + \frac{\varkappa_1}{j(2\pi f)\epsilon_v} \qquad (式1)$$

ここで ϵ^* は複素誘電率（$=\epsilon'-j\epsilon''$），$j=(-1)^{1/2}$，$\varkappa_1$ は導電率の低周波収斂値，ϵ_h は誘電率の高周波収斂値，ϵ_v は真空の誘電率，f は周波数，$\Delta\epsilon$ は誘電率増分，ϵ''は複素誘電率の虚数部，f_c は緩和周波数，β は Cole-Cole パラメータ，添え数字は2つの分散に対応する．

III　実験結果

角膜を含む摘出眼球前部の誘電測定例を図2（○）に示す．10 kHz から 100 MHz の測定周波数全域にわたり誘電率は周波数とともに減少し，導電率は反対に増加する“誘電分散”現象を認めた（図2a）．一般に，このような分散は loss tangent 平面では上に凸の曲線となるが，この例でも図2bのように，10^6Hz 付近に肩（shoulder）をもち 10^7Hz でピークに達するカーブを描いた．図2a，bの実線は2項 Cole-Cole 式による最適理論曲線である．以上のカーブ・フィッティングから得られた誘電パラメータ値を表1に示す．図2bの2種の破線は，この理論曲線を2つの分散に分解し，それぞれ独立にプロットしたものである．

図1で中心電極と輪状電極の間に示した2種類の電気力線は，次の2つの可能性を想定したものである．(a) 電気力線が眼球内部に達せず，角膜層のみに限局する．(b) 電気力線が眼球内部に達し，虹彩や水晶体も同時に測定される．これらのいずれが事実に近いかを知る目的で，前房水を空気に置換したのち測定した（図3）．その結果，空気置換では正常状態に比較して，

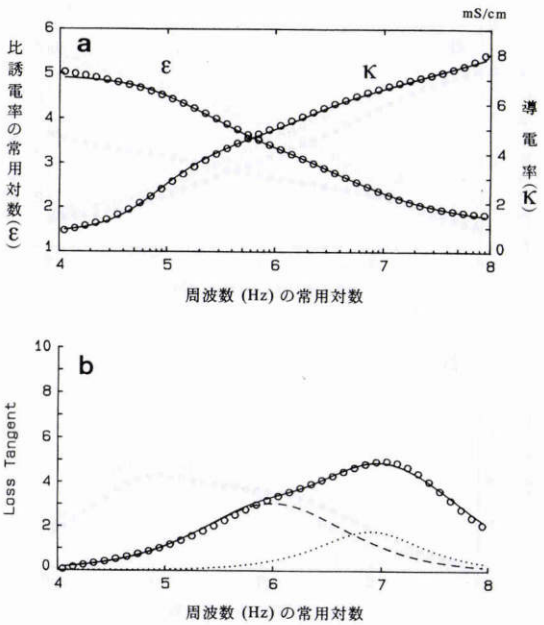

図2　典型的な正常白色家兎前眼部の誘電挙動．
a：誘電率（ϵ）と導電率（$\varkappa$）の周波数依存性．b：同じデータの loss tangent の周波数依存性．プロットは実測値．実線は2項 Cole-Cole 式による最適理論曲線．2種の破線はこれを2つの分散に分解したもの．表1に誘電パラメータを示す．

表1　図2で用いた誘電パラメータ

	ε_h	$\varkappa_1$ (mS/cm)	$\Delta\varepsilon$	f_c (MHz)	β
分散1（低周波）	950	0.07	85,000	0.07	0.91
分散2（高周波）	45	5.4	900	2.0	0.99

ε_h：誘電率の高周波収斂値　　$\varkappa_1$：導電率の低周波収斂値
$\Delta\varepsilon$：誘電率増分（$=\varepsilon_l-\varepsilon_h$）　　ε_l：誘電率の低周波収斂値
f_c：特性周波数　　β：Cole-Cole パラメータ

特に導電率が高周波側で大きく低下し，loss tangent 上でも著明な変化を認めた．これは今回用いた電極では電気力線が角膜全層を貫き，角膜内皮より後方の眼球内部に到達していることを意味し，(b)のモデルが適当であることを示す．

図4aは角膜上皮を機械的に剝離した際の実測データと2項 Cole-Cole 式でカーブ・フィッティングし，得られた理論曲線（実線）および後者を2つに分解したもの（破線）の loss tangent 表示である．図4bは前房水を70% エタノールに置換し，角膜内皮傷害を惹起させた場合である．また図4cには，角膜上皮剝離と前

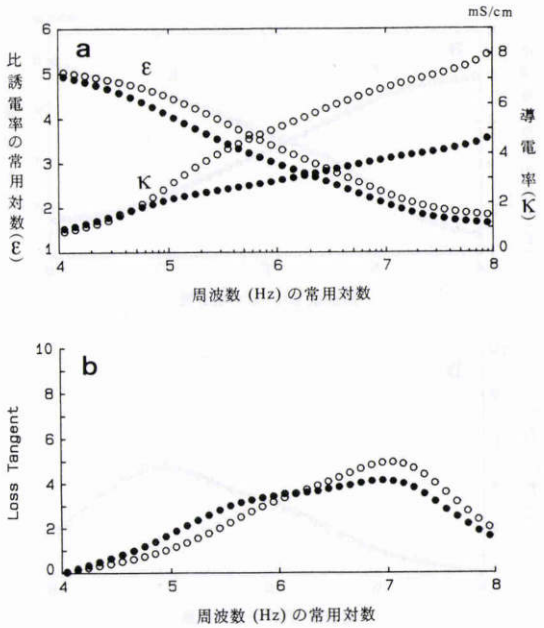

図3 正常状態.
正常状態（○）と前房水を空気に置換（●）した場合の ϵ と κ の周波数依存性(a)およびその loss tangent 表示（b).

表2 図4 a で用いた誘電パラメータ

	ε_h	κ_l (mS/cm)	$\Delta\varepsilon$	f_c (MHz)	β
分散1(低周波)	355	2.9	420,000	0.015	0.94
分散2(高周波)	55	7.2	300	2.4	0.94

ε_h：誘電率の高周波収斂値　κ_l：導電率の低周波収斂値
$\Delta\varepsilon$：誘電率増分($=\varepsilon_l-\varepsilon_h$)　ε_l：誘電率の低周波収斂値
f_c：特性周波数　β：Cole-Cole パラメータ

表3 図4 b で用いた誘電パラメータ

	ε_h	κ_l (mS/cm)	$\Delta\varepsilon$	f_c (MHz)	β
分散1(低周波)	490	1.15	120,000	0.01	0.86
分散2(高周波)	40	2.7	450	1.5	0.97

ε_h：誘電率の高周波収斂値　κ_l：導電率の低周波収斂値
$\Delta\varepsilon$：誘電率増分($=\varepsilon_l-\varepsilon_h$)　ε_l：誘電率の低周波収斂値
f_c：特性周波数　β：Cole-Cole パラメータ

房水の70%エタノール置換の2つの処理を同時に施した場合の結果をプロットした.

白色家兎角膜の透過電顕写真を図5に示す. 正常角膜上皮側（a), 機械的上皮剝離角膜の上皮側（b), 正常角膜内皮側（c）およびアルコール性内皮傷害後の内皮側（d）である. (b)ではほぼ完全に角膜上皮細胞層が除かれており, (d)では70%エタノールによる角膜内皮細胞の膨潤像ならびに細胞膜破壊像が観察された.

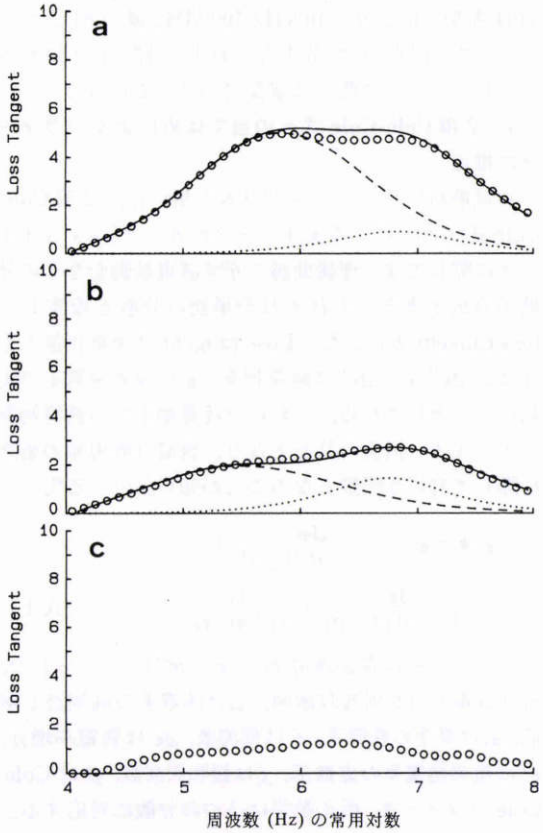

図4 角膜に各種の処理を施した場合の loss tangent の周波数依存性.
a：機械的角膜上皮剝離. b：前房水のエタノール置換による角膜内皮傷害. c：機械的上皮剝離＋エタノールによる内皮傷害. プロットは実測値. 実線は2項 Cole-Cole 式による最適理論曲線. 2種の破線はこれを2つの分散に分解したもの. 表2, 表3に a および b の誘電パラメータを示す.

IV 考 按

眼組織の誘電特性に関する研究では, 摘出水晶体を対象とするいくつかの報告がある[4)5)]. 水晶体では, shell モデルに基づく詳細な誘電理論解析[3)]により, $10^2-5\cdot10^8$ Hz 域での水晶体の示す誘電分散現象は基本的に生体膜に由来する, いわゆる“β 分散[1)]”である

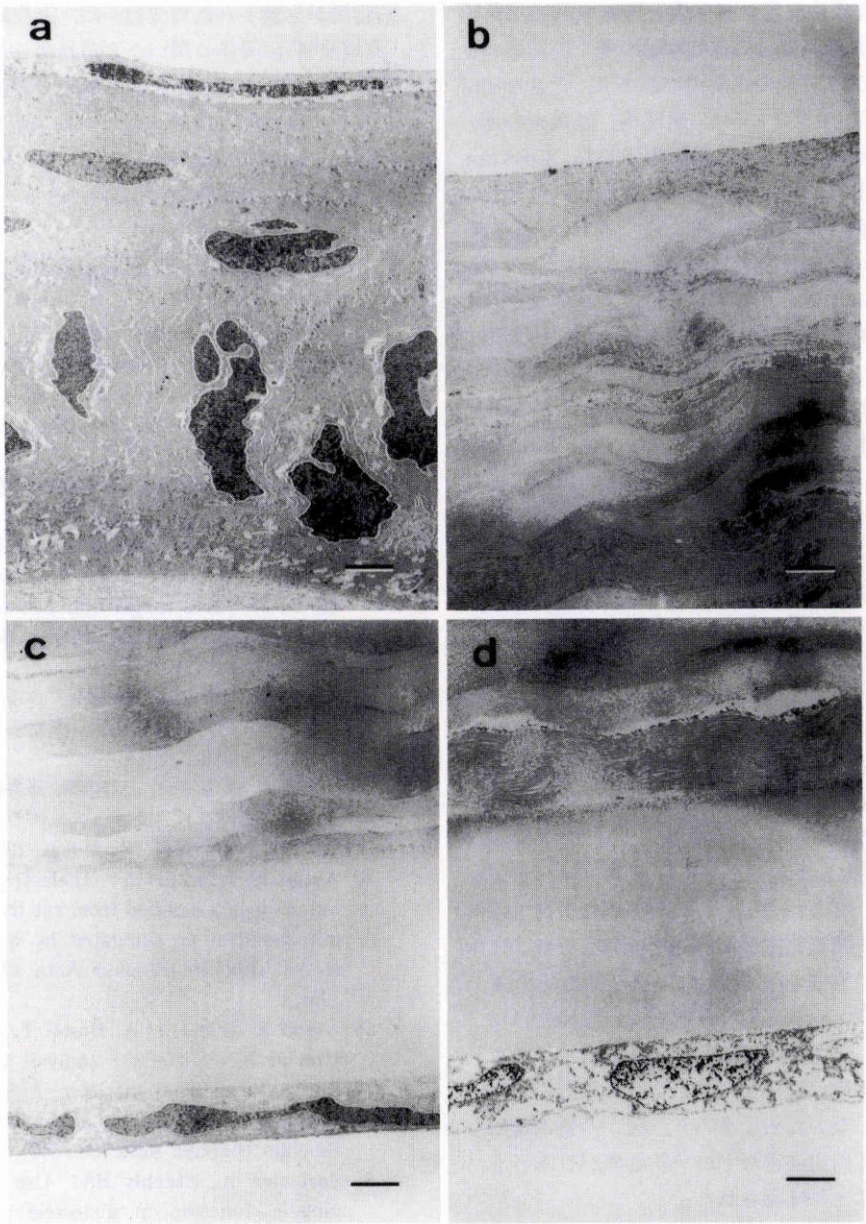

図5　透過型電子顕微鏡写真.

a：正常角膜上皮．数層の角膜上皮細胞を認める．b：機械的上皮剝離後の角膜上皮側．上皮細胞が除去され角膜実質が露出している．家兎ではボーマン膜は痕跡的で目立たない．c：正常角膜内皮側．一層の内皮細胞，デスメ膜，角膜実質の一部を認める．d：70%エタノールにより内皮細胞層を処理した角膜内皮側．内皮細胞の浮腫・細胞膜の破壊が認められ、デスメ膜・角膜実質には大きな変化を認めない．（バーは2 μm）

ことを既に我々が示した．角膜の電気生理学的研究も多数報告されているが，多くは *in vitro* での研究であり，我々の試みているような *in situ* のアプローチは比較的少ない．

今回用いた測定周波数は 10^4～10^8Hz であり，この周波数領域で誘電分散現象を起こさせるものは，水晶

体の[3]場合と同様に無傷の細胞膜と考えられる．角膜組織中には上皮細胞層と内皮細胞層に多くの細胞が存在し，これらがβ分散の主要因であろう．正常な摘出眼球前部の測定例(図2)では，誘電率，導電率のカーブはともに非常になだらかな分散を示した．Loss tangent上では，10^7Hz付近にピークをもつ幅広の分散となり，眼球内部の複雑な構造を反映するものと考えられる．前房水の空気置換実験で示したように，この方法では角膜のみにとどまらず，虹彩・水晶体などの深部組織をも同時に測定している可能性が高い．また，前房水を空気で置換した測定例では，虹彩・水晶体などの後部構造は絶縁されるので，これが実質的な角膜のみの誘電挙動に近いと考えられる．そのloss tangent表示（図3）をみると，図2では判別困難であった低周波側の分散の肩（周波数10^5～10^6Hzを中心とする分散）がより明確となり，角膜自体に2つの誘電分散が関係することが示唆される．

上述のごとく，分散に寄与する角膜内の部位は，上皮細胞層と内皮細胞層であり，角膜の2つの分散はこの2層に割り振られるのが自然である．角膜上皮を機械的に剝がした場合，loss tangent上で2つに分割した理論曲線（図4a）で見ると，低周波側の分散1が大きくなり，反対に高周波側の分散2は小さくなった．角膜内皮を70%エタノールで破壊した実験では，図4bのように，分散1は大きく低下し，分散2には著変を認めなかった．このことより，低周波側の分散1は角膜内皮細胞層と密接に関係し，高周波側の分散2は角膜上皮細胞層の影響を強く受けていると推定される．また，角膜上皮・内皮ともに傷害を受けた場合には，図4cのように分散現象がほとんど消失した．残された角膜実質は細胞(膜)成分に乏しく，β分散の発生にほとんど寄与しないためであろう．図5の透過電顕写真で上皮剝離，内皮傷害などの角膜処理が目的どうりなされていることが確認された．

以上のように，表面電極法による角膜の*in situ*誘電測定を行い，その挙動を2項Cole-Cole式により解析すると，2つの誘電分散に分解されたので，角膜内皮細胞層が分散1（低周波側）に，上皮細胞層が分散2（高周波側）に関係の深いことが判明した．このように，特徴的な2つの分散の起源が推定できたので，今後は本法を各種の角膜異常に対して*in situ*で適用し，loss tangent表示を併用することにより，角膜疾患の電気生理学的な定量的評価が可能であることが示唆された．

本論文の要旨は第95回日本眼科学会総会（1991年）において発表した．

文　献

1) **Foster KR, Schwan HP**: Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. Crit Rev Biomed Eng 17: 25—104, 1989.
2) **人交昭彦，渡辺牧夫**：生体組織・細胞の誘電解析．病態生理 11: 372—378, 1992.
3) **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.
4) **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.
5) **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.
6) **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.
7) **Asami K, Irimajiri A, Hanai T, Shiraishi N, Utsumi K**: Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver. I. Swollen mitoplasts as simulated by a single-shell model. Biochim Biophys Acta 778: 559—569, 1984.
8) **Surowiec A, Stuchly SS**: Use of the loss-tangent function in dielectric spectroscopy. Bioelectromagnetics 7: 259—269, 1986.