

# 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

目代 康子<sup>1)2)</sup>, 渡辺 牧夫<sup>1)2)</sup>, 安藤 元紀<sup>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

組織の電気的特性に着目した角膜障害の定量的評価法の確立を目指して, 70%エタノール点眼による家兎角膜の上皮障害を作り, その治癒過程を表面電極を用いる誘電測定によって17日間にわたり追跡した。データは現象の整理に有用な loss tangent (誘電正接) で表現し, そのピーク値の比を以て上皮障害度を表す指標とした。眼球前部では  $10^4\text{Hz} \sim 10^8\text{Hz}$  の周波数域において, 幅広の誘電分散が認められ, これは2つの分散に分割できた。障害作成直後では  $P_1/P_t$  比 ( $P_t$ : loss tangent 上の分散全体のピーク値,  $P_1$ : 低周波側のピーク値) は著明に上

昇し, 治癒につれて元のレベルに戻った。 $P_2/P_t$  比 ( $P_2$ : 高周波側のピーク値) は逆の経過をたどった。これらの誘電的指標の消長と障害面積との間には有意の相関が認められた。したがって, 上皮障害を含む角膜疾患に対して, 微細なレベルでの新しい定量的評価を行える可能性が示唆された。(日眼会誌 98: 215—223, 1994)

キーワード: インピーダンス, 角膜上皮障害, 創傷治癒, 誘電解析, 誘電正接

## Dielectric Behavior of the Rabbit Cornea as a Measure of the Healing Process in Injured Epithelium

Yasuko Mokudai<sup>1)2)</sup>, Makio Watanabe<sup>1)2)</sup>, Motonori Ando<sup>2)</sup>  
and Hisayuki Ueno<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, <sup>2)</sup>Department of Physiology, Kochi Medical School

### Abstract

To correlate changes in the passive electrical properties of the rabbit cornea with quantitative grading of corneal injuries induced by topical application of 70% ethanol, we measured ocular tissue impedances using a surface electrode over the range of  $10^4 \sim 10^8$  Hz and followed their temporal changes for up to 17 days. Dielectric measurements on control eyes yielded a broad dispersion curve, which, in loss tangent terms, could be decomposed into two components: dispersion 1 on the low-frequency side and dispersion 2 on the high-frequency side. By defining the peak value of the total dispersion as  $P_t$  and those of subdispersions 1 and 2 as  $P_1$  and  $P_2$ , the ratios,  $P_1/P_t$  and  $P_2/P_t$ , were found to serve as

useful indices. Upon appearance of corneal erosion due to ethanol,  $P_1/P_t$  markedly increased and returned to the control level with re-epithelialization of the cornea, and the time course of  $P_2/P_t$  showed a mirror image to that of  $P_1/P_t$ . Both ratios correlated well with the erosion area determined photographically. These results indicate that dielectric spectroscopy is applicable to the assessment of the extent and severity of corneal injury. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 215—223, 1994)

Key words: Impedance, Corneal epithelial injury, Wound healing, Dielectric analysis, Loss tangent

## I 緒 言

角膜疾患とくに上皮の損傷例は, 日常診療での頻度も高く, 眼科臨床において重要な位置を占める。このよう

な上皮障害の評価法としては, フルオレセイン染色, あるいは最近ではスペキュラーマイクロスコープによる角膜上皮の撮影<sup>1)2)</sup>なども行われている。後者の場合, 評価の指標は形態学的特徴である。しかし, ヒトの角膜内皮

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 目代 康子

(平成5年8月12日受付, 平成5年11月12日改訂受理)

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

(Received August 12, 1993 and accepted in revised from November 12, 1993)

はほとんど再生しないのに、上皮は盛んに増殖し、しかも細胞が数層に重なるため、角膜上皮の病的状態の把握に当たり、種々の問題が生ずる。すなわち、内皮のように細胞数やその形態学的特徴をみるだけでは、不十分なことが多い。また、上皮細胞同志の接着不良のため治癒が遅れたり、再発を繰り返すこともある。したがって、上皮層を全体として捕える定量的評価に際しては、スペキュラーマイクロスコープ法による形態観察のみではなく、異なる視点に基づく上皮機能評価法の導入が望まれる。

誘電分散法は、細胞・生体組織の内部構造を破壊することなく、細胞膜や細胞内部の電気的特性を調べることができる手法である<sup>3)4)</sup>。眼球組織に対する本法の適用例としては、カエルやラットの摘出水晶体の誘電挙動<sup>5)~7)</sup>および *in vivo* 家兎眼球前部の誘電測定の結果<sup>8)</sup>がすでに我々のグループにより報告されている。本研究は、その臨床応用を目指す予備実験の1つである。すなわち、細胞あるいは上皮層レベルでの変化を定量的に調べることが目的として、家兎角膜に実験的上皮障害を作成し、治癒に向かう過程での角膜誘電挙動の変化を追跡したので報告する。

## II 実験方法

白色家兎8匹15眼を使用した。6匹12眼は2群に分けて角膜上皮障害を作成し、治癒過程における角膜の誘電挙動の変化を観察した。2匹3眼は組織学的検討に供した。

### 1. 角膜上皮障害の作成

ベントバルビタールナトリウム (ネンプタール®) 50 mg/kg の腹腔内投与により全身麻酔し、さらに0.4% 塩酸オキシプロカイン (ベノキシール®) で表面麻酔した後、70% エタノールの点眼により角膜上皮障害を作成した。I群 (広汎障害群) では70% エタノール1 ml を角結膜の全表面に1分間かけて滴下後、生理食塩水で十分に洗浄した。これに対してII群 (限局性障害群) では、角膜輪部および結膜に障害が及ばないように、断端の滑らかなプラスチックの円筒 (内径11 mm) を角膜面に圧着し、この円筒内に70% エタノール1 ml を1分間かけて滴下、吸引除去の後、生理食塩水で十分に洗浄した。

### 2. 誘電率 ( $\epsilon$ ) と導電率 ( $\kappa$ ) の測定

測定直前に上記の方法で麻酔し、被検動物の不動化をはかった。前報<sup>8)</sup>と同様に、網膜電位図用角膜電極を改造した同心円状表面電極 (中心電極: 直径3.5 mm, 輪状電極: 内径11.5 mm, 幅0.5 mm) を用い、これを角膜表面に直接接触させた。YHP社インピーダンス・アナライザ (4194 A) およびインピーダンス・プローブ (41941-61002) を用いて、10<sup>4</sup> Hz ~ 10<sup>8</sup> Hz にわたる広帯域誘電測定を行った。1回の走査は約40秒で完了した。

### 3. 誘電測定データの処理

2項 Cole-Cole 式<sup>9)</sup>に基づくカーブ・フィッティングおよび loss tangent 表示を行った。実測値を複素誘電率  $\epsilon^*$  ( $=\epsilon' - j\epsilon''$ ) の実部と虚部に分けて表すと、 $\epsilon' = \epsilon$  および  $\epsilon'' = \kappa/2\pi f\epsilon_v$  ( $f$  = 周波数,  $\epsilon_v$  = 真空の絶対誘電率) になる。直流導電率  $\kappa_1$  の影響を除いた損失項  $\Delta\epsilon'' = (\kappa - \kappa_1)/2\pi f\epsilon_v$  を用いることにすれば、loss tangent (誘電正接) は次式で与えられる。

$$\text{loss tangent} = \Delta\epsilon''/\epsilon' \quad (\text{式1})$$

一方、組織の誘電挙動は下記の拡張 Cole-Cole 式でうまく表現されることが多い。

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

ここに、 $\Delta\epsilon$  = 誘電率増分,  $\epsilon_h = \epsilon$  の高周波収斂値,  $f_c$  = 特性周波数,  $\beta$  = Cole-Cole パラメータ,  $j = (-1)^{1/2}$ , 添え字は分散1と2を意味する。

データ処理はすべて自作のプログラム<sup>8)</sup>を用いて実施した。すなわち、まず実測値より式1から loss tangent を計算した。次に、式2に対するカーブ・フィッティングを行い、全体の分散を分散1と分散2の2成分に分離した。このようにして得られた2つの分散について、再び式1に従いそれぞれの loss tangent 値を計算により推定した。なお、カーブ・フィッティングに際しては、式2に含まれる各パラメータを系統的に変化させ、計算値と実測値の残差の総和が最小になる点をもって最適曲線とした<sup>8)</sup>。

### 4. 経過観察

I群, II群それぞれ3匹6眼について、角膜のエタノール処理前、処理直後、および1, 3, 6, 10, 17日後にインピーダンス測定を行った。引き続きフルオレセインで染色し、前眼部の表面像を毎回写真撮影した。2, 4の操作後、角膜保護剤および抗生物質眼軟膏を点入した。

### 5. 角膜びらん面積の測定

前項の操作により得られたフルオレセイン染色前眼部写真から、GRAPHTEC社製デジタイザー MITABLET-II を用いて、各時点での角膜全体に対する障害部の面積比を求め%表示した。ただし、角膜の曲率に起因する誤差については、とくに補正していない。

### 6. 組織学的観察

家兎2匹を用い、1匹の片眼はI群の方法で、他眼はII群の方法で角膜上皮障害を作成し、3日後に眼球摘出、ホルマリン固定後、HE染色およびPAS染色組織標本を得た。また、1匹1眼は正常例として同様の標本作成に供した。

### III 結果

#### 1. 正常角膜の誘電挙動 (図1)

一般に、組織や細胞懸濁液のインピーダンスに関しては、周波数が高くなるにつれて試料の誘電率( $\epsilon$ )は減少し、導電率( $\kappa$ )は逆に増加する現象が認められる。これを“誘電分散”と呼んでいる<sup>3)4)</sup>。眼球前部(正常12眼)から得られた誘電分散曲線の平均値を図1に示す。ここでは“平均値”をプロットしたが、標準偏差で示した個別眼間の変動の程度は誘電分散特性を損なう性質のもの

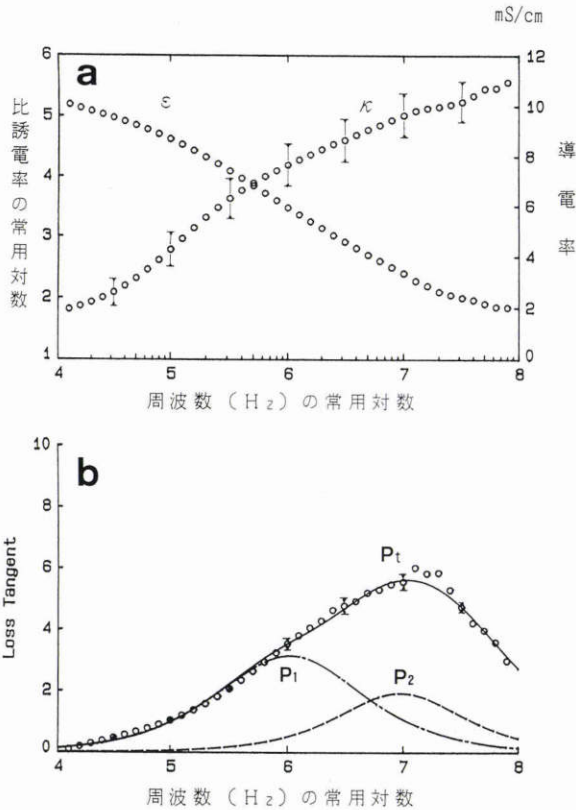


図1 正常眼球前部の誘電挙動(白色家兎, 6匹12眼の平均値)。

a: 誘電率( $\epsilon$ )と導電率( $\kappa$ )の周波数依存性。b: loss tangentの周波数依存性。

丸印: 12眼の平均値( $\pm$ 標準偏差)。  $\epsilon$  値の標準偏差は丸印の直径以下である。 —: 2項 Cole-Cole 式による最適理論曲線。 ---, - - - : 2つの分散に分割したもの。  $P_t$ : 全体の分散のピーク値。  $P_1$ : 低周波側の分散のピーク値。  $P_2$ : 高周波側の分散のピーク値。解析に用いた誘電パラメータを表1に示す。

表1 図1 bで用いた誘電パラメータ

	$\epsilon_h$	$\kappa_1$ (mS/cm)	$\Delta\epsilon$	$f_c$ (MHz)	$\beta$
分散1(低周波)	950	0.9	88,000	0.08	0.92
分散2(高周波)	50	5.4	900	1.6	0.97

$\epsilon_h$ : 誘電率の高周波収斂値  $\kappa_1$ : 導電率の低周波収斂値  
 $\Delta\epsilon$ : 誘電率増分 (=  $\epsilon_l - \epsilon_h$ )  $\epsilon_l$ : 誘電率の低周波収斂値  
 $f_c$ : 特性周波数  $\beta$ : Cole-Cole パラメータ

ではなく、少なくとも  $\kappa$  の絶対値を問題とするのでない限り、特性の全体像はよい再現性をもつことがわかった。 $\kappa$  値の変動をもたらす要因としては、個体差よりも角膜表面の濡れ具合、電極の圧着度などがあげられ、いずれも「表面電極法」を採用する場合には避け難いものであった(しかし、次に述べる loss tangent の計算では、定義からも明らかなように、“ $\kappa - \kappa_1$ ”という差を扱うので、個別眼間の  $\kappa$  の変動自体はキャンセルされ、重大な支障にはならない)。結局、 $10^4$  Hz ~  $10^8$  Hz の周波数域にわたり、生体組織一般において観測されるような幅広の誘電分散が認められ(図1 a), 眼球内部の複雑な構造を反映するものと解される。

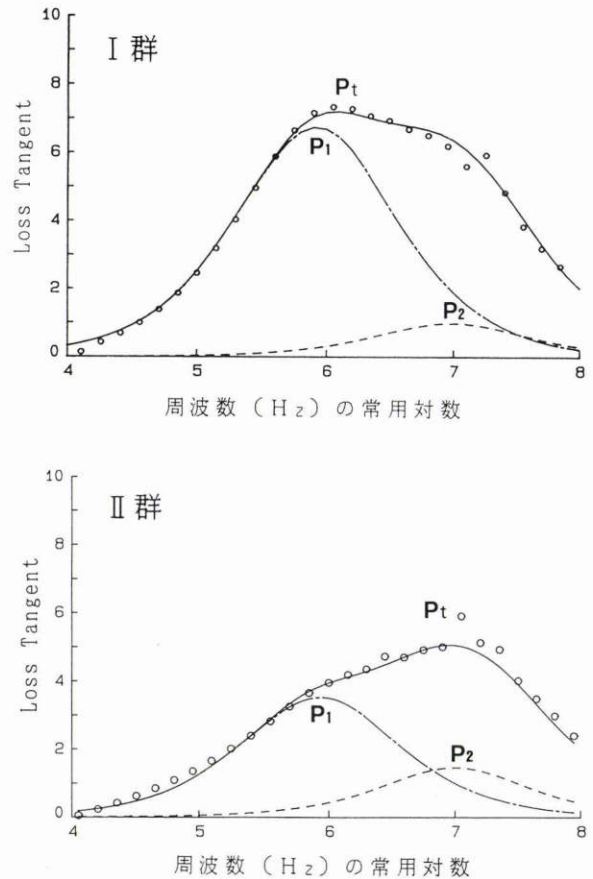


図2 70%エタノール処理直後における loss tangentの周波数依存性(典型例)。

I群: 広汎障害群, II群: 限局性障害群。

記号は図1と同様。カーブ・フィッティングから得られた誘電パラメータを表2に示す。

表2 図2で用いた誘電パラメータ

	$\epsilon_h$	$\kappa_1$ (mS/cm)	$\Delta\epsilon$	$f_c$ (MHz)	$\beta$	
I群	分散1	428	5.1	240,000	0.031	0.96
	分散2	48	9.8	380	2.8	0.88
II群	分散1	851	4.4	107,000	0.065	0.935
	分散2	51	8.5	800	2.1	0.91

記号の意味は表1に同じ。

Loss tangent は、交流電場中における被測定物質のエネルギー損失の目安であり、生体試料の誘電分散現象を整理する場合にも便利な関数である<sup>10)</sup>。図1aの誘電挙動を loss tangent で表現すると、図1b(丸印)になる。実線は式1および式2によるカーブ・フィッティングの結果を示す最適曲線である。ここで用いた誘電パラメータの値を表1にあげる。2種の破線はこの曲線を2つの分散に分解し、それぞれトレースしたものである。以下の議論では loss tangent ピーク値の消長が問題になるから、全体の分散のピーク値を  $P_t$ 、低周波側(分散1)および高周波側(分散2)の分散のピーク値をそれぞれ  $P_1$ 、 $P_2$  と呼ぶことにする。このように、上記周波数域内にお

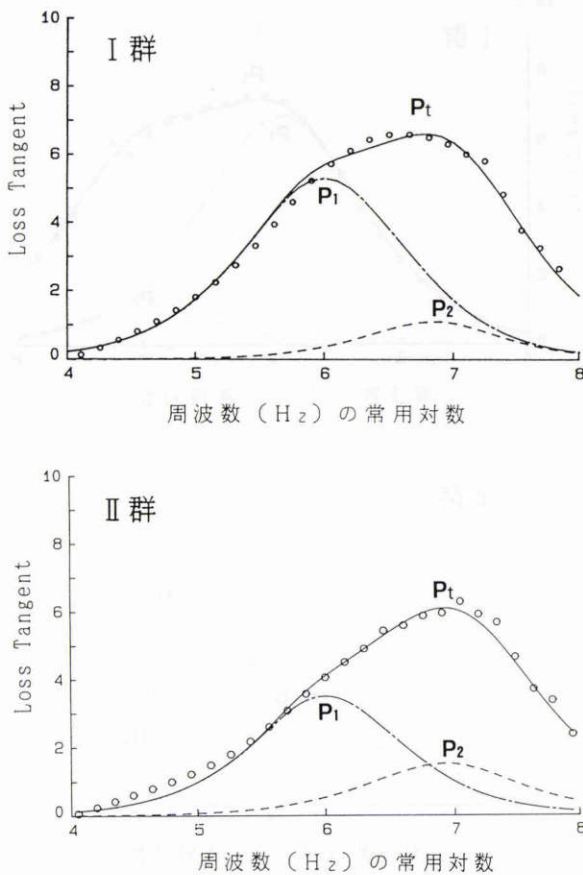


図3 処理後3日目における loss tangent の周波数依存性 (被検眼は図2と同一)。

I群：広汎障害群, II群：限局性障害群。  
記号は図1と同様。カーブ・フィッティングから得られた誘電パラメータを表3に示す。

表3 図3で用いた誘電パラメータ

	$\epsilon_h$	$\chi_1$ (mS/cm)	$\Delta\epsilon$	$f_c$ (MHz)	$\beta$	
I群	分散1	395	5.95	135,000	0.046	0.95
	分散2	45	9.8	350	2.2	0.94
II群	分散1	843	5.0	81,000	0.09	0.95
	分散2	43	9.4	800	1.6	0.90

記号の意味は表1に同じ。

いて眼球前部が示す分散には少なくとも2種類の成分が含まれるが、それぞれの成立要因を分析すると、分散1は角膜内皮側に、分散2は角膜上皮側に関係が深い<sup>8)</sup>。

2. 上皮障害作成後の角膜誘電挙動の変化 (図2, 3)

図2はエタノール処理直後の解析結果である。正常例(図1b)と比較して、全分散のピーク値  $P_t$  に対する  $P_1$  の相対的上昇および  $P_2$  の相対的低下がみられる。これらの変化はI群の方がII群よりも顕著であった。障害作成から3日(図3)経つと、I・II群ともに、直後(図2)に比べ  $P_1$  および  $P_2$  の回復傾向がみられた。

3. フルオレセイン染色による前眼部所見 (図4, 5)

障害作成から24時間後に検査すると、期待どおりに、I群(図4)では角膜全体に及ぶ、II群(図5)では中央部に限局した障害がみられた。日数の経過とともに、これらの上皮障害像は徐々に縮小・軽減し、I群ではおおむね10日目、II群では6日目に正常像が得られた。

4. 組織学的観察 (図6)

障害3日後の角膜について、HE および PAS 染色標本を調べた。HE 染色像では、I群の角膜中央部の上皮組織はほぼ完全に欠損し、周辺部から中央部に向けて上皮細胞が増殖・伸展していた。また、角膜実質には明らかな浮腫像および好酸球と思われる炎症性細胞浸潤を認めた(図6a, b)。II群では、角膜中央部は薄い上皮細胞層に覆われ、周辺部には上皮細胞の増殖・伸展が認められた(図6c, d)。PAS 染色によると、I群で結膜由来と思われる細胞(杯細胞)が角膜領域に少数確認されたが(図6f)、II群ではみられなかった。

5. 障害治癒過程における誘導挙動の変化

角膜誘電特性の指標として loss tangent ピーク値の比( $P_1/P_t$  および  $P_2/P_t$ ) をとり、障害作成後17日目までその変化を追跡した(図7, 表4)。I群の場合、 $P_1/P_t$  比は処理前と比較して直後には著明に上昇し、ほぼ1週間で元のレベルに戻った。反対に、 $P_2/P_t$  比は処理前に比べ直後には著明に低下し、その後徐々に回復した。II群ではこの変化はI群のそれより少なかった。

I群では  $P_1/P_t$  比、 $P_2/P_t$  比ともに処理前に比べ、直後、1日後、3日後で有意差を認め ( $p < 0.01$ )、6日目以降の有意差は消失した。II群では  $P_1/P_t$  比は処理前に比べ、直後 ( $p < 0.01$ )、1日後 ( $p < 0.05$ ) で有意差を認め、3日目以降の有意差は消失した。 $P_2/P_t$  比は1日後 ( $p < 0.01$ )、3日後 ( $p < 0.05$ ) のみで有意差を認め、直後および6日目以降では有意の差を認めなかった。

6. 誘電的指標 ( $P_1/P_t$  比、 $P_2/P_t$  比) と障害面積との相関 (図8)

I群(図8a)の場合、 $P_1/P_t$  比は障害面積との間に有意の正の相関 ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.001$ ) があり、 $P_2/P_t$  比では有意の負の相関関係 ( $r = -0.77$ ,  $p < 0.001$ ) を認めた。II群(図8b)でもこの傾向は同様であった。回帰直線に対するデータの散り方はII群よりもI群の方が激しい

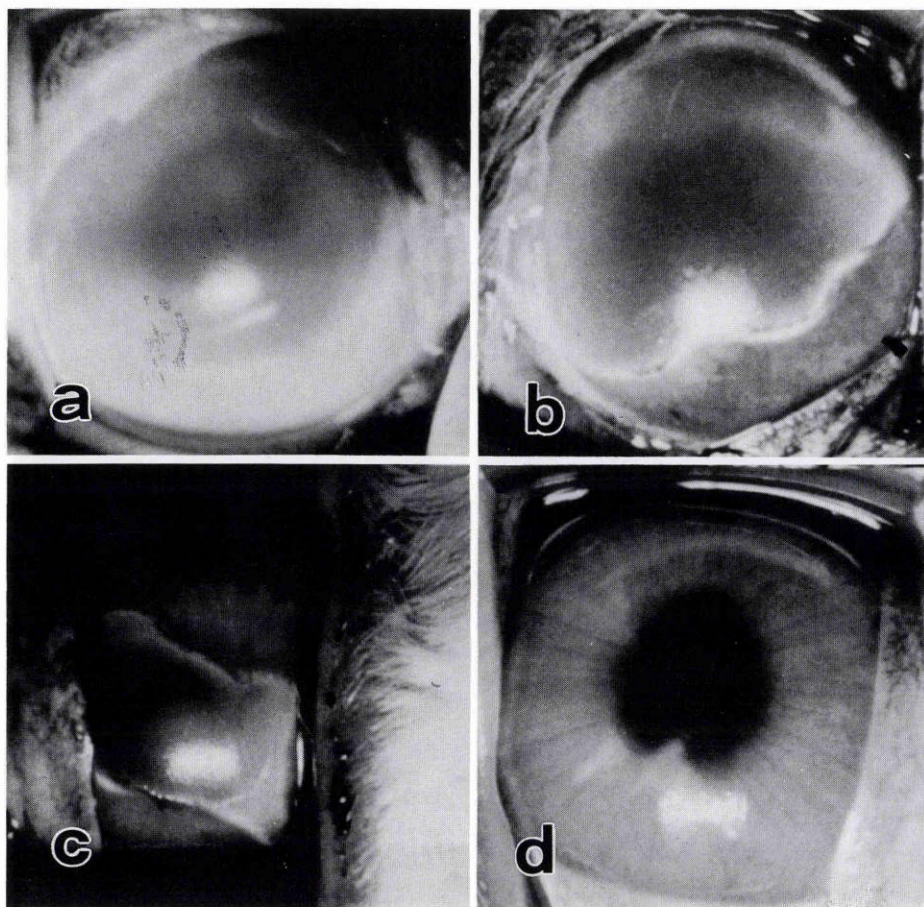


図 4 上皮障害修復過程を示すフルオレセイン染色後の前眼部所見 (I 群).  
a: 処理 1 日後, b: 3 日後, c: 6 日後, d: 10 日後.

表 4 上皮障害の治癒過程における  $P_1/P_t$  比,  $P_2/P_t$  比の経日変化 (平均値 ± 標準偏差)

	$P_1/P_t$ 比		$P_2/P_t$ 比	
	I 群	II 群	I 群	II 群
処理前	0.533 ± 0.027	0.528 ± 0.017	0.298 ± 0.027	0.318 ± 0.017
直 後	0.927 ± 0.011*	0.650 ± 0.039*	0.147 ± 0.012*	0.292 ± 0.019
1 日後	0.902 ± 0.023*	0.597 ± 0.041**	0.157 ± 0.036*	0.249 ± 0.030*
3 日後	0.744 ± 0.065*	0.556 ± 0.039	0.219 ± 0.029*	0.248 ± 0.056**
6 日後	0.562 ± 0.039	0.449 ± 0.032	0.284 ± 0.074	0.325 ± 0.055
10 日後	0.512 ± 0.054	0.501 ± 0.038	0.309 ± 0.092	0.312 ± 0.032
17 日後	0.507 ± 0.061	0.498 ± 0.038	0.035 ± 0.071	0.301 ± 0.012

\* $p < 0.01$  \*\* $p < 0.05$

記号の意味は図 7 に同じ.

p: 対応のある t 検定による処理前の値に対する有意水準.

にもかかわらず, 相関度の点では I 群が II 群よりも高かった.

#### IV 考 按

角膜は上皮, ボーマン膜, 実質, デスマ膜 (家兎では痕跡的) および内皮の 5 層が重畳した組織であるが, 細胞のほとんどは上皮層と内皮層に存在する. 誘電分散現象は組織構築, とりわけ“細胞”の電気的性質を反映す

る<sup>34)</sup>ので, 角膜の誘電分散の主要因は上皮と内皮の細胞層とみてよい. では, 上皮層の障害により  $P_1$  の上昇と  $P_2$  の低下をもたらす理由は何であろうか.

眼球前部の示す誘電分散は 2 つの成分に分けられる. 渡辺ら<sup>9)</sup>は上皮あるいは内皮の選択的欠損を生じさせ, 表 5 に要約される結果を得た. これは分散 1 が内皮層に由来するものであり, 分散 2 は上皮層がその主要因であることを示唆する. この実験では物理的に上皮を欠損さ

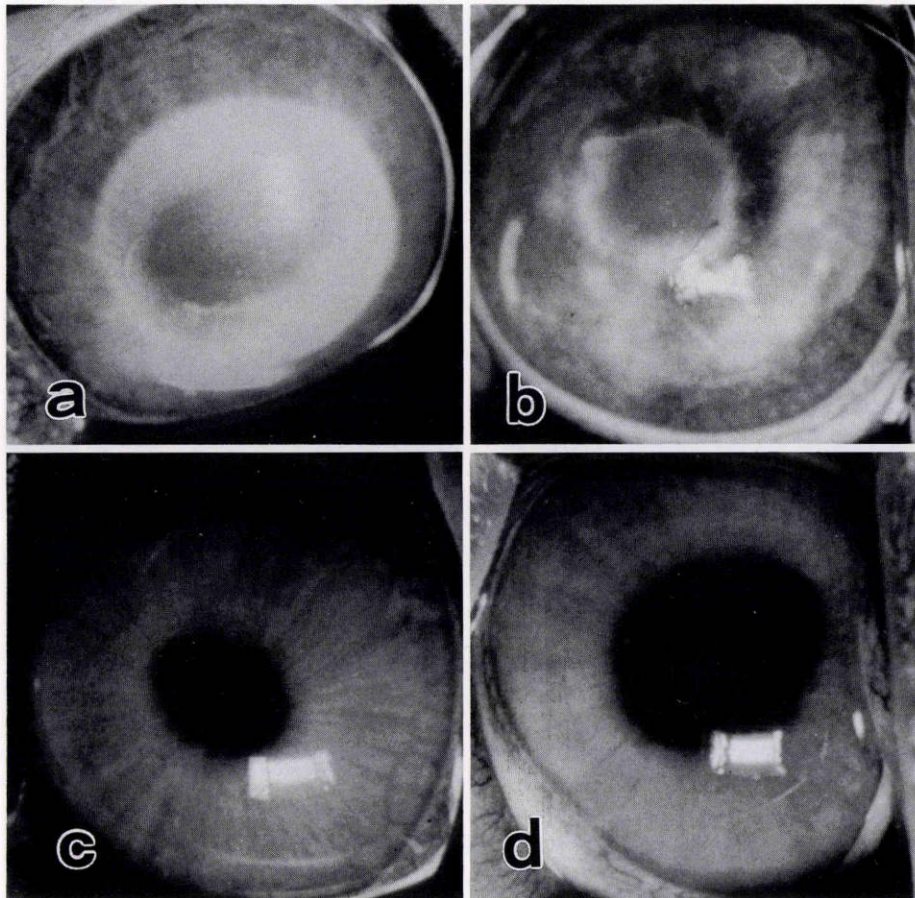


図5 上皮障害修復過程を示すフルオレオセイン染色後の前眼部所見 (II群).  
a: 処理1日後, b: 3日後, c: 6日後, d: 10日後.

表5 上皮または内皮の障害による誘電的指標の増減ならびにその理由

処置	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
上皮除去 内皮無傷	著しく 上昇 (分散1の強度を減弱させていた上皮層が除かれた)	低下 (分散2の成因が消滅した)
上皮無傷 内皮障害	やや 低下 (分散1の原因が消滅した)	不変 (分散2の原因が健在)
上皮除去 内皮障害	低下 (分散1の原因が消滅した)	低下 (分散2の原因が消滅した)

“上昇”, “低下”, “不変”: 正常角膜の指標を基準とした判定.  
処置により P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>が変化する理由を括弧内に付記した.

せたが、今回我々は化学的上皮障害を作成し、誘電挙動の視点から治癒過程を追跡した。その結果、上皮障害作成直後には loss tangent ピーク値の比である P<sub>1</sub>/P<sub>t</sub>比の上昇と同時に P<sub>2</sub>/P<sub>t</sub>比の低下が観察され、角膜上皮細胞層が分散2の主要因であることを再確認した。したがって、上皮障害時に P<sub>1</sub>/P<sub>t</sub>比が増大するメカニズムとしては、① 上皮欠損により、無傷眼に比べて電気力線がより容易に深くまで到達する。それゆえ、② 角膜の最深部に存在する内皮層の誘電分散(すなわち P<sub>1</sub>)が相対的に増強される。さらに、③ 虹彩や水晶体に起因する分散強度も重畳する可能性がある。この場合、誘電分散は“細胞”とくに“膜”の存在によって生ずるものであるから、膨化した実質(図6 a, b)の影響は無視してよいと考えら

れる。いずれにせよ、上皮障害の治癒と平行して誘電的指標も回復するので、誘電分散法から得られる情報が角膜上皮の状態(欠損域の広さ、障害細胞層の深さなど)を反映することは確かである。

角膜上皮障害の定量的指標として、我々は“P<sub>1</sub>/P<sub>t</sub>比”および“P<sub>2</sub>/P<sub>t</sub>比”の2つに注目した。前者の方が後者よりも顕著な変化を示し、また経日変化(図7)においても障害面積との関係(図8)においても、データのばらつきが少なかった。単一指標としての P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub>比も検討したが、経日変化での変動係数(標準偏差/平均値)の平均値をみると P<sub>1</sub>/P<sub>t</sub>=0.066, P<sub>2</sub>/P<sub>t</sub>=0.143, P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub>=0.174 となり、指標としては P<sub>1</sub>/P<sub>t</sub>比が最良であった。また、角膜内皮のみを選択的に障害した場合、P<sub>1</sub>/P<sub>t</sub>比は著明に

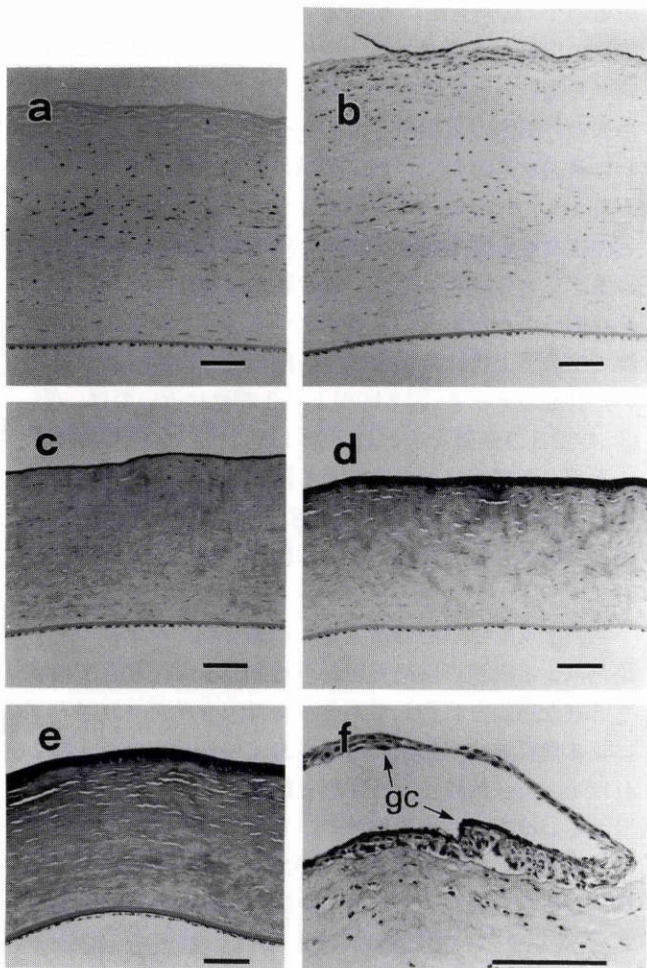


図 6 家兎角膜標本の光顕写真 (スケールはすべて 100  $\mu\text{m}$ ).

a: I 群, 処理 3 日後, 中央部. b: I 群, 処理 3 日後, 周辺部. c: II 群, 処理 3 日後, 中央部. d: II 群, 処理 3 日後, 周辺部. e: 正常, 中央部. a~e はすべて HE 染色. f: a, b と同じ組織の PAS 染色像. b の反対側に位置する周辺部. a, b, c, d, f は同一家兎から作成した.

I 群では, 角膜中央部の上皮組織が欠損し (a), 周辺部から上皮細胞が増殖・伸展していた (b). また, 角膜実質には著明な浮腫および炎症性細胞浸潤を認めた. II 群では, 角膜中央部は薄い上皮細胞層に被われ (c), 周辺部では上皮細胞の増殖・伸展が認められた (d). I 群においては PAS 陽性の杯細胞 (gc) が角膜領域に少数確認された (f).

低下するが,  $P_2/P_t$  比には著変を認めない. 以上から, 角膜障害の定量化に際して, 検出能力の高いのは  $P_1/P_t$  比であり, これが主たる指標となる. しかし, 例えば上皮・内皮ともに障害された場合<sup>8)</sup>には,  $P_1/P_t$  比だけでは判定が難しい場合もあり,  $P_2/P_t$  比も補助的な指標としては考慮すべきであろう.

上皮の幹細胞は角膜輪部に存在し, 上皮障害の治癒過程においてはもちろん, 正常時にも上皮細胞の再生・更新に大きな役割を果たすと考えられている<sup>11)~15)</sup>. したがって, 角膜上皮障害が輪部の幹細胞にまで波及すれば,

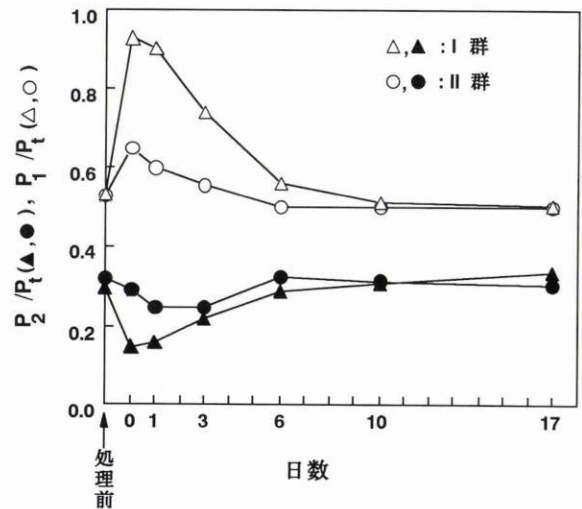


図 7 上皮障害の治癒過程における  $P_1/P_t$  比,  $P_2/P_t$  比の経日変化 (平均値).

$P_t$ : 全体の分散のピーク値.  $P_1$ : 分散 1 のピーク値.  $P_2$ : 分散 2 のピーク値.

正常な上皮への修復は困難となり, 結膜上皮が角膜上皮に侵入する. 侵入してきた細胞については, その性状が変わらないままに留まる<sup>16)</sup>のか, あるいは角膜上皮細胞に化生・転換する<sup>17)~19)</sup>のかは, 現在のところ確定していない. いずれにせよ, 輪部上皮が障害されると角膜上皮への再生能は極度に低下し, 角膜上皮疾患へとつながる.

我々はこの点に着目し, エタノール性角膜上皮障害を作成する際に 2 つのグループ (I 群: 角膜輪部を含む角結膜全体の障害, II 群: 輪部を除く中央部のみの障害) に分けた. 組織の誘電挙動は細胞層の電気的性質と組織構築を反映するので, 今回の障害実験により見出された誘電的指標の変化は, ① 障害面積, ② 障害深度, ③ 細胞組成の変化 (異種細胞の出現 = 結膜上皮細胞の伸展) など複数の因子の影響をうけているはずである.

まず, ① 障害面積については, I, II 群ともに  $P_1/P_t$  比および  $P_2/P_t$  比と障害面積との間に有意の相関を認め (図 8 a, b), これらの指標は障害面積の広狭をよく反映している. 図 8 の回帰直線に対するデータの散り方は, I 群の方が II 群より激しいにもかかわらず, 相関度の点では I 群の方が優れていた. その理由は, 図 8 a の横軸 (障害面積) の両端 (0% と 100%) にデータが集中し, かつ揃っているためである. また, 本実験で用いた表面電極法では, 中心電極と輪状電極に挟まれるドーナツ状の部分の誘電挙動をみており, 中心電極 (直径 3.5 mm) に覆われる直下の区域は測定できない可能性がある. したがって, 障害部位が縮小し中心電極下に隠れた場合には, 障害度の判定は難しいと予想される. 障害面積と  $P_1/P_t$  比,  $P_2/P_t$  比との相関について I 群と II 群のデータをまとめると (図 9), 障害面積が 60% 以上のときに  $P_1/P_t$  比および  $P_2/P_t$  比の傾きが強くなる傾向がある (2 相性に近い). 60% 以上の障害時には, 障害面積に加えて, ②

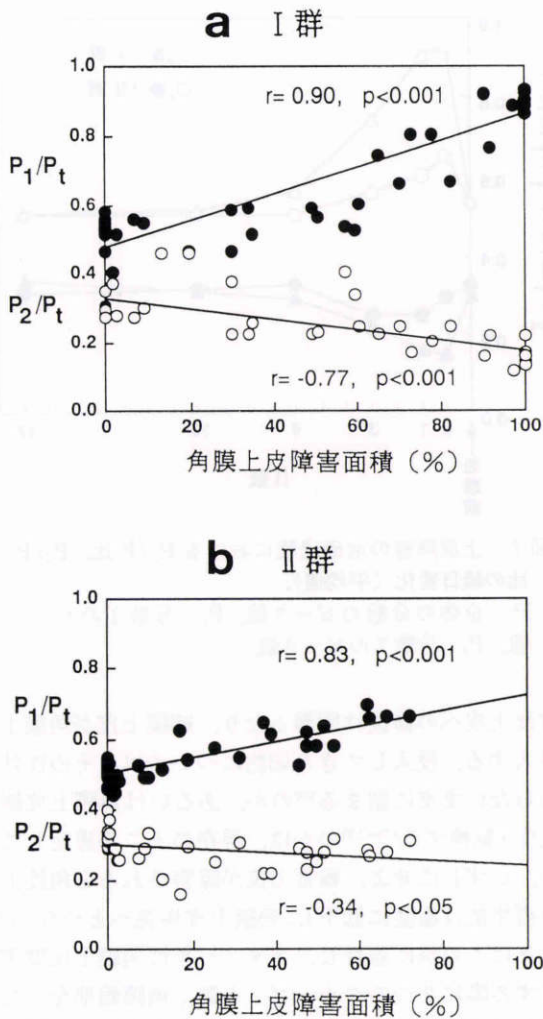


図8 治療過程における上皮障害残存部分の面積(%)と  $P_1/P_t$ 比,  $P_2/P_t$ 比との相関。  
 黒丸:  $P_1/P_t$ 比, 白丸:  $P_2/P_t$ 比, r: 相関係数, p: F検定による有意水準。

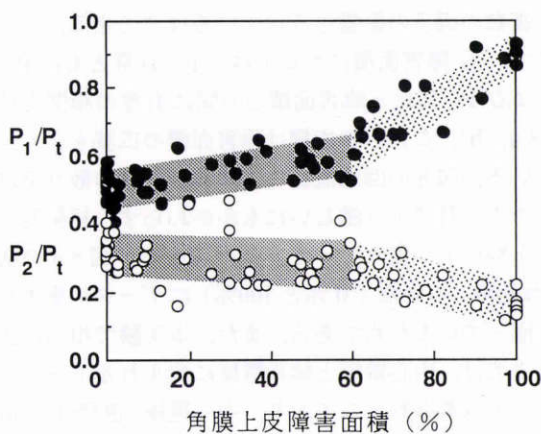


図9 図8におけるI群とII群のデータを合わせたもの。  
 障害面積が60%以上の時に  $P_1/P_t$ 比および  $P_2/P_t$ 比の傾きが強くなる(2相性に近い)。

障害深度も深い可能性が高く、傾きが強くなる原因の1つと考えられる。また、I群では輪部上皮も障害されて

いるので、結膜上皮の角膜への伸展一すなわち、③異種細胞の出現が予想される。しかし、今回の組織標本は障害3日後という比較的早い時期のものであるため、結膜由来の杯細胞の出現頻度はそれほど大きくなかった。さらに経過を追跡していれば、PAS陽性細胞が増加<sup>15)</sup>していたかも知れない。この結膜由来の細胞が誘電的指標にどのような影響を及ぼすかは不明であるが、図8aにおけるデータのばらつきは、測定誤差に加え、これらの複雑な因子がからんでいる可能性がある。これに比べ、II群では輪部上皮は無傷なので異種細胞の出現はあり得ない。II群のデータ(図8b)がより1相性に近いのは、②、③の項目の影響をそれほど強く受けていないためであろう。表面電極法から得られる誘電的指標の変化には、このように多くの因子が関係するものと予想されるので、今後はこれらの因子による影響を個別のかつ詳細に解明することが課題となる。

角膜上皮障害の評価法として、通常はフルオレセイン染色による細隙灯顕微鏡検査が行われるが、最近ではより詳細な評価を目指してスペキュラーマイクروسコープによる角膜上皮撮影法も導入されている。この方法によれば *in vivo* 角膜上皮の細胞を観察できるが、上皮最表層あるいは内皮細胞層だけの、しかも細胞数や形といった形態観察に留まる点に限界がある。上皮全層の、より精細な観察を望むなら、共焦点顕微鏡法の採用が期待されるが、いくつかの問題点もかかえている<sup>20)</sup>。今回我々が行った誘電分散法は、形態観察とは異なる視点から、上皮層の全体を対象として細胞膜や細胞間結合の異常を検出しようとする新しい試みの一つである。誘電スペクトル法という電気生理学的手法を用いて侵襲なしに定量的評価を行える可能性が示唆されたので、今後さらに研究を進めることにより、本法が角膜上皮疾患の予後判定に役立つ有用な指標を提供できるか否かを見極めたい。

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。第一病理学教室円山英昭助教授には組織像について御教示を得ました。併せて感謝いたします。

本研究は平成4年度文部省科学研究費補助金(No.04771355)の補助を受けた。なお、本論文の要旨は第96回日本眼科学会総会(平成4年)において発表した。

文 献

- 1) Tsubota K, Kasahara T: Image analysis of the corneal epithelium. *Ophthalmologica* 200: 68-71, 1990.
- 2) Tsubota K, Yamada M, Naoi S: Specular microscopic observation of human corneal epithelial abnormalities. *Ophthalmology* 98: 184-191, 1991.
- 3) 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.
- 4) Foster KR, Schwan HP: Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical



- review. *Crit Rev Biomed Eng* 17: 25-104, 1989.
- 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) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) **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.
  - 10) **Surowiec A, Stuchly SS**: Use of the loss-tangent function in dielectric spectroscopy. *Bioelectromagnetics* 7: 259-269, 1986.
  - 11) 山田昌和, 坪田一男: 角膜上皮の病態生理. *臨眼* 45: 205-210, 1991.
  - 12) 檀上眞次: 輪部結膜の意義と特異性. *あたらしい眼科* 7: 337-340, 1990.
  - 13) **Dua HS, Forrester JV**: The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 110: 646-656, 1990.
  - 14) 秋谷 忍, 高橋 広, 濱田恒一: 角膜上皮に関する最近の知見. *眼紀* 41: 643-651, 1990.
  - 15) **Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA**: Limbal epithelium in ocular surface wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 73-80, 1982.
  - 16) **Kruse FE, Chen JJY, Tsai RJF, Tseng SCG**: Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1903-1913, 1990.
  - 17) **Shapiro MS, Friend J, Thoft RA**: Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 135-142, 1981.
  - 18) **Kinoshita S, Friend J, Thoft RA**: Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunctival to corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1008-1014, 1983.
  - 19) **Tseng SCG, Farazdaghi M, Rider AA**: Conjunctival transdifferentiation induced by systemic vitamin A deficiency in vascularized rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1497-1504, 1987.
  - 20) 富井 聡, 木下 茂, 中内正海: Tandem Scanning Confocal Microscope. *あたらしい眼科* 9: 1665-1669, 1992.