

角膜における臨界現象

奈良県立医科大学眼科学教室

松 浦 豊 明

CRITICAL BEHAVIOR OF THE CORNEA

TOYOAKI MATSUURA

Department of Ophthalmology, Nara Medical University

Received July 29, 1994

Abstract: Primary corneal opacity investigated by dynamic light scattering indicates that it is due to reversible critical density fluctuations associated with phase transitions of the corneal gel. Critical phenomena normally associated with phase transitions the cornea, as well as upon increasing temperature. The critical behaviour dependence upon increasing temperature indicates that hydrophobic interactions, arising from changes in the local entropy of water, are dominant in inducing the phase transition.

Index Terms

cornea, dynamic laser light scattering, phase transition, critical behavior

はじめに

角膜は眼球の一番外側にあり可視光から見るとほとんど透明である。その構造は表面に平行な5層からなり、表面から順番に上皮層、ポーマン膜、実質層、デスメ膜、そして内皮層からなる。これらの構造のうち実質層が全体の厚みの約90%をしめる。人の場合約200層の膜状のglycosaminoglycanの基質に囲まれた棒状のコラーゲンが積み重なっている¹⁾。そのラメラ構造のなかで棒状のコラーゲンはその層ごとに方向が異なっている。そのため一軸性の複屈折を示す²⁾。そして角膜が透明であるわけはラメラ構造のなかのコラーゲンの構造が非常に整然として光の乱反射をお互いに打ち消しあうと言う仮説よりも(lattice theory³⁾)それらの構造が光の波長よりも短いことによる³⁾、と考えるほうが理に叶っていると思われる。この考えにしたがうと、角膜が混濁するということは構造のことなるすなわち濃度の高い高分子の一群が角膜の実質内に生じてそれが光を散乱させ角膜混濁が生じると推測できる。

さて臨牀的には色々な原因で生じる角膜混濁は視力を低下させることが多く、時として失明の原因となる。角膜疾患に加えて角膜に張力が加えられたとき、(具体的に

は急性緑内障や手術時である。)角膜は混濁を生じる。その混濁は張力が取り去られるとすぐに消え透明になる⁴⁾。このような可逆的な瞬時に生じる混濁の現象はどのようにして生じるのかについては明確に説明されていない。

これまで、角膜の構造については特に電子顕微鏡を用いたり¹⁾、小角静的光散乱を用いて調べられてきた²⁾。しかし角膜について動的な光散乱によって角膜のゲルの状態を調べたものはない。今回の研究は動的な光散乱を用いて角膜の混濁を引き起こすゲルの状態を調べたものである。そして合成されたゲルにおいて見られる相転移とそれに伴う臨界現象の理論があてはまることを見だし、角膜混濁の原因を明かにするものである。

方 法

1. 試料の作製について

子牛の眼球がこの実験に用いられた。摘出された角膜は4°Cの角膜保存液(F-10 solution, GIBCO Laboratories)に浸されその生理的活性を保つようにしている。すべての実験は角膜が肉眼的に全く透明性を維持している摘出後8時間以内に行なった。角膜は特殊なトレンパンを用いて縦1mm、横5mmの長方形に打ち抜いた。角膜を伸展させるときはその両端を固定しマイクロトランス

レーザを用いた。その際角膜はカバーガラスではさまれそのすきまにシリコンオイルを乾燥防止と安定した光散乱を得るために入れてある。このシリコンオイルは今回の実験で角膜からの散乱光に対して影響を与えないことは確認してある。温度の制御は循環恒温槽の水を用いて、試料の角膜のはいったセルの周辺の温度を変化させることができる。その精度は $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ である。さらに摘出した角膜だけでなく眼球全体からの動的散乱も測定している。その際に摘出角膜を伸展させる操作として眼圧を上昇させている。眼圧は前房内に注射器で生理食塩水を注入して調節している。

2. 顕微鏡下での動的レーザー光散乱

角膜は厚さ約1mmと比較的薄いため顕微鏡下での動的レーザー光散乱(microscopic laser light scattering spectroscopy, MLSS)を行なっている。一般的な動的散乱との違いは測定範囲が約1万倍小さいことである。つまり $2\ \mu\text{m}^3$ の体積の部分からの散乱光の情報が得られることになる。それゆえ角膜実質の数層のなかのゲルの揺らぎの情報が得られる。MLSSの概略図についてはFig. 1に示してある^{3) 4)}。光源はヘリウム/ネオンレー

ザー(Spectra Physics 124 A)であり、コンデンサーレンズで集光された後ガラスファイバーで試料の角膜まで運ばれる。ファイバーの先端には集光レンズが置かれていて顕微鏡下で(Nikon Optiphot),角膜の任意の層に焦点をあわせることができる。測定部位からの散乱光は顕微鏡の一方の接眼レンズのなかに置かれてあるファイバー(Gamma Scientific 700-10-36 A)に集められそこからフォトマルチプライアータチューブ(EMI 9863 B-350)にその情報が送られる。光子の数の揺らぎはコリレータ(Brookhaven Instrument, Model BI-2030 A)を用いて解析される。

3. 動的散乱について

特に角膜のようなゲルからの散乱光は動的な網目の揺らぎによるものとゲルのなかの不均一な構造による静的なものがある。よって散乱光強度は静的な要素 I_s と動的な要素 $J_D(t)$ の和となる。

$$I(t) = I_s + I_D(t) \quad (1)$$

ある時間毎の散乱光強度 $I(t)$ は相互相関関数を用いて解析される⁷⁾。

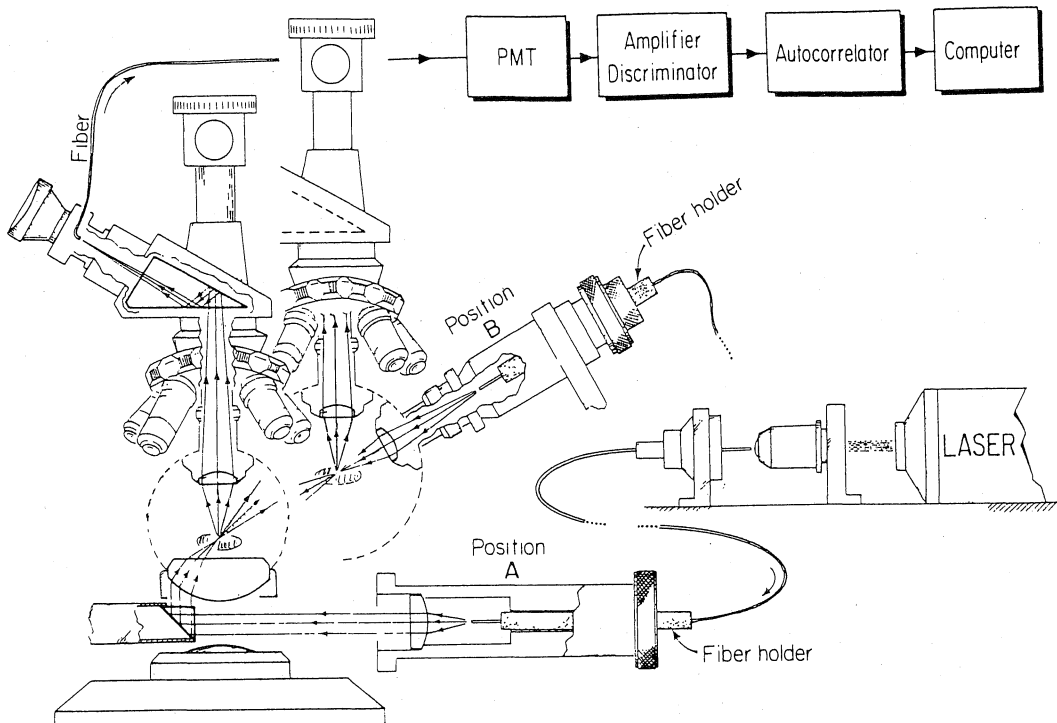


Fig. 1. Optical setup for microscope laser light scattering spectroscopy (MLSS). Positions A and B are respectively the forward and backward scattering geometry.

$$C(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle_t \quad (2)$$

ここで $\langle \rangle$ はある時間 t の間の平均を表す。一般に濃度相関関数は電界 $E(t) : I(t) = E(t)E^*(t)$ としたとき次のように書き直すことができる。

$$g(\tau) = \frac{\langle E(t) \cdot E^*(t+\tau) \rangle_t}{\langle E(t) \cdot E^*(t) \rangle_t} \quad (3)$$

そして $C(t)$ は次のように書くことができる。

$$C(\tau) = (I_s + I_b)^2 + A \{ I_b^2 \cdot g^2(\tau) + 2I_s \cdot I_b g(\tau) \} \quad (4)$$

ここで A は装置の光学的な要素によって決められる定数であり、今回の実験では 0.8 である。

角膜から得られる散乱光強度相関関数は 2 つの要素の存在を示す 2 重指数関数で良く近似することができる。(結論のところ述べる。)

$$g(\tau) = \frac{A_r}{A_r + A_s} \exp(-D_r K^2 \tau) + \frac{A_s}{A_r + A_s} \exp(-D_s K^2 \tau) \quad (5)$$

ここで k は散乱光の測定角度 θ 、測定光の波長 λ によって決められる定数である。

$$k = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (6)$$

今回の実験の場合 k の値は約 $6.3 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ である。

4. 高分子ゲルの力学と臨界現象

ゲルの網目の濃度の揺らぎはいわゆる共同拡散運動にしたがう。

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2}, \quad D = \frac{K + \frac{3}{4}\mu}{f} \quad (7)$$

D はゲルの相互拡散定数である。 K は体積弾性率、 μ はずり弾性率である。そして f はゲルの網目が水のなかを広がっていくときの水とゲルの網目の間の摩擦定数である。濃度の揺らぎの相関関数 $\Delta f(t)$ はある波動のベクトルが与えられるとき次のように表される。

$$\begin{aligned} \langle \Delta \phi(t+\tau) \cdot \Delta \phi(t) \rangle_t \\ = \langle \Delta \phi^2 \rangle \exp[-Dk^2\tau] \propto \frac{kT}{K + \frac{3}{4}\mu} \exp[-Dk^2\tau] \end{aligned} \quad (8)$$

2 つの要素からの関与が考えられる本例の場合濃度の

揺らぎの相関関数は次のように簡単に表すことができる。

$$\begin{aligned} \langle \Delta \phi(t+\tau) \cdot \Delta \phi(t) \rangle_t = \frac{kT}{M_1} \exp(-D_1 k^2 \tau) \\ + \frac{kT}{M_2} \exp(-D_2 k^2 \tau) \end{aligned} \quad (9)$$

ここで M_1, M_2 はそれぞれ 2 つの要素に対応する体積弾性率である。そして kT (k は Boltzman 定数, T は絶対温度を表す) は熱エネルギーを表す。式(5)における相関関数は直接に揺らぎの相関関数(9)に対応する。

さらに濃度の揺らぎに加えて一般的に合成高分子であれ、生体高分子であれそれらは外界の環境変化によって連続的もしくは非連続的な体積相転移を引き起こす^{9) 10)}。そしてこれらは可逆的である。このような相転移現象は例えば気体液体の相転移と良く似ている。また気体液体の相転移でも見られるようにゲルがある特殊な状態、すなわち臨界点に近づくと境界現象が見られる^{11) 12)}。ゲルが臨界点に近づくと網目の揺らぎが無限に大きく、ゆっくりになる。このことはゲルが臨界点に近づくと網目の揺らぎの振幅と緩和時間が無限に大きくなることを表す。この時に網目の密度が不均一になり光の波長に対して有効な散乱体となる。それゆえゲルの網目が臨界点に近づくとゲルが混濁するのである。また、これまでに述べてきた式(8)(9)で言うと、弾性率 M 、そして相互拡散定数 D が 0 に近づくとことを表している。今回の実験でこのような角膜の臨界現象が角膜を引き伸ばしたときと温度を上昇させたときに現われることを見いだした。

結 果

Fig. 2 は小牛の角膜からの散乱光の典型的な相関関数

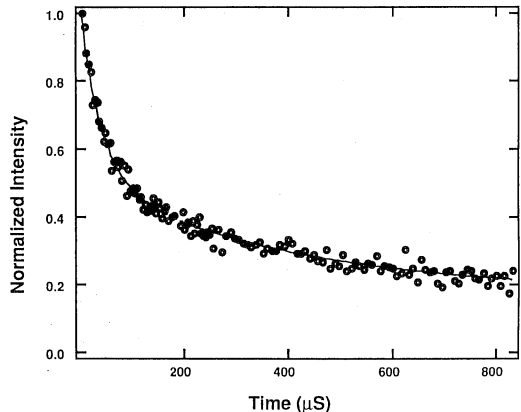


Fig. 2. A correlation function of light scattered from the calf cornea. The solid line represent the non-linear least square fit using Eq. (5) of the text.

を表す。実線は式(5)を用いて近似した2重指数関数を表す。そこで得られる係数は2つの相互拡散定数, より早い要素からのもの: D_f とよりゆっくりした要素のもの: D_s がある。そしてより早い要素からの散乱光の割合が% A_f であり, % $A_f = 100 A_f / (A_f + A_s)$ と定義している。これら3つの係数 D_f , D_s そして% A_f は角膜の散乱光が得られるどの位置においても大きな違いを見せなかった。角膜の周辺部か中央部か, 浅いところか, 深いところか, そのような測定部位には関係がなかった。このことは濃度の揺らぎから考えると角膜実質は均一なゲルであるといえる。

散乱光強度の相関関数は角膜を引っ張ったときに劇的な変化を見せる。相互拡散定数が, D_f , D_s どちらも角膜の長さで見たときの伸びが18%に達すると急激に減少する(Fig. 3 a)。

相互拡散強度が減少すると同時に角膜からの散乱光強度が伸び率が閾値に達すると急激に増加する(Fig. 3 b)。言い換えると角膜な臨界点に近づくと混濁するのである。そしてこれらの変化は可逆的である。切り出した角膜でこのような変化が見られるのみならず眼球全体として眼内圧を変化させて角膜に張力を加えたとき全く同じような結果が得られる。そして眼内圧を元に戻すとすぐに角膜の混濁は消えて散乱光強度の相関関数も元に戻る。

また, 温度変化に対する角膜ゲルの動的な変化については, 10°C から 50°C まで調べた。早い要素からの散乱光の割合% A_f は 35°C までほぼ一定であり 50°C に近づくとだんだんと減少する(Fig. 4 a)。 D_f , D_s はどちらも 35°C まで増加しそれから減少し 50°C に近づくと 0 に収束し始める(Fig. 4 b)。 D_f , D_s の変化の傾向としては 35°C までは水の粘性 $\eta(T)$ の影響を受けるようである。そしてゲルの拡散係数と水の粘性の関係は Stokes-Einstein の関係式として以下のようにかくことができる。

$$D(t) = \frac{kT}{6\pi\eta(T)\xi} \quad (10)$$

ここで ξ は高分子の鎖の有効な長さ, そして kT は熱エネルギーを表す。この実験の結果から 35°C までは拡散係数は式(10)で与えられる値によく一致する。(Fig. 4 b) 角膜において ξ を一定と考え, 温度に応じて変化する水の粘性を式(10)に代入して計算した拡散係数が実線である。ここで ξ が 35°C まで変化しないことはその間の% A_f がほぼ一定であることから推測される。なぜならば観察される揺らぎの振幅の比率は ξ^2 に比例するからである。これらのことから 35°C まで拡散係数が増加していくことは理解できる。しかし 35°C を越えると計算上はさら

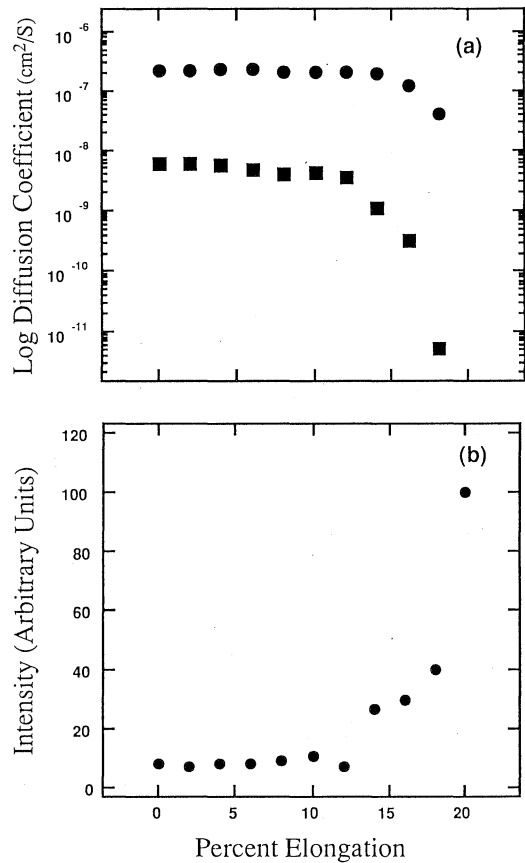


Fig. 3. The effects of elongation on the observed dynamics within the cornea. As shown in part (a), the values for both D_f (●) and D_s (■) diffusion coefficients are diminishing as the intensity of light scattered by the cornea (●), in part (b), is concurrently increasing with respect to elongation of the corneal gel.

に増加していくと考えられるのに D_f , D_s ともに減少し始める。このことは角膜ゲルが臨界温度に近づいて臨界現象を示している直接の証拠と考えられる。前に述べたようにゲルが臨界温度に近づくと濃度の揺らぎの緩和時間がすみやかに 0 に近づくと同時に散乱光強度は 35°C を越えると Fig. 5 で示されているように急激に増加する。

そして角膜の散乱光強度と拡散係数の変化は 45°C までとはまったく可逆的である。そして 45°C を越えると網目の揺らぎは固定され動的な揺らぎを測定することが困難になる。その時角膜は完全に白濁する。このとき生じている白濁はこれまでに述べてきた臨界現象によるものでないと思われる。つまり 45°C から 50°C の間の角膜

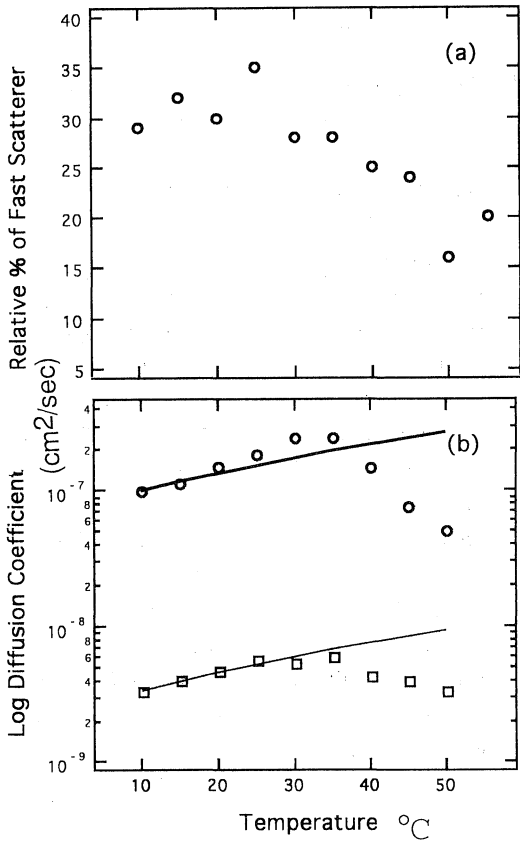


Fig. 4. The effect of increasing temperature on the relative percent amplitude of the fast diffusion coefficient is shown in part (a), and the measured values for D_f and D_s are in part (b). As evidenced, the relative amplitude (O) remains essentially constant up to a temperature of 35°C.

Beyond this temperature, it tends towards zero up to 50°C from which point the cornea becomes denatured. As predicted by Eqn. (10) of text, the initial trend for both D_f (O) and D_s (□) upon increasing temperature is directly related to the change in viscosity of water with respect to temperature. As can be seen, the initial data are in good agreement with calculated values (solid lines) using Eqn. (10) up to a temperature of 35°C. Above 35°C, both D_f and D_s are rapidly decreasing due to the critical slowing down of density fluctuations as the corneal gel approaches the critical temperature.

混濁は熱による蛋白変性の結果によると考えられる。

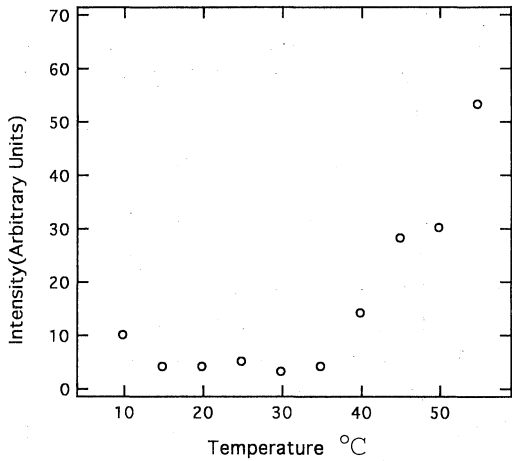


Fig. 5. The effects of increasing temperatures on the observed back-scattered light intensity (O) are shown. The initial scattered intensity is relatively constant up to a temperature of 35°C. Beyond 35°C the scattered intensity increases dramatically as it approaches a critical threshold in the vicinity of 50°C. Above this temperature the opacity is presumably due to the denaturation of the collagen fibrils.

考 察

温度の変化に伴う臨界現象の出現から角膜は疎水的なゲルであるといえる。つまり温度が上昇すると高分子と高分子の相互作用が優勢になるのである。実際角膜ゲルを構成する glycosaminoglycan そして、コラーゲンは疎水的な高分子である。さらに角膜が 45°C を越えると熱変性を生じることが角膜の熱に対する病理的な報告と一致する¹³⁾。

臨床的に角膜に対する温熱療法は円錐角膜、角膜真菌症、の治療に用いられている。また熱によって角膜の曲率半径を変化させ屈折矯正を行なうことも行われている。これらの治療では角膜の実質のえ死や瘢痕が残る恐れがある。今回の実験の結果から、角膜ゲルの熱に対する安全域は 45°C を越えないことであると考えている。

さらに近年屈折矯正手術が盛んに行なわれるようになってきている。Radialkeratotomy は角膜ゲルに切れ目を入れて角膜の屈折力を変化させる。エキシマレーザーによって角膜の表面を切除することも広く行なわれるようになりつつある。しかしこれらいずれの場合にも、術後の角膜混濁は大きな問題となっている。ゆえに、このような新しい手技を評価するうえで動的光散乱を用いたゲルの評価は大変有用であると思われる。さらに眼球自体、

角膜のみならず水晶体、水晶体囊そして硝子体すべてがゲルからなっている。今回この実験で用いた装置は眼球組織すべてのゲルの動的な変化を非侵襲的に測定できると考えられる。

結 論

ゲルを構成して高分子は柔軟でたえず熱的に揺らいでいる、ゲルの網目の揺らぎは屈折率の揺らぎを生みそれによって光が散乱されるのでレーザー動的光散乱法を用いて観測することができる。今回の実験で、角膜のゲルの網目からの揺らぎを測定することが始めて行なわれた。その結果、前に述べた式(8)で言うと、散乱光の揺らぎの大きさからゲルの網目の硬さ、柔らかさを表す体積弾性率 K が、また揺らぎの時間からゲルの網目の拡散係数 D が決定できる。そして臨界点ではゲルの網目の膨潤、収縮の時間が無限に遅くなる。この臨界点の近傍ではゲルの網目の揺らぎは無限に大きくなり、かつ、無限に遅くなる。この時ゲルの網目の密度が不均一になりゲルは混濁する。このような物理的な現象が角膜において存在していることを動的光散乱を用いて示した。そして角膜に圧力がかかったときに生じる混濁、45°Cまで温度を上昇させたときの角膜混濁は角膜ゲルの臨界現象によることが示された。

稿を終えるに臨み、御指導ならびに御校閲を賜った恩師西信元嗣教授ならびに本学第2生理学教室榎 泰義教授、および生化学教室神谷知彌教授に深甚なる謝意を表します。

(この研究はNIH, EY 05272-05によって援助されている。)

文 献

- 1) **Maurice, D. M.** : *in* The Eye (Davson, H., ed.). 3rd Edition, Academic Press, New York, p1-158, 1984.
- 2) **Bettelheim, F. A. and Vincigurerra, M. J.** : *Bio-phys. Acta* **177** : 259-264, 1964.
- 3) **Benedek, G. B.** : Theory of transparency of the eyes. *Appl. Optics* **10** : 459-473, 1971.
- 4) **McCally, R. L. and Farrell, R. A.** : *Polymer* **18** : 444-448, 1977.
- 5) **Nishio, I., Tanaka, T., Sun, S-T., Imanishi, Y. and Ohnishi, S. T.** : *Science* **220** : 1173-1175, 1983.
- 6) **Peetermans, J., Nishio, I., Ohnishi, S. T. and Tanaka, T.** : *Biophysics* **83** : 352-356, 1986.
- 7) **Pecora, R.** : *Dynamic Light Scattering* Plenum Press, New York, p347-406, 1985.
- 8) **Tanaka, T., Hocker, L. O. and Benedek, G. B.** : *J. Chem. Phys.* **59** : 5151-5159, 1973.
- 9) **Tanaka, T., Fillmore, D. J., Sun, S-T., Nishio, I., Swislow, G., and Shah, A.** : *Phys. Rev. Letters* **45** : 1636-1639, 1980.
- 10) **Onuki, A.** : *J. Phys. Soc. Japan.* **56**(3) : 699-702, 1988.
- 11) **Tanaka, T., Ishiwata, S. and Ishimoto, C.** : *Phys. Rev. Letters* **38** : 771-774, 1977.
- 12) **Li, Y. and Tanaka, T.** : *J. Chem. Phys.* **90** : 5161-5166, 1988.
- 13) **Goldblatt, W. S., Finger, P. T., Perry, H. D. and Stroh, E. M. D. S.** : *Hyperthermic treatment of rabbit corneas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30** : 1788-93, 1989.