

摘出サル瞳孔面積に対する種々生理活性物質の反応性

福 永 博 一

信州大学医学部眼科学教室

(主任: 瀬川 雄三教授)

Effects of Biologically Active Agents on the Cross-sectional Area of Pupils in Isolated Monkey Irides

Hirokazu FUKUNAGA

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Katsuzo SEGAWA)

Effects of biologically active substances on the cross-sectional area of pupils were investigated in isolated monkey irides. Changes in the cross-sectional area were measured by a domestic-made area-measuring gauge utilizing an area image sensor with a single-lens reflex camera. In the isolated monkey irides, epinephrine (EP), norepinephrine (NE) and dopamine caused dose-dependent increases in the cross-sectional area (mydriasis), but isoproterenol (ISP) had no effect on it. The decreasing order of the responses was as follows: $EP \geq NE > \text{dopamine}$. The threshold concentration in the EP-induced mydriasis was approximately $2.5 \times 10^{-8} M$. Pretreatment with an α -adrenoceptor antagonist, phentolamine, shifted dose-dependently the dose-response curves of EP and NE to the right. On the other hand, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), 5-hydroxytryptamine (5-HT), acetylcholine (ACh), adenosine, ATP, ADP, AMP and histamine produced dose-dependent decreases in the cross-sectional area (miosis). The decreasing order of the responses was as follows: $PGF_{2\alpha} \geq 5-HT > ACh > \text{adenosine} \geq ATP \geq ADP \geq \text{histamine} \geq AMP$. The threshold concentration in the $PGF_{2\alpha}$ -induced miosis was about $10^{-9} M$. The 5-HT- and ACh-induced mioses were dose-dependently suppressed by pretreatment with methysergide and atropine, respectively. Effects of similar active substances on the cross-sectional area of isolated monkey punched pupils in which pupillary sphincter muscles were removed by means of an ophthalmic trepan were studied. Almost all substances except for 5-HT and ACh produced qualitatively similar responses in the punched pupil preparations as well as in normal preparations. 5-HT and ACh, on the contrary, caused dose-dependent increases in the cross-sectional area, which were significantly inhibited by pretreatment with methysergide and atropine, respectively. These findings suggest that high concentrations of 5-HT and ACh induce contractions in both pupillary sphincter and dilator smooth muscles, and then the summation of developed tensions in both smooth muscle layers produced by the agents always elicits a miotic response in isolated monkey irides.

It is also suggested as a possible hypothesis that a contraction of pupillary dilator smooth muscles produced by high concentrations of 5-HT or ACh may be related to a compensatory role in regulation of the cross-sectional area of the pupil. *Shinshu Med. J.*, 36: 495-508, 1988

(Received for publication March 5, 1988)

Key words: monkey, pupil area, area image sensor, biologically active agent, punched iris
サル, 瞳孔面積, エリアイメージセンサ, 生理活性物質, 打ち抜き瞳孔標本

I はじめに

一般に瞳孔面積は、瞳孔括約筋と瞳孔散大筋の発生張力の力学的平衡により規定されていることが推測できる¹⁾。ところが、これまでの研究の多くは瞳孔括約筋と瞳孔散大筋をそれぞれ別々の摘出条片として、体液性ならびに神経性制御因子の生理学的役割を解析してきたものである²⁾⁻³⁰⁾。

これに対し、瞳孔面積を指標として瞳孔括約筋、瞳孔散大筋両方を含む虹彩全体の反応性を比較検討しようとする試みは、現在までのところ Lowenstein と Lowenfeld³¹⁾ の報告を除きほとんど見当たらない。彼らの実験は電子瞳孔計を用いて、臨床検査法の1つとして瞳孔面積変化を解析したものであり³¹⁾⁻³⁷⁾、対光反射等の神経性因子の関与を除外して瞳孔括約筋、瞳孔散大筋に対する体液性因子の直接作用を観察することは難しかった。

そこで本研究では、光电変換素子エリアイメージセンサ³⁸⁾と一眼レフカメラを用いて、摘出した瞳孔標本の瞳孔面積、瞳孔内径を同時測定できる実験装置を開発し、その装置を用いてサルの瞳孔面積に及ぼす種々生理活性物質の直接影響を比較検討し、あわせて薬理学的受容体解析を行ったので報告する。

II 実験材料および方法

実験には3~14kgの日本ザル(46頭)を雌雄の別

なく用いた。サルは ketamine hydrochloride (30~50mg/kg, i. m.) を用いて麻酔し、脱血屠殺した後ただちに眼球を摘出した。保生液中で眼球の強膜輪部にフリリンガーリングを縫着した後、角膜ならびに赤道部より後方の強膜を切除した。この眼球より硝子体、水晶体を丁寧に取り除き、虹彩および毛様体が無傷の円盤状瞳孔標本作製した。この標本を図1に示すような容量8mlの透明な灌流型臓器槽内に装着し、灌流ポンプ(ATTO SJ 1211 H)を用い、毎分6.2mlの定流量で灌流した。灌流液は、温度 $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.4に維持した Krebs 液(組成[mM]): NaCl 120.0, KCl 5.9, NaHCO_3 25.0, NaH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.2, Glucose 5.5)を用いた。保生液には実験中絶えず、95% O_2 +5% CO_2 混合ガスの通気を行い pH 7.4 に維持した。

作製した瞳孔面積連続測定装置(図1)の概略は次の通りである。装置に付設された1眼レフカメラ(アサヒペンタックス SV)により撮影した瞳孔像は、カメラの焦点面に固定したエリアイメージセンサ(松下電子 MEL 64×64)の受光面上に投影される。イメージセンサからの瞳孔像ビデオ信号はビデオ信号処理回路に導かれ、瞳孔面積が計測される。瞳孔面積計測の原理を図2に模式的に示した。すなわちエリアイメージセンサ(4096ビット, 64×64)は1 MHz/bit の速度で第1行(1~64ビット)、第2行(65~128ビット)と順次走査してゆき、4096ビットで1画面の走査が完

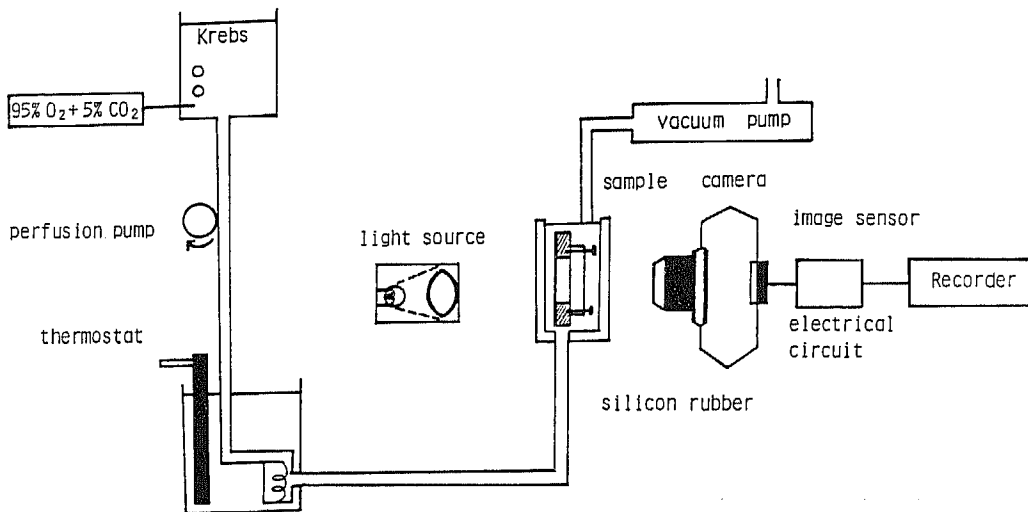


図1 実験装置の模式図

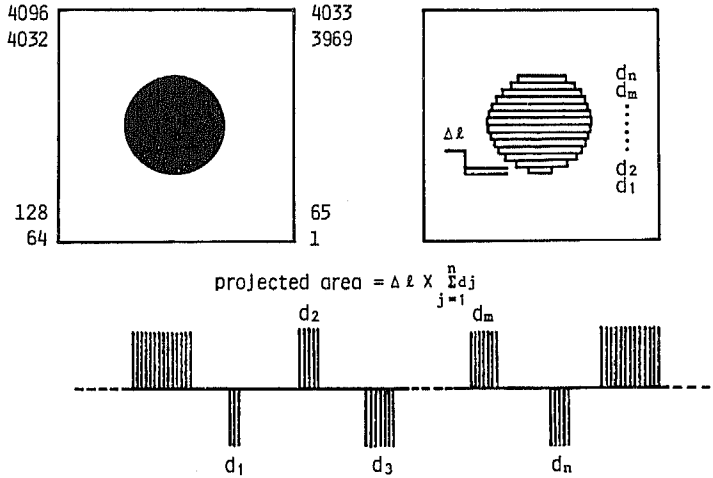


図2 エリアイメージセンサ受光面の投影像とビデオ信号処理方式の模式図

了する光電変換素子である。水平ならびに垂直走査繰り返し周波数はそれぞれ11.4 KHz, 178 Hz である。図2 Aに示すエリアイメージセンサ受光面上の瞳孔投影像は、エリアイメージセンサの自動走査により d_1 から d_n までの n 等分の弦に分割される(図2B)。この n 個の弦の長さ d_j (瞳孔径) の総和と弦の幅 Δl の積($\Delta l \times \sum_{j=1}^n d_j$) が電氣的に算出され、瞳孔面積が求められる。図2 Cは $d_1 \sim d_n$ のそれぞれの弦の長さに対応するビデオ信号を示すパルス列である。このパルス列を正方向に揃えた後、高速比較器により波形整形を行い、D/A変換器を経て任意3点の瞳孔径が同時に計測できる。このようにして求めた瞳孔面積と任意の3点の瞳孔径の時間経過を直記式オシログラフ(三栄測器 8 S) に記録した。光学倍率 $\times 1$ の場合、本装置の原理的な分解能は瞳孔径において $64 \mu\text{m}$ 、瞳孔面積は 0.0041mm^2 である。

実験は、摘出瞳孔標本を保生槽内に約2時間放置し、標本の瞳孔面積が安定したことを確認した後、各種生理活性物質をマイクロシリンジを用いて累積的に臓器槽内に投与し(0.2ml以下)、面積変化を記録した³⁹⁾。各種薬理的拮抗剤の影響を観察する場合には、これらの拮抗薬を含む保生液で30分間標本を灌流した時点で、それぞれの拮抗薬に対応した生理活性物質を対照と同様の方法で投与し、用量-反応曲線を求めて比較検討した。瞳孔括約筋切除標本の作製は、瞳孔標本を 10^{-4}M AChにより縮瞳させた後、瞳孔縁より約2mmの位置で眼科用トレパンを用いて瞳孔括約筋を切除し

た。実験後、使用標本すべてを組織学的に検索し、瞳孔括約筋が完全に切除されていることを確認した。この打ち抜き瞳孔標本に対しても対照と同様の方法で各種生理活性物質の反応性とその受容体の薬理的解析を行った。

使用した薬物は下記の通りである。d1-norepinephrine hydrochloride (NE)(三共), d1-epinephrine hydrochloride (EP) (第一製薬), isoproterenol hydrochloride (ISP)(日研化学), dopamine hydrochloride (和光), histamine dihydrochloride (和光), serotonin creatinine sulfate (5-HT) (Sigma), acetylcholine chloride (ACh)(第一製薬), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) (小野薬品), adenosine (興和), ATP disodium (興和), ADP disodium (興和), AMP sodium (興和), phentolamine mesylate (Ciba-Geigy), atropine sulfate (田辺), methysergide bimaleate (Sandoz), propranolol hydrochloride (住友)。

実験結果はすべて平均値士標準偏差として表示した。平均値の統計学的な検定は paired あるいは non-paired の Student's t -test を用い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

III 実験結果

A 瞳孔全体標本 (whole iris)

1. 種々生理活性物質の作用

実験開始前における対照時のサル瞳孔面積は、平均

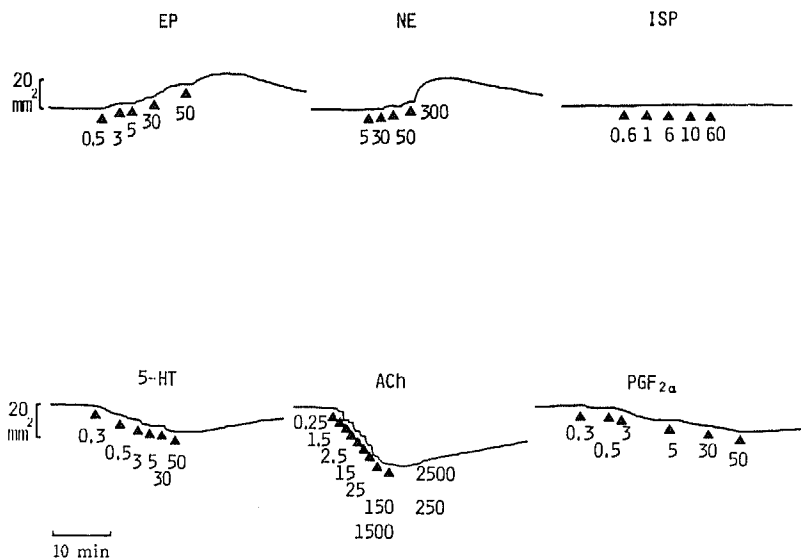


図3 サル摘出瞳孔全体標本における瞳孔面積に対する生理活性物質反応の典型例
 上段: epinephrine (EP), norepinephrine (NE), isoproterenol (ISP).
 下段: 5-hydroxytryptamine (5-HT), acetylcholine (ACh), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$).

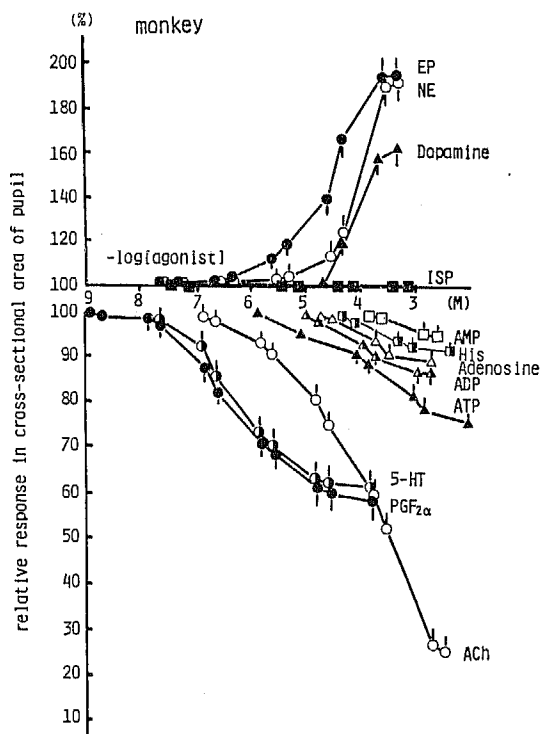


図4 サル摘出瞳孔全体標本における瞳孔面積変化を指標とした種々生理活性物質の用量-反応曲線 (n=7, 平均値±標準誤差)。
 縦軸: 瞳孔面積の相対的变化量すなわち、薬物投与前の瞳孔面積 (S_0) に対する薬物投与後の瞳孔面積 (S) の百分率を表す。
 上段が散瞳, 下段が縮瞳反応を示す。
 横軸: 使用した生理活性物質の濃度を対数表示で示した。

12.0±0.6mm² (n=8) でほぼ一定であった。また本実験に使用した生理活性物質に対する反応性は摘出実験開始後6時間程度まできわめてよい再現性を示し、tachyphylaxis は認められなかった。Epinephrine (EP), norepinephrine (NE), isoproterenol (ISP) に対するサル瞳孔全体標本の典型的な反応例を図3上段に示した。EP (0.5-50μg) や NE (5-300μg) は用量依存的に瞳孔面積を増大(散瞳)させた。これらの反応における閾値用量は、EP は0.5μg, NE では5μgであった。ところが ISP (0.6-60μg) は瞳孔面積に全く影響を与えなかった。

図3下段は摘出したサル瞳孔全体標本の 5-hydroxy-tryptamine (5-HT), acetylcholine (ACh), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) に対する典型的な反応を示している。縮瞳反応の検索はすべて散瞳薬 (norepinephrine 300μg) の前投与により、あらかじめ一定レベル (初期値の約91%) まで散瞳させた標本を用いて行った。5-HT, ACh, PGF_{2α} ともに低用量(約0.3μg) から瞳孔面積を縮小(縮瞳)させ、その反応は用量依存的であった。ACh の縮瞳反応の程度は、PGF_{2α} や5-HT と比べてきわめて著しく、最大反応時にはピンホール状態にまで至った。

サルの瞳孔全体標本における瞳孔面積に対する生理活性物質の反応性を用量-反応曲線にまとめたものが図4である。このグラフの横軸はいずれも使用した生理活性物質の濃度をモル濃度で表わし、縦軸は瞳孔面積の相対的な変化量を示している。すなわち薬物投与前の瞳孔面積に対する薬物投与後の瞳孔面積の相対比率であり、上段が散瞳、下段が縮瞳を表す。図4で示すように、サルの瞳孔全体標本では EP, NE, dopamine はいずれも瞳孔面積を用量依存的に増加させ、散瞳反応を誘起した。この散瞳反応の閾値濃度は EP (2.5×10⁻⁸M) が最も低く、ついで NE (3×10⁻⁸M), dopamine (3×10⁻⁸M) の順であった。一方、ISP は10⁻⁸M から10⁻⁹M まで濃度を上昇させても瞳孔面積にはほとんど変化が認められなかった。

これに対し、PGF_{2α}, 5-HT, ACh, adenosine, ATP, ADP, AMP ならびに histamine はすべて、用量依存的にサルの瞳孔面積を縮小させた。これらの薬物の閾値濃度は PGF_{2α} ≤ 5-HT < ACh < ATP ≤ ADP ≤ adenosine ≤ histamine ≤ AMP の順であった。すなわち PGF_{2α} の親和性が最も高く、その閾値濃度(2.4×10⁻⁹M) は ACh (2.3×10⁻⁷M) のそれと比較して約1/100 低値を示した。

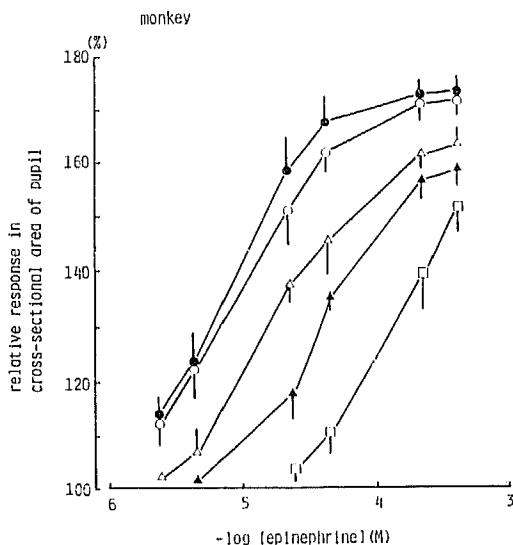


図5 サル摘出瞳孔全体標本の epinephrine による散瞳反応に対する propranolol ならびに phentolamine の作用 (n=6, 平均値±標準誤差)

- ; 対照群
- ; propranolol (10⁻⁷M) 前処置群
- △—△ ; propranolol (10⁻⁷M) + phentolamine (10⁻⁸M) 前処置群
- ▲—▲ ; propranolol (10⁻⁷M) + phentolamine (10⁻⁷M) 前処置群
- ; propranolol (10⁻⁷M) + phentolamine (10⁻⁶M) 前処置群

2. 生理活性物質の受容体解析

瞳孔全体標本における瞳孔面積を指標として、各種生理活性物質の薬理学的受容体解析を行った。図5に EP の散瞳反応に対するアドレナリン作動性α 受容体遮断剤 phentolamine の作用を用量-反応曲線にまとめた。この実験では、あらかじめ灌流保生液中にアドレナリン作動性β 受容体遮断剤, propranolol を10⁻⁷M 添加し、β 受容体を遮断した状態で行った。

この図から明らかなように、EP によるサルの散瞳反応は10⁻⁷M propranolol 前処置を施しても対照群との間に有意な変化は認められなかった。その状態で phentolamine (10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M) を追加処置すると対照の用量-反応曲線は右方に移動した。反応量100-140%範囲における Schild のプロット⁴⁰⁾⁴¹⁾より pA₂=8.96 (n=6) の値を得た。

図6はサル瞳孔全体標本の ACh による縮瞳反応に及ぼすムスカリン受容体遮断剤 atropine の影響を検

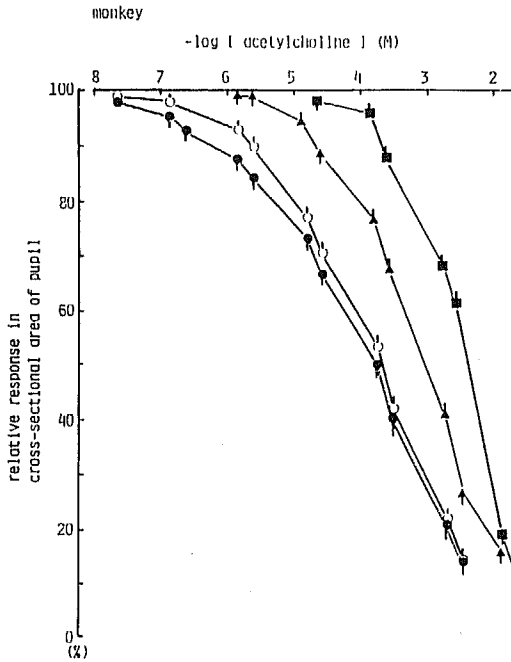


図6 サル摘出瞳孔全体標本の acetylcholine による縮瞳反応に対する atropine の作用 (n=6, 平均値±標準誤差).

- ; 対照群
- ; atropine (10⁻⁹M) 前処置群
- ▲—▲; atropine (10⁻⁸M) 前処置群
- ; atropine (10⁻⁷M) 前処置群

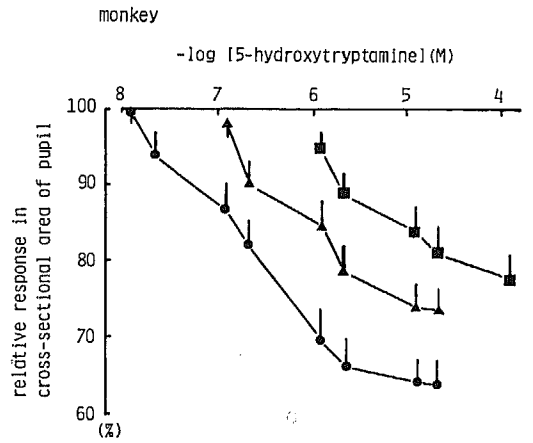


図7 サル摘出瞳孔全体標本の 5-hydroxytryptamine (5-HT) による縮瞳反応に対する methysergide の作用 (n=5, 平均値±標準誤差).

- ; 対照群
- ▲—▲; methysergide (10⁻⁷M) 前処置群
- ; methysergide (10⁻⁶M) 前処置群

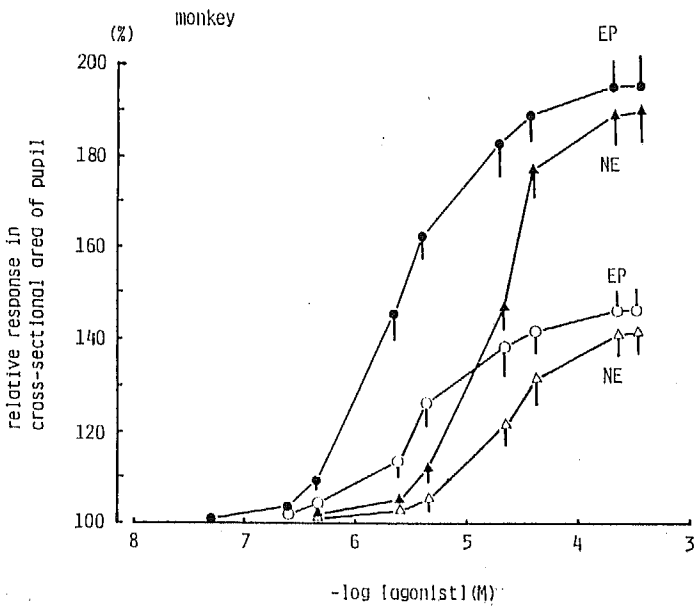


図8 サル摘出瞳孔全体標本と打ち抜き瞳孔標本における epinephrine (EP) と norepinephrine (NE) の反応 (n=5, 平均値±標準誤差) 縦軸ならびに横軸の指標は図4と同一である。

- ; 全体標本の EP に対する用量-反応曲線
- ; 打ち抜き標本の EP に対する用量-反応曲線
- ▲—▲; 全体標本の NE に対する用量-反応曲線
- △—△; 打ち抜き標本の NE に対する用量-反応曲線

索し、用量-反応曲線にまとめたものである。Atropine ($10^{-9}M$, $10^{-8}M$, $10^{-7}M$) を前処置すると、ACh による用量-反応曲線は用量依存的に右方に平行移動した。pA₂ 値は8.47 (n=6) であった。

サル瞳孔全体標本の 5-HT 縮瞳反応に対する 5-HT 拮抗剤 methysergide 前処置の影響を用量-反応曲線にまとめて図 7 に示した。Methysergide ($10^{-7}M$, $10^{-6}M$) 前処置により、5-HT による縮瞳反応は用量依存的に抑制された。反応量 100-80% 範囲における

pA₂ 値は7.85 (n=5) の値を示した。

B 打ち抜き瞳孔標本 (punched iris)

瞳孔全体標本から瞳孔括約筋のみを切除した打ち抜き瞳孔標本、すなわち瞳孔散大筋だけが残存した標本に対する種々生理活性物質の作用をサル眼球を用いて比較検討した。この操作により瞳孔面積は打ち抜き前 $8.9 \pm 0.4 \text{mm}^2$ から、打ち抜き後 $18.0 \pm 0.8 \text{mm}^2$ (n=9) に増加した。図 8 はサルの瞳孔全体標本と打ち抜き瞳孔標本における EP と NE による散瞳反応の結

表 1 サルの摘出瞳孔全体標本ならびに打ち抜き標本における EP, NE に対する反応量

	n	percent change in cross-sectional area of pupil (%)			
Epinephrine		$4.7 \times 10^{-7}(M)$	$4.7 \times 10^{-6}(M)$	$4.7 \times 10^{-5}(M)$	$4.7 \times 10^{-4}(M)$
whole iris	5	7.4 ± 1.7	62.3 ± 5.1	92.6 ± 5.8	100
punched iris	5	$6.7 \pm 0.8 \text{NS}$	$59.8 \pm 4.3 \text{NS}$	$91.1 \pm 4.7 \text{NS}$	100
Norepinephrine		$4.9 \times 10^{-7}(M)$	$4.9 \times 10^{-6}(M)$	$4.9 \times 10^{-5}(M)$	$4.9 \times 10^{-4}(M)$
whole iris	5	2.2 ± 0.6	12.4 ± 2.5	83.7 ± 6.3	100
punched iris	5	$2.6 \pm 0.7 \text{NS}$	$12.5 \pm 2.8 \text{NS}$	$79.3 \pm 5.9 \text{NS}$	100

Epinephrine (EP) ならびに norepinephrine (NE) それぞれの最大反応量を 100% とし、図 9 に示した用量-反応曲線を規準化し直した用量-反応関係。数値は平均値±標準誤差で示す。

N. S. : 有意差なし

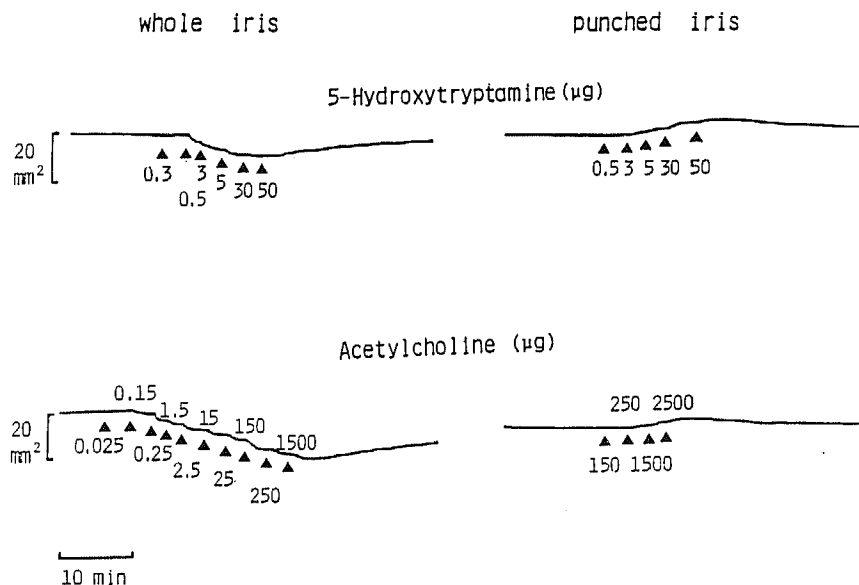


図 9 サルの瞳孔全体標本 (whole iris) ならびに打ち抜き瞳孔標本 (punched iris) における 5-hydroxytryptamine (5-HT) と acetylcholine (ACh) 反応性の典型例。

果を用量-反応曲線にまとめたものである。EP は両標本においていずれも用量依存性の散瞳反応を誘起した。反応の閾値濃度は切除前後でほとんど変化なく約 $4.7 \times 10^{-6} M$ であった。一方最大反応量は瞳孔括約筋切除により対照群の約47%に低下した。しかし両標本の薬物投与前の瞳孔面積(相対比率の100%値)が異なっているため、両曲線の最大反応量をそれぞれ100%として、規準化し直すと、両者の用量-反応曲線はほぼ一致することが確認された(表1)。NEについても同様の傾向が認められた。図9にサル

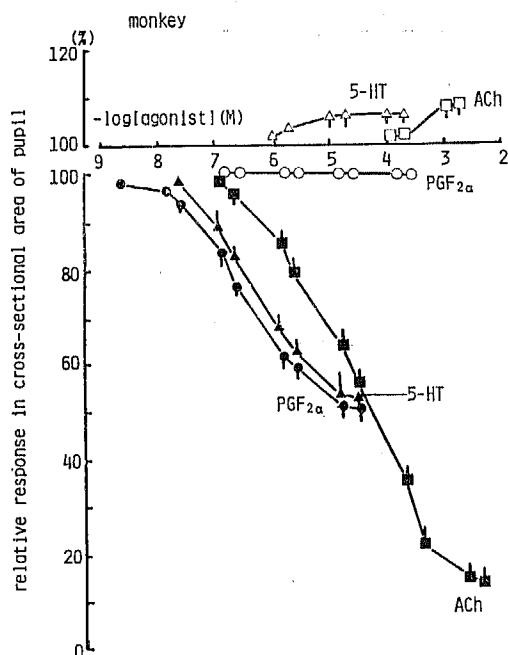


図10 サル摘出瞳孔全体標本と瞳孔括約筋打ち抜き標本における prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), 5-hydroxytryptamine (5-HT), acetylcholine (ACh) の反応 (n=5, 平値均±標準誤差) 縦軸ならびに横軸の指標は図4と同一である

- ; 全体標本の $PGF_{2\alpha}$ に対する用量-反応曲線
- ; 打ち抜き標本の $PGF_{2\alpha}$ に対する用量-反応曲線
- ▲—▲ ; 全体標本の 5-HT に対する用量-反応曲線
- △—△ ; 打ち抜き標本の 5-HT に対する用量-反応曲線
- ; 全体標本の ACh に対する用量-反応曲線
- ; 打ち抜き標本の ACh に対する用量-反応曲線

本(左側)ならびに打ち抜き標本(右側)における 5-hydroxytryptamine と acetylcholine 反応の典型例を示した。上段左に示すように瞳孔全体標本の場合、すでに示した通り、5-HT は顕著な縮瞳反応を誘起した。ところが上段右に示すように瞳孔括約筋を除去した打ち抜き瞳孔標本では、5-HT による縮瞳反応は全く認められず、高用量 ($3\mu g$ 以上) の 5-HT は反対に散瞳反応を惹起することが判明した。同様の傾向は下段に示すように ACh の縮瞳反応でも認められた。しかし、ACh の場合、散瞳反応に逆転する用量は 5-HT ($3\mu g$) に比べて非常に高く、 $250\mu g$ に達した。

図10はサルの瞳孔全体標本と打ち抜き瞳孔標本における 5-HT, ACh, $PGF_{2\alpha}$ の反応結果を用量-反応曲線にまとめたものである。サルの瞳孔全体標本は 5-HT, ACh により用量依存性の縮瞳反応が惹起されるが、打ち抜き標本では縮瞳反応はまったく認められず、逆に 5-HT は $10^{-6} M$ 以上、ACh は $10^{-4} M$ 以上の高濃度領域において対照群とは反対の散瞳反応が誘起された。 $PGF_{2\alpha}$ は瞳孔全体標本では図4で示したような用量依存性の縮瞳反応を惹起したが、打ち抜き標本では $10^{-4} M$ まで濃度を上昇させても瞳孔面積には何らの変化も認められなかった。これらの 5-HT ならびに ACh で誘起された散瞳反応も methysergide ならびに atropine の前処置によって用量依存的に抑制された。

IV 考 察

A 瞳孔面積連続測定装置

瞳孔面積計測装置として、従来より臨床領域では電子瞳孔計3D-37)がよく知られている。この装置はヒトの瞳孔面積変化を測定することができるという利点はあるが、その測定は非連続的であり、しかも装置が非常に高価で使用方法が難しく、動物実験用装置としては適さない。同時に、測定に際して対光反射を常に誘起し、瞳孔面積を調節している神経性因子の関与を除外することができないなどの欠点がある。そこでまずはじめに私共は摘出した眼球の瞳孔面積を連続的にしかも簡便に測定する装置を開発した。固体撮像素子、エリアイメージセンサ38)を一眼レフカメラの焦点面に固定して作製した *in vitro* 実験用瞳孔面積連続測定装置の特長は次のように要約される。

(1)光学的倍率×1の状態では最大4.1mmの瞳孔径と13.2mm²の面積の連続的な測定が可能である。(2)原理的に64μmの瞳孔径変化と0.0041mm²の面積変化

が弁別できる。(3)接写リングを含めたカメラのレンズ系を利用すれば($\times 0.25 \sim \times 2$)の光学倍率の画像処理が行える。(4)応答周波数の上限は約30Hzである。(5)瞳孔像がオンスコープ画面に表示され、測定状況がモニターできる。

本装置と原理的に類似した Quilliam⁴²⁾が開発した光電的瞳孔面積測定装置は、瞳孔領域を通過してきた可視光を直接光電変換器でとらえ、瞳孔面積を直接記録するものである。この Quilliam らの装置では光電変換器の出力が光の照度の変化によって影響されるため、瞳孔面積と装置出力との間の直線性が私共の作製した装置に比べて劣ること、また長時間におよぶ光照射によって光電変換器の基底が焼損し、変換出力が低下するなどの欠点があった⁴²⁾⁻⁴⁶⁾。その点私共の作製した瞳孔面積連続測定装置では、光電変換素子が一眼レフカメラの焦点面上に装着されているため、その装置出力は一定照度以上の光が得られればほとんど変化しなく、しかも熱遮断フィルターを内蔵しているため、長時間の連続測定にも耐えうるなどの利点を有する。

B サル瞳孔面積変化に及ぼす生理活性物質の作用とその受容体解析

瞳孔の縮瞳・散瞳の程度は、瞳孔括約筋と瞳孔散大筋の発生張力の平衡によって決定されることが予想される¹⁾。したがって、従来のような瞳孔括約筋および瞳孔散大筋を別々に剝離摘出した条片標本を用いた実験²⁾⁻³⁰⁾では生理活性物質の瞳孔面積それ自体に対する調節様式を把握することは困難である。サルの瞳孔括約筋および瞳孔散大筋はこれらの摘出条片標本を用いた実験によりアドレナリン α 作用薬により両筋はともに収縮すると報告されている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。こうした事実も α 作用薬が虹彩に作用したような場合、瞳孔面積は両筋の形態学的配列と両筋の発生張力の程度によって決定されてくることを示しており、単に瞳孔散大筋の収縮反応量の大きさだけで瞳孔面積を推定することはできないことを示唆している。こうした作業仮説を背景として私共は瞳孔面積を指標として生理活性物質の反応性を検索し、その反応性と瞳孔括約筋打ち抜き標本の反応性を比較検討することによって、瞳孔面積を規定している両筋の役割を解析した。

本実験結果よりサルの瞳孔面積は、EP、NE 投与により増大し(図4)、この面積増大反応は α 遮断剤 phentolamine の前処置によって用量依存的に抑制されたが、 β 遮断剤 propranolol 前処置では、有意な影響を受けなかった(図5)。一方、同じ濃度の EP

と NE に対する反応性を比較すると EP による発生張力の方が大きい。この差を生ずる原因として ①サル虹彩平滑筋に分布する α 受容体の EP、NE に対する親和性に差がある。あるいは ②虹彩平滑筋における α 受容体にサブタイプ(α_1 , α_2)が存在し、その分布密度に差異があり、それぞれの α 受容体に対する EP、NE の選択性が異なるために生じた差異であるなどの可能性が考えられるが、その詳細については今後の検討が必要である。またサルの瞳孔面積は $10^{-8} \sim 10^{-9}$ M 濃度範囲の ISP を投与しても変化が認められなかった(図4)。これらの事実より、サルの瞳孔面積調節におけるカテコラミンの役割は、 α 受容体刺激により散瞳反応が誘起されるが、 β 受容体刺激では瞳孔面積はほとんど変化しないことが判明した。Langham と Diggs⁴⁹⁾も *in vivo* の実験で、EP や NE の点眼によりサルの瞳孔は散瞳反応を示すが、ISP や salbutamol の点眼では瞳孔径や瞳孔面積は変化しないことを報告しており、我々の結果と一致する。サルの眼球より瞳孔散大筋を摘出し、発生張力変化を記録しながら行った実験でも、アドレナリン作動性 α 受容体の刺激は瞳孔散大筋を顕著に収縮させるという結果は得られている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。

サルの瞳孔はさらに dopamine の投与によって用量依存的に散瞳反応を誘起し(図4)、その閾値濃度は約 2.6×10^{-9} Mであった。Spiers と Calne¹⁸⁾は *in vivo* の実験で、ヒトの眼球に dopamine を点眼すると散瞳反応がおり、この反応は guanethidine や α 遮断剤の前処置によって抑制されることを確認し、dopamine がアドレナリン作動性神経より NE を放出させ散瞳反応を誘起していることを報告した。今回示したサルの dopamine 誘起の散瞳反応も α 遮断剤で抑制されヒトと同じような作用機序が考えられるが、自律神経系の関与の詳細については今後の検討を要する。

一方サルの瞳孔は図4で示したようにきわめて低濃度(1.4×10^{-9} M)の 5-HT と $\text{PGF}_{2\alpha}$ により縮瞳反応が誘起される。5-HT 誘起の縮瞳反応は5-HT 受容体の遮断剤である methysergide で競合的に抑制された(図7)。この結果より、サルの5-HT 縮瞳反応はセロトニン受容体を刺激した結果生じたものと思われる。

一方、イヌ瞳孔全体標本は5-HT により用量依存的な散瞳反応が発生し、ネコの瞳孔全体標本ではサルと同様縮瞳反応が認められ、これらの5-HT 反応はすべて methysergide で競合的に抑制されることが、知

られている⁴³⁾⁵⁰⁾。こうした事実は瞳孔面積変化に対する5-HT反応には著しい種差があり、その種差の生じる機能・形態学的特徴や生理学的意義については現在不明であり、今後の検討が待たれる。

PGF_{2α}もサルの瞳孔全体標本に対して、きわめて低濃度(1.4×10⁻⁹M)から縮瞳反応を誘起した(図4)。ところが最大反応時の瞳孔面積変化率は約43.2%であり、ACh(78.0%)に比較して明らかに低値を示した。すなわち、PGF_{2α}投与ではAChと違ってピンホール状態の瞳孔にはなり得ないことを示している。

動物の虹彩抽出物中には多量のPGE₂やPGF_{2α}の含まれていることが知られている⁵¹⁾。また臨床的には急性の眼内炎症時⁵²⁾やPosner-Schlossman症候群時⁵³⁾に房水中のPGsが急増することはよく知られている。こうした事実は、生理学的ならびに病態生理学的に房水中PGs(特にPGF_{2α})は瞳孔面積の調節に重要な役割を果たしている可能性を指摘できると同時に、PGF_{2α}類似物質からの縮瞳剤開発も薬理的観点から注目に値すると思われる。

一方サルの瞳孔面積はAChにより用量依存的に減少し、その反応の閾値濃度は5-HT、PGF_{2α}に比べてやや高く大体2.3×10⁻⁷Mであった(図4)。このAChの用量-反応曲線はムスカリン受容体遮断剤アトロピンの前処置によって右方に平行移動した(図6)。これらの結果より、サル瞳孔のACh反応はムスカリン受容体を媒介して縮瞳反応を誘起させたことが確認された。

さらにサルの瞳孔面積はadenosine, adenine nucleotides, histamineにより縮瞳反応が惹起された(図4)。Adenosineやadenine nucleotidesはイヌ・サル瞳孔全体標本でいずれも縮瞳反応を誘起し、種差がほとんどないのに対し、ヒスタミンの反応はサルやヒトの瞳孔全体標本では縮瞳反応を示す⁵⁴⁾が、イヌでは反対に散瞳反応を誘起することが知られている⁵⁰⁾。Histamine反応には著しい種差の存在するのが特徴である。しかし上記の物質はいずれも反応の閾値濃度が10⁻⁹M以上であり、また最大反応も他の活性物質の反応に比べてきわめて小さく、瞳孔面積調節物質としての生理学的役割は少ないものと思われる。

C 打ち抜き瞳孔標本の生理活性物質反応性

瞳孔面積の増減は瞳孔括約筋と瞳孔散大筋の発生張力の力学的平衡と両筋の構造的配列によって決定されるものである。すなわち、瞳孔括約筋と瞳孔散大筋の

いずれにも同一の薬物受容体が存在し、その感受性の違いによって瞳孔面積の増減を調節している可能性が予測できる。そこで、瞳孔括約筋を完全に除去した打ち抜きサル瞳孔標本を用いてその可能性を検索した。

図8で示したようにサルの打ち抜き瞳孔標本はEP、NEに対して対照標本と同様、用量依存性の散瞳反応を示した。これらの反応における閾値濃度(EP:4.7×10⁻⁸M, NE:5.0×10⁻⁷M)は、瞳孔括約筋切除前の正常瞳孔標本とほぼ同一であり、有意な差異は認められなかった。同時にそれぞれの標本における最大反応量を100%として図8で示した用量-反応曲線を規準化し直してみると、両標本間の用量-反応曲線はほぼ一致してしまうことも確認できた(表1)。

摘出したサルの瞳孔散大筋条片はEP、NE投与により用量依存的な収縮反応を呈することが知られている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。しかしながら瞳孔面積増大現象の解析にあたっては、瞳孔散大筋の著しい収縮反応に①瞳孔括約筋の収縮反応が防衛的に加味され負のフィードバック機構を作動させている、あるいは②瞳孔括約筋の弛緩反応が協調的に関与し正のフィードバック機構を作動させている等の可能性を考慮する必要もある。ところが、サルの瞳孔括約筋の摘出条片の実験からはβ受容体の存在はほとんど認められず、EPやNEでむしろわずかな収縮反応を惹起することが知られている⁵⁰⁾⁵¹⁾。同時に私共の実験結果もサルの正常瞳孔標本において、β作用薬のISPは瞳孔面積を全く変化させないことを示している。以上の事実を考え合わせると、サルの正常瞳孔標本で観察されたEP、NEによる散瞳反応は、瞳孔散大筋に主に分布するα受容体の刺激作用に基づく収縮現象によって惹起されたものであり、瞳孔括約筋の収縮はたとえ存在するとしても、瞳孔散大筋の強力な発生張力により、相殺されてしまっていると推測される。組織化学的に虹彩に対するアドレナリン作動性神経の分布様式を調べた研究によると、サルの瞳孔標本では、アドレナリン作動性神経は瞳孔散大筋にきわめて密に分布しているのに対し、瞳孔括約筋では僅少であることも知られている⁵⁵⁾⁵⁶⁾。こうした事実もカテコラミンによるサルの瞳孔面積調節作用は、瞳孔散大筋の収縮・弛緩反応が重要な役割を演じている可能性を示唆していると思われる。しかしサル瞳孔括約筋のα受容体刺激作用に基づく僅少な収縮反応の生理学的意義については今後の検討が必要であろう。1つの可能性としては、アドレナリン作動性α受容体刺激による瞳孔散大筋の収縮力に力学的に拮抗し、過大散

瞳を防ぐための1つの防御機構を果たしているとも考えることができよう。

図10に示すようにサルの打ち抜き瞳孔標本では $PGF_{2\alpha}$ ($10^{-7}M \sim 10^{-4}M$) は、散瞳・縮瞳いずれの反応も示さなかった。したがって、正常瞳孔全体標本が $PGF_{2\alpha}$ で著しい縮瞳反応を示したのは、瞳孔括約筋の収縮反応に基づくものであり、サルの瞳孔散大筋に対しては $PGF_{2\alpha}$ は何らの緊張変化も及ぼさないことが判明した。Van Alphen ら⁴⁷⁾も摘出したサルの摘出標本を用いた実験で、サルの瞳孔散大筋は $PGF_{2\alpha}$ に対してほとんど親和性を示さないことを報告している。一方、サルの瞳孔括約筋標本は $PGF_{2\alpha}$ に対して、用量依存性の収縮反応を示すことが知られており⁵⁴⁾⁵⁶⁾、私共の瞳孔面積を指標とした、実験結果とよく符号する。

サルの打ち抜き瞳孔標本は、高濃度の 5-HT ($10^{-6}M$ 以上) や ACh ($10^{-4}M$ 以上) によって、正常瞳孔全体標本とは反対の散瞳反応を用量依存的に誘起した。こうした事実は以下のことを示唆する。

(1) 低濃度の 5-HT や ACh は、瞳孔括約筋のみを収縮させ、縮瞳反応を惹起する。(2) 高濃度の 5-HT や ACh は瞳孔括約筋、瞳孔散大筋両者に収縮反応を誘起するが、その発生張力の平衡関係は瞳孔括約筋の

方が優るため、結果的に縮瞳反応を示す。この(2)の現象は 5-HT と ACh では濃度依存性に著しい差異があり、ACh では $10^{-4}M$ 以上のきわめて、高濃度にならないとこの現象は生じてこないことも特徴である。この現象の生理学的意義は不明であるが、先に述べた通り虹彩組織の ACh や 5-HT 濃度が著しく増加した場合、サル瞳孔が極度に縮瞳し、光量が全く遮断されてしまうのを防ぐ生体の自己防御的な役割を果たしていることが予測できる。

謝辞 稿を終わるに臨み、御校閲ならびに御指導を賜りました瀬川雄三教授ならびに第1生理学教室大橋俊夫教授に御礼申し上げますとともに、装置の開発に多大のご協力をいただきました長野高専機械科坂口正雄教授、研究の実施に当たってご援助いただいた第1生理学教室河合康明講師をはじめ教室員の皆様に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は、第90回日本眼科学会総会(1986年5月)、第28回日本平滑筋学会総会(1986年6月)、第64回日本生理学会大会(1987年4月)、第91回日本眼科学会総会(1987年5月)、および第65回日本生理学会大会(1988年4月)、において発表した。

文 献

- 1) Norte, J. : Iris and pupil. Records, R. E. : Physiology of The Human Eye And Visual System 1st ed., pp.217-231, Harper and Row, Publishers, Hagerstown, 1979
- 2) Yoshitomi, T. and Ito, Y. : Double reciprocal innervation in dog iris sphincter and dilator muscles. Invest Ophthalmol Vis Sci, 27 : 83-91, 1986
- 3) Suzuki, R., Osa, T. and Kobayashi, S. : Cholinergic inhibitory response in the bovine iris dilator muscle. Invest Ophthalmol Vis Sci, 24 : 760-765, 1983
- 4) Ehinger, B., Falck, B. and Persson, H. : Function of cholinergic nerve fibers in the cat iris dilator. Acta Physiol Scand, 72 : 139-147, 1968
- 5) Schaeppi, U. and Koella, W.P. : Innervation of cat iris dilator. Am J Physiol, 207 : 1411-1416, 1964
- 6) Narita, S. and Watanabe, M. : Response of the isolated rat iris sphincter to cholinergic and adrenergic agents and electrical stimulation. Life Sci, 29 : 285-292, 1981
- 7) Narita, S. and Watanabe, M. : Response of isolated rat iris dilator to adrenergic and cholinergic agents and electrical stimulation. Life Sci, 30 : 1211-1218, 1982
- 8) Persson, H. and Sonmark, B. : Adrenoceptors and cholinceptors in the rabbit iris. Eur J Pharmacol, 15 : 240-244, 1972
- 9) Posner, J. : The inhibitory innervation of the bovine iris sphincter. Proc Br Pharmacol Soc, 4-5 : 515-516, 1969
- 10) Konno, F. and Takayanagi, I. : Characterization of post synaptic α_1 -adrenoceptors in the rabbit iris dilator smooth muscle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 333 : 271-276, 1986

- 11) Takayanagi, I. and Kaneko, M. : Contractile response of rabbit dilator pupillae muscle to isotonic high K or norepinephrine, and Ca movement. *Eur J Pharmacol*, 79 : 159-162, 1982
- 12) Schaeppi, U. and Koella, W.P. : Adrenergic innervation of cat iris sphincter. *Am J Physiol* 207 : 273-278, 1964
- 13) Youfzai, S.Y.K. and Abdel-Latiff, A.A. : Alpha₁-adrenergic receptor induced subsensitivity and supersensitivity in rabbit iris-ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28 : 409-419, 1987
- 14) Matheny, J.L. and Ahlquist, R.P. : Adrenoceptor alteration by temperature in iris dilator muscle of rabbit. *Arch Int Pharmacodyn*, 209 : 197-203, 1974
- 15) Mochizuki, M. : The beta-adrenergic effects and cyclic AMP in the sphincter pupillae of the albino rabbit. *Jpn J Ophthalmol*, 23 : 49-57, 1979
- 16) Patil, P.N. : Adrenergic receptors of the bovine iris sphincter. *J Pharmacol Exp Ther*, 166:299-307, 1969
- 17) Koella, W.P., Rubin, R. and Schaeppi, U. : Effects of serotonin upon the isolated iris sphincter of the cat. *J Pharmacol Exp Ther*, 155 : 440-448, 1966
- 18) Spiers, A.S.D. and Calne, D.B. : Action of dopamine on the human iris. *Br Med J*, 4 : 333-335, 1969
- 19) Ueda, N., Muramatsu, I., Sakakibara, Y. and Fujiwara, M. : Noncholinergic, nonadrenergic contraction and substance P in rabbit iris sphincter muscle. *Jpn J Pharmacol*, 31 : 1071-1079, 1981
- 20) Schaeppi, U. and Koella, W.P. : Reaction of isolated pig iris sphincter to electrical stimulation and acetylcholine. *Am J Physiol*, 206 : 255-261, 1964
- 21) Yamauchi, D.N., Desantis, L. and Patil, P.N. : Relative potency of cholinomimetic drugs on the bovine iris sphincter strips. *Invest Ophthalmol*, 12 : 80-83, 1973
- 22) Takats, I. : Effect of prostaglandin E₂ on the isolated rabbit iris sphincter. *Aldrecht V. Graefes Arch Ophthalmol*, 200 : 257-262, 1976
- 23) Gustafsson, L., Hedqvist, P. and Lundgren, G. : Pre- and postjunctional effects of prostaglandin E₂, prostaglandin synthetase inhibitors and atropine on cholinergic neurotransmission in guinea pig ileum and bovine iris. *Acta Physiol Scand*, 110 : 401-411, 1980
- 24) Gustafsson, L., Hedqvist, P. and Lagergrantz, H. : Potentiation by prostaglandins E₁, E₂, and F_{2α} of the contraction response to transmural stimulation in the bovine iris sphincter muscle. *Acta Physiol Scand*, 95 : 26-33, 1975
- 25) Suzuki, R. and Kobayashi, S. : Response of bovine intra-ocular muscles to transmural stimulation in the presence of various prostaglandins. *Exp Eye Res*, 36 : 787-798, 1983
- 26) Zhang, J., Butler, J.M., Ohara, K. and Cole D.F. : Sensory neural mechanisms in contraction of the isolated sphincter pupillae: the role for substance P and the effects of sensory denervation on the responses to miotics. *Exp Eye Res*, 35 : 43-54, 1982
- 27) Suzuki, R. and Kobayashi, S. : Different effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on the motor function of bovine intraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24 : 1566-1571, 1983
- 28) Ueda, N., Muramatsu, I., Hayashi, H. and Fujiwara, M. : Trigeminal nerve: the possible origin of substance P-nergic response in isolated rabbit iris sphincter muscle. *Life Sci*, 31 : 369-375, 1982
- 29) Bynke, G., Wahlestedt, C., Beding, B. and Hakanson, R. : Pupillary supersensitivity to substance P following prolonged treatment with tetrodotoxin or substance P antagonists. *Eur J Pharmacol*, 108 : 217-223, 1985
- 30) Ueda, N., Muramatsu, I., Taniguchi, S. and Fujiwara, M. : Effects of neurokinin A, substance P and electrical stimulation on the rabbit iris sphincter muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 239 : 494-499, 1986

- 31) Lowenstein, O. and Lowenfeld, I. : Electronic pupillography. *A.M.A. Arch Ophthalmol*, 59 : 352-363, 1958
- 32) Gambil, H.D., Ogle, K.N. and Kearns T.P. : Mydriatic effect of four drugs determined with pupillograph. *Arch Ophthalmol*, 77 : 740-746, 1967
- 33) Haddad, N. J., Moyer, N. J. and Riley F.C. : Mydriatic effect of phenylephrine hydrochloride. *Am J Ophthalmol*, 70 : 729, 1972
- 34) Chang, F.W., Mccan, T.A. and Hitchcock J.R. : Sector pupil dilation with phenylephrine and tropicamide. *Am J Ophthalmol*, 62 : 482-486, 1985
- 35) Ogle, K.N., Whisnant, R.A. and Hazelrig, J.B. : Quantitative study of pupil response to miotic drugs. *Invest Ophthalmol*, 5 : 176-185, 1966
- 36) Narasaki, S., Kawai, K., Kubota, S. and Noguchi, J. : Videopupillographic perimetry and its clinical application. *Jpn J Ophthalmol*, 18 : 253-274, 1974
- 37) Shoumura, K. and Imai, H. : Pupillary responses evoked by electrical stimulation of area pretectaris in cats. *Jpn J Ophthalmol*, 30 : 436-452, 1986
- 38) Sakaguchi, M., Ohhashi, T. and Azuma, T. : A camera-type diameter gauge applicable to small blood and lymph vessels. *Pflügers Arch*, 388 : 261-265, 1980
- 39) Van Rossum, J.M., Hurkmans, J.A.Th.M. and Wolters, C.J.J. : Cumulative dose-response curves, II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn.*, 143 : 299-330, 1963
- 40) Arunlakshana, O. and Schild, H.O. : Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol*, 14 : 48-58, 1959
- 41) Schild, H.O. : *Applied Pharmacology*, 12th ed., pp.9-18, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1980
- 42) Quilliam, J.P. : A quantitative method for the study of the reactions of the isolated cat's iris. *J Physiol*, 110, 237-247, 1949
- 43) Koella, W. and Schaeppi, U. : The reaction of the isolated cat iris to serotonin. *J Pharmacol Exp Ther*, 138 : 154-158, 1962
- 44) Schaeppi, U., Dennison, B.L. and Dodd, M. : Nonganglionic parasympathomimetic action of nicotine upon the isolated cat iris. *J Pharmacol Exp Ther*, 154 : 216-223, 1966
- 45) Schaeppi, U., Rubin, R. and Koella, W.P. : Electrical stimulation of the isolated cat iris. *Am J Physiol*, 210 : 1165-1169, 1966
- 46) Soloway, M.R., Stjernschantz, J. and Sears, M. : The miotic effect of substance P on the isolated rabbit iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20 : 47-52, 1981
- 47) Van Alphen, G.W.H.M., Wilhelm, P.B. and Eisenfeld, P.W. : The effect of prostaglandins on the isolated internal muscle of the mammalian eye, including man. *Doc Ophthalmol*, 42 : 397-415, 1977
- 48) Van Alphen, G.W.H.M., Holland, L., Kern, R. and Robinette, S.L. : Adrenergic receptors of the intraocular muscles. *Arch Ophthalmol*, 74 : 253-259, 1965
- 49) Langham, M.E. and Diggs, E. : β -adrenergic responses in the eyes of rabbits, primates, and man. *Exp Eye Res*, 19 : 281-295, 1974
- 50) 福永博一, 大橋俊夫, 坂口正雄 : 瞳孔面積変化を指標とした虹彩平滑筋の薬理学的解析. *日本平滑筋誌*, 22 : 300-302, 1986
- 51) Ambache, N. and Brummer, H.C. : A simple chemical procedure for distinguishing E from F prostaglandins with application to tissue extracts, *Br J Pharmacol Chemothe*, 33 : 162, 1968
- 52) Eakins, K.E., Whitelocke, R.A.F., Bennett, A. and Maytenet, A.C. : Prostaglandin-like activity in ocular inflammation. *Br Med J*, 3 : 452, 1972
- 53) Masuda, K., Izawa, Y. and Mishima, S. : Prostaglandins and glaucomato-cyclitic crisis. *Jpn J Ophthalmol*, 19 : 368-375, 1975

- 54) Thompson, H.S. : The pupil. Moses, R.A. Adler's physiology of the eye. Clinical application. 7th ed., pp.326-356 The C.V.Mosby company, St. Louis, Toronto, London, 1981
- 55) Staflova, J. : A comparative study of the adrenergic innervation of the iris and ciliary structures in 18 species in phylogenesis. J Morphol, 128 : 387-402, 1969
- 56) Laties, A.M. : Ocular melanin and the adrenergic innervation to the eye. Trans Am Ophthalmol Soc, 122 : 560-605, 1974

(63. 3. 5 受稿)
