

網膜内因性ドーパミンによるウサギ *in vivo* 網膜電図の変化

小林 顕, 白尾 裕, 田川 茂樹, 加藤 要, 田村 敏博

金沢大学医学部眼科学教室

要 約

ドーパミンの神経終末への再吸収阻害剤であるノミフェンシン(硝子体中で30, 100, 300, 500 および 1,000 μM)のウサギ *in vivo* 網膜電図(ERG)に及ぼす影響を調べた。100 μM および 300 μM ノミフェンシンは律動様小波振幅の総和を増大させた(ともに $p < 0.05$)が、1,000 μM では減少させた($p < 0.01$)。100 μM および 1,000 μM ノミフェンシンは scotopic b 波振幅を減弱させた(ともに $p < 0.05$)が、調べたすべての濃度で scotopic b 波頂点潜時, 0 log 刺激光による b 波ならびに a 波の振幅と頂点潜時のいずれも変化させなかった。そ

れぞれ単独では scotopic b 波も律動様小波も変化させ得ない量のドーパミン(硝子体内濃度 1 μM)とノミフェンシン(硝子体内濃度 30 μM)の同時投与は、律動様小波を増大させた。上記の結果は、内因性ドーパミン放出量は ERG を変化させるに十分であることを示唆する。(日眼会誌 100: 111-117, 1996)

キーワード: ドーパミン, ドーパミントランスポーター, ノミフェンシン, 網膜電図, 律動様小波

Effects of Retinal Intrinsic Dopamine on the *in Vivo* Electroretinogram of RabbitsAkira Kobayashi, Yutaka Shirao, Shigeki Tagawa,
Kaname Katoh and Toshihiro Tamura

Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine

Abstract

The effects of intravitreal injection of nomifensine, a potent dopamine uptake blocker, on the electroretinogram (ERG) were investigated in rabbit. Nomifensine enhanced the amplitude of the oscillatory potentials at 100 μM (intravitreal concentration) and 300 μM ($p < 0.05$), but it attenuated the oscillatory potentials at 1,000 μM ($p < 0.01$). Nomifensine attenuated the amplitude of the scotopic b-wave at 100 μM and 1,000 μM ($p < 0.05$), leaving the peak latency of the scotopic b-wave unaltered at all concentrations tested (30, 100, 300, 500 and 1,000 μM). Neither the amplitude nor the peak latency of the dark-adapted a- and b-waves elicited by bright stimuli was altered at any

nomifensine concentration tested. 1 μM dopamine and 30 μM nomifensine together, each of which is insufficient to alter either of the scotopic b-wave or the oscillatory potentials when applied alone, reduced the scotopic b-wave and enhanced the oscillatory potentials. These results suggest that intrinsic dopamine release in the retina is large enough to alter the ERG. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 111-117, 1996)

Key words: Dopamine, Dopamine transporter, Nomifensine, Electroretinogram, Oscillatory potentials

I 緒 言

ドーパミンは脊椎動物網膜のアマクリン細胞および網膜層間細胞に存在することが確認されており¹⁾²⁾, 外因性(硝子体内注入あるいは静脈内注射など)に投与された

ドーパミンが網膜の電気的活動に及ぼす変化はいくつか報告³⁾⁻⁸⁾されている。しかし、内因性ドーパミンによる網膜の電気生理学的変化は著者らの知る限りでは報告されていない。網膜内のドーパミンの濃度は、ヒトにおいて 1.9 μM ⁹⁾, ウサギにおいて 2.2 μM ¹⁰⁾または 2.9 μM ¹¹⁾と

別刷請求先: 920 石川県金沢市宝町 13-1 金沢大学医学部眼科学教室 小林 顕
(平成7年3月16日受付, 平成7年9月20日改訂受理)

Reprint requests to: Akira Kobayashi, M.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine, 13-1 Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa-ken 920, Japan

(Received March 16, 1995 and accepted in revised form September 20, 1995)

報告されている。これらの値はドーパミンのほとんどはシナプス空隙以外の部分に存在する¹⁾ため、内因性ドーパミンがシナプス空隙において網膜の電気的性質を変調させ得る程度の濃度で存在するか否かは調べられていない。そこで今回、我々はそれを知ることを目的として、ドーパミン再吸収阻害剤であるノミフェンシン^{12)~16)}のウサギ硝子体内注入による *in vivo* 網膜電図(ERG)に及ぼす影響を調べた。

II 方 法

暗赤色光下で白色ウサギ(体重2~3 kg, 18匹)に1%塩酸リドカインによる浸潤麻酔後、気管切開、気管内挿管および不動化(塩化ツボクラリン0.5 mg/kg/hr, 筋肉注射)を施し、直ちに人工呼吸(1回送気量40 ml, 60回/分)を行った。1%塩酸リドカインによる球後麻酔および浸潤麻酔の後、眼瞼および瞬膜を切除し、ミドリンP®(参天製薬)の点眼により極大に散瞳した。

刺激光として、安定化電源によって駆動された500 Wキセノンアーク灯(Xenon Arc 45, 三双製作所)から得られる連続光を電気刺激装置(SEN-3201, 日本光電)および電磁式シャッター(三双製作所)で断続し、得られた持続時間100 msecの白色矩形波刺激光を中性フィルターと直径4 mmの硝子線維束を介して背景光を与えずに角膜上方約1.5 cmの位置から介して照射した(0 log単位は角膜面5,000 luxに相当, 照度計H-100, 三双製作所)。角膜実質に穿通させた脳波用針電極(NE-223 S, 日本光電)を関電極, 剃毛した前頭部正中線上においた皿電極(NT-614 U, 日本光電)を不関電極として得られる電位を時定数2秒または時定数0.003秒で交流増幅し(AB-622 M, 日本光電), それぞれa波およびb波または

律動様小波(oscillatory potentials, OPs)を得た。電位をFMデータレコーダー(NFR-3515, 直流から2.5 kHz, Sony)で保存し, 信号加算平均装置(ATAC-250, 日本光電)で得た後X-Yプロッター(WX-4401, 渡辺測器)で描画した。a波振幅として基線からa波底までの電位差, b波振幅として基線またはa波底のうち, 低い方からb波頂点までの電位差を計測した。OPの計測方法は米村ら¹⁷⁾の方法に準じた。

30分以上の暗順応後, 刺激光強度 $-5 \log$ から1分毎に1 logずつ強度を上げてそれぞれの刺激光強度でa波またはb波を記録し, 次いで, 0 log刺激光を0.3 Hzの頻度で21回与えて得られた応答を加算してOPを得た。両眼から同時に記録し, 左右のERG振幅の差が20%以内であることを確認した。本報では, 暗順応下で $-5 \log$ 刺激光によって惹起されたb波はほとんど杆体系の応答と考えられるのでscotopic b波と呼び, 暗順応下で0 log刺激光によって惹起されたa波およびb波は杆体系と錐系の混合応答と考えられるので, それぞれ強刺激a波および強刺激b波と呼ぶ。OPの各小波を頂点潜時の短い順に $O_1 \sim O_4$ と呼ぶ。次いで片眼(試験眼)に薬液を, 対眼(対照眼)に対照液をそれぞれ硝子体内注入し(後述), 暗順応の後に対照眼と試験眼から同時にERG(以下ではそれぞれ対照ERGと試験ERGと呼称)を記録した。薬液注入に際しては, 米村ら¹⁸⁾の方法に従い, まず, 0.1 mlの前房水を吸引し, 次いで, 27ゲージ注射針を用いて角膜輪部から約3 mmの後部の強膜を貫き, 注射針のベベル面を水晶体側に向けながら0.1 mlの薬液を徐々に硝子体内に注入した。以下の2種の実験を行った。

実験 1.

15匹のウサギに対し, 試験眼には硝子体内濃度が30,

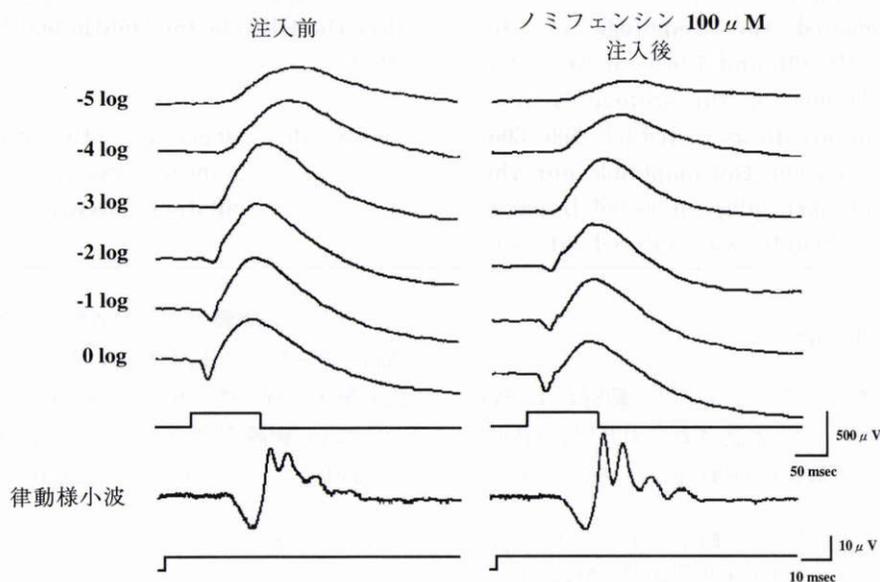


図1 ノミフェンシン(NF)100 μ M投与前後におけるa波, b波の変化および律動様小波(OP)の1例。

左: 投与前, 右: 投与後, $-5 \log \sim 0 \log$ までの波形は時定数2秒で, OPは時定数0.003秒で増幅された。

一番下および下から3番目のトレースは刺激光の点滅を示す。

100, 300, 500, 1,000 μM (ウサギ硝子体容積を約 1.7 ml として計算, 以下では薬剤が硝子体内で均一に拡散すると仮定した際の硝子体内濃度で投与量を示す) となるような nomifensine (NF) (和光純薬) 溶液を, 対照眼には NF 溶液の溶媒のみを注入し, 60 分の暗順応を与えて ERG を記録した. 溶媒としてオペガード MA[®] (千寿製薬) を用いた.

実験 2.

3 匹のウサギに対し, ドーパミンと NF の ERG に及ぼす効果が相乗的であるか否かを調べるために, 試験眼には 1 μM ドーパミンを, 対照眼にはその溶媒 (実験 1 と同一) のみを注入して実験 1 と同様に 60 分の暗順応を与え ERG を記録し, 次いで, 両眼に 30 μM NF を投与して

60 分の暗順応後に ERG を記録した.

III 結 果

図 1 に実験 1 で得られた波形の例を示す. 100 μM NF 硝子体注入前 (図 1 左) に比べて注入後 (図 1 右) で scotopic b 波の振幅は減弱し (図 1, -5 log, 左右), OP 振幅は著明に増大した (図 1 最下段の波形, 左右). a 波振幅は変化しなかった (図 1, 0 log, 左右). 以下に ERG 各成分の注入前の値に対する注入後の値の比を, 調べた NF 投与量ごとに示す. まず, OP 振幅総和の注入前後の比を示す (図 2). 100 μM および 300 μM NF において OP 振幅総和は有意 (いずれも $p < 0.05$) に増大したが, 30 μM および 500 μM では変化せず ($p < 0.05$), 1,000 μM では有意に減弱した ($p < 0.01$). Scotopic b 波振幅は 100 μM および 1,000 μM NF によって有意に ($p < 0.05$) 減弱した (図 3). 強刺激 b 波振幅は 100 μM および 300 μM NF で増大傾向を示したが, いずれの投与量においてもその変化は有意ではなく ($p > 0.05$), 頂点潜時はいずれの投与量においても変化しなかった ($p > 0.05$) (図 4). 強刺激 a 波の振幅, 頂点潜時の比は調べたすべての NF の濃度において変化しなかった (図 5). 以上から, ERG を最も安定して変化させる NF 投与量は 100 μM であることが判明したので, この濃度で以下に示す検討をさらに加えた.

100 μM NF は O_{1-4} のすべての成分を有意に増大させ (図 6) (O_1, O_2 および O_4 では $p < 0.01$, O_3 では $p < 0.05$) O_2 の頂点潜時を延長させた ($p < 0.05$) が, O_1, O_3 および O_4 の頂点潜時は変化させなかった (図 7). 次に, 100 μM NF による a 波の変化を刺激光の強さを -5 log から 1 log ずつ順次増強しながら測定したところ, いずれの刺激光強度においても振幅および頂点潜時に有意な変化はみられなかった ($p > 0.05$) (図 8). 同様に NF 100 μM による b 波の変化を測定したところ, -5 log 弱刺激光での

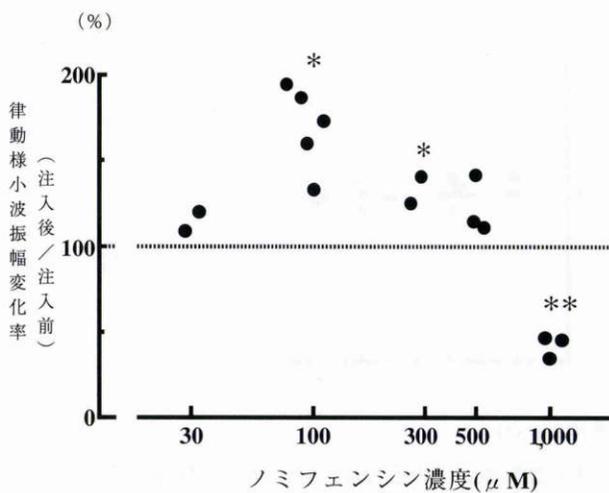


図 2 NF (30, 100, 300, 500, 1,000 μM) : すべて硝子体内濃度, 以下の図でも同様) 投与前後における OP 振幅総和の比.

縦軸は投与前の値に対する投与後の値の百分率を, 横軸は硝子体内 NF 濃度 (方法参照) をそれぞれ示す (図 3, 4 および 5 でも同様). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

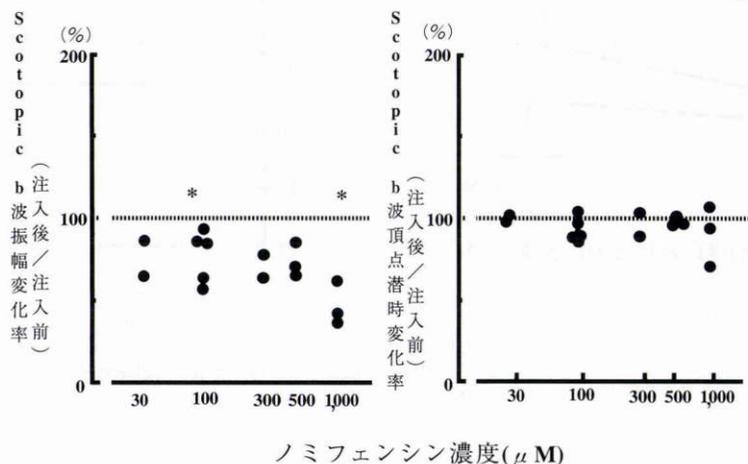


図 3 NF (30, 100, 300, 500, 1,000 μM) 投与前に対する投与後の scotopic b 波の振幅 (左) および頂点潜時の百分率 (右).

*: $p < 0.05$

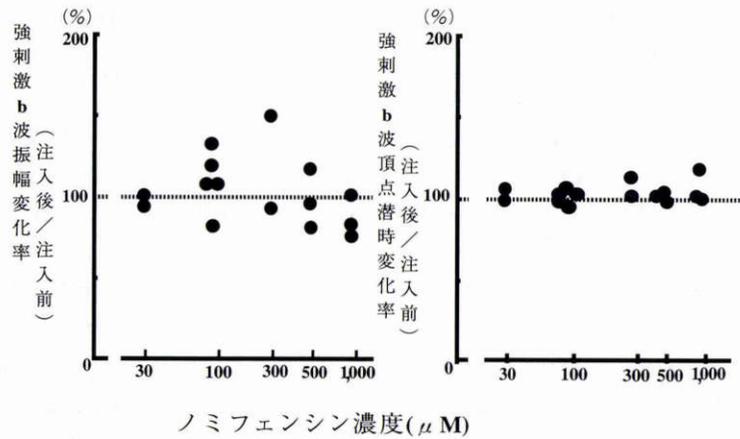


図4 NF(30, 100, 300, 500, 1,000 μ M)投与前に対する投与後の強刺激 b 波振幅(左)および強刺激 b 波頂点潜時の百分率(右).

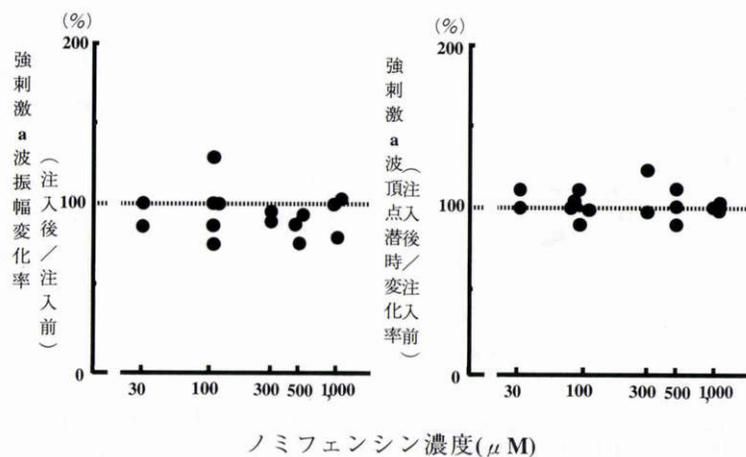


図5 NF(30, 100, 300, 500, 1,000 μ M)投与前に対する投与後の強刺激 a 波の振幅(左)および頂点潜時の百分率(右).

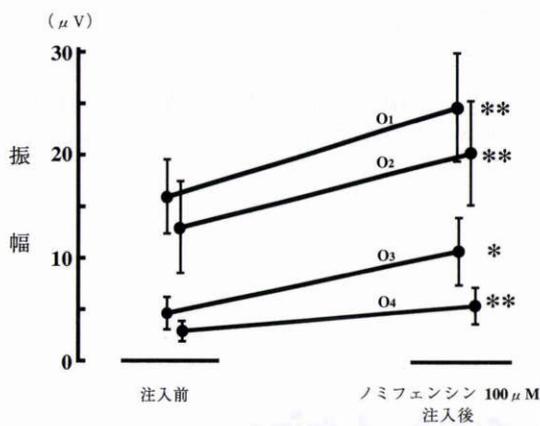


図6 NF(100 μ M)投与前後における OP 各成分(O₁~O₄)の振幅の比較.

縦線分は平均値±標準偏差を示し、縦線分が判然としない場合は標準偏差が描画点の大きさの中に含まれることを示す(図7~9でも同様).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

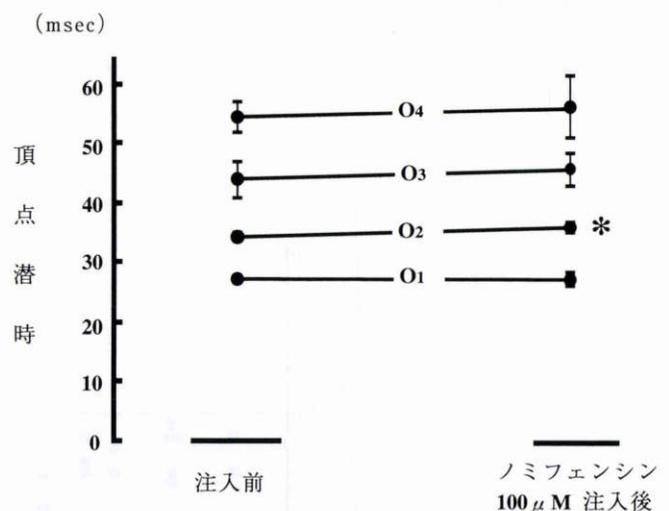


図7 NF(100 μ M)投与前後における OP 各成分(O₁~O₄)の頂点潜時の比較.

*: $p < 0.05$

み b 波振幅が有意に減弱した($p < 0.05$)が、 $-4 \log$ 以上の刺激光では b 波振幅に変化はみられなかった($p > 0.05$) (図9).

次に、実験2の結果を示す。ドーパミン1 μ M 投与は scotopic b 波をわずかに減弱させた(図10, 上段). NF 30 μ M は ERG をほとんど変化させないことがわかってい

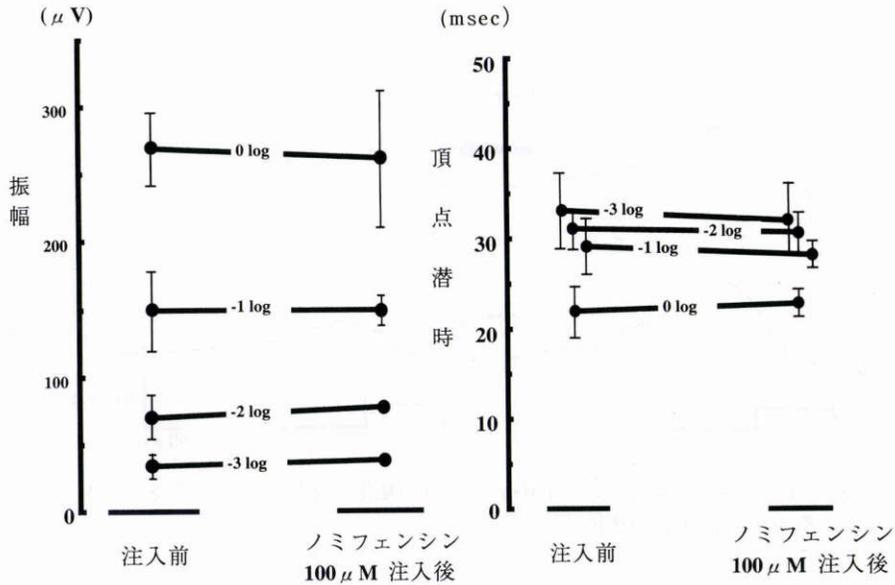


図8 NF(100 μM)投与前後における各刺激光強度での a 波の振幅(左)および頂点潜時(右)の比較.

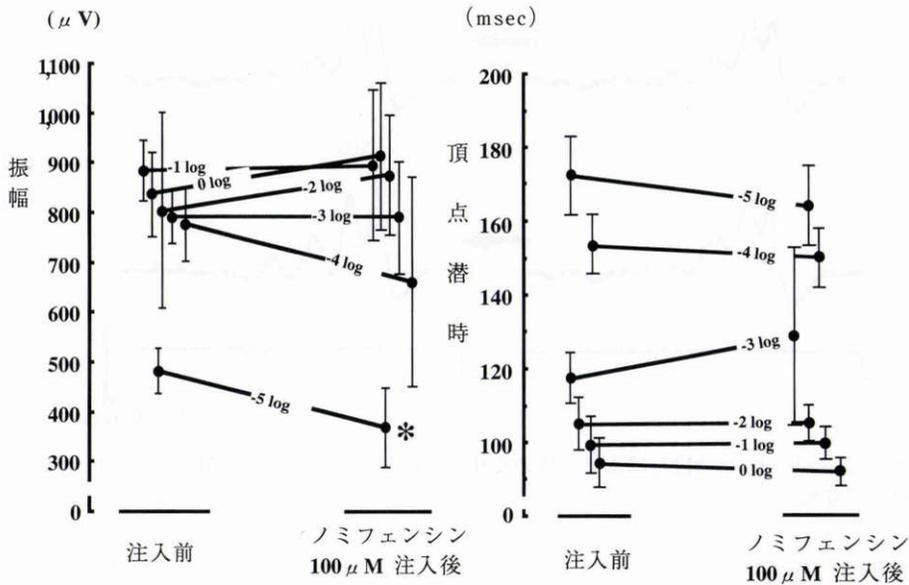


図9 NF(100 μM)投与前後における各刺激光強度での b 波の振幅(左)および頂点潜時(右).
*: $p < 0.05$

る(図2~5)が,ドーパミン 1 μM と NF 30 μM の同時投与をすることにより scotopic b 波がドーパミン 1 μM 投与のみの場合に比べて大きく減弱し(図 10, 下段), 十分量のドーパミンを硝子体内投与した場合¹¹⁾と同様の効果を示した. すなわち, 外因性ドーパミンと NF は scotopic b 波振幅に対して相乗的作用を有した. ドーパミン 1 μM の単独投与は OP を変化させなかった(図 11, 上段)が, ドーパミン 1 μM に OP を変化させない量の NF (30 μM , 図 2, 6, 7)を加えて投与すると OP は著しく増大した(図 11, 下段). すなわち, 外因性ドーパミンと NF は OP 振幅に対しても相乗的作用を有した. 実験 2 を行ったすべてのウサギ (3 匹) において上記のような ERG の変化が見られた.

IV 考 按

ドーパミンは脊椎動物において, 網膜内神経伝達物質として作用していると考えられている. その証拠には, ①ドーパミン合成酵素, 分解酵素が網膜に存在し¹⁾, ②光刺激によってドーパミンが網膜から放出され¹⁾, ③ドーパミンが明順応類似の形態学的効果を視細胞と網膜色素上皮に及ぼし^{19)~21)}, ④ドーパミンが明順応と同様に水平細胞の de-coupling を引き起こし²²⁾, ⑤網膜の種々の細胞にはドーパミンレセプターが証明される (D_1 レセプター, 内顆粒層, 内網状層; D_2 レセプター, 視細胞層)²³⁾ ことなどがあげられる. ドーパミンが網膜の電気的活動を変化させることは, 外因性にドーパミンを投与する実験で証明

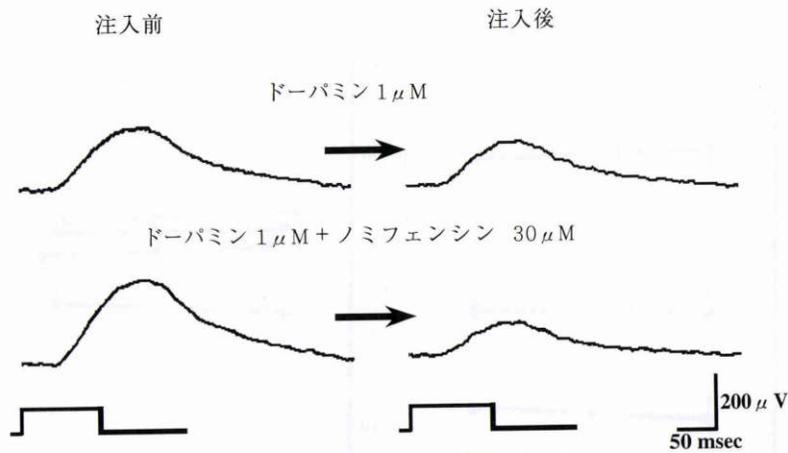


図10 ドーパミン(1 μ M)単独投与による scotopic b波の変化(上段)とドーパミン(1 μ M)とNF(30 μ M)の同時投与による scotopic b波の変化(下段).
一番下のトレースは刺激光の点滅を示す(図11でも同様).

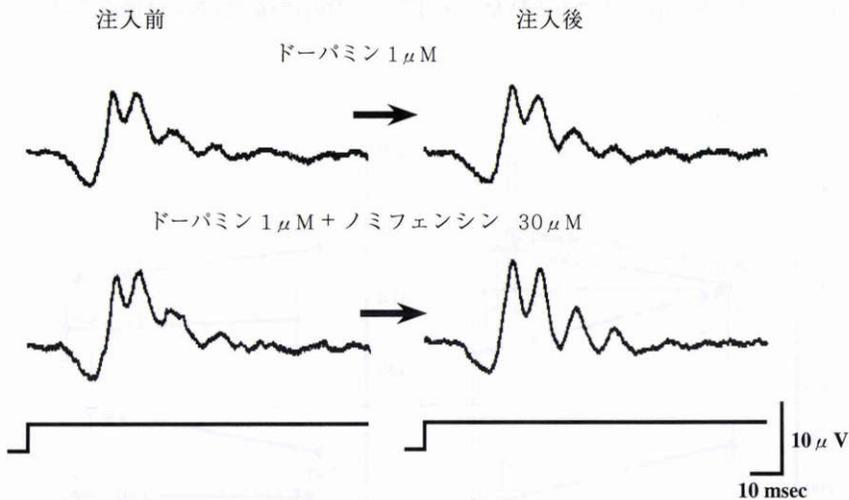


図11 ドーパミン(1 μ M)単独投与による OPの変化(上段)とドーパミン(1 μ M)とNF(30 μ M)の同時投与による OPの変化(下段).

されているが^{3)~8)}, 網膜内で放出されるドーパミンが果たして網膜の電気的活動を変調するか否かは知られていない。

我々の実験では, ドーパミン再吸収阻害剤であるNFの硝子体内投与によってERGは以下のような変化, すなわち, OPの振幅の総和の増大, scotopic b波の振幅の減弱(いずれもNF 100 μ M, 図1)を呈した. これは外因性に投与されたドーパミンによるERG変化³⁾と類似している. NFがERGを変化させる機序としては, 以下のような可能性が考えられる. ①NFがドーパミンレセプターに作用する, ②NFがドーパミン作動性神経細胞を抑制する神経細胞を抑制する, ③NFによるドーパミン再吸収阻害がシナプス間隙のドーパミン濃度を高めるなどの可能性がある. ①は, NFについてこれまでに知られている性質^{12)~16)}と異なるうえ, 微量のドーパミンと微量のNFの相乗的効果(図10, 11)を説明できないから否定的である. ②は, NFにこれまでにそのような作用が知ら

れていないうえ, やはり微量のドーパミンと微量のNFの相乗的効果を説明できないため否定的である. 一方, ③の可能性を否定するような実験結果は今までに得られていないため, ③の可能性が最も高いと考えられる. O'Connorら²⁴⁾によると, *in vitro* コイ網膜においてNF 30 μ Mはドーパミン感受性のcAMP濃度を上昇させたという. この結果は, ③の可能性を支持している.

Perossiniら²⁵⁾によれば, 25~30歳の健常成人7人にNF 100 mgを投与したところ, 有意なb波振幅(30分間の暗順応後, 1J閃光刺激)の上昇が認められたという(p=0.002: 1時間後, p=0.004: 2時間後). Perossiniら²⁵⁾の報告したERG変化と我々の実験結果は, 前者²⁵⁾ではb波(恐らく杆体系-錐体系混合)が増大し, 本報ではOPが増大したという点で異なっているが, 前者ではNFによる全身的作用の影響²⁶⁾(臨床的には, 躁状態や精神病症状の悪化など)を免れることはできないという点で前者と後者を同列に論じることはできない. 我々の

NF 投与量は仮に眼内から全身に移行したとしても体重 1 kg 当たり約 20 μg (NF 100 μM の場合) で、人における投与量²⁵⁾に比してはるかに少ないから、全身的作用の影響は少ないと考えられる。したがって、NF の網膜に対する直接的作用としては我々の結果の方が妥当であろう。今回の結果は、網膜内因性ドーパミンが網膜の電気的活動を変調させるという考えを支持する傍証となる。また、再吸収阻害剤によって ERG が変化するということは、ドーパミンの網膜内におけるターンオーバーが迅速であるというこれまでの推測⁹⁾を裏付けるとも解釈される。

複数種あるドーパミンレセプターのうちのどれが上記の ERG 変化に関わっているかに興味が持たれるが、それについては続報に詳述されよう。

稿を終えるにあたり、御指導、御鞭撻ならびに御校閲を賜りました金沢大学医学部眼科学教室河崎一夫教授に謹んで深甚の謝意を申し上げます。

文 献

- 1) Ehinger B: Functional role of dopamine in the retina. In: Osborne NN, et al (Eds): Progress in Retinal Research. 2: 213—232, Pergamon Press, Oxford, 1983.
- 2) Negishi K, Teranishi T, Kato S: The dopaminergic system of the teleost retina. In: Osborne NN, et al (Eds): Progress in Retinal Research. 9: 1—48, Pergamon Press, Oxford, 1989.
- 3) 白尾 裕, 加藤 要, 田村敏博, 佐々木次壽, 河原崎正裕, 東出朋巳, 他: ドーパミンおよびハロペリドール硝子体内注入のウサギ *in vivo* ERG に及ぼす影響. 眼紀 45: 23—28, 1994.
- 4) Starr MS: The effects of various amino acids, dopamine and some convulsants on the electroretinogram of the rabbit. Exp Eye Res 21: 79—87, 1975.
- 5) Shiells RA, Falk G: Dopamine hyperpolarizes and reduces the light responses of rod on-center bipolar cells in the retina of the dogfish. Neurosci Lett 55: 331—336, 1985.
- 6) Wachtmeister L, Dowling JE: The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 1176—1188, 1978.
- 7) Dawis SM, Niemeyer G: Dopamine influences the light peak in the perfused mammalian eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 330—335, 1986.
- 8) Sato T, Yoneyama T, Kim HK, Suzuki TA: Effect of dopamine and haloperidol on the c-wave and light peak of the light-induced responses in chick eye. Doc Ophthalmol 65: 87—95, 1987.
- 9) Frederick JM, Rayboan ME, Laties AM, Lam DMK, Hollyfield JG: Dopaminergic neurons in the human retina. J Comp Neurol 210: 65—79, 1982.
- 10) Lam DMK, Fung SC, Kong YC: Postnatal development of dopaminergic neurons in the rabbit retina. J Neurosci 1: 1117—1132, 1981.
- 11) Floren I, Hansson HC: Investigations into whether 5-hydroxytryptamine is a neurotransmitter in the retina of rabbit and chicken. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 117—125, 1980.
- 12) Schacht U, Leven M, Gerhards HJ, Hunt P, Raynaud JP: Recent investigations on the mechanism of action of nomifensine. Int Pharmacopsychiatry 17: 21—34, 1982.
- 13) Fielding S, Szewczak MR: Pharmacology of nomifensine: A review of animal studies. J Clin Psychiatry 45: 12—20, 1984.
- 14) Hunt P, Kannengiesser M, Raynaud JP: Nomifensine: A new potent inhibitor of dopamine uptake into synaptosomes from rat brain corpus striatum. J Pharm Pharmacol 26: 370—371, 1974.
- 15) Trimble MR: Epilepsy, antidepressants, and the role of nomifensine. J Clin Psychiatry 45: 39—42, 1984.
- 16) Siegfried K, Tauber K: Pharmacodynamics of nomifensine: A review of studies in healthy subjects. J Clin Psychiatry 45: 33—38, 1984.
- 17) 米倉大蔵, 蓮井 勲, 河崎一夫: 正常人眼 ERG の律動様小波の統計的観察. 眼紀 23: 390—395, 1972.
- 18) 米倉大蔵, 河崎一夫, 望月清文, 鳥崎真人: 網膜に及ぼす硫酸ゲンタマイシンの影響. 家兎 *in vivo* ERG による検討. 日眼会誌 89: 1039—1045, 1985.
- 19) Dearry A, Burnside B: Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas. I. Induction of cone contraction is mediated by D₂ receptors. J Neurochem 46: 1006—1021, 1986.
- 20) Dearry A, Burnside B: Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas. II. Modulation by γ -aminobutylic acid and serotonin. J Neurochem 46: 1022—1031, 1986.
- 21) Dearry A, Burnside B: Regulation of teleost retinomotor movements by cyclic AMP, calcium, and dopamine. In: O'Brien PJ, et al (Eds): Pineal and Retinal Relationship. 57—91, Academic Press, New York, 1986.
- 22) Teranishi T, Negishi K, Kato S: Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina. Nature 301: 243—246, 1983.
- 23) Tran VT, Dickman M: Differential localization of dopamine D₁ and D₂ receptors in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1620—1626, 1992.
- 24) O'Connor P, Dorison SJ, Watling KJ, Dowling JE: Factors affecting release of ³H-dopamine from perfused carp retina. J Neurosci 6: 1857—1865, 1986.
- 25) Perossini M, Fornaro P: Electroretinographic effects induced in humans by psychopharmacologic agents. Doc Ophthalmol 75: 1—6, 1990.
- 26) Elliott JM, Stephenson JD: In: RA Webster, et al (Eds): Neurotransmitters, Drugs and Disease. 361—397. Blackwell Scientific Publications Limited, Oxford, 1989.