

エンドセリン投与の家兎視神経乳頭イオン環境に及ぼす影響

山口 ひとみ

大阪医科大学眼科学教室

要 約

エンドセリン-1(以下, ET-1)は網膜循環やその自動調節機構に関与し, その分泌異常は網脈絡膜・視神経疾患の一因となり得ると考えられている。今回, ET-1の視神経乳頭への影響を検討するため, 透過型電子顕微鏡(以下, 電顕)による乳頭部の形態変化の観察と, 電子プローブ X線微小分析法(以下, X線分析)による新鮮凍結無固定標本の乳頭部軸索・髄鞘内元素(イオン)濃度の測定を行った。白色家兎の1眼にET-1(10^{-6} M)0.1 ml(ET群)を, 他眼にオペガード MA[®] 0.1 ml(対照群)を硝子体内中央部へ注入し, 2時間後の変化を定量した。電顕観察では, 対照群に比べET群で軸索の多形性と髄鞘の障害の

傾向を示した。X線分析では, Caは軸索で対照群0.5, ET群0.8 mmol/kg wet weightと有意に増加し($p < 0.05$), ClはET群で軸索で有意に増加し, Kは軸索・髄鞘で有意に減少した。細胞内カルシウムが増加すると蛋白分解酵素活性が増加することも考えられ, 視神経障害の原因となる可能性が示唆された。(日眼会誌 100: 34-39, 1996)

キーワード: エンドセリン-1, 視神経乳頭, 透過型電子顕微鏡, 電子プローブ X線微小分析法, カルシウム濃度

Effect of Endothelin on Ionic Background in the Optic Nerve Head of Rabbits

Hitomi Yamaguchi

Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

Abstract

Endothelin-1 (ET-1) is thought to have some effect on the retinal circulation and its autoregulation. The disturbance of ET-1 secretion might contribute to the pathogenesis of retinchoroidal or optic nerve disease. In this study, to determine the effect of ET-1 on the optic nerve head, we observed the optic nerve with a transmission electron microscope and measured element contents in the axon and myelin of the optic nerve head by electron probe X-ray microanalysis. Albino rabbits were given an injection of 0.1 ml (10^{-6} M) ET-1 into the middle of the vitreous of one eye (ETs) and 0.1 ml Opeguard-MA[®] into the other eye (controls), and 2 hours after the injection changes in the optic disc were observed. In transmission electron microscopy ($n =$

3), axon polymorphism and myelin disorder were seen. The X-ray analysis of frozen sections ($n = 5$) revealed that with ET-1 treatment Ca and Cl concentrations were increased in the axon, and K concentration was decreased significantly in both axon and myelin. These results suggest that the increase of intracellular Ca could elevate the activity of some proteases, which might then cause damage to the optic nerve. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 34-39, 1996)

Key words: Endothelin-1, Optic nerve head, Transmission electron microscope, Electron probe X-ray microanalysis, Ca concentration

I 緒 言

エンドセリンは, 1988年柳沢ら¹⁾により発見された強力で持続的な血管収縮作用を持つ生理活性ペプチドである。眼内では虹彩・毛様体の平滑筋²⁾³⁾や網膜血管⁴⁾などに

受容体が存在し, 網膜循環や眼圧調節の自動調節機構³⁾に関与し, その分泌異常は網脈絡膜・視神経疾患の一因となり得る可能性を示唆している⁵⁾。正常眼圧緑内障患者では血中のエンドセリン-1が増加し⁶⁾, また, エンドセリン-1を家兎の硝子体内に投与すると眼圧低下²⁾, 網膜血

別刷請求先: 569 大阪府高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 山口ひとみ

(平成6年12月20日受付, 平成7年9月4日改訂受理)

Reprint requests to: Hitomi Yamaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Medical College, 2-7 Daigaku-cho, Takatsuki-shi Osaka-fu 569, Japan

(Received December 20, 1994 and accepted in revised form September d, 1995)

管の収縮²⁾⁵⁾⁷⁾, 視神経乳頭の蒼白化と視覚誘発電位の頂点潜時の延長⁸⁾, 視神経乳頭・脈絡膜での組織血流量の低下⁹⁾を生じるという既報を踏まえ, 視神経障害とエンドセリンとの関連性を調べるため, 視神経乳頭の直接の変化を捕えるべく, 視神経乳頭の組織とイオン環境の変化を透過型電子顕微鏡と電子プローブ X 線微小分析法^{10)~12)}を用いて検討した。

II 実験方法

実験動物には成熟白色家兎 8 匹(体重 2.65 kg~3.45 kg)を使用した。方法は, ミドリリン P®点眼液(参天製薬)で散瞳した後, 塩酸オキシプロカイン点眼麻酔下で, 角膜輪部から 3 mm 後方の毛様体扁平部に相当する強膜から 30 G 針で硝子体中央部に刺入し, 片眼に人工眼内灌流液(オペガード MA®, 千寿製薬)で 10^{-6} mol/l に調整したエンドセリン-1(endothelin-1 human: ペプチド研究所) 0.1 ml を, 他眼にオペガード MA®(千寿製薬) 0.1 ml を注入し, それぞれ ET 群, 対照群とした。同時に輪部から 30 G 針で前房穿刺し, 注入した量と同量の前房水を排除して眼圧への影響が最小限となるように調節し, 注入前後の眼圧を Alcon Applanation Pneumatograph®で確認した。2 時間後にペントバルビタールナトリウム(ネンブター®) 40 mg/kg の静注麻酔下で眼球を摘出

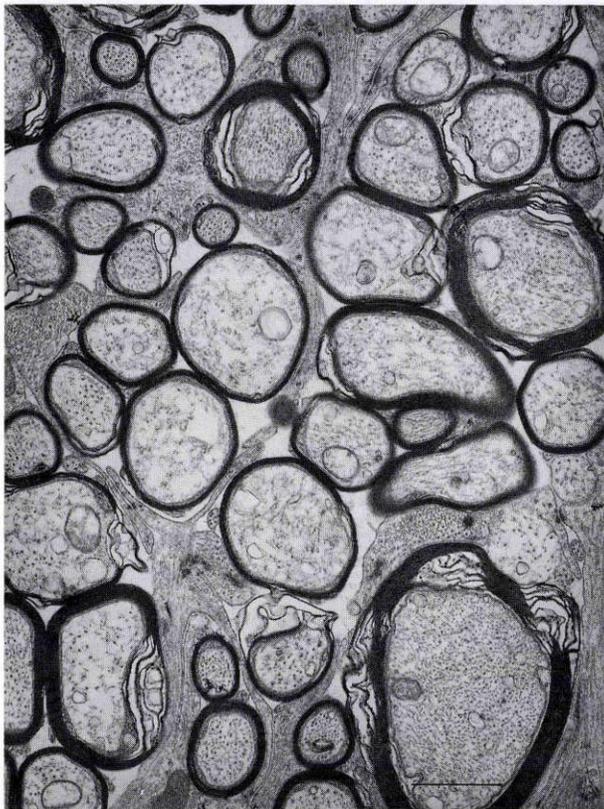
した。

1. 透過型電子顕微鏡観察

白色家兎 3 匹から摘出した眼球を 2.5% グルタルアルデヒド 1% オスミウム酸の二重固定後, 型通りにエタノール脱水し, エポソ 812 に包埋後, 視神経乳頭部の超薄切片を作製し, 酢酸ウランおよびクエン酸鉛の染色を施し, H-800 型透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

2. 電子プローブ X 線微小分析法

白色家兎 5 匹から眼球摘出した後, 直ちに無固定の新鮮な視神経の乳頭面から眼球直後の視神経までの部分を直径 3.5 mm の円柱状のチップに載せ, 液体窒素で -196°C に冷却した銅製ブロックに瞬間的に押し当て凍結処理を行った。 -135°C に冷却された超マイクロームで凍結処理した視神経の乳頭面から, $30\ \mu\text{m}$ を荒削りした後の部分から $0.1\ \mu\text{m}$ の厚さの凍結超薄切片作製し, コロジオン膜を張った金メッシュに載せ圧迫伸展し, 液体窒素で冷却しながら凍結乾燥器に移し, -85°C , $10^{-3}\sim 10^{-4}$ Torr で一昼夜凍結乾燥し, カーボン蒸着を施した。その後, 大型電子顕微鏡の試料室に挿入後, 透過走査電子顕微鏡像を観察しながら, 電子顕微鏡に装着された X 線検出分析装置によって視神経軸索と髄鞘内の X 線微小分析を行い, エネルギー分散型 X 線スペクトルを得た (Kevex Si(Li) X 線検出分析装置 Kevex 5100 or 7000



a



b

図1 透過型電子顕微鏡写真。

a: 対照群。ほぼ円形の軸索が並び, 髄鞘の乱れも少ない。バーは $1\ \mu\text{m}$ 。b: ET 群(エンドセリン-1 投与群)。軸索が多形性を示し, 髄鞘の膜構造も乱れている。バーは $1\ \mu\text{m}$

multichannel analyzer: Kevex Corp., Burlingame, Calif., USA: Hitachi H-500). X線微小部分分析は5匹の各家兎につき6か所ずつ測定を行い,その平均値を用いた.電子顕微鏡の加速電圧は75KVで,電子プローブの直径は0.1~1 μ mである.X線分析装置はマイクロコンピュータ(Hitachi MB-MA 16003, CPU: 8088, MS-DOS)と接続され,Na・Mg・P・S・Cl・K・Ca元素濃度測定用のプログラムを備えている.また,そのプログラムはX線微小部分分析の統計解析をも含んでいる^{10)~12)}.元素濃度の計算は,エネルギー分散型スペクトル上で各元素のエネルギーレベルでのピークとバックの比(P/B値)を算出し,それをアルブミンと各種元素組成のリング液から作った標準試料の凍結切片から得たP/B値-各元素濃度の検定直線のグラフにあてはめて,上記コンピュータシステムを用いて計算した.また,各元素のピークの重なり誤差をなくすためにGaussian fitting法も行った.統計計算にはMann-Whitney検定を使用した.

III 結果

1. 透過型電子顕微鏡観察

視神経乳頭の電子顕微鏡像を図1に示す.対照群ではほぼ円形の軸索が並び,髄鞘の乱れもほとんど認めなかった(図1a).エンドセリン-1の硝子体内注入2時間後の眼底所見は網膜動脈のほぼ完全閉塞が認められ,視神経乳頭は蒼白を示していたが,ET群の電子顕微鏡像では軸索の多形性を認め,髄鞘の膜構造の障害も認められた(図1b).

2. 電子プローブ X線微小部分分析

電子プローブ X線分析に供する視神経乳頭部の無固定新鮮凍結切片の透過走査電子顕微鏡像を図2に示す.無固定のため解像力は低いが,軸索・髄鞘の構造ははっきり同定できた.それぞれの部の X線微小部分分析の結果のエネルギー分散型 X線スペクトラムの代表例を図3に示した.軸索・髄鞘で高いPとKのピーク,低いNa・Mg・S・Cl・Caのピークがみられた.髄鞘ではより高いPのピークがみられた.ET群では軸索内でKの低下とClの上昇を認めた.また,髄鞘では著しいKの低下を認めた.これらのスペクトラムから計算された軸索内,髄鞘内の各元素濃度を表1に示した.Na・Mg・S濃度はET群と対照群で有意差はなかった.Pは髄鞘の方が膜成分のリン脂質を多く含んでいるため,軸索より高く測定された.Clは軸索で対照群 33 \pm 4 mmol/kg wet weight(平均値 \pm 標準誤差)(以下,同様),ET群 51 \pm 5と有意に増加した.Kは軸索で対照群 135 \pm 7,ET群 99 \pm 8と,髄鞘で対照群 147 \pm 9,ET群 106 \pm 7とともに有意に減少した.Caは軸索で対照群 0.5 \pm 0.1,ET群 0.8 \pm 0.1と有意に増加した(図4).

表1 視神経乳頭の元素濃度

	軸 索		髄 鞘	
	対照群	ET 群	対照群	ET 群
Na	30 \pm 3	29 \pm 2	27 \pm 4	30 \pm 3
Mg	14 \pm 3	14 \pm 3	27 \pm 4	14 \pm 3
P	140 \pm 16	119 \pm 11	165 \pm 16	159 \pm 20
S	11 \pm 1	12 \pm 2	12 \pm 2	16 \pm 3
Cl	33 \pm 4	51 \pm 5*	42 \pm 7	50 \pm 6
K	135 \pm 7	99 \pm 8*	147 \pm 9	106 \pm 7*
Ca	0.5 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1*	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1

(平均値 \pm 標準誤差 mmol/kg wet weight, n=5)

*: 対照群とET群の比較で(Mann-Whitney検定; p<0.05)

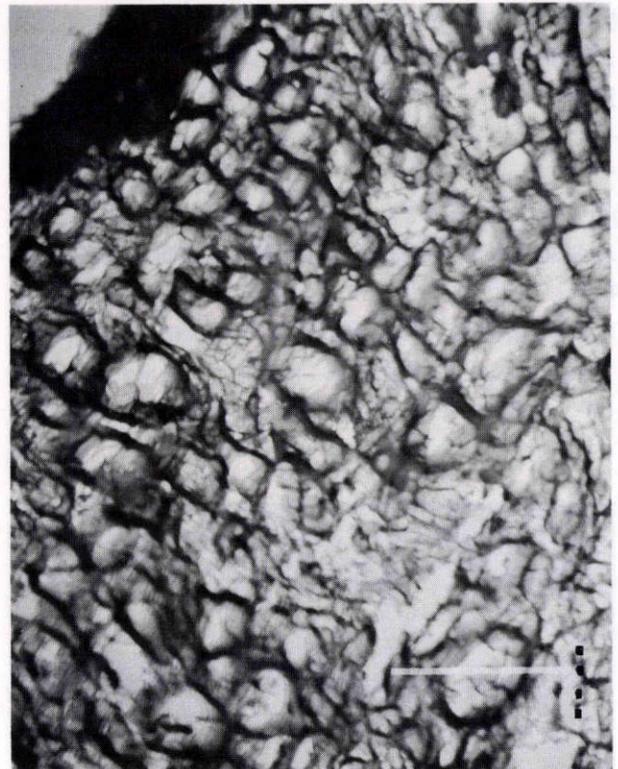
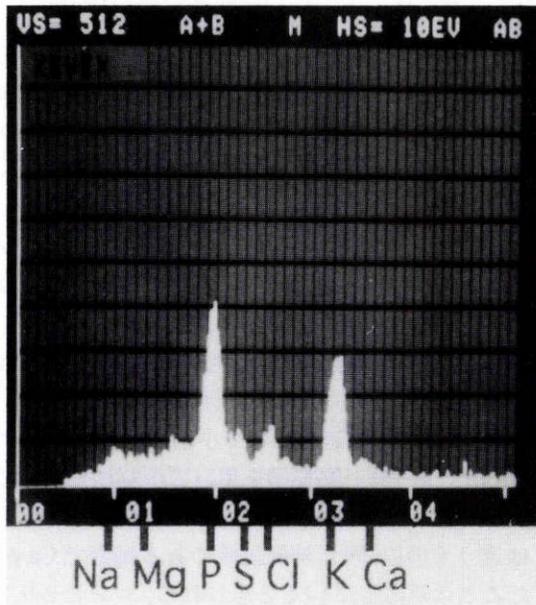


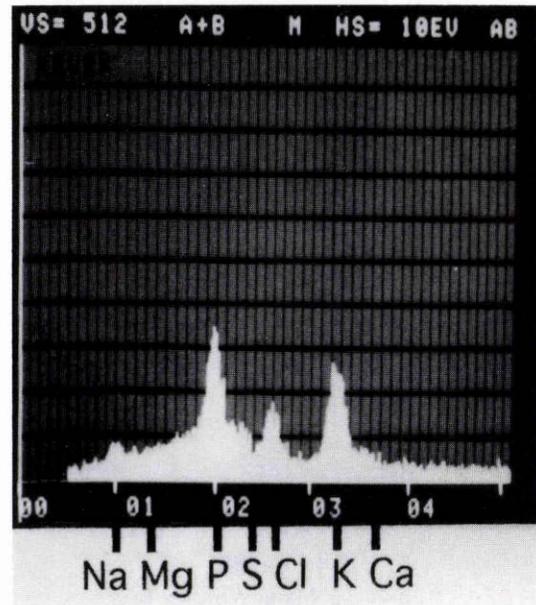
図2 透過走査電子顕微鏡写真.
無固定凍結標本のため像の解像度は低いが,軸索,髄鞘の構造は同定できる.バーは5 μ m

IV 考 按

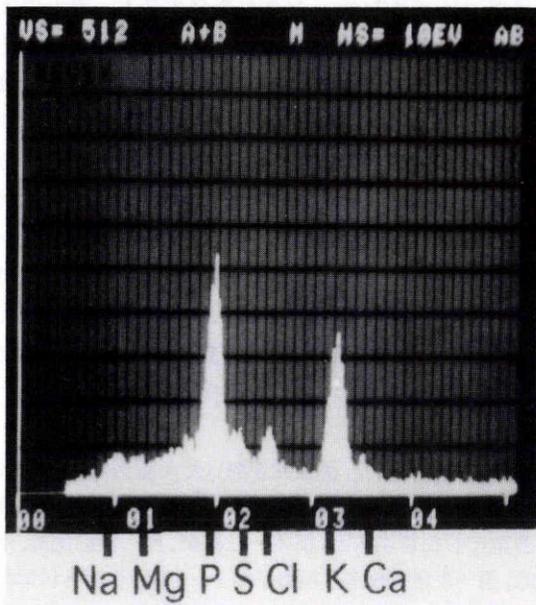
エンドセリンが発見されて以来,視神経乳頭との関連性についてはいくつかの報告がある.正常眼圧緑内障患者では血中のエンドセリン-1の高値が報告⁹⁾され,家兎硝子体内へのエンドセリン-1投与によって視覚誘発電位の頂点潜時の延長⁹⁾や視神経乳頭での血流量の低下⁹⁾を生じるとの報告から,視神経乳頭への影響も大きいことが示唆されている.しかし,これまでにエンドセリン投与に対する視神経乳頭そのものの形態学的・生化学的反応の報告はみられない.特に,X線微小部分分析法を用いて,エンドセリンに対する視神経乳頭のイオン環境の変化を調べた報告は今回のものが初めてである.



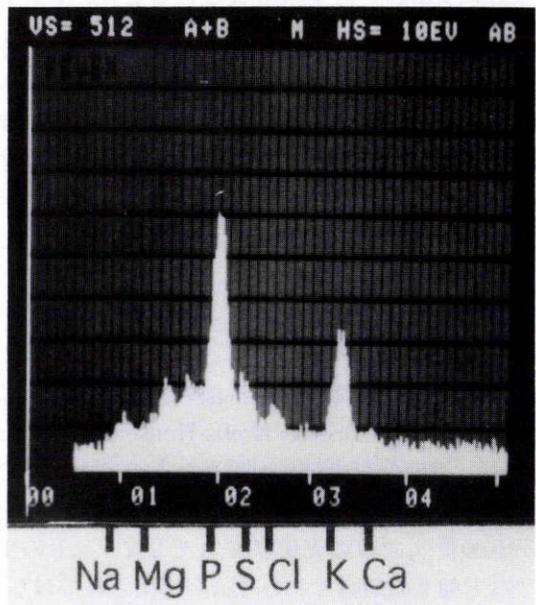
a



b



c



d

図3 エネルギー分散型 X 線スペクトラムの典型例。

a: 軸索対照群, b: 軸索エンドセリン(ET)群, c: 髄鞘対照群, d: 髄鞘 ET 群

今回、エンドセリン-1投与後2時間を採用した理由は、坂上ら⁷⁾のエンドセリン-1(10^{-6} mol/l)0.1 ml投与で網膜血管径の有意な収縮が、5分～3時間後にあったとの報告と、杉山ら⁹⁾のエンドセリン-1(10^{-5} mol/l, 10^{-6} mol/l)0.1 ml投与で視神経乳頭の組織血流量が75分をピークに3時間後も有意に減少したとの報告から、視神経乳頭に確実に影響を与えていると考えられたのが2時間後であったからである。他に、佐藤ら¹³⁾はエンドセリン-1(10^{-10} mol)投与後静脈で約28分後に、動脈で約54分後に血流の再開が認められたとしているが、その後も血管攣縮、分節状収縮の所見があり影響は残っていたと

考えられることと、エンドセリン-1の投与部位が後部硝子体内であったということから、今回の投与部位と同じである杉山ら⁷⁾(硝子体内中央部)と投与部位の近い坂上ら⁹⁾(前部周辺部硝子体中)の報告から2時間後を採用した。

エンドセリン-1による眼の組織学的変化の観察としては、岡田は光学顕微鏡で網脈絡膜に異常を認めず、透過電子顕微鏡観察法でも網膜外層および脈絡膜毛細血管板、脈絡膜の細動脈において異常所見が検出できなかったと報告¹⁴⁾している。我々は視神経乳頭の透過型電子顕微鏡観察で軸索・髄鞘のエンドセリン-1による多形性や

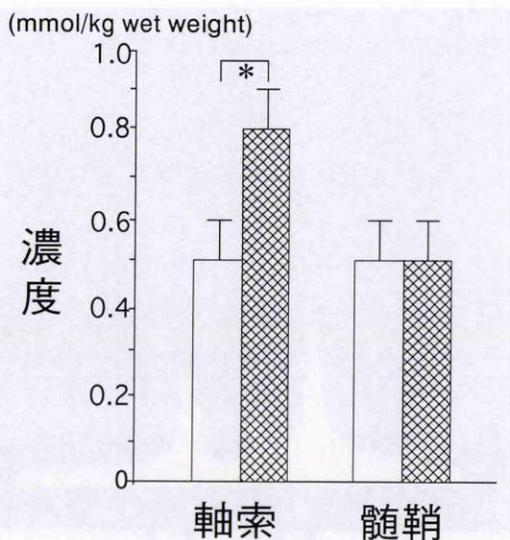


図4 Ca濃度.

*: $p < 0.05$, Mann-Whitney 検定

□: 対照群 ▨: ET群

乱れの傾向を観察した。岡田¹⁴⁾はエンドセリン-1の 10^{-5} mol/l と 10^{-6} mol/l を 0.1 ml 硝子体内に投与し、60分後に眼球摘出したとしており、組織学的変化が認められなかったのは注入から摘出までの時間に起因する可能性がある。しかし、これは網脈絡膜の場合と異なり、視神経乳頭がエンドセリンの影響をより受けやすく、組織学的変化を来しやすい可能性を示しており、興味深い。ただし、これがエンドセリンによるイオンチャンネルを介した直接変化なのか、血流障害による二次的な変化なのかは今後の検討を要する。

電子プローブ X 線微小分析法の測定結果の信頼性は、佐々木らが 20% BSA の Krebs-Henseleit 液の $\text{Na} \cdot \text{Cl} \cdot \text{K} \cdot \text{Ca}$ 濃度の測定結果が妥当なものであるとの既報¹¹⁾でも証明されている。さらに、イヌの唾液腺の腺房細胞や分泌顆粒¹¹⁾、タコの光受容体¹⁵⁾、そしてラットの坐骨神経¹⁶⁾など種々の細胞でこの方法が応用されており、生体組織のイオン現象を捕える方法として確立されたものと考えられる。視神経乳頭の直接の変化を捕えられるということでは、この方法によって乳頭部のイオン環境の変化を調べることも視神経障害の機序に関連して重要であると考え、今回検討を行った。

今回の電子プローブ X 線微小分析法では、エンドセリン-1 投与で軸索内の Ca および Cl が増加し、軸索内および髄鞘内の K が減少した。K が減少すれば神経の軸索および細胞内静止膜電位が高くなるため、刺激に対して反応しにくくなり、視覚誘発電位で頂点潜時の延長⁸⁾を示すこととも対応している。Ca が増加すると蛋白分解酵素活性が増加するため、組織の壊死を引き起こしやすいことから、これが視神経障害の一因になっている可能性も考えられる。

今回の測定では、Ca はイオンだけでなく Ca の総量(結

合+イオン)の測定であるが、総量 $[\text{Ca} \cdot \text{CaM}]$ 、イオン濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ 、Ca 結合蛋白質濃度 $[\text{CaM}^{2-}]$ と Ca 結合蛋白質の解離定数 $(K_{D,\text{Ca}^{2+}})$ の関係は $[\text{Ca}^{2+}][\text{CaM}^{2-}]/[\text{Ca} \cdot \text{CaM}] = K_{D,\text{Ca}^{2+}}$ で表現され、 $K_{D,\text{Ca}^{2+}}$ は細胞内のもの(カルモジュリンなど)では $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{M}$ である¹⁷⁾。この式を近似すると、 $-\log[\text{Ca}^{2+}] = -\log K_{D,\text{Ca}^{2+}} + \log[\text{CaM}^{2-}]/[\text{Ca} \cdot \text{CaM}]$ から $p\text{Ca} = pK_{D,\text{Ca}^{2+}} + \log[\text{CaM}^{2-}]/[\text{Ca} \cdot \text{CaM}]$ となる。 $K_{D,\text{Ca}^{2+}}$ と $[\text{CaM}^{2-}]$ は一定なので、Ca の総量 $[\text{Ca} \cdot \text{CaM}]$ が増加すればイオン濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ ($p\text{Ca}$ の Ca) も増加すると考えられる。したがって、視神経軸索においてエンドセリンにより Ca イオンが増加したことになり、これは蛍光顕微鏡を用いて小脳のニューロンにおいて¹⁸⁾、また、レーザー顕微鏡を用いて小脳核において¹⁹⁾ エンドセリンによる Ca イオンが増加するとして既報と部位は違うものの、同じ神経組織である軸索で Ca が増加したことは対応していると思われる。エンドセリン-1 の血管平滑筋での作用機序は、血管平滑筋膜に存在する特異的受容体に結合することから開始し、受容体の活性化により、Ca イオンチャンネルを介する Ca 流入の促進や、inositol trisphosphate による Ca 貯蔵部位(主に筋小胞体)からの Ca 遊出の促進の結果、細胞内遊離 Ca 濃度が上昇し、その結果、ミオシン軽鎖キナーゼが活性化されて筋収縮が開始されると推定されている²⁰⁾。その他の中樞神経系や神経軸索での作用機序については十分に解明されていないが、同様の機序が視神経乳頭にも適用されると仮定すると、今回の結果は説明される。しかし、視神経軸索における Ca 濃度の上昇がエンドセリン-1 による直接的な作用が主なのか、虚血性変化などによる二次的な変化が主なのかについては、今後さらに検討を要すると思われる。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った大阪医科大学眼科学教室東 郁郎教授に深謝いたします。また、ご協力を賜りました同教室の杉山哲也医師、清水一弘医師、奥 英弘医師、濱田潤医師、第一生理学教室中垣育子博士、一般消化器外科学教室秋元 寛医師、兵庫医科大学第一生理学教室佐々木貞雄助教授に感謝申し上げます。

本論文の要旨は第 60 回日本中部眼科学会(平成 6 年 9 月、神戸)において発表した。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 441-415, 1988.
- 2) MacCumber MW, Jampel HD, Snyder SH: Ocular effects of the endothelins. Abundant peptides in the eye. *Arch Ophthalmol* 109: 705-709, 1991.
- 3) Erickson-Lamy K, Korbmacher C, Schuman JS, Nathanson JA: Effects of endothelin on outflow facility and accommodation in the monkey eye *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 492-495,

- 1991.
- 4) **Takahashi K, Brooks RA, Kanse SM, Ghatei MA, Kohner EM, Bloom SR**: Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* 38: 1200-1202, 1989.
 - 5) **Chakravarthy U, Archer DB**: Endothelin: A new vasoactive ocular peptide. *Br J Ophthalmol* 76: 107-108, 1992.
 - 6) 守屋伸一, 杉山哲也, 清水一弘, 濱田 潤, 徳岡 覚, 東 郁郎: 低眼圧緑内障とエンドセリン(ET-1). *眼紀* 43: 554-559, 1992.
 - 7) 坂上 欧, 桐生純一, 竹内 篤, 山本文昭, 本田孔士: エンドセリンの網膜血管に対する作用. *日眼会誌* 96: 469-472, 1992.
 - 8) 奥 英弘, 杉山哲也, 守屋伸一, 濱田 潤, 東 郁郎: エンドセリン硝子体内注入による視機能変化. *日眼会誌* 97: 467-473, 1993.
 - 9) 杉山哲也, 奥 英弘, 守屋伸一, 清水一弘, 濱田 潤, 東 郁郎: エンドセリン-1の眼循環に及ぼす影響. *日眼会誌* 97: 678-682, 1993.
 - 10) **Dörge A, Rick R, Gehring K, Thurau K**: Preparation of freeze-dried cryosections for quantitative X-ray microanalysis of electrolytes in biological soft tissues. *Pflugers Arch (Eur J Physiol)* 373: 85-97, 1978.
 - 11) **Sasaki S, Nakagaki I, Mori H, Imai Y**: Intracellular calcium store and transport of elements in acinar cells of the salivary gland determined by electron probe X-ray microanalysis. *Jpn J Physiol* 33: 69-83, 1983.
 - 12) **Nakagaki I, Sasaki S, Shiguma M, Imai Y**: Distribution of elements in the pancreatic exocrine cells determined by electron probe X-ray microanalysis. *Pflugers Arch (Eur J Physiol)* 401: 340-345, 1984.
 - 13) 佐藤 剛, 武井一夫, 野々山智仁, 宮内 卓, 後藤勝年, 本村幸子: エンドセリン-1の家兎網膜血管に対する収縮作用. *日眼会誌* 97: 683-689, 1993.
 - 14) 岡田大造: エンドセリンの脈絡膜循環に及ぼす影響. 第2報. 局所投与による影響. *眼紀* 45: 393-397, 1994.
 - 15) **Takagi M, Salehi SA, Nakagaki I, Sasaki S**: X-ray microanalysis of the effect of illumination on the ionic composition of the octopus photoreceptor. *Photochem Photobiol* 45: 651-656, 1987.
 - 16) **Shibahara N, Okada S, Onishi S, Hamada K, Takasaki N, Miyazaki S, et al**: Axoplasmic electrolyte contents measured X-ray microanalysis in experimental uremic neuropathy. *Jpn J Nephrol* 32: 37-44, 1990.
 - 17) 山田常雄, 他(編): 岩波生物学辞典, 第3版. 岩波書店, 東京, 217, 1983.
 - 18) **Chuang DM, Lin WW, Lee CY**: Endothelin-induced activation of phosphoinositide turnover, calcium mobilization, and transmitter release in cultured neurons and neurally related cell types. *J Cardiovasc Pharmacol* 17: 85-88, 1991.
 - 19) **Goldman RS, Finkbeiner SM, Smith SJ**: Endothelin induces a sustained rise in intracellular calcium in hippocampal astrocytes. *Neurosci Lett* 123: 4-8, 1991.
 - 20) 平田結喜緒: エンドセリンの作用と放出制御に関わる細胞内情報伝達系. *実験医学* 8: 124-131, 1990.