

白色, 有色家兎瞳孔括約筋, 散大筋およびその神経効果器 接合部におけるボツリヌス A 型毒素の作用

石川 均¹⁾, 三井 義久¹⁾, 吉富 健志²⁾, 真下紀美代¹⁾

青木 繁¹⁾, 向野 和雄¹⁾, 清水 公也¹⁾

¹⁾北里大学医学部眼科学教室, ²⁾和歌山県立医科大学眼科学教室

要 約

目 的：家兎瞳孔括約筋, 散大筋, およびその神経効果器接合部におけるボツリヌス A 型毒素の作用を検討した。

方 法：瞳孔括約筋, 瞳孔散大筋を摘出し灌流槽に固定し一対の塩化銀電極を通してフィールド刺激を加え, 等尺性収縮を記録した。

結 果：フィールド刺激により瞳孔括約筋は二相性の収縮反応を示し, 両反応ともボツリヌス A 型毒素 (150 nM) 前投与で抑制された。この抑制作用は白色家兎において強かった。一方, ボツリヌス A 型毒素は瞳孔括約筋で外因性に投与されたカルバコールおよびサブスタンス P の収縮へは影響を及ぼさなかった。瞳孔散大筋に

フィールド刺激を加えると一相性の収縮を示した。この収縮はボツリヌス A 型毒素の影響を受けなかった。

結 論：ボツリヌス A 型毒素は運動神経末端からのアセチルコリンの放出抑制作用のみならず, ウサギ瞳孔括約筋の副交感神経末端からの神経伝達物質の放出, 三叉神経由来と考えられるサブスタンス P の放出をも抑制することが推定された。(日眼会誌 105 : 218—222, 2001)

キーワード：ボツリヌス A 型毒素, フィールド刺激, サブスタンス P, 白色家兎, 有色家兎

Presynaptic Effects of Botulinum Toxin Type A on the Neuronally Evoked Response of Albino and Pigmented Rabbit Iris Sphincter and Dilator Muscles

Hitoshi Ishikawa¹⁾, Yoshihisa Mitsui¹⁾, Takeshi Yoshitomi²⁾, Kimiyo Mashimo¹⁾

Shigeru Aoki¹⁾, Kazuo Mukuno¹⁾ and Kimiya Shimizu¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kitasato University, School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Wakayama Medical College

Abstract

Purpose : To investigate the effects of botulinum toxin type A (botulinum A toxin) on the autonomic and other non-adrenergic, non-cholinergic nerve terminals.

Methods : The effects of neurotoxin on twitch contractions evoked by electrical field stimulation (EFS) were studied in isolated rabbit iris sphincter and dilator muscles using isometric tension recording.

Results : Botulinum A toxin (150nM) inhibited the fast cholinergic and slow substance P-ergic component of contraction evoked by EFS in the rabbit iris sphincter muscle without affecting the response to carbachol and substance P. Botulinum A toxin (150

nM) did not affect the twitch contraction evoked by EFS in the rabbit iris dilator muscle.

Conclusion : These data indicated that botulinum A toxin may inhibit not only the acetylcholine release in the cholinergic nerve terminals, but also substance P release from the trigeminal nerve terminals of the rabbit iris sphincter muscle. However, neurotoxin has little effect on the adrenergic nerve terminals of the rabbit iris dilator muscle. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 218—222, 2001)

Key words : Botulinum toxin type A, Electrical field stimulation, Substance P, Albino rabbit, Pigmented rabbit,

別刷請求先 : 228-8555 相模原市北里 1-15-1 北里大学医学部眼科学教室 石川 均

(平成 12 年 4 月 18 日受付, 平成 12 年 9 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to : Hitoshi Ishikawa, M.D. Department of Ophthalmology Kitasato University, School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, 228-8555, Japan

(Received April 18, 2000 and accepted in revised form September 27, 2000)

I 緒 言

神経終末からの伝達物質の放出を阻害する clostridial neurotoxin には嫌気性芽胞形成桿菌の *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* から産生される破傷風神経毒素とボツリヌス神経毒素がある。これらの毒素は類似構造をしており、菌体内で 1 本鎖ポリペプチドとして産生されるが細菌の溶解時にプロテアーゼによって、軽鎖と重鎖が S-S 結合により結び付けられた 2 本鎖ポリペプチドに変わり強い毒性を示すようになる¹⁾。ボツリヌス毒素はかつてボツリヌス中毒の原因毒素としてのみ知られていたが、1973 年 Scott ら²⁾は外眼筋の筋力を減弱させる物質の発見を目的として、alchol, cobra neurotoxin, diisopropyl fluorophosphate (DFP), botulinum neurotoxin type A (ボツリヌス A 型毒素) を使用し、ボツリヌス A 型毒素投与が最も低濃度で効果的であることを確認した。その後、米国 Food Drug Administration (FDA) 指導のもと臨床的にその有効性、安全性が確認され、現在我が国でも眼瞼痙攣に対し臨床的に幅広く使用されている³⁾。ボツリヌス毒素の作用機序として、① 神経終末膜の毒素の特異的受容体への結合、② 神経終末内への侵入、③ 神経終末内での神経伝達物質放出抑制の 3 ステップモデルが提唱されている^{4)~6)}。すなわち、運動神経末端に注入されたボツリヌス A 型毒素は、強固に結合し同部位でカルシウムの細胞内への流入を阻止しアセチルコリンの分泌を抑制していることが知られている⁶⁾。ボツリヌス A 型毒素が運動神経末端で筋肉の痙攣を抑制する機序については非常に明確な報告がなされているが、自律神経末端、さらに、非コリン非アドレナリン神経末端への作用についてはほとんど解明されていない。そこで今回、我々はボツリヌス A 型毒素の白色および有色家兎瞳孔括約筋、散大筋、その神経効果器接合部への作用を等尺性収縮記録法で検討した。

II 方 法

11 匹の白色雄、5 匹の有色家兎 (体重 2~3 kg) を用い過剰量のペントバルビタールナトリウム (ネンプタール[®]) を耳静脈から注射し屠殺後、眼球を摘出、以下に示す組成のクレブス液中 (mM) に眼球を保存した (NaCl 94.8, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, Glucose 11.7)。その後、顕微鏡下で幅 2~3 mm の瞳孔括約筋条片、幅 1~2 mm、長さ 3~4 mm の瞳孔散大筋条片を作製した⁷⁾。これらの標本の両端を絹糸で結び、一端を灌流槽に固定、他端を mechano transducer (Nippon Koden Co, EF-601 G) に接続し、当尺性収縮記録法を用いて機械的反応を測定した。

フィールド刺激実験：作製した筋条片は容量 1.5 ml のクレブス液で満たされた灌流槽に縦方向に設置した。灌流槽は常に酸素 (95% O₂, 5% CO₂) で通気し、37°C に

保温したクレブス液を持続的に (0.3 ml/sec) 灌流した。瞳孔括約筋には 100 mg, 散大筋には 50 mg の初期張力を加え、矩形波パルス通電を灌流槽中の一対の塩化銀電極を通して行いフィールド刺激とした。用いた矩形波パルスの強さは 100 V, パルス幅は 0.1~0.8 msec で、20 Hz で頻回刺激を行った。刺激間隔は通常、瞳孔括約筋で 5 分、瞳孔散大筋では 3 分間隔に設定した。安定した収縮が得られることを確認した後、実験を開始した。結果は全く前処置を行わない状態で得られた収縮を 100% として計算した。

統計処理：結果は平均値±標準誤差で表し、Students t-test を用いて *p<0.05 を有意とした。

薬剤：ボツリヌス A 型毒素 (和光純薬工業株式会社)、サブスタンス P (株式会社ペプチド研究所)、カルバコール (Sigma Chemical Co, St Louis, 米国) である。

III 結 果

灌流槽中に懸垂した括約筋、散大筋条片は 30~60 分の灌流によって徐々に弛緩した後、一定の静止張力を示した。実験中自発収縮は全くなかった。さらに、これらの筋条片はフィールド刺激で収縮を呈し、いずれの収縮もフグ毒であるテトロドトキシン (0.1 μM) 投与で消失した (結果示さず)。すなわち、フィールド刺激によって起こるこれらの反応は、内在神経を介した神経原性の収縮であると考えられた。

瞳孔括約筋はフィールド刺激により、早い収縮とそれに続くゆっくりとした収縮の二相性の収縮がある (図 1 A)。早い収縮はアトロピンにより完全に消失したが、ゆっくりとした収縮は影響を受けなかった (結果示さず)。ボツリヌス A 型毒素 (150 nM) を投与すると両収縮とも徐々に抑制され、特に早い収縮は 3 時間以内にすべての標本で完全に消失した (図 1 B, C)。詳細な抑制程度を表 1 に示す。同様の反応は有色家兎でも観察されたが、白色家兎ではフィールド刺激による瞳孔括約筋の早い反応は完全に消失したが、有色家兎では抑制は 36% であり、その収縮抑制は有意に小さかった (表 1)。さらに、白色家兎瞳孔括約筋は外因性に投与されたカルバコール、サブスタンス P で濃度依存性の収縮を示したが、その反応はボツリヌス毒素 (150 nM) 前投与の影響は受けなかった (図 2)。

一方、瞳孔散大筋についてみるとフィールド刺激により一相性の早い収縮を示したが、表 1、図 3 に示すようにボツリヌス A 型毒素はこの瞳孔散大筋の反応へはほとんど影響を及ぼさなかった。

IV 考 按

ボツリヌス治療の臨床応用は斜視に対する治療報告に始まる⁸⁾。その後、異常筋収縮やジストニアを中心に種々の不随意運動の治療に用いられ、我が国においても

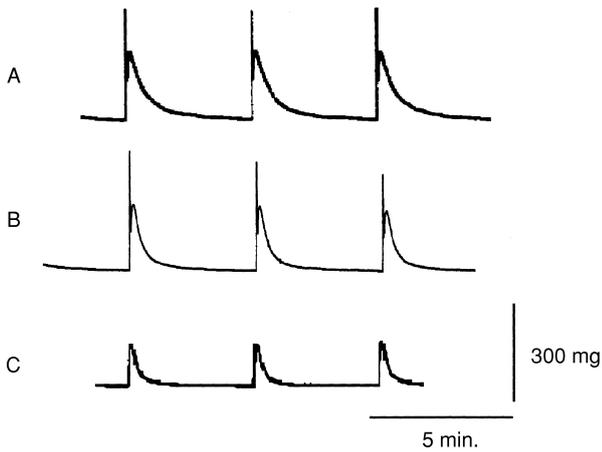


図 1 白色家兎瞳孔括約筋におけるフィールド刺激による収縮ならびにボツリヌス A 型毒素(150 nM)の作用。
A：対照，B：ボツリヌス投与後 100 分，C：ボツリヌス投与後 200 分

表 1 白色，有色家兎瞳孔括約筋，散大筋におけるボツリヌス A 型毒素(150 nM)のフィールド刺激に対する収縮抑制作用の比較

種	瞳孔括約筋		瞳孔散大筋
	早い収縮	ゆっくりした収縮	
白色	0%* n=12/7	62.1±7.2% n=14/7	104.2±2.7% n=6/5
有色	36.0±22% n=4/3	75.0±25% n=4/3	

結果は全く前処置を行わない状態で得られた収縮を 100%として計算。標本はボツリヌス A 型毒素を 300 分処置。
n=実験に用いた眼球数/実験に用いた動物数。*：白色，有色家兎瞳孔括約筋におけ早い収縮の比較。平均値±標準誤差

ほとんどの眼瞼痙攣に著効が実証されている。しかしながら近年，自律神経に対する副作用も報告されている。すなわち，ボツリヌス A 型毒素をウサギ⁹⁾，ラット¹⁰⁾の球後に注射すると同側の瞳孔が散大することが知られて

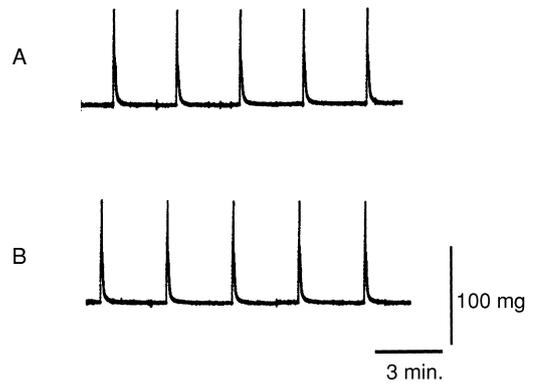


図 3 白色家兎瞳孔散大筋におけるフィールド刺激による収縮ならびにボツリヌス A 型毒素(150 nM)の作用。

A：対照，B：ボツリヌス投与後 200 分

いる。さらに，瞳孔散大による眼圧上昇がヒトで報告¹¹⁾されている。これらの副作用は，ボツリヌス A 型毒素が毛様神経節に浸潤していくため出現したと考えられている。その理由として，現在製剤として使用されているボツリヌス A 型毒素はアルブミン添加であり，分子量が巨大なため腸管でさえ容易には吸収されず，毒素が直接角膜，強膜を透過することは不可能と考えられるためである⁸⁾。

一般にウサギ瞳孔括約筋にフィールド刺激を加えると早い収縮成分とゆっくりとした収縮成分の 2 つがあり，早い収縮はコリン作働性，ゆっくりとした収縮はサブスタンス P によるものと考えられている¹²⁾¹³⁾。今回の実験から，ボツリヌス A 型毒素(150 nM)はコリン作働性収縮を完全に抑制した。さらに，ボツリヌス A 型毒素は瞳孔括約筋において外因性に投与したカルバコールによる収縮に影響を及ぼさなかった。すなわち，ボツリヌス A 型毒素は家兎瞳孔括約筋の副交感神経末端に直接作用し，アセチルコリンの放出を抑制したと考えられる。

家兎眼において，機械的，化学的刺激，あるいは三叉

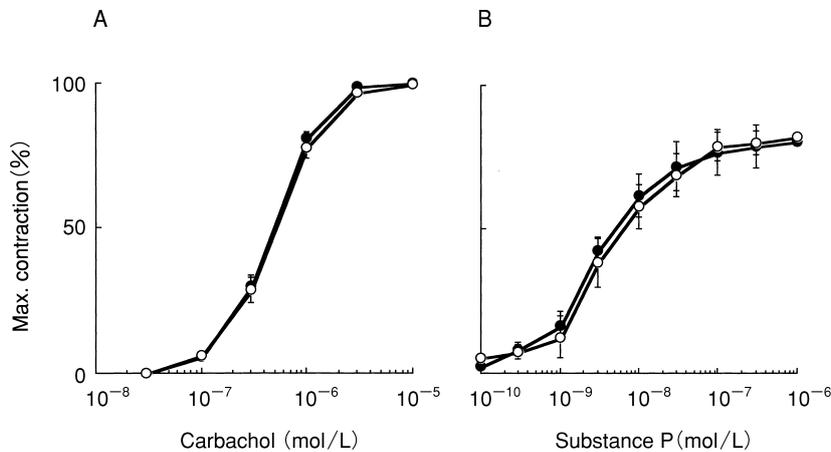


図 2 白色家兎瞳孔括約筋におけるカルバコール，サブスタンス P の容量反応曲線。
○：ボツリヌス A 型毒素(150 nM)前投与，●：対照

神経を頭蓋内で刺激することによって、前眼部に縮瞳、結膜や虹彩の充血などの反応が発生するが、この炎症反応は知覚神経末端から遊離されるサブスタンス P を介する反応である。つまり、三叉神経を頭蓋内で刺激すると、房水内サブスタンス P が知覚神経末梢部から分泌される¹⁴⁾。このように家兎瞳孔括約筋には機能的、さらに組織学的にもサブスタンス P の存在が示されている¹⁵⁾¹⁶⁾。今回、ボツリヌス A 型毒素は外因性に投与されたサブスタンス P の収縮へは影響を及ぼさず、フィールド刺激によるサブスタンス P の収縮を抑制することが確認された(図 1, 2, 表 1)。以上の結果からボツリヌス A 型毒素はコリン作働性神経末端のみならずサブスタンス P 作働性神経末端に結合し、その神経伝達物質放出の抑制を行っていることが示された。このような家兎瞳孔括約筋におけるフィールド刺激によるサブスタンス P の反応はプロスタグランジン¹⁷⁾により増強され、エンドセリン¹⁸⁾により抑制されることが知られている。Montecucco ら¹⁹⁾はボツリヌス A 型毒素がまだ明らかになっていない非コリン非アドレナリン神経末端に結合し作用するというを結合実験によって報告しており、今回の結果から、その一つにこのサブスタンス P 作働性神経末端が考えられた。

今回の実験では白色、有色両方の家兎を用い実験を行っているが、表 1 から明らかなように、ボツリヌス A 型毒素による抑制効果は白色家兎で有意に強かった。この原因としてはボツリヌス A 型毒素が虹彩の色素に結合し、見かけ上作用が減弱したためと考えられる。一般に副交感神経遮断薬であるアトロピン²⁰⁾、交感神経遮断薬であるプラゾシン²¹⁾は、このように虹彩色素への薬物の結合が強いと考えられている。

ボツリヌス中毒患者の瞳孔は中等度散大することが知られているが、これは交感神経、副交感神経両者の麻痺によるものと考えられていた²²⁾。今回の実験から、ボツリヌス A 型毒素はウサギ瞳孔散大筋においてフィールド刺激による収縮にほとんど影響を及ぼさなかったことから、この散瞳は主にコリン作働性神経末端への作用によると考えられた。

V 結 語

ボツリヌス A 型毒素は運動神経末端からのアセチルコリンの放出のみならず、ウサギ瞳孔括約筋の副交感神経末端からのアセチルコリンの放出、さらに、三叉神経末端からのサブスタンス P の放出をも抑制することが考えられた。しかし、ボツリヌス A 型毒素はアドレナリン神経末端に対しては非常に影響を及ぼしにくいことが推定された。

文 献

- 1) 持田澄子：破傷風，ボツリヌス神経毒素の伝達物質放出阻害機構。生化学 66：254—259, 1994.
- 2) Scott AB, Rosenbaum A, Collins C：Pharmacological weakening of extraocular muscles. Invest Ophthalmol Vis Sci 12：924—927, 1973.
- 3) 岩重博康，根本祐次，高橋英樹，丸尾敏夫：眼瞼痙攣に対する A 型ボツリヌス毒素の有効用量の検討。日眼会誌 99：663—668, 1995.
- 4) Osako M, Keltner JL：Botulinum Atoxin(Oculinum)in Ophthalmology. Surv Ophthalmol 36：28—46, 1991.
- 5) Kelly RB, Deutsch JW, Carlson SS, Wagner JA：Biochemistry of neurotransmitter release. Ann Rev Neurosci 2：399—446, 1979.
- 6) Stanley EF, Drachman DB：Botulinum toxin blocks quantal but not non-quantal release of Ach at the neuromuscular junction. Brain Res 261：172—75, 1983.
- 7) Kern R：Die adrenergischen Rezeptoren der inträoculaen Muskeln der Menschen. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 180：231—48, 1970.
- 8) Scott AB：Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. Trans Am Ophthalmol Soc 79：734—70, 1981.
- 9) Kupfer C：Selective block on synaptic transmission in ciliary ganglion by type A botulinum toxin in rabbits. Proc Soc Exp Biol Med 99：474—76, 1958.
- 10) Levy Y, Kremer I, Shavit S, Korczyn AD：The pupillary effects of retrobulbar injection of botulinum toxin A(Oculinum)in albino rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 32：122—125, 1991.
- 11) Corridan P, Nightingale S, Mashoudi N, Williams AC：Acute angle-closure glaucoma following botulinum toxin injection for blepharospasm. Br J Ophthalmol 74：309—310, 1990.
- 12) Ueda N, Muramatsu I, Sakakibara Y, Fujiwara M：Noncholinergic, nonadrenergic contraction and substance P in rabbit iris sphincter muscle. Jpn J Pharmacol 31：1071—1079, 1981.
- 13) Wahlestedt C, Bynke G, Beding B, Leithner PV, Hakanson R：Neurogenic mechanisms in control of the rabbit iris sphincter muscle. Eur J Pharmacol 117：303—309, 1985.
- 14) Bill A, Stjernschantz J, Mandahl A, Brodin E, Nilsson G.：Substance P：Release on trigeminal nerve stimulation, effect in the eye. Acta Physiol Scand 106：371—373, 1979.
- 15) Tervo K, Tervo T, Eranko L, Eranko O, Valtonen S, Cuello AC：Effect of sensory and sympathetic denervation on substance P immunoreactivity in nerve fibres of the rabbit eye. Exp Eye Res 34：577—585, 1982.
- 16) Butler JM, Powell D, Unger WG：Substance P levels in normal and sensorily denervated rabbit eye. Exp Eye Res 30：311—313, 1980.

- 17) **Ueda N, Muramatsu I, Fujiwara M** : Prostaglandins enhance trigeminal substance P-ergic responses in the rabbit iris sphincter muscles. *Brain Res* 337 : 347—351, 1985.
 - 18) **Ishikawa H, Yoshitomi T, Harada Y, Katori M, Ishikawa S** : The presence of two sites of action of endothelins in the isolated rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Curr Eye Res* 12 : 1049—1055, 1993.
 - 19) **Montecucco C, Schiavo G** : Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Quart Rev Biophys* 28 : 423—472, 1995.
 - 20) **Salazar M, Shimada K, Patil PN** : Iris pigmentation and atropine mydriasis. *J Pharmacol Exp Ther* 197 : 79—88, 1976.
 - 21) **Ishikawa H, Miller DD, Patil PN** : Comparison of post-junctional α -adrenoceptors in iris dilator muscle of humans, and albino and pigmented rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354 : 765—772, 1996.
 - 22) **Miller RN** : Disorder of pupillary function, accommodation and lacrimation. In : Miller RN, (Ed) : Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology. Williams and Wilkins, Baltimore, 469—556, 1985.
-