

涙液分泌における交感神経の役割

第2報 上頸交感神経節刺激後の涙腺組織血流量と分泌顆粒の変化 (図4, 表1)

政 岡 則 夫 (岡山大学医学部眼科学教室)

Changes of the Blood Flow of the Lacrimal Gland and the Volume Proportion of Secretory Granules by Stimulation of the Preganglionic Trunk of Superior Cervical Ganglion in the Rabbit

Norio Masaoka

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

要 約

血管と腺房細胞への交感神経の作用を検討した。上頸交感神経節の近位端を電気刺激し、水素クリアランス法にて涙腺組織血流量を刺激前、刺激終了直後そして15分毎に60分まで測定した。また、片側の上頸交感神経節の近位端を電気刺激した後、電子顕微鏡を用いたステレオロジーにて刺激側と非刺激側の腺房細胞内の分泌顆粒の変化を比較した。電気刺激は20C/S, 50msec, 5~6Vで2分間行なった。その結果、1. 組織血流量は刺激前に比べて刺激終了直後において有意($p < 0.005$)に減少し、15分以後はほぼ回復していた。2. 刺激側の分泌顆粒は非刺激側に比べて有意に減少($p < 0.05$)していた。以上より、交感神経に血管からの腺腔への水分輸送の抑制作用と分泌顆粒の分泌促進作用の可能性があると考えた。(日眼 91: 1030—1035, 1987)

キーワード：ウサギ涙腺、上頸交感神経節刺激、涙腺組織血流量、分泌顆粒、水素クリアランス

Abstract

The Present study was undertaken to investigate the role of the sympathetic nerve in relation to the vessels and acinar cells in rabbit lacrimal glands. After the preganglionic trunk of the unilateral superior cervical ganglion was stimulated electrically, the blood flow of the ipsilateral lacrimal glands was measured by the hydrogen clearance method and the quantitative changes of the volume proportion of secretion granules per cell were analysed by applying stereological technique on bilateral glands. The results were as follows: 1. The blood flow of lacrimal glands was immediately decreased after stimulation. 2. Volume proportion of secretion granules per cell decreased in stimulated lacrimal glands, as compared with non-stimulated lacrimal glands. These results suggest that the transport of water from vessels to the lumen might be inhibited by sympathetic constriction of vessels and secretion of granules might be facilitated by sympathetic stimulation. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 1030—1035, 1987)

Key words: Rabbit lacrimal gland, Sympathetic nerve impulse, Blood flow of lacrimal gland, Secretory granules, Hydrogen clearance method

別刷請求先：700 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 政岡 則夫

Reprint requests to: Norio Masaoka, M.D. Dept. of Ophthalmol., Okayama Univ. Medical School 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(昭和62年5月21日受付) (Accepted May 21, 1987)

I 緒 言

涙液分泌の支配が自律神経によるならばその機能を研究することは、乾性角結膜炎をはじめ種々の角結膜疾患の治療への応用に役立つと考えられる。しかし、副交感神経の作用については涙液産生機序や作用部位等につきかなり詳細に研究されてきている^{1)~6)}が、交感神経の主涙腺に対する涙液分泌作用については未だ不明な点が多い。ウサギの排出管へ微小カニューレを挿入して、主涙腺よりの涙腺分泌速度が正確にそして経時的に測定されるようになった⁷⁾が、カニューレ法を用いた薬理学的および電気生理学的研究のみ^{1)3)6)~10)}では、交感神経が主涙腺内の血管、筋上皮細胞、腺房細胞および導管上皮細胞のいずれに作用するかを解明することは困難である。

そこで、著者は、交感神経の主涙腺における作用部位および涙液分泌作用を研究する目的で、まず前報においてノルアドレナリン作働性神経が血管と腺房細胞周囲に分布することを報告した¹¹⁾。

今回、交感神経の血管と腺房細胞への作用を別々に知る目的で、上頸交感神経節近位端を電気刺激し、涙腺組織血流量と腺房細胞内の分泌顆粒を検討した。その結果、交感神経刺激後の組織血流量の減少および刺激側分泌顆粒の減少を認めたので報告する。

II 実験方法

1. 涙腺組織血流量の測定

体重2.3~2.9kgの8羽の成熟白色ウサギを使用した。sodium pentobarbital 全身麻酔下で、上頸交感神経節の近位端を電気刺激装置 (SEN-3201, 日本光電) およびアイソレーター (SS-102J, 日本光電) を用い、20C/S, 50msec, 5~6V で2分間電気刺激した。刺激終了直後より15分毎に60分後までの刺激側涙腺の組織血流量を水素クリアランス法^{12)~15)}にて測定した。両眼に塩酸オキシプロカインを点眼後、下眼瞼を切除し露出した眼窩外涙腺に直径300 μ mの針状関電極 (UHE-100, ユニークメディカル) を刺入した。血型不関電極 (UHE-001型, ユニークメディカル) を大腿皮下に埋没した。測定装置には水素クリアランス組織血流量計 (UHメーター-PHG201型, ユニークメディカル) とUHメーター用LOG-AMP (LOG-100型, ユニークメディカル) を使用し、卓上型自動平衡記録計 (U-228型, 日本電子科学) にクリアランス曲線と片対数処理したLOG-AMP出力とを同時に記録した。水素ガス

は解放的に0.3~0.6l/minを20~60秒間吸入させ、LOG-AMP出力の最も直線的に減少する部分で水素濃度の半減期を求め、Ketyの理論¹⁶⁾を用いて組織血流量を算出した。血流量測定は、クリアランス曲線が安定した後上頸交感神経節刺激前に3~6回行ない。その平均値を求め刺激前の代表値とした。血流量は15分毎に計測した。刺激前血流量と刺激終了直後、15分後、30分後、45分後、60分後の血流量とでそれぞれ対応のあるt検定を行なった。

2. 分泌顆粒の腺房細胞内での占拠率の測定

体重3.3~3.8kgの5羽の成熟白色ウサギを使用した。sodium pentobarbital 全身麻酔下で、片側の上頸交感神経節を組織血流量測定の時と同条件で電気刺激し、刺激終了5分後にsodium pentobarbital 静注にて殺し、直ちに両側的主涙腺を摘出した。

1) 電子顕微鏡写真撮影

摘出した組織は直ちに2.5%グルタルアルデヒド液 (pH 7.4, 0.1mol 磷酸緩衝液を使用) に浸漬し、30分後にいちど組織を細切し再び1時間30分固定した。その後1%OsO₄ (pH 7.4, 0.1mol 磷酸緩衝液を使用) に2時間後固定した。固定液は左右で同条件になるように、あらかじめ作製したものを二分して使用した。固定後エタノール系列にて脱水し、エポンに包埋した。一つの涙腺より3ブロック取り出し、SORVALL MT2-B Ultra Microtomeにて超薄切片を作製し、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛の二重染色を施し、日立HS-9型電子顕微鏡にて撮影した。電子顕微鏡写真は倍率3,000で1グリッドの四隅を無作為に撮り、一つの涙腺につき三つの超薄切片から40枚撮影した。最終的には7,300倍にプリントした。

2) ステレオロジー

切片の断面より三次元的データを得るためにステレオロジー²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾を用いた。40枚のプリント上のそれぞれの腺房細胞とそこにある分泌顆粒の面積解析には、ミニフロッピーディスクとドットプリンターを内蔵した32KBのマイクロコンピュータ (Seiko 5900, 精工舎) そしてソニックディジタイザー (GRAF/PEN gp 3, ナック) のグラフペンを使って測定し、それより一つの腺房細胞とそこに含まれる全ての分泌顆粒との面積比を求めた。Delesseの定理¹⁷⁾¹⁸⁾ (集合体の任意の断面に現われる集合体のそれぞれの成分の面積は、集合体に含まれるそれぞれの成分に比例する) より、この面積比から腺房細胞とそこに含まれる分泌顆粒の体積比を求めた。これを40枚のプリントのすべての腺

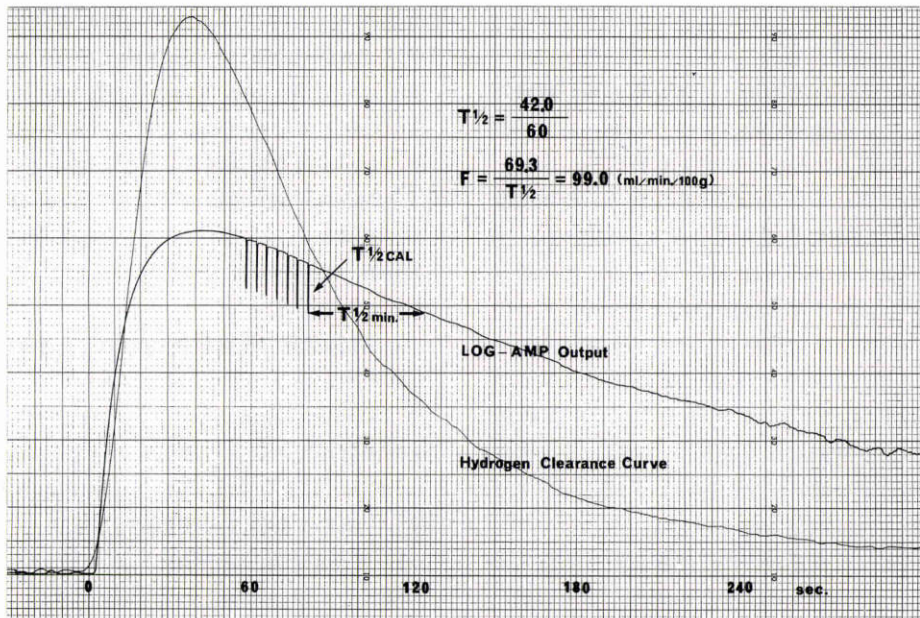


Fig. 1 A typical hydrogen clearance curve and its semilogarithmic line (LOG-AMP output). $T_{1/2}$ CAL indicates half of the tissue hydrogen concentration (logarithmic scale). $T_{1/2}$ min.: The time in minutes for the tissue hydrogen concentration to be reduced to half of its numerical value. F: blood flow per minute per 100g weight of tissue.

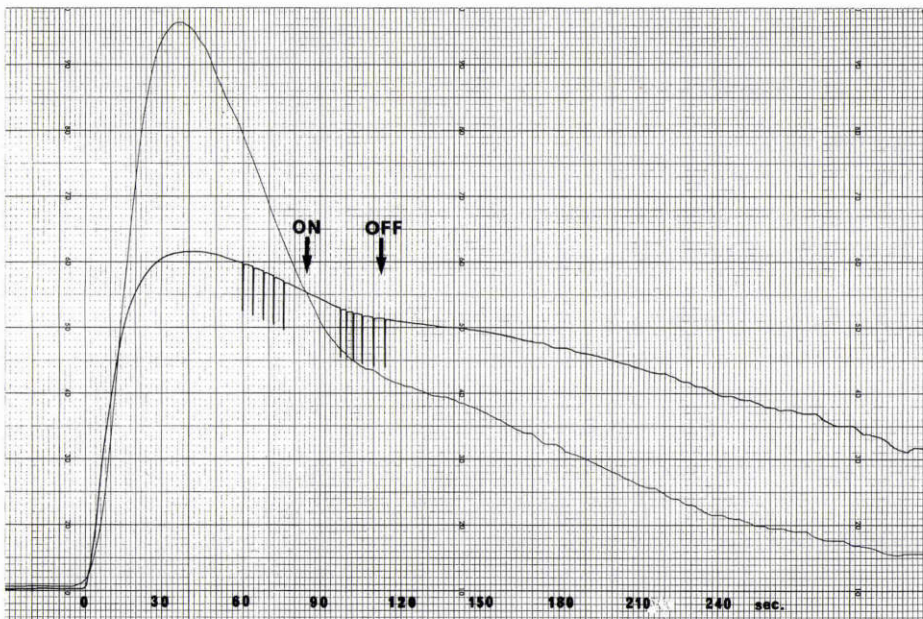


Fig. 2 The change of the hydrogen clearance curve and its semilogarithmic line (LOG-AMP output) by stimulation of the preganglionic trunk of the superior cervical ganglion. The flattened curve indicates the decrease of the blood flow. ON: The start of electrical stimulation. OFF: The stop of electrical stimulation.

房細胞(250個以上)に行ない、その平均値を求め分泌顆粒の一つの腺房細胞内の占拠率の代表値とした。刺激側と非刺激側で対応のあるt検定を行なった。

III 結 果

1. 涙腺組織血流量の変化

刺激前の組織血流量(Fig. 1)は刺激開始とともに減少した。これは Fig. 2のごとく、刺激前のクリアランスカーブの途中の高いレベルで刺激すると、クリアランスカーブが組織血流量の減少に応じて平坦化したこ

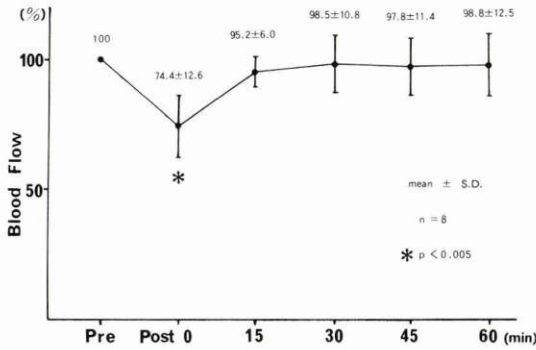


Fig. 3 The change of the blood flow of the lacrimal gland after electrical stimulation of the preganglionic trunk of the superior cervical ganglion. Pre: Pre-stimulation. Post: Post-stimulation. *: statistically significant decrease.

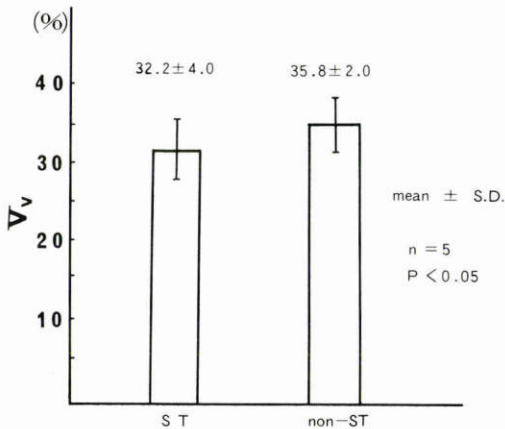


Fig. 4 The volume proportion of secretion granules per unit volume of acinar cell (Vv). ST: stimulated lacrimal glands. non-ST: non-stimulated lacrimal glands. The difference between Vv in ST and Vv in non-ST is statistically significant ($p < 0.05$).

Table The volume proportion of secretion granules per unit volume of acinar cell in 5 rabbits.

| N O. | stimulated (%) | non-stimulated (%) |
|-------------|----------------|--------------------|
| 1 | 26.3 | 33.7 |
| 2 | 37.0 | 38.8 |
| 3 | 30.7 | 34.0 |
| 4 | 33.4 | 36.4 |
| 5 | 33.9 | 36.3 |
| mean ± S.D. | 32.2 ± 4.0 | 35.8 ± 2.0 |

とより示された。また刺激前の組織血流量の89.9 ± 24.0ml/min/100g (mean ± S.D., n = 8)を100%とすると刺激終了直後は74.4 ± 12.6%, 15分後は95.2 ± 6.0%, 30分後は98.5 ± 10.8%, 45分後は97.8 ± 11.4%, 60分後は98.8 ± 12.5%であった(Fig. 3)。直後のみ統計学的に有意に減少していた ($p < 0.005$)。

2. 分泌顆粒の腺房細胞内での占拠率

腺房細胞内の分泌顆粒、粗面小胞体そして腺腔側の微絨毛様突起を含めて形態の差異は刺激側涙腺と非刺激側涙腺においてみられなかった。ただし稀に両者の分泌顆粒において分泌顆粒が互いに融合する像がみられた。占拠率の計算においては、データのあいまいな解釈を避けるために典型的分泌顆粒のみを対象とした。その結果、占拠率は刺激側で32.2 ± 4.0% (mean ± S.D. n = 5)、非刺激側で35.8 ± 2.0%であった(Fig. 4, Table)。統計学的に刺激側分泌顆粒は非刺激側に対して有意に減少していた ($p < 0.05$)。

IV 考 按

いままでに、主涙腺における涙液産生経路として次の二つが報告されている。第一の経路は血管から間質を通り腺腔側への水分および電解質輸送経路¹⁾⁴⁾⁻⁶⁾であり、第二の経路は外部よりの刺激が腺房細胞に働き、分泌顆粒が腺腔側へ開口分泌により積極的に放出される経路¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾である。副交感神経においては電気生理学的研究および薬理学的研究等により詳細に研究されており、第一および第二の経路が共に促進されると理解されている¹⁾⁶⁾。しかし、交感神経がこの二つの経路にいかんにか作用するかは、いまだ十分に理解されていない。そこで著者はまず前報において、ノルアドレナリン作動性神経が涙腺内の血管と腺房細胞周囲に分布するこ

とを明らかにし、ノルアドレナリン作働性神経が血管と腺房細胞に作用する可能性を示した¹¹⁾。ところで、最近、微小カニューレを用いて主涙腺よりの涙液のみを採取することが可能となり自律神経の涙液産生経路の解明が進んできている^{13)16)~10)}。だが、交感神経を刺激した後この方法で採取される涙液は、交感神経の血管と腺房細胞への総合作用の結果を反映していると考えられる。そこで交感神経の主涙腺よりの分泌作用を研究するうえで、血管への作用と分泌顆粒への作用を別々に知る必要があると考え、今回、涙腺組織血流量および分泌顆粒の変動を検討した。

組織血流量の測定には水素クリアランス法^{12)~15)}を用いた。この方法は実験手技が簡単で、組織損傷は軽微であり、本研究のように同一部位で刺激前後で繰り返し測定できる利点がある。眼科領域において組織血流量は脈絡膜¹²⁾¹⁴⁾、毛様体¹³⁾および視神経¹⁵⁾などで計測されているが、著者の知る限りはまだ涙腺においてその報告はない。涙腺組織血流量は同種のウサギ脈絡膜組織血流量¹²⁾¹⁴⁾に対して約1/3と少なく、水素の吸入より組織飽和した後、再び安定するまでに10分以上かかり、短時間に繰り返し計測することは困難なため15分毎に計測した。また、刺激終了直後より15分毎に刺激後60分後まで測定し、刺激開始より減少した血流量は刺激直後において有意に減少し、15分後はほぼ回復していた。ノルアドレナリン作働性神経が活動すると、 α 作用により主に細動脈の収縮が起こり血管抵抗が上がる²¹⁾。これより刺激直後の時点ではノルアドレナリン作働性神経による血管収縮が起こり、涙腺組織血流量が減少したと考えた。また、ノルアドレナリン作働性神経が刺激された場合、細動脈は細静脈より強力に収縮するため、(前毛細血管抵抗)/(後毛細血管抵抗)が大きくなり、平均毛細管圧が下がる。それで血管外側から内側に細胞外液の移動が起こる²¹⁾。それにより血管から間質への血漿への移動を抑制すると考えた。

この血管から間質への血漿の移動の抑制は何を意味するだろうか。生理的涙液分泌機構には、基礎分泌と反射性分泌とがある²²⁾。現在までのところ基礎分泌に関して血管から腺腔への水分輸送が関係するか否かは証明されていない。しかし、副交感神経刺激時のように負荷が加えられたならば血管→間質→腺腔への水分輸送の促進が起こると報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。副交感神経刺激があると副交感神経終末よりアセチルコリンが放出され、腺房細胞の膜受容器と相互作用する。その

結果腺房細胞内のCaイオンが上昇し、これにより細胞外液にKイオンが流出しClイオンは腺腔内に分泌される。NaイオンはClイオンに引かれて細胞間質液より腺腔内に移動する。このClとNaイオンの移動により発生した濃度勾配により、水分は間質側から腺腔側へ移動すると理解されている⁴⁾⁵⁾。この間質への水分の供給は血管からである。このとき、涙液分泌速度は自発性分泌の10数倍となる¹³⁾¹⁶⁾。このように、盛んに血管→間質→腺腔への水分輸送が行なわれている時に交感神経が刺激されるならば、前述したように血管から間質への水分輸送が抑制され、水分輸送が低下すると推測できる。このことは、副交感神経作働薬により促進された涙液分泌速度が上頸交感神経節の刺激により早期に抑制され、さらにこの効果が α ブロッカーにより抑制されたBotelhoら⁹⁾の報告と一致する。

涙液中の蛋白質は腺房細胞内で合成され、分泌顆粒として蓄えられ、刺激により開口分泌される²⁰⁾。交感神経作働薬投与により、涙液中の蛋白質濃度が上昇するという報告がある¹⁾。しかし、微小カニューレで採取された涙液中の蛋白質濃度は分泌顆粒以外の水分の影響を受け、そのため蛋白質濃度の上昇は水分輸送が減少したためかあるいは蛋白質の開口分泌が促進された場合に起こると考えられる。そこで血管からの水分輸送の影響を除外した交感神経の分泌顆粒への作用を知る目的で、上頸交感神経節を電気刺激後、腺房細胞内の分泌顆粒の変化を検討した。ステレオロジー²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾を用いることで電子顕微鏡写真の腺房細胞内の分泌顆粒の二次元情報より三次元的解析が可能となった。ステレオロジーにはDelesseの定理を用いたが、これは数学的に証明されている¹⁷⁾¹⁸⁾。結果は、統計学的に非刺激側に比べて刺激側の分泌顆粒が有意に減少していた(Fig. 4)。これより、刺激側涙腺において腺房細胞周囲のノルアドレナリン作働性神経が腺房細胞に作用し、開口分泌が促進されたかまたは分泌顆粒合成が抑制されたと考えた。しかしノルアドレナリン投与後細胞内電位の測定を行ない脱分極性の電位変化を認め、さらに涙液中の蛋白と糖と γ グロブリン濃度の上昇を認めた吉川の報告¹⁾やin vitroの実験で細切した涙腺を用いて血管の作用を除去したうえで、交感神経作働薬を使って蛋白質分泌を認めたBrombergの報告²³⁾より開口分泌の促進の可能性が強く示唆された。ただし開口分泌の促進を明らかにするには、交感神経刺激前後でのフリーズフラクチャー¹⁹⁾を用いた開口分泌の検討なども必要と考える。

以上、交感神経刺激による血管からの水分輸送の抑制と分泌顆粒分泌促進作用の可能性を示した。これより交感神経の生理的役割については、蛋白質等の高分子物質(蛋白質, 糖, γ グロブリン等)の涙液濃度をあげ角膜での貯留時間を延長し、角膜の栄養代謝および抗菌作用等を促進するのではないかと考えた。

ところで、ノルアドレナリンには α 作用と β 作用が認められているが、開口分泌促進作用を持つならば α 作用と β 作用のどちらであろうか。これに関しては α と β 作働薬または拮抗薬を用いた生理学的研究が行なわれている⁹⁾¹⁰⁾が、 β 作用に関しては β 作働薬を用いて蛋白質分泌促進が認められたこと、さらに上頸交感神経節の電気刺激で促進された涙液分泌速度が β ブロッカーで抑制された報告⁹⁾¹⁰⁾より、ノルアドレナリンの β 作用が分泌顆粒の開口分泌促進にあずかる可能性があると考えられる。ただし、 α 作用に関しては意見の一致がみられていない、それは α 作働薬および拮抗薬が強く血管に作用するためと考えられる。しかし、近年、自律神経作働薬および拮抗薬を用いた *in vitro* の研究が進み、交感神経においては α および β 作用が共に腺房細胞よりの蛋白質分泌を促進することが報告された^{23)~25)}。これに関してはラジオオートグラフィを用いた腺房細胞の受容体の研究も必要とならう。

拙筆に臨み、御指導、御校閲いただいた恩師松尾信彦教授に深謝いたします。また細田彰、光岡建之、進 輝子、丹原久美子の諸氏の技術的援助に感謝します。

なお本研究には文部省科学研究費補助金(奨励研究 A, 課題番号62771370)の援助を受けた。附記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 吉川太刀夫, 赤木好男: 涙腺の水分・塩分分泌機構. 眼紀 29: 680—697, 1978.
- 2) Diaz G, Orzalesi N, Riva FT: Stereological investigation on the effect of metaproterenol, pilocarpine and atropine administration on the human lacrimal gland. *Exp Eye Res* 30: 291—298, 1980.
- 3) 新家信行: 反射性分泌に関する神経生理学的研究. 日本生理誌 46: 191—204, 1984.
- 4) Petersen OH, Maruyama Y: Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307: 693—696, 1984.
- 5) 西川明徳: 外分泌腺細胞の生理学—外分泌機構とその異常—. 日本臨床 44: 1498—1499, 1986.
- 6) 新家信行: 涙液分泌. 日本臨床 44: 1516—1520, 1986.
- 7) Botelho SY, Hisada M, Fuenmayor N: Functional innervation of the lacrimal gland in the cat. *Arch Ophthalmol* 76: 581—588, 1966.
- 8) 吉川太刀夫: Adrenaline 及び Noradrenaline 刺激時の涙液分泌並びに涙腺電位変化. 眼紀 21: 712—717, 1970.
- 9) Botelho J, Martinetz EV, Pholpramool C, et al: Modification of stimulated lacrimal gland flow by sympathetic nerve impulses in rabbit. *Am J Physiol* 230: 80—84, 1976.
- 10) Tangkrisanavinont V: Adrenergic control of lacrimal secretion in rabbits. *Life Sci* 34: 2373—2378, 1984.
- 11) 政岡則夫: 涙液分泌における交感神経の役割. 第1報. 白色ウサギ涙腺内の交感神経支配に関する組織学的および電子顕微鏡学的観察. 日眼 90: 1346—1355, 1986.
- 12) 松尾信彦: 脈絡膜循環の特異性. 日眼 84: 2147—2206, 1980.
- 13) 新田安紀芳, 高山秀男, 木村保孝他3: 水素クリアラランス法によるサル眼毛様体血流量の研究. 日眼 87: 267—277, 1983.
- 14) 政岡史子: 交感神経の脈絡膜循環に及ぼす影響. 第1報. 上頸交感神経節切断および刺激効果の水素クリアラランス法による検討. 眼紀 37: 140—146, 1986.
- 15) 篠山治彦, 堀内二彦: 眼循環の研究. 眼窩内視神経血流量測定について. 日眼 90: 1375—1380, 1986.
- 16) Kety SS, Schmidt CF: The determination of cerebral blood flow in man by the use of nitrous oxide in low concentrations. *Am J Physiol* 143: 53—66, 1945.
- 17) 馬場謙介, 木村一元, 宮本 潔他3: 形態計測(II)—形状のいかんを問わない stereology—. 細胞 9: 68—77, 1977.
- 18) DeHoff RT, Rhines FN: Quantitative Microscopy. 牧島邦夫, 篠原靖忠, 小森尚志 共訳, 計量形態学, 東京, 内田老鶴圃, 1983.
- 19) Tanaka Y, DeCamilli P, Meldolesi J: Membrane interactions between secretion granules and plasmalemma in three exocrine glands. *J Cell Biol* 84: 438—453, 1980.
- 20) 黒住一昌: 経細胞輸送 II, 分泌, 黒住一昌, 菅野富夫 編, 細胞生物学シリーズ, 物質輸送の細胞生物学, 東京, 朝倉書店, 152—241, 1983.
- 21) 熊田 衛, 沼尾嘉信: 循環系の調節. 本郷利憲, 広重 力, 豊田順一, 熊田 衛 編, 標準生理学, 東京, 医学書院, 546—571, 1985.
- 22) Jones LT: The lacrimal secretory system and its treatment. *Am J Ophthalmol* 62: 47—60, 1966.
- 23) Bromberg BB: Autonomic control of lacrimal protein secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 110—116, 1981.
- 24) Putney JW, VandeWalle CM, Leslie BA: Stimulus-secretion coupling in the rat lacrimal gland. *Am J Physiol* 235: c188—c198, 1978.
- 25) Friedman ZY, Lowe M, Selinger Z: β -adrenergic receptor stimulated peroxidase secretion from rat lacrimal gland. *Biochim Biophys Acta* 675: 40—45, 1981.