

眼炎症と眼神経ペプチド

第1報 家兎眼における神経ペプチドの測定 (図3, 表3)

片 山 寿 夫 (川崎医科大学附属川崎病院眼科)

Ocular Inflammation and Neuropeptides in Rabbit Ocular Tissue

Report 1. Measurement of Neuropeptide in Rabbit Ocular Tissue

Toshio Katayama

Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School

要 約

家兎の眼組織における神経ペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と radioimmunoassay (RIA) の併用で測定した。神経ペプチドでは, substance P (SP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin, neurotensin の定量が可能であった。定量の結果, SP は網膜に, VIP は脈絡膜に, somatostatin は網膜に多く含まれ, それぞれ 8.80mg/g wet weight, 6.81mg/g wet weight, 1.07mg/g wet weight であった。また, neurotensin は微量であった。SP を介し眼炎症をひきおこす 1% nitrogen mustard 点眼 60 分後の SP 量は, 前房水, 脈絡膜, 硝子体, 虹彩で増加を示し, 網膜, 角膜では低下を示した。(日眼 92: 448—452, 1988)

キーワード: 神経ペプチド, 高速液体クロマトグラフィー, ラジオイムノアッセイ, 家兎, ナイトロゲン, マスタード

Abstract

Neuropeptide in rabbit ocular tissue, such as substance (SP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin and neurotensin were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) and radioimmunoassay (RIA). The result disclosed the highest amount of SP and somatostatin to be in the retina and that of VIP in the choroid, amounting to 8.80, 1.07 and 6.81mg/g wet tissue weight respectively. Neurotensin was detected only in minute amounts. Nitrogen mustard is well known to induce ocular inflammation via SP. The amount of SP after instillation of a 1% nitrogen mustard drop increased in the aqueous humor, the choroid, the vitreous body and in the iris, but decreased in the retina and in the cornea. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 448—452, 1988)

Key words: Neuro-peptide, HPLC, RIA, Rabbit, Nitrogen mustard

I 緒 言

近年, 複雑な神経系の情報伝達や神経刺激の介達調節に関する物質として神経ペプチドが注目されてきた。神経ペプチドの脳における分布や働きについて

は次第に明らかにされてきている。また眼組織における神経ペプチドも徐々に解明されてきている。著者は家兎虹彩光照射時に substance P (SP) が前房中に遊離されることを認め, 眼炎症時に神経ペプチドが関与することを報告した¹⁾²⁾。

別刷請求先: 700 岡山市中山下2-1-80 川崎医科大学附属川崎病院眼科 片山 寿夫 (昭和62年9月21日受付)

Reprint requests to: Toshio Katayama, M.D. Dept. of Ophthalmol. Kawasaki Medical School

2-1-80 Nakasange Okayama City, 700 Japan

(Accepted September 21, 1987)

従来、神経ペプチドの生体内での役割については生物活性に関する研究、免疫化学的方法による存在部位の研究よりなされてきた。今回、現在測定可能な神経ペプチド、即ち SP, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin, neurotensin の眼組織での内在量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と Radioimmunoassay (RIA) の併用で測定した。さらに Nitrogen Mustard の点眼にて前眼部への化学的刺激を惹起し、眼組織での SP の量的変化を測定したので報告する。

II 実験方法

1. 材料

体重1.0kg 前後の幼若白色雄家兎から得た眼球を使用した。

2. 実験方法

1) 神経ペプチドの測定法

(1) 各神経ペプチドの抽出 (図1)

白色家兎を空気栓塞で屠殺し直ちに眼球を摘出した。先ず実体顕微鏡下にて前房水を採取し、次いで輪部から2mm 後方で割を入れ、角膜、虹彩を切除し、スパーテルにて硝子体、網膜、脈絡膜を剥離切除した。すべての操作は氷上にて行われた。得られた各眼組織の湿重量を2眼プールで計量後、1 M 酢酸2ml を加えてテフロンコーティングしたブレンダーで細切し、100℃で15分間煮沸後、3,000rpm で10分間遠沈する。得られた上清に、倍量のアセトンを混和後、4℃で30分間放置し、3,000rpm で10分間遠沈する。得られた上清を濃縮乾固し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む15%アセトニトリル0.5ml を加えて攪拌後ろ過し、逆相液体クロマトグラフィー (HPLC) の材料とした。HPLC より各神経ペプチドの分画を得、RIA にて各神経ペプチドの定量した。

(2) 高速液体クロマトグラフィーの条件 (表1)

ポンプ2台は Model 6000A (Waters)、溶媒プログラマーは Model 660 (Waters)、注入器は Model U-6 K、カラムは Cosmosil₅ C₁₈-P 直径4.6×100mm (半井化学) を使用し、移動相はアセトニトリルで、0.1%トリフルオロ酢酸に溶かした15%アセトニトリルから27.5%アセトニトリルへの直線勾配で5分間グラディエントをかけた。流出率は1ml/min、温度は室温で行なった。検出器は SPD-2A (島津) を用い、210nm で検出した。記録器は C-R2A クロマトバック (島津) を用いた。各ペプチドの溶出パターンを図2に示す。

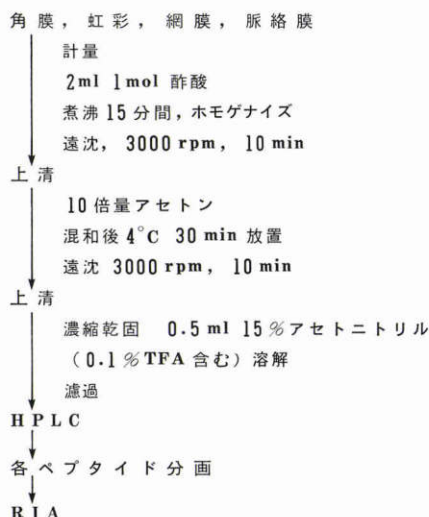


図1 ペプチドの定量法

表1 高速液体クロマトグラフィーによるペプチドの抽出

装置:	Model 6000A (Waters)
注入器:	Model U-6 K (Waters)
カラム:	Cosmosil 5C ₁₈ -P (半井化学)
	size $\phi 4.6 \times 100$ mm
移動相:	15% ~ 27.5% アセトニトリル (0.1% トリフルオロ酢酸を含む)
流出率:	1 ml/min
温度:	室温
検出器:	SPD-2A (島津)
	210 nm
記録器:	C-R 2A クロマトバック (島津)

(3) RIA

HPLC で得られた各ペプチド分画に家兎抗ペプチド血清を加え、さらにヨードラベルした各ペプチド (Amersham) を加え数秒振盪し、4℃で48時間インキュベートした。チャーコールに懸濁したデキストランを加え、2,000rpm で10分間遠沈し、上清をガンマカウンター (Aloka) で測定した。

2) Nitrogen Mustard 点眼後の SP の変化

5羽の家兎の両眼に1% Nitrogen Mustard (Sigma) を50 μ l 点眼し、60分後に空気栓塞で屠殺し、上記の方法で各眼組織の SP 量を2眼プールで測定した。

表2 家兎眼組織における各ペプチドの量

	Substance P	VIP	Somatostatin	Neurotensin	
角膜	4.68 ± 1.04	0.19 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.41 ± 0.14	ng/g wet weight
虹彩	2.85 ± 1.17	1.29 ± 0.44	0.22 ± 0.03	0.60 ± 0.33	"
網膜	8.80 ± 2.38	0.94 ± 0.10	1.07 ± 0.13	0.10 ± 0.03	"
脈絡膜	0.40 ± 0.04	6.81 ± 2.16	0.12 ± 0.02	0.05	"
硝子体	0.02	0.02	0.01	trace	"
前房水	0.04	0.04 ± 0.01	0.01	trace	ng/ml

平均 ± 標準誤差

N = 5

2眼プールで行なった。

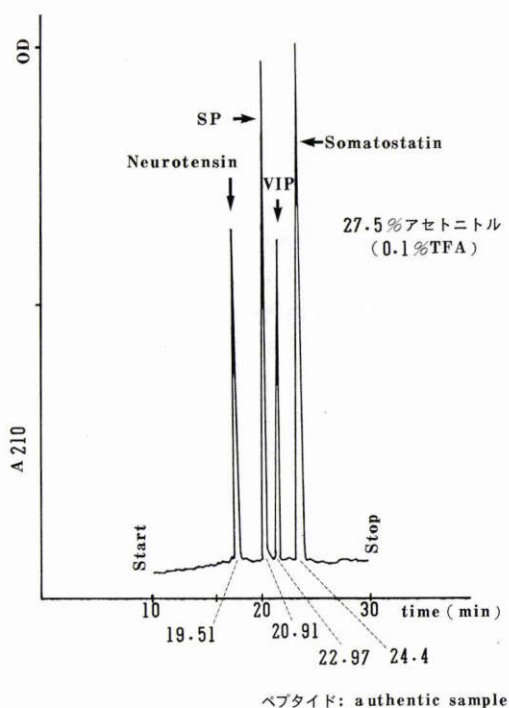


図2 ペプチドのHPLC溶出パターン

III 結果

1. 神経ペプチドの定量 (表2)

SPは網膜に最も多く、8.80ng/g wet weight 含まれ、次いで角膜、虹彩に多く含まれていた。

VIPは脈絡膜に最も多く、6.81ng/g wet weight 含まれ、次いで虹彩、網膜に多く含まれていた。

Somatostatinは網膜に最も多く、1.07ng/g wet weight 含まれ、他の組織には微量であった。

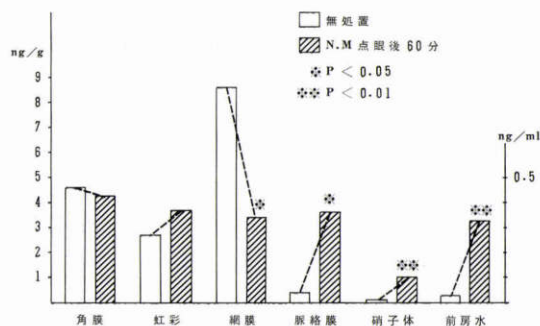
neurotensinは虹彩に多く、0.60ng/g wet weight 含

表3 Nitrogen Mustard 点眼後のSPの変化

	SP量 *	無処置との比較
角膜	4.19 ± 0.40	— 10.5 %
虹彩	3.72 ± 0.60	+ 30.5 %
網膜	3.37 ± 0.07	— 61.7 %
脈絡膜	3.56 ± 0.73	+ 790 %
硝子体	0.15 ± 0.01	+ 650 %
前房水	0.42 ± 0.02	+ 950 %

平均 ± 標準誤差

N = 5

* ng/g wet weight
ng/ml

Nitrogen Mustard 点眼後60分で、SP量は前房水、脈絡膜、硝子体、虹彩で増加し、角膜、網膜で減少した。

図3 Nitrogen Mustard 点眼によるSP量の変化

まれ、他の組織には微量であった。

また組織別に各ペプチドの含有量を比較してみると、角膜にはSPが最も多く、虹彩にはSP, VIP, 網膜にはSP, 脈絡膜にはVIPが多かった。硝子体、前房水には各ペプチド共、極微量であった。

2. Nitrogen Mustard 点眼60分後のSP量の変化

Nitrogen Mustard 点眼直後より眼刺激反応が著名

となり、結膜浮腫、充血、縮瞳、前房内に炎症細胞の出現が認められた。

無処置群と比較し SP 量が著明に増加した組織は、前房水 (9.5倍)、脈絡膜 (7.9倍)、硝子体 (6.5倍) であり、虹彩では約30%の増加を示した (表3)。前房水および硝子体では危険率1%以下、硝子体では5%以下で処置群に増加が認められた。逆に SP 量の低下した組織は、網膜 (62%)、角膜 (11%) であった (図3)。

IV 考 按

現在、免疫組織学的に網膜内に認められるペプチドとして、SP, VIP, somatostatin, enkephalin, neurotensin, glucagon, luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), thyroxine releasing hormone (TRH) などがある。これらは網膜内顆粒層の内層のアマクリン細胞に存在している^{3)~6)}。

これらのペプチドの働きは徐々に解明されてきている。SP は網膜周辺のアマクリン細胞に存在し、杆体との関係が示唆されている⁷⁾。VIP は顔面神経と関係があり、脈絡膜血流量との関連が示唆されている⁸⁾。また、somatostatin は網膜の個体発生との関係が示唆されている⁹⁾。neurotensin の作用はほとんどわかっていない。

今回、HPLC と RIA の併用で、各ペプチドの眼組織での局在を兎眼2眼プールで測定した。その結果、SP, somatostatin は網膜に、VIP は脈絡膜に、neurotensin は虹彩に最も多く含まれていた。また、それぞれ他の眼組織にも少量ではあるが含まれていた。SP, somatostatin, VIP の測定結果は今までに報告された免疫組織学的方法や生理活性に関する研究結果と一致している。neurotensin は今後の解明が期待される。

今回、実際に SP を介する眼炎症を惹起し、眼内での SP の量的変動の測定を試みた。前眼部への化学的刺激剤である Nitrogen Mustard の点眼を行ない眼炎症を惹起した。Nitrogen Mustard による眼反応は2相性であることが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。初期の反応は点眼後1時間で出現し、眼圧上昇、縮瞳、前眼部炎症をひき起こす。この反応はインドメサシン投与で影響を受けず、球後にエタノール注射された denervated eye では完全に block されることにより、neurogene な反応が示唆され、SP の関与が疑われている。後期の反応は Nitrogen Mustard 点眼後3~12時間で出現し、眼圧上昇、前房内炎症を起こす。この反応はインドメサシン投与で block され、Prostaglandin を介する反応が

疑われている。

著者は同様に Nitrogen Mustard の家兎眼への点眼を行ない、その初期の反応における SP の定量を試みた。Nitrogen Mustard 点眼直後より兎は声を出して鳴き、結膜浮腫、充血が起こり、縮瞳し、前眼部の炎症をおこした。SP は前房内で著明な増加を示し、脈絡膜、硝子体、虹彩でも増加した。この反応は前報で著者ら¹⁾が報告した SP を家兎の硝子体内に注入した後におこる眼反応と一致し、Nitrogen Mustard 点眼後の初期の反応は SP 遊離のためと考えた。

また、著者らは SP が虹彩から遊離されることも示している²⁾。虹彩からの SP の遊離は虹彩アルゴンレーザー光照射によっても増加され、虹彩光照射によっておこる種々の眼反応に SP が関与することを明らかにしている。

SP 以外の神経ペプチドは、今回の実験により眼球内での存在部位が明らかにされた。これらの神経ペプチドが組織内でいかなる作用を持つか、今後の課題としたい。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました藤原久子助教授に深謝いたします。

本論文の要旨は、第91回日本眼科学会総会 (京都, 1987) で発表した。

文 献

- 1) 片山寿夫, 藤原久子, 坂本高章他: 虹彩レーザー光凝固術における Prostaglandin E₂ および Substance P の関与について, 日眼 90(12): 1611-1616, 1986.
- 2) 片山寿夫, 藤原久子, 中田敬一: 家兎虹彩からのプロスタグランディン E₂ と Substance P 遊離について, あたらしい眼科 3(9): 1342-1344, 1986.
- 3) 福田全克, 石本一郎, 桑山泰明他: 網膜ペプチド作動性システムについて, I. 間接蛍光抗体法による検索, 日眼 85(7): 578-581, 1981.
- 4) 桑山泰明, 石本一郎, 清水芳樹他: 網膜ペプチド作動性システムについて, III. グルカゴンに関する検索, 日眼 86: 789-793, 1982.
- 5) Medzihradsky F: Stereospecific binding of etrophine in isolated neural cells and in retina, determined by a sensitive microassay. Brain Res 108: 212-219, 1976.
- 6) Schaeffer JM, Brownstein MJ, Axelrod J: Thyrotropin-releasing hormone-like material in the rat retina: Changes due to environmental lighting. Proc Natl Acad Sci USA 74: 3579-3581, 1977.
- 7) Ishimoto I, Shiosaka S, Shimizu Y, et al: Two types of Substance P-containing cells and

- their uneven distribution in the chicken retina : An immunohistochemical analysis with flat mounts. *Brain Res* 240 : 171—174, 1982.
- 8) **Bill A, Stjernschantz J, Nilsson S** : Increase in ocular blood flow by VIP and facial nerve stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci Supple* 16 : 16, 1980.
- 9) **Kuwayama Y, Fukuda M, Ishimoto I** : Ontogeny of somatostatin in the rat retina in relation to the catecholamine containing system. *Fol Ophthalmol Jap* 32 : 541—547, 1981.
- 10) **Camras CB, Bito LZ** : The patho-physiological effects of nitrogen mustard on the rabbit eye. I. The bipolar intra-ocular pressure response and the role of prostaglandins. *Exp Eye Res* 30 : 41—52, 1980.
- 11) **Camras CB, Bito LZ** : The patho-physiological effects of nitrogen mustard on the rabbit eye. II. The inhibition of the initial hypertensive phase by capsaicin and the apparent role of Substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 423—428, 1980.
- (第91回日眼総会原著)
-