

ウシ瞳孔括約筋におけるアセチルコリンと カルバコールの効果の違いについて

芳野 秀晃・鈴木 亮・花田 美穂 (山口大学医学部眼科学教室)

要 約

ウシ瞳孔括約筋は Ach に対し 10^{-9} ~ 10^{-8} M では収縮しなかった。 3×10^{-5} ~ 10^{-2} M という非常に高濃度を投与しても得られた収縮は小さかった。 3×10^{-7} neostigmine 存在下では Ach の閾値濃度が 3×10^{-8} M となり反応の大きさも著明に増加した。瞳孔括約筋では神経刺激をしなくても Ach が放出されている。瞳孔括約筋は atropine で幾分 tone が減少したので、この自発的に放出されている Ach が tone の一部を担っていると考えた。Ach は神経末端を脱分極させ種々の伝達物質を放出させ易くするので、それを防止するため瞳孔括約筋組織では豊富な AchE を準備してこの Ach を分解しておく必要があるとも考えられる。(日眼会誌 93: 489-493, 1989)

キーワード：内眼筋，瞳孔，アセチルコリン，アセチルコリンエステラーゼ，カルバミルコリン，瞳孔括約筋，毛様体筋

Effects of Acetylcholine and Carbachol on the Iris Sphincter

Hideaki Yoshino, Ryo Suzuki and Miho Hanada

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University, School of Medicine

Abstract

We compared the effects of acetylcholine and carbachol on iris sphincters. The muscle strips (mostly bovine tissues) were isolated and incubated in a 0.2ml organ bath. Results revealed an approximately ten-thousandfold difference in potency between carbachol and acetylcholine, in the bovine iris. Acetylcholine and/or endogenous chemical agents were spontaneously released from bovine tissue. Acetylcholinesterase activity in this tissue strongly inhibited the acetylcholine action, in order to protect the nerve terminals from random depolarization due to the released acetylcholine. Among several species (bovine, rabbit, hamster), Ach action was the least in the bovine iris sphincter muscle. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 489-493, 1989)

Key words: intraocular muscle, pupil, acetylcholine, acetylcholinesterase, iris sphincter, ciliary muscle, carbamylcholine

I 緒 言

瞳孔括約筋は主に副交感神経により縮瞳する¹⁾。したがって Krebs 液中の摘出瞳孔括約筋標本も acetyl

choline (Ach) の投与により強く収縮することが予想される。

ところが私共は内眼筋の実験を始めて間もなくの頃から内眼筋特に瞳孔括約筋が外来性の Ach にほとん

別刷請求先：755 宇部市西区小串1144 山口大学医学部眼科学教室 芳野 秀晃

(昭和60年 4 月 1 日受付，平成元年 1 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to: Ryo Suzuki, M.D. Dept. of Ophthalmol., Yamaguchi Univ. School of Med.

1144 Kogushi, Nishi-ku, Ube 755, Japan

(Received April 1, 1985 and accepted in revised form January 28, 1989)

ど反応しない²³⁾ことを体験し素朴な疑問をもった。腸管などでは *in vitro* でも外来性に投与された Ach に強く反応するし、副交感神経支配の強い組織ではなおのこと敏感に反応することがよく知られているからである⁴⁾⁵⁾。瞳孔括約筋が Ach に対してほとんど反応しない事実は既に Alphen⁶⁾, Ohara⁷⁾などの記載^{6)~11)}がある。しかしながら薬理学者は冷蔵保存が可能で acetylcholinesterase (AChE) の分解を受けにくい Ach 類同の carbachol を好んで用いて研究を進めがちであるため、Ach と carbachol 間の予想外の作用差について詳細はまだ報告されていないし、考察はなおのことなされていない。

そこで私達はウシ瞳孔括約筋標本を用い Ach と carbachol の用量作用曲線を調べた。そして AchE 阻害薬である neostigmine や eserine¹²⁾¹³⁾, 神経伝達の阻害薬である tetrodotoxin¹⁴⁾, Ach の神経末端からの放出を抑制することが知られている botulinum toxin¹⁵⁾¹⁶⁾などの薬物を組み合わせて使用することにより、瞳孔括約筋組織中に豊富に存在する AchE の存在意義と同組織からの Ach 放出の意味について考察した。

II 実験方法

実験動物はウシを用いた。眼球摘出後、ただちに瞳孔縁により瞳孔括約筋を含む幅 1~1.5mm, 長さ 4mm の筋標本作製した。絹糸を用いて 0.2ml の筋浴槽内でその一端を固定、他端を記録系に接続した。筋張力の記録は FD pick-up (TB-612T, 日本光電), carrier amplifier (AP-620G, 日本光電), 記録計 (up-6522A, ナショナル) による。

電気刺激は銀一塩化銀電極を介して刺激装置 (MSE-3R, 日本光電) によりくり返し経壁刺激をおこなった。電気刺激の条件はパルス幅 0.5msec, 刺激電圧は 60V で、30秒~90秒間隔でおこなった。Krebs 液に 95% O₂~5% CO₂混合ガスを通気して pH 7.2~7.4, 温度 36°C を保ち、筋浴槽を Krebs 液で溶解した一定濃度の薬液で灌流した。

Krebs 液の組成は Na⁺ 137.4, K⁺ 5.9, Mg²⁺ 1.2, Ca²⁺ 2.5, Cl⁻ 134.0, H₂PO₄⁻ 1.2, HCO₃⁻ 15.5, glucose 11.5 (mM) で極めて高濃度の Ach を使用する場合は別に同量のコリンを用いてコントロールとした。

実験に使用した薬物は acetylcholine chloride (和光), atropine sulfate (和光), carbachol (carbamyl choline, Sigma), neostigmine bromide (Sigma),

eserine (Sigma), botulinum toxin (和光)を用いた。薬物の濃度は mole (M) で示した。

実験方法の詳細は以前に示した通りである²³⁾。

III 結果

瞳孔括約筋は carbachol の投与により 3×10^{-8} M を閾値として濃度依存的に収縮反応を示したが、carbachol 類同の Ach では 2×10^{-5} ないし 3×10^{-5} M の極めて高濃度が必要であった。

図 1 に carbachol と Ach の典型的な反応曲線を濃度を変えて 2 例示した。同じ収縮をひきおこすためには Ach は carbachol よりもはるかに高濃度を要することがわかるが収縮の立ち上りは carbachol より Ach の方がむしろ速かった。洗浄後、収縮力が回復するまでの時間は Ach の方が長い時間を要した。

Ach が組織中の AchE で分解されることが収縮力の差につながる事が考えられるので neostigmine の存在下に実験を行うことにした。

標本に neostigmine を作用させると約 6×10^{-7} M から tone がわずかに上昇し 10^{-6} M 以上では Ach より強力な収縮を示した。 10^{-5} M 以上の neostigmine によって起こった収縮は洗浄してもなかなか元のレベルにはもどらなかつた。この neostigmine の作用は 10^{-6} M atropine の前処置によりほぼ完全に消失した。

ここで 4 級アンモニウム構造をもつ neostigmine 自体が Ach 様作用をもっていることは否定できない¹²⁾が、しかし 3 級アミンの eserine でも同様のことが観察された。

Neostigmine は 10^{-8} M から副交感神経起因性の収縮を用量依存的に増強させた。Neostigmine の濃度を上げるに従って神経を介した瞳孔括約筋の収縮高は増強したが $5-7 \times 10^{-7}$ M からは神経を刺激しないときと同様に tone の上昇がみられた。

3×10^{-7} M neostigmine 存在下の典型的な実例を図 2 に示し、表 1 に結果をまとめた。すなわち瞳孔括約筋は neostigmine 存在下では Ach 単独の場合より、低濃度で大きな収縮をおこすことができた。Neostigmine 存在下では Ach の効力は約 480~1850 倍 (各々 ED₅₀, ED₃₀) と増強した。また筋は 3×10^{-8} M Ach にも有意に収縮し閾値濃度は約 1000 分の 1 となった。Carbachol の反応は neostigmine 存在下の Ach の反応より若干強力であった (ED₅₀ で 26 倍, ED₃₀ で 6.2 倍)。Neostigmine 存在下での Ach の反応は carbachol よりもはるかに急激な立ち上りを示した。

表 1 ウシ瞳孔括約筋における acetylcholine, acetylcholine+neostigmine および carbachol の ED₅₀ と ED₃₀. Ach, acetylcholine ; NS, neostigmine ; Cch, carbachol. 反応は、10⁻⁴M carbachol で惹起された収縮高を100として%表示した.

	Ach	Ach+NS	Cch
ED ₅₀	$(5.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ (n=11)	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ (n= 9)	$(4.3 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ (n=18)
ED ₃₀	$(2.4 \pm 0.6) \times 10^{-3}$ (n= 5)	$(1.3 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ (n= 4)	$(2.1 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ (M) (n= 7)

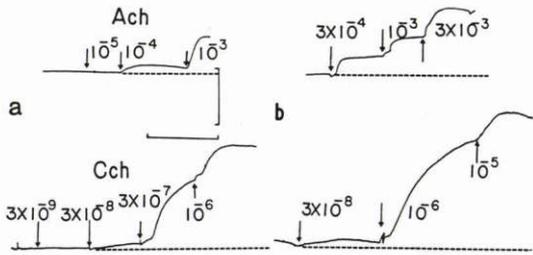


図 1 ウシ瞳孔括約筋における acetylcholine と carbachol の効果. a, b の別の標本からの記録である. Acetylcholine と carbachol の極だった力価の違いが明瞭である. 濃度 (mole/l) : Cch, carbachol ; Ach, acetylcholine. 水平バー=60秒, 垂直バー=200 mg.

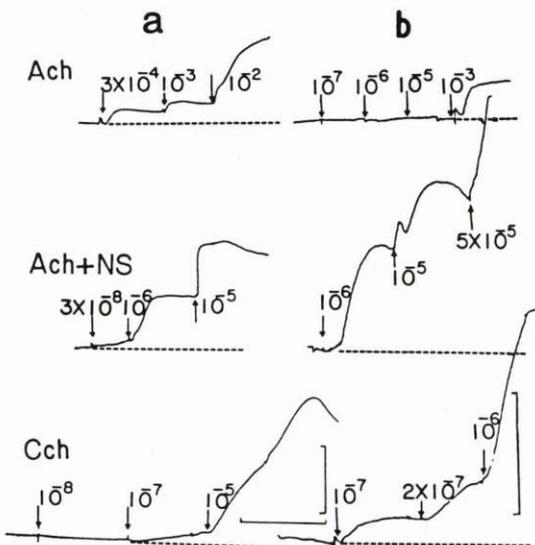


図 2 ウシ瞳孔括約筋における acetylcholine, acetylcholine+neostigmine および carbachol の効果. a, b は別の標本, 濃度は mole/l で表示, Ach, acetylcholine ; NS, 3×10^{-7} M neostigmine ; Cch, carbachol. 水平バー=60秒, 垂直バー=200mg.

表 1 には Ach および neostigmine 存在下の Ach の反応の大きさを示している. ED₅₀で Ach と carbachol の効力を比較すると, AchE 作用にうちかかって carbachol の ED₅₀に相当する収縮を起こさせるには約 12000倍という高濃度の Ach を要することがわかった.

IV 考 按

Carbachol は Ach と違って安定であるが Ach とほぼ同じ生物活性を有している⁴⁾⁵⁾. Ach 単独では 10⁻⁷ ~ 10⁻⁵M の比較的高濃度でもウシ瞳孔括約筋の収縮は観察されなかったが, neostigmine 存在下では 3×10^{-8} M が Ach の閾値濃度となり収縮効果も数1000倍と大きくなった. したがって neostigmine で AchE による分解をまぬがれた場合には他の組織と同様虹彩でも Ach はやはり強力な agonist であるといえるだろう.

いわゆる AchE 阻害薬は瞳孔括約筋では Ach より強い収縮作用を有していた. 毛様体神経の伝達物質である Ach 自体の効果が瞳孔括約筋で非常に弱くその代わりに Ach 分解酵素抑制剤の方が作用がはるかに強力であるのは他の組織⁴⁾では見られない内眼筋の特徴である. ヒトにおいても eserine 点眼が pilocarpine 点眼よりも強力で持続性の縮瞳効果を有することが知られているが, その機序は瞳孔括約筋のこの特徴のためであろう.

組織によっては eserine が Ca-influx を抑制して小胞体に直接作用しその結果として筋の収縮力が増強するという報告¹³⁾がある. しかしながら neostigmine も eserine と同様に tone を上昇させたし, また atropine で拮抗されたので, neostigmine はこの組織では主として AchE を抑制することによってその効果を発現したと考えてよいだろう.

本実験でウシ瞳孔括約筋は neostigmine と eserine で tone が上昇し, それは botulinum toxin¹⁶⁾¹⁷⁾で幾分

減少した。故に、瞳孔括約筋組織から Ach が自発的に放出されている可能性がある。

確かに骨格筋においては Ach の自発的放出はよく知られていて、それが miniature endplate potential の成因であるけれども、そのような組織でも AchE 阻害薬によって内眼筋のように収縮することはない¹⁵⁾¹⁷⁾。

瞳孔括約筋組織からの自発的な Ach 放出にはなにか特別の意味があるのではないだろうか。他の平滑筋と異なり瞳孔括約筋の tone は活動電位等の電気現象を介したのではない¹⁸⁾¹⁹⁾ので、その tone の維持には密な神経支配と内因性物質の関与²⁾が重要であろう。神経末端からの絶えざる Ach の放出が瞳孔括約筋がその tone を維持するために必須であると私共は考えた。冷蔵貯蔵した標本からは神経因子や内因性物質は放出され難いと考えられがちであるが、24時間冷蔵保存した瞳孔括約筋も神経刺激によく反応した。この組織では神経要素についても考慮を払っておくべきである。他の内眼筋組織でも類似の自発的な Ach 放出が認められている³⁾¹⁹⁾。

ではなぜこの Ach の作用をわざわざうち消すように豊富な AchE²⁰⁾²¹⁾が瞳孔括約筋組織に分布しているのだろうか。外因性であれ内因性であれ Ach は神経末端を脱分極させ伝達物質の放出を促す²²⁾。したがって内眼筋のように種々の神経支配を濃密に受けている組織においてはなおさらのこと、持続的に放出される Ach を完全に不活化させ神経の指令なしにやみくもに内在神経から伝達物質が放出されないようにしておく必要があるのではないかと考えた。

以上のことをまとめるとウシ瞳孔括約筋はその濃密な神経末端を Ach から充分に保護するために豊富な AchE を必要としているが、またその一方では瞳孔括約筋はその tone を維持するために Ach その他の内因性物質の放出²⁾をたえまなく続けている、という両面が考えられる。

本研究は昭和58, 59年度の文部省科研奨励 A の援助を受けた。あつく感謝します。また小林俊策山口大名誉教授の当時のご指導に深謝します。

文 献

- 1) 大野新治：瞳孔とその異常。pp. 212—261, 神経眼科学, 石川 哲編, 医学書院, 1974.
- 2) Suzuki R, Kobayashi S: Response of bovine intraocular muscles to transmural stimulation in the presence of various prostaglandins. *Exp Eye Res* 36: 789—798, 1983.
- 3) Suzuki R: Neuronal influence on the mechanical activity of the ciliary muscle. *Brit J Pharmacol* 78: 591—597, 1983.
- 4) Kosterlitz HW: Effects of choline esters on smooth muscle and secretions. In *Physiological Pharmacology*. Vol 3, The Nervous System-Part C: Autonomic Nervous System Drugs. pp. 97—161. Ed by Root WS, Hofmann FG, Academic Press, Inc, New York, 1967.
- 5) Snyder SH, Chang KJ, Kuhar MJ, et al: Biochemical identification of the mammalian muscarinic cholinergic receptor. *Fed Proc* 34: 1915—1921, 1974.
- 6) van Alphen GWHM, Kern R, Robinette, S.L: Adrenergic receptors of the intraocular muscles: Comparison to cat, rabbit and monkey. *Arch Ophthalmol* 74: 253—259, 1965.
- 7) Ohara, K: Effects of cholinergic agonists on isolated iris sphincter muscles: A pharmacodynamic study. *Jpn J Ophthalmol* 21: 516—527, 1977.
- 8) Yamauchi DM, De Santis L, Patil PN: Relative potency of cholinomimetic drugs on the bovine iris sphincter strips. *Invest Ophthalmol* 12: 80—82, 1973.
- 9) Harris LS, Shimmoyo M, Hughes J: Dose response of cholinergic agonists on cat irides. *Arch Ophthalmol* 91: 299—302, 1974.
- 10) Kloog Y, Heron DS, Korczyn AD, et al: Muscarinic acetylcholine receptors in albino rabbit iris-ciliary body. *Mol Pharmacol* 15: 581—587, 1979.
- 11) Akesson C, Swanson C, Patil PN: Muscarinic receptors of rabbit irides. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 322: 104—110, 1983.
- 12) Taylor P: Anticholinesterase agents. In *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (6th ed), pp. 100—119. Ed by Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, Macmillan Publishing Co, Inc New York, Toronto, London (1980).
- 13) Pagala MKD, Sandow A: Physostigmine induced contractures in frog skeletal muscle. *Pfuger's Arch* 363: 223—229, 1976.
- 14) Kuriyama H, Osa T, Toida N: Membrane properties of the smooth muscle of the guinea-pig ureter. *J Physiol* 191: 225—238, 1967.
- 15) Brooks VB: An intracellular study of the action of repetitive nerve volleys and of botulinum toxin on miniature endplate potentials. *J Physiol (Lond)* 134: 264—277, 1956.

- 16) **Simpson LL**: Studies on the mechanism of action of botulinum toxin. *Adv Cytopharmacol* 3: 27—34, 1979.
- 17) **Katz B, Miledi R**: Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 196: 59—72, 1977.
- 18) **Bülbring E, Hooton IN**: Membrane potentials of smooth muscle fibres in the rabbit's sphincter pupillae. *J Physiol (Lond)*, 125: 292—301, 1954.
- 19) **Suzuki R, Kobayashi S**: Effects of divalent cations on the spontaneous synchronization in mammalian iris sphincter muscle cells *Exp Eye Res* 42: 407—415, 1986.
- 20) **Lund-Karlsen R, Fonnum F**: The effect of locally applied cholinesterase inhibitors and oximes on the acetylcholinesterase activity in different parts of the guinea-pig eye. *Acta Pharmacol Toxicol* 38: 299—307, 1976.
- 21) **Mindel JS, Mittag TW**: Choline acetyltransferase in ocular tissues of rabbits, cats, cattle and man. *Invest Ophthalmol* 15: 808—814, 1976.
- 22) **Liao CS, Freer RJ**: Acetylcholine potentiation of field stimulated rat vas deferens: a pre-synaptic muscarinic mechanism *Life Sci* 33: 1861—1867, 1983.