

## 紫外線によるハムスター虹彩の縮瞳について

芳野 秀晃, 鈴木 亮, 中山 昌子, 栗本 晋二

山口大学医学部眼科学教室

### 要 約

ハムスターの瞳孔は網膜がなくても可視光線で縮瞳することが知られている。高等哺乳動物の瞳孔が波長に応じて縮瞳する可能性があるので、ハムスター瞳孔における紫外線照射の効果を調べた。摘出ハムスター瞳孔は紫外線に緩やかな縮瞳を生じ、縮瞳反応は約60秒で最大に達した。紫外線による縮瞳は ascorbic acid, catalase, allopurinol, indomethacin の影響を受けなかった。しかしこの縮瞳は十分な時間をかければ procaine や quinacrine や nordihydroguaiaretic acid で徐々に抑制された。また外液の  $Ca^{2+}$  と  $Mg^{2+}$  除去により縮瞳は強く抑制された。紫外線によってくり返し観察されたこの縮瞳反応はいわゆる酸素毒の効果でなく、細胞膜や phospholipase  $A_2$  と関連したものであることがわかった。(日眼会誌 94: 632-636, 1990)

キーワード: 紫外線, ハムスター瞳孔, 試験管内, プロカイン

## Effect of Ultraviolet Light on the Hamster Pupil

Hideaki Yoshino, Ryo Suzuki, Masako Nakayama and Shinji Kurimoto

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

### Abstract

This is the first study on the effects of ultraviolet light (UV) on the hamster pupil in vivo and in vitro. UV caused constriction of the pupil even after the death of the hamster. Both visible light and UV induced myosis of the enucleated hamster eyes. UV-induced miosis occurred very late and continued after the cessation of UV stimuli. The UV-induced miosis was not significantly affected by ascorbic acid, catalase, allopurinol, but it was gradually inhibited by procaine or quinacrine, phospholipase  $A_2$  inhibitors. Withdrawal of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  with EGTA and/or EDTA strongly inhibited the UV-induced miosis. This study suggests that the UV-induced miosis was not related to oxidative stress, but related to a second messenger via the muscle cell membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 632-636, 1990)

Key words: Ultraviolet Hamster pupil, In vitro, Procaine

## I 緒 言

網膜がなくても下等の脊椎動物(カエル, うなぎ等)の虹彩は光刺激で収縮することが古くから知られている<sup>1-4)</sup>。しかしながら, 高等の哺乳動物では光に対す

る瞳孔の反応は網膜と副交感神経を介したものである<sup>5)</sup>。摘出ラット瞳孔散大筋自体が可視光線に反応する可能性があるが<sup>6)</sup>, 極めて強力な可視光線で実験されている。

網膜がなければ一般に高等哺乳動物の虹彩は光では

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 鈴木 亮

(平成元年9月27日受付, 平成元年12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 September 27, 1989 and accepted in revised form December 28, 1989)

収縮しない<sup>5)</sup>。しかし死亡させた後も、atropine で処理してもハムスターの瞳孔は光で収縮することを私どもは見いだした<sup>7)</sup>。摘出眼球だけでなく網膜を除去した虹彩標本が光で収縮することから、高等動物であるハムスターに網膜機能を介さない光による縮瞳反応が存在することを示唆した<sup>7)</sup>。

しかし紫外線に対して縮瞳するか否か、また可視光線と紫外線とでその縮瞳機構に差がみられるのか否かはまだ報告がない。高等哺乳動物に網膜を介さない紫外線による瞳孔反応が存在するか否かを網膜を完全に除去したハムスターの虹彩標本を使って調べた。

## II 実験方法

ハムスター眼球の強膜、網膜、硝子体、水晶体を除去し実体顕微鏡で瞳孔径を測定した。この方法は内在性の筋のトヌスや薬物洗浄後の筋機能回復を知ることができない<sup>8)~10)</sup>が、簡便である。

照明装置 (FI-150, 杉浦電子, 東京) から、集光器により均一なスポット照明をファイバーで導き、照射光量は照度計によりルクス単位で測定し、各々専用のフィルターで目的とする波長を得た。光量は分光感度特性を補正し、虹彩面上と同じ照度と積算照度を測定出来るよう工夫した。目的とする光以外の影響を除くため、暗室で実験し、基準照度との偏差値測定を行った。温度によって虹彩筋のトヌスが変化したので、コールドミラーとコールドフィルターおよび外液に灌流液を流すことによりハロゲン光源の熱を遮断した。温度は UNI COOL (UC-65, 東京理科器械) により  $36.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$  に保った。

紫外線は位相差顕微鏡の光源に UV フィルターを用いて得た。実際に得られた紫外線の強度は model UVX digital radiometer (ウルトラバイオレット社, 米国) で測定した。紫外線照射法の概要を図 1 に示す。

灌流液の組成は  $\text{Na}^+$ 137.4,  $\text{K}^+$ 59,  $\text{Mg}^{2+}$ 1.2,  $\text{Ca}^{2+}$ 2.5,  $\text{Cl}^-$ 134.0,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 1.2,  $\text{HCO}_3^-$ 15.5, グルコース 11.5mM である。使用した薬物は acetylcholine, carbachol (和光純薬), pilocarpine HCl (Sigma), procaine HCl (Sigma), quinacrine (Sigma), nordihydroguaiaretic acid (NDGA, 和光), allopurinol (Sigma), ascorbic acid (AsA, Sigma), catalase (Sigma), AA861 (武田), FPL55712 (吉富), glycoetherdiamine-tetra-acetic acid (EGTA), disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA), nembutal (Abbot) である。ハムスターに 0.08cc nem-

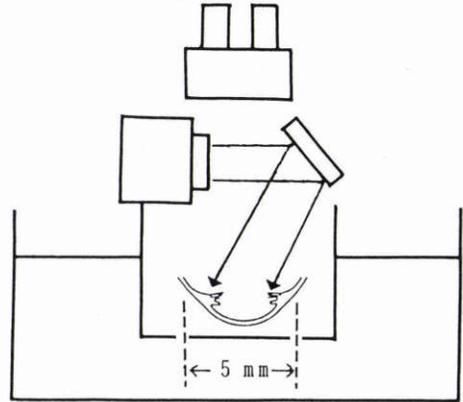


図1 紫外線照射の方法。ハムスター虹彩は3mlの自家製筋浴槽に浸し、温度( $36.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$ )を一定に保った。紫外線は可視光線と同様、縮瞳を生じたので実体顕微鏡で測定した。

butal を皮下注射した。

## III 結果

### ハムスター瞳孔

ハムスターは *in vivo* では約5mmの角膜径、300~500 $\mu\text{m}$ の瞳孔径を有する<sup>7)</sup>。暗室で散瞳し、可視光線のみならず紫外線で縮瞳する。アトロピンで散瞳し、暗室でさらに散瞳するが、アトロピンのもとでも可視光線や紫外線で縮瞳した (図2)。

### 紫外線の照射法

可視光線では光照射の方向によって瞳孔の効果が異なり、虹彩に直接照射すると、角膜や水晶体を介して照射するより、はるかに強力であった。

図3に紫外線を種々の方法で照射した場合の瞳孔の反応を示す。紫外線照射の方法は(a)水晶体を除去し、虹彩上皮を直接照射する (b) 眼球を赤道部より前方で切断、網膜を除去し角膜側から照射する (c) 網膜を除去するも水晶体をつけたまま照射する、以上の3通りである。(b) - (c) の場合で縮瞳効果の小さなき、水晶体を除くと、大きな縮瞳効果を示すようになった。虹彩上皮を直接照射する方法による縮瞳反応を100%としてそれぞれを比較した。角膜上ないし水晶体後方から照射すると、瞳孔反応が各々75%、40%と悪化した。そのため水晶体を除去し虹彩上皮側より紫外線を照射した。紫外線の瞳孔径に及ぼす効果や薬物応答性は角膜前方より照射する場合と比べて有意差はなかった。

### 瞳孔径の変化

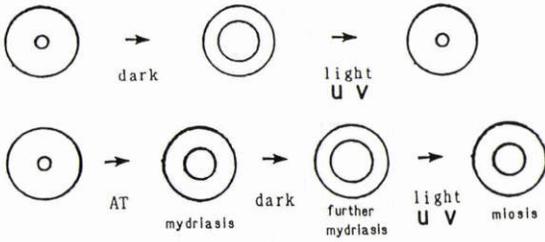
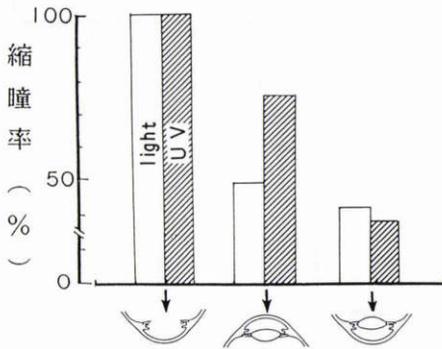


図2 ハムスター瞳孔の反応。光遮断(dark)とアトロピン(AT)で散瞳, 可視光線(light)と紫外線 UV で縮瞳した。



照射法による縮瞳率の違い

図3 紫外線の照射方向と瞳孔径。水晶体を除去し、虹彩の上皮を直接刺激したとき瞳孔径は最小となった。

紫外線照射による縮瞳は緩やかに生じた。可視光線では照射直後から縮瞳を開始した<sup>1)</sup>。光量が弱ければ縮瞳率は小さいが、縮瞳反応は迅速であった。

図4に照射時間と最大縮瞳を得るまでの時間関係を示した。紫外線では緩やかに縮瞳し最大縮瞳に達するまでの時間は約60秒であった。これは可視光線で速やかに縮瞳する場合と対照的であった。

照射時間が5秒より短いと、可視光線の場合と異なり瞳孔反応はほとんど生じなかった。回復の時間経過は照射時間と共に延長した。例えば60秒照射したときは回復に約10分必要とした。

#### ascorbic acid (AsA)

AsA (1~3mM) は瞳孔径を変化させなかった。

#### catalase (CAT)

瞳孔は  $3 \times 10^{-5}$ M 以上の CAT で縮瞳した。ごく僅かしか縮瞳しない最高濃度の CAT ( $10^{-5}$ M) で30~60分間虹彩を処理しておいても紫外線照射で十分に縮瞳した。すなわち CAT  $10^{-5}$ M 1時間後、紫外線に対しな

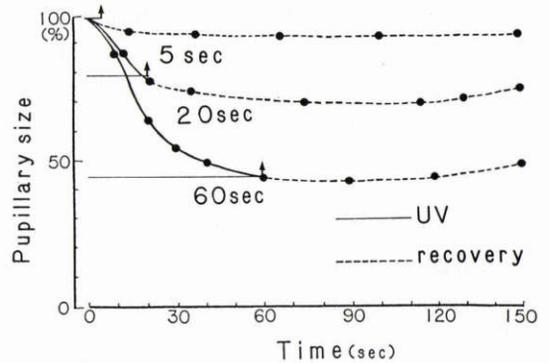


図4 ハムスター瞳孔径におよぼす紫外線の照射時間と最大縮瞳を得るまでの時間経過。紫外線の効果は極めて遅くあらわれ、回復にも長い時間を要した。—UV 照射時間, ---照射中止後の回復過程。

お46%の縮瞳率を示した。

#### allopurinol

allopurinol ( $10^{-3}$ — $10^{-6}$ M) を長時間(150分)作用させても紫外線による縮瞳は抑制されなかった。瞳孔径に及ぼす allopurinol 自体の効果も小さかった。

#### AA861および FPL55712

AA861や FPL55712は120分間作用させても紫外線収縮を抑制できなかった。

#### indomethacin

indomethacin では同反応は抑制されなかった。

#### procaine

procaine (5mM) を用いると紫外線による縮瞳は次第に抑制された。図5に30, 60, 180分のときの瞳孔反応を示す。5mM より高濃度では経時的に紫外線による縮瞳を抑制することが出来た。1~3mM の低濃度でも長時間作用させると抑制効果を示した(図5)。摘出虹彩標本は時間と共に紫外線に対する応答が少しずつ減少する可能性があるため、薬物を付加しないときの縮瞳量を基準にした。

#### quinacrine

quinacrine でも紫外線による縮瞳は次第にわずかつ抑制された。すなわちこの縮瞳は phospholipase  $A_2$  を十分に阻害する  $10^{-4}$ M では120分後に20%以下にまで抑制された。

#### NDGA

NDGA は約60分後から、紫外線による瞳孔反応を抑制したが15%以内であった。

#### Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>除去効果

紫外線による縮瞳が外液 Ca<sup>2+</sup>や Mg<sup>2+</sup>を除去する

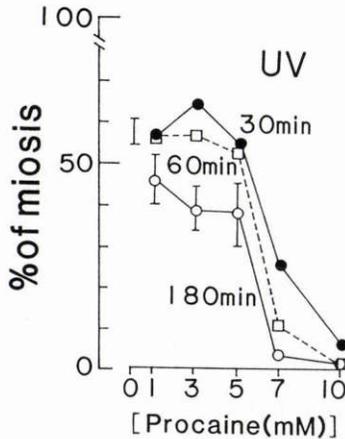


図5 紫外線の最大縮瞳率に及ぼす procaine の効果. 時間と共に紫外線に対する摘出標本の応答性が減少するため、薬物作用前の縮瞳量を100とした。

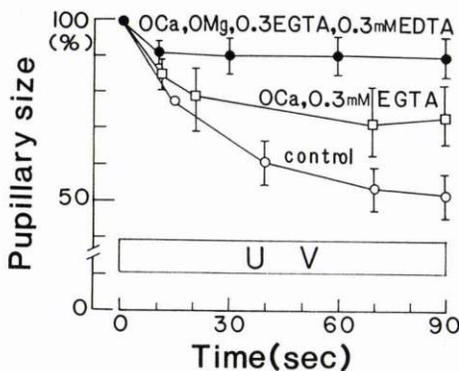


図6 紫外線による縮瞳におよぼす  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  除去効果. 外液より  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  を除去し、各々 0.3mM EGTA, EDTA を加えた。

ことでどの程度抑制されるかを調べた。図6に示したごとく  $Ca^{2+}$  除去だけでは紫外線の効果は完全には遮断できなかった。  $Mg^{2+}$  を除去することにより縮瞳率とその速度が著明に減少した。カチオンを除くと可視光線で認められた初期の縮瞳反応<sup>7)</sup>が紫外線では全く認められなかった。

#### IV 考 按

紫外線でハムスター瞳孔は死亡後も、網膜を除去しても、そしてアトロピンの下でも縮瞳した。この縮瞳の特徴は反応が緩やかに生じることで、最大縮瞳に達するまで約60秒必要とした。また照射時間が短いとほとんど縮瞳しなかった。これは以前に報告した可視光

線による縮瞳反応<sup>7)</sup>と異なる。

縮瞳は虹彩上皮側から紫外線を照射したときに最も強力であった。水晶体後面や角膜側からの紫外線による縮瞳は弱かったが、角膜や水晶体を取り除くと十分な縮瞳を示した。紫外線は波長が短いため角膜や水晶体の影響を受け易く、そのことによって縮瞳効果が異なると考えた。

紫外線による縮瞳は AsA の影響を受けなかった。紫外線は活性化酸素を介して虹彩の縮瞳をひきおこすと予想したが、くりかえし縮瞳が生じることと AsA, catalase や allopurinol で収縮が変化しないことから活性化酸素とは別の作用機構が示唆された。

この縮瞳反応は外液  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  を除去することで減少し、時間をかければ procaine や quinacrine で抑制された。抑制効果の発現に長時間を必要とはしたが、この紫外線の反応は phospholipase A2 を介したものと考えた。この反応は prostaglandins<sup>11)</sup> の合成阻害である indomethacin で影響されず、NDGA でわずかに抑制されたが AA861 や leucotriene  $C_4$ ,  $D_4$  の拮抗薬とされる FPL55712 で抑制されなかったので、正確な作用部位を特定することは困難である。

高等の哺乳動物では虹彩が直接、光に反応するとは考えられていなかった<sup>5)13)</sup>。しかし本研究で高等哺乳動物にも網膜機能を介さない瞳孔の反応が存在することがわかった。可視光線での報告(虹彩<sup>7)</sup>, 血管<sup>12)</sup>)と類似点もあるが、時間経過や外液のカチオンに対する反応が異なっていたので、縮瞳発生の機構について可視光線と紫外線の違いを更に検討したい。

本研究は文部省科研一般 C02807164 および内藤記念財団の援助を受けた。あつく感謝します。

#### 文 献

- 1) Weale RA: Observations on the direct effect of light on the irides of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis*. *J Physiol Lond* 132: 257-266, 1956.
- 2) Bridges CDB: Visual pigments of some common laboratory mammals. *Nature Lond* 184: 1727-1728, 1959.
- 3) Seliger HH: Direct action of light in naturally pigmented muscle fibers. I. Action spectrum for contraction in eel iris sphincter. *J Gen Physiol* 46: 333-342, 1962.
- 4) Barr L, Alpern M: Photosensitivity of the frog iris. *J Gen Physiol* 46: 1249-1265, 1963.
- 5) Thompson HS: The pupil and the autonomic nervous system. In "Neuro-Ophthalmology. Vol

- 1" (Ed Lessell S, van Dalen JTW). *Excepta Medica*, Amsterdam, Oxford, Princeton, 226—240, 1980.
- 6) 増田 豊, 今泉祐二, 渡辺 稔: ラット虹彩散瞳筋の光誘発性収縮について. *日本平滑筋誌* 21: 332—334, 1985.
- 7) 芳野秀晃, 鈴木 亮, 中山昌子, 他: 網膜機能を介さない可視光線による瞳孔の反応について. *日眼会誌* 投稿中.
- 8) Suzuki R, Kobayashi S: Different effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on the motor function of bovine intraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1566—1571, 1983.
- 9) Suzuki R, Kobayashi S: Effects of divalent cations on the spontaneous synchronization in mammalian iris sphincter muscle cells. *Exp Eye Res* 42: 407—415, 1987.
- 10) Suzuki R, Kobayashi S: Muscle tone and drug sensitivity of isolated bovine iris sphincter are enhanced at low temperatures. *Graefes Arch Ophthalmol* 225: 137—140, 1987.
- 11) Ambache N, Kavanagh L, Whiting J: Effect of mechanical stimulation on rabbits eyes: Release of active substance in anterior chamber perfusates. *J Physiol (Lond)* 176: 378—408, 1965.
- 12) Furchgott RF, Ehrreich SJ, Greenblatt E: The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta. *J Gen Physiol* 44: 499—519, 1961.
- 13) Lowenstein O, Loewenfeld IE: The pupil, In the Eye (Edited by Davson H). Academic Press, New York, Vol 3, 255—337, 1969.
-