

ラット虹彩毛様体のノルエピネフリン含量及びそれに対する α_2 受容体刺激剤アプラクロニジン点眼の影響

広松 正児¹⁾, 新家 真²⁾, 藤森観之助³⁾

¹⁾広松眼科, ²⁾東京大学医学部眼科学教室, ³⁾国立衛生試験所薬理

要 約

ラット虹彩毛様体組織中の生理的カテコールアミン量を正確に測定するために、マイクロ波照射装置にて代謝酵素を不活性化し、高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器を用いて測定を行った。虹彩毛様体組織蛋白量当りのノルエピネフリン量は $3.56 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ ($21.1 \pm 1.3 \text{ nmol/g}$) (平均 \pm 標準誤差, $n=7$) であり、ドーパミン、エピネフリンなど他のカテコールアミンは検出限界下だった。又この測定方法を利用して、 α_2 受容体刺激剤アプラクロニジン (0.05%) 5 μl 点眼の虹彩毛様体組織中のノルエピネフリン含量に及ぼす影響を調べたところ、点眼1時間時点で7.7%の増加を認めた ($p < 0.05$)。 (日眼会誌 96: 580—586, 1992)

キーワード：ラット虹彩毛様体, ノルエピネフリン, マイクロ波, 高速液体クロマトグラフィー, アプラクロニジン

Effects of α_2 -agonist Apraclonidine on Norepinephrine Levels in the Rat Iris-ciliary Body

Shouji Hiromatsu¹⁾, Makoto Araie²⁾ and Kannosuke Fujimori³⁾

¹⁾Hiromatsu Eye Clinic

²⁾Department of Ophthalmology, Tokyo University School of Medicine

³⁾Division of Pharmacology, Biological Safety Research Center,
National Institute of Hygienic Sciences

Abstract

In an attempt to estimate the *in vivo* catecholamine level in rat iris-ciliary body, animals were sacrificed by microwave irradiation which rapidly inactivates metabolic enzymes. Catecholamine levels in the iris-ciliary body were determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. The norepinephrine level in rat iris-ciliary body per gram tissue protein was $3.56 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ ($21.1 \pm 1.3 \text{ nmol/g}$) (mean \pm SEM, $n=7$). Neither dopamine nor epinephrine were detected. A single instillation of 5 μl of an 0.05% apraclonidine (α_2 -agonist) to one eye of a rat increased the norepinephrine level in the iris-ciliary body by 7.7% one hour after administration ($p < 0.05$). (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 580—586, 1992)

Key words: Rat iris-ciliary body, Norepinephrine, Microwave, High-performance liquid chromatography, Apraclonidine

別刷請求先：299-01 市原市姉崎 532 広松眼科 広松 正児
(平成3年7月17日受付, 平成3年12月11日改訂受理)

Reprint requests to: Shouji Hiromatsu, M.D. Hiromatsu Eye Clinic, 532 Anesaki, Ichihara 299-01, Japan
(Received July 17, 1991 and accepted in revised form December 11, 1991)

I 緒 言

虹彩毛様体には、自律神経である交感神経及び副交感神経が豊富に分布しており、瞳孔反応、調節機能のみならず、血流動態や眼圧調節機能に密接に関連している。虹彩毛様体に分布している交感神経は、上頸神経節からの節後線維であり、その神経伝達物質はノルエピネフリン (NE) である¹⁾。虹彩毛様体における交感神経系の作用や活動度の変化を研究するうえで、神経伝達物質である NE 量の正確な測定は不可欠である。しかし、一般に神経伝達物質には代謝が速いことが知られており、例えば、室温におけるラット断頭3分後の線条体内の NE 量は、断頭直後の NE 量の約 60% と報告されている²⁾。

従来眼科領域で虹彩毛様体の NE 量測定に使用された組織分離や試料調整の方法は、水冷法³⁾又は液体窒素による凍結法⁴⁾である。しかし、水冷法は代謝酵素の不活性化が不十分である。また凍結法の問題点は、小動物を屠殺後、取り出した組織内部までの完全凍結に要する時間が比較的に長いために死後変化を完全に除外できないこと、凍結組織を対象とするための特定部位を分離する操作に困難が伴うこと、及び組織内の酵素活性は凍結により不活性化されるが、この変化は可逆性であるために組織分離や試料調製のための部分融解で再び不安定物質の変動が始まること等である⁵⁾。

近年、脳組織における神経伝達物質の定量にさいしては、マイクロ波 (Mw) 照射による代謝酵素の不活性化が標準的となった²⁾。本法は Mw 照射により、組織内の水分子相互の摩擦を惹起させることにより急激な熱発生を招来し、この熱により、速やかに酵素蛋白を不可逆的に変性—不活化させるものである。本法は凍結法に比較して、その酵素の不活性化が不可逆性であるために再融解にともなう変化の可能性がないこと、固定が迅速に行えること、また凍結組織でないために組織の摘出や特定部位の分離など固定後の取扱いが容易であること、などのいくつかの利点を持っている⁵⁾。今回、我々は生理的状态における虹彩毛様体中のカテコールアミン (CA) 含量の正確な測定を目的として、Mw 照射法によりラット虹彩毛様体組織を固定、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)/電気化学検出器 (ED) を用いて組織中 CA の同定を行った。また新しい眼圧下降薬として注目されている α_2 -agonist アブラクロジンの作用機構の解明の一助として、アブラクロジン点眼の虹彩毛様体 NE 含量に及ぼす影響もあ

わせ検討したのでこれらの結果を報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

Wistar 系雄ラット (7 週齢から 10 週齢、平均体重 240 g: 埼玉実験動物) を使用した。

2. 薬物

使用した薬物はノルエピネフリン (NE)、エピネフリン (Ep)、ドーパミン (DA)、3, 4-dihydroxybenzylamine (DHBA)、塩酸アブラクロジンであった。NE、Ep、DA、DHBA は Sigma (St. Louis, Missouri, U.S.A.) より購入、塩酸アブラクロジンは 1% 眼科用点眼溶液として Alcon Lab Inc. (Fort Worth, Texas, U.S.A.) より供与を受けた。

3. 照射条件の決定

ラットを専用ホルダーにて固定し、頭部に Mw 照射装置 (NJE 2603 新日本無線、東京) により Mw (9.5 kW, 2,450 MHz) を照射屠殺した。照射時間は 0.6、0.7、0.8、0.9 又は 1.0 秒であり、照射屠殺後、先端に熱電対を装填した針を眼球内部 (硝子体中) に穿刺し、Digital Multithermometer (TR-2112 A, アドバンテクト、東京) にて照射 30 秒後の眼球内部の温度を測定した。その後眼球内各組織を実体顕微鏡下に観察した。

4. 組織の固定

前実験の結果より、照射条件は 9.5 kW, 0.9 秒間とした。速やかに両眼球を摘出、赤道部に割をいれ、実体顕微鏡下にて、眼球内部より虹彩毛様体を分離した。5 匹、10 眼の虹彩毛様体をまとめて 1 サンプルとし、0.02% EDTA 及び内部標準として DHBA 10 ng を含む 0.2 N 過塩素酸 1 ml 中で氷冷下ホモジナイズした。その後サンプルは、20 分間 10,000 g にて遠心分離を行い、その上清をポア径 0.45 μm のミリポアフィルター (Millipore Type HA, 日本ミリポア工業、米沢) にて濾過後、測定時まで -30°C で冷凍保存した。一方沈査は 0.1 N NaOH で溶解後 Lowry 法⁶⁾による組織蛋白定量に供した。

5. CA の定量

1) アルミナ吸着法による定量

CA の定量では CA をアルミナに吸着、分離させてから定量する方法が標準的である⁷⁾。上清を解凍後、その一部 0.3 ml に 0.4 M K_2CO_3 0.05 ml 及び 1.2 M トリスバッファー 0.1 ml (pH 8.6) を添加混合し、酸化アルミナ 250 mg を詰めた微小カラム (1 ml Eppendorf tip) に通過せしめた。酸化アルミナを 0.3 ml の

蒸留水で2度洗浄した後、酸化アルミナに吸着されたCAを0.2 N 塩酸0.3 mlで溶出させた。溶出は4回を行い、各々のサンプル20 μ lをHPLCに注入し、EDによりカテコールアミン量を定量した。

標品としては、NE, Ep, DA, DHBAをそれぞれ3 ng含有する0.3 ml混合標準溶液を上記と同じ手順で注入した。定量値はデータプロセッサにて得られたクロマトグラムのピーク高を用いて内部標準DHBAの回収率より計算した。

測定装置はHPLC (LC-304, Bioanalytical Systems, Lafayette, Indiana, U.S.A.), プレカラム, 分析カラム (BAS 日本, 東京), グラスカーボン電極 (TC-5, Bioanalytical Systems) を装備したED (LC-4 B, Bioanalytical Systems), クロマトグラフィック データプロセッサ (C-R 3 A, 島津, 京都) から成り立っている。移動相は Mengら⁸⁾の方法に基づき, 1.03 mM EDTA, 0.008% sodium octyl sulphate, 5% acetonitrileを含む0.013 M クエン酸-0.006 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) を採用し, 流速は1.0 ml/分とした。プレカラム (30 \times 4.6 mm) と分析カラム (250 \times 4.6 mm) の充填剤は Biophase ODS (5 μ m 粒子) (PN 6017, BAS 日本) であった。電位は Ag/AgCl に対して +700 mV とした。

2) 直接法による定量

次に1)の方法の手技を簡略化する目的で、アルミナ吸着をはぶく測定法の可能性を検討した。実際には1)の実験に使用した解凍後上清の一部をHPLCに20 μ l注入、測定した。

標品及び測定条件は1)と同様とした。

6. アブラクロニジン点眼実験

ラット片眼に5 μ l, 0.05% 塩酸アブラクロニジンを、他眼に5 μ l 生理食塩水を点眼し、1時間後、ラット頭部に Mw (9.5 kW, 2,450 MHz) を0.9秒間照射した。(点眼後屠殺するまでの時間は、ヒトにおいて1%アブラクロニジン点眼1時間後に有意な眼圧下降を示す⁹⁾ことを参考に決定した。)その後、直接法にてNE量の測定を行った。なおこの場合、10匹のアブラクロニジン点眼側または生理食塩水点眼側の虹彩毛様体をまとめて1サンプルとした。

III 結果

1. MW 照射時間と眼球内温度及び実体顕微鏡所見

Mw 照射時間と照射後30秒の眼球内温度は84.9℃

(0.6秒)から91.7℃(0.9秒)までほぼ直線的に増加した(図1)。1.0秒照射では5眼中3眼に破裂がみられた。また実体顕微鏡下の観察では、0.6秒以上の照射で、水晶体の内部まで完全白濁が観察され、0.8秒以上の照射で、虹彩毛様体の血管が赤茶色の線として明瞭に観察された。この結果よりできるだけ眼球内の温度を眼球が破裂せぬ程度に上げ、かつ虹彩毛様体の同定が容易である Mw の照射時間、0.9秒を以後の実験で採用した。同機種を用いた場合、9 kW の Mw 0.8秒照射後60秒以内のラットの脳内温度が94.0℃である¹⁰⁾ことからこの照射時間で充分であると思われる。

2. CA の定量

1) アルミナ吸着法による定量

図2 a, b に HPLC クロマトグラムを示す。(a は標品, b はサンプル) 標品の溶液では2回めと3回めの塩酸溶出でほとんどのCAが溶出された。サンプルでは標品溶液における同様にNEとDHBAのピークは塩酸溶出2回めと3回めにほとんどが現れたが、Ep, DAのピークは認められなかった。標品, サンプルのNE, DHBAのピークの高さ、注入量、虹彩毛様体組織蛋白量より、虹彩毛様体組織蛋白量当りのNE量を計算すると、 $3.29 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$ ($19.5 \pm 2.3 \text{ nmol/g}$) (平

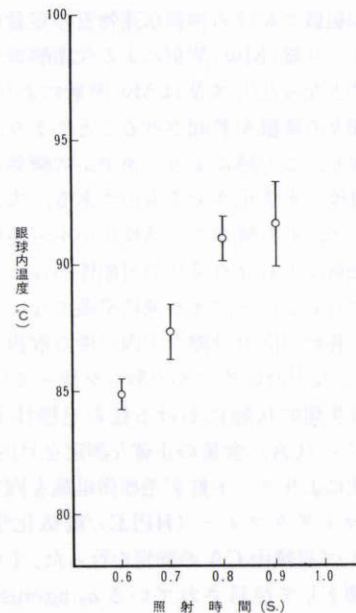


図1 マイクロ波照射時間と眼球内温度の関係、Mw 出力9.5 kW, 平均値±標準誤差, n=3

均値±標準誤差, n=7) となった。

2) 直接法による定量

図3 a, bにHPLCクロマトグラムを示す(aは標品, bはサンプル), アルミナ呼着法によるものと同じ retention timeにNEに一致するピークのみがみられ, またEp, DAに一致するピークはみられなかった。虹彩毛様体組織蛋白量当りのNE量は $3.56 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ ($21.1 \pm 1.3 \text{ nmol/g}$) (平均値±標準誤差, n=7) となり, 1)の結果と有意差を認めなかった(unpaired t-test $p > 0.2$)。NE量が1)の結果と差がないことより2)のNEに一致するピークにNE以外のピークが重なっている可能性はなく, このピークは純粋にNEのみのピークであるといえる。つまり直接法でもNE量の測定が可能であることが示された。故に以下の測定には2)の方法を使うことにした。

3. アブラクロニジン点眼実験

アブラクロニジン点眼群の虹彩毛様体組織蛋白量当りのNE量は, $4.18 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ ($24.7 \pm 0.8 \text{ nmol/g}$) (平均値±標準誤差, n=10) で, 生理食塩水点眼群の

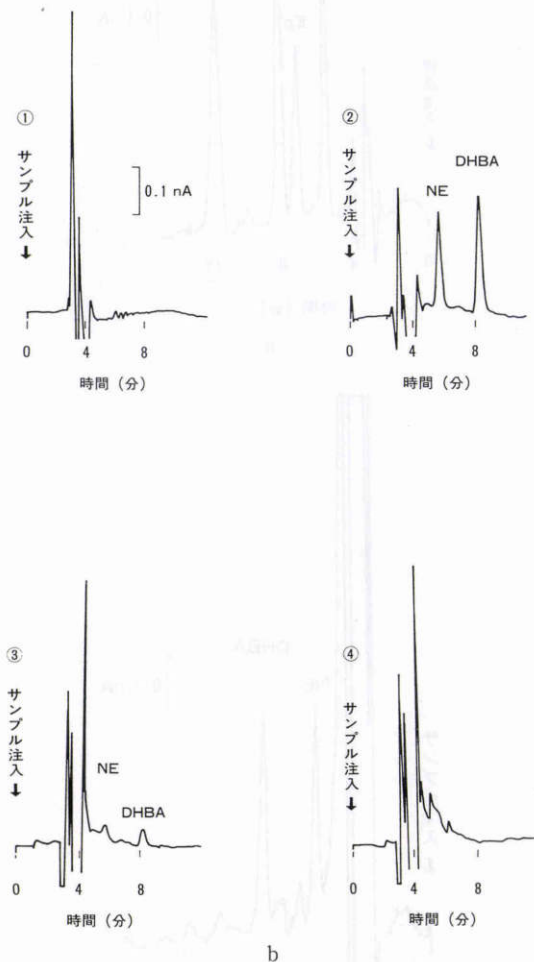
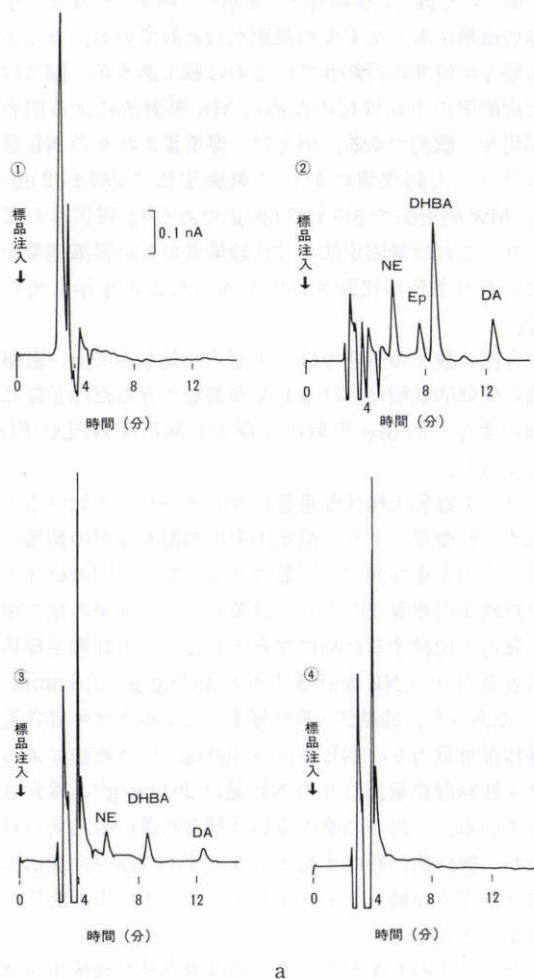


図2 HPLCクロマトグラム (アルミナ吸着法)。

a. NE, Ep, DA, DHBAの標品混合溶液のクロマトグラム。NE, Ep, DA, DHBAをそれぞれ3ng含有する0.3ml標品混合溶液をアルミナカラムに通した。①, ②, ③, ④はそれぞれ0.2N塩酸0.3mlを用いたそれぞれの溶出の回数のクロマトグラムを示す。注入量は $20 \mu\text{l}$ とした。検出器レンジはフルスケール1nAとした。b. ラット虹彩毛様体抽出物のクロマトグラム。サンプルには内部標準としてDHBAを加えた。(10ng/ml) 10000gの遠心分離後の上清0.3mlをアルミナカラムに通した。①, ②, ③, ④はそれぞれ0.2N塩酸0.3mlを用いた溶出のそれぞれの回数のクロマトグラムを示す。注入量は $20 \mu\text{l}$ とした。検出器レンジはフルスケール1nAにした。

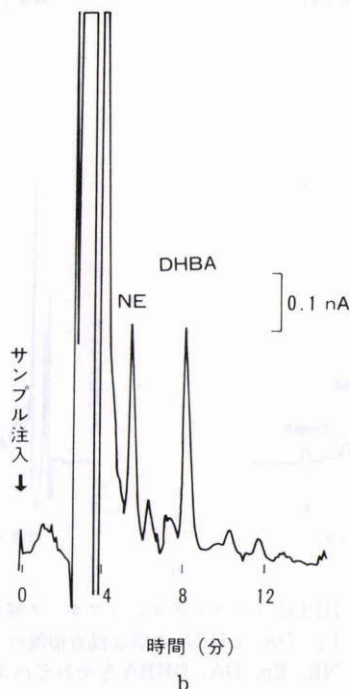
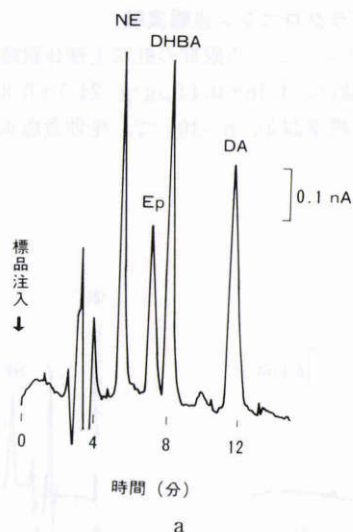


図3 HPLCクロマトグラム(直接法)。

a. NE, Ep, DA, DHBAの標品の混合溶液のクロマトグラム。標品溶液1 ml中にはNE, Ep, DA, DHBAをそれぞれ10 ng含有し、注入量は20 μ lとした。検出器レンジはフルスケール1 nAにした。b. ラット虹彩毛様体抽出物のクロマトグラム。サンプルには内部標準としてDHBAを加え(10 ng/ml)、注入量は20 μ lとした。検出器レンジはフルスケール1 nAにした。

表1 NE含量に及ぼすアブラクロニジン点眼の影響

点眼	n	NE μ g/g 蛋白
生理食塩水	10	3.88 \pm 0.13
アブラクロニジン	10	4.18 \pm 0.14*

生理食塩水を片眼に、0.05%アブラクロニジンを他眼に5 μ l点眼した。10匹のラット片眼の虹彩毛様体をまとめて1サンプルとした。nはサンプル数である。表示した値は平均値 \pm 標準誤差、*はpaired t-testで5%の有意を示す。

それは、3.88 \pm 0.13 μ g/g (23.0 \pm 0.8 nmol/g) (平均値 \pm 標準誤差, n=10)であり、アブラクロニジンにより7.7%有意に増加した (paired t-test $p < 0.05$)。また生食点眼群のその含量は前実験で求めた値と有意差がなかった (unpaired t-test $p > 0.2$)

IV 考 按

脳¹⁰⁾、心臓¹¹⁾、輸精管¹²⁾、血清¹³⁾、血漿¹¹⁾¹³⁾などの生体の組織においてCAの測定が行われている。もっとも盛んに研究が行われているのは脳であるが、脳では代謝酵素の不活性化のためにMw照射法による固定が現在一般的である。例えば、湿重量あたりのNE量はラット大脳皮質において無固定法で289 \pm 42 ng/g、Mw照射法で543 \pm 37 ng/gである⁹⁾と報告されており、これは無固定法では代謝酵素のため組織調整中にかなりNEが代謝されてしまったことを示している。

今回の我々の研究では、上記の知見をふまえ、眼組織の生理的状態におけるCA含量をできるだけ正確に測定するためMw照射法を採用し測定はHPLC/EDによった。

ラット虹彩毛様体湿重量はウサギやウシと比べるとはるかに微量であり、測定中室内の湿度などの影響を受けその正確な測定は困難である。故に今回の研究では組織蛋白重量当りとして計算したが、従来の他の種の報告と比較するために参考としてラット虹彩毛様体質重量当りのNEを計算すると467 ng/g (2.8 nmol/g)であった。凍結法(液体窒素)によるウサギ虹彩毛様体湿重量当りのNE量は5,400 ng/g⁴⁾、氷冷法によるウシ虹彩湿重量あたりのNE量は292 ng/g³⁾と報告されている。これらの値の違いは種差の違いも考えられるが、凍結法、特に氷冷法では、すでに述べた理由により生理的な値よりも変化してしまっている可能性が否定できない。

サンプルのCAをアルミナに吸着させた後溶出させ

て、HPLCに注入する方法はCAの分離、測定法としてすでに確立された方法であるが⁷⁾、手技が煩雑で、今回のような少量の測定において他の組織に比べ回収率に問題があると思われた。今回我々は、同一サンプルの一部をアルミナ吸着-溶出の過程を省いて直接HPLCに打ち込み(直接法)、結果をアルミナ吸着法と比較した。両方法で得られたNEと考えられるピークのretention timeは同じで、計算されたNEの測定量にも差がなかった。換言すれば直接法のNEのピークにNE以外のピークの重なっている可能性は無く、直接法はNE測定のための簡便法として使用しうると考えられた。

ところでアブラクロニジンは交感神経 α_2 受容体刺激剤であり、眼圧下降作用を持つclonidineの誘導体である。clonidineは血液脳関門を通過し著明な血圧下降を引き起こすが、アブラクロニジンはこの欠点を軽減させる目的で開発された¹⁴⁾。眼圧下降の作用機序は主に房水産生を下げることによるもので、房水流出能に影響を及ぼさないことが明らかにされているが⁹⁾¹⁵⁾、本剤は特にアルゴンレーザートラベクトラスティー及びアルゴンレーザー虹彩切開術の術後眼圧上昇に対して、他の薬剤と違い、効果的にそれを抑制し¹⁶⁾、現在注目されている薬剤である。

今回アブラクロニジンの虹彩毛様体中のNE含量に及ぼす影響を調べた結果、組織蛋白量当りではアブラクロニジンはNE含量を有意に増加させることが明らかとなった。測定したNE含量の変動は、虹彩毛様体組織に存在する交感神経終末中のNE量の変動を示しており、測定結果はアブラクロニジンが交感神経終末中のNE量を増加させたことを示唆する。ウサギ虹彩毛様体のin vitro実験で α_2 -agonistは前シナプス性に神経終末よりのNE放出を抑制することが知られている¹⁷⁾。従って同様の機構(presynaptic regulation)¹⁸⁾がラットの虹彩毛様体に存在すれば、神経終末中のNE量は α_2 -agonistで増加するはずであり、我々がin vivoの虹彩毛様体組織に於て得た結果はこれに一致する。

虹彩毛様体のNE含量の正確な測定は、眼の交感神経系の調節、散瞳、眼血流動態、眼圧のコントロールに対する作用を研究する上での基礎的知識となる。今回の我々の結果は、虹彩毛様体組織の生理的なCA量を、Mw照射法を初めて応用することにより、最も正確に測定したものであり、その意義が大きいと考えられる。また薬剤による組織中の神経伝達物質の量の変

動を調べることはその薬剤の作用機序の解明の一助になると考えられる。今回アブラクロニジンによる神経終末のNE量の変動を検出できたことは、本法が眼組織における交感神経系の生理及び薬理の研究に有用であることを示している。

文 献

- 1) **Sears ML**: Catecholamines in relation to the eye, in Greep RO, Astwood EB (eds): Handbook of physiology Sec 7, Vol 6. Washington, DC, Am Physiol Soc, 553—590, 1975.
- 2) **Ikarashi Y, Maruyama Y**: Use of 10 kW microwave irradiation to prevent post mortem changes in rat brain central nervous system biogenic amine levels, in Blank CL, Howard S, Maruyama Y (eds): Microwave Irradiation for Histological and Neurochemical Investigations, Tokyo, Soft Science Publications, 1—9, 1989.
- 3) **横田健司, 栗本晋二, 柳原延章, 他**: ウン虹彩のカテコールアミンとその生合成. 日眼会誌 92: 139—145, 1988.
- 4) **Gherezghiher T, Koss MC**: Quantative assessment of ocular norepinephrine concentration in the rabbit using liquid chromatography with electrochemical detection. Ophthalmic Res 17: 65—71, 1985.
- 5) **栗山欣弥, 村松 信, 結城竹彦**: マイクロウェーブ照射による脳内神経伝達物質代謝関連酵素の不活性化. 丸山悠司編: 中枢薬理におけるマイクロウェーブ照射法の理論と応用. 東京, ソフトサイエンス社, 81—90, 1981.
- 6) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al**: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265—275, 1951.
- 7) **Well-Malherbe H, Bone AD**: The chemical estimation of adrenaline-like substances in blood. Biochem J 51: 311—318, 1952.
- 8) **Meng QC, Chen Y, Oparil S**: A simple method of biogenic amines and their metabolites from biological samples for analysis by HPLC-EC. Life Sci 44: 1207—1213, 1989.
- 9) **Robin AL**: Short-term effects of unilateral 1% apraclonidine therapy. Arch Ophthalmol 106: 912—915, 1988.
- 10) **Ikarashi Y, Maruyama Y**: High-performance liquid chromatographic analysis of regional catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in rat brain following microwave irradiation. Biogenic Amines 1: 341—357, 1984.
- 11) **Eriksson BM, Persson BA**: Determination of catecholamines in rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electro-

chemical detection. *J Chromatogr* 228: 143-154, 1982.

12) **Oishi R, Mishima S, Kuriyama H**: Determination of norepinephrine and its metabolites released from rat vas deferens using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sci* 32: 933-940, 1982.

13) **Davis GC, Kissinger PT**: Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase liquid chromatography. *Anal Chem* 53: 156-159, 1981.

14) **Cavero I, Depoortere H, Lefevre-Borg F**: Pharmacological studies on paraaminoclonidine. *Br J Pharmacol* 69: 295-296, 1980.

15) **Gharagozloo NZ, Relf SJ, Brubaker RF**: Aqueous flow is reduced by the alpha adrenergic agonist apraclonidine. *Ophthalmology* 95: 1217-1220, 1988.

16) **Brown RH, Stewart RH, Lynch MG, et al**: ALO2145 reduces the intraocular pressure elevation following anterior segment laser surgery. *Ophthalmology* 95: 378-384, 1988.

17) **Jumblatt JE, Liu JGH, North GT**: Alpha-2 adrenergic modulation of norepinephrine secretion in the perfused rabbit iris-ciliary body. *Curr Eye Res* 6: 767-777, 1987.

18) **Langer SZ**: Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 32: 337-363, 1981.