

## ラット虹彩毛様体のアセチルコリン含量及び それに対するアトロピン点眼の影響

広松 正児<sup>1)</sup>, 新家 真<sup>2)</sup>, 藤森観之助<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>広松眼科, <sup>2)</sup>東京大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup>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アセチルコリン含量を測定するために、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アセチルコリン量は  $58.8 \pm 5.0$  nmol/g (平均±標準誤差, n=9) であった。又この測定方法を利用して、アトロピン (0.05%) 5  $\mu$ l 点眼の虹彩毛様体組織中のアセチルコリン含量に及ぼす影響を調べたところ、点眼30分後で組織蛋白量あたり17%のアセチルコリン含量の減少を認めた ( $p < 0.02$ )。 (日眼会誌 96: 587-591, 1992)

キーワード: ラット虹彩毛様体, アセチルコリン, マイクロ波, 高速液体クロマトグラフィー, アトロピン

## Effects of Atropine on Acetylcholine Levels in the Rat Iris-ciliary Body

Shouji Hiromatsu<sup>1)</sup>, Makoto Araie<sup>2)</sup> and Kannosuke Fujimori<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Hiromatsu Eye Clinic

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Tokyo University School of Medicine

<sup>3)</sup>Division of Pharmacology, Biological Safety Research Center,  
National Institute of Hygienic Sciences

### Abstract

In an attempt to estimate the in vivo acetylcholine level in rat iris-ciliary body, animals were sacrificed by microwave irradiation which rapidly inactivates metabolic enzymes. Acetylcholine levels in the iris-ciliary body were determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. The acetylcholine level in rat iris-ciliary body per gram tissue protein was  $58.8 \pm 5.0$  nmol/g (mean  $\pm$  SEM, n=9). A single instillation of 5  $\mu$ l of an 0.05% atropine to one eye of a rat decreased acetylcholine level in the iris-ciliary body by 17% half an hour after administration ( $p < 0.02$ ). (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 587-591, 1992)

**Key words:** Rat iris-ciliary body, Acetylcholine, Microwave, High-performance liquid chromatography, Atropine

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、調節機能のみでなく、眼内血流動態や眼圧調節機能に密接に関与している。虹彩毛様体に分布している副交感神経は、従来毛様神経節からの節後線維であるとされてきたが、近年翼口蓋神経節からの節後線維の存在も示唆されており、その神経伝達物質はアセチルコリン (ACh) である<sup>1)2)</sup>。

虹彩毛様体における副交感神経系の作用や薬理を研究するうえで、神経伝達物質である ACh 量の正確な測定は重要である。一般に神経伝達物質は代謝が速く、脳内 ACh は死後においても著しい代謝変化を受け、脳内含量が速やかに低下することが知られている<sup>3)4)</sup>。

従来動物眼虹彩の ACh 量測定は液体窒素による凍結固定法により行われた<sup>5)</sup>。凍結法の問題点は、小動物を屠殺後、組織を内部まで完全に凍結するのに要する時間が比較的長いために死後変化を完全に除外できないことにある。また他の欠点として、凍結組織を対象とするため、特定部位を分離する操作に困難が伴うことや、組織内の酵素活性の凍結による不活性化は可逆性であるために試料調整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、凍結組織では氷の結晶形成のために細胞膜の破壊が起こり、既存の ACh などは分解される可能性があることなどである<sup>6)</sup>。

一方マイクロ波 (Mw) 照射法を用いて代謝酵素の不活性化を行う方法は、現在特に脳内神経伝達物質の研究に広く使用されている方法である。Mw 照射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試料調整的にも神経伝達物質の変化の可能性がないこと、組織の固定が迅速に行えること、また凍結組織でないために特定組織の分離など固定後の取扱いが容易であること、などの特徴を持っている<sup>6)</sup>。

現在まで眼科領域で報告されている ACh の測定方法は、enzymatic assay<sup>5)</sup>、bioassay、radiometric assay<sup>7)</sup>などである。enzymatic assay、bioassay は感度が低い、また radiometric assay は操作が煩雑であり、酵素反応を利用する方法であるため使用薬物により酵素が影響を受ける可能性が常に存在しており、前もって使用薬物の影響を検討しておかなければならない等の欠点を有している<sup>8)</sup>。

近年、ACh の定量は固定化酵素カラムの開発により、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) /電気化学検

出器 (ED) を用いて精度よく且簡便に測定できるようになった<sup>9)10)</sup>。この方法は、Potter ら<sup>11)</sup>の測定方法を原理としたものであり、それは以下のとうりである。固定化酵素カラムはアミノアルキル化多孔性ガラスビーズを担体として用い、アセチルコリンエステラーゼのアミノ基とコリンオキシターゼのアミノ基がグルタルアルデヒドにより担体上に結合しているものである。アセチルコリンが2種類の酵素と反応して過酸化水素が発生するが、過酸化水素が酸化還元反応を受ける際に生じる電流の変化を最終的に検出し ACh の定量を行うので、測定結果に他の有機物質が混入している可能性はない。

今回、我々は生理的状態における虹彩毛様体中の ACh 含量の正確な測定を目的として、Mw 照射法により組織を固定し、固定化酵素カラムを使用した HPLC/ED を用いて ACh の測定を行った。またこの測定法を利用して、アトロピン点眼の虹彩毛様体 ACh 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 11 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 ACh、コリン (Ch) (Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.), sodium 1-octanesulfonic acid (SOS) (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.), tetramethylammonium chloride (TMA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (和光, 大阪) であった。全ての薬物は分析試薬等級を用いた。また ethylhomocholine (EHC) は BAS 日本 (東京) より供与されたものを用いた。

### 3. 組織の固定

ラットを専用ホルダーにて固定し、Mw 照射装置 (NJE 2603 新日本無線, 東京) により Mw (2, 450 MHz) を前報に記した如く 9.5 kW の出力で頭部に 0.9 秒間照射屠殺した。速やかに両眼球摘出、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摘出した。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 と内部標準として 1 nmol の EHC をふくむ 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、その上清はボア径 0.45

$\mu\text{m}$  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 $-30^{\circ}\text{C}$  冷凍保存した. 一方沈査は $0.1\text{N}$  NaOHで溶解後Lowry法<sup>12)</sup>による組織蛋白定量に供した.

#### 4. ACh定量

上清を解冻後, HPLCに注入し, EDより測定した. 標品としては, 各々 $0.02\text{nmol}$ のACh, Ch, EHC混合標準溶液を注入した. 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面積を用いて内部標準EHC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, 固定化酵素カラム<sup>9)</sup> (いずれもBAS日本, 東京), カラムヒーター (LC-22/23 A, Bioanalytical Systems), プラチナ電極 (TL-10 A, 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 $3.6\text{mM}$  EDTA,  $1\text{mA}$  TMA,  $70\mu\text{M}$  SOSを含む $50\text{mM}$  リン酸緩衝液 (pH 8.3) を用い, 流速は $1\text{ml/分}$ とした. プレカラム ( $10\times 4.6\text{mm}$ ) と分析カラム ( $150\times 4.6\text{mm}$ ) の充填剤はスチレンポリマー PLRP-S ( $7\mu\text{m}$  粒子) (Polymer Laboratory, Shropshire, U.K.) であった. 分析カラムと固定化酵素カラムはカラムヒーターにより $37^{\circ}\text{C}$ に維持された. 電位はAg/AgClに対して $+500\text{mV}$ とした.

#### 5. アトロピン点眼実験

##### 1) アトロピンの濃度決定

ラットにおいて片眼に点眼後, 他眼の瞳孔に影響しないアトロピンの点眼濃度を決定するための実験を行った.  $0.2\%$ ,  $0.1\%$ ,  $0.05\%$ アトロピンをそれぞれラット右眼に $5\mu\text{l}$ 点眼して点眼5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120分後の両眼の瞳孔径を一定照度 ( $400\text{lx}$ ) のもとで計測し, 左眼が散瞳しない最高濃度を調べた. 各々の濃度において3匹ずつ実験を行った.

なおアトロピン点眼液は第三版病院薬局製剤<sup>13)</sup>により作成した.

##### 2) アトロピン点眼のACh含量に及ぼす影響

ラットの右眼に1)の実験の結果より $0.05\%$ アトロピンを $5\mu\text{l}$ , 左眼に生理食塩水を $5\mu\text{l}$ 点眼した. 点眼30分後, ラット頭部にMw ( $9.5\text{kW}$ ,  $2,450\text{MHz}$ ) を $0.9$ 秒間照射屠殺後, 3, 4. の実験と同一方法で各々のACh量の測定を行った. なおこの場合, 10匹の片眼よりの虹彩毛様体をまとめて1サンプルとした.

### III 結 果

#### 1. AChの定量

図1, 図2にHPLCクロマトグラムを示す. 標品のCh, EHC, AChのピークのリテンションタイムに一致したピークがサンプルにも現れた. 標品, サンプルのACh, EHCのピークの面積, 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ACh量を計算すると,  $58.8\pm 5.0\text{nmol/g}$  (平均値 $\pm$ 標準誤差,  $n=9$ ) となった.

#### 2. アトロピン点眼実験

##### 1) アトロピン濃度の決定

全例に点眼10分後に右眼に散瞳が見られた. また測定時間内に $0.2\%$ 点眼群では3匹中3匹,  $0.1\%$ 点眼群

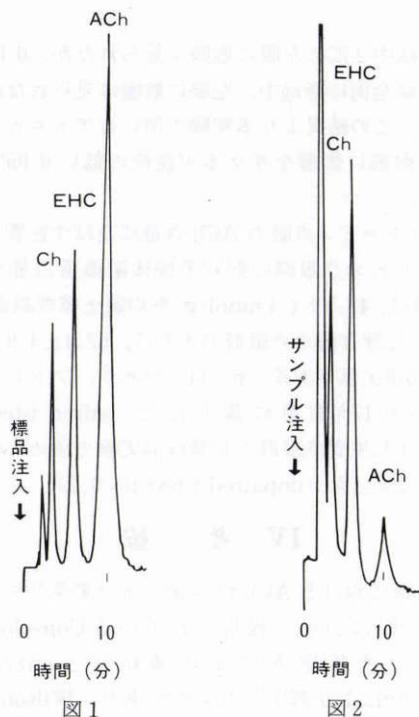


図1 ACh, Ch, EHCの標品の混合溶液のHPLCクロマトグラム. 標品溶液 $1\text{ml}$ 中には, ACh, Ch, EHCをそれぞれ $1\text{nmol}$ 含有し, 注入量は $20\mu\text{l}$ とした. 検出器レンジはフルスケール $2\text{nA}$ にした.

図2 ラット虹彩毛様体抽出物のHPLCクロマトグラム. サンプルには内部標準としてEHCを加え ( $1\text{nmol/ml}$ ), 注入量は $20\mu\text{l}$ とした. 検出器レンジはフルスケール $2\text{nA}$ にした.

図1, 図2とも最初の5分間のピークの感度はタイムスケジュールのプログラムに従って $1/8$ にした.

表1 アトロピン濃度と非点眼眼の散瞳の割合

アトロピン濃度(%)	0.05	0.1	0.2
散瞳	0/3	2/3	3/3

散瞳欄の分母はラット総数、分子は右眼にアトロピン5 $\mu$ l点眼して、観察時間内に左眼に散瞳がみられたラット数を示す。

表2 アセチルコリン (ACh) 含量に及ぼすアトロピンの影響

点 眼	n	ACh nmol/g 蛋白
生理食塩水	11	52.4 $\pm$ 4.9
アトロピン	11	43.5 $\pm$ 4.4*

生理食塩水を片眼に、0.05%アトロピンを他眼に5 $\mu$ 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2%の有意を示す。

では3匹中2匹に左眼に散瞳が見られたが、0.05%点眼群では全例に経過中、左眼に散瞳は見られなかった(表1)。この結果より本実験で用いるアトロピン濃度は非点眼眼に影響を与える可能性の低い0.05%に決定した。

#### 2) アトロピン点眼のACh含量に及ぼす影響

アトロピン点眼群の虹彩毛様体組織蛋白量当りのACh量は、43.5 $\pm$ 4.4 nmol/g(平均値 $\pm$ 標準誤差, n=11)で、生理食塩水点眼群のそれは、52.4 $\pm$ 4.9 nmol/g(平均値 $\pm$ 標準誤差, n=11)であり、アトロピン点眼により17%有意に減少した(paired t-test  $p < 0.02$ )。また生食点眼群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

眼組織におけるAChの定量はネコ虹彩<sup>5)</sup>やウサギ角膜上皮<sup>7)</sup>において報告されているConsoloら<sup>5)</sup>のデータは液体窒素による凍結法とenzymatic assay<sup>14)15)</sup>により測定したものであり、Wilsonら<sup>7)</sup>のデータは組織をそのまま分離、速やかにホモジナイズ調整してbioassayまたはradiometric assay<sup>16)</sup>により測定したものであった。

神経伝達物質の代謝は一般に速やかであり、その生理的含量測定のためには代謝酵素を速やかに不活性化することが不可欠となる。脳におけるAChの測定において、断頭してそのまま組織を調整する方法、断頭してから組織を液体窒素で凍結する方法とMw照射法の測定値に大きな差が報告されている。例えば湿重

量当りのACh量はマウス全脳において断頭法のみでは10.6 $\pm$ 1.5 nmol/g、断頭-凍結法では16.6 $\pm$ 0.9 nmol/g、Mw照射法(1.3 kW, 2,450 MHz, 1.5秒)では28.2 $\pm$ 0.8 nmol/gであり<sup>17)</sup>、またラットにおいて断頭法では9.1 $\pm$ 2.3 nmol/gであったのに対し、Mw照射法(9.0 kW, 2,450 MHz, 0.9秒)では24.1 $\pm$ 3.1 nmol/gであった<sup>18)</sup>。これらの事実は、断頭法、凍結法とも、Mw法に比べて代謝酵素の不活性化が不完全であり、これらの方法では、生理的な組織内AChの測定が眼組織においても困難であることを示している。

今回我々はラット虹彩毛様体のACh含量の測定において生理的な状態に最も近い値を測定する目的で組織の固定法としてMw照射法を採用した。前報に記したごとくMw(9.5 kW, 2,450 MHz)0.9秒照射30秒後の眼内温度は91.7 $^{\circ}$ Cであった。Mw(9 kW, 2,450 MHz)0.6秒照射後のラット脳内温度は70.1 $^{\circ}$ Cであり、そのときのアセチルコリンエステラーゼ活性は99.7%不活性化されていたと報告されている<sup>18)</sup>。この事実は今回採用された照射条件は眼組織のAChに関する酵素の不活性化に充分であると考えられた。

ラット虹彩毛様体湿重量は微量であり、その測定は室内の湿度などの影響をうけ変動しやすく正確な測定は困難である。故に我々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Mw照射後の1サンプル分の虹彩毛様体の組織重量を各々測定してラット虹彩毛様体組織重量当りのACh量を計算すると6.78 nmol/gであった。これは凍結法及びenzymatic assayによるネコ虹彩の組織重量当りのACh量<sup>5)</sup>の37%にあたる。またラット虹彩毛様体組織蛋白量当りのACh量は58.8 nmol/gであり、これはradiometric assayによるウサギ角膜上皮中心の組織蛋白量当りのACh量<sup>7)</sup>の3.4%にあたる。これら以前の報告との直接的比較は種差、組織及び方法の違いより難しいが、マイクロ波照射法によるラットの大脳皮質の組織重量当りのACh量は平均24.1 nmol/gと報告されており<sup>18)</sup>、虹彩毛様体中の含量はその27%にあたる。

ところでアトロピンは代表的な副交感神経抑制剤であり、その作用機序はアセチルコリンと競合してレセプターと結合することである。今回アトロピンの虹彩毛様体中のACh含量に及ぼす影響を調べた結果、有意に減少させることが明らかとなった。測定したACh量の変動は虹彩毛様体組織に存在する神経終末中の

ACh量の変動を反映しており、測定結果はアトロピンがコリン神経終末中のACh量を減少させたことを示唆する。モルモット回腸やラット虹彩の *in vitro* 実験でムスカリン受容体アンタゴニストは前シナプス性に神経終末よりのACh放出を促進することが知られている<sup>19)20)</sup>。従って同様の機構(presynaptic regulation)がラットの虹彩毛様体の副交感神経に存在すれば、神経終末中のACh量はムスカリン受容体アンタゴニストで減少するはずであり、我々が *in vivo* の虹彩毛様体組織において得た結果はこれに一致する。

虹彩毛様体のACh含量の正確な測定は副交感神経系の瞳孔反応、調節、眼血流動態や眼圧のコントロールに関する研究の重要な基礎知識となる。今回の我々の結果は、虹彩毛様体組織の生理的なACh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となると考えられる。今回アトロピンによる神経終末のACh量の変動を理論の予想通りに検出できたことは、本法が眼組織における副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) Stone RA, Kuwayama Y: The nervous system and intraocular pressure, in Ritde R, Shield MB, Krupin T (eds): *The Glaucoma*, St Louis, The C.V. Mosby Co., 257—279, 1989.
- 2) 稲垣 忍: 末梢神経. 遠山正彌, 塩谷弥兵衛 編: 化学的神経機能解剖学. 大阪, 厚生社, 509—593, 1987.
- 3) Stavinoha WB, Weintraub ST, Modak AT: The use of microwave heating to inactivate cholinesterase in the rat brain prior to analysis for acetylcholine. *J Neurochem* 20: 361—371, 1973.
- 4) Guyenet PG, Javoy E, Euvrard C, et al: The effect of drugs on the choline and acetylcholine content of the rat striatum following two methods of sacrifice. *Neuropharmacology* 16: 385—390, 1977.
- 5) Consolo S, Garattini S, Landinsky H, et al: Effect of chemical sympathectomy on the content of acetylcholine, choline and choline acetyltransferase activity in the cat spleen and itis. *J Physiol* 220: 639—646, 1972.
- 6) 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.
- 7) Wilson WS, Mcken CE: Regional distribution of acetylcholine and associated enzymes and their regeneration in corneal epithelium. *Exp Eye Res* 43: 235—242, 1986.
- 8) 米原典史, 野口 豊, 吉田 博: アセチルコリンの定量. 蛋核酵 26: 1232—1235, 1981.
- 9) Asano M, Miyauchi T, Kato T, et al: Determination of acetylcholine and choline in rat brain tissue by liquid chromatography/electrochemistry using an immobilized enzyme post column reactor. *J Liq Chromatogr* 9: 199—215, 1986.
- 10) Fujimori K, Yamamoto K: Determination of acetylcholine and choline in perchlorate extracts of brain tissue using liquid chromatography—electrochemistry with an immobilized-enzyme reactor. *J Chromatogr* 414: 167—173, 1987.
- 11) Potter PE, Meek JL, Neff NH: Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem* 41: 188—194, 1983.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—276, 1951.
- 13) 日本病院薬剤師会編: 第3版, 病院薬局製剤, 東京, 薬事日報社, 113, 1990.
- 14) Feigenson ME, Saelens JK: An enzyme assay for acetylcholine. *Biochem Pharmacol* 18: 1479—1486, 1969.
- 15) Saelens JK, Allen MP, Simke JP: Determination of acetylcholine and choline by an enzymatic assay. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 186: 279—286, 1970.
- 16) Goldberg AM, McCaman RE: The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain. *J Neurochem* 20: 1—8, 1973.
- 17) Maruyama Y, Iida N, Horikawa A, et al: A new microwave device for rapid thermal fixation of the murine brain. *J Microwave Power* 13: 53—57, 1978.
- 18) Ikarashi Y, Maruyama Y, Stavinoha WB: Study of the use of the microwave magnetic field for the rapid inactivation of brain enzymes. *Jpn J Pharmacol* 35: 71—387, 1984.
- 19) Sawnok J, Jhamandas J: Muscarinic feedback inhibition of acetylcholine release from the myenteric plexus in the guinea pig ileum and its status after chronic exposure to morphine. *Can J Pharmacol* 55: 909—916, 1977.
- 20) Richardson JS, Mattio TG, Giacobini E: Amitriptyline and imipramine inhibit the release of acetylcholine from parasympathetic nerve terminals in the rat iris. *Can J Physiol Pharmacol* 62: 857—859, 1984.