

## 中枢神経系による眼圧制御を研究するための新しい実験モデル

吉澤 豊久

新潟大学医学部眼科学教室

## 要 約

中枢神経系による眼圧の制御を研究するために、ネコの視床下部に *oxytocin* を微小イオン泳動法を用いて投与し眼圧に対する影響を検討した。全身麻酔・筋弛緩を行い、気管内挿管後、人工呼吸下でネコを定位脳固定装置に装着した。眼圧および全身血圧を連続的にモニターしながら、*oxytocin* および対照の生理的食塩水を満たした3～5連のガラス微小電極を脳座標で視床下部に合わせて刺入し、各薬剤を微小イオン泳動法により注入した。実験終了後、ネコを深麻酔下に経心臓的に灌流固定した。50  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、中性赤で染色し電極刺入痕を同定した。*oxytocin* を視索上核内に注入したときのみ、血圧に非依存的な眼圧上昇を認め、その潜時は  $171 \pm 25$  秒、振幅は  $0.99 \pm 0.46$  mmHg であった。以上から、ネコ視床下部の *oxytocin* 感受性細胞は眼圧の制御に関係していることが示唆され、この実験モデルは中枢性眼圧制御を研究するために有用であると思われる。(日眼会誌 97: 575-580, 1993)

キーワード：眼圧、中枢性制御、視床下部、ネコ、*oxytocin*

## New Experimental Model of Central Regulation of Intraocular Pressure

Toyohisa Yoshizawa

*Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine*

## Abstract

We investigated the effect on the intraocular pressure (IOP) of microiontophoretic injection of oxytocin (OXT) into the cat hypothalamus, to elucidate the mechanisms of IOP regulation by the central nervous system (CNS). Under sodium pentobarbital anesthesia, the cat was fixed in a stereotaxic apparatus, immobilized, and ventilated artificially through a tracheal cannula. The IOP and blood pressure were continuously recorded with an electromanometer. A 3-to 5-barreled glass microelectrode was used; OXT and saline as a control were injected iontophoretically into the hypothalamus according to the stereotaxic coordinates. On completion of the experiment, the animal was deeply anesthetized and perfused transcardially. Frozen sections were cut and stained with neutral red, and the tracks of the electrodes were reconstructed. The IOP was elevated gradually without change in blood pressure, when OXT was injected into the supraoptic nucleus. The latency and the amplitude of this response were  $171 \pm 25$  sec and  $0.99 \pm 0.46$  mmHg (average  $\pm$  SD;  $n=4$ ), respectively. The IOP showed no change after saline application to the same site. We concluded that OXT-sensitive cells in the cat hypothalamus may play a role in regulating IOP. This model may be useful to study the mechanisms of IOP regulation by the CNS. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 575-580, 1993)

Key words: Intraocular pressure, Central regulation, Hypothalamus, Cat, Oxytocin

別刷請求先：951 新潟市旭町通1番町 新潟大学医学部眼科学教室 吉澤 豊久

(平成4年9月28日受付, 平成4年11月16日改訂受理)

Reprint request to: Toyohisa Yoshizawa, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine 1 Asahimachi, Niigata 951, Japan

(Received September 28, 1992 and accepted in revised form November 16, 1992)

## I 緒 言

初期の原発開放隅角緑内障では電子顕微鏡レベルで隅角の線維柱帯に異常が認められない時にすでに眼圧が上昇していることから、中枢神経系の関与が推定されている<sup>1)</sup>。眼圧の中核については古くから間脳、特に視床下部が有力候補とされてきた。1950年頃から臨床的に、間脳の外傷や疾患で眼圧の異常が報告され<sup>2)</sup>、実験的にはネコ間脳の電気刺激によって眼圧が変化すること<sup>3)4)</sup>が知られている。また、1984年 Krupin ら<sup>5)</sup>はウサギの第3脳室に vasopressin を注入すると房水産生が増加して眼圧が上昇することを報告した。しかし、これらの実験は眼圧の中核の局在については明らかにできなかった。一方、免疫組織化学的に oxytocin を含むニューロンは視床下部の視索上核および室旁核に多く認められ、これらのニューロンは oxytocin に反応することがわかっている<sup>6)</sup>。そこで今回、我々は中枢神経系による眼圧の神経性制御の機構を知るための研究の第一歩として、vasopressin と構造的に類似する下垂体後葉ホルモン、oxytocin を脳の局所に投与し眼圧の変化を測定する実験モデルを考案した。このモデルは微小イオン電気泳動法を用いており、電気刺激実験や脳室灌流実験と比べ、より狭い範囲を刺激することが可能で、投与物質と脳内の感受部位とを直接関係づけることができる点で優れている。今回の実験データは予報的なものであるが、oxytocin 投与が眼圧にどのような影響を与えるか、さらにその効果が生じた部位の局在について検討した。

## II 実験方法

### 1. 実験動物

2.5 kg 前後の成熟ネコ 5 匹を用い、sodium pentobarbital (35 mg/kg i.p.) で麻酔導入後大腿静脈を確保し、succinylcholine (2 mg/kg i.v.) を注射し、気管内挿管した。外眼筋の影響を除外するために gallamine triethiodide (10 mg/kg i.v.) で不動化して人工呼吸下で実験を行った。実験中は常に心電図・終末呼気二酸化炭素濃度 (30~40 mmHg に維持)・体温 (フィードバック機構付きヒーターマットで直腸温 38°C に維持) をモニターし、gallamine triethiodide (5~10 mg/kg/h)、sodium pentobarbital (3~4 mg/kg/h) を持続静注した。

眼圧は、heparin 添加乳酸リンゲル液を満した 27 G 針を前房に刺入し、トランスジューサー (DTX/plus<sup>®</sup>、

SPECTRAMED 社) に接続し、キャリアアンプ (AP-601 G, 日本光電社) で増幅し、ペンレコーダー (FWR-3701, グラフテック社) に記録した。血圧は、ヘパリン添加乳酸リンゲル液を満したカテーテル (カットダウン用節付き静脈カテーテル<sup>®</sup>, 3 French, アトム社) を大腿動脈または上腕動脈に挿入し、眼圧と同様の方法で記録した。眼圧・血圧は実験中連続的にモニターした。

動物を脳定位固定装置 (SN-3, 成茂社) に固定し、頭頂骨を開頭し、脳定位座標により視床下部の視索上核を目標にして微小多連電極を脳に刺入した。

### 2. 微小イオン電気泳動法

3~5 連のガラス微小電極、先端の直径、75~100  $\mu\text{m}$ ；それぞれの微小ピペットの直径、15~20  $\mu\text{m}$ ；刺入部の長さ、25~30 mm；図 1A (全体)、B (先端部)) は 2~4 本の 1.2 mm 径のバイレックスガラス管を 2.5 mm 径のガラス管の中央部分に銅線、熱収縮チューブおよび  $\alpha$ -cyanoacrylate (アロンアルファ<sup>®</sup>, 東亜合成化学社) で束ねたものを Glass microelectrode puller (PE-2, 成茂社) で加熱牽引して自作し、使用した。それぞれのバレルに oxytocin (5 i.u./ml, Sigma 社)、対照として生理的食塩水 (165 mM) を満し、溶液の pH は 7.0~8.0 に調製した。イオン電気泳動は微小イオン泳動装置 (DPI-30 B, ダイアメディカル社) を用い、泳動電流を 50~100 nA

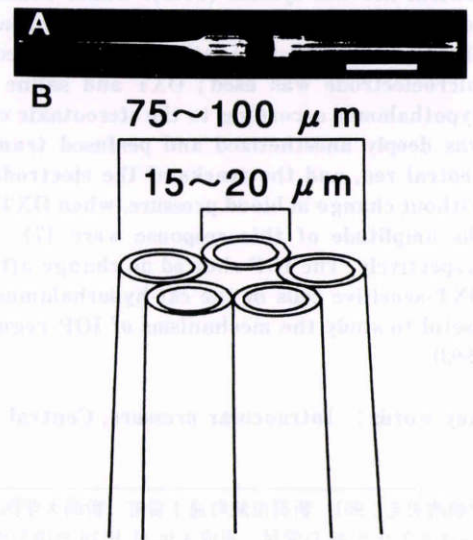


図 1 多連微小ガラス電極。

A: 全体像の写真 バーは 1  $\mu\text{m}$  を示す。B: 先端の概略図。



DC(電極, 負), 保持電流を5~10 nA DCとした。電極は両側外耳道を結んだ線を0とする脳地図で前後は前方へ12.0~14.0 mm(以下Ammで表す), 中心(矢状縫合)から1.0~4.0 mm(以下Lmmで表す)の範囲でマイクロニブルーター(SM-15, 成茂社)にて垂直に刺入し, 深さは両外耳道を結んだ線から4.0~10.0 mm(以下Dmmで表す)を中心に0.5~1.0 mm毎に刺激した。残りのパレルに詰めた色素(0.5 M クエン酸ナトリウム溶液に溶かした2% brilliant blue (Sigma社) または2% fast green FCF (Sigma社))を3  $\mu$ A DCで5分間投与して, 反応した点をマークした。

### 3. データ解析

トランスジューサーからの電気信号をキャリアアンプで増幅し, ペンレコーダーで記録したデータをデジタイザー(K-510 MkII, ロジテック社)で読み込み, フロッピーディスクに保存した。データはパーソナルコンピュータを用いてオフラインで解析した。薬剤投与後, 反応開始点までの時間を潜時とし, 眼圧および血圧の最大値を反応のピークとし, ピークの眼圧および血圧から投与前1分間の眼圧および血圧の平均値を差し引いた値を振幅とした。投与前1分間と反応のピークの前後30秒, 合計1分間のデータ(眼圧については2秒毎各30点のデータ, 血圧については60秒間に含まれる最大および最小血圧値各20点)を比較し, 対応のない場合のt検定で有意なもの( $p < 0.05$ )を有効な反応とした。解析に使用したプログラムはSigma-plot<sup>®</sup>および自作プログラムである。

### 4. 組織標本

実験終了後, 深麻酔下(sodium pentobarbital, 50~70 mg/kg)で経心臓的に灌流固定した。最初に300~500 mlの等張リン酸緩衝液, 続いて10% formaldehyde リン酸緩衝液を500~1,000 ml灌流した。電極刺入部分を含むブロックを切り出し, 50  $\mu$ m厚の凍結切片を作製しneutral redで染色し, 電極の穿刺位置を組織学的に検討した。

なお, この実験はヘルシンキ宣言, 動物の保護および管理に関する法律, および実験動物の飼養及び保管等に関する基準に則して行った。

## III 結 果

OxytocinをA14L2, 深さD5の位置で50 nA, 2分間投与すると, 眼圧は図2Aに示すような上昇反応を示した。眼圧反応の潜時は191秒, 眼圧反応の振幅

は1.11 mmHgで, この変化は統計学的に有意( $p < 0.001$ )であった。組織学的検索で図2Aの反応は図3Aの星印の位置で誘発され, この位置に対照の生理的食塩水を50 nA, 2分間投与しても図2Bに示すように反応は誘発されず, また, そこから1.0 mm上方に離れた図3Aの●印の点ではoxytocinを50 nA, 2分間投与しても図2Cに示すように反応は誘発されなかった。すなわち, この例ではoxytocinで誘発される眼圧上昇は視索上核に局限していた。図4に図2Aの反応が誘発されたoxytocin投与部位(図4Bの矢印)の光学顕微鏡写真を示した。

もう1例ではA13L3, 深さD4にoxytocinを50 nA, 2分間投与すると図5Bのように血圧に依存しない眼圧上昇反応が得られた。この反応では眼圧については統計学的に有意( $p < 0.002$ )で, 血圧に関しては有意な変化ではなかった( $p > 0.5$ )。眼圧反応の潜時は167秒, 眼圧反応の振幅は0.62 mmHgであった。しかし, この位置に対照の生理的食塩水を50 nA, 2分間投与しても図5Cに示すように反応は誘発されず, 血圧も変化しなかった。さらに, 1.0 mm上の位置にoxytocinを投与した場合も図5Aのように眼圧, 血圧ともに変化は認められなかった。この眼圧上昇反応が得られたoxytocinの投与位置は, 図3Bに星印で示したように視索上核内であった。得られたすべての反

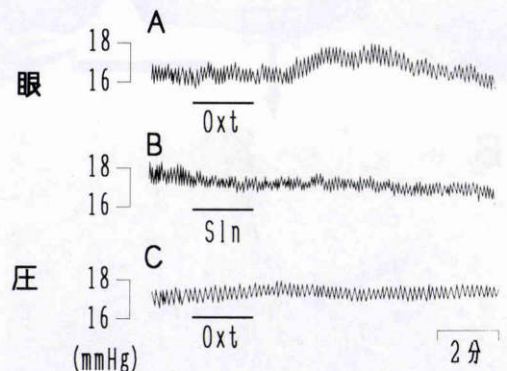


図2 脳座標 A14L2の眼圧反応。

A: 深さD=5.0 mm(図3Aの☆)にoxytocinを50 nA, 2分間投与して得られた反応。潜時は191秒, 振幅は1.11 mmHgであった。B: Aと同じ部位に生理的食塩水を50 nA, 2分間投与したときの反応。眼圧は不変であった。C: 深さD=6.0 mm(図3Aの●)にoxytocinを50 nA, 2分間投与したときの反応。眼圧は不変であった。(Oxt: oxytocinの投与時間, Sln: 生理的食塩水の投与時間)

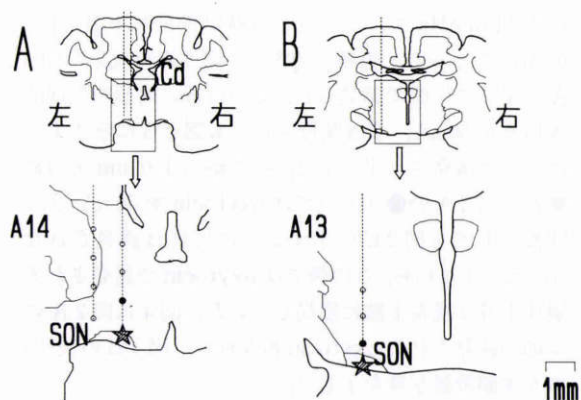


図3 ネコ脳の前額断。

☆は oxytocin 投与により眼圧上昇反応が得られた部位。視索上核に限局していた。A：図2の反応の得られた電極刺入痕，B：図5の反応の得られた電極刺入痕（Cd：尾状核，SON：視索上核）

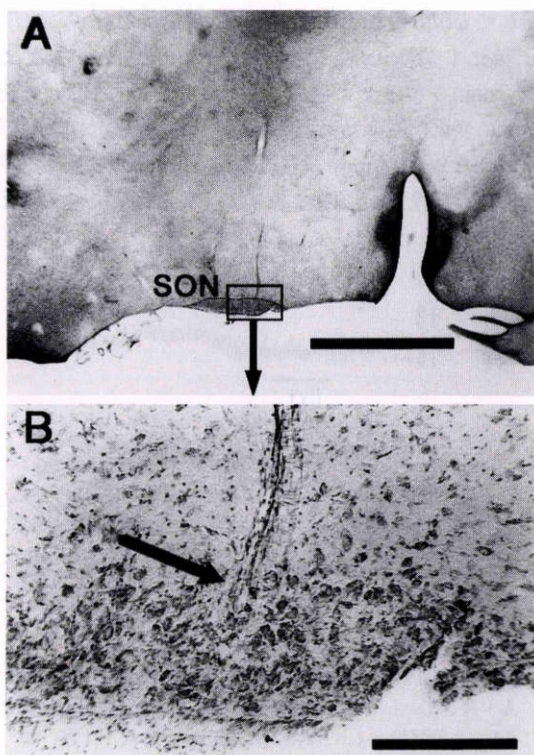


図4 Oxytocin 投与部位の顕微鏡写真。

A：弱拡大 バーは2.0 mm，SONは視索上核を示す。B：Aの長方形で囲んだ部分の拡大 矢印は oxytocin の投与部位，バーは200  $\mu$ mを示す。

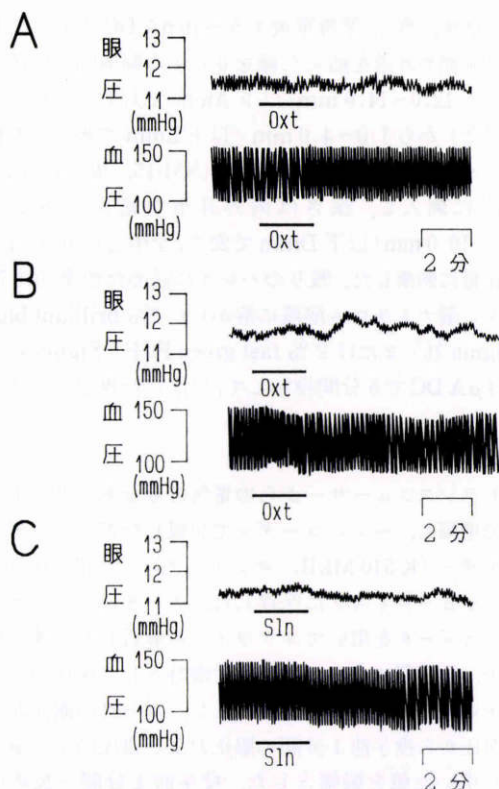


図5 脳座標 A13L3の眼圧および血圧の反応。

A：深さD=5.0 mm（図3 Bの●）に oxytocin を50 nA，2分間投与しても眼圧，血圧ともに変化は認められなかった。B：深さD=4.0 mm（図3 Bの☆）に oxytocin を50 nA，2分間投与すると血圧に依存しない眼圧上昇反応が得られた。潜時は167秒，振幅は0.62 mmHgであった。C：Bと同じ位置に対照の生理的食塩水を50 nA，2分間投与しても眼圧は不変で，血圧も変化しなかった。（Oxt：oxytocinの投与時間，Sln：生理的食塩水の投与時間）

応の平均値±標準偏差は潜時が $171 \pm 25$ 秒，振幅が $0.99 \pm 0.46$  mmHg ( $n=4$ )であった。図6は実験に使用したすべてのネコから得られた結果をまとめたもので，●印の点は oxytocin 投与で眼圧上昇反応が誘発された位置で，○印の点はすべて反応が誘発されなかった位置である。このように oxytocin の微小イオン泳動的投与で得られる眼圧上昇反応は限局した部位，すなわち，視索上核に限られていた。なお，以上の反応はすべて oxytocin を投与した同側眼の眼圧および同側の動脈から得られた反応である。



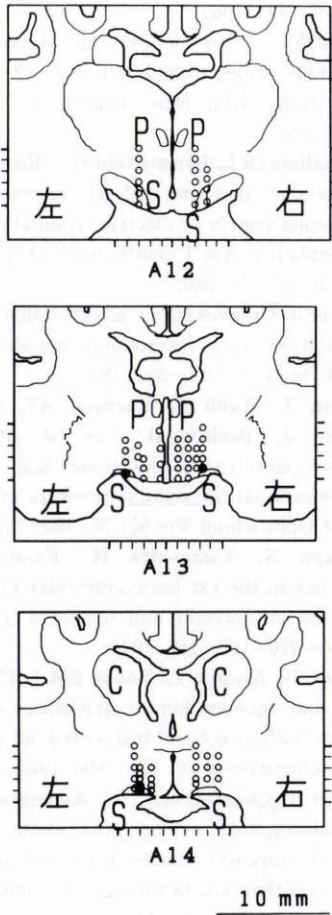


図 6 すべてのデータをまとめた図。

●は oxytocin 投与で眼圧上昇反応が得られた部位，  
○は反応が誘発されなかった部位を示す。S は視索上核，P は室旁核，C は尾状核を示す。

#### IV 考 按

このモデルが従来行われてきた眼圧の中枢神経系による制御に関する実験と比較して優れている点は、刺激が極く狭い範囲に局在することである。1955 年 von Sallmann<sup>3)</sup>は腹側の視床下部の電気刺激で血圧上昇に平行した眼圧上昇が、背側の視床下部および腹側の視床の電気刺激で血圧下降に平行した眼圧下降または血圧変化に依存しない眼圧上昇がみられることが多かったと報告した。また、1956 年 Gloster<sup>4)</sup>は間脳の後背側領域の電気刺激で血圧に依存しない眼圧上昇が生じ、視床下部の中央部で血圧変化に依存しない眼圧下降が認められたと述べた。しかし、電気刺激実験で

は刺激電流がかなり広い範囲に達し、通過線維を刺激しないとも限らない。1950 年代のネコ間脳の電気刺激実験で眼圧の上昇または下降反応部位が局限されなかった原因にこれが関係していたと思われる。さらに、Krupin<sup>5)</sup>らの脳室灌流実験でも灌流される物質の感受部位は特定できていない。これらに比較して、微小イオン泳動法は、①局所に局限して刺激することができる。②いろいろな物質を同じ方法で投与することができる。③その拡散範囲は電流の強さ、溶液の濃度、溶媒の種類などで調節することができる。④極細い電極で投与できるため組織への侵襲も低く抑えられる。⑤多連微小ガラス電極を使用しているためにいろいろな種類の薬剤を同時に同じ部位に投与することができるなどの長所がある。しかし、作製する電極の先端の太さや形状によって電極の抵抗が変わり、投与物質の流出量が変わるため拡散範囲がややばらつくという欠点もある。

ネコ視床下部視索上核に oxytocin を微小イオン泳動的に投与すると、血圧に依存しない眼圧上昇反応が誘発された。この反応は電気刺激による過去の報告(反応は刺激とほぼ同時に起こり、刺激中持続してすぐに戻るといった反応)と比べて反応までの潜時および反応終了までの経過時間が長く、脳室灌流実験(反応のピークが投与開始から 45 分後)に比べて潜時が短く、経過も短かった。これは電流が一瞬のうちに反応部位まで到達するのに対して、イオン泳動法では薬剤が拡散によってニューロンに達するまでに数分を要するためと考えられた。さらに、脳室灌流実験では脳室から反応感受部位に拡散到達するまでに数十分の時間が必要のためと思われる。また、薬剤の投与範囲が局限されるために、反応の振幅という点ではイオン泳動法では電気刺激実験や脳室灌流実験よりも小さい振幅であった。さらに、バルビタール系薬剤は不顕性量 (sub-clinical dose) の使用で、房水の産生を抑制することが知られている<sup>7)</sup>。この実験では麻醉薬として sodium pentobarbital を使用しており、このことも反応の振幅が小さい一因であろう。

一般に、眼圧上昇は房水産生増加または房水流出抵抗の増加によって起こる。oxytocin はその構造が vasopressin に似ており、この反応は vasopressin のウサギ脳室灌流実験と同様に房水産生増加によって生じると推測される。視索上核に存在するニューロンは oxytocin を含有し、それらのペプチドに反応するため、投与した oxytocin により賦活化した後葉ホルモ

ン感受性ニューロンが眼圧を上昇させると推定される。視床下部は体温や血圧の日内変動に関係しており、oxytocin は眼圧の日内変動に関与しているのかもしれない。元来、oxytocin, vasopressin という下垂体後葉ホルモンの働きはそれぞれ乳汁分泌・子宮収縮、利尿作用による水分調節が知られているが、これらのホルモン分泌細胞は大脳皮質・中脳・延髄・脊髄・大脳辺縁系など広範囲に神経線維を投射しており<sup>8)</sup>、未知なる働きの1つとして眼圧調節があるのかもしれない。これらの細胞からの遠心路については2つ考えられ、1つは視索上核から脳幹の動眼神経副交換神経核、毛様神経節を經由して毛様体に至る経路、2つ目は、視索上核から視神経を通して毛様体に至る経路がある。前者は免疫組織化学の実験で抗 oxytocin 抗体で染まる線維が視索上核から脳幹まで伸びている<sup>9)</sup>という事実から支持され、後者は片眼視神経切断動物で飲水試験の結果に異常を示す<sup>9)10)</sup>ことから推測される。

この実験で oxytocin が中枢性の眼圧制御に関与している可能性が示唆された。この新しい実験モデルは中枢神経系による眼圧の制御機構を研究する上で役立つものと考え、今後、中枢神経系による眼圧の制御機構をさらに明らかにするためには、もう1つの下垂体後葉ホルモンである vasopressin や adrenalin, histamine などの薬剤およびその遮断薬を視床下部に投与し、それらの眼圧に及ぼす影響を調べることや biocytin, horseradish peroxidase などのトレーサーを用いて遠心路の解明を行うことが必要である。

稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました新潟大学医学部眼科学教室、岩田和雄教授および同第一生理学教室、板東武彦教授、微小多連ガラス電極作製の技術的指導を頂きました山梨医科大学第一生理学教室、永井正則助教授、および図の作製に協力頂きました新潟大学眼科学教室、荒木幸雄技官に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 岩田和雄：原発開放隅角緑内障の初期病態。臨眼

- 39: 407—424, 1985.
- 2) **Brand VI**: Über intraokulare Hypotonie als Merkmal einiger Krankheiten des Zentralnervensystems. *Klin Mbl Augenheilk* 150: 813—821, 1967.
- 3) **von Sallmann L, Lowenstein O**: Responses of intraocular pressure, blood pressure, and cutaneous vessels to electric stimulation in the diencephalon. *Am J Ophthalmol* 39(Number 4, Part 2): 11—29, 1955.
- 4) **Gloster J, Greaves DP**: Effect of diencephalic stimulation upon intraocular pressure. *Br J Ophthalmol* 41: 513—531, 1957.
- 5) **Krupin T, Webb G, Barbosa AT, Gulli B, Levine J, Becker B**: Central effects of thyrotropin-releasing hormone and arginine vasopressin on intraocular pressure in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 932—937, 1984.
- 6) **Inenaga K, Yamashita H**: Excitation of neurones in the rat paraventricular nucleus in vitro by vasopressin and oxytocin. *J Physiol London* 370: 165—180, 1986.
- 7) **Becker B, Krupin T, Podos SM**: Phenobarbital and aqueous humor dynamics: effect in rabbits with intact and transected optic nerves. *Am J Ophthalmol* 70: 686—690, 1970.
- 8) **Alonso G, Szafarczyk A, Assenmacher I**: Radioautographic evidence that axons from the area of supraoptic nuclei in the rat project to extrahypothalamic brain regions. *Neuroscience Letters* 66: 251—256, 1986.
- 9) **Podos SM, Krupin T, Becker B**: Mechanism of intraocular pressure response after optic nerve transection. *Am J Ophthalmol* 72: 79—87, 1972.
- 10) **Cox CE, Fitzgerald CR, King RL**: A preliminary report on the supraoptic nucleus and control of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol* 14: 26—28, 1975.