

ラット虹彩における各種神経線維の分布と密度に関する 免疫電子顕微鏡的研究

平井 玲子¹⁾, 玉巻 伸章²⁾, 石黒 裕之¹⁾, 深見嘉一郎¹⁾, 野条 良彰²⁾

¹⁾福井医科大学眼科学講座, ²⁾福井医科大学第一解剖学講座

要 約

ラット虹彩における交感, 副交感, 知覚の神経線維を免疫組織化学法により同定し, 瞳孔散大筋, 瞳孔括約筋との位置的關係に注目しながら電子顕微鏡的に観察を行った. 用いた一次抗体は, ① 抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体, ② 抗サブスタンス P (SP) 抗体, および抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 抗体を混合, ③ 抗 TH, 抗 SP および抗 CGRP 抗体を混合の 3 種類で反応陽性と陰性線維に分類した. 瞳孔散大筋領域の支質の前房側では TH 陽性, SP/CGRP 陽性, TH/SP/CGRP 陰性の 3 種の神経線維の分布比率は, それぞれ 18%, 37%, 45% であり, 散大筋領域の支質の

後房側では, それぞれ 11%, 3%, 86% であった. 瞳孔括約筋領域の支質では, それぞれ 45%, 26%, 29% で, 括約筋層内では, それぞれ 23%, 1%, 76% であった. 以上の結果から, 散大筋や括約筋に対する交感, 副交感神経の二重支配が, また, 知覚神経は虹彩前房側の支質内にもっぱら存在していることが確認された. (日眼会誌 98: 130-136, 1994)

キーワード: チロシンヒドロキシラーゼ, サブスタンス P, 抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド, 免疫電子顕微鏡, ラット虹彩

An Immunoelectron Microscopic Study of Distribution and Density of Nerve Fibers Innervating the Rat Iris

Reiko Hirai¹⁾, Nobuaki Tamamaki²⁾, Hiroyuki Ishiguro¹⁾,
Kaitiro Hukami¹⁾ and Yoshiaki Nojyo²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Fukui Medical School

²⁾Department of Anatomy, Fukui Medical School

Abstract

We studied the sympathetic, parasympathetic and sensory nerve fibers in the rat iris using electron microscopic immunohistochemical techniques. Antibodies raised against tyrosine hydroxylase (TH), substance P (SP), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) were used alone or combined together to characterize the nerve fibers. The ratios of the TH-positive, SP/CGRP-positive and TH/SP/CGRP-negative fibers were 18%, 37%, and 45% in the anterior half of the dilator stroma, 11%, 3%, and 86% in the posterior half of the dilator stroma,

45%, 26%, and 29% in the sphincter stroma, and 23%, 1%, and 76% in the sphincter muscle layer. These results confirm that the sympathetic and parasympathetic fibers doubly innervate both rat iris sphincter and iris dilator muscles, whereas sensory nerve fibers innervate mainly the stroma. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 130-136, 1994)

Key words: Tyrosine hydroxylase, Substance P, Calcitonin gene-related peptide, Immunoelectron microscopy, Rat iris

I 緒 言

虹彩は大きく交感, 副交感, 知覚の 3 種の神経によっ

て支配されている. 交感神経は, 最初アミン蛍光法で, 次にニューロペプチド Y やチロシンヒドロキシラーゼ (TH) に対する抗体を用いた免疫組織化学法で観察され

別刷請求先: 910-11 福井県吉田郡松岡町下合月 23-3 福井医科大学眼科学講座 平井 玲子

(平成 5 年 5 月 20 日受付, 平成 5 年 9 月 9 日改訂受理)

Reprint requests to: Reiko Hirai, M.D. Department of Ophthalmology, Fukui Medical School, 23-3 Shimoaizuki Matsuoka-cho, Yoshida-gun, Fukui-ken 910-11, Japan

(Received May 20, 1993 and accepted in revised form September 9, 1993)

てきた^{1)~4)}。一方、副交感神経⁵⁾⁶⁾や知覚神経^{7)~10)}も同様に神経ペプチドに対する免疫組織化学法で観察されている。交感性および副交感性線維は特に瞳孔径調節に関与するものとされ、瞳孔括約筋には副交感神経が、瞳孔散大筋には交感神経が主に分布し、支配しているとされてきた¹¹⁾¹²⁾。しかし、近年、多くの生理学的、薬理学的研究によって、この瞳孔径の神経調節機序は単純化されすぎており、実際は、もっと複雑であることが指摘されるようになってきていた。すなわち、ラットやイヌの瞳孔括約筋においては、コリン作動性の興奮およびアドレナリン作動性の抑制支配の存在、そして瞳孔散大筋においてはアドレナリン作動性の興奮およびコリン作動性の抑制支配の存在が報告されている^{13)~15)}。一方、サブスタンスP (SP) を含む知覚線維は、虹彩の知覚、特に疼痛受容の伝達に関係しているとされているが、SP に代表されるタキキニンはウサギの瞳孔括約筋を収縮させることでも知られている¹⁶⁾。

虹彩におけるこうした各種神経線維の機能について、形態学的には、3種の神経線維の正確な分布と密度を知ることによって、それら神経線維の生理機能への関与の強弱を推測することが可能である。3種の神経線維の存在は光学顕微鏡的、電子顕微鏡的にすでに個別的には観察され

ているが、分布比率についての報告は一切ない。そこで今回、我々はラット虹彩について、免疫組織化学法を用いて神経線維を同定分類し、神経線維の分布と数について詳しく調べ、各種線維の分布比率を算出した。

II 実験方法

体重 250~350 g の成熟 SD ラット 18 匹を用い、ペントバルビタールナトリウム 0.05% 溶液 0.3 ml の麻醉下に注入固定を行った。

1. 光学顕微鏡試料：ラット 12 匹、24 眼を用いた。3.5% パラホルムアルデヒドと 0.19% ピクリン酸を含有する 0.1 M 磷酸緩衝液で灌流固定を行い、摘出眼球から虹彩を採取、同じ固定液で 1 日浸漬固定後、0.3% Triton X 100 含有の磷酸緩衝生理食塩水 (PBS) に 2~4 日間浸した。さらに、3% H₂O₂ 液に 5 分間室温で浸漬、PBS で 3 回洗浄したのち、次の通りの一次抗体と 2~4 日間浮遊法で反応させた。①抗ラットチロシンヒドロキシラーゼ (TH) ウサギポリクローナル抗体 (藤田保健衛生大学医学部解剖学講座永津郁子教授から供与¹⁷⁾) (希釈倍率 1 : 4000)、②抗サブスタンス (SP) ウサギポリクローナル抗体と抗ラットカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) ウサギポリクローナル抗体 (それぞれ

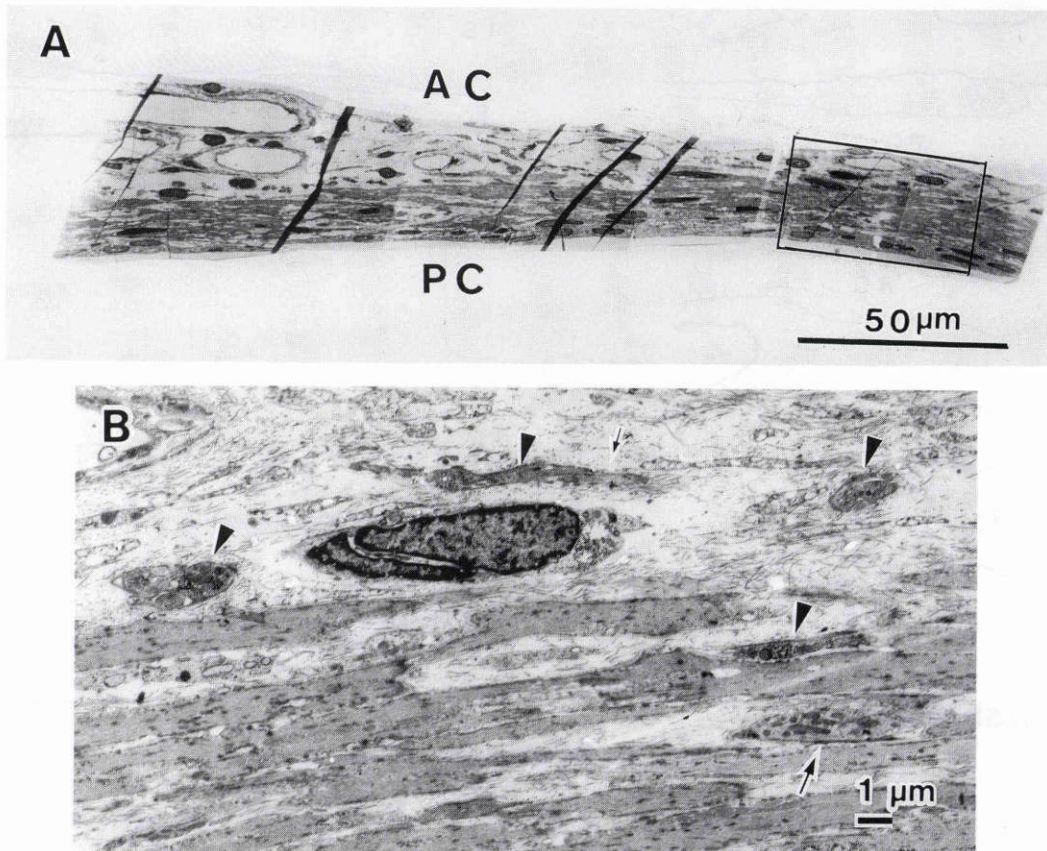


図1 抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 染色による瞳孔括約筋部の電子顕微鏡写真。
A: 連続撮影された 18 枚の写真を張り合わせた合成写真、図中の枠の部分を描画図 (図 2 B) で示した。AC: 前房、PC: 後房 B: A の一部を拡大したもので、図 2 B の枠にあたる。陽性線維は矢尻、陰性線維は矢印で示してある。

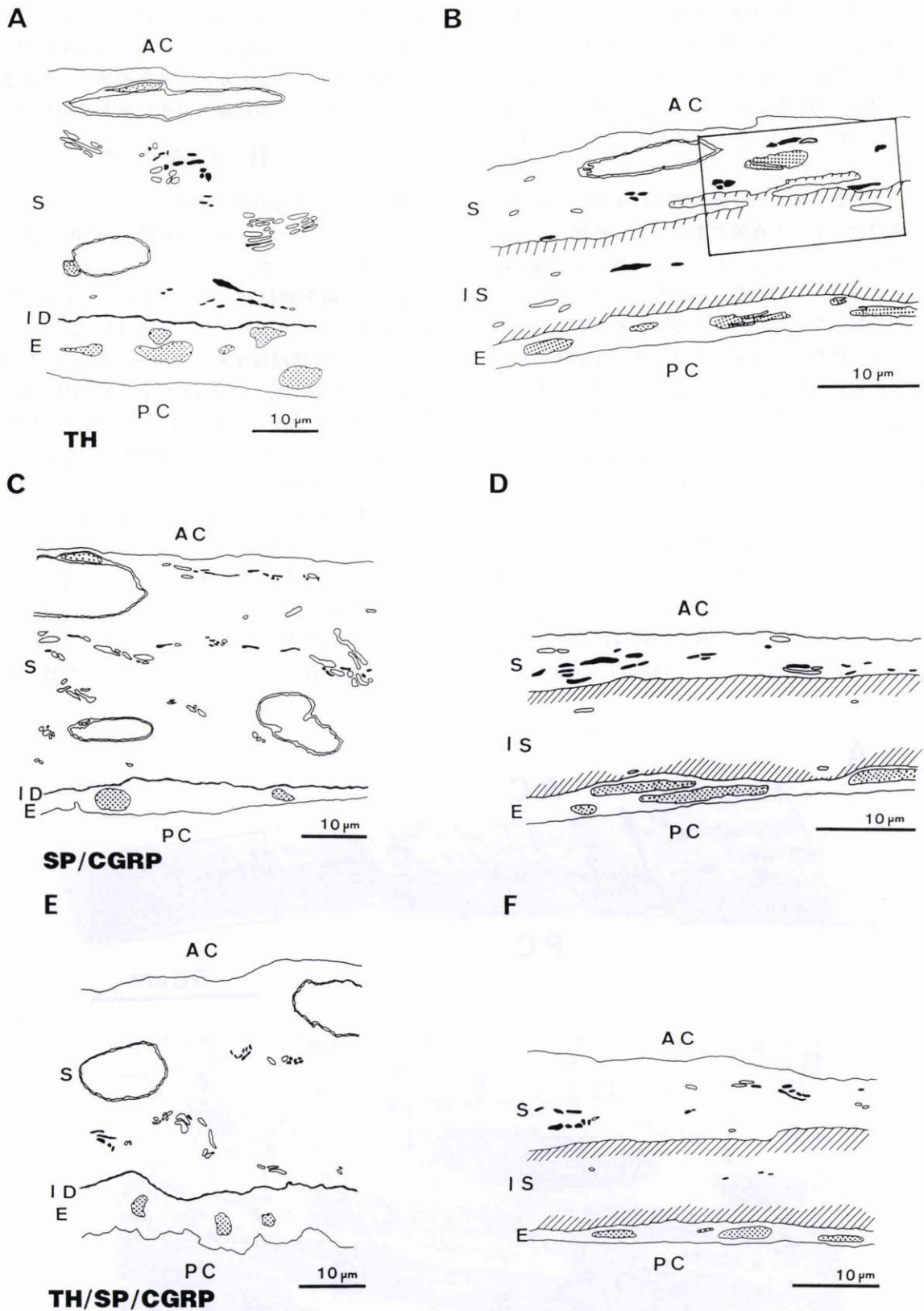


図2 各染色による電子顕微鏡合成写真の描画図。

抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体染色 (A,B), 抗サブスタンス P(SP) 抗体および抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 抗体の混合による染色 (C,D), 抗 TH, 抗 SP, 抗 CGRP 抗体の混合による染色 (E,F) を行った。

陽性線維は黒丸, 陰性線維は白丸で示してある。瞳孔散大筋の薄層は太線で, 瞳孔括約筋の前後の境界は斜線によって示してある。支質中の細胞や虹彩の上皮細胞の核は, 網掛けで示してある。A, C, E: 瞳孔散大筋部, B, D, F: 瞳孔括約筋部。

AC: 前房, PC: 後房, S: 支質, ID: 瞳孔散大筋, IS: 瞳孔括約筋, E: 上皮細胞層

Cam bridge Research Bio-chemical 社)を混合(それぞれ1:4,000), ③抗TH(1:8,000), 抗SP(1:4,000), 抗CGRP(1:4,000)を混合したものである。抗体と希釈には0.3% Triton X 100と0.3%牛血清アルブミン含むPBSを用いた。PBSで洗浄後, 二次抗体であるビオチン化抗ウサギIgG抗体(Vectastain ABCキット; VECTOR社), 次に, 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで反応した。さらに, 0.025% 3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)含有トリス塩酸緩衝液中に5分浸漬し, 0.03% H₂O₂を加え, 15分間呈色反応を行った。全載標本を光学顕微鏡(光顕)で観察した。

2. 電子顕微鏡試料: ラット3匹3眼を用いた。灌流固定後, 虹彩を摘出, 4等分し, 免疫組織化学染色に用いた。電子顕微鏡(電顕)試料においてはTriton X 100の濃度を低くしたこと(0.1%), およびH₂O₂処理を省略したこと以外, 光顕試料と同様である。反応後, 各虹彩片をオスmium固定, アルコール脱水, エポン包埋した。瞳孔括約筋中央部, 次に虹彩中央部(瞳孔散大筋)の2か所で超薄切片を作成した。虹彩の円周方向に約200μmの長さで, 虹彩全層を含む連続写真を撮影(3,000倍), 合成写真を18セット作成し(図1A), 著者のうち3人が独立して, 合成写真上の神経線維を陽性と陰性に分類, 計数し, それらを平均し, 200μmあたりの本数とした。

III 結 果

光顕, 電顕観察: 光顕試料においては陽性神経線維や神経束は, 数珠状あるいは平滑で, 虹彩全域にわたって均一に網工を形成しており, 虹彩の各部, すなわち, 耳側, 背側, 腹側, 鼻側部位による分布の違いは認められなかった。電顕試料ではすべての陽性線維は, 軸索基質や小胞構造がDAB沈着のために高い電子密度を示した。神経線維の多くは, 束を形成していたが, 単独で走行しているものもあった。神経束では, 陽性と陰性線維の混合がしばしば認められた。ほとんどの神経線維は無髄であったが, 前境界膜近くの結合組織には有髄線維が稀に認められた。この有髄線維はいずれの抗体にも陰性であった。TH陽性線維(図2A,B, 図3A)は虹彩全域にわたって分布しており, その少数は瞳孔散大筋の近傍にみられたが, 接触する像は認められなかった。TH陽性線維の径は細かった。SP/CGRP陽性線維は(図2C,D, 図3B)はもっぱら支質中に存在し, 一部, 瞳孔括約筋の近傍に集まっていた(図2D)。なお, 支質中の毛細血管の周囲にはSP/CGRP陽性線維が最も多かった。このSP/CGRPの線維の径は大小さまざまであった。TH/SP/CGRP陽性ならびに陰性線維(図2E,F, 図3C)は, いずれも虹彩全域にわたって分布していたが, 一部のものは瞳孔散大筋に接近し, また瞳孔括約筋の内部にも存

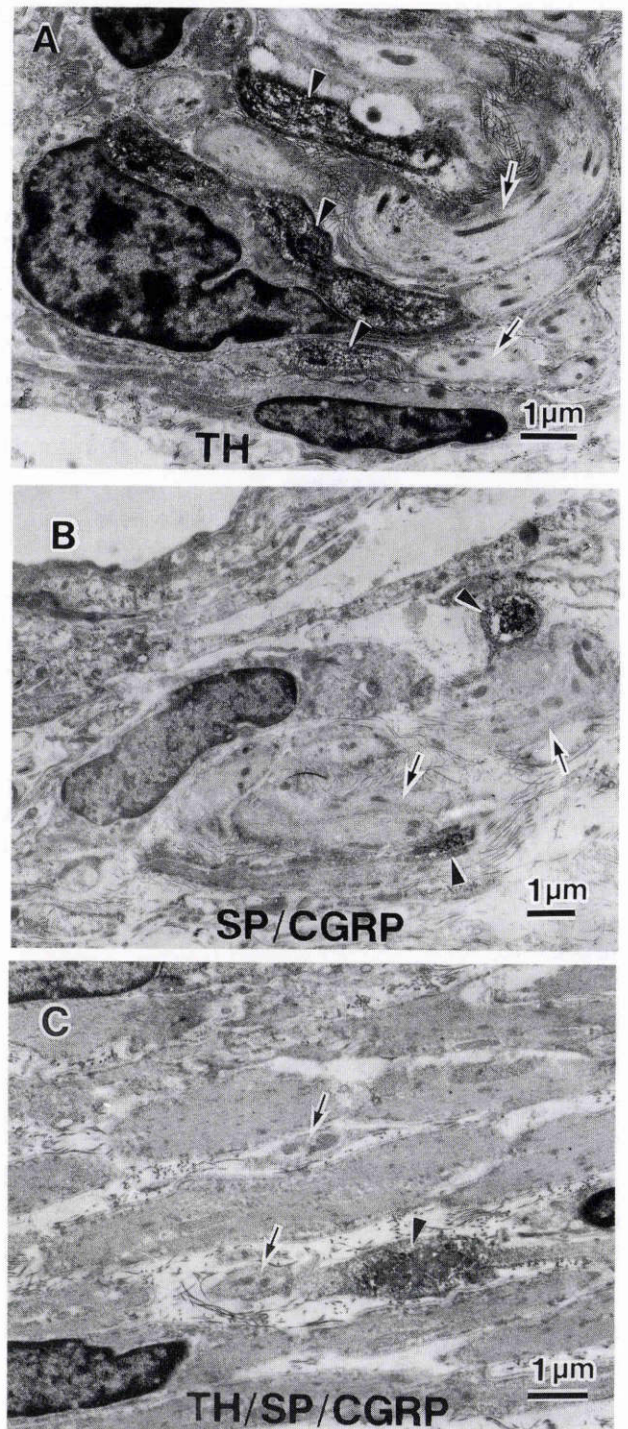


図3 各種抗体により免疫染色を行ったラット虹彩にみられた陽性, 陰性神経線維の電顕像。

陽性線維は矢尻, 陰性線維は矢印で示してある。

A: 抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体染色。瞳孔括約筋部の支質にみられた神経の束。写真中央左側には核膜嵌入を示すシュワン細胞の核がみられる。B: 抗サブスタンス P (SP) 抗体および抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 抗体の混合による染色。瞳孔散大筋領域の支質にみられた神経の束。この束においては, 陰性線維の方が陽性線維よりも多かった。C: 抗 TH, 抗 SP, 抗 CGRP 抗体の混合による染色。瞳孔括約筋筋層内にみられた神経線維。核は筋細胞のものである。

表1 各種神経の分布：観察例(1, 2, 3)の数値は虹彩円周方向 200 μm あたりの本数

部 位	n=3	抗体の組み合わせ					
		TH		SP/CGRP		TH/SP/CGRP	
		陽 性	陰 性	陽 性	陰 性	陽 性	陰 性
瞳孔散大筋							
前部	1	21	47	51	83	38	40
	2	22	74	57	147	57	57
	3	30	175	47	40	87	88
	平均本数	24.3	98.6	51.7	90	60.7	61.7
後部	1	32	61	6	7	27	91
	2	27	72	0	205	35	271
	3	14	88	10	116	42	195
	平均本数	24.3	73.7	5.3	109.3	34.7	185.7
瞳孔括約筋							
前部	1	55	92	39	63	137	51
	2	49	76	36	55	86	23
	3	56	83	19	82	64	32
	平均本数	53.3	83.7	31.3	66.7	95.7	35.3
後部 (筋層内)	1	26	100	1	40	25	108
	2	10	55	0	22	7	13
	平均本数	18.0	77.5	0.5	31	16	60.5

なお、瞳孔括約筋後部に関しては3例中1例において神経線維数が異常に少なく除外した。
 TH：抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体染色、SP/CGRP：抗サブスタンス P (SP) 抗体および抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 抗体の混合による染色、
 TH/SP/CGRP：抗 TH、抗 SP、抗 CGRP 抗体の混合による染色。

在していた。

神経線維の分布数とその比率：上皮細胞層には神経線維はみられないため、観察計数対象領域としては、上皮細胞を除いた残りの部分を前後に2等分した。瞳孔散大筋部では支質を前房側と後房側の2部に分け、瞳孔括約筋部では括約筋前房側の支質と筋層部に分けた。それぞれの部分について、TH陽性、SP/CGRP陽性、TH/SP/CGRP陰性線維の数を数え、平均本数を算出した(表1)。

1. 瞳孔散大筋部前房側ではTH陽性、SP/CGRP陽性、TH/SP/CGRP陰性の3種の神経線維が混在していた。分布比率は、それぞれ18%、37%、45%であった。

2. 瞳孔散大筋部後房側では、それぞれ11%、3%、86%であった。

3. 瞳孔括約筋部前房側では、それぞれ45%、26%、29%であった。

4. 瞳孔括約筋層部では、それぞれ23%、1%、76%であった。

IV 考 按

虹彩支配神経線維について、免疫組織化学法などで分類し、その分布比率について報告されたことはない。今回、我々は免疫組織化学法を用いてラット虹彩の神経線維の同定と分類を試みた。ドーパミン合成酵素であるTHはカタコラミン含有細胞の良いマーカーとして確立

されており¹⁸⁾、TH陽性線維を交感神経とみなした。知覚神経線維のマーカーとしては神経ペプチドであるSPやCGRPが考えられるが、モルモットでSP陽性線維のほとんどがCGRP陰性であることが報告されている¹¹⁾。一方、ラットでは、SPとCGRPの共存する線維以外にも、CGRP陽性かつSP陰性という線維がみられたとの報告もある¹⁹⁾。よって、ラット虹彩における知覚神経線維検出のためにはSPとCGRPの2種類を混合した方がより多くの知覚線維が観察できると考えた。実際、SPとCGRPは虹彩に知覚神経線維を送る三叉神経節の細胞に存在することが報告されており¹⁰⁾、SP/CGRP陽性線維はほぼ知覚線維と判断してもよいと思われる。

副交感神経線維のマーカーとしては vasoactive intestinal polypeptide (VIP) があるが、抗VIP抗体ではラット虹彩の線維は染色されなかったと報告されており²⁰⁾、実際、我々が用いた抗VIP抗体でも染色されなかった。また、アセチルコリン分解酵素である acetylcholine esterase の組織化学法も利用できるが²¹⁾、予備的に行った観察で陽性像が明らかに異型の2つのパターンを示し、今回の観察には利用しなかった。また、アセチルコリン合成酵素である choline acetyltransferase に対する免疫組織化学法も有用であるが、末梢神経系における反応は満足いく状態ではないといわれている²²⁾。以上のことから、本研究では3種類の神経を識別するのにTH、SP、CGRPの3種を上記の如く、単一あるいは混合

して使用, おおよそ TH 陽性線維を交感, SP/CGRP 陽性を知覚, TH/SP/CGRP 陰性を副交感性線維と判断した. 特に, 副交感性線維に関しては, Jackson²³⁾は細胞内 HRP 染色法を用いて, 毛様体神経節からの副交感性線維が瞳孔括約筋ばかりでなく, 瞳孔散大筋領域でも分枝し, 終末として機能していることを報告している. 瞳孔括約筋への単一の副交感性線維のインパルスが, 同時にそれに対応する領域の瞳孔散大筋を弛緩させることに働いていると述べている. 我々の今回の結果も彼の報告によく一致している. すなわち, 瞳孔散大筋の直前の支質内に多数存在する TH/SP/CGRP 陰性線維は, Jackson のいう瞳孔散大筋への副交感線維の関与と推測できる. 我々は今回, TH/SP/CGRP 陰性線維のほとんどを副交感線維とみなしたが, 陰性線維であるから全く別種の線維を含む可能性がある. たとえば, 神経ペプチドであるエンケファリンやニューロテンシンまたは, 最近注目されている酸化窒素合成酵素を含有する線維も含まれる可能性を考慮しなければならないであろう⁴⁾²⁴⁾²⁵⁾.

一方, SP は本来侵害(疼痛)知覚に関係しているといわれているが, 瞳孔括約筋における SP 陽性線維が種々の哺乳動物で非コリン, 非アドレナリン性の収縮を引き起こすといわれている²⁶⁾²⁷⁾. 我々の結果では, SP/CGRP 陽性線維は瞳孔括約筋の間に殆どみられなかったものの, 一部の線維が瞳孔括約筋近傍の支質に存在していたことは, ラットにおいて SP が括約筋の弱い収縮を引き起こすという薬理学的所見を支持していると思われる. また, 最近, SP やそれに関連するタキキニンが一次知覚神経の中枢内終末と同様, 末梢の終末でも神経伝達物質として働くことが薬理学的研究で報告され²⁸⁾, 眼の場合は血液房水柵の破壊, 虹彩や結膜の充血, 血漿滲出といったような神経性炎症を含む防御機構に関与すると考えられている²⁹⁾. 我々の観察において, SP/CGRP 陽性知覚線維のほとんどが散大筋でも括約筋でも前房側の支質に存在し(表1), また毛細血管周囲に多くみられたことは, これらの線維が上述の機能と関係していることを示唆している.

今回用いた神経線維の同定方法は決して完全なものとはいえない. さらに適確な検出方法を利用して, より詳細な分布と比率を確かめなければならないと考えている.

本研究を遂行するにあたり, 抗 TH 抗体を提供下さった藤田保健衛生大学の永津郁子教授, および技術的支援を提供下さった本学実験機器センター電顕部門の高木 均技官に深謝致します. 本論文の要旨は第 97 回日本眼科学会総会で発表した.

文 献

- 1) Ehinger B, Falck B: Concomitant adrenergic and parasympathetic fibres in the rat iris. *Acta Physiol Scand* 67: 201—207, 1966.
- 2) Björklund H, Hokfelt T, Goldstein M, Terenius L, Olson L: Appearance of the noradrenergic markers tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y in cholinergic nerves of the iris following sympathectomy. *J Neurosci* 5: 1633—1643, 1985.
- 3) Stone RA, Laties AM, Emson PC: Neuropeptide Y and the ocular innervation of rat, guinea pig, cat and monkey. *Neuroscience* 17: 1207—1216, 1986.
- 4) Hernandez DE, Jennes L: Immunohistochemical demonstration of neurotensin and tyrosine hydroxylase in iris nerves of the rabbit eye. *Histochemistry* 92: 261—264, 1989.
- 5) Terenghi G, Polak JM, Probert L, McGregor GP, Ferri GL, Blank MA, et al: Mapping, quantitative distribution and origin of substance P- and VIP- containing nerves in the uvea of guinea pig eye. *Histochemistry* 75: 399—417, 1982.
- 6) Miller AS, Coster DJ, Costa M, Furness JB: Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive nerve fibres in the human eye. *Aust J Ophthalmol* 11: 185—193, 1983.
- 7) Miller A, Costa M, Furness JB, Chubb IW: Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neurosci Lett* 23: 243—249, 1981.
- 8) Tervo K, Tervo T, Eränkö L, Eränkö O, Cuello AC: Immunoreactivity for substance P in the Gasserian ganglion, ophthalmic nerve and anterior segment of the rabbit eye. *Histochem J* 13: 435—443, 1981.
- 9) Seiger A, Selin UB, Kessler J, Black I, Ayer-Lelievre C: Substance P-containing sensory nerves in the rat iris. Normal distribution, ontogeny and innervation of intraocular iris grafts. *Neuroscience* 15: 519—528, 1985.
- 10) Kuwayama Y, Stone RA: Distinct substance P and Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in the guinea pig eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1947—1954, 1987.
- 11) Loewenfeld IE: Mechanisms of reflex dilatation of the pupil: Historical review and experimental analysis. *Docum Ophthalmol* 12: 185—448, 1958.
- 12) Duke-Elder S, Wybar KC: System of Ophthalmology, Vol. 2, The Anatomy of the Visual System, Henry Kimpton, London, 1961.
- 13) Narita S, Watanabe M: Response of the isolated rat iris sphincter to cholinergic and adrenergic agents and electrical stimulation. *Life Sci* 29: 285—292, 1981.
- 14) Yoshitomi T, Ito Y, Inomata H: Adrenergic excitatory and cholinergic inhibitory innervations in the human iris dilator. *Exp Eye Res* 40: 453—459, 1985.
- 15) Yoshitomi T, Ito Y: Double reciprocal innervations in dog iris sphincter and dilator muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 83—91, 1986.
- 16) Leander S, Håkanson R, Rosell S, Folkers K,

- Sundler F, Tornqvist K**: A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation. *Nature (Lond)* 294: 467—469, 1981.
- 17) **Uemura Y, Sugimoto T, Nomura S, Nagatsu I, Mizuno N**: Tyrosine hydroxylase like immunoreactivity and catecholamine fluorescence in ciliary ganglion neurons. *Brain Res* 416: 200—203, 1987.
- 18) **Nagatsu I, Karasawa N, Kondo Y, Inagaki S**: Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase, dopamine- β -hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyltransferase in the adrenal glands of the frog and rat by a peroxidase-antiperoxidase method. *Histochemistry* 64: 131—144, 1979.
- 19) **Matsuyama T, Wanaka A, Yoneda S, Kimura K, Kamada T, Girgis S, et al**: Two distinct calcitonin gene-related peptide-containing peripheral nervous systems: Distribution and quantitative differences between the iris and cerebral artery with special reference to substance P. *Brain Res* 373: 205—212, 1986.
- 20) **Uddman R, Alumets J, Ehringer B, Håkanson R, Loren I, Sundler F**: Vasoactive intestinal peptide nerves in ocular and orbital structures of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 878—885, 1980.
- 21) **Tago H, Kimura H, Maeda T**: Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J Histochem Cytochem* 34: 1431—1438, 1986.
- 22) **Kimura H, McGeer PL, Peng JH**: Choline acetyltransferase-containing neurons in the rat brain. In: Björklund A, et al (Eds): *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 3, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 51—67, 1984.
- 23) **Jackson PC**: Innervation of the iris by individual parasympathetic axons in the adult mouse. *J Physiol* 378: 485—495, 1986.
- 24) **Korezyn AD, Eshel Y, Keren O**: Enkephalin mydriasis in mice. *Eur J Pharmacol* 65: 285—287, 1980.
- 25) **Toda N, Okamura T**: Mechanism of neurally induced monkey mesenteric artery relaxation and contraction. *Hypertension* 19: 161—166, 1992.
- 26) **Butler JM, Hammond BR**: The effects of sensory denervation on the responses of the rabbit eye to prostaglandin E1, bradykinin and substance P. *Brit J Pharmacol* 69: 495—502, 1980.
- 27) **Unger WG, Tighe J**: The response of the isolated iris sphincter muscle of various mammalian species to substance P. *Exp Eye Res* 39: 677—684, 1984.
- 28) **Muramatsu I**: Peripheral transmission in primary sensory nerves. *Jpn J Pharmacol* 43: 113—120, 1987.
- 29) **Bill A, Stjernschantz J, Mandahl A, Brodin E, Nilsson G, Substance P**: Release on trigeminal nerve stimulation, effects in the eye. *Acta Physiol Scand* 106: 371—373, 1979.