

4) マウスにおける眼内平滑筋の細胞生理学的実験手法の確立と信号伝達経路の研究への展開

研究代表者 赤尾 鉄平

[研究目的]

眼内平滑筋は、目の遠近調節（毛様体筋）と光量調節（瞳孔括約筋と散大筋）に必要な微少張力を提供する重要な組織である。眼房水の流出率調節については眼内圧の恒常性維持にも重要な役割を演じており、その異常は緑内障の病因の一つとして注目されている。これらの筋が副交感神経（毛様体筋と瞳孔括約筋）または交感神経（瞳孔散大筋）に支配されることは組織学および薬理学的の研究により早くから知られているが、適当な動物実験材料が限られるところから伝達物質の作用機序に関する研究は非常に遅れている。今回の研究では、そのあまりの小ささから本分野では全く用いられてこなかったマウスの眼球を実験材料として使用するための方法を確立することを目指した。

[実験方法]

頸椎脱臼により屠殺した BALB/c オスマウスの眼球から虹彩をリング状に切り出し、U ゲージトランスデューサーにつないで等尺性張力を記録した。専用

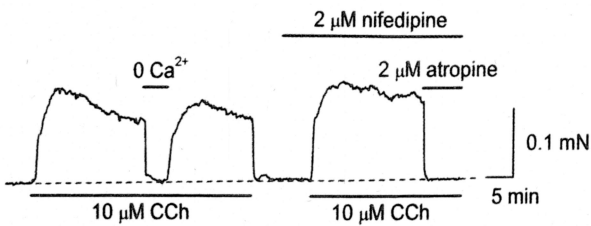


図1 マグヌス法によるマウス瞳孔括約筋の張力測定

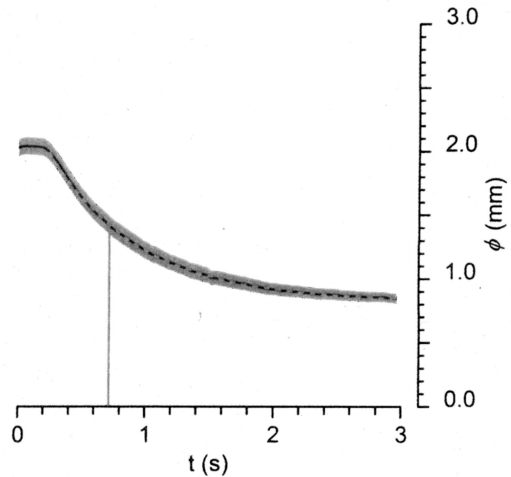


図3 マウス対光反射による瞳孔径変化

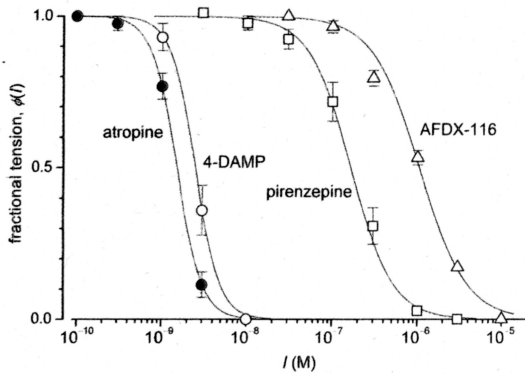


図2 マウス瞳孔括約筋におけるムスカリン受容体拮抗薬の濃度応答曲線

による張力発生に関わるムスカリン受容体は M_3 型であることを示している。Nifedipine ($1 \mu\text{M}$) は、CCh ($10 \mu\text{M}$) による収縮に影響を与えなかった (図なし)。これは、マウス瞳孔括約筋にはウシ毛様体筋と同様に L 型 Ca チャンネルが発現していないことを示す結果である。

に作成した微小灌流槽 (組織槽容量 $180 \mu\text{L}$) を用いた。灌流 (流速 1.1 mL) には HEPES-Krebs 液 ($\text{pH } 7.4$, 36°C) を用いた。生きたマウスの瞳孔径の変化を実体顕微鏡に取り付けた CMOS 赤外線ビデオカメラ (30 fps) を用いて観察した。暗闇で暗順応させたあと、白色 LED (輝度 10^7 cd/m^2) を目に照射したときの対光反射の時間経過を記録した。瞳孔径野経時変化は自作解析ソフトを用いてオフラインで解析した。

暗闇で暗順応させたマウスの瞳孔径は $2.1 \pm 0.1 \text{ mm}$ ($n=12$) であった。白色 LED 光を照射すると 0.2 s の潜時ののち、指数関数的 (時定数 $0.74 \pm 0.12 \text{ s}$) に $0.33 \pm 0.03 \text{ mm}$ ($n=12$) まで縮瞳した (図 3)。この縮瞳記録法は、われわれが計画している各種チャネル遺伝子 (TRPC や STIM1/Orai1 など) の遺伝子ノックアウトが眼内筋のムスカリン受容体刺激に対する応答に及ぼす影響を調べる実験に際し、目的にかなった標的遺伝子を決定するための非侵襲的スクリーニングテストに効果的に利用できるものと期待される。

[結果と考察]

瞳孔括約筋標本は灌流液に carbachol (CCh; $10 \mu\text{M}$) を投与すると比較的はやい立ち上がりの初期相と安定な持続相からなる張力を発生した (図 1)。この張力は、われわれが従来用いてきたウシ眼内筋標本の場合に比べ微小 (約 $1/10$) ではあるが十分ペンレコーダで記録可能であった (図 1)。持続相において灌流液から Ca^{2+} (2 mM EGTA 添加) を除くと筋は速やかに弛緩した (図 1)。各種ムスカリン受容体阻害薬は、CCh による収縮を濃度依存性に抑制した (図 2)。ID₅₀ 値 (nM) は次のとおり: atropine, 1.1; 4-DAMP, 1.5; pirenzepine, 164; AFDX-116, 1050。この結果は CCh