

一酸化窒素発生化合物の眼圧および房水動態に対する作用

小嶋 祥太¹⁾, 杉山 哲也, 清水 一弘¹⁾, 石田 理¹⁾中島 正之¹⁾, 東 郁郎¹⁾, 郷 保正²⁾¹⁾大阪医科大学眼科学教室, ²⁾塩野義製薬研究所

要 約

一酸化窒素(以下, NO)自発発生化合物であるS-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン(SNAP)の白色家兎の眼圧に及ぼす影響を検討した。SNAP(10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M) 20 μ l を硝子体内に注入すると, 眼圧は60~120分後に有意に下降し, その下降は 10^{-3} Mと 10^{-4} Mで用量依存性を示した。これらの変化はNO消去剤前投与により抑制されることから, SNAPから発生したNOによって生じたと考えられる。また, このときの前房内フレア値はほとんど変化しなかった。また, 房水流出率, 房水

流量にもSNAP投与による影響はみられなかった。以上から, SNAP硝子体内投与は家兎眼圧を下降させるが, その機序はconventional outflowや房水産生量の変化とは直接には関係がないと考えられた。(日眼会誌 100: 181-186, 1996)

キーワード: 一酸化窒素, SNAP, 眼圧, 房水流出率, 房水流量

Effect of a Nitric Oxide Donor on Intraocular Pressure

Shota Kojima¹⁾, Tetsuya Sugiyama¹⁾, Kazuhiro Shimizu¹⁾,
Osamu Ishida¹⁾, Masayuki Nakajima¹⁾, Ikuo Azuma¹⁾
and Yasumasa Goh²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Osaka Medical College²⁾Shionogi Research Laboratories, Osaka

Abstract

We examined the effect of nitric oxide (NO) on intraocular pressure (IOP) and aqueous humor dynamics by using a NO donor, S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) in rabbits. Intravitreal injection of 20 μ l of SNAP solution (10^{-4} to 10^{-2} M) reduced IOP from 60 to 120 min after injection. The magnitude of IOP reduction was dose-dependent within 10^{-4} and 10^{-3} M. The IOP reduction was inhibited by pretreatment with a NO trapping agent, carboxy-PTIO, indicating that IOP reduction was induced by NO released from SNAP. The aqueous flare as assessed with a laser cell flare meter was not

accompanied with the IOP reduction indicating that no inflammatory response occurred. Neither tonographic outflow facility nor aqueous flow rate was affected by the treatment with SNAP. We conclude that NO reduces IOP through a mechanism which is not directly involved with the change of conventional outflow or aqueous formation in rabbits. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 181-186, 1996)

Key words: Nitric oxide, SNAP, Intraocular pressure, Outflow facility, Aqueous flow rate

I 緒 言

一酸化窒素(NO)は血管内皮細胞由来弛緩因子(endothelium-derived relaxing factor: 以下, EDRF)として局所の血流調節に重要な役割を果たしていることが近年判明し, その血管拡張作用¹⁾や血管平滑筋弛緩作用²⁾など

について報告されている。

眼局所においては, 網膜におけるNOの作用³⁾やNO合成酵素(以下, NOS)の局在が調べられており, 毛様体上皮においてもNOSが存在していることが報告⁴⁾されている。また, 生体内でNOを発生する化合物は, ①NO産生系を活性化するもの, ②代謝されてNOを発生す

別刷請求先: 569 大阪府高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 小嶋 祥太
(平成7年8月15日受付, 平成7年10月6日改訂受理)

Reprint requests to: Shota Kojima, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Medical College, 2-7, Daigaku-cho, Takatsuki-shi, Osaka-fu 569, Japan

(Received August 15, 1995 and accepted in revised form October 6, 1995)

るもの、③ NO 自発発生化合物の3種類に大きく分類され、様々な研究に広く使用されている⁵⁾。

眼房水の動態に関与する作用としては、房水動態に重要な役割を担っている毛様体筋を NO が弛緩させることが知られている⁶⁾。また、眼圧下降作用について Nathanson⁷⁾や Schuman ら⁸⁾は sodium nitroprusside や hydralazine などの NO 関連物質を点眼すると眼圧下降が起こると報告している。しかし、彼らの用いた化合物は純粋な NO 発生化合物といいがたい。例えば、sodium nitroprusside は NO 発生作用も知られるが、分子中の鉄の影響も考えられる。また、他の化合物は代謝過程を経て NO を発生させることがわかっており、他の作用があることも知られている。したがって、厳密な意味で NO 単独の眼圧下降作用と切り切れない。そこで今回、我々は NO の眼圧および房水動態への影響について調べるため、NO 自発発生化合物である S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (以下、SNAP) を家兎硝子体内に投与して検討した。

II 実験方法

対象は、成熟白色家兎 33 匹(体重 2.5~4.0 kg) 66 眼を用いた。実験は、塩酸オキシブプロカイン(ペノキシール®)点眼による局所麻酔のみで行った。眼圧・房水流出率測定には Alcon Applanation Pneumatograph® を、前房内フレア値は興和社製レーザーセルフレアメーター FC-1000 を使用し、房水流量測定には Coherent 社製 Fluorotron Master® を用いた。使用した薬剤は SNAP (和光純薬)で、これは S-ニトロソ化合物であり、数少ない NO 自発発生剤として用いられる重要な物質で常温では比較的安定である(図 1)。試験薬としては、この物質を DMSO(dimethyl sulfoxide)100% 液で 10^{-1} M に溶解し、それを眼内灌流液(オベガード MA®, 千寿製薬)で希釈して 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} M 液を作成して用いた。また、NO の消去剤としては、2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) の水溶性を増加させた物質である carboxy-PTIO (和光純薬)をオベガード MA® で溶解し、 10^{-2} M 液として用いた。対照液としては各試験薬(各濃度)の溶媒のみを用い、硝子体内注入に際してはハミルトン社製・マイクロシリンジ# 705 (50 μ l) に 30 G 針を付けて用いた。

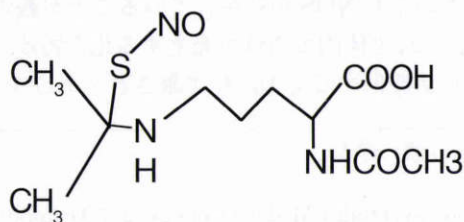


図1 S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)の構造式。

実験1：SNAP 単独投与および NO 消去剤前投与の眼圧への影響

輪部から 3 mm 後極側の強膜から 30 G 針で硝子体中央部に向けて、白色家兎の 1 眼にそれぞれ 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M の濃度の SNAP を、他眼には対照液を各 20 μ l 注入し、その際の対照眼と処置眼の眼圧の経時的变化を 15 分毎に 3 時間にわたって測定した。次いで、1 眼に NO 消去剤である carboxy-PTIO を、他眼に対照液を各 20 μ l 硝子体内投与した 15 分後、両眼に SNAP (10^{-3} M) 20 μ l を硝子体内に注入し、眼圧の経時的变化を同様に測定した。

実験2：SNAP 投与による前房内フレア値への影響

実験 1 と同様に、1 眼には SNAP (10^{-2} M) 20 μ l を、他眼には対照液を各 20 μ l 注入し、その際の前房内フレア値を 30 分毎に 3 時間にわたって測定した。

実験3：SNAP 投与による房水流出率 C 値への影響

実験 1 と同様に、1 眼には SNAP (10^{-3} M) 20 μ l を、他眼には対照液を各 20 μ l 注入し、その際の房水流出率 C 値の変化を投与前と投与 90 分後に、2 分間のトノグラフィを用いて測定した。なお、このトノグラフィはヒトのものを準用したものであり、正確には家兎用のものではないが、対照眼との比較をする上では問題はないと思われる⁹⁾¹⁰⁾。

実験4：SNAP 投与による房水流量 F 値への影響

房水流量 F 値は 10% フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)溶液 50 μ l を 5 分毎に 5 回点眼し、生理食塩水で十分に洗浄してから点眼開始 6.5 時間後から 90 分毎にフルオレセインの前房内濃度と角膜濃度とを測定し、2 点間の減少曲線から算出した¹¹⁾。なお、この測定前に無処置の家兎を上記の方法でフルオレセイン濃度を測定し、点眼後約 5 時間経ればその減少が定常となるのを確認した。試験薬の投与はフルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)溶液点眼 6.5 時間後と 8 時間後の両眼のフルオレセイン濃度を前述のように測定し、8 時間後の測定直後に実験 1 と同様にしてい、1 眼には SNAP (10^{-3} M) 20 μ l を、他眼には対照液を各 20 μ l 注入した。そして、9.5 時間後と 11 時間後の前房と角膜のフルオレセイン濃度を測定した。6.5 時間後と 8 時間後のフルオレセイン濃度を用いて計算した F 値を投与前の値とし、同様に 8 時間後から 9.5 時間後の値と、9.5 時間後から 11 時間後の値を用いて F 値を計算し、それらを投与後の値とした。

なお、統計処理は、実験 1 では SNAP 単独投与での眼圧下降を調べたものでは、試験薬の投与前後の間で paired t-test を用い、NO 消去剤を用いた実験では対照眼と消去剤前投与眼との間で paired t-test を用いた。他の実験では、初期値と投与後との間および試験薬投与眼と対照眼との間で paired t-test を行った。有意水準が 5% 未満のものを統計学的に有意とした。

III 結 果

実験1：SNAP 単独投与およびNO 消去剤前投与の眼圧への影響

10^{-4} M の SNAP 投与眼と対照眼の眼圧の変化は、それぞれ初期値が 19.8 ± 2.5 (平均値 $\pm$ 標準偏差, 以下同様), 19.0 ± 2.9 , 最大の眼圧差が出た 75 分後では 18.8 ± 2.4 , 21.0 ± 1.9 , 最終測定時間である 3 時間後が 19.3 ± 2.5 , 20.3 ± 1.3 であった。 10^{-3} M の SNAP 投与眼と対照眼の眼圧の変化では、初期値が 20.8 ± 3.1 , 21.0 ± 2.9 , 最大の眼圧差が出た 90 分後では 19.0 ± 3.6 , 23.8 ± 3.2 , 3 時間後が 19.5 ± 4.7 , 20.3 ± 3.6 であった。 10^{-2} M の SNAP 投与眼と対照眼の眼圧の変化では、初期値が 21.5 ± 4.5 , 21.6 ± 3.5 , 最大の眼圧差が出た 75 分後では 18.8 ± 4.9 , 23.0 ± 2.5 , 3 時間後が 20.0 ± 3.9 , 21.3 ± 3.5 であった。SNAP 投与眼と対照眼の眼圧差で検討すると、対照眼と比較して SNAP 投与眼では、 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M とも 60 分後から 120 分後まで下降が認められ (図2), 10^{-3} M では投与 60 分後から 120 分後まで有意に下降を認め、90 分後に最大平均 4.5 mmHg 下降した (図3)。図2は3濃度での眼圧の変化をまとめたもので、

図3は 10^{-3} M のみを標準誤差を含めてグラフにしている。 10^{-4} M (2 nmol) より 10^{-3} M (20 nmol) で用量が高いほど眼圧下降も大きくなる傾向を示したが、 10^{-2} M (200 nmol) では 10^{-3} M とほぼ同様の下降を認めた。このことから、少なくとも 10^{-4} M $\sim 10^{-3}$ M (2 $\sim$ 20 nmol) においては用量依存性があるものと推測された。

Carboxy-PTIO は NO 消去剤であり、NO を捕捉し NO の作用をなくすことが知られている。Carboxy-PTIO を片眼の硝子体内に前投与し、その後、両眼に SNAP を投与したときの両眼の眼圧変化を図4に示す。Carboxy-PTIO 投与眼では SNAP 単独より眼圧下降は小さく、carboxy-PTIO が SNAP の作用による眼圧下降を抑制することがわかった。

実験2：SNAP 投与による前房内フレア値への影響

SNAP 投与による炎症作用を調べるため、今回用いた中で最も濃度の高い SNAP 10^{-2} M (200 nmol) の投与による前房内フレアの変化を測定したが、投与後 15 分から 3 時間後にわたって対照眼との間で有意な差はみられなかった (図5)。また、浸潤した細胞数についても計測したが、変化はみられなかった。

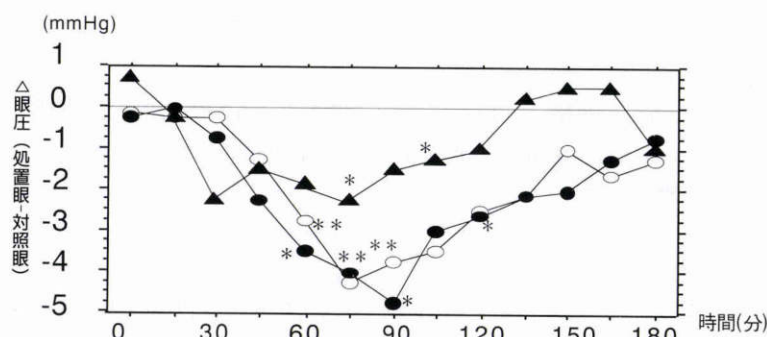


図2 SNAP (20 μ l) 硝子体内投与による眼圧の変化。

▲: 10^{-4} M (2 nmol), ●: 10^{-3} M (20 nmol), ○: 10^{-2} M (200 nmol). Y 軸の Δ 眼圧 (mmHg) は、SNAP 投与眼の眼圧から vehicle 投与眼の眼圧を引いた差、つまり、[処置眼 - 対照眼]. 各 $n=4$. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (paired t-test による初期値との比較)

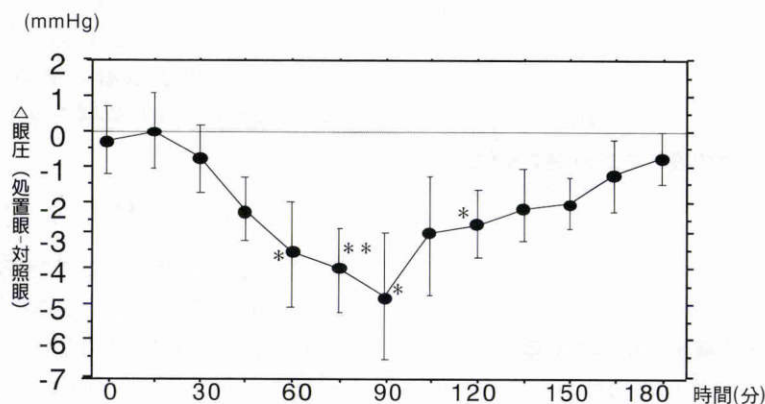


図3 SNAP (10^{-3} M $\times$ 20 μ l = 20 nmol) 硝子体内投与による眼圧の変化。

$n=4$, バーは標準誤差を示す. *: $p < 0.05$ (paired t-test による同時点での比較)

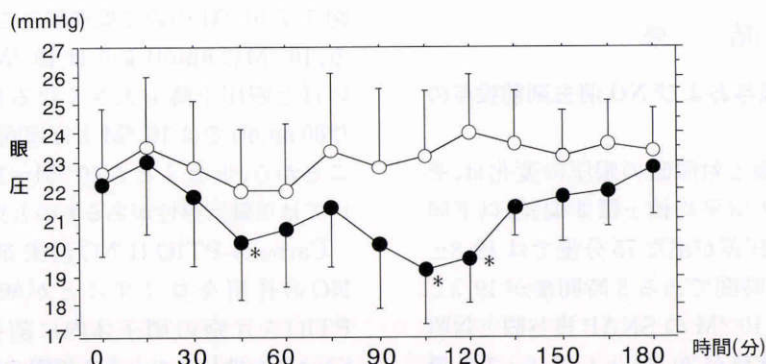


図4 SNAP(20 nmol)による眼圧の変化に対するPTIO(200 nmol)前投与の影響。

●：対照液投与 15 分後に SNAP 10⁻³M(20 nmol)を投与した眼圧, ○：PTIO 投与 15 分後に SNAP 10⁻³M(20 nmol)を投与した眼圧, n=5, X 軸は SNAP 投与時からの時間, バーは標準誤差を示す。*: p<0.05(pair-wise t-test による対照眼との比較)

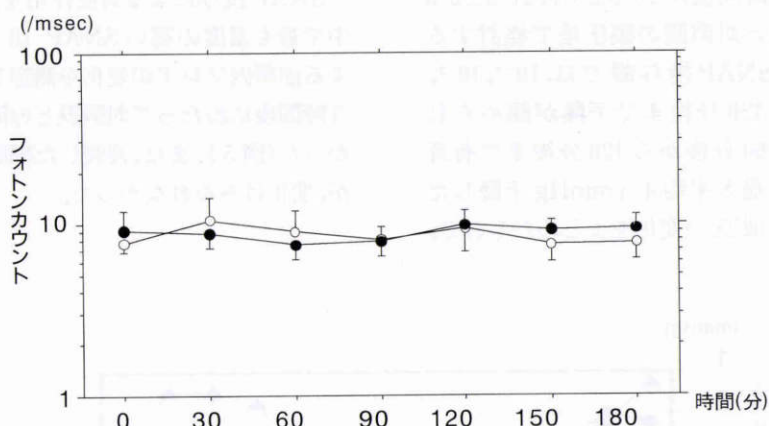


図5 SNAP(200 nmol)硝子体内投与による前房内フレアの変化。

●：SNAP, ○：対照液, 各 n=4, バーは標準誤差を示す。

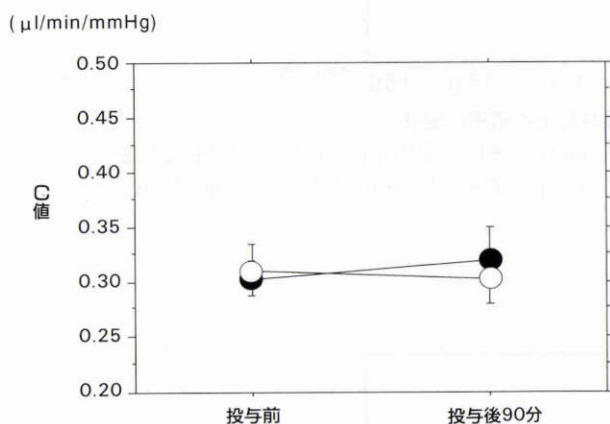


図6 SNAP(20nmol)硝子体内投与によるC値の変化。

●：SNAP, ○：対照液, 各 n=6, バーは標準誤差を示す。

実験3：SNAP投与による房水流出への影響

SNAP投与による眼圧下降作用の機序を調べるために最も眼圧下降が大きかったSNAP 10⁻³M(20 nmol)を用いて房水流出率を測定した。投与前のC値は約0.3と

なり、家兎で過去に報告されている値¹⁰⁾とほぼ一致した。SNAP投与後、最大眼圧下降を示す90分後に測定したC値は対照群および前値と差はなく、SNAP投与はC値に影響を与えないことがわかった(図6)。

実験4：SNAP投与による房水流量への影響

さらに、SNAP投与による眼圧下降作用の機序を調べるために最も眼圧下降が大きかったSNAP 10⁻³M(20 nmol)を用いて房水流量を測定した。投与前のF値は約1.7となり、家兎で過去に報告されている値¹¹⁾より小さいが、これは測定機器の違いによるものと思われ、SNAP投与はF値に影響を与えないことがわかった(図7)。

IV 考 按

NOの眼局所投与による眼圧に関する報告については、これまでKrupinら¹²⁾がNO関連物質であるsodium azide(NaN3)0.1~2.0%やsodium nitroprusside(SNP), 0.1~2.0%の点眼によって眼圧が上昇するという報告をしている。眼圧上昇の機序として、全身血圧やトノグラフィーを用いた房水流出率が影響を受けないこと

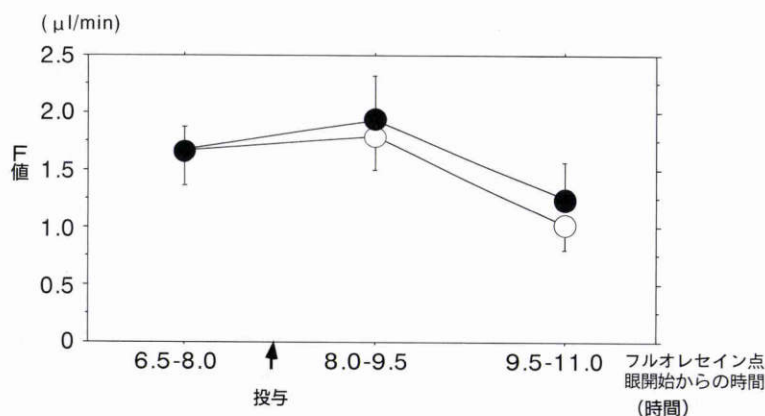


図7 SNAP (20 nmol) 硝子体内投与による F 値の変化。

投与は, SNAP または対照液を硝子体内投与したという意味, それぞれの値は, フルオレセイン点眼後の測定時間の 2 点間での房水流量 F 値を計算したもの. ●: SNAP, ○: 対照液. 各 n=6, バーは標準誤差を示す.

から, 房水産生量が増加することによって生じていると推測している. Nathanson⁷⁾は, さらに多くの NO 関連物質 (nitroglycerin, SNP, sodium nitrite, hydralazine など) を用いて詳細に眼圧の変化を調べている. 今回の我々の実験では, NO そのものの作用を調べるために NO 自発発生化合物である SNAP を用いた. その理由は, 代謝過程を含んで NO を発生させる物質や他の作用があることが知られている物質を投与すると, NO 自体の作用のみでなく, 別の経路が働く可能性があるからである. したがって, NO 自発生物の硝子体内投与は NO 単独の作用をみるのに適していると考えられる. SNAP 10^{-4} M (2 nmol), 10^{-3} M (20 nmol), 10^{-2} M (200 nmol) の 3 濃度の硝子体内投与による眼圧の変化を調べたところ, この 3 濃度とも明らかな眼圧下降作用がみられ, 10^{-3} M (20 nmol) を最大降下量とする用量依存性がみられた. また, NO に直接作用して消去する物質である carboxy-PTIO¹³⁾により, この作用が抑制されたことから, この眼圧下降作用が NO によるものであることが結論される. 濃度や NO 消去剤前投与による最大眼圧差の生じる時間のずれは, NO やその消去剤の硝子体中の拡散速度や複雑な作用機序によるものと推測される.

また, NO はラジカルであるため細胞障害を起こし, プロスタグランジン産生を含んだ炎症様反応を起こす可能性が考えられる. そこで前房内フレアを測定し, 炎症様反応の有無について検討した. その結果, フレア値および細胞数に変化はなく, 炎症様反応が起こっていないことが確認された.

眼圧下降の機序として, Nathanson ら⁷⁾や Schuman ら⁸⁾は NO による房水流出率の増大を指摘しているが, 彼らの実験においても濃度や条件の相違があると, 必ずしも NO によって房水流出率が増大するとは限らず, NO の特殊な作用機序により様々な部位へ様々な作用を及ぼしている可能性があるとして結論づけている. 我々は眼圧下降機序を調べるためにまず房水流出率を測定した

が, 対照眼と差がなかった. C 値が必ずしも正確な流出率を反映するものではないが, 前房内のフレアが SNAP 硝子体内投与により変化しなかったことから血液房水柵の破壊は考えにくく, 少なくとも左右眼の pseudofacility の血液房水柵の破壊による差はないものと考えられる. しかし, これらのことを正確に知るにはまた別の方法が必要になると思われる. また, 我々は房水流量を測定したが, 特に変化が生じなかった. これら 2 つの実験から, NO は conventional outflow や房水産生には大きな影響を与えないで眼圧を下降する可能性が考えられ, NO による眼圧下降機序はそれ以外の要因, すなわちぶどう膜強膜流出の増加や上強膜静脈圧の下降によるものが関与するのではないかと推測された. SNAP を含んだ NO 発生剤は毛様体筋を弛緩させることが報告⁶⁾されている. 毛様体筋の弛緩は房水のぶどう膜強膜流出を促進することが知られているので, 今回の SNAP による眼圧下降の一部にぶどう膜強膜流出が関与している可能性が大きいと考えられるが, 房水流出系のより詳しい検討が必要であると考えられた. また, NO の作用は多種多様で不安定であり, また, 作用機序も複雑で拡散も一定でなく, 種々の要因によって容易に変化を受ける可能性がある. したがって, 今回の結果はあくまでもここで示した実験系を用いた結果であるので, いかなる条件下でも同じ結果を得られるとは限らない. 詳細については今後の検討が待たれる.

本論文の要旨は第 99 回日本眼科学会総会 (平成 7 年 4 月, 名古屋) において発表した.

文 献

- 1) Edwards CJ, Ignarro JL, Hyman LA, Kadowitz JP: Relaxation of intrapulmonary artery and vein by nitrogen oxide-containing vasodilators and cyclic GMP. J Pharmacol Exp Ther 228: 33-42, 1983.
- 2) Ignarro JL, Lippton H, Edwards CJ, Baricos HW, Hyman LA, Kadowitz JP, et al: Mecha-

- nism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrate, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218: 739—749, 1981.
- 3) **Kitamura Y, Okamura T, Kani K, Toda N**: Nitric oxide-mediated retinal arteriolar and arterial dilatation induced by substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2859—2865, 1993.
 - 4) **Osborne NN, Barnett LN, Herrera JA**: NADPH diaphorase localization and nitric oxide synthetase activity in the retina and anterior uvea of the rabbit eye. *Brain Res* 610: 194—198, 1993.
 - 5) **丹野雅幸, 宮田直樹**: 生体内で NO を発生する化合物. *現代化学* 4: 36—41, 1994.
 - 6) **Goh Y, Hotehama Y, Mishima KH**: Characterization of ciliary muscle relaxation induced by various agents in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1188—1192, 1995.
 - 7) **Nathanson AJ**: Nitrovasodilators as a new class of ocular hypotensive agents. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 956—965, 1991.
 - 8) **Schuman SJ, Erickson K, Nathanson AJ**: Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res* 58: 99—105, 1994.
 - 9) **Langham EM, Leydhecker W, Krieglstein G, Waller W**: Pneumotonographic studies on normal and glaucomatous eyes. *Adv Ophthalmol* 32: 108—133, 1976.
 - 10) **Goh Y, Oshima T, Araie M**: Mechanism of intraocular pressure reduction observed after topical applanation of S-1033 in animals. *Jpn J Ophthalmol* 38: 228—235, 1994.
 - 11) **Goh Y, Araie M, Nakajima M, Azuma I, Hayashi O**: Effect of topical prostaglandin D₂ on the aqueous humor dynamics in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227: 476—481, 1989.
 - 12) **Krupin T, Weiss A, Becker B, Holmberg N, Fritz C**: Increased intraocular pressure following topical azide or nitroprusside. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 1002—1007, 1977.
 - 13) **Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohono M, Sasamoto K**: Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction. *Biochem* 32: 827—832, 1993.