

網膜の虚血—再灌流障害に対するカルシウム拮抗薬の作用

森 敏郎¹⁾, 菅原 岳史²⁾, 細部 泰雄²⁾, 後藤 寿裕²⁾, 加藤 千晶²⁾, 田澤 豊²⁾¹⁾岩手県立中央病院眼科, ²⁾岩手医科大学医学部眼科学教室

要 約

カルシウム拮抗薬の一種であるニカルジピン(NC)の虚血—再灌流障害に対する網膜保護効果を検討した。0.01%のNC生理食塩水溶液0.1 mlを家兎の硝子体内に注入し、60分後に眼圧を140 mmHgに上昇させて90分間の網膜虚血を負荷し、再灌流した後に網膜電図(ERG)を記録した(n=4)(NC群)。また、虚血を負荷せずに同量のNCを硝子体内に注入してERGを記録することにより、NC自体の網膜に及ぼす影響も検討した(n=4)。その結果、NC群の虚血解除後のb波振幅は、生理食塩水を注入した対照群と比較して有意に高い回復率

を示した($p<0.05$)。a波振幅およびb波頂点潜時は、NC群と対照群との間で有意差はなかった。NCを投与した非虚血負荷網膜からのERGは、投与前と比較して変化は認められなかった。NCの網膜虚血—再灌流障害に対する予防効果が確認され、同剤が網膜虚血治療剤として有用である可能性が示唆された。(日眼会誌 100: 773—776, 1996)

キーワード: カルシウム拮抗剤, ニカルジピン, 網膜, 虚血—再灌流障害, 網膜電図

The Effect of Calcium Antagonist on Ischemia-reperfusion Injury of the Rabbit Retina

Toshiro Mori¹⁾, Takeshi Sugawara²⁾, Yasuo Hosobe²⁾,
Toshihiro Gotoh²⁾, Chiaki Kato²⁾ and Yutaka Tazawa²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Iwate Prefectural Central Hospital²⁾Department of Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine

Abstract

We investigated the effect of nicardipine (NC), a calcium antagonist, on retinal ischemia-reperfusion injury. Electroretinogram(ERG) was recorded from rabbit eyes before and after ischemia produced by increasing intraocular pressure to 140 mmHg for 90 min after giving 0.01% NC (0.1 ml) intravitreally (n=4). ERGs from intact (non-ischemic) rabbit eyes after injecting NC intravitreally was also recorded (n=4)(NC group). The recovery rate of b-wave amplitude after reperfusion was significantly higher in the NC group than in the control group which was given saline without NC ($p<0.05$). There were no significant differences between the NC and the

control groups in a-wave amplitude and implicit time of the b-wave. No significant changes were detected in the a-wave or b-wave amplitude after intravitreal injection of NC into the intact eyes. We suggest that NC can prevent ischemia-reperfusion injury of the rabbit retina and could be considered for clinical use. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 773—776, 1996)

Key words: Calcium antagonist, Nicardipine, Retina, Ischemia-reperfusion injury, Electroretinogram(ERG)

I 緒 言

カルシウム拮抗薬(以下, Ca拮抗薬)は、血管拡張作用を有し、また、虚血性の細胞障害を軽減することから、脳

循環の治療薬として注目を集めている薬物である。眼科領域の虚血性疾患に対しても網膜浮腫の軽減や網膜血流量の増大などを目的として、その有効性が検討されつつある^{1)~3)}。しかしながら、網膜における虚血とその後の再

別刷請求先: 020 岩手県盛岡市上田1-4-1 岩手県立中央病院眼科 森 敏郎

(平成7年10月11日受付, 平成8年5月14日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiro Mori, M.D. Department of Ophthalmology Iwate Prefectural Central Hospital. 1-4-1 Ueda, Morioka-shi, Iwate-ken 020, Japan

(Received October 11, 1995 and accepted in revised form May 14, 1996)

灌流障害(虚血一再灌流障害)に対する同剤の作用機序と有効性については、未だ不明な点が多々残されている。

そこで今回は、実験的網膜虚血を作成した家兎に Ca 拮抗薬の一種であるニカルジピン(NC)を投与し、網膜電図(ERG)を指標として NC の網膜虚血保護剤としての有効性を検討した。

II 実験方法

有色家兎(体重 1.8~3.2 kg)14 匹 14 眼の瞳孔をミドリン P®(参天)および 1% アトロピンで極大散瞳させた後に、家兎の腹腔内にウレタン(1.0 g/kg)を注射して全身麻酔した。

ERG の記録には電極として銀-塩化銀電極を用い、関電極は角膜面上に、不関電極は角膜輪部から 3 mm 後方の強膜上に設置した。また、接地電極として 19 G 注射針を大腿筋に刺入した。光刺激は 250 W ハロゲンランプ光を直径 6 mm のファイバーオプティクスで眼前に誘導し、角膜面上で 4,000 lx に調節した。刺激時間は 4 秒とした。誘発された網膜応答は交流増幅器(日本光電社 AVB-21)で増幅した後、オシロスコープ(日本光電社 RTA-1100)に表示してこれを記録した。

NC の虚血網膜に対する効果を検討するため、0.01% NC 生理食塩水溶液 0.1 ml を 27 G 針で毛様体扁平部から硝子体腔内に注入し、その 60 分後に後述する方法で網膜虚血を负荷した(NC 群)。NC 投与前、網膜虚血前、虚血解除直前および網膜虚血を解除後 4 時間まで 30 分間隔で、さらに 24 時間後に ERG を記録した。対照群は同量の生理食塩水を硝子体に注入し、60 分後に網膜虚血を上記と同様に负荷した。

NC 自体の網膜への影響を検討する目的で、網膜虚血を负荷せずに 0.01% NC 生理食塩水溶液 0.1 ml あるいは生理食塩水のみ 0.1 ml を硝子体内注入した群の、注入後 4 および 24 時間の ERG を記録した。

得られた ERG の a, b 波振幅と b 波の頂点潜時を、NC あるいは生理食塩水注入前に記録した値(100%)と比較し、回復率あるいは変化率を student's paired t-検定で検討した。網膜虚血の作成方法は前報^{4)~6)}に詳細に記載したが、22 G の血管留置針を角膜輪部から前房内に刺入し、この針とヘパリン加生理食塩水を満たした注射筒とを接続し、注射筒を押すことによって眼圧を 140 mmHg に上昇させ 90 分間持続した。

II 結果

1. 虚血眼から記録した ERG の代表波形

NC あるいは生理食塩水を硝子体内に投与し、その後虚血を负荷したそれぞれの群の ERG の代表波形を図 1 に示した。NC 群および対照群ともに虚血によって ERG 振幅は消失したが、虚血解除後は 4 時間までは a, b 波振幅が次第に回復し、その後、24 時間までほぼ同じ波

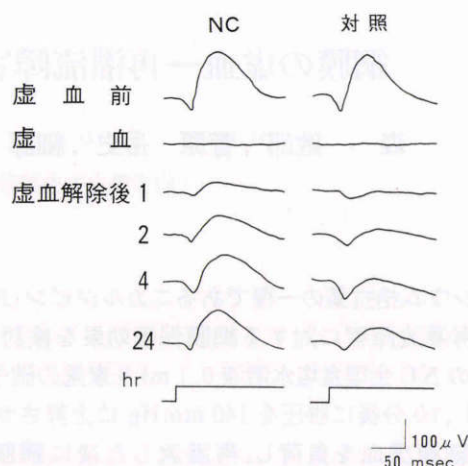


図 1 虚血负荷眼から記録された網膜電図(ERG)の代表波形。

対照には生理食塩水を硝子体内に注入している(図 2, 3 および 4 も同じ)。NC: ニカルジピン

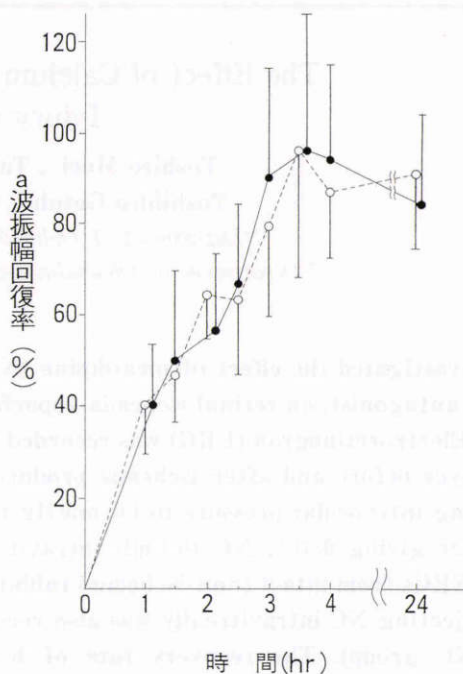


図 2 虚血解除後の ERG a 波振幅回復率の経時変化 (n=4)。

○: ニカルジピン群, ●: 対照群(図 3 と 4 も同じ)。

形を示した。

2. 虚血眼における NC による a 波振幅回復への効果

NC 群および対照群の虚血解除後の a 波振幅の回復率(n=4 の平均)の経時的变化を図 2 に示した。対照群の a 波の振幅は硝子体内注入前の値と比較して、虚血解除後 1 時間で $40.5 \pm 11.1\%$ (平均値 $\pm$ 標準偏差, 以下同じ)、2 時間で $65.8 \pm 11.0\%$, 3 時間で $79.8 \pm 21.2\%$, 4 時間で $87.5 \pm 15.8\%$ と徐々に増大した後、その値を保ち、24 時間で $91.8 \pm 16.5\%$ とほぼその値を維持していた。一方、NC 群では虚血解除後 1 時間で $40.5 \pm 13.8\%$, 2 時

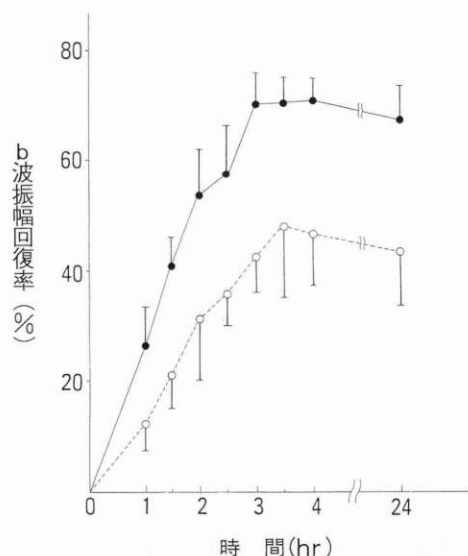


図3 虚血解除後の ERG b 波振幅回復率の経時変化 (n=4).

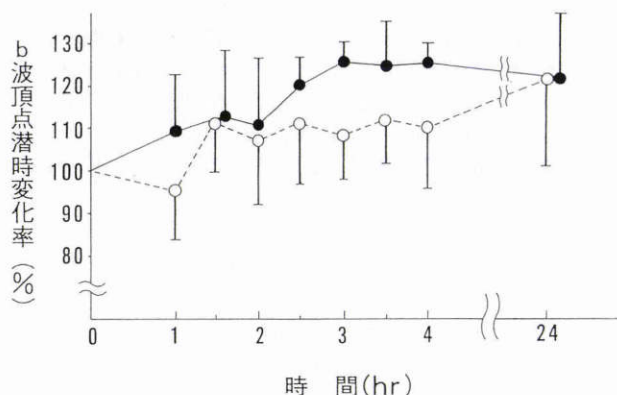


図4 虚血解除後の ERG b 波頂点潜時の変化率の経時変化 (n=4).

間で $56.8 \pm 17.0\%$, 3 時間で $89.5 \pm 25.1\%$, 4 時間で $93.7 \pm 21.1\%$ と徐々に増大した後, その値を保ち, 24 時間では $83.3 \pm 21.1\%$ とほぼその値を維持していた. NC 群と対照群との間には有意差は認められなかった.

3. 虚血眼における NC による b 波振幅回復への効果

NC 群および対照群の虚血解除後の b 波振幅の回復率 (n=4 の平均) の経時変化を図 3 に示した. 対照群の b 波振幅の回復率は, 虚血解除後 1 時間では $12.3 \pm 4.5\%$, 2 時間で $31.3 \pm 1.4\%$, 3 時間で $42.3 \pm 6.7\%$, 4 時間で $46.8 \pm 9.5\%$ と徐々に回復し, 24 時間後は $43.3 \pm 10.3\%$ とその値を維持していた. 一方, NC 群の b 波振幅の回復率は, 虚血解除後 1 時間で $26.4 \pm 6.9\%$, 2 時間で $54.0 \pm 9.2\%$, 3 時間で $70.1 \pm 6.5\%$, 4 時間で $72.2 \pm 4.0\%$ と徐々に回復した後, その値を保ち, 24 時間後は $67.7 \pm 5.9\%$ であった. 両群とも a 波の場合よりも回復率は低かったが, NC 群の回復率は対照群よりもすべての測定時点で有意に高値を示した ($p < 0.05$).

表 1 非虚血負荷眼から記録された網膜電図振幅の変化率

注入後の時間	NG 群	生理食塩水群
a 波 4 (時間)	100.2 ± 10.2	$102.8 \pm 29.2 (\%)$
24	94.8 ± 17.8	108.3 ± 14.4
b 波 4	105.0 ± 14.0	97.7 ± 3.5
24	104.0 ± 1.4	102.0 ± 3.5

ニカルジピン (NG) と生理食塩水を硝子体内へ投与している.

4. 虚血眼における NC による b 波頂点潜時への影響

NC および対照群の虚血解除後の b 波頂点潜時の変化 (n=4) の経時変化を図 4 に示した. 対照群の b 波の頂点潜時は, 虚血解除後 1 時間で $99.6 \pm 13.8\%$, 2 時間で $107.5 \pm 15.0\%$, 3 時間で $107.5 \pm 9.6\%$, 4 時間で $110.8 \pm 15.7\%$, 24 時間で $120.0 \pm 14.0\%$ であった. 一方, NC 群の b 波の頂点潜時は, 虚血解除後 1 時間で $110.4 \pm 15.8\%$, 2 時間で $112.0 \pm 15.3\%$, 3 時間で $125.7 \pm 5.1\%$, 4 時間で $125.7 \pm 5.1\%$, 24 時間で $106.3 \pm 14.0\%$ であった. 両群とも硝子体注入前よりも遅延する傾向がみられたが, 各測定時点で両群の間に有意差はみられなかった.

5. 非虚血負荷網膜に対する NC の影響

非虚血負荷眼に NC あるいは生理食塩水を投与した時の a, b 波振幅の変化率を表 1 に示した. NC 群および生理食塩水群の a, b 波ともに注入後の振幅は変わらず, また, 両群の間でも有意差はみられなかった.

IV 考 按

今回の結果において, NC の投与によって網膜虚血—再灌流障害後の ERG b 波振幅の回復が対照群よりも良好な成績が得られたことは, Ca 拮抗剤が網膜虚血の予防に有効であることを ERG 振幅の面から客観的に証明したものと思われる.

Ca 拮抗薬の血管拡張作用は, 同剤が血管平滑筋の細胞膜に存在する膜電位依存性 Ca イオンチャンネル voltage-dependent calcium channels (VDCCs) に作用し, Ca イオンの細胞内流入を抑制することによって生じると考えられている. 事実, Ca 拮抗薬の投与による脳血流量の増大が確認され, 脳梗塞, 一過性脳虚血発作などの患者に臨床応用されつつある⁷⁾. 眼科領域では Ca 拮抗薬の一種であるニフェジピンの投与によって家兎やサルの前脈絡膜血流量が増加した¹²⁾ことから, 脈絡膜の閉塞性疾患に対する有用性が検討されている⁸⁾⁹⁾. しかしながら, 同剤の網膜血管への作用機序の詳細や全身への影響, さらには投与量などは未解決であるのが現状である.

Ca 拮抗薬の網膜保護の機序には血管拡張作用の他に, Ca イオンの網膜神経細胞内への流入抑制作用が考えられている⁷⁾. 細胞膜における Ca イオン流入チャンネルに

は受容体作動性イオンチャンネル receptor-operated ion channels (ROCs) と前述の VDCCs とが知られており、今回使用した Ca 拮抗薬は VDCCs に作用する薬剤であるが、ROCs への拮抗剤も虚血保護作用を持つことが明らかになりつつある^{4)~6)10)~12)}。例えば、デキストロメトルファンは ROCs 拮抗剤の中でも N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗剤の一種であるが、著者らは以前にデキストロメトルファンの予防投与が今回と同様の方法で作成した家兎網膜虚血に対して、網膜障害を軽減することを既に報告^{4)~6)}している。しかしながら、Ca 拮抗薬やデキストロメトルファンの血管拡張作用や Ca イオンの細胞内流入防止作用が網膜虚血予防にどのように関与しているかは未だ明確な結論が得られていない。

In vitro の網膜では灌流液の一定量までの流量の増加に伴い、ERG の振幅も増大することが判明している¹³⁾。今回の結果で非虚血網膜に NC を投与した群の ERG が不変であったことは、用いた NC の濃度では網脈絡膜の血流量の増加が生じないことの証であり、そのため、今回の実験で立証された虚血予防効果は血流量の増加によるよりも Ca イオンの細胞内流入阻止による神経細胞保護効果が主な原因とも考えられる。

今回の実験では、これまでの脳循環障害に対する基礎的あるいは臨床的研究から得られた NC の有効濃度⁷⁾を参考にしたため、薬物濃度依存性についての調査は行っていない。今後、虚血一再灌流障害を軽減する NC の網膜至適濃度の検討が、今回の結果を確認する上でも必要である。また、前述したデキストロメトルファンは、投与時期により b 波回復率に相違がみられたことから⁵⁾、本剤の臨床応用のためには虚血作成後の投与の効果も検討の課題である。さらに、NC の虚血一再灌流障害の軽減作用が神経細胞以外の網膜細胞にも発現するのか興味を持たれるところである。

今回の実験では、対照群と NC 群の間では b 波の頂点潜時に有意差は認められなかったが、NC 群において一部の頂点潜時が延長する傾向がみられた。正常網膜から記録される ERG では b 波の振幅と頂点潜時は負の相関があり、今回の結果とは矛盾する。その理由として、小さな波形からの頂点潜時の計測には誤差が生じ得ること、各個体の変化率の平均で比較していることなど比較方法上の問題が考えられた。

Ca 拮抗薬には全身の末梢血管の拡張に伴う血圧下降作用もあることから、全身投与では逆に網膜血流量の低下を惹起する可能性がある。今回の薬物の硝子体内投与は、このような全身性の影響を除外することができると考えられ、局所投与の可能な眼科領域への NC の応用の可能性をさらに高めたものと思われる。

文 献

- 1) 三好輝行：脈絡膜循環に及ぼす Nifedipine の影響。第 1 報。成熟家兎における脈絡膜血流量の変化。眼紀 35: 664—670, 1984.
- 2) 三好輝行：脈絡膜循環に及ぼす Nifedipine の影響。第 2 報。猿眼における脈絡膜血流量の変化。眼紀 36: 1571—1575, 1985.
- 3) 高塚忠宏：塩酸ニカルジピンの家兎網膜微小循環動態に及ぼす影響について。眼紀 35: 877—882, 1984.
- 4) 菅原岳史, 森 敏郎, 亀井俊也, 田澤 豊：家兎網膜虚血に対する dextromethorphan の予防効果。日眼会誌 96: 90—95, 1992.
- 5) 菅原岳史：網膜虚血に対するグルタミン酸レセプター拮抗剤 (Dextromethorphan) の神経細胞保護効果。日眼会誌 96: 884—891, 1992.
- 6) 菅原岳史, 森 敏郎, 細部泰雄, 加藤千晶, 亀井俊也, 田澤 豊：デキストロメトルファンの家兎硝子体への予防的投与による網膜虚血保護効果。あたらしい眼科 10: 1416—1420, 1993.
- 7) 植松大輔, 福内靖男：脳循環と Ca 拮抗剤。脳神経 42: 17—31, 1990.
- 8) 葛西 款, 玉井 信：単純型糖尿病性網膜症の血液—網膜柵に対する抗 Ca^{++} 性循環機能改善剤の効果。臨眼 41: 998—999, 1987.
- 9) 中山 正, 大滝千秋：網膜血管閉塞性疾患に対する塩酸ニカルジピンの使用経験。眼紀 40: 241—247, 1989.
- 10) George CP, Goldberg MP, Choi DW, Steinberg GK: Dextromethorphan reduces neocortical ischemic neuronal damage *in vivo*. Brain Res 440: 375—379, 1988.
- 11) Steinberg GK, Saleh J, Kunis D: Delayed treatment with dextromethorphan and dextromethorphan reduces cerebral damage after transient focal ischemia. Neurosci Lett 89: 193—197, 1988.
- 12) Yoon YH, Marmor MF: Dextromethorphan protects retina against ischemic injury *in vivo*. Arch Ophthalmol 107: 409—411, 1989.
- 13) Papst N, Demant E, Niemeyer G: Changes in PO_2 induce retinal autoregulation *in vitro*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 219: 6—10, 1982.