

房水流出と隅角組織に及ぼす交感神経作働薬と phosphodiesterase 阻害薬の効果

鈴木 亮¹⁾²⁾, 藤倉 義久¹⁾, Anderson PJ²⁾

¹⁾山口大学医学部眼科学教室, ²⁾ハーバード大学マサチューセッツ眼科耳鼻科病院ハウ眼科研究室

要 約

Epinephrine は隅角組織に作用して房水流出率を上げて眼圧を下げると思われているが, 摘出眼を用いた交感神経作働薬の急性実験で, 房水流出率と隅角培養細胞の観察を併せて行った報告はないようである. 我々は新鮮な摘出ウシ眼を使用し, 定圧法(15, 20 mmHg)で房水流出率を実測し, 培養細胞は Crean の方法で観察することにより交感神経作働薬と phosphodiesterase (PDE) 阻害薬の作用を比較した.

摘出ウシ眼の房水流出率は epinephrine, isoproterenol および β_1 作働薬である dobutamine では急性には増加せず, 非常な高濃度(10^{-3} M)では, むしろ流出率が低下した. 一方, isobutylmethylxanthine, theophylline, d-butyryl-cyclic AMP (dB-cAMP), caffeine などの PDE 阻害薬で流出率は著明に増加した. 高濃度でも β_2 作働薬である salbutamol では隅角内皮細胞や房水流出率はほとんど変化しなかった. 摘出ウシ毛様体筋も β 刺

激薬にほとんど反応しなかった. すなわち, 種々の交感神経作働薬では隅角内皮細胞の形態は変化しても房水流出率は増加しなかった. しかし, PDE 阻害薬では細胞の形態のみならず, 房水流出率も著明に増加した. 交感神経作働薬の効果は単独では僅かであったものの, dB-cAMP などで類似の反応が生じ, また, それ自体では効果のない濃度の PDE 阻害薬との併用によって増強した.

ウシ眼では β_1 作働薬よりも PDE 阻害薬の方が強力な作用を有していた. 房水流出路近傍の細胞は動物の種差に応じてそれぞれ特有の β 受容体を有するものの, 細胞内の PDE によって, 著しくその効果の発現が抑制されている状態にあると考えた. (日眼会誌 101: 551-557, 1997)

キーワード: 隅角, 房水流出率, 緑内障, 交感神経作働薬, 眼圧

Effects of β -Adrenergic Agonists and Phosphodiesterase Inhibitors on the Outflow Facility of the Eye

Ryo Suzuki¹⁾²⁾, Yoshihisa Fujikura¹⁾ and Anderson PJ²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Howe Laboratory, Massachusetts
Eye & Ear Infirmary, Harvard Medical School

Abstract

Changes in the outflow facility of perfused bovine eyes and in the shape of cells in cultured trabecular meshwork (TM) were studied after exposure to adrenergic drugs. Dobutamine, a selective β_1 agonist caused confluent TM cells to change from their usual polygonal shape to a characteristic stellate shape. Salbutamol, a selective β_2 agonist showed no effect. The phosphodiesterase (PDE) inhibitors, isobutylmethylxanthine (IBMX), theophylline, and caffeine were also very effective in producing this shape change. Epinephrine, isoproterenol, dobutamine or salbutamol did not increase the outflow facility, at temperatures of 22°C or 36°C, whereas theophylline, caffeine and IBMX increased the facility in a dose-dependent manner. The high concentrations of β -adrenergic agents required to produce even a small change in outflow facility and the cell shape argue against the involvement of adrenergic receptor mediation; on the other hand, the enhancement of the effects of epinephrine by PDE inhibitors and a similar effect produced by cAMP suggest that the changes in the cell shape are

tamine or salbutamol did not increase the outflow facility, at temperatures of 22°C or 36°C, whereas theophylline, caffeine and IBMX increased the facility in a dose-dependent manner. The high concentrations of β -adrenergic agents required to produce even a small change in outflow facility and the cell shape argue against the involvement of adrenergic receptor mediation; on the other hand, the enhancement of the effects of epinephrine by PDE inhibitors and a similar effect produced by cAMP suggest that the changes in the cell shape are

別刷請求先: 755 山口県宇部市西区小串 1144 山口大学医学部眼科学教室 鈴木 亮
(平成8年9月20日受付, 平成9年3月7日改訂受理)

Reprint requests to: Ryo Suzuki, M.D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine,
1144 Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755, Japan

(Received September 20, 1996 and accepted in revised form March 7, 1997)

produced by β -receptor activation. The β -adrenergic agents were ineffective on changing outflow facility but the PDE inhibitors were remarkably effective in producing both shape change and increasing facility. PDE inhibition has much greater influence on and around the outflow channels than pure β -adrenergic agonists, at least in

enucleated bovine eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 551-557, 1997)

Key words: Trabecular meshwork, Outflow facility, Glaucoma, Adrenergic agonists, Phosphodiesterase inhibitor, Intra-ocular pressure

I 緒 言

Epinephrine は隅角組織に作用して房水流出率を上げて眼圧を下げる¹⁾²⁾と考えられている。この眼圧下降はヒト¹⁾³⁾、実験動物⁴⁾⁵⁾においてみられる。その作用機構の詳細は不明であるが、主として房水流出を促進する⁵⁾⁶⁾といわれている。

隅角線維柱帯の細胞には β 受容体が存在しており⁷⁾⁸⁾、この β 受容体を介した細胞の形態変化⁹⁾¹⁰⁾が房水流出率を上昇させるように作用する¹⁰⁾可能性がある。また、sulfhydryl (SH) 剤¹¹⁾¹⁴⁾を使った実験結果から、房水流出と隅角組織機能との関連¹⁵⁾が研究されるようになってきている。

最近、器官眼¹⁶⁾を用いて epinephrine の効果⁹⁾が調べられているが、種々の交感神経作働薬の房水流出率に及ぼす効果を摘出眼で実測し、それに対応させて隅角培養細胞の観察を行った報告はないようである。

我々は種々の交感神経作働薬として、epinephrine の他に β 選択性の高い isoproterenol, β_1 作働薬である dobutamine, β_2 作働薬である salbutamol および phos-

phodiesterase (PDE) 阻害薬として、isobutylmethylxanthine (IBMX), theophylline, caffeine を用い、ウシ眼の毛様体筋の反応を考慮しながら房水流出と隅角内皮細胞の形態変化を併せて調べた。なお、毛様体筋と房水流出率に及ぼす PDE 阻害薬の効果については別に発表予定である。

II 実験方法

新鮮な摘出ウシ眼を実験に使用した。房水流出率の実測は既報¹⁰⁾に従い、定圧法を用いた。温度は 22°C (室温) と 35°C の両方で検討した。

毛様体筋の収縮は、等尺性に静止筋緊張と神経興奮性収縮高を調べた。隅角内皮細胞の培養は Crean¹⁷⁾¹⁸⁾の方法を用いた。細胞は位相差顕微鏡でまず観察し、薬物で変化した細胞数に応じて + : 5~24% ; ++ : 25~70% ; +++ : >70% のように分類した。アクチンの染色などは市販の抗ヒトモノクローナル抗体 (du Pont, DE) を用いた。

使用した薬物は epinephrine, timolol, (\pm)-isoproterenol HCl, theophylline, caffeine, cyclic adenosine-3',

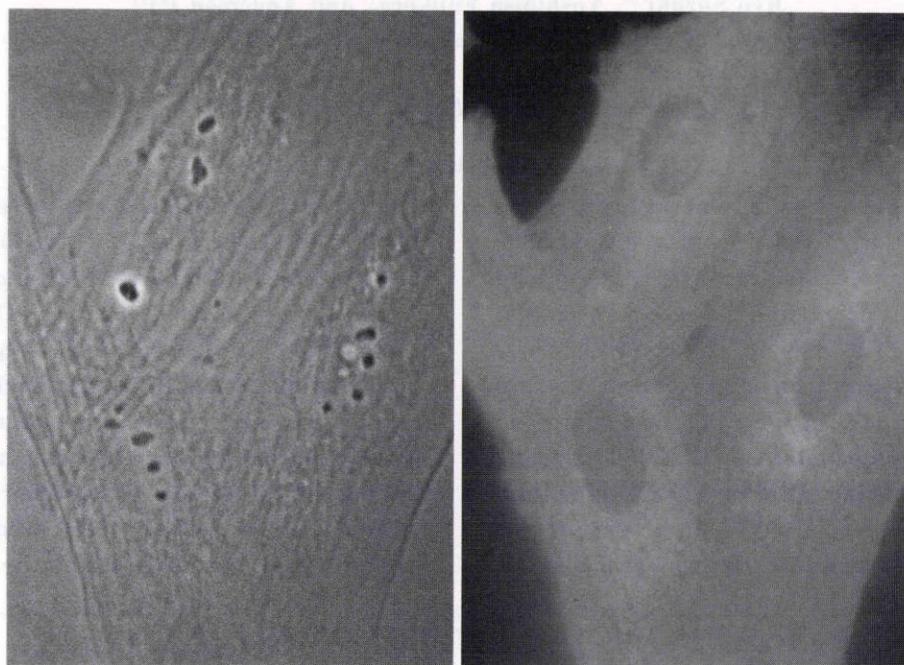


図1 培養ウシ隅角内皮細胞の形態。

3つの細胞はともによく伸展し、細胞間には間隙が見られない。

左：位相差顕微鏡写真，右：同一部分のアクチン染色。

5'-monophosphate-Na (cAMP), N 6-2'-O-dibutyryl cyclic AMP (dB-cAMP), isobutylmethylxanthine (IBMX) で, Sigma 社製 (St Louis, MO) である。また, dobutamine と salbutamol は Lilly 社 (Indianapolis, IN) から提供を受けた。

これらの詳細はすでに報告¹⁰⁾¹⁹⁾²⁰⁾した通りである。

III 結 果

正常のウシ隅角内皮細胞(図1)は多角形で、ときに細い突起を有したが、confluence になると細い突起は消失した。

Epinephrine を投与すると、細胞は濃度と時間に応じて特徴的な形態を示した。この変化は通常が多角形から樹枝状の形態へと変化した。つまり、核の回りで凝集し、長い放射状の突起を出して容器に付着した。

Theophylline は 3~10 mM で類似の形態変化を示し、その変化は epinephrine より急速であった。この変化はアクチンの凝集を示し、図2に示すようにフィラメントの構造は観察できなくなった。濃度と投与時間との関係について細胞の形態を評価するために、位相差顕微鏡の下で細胞を樹枝状に変化した細胞の数に応じて、方法に示した4通りに分類した。

10^{-3} M では dobutamine は 3 時間以内に, isoproterenol は 6 時間で十分な効果を示したが, epinephrine では 18 時間かかった(図3a)。同様の細胞変化を来すために epinephrine は, 10^{-4} M では 2 日, 10^{-5} M では 3 日間かかった(図示せず)。Theophylline(図3b)は, 1 mM 以下ではそれ自身では効果を示さなかった。しかし, 0.3~0.6 mM の theophylline を各々の交感神経作働薬のに入った well に投与すると, 交感神経作働薬(epine-

phrine, isoproterenol, dobutamine) の効果は著明となり, 早期に低濃度で出現した。Timolol は 10 倍以上の濃度でも各々の反応を完全に抑制することはできず, また, salbutamol は 10^{-3} M という高濃度でも効果はなかった。

PDE 阻害薬では細胞形態の変化はさらに著しかった。図3bに示す通り IBMX が最も強力で, ほとんどの変化は 3 時間以内にみられた。

cAMP や dB-cAMP も類似の変化を示した(図3c)。細胞膜を通過可能な dB-cAMP は cAMP より低濃度から効果がみられた。Butyrate 単独では, その濃度では効果を示さなかった。なお, adenosine (3~10 mM) の作用も cAMP の作用に類似していた。

1. 房水流出率への効果

房水流出率に及ぼす薬物の効果を投与後 30, 60, 90 分で対照眼と比較した。22°C(室温)では, epinephrine, isoproterenol および dobutamine は 10^{-3} M という高濃度でも房水流出率に影響しなかった(図4a)。その一方, IBMX, theophylline や caffeine は対照と比べ著明に流出率を上昇させた。すなわち, IBMX は 60 分で, 他の PDE 阻害薬も 90 分までに流出率は対照のほぼ 2 倍になった(図4b)。

35°Cでは, epinephrine, isoproterenol および dobutamine は 10^{-3} M の高濃度でも房水流出率を上げず(図5a), むしろ投与後の 90 分になると, 高濃度の epinephrine, isoproterenol, dobutamine を灌流した側の房水流出率の方が対照眼よりも低下した。3~4 時間まで灌流しても流出率は上昇に転じることはなかった。灌流 3 時間で dobutamine (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) による流出率は各々の対照の, 97.3 ± 6.8 (平均値 \pm 標準偏差), $80.8 \pm$

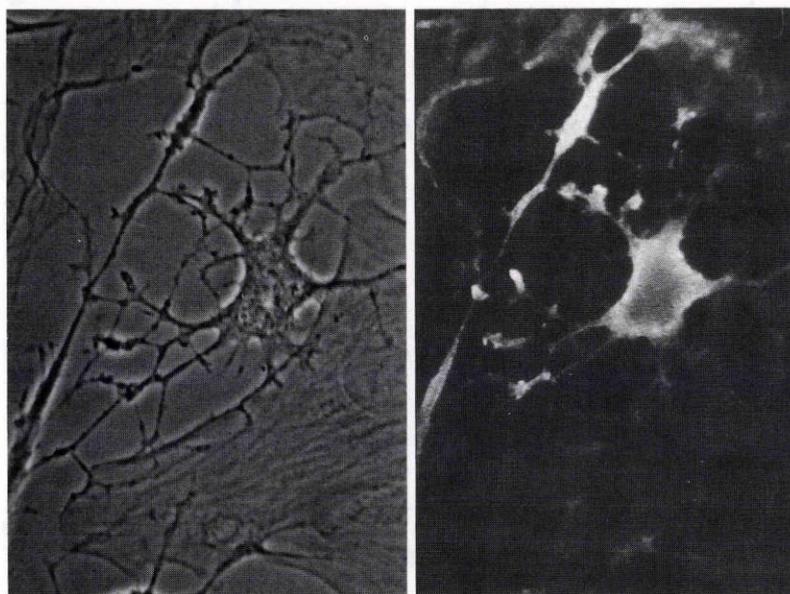


図2 Theophylline によるウシ隅角内皮細胞の形態(2 mM, 2時間).
a: 位相差顕微鏡写真, b: 同一部分のアクチン染色。

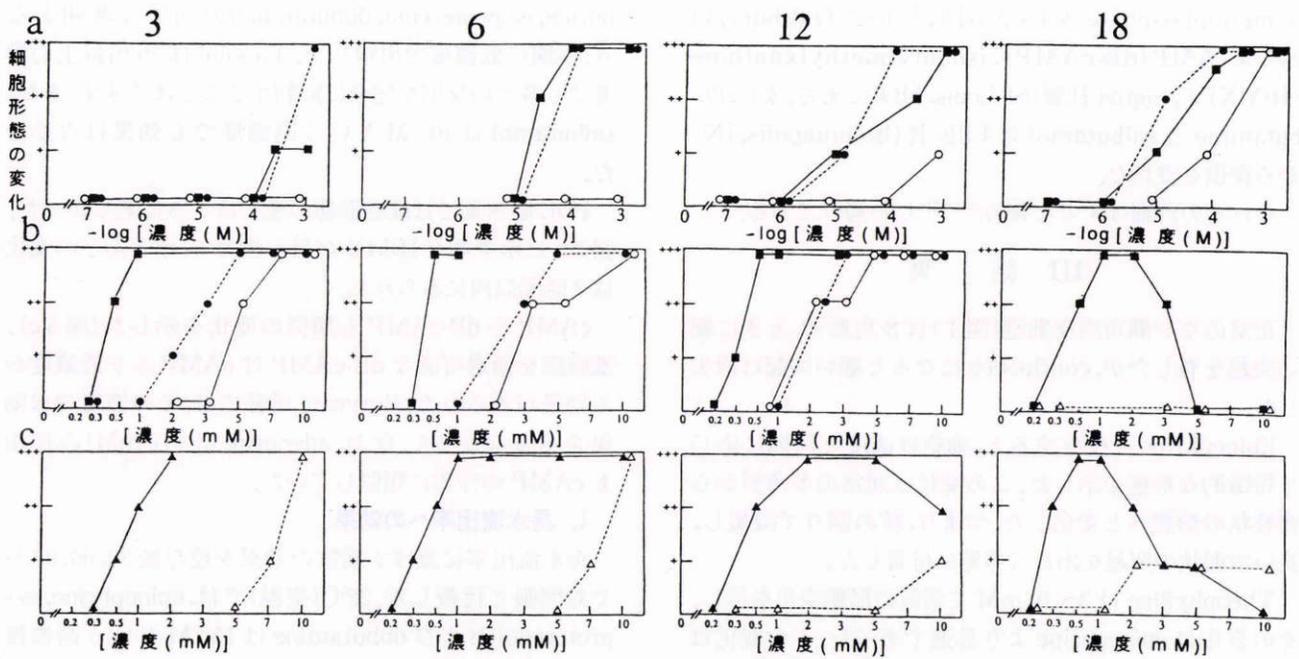


図3 種々の薬物投与3, 6, 12, 18時間後の細胞の観察。

a : 交感神経作働薬, b : phosphodiesterase (PDE) 抑制剤, c : cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate-Na (c AMP) 類, 各培養皿の2~3部位の, 変化した細胞数によって+ : 5~24%, ++ : 25~70%, +++ : >70%と分類した. 各々の薬物の効果は dobutamine > isoproterenol > epinephrine ; isobutylmethylxanthine (IBMX) > theophylline > caffeine ; N 6-2'-O-dibutyryl cyclic AMP (dBcAMP) > cAMP の順であった.
 a) ○ : epinephrine, ■ : isoproterenol, ● : dobutamine, b) ■ : IBMX, ● : theophylline, ○ : caffeine, c) ▲ : dBcAMP, △ : cAMP

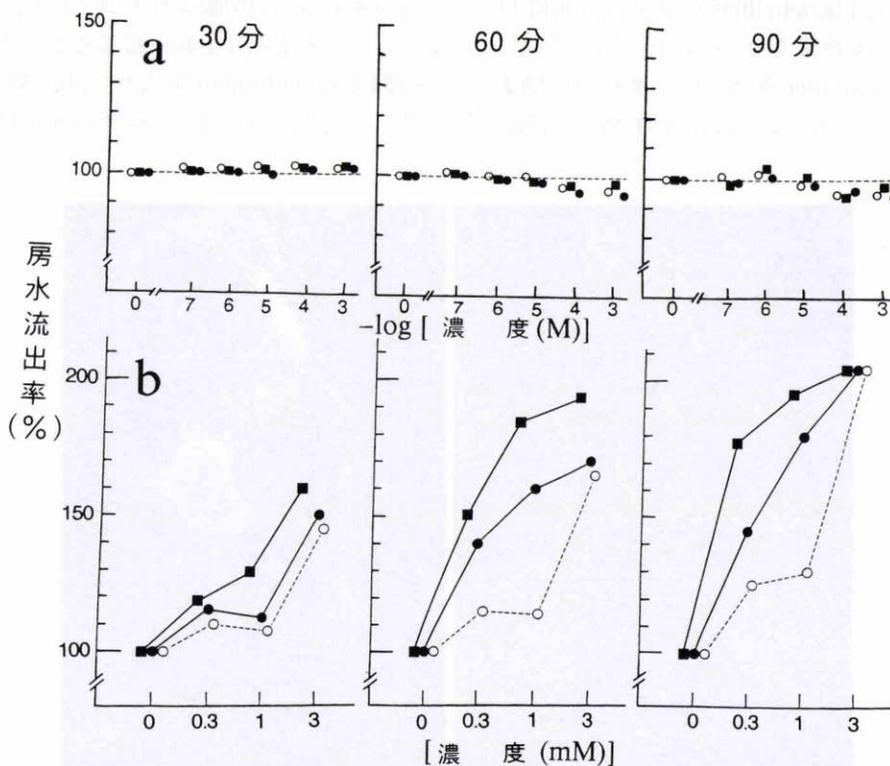


図4 22°Cで測定した摘出ウシ眼球の房水流出率に及ぼす(a)交感神経β作働薬と(b)PDE阻害薬の効果. n=6.

a : epinephrine, isoproterenol, dobutamine, b : IBMX, theophylline, caffeine

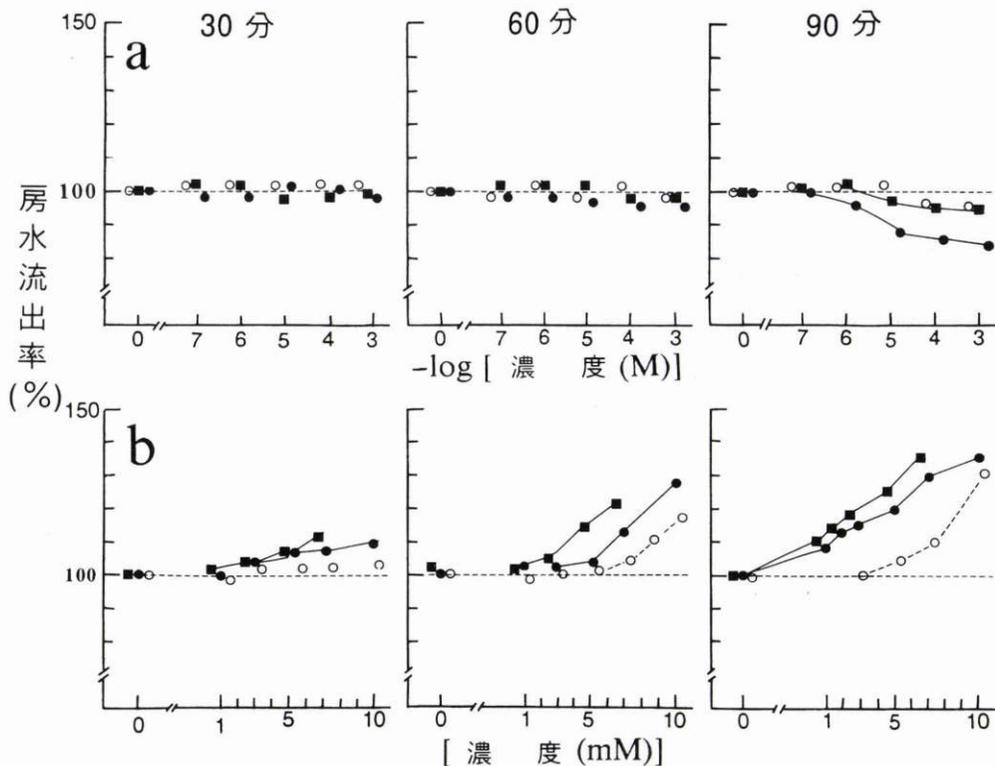


図5 35°Cで摘出ウシ眼球の房水流出率に及ぼす(a)交感神経 β 作働薬と(b)PDE阻害薬の効果。
n=6.

a : epinephrine, isoproterenol, dobutamine, b : IBMX, theophylline, caffeine

5.9, $83.5 \pm 4.7\%$ になった。一方、PDE阻害薬は22°Cと同様に35°Cでも著明に流出率を上昇させた。房水流出率に及ぼす効力は $\text{IBMX} > \text{theophylline} > \text{caffeine}$ の順であった(図5b)。

要約すると、摘出眼の房水流出率は epinephrine や isoproterenol では増加せず、非常な高濃度(10^{-3}M)では、むしろ流出率が低下した。一方、dB-cyclic AMP および IBMX, theophylline などの PDE 抑制薬で房水流出率は著明に増加した。高濃度でも salbutamol では隅角内皮細胞や房水流出率の変化はほとんどなかった。摘出ウシ毛様体筋も β 刺激薬にほとんど反応せず、かつて得た所見と一致した¹⁹⁾。

なお、隅角内皮細胞と房水流出率に関する本結果は、現在投稿中の「毛様体筋と房水流出に及ぼす PDE 阻害薬の効果」と同様であった。

IV 考 按

今回の摘出ウシ眼球の実験から、種々の交感神経作働薬は高濃度で隅角内皮細胞の形態を変化させるものの、房水流出率は少なくとも我々の観察時間内では増加しないことがわかった。しかしながら、PDE阻害薬では細胞の形態のみならず、流出率が著明に増加した。すなわち、隅角および毛様体筋など眼圧と関係する組織においては、 β 作働薬よりも PDE 阻害薬の方がはるかに強力な作用を有した。

この隅角内皮細胞への epinephrine の効果は濃度依存性で特徴的な細胞形態を示し、Tripathi²¹⁾²²⁾の報告とほぼ一致する。Kawaら²³⁾は epinephrine を投与したときの変化を cell elongation と表現している。

我々の実験で isoproterenol は epinephrine と作用は類似していたが、効果はやや強力であった。使用した交感神経作働薬の中では dobutamine (β_1 作働薬)が最も強力であった。ところが、salbutamol (β_2 作働薬)は 10^{-3}M という高濃度でも細胞形態に変化を示さなかった。

従来、隅角組織には動物でも β_2 受容体が分布する⁷⁸⁾とされており、眼圧下降作用も β_2 受容体⁸⁾を介していると考えられる。その機能面²⁰⁾は摘出眼の灌流実験では調べられていなかった。しかし、本実験で少なくともウシ眼では β_1 作働薬の方が強力な効果を示すことがわかった。

隅角内皮細胞の形態は、PDE阻害薬によっても交感神経作働薬と類似の変化が生じた。dB-cAMP や adenosine にも同様の効果がみられた。以上のことから、この細胞形態の変化は cAMP を介した反応であるかも知れない。しかしながら、cGMP 濃度を上昇させる zaprinast が強力な効果を示したこと(未発表)、および theophylline や IBMX も cGMP を上昇させることから、cAMP とは別の経路を介した現象をみている可能性がある。

この培養細胞が生体の細胞と同じ役割を果たしているのか、また均一の細胞のみ^{24)~26)}を観察できているのかどうかは不明である。しかし、毛様体筋の効果を実測した別

論文で述べるように、培養細胞は glycosaminoglycan 合成²⁷⁾、 β 受容体⁷⁾⁸⁾²⁴⁾、ステロイド反応¹⁶⁾、TPA 合成能²⁸⁾や貪食能²⁹⁾を有しているという報告もあり、生体流出路組織の機能を反映していると考えた。

ところで、本実験で PDE 阻害薬、特に IBMX で房水流出率の上昇がみられた一方、交感神経作働薬による房水流出率の変化は僅かであった。22°C と 35°C で調べても交感神経作働薬は房水流出率を上昇させず、高濃度の dobutamine はむしろ流出率を僅かながら低下させた。もし、房水流出率の変化が隅角内皮細胞の形態変化と同じ機構を介しているのならば、交感神経作働薬が PDE 阻害薬ほど摘出眼の房水流出率を上昇させなかった理由は、灌流実験と培養実験の時間の違いによるのかも知れない。我々の実験では、時間が経つごとに交感神経作働薬は房水流出率を下げる傾向がみられた。3～4 時間以上灌流した際に、隅角組織が正常に機能しているかどうか報告がないので、交感神経作働薬の房水流出率への効果をみるためには、さらに長時間観察できる方法を考えてみたい。また、このことは epinephrine の房水流出の研究が *in vitro* では進展していない理由の一つかも知れない。

隅角の細胞形態と房水流出率に cAMP や dB-cAMP も同様の変化を示したし、PDE 阻害薬単独では効果のなかった濃度で交感神経作働薬の効果が急速に、そして大きく表れた。したがって、細胞の形態のみならず、房水流出率の変化もその一部は cAMP を介したのものであると考えてよいであろう。しかし、cGMP や高濃度の epinephrine あるいは他の β 作働薬による細胞の障害についても検討する必要がある。

以上のことをウシ眼のみにみられる現象と考えるのは、おそらく適当ではない。Epinephrine による房水流出率の上昇は摘出眼では Erickson-Lamy ら⁹⁾による報告があるにすぎず、epinephrine が動物の摘出眼の房水流出を上昇させるという報告は、我々の調べた限りまだない。また、毛様体筋では種差が著しいものの、 β 作用による筋の弛緩反応は小さいかもしくは無視できる¹⁹⁾のに、しかしながら、PDE 阻害薬は毛様体筋を強力に弛緩させる²⁰⁾。よって、房水流出路近傍の細胞(隅角内皮細胞、毛様体筋)は動物の種差に応じて、それぞれ特有の β 受容体を有するけれども、その機能は細胞内の豊富な PDE によって著しく効果の発現が抑制されている状態にある。

本研究の一部は科学研究費(基盤 C-08672018)の援助を受けた。本論文は JJO でも発表予定²⁰⁾である。

なお、「毛様体筋と房水流出率に及ぼす PDE 阻害薬の効果」については第 7 回日本緑内障学会で発表し、別に論文(和文)として投稿中である。本論文では毛様体筋以外の部分を主として記した。

文 献

- 1) **Becker B, Pettit TJ, Gay AJ**: Topical epinephrine therapy of open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 66: 219–225, 1961.
- 2) **Epstein DL**: Primary Open Angle Glaucoma. In: Epstein DL (Ed): *Chandler and Grant's Glaucoma*, 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 136–138, 1986.
- 3) **Obstbaum SA, Kolker AE, Phelps CD**: Low dose epinephrine: Effect on intraocular pressure. *Arch Ophthalmol* 92: 118–120, 1974.
- 4) **Boas RS, Messenger MJ, Mittag TW**: The effects of topically applied epinephrine and timolol on intraocular pressure and aqueous humor cyclic-AMP in the rabbit. *Exp Eye Res* 32: 681–690, 1981.
- 5) **Potter DE, Rowland JM**: Adrenergic drugs and intraocular pressure: Effects of selective β -adrenergic agonists. *Exp Eye Res* 27: 615–625, 1978.
- 6) **Bill A**: Effects of norepinephrine, isoproterenol, and sympathetic stimulation on aqueous humor dynamics on vervet monkeys. *Exp Eye Res* 10: 31–46, 1970.
- 7) **Wax MB, Molinoff PB, Alvarado J**: Characterization of β -adrenergic receptors in culture human trabecular cells and in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 51–57, 1989.
- 8) **Mittag TW**: Adrenergic and dopaminergic drugs in glaucoma. In: Ritch R, et al (Eds): *The Glaucomas*. CV Mosby Co, St Louis, 523–537, 1989.
- 9) **Erickson-Lamy KA, Nathanson JA**: Epinephrine increases facility of outflow and trabecular meshwork cAMP content in the human eye *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press).
- 10) **Suzuki R, Anderson PJ**: A temperature dependent action of fluoride on aqueous outflow facility of the calf eye. *Curr Eye Res* 12: 1–7, 1994.
- 11) **Epstein DL, Hashimoto JM, Anderson PJ**: Effect of iodoacetamide perfusion on the outflow facility of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 625–631, 1981.
- 12) **Epstein DL, Patterson MM, Rivers SC**: N-ethylmaleimide increases the facility of aqueous outflow of excised monkey and calf eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 752–756, 1982.
- 13) **Erickson-Lamy KA, Schroeder A, Epstein DL**: Ethacrynic acid induces reversible shape and cytoskeletal changes in culture cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2631–2640, 1992.
- 14) **Freddo TF, Patterson MM, Scott DR**: Influence of mercurial sulfhydryl agents on aqueous humor outflow pathways in enucleated eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 278–285, 1984.
- 15) **Croft MA, Hubbard WC, Kaufman PL**: Effect of ethacrynic acid on aqueous outflow dynamics

- in monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 1167—1175, 1994.
- 16) **Johnson DH, Bradley JMB, Acott TS**: The effect of dexamethasone on glycosaminoglycans of human trabecular meshwork in perfusion organ culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 2568—2571, 1990.
- 17) **Crean EV, Sherwood M, Casey R**: Establishment of calf trabecular meshwork cell cultures. Exp Eye Res 45 : 503—512, 1986.
- 18) **Crean EV, Tyson SL, Richardson TM**: Factors influencing glycosaminoglycan synthesis by calf trabecular meshwork cell cultures. Exp Eye Res 43 : 365—374, 1986.
- 19) **Suzuki R**: Neuronal influence on the mechanical activity of the ciliary muscle. Br J Pharmacol 78 : 591—597, 1983.
- 20) **Suzuki R, Karageuzian LN, Anderson PJ**: Effects of adrenergic agents and phosphodiesterase inhibitors on outflow facility and cell shape of bovine trabecular meshwork. Jpn J Ophthalmol (accepted for publication).
- 21) **Tripathi BJ, Tripathi RL**: Effect of epinephrine *in vitro* on the morphology, phagocytosis and mitotic activity of human trabecular endothelium. Exp Eye Res 33 : 731—744, 1984.
- 22) **Tripathi RC, Borisuth NSC, Li J**: Growth factors in the aqueous humor and their clinical significance. J Glaucoma 3 : 248—258, 1994.
- 23) **Kawa JE, Higginbotham EJ, Chang IL**: Effects of antiglaucoma medications on bovine trabecular meshwork cells *in vitro*. Exp Eye Res 57 : 557—565, 1993.
- 24) **Coroneo MT, Korbmacher C, Flugel C**: Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells. Exp Eye Res 52 : 375—388, 1991.
- 25) **Hogg P, Calthorpe M, Ward S**: Migration of cultured bovine trabecular meshwork cells to aqueous humor and constituents. Invest Ophthalmol Vis Sci 36 : 2449—2460, 1995.
- 26) **Grierson I, Robins E, Howes RC**: Preliminary observations on human trabecular meshwork cells *in vitro*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 212 : 173—186, 1980.
- 27) **Schachtschabel DO, Rohen JW, Wever J**: Synthesis and composition of glycosaminoglycans by cultured human trabecular meshwork cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 218 : 113—117, 1982.
- 28) **Shuman MA, Polansky JR, Merkel C**: Tissue plasminogen activator in cultured human trabecular meshwork cells. Predominance of enzyme over plasminogen activator inhibitor. Invest Ophthalmol Vis Sci 29 : 401—405, 1988.
- 29) **Day J, Grierson I, Unger WG**: Some effects of phagocytosis on bovine meshwork cells in culture. Exp Eye Res 43 : 1077—1087, 1986.
- 30) **鈴木 亮**: 毛様体筋と房水流出率における交感神経関連薬の効果. あたらしい眼科(印刷中)