

シクロスポリン A 頻回点眼による家兎の縮瞳と炎症様反応

土至田 宏

順天堂大学医学部眼科学教室・薬理学教室

要 約

シクロスポリン A (CyA) 頻回点眼により生じる家兎のアトロピン抵抗性の縮瞳の原因を明らかにするために、CyA による瞳孔括約筋収縮作用に起因するものかと、CyA が炎症あるいは炎症様反応を惹起することに伴うものかの両面から検討した。摘出瞳孔括約筋標本は CyA により筋収縮をほとんど生じなかった。0.1% CyA 頻回点眼後の家兎の経時的観察で、8 匹中 7 匹 (87.5%) で CyA 点眼側のみ点眼終了後 6~12 時間経てから縮瞳を生じ、ほぼ同時期に結膜・毛様充血と前房内フレア上昇を認め、半数の動物で前房内フィブリン様物質の析出を認めた。これらはいずれも抗炎症剤、特にインドメタシン処置により消失あるいは減弱した。また、0.1% CyA

頻回点眼後には、同側の虹彩血管・毛様体上皮の血液房水柵機能の破綻が確認された。同縮瞳時に採取した房水は蛋白濃度が上昇していたが、浮遊細胞数は増加しなかった。基剤頻回点眼後および 0.1% CyA 1 回点眼後には変化がみられなかったことから、CyA 頻回点眼による縮瞳は、過量の CyA 投与によってもたらされる炎症様反応や血液房水柵機能の破綻に伴って生じることが推定された。(日眼会誌 102:256-264, 1998)

キーワード: シクロスポリン A, 縮瞳, 炎症, 血液房水柵, 瞳孔括約筋

Repetitive Instillations of Cyclosporin A Eyedrop induce Pupillary Constriction and Anterior Chamber Inflammation-like Reactions in Rabbits

Hiroshi Toshida

Department of Ophthalmology and Pharmacology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

We attempted to clarify the mechanism of atropine-resistant miosis caused by repetitive instillations of cyclosporin A (CyA) eye drop in rabbits by investigating the possibility that the miosis may be attributable to CyA-induced contraction of the iris sphincter muscle, and that it may be resulting from inflammatory or inflammation-like reactions caused by CyA in living rabbit eyes.

CyA did not induce contraction of the isolated iris sphincter muscle. Eight Dutch rabbits were given repetitive instillations of 0.1% CyA eye drops, and 7 rabbits (87.5%) exhibited miosis, accompanied by conjunctival and pericorneal hyperemia, and increased anterior flare 6 to 12 hours after the instillations. Fibrinoid formation in the anterior chamber was observed in 4 rabbits (50.0%).

All of these findings were inhibited by treatment with anti-inflammation drugs, especially by indo-

methacin. After repetitive applications of 0.1% CyA eye drops, breakdown of the blood-aqueous barrier was observed in the ipsilateral iris vessels and ciliary epithelium. Increase in the aqueous protein concentration was noted, but there were no changes in the cell number.

Repetitive instillations of the vehicle and single instillation of 0.1% CyA did not induce these inflammation-like findings. These results indicate that the miosis is a secondary effect resulting from ocular inflammation-like reactions and breakdown of the blood-aqueous barrier caused by excessive application of CyA. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 256-264, 1998)

Key words: Cyclosporin A, Miosis, Inflammation, Blood-aqueous barrier, Iris sphincter muscle

I 緒 言

シクロスポリン (CyA) をはじめとする免疫抑制剤は、

全身投与による腎障害¹⁾、脳浮腫²⁾、高血圧^{3,4)}などの重篤な副作用の発生が数多く報告されている。眼科領域への適応に際しては、これら全身合併症を軽減する目的で CyA

別刷請求先: 113-8421 東京都文京区本郷 3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 土至田 宏
(平成 9 年 10 月 7 日受付, 平成 9 年 12 月 4 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Toshida, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

(Received October 7, 1997 and accepted in revised form December 4, 1997)

の眼への局所投与の応用,すなわち,点眼剤の開発・研究が試みられており^{5)~7)},その成果は1979年にCosterら⁸⁾がオリーブ油に溶解した2% CyA点眼液の家兎角膜移植での免疫抑制効果を示して以来,盛んに報告されるようになった。しかし,CyAは疎水性が非常に高いため⁹⁾,基剤の選択および眼組織への移行性が問題となっており,また,当初溶媒に用いられていた油性の溶解剤は,眼刺激性および角膜実質への透過性が低いため適材とはいえず,代わって界面活性剤が試みられるようになった。Kanaiら¹⁰⁾は α -シクロデキストリンを基剤とするCyA点眼液を開発してその高い角膜透過性を報告し,秋山ら⁷⁾はこの点眼液を家兎角膜移植眼に投与した結果,透明治癒率が高濃度のCyA点眼液の方でより高かったと報告している。この研究過程において,同CyA点眼液の角膜透過性を確認するために0.1% CyA点眼液を白色家兎に30分毎に6回点眼したところ,縮瞳が生じることが見出され,報告¹¹⁾した。この縮瞳は,点眼後数時間経過してから瞳孔径が縮小し始め,8時間後に最小となった後,24時間後には点眼前の大きさに戻るといった,一過性であるが持続時間の長いもので,明らかな眼圧変化を伴わず,また,アトロピン抵抗性のものであった。現在までのところ,この縮瞳の原因は明らかにされていない。

縮瞳の機序としては一般に,副交感神経刺激,収縮物質によるアゴニスト刺激によるものや¹²⁾,種々の炎症に伴うもの¹³⁾などがあげられる。CyAによる縮瞳は,前述のごとくアトロピン抵抗性であることから,副交感神経刺激以外の機序によることが推測される。そこで,今回我々はこの縮瞳の原因を検索するべく,家兎摘出瞳孔括約筋標本を用いてCyAによる収縮反応性を観察する*in vitro*の実験と,CyA頻回点眼により生じる縮瞳が炎症あるいは炎症様反応に伴うものであるかを確認するための*in vivo*の実験,すなわち,CyA点眼液点眼後の細隙灯顕微鏡および前房内フレアの経時的観察,さらに,縮瞳時に採取した房水の蛋白濃度測定および房水中浮遊細胞数計測を行った。また,CyA頻回点眼による血液房水柵機能の破綻の有無を形態学的に評価,判定した。

II 実験方法

1. 家兎摘出瞳孔括約筋標本を用いての張力測定

1) 材 料

細隙灯顕微鏡検査で眼異常のない雌の成熟日本白色家兎(体重2.5~3.0 kg)24匹を用いた。ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®],ダイナボット)50 mg/mlを耳静脈から注射した後に頸動脈から放血,致死後に眼球を摘出した。眼球は直ちに95% O₂, 5% CO₂混合ガスを通気した4℃のKrebs-Henseleit液(Krebs液; NaCl 118.9 mM: MgCl₂ 1.2 mM: CaCl₂ 1.2 mM: KH₂PO₄ 1.2 mM: NaHCO₃ 24.9 mM: glucose 5.6 mM: pH 7.4)中に留置し,手術用顕微鏡下で虹彩を液内で摘出,約0.7

mm幅のリング状瞳孔括約筋標本を作製した。

使用薬物は,carbamylocholine chloride(カルバコール)はSigma社(St Louis, MO, 米国)から購入し,CyAはNovartis社(旧Sandoz社, Basel, スイス)から提供を受けた。CyAの溶媒は1%エタノールを含んだKrebs液(エタノールKrebs液)とした。これはCyAの疎水性が非常に高いため⁹⁾,本実験に用いた最高濃度である10 μ MのCyAは0.1%以下の濃度のエタノールKrebs液では溶解せず,あるいは0.1%エタノールKrebs液にCyA 1 μ Mを溶解後,長時間通気すると析出することもあったため(データ未発表),10 μ MまでのCyAを十分に溶かし得る1%エタノールKrebs液を溶媒として選択した。

2) 張力測定の概要

筋標本は混合ガスを通気した37℃のKrebs液で満たされた液槽(約2 ml)内の2本のステンレス製フック(0.14 mm径)に留置した。フックの一端は液槽に,もう一端はトランスデューサー(UL-2 GR, Minebea)に固定し,張力変化に従って発生した歪みを電位変化としてアンプリファイヤー(AS 1202, 日本電気三栄)で増幅し,ペンレコーダー(SS-100, Sekonic)で記録した。各筋標本は張力をかけずに60分間放置した後に約100 mgの初期張力をかけ,90分間平衡化させてから等尺性張力測定を開始した。薬物投与は液槽内の液を全置換することにより行った。始めにカルバコール(1 μ M)を投与して筋標本の収縮反応性を観察し,収縮反応が最大に達した直後にKrebs液で基線に戻るまで洗浄した。約20分間平衡化後,再度カルバコール(1 μ M)を投与し,収縮高の再現性が得られるまで3~8回これを繰り返した。次に,1 nM~30 μ Mの濃度のカルバコール溶液を同様の方法で投与し,得られた収縮高から濃度反応曲線を作成した。すべての収縮高は,本実験系で最大収縮の得られた10 μ Mのカルバコールによる収縮高に対する相対値で表した。対照としての1%エタノールKrebs液投与により基線をわずかに上昇させた場合には,CyA投与によって得られた収縮高からその分の収縮高を差し引いてCyAの収縮高とした。

2. 縮瞳および前眼部所見の経時的観察

1) 材 料

細隙灯顕微鏡検査で眼異常のない,同一施設(白石実験動物飼育所)から購入した成熟純系ダッチ兎(体重1.2~2.0 kg)23匹を雌雄の別なく使用した。飼育は室温23 \pm 2(平均値 \pm 標準偏差)℃,湿度40~70%,照明時間12時間/日,換気回数12回/時間の条件下で行った。使用薬物としては,0.1% CyA点眼液および界面活性剤である同基剤点眼液は参天製薬から提供を受けた。シクロオキシゲナーゼ阻害剤である0.5% インドメタシン点眼液(インドメロール[®], 千寿製薬)¹⁴⁾,長時間作用型の副腎皮質ホルモン製剤である0.1% デキサメタゾンリン酸ナトリウ

ム点眼液(デカドロン[®], 萬有製薬)¹⁵⁾は, それぞれ市販品を購入した。

2) 実験方法

実験を開始するに当たっては, 家兔を験者および各操作に馴化させるために, 実験開始3日前から毎日, 本実験スケジュールの点眼処置以外の操作を繰り返し行い, 本実験の最中に, 特に, 瞳孔径計測の際に精神的動揺や興奮による影響がなるべく及ぼされることのないよう, さらに, 実験中に不要な操作や雑音なども生じぬよう配慮した。その影響が瞳孔径などに及んだ場合は, 安静が保たれるまで約5~10分ほど放置して対処した。以降のすべての実験に際しては, 片眼は常にこの影響の有無を知る指標かつ対照とするべく, 基剤のみの点眼とし, CyAの点眼はもう片眼のみとした。なお, すべての点眼液の点眼時には, 点眼した薬液が瞼裂から溢れぬよう, また, 体動により飛散せぬよう, 点眼後約5分間家兔の頭部を両手で保持し, 投与量の損失のないよう配慮した。

点眼前後の動物の観察は, 家兔を兔固定器(シナノ製作所)で固定した状態で, 細隙灯顕微鏡検査と瞳孔径計測, 前房内フレア測定の際に行った。細隙灯顕微鏡検査と瞳孔径計測は点眼前, 点眼直後, 点眼1, 3, 6, 12, 24, 36および48時間後に, 前房内フレア測定は点眼前, 点眼3, 6, 12, 24, 36および48時間後に行った。瞳孔径計測は既報のごとく¹⁰⁾, 暗室内で約5分間暗順応させてから赤外線ビデオレチノスコープ(infrared video camera C-20 R, キヤノン)¹⁶⁾¹⁷⁾を用いて前眼部をビデオテープに撮影し, その画像をパーソナルコンピュータに取り込んでデジタル化し, 画像解析フリーソフトであるNIH image, version 1.58を用いて瞳孔面積を計測して平均瞳孔径を算出した。すべての瞳孔径はCyA点眼前の値を1とした相対値で表した。前房内フレア測定にはレーザーフレア・セルメーター(FC 1000, 興和)を用い, 得られた前房フレア強度はフォトンカウント/mm秒(pc/ms)で表した。

実験は動物を無作為に4つの群に分けて行い, 第1群は8匹, 第2~4群は5匹ずつで構成された。

第1群: CyA 1回点眼群。0.1% CyA 点眼液を右眼に, 同基剤点眼液を左眼に1滴(約40 μ l)点眼した。

第2群: CyA 頻回点眼群。0.1% CyA 点眼液を右眼に, 同基剤点眼液を左眼に30分毎に1滴ずつ6回繰り返し点眼し, 最終点眼時を実験開始時とした。

第3群: インドメタシン処置+CyA 6回点眼群。インドメタシン点眼液を両眼に, 実験開始日の前日から最終観察時まで6時間毎に1滴ずつ点眼処置した。さらに, CyA 点眼開始3, 2, 1, 0.5時間前にも点眼した。CyA 点眼パターンは第2群と同じであった。

第4群: デキサメタゾン処置+CyA 6回点眼群。デキサメタゾン点眼液を両眼に, 実験開始日の前日から最終観察時まで6時間毎に点眼処置した。CyA 点眼パターンは

第2群と同じであった。

3. 房水中蛋白濃度測定・浮遊細胞数計測

細隙灯顕微鏡検査で眼異常のないダッチ兔4匹に0.1% CyA 点眼液あるいは基剤点眼液を6回点眼した後, 6~12時間経過して縮瞳および前房内フレア強度の上昇を確認した時点で塩酸オキシプロカイン(ペノキシル[®], 参天製薬)を1滴点眼してから前房水を30 G 針で採取した。また, 非点眼動物2匹4眼の前房水も同様の方法で採取し, 正常対照とした。浮遊細胞数計測は光学顕微鏡下で血球計算計を用いて計算した。蛋白濃度はBradford法¹⁸⁾(Bio-Rad社, Hercules, CA, 米国)で測定した。

4. 血液房水柵機能の形態学的評価

細隙灯顕微鏡検査で眼異常のない雌の成熟日本白色家兔(体重2.5~3.0 kg)3匹を用いた。トレーサーとしてエバンスブルー(Sigma社)を用いて血液房水柵機能の形態学的評価を行った¹⁹⁾²⁰⁾。0.1% CyA 点眼液あるいは基剤点眼液を6回点眼し, 3~5時間後に縮瞳を確認した時点で2% エバンスブルー生理食塩水溶液(1.5 ml/kg)を耳静脈から注射した。15分後, ペントバルビタールナトリウム(ネプタール[®])50 mg/mlを耳静脈から注射, 致死後に眼球を摘出した。虹彩・毛様体組織を採取し, 直ちに液体窒素を用いて急速凍結した後, クライオスタットで約5 μ m厚の組織切片を作製した。風乾後, 蛍光顕微鏡(620 nm)下でエバンスブルーの漏出の有無を観察した。

なお, すべて動物は, The ARVO Resolution on the Use of Animals in Researchに従って取り扱った。

5. 統計学的解析方法

縮瞳および炎症様所見の経時的観察では, CyA 点眼群は瞳孔径・前房フレア強度とも, 各観察時点における値をCyA 点眼側と基剤点眼側とで比較した。有意差検定には対応のあるt検定を用い, 有意水準は5%とした。抗炎症剤による抑制効果判定には, CyA 6回点眼群とインドメタシン処置群あるいはデキサメタゾン処置群とで比較, 検討した。房水中浮遊細胞数計測と蛋白濃度測定では, CyA 6回点眼群と基剤点眼群あるいは非点眼群とで比較, 検討した。これらの有意差検定にはいずれも対応のないt検定を用い, 有意水準は5%とした。すべての測定値は平均値 \pm 標準誤差で示した。

III 結 果

1. 摘出瞳孔括約筋標本の張力測定

家兔摘出瞳孔括約筋標本はカルバコール投与により迅速, かつ再現性のある安定した収縮が得られた。図1Aにカルバコール1 μ Mによる収縮の代表例を示す。30 nMから10 μ Mの濃度の間で濃度依存的に収縮し(図2), 10 μ Mのカルバコールにより最大張力が得られ, その収縮力は 427.6 ± 23.2 mg(n=27)であった。濃度反応曲線はS字状を描き, Hillの式²¹⁾から得られた50%有効

量(ED 50)は $2.44 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($n=27$)であった。一方、CyA は $10 \mu\text{M}$ までのすべての濃度で 5 例中 3 例で収縮反応を認めず、認められた 2 例でも収縮高はカルバコールに比較して極めて低く(図 2)、また、最大反応に達するまで数分を要するなど収縮速度も非常に緩徐であった。図 1 B に CyA による収縮のみられた 1 例を示す。

2. 縮瞳および前眼部所見の経時的観察

1) 第 1 群(図 3 A)

CyA 1 回点眼および基剤 1 回点眼では、すべての動物において前眼部異常所見、瞳孔径変化、前房フレア強度上昇は認められなかった。

2) 第 2 群(図 3 B)

基剤 6 回点眼では、すべての動物で軽度の結膜充血を認めた以外には、瞳孔径および前房フレア強度に変化を来さなかった。

CyA 6 回点眼により、8 匹中 7 匹(87.5%)で CyA 点眼側のみで瞳孔径が縮小し、CyA 点眼側の点眼 6, 12 時間後の瞳孔径($0.62 \pm 0.08, 0.71 \pm 0.07$)は基剤点眼側の瞳孔径($1.00 \pm 0.02, 1.00 \pm 0.02$)に比べ、それぞれ有意な縮小を認めた($p < 0.005, p < 0.01$)。前房フレア強度上昇は、すべての動物の CyA 点眼側で縮瞳とほぼ同時期に認められ、点眼 6, 12 時間後の前房フレア強度($238.3 \pm 77.51 \text{ pc/ms}, 204.1 \pm 52.18 \text{ pc/ms}$)は基剤点眼側($8.93 \pm 3.04 \text{ pc/ms}, 6.76 \pm 0.85 \text{ pc/ms}$)に比べ、それぞれ統計学的に有意な上昇を認めた($p < 0.05, p < 0.01$)。これらの変化はいずれも、程度と発現時間、持続時間には個体差が大きかった。また、すべての動物で縮瞳やフレア強度上昇とはほぼ同時期に、CyA 点眼側で結膜・毛様充血、および前房がやや浅くなる傾向がみられ、さらに、8 匹中 4 匹(50.0%)の CyA 点眼側で最大縮瞳時、かつ前房フレア強度が最大となった時点では、細隙灯顕微鏡検査によって前房内混濁、および瞳孔縁全周または一部へのフィブリン様物質の析出を認めた(図 4)。これらのすべての所見は、点眼 48 時間後までには点眼前と同様の状態にまで戻った。なお、角膜には全観察期間中、著変を認めなかった。

3) 第 3 群(図 3 C)

インドメタシン処置により、結膜・毛様充血出現はすべての動物で抑制された。縮瞳傾向はわずかに認められたものの、第 2 群の CyA 類回点眼群に比べ、点眼 6 時間後に統計学的に有意な差をもって抑制された($0.88 \pm 0.06, p < 0.05$)。前房フレア強度の上昇はすべての動物の全経過観察時においてほぼ完全に抑制され、特に第 2 群で統計学的に有意な上昇の認められた点眼 6, 12 時間後には、インドメタシン処置によって統計学的に有意な差をもって抑制された($6.86 \pm 1.99 \text{ pc/ms}, 7.36 \pm 1.05 \text{ pc/ms}$, それぞれ $p < 0.05, p < 0.01$)。また、前房内への析出物の出現は 1 匹もみられなかった。

4) 第 4 群(図 3 D)

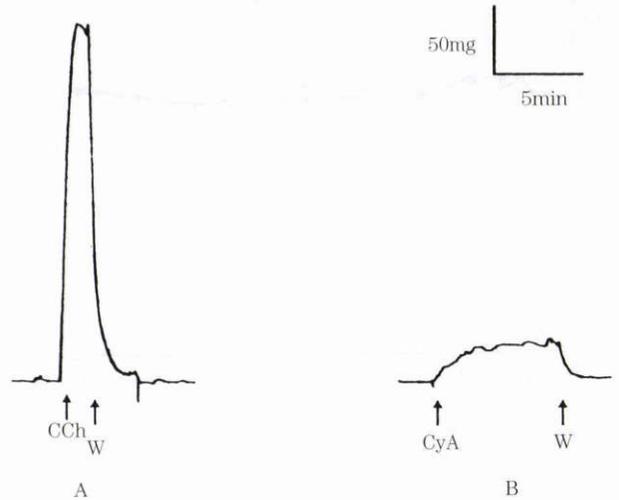


図 1 A カルバコール(CCh) $1 \mu\text{M}$ 投与時の瞳孔括約筋収縮の代表例。

CCh は投与直後から迅速な収縮を生じた。
W: 洗浄

図 1 B シクロスポリン(CyA) $1 \mu\text{M}$ 投与時の瞳孔括約筋収縮の代表例。

CyA, CCh に比べ非常に弱く、かなりゆっくりとした、徐々に最大に達する収縮をもたらした。

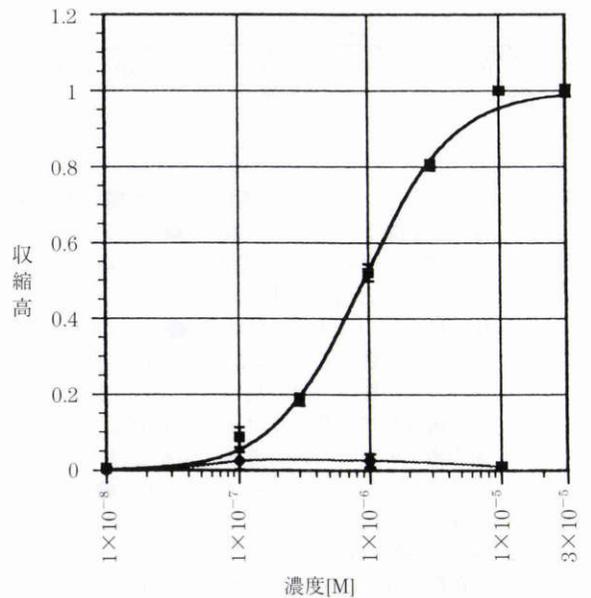


図 2 CCh, CyA の濃度反応曲線。

CCh(■: $n=27$)では S 字状の濃度反応曲線が描かれたのに対し、CyA(●: $n=5$)では、投与したすべての濃度で収縮を認めないか、認めてもごく僅かな収縮であった。(平均値 \pm 標準誤差)。

デキサメタゾン処置群では、結膜・毛様充血出現は縮瞳のみられた 5 匹中 3 匹(60.0%)で認められ、縮瞳は点眼 12 時間後(0.91 ± 0.01)でのみ第 2 群に比べて統計学的に有意に抑制されたものの($p < 0.05$)、点眼 6 時間後には統計学的に有意な抑制は認められず、また、前房フレア強度の上昇についてはどの時点においても統計学的に有意な抑制は認められなかった。瞳孔径が最小、かつ前房フ

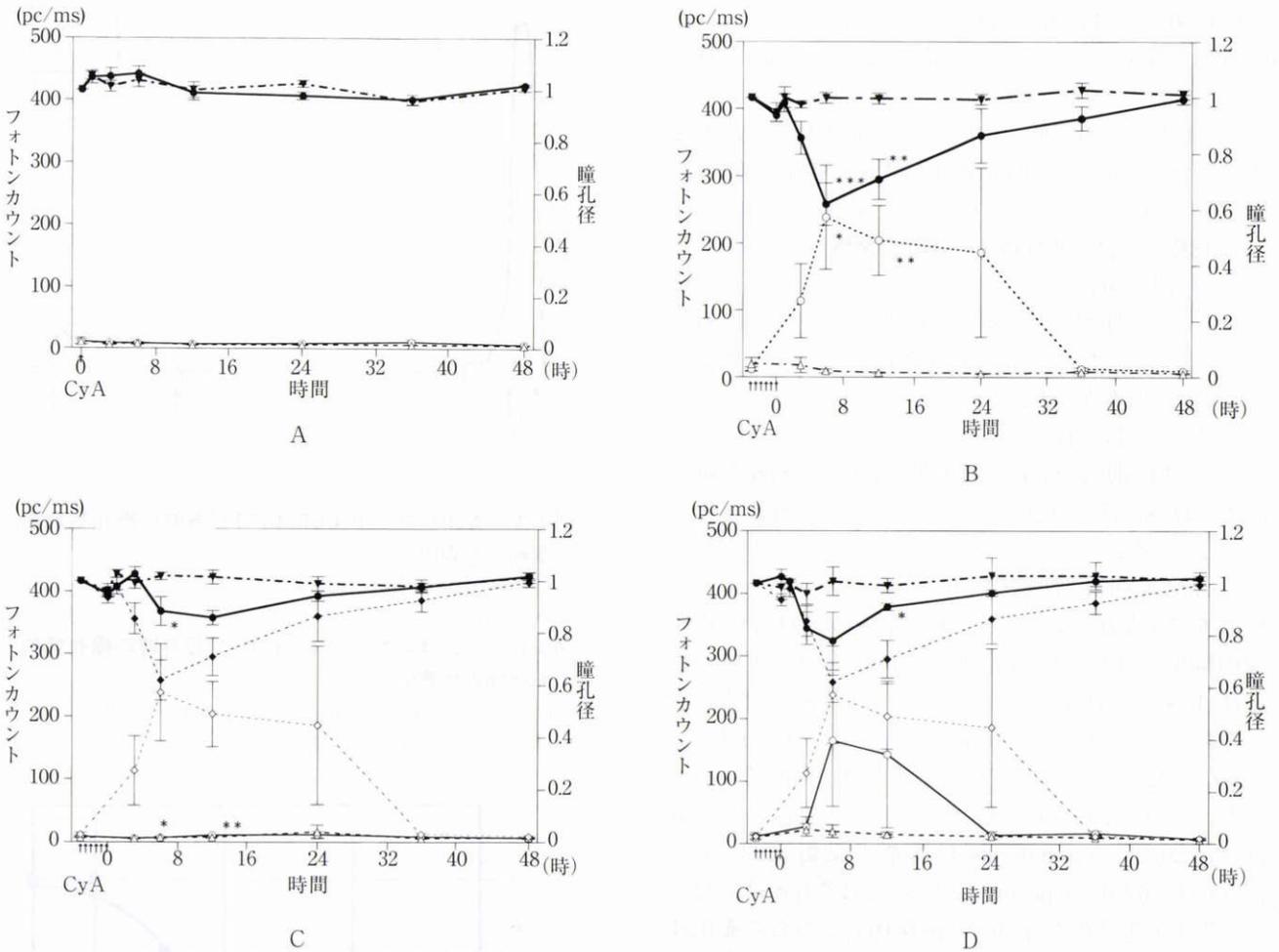


図3 CyA点眼による瞳孔径・前房フレア強度の経時的変化。

A：第1群；CyA 1回点眼群。●はCyA点眼側の瞳孔径を，▼は基剤点眼側の瞳孔径を，○はCyA点眼側の前房フレア強度を，△は基剤点眼側の前房フレア強度を，それぞれ示す(平均値±標準誤差：各n=5)。瞳孔径，前房フレアとも著変を認めなかった。

B：第2群；CyA 6回点眼群。●はCyA点眼側の瞳孔径を，▼は基剤点眼側の瞳孔径を，○はCyA点眼側の前房フレア強度を，△は基剤点眼側の前房フレア強度を，それぞれ示す(平均値±標準誤差：各n=8)。CyA点眼側では点眼6～12時間の間に基剤点眼側に対し統計学的に有意な縮瞳(**：P<0.01, ***：p<0.005)，および前房フレア強度の上昇(*：p<0.05, **：p<0.01)を認めた。これらの変化はすべて，点眼48時間後には点眼前の値に戻った。なお，基剤点眼側ではこれらの変化は，全く生じなかった。

C：第3群；インドメタシン処置群。●はCyA点眼側の瞳孔径を，▼は基剤点眼側の瞳孔径を，○はCyA点眼側の前房フレア強度を，△は基剤点眼側の前房フレア強度を，それぞれ示す(平均値±標準誤差：各n=5)。さらに，第2群で得られたCyA 6回のみ点眼群の瞳孔径を◆で，前房フレア強度を◇で示す。インドメタシン処置群のCyA点眼側では，CyA 6回点眼のみでみられた縮瞳は一部減弱し，点眼6時間後には統計学的に有意な抑制が認められた(*：p<0.05)。前房フレア強度の上昇はいずれの時間とも完全に抑制された(*：p<0.05, **：p<0.01)。

D：第4群；デキサメタゾン処置群。●はCyA点眼側の瞳孔径を，▼は基剤点眼側の瞳孔径を，○はCyA点眼側の前房フレア強度を，△は基剤点眼側の前房フレア強度を，それぞれ示す(平均値±標準誤差：各n=5)。さらに，第2群で得られたCyA 6回のみ点眼群の瞳孔径を◆で，前房フレア強度を◇で示す。デキサメタゾン処置群のCyA点眼側では，CyA 6回点眼のみでみられた縮瞳，前房フレア強度の上昇はCyA 6回点眼のみの群に比べやや軽減したものの，点眼12時間後でのみ統計学的に有意な縮瞳の減弱(*：p<0.05)を認めた他には瞳孔径，前房フレア強度はどの時間においても統計学的に有意な抑制は認められなかった。

フレア強度の最大となった点眼12時間後には，1匹(20.0%)で瞳孔領への析出物の出現を認めたが，24時間後には消失した。

3. 房水中蛋白濃度測定・浮遊細胞数計測

CyA 6回点眼後の縮瞳時の房水中蛋白濃度および前

房フレア強度を図5に示す。房水中蛋白濃度は，基剤6回点眼後，非点眼ではそれぞれ0.24±0.08 mg/ml, 0.37±0.08 mg/ml(各n=4)であったのに対し，CyA 6回点眼後は10.80±2.59 mg/ml(n=4)と，これら両者に対し有意な上昇を認めた(各p<0.05)。一方，前房フレア強度は

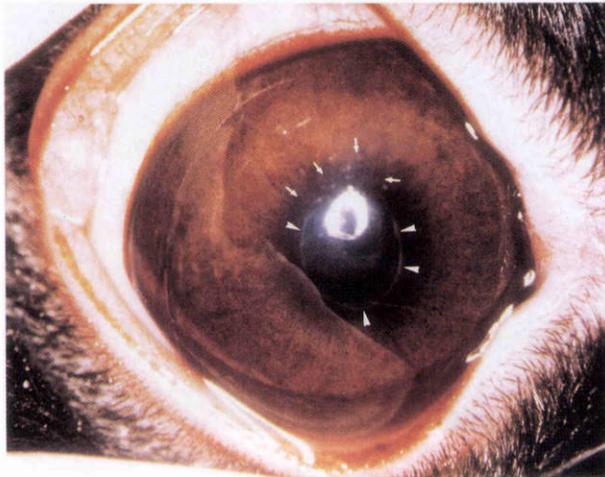


図 4 A CyA 6 回点眼 12 時間後の外眼部写真。強い縮瞳と瞳孔縁全周にフィブリン様析出物(矢じり), および前房混濁(矢印)を認めた。

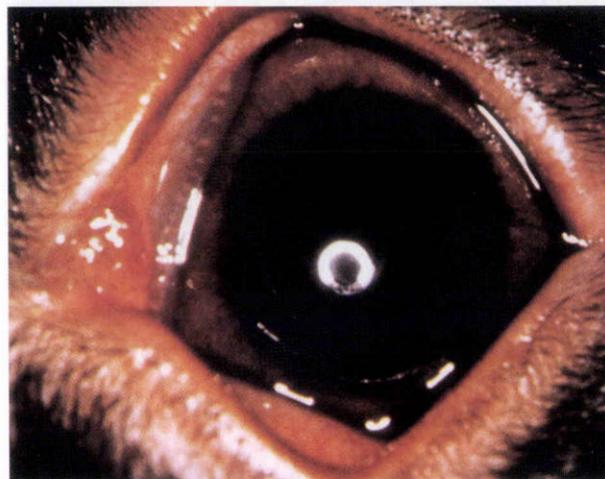


図 4 B 基剤 6 回点眼 12 時間後の外眼部写真。著変を認めなかった。

CyA 6 回点眼は 502.00 ± 58.76 pc/ms であり, 基剤 6 回点眼 (13.75 ± 7.10 pc/ms), 非点眼 (11.55 ± 5.92 pc/ms) に対し有意な上昇を認め (各 $p < 0.005$), 実際の房水中蛋白濃度測定の結果と同様の傾向がみられた。房水中浮遊細胞数は, CyA 6 回点眼後は 7.56 ± 2.36 個/ μ l, 基剤点眼後は 5.06 ± 2.83 個/ μ l と, 両者間に有意な差を認めなかった。

4. 血液房水柵機能の形態学的評価

虹彩組織は, 基剤点眼側ではエバンスブルーが血管内のみに限局しているのに対し (図 6 B), CyA 頻回点眼側ではエバンスブルーが血管から漏出し, 虹彩実質にびまん性に漏出している所見が観察された (図 6 A)。毛様体突起虹彩部では, CyA 頻回点眼側でのみ, 毛様体上皮からのエバンスブルーの漏出が確認された (図 6 C)。基剤点眼側では漏出は認められなかった (図 6 D)。以上の結果から, 虹彩血管, 毛様体上皮の両組織で CyA 頻回点眼による血液房水柵機能の破綻が確認された。

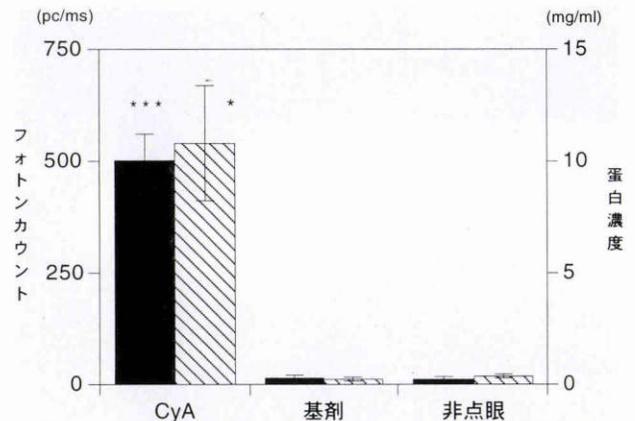


図 5 CyA 6 回点眼 6~12 時間後の縮瞳中に測定した前房フレア強度とその直後に採取した前房水の蛋白濃度 (Bradford 法)。

■は前房フレア強度を, □は蛋白濃度 (Bradford 法) を表す。

CyA 点眼後では基剤点眼後および非点眼に対し, 前房フレア強度, Bradford 法による蛋白濃度ともに, 統計学的に有意な上昇を認めた (* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.005$)。

IV 考 按

CyA の免疫抑制剤としての主な作用機序は, T 細胞のインターロイキン 2 産生を阻害することによる細胞性免疫の抑制であることが知られている²²⁾²³⁾。一方, CyA 点眼液を正常家兎に頻回点眼すると縮瞳を生じることが見出されているが, この原因は不明であり¹¹⁾, また, この縮瞳は免疫異常のない動物に生じることから, 少なくとも通常の免疫抑制で考えられている機序とは異なるものと推測されていた。本論文では, この縮瞳の機序について検討した。

家兎摘出瞳孔括約筋標本を用いた *in vitro* の収縮実験に際しては, 実際の縮瞳時に房水, 虹彩組織に存在する CyA 濃度に相当する濃度域で行うべく, 予備実験として, 0.1% CyA 頻回点眼 5 時間後の縮瞳中に採取した白色家兎眼の房水および虹彩の CyA 組織内濃度を, ラジオイムノアッセイ法を用いて測定した。それぞれ 40.6 ± 2.1 ng/ml, 714.8 ± 106.0 ng/g (それぞれ $n=5$) であったことから (データ未発表), 本実験に用いた CyA の濃度域はそれらの濃度を含む $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M (12.0 ng/ml ~ 12.0 μ g/ml) とした。その結果, 今回行った実験条件下ではいずれの濃度でも CyA は収縮反応を生じないか, 生じてもごくわずかであったことから (図 2), この収縮は, 家兎への CyA 頻回点眼後に生じる縮瞳の程度と比較して極めて軽度であり, 縮瞳の原因との関連性は低いものと考えられた。また, この収縮の生じたものについてはアトロピン (10^{-7} M) で拮抗されなかった (データ未発表)。

CyA 頻回点眼後の前眼部所見および前房フレア強度の経時的観察・測定では, 実験動物としてダッチ兎を用いた。これはレーザーフレア測定の際に白色家兎では

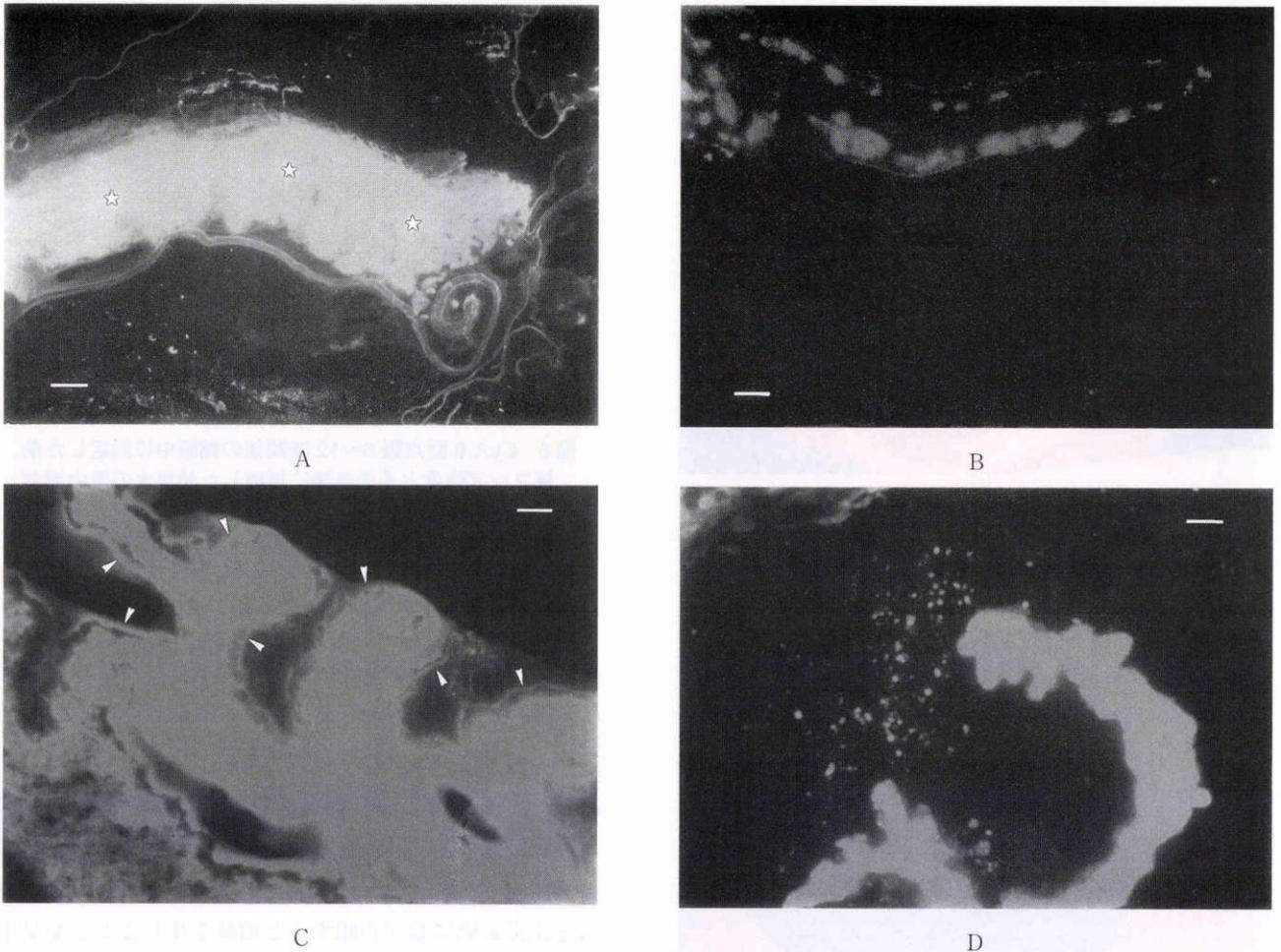


図6 血液房水柵機能の形態学的評価.

CyA 6 回点眼 3~5 時間後の縮瞳中に 2% エバンスブルー溶液 (1.5 ml/mg) を全身投与し, 15 分後に致死して得られた虹彩・毛様体凍結切片を, 蛍光顕微鏡 (620 nm) 下で観察した.

A: CyA 6 回点眼後の虹彩. エバンスブルーの虹彩実質全体への瀰漫的な漏出を認めた (☆). バーは 20 μ m.

B: 基剤 6 回点眼後の虹彩. エバンスブルーは虹彩血管内にとどまり, 虹彩実質への漏出は認められなかった. バーは 20 μ m.

C: CyA 6 回点眼後の毛様体突起. 毛様体上皮からのエバンスブルーの漏出を認めた (矢じり). バーは 10 μ m.

D: 基剤点眼後の毛様体突起. エバンスブルーは毛様体実質内にとどまり, 毛様体上皮からの漏出は認められなかった. バーは 10 μ m.

バックグラウンド値がアーチファクトの影響で大きくなり, 有効なフォトカウントが得られない²⁰⁾ためと, 個体差による影響を可能な限り小さくするために純系の有色家兎であるダッチ兎を選択し, さらに, すべて同一施設から購入した. その結果, ダッチ兎の方が, 既報¹¹⁾の白色家兎でみられた 0.1% CyA 類回点眼後 3~8 時間で生じる縮瞳に比べ, その出現時間が 6~12 時間後と遅いものの, 白色家兎と同様か, あるいはそれ以上と思われる著明な縮瞳を呈した. 縮瞳とほぼ平行して結膜・毛様充血, 縮瞳, 瞳孔領へのフィブリン様析出物出現, 前房フレア強度上昇などの前眼部所見が出現した. このうち, 前房フレア強度は前房水中蛋白濃度と同様に上昇しており (図 5), さらに, 虹彩血管と毛様体上皮における血液房水柵機能の破綻が証明された (図 6) ことから, これは両組織から血漿蛋白成分が漏出したことに起因すると考えられる.

以上の所見は, いずれも前眼部, 特に前部ぶどう膜に炎症が惹起された時に呈することのあるものであるが, 以下の点で一般的に認識されている, いわゆる炎症の特徴と異なっている. すなわち, 血管透過性亢進を生じつつも炎症性細胞の前房内への遊走を認めなかった点, 抗炎症剤の効果が非ステロイド性抗炎症剤よりも副腎皮質ステロイド剤の方が弱かった点 (図 3 C, D) である. このため, 本論文では CyA 類回点眼後にみられたこれらの変化を炎症様反応としたが, この病態は, あるいはいわゆる炎症の前段階であるか, または炎症の一部症状のみが発現された状態である可能性も否定できない.

CyA 類回点眼後の縮瞳および前眼部所見を動物別にみた場合, 出現時間や持続時間, 程度などの差は大きかったが, これは CyA を全身投与した際, 血中濃度や肝臓, 腎臓などへの組織移行性, 組織内濃度などがピークに達

する時間や効果などにおいて、CyAのその強い疎水性のために非常に激しいばらつきが存在するというこれまでの結果²⁵⁾²⁶⁾と一致していた。

当教室でのこれまでの研究では、家兎角膜移植眼における透明治癒率の向上に有効なCyA点眼液の濃度は0.1%、0.05%、0.025%の順で、濃度依存性であった²⁷⁾²⁸⁾。このうち、0.05% CyA 1回点眼4時間後の虹彩のCyA組織内濃度は 63.3 ± 12.4 ng/g (n=3)であり、0.1% CyA 頻回点眼5時間後の縮瞳中の虹彩では前述のごとく 714.8 ± 106.0 ng/g (n=5)であったことから(いずれもデータ未発表)、縮瞳および炎症様反応を生じ得る境界となるCyA組織内濃度は、少なくともこの間にあると考えられた。このようにCyAの虹彩組織内濃度に限って見た場合、角膜移植に有効な濃度と、縮瞳および炎症様反応を生じた濃度との差がわずかに10倍程度であったことから、安全域がかなり狭いと考えられた。また、今回の実験では0.1% CyA点眼液を今回の実験で用いたが、同点眼液の1回点眼あるいは基剤頻回点眼ではほとんど変化せず、短時間に頻回に点眼すると炎症様反応を惹起されたことから、CyAが安全域のかなり狭い薬物であると思われた。その他の点眼液の濃度、あるいは点眼回数については未検討である。

CyAが具体的にどのような機序で縮瞳、血液房水柵機能の破綻および炎症様反応を惹起するかについては、なお不明である。また、縮瞳に関しては、いわゆる炎症時に生じる縮瞳の機序も完全には明らかでない現時点においては、はっきりした結論は出ないと思われるものの、今回の結果で、虹彩・毛様体の血液房水柵機能破綻が証明されたことから、これによる血漿成分の漏出が虹彩・毛様体組織全体の浮腫、腫脹をもたらし、外観上縮瞳・浅前房を呈している可能性や、あるいはそれが刺激となり、二次的に瞳孔括約筋を収縮させた可能性も否定できないと思われた。虹彩・毛様体における血液房水柵機能のさらなる検討を含め、今後この病態の病理組織学的検討を予定している。

CyA頻回点眼後の縮瞳と前眼部の炎症様所見がシクロオキシゲナーゼ阻害剤で抑制されたことから、原因物質としてアラキドン酸カスケードのうち、プロスタグランジン(PG)類などのシクロオキシゲナーゼ系の物質の関与が強く推定されるが、房水中のPG検索を行った結果、PGE₂、PGF_{2α}などの上昇は認められなかった(データ未発表)。これはサンプルが微量であるためや、物質の不安定性により分解・代謝された可能性、その他未検索のオートコイド類に起因する可能性などが考えられる。現在までのところ原因物質の同定はできていないが、その他にも、サブスタンスPをはじめとするタキキニン類やヒスタミン、血小板活性化因子(PAF)、腫瘍壊死因子(TNF)などのケミカルメディエーターの関与の可能性も考慮しなければならない。原因物質については現在検

索中である。

今回の結果は比較的炎症や刺激に対し感受性が高いといわれる家兎²⁸⁾での実験であり、現在までのところ、ヒトを含めた他の動物種ではCyAにより前眼部炎症、または縮瞳を生じたという報告は全くないことから、種特異性がある可能性も考えられる。CyAはヒトにおける全身投与の際には、投薬計画を立てる上で腎障害などの副作用の発生防止目的で全血検体によるCyA濃度のモニタリングを定期的に行うことが一般化している²⁹⁾。よって、CyA点眼液のヒトへの投与に際してもその濃度管理、特に頻回点眼などによる過量投与には十分な注意の必要性があると思われた。

稿を終えるに当たり、ご指導ご校閲を賜りました順天堂大学眼科学教室金井 淳教授ならびに同薬理学教室小川靖男教授、ご指導ご助言を賜りました防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授に深く感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) Bennett WM, Pulliam JP: Cyclosporine nephrotoxicity. *Ann Intern Med* 99: 851—854 1983.
- 2) Nussbaum ES, Maxwell RE, Bitterman PB, Hertz MI, Bula W, Latchaw RE: Cyclosporine A toxicity presenting with acute cerebellar edema and brainstem compression. *J Neurosurg* 82: 1068—1070, 1995.
- 3) Bennett WM, Porter GA: Cyclosporine-associated hypertension. *Am J Med* 49: 584—588, 1988.
- 4) Mayer-Lehnert KH, Schrie RW: Potential mechanism of cyclosporine A induced vascular smooth muscle contraction. *Hypertension* 13: 352—360, 1989.
- 5) 高野俊之, 小林千博, Alba RM, 金井 淳: 0.025% シクロスポリン点眼(アルファーシクロデキストリン溶解)の家兎角膜移植での免疫抑制効果. *日眼会誌* 96: 834—840, 1992.
- 6) Alba RM, 金井 淳, 高野俊之, 小林千博, 中島 章, 栗原弘三, 他: The effect of various vehicles for cyclosporin eye drops. *眼紀* 40: 902—908, 1989.
- 7) 秋山修一, 横山利幸, 高野俊之, 小林千博, 金井 淳: シクロスポリン点眼の角膜移植への応用. *日眼会誌* 97: 378—382, 1993.
- 8) Coster DJ, Shepherd WF, Fook TC, Rice NS: Prolonged survival of corneal allografts in rabbits treated with cyclosporin A. *Lancet* 2: 688—689, 1979.
- 9) In: Budavari S (Ed): *The Merck Index* 12th ed. Merck. Whitehouse Station, NJ, 464—465, 1996.
- 10) Kanai A, Alba RM, Takano T, Kobayashi C, Nakajima A, Kurihara T, et al: The effect of the cornea of alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporin eye drops. *Transplant Proc* 121: 3150—3152, 1989.

- 11) 土至田 宏, 市川高文, 中安清夫, 金井 淳: 家兔におけるシクロスポリン点眼の縮瞳作用. あたらしい眼科 12: 1935—1939, 1995.
- 12) 吉富健志: 瞳孔: 神経支配と生体内活性物質. 日本の眼科 64: 533—537, 1993.
- 13) O'Brien JM, Albert DM, Foster CS: Anterior uveitis. In: Albert DM, et al(Eds): Principles and Practice of Ophthalmology: Clinical Practice, WB Saunders, Pennsylvania, 407—423, 1994.
- 14) Hanna C, Keatts HC, Rock L: Indomethacin in ocular inflammation in rabbits. Arch Ophthalmol 77: 554—558, 1967.
- 15) Schimmer BP, Parker KL: Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormone. In: Hardman JG, et al(Eds): Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th Ed, McGraw-Hill, New York, 1459—1485, 1995.
- 16) 矢沢興司: フォトレチノスコープ. 臨眼 38: 847—849, 1984.
- 17) 鹿島佳代子, 矢沢興司, 末房喜代子, 鈴木裕子, 相川典代, 石引美貴: 赤外線ビデオレチノスコープによる前眼部の観察記録. 臨眼 47: 458—459, 1993.
- 18) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochem 72: 248—254, 1976.
- 19) Rapaport SI, Thompson HK: Osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey without associated neurological deficits. Science 180: 971, 1973.
- 20) Okisaka S, Kuwabara T: Selective destruction of the pigmented epithelium in the ciliary body of the eye. Science 184: 1298—1299, 1974.
- 21) 高柳一成, 久山哲広: 受容体結合実験. 高柳一成(編): 薬物受容体. 南山堂, 東京, 33—54, 1990.
- 22) Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: Biological effects of cyclosporine A: A new antilymphocytic agent. Agents Actions 6: 468—475, 1976.
- 23) Drugge RJ, Handschmacher RE: Cyclosporine-mechanisms of action. Transplant Proc 20(suppl. 2): 301—305, 1988.
- 24) 高橋 貞, 稲用和也: 動物実験—薬物効果の測定および実験的ぶどう膜炎への応用—. 清水昊幸, 他(編): 眼科 Mook 42 レーザーフレア・セル測定. 金原出版, 東京, 195—209, 1990.
- 25) Fahr A: Cyclosporin clinical pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet 24: 472—495, 1993.
- 26) Grevel J, Nuesch E, Abisch E, Kutz K: Pharmacokinetics of oral cyclosporin A (Sandimmun) in healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol 31: 211—216, 1986.
- 27) 金井 淳, 上杉祐子, 海老原伸行, 中安清夫: 角膜移植と免疫抑制剤. 第1回国際眼科シンポジウム 1: 309—310, 1997.
- 28) Bito LZ: Species differences in the responses of the eye to irritation and trauma: A hypothesis of divergence in ocular defense mechanisms, and the choice of experimental animals for eye research. Exp Eye Res 39: 807—829, 1984.