

ホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬 NSP-805 の家兎網脈絡膜循環に対する影響 —レーザードップラフローメータを用いた検討—

内田 英哉¹⁾, 富田 剛司²⁾, 保科 太³⁾, 望月 信夫⁴⁾, 北澤 克明¹⁾

¹⁾岐阜大学医学部眼科学教室, ²⁾東京大学大学院医学系研究科眼科学教室

³⁾わかもと製薬株式会社, ⁴⁾日本曹達株式会社

要 約

目的: ホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬である NSP-805 静脈内投与の正常家兎眼の網脈絡膜循環に対する影響を検討し, カルシウム拮抗薬である nicardipine hydrochloride と比較する。

方法: 白色家兎 24 匹を対象とした。全身麻酔下で NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を静脈内投与し, 網脈絡膜循環を測定した。また, 溶媒対照として 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いた。網脈絡膜循環の評価は, scanning laser Doppler flowmeter (Heidelberg Retina Flowmeter) を用い, 薬剤投与前値と投与後 120 分まで血流パラメータを測定した。網脈絡膜循環測定中は心拍数, 全身血圧をモニタリングした。各薬剤において投与前と投与後 20 分毎の網脈絡膜循環パラメータの比較, また薬剤投与群と対照群の比較を行った。

結果: 低濃度 NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与後, 網脈絡膜循環パラメータは有意に上昇した ($p < 0.05$)。高濃度 NSP-805 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) は, 全身血圧を有意に下降させたが, 網脈絡膜循環パラメータ上昇率は低濃度 NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) に比べ弱かった。低濃度 NSP-805 投与群と nicardipine 投与群は 20% DMSO 投与群に比べ, 網脈絡膜循環パラメータの有意な上昇があった。

結論: ホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬である NSP-805 は, 正常家兎眼の網脈絡膜循環を増加させる。(日眼会誌 106 : 615-620, 2002)

キーワード: ホスホジエステラーゼ阻害薬 NSP-805, ハイデルベルグレチナフローメータ, 網脈絡膜循環

The Effect of Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor on Chorio-retinal Blood Flow in Rabbits Eyes

Hideya Uchida¹⁾, Goji Tomita²⁾, Futoshi Hoshina³⁾, Nobuo Mochizuki⁴⁾ and Yoshiaki Kitazawa¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Gifu University School of Medicine

²⁾The University of Tokyo, Graduate School of Medicine

³⁾Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd., ⁴⁾Nippon Soda Co., Ltd.

Abstract

Purpose: To investigate the ocular effect of intravenous administration of a phosphodiesterase type 3 inhibitor (NSP-805) and to compare the effect of NSP-805 with that of a calcium antagonist (nicardipine hydrochloride) on chorio-retinal blood flow in anesthetized albino rabbits.

Methods: Twenty-four female albino rabbits (weighting 2.0~4.0 kg) were anesthetized with intravenous injection. NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and nicardipine of 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were intravenously administered to the anesthetized rabbits. Intravenously administration of 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a vehicle. Chorio-retinal blood flow was measured with a laser Doppler flowmeter at baseline and every 20 minutes after intravenous administration for 120 minutes. Heart rates and systemic blood pressure were monitored. Baseline measurements were compared with every 10 minutes after intravenous administration. Differences between the drug groups and vehicle group were anal-

alyzed.

Results: After administration of a low dose of NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the chorio-retinal blood flow was significantly increased ($p < 0.05$). A high dose NSP-805 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) reduced systemic blood pressure significantly, but the increase of chorio-retinal blood flow was less than that at the low dose of NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Chorio-retinal blood flow in the NSP 805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) groups was significantly increased over that in the control group (20% DMSO) ($p < 0.05$).

Conclusion: The results suggest that the NSP-805 has the potential of increasing chorio-retinal blood flow in rabbit eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 615-620, 2002)

Key words: Phosphodiesterase NSP-805, Heidelberg Retina Flowmeter, Chorio-retinal blood flow

別刷請求先: 500-8705 岐阜市司町 40 岐阜大学医学部眼科学教室 内田 英哉

(平成 13 年 12 月 28 日受付, 平成 14 年 5 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Hideya Uchida, M. D. Department of Ophthalmology, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500-8705, Japan

(Received December 28, 2001 and accepted in revised form May 13, 2002)

I 緒 言

近年、緑内障、特に正常眼圧緑内障における視神経障害の発症、進行に眼圧以外の因子の関与が考えられており、新しい治療法としてカルシウム拮抗剤¹⁾や nitric oxide donors など種々の末梢循環改善薬の有効性が注目されてきている。Phosphodiesterase (PDE) 阻害薬もまた血小板凝集抑制作用、末梢血管拡張作用などの生理作用を発現²⁾することから、末梢循環改善薬として緑内障の新しい治療法に応用できる可能性がある。最近開発された NSP-805 は、分子量 297 のピリダジノン誘導体であり、PDE のアイソザイムのうち 3 型を特異的に阻害し、他の 3 型阻害薬に比し強力でかつ選択性が高い薬剤であり、強力な血管拡張作用を有する³⁾。

一方、末梢循環改善の評価には水素ガスクリアランス法やマイクロスフェア法、臨床的には蛍光眼底造影検査などが使用されてきたが、近年は血流を非侵襲的に評価できる Heidelberg Retina Flowmeter (以下、HRF: Heidelberg Engineering GmbH) を代表とするレーザードップラフローメータやレーザースペックル法による解析が行われている⁴⁾。

今回、我々は NSP-805 の眼血流のうち末梢循環への影響を正常家兎眼でスキニングレーザードップラフローメータを用いて検討し、代表的なカルシウム拮抗薬である nifedipine hydrochloride と比較検討したので報告する。

II 実験方法

1. 対 象

体重 2.0~4.0 kg の雌日本白色種家兎(中部科学資材) 24 匹を使用した。

2. 被験薬剤と調製方法および投与方法

Ethyl carbamate (Urethane, Sigma, Inc.) 1~1.2 g/5 ml/kg を左耳介静脈から注入し、全身麻酔下で NSP-805 (日本曹達) を dimethyl sulfoxide (以下、DMSO: Nacalai Tesque, Inc.) で溶解し DMSO を 20% になるよう生理食塩液で希釈、40 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与した。

Nifedipine hydrochloride (以下、nifedipine: Perdipine[®] 注射液 2 mg, 山之内製薬) は生理食塩液(大塚製薬) で希釈、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与した。

陰性対照として、DMSO を生理食塩液で希釈し 20% とし投与した。

投与は右耳介静脈から 0.2 ml/kg の容量で 30~60 秒かけて緩徐に投与した。

3. 血流の測定

0.4% tropicamide (Mydrin-M[®], 参天製薬) を左眼に点眼し散瞳させた。網脈絡膜の組織血流の測定はレーザードップラフローメータの一つである HRF で行った。

HRF カメラヘッドに家兎眼用レンズを装着し、画角 10° を用い、左眼の視神経乳頭耳側の 1~2 乳頭径離れた位置で、大血管のない部分を測定した。測定は、投与前に 3~4 回測定を繰り返し一定の値になったことを確認し、その平均値を投与前値とし、薬剤投与後は 10 分毎に 60 分まで、その後 20 分毎に 120 分後まで行った。各時点で網脈絡膜同一部位を 2 回測定し、測定パラメータ (volume, flow および velocity) の平均値を求めた。測定範囲としては大血管のない 10×10 ピクセルのエリアで行った。

4. 血圧、脈拍数の測定

全身麻酔後に家兎を固定し左大腿部を切開した後、大腿動脈カニューレを挿入した。圧力トランスデューサー (DX-360, 日本光電) を介し、血圧はひずみ圧力用アンブ (AP-641 G, 日本光電) を用いて全身血圧を測定した。また、脈拍数は瞬時心拍計ユニット (AT-601 G, 日本光電) で測定し、卓上型ペンレコーダー (WT-645 G, 日本光電) に記録した。また、直腸温をサーミスタ温度計 (MGA 3-219, 日本光電) で随時チェックした。

5. 解 析

HRF 血流パラメータである volume, flow および velocity のうち flow を代表値として用いた。パラメータは相対値であるため投与前値を 100% とした変化率を用い、平均値±標準誤差 (SE) で示した。このときオフセット値⁵⁾は考慮しなかった。

血圧、脈拍数は平均値±標準偏差 (SD) で示した。

各薬剤の投与前後の経時変化は、対応のある 2 群の比較 (paired-t test) で解析した。また、各薬剤間の比較には繰り返しのある二元配置の分散分析 (Two-way repeated measures ANOVA) を用いて比較した。それぞれの検定で危険率 5% 未満を有意差ありとした。

III 結 果

1. 網脈絡膜血流に対する影響

1) 各薬剤の経時変化

対照とした 20% DMSO 投与群では、flow は初期値よりほぼ一定の値を示した。

NSP-805 の 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、flow は持続性のある増加作用を示した。すなわち、20~80 分にかけて有意な増加があり、60 分で最高 132% に達した (図 1)。NSP-805 の 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群に比しやや遅れて 30 分から増加し始め 80 分まで有意に増加し、60 分で最高 121% の増加に留まった (図 2)。

陽性対照である nifedipine の 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群は、flow は投与前値に比し 20~50 分にかけて、最高 134% と有意な増加があった (図 3)。

2) 群間比較検討

陰性対照である 20% DMSO 投与群と各薬剤投与群との群間比較検討を行ったところ、NSP-805 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

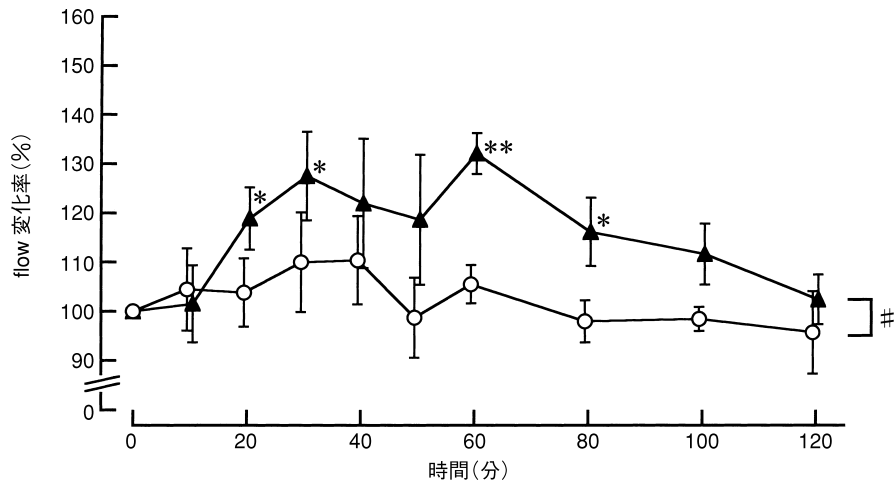


図 1 NSP-805 40 µg/kg 投与による網脈絡膜循環 (flow 値) 変化.

▲：NSP-805 の 40 µg/kg 投与群，○：基剤 (20% dimethyl sulfoxide：以下，DMSO) 投与群。
 n=6，バーは標準誤差を示す。薬剤投与前との比較では NSP-805 (40 µg/kg) 投与後 80 分まで有意な網脈絡膜血流の増加があった (*：p<0.05，**：p<0.01, paired t-test)。また，基剤 (20% DMSO) 投与群との比較では有意な網脈絡膜血流増加があった [#：p<0.05 (Two-way repeated measures ANOVA)]。

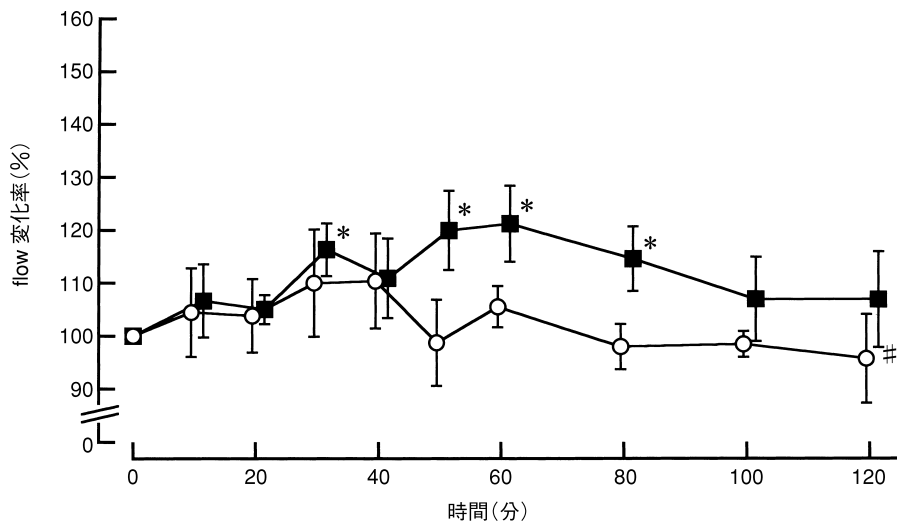


図 2 NSP-805 100 µg/kg 投与による網脈絡膜循環 (flow 値) 変化.

■：NSP-805 の 100 µg/kg 投与群，○：基剤 (20% DMSO) 投与群。
 n=6，バーは標準誤差を示す。薬剤投与前との比較では NSP-805 (100 µg/kg) 投与後 30~80 分まで有意な網脈絡膜血流の増加があった (*：p<0.05, paired t-test)。また，基剤 (20% DMSO) 投与群との比較では有意差はなかった [#：N.S. (Two-way repeated measures ANOVA)]。

投与群で flow に有意な増加があった (図 1)。一方，N-SP-805 (100 µg/kg) 投与群とは有意差はなかった (図 2)。また，20% DMSO 投与群に比較し，nicardipine (40 µg/kg) 投与群で flow に有意な増加があった (図 3)。

2. 血圧・脈拍数に対する影響

20% DMSO 投与群では，血圧に対しては変化なく，NSP-805 (40 µg/kg) 投与群では，血圧は投与 10 分後に平均で最大 13.3 mmHg の下降がみられ，徐々に回復，ほぼ 50 分後には投与前に戻った。NSP-805 (100 µg/kg) 投与群では血圧は投与 10~30 分にかけて平均で最大 21 mmHg 前後の下降があり，120 分後においても平均で

10 mmHg 前後下降していた。NSP-805 の血圧に対する作用は用量依存性であった。一方，nicardipine (40 µg/kg) 投与群では，血圧は投与 10 分後に最大で平均 21.6 mmHg の下降があり，50 分後まで有意に低下し，その後緩徐に回復した (図 4)。

脈拍数に関しては，20% DMSO 投与群および nicardipine (40 µg/kg) 投与群では影響を与えなかった。一方，NSP-805 (40 µg/kg) 投与群では脈拍数は投与 10 分で有意に最大で，平均 23.4 beats/min 増加し，その後 50 分には投与前値のレベルに回復，120 分後においても対照群に比し脈拍数が増加していた。NSP-805 (100 µg

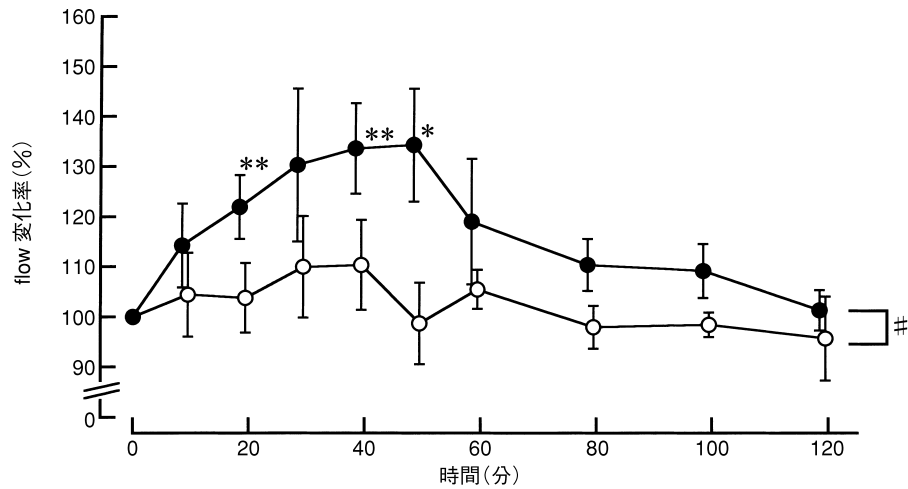


図 3 Nicardipine 40 µg/kg 投与による網脈絡膜循環(flow 値)変化。

●：nicardipine の 40 µg/kg 投与群，○：基剤(20% DMSO)投与群。

n=6, バーは標準誤差を示す。薬剤投与前との比較では nicardipine (40 µg/kg) 投与後 20 分から有意な網脈絡膜血流の増加があった(*: p<0.05, **: p<0.01, paired t-test)が NSP-805 に比して持続時間は短時間(50 分)であった。また、基剤(20% DMSO)投与群との比較では有意な網脈絡膜血流増加があった[#: p<0.05(Two-way repeated measures ANOVA)]。

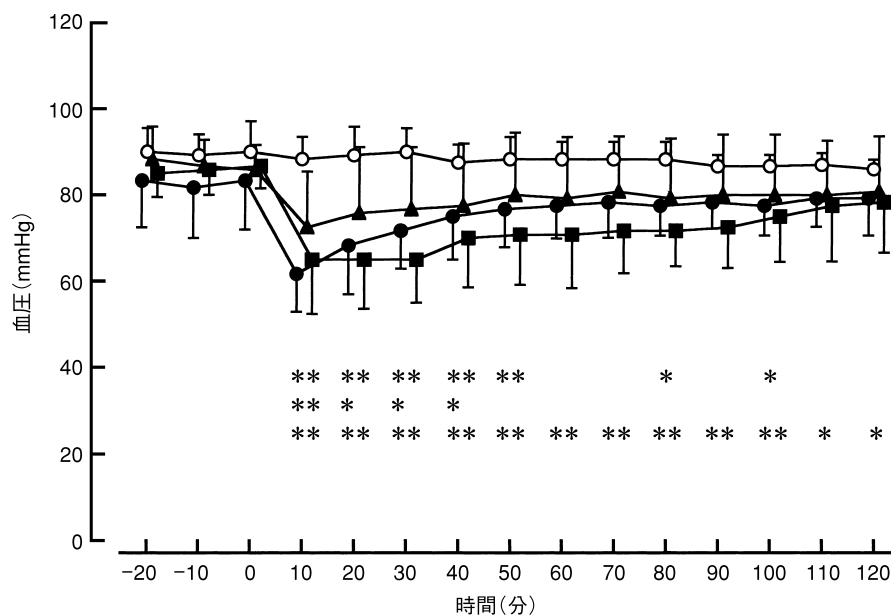


図 4 各薬剤の全身血圧に対する影響。

●：nicardipine(40 µg/kg)投与群，▲：NSP-805(40 µg/kg)，■：NSP-805(100 µg/kg)，○：基剤(20% DMSO)投与群。n=6, バーは標準偏差を示す。基剤(20% DMSO)投与群では血圧に有意な変化はなかった。Nicardipine(40 µg/kg)投与群では血圧は投与後 10~50 分後まで有意な下降があった。また、NSP-805 は用量依存性に全身血圧を下降させ NSP-805(100 µg/kg)では 120 分後においても有意な低下があった(*: p<0.05, **: p<0.01, paired t-test)。

/kg)投与群では脈拍数は投与 10 分で最大で、平均 36.6 beats/min 増加し、その後 90 分には投与前値のレベルに回復、120 分後においても対照群に比し脈拍数が増加していた。NSP-805 の脈拍数に対する作用は用量依存性であった(図 5)。

IV 考 按

PDE はサイクリック AMP(cAMP)や GMP(cGMP)を分解する酵素であり、そのアイソザイムは現在 8 種知られている⁶⁷⁾。また、その阻害薬は cAMP や cGMP の濃度を高めることにより、陽性変力作用、血小板凝集抑制作用、末梢血管拡張作用、気管支平滑筋拡張作用な

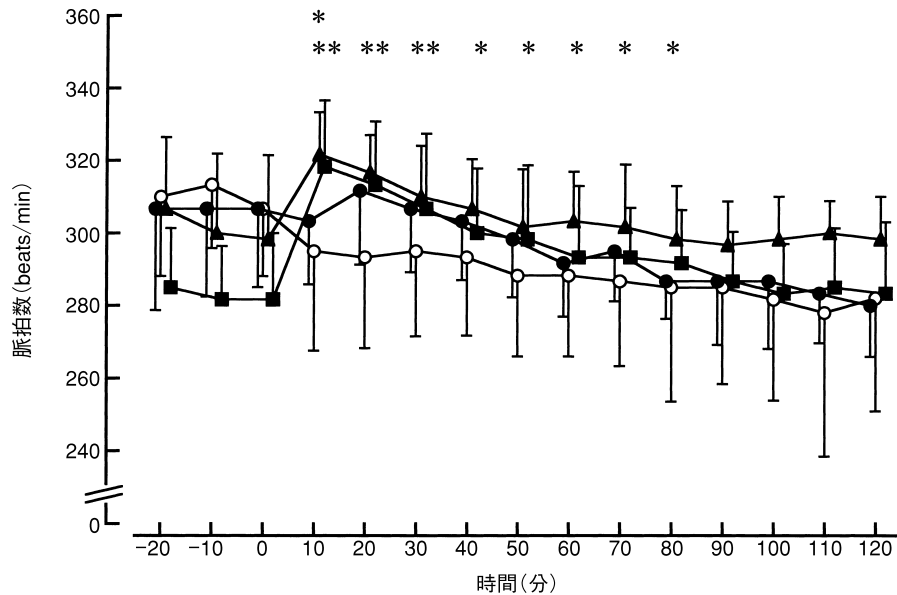


図 5 各薬剤の脈拍数に対する影響。

● : nicardipine (40 µg/kg) 投与群, ▲ : NSP-805 (40 µg/kg), ■ : NSP-805 (100 µg/kg), ○ : 基剤 (20% DMSO) 投与群. n=6, バーは標準偏差を示す. Nicardipine (40 µg/kg), 基剤 (20% DMSO) 投与群では脈拍数に有意な影響は与えなかったが, NSP-805 は用量依存性に脈拍数を増加させた (* : p<0.05, ** : p<0.01, paired t-test).

どの生理作用を発現する²⁾⁸⁾.

PDE の眼における作用としては, 視細胞での PDE の活性化による光情報伝達が代表的である²⁾. すなわち, ロドプシンの光吸収とともに杆体細胞で 5 型の PDE が活性化され, セカンドメッセンジャーの cGMP が急速に分解され, Na⁺チャンネルが閉鎖され光情報が伝達される⁹⁾. 以前, 5 型に分類されていたこの酵素は photoreceptor 細胞に特異的な酵素として, 現在は 6 型に分類されている⁶⁾⁷⁾. また家兎において, 非特異的な PDE 阻害薬局所投与により, 眼圧下降作用を生じたとの報告¹⁰⁾もある.

NSP-805 は分子量 297 のピリダジノン誘導体であり, PDE 3 型の阻害薬として心不全の基本的病態である心筋の収縮力の低下を改善する薬剤(強心剤)として開発され, 血管拡張作用も有する. NSP-805 は PDE 3 型を強力かつ選択的に阻害する. Mochizuki ら³⁾はモルモットの左心室筋由来の PDE 3 型に対する影響を, NSP-805 と PDE 3 型の阻害薬の一つで強心剤として使用されている milrinone と比較した. 彼らは IC₅₀ 値で NSP-805 は milrinone の 19 倍強い効力を示し, さらに, NSP-805 の 3 型に対する選択性が milrinone に比べ約 60 倍強いことを示した. また, ラット摘出血管による弛緩作用の検討などでは血管拡張作用があり, 麻酔下イヌ十二指腸内投与による検討においては milrinone より強心効果が強く, かつ持続的であったと報告している.

近年, 緑内障の薬物療法分野では, 従来の眼圧下降療法の他に視神経障害の改善, 特に血流の改善をターゲットとした治療が試みられている. Kitazawa ら¹⁾は

カルシウム拮抗薬の nifedipine を用いた検討で, 正常眼圧緑内障患者に対して視野改善効果があったと報告した. 動物で網膜または脈絡膜の組織血流に対する効果を検討した報告はカルシウム拮抗薬の代表である nicardipine hydrochloride を用い, 玉置ら¹¹⁾が家兎でレーザースペックル網膜末梢循環解析機ならびに colored microspheres 法¹²⁾で検討を行い, 末梢循環改善の有用性を報告している. PDE 阻害薬の末梢循環を検討した報告は, Lee ら¹³⁾が milrinone をネコに点眼し, laser Doppler flowmetry で眼血流は改善したとしているが, 高用量では血圧の低下があったと報告している. また, Hotta ら¹⁴⁾は cAMP に選択性の PDE 阻害薬である cilostazol をラットに投与し laser Doppler flowmetry で検討を行い, 極短時間の検討ではあるが静脈内投与では血流の減少がみられるが, 網膜動脈に直接投与した場合, 血流改善があったと報告した.

今回, 我々は milrinone より PDE 3 型に強力かつ選択的に作用し, 血管拡張作用を有する NSP-805 に関して, 麻酔下家兎静脈内投与による血流改善作用および持続的效果について, 網脈絡膜組織血流を指標とし HRF を用い検討を行った. HRF は組織内に存在する赤血球にレーザー光を当て, その反射波によるドップラ効果をフーリエ解析することにより, 組織血流量を flow, velocity, volume のパラメータで表す装置である. これらのパラメータのうち, volume は測定ウィンドウ内のすべての赤血球数に比例し, flow は測定ウィンドウ内の赤血球の移動距離に比例し, velocity は flow を volume で除した値に比例するといわれている. 今回の検

討では血流量の変化を評価するため flow を代表値として用いた。

NSP-805 の 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量では, nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) により近い網脈絡膜血流増加効果を示した。さらに, 投与後 80 分までの有意な血流増加がみられたことから, nicardipine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) よりも長い作用時間をもつ可能性が推定された。一方, NSP-805 の 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与時に比し網脈絡膜血流増加効果が弱かったが, この用量ではより全身血圧の低下作用が強力であったため, 眼灌流圧低下が生じた可能性が推察される。将来的に NSP-805 はその眼血流改善作用から緑内障治療薬候補に挙げられる可能性はあるが, 開放隅角緑内障において拡張期眼灌流低下が視神経傷害の危険因子として推定されていることもあり¹⁶⁾¹⁷⁾, 今後至適量の検討が必要と思われる。

また, 緑内障発症機序として循環障害因子や血小板凝集能の亢進があるとの報告もあることから, 持続的な血管拡張性があり血小板凝集阻害作用などを併せ持つ PDE 阻害薬は, 今後も検討に値すると思われる。

文 献

- 1) Kitazawa Y, Shirai H, Go FJ : The effect of Ca^{2+} -antagonist on visual field in low-tension glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 227 : 408—412, 1989.
- 2) Beavo JA, Reifsnnyder DH : Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes and the design of selective inhibitors. Trends Pharmacol Sci 11 : 150—155, 1990.
- 3) Mochizuki N, Uchida S, Miyata H : Cardiovascular effects of NSP-804 and NSP-805, novel cardiostimulant agents with vasodilator properties. J Cardiovasc Pharmacol 21 : 983—995, 1993.
- 4) 富田剛司 : 緑内障における乳頭末梢循環の評価。あたらしい眼科 14 : 843—847, 1997.
- 5) 岡村紀夫, 張野正誉, 北西久仁子, 鈴木美奈 : 全身麻酔下ネコにおける走査型レーザードップラー血流計の信頼度の検討。日眼会誌 102 : 587—593, 1998.
- 6) Sonnenburg WK, Beavo JA : Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. Adv Pharmacol 26 : 87—114, 1994.
- 7) Barnes PJ : Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function. Eur Respir J 8 : 457—462, 1995.
- 8) Nicholson CD, Challiss RAJ, Shahid M : Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. Trends Pharmacol Sci 12 : 19—27, 1991.
- 9) 井上正則 : 2. 視細胞の興奮 (物理量から膜電位へ)。丸尾敏夫, 他 (編) : 眼科診療プラクティス 17. 眼科診療に必要な生理学。文光堂, 東京, 62—67, 1995.
- 10) Hariton C : Ocular hypotension induced by topical dopaminergic drugs and phosphodiesterase inhibitors. Eur J Pharmacol 258 : 85—94, 1994.
- 11) 玉置泰裕, 川本英三, 新家 真, 江口秀一郎, 藤居 仁 : Ca^{2+} 拮抗薬の家兎網膜末梢循環に及ぼす影響。日眼会誌 98 : 240—244, 1994.
- 12) 玉置泰裕, 新家 真, 富所敦男, 富田 憲 : Colored Microsphere 法による眼循環の測定。あたらしい眼科 13 : 403—406, 1996.
- 13) Lee KC, Silver PJ, Bode DC, Gherezghiher T : Ocular effect of topical administration of the phosphodiesterase III inhibitor milrinone in rabbits and cats. Meth Find Exp Clin Pharmacol 15 : 527—534, 1993.
- 14) Hotta H, Ito H, Kagitani F, Sato A : Cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor, dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats. Eur J Pharmacol 344 : 49—52, 1998.
- 15) Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC : Hypertension, perfusion pressure, and primary open-angle glaucoma. A population-based assessment. Arch Ophthalmol 113 : 216—221, 1995.
- 16) Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A : Vascular risk factors for primary open angle glaucoma : The Egna-Neumarkt Study. Ophthalmology 107 : 1287—1293, 2000.
- 17) Hoyng PF, Greve EL, Kea F, Geijssen C, Oosting H : Platelet aggregation and glaucoma. Doc Ophthalmol 61 : 167—173, 1985.