

# ヒトおよびマウス末梢血単核球の炎症性サイトカイン産生に及ぼす 緑内障治療薬の作用

河合 憲司<sup>1)</sup>, 大橋 秀記<sup>1)</sup>, 鈴木 崇弘<sup>1)</sup>, 北垣 英樹<sup>2)</sup>, 藤澤 茂樹<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部専門診療学系眼科, <sup>2)</sup>大塚製薬株式会社

## 要 約

**目 的:** ヒトおよびマウス末梢血単核球を用いて各種抗緑内障治療薬の抗炎症作用について検討した。

**対象と方法:** 健康男子および BALB/c マウスから調製した末梢血単核球(PBMCs)を, それぞれ 10% ウシ胎仔血清 (FBS) 含有 RPMI 1640 培地に懸濁し, 各種緑内障治療薬原末を同時に添加して CO<sub>2</sub> インキュベータ内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub> に設定) で 30 分間培養後, リポポリサッカライド (LPS) を添加し, 一定時間培養後, 培地中の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) あるいは interleukin (IL)-6 量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。

**結 果:** カルテオロールは PBMCs からの TNF- $\alpha$  あ

るいは IL-6 産生を抑制した。一方, 今回検討した交感神経  $\beta$  遮断薬, 炭酸脱水酵素阻害薬 (CAI), プロスタグランジン薬 (PG) は炎症性サイトカインの産生にほとんど影響を及ぼさなかった。

**結 論:** カルテオロールは, 末梢血単核球からの炎症性サイトカイン産生に対して抑制作用を示すことが明らかとなった。(日眼会誌 114 : 669—677, 2010)

**キーワード:** カルテオロール塩酸塩, 緑内障治療薬, 内因性交感神経刺激作用 (ISA), 炎症性サイトカイン, 末梢血単核球 (PBMCs)

## Effect of Anti-glaucoma Drugs on Inflammatory Cytokine Production by Human and Murine Peripheral Blood Mononuclear Cells

Kenji Kawai<sup>1)</sup>, Hideki Ohashi<sup>1)</sup>, Takahiro Suzuki<sup>1)</sup>, Hideki Kitagaki<sup>2)</sup> and Shigeki Fujisawa<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Tokai University School of Medicine

<sup>2)</sup>Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

## Abstract

**Objective:** We investigated both human and murine peripheral blood mononuclear cells to find which of the anti-glaucoma drugs used to lower intraocular pressure drug also suppresses inflammation.

**Subjects & Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) prepared from healthy men and from BALB/c mice were suspended in RPMI 1640 culture medium containing 10% FBS. Each test drug was added to the cells, and they were cultured in a CO<sub>2</sub> incubator (set to 37°C and 5% CO<sub>2</sub>) for 30 minutes. Lipopolysaccharide (LPS) was added to the same cells and they were cultured again for a given period of time, after which either tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin-6 (IL-6) levels in the culture medium were determined by ELISA.

**Results:** Carteolol inhibited production of both TNF- $\alpha$  and IL-6 from PBMCs. The other test agents had no inhibitory effect. The carbonic anhydrase

inhibitor (CAI) dorzolamide, isopropyl unoprostone and latanoprost had almost no effect on the production of inflammatory cytokines.

**Conclusions:** We demonstrated that carteolol exhibits an inhibitory action on the production of inflammatory cytokines from PBMCs because of its intrinsic sympathomimetic action. We also showed that CAI and PG drugs had almost no effect on inflammatory cytokine production.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 669—677, 2010)

**Key words:** Carteolol hydrochloride, Intraocular hypotensive drugs, Intrinsic sympathetic activity (ISA), Pro-inflammatory cytokines, Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

別刷請求先 : 259-1193 伊勢原市下糟屋 143 東海大学医学部専門診療学系眼科 河合 憲司  
(平成 21 年 6 月 12 日受付, 平成 22 年 3 月 19 日改訂受理) E-mail : k-kawai@is.icc.u-tokai.ac.jp

Reprint requests to : Kenji Kawai, M.D. Department of Ophthalmology, Tokai University, School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara-shi, Kanagawa-ken 259-1193, Japan

(Received June 12, 2009 and accepted in revised form March 19, 2010)

## I 緒 言

近年,新しい眼手術法の開発,進歩により,眼手術はより安全に行われるようになってきた。しかしながら,しばしば術後炎症とそれに伴う一過性の眼圧上昇が認められる。レーザー治療後の眼圧上昇についても多くの報告がある<sup>1)2)</sup>。この眼圧上昇の原因として炎症細胞の関与も考えられている<sup>2)</sup>。そのため,副腎皮質ステロイド薬あるいは非ステロイド性抗炎症薬との併用で,眼圧下降薬を術後の眼圧コントロールのために用いている。

炎症を起こした部位では,マクロファージ,好中球,好酸球などの免疫担当細胞(炎症性細胞)の集簇が起こり<sup>3)4)</sup>,さらに,tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6)などの炎症性サイトカインが,房水および硝子体内で増加することが確認されていることから<sup>5)~7)</sup>,炎症の発症と眼圧上昇の一連の反応に,炎症性細胞やそれらから産生される炎症性サイトカインが影響している可能性が考えられる。

眼手術後の眼圧上昇に対して眼圧降下剤の点眼を行うが,これら眼圧降下剤の中に抗炎症効果を有する薬剤があれば,眼手術後の使用に適しているのではないかと考え,各種の眼圧降下剤の炎症性サイトカイン産生抑制作用について検討することとした。

カルテオロール塩酸塩 [5-(3-tert-butylamino-2-hydroxy) propoxy-3,4-dihydrocarbostyryl hydrochloride] は,眼圧降下剤ミケラン<sup>®</sup>点眼液の有効成分として,緑内障,高眼圧症<sup>8)9)</sup>の治療に用いられる化合物である。このカルテオロール塩酸塩は交感神経 $\beta$ 刺激剤である<sup>10)</sup>,内因性交感神経刺激作用(ISA)も有しており, $\beta_1$ および $\beta_2$ -adrenoceptor(AR)に対して,刺激作用あるいは遮断作用の両方の作用をもつことが明らかにされている<sup>11)12)</sup>。近年になり,交感神経 $\beta$ 刺激活性を有する薬剤が,マクロファージなどの炎症性細胞に対して抑制的な作用を示し,炎症や免疫応答反応に重要な役割を担っている炎症性サイトカイン産生を阻害することが知られるようになってきた<sup>13)~15)</sup>。さらに,Izeboudらは,その作用が, $\beta_2$ -AR刺激を介して発現していることを明らかにし,交感神経 $\beta$ 刺激薬が,炎症治療に有用な特性をもっていることを示した<sup>15)</sup>。これらのことから,パーシャル交感神経 $\beta$ 刺激作用を有するカルテオロール塩酸塩が,炎症性細胞の機能を制御し,炎症に対して抑制的な作用を示す可能性が考えられた。

本研究では,マウスおよびヒトの末梢血単核球(PBMCs)を用い,リポポリサッカライド(LPS)刺激で誘導されるTNF- $\alpha$ およびIL-6産生に対するカルテオロール塩酸塩の影響を調べた。同時に,現在,眼圧降下剤として用いられている交感神経 $\beta$ 遮断薬のチモロールマレイン酸,レボブノロール塩酸塩,ニブラジロールについて作用を比較検討した。さらに,眼圧下降薬として用い

られる炭酸脱水酵素阻害薬のドルゾラミド塩酸塩,プロスタグランジン(PG)製剤であるラタノプロストおよびイソプロピルウノプロストンについても検討を行った。

## II 材料と方法

### 1. 動物

BALB/c系雄性マウスを,日本クレア株式会社より6週令で購入し,1週間以上の馴化飼育を行ったのち試験に供した。試験動物は,温度20~24 $^{\circ}$ C,湿度45~65%に設定した12時間(7:00~19:00点灯)照明の飼育室に収容し,水(滅菌水道水)および餌(CRF-1,オリエンタル酵母工業株式会社)を自由に摂取させた。

「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。

### 2. 試 薬

カルテオロール塩酸塩(Lot. B2K75F),レボブノロール塩酸塩(Lot. 12455 E 200604017),ニブラジロール(Lot. 503001),ドルゾラミド塩酸塩(Lot. RRDW 070),ラタノプロスト(Lot. 060473-QCS-11)およびイソプロピルウノプロストン(Lot. FM 0007)は大塚製薬株式会社(徳島研究所),杏林製薬株式会社,興和創薬株式会社,万有製薬株式会社,ファイザー株式会社,上野製薬株式会社よりそれぞれ提供いただいた。

チモロールマレイン酸(Lot. 061K1290),硫酸サルブタモール(Lot. 117H 46964)はSIGMA社から購入した。

ニブラジロールを除く試験サンプルは,いずれもPB-S(-)に用時溶解し,10%ウシ胎仔血清(FBS)(ICN Biomedicals, Inc.)含有RPMI 1640培地(株式会社日研生物医学研究所)で希釈することにより試験溶液を調製した。ニブラジロールの試験溶液は,等モルの塩酸を加えPB-S(-)および10%FBS含有RPMI 1640培地を用いて調製した。

### 3. マウス末梢血単核球(PBMCs)の採取と活性化

マウスの腹大静脈から血液を採取し,等量の血球分離液(Lympholyte<sup>®</sup>-M CL-5030,大日本製薬株式会社)を加えて遠心分離(約1,000g,20分間,室温)した。採取したPBMCsをメッシュで濾過し,遠心分離(室温,約800g,約10分間)を行った。遠心後のペレットに適量の培地を加え懸濁した後,懸濁液をトリパンブルー染色液で5倍希釈し,血球計算板を用いて細胞数を計測した。懸濁液の細胞数が $2.0 \times 10^6$  cells/mlとなるようRPMI 1640培地を加えて調整し,24穴プレートの各wellに当該懸濁液250 $\mu$ lと試験物質溶液200 $\mu$ lを混合し30分間培養後,10 $\mu$ g/mlのLPS溶液50 $\mu$ lを添加して,CO<sub>2</sub>インキュベータ内(37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>に設定)で24時間培養した。培養中,設定した時間に各wellから培地を適量採取し,培地中のTNF- $\alpha$ (培養4時間)およびIL-6量(培養24時間)を測定した。

#### 4. ヒト末梢血単核球(PBMCs)の採取と活性化

36 歳, 健康男子の静脈からヘパリン採血を行い, 等量の血球分離液(Lympholyte<sup>®</sup>-M CL-5030, 大日本製薬株式会社)を加えて遠心分離(約 1,000 g, 20 分間, 室温)した. 採取した PBMCs をメッシュで濾過し, 遠心分離(室温, 約 800 g, 約 10 分間)を行った. 遠心後のペレットに適量の RPMI 1640 を加え懸濁した後, 懸濁液をトリパンブルー染色液で 5 倍希釈し, 血球計算板を用いて細胞数を計測した. 懸濁液の細胞数が  $4.0 \times 10^6$  cells/ml となるよう RPMI 1640 を加えて調整し, 24 穴プレートの各 well に当該懸濁液 250  $\mu$ l と試験物質溶液 200  $\mu$ l を混合し 30 分間培養後, 1  $\mu$ g/ml の LPS 溶液 50  $\mu$ l を添加して, CO<sub>2</sub>インキュベータ内(37°C, 5% CO<sub>2</sub>に設定)で 24 時間培養した. 培養中, 設定した時間に各培地を適量採取し, 培地中の TNF- $\alpha$ (培養 4 時間)および IL-6 量(培養 24 時間)を測定した.

なお, 本試験で使用した血液は, 共同研究者の 1 人から, 本人の承諾を得た上で採血を行った.

薬剤の効果を検討するにはすべての薬剤において用量依存性を検討する必要があるが, 以前の我々の検討結果<sup>16)</sup>から, 効果のある薬剤は用量依存的に効力を示すことと, 多くの交感神経  $\beta$  遮断薬の房水内濃度は  $10^{-6}$ M 程度<sup>17)~19)</sup>であることから, 本試験での各薬剤は  $10^{-6}$ M で検討した. PG 製剤のラタノプロストのみ房水内濃度は  $10^{-10}$ M<sup>20)</sup>と極端に低いが, ラタノプロストが炎症を誘発する可能性を検討するために,  $10^{-6}$ M の統一濃度で検討した. また, 薬剤の効果を正確に検討するには種々の反応時間での薬剤効果を検討する必要があるが, 今回は LPS の作用が強く出る時間<sup>16)</sup>で検討した.

#### 5. 炎症性サイトカインの定量

##### 1) マウス

培地中の TNF- $\alpha$  および IL-6 量は, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (OptEIA<sup>™</sup>, Pharmin-gen 社)を用いて測定した.

##### 2) ヒト

培地中の TNF- $\alpha$  および IL-6 量は, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (OptEIA<sup>™</sup>, Pharmin-gen 社)を用いて測定した.

#### 6. 統計解析

データは平均値  $\pm$  標準偏差で表した. 対照群と各試験群のサイトカイン量を一元配置分散分析法で比較し, Dunnett's test (両側)で群間の差の有無を検定した. 有意水準は 5% とした. 検定には, SAS ソフトウェア (SAS Release 8.1)を用いた.

#### 7. 試験分担

本試験は東海大学と大塚製薬株式会社の共同研究として行った.

マウスの試験は東海大の KK が大塚製薬株式会社赤穂研究所にてマウスからの PBMCs 分離, 培養, さらに

サイトカインの測定を行った. ヒトの試験は東海大で採血, PBMCs 分離, 培養を KK, OH, ST が行い, サンプルを大塚製薬株式会社赤穂研究所に送付し, 大塚製薬株式会社赤穂研究所の KH と FS がサイトカインの測定を行った.

### III 結 果

#### 1. マウス末梢血単核球の炎症性サイトカイン産生に対するカルテオロール塩酸塩の作用と他剤との作用比較

マウス末梢血単核球を LPS で刺激したときの, TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生パターンは以前の報告<sup>16)</sup>で検討しており, 今回はその結果から TNF- $\alpha$  は LPS 添加 4 時間後, IL-6 は LPS 添加 24 時間後の培養上清を測定した.

TNF- $\alpha$  の産生について図 1(a, b, c)に示した. 当該細胞は LPS 刺激 4 時間後に  $546 \pm 63$  pg/ml の TNF- $\alpha$  を産生した. カルテオロール塩酸塩は, 当該細胞の TNF- $\alpha$  産生に対して抑制する傾向 ( $426 \pm 19$  pg/ml) が認められた.

交感神経  $\beta$  遮断薬であるチモロールマレイン酸 ( $785 \pm 116$  pg/ml) およびレボブノロール塩酸塩 ( $780 \pm 106$  pg/ml) は, 対照との比較 ( $546 \pm 63$  pg/ml) において TNF- $\alpha$  産生を逆に助長する傾向を示し, 統計学的に有意 (いずれも  $p < 0.01$ ) な TNF- $\alpha$  産生増加作用を示した. ニプラジロール ( $669 \pm 68$  pg/ml), PG 製剤であるイソプロピルウノプロストン ( $671 \pm 69$  pg/ml) およびラタノプロスト ( $657 \pm 59$  pg/ml) は対照との比較 ( $684 \pm 101$  pg/ml) において, 有意な作用を認めなかった. なお, 効果対照として用いた硫酸サルブタモール ( $55 \pm 8$  pg/ml) は対照との比較 ( $788 \pm 151$  pg/ml) において統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) な TNF- $\alpha$  産生抑制作用を示した.

IL-6 の産生について図 2(a, b, c)に示した. 当該細胞は LPS 刺激 24 時間後に  $1,234 \pm 198$  pg/ml の IL-6 を産生した. カルテオロール塩酸塩は, 当該細胞の IL-6 産生に対して抑制する傾向 ( $1,085 \pm 41$  pg/ml) が認められた.

チモロールマレイン酸 ( $1,424 \pm 91$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,234 \pm 198$  pg/ml) において IL-6 産生を逆に助長する傾向を示し, 統計学的に有意 ( $p < 0.05$ ) な IL-6 産生増加作用を示した. レボブノロール塩酸塩 ( $1,376 \pm 71$  pg/ml) は, 対照との比較 ( $1,234 \pm 198$  pg/ml) において有意な作用を認めなかった. ニプラジロール ( $1,284 \pm 116$  pg/ml), イソプロピルウノプロストン ( $1,311 \pm 105$  pg/ml) およびラタノプロスト ( $1,348 \pm 172$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,292 \pm 70$  pg/ml) において, 有意な作用を認めなかった. なお, 効果対照として用いた硫酸サルブタモール ( $597 \pm 32$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,325 \pm 53$  pg/ml) において統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) な IL-6 産生抑制作用を示した.

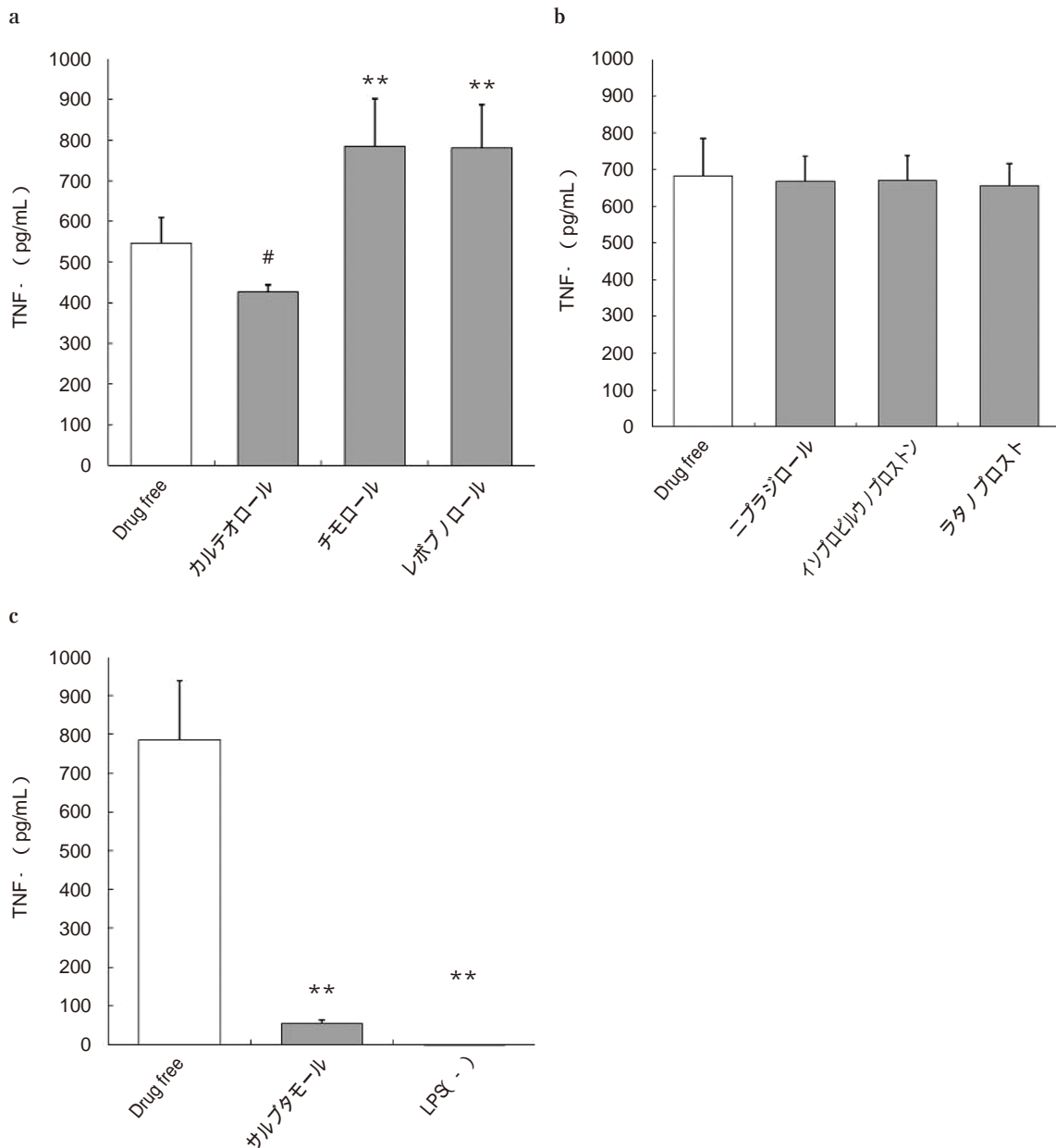


図 1 リポポリサッカライド(LPS)誘発によるマウス末梢血単核球からの tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )の産生。

Drug free は薬剤添加しない対照を示している。図 1a はカルテオロール、チモロール、レボブノロールを比較している。図 1b はニプラジロール、イソプロピルウノプロストン、ラタノプロストを比較している。図 1c は効果対照として用いたサルプタモールと LPS 無添加の結果を示している。結果は 6 個の培養 well の上清を各々測定した結果を平均値 $\pm$ 標準偏差で示している。# は統計学的な傾向( $p < 0.10$ )を示し、\*\* は統計学的な有意差( $p < 0.01$ )を示している。

## 2. ヒト末梢血単核球の炎症性サイトカイン産生に対するカルテオロール塩酸塩の作用と他剤との作用比較

ヒト末梢血単核球を用いての試験もマウスと同様、各薬剤は  $10^{-6}$ M で検討した。

TNF- $\alpha$  の産生について図 3(a, b, c)に示した。当該細胞は LPS 刺激 4 時間後に  $950 \pm 100$  pg/ml の TNF- $\alpha$  を産生した。カルテオロール塩酸塩は、当該細胞の TNF- $\alpha$  産生に対して統計学的に有意( $p < 0.01$ )な抑制作用

用 ( $620 \pm 140$  pg/ml) が認められた。

チモロールマレイン酸 ( $970 \pm 90$  pg/ml) およびレボブノロール塩酸塩 ( $930 \pm 110$  pg/ml) は、対照との比較 ( $950 \pm 100$  pg/ml) において、有意な作用を認めなかった。ニプラジロール ( $970 \pm 80$  pg/ml) および PG 製剤であるイソプロピルウノプロストン ( $1,010 \pm 80$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,040 \pm 80$  pg/ml) において、有意な作用を認めなかったが、ラタノプロスト ( $910 \pm 60$  pg/ml) は統計学的に有意 ( $p < 0.05$ ) な抑制作用が認められた。炭酸脱水

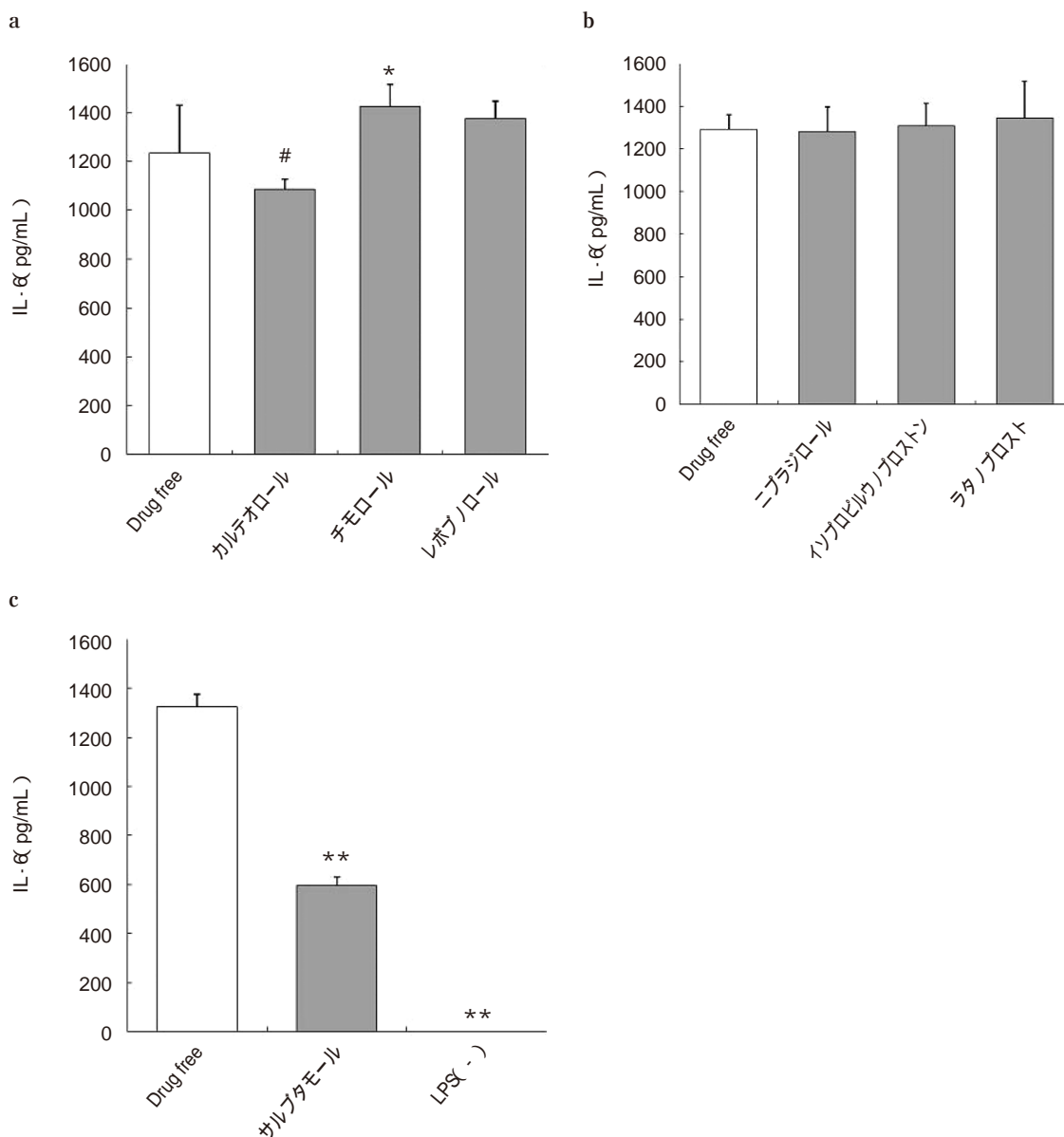


図 2 LPS 誘発によるマウス末梢血単核球からの interleukin-6 (IL-6) の産生.

Drug free は薬剤添加しない対照を示している. 図 2a はカルテオロール, チモロール, レボブノロールを比較している. 図 2b はニプラジロール, イソプロピルウノプロストン, ラタノプロストを比較している. 図 2c は効果対照として用いたサルブタモールと LPS 無添加の結果を示している. 結果は 6 個の培養 well の上清を各々測定した結果を平均値 ± 標準偏差で示している. # は統計学的な傾向 ( $p < 0.10$ ) を, \* は統計学的な有意差 ( $p < 0.05$ ) を, \*\* は統計学的な有意差 ( $p < 0.01$ ) を示している.

酵素阻害薬のドルゾラミド塩酸塩 ( $970 \pm 60$  pg/ml) は, 対照との比較 ( $1,040 \pm 100$  pg/ml) において, 有意な作用を認めなかった.

なお, 効果対照として用いた硫酸サルブタモール ( $610 \pm 50$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,040 \pm 100$  pg/ml) において統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) な TNF- $\alpha$  産生抑制作用を示した.

IL-6 の産生について図 4(a, b, c) に示した. 当該細胞は LPS 刺激 24 時間後に  $1,230 \pm 20$  pg/ml の IL-6 を産生した. カルテオロール塩酸塩は, 当該細胞の IL-6 産生に対して統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) な抑制作用 ( $840$

$\pm 20$  pg/ml) が認められた.

チモロールマレイン酸 ( $1,190 \pm 20$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,230 \pm 20$  pg/ml) において有意な作用を認めなかったが, レボブノロール塩酸塩 ( $1,150 \pm 60$  pg/ml) は, 対照との比較 ( $1,230 \pm 20$  pg/ml) において統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) な抑制作用が認められた. ニプラジロール ( $1,170 \pm 30$  pg/ml), イソプロピルウノプロストン ( $1,170 \pm 50$  pg/ml) およびラタノプロスト ( $1,170 \pm 30$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,200 \pm 40$  pg/ml) において, 有意な作用を認めなかった. ドルゾラミド塩酸塩 ( $1,080 \pm$

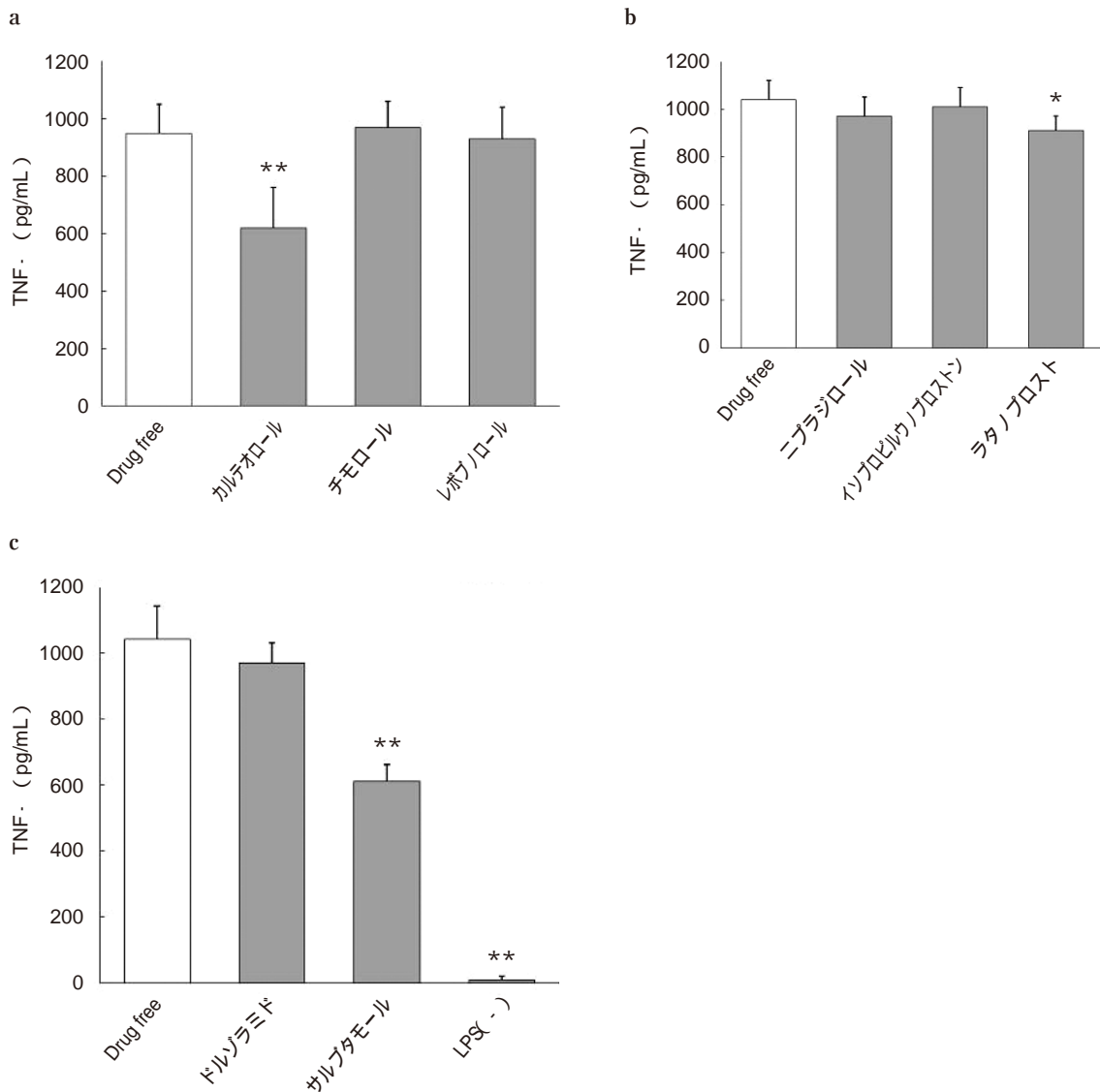


図 3 LPS 誘発によるヒト末梢血単核球からの TNF- $\alpha$  の産生.

Drug free は薬剤添加しない対照を示している. 図 3 a はカルテオロール, チモロール, レボプロロールを比較している. 図 3 b はニブラジロール, イソプロピルウノプロストン, ラタノプロストを比較している. 図 3 c はドルゾラミド, 効果対照として用いたサルプタモールおよび LPS 無添加の結果を示している. 結果は 6 個の培養 well の上清を各々測定した結果を平均値  $\pm$  標準偏差で示している. \* は統計学的な有意差 ( $p < 0.05$ ) を, \*\* は統計学的な有意差 ( $p < 0.01$ ) を示している.

30 pg/ml) は, 対照との比較 ( $1,150 \pm 40$  pg/ml) において, 統計学的に有意 ( $p < 0.05$ ) な抑制作用が認められた.

なお, 効果対照として用いた硫酸サルプタモール ( $1,100 \pm 50$  pg/ml) は対照との比較 ( $1,150 \pm 40$  pg/ml) において有意な作用を認めなかった.

#### IV 考 按

ミケラン点眼薬の有効成分であるカルテオロール塩酸塩は, LPS 刺激によって誘導されるヒトおよびマウス末梢血単核球の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  および IL-6) の産生に対して阻害活性を有することが, 本検討において明らかとなった (図 1~4). Er らは, 家兔眼を用いた白内障手術実験において, 房水中に TNF- $\alpha$ , IL-6,

IL-1 $\beta$  および IL-2 レセプターが増加することを見出し<sup>5)</sup>, さらに, レーザーによる内眼手術においても, 房水<sup>6)</sup>あるいは硝子体<sup>7)</sup>中に, TNF- $\alpha$  および IL-6 が増加することを明らかにしている. これら炎症性サイトカインは, 好中球, リンパ球および血管内皮細胞を活性化し, さらに, 細胞接着分子, プロスタグランジン類および nitric oxide synthase を誘導するなど<sup>21)</sup>, 生体の炎症反応の発症・進展に重要な働きを有していることから, 内眼手術などによって生じる炎症反応に対して, カルテオロール塩酸塩が有効な場合があるかもしれない. また, 最近の研究において TNF- $\alpha$  は, 広義の原発開放隅角緑内障 (POAG: NPG) 患者の網膜で著しく増加することが確認され, TNF- $\alpha$  の著明な増加が, glaucomatous optic

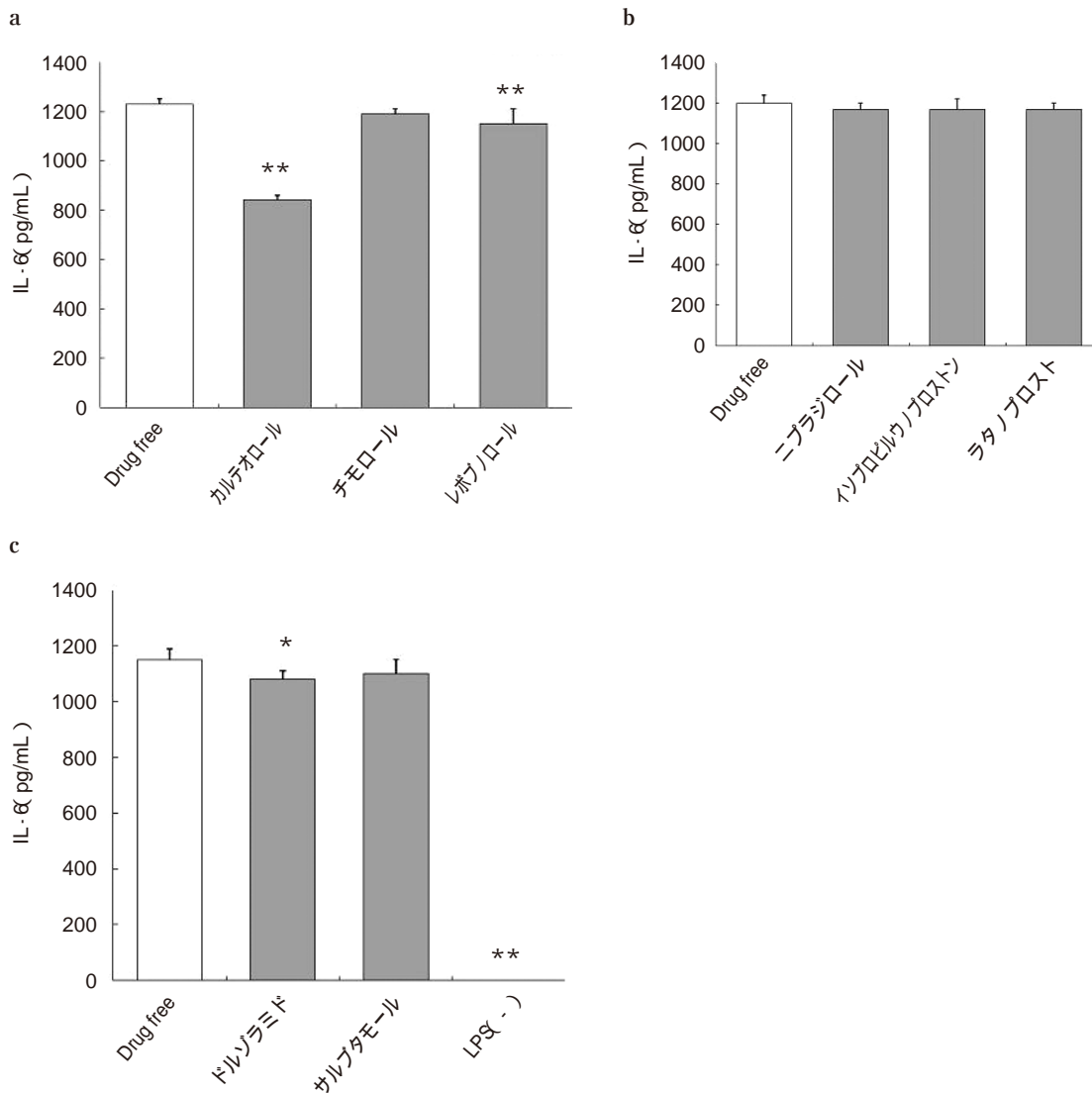


図 4 LPS 誘発によるヒト末梢血単核球からの IL-6 の産生。

Drug free は薬剤添加しない対照を示している。図 4 a はカルテオロール、チモロール、レボブノロールを比較している。図 4 b はニブラジロール、イソプロピルウノプロストン、ラタノプロストを比較している。図 4 c はドルゾラミド、効果対照として用いたサルプタモールおよび LPS 無添加の結果を示している。結果は 6 個の培養 well の上清を各々測定した結果を平均値±標準偏差で示している。  
\*は統計学的な有意差( $p < 0.05$ )を、\*\*は統計学的な有意差( $p < 0.01$ )を示している。

neuropathy の進行に何らかの役割を果たしている可能性が示されている<sup>22)~25)</sup>。また、IL-6 は、neovascular glaucoma の発症に関与しているとの報告<sup>26)</sup>もあり、これら炎症性サイトカインの産生に対して阻害作用を示したことは、有益な作用と考える。

カルテオロール塩酸塩の眼内移行性については、有色家兎を用いた実験において詳細に調べられている。Fujiio らは、2% <sup>14</sup>C-carteolol eye drops を有色家兎に単回点眼したときの房水を含む眼組織中のカルテオロール濃度を調べ、点眼 1 時間後に房水内で  $1 \mu\text{M}$  以上、虹彩(前眼部)で  $10 \mu\text{M}$  以上の濃度になることを報告した<sup>27)</sup>。また、視神経乳頭(後眼部)においても、点眼 8 時間後ではあるが  $1 \mu\text{M}$  を超える放射活性を示すことを報告して

いる。一方、1 日 2 回の反復点眼では、単回点眼よりさらに高濃度の眼内移行がみられることも明らかにしている。今回の検討において、各種の薬剤は  $1 \mu\text{M}$  で検討しており、カルテオロール塩酸塩の炎症性サイトカイン産生抑制作用は、ヒトおよびマウスの末梢血単核球のいずれにおいても認められていることから、外眼部はもとより眼内の炎症性サイトカイン産生に対しても、局所投与で抑制効果を期待できることが示された。

炎症性細胞からの炎症性サイトカイン産生に及ぼす  $\beta$ -agonists の作用については、近年 Yoshimura ら<sup>13)</sup>や Izeboud ら<sup>14)15)</sup>によって研究が進められ、 $\beta$ -AR subtype ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ )の中で  $\beta_2$ -AR が作用を調停していることが明らかにされている<sup>15)</sup>。選択性の高い  $\beta_2$ -AR agonist

のサルブタモール硫酸塩が、本実験で強い TNF- $\alpha$  産生抑制作用を示したことは、これを裏けるものである(図 1, 3)。しかしながら、今回一方、ヒト末梢血単核球からの IL-6 の産生を抑制できなかった。この原因は不明であるが、サルブタモール硫酸塩はラット細胞からのヒスタミンの遊離抑制作用<sup>28)</sup>とヒト肺切片からのヒスタミン遊離抑制作用<sup>29)</sup>では効果を示す濃度が大きく異なり、効果に種差があることが報告されている。今回、用いたサルブタモール硫酸塩はヒトの細胞に対する試験としては濃度が高すぎたことと培養時間が 24 時間の長時間であったためと推察された。また、我々は以前の報告<sup>16)</sup>でマウス末梢血単核球やマクロファージにおける LPS 刺激時のサルブタモール硫酸塩の IL-6 産生抑制作用が弱いことを報告している。

パーシャル交感神経  $\beta$  刺激薬は、交感神経  $\beta$  刺激薬の存在如何によって、刺激薬もしくは遮断薬としての作用を示すといわれている<sup>12)</sup>。カルテオロール塩酸塩は、交感神経  $\beta$  刺激薬に対し、低濃度で遮断薬、高濃度で刺激薬として作用することが Wheeldon らの研究<sup>11)</sup>で明らかにされており、今回認められたカルテオロール塩酸塩の炎症性サイトカイン産生抑制作用は、本薬剤のパーシャル交感神経  $\beta$  刺激作用すなわち ISA に基づく作用であると推察される。

内眼手術後の眼圧コントロールに用いられている薬剤で、塩酸カルテオロールの同種同効薬(交感神経  $\beta$  遮断薬)である、チモロールマレイン酸、レボプロロール塩酸塩およびニブラジロールについて TNF- $\alpha$  および IL-6 産生に及ぼす作用を調べたが、レボプロロール塩酸塩がヒト末梢血単核球から IL-6 産生をわずかに抑制した以外、いずれの薬剤にもこれら炎症性サイトカインの産生を阻害する作用は認められず、逆に、マウス末梢血単核球からの TNF- $\alpha$  産生は統計学的に有意に助長する作用を示した(図 1)。したがって、これら薬剤はいずれも、パーシャル交感神経  $\beta$  刺激作用すなわち ISA を有さないと考えられ、術後生じる炎症性サイトカイン産生には影響しないと推察される。

一方、炭酸脱水酵素阻害薬のドルゾラミド塩酸塩、PG 製剤であるラタノプロストおよびイソプロピルウノプロストンについても TNF- $\alpha$  および IL-6 産生に及ぼす作用を調べたが、ラタノプロストとドルゾラミド塩酸塩がそれぞれヒト末梢血単核球から TNF- $\alpha$  と IL-6 産生をわずかに抑制しただけで、炎症性サイトカインの産生抑制作用は認められなかった。PG 製剤については眼内に移行することにより、薬物が活性体になることが知られている。今回の検討は原末を用いた試験管内の試験であり、十分な検討とはいえず、今後のさらなる検討が必要である。特に炎症動物モデルでの薬剤効果の検討を継続して行う必要がある。

以上、カルテオロール塩酸塩は、炎症反応の主な原因

因子である、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$  および IL-6)の産生を有意に阻害する作用を有していることがマウスおよびヒトの末梢血単核球を用いた試験で明らかとなり、内眼手術後の点眼により、眼圧下降作用に加え術後炎症の制御も期待できる薬剤であることが示された。

この報告は 2008 年 4 月の第 112 回日本眼科学会総会で報告した。

## 文 献

- 1) Koss MC, March WF, Nordquist RE, Gherezghier T : Acute intraocular pressure elevation produced by argon laser trabeculoplasty in the cynomolgus monkey. Arch Ophthalmol 102 : 1699—1703, 1984.
- 2) 谷原秀信, 永田 誠 : レーザー治療後一過性眼圧上昇に対するカルテオロール点眼薬の予防効果. 臨眼 82 : 65—68, 1988.
- 3) Tsubota K, Yamada M, Kajiwarra K, Ugajin S, Hasegawa T, Kobayashi TK : Cytologic evaluation of conjunctival epithelium after cataract surgery. Cornea 11 : 418—426, 1992.
- 4) Arici MK, Demircan S, Topalkara A, Güler C, Aker H, Arici DS : Effect of conjunctival structure and inflammatory cell counts on intraocular pressure after trabeculectomy. Ophthalmologica 213 : 371—375, 1999.
- 5) Er H, Gündüs A, Turkoz Y, Çiğli A, İsci N : Effects of NG-nitro L-arginine and corticosteroids on aqueous humor levels of nitric oxide and cytokines after cataract surgery. J Cataract Refract Surg 25 : 794—799, 1999.
- 6) Er H, Doganay S, Turkoz Y, Cekmen M, Daglioglu MC, Gündüs A, et al : The levels of cytokines and nitric oxide in rabbit vitreous humor after retinal laser photocoagulation. Ophthalmic Surg Lasers 31 : 479—483, 2000.
- 7) Er H, Gündüs A, Çiğli A, Turkoz Y, Cekmen M : Quantification of nitric oxide and cytokines in rabbit aqueous humor after neodymium : YAG laser capsulotomy. Ophthalmic Res 32 : 106—109, 2000.
- 8) Sugiyama K, Enya T, Kitazawa Y : Ocular hypotensive effect of 8-hydroxycarteolol, a metabolite of carteolol. Int Ophthalmol 13 : 85—89, 1989.
- 9) Frishman WH, Fuksbrumer MS, Tannenbaum M : Topical ophthalmic  $\beta$ -adrenergic blockade for the treatment of glaucoma and ocular hypertension. J Clin Pharmacol 34 : 795—803, 1994.
- 10) Takayanagi I, Koike K : A possible mechanism of action of a  $\beta$ -adrenagic partial agonist(carteolol) in guinea pig taenia caecum. J Pharm Dyn 6 : 56—59, 1983.
- 11) Wheeldon NM, Mcdevitt DG, Lipworth BJ : Evaluation of *in vivo* partial  $\beta_1/\beta_2$ -agonist activity : a dose-ranging study with carteolol. Br J Clin



- Pharmac 33 : 411—416, 1992.
- 12) **Lipworth BJ, Grove A** : Evaluation of partial  $\beta$ -adrenoceptor agonist activity. *Br J Clin Pharmacol* 43 : 9—14, 1997.
  - 13) **Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, Usami E, Nakao T, Watanabe S, et al** : Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1- $\beta$  production by  $\beta$ -adrenoceptor agonists from lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacology* 54 : 144—152, 1997.
  - 14) **Izeboud CA, Mocking JAJ, Monshouwer M, Van Miert AS, Witkamp RF** : Participation of  $\beta$ -adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *J Recept Signal Transduct Res* 19 : 191—202, 1999.
  - 15) **Izeboud CA, Vermeulen RM, Zwart A, Voss HP, Van Miert AS, Witkamp RF** : Stereoselectivity at the  $\beta_2$ -adrenoceptor on macrophages is a major determinant of the anti-inflammatory effects of  $\beta_2$ -agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362 : 184—189, 2000.
  - 16) **Kawai K, Kuwahara K, Oizumi N, Kitagaki H, Fujisawa S** : Effects of carteolol hydrochloride on the *in vitro* production of LPS-induced proinflammatory cytokines by murine macrophage. *J Ocul Pharmacol Ther* 20 : 237—245, 2004.
  - 17) **新家 真, 高瀬正弥, 横山幸男, 北川正敏** : チモロール点眼, 眼内移行の動態薬理学的解析, 及び人眼房水動態に及ぼす作用について. *日眼会誌* 84 : 97—104, 1980.
  - 18) **伊澤 成, 小室正勝, 大久保秀夫** : 塩酸レボプロロール点眼液の白色および有色ウサギにおける眼内動態. *あたらしい眼科* 14 : 287—297, 1997.
  - 19) **小出高志, 藤野秀樹, 吉村三夫, 木全秀樹, 高尾厚志, 本多尚子, 他** : KT-210 (Nipradilo 点眼液) のウサギにおける体内動態. *薬理と治療* 24 : 53—65, 1996.
  - 20) **Sjöquist B, Tajallaei S, Stjernschantz J** : Pharmacokinetics of latanoprost in the cynomolgus monkey. *Arzneimittelforschung* 49 : 225—233, 1999.
  - 21) **Cohen J** : The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420 : 885—891, 2002.
  - 22) **Yan X, Tezel G, Wax MB, Edward DP** : Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor  $\alpha$  in glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 118 : 666—673, 2000.
  - 23) **Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB** : TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1787—1794, 2001.
  - 24) **Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, et al** : Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neuroscience* 26 : 12633—12641, 2006.
  - 25) **Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kwong JMK, Ross-Cisneros FN, Wang J, Tsai RK, et al** : TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration and nuclear factor- $\kappa$ B p 65. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 1448—1457, 2006.
  - 26) **Chen KH, Wu CC, Roy S, Lee SM, Liu JH** : Increased interleukin-6 in aqueous humor of neovascular glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2627—2632, 1999.
  - 27) **Fujio N, Kusumato N, Odomi M** : Ocular distribution of carteolol after single and repeated ocular instillation in pigmented rabbits. *Acta Ophthalmol* 72 : 688—693, 1994.
  - 28) **Chen KH, Wu CC, Roy S, Lee SM, Liu JH** : Increased interleukin-6 in aqueous humor of neovascular glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2627—2632, 1999.
  - 29) **Fujio N, Kusumato N, Odomi M** : Ocular distribution of carteolol after single and repeated ocular instillation in pigmented rabbits. *Acta Ophthalmol* 72 : 688—693, 1994.