

## $\beta$ 作動薬, メラニン色素とグリセオール酸の眼圧下降作用

木内 良明

広島大学医学部眼科学教室

### 要 約

cAMP 分解酵素阻害剤の一つであるグリセオール酸エステル (GA エステル) の眼圧下降作用が,  $\beta$  レセプター刺激剤 (イソプロテレンール),  $\beta$  レセプター遮断剤 (チモロール) との組み合わせでどんな修飾を受けるか, また, メラニン色素の有無でどんな影響を受けるか検討した。

イソプロテレンールと GA エステルは相乗的に, チモロールと GA エステルは相加的に家兎の眼圧を下降させた。また, GA エステルの眼圧下降作用はメラニン色素の存在に影響を受けなかった。GA エステルは従来の抗緑内障点眼薬にはない, 特異な性質があると思われた。(日眼会誌 94: 663-672, 1990)

キーワード: グリセオール酸, cAMP 分解酵素阻害剤, イソプロテレンール, チモロール, メラニン色素

## Changes in Ocular Hypotensive Effect of Griseolic Acid with Isoproterenol, Timolol and Melanin.

Yoshiaki Kiuchi

*Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine*

### Abstract

Griseolic acid-ester (GA-ester), one of the strongest cAMP phosphodiesterase inhibitors, was combined with isoproterenol and timolol in this study to evaluate the effect on intraocular pressure (IOP). Furthermore, the ocular hypotensive effect of GA-ester in pigmented and albino rabbits was compared, and the binding ability of GA-ester to synthetic melanin was examined. GA-ester markedly enhanced the hypotensive effect of isoproterenol, and the combination of GA-ester with timolol resulted in an additional fall in IOP. No differences in the hypotensive effect of GA-ester between pigmented and albino rabbits were observed. GA-ester did not bind to synthetic melanin. GA-ester has unique characteristics as an ocular hypotensive agent. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 663-672, 1990)

Key words: Griseolic acid, cAMP phosphodiesterase inhibitor, Isoproterenol, Timolol, Melanin

## I 緒 言

$\beta$  レセプターの刺激でレセプターに接続したアデニレートサイクラーゼが活性化され, ついで細胞内の cAMP の活性が上昇する<sup>1)</sup>. このアデニレートサイク

ラーゼを間接的に, あるいは直接刺激するコレラ毒素<sup>2)</sup>, フォルスコリン<sup>3)</sup>に眼圧下降作用があることが報告され, 眼圧の調節機構と cAMP・アデニレートサイクラーゼを介する系の関係が注目されてから久しい<sup>1)-4)</sup>. しかし, これまでに, cAMP 分解酵素阻害剤と

別刷請求先: 734 広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 木内 良明

(平成元年11月2日受付, 平成元年12月27日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshiaki Kiuchi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hiroshima Univ. School of Med.

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(Received November 2, 1989 and accepted in revised form December 27, 1989)

眼圧の関係を明らかにした報告は多くない<sup>5)</sup>。近年、木内<sup>5)</sup>、Mishima ら<sup>6)</sup>は強力な cAMP 分解酵素阻害剤の一つであるグリセオール酸(GA)<sup>7)</sup>、およびグリセオール酸エステル(GA エステル)<sup>6)</sup>の眼局所投与で白色家兎の眼圧が有意に下降することを報告している。

今回、GA エステルの眼圧下降作用が、 $\beta$  レセプター刺激剤(イソプロテレノール)、 $\beta$  レセプター遮断剤(チモロール)と組みあわせたとき、また、メラニン色素の有無でどんな影響を受けるか検討した。

## II 実験方法

### 1. 実験動物

GA とイソプロテレノール、チモロールの組みあわせ点眼には体重2.5~3.0Kgの白色家兎を、メラニン色素の影響の検討には体重2.5~3.0kgの有色、白色家兎を雌雄の区別なく用いた。

### 2. 使用薬物

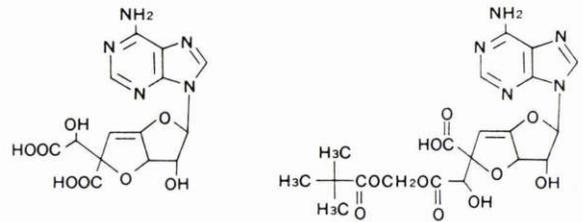
木内<sup>5)</sup>、Mishima ら<sup>6)</sup>の報告と同じく、眼内移行性を良くするためにグリセオール酸の8位をPOMエステル化したGAエステル(三共)を用いた(図1)。GAエステルはリン酸緩衝液で溶解した後、1N NaOHでpH7.0に調整した。イソプロテレノール(シグマ)、チモロール(シグマ)はWoodward ら<sup>8)</sup>と同じく、生理食塩液で溶解した。薬剤の溶解後、1N NaOHでpHを5.5~7.4に調整し、点眼に使用した。

### 3. 薬物投与方法および眼圧測定法

1眼には薬物50 $\mu$ lを点眼し、他眼には薬物の溶解液を同様に点眼してコントロールとした。眼圧計はpneumatograph (PTG, 日本アルコン)を用いた。眼圧の測定は点眼の直前、点眼30分後、および点眼後6時間まで1時間ごとに行なった。複数の薬物を投与するときは最初の薬物の点眼前、および2種めの薬物の点眼前と点眼30分後、以後6時間のあいだ1時間毎に眼圧の測定を行なった。

実験1)  $\beta$  レセプター刺激剤(イソプロテレノール)の影響

まず、イソプロテレノールおよびGAエステル単独点眼による眼圧の変化を検討した。イソプロテレノールは0.002%、0.003%、0.005%、0.05%の4通り、GAエステルは0.5%、1%、2%の3通りの濃度で点眼実験を行なった。ついで、0.5%GAエステルと0.002%イソプロテレノール、および1%GAエステルと0.003%イソプロテレノールの組みあわせで点眼実験を行なった。GAエステル点眼1時間後にイソプロテレノール



Griseolic Acid

Griseolic Acid-ester

図1 グリセオール酸とグリセオール酸エステルの構造式

を点眼し眼圧の経過を観察した。

実験2)  $\beta$  レセプター遮断剤(チモロール)の影響

両眼に0.5%チモロールを点眼し、その眼圧下降作用を検討した。ついで、チモロールとイソプロテレノールの組み合わせ投与を行なった。0.5%チモロールの両眼点眼30分後に0.005%イソプロテレノールを1眼に点眼し、眼圧の経過を観察した。次に、0.5%チモロールの両眼点眼の30分後に2%GAエステルを1眼に点眼し、眼圧の経過を観察した。

実験3) メラニン色素の影響

#### ①眼圧下降実験

2%GAエステルと0.5%チモロールの、白色家兎と有色家兎に対する眼圧下降作用を比較した。

#### ②薬剤と合成メラニンの結合実験

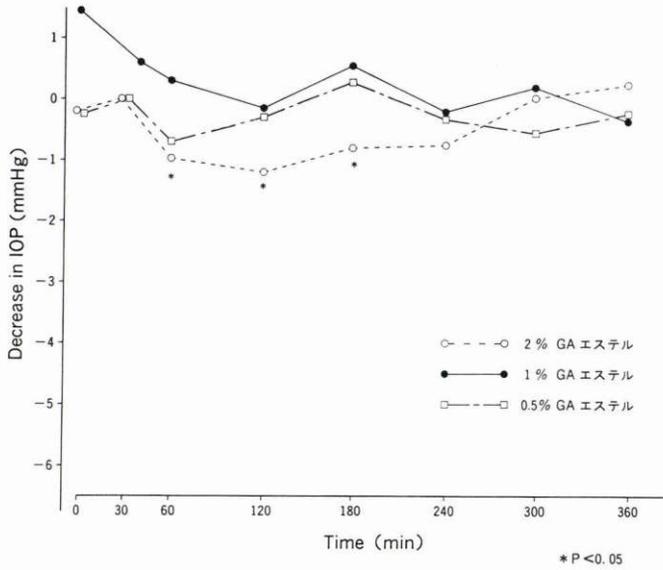
メラニンの合成：メラニンは、Potts<sup>9)</sup>の方法に準じてd-*l*-ジヒドロキシフェニルアラニン(東京化成工業)100mgあたりチロシナーゼ(シグマ)2200単位を加え、37°Cで4時間インキュベートし、合成した。合成されたメラニンは精製水で数回洗浄液の上清に200~300nmの範囲で吸光のピークがないことを確認した後、凍結乾燥した。

薬剤と合成メラニンの結合量の測定：既知濃度のGAエステル、チモロールの水溶液3mlに合成メラニン3mgを加え、37°Cで20~60分インキュベートした。15,000Gで15分間遠沈した後、上清の260nmにおける吸光度を分光光度計(ベックマン)で測定し、あらかじめ作成しておいた検量線に当てはめ、合成メラニンと結合した薬物の量を求めた<sup>10)</sup>。

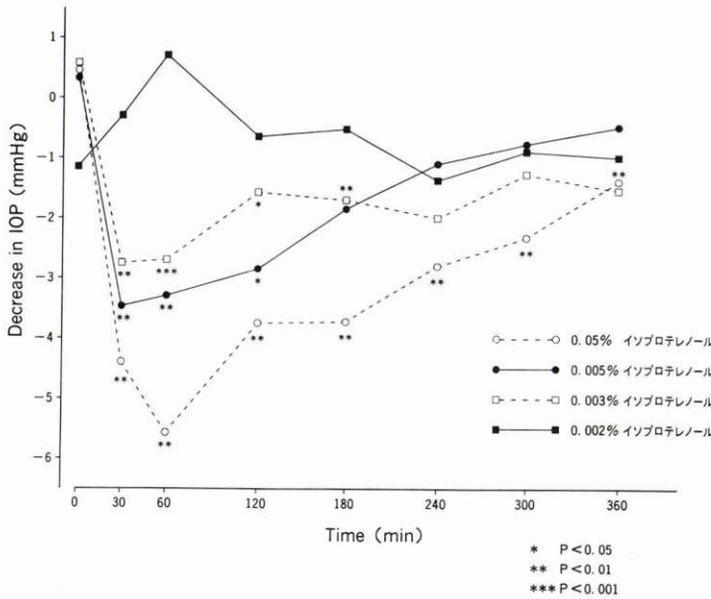
## III 結果

1.  $\beta$  レセプター刺激剤(イソプロテレノール)の影響

2%GAエステル単独点眼では、点眼後1~3時間



a

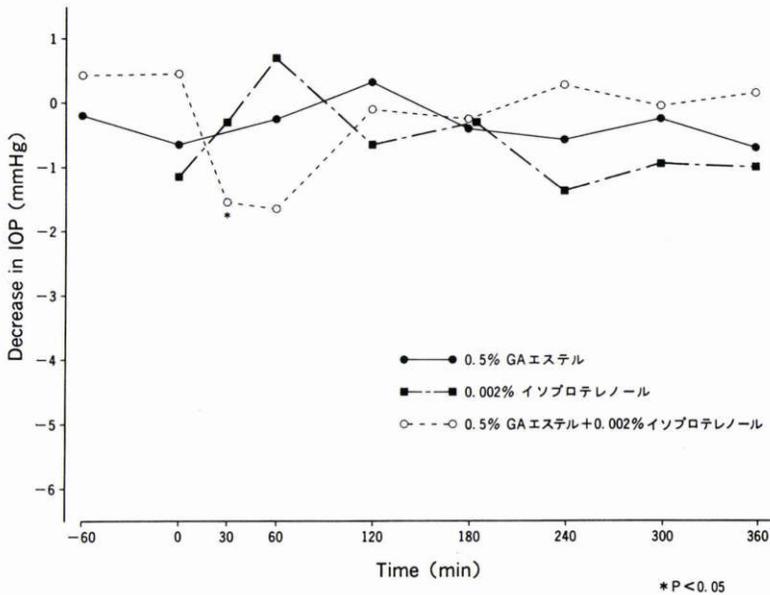


b

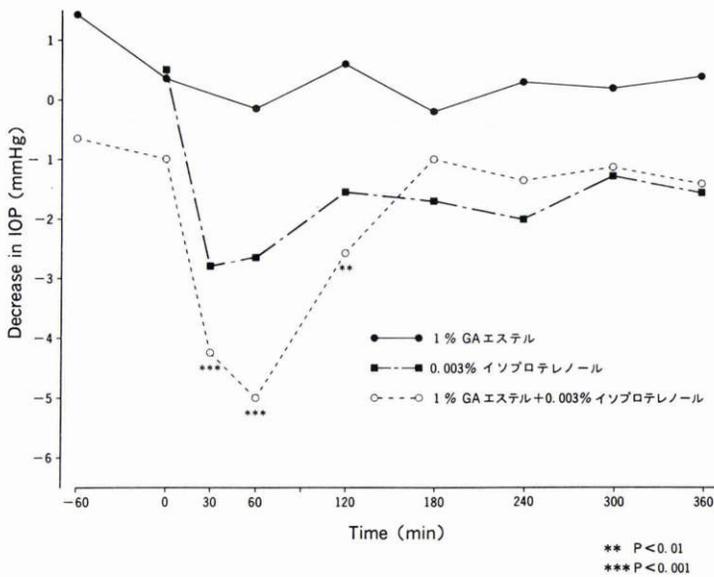
図 2 a: グリセオール酸エステル点眼の眼圧下降作用, b: イソプロテレンール点眼の眼圧下降作用

のあいだ, 処置眼の眼圧は有意に下降した. 点眼後 2 時間の時点で眼圧は最も下降し, その最大眼圧下降幅は  $1.19 \pm 0.35 \text{ mmHg}$  (Mean  $\pm$  SEM) であった. 1% GA エステルと 0.5% GA エステルの単独点眼では, 有意な眼圧下降が得られなかった (図 2a). 0.002% イソ

プロテレンールの点眼では, 眼圧は有意に下降しなかった. しかし, 0.003% イソプロテレンール点眼では, 点眼後 30 分と, 1, 2 時間および 4 時間に処置眼の眼圧は有意に下降した. 0.005% イソプロテレンール点眼では点眼後 30 分から 2 時間のあいだ, また, 0.05% イ



a



b

図3 a: 0.5%グリセオール酸エステルと0.002%イソプロテレンールの組みあわせ点眼による眼圧変動, b: 1%グリセオール酸エステルと0.003%イソプロテレンールの組みあわせ点眼による眼圧変動

ソプロテレンール点眼では点眼後30分から6時間以上続く有意な眼圧下降が得られた。イソプロテレンール点眼後の最大眼圧下降幅は用量依存性に増加し、0.002, 0.003, 0.005, 0.05%のイソプロテレンールで

はそれぞれ、 $1.43 \pm 0.38 \text{ mmHg}$ ,  $2.75 \pm 0.61 \text{ mmHg}$ ,  $3.50 \pm 0.89 \text{ mmHg}$ ,  $5.58 \pm 0.88 \text{ mmHg}$ であった(図2 b)。

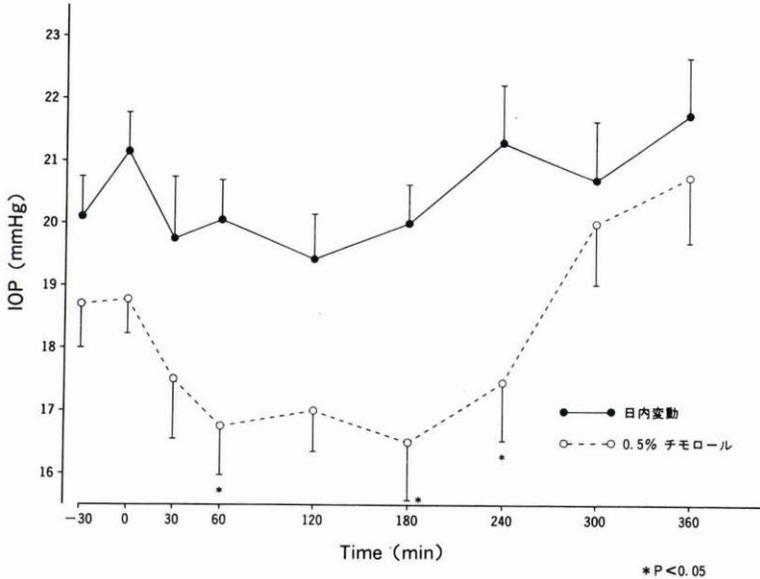
0.5%GA エステルと0.002%イソプロテレンールの

組み合わせ点眼では、イソプロテレノール点眼後30分の時点で有意な眼圧下降が得られた(図3a)。また、1%GAエステルと0.003%イソプロテレノールの組みあわせでは、イソプロテレノール点眼1時間後に、処置眼の眼圧は $5.0 \pm 0.82 \text{ mmHg}$  下降し、1%GAエステルと0.003%イソプロテレノール点眼それぞれの最大眼圧下降幅 ( $0.29 \pm 0.42 \text{ mmHg}$  と  $2.75 \pm 0.61$

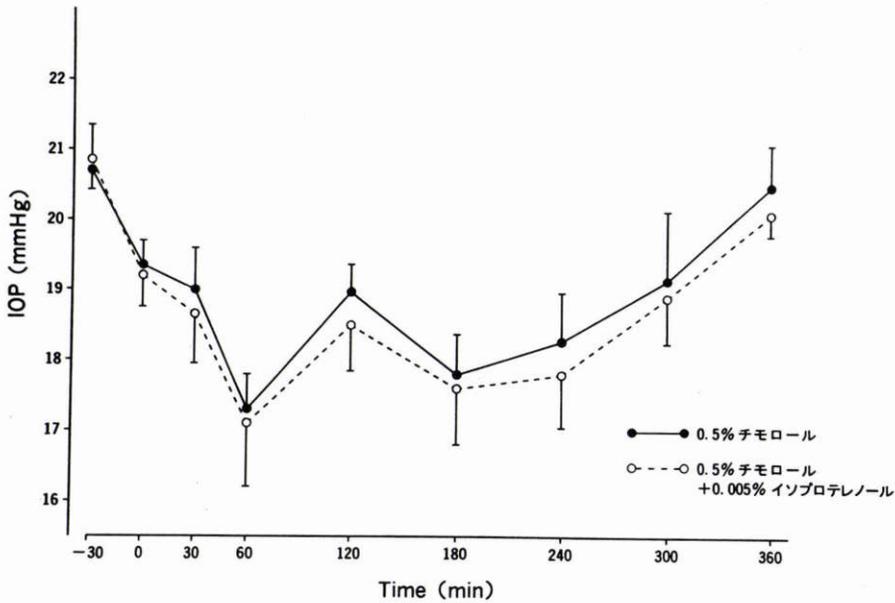
mmHg)の合計以上に眼圧が下降した(図3b)。

2. βレセプター遮断剤(チモロール)の影響

-30分の時点で、両眼に0.5%チモロールを点眼した時の眼圧の経過を、無処置時の経過と比べると、点眼後1, 2, 4時間の時点で有意に眼圧は下降した。点眼後2時間の時点では有意な眼圧下降が得られなかったが両者のあいだに $2.44 \pm 1.08 \text{ mmHg}$ の眼圧差があっ



a



b

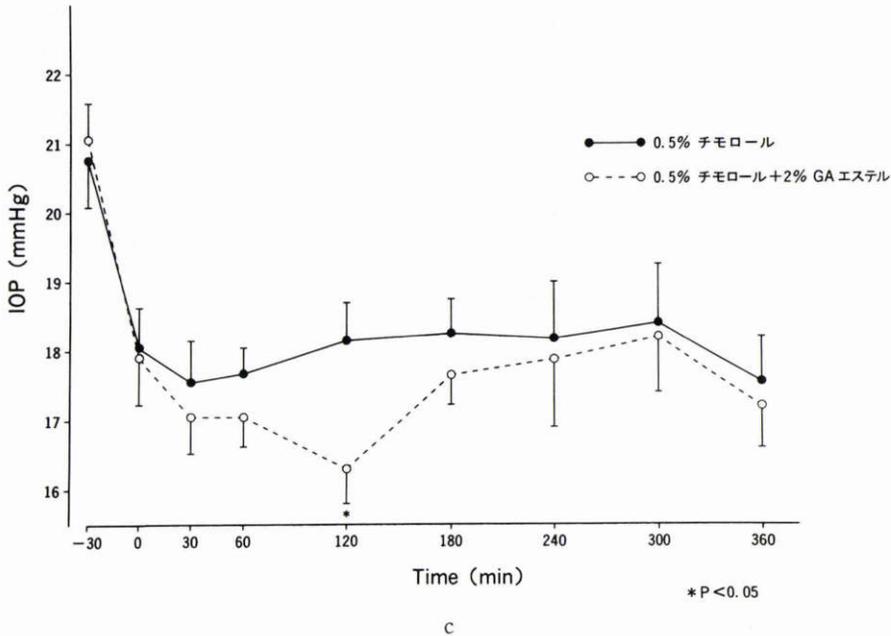


図4 a: 0.5%チモロール両眼点眼後の眼圧変化と眼圧日内変動, b: 0.5%チモロールと0.005%インプロテレンールの組みあわせ点眼による眼圧変動, c: 0.5%チモロールと2%グリセオール酸エステルの組みあわせ点眼による眼圧変動

た(図4a)。両眼に0.5%チモロールを点眼した後, 0.005%インプロテレンール点眼を行なってもそれ以上の眼圧下降は得られなかった(図4b)。しかし, 同様に0.5%チモロールで前処置したあと2%GAエステルを一眼すると, GA処置眼の眼圧はさらに下降し, GAエステル点眼2時間後に, GA非処置眼とのあいだに有意な眼圧差が生じた(図4c)。

### 3.メラニン色素の影響

#### 1) 眼圧下降実験

2%GAエステルの点眼後, 白色家兎では点眼後1~3時間のあいだ, 有色家兎では2~3時間のあいだ処置眼の眼圧は有意に下降した。その最大眼圧下降幅は白色家兎では $1.19 \pm 0.35$ mmHg, 有色家兎では $1.25 \pm 0.51$ mmHgと両者の間に差は無かった(図5a, b)。白色家兎の一眼に0.5%チモロールを点眼すると, 点眼後3~6時間のあいだ処置眼の眼圧は有意に下降し, その最大眼圧下降幅は $2.50 \pm 0.31$ mmHgであった。ところが, 0.5%チモロールを有色家兎に点眼しても有意な眼圧下降は得られなかった(図6a, b)。

#### 2) 薬物の合成メラニンとの結合実験

チモロールは合成メラニンとインキュベーションしなくても遠沈するだけで, その25.0%が合成メラニ

ンと結合した(図7a)。60分のインキュベーションでチモロールと合成メラニンは約45%結合し, 両者の結合はこの時点で平衡に達したと思われる。一方, GAエステルはメラニン色素と結合しなかった。以後, インキュベーション時間を60分として実験を行った。

薬剤の濃度を変化させ合成メラニン1mgに結合するチモロールとGAエステルの量を求めた。チモロールでは加えたチモロールの濃度に比例して結合量は増加した。しかし, GAエステルは合成メラニンと結合しなかった(図7b)。

## IV 考 按

$\beta$ レセプター刺激剤, コレラ毒素, フォルスコリンなどのアデニレートサイクラーゼ・cAMP系を活性化する物質を, 家兎, 猿, 人に作用させると眼圧が下降することが既に多く報告されている<sup>1)-4)11)</sup>。このことから, 眼圧の調節にアデニレートサイクラーゼ・cAMPを介する系が何らかの役割を果たしている可能性は強いと思われる。しかし, 現在までcAMPの分解酵素阻害剤の単独投与で有意な眼圧下降を得られたことを示した報告は, GA, GAエステルを用いた木内<sup>5)</sup>, Mishimaら<sup>6)</sup>のものだけである。今回, 強力なcAMP分

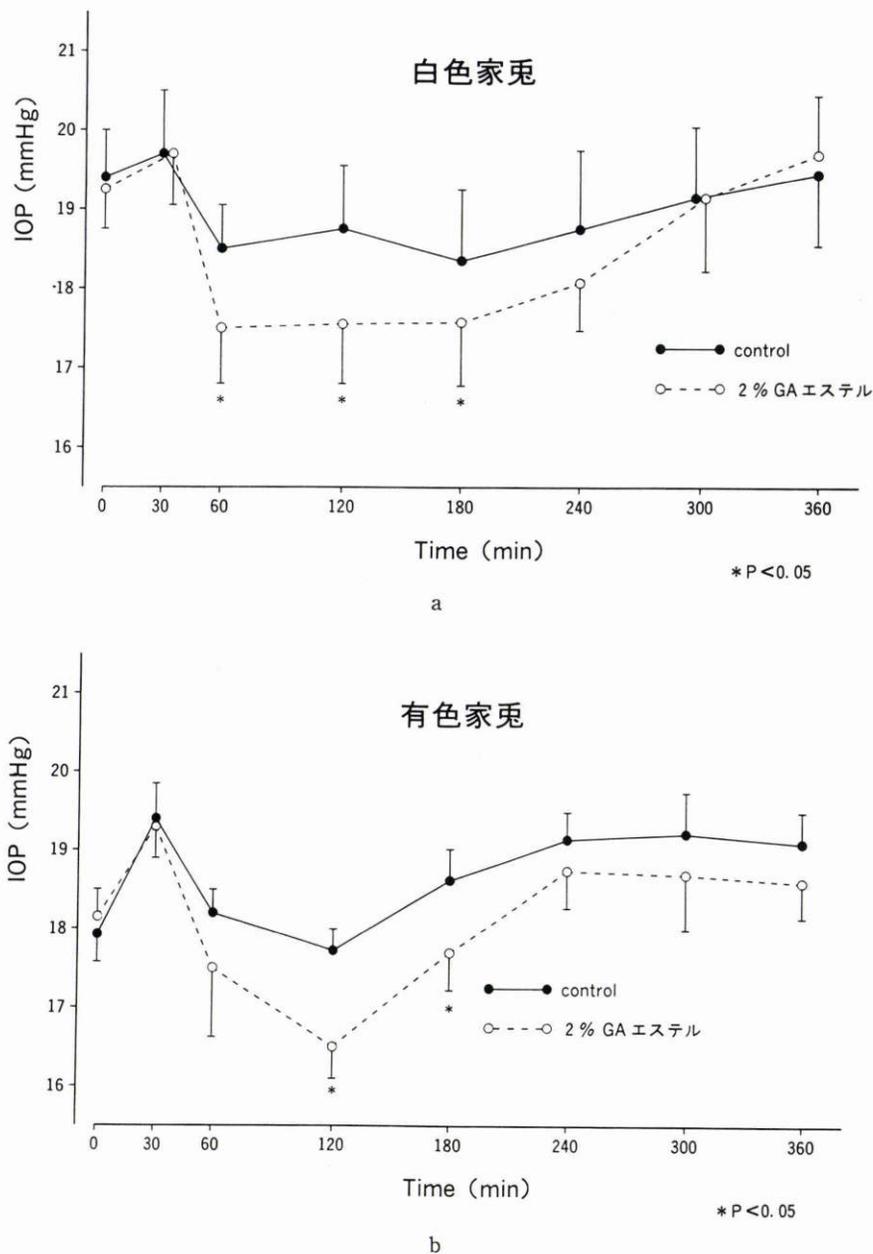
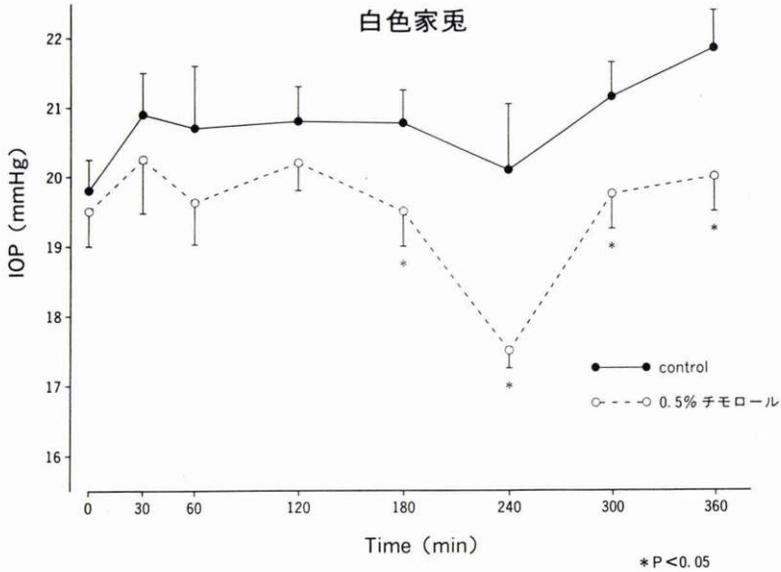


図5 a: 白色家兎に2%グリセオール酸エステルを点眼したときの眼圧変動, b: 有色家兎に2%グリセオール酸エステルを点眼したときの眼圧変動

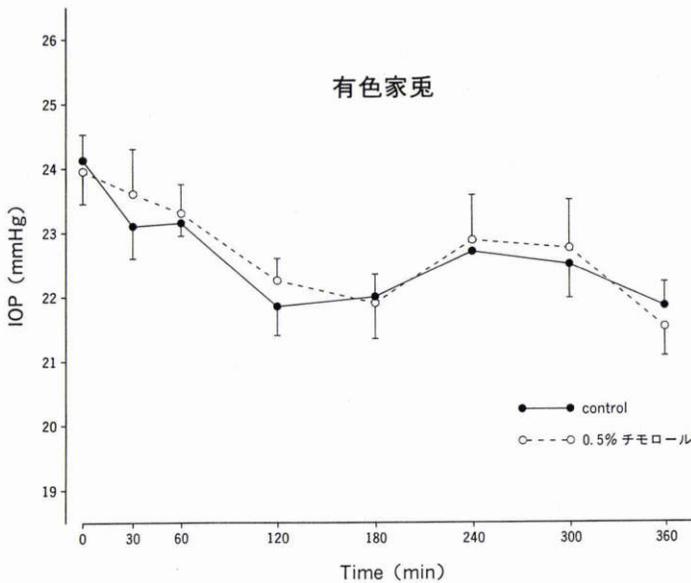
解酵素阻害剤であるGAエステルが、 $\beta$ レセプター刺激剤であるイソプロテレノールや $\beta$ レセプター遮断剤であるチモロールの眼圧下降作用をどのように修飾するか検討した。さらに、各種、眼圧下降剤、瞳孔剤がメラニン色素を多く含む組織あるいはメラニン顆粒に吸着されることが報告されている<sup>12)~15)</sup>。いずれの薬

物においてもメラニン色素が多いほどその薬効が減少している<sup>15)</sup>。そこで、GAエステルの眼圧下降作用に対するメラニン色素の影響を検討した。

GAエステルをイソプロテレノールと組み合わせると、次のような結果が得られた。眼圧下降を示さない濃度のGAエステル(0.5%)とイソプロテレノール



a



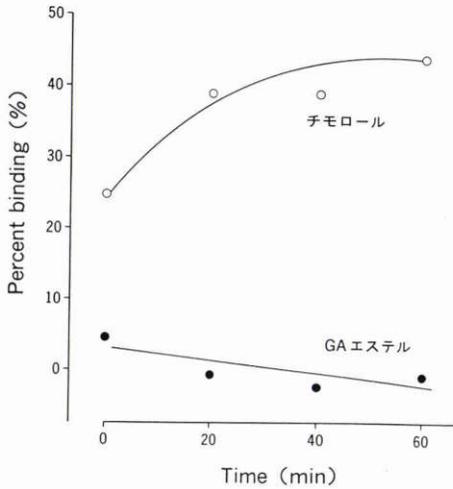
b

図6 a: 白色家兎に0.5%チモロールを点眼したときの眼圧変動, b: 有色家兎に0.5%チモロールを点眼したときの眼圧変動

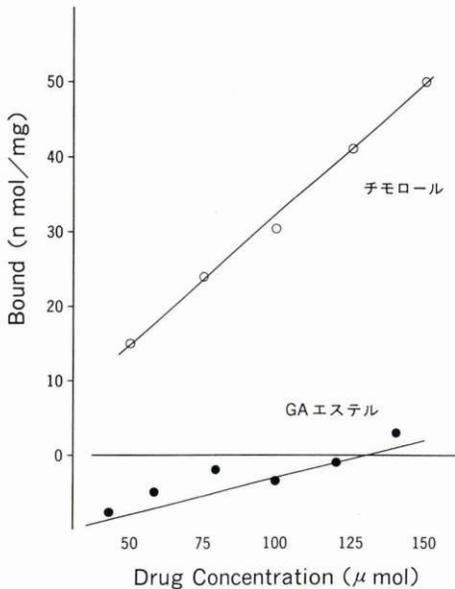
(0.002%)でも、これらを組み合わせることで有意な眼圧下降が得られた。さらに、中等度の眼圧下降を示す濃度のイソプロテレノール(0.003%)と1%GAエステルの組み合わせでは、それぞれの眼圧下降幅の合計以上に眼圧は下降し、両者は相乗的に作用した。こ

のことは、眼内のcAMP濃度の上昇は眼圧を下降させるという今までの報告を間接的に支持するものと考えられる<sup>1)</sup>。

$\beta$ レセプター刺激剤であるイソプロテレノール、エピネフリンのみならず $\beta$ レセプター遮断剤の点眼で



a



b

図 7 a: 薬物と合成メラニンの結合率の経時的な変化, b: 薬物と合成メラニンの結合量

眼圧が下降することは、眼圧の下降機序を考えるうえで混乱をきたしている<sup>1)</sup>。しかし、エピネフリン、 $\beta$  レセプター遮断剤は両者とも、臨床的に抗緑内障剤として広く用いられている。しかし、エピネフリンと  $\beta$  遮断剤を組み合わせて使用してもなかなか相加的な効果が期待できないようである<sup>16)</sup>。今回の実験でも、0.5% チモロールの点眼で前処置したあと、有効濃度のイソ

プロテレノール (0.005%) を作用させてもそれ以上の眼圧下降は得られなかった。これは  $\beta$  レセプター遮断剤が  $\beta$  レセプターを遮断してしまうためイソプロテレノールが作用できなかったと推測される<sup>17)</sup>。しかし、同じように 0.5% チモロールの点眼で前処置したあと、2% GA エステルを点眼すると眼圧はさらに下降した。GA エステルはレセプターを介さずに作用するため、 $\beta$  レセプター遮断剤と同時に使用しても cAMP 系を作動させることができ相加的に眼圧を下降させることができたのかもしれない。

メラニン色素と薬物の結合のメカニズムはいまだに不明な点が多い。メラニン色素と薬物の結合にイオン結合が関与し、特に、メラニンのカルボキシル基が陰極として作用し、薬物の陽極と結合するのではないかと推定されている<sup>18)-20)</sup>。さらに、メラニン色素と薬物の結合に非電気的な力、van der Waal 力も働いていると考えられている<sup>18)-20)</sup>。 $\beta$  遮断剤では、メラニン色素のカルボキシル基と  $\beta$  遮断剤のプラスに荷電されたアミノグループのあいだに生じる ionic な力と van der Waal 力の二つともが、両者の結合に作用していると報告されている<sup>19)</sup>。今回、Tsuchiya ら<sup>10)</sup>、Abrahamsson ら<sup>19)</sup>の実験と同じようにチモロールは合成メラニンと結合することが示された。一方、GA エステルはプラスに荷電された部位がないこと、芳香環が無いことから、合成メラニンと結合できなかったであろう。

GA エステルの点眼では、有色家兎を用いても白色家兎を用いても有意な眼圧下降が生じた。しかし、チモロールの点眼では、白色家兎の眼圧は有意に下降したが有色家兎の眼圧は下降しなかった。チモロールはメラニンと結合するため、有色家兎では白色家兎と比べ眼内の遊離の薬物量が少なくなり眼圧が下降しなかったと推察される<sup>15)19)</sup>。一方、GA エステルはメラニンとの結合がほとんど無いため、有色、白色家兎とも同程度の眼圧下降が得られたのであろう。

GA エステルは、 $\beta$  レセプター刺激剤の眼圧下降効果を著しく増強し、 $\beta$  レセプター遮断剤と相加的に眼圧を下げる。さらに、メラニン色素の影響も受けにくい。GA エステルは、従来から用いられている抗緑内障点眼薬にないユニークな性質をもつ薬剤である。

稿を終るにあたり、調枝寛治教授のご校閲に感謝します。また、ご指導頂きました三嶋 弘助教授、薬効解析科学教室の黒川知則講師に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) **Sears ML**: Autonomic nervous system: Adrenergic agents, In **Sears ML** (ed): *Pharmacology of the Eye*, Berlin, Springer-Verlag, 193—248, 1984.
- 2) **Gregory D, Sears ML, Bausher L**: Intraocular pressure and aqueous flow are decreased by cholera toxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 371—381, 1981.
- 3) **Caprioli J, Sears M, Bausher L**, et al: Forskolin lowers intraocular pressure by reducing aqueous inflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 268—277, 1984.
- 4) 三嶋 弘, 木内良明: 緑内障の新薬(1)—細胞の情報伝達機構に作用する薬物について—。眼科 Mook 40: 206—219, 1989.
- 5) 木内良明: グリセオール酸 (cAMP-phosphodiesterase 阻害剤) 局所投与による眼圧変化の基礎的研究。第1報。グリセオール酸の点眼, 結膜下注射, および硝子体内注入による眼圧動態。広大医誌 36: 683—689, 1988.
- 6) **Mishima HK, Kiuchi Y, Yokoyama Y**: Griseolic acid, cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, lowers rabbit intraocular pressure. *Curr Eye Res* (in press).
- 7) **Iijima Y, Nakagawa F, Honda S**, et al: Biological properties of griseolic acid, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor with an adenine group. *FEBS Letters* 192: 179—183, 1985.
- 8) **Woodward DF, Chen J, Padillo E**, et al: Pharmacological characterization of  $\beta$ -adrenoceptor subtype involvement in the ocular hypotensive response to  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Exp Eye Res* 43: 61—75, 1986.
- 9) **Potts AM**: The reaction of uveal pigment in vitro with polycyclic compounds. *Invest Ophthalmol* 3: 405—416, 1964.
- 10) **Tsuchiya M, Hayasaka S, Mizuno K**: Affinity of ocular acid-insoluble melanin for drugs in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 822—825, 1987.
- 11) **Mishima H, Bausher L, Sears M**, et al: Fine structural studies of ciliary processes after treatment with cholera toxin or its B subunit. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 219: 272—278, 1982.
- 12) **Shibata T, Mishima H, Kurokawa T**: Ocular pigmentation and intraocular pressure to forskolin. *Curr Eye Res* 7: 667—674, 1988.
- 13) **Melikian HE, Lieberman TW, Leopold IH**: Ocular pigmentation and pressure and outflow responses to pilocarpine and epinephrine. *Am J Ophthalmol* 72: 70—73, 1971.
- 14) **Emiru VP**: Response to mydriatics in the African. *Br J Ophthalmol* 55: 538—543, 1971.
- 15) **Patil PN, Shimada K, Feller DR**, et al: Accumulation of (—)-C<sup>14</sup>-ephedrine by the pigmented and the nonpigmented iris. *J Pharmacol Exp Ther* 188: 342—352, 1974.
- 16) **Morrison JC, Robin AL**: Adjunctive glaucoma therapy: A comparison of apraclonidine to dipivefrin when added to timolol maleate. *Ophthalmology* 96: 3—7, 1989.
- 17) 宇井理生: 受容体と情報伝達。東京, 東京化学同人, 1—27, 1986.
- 18) **Larsson B, Tjälve H**: Studies on the mechanism of drug-binding to melanin. *Biochem Pharmacol* 28: 1181—1187, 1979.
- 19) **Abrahamsson T, Boström S, Bräutigam J**, et al: Binding of the  $\beta$ -blockers timolol and H216/44 to ocular melanin. *Exp Eye Res* 47: 565—577, 1988.
- 20) **Tjälve H, Nilsson M, Larsson B**: Studies on the binding of chlorpromazine and chloroquine to melanin in vivo. *Biochem Pharmacol* 30: 1845—1847, 1981.