

白内障治療薬のフリーラジカルスカベンジャー作用による評価

藤原 久子 田仲 延子, 鈴木 隆司

川崎医科大学附属川崎病院眼科

要 約

白内障形成の一つの trigger となるフリーラジカルの発生抑制作用を指標として抗白内障薬の作用を評価した。Hypoxanthine-xanthine oxidase system による発生するスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) と Fenton 反応により発生するヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) を電子スピン共鳴法 (ESR) により測定し, その発生に対する抗白内障薬の抑制作用を検討した。その結果, ピレノキシン pirenixine, アスコルビン酸 ascorbic acid, glutathione (GSH) に強い抑制効果が認められた。(日眼会誌 95: 1071-1076, 1991)

キーワード: 白内障治療薬, フリーラジカル, 電子スピン共鳴法 (ESR)

The Effects of Anti-Cataract Drugs on
Free Radicals Formation in Lenses

Hisako Fujiwara, Nobuko Tanaka and Takashi Suzuki

Department of Ophthalmology, Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School

Abstract

Numerous factors are related to the development of cataract. In particular the effects of free radicals as triggers for the formation of cataracts have recently attracted attention. The oxygen radicals ($O_2^{\cdot-}$) produced by the hypoxanthine-xanthine oxidase system and the hydroxyl radicals ($HO\cdot$) produced by Fenton reaction were measured using electron spin resonance (ESR) methods. In the present study, we investigated the effects of compounds used as anti-cataract drugs and evaluated their inhibitory effects on radical formation. Pirenixine and ascorbic acid both caused potent suppression of the radicals. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 1071-1076, 1991)

Key words: Anti-cataract drugs, Free radicals, Electron spin resonance (ESR)

I 緒 言

白内障の成因は必ずしも一元的ではなく色々なものがあげられる。臨床的にもっとも多くみられる老人性白内障についても水晶体混濁の機構はいまだ充分に解明されていない。したがって白内障の薬物治療法は十

分な理論的根拠にもとづいたものとは云えない。現在用いられている白内障治療薬は白内障水晶体が示す生化学的パラメーターの変化をとらえ, その回復と維持をはかろうとするものや臨床経過にもとづいて経験的に使用されているものである¹⁾。

近年, 白内障の発生にフリーラジカルによる水晶体

別刷請求先: 700 岡山市中山下 2-1-80 川崎医科大学附属川崎病院眼科 藤原 久子

(平成3年1月11日受付, 平成3年3月2日改訂受理)

Reprint requests to: Hisako Fujiwara, M.D. Department of Ophthalmology, Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School.

2-1-80 Nakasange, Okayama 700, Japan

(Received January 11, 1991 and accepted in revised form March 2, 1991)

形質膜障害が関与しているとする考えがある。著者らはフリーラジカルの一つであるスーパーオキシド(O_2^-)を特異的に除去するスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)が白内障の進行とともに活性が低下することを報告した²⁾。

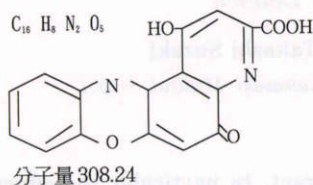
そこで現在臨床的に使用されている白内障治療薬のうち抗酸化作用を理論的に有すると考えられる薬剤についてフリーラジカルスカベンジャー作用による評価を試みたので報告する。

II 実験方法

1. 評価薬剤

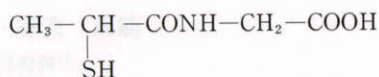
- 1) ascorbic acid
- 2) glutathione (GSH)
- 3) Pirenexine (カタリン®千寿)

1-Hydroxy-5H-pyrido [3,2-a] phenoxazine-3-carboxylic acid



4) Tiopronin (チオラ®参天)

N-(2-mercaptopropionyl)-glycine
 $C_5H_9NO_3S$



分子量163.9

5) Hachimiziougan (八味地黄丸)

八味地黄丸は5.2gを100mlの蒸留水に入れ、50℃で1時間抽出したものを原液として希釈して用いた。

2. スーパーオキシド消去作用の測定³⁾

薬剤のSOD様活性を測定した。ヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系(hypoxanthine-xanthine oxydase system)より産生されるスーパーオキシドを5.5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMDO)により捕捉し得られるDMPO-OOHシグナル強度の薬剤による抑制率を求めた。測定のための反応液は磷酸緩衝液中に2mM ヒポキサンチン50 μ l, 5.5mM diethylenetriamine-pentacetic acid (DETAPAC) 35 μ l, 種々の濃度の試料50 μ l, DMPO 10 μ l, 0.272unit/ml, キサンチンオキシターゼ55 μ l (計200 μ l)を順次混合し、2分後に電子スピン共鳴法(ESR: electron spin resonance)により測定した。ESR Model ES-FE₂XGS(日本電子)を使用した。

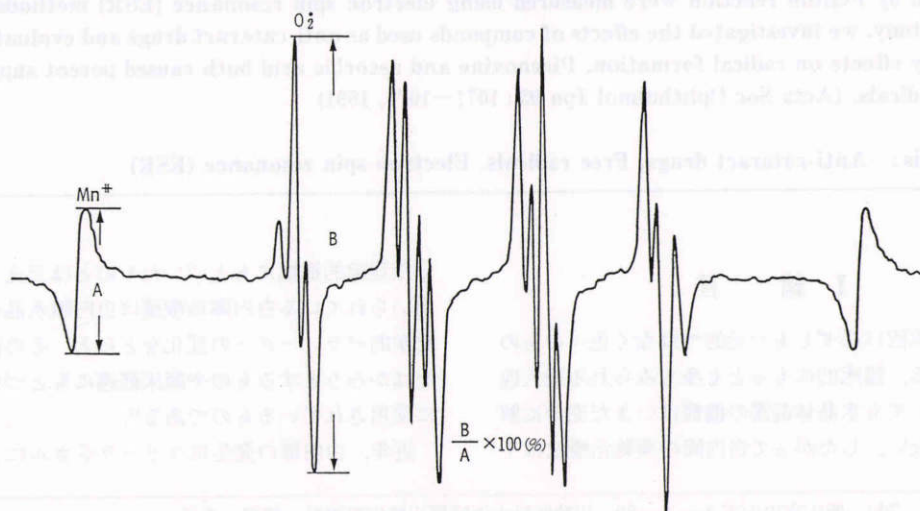


図1 ヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系より産生されるスーパーオキシドのESRスペクトル。

Spectrometer settings :

Temp; room temp, Power; 8mW, Field; 339.5mT/G \pm 5mT/G, Sweep time; 2 min, Modulation; 9.9409 G Hz, Receiver gain; 4 \times 100, Time constant; 0.1 s

3. ヒドロキシルラジカル消去作用の測定⁴⁾

Fenton 反応, 即ち $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}\cdot + ^-\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$ を利用した.

Fenton 反応でヒドロキシルラジカルを発生させ, DMPO で捕捉すると DMPO-OH シグナルが得られる. 他に反応物質が共存すると, この DMPO-OH シグナルが抑制される. これを利用して薬剤の反応性を測定した. 測定の為の反応液は 0.1M 磷酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4 に 0.2mM DETAPAC 100 μ l, 0.1mM, 種々の濃度の試料 20 μ l, 22.6mM H_2O_2 10 μ l (計 150 μ l) を順次混合し, 1 分後に ESR で測定した.

III 結 果

1. スーパーオキシド発生に対する薬剤の効果

DMPO をトラップ剤とするスピントラッピングによってヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系から得られる ESR スペクトルを図 1 に示した.

薬剤によるスーパーオキシド生成の抑制率は Mn^{2+} のシグナル A に対する O_2 シグナル B の百分率 ($\frac{B}{A} \times 100$) により, DMPO-OOH シグナル即ち O_2 生成量を求め, 無添加時を 100 としてそれに対する比率により求めた.

1 例を図 2 と図 3 に示した.

すべての薬剤についての結果を図 4 にまとめた. スーパーオキシド発生を 50% 抑制する薬剤の濃度を表 1 に示した. もっとも濃度の低いのは pirenoxine で次

いで, ascorbic acid であった.

2. ヒドロキシルラジカル発生に対する薬剤の効果

Fenton 反応により得られたヒドロキシルラジカルの ESR スペクトルを図 5 に示した.

1 例を図 6 と図 7 に示した. すべての薬剤の効果を図 8 に示した. ヒドロキシルラジカルの発生を 50% 抑制する薬剤の濃度を表 2 に示した. 最も濃度の低いのは ascorbic acid, pirenoxine, GSH であった.



図 2 スーパーオキシドに対する Pirenoxine の抑制効果を示す ESR スペクトル.

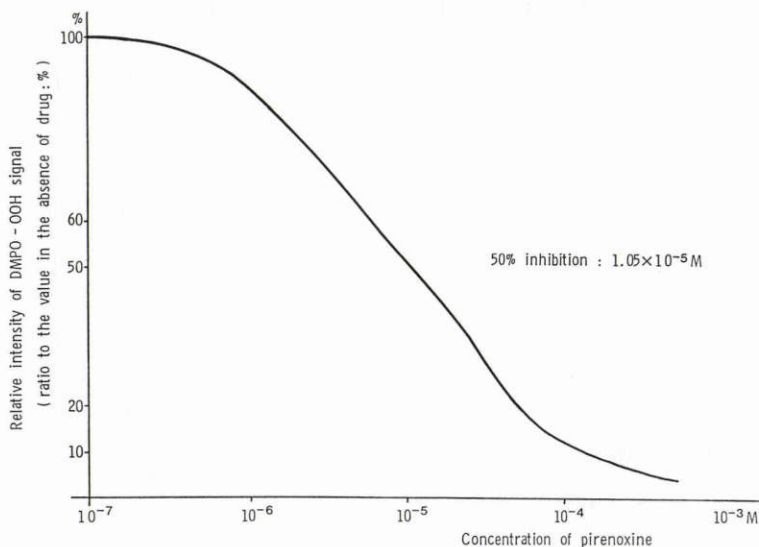


図 3 Pirenoxine の抑制率を示すグラフ.

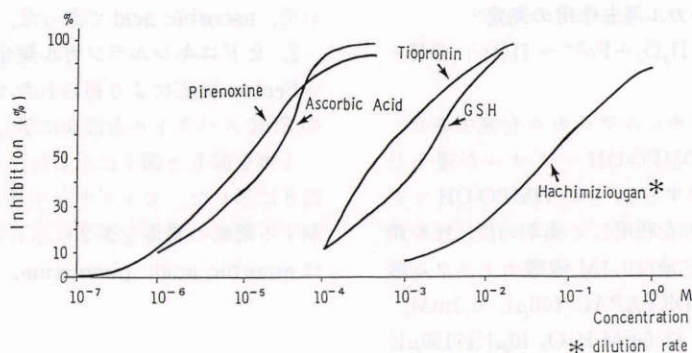


図4 スーパーオキシド発生に対する各種薬剤の効果を示すグラフ.

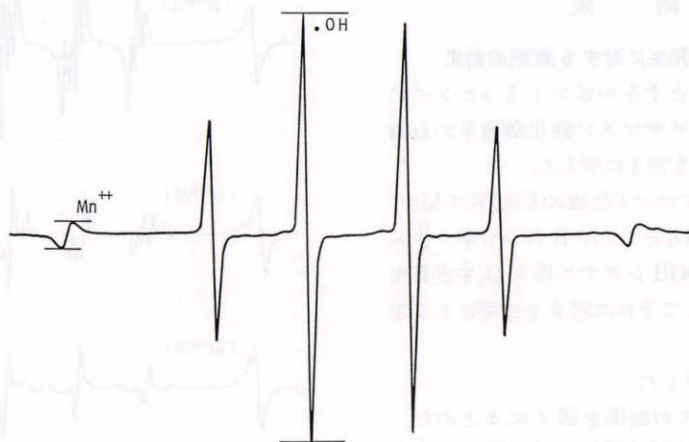


図5 Fenton 反応により産生されるヒドロキシルラジカルの ESR スペクトル.

Spectrometer settings:

Temp; room temp, Power; 8mW, Field; 331.7mT/G \pm 5mT/G, Sweep time; 1 min,
Modulation; 9.047 G Hz, Receiver gain; 1.6 \times 100, Time constant; 0.1 s

表1 スーパーオキシド発生を50%抑制させる
薬剤の濃度

Drug	50% inhibition drug concentration
Ascorbic Acid	2.4×10^{-5} M
GSH	1.6×10^{-4} M
Pirenoxine	1.05×10^{-5} M
Tiopronin	4.6×10^{-4} M
Hachimiziougan	2×10^{-1} *

*rate of dilution

IV 考 按

最も多い白内障は老人性白内障であるが、その発症の機構は少しずつ解明されているものの、いまだ十分ではない。高齢化社会の到来とともに老人性白内障患

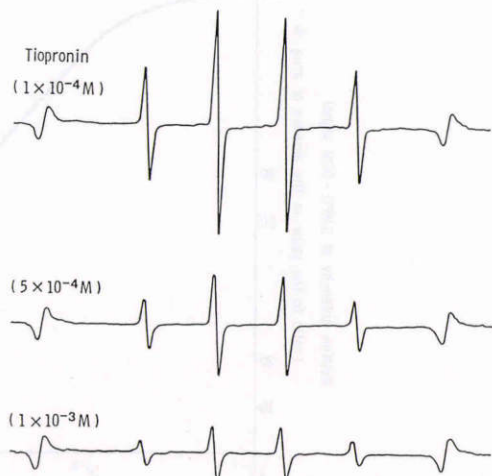


図6 ヒドロキシルラジカルに対する Tiopronin の抑制効度を示す ESR スペクトル.

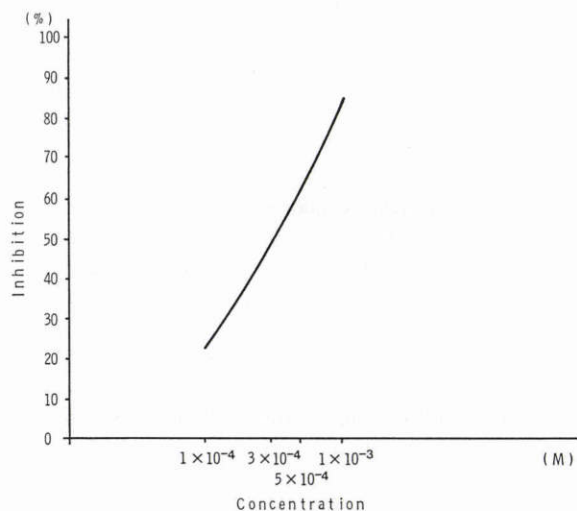


図 7 Tiopronin の抑制率を示すグラフ。

表 2 ヒドロキシルラジカルを 50% 抑制させる薬剤の濃度

Drug	50% inhibition drug concentration
Ascorbic Acid	$2 \times 10^{-5} \text{M}$
GSH	$5.3 \times 10^{-4} \text{M}$
Pirenexine	$3 \times 10^{-5} \text{M}$
Tiopronin	$3 \times 10^{-4} \text{M}$
Hachimiziougan	1*

*dilution rate

者の増加は著しく危険因子の解明などの疫学的研究とともに白内障の治療薬の開発も真剣にとり組まなければならない問題である。

老人性白内障の治療の要点として水晶体繊維形質膜

の安定性と水晶体構造蛋白の酸化防止があげられている⁵⁾。近年水晶体と光酸化の問題や白内障とフリーラジカルとの関連が注目されている。白内障の発症機序にフリーラジカルが関与しているとする研究はラットやヒト水晶体に紫外線を照射するとフリーラジカルが発生することが ESR により検出されること⁶⁾⁷⁾。Emory マウス遺伝白内障⁸⁾、ラットのガラクトース白内障⁹⁾老人白内障²⁾の水晶体で活性酸素に対する消去作用を有する SOD 活性が低下するなどがあげられている。また老人性白内障の危険因子として日照時間や紫外線の多い地域があげられるという疫学的研究によっても裏付けされている。

老人性白内障の発生は一元的な要因ではないことは言うまでもないが、本実験は現在用いられている白内障治療薬について抗酸化剤としての検討を行い、pirenoxine, ascorbic acid, GSH に高い抑制作用を認めた。pirenoxine と ascorbic acid では $\text{OH} \rightarrow \text{H} \cdot$, GSH と Tiopronin では $\text{SH} \rightarrow \text{S} \cdot$ となると推測される。臨床的に用いられている点眼薬 pirenexine の濃度は $16 \times 10^{-5} \text{M}$ 、GSH の濃度は $65 \times 10^{-3} \text{M}$ である。pirenoxine は房水や水晶体への移行が確かめられている。本実験により、スーパーオキシドの 50% 抑制を示す濃度は $1.05 \times 10^{-5} \text{M}$ 、ヒドロキシルラジカルでは $3 \times 10^{-5} \text{M}$ を要することが明らかとなった。今後さらに検討が必要であるが臨床上有効な濃度と考えられる。GSH のスーパーオキシドの 50% の抑制を示す濃度は $1.6 \times 10^{-4} \text{M}$ 、ヒドロキシルラジカルでは $5.3 \times 10^{-4} \text{M}$ を要することが判明した。GSH の水晶体への移行は不明であるが、房水中には移行するとされている。GSH の安定性や眼内移行についてさらに研究が必要と考えられるが点眼薬としてラジカルスカベンジャーとしても有効な

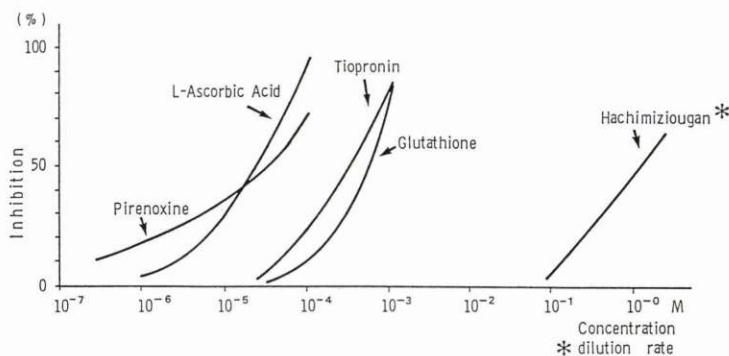


図 8 ヒドロキシルラジカル発生に対する各種薬剤の効果を示すグラフ。

濃度を有している。これらはフリーラジカスカベンジャー作用を有するという点で長期に使用することにより白内障の予防や進行の予防として意義のある薬剤として認めてよいと考えられる。

文 献

- 1) 津山嘉一郎：白内障。藤原隆明編：眼科 Mook 44 最近の眼科薬物療法。東京，金原出版，12—20，1990。
- 2) 藤原久子，鈴木隆司，亀田 泰，他：白内障と Superoxide Dismutase 活性。あたらしい眼科 6：770—772，1989。
- 3) Ueno I, Kohno M, Yoshihira K, et al: Quantitative determination of the superoxide radicals in the xanthine oxidase reaction by measurement of the electron spin resonance signal of the superoxide radical spin adduct of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. J Pharm Dyn 7: 563—569, 1984。
- 4) 谷川 徹，吉川敏一，内藤裕二，他：各種物質とヒドロキシラジカルとの反応性。西川弘恭，吉川敏一編：ESR とフリーラジカル。東京，日本医学館，109—114，1989。
- 5) 山本覚次：我が国で用いられている白内障治療のいろいろとその薬理的理由。日本の眼科，臨時増刊，眼科医の手引，第2集，321，39—40，1988。
- 6) Brokman RF, Lerman S: Evidence for a free radical mechanism in aging and UV-irradiated ocular lenses. Exp Eye Res 25: 303—309, 1977。
- 7) Weiter JJ, Subramanian S: Free radicals produced in human lenses by a biphotonic process. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 869—873, 1978。
- 8) Bhuyan KC, Bhuyan DK, Kuck JFR Jr, et al: Increased lipid peroxidation and altered membrane functions in Emory mouse cataract. Curr Eye Res 9: 597—606, 1982/1983。
- 9) 平岩紀子，石黒伊三雄：ガラクトース白内障ラット水晶体活性酸素代謝の変動。日眼会誌 88: 185—192, 1984。

