

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止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^-) 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 pirenoxine, 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^-) 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. Pirenoxine 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のものがあげられる。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方がある。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クターゼ(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⁾。

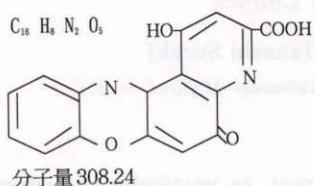
そこで現在臨床的に使用されている白内障治療薬のうち抗酸化作用を理論的に有すると考えられる薬剤についてフリーラジカルスカベンジャー作用による評価を試みたので報告する。

II 実験方法

1. 評価薬剤

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

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



- 4) Tiopronin (チオラ®参天)

N-(2-mercaptopropionyl)-glycine



分子量 163.9

5) Hachimiougan (八味地黄丸)

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

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 oxidase system)より產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 50μl, 5.5mM diethylenetriamine-pentacetic acid (DETAPAC) 35μl, 種々の濃度の試料 50μl, DMPO 10μl, 0.272unit/ml, キサンチノキシターゼ 55μl (計 200μl) 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。

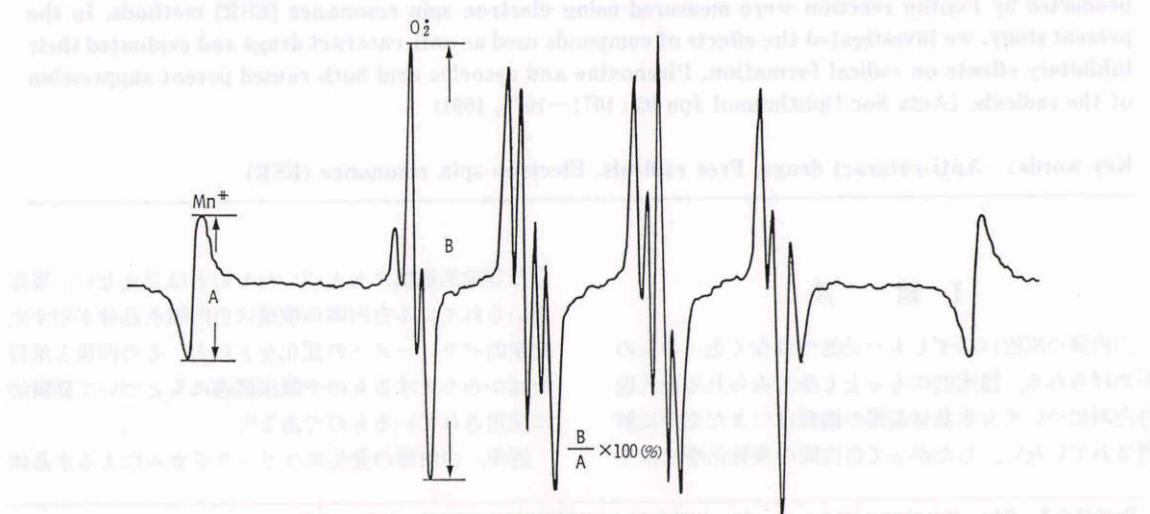


図 1 ヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系より產生されるスーパーオキシドの ESR スペクトル。

Spectrometer settings :

Temp ; room temp, Power ; 8mW, Field ; 339.5mT/G±5mT/G, Sweep time ; 2 min, Modulation ; 9.9409 G Hz, Receiver gain ; 4×100, 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 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$ 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。これを用い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 100μl, 0.1mM, 種々の濃度の試料 20μl, 22.6mM H₂O₂ 10μl(計 150μl) 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 Mn²⁺ のシグナル A に対する O₂ シグナル B の百分率 ($\frac{B}{A} \times 100$) により、DMPO-O₂H シグナル即ち O₂ 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 pirenroxine 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, pirenroxine, GSH であった。

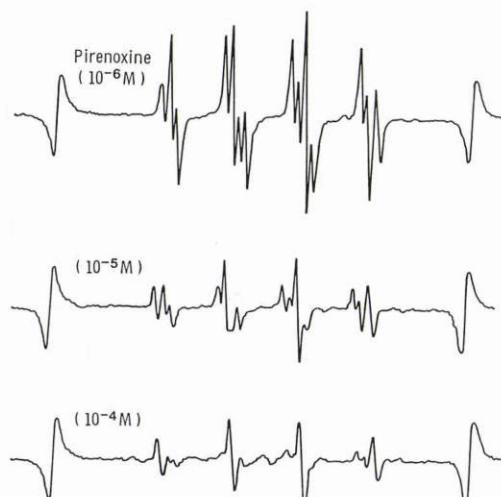


図 2 スーパーオキシドに対する Pirenroxine の抑制効果を示す ESR スペクトル。

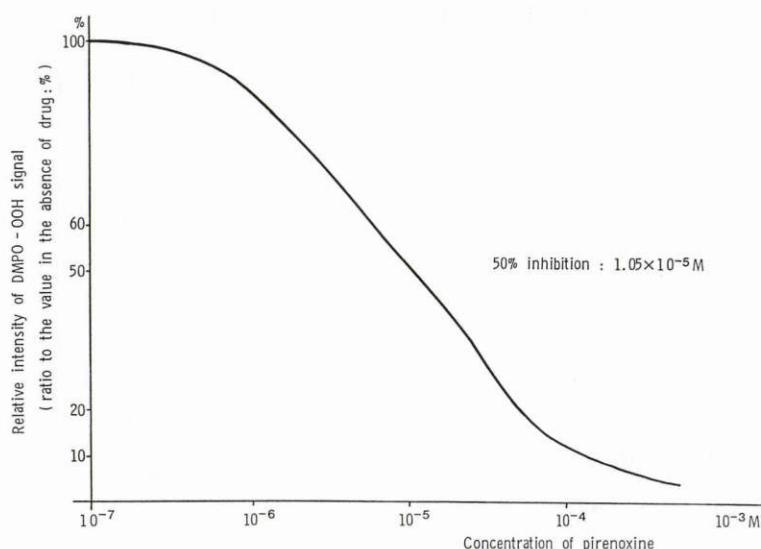


図 3 Pirenroxine の抑制率を示すグラフ。

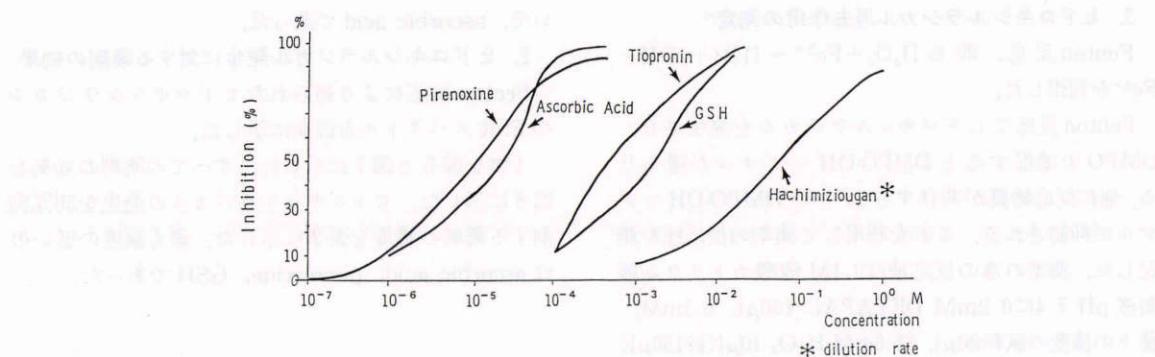


図4 スーパーオキシド発生に対する各種薬剤の効果を示すグラフ。

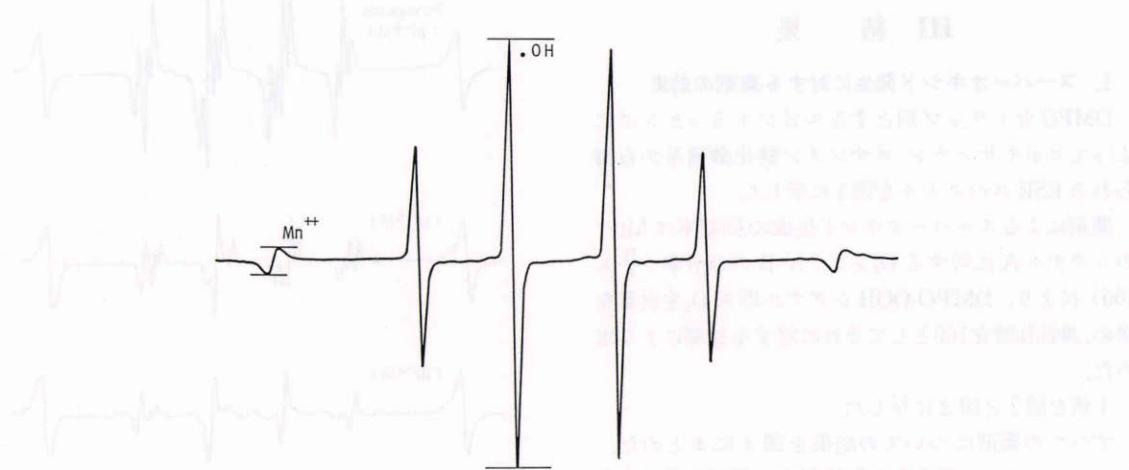


図5 Fenton反応により產生されるヒドロキシラジカルのESRスペクトル。

Spectrometer settings:

Temp ; room temp, Power ; 8mW, Field ; 331.7mT/G±5mT/G, Sweep time ; 1 min,
Modulation ; 9.047 G Hz, Receiver gain ; 1.6×100, 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づ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

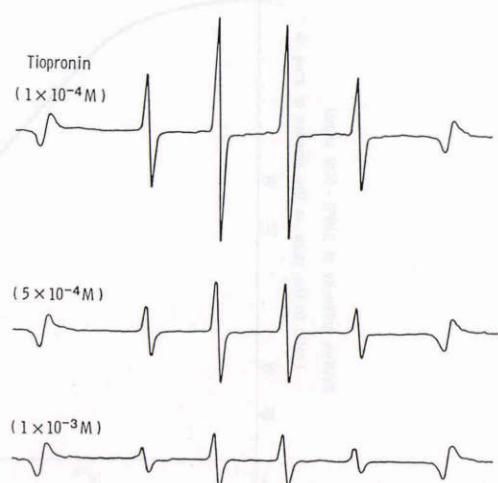


図6 ヒドロキシラジカルに対するTioproninの抑制効度を示すESRスペクトル。

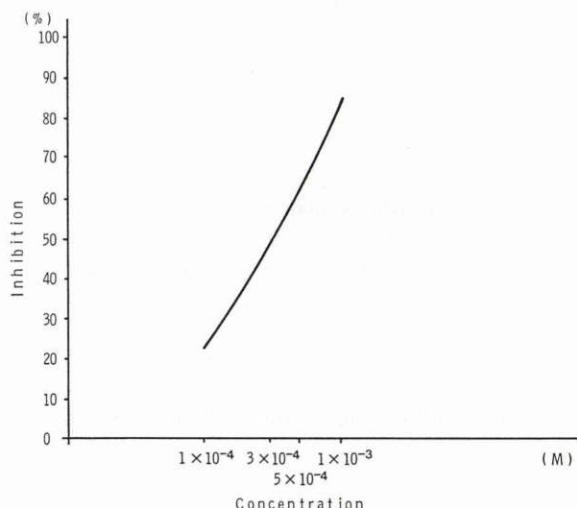


図7 Tioproninの抑制率を示すグラフ。

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	2×10^{-5} M
GSH	5.3×10^{-4} M
Pirenoxine	3×10^{-5} M
Tiopronin	3×10^{-4} 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纖維形質膜

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云うまでもないが、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OH \rightarrow $\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\cdot\cdot}}$ 、GSHとTioproninではSH \rightarrow $\overset{\text{H}}{\underset{\text{S}}{\cdot\cdot}}$ となると推測される。臨床的に用いられている点眼薬 pirenoxine の濃度は 16×10^{-5} M、GSHの濃度は 65×10^{-3} 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 1.05×10^{-5} M、ヒドロキシルラジカルでは 3×10^{-5} 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場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 1.6×10^{-4} M、ヒドロキシルラジカルでは 5.3×10^{-4} 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

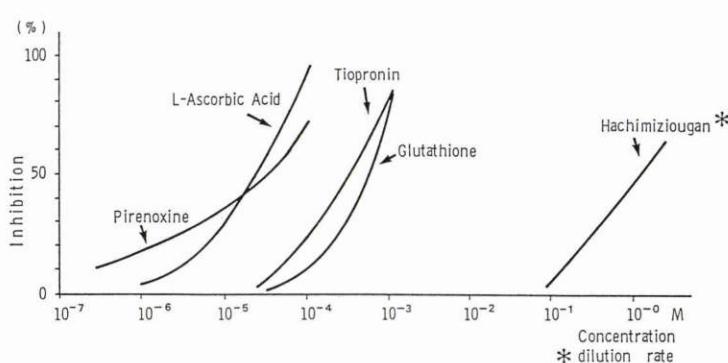


図8 ヒドロキシルラジカル発生に対する各種薬剤の効果を示すグラフ。

濃度を有している。これらはフリーラジカル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：各種物質ヒト水晶体活性酸素代謝の変動。日眼会誌 88: 185-192, 1984.

ドロキシル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。日本的眼科、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.

