

緑内障治療薬とメラニン色素の相関

永田 淳士

広島大学医学部眼科学教室

要 約

薬剤の眼圧下降作用におけるメラニン色素の影響を検討するために、白色家兎と有色家兎眼に各種緑内障治療薬を点眼して眼圧の変化を調べた。また、これらの薬剤の合成メラニンとの結合実験を行い、分光光度計を用いて合成メラニンに結合した薬剤の量を測定した。0.5%チモロール、1%エピネフリン、3%ピロカルピンの点眼では、いずれも有色家兎に比べて白色家兎で有意に大きな眼圧下降が認められた。0.02%プロスタグランディン E₂ と F_{2α} の点眼では白色と有色家兎とで、その眼圧下降に差は認められなかった。薬剤の合成メラニンに対する結合性は、β-交感神経遮断剤で非常に高く、エピネフリンとピロカルピンは、中等度の結合性を示し、プロスタグランジン系は、全く結合性を示さなかった。これらのことから、点眼されたある種の薬剤は眼内のメラニン色素に結合し、そのため薬効発現部位での遊離の薬剤濃度が減少し、その薬理作用が減弱する可能性が示唆された。(日眼会誌 95: 644-649, 1991)

キーワード：合成メラニン、緑内障治療薬、分光光度計、結合実験

Interaction of Antiglaucomatous Drugs and Melanin Granule

Atsuhito Nagata

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

Abstract

The author investigated the effects of several antiglaucomatous drugs and prostaglandins (E₂ and F_{2α}) on intraocular pressure responses in pigmented and albino rabbits, and spectrophotometrically assessed the binding of these drugs to synthetic melanin. Topical application of 0.5% timolol, 1% epinephrine and 3% pilocarpine had greater ocular hypotensive effects in albino rabbits than in pigmented rabbits. However no such differences were seen with application of prostaglandins. Melanin binding of drugs was higher in the order of befunolol, carteolol, timolol, epinephrine and pilocarpine. At higher concentrations of the drugs, the degree of binding increased. Prostaglandins had no binding ability. Thus drugs with lower hypotensive effects in pigmented rabbits than in albino rabbits had high melanin binding ability, whereas drugs with similar effects in pigmented and albino rabbits had no melanin binding ability. It is speculated that some antiglaucomatous drugs bind to melanin, resulting in decreased pharmacological action. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 644-649, 1991)

Key words: Synthetic melanin, Antiglaucomatous drugs, Spectrophotometer, Binding assay

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 永田 淳士
(平成2年10月12日受付, 平成2年11月19日改訂受理)

Reprint requests to: Atsuhito Nagata, M.D. Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine.

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

(Received October 12, 1990 and accepted in revised form November 19, 1990)

I 緒 言

近年フェノチアジン¹⁾やクロロキン²⁾を初めとして、種々の薬剤が体内のメラニン色素に吸着することが確認され、その薬効に影響を及ぼすことが示唆されている。眼科領域でも、エピネフリンやピロカルピン等の緑内障治療薬が白人に比べて東洋人や黒人で、その眼圧下降効果の小さいことが経験的に知られている³⁾⁴⁾。この説明の一つとして、これらの薬剤が眼内のメラニン色素に結合し、そのために薬理作用が減弱するのではないかの考えがある⁴⁾⁵⁾。

そこで、各種緑内障治療薬を用いて、白色家兎と有色家兎で点眼実験を行い、それぞれの薬剤の眼圧下降作用における色素の影響を検討した。加えて、これらの薬剤と合成メラニンとの結合実験を行い、分光光度計を用いて合成メラニンに結合した薬剤の量を測定したので報告する。

II 実験方法

1. 緑内障治療薬の点眼実験

1) 使用薬剤

各薬剤はそれぞれ生理食塩液に溶解し、pH6.5前後に調整した。薬剤は0.5%チモロール(以下すべてシグマ)、3%ピロカルピン、1%エピネフリン、0.02%プロスタグランディン E₂、F₂αとして使用した。

2) 使用動物

体重2.5kg前後の健常成熟白色家兎及び有色家兎各々8羽を雌雄の区別なく使用した。各点眼実験は、2週間の間隔をおいて実施した。

3) 薬剤の投与方法及び眼圧測定方法

薬液50μlを家兎の右眼に3分間おきに2回点眼し、左眼には生理食塩液50μlを同様に2回点眼しコントロールとした。眼圧は、pneumatograph(Alcon社)を用いて、経時的に測定した。測定値は、student T testにて統計的解析を行った。

2. 薬剤と合成メラニンとの結合実験

1) 合成メラニンの作製

Pottsらの方法⁶⁾に従い、d, 1-dihydroxyphenylalanine (DOPA) (東京化成) 1gとpolyphenoloxidase (mushroom tyrosinase 2200Unit/mg, シグマ) 20mgを0.1M 磷酸緩衝液300mlに混合し、37°Cで4時間インキュベートした。ついで、15,000gで20分間遠心分離して得られた沈澱物を約5回蒸留中で洗浄し、合成メラニンとした。1gのDOPAより凍結乾燥後、約150mg

表1 各薬剤の極大吸光波長

薬 剤	極大吸光波長 (nm)
ピロカルピン	214
エピネフリン	280
チモロール	295
ベフノロール	295
カルテオロール	259
プロスタグランディン E ₂	204
プロスタグランディン F ₂ α	204

の合成メラニンが得られた。最終的に得られた合成メラニンを0.066M 磷酸緩衝液に混合した後、その混合液を15,000gで15分間遠心分離した上清には、200~300nmの紫外領域において、光吸収のピークがないことを確認した。

2) 使用薬剤

チモロール(シグマ)、カルテオロール(大塚)、ベフノロール(科研)、エピネフリン(シグマ)、ピロカルピン(シグマ)、プロスタグランディン E₂、F₂α(シグマ)を0.066M 磷酸緩衝液に溶解した液として用いた。表1に各薬剤の紫外域における極大吸光波長を示した。

3) 結合実験

まず、合成メラニンの薬剤結合量に対するインキュベーション時間の影響を調べるため、10⁻⁴Mの薬剤濃度液3mlと合成メラニン12mgを混合し、37°Cで、0分、20分、60分間インキュベートしたのち、混合液を15,000gで15分間遠心分離し、その上清の吸光度を、各薬剤の極大吸光波長を用いて、Beckman分光光度計で測定した。もとの10⁻⁴M濃度の吸光度から上清の吸光度を差し引いたものをメラニンに結合した薬剤の量として、その結合率を計算した。

さらに、メラニンに結合する薬剤量の、濃度による変化を検討した。各薬剤の濃度を0.5~3.0×10⁻⁴Mの範囲で変化させ、各濃度薬液3mlと合成メラニン3mgを混合した。この混合液を37°Cで60分間インキュベートしたのち、15,000gで15分間遠心分離し、得られた上清の吸光度を測定してメラニンに結合した薬剤の量を計算した。

III 実験結果

1. 点眼実験

1) 0.5%チモロール点眼後の眼圧変動は、白色家兎では、コントロール眼と比較して点眼4~5時間後で

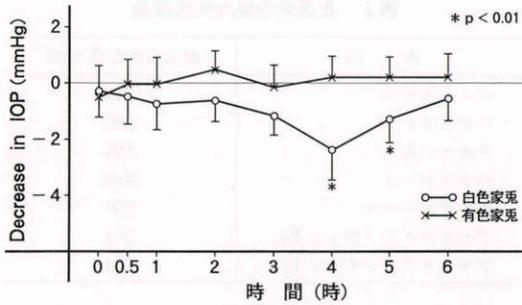


図1 0.5%チモロール点眼後の眼圧変動。値は処置眼と対照眼の平均眼圧の差を示した。(以下、図5まで同じ)

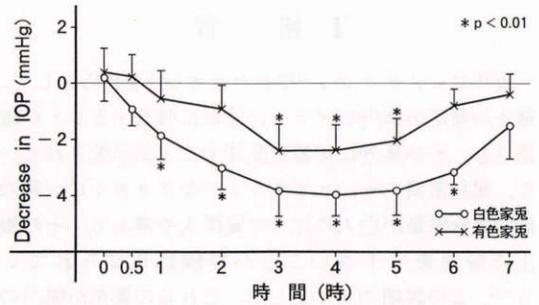


図3 1%エピネフリン点眼後の眼圧変動

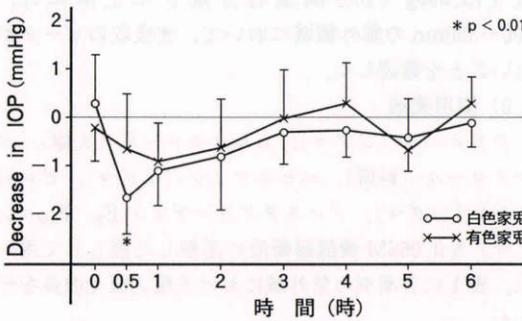


図2 3%ピロカルピン点眼後の眼圧変動

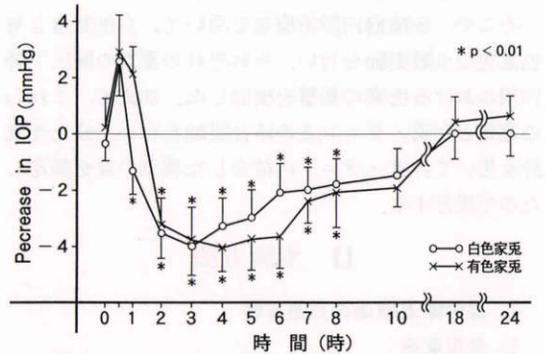


図4 0.02%プロスタグランジン E₂点眼後の眼圧変動

有意の眼圧下降を示したが、有色家兎では、有意の眼圧下降は認められなかった(図1)。

2) 3%ピロカルピン点眼後は、白色家兎では30分から1時間後にコントロール眼と比較して有意の眼圧下降が認められたが、有色家兎では有意の眼圧下降は認められなかった(図2)。

3) 1%エピネフリン点眼後では、白色、有色家兎ともコントロール眼と比較して有意の眼圧下降が認められたが、その最大眼圧下降幅は有色家兎に比べて白色家兎で明らかに大きく、点眼4時間後と5時間後で両者の間に有意差を認めた(図3)。

4) 0.02%プロスタグランジン E₂と F_{2α} の点眼では、白色、有色家兎ともに有意の眼圧下降が認められ、その眼圧下降の程度に、白色と有色の家兎による差は認めなかった(図4、図5)。

2. 合成メラニンと薬剤との結合実験

1) インキュベート時間の影響

メラニンと薬剤を混合し、すばやく遠心分離した時点でも、β-交感神経遮断剤ではすでにかなりの量がメラニンに結合した。その後、結合量は時間と共にわず

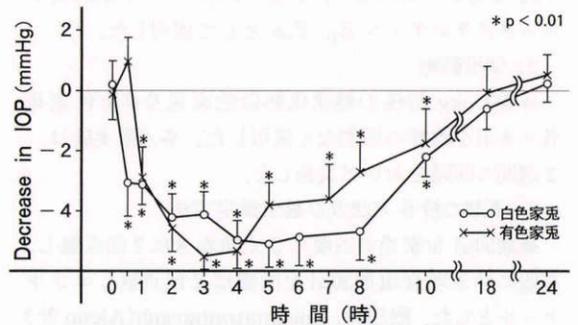


図5 0.02%プロスタグランジン F_{2α} 点眼後の眼圧変動

かに増加傾向を示した(表2)。エピネフリンとピロカルピンでも、同様の傾向を示し、結合量は時間と共にわずかに増加した。薬剤濃度10⁻⁴Mにおいて、β-交感神経遮断剤は約80%、エピネフリンは約49%、ピロカルピンは約38%が合成メラニンに結合した。一方、プロスタグランジン E₂と F_{2α} は、ともに合成メラニンに対して全く結合しなかった。

2) 薬剤濃度変化による影響

表2 合成メラニンに対する薬剤の結合率

薬 剤	インキュベート時間(分)		
	0	20	60
ベフノロール	82	88	91
カルテオロール	72	80	85
チモロール	70	78	81
エピネフリン	32	44	49
ピロカルピン	27	35	38
プロスタグランディン E ₂	2	0	3
プロスタグランディン F _{2α}	0	0	0

各薬剤 (10⁻⁴M, pH7.4) 3 ml を合成メラニン12 mg と混合し, 必要な時間37°C でインキュベートした. 各々の値は2回実験の平均値を示した.

表3 合成メラニン1 mg 当たりの薬剤結合量

薬 剤	薬剤初期濃度 (×10 ⁻⁴ M)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
カルテオロール	0.35	0.45	0.85	1.18	1.31	0.70
チモロール	0.21	0.40	0.79	1.01	0.22	
エピネフリン	0.15	0.25	0.37	0.45	0.58	
ピロカルピン	0.07	0.18	0.26	0.36	0.42	
プロスタグランディン E ₂	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	
プロスタグランディン F _{2α}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

(×10⁻⁷mol)

合成メラニン3 mg と各薬剤 (pH7.4) 3 ml を混合し, 37°C で60分間インキュベートした. 各々の値は2回実験の平均値を示した.

メラニンに対する薬剤の結合量は, 結合する全ての薬剤で濃度依存的に増加した. 中でもβ-交感神経遮断剤の結合量は, エピネフリンやピロカルピンに比べて高かった(表3). 薬剤濃度10⁻⁴Mにおいて, メラニン1mg に対してカルテオロールは0.45×10⁻⁷mol, チモロールは0.4×10⁻⁷mol, エピネフリンは0.25×10⁻⁷mol, ピロカルピンは0.18×10⁻⁷mol 結合した. プロスタグランディン E₂ と F_{2α} は, どの濃度でもほとんど合成メラニンとの結合はなかった.

IV 考 按

近年, 生体内のメラニン色素と薬剤との相互作用が注目されており⁷⁾, その一つの理由として, メラニン色素と薬剤との結合性の問題があげられる. すでに, 多くの薬剤が in vivo や in vitro で, メラニン色素に結合することが証明されている⁸⁾⁻¹⁰⁾. これらのうちには, 静脈内に投与されたベフノロールが眼内のメラニン顆粒に取り込まれたことを光学的に示した報告¹¹⁾や, 有色家兎眼に点眼されたチモロールは, 白色家兎

眼に点眼された時の約10倍量が虹彩に蓄積したとの報告¹²⁾がある. 投与された薬剤が生体内でメラニン色素に結合すると, 薬理作用発現部位での遊離薬剤の濃度が減少し, 目的とする薬理作用の減弱する可能性が指摘されている⁵⁾⁶⁾¹³⁾. アトロピン¹⁴⁾, ホマトロピン¹⁴⁾, ピロカルピン³⁾, エピネフリン⁴⁾等の自律神経系に影響を及ぼす点眼薬が, 虹彩色素の少ない白人に比べて, 虹彩色素の多い白人や黒人で, その薬理作用が減弱することはすでに知られている. この現象は, 薬剤がメラニン色素に結合するためかもしれないと考えられている³⁾⁴⁾¹⁴⁾¹⁵⁾. 緑内障治療薬をはじめとする種々の点眼剤の黒人, 東洋人と白人との間にみられる薬理作用の差は, 人種差や個体差に加えて, 眼内に含まれるメラニン色素量の差にも依存している可能性を示唆するものかもしれない³⁾¹⁶⁾.

そこで今回, 眼圧下降作用を示す薬剤を対象を絞り, 各薬剤の合成メラニンに対する結合性を比較し, さらに, 薬剤の有色と白色家兎での眼圧下降作用の差を検討した. 薬剤の合成メラニンに対する結合性はβ-交感神経遮断剤で非常に高く, エピネフリン, ピロカルピンは中等度の結合性を示し, プロスタグランジン系は全く結合性を示さなかった. 眼圧下降実験で, 合成メラニンに多かれ, 少なかれ結合性を示したチモロール, エピネフリン, ピロカルピンの点眼では, 白色家兎に比べて, 有色家兎で眼圧下降作用の減弱が認められた. 一方, 合成メラニンに全く結合性を示さなかったプロスタグランジン E₂, F_{2α} の点眼では, 白色, 有色家兎ともにほぼ同程度の眼圧下降作用が認められた. 白色家兎と有色家兎ではメラニン色素の量が異なるほかには, 薬剤の代謝酵素をはじめとした生体内の緒条件が全く同一であるとして論じることはできない. しかし, メラニン色素の薬剤に対する影響を調べるために, 有色および有色家兎は1つのモデルとなりうるのではないと思われる. Potts 等⁶⁾は, 合成メラニンと, 眼組織から抽出した酸不溶性メラニンとが, 同様の薬剤結合性を示したと報告しており, 生体内においてもメラニン色素がこれらの薬剤と結合することは十分に考えられる. これらのことから, 点眼で, 投与された薬剤でも, 虹彩や毛様体をはじめとした眼内のメラニン色素に結合し, そのための薬理作用発現部位での遊離の薬剤濃度が減少し, その薬理作用が減弱する可能性があると思われる.

メラニン色素と薬剤との結合様式については, メラニン色素のインドール核が薬剤に対して大きな結合能

を持つ¹⁷⁾とか、薬剤のアミノグループとメラニン色素のカルボキシルグループとの間のイオン結合である¹⁸⁾とか、薬剤の多環状芳香構造がメラニン色素に対して高い親和性を持つ⁶⁾とか等、さまざまな意見があるが、いまだ定説はない。また、メラニン色素が free radical として働き、電子受容体となって薬剤と結合するとの報告⁶⁾もある。いずれにしても、メラニン色素はその構造の多様性からも、複数の薬剤結合部位が想定されており¹⁹⁾、一つの結合様式で結合メカニズムの全てを説明することは困難のように思われる。今回の実験でも、合成メラニンに結合する薬剤量は濃度依存的に増大し、合成メラニンと各薬剤は非特異的な結合性を示した。

メラニン色素と薬剤の結合は、目的とする作用部位での薬理作用を減弱させるだけでなく、薬理作用の延長や薬剤の眼毒性とも関係した問題であると思われる。メラニン色素に結合した薬剤はメラニンから徐々に放出され、その効果が長期間におよぶ可能性があり、チモロールをはじめとして、 β -交感神経遮断剤の作用が延長することが指摘されている²⁰⁾²¹⁾。一方、フェノチアジン¹⁾やクロロキシン²⁾がメラニン色素を多量に含むぶどう膜に蓄積し、眼毒性を発揮することが知られている。また、眼組織のメラノサイトは自律神経の支配を受けており、特に交感神経支配はメラノサイト内でのメラニンの発生と維持に意義があると推測されており²²⁾、薬剤結合性との関連で、興味あるところである。

このように、メラニン色素は薬剤の薬理作用や副作用に密接にかかわる重要な因子のひとつと思われ、眼色素の多い日本人では、今後さらにこの方面での検討が必要であると思われる。

稿を終えるにあたり、調枝寛治教授のご校閲に深謝します。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) Potts AM: The concentration of phenothiazines in the eye of experimental animals. Invest Ophthalmol 1: 522-530, 1962.
- 2) Tjalve H, Nilson M, Larsson B: Studies on the binding of chlorpromazine and chloroquine to melanin in vivo. Biochem Pharmacol 30: 1845-1847, 1981.
- 3) Harris IS, Galin MA: Effect of ocular pigmentation on hypotensive response to pilocarpine. Am J Ophthalmol 72: 923-925, 1971.
- 4) Melikian HE, Lieberman TW, Leopold LH: Ocular pigmentation and pressure and outflow responses to pilocarpine and epinephrine. Am J Ophthalmol 72: 70-73, 1971.
- 5) Lyons JS, Krohn DL: Pilocarpine uptake by pigmented uveal tissue. Am J Ophthalmol 75: 885-888, 1973.
- 6) Potts AM: The reaction of uveal pigment in vitro with polycyclic compounds. Invest Ophthalmol 3: 405-416, 1964.
- 7) Hayasaka S, Makajima M, Mizuno K: Effects of pindolol, bethanecol and melanin treated with adrenergic beta-blocking agents on lysosomal enzymes in bovine ciliary body iris in vitro. Jpn J Ophthalmol 30: 185-191, 1986.
- 8) Atlasik B, Stepien K, Wilcozok T: Interaction of drugs with ocular melanin in vitro. Exp Eye Res 30: 325-331, 1980.
- 9) Tuchiya M, Hayasaka S, Mizuno K: Affinity of ocular acid-insoluble melanin for drugs in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 822-825, 1987.
- 10) 木内良明: β 作動薬。メラニン色素とグリセオール酸の眼圧下降作用。日眼会誌 94: 39-48, 1990.
- 11) Yamabayashi S, Gunarso W, Tsukahara S, et al: Incorporation of ³H-Bethanecol (Beta-blocking agent) into melanin granules of ocular tissues in the pigmented rabbits. Histochemistry 73: 371-375, 1981.
- 12) Urtili A, Salminen L: A comparison between iris-ciliary body concentration and receptor affinity of timolol. Acta Ophthalmol 63: 16-18, 1981.
- 13) Patil PN, Shimada K, Feller DR, et al: Accumulation of (-)-C-ephedrine by the pigmented and the nonpigmented iris. J Pharmacol Exp Ther 188: 342-352, 1974.
- 14) Salazer M, Shimada K, Patil P: Iris pigmentation and atropine mydriasis. J Pharmacol Exp Ther 197: 79-88, 1976.
- 15) Barbee RF, Smith JR: A comparative study of mydriatic and cycloplegic agents. In human subject without eye disease. Am J Ophthalmol 44: 617-622, 1957.
- 16) Emiru VP: Response to mydriatics in the African. Br J Ophthalmol 55: 538-543, 1971.
- 17) Ings RMJ: The melanin binding of drugs and its implications. Drug Metab Rev 15: 1183-1212, 1984.
- 18) Larsson B, Tjalve H: Studies on the mechanism drug-binding melanin. Biochem Pharmacol 28: 1181-1187, 1985.
- 19) Krystyna B, Wilcozok S and Wilcozok T: Studies of the mechanism of chloroquine bind-

ing to synthetic dopa-melanin. *Biochem Pharmacol* 31: 3359—3365, 1982.

- 20) 平松正直, 山下秀明: β -遮断剤局所投与後の毛様体の形態学的変化. その1, 結膜下注射. *日眼会誌* 86: 341—355, 1982.
- 21) 新家 真, 高瀬正弥, 坂井康雄, 他: β 遮断薬 Befunolol の緑内障治療応用に関する研究. 第1

報. Befunolol 点眼後, 白色および有色家兎に於ける眼内移行とその動態薬理的解析. *日眼会誌* 85: 426—434, 1981.

- 22) 杉田 新, 吉岡久春, 猪口哲夫: 上頸神経節切除の脈絡膜メラノサイトに及ぼす影響について. *日眼会誌* 88: 191—197, 1984.
-