ネコ摘出灌流眼球におけるcarteololの網膜電図に及ぼす影響

宮村 直孝，宇治 幸隆
三重大学医学部眼科学教室

要 約

暗順応下のネコ摘出灌流眼球における**carteolol**の**ERG b**波に及ぼす影響を検討した．**Carteolol**は杆体系の機能を反映する弱刺激でも，杆体系と錐体系の機能を反映する強刺激でも**ERG b**波振幅を可逆的に増大させた．その原因としては，1．網膜血管灌流量の増大，2．**ERG b**波発生にかかわる網膜内の受容体への直接作用が考えられ，**carteolol**のもつ内因性交感神経刺激作用および血管内皮由来平滑筋弛緩因子分泌促進作用の関与が示唆された．（日眼会誌 96：878—883，1992）

キーワード：カルテオロール，網膜電図，ネコ摘出灌流眼球，内因性交感神経刺激作用，
血管内皮由来平滑筋弛緩因子

Effects of Carteolol on Electroretinograms in Isolated Perfused Cat Eye

Naotaka Miyamura and Yukitaka Uji
Department of Ophthalmology, Mie University School of Medicine

Abstract

Effects of carteolol on ERG b-wave amplitude were investigated in dark adapted isolated perfused cat eyes. Carteolol enhanced ERG b-waves with both strong stimuli that reflect the function of both the rod and cone systems, and weak stimuli that reflect the function of the rod system. These observations suggest the following two ideas i.e.: 1. Carteolol increases the flow in retinal vessels of perfusate. or 2. Carteolol has interaction with retinal β-adrenergic receptors related to the origin of the ERG b-wave. It is likely that both participate in the intrinsic sympathomimetic activity and the release activity of the endothelium derived relaxing factor of carteolol. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 878—883, 1992)

Key words: Carteolol, Electroretinogram, Isolated perfused cat eye, Intrinsic sympathomimetic activity, Endothelium derived relaxing factor

I 緒 言

ネコ摘出灌流眼球は，網膜の機能を研究する上で，全身の影響を排除できるため，安定した条件を提供する．ネコ摘出灌流眼球を用いて研究した，アドレナリン作動薬および遮断薬の網膜機能に及ぼす影響については，多くの報告[1)~7)]があり，網膜にはアドレナリン作動性メカニズムが存在することが，示唆されている．

別刷請求先：514 津市江戸橋2—174 三重大学医学部眼科学教室 宮村 直孝
（平成3年12月27日受付，平成4年2月12日改訂受理）
Reprint requests to: Naotaka Miyamura, M.D. Department of Ophthalmology, Mie University School of Medicine. 2-174 Edobashi, Tsu 514, Japan
(Received December 27, 1991 and accepted in revised form February 12, 1992)

Gerberら[6][7]は，β遮断薬であるpropranolol，timolol，およびβ2遮断薬であるICI-118.551を用いて，網膜電図（以下ERG）に及ぼす影響を調べ，脂溶性の大きいpropranololとICI-118.551は杆体系b波振幅を増大させ，錐体系b波振幅を減少させるが，脂溶性の小さいtimololはどちらにも影響を与えないことから，この違いはtimololは網膜血管柵を通過しないからだろうと推論している．今回，筆者らはtimololより脂溶性が若干小さいが，内因性交感神経刺激作用[8]や，血管内皮由来平滑筋弛緩因子分泌促進作用[9]をもちβ遮断薬でありながら網膜血流量を増加させるという報告[10][11]があって緑内障研究領域で注目されているcarteololを用い，ERGに及ぼす影響を調べた結果，若干の知見を得たので報告する．

II　実験方法

方法はNiemeyerらのもの[12)~15)]に準じて，当教室の灌流システムを作成した．

1．実験動物および眼球摘出

体重3.1～4.3 kgの成熟ネコ4匹5眼を使用した．ネコを塩酸ケタミン（ケタラール®）40 mg/kg筋注およびペントバルビタールナトリウム（ネンブタール®）30 mg/kg筋注にて全身麻酔した．瞳孔は1％アトロピン点眼にて散瞳させた．肘静脈よりリンゲル液を点滴し，ヘパリン静注用および出血時の補液用のルートとした．眼球摘出は低照明の赤色光のもとで以下のように行った．まず外角切開し，眼窩外壁骨を一部除去後，結膜全周切開を行い，外眼筋を切断し，視神経をできるだけ長く眼球に付けて（12～15 mm）切断した．摘出直前にはヘパリン（1,500 IU/kg）を静注し，血管内凝固をおこりにくくした．1眼摘出後は，ヘパリン拮抗薬硫酸プロタミン10 mg/kgを静注し，塩酸ケタミンを1時間毎に10 mg/kg筋注した．1眼の実験終了後，もう1眼を同様の方法で摘出した．

摘出した眼球は，手術顕微鏡下に，約15分以内で，先細りのポリエチレンカニューレにophthalmociliary arteryを接続し，灌流を開始した．その直後に，検眼鏡にて網膜動脈内を灌流液とともに血液が流れ去るのを確認した．顕微鏡下で見て側副血行路などからのleakageがあれば焼灼閉鎖した．また，眼内の抵抗が高くなりすぎないように，1つの渦静脈を開放した．

2．灌流液および灌流システム

組織培養液medium 199（10×，with Earle's salts）135 ml，HEPES buffer（20 mM）27 ml，L-glutamine（20 mM）4.6 ml，gentamicin（40 mg）1 ml，new born calf serum 540 ml，蒸留水1,188 mlから成る灌流液を，孔径0.45 μmのmembrane filter（HAWP 04700，ミリポア）で濾過し，100％酸素を通じ飽和させ，室温でpH 7.5となるように1N NaOHまたは1N HClにて調整した．灌流液は，静水圧にて送り込まれ，灌流量はflow meterで計測しながら調節し（1～2 ml/min），さらに，恒温槽の中のチューブを通して37℃になるように設定した（図1）．

3．刺激装置および記録方法

刺激光は500 W xenon光源（UXL 500 D-0）から620 nmの干渉フィルターを通して単色光刺激とし，ファイバーオプティクスによって角膜上に導いた．角膜面上でのエネルギーは0.71 W/m²で，これを0.0 log unitとした．電極は，銀塩化銀電極を使用し，関電極を角膜上に，不関電極を後極部強膜上に，接地電極はチャンバー内に置いた．網膜電位は，交流増幅器（AB 610 G，日本光電）を介してレクチコーダ（RJG-4124，日本光電）およびオシログラフ（2230，ソニーテクトロニクス）にて記録した．

4．順応および刺激光の強度，刺激時間，間隔

1時間以上，暗順応下で灌流し，ピーク波長が620 nmの単色光刺激を刺激時間20 msecで，−2 log unitの刺激光として30秒毎に与えながら，ERGが安定するのを待った．

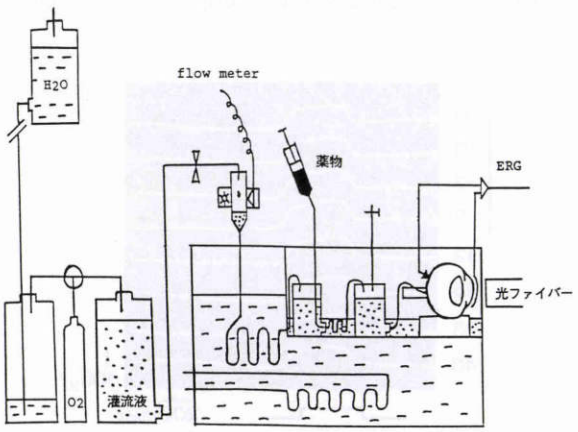

図1　灌流システム．
灌流液は静水圧（160 cmH_2O）で送り込まれ，flow meterで流量が測定される．眼球直前の2つの小瓶は途中で生じた気泡が眼球内に入らないようにするためのものである．また薬物はこの小瓶の位置で投与される．大きな水槽は恒温槽で37℃に設定されている．

弱刺激としてピーク波長620 nm単色光，刺激時間400 msecを用い，400 nm刺激において得られた波形と同様の波形が得られるようにNDフィルターを調整してrod matchとした．強刺激として強さ0 log unitで，刺激光自体による杆体色素の褪色を少なくするため刺激時間20 msecを用い，刺激間隔は両者とも30秒に設定した．

5. Carteololの投与法

薬物は，灌流液の1分間あたりの流量から計算して，最終的に目的の濃度となって眼球内に送り込まれるように，syringe pumpにて眼球に入る前の小瓶の位置で（図1）投与した．Carteolol 5～923 μMを10～16分間投与し，ERGに対する影響を観察後，60分間以上待って，薬物が完全にwash outされ，b波振幅がもとの大きさに戻ってから，次のseriesを開始した．

III 結　果

1. 弱刺激に対するb波の反応

図2にcarteolol 57 μMを10分間投与しながら，弱刺激を与えた時のERG波形を示す．b波振幅は投与開始後12分でcontrolの116%に増大し，40分で元の大きさに戻った．図3は，弱刺激の，carteolol投与によるb波振幅の時間経過である．最高で約120%への増大がみられた．いずれの濃度においてもb波頂点潜時に変化はみられなかった．

2. 強刺激に対するb波の反応

図4にcarteolol 170 μMを16分間投与しながら，

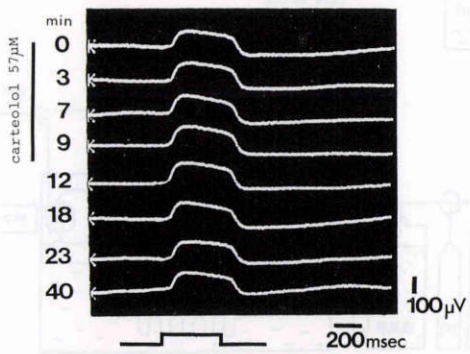

図2　Carteolol 57 μMを10分間投与しながら，弱刺激を与えた時のERG波形の変化．
投与中b波振幅は徐々に増大し，12分でcontrolの116%に達した．その後徐々に減少し40分で元の大きさに戻った．刺激光強度－2 log unit，刺激時間400 msec，620 nm単色光刺激．

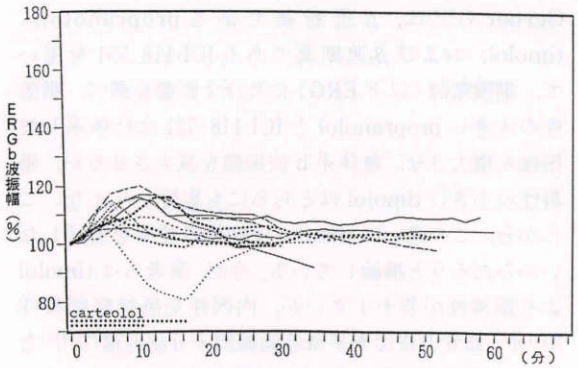

図3　弱刺激によるb波振幅の時間経過．
投与前のb波振幅を100%としてb波振幅を%で表した．Carteolol投与によりb波振幅は増大し，再び元の大きさに戻る傾向にあった．b波振幅が減少しているものは595 μMと高濃度を投与したものである．

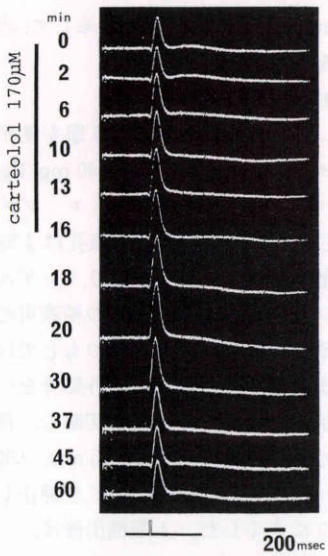

図4　Carteolol 170 μMを16分間投与しながら，強刺激を与えた時のERG波形の変化．
b波振幅は投与開始後20分で160%に増大し60分で元の大きさに戻った．刺激光強度0 log unit，刺激時間20 msec，620 nm単色光刺激．

強刺激を与えた時のERG波形を示す．b波振幅は投与開始後20分でcontrolの160%に増大し，60分で元の大きさに戻った．b波の頂点潜時には影響はみられなかった．図5は，強刺激の，carteolol投与によるb波振幅の時間経過である．強刺激のほうが弱刺激に比して増加率は大きく，最高で約175%への増大がみられた．

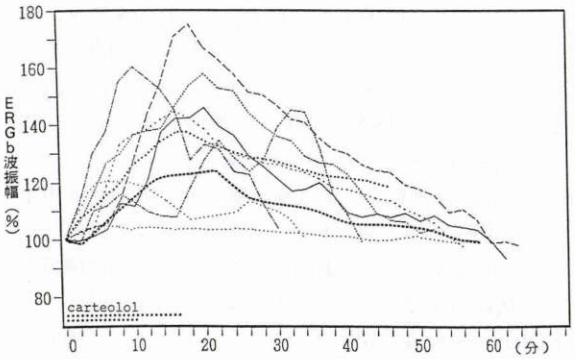

図5　強刺激によるb波振幅の時間経過.
図3と同様に投与前のb波振幅を100%とした. Carteolol投与により最高で175%への増加が見られた.

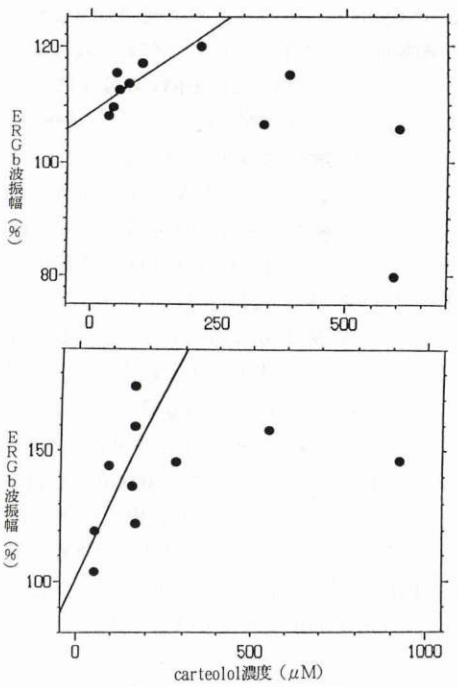

図6　Carteololの濃度とb波振幅比との関係.
Carteolol投与前のb波振幅を100%として最も変化した値の比を縦軸に示す. 上が弱刺激. 下が強刺激のものである. 図内の直線は250 μM以下における回帰直線（弱刺激：y=0.06x+108.9, 強刺激：y=0.288x+102.2）. 250 μM以下での相関係数は, 弱刺激：0.849（p<0.05）. 強刺激：0.650.

3. 濃度と増加率の関係

Carteololの濃度とb波振幅増加率の関係を図6に示した. 上が弱刺激の, 下が強刺激のものである. 図

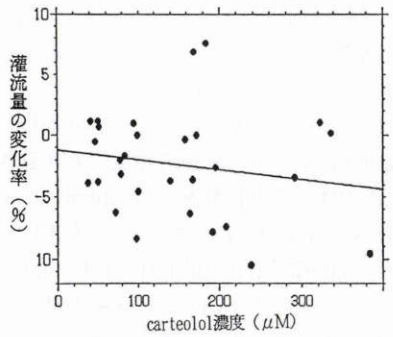

図7　Carteololの濃度と灌流液の流量の変化.
Carteolol投与前の流量に対し, 最も変化した値の比を縦軸に示す. Carteolol濃度と流量の変化との間には有意な相関関係はなかった.

内の直線は250 μM以下における回帰直線を示す. 250 μM以下での相関係数rは, 弱刺激では0.849でt検定によれば有意な正の相関を示した（n=7, p<0.05）が, 強刺激ではr=0.650で有意な相関はなかったが濃度依存の傾向はみられた.

4. Carteololの灌流液の流量に対する影響

灌流液は静水圧でカニューレから動脈内に送り込まれるため, 眼球側の抵抗の変化によって増減する流量を流量計で記録することができる. 図7はcarteololの濃度と灌流液の流量の変化を表したものであるが, 濃度と流量の変化の間には有意な相関関係はなく, むしろ, 灌流量が減少しているもののほうが多かった.

IV　考　　按

Niemeyerら[1)~5)]は, ネコ摘出灌流眼球で, β刺激薬であるnylidrinのERGに及ぼす影響を検討し, 暗順応・明順応ともにERGb波振幅を増大させることを報告し, 網膜内層にβ受容体が存在することを示唆した. 一方, Gerberら[6)7)]は, 脂溶性の大きいβ遮断薬であるpropranololやICI 118.551はb波振幅を可逆性に, 暗順応では増大させ, 明順応では減弱させたが, このことも, βアドレナリン作動性メカニズムの存在を示すものであると述べている. しかし, その機序については, 明確な説明はなされていない. さらにtimololは, 暗順応下でも明順応下でも, b波振幅に影響を与えなかったことから, これはtimololが, その小さい脂溶性故に網膜血管柵を通過しないからではないかと推論している. 今回, 我々が使用したcarteololの脂溶性はtimololより若干小さい（20℃でn-octanolとph7の緩衝液との間の分配係数はcarteololは

0.214[16], timolol は 0.28[17],). したがって, carteolol はさらに網膜血管柵を通過しにくいことが予想されるが, 本実験では, ネコ摘出灌流眼球において, carteolol が ERG b 波に強い影響を与えることを示した. しかし, carteolol は最近緑内障研究領域でも注目されているように内因性交感神経刺激作用 (intrinsic sympathomimetic activity : ISA)[8]および血管内皮由来平滑筋弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor : EDRF) 分泌促進作用[9]があり, 本実験の結果にこれらの因子が関与したことも充分考えられるので, 以下の如く考察を加えた.

本実験では carteolol は杆体系の機能を反映する弱刺激でも, 杆体系と錐体系の両者の機能を反映する強刺激でも, ERG b 波振幅は増大した. したがって, carteolol の b 波振幅に及ぼす影響は, propranolol 等の β 遮断薬の作用よりも, β 刺激薬の作用に似ている. この実験では ERG b 波が増大する因子としては次の 2 つが考えられる.

1. 網膜血管灌流量の増大
2. ERG b 波発生にかかわる網膜内の受容体への直接作用

Carteolol は ISA による β 刺激作用と EDRF 分泌促進作用をもつので, 内服で網膜血管が拡張したという報告[10]や, 点眼でも眼脈流量を増大させたという報告[11]がある. 本実験では carteolol 投与により, 灌流量の増大はみられず, むしろ減少しているものの方が多く, 上記の報告とは相反する結果であった. しかし, Alm ら[18]の microsphere による測定ではネコの脈絡膜血流量は 734 mg/min, 毛様体は 262 mg/min, 虹彩は 60 mg/min であり, それに対し網膜は 15 mg/min と非常に少ないと述べており, 実際には網膜の灌流量が増加していたとしても全体の 2 %にすぎないので, 我々が測定した網膜や脈絡膜, 毛様体など全ての脈管の流量を示す値には反映されていなかった可能性がある.

網膜血管の交感神経支配については, Ferrari-Dileo[19]はウシ網膜血管には α 受容体も β 受容体も存在すると報告し, Hoste ら[20]は, 網膜血管には機能的な β 受容体はないと述べていて結論は出ていない. 一方, 脈絡膜血流は交感神経刺激によって減少し (家兎 : 水素クリアランス法[21], ネコ : microsphere 法[22][23]), 脈絡膜血管は α 受容体優位であるといわれており[22], 網膜血流と脈絡膜血流は β 遮断薬に対して異なる反応を示すことも考えられる.

したがって, ERG b 波の増大は, 全体の灌流量の増加を示さなかったものの網膜血管が拡張し網膜灌流量の増加したための変化である可能性はある. なぜなら, β 遮断薬のもつ ISA の効果は安静時や睡眠中の交感神経亢進がほとんどない場合に最もよくみられる[24]というから, 除神経してある摘出眼球では β 遮断作用よりも, ISA が強くあらわれ, 血管は拡張するかもしれないからである. もし Hoste ら[20]がいうように網膜血管に機能的な β 受容体がないとしても carteolol には EDRF 分泌促進作用があるので, これによって網膜血流を増し, b 波振幅を増大させている可能性はあり得る.

一方, Niemeyer ら[1)~5)]は, ネコ摘出灌流眼球で β 刺激薬が ERG b 波振幅を増大させた原因として, digital image analysis によれば, β 刺激薬の末梢血管拡張作用が, 網膜血管には認められず, 有意の灌流量の変化をきたさなかったため, この ERG の変化は血流増加ではなく, β 刺激薬が情報伝達にかかわる網膜内 β 受容体を介して生じさせたものであることを示唆すると述べている. したがって, 本実験における b 波増大の原因はこの β 受容体に何らかの影響が及んだ結果とも考えられる. ヒトで carteolol 20 mg 内服後の最高血中濃度は 0.09~0.25 μM である[25]. β 遮断作用を期待して投与する常用量はさらに少なく 1 回 5 ~15 mg, 1 日 2 ~ 3 回に分割して内服投与する. 今回 b 波振幅に影響を与えたのは, 約 50 μM 以上であり, 用量としてはかなり大きい. それ以下の用量では ERG に影響を及ぼさなかった. これは, carteolol の脂溶性が小さいため, 低濃度では網膜血管柵を通過できず, ERG に影響を及ぼさないが, 高濃度では網膜血管柵を通過し, ERG b 波発生にかかわる網膜内層の β 受容体に対して, carteolol の持つ ISA が発現したためとも推察できる.

Carteolol の網膜血管に及ぼす影響についてはまだ充分解明されていない今日, 本実験の結果からは上に述べた 2 つの因子がいずれかが作用したと考えられる. Propranolol に関して細動脈のレベルで網膜血管を拡張させ, これはカルシウム拮抗作用があるからではないかという報告[20]があるが, 今後 carteolol についても同様の研究が発展することが期待される.

文 献

1) **Niemeyer G, Cottier D, Resch H**: Effects of buphenine (nylidrin) on the perfused mammalian eye. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol

225 : 33—38, 1987.

2) **Niemeyer G, Cottier D, Gerber U** : Effects of β-agonists on b- and c-waves implicit for adrenergic mechanisms in cat retina. Doc Ophthalmol 66 : 373—381, 1987.

3) **Gerber U, Niemeyer G** : Die Wirkung von Clenbuterol, einem β_2-adrenergen Agonisten, im perfundierten Katzenauge. Klin Mbl Augenheilk 190 : 238—240, 1987.

4) **Cottier D, Niemeyer G, Resch H** : Einfluss von Buphenin auf die Retina des isolierten Saugetierauges. Klin Mbl Augenheilk 188 : 532—536, 1986.

5) **Uji Y, Niemeyer G, Gerber U** : The effects of β-adrenergic agonists on cone systems in the cat eye. Doc Ophthalmol 70 : 77—87, 1988.

6) **Gerber U, Niemeyer G** : β-adrenergic antagonists modify retinal function in the perfused cat eye. Clin Vis Sci 3 : 255—266, 1988.

7) **Niemeyer G, Gerber U, Uji Y** : Wirkung von β-Blockern auf die Netzhautfunktion in vitro. Klin Mbl Augenhlk 192 : 391—394, 1988.

8) **Yabuuchi Y, Kinoshita D** : Cardiovascular studies of 5-(3-tert-butylamino-2-hydroroxy) propoxy-3,4-dihydrocarbostyril hydrochloride (OPC-1085), a new potent β-adrenergic blocking agent. Jpn J Pharmacol 24 : 853—861, 1974.

9) **Janczewski P, Boulanger C, Iqbal A,** et al : Endothelium-dependent effects of carteolol. J Pharmacol Exp Ther 247 : 590—595, 1988.

10) **図師郁子, 土坂寿行, 金　恵媛,** 他：カルテオロールの網膜血管におよぼす影響. 日眼会誌　95(抄録) : 315, 1991.

11) **山崎　斉, 馬場裕行, 所　敬**：チモロール及びカルテオロール点眼による眼脈流量の変化について. 日眼会誌　95(抄録) : 266, 1991.

12) **Niemeyer G** : The function of the retina in the perfused eye. Doc Ophthalmol 39 : 53—116, 1975.

13) **Niemeyer G** : Neurobiology of perfused mammalian eyes. J Neurosci Methods 3 : 317—337, 1981.

14) **Dawis SM, Hofmann H, Niemeyer G** : The electroretinogram, standing potential, and light peak of the in vivo cat eye during acid-base changes. Vision Res 25 : 1163—1177, 1985.

15) **宇治幸隆, Niemeyer G** : Perfused eye を用いた電気生理学的研究について. 安達恵美子 編：眼科 Mook　41　視覚電気生理, 最近の知識. 東京, 金原出版, 30—49, 1989.

16) **木戸　勝, 森　英雄, 森田園光,** 他：5-(3-tert-butylamino-2-hydroxy) propoxy-3,4-dihydrocarbostyril hydrochloride (OPC-1085) の構造ならびに安定性について. 基礎と臨床　8 : 700—711, 1974.

17) **Woods PB, Robinson ML** : An investigation of the comparative liposolubilities of β-adrenoceptor blocking agents. J Pharm Pharmacol 33 : 172—173, 1981.

18) **Alm A, Bill A** : The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. Acta Physiol Scand 84 : 306—319, 1972.

19) **Ferrari-Dileo G** : $Beta_1$ and $beta_2$ adrenergic binding sites in bovine retina and retinal blood vessels. Invest Ophthalmol Vis Sci 29 : 695—699, 1988.

20) **Hoste AM, Boels PJ, Andries LJ,** et al : Effects of beta-antagonists on contraction of bovine retinal microarteries in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 1231—1237, 1990.

21) **政岡史子**：交感神経の脈絡膜循環に及ぼす影響. 第1報. 上頸交感神経節切断および刺激効果の水素クリアランス法による検討. 眼紀　37 : 140—146, 1986.

22) **Bill A** : Autonomic nervous control of uveal blood flow. Acta Physiol Scand 56 : 70—81, 1962.

23) **Weiter JJ, Schachar RA, Ernest JT** : Control of intraocular blood flow. II. Effects of sympathetic tone. Invest Ophthalmol 12 : 332—334, 1973.

24) **Taylor SH** : Intrinsic sympathomimetic activity : Clinical fact or fiction? Am J Cardiol 52 : 16D—26D, 1983.

25) **Ishizaki T, Ohnishi A, Sasaki T,** et al : Pharmacokinetics and absolute bioavailability of carteolol, a new β-adrenergic receptor blocking agent. Eur J Clin Pharmacol 25 : 95—101, 1983.