

外因性プロスタグランジン E₂ の眼炎症様反応に対する カルシウム拮抗剤の影響

鍛冶 兆宏, 開 繁義, 平田 秀樹

富山医科薬科大学医学部眼科学教室

要 約

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) によって引き起こされる前眼部炎症様反応に対して, カルシウム拮抗剤 (Ca 拮抗剤) がどのような挙動を示すか有色家兎を用いて検討した。PGE₂ はガラス円筒を用いて経角膜的に投与し, 3 種の Ca 拮抗剤 (ニカルジピン, ベラパミル, ジルチアゼム) は, 1 回量を 125~1,000 μg/kg で耳静脈から全身投与した。PGE₂ 投与の 30 分前または直前に単回投与, PGE₂ 投与の直前および 30 分後に 2 回投与した。前房内フレアを PGE₂ 投与後 6 時間, 眼圧を 1 時間まで測定し

た。PGE₂ 投与によってフレアの上昇が一峰性で, 数時間で初期値に戻り, 初期に一過性の眼圧上昇を示すが, 特にニカルジピンでこの炎症様反応を有意に抑制した。この結果から, Ca 拮抗剤は PGE₂ が関与する前眼部炎症を抑制する可能性が示唆された。(日眼会誌 98: 825-831, 1994)

キーワード: カルシウム拮抗剤, ニカルジピン, プロスタグランジン E₂, 前房内フレア, 眼圧

The Effects of Calcium Antagonists on Prostaglandin E₂ Reaction in Rabbit Eyes

Yoshihiro Kaji, Shigeyoshi Hiraki and Hideki Hirata

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Abstract

We determined the effects of calcium antagonism (CAs) on prostaglandin E₂ (PGE₂) induced responses in the anterior ocular segment. PGE₂ was administered to pigmented rabbit eyes with a glass cylinder attached to the corneal surface. CAs (nicardipine, verapamil, diltiazem: 125~1,000 μg/kg) were injected intravenously either once (30 min. before or at the same time as the PGE₂ administration), or twice (at the same time as the PGE₂ administration and 30 min. after). We evaluated the aqueous flare (AF) for 6 hours using a laser flare cell meter and intraocular pressure (IOP). A single peak rise of AF was observed about 1 hour after the PGE₂ administration and

a transient elevation of IOP 15~30 min. after. Intravenously injected CAs reduced these responses. Nicardipine (500~1,000 μg/kg) in particular significantly suppressed both the rise of AF and the IOP elevation. These results suggest that CAs suppress ocular inflammatory responses induced by PGE₂ effectively. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 825-831, 1994)

Key words: Calcium antagonists, Nicardipine, Prostaglandin E₂, The aqueous flare, Intraocular pressure

I 緒 言

プロスタグランジンは, 生体のホメオスタシスの維持に関わるオータコイドの 1 つで, 細胞外からの刺激に応じて遊離し, 様々な臓器で多彩な薬理作用を発揮する。眼内の炎症にもプロスタグランジンの関与が知られているが, 特に, プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は実験的に

は家兎眼への点眼による一過性の眼圧上昇および房水蛋白濃度上昇の報告^{1)~3)}がみられ, 我々も角膜円筒法での経角膜的投与によって, 前房内フレアの上昇が一峰性の反応を示し, また, 初期には一過性の眼圧上昇を示すことを確かめている。

カルシウム拮抗剤 (Ca 拮抗剤) は, 細胞外の Ca²⁺ の細胞内への流入を阻害するとともに, 細胞内においては筋

別刷請求先: 930-01 富山県富山市杉谷 2630 富山医科薬科大学医学部眼科学教室 鍛冶 兆宏
(平成6年3月1日受付, 平成6年5月11日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihiro Kaji, M.D. Department of Ophthalmology, of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University. 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama-ken 930-01, Japan

(Received March 1, 1994 and accepted in revised form May 11, 1994)

小胞体などの貯蔵Ca細胞質内への遊離を阻害することにより、細胞質内の遊離Ca²⁺の増加を抑制すると考えられ、この薬理作用に基づいて臨床的には降圧剤、抗不整脈剤、末梢循環改善剤として広く利用され、眼科領域でも、脈絡膜循環に及ぼす影響⁴⁾、正常眼圧緑内障などへの利用に関する報告⁵⁾、Ca拮抗剤の眼圧、房水動態への影響⁶⁾に関する報告などがみられる。

また、アラキドン酸遊離はCa²⁺動員を生じる刺激に呼応して起こり⁷⁾、実験的にマウスの腹腔内から単離したマクロファージを用いて nifedipine, nisoldipine のホスホリパーゼA₂阻害作用を調べた報告⁸⁾もみられるが、眼科領域ではアラキドン酸カスケード、炎症反応に対してCa拮抗剤がどのような挙動を示すか言及した報告は、調べた限りでは見当たらない。今回、外因性に投与したPGE₂による眼反応に対して、Ca拮抗剤がどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、本実験を行った。

II 実験方法

PGE₂は、既報⁹⁾¹⁰⁾に従い、ガラス円筒を用いて4分間接触させる角膜円筒法で経角膜的に投与し、Ca拮抗剤はPGE₂投与の30分前、直前、30分後のいずれかの時点で耳静脈から全身投与した。

1. 実験動物

成熟雄日本有色家兎(体重2.0~3.0 kg) 50匹を用いた。

2. 使用薬剤

PGE₂(フナコシ株式会社製)は、エタノールを5%含有する生理的食塩水溶液に溶解し、25または50 μg/mlの濃度で使用した。

今回用いたCa拮抗剤は3種類で、ジヒドロピリジン系のニカルジピンはペルジピン®注射液(山之内製薬株式会社)を用い、1回量を125, 250, 500, 1,000 μg/kgで単回または2回の静注を行った。フェニルアルキルアミン系のベラパミルはワソラン®注(エーザイ株式会社)を、ベンゾジアゼピン系のジルチアゼムはヘルベッサ®注射液(田辺製薬株式会社)を用い、500, 1,000 μg/kgを2回静注した。

3. 測定

1) フレア

PGE₂の前房内炎症様反応は、レーザーフレアセルメーター(興和株式会社製, FC-1000)で経時的にPGE₂投与後6時間までフレア測定を行った。

2) 眼圧

非接触型眼圧計(甲南キラー社製, Pulsair)でPGE₂投与後1時間まで測定した。

3) 瞳孔径

PGE₂投与前後でHaab瞳孔計を用い、500ルクスの照度の下で測定した。

4) 房水成分

房水成分の分析は、PGE₂投与の30分間にニカルジピンを1,000 μg/kgを単回投与した一定時間後に29 G針で採取した房水について既報¹¹⁾に従い、アスコルビン酸、グルタチオンを指標に高速液体クロマトグラフィ法(HPLC法)を用いて行った。

4. 実験内容

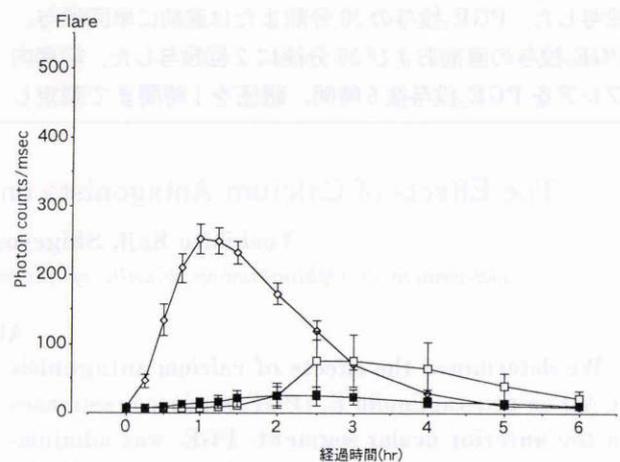
実験1:ニカルジピンにおける投与時期の比較実験

PGE₂投与の30分前または直前で、ニカルジピンを500または1,000 μg/kgで単回投与した。

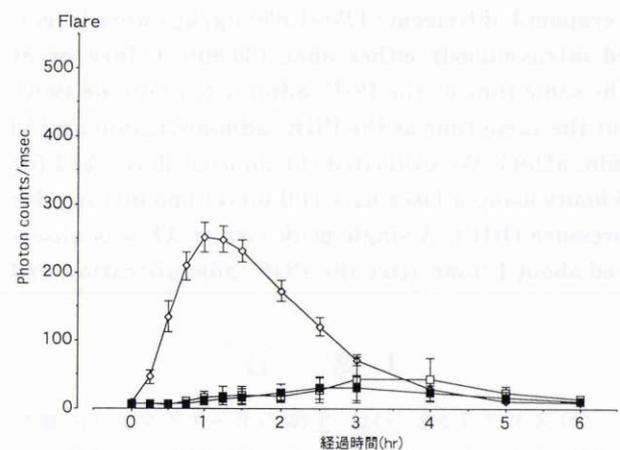
実験2:ニカルジピンのdose-responseに関する実験

PGE₂投与の直前、30分後で、ニカルジピンを1回量: 125, 250, 500, 1,000 μg/kgで、2回投与した。

実験3:PGE₂眼反応の抑制における3種のCa拮抗剤の比較実験



(a) PGE₂濃度: 25 μg/ml



(b) PGE₂濃度: 25 μg/ml

図1 ニカルジピン単回投与に対するプロスタグランジンE₂(PGE₂) 25 μg/ml投与後のフレア値の経時変化。

(a) ニカルジピン500 μg/kg投与, (b) ニカルジピン1,000 μg/kg投与, 菱形: PGE₂投与のみ, 白四角: 500, 1,000 (直前): PGE₂投与直前にニカルジピン500, 1,000 μg/kg投与, 黒四角: 500, 1,000 (30分前): PGE₂投与30分前にニカルジピン500, 1,000 μg/kg投与, n=6, 平均値±標準誤差。

PGE₂投与の直前, 30分後で, ニカルジピン, ベラパミル, ジルチアゼムをそれぞれについて1回量を500および1,000 μg/kgで, 2回投与した.

III 実験結果

1. フレアについて

PGE₂投与によるフレアの経時変化は約1時間後でピークとなり, 数時間で初期値に戻る一峰性の反応を示し, Ca拮抗剤を投与することにより, フレアの上昇は抑制された.

実験1: 25 μg/mlのPGE₂投与群では, 投与後2時間まではほぼ完全な反応の抑制がみられ, その後わずかなフレア上昇を認めた(図1a, b). 50 μg/mlのPGE₂投与群では, 25 μg/mlのPGE₂投与群より高いフレア値を示しているが, 反応曲線下の面積比から算出した抑制率は68~88%を示した(図2a, b). また, 500 μg/kgのニカルジピン投与例では, 2群の投与時間のずれが反応曲線の立ち上がりのずれとほぼ一致した(図1a, 2a)

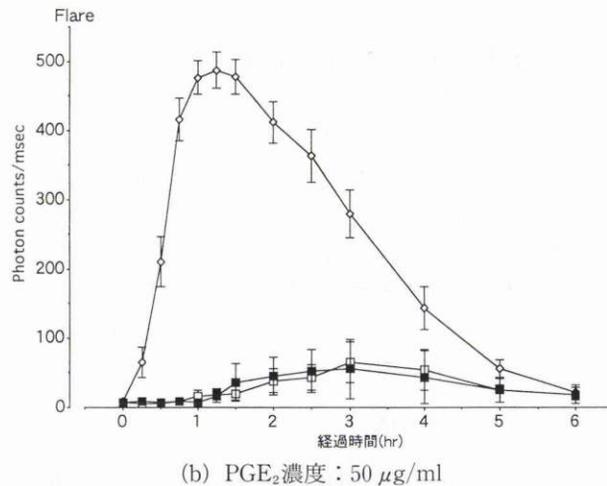
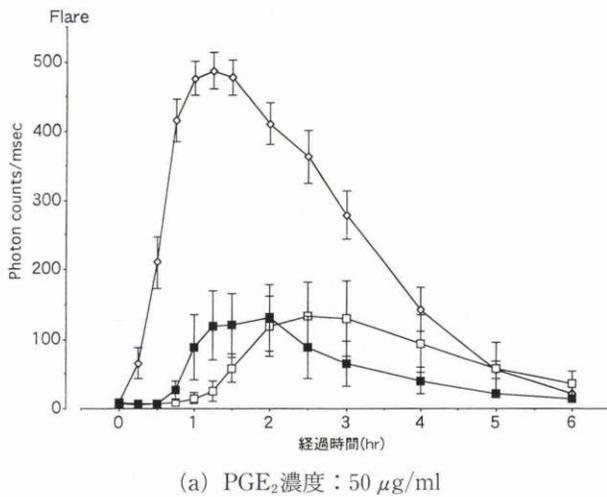


図2 ニカルジピン単回投与に対するPGE₂ 50 μg/ml投与後のフレア値の経時変化. (a) ニカルジピン500 μg/kg投与, (b) ニカルジピン1,000 μg/kg投与記号は, 図1と同じ.

実験2: 25 μg/mlのPGE₂投与群では, ニカルジピン125 μg/kg投与例で若干のフレア上昇を認めたが, 他はほぼ完全な抑制を認めた(図3a). 50 μg/mlのPGE₂投与群は, 25 μg/mlのPGE₂投与群に比較してフレアの上昇がみられるものの, かなり強い抑制を認め, 抑制はニカルジピンの用量に依存した(図3b).

実験3: ベラパミル, ジルチアゼムは, 小用量では十分な抑制を示さなかったため, 1回量を500および1,000 μg/kgとして比較した. 抑制作用の強さは, ニカルジピン>ベラパミル>ジルチアゼムの順でニカルジピンでは強い抑制を認めたが, ジルチアゼムではほとんど認めなかった(図4, 5).

2. 眼圧について(図6)

今回の眼圧測定はmanometryを使用したcalibra-

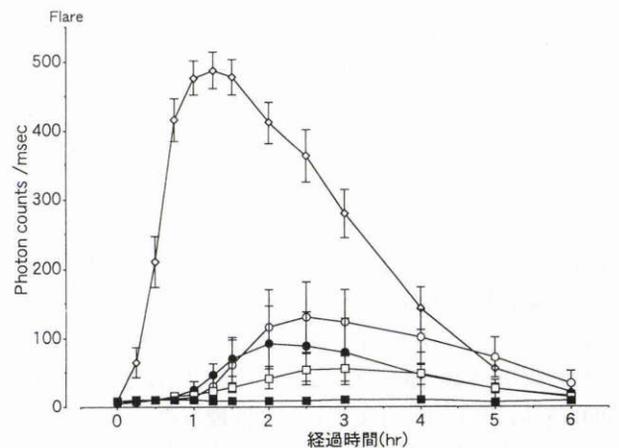
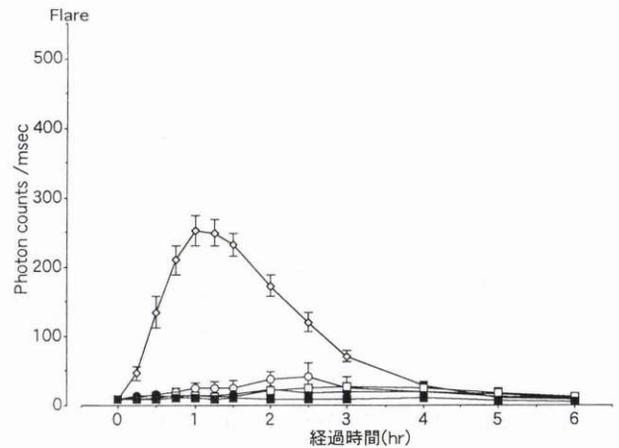


図3 ニカルジピン2回投与に対するPGE₂投与後のフレア値の経時変化.

ニカルジピンはPGE₂投与直前, 30分後に静注. (a) PGE₂濃度: 25 μg/ml, (b) PGE₂濃度: 50 μg/ml, 菱形: PGE₂投与のみ, 白丸: ニカルジピン1回投与量125 μg/kg, 黒丸: ニカルジピン1回投与量250 μg/kg, 白四角: ニカルジピン1回投与量500 μg/kg, 黒四角: ニカルジピン1回投与量1,000 μg/kg, n=6, 平均値±標準誤差

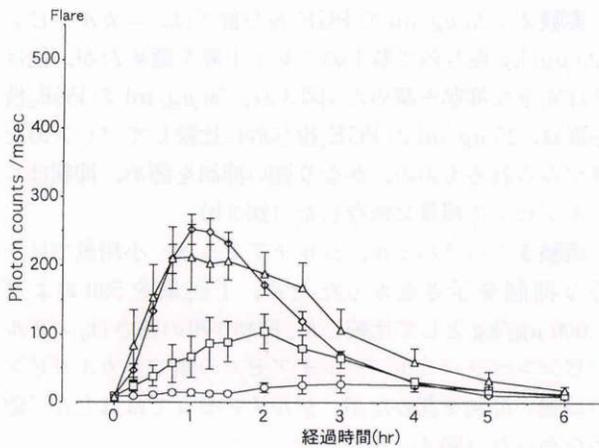
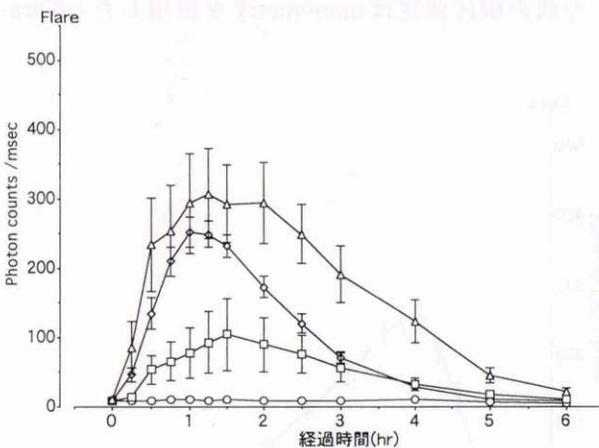
(a) PGE₂濃度：25 µg/ml(b) PGE₂濃度：25 µg/ml

図4 3種のカルシウム拮抗剤 (Ca拮抗剤) 投与に対する PGE₂ 25 µg/ml 投与後のフレア値の経時変化。

Ca拮抗剤は PGE₂投与直前、30分後に静注
(a) 3種のCa拮抗剤1回投与量 500 µg/kg, (b) 3種のCa拮抗剤1回投与量 1,000 µg/kg 投与, 菱形: PGE₂投与のみ, 丸: ニカルジピン, 四角: ベラパミル, 三角: ジルチアゼム, n=6, 平均値±標準誤差

tion をしておらず, Δ intraocular pressure (IOP) は相対的な変化値である。

PGE₂投与後の眼圧のピーク値と処置前値との差, すなわち眼圧の変化量は 25 µg/ml の PGE₂投与群のうち, 500 µg/kg 以上のニカルジピン 2回投与例, ベラパミルの各投与例で眼圧変化量は有意に減少した。また, 50 µg/ml の PGE₂投与群では, ニカルジピンの直前単回投与を除く投与群, ベラパミルの各投与例で眼圧変化量は有意に減少した。なお, 有意差検定は, Dunn's Procedure for Comparing a Control to All other Means で行った。

3. 瞳孔径について (図7)

PGE₂投与後の縮瞳に関して, 本実験では PGE₂単回投与群と各 Ca拮抗剤投与群との間に有意差を認めなかった。

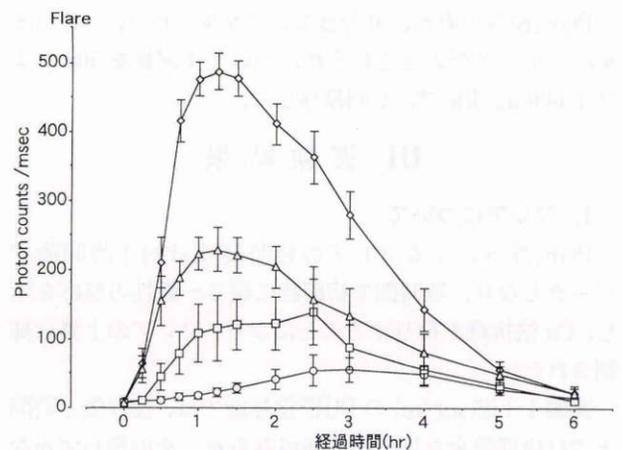
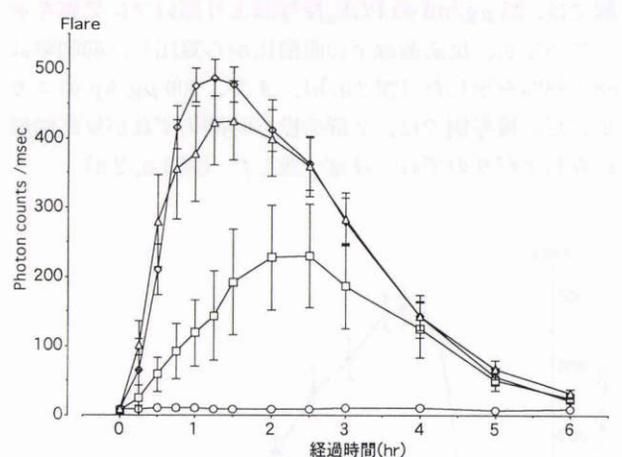
(a) PGE₂濃度：50 µg/ml(b) PGE₂濃度：50 µg/ml

図5 3種のCa拮抗剤投与に対する PGE₂ 50 µg/ml 投与後のフレア値の経時変化。

Ca拮抗剤は PGE₂投与直前、30分後に静注
(a) 3種のCa拮抗剤1回投与量 500 µg/kg, (b) 3種のCa拮抗剤1回投与量 1,000 µg/kg 投与, 菱形: PGE₂投与のみ, 丸: ニカルジピン, 四角: ベラパミル, 三角: ジルチアゼム, n=6, 平均値±標準偏差

4. 房水成分の濃度変化について (図8)

50 µg/ml の PGE₂投与 30分前にニカルジピン 1,000 µg/kg を単回投与し, PGE₂投与後 1~2時間で房水を採取し, アスコルビン酸, グルタチオンを測定し, 各々の処置前値と比較した。

PGE₂のみの投与群では, フレアの上昇に伴ってアスコルビン酸, グルタチオンは減少したが, ニカルジピン投与群の1時間後ではフレアの上昇はみられず, 各成分とも変化はほとんどみられなかった。

IV 考 按

今回, Ca拮抗剤は, WHO 専門委員会によって機能的に分類される 6種類のうち, 3種類の selective slow Ca²⁺ channel blockers, nifedipine-like: ニカルジピン, verapamil-like: ベラパミル, diltiazem-like: ジルチア

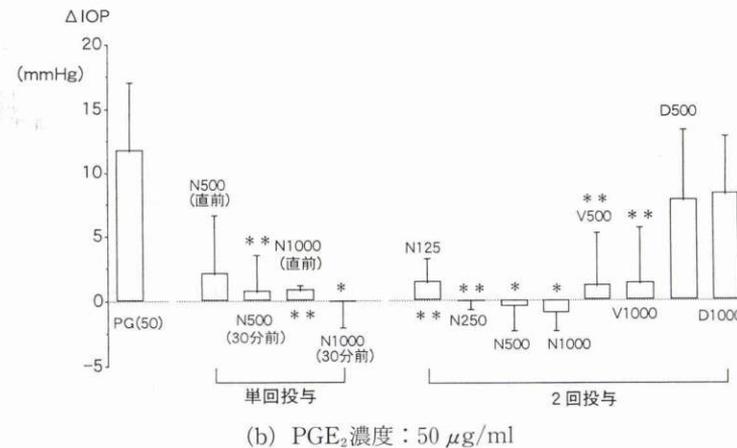
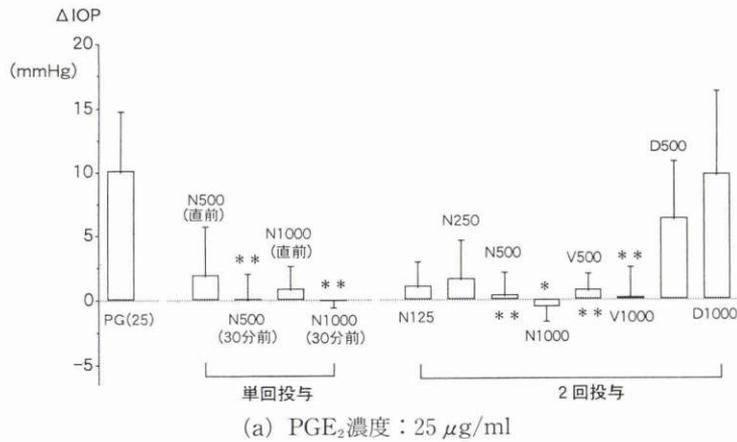


図6 眼圧変化量。

(a) PGE₂濃度：25 μg/ml, (b) PGE₂濃度：50 μg/ml, ΔIOP = (PGE₂投与後の最高眼圧) - (処置前置), N：ニカルジピン, V：ベラパミル, D：ジルチアゼム, 数字はCa拮抗剤の1回投与量. n=6, 平均値±標準偏差, * : p<0.01, ** : p<0.05.

ゼムを用いて比較検討した。Ca拮抗剤3剤のLD₅₀は家兎でのデータはないが、ラットで20,000~60,000 μg/kgであり、これらの値を参考にして、Ca拮抗剤の総投与量を概ねLD₅₀の1/10以下となるようにした。また、PGE₂を生理食塩水に完全に溶解するためにエタノールを5%含有する生理食塩水に溶解したが、5%エタノールのみを含有する水溶液の経角膜的投与ではフレア、眼圧、瞳孔径に何ら変化を認めなかった。PGE₂の経角的な局所投与によって、初期に一過性の眼圧上昇を示し、また、フレアの上昇が数時間で一峰性の変化を示す前眼部の炎症様反応がみられたが、Ca拮抗剤の全身投与でも抗炎症剤と同様に反応抑制を示した。特に、ニカルジピンでは容量依存的にフレアの上昇を抑制し、最大用量の1,000 μg/kgの2回投与群でほぼ完全な抑制を示したことは非常に興味深い。また、ニカルジピン投与によって房水中のアスコルビン酸、グルタチオンの濃度低下も抑制された。

以上の結果から、Ca拮抗剤の中にはニカルジピンのように抗炎症性に働くものが存在する可能性が大きいと考えられる。

細胞は、その膜表面にPG、ヒスタミン、セロトニンなどのオートコイド、神経伝達物質、ホルモンおよびサイトカインなどに対して特異的受容体を有し、この受容体を介して細胞内に情報を伝達し細胞応答を発現するが、その情報伝達を司るセカンドメッセンジャーとして、環状ヌクレオチド(cAMP, cGMP), Ca²⁺, ジアシルグリセロールおよびイノシトール-1,4,5-三リン酸が知られており¹²⁾, PGの作用のほとんどがcAMPあるいはCa²⁺で説明されている。この点からすれば、Ca拮抗剤がPGによる反応を抑制したことは、Ca拮抗剤が虹彩、毛様体のPGの受容体を有する細胞に直接作用した可能性が考えられる。

また、Ca²⁺動員を生ずる何らかの刺激に呼応し、Ca²⁺依存性のホスホリパーゼA₂が活性化されると、アラキドン酸はリン脂質にエステル結合した状態から遊離のアラキドン酸となり、PGやロイコトリエンに代謝される。以前から、PGE₂の点眼投与によって房水蛋白濃度の上昇を伴う炎症様反応が知られている¹⁾が、この反応はPGE₂がアラキドン酸カスケードを活性化した結果と考えることもできる。また、アラキドン酸投与でもPGと同様の眼

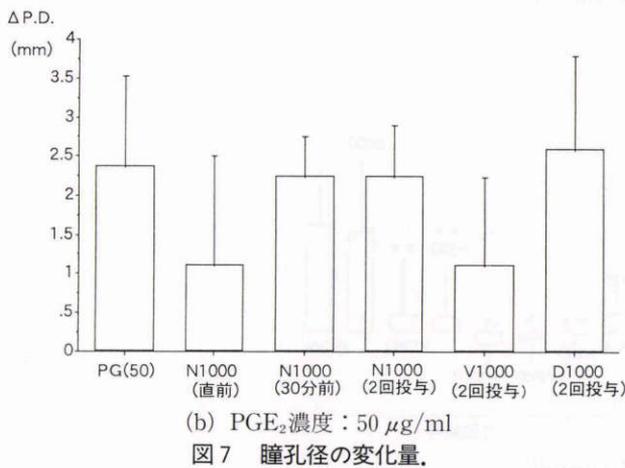
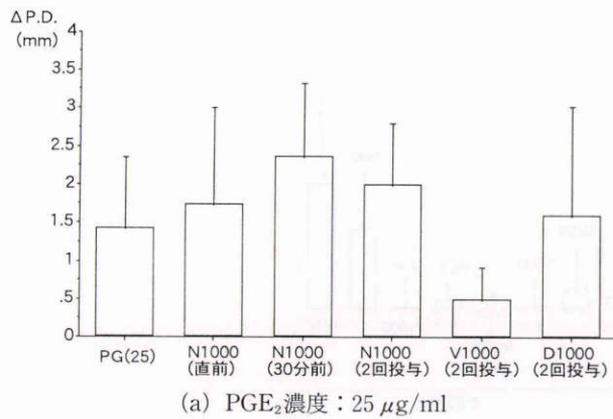


図7 瞳孔径の変化量.

(a) PGE₂濃度: 25 μg/ml, (b) PGE₂濃度: 50 μg/ml, カルシウム拮抗剤は1,000 μg/kg投与, ΔP.D. = (PGE₂投与前の瞳孔径) - (PGE₂投与後の瞳孔径), N: ニカルジピン, V: ペラパミル, D: ジルチアゼム, 数字はCa拮抗剤の1回投与量, n=6, 平均値±標準偏差.

反応を起こす³⁾が, Ca²⁺依存性のホスホリパーゼA₂にCa拮抗剤が作用するとすれば, アラキドン酸カスケードにおけるPG合成の前段階で抑制されていることが考えられ, 今後, アラキドン酸投与による眼反応をCa拮抗剤が抑制するかどうかを確認してみる必要がある.

さらに, 紫外線照射によってCa²⁺ channel blockersの活性を消失させたnifedipineおよびnisoldipineが直接的なホスホリパーゼA₂阻害作用を示した⁸⁾という報告もみられることから, 今回のCa拮抗剤投与での抑制作用において, 様々な機序が考えられる.

フレアの経時的変化およびΔIOPの結果から, ニカルジピン単回投与では500および1,000 μg/kgの投与群とも直前よりも30分前投与でより高い抑制率がみられ, ニカルジピンが虹彩, 毛様体の組織中で有効濃度に達するのに一定時間を要するためと思われる. 今回の実験結果からは, 最も有効な投与のタイミングを確定することはできないが, PGE₂投与の30~60分前が有効と考えられた. また, ニカルジピンの2回投与群では, 総投与量が500 μg/kg以上になるとすべて80%以上の抑制率を

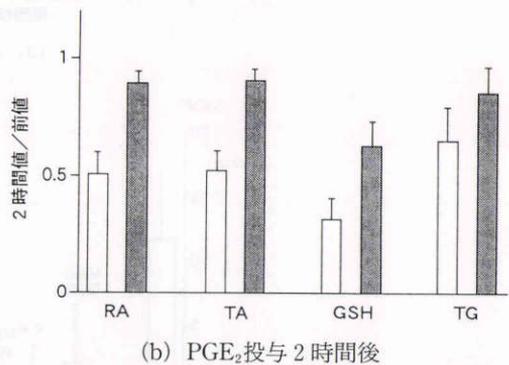
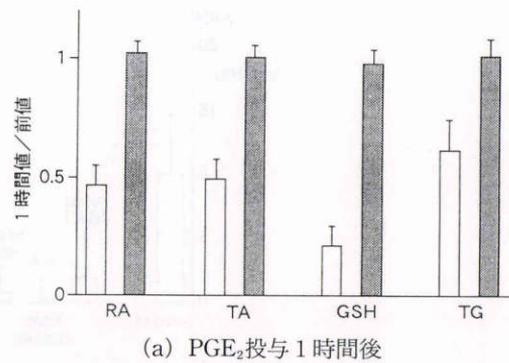


図8 PGE₂ 50 μg/ml 反応抑制下の房水成分濃度比 (対処置前値).

(a) PGE₂投与1時間後, (b) PGE₂投与2時間後. 白四角: PGE₂投与のみ, 黒四角: PGE₂投与30分前にニカルジピン1,000 μg/kg投与, RA: 還元型アスコルビン酸, TA: 総アスコルビン酸, GSH: 還元型グルタチオン, TG: 総グルタチオン, n=7, 平均値±標準偏差.

示したが, 臨床的にワンショット静注量は10~30 μg/kgであり, 常用量と比較して, 本実験では大量のニカルジピンを使用したことになる. 臨床的にはニカルジピンの最大使用量が30 mg/日とされており, 安全域の広い薬剤であるが, 少量の投与でも抑制されるかどうかを検討する必要がある. また, 経角膜的にCa拮抗剤が眼内に移行するならば, 点眼を含めた局所投与は眼科領域では非常に有効な投与方法となるであろう.

これまでCa拮抗剤が血管透過性亢進に起因すると考えられる蛋白漏出を抑制することを生体内で経時的に調べた報告はなく, 今回の眼組織における実験でこれを初めて明らかにした. Ca拮抗剤がPGE₂の眼反応を抑制したことは, 血液房水柵の機能低下にもCaチャンネル, Caイオンが関与する可能性を示唆するものと考えられる.

3種類のCa拮抗剤は同じ投与量で比較した結果, ジルチアゼムはほとんどPGE₂による眼反応を抑制せず, ニカルジピンは強い抑制作用を示した. 3種のCa拮抗剤の抑制効果の違いは, 今回の実験結果からは明らかにされないが, 組織親和性, 蛋白結合能, 溶解度など, 物性の違いによるCa拮抗剤の眼内移行の相違などが考えられ, 今後, 血液房水柵の機能を研究する上でも機能の異なる種々のCa拮抗剤は興味ある知見を供することが

期待される。また、抗炎症作用を期待して臨床応用を考えると、シクロオキシゲナーゼ系が関与する急性炎症モデル、例えば、虹彩光凝固や白内障手術などの外科的侵襲を加えた実験的炎症モデル眼に対して、Ca拮抗剤が確実にその炎症反応を抑制するかどうかを確認する必要がある、現在、この点を検討中である。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました窪田靖夫教授に深謝いたします。なお、本論文の一部は第59回日本中部眼科学会において発表した。

文 献

- 1) **Camras CB, Bito LZ, Eakins KE**: Reduction of intraocular pressure by prostaglandins applied topically to the eyes of conscious rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 1125—1134, 1977.
- 2) **Green K, Kim K**: Pattern of ocular response to topical and systemic prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14: 36—40, 1975.
- 3) **Podos SM, Becker B, Kass MA**: Prostaglandin synthesis, inhibition, and intraocular pressure. *Invest Ophthalmol* 12: 426—433, 1973.
- 4) **玉置泰裕, 川本英三, 江口秀一郎, 新家 真, 藤居仁**: Ca拮抗薬の家兎脈絡膜末梢循環に及ぼす影響. *臨眼* 47: 365—368, 1993.
- 5) **白井久行, 浅野紀美江, 北澤克明, 呉 輔仁**: Ca²⁺拮抗剤の低眼圧緑内障視野変化に及ぼす影響. *日眼会誌* 92: 792—797, 1988.
- 6) **佐々木隆弥**: 塩酸ニカルジピン (Ca²⁺ channel blocker)の家兎眼圧および房水動態に及ぼす影響について. *日眼会誌* 97: 665—671, 1993.
- 7) **竹縄忠臣**: 受容体活性とアラキドン酸カスケード. *日本臨床* 47(増刊): 78—84, 1989.
- 8) **Joseph C, Eileen B, Richard PC**: Inhibition of phospholipase A₂ (PLA₂) activity by infedipine and nisoldipine is independent of their calcium-channel-blocking activity. *Inflammation* 11: 353—364, 1987.
- 9) **尾崎真由美, 開 繁義, 沼田このみ**: 涙液および房水の成分を指標としたアルカリ熱傷の研究. *日眼会誌* 96: 559—568, 1992.
- 10) **開 繁義, 平田秀樹, 鍛冶兆宏**: 長期に連用する点眼液の家兎角膜組織に対する影響. *あたらしい眼科* 10: 595—601, 1993.
- 11) **開 繁義, 山田佑司, 中村泰久**: 眼組織中の還元型グルタチオンの高速液体クロマトグラフィー (蛍光検出法)による定量法. *あたらしい眼科* 2: 294—298, 1985.
- 12) **石川智彦, 日高弘義**: カルシウム調節物質. 蛋白質核酸 酵素 38: 83—95, 1993.