

エンドセリン-1 眼循環障害モデルに対する Ca^{2+} 拮抗薬の効果

前谷 悟¹⁾, 杉山 哲也²⁾, 奥 英弘²⁾, 島村 一郎²⁾

清水 一弘²⁾, 濱田 潤²⁾, 守屋 伸一¹⁾

¹⁾生駒総合病院眼科, ²⁾大阪医科大学眼科学教室

要 約

Ca^{2+} 拮抗薬の全身投与がエンドセリン-1 投与眼(眼循環障害モデル)に及ぼす影響を家兎で検討した。 Ca^{2+} 拮抗薬投与群には塩酸ニカルジピン(20 μ g/kg)を、対照群には生理食塩水(0.4 ml/kg)をそれぞれ静注し、その15分後に両群の硝子体内にエンドセリン-1(10^{-6} M, 10 μ l)を投与した。その際の相対的網膜動脈径(乳頭縁の網膜動脈径/乳頭径)、視神経乳頭組織血流量、視覚誘発電位、眼圧、血圧の変化を測定した。対照群では、エンドセリン-1投与により網膜動脈収縮、視神経乳頭組織血流量の減少、視覚誘発電位潜時の延長、眼圧下降がみら

れたが、 Ca^{2+} 拮抗薬投与群ではいずれも有意に抑制された。これらのことから、 Ca^{2+} 拮抗薬の全身投与がエンドセリンによる眼循環障害を抑制し得ることが示された。しかし、全身血圧への影響として投与直後から45分まで有意な下降を示したことから、今後は投与量について検討が必要と思われた。(日眼会誌 99:40-46, 1995)

キーワード： Ca^{2+} 拮抗薬、エンドセリン-1、相対的網膜動脈径、視神経乳頭組織血流量、血圧

Effect of Systemic Calcium Antagonist on a Model of Ocular Circulation Disturbance Induced by Endothelin-1

Satoru Maetani¹⁾, Tetsuya Sugiyama²⁾, Hidehiro Oku²⁾,
Ichiro Shimamura²⁾, Kazuhiro Shimizu²⁾, Jun Hamada²⁾
and Shinichi Moriya¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Ikoma General Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

Abstract

We studied the effect of generally applied calcium antagonist on endothelin (ET-1) treated rabbit eyes. Nicardipine (20 μ g/kg) was injected intravenously 15 minutes before intravitreal injection of 10 μ l of ET-1 at 10^{-6} M. We measured the relative caliber of the retinal artery (the caliber of the retinal artery at the edge of the optic nerve head (ONH)/that of ONH), the capillary blood flow in ONH, visual evoked potential (VEP), intraocular pressure (IOP), and blood pressure (BP). In the control group (0.4 ml/kg of saline), administration of ET-1 caused contraction of the retinal artery, decrease of the capillary blood flow in ONH, prolongation of the VEP latency, and reduction of IOP. But these

effects were significantly reduced in the calcium antagonist group. These results showed that generally applied calcium antagonist inhibits the disturbance of ocular circulation induced by ET-1. However, it also caused significant reduction of BP until 45 minutes after application, so we will have to work to find the optimum dose of calcium antagonist. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:40-46, 1995)

Key words: Calcium antagonist, Endothelin-1, Relative caliber of the retinal artery, Capillary blood flow in the optic nerve head, Blood pressure

別刷請求先：569 大阪府高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 前谷 悟

(平成6年6月1日受付, 平成6年7月27日改訂受理)

Reprint requests to: Satoru Maetani, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Medical College, 2-7 Daigakucho, Takatsuki-shi, Osaka-fu 569, Japan

(Received June 1, 1994 and accepted in revised form July 27, 1994)

I 緒言

エンドセリン (endothelin: 以下, ET) は, 強力な血管収縮作用を持つ生理活性ペプチド¹⁾であり, 眼内にも受容体の存在が証明されている²⁾. 臨床的にも, 網膜静脈閉塞症や低眼圧緑内障などの眼疾患への関与が示唆されている^{3,4)}. 我々は, これまでに本物質の投与によって視神経乳頭や脈絡膜の血流量の減少, 視覚誘発電位 (visual evoked potential: 以下, VEP) 潜時の延長, 眼圧下降が生じることを報告してきた^{5,6)}. 今回は, ET の作用機序として細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度を増加させることが示唆されている⁷⁾ことに注目し, Ca^{2+} 拮抗薬の全身投与が ET-1 眼循環障害モデルに及ぼす影響を検討した.

II 実験方法

実験動物として, 成熟有色家兎 20 匹 (2.5~3.5 kg) 40 眼を用いた. VEP の実験には, 成熟白色家兎 6 匹 (3.3~3.8 kg) 12 眼を用いた. まず, ミドリリン P[®]点眼液で散瞳した後, Ca^{2+} 拮抗薬投与群には塩酸ニカルジピン 20 μ g/kg (ペルジピン[®]を生理食塩水で 0.05% に希釈したものを 0.4 ml/kg) を, 対照群には生理食塩水 0.4 ml/kg をそれぞれ静注した. その 15 分後に両群の硝子体内に, ET-1 (<endothelin-1 (human) (ペプチド研究所) を人工眼内灌流液 (オペガード MA[®]) で 10^{-6} M に調整したものを>を毛様体扁平部から 30 G 針で, 各 10 μ l 投与した. その際の相対的網膜動脈径 (乳頭縁の網膜動脈径/乳頭径), 視神経乳頭組織血流量, VEP, 眼圧, 血圧の変化について検討した. なお有意差検定は, 実験 1~4 は paired-t 検定, 実験 5 は non-paired-t 検定による.

実験 1: 相対的網膜動脈径の計測

ミドリリン P[®]点眼液で散瞳した後, 塩酸ニカルジピン・生理食塩水投与前と投与後 15 分後 (ET-1 硝子体内投与直後) から 15 分間隔で 2 時間後まで, 興和社製の手持ち眼底カメラ RC-2 を用いて眼底撮影した. 得られたスライドを映写して約 40 倍に拡大して, 乳頭縁での網膜動脈の径および乳頭の縦径を計測することにより, 相対的網膜動脈径 (乳頭縁の網膜動脈径/乳頭径) を算出し, 平均した. そして, その経時的変化を求めた.

実験 2: 視神経乳頭組織血流量の測定

全身麻酔薬としてウレタン 1.3 g/kg を腹腔内投与し, 約 2 時間後の安定した麻酔深度下で実験を行った. 組織血流量の測定にはバイオメディカルサイエンス社製の電解式組織血流計 RBF-222 を用いた. 視神経乳頭の血流量測定法の詳細は前報⁵⁾の通りである. 今回は, ET-1 を硝子体内に注入後, 測定間隔を 15 分として 3 時間行った.

実験 3: VEP の測定

全身麻酔薬としてペントバルビタールナトリウム (ネンプタル[®]) (30 mg/kg) を腹腔内注射し, さらに, 2% 塩酸リドカインを頭皮下に注射して骨膜を露出して, 正

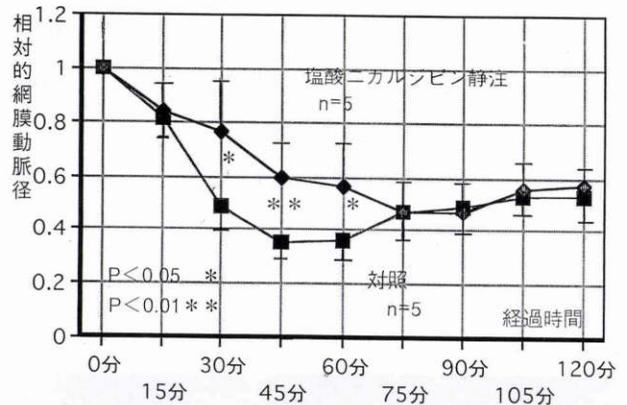


図1 塩酸ニカルジピン前投与による相対的網膜動脈径の変化.

(エンドセリン-1 (ET-1) 眼循環障害モデル)

バーは標準偏差を示す (以下, 同様)

中硬膜上にステンレス製ビス状電極を 2 か所に留置した. 電極留置後 2 週間の覚醒期間を置いた. 電位の測定には, 光刺激装置 (日本光電社製, SLS 4100), 増幅器 (日本光電社製, VC 10), 加算器 (日本光電社製, DAT 1100), XY レコーダー (理科電気社製, RW 115) を用いた. VEP の測定法の詳細は前報⁹⁾の通りである. 前回と今回で相違する点として, sensitivity を 50~20 μ V へ感度を上げ, 刺激光強度を 2.0~0.6 J へ減弱した. ET-1 を硝子体内に注入後, 測定間隔を 30 分として 3 時間後まで行った後, さらに 24 時間後に測定した.

実験 4: 眼圧測定

ミドリリン[®]点眼液で散瞳した後, 塩酸ニカルジピン・生理食塩水投与前と投与 15 分後 (ET-1 硝子体内投与直後) から 15 分間隔で 3 時間後まで, 0.4% 塩酸オキシプロコカイン (ペノキシール[®]) 点眼下で Alcon Applanation Pneumatograph TM[®] を用いて眼圧測定した.

実験 5: 血圧測定

全身麻酔薬としてペントバルビタールナトリウム (ネンプタル[®]) (25 mg/kg) を静脈内注射した. 約 1 時間後の安定した麻酔深度下で鼠径部の大腿動脈を露出し遠位端を結紮した後, 近位端を仮結紮し, バーナス剪刀で血管を垂直に切開し, カニキュレを深部まで挿入して結紮し, 圧力トランスデューサ (グールド社製, P 10 EZ) を用いて血圧を測定した. 血圧が安定した後, 塩酸ニカルジピン 20 μ g/kg を静注し, その 15 分後に右眼硝子体内に ET-1 を注入して, 3 時間後まで血圧測定を続けた.

III 結果

実験 1: 相対的網膜動脈径の計測

ET-1 の硝子体内投与により, Ca^{2+} 拮抗薬 (塩酸ニカルジピン) 投与群, 対照 (生理食塩水投与) 群ともに動脈径は収縮したが, 塩酸ニカルジピン投与群では収縮が抑制され, 30~60 分後で有意差がみられた (図 1). 典型例を図 2 に示したが, 対照群では ET-1 の硝子体内投与に

より、視神経乳頭の蒼白化が著明で、網膜動静脈の収縮が顕著であり、30~60分後では、塩酸ニカルジピン投与群と対照群では明らかに網膜動脈径に差がみられた。90分後には差が縮小する傾向にあった(図2)。

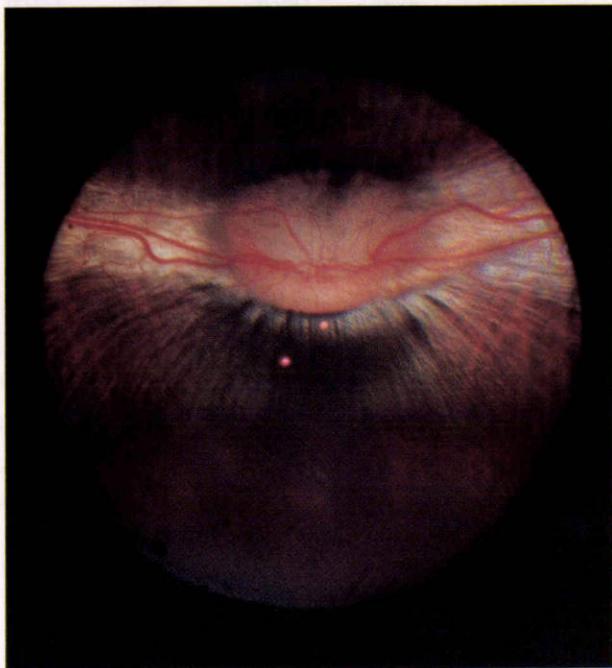
実験2：視神経乳頭組織血流量の測定

ET-1投与により、対照群では明らかに組織血流量は減少した(最大は75分後で20.7%)、塩酸ニカルジピン投与群ではその減少が抑えられ、30~135分後(最大の差

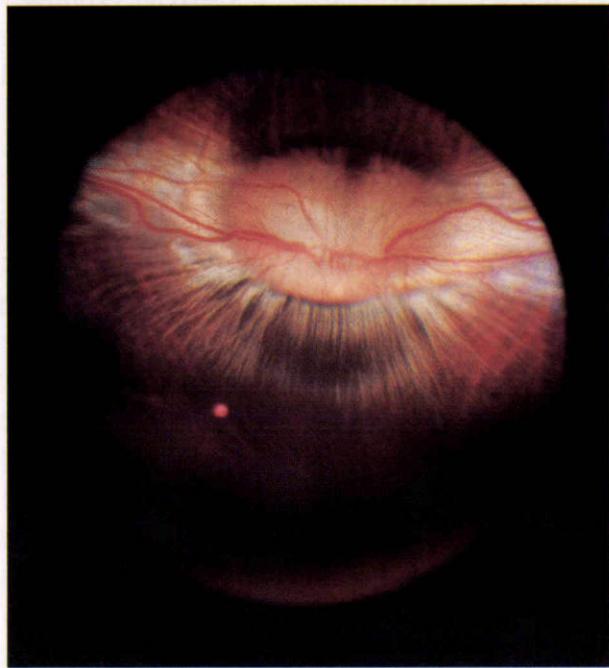
は75分後)で有意差がみられた(図3)。

実験3：VEPの測定

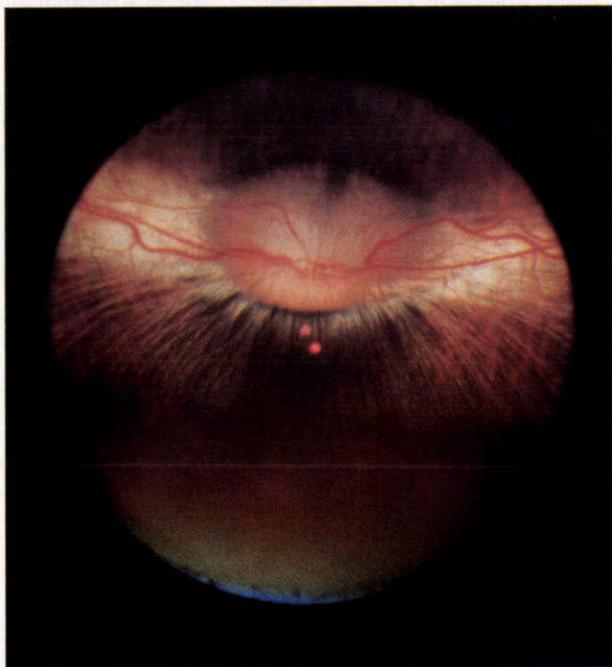
ET-1投与により、対照群では光刺激後20 msec前後に認められた、N₁(最初の陰性波)、P₁(最初の陽性波)潜時が延長した。両潜時とも、塩酸ニカルジピン投与群では延長が抑制され、N₁では90分後~120分後と150分後で、P₁では60分後と120分後で有意差がみられた(図4)。



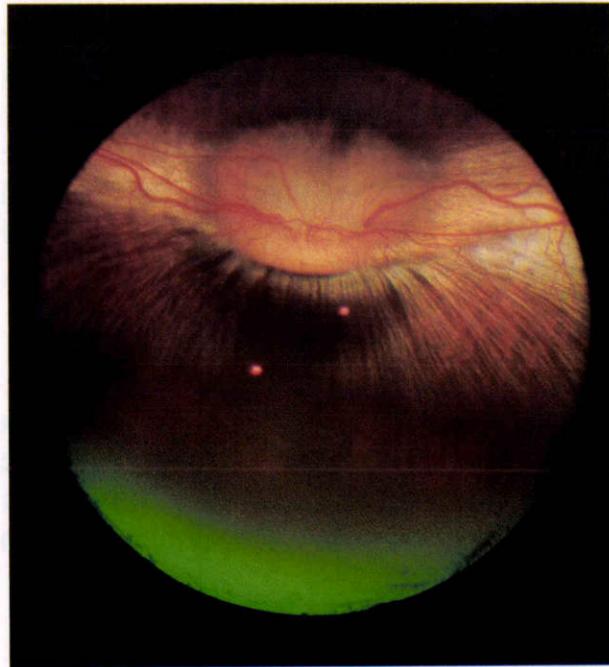
ET-1
注入前



注入後30分

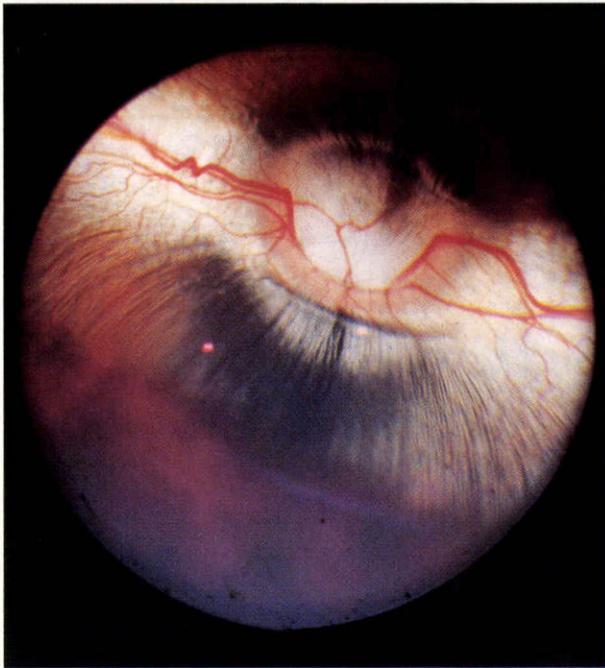


注入後60分

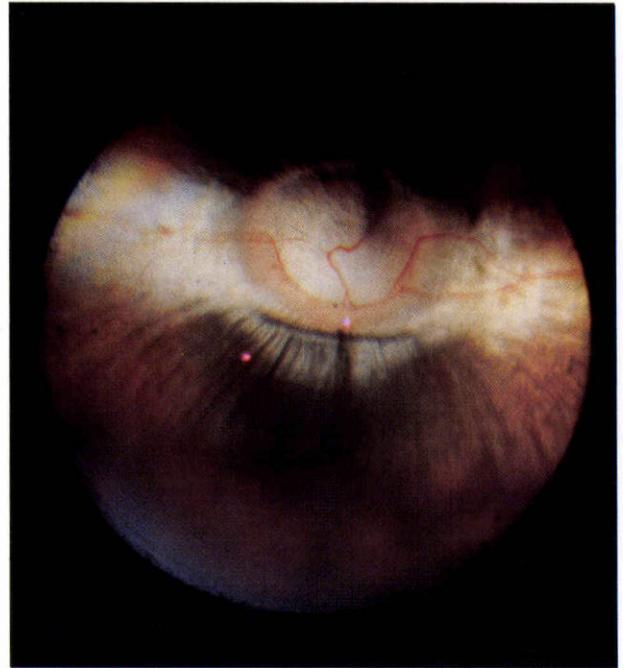


注入後90分

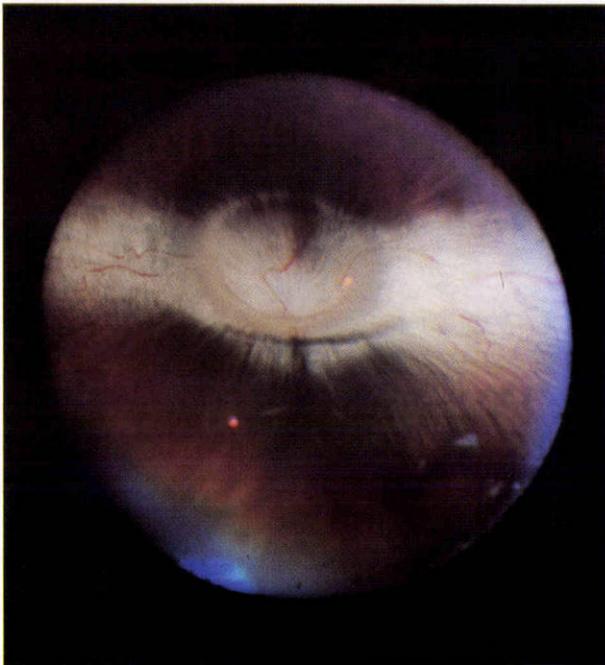
a<塩酸ニカルジピン前投与>



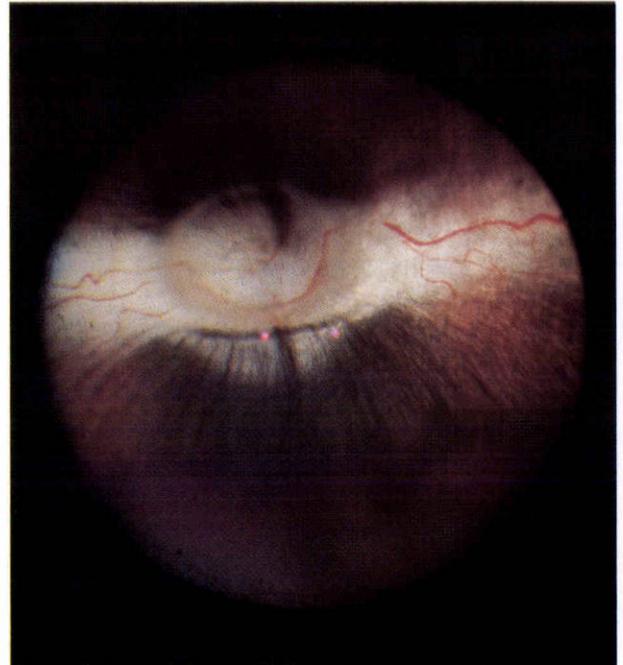
ET-1
注入前



注入後 30 分



注入後 60 分



注入後 90 分

b<生理食塩水前投与>

図 2 a, b 塩酸ニカルジピン前投与による相対的網膜動脈径の眼底所見変化。
(ET-1 眼循環障害モデル)

実験 4：眼圧測定

ET-1 投与により、眼圧は両群とも下降したが、塩酸ニカルジピン投与群では下降が少し抑制され、30～45 分で有意差がみられた (図 5)。

実験 5：血圧測定

塩酸ニカルジピン静注により、45 分まで有意に下降し

た (最大は静注直後の 17 mmHg, 静注前の 15.8%) が、その後緩慢に回復し、60 分後にはほぼ投与前の平均血圧レベルに回復した (図 6)。

IV 考 按

Ca^{2+} 拮抗薬は、血管平滑筋細胞の細胞膜を介する Ca^{2+}

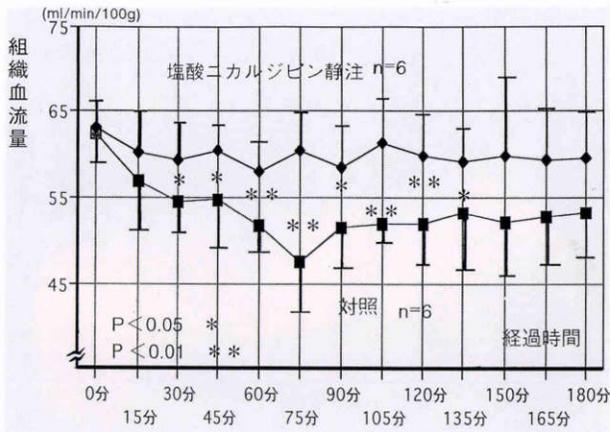


図3 塩酸ニカルジピン前投与による視神経乳頭組織血流量の変化。(ET-1眼循環障害モデル)

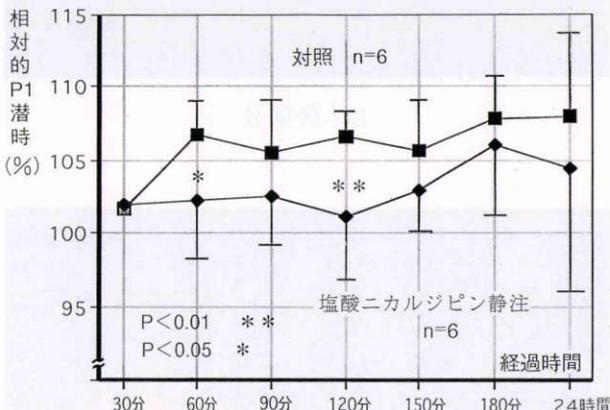


図4 塩酸ニカルジピン前投与による視覚誘発電位(VEP)の相対的P₁潜時の変化。(ET-1眼循環障害モデル)

N₁の場合 notchを生じることがあったため、より信頼性の高いP₁潜時の変化を示す。初期P₁潜時<塩酸ニカルジピン投与群23.9 msec・対照群23.6 msec>を100%にした値が、相対的P₁潜時になる。

流入を抑制することにより、血管平滑筋を弛緩させて末梢血管を拡張させる薬剤である⁸⁾。臨床的にも降圧剤としてだけでなく、脳循環改善剤として用いられており⁹⁾、眼科領域においても低眼圧緑内障患者の視野障害改善が認められたという報告もある¹⁰⁾。同薬剤が脈絡膜、網膜、視神経乳頭の血流量を増加させることは、すでに報告されている^{11)~15)}。しかし、循環障害モデル眼を用いてCa²⁺拮抗薬の影響を検討した報告はほとんどみられない。

一方、ET-1は1988年柳沢ら¹¹⁾によって初めて報告された強力な持続性の血管収縮活性を持つペプチドである。その後の研究で、ET-1はヒト、ウサギなどの種々の哺乳類の血管内皮細胞で産生されることが判明した¹⁶⁾。ET-1の作用機序は、まず、血管平滑筋膜に存在するET-1特異的受容体と結合することに始まる。そして、受容体

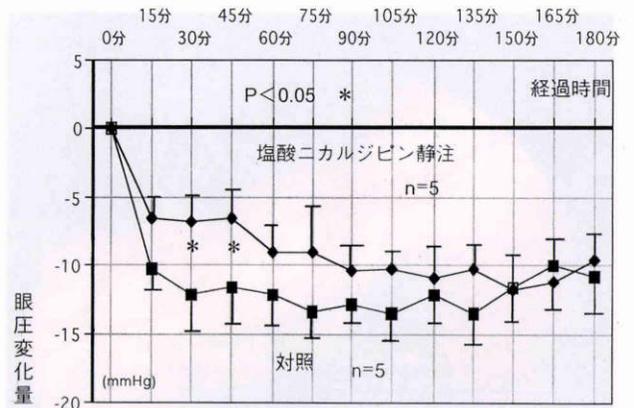


図5 塩酸ニカルジピン前投与による眼圧変化量。(ET-1眼循環障害モデル)

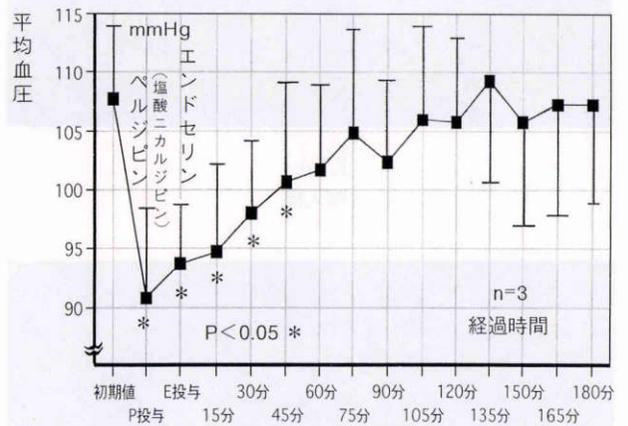


図6 塩酸ニカルジピン投与による血圧の変化。(ET-1眼循環障害モデル)

P投与<ペルジピン®, 塩酸ニカルジピン 20 μg/kg 静注>その15分後に右眼の硝子体内にE投与<ET-1>。また、ET-1投与前と投与直後には、血圧の変化に有意差はなかった。

の活性化により、Ca²⁺チャンネルを介するCa²⁺流入が促進されたり、イノシトール三リン酸(IP₃)による筋小胞体からのCa²⁺遊出が促進される結果、細胞内遊離Ca²⁺濃度が上昇する。その結果、ミオシン軽鎖キナーゼが活性化されて筋収縮が開始されるものと推定されている⁷⁾。

ET-1眼循環障害モデル眼を用いてCa²⁺拮抗薬の効果を判定することは、ETならびにCa²⁺拮抗薬が網膜静脈閉塞症や低眼圧緑内障などの眼疾患への関与が示唆されている³⁾⁴⁾¹⁰⁾ため、臨床的にも意義あるものと思われる¹⁷⁾。今回の実験の目的は、Ca²⁺拮抗薬の投与がET-1による眼循環障害を抑制できるか、どうかであった。その判定のために、相対的網膜動脈径、視神経乳頭組織血流量、視性誘発電位(VEP)、眼圧の4つの項目について調べた。実験1で用いた眼底写真をスライド映写により、拡大して相対的網膜動脈径の変化を求める方法は、人眼で薬剤の影響を見る際に用いた報告¹⁸⁾もあり、焦点の合っ

た写真を用いる限り適切であると考えられる。実験2で用いた電解式組織血流計による測定の妥当性については、前報⁵⁾で述べたように微小循環の変化を知る上で広く用いられている水素クリアランス法を簡便化したもので、目的部位において水素電極針に水素を発生させることにより、短時間毎の反復測定も可能という利点を持つ¹⁹⁾。もちろん、電極による組織損傷は避けられないが、同一個体の他眼を対照としてしているため、問題は少ないものと思われる。実験3で用いた VEP の再現性については、以前の報告⁶⁾で述べたごとく良好であり、家兎の視機能測定法として適切と考える。さらに、ET-1 の投与量、濃度についても、前房穿刺を必要としない容量として 10 μ l を、有意な乳頭組織血流量の減少を得た最低濃度として 10⁻⁶M を最適と考えた⁵⁾。

著者らの過去の報告⁵⁾⁶⁾によれば、ET-1 による眼循環障害眼では網膜血管収縮、視神経乳頭組織血流量の減少、VEP の潜時延長、眼圧下降がみられた。今回の実験でも、生理食塩水で前処置した対照群では同様の結果を得た。それに対して、Ca²⁺拮抗薬前投与により、循環障害モデル眼における網膜血管収縮、視神経乳頭組織血流量の減少、VEP の潜時延長がいずれも有意に抑制された。視神経乳頭組織血流量の減少が網膜血管収縮に比べ、より長時間（約2時間）抑制されたことは、Ca²⁺拮抗薬の作用が視神経乳頭において、より持続的であることを示唆した。さらに、視神経乳頭組織血流量の変化が視機能に直接反映されることも示された。さらに、ET-1 循環障害モデル眼でみられる眼圧下降は、Ca²⁺拮抗薬前投与により一時的に抑制された。このことは、ET-1 による眼圧下降機序にも Ca²⁺動態が関与していることを示唆するとともに、Ca²⁺拮抗薬の循環に対する奏効機序に眼圧下降（眼灌流圧の増加）が関与していないことを示している。以上の結果から、眼局所の循環障害モデルにおいて Ca²⁺拮抗薬の全身投与が奏効し、Ca²⁺拮抗薬の眼循環改善薬としての有用性が示された。

さて、Ca²⁺拮抗薬の投与量は全身血圧への影響が少なく、選択的に末梢血流量を増加できる量として、玉置ら¹³⁾の塩酸ニカルジピン 40 μ g/kg 静注後、静注前の平均 81.6% になり、回復に 45 分を要したという報告や Harino ら¹⁵⁾の塩酸ニカルジピン 20 μ g/kg を静注することにより、視神経乳頭組織血流量が増加したという報告から、塩酸ニカルジピン 20 μ g/kg とした。しかし、全身血圧への影響として、投与直後に平均 17 mmHg（静注前の 15.8%）の下降を示した。その後緩慢に回復し、60 分後にほぼ投与前の平均血圧レベルに回復した。著者らが予想したより血圧は低下し、回復にも時間を要した。今後は投与量についての検討が必要と思われる。さらに、より臨床に近づけるためには、ET-1 投与の後、ある程度の時間を置いて、Ca²⁺拮抗薬を投与して効果をみる必要があるように思われた。

最後に、著者らは今回の実験における Ca²⁺拮抗薬の奏効機序は、ET-1 の作用の抑制であると考えているが、Ca²⁺拮抗薬が眼循環に直接作用した可能性も否定できず、今後の検討を要すると思われる。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った東 郁郎教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第 98 回日本眼科学学会（平成 6 年 4 月、横浜）において発表した。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411—415, 1988.
- 2) MacCumber MW, Jampel HD, Snyder SH: Ocular effects of the endothelins. Abundant peptides in the eye. *Arch Ophthalmol* 109: 705—709, 1991.
- 3) 土屋寛芳, 高橋一則, 田中 寧, 小原喜隆: 網膜静脈閉塞症における血管攣縮因子の変動. *臨眼* 46: 431—434, 1992.
- 4) 守屋伸一, 杉山哲也, 清水一弘, 濱田 潤, 徳岡 覚, 東 郁郎: 低眼圧緑内障とエンドセリン (ET-1). *眼紀* 43: 554—559, 1992.
- 5) 杉山哲也, 奥 英弘, 清水一弘, 守屋伸一, 濱田 潤, 東 郁郎: エンドセリン-1 の眼循環に及ぼす影響. *日眼会誌* 97: 678—682, 1993.
- 6) 奥 英弘, 杉山哲也, 守屋伸一, 濱田 潤, 東 郁郎: エンドセリン硝子体内注入による視機能変化. *日眼会誌* 97: 467—473, 1993.
- 7) 平田結喜緒: エンドセリンの作用と放出制御に関わる細胞内情報伝達系. *実験医学* 8: 124—131, 1990.
- 8) 口井正人, 西尾一郎, 津田和志, 中村吉成, 中谷俊生, 増山善明: 高血圧と Ca 拮抗薬. *循環器科* 16: 140—150, 1984.
- 9) 大友英一: 各種脳血管障害に対する YC-93 (塩酸ニカルジピン) の臨床効果. *基礎と臨床* 13: 63—69, 1979.
- 10) 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.
- 11) 三好輝行: 脈絡膜循環に及ぼす nifedipine の影響. 第 1 報. 成熟家兎における脈絡膜血流量の変化. *眼紀* 35: 664—670, 1984.
- 12) 三好輝行: 脈絡膜循環に及ぼす nifedipine の影響. 第 2 報. 猿眼における脈絡膜血流量の変化. *眼紀* 35: 1571—1575, 1985.
- 13) 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. —レーザー・スペックル末梢循環解析機による検討—. *臨眼* 47: 365—368, 1993.
- 14) 野口 傑, 木村保孝, 新田安紀芳, 清水 良, 小林和夫, 青木孝一, 他: Ca 拮抗剤による視神経乳頭組織血流量の変化. *日眼会誌* 96: 967—972, 1992.
- 15) Harino S, Riva CE, Petrig BL: Intravenous nicardipine in cats increases optic nerve head but not retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2885—2890, 1992.

