

自律神経作働薬の人間血液房水橋

蛋白透過性に及ぼす効果

—前房内フレア—強度測定による評価—

森 樹 郎

自律神経作動薬の人眼血液房水柵 蛋白透過性に及ぼす効果

前房内フレアー強度測定による評価

森 樹 郎

目 次

研究の目的・背景	2
第1章	
前房内フレアー強度測定による人眼血液房水欄蛋白透過性の評価法	6
第1章 第1節	
血液房水欄の蛋白透過性について	6
第1章 第2節	
前房内フレアー強度と前房内蛋白濃度の相関	8
第2章	
各種自律神経作動薬点眼の人眼血液房水欄蛋白透過性に及ぼす効果	20
第2章 第1節	
ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬、遮断薬の人眼BAB透過性に及ぼす効果	20
第2章 第2節	
α アドレナリン受容体刺激薬が人眼BAB透過性に及ぼす効果	34
第2章 第3節	
β アドレナリン受容体刺激薬、遮断薬が人眼BAB透過性に及ぼす効果	41
第2章 第4節	
β アドレナリン受容体遮断薬timolol点眼が房水流量に及ぼす効果を前房内蛋白濃度の経時変化から評価する方法	49
総括	56
謝辞	58
引用文献	59

研究の目的・背景

自律神経作動薬は眼科の臨床において最も多用される薬剤である(1)。眼科診察に欠くことのできない散瞳薬をはじめとして、現在、臨床的に使用されている抗緑内障点眼薬はすべて自律神経作動薬である。自律神経作動薬による緑内障治療の歴史は古く、中でもpilocarpine, epinephrineは90年以上にわたって使用されている(2-4)。これらの薬剤は現在もお第一線の治療薬であるが、その人眼の生理機能に対する影響は充分明らかにされていない。緑内障の罹病率は中年以降の成人で3%以上と言われている。また、抗緑内障薬による慢性緑内障の眼圧コントロールは多くの症例で生存期間を通して続けられる。したがって抗緑内障薬が人眼の生理機能に及ぼす効果を明らかにすることは臨床的に大きな意味を持つ。

一般に薬剤の眼に対する副作用を考える上で重要な生理機能として血液房水柵(blood-aqueous barrier, BAB)の機能が挙げられる。BABは毛様体上皮と虹彩血管に存在して血漿蛋白が直接房水に移行しないためのbarrierとして働き、さらに血漿と房水との間でさまざまな物質の能動輸送を行なう(5)(図1左)。このようなBABの機能により房水の組成は血漿のそれと異なり、特に正常房水の蛋白濃度は血漿中の濃度の1/100以下でしかない(5)。房水はその産生、循環、排出という房水動態によって眼内圧を一定に保つほか、血管をもたない角膜や水晶体に対する物質交換の媒体でもある(5, 6)。この意味においてBABは眼のhomeostasisを規定する重要な要素の一つである。BABは、組織学的には毛様体無色素上皮と虹彩血管内皮の細胞間tight junctionである(5, 7) (図1右)。毛様体実質の血管はbarrierを持たないため、毛様体実質内には血漿蛋白が豊富に存在するが、毛様体無色素上皮がbarrierとなって前房へ流入しない。一方、虹彩では血管内皮がbarrierとなって血漿蛋白が虹彩実質に漏出しない。虹彩上皮の前房側はbarrierをもたないので、虹彩毛様体実質内の血漿蛋白の一部は虹彩実質を経由して虹彩根部から定常的に前房内に漏出している(7-9)。正常眼房水中にわずかに存在する蛋白の大部分はこの経路によって前房へ流入したものである。

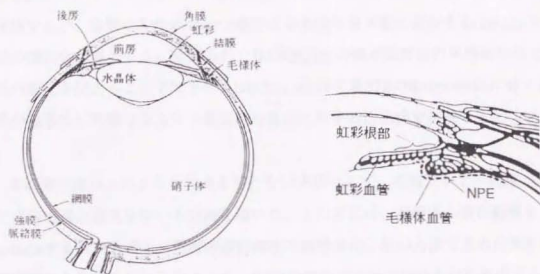


図1 眼の構造

左) 眼球の全体図 (渡邊郁緒、新身勝彦著: イラスト眼科, 文光堂、東京 1987より改変)

右) 虹彩毛様体の血管系と血液房水槽。血液房水槽(BAB)は虹彩血管の内皮と毛様体の無色素上皮(non-pigmented epithelium, NPE, 点線で表示)に存在する。毛様体血管は有意で血漿蛋白を透過するため、毛様体実質内部には多量の血漿蛋白が存在する。毛様体実質内蛋白の一部は正常眼でも虹彩実質に浸潤し、虹彩根部から前房へ漏出する (本文参照)。

BABの血漿蛋白に対するbarrier機能は炎症をはじめとする眼内の障害で破綻するので、臨床診断では常に評価の対象となる(10)。BAB機能の破綻によって生じた前房水蛋白濃度の上昇は細隙光の散乱 (前房フレアー) として観察することができる(11)。前房フレアーの観察は前眼部炎症の評価のために眼科臨床検査で必ず行なわれるが、細隙灯顕微鏡による前房フレアーの観察には半定量的かつ主観的であるという限界がある。BAB機能の実験的評価は血液中に投与した各種tracerが房水中に漏出する量を穿刺によって採取した房水を用いて測定する方法が行なわれてきたが(12-14)、前房穿刺はBAB機能を容易に障害するので(15, 16)その精度は十分ではなかった。穿刺を行わないBAB機能の評価は全身投与した蛍光色素の前房内漏出量を前房内の蛍光強度で定量するfluorophotometryによって可能になった(17, 18)。この方法が従来の最も一般的なBAB機能の評価法である。

人眼のBAB機能は殆どすべてこのfluorophotometryによって評価されてきた。しかしこの方法にもいくつかの問題がある。1) 全身投与されたfluoresceinは体内でより蛍光強度が低いfluorescein glucuronideに代謝されるので定量的評価が困難

である(19, 20)。2) この手法ではBAB透過性をfluorescein濃度の前房/血漿比によって評価するが、血漿中のfluorescein濃度は全身投与後次第に減少する(20-22)ので、頻回の採血を必要とする。3) 得られたBAB透過性の値が数時間の平均値なので、短時間の変化を捉えることができない(20-22)。4) 分子量376のfluoresceinに対する透過性が臨床的に問題になる分子量数万の蛋白に対する透過性を反映するとはいえない。

本研究では以上のような欠点を持たない方法として、前房フレアー強度から求めた前房内蛋白濃度を用いる方法を用いた。この方法は、前房内の蛋白動態をsimulateする数式モデルに前房内蛋白濃度の経時変化と他の方法で求めた房水流量の経時変化を組み込むことによって、BABの蛋白透過性の経時変化を算出するものである。この方法の可能性はKrakau(23)が示したが、実現には至らなかった。彼らが考案した前房内フレアーの写真撮影による前房内蛋白濃度測定法(11, 24, 25)は簡便とはいえ精度も充分ではなかった。また当時は房水流量を正確に測定する方法が確立していなかったで、フレアー強度の変化を解析することしかできなかった(26-28)。前房内蛋白濃度の非侵襲的、簡便、高精度な測定は、近年開発されたlaser flare-cell meterによって可能になった(29)。この装置は、前房内に照射したHe-Neレーザー光の散乱光強度を光電子倍增管を用いて定量化することによって細胞顕微鏡で判別できない微弱な前房内フレアーをも定量化する(図2)。



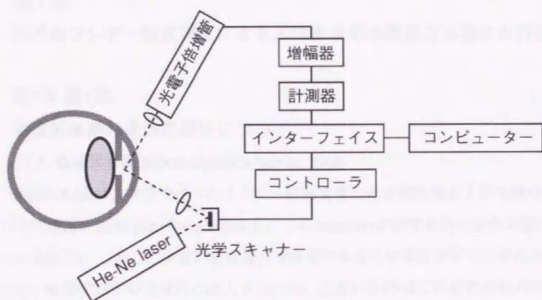


図2 Laser flare-cell meterによる前房内フレアの測定(写真)と laser flare-cell meterの構造

本研究のBAB透過性評価法は、このlaser flare-cell meterによる前房内蛋白濃度の測定とfluorophotometryによる房水流量の高精度な測定(30, 31)を組み合わせたものである。後者の方法は、角膜に取り込ませたfluoresceinを房水が洗い出すことを利用して、角膜中と房水中のfluorescein濃度の経時変化から房水の流速を算出するものである。

本研究で使用した自律神経系作動薬はムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬であるpilocarpineとその遮断薬であるtropicamide、交感神経 α_1 アドレナリン受容体刺激薬であるphenylephrine、 α_2 アドレナリン受容体刺激薬であるapraclonidine、 α 、 β アドレナリン受容体刺激薬であるepinephrine、 β アドレナリン受容体遮断薬であるtimololである。pilocarpine, apraclonidine, epinephrine, timololは抗緑内障薬として、tropicamideとphenylephrineは散瞳薬として治療および検査に使用されている。なお、BABの機能は血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)と類似すると考えられているが、このBBB透過性が自律神経作動薬等によって変化することはいくつかの研究で報告されている(32-43)。

第1章

前房内フレアー強度測定による人眼血液房水柵蛋白透過性の評価法

第1章 第1節

血液房水柵の蛋白透過性について

1.1.1. 血液房水柵 (blood-aqueous barrier, BAB)

狭義のBABは、前項で述べたように、虹彩血管の内皮細胞間および毛様体無色素上皮細胞間のtight junctionsを意味し、このjunctionが血漿蛋白の房水中漏出を妨げている(5, 7)。しかし、少量の血漿蛋白は有窓である毛様体血管から毛様体実質へ漏出し、虹彩根部から前房内に流入する(7-9)。広義のBABはこの虹彩根部の毛様体実質を含む。

1.1.2. BABを透過する蛋白の数式モデル

BABを透過する物質の動態は従来より2コンパートメントモデルによって数式化されている(44, 45)。以下にこのモデルを説明する。容積が V_1 および V_2 であるコンパートメント1とコンパートメント2が、共通の容質を各々濃度 C_1 , C_2 で含む時、時間 dt の間にコンパートメント1からコンパートメント2へ、コンパートメント2からコンパートメント1へ移動する容質の質量を各々 dm_{12} , dm_{21} とすると、

$$dm_{12} = AKC_1 dt$$

$$dm_{21} = AKC_2 dt$$

と表される。Aは容質が移行する境界の面積、Kはそこでの移行係数である。時間 dt におけるコンパートメント1での容質質量の正味の変化 dm_1 は

$$dm_1 = dm_{21} - dm_{12} = AK(C_2 - C_1) dt$$

である。コンパートメント1を前房、コンパートメント2を血漿、容質を蛋白とすると、2つのコンパートメント間にはこの他に後房から前房を経て眼外へと流れる房水流による蛋白の入出がある。時間 t における房水流量を $f(t)$ 、前房内蛋白濃度を $C_a(t)$ 、後房内蛋白濃度を $C_h(t)$ とすると、房水流による蛋白流入量は $f(t)C_h(t)$ 、流出量は $f(t)C_a(t)$ である。時間 t における前房内蛋白質量を $M_a(t)$ 、AKを $A_{in}(t)$ と書くと、

$$\frac{dM_a(t)}{dt} = A_{in}(t)[C_p(t) - C_a(t)] - f(t)[C_a(t) - C_h(t)] \quad (1)$$

が得られる。同様にコンパートメント1を後房、コンパートメント2を血漿とし、時間 t における後房内蛋白質量を $M_h(t)$ 、 AK を $H_{in}(t)$ と書くと、

$$\frac{dM_h(t)}{dt} = H_{in}(t)[C_p(t) - C_h(t)] - f(t)C_h(t) \quad (2)$$

が得られる。ここで $M_a(t)$ は時間 t における前房内蛋白総量、 $M_h(t)$ は時間 t における後房内蛋白総量、 $A_{in}(t)$ は時間 t における前房のBAB蛋白透過性の指標、 $H_{in}(t)$ は時間 t における後房のBAB蛋白透過性の指標、 $C_p(t)$ は時間 t における血漿蛋白濃度、 $C_a(t)$ は時間 t における前房内蛋白濃度、 $C_h(t)$ は時間 t における後房内蛋白濃度、 $f(t)$ は時間 t における房水流量である。また、 $V_a(t)$ を時間 t における前房容積、 $V_h(t)$ を時間 t における後房容積とすれば、 $M_a(t) = V_a(t)C_a(t)$ 、 $M_h(t) = V_h(t)C_h(t)$ が成り立つ。

本来、前房と後房は2つのコンパートメントに分かれるので、そのBAB透過性も前房-血漿、後房-血漿と独立して設定すべきである。しかし、後房は眼外から透見できないので、現時点では C_h 、 V_h を非侵襲的に測定することはできない。したがって、少なくとも人眼においては、前後房を併せた形でBAB透過性を評価せざるをえない。本研究では、次式によって規定される前房内への蛋白流入指数 $P_{in}(t)$ を人眼におけるBAB透過性の指標として用いた。

$$\frac{dM_a(t)}{dt} = P_{in}(t)[C_p(t) - C_a(t)] - f(t)C_a(t) \quad (3)$$

この $P_{in}(t)$ は厳密には式(1)、(2)で規定した $A_{in}(t)$ と $H_{in}(t)$ の和ではないが、後房に流入した蛋白は房水流によって前房に流入するので、前後房を合わせたBAB蛋白透過性の指標となりうる。式(3)を変形すると $P_{in}(t)$ は以下の式で与えられる。

$$P_{in}(t) = \left[f(t)C_a(t) + \frac{dV_a(t)}{dt}C_a(t) + \frac{dC_a(t)}{dt}V_a(t) \right] / [C_p(t) - C_a(t)] \quad (4)$$

前房容積が変化しない場合、式(1)の両辺を体積 V_a で除し $P_{in}(t)/V_a$ を $k_{in}(t)$ と書くと、

$$\frac{dC_a(t)}{dt} = k_{in}(t)[C_p - C_a(t)] - \frac{f(t)}{V_a}C_a(t) \quad (5)$$

となる。 $k_{in}(t)$ は前房内への蛋白の流入係数と定義され、次の式で与えられる。

$$k_{in}(t) = \left[\frac{dC_a(t)}{dt} + \frac{f(t)C_a(t)}{V_a} \right] / [C_p - C_a(t)] \quad (6)$$

前房容積が一定であればこの $k_{in}(t)$ をBABの蛋白透過性の指標とすることができる。本研究で使用した各種自律神経作動薬の中で前房容積を変化させる薬剤である pilocarpine と tropicamide についてはBAB透過性の指標として $P_m(t)$ を用い、前房容積を変化させない apraclonidine, phenylephrine, epinephrine, timolol については $k_{in}(t)$ を用いた。

第1章 第2節

前房内フレアー強度と前房内蛋白濃度の相関

1.2.1. 序論

本研究で開発したBAB透過性の評価法では、前房内蛋白濃度を laser flare-cell meter で測定した前房内フレアー強度から求めるので、前房内フレアー強度と前房内蛋白濃度が正確に対応することが必要である。しかし、フレアーは異なる光散乱特性を持った様々な前房内物質の光散乱の合計なので、フレアー測定によって常に前房内蛋白濃度が正確に定量できるわけではない(46-48)。たとえばBABの障害が進むと強く光を散乱する大分子蛋白が前房内に流入し、フレアー強度と前房内蛋白濃度との相関が変化する(48)。さらに、高濃度の蛋白溶液のフレアー強度を測定する際には、散乱光がさらに溶液中の蛋白分子によって二次散乱(quenching)を受けて減弱する可能性がある。したがって、laser flare-cell meter を前房内蛋白濃度の定量的評価に用いるためには適切な補正が必要がある。そこで、様々な程度のBAB障害をもつ眼において laser flare-cell meter のフレアー測定値(photon count/msec)、その値を同等のフレアーをもつ albumin 溶液の濃度に変換した値、実際の前房内 albumin 濃度の三者の関係を解析した。前房内 albumin 濃度は血漿 albumin 濃度と fluorescein isothiocyanate (FITC) を標識した albumin の前房/血漿濃度比から求めた。この方法を用いたのは、1) フレアー値と前房内 albumin 濃度の経時変化が同一眼で測定でき、2) 前房穿刺によって得られた少量の房水から albumin の絶対濃度を測定することにはかなりの誤差が伴うからである。結果より、前房内 albumin 濃度はフ

レアー値が約100 photon count/ms以下ならばalbumin濃度に換算したフレアー値で定量的に評価され、それ以上の場合はフレアー値そのものを用いた方が換算値を用いるよりも正確に前房内albumin濃度を評価できることが明かとなった。

1.2.2. 対象および方法

2-1 対象

有色家兎(2.0-2.5 kg) 13羽

2-2 薬剤

chromatography精製 rabbit albumin (Cappel Products)

rabbit albumin (fraction V, Sigma)

fluorescein isothiocyanate (Sigma)

prostaglandin E_1 (Sigma)

0.4% tropicamide (ミドリン-M®, 参天製薬)

4% pilocarpine (サンピロ®, 参天製薬)

人工房水 (オベガード®, 千寿製薬)

2-3 機器

laser flare-cell meter (FC-1000®, 興和)

slit-lamp fluorophotometer (トプコン)

microconcentrator (Centricon®-30, WR Grace)

2-4 FITC-albuminの作成

FITC-albuminはMacDonaghらの方法(49)に準じて家兎albumin とFITCを重合させて作成した。FITC-albumin溶液の一部分を磷酸緩衝液(PBS, pH 7.4)で1000倍に希釈してmicroconcentratorで重合していないFITCを濾過した。濾液の蛍光強度をslit-lamp fluorophotometerで測定し、濾過前のものの蛍光強度の0.5%以下であることを確認した。したがって、作成したFITC-albumin溶液中の非重合FITCは無視できる程度である。FITC-albumin溶液は0.22 μ m フィルターで無菌化し、使用時まで4℃で保存した。

2-5 薬剤を投与した家兎眼におけるフレアーと蛍光強度測定

有色家兎(2.0-2.5 kg)にFITC-albumin溶液(prostaglandin E_1 投与群には50 mg/kg、pilocarpineまたはtropicamide投与群では300 mg/kg)を耳静脈から投与し、投与後

60-72時間後に測定を開始した。前房内蛍光強度はslit-lamp fluorophotometerで、フレアー強度をlaser flare-cell meterで測定した。これらの測定を家兎の両眼に、1) 強度のBAB障害を起こさせるために10 μ g prostaglandin E_1 (20 μ l PBSに溶解)を、2) 軽度のBAB透過性変化(第2章第1節参照)を起こすために30 μ l 4% pilocarpine または30 μ l 0.4% tropicamideを点眼した前後に行なった。FITC-albuminを投与した反対側の耳静脈から静脈血70 μ lを各測定の直後にヘパリン処理したガラス管で採取しヘマトクリット遠心機で10000 x G、2分遠心した。分離した血漿をPBSで50倍に希釈し蛍光強度をslit-lamp fluorophotometerで測定した。最終測定の後に家兎をketalar筋注(30 mg/kg)で麻酔し、心臓から動脈血を採取した。血漿中albumin濃度、総蛋白濃度をそれぞれbromocresol法(50)とBradford法(51)で求めた。これらの濃度は測定期間中一定であると仮定した。血漿中の重合していないFITCを評価するため、各家兎の血漿希釈液の蛍光強度を前述のごとく濾過する前後で測定した。各家兎血漿の濾過後の蛍光強度は濾過前の1%以下であった。fluorophotometerの励起光強度の安定度は標準液(人工房水に溶解した100 ng/ml sodium fluorescein)の蛍光強度を随時測定することで確認した。

2-6 Laser flare-cell meterのcalibration

Laser flare-cell meterの測定値(photon count/ms)とalbumin溶液濃度の関係をin vitroの測定で求めた。chromatographyで精製した家兎albuminと人工房水でalbumin溶液の希釈系列(20 mg/100 ml- 5.3 g/100 ml)を作成した。これらの溶液を人工前房模型(図3)に入れてフレアー強度をlaser flare-cell meterで測定した。

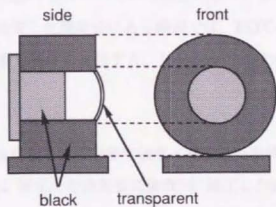


図3 人工前房模型

2-7 蛋白が蛍光強度測定に及ぼす背景効果の評価

蛋白分子は自家蛍光を持つ一方、蛍光物質の蛍光を二次的に散乱するので、蛍光物質の蛍光強度測定は測定溶液中の蛋白分子の影響を受ける(52)。したがって、得られた蛍光強度測定値は補正を要する。BAB機能が正常な時の前房内蛋白は主としてalbuminであるが、BABが著しく障害された時にはその組成が血漿の組成に近づく(8, 53, 54)。本研究ではFITC-albuminの蛍光強度測定に及ぼす影響をalbuminと血漿について調べた。家兎albumin (fraction V)の溶液または正常家兎の血漿を人工房水で4.5倍に順次希釈して0-8.0 g/100mlのalbuminまたは血漿を含む溶液群を作成した。これらの溶液に順次4.5倍に希釈したFITC-albumin溶液群を混合して、albuminまたは血漿の濃度とFITC-albumin濃度のマトリックスを作成した。これらの溶液をplastic cuvette (10x10x48 mm)に入れ、その蛍光強度をslit-lamp fluorophotometerで測定した。測定光路と励起光路の角度は直角に設定し、cuvetteの前壁と側壁をそれぞれの光路に直交するように設置した。測定窓はcuvetteの前壁と側壁の内壁からそれぞれ1.2 mmの距離をもつ点に合わせた。

2-8 前房内albumin濃度の決定

前房内albumin濃度を血漿内albumin濃度とFITC-albumin濃度の前房/血漿比から以下の式を用いて求めた。

前房内albumin濃度＝

$$\text{血漿内albumin濃度} \times \text{前房内FITC-albumin濃度} / \text{血漿内FITC-albumin濃度} \quad (7)$$

この式は生体組織内で同様の分子特性を持つ(55, 56)とされるFITC-albuminとnative albuminが同様にBABで扱われるという仮定に基づくものである。FITC-albumin濃度がその蛍光強度と直線関係にある範囲では、FITC-albumin濃度は蛋白質の背景効果を補正した蛍光強度に比例する。したがって式(7)は以下のように書くことができる。

前房内albumin濃度＝

$$\text{血漿内albumin濃度} \times \text{補正した前房内蛍光強度} / \text{補正した血漿蛍光強度} \quad (8)$$

本実験のデータ解析では“補正した血漿蛍光強度”を“補正した50倍希釈血漿の蛍光強度”×50で求めた。こうして求めた前房内albumin濃度をフレアー値およびalbumin濃度に変換したフレアー値と比較した。

1.2.3. 結果

3-1 薬剤を点眼した家兎の前房内フレアー強度と血漿、前房内の蛍光強度

PGE₁点眼によってフレアー値は急激に上昇したが、希釈した血漿の蛍光強度は実験期間中はほぼ一定であった(図4)。フレアー強度と前房内蛍光強度はpilocarpine点眼により増加し、tropicamide点眼により減少した(図5)。血漿albumin濃度と血漿総蛋白濃度はそれぞれ 4.0 ± 0.4 g/100 ml、 7.2 ± 0.5 g/100 ml (mean \pm SD, n=12)であった。

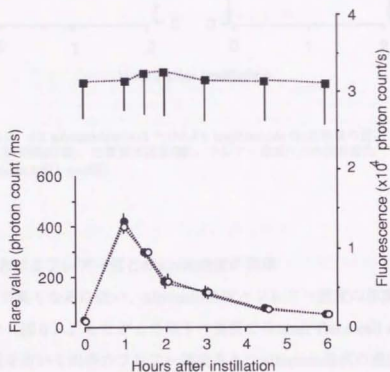


図4 PGE₁点眼後の前房内蛍光強度(●)、血漿蛍光強度(■)、フレアー強度(○)の経時変化(mean \pm SD, n=8眼)

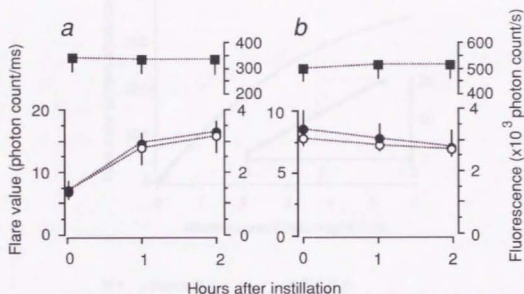


図5 4% pilocarpine (a)または0.4% tropicamide (b)点眼後の前房
内蛍光強度(●)、血漿蛍光強度(■)、フレアー強度(○)の経時変化
(mean ± SD, n=8眼)

3-2 In vitroにおけるフレアー値とalbumin濃度の関係

albumin濃度が高くなるに従い、albumin濃度とフレアー強度の相関を表す曲線の傾きが減少した(図6)。したがって以下の解析ではlaser flare-cell meterのフレアー値を図6の曲線を用いて同等のフレアー強度をもつalbumin溶液の濃度に変換した。変換には3次近似曲線を表す次式を用いた。

$$Y = -22.1 + 10.5X - 1.49 \times 10^{-2}X^2 + 9.25 \times 10^{-5}X^3 \quad (9)$$

X: フレアー値(photon count/ms)

Y: 同等のフレアーを生じるalbumin溶液の濃度(mg/100 ml)

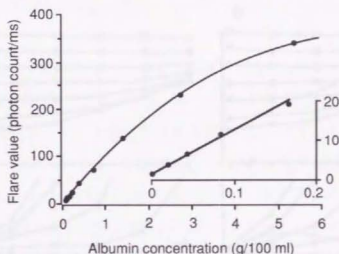


図6 albumin濃度とフレアー強度の関係
順次2倍に希釈した家兎albumin溶液を人工前房模型に入れ、laser flare-cell meterで測定した。insetは20 photon count/ms以下の部分の拡大図。直線は5点の回帰直線($y=110x+1.3$, $r^2=0.995$)を表す。

3-3 FITC-albuminの蛍光強度に及ぼす蛋白の背景効果

albuminと血漿はともに低濃度のFITC-albuminの蛍光強度測定値に明らかな影響を与えた(図7)。albuminまたは血漿蛋白による蛍光測定値の増加は、これらの大分子がもつ自家蛍光によると考えられる。また、蛍光強度測定値の減少はFITC-albuminの蛍光が溶液中の蛋白分子によって二次散乱された結果と考えられる。図7下は一連の濃度のalbuminまたは血漿蛋白を含むFITC-albumin溶液の蛍光強度と蛋白を含まないFITC-albumin溶液の蛍光強度の比を示す。これらの比はalbuminまたは血漿がFITC-albumin溶液の蛍光強度におよぼす背景効果の指標(I_{back})を表す。

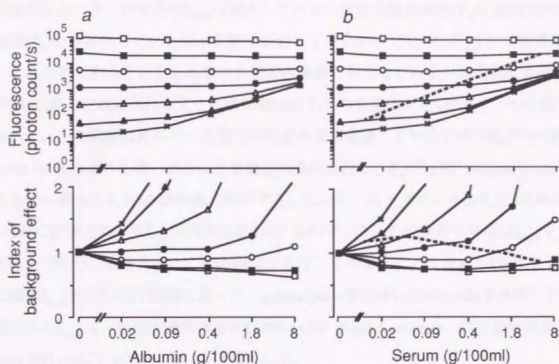


図7 albuminと血漿がFITC-albumin蛍光強度に与える背景効果(上) 順次4.5倍に希釈したFITC-albumin(□, ■, ○, ●, △, ×)と人工房水のみ(×)を順次4.5倍に希釈した家兎albumin(a)または家兎血漿(b)に混合して蛍光強度を測定した。3回の測定値の平均を示す。(下) 順次希釈した家兎albumin(a)または家兎血漿(b)中で測定した蛍光強度とalbuminまたは血漿なしで測定した蛍光強度の比を示す。bの点線はPGE₁投与眼の蛍光強度を補正する際に用いる(本文参照)。

3-4 蛍光強度測定結果を補正するための背景効果指標

蛍光強度測定値を以下の式で補正した。

$$\text{補正した蛍光強度} = \text{蛍光強度測定値} / \text{背景効果指標}(I_{\text{back}}) \quad (10)$$

前房内蛍光強度と50倍に希釈した血漿の蛍光強度は以下の理由から共に血漿の I_{back} で補正した。1) 前房内蛋白は高濃度(>0.4 g/100 ml)の場合に血漿蛋白に近い組成をもつと考えられる(54)、2) 図7からalbuminと血漿は低濃度のFITC-albumin溶液(<0.4 g/100 ml)の蛍光強度に同様の背景効果を与える。各々の蛍光強度測定値に対する I_{back} は測定対象の蛍光強度と蛋白濃度から概算した。PGE₁を点眼した家兎の希釈血漿の I_{back} は、蛍光強度が550-700 photon count/s、蛋白濃度が130-160 mg/100 mlなので1.2と算定した。pilocarpineまたはtropicamideを点眼した家兎の希釈血漿の I_{back} は、蛍光強度が 6×10^3 - 10×10^3 photon count/s、蛋白濃度が130-160 mg/100 mlなので0.8と算定した。PGE₁を点眼した家兎の前房では蛍光強度と蛋白濃度は広い範

囲で変化したので、前房水の I_{back} は補正していない前房内蛍光強度(F_a)と前房内総蛋白濃度(T_a)から算出した。 T_a は本実験で測定していないので $T_p \cdot F_a / (F_p / 1.2)$ で概算した。ここで T_p と F_p はそれぞれ血漿中の総蛋白濃度と補正していない蛍光強度を表す。 PGE_1 を点眼した眼における T_a と F_a の関係は図7上の点線で、 I_{back} は図7下の点線で示される。上の概算は F_a に対する蛋白の背景効果を考慮していないので F_a が 5×10^3 photon count/sよりも高い場合に T_a を約10%過小評価し、 F_a が 1×10^3 photon count/sよりも低い場合に T_a を10-20%過大評価する。しかし、図7下によると T_a が $1/2$ あるいは2倍に計算されても I_{back} の変化は0.1以下なので、この T_a の概算の精度は I_{back} を算出する上で十分だと言える。この点線によれば、このようにして求めた PGE_1 を点眼した眼の I_{back} は0.9-1.2の範囲にあった。pilocarpineまたはtropicamideを点眼した眼の前房水の I_{back} は、前房内蛍光強度が 1×10^3 - 4×10^3 photon count/s、前房蛋白濃度が80 mg/100 ml以下なので(図5) 1.0とした。

蛍光強度測定結果を補正した後、前房内albumin濃度を式(8)で求めた。albuminを含まないFITC-albumin溶液の蛍光強度と濃度は、蛍光強度が 10^2 - 10^6 photon count/sの範囲で直線関係にあったので(図7)、式(8)を本実験で用いることは妥当である。

3-5 フレー値、albumin濃度に換算したフレー値、前房内albumin濃度の関係
 PGE_1 を点眼した眼ではalbumin濃度に換算したフレー値(g/100 ml)と前房内albumin濃度の相関は二相性であった。前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml (即ちフレー値が100 photon count/ms) 以下の範囲では両者の相関は直線的で、その回帰直線は $y = 1.74x + 0.05$, $r^2 = 0.93$ であった。一方、前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以上の範囲ではその相関は低く、回帰直線($y = 2.75x - 0.01$, $r^2 = 0.70$)の傾きが増大した(図8上)。6 g/100 mlを越える濃度のalbumin溶液のフレー値はlaser flare-cell meterで測定できないので、350 photon count/msを越えるフレー値に対応する点(×)は計算から除外した。pilocarpineまたはtropicamideを点眼した眼においてはalbumin濃度に換算したフレー値と前房内albumin濃度は全領域で直線関係にあり、その回帰直線は $y = 1.75x + 0.01$, $r^2 = 0.96$ であった(図8中)。

前房内albumin濃度とalbumin濃度に換算したフレー値の相関が二相性であったので、さらに前房内albumin濃度とフレー値そのものを比較した。 PGE_1 を点眼した眼ではフレー値と前房内albumin濃度はほぼ一様の相関を示し、その回帰直線

は $y = 205x + 3.5$, $r^2 = 0.95$ であった (図8下)。

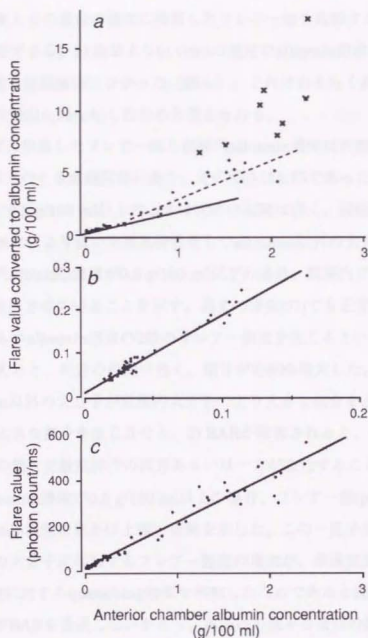


図8 a, PGE投与眼におけるalbumin濃度に換算したフレアー強度と前房内albumin濃度の関係。実線は前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以下の30点に対する回帰直線($y = 1.74x + 0.05$, $r^2 = 0.93$)を表す。点線は前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以上で×以外の18点に対する回帰直線($y = 2.75x - 0.01$, $r^2 = 0.70$)を表す (本文参照)。
b, pilocarpineまたはtropicamide投与眼におけるalbumin濃度に換算したフレアー強度と前房内albumin濃度の関係。直線は回帰直線($y = 1.75x + 0.01$, $r^2 = 0.96$)を表す。
c, PGE投与眼におけるフレアー値と前房内albumin濃度の関係。直線は回帰直線($y = 205x + 3.5$, $r^2 = 0.95$)を表す

1.2.4. 考按

本実験では以下の理由からalbumin濃度に換算したフレアー値と前房内albumin濃度を比較した。1) フレアー強度測定による前房内蛋白濃度測定の定量性は前房内の単一蛋白の濃度とその蛋白の濃度に換算したフレアー値を比較することによって最も直接的に評価できる。2) 結果よりin vitroの測定でalbumin溶液のフレアー測定値がalbumin濃度と直線関係になかった(図6)。これはおそらく高濃度の蛋白がフレアー光を二次散乱(quench)したためと考えられる。

albumin濃度に換算したフレアー値と前房内albumin濃度は前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以下のとき直線関係にあり、その傾きは1.75であった。一方、前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以上のときは両者の相関は弱く、回帰直線の傾きが増大した。この結果は、より強い光散乱特性をもつalbumin以外の大分子が家兎前房に存在し、前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以下の場合、前房内フレアーの43% (0.75/1.75)を生じさせていることを示す。過去の研究(57)でも正常家兎の前房水は同じ蛋白濃度をもつalbumin溶液の2倍のフレアー強度を生じるという結果が示された。この範囲を越えると、両者の相関は低く、傾きが約60%増大した。この結果は1) それらのalbumin以外の大分子が前房内大分子のより大きな割合を占め、その結果フレアーのより大きな部分を生じさせる、2) BABが障害されると、それらのalbumin以外の大分子の量と光散乱特性の両方あるいは一方が変化することを示唆する。他方、前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以上の場合、フレアー値(photon count/ms)と前房内albumin濃度は見かけ上強い相関を示した。この一見矛盾する結果は、albumin以外の大分子に起因するフレアー強度の増加が、高濃度蛋白のlaser flare-cell meter測定に対するquenching効果を相殺したためであると説明できる。

異常な蛋白がBABを透過しないかぎり、前房内の様々な蛋白の組成は一定であるので(8, 54)、前房内albumin濃度が0.5 g/100 ml以下のときalbumin濃度に換算したフレアー値は前房内albumin濃度と同様、前房内総蛋白濃度とも直線関係にある可能性が高い。人眼では異常な蛋白は前房内蛋白濃度が130 mg/100 mlを越えると前房に出現するので(54)、人眼での境界値は本実験の値よりも低いと考えられる。

本実験の結果は、前房内albumin濃度を定量的に評価する際にはフレアー値そのものとalbumin濃度に換算したフレアー値を適切に使い分ける必要があることを示した。BABの破壊があるレベル(家兎の場合フレアー値が100 photon count/ms)以下の場合でも、in vitroの測定でフレアー値と前房内albumin濃度の回帰直線がわず

かに原点を逸れる（図6 inset）ことから、albumin濃度に変換したフレアー値が変換しない値よりも前房内albumin濃度（おそらく前房内総蛋白濃度も）の正確な指標となる。しかし、前述のように、房水中にはalbumin以外の蛋白も存在するので、albumin濃度に変換したフレアー値は、前房内albumin濃度そのものではなく、それに比例する量である。一方、BAB機能破綻がそのレベル以上の場合には、albumin濃度に変換しないフレアー値そのものの方が結果としてより誤謬の少ない指標となる。さらに、変換したフレアー値とフレアー値そのものを適切に使い分けることで、BAB機能破綻の程度（蛋白濃度の前房/血漿比）を定量的に評価することができる。以下、自律神経作動薬を点眼した人眼の前房内蛋白濃度をlaser flare-cell meterで測定する際には、その濃度が人眼において前房albumin濃度とフレアー強度の直線関係が崩れると考えられる値(130 mg/100ml)を越えないので、上述の理由よりフレアー値をalbumin濃度に変換した。

第2章

各種自律神経作動薬点眼の人眼血液房水蛋白透過性に及ぼす効果

第2章 第1節

ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬、遮断薬の人眼BAB透過性に及ぼす効果 (58)

2.1.1. 序論

ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬であるpilocarpineは緑内障治療として広く使用されているが、炎症の在る或いは血管新生を伴う眼には禁忌とされている(4, 59, 60)。Wessleyが初めてpilocarpine点眼による前房水中の蛋白増加を報告して(61)以来、この薬剤が動物眼のBAB透過性を増加させることは各種tracerを使った研究で報告されている(12-14)。人眼では、白内障手術前のpilocarpine使用が術後炎症を増悪させ、虹彩後癒着を助長することが知られている(62, 63)。さらに強力な縮瞳薬である抗コリンエステラーゼは著明な前眼部炎症を引き起こす(1)。これに対し、ムスカリン性アセチルコリン受容体遮断薬であるatropineは動物眼のBAB透過性を減少させると報告され(14, 64)、人眼でも前眼部炎症を軽減すると考えられている(1)。このような臨床上の重要性にもかかわらず、これらの薬剤が人眼BABに与える影響を定量的かつ経時的に検討した報告は殆どない。数少ない研究はfluorophotometryを用いたものに限られ、pilocarpineがBAB透過性に影響しないと報告しているが(65, 66)、fluorophotometryによって得られた情報には大きな理論上の制限があることはすでに3頁で述べた。BABと類似した機能をもつと考えられるBBBの透過性はacetylcholineによって増加することが知られている(35)。遮断薬については報告がない。本研究では遮断薬として散瞳と調節麻痺を目的に眼科診療に頻用されるtropicamideを用いた。atropineは調節麻痺作用が1週間以上持続するので正常篤志者を対象とした実験には適さない。

2.1.2. 対象及び方法

2-1 対象

20-27歳の正常男性篤志者を対象とした。以下、本研究のすべての実験において、

実験に先立ちその内容、意義を十分説明し、被験者から書面による同意を得た。本研究のすべての実験は東京大学医学部倫理委員会によって承認されたものである。

2-2 薬剤

1% pilocarpine (サンピロ® 1%, 参天製薬)

3% pilocarpine (サンピロ® 3%, 参天製薬)

0.4% tropicamide (ミドリンM®, 参天製薬)

10% fluorescein溶液 (Fluorescite®, Alcon Laboratories)

2-3 機器

前房内蛋白濃度をlaser flare-cell meter (FC-1000®, 興和)を用いて測定し(29)、得られたフレアー強度をヒトalbumin濃度に変換して前房内蛋白濃度とした(67)。

fluorophotometryはfluorophotometer (Fluorotron Master®, Coherent Medical)に前房用アダプターをつけて行なった。この測定器械は角膜内fluorescein濃度を過小評価するので、その濃度を1.7倍して補正した(68)。

2-4 縮瞳時のフレアー強度測定

pilocarpineは縮瞳を引き起こすので、小瞳孔の前房内フレアー測定に与える影響を人眼で検討した。6名の正常若年者(12眼)を対象として暗室で測定を行なった。瞳孔径はlaser flare-cell meterの接眼レンズに組み込んだスケールを用いて測定した。次に、laser flare-cell meterに付属した細隙灯の光を瞳孔鎖に照射して縮瞳させ、再び前房内フレアーを測定した。細隙灯は測定開始と同時に消えるよう設計されている。縮瞳時の瞳孔径測定はフレアー測定中に行なった。

2-5 前房内蛋白濃度の測定

1% pilocarpine点眼には10人、3% pilocarpine点眼には8名の被験者が参加した。9時から21時まで30分から2時間の間隔で前房内フレアー強度を測定した。その直後に眼圧をGoldmann圧平式眼圧計で測定し、瞳孔径をHaabの瞳孔計を用いて一定照度の室内で測定した。11時に薬剤30 µlを無作為に選んだ片眼に、他眼に同量の基剤を点眼した。17時に静脈採血を行ない、血漿蛋白濃度をbiuret法で測定した。

0.4% tropicamide点眼には8名の被験者が参加した。10時から17時まで30分から1時間の間隔で前房内フレアー強度、眼圧、瞳孔径を測定した。11時に薬剤30 µlを無作為に選んだ片眼に、他眼に同量の基剤を点眼した。17時に静脈採血を行ない、血漿蛋白濃度をbiuret法で測定した。

2-6 房水流量の測定

1週間後、同一被験者でfluorophotometryを行なった。測定開始の14時間前に10% fluorescein溶液を両眼の結膜嚢に3分間隔で5-9滴点眼し、青色光下に細隙灯で充分な角膜染色を確認した後、直ちに結膜嚢を生理的食塩水で洗浄した。

1% pilocarpine, 3% pilocarpine点眼ともにフレアー強度測定に参加した被験者のうち各5名が参加に同意した。角膜および前房内のfluorescein濃度を9時から21時まで、1-2時間の間隔で行ない、引き続き前房容積を写真撮影法(69)で測定した。眼圧と瞳孔径を10時、13時、15時に測定した。眼圧測定に際しては、角膜の圧平領域の確認のためcondensed milkを用いた。11時に30 μ lの各薬剤を前房内蛋白濃度測定の際と同じ眼に点眼した。

0.4% tropicamide点眼にはフレアー測定に参加した8名全員が参加した。角膜および前房内のfluorescein濃度を10時から17時まで、1時間の間隔で行ない、引き続き前房容積を測定した。眼圧と瞳孔径を10時、13時、15時に上記のごとく測定した。11時に30 μ lの0.4% tropicamideを前房内蛋白濃度測定の際と同じ眼に点眼した。

時間tにおける房水流量 $f(t)$ はfluorescein点眼によるfluorophotometry (Jones-Maurice第2法変法(30, 31, 67))に準じ、次の式を用いて算出した。

$$f(t) = 0.9 \left[V_c \frac{dF_c(t)}{dt} + V_a(t) \frac{dF_a(t)}{dt} \right] / F_a(t) \quad (11)$$

V_c : 角膜実質容積 (人眼の正常値70 μ lを用いた(70))

$F_c(t)$: 時間tにおける角膜内fluorescein濃度

$F_a(t)$: 時間tにおける前房内fluorescein濃度

0.9は虹彩表面で拡散により吸収されるfluoresceinを補正する係数である(70)。

dF_c/dt と dF_a/dt は差分によって近似した(20)。

2-7 BABの蛋白透過性の算出

1.1.2.の式(4)を用いてBABの蛋白透過性のindexである $P_m(t)$ を計算した。フレアー測定のみに参加し、fluorophotometryに参加しなかった被験者の $f(t)$ には、フレアー測定とfluorophotometryの両方に参加した被験者の平均を用いた。

2.1.3. 結果

3-1 縮瞳がフレアー測定に与える影響

人眼において縮瞳時のフレアー強度と通常瞳孔時のフレアー強度との間に有意差は認められなかった($P>0.1$, paired t-test; 表1)。

表1

瞳孔径とフレアー強度の関係

瞳孔径 (mm)	フレアー強度 (mg/100ml*)
4.8±0.1	18.1±1.8
2.5±0.1	18.9±2.1

mean±SEM, n=12. *, albumin濃度に換算

3-2 薬剤点眼後前房内蛋白濃度、瞳孔径、眼圧、房水流量、前房容積

図9-11は、点眼前後の前房内蛋白濃度、瞳孔径、房水流量、眼圧、前房容積の経時変化を示す。全ての被験者でfluorophotometry開始時に角膜内fluorescein濃度は700ng/ml以上であった。この濃度は実験期間を通して正確なfluorophotometryを行うに充分なものであった。

1% pilocarpine (図9)

前房内蛋白濃度は点眼3, 8, 10時間後に有意に上昇し、8時間後に最大 $21\pm10\%$ 上昇した(mean±SEM, n=10, $P<0.05$, paired t-test)。瞳孔径は点眼0.5-10時間後に減少し、最大 2.0 ± 0.2 mm減少した。眼圧は点眼1-3時間後に有意に下降し、2時間後に最大 1.4 ± 0.5 mmHg下降した。房水流量は有意に変化しなかった。前房容積は点眼2-3時間後に有意に減少し、2時間後に最大 $9\pm3\%$ 減少した。血漿蛋白濃度は 7.1 ± 0.2 g/100mlであった。前房内蛋白濃度測定時と房水流量測定時で瞳孔径、眼圧に有意の差はなかった($P>0.1$, unpaired t-test)。

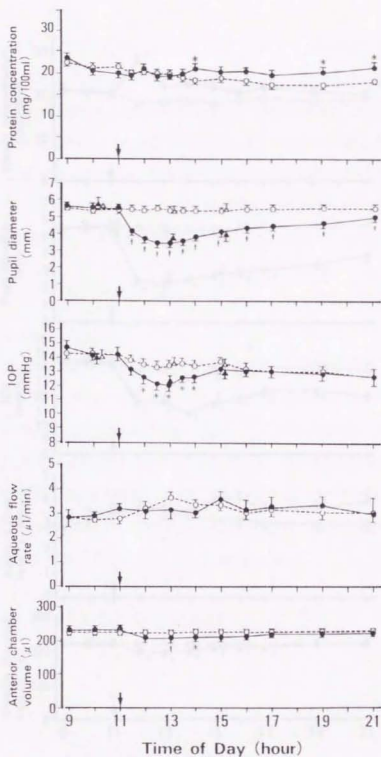


図9 1% pilocarpine点眼前後の前房内蛋白濃度(n=10)、瞳孔径(n=10)、眼圧(n=10)、房水流量(n=5)、前房容積(n=5)。●は投与眼、○は他眼を表す。↓は薬剤点眼の時刻を表す(mean±SEM; *, P<0.05; †, P<0.01; paired t-test)。fluorophotometryを行なった日の瞳孔径と眼圧(▲は投与眼、△は他眼)はフレアー測定を行なった日のもの(●、○)と有意に異ならなかった。(P>0.1, unpaired t-test)

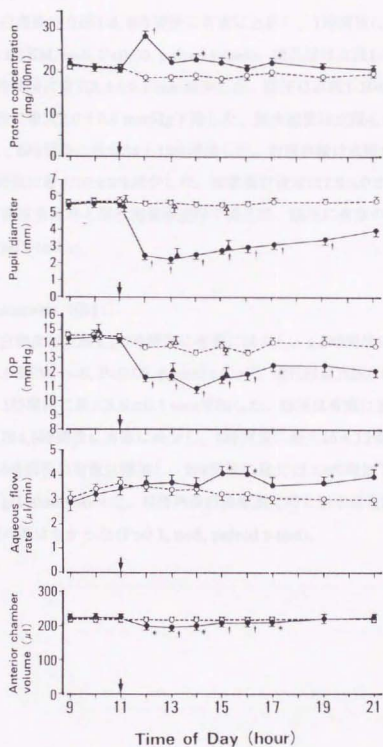


図10 3% pilocarpine点眼前後の前房内蛋白濃度(n=8)、瞳孔径(n=10)、眼圧(n=8)、房水流量(n=5)、前房容積(n=5)。●は投与眼、○は他眼を表す。↓は薬剤点眼の時刻を表す(mean ± SEM; *, $P < 0.05$; †, $P < 0.01$; paired t-test)。fluorophotometryを行なった日の瞳孔径と眼圧(▲は投与眼、△は他眼)はフレアー測定を行なった日のもの(●、○)と有意に異ならなかった。(P>0.1, unpaired t-test)

3% pilocarpine (図10)

前房内蛋白濃度は点眼1-4, 6時間後に有意に上昇し、1時間後に最大 $55 \pm 11\%$ 上昇した(mean \pm SEM, $n=8$, $P<0.05$, paired t-test)。瞳孔径は点眼1-10時間後に有意に減少し、2時間後に最大 3.4 ± 0.2 mm減少した。眼圧は点眼1-10時間後に有意に下降し、3時間後に最大 2.0 ± 0.5 mmHg下降した。房水流量は点眼4, 5, 8, 10時間後に有意に増加し、5時間後に最大 $34 \pm 13\%$ 増加した。前房容積は点眼1-6時間に有意に減少し、2時間後に最大 $10 \pm 2\%$ 減少した。血漿蛋白濃度は 7.2 ± 0.2 g/100mlであった。前房内蛋白濃度測定時と房水流量測定時で瞳孔径、眼圧に有意の差はなかった($P>0.1$, unpaired t-test)。

0.4% tropicamide (図11)

前房内蛋白濃度は点眼1, 1.5時間後に有意に減少し、1.5時間後に最大 $17 \pm 7\%$ 減少した(mean \pm SEM, $n=8$, $P<0.05$, paired t-test)。瞳孔径は点眼0.5 - 5時間後に有意に増加し、1時間後に最大 3.6 ± 0.1 mm増加した。眼圧は有意に変化しなかった。房水流量は点眼4, 5時間後に有意に減少し、5時間後に最大 $15 \pm 11\%$ 減少した。前房容積は点眼1-4時間後に有意に増加し、2時間後に最大 $12 \pm 4\%$ 増加した。血漿蛋白濃度は 7.1 ± 0.3 g/100mlであった。前房内蛋白濃度測定時と房水流量測定時で瞳孔径、眼圧に有意の差はなかった ($P>0.1$, $n=8$, paired t-test)。

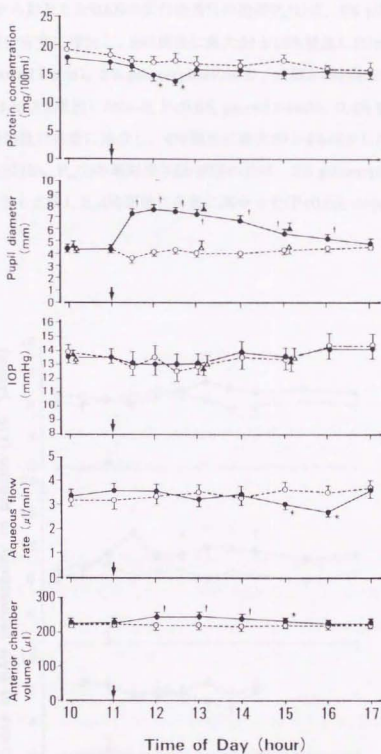


図11 0.4% tropicamide点眼前後の前房内蛋白濃度(n=8)、瞳孔径(n=8)、眼圧(n=8)、房水流量(n=8)、前房容積(n=8)。●は投与眼、○は他眼を表す。↓は薬剤点眼の時刻を表す(mean±SEM; *, P<0.05; †, P<0.01; paired t-test)。fluorophotometryを行なった日の瞳孔径と眼圧 (▲は投与眼、△は他眼) はフレア測定を行なった日のもの (●、○) と有意に異ならなかった。(P>0.1, paired t-test)

3-3 薬剤点眼後のBABの蛋白透過性

以上測定値から計算したBABの蛋白透過性の指標 $P_m(t)$ は、1% pilocarpineの場合、点眼3-8時間後に有意に増加し、8時間後に最大 $34 \pm 10\%$ 増加した(mean \pm SEM, $n=10$, $P<0.05$, paired t-test)。3% pilocarpineの場合、点眼3-8時間後に有意に増加し、1時間で最大 $71 \pm 13\%$ 増加した($n=8$, $P<0.05$, paired t-test)。0.4% tropicamideの場合、点眼4-5時間後に有意に減少し、4時間後に最大 $30 \pm 4\%$ 減少した($n=8$, $P<0.05$, paired t-test)(図12)。 $P_m(t)$ の薬剤投与眼/他眼の比は、3% pilocarpineの方が1% pilocarpineよりも点眼1, 2, 4時間後に有意に高かった($P<0.05$, unpaired t-test)(図13)。

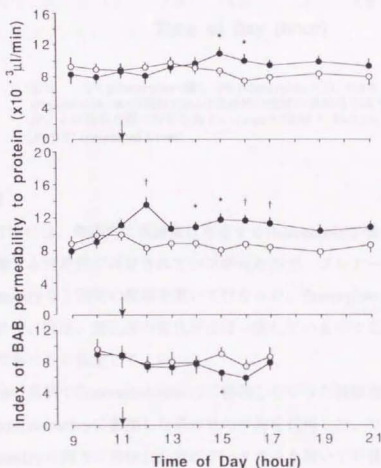


図12 1% pilocarpine (上 $n=10$)、3% pilocarpine (中 $n=8$)、0.4% tropicamide (下 $n=8$) 点眼前後のBAB透過性の指標の経時変化。●は投与眼、○は他眼を表す。↓は薬剤点眼の時刻を表す。mean \pm SEM. *, $P<0.05$; †, $P<0.01$ (paired t-test)

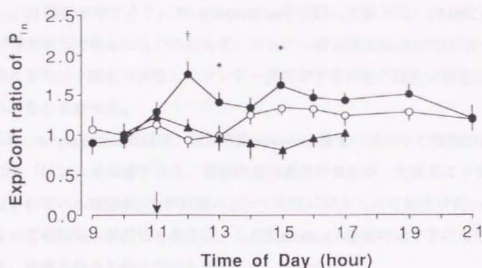


図13 3% pilocarpine (●)、1% pilocarpine (○)、0.4% tropicamide (▲)点眼後のBAB透過性の指標の薬剤投与眼/他眼比。↓は薬剤点眼の時刻を表す。mean±SEM. *, $P<0.05$; †, $P<0.01$ (unpaired t-test)

2.1.4. 考按

本実験施行時には、角膜内に高濃度に存在するfluoresceinが僅かなフレアー変化の測定に影響する可能性が否定されていなかったため、フレアー測定とfluorophotometryを1週間の間隔を置いて行なった。fluorophotometryの日とフレアー測定の日で、眼圧、瞳孔径の変化がほぼ一致しているためこれらの実験日での薬効は同じであったと仮定してよい。

pilocarpineの実験でfluorophotometryに参加しなかった被験者に対しては、 P_{in} の計算にfluorophotometryに参加した者の値の平均を代用した。フレアー測定とfluorophotometryの両方に参加した者のデータのみを用いて計算した P_{in} は、1% pilocarpineの場合、点眼4, 5時間後に有意に増加して($P<0.05$)、最大増加は $31 \pm 15\%$ (mean±SEM)となり、3% pilocarpineの場合、点眼1, 3-6時間後に有意に増加して最大増加は $80 \pm 27\%$ となる。これらの値が結果の値とほぼ同じであることは、 $f(t)$ の平均値を一部の被験者で用いることが大きな過誤の原因にはならないことを示

している。

pilocarpineは前房内蛋白濃度を増加させ、tropicamideは前房内蛋白濃度を減少させた。この増加が瞳孔径の変化によって生じた可能性が低いことは以下の事実から示される。1) 図9が示すように、フレアー強度の変化と瞳孔径の変化が平行していない。2) 図10が示すように3% pilocarpineを点眼した眼では、12:00と13:00で瞳孔径が殆ど同じであるにもかかわらず、フレアー測定値は12:00の方が高い。3) 補助実験により、小瞳孔で測定したフレアー強度が平常状態の瞳孔で測定したものと有意に異ならなかった。

また、tropicamide点眼後、前房内fluorescein濃度の減少率の増加が認められなかったこと(図14)を考慮すると、前房内蛋白濃度の減少が、前房より蛋白濃度が低いとされている後房水(71)が散瞳によって前房に流入した可能性は低い。もし、散瞳によって前後房水が混じりあえば、このfluorescein濃度の減少率は増加するはずである。同様の結果を他の研究も報告している(72)。

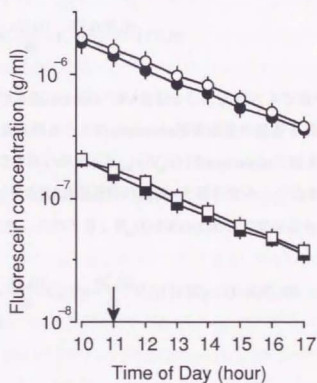


図14 0.4% tropicamide点眼前後の角膜と前房内fluorescein濃度。mean ± SEM; n=8。●は投与眼の角膜、○は他眼の角膜、■は投与眼の前房、□は他眼の前房、↓は点眼時刻を表す。

3% pilocarpineの1回点眼は房水流量を増加させ、1% pilocarpineは増加させなかった。fluorescein点眼法を用いて白人を対象にした研究では0.5% pilocarpineの1回点眼で房水流量が増加する(66)。この差異は両者の被験者群のブドウ膜色素の差に帰すことができるかも知れない(73)。これに対してtropicamideは房水流量を減少させた。毛様体のムスカリン性アセチルコリン受容体に対する刺激は毛様体のcyclic-AMP濃度を低下させ(74)、cyclic AMP濃度の低下は房水産生を増加させる(74, 75)ので、今回の結果、すなわち、ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬による房水流量の増加と遮断薬による房水流量の減少は、人眼の房水産生が少なくとも部分的にはムスカリン性アセチルコリン受容体に関与していることを示唆する。

pilocarpineは用量依存的にBABの蛋白透過性を増加させた。ここで、BAB透過性の増加がfluorophotometryによって算出された房水流量に影響し、式(4)によって計算したBAB透過性を過大評価する可能性を考慮に入れる必要がある。式(11)で計算した房水流量はより正確には以下の式で与えられる。

$$f(t) = (1 - \frac{k_{dpa}(t)}{k_{out}(t)}) [V_c \frac{dF_c(t)}{dt} + \frac{dV_a(t)F_a(t)}{dt}] / F_a(t) \quad (12)$$

$k_{dpa}(t)$ は時間tにおけるfluoresceinのBABを介した拡散による血中への消失係数、 $k_{out}(t)$ は時間tにおける前房からのfluorescein消失総量の係数を表す。本実験では、 $k_{dpa}(t)$ は知ることができないので、 $k_{dpa}(t)V_a(t)$ (fluoresceinに対するBAB透過性の指標)が $P_{in}(t)$ (蛋白に対するBAB透過性の指標)と平行する、すなわち $k_{dpa}(t)V_a(t) = \alpha P_{in}(t)$ であると仮定した。このとき、 $P_{in}(t)$ と $f(t)$ は次の式で与えられる。

$$P_{in}(t) = [f^*(t)C_a(t) + \frac{dV_a(t)}{dt}C_a(t) + \frac{dC_a(t)}{dt}V_a(t)] / [C_p - (1-\alpha)C_a(t)] \quad (13)$$

$$f(t) = f^*(t) - \alpha P_{in}(t) \quad (14)$$

α は定数で

$$f^*(t) = [V_c \frac{dF_c(t)}{dt} + \frac{dV_a(t)F_a(t)}{dt}] / F_a(t) \quad (15)$$

である。正常人眼の $k_{dpa}(t)$ はおおよそ $1 \times 10^{-3}/\text{min}$ なので(20, 65)、 α は点眼していない眼の $C_a(t)$, C_p , $V_a(t)$, $f(t)$ の平均値から約20と計算される。上の式を用いて再計算し

た $P_m(t)$ の最大変化は、1% pilocarpineで $29 \pm 11\%$ 、3% pilocarpineで $69 \pm 15\%$ 、0.4% tropicamideで $23 \pm 13\%$ である(mean \pm SEM)。これらの値は本実験の結果の値に近いので、BAB透過性に対して $f(t)$ を補正せずに $P_m(t)$ を1.1.2.の式(4)で求めることは大きな過誤の原因にならないと考えられる。房水流量に関しては、式(12)を用いてBAB透過性の増加に対して補正した $f(t)$ は、BAB透過性の増加が最大である3% pilocarpine点眼1時間後の時点で、補正しない $f(t)$ より4%少ないにすぎない。このことは、BAB透過性で補正しない $f(t)$ も大きな過誤を含まないことを示唆する。

ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激によるBAB透過性の増加のメカニズムは明らかでないが、1)毛様体上皮の透過性の増加(76, 77)、2)毛様体突起部の血管内皮の透過性上昇(77)、3)前部ブドウ膜の血流増加(78)などが考えられる。現在のところ毛様体上皮や虹彩血管内皮のtight junctionの変化、あるいは毛様体実質の透過性の変化のメカニズムを解析した報告はない。BBB透過性の変化に関しても同様である。一般には、上皮細胞のtight junctionは多様な刺激にすばやく反応する動的な構造であると考えられている(79)。種々の培養上皮細胞や組織においてtight junctionの透過性は細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇(80-88)やprotein kinase Cの活性化(89-94)によって増加し、細胞内cAMP濃度の増加によって減少する(95-100)ことが知られている。pilocarpineはムスカリン性アセチルコリン受容体の各種サブタイプの中で、M1,3,5に相対的選択性を示し(101-103)、人眼毛様体上皮と虹彩血管にはM3のサブタイプが多いと報告されている(104, 105)。M1,3への刺激はphospholipase C (PLC) β の活性化を介してdiacyl glycerol (DG)とinositol triphosphate (IP_3)の産生を促し、M2,4への刺激はadenylate cyclaseを阻害してcAMPの増加を抑制する(106)。したがって、人眼へのpilocarpineの点眼は虹彩毛様体においてPKCの活性化と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を介してtight junctionの透過性を増加させると考えられる。また、pilocarpineがM2に作用すると虹彩毛様体でcAMPが減少するので、tight junctionの透過性の増加は抑制されない。pilocarpineによる P_m の増加は以上のような受容体からtight junctionへのシグナルによるものかもしれない。

一方、前房内への蛋白分子の流入は毛様体筋の収縮と弛緩によっても影響を受ける。正常状態では、蛋白分子は毛様体突起の実質内の血管から漏出し、虹彩実質を通過して前房内へ流入すると考えられている(7-9)。毛様体血管から出た蛋白の多くは毛様体筋の中を拡散し強膜を通して眼外に出るとされているので(107)、毛様体

筋が収縮して蛋白の脈絡膜下腔への流れが遮断されると、前房へ流れ込む蛋白が増えることも考えられる。しかし、毛様体筋の収縮によって毛様体実質内での蛋白の流れ(uveoscleral flow)自体も抑制されるので(108)、これらの作用は相殺する方向に働くことになる。一方、毛様体筋の弛緩は、血漿蛋白の前房内への流入に対して収縮時とは反対の作用を及ぼすと考えられる。毛様体筋の収縮、弛緩が全体として前房内蛋白の流入をどのように変化させるかについては、本研究の方法では情報を得られない。これは今後の検討を要する課題である。もう一つの毛様体筋収縮の蛋白流入に対する影響として考えられるのは、虹彩毛様体実質内に蓄えられていた蛋白の放出である。3% pilocarpine点眼後ただちに認められた前房内蛋白濃度の急激な増加は、この作用が原因になっていた可能性がある。しかし、この作用は長く続く性質のものでないことを考えると、本実験で認められた持続的な $P_{in}(t)$ の増加をこの作用のみに帰することは非合理的である。

ここで用いた前房内蛋白動態を規定する数式は、蛋白分子が虹彩毛様体実質内を通過するのに要する時間の遅れを表す項を含んでいない。このような遅れを表す因子は、家兎眼の虹彩毛様体で定常状態の蛋白拡散をsimulateした数式モデルで使われている(9)。このモデルを本実験の解析に組み込めば、 $P_{in}(t)$ の変化の中で、毛様体上皮や虹彩血管内皮の透過性の変化なしに虹彩毛様体実質内での蛋白拡散の変化によるものがどの程度の部分を占めるのかを決定できる可能性がある。しかし、このモデルを本実験に適用するためには、pilocarpineとtropicamideがこのモデルのparameter、即ち毛様体実質の大きさと多孔性、蛋白の拡散性、毛細血管に対する蛋白流の透過定数を人眼でどのように変化させるかを明らかにしなければならない。

本実験で算出した $P_{in}(t)$ は前房内への血漿蛋白の流入しやすさを定量的に表すもので広義のBAB透過性であるが、結果の臨床的意義について言及したい。本実験の結果からpilocarpineの一回点眼が正常若年者のBABの蛋白透過性を増加させることが明かとなった。加齢に伴ってBABが障害されること(109)を考慮すると、この増加は長期にわたってpilocarpine治療を受けている高齢の緑内障患者ではより著明であろう。したがって、これらの患者に内眼手術を行なう際には十分な注意が必要である。さらに、医師は緑内障患者にpilocarpineを処方する際に眼圧下降効果と本研究で明かとなったBAB透過性増加作用という得失のバランスを十分考慮するべきである。将来的にはこのようなBAB透過性増加作用のない薬剤の開発が必要であろう。

他方、atropineは内眼術後に散瞳と毛様体筋弛緩のためだけでなく、BAB透過性の減少させる意味で重要であると考えられている(1)。本実験で確認されたtropicamideによるBAB透過性の減少は、はじめてその考えに実験的裏付けを与えた。

第2章 第2節

α アドレナリン受容体刺激薬が人眼BAB透過性に及ぼす効果 (110, 111)

2.2.1. 序論

α_1 刺激薬であるphenylephrineは散瞳薬として広く使用され、人眼の房水動態に殆ど作用しないと考えられていた。phenylephrineは開放隅角緑内障で眼圧下降効果を持たず(112-115)、房水産生にも作用しないと報告されている(116, 117)。一方、van Genderenらはphenylephrineが房水流量を130%増加させると報告した(72)。このような房水流量の増加は、glaucomatocyclitic crisisの発作時に房水流量が35%増加しfluoresceinに対するBAB透過性が160%増加すること(118)を考えると、非生理的なものと考えられる。しかし、従来のfluorophotometryを用いた報告ではphenylephrine点眼によるBAB透過性の変化は検出されていない(116)。phenylephrine点眼は緑内障治療に用いられないが、眼底検査や白内障手術前に多用されるので、この薬剤のBAB透過性に対する作用を再評価することには臨床的意義があると考えた。

α_2 刺激薬であるapraclonidineは近年、眼圧下降薬として臨床治療に用いられるようになった。その眼圧下降作用(119-121)は房水産生抑制による(122)。しかし、この薬剤が前眼部のレーザー手術後の眼圧上昇を抑制する効果(123-125)はtimololやacetazolamideのように同程度の房水産生を抑制する薬剤の効果(126-128)よりも優れていることから、房水動態に対して特殊な作用を持つと考えられている。

apraclonidine点眼は、家兎虹彩へのレーザー照射による眼圧と房水蛋白濃度の上昇(129-131)の両方を抑制するという報告(131)はその眼圧上昇抑制作用がBAB透過性に関係することを示唆している。しかし、fluorophotometryではapraclonidineによる人眼BAB透過性の変化は有意でなかった(122)。したがって、本研究の方法を用いてapraclonidineの人眼BAB透過性に対する作用を再検討した。

遮断薬については α_1 アドレナリン受容体遮断薬であるbunazosinが人眼のBAB透過性を有意に変化させないことが当教室の研究(132)で明らかにされており、 α_2 アドレ

ナリン受容体遮断薬は臨床的に使用されていないため、本研究では検討の対象としなかった。

2.2.2. 対象および方法

2-1 対象

20-24歳の正常男性篤志者を対象とした。

2-2 薬剤

5% phenylephrine (ネオシネジン®、興和新薬)

0.5% apraclonidine (Alcon Laboratories, Fort Worth)

2-3 機器

pilocarpineとtropicamideの場合と同様である。(2.1.2.参照)

2-4 前房内蛋白濃度の測定

9時から17時まで30分から1時間の間隔で前房内フレア強度をlaser flare-cell meterで測定した。その直後に眼圧をGoldmann圧平式眼圧計で測定し、瞳孔径をHaabの瞳孔計を用いて一定照度の室内で測定した。11時に薬剤30 μ lを無作為に選んだ片眼に、他眼に同量の基剤を点眼した。17時に静脈採血を行ない、血漿蛋白濃度をbiuret法で測定した。

2-5 房水流量の測定

1週間後、同一被験者でfluorophotometryを行なった。測定開始の14時間前に10% fluorescein溶液を両眼の結膜嚢に3分間隔で5-9滴点眼し、青色光下に細隙灯で充分な角膜染色を確認した後、直ちに結膜嚢を生理的食塩水で洗浄した。角膜および前房内のfluorescein濃度を9時から17時まで、1時間の間隔で行ない、引き続き前房容積を写真撮影法(69)で測定した。眼圧と瞳孔径を10時、13時、15時に測定した。眼圧測定に際しては、角膜の圧平領域の確認のためcondensed milkを用いた。11時に30 μ lの各薬剤を前房内蛋白濃度測定の際と同じ眼に点眼した。房水流量は2.1.2.の式(11)によって算出した。

2-6 前房内蛋白流入係数の算出

1.1.2.の式(6)を用いてBABの蛋白透過性の指標である $k_m(t)$ を計算した。

2.2.3. 結果

2.2.3.1. phenylephrine

前房内蛋白濃度はphenylephrine点眼3時間後に有意に $20 \pm 6\%$ 減少した(mean \pm SEM, $n=10$, $P<0.05$, paired t-test)。瞳孔径は点眼0.5-6時間後に有意に増加し、1.5時間後に最大 $7.3 \pm 0.1\text{mm}$ まで増加した。房水流量は点眼1, 2時間後にそれぞれ有意に $81 \pm 13\%$, $125 \pm 35\%$ 増加し、点眼4時間後には有意に $20 \pm 5\%$ 減少した(図15)。

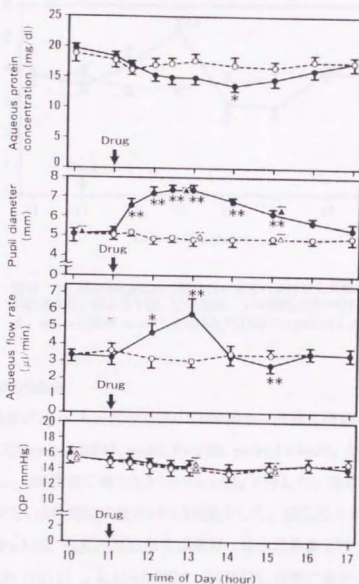


図15 5% phenylephrine点眼前後の前房内蛋白濃度、瞳孔径、房水流量、眼圧の経時変化。●は投与眼、○は他眼を表す。▲と△はそれぞれfluorophotometryを行なった日の投与眼と他眼を表す。↓は薬剤点眼の時刻を表す。(mean \pm SEM; $n=10$ *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; paired t-test)

眼圧と前房容積は有意に変化しなかった($P>0.2$, paired t-test)。血漿蛋白濃度は 7.2 ± 0.2 g/100ml であった。前房内蛋白濃度測定時と房水流量測定時で瞳孔径、眼圧に有意の差はなかった。 $k_{in}(t)$ は点眼1, 2時間後にそれぞれ有意に $31 \pm 14\%$, $66 \pm 21\%$ 増加し、3時間後に有意に $18 \pm 8\%$ 減少した (図16)。

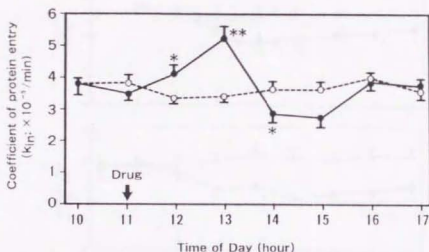


図16 5% phenylephrine点眼前後の前房内蛋白流入係数(k_{in})の経時変化。●は投与眼、○は他眼、↓は薬剤点眼の時刻を表す。mean \pm SEM. $n=10$ *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (paired t-test)

2.2.3.2. apraclonidine

前房内蛋白濃度はapraclonidine点眼0.5-6時間後に有意に増加し、6時間後に最大 $47 \pm 7\%$ 増加した(mean \pm SEM, $n=10$, $P<0.05$, paired t-test)。眼圧は点眼1-6時間後に有意に下降し、3時間後に最大 3.8 ± 0.2 mmHg下降した。房水流量は点眼2-6時間後に有意に減少し、3時間後に最大 $45 \pm 5\%$ 減少した。瞳孔径と前房容積は有意に変化しなかった($P>0.2$)。前房内蛋白濃度測定時と房水流量測定時で眼圧に有意の差はなかった($P>0.2$) (図17)。 $k_{in}(t)$ は点眼3, 4時間後に有意に減少し、3時間後に最大 $21 \pm 6\%$ 減少した (図18)。

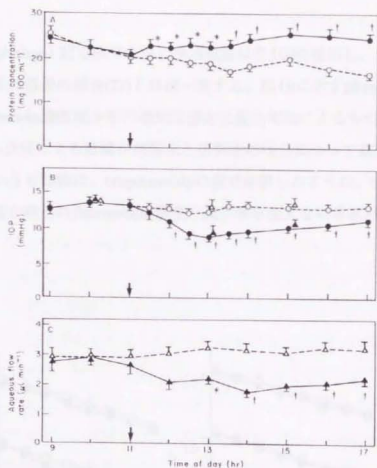


図17 0.5% apraclonidine点眼前後の前房内蛋白濃度(A)、眼圧(B)、房水流量(C)の経時変化。●は投与眼、○は他眼を表す。▲と△はそれぞれfluorophotometryを行なった日の投与眼と他眼を表す。↓は点眼時刻を表す。mean \pm SEM; n=10. *, P<0.05; †, P<0.01 (paired t-test)

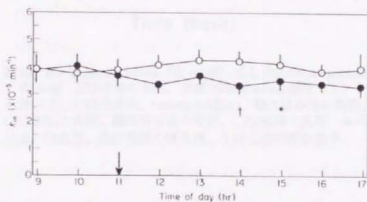


図18 0.5% apraclonidine点眼前後の前房内蛋白流入係数(k_{in})の経時変化。●は投与眼、○は他眼、↓は点眼の時刻を表す。mean \pm SEM; n=10. *, P<0.05; †, P<0.01 (paired t-test)

2.2.4. 考按

5% phenylephrine 1 回点眼で人眼の房水流量は約100%増加し、ついで約20%減少した。この結果は以前の報告(72)とほぼ一致する。図19に示すphenylephrine点眼後の前房内fluorescein濃度減少率の増加は房水流量の増加によるものである。

phenylephrine点眼による散瞳が前房水と後房水の混合によって前房内fluoresceinを希釈したという可能性は、tropicamideの項で考察したように、tropicamideによる同程度の散瞳が前房内fluorescein濃度の減少率を変えない事実から否定的である。

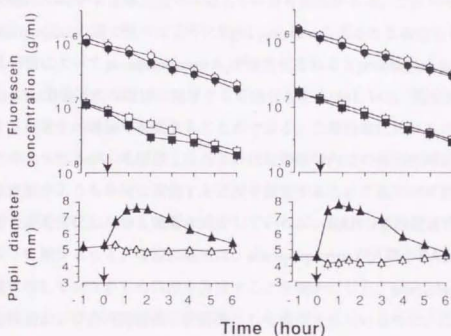


図19 5% phenylephrine (左 $n=10$) または0.4% tropicamide (右 $n=8$) 点眼前後の角膜、前房内fluorescein濃度 (上) と瞳孔径 (下) の経時変化。(mean \pm SEM) ●は投与眼の角膜、○は他眼の角膜、■は投与眼の前房、□は他眼の前房、▲は投与眼の瞳孔径、△は他眼の瞳孔径、↓は点眼時刻を表す。

BAB透過性の指標である k_{in} も、phenylephrine点眼後に増加し、ついで減少するという二相性変化を示した。このような変化が従来のfluorophotometryを用いた研究がで検出できなかったは、fluorophotometryではBAB透過性が数時間の平均とし

て算出されるので二相性変化も平均化されたためと考えられる。

動物眼では、phenylephrine点眼が房水流量を増加させる(133)、減少させる(134, 135)、変化させない(136)など、見解は一致していない。phenylephrine点眼は家兎の前部ブドウ膜血流を減少させると報告されている(137)。人眼でも同様の変化を仮定すれば、毛様体血管から毛様体実質を経て前房へ漏出する蛋白(7-9)は減少するはずである。したがって、今回認められたBABの蛋白透過性の増加は、毛様体実質から直接前房に達する経路ではなく、毛様体上皮や虹彩血管内皮のtight junctionを透過して血漿蛋白が前房内に流入したことを示唆する。実際、phenylephrineは摘出家兎毛様体上皮の透過性を増加することが知られている(138)。 α_1 受容体刺激は IP_3 とDGの産生を促進することで、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とPKCの活性化を引き起こす(139)とされる。また、 α_1 受容体刺激による膜電位依存性Caチャンネル活性化を介した Ca^{2+} 流入増加(140)が毛様体上皮でも生じている可能性がある。これらのシグナルはpilocarpineの項で述べたようにtight junctionの透過性を増加させる。一方、 α_1 受容体刺激によってphospholipase A_2 が活性化されるとprostaglandinが産生され、二次的にBAB透過性の増加に関与する可能性もある(141, 142)。房水流量の増加も水に対する透過性の増加で説明することができる。二相性変化のメカニズムは複雑であると考えられるが、毛様体上皮あるいは虹彩血管内皮の透過性増大が前部ブドウ膜の血流減少よりも早期に回復する状況を仮定することで説明が可能である。すなわち、前者が正常化した後も後者が減少していれば、BABの蛋白透過性と房水流量は正常以下に減少する。今回の結果は、phenylephrineが人眼のBABの透過性と房水流量に対して少なからぬ作用を及ぼすことを明かにした。phenylephrineは日常の眼底検査および白内障術前に散瞳薬として頻用されているので、このような α_1 作動薬の性質は今後の研究を促す重要な臨床的意義を持つと言える。

0.5% apraclonidine点眼は従来の報告(119-122)と同程度に眼圧と房水流量を減少させ、さらにBAB透過性の指標である k_{in} を20%減少させた。 α_2 アドレナリン受容体への刺激はadenylate cyclaseの阻害によってcAMPの上昇を抑制し(143)、また、Caチャンネルの阻害によって細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入を抑制する(144)。前述のように、細胞外 Ca^{2+} の流入はtight junctionの透過性を増加させるので、apraclonidine点眼による k_{in} の減少はtight junctionの透過性の減少によるものであろう。また、前述のように、正常状態では血漿蛋白は毛様体内の有窓血管から虹彩毛様体実質内を経て前

房内に流入するので(7-9)、apraclonidine点眼は前部ブドウ膜の血流を減少させる(145, 146)ことによって蛋白の前房内流入を減少させる。ここで明らかになったapraclonidineによる前房内蛋白流入係数の減少は、この薬剤がもつBAB透過性減少作用を人眼で初めて実験的に示したものである。ごく最近apraclonidineは白内障手術後の炎症を抑制する(147)と報告された。この薬剤が病的状態のBABと正常状態のBABの透過性を同一のメカニズムによって減少させるかどうかは現時点では明らかではない。

レーザー照射後の眼圧上昇の機序はいまだに明らかにされていないが、prostaglandin産生を介する、あるいは三叉神経刺激を介するBAB破綻が少なくとも部分的に関与していると考えられている(148, 149)。正常なBABに対する作用がレーザー照射後のBABに対するものと同一とは限らないが、ここで認められたapraclonidineによる前房内蛋白流入係数の減少は、レーザー照射後のBAB破綻による蛋白の前後房への流入を抑制する方向に働く。さらに、apraclonidineは β -遮断薬と同様に房水流量を減少させることによってレーザー照射後の眼圧上昇を抑制することができる(128, 150)。これに対し、代表的な交感神経 β -遮断薬であるtimolol点眼は、正常人眼のBAB透過性に有意の作用を及ぼさない(次節参照)。この点で、apraclonidineは房水流量とBAB透過性の両方を減少させることができる唯一の市販薬剤である。この意味で、 β -遮断薬や炭酸脱水酵素阻害薬では十分に抑制できないブドウ膜炎に起因する眼圧上昇(59)に対しapraclonidineが有効である可能性がある。

第2章 第3節

β アドレナリン受容体刺激薬、遮断薬が人眼BAB透過性に及ぼす効果
(151, 152)

2.3.1. 序論

epinephrineは抗緑内障薬として今世紀の初頭から使われているが(3)、その人眼の房水動態に与える効果には不明点が多い。房水流量はepinephrine点眼によって増加する、変わらない、減少するなど見解の一致がなく、この多様性は被験者、投与量、投与期間、測定時間などの違いによって説明されている(75)。BAB透過性に関しては、fluorescein全身投与法による研究によってfluoresceinに対するBAB透過性はepinephrine 1回点眼で減少し(65)、長期投与ではprostaglandin産生を介して増加

する(153)と報告されている。後者の実験結果は、epinephrineの長期投与を受けている緑内障眼のBABは有意に障害され、そのような眼が内眼手術を受ける際に特別の注意が必要なことを示す点で重要である。前節で示したように α_1 作動薬であるphenylephrineはBAB透過性を二相性に変化させ、 α_2 作動薬であるapraclonidineが減少させる。そこで α_1 作用と α_2 作用を持ち合わせるepinephrine(154)が血漿蛋白に対するBAB透過性にどのような効果をもたらすのかを検討した。

現在広く用いられている β 遮断薬timololは、臨床的に明らかなBABの破綻をきたさないとされている(1)。白内障術前に点眼した0.5% timololが術中に採取した房水中の蛋白濃度を増加させるが、各種蛋白の構成比を変化させないこと(155, 156)もこの見解を支持している。しかし、これらの報告はBABの蛋白透過性を定量的に評価したものではない。BABのfluoresceinに対する透過性はtimolol点眼によって増加すると報告されている(65)。

2.3.2. 対象および方法

2-1 対象

22-30歳の正常男性篤志者を対象とした。

2-2 薬剤

1% epinephrine (エピスタ[®]、参天製薬)

0.5% timolol (チモプトール[®]0.5%、参天製薬)

2-3 機器

pilocarpineとtropicamideの場合と同様である。(2.1.2.参照)

2-4 前房内蛋白濃度の測定

8時または9時から17時まで1時間の間隔で前房内フレアー強度をlaser flare-cell meterで測定した。その直後に眼圧をGoldmann圧平式眼圧計で測定し、瞳孔径をHaabの瞳孔計を用いて一定照度の室内で測定した。11時に薬剤30 μ lを無作為に選んだ片眼に、他眼に同量の基剤を点眼した。17時に静脈採血を行ない、血漿蛋白濃度をbiuret法で測定した。

2-5 房水流量の測定

前房内蛋白濃度の測定と同時にfluorophotometryを行なった。測定開始の8時間前に5%または10% fluorescein溶液 (Fluorescite[®], Alcon Laboratories)を両眼の結膜

囊に3分間隔で5-9滴点眼し、青色光下に細隙灯で充分な角膜染色を確認した後、直ちに結膜囊を生理的食塩水で洗浄した。

角膜および前房内のfluorescein濃度と眼圧を8時または9時から17まで、1時間の間隔で行ない、10時と13時に前房容積を写真撮影法(69)で、瞳孔径をHaabの瞳孔計で測定した。眼圧測定に際しては、角膜の圧平領域の確認のためcondensed milkを用いた。

2-6 前房内蛋白流入係数の算出

1.1.2.の式(6)を用いてBABの蛋白透過性の指標である $k_{in}(t)$ を計算した。

2.3.3. 結果

2.3.3.1. epinephrine

前房内蛋白濃度は測定の全期間を通して対照である他眼と比較して有意に変化しなかった($P>0.2$, paired t-test; 図20)。眼圧は点眼1-4時間後に他眼より有意に下降した($P<0.05$, paired t-test)。瞳孔径と前房容積は有意に変化しなかった。以上から計算した $k_{in}(t)$ は有意に変化しなかった($P>0.1$, paired t-test; 図21)。



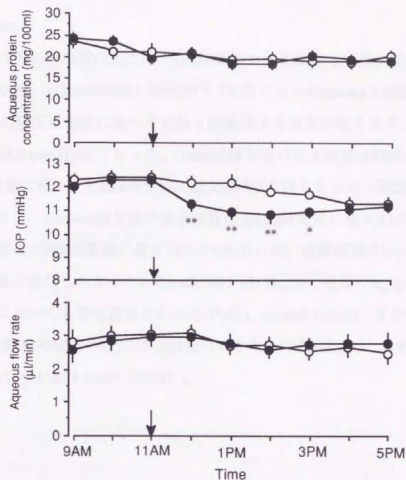


図20 1% epinephrine点眼前後の前房内蛋白濃度(上)、眼圧(中)、房水流量(下)の経時変化。●はepinephrine投与眼、○は他眼、↓は点眼時刻を表す。mean \pm SEM; n=12. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (paired t-test).

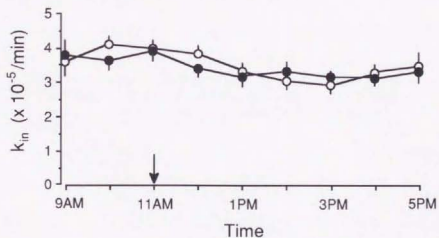


図21 1% epinephrine点眼前後の前房内蛋白流入係数(k_{in})の経時変化。●はepinephrine投与眼、○は他眼、↓は点眼時刻を表す。mean \pm SEM; n=12.

2.3.3.2. timolol

timolol投与眼の前房内蛋白濃度は点眼1時間後から他眼より有意に高く($P<0.05$, paired t-test)なり、点眼5時間後に最大 $37\pm4\%$ 高くなった(mean \pm SEM, $n=10$)。timolol投与眼の眼圧は他眼に比べて点眼1時間後から有意に低くなり、点眼2時間後に最大 3.0 ± 0.3 mmHg低くなった。timolol投与眼の房水流量は他眼に比べて点眼1時間後から有意に低く、点眼2時間後に最大 $30\pm4\%$ 低くなった(図22)。点眼1時間前と比較すると、timolol投与眼の房水流量は点眼3時間後に最大 $31\pm6\%$ 減少し、他眼の房水流量は点眼4時間後に最大 $10\pm5\%$ 減少した。前房容積はtimolol投与眼、他眼ともに有意に変化しなかった。timolol投与眼の $k_{in}(t)$ と他眼の $k_{in}(t)$ との間には、いかなる時点においても有意差はなかった($P>0.1$, paired t-test)。また、timolol投与眼において点眼1時間前の $k_{in}(t)$ は点眼後のいかなる時点の $k_{in}(t)$ とも有意に異ならなかった($P>0.1$, paired t-test) (図23)。



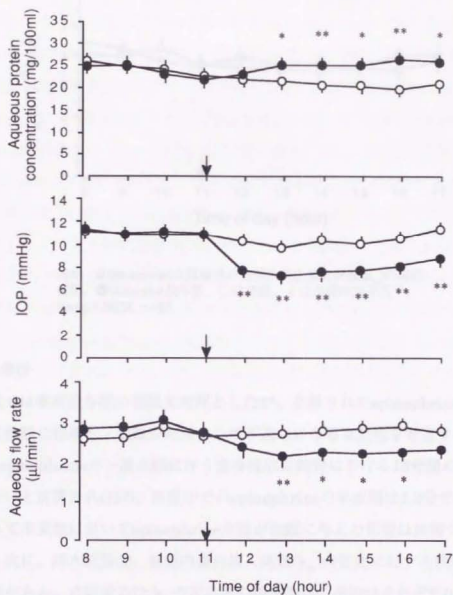


図22 0.5% timolol点眼前後の前房内蛋白濃度、眼圧、房水流量の経時変化。●はtimolol投与眼、○は他眼、↓は点眼時刻を表す。mean \pm SEM; n=10. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (paired t-test)

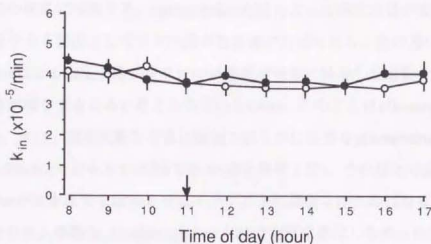


図23 0.5% timolol点眼前後の前房内蛋白流入係数(k_{in})の経時変化。●はtimolol投与眼、○は他眼、↓は点眼時刻を表す。
mean \pm SEM; n=10.

2.3.4. 考按

本実験では薬剤投与眼の他眼を対照としたが、点眼されたepinephrineが全身吸収によって他眼に作用し、他眼が対照として不適当になる可能性を考慮する必要がある。2% epinephrineの一滴点眼に伴う全身吸収は副腎における15分間の基礎産生量に満たないと計算され(157)、血漿中でのepinephrineの半減期は1.2分である(158)。したがって本実験においてepinephrine点眼が他眼に与えた影響は無視できる程度であろう。次に、房水流量(f)、前房内蛋白流入係数(k_{in})の変化に対する検出力を評価する必要がある。点眼前の f と k_{in} の左右差の標準偏差の平均はそれぞれ0.75と0.70であった。これらの値は f 、 k_{in} の値の平均のそれぞれ22%, 24%に相当するので、危険率0.05、検出力0.2、例数12で検出できる変化は f で19%、 k_{in} で21%となる(159)。したがって大きな変化を検出できなかった可能性は低い。

本実験において房水流量はepinephrine点眼によっていかなる時点においても変化しなかった。眼圧は有意に下降したので、薬剤の眼内濃度は薬理的作用を及ぼすのに充分なものであったはずである。同様のfluorescein点眼とデータ解析法を用いた以前の報告ではepinephrine点眼が房水流量の数時間の平均を15-19%増加させている(160, 161)ので、効果のピーク時での増加量は20%を越えていたはずである。前述のように本実験でこの程度の変化が検出できなかった可能性は低い。一方、他の報告では、epinephrine点眼による房水流量の変化は非常に小さいので臨床的意義がなく、また個体差が大きいために時間依存性の変化を検出できなかった(162)。本実験

の結果はこの知見に合致する。epinephrine点眼によって房水流量が変化がなかった原因になりうる要因としてブドウ膜の色素量があげられる。色の濃い眼でepinephrineによる眼圧下降が少ないのは薬剤が色素に結合して遊離状態で活性をもつ薬剤の量が減少するためと考えられている(163)。このことはpilocarpineにもあてはまる(73)。また、房水流量を有意に増加させるのに必要なpilocarpine濃度は白人種では0.5%(66)で日本人では3%である(第2章第1節)。それ以上の説明はepinephrineが房水流量を増加させるメカニズムの解明を待たねばなるまい。

前房内蛋白流入係数(k_{in})はepinephrine点眼で有意に変化しなかった。この結果は他のアドレナリン受容体刺激薬での結果と異なる。 α_1 作動薬であるphenylephrineは k_{in} に二相性の変化(増加→減少)をもたらし、 α_2 作動薬であるapraclonidineは k_{in} を減少させた(前節)。 β アドレナリン受容体刺激薬の k_{in} に対する作用は確認されていないが、metaproterenolはfluoresceinに対するBAB透過性を増加させる(65)。人目の虹彩毛様体には α_1 受容体以外に少なくとも α_2 、 β_2 受容体が存在するので(164-166)、前述の α_1 、 α_2 作用が同時に働くことで $[Ca^{2+}]_i$ 変化が減弱し、 β_2 作用によるcAMP濃度増加がBAB透過性の増加を抑制することが考えられる。その結果としてBAB透過性の変化が有意でなくなるという説明も可能であろう。しかし、この結果はfluorescein全身投与法による研究で示唆されているepinephrineの長期投与によるBAB障害の可能性(153)を否定するものではない。

epinephrine 1 回点眼は房水流量に影響しなかったが、長期投与では他の報告(157)のごとく本実験の被験者においても房水産生が増加するかもしれない。fluorophotometryを用いた最近の研究では他の β 作動薬も眼内濃度が充分であれば房水流量を増加させると報告されている(65, 167-169)。epinephrine点眼治療を受けている緑内障患者においてepinephrine長期投与のBAB透過性に与える作用を評価することは今後の課題である。

片眼に点眼したtimololは他眼の房水流量を減少させ、眼圧を下げることが知られているので(141, 170)、BABに対する作用も他眼に及んだ可能性がある。その場合には他眼を対照とすることが不適当なので、本実験では他眼との比較だけでなく点眼前後の同一眼の比較も行った。同一眼における点眼前後の $k_{in}(t)$ の差の検定における検出力をepinephrineの場合と同様に評価すると、点眼前の $k_{in}(t)$ が正規分布を大きく外れず、標準偏差が0.8-0.9なので、有意水準0.05、検出力0.2、例数10で検出でき

る $k_{in}(t)$ の差は0.8-0.9となる(159)。これは $k_{in}(t)$ の値の20-25%である。同様の方法でpilocarpine点眼がBAB透過性の指標(P_m)に及ぼす影響を検討すると例数5で24%の変化が有意に検出される(第2章第1節)ことから、本実験で臨床的に意味をもつ程度の変化量を検出できなかった可能性は低いと考えられる。

timolol投与眼の房水流量は他眼に比べて最大30%減少した。これは日本人でfluorescein全身投与法によって得られた結果(65)とほぼ一致し、白色人種における結果(141, 170)よりもやや低い値である。timololは眼内の色素に結合するので(171)、色素に富む日本人の眼では、白色人種に比べてbiophaseでのtimololの濃度が低いと考えられることがその一因であろう。眼圧、房水流量が変化したにもかかわらず、房内蛋白流入係数 $k_{in}(t)$ がtimolol投与眼と他眼の間、点眼前後で有意に異ならなかったことは、timololの1回点眼がBABの蛋白透過性を大きく変化させないことを示している。このことはSturらの報告(155, 156)、家兎でtimolol点眼が α -melanocyte stimulating hormoneによるBAB透過性の増加を抑えるという報告(172)、 β 受容体刺激薬によるratの虹彩血管の拡張をtimololが抑制するという報告(173)と合い容れる。一方、分子量332の小分子であるfluoresceinイオンは正常のBABを容易に通過するため、fluoresceinに対する透過性の増加と蛋白に対する透過性の上昇が比例するとは限らない。したがって、我々の結果はtimolol点眼がfluoresceinに対するBABの透過性を増加させるというfluorophotometryの結果(65)と必ずしも矛盾しない。

timololは毛様体においてepinephrineによるcAMPの増加を抑制するが(74)、 $[Ca^{2+}]_i$ を動かす経路に関与しないので、単独ではtight junctionの透過性に大きく影響しないと考えられる。timolol点眼が人眼BABの蛋白透過性を有意に変化させないという本実験の結果は、1) pilocarpineの使用が適切でない続発性緑内障や眼内手術後の炎症を伴う眼圧上昇(59)に対してtimololを用いることの妥当性を人眼で実験的に示した、2) timolol点眼による房水流量の変化を前房内蛋白濃度の経時変化から評価する方法(次節)の根拠となる点で意義を持つ。

第2章 第4節

β アドレナリン受容体遮断薬timolol点眼が房水流量に及ぼす効果を前房内蛋白濃度の経時変化から評価する方法 (174)

2.4.1. 序論

眼科領域で最も広く使用されている β -アドレナリン受容体遮断薬、timololが房水流量を減少させることで眼圧を下降させることはすでに確立されているが(141, 170)、その作用機序については見解が一致していない(74, 175)。人眼においてさらにtimololの薬理学的作用を研究する際に、この薬剤が房水流量に与える作用を継続してモニターする簡便で非侵襲的方法が望まれる。この目的のために用いられてきたfluorophotometryはいくつかの問題点を持っている。1) 外因物質であるfluoresceinの点眼は外眼部に副作用を及ぼす可能性がある。2) fluorophotometryによりJones-Maurice第2法で算出された房水流量(30, 31, 142)は前房内fluorescein濃度(F_e)よりも、角膜内fluorescein濃度(F_c)に依存するが、fluoresceinの角膜内分布は不均一なので F_c の正確な測定が困難である。さらに、Jones-Maurice第2法の理論的な基盤であるtwo-compartment modelは F_c の変化が即座に F_e を変化させることを前提としている。しかし、fluoresceinの角膜内での動きはfree solution中よりかなり遅い(176)ので、 F_c の変化は遅れるはずである。3) 点眼したfluoresceinは次第に眼外へ排出されるので、角膜内fluorescein濃度は指数関数的に減少し、蛍光測定を6-7時間以上続けることは難しい。人眼における β 遮断薬の房水動態に対する作用は12時間以上続くため(177)、fluorophotometryはその作用をモニターするのに必ずしも適しているとは言えない。

前房内フレアー強度の測定から房水流量の変化を評価する試みはいくつか報告されている(23, 28, 57, 67)。これはBAB透過性が一定であるという仮定のもとにフレアー強度の経時変化から房水流量を算出するものである。この方法には上述のfluorophotometryがもつ欠点が無い。前節でtimololの点眼が人眼BABの蛋白透過性に有意の変化を与えないことが明らかになったので、本節ではtimolol点眼が人眼の房水流量に及ぼす作用の経時変化を前房内フレアー強度から定量的に評価できることを示した。

2.4.2. 対象および方法

2-1 対象

20-24歳の正常男性篤志者を対象とした。

2-2 薬剤

0.5% timolol (チモプトール® 0.5%, 参天製薬, 大阪)

基剤 (参天製薬, 大阪)

2-3 機器

pilocarpineとtropicamideの場合と同様である。(2.1.2.参照)

2-4 房水流量の計算方法

1.1.2の式(7)を変形すると次式が得られ、前房内蛋白濃度 $C_a(t)$ の変化から房水流量 $f(t)$ を計算することができる。

$$f(t) = V_{al} \left[\frac{-d \ln C_a(t)}{dt} + k_{in}(t) \left(\frac{C_p}{C_a(t)} - 1 \right) \right] \quad (16)$$

timololの点眼は他眼の房水産生をも抑制する。したがって本実験では、薬剤投与眼と他眼の房水流量の変化の両方を算出する目的から、薬剤投与眼の対照を他眼ではなくtimololを点眼しない状態の同一眼とした。

2-5 k_{in} の計算とtimolol点眼を伴わない前房内蛋白濃度測定

k_{in} を式(6)を用いて計算した。まず10人の被験者を用い、fluorophotometry (Jones-Maurice 第2法変法(30, 31))で房水流量を測定した。測定開始の14時間前に10% fluorescein溶液を被験者の両眼に3分間隔で5滴点眼し、直ちに結膜囊を生理的食塩水で洗浄した。角膜および前房内のfluorescein濃度を9時から11時まで40分間隔で4回測定した。前房容積は10時に測定した。9時から11時までの房水流量の平均 \bar{f} を次の式で計算した。

$$\bar{f} = 0.9 \left[\left(\frac{\bar{F}_c}{\bar{F}_a} \right) V_c A_c + V_a A_a \right] \quad (17)$$

V_c は角膜実質の容積で、正常人眼の値 $70 \mu l$ (70)を用いた。 (\bar{F}_c/\bar{F}_a) は4回の F_c/F_a の測定値の平均である。この値を式(6)の $f(t)$ として用いた。

1週間後、同一の被験者を用いて、薬剤の点眼を行わずに、9時から21時まで30分から2時間の間隔で前房内蛋白濃度と眼圧を測定した。21時に静脈血を採取し、血漿蛋白濃度をbiuret法で測定した。9時、10時、11時の前房内蛋白濃度測定値からの平均を式(6)の $C_a(t)$ とし、 $dC_a(t)/dt$ は最小二乗法で求めた傾きとした。以上のデータを式(6)に代入して各被験者眼の k_{in} を算出した。また、ここで得られた前房内蛋白濃度と眼圧の経時変化は以下に述べるtimolol点眼を伴う実験のbaselineとした。

2-6 timolol点眼を伴う前房内蛋白濃度測定

さらに1週間後、同一の被験者で同様の測定を行なった。11時に30 μ lの0.5% timololを無作為に選んだ片眼に点眼し、他眼には同量の基剤を点眼した。timolol点眼を伴わない時の前房内蛋白濃度からbaselineとなる房水流量を計算し、timolol点眼を伴う時の前房内蛋白濃度からtimolol投与眼と他眼の房水流量を計算した。

2.4.3 結果

k_{in} の値は $4.31 \pm 0.26 \times 10^{-5}/\text{min}$ であった(mean \pm SEM, $n=10$)。投与眼の前房内蛋白濃度は、timololを点眼しなかった日の同時刻の測定値と比べ、点眼1-10時間後に有意に増加し、点眼4時間後に最大 $63 \pm 7\%$ 増加した(mean \pm SEM, $n=10$, $P<0.05$, paired t-test)。眼圧は、同様に点眼0.5-10時間後に有意に下降し、2.5時間で最大 4.9 ± 0.3 mmHg下降した(図24)。

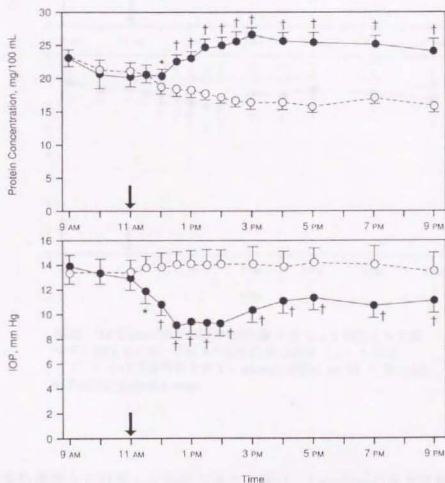


図24 0.5% timolol投与眼(●)と前もって両眼とも点眼せずに測定した同一眼(○)の前房内蛋白濃度(上)と眼圧(下)。↓は点眼時刻を表す。mean \pm SEM; $n=10$, $P<0.01$ (paired t-test)。

timolol投与眼の他眼の前房内蛋白濃度は3.5, 4, 8時間後に有意に増加し、点眼4時間後に最大 $25 \pm 6\%$ 増加した。眼圧は点眼1-10時間後に有意に下降し、点眼2.5時間後に最大 2.3 ± 0.5 mmHg下降した。前房内蛋白濃度から計算した投与眼の房水流量は、timololを点眼しない時のbaselineの房水流量に比べて、点眼0.5-10時間後に有意に減少し、点眼4時間後に最大 $38 \pm 3\%$ 減少した(図25)。

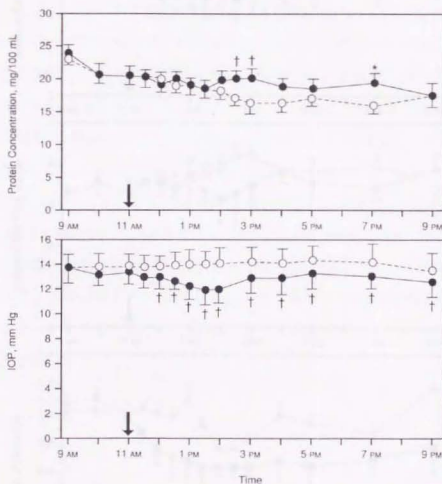


図25 0.5% timolol投与眼の他眼(●)と前もって両眼とも点眼せずに測定した同一眼(○)の前房内蛋白濃度(上)と眼圧(下)。↓は点眼時刻を表す。mean \pm SEM; n=10. *, P<0.05; †, P<0.01 (paired t-test)。

前房内蛋白濃度から計算した他眼の房水流量は、baselineの房水流量に比べて点眼3-4, 8時間後に有意に減少し、点眼3時間後に最大 $23 \pm 5\%$ 減少した。投与眼の房水流量減少率は他眼の減少率に比べて点眼1-2.5, 4-10時間後有意に高かった。点眼1時間前

と比較すると、投与眼の房水流量は点眼4時間後に最大 $30 \pm 5\%$ 、他眼の房水流量は点眼3時間後に最大 $10 \pm 6\%$ 減少した(図26)。

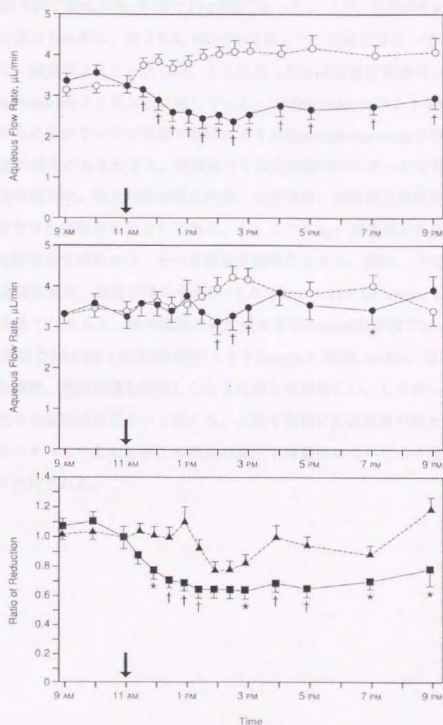


図26 (上) timolol投与眼(●)と点眼を行なわない同一眼(○)の房水流量の計算値 (中) timolol投与眼の他眼(●)と点眼を行なわない同一眼(○)の房水流量の計算値 (下) timolol投与眼(■)と他眼(▲)の房水流量の減少率。↓は点眼時刻を表す。
mean \pm SEM; n=10. *, P<0.05; †, P<0.01 (paired t-test).

2.4.4. 考按

前房内蛋白濃度から計算した房水流量の、点眼前と比較した最大減少率は、timolol投与眼で $30 \pm 10\%$ 、他眼で $10 \pm 6\%$ であった。一方、前節のfluorophotometryで求めた値はそれぞれ、 $31 \pm 6\%$ 、 $10 \pm 5\%$ であった。被験者は同一でないが、投与眼、他眼ともに減少率はよく一致した。ここに示した房水流量計算法は、以下の点でfluorophotometryよりも人眼に適している。1) fluoresceinのような外因性のtracerを投与する必要がないので序論で挙げたようなfluorophotometryに伴う短所が無い。2) 被験者の協力があるかぎり、何時間でも房水流量のモニターが可能である。一方、この方法の短所は、個々の眼で房水流量、前房容積、血漿蛋白濃度を測定して k_{in} の値を定めなければならないことである。もしここで k_{in} 、血漿蛋白濃度、前房容積にある一定値をあてはめれば、その手続きを簡略化できる。仮に、今回の被験者の k_{in} 、血漿蛋白濃度、前房容積の平均値(それぞれ、 $4.31 \times 10^{-6}/\text{min}$ 、 $7.0 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 、 $219 \mu\text{l}$)をあてはめると、房水流量の最大減少率はtimolol投与眼で $39 \pm 7\%$ (点眼4時間後)、他眼で $22 \pm 5\%$ (点眼3時間後)となり($\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=10$)、個々の眼で k_{in} 、血漿蛋白濃度、前房容積を測定したときの値とほぼ等しい。したがって、この簡略法でも大きな誤差は生じないと言える。人眼で簡便に β -遮断薬が房水流量に与える影響をモニターしうる本法がこの薬剤の眼圧下降機序についての今後の研究に役立つことが期待される。

総括

緑内障の治療と眼科診療検査薬に頻用される自律神経系作動薬が人眼BABの蛋白透過性に及ぼす効果をlaser flare-cell meterによる前房内フレア強度の測定とfluorophotometryによる房水流量の測定を組み合わせることにより評価した。各薬剤による前房内蛋白濃度、房水流量、及びBAB蛋白透過性の最大変化率を表2に示す。ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬であるpilocarpineはBAB透過性を増加させ、その遮断薬であるtropicamideはBAB透過性を減少させた。 α_1 アドレナリン受容体刺激薬であるphenylephrineはBAB透過性を大きく増加させた後に減少させるという二相性の変化を生じ、 α_2 アドレナリン受容体刺激薬であるapraclonidineはBAB透過性を減少させた。 α および β アドレナリン受容体刺激薬であるepinephrineと β アドレナリン受容体遮断薬であるtimololはBAB透過性を有意に変化させなかった。

表 2

薬剤	被験者数	薬剤点眼による最大変化(%)		
		前房内蛋白濃度	房水流量	BAB蛋白透過性
1% pilocarpine	10	21 \pm 10 (増)	NS	34 \pm 10 (増)
3% pilocarpine	8	55 \pm 11 (増)	34 \pm 13 (増)	71 \pm 13 (増)
0.4% tropicamide	8	17 \pm 7 (減)	15 \pm 11 (減)	30 \pm 4 (減)
1% phenylephrine	10	20 \pm 6 (減)	125 \pm 35 (増) → 20 \pm 5 (減)	66 \pm 21 (増) → 18 \pm 8 (減)
0.5% apraclonidine	10	47 \pm 7 (増)	45 \pm 5 (減)	21 \pm 6 (減)
1% epinephrine	12	NS	NS	NS
0.5% timolol	10	37 \pm 4 (増)	30 \pm 4 (減)	NS

(NS, 有意の変化なし)

(mean \pm SEM)

BAB透過性は毛様体上皮と虹彩血管内皮のtight junction、毛様体の血流量、毛様体筋の緊張、prostaglandinを始めとする二次的なmediatorの産生など多くの要素によって規定されるので、薬物がそれに及ぼす効果のメカニズムを解析することは容易でない。しかし、各薬物受容体刺激・遮断による細胞内 Ca^{2+} やcAMPの濃度変化、protein kinase C活性化といったシグナル伝達を想定すると、得られた結果は培養上

皮細胞などにおけるセカンドメッセンジャーとtight junction透過性の関係に概ね矛盾しないものであった。

自律神経系作動薬が人眼BABの透過性を様々に変化させることは、これらの薬剤が緑内障治療薬として長期に使用される、あるいは眼科診療の検査薬として日常的に頻用されることを考慮すると臨床的に重要な意味を持つ。即ち、BAB透過性を増加させるpilocarpineで治療されている緑内障眼や術前散瞳を目的にphenylephrine点眼を受けた眼の手術には注意が必要なこと、BAB透過性を減少させるtropamideやapraclonidineは術後炎症を始めとする眼内炎の抑制に有利であること、BAB透過性に影響を与えないepinephrineやtimololは炎症を持つ眼に投与してもBABの破綻を増悪する可能性が低いこと、などを示唆する。

本研究で開発したBAB透過性の評価法は従来の方法と比べて欠点が少なく簡便に行なえる。この方法は薬剤の作用を評価するに留まらず、人眼BAB透過性の生理的あるいは病的な変化を評価することにおいても有用なので、眼科基礎および臨床研究上の意義は大きいと考える。

謝辞

本研究は東京大学医学部眼科学教室において増田寛次郎教授、新家 真助教授の指導の下に行なわれたものである。ここに両先生への深甚なる感謝の意を表す。

引用文献

1. Havener WH: Autonomic drugs. In: Ocular Pharmacology. 5th ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1983: 261-417.
2. Hoskins HD Jr. and Kass MA: Cholinergic drugs. In: Becker-Shaffer's Diagnosis and therapy of the glaucomas. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989: 420-452.
3. Hoskins HD Jr. and Kass MA: Adrenergic agonists. In: Becker-Shaffer's Diagnosis and therapy of the glaucomas. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989: 453-469.
4. Nardin GF, Zimmerman TJ, Zalta AH, and Felts K: Ocular cholinergic agents. In: Shields M, Krupin T, and Ritch R, ed. The Glaucomas. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989: 515-521.
5. Caprioli J: The ciliary epithelia and aqueous humor. In: Moses R and Hart WJ, ed. Adler's Physiology of the eye. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1987: 204-222.
6. Alm A and Bill A: Ocular circulation. In: Moses RA and Hart WMJ, ed. Adler's Physiology of the eye. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1987: 183-203.
7. Raviola G: The structural basis of the blood-aqueous barriers. *Exp Eye Res* 1977;25 (Suppl):27-63.
8. Dernouchamps JP: The proteins in the aqueous humour. *Doc Ophthalmol* 1982;53:193-249.
9. Freddo TF, Bartels SP, Barsotti MF, and Kamm RD: The source of proteins in the aqueous humor of the normal rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:125-137.
10. Tessler HH: Uveitis. In: Sanders DR, Goldbert MF, and Peyman GA, ed. Principles and practice of ophthalmology. Philadelphia: WB Sanders, 1980: 1554-1562.
11. Anjou CIN and Krakau CET: Aqueous flare and protein content in the anterior chamber of normal rabbits' eyes. *Acta Ophthalmol* 1961;39:95-101.
12. Krause AC, Yudkin AM, Stevens MA, Bunnell WW, and Hughson DT: The influence of drugs on the transmission of arsenic into the aqueous humor. *J Pharmacol Exp Ther* 1930;39:153-163.
13. Becker B: The measurement of rate of aqueous flow with iodide. *Invest Ophthalmol* 1962;1:52-58.
14. Stocker FW: Experimental studies on the blood-aqueous barrier. *Arch*

- Ophthalmol 1947;37:583-590.
15. Neupert JR and Lawrence C: Protein release during aqueous withdrawal in rabbits. Invest Ophthalmol 1970;9:865-72.
 16. Stjernschantz J, Uusitalo R, and Palkama A: The aqueous proteins of the rat in normal eye and after aqueous withdrawal. Exp Eye Res 1973;16:215-221.
 17. Lugossy G: The fluorescein permeability of the blood-aqueous barrier. Adv Ophthalmol 1959;9:110-251.
 18. Amsler M and Huber A: Methodik und erste klinische Ergebnisse einer Funktionsprüfung der Blut-Kammerwasser-Schranke. Ophthalmologica 1946;111:155-176.
 19. Chen SC, Nakamura H, and Tamura Z: Determination of fluorescein and fluorescein monoglucuronide excreted in urine. Chem Pharm Bull 1980;28:2812-2816.
 20. Araie M, Sawa M, Nagataki S, and Mishima S: Aqueous humor dynamics in man as studied by oral fluorescein. Jpn J Ophthalmol 1980;24:346-362.
 21. Nagataki S: Aqueous humor dynamics of human eyes as studied using fluorescein. Jpn J Ophthalmol 1975;19:235-249.
 22. 新家 真、松元 俊: 静注後フルオレセインの血漿内動態の解析及び血液房水欄透過性の算出. 日本眼科学会雑誌 1983;87:403-409.
 23. Krakau CET: On the connection between aqueous flow and flare. Ophthalmologica 1962;144:153-164.
 24. Dyster-Aas HK and Krakau CET: A photo-electric instrument for measuring the aqueous flare in the intact eye. Ophthalmologica 1963;146:48-56.
 25. Anjou CIN and Krakau CET: A photographic method for measuring the aqueous flare of the eye in normal and pathological conditions. Acta Ophthalmol 1960;38:178-224.
 26. Dyster-Aas HK: A comparison between the aqueous flare inducing effect of alpha-melanocyte stimulating hormone and minimal trauma. Acta Ophthalmol 1965;43:30-46.
 27. Anjou CIN and Dyster-Aas HK: The effect of acetazolamide on the aqueous flare in normal human eyes. Acta Ophthalmol 1962;40:339-347.
 28. Anjou CIN: Physiological variations of the aqueous flare density in normal human eyes. Acta Ophthalmol 1961;39:525-539.
 29. Sawa M, Tsurimaki Y, Tsuru T, and Shimizu H: New quantitative method

- to determine protein concentration and cell number in aqueous in vivo. *Jpn J Ophthalmol* 1988;32:132-142.
30. Gaul GR and Brubaker RF: Measurement of aqueous flow in rabbits with corneal and vitreous depots of fluorescein dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1331-1335.
31. Jones RF and Maurice DM: New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res* 1966;5:208-220.
32. Johansson B and Martinsson L: β -adrenoreceptor antagonists and the dysfunction of the blood-brain barrier induced by adrenaline. *Brain Res* 1980;181:219-222.
33. Raichle M, Hartman B, Eichling J, and Sharpe L: Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3726-3730.
34. Raichle M and Hartman B: Antidepressants alter cerebrovascular permeability and metabolic rate in primates. *Science* 1982;217:250-252.
35. Domer F, Boertje S, Bing E, and Reddix I: Histamine- and acetylcholine-induced changes in the permeability of the blood-brain barrier of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology* 1983;22:615-619.
36. Baba M, Oishi R, and Saeki K: Enhancement of blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein by stimulation of μ opioid receptors in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988;337:423-428.
37. Sankar R, Domer F, and Merine D: Effects of dopaminergic and adrenergic blockade on amphetamine-induced extravasation of protein into the brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology* 1981;20:667-673.
38. Gross P, Teasdale G, Angerson W, and Harper A: H₂-receptor mediates increase in permeability of the blood-brain barrier during arterial histamine infusion. *Brain Res* 1981;210:396-400.
39. Preskorn S, Hartman B, Irwin G, and Hughes C: Role of the central adrenergic system in mediating amitriptyline-induced alteration in the mammalian blood-brain barrier in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;223:388-395.
40. Preskorn S, Raichle M, and Hartman B: Antidepressants alter cerebrovascular permeability and metabolic rate in primates. *Science* 1982;217:250-252.

41. Sarmiento A, Borges N, and Azevedo I: Adrenergic influences on the control of blood-brain barrier permeability. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1991;343:633-637.
42. Kobayashi H, Magnoni M, Govoni S, Izumi F, Wada A, and Trabucchi M: Neuronal control of brain microvessel function. *Experimentia* 1985;41:427-434.
43. Tengvar C, Pettersson C, Mohammed A, and Olsson Y: Effects of the noradrenaline neurotoxin N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromo-benzylamine hydrochloride (DSP4) on the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol* 1989;78:28-34.
44. Davson H and Matchett P: The kinetics of penetration of the blood-aqueous barrier. *J Physiol* 1953;122:11-32.
45. Cole DF: Ocular fluids. In: Davson H, ed. *The Eye*. Orlando: Academic Press, 1984: 269-390.
46. Oshika T, Nishi M, Mochizuki M, Nakamura M, Kawashima H, Iwase K, and Sawa M: Quantitative assessment of aqueous flare and cells in uveitis. *Jpn J Ophthalmol* 1989;33:279-287.
47. Sawa M: Clinical application of laser flare-cell meter. *Jpn J Ophthalmol* 1990;34:346-363.
48. Shah SW, Spalton DJ, and Taylor JC: Correlations between laser flare measurements and anterior chamber protein concentrations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2878-2884.
49. McDonagh P and Williams S: The preparation and use of fluorescent-protein conjugates for microvascular research. *Microvascular Res* 1984;27:14-27.
50. Dumas BT, Watson WA, and Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87-96.
51. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
52. Barsotti MF, Bartels SP, Kamm RD, and Fredde TF: Background-protein effects on fluorophotometric data. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2046-2050.
53. Dernouchamps JP and Heremans JF: Molecular sieve effect of the blood-aqueous barrier. *Exp Eye Res* 1975;21:289-297.

54. Krause U and Raunio V: The proteins of the pathologic human aqueous humor. *Ophthalmologica* 1970;160:280-287.
55. Landel AM: Stability studies on fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin conjugate. *Anal Biochem* 1976;73:280-289.
56. Schiller AA, Schayer RW, and Hess EL: Fluorescein-conjugated bovine albumin. *J Gen Physiol* 1952;36:489-511.
57. MacLaren JW, Trocme SD, Relf S, and Brubaker RF: Rate of flow of aqueous humor determined from measurements of aqueous flare. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:339-346.
58. Mori M, Araie M, Sakurai M, and Oshika T: Effects of pilocarpine and tropicamide on blood-aqueous barrier permeability in man. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:416-423.
59. Krupin T and Feitl ME: Glaucoma associated with uveitis. In: Shields MB, Krupin T, and Ritch R, ed. *The Glaucomas*. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989: 1205-1224.
60. Wand M: Neovascular glaucoma. In: Shields MB, Krupin T, and Ritch R, ed. *The Glaucomas*. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1989: 1063-1110.
61. Wessely K: Experimentelle Untersuchungen über Reizübertragung von einem Auge zum andern. von Graefe's *Arch Ophthalmol* 1900;50:123-149.
62. Abraham SV: Miotic iridocyclitis: its role in the surgical treatment of glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1959;48:634-643.
63. Chen HSL, Steinmann WC, and Spaeth GL: The effect of chronic miotic therapy on the results of posterior chamber intraocular lens implantation and trabeculectomy in patients with glaucoma. *Ophthalmic Surg* 1989;20:784-789.
64. Adler FH: The action of atropine in ocular inflammations. *Arch Ophthalmol* 1926;55:484-500.
65. Araie M and Takase M: Effects of various drugs on aqueous humor dynamics in man. *Jpn J Ophthalmol* 1981;25:91-111.
66. Nagataki S and Brubaker RF: Effect of pilocarpine on aqueous humor formation in human beings. *Arch Ophthalmol* 1982;100:818-821.
67. Oshika T and Araie M: Time course of changes in aqueous protein concentration and flow rate after oral acetazolamide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:527-534.
68. 森 樹郎、新家 真: Fluorotron Masterの角膜内蛍光強度測定値と真の

fluorescein濃度との関係. 日本眼科紀要 1990;41:2204-2207.

69. Johnson SB, Coakes RL, and Brubaker RF: A simple photogrammetric method of measuring anterior chamber volume. *Am J Ophthalmol* 1978;85:469-474.
70. Brubaker RF: Clinical evaluation of the circulation of aqueous humor. In: Duane TD and Jaeger EA, ed. *Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: Harper & Row Publishers, 1986: 1-11.
71. Constant MA and Falch J: Phosphate and protein concentrations of intraocular fluids: I. Effect of carbonic anhydrase inhibition in young and old rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1963;2:332-343.
72. van Genderen MM, van Best JA, and Oosterhuis JA: The immediate effect of phenylephrine on aqueous flow in man. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1469-1473.
73. Mishima S: Clinical pharmacokinetics of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:504-541.
74. Yorio T: Review: cellular mechanism in the actions of antiglaucoma drugs. *J Ocular Pharmacol* 1985;1:397-422.
75. Sears ML: Autonomic nervous system: Adrenergic agonists. In: Sears ML, ed. *Pharmacology of the Eye*. New York: Springer-Verlag, 1984: 193-248. (Born GVR, Farah A, Herken H, and Welch AD, ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*; vol 69).
76. Green K, Griffin C, and Hensley A: Effect of parasympathetic and vasoactive drugs on ciliary epithelium permeability. *Exp Eye Res* 1978;27:533-538.
77. Cole DF: The site of breakdown of the blood-aqueous barrier under the influence of vaso-dilator drugs. *Exp Eye Res* 1974;19:591-607.
78. Alm A, Bill A, and Young FA: The effects of pilocarpine and neostigmine on the blood flow through the anterior uvea in monkeys. A study with radioactively labelled microspheres. *Exp Eye Res* 1973;15:31-36.
79. Schneeberger EE and Lynch RD: Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262:L647-661.
80. Cereijido M, Meza I, and Martinez PA: Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Am J Physiol* 1981;240:C96-102.
81. Palant CE, Duffey ME, Mookerjee BK, Ho S, and Bentzel CJ: Ca^{2+} regulation of tight-junction permeability and structure in *Necturus* gallbladder. *Am J Physiol* 1983;245:C203-212.

82. Kern DF and Malik AB: Microvascular albumin permeability in isolated perfused lung: effects of EDTA. *J Appl Physiol* 1985;58:372-375.
83. Crone C: Modulation of solute permeability in microvascular endothelium. *Fed Proc* 1986;45:77-83.
84. Gonzalez ML, Contreras RG, Bolivar JJ, Ponce A, Chavez, De, Ramirez, B, and Cerejido M: Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Am J Physiol* 1990; 259:C978-986.
85. He P, Pagakis SN, and Curry FE: Measurement of cytoplasmic calcium in single microvessels with increased permeability. *Am J Physiol* 1990;258:H1366-1374.
86. Nathanson MH, Gautam A, Ng OC, Bruck R, and Boyer JL: Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am J Physiol* 1992;262:G1079-1086.
87. Lum H, Aschner JL, Phillips PG, Fletcher PW, and Malik AB: Time course of thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca^{2+} i and inositol polyphosphates. *Am J Physiol* 1992;263:L219-225.
88. He P and Curry FE: Differential actions of cAMP on endothelial $[Ca^{2+}]_i$ and permeability in microvessels exposed to ATP. *Am J Physiol* 1993;265:H1019-1023.
89. Johnson A, Phillips P, Hocking D, Tsan MF, and Ferro T: Protein kinase inhibitor prevents pulmonary edema in response to H_2O_2 . *Am J Physiol* 1989;256:H1012-1022.
90. Murray MA, Heistad DD, and Mayhan WG: Role of protein kinase C in bradykinin-induced increases in microvascular permeability. *Circ Res* 1991;68:1340-1348.
91. Balda MS, Gonzalez ML, Contreras RG, Macias SM, Torres MM, Garcia SJ, and Cerejido M: Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol* 1991;122:193-202.
92. Ellis B, Schneeberger EE, and Rabito CA: Cellular variability in the development of tight junctions after activation of protein kinase C. *Am J Physiol* 1992;263:F293-300.
93. Stasek JJ, Patterson CE, and Garcia JG: Protein kinase C phosphorylates caldesmon77 and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Cell Physiol* 1992;153:62-75.

94. Balda MS, Gonzalez ML, Matter K, Cerejido M, and Anderson JM: Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol* 1993;123:293-302.
95. Duffey ME, Hainau B, Ho S, and Bentzel CJ: Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. *Nature* 1981;294:451-453.
96. Inagaki N, Miura T, Daikoku M, Nagai H, and Koda A: Inhibitory effects of beta-adrenergic stimulants on increased vascular permeability caused by passive cutaneous anaphylaxis, allergic mediators, and mediator releasers in rats. *Pharmacology* 1989;39:19-27.
97. Minnear FL, DeMichele MA, Moon DG, Rieder CL, and Fenton J2: Isoproterenol reduces thrombin-induced pulmonary endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 1989;257:H1613-1623.
98. Casnocha SA, Eskin SG, Hall ER, and McIntire LV: Permeability of human endothelial monolayers: effect of vasoactive agonists and cAMP. *J Appl Physiol* 1989;67:1997-2005.
99. Takeda T, Yamashita Y, Shimazaki S, and Mitsui Y: Histamine decreases the permeability of an endothelial cell monolayer by stimulating cyclic AMP production through the H2-receptor. *J Cell Sci* 1992;101:745-750.
100. Seibert AF, Thompson WJ, Taylor A, Wilborn WH, Barnard J, and Haynes J: Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion: role of cAMP. *J Appl Physiol* 1992;72:389-395.
101. Hoss W, Woodruff JM, Ellerbrock BR, Periyasamy S, Ghodsi HS, Stibbe J, Bohnett M, and Messer WJ: Biochemical and behavioral responses of pilocarpine at muscarinic receptor subtypes in the CNS. Comparison with receptor binding and low-energy conformations. *Brain Res* 1990;533:232-238.
102. Lazareno S, Farries T, and Birdsall N: Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors M1-M4. *Life Sci* 1993;52:449-456.
103. Vanderheyden P, Gies JP, Ebinger G, De KJ, Landry Y, and Vauquelin G: Human M1-, M2- and M3-muscarinic cholinergic receptors: binding characteristics of agonists and antagonists. *J Neurol Sci* 1990;97:67-80.
104. Crook RB and Polansky JR: Neurotransmitters and neuropeptides stimulate inositol phosphates and intracellular calcium in cultured human nonpigmented ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1706-

1716.

105. Woldemussie E, Feldmann BJ, and Chen J: Characterization of muscarinic receptors in cultured human iris sphincter and ciliary smooth muscle cells. *Exp Eye Res* 1993;56:385-392.
106. Ashkenazi A, Peralta E, Winslow J, Ramachandran J, and Capon D: Functional diversity of muscarinic receptor subtypes in cellular signal transduction and growth. Subtypes of muscarinic receptors IV. *Trends Pharmacol Sci Suppl* 1989;16-22.
107. Bill A: Capillary permeability to and extravascular dynamics of myoglobin, albumin, and gammaglobulin in the uvea. *Acta Physiol Scand* 1968;73:204-219.
108. Bill A and Wälinder P-E: The effects of pilocarpine on the dynamics of aqueous humor in a primate (*Macaca irus*). *Invest Ophthalmol* 1966;5:170-175.
109. Inada K, Murata T, Baba H, Murata Y, and Ozaki M: Increase of aqueous humor proteins with aging. *Jpn J Ophthalmol* 1988;32:126-131.
110. Araie M, Mori M, and Oshika T: Effect of topical phenylephrine on the permeability of the blood-aqueous barrier in man. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;230:171-174.
111. Mori M and Araie M: Effect of apraclonidine on blood-aqueous barrier permeability to plasma protein in man. *Exp Eye Res* 1992;55:555-559.
112. Becker B, Gage T, Kolker AE, and Gay AJ: The effect of phenylephrine hydrochloride on the miotic treated eye. *Am J Ophthalmol* 1959;48:313-321.
113. Holland MG and Wei CP: Chemical sympathectomy in glaucoma therapy: An investigation of alpha and beta adrenergic supersensitivity. *Ann Ophthalmol* 1973;5:783-796.
114. Lee PF: The influence of epinephrine and phenylephrine on intraocular pressure. *Arch Ophthalmol* 1958;60:863-867.
115. Schimek RA and Lieberman WJ: The influence of cyclogel and neosynephrine on tonographic studies of mitotic control. *Am J Ophthalmol* 1961;Am J Ophthalmol:781-784.
116. Araie M: Acute effects of topical phenylephrine on aqueous humor dynamics and corneal endothelial permeability in man. *Jpn J Ophthalmol* 1983;27:340-345.
117. Lee DA and Brubaker RF: Effect of phenylephrine on aqueous humor flow. *Curr Eye Res* 1982;2:89-92.

118. Nagataki S and Mishima S: Aqueous humor dynamics in glaucomatocyclitic crisis. *Invest Ophthalmol* 1976;15:365-370.
119. Abrams DA, Robin AL, Pollack IP, deFaller JM, and DeSantis L: The safety and efficacy of topical 1% ALO 2145(p-aminoclonidine hydrochloride) in normal volunteers. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1205-1207.
120. Jampel HD, Robin AL, Quigley HA, and Pollack IP: Apraclonidine. A one-week dose-response study. *Arch Ophthalmol* 1988;106:1069-1073.
121. Robin AL: Short-term effects of unilateral 1% apraclonidine therapy. *Arch Ophthalmol* 1988;106:912-915.
122. Gharagzloo NZ, Relf SJ, and Brubaker RF: Aqueous flow is reduced by the alpha-adrenergic agonist, apraclonidine hydrochloride (ALO 2145). *Ophthalmology* 1988;95:1217-1220.
123. Brown RH, Stewart RH, Lynch MG, Crandall AS, Mandell AI, Wilenski JT, deFaller JM, and Higginbotham EJ: ALO 2145 reduces the intraocular pressure elevation after anterior segment laser surgery. *Ophthalmology* 1988;95:378-384.
124. Pollack IP, Brown RH, Crandall AS, Robin AL, Stewart RH, and White GL: Prevention of the rise in intraocular pressure following Neodymium-YAG posterior capsulotomy using topical 1% apraclonidine. *Arch Ophthalmol* 1988;106:754-757.
125. Robin AL, Pollack IP, and deFaller JM: Effects of topical ALO 2145 (p-aminoclonidine hydrochloride) on the acute intraocular pressure rise after laser iridotomy. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1208-1211.
126. Hoskins HD Jr., Hetherington J Jr., Minckler DS, Lieberman MF, and Shaffer RN: Complications of laser trabeculoplasty. *Ophthalmology* 1983;90:796-799.
127. Migliori ME, Beckman H, and Channell MM: Intraocular pressure changes after Neodymium-YAG laser capsulotomy in eyes pretreated with timolol. *Arch Ophthalmol* 1987;105:473-475.
128. Richter CU, Arzeno G, Pappas HR, Arrig CA, Wasson P, and Steinert RF: Prevention of intraocular pressure elevation following Neodymium-YAG laser posterior capsulotomy. *Arch Ophthalmol* 1985;103:912-915.
129. Schrems W, van Drop HP, Mechler W, and Krieglstein GK: The time course of laser-induced disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1983;221:65-67.
130. Schrems W, van Drop HP, Wendel M, and Krieglstein GK: The effect of yag

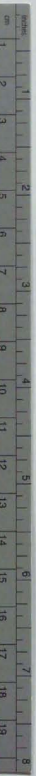
- laser iridotomy on the blood-aqueous barrier in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1984;221:179-181.
131. Sugiyama K, Kitazawa Y, and Kawai K: Apraclonidine effects on ocular responses to YAG laser irradiation to the rabbit iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:708-714.
 132. Oshika T, Araie M, Sugiyama T, Nakajima M, and Azuma I: Effects of bunazosin hydrochloride on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in normotensive human eyes. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1569-1574.
 133. Araie M: Time change of rabbit aqueous flow under influence of adrenergic drugs. *Exp Eye Res* 1985;40:391-403.
 134. Bucci MG, Novati M, and Santillo C: Die antagonistische Wirkung der lokalen Verabreichung von Epinephrin und Phenylephrin auf die durch Perfusion von autologem sekundärem Kammerwasser hervorgerufene Augenhypertension beim Kaninchen. *Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1972;185:207-220.
 135. Macri FJ and Cevario SJ: The inhibitory actions of dopamine, hydroxyamphetamine and phenylephrine on aqueous humor formation. *Exp Eye Res* 1978;26:85-89.
 136. Green K and Padgett D: Effect of various drugs on pseudofacility and aqueous humor formation in the rabbit eye. *Exp Eye Res* 1979;28:239-246.
 137. Morgan TR, Green K, and Bowman K: Effects of adrenergic agonists upon regional ocular blood flow in normal and ganglionectomized rabbits. *Exp Eye Res* 1981;32:691-697.
 138. Green K and Griffin C: Adrenergic effect on the isolated rabbit ciliary epithelium. *Exp Eye Res* 1978;27:143-149.
 139. Exton J: The roles of calcium and phosphoinositides in the mechanisms of alpha1-adrenergic and other agonists. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1988;111:118-224.
 140. Han C, Abel P, and Minneman K: Alpha1-adrenergic receptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature* 1987;342:32-38.
 141. Yablonski ME, Zimmerman TJ, Waltman SR, and Becker B: A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics. *Exp Eye Res* 1978;27:135-142.
 142. Yablonski ME, Hayashi M, Cook DJ, Chubak G, and Sirota M:

- Fluorophotometric study of intravenous carbonic anhydrase inhibitors in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:2076-2082.
143. Cotecchia S, Kobilka B, Daniel K, Nolan R, Lapetina E, Caron M, Lefkowitz R, and JW R: Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1990;265:63-69.
144. Rosenthal W, Hescheler J, Trautwein W, and Schultz G: Control of voltage-dependent Ca^{2+} channels by G-protein coupled receptors. *FASEB J* 1988;2:2784-2790.
145. Bill A: Effects of ALO2145 on ocular blood flow. Data on File Alcon Laboratories
146. Chandler ML and DeSantis L: Studies of p-amino clonidine as a potent antiglaucoma agent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;25(Suppl.):227.
147. Araie M and Ishii K: Effects of apraclonidine on intraocular pressure and blood-aqueous barrier permeability after phacoemulsification and intraocular lens implantation. *Am J Ophthalmol* 1993;116:67-71.
148. Krupin T, Stone RA, Cohen BH, Kolker AE, and Kass MA: Acute intraocular pressure response to Argon laser iridotomy. *Ophthalmology* 1985;92:922-926.
149. Stjernschantz J, von Dickhoff K, Oksala O, and Seppa H: A study of the mechanism of ocular irritation following YAG laser capsulotomy in rabbits. *Exp Eye Res* 1986;43:641-651.
150. Silverstone DE, Novack GD, Kelley EP, and Chen KS: Prophylactic treatment of intraocular pressure elevations after Neodymium:YAG laser posterior capsulotomies and extracapsular cataract extractions with levobunolol. *Ophthalmology* 1988;95:713-718.
151. Mori M, Sakurai M, and Araie M: Effect of topical epinephrine on permeability of blood-aqueous barrier in human eyes. *Jpn J Ophthalmol* 1992;36:342-347.
152. 森 樹郎、桜井真彦、新家 真: チモロール点眼と人眼血液房水橋の蛋白透過性. *日本眼科学会雑誌* 1992;96:1418-1422.
153. Miyake K, Miyake Y, and Kuratomi R: Long-term effects of topically applied epinephrine on the blood-ocular barrier in humans. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1360-1363.
154. Ruffolo R Jr.: Interactions of agonists with peripheral alpha-adrenergic reactions. *Fed Proc* 1984;43:2910-2916.

155. Stur M, Grabner G, Dorda W, and Zehetbauer G: The effect of timolol on the concentrations of albumin and IgG in the aqueous humor of the human eye. *Am J Ophthalmol* 1983;96:726-729.
156. Stur M, Grabner G, Huber-Spitzy V, Schreiner J, and Haddad R: Effect of timolol on aqueous humor protein concentration in the human eye. *Arch Ophthalmol* 1986;104:899-900.
157. Schneider TL and Brubaker RF: Effect of chronic epinephrine on aqueous humor flow during the day and during sleep in normal healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2507-2510.
158. Rosen SG, Linares OA, Sanfield JA, Zech L, Lizzo VP, and Halter JB: Epinephrine kinetics in humans: Radiotracer methodology. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:753-761.
159. 佐久間昭: 薬効評価—計画と解析 1. 東京: 東京大学出版会, 1977
160. Schenker HI, Yablonski ME, Podos SM, and Linder L: Fluorophotometric study of epinephrine and timolol in human subjects. *Arch Ophthalmol* 1981;99:1212-1216.
161. Topper JE and Brubaker RF: Effects of timolol, epinephrine, and acetazolamide on aqueous flow during sleep. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;1315-1319.
162. Nagataki S and Brubaker RF: Early effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye. *Ophthalmology* 1981;88:278-282.
163. Melikian HE, Lieberman TW, and Leopold IH: Ocular pigmentation and pressure and outflow response to pilocarpine and epinephrine. *Am J Ophthalmol* 1971;72:70-73.
164. Elena PP, Denis P, Kosina-Boix M, Saraux H, and Lapalus P: Beta adrenergic binding sites in the human eye: an autoradiographic study. *J Ocul Pharmacol* 1990;6:143-149.
165. Matsuo T and Cynader MS: Localization of alpha-2 adrenergic receptors in the human eye. *Ophthalmic Res* 1992;24:213-219.
166. Nathanson JA: Human ciliary process adrenergic receptor: Pharmacological characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:798-804.
167. Brubaker RF: Flow of aqueous humor in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:3145-3166.
168. Coakes RL and Siah PB: Effects of adrenergic drugs on aqueous humour dynamics in the normal human eye. I. *Br J Ophthalmol* 1984;68:393-397.
169. Mishima S: Ocular effects of beta-adrenergic agents. *Surv Ophthalmol*

1982;27:187-208.

170. Coakes RL and Brubaker RF: The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure in the normal eye. *Arch Ophthalmol* 1978;96:2045-2048.
171. Abrahamsson T, Boström S, Bräutigam J, Lagerstrom PO, Regardh CG, and Vauquelin G: Binding of the beta-blockers timolol and H 216/44 to ocular melanin. *Exp Eye Res* 1988;47:565-577.
172. Holmdahl G and Bengtsson E: The effect of timolol maleate on the disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20:726-732.
173. Szalay J: Effect of beta adrenergic agents on blood vessels of the rat iris. II. Morphological modifications of the vessel wall. *Exp Eye Res* 1980;31:299-311.
174. Mori M and Araie M: A simple method of determining the time course of timolol's effects on aqueous flow in humans. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1099-1103.
175. Lotti VJ, LeDouarec JC, and Stone CA: Autonomic nervous system: Adrenergic antagonists. In: Sears ML, ed. *Pharmacology of the Eye*. New York: Springer-Verlag, 1984: 249-277. (Born GVR, Farah A, Herken H, and Welch AD, ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*; vol 69).
176. Maurice DM: The movement of fluorescein and water in the cornea. *Am J Ophthalmol* 1960;49:1011-1016.
177. Novack GD: Ophthalmic beta-blockers since timolol. *Surv Ophthalmol* 1987;31:307-327.



Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
Patch 1	Patch 2	Patch 3	Patch 4	Patch 5	Patch 6	Patch 7	Patch 8	Patch 9

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A	1	2	3	4	5	6	M	8	9	10	11	12	13	14	15	B	17	18	19
Gray Patch 1	Gray Patch 2	Gray Patch 3	Gray Patch 4	Gray Patch 5	Gray Patch 6	Gray Patch 7	Gray Patch 8	Gray Patch 9	Gray Patch 10	Gray Patch 11	Gray Patch 12	Gray Patch 13	Gray Patch 14	Gray Patch 15	Gray Patch 16	Gray Patch 17	Gray Patch 18	Gray Patch 19	Gray Patch 20