

チモロール点眼と人眼血液房水柵の蛋白透過性

森 樹郎, 桜井 真彦, 新家 真

東京大学医学部眼科学教室

要 約

正常若年者 10 人において、0.5%timolol の点眼が血液房水柵の蛋白透過性に与える影響を検討した。薬剤を片眼に点眼し、点眼前後に fluorophotometry による房水流量の測定、laser flare-cell meter による前房内蛋白濃度の測定、眼圧と前房容積の測定を行った。得られた房水流量、前房内蛋白濃度の経時変化を前房内蛋白動態を規定する式に代入し、前房内蛋白流入係数の経時変化を算出した。基剤を点眼した他眼と比較して、前房内蛋白濃度は点眼 5 時間後に最大 $37 \pm 4\%$ 増加し、房水流量は点眼 2 時間後に最大 $30 \pm 4\%$ 減少した。眼圧は点眼 2 時間後に最大 3.0 ± 0.3 mmHg 下降した（平均値 $\pm$ 標準誤差）。前房内蛋白流入係数は他眼との比較、点眼前後の比較においても有意に変化しなかった。このことは 0.5%timolol 点眼が人眼血液房水柵の蛋白透過性を大きく変化させないことを示唆した。（日眼会誌 96:1418—1422, 1992）

キーワード：チモロール、血液房水柵、蛋白透過性、人眼、レーザーフレア・セルメーター

Topical Timolol and Blood-aqueous Barrier Permeability to Protein in Human Eyes

Mikiro Mori, Masahiko Sakurai and Makoto Araie

Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

Abstract

The effect of topical 0.5% timolol on the permeability of the blood-aqueous barrier to plasma protein was studied in ten young normal volunteers. Before and after instillation of timolol in one eye, simultaneous measurements of aqueous flow rate, $f(t)$, by fluorophotometry and protein concentration in the anterior chamber, $C_a(t)$, with a laser flare-cell meter were made in both eyes at hourly intervals. The coefficient of protein entry into the anterior chamber was calculated using an equation formulating protein dynamics in the anterior chamber from the changes in $f(t)$, $C_a(t)$, and plasma protein concentration. The $C_a(t)$ in the treated eye showed a maximum increase of $37 \pm 4\%$ (mean $\pm$ SEM) as compared with that in the fellow eye 5 hours after instillation, while the $f(t)$ in the treated eye showed a maximum reduction of $30 \pm 4\%$ 2 hours after instillation. The intraocular pressure in the treated eye showed a maximum reduction of 3.0 ± 0.3 mmHg 2 hours after instillation. No significant changes were found in the coefficient of protein entry in the anterior chamber between before and after timolol instillation or between timolol-treated and fellow untreated eyes. These results indicated that topical 0.5% timolol does not affect the permeability of the blood-aqueous barrier to plasma protein significantly. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:1418—1422, 1992)

Key words: Timolol, Blood-aqueous barrier, Protein permeability, Human eyes, Laser flare-cell meter

別刷請求先：113 文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 森 樹郎

（平成 4 年 1 月 31 日受付，平成 4 年 5 月 22 日改訂受理）

Reprint requests to: Mikiro Mori, M.D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

（Received January 31, 1992 and accepted in revised form May 22, 1992）

I 緒 言

緑内障の治療は長期にわたって行われるので、使用される治療薬は眼組織の生理的 integrity を障害しないことが望ましい。しかし、実際には pilocarpine が眼内手術後の炎症を遷延させ¹⁾²⁾、抗コリンエステラーゼが著明な血液房水柵の障害を引き起こすこと³⁾が知られている。したがって抗緑内障薬を使用する際には血液房水柵機能に対する影響を常に念頭に置く必要がある。一方、現在広く用いられている β 遮断剤 timolol は、臨床的に明らかな血液房水柵の破壊をきたさないとされている³⁾。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ものの、各種蛋白の構成比を変化させないこと⁴⁾⁵⁾もこの見解を支持している。しかし、これらの報告は血液房水柵の蛋白透過性を定量的に評価したものではない。また、血液房水柵の 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⁶⁾が、この fluorophotometry による血液房水柵透過性の評価にも以下の問題がある。第一に、小分子である fluorescein に対する透過性の変化が、血液房水柵の臨床的な指標、即ち蛋白に対する透過性の変化をそのまま表しているとは言えないこと。第二に、全身投与された fluorescein の大部分は弱いながらも fluorescein 類似の蛍光を発する fluorescein glucuronide に代謝される⁷⁾ため、fluorophotometry では正確な fluorescein の透過性の評価が難しいことである。我々は今回、前房内蛋白濃度と房水流量の経時変化から臨床問題となる血液房水柵の蛋白透過性を定量的に算出し、timolol 点眼がこの蛋白透過性に与える影響を再検討した。その結果、timolol の 1 回点眼は血液房水柵の蛋白透過性を有意に変化させないことが明らかになったので報告する。

II 実験方法

1. 対象

年齢 22~27 歳の男性篤志者 10 人を対象とした。いずれの被験者も眼科的、全身の疾患を有せず、屈折異常も 3 diopter 以内であった。実験に先立ち、その方法、意義について説明し、同意を得た。実験はすべて東京大学医学部倫理委員会の承認を受けたものである。

2. 薬剤

0.5% timolol (Timoptol[®] 0.5%, 参天製薬) とそ

の基剤 (参天製薬) を用いた。

3. 血液房水柵の蛋白透過性の計算方法

前房内の蛋白は、生理的状态では毛様体内で血管から漏出した血漿蛋白の一部が虹彩実質を通過して前房内に入り⁸⁾⁹⁾、房水流によって前房外へ出ると考えられている¹⁰⁾。したがって、その動態は前房、後房、血漿の 3 者の間でおきる蛋白の交換によって規定される。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 $C_h(t)$ 、前房内蛋白質量を $M_a(t)$ 、血漿蛋白濃度を C_p 、血漿蛋白の前房内への透過性の指標を $P_{in}(t)$ 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 $f(t)C_a(t)$ であるので、次の式が成立する。

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

前房容積を $V_a(t)$ とすると、 $M_a(t) = V_a(t)C_a(t)$ なので、 $V_a(t)$ が一定の時、式(1)は

$$\frac{dC_a(t)}{dt} = \frac{P_{in}(t)}{V_a} [C_p - C_a(t)] + \frac{f(t)}{V_a} [C_h(t) - C_a(t)] \quad (2)$$

と書ける¹¹⁾。健康状態では毛様体上皮は蛋白分子を通過させない⁸⁾ので、 $C_h(t) \approx 0$ と仮定できる⁹⁾。 $P_{in}(t)/V_a$ は前房容積で規準化した血漿から前房内への蛋白流入係数を表すのでこれを $k_{in}(t)$ と書く。式(2)を書き換えると $k_{in}(t)$ は次の式で与えられる。

$$k_{in}(t) = \left[\frac{dC_a(t)}{dt} + \frac{f(t)C_a(t)}{V_a} \right] / [C_p - C_a(t)] \quad (3)$$

4. 実験の手順

$k_{in}(t)$ を算出するのに必要な式(3)右辺の諸変数値は以下のように求めた。実験前日 23 時に 5% fluorescein 溶液を 5 分間隔で 1 滴ずつ計 5~10 滴、青色光下に細隙灯顕微鏡で十分な角膜の染色が観察されるまで両眼に点眼した。点眼終了 5 分後に生理的食塩水で結膜囊を洗浄した。実験当日、角膜内および前房内 fluorescein 濃度、眼圧を 8 時から 17 時まで 1 時間ごとに測定した。Fluorescein 濃度の測定には fluorophotometer (Fluorotron Master[®], Coheret) を用いた。この機器は角膜内 fluorescein 蛍光強度を過小評価するので、得られた測定値を 1.7 倍して補正した¹²⁾。Goldmann 圧平式眼圧計による眼圧測定に際しては角膜の圧平領域を condensed milk で確認し、測定後に生理的食塩水で眼球をよく洗浄した。前房容積 (V_a)

は写真撮影法¹³⁾を用いて10時と13時に測定した。静脈採血を17時に行い、血漿蛋白濃度(C_p)をbiuret法で測定した。眼圧測定直後に、前房内フlea強度の測定をレーザーフlea・セルメーター(FC-1000®, 興和, 東京)で行い¹⁴⁾, 得られた測定値をヒトalbumin濃度に換算して前房内蛋白濃度($C_a(t)$)とした¹⁵⁾。11時に無作為に選んだ片眼に30 μ lの0.5%timololを、他眼に同量の基剤を点眼した。点眼後10分間は投与眼の下眼瞼内側部を手指で圧迫させ、薬剤の全身吸収を抑えるよう努めた。

房水流量はJones-Maurice第2法変法¹⁶⁾¹⁷⁾に従い次式を用いて算出した¹⁷⁾。

$$f(t) = 0.9 \left[V_c \frac{dF_c(t)}{dt} + V_a \frac{dF_a(t)}{dt} \right] / F_a(t) \quad (4)$$

V_c : 角膜容積 (70 μ l とした¹⁸⁾)

$F_c(t)$: 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

式(3)の $dC_a(t)/dt$ および式(4)の $dF_c(t)/dt$ と $dF_a(t)/dt$ は差分によって近似した¹⁹⁾。結果で述べるように、 V_a は点眼前後で有意に変化しなかったため、式(4)には点眼前の値を定数として代入した。

III 結 果

Timolol 投与眼の前房内蛋白濃度は他眼に比べて点眼1時間後から有意に増加し ($p < 0.05$, paired t-test), 点眼5時間後に最大 $37 \pm 4\%$ 増加した (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=10$)。Timolol 投与眼の眼圧は他眼に比べて点眼1時間後から有意に減少し, 点眼2時間後に最大 3.0 ± 0.3 mmHg 減少した。Timolol 投与眼の房水流量は他眼に比べて点眼1時間後から有意に減少し, 点眼2時間後に最大 $30 \pm 4\%$ 減少した (図1)。また, timolol 投与眼の房水流量は点眼1時間前と比較して点眼2時間後から有意に減少し, 点眼3時間後に最大 $31 \pm 6\%$ 減少した。同様に他眼の房水流量は点眼1時間前と比較して点眼4時間後に有意に $10 \pm 5\%$ 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 投与眼では, 点眼1時間前の $k_{in}(t)$ は点眼後のいかなる時点の $k_{in}(t)$ ととも有意に異ならなかった ($p > 0.1$, paired t-test) (図2)。

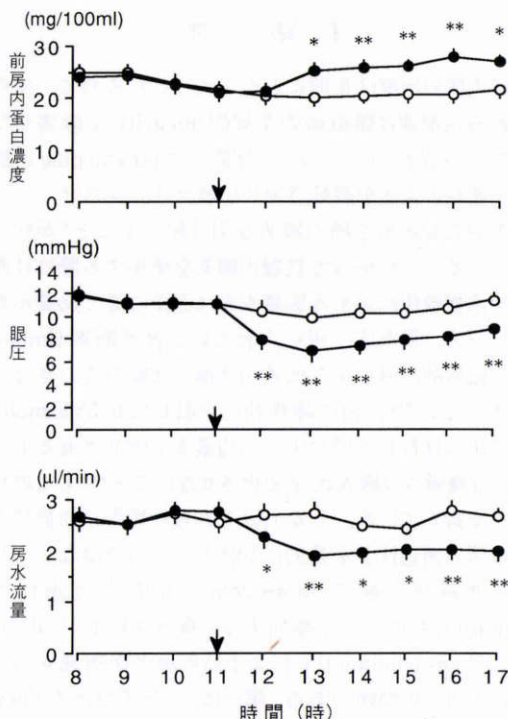


図1 0.5%timolol点眼前後の前房内蛋白濃度, 眼圧, 房水流量の経時変化。

●はtimolol投与眼, ○は他眼を表し, ↓は点眼時刻を示す。平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=10$ 。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (paired t-test)。

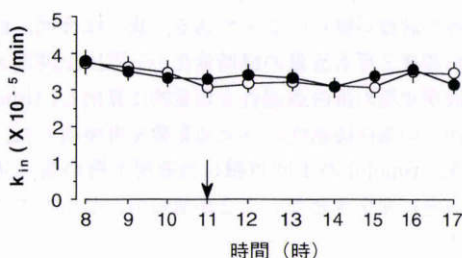


図2 0.5%timolol点眼前後の前房内蛋白流入係数(k_{in})の経時変化。

●はtimolol投与眼, ○は他眼を表し, ↓は点眼時刻を示す。平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=10$ 。

IV 考 按

今回の実験では, timolol 投与眼の房水流量は他眼に比べて最大30%減少した。これは従来の日本人における fluorescein 全身投与法による結果⁶⁾とほぼ一致し, 白色人種における結果²⁰⁾²¹⁾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²²⁾、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回点眼が血液房水柵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⁴⁾⁵⁾の報告、家兎でtimolol点眼が α -melanocyte stimulating hormoneによる血液房水柵透過性の増加を抑えるという報告²³⁾、 β -agonistによるratの虹彩血管の拡張をtimololが抑制するという報告²⁴⁾と合い容れる。一方、分子量332の小分子であるfluoresceinイオンは正常の血液房水柵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に対する血液房水柵の透過性を増加させるというfluorophotometryの結果⁶⁾と必ずしも矛盾しない。

片眼に点眼したtimololが他眼の房水流量を減少させ、眼圧を下げることは知られており²⁰⁾²¹⁾、本研究でも他眼の房水流量が減少した。Timolol点眼が他眼の血液房水柵に作用するならtimolol投与眼と他眼で k_{in} を比較することは不適當である。その可能性が否定できないので、本研究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 $k_{in}(t)$ の差の検定では、 $k_{in}(t)$ の差が正規分布を大きく外れないことから、有意水準 α 、検出力 $1-\beta$ 、例数 n で検出できる $k_{in}(t)$ の差 δ は次の式で与えられる²⁵⁾。

$$\delta = \frac{\sigma}{\sqrt{n-2}} \{t_{\alpha}[\infty] + t_{2\beta}[\infty]\} \quad (5)$$

σ は点眼前後の $k_{in}(t)$ の差の標準偏差、 $t[\infty]$ は自由度 ∞ での t 値である。 $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.2$ とすれば、timolol投与眼における点眼1～3時間後の σ は0.8～0.9なので δ は0.8～0.9となる。これは $k_{in}(t)$ の値の20～25%である。一般にbioequivalencyの範囲は $\pm 20\%$ 程度以内とされていること、同様の方法でpilocarpine点眼が P_{in} に及ぼす影響を検討した場合、 $n=5$ で24%の変化が検出されている²⁶⁾ことから、本法の検出力は臨床的に意味をもつ変化量の検出には充分であると考えられる。

今回の結果は次のような意義をもつと言える。1) pilocarpineが禁忌とされている続発性緑内障や眼内

手術後の炎症を伴う眼圧上昇²⁷⁾に対して、timololを用いることの正当性を人眼ではじめて実験的に示した。

2) 血液房水柵の蛋白透過性(k_{in})がtimolol点眼によって変化しないことを前提として、前房内の蛋白濃度変化から房水流量を計算する方法の妥当性を示唆する。すなわち、式(3)を変形すると $f(t)$ は次の式で与えられる。

$$f(t) = V_a \left[-\frac{d \ln C_a(t)}{dt} + k_{in} \left(\frac{C_p}{C_a(t)} - 1 \right) \right] \quad (6)$$

Timolol点眼で変化しない V_a 、 k_{in} 、 C_p には、別個に一時点で測定した各被験者の値、あるいは人眼での正常値を定数としてあてはめることで、 $f(t)$ の経時変化を $C_a(t)$ の経時変化だけから算出できる²⁸⁾。Timololを代表とする β -blockerが最も多く使用される眼圧下降薬であるにもかかわらず、その薬理的作用機序が充分解明されていないことを考慮すると、この方法は今後の β -blockerの研究を進める上で有用であろう。また、 $C_a(t)$ と $f(t)$ の経時変化から血液房水柵透過性の指標である k_{in} の経時変化を求める本法は他の薬剤に適用できるので²⁶⁾²⁹⁾³⁰⁾、各種薬剤の血液房水柵機能に対する影響を評価する有用な方法として幅広い応用が期待される。

文 献

- 1) Abraham SV: Miotic iridocyclitis: Its role in the surgical treatment of glaucoma. Am J Ophthalmol 48: 634-643, 1959.
- 2) Chen HSL, Steinmann WC, Spaeth GL: The effect of chronic miotic therapy on the results of prosterior chamber intraocular lens implantation and trabeculectomy in patients with glaucoma. Ophthalmic Surg 20: 784-789, 1989.
- 3) Havener WH: Autonomic drugs, in Ocular Pharmacology, St. Louis, The C.V. Mosby Co., 261-417, 1983.
- 4) Stur M, Grabner G, Huber-Spitzy V, et al: Effect of timolol on aqueous humor protein concentration in the human eye. Arch Ophthalmol 104: 899-900, 1986.
- 5) Stur M, Grabner G, Dorda W, et al: The effect of timolol on the concentrations of albumin and IgG in the aqueous humor of the human eye. Am J Ophthalmol 96: 726-729, 1983.
- 6) Araie M, Takase M: Effects of various drugs on aqueous humor dynamics in man. Jpn J Ophthalmol 25: 91-111, 1981.
- 7) Chen SC, Nakamura H, Tamura Z: Determination of fluorescein and fluorescein monoglu-

- cronide excreted in urine. *Chem Pharm Bull* 28: 2812—2816, 1980.
- 8) **Raviola G**: The structural basis of the blood-aqueous barriers. *Exp Eye Res* 25(Suppl): 27—63, 1977.
- 9) **Freddo TF, Bartels SP, Barsotti MF**, et al: The source of proteins in the aqueous humor of the normal rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 125—137, 1990.
- 10) **Bill A**: Basic physiology of the drainage of aqueous humor. *Exp Eye Res* 25(Suppl): 291—304, 1977.
- 11) **Cole DF**: Ocular fluids, in Davson H (ed): *The Eye*, Orlando, Academic Press, 269—390, 1984.
- 12) 森 樹郎, 新家 真: Fluorotron Master®の角膜内蛍光強度測定値と真的 fluorescein 濃度の関係, *眼紀* 41: 2204—2207, 1990.
- 13) **Johnson SB, Coakes RL, Brubaker RF**: A simple photogrammetric method of measuring anterior chamber volume. *Am J Ophthalmol* 85: 469—474, 1978.
- 14) **Sawa M, Tsurimaki Y, Tsuru T**, et al: New quantitative method to determine protein concentration and cell number in aqueous in vivo. *Jpn J Ophthalmol* 32: 132—142, 1988.
- 15) **Oshika T, Araie M**: Time course of changes in aqueous protein concentration and flow rate after oral acetazolamide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 527—534, 1990.
- 16) **Jones RF, Maurice DM**: New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res* 5: 208—220, 1966.
- 17) **Gaul GR, Brubaker RF**: Measurement of aqueous flow in rabbits with corneal and vitreous depots of fluorescent dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1331—1335, 1986.
- 18) **Brubaker RF**: Clinical evaluation of the circulation of aqueous humor, in Duane TD, Jaeger EA (eds): *Clinical Ophthalmology*, Philadelphia, Harper & Row Publishers, 1—11, 1986.
- 19) **Araie M, Sawa M, Nagataki S**, et al: Aqueous humor dynamics in man as studied by oral fluorescein. *Jpn J Ophthalmol* 24: 346—362, 1980.
- 20) **Coakes RL, Brubaker RF**: The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure in the normal eye. *Arch Ophthalmol* 96: 2045—2048, 1978.
- 21) **Yablonski M, Zimmerman T, Waltman S**, et al: A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics. *Exp Eye Res* 27: 135—142, 1978.
- 22) **Abrahamsson T, Boström S, Bräutigam J**, et al: Binding of the beta-blockers timolol and H 216/44 to ocular melanin. *Exp Eye Res* 47: 563—577, 1988.
- 23) **Holmdahl G, Bengtsson E**: The effect of timolol maleate on the disruption of the blood-aqueous barrier in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 726—732, 1981.
- 24) **Szalay J**: Effect of beta adrenergic agents on blood vessels of the rat iris. II. Morphological modifications of the vessel wall. *Exp Eye Res* 31: 299—311, 1980.
- 25) 佐久間昭: 薬効評価—計画と解析1. 東京, 東京大学出版会, 133—146, 1977.
- 26) **Mori M, Araie M, Sakurai M**, et al: Effects of pilocarpine and tropicamide on blood-aqueous barrier permeability in man. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 416—423, 1992.
- 27) **Krupin T, Feitl ME**: Glaucoma associated with uveitis, in Ritch R, Schields MB, Krupin T (eds): *The Glaucomas*, St. Louis, The C.V. Mosby Co., 1205—1224, 1989.
- 28) **Mori M, Araie M**: A simple method of determining the time course of timolol's effects on aqueous flow in humans. *Arch Ophthalmol* 109: 1099—1103, 1991.
- 29) **Mori M, Araie M**: Effect of apraclonidine on blood-aqueous barrier permeability in man. *Exp Eye Res* 54: 555—559, 1992.
- 30) **Araie M, Mori M, Oshika T**: Effect of phenylephrine on blood-aqueous barrier permeability in man. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 230: 171—174, 1992.