

## グリセオール酸 (cAMP-Phosphodiesterase 阻害剤) 局所投与による眼圧変化の基礎的研究

第1報 グリセオール酸の点眼, 結膜下注射  
および硝子体内注入による眼圧動態

木 内 良 明

広島大学医学部眼科学教室 (主任: 調枝寛治教授)

受付 昭和63年8月30日

受理 昭和63年10月3日

健常成熟白色家兎の片眼に, cAMP-phosphodiesterase 阻害剤のひとつであるグリセオール酸 (GA) の点眼, 結膜下注射, 硝子体内注入を行ない, 非投与眼をコントロールとして, GA の眼圧下降効果について検討した。

0.5% GA (50  $\mu$ l) 点眼では, わずかな眼圧下降しか得られなかった。1% GA (50  $\mu$ l) 点眼では, 点眼後2時間の時点で, 2% GA 点眼では, 1~5時間後の時点で有意の眼圧下降が得られた。処置眼と非処置眼の最大眼圧差 (Mean $\pm$ SEM) は, 0.5% GA の点眼では  $1.2\pm 0.58$  mmHg, 1% GA の点眼では  $2.0\pm 0.57$  mmHg, 2% GA の点眼では  $3.8\pm 0.47$  mmHg となり用量依存性の眼圧下降が認められた。

1% GA (100  $\mu$ l) の結膜下注射では, 注射後4時間と5時間の2時点で, 2% GA (100 $\mu$ l) の結膜下注射では, 注射後3時間, 5時間および6時間の3時点で, 処置眼の眼圧が有意に下降した。その最大眼圧差は1% GA では  $2.2\pm 0.49$  mmHg, 2% GA では  $2.9\pm 1.04$  mmHg であった。

1% GA (10  $\mu$ l) の硝子体内注入では, 著明な眼圧下降が注射12時間後からみられ, 36時間持続した。注射48時間後に最も眼圧は下降 ( $4.2\pm 0.76$  mmHg) し, その後, 眼圧は徐々に上昇して6日後に処置眼, 非処置眼間の眼圧差は無くなった。

cAMP 分解酵素, phosphodiesterase の阻害剤である GA の単独投与で, 今回初めて有意の眼圧下降が得られたことを報告した。

**Key words :** cAMP-phosphodiesterase inhibitor, Griseolic acid, Intraocular pressure

1972年, Neufeld ら<sup>1)</sup> はエピネフリン, ノルエピネフリン, イソプロテレノールの3種の  $\beta$ -adrenergic agents を家兎眼に点眼すると, 前房水中の cAMP 活性が上昇すること, 前房水中の cAMP 活性の上昇度に比例して眼圧の下降が得られることを初めて報告した。続いて, 1981年, Gregory ら<sup>2)</sup> はレセプターを介して, adenylate cyclase を不可逆的に活性化する chorela toxin が, 極微量でも房水産性を抑制し, 眼圧を著明に下降させることを報告している。さらに, Caprioli ら<sup>3)</sup> は膜レセプターを介さず, 直

接 adenylate cyclase を活性化する forkolin が, 点眼でも有意に家兎, 猿, 人の眼圧を下げることを示した。その機序として, 房水産生抑制が考えられると延べている。そのほか, ドーパミンがドーパミンレセプターを介して, 人眼あるいは牛眼の毛様体上皮の cAMP 活性を上昇させること<sup>4)</sup>, dopamine receptor agonists が家兎の眼圧を下げることも報告されている<sup>1)</sup>。Human chorionic gonadotropin (hCG)<sup>5)</sup>, 百日咳菌毒素<sup>23)</sup> などの adenylate cyclase 活性化物質も眼圧を下降させる作用を有すると報告されている。こ

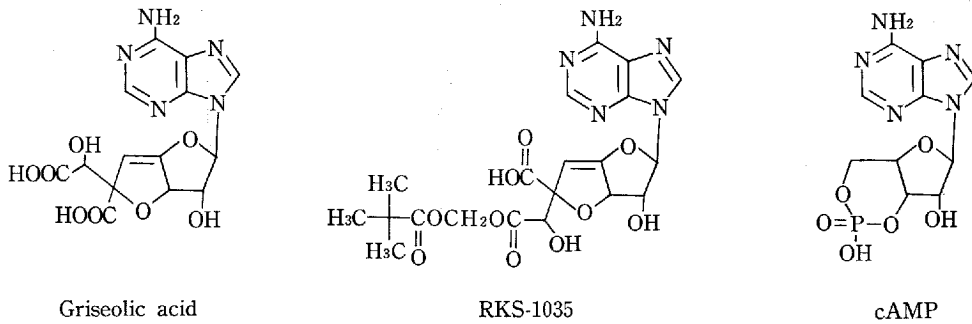


Fig. 1. Structure of griseolic acid ( $C_{14}H_{13}O_8N_5$ ; Mr. 379), RKS-1035 and cAMP

Table 1. Formula of buffer solution

$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	728 mg
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	716 mg
NaCl	400 mg
Methyl-p-hydroxybenzoate	26 mg
Propyl-p-hydroxybenzoate	14 mg
Purified Water	q. s.
Total	100 ml

(溶解後 1-N NaOH で pH 7.0 とした。)

これらの点から考えて、眼圧の調節が cAMP 系を介して行われている可能性が強いと思われる。

Cholera toxin, hCG, ドーパミン, forskolin, 百日咳菌毒素など、cAMP 合成を促進する物質で眼圧が下降するのであれば、cAMP の分解を抑制した場合、眼圧はどう変化するであろうか。cAMP の分解酵素である cAMP-phosphodiesterase 阻害剤を用いて十分な眼圧下降を得た報告はない。これまで、わずかに Hoyng<sup>ら</sup><sup>8)</sup> が phosphodiesterase 阻害剤の一つである isobutylmethylxantine (IBMX) を使用し、眼圧下降実験を行ない、IBMX 単独点眼では有意な眼圧下降が得られなかったと報告している。しかし、細胞内の cAMP を増加させる  $\beta$ -adrenergic agents (エピネフリン, ノルエピネフリン, イソプロテレンール) と IBMX を組み合わせると、adrenergic agents のもつ眼圧下降作用が増幅されたと報告しているがその詳細は述べていない。

グリセオール酸 (GA) は *Streptomyces griseoaurantiacus* から抽出された全く新しい、強力な cAMP-phosphodiesterase 阻害剤である<sup>15)</sup> GA の構造は cAMP ときわめて類似しており、cAMP と競合し、cAMP-phosphodiesterase の作用を阻害する (Fig. 1)<sup>9)</sup>。GA の cAMP-phosphodiesterase を阻害する能力は、ラットの脳を用いた実験によるとテオフィリン

の約 2,500 倍、パパペリンの約 25 倍<sup>9)</sup>、IBMX の約 40 倍<sup>22)</sup> ときわめて強力である。今回、強力な cAMP-phosphodiesterase 阻害剤である GA が眼圧に与える影響をみるため、健常成熟白色家兎眼にたいして点眼、結膜下注射および硝子体内注入の 3 種類の異なる方法で、各種濃度の GA を投与し、その眼圧動態を検討したので概要を報告する。

## 材料と方法

### 1. 使用薬剤

今回の実験では、GA の眼内移行性を増すため、GA の acyloxyalkyl ester 誘導体でグリセオール酸の 8' 位が pivaloyloxymethyl ester (8'-POM ester) を形成した RKS-1035 を用いた (Fig. 1)。RKS-1035 水溶液は Table 1 に示すリン酸緩衝液に溶解し、溶解後 1 N-NaOH で pH 7.0 に調整した。RKS-1035 は眼内で加水分解を受け GA となって作用する<sup>22)</sup>。RKS-1035 は三共株式会社から提供を受けた。

### 2. 使用動物

健常成熟白色家兎 (体重 2.5 kg 前後) を雌雄の区別なく用いた。

### 3. GA 投与方法および眼圧測定法

1) 点眼: 0.5, 1, 2% GA 水溶液 50  $\mu$ l を右眼に点眼し、左眼にはリン酸緩衝液を同量点眼した。点眼直前、点眼後 30 分、及び点眼後 6 時間まで 1 時間毎に、pneumatograph (PTG, Alcon 社) を用いて眼圧測定を行なった。

2) 結膜下注射: 前処置として、注射 3, 2, 1 時間及び 30 分前に 0.5% インドメサシン油性点眼液 50  $\mu$ l を点眼した。1, 2% GA 水溶液 100  $\mu$ l を右眼の球結膜下に注入し、左眼にはリン酸緩衝液を同量注入した。点眼実験と同じく、点眼直前及び点眼後 30 分、1, 2, 3, 4, 5, 6 時間の 8 時点で PTG を用いて眼圧を測定した。

3) 硝子体内注入：前処置として注射前3, 2, 1時間及び30分に0.5%インドメサシン油性点眼液 50  $\mu$ lを点眼した。1% GA 水溶液 10 $\mu$ l を右眼角膜輪部から 2 mm の部位に30ゲージ針を用いて、硝子体内に注入した。左眼にはリン酸緩衝液 10  $\mu$ l を同様に注入した。注射の直前、注射後30分, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24時間の12時点と、その後、24時間ごとに6日間 PTG を用いて眼圧測定を行なった。

どの実験でも、眼底検査と細隙燈顕微鏡下で結膜、角膜、前房などの前眼部の観察を時間の経過と共に行なった。瞳孔径の計測は Haab 瞳孔計で行なった。また、得られた結果は平均値±標準誤差で表わした。

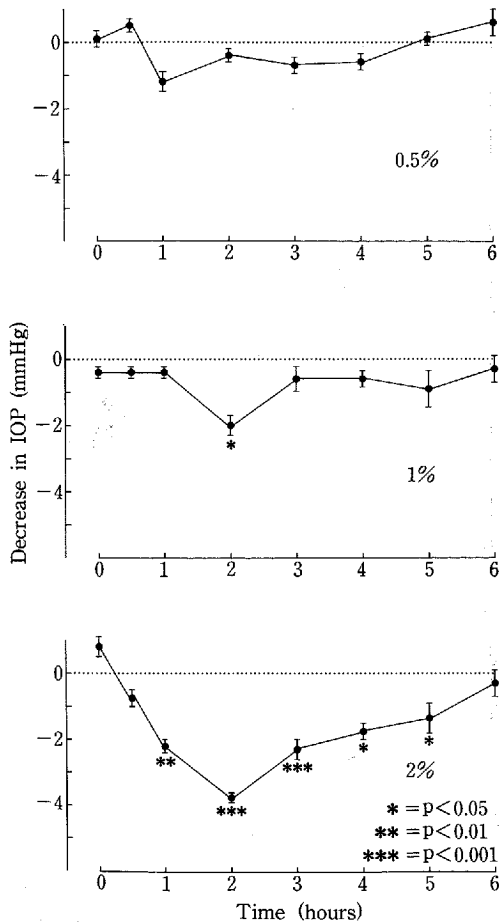


Fig. 2. IOP changes versus time after topical application of griseolic acid. Values are mean differences between the IOP of control eyes and treated eyes. (\*=p<0.05, \*\*=p<0.01, \*\*\*=p<0.001)

## 成 績

### 1) 点眼による眼圧動態

0.5% GA 水溶液点眼では、コントロール眼に比し、わずかな眼圧下降しか得られなかったが、1% GA 水溶液点眼では点眼2時間後に、また、2% GA 水溶液点眼では点眼1~5時間後に、処置眼の眼圧は有意に下降した (Fig. 2)。6時間後には左右眼の眼圧差はなくなった。各点眼液濃度での最大眼圧差は0.5%水溶液では  $1.2 \pm 0.58$  mmHg, 1% 水溶液では  $2.0 \pm 0.57$  mmHg, 2% 水溶液では  $3.8 \pm 0.47$  mmHg となり、点眼液濃度と最大眼圧差の間には強い相関が認められた ( $r=0.97$ ) (Fig. 3)。全例とも、前眼部、中間透視体、眼底に著変は無かった。

### 2) 結膜下注射による眼圧動態

1% GA 水溶液の結膜下注射では、注射直後から処置眼の眼圧は下降し、注射4時間及び5時間後の2時点で処置眼の眼圧は対照眼に対し、有意に下降した。2% GA 水溶液の結膜下注射では、注射3, 5及び6時

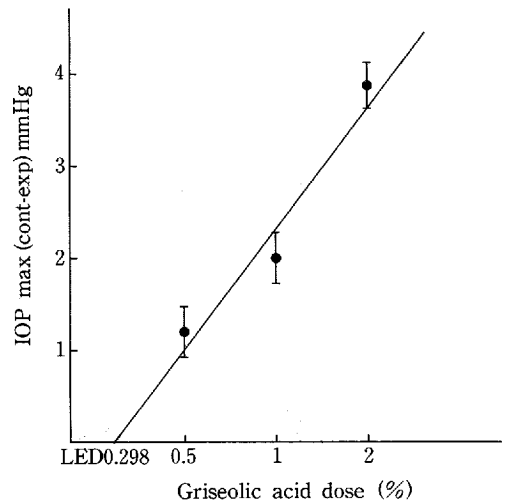


Fig. 3. Linear regression of the maximum decrease in the intraocular pressure as a function of the logarithm of topical griseolic acid dose. ( $r=0.97$ )

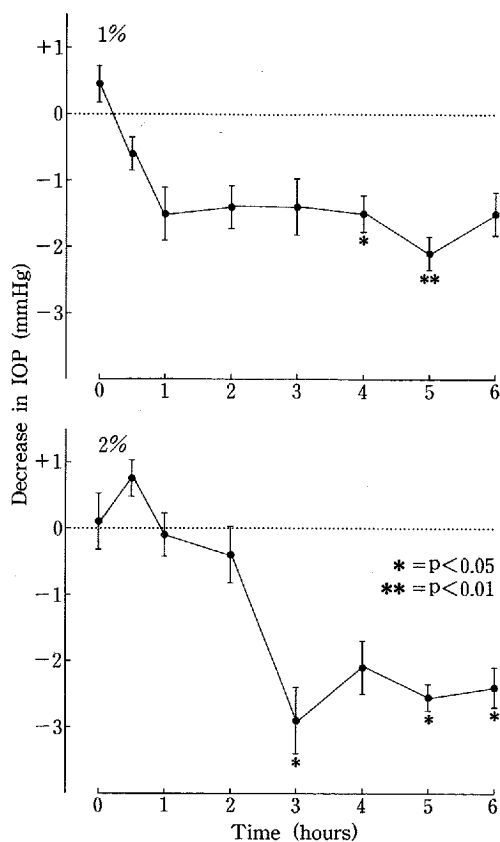


Fig. 4. IOP changes versus time after subconjunctival injection of griseolic acid. Values are mean differences between the IOP of control eyes and treated eyes. (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ )

間後の3時点で有意な眼圧の下降が得られた。1% GA では注射後5時間で、2% GA では注射後3時間で眼圧差は最も大きくなり、それぞれの最大眼圧差は  $2.2 \pm 0.49$  mmHg,  $2.6 \pm 0.42$  mmHg であった (Fig. 4)。全例とも前眼部、中間透光体、眼底に著変は無かった。

### 3) 硝子体注入による眼圧動態

処置眼の眼圧は対照眼に比して、5日間にわたり有意に下降した。注射12時間後から36時間にわたって著明な眼圧下降がみられ、注射48時間後に眼圧は最も下降した。その最大眼圧差は  $4.2 \pm 0.76$  mmHg であった。眼圧は以後徐々に上昇し、6日後にはほぼ対眼(非処置眼)の眼圧に帰した (Fig. 5)。

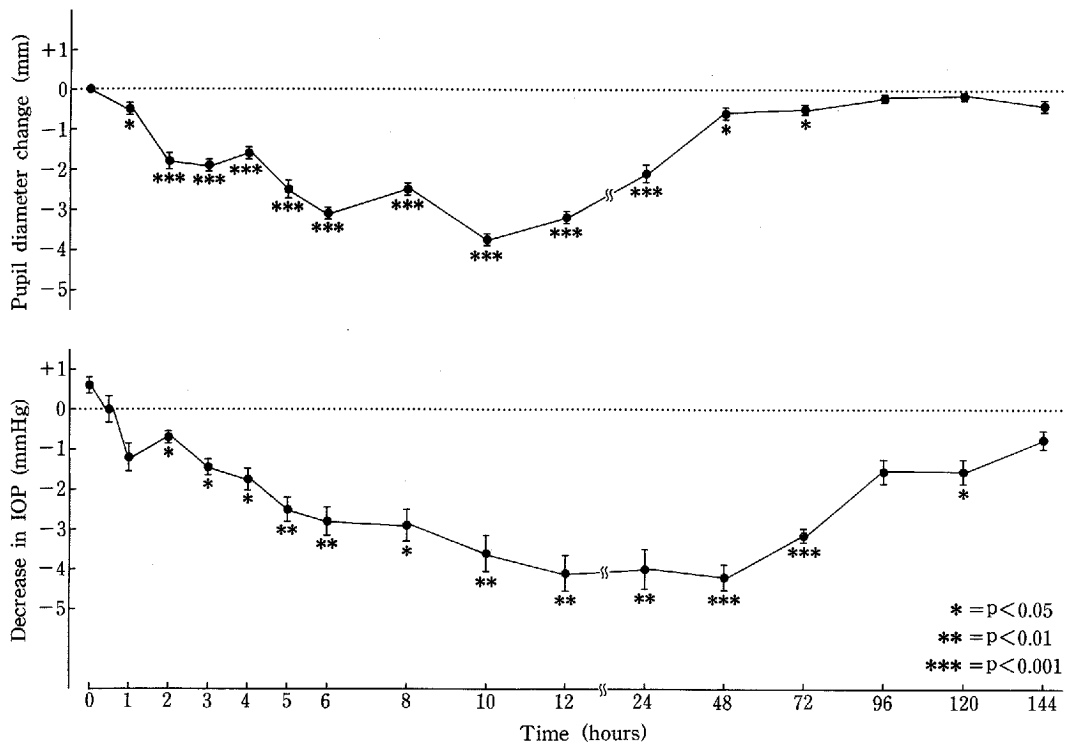
GA の硝子体内注入では、縮瞳が観察された。瞳孔は GA 注入1時間後から縮瞳し始め、注射後10時間

で瞳孔径の左右差が最も大きくなり ( $3.7 \pm 0.35$  mm)、3日後にはほぼ左右差がなくなった (Fig. 5)。しかし、結膜、角膜、前房、水晶体、眼底には異常はみられなかった。

## 考 察

$\beta$ -Adrenergic agents<sup>16)</sup>, choleratoxin<sup>6)</sup> forskolin<sup>4, 12, 20)</sup>, 百日咳菌毒素<sup>23)</sup> など、毛様体上皮細胞中の cAMP 活性を上昇させる物質が眼圧を下降させることは、すでに数多く報告されている。では、cAMP の分解を阻害し、眼内の cAMP 濃度を増加させたとき、眼圧はどう変化するかという点は非常に興味深い。しかし、cAMP-phosphodiesterase 阻害剤を用いて細胞内の cAMP の分解を阻害し、cAMP 濃度を上昇させて有意な眼圧下降を得た報告は現在までない。今回は、この観点から、cAMP-phosphodiesterase 阻害剤の一つである GA を用いて眼圧下降実験を行なった。GA は1985年に初めて報告された全く新しい cAMP-phosphodiesterase 阻害剤である<sup>15)</sup>。GA の性質、作用については Iijima ら<sup>9)</sup> が検討を行なっている。ラットの脳から得られた cAMP-phosphodiesterase に対する GA の阻害能力はテオフィリンの約2,500倍、パパペリンの約25倍と強力で、GA 10 mg/kg を皮下注射すると、50分後には肝臓の cAMP 濃度は対照の5倍、血漿中の cAMP 濃度は9倍に増加する。さらに、彼らは、ラットの肝から粗製された cAMP-dependent protein kinase について、agonist としても antagonist としても全く作用せず、血小板の凝集や、腸管平滑筋の弛緩も起こさなかったと述べているが、詳細な実験成績は記載されていない。GA は cAMP-phosphodiesterase に対して特異的に作用する強力な阻害剤といえる。

GA の投与は、眼科臨床で頻用される投与方法、すなわち点眼、結膜下注射にて行なった。また、薬物の眼球に対する真の作用を知るために<sup>10)</sup> GA を硝子体内に注入し、その眼圧動態も検討した。その結果、GA の点眼では点眼後1~2時間で最も眼圧が下降し、処置眼と非処置眼の最大眼圧差は 0.5% GA では  $1.2 \pm 0.58$  mmHg, 1% GA では  $2.0 \pm 0.57$  mmHg, 2% GA では  $3.8 \pm 0.47$  mmHg と用量依存性の眼圧下降作用を認めた。1% GA の結膜下注射では注射5時間後に、2% GA の結膜下注射では注射3時間後に、最大の眼圧差が得られた。処置眼と非処置眼の最大眼圧差は 1% GA では  $2.2 \pm 0.49$  mmHg, 2% GA では  $2.9 \pm 1.04$  mmHg であった。結膜下注射によって得られた最大眼圧差は、点眼実験で得られた眼圧下降幅



**Fig. 5.** IOP and pupil diameter changes versus time after intravitreal injection of 1% griseolic acid. Values are mean differences between the IOP of control eyes and treated eyes, and differences between the diameter of control eyes and treated eyes. (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ )

よりも少なく、最大効果発現時間も点眼に比べて結膜下注射では遅れた。結膜下注射では薬物が徐々に眼内に移行すること<sup>7,21)</sup>、反射眼にも薬物が作用する可能性があること<sup>2)</sup>を考えると、点眼と結膜下注射の効果発現の差は、薬物の眼内移行形式が異なるために生じたのではないと思われる。一方、GAの硝子体内注入では5日間にわたって有意な眼圧下降があった。その最大眼圧差も $4.2 \pm 0.72$  mmHgと点眼、結膜下注射によるものと比べて大きかった。Chorela toxinの硝子体内注入では、約2週間にわたって<sup>6)</sup>、百日咳毒素の硝子体内注入では5日間にわたって<sup>23)</sup> 著明な眼圧下降が得られている。また、ノルエピネフリンの点眼では<sup>10)</sup> 24時間後には処置眼と非処置眼との間に眼圧差がなくなっているのに比べ、硝子体注入では5日以上も有意な下降が続いている。硝子体内に薬剤を注入した方が他の投与方法よりも強く、長期に渡る眼圧下降が生じた。Langhamら<sup>10)</sup>はなぜ、ノルエピネフリンの硝子体内注入でこのように長期にわたる眼圧下降が得られるか分からないと述べている。

点眼、結膜下注射では前眼部、中間透光体、眼底に

著変は生じなかった。一方、GAの硝子体内注入では中間透光体、眼底に著変は生じないものの、強い縮瞳現象が出現した。Alphenら<sup>1)</sup>は家兎の瞳孔括約筋の $\beta$ -レセプターを刺激すると瞳孔括約筋は弛緩すると報告している。また、望月は<sup>14)</sup> イソプロテレノール、dibutyryl cAMPを用いて瞳孔括約筋の弛緩が細胞内cAMP量の増加によってもたらされることをあきらかにしているが、今回、なぜGAの硝子体内注入で縮瞳したか今のところ不明である。

さて、GAの眼圧下降機序は何であろうか。 $\beta$ -Adrenergic agents, chorela toxin, forskolinなど毛様体上皮のcAMP濃度を上昇させる物質は、毛様体上皮からの房水産生量を減少させ、眼圧を下げるといわれる<sup>19)</sup>。また、1975年、Neufeldら<sup>17)</sup>はエピネフリン、dibutyryl cAMPを前房内に注入すると、房水流出量が約2倍になることを報告している。また、Mishima<sup>13)</sup>は文献的考察を行ない、猿眼は房水流出量はcAMPの影響を受けると結論している。さらに、第2の房水流出路として毛様体の組織間隙から房水が上強膜腔に入り、そこから脈絡膜循環に吸収されたり、

強膜組織内を移動して眼球外に出るという uveoscleral outflow がある。この uveoscleral outflow がエピネフリンの  $\beta$  作用で増大するという報告がある<sup>3)</sup>。今回の実験の結果から、GA 処置による眼圧低下のメカニズムがはたして房水産生量の減少なのか、房水流出抵抗の低下なのか、uveoscleral outflow の増大なのかについて、現時点ではなにも言及できない。この点については、今後の重要な検討課題である。

今回、点眼、結膜下注射、硝子体内注入いずれの投与方法にても cAMP-phosphodiesterase 阻害剤である GA の単独投与で有意な眼圧下降が得られた。過去に、cAMP-phosphodiesterase 阻害剤単独投与で有意な眼圧下降が得られた例はなく、今回初めて、cAMP-phosphodiesterase の作用を阻害するだけでも眼圧が下がることを示した。

#### 謝 辞

本論文を終えるにあたり、調枝寛治教授の御校閲に深謝いたします。また、ご指導頂きました三嶋 弘助教授に厚くお礼申し上げます。

#### 参 考 文 献

1. van Alphen, G. W. H. M., Kern, R. and Robinette, S. L. 1965. Adrenergic receptors of the intraocular muscles, comparison to cat, rabbit and monkey. Arch. Ophthalmol. 74: 253-259.
2. 馬場さえ子, 沖本峰子, 宮地幸隆 1981. Betamethasone phosphate (BM) の球後および結膜下注射後の前房水および血中 BM 濃度. 眼紀 32 : 857-860.
3. Bill, A. 1969. Early effects of epinephrine on aqueous humor dynamics in vervet monkey (*Cercopithecus ethiops*). Exp. Eye Res. 8:35-43.
4. Caprioli, J., Sears, M., Baudsher, L., Gregory, D. and Mead, A. 1984. Forskolin lowers intraocular pressure by reducing aqueous inflow. Invest. Ophthalmol. vis. sci. 25:371-381.
5. De Vries, G. W., Mobasser, A. and Wheeler, L. A. 1986. Stimulation of endogenous cyclic AMP levels in ciliary body by SK & F82526, a novel dopamin receptor agonist. Curr. Eye Res. 5:449-455.
6. Gregry, D., Sears, M., Bausher, L., Mishima, H. and Meed, A. 1981. Intraocular pressure and aqueous flow are decreased by cholera toxin. Invest. Ophthalmol. vis. sci. 20:371-381.
7. Hardy, R. G. Jr. and Paterson, C. A. 1971. Ocular penetration of labeled chloramphenicol following subconjunctivally injected C<sup>14</sup> hydrocortisone. Am. J. Ophthalmol. 58: 362-366.
8. Hoying, P. F. J. and Groeneboer, C. 1987. isobutylmethylxantine (IBMX), A phosphodiesterase inhibitor, enhances ocularhypotension, induced by adrenergic agents in the pigmented rabbit eye. ARVO abstracts:12.
9. Iijima, Y., Nakagawa, F., Honda, S., Oda, T., Naito, A. and Yamazaki, M. 1985. Biological properties of griseolic acid, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor with an adenine group. FEBS letters 192:179-183.
10. Langham, M. E. and Diggs, E. M. 1972. Quantitative studies of the ocular response to norepinephrine. Exp. Eye Res. 13:161-171.
11. Mekki, Q. A. and Turner, P. 1985. Stimulation of dopamine receptors (type 2) lowers human intraocular pressure. Br. J. Ophthalmol. 69:909-901.
12. 三嶋 弘, 柴田哲夫, 増田寛次郎, 高瀬正弥, 新家 真, 北沢克明, 粕谷 豊, 細川友和 Forskolin 点眼による緑内障治療の可能性. 眼紀, 投稿中.
13. Mishima, S. 1982. Ocular effects of beta-adrenergic agents. XII Jules Stein lecture. Surv. Ophthalmol 27:187-208.
14. 望月 学 1979. 白色家兎瞳孔括約筋における  $\beta$  agrenaline 作用と cyclic AMP. 日眼会誌 83 : 1517-1523.
15. Nakagawa, F., Okazaki, T., Naito, A., Iijima, Y. and Yamazaki, M. 1985. Griseolic acid, an inhibitor of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase. 1. taxonomy, isolation and characterization. J. Antibiotics. 38:823-829.
16. Neufeld, A. H., Jampol, L. M. and Sears, M. 1972. cyclic-AMP in the aqueous humor: the effect of adrenergic agents. Exp. Eye Res. 14:242-250.
17. Neufeld, A. H., Dueker, D. K., Veggy, T. and Scars, M. L. 1975. Adenosine 3', 5'-monophosphate increases the outflow of aqueous humor from the rabbit eye. Invest. Ophthalmol. 1440-43.
18. Sears, M. L. and Mead, A. 1983. A major pathway for the regulation of intraocular pressure. Intl. Ophthalmol. Clin. 6:201-212.
19. Sears, M. L., Caprioli, J., Kondo, K. and Bausher, L. 1984. A mechanism for the control of aqueous humor formation, p. 303-324.

- In* S. M. Drance (ed.), Applied pharmacology in the medical treatment of glaucoma. Grune & Stratton, Inc.
20. **Sibata, T., Mishima, H. and Kurokawa, T.** 1988. Ocular pigmentation and intraocular pressure to forskolin. *Curr. Eye Res.* 7: 667-674.
  21. **Wine, N. A., Gornall, A. G. and Basu, P. K.** 1967. The ocular uptake of subconjunctivally injected C<sup>14</sup> hydrocortisone. *Am. J. Ophthalmol.* 58:362-366.
  22. **Yamazaki, M.** personal communication
  23. **吉村長久, Mittag, T. W. and Podos, S. M.** 1988. 家兔毛様突起における GTP 結合蛋白質の存在と百日咳毒素による作用修飾, 眼圧に対する作用と作用機序の生化学的解析. *日眼会誌* 92臨時増刊号: 122.

## Experimental Study on Changes of Intracocular Pressure by The Application of Griseolic Acid

### 1. Intraocular pressure changes in albino rabbits after treatment with Griseolic acid

Yoshiaki KIUCHI

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine  
(Director: Prof. Kanji CHOSHI)

Changes in intraocular pressure (IOP) were studied in albino rabbits with topical application and subconjunctival and intravitreal injection of griseolic acid, a potent cAMP-phosphodiesterase inhibitor.

Topical application of 0.5% griseolic acid showed no significant ocular hypotensive response. But, a significant reduction in IOP was observed at 2 hr after topical application of 1% griseolic acid. And the ocular hypotensive response lasted 5 hrs after topical application of 2% griseolic acid. IOP in rabbits was reduced in a dose-related manner following topical ocular application of concentrations of 0.5% to 2%. Subconjunctival injection of 1% and 2% griseolic acid also reduced IOP in rabbits significantly. A prolonged and marked decrease in IOP, lasting 5 days, followed the intravitreal injection of 1% griseolic acid.

# グリセオール酸 (cAMP-Phosphodiesterase 阻害剤) 局所投与による眼圧変化の基礎的研究

## 第2報 グリセオール酸エステル点眼後の房水循環動態の変化

木 内 良 明

広島大学医学部眼科学教室 (主任: 調枝寛治教授)

受付 平成1年10月18日

受理 平成1年12月16日

白色家兎に, cAMP-phosphodiesterase 阻害剤の一つであるグリセオール酸エステル (GA エステル) を投与し, その眼圧下降機序と GA エステル点眼の血液房水関門に対する影響を検討した。フルオロフォトメトリー角膜法で求めた房水産生量は, GA 処置眼では  $2.63 \pm 0.27 \mu\text{l}/\text{min}$ , 対象眼では  $3.35 \pm 0.27 \mu\text{l}/\text{min}$  と GA 処置眼で有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。房水流出率, ぶどう膜強膜流出量, 房水蛋白濃度には GA エステルを点眼しても影響がなかった。

GA エステルの眼圧下降機序は, 主として房水産生の抑制によるものと考えられた。また, GA エステルの点眼は, 血液房水関門に大きな影響を与えないと考えられた。

**Key words** : cAMP-phosphodiesterase inhibitor, Griseolic acid, Intraocular pressure, Aqueous humor dynamics

cAMP の合成を促進させる。コレラ毒素<sup>14, 20, 23</sup>, フォルスコリン<sup>12, 35</sup> の眼局所投与で家兎, サル, ヒトの眼圧が有意に下降することが報告され, cAMP を介する系が眼圧の調節機構の中で重要な役割を演じていると考えられるようになった<sup>21, 24, 32-34</sup>。

グリセオール酸 (GA) は cAMP 分解酵素の働きを強力に阻害する物質である<sup>15</sup>。既に GA および GA のエステル誘導体 (GA エステル) を眼局所に投与しても, 白色家兎の眼圧が有意に下降することを報告した<sup>18, 22</sup>。そこで今回, GA エステルの眼圧下降機序を調べるため, GA エステル点眼後の白色家兎における房水産生量, 房水流出率, ぶどう膜強膜流出量の変化を検討した。また, GA エステル点眼の血液房水関門に対する影響をみるため, GA エステル点眼の血液房水蛋白濃度を測定した。

### 実験方法

#### 1. 使用薬剤

前報と同じく<sup>18, 22</sup> GA の 8' の位が pivaloyloxy-methyl ester を形成した GA エステルを 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し, 実験に使用した (Fig.

1)。

#### 2. 使用動物

雄性健常白色家兎 (2.0~2.5 kg) を用いた。

#### 3. 房水産生量の測定

房水産生量の測定はフルオロフォトメトリー角膜法にて行なった。フルオレセインはイオントフォレーシス (iontophoresis) で角膜内に移行させた。塩酸ケタミン (20 mg/kg) とクロルプロマジン (2 mg/kg) を筋注した後, 0.4%塩酸プロカインを点眼し, フルオレセインゼリー (2%寒天, 10%フルオレセイン) を角膜中央部にあて, 1 mA の電流を1分間通電した。イ

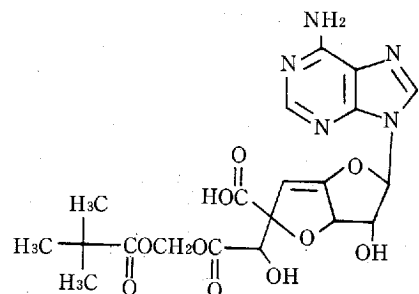


Fig. 1. Structure of GA-ester



オントフォーシスの12時間後から角膜および前房水中のフルオレセイン濃度の測定を、スリットランプ型フルオロフォトメーター<sup>3)</sup>を用いて1時間ごとに10時間行なった。フルオレセイン濃度測定開始後3時間と6時間の時点で、2% GA エステル 60  $\mu$ l を1眼に点眼し、同量の 0.04 M リン酸緩衝液 (pH. 7.0) を他眼に点眼した。また、フルオロフォトメトリー開始前、開始後3時間、5時間、8時間の時点で pneumatonograph (PTG, Alcon 社) で眼圧を測定した。得られたデータの解析は Jones & Maurice の第2法<sup>16)</sup>を用いて行なった。すなわち、角膜と前房水中の総フルオレセイン量を Mt としたとき、眼球からフルオレセインが減少する率は  $dMt/dt$  と表現される。角膜中のフルオレセインはすべて房水中に移行するため、眼球からのフルオレセインの消失は全て房水を介して行なわれる<sup>16)</sup>。房水中フルオレセイン濃度を Ca, 前房水容積を Va, 前房からのフルオレセイン排出率を Ko とすると、

$$dMt/dt = -Ca \cdot Va \cdot Ko$$

と表現される。

A を眼球からのフルオレセイン減少率とすると、

$$dMt/dt = -A \cdot Mt$$

がなりたつ。よって、

$$A \cdot Mt = Ca \cdot Va \cdot Ko$$

$$Va \cdot Ko = A \cdot Mt / Ca$$

房水流量を f とすると、

$$f = Va \cdot Ko = A \cdot Mt / Ca \quad \text{①}$$

ここで Vc を角膜容積, Cc を角膜内フルオレセイン濃度とすると、

$$Mt = Va \cdot Ca + Vc \cdot Cc \quad \text{②}$$

となる。②式を①式に代入すると、

$$f = Va \cdot A + Vc \cdot Cc \cdot A / Ca$$

角膜, 前房水中のフルオレセインの減少率をそれぞれ, Ac と Aa で表わすと, 両者は経時的なフルオレセイン濃度の測定から別々に求められるので、

$$f = Va \cdot Aa + Vc \cdot Cc \cdot Ac / Ca$$

となる。また、角膜と前房水中のフルオレセイン濃度 Ca と Cc には、適当な時刻における実際の濃度を代入した。前房水容積 Va, はフルオレセイン濃度の測定終了後、26G 針にて前房水を採取し測定した。角膜容積 Vc は、前房水採取後角膜を切離し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH. 7.4) でみたした内径約 3 mm のチューブに入れ、増加した体積をマイクロピペットで測定した。最初の4眼での角膜容積の平均値が約 80  $\mu$ l となったため、以後、角膜容積 Vc は 80  $\mu$ l として計算した。

#### 4. 房水流出率の測定

房水流出率の算定のために、PTG を用いてトノグラフィーを行なった。塩酸ケタミン 10 mg/kg をトノグラフィー開始10分前に筋注した。トノグラフィーは 2% GA 50  $\mu$ l 点眼前と点眼2時間後に行なった。測定記録から房水流出率の算出には標準換算表を用いた<sup>12)</sup>。

#### 5. ぶどう膜強膜流出量の測定

ぶどう膜強膜流出量の測定は、Suguro ら<sup>36)</sup>の方法に準じて行なった。2% GA エステル 50  $\mu$ l を1眼に、0.04 M リン酸緩衝液 (pH. 7.0) を他眼に点眼した後、インドメサシン油性点眼液を30分毎に、両眼に点眼した。2% GA エステル点眼後1.5時間の時点で、塩酸ケタミンを 40 mg/kg 筋注した。筋注後約10分の時点で両眼の前房に23G注射針を刺入し、前房水を採取した後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH. 7.4) で調整した  $10^{-4}$  M fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) 70,000 を満たしたリザーバーに連結した。灌流圧 15 mmHg で30分間灌流した。薬殺後、速やかに眼球を摘出し、結膜、角膜、眼球周囲組織を除去し、虹彩表面の FITC-dextran を生理食塩水で洗浄した。小シャーレ内で眼球から強膜とそれ以外の組織(ぶどう膜, 網膜, 硝子体, 後房水, 上脈絡膜腔液)に分けた。各組織は剪刀にて細切した後、2 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH. 7.4) を加えた。組織をホモゲナイザーで粉碎均等化し、12,000  $\times$  g で20分間遠心分離した。得られた上清の蛍光強度を日本分光 FP-550 型蛍光光度計で測定した。あらかじめ作成しておいた基準曲線から FITC-dextran 70,000 の濃度を求めた。ぶどう膜強膜流出量は以下のように計算した。

ぶどう膜強膜流出量

$$= \frac{\text{FITC-dextran 70,000 濃度(上清)} \times \text{上清量}}{\text{FITC-dextran 70,000 濃度(灌流液)} \times \text{灌流時間}}$$

強膜中、および強膜以外の組織から、それぞれに計算されたぶどう膜強膜流出量を合計し、全ぶどう膜強膜流出量とした。

#### 6. 前房水中蛋白濃度の測定

GA エステル点眼の血液房水関門に対する影響を知るために、2% GA エステル 50  $\mu$ l の点眼前と点眼後 1, 2, 3 時間の時点で前房水中の蛋白濃度を測定した<sup>28)</sup>。一眼には 0.04 M リン酸緩衝液 (pH. 7.0) を点眼してコントロールとした。蛋白濃度の測定は Bradford の microassay 法<sup>11)</sup>にて行なった。前房水の採取は26G針を角膜から前房に刺入し、針先と虹彩の接触を避けながら行なった。50倍に希釈した前房水 0.8

ml に Coomassie Brilliant Blue G-250 を 0.2 ml 加え、595 nm の波長における吸光度を測定した。あらかじめ作成された基準線から前房中の蛋白濃度を求めた。

## 成 績

### 1. 房水流量測定

点眼前の房水流量は処置眼では  $3.38 \pm 0.41 \mu\text{l}/\text{min}$  (Mean $\pm$ SEM), 対照眼では  $3.70 \pm 0.37 \mu\text{l}/\text{min}$  で、房水流量に差は認められなかった。2%GA エステルの点眼側では、房水流量は  $2.63 \pm 0.27 \mu\text{l}/\text{min}$  となり、処置前と比較して有意に減少した ( $p < 0.05$ )。しかし、対照眼では  $3.35 \pm 0.27 \mu\text{l}/\text{min}$  と変化がなかった。2% GA エステル点眼後、処置眼 ( $2.63 \pm 0.27 \mu\text{l}/\text{min}$ ) と非処置眼 ( $3.35 \pm 0.27 \mu\text{l}/\text{min}$ ) の間でも有意に差があった ( $p < 0.05$ ) (Table 1)。フルオロフォトメトリーの経過中、処置眼の眼圧は点眼後 5 時間で

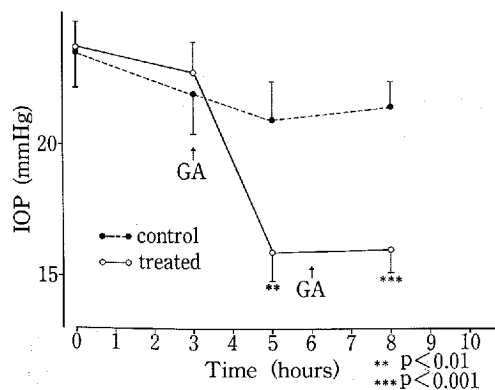
**Table 1.** Change in aqueous flow rate following topical 2% GA-ester application

	Aqueous flow rate $\mu\text{l}/\text{min}$	
	before treatment	after treatment
treated eye	$3.38 \pm 0.41 \ddagger$	$2.63 \pm 0.27 \ddagger^*$
control eye	$3.70 \pm 0.37$	$3.35 \pm 0.27^*$

Mean $\pm$ SEM (N=8)

\*  $p < 0.05$  between treated eyes and control eyes.

‡  $p < 0.05$  between pre-treated eyes and post-treated eyes.



**Fig. 2.** Intraocular pressure (IOP) changes during fluorophotometry. GA-ester was topically administered 3 and 6 hours after of fluorophotometry.

$5.03 \pm 0.93 \text{ mmHg}$ , 点眼後 8 時間で  $5.38 \pm 0.78 \text{ mmHg}$  と、著明に眼圧は下降した (Fig. 2)。

### 2. 房水流出率の測定

実験中に処置眼の眼圧は、点眼によって  $15.5 \pm 0.62 \text{ mmHg}$  (Mean $\pm$ SEM) から  $11.2 \pm 0.31 \text{ mmHg}$  へと著明に下降した ( $p < 0.001$ ) しかし、房水流出率は処置眼、非処置眼の間にも、処置前後にも有為な差は認められなかった (Table 2)。

### 3. ぶどう膜強膜流出量の測定

**Table 2.** Change in outflow facility following topical 2% GA-ester application

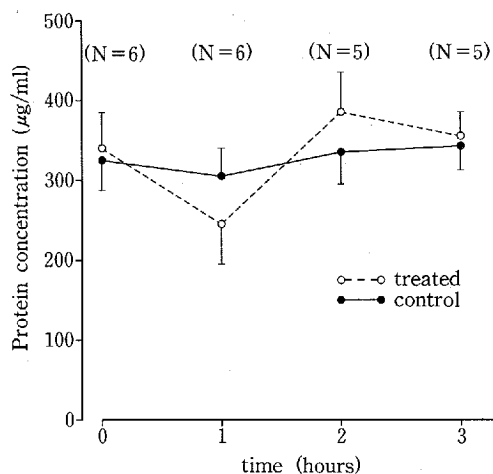
	Outflow facility $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$	
	before treatment	after treatment
treated eye	$0.13 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.01$
control eye	$0.19 \pm 0.04$	$0.14 \pm 0.02$

Mean $\pm$ SEM (N=6)

**Table 3.** Uveoscleral outflow following topical 2% GA-ester application

	Uveoscleral outflow $\mu\text{l}/\text{min}$
treated eye	$0.277 \pm 0.053$
control eye	$0.268 \pm 0.045$

Mean $\pm$ SEM (N=8)



**Fig. 3.** Change in protein concentration of aqueous humor following topical application of GA-ester

2% GA エステルの点眼後1.5時間で, GA 処置眼の眼圧は  $2.69 \pm 0.48$  mmHg 下降した ( $p < 0.01$ )。ところが, ぶどう膜強膜流出量は GA 処置眼で  $0.277 \pm 0.053$   $\mu\text{l}/\text{min}$ , 対照眼で  $0.268 \pm 0.045$   $\mu\text{l}/\text{min}$  と差はなかった (Table 3)。

#### 4. 前房水中蛋白濃度

GA エステル点眼の有無にかかわらず, 前房水中の蛋白濃度に変化はなかった (Fig. 3)。

### 考 察

房水産生量の測定は Jones & Maurice の第2法<sup>16)</sup>によって行なった。前眼部のフルオロフォトメトリーは, フルオレセインの投与方法の違いによって全身投与方法と局所投与方法がある<sup>11)</sup>。全身投与されたフルオレセインは極早期からグルクロンサン抱合を受け, 真の蛍光濃度を測定するのが困難である<sup>17)</sup>。局所投与方法でも Jones & Maurice<sup>16)</sup> の第1法では, フルオレセイン投与後早期のフルオレセイン濃度の測定が重要であるにもかかわらず, フルオレセイン投与後早期の角膜中フルオレセイン濃度が均一になるのにかなりの時間がかかるため, 第1法では多くの誤差要因が入る<sup>2)</sup>。そのため今回は, Jones & Maurice の第2法<sup>16)</sup>で房水産生量の測定, 計算を行なった。その結果, フォルスコリン<sup>12, 19)</sup> やコレラ毒素<sup>14)</sup> を投与したときと同様に, GA エステルの点眼で房水産生が抑制されることがわかった。

房水の流出機構における cAMP の役割については, 統一された見解がなく, 議論の分かれるところである<sup>19)</sup>。Neufeld ら<sup>29)</sup> は, ヒト, サル, 家兎の繊維柱帯を含む強角膜リングに  $\beta$  レセプター刺激剤を作用させると, 組織中の cAMP 濃度が上昇することを示した。Wax ら<sup>38)</sup> は, 繊維柱帯に  $\beta$  レセプターが存在することを報告している。さらに, cAMP<sup>27)</sup> やフォルスコリン<sup>4)</sup> を前房中に注入すると, 房水流出量が増加することも報告され, 房水流出の調節にも cAMP を介する系が関与する可能性が示されている。しかし, 一方で, Lee ら<sup>19)</sup>, Caprioli ら<sup>12)</sup> は, フォルスコリン点眼後, 家兎でもサルでも房水流出量に変化がおこらなかったと報告し, イソプロテノールの点眼も同様に房水流出率に影響を及ぼさないとされている<sup>31)</sup>。さらに,  $\beta$  レセプター遮断剤点眼で房水流出率に変化が生じないことが広く認められており<sup>26)</sup>。房水の流出には cAMP を介する系が積極的には働いていないとする意見も少なくない。この混乱は, 無侵襲で房水流出率を測定する方法がトノグラフィーしかないにもかかわらず, そのトノグラフィーに理論上の欠

陥が多く含まれているためと思われる<sup>25)</sup>。今回の実験では, GA エステルの投与後, 房水流出率に変化はなかった。しかし, 房水流出の調節に, cAMP を介する系がどのような役割をはたしているかは今後の検討を要する問題である。

房水の流出経路には繊維柱帯, Schlemm 管を通る経路と, Schlemm 管を介さないぶどう膜強膜流出路がある<sup>5-10)</sup>。家兎眼におけるぶどう膜強膜流出量はそれを算出した実験方法でかなり差がある。<sup>131I</sup>I で標識したアルブミンを用いた Bill の方法では  $0.11$   $\mu\text{l}/\text{min}$ <sup>7)</sup> であるが, FITC-dextran の強膜通過性から計算された方法では  $0.78$   $\mu\text{l}/\text{min}$ <sup>30)</sup> で, Fatt らが水の強膜通過性から計算した方法では  $0.74$   $\mu\text{l}/\text{min}$ <sup>13)</sup> であった。今回, ぶどう膜強膜流出量の測定は, Suguro らの方法<sup>36)</sup> に準じて行なった。その理由として, ラジオアイソトープを用いるかわりに FITC-dextran を用いるため簡便であること, 特別な装置を必要としないこと<sup>36)</sup>, FITC-dextran は分子量が均一であり溶液中のフルオレセインの解離が極めて少ないため, デキストランの量をフルオレセインの蛍光強度測定で知ることができるというトレーサーとしての利点があるからである<sup>37)</sup>。

エピネフリンの  $\beta$  作用でぶどう膜強膜流出量が増大するという報告<sup>3)</sup> があるが, 今回の実験では GA エステル処置眼のぶどう膜流出量は  $0.277 \pm 0.053$   $\mu\text{l}/\text{min}$  で, 対照眼では  $0.268 \pm 0.045$   $\mu\text{l}/\text{min}$  であり, 両者の間には有意な差がなかった。

分子量の大きな物質は強膜を通りにくく, FITC-dextran 70,000 を使用する本方法では実際の値より過小評価されると, 大原ら<sup>30)</sup> は発表している。また, 組織の中の FITC-dextran を100%回収できない点もある。これらを考えると, 実際のぶどう膜強膜流出量は今回の値より, もう少し大きな値となる可能性が高い。しかし, 薬物投与眼と非投与眼のぶどう膜強膜流出量に差が生じるかどうかを検討するには, 本法は十分な方法であると思われる。

GA エステルの点眼による眼房水動態の変化を検討した結果, 房水産生量だけが有意に減少した。本実験の結果から GA エステルの眼圧下降機序は, 主として房水産生の抑制によるものと考えられる。

また, GA エステルの点眼後, 前報<sup>18)</sup> と同じく家兎眼に炎症所見を認めなかった。また GA エステルを点眼しても房水中の蛋白濃度に変化がなかった。このことから, GA エステルの点眼は血液房水関門に何ら影響を及ぼさないと考えられる。

## 謝 辞

本論文を終えるにあたり、ご校閲頂きました調枝寛治教授に深謝致します。また、ご指導頂きました三嶋弘助教授および、東京大学眼科教室の新家 真講師に厚くお礼申し上げます。

## 参 考 文 献

1. 新家 真 1984. フルオロフォトメトリーの原理. 眼科 Mook 22:54-70.
2. 新家 真, 澤 充, 長滝重智 1983. フルオレセイン点眼による人眼房水動態の基礎, 最小2乗法による解析. 日眼会誌 87:203-209.
3. 新家 真, 高瀬正弥, 西村新一, 佐藤 勝, 田子秀雄 1981. 新しい高性能細隙灯測光顕微鏡の試作. 日眼光学誌 2:114-118.
4. Bartels, S. P., Lee, S. R. and Neufeld, A. H. 1983. Forskolin stimulate cyclic AMP synthesis, lower intraocular pressure and increases outflow facility in rabbits. *Curr. Eye Res.* 2:673-681.
5. Bill, A. 1965. The aqueous humor drainage mechanism in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence of unconventional route. *Invest. Ophthalmol.* 4:911-919.
6. Bill, A. 1966. Conventional and uveoscleral drainage of aqueous humor in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) at normal and high intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* 12:275-281.
7. Bill, A. 1966. The route of bulk drainage of aqueous humour in rabbits with and without cycloidalysis. *Doc. Ophthalmol.* 20:157-169.
8. Bill, A. 1969. Early effects of epinephrine on aqueous humor dynamics in vervet monkey (*Cercopithecus ethiops*). *Exp. Eye Res.* 8:35-43.
9. Bill, A. 1970. Effect of norepinephrine, isoproterenol and sympathetic stimulation of aqueous humor dynamics in vervet monkeys. *Exp. Eye Res.* 10:31-46.
10. Bill, A. and Phillips, C. I. 1976. Uveoscleral drainage of aqueous humor in human eyes. *Exp. Eye Res.* 12:275-281.
11. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
12. Caprioli, J., Sears, M., Bausher, L., Gregory, D. and Mead, A. 1984. Forskolin lowers intraocular pressure by reducing aqueous inflow. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25:371-381.
13. Fatt, I. and Hedbys, B. O. 1970. Flow of water in the sclera. *Exp. Eye Res.* 10:243-249.
14. Gregory, D., Sears, M., Bausher, L., Mishima, H. and Mead, A. 1981. Intraocular pressure and aqueous flow are decreased by cholera toxin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20:371-381.
15. Iijima, Y., Nakagawa, F., Honda, S., Oda, T., Naito, A. and Yamazaki, M. 1985. Biological properties of griseolic acid, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor with an adenine group. *FEBS letters* 192:179-183.
16. Jones, R. F. and Maurice, D. M. 1966. New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp. Eye Res.* 5:208-220.
17. 萱沢文雄, 三宅謙作 1987. Fluorophotometry の臨床. 眼紀 38:1079-1094.
18. 木内良明 1988. グリセオール酸 (cAMP-phosphodiesterase 阻害剤) 局所投与による眼圧変化の基礎的研究. 第1報グリセオール酸の点眼, 結膜下注射, および硝子体内注入による眼圧動態. 広大医誌 36:683-689.
19. Lee, P., Podos, S. M., Mittag, T. and Severin, C. 1984. Effect of topically applied forskolin on aqueous humor dynamics in cynomolgus monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25:1206-1209.
20. Mishima, H., Bausher, L., Sears, M., Gochou, M., Ono, H. and Gregory, D. 1982. Fine structural studies of ciliary processes after treatment with cholera toxin or its B subunit. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 219:272-278.
21. 三嶋 弘, 木内良明 1989. 緑内障の新薬(1)—細胞の情報伝達機構に作用する薬物について—. 眼科 Mook 41:141-154.
22. Mishima, H. K., Kiuchi, Y. and Yokoyama, Y. Griseolic acid, cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, lower rabbit intraocular pressure. *Curr. Eye Res.* in press.
23. Mishima, H., Sears, M., Bausher, L. and Gregory, D. 1982. Ultracytochemistry of cholera-toxin binding sites in ciliary processes. *Cell Tissue Res.* 223:241-253.
24. 三嶋 弘, 柴田哲夫, 木内良明, 増田寛次郎, 高瀬正弥, 新家 真, 粕谷 豊, 細川友和 1988. Forskollin 点眼による緑内障治療の可能性. 眼紀 39:2113-2120.
25. 三島濟一 1970. 房水の産生と流出について—トノグラフィーの問題点—. 臨眼 24:1457-1470.
26. Neufeld, A. H. 1984. The mechanism of action of adrenergic drugs in the eye. p. 277-301.

- In* M. L. Sears (ed.), *Glaucoma. Applied pharmacology in medical treatment.* Grune & Stratton. Inc. Orlando.
27. **Neufeld, A. H., Dueker, D. K., Vegge, T. and Sears, M. L.** 1975. Adenosine 3', 5'-monophosphate increases the outflow of aqueous humor from the rabbit eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 14:40-42.
  28. **Neufeld, A. H., Jampol, L. M. and Sears, M. L.** 1972. Aspirin prevents the disruption of the blood aqueous barrier in the rabbits eye *Nature.* 2389:158-159.
  29. **Neufeld, A. H. and Sears, M. L.** 1974. Cyclic-AMP in ocular tissues of the rabbits, monkey and human. *Invest. Ophthalmol.* 13: 475-477.
  30. 大原国俊 1984. 強膜の機能. *眼科 Mook* 22: 173-180.
  31. **Ross, R. A. and Drance, S. M.** 1970. Effect of topically applied isoproterenol on aqueous dynamics in man. *Arch. Ophthalmol.* 83:39-44.
  32. **Sears, M. L.** 1984. Autonomic nervous system: Adrenergic agents, p.193-248. *In* M. L. Sears (ed.), *Pharmacology of the eye.* Springer-Verlag.
  33. **Sears, M. L., Caprioli, J., Kondo, K. and Bausher, L.** 1984. A mechanism for the control of aqueous humor formation, p.303-324. *In* S. M. Drance (ed.), *Applied pharmacology in the medical treatment of glaucoma.* Grune & Stratton, Inc.
  34. **Sears, M. L. and Mead, A.** 1983. A major pathway for the regulation of intraocular pressure. *Int. Ophthalmol. Clin.* 6:201-212.
  35. **Shibata, T., Mishima, H. and Kurokawa, T.** 1988. Ocular pigmentation and intraocular pressure to forskolin. *Curr. Eye Res.* 7: 667-674.
  36. **Suguro, K., Toris, C. B. and Pederson, J. K.** 1985. Uveoscleral outflow following cyclodialysis in the monkey eye using a fluorescein tracer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26: 810-813.
  37. **Tripathi, R. C. and Tripathi, B. J.** 1977. A new method for light and electron microscopic localization of fluorescein-labelled dextran in ocular tissue using epoxy-resin embedding. *Exp. Eye Res.* 25:259-267.
  38. **Wax, M. B., Molimoff, P. B., Alvarado, J. and Polansky, J.** 1989. Characterization of  $\beta$  adrenergic receptors in cultured human trabecular cells and in human trabecular meshwork. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 51-57.

## Experimental Study on Changes of Intraocular Pressure by the Application of Griseolic Acid

### 2. Effect of griseolic acid-ester on aqueous humor dynamics in rabbits

Yoshiaki KIUCHI

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine  
(Director: Prof. Kanji CHOSHI)

The mechanism of griseolic acid-ester (GA-ester), a potent cAMP-phosphodiesterase inhibitor, in lowering intraocular pressure (IOP) was studied using albino rabbits.

The mean aqueous flow rate measured by fluorophotometry was significantly lower in GA-treated eyes than in control eyes. Topical application of GA-ester did not alter tonographic outflow or uveoscleral outflow measured using fluorescein isothiocyanate labeled-dextran. No differences in aqueous humor protein concentrations between GA-treated eyes and control eyes were observed.

A GA-ester IOP lowering mechanism may be attributed to the decrease in aqueous inflow. Topical application of GA-ester does not induce an inflammatory response in the eye nor cause changes in the blood aqueous barriers.