

各種抗緑内障点眼薬のヒト角膜上皮細胞に対する影響

青山裕美子, 本木 正師, 橋本真理子

聖マリアンナ医科大学眼科学教室

要 約

目的：抗緑内障点眼薬およびその基剤が、ヒト角膜上皮細胞の細胞増殖に与える影響を検討した。

方法：抗緑内障点眼薬であるプロスタグランジン製剤(2剤)、 β 遮断薬(4剤)および炭酸脱水酵素阻害薬(1剤)の計7剤と、キサラタン基剤を除く各点眼薬の基剤(計6剤)において、2倍希釈系列(10~2,560倍)を作製した。各希釈液を正常ヒト角膜上皮細胞の培養液に添加して48時間培養後、吸光度を490nmで測定し、細胞増殖抑制率を算出した。さらに、細胞増殖を50%抑制する希釈倍率(50%抑制時希釈倍率)を抑制率から算出した。

結果：いずれの抗緑内障点眼薬も、希釈倍率が低い場合には細胞増殖は100%抑制された。40倍希釈ではトルソプト®およびチモプトール®で有意に抑制率は低下した。160倍希釈においても100%近い抑制率を示したのはレスキュラ®であった。640倍希釈以上ではいずれの薬剤でも抑制率は50%以下となり、薬剤間で有意差はなかった。基剤においても希釈倍率は異なるものの

同様な傾向であった。各抗緑内障点眼薬の50%抑制時希釈倍率は、レスキュラ®>キサラタン®>ベトプティック®>ハイパジール®>ミケラン®>チモプトール®>トルソプト®の順に低値となり、基剤の50%抑制時希釈倍率は、レスキュラ基剤>ハイパジール基剤>ベトプティック基剤>ミケラン基剤>チモプトール基剤>トルソプト基剤の順で低値であった。

結論：いずれの抗緑内障点眼薬も角膜上皮細胞に対して増殖抑制作用を有しており、プロスタグランジン製剤で強く、トルソプト®が最も弱かった。さらに、この細胞増殖抑制作用には点眼薬の主薬のみならず基剤の影響もあり、その基剤の影響の程度は点眼薬により異なることが明らかとなった。(日眼会誌 108:75-83, 2004)

キーワード：ヒト角膜上皮細胞, トルソプト®, β 遮断薬, プロスタグランジン製剤, 細胞増殖抑制率

Effect of Various Anti-glaucoma Eyedrops on Human Corneal Epithelial Cells

Yumiko Aoyama, Masamitsu Motoki and Mariko Hashimoto

Department of Ophthalmology, St. Marianna University School of Medicine

Abstract

Purpose: To investigate the effects of anti-glaucoma eyedrops and vehicles on the proliferation of human corneal epithelial cells.

Material and Methods: Seven eyedrops [prostaglandin $F_{2\alpha}$ analogs (2), β blockers (4), topical carbonic anhydrase inhibitor (1)], and six of the eyedrop vehicles, excluding that of Xalatan®, were used. Anti-glaucoma eyedrops and vehicles were serially diluted 2-fold with culture medium (10~2,560 fold). The mixture was added to human corneal epithelial cells and incubated for 48 hrs. Cell proliferation was measured by commercial assay kit. Dye-reagents were added to the wells and incubated for 1h at 37°C. Optical density were measured at 490 nm. The dilution rate for 50% inhibition was calculated as the dilution rate of drugs or vehicles necessary to produce 50% inhibition of cell proliferation.

Result: All drugs completely inhibited cell proliferation when the dilution rate was low. At 40-fold dilution, Trusopt® and Timoptol® showed a significant decrease in cell growth inhibition. On the other hand, Rescula® showed almost 100% inhibition at 160-fold dilution. Above 640-fold dilution, the inhibition rate of all drugs became 50% or less and there was no significant difference between drugs. Vehi-

cles also inhibited cell growth. The dilution rates for growth inhibition by vehicles were different from those of drugs. The dilution rate at 50% inhibition of anti-glaucoma eyedrops decreased in the following order: Rescula® > Xalatan® > Betoptic® > Hypadil® > Mikelan® > Timoptol® > Trusopt®. The dilution rate for 50% inhibition of vehicles decreased in the following order: Rescula vehicle > Hypadil vehicle > Betoptic vehicle > Mikelan vehicle > Timoptol vehicle > Trusopt vehicle.

Conclusion: All anti-glaucoma eyedrops inhibited cell proliferation. These effects were stronger in prostaglandin $F_{2\alpha}$ analogs and weakest in Trusopt®. Furthermore, the inhibition of cell proliferation was caused also by the vehicle of eyedrops, and the influence of the vehicle varied in each type of eyedrops.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108: 75-83, 2004)

Key words: Human corneal epithelial cell, Trusopt®, β blockers, Prostaglandin related medicine, Growth inhibition rate of cell proliferation

別刷請求先：216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1 聖マリアンナ医科大学眼科学教室 青山裕美子
(平成14年7月22日受付, 平成15年6月18日改訂受理)

Reprint requests to: Yumiko Aoyama, M. D. Department of Ophthalmology, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511, Japan

(Received July 22, 2002 and accepted in revised form June 18, 2003)

I 緒 言

緑内障においてはその疾患の性格上、抗緑内障点眼薬が長期使用されることが多い。しかし、時として点眼によると思われる角膜上皮障害が惹起され、治療が遅れた場合は重篤化を来すことが報告¹⁾されている。このような角膜上皮障害の原因として、 β 遮断薬やプロスタグランジン製剤といった点眼薬の製剤特性^{2)~7)}が挙げられたり、点眼薬に含まれている防腐剤の影響によるとの報告^{8)~12)}もなされているが、未だ明確ではない。

そこで今回、いずれの抗緑内障点眼薬が角膜に及ぼす影響が強いかを明らかにするため、ヒト角膜上皮細胞を用いて、各種の抗緑内障点眼薬の細胞増殖抑制効果を比較検討した。さらに、各点眼薬の基剤が角膜に及ぼす影響についても検討した。

II 実験方法

1. 実験材料

培養細胞は凍結正常ヒト角膜上皮細胞(クラボウ社)、培養液は Epilife(クラボウ社)、増殖添加剤は HCGS 増殖添加剤セット KC-6450(クラボウ社)を用いた。Cell Titer 96 One Solution Cell Proliferation Assay(プロメガ社)を試験試薬とした。抗緑内障点眼薬は市販製品のトルソプト[®](1%)、レスキュラ[®](0.12%)、キサラタン[®](0.005%)、ミケラン[®](2%)、チモプトール[®](0.5%)、ハイパジール[®](0.25%)、ベトプティック[®](0.5%)、基剤としてはキサラタン基剤を除いたトルソプト基剤、レスキュラ基剤、ミケラン基剤、チモプトール基剤、パイパジール基剤、ベトプティック基剤を各社

に作製を依頼し、実験に供した。

2. 実験操作

ヒト角膜上皮細胞を 25 cm³培養フラスコに植え込み、細胞がサブコンフルエントになった時点で、剥離後 1×10^5 個/ml の細胞浮遊液を作製した。96 well プレートに 50 μ l (0.5×10^4 個)ずつ分注し、培養液を加え各 well の全量を 100 μ l として 24 時間培養した。その後培養液を除去し、各薬剤を 2 倍希釈系列(10~2560 倍)になるように培養液で希釈分注し、48 時間培養した。各 well に試薬 20 μ l を加え、37°C で 1 時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定した(各 well の吸光度は 2 回測定の平均値とした)。各薬剤とも、1 回の実験に 2 系列 18 well を用い、同実験を 4 回繰り返した。薬剤無添加群を対照として下記に示す計算式で細胞増殖抑制率を算出した。

細胞増殖抑制率(%) = $100\% - (\text{薬剤添加 well の平均吸光度} / \text{薬剤無添加 well の平均吸光度}) \times 100\%$

また、各薬剤の希釈倍率と細胞増殖抑制率のグラフから、50% 増殖抑制率を示す希釈倍率を算出し、50% 抑制時希釈倍率とした。50% 抑制時希釈倍率の算出には Graphpad Prism 3.00 ソフトウェアを用い、近似曲線の方程式から計算により求めた(Graphpad Software Inc., San Diego, CA, 米国)。

III 結 果

1. 角膜上皮細胞に対する細胞増殖抑制効果

各薬剤系列の薬剤無添加群における平均吸光度(OD, 平均値 \pm 標準偏差), n=8 はレスキュラ[®](0.494 \pm 0.064), キサラタン[®](0.541 \pm 0.116), チモプトール[®]

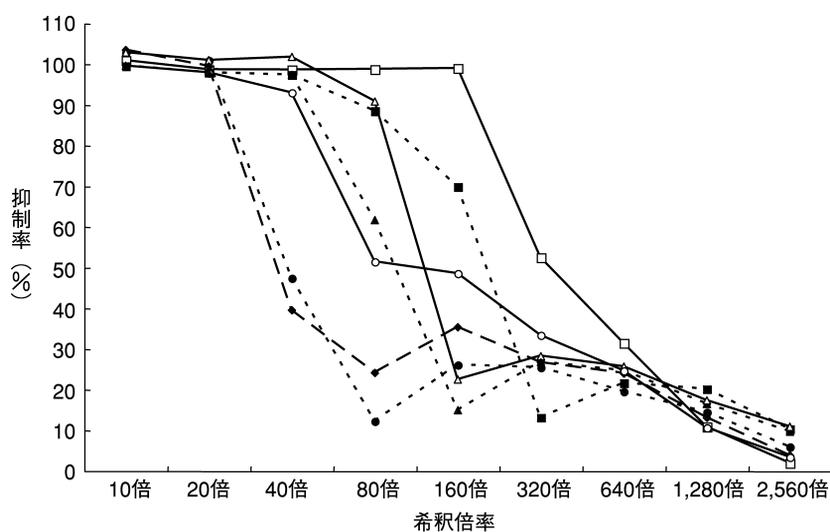


図 1 各抗緑内障点眼薬の角膜上皮細胞に対する細胞増殖抑制効果。

- : レスキュラ[®]
- : ミケラン[®]
- △— : ベトプティック[®]
- ◆— : トルソプト[®]
- : キサラタン[®]
- : チモプトール[®]
- ▲— : ハイパジール[®]

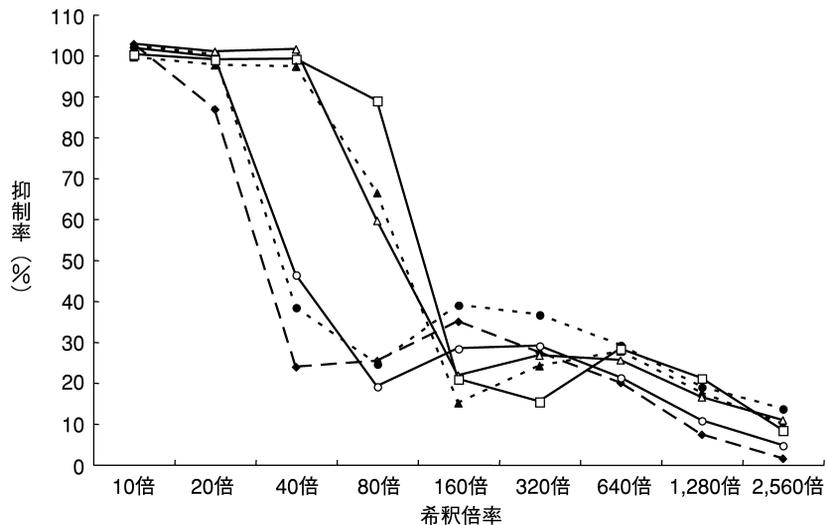


図 2 各抗緑内障点眼薬基剤の角膜上皮細胞に対する細胞増殖抑制効果。

—□—：レスキュラ基剤 —○—：ミケラン基剤
 --●--：チモプトール基剤 —△—：ベトプティック基剤
 --▲--：ハイパジール基剤 --◆--：トルソプト基剤

(0.526 ± 0.074), トルソプト® (0.478 ± 0.035), パイパジール® (0.551 ± 0.091), ミケラン® (0.569 ± 0.099) およびベトプティック® (0.450 ± 0.028)であった。

図 1 に各抗緑内障点眼薬の角膜上皮細胞に対する細胞増殖抑制効果を示す。レスキュラ®では、希釈倍率 10～160 倍まで細胞増殖はほぼ 100% 抑制され、抗緑内障点眼薬の中で最も高い抑制率であった。キサラタン®では、希釈倍率 40 倍までほぼ 100% 抑制され、80 倍希釈で 88%、160 倍希釈で 70% と、レスキュラ®に次いで高い抑制率を示した。

β 遮断薬の中では、ベトプティック®において希釈倍率 80 倍まで細胞増殖は 90% 以上抑制され、160 倍希釈で抑制率は 22% に減じ、最も抑制率が高かった。ハイパジール®では、希釈倍率 40 倍までほぼ 100% 抑制され、80 倍希釈で 61%、160 倍希釈で 15% と希釈倍率が増すとともに抑制率は減少した。ミケラン®では、希釈倍率 40 倍で 93%、80 倍希釈で 51% と、ややハイパジール®より低い抑制率であった。チモプトール®は、希釈倍率 40 倍で抑制率 47%、80 倍希釈で 12% であり、 β 遮断薬の中では最も低い抑制率であった。抗緑内障点眼薬のうちで最も低い抑制率を示したのは、希釈倍率 40 倍で抑制率 40% のトルソプト®であった。

図 2 に抗緑内障点眼薬の各基剤が角膜上皮細胞に及ぼす細胞増殖抑制効果を示す。レスキュラ基剤は希釈倍率 40 倍まで細胞増殖はほぼ 100% 抑制され、80 倍希釈で 89% となった。 β 遮断薬の中では、ベトプティック基剤とハイパジール基剤がほぼ同様な抑制率で推移し、2 基剤とも希釈倍率 40 倍までほぼ 100% 抑制され、80 倍希釈で約 60%、160 倍希釈で 15～20% にそれぞれ減じた。一方、ミケラン基剤とチモプトール基剤では

20 倍希釈までほぼ 100% 抑制されたが、40 倍希釈で 40～45%、80 倍希釈で 20～25% と、ベトプティック基剤およびハイパジール基剤に比べ抑制率は低値を示した。抑制率が最も低かったのはトルソプト基剤であり、希釈倍率 20 倍で 87% となり、40～320 倍希釈の範囲では 20% 台で推移した。

2. 抗緑内障点眼薬と基剤との細胞増殖抑制効果の比較(図 3)

各種の抗緑内障点眼薬と基剤との比較において、点眼薬と基剤の抑制率がほぼ一致していたのはハイパジール®(図 3 D)であり、チモプトール®でも、10～40 倍希釈で点眼薬と基剤の抑制率はほぼ一致した(図 3 C)。ベトプティック®では 80 倍希釈においてのみ点眼薬の抑制率が基剤に比べて高値であったが、その他の希釈倍率では点眼薬と基剤の抑制率はほぼ一致していた(図 3 E)。トルソプト®では、希釈倍率 20～40 倍で基剤より点眼薬の抑制率の方が約 15% 高かったが、80 倍希釈以上では点眼薬、基剤ともほぼ同じ抑制率で推移し有意差はなかった(図 3 F)。一方、ミケラン®では、希釈倍率 10～20 倍では点眼薬と基剤の抑制率はほぼ一致していたが、40～80 倍希釈においては点眼薬の抑制率が基剤に比べて有意($p < 0.01$)に、160 倍希釈では有意差はないものやや高値となった(図 3 B)。点眼薬と基剤において、抑制率が最も大きかったのはレスキュラ®であり、80 倍希釈までは点眼薬、基剤ともほぼ 100% 近く抑制され加えて 160～320 倍希釈では、点眼薬の抑制率は基剤に比べて有意($p < 0.01$)に高値となった(図 3 A)。

3. 多重比較検定による解析

抗緑内障点眼薬の細胞増殖抑制作用に薬剤間で有意差があるかどうかを、Bonferroni/Dunn 法の多重比較検

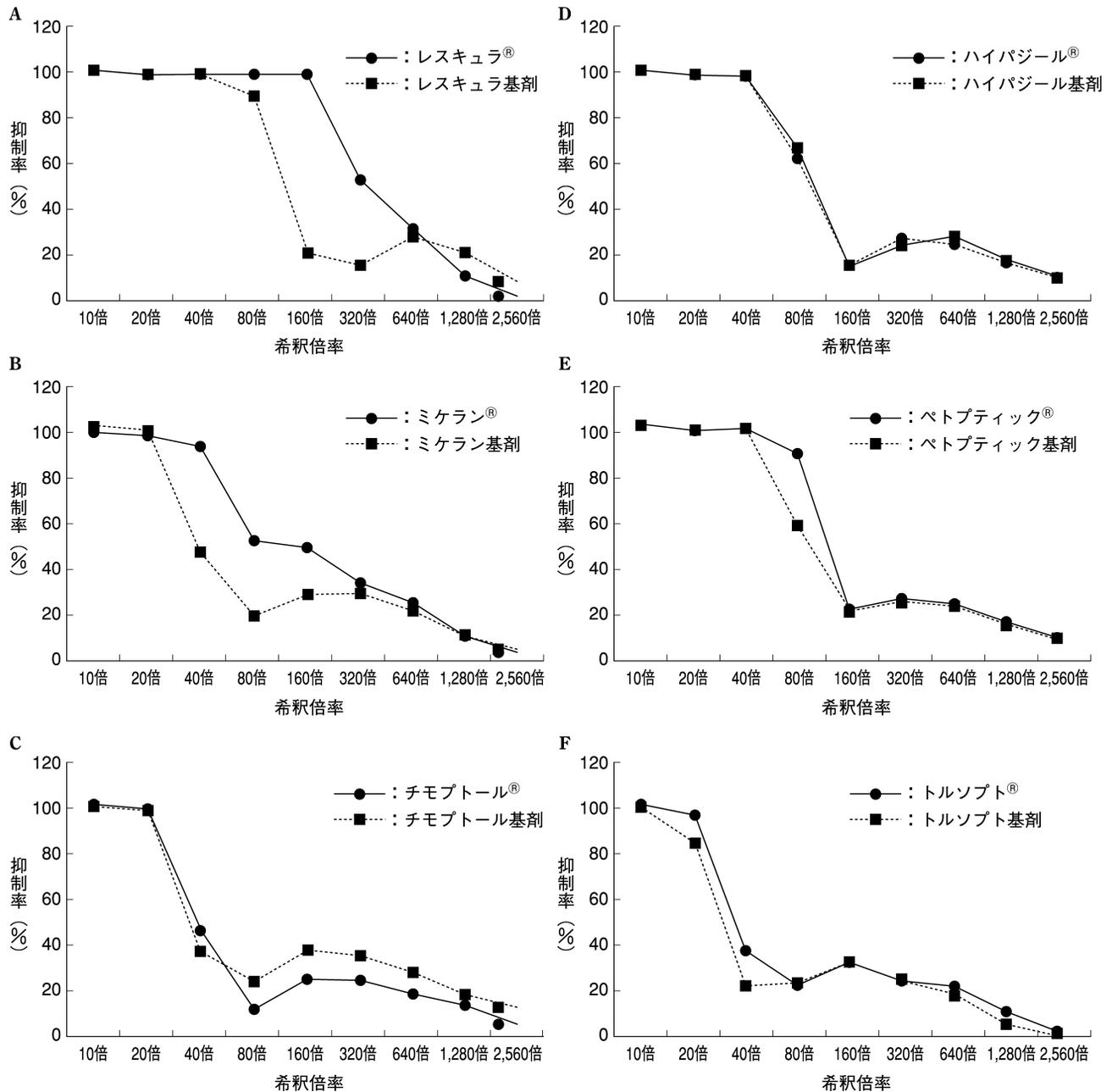


図 3 各抗緑内障点眼薬と基剤における細胞増殖抑制効果の比較。

A: レスキュラ® D: ハイバジール®
 B: ミケラン® E: ペトプティック®
 C: チモプトール® F: トルソプト®

定を用いて検討した(図4)。

点眼薬の希釈倍率が10~20倍, すなわち, 培養液に添加した点眼薬の濃度が高濃度の場合には, いずれの点眼薬でも細胞増殖は100%抑制された。40倍希釈になると, トルソプト®およびチモプトール®で他の点眼薬に対して抑制率は有意に低値であった。80倍希釈ではミケラン®, ハイバジール®においても抑制率が有意に低下し, β 遮断薬の中ではペトプティック®が有意に高い抑制率を示した。160倍希釈においても100%近い抑制率を示したのはレスキュラ®で, 次いで抑制率が高

かったのはキサラン®であり, プロスタグランジン製剤の抑制率が有意に高値であった。640倍希釈以上ではいずれの薬剤でも抑制率は50%以下となり, 薬剤間で有意差はなかった。

同様に, 多重比較検定を用いて検討した各抗緑内障点眼薬基剤における結果を示す(図5)。いずれの基剤においても, 希釈倍率が10倍の時には100%抑制された。20倍希釈では, トルソプト基剤以外の他の基剤では100%抑制されていたが, トルソプト基剤は有意に低値であった。40倍希釈では, チモプトール基剤および

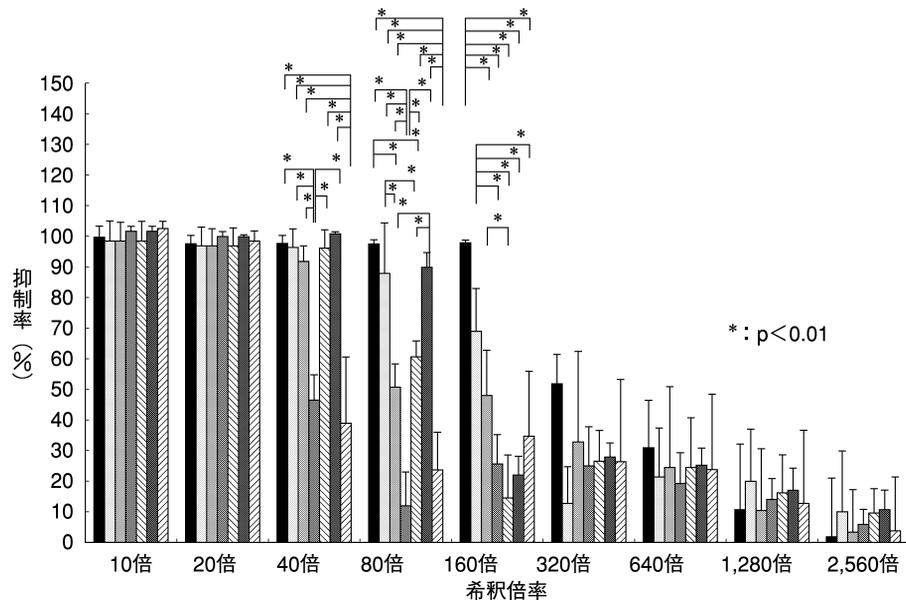


図 4 各抗緑内障点眼薬における細胞増殖抑制率の多重比較解析.

- : レスキュラ®
- : キサラタン®
- ▨ : ミケラン®
- : チモプトール®
- ▨ : ハイパジール®
- : ベトプティック®
- ▨ : トルソプト®

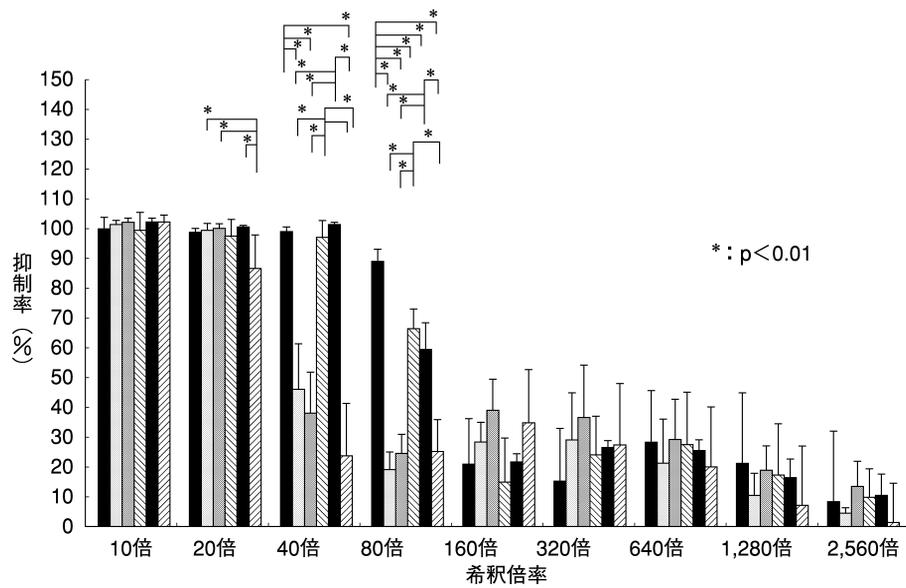


図 5 各抗緑内障点眼薬基剤における細胞増殖抑制率の多重比較解析.

- : レスキュラ基剤
- ▨ : ミケラン基剤
- : チモプトール基剤
- ▨ : ハイパジール基剤
- : ベトプティック基剤
- ▨ : トルソプト基剤

ミケラン基剤でも抑制率は他の基剤よりも有意に低値であった。ハイパジール基剤，ベトプティック基剤およびレスキュラ基剤については，80 倍希釈でも他の基剤に比べ抑制率は有意に高かった。160 倍希釈以上では，いずれの基剤でも抑制率は 50% 以下となり，基剤間で有意差はなかった。

4. 50% 抑制時希釈倍率の算出

算出方法は Graphpad Prism 3.00 ソフトウェア (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, 米国) を用いて，近似曲線の方程式から各抗緑内障点眼薬および基剤の 50% 抑制時希釈倍率を算出した。

抗緑内障点眼薬においては，レスキュラ® > キサラタ

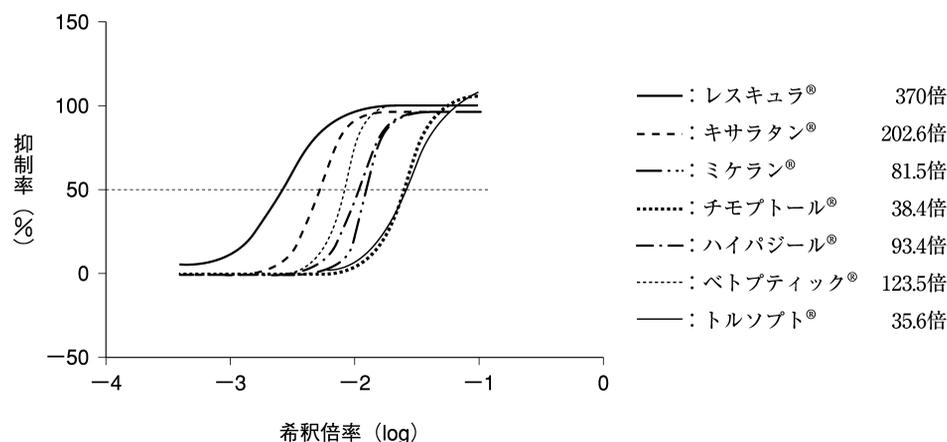


図 6 各抗緑内障点眼薬の反応曲線と 50% 抑制時希釈倍率。

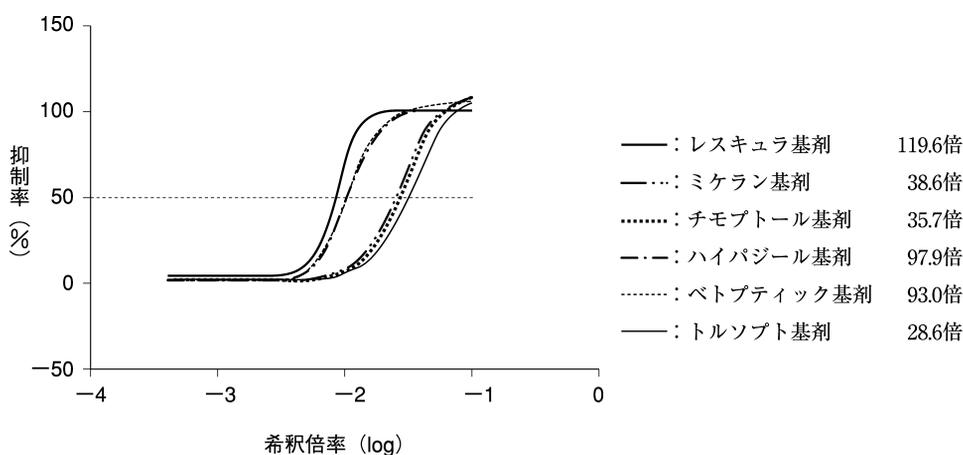


図 7 各抗緑内障点眼薬基剤の反応曲線と 50% 抑制時希釈倍率。

ン®>ベトプティック®>ハイパジール®>ミケラン®>チモプトール®>トルソプト®の順に 50% 抑制時希釈倍率は減じた(図 6)。基剤においては、レスキュラ基剤>ハイパジール基剤>ベトプティック基剤>ミケラン基剤>チモプトール基剤>トルソプト基剤の順に 50% 抑制時希釈倍率は減じた(図 7)。

IV 考 按

抗緑内障点眼薬による角膜上皮障害が β 遮断薬やプロスタグランジン製剤により生じやすいこと¹¹⁻⁷⁾は既に良く知られている。1999 年以降、本邦では数多くの抗緑内障点眼薬が臨床使用されるようになったが、それら各種の抗緑内障点眼薬を同じ条件下で比較した報告はこれまでになく、いずれの点眼薬が角膜上皮に影響を及ぼしやすいかを検討することは重要であると考えられる。

点眼薬による角膜上皮障害を来す原因としては、点眼薬自体による影響もさることながら、角膜の脆弱性を来す基礎疾患の存在¹³⁾も考慮せねばならず、実際の臨床での検討においては、たとえ対象となる症例の年齢を揃えて、基礎疾患を除外し、点眼薬、点眼方法、点眼期間を

同一条件にしても、個体差という要因は除外できない。そこで本検討では、それらの要因をすべて同一条件とすることができるヒト角膜上皮細胞を用いて *in vitro* の実験を行うことにより、各種の抗緑内障点眼薬が角膜上皮に及ぼす影響についての比較も評価できると考えた。加えて、抗緑内障点眼薬が角膜上皮障害を起こす主因は、 β 遮断薬やプロスタグランジン製剤といった製剤特性によるものであろうが、防腐剤による影響も無視できないこともこれまでの報告⁸⁾⁻¹²⁾により明らかとなっている。その防腐剤の中でも、特に塩化ベンザルコニウムの細胞ないし組織毒性が強い¹⁰⁾とされている。防腐剤は点眼薬において必ずしも同一ではなく、また、その濃度も異なっているが、今回の実験に供した点眼薬においては濃度は異なるものの、すべて塩化ベンザルコニウムが用いられていた。そこで本検討では、各抗緑内障点眼薬の角膜上皮に及ぼす影響が、主薬の製剤特性によるものか塩化ベンザルコニウムの影響によるものかを明らかにする目的で、市販の抗緑内障点眼薬と、そこから主薬だけを除いた防腐剤を含む基剤との比較検討も行った。

これらの点眼薬と基剤が角膜上皮細胞に及ぼす影響を

表 1 各緑内障点眼薬の防腐剤とその濃度

抗緑内障点眼薬	防腐剤	濃度
レスキュラ®	塩化ベンザルコニウム	0.01%?
キサラタン®	塩化ベンザルコニウム	0.02%
ミケラン®	塩化ベンザルコニウム	0.005%
チモプトール®	塩化ベンザルコニウム	0.005%
ハイパジール®	塩化ベンザルコニウム	0.01%
ベトプティック®	塩化ベンザルコニウム	0.01%
トルソプト®	塩化ベンザルコニウム	0.005%

検討する方法として、ここでは細胞増殖がどの程度抑制されるかという細胞増殖抑制率を算出して評価した。薬剤を培養細胞と接触させた場合、細胞に及ぼす影響の最も明らかな所見は細胞の死滅であり、次いで細胞の増殖が抑制されることである。それゆえ、細胞増殖抑制率を用いることにより、それが 100% に近ければ細胞に及ぼす影響が大きく、0% に近ければ細胞に対する影響が小さいと評価した。この抑制率により各抗緑内障点眼薬を比較したところ、いずれの点眼薬も角膜上皮細胞に対し増殖抑制作用を有していたが、その抑制作用には差があり、希釈倍率が低い、すなわち高濃度でも抑制率が低くなったのは、トルソプト®とチモプトール®であった。一方、高い希釈倍率、すなわち低濃度になっても高い抑制率を示したのは、レスキュラ®, 次いでキサラタン®であった。各抗緑内障点眼薬の基剤においても、いずれも増殖抑制作用を有していたが、点眼薬と同様に、トルソプト基剤とチモプトール基剤では、高濃度でも抑制率が他の基剤に比べて低値であったのに対し、レスキュラ基剤では、低濃度でも高い抑制率を示した。

これらの結果から、抗緑内障点眼薬の中では、炭酸脱水酵素阻害薬であるトルソプト®とβ遮断薬であるチモプトール®は角膜上皮細胞に対する影響が小さく、プロスタグランジン製剤であるレスキュラ®およびキサラタン®は角膜上皮細胞に対し強い影響を有しており、この増殖抑制作用には、主薬のみではなく基剤も大きく関与していることが明らかとなった。

点眼薬の基剤には、防腐剤として塩化ベンザルコニウムが含まれているが、その濃度は表 1 に示すようにキサラタン®が最も高濃度であり、チモプトール®, ミケラン®およびトルソプト®では低濃度¹⁴⁾である。トルソプト®とチモプトール®の点眼薬において細胞増殖抑制率が低かった要因としては、これらの基剤の抑制率も低かったことから、含有される塩化ベンザルコニウムの濃度が低いことが点眼薬の抑制率を低くするのに影響を及ぼしていることは明らかであろう。同様に、高濃度の塩化ベンザルコニウムの含有が点眼薬や基剤において抑制率を高くするのに関与していることは、β遮断薬の中でハイパジール®やベトプティック®の点眼薬や基剤の抑制率が高かった結果からも裏付けられよう。しかし、抑

制率が最も高かったのは、塩化ベンザルコニウム濃度が最も高かったキサラタン®ではなくレスキュラ®であったことは、細胞への影響がすべて塩化ベンザルコニウムのみ起因するのではなく、その他の添加物や主薬も関与していることを推定して、これは各抗緑内障点眼薬と基剤との比較(図 3)でも明確になっている。これまで特にチモプトール®においては、その歴史も古いことから薬剤性の角膜上皮障害に関する報告^{15)~18)}が数多くなされておられ、その原因としては点眼薬自体の細胞毒性や眼表面に対して有する局所麻酔作用により涙液分泌能が低下することが上げられている¹⁵⁾¹⁶⁾が、今回の結果でチモプトール®において細胞増殖抑制率が低かったことから、チモプトール®自体が細胞毒性を有しているのではないことが明らかとなった。しかし、日常の臨床においては、チモプトール®の点眼により点状表層角膜症などの角膜上皮障害がある¹⁵⁾¹⁷⁾ことから、チモプトール®が有する他の作用が角膜上皮障害の発生に関与していると考えられる。一方、炭酸脱水酵素阻害薬であるトルソプト®においては、角膜内皮の機能不全を起こす可能性が指摘されている¹⁸⁾¹⁹⁾ものの、角膜上皮に対する影響に関する報告はほとんどない。このことは、今回の培養角膜上皮細胞の増殖抑制に対するトルソプト®の影響が小さかったことと矛盾せず、トルソプト®では基剤に含まれる塩化ベンザルコニウムの濃度が低いことと、主薬自身も上皮細胞に影響を及ぼしにくいいため、増殖を抑制する作用が弱かったものと考えられた。

今回使用した抗緑内障点眼薬および基剤において、角膜上皮細胞の増殖が 50% 抑制される濃度(50% 抑制時希釈倍率)を算出した。すなわち、50% 抑制時希釈倍率が大きいということは、低用量でも角膜上皮細胞の増殖を抑制することを意味している。各抗緑内障点眼薬において、50% 抑制時希釈倍率が最も大きかったのは、レスキュラ®の 370 倍である。一方、50% 抑制時希釈倍率が最も小さかったのはトルソプト®で、その 50% 抑制時希釈倍率は 35.6 倍であり、次いでチモプトール®が 38.4 倍であった。これらは点眼薬を 35~38 倍に希釈すれば、角膜上皮細胞に対する増殖抑制作用を 50% に減ずることができるといえる。同様に、各抗緑内障点眼薬の基剤の 50% 抑制時希釈倍率を算出したところ、基剤の 50% 抑制時希釈倍率は、レスキュラ®が最も大きく、最も小さかったのはトルソプト®であった。ベトプティック®とハイパジール®においては、点眼薬と基剤とで 50% 抑制時希釈倍率の順番が入れ替わっていたことから、細胞増殖抑制作用に強く影響を及ぼすものが点眼薬により異なることが考えられたので、各点眼薬において主薬、基剤の影響を検討した。それぞれの抗緑内障点眼薬と基剤を比較したのが図 3 であるが、両者が同じ抑制率の推移を示したのがハイパジール®であり、ハイパジール®においては主薬の影響はほとんどないと考

えられる。ベトプティック®とトルソプト®については、ある希釈倍率において両者間に多少の差があるもののほぼ同じ抑制率の推移を示したことから、両点眼薬においては主薬の影響は比較的少ないといえよう。それに比べ、レスキュラ®およびミケラン®においては点眼薬の抑制率が高値を示しており、これらの点眼薬においては主薬が抑制率に大きく関与していることが推定された。

しかし、実際の臨床においては、ミケラン®は角膜に対する影響の少ない点眼薬としての印象が強い。これにはミケラン®が、抗緑内障点眼薬のうちで油/水分係数の小さい点眼薬であり、点眼後速やかに眼内および体内移行していくため、角膜表面への直接の作用時間が少ないのも一因であろう。一方、レスキュラ®などのプロスタグランジン F_{2α} (PGF_{2α}) 誘導体の点眼薬では、副作用として虹彩色素沈着などが多く報告されているが、角膜上皮障害も生じることが指摘^{9)~7)}されている。これらの点眼薬が油/水分係数の大きい点眼薬であり、角膜表面での滞留時間が長いことも角膜上皮障害の発生要因であろうが、Oda ら²⁰⁾は培養ヒト結膜細胞において、イソプロピルウノプロストン(以下、ウノプロストン)が細胞増殖を抑制し、生存細胞数を減少させることを報告している。その機序として、ウノプロストンの基剤は細胞構造や細胞増殖に影響を与えないが、ウノプロストン自体が細胞周期には影響を与えないものの細胞構造を変化させることを検証しており、それが延いては角膜上皮障害を惹き起こすであろうと推論している。今回、我々が用いたヒト角膜上皮細胞におけるレスキュラ®の点眼薬および基剤での細胞増殖抑制作用は、これをまさに裏付ける結果となっている。また、俊野ら²⁾は培養角膜上皮細胞を用いて、ウノプロストンとβ遮断薬を比較し、ウノプロストンが強い細胞毒性を持っていることを報告しているが、彼らもウノプロストンの基剤ではなく、ウノプロストンの主薬自体に大半の責任があるとしている。本検討からも、レスキュラ®では、基剤よりも主薬が抑制率に大きく関与していることが立証できたことから、ウノプロストン自体が細胞増殖抑制作用を有することは明らかである。その機序に関してはまだ不明な点が多いが、ウシの培養角膜上皮細胞を用いた検討²¹⁾で、外来性の PGF_{2α} が、低濃度では細胞増殖を促進し、高濃度では細胞増殖を抑制したことより、レスキュラ®における細胞増殖抑制作用は、高濃度の外来性 PGF_{2α} による直接的な作用であることが考えられるが、それを明言するにはもう少しのデータの蓄積を要するであろう。

以上のことにより、いずれの抗緑内障点眼薬においても角膜上皮細胞の増殖は抑制されるが、その抑制の程度は点眼薬により異なり、また、その原因として一概に防腐剤のみが角膜上皮細胞に抑制的に働いているのではなく、様々な因子が絡み合っていると思われる。加えて、実際の臨床においては、角膜上皮細胞増殖抑制作用のみ

でなく涙液動態、角膜知覚への影響など薬剤による間接的な影響も考慮する必要があり、本試験は *in vitro* での検討で必ずしも臨床において同様とは限らないが、使用する薬剤選択の一助となれば幸いである。

抗緑内障点眼薬は、長期に及んで点眼するものであるため、角膜に対する影響について注意深い観察とさらなる検討が今後にも必要である。

文 献

- 1) 橋 信彦, 木村泰朗, 石井るみ子, 藤田邦彦, 土至田 宏, 佐渡一成, 他: イソプロピルウノプロストン(レスキュラ®)点眼液によると思われる角膜上皮障害. あたらしい眼科 13: 1097-1101, 1996.
- 2) 俊野敦子, 岡本茂樹, 島村一郎, 宮本二美, 原祐子, 児玉俊夫, 他: プロスタグランジン F_{2α} イソプロピルウノプロストン点眼薬による角膜上皮障害の発症メカニズム. 日眼会誌 102: 101-105, 1998.
- 3) 阪本吉広, 岩崎直樹, 前田直之, 渡辺 仁, 切通彰, 井上幸次, 他: プロスタグランジン F_{2α} 点眼薬による角膜上皮障害. 臨眼 49: 1845-1848, 1995.
- 4) 小室 青, 横井則彦, 木下 茂: ラタノプロストンによる角膜上皮障害. 日眼会誌 104: 737-739, 2000.
- 5) 坂田信義, 田川義継, 松田 彰, 渡辺一順, 井尾晃子: 抗緑内障点眼薬による角膜上皮障害の5症例. 眼紀 48: 757-760, 1997.
- 6) 植木麻理, 川上 剛, 奥田隆章, 杉山哲也, 中島正之, 池田恒彦: ラタノプロストンの眼圧下降効果と副作用. あたらしい眼科 18: 655-658, 2001.
- 7) 田 聖花, 中島正之, 植木麻里, 清水一弘, 池田恒彦, 張野正誉: ラタノプロストンによる考えられる角膜上皮障害. 臨眼 55: 1995-1999, 2001.
- 8) 大竹雄一郎, 山田昌和, 佐藤直樹, 濱野 孝, 今安正樹, 坪田一男: 点眼薬中の防腐剤による角膜上皮障害について. あたらしい眼科 8: 1599-1603, 1991.
- 9) 高橋信夫, 向井佳子: 点眼剤用防腐剤塩化ベンザルコニウムの細胞毒性とその作用機序—細胞培養学的検討—. 日本の眼科 58: 945-950, 1987.
- 10) Burstein NL, Klyce SD: Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 899-911, 1977.
- 11) Pfister RR, Burstein N: The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: A scanning electron microscope study. Invest Ophthalmol 15: 246-259, 1976.
- 12) 平塚義宗, 木村泰朗, 藤田邦彦, 金井 淳: 点眼薬防腐剤によると思われる不可逆的角膜上皮障害. 臨眼 48: 1099-1102, 1994.
- 13) 井上賢治, 加藤 聡, 大原千佳, 天野史郎, 大鹿哲朗: 点眼薬使用中の糖尿病患者における角膜上皮障害. あたらしい眼科 18: 1433-1437, 2001.
- 14) 青山裕美子: 緑内障の薬物治療—抗緑内障点眼薬と

- 角膜. *Frontiers in Glaucoma* 4 : 132—147, 2003.
- 15) 木村泰朗 : 緑内障治療薬と角膜障害. *臨床と薬物治療* 19 : 1123—1126, 2000.
 - 16) 大槻勝紀, 横井則彦, 森 和彦, 松本康宏, 足立和加子, 石橋 健, 佐藤昌昭, 木下 茂 : β 遮断剤の点眼が眼表面に及ぼす影響. *日眼会誌* 105 : 149—154, 2001
 - 17) **Herreras JM, Pastor JC, Calonge M, Asensio VM** : Ocular surface alteration after long-term treatment with an antiglaucomatous drug. *Ophthalmology* 99 : 1082—1088, 1992.
 - 18) 山本哲也 : 緑内障治療薬の副作用とその対処法. *あたらしい眼科* 17 : 1347—1351, 2000.
 - 19) **Konowal A, Morrison JC, Brown SVL, Cooke DL, Maguire LJ, Verdier DV**, et al : Irreversible corneal decompensation in patients treated with topical dorzolamide. *Am J Ophthalmol* 127 : 403—406, 1999.
 - 20) **Oda M, Takahashi N** : Cell injury effect of isopropyl unoprostone, an antiglaucoma agent, on cultured human conjunctival cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 15 : 489—496, 1999.
 - 21) **Conconi MT, Spinazzi R, Tommasini M, Limoli A, Paenigotto PP** : Prostaglandin F₂ alpha can modulate the growth and the differentiation of bovine corneal epithelial cells cultured *in vivo*. *Ann Anat* 183 : 567—573, 2001.