

## 緑内障点眼薬の培養ヒト角膜内皮細胞に対する毒性試験

綾木 雅彦<sup>1)</sup>, 野田 好子<sup>1)</sup>, 谷口 重雄<sup>1)</sup>, 小出 良平<sup>2)</sup>  
岩沢 篤郎<sup>3)</sup>, 井上 吐州<sup>4)</sup>, 井上 洋一<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>昭和大学医学部藤が丘病院眼科, <sup>2)</sup>昭和大学医学部眼科学教室

<sup>3)</sup>昭和大学藤が丘病院組織培養室, <sup>4)</sup>オリンピア眼科病院

### 要 約

**目 的**：緑内障点眼薬 14 剤のヒト角膜内皮細胞への毒性を検討したので報告する。

**方 法**：培養したヒト角膜内皮細胞, 角膜上皮細胞, 結膜上皮細胞に薬液を 2 日間作用させて毒性を検討した。対象はキサラタン<sup>®</sup>, レスキュラ<sup>®</sup>, チモプトール<sup>®</sup>, チマバック<sup>®</sup>, ミケラン<sup>®</sup>, ブロキレート<sup>®</sup> PF, ミロール<sup>®</sup>, ハイパジール<sup>®</sup>, ベトブティック<sup>®</sup>, デタントール<sup>®</sup>, トルソプト<sup>®</sup>, エイゾプト<sup>®</sup>, 2% と 4% サンピロ<sup>®</sup>である。

**結 果**：緑内障点眼薬の角膜内皮毒性は, プロスタグランジン製剤が交感神経  $\alpha$ ,  $\beta$  遮断薬や炭酸脱水酵素阻

害薬よりも大きい傾向があった。塩化ベンザルコニウムを含まない点眼液の毒性が低かった。1,000 倍希釈以上では毒性は著明に低下した。

**結 論**：緑内障点眼薬の培養ヒト角膜内皮細胞への毒性は, 塩化ベンザルコニウムの影響が大きく, 1,000 倍希釈以上では毒性はほとんど消失した。(日眼会誌 113 : 576—582, 2009)

**キーワード**：角膜内皮細胞, 点眼薬, 緑内障, 塩化ベンザルコニウム

## Cytotoxicity of Antiglaucoma Ophthalmic Solutions for Human Corneal Endothelial Cells

Masahiko Ayaki<sup>1)</sup>, Yoshiko Noda<sup>1)</sup>, Shigeo Yaguchi<sup>1)</sup>, Ryohei Koide<sup>2)</sup>  
Atsuo Iwasawa<sup>3)</sup>, Toshu Inoue<sup>4)</sup> and Yoichi Inoue<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology Fujigaoka Hospital, Showa University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Clinical Pathology, Fujigaoka Hospital, Showa University School of Medicine

<sup>4)</sup>Olympia Eye Hospital

### Abstract

**Purpose** : The cytotoxicity of a range of commercial antiglaucoma ophthalmic solutions was assessed in human corneal endothelial cells using *in vitro* techniques.

**Methods** : Cell survival was measured using the WST-1 assay for endothelial cells and the MTT assay for epithelial cells. Commercially available timolol, carteolol, latanoprost, unoprostone, levobunolol, bunazosine, betaxolol, nipradiol, dorzolamide, brinzolamide, and pilocarpine were assessed. The survival of cells exposed to test ophthalmic solutions was expressed as a percentage of cell survival in the control solution (distilled water added to media) after 48 hours exposure.

**Results** : Survival was lower in prostaglandins and in medications containing benzalkonium. It increased to more than 85% after dilution of 1000-fold or more dilution.

**Conclusions** : Antiglaucoma ophthalmic solutions have corneal endothelial toxicity. The toxicity significantly decreases after dilution of 1000-fold or more dilution and toxicity seems to be due mostly to benzalkonium chloride.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 576—582, 2009)

**Key words** : Corneal endothelium, Ophthalmic solution, Glaucoma, Benzalkonium chloride

別刷請求先 : 227-8501 横浜市青葉区藤が丘 1-30 昭和大学藤が丘病院眼科 綾木 雅彦  
(平成 20 年 7 月 18 日受付, 平成 20 年 12 月 16 日改訂受理)

Reprint requests to : Masahiko Ayaki, M.D. Department of Ophthalmology, Showa University Fujigaoka Hospital, 1-30 Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama 227-8501, Japan

(Received July 18, 2008 and accepted in revised form December 16, 2008)

## I 緒 言

緑内障は 40 歳以上の日本人の 5% 近くが罹患する疾患であることが疫学調査で明らかになり<sup>1)</sup>、相当数の緑内障患者が点眼薬を使用していると見込まれる。点眼薬治療は手術と比較すると安全性に優れ、主な副作用は眼表面の毒性による刺激や充血などである。これに関しては臨床実験の他に動物実験や培養細胞による研究が多数なされてきた<sup>2)~7)</sup>。また、大部分の点眼薬に防腐剤として添加されている塩化ベンザルコニウムの結膜上皮細胞毒性についても従来から検討されている<sup>8)~11)</sup>。しかしながら、眼内の重要な組織である角膜内皮細胞への点眼薬の影響の基礎的検討は、わずかしが行われていない<sup>12)13)</sup>。今回、緑内障点眼薬と他の長期処方点眼薬を対象として、培養ヒト角膜内皮細胞、角膜上皮細胞、結膜上皮細胞に対する毒性試験を行ったので報告する。

## II 実験方法

角膜内皮細胞は米国アイバンク Northwest Lions Eye Bank よりヒト角膜を購入して培養し、継代 3 代目の細胞を実験に使用した。培養液は Dulbecco's Minimum Essential Medium (15% ウシ胎仔血清添加) で、2 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor), 30 mg/l L-グルタミン, 2.5 mg/l ファンギゾン, 2.5 mg/l ドキシサイクリンを添加して使用した。IV 型コラーゲンでコートした培養容器を使用し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。培養液は 3 日ごとに交換した。培養開始後約 2 か月で 3 代の継代培養を経て実験可能な細胞数が得られた。形態上、特徴的な六角形細胞を示したことから、角膜内皮細胞であることを確認した。市販されている細胞は、SIRC (ヒト角膜上皮細胞, ATCC CCL-60, ATCC: American Tissue and Cells Corporation), Chang conjunctiva (ヒト結膜上皮細胞, ATCC CCL-20.2, ATCC) を使用した。培養方法は添付文書に従った。

細胞生存率の定量は、角膜内皮細胞には WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) アッセイ<sup>14)</sup> を使用し、他の細胞には MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) アッセイ<sup>15)</sup> を使用した。約  $1 \times 10^4$  の細胞を含む細胞浮遊液 100  $\mu$ l に、種々の濃度の薬液 10  $\mu$ l を加え、最終濃度がそれぞれ 10, 20, 100, 1,000, 10,000 倍希釈になるように 5 種類に調整し 2 日間培養後測定した<sup>16)</sup>。WST-1, MTT アッセイともに、細胞のミトコンドリア活性に応じて発せられるシグナルを分光光度計で測定する方法であり、生細胞数と良好な相関を示す。今回、MTT アッセイにて一般的な検討は十分可能であるが、臨床的にもよく知られているようにヒト角膜内皮細胞は増殖が遅く大量に培養することができないため、少数の細胞数でも比較可能な高感度の WST アッ

セイを使用した。細胞生存率は同量 (10  $\mu$ l) の蒸留水を添加した対照液の結果との比率 (%) で算出した。すべての細胞の実験で測定を 8~16 回繰り返し、平均値と標準偏差を算出した。

検討した緑内障点眼薬はラタノプラスト (キサラタン<sup>®</sup>, ファイザー), ウノプロストン (レスキュラ<sup>®</sup> 0.12%, 参天製薬), チモロール (チモプトール<sup>®</sup> 0.5%, 萬有製薬・参天製薬), チモロール (チマバック<sup>®</sup>, 日点), カルテオロール (ミケラン<sup>®</sup> 2%, 大塚製薬), カルテオロール (プロキレート<sup>®</sup> PF 2%, 日点), レボブノロール (ミロル<sup>®</sup> 0.5%, 科研製薬), ニブラジオール (ハイパジール<sup>®</sup> 0.25%, 興和創薬), ベタキシノール (ベトプティック<sup>®</sup> 0.5%, 日本アルコン), ブナゾシン (デタントール<sup>®</sup> 0.01%, 参天製薬), ドルゾラミド (トルソプト<sup>®</sup> 1%, 萬有製薬), プリンゾラミド (エイゾプト<sup>®</sup> 1%, 日本アルコン), ピロカルピン (サンピロ<sup>®</sup> 2%, サンピロ<sup>®</sup> 4%, 参天製薬) である。緑内障点眼薬のように臨床的に長期間処方されることが多い点眼薬として、加齢白内障治療薬ピレノキシリン (カリーユニ<sup>®</sup> 0.005%, 参天製薬), 調節機能改善剤シアノコバラミン (サンコバ<sup>®</sup> 0.02%, 参天製薬), 角結膜上皮障害治療薬ヒアルロン酸 (ヒアレイン<sup>®</sup> 0.1%, ヒアレインミニ<sup>®</sup> 0.1%, 参天製薬) についても検討した。点眼薬の添加物は添付文書を、塩化ベンザルコニウムの濃度は文献を参照した<sup>17)</sup> (表 1)。チマバックとプロキレート PF はフィルター付き点眼容器、ヒアレインミニは使いきり容器に入っていて添加物が除去されるしくみになっている。なお、角膜上皮細胞と結膜上皮細胞に対するチモプトール, チマバック, ミケラン, プロキレート PF, ヒアレイン, ヒアレインミニの毒性については既報<sup>13)</sup> で報告した。

## III 結 果

抗緑内障点眼薬の角膜内皮細胞の生存率は、プロスタグランジン製剤であるキサラタンとレスキュラが交感神経  $\alpha$ ,  $\beta$  受容体遮断薬や炭酸脱水酵素阻害薬よりも小さい傾向があった (表 1, 図 1, 2)。1,000 倍以上の希釈率ではいずれの点眼薬も生存率は 85% 以上であったが、チマバックのみ希釈による生存率の上昇が少なかった。また、塩化ベンザルコニウムを含まないサンピロでは生存率が大きくなっていった。点眼瓶にフィルターを付けて添加物を濾過した製剤であるチマバックとプロキレート PF について、主剤が同じであるチモプトールとミケランとそれぞれ比較すると、10 倍希釈ではフィルター付きの製剤の生存率の方が大きくなっていった。塩化ベンザルコニウムを含む点眼薬のなかでは濃度が最も低いハイパジールの生存率が高かった。塩化ベンザルコニウムの濃度と 10 倍希釈での生存率を並べてグラフに表示したところ、塩化ベンザルコニウムが含まれない点眼薬では生存率が高くなっていった (図 2)。同じ条件で実験した角

表 1 緑内障点眼薬の成分とヒト角結膜細胞に対する毒性

点眼薬の製品名*	有効成分と添加物**	48 時間培養後の細胞生存率(%) (平均値±標準偏差, 10 倍希釈/1,000 倍希釈)			BAK 濃度 (%) <sup>15)</sup>
		角膜内皮細胞	角膜上皮細胞	結膜上皮細胞	
<b>プロスタグランジン製剤</b>					
キサラタン®	ラタノプラスト 0.005%, BAK, リン酸水素ナトリウム, リン酸二水素ナトリウム, 等張 化剤	22.7±7.1/97.0±11.0	4.0±3.2/99.6±7.1	2.4±0.5/92.8±6.0	0.02
レスキュラ® 0.12%	インプロピルウノプロストン, BAK, ポリソルベート 80, 等 張化剤, pH 調節剤	20.0±4.4/94.0±8.4	3.3±0.4/102.8±5.5	3.2±0.5/91.0±8.1	0.005
<b>交感神経 α, β 受容体遮断薬</b>					
チモプトール® 0.5% (β)	マレイン酸チモロール, BAK, リン酸二水素ナトリウム, リン 酸水素ナトリウム, 水酸化ナト リウム	20.1±1.9/102.6±15.6	***	***	0.005
チマバック® (β)	マレイン酸チモロール 0.5%, リン酸水素ナトリウム, リン酸 二水素ナトリウム	45.4±6.6/85.2±10.7	***	***	0
ミケラン® 2% (β)	塩酸カルテオロール, BAK, 塩化ナトリウム, リン酸二水素 ナトリウム, 無水リン酸一水素 ナトリウム	19.8±7.0/97.9±7.5	***	***	0.005
プロキレート® PF 2% (β)	塩酸カルテオロール, ホウ酸, ホウ砂	26.4±6.5/109.7±20.3	***	***	0
ミロル® 0.5% (α, β)	塩酸レボプロロール, BAK, リン酸二水素カリウム, リン酸 水素ナトリウム, 等張化剤, ポ リビニルアルコール(部分けん 化剤), ピロ亜硫酸ナトリウム, EDTA, pH 調整剤	15.8±6.1/92.3±18.9	7.5±1.9/102.1±3.8	4.2±0.5/104.1±5.4	0.004
デタントール® 0.01% (α)	塩酸ブナゾシン, BAK, 濃グ リセリン, ホウ酸, pH 調節剤	23.7±3.6/91.1±21.7	31.1±9.8/101.7±9.9	2.6±0.6/111.0±7.1	0.005
ハイバジール® 0.25% (α, β)	ニブラジロール, BAK, リン 酸水素ナトリウム, リン酸二水 素カリウム, 塩酸, 塩化ナトリ ウム	37.7±8.3/89.3±5.8	49.8±10.4/104.5±7.6	3.4±0.4/110.7±14.6	0.002
ベトプティック® 0.5% (β)	塩酸ベタキシロール, BAK, EDTA, 等張化剤, pH 調節剤 2 成分	20.9±5.9/105.8±14.8	4.7±1.4/99.3±7.1	2.4±0.7/101.4±7.3	0.01
<b>炭酸脱水酵素阻害薬</b>					
トルソプト® 1%	塩酸ドルゾラミド, BAK, ヒ ドロキシエチルセルロース, D-マンニトール, クエン酸ナ トリウム, 塩酸	22.9±8.1/97.8±10.8	6.4±1.6/102.0±6.8	3.9±0.7/111.0±10.2	0.005
エイゾプト® 1%	プリンゾラミド, BAK, カル ボキシビニルポリマー, チロキ サポール, D-マンニトール, EDTA, pH 調節剤 2 成分, 等 張化剤	20.2±5.5/94.5±12.7	11.1±8.1/106.9±3.2	3.9±0.5/103.2±6.3	0.01
<b>副交感神経遮断薬</b>					
サンピロ® 2%	塩酸ピロカルピン, クロロプタ ノール, パラオキシ安息香酸ブ ロピル, パラオキシ安息香酸メ チル, ホウ酸, ホウ砂, pH 調 節剤	51.5±9.3/110.3±8.4	66.9±6.0/102.3±7.8	35.0±3.6/105.4±6.0	0
サンピロ® 4%	同上	29.3±7.0/116.6±8.1	54.0±4.5/96.3±5.5	14.1±2.6/97.9±3.3	0
<b>長期点眼薬</b>					
カリユニ® 0.005%	ピノレキシシ, BAK, EDTA, 濃グリセリン, ポリソルベート 80, pH 調節剤	23.2±6.7/105.8±16.0	63.0±8.5/102.6±2.5	3.2±0.3/109.6±11.1	0.005
サンコバ® 0.02%	シアノコバラミン, BAK, ホ ウ酸, ホウ砂	19.1±3.7/105.5±14.5	5.8±0.7/98.7±4.2	3.4±0.3/101.9±7.6	0.01
ヒアレイン® 0.1%	ヒアルロン酸ナトリウム, BAK, EDTA, ε-アミノカブ ロン酸	39.1±8.7/97.5±9.2	***	***	0.003
ヒアレインミニ® 0.1%	ヒアルロン酸ナトリウム, ED- TA, ε-アミノカブロン酸, pH 調節剤	102.7±17.3/104.1±11.3	***	***	0

BAK: 塩化ベンザルコニウム, EDTA: エデト酸ナトリウム, \*: 各製品名から点眼剤, 点眼液などは省略した, \*\*: 添付文書を参照した, \*\*\*: 文献 13 で報告済み.

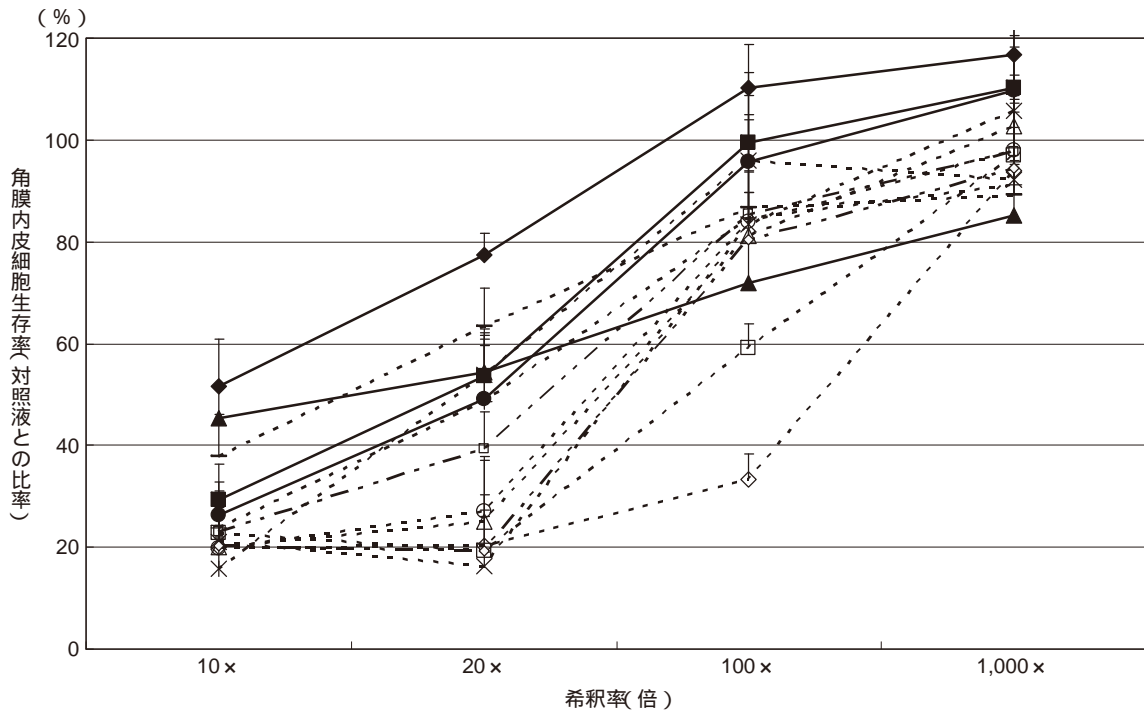


図 1 緑内障点眼薬の培養ヒト角膜内皮細胞に対する毒性。

48 時間培養後の生存率を、対照との比率で算出している。プロスタグランジン製剤(点線で結ばれた◇と□)はすべての希釈率において低い値を示している。また、添加物が除かれている製剤(実線で表示)や塩化ベンザルコニウム濃度が低いハイパジールでは生存率が高い傾向がある。

…◇…: レスキュラ 0.12%, --□…: キサラタン, ---△…: チモプトール 0.5%, —▲…: チマバック, …○…: ミケラン 2%, —●…: プロキレート PF 2%, ---+…: デタントール 0.01%, …×…: ミロル 0.5%, …×…: ベトプティック 0.5%, ---…: ハイパジール 0.25%, -□…: トルソプト 1%, —◇…: エイゾプト 1%, —■…: サンピロ 4%, —◆…: サンピロ 2%.

膜上皮細胞や結膜上皮細胞の生存率も、角膜内皮細胞と同様の傾向があった(表 1)。サンピロの 2% と 4% の比較では、すべての実験で 4% の生存率の方が低くなっていた。

塩化ベンザルコニウムを含む長期処方点眼薬の角膜内皮細胞の生存率は、10 倍希釈では 19~39% と緑内障点眼薬と同等であった(表 1, 図 2, 3)。

#### IV 考 按

緑内障点眼薬の培養ヒト角膜内皮細胞への毒性は、プロスタグランジン製剤が交感神経  $\alpha$ ,  $\beta$  受容体遮断薬, 炭酸脱水酵素阻害薬, 副交感神経遮断薬よりも大きい傾向があった。また、添加物の塩化ベンザルコニウムと毒性との関連が示唆された。すなわち、防腐剤が除かれているか塩化ベンザルコニウムの濃度が低い薬では毒性が低い傾向があった。ピロカルピンでは主剤の濃度が低い方が常に毒性が低く、主剤の影響もあることが示された。チマバックは希釈による生存率の上昇が少なかったが、原因は不明である。以上のような所見は角膜上皮細胞と結膜上皮細胞への毒性でも同様であった。青山ら<sup>2)</sup>は培養ヒト角膜上皮細胞を使用して 48 時間培養後の抗緑内障点眼薬の増殖抑制率を検討している。主剤と基剤

とに分けて実験し、いずれもプロスタグランジン製剤 > 交感神経  $\beta$  遮断薬 > 炭酸脱水酵素阻害薬の順に抑制が強い傾向があったとしている。使用した細胞は異なるが、今回の角膜内皮細胞の結果も同様の傾向を示した。緑内障点眼薬による角膜内皮障害の研究としては、トルソプト点眼と角膜浮腫についての報告があるが<sup>18)~20)</sup>、渉猟した限りでは培養ヒト角膜内皮細胞を使用した報告はない。

著者らは今回と同じ条件で点眼薬の添加物の培養ヒト角膜内皮細胞毒性を検討しており<sup>13)</sup>、点眼薬に使用される濃度に近い 0.01% 塩化ベンザルコニウムの 10 倍希釈での細胞生存率は 22.4% であり、同量の 0.01% 塩化ベンザルコニウムを含むベトプティック (20.9%), エイゾプト (20.2%), サンコバ (19.1%) と同様の数値であった。このことから、角膜内皮細胞毒性が塩化ベンザルコニウム濃度に強く影響されていることが推測できる。培養角膜上皮細胞や結膜上皮細胞を使用して緑内障点眼薬中の塩化ベンザルコニウムの影響を検討した従来の研究<sup>3)~5)</sup>でも、塩化ベンザルコニウムによる毒性が確認されている。他の添加物ではポリソルベートに毒性があるが、これを含むカリーユニの毒性は今回の検討では特に高くはなかった。既報<sup>13)</sup>のごとく、ポリソルベートも

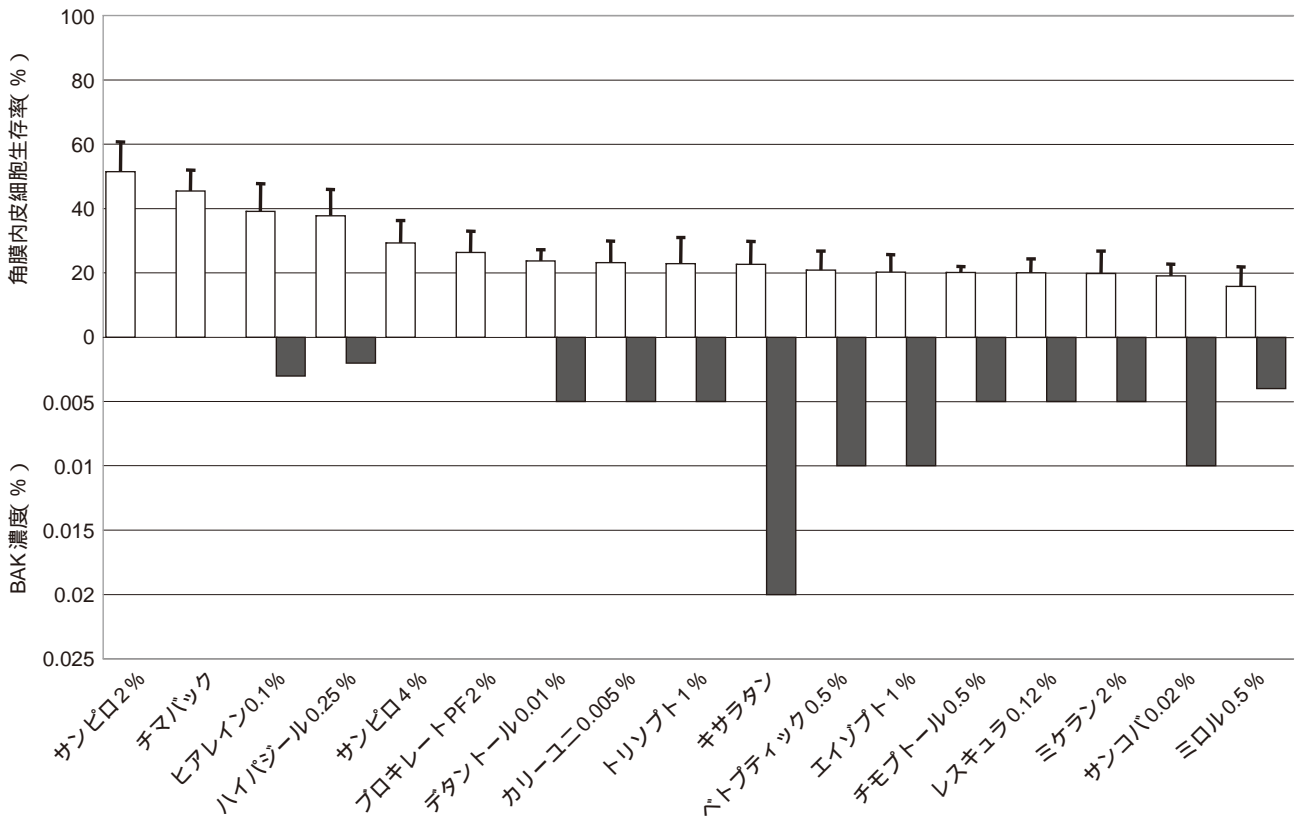


図 2 培養ヒト角膜内皮細胞に対する毒性と塩化ベンザルコニウム濃度。

それぞれの点眼薬の 10 倍希釈時の生存率とその右隣に塩化ベンザルコニウム濃度を負方向に示した。塩化ベンザルコニウムを含まない方が生存率が高くなっている。塩化ベンザルコニウムを含む点眼薬では濃度が低いヒアレインとハイバジールの生存率が高くなっている。BAK：塩化ベンザルコニウム。

□：角膜内皮細胞生存率，■：BAK 濃度。

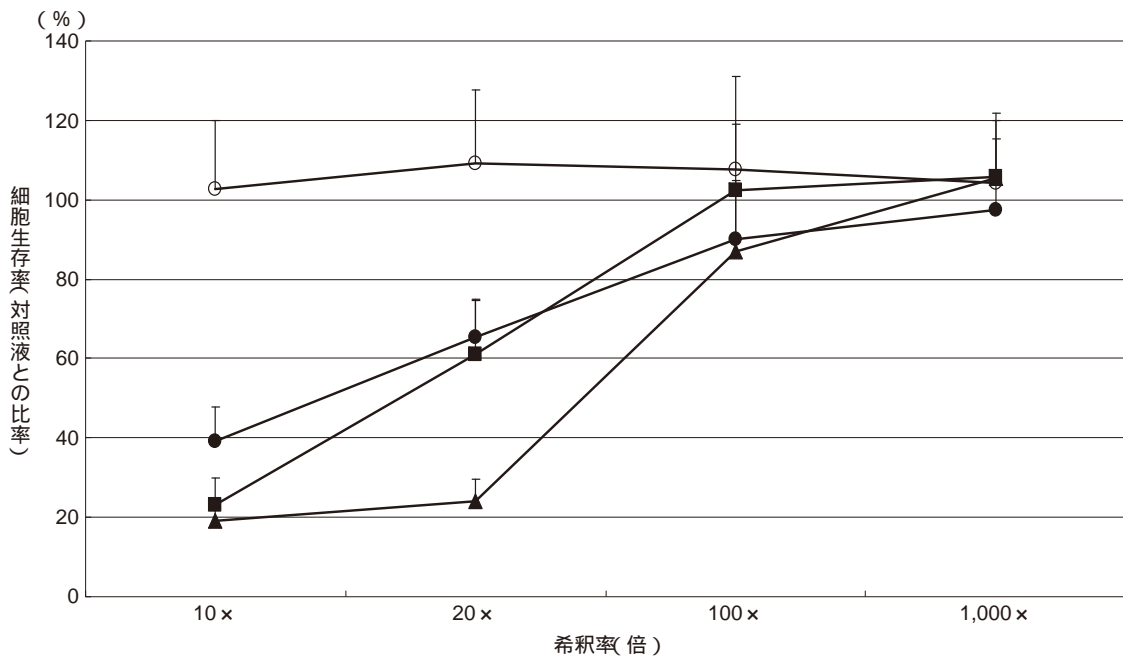


図 3 長期処方点眼薬の培養ヒト角膜内皮細胞に対する毒性。

48 時間培養後の細胞生存率を、対照との比率で算出している。塩化ベンザルコニウムを含む長期処方点眼薬の生存率は、緑内障点眼薬と同等であった。使いきり容器に入っているヒアレインミニの生存率が高い。  
 ●：ヒアレイン 0.1%，▲：サンコバ 0.02%，■：カリユニ 0.005%，○：ヒアレインミニ 0.1%。

0.1% 以下の濃度での毒性は各細胞とも低く、サンピロに使用されているパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピルも、それぞれサンピロ点眼薬中の濃度の 0.026% と 0.014% では細胞毒性は低い(未発表データ)。

緑内障点眼薬は角膜内皮細胞に到達するまでに 1,000~10 万倍に希釈され<sup>21)22)</sup>、今回の結果からは毒性はほとんどないことになる。また、長期間処方される点眼薬の角膜内皮細胞生存率と防腐剤濃度は緑内障点眼薬と同等であった。これらの点眼薬は歴史も長く、長期に使用している症例も相当数にのぼり、緑内障点眼薬の長期毒性を検討する比較対象として有用と思われる。櫻井ら<sup>23)</sup>は、1,608 眼の白内障手術患者の角膜内皮細胞密度を検討し、眼疾患のない 41 眼(2.5%)で年齢に比して細胞密度が少なかったとしている。対象の中で長期間点眼薬を使用していた症例の割合は不明だが、相当数の白内障患者が年余にわたり白内障治療薬を点眼していると経験上思われるので、点眼薬が原因で障害が発生する可能性は大きくないといえよう。点眼薬の 10~100 倍希釈の濃度まで角膜内皮毒性があるが、角膜上皮障害や、内眼手術後の創離開のように眼内外が交通するような状態が長期間続いたとしても、角膜内皮細胞に曝露する濃度は低い。さらに房水流もあるため角膜内皮細胞への毒性はあまり生じないと思われる。

本研究はミトコンドリア活性を測定するバイオアッセイ法での検討のみなので、形態学的検討や他の細胞毒性試験法によってさらに検証されるべきであろう。今回は薬液の細胞への作用時間を 48 時間としたが、従来の研究では 5 秒<sup>8)</sup>、15 分<sup>4)5)</sup>、30 分<sup>6)</sup>、24 時間<sup>8)</sup>で検討されている。点眼薬の培養細胞による毒性試験の標準的方法が定まっておらず、点眼後の薬物が結膜嚢や角膜内に滞留する時間は 48 時間よりはるかに短いため、将来的には今回よりも短い作用時間で検討する必要がある。今回の実験は市販の点眼薬を使用したため、主剤と基剤それぞれの角膜内皮細胞毒性への関与は不明である。しかしながら、一般臨床では市販の点眼薬が使用されるので、今回の研究には十分な意義があると考えられる。

本研究は平成 19 年度の神奈川県眼科医会眼科臨床研究助成金を受けて行われた。本稿の要旨は第 31 回角膜カンファレンス・第 23 回日本角膜移植学会(2007 年 2 月、宮崎市)、2007 年 ARVO meeting(2007 年 5 月、米国フロリダ州フォートローダーデール)で発表した。

## 文 献

1) Iwase A, Araie M, Tomidokoro A, Yamamoto T, Shimizu H, Kitazawa Y : Tajimi Study Group. Prevalence and causes of low vision and blindness in a Japanese adult population : the Tajimi Study. Oph-

thalmology 113 : 1354—1362, 2006.

2) 青山裕美子, 本木正師, 橋本真理子 : 各種抗緑内障点眼薬のヒト角膜上皮細胞に対する影響. 日眼会誌 108 : 75—83, 2004.

3) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S : Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. J Glaucoma 12 : 486—490, 2003.

4) Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, et al : Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol : An *ex vivo* and *in vitro* study. Invest Ophthalmol Vis Sci 45 : 1360—1368, 2004.

5) De saint jean M, Debbasch C, Brignole F, Rat P, Warnet J-M, Baudouin C : Toxicity of preserved and unpreserved antiglaucoma topical drugs in an *in vitro* model of conjunctival cells. Curr Eye Res 20 : 85—94, 2000.

6) Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F : *In vitro* study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctiva-derived epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : 2444—2450, 2005.

7) Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R : Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. Cornea 23 : 490—496, 2004.

8) Pfister RR, Burstein NL : The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium : a scanning electron microscope study. Invest Ophthalmol Vis Sci 15 : 246—259, 1976.

9) Burstein NL, Klyce SD : Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 16 : 899—911, 1977.

10) 高橋信夫 : 培養結膜上皮細胞に対する薬剤毒性 第 1 報 防腐剤. 日眼会誌 84 : 1171—1176, 1980.

11) De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C : Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 619—630, 1999.

12) 加治優一, 大鹿哲郎 : 各種フルオロキノロン剤による角膜内皮細胞毒性の比較. あたらしい眼科 24 : 1229—1232, 2007.

13) Ayaki M, Yaguchi S, Koide R, Iwasawa A : Cytotoxicity of ophthalmic solutions with and without preservatives for human corneal endothelial cells, epithelial cells, and conjunctival epithelial cells. Exp Clin Ophthalmol 36 : 553—559, 2008.

14) Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He P : A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. Chem Pharm Bull 41 : 1118—1122, 1993.

- 15) **Mosmann T** : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 : 55—63, 1983.
  - 16) **渡辺正巳** : 細胞毒性試験法. 日本組織培養学会 (編) : 細胞トキシコロジー試験法. 朝倉書店, 東京, 71—72, 1991.
  - 17) 点眼薬の防腐剤濃度. 大橋裕一, 他(編) : 眼科薬剤クイックリファランス. 南江堂, 東京, 198—202, 2004.
  - 18) **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.
  - 19) **Giasson CJ, Nguyen TQ, Boisjoly HM, Lesk MR, Amyot M, Charest M** : Dorzolamide and corneal recovery from edema in patients with glaucoma or ocular hypertension. *Am J Ophthalmol* 129 : 144—150, 2000.
  - 20) **Egan CA, Hodge DO, McLaren JW, Bourne WM** : Effect of dorzolamide on corneal endothelial function in normal human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 23—29, 1998.
  - 21) **Vareilles P, Silverstone D, Plazonnet B, Le Douarec JC, Sears ML, Stone CA** : Comparison of the effects of timolol and other adrenergic agents on intraocular pressure in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 : 987—996, 1977.
  - 22) **Araie M, Takase M, Sakai Y, Ishii Y, Yokoyama Y, Kitagawa M** : Beta-adrenergic blockers : ocular penetration and binding to the uveal pigment. *Jpn J Ophthalmol* 26 : 248—263, 1982.
  - 23) **櫻井美晴, 羽藤 晋, 望月弘嗣, 大野健治, 山田昌和** : 白内障術前患者の角膜内皮細胞減少例とその要因. *臨眼* 60 : 73—77, 2006.
-