

## 涙液の生化学的分析による眼局所用薬剤の 角膜障害性の評価 (図12, 表1)

開 繁義・石田 俊郎・狩野真由美 (富山医科薬科大学医学部眼科学教室)

### Estimation of Corneoconjunctival Damage Due to Topical Ophthalmic Agents by Biochemical Analysis of Tear Fluid

Shigeyosi Hiraki, Tosio Isida, Mayumi Kano

*Department of Ophthalmology, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

#### 要 約

薬物点眼による角膜および結膜の障害性評価の研究は、*in vitro* では培養結膜細胞などに対する細胞毒性を数量化する方法を用いているが、生体でない欠点がある。動物実験では、前眼部の肉眼的検査法、摘出眼球での組織化学的または形態学的な検査法などが用いられるが、いずれも定量性に難点がある。房水蛋白を指標とする生化学的方法もあるが、*Ocular Surface* の障害度評価法としては妥当性に乏しい。本研究では、生体眼に点眼した薬物による *Ocular Surface* の障害度を評価するために、角膜および結膜に多量に含まれるグルタチオン、アスコルビン酸、および結膜に含まれるが角膜には含まれない血清アルブミンの3成分を指標として、薬物接触による影響で涙液中に放出された各成分の量を測定した。その結果、各成分の放出量は角結膜組織の障害度を強く反映した。従って、涙液を生化学的に分析する方法により、薬物による角結膜組織の障害度を定量的に評価できることが確認された。(日眼 92:1553—1564, 1988)

キーワード：眼局所用薬剤，角結膜障害性，涙液，生化学的分析，グルタチオン

#### Abstract

Estimation of corneoconjunctival damage caused by topical ophthalmic agents has heretofore been performed by evaluation of cytotoxicity against cultured cells *in vitro*, and by macroscopic examination of the ocular surface *in vivo*, and by histochemical or morphological examination of the enucleated eye. However, the degree of methods are inadequate for accurate quantitative estimation of damage. A biochemical method measuring the protein content in aqueous humor was not clearly related to ocular surface damage. In order to estimate ocular surface damage caused by topical ophthalmic agents, glutathione, ascorbic acid and serum-albumin exuded into tear fluid from ocular tissues *in vivo* were measured. As a result, the exudation of these components into the tear fluid correlated highly with ocular surface damage. Therefore, the damage can be estimated quantitatively by biochemical analysis of tear fluid. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 92:1553—1564, 1988)

**Key words:** Topical ophthalmic agents, Corneoconjunctival damage, Tear fluid, Biochemical analysis, Glutathione

別刷請求先：930-01 富山市杉谷2630 富山医科薬科大学医学部眼科 開 繁義 (昭和63年6月20日受付)

Reprint requests to: Shigeyoshi Hiraki, Dept. of Ophthalmol., Faculty of Medicine, Toyama Med. and Pharmaceutical Univ.

2630 Sugitani, Toyama-shi 930-01, Japan

(Accepted for publication June 20, 1988)

## I 緒 言

水晶体および角膜は多量のグルタチオン(以下GSHと略す)を含有することが従来より知られているが、結膜、房水、涙液ではその含有率が不明なため、著者らはまずGSHの高感度分析法<sup>1)</sup>を確立した。その結果、結膜は角膜と同様に多量のGSHを含有するが、房水および涙液はGSH含有量が極めて少ないことを明らかにした<sup>2)</sup>。また、生理的に存在する涙液量は極めて少ないため、その採取は困難であり、従来の涙液成分の研究では採取法自体に問題あると考えられたので、著者らは涙液中のGSHなどを指標にして涙液の採取法を検討した結果、組織への接触が避けたい濾紙などを用いた涙液採取では角結膜組織に多少とも損傷を与え、その傷害度とGSHなどの涙液濃度には強い相関性があることを明らかにした<sup>3)</sup>。さらに著者らは、涙液中に検出されるGSHが単に機械的な傷害度を反映するばかりでなく、点眼などの薬物接触による化学的な傷害度をも反映する可能性を示唆した<sup>4)</sup>。

今回、家兎眼の角結膜組織に薬液を接触させ、それによって涙液または接触させた薬液中に放出されたGSHなどの組織由来の成分を分析し、薬物の種類および濃度、接触方法の違いによる差異を究明することによって、角結膜組織に対する薬物の障害度を評価する方法を検討したので報告する。

## II 実験方法

### 1. 実験動物

体重2.5~3.5Kgの成熟雄性日本白色家兎を用いた。

### 2. 使用薬剤

1. 塩化ナトリウム (NaCl), 2. balanced salt solution (BSS<sup>®</sup>), 3. パラオキシ安息香酸メチル (MP), 4. クロロブタノール (CB), 5. ベンジルアルコール (BA), 6. 塩化ベンザルコニウム (BZC), 7. グルコン酸クロルヘキシジン (HG), 8. ポリソルベート80(PS-80), 9. 蒸留水, 10. 塩酸オキシプロカイン (OXP), 11. ベノキシール<sup>®</sup>0.4%液 (Benoxil), 12. インタル<sup>®</sup>点眼液 (Intal), 13. 硫酸ゲンタマイシン (GM), 14. クロラムフェニコール (CP), 15. 酢酸 (AcA), 16. アスコルビン酸 (AsA), 17. 塩酸 (HCl), 18. 水酸化ナトリウム (NaOH)

上記薬剤のうち、BSS<sup>®</sup>(Alcon社製)、Benoxil<sup>®</sup>(参天製薬<sup>®</sup>製)、Intal<sup>®</sup>(藤沢薬品工業<sup>®</sup>製)は市販の製

剤をそのまま使用した。PS-80、OXP、CP、BZCは日本薬局方品、GMはSigma社製、HGは住友製薬<sup>®</sup>製、その他は和光純薬工業<sup>®</sup>製の特級試薬を用いた。市販製剤、NaCl溶液および蒸留水を除くすべての薬液は、塩化ナトリウムにてほぼ等張化し、市販製剤以外の薬液の調製はすべて無菌的に行った。

### 3. 角結膜への薬液接触法および試料液の採取法

#### 1) 結膜プール法

角膜の位置がほぼ上向きになるように固定器を傾けて、薬液250 $\mu$ lをマイクロピペットで結膜嚢内に点眼し、この液が流失しないように上下眼瞼を手指で軽く引きながら、角結膜面に2分間接触させた後、貯留する液をガラスピペットで速やかに採取して、試料液とした。

#### 2) 角膜円筒法

上方に向けられた角膜の中央にガラス円筒(内径11mm、外径14mm、高さ35mm)を密着し、その円筒内に薬液600 $\mu$ lを入れて2分間角膜に接触させた後、直ちにマイクロピペットで300 $\mu$ lを採取し、試料液とした。

#### 3) 薬液点眼—メニカス涙液法

薬液50 $\mu$ lを結膜嚢内に点眼した後、経時的にガラス毛細管(先端の内径0.2~0.3mm、外径約0.6mm)で眼瞼メニカスの涙液、約2 $\mu$ lを重量既知の容器に採取し、涙液の秤量を行った後、蒸留水で一定の倍率に希釈した液を試料液とした。

#### 4) 薬液点眼—生食液結膜プール法

薬液50 $\mu$ lを1回または一定の間隔で複数回、結膜嚢内に点眼した後、結膜プール法(生理食塩液:250 $\mu$ l、接触時間:2分)を準用して経時的に試料液を採取した。

### 4. 測定成分および測定方法

測定の対象とした成分はグルタチオン(GSH)、アスコルビン酸(以下AsAと略す)、血清アルブミン(以下s-Albと略す)の3成分で、試料液は必要に応じて適宜分割した。測定は以下に示す各成分の分析法を適用して、試料液中の検出量または濃度を算出した。

#### 1) GSHの測定

10~50 $\mu$ lの試料液にreaction bufferとして0.5M酢酸ナトリウム—塩酸緩衝液(pH3.3)および発蛍光試薬としてN-(9-acridinyl)maleimide溶液(500 $\mu$ g/ml)を1:8:1の割合で混合し、40 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、その反応液について高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)(蛍光検出)にて定量した。

2) AsA の測定

試料液10~50 $\mu$ l に0.5%Dithiothreitol を含む0.02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液を1:1の割合で混合し、室温で約30分間経過させた後、この液についてHPLC法(UV検出)にて定量した。

3) s-Alb の測定

試料液10 $\mu$ l を前処理を行うことなく、HPLC法(UV検出)にて定量した。

なお、上記3成分の測定には、既報<sup>1)~5)</sup>に示した条件を準用した。

5. 角結膜の肉眼的検査および染色試験

各実験の前後における前眼部の状態を福井一池本法<sup>6)</sup>に準じて肉眼的に検査した。また、角膜円筒法で試料液を採取した後に、1%Fluorescein液を点眼して経時的に角膜の染色状態を調べた。

III 結 果

結膜プール法および角膜円筒法で薬液を接触させた角結膜組織の表面または内部から放出されるGSH, AsA, s-Albの量を測定し、各成分の放出量が、薬液の浸透圧, pH, 接触時間, 薬物の種類および濃度などによって受ける影響について検討した。また、通常の点眼法で投与した薬物の角結膜組織に対する影響については、経時的に採取した涙液を分析して、以下の結果を得た。

1. 結膜プール法および角膜円筒法における角結膜組織のGSH, AsA放出性に影響を与える諸因子

(1) 塩化ナトリウムの濃度 (図1, 図2)

結膜プール法のGSH放出性については既報<sup>4)</sup>の結果を全試料液中の検出量 (ng) に換算して角膜円筒法の結果と併せて図1に示し、AsAの放出性は図2に示す。角膜および結膜の両方に薬液が接触する結膜プール法では、角結膜円筒法よりもGSHで4~5倍、AsAで4~6倍高い値を示した。GSH, AsAともに0.9%NaClで最も低値を示し、生理食塩液より浸透圧が低くても高くてもGSH, AsAの放出性は大であった。

(2) 薬剤の種類 (図3, 図4)

点眼薬の防腐剤を初め、種々の薬剤について、GSHの放出性を比較した結果を図3に、AsAの結果を図4に示す。BSS<sup>®</sup>では両方の接触法で、GSH, AsAとも0.9%NaClよりさらに低値を示した。結膜プール法では、0.1%MP, 0.4%CB, 0.5%BA, 0.3%GMのGSH放出量は0.9%NaClと有意差がなかった。角膜円筒法では、多くの薬剤のGSH放出性が結膜プール法の結果と類似していたが、0.4%OXFでは0.9%NaClにほぼ等しかった。また、0.4%OXFと0.005%BZCを含有するBenoxil<sup>®</sup>ではBZCの影響のみを反映する結果となっている。結膜プール法におけるGSH放出量は、同一薬剤の角膜円筒法の値に比して約2~5倍大きい程度であるが、0.4%OXFでは28倍、1%PS-80では9

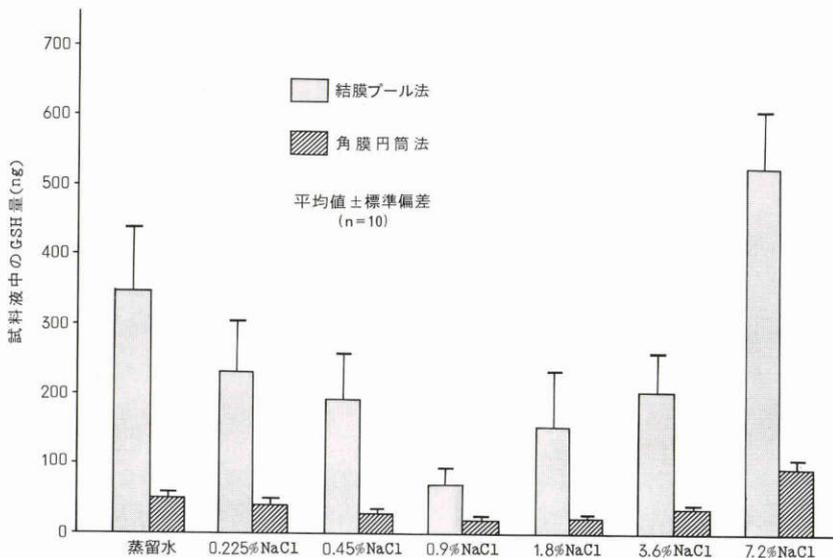


図1 結膜プール法および角膜円筒法における GSH 放出性に与える塩化ナトリウム濃度の影響 (図中の bar は標準偏差を示す)

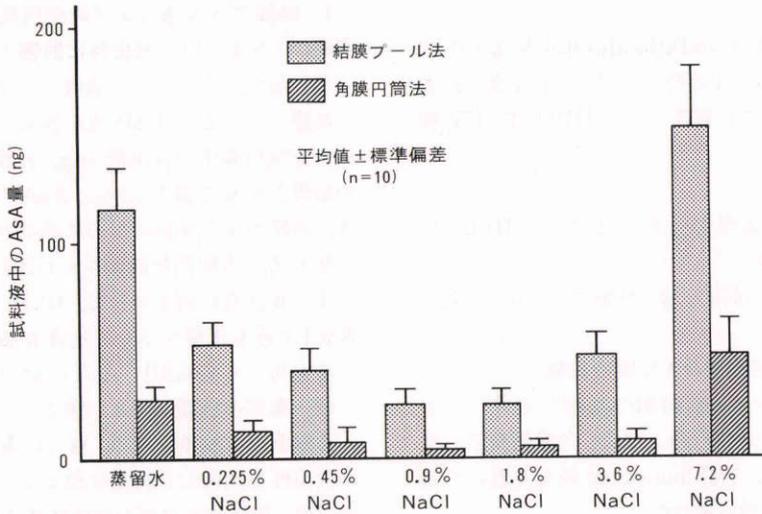


図2 結膜プール法および角膜円筒法におけるAsA放出性に与える塩化ナトリウム濃度の影響(図中のbarは標準偏差を示す)

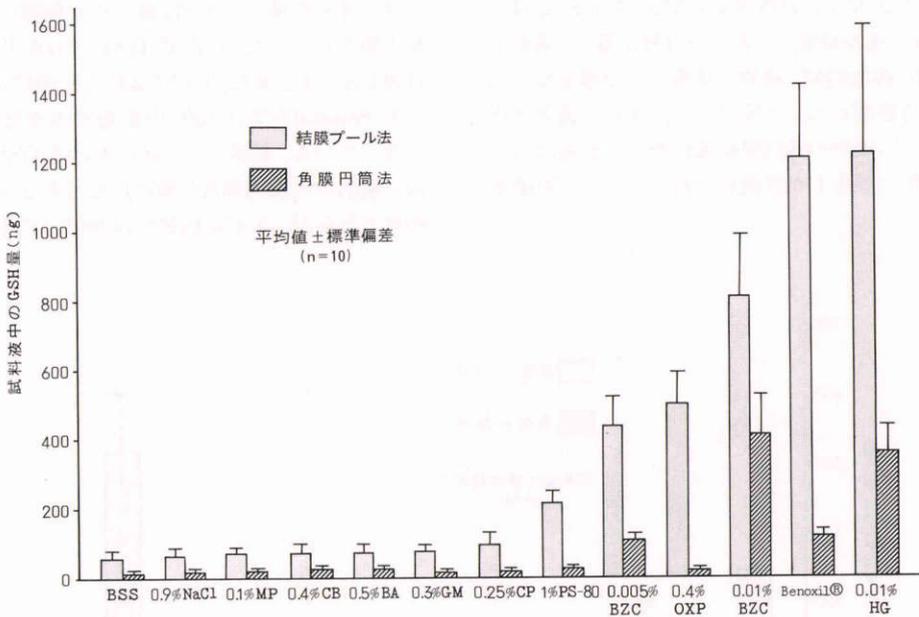


図3 結膜プール法および角膜円筒法におけるGSH放出性の比較(図中のbarは標準偏差を示す)

倍と高値を示す薬剤もあった。一方、AsAについては、AsAの測定を妨害する薬剤が多かったので測定し得た薬液は少ないが、GSHの場合とほぼ類似した放出傾向が認められた。

(3) 薬物の濃度 (図5, 図6, 図7)

GSHの結果は図5, 図6に、AsAの結果は図7に示す。両成分の放出性はいずれの薬液接触法によっても、HG, BZC, OXPでは薬物濃度に高い依存性を示した。また、HGとBZCのGSH放出性は両薬液接触法で逆転しているが、AsAの放出性は並行している。0.4%以

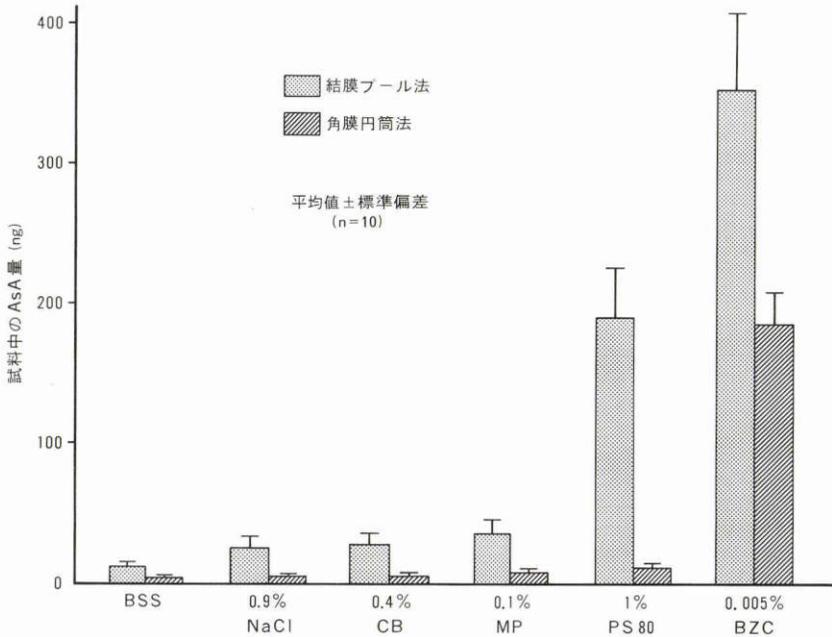


図4 結膜プル法および角膜円筒法におけるAsA放出性の比較(図中のbarは標準偏差を示す)

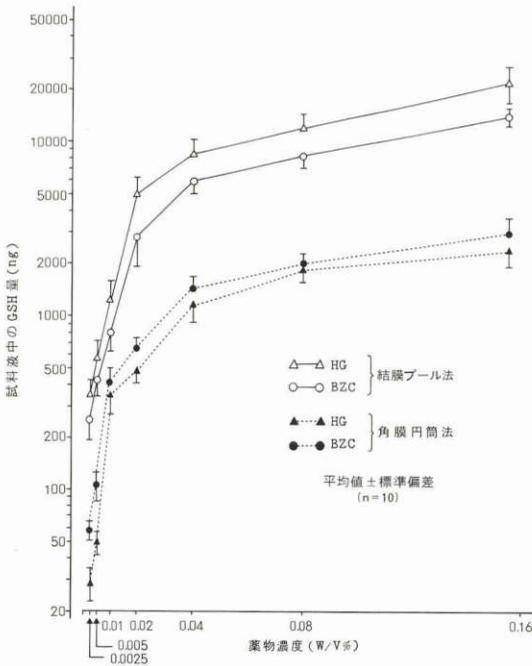


図5 結膜プル法および角膜円筒法におけるGSH放出性に与えるBZC, HG濃度の影響

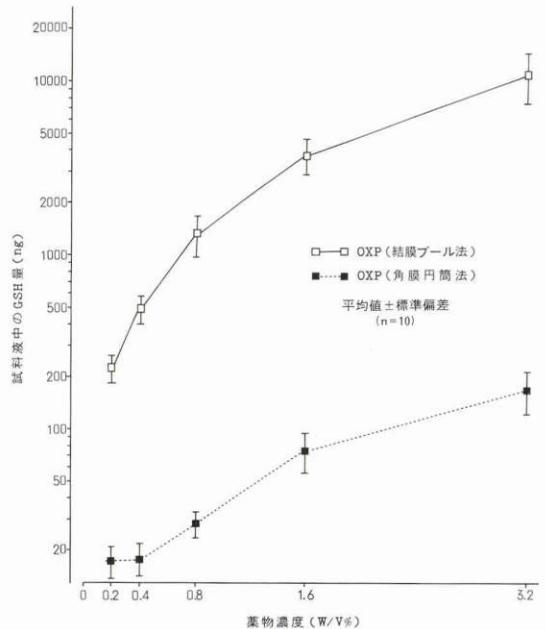


図6 結膜プル法および角膜円筒法におけるGSH放出性に与えるOXP濃度の影響

下の OXP では角膜円筒法における GSH 放出性が 0.9%NaCl にはほぼ等しく, HG, BZC とはかなり異

なった挙動を示した.

(4) 酸およびアルカリ (図8, 図9)

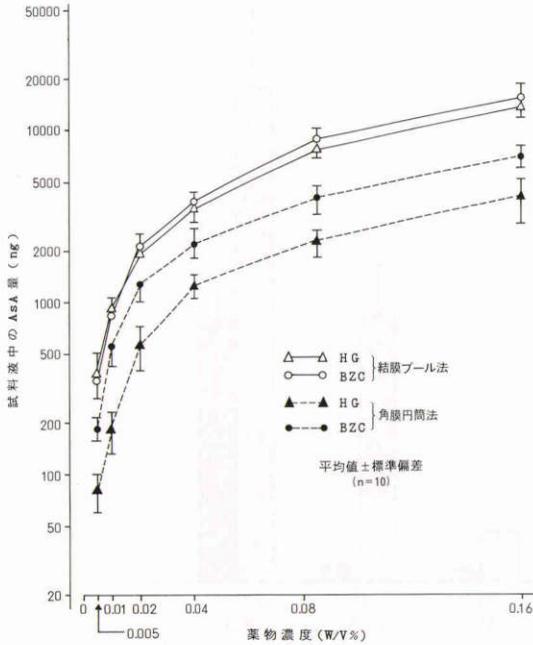


図7 結膜プール法および角膜円筒法におけるAsA放出性に与えるBZC, HG濃度の影響

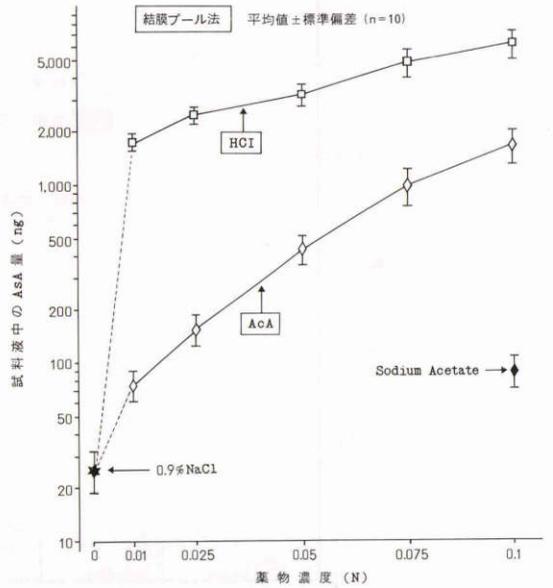


図9 結膜プール法におけるAsA放出性に与える酸濃度の影響

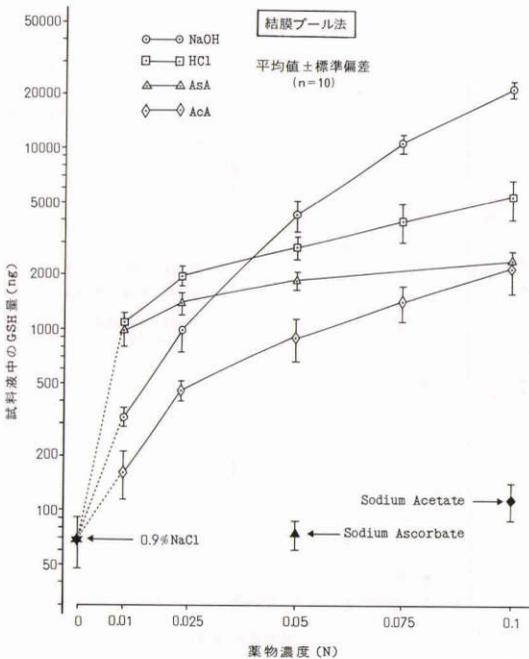


図8 結膜プール法におけるGSH放出性に与える酸およびアルカリ濃度の影響

結膜プール法にて酸およびアルカリの濃度が放出性に与える影響を調べた結果、GSHについては図8に、

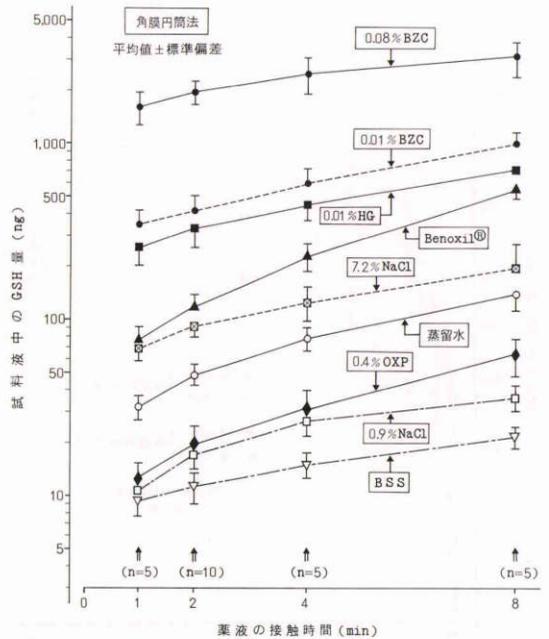


図10 角膜円筒法におけるGSH放出性に与える薬液接触時間の影響

AsAについては図9に示す。HG, BZC, OXPの場合と同じく、GSHおよびAsAの放出性は酸、アルカリの濃度に高い依存性を示した。しかし、放出量の濃度

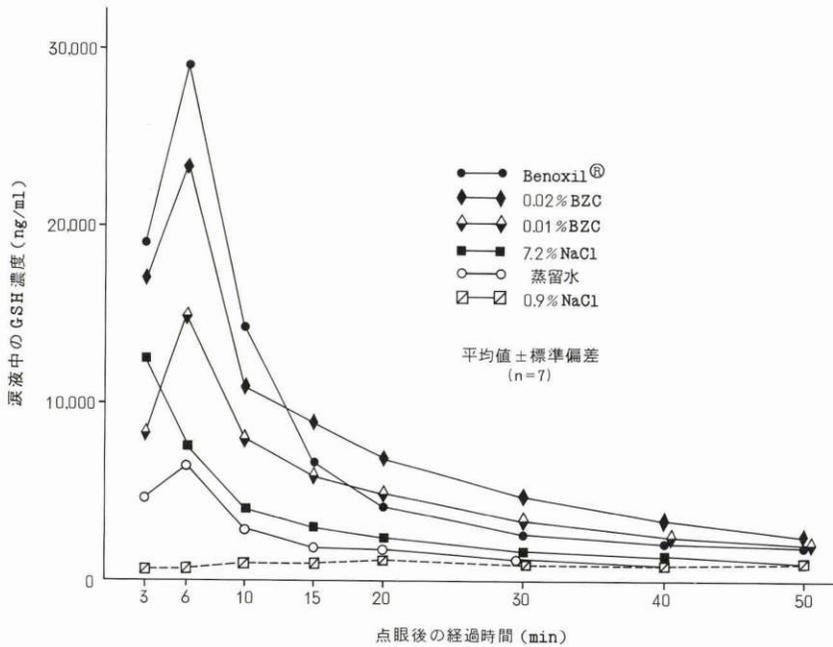


図11 薬液点眼一メニスカス涙液法におけるGSH放出性の経時変化

依存曲線は酸とアルカリで異なりまた、酸の種類によっても大きく異なっていた。0.01Nと0.1NのGSH放出量の比は水酸化ナトリウムを作用させた場合、約70倍、塩酸、アスコルビン酸、酢酸ではそれぞれ約5倍、2.4倍、14倍であった。また、アスコルビン酸のナトリウム塩および酢酸のナトリウム塩では0.9%NaClでの放出量に近似した。一方、AsAについては測定法上の理由から、塩酸および酢酸の結果のみを示すが、その濃度依存曲線はGSHと類似した。

(5) 薬液の接触時間 (図10)

角膜円筒法におけるGSHの放出量と薬液の接触時間の関係を図10に示す。GSH放出量は接触時間に比例した。薬剤によって比例勾配がやや異なり、接触時間8分と1分のGSH放出量の比は平均で2.5~3倍の範囲にあるが、蒸留水で4.4倍、OXFで約5倍、Benoxil®で約7倍と高値を示した。

2. 薬液点眼一メニスカス涙液法におけるGSH放出性 (図11)

薬液点眼後のメニスカス涙液中GSH濃度を経時的に測定した結果を図11に示す。0.9%NaClの点眼では点眼前の生理的なメニスカス涙液中のGSH濃度 [1092±483ng/ml (n=50)] にほぼ等しく、経時的にも変化はなかった。蒸留水と7.2%NaClの点眼では、一時的にGSH濃度の上昇を認めたが、20分後ではほぼ

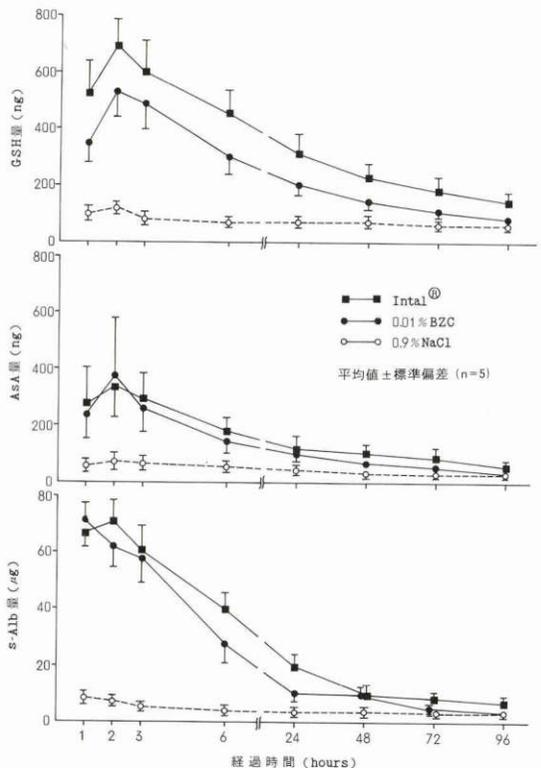


図12 薬液点眼一肉食液結膜プル法におけるGSH, AsA, s-Alb放出性の経時変化

点眼前の正常値に戻った。これに対して Benoxil® および0.01%, 0.02%BZCでは, 点眼後に多量の GSH が涙液中に放出されており, しかも正常値に戻るのに長時間を要した。また, 各薬剤について涙液中 GSH 濃度を時間で積分した値は, 結膜プール法の結果と良好な相関性を示した。

3. 薬液点眼一食液結膜プール法における涙液中 GSH, AsA, s-Alb 濃度 (図12)

薬液50μl を15分毎に10回連続点眼した後, 生理食塩

液を用いた結膜プール法で採取した試料液について, 3成分の経時変化を調べた結果を図12に示す。0.9% NaCl では, 10回の連続点眼後でも3成分の放出量は点眼前の結果とほとんど変わらなかった。これに対して, 結膜プール法および角膜円筒法で GSH, AsA の放出性が高かった0.01%BZCでは, s-Alb を含む3成分とも高い放出性があり, しかもその経時変化はほぼ類似した。

4. 角膜障害度の肉眼的検査および染色試験 (表1)

表1 薬液接触による角膜の Fluorescein 染色度および肉眼的観察所見の経時変化

薬液接触法：角膜円筒法			薬液接触後の経過時間 (hours)									
			0	1	3	9	24	0	1	3	9	24
薬剤名	濃度(%)	接触時間	角膜の染色度					角膜の透明度				
NaCl	0.9	2 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	0.9	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	7.2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	7.2	8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
蒸留水		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蒸留水		8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BZC	0.0025	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BZC	0.0025	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BZC	0.0025	8	+	#	+	-	-	+	-	-	-	-
BZC	0.01	2	-	#	#	+	-	+	-	-	-	-
BZC	0.01	4	-	#	#	+	+	+	+	+	-	-
BZC	0.01	8	#	#	#	#	+	+	#	#	+	-
BZC	0.04	2	#	#	#	#	+	+	#	#	+	+
BZC	0.16	2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
HG	0.0025	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HG	0.01	2	+	#	#	#	+	+	+	-	-	-
HG	0.04	2	#	#	#	#	#	#	#	#	+	+
HG	0.16	2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+
BSS		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP	0.1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB	0.4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BA	0.5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP	0.25	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS-80	1.0	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
判定基準			- : 染色されない + : 軽度に染色 # : 中等度に染色 ## : 強度に染色					- : 完全に透明 + : わずかに不透明 # : 不透明一虹彩透見可能 ## : 不透明一虹彩透見不能				

角膜円筒法で薬剤を作用させた後の障害度を肉眼的、鏡検的に観察した結果ならびに、Fluoresceinによる角膜染色度を検査した結果を表1に示す。角膜上皮の軽度の障害は肉眼的には判定し難く、Fluorescein染色による細隙灯顕微鏡検査でも確認できない場合が見られた。しかし、強い障害性を有する薬剤では、定量的に評価することは難しいが、障害部所見の異常度は薬物の濃度および接触時間に相関性を示した。

#### IV 考 按

薬物の眼組織障害性の評価に関する研究は、従来より種々の方法で行われてきた。以前には、ヒト眼に対して点眼または結膜下注射を行い、疼痛などの自覚症状を調べる方法や前眼部を他覚的に検査する方法<sup>7)</sup>が採られたこともある。動物を用いた実験では、点眼や結膜下注射による前眼部の他覚的検査<sup>8)~13)</sup>、角膜内注射による角膜混濁度の測定<sup>11)14)</sup>、前房内注入による房水蛋白量の増加率の測定<sup>11)15)</sup>、硝子体内注入による房水蛋白量の測定<sup>16)</sup>、硝子体内注入による他覚所見の検査および組織学的変化<sup>17)~19)</sup>、上皮を剝離した角膜または結膜の上皮再生阻害作用を調べる方法<sup>20)~25)</sup>などがある。

しかしながら、点眼薬剤による眼障害性を評価する実験系としては、上記の方法は妥当性に乏しい面があり、点眼または点眼に準ずる方法で薬剤を投与し、前眼部における障害度を定量的に表現できる方法が最も望ましい。点眼による前眼部組織の障害度を評価する方法としては、肉眼的に観察した所見を一定の基準に照らして判定する Draize 法<sup>26)</sup>が知られており、Draize 法の採点基準に改良を加えた福井—池本法<sup>6)</sup>は有用性の高い判定法とされている。頻回点眼または結膜囊内灌流による角膜上皮障害を Fluorescein 染色によって観察する方法<sup>13)27)28)</sup>もある。さらに、角膜の Temperature Reversal Effect, すなわち、角膜は低温下で水分を吸収して厚くなり、体温に戻せば元の厚さに近くなる性質に薬剤が及ぼす影響度を指標に定量的評価を試みた報告<sup>29)</sup>もある。

一方、組織化学的方法としては、点眼後の摘出眼について、角膜の呼吸解糖に参与するグリコーゲンの PAS 反応および組織の新陳代謝に参与するアルカリホスファターゼなどの酵素反応を指標とする方法<sup>30)~32)</sup>がある。1970年代に入ってから、電顕を用いた形態学的な研究<sup>33)~43)</sup>が盛んに行われ、点眼およびその防腐剤、基剤などによる角結膜上皮障害性が微細に

示されるようになった。しかしながら、組織学的方法ならびに形態学的方法は優れた情報を提供する反面、組織を摘出する必要があるために、迅速性、簡便性、経済性に乏しく、さらに障害度を定量的に表現し難いなどの欠点がある。

一方、動物を用いない *in vitro* の実験系では、培養細胞などに対する細胞毒性を指標にして薬物の眼障害性を評価する方法<sup>44)~51)</sup>が検討されてきた。高橋<sup>48)~51)</sup>は、防腐剤、局所麻酔剤、 $\beta$ -遮断剤などの50%細胞増殖阻止率を求め、生理食塩液と被検液を対比して薬剤毒性を数量化する方法、あるいは50%細胞障害率を起こす時間を比較して、細胞障害の発現速度を指標に、薬剤毒性を定量的に評価する方法を示している。この培養細胞を用いた評価法は *in vitro* であることから経済性に優れ、定量性および再現性も良い方法とされているが、人工的特殊環境下での増殖系の細胞を用いた方法であり、*in vivo* でない諸制約はあくまで残っている。

著者らは点眼剤を初めとする眼局所用薬剤、化学薬品などの角膜上皮組織に対する障害性を *in vivo* で定量的に評価する方法を確立するために、涙液中の GSH, AsA, Alb の3成分に注目した。GSH は主涙腺からは分泌されないが<sup>2)</sup>、GSH を多量に含有する角膜および結膜は涙液に常に接しており、角結膜組織表面の物理的・生化学的、生理学的な変化によってその表面または内部から GSH が浸出し、その GSH 量が角結膜の障害性を反映する指標になると考えられた<sup>4)</sup>。また、AsA は主涙腺から僅かに分泌されているが、その濃度は低く血清濃度の約1/5で<sup>2)</sup>、角膜および結膜には多量の AsA が含有されていることから、AsA も GSH と同様に角結膜の障害性を反映する指標になると考えられた。また、涙液中の s-Alb の濃度は Lysozyme およびその他の涙液特異蛋白に比して著しく低いこと<sup>2)52)~54)</sup>、s-Alb は結膜には多量に含まれるが<sup>2)</sup>、角膜には存在しないことから、s-Alb もまた結膜の障害性を反映する指標になり得ると考えられた。以上の予測の元に本研究を行い、以下のような知見を得た。

角結膜組織の GSH, AsA の放出性は塩化ナトリウム濃度の影響をかなり受けるが、これは主として浸透圧が関与した物質の膜透過性の変化と考えられた。BSS®は生理食塩液よりもさらに生理的な塩溶液と考えられており、本研究においてもそれを裏付ける結果となった。従って、角結膜にとってより生理的な塩溶液を採求するには、結膜プール法または角膜円筒法を

適用することが推奨される。

薬剤の角結膜障害性を評価した従来の研究、すなわち、臨床的な検査<sup>6)13)27)29)55)~57)</sup>、組織化学的な検査<sup>30)</sup>、走査電顕による形態学的な検査<sup>33)~43)</sup>、培養細胞に対する毒性の検査<sup>46)~51)</sup>、涙液膜の安定性に及ぼす影響<sup>58)</sup>、角膜の物質透過性に及ぼす角膜障害度の影響<sup>59)</sup>、全身投与した薬物の結膜透過性に及ぼす影響<sup>60)</sup>などの研究で障害度が既に判明している薬剤の評価内容と、本研究の結膜プール法および角膜円筒法で示されたGSHならびにAsAの放出性を比較した結果、前者と後者は良好な一致を示した。従って、薬剤による角膜障害性の評価法として結膜プール法および角膜円筒法はその妥当性が明確に認められた。

BZC, HG, OXPのような細胞毒性の強い薬剤では、GSH, AsAの放出性と薬剤濃度に高い相関性が認められ、本法は障害度の評価に高い定量性を有することが判明した。酸およびアルカリについても同様に、その濃度とGSH, AsAの放出量に高い相関性が認められた。酸の種類による放出性の差異はpH、すなわち水素イオン濃度が強く関与している結果と考えられる。このことは竹田<sup>32)</sup>が組織化学的研究で角膜障害性を指摘している1%アスコルビン酸点眼液でも、本研究で示したようにアスコルビン酸のナトリウム塩ではGSH放出性が0.9%NaClに近似している事実と一致する。また、角膜透過性に及ぼすpHの影響についてMaurice<sup>61)</sup>、Conradら<sup>62)</sup>、Kellerら<sup>63)</sup>が示した実験結果とも一致している。また、GSH, AsAの放出量は薬液の接触時間に比例していることから、角結膜の障害度は薬液の濃度のみならず接触時間にも強い影響を受けることが確認された。

角膜円筒法は角膜のみに対する障害度の評価法であり、結膜プール法は角結膜全体に対する評価法であるが、一般的に前者と後者の結果に高い相関性を示す薬剤が多い。しかし、両者の結果の相関性が低い薬剤もある。従って、結膜の障害性を単独に調べるには、角膜をガラス円筒などで遮蔽して、薬液を結膜のみに接触させる方法が推奨される。

角膜円筒法および結膜プール法は共に薬剤による角結膜障害度の評価に高い再現性を有する方法であり、点眼薬およびその基剤、さらには種々の化学物質などの角結膜に対する障害性を簡便かつ迅速に判定し得る評価法である。しかも、従来の方法では判定し難い軽微な変化でも確実に評価できる特長を有している。

薬液点眼—メニスカス涙液法および薬液点眼—生食

液結膜プール法の結果はいずれも結膜プール法の結果と高い相関性を有しており、薬液の接触法は臨床で用いていると同じ点眼法であることから、動物またはヒトに対する点眼薬の安全性を確認する試験法として高い応用性があると考えられる。これらの2法はいずれも、人工的に障害を加えた角結膜の修復メカニズムを解明することやその修復を促進する治療薬の効果を経時的に評価する方法として有用性が高いと考えられる。また、薬液点眼—メニスカス涙液法の結果から、臨床的にヒト眼瞼縁メニスカス部よりガラス毛細管で採取した涙液中のGSH, AsA, s-Albの濃度を測定することによって、外傷または種々の疾患を有する角結膜組織の病態把握に有益な情報が得られる可能性が示唆される。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました窪田靖夫教授に深謝致します。

なお、本論文の要旨は、第90回日本眼科学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 開 繁義, 山田裕司, 中村泰久: 眼組織中の還元型グルタチオンの高速液体クロマトグラフィー (蛍光検出法)による定量法. あたらしい眼科 2: 294-298, 1985.
- 2) 石田俊郎, 開 繁義, 中村泰久: 涙液採取法に関する研究. 日眼 91: 473-480, 1987.
- 3) 開 繁義, 石田俊郎, 山田祐司他: 涙液グルタチオンの分析に関する研究. あたらしい眼科 2: 990-993, 1985.
- 4) 開 繁義, 石田俊郎, 山田祐司他: 薬物点眼による涙液グルタチオン濃度の変化. あたらしい眼科 3: 383-386, 1986.
- 5) 開 繁義, 山田祐司, 石田俊郎他: 高速液体クロマトグラフィーによる房水成分の分析 (第1報). 眼 35: 393-398, 1984.
- 6) 福井成行, 池本文彦: 点眼の眼刺激性に関する研究 (第1報). 各種物質の即時刺激性と連用による眼障害について. 現代の臨床 4: 277-289, 1970.
- 7) Leopold IH: Indication for the use and mords of administration of streptomycin. Amer J Ophthalmol 32: 583-584, 1949.
- 8) Locke JC: Experimental studies with antibiotics. Amer J Ophthalmol 32: 135-144, 1949.
- 9) Andrew R: Penetration of aureomycin into the eye. Arch Ophthalmol 42: 365-372, 1949.
- 10) Vogel AW, Leopold IH, Nichols A: Neomycin ocular-tissue tolerance and penetration when locally applied in the rabbit eye. Amer J Ophthalmol 34: 1357-1362, 1951.
- 11) 桐沢長徳, 徳田久弥, 福岡龍樹: 化学療法剤の眼組

- 織に対する障害について, 日眼 55: 392—398, 1951.
- 12) **Cannon EJ, Nichols AC, Leopold IH**: Studies on the intraocular penetration and toxicity of teramycin. *Arch Ophthalmol* 47: 344—349, 1952.
  - 13) **中山愛文**: 各種抗生物質の結膜, 角膜に及ぼす障害について, 第1報. 点眼による障害, 日眼 59: 4—22, 1955.
  - 14) **桐沢長徳**: ペニシリンの局所刺激性の数量的判定法について, 日眼 54: 72—74, 1950.
  - 15) **関口邦夫**: 眼治療剤の眼障害に関する研究, 第1編. 化学療法剤の研究, 日眼 59: 492—504, 1955.
  - 16) **von Sallmann L, Meyer K, Grandi JD**: Experimental study on penicillin treatment of ectogenous infection of vitreous. *Arch Ophthalmol* 32: 179—189, 1944.
  - 17) **Leopold IH, Wiley M, Dennis R**: Vitreous infection and streptomycin. *Amer J Ophthalmol* 30: 1345—1352, 1947.
  - 18) **山下喜一**: 抗生物質の眼内組織に与える障害について, 日眼 58: 1414—1437, 1954.
  - 19) **関口邦夫**: 眼治療剤の眼障害に関する研究, 第2編. 抗生物質による眼障害の組織学的研究, 日眼 63: 4163—4183, 1959.
  - 20) **Bellows JG, Farmer CJ**: Streptomycin in ophthalmology. *Amer J Ophthalmol* 30: 1215—1220, 1947.
  - 21) **Leopold IH, Nichols AC, Vogel AW**: Penetration of chloramphenicol into the eye. *Arch Ophthalmol* 44: 22—36, 1950.
  - 22) **Marr WG, Wood R, Storck M**: Effect of agents on regeneration of corneal epithelium. *Amer J Ophthalmol* 34: 609—612, 1951.
  - 23) **山敷 力**: 諸種抗生物質及び化学物質の結膜上皮細胞増殖能力に及ぼす影響, 日眼 56: 996—999, 1952.
  - 24) **山敷 力**: コーチゾンの角膜結膜上皮細胞増殖能力に及ぼす影響, 臨眼 7: 67—68, 1953.
  - 25) **Marr WG, Wood R, Grieves M**: Further studies on the effect of agents on regeneration of corneal epithelium. *Amer J Ophthalmol* 37: 544—548, 1954.
  - 26) **Draize JH**: in "Appraisal of safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics", Association of FDA Officials of US, 49, 1959.
  - 27) **中山愛文**: 各種抗生物質の結膜, 角膜に及ぼす障害について, 第2報. 円蓋部結膜下注射による障害, 日眼 59: 148—162, 1955.
  - 28) **杉浦清治, 酒井忠一**: 点眼薬に於ける防腐剤, 粘稠基剤の眼障害についての検討, 眼臨 62: 452—457, 1968.
  - 29) **高橋信夫**: 角膜 Temperature Reversal Effect に及ぼす薬剤の影響, 臨眼 25: 406—412, 1971.
  - 30) **谷脇琢磨**: 各種点眼用軟膏基剤の角膜組織に対する障害性について, その1 角膜組織のグリコーゲンについて, 日眼 69: 809—831, 1965.
  - 31) **岡村良一**: 副腎皮質ホルモン剤点眼後の家兎角膜糖質の組織化学的研究, 日眼 72: 946—955, 1968.
  - 32) **竹田卓哉**: 常用点眼剤の角膜障害性に関する組織化学的研究, 日眼 73: 928—947, 1969.
  - 33) **Gasset AR, Ishii Y, Kaufman HE et al**: Cytotoxicity of ophthalmic preservatives. *Amer J Ophthalmol* 78: 98—105, 1974.
  - 34) **高島玲子, 櫻山達夫, 三井幸彦**: Steroid と抗生物質点眼の家兎角膜に及ぼす影響: 走査型電子顕微鏡による研究, 日眼 79: 639—651, 1975.
  - 35) **Tønnum AM**: Effects of benzalkonium chloride upon the corneal epithelium studied with scanning electron microscopy. *Acta Ophthalmol* 53: 358—366, 1975.
  - 36) **Pfister RR, Burstein NL**: The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscopy study. *Invest Ophthalmol* 15: 246—259, 1976.
  - 37) **Burstein NL, Klyce SD**: Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. *Invest Ophthalmol* 16: 899—911, 1977.
  - 38) **佐々木研二, 赤木好男, 糸井素一**:  $\beta$ -遮断剤の点眼による家兎角膜上皮障害について, 走査型電子顕微鏡的観察, 眼紀 31: 867—871, 1980.
  - 39) **Brewitt H, Bonatz E, Honegger H**: Morphological changes of the corneal epithelium after application of topical anaesthetic ointments. *Ophthalmologica* Basel 180: 198—206, 1980.
  - 40) **Jan Dormans AMA, van Logten MJ**: The effects of ophthalmic preservatives on corneal epithelium of the rabbit: a scanning electron microscopical study. *Toxicol Appl Pharmacol* 62: 251—261, 1982.
  - 41) **小川剛史**: 走査電子顕微鏡による新しい各種点眼薬の毒性研究, 日眼 88: 1093—1106, 1984.
  - 42) **Collin HB**: Ultrastructural changes to corneal stromal cells due to ophthalmic preservatives. *Acta Ophthalmologica* 64: 72—78, 1986.
  - 43) **Collin HB, Carroll N**: Ultrastructural changes to the corneal endothelium due to benzalkonium chloride. *Acta Ophthalmologica* 64: 226—231, 1986.
  - 44) **西山澄夫**: 抗生物質, その他の薬物の結膜上皮細胞に及ぼす影響の組織培養法による研究, 日眼 62: 846—868, 1958.

- 45) 内田幸男：家兔角膜 Fibroblastic Cell 継代株の増殖に及ぼす薬剤の影響。日眼 64：1257-1266, 1960.
- 46) 徳田久弥, 岡村良一, 田中留志夫他：新しい化学療法剤の眼障害度。日眼 65：2030-2038, 1961.
- 47) 鈴木 宏：最近の各種薬物の眼障害度に関する研究。日眼 72：2460-2471, 1968.
- 48) 高橋信夫：培養細胞利用の薬剤毒性検定の試み。眼紀 28：1456-1462, 1977.
- 49) 高橋信夫：局所麻酔剤の細胞毒性。眼紀 29：1517-1524, 1978.
- 50) 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 84：1171-1176, 1980.
- 51) 高橋信夫：培養結膜上皮細胞に対する薬剤毒性。第2報。抗緑内障剤。日眼 85：1046-1052, 1981.
- 52) van Haeringen NJ：Clinical biochemistry of tears. Survey Ophthalmol 26：84-96, 1981.
- 53) Janssen PT, van Bijsterveld OP：Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins. Invest Ophthalmol 24：623-630, 1983.
- 54) 北野周作：Ocular surface—その生理と病態—。日眼 91：1-26, 1987.
- 55) 古谷智恵子：逆性石鹼の眼内に対する作用細菌。その1。実験的研究。眼紀 5：197-202, 1954.
- 56) 池田一三, 古味敏彦, 中路 博：逆性石鹼の眼科的応用。眼紀 6：222-224, 1955.
- 57) 中之 勝：各種抗かび剤の家兔結膜並びに角膜に及ぼす影響について。薬剤学 18：94-99, 1958.
- 58) Wilson WS, Duncan AJ, Jay JL：Effect of benzalkonium chloride on the stability of precorneal tear film in rabbit and man. Brit J Ophthalmol 59：667-669, 1975.
- 59) Burstein NL：Preservative alteration of corneal permeability in human and rabbits. Invest Ophthalmol 25：1453-1457, 1984.
- 60) Ishida T, Hiraki S, Nakamura Y：Topical anesthetic and its effect on the corneoconjunctival surface. Concepts Toxicol 4：121-125, 1987.
- 61) Maurice DM：Influence on corneal permeability of bathing with solutions of differing reaction and tonicity. Brit J Ophthalmol 39：463-473, 1955.
- 62) Conrad JM, Reay WA, Polcyn RE, et al：Influence of tonicity and pH on lacrimation and ocular drug bioavailability. J Parenteral Drug Assoc 32：149-161, 1978.
- 63) Keller N, Moore D, Carper D, et al：Increased corneal permeability induced by dual effects of transient tear film acidification and exposure to benzalkonium chloride. Exp Eye Res 30：203-210, 1980.

(第90回日眼総会原著)