

0.0015%タフルプロスト点眼液のベンザルコニウム塩化物濃度の最適化検討 —眼表面安全性と保存効力の視点から—

浅田博之,* 七條(高岡)優子, 中村雅胤, 木村章男

Optimization of Benzalkonium Chloride Concentration in 0.0015% Tafluprost Ophthalmic Solution from the Points of Ocular Surface Safety and Preservative Efficacy

Hiroyuki ASADA,* Yuko TAKAOKA-SHICHIJO, Masatsugu NAKAMURA, and Akio KIMURA

Research and Development Division, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.,
8916-16 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

(Received December 3, 2009; Accepted January 15, 2010)

Optimization of benzalkonium chloride (alkyl dimethylbenzylammonium chloride: BAK) concentration as preservative in 0.0015% tafluprost ophthalmic solution (Tapros® 0.0015% ophthalmic solution), an anti-glaucoma medicine, was examined from the points of ocular surface safety and preservative efficacy. BAKC₁₂, which is dodecyl dimethylbenzylammonium chloride, and BAKmix, which is the mixture of dodecyl, tetradecyl and hexadecyl dimethylbenzylammonium chloride were used in this study. The effects of BAKC₁₂ concentrations and the BAK types, BAKC₁₂ and BAKmix, in tafluprost ophthalmic solution on ocular surface safety were evaluated using the *in vitro* SV 40-immobilized human corneal epithelium cell line (HCE-T). Following treatments of Tafluprost ophthalmic solutions with BAKC₁₂, its concentration dependency was observed on cell viability of HCE-T. The cell viability of HCE-T after treatment of these solutions with 0.001% to 0.003% BAKC₁₂ for 5 minutes were the same level as that after treatment of the solution without BAK. Tafluprost ophthalmic solution with 0.01% BAKC₁₂ was safer for the ocular surface than the same solution with 0.01% BAKmix. Preservatives-effectiveness tests of tafluprost ophthalmic solutions with various concentrations of BAKC₁₂ were performed according to the Japanese Pharmacopoeia (JP), and solutions with more than 0.0005% BAKC₁₂ conformed to JP criteria. It was concluded that 0.0005% to 0.003% of BAKC₁₂ in tafluprost ophthalmic solution was optimal, namely, well-balanced from the points of ocular surface safety and preservative efficacy.

Key words—ocular surface safety; preservative efficacy; benzalkonium chloride; preservative; tafluprost; anti-glaucoma medicine

緒 言

点眼液中の防腐剤は、使用時に起こり得る二次汚染の防止のために配合されており、点眼液を安全に使用するためにも繰り返し使用される点眼液には必要不可欠である。ベンザルコニウム塩化物 (BAK) は点眼液に用いられる代表的な防腐剤であり、パラベン類やクロロブタノールなどの防腐剤に比べて、保存効力が高く、水溶性で化学的にも安定であり、扱い易いことから、点眼液の約7割で使用されている。¹⁾

一方、BAKは角膜上皮障害を引き起こす可能性があることも多く報告されており、^{2,3)}防腐剤として

BAKを配合する場合は、対象疾患、BAK配合濃度、点眼頻度(一日点眼回数)、治療期間などを考慮する必要がある。

緑内障は慢性疾患であり、治療には単剤で十分な効果が得られず、多剤併用される場合が多く、緑内障治療患者に、ドライアイ、眼瞼炎、点状表層角膜症などの眼表面(角膜・結膜)における変化が起きていることが報告されている。⁴⁻⁶⁾したがって、抗緑内障点眼液の防腐剤濃度を設定する際は、その保存効力と眼表面への安全性のバランスを考慮することが重要である。^{2,7)}

そこで、本研究では、抗緑内障点眼液であるタフルプロスト®点眼液0.0015%(タフルプロスト点眼液)の防腐剤濃度最適化を眼表面安全性及び保存効力の観点から検討したので報告する。

参天製薬株式会社研究開発本部

*e-mail: hiroyuki.asada@santen.co.jp

方 法

1. 点眼液の調製 タブロス®点眼液 0.0015% は、有効成分であるタフルプロストのほかにポリソルベート 80, リン酸二水素ナトリウム, エデト酸ナトリウム水和物, 濃グリセリン, pH 調節剤及び精製水を含み, 防腐剤として BAK を配合している。本研究では, 種々炭素鎖長のホモログの混合比が異なる BAKC₁₂ と BAKmix (Fig. 1) を用い, BAK 以外の組成はタブロス®点眼液 0.0015% と同濃度配合した点眼液を用いた。また, 培養ヒト角膜上皮細胞障害試験では, BAK 不含タフルプロスト点眼液, 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.005%, 0.01% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液及び 0.01% BAKmix 配合タフルプロスト点眼液を用い, 保存効力試験では, 0.0003%, 0.0005%, 0.001%, 0.002%, 0.003% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液を用いた。

2. 培養ヒト角膜上皮細胞障害性試験 SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T, RCB No. 2280: 理化学研究所より供与) は, 培養培地 [15% ウシ血清 (FBS), 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml human EGF, 40 µg/ml Gentamicin を含む DMEM/F-12] にて培養, 継代維持を行い, 細胞障害性試験に用いた。

HCE-T は, 75 cm² フラスコ内に播種し, サブコンフルエントにまで培養した。この細胞を 0.05% トリプシン-EDTA にて剥離し, 10% FBS-DMEM/F12 培地に回収した。回収した細胞を 96 穴プレートの各 well に 100 µl (1.0×10⁴/well) 播種し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。BAK 不含タフルプロスト点眼液, 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.005%, 0.01% の BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液及び 0.01% BAKmix 配合タフルプロスト点眼液 100 µl に置換し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 1 分, 3 分あるいは 5 分間処置した。その後, 各点眼液を 100 µl DMEM/F12 培地に置換し, MTS 試薬キット (Promega) の基質 20 µl を加え, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 2 時間作用させ, マイクロプレートリーダーにて 490 nm の吸光度を測定することにより細胞障害性 (生存率) を評価した。なお, 生存率は, 点眼液添加後の各処置時間における吸光度値を点眼液添加前における吸光度値によって除した結果の百分率値で表した。

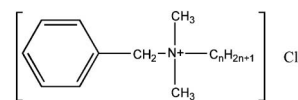


Fig. 1. Chemical Structure of Benzalkonium Chloride BAKC₁₂; (n=12), BAKmix; (mixture of n=12, 14, 16).

Table 1. Interpretation Criteria (Product Category IA) of Preservatives-effectiveness Tests in the 15th Edition of Japanese Pharmacopoeia

| Microorganisms | Interpretation criteria | |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| | After 14 days | After 28 days |
| Bacteria | 0.1% of inoculum count or less | Same or less than level after 14 days |
| Yeasts/Moulds | Same or less than inoculum count | Same or less than inoculum count |

3. 保存効力試験 日本薬局方 (第十五改正) 保存効力試験法に従い, 0.0003%, 0.0005%, 0.001%, 0.002%, 0.003% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液の保存効力試験を実施し, 点眼液に適応されるカテゴリ IA の基準 (Table 1) に従って評価した。細菌として, *Escherichia coli* (菌株 ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (菌株 ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (菌株 ATCC 6538), 真菌として, *Candida albicans* (菌株 ATCC 10231), *Aspergillus niger* (菌株 ATCC 16404) を試験に用いた。

結 果

1. ヒト角膜上皮細胞に及ぼす防腐剤の影響

Figure 2 に防腐剤として 0-0.01% BAKC₁₂ 及び 0.01% BAKmix を配合するタフルプロスト点眼液の処置による HCE-T の生存率に及ぼす影響を示す。BAK 不含タフルプロスト点眼液処置群では, 処置時間に依存して若干生存率の減少が認められるものの, 5 分間の処置でほとんど変化はなかった。0.001-0.003% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液処置群において, いずれの処置時間でも生存率は, BAK 不含タフルプロスト点眼液処置群とほぼ同程度であった。また, 0.005%, 0.01% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液及び 0.01% BAKmix 配合タフルプロスト点眼液処置群では, 処置 1 分後から 0-0.003% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液処置群に比して, 生存率は低値を示し, BAKC₁₂ の濃度及

び処置時間に依存して生存率は減少した。0.01% BAKC₁₂ と 0.01% BAKmix 配合タフルプロスト点眼液処置群の比較では、BAKmix 配合点眼液処置群の生存率の方が低値であった。処理 5 分までの生存率は、以下の順に高かった：BAK 不含タフルプロスト点眼液=0.001% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液=0.002% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点

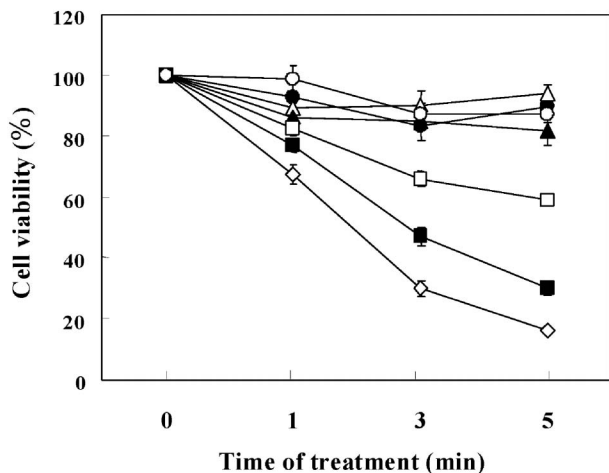


Fig. 2. Cell Viability of SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Using MTS Assay on the Treatment with Tafluprost Ophthalmic Solutions with Various Concentrations of BAK

Each value shows the mean±S.E. of triplicate. ○; BAK free, ●; 0.001% BAKC₁₂, △; 0.002% BAKC₁₂, ▲; 0.003% BAKC₁₂, □; 0.005% BAKC₁₂, ■; 0.01% BAKC₁₂, ◇; 0.01% BAKmix, containing tafluprost ophthalmic solutions.

眼液=0.003% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液 > 0.005% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液 > 0.01% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液 > 0.01% BAKmix 配合タフルプロスト点眼液.

2. 保存効力試験 Table 1 に日本薬局方 (第十五改正) 保存効力試験法のカテゴリー I A の判定基準 (日局基準) を示す。また、Table 2 に 0.0003-0.003% BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液の保存効力試験の結果を示す。

タフルプロスト点眼液中に接種された約 10⁵-10⁶ 個の菌数は、いずれの菌も経時的に減少し、BAKC₁₂ の濃度依存的な保存効力が確認された。0.0003% BAK 配合タフルプロスト点眼液では、*E. coli* に対する効果が日局基準を満たさなかったが、0.0005%以上の BAKC₁₂ 配合タフルプロスト点眼液ではいずれの菌に対しても十分な効果が認められ、日局基準を満たした。さらに、0.001%以上の BAKC₁₂ を配合したタフルプロスト点眼液においては、菌接種 14 日後の時点で、細菌が検出されず、真菌に関しては接種菌数の 5%以下の生菌数であった。

考 察

ベンザルコニウム塩化物 (BAK) の点眼液中の配合濃度は、0.005%又は 0.01%で配合されている

Table 2. Results of Anti-microorganism Preservatives-effectiveness Tests of 0.0015% Tafluprost Ophthalmic Solutions with Various Concentrations of BAKC₁₂

| | | 0.0015% Tafluprost ophthalmic solutions | | | | |
|-------------------------------|---------------|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 0.0003% BAKC ₁₂ | 0.0005% BAKC ₁₂ | 0.001% BAKC ₁₂ | 0.002% BAKC ₁₂ | 0.003% BAKC ₁₂ |
| Type of microorganism | Period | % of viable microorganism count to inoculum count | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | after 14 days | 1.1% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| | after 28 days | 0.1% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | after 14 days | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| | after 28 days | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | after 14 days | 0.1% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| | after 28 days | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>Candida albicans</i> | after 14 days | 20.7% | 9.5% | 0.5% | 0.0% | 0.0% |
| | after 28 days | 0.0% | 0.1% | 0.0% | 0.0% | 0.0% |
| <i>Aspergillus niger</i> | after 14 days | 28.2% | 41.8% | 4.1% | 0.1% | 0.0% |
| | after 28 days | 22.3% | 31.8% | 3.9% | 0.0% | 0.0% |

製品が多く、国内使用実績としては0.02%が最大濃度である。一般的に、点眼液の防腐剤濃度は、使用実績内である場合は、保存効力試験の結果にのみ基づいて濃度設定されることが多い。

BAKが眼表面に対して細胞障害性の可能性を有することは*in vitro*角膜及び結膜培養細胞等を用いた試験により数多く報告されているが、^{2,3)}実際の臨床使用上では、BAKに起因すると断定される重篤な副作用は少ない。しかしながら、複数の点眼液を長期間投与した緑内障治療患者においては、灼熱感、眼刺激、ドライアイ、流涙、かゆみなどの症状や、眼瞼炎、充血、点状表層角膜症といった眼表面における様々な兆候の発生率は高く、投与点眼液の数を減らすなど、BAK暴露量を低減することにより、これら眼表面での症候発現率が低減することが近年報告されている。^{4,5)}これら眼表面での症候は、緑内障治療のコンプライアンスにも影響し得ることから重大な問題と考えられる。

そこで、本研究では、抗緑内障点眼液であるタフルプロスト点眼液の防腐剤濃度の最適設定を目的とし、角膜上皮細胞の障害性に及ぼすBAK濃度の影響とBAK種の影響を検討し、さらに保存効力に及ぼすBAK濃度の影響を検討した。*In vitro*角膜上皮細胞に対する障害性は、種々試験条件で報告されているが、点眼されたBAKは通常5分後にはほぼ眼表面から消失することから、²⁾本研究では、角膜上皮細胞に種々濃度のBAK₁₂あるいは0.01% BAKmixを配合したタフルプロスト点眼液を1分、3分、5分間処置後の角膜上皮細胞の生存率を評価した。また、保存効力については、日本薬局方保存効力試験法の基準に基づき、BAK₁₂の最

小必要濃度を検討した。

その結果、角膜上皮細胞障害に対しては、BAK₁₂濃度依存性が確認され、0.003%以下のBAK₁₂を配合したタフルプロスト点眼液では、角膜上皮細胞に対する障害性はみられなかった。また、0.01% BAK₁₂配合タフルプロスト点眼液は0.01% BAKmix配合タフルプロスト点眼液に比べて障害性が少なく、既に報告されている結果と一致した。⁸⁾

保存効力についても、BAK₁₂濃度依存性が確認され、0.0005%以上のBAK₁₂を配合することにより日本薬局方保存効力試験法の基準を満たすことが判明した。

これら細胞障害性試験及び保存効力試験の結果から、タフルプロスト点眼液のBAK₁₂濃度としては、0.0005-0.003%の範囲で配合することが望ましいことが示唆された (Fig. 3)。

緑内障治療薬は1980年代以降チモロールマレイン酸塩を始めとするβ遮断薬が主流であったが、1990年後半以降は、種々メカニズムの眼圧下降点眼液が発売されている。⁹⁾その中でも眼圧下降作用が非常に強いプロスタグランジン誘導体においては数社から発売されており、タプロス®点眼液0.0015%については、日本人に多い正常眼圧緑内障にも効果を有することが臨床的に証明される^{10,11)}など、効果、副作用面での緑内障治療薬の選択の幅が広がっている。このような状況の中で、防腐剤の功罪、すなわち防腐剤の安全性と有効性の“well balance”を考慮して眼に優しい点眼液を設計することは、より緑内障治療薬の選択の幅を広げることになり、コンプライアンス向上、さらにはQuality of Vision

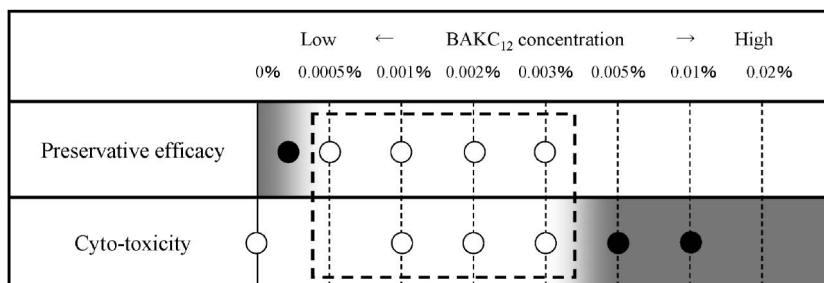


Fig. 3. Optimization of BAK₁₂ Concentration from the Point of Cyto-toxicity and Preservative Efficacy

○; Conformed to criteria of preservatives-effectiveness tests of Japanese Pharmacopoeia (JP) in preservative efficacy column and not influenced on cell viability for 5 minutes treatment in cyto-toxicity column, ●; Not conformed to JP criteria of preservatives-effectiveness tests in preservative efficacy column and influenced on cell viability for 5 minutes treatment in cyto-toxicity column, [---]; BAK concentration range within the dotted line box is optimum from the point of cyto-toxicity and preservative efficacy.

の改善につながることを期待される。

REFERENCES

- 1) Whitson J. T., Varner D. L., Netland P. A., *Rev. Ophthalmol.*, **11**, 69–77 (2006).
- 2) Nakamura M., Yamashita T., Nishida T., Otori T., *J. Jpn. C.L. Soc.*, **35**, 238–241 (1993).
- 3) De Saint Jean M., Brignole F., Bringuier A. F., Bauchet A., Feldmann G., Baudouin C., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 619–630 (1999).
- 4) Pisella P. J., Pouliquen P., Baudouin C., *Br. J. Ophthalmol.*, **86**, 418–423 (2002).
- 5) Jaenen N., Baudouin C., Pouliquen P., Manni G., Figueiredo A., Zeyen T., *Eur. J. Ophthalmol.*, **17**, 341–349 (2007).
- 6) Leung E. W., Medeiros F. A., Weinreb R. N., *J. Glaucoma*, **17**, 350–355 (2008).
- 7) Kamei Y., Fujisawa S., Tetsuka S., Miyanaga Y., Todome Y., Ohkuni H., *J. Jpn. C.L. Soc.*, **35**, 231–237 (1993).
- 8) Erhart M., Zilliox P., Burlet G. L. D., Andermann G., *Concepts Toxicol.*, **4**, 145–151 (1987).
- 9) Sawaguchi S., *Atarashii Ganka*, **25**, 297–302 (2008).
- 10) Tabuchi H., *Clinic Magazine*, **36**, 26–28 (2009).
- 11) Kawamura A., *Nihon Byouin Yakuzai-shikai Zasshi*, **45**, 552–553 (2009).