

不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) を用いた緑内障治療配合剤の
in vitro 角膜細胞傷害性評価

長井紀章,^a 村尾卓俊,^a 大江恭平,^a 伊藤吉将,^{*,a,b} 岡本紀夫,^c 下村嘉一^c

An *In Vitro* Evaluation for Corneal Damages by Anti-glaucoma Combination
Eye Drops Using Human Corneal Epithelial Cell (HCE-T)

Noriaki NAGAI,^a Takatoshi MURAO,^a Kyouhei OE,^a Yoshimasa ITO,^{*,a,b}

Norio OKAMOTO,^c and Yoshikazu SHIMOMURA^c

^aSchool of Pharmacy, ^bPharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University,
3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan, and ^cDepartment of
Ophthalmology, Kinki University School of Medicine, 377-2 Ohno
Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan

(Received January 22, 2011; Accepted March 22, 2011; Published online March 28, 2011)

The combination of anti-glaucoma eye drops is frequently used in clinical treatment, and it is known that the combination can cause corneal damage. Recently, an anti-glaucoma combination eye drops is developed, and the treatment by the combination eye drops is expected to enhance quality of life. However, effects of the combination eye drops on corneal epithelial cell damage have not been clarified. In this study, we investigated the corneal epithelial cell damage of commercially available anti-glaucoma combination eye drops, such as Xalacom[®] (latanoprost/timolol maleate combination eye drops), Duotrav[®] (travoprost/timolol maleate combination eye drops) and Cosopt[®] (dorzolamide hydrochloride/timolol maleate combination eye drops) using the human corneal epithelial cell (HCE-T). The cytotoxicity in Xalacom[®] was higher than that in Xalatan[®] (eye drops containing latanoprost) and Timoptol[®] (eye drops containing timolol maleate), and the benzalkonium chloride (BAC) and timolol maleate were related to cytotoxicity in Xalacom[®]. The cytotoxicity in Duotrav[®] and Cosopt[®] was lower than that in Timoptol[®]. The Duotrav[®] is preserved with a non-BAC system (POLYQUAD, polidronium chloride). Therefore, it was suggested that the POLYQUAD related to the low cytotoxicity in Duotrav[®]. On the other hand, the D-mannitol reduced the cytotoxicity by BAC in this study. This result suggested that the cytotoxicity in Cosopt[®] was reduced by D-mannitol. The Duotrav[®] and Cosopt[®] may be less damaging to the ocular surface of glaucoma patients receiving long-term eye drop therapy in compared with the combination of anti-glaucoma eye drops.

Key words—Duotrav[®]; Cosopt[®]; Xalacom[®]; D-mannitol; corneal epithelial cell

緒 言

緑内障は失明を伴う眼疾患であり、その要因には眼圧とそれ以外の因子（循環障害など）が考えられている。臨床においては、緑内障治療薬による薬物治療が第一選択となるが、眼圧コントロールが困難な患者に対しては作用機序の異なる複数の緑内障治療薬が追加される。しかし、緑内障治療薬の多剤併用は点眼表層角膜症や眼瞼炎といった眼局所の副作用や、患者からのしみる、かすむ、眼が充血すると

いった訴えを増加させるとともに、患者のコンプライアンス低下につながる。これらの問題を改善すべく、近年ではラタノプロスト・チモロールマレイン酸塩配合点眼薬であるザラカム[®]やトラポプロスト・チモロールマレイン酸塩配合点眼薬であるデュオトラバ[®]等が市販され、これら配合点眼薬が Quality of Life (QOL) の高い治療法へつながるものとして注目されている。

緑内障治療薬の角膜障害は、点眼薬中に含まれる主薬、添加剤、保存剤だけでなく、角膜知覚、涙液動態及び結膜といったオキュラーサーフェス（眼表面）の状態が関与することが明らかとされ、臨床 (*in vivo*) 及び基礎 (*in vitro*) 両面からの観察が重

^a近畿大学薬学部製剤学研究室, ^b同薬学総合研究所,
^c近畿大学医学部眼科学教室

*e-mail: itoyoshi@phar.kindai.ac.jp

要であることが報告されている。¹⁾しかし、近年販売された配合点眼薬の *in vitro* 角膜上皮細胞傷害性評価についての報告は十分にはなされていない。筆者らはこれまで、角膜上皮細胞を用いた点眼薬処理時の細胞増殖抑制率を求め、点眼薬の角膜傷害性の評価を行ってきた。²⁾また、緑内障治療薬による不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) 傷害作用が、正常ヒト角膜上皮細胞に非常に類似し、さらに細胞増殖性、感受性にばらつきが少なく、HCE-T が正常ヒト角膜上皮細胞の代わりに *in vitro* 角膜傷害性評価に使用できることを報告している。²⁾一方、この方法は角膜細胞増殖の抑制からその傷害性を表す間接的なものであるため、点眼薬処理時の角膜上皮細胞の生存率を測定する方が臨床での使用状況に近く、より意義ある方法と考えられた。今回、この HCE-T を用い、現在臨床現場で多用されている緑内障治療薬・配合点眼薬ザラカム[®]、デュオトラバ[®]及びコソプト[®]処理時の細胞生存率を測定することで、*in vitro* 角膜上皮細胞傷害性評価を行った。

実験方法

1. 使用細胞 培養細胞は理化学研究所より供与された不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T, RCB No. 1384) を用い、100 IU/ml ペニシリン (GIBCO 社製)、100 µg/ml ストレプトマイシン (GIBCO 社製) 及び 5.0% ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO 社製) を含む DMEM/F12 培地 (GIBCO 社製) にて培養した。

2. 使用薬物 緑内障治療薬は市販製剤である 0.5% チモプトール[®] (主薬 チモロールマレイン酸塩)、0.005% キサラタン[®] (主薬 ラタノプロスト)、1% トルソプト[®] (主薬 ドルゾラミド塩酸塩) 及びこれらの主薬を含む配合点眼薬ザラカム[®] (主薬 ラタノプロスト及びチモロールマレイン酸塩)、デュオトラバ[®] (主薬 トラボプロスト及びチモロールマレイン酸塩)、コソプト[®] (主薬 ドルゾラミド塩酸塩及びチモロールマレイン酸塩) の 6 剤を用いた。ベンザルコニウム塩化物 (BAC) は関東化学株式会社、チモロールマレイン酸塩は SIGMA から購入したものをを用いた。また、BAC、チモロールマレイン酸塩の溶解には生理食塩水を用い、pH 7.0 で等張のものを 0.005, 0.02% BAC 及び 0.5% チモロールマレイン酸点眼溶液としてそれぞれ使用した。

Table 1. Additives in Anti-glaucoma Eye Drops Used in This Study

Anti-glaucoma eye drops	Additives
Xalacom [®]	BAC, Disodium hydrogen phosphate anhydrous, Sodium dihydrogen phosphate hydrate, Isotonic agent
Duotrav [®]	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil 40, propylene glycol, Boric acid, D-mannitol, Sodium chloride, Polidronium chloride, pH adjusting agent
Cosopt [®]	BAC, Hydroxyethyl cellulose, Sodium citrate hydrate, D-mannitol, Sodium hydroxide
Xalatan [®]	BAC, Sodium dihydrogen phosphate, Isotonic agent, Disodium hydrogen phosphate
Travatanz [®]	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil 40, Propylene glycol, Boric acid, D-sorbitol, Zinc chloride, pH adjusting agent
Timoptol [®]	BAC, Sodium dihydrogen phosphate, Disodium hydrogen phosphate, Sodium hydroxide
Trusopt [®]	BAC, Hydroxyethyl cellulose, D-mannitol, Sodium citrate, Hydrochloric acid

Table 1 には本研究で用いた各種緑内障治療薬に含まれる添加物を示す。

3. 緑内障治療薬による細胞処理法 HCE-T (50×10⁴ 個) をフラスコ (75 cm²) 内に播種し、80% コンフルーエンスとなるまで培養した。^{3,4)} この細胞を、0.05% トリプシンにて剥離し、細胞数を計測後、96 well プレートに 100 µl (1×10⁴ 個) ずつ播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養したものを実験に用いた。実際の操作法として、HCE-T 細胞を 10–120 秒薬剤にて処理後、PBS にて 2 回洗浄し、各 well に 100 µl の培地及び TetraColor ONE (生化学社製) 20 µl を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 1 時間処理後、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社製) にて 490 nm の吸光度 (Abs) を測定した。本実験における細胞傷害性は TetraColor ONE を用い、テトラゾリウム塩が生細胞内ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼにより生産されたホルマザンを測定することで表した。本研究では、薬剤処理後の細胞生存率 (%) を下記の計算式により算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \text{Abs}_{\text{薬剤処理}} / \text{Abs}_{\text{未処理}} \times 100$$

4. 統計学的処理 実験結果は平均値±標準誤差 (S.E.) で表した。有意差検定は JAM Ver.5.1

(日本 SAS 協会) コンピュータプログラムを用いて行った。各々の実験値は単群比較においては Student の *t*-test を用い、多群間比較においては Dunnett の多群間比較により解析した。また、本研究では *p* 値が 0.05 以下を有意差ありとした。

結 果

1. 緑内障治療剤・配合点眼液ザラカム®による角膜上皮細胞傷害性 Figure 1 にはキサラタン®, チモプトール®及びこれら 2 種の主薬を有する配合点眼薬であるザラカム®処理における角膜上皮細胞傷害性を示す。いずれの処理群においても処理時間の増加とともに細胞生存率の低下が認められた。キサラタン®処理群において、30 秒処理後の細胞生存率は 11.3%であった。チモプトール®処理群では 30 秒処理において 82.0%の細胞が生存しており、キサラタン®と比較しその細胞傷害性は低かった。一方、ザラカム®処理群では、30 秒処理後の細胞生存率は 0%であり、キサラタン®やチモプトール®と比較しその細胞傷害性は高かった。Figure 2 にはキサラタン®及びザラカム®中に含まれる保存剤 0.02% BAC 及びチモプトール®中に含まれる保存剤 0.005% BAC の角膜上皮細胞傷害性を示す。BAC 濃度の増加によりその細胞傷害性の増加がみられた。0.02% BAC 処理群では 10 秒処理によりその生存率は 22.8%, 20 秒処理後の細胞の生存は全く認めず、その角膜上皮細胞傷害性は、0.02% BAC を含有するキサラタン®やザラカム®のそれと比較し高いものであった。Figure 3 にはチモプトール®とその主薬であるチモロールマレイン酸塩及び保存剤である 0.005% BAC の角膜上皮細胞傷害性

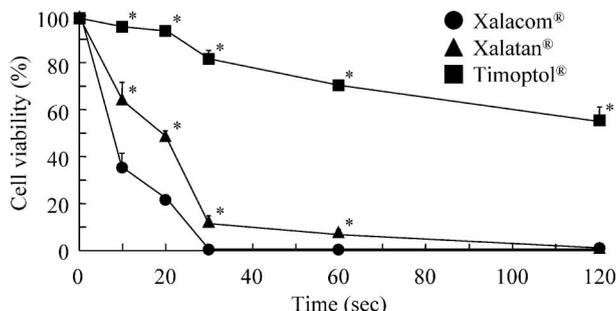


Fig. 1. Comparison of Corneal Epithelial Cell Damage by Treatment with Xalacom®, Xalatan® and Timoptol®. The data are presented as means ± S.E. of 3-5 experiments. **p* < 0.05 vs. Xalacom®.

を示す。120 秒処理において、チモロールマレイン酸塩処理群では 87.8%, 0.005% BAC 処理群では 70.5%の細胞生存率であった。チモプトール®処理群における 120 秒処理後の細胞生存率は 55.9%であり、チモプトール®処理における角膜上皮細胞の消失は、主薬であるチモロールマレイン酸塩と保存剤である 0.005% BAC 処理時の細胞消失の総和と同程度であった。

2. 緑内障治療剤・配合点眼液デュオトラバ®による角膜上皮細胞傷害性 Figure 4 にはトラバタンズ®, チモプトール®及びこれら 2 種の主薬を有する配合点眼薬デュオトラバ®処理における角膜上皮細胞傷害性を示す。トラバタンズ®処理群ではほとんど細胞傷害が認められず、120 秒処理後の細胞生存率は 98.4%であった。チモプトール®120 秒処理時の細胞生存率は 55.9%であったが、デュオトラバ®120 秒処理時の細胞生存率は 85.1%であり、チ

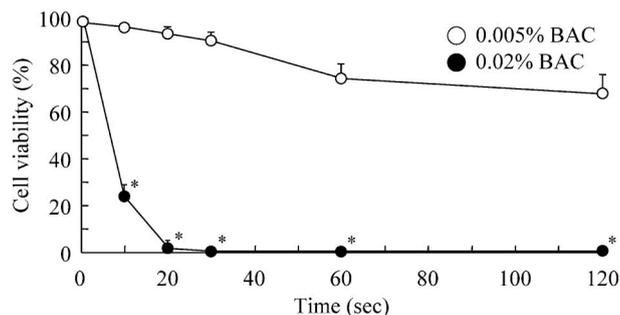


Fig. 2. Comparison of Corneal Epithelial Cell Damage by Treatment with BAC Solution. The data are presented as means ± S.E. of 5-8 experiments. **p* < 0.05 vs. 0.02% BAC solution.

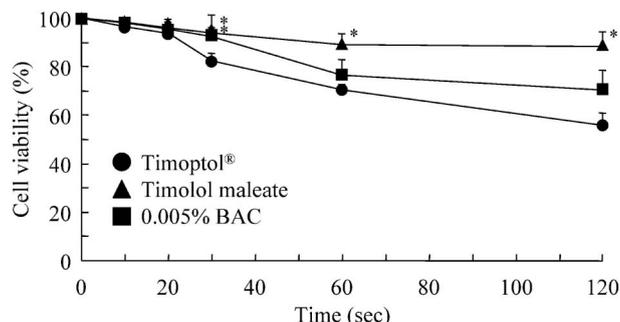


Fig. 3. Comparison of Corneal Epithelial Cell Damage by Treatment with Timoptol®, Timolol Maleate and BAC Solution. The data are presented as means ± S.E. of 3-8 experiments. **p* < 0.05 vs. Timoptol®.

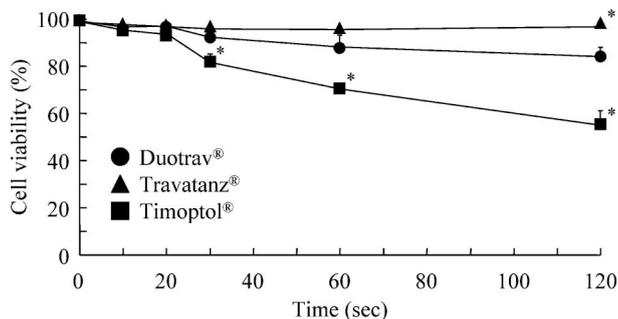


Fig. 4. Comparison of Corneal Epithelial Cell Damage by Treatment with Duotrav®, Travatanz® and Timoptol®
The data are presented as means ± S.E. of 3-5 experiments. * $p < 0.05$ vs. Duotrav®.

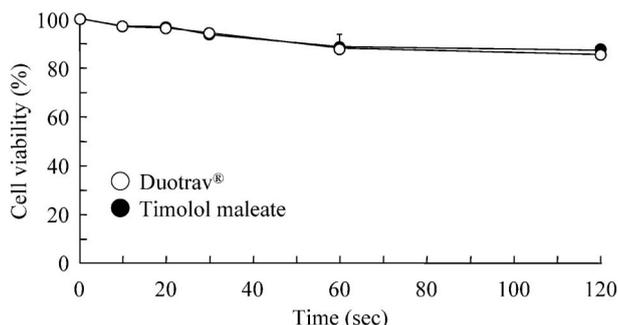


Fig. 5. Comparison of Corneal Epithelial Cell Damage by Treatment with Duotrav® and Timolol Maleate Solution
The data are presented as means ± S.E. of 4-5 experiments.

モプトール®処理群と比較し、その角膜傷害性は低かった。このデュオトラバ®処理群の細胞傷害性は、チモロールマレイン酸塩処理群と同程度であった (Fig. 5)。

3. 緑内障治療剤・配合点眼液コソプト®による角膜上皮細胞傷害性 Figure 6 にはトルソプト®, チモプトール®及びこれら 2 種の主薬を有する配合点眼薬コソプト®処理における角膜上皮細胞傷害性を示す。トルソプト®処理群の 120 秒処理後の細胞生存率は 86.1%であり、チモプトール®処理群では 55.9%であった。一方、コソプト®120 秒処理時の細胞生存率は 74.1%であり、チモプトール®処理群と比較し、その角膜傷害性は低かった。Figure 7 にはコソプト®中に含まれる D-マンニトールが BAC にて処理を施した角膜上皮細胞生存率へ与える影響について示す。120 秒処理において 0.005% BAC 処理群では 70.5%の細胞生存率であったが、0.5% D-マンニトールを 0.005% BAC に含有することで、この細胞傷害は軽減され、120 秒処理後におい

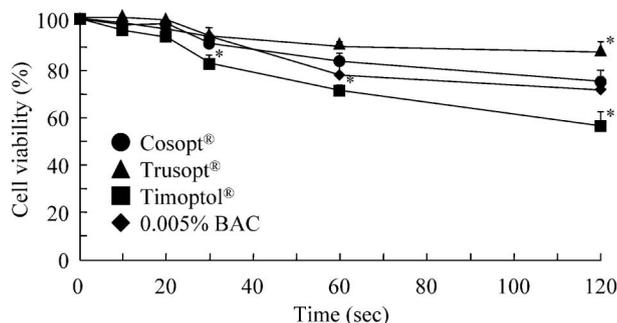


Fig. 6. Comparison of Corneal Epithelial Cell Damage by Treatment with Cosopt®, Trusopt® and Timoptol®
The data are presented as means ± S.E. of 3-8 experiments. * $p < 0.05$ vs. Cosopt®.

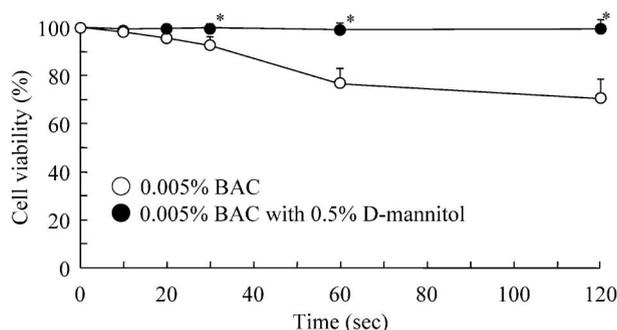


Fig. 7. Effect of D-mannitol on BAC Cytotoxicity in Corneal Epithelial Cell
The data are presented as means ± S.E. of 5-8 experiments. * $p < 0.05$ vs. 0.005% BAC solution.

てもほとんど細胞傷害性はみられなかった。

考 察

角膜上皮は 5-6 層の細胞層から構成され、基底細胞と表層細胞に大きく分けられる。このうち基底細胞は分裂増殖機能と接着機能を、表層細胞はバリア機能及び涙液保持機能を担っている。この 4 つの機能のどれか 1 つでも破綻した際角膜上皮障害が認められるが、中でも薬剤の影響を特に受け易いとされているのがバリア機能と分裂機能である。⁵⁾ 今回用いた不死化ヒト培養角膜細胞 HCE-T による *in vitro* 角膜実験は、個体差やオキュラーサーフェスの状態の要因をすべて同一条件の状態で評価することが可能なため、薬剤自身が有する角膜上皮細胞傷害性を検討するのに適している。本研究では、この HCE-T を用い、同一条件下における緑内障治療配合点眼薬の角膜上皮細胞傷害性を検討すべく、現在臨床現場で多用されている緑内障治療剤・配合点眼

液ザラカム[®]、デュオトラバ[®]及びコソプト[®]3種の *in vitro* 角膜上皮細胞傷害性評価を行った。

In vitro 角膜上皮細胞傷害性評価を行う上で点眼薬処理時間の設定は重要である。*In vivo* では一般的に点眼液は点眼後涙液により 1/5 まで希釈され、その後涙液として鼻涙管から排出されることが知られている。⁶⁾ このように、*in vivo* では薬剤が長時間角膜に滞留しないことから、本実験のような *in vitro* 実験系では臨床 (*in vivo*) よりも短時間で強い傷害性が認められる。したがって、本研究では点眼薬処理開始後 120 秒を目安に実験を行い、点眼薬自身の角膜上皮細胞への障害性評価を行った。ザラカム[®]配合点眼液（主薬 ラタノプロスト及びチモロールマレイン酸塩）では、それぞれを主薬とするキサラタン[®]、チモプトール[®]と比較し高い角膜上皮細胞傷害性を示した (Fig. 1)。点眼薬には品質の劣化を防ぐ目的で保存剤が添加されており、薬剤性角膜傷害には主薬のみでなくこの保存剤が強く関与する。⁷⁾ 今回用いたザラカム[®]、キサラタン[®]及びチモプトール[®]いずれにおいても保存剤として BAC が用いられており、その濃度はザラカム[®]、キサラタン[®]では 0.02%、チモプトール[®]では 0.005% であった。したがって、ザラカム[®]の高い細胞傷害性は 0.02% という高い BAC 濃度と主薬であるラタノプロスト及びチモロールマレイン酸塩に起因するものと考えられた。そこで、これら高い細胞傷害性が 0.02% BAC に起因することを明らかにすべく、0.005% 及び 0.02% BAC にて処理した際の細胞傷害性について検討を行った。その結果、0.005、0.02% BAC ともに細胞傷害が認められ、0.02% BAC 処理群の細胞傷害性は 0.005% BAC 処理群と比較し有意に高値を示した (Fig. 2)。さらに、この 0.02% BAC の細胞傷害性は同濃度の 0.02% BAC を含有するキサラタン[®]やザラカム[®]よりも高値であった (Figs. 1 and 2)。Guenoun らは結膜細胞を用い、プロスタグランジン分子が BAC による細胞障害の抑制効果を有していることを報告している。⁸⁻¹⁰⁾ したがって、本実験においてもラタノプロストが BAC の細胞傷害を抑制しているものと示唆された。ザラカム[®]においてもラタノプロストを含有していることから、BAC による傷害性は軽減されているものと考えられる。このためザラカム[®]がキサラタン[®]より高い細胞傷害性を有する原因とし

てラタノプロスト及び BAC 以外の因子が考えられた。そこで、チモプトール[®]及びチモプトール[®]の主薬であるチモロールマレイン酸塩、保存剤 0.005% BAC の細胞障害性を検討したところ、チモプトール[®]の細胞傷害性はチモロールマレイン酸塩と 0.005% BAC の細胞傷害性の総和として表れた (Fig. 3)。これらの結果から、ザラカム[®]が同濃度の BAC を含有するキサラタン[®]より高い角膜上皮細胞傷害性を示す要因にこのチモロールマレイン酸塩が係わるものと考えられた。

次にデュオトラバ[®]配合点眼液（主薬 トラボプロスト及びチモロールマレイン酸塩）の角膜上皮細胞傷害性について検討を行った。トラボプロストを主薬とするトラバタンズ[®]は 120 秒処理でもほとんど細胞傷害性が認められなかった。デュオトラバ[®]はトラバタンズ[®]よりも高い細胞傷害性を示したが、チモプトール[®]と比較しその細胞傷害性は有意に低く、刺激性の低い配合薬であることが明らかとなった (Fig. 4)。デュオトラバ[®]やトラバタンズ[®]は BAC 非含有製剤であり、日本アルコン株式会社が特許を有するポリクオッド（塩化ポリドロニウム）及び Sofzia（塩化亜鉛、ホウ酸を含むソルビトール緩衝剤保存システム）をそれぞれ保存剤として使用している。これら保存剤は BAC の高い角膜上皮細胞傷害性を避けるために考案されたものであり、デュオトラバ[®]やトラバタンズ[®]の細胞傷害性がチモプトール[®]のそれより低い主たる理由として、保存剤の違いが関与するものと考えられた。また、デュオトラバ[®]とチモロールマレイン酸塩の角膜上皮傷害性が同程度であったことから (Fig. 5)、デュオトラバ[®]の細胞傷害性はポリクオッドよりも、主薬であるチモロールマレイン酸塩に起因するものであり、デュオトラバ[®]中のポリクオッド濃度は非公開であるが、その角膜上皮傷害性はわずかであることが示唆された。

一方、コソプト[®]（主薬 ドルゾラミド塩酸塩及びチモロールマレイン酸塩）は、チモプトール[®]と比較し角膜上皮細胞への影響は少なく低刺激性であった (Fig. 6)。コソプト[®]、トルソプト[®]及びチモプトール[®]もまた保存剤として BAC が用いられており、トルソプト[®]及びチモプトール[®]中の BAC 濃度は 0.005% である。また国内で市販されているコソプト[®]の含有 BAC 濃度は非公開だが、海外で市販

されているコソプト®含有 BAC 濃度は 0.0075% である。今回の結果から、コソプト®及びトルソプト®の細胞傷害性が 0.005% BAC のそれよりも低かったため、コソプト®及びトルソプト®中の主薬又は添加物が BAC の細胞傷害性を軽減する可能性が示唆された。そこでまず、両者の主薬であるドルゾラミド塩酸塩と保存剤 BAC の混合溶液を用い、その細胞傷害性を検討したところ、1%ドルゾラミド塩酸塩と 0.005% BAC の混合溶液の細胞傷害性は、0.005% BAC のそれより高かった (BAC 処理群 70.5±7.0; 0.005% BAC 含有ドルゾラミド塩酸塩処理群 61.4±6.1, %, mean±S.E., n=4, 120 秒処理)。この結果から、これらの成分の混合は細胞傷害性を相加的に増加するものと考えられた。そこで次に、両者に含まれる添加物 D-マンニトールに着目し、D-マンニトールが BAC にて処理した際の細胞傷害性に与える影響について検討を行った。その結果、D-マンニトールの添加は BAC の細胞傷害性を軽減する効果を示した (Fig. 7)。したがって、コソプト®及びトルソプト®でその細胞傷害性が低いのは添加物である D-マンニトールが係わっており、コソプト®ではチモプトールマレイン酸塩を含有するトルソプト®より細胞傷害性が高いことが明らかとなった。D-マンニトールには強い角膜細胞増殖作用や接着作用効果はみられないため (Data not shown), D-マンニトールは BAC 自身の毒性を軽減しているものと考えられる。BAC の角膜傷害性は界面活性作用により細胞膜の浸透性を高め、膜破壊、細胞質の変性を起こすことに由来するため^{11,12)} 今後 BAC と D-マンニトール併用時におけるこれら薬物浸透性、膜破壊、細胞質の変性について検討を行っていく予定である。

以上、本研究では同一条件下において、ザラカム®, デュオトラバ®及びコソプト®配合点眼液の薬剤自身が有する角膜上皮細胞傷害性の強さ及びその細胞傷害性の要因を明らかとした。今回の結果から、ザラカム®配合点眼液の角膜上皮細胞傷害性は従来の 2 単剤併用時のそれと比較し同程度若しくはそれ以下であることが示され、ザラカム®配合点眼液は患者のコンプライアンス向上に優れた効果を発揮するものと考えられた。また、デュオトラバ®及びコソプト®配合点眼液は従来の 2 単剤併用時より角膜上皮細胞傷害性が低いため、長期に渡り緑内障

治療薬を使用する患者にとって非常に有効な点眼薬となり得ることを明らかとした。一方、これら角膜上皮細胞傷害性は、臨床においては涙液能低下等の他の作用により相乗的に角膜上皮細胞障害を引き起こすと考えられることから¹³⁾ 今回の *in vitro* の結果を基盤とした臨床結果のさらなる解析を行うことで、緑内障患者に対する薬剤の決定がより容易になるものと考えられた。これらの報告は今後の点眼薬開発及び緑内障治療薬投与時における薬物選択を決定する上で 1 つの指標になるものと考えられた。

REFERENCES

- 1) Tokuda N., Aoyama Y., Inoue J., Ueno S., *St. Marianna Medical Journal*, **32**, 339-356 (2004).
- 2) Nagai N., Ito Y., Okamoto N., Kawakami Y., *Journal of the Eye*, **25**, 553-556 (2008).
- 3) Toropainen E., Ranta V. P., Talvitie A., Suhonen P., Urtti A., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 2942-2948 (2001).
- 4) Taliana L., Evans M. D., Dimitrijevic S. D., Steele J. G., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 81-89 (2001).
- 5) Toshino A., Okamoto S., Shimamura I., Miyamoto H., Hara Y., Kojima T., Ohashi Y., *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, **102**, 101-105 (1998).
- 6) Goto H., Yoshikawa K., Yamada M., Iino M., "Ganka-Kaigyoi notameno Gimon Nanmon Kaiketushaku," Shindan to Chiryosha Tokyo, 2006, pp. 216-217.
- 7) Nagai N., Murao T., Okamoto N., Ito Y., *J. Oleo Sci.*, **59**, 135-141 (2010).
- 8) Pisella P. J., Debbasch C., Hamard P., Creuzot-Garcher C., Rat P., Briqnole F., Baudouin C., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 1360-1368 (2004).
- 9) Guenoun J. M., Baudouin C., Rat P., Pauly A., Warnet J. M., Briqnole-Baudouin F., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 2444-2450 (2005).
- 10) Guenoun J. M., Baudouin C., Rat P., Pauly A., Briqnole-Baudouin F., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 4594-4599 (2005).
- 11) Kawashima Y., *Practical Ophthalmology*, **42**, 86-87 (1999).
- 12) De Saint Jean M., Brignole F., Bringuier A.

F., Bauchet A., Feldmann G., Baudouin C.,
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **40**, 619–630
(1999).

13) Ohtsuki Y., Yokoi N., Mori K., Matsumoto

Y., Adachi W., Ishibashi K., Sato M.,
Kinoshita S., *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*,
105, 149–154 (2001).