

点眼薬における防腐剤無配合組成は 角膜に影響を与えにくいことをモデル実験で初めて確認

ライオン株式会社（代表取締役社長・掬川 正純）は、点眼薬において独自の防腐剤無配合組成を開発してきました。この度、防腐剤無配合組成が、防腐剤配合組成に比べ、角膜の表面にある角膜上皮細胞に対する悪影響を与えにくいことを初めて確認しました。本成果は、第39回日本眼薬理学会（2019年9月14日、愛知県名古屋市）で発表し、医学雑誌に論文を投稿中です。

■研究の背景

点眼薬には、開封後に微生物が繁殖することを抑えるために、多くの場合、防腐剤が配合されています。防腐剤を配合しても、用法用量を守って使用する範囲では、目に悪影響を及ぼさないとされていますが、緑内障の患者^{※1}、ドライアイやアレルギー性結膜炎の患者^{※2}、ソフトコンタクトレンズ装用時^{※3}などの場合は、防腐剤による角膜上皮への影響が懸念されています。

これまで当社は、トロメタモール（緩衝剤）、ホウ酸（緩衝剤）、エデト酸ナトリウム（安定化剤）を組み合わせることで、防腐剤を配合せずに、点眼薬に必要な防腐力を付与する組成（TBE組成）を開発してきました^{※4}。

そこで、当社が開発した防腐剤無配合組成の角膜上皮細胞への影響を、代表的な防腐剤である塩化ベンザルコニウムの溶液と比較しました。

※1 IOVS, 2012, 53(9), 5154-60

※2 Prog Retin Eye Res., 2010, 29(4), 312-34

※3 Arch Ophthalmol., 1990, 108(2), 244-6

※4 あたらしい眼科, 2010, 27(4), 518-22

■研究結果

＜実験概要＞

TBE組成の角膜上皮細胞への影響の有無について、3つの点から塩化ベンザルコニウム（BAK）溶液と比較しました。

【試験製剤】・TBE組成：トロメタモール 0.1%、ホウ酸 1%、エデト酸ナトリウム 0.1%

・塩化ベンザルコニウム溶液：塩化ベンザルコニウム（BAK）を各目的濃度に調製
いずれも、リン酸緩衝液にて、浸透圧(285mOsm)とpH(7.0)を調整

＜結果＞

1) TBE組成の角膜上皮細胞に対する毒性は、塩化ベンザルコニウム溶液に比べ低い

方法：培養したヒト角膜上皮細胞に各製剤を添加し、一定期間接触させた後の細胞生存率より50%細胞致死時間（CDT₅₀）を算出した

角膜上皮細胞に対する毒性を調べた結果、TBE組成は、細胞致死率が50%に達するまでの時間を示すCDT₅₀が30分以上となり、細胞毒性が低いことがわかりました。一方、塩化ベンザルコニウム（BAK）溶液は、濃度依存的にCDT₅₀が低下し、最も低濃度の0.001%においても、CDT₅₀の値がTBE組成より小さくなりました。これらの結果から、TBE組成の細胞毒性は、塩化ベンザルコニウム溶液よりも低いことが示唆されました。

検体名	CDT ₅₀
TBE組成	>30.00分
BAK 0.001%	5.12分
BAK 0.002%	2.41分
BAK 0.003%	<1.00分

CDT₅₀：50%細胞致死時間

表1 各製剤のCDT₅₀

2) TBE 組成は、塩化ベンザルコニウム溶液に比べ、角膜上皮細胞のタイトジャンクションに影響を与えない

角膜では、角膜上皮細胞同士がタイトジャンクションという強固な結合を形成しており、外部からの刺激物質などの侵入を防いでいます。タイトジャンクションに対する影響を、以下の2つの実験で確認しました。

① 経上皮電気抵抗 (TER) 測定

方法：ヒト角膜上皮細胞を1層のシート状に培養し、各試験製剤を一定時間接触させた後、シートの電気抵抗値を経時で測定した

タイトジャンクションにより角膜上皮細胞同士が強固な結合を形成している場合は、電気抵抗値は高い値を示します。そこで、各製剤を接触させた後の電気抵抗値 (TER) を接触前の値と比較し、相対変化率として表しました (図2)。その結果、TBE 組成は、接触後に一時的に低下したものの、その後は回復しました。一方、塩化ベンザルコニウム溶液は、濃度依存的に一時的な TER の減少が大きくなり、回復も遅延しました。

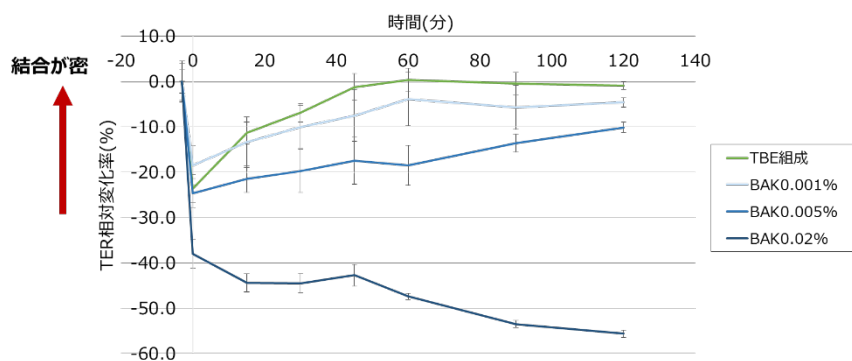


図2 各製剤接触処理後の経上皮電気抵抗値の相対変化率の推移

② オクルディン免疫染色

方法：ヒト角膜上皮細胞を培養し、各製剤を一定時間接触させた後、免疫染色法により、角膜上皮細胞のオクルディンの状態を観察した。

タイトジャンクションを形成するたんぱく質の一つ、オクルディンの状態を観察し、タイトジャンクションへの影響の有無を確認しました。製剤を接触させていない状態 (PBS) では、細胞膜上にオクルディンの発現が観察されました。TBE 組成や塩化ベンザルコニウム溶液 0.001% を接触させた場合は、オクルディンの局在性に変化は見られなかったものの、塩化ベンザルコニウム溶液 0.003% では、オクルディンの局在が破線状に変化しており、タイトジャンクションが崩れているような変化が認められました (図3)。これらの結果から、TBE 組成は塩化ベンザルコニウム溶液に比べ、角膜上皮細胞のタイトジャンクションへの影響が低いことが示唆されました。

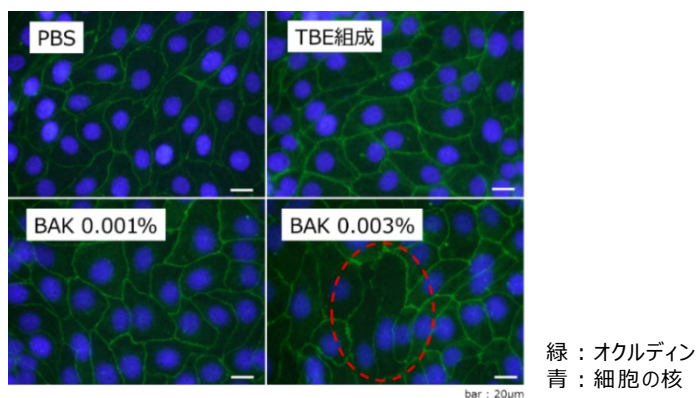


図3 各製剤接触後のオクルディンの状態

3) TBE 組成は塩化ベンザルコニウム溶液に比べて膜型ムチンに対する影響が小さい

方法：ヒト角膜上皮細胞を培養し、各試験製剤を一定時間接触させた後、発現している膜型ムチンの有無をローズベンガル染色により観察した。

正常な角膜上皮細胞は、膜型ムチンを産生し、涙を安定化させるなど瞳を健康な状態に保つことに寄与しています。そこで、膜型ムチンの産生状況を、TBE 組成と塩化ベンザルコニウム溶液で比較しました。ローズベンガルで染色されることは、膜型ムチンがないことを示しています。

その結果、製剤を接触させていない状態（PBS）では、ローズベンガルで染色される部分が少なく、膜型ムチンの産生が観察されました。TBE 組成を接触させた場合は、染色領域を変化させず、膜型ムチンへの影響は小さかったのに対し、塩化ベンザルコニウム溶液は濃度依存的にローズベンガルで染色される範囲が広くなりました（図 4）。このことから、TBE 組成は、塩化ベンザルコニウム溶液に比べて膜型ムチン産生に対する影響が低いことが示唆されました。

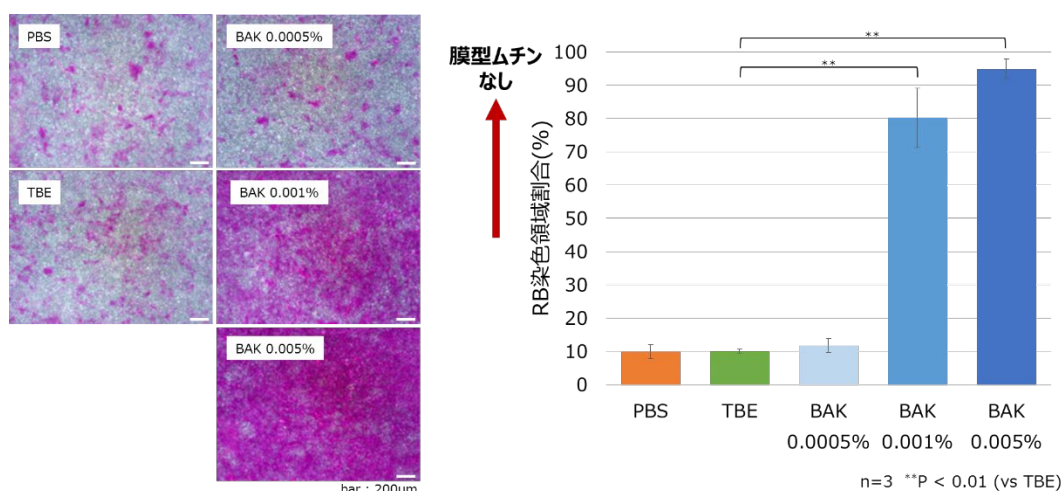


図 4 各製剤接触後のローズベンガル染色結果

■今後の展開

防腐剤無配合組成（TBE 組成）は、防腐剤を配合したときに比べ、角膜上皮細胞に悪影響を与えにくいことが確認できました。スマートフォンの普及などで目を酷使し、角膜への負荷がかかることが多い中、今後、当社は本技術を幅広く展開し、角膜への影響がより少ない点眼薬を開発してまいります。

<学会発表概要>

【第 39 回日本眼薬理学会】

- ◎発表日 2019 年 9 月 14 日（土）
- ◎会場 名古屋市立大学病院
- ◎演題 角膜上皮細胞に対する塩化ベンザルコニウム及び防腐剤フリー組成の影響
椛嶋恭平¹、内山章¹、海老原伸行²、村上晶³

- 1 ライオン株式会社薬品研究所
- 2 順天堂大学医学部附属浦安病院 眼科
- 3 順天堂大学大学院 医学研究科 眼科学

以 上

お問い合わせ窓口
<報道関係の方> コーポレートコミュニケーションセンター 03-3621-6661