ビーズミル破碎に伴うピレノキシン点眼製剤の薬物溶解速度及び分散安定性の改善

上野祥奈,^a 山岡咲絵,^a 伊藤吉將,^a 小竹 武,^a 中澤洋介,^b 長井紀章*,^a

Improvement of Dissolution Rate and Stability in a Pirenexine Ophthalmic Suspension by the Bead Mill Methods

Akina Ueno,^a Sakie Yamaoka,^a Yoshimasa Ito,^a Takeshi Kotake,^a
Yosuke Nakazawa,^b and Noriaki Nagai*,^a^aFaculty of Pharmacy, Kindai University; 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan; and^bFaculty of Pharmacy, Keio University; 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan.

(Received December 13, 2016; Accepted January 12, 2017)

Foreign matter sensation and blurred vision following instillation of ophthalmic suspension are often observed, and remaining of solid particle on cornea is related these side effects. In addition, low dispersion stability in the ophthalmic suspension affects the therapeutic effect. In this study, we have attempted to enhance the dissolution rate and stability of commercially available pirenexine ophthalmic suspension (CA-pirenexine eye drops), anti-cataract eye drops, by changes in particle size. Methylcellulose, zirconia beads (0.1 mm) and Micro Smash were used to mill the pirenexine (bead mill method), and the distribution of particle size was changed to approximately 60–900 nm (nanodispersions) from 70 nm–3 μ m (CA-pirenexine eye drops). The dissolution rate of pirenexine increased by the bead mill, and the dissolution rate constant in pirenexine nanodispersions was 2.1-fold than that in CA-pirenexine eye drops. Moreover, the dispersion stability in nanodispersions also significant higher in comparison with the CA-pirenexine eye drops. The dispersion ratio in CA-pirenexine eye drops and pirenexine nanodispersions at 2 d after suspension was 48%, 99%, respectively. In conclusion, we showed that the dissolution rate and dispersion stability of CA-pirenexine eye drops were enhanced by the bead mill method. These findings provide significant information that can be used in the design of ophthalmic suspension.

Key words—pirenexine; nanoparticle; ophthalmic suspension; dissolution rate; stability

緒 言

水晶体は毛様体小帯によって眼内の適正位置に懸垂されている無神経、無血管の透明器官であり、この水晶体が原因を問わず混濁をきたす状態を白内障という。わが国を始めとする先進国では白内障は外科的手術により治療できるものの、発展途上国では十分な施設がなく、白内障はいまだ世界の失明原因第一位の疾患である。また、わが国での疫学調査においても、白内障有病率は加齢に伴って増加し、60歳代では人口の半数を超える約60%、80歳代では男女にかかわらずほぼ100%の方において白濁がみられることが報告されている。¹⁾ 加齢性白内障はこれら全白内障患者の約95%を占め、¹⁾ 成因として、

太陽光中に含まれる紫外線等による水晶体細胞への酸化的ストレス（活性酸素種）等が知られている。^{2,3)} この機構として、酸化的傷害により水晶体上皮細胞、特に細胞膜が傷害を受け細胞内恒常性が破綻をきたし電解質バランス等が崩れ、上昇した細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) が Ca^{2+} 依存性タンパク分解酵素であるカルパインを活性化し、最終的にクリスタリンタンパク質が分解・凝集され水晶体混濁が引き起こされるという仮説が提唱されている。^{2,3)}

ピレノキシン点眼液は加齢性白内障治療剤として臨床で用いられている点眼製剤である。その作用機序は、白内障成因時に水晶体の水溶性タンパクが、有核アミノ酸（トリプトファン、チロジン等）の代謝異常で生じるキノイド物質によって変性し不溶性化する^{4,5)} といったキノイド学説に従うものであり、ピレノキシンは、キノイド物質のこの作用を競

^a近畿大学薬学部, ^b慶應大学薬学部

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

合的に阻害することにより、白濁進行を抑制する。現在市販されているピレノキシ点眼製剤は、溶解液に用時溶解して使用する錠剤型のもので、容器中では懸濁した状態であり、点眼後涙液により溶解する懸濁型の2つに大きく分けることができる。白内障患者には高齢者が多いことから、後者の懸濁点眼製剤が主として処方されている。一方、懸濁型の製剤は固体の微粒子を点眼するため、臨床において点眼後に異物感や霧視などを生じることが知られている。また、懸濁製剤は分散安定性の観点から十分に攪拌（振って）からの使用が必要となるが、高齢者ではこの操作が不十分となり、効果的な治療の妨げとなるといった問題点が挙げられる。したがって、このような問題点を改善し、有用性を向上させることは、超高齢化社会を迎えるわが国においては非常に重要である。本研究では湿式破碎法を基盤とする製剤手法を用い、ピレノキシ点眼製剤の機能改善を試みた。

実験方法

1. 試薬 本研究では市販懸濁点眼製剤であるピレノキシ点眼液（カリーユニ®点眼液 0.005%，参天製薬株式会社，大阪）を用いた。また、メチルセルロース（MC，SM-4）は信越化学工業株式会社（東京）から購入し、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素ナトリウム水和物及びホウ酸は和光純薬工業株式会社（大阪）のものを用いた。

2. 湿式破碎処理によるピレノキシ点眼液の調製 1%MC添加・非添加条件下、市販ピレノキシ点眼液を、直径0.1 mmのジルコニアビーズ2 gを含む2 mLチューブに加え、ビーズ式破碎装置 Micro Smash™（株式会社TOMY精工，東京）にて湿式破碎処理（5500 rpm，30 s，4℃）を行った。その後、遠心分離（3000 rpm，60 s，4℃，株式会社TOMY精工，東京）により、破碎時に生じた気泡を取り除いた（脱泡処理）。この薬物破碎及び脱泡処理を1組（セット）とし、計20セット繰り返すことで、ピレノキシの微細化を行った。本研究では、1%MC添加湿式破碎処理群をピレノキシ点眼液と定義した。また、市販及び調製製剤の薬物粒子径測定にはSALD-7100（島津製作所，京都）を用いた（屈折率 $1.40 \pm 0.05i$ ）。

3. 薬物溶解挙動の評価 100 μ L 人工涙液（塩化ナトリウム 5.5 mg/mL，塩化カリウム 1.6 mg/mL，炭酸カルシウム 0.6 mg/mL，リン酸水素ナトリウム水和物 1.8 mg/mL，ホウ酸 12 mg/mL）を含む石英セルを紫外可視分光光度計 UVmini-1240（島津製作所，京都）に設置した。その後、市販ピレノキシ点眼液又はピレノキシ点眼液1 mLを石英セル内に加え、一定時間毎に433 nmの吸光度（Abs）を測定し、経時的なAbs変化から薬物溶解度を算出した。また、薬物溶解速度は、見かけの溶解速度定数（ k ， s^{-1} ）として表し、 k はEq. (1)で計算した。

$$C_t = C_{\infty} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (1)$$

ここで、 t は点眼製剤添加後の時間（0–5 秒）、 C_{∞} 及び k は薬物添加 ∞ 及び t 時間後の溶解度を示す。

4. 薬物分散安定性の評価 市販ピレノキシ点眼液又はピレノキシ点眼液を、5 mL試験管に3 mL加えた（液面の高さ，約4 cm）。その後、一定時間毎に液面から5 mm下の位置で点眼製剤を50 μ Lずつを採取し、サンプル中薬物濃度を測定することで分散安定性を確認した。薬物濃度（ピレノキシ濃度）は、得られたサンプルを人工涙液にて溶解後、紫外可視分光光度計 UVmini-1240にて433 nmのAbsを測定することで得た。分散安定性（%）は、Eq. (2)にて算出した。

分散安定性（%）

$$= (\text{測定時の Abs}) / (\text{実験開始時の Abs}) \times 100 \quad (2)$$

5. 点眼液一滴量の測定 市販点眼瓶に充填したピレノキシ点眼液又はピレノキシ点眼液を、天秤に設置したトレイ上に一滴ずつ落とし、その重量変化を測定した。本実験は計10回繰り返す行い、平均値とばらつきから、点眼液一滴の量及び精度を評価した。

6. 統計解析 データは平均 $\pm$ 標準誤差（S.E.）として表した。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. 湿式破碎処理によるピレノキシ点眼液の粒子径変化 Figure 1は破碎処理に伴う市販ピレノ

Fig. 1. Image (A), Particle Size of Commercially Available Pirenoxine Eye Drops (B) and Milled-pirenoxine Dispersions without (C) or with MC (D)

Particle size was determined using a nanoparticle size analyzer SALD-7100 (refractive index $1.40 \pm 0.05i$).

キシ点眼液の色調 (A) 及び粒子径 (B-D) の変化を示す。市販ピレノキシ点眼液中の懸濁薬物は $70 \text{ nm} - 3 \text{ }\mu\text{m}$ とナノオーダーの粒子からマイクロオーダーの粒子まで幅広いサイズの粒子が認められた。本製剤をビーズミルにて湿式破碎処理を行ったところ、粒子サイズが $1 \text{ }\mu\text{m}$ 以下 (平均粒子径 206 nm) と、粒子サイズの分布はナノ領域となったが、破碎処理後に色調の変化が認められ、回収率は 58% であった。添加物として MC を用いたところ、 0.5% MC 添加では色調の変化がみられたが、 1.0% MC 添加により色調に変化はみられず、湿式破碎処理後の平均粒子径は 206 nm であった (Table 1)。

Table 1. Changes in Particle Size, Recovery Rate and Color in Pirenoxine Eye Drops Containing MC by the Treatment of Bead Mill

MC content (%)	0%	0.5%	1.0%	2.0%
Particle size (nm)	206 ± 2.8	207 ± 2.9	206 ± 2.6	210 ± 3.3
Recovery rate (%)	58 ± 2.1	62 ± 2.0	$67 \pm 1.7^*$	62 ± 2.1
Color	Change	Change	Non-change	Non-change

Particle size was determined using a nanoparticle size analyzer SALD-7100 (refractive index $1.40 \pm 0.05i$). The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 independent experiment. $^*p < 0.05$, vs. commercially available eye drops (0%).

また、MC 非添加時に比べ、回収率が改善し、1.0 %MC 添加群のその値は 67%であった (ピレノキシナノ懸濁液)。一方、2.0%MC 添加では湿式破碎処理後の色調の変化は抑制されたが、1.0%MC 添加群に比べ回収率は低値であった。

2. 湿式破碎処理によるピレノキシ点眼剤の溶解速度及び分散安定性の改善 Figure 2 は市販ピレノキシ点眼液及びピレノキシナノ懸濁液の人工涙液に対する溶解挙動を、Table 2 はその速度パラメーターを示す。ピレノキシナノ懸濁液は市販ピレノキシ点眼液と比較し、人工涙液への溶解速度が高く、見かけの溶解速度定数は 2.1 倍であった (Table 2)。この際、市販ピレノキシ点眼液を湿式破碎した懸濁液 (MC 非含有ビーズミル処理群) の溶解速度は $1.89 \pm 0.23 \text{ s}^{-1}$ と、ピレノキシナノ懸濁液 (MC 含有ビーズミル処理群) と同程度であった。一方、飽和溶解度は市販ピレノキシ点眼液とピレノキシナノ懸濁液間で有意な差はみられなかった。Figure 3 は市販ピレノキシ点眼液及びピレノキシナノ懸濁液の分散安定性を示す。市販ピレノキシ点眼液では 1 日静置することで 63%、2 日間の静置では 48%まで採取部分における薬物濃度の低下 (薬物の沈降) が認められた。この分散安定性もまた破碎処理により改善され、ピレノキシナノ懸濁液では市販ピレノキシ点眼液に比べ薬物分散安定性が高く、調製 2 週間後においても採取位置における薬物濃度の低下はみられなかった (分散安定性 99.4%)。さらに、市販ピレノキシ点眼液とピレノキシナノ懸濁液の一滴量 (重量) について測定したところ、それぞれ $38.8 \pm 1.3 \text{ mg}$ 、 $40.4 \pm 1.3 \text{ mg}$ であった (means $\pm$ S.E., $n=10$)。

考 察

ピレノキシは、加齢性白内障の薬物治療において、臨床で唯一用いられている点眼剤であるが、ピレノキシ点眼液は懸濁型であるため点眼後の異物感や霧視がみられる。また、使用時には十分に攪拌が必要など白内障患者の大多数を占める高齢者においては使い勝手が十分とは言えないのが現状である。そこで本研究では、これら薬物溶解速度及び分散安定性といった問題点を改善すべく、懸濁点眼剤の製剤工夫 (粒子径の変更) を試みた。

固体状態の粒子サイズをナノ領域まで微細化する

Fig. 2. Behavior of Drug Dissolution in the Commercially Available Pirenixine Eye Drops (open circles) and Pirenixine Nanodispersions (closed circles)

The Pirenixine dispersion ratio (%) was calculated by Eq. (2) in "Experimental Methods". Solid lines represent the fitted curves for multiple applications of a commercially available pirenixine eye drops or pirenixine nanodispersions. The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 independent experiments. * $p < 0.05$, vs. commercially available eye drops.

Table 2. Rate of Pirenixine Dissolution in Commercially Available Eye Drops and Pirenixine Nanodispersions

	Commercially available eye drops	Pirenixine nanodispersions
Saturation solubility (C_{∞} , $\mu\text{g/mL}$)	21.7 ± 0.85	20.6 ± 0.63
Dissolution rate constant (k , s^{-1})	0.89 ± 0.11	$1.86 \pm 0.26^*$

Parameters were calculated according to Eq. (1) (see Experimental Methods). The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 independent experiment. * $p < 0.05$, vs. commercially available eye drops.

Fig. 3. Stability of the Commercially Available Pirenixine Eye Drops (open columns) and Pirenixine Nanodispersions (closed columns)

0.005% commercially available pirenixine eye drops and pirenixine nanodispersions were kept in the dark at 20°C for 5 d. The pirenixine dispersion ratio were calculated by Eq. (2) in "Experimental Methods". The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 independent experiments. * $p < 0.05$, vs. commercially available eye drops.

技術として、原子あるいは分子サイズの前薬をより大きな粒子へと成長させるビルドアップ法と、前薬に機械的なエネルギーを加えることにより微細化を行うブレイクダウン法が知られている。^{6,7)} ブレイクダウン法はビルドアップ法と比較して比較的容易であるほか、大量生産に適しているといった長所を有する。また、ブレイクダウン法には乾式法と湿式法が存在するが、乾式法による破碎で微細化できる限界粒子径の大きさや生産性を考慮すると、湿式法の方がメリットは多い。⁸⁾ したがって、本研究ではビーズミル法を用いた湿式ブレイクダウン法にて市販ピレノキシン点眼液の薬物粒子径変更を試みた。湿式ブレイクダウン法(ビーズミル法)を行う上で、破碎条件の設定は非常に重要である。ビーズミル法は長時間の破碎により温度が上がり薬物が不安定となる。このため一回の処理時間は30秒とし、十分冷却した条件下で処理を行った。また、強力な破碎力が得られない際には粒子サイズがナノサイズとならないことから、回転速度は、今回使用した株式会社 TOMY 精工社製 ビーズ式破碎装置 Micro Smash™ の最大回転数である 5500 rpm を選択し、破碎による粒子径変化がみられなくなったとき操作を終了した。まず、本ビーズミル処理条件にて、市販ピレノキシン点眼液中の破碎を行った。市販ピレノキシン点眼液では 70 nm–3 μ m と幅広いサイズの粒子が分散しており [Fig. 1(B)], 本製剤をビーズミルにて湿式破碎処理を行ったところ、処理過程において色調の変化がみられた [Fig. 1(A)]。また、破碎処理によりピレノキシンのビーズへの吸着がみられ、その回収率は 58% であった。ピレノキシンは金属イオンの混入により色調が変化することが知られている。⁹⁾ 本破碎処理ではジルコニアビーズを使用しており、これらジルコニアの摩耗・溶出がピレノキシンの色調に影響したものと示唆された。したがって、まずジルコニアの溶出がみられないビーズミル破碎処理方法について検討を行った。

MC はセルロースを原料として得られるセルロース誘導体であり、優れた増粘性・吸水性・保水性・安全性を有することから眼科領域においては粘稠化剤(点眼用添加剤)として多用されている。この MC には多くの種類が存在し、その種類により粘度が異なる。Nagai らはトラニラスト、インドメタシン、シロスタゾールやレバミピドなど様々な医薬品

を用いた系にて、セルロース系化合物を添加することで、ビーズミル処理(湿式破碎)時における破碎効率が安定することを見出し報告している。^{10–13)} 今回、これら MC による破碎効率の安定化が、破碎時における金属イオンの摩耗・溶出にも影響しているのではないかと考え、市販ピレノキシン点眼液に MC を添加した処方(湿式破碎処理)を試みた。その結果、ビーズミル破碎処理後においてもピレノキシンの色調変化はみられず [Fig. 1(A)], 湿式破碎処理後の平均粒子径は 206 nm, 回収率は 67% と、回収率の改善も認められた [Fig. 1(D), ピレノキシンナノ懸濁液]。これら結果は、MC 添加がビーズ間に対して緩衝作用を有することを裏付けるとともに、この緩衝作用がジルコニアの摩耗・溶出抑制と破碎効率の安定化につながる可能性を示した。また、他の代表的セルロース系誘導体であるカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いてビーズミル破碎処理を行った際にも、ピレノキシンの色調変化は抑制された (data not shown)。今後、ジルコニアビーズを用いたビーズミル破碎処理時における金属イオン溶出と MC を始めとするセルロース系誘導体の関係の解明を目指した更なる研究が必要である。

ピレノキシン点眼剤の薬物粒子は点眼後、速やかに涙液に溶解する。この溶解した薬物が角膜を通過し、眼内にて水晶体に取り込まれることで薬効を発揮する。しかし、点眼後に薬物が速やかに溶解しない際には、眼表面上に固体状態の薬物粒子が存在することによる霧視や異物感といった副作用が生じる。この際、粒子が大きいほどこれら異物感が高まることが知られている。また、近年のペットブームにおいて、小動物の寿命も延びていることから、犬や猫においても白内障の発症が認められ、発症時にはエサなどを自分で食べることができないなど生活に支障をきたすといった問題が挙げられる。ピレノキシン点眼液はヒトの白内障治療薬であるが、犬や猫といった小動物の白内障治療にも用いられている。これら小動物は、ヒトに比べて眼球が前面に突出しており、点眼後の薬物がすぐに結膜部分まで流れる、または目からこぼれるといった傾向がある。このことから、懸濁点眼液の薬物溶解速度を向上させることは、ヒトだけでなく、小動物治療に

においても副作用軽減及び治療効果の向上において重要である。そこで、破碎前の市販ピレノキシナノ懸濁点眼液と、破碎後のピレノキシナノ懸濁液について、人工涙液に対する薬物溶解速度の比較検討を行った。ピレノキシナノ懸濁液では、市販ピレノキシナノ点眼液と比較して速やかに涙液へと溶解することが明らかとなった (Fig. 2 and Table 2)。一般に、薬物の溶解速度には薬物と溶媒の接触面積が係わっている。今回調製したピレノキシナノ懸濁液では、市販点眼液に比べ、粒子サイズが小さく、粒子間の大きさも均一であることから、比表面積が高く、その結果、薬物溶解速度が飛躍的に増加したものと考えられた。懸濁点眼剤点眼後の異物感や霧視は懸濁粒子によることが知られているが、ヒトではオキュラサーフェイスに個人差があることから、懸濁点眼剤中の粒子サイズと点眼後の異物感や霧視の関係を明確にすることは困難である (例えばドライアイ患者では、涙液が少ないことから、健常人と比較し点眼後の異物感や霧視を強く感じる傾向にある)。一方、ピレノキシナノ点眼剤中の懸濁薬物は、点眼後涙液により溶解することから、その懸濁物が溶解するまでの時間 (溶解速度) が異物感や霧視の発生要因に関与するものと考えられる。本研究の *in vitro* 実験結果 (Fig. 2 and Table 2) から、市販点眼液では溶解までに約 4 秒を要したが、ナノ粒子の状態では約 2 秒と溶解までの時間が顕著に短縮されることが確認できた。したがって、本実験で調製したピレノキシナノ懸濁液は、市販品と比較し点眼後の霧視や異物感を改善するとともに、小動物に対する白内障治療にも適することが期待できる。本結果は *in vitro* 系での検討であることから、ヒト及び動物への有用性を述べるためには、今後 *in vivo* 系における更なる研究が必要である。

さらに、薬物の投与においては、副作用発現や薬効の観点から、投与毎の薬物含量が均一であることが求められる。一方、ピレノキシナノを始めた懸濁点眼液は、時間とともに懸濁薬物が点眼容器の底部に沈殿する (懸濁液中で主薬の希薄な層と富む層に分離する傾向にある) ため、使用前によく振り、点眼液中の薬物濃度を均一にする必要がある。通常、点眼液 1 滴は 30–50 μL であるが、使用前の攪拌が不十分であり、希薄な層と富む層に分かれた状態で点眼した際には、点眼液 1 滴中の薬物量にばら

つきが生じ、適切な治療が困難となる。これら使用前によく振る作業は、どの程度振ればよいのかが不透明であり、また、高齢者ではこれら攪拌を忘れるといった声をよく聴く。したがって、懸濁点眼製剤における薬物分散安定性の改善は、安定した薬物供給や、点眼液の有用性向上に大きく寄与する。本研究において、市販ピレノキシナノ点眼液とピレノキシナノ懸濁液の分散安定性を比較したところ、ピレノキシナノ懸濁液で有意に高い分散安定性を示した (Fig. 3)。今回調製したピレノキシナノ懸濁液には、市販品と異なり、破碎処理時に必要であった MC が含まれている。MC は点眼製剤領域において増粘剤として用いられており、また水溶性高分子であることから、足場構造 (網目構造) を形成する。そこで、筆者らはこの MC と粒子サイズが分散安定性に与える影響をより明確にすべく、市販ピレノキシナノ点眼液に MC を加えたのみの試料と MC を添加せずにビーズミル破碎を行った試料を用いて検討を行った。その結果、市販ピレノキシナノ点眼液に MC を加えたのみの試料の調製 5 日後の分散安定性 (ピレノキシナノ分散率) は $31.5 \pm 5.6\%$ と市販ピレノキシナノ点眼液 (MC 非含有) と大きな差はみられなかった。また、MC を添加せずにビーズミル破碎を行った試料の調製 5 日後の分散安定性は $57.2 \pm 6.9\%$ と、市販ピレノキシナノ点眼液に比べ安定性は高かったものの、ピレノキシナノ懸濁液ほどの安定性は示さなかった。したがって、ピレノキシナノ懸濁液における薬物粒子の分散安定性向上は、薬物粒子サイズの低減と MC 添加による薬液の粘度増加の 2 つの要因による相乗効果によるものと示唆された。

さらに、本研究で調製したピレノキシナノ懸濁液は MC を含んでいるため、点眼剤としての投与量に影響を及ぼす一滴量 (一回の滴下量) についても検討を行った。その結果、MC 添加による影響はほとんどみられず、ピレノキシナノ懸濁液の一滴量は市販品のそれと同程度であることが確認できた。

以上、本研究ではビーズミル処理と MC の添加により、市販ピレノキシナノ点眼液の湿式破碎処理が可能であることを示した。また、本処理により、ピレノキシナノ懸濁製剤の薬物溶解速度及び分散安定性が向上することを見出した。本研究は、ヒトだけでなく、犬や猫といった小動物の白内障治療におい

ても非常に有用であるとともに、点眼液の安全性、利便性の向上に大きく寄与するものと考えられる。

謝辞 本研究は MEXT 科研費 15K08115 の助成を受けたものです。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Sasaki K., *Jpn. J. Med. Pharm Sci.*, **33**, 1271–1277 (1995).
- 2) Dilsiz N., Olcucu A., Cay M., Naziroglu M., Çobanoğlu D., *Cell Biochem. Funct.*, **17**, 1–7 (1999).
- 3) Spector A., *FASEB J.*, **9**, 1173–1182 (1995).
- 4) Shearer T. R., David L. L., Anderson R. S., Azuma M., *Curr. Eye Res.*, **11**, 357–369 (1992).
- 5) Goldstein L. E., Muffat J. A., Cherny R. A., Moir R. D., Ericsson M. H., Huang X., Mavros C., Coccia J. A., Faget K. Y., Fitch K. A., Masters C. L., Tanzi R. E., Chylack L. T. Jr., Bush A. I., *Lancet*, **361**, 1258–1265 (2003).
- 6) Henzie J., Barton J. E., Stender C. L., Odom T. W., *Acc. Chem. Res.*, **39**, 249–257 (2006).
- 7) Rothmund P. W., *Nature*, **440**, 297–302 (2006).
- 8) Kamiya S., Yamada M., Kurita T., Miyagishi A., Arakawa M., Sonobe T., *Int. J. Pharm.*, **354**, 242–247 (2008).
- 9) Santen Pharmaceutical Co., Ltd., Kary Uni[®] ophthalmic suspension 0.005%, Package insert.
- 10) Nagai N., Ito Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 96–104 (2014).
- 11) Nagai N., Ito Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1109–1118 (2014).
- 12) Nagai N., Yoshioka C., Ito Y., Funakami Y., Nishikawa H., Kawabata A., *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 29329–29344 (2015).
- 13) Nagai N., Ito Y., Okamoto N., Shimomura Y., *Exp. Eye Res.*, **151**, 47–53 (2016).