涙液中薬物動態研究に向けたマイクロダイアリシス— キャピラリー液体クロマトグラフィー法の開発

長井紀章,* 上野祥奈, 石井美有, 福岡侑也, 大竹裕子

Design of Microdialysis-CLC Method for Measurement of Drug Behavior in Lacrimal Fluid after Instillation

Noriaki Nagai,* Akina Ueno, Miyu Ishii, Yuya Fukuoka, and Hiroko Otake

Faculty of Pharmacy, Kindai University; 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan.

(Received March 12, 2018; Accepted April 6, 2018)

The ophthalmic application is the main route for the therapy of glaucoma, and is well-accepted by glaucoma patients. Therefore, it is important to measure the drug behavior in lacrimal fluid after instillation of eye drops. In this study, we used ophthalmic formulation (eye drops) containing timolol maleate (TM), in anti-glaucoma eye drops, and attempted to measure the drug behavior after instillation of TM eye drops. First, we collected the lacrimal fluid (5 μ L) every 10 time after instillation using micropipette, and measured by the HPLC method. The TM concentration in lacrimal fluid was 21.2 μ g/mL at 5 min after the instillation, and the TM was remained for 30 min after the instillation. Next, we collected the lacrimal fluid *via* the dialysis probe, and measured by the HPLC method. The retention of TM in lacrimal fluid was observed for 45 min after the instillation, and the measurement accuracy was enhanced by system with an automatic injection of TM solution *via* dialysis probe (microdialysis-HPLC method). In addition, the measurement accuracy increased more by using a capillary liquid chromatography (CLC) instead of an HPLC (microdialysis-CLC method), and the retention time of TM in lacrimal fluid was extended to 75 min after the instillation. In conclusion, we showed that the microdialysis-CLC method was suitable to measure the drug behavior in lacrimal fluid after instillation. These findings provide significant information that can be used in the design and evaluation of ophthalmic formulation.

Key words—microdialysis; timolol maleate; eye drops; capillary liquid chromatography; monolithic capillary column

緒 言

緑内障は、わが国における中途失明の原因第一位の疾患であり、40歳以上ではおよそ5%（20人に一人）が緑内障に罹患しているといわれている。¹⁾ これら緑内障の治療として、唯一エビデンスがあるのが眼圧を降下させることであり、²⁾ その主たる手段として点眼療法が行われている。抗緑内障薬はプロスタグランジン関連薬、 β 遮断薬、 α_1 遮断薬、 $\alpha\beta$ 遮断薬、 α_2 刺激薬、炭酸脱水素酵素阻害薬、副交感神経刺激薬、交感神経刺激薬及びRhoキナーゼ（Rho-associated protein kinase; ROCK）阻害薬の大きく9系統に分類され、単剤で十分な眼圧降下作用がみられない際には、眼圧降下機構の異なる2種以上の点眼薬による多剤投与が行われる。なかで

も β 遮断薬チモロールマレイン酸塩（timolol maleate; TM）は、多くの配合剤としても用いられる優れた抗緑内障薬である。一方、これら抗緑内障薬の作用部位は眼内の毛様体、ぶどう膜強膜や繊維柱帯（シュレム管）であり、点眼後薬物が角膜を通過し、房水中に移行することが必須である。このよう緑内障治療薬のバイオアベイラビリティ向上を目的とし、眼表面での薬物滞留性を高める製剤工夫などが行われており、TM点眼薬の持続性製剤では、増粘剤ジュランガムが添加されている。一方、点眼薬点眼後の眼表面上薬物挙動を正確に測定するための手技もまた、今後の点眼製剤開発において非常に重要であるが、いまだ十分には確立されていないのが現状である。また、 β 遮断薬は喘息、慢性閉塞性疾患、心不全を悪化させることから、点眼後の薬物挙動の把握は副作用予防の面からも有用な技術と考えられる。

涙液は涙腺から絶えず分泌されており、涙液分泌

近畿大学薬学部

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

量は $1\text{--}2\ \mu\text{L}/\text{min}$ といわれている。³⁾ また、ウサギと人の涙液分泌量のデータは類似しており、³⁾ 健康人（覚醒時刺激のない状態）の眼球表面（結膜囊）での涙液量は約 $7\ \mu\text{L}$ と報告されている。³⁾ この涙液は、内眼角部（目頭）に集まり、涙点から涙小管→涙囊→鼻涙管→鼻腔を介し咽頭部や消化管へと流出する。⁴⁾ 一方、ヒトでは眼球表面（結膜囊）の最大保持用量は約 $30\ \mu\text{L}$ であることから、点眼後（ $30\text{--}50\ \mu\text{L}$ ）は、結膜囊に存在する涙液約 $7\ \mu\text{L}$ と $23\ \mu\text{L}$ の点眼薬が眼表面上に保持される。さらに、涙液は点眼による刺激で新たに分泌されることから、点眼薬はもともとの濃度の約 $1/10$ まで希釈され、その後眼表面から流出する。このような性質上、眼表面上の薬物挙動を測定するためには、涙液量に影響を与えず、経時的かつ高感度に薬物を測定する必要がある。

マイクロダイアリシス法は中空糸状の半透膜を用いて、組織液などに含まれる物質を抽出する技術である。送液側から微量注入ポンプを用いて透析チューブ内に溶液を送ることで、半透膜の分画分子量より小さい物質が、外液から灌流液といった濃度勾配の低い方へ拡散するという原理を利用し、外液量をほとんど変化させることなく、経時的に目的物質を回収することができる。本研究ではキャピラリー液体クロマトグラフィー（capillary liquid chromatography; CLC）とマイクロダイアリシス法を連結した手法を用い、市販 TM 点眼薬点眼後の涙液中薬物挙動の把握について検討を行った。

実験方法

1. 実験材料 市販点眼製剤である TM 点眼薬（チモプトール®点眼液 0.5%，参天製薬株式会社、大阪）とその標準品は参天製薬株式会社（大阪）と Sigma-Aldrich（大阪）からそれぞれ購入した。HPLC 前処理用ろ過フィルター コスモナイスフィルター W（ポアサイズ $0.45\ \mu\text{m}$ 、直径 $4\ \text{mm}$ ）はナカライテスク（京都）、再生セルロース膜製透析プローブ（A-I-20-03、深さ $20\ \text{mm}$ 、膜長 $3\ \text{mm}$ 、プローブ部内径 $0.04\ \text{mm}$ ）はエイコム（京都）のものを用いた。また、Inertsil® ODS-3 カラム（カラム内径 $2.1\ \text{mm}$ 、カラム長 $50\ \text{mm}$ ）及び MonoCap C18 Fast-flow モノリスカラム（Capillary EX-Nano、カラム内径 $0.2\ \text{mm}$ 、カラム長 $250\ \text{mm}$ ）はジーエ

ルサイエンス株式会社から購入した。

2. 実験動物 雄性日本白色種ウサギ（ $2\text{--}3\ \text{kg}$ ）は清水実験材料株式会社から購入した。ウサギの飼育は標準条件下（室温 25°C 、7–19 時蛍光灯下、19–7 時暗所下）で行い、餌は市販品 CR-3（日本クレア、東京）を与え、水は自由に摂取させた。ウサギ涙液の経時的採取は、瞬きによる涙液挙動の変化を避けるため、涙液採取時以外は閉眼状態とした。また、動物実験は近畿大学実験動物委員会の承認を受け（実験承認番号 KAPS-25-003、2013 年 4 月 1 日承認）、Association for Research in Vision and Ophthalmology（ARVO）の実験動物指針に準じて行った。

3. バッチサンプリング法による薬物測定 ウサギ涙液を結膜部目頭部位からマイクロピペットにて経時的に $5\ \mu\text{L}$ ずつ採取し、メタノールにて $15\ \mu\text{L}$ となるように調製した。本溶液をコスモナイスフィルター W にてろ過後、マイクロシリンジを用い日本分光社製 LC-Net II/ADC system（送液ポンプ PU-2089 Plus 及び UV 検出器 UV-2075 Plus）に $10\ \mu\text{L}$ 注入することで、薬物量の測定を行った [Fig. 1(A)]。TM の HPLC 測定は、移動相 $25\ \text{mM}$ リン酸緩衝液/メタノール/アセトニトリル（ $70/20/10$, v/v/v）、カラム Inertsil® ODS-3 カラム、移動相の流速 $250\ \mu\text{L}/\text{min}$ 、検出波長 $294\ \text{nm}$ にて行った。⁵⁾

4. 透析膜回収法による薬物測定 ウサギ結膜部目頭部位に透析プローブを設置し、他方からマイクロシリンジポンプ ESP-32（エイコム、京都）にて生理食塩水を送液することで得られる透析液を 10 分間隔で回収した。ESP-32 による透析プローブへの送液速度は $0.1\text{--}4\ \mu\text{L}/\text{min}$ にて検討を行った。得られた透析液をメタノールにて $10\ \mu\text{L}$ となるように調製し、マイクロシリンジにて日本分光社製 LC-Net II/ADC system に注入することで、薬物量の測定を行った [Fig. 1(B)]。HPLC 条件は上記に示した方法と同様にて行った。また、本系では、10 分間回収した透析液の測定を行っていることから、得られた値を測定時間の中間時の濃度として表した。

5. マイクロダイアリシス-HPLC 法による薬物測定 測定試料の回収と注入には日本分光社製 LC-Net II/ADC system 接続オートラインインジェクター EAS-20（流路容量 $20\ \mu\text{L}$ 、エイコム、京都）を用いた。ウサギ結膜部目頭部位に透析プローブを

A Batch-sampling method **B Dialysis-prove method** **C Microdialysis-HPLC method** **D Microdialysis-CLC method**

Fig. 1. Diagrams of Batch-sampling (A), Dialysis-prove (B), Microdialysis-HPLC (C) and Microdialysis-CLC (D) Methods

設置し、他方からマイクロシリンジポンプ ESP-32 にて生理食塩水を連続的に送液し、回収した透析液を 10 分毎に Fig. 1 (C) 中ルート B を介して HPLC に自動注入 ($10 \mu\text{L}$) し、薬物測定を行った [Fig. 1 (C)].⁶ 本系では、1 回の測定において 10 分間回収

した透析液を試料としていることから、得られた値を測定時間の中間時の濃度として表した。ESP-32 による透析プローブへの送液速度は $1 \mu\text{L}/\text{min}$ とし、HPLC 条件は上記に示した方法と同様に行った。

Fig. 2. Drug Behavior in Lacrimal Fluid after Timolol Maleate Instillation by the Batch-sampling Method

Batch-sampling method was shown in Fig. 1 (A). The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 experiments.

Fig. 3. Recovery Rate of Timolol Maleate *via* Dialysis Prove in the 0.1–4 μ L/min Flow Rate

The prove was put in the 16 μ g/mL timolol maleate solution. The data are presented as means $\pm$ S.E. of 6 experiments.

6. マイクロダイアリシス-CLC 法による薬物測定 試料の回収と注入にはナノ HPLC MP701 system 接続オートラインインジェクター (インターナルインジェクター, 流路容量 0.1 μ L, GL サイエンス, 東京) を用いた. ウサギ結膜部目頭部位に透析プローブを設置し, 他方からマイクロシリンジポンプ ESP-32 にて生理食塩水を連続的に送液した. ナノ HPLC MP701 への送液は, インターナルインジェクターにて測定時間における透析液 0.1 μ L を自動注入 (ルート B) することで行った [Fig. 1 (D)]. ESP-32 による透析プローブへの送液速度は 0.1 μ L/min とし, ナノ HPLC MP701 system による TM の測定条件は, 移動相 25 mM リン酸緩衝液/メタノール/アセトニトリル (70/20/10, v/v/v), カラム MonoCap C18 Fast-flow モノリスカラム, 移動相の流速 1 μ L/min, 検出波長 294 nm にて行った.

7. 解析 データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) として表した.

結 果

1. HPLC 法による涙液中薬物挙動の測定

Figure 2 はバッチサンプリング法を用いた際の TM 点眼薬点眼後の涙液中薬物挙動を示す. バッチサンプリング法において, コスモナイスフィルター W にてろ過後の薬物回収率は $91.8 \pm 2.1\%$ ($n=5$) であり, 検量線の r 値は 0.9997 と良好であった. 本法にてウサギ涙液中薬物濃度を測定したところ, 点眼 5 分後は 21.2 μ g/mL であり, 点眼 30 分以降で薬物の検出はみられなかった. また, 点眼 5 分後

Fig. 4. Drug Behavior in Lacrimal Fluid after Timolol Maleate Instillation by the Dialysis-prove Method

The experiment was done in the 1 μ L/min flow rate. Dialysis-prove method was shown in Fig. 1 (B). The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 experiments.

の涙液中薬物量の標準誤差は 4.8 μ g/mL と大きなバラツキがみられた. Figures 3 及び 4 は透析膜回収法を用いた際の薬物回収率 (Fig. 3) と TM 点眼薬点眼後の涙液中薬物挙動 (Fig. 4) を示す. 透析プローブを介した薬物回収率は, ESP-32 による透析プローブへの送液速度の増加とともに低下し, 送液量 4 μ L/min 時の回収率と比較し, 送液量 1 μ L/min 時の回収率は 4.8 倍高値であった (Fig. 3). また, 送液量を 1 μ L/min より低くすることで, 高い回収率が得られたが (0.1 μ L/min における薬物回収率 83.5%), 10 分間隔における溶液の採取量が微量となり HPLC への適用が困難であった. これら ESP-32 による透析プローブへの送液速度を 1 μ L/min に固定し, 得られた透析液から検量線を作成したところ, 濃度の増加に従ってピーク面積値の上昇

が認められ、その r 値は 0.9854 であった。また、本法にてウサギ涙液中薬物濃度を測定したところ、点眼 5 分後の濃度は $24.5 \mu\text{g/mL}$ であり、点眼 50 分以降で検出限度以下となった (Fig. 4)。一方、点眼後の各ポイントにおいて、涙液中薬物量の標準誤差が高値であり、バッチサンプリング法に比べバラツキは高い傾向にあった。

2. マイクロダイアリシス-HPLC, -CLC 法による涙液中薬物挙動の測定 Figure 5 はマイクロダイアリシス-HPLC 法を用いた際の TM 点眼薬点眼後の涙液中薬物挙動を示す。マイクロダイアリシス-HPLC 法における検量線は直線性を示し、 r 値は 0.9971 であった。これらマイクロダイアリシス-HPLC 法にてウサギ涙液中薬物濃度を測定したところ、点眼 50 分後まで薬物の検出が認められ、透析膜回収法と類似した薬物消失を示した。一方、点眼 15 分後の涙液中薬物量の標準誤差は $2.4 \mu\text{g/mL}$ と、透析膜回収法のそれ ($7.2 \mu\text{g/mL}$) と比較し、涙液中薬物量のバラツキが軽減された。Figure 6 はマイクロダイアリシス-CLC 法を用いた際の TM 点眼薬点眼後の涙液中薬物挙動を示す。マイクロダイアリシス-CLC 法の検量線において、 r 値は 0.9982 であり、先の LC-Net II/ADC system を用いた系 (マイクロダイアリシス-HPLC 法) より直線性はわずかに低かった。一方、点眼後のウサギ涙液中薬物濃度変化を測定したところ、点眼 75 分後まで、経時的な薬物の消失が確認できた。また、バッチサンプリング法や透析膜回収法に比べバラツキも少なく (点眼 15 分後の標準誤差 $2.8 \mu\text{g/mL}$)、高い再現性が確認された。

考 察

点眼薬は眼領域の主要な製剤であり、臨床において広く用いられている剤形である。これら点眼薬適用後の眼表面における薬物挙動を正確に測定することは、点眼薬の薬効評価及び開発において極めて重要である。一方、涙液は涙点を通して現表面から排出されることや点眼刺激で涙液分泌が促進されること、また、涙液量自体が微量であることから、眼表面上における点眼後の薬物挙動を正確に評価するためには、涙液量に影響を与えず、経時的かつ高感度に薬物を回収測定する必要がある。本研究では、点眼薬の正確な涙液中薬物挙動の測定法確立を目指

Fig. 5. Drug Behavior in Lacrimal Fluid after Timolol Maleate Instillation by the Microdialysis-HPLC Method

The experiment was done in the $1 \mu\text{L/min}$ flow rate. Microdialysis-HPLC method was shown in Fig. 1(C). The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 experiments.

Fig. 6. Drug Behavior in Lacrimal Fluid after Timolol Maleate Instillation by the Microdialysis-CLC Method

The experiment was done in the $0.1 \mu\text{L/min}$ flow rate. Microdialysis-CLC method was shown in Fig. 1(D). The data are presented as means $\pm$ S.E. of 5 experiments.

し、マイクロピペットを用いたバッチサンプリング法 [Fig. 1(A)], 透析プローブにより薬物回収を行う透析膜回収法 [Fig. 1(B)], マイクロダイアリシス法と HPLC 法を連結したマイクロダイアリシス-HPLC 法 [Fig. 1(C)] 及びマイクロダイアリシス法と CLC 法を連結したマイクロダイアリシス-CLC 法 [Fig. 1(D)] の異なる 4 種の手法を用い、市販 TM 点眼薬点眼後の涙液中薬物挙動の評価を試みた。

まず、点眼後の涙液を経時的にピペットマンで採取し、HPLC にて薬物測定を行うバッチサンプリング法 [Fig. 1(A)] について検討を行った。一般に人やウサギでは、眼球表面の最大保持用量は約 $30 \mu\text{L}$ と量が少なく、涙液分泌量も $1\text{--}2 \mu\text{L/min}$ と

わずかであることが知られている。³⁾ 本研究においても、予備実験にて10分毎に10 μL の涙液採取を検討したが、十分な涙液を採取することはできなかった。そこで、1回の涙液採取量を5 μL として検討を行った。点眼5分後のウサギ涙液中薬物濃度は21.2 $\mu\text{g/mL}$ であり、点眼30分以降では薬物の検出はみられなかった (Fig. 2)。バッチサンプリング法では涙液とともに、涙液中に含まれる薬物の大部分を10分毎に採取しており、点眼後の薬物消失が見かけ上高まり、正確な連眼後の涙液挙動を反映できていないものと考えられる。そこでこれら問題点を改善すべく、透析プローブを用いた微量涙液採及び低眼刺激における薬物回収を試みた。

透析プローブは分子量5–25 kDa以下の物質を回収し、透析液はろ過や予備精製なしでHPLC法に用いることができる。また、透析膜の種類を変更することで、大きさや性質の異なった分子を回収することが可能である。これら透析膜の種類には再生セルロース、セルロースアセテート、ポリアクリロニトリル、ポリカーボネートなどがあり、本研究では一般的に低分子の物質の透析に用いられる再生セルロースを選択し実験を行った。透析プローブを用いるうえで薬物回収率の把握は重要であり、回収率はプローブへの送液速度が高まるほど低下することが報告されている。⁷⁾ また、多くの実験ではハンドリングと透析効率の面から1–4 $\mu\text{L/min}$ の送液速度が用いられている。⁷⁾ 本研究においてもプローブへの送液速度の増加とともに薬物回収率は低下し、送液量0.1 $\mu\text{L/min}$ 、1 $\mu\text{L/min}$ 及び4 $\mu\text{L/min}$ の回収率はそれぞれ83.5%、18.4%、3.8%であった (Fig. 3)。一方、それぞれの送液速度において、回収できた透析液量に差がみられ、送液量0.1 $\mu\text{L/min}$ 、1 $\mu\text{L/min}$ 及び4 $\mu\text{L/min}$ 時の回収量は $0.7 \pm 0.2 \mu\text{L}/10 \text{ min}$ 、 $9.9 \pm 0.4 \mu\text{L}/10 \text{ min}$ 、 $39.8 \pm 1.2 \mu\text{L}/10 \text{ min}$ とプローブへの送液速度が1 $\mu\text{L/min}$ より遅い際には、平均値が回収理論値から大きくずれるとともに、平均値に対する標準誤差の割合が高まった。これらは、機器の精度としては送液可能であるが、回収量が非常に微量となることから、手動では安定した採取が困難であることに起因しており、本研究では、透析液の回収率・回収量の両面を考慮し、プローブへの送液速度を1 $\mu\text{L/min}$ に設定して検討を行った。透析プローブにより薬物回収を行う透析膜

回収法 [Fig. 1(B)] では、バッチサンプリング法に比べ、バラツキが高く r 値は0.9854であった。一方、バッチサンプリング法と比較し、点眼後の薬物検出時間が増加し、点眼50分後まで涙液中薬物挙動の評価が可能であった (Fig. 4)。これらは、透析プローブを用いることでサンプリング時の涙液の過剰減少やそれに伴う眼表面の刺激が改善したことと起因するものと考えられた。また、これら透析プローブを用いたマイクロダイアリス法とHPLC法を連結した装置 (マイクロダイアリス-HPLC法) を作製し、市販TM点眼薬点眼後の涙液挙動を確認したところ、透析液回収とHPLCへの注入過程の簡略化に伴い、人為的操作に起因するバラツキが改善され、透析膜回収法に比べより再現性の高い薬物消失挙動が得られた (Fig. 5)。

HPLCは幅広い分野で応用されている簡便かつ優れた測定方法であるが、今回のように微量サンプルの測定に適した方法とは言えない。また、本法では10分間貯留した透析液を測定するため、正確な眼表面での薬物挙動を反映しているとは言えず、更なる改良が必要である。一方、キャピラリーカラムを利用したCLCは、高性能化、検出の高感度化、分離システムの簡易化あるいは高機能化につながるものとして近年期待されている測定法である。このCLCはカラム内径の微小化に基づき、移動相流量が0.1–30 $\mu\text{L/min}$ と、従来のHPLCの移動相流量に比べ2–3桁小さいことが特徴である。このためCLCでは、カラム内径の微小化に伴う検出感度の改善や移動相溶媒の使用量及び廃溶媒量の減少が挙げられる。また、カラム熱容量が小さいため温度制御が容易であり、温度プログラミングの有効化につながるなどのメリットがある。さらに、質量分析 (MS)、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography; GC) 及びキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis; CE) といった高性能分離分析法より広く適用可能であることが最大の特徴と言える。本研究への応用性としても、CLCは回収した透析液の容量がナノリットルであっても測定可能であり、マイクロダイアリス-HPLC法のように透析液を集める必要がなく、目的の時間における薬物量の測定が可能と考えられる。そこで次に、先に示したマイクロダイアリス法とCLCを連結した装置 [マイクロダイアリス-CLC法, Fig. 1

(D)] を作製し、点眼後の涙液挙動測定への有用性について検討を行った。その結果、バッチサンプリング法、透析膜回収法、マイクロダイアリシス-HPLC 法と比較しバラツキも少なく、かつ点眼 75 分後まで経時的な TM の消失が確認できた。今回用いた CLC 移動相の流速は $1 \mu\text{L}/\text{min}$ であり、HPLC 法 ($250 \mu\text{L}/\text{min}$) の $1/250$ である。これらモノリス型キャピラリーカラム使用による流速の減少が、高感度な薬物検出につながり、結果、微量な涙液中薬物変化の把握を可能にしたものと考えられた。また、透析膜回収法やマイクロダイアリシス-HPLC 法では、0–10 分間隔で連続的に回収した涙液の平均薬物濃度が点眼 5 分後として算出される。このため、薬物挙動は把握できるものの、測定時における正確な薬物量を表すことができない。一方、点眼 5 分後の涙液中薬物量が、バッチサンプリング法の値と類似しているように、マイクロダイアリシス-CLC 法は測定時間における薬物濃度を直接反映することが可能である。今後、透析プローブを介した薬物回収率をさらに高めることで、より正確に眼表面での薬物挙動を把握することが可能と考えられる。マイクロダイアリシス法の薬物回収率改善には、プローブ膜細孔の拡大などが考えられ、現在検討を進めているところである。

以上、本研究ではマイクロダイアリシス法と CLC の組み合わせにより、眼表面での薬物濃度変化の把握が可能であることを示した。また、本法を用いることで、市販 TM 点眼薬点眼後の眼表面薬物挙動を明らかとした。近年、Klaus らはマイクロダイアリシス法と HPLC 法を用いることで、ウサギ房水や硝子体中のファーマコキネティクス解析が可能であることを報告している。⁸⁾したがって、マイクロダイアリシス-CLC 法はこれらウサギ房水や硝子体中の薬物動態解析にも応用可能であると考えられ、今後の応用性が期待できる。本研究は、点眼

薬のドラッグデリバリーシステム開発研究に有用であるとともに、点眼薬の安全性、利便性の向上にも大きく寄与するものと考えられる。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Yamamoto T., Iwase A., Araie M., Suzuki Y., Abe H., Shirato S., Kuwayama Y., Mishima H. K., Shimizu H., Tomita G., Inoue Y., Kitazawa Y., Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society, *Ophthalmology*, **112**, 1661–1669 (2005).
- 2) Japan Glaucoma Society. “The Japan Glaucoma Society Guidelines for Glaucoma,” 4th ed., 2018: <http://www.nichigan.or.jp/member/guideline/glaucoma4.pdf>, cited 10 March, 2018.
- 3) Chen T., Ward D. A., *Am. J. Vet. Res.*, **71**, 671–676 (2010).
- 4) Ohman L., Edqvist L. E., Johansson E. D., *Acta Ophthalmol.* (Copenh.), **60**, 106–112 (1982).
- 5) Nagai N., Ogata F., Otake H., Kawasaki N., Nakazawa Y., Kanai K., Okamoto N., Shimomura Y., *Exp. Eye Res.*, **165**, 118–124 (2017).
- 6) Nagai N., Murao T., Inubuse R., Konishi N., Ito Y., *Yakugaku Zasshi*, **131**, 621–628 (2011).
- 7) Nakahara D., Kato M., *J. Physiol. Soc. Jpn.*, **61**, 363–376 (1999).
- 8) Klaus R., Jin C., Maier-Salamon A., Jäger W., Knopf C., Zeitlinger M., Richter-Müsch S., Schmidl D., Schmetterer L., Garhöfer G., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **32**, 390–395 (2016).