

抗緑内障点眼薬であるチモロールマレイン酸塩に対する  
ドラッグデリバリーシステムの応用に関する研究

喜多 瑞樹

Study on the application of drug delivery system to timolol  
maleate, an anti-glaucoma eyedrop

Mizuki KITA

## 目次

序論 .....	1
第 1 章 北里大学附属動物病院で緑内障と診断されたイヌに対する 回顧的研究 .....	3
1. 緒言 .....	3
2. 材料および方法 .....	4
3. 結果 .....	4
4. 考察 .....	5
付図および付図説明 .....	7
第 2 章 健常犬に対しナノ粒子水酸化マグネシウム混合チモロール マレイン酸塩を単回投与した際の眼圧下降作用の検証 .....	8
1. 緒言 .....	8
2. 材料および方法 .....	8
3. 結果 .....	11
4. 考察 .....	16
付図および付図説明 .....	19
第 3 章 健常犬に対しナノ粒子水酸化マグネシウム混合チモロール マレイン酸塩を 1 日 2 回連続投与した際の眼圧下降作用の検証 .	32
1. 緒言 .....	32
2. 材料および方法 .....	33
3. 結果 .....	35
4. 考察 .....	39
付図および付図説明 .....	43

総括 .....	57
参考文献 .....	61
謝辞 .....	70

## 序論

緑内障は、網膜神経節細胞とその軸索の不可逆的変性を共通の病態とする眼疾患である[2, 6, 16, 19]。本疾患は、日本人の視覚喪失の原因の第一位であると報告されている[25]。現在、緑内障の発症のリスク因子は数多く報告されているが、最も重要かつ修正可能なものは、眼圧である[2, 6, 19, 21]。そのため、エビデンスを伴った唯一の緑内障治療法は、点眼療法を主とした眼圧下降による視神経の物理的障害の抑制である[2, 6, 16, 19, 21, 32]。

現在、交感神経 $\beta$ 受容体遮断薬、縮瞳薬、炭酸脱水酵素阻害薬、プロスタグランジン関連薬など、様々な抗緑内障点眼薬が市販されている[2, 16, 21]。これらのうちプロスタグランジン関連薬は、優れた眼圧下降作用を有するため、原発緑内障に対する第一選択薬として使用される[2, 16, 21]。しかし本薬剤は、眼局所副作用として、血液房水関門の破綻に起因する起炎作用を有し、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障に対しては使用禁忌である[15, 20, 40]。対して交感神経 $\beta$ 受容体遮断薬の一つであるチモロールマレイン酸塩(TM)は、血液房水関門の破綻を誘発しない[15]。そのためTMは、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障を含む多くの病態の緑内障に対し、単独あるいは他の薬剤と併用して一般的に使用される[24]。TMは、毛様体無色素上皮の交感神経 $\beta$ 受容体を非選択的に遮断し、房水産生を抑制することで眼圧を下降させる[13, 50]。しかし、TMはいくつかの欠点もある。TMは、イヌでは眼圧下降作用が十分でなく、さらに徐脈や血圧低下、気管支喘息などの全身副作用を誘発あるいは増悪させる[9, 22, 24, 41, 46]。その原因として、TMを含む多くの水溶性点

眼薬は、疎水性である角膜上皮を透過することが困難で、眼内への移行量が点眼量の 5% 未満と非常に少量であることが挙げられる [29, 30, 48]。余剰な点眼薬は鼻涙管より吸収され、全身循環へ流入することで、前述の全身副作用を引き起こしうる [29, 30, 48]。

近年、薬剤の生物学的利用能の改善を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) が着目されている [34]。DDS は眼科領域にも応用されつつあり、ナノキャリア混合製剤、ヒドロゲル製剤、薬剤含浸コンタクトレンズなどが試みられている [8, 27, 29, 30, 47]。これらはいずれも、薬剤の生物学的利用能の改善が期待されるが、いくつかの欠点もある。ヒドロゲル製剤は、その高い粘調性のために、点眼時の不快感や刺激性がある [3, 51]。薬剤含浸コンタクトレンズは、装用後早期の脱落が課題として考えられる [4]。一方でナノキャリア混合製剤は、既存薬剤にナノキャリアを混合することで容易に作製可能であり、通常の間眼薬と同様に使用可能であると考えられ、他の DDS 製剤にはない利点がある [27, 29, 30]。

点眼薬に対し応用可能なナノキャリアの一つに、水酸化マグネシウム (MH) がある。MH は瀉下剤や制酸剤として、古くから使用されている [5]。ナノ粒子 MH (nMH) の点眼により、角膜上皮細胞間隙が拡張し、混合薬剤の眼内移行性が向上する [27, 29, 30]。本薬剤を TM に応用することで、TM の副作用を増大させることなく眼圧下降作用を増大させ、nMH 混合 TM (nMH-TM) が、新たなイヌの抗緑内障点眼薬となる可能性がある。本研究は、nMH-TM のイヌの緑内障治療への応用を目指し、イヌの緑内障に関する基礎的データの収集ならびに健常犬に対する nMH-TM 眼圧下降作用の評価を実施した。

## 第 1 章

# 北里大学附属動物病院で緑内障と診断されたイヌに対する回顧的研究

### 1. 緒言

緑内障は一般的に、発症の原因（原発あるいは続発）と隅角性状（開放あるいは閉塞）により分類される[16, 21]。ヒトとイヌでは、緑内障の病態が大きく異なる。日本人の緑内障の約 9 割は、原発緑内障で、そのうち約 9 割が開放隅角である[45]。イヌの緑内障は、約 6 割が続発緑内障である[42, 43]。原発開放隅角緑内障の治療は、プロスタグランジン関連薬の点眼が第一選択である[2, 16, 21]。続発緑内障は、ぶどう膜炎、外傷、水晶体偏位、眼内新生物などを原因疾患として発症する[16, 21]。本疾患は、原因疾患の治療とともに、抗緑内障点眼薬を使用する[11, 16, 21]が、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障は、起炎性を有する点眼薬の使用が禁忌である[15, 20, 40]。

アメリカ合衆国で実施された、40 年間に及ぶ大規模疫学調査によると、1994 年～2002 年におけるイヌの緑内障の有病率は 1.9%で、年々上昇傾向にあると報告されている[10, 11]。緑内障がイヌの視覚喪失の原因疾患に占める割合は報告されていないが、本疾患は日本人の視覚喪失の原因疾患の第一位であり[25]、イヌにおいても緑内障は重要な眼疾患のうちの 1 つであると考えられる。

第 1 章では、イヌの緑内障に関する基礎的データの収集を目的に、北里大学附属動物病院で緑内障と診断されたイヌに対する回顧的研究を実施した。

## 2. 材料および方法

本研究では、2007年7月～2012年12月までに北里大学附属動物病院に来院したイヌの眼科初診症例を対象とした。そのうち、視覚障害に関する評価がされていない症例は、研究対象から除外した。視覚障害の有無は、威嚇瞬目反応、幻惑反射、対光反射、迷路試験の結果より判断した。緑内障は、眼圧が20 mmHg以上で視覚障害が認められ、上強膜血管のうっ血、眼瞼痙攣、散瞳、角膜浮腫、視神経乳頭の陥凹や委縮、網膜血管の狭細化など、緑内障に特徴的な臨床症状が認められるものとした。これらのうち、ぶどう膜炎、外傷、水晶体偏位、眼内新生物など、続発緑内障の発症要因となる眼疾患の併発が認められないものを原発緑内障、併発しているものを続発緑内障とした。

対象となった症例全420頭840眼に対し、緑内障の罹患率、病態、視覚喪失の割合について調査を行った。

## 3. 結果

全840眼のうち、41眼(4.9%)が緑内障に罹患しており、そのうち6眼は、両側性であった。平均年齢は $8.6 \pm 3.1$ 歳で、性別は、雄が10頭、雌が28頭であった。緑内障の病態の内訳は、22眼(53.7%)がぶどう膜炎を伴う続発緑内障、18眼(43.9%)が原発緑内障、1眼(2.4%)が水晶体前方脱臼を伴う続発緑内障であった(図1)。

緑内障に罹患していた41眼のうち、32眼(78.0%)が、初診時に視覚を喪失していた。これは初診時に視覚を喪失していた症例(141眼)の22.7%を占め、その割合は、網膜変性症(41.8%)に



次いで原因疾患の第二位であった。

#### 4. 考察

本研究では、イヌの緑内障に関する基礎的データの収集を目的に、北里大学附属動物病院で緑内障と診断されたイヌに対する回顧的研究を実施した。その結果、イヌの緑内障の 53.7% がぶどう膜炎を伴う続発緑内障であり、緑内障はイヌの視覚喪失の原因疾患の第二位であることが明らかとなった。

イヌの緑内障に関する最新の疫学調査では、イヌの緑内障の 40.9% が原発緑内障、59.1% が続発緑内障であったと報告されている [42, 43]。これは、本研究結果と同等であり、イヌの緑内障は続発緑内障がその病態の主であることが、あらためて確認された。既報ではまた、続発緑内障のうち、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障が病態の第一位であり、その割合は、23.0% と報告されている [42, 43]。本研究では続発緑内障のうち、95.7% (22/23 眼) がぶどう膜炎を伴う続発緑内障であり、既報と比較し非常に大きな割合を占める結果となった。その一要因として、病態の分類法が異なる点が挙げられる。既報 [42, 43] では、水晶体原性ぶどう膜炎や前房内出血を伴う続発緑内障は、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障とは別の疾患として分類されていた。対して本研究では、これらはすべてぶどう膜炎を伴う続発緑内障として分類した。

本研究において、緑内障と診断されたイヌのうち 78.0% が、初診時に視覚を喪失していた。さらに、緑内障は、イヌの視覚喪失の原因疾患として、網膜変性症に次いで第二位であった。網膜変性症、緑内障はともに不可逆的な視覚喪失につながる疾患であり、特に網

膜変性症は、視覚を喪失する以前に診断を下したとしても、病態の進行を抑制することは不可能である。しかし先述のとおり、緑内障は、点眼療法を主とした眼圧下降により病態の進行を遅らせることが可能で、ぶどう膜炎や網膜剥離などとともに治療対象となる疾患である[2, 6, 16, 19, 21, 32]。つまり緑内障は、視覚喪失の原因疾患のうち治療対象となる疾患としては第一位であり、緑内障を適切に治療することで、イヌの視覚保持率の改善につながると考えられた。

本章の結論として、イヌの緑内障の最も一般的な病態は、プロスタグランジン関連薬の使用が禁忌である、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障であることが確認された。また緑内障は、イヌの視覚喪失の原因疾患として、網膜変性症に次いで第二位であることが明らかとなった。これらより、イヌの視覚保持率の改善のためには、TMを含め、起炎作用を有さない既存抗緑内障点眼薬の眼圧下降作用の向上が、必要であると考えられた。

付図および付図説明

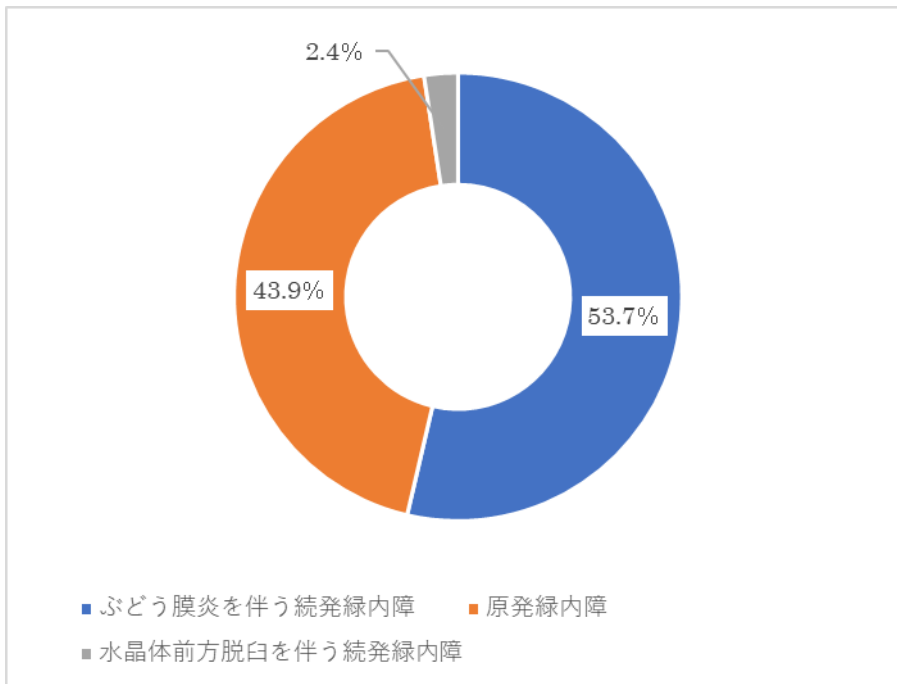


図 1.

緑内障の病態の内訳

イヌの緑内障の病態はぶどう膜炎を伴う続発緑内障が主であり、緑内障罹患症例の 53.7% を占めていた。

## 第 2 章

### 健常犬に対しナノ粒子水酸化マグネシウム混合 チモロールマレイン酸塩を単回投与した際の 眼圧下降作用の検証

#### 1. 緒言

交感神経  $\beta$  受容体非選択的遮断薬である TM は、毛様体無色素上皮に作用し、房水産生を抑制することで、用量依存的に眼圧を下降させる [9, 13, 50]。TM 点眼薬は通常、0.25% ~ 0.5% 溶液が使用されるが、これらの濃度では、健常犬に対する眼圧下降作用が得られず、より高用量で使用する必要があるとの報告もある [9, 13]。他方で、TM の全身副作用もまた用量依存的であり、高濃度の TM 点眼は推奨されていない [9, 24, 41, 46]。

これまでに、げっ歯類モデルを用いた研究では、TM に対し nMH を混合することで、眼圧下降作用が増大することが明らかとなっているが、nMH-TM の全身副作用は検討されていない [29]。また TM は、対側眼の眼圧下降作用や、特にイヌでは瞳孔径の収縮作用も有する [9, 22, 50] が、nMH の混合によるこれらの作用への影響は不明である。

第 2 章では、健常犬に対し nMH-TM を単回投与した際の、眼圧、瞳孔径、心拍数、血圧に及ぼす影響について、TM と比較検討した。

#### 2. 材料および方法

##### 2-1. 供試動物

本実験には、動物繁殖研究所（茨城）より購入した健常ビーグル

犬 5 頭（平均年齢  $2.1 \pm 0.6$  歳、平均体重  $11.1 \pm 0.7$ kg）を使用した。すべてのイヌは、実験で使用される前に、シルマー 1 型涙液試験（STT-1；シルメル試験紙、あゆみ製薬株式会社、東京）、角膜フルオレセイン染色（フローレス眼検査用試験紙 0.7mg、あゆみ製薬株式会社、東京）、0.4% オキシブプロカイン（ベノキシール点眼液 0.4%、参天製薬株式会社、大阪）点眼後の眼圧測定（Tono-Pen AVIA Vet®, Reichert Inc, Depew, NY, U.S.A）、細隙灯生体顕微鏡検査（SL-15、コーワ株式会社、東京）、および間接検眼検査（Volk 20D lens, Volk Optical Inc., Mentor, Ohio, U.S.A）を含む完全な眼科検査を受け、異常がないことが確認された。イヌは、室温  $18 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40～70%、明期：午前 7 時～午後 7 時、暗期：午後 7 時～午前 7 時の環境下で個体毎のケージ内で飼育し、1 日 1 回（午前 7 時）市販のドライフード（CLEAR Dog Diet CD-5M®, 日本クレア株式会社、東京）を給餌した。動物の取り扱いおよび実験内容は、本実験北里大学獣医学部の動物倫理委員会により承認されている（承認番号 18-145）。

## 2-2. 薬剤

本実験では、TM として、市販 0.5% TM（チモプトール®点眼液 0.5%、参天製薬、大阪）を使用した。0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、それぞれ 0.02% ならびに 0.2% nMH 懸濁液と 1% TM 溶液（Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A.）を 1：1 の割合で混合し作製した。0.02% ならびに 0.2% nMH 懸濁液は、既報 [26, 29] に従いビーズミル法で作製したものが、近畿大学薬学部より提供された。

### 2-3. 実験デザイン

本実験では、生理的食塩水 (saline)、TM、0.01% nMH-TM、0.1% nMH-TM を使用し、健常犬 5 頭に対する単盲検クロスオーバー試験を実施した。本クロスオーバー試験開始前に、馴化を目的に 5 日間眼圧を測定した。

4 種の薬剤のうち 1 種を、片眼に対し 50  $\mu$ L 投与した(午前 9 時)。対側眼は無処置とした。投与 12 時間後まで、各測定項目を継時的に測定した。7 日間以上の休薬ののち、新たな薬剤を用いて同様の実験を繰り返した。

### 2-4. 測定

眼圧、瞳孔径、心拍数、平均動脈血圧は、薬剤投与直前 (ベースライン)、投与 1、2、3、5、7、9、12 時間後 (T1~T12) に測定した。眼圧は各測定時点につき 3 回測定し、その平均値を測定時点での眼圧とした。瞳孔径の測定にはデジタルキャリパーを使用した。心拍数は、聴診器を用いて 1 分間測定した。平均動脈血圧の測定には、オシロメトリック式血圧計 (BP-608 Evolution II Veterinary version、フクダコーリン株式会社、東京) を使用した。平均動脈血圧測定の際にはイヌを腹臥位に保定し、既報のガイドライン[1]に従い、尾部に周囲長の 30~40% の幅のカフを装着した。平均動脈血圧は各測定時点につき 3 回測定し、その平均値を測定時点での平均動脈血圧とした。結膜充血、結膜浮腫、眼脂、角膜フルオレセイン染色は、既報[7]に倣い、表 1 の基準でスコア化し、STT-1 とともに、ベースライン、T12 に評価した。

## 2-5. 統計解析

得られたデータは、平均値±標準偏差で示した。すべての測定項目について、一元配置分散分析を用い、ベースライン値を薬剤群間で比較した。すべての測定項目について、各薬剤投与後の継時的変化を反復測定分散分析により比較した。さらに、すべての測定項目について、各薬剤群の最低値を、一元配置分散分析により比較した。分散分析により有意差が認められた場合には、ボンフェローニ検定による多重比較を実施した。すべての統計解析には EZR version 1.54 使用し、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 3. 結果

### 3-1. ベースラインの評価

ベースラインにおける眼圧、瞳孔径、心拍数、平均動脈血圧を、表 2 に示す。全測定項目において、ベースライン値に、薬剤群間で有意な差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

### 3-2. nMH-TM の効果検証

#### 3-2-1. 処置眼の眼圧への影響

処置眼の眼圧の推移を図 2A、表 3 に示す。

TM 群は薬剤投与後、わずかな眼圧の下降傾向が認められ、T2 において、saline 群と比較し最大  $1.0 \pm 0.6$  mmHg 下降した。しかし、すべての時点で、saline 群との有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

0.01% nMH-TM 群は、T2 において、saline 群と比較し最大  $2.9 \pm 0.9$  mmHg 下降し、T2、T7 において、saline 群との有意差が認めら

れた（すべて  $P < 0.01$ ）。さらに T2 において、TM 群とも有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。

0.1% nMH-TM 群は、T3 において、saline 群と比較し最大  $2.6 \pm 1.1$  mmHg 下降し、T2、T3、T7 において saline 群との有意差が認められた（すべて  $P < 0.01$ ）。すべての時点で TM 群、0.01% nMH-TM 群との有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

各薬剤群における最低眼圧は、saline 群が T1、TM 群ならびに 0.1% nMH-TM 群が T3、0.01% nMH-TM 群が T2 に記録した。その眼圧は、saline 群が  $12.9 \pm 0.6$  mmHg、TM 群が  $12.2 \pm 1.0$  mmHg、0.01% nMH-TM 群が  $10.6 \pm 0.6$  mmHg、0.1% nMH-TM 群が  $10.6 \pm 1.1$  mmHg で、0.01% nMH-TM 群と saline 群間、0.1% nMH-TM 群と saline 群間で有意差が認められた（すべて  $P < 0.01$ ）。

### 3-2-2. 対側眼の眼圧への影響

対側眼の眼圧の推移を図 2B、表 3 に示す。

TM 群は薬剤投与後、わずかな眼圧の下降傾向が認められ、T3 において、saline 群と比較し最大  $1.2 \pm 1.2$  mmHg 下降した。しかし、すべて時点で、saline 群との有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

0.01% nMH-TM 群は、T2 において、saline 群と比較し最大  $2.3 \pm 0.9$  mmHg 下降し、saline 群（ $P < 0.01$ ）および TM 群（ $P < 0.05$ ）との有意差が認められた。

0.1% nMH-TM 群は、T3 において、saline 群と比較し最大  $2.0 \pm 0.8$  mmHg 下降し、T2、T3、T5、T7 において saline 群との有意差が認められた（T2、T3、T5： $P < 0.01$ ；T7： $P < 0.05$ ）。さらに T5 において、TM 群とも有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。すべての時点



で、0.01% nMH-TM 群との有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

各薬剤群における最低眼圧は、saline 群が T1、TM 群ならびに 0.1% nMH-TM 群が T3、0.01% nMH-TM 群が T2 に記録した。その眼圧は、saline 群が  $13.4 \pm 0.7$  mmHg、TM 群が  $12.4 \pm 0.9$  mmHg、0.01% nMH-TM 群が  $11.3 \pm 0.9$  mmHg、0.1% nMH-TM 群が  $11.6 \pm 0.9$  mmHg で、0.01% nMH-TM 群と saline 群間で有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。

### 3-2-3. 処置眼の瞳孔径への影響

処置眼の瞳孔径の推移を図 3A、表 4 に示す。

TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、T1 から T12 まで、saline 群と比較し有意に瞳孔径が縮小した（TM 群：T1～T9： $P < 0.01$ ；T12： $P < 0.05$ ）（0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群：T1～T7、T12： $P < 0.01$ ；T9： $P < 0.05$ ）。TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群の瞳孔径は、saline 群から、それぞれ最大で、 $1.1 \pm 0.2$  mm、 $1.4 \pm 0.1$  mm、 $1.4 \pm 0.4$  mm 縮小した。これらはいずれも T3 に観察された。すべての時点において、TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群間での有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

各薬剤群における最小瞳孔径は、saline 群ならびに TM 群が T5、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群が T3 に記録した。その瞳孔径は、saline 群が  $5.2 \pm 0.2$  mm、TM 群が  $4.2 \pm 0.3$  mm、0.01% nMH-TM 群が  $4.1 \pm 0.3$  mm、0.1% nMH-TM 群が  $4.0 \pm 0.3$  mm であった。TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群は、いずれも saline 群と比較し有意に瞳孔径が縮小した（すべて  $P < 0.01$ ）が、これら 3 つの薬剤群間で有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

#### 3-2-4. 対側眼の瞳孔径への影響

対側眼の瞳孔径の推移を図 3B、表 4 に示す。

TM 群の瞳孔径は、saline 群と比較し、T7 において、最大で  $0.3 \pm 0.3$  mm 縮小した。しかし、すべての時点において saline 群との有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

0.01% nMH-TM 群は T7 において、0.1% nMH-TM 群は T3 において、それぞれ saline 群と比較し有意に瞳孔径が縮小した（すべて  $P < 0.05$ ）。その変化量は、それぞれ  $0.7 \pm 0.2$  mm、 $0.7 \pm 0.4$  mm であった。しかし、その他の時点で saline 群との有意差は認められず（すべて  $P > 0.05$ ）、明らかな縮瞳傾向は観察されなかった。

各薬剤群における最小瞳孔径は、saline 群が T5、TM 群が T9、0.01% nMH-TM 群が T7、0.1% nMH-TM 群が T3 に記録した。その瞳孔径は、saline 群が  $5.2 \pm 0.2$  mm、TM 群が  $5.0 \pm 0.3$  mm、0.01% nMH-TM 群が  $4.7 \pm 0.2$  mm、0.1% nMH-TM 群が  $4.8 \pm 0.4$  mm で、これら 4 つの薬剤群間で有意差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。

#### 3-2-5. 心拍数への影響

心拍数の推移を図 4、表 5 に示す。

TM 群は、saline 群から最大で、T1 の時点で  $26.8 \pm 13.8$  bpm 減少し、T1～T3 において、saline 群との有意差が認められた（T1： $P < 0.01$ ；T2、T3： $P < 0.05$ ）。

0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群は、saline 群から最大で、いずれも T1 の時点で  $38.4 \pm 5.4$  bpm、 $32.8 \pm 6.9$  bpm 減少し、両薬剤群ともに T1～T5 において、saline 群との有意差が認められた（0.01% nMH-TM 群：T1、T3、T5： $P < 0.01$ ；T2： $P < 0.05$ ）（0.1% nMH-TM 群：T1、T3： $P < 0.01$ ；T2、T5： $P < 0.05$ ）。いずれの時点において

も、TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群間での心拍数の有意な差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

各薬剤群における最低心拍数は、saline 群が T12、TM 群が T2、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群が T3 に記録した。その心拍数は、saline 群が  $100.4 \pm 11.1$  bpm、TM 群が  $86.0 \pm 8.6$  bpm、0.01% nMH-TM 群が  $78.2 \pm 6.3$  bpm、0.1% nMH-TM 群が  $81.4 \pm 9.1$  bpm であった。0.01% nMH-TM 群と saline 群間において有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）が、TM 群と saline 群間、0.1% nMH-TM 群と saline 群間において有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群間において、最低心拍数に有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

#### 3-2-6. 平均動脈血圧への影響

平均動脈血圧の推移を図 5、表 6 に示す。

TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群はそれぞれ、saline 群から最大で  $9.6 \pm 15.0$  mmHg、 $5.4 \pm 10.3$  mmHg、 $9.2 \pm 17.2$  mmHg 低下した（それぞれ T5、T2、T5 に記録）が、すべての時点において、saline 群、TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群間で、平均動脈血圧の有意な差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

#### 3-3. nMH-TM の眼局所および全身への副作用

すべての薬剤群において、本実験すべての期間を通し、結膜充血、結膜浮腫、眼脂、角膜フルオレセイン染色スコアは 0 であった。さらに、すべての薬剤群において、薬剤投与前後で STT-1 値の有意な変化は認められなかった（データ示さず）。

#### 4. 考察

本研究では、健常犬に対し 0.01%ならびに 0.1% nMH-TM を単回投与した際の眼圧下降作用について検討した。その結果、各薬剤群の最大眼圧下降量は、TM 群で  $1.0 \pm 0.6$  mmHg、0.01% nMH-TM 群で  $2.9 \pm 0.9$  mmHg、0.1% nMH-TM 群で  $2.6 \pm 1.1$  mmHg であり、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群は、TM 群と比較し有意に眼圧が下降した。さらに、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM が瞳孔径、心拍数、血圧に及ぼす影響は、TM と同等で、nMH の混合による TM の副作用の増大は認められなかった。

用量依存的な眼圧下降作用を有する TM 点眼薬は通常、0.25%～0.5% 溶液が使用される [9, 13, 50] が、健常犬の眼圧を下降させるためには、より高用量で使用する必要があるとの報告もある [9]。本研究では TM として、市販 0.5% TM 点眼薬を使用した。TM は健常犬の眼圧を最大  $1.0 \pm 0.6$  mmHg 下降させたが、その眼圧下降作用に saline との有意差は確認されず、眼圧下降作用が弱いことが明らかとなった。健常犬の眼圧を下降させるためには、TM をより高濃度で投与する必要があると推察された。

本研究で使用した nMH は、角膜上皮細胞間隙を拡張することで、点眼薬の眼内移行性を向上させるが、TM に 0.01% または 0.1% nMH を混合することで、点眼投与後の薬物房水中濃度時間曲線面積が 3 倍以上に増大することが示されている [29]。本研究において、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM の最大眼圧下降量は、TM の 2.6～2.9 倍と、優れた眼圧下降作用を示した。これは、nMH の混合により TM の眼内移行性が向上し、房水中 TM 濃度が有効濃度に達したためだと考えられた。

本研究では、0.01% nMH-TM と 0.1% nMH-TM の眼圧下降作用に、有意差は認められなかった。nMH の混合による眼内移行性の向上作用は用量依存的ではなく、0.01% nMH と 0.1% nMH で同等であることが明らかとなっている [29]。本結果より、TM に対する nMH の混合濃度は 0.01% が望ましいことが示唆された。

本研究において、TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群の瞳孔径は、saline 群から、それぞれ最大で、 $1.1 \pm 0.2$  mm、 $1.4 \pm 0.1$  mm、 $1.4 \pm 0.4$  mm 収縮したが、これら 3 群間に有意差はなく、nMH の混合による TM の縮瞳作用の増大は認められなかった。イヌに対する 2~8% TM 点眼液の縮瞳作用は、TM の濃度に関わらず同等であったと報告されている [13]。本研究において、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群の房水中の TM 濃度は、TM 群と比較し高いと推察されるが、TM の縮瞳作用は用量依存的でないために、瞳孔径に薬剤群間で差がなかったと考えられた。

TM は、イヌにおいて、対側眼の眼圧や瞳孔径にも影響を及ぼすと報告されている [9, 22, 50]。本研究において、TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、対側眼の眼圧を、それぞれ最大で  $1.2 \pm 1.2$  mmHg、 $2.3 \pm 0.9$  mmHg、 $2.0 \pm 0.8$  mmHg 下降させた。TM は有意な眼圧下降を示さなかったが、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は saline、TM と比較し、有意に下降した。また、TM、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、対側眼の瞳孔径を、それぞれ最大で  $0.3 \pm 0.3$  mm、 $0.7 \pm 0.2$  mm、 $0.7 \pm 0.4$  mm 収縮させたが、いずれも saline と比較し有意ではなかった。TM の対側眼への作用メカニズムは未だ明らかとなっていないが、その一つとして、鼻涙管より吸収され全身循環へ流入した TM が、対側眼に作用すると考えられている

[37]。しかし、0.5% TM を点眼した際の血漿中 TM 濃度は、投与眼の房水中 TM 濃度のおよそ 300 分の 1 と、非常に低濃度であることが報告されている [31, 49]。TM の眼圧下降作用は用量依存的である [9, 13] ことから、極低濃度の血漿中 TM が対側眼に作用し、眼圧を下降させることは困難であると推察される。さらに、TM の対側眼への作用が、全身循環を介して対側眼に流入した TM によるものであるならば、イヌにおいては縮瞳もまた生じると想定される。その他の作用メカニズムとして、全身循環へ流入した薬剤が中枢神経を介した作用や、左右眼の眼圧相互調節機構の存在が指摘されている [37, 38]。本研究で認められた nMH-TM の対側眼の眼圧下降作用は、これらのメカニズムが関与している可能性が考えられた。

イヌ、ヒトともに、TM はいくつかの全身副作用を生じさせることが報告されており、これらは鼻涙管より吸収され全身循環へ流入した TM が関与する [22, 24, 31, 41, 46]。本研究では TM、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、心拍数を、それぞれ最大で  $26.8 \pm 13.8$  bpm、 $38.4 \pm 5.4$  bpm、 $32.8 \pm 6.9$  bpm 下降させ、いずれの薬剤でも徐脈作用が認められたが、その程度は 3 薬剤間で有意差はなく、同等であった。また、いずれの薬剤でも血圧低下は生じず、nMH の混合による TM の副作用の増大は確認されなかった。これらのことから、nMH は混合薬剤の全身循環への流入量を増加させないことが示唆された。

本章の結論として、0.01% ならびに 0.1% nMH は、TM の全身副作用を増大させることなく、最大眼圧下降作用を 2.6~2.9 倍に増大させることが明らかとなった。0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、TM よりも優れたイヌの眼圧下降薬である可能性が示唆された。

付図および付図説明

表 1.

結膜充血、結膜浮腫、眼脂、角膜フルオレセイン染色の評価基準

項目	スコア	所見
結膜充血	0	正常
	1	角膜輪部から 1-3mm の範囲に淡紅～赤色の結膜血管が確認される
	2	複数の膨隆した赤色結膜血管分枝が角膜輪部～結膜円蓋に確認される
	3	2の所見に加え、結膜血管間の結膜が淡紅～赤色に染まる さらに、眼球/眼瞼結膜に点状出血が確認されることもある
結膜浮腫	0	正常
	1	局所的な結膜の腫脹が認められるが、眼瞼の外反や眼瞼の形状に変化はない
	2	広範な結膜の腫脹が認められるが、眼瞼の外反や眼瞼の形状に変化はない
	3	眼球/眼瞼結膜の腫脹が認められ、眼瞼の外反や変位があるが、完全な閉瞼は可能
4	眼球/眼瞼結膜の腫脹が顕著で、眼表面や眼内の評価が困難である。閉瞼は不良で、眼瞼裂から結膜が突出している	
眼脂	0	正常
	1	正常以上の眼脂が認められ、眼表面や眼窩に貯留しているものの、眼瞼や睫毛には付着していない
	2	眼脂が豊富で容易に観察でき、眼瞼や睫毛に貯留している
	3	眼脂が眼瞼を超えて付着しており、眼周囲皮膚に貯留している
角膜フルオレセイン染色 (重症度)	0	正常
	1	僅かな多巣性の点状染色陽性
	2	多巣性から集簇性の点状染色陽性
	3	局所または多巣性の上皮欠損を伴うが、実質の欠損はない
4	局所または多巣性の上皮および実質欠損を伴い明瞭に染色陽性	
角膜フルオレセイン染色 (範囲)	0	正常
	1	1～25%の領域が染色陽性
	2	26～50%の領域が染色陽性
	3	51～75%の領域が染色陽性
4	76～100%の領域が染色陽性	



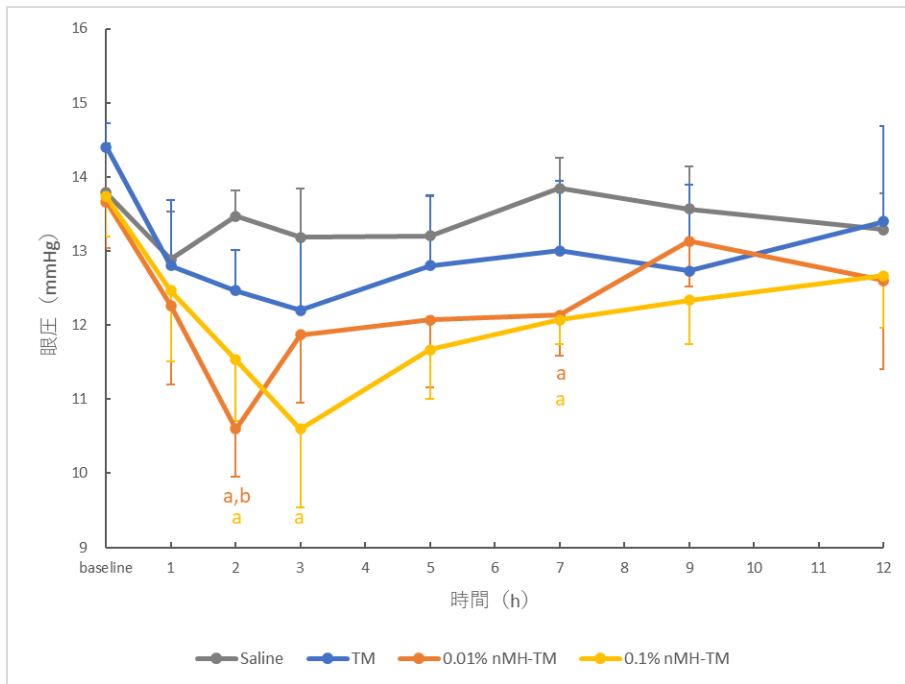
表 2.

ベースラインの眼圧、瞳孔径、心拍数、平均動脈血圧

	眼圧 (mmHg)		瞳孔径 (mm)		心拍数 (bpm)	血圧 (mmHg)
	処置眼	対側眼	処置眼	対側眼		
saline	13.8 ± 0.7	13.9 ± 0.8	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3	114.2 ± 9.7	83.6 ± 5.1
TM	14.4 ± 0.3	14.4 ± 0.4	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.3	124.8 ± 15.1	107.6 ± 18.1
0.01% nMH-TM	13.7 ± 0.6	14.1 ± 0.9	5.7 ± 0.3	5.8 ± 0.4	115.4 ± 19.0	90.0 ± 11.1
0.1% nMH-TM	13.7 ± 0.5	13.9 ± 0.7	5.6 ± 0.5	5.6 ± 0.5	109.2 ± 17.5	96.2 ± 10.2

すべての項目において、薬剤群間でベースライン値に有意差は認められなかった。

(A)



(B)

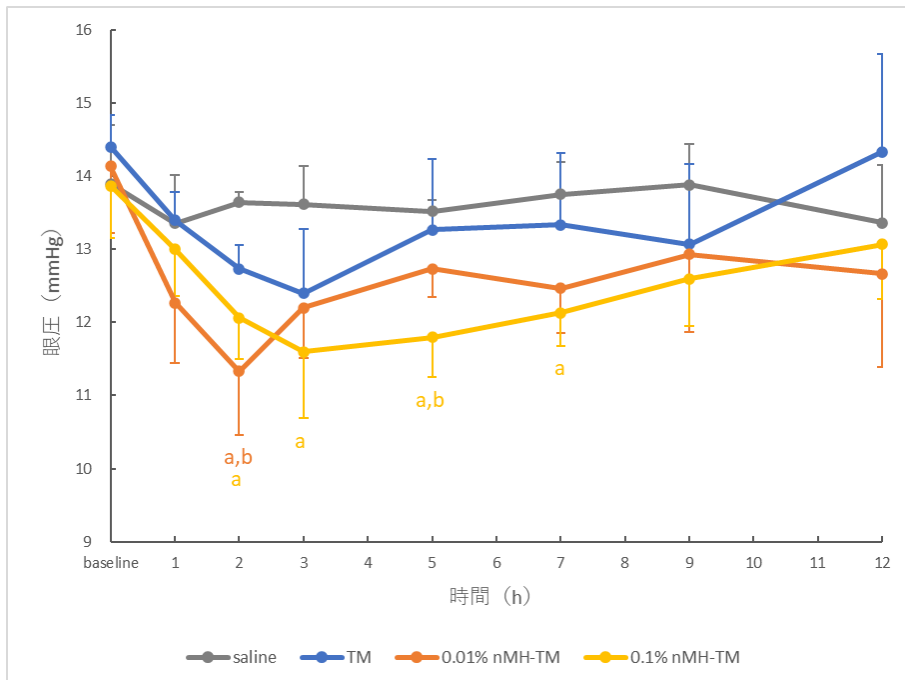


図 2.

処置眼の眼圧 (A) および対側眼の眼圧 (B) の変化データはすべて平均値±標準偏差で示している。

a :  $P < 0.05$  vs. saline 群

b :  $P < 0.05$  vs. TM 群

c :  $P < 0.05$  vs. 0.01% nMH-TM 群

0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群は、saline 群、TM 群と比較し、有意に両眼の眼圧が下降した。

0.01% nMH-TM 群と 0.1% nMH-TM 群間での有意差は認められなかった。

表 3.  
処置眼および対側眼の眼圧の変化

		ベースライン	T1	T2	T3	T5	T7	T9	T12
saline	処置眼	13.8 ± 0.7	12.9 ± 0.6	13.5 ± 0.3	13.2 ± 0.7	13.2 ± 0.5	13.8 ± 0.4	13.6 ± 0.6	13.3 ± 0.5
	対側眼	13.9 ± 0.8	13.4 ± 0.7	13.6 ± 0.1	13.6 ± 0.5	13.5 ± 0.2	13.8 ± 0.4	13.9 ± 0.5	13.4 ± 0.8
TM	処置眼	14.4 ± 0.3	12.8 ± 0.9	12.5 ± 0.5	12.2 ± 1.0	12.8 ± 1.0	13.0 ± 0.9	12.7 ± 1.2	13.4 ± 1.3
	対側眼	14.4 ± 0.4	13.4 ± 0.4	12.7 ± 0.3	12.4 ± 0.9	13.3 ± 1.0	13.3 ± 1.0	13.1 ± 1.1	14.3 ± 1.3
0.01%	処置眼	13.7 ± 0.6	12.3 ± 1.1	10.6 ± 0.6 <sup>ab</sup>	11.9 ± 0.9	12.1 ± 0.9	12.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	13.1 ± 0.6	12.6 ± 1.2
nMH-TM	対側眼	14.1 ± 0.9	12.3 ± 0.8	11.3 ± 0.9 <sup>ab</sup>	12.2 ± 0.7	12.7 ± 0.4	12.5 ± 0.6	12.9 ± 1.1	12.7 ± 1.3
0.1%	処置眼	13.7 ± 0.5	12.5 ± 1.0	11.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	10.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.7	12.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.6	12.7 ± 0.7
nMH-TM	対側眼	13.9 ± 0.7	13.0 ± 0.6	12.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	11.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.5 <sup>ac</sup>	12.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.6	13.1 ± 0.7

データはすべて平均値 ± 標準偏差 (mmHg) で示している。

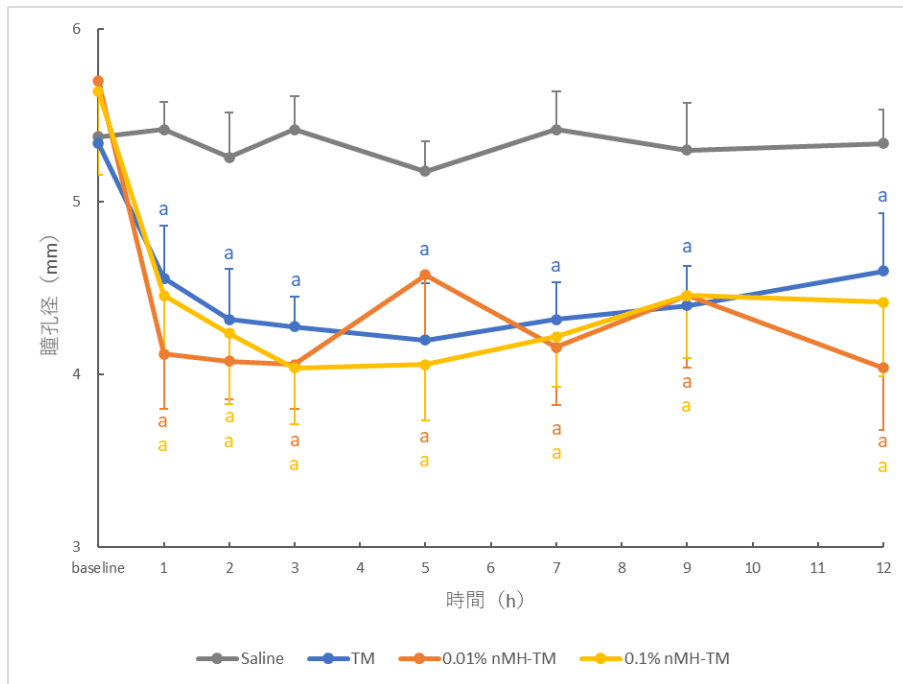
a :  $P < 0.05$  vs. saline 群

b :  $P < 0.05$  vs. TM 群

c :  $P < 0.05$  vs. 0.01% nMH-TM 群

0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群は、saline 群、TM 群と比較し、有意に両眼の眼圧が下降した。  
0.01% nMH-TM 群と 0.1% nMH-TM 群間での有意差は認められなかった。

(A)



(B)

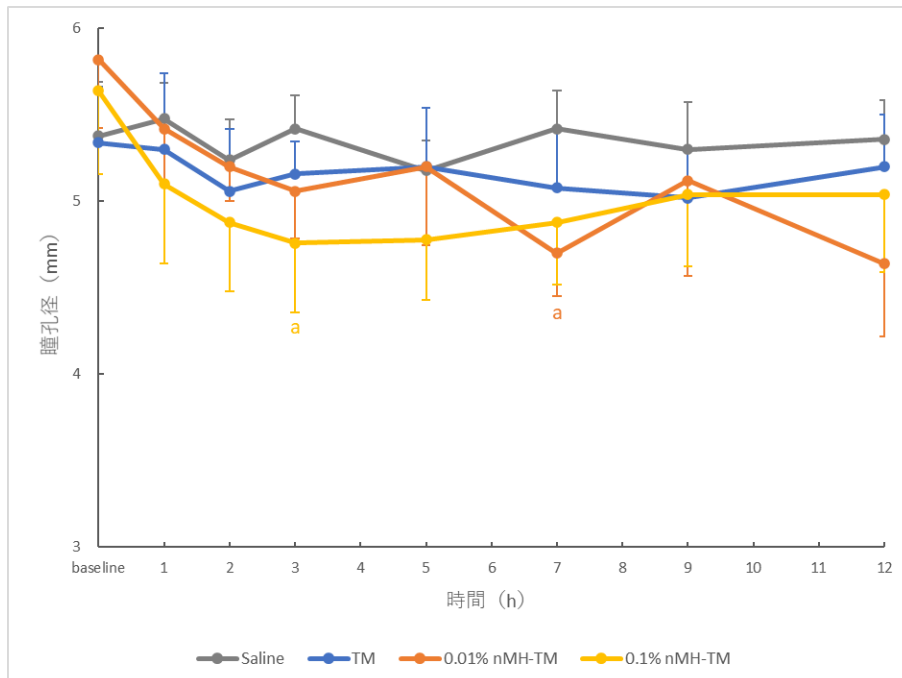


図 3.

処置眼の瞳孔径 (A) および対側眼の瞳孔径 (B) の変化データはすべて平均値±標準偏差で示している。

a:  $P < 0.05$  vs. saline 群

TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、saline 群と比較し、有意に処置眼の瞳孔径が収縮した。

0.01% nMH-TM 群は T7 において、0.1% nMH-TM 群間は T3 において、処置眼の瞳孔径に、saline 群との有意差が認められたが、両薬剤とも明確な縮瞳傾向は確認されなかった。

表 4.  
処置眼および対側眼の瞳孔径の変化

		ベースライン	T1	T2	T3	T5	T7	T9	T12
saline	処置眼	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.2
	対側眼	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2
TM	処置眼	5.3 ± 0.3	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
	対側眼	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.4	5.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.0 ± 0.3	5.2 ± 0.3
0.01%	処置眼	5.7 ± 0.3	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>
nMH-TM	対側眼	5.8 ± 0.4	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.5	4.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.5	4.6 ± 0.4
0.1%	処置眼	5.6 ± 0.5	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
nMH-TM	対側眼	5.6 ± 0.5	5.1 ± 0.5	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.3	4.9 ± 0.4	5.0 ± 0.4	5.0 ± 0.4

データはすべて平均値 ± 標準偏差 (mm) で示している。

a:  $P < 0.05$  vs. saline 群

TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、saline 群と比較し、有意に処置眼の瞳孔径が収縮した。

処置眼の縮瞳作用に、TM 群、0.01% nMH-TM 群、0.1% nMH-TM 群間での有意差は認められなかった。

全ての薬剤群において、対側眼の瞳孔径の有意な変化は認められなかった。

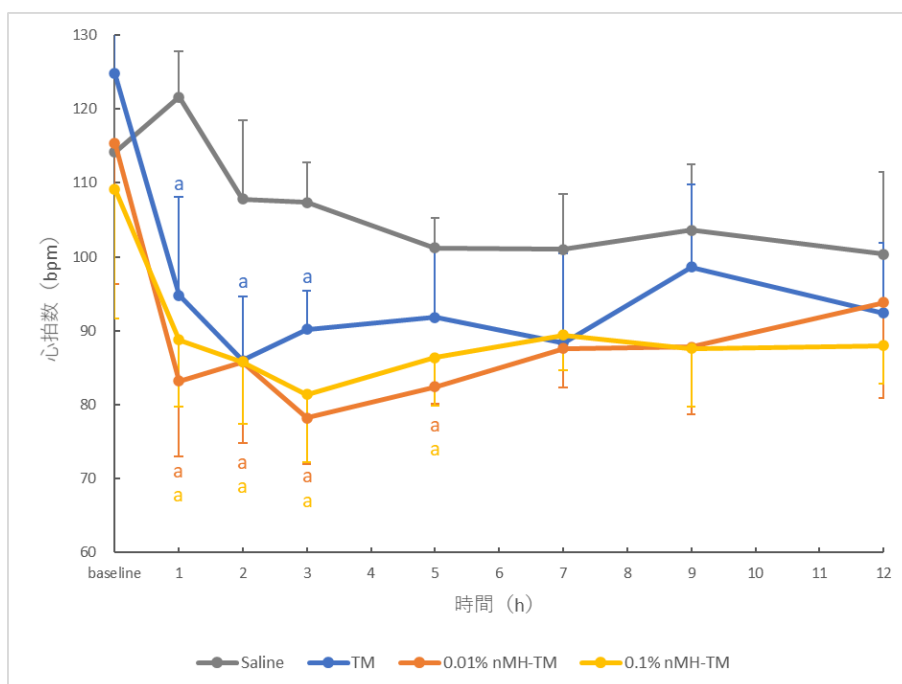


図 4.

心拍数の変化

データはすべて平均値±標準偏差で示している。

a :  $P < 0.05$  vs. saline 群

TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、saline 群と比較し、有意に心拍数が減少した。

徐脈作用に、TM 群、0.01% nMH-TM 群、0.1% nMH-TM 群間での有意差は認められなかった。



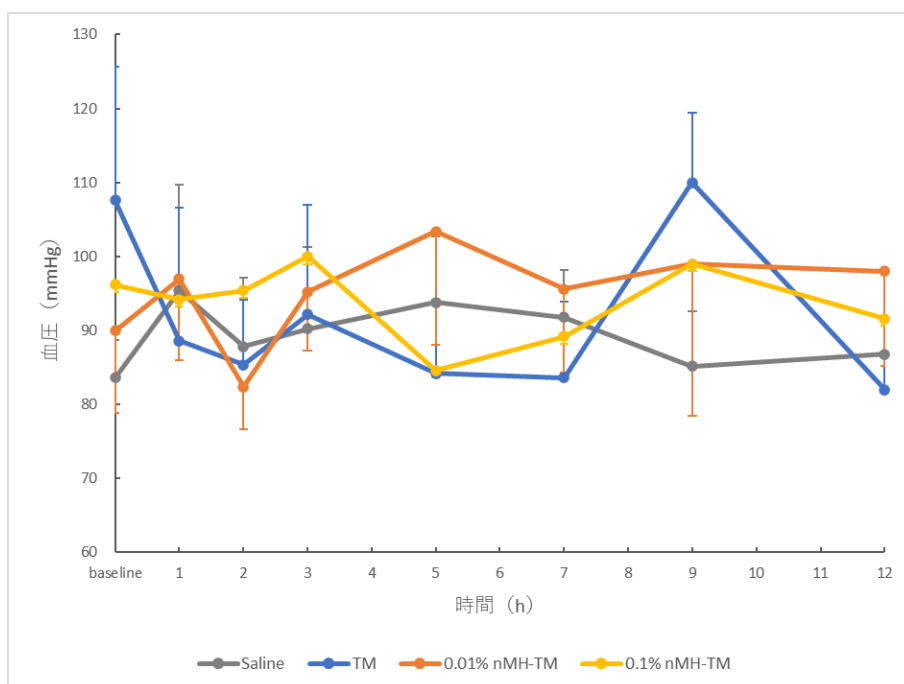
表 5.  
心拍数の変化

		ベースライン	T1	T2	T3	T5	T7	T9	T12
saline	処置眼	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.2
	対側眼	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2
TM	処置眼	5.3 ± 0.3	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
	対側眼	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.4	5.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.0 ± 0.3	5.2 ± 0.3
0.01%	処置眼	5.7 ± 0.3	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>
nMH-TM	対側眼	5.8 ± 0.4	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.5	4.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.5	4.6 ± 0.4
0.1%	処置眼	5.6 ± 0.5	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
nMH-TM	対側眼	5.6 ± 0.5	5.1 ± 0.5	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.3	4.9 ± 0.4	5.0 ± 0.4	5.0 ± 0.4

データはすべて平均値 ± 標準偏差 (bpm) で示している。

a :  $P < 0.05$  vs. saline 群

TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、saline 群と比較し、有意に心拍数が減少した。徐脈作用に、TM 群、0.01% nMH-TM 群、0.1% nMH-TM 群間での有意差は認められなかった。



**図 5.**  
 平均動脈血圧の変化  
 データはすべて平均値±標準偏差で示している。  
 すべての薬剤群において、平均動脈血圧の有意な変化は認められなかった。

表 6.  
平均動脈血圧の変化

	ベースライン	T1	T2	T3	T5	T7	T9	T12
saline	83.6 ± 5.1	95.4 ± 14.3	87.8 ± 9.4	90.2 ± 11.1	93.8 ± 8.9	91.8 ± 6.4	85.2 ± 7.4	86.8 ± 11.3
TM	107.6 ± 18.1	88.6 ± 18.0	85.4 ± 8.8	92.2 ± 14.8	84.2 ± 10.0	83.6 ± 10.3	110.0 ± 9.4	82.0 ± 15.9
0.01% nMH-TM	90.0 ± 11.1	97.0 ± 11.0	82.4 ± 5.7	95.2 ± 7.9	103.4 ± 15.4	95.6 ± 11.3	99.0 ± 20.5	98.0 ± 12.8
0.1% nMH-TM	96.2 ± 10.2	94.2 ± 11.8	95.4 ± 7.8	100.0 ± 25.9	84.6 ± 12.8	89.2 ± 16.6	99.0 ± 14.6	91.6 ± 5.9

データはすべて平均値 ± 標準偏差 (mmHg) で示している。  
すべての薬剤群において、平均動脈血圧の有意な変化は認められなかった。

## 第 3 章

### 健常犬に対しナノ粒子水酸化マグネシウム混合

### チモロールマレイン酸塩を 1 日 2 回連続投与した際の

### 眼圧下降作用の検証

#### 1. 緒言

イヌ、ヒト共に、眼圧には日内変動が存在する [12, 14, 32, 33, 36]。そのため、緑内障患者に対する眼圧下降療法の効果を評価する際に、ある単一時点でのみの眼圧測定では、ピーク眼圧の過小評価につながり、目標とした眼圧下降量に達したと誤認することがある [14, 39]。そこで近年、1 日のうち複数回眼圧を測定し、日中平均眼圧を算出し、これを基に治療効果を評価することが一般になりつつある [14, 23, 39]。ヒトの緑内障における眼圧コントロールの目標は、ベースライン値から 20%～50% 下降させることである [16]。イヌでは眼圧コントロールの目標は規定されていないが、ヒト同様、日中平均眼圧を下降させることが重要であると考えられる。

TM は臨床的に、通常 1 日 2 回点眼投与される [24]。しかし、健常犬に対する TM の 1 日 2 回点眼では、明らかな眼圧下降作用が得られなかったと報告されており [41]、TM は健常犬に対する日中平均眼圧下降作用を有さないと考えられる。

第 3 章では、第 2 章で健常犬に対する有効性が示唆された nMH-TM を、1 日 2 回点眼投与し、その日中平均眼圧下降作用を TM と比較検討した。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 供試動物

本実験には、動物繁殖研究所（茨城）より購入した健常ビーグル犬 5 頭（平均年齢  $1.6 \pm 0.1$  歳、平均体重  $11.4 \pm 0.7$  kg）を使用した。すべてのイヌは、実験で使用される前に、シルマー 1 型涙液試験（STT-1；シルメル試験紙、あゆみ製薬株式会社、東京）、角膜フルオレセイン染色（フローレス眼検査用試験紙 0.7mg、あゆみ製薬株式会社、東京）、0.4% オキシブプロカイン（ベノキシール点眼液 0.4%、参天製薬株式会社、大阪）点眼後の眼圧測定（Tono-Pen AVIA Vet®, Reichert Inc, Depew, NY, U.S.A）、細隙灯生体顕微鏡検査（SL-15、コーワ株式会社、東京）、および間接検眼検査（Volk 20D lens, Volk Optical Inc., Mentor, Ohio, U.S.A）を含む完全な眼科検査を受け、異常がないことが確認された。イヌは、室温 18~28℃、湿度 40~70%、明期：午前 7 時~午後 7 時、暗期：午後 7 時~午前 7 時の環境下で個体毎のケージ内で飼育し、1 日 1 回（午前 7 時）市販のドライフード（CLEAR Dog Diet CD-5M®, 日本クレア株式会社、東京）を給餌した。動物の取り扱いおよび実験内容は、本実験北里大学獣医学部の動物倫理委員会により承認されている（承認番号 19-048）。

### 2-2. 薬剤

本実験では、TM として、市販 0.5% TM（チモプトール®点眼液 0.5%、参天製薬、大阪）を使用した。0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、それぞれ 0.02% ならびに 0.2% nMH 懸濁液と 1% TM 溶液（Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A.）を 1 : 1 の割合で混

合し作製した。0.02%ならびに 0.2% nMH 懸濁液は、既報 [26, 29] に従いビーズミル法で作製したものが、近畿大学薬学部より提供された。

### 2-3. 実験デザイン

本実験では、生理的食塩水 (saline)、TM、0.01% nMH-TM、0.1% nMH-TM を使用し、健常犬 5 頭に対する単盲検クロスオーバー試験を実施した。本クロスオーバー試験開始前に、馴化を目的に 5 日間眼圧を測定した。

本実験は各薬剤につき 12 日間実施した。実験 1 日目 (D1) ~ D5 までは、ベースラインの設定のため薬剤を投与せず、D6~D12 は 4 種の薬剤のうち 1 種を、片眼に対し 1 日 2 回 (午前 9 時、午後 9 時)、1 回あたり 50  $\mu$ L 投与した。対側眼は無処置とした。28 日間以上の休薬ののち新たな薬剤を用いて同様の実験を繰り返した。

### 2-4. 測定

眼圧、瞳孔径、心拍数、平均動脈血圧は、D1~D12 まで、1 日 3 回 (午前 9 時、午後 3 時、午後 9 時) 測定した。眼圧は各測定時点につき 3 回測定し、その平均値を測定時点での眼圧とした。瞳孔径の測定にはデジタルキャリパーを使用した。心拍数は聴診器を用いて 1 分間測定した。平均動脈血圧の測定にはオシロメトリック式血圧計 (BP-608 Evolution II Veterinary version、フクダコーリン株式会社、東京) を使用した。平均動脈血圧測定の際にはイヌを腹臥位に保定し、既報のガイドライン [1] に従い、尾部に周囲長の 30~40% の幅のカフを装着した。平均動脈血圧は各測定時点につき 3 回

測定し、その平均値を測定時点での平均動脈血圧とした。結膜充血、結膜浮腫、眼脂、角膜フルオレセイン染色、糞便性状は、既報[7, 44]に倣い、表 7 の基準でスコア化し、STT-1 とともに、D1、D12 に評価した。また、全試験期間中、腹部膨満や嘔吐などの消化器症状を含む、身体所見の異常の有無も記録した。

## 2-5. 統計解析

得られたデータは、平均値±標準偏差で示した。すべての測定項目について、各薬剤の D1～D5 の測定値に対し、反復測定分散分析を行った。すべての測定項目について、D6～D12 の測定値の平均値を算出し、ベースラインからの変化量を、各薬剤群間で一元配置分散分析により比較した。さらに眼圧について、3 つの測定時点毎の測定値の平均値を算出し、ベースラインからの変化量を、各薬剤群間で一元配置分散分析により比較した。ベースラインは各薬剤群それぞれ、D1～D5 の測定値の平均値とした。分散分析により有意差が認められた場合には、ボンフェローニ検定による多重比較を実施した。すべての統計解析には EZR version 1.54 使用し、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 3. 結果

### 3-1. ベースラインの評価

ベースライン設定期間における眼圧、瞳孔径、心拍数、平均動脈血圧の日中平均値の推移を、表 8～11 に示す。D1～D5 の間、全測定項目において、薬剤群間で有意な差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。さらに、全測定項目において、有意な継時的変化は認め

られなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

### 3-2. nMH-TM の効果検証

#### 3-2-1. 処置眼の眼圧への影響

処置眼の日中平均眼圧の推移を図 6A に、ベースラインからの平均変化量を表 12 に示す。

TM 群の日中平均眼圧のベースラインからの平均変化量は、 $0.0 \pm 0.2$  mmHg であり、saline 群と比較し有意な差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。各測定時間における眼圧について、午後 9 時の時点でのみ眼圧が下降し、ベースラインからの平均変化量は、 $-0.6 \pm 0.4$  mmHg であった。これは、saline 群と比較して有意ではなかった（ $P > 0.05$ ）。

0.01% nMH-TM 群の日中平均眼圧のベースラインからの平均変化量は、 $-0.8 \pm 0.3$  mmHg であり、saline 群（ $P < 0.01$ ）および TM 群（ $P < 0.05$ ）と比較し有意に下降した。各測定時間における眼圧について、午前 9 時（ $-0.9 \pm 0.4$  mmHg）、午後 3 時（ $-1.0 \pm 0.1$  mmHg）において、saline 群（すべて  $P < 0.05$ ）および TM 群（すべて  $P < 0.01$ ）と比較し有意に下降したが、午後 9 時（ $-0.7 \pm 0.6$  mmHg）の時点では有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

0.1% nMH-TM 群の日中平均眼圧のベースラインからの平均変化量は、 $-1.2 \pm 0.4$  mmHg であり、saline 群および TM 群と比較し有意に下降した（すべて  $P < 0.01$ ）。各測定時間における眼圧について、午前 9 時（ $-1.1 \pm 0.4$  mmHg）、午後 3 時（ $-1.2 \pm 0.6$  mmHg）、午後 9 時（ $-1.3 \pm 0.5$  mmHg）のいずれの時点でも、saline 群と比較して有意に低値であった（すべて  $P < 0.01$ ）。また午前 9 時と午後 3 時の時



点において、TM 群と比較して有意に眼圧が下降した（すべて  $P < 0.01$ ）が、午後 9 時の時点においては有意差が認められなかった（ $P > 0.05$ ）。

すべての測定時点で、0.01% nMH-TM 群と 0.1% nMH-TM 群間で有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

### 3-2-2. 対側眼の眼圧への影響

対側眼の日中平均眼圧の推移を図 6B に、ベースラインからの平均変化量を表 13 に示す。

TM 群の日中平均眼圧のベースラインからの平均変化量は、 $0.0 \pm 0.2$  mmHg であり、saline 群と比較し有意な差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。各測定時間における眼圧について、午後 9 時の時点でのみ眼圧が下降し、ベースラインからの平均変化量は、 $-0.5 \pm 0.4$  mmHg であった。これは、saline 群と比較して有意ではなかった（ $P > 0.05$ ）。

0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群の日中平均眼圧のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $-0.5 \pm 0.2$  mmHg、 $-1.0 \pm 0.4$  mmHg であった。これらはいずれも、saline 群（ $P < 0.05$ ：0.01% nMH-TM 群； $P < 0.01$ ：0.1% nMH-TM 群）、TM 群（ $P < 0.05$ ：0.01% nMH-TM 群； $P < 0.01$ ：0.1% nMH-TM 群）と比較し、有意であった。各測定時間における眼圧について、0.01% nMH-TM 群は、午前 9 時（ $-0.7 \pm 0.3$  mmHg）、午後 3 時（ $-0.8 \pm 0.2$  mmHg）の時点で、saline 群（すべて  $P < 0.05$ ）、TM 群（ $P < 0.05$ ：午前 9 時； $P < 0.01$ ：午後 3 時）と比較し、有意に下降したが、午後 9 時の時点（ $-0.2 \pm 0.5$  mmHg）では有意差が認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。0.1% nMH-TM 群は、すべての測定時間で、saline 群と比較し有意に眼圧が低下し

た ( $-1.0 \pm 0.3$  mmHg : 午前 9 時 ;  $-1.0 \pm 0.6$  mmHg : 午後 3 時 ;  $-1.1 \pm 0.5$  : 午後 9 時 ; すべて  $P < 0.01$ )。また、0.1% nMH-TM 群は、午前 9 時、午後 3 時において、TM 群と比較して有意に眼圧が下降した (すべて  $P < 0.01$ ) が、午後 9 時の時点では、有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。0.1% nMH-TM 群は、午後 9 時の時点において、0.01% nMH-TM 群と比較し有意に眼圧が下降した ( $P < 0.05$ )。

### 3-2-3. 処置眼の瞳孔径への影響

処置眼の日中平均瞳孔径の推移を図 7A に示す。

TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群の日中平均瞳孔径のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $-0.6 \pm 0.2$  mm、 $-0.9 \pm 0.1$  mm、 $-0.4 \pm 0.2$  mm であった。TM 群、0.01% nMH-TM 群は、いずれも saline 群と比較して有意に瞳孔径が縮小した (すべて  $P < 0.01$ ) が、0.1% nMH-TM 群は、saline 群と比較して統計学的に有意ではなかった ( $P > 0.05$ )。0.01% nMH-TM 群の瞳孔径のベースラインからの平均変化量は、TM 群 ( $P < 0.05$ )、0.1% nMH-TM 群 ( $P < 0.01$ ) と比較し統計学的に有意であった。

### 3-2-4. 対側眼の瞳孔径への影響

対側眼の日中平均瞳孔径の推移を図 7B に示す。

TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群の日中平均瞳孔径のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $0.2 \pm 0.2$  mm、 $-0.2 \pm 0.1$  mm、 $0.3 \pm 0.1$  mm であった。TM 群、0.1% nMH-TM 群は、saline 群 ( $P < 0.05$  : TM 群 ;  $P < 0.01$  : 0.1% nMH-TM 群)、0.01% nMH-TM 群 (すべて  $P < 0.01$ ) と比較し、有意に瞳孔径が拡大した。

### 3-2-5. 心拍数への影響

日中平均心拍数の推移を図 8 に示す。

TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群の日中平均心拍数のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $-11.7 \pm 4.1$  bpm、 $-8.8 \pm 1.0$  bpm、 $-11.4 \pm 8.2$  bpm であった。TM 群、0.1% nMH-TM 群は、saline 群と比較して有意に日中平均心拍数が減少した（すべて  $P < 0.05$ ）が、0.01% nMH-TM 群と saline 群との間に有意な差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。TM 群と 0.01% nMH-TM 群間、TM 群と 0.1% nMH-TM 群間で有意差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

#### 3-2-6. 平均動脈血圧への影響

平均動脈血圧の日中平均値の推移を図 9 に示す。

TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群の平均動脈血圧の日中平均値のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $-3.2 \pm 4.8$  mmHg、 $-0.6 \pm 4.3$  mmHg、 $3.2 \pm 2.5$  mmHg であった。saline 群、TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群間で、平均動脈血圧の日中平均値のベースラインからの平均変化量に、有意な差は認められなかった（すべて  $P > 0.05$ ）。

#### 3-3. nMH-TM の眼局所および全身への副作用

すべての薬剤群において、本実験すべての期間を通し、結膜充血、結膜浮腫、眼脂、角膜フルオレセイン染色、糞便性状スコアは 0 であった。さらに、すべての薬剤群において、薬剤投与前後で STT-1 値の有意な変化は認められなかった（データ示さず）。

#### 4. 考察

本研究では、健常犬に対し 0.01%ならびに 0.1% nMH-TM を 1 日 2 回、連続投与した際の眼圧下降作用について検討した。その結果、

各薬剤群の日中平均眼圧下降量は、TM 群で  $0.0 \pm 0.6$  mmHg、0.01% nMH-TM 群で  $0.8 \pm 0.3$  mmHg、0.1% nMH-TM 群で  $1.2 \pm 0.4$  mmHg であり、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM は、TM と比較し、優れた日中平均眼圧下降作用を有することが明らかとなった。さらに、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM が心拍数や血圧に及ぼす影響は、TM と同等で、nMH の混合による TM の全身副作用の増大は認められなかった。

本研究において、1日2回の TM 点眼による日中平均眼圧下降量は、 $0.0 \pm 0.6$  mmHg で、健常犬の日中平均眼圧を下降させることはなかった。既報においても、健常犬に対し 0.5% TM の 1日2回の点眼投与では眼圧下降作用は得られなかったと報告されている[41]。これらより、1日2回の 0.5% TM 点眼は、健常犬の日中平均眼圧下降作用を有さないことが示唆された。

本研究では、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM の 1日2回点眼は、健常犬の日中平均眼圧を、それぞれ  $0.8 \pm 0.3$  mmHg、 $1.2 \pm 0.4$  mmHg 下降させ、これは TM 群と比較し有意であった。本結果は第2章と同様、nMH の混合により TM の眼内移行性が向上したためであると考えられる。

本研究において、0.1% nMH-TM の、午後9時における眼圧変化量 ( $-1.3 \pm 0.5$  mmHg) は、saline 群 ( $0.1 \pm 0.2$  mmHg) と比較し、有意であったが、0.01% nMH-TM 群は、 $-0.7 \pm 0.6$  mmHg で、saline 群との有意差は認められなかった。しかし、TM 群、0.01% ならびに 0.1% nMH-TM 群の、薬剤投与後の眼圧実測値は、それぞれ  $11.3 \pm 0.8$  mmHg、 $10.5 \pm 0.6$  mmHg、 $10.7 \pm 0.8$  mmHg であり、0.01% nMH-TM 群が最も低値であった。本研究では、各薬剤の投与前にベース

ラインを測定し、ベースラインからの眼圧変化量を比較した。0.01% nMH-TM 群の午後 9 時におけるベースライン眼圧は、 $11.2 \pm 0.7$  mmHg で、saline 群、TM 群、0.1% nMH-TM 群のベースライン眼圧(それぞれ  $11.7 \pm 0.8$  mmHg、 $11.9 \pm 0.5$  mmHg、 $12.0 \pm 0.8$  mmHg)と比較して最も低値であった。ベースライン眼圧が低値であれば、眼圧変化量が小さく算出されるため、見かけ上、眼圧下降作用が小さくなる。全ての測定時点における眼圧変化量に、0.01% nMH-TM 群と 0.1% nMH-TM 群との間に有意差がない点、nMH の混合による眼内移行性の向上作用は、0.01% nMH と 0.1% nMH で同等であるとの既報[29]を踏まえると、本結果は、ベースライン眼圧の差によるものであると考えられた。

本研究において、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群の日中平均瞳孔径のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $-0.9 \pm 0.1$  mm、 $-0.4 \pm 0.2$  mm で、0.01% nMH-TM は saline と比較し有意な縮瞳作用を示したが、0.1% nMH-TM の縮瞳作用は、saline と比較し有意ではなかった。前述の通り、nMH の混合による眼内移行性の向上作用は、0.01% nMH と 0.1% nMH で同等である[29]と報告されており、0.01% nMH-TM 群と 0.1% nMH-TM 群の房水中 TM 濃度は等しいと考えられる。そのため本結果は、イヌにおける TM の縮瞳作用は用量非依存的であるとの既報[13]と矛盾する。また、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群の日中平均心拍数のベースラインからの平均変化量は、それぞれ  $-8.8 \pm 1.0$  bpm、 $-11.4 \pm 8.2$  bpm で、0.1% nMH-TM は saline と比較し有意な徐脈作用を示したが、0.01% nMH-TM は saline との有意差が認められなかった。本結果は、TM の徐脈作用は用量依存的であるという既報[31]と矛盾する。0.1% nMH-TM 群

のベースライン瞳孔径は、 $4.1 \pm 0.3$  mm であり、saline 群、TM 群、0.01% nMH-TM 群のベースライン瞳孔径（それぞれ  $4.4 \pm 0.4$  mm、 $4.2 \pm 0.4$  mm、 $4.6 \pm 0.3$  mm）と比較して最も低値であった。また、0.01% nMH-TM 群のベースライン心拍数は、 $84.3 \pm 5.9$  bpm であり、saline 群、TM 群、0.1% nMH-TM 群のベースライン心拍数（それぞれ  $86.5 \pm 8.7$  mm、 $86.3 \pm 9.8$  mm、 $90.9 \pm 12.1$  mm）と比較して最も低値であった。これらのベースライン値の差により、0.1% nMH-TM の瞳孔径変化量や 0.01% nMH-TM の心拍数変化量が小さく算出され、0.1% nMH-TM の縮瞳作用や 0.01% nMH-TM の徐脈作用が有意ではなかったと推察された。

本研究では、0.01%ならびに 0.1% nMH の混合により、TM の徐脈作用や血圧低下作用が増大することはなかった。さらに、nMH の混合による眼局所副作用や、下痢、腹部膨満や嘔吐などの全身副作用は認められなかった。これまでに nMH あるいは nMH と他の薬剤の混合薬の点眼は、角膜創傷治癒に影響を与えず、角膜障害性を有さないことが示されている [29, 30]。また、本研究で使用した 0.1% nMH-TM 中の MH は、制酸剤や瀉下薬としての経口投与量の 1000 分の 1 未満と、非常に低用量である [5]。これらを踏まえると、nMH や nMH-TM は、深刻な眼局所あるいは全身副作用は生じないと考えられた。

本章の結論として、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM を 1 日 2 回点眼投与することで、深刻な眼局所あるいは全身副作用を生じさせることなく、健常犬の日中平均眼圧を下降させた。0.01%ならびに 0.1% nMH-TM は、新たなイヌの眼圧下降薬となりうることが示唆された [18]。

付図および付図説明

表 7.  
結膜充血、結膜浮腫、眼脂、角膜フルオレセイン染色、糞便性状の評価基準

項目	スコア	所見
結膜充血	0	正常
	1	角膜輪部から 1・3mm の範囲に淡紅～赤色の結膜血管が確認される
	2	複数の膨隆した赤色結膜血管分枝が角膜輪部～結膜円蓋に確認される
	3	2 の所見に加え、結膜血管間の結膜が淡紅～赤色に染まる さらに、眼球/眼瞼結膜に点状出血が確認されることもある
結膜浮腫	0	正常
	1	局所的な結膜の腫脹が認められるが、眼瞼の外反や眼瞼の形状に変化はない
	2	広範な結膜の腫脹が認められるが、眼瞼の外反や眼瞼の形状に変化はない
	3	眼球/眼瞼結膜の腫脹が認められ、眼瞼の外反や変位があるが、完全な閉瞼は可能
4	眼球/眼瞼結膜の腫脹が顕著で、眼表面や眼内の評価が困難である。閉瞼は不良で、眼瞼裂から結膜が突出している	
眼脂	0	正常
	1	正常以上の眼脂が認められ、眼表面や眼窩に貯留しているものの、眼瞼や睫毛には付着していない
	2	眼脂が豊富で容易に観察でき、眼瞼や睫毛に貯留している
3	眼脂が眼瞼を超えて付着しており、眼周囲皮膚に貯留している	
角膜フルオレセイン染色 (重症度)	0	正常
	1	僅かな多巣性の点状染色陽性
	2	多巣性から集簇性の点状染色陽性
	3	局所または多巣性の上皮欠損を伴うが、実質の欠損はない
4	局所または多巣性の上皮および実質欠損を伴い明瞭に染色陽性	
角膜フルオレセイン染色 (範囲)	0	正常
	1	1～25%の領域が染色陽性
	2	26～50%の領域が染色陽性
	3	51～75%の領域が染色陽性
4	76～100%の領域が染色陽性	
糞便性状	1	硬く乾燥した便
	2	硬い固形便
	3	柔らかい固形便
	4	柔らかい半固形便
	5	水様便



表 8.  
ベースライン設定期間の眼圧

		D1	D2	D3	D4	D5	平均
saline	処置眼	11.5 ± 1.1	11.6 ± 0.8	11.7 ± 0.9	11.3 ± 0.9	11.8 ± 1.0	11.6 ± 0.9
	対側眼	11.6 ± 1.0	11.8 ± 0.8	11.5 ± 1.0	11.3 ± 0.9	11.7 ± 1.0	11.6 ± 0.9
TM	処置眼	11.8 ± 0.6	11.2 ± 0.7	11.3 ± 0.9	11.5 ± 0.9	11.6 ± 0.7	11.5 ± 0.6
	対側眼	11.8 ± 0.6	11.2 ± 0.8	11.4 ± 0.8	11.3 ± 0.7	11.4 ± 0.9	11.4 ± 0.7
0.01%	処置眼	11.3 ± 0.8	11.5 ± 0.6	11.7 ± 0.7	11.4 ± 0.6	11.2 ± 0.7	11.4 ± 0.6
nMH-TM	対側眼	11.5 ± 0.8	11.5 ± 0.5	11.7 ± 0.6	11.6 ± 0.6	11.4 ± 0.7	11.5 ± 0.5
0.1%	処置眼	11.7 ± 0.8	11.7 ± 1.1	12.0 ± 1.0	11.3 ± 0.6	11.8 ± 0.8	11.7 ± 0.8
nMH-TM	対側眼	11.7 ± 0.9	11.7 ± 1.0	12.3 ± 1.1	11.2 ± 0.7	11.9 ± 0.9	11.8 ± 0.9

データはすべて平均値±標準偏差 (mmHg) で示している。  
ベースライン設定期間の眼圧に、薬剤群間で有意な差は認められなかった。

表 9.  
ベースライン設定期間の瞳孔径

		D1	D2	D3	D4	D5	平均
saline	処置眼	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.4
	対側眼	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.4
TM	処置眼	4.0 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.4
	対側眼	4.0 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.4
0.01%	処置眼	4.7 ± 0.5	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.4	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.6 ± 0.3
nMH-TM	対側眼	4.7 ± 0.4	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.4	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.3
0.1%	処置眼	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.6	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3
nMH-TM	対側眼	4.3 ± 0.3	4.4 ± 0.6	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.4

データはすべて平均値±標準偏差 (mm) で示している。  
ベースライン設定期間の瞳孔径に、薬剤群間で有意な差は認められなかった。

表 10.  
ベースライン設定期間の心拍数

	D1	D2	D3	D4	D5	平均
saline	87.1 ± 7.7	85.7 ± 9.3	88.1 ± 10.2	87.3 ± 8.6	84.4 ± 8.6	86.5 ± 8.7
TM	85.9 ± 10.1	87.5 ± 12.5	83.3 ± 8.7	84.8 ± 11.2	90.0 ± 7.5	86.3 ± 9.8
0.01% nMH-TM	86.8 ± 4.5	83.5 ± 8.3	84.3 ± 7.9	82.7 ± 5.4	84.1 ± 5.4	84.3 ± 5.9
0.1% nMH-TM	91.7 ± 9.9	92.5 ± 14.9	90.5 ± 15.6	90.1 ± 10.3	89.5 ± 12.9	90.9 ± 12.1

データはすべて平均値±標準偏差 (bpm) で示している。  
ベースライン設定期間の心拍数に、薬剤群間で有意な差は認められなかった。

表 11.

ベースライン設定期間の平均動脈血圧

	D1	D2	D3	D4	D5	平均
saline	90.8 ± 10.4	86.3 ± 9.0	88.3 ± 12.0	85.6 ± 9.3	84.0 ± 7.2	87.0 ± 9.1
TM	93.0 ± 6.6	89.2 ± 4.1	89.3 ± 10.5	87.0 ± 6.8	92.8 ± 7.8	90.3 ± 6.6
0.01% nMH-TM	86.7 ± 8.7	84.4 ± 9.8	86.0 ± 5.6	90.0 ± 9.6	85.4 ± 8.1	86.5 ± 8.0
0.1% nMH-TM	90.4 ± 10.3	86.6 ± 9.6	90.7 ± 8.3	87.8 ± 10.6	92.8 ± 10.8	89.7 ± 9.5

データはすべて平均値±標準偏差 (mmHg) で示している。

ベースライン設定期間の平均動脈血圧に、薬剤群間で有意な差は認められなかった。

表 12.  
処置眼の眼圧のベースラインからの変化量

		ベースライン				処置期間			
		午前 9 時	午後 3 時	午後 9 時	日中平均	午前 9 時	午後 3 時	午後 9 時	日中平均
saline	変化量 (mmHg)					0.0 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2
	眼圧 (mmHg)	11.4 ± 1.1	11.7 ± 0.9	11.7 ± 0.8	11.6 ± 0.9	11.4 ± 0.9	11.9 ± 1.0	11.7 ± 0.7	11.7 ± 0.8
TM	変化量 (mmHg)					0.0 ± 0.2	0.6 ± 0.4	-0.6 ± 0.4	0.0 ± 0.2
	眼圧 (mmHg)	11.6 ± 0.7	10.9 ± 0.8	11.9 ± 0.5	11.5 ± 0.6	11.5 ± 0.8	11.6 ± 0.8	11.3 ± 0.8	11.5 ± 0.8
0.01%	変化量 (mmHg)					-0.9 ± 0.4 <sup>ab</sup>	-1.0 ± 0.1 <sup>ab</sup>	-0.7 ± 0.6	-0.8 ± 0.3 <sup>ab</sup>
nMH-TM	眼圧 (mmHg)	11.6 ± 0.9	11.5 ± 0.5	11.2 ± 0.7	11.4 ± 0.6	10.7 ± 0.6	10.5 ± 0.5	10.5 ± 0.4	10.6 ± 0.4
0.1%	変化量 (mmHg)					-1.1 ± 0.4 <sup>ab</sup>	-1.2 ± 0.6 <sup>ab</sup>	-1.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	-1.2 ± 0.4 <sup>ab</sup>
nMH-TM	眼圧 (mmHg)	11.4 ± 0.9	11.7 ± 0.8	12.0 ± 0.8	11.7 ± 0.8	10.3 ± 0.6	10.5 ± 0.6	10.7 ± 0.8	10.5 ± 0.6

データはすべて平均値 ± 標準偏差で示している。

a :  $P < 0.05$  vs. saline 群

b :  $P < 0.05$  vs. TM 群

0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群は、saline 群、TM 群と比較し、有意に日中平均眼圧が下降した。

表 13.

対側眼の眼圧のベースラインからの変化量

		ベースライン				処置期間			
		午前 9 時	午後 3 時	午後 9 時	日中平均	午前 9 時	午後 3 時	午後 9 時	日中平均
saline	変化量 (mmHg)					0.0 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.2	0.1 ± 0.2
	眼圧 (mmHg)	11.5 ± 1.0	11.7 ± 0.9	11.6 ± 0.8	11.6 ± 0.9	11.5 ± 0.8	11.9 ± 0.9	11.6 ± 0.7	11.7 ± 0.8
TM	変化量 (mmHg)					0.0 ± 0.2	0.6 ± 0.4	-0.5 ± 0.4	0.0 ± 0.2
	眼圧 (mmHg)	11.6 ± 0.7	10.9 ± 0.8	11.8 ± 0.6	11.4 ± 0.7	11.6 ± 0.7	11.6 ± 0.9	11.3 ± 0.9	11.5 ± 0.8
0.01%	変化量 (mmHg)					-0.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>	-0.8 ± 0.2 <sup>ab</sup>	-0.2 ± 0.5	-0.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>
nMH-TM	眼圧 (mmHg)	11.8 ± 0.8	11.6 ± 0.5	11.2 ± 0.7	11.5 ± 0.5	11.1 ± 0.6	10.8 ± 0.6	11.0 ± 0.4	11.0 ± 0.5
0.1%	変化量 (mmHg)					-1.0 ± 0.3 <sup>ab</sup>	-1.0 ± 0.6 <sup>ab</sup>	-1.1 ± 0.5 <sup>ac</sup>	-1.0 ± 0.4 <sup>ab</sup>
nMH-TM	眼圧 (mmHg)	11.6 ± 0.9	11.7 ± 0.9	11.9 ± 1.0	11.8 ± 0.9	10.6 ± 0.7	10.8 ± 0.7	10.8 ± 0.8	10.7 ± 0.6

データはすべて平均値±標準偏差で示している。

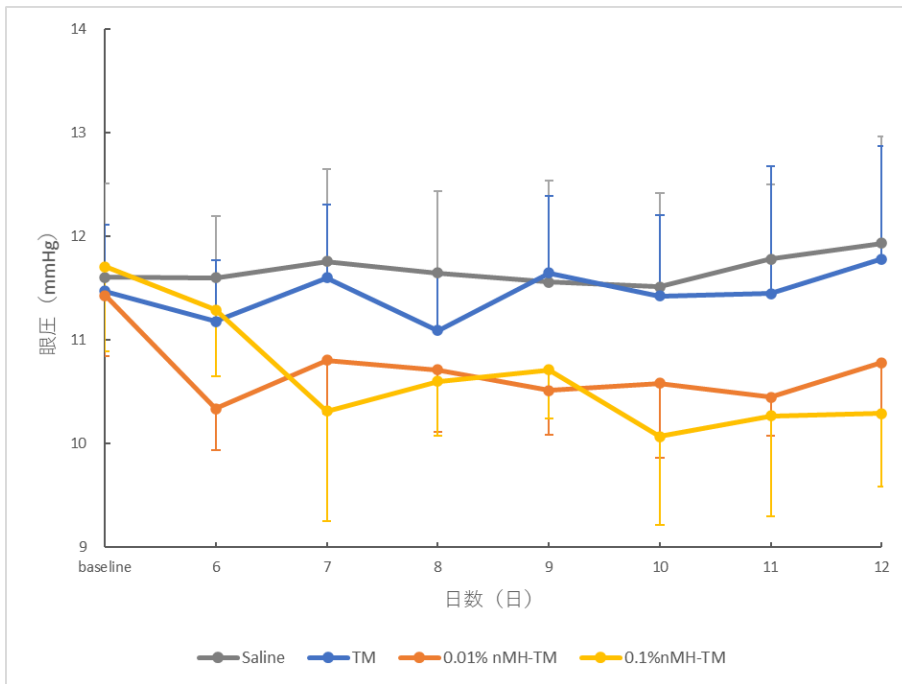
a :  $P < 0.05$  vs. saline 群

b :  $P < 0.05$  vs. TM 群

c :  $P < 0.05$  vs. 0.01% nMH-TM 群

0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群は、saline 群、TM 群と比較し、有意に日中平均眼圧が下降した。

(A)



(B)

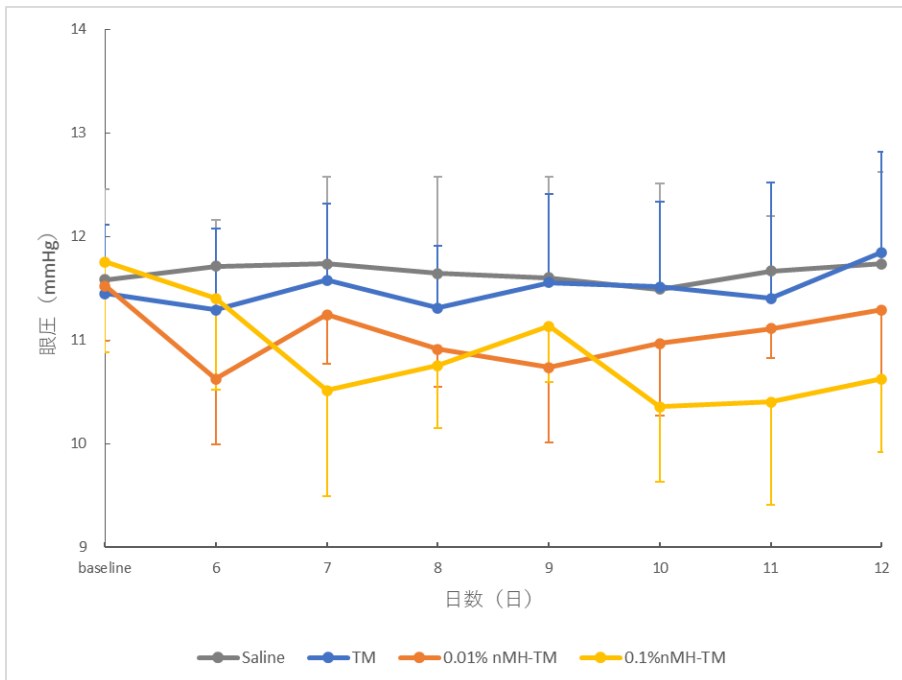


図 6.

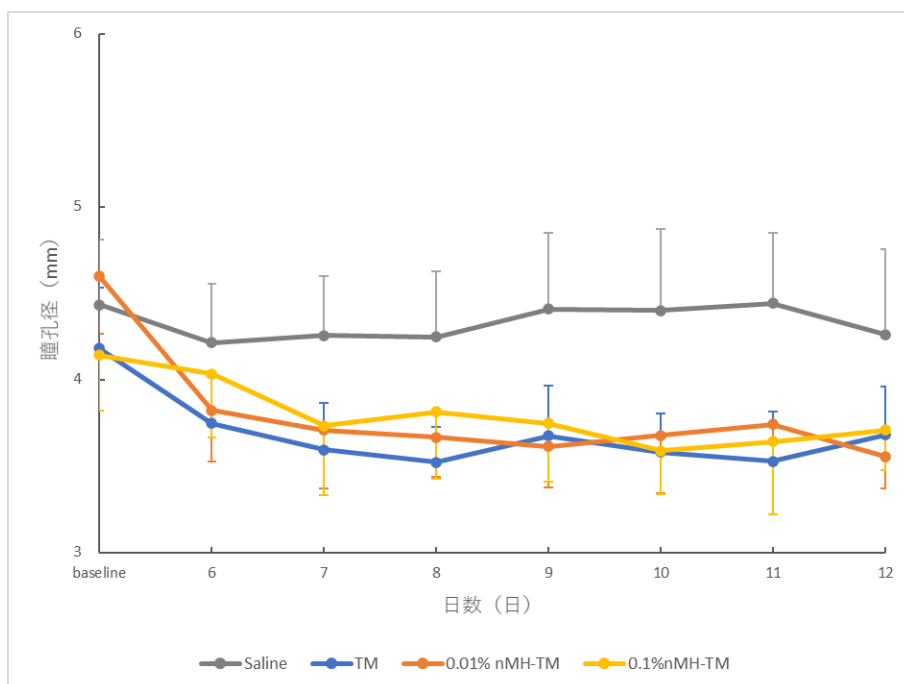
処置眼の眼圧 (A) および対側眼の眼圧 (B) の変化

データはすべて平均値±標準偏差で示している。

0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群は、点眼初日より両眼の眼圧の下降傾向が認められた。



(A)



(B)

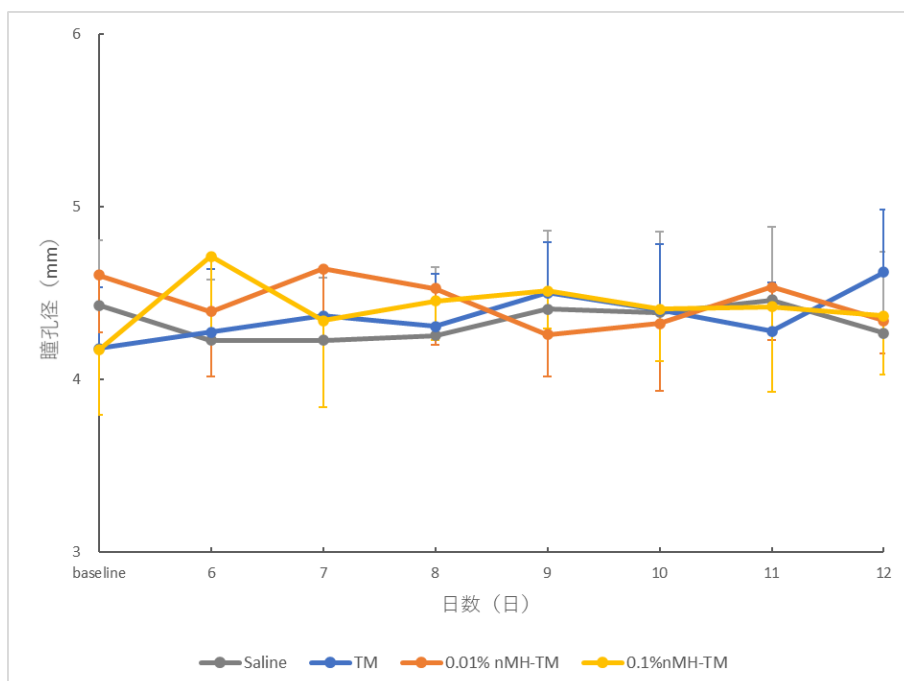


図 7.

処置眼の瞳孔径 (A) および対側眼の瞳孔径 (B) の変化  
データはすべて平均値±標準偏差で示している。

TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、点眼初日より処置眼の瞳孔径が収縮し、その作用は 3 つの薬剤群で同等であった。

すべての薬剤群で、対側眼の縮瞳作用は認められなかった。

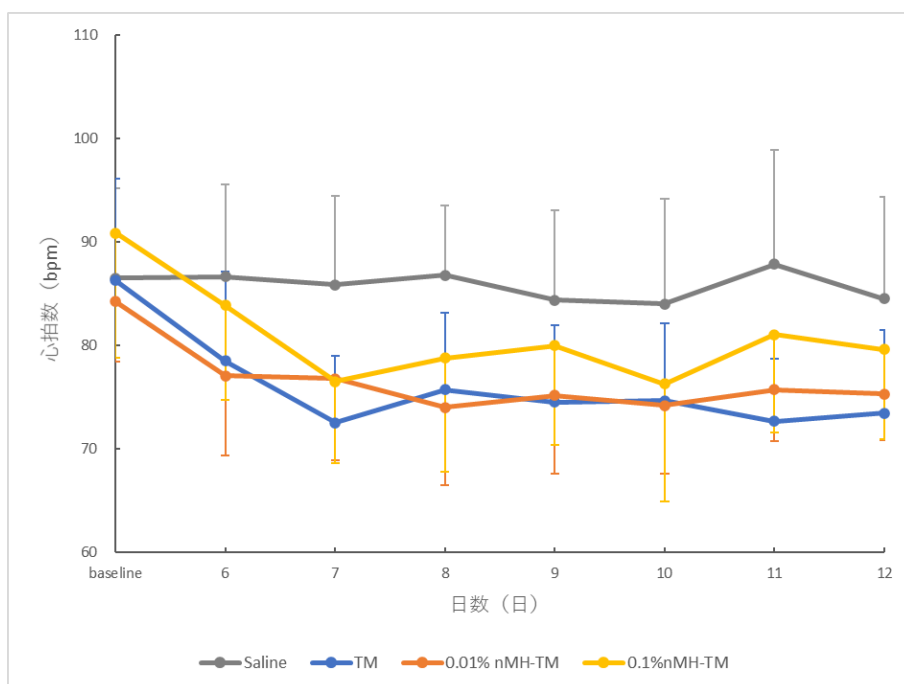


図 8.  
 心拍数の変化  
 データはすべて平均値±標準偏差で示している。  
 TM 群、0.01%ならびに 0.1% nMH-TM 群はいずれも、点眼初日より心拍数が減少し、その作用は 3 つの薬剤群で同等であった。

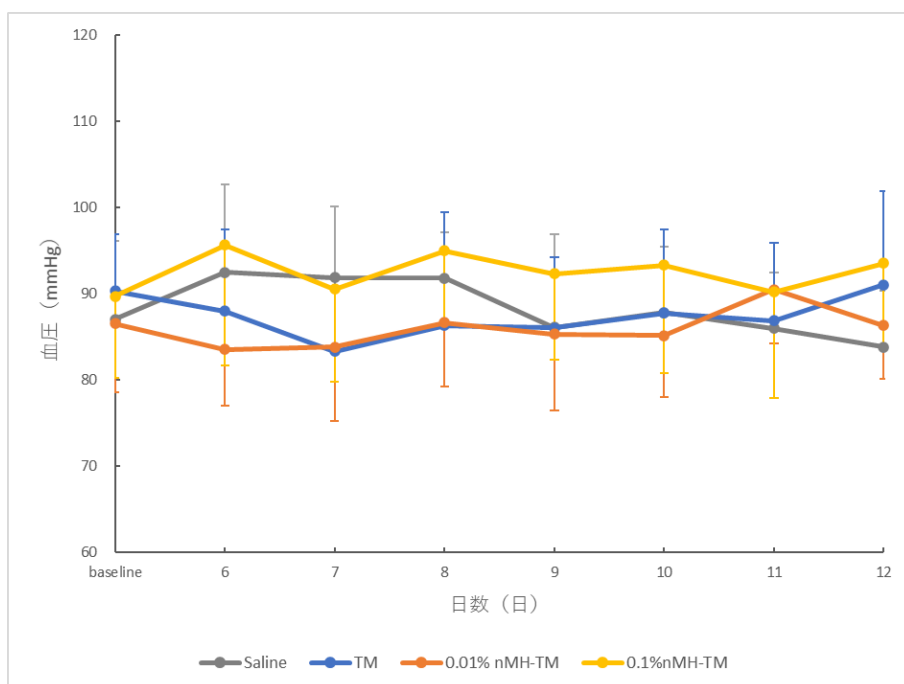


図 9.  
 平均動脈血圧の変化  
 データはすべて平均値±標準偏差で示している。  
 すべての薬剤群において、平均動脈血圧の変化は認められなかった。

## 総括

ヒトにおける視覚喪失の原因疾患の第一位である緑内障の治療法は、主として点眼薬を用いた内科療法である[2, 6, 16, 19, 21, 25, 32]。ヒトの緑内障の病態の主である原発緑内障の治療は、優れた眼圧下降作用を有するプロスタグランジン関連薬が第一選択である[2, 16, 21]。他方で、イヌの緑内障の病態の主は続発緑内障であるが、特にぶどう膜炎を伴う続発緑内障に対するプロスタグランジン関連薬の点眼は禁忌であり、眼圧下降作用に劣る TM などが使用される[15, 20, 40]。TM は用量依存的な眼圧下降作用を有する[9, 13]が、全身副作用もまた用量依存的である[9, 24, 41, 46]。そのため、眼圧下降作用を得るために高濃度の TM を投与することは、推奨されない[9, 24, 41, 46]。そこで、TM に対し薬剤の生物学的利用能の改善を目的とした DDS を応用することで、nMH-TM が、全身副作用が小さく、優れた眼圧下降作用を有し、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障に対しても有効な抗緑内障点眼薬となりうると考えた。本研究の目的は、イヌの緑内障治療に対する nMH-TM の実用化を目指し、イヌの緑内障に関する基礎的データを収集するとともに、健常犬に対する nMH-TM の有効性を検証することであった。

第 1 章では、北里大学附属動物病院で緑内障と診断されたイヌに対する回顧的研究を実施した。その結果、イヌの緑内障 53.7% が、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障であることが確認された。また、緑内障に罹患していたイヌの 78.0% が視覚を喪失しており、緑内障は、視覚喪失の原因疾患として大きな割合を占めることが明らかとなった。第 2 章では、健常犬に対し nMH-TM を単回投与した際の眼圧

下降作用を検証した。その結果、nMHの混合により、TMの最大眼圧下降作用が2.6~2.9倍にまで増大することが明らかとなった。一方で、TMが有する副作用が増大することはなかった。第3章では、健常犬に対しnMH-TMを1日2回連続点眼した際の、日中平均眼圧下降作用を検証した。その結果、TMの日中平均眼圧下降作用は0.0 mmHgであったのに対し、nMHを混合することで、日中平均眼圧下降作用が0.8~1.2 mmHgにまで増大することが明らかとなった。一方で、TMが有する副作用が増大することはなかった。

本結果から、イヌの視覚喪失の原因疾患として大きな割合を占める緑内障の半数以上がぶどう膜炎を伴う続発緑内障であり、イヌの視覚保持率の改善のためには、TMを含め、起炎作用を有さない既存抗緑内障点眼薬の眼圧下降作用の向上が、必要であると考えられた。本研究において、nMH-TMの単回投与時の最大眼圧下降量は、2.6~2.9 mmHg (19.6~21.4%)であった。健常犬に対しラタノプロストを単回投与した際の最大眼圧下降量は、2.1 mmHg (24.3%)と報告されており[17]、nMH-TMは、眼圧下降作用が最も優れる抗緑内障点眼薬である、プロスタグランジン関連薬に劣らない眼圧下降作用を有していた。健常犬に対するTMの眼圧下降作用が、nMHの混合により増大する作用機序の解明には、角膜上皮の形態や房水中TM濃度を評価する必要がある。しかし、本研究におけるnMH-TMの効果検証は、個体間の眼圧のばらつきを最小限にする目的で、同一犬を用いたクロスオーバー法により実施した。そのため、各薬剤投与後、角膜上皮の形態評価のために眼球を摘出することが不可能であった。さらに、房水の採材は、眼圧下降や続発緑内障の発症につながりうるぶどう膜炎を誘発する[40]ため、房水中TM濃度の

測定も不可能であった。健常犬に対する nMH-TM の最大眼圧下降作用が、TM の 2.6~2.9 倍であったという結果は、nMH が薬物房水中濃度時間曲線面積を 3 倍以上に増大させるという既報 [29] と一致する。TM の眼圧下降作用は用量依存的である [9, 13] ことから、nMH-TM が優れた眼圧下降作用を示した機序として、既報 [29] と同様、nMH が角膜上皮細胞間隙を拡張し、TM の眼内移行が促進され、房水中 TM が有効濃度に達したためであると考えられた。健常犬に対し nMH-TM を 1 日 2 回連続投与した際の日中平均眼圧下降作用は TM よりも有意に大きく、0.8~1.2 mmHg であり、眼圧下降率は、7.3%~10.3% であった。これは、nMH-TM 単回投与時の最大眼圧下降量に大きく劣る結果となった。本結果は、抗緑内障点眼薬の有効性の評価として、最大眼圧下降量のみを計測した場合、日中平均眼圧下降作用が正しく評価されない可能性があることを示している。緑内障治療の際に、複数のタイムポイントにおける眼圧を測定し、日中平均眼圧を評価することの重要性が、改めて確認された。イヌの緑内障眼における眼圧コントロール目標は規定されていないが、ヒトでは、ベースライン値から 20%~50% 下降させることが目標とされている [16]。ヒトの眼圧コントロールの目標を基準にすると、本研究における nMH-TM の日中平均眼圧下降量は十分でなかった。しかし、TM の眼圧下降作用は、健常犬と比較し、緑内障に罹患したイヌの方が大きいと報告されている [13]。そのため、緑内障に罹患したイヌに対する nMH-TM の日中平均眼圧下降作用は、本結果よりもさらに大きい可能性が考えられる。今後の課題として、緑内障に罹患したイヌに対する nMH-TM の有効性を、既存抗緑内障点眼薬と比較検討することが挙げられた。

結論として、本研究では、①イヌの緑内障の最も一般的な病態は、ぶどう膜炎を伴う続発緑内障であり、緑内障はイヌの視覚喪失の原因疾患として大きな割合を占めること、②nMHは、健常犬に対するTMの副作用を増大させることなく、眼圧下降作用を増大させること、③1日2回のnMH-TM点眼により、健常犬の日中平均眼圧が下降することが明らかとなり、nMH-TMは健常犬の眼圧下降薬として有効であることが示された[18]。本成果は、新たなイヌの抗緑内障点眼薬の実用化に向け大きな役割を果たし、イヌの視覚保持率の向上に貢献することが期待される。



## 参考文献

1. Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L., & Syme, H. M. 2018. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 32(6): 1803–1822.
2. Alario, A. F., Strong, T. D., & Pizzirani, S. 2015. Medical treatment of primary canine glaucoma. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 45(6): 1235–1259.
3. Che Arif, F. A., Hilmi, M. R., Mohd Kamal, K., & Ithnin, M. H. 2020. Evaluation of 18 artificial tears based on viscosity and pH. *Malaysian J. Ophthalmol.* 2(2): 96–111.
4. Diehl, K. A., Bowden, A. C., & Knudsen, D. 2019. Bandage contact lens retention in dogs—A pilot study. *Vet. Ophthalmol.* 22(5): 584–590.
5. Donowitz, M. & Rood, R. P. 1992. Magnesium hydroxide: new insights into the mechanism of its laxative effect and the potential involvement of prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Clin. Gastroenterol.* 14(1): 20–26.
6. Doozandeh, A. & Yazdani, S. 2016. Neuroprotection in glaucoma. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 11(2): 209–220.
7. Eaton, J. S., Miller, P. E., Bentley, E., Thomasy, S. M., & Murphy, C. J. 2017. The SPOTS system: An ocular scoring system optimized for use in modern preclinical drug development and toxicology. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*

- 33(10): 718–734.
8. El-Feky, G. S., Zayed, G. M., Elshaier, Y. A. M. M., & Alsharif, F. M. 2018. Chitosan-gelatin hydrogel crosslinked with oxidized sucrose for the ocular delivery of timolol maleate. *J. Pharm. Sci.* 107(12): 3098–3104.
  9. Gelatt, K N, Larocca, R. D., Gelatt, J. K., Strubbe, D. T., & MacKay, E. O. 1995. Evaluation of multiple doses of 4 and 6% timolol, and timolol combined with 2% pilocarpine in clinically normal beagles and beagles with glaucoma. *Am. J. Vet. Res.* 56(10): 1325–1331.
  10. Gelatt, Kirk N. & MacKay, E. O. 2004. Prevalence of the breed-related glaucomas in pure-bred dogs in North America. *Vet. Ophthalmol.* 7(2): 97–111.
  11. Gelatt, Kirk N. & MacKay, E. O. 2004. Secondary glaucomas in the dog in North America. *Vet. Ophthalmol.* 7(4): 245–259.
  12. Giannetto, C., Piccione, G., & Giudice, E. 2009. Daytime profile of the intraocular pressure and tear production in normal dog. *Vet. Ophthalmol.* 12(5): 302–305.
  13. Gum, G., Larocca, R., Gelatt, K. N., Mead, J., & Gelatt, J. 1991. The effect of topical timolol maleate on intraocular pressure in normal beagles and beagles with inherited glaucoma. *Prog. Vet. Comp. Ophthalmol.* 1: 141–149.
  14. Hughes, E. H., Spry, P., & Diamond, J. 2003. 24-Hour monitoring of intraocular pressure in glaucoma management: A retrospective review. *J. Glaucoma* 12(3): 232–236.

15. Johnstone McLean, N. S., Ward, D. A., & Hendrix, D. V. H. 2008. The effect of a single dose of topical 0.005% latanoprost and 2% dorzolamide/0.5% timolol combination on the blood-aqueous barrier in dogs: A pilot study. *Vet. Ophthalmol.* 11(3): 158–161.
16. Jonas, J. B., Aung, T., Bourne, R. R., Bron, A. M., Ritch, R., & Panda-Jonas, S. 2017. Glaucoma. *Lancet* 390(10108): 2183–2193.
17. Kahane, N., Bdolah-Abram, T., Raskansky, H., & Ofri, R. 2016. The effects of 1% prednisolone acetate on pupil diameter and intraocular pressure in healthy dogs treated with 0.005% latanoprost. *Vet. Ophthalmol.* 19(6): 473–479.
18. Kita, M., Kanai, K., Mitsuhashi, H., Noguchi, T., Nagai, N., Yamaguchi, M., Otaka, Y., Kudo, R., Yamashita, Y., & Tajima, K. 2021. Magnesium Hydroxide Nanoparticles Improve the Ocular Hypotensive Effect of Twice Daily Topical Timolol Maleate in Healthy Dogs. *Vet. Sci.* 8(8): 168.
19. Komáromy, A. M., Bras, D., Esson, D. W., Fellman, R. L., Grozdanic, S. D., Kagemann, L., Miller, P. E., Moroi, S. E., Plummer, C. E., Sapienza, J. S., Storey, E. S., Teixeira, L. B., Toris, C. B., & Webb, T. R. 2019. The future of canine glaucoma therapy. *Vet. Ophthalmol.* 22(April): 726–740.
20. Krohne, S. G. 1994. Effect of topically applied 2% pilocarpine and 0.25% demecarium bromide on blood-aqueous barrier

- permeability in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 55(12): 1729–1733.
21. Lusthaus, J. & Goldberg, I. 2019. Current management of glaucoma. *Med. J. Aust.* 210(4): 180–187.
  22. Maehara, S., Ono, K., Ito, N., Tsuzuki, K., Seno, T., Yokoyama, T., Yamashita, K., Izumisawa, Y., & Kotani, T. 2004. Effects of topical nipradilol and timolol maleate on intraocular pressure, facility of outflow, arterial blood pressure and pulse rate in dogs. *Vet. Ophthalmol.* 7(3): 147–150.
  23. Mansouri, K., Tanna, A. P., De Moraes, C. G., Camp, A. S., & Weinreb, R. N. 2020. Review of the measurement and management of 24-hour intraocular pressure in patients with glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 65(2): 171–186.
  24. Maślanka, T. 2014. Autonomic drugs in the treatment of canine and feline glaucoma - Part II: Medications that lower intraocular pressure by reducing aqueous humour production. *Pol. J. Vet. Sci.* 17(4): 753–763.
  25. Morizane, Y., Morimoto, N., Fujiwara, A., Kawasaki, R., Yamashita, H., Ogura, Y., & Shiraga, F. 2019. Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn. J. Ophthalmol.* 63(1): 26–33.
  26. Nagai, N., Ito, Y., Okamoto, N., & Shimomura, Y. 2014. A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal

- permeability. *Toxicology* 319(1): 53–62.
27. Nagai, N., Iwai, Y., Deguchi, S., Otake, H., Kanai, K., Okamoto, N., & Shimomura, Y. 2019. Therapeutic potential of a combination of magnesium hydroxide nanoparticles and sericin for epithelial corneal wound healing. *Nanomaterials* 9(5): 768.
28. Nagai, N., Nakazawa, Y., Ito, Y., Kanai, K., Okamoto, N., & Shimomura, Y. 2017. A nanoparticle-based ophthalmic formulation of dexamethasone enhances corneal permeability of the drug and prolongs its corneal residence time. *Biol. Pharm. Bull.* 40(7): 1055–1062.
29. Nagai, N., Ogata, F., Otake, H., Kawasaki, N., Nakazawa, Y., Kanai, K., Okamoto, N., & Shimomura, Y. 2017. Co-instillation of nano-solid magnesium hydroxide enhances corneal permeability of dissolved timolol. *Exp. Eye Res.* 165: 118–124.
30. Nagai, N., Yamaoka, S., Fukuoka, Y., Ishii, M., Otake, H., Kanai, K., Okamoto, N., & Shimomura, Y. 2018. Enhancement in corneal permeability of dissolved carteolol by its combination with magnesium hydroxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1): 1–11.
31. Nieminen, T., Lehtimäki, T., Mäenpää, J., Ropo, A., Uusitalo, H., & Kähönen, M. 2007. Ophthalmic timolol: Plasma concentration and systemic cardiopulmonary effects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 67(2): 237–245.

32. Oddone, F., Rossetti, L., Tanga, L., Berardo, F., Ferrazza, M., Michelessi, M., Roberti, G., Manni, G., & Centofanti, M. 2015. Effects of topical bimatoprost 0.01% and timolol 0.5% on circadian IOP, blood pressure and perfusion pressure in patients with glaucoma or ocular hypertension: A randomized, double masked, placebo-controlled clinical trial. *PLoS One* 10(10): 1–15.
33. Orzalesi, N., Rossetti, L., Invernizzi, T., Bottoli, A., & Autelitano, A. 2000. Effect of timolol, latanoprost, and dorzolamide on circadian IOP in glaucoma or ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(9): 2566–2573.
34. Patel, A. 2013. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J. Pharmacol.* 2(2): 47.
35. Peng, C. C., Ben-Shlomo, A., MacKay, E. O., Plummer, C. E., & Chauhan, A. 2012. Drug delivery by contact lens in spontaneously glaucomatous dogs. *Curr. Eye Res.* 37(3): 204–211.
36. Piccione, G., Giannetto, C., Fazio, F., & Giudice, E. 2010. Influence of different artificial lighting regimes on intraocular pressure circadian profile in the dog (*Canis familiaris*). *Exp. Anim.* 59(2): 215–223.
37. Piltz, J., Gross, R., Shin, D. H., Beiser, J. A., Dorr, D. A., Kass, M. A., & Gordon, M. O. 2000. Contralateral effect of topical  $\beta$ -adrenergic antagonists in initial one-eyed trials in the ocular hypertension treatment study. *Am. J. Ophthalmol.*

- 130(4): 441–453.
38. Rao, H. L., Senthil, S., & Garudadri, C. S. 2014. Contralateral intraocular pressure lowering effect of prostaglandin analogues. *Indian J. Ophthalmol.* 62(5): 575–579.
39. Sanchez, R. F., Vieira da Silva, M. J., & Dawson, C. 2017. Design of an intraocular pressure curve protocol for use in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 58(1): 42–48.
40. Sato, K., Iwasaki, K., Nagai, N., Yamashita, Y., Chikazawa, S., Hoshi, F., & Kanai, K. 2019. Comparison of early posttreatment effects of two steroidal anti-inflammatory ophthalmic drugs on the ocular inflammatory response induced by paracentesis in healthy canine eyes. *Vet. Ophthalmol.* 22(5): 607–613.
41. Smith, L. N., Miller, P. E., & Felchle, L. M. 2010. Effects of topical administration of latanoprost, timolol, or a combination of latanoprost and timolol on intraocular pressure, pupil size, and heart rate in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* 71(9): 1055–1061.
42. Strom, A. R., Hässig, M., Iburg, T. M., & Spiess, B. M. 2011. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009. Part 1: Congenital and primary glaucoma (4 and 123 cases). *Vet. Ophthalmol.* 14(2): 121–126.
43. Strom, A. R., Hässig, M., Iburg, T. M., & Spiess, B. M. 2011. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of

- Zurich from 1995 to 2009. Part 2: secondary glaucoma (217 cases). *Vet. Ophthalmol.* 14(2): 127–132.
44. Stropfová, V., Pogány Simonová, M., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., Farbáková, J., Mad'ari, A., & Lauková, A. 2014. Effect of *Bifidobacterium animalis* B/12 administration in healthy dogs. *Anaerobe* 28: 37–43.
45. 鈴木康之, 山本哲也, 新家眞, 岩瀬愛子, 富所敦男, 阿部春樹, 白土城照, 桑山泰明, 三嶋弘, 清水弘之, 富田剛司, 井上洋一, 北澤克明 2008. 日本緑内障学会多治見疫学調査(多治見スタディ) 総括報告. 日本眼科学会雑誌. 112(12): 1039-1058.
46. Svec, A. L. & Strosberg, A. M. 1986. Therapeutic and systemic side effects of ocular  $\beta$ -adrenergic antagonists in anesthetized dogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27(3): 401–405.
47. Takiyama, N., Shoji, S., Habata, I., & Ohba, S. 2006. The effects of a timolol maleate gel-forming solution on normotensive beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 68(6): 631–633.
48. Urtti, A. 2006. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(11): 1131–1135.
49. Volotinen, M., Mäenpää, J., Kautiainen, H., Tolonen, A., Uusitalo, J., Ropo, A., Vapaatalo, H., & Aine, E. 2009. Ophthalmic timolol in a hydrogel vehicle leads to minor inter-individual variation in timolol concentration in aqueous humor. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36(2–3): 292–296.



50. Wilkie, D. A. & Latimer, C. A. 1991. Effects of topical administration of timolol maleate on intraocular pressure and pupil size in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 52(3): 432–435.
51. Zhu, H. & Chauhan, A. 2008. Effect of viscosity on tear drainage and ocular residence time. *Optom. Vis. Sci.* 85(8): 715–725.

## 謝辞

稿を終えるに当たり、御懇切なる御指導、御教授を賜りました北里大学獣医学部小動物第2内科学研究室の金井一享 教授、田島一樹 講師に謹んで感謝の意を表します。

また本研究を遂行するに当たり、御助力を頂きました近畿大学薬学部製剤学研究室の長井紀章 准教授ならびに研究室の皆様、北里大学獣医学部小動物第2内科学研究室の皆様に心から感謝を申し上げます。