

ヒトテノン嚢由来培養線維芽細胞に対するトラニラストの
細胞増殖抑制効果いしばし ともかず あおやま ゆ み こ もと き まさみつ
石橋 朋和 青山裕美子 本木 正師
はしもと まり こ うえ の さと き
橋本真理子 上野 聰樹

(受付：平成 13 年 8 月 20 日)

抄 録

トラニラストの線維芽細胞増殖抑制効果について、ヒトテノン嚢由来培養線維芽細胞を用いて、その濃度や投与時期による影響を検討した。塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト点眼薬での添加培養では、細胞増殖抑制率が各濃度別で 75 μ M 41%, 150 μ M 63%, 300 μ M 99%, 600 μ M 117% と濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示した。防腐剤の影響を考えた塩化ベンザルコニウム抜きトラニラストでの実験でも、各濃度別に 75 μ M 27%, 150 μ M 47%, 300 μ M 79%, 600 μ M 98% と濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示したが、明らかな細胞死は認めなかった。塩化ベンザルコニウム抜きトラニラストを用いて、投与時期の違いによる細胞増殖抑制効果を比較した。後投与群では各濃度で細胞増殖抑制率が 27 ~ 98% と、濃度依存性の増殖抑制効果を示した。前投与群は各濃度で細胞増殖抑制率が 43 ~ 55% と後投与群より低くなり、濃度依存性は認めなかった。前 + 後投与群では各濃度で細胞増殖抑制率が 75 ~ 104% と最も強い増殖抑制効果を示し、濃度依存性も軽度認めた。一方、マイトマイシン C (MMC) を用いて同様の実験を行ったところ、細胞増殖抑制率がすべての濃度において 100% 以上の強い増殖抑制効果を示し、高濃度では強い細胞死も認めた。以上の実験により、トラニラストは線維芽細胞に対し MMC と比べ安全な細胞増殖抑制効果を有していた。したがって緑内障手術後の線維芽細胞増殖抑制による濾過胞の維持を目的とした場合、術前よりの継続的投与が、最も効果が期待できるものと考えられた。

索引用語

トラニラスト, 緑内障, 線維芽細胞, 濾過胞

緒 言

現在、緑内障濾過手術では形成された房水側副流出路すなわち濾過胞の存続が降圧維持に重要な因子¹⁾となっている。その目的で、近年、代謝拮抗薬であるマイトマイシン C (以下 MMC) および 5-fluorouracil

(以下 5-FU) などを用いた方法²⁻⁴⁾が行われてきたが、その細胞毒性による合併症も続々と報告⁵⁻⁷⁾されている。抗アレルギー薬であるトラニラスト⁸⁾は、その薬効の 1 つである transforming growth factor- β_1 (以下 TGF- β_1) 抑制作用が線維芽細胞の増殖を抑制し、細胞間物質の産生を抑制することなどにより、緑内障濾過手術での濾過胞の形成維持に効果⁹⁾¹⁰⁾を認める一方で、正常組織に対しては影響を及ぼしにくいことなどが報告¹¹⁻¹⁵⁾されており、緑内障術後成績および

安全性の向上に対し、新たな臨床応用への可能性が期待¹⁶⁻²¹⁾されている。そこで今回、ヒトテノン嚢組織の培養細胞を用いて、トラニラストの線維芽細胞増殖抑制作用をMMCと比較しつつ、その抑制効果と投与方法による影響をin vitroで検討した。

実験材料および実験方法

1. 使用薬物

本実験には塩化ベンザルコニウムを含有する0.5%トラニラスト点眼薬（以下、塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト）、および塩化ベンザルコニウムが含有されていない0.5%トラニラスト点眼薬（以下、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト）を使用した。なお、両点眼薬共にキッセイ薬品（株）、わかもと製薬（株）に作成依頼した薬剤を実験に供した。その他、本研究ではfetal bovine serum（FBS; JRH biosciences, Kansas）、porcine trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid（trypsin-EDTA; GIBCO, Rockville）、minimum essential medium（MEM; GIBCO）、gentamicin（SIGMA, St. Louis）、mitomycin c（MMC; SIGMA）を使用した。

2. 線維芽細胞の培養

聖マリアンナ医科大学病院眼科において、インフォームドコンセントを行い、緑内障手術（サイノストミー併用トラベクトミー）を施行された、特記すべき既往歴が無く初回手術の症例より得られたテノン嚢組織を35 mmシャーレ（FALCON）に静置した。培養液は10% FBSおよび0.001 mg/ml ゲンタマイシンを添加したMEM培地でエクスプラント法にて37°C、5% CO₂存在下で組織培養した（n=2）。組織片から生えだした細胞がシャーレの底面を覆った時点で0.25% trypsin-0.02% EDTAで細胞を剥離し、初代培養を行った。その後、同様にして3代継代培養し得られた細胞を実験に用いた。

3. MMCによる細胞増殖抑制効果の検討

培養細胞にMMCの添加培養を開始し、培養2,4,7日目の細胞数をビルケルチュルク血球計算板にて計測した。なお、培養液の交換は1回/日施行し、細胞数の計測は同一シャーレにて4回ずつ行い、その平均を用いた。

本実験の培養およびMMCの投与方法

a) コントロール群

3代継代培養細胞を5×10⁴個シャーレに分注し、

MMC無添加の培養液で培養を開始し、培養2,4,7日目に細胞数を計測した。

b) MMC投与群

3代継代培養細胞を5×10⁴個シャーレに分注し、MMCを培養液で希釈し濃度を10 μMと調整したものを、2倍希釈系列にてそれぞれ（10 μM, 7.5 μM, 5 μM, 2.5 μM）の濃度に調整した培養液で培養を開始し、培養2,4,7日目に細胞数を計測した。

4. 塩化ベンザルコニウムの有無による

トラニラストの細胞増殖抑制効果の比較

塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト点眼薬、および塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬をそれぞれ培養細胞に添加し培養を開始し、トラニラスト添加培養を7日間行った。培養2,4,7日目の細胞数をビルケルチュルク血球計算板にて計測し、各コントロール群に対する細胞増殖抑制効果を比較した。なお、培養液の交換は1回/日施行し、細胞数の計測は同一シャーレにて4回ずつ行い、その平均を用いた。

本実験の培養およびトラニラストの投与方法

a) コントロール群

3代継代培養細胞を5×10⁴個シャーレに分注し、トラニラスト無添加の培養液で培養を開始し、培養2,4,7日目に細胞数を計測した。

b) トラニラスト投与群

3代継代培養細胞を5×10⁴個シャーレに分注し、塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト点眼薬、および塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬を培養液で25倍希釈（600 μM）としたものを、2倍希釈系列にてそれぞれ（600 μM, 300 μM, 150 μM, 75 μM）の濃度に調整した培養液で培養を開始し、培養2,4,7日目に細胞数を計測した。

5. トラニラストの投与時期による

細胞増殖抑制効果の比較

塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬を用いて、トラニラスト投与時期を前投与、後投与、および前+後投与の3方法に分けて培養を開始し、培養2,4,7日目の細胞数をビルケルチュルク血球計算板にて計測し、コントロール群に対する細胞増殖抑制効果の比較を行った。なお、培養液の交換は1回/日施行し、細胞数の計測は同一シャーレにて4回ずつ行い、その平均を用いた。

本実験の培養およびトラニラストの投与方法

a) コントロール群

3代継代培養細胞を 5×10^4 個シャーレに分注し、トラニラスト無添加の培養液で培養を開始し、培養2, 4, 7日目に細胞数を計測した。

b) トラニラスト前投与群

3代継代培養細胞がプレコンフルエント状態となった時点で、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬を培養液で25倍希釈 ($600 \mu\text{M}$) としたものを、2倍希釈系列にてそれぞれ ($600 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$) の濃度に調整した培養液で7日間の培養を開始し、コンフルエントの状態とした。その細胞を 5×10^4 個シャーレに分注し、トラニラスト無添加の培養液にて培養を行い、培養2, 4, 7日目に細胞数を計測した。

c) トラニラスト後投与群

3代継代培養細胞を 5×10^4 個シャーレに分注し、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬を培養液で25倍希釈 ($600 \mu\text{M}$) としたものを、2倍希釈系列にてそれぞれ ($600 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$) の濃度に調整した培養液で培養を行い、培養2, 4, 7日目に細胞数を計測した。

d) トラニラスト前投与+後投与群

3代継代培養細胞がプレコンフルエント状態となった時点で、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬を培養液で25倍希釈 ($600 \mu\text{M}$) としたものを、2倍希釈系列にてそれぞれ ($600 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$) の濃度に調整した培養液で7日間の培養を開始し、コンフルエントの状態とした。その細胞を 5×10^4 個シャーレに分注し、同様の方法で塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト点眼薬を ($600 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$) の濃度に調整した培養液で培養を行い、培養2, 4, 7日目に細胞数を計測した。

6. 細胞増殖抑制率の算定

トラニラスト無添加で培養したコントロール群の細胞増殖数と比較し、各濃度のトラニラストを添加して培養することによって、同時期の細胞増殖がどの程度抑制されているかを次式にて算定し、細胞増殖抑制効果の比較を行った。なお、細胞増殖抑制率は細胞の定着・増殖が落ち着く、培養4, 7日目の細胞数から算定した。

x = コントロール群での測定時の細胞数

y = コントロール群と同じ測定日の各実験群における細胞数

z = 培養0日目の細胞数 (5×10^4 個)

$$\text{細胞増殖抑制率 (\%)} = 100 (\%) - \frac{y-z}{x-z} \times 100 (\%)$$

実験結果

1. MMC による細胞増殖抑制効果の比較培養

MMC 無添加にて培養したコントロール群の平均細胞数は培養日数と共に増加し、培養4, 7日目では $18.1, 30.2 \times 10^4$ 個/dish であった。MMC 投与群の平均細胞数は、各 MMC 濃度において培養4日目には、 $2.5 \mu\text{M}$ 1.8×10^4 個/dish, $5 \mu\text{M}$ 1.0×10^4 個/dish, $7.5 \mu\text{M}$ 0.4×10^4 個/dish, $10 \mu\text{M}$ 0.2×10^4 個/dish, 培養7日目では $2.5 \mu\text{M}$ 0.2×10^4 個/dish, $5 \mu\text{M}$ 0.1×10^4 個/dish, $7.5 \mu\text{M}$ 0.1×10^4 個/dish, $10 \mu\text{M}$ 0×10^4 個/dish と、いずれの濃度でも培養4日目より培養細胞数は減少し、著明に細胞は増殖抑制された (Fig. 1a)。細胞増殖抑制率を算出した比較では、培養4, 7日目の細胞増殖抑制率は、各 MMC 濃度でそれぞれ $2.5 \mu\text{M}$ 124.4, 119.0%, $5 \mu\text{M}$ 130.5, 119.4%, $7.5 \mu\text{M}$ 135.1, 119.4%, $10 \mu\text{M}$ 136.6, 119.8% であり、培養4日目より、いずれの濃度においても100%以上の細胞抑制率となり、細胞の死滅を認めた (Fig. 1b)。

2. 塩化ベンザルコニウムの有無による細胞増殖抑制効果の比較

トラニラスト無添加にて培養したコントロール群の平均細胞数は、培養日数と共に増加し、培養4, 7日目では $19.7, 24.8 \times 10^4$ 個/dish であったのに対し、塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群の培養4, 7日目の平均細胞数は、各トラニラスト濃度でそれぞれ $75 \mu\text{M}$ $16.0, 16.7 \times 10^4$ 個/dish, $150 \mu\text{M}$ $11.7, 12.3 \times 10^4$ 個/dish, $300 \mu\text{M}$ $5.0, 5.2 \times 10^4$ 個/dish, $600 \mu\text{M}$ $4.0, 1.7 \times 10^4$ 個/dish と、培養細胞数はコントロール群に比べ濃度依存性に減じた (Fig. 2a)。塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群においても、培養4, 7日目でのコントロール群の平均細胞数が $23.2, 30.3 \times 10^4$ 個/dish であったのに比べ、培養4, 7日目の平均細胞数が、各トラニラスト濃度でそれぞれ $75 \mu\text{M}$ $15.8, 23.6 \times 10^4$ 個/dish, $150 \mu\text{M}$ $11.0, 18.3 \times 10^4$ 個/dish, $300 \mu\text{M}$ $7.1, 10.4 \times 10^4$ 個/dish, $600 \mu\text{M}$ $3.8, 5.4 \times 10^4$

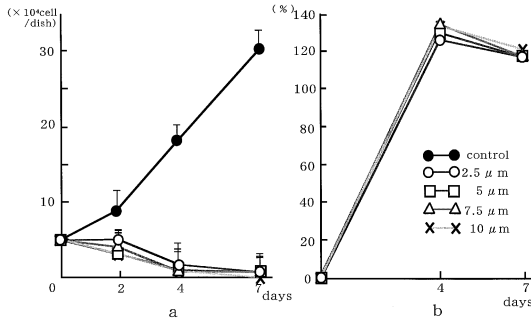


Fig. 1 Inhibitory effect of MMC.

a = cell number

b = inhibitory effect

Inhibitory effect on cell proliferation showed above 100% on all dilution concentration by MMC.

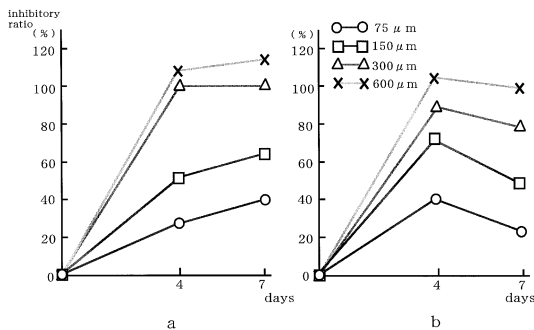


Fig. 3 Inhibitory effect in inhibitory ratio by tranilast.

a = tranilast with benzalkonium chloride

b = tranilast without benzalkonium chloride

The group of tranilast with benzalkonium chloride was higher than the group of tranilast without benzalkonium chloride 15~20% in inhibitory ratio.

個/dishであり、いずれの濃度でもコントロール群と比べて培養4日目より培養細胞数は減じ、濃度依存性の変化を認めた (Fig. 2b)。両群において増殖細胞数は、培養4,7日目共にいずれのトラニラスト濃度でも塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群の方が塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群より多かった。両群の細胞増殖抑制率を算出し比較 (Fig. 3) すると、培養4日目の細胞増殖抑制率は、塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群では、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 25.2, 40.7%, 150 μM 54.4, 67.0%, 300 μM 100.0, 88.5%, 600 μM 106.8, 106.6% (Fig. 3a, b) であり、両群共に濃度依存性に培養細胞数は減ずるものの、両群間の細胞増殖抑制率には明らかな差は認められな

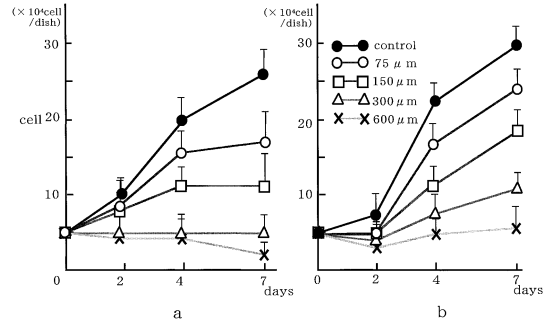


Fig. 2 Inhibitory effect on cell population by tranilast.

a = tranilast with benzalkonium chloride

b = tranilast without benzalkonium chloride

Both groups showed inhibitory effect on cell proliferation, and it showed concentration dependency.

かった。培養7日目の細胞増殖抑制率では、塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群では、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 40.9, 26.5%, 150 μM 63.1, 47.4%, 300 μM 99.0, 78.7%, 600 μM 116.7, 98.4% (Fig. 3a, b) と、両群共に濃度依存性の細胞増殖抑制を示し、かつすべての濃度において塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群が、塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群に比べて15~20%強く細胞増殖抑制効果を示した。

3. トラニラストの投与時期による

細胞増殖抑制効果の比較

トラニラスト無添加にて培養したコントロール群の平均細胞数は、培養4,7日目で 23.2, 30.3 × 10⁴ 個/dishであり、培養日数と共に増加を認めた (Fig. 4a)。塩化ベンザルコニウム抜きトラニラストの投与時期別での培養細胞増殖数においては、各群とも培養2日目までは明らかな細胞増殖を認めず、培養4日目以降に培養細胞数の増加を認めた。後投与群では培養4,7日目の平均細胞数は、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 15.8, 23.6 × 10⁴ 個/dish, 150 μM 11.0, 18.3 × 10⁴ 個/dish, 300 μM 7.1, 10.4 × 10⁴ 個/dish, 600 μM 3.8, 5.4 × 10⁴ 個/dishであり、いずれの濃度においてもコントロール群に比べ培養細胞数は減じており、培養細胞に対する細胞増殖抑制効果を、培養4日目より認めた (Fig. 4b)。前投与群においては、培養4,7日目の平均細胞数は各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 14.7, 19.5 × 10⁴ 個/dish, 150 μM 12.6, 18.8 × 10⁴ 個/dish

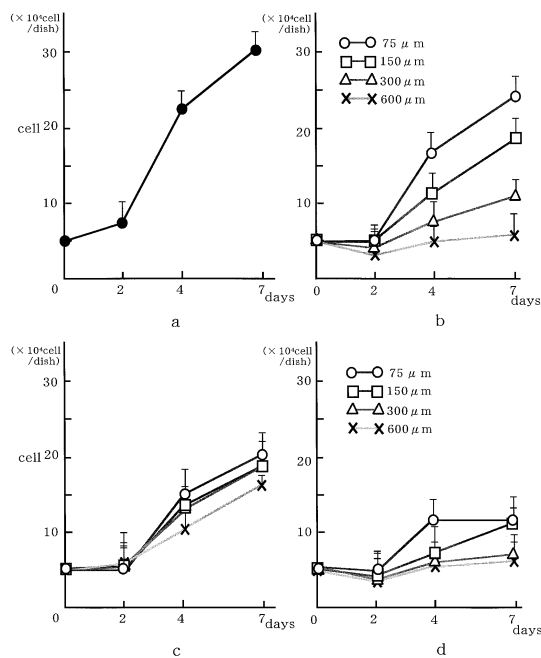


Fig. 4 Inhibitory effect on cell population by tranilast.
a = control
b = post-administration
c = pre-administration
d = pre + post administration
 Each group showed inhibitory effect on cell proliferation, but it showed different concentration dependency.

dish, 300 μM 11.8, 18.6 × 10⁴ 個 / dish, 600 μM 10.1, 16.4 × 10⁴ 個 / dish (Fig. 4c) であり、いずれの濃度でも培養 4 日目より増殖細胞数は抑制されたが、濃度間に差はほとんどなく、後投与群と比べてやや低い細胞増殖抑制効果を認めた。前 + 後投与群においては培養 4, 7 日目の平均細胞数は、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 11.6, 11.3 × 10⁴ 個 / dish, 150 μM 5.8, 10.1 × 10⁴ 個 / dish, 300 μM 5.2, 5.8 × 10⁴ 個 / dish, 600 μM 4.0, 4.1 × 10⁴ 個 / dish (Fig. 4d) と増殖細胞数は最も低く、培養 4 日目より各群の中で最も強い細胞増殖抑制効果を認めたが、濃度間での差は小さかった。各群の細胞増殖抑制率を算出し比較したのが Fig. 5 である。後投与群では培養 4, 7 日目の細胞増殖抑制率が、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 40.7, 26.5%, 150 μM 67.0, 47.4%, 300 μM 88.5, 78.7%, 600 μM 106.6, 98.4% と、培養 4 日目より濃度依存性の細胞増殖抑制効果を認めた (Fig. 5a)。前投与群では培養 4, 7 日目の細胞増殖抑制率が、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM

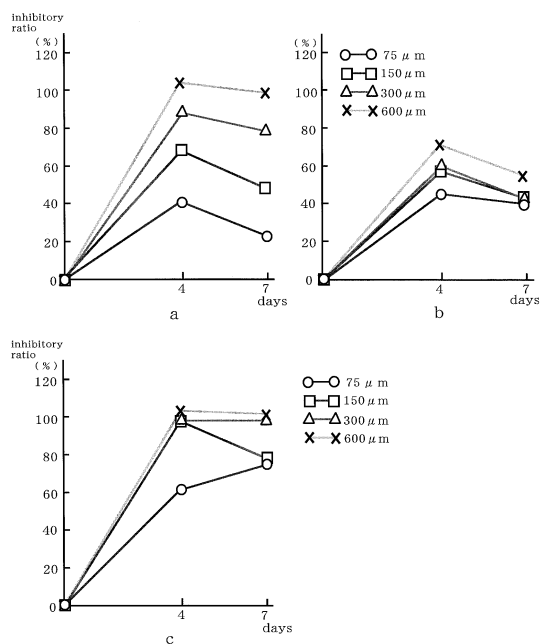


Fig. 5 Inhibitory effect in inhibitory ratio by tranilast.
a = post-administration
b = pre-administration
c = pre + post administration
 Inhibitory effect on cell proliferation in pre+post administration group was the highest than other groups.

46.7, 42.7%, 150 μM 58.2, 45.5%, 300 μM 62.6, 46.2%, 600 μM 72.0, 54.9% であり、培養 4 日目ではやや濃度依存性に細胞増殖が抑制されたが、培養 7 日目には各濃度間に大きな差はなく、明らかな濃度依存性は認めなかった (Fig. 5b)。前投与 + 後投与群では培養 4, 7 日目の細胞増殖抑制率が、各トラニラスト濃度でそれぞれ 75 μM 63.7, 75.1%, 150 μM 95.6, 79.1%, 300 μM 98.9, 96.8%, 600 μM 105.5, 103.6% と、各投与群の中で最も強い細胞増殖抑制効果を培養 4 日目より認め、培養 7 日目でのみやや濃度依存性に細胞増殖が抑制されたが、有意な差はなかった (Fig. 5c)。

考 按

緑内障濾過手術における眼圧下降効果は、その濾過胞の大きさや形状とある程度相関¹⁾しており、そのため術後の良好な眼圧を長期間保つには、いかに濾過胞を形成し維持させるかが重要となっている。最近では、濾過手術であるトラベキュlectミーの術後成績は

MMC の併用により格段に向上²⁻⁴⁾し、胞状な濾過胞が維持され眼圧下降の持続的効果が得られるようになった。これは術野に直接的に MMC を作用させることで、結膜下および強膜弁の作製部位における線維芽細胞の増殖を抑え、瘢痕形成を抑制して良好な濾過機能を維持しうるのであると考えられている。ところが MMC には強い細胞毒性という重大な問題点があり、MMC 併用トラベキュラー術後長期における濾過胞からの漏出⁵⁾や、濾過胞周囲の角膜上皮バリア機能の低下などの MMC による影響⁶⁾⁷⁾が次々と指摘されている。そのため現在では、安全にしかも同様な抑制効果を持つ薬剤・方法などが模索されており、その期待の出来る薬剤の1つとしてトラニラストが注目されている。抗アレルギー薬であるトラニラストは、肥満細胞等の炎症細胞からの、ヒスタミンやプロスタグランジンなどのケミカルメディエーターの遊離抑制や、血管透過性亢進の抑制を作用機序として抗アレルギー作用を示す⁸⁾ことが知られている。しかしトラニラストにはこのような抗アレルギー作用以外にも、TGF- β_1 をはじめとするサイトカインの産生・遊離抑制作用が認められ、線維芽細胞増殖やコラーゲン合成の抑制効果を有していることから、ケロイドおよび肥厚性瘢痕に対して、その治療や予防に臨床的に用いられて効果²¹⁻²³⁾が認められている。同様にそれらの作用が、近年眼科領域においても後発白内障の後囊混濁抑制²⁴⁾やエキシマレーザー照射後の角膜上皮混濁抑制²⁵⁾、翼状片術後の再発抑制²⁶⁾に効果があることが報告されており、緑内障濾過手術においてもその線維芽細胞増殖抑制作用が、MMC 等と同様に術後濾過胞の形成維持の成績向上に対して、一定の効果を期待ができるのではないかと考えられている。そこで今回、緑内障手術における濾過胞周囲の瘢痕形成に関連するヒトテノン囊由来培養線維芽細胞を用いて、現在主に使用されている MMC と比較し、その培養細胞への実際の影響や問題について検討し、それと共に主に TGF- β_1 抑制作用によるとされるトラニラストの細胞増殖抑制効果が、MMC と比べていかなる効果を示すかを明らかにする目的で、その濃度および投与時期による影響、製品(リザベン[®])に含有される防腐剤(塩化ベンザルコニウム)の影響も含め検討した。

まず、現在の緑内障濾過手術において、術後濾過胞

の形成維持に対し有効な代謝拮抗薬として広く臨床で用いられている MMC において、その細胞増殖抑制効果および細胞への影響を確認するため、ヒトテノン囊由来線維芽細胞を用いて、MMC の添加培養による培養細胞に対する影響を検討した。培養細胞数は培養4日目からすべての濃度において増殖がみられず、細胞増殖抑制率は100%以上そのまま推移し、強い抑制効果を示した。またいずれの濃度においても徐々に細胞数の減少を認め、経過と共に細胞が死滅することが明らかとなった。以上から MMC にはその強力な線維芽細胞増殖抑制効果とともに、問題となっている強い細胞毒性の効果を持つことが確認することができた。そのため、MMC より安全かつ同様な効果を示す手段があれば、臨床においては最善であることは明らかである。本実験では抗アレルギー点眼薬として、臨床上一般的に使用されているトラニラスト点眼薬(リザベン[®])を用いて、培養液へのトラニラスト添加培養によりヒトテノン囊由来線維芽細胞の細胞増殖に対してどのような効果があるかを検討した。その結果、培養細胞はトラニラストにより濃度依存性に増殖を抑制されていたことから、トラニラストには線維芽細胞増殖抑制効果があることが明らかとなった。しかし実際には、製品に含まれる防腐剤、特に塩化ベンザルコニウムの細胞毒性による影響も大きな問題²⁷⁻²⁹⁾になっており、それらによる影響を区別するために塩化ベンザルコニウムを抜いたトラニラスト点眼薬にて、塩化ベンザルコニウムが細胞に及ぼす影響と、トラニラスト自体が有する細胞増殖抑制効果を同時に検討する必要がある。その結果、塩化ベンザルコニウムを抜いたトラニラスト点眼薬においても、培養7日目の細胞増殖抑制率が、各トラニラスト濃度で75 μ M 26.5%、150 μ M 47.4%、300 μ M 78.7%、600 μ M 98.4%と、濃度依存性の強い細胞増殖抑制効果を認め、トラニラスト自体の線維芽細胞への増殖抑制効果が確認できた。またすべての濃度において、塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群が塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群より強い細胞増殖抑制効果を認め、細胞増殖抑制率では塩化ベンザルコニウム入りトラニラスト群が塩化ベンザルコニウム抜きトラニラスト群よりも15~20%高値を示し、細胞増殖抑制そのものには塩化ベンザルコニウムの影響もあることが示唆された。本実験においては光学顕微鏡での

観察において細胞の進展を認めず、定着しないため培養液交換時に流出した細胞は死滅した細胞として細胞計測数から除外したが、トラニラスト点眼薬（リザベン[®]）そのものは形態の変性はやや認めるものの、MMCと異なり全ての群において細胞増殖が徐々に認められ、細胞計測数からの除外を行った細胞死などの激的な変化を明らかに認めず、塩化ベンザルコニウムの細胞毒性によると考えられる直接的な強い障害は認めなかったことより、臨床においてトラニラスト点眼薬（リザベン[®]）は、線維芽細胞抑制効果を期待する薬剤として有用であると考えられた。なお、培養細胞において各群の培養2日目の細胞数が、添加トラニラストが低濃度であっても分注した細胞数より一時的に減少するなどの変動を示した原因としては、継代培養後2日では細胞によってはまだしっかりと定着しておらず、その増殖開始前に一時的に元の細胞数より減少することがあるのではないかと考えられた。

以上の結果を踏まえて、トラニラストの臨床への実際的な応用を考え、トラニラストの投与時期を区別することにより細胞増殖抑制効果に違いがあるかを検討した。培養細胞は培養4日目から、トラニラストのいずれの投与群においても細胞増殖抑制効果を認め、その効果は各群間で相違があった。投与時期では、後投与群では濃度依存性に細胞は強く抑制されたことにより、トラニラストには細胞増殖に対する抑制作用があることが明らかとなった。前投与群では、後投与群と比べ増殖抑制効果は低く濃度による差も認めないが、プレコンフルエント状態でトラニラストを作用させ、それを継代培養した細胞においてもコントロール群と比較して増殖抑制効果を有していたことから、トラニラストの細胞増殖を抑制する作用機序は、明らかな細胞死にいたるほどではないにしても、遺伝子レベルには作用している可能性も考えられる。トラニラストの作用機序については、現在ではその強いTGF- β_1 抑制効果が、線維芽細胞増殖抑制効果の主な作用機序として考えられている^{19) 30)}が、トラニラストにはTGF- β_1 抑制効果のみならず、同様に線維芽細胞増殖、コラーゲン合成に関与しているinterleukin-1 β (IL-1 β)、platelet-derived growth factor (PDGF)の抑制効果も認められている³¹⁾。またアポトーシスの阻止が肥厚性癍痕を生じる機序の1つとの報告³²⁾もあり、同様にそれが創傷治癒過程の線維芽細胞に関与していること

も考えられる。水晶体上皮培養細胞を用いた報告にはトラニラストによるアポトーシスの影響を示唆するもの³³⁾があり、その経路は不明であるがトラニラストによるアポトーシス誘導が細胞増殖抑制効果の一因である可能性も考えられた。しかし今回の結果のみでは、トラニラストの作用機序の詳細については不明であり、今後さらに検討が必要と考えられた。また今回の結果で前投与後では細胞増殖抑制効果が減弱しながらも眼組織の中でしばらくの間持続していることが示唆されたことより、臨床において、いくらかのトラニラスト休業期間をおいたとしても、一定の細胞増殖抑制効果は期待できることが考えられた。一方、前と後の両時期の投与群においては前投与の影響により濃度依存性は後投与群より低いが、細胞増殖抑制効果は各投与群の中で最も強い効果を示した。以上のことより、いずれの投与方法においても線維芽細胞増殖抑制効果は期待できるが、術前からの継続的なトラニラスト点眼投与が、濾過胞の形成維持を考えた場合には、最も有効である可能性が本実験により示唆された。

今回の実験により、トラニラストは線維芽細胞増殖抑制効果を有し、MMC、5-FU等と比べ細胞への障害が少なく、緑内障濾過手術後の濾過胞維持に対し安全な効果が期待でき、また術前投与および術後投与が共に有効な薬剤であると考えられた。しかしトラニラストの作用機序およびTGF- β_1 の発現が減少する創傷治癒機転の落ち着いた以降の効果などは依然として不明であり、その有効な投与期間についての問題や臨床的至適濃度などについては、今後もさらなる検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) 山本 哲也, 佐久間 毅, 北澤 克明. Ultrasound Biomicroscope による結膜濾過胞の観察—眼圧コントロールとの関連—. あたらしい眼科 1995; 12: 1305-1308.
- 2) Kitazawa Y, Taniguchi T, Nakano Y, Shirato S and Ymamoto T. 5-Fluorouracil for tarabeculectomy in glaucoma. Graefes Arch Clin EXP Ophthalmol 1987; 225: 403-405.
- 3) Kitazawa Y, Kawase K, Matsushita H and Minobe M. Tarabeculectomy with matomacin C. Arch Ophthalmol 1991; 109: 1693-1698.
- 4) 原岳, 白土城照, 宮田典男, 江口甲一郎, 高田美貴

- 子. マイトマイシン C を併用した初回線維柱帯切除術. 日眼会誌 1995; 99: 1283-1287.
- 5) 溝口尚則, 松村美代, 門脇弘之, 黒田真一郎, 永田誠. トラベクレクトミー術後濾過胞の長期経過—濾過胞の安全性—. 日眼会誌 1997; 101: 874-878.
 - 6) 山本哲也, 北澤克明. 線維芽細胞増殖阻害剤を併用するトラベクレクトミー: その光と陰. 眼科 1995; 37: 39-46.
 - 7) 坂本泰二, 大島祐司. 代謝拮抗薬の今後の展望: あたらしい薬剤・投与方法. 眼科手術 1999; 12: 51-56.
 - 8) 三国郁夫, 清水由規, 小暮文夫, 湯浅武之助, 雑賀壽和, 小川暢也. アレルギー性結膜炎および春期カタルに対するトラニラスト点眼液の臨床評価—Disodium Cromoglycate 点眼薬を対照とした二重盲検比較試験. 臨床医薬 1993; 9: 669-683.
 - 9) Tripathi RC, Chan WFA, Li J and Tripathi BJ. Trabecular cells express the TGF- β_2 gene and secrete the cytokine. EXP Eye Res 1994; 58: 523-528.
 - 10) Tripathi RC, Li J, Chan WFA and Tripathi BJ. Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF- β_2 . EXP Eye Res 1994; 59: 723-728.
 - 11) 須澤東夫, 菊池信次, 市川潔, 新井伸彦, 田澤滋樹, 土屋興巨, 百瀬泰紀, 柴田信夫, 松本智透, 浜野修一郎, 小松英忠, 宮田廣志. アレルギー疾患治療薬 Tranilast のケロイド組織に対する作用. 日薬理誌 1992; 99: 231-239.
 - 12) 菊池信次, 市川潔, 須澤東夫, 浜野修一郎, 宮田廣志. Tranilast および他の抗アレルギー薬のコラーゲン合成およびサイトカイン産生・遊離に対する作用. 基礎と臨床 1992; 26: 4377-4383.
 - 13) Aoyama Y, Ueno S and Ishii Y. Suppression of trabecular fibrous cell hyperplasia by tranilast. Invest Ophthalmol Vis Sci 39 (Suppl) 1998; 27.
 - 14) Cunliffe IA, Rens RC and Rennie IG. The effect of TGF- β_1 and β_2 on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture. Acta Ophthalmol 1996; 74: 31-35.
 - 15) Suzawa H, Kikuchi S, Arai N and Koda A. The mechanism involved in the inhibitory action of tranilast on collagen biosynthesis of Keroido fibroblast. Jpn J Pharmacol 1992; 60: 91-96.
 - 16) 杉山哲也, 清水一弘. トラニラスト点眼により緑内障術後濾過胞が良好に保たれた一例. 臨眼 1999; 53: 145-148.
 - 17) 青山裕美子, 石橋朋和, 四万村京子, 上野聰樹. シスソトミー併用トラベクレクトミーにおけるトラニラスト点眼の効果. あたらしい眼科 2000; 17: 439-442.
 - 18) 青山裕美子, 本木正師, 橋本真理子. 家兎緑内障濾過手術におけるトラニラストの濾過胞形成への影響. あたらしい眼科 2000; 17: 1283-1290.
 - 19) 千原悦夫, 落合春幸, 董瑾. 緑内障濾過胞に対する TGF- β_1 阻害剤トラニラストの効果. 日本眼科紀要 1999; 50: 260-266.
 - 20) 千原悦夫, 落合春幸. TGF- β_1 阻害剤トラニラスト点眼による緑内障濾過胞維持効果と点眼の安全性についての検討(予報). あたらしい眼科 1998; 15: 415-417.
 - 21) 石橋康正, 原田昭太郎, 新村真人, 川島真. トラニラストのケロイド・肥厚性癍痕に対する臨床試験. 臨床医薬 1991; 7: 2829-2838.
 - 22) 石倉直敬, 塚田貞夫, 井出克樹, 赤羽紀子, 置塩良政, 長谷田康男, 亀井康二, 山本正樹, 林洋司, 小島正嗣, 岡田忠彦. 肥厚性癍痕およびケロイドに対する内服療法としてのトラニラストの使用効果. 基礎と臨床 1992; 26: 489-497.
 - 23) 藤野豊美, 中島英雄, 花岡一男. トラニラストによる癍痕ケロイド・肥厚性癍痕の術後再発防止効果の検討. 臨床と研究 1992; 69: 251-261.
 - 24) 宮沢優美子, 岩城陽一, 矢高真人, 戸張幾生. トラニラスト点眼薬濃度と後発白内障抑制. 日眼会誌 2001; 105: 442-446.
 - 25) 酒井達郎, 岡本進, 岩城陽一. トラニラスト点眼薬のエキシマレーザー照射後の角膜上皮混濁に対する抑制効果. 日眼会誌 1997; 101: 783-787.
 - 26) 田邊麻由子, 岩下憲四郎, 弓削堅志. トラニラスト点眼薬の翼状片術後の再発抑制効果. 眼科手術 1999; 12: 547-549.
 - 27) 高橋信夫, 佐々木一之. 防腐剤とその眼に与える影響. 眼科 1989; 31: 43-48.
 - 28) 濱野孝, 坪田一男, 今安正樹. 点眼薬中の防腐剤が角膜上皮に及ぼす影響—涙液中 LDH 活性を指標として—. 日本眼科紀要 1991; 4: 780-783.
 - 29) 中村雅胤, 若島洋子, 壬生寛之. ヒアルロン酸ナトリウム点眼液のウサギ角膜上皮創傷治癒促進効果に対する防腐剤の影響. 日本眼科紀要 1997; 4: 308-312.
 - 30) 郡司祐則, 周立軍, 館下亨, 小野一郎, 金子史男. トラニラストが線維芽細胞の TGF- β_1 , コラーゲン, コラーゲナーゼ産生に与える影響に関する実験的研究. 日形会誌 1996; 16: 765-772.

- 31) 須藤東夫, 菊池伸次, 市川潔. アレルギー疾患治療薬 Tranilast の Cytokine 産生・遊離に対する抑制作用. 応用薬理 1992; 43: 409-414.
- 32) 赤坂喜清, 石川由起夫, 犬塚潔, 足羽紀子, 木口英子, 石井壽晴. 隆起性および扁平癬痕におけるアポトーシス関連抗原の発現. *Connective Tissue* 1998; 30: 29-35.
- 33) 鈴木裕子, 岩城正佳, 今川路子, 竹内実. 抗アレルギー薬による水晶体上皮細胞の増殖抑制. 日眼会誌 2001; 105: 517-523.

Abstract

A Study on the Inhibitory Effect of Tranilast on Cell Proliferation by Cultured Human Tenon's Fibroblasts

Tomokazu Ishibashi, Yumiko Aoyama, Masamitsu Motoki, Mariko Hashimoto, and Satoki Ueno

The use of antimetabolites such as Mitomycin C (MMC) has clearly improved the postoperative results of glaucoma filtering operations despite various postoperative complications, and it has recently been reported that tranilast can be expected to exert a similar inhibitory effect on fibroblasts without such cellular complications. We compared the effect of tranilast and MMC on cultured fibroblasts. The inhibitory effect of MMC on cell proliferation was above 100%, and all dilutions resulted in cell death. The inhibitory effect on cell proliferation of tranilast plus an antiseptic (RIZABEN[®]) was: 75 μ M 41%, 150 μ M 63%, 300 μ M 99%, and 600 μ M 117% respectively at various concentrations, and it showed concentration dependency. By contrast, the inhibitory effect on cell proliferation of tranilast without an antiseptic was: 75 μ M 27%, 150 μ M 47%, 300 μ M 79%, and 600 μ M 98% respectively. Concentration dependency was also observed, and cell death was not seen at any dilutions. We also examined the inhibitory effect of tranilast on cell proliferation when administered at different times. The inhibitory effect on cell proliferation in the post-administration group was 27 ~ 98% at each concentration, and it showed concentration dependency. The inhibitory effect on cell proliferation in the pre-administration group was 43 ~ 55% at each concentration. These findings showed that the effect was lower in the pre-administration group than in the post-administration group. The inhibitory effect on cell proliferation reached 75 ~ 104% in the pre- and post-administration group at each concentration. These results suggest that the inhibitory effect of tranilast on cell proliferation is also effective and safe, and that it is unassociated with the cellular disorders caused by MMC. Therefore, these effects of tranilast can be expected to improve the outcome of glaucoma operations when continuously administered clinically beginning in the preoperative period. (*St. Marianna Med. J.*, **29**: 407-415, 2001)

Department of Ophthalmology (Director: Prof. Satoki Ueno)

St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, 216-8511, Japan