

## ARI (M-79175) の家兎眼内移行動態 (図5, 表2)

小島 正美・佐々木一之・谷口 智子 (金沢医科大学眼科学教室)

The Intraocular Penetration of ARI (M-79175)  
in Rabbit Eyes

Masami Kojima, Kazuyuki Sasaki and Tomoko Taniguchi

Department of Ophthalmology Kanazawa Medical University

## 要 約

0.05% M-79175 点眼液を1回 (40 $\mu$ l), および, 5分毎5回 (各40 $\mu$ l $\times$ 5回) を白色家兎眼に点眼し, 点眼終了後15分より6時間までの8時点で, M-79175 の房水移行濃度を HPLC で測定した. 1回投与群では15分で1.02 $\pm$ 0.20 $\mu$ g/ml の最高値を示し, 180分後まで移行が確認された. 頻回点眼群では最終点眼終了後15分で最高値3.38 $\pm$ 1.90 $\mu$ g/ml を示し, 以後, 緩慢な減少を示し, 180分後においてもなお0.26 $\pm$ 0.21 $\mu$ g/ml の移行が確認された. HPLC 法は M-79175 の眼内移行濃度測定に有用な検討手段として, 今後用いられてもよいものと思われた. (日眼 91: 643-646, 1987)

キーワード: AR 阻害剤, 眼内移行動態, 高速液体クロマトグラフィー

## Abstract

The concentration of 0.05% Aldose reductase inhibitor ARI (M-79175) in the aqueous humor of rabbit eyes after instillation was measured by high performance liquid chromatography. The highest concentration of M-79175 in the aqueous humor was 3.4 $\mu$ g/ml 15 minutes after the final instillation. After 3 hours, trace levels of the drug were detectable in the aqueous humor. The concentrations of M-79175 in the aqueous humor following multiple instillation were 4 times as much as the concentrations following single instillations. This is method is very useful to measure M-79175 concentration. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 643-646, 1987)

Key words: AR inhibitor, drug penetration in the eye, HPLC

## I 緒 言

Aldose reductase (AR) 阻害剤の糖尿病性白内障に対する薬効を検討した種々の実験的研究が内外行われており, 少なくとも実験レベルでは経口のみならず, 局所投与でも AR 阻害剤が抗白内障作用を示すことが明らかにされている. 本剤の白内障に対する生化学的検討, 形態学的研究は精力的に行われてきたが, 投与された薬剤の眼内動態に関する研究は数多くない<sup>1)2)</sup>. 投与された薬剤が眼内で, その有効濃度をどれ

程の間維持しているのかを知ることは眼疾患, あるいは, 治療薬剤の種類を問わず, 眼科薬物療法の基本と考える. 著者らが検討している AR 阻害剤 (M-79175) に関しては, 現在まで前田らによる同位元素使用による報告があり, 本薬剤の眼組織内での蓄積が推測されている<sup>2)</sup>. 本研究は高速液体クロマトグラフィー法(以下 HPLC と略す)を用いて, 投与された AR 阻害剤の眼内移行動態を明らかにすることができるか, 又, この測定方法が今後のこの種の検索に広く応用可能であるかを検討することを目的に正常家兎眼における薬剤

別刷請求先: 920-02 石川県河北郡内灘町大学 1-1 金沢医科大学眼科学教室 小島 正美

Reprint requests to: Masami Kojima. Dept. of Ophthalmol., Kanazawa Medical Univ.

1-1 Daigaku, Uchinada-machi, Kahoku-gun, Ishikawa 920-02, Japan

(昭和62年2月2日受付) (Accepted February 2, 1987)

の房水内移行濃度を測定した。

## II 実験方法

### 実験材料

実験動物には、体重2.5~3kgの白色家兎(雌性)を使用した。

### AR阻害剤投与方法

AR阻害剤として0.05% M-79175点眼液(エーザイ)を使用し、本剤40 $\mu$ lを1回点眼したものを1回投与群(A群)とし、同量のM-79175を5分毎5回点眼したものを頻回投与群(B群)とした。また片眼(右眼)に5分毎5回の点眼を行い、薬剤非投与側(左眼)房水内へのM-79175の移行についても検討を行った(C群)。点眼は、いずれもマイクロピペットを用いて正確に40 $\mu$ lを結膜嚢内に注入した。

### 試料採取方法

点眼終了後、15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360分の各時点で房水を採取した。房水の採取にあたっては、あらかじめ0.4%塩酸オキシブプロカイン(ベノキシル®)で点眼麻酔を行い、採取前に生理食塩水で前眼部を洗浄した上で、角膜輪部より、26G注射針を前房内に刺し、房水0.3mlを採取した。家兎はいずれも1眼1回の使用で各時点4~10眼から試料を採取した。

### 試料の前処理

試料の前処理については上田、三宅らの方法(未発表資料)に準じて行った。房水は0.2mlを試料とし、これに内部標準物質としてSorbiniol 50 $\mu$ g/mlを0.1ml加え、これにCH<sub>3</sub>OH 0.4ml、および1N HClを0.5ml加えた後に、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=3:2の混液を4ml加えた。この溶液を10分間振盪して薬剤を有機層に抽出後、10分間遠心分離(2,000r.p.m.)を行い、上層の有機層を採取した。この有機層に0.1N NaOHを2ml加えて10分間振盪抽出操作を行った後、遠心分離(2,000r.p.m.)を行い、これより下層を得た。さらに、この水層にC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3:2)を5ml加え、振盪、遠心分離を同様に行って、再び下層の水層をとり、これに1N HCl 1mlとC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3:2)を4ml加え、同様の振盪、遠心分離を行って薬剤を有機層に抽出し、この有機層より3ml採取し、30分間減圧下で蒸発乾固した後、これにMobile phaseとしてCH<sub>3</sub>CN:20mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>=21:79に調製したものを100 $\mu$ l加え、そのうちの20~80 $\mu$ lを試料としてHPLCに注入した(図1)。



図1 試料の前処理

表1 The analysis conditions of HPLC

Column	: Zorbax-C8 (4.6mm $\times$ 15cm)
Column temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Flow rate	: 0.7~1.0ml/min.
Detection	: UV 285nm
Sensitivity	: 0.005AUFs
Sample size	: 20~80 $\mu$ l
Mobile phase	: CH <sub>3</sub> CN:20mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> =21:79

### M-79175 濃度測定方法

上記の方法で得た試料はHPLC(島津C-R3A)を用い、以下の条件下(表1)で定量を行った。分離用カラムはZorbax-C<sub>8</sub>を使用し、移動相としてCH<sub>3</sub>CN:20mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>=21:79を用い、流速0.7~1.0ml/min.の条件下でUV 285nm(0.005AUFs)で検出した。検体の濃度算出には無処置の家兎の房水を用い、Sorbiniolを内部標準物質として、既知濃度のM-79175を加えて検量線を作製した。検出ピークの同定には重ね合わせ法を用いた。

## III 結果

無処置眼の房水のクロマトグラム上には内部標準物質

質である Sorbinil および、測定薬剤である M-79175 の検出を妨害する組織成分、代謝物等は存在しなかった (図 2)。検量線は M-79175 濃度と M-79175/internal standard peak 面積比との間に良好な相関関係 ( $r=0.9989$ ) を示した (図 3)。検量線は M-79175 濃度  $50 \mu\text{g/ml}$  まで直線性があつた。

上記定量法を用い、房水中の M-79175 濃度の時間的推移を検討した結果、M-79175 の房水内移行は A 群 (1 回投与群) では点眼終了後 15 分で  $1.02 \pm 0.20 \mu\text{g/ml}$  を示し、その後、30 分で  $0.89 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ 、60 分で

$0.45 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$  と急速に減少したが、180 分後でも残留が確認された (表 2, 図 4)。

B 群 (頻回投与群) の移行動態としては A 群とはほぼ同様の傾向を示したが、房水内濃度は投与後 15 分で  $3.38 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$  を示し、以後、30 分で  $2.58 \pm 1.68 \mu\text{g/ml}$ 、60 分で  $1.38 \pm 1.10 \mu\text{g/ml}$ 、120 分で  $0.39 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$  と緩慢に減少し、180 分後の濃度値は  $0.26 \pm 0.21$

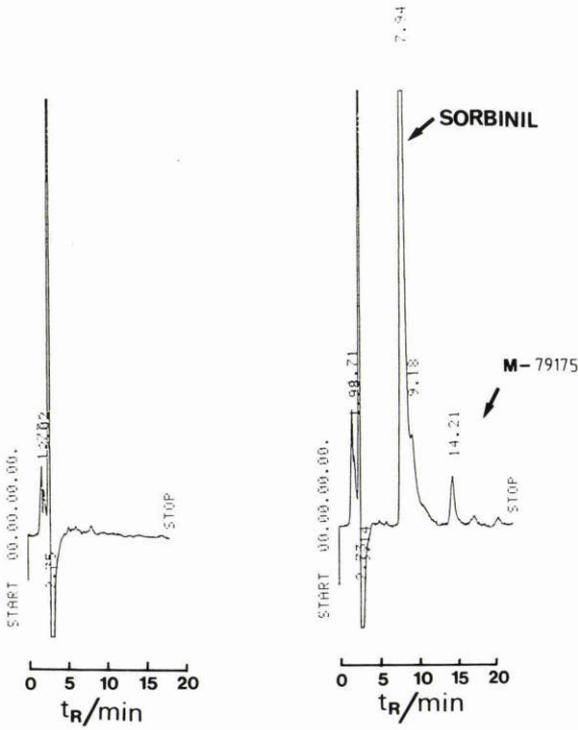


図 2 Chromatograms of M-79175 and I.S. extracted from aqueous humor

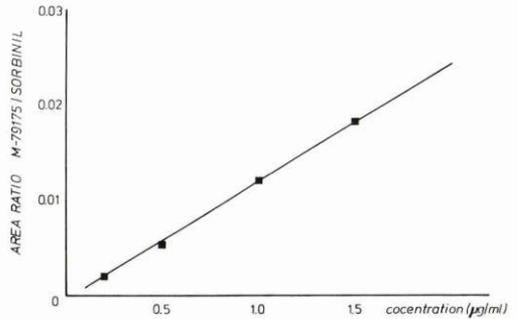
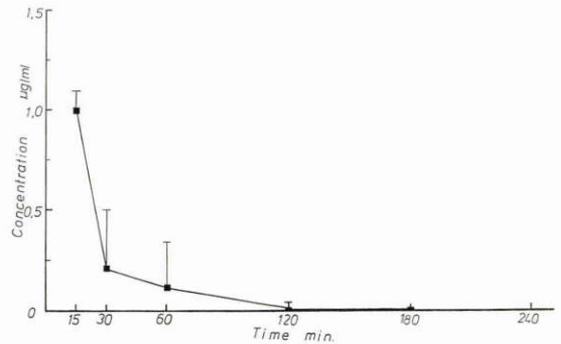


図 3 Aqueous humor:  $y=0.013 \times x - 0.001$   
 $r=0.999$



Single instillation  
 $n=10$   
図 4 The concentration of M-79175 in the aqueous humor

表 2 M-79175房水内移行濃度

min.	15	30	60	120	180	240	300	360
1 回点眼群 A 群	$1.02 \pm 0.20$	$0.89 \pm 0.38$	$0.45 \pm 0.24$	trace	trace	—	—	—
頻毎点眼群 B 群	$3.38 \pm 1.90$	$2.58 \pm 1.68$	$1.38 \pm 1.10$	$0.39 \pm 0.11$	$0.26 \pm 0.21$	—	—	—

( $\mu\text{g/ml}$ )  $n=4 \sim 10$

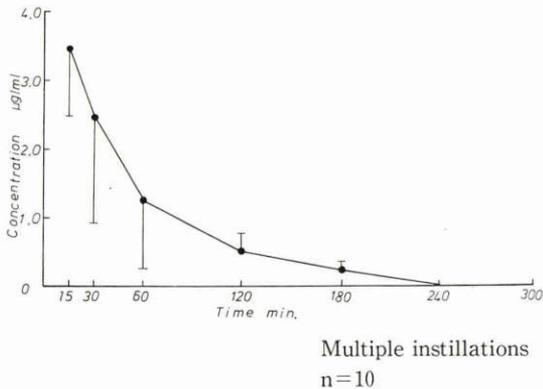


図5 The concentration of M-79175 in the aqueous humor

μg/mlであった。投与後240分以後での残留は認めなかった(表2, 図5)。また, C群, 薬剤片眼投与による非投与側眼の房水中には, M-79175は検出されなかった。

#### IV 考 按

AR 阻害剤は, 抗糖尿病性白内障剤として期待されているが, これが正式に臨床応用されるには到っていない。抗白内障という薬剤の持つ性格上, 長期間の持続投与がまず考えられるが, 本剤そのものの生体に及ぼす影響を考えると, 動物実験レベルの結果を臨床に導入するには, なお検討されねばならない幾つかの事項が残されている。投与されたAR阻害剤の眼組織内移行動態もその一つであろう。AR阻害剤の眼内組織濃度の測定法については, 現在までRadio immunoassay法による報告<sup>2)</sup>および, HPLC法によるものがある<sup>1)</sup>。今回, 著者らは目的とする薬物のみを分離し, 測定するHPLC法を用いて房水中M-79175濃度の測定する方法を検討した。この条件下で測定し得た房水中M-79175濃度は点眼終了後早期よりかなりの高濃度値を示し, 1回投与群, 頻回投与群ともに, 点眼終了3時間後でも薬剤の残留を認めている。薬剤の総投与量と眼内に移行した薬剤の濃度は, 1回投与群で最大移行時(15分後)で総投与量20μgの5.1%が移行しており, 30分では4.5%, 60分では2.3%であった。頻回投与群では最大移行時(15分後)で総投与量100μg

の3.4%が移行しており, 30分で2.6%, 60分で1.4%, 120分で0.4%, 180分後でも0.3%が検出された。本薬剤が角膜透過性に優れていることは, すでに加藤ら<sup>3)</sup>によって指摘されているところであるが, 今回の結果もこれを裏付けるものである。

本薬剤の眼内移行濃度を種々のアルドース還元酵素のIC<sub>50</sub>と比較すると, 1回点眼群では最大移行時の15分で, ウシ水晶体ARのIC<sub>50</sub>の23倍, ラット水晶体ARの102倍, ヒト胎盤ARの41倍の濃度に相当するものであった。頻回投与群では同じく最大移行時の15分で, ウシ水晶体ARの75倍, ラット水晶体ARの338倍, ヒト胎盤ARの135倍の濃度を示し, 180分後においてもウシ水晶体ARの6倍, ラット水晶体ARの26倍, ヒト胎盤ARの10倍の濃度として認められた。本実験は家兎眼を用いて行われたものであるため, 上記のウシ, ラット, ヒト胎盤のIC<sub>50</sub>の数値と直接比較し得るものではないが, 本実験系では最大移行時のみならず, 最終点眼終了3時間後でもAR活性を阻害し得る濃度が残留する可能性があることが推察された。点眼によっても実験的に誘発した糖白内障の発症, 進行を阻止することは, すでに確認されているので, 少なくとも動物実験レベルでは薬剤投与量と抗白内障作用の関連は今後ある程度は解明されよう。房水のみならず眼内の他組織内の薬剤移行動態, あるいは, 蓄積の状態など, 今回用いたHPLC法により十分解析でき得るものとする。

稿を終えるにあたり, 本剤を提供して頂きましたエーザイ株式会社に感謝致します。

#### 文 献

- 1) Crabbe MJC, Michael P, Burgess SEP, Cheng H: The penetration of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, into lens, aqueous humor and erythrocytes of patients undergoing cataract extraction. *Exp Eye Res* 40: 95—99, 1984.
- 2) 前田直之, 細谷比左志ほか: Aldose reductase inhibitor(E-1008)の眼内移行. *日眼会誌第90回本眼科学会総会講演抄録集*, 143, 1986.
- 3) 加藤晃良, 石橋泰雄, 三宅康夫ほか: アルドース還元酵素阻害剤(M-79175)の角膜透過性に関する基礎的検討. *あたらしい眼科* 3: 412—414, 1986.