

抗アレルギー剤 AA-673点眼液の眼内動態に関する検討

(第2報) 家兎眼への1.0% AA-673点眼液の21日間

連続点眼投与後の組織蓄積性について (図4, 表3)

小河 貴裕・大平 光彦 (千寿製薬株式会社伊丹研究所)
池尻 芳文・阪上 享宏

Intraocular Tissue Accumulation During and After Consecutive Instillation of 1.0% AA-673 Anti-allergic Agent Ophthalmic Solution for 21 Days in Rabbit Eyes

Takahiro Ogawa, Mitsuhiro Ohira, Yoshifumi Ikejiri,
and Takahiro Sakaue

Itami Research Laboratories, Senju Pharmaceutical Co., Ltd

要 約

1.0% AA-673点眼液を1日1回で7, 14, 21回連続点眼し, 家兎眼組織へのAA-673の蓄積性および1回あるいは21回点眼後の組織中AA-673の消失を検討した。最終点眼後24時間のAA-673の組織濃度は点眼回数の増加とともに増大し, 結膜, 前房水および水晶体では14回で定常状態になり, 他の組織ではなお増大し, 21回で最大濃度となった。各組織の複数回投与後24時間の最大濃度と1回点眼後24時間の濃度とを比較すると, 蓄積率は前部強膜が最も高く8.4倍, 結膜5.6倍, 水晶体5.5倍, 血清5.1倍, 角膜および虹彩・毛様体3.9倍そして前房水3.1倍であった。21回連続点眼後の各組織でのAA-673の消失速度定数は角膜 1.45day^{-1} , 結膜 0.32day^{-1} および水晶体 0.32day^{-1} であった。この値は1回点眼後の値とほぼ同じであった。これらの結果より, AA-673は連続点眼すると眼組織に蓄積するが, 点眼中止により眼組織には残留しないと考えられた。(日眼 92: 1190—1195, 1988)

キーワード: AA-673点眼液, 家兎眼, 連続点眼, 蓄積性, 消失速度定数

Abstract

The accumulation of AA-673 in ocular tissues in rabbit after consecutive instillation (7, 14 and 21 times) of 1.0% AA-673 ophthalmic solution once daily and the elimination of AA-673 in the ocular tissues after single or 21 times instillation of the solution were investigated. The concentration of AA-673 in the tissues at 24 hr after final instillation increased with the frequency of instillation, that is, the concentration in the conjunctiva, aqueous humor and lens reached a plateau after 14 instillations, and the concentration in other tissues increased with further instillations, reaching a maximum after 21 instillations. The maximal concentration of each tissue at 24 hr after multiple instillations was compared to the concentration at 24 hr after a single instillation. The ratios of accumulation between multiple instillations and single instillation were 8.4 in the anterior sclera, the largest ratio of accumulation of all the tissues measured, 5.6 in the conjunctiva, 5.5 in the lens, 5.1 in serum, 3.9 in the cornea and in the iris with ciliary bodies, and 3.1 in the aqueous humor. The elimination rate constant

別刷請求先: 664 伊丹市大鹿桜ヶ丘1-1 千寿製薬株式会社伊丹研究所 小河 貴裕 (昭和63年3月10日受付)

Reprint requests to: Takahiro Ogawa Itami Research Laboratories, Senju Pharmaceutical Co., Ltd.

1-1 Sakuragaoka, Oshika, Itami 664, Japan

(Accepted for publication March 10, 1988)

of AA-673 in the tissues after 21 instillations was 1.45 day^{-1} in the cornea, 0.32 day^{-1} in the conjunctiva and 0.32 day^{-1} in the lens. These values were roughly similar to the elimination rate constant of these tissues after a single instillation. These results suggested that AA-673 accumulated in the ocular tissues by consecutive instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution, but that it did not remain in the ocular tissues after the cessation of instillation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1190—1195, 1988)

Key words: AA-673 ophthalmic solution, Rabbit's eye, Consecutive instillation, Accumulation, Elimination rate constant

I 緒 言

抗アレルギー剤 AA-673点眼液の家兎眼への1回点眼時の眼内動態については、吸収、消失がすみやかであることをすでに報告した¹⁾。人に連用された場合の安全性について何らかの示唆を得るためには、連続点眼後の動態を知ること重要であると考えられる。

1.0%AA-673点眼液の投与は1日1回として、1回点眼および7, 14, 21回連続点眼を行い、最終点眼終了後24時間の組織内濃度を測定し、蓄積性の検討を行った。また、1回点眼後の各組織よりの消失と21回連続点眼後の各組織よりの消失を比較することにより組織への残留性について検討した。

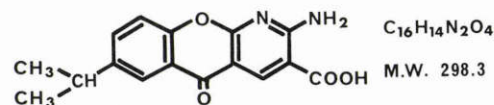
II 実験材料および方法

1. 使用動物

体重約2kgの雄性白色家兎を室温 $24 \pm 4^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の環境下で、1週間馴化を行った後、眼に異常のないことを確認し使用した。飼料は固形飼料(ラボRG-RO、日本農産工業)を1日80g与え、水は水道水を自由に摂取させた。

2. 薬物

AA-673はFig. 1に示す化学構造式を有し、無味無臭で白色～帯黄色であり、水に溶けにくい。0.25%AA-673点眼液は臨床において1日4回点眼²⁾するので、今回の試験にはその4倍濃度で眼障害性のない³⁾1.0%AA-673点眼液を用い、pHは7.6、浸透圧は約327



2-Amino-7-isopropyl-5-oxo-5H-[1,3-benzopyrano[2,3-b]pyridine-3-carboxylic acid

Fig. 1 Chemical structure of AA-673.

mOsm/kg $\cdot\text{H}_2\text{O}$ であった。

3. 試験方法

1) 点眼および組織採取時間

1.0%AA-673点眼液を1日1回(午前9:00)両眼に $50\mu\text{l}$ ずつ点眼した。1回点眼および7, 14, 21回連続点眼の最終点眼終了後よりの組織採取時間は以下に示す通りに行った。

点眼回数	最終点眼終了後よりの採取時間(hr)
1回点眼	24, 48, 72, 168
7回点眼	24
14回点眼	24
21回点眼	24, 48, 72, 168

2) 組織採取の方法

耳静脈より血液を約4ml採取し、その直後 pento-barbital-Na を耳静脈内投与して麻酔死させ、充分な量の生理食塩液で外眼部を洗浄した。

眼瞼縁を皮膚移行部にそって切開し、眼瞼結膜、外眼筋を付着させたままで速やかに眼球を摘出した。血液や水分を濾紙で吸い取り、眼瞼結膜を分離し、27G針を用いて前房水を注射管内に全量採取した。その後眼球をサランラップで包み、ドライアイスアセトン(-70°C)で凍結させた。そして凍結眼球の角膜輪部より約5mmの強膜部を輪状に切断し、眼球を前部と後部に切断した。この眼球後部より硝子体を取り出し網・脈絡膜を剝離した。ついで前部眼球より水晶体を取り出し、虹彩・毛様体を根部より切り離した後、角膜と前部強膜を分離した。採取したすべての組織は速やかに電子天秤によりその重量を測定した。

3) 組織より AA-673の抽出および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量

前房水と血液を除くすべての組織は、内部標準物質 4-methylumbeliferone(40ng/ml)を含むメタノール溶液5ml中ハサミで細切して、30分間振とう後1晩室温

放置し AA-673を抽出した。抽出後、3,000rpm, 10分間遠心分離し上清を4ml 採取した。そして減圧下でこの試料を蒸発乾固させ、移動相0.5ml (50mM リン酸一ナトリウム(水酸化ナトリウムを適量加えて pH 8としたもの):アセトニトリル=3:1)で溶解し、その10 μ l を HPLC にて定量分析した。なお血液は遠心分離(3,000rpm, 10分間)して得た血清1ml を内部標準物質を含むメタノール溶液5ml に加え以下同様に操作した。前房水は抽出操作せずに採取した内の10 μ l を定量分析に用いた。

AA-673の分析には μ BONDASPHERE C₁₈ (5 μ m, 3.9mm $\times$ 150mm, Waters 社) カラムを用い、温度は35 $^{\circ}$ C, 流速は1.0ml/min とした。カラム溶出液は蛍光検出器 (RF-533, 島津製作所) を用い、Ex. 350nm, Em. 402nm で連続的に検出を行い、レコーダーに記録した。サンプル中の AA-673の定量は、既知量の AA-673を HPLC で分析した際の面積を840型 Data and Chromatography Control Station (Waters 社) により計算し、その値を基準として算出した。この条件における AA-673の定量限界は0.01ng であった。

III 実験結果

1. 連続点眼による影響

1.0%AA-673点眼液を1日1回で7, 14および21日間連続点眼を行ったが、いずれの家兎も眼組織および全身に対する影響は認められず、また順調な体重増加を示した。

2. 1回点眼および連続点眼による各眼組織への分布

1回点眼および各連続点眼終了24時間後の各組織内濃度を Table 1 および Fig. 2 に示した。その結果、連続点眼を行うことによってほとんどの組織で濃度の増加がみられ、結膜、前房水および水晶体では14回点眼で組織内濃度が飽和に達したと考えられた。

7, 14あるいは21回連続点眼後24時間の組織内濃度で最高を示したものと1回点眼後24時間の組織内濃度とを比較すると、角膜では3.9倍、結膜では5.6倍、前部強膜では8.4倍、前房水では3.1倍、水晶体では5.5倍に増加した。また、虹彩・毛様体は1回点眼では検出限界値以下であるため、7回点眼と21回点眼とで比べると3.9倍に増加した。硝子体と網・脈絡膜には21回点

Table 1 Tissue concentrations at 24 hr after single or consecutive instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution to rabbit's eyes

Tissue	Concentration of AA-673 (ng/100mg tissue)			
	Single	7 times	14 times	21 times
Cornea	5.71 $\pm$ 1.01 (1.00)	5.39 $\pm$ 0.46 (0.94)	14.19 $\pm$ 1.76 (2.49)	22.44 $\pm$ 6.96 (3.93)
Conjunctiva	4.90 $\pm$ 1.69 (1.00)	27.50 $\pm$ 11.21 (5.61)	11.77 $\pm$ 3.43 (2.40)	13.44 $\pm$ 4.17 (2.74)
Sclera	1.26 $\pm$ 0.60 (1.00)	0.97 $\pm$ 0.44 (0.77)	2.92 $\pm$ 0.22 (2.32)	10.61 $\pm$ 4.06 (8.42)
Iris & Cilliary body	N.D.	1.25 $\pm$ 0.58 (1.00)	3.13 $\pm$ 0.56 (2.50)	4.86 $\pm$ 1.02 (3.89)
Aqueous humor	0.15 $\pm$ 0.05 (1.00)	0.21 $\pm$ 0.04 (1.40)	0.46 $\pm$ 0.04 (3.07)	0.40 $\pm$ 0.10 (2.67)
Lens	0.35 $\pm$ 0.09 (1.00)	0.86 $\pm$ 0.07 (2.46)	1.94 $\pm$ 0.25 (5.54)	1.60 $\pm$ 0.26 (4.57)
Vitreous body	N.D.	N.D.	N.D.	0.02 $\pm$ 0.02
Retina & Choroid	N.D.	N.D.	N.D.	9.82 $\pm$ 6.35
Serum	0.13 $\pm$ 0.01 (1.00)	0.35 $\pm$ 0.08 (2.69)	0.33 $\pm$ 0.05 (2.54)	0.66 $\pm$ 0.17 (5.08)

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 to 6 eyes. Figures in parentheses are expressed as the ratio to tissue concentration after a single application.

N.D.: not detected.

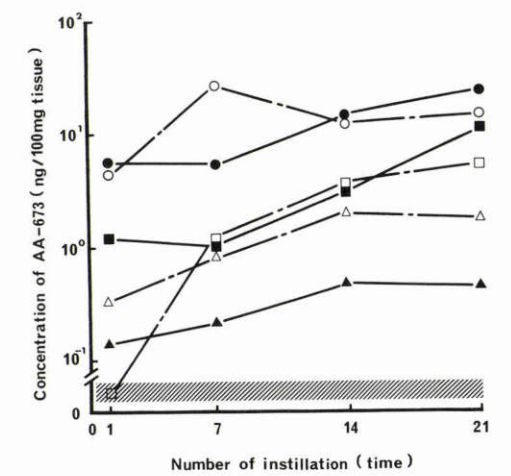


Fig. 2 Tissue concentrations in the cornea (●), conjunctiva (○), sclera (■), iris & ciliary body (□), aqueous humor (▲) and lens (△) at 24 hr after single or consecutive instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution to rabbit's eyes. Each value represents the mean of 5 to 6 eyes. ■ : not detected

眼にのみ認められた。血清においても連続点眼を行うことにより濃度の増加がみられ、1回点眼と21回点眼の濃度を比較すると5.1倍に増加した。

3. 1 回点眼後の各眼組織よりの消失

1 回点眼後、各眼組織よりの AA-673 の消失を Table 2 および Fig. 3 に示した。その結果、AA-673 は各組織においてすみやかな消失を示し、虹彩・毛様体、硝子体および網・脈絡膜では最初の測定時点である 24 時間で検出限界値以下となり、前房水では 48 時間、水

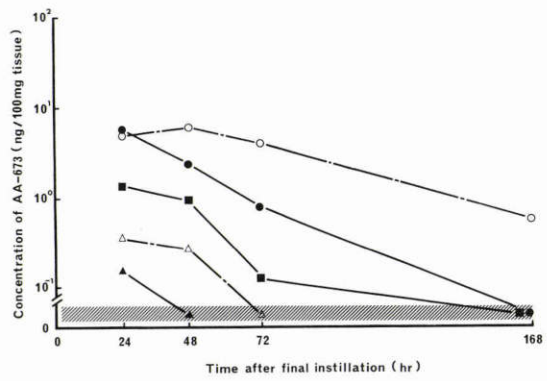


Fig. 3 Tissue concentrations in the cornea (●), conjunctiva (○), sclera (■), aqueous humor (▲) and lens (△) at various hours after single instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution to rabbit's eyes. Each value represents the mean of 5 to 12 eyes. ■ : not detected

Table 2 Tissue concentrations at various hours after single instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution to rabbit's eyes

Tissue	Concentration of AA-673 (ng/100mg tissue)			
	24 hr	48 hr	72 hr	168 hr
Cornea	5.71±1.01 (1.00)	2.21±0.51 (0.39)	0.74±0.35 (0.13)	N.D.
Conjunctiva	4.90±1.69 (1.00)	5.60±2.13 (1.14)	3.79±2.38 (0.77)	0.53±0.36 (0.11)
Sclera	1.26±0.60 (1.00)	0.88±0.35 (0.70)	0.14±0.14 (0.11)	N.D.
Iris & Ciliary body	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Aqueous humor	0.15±0.5	N.D.	N.D.	N.D.
Lens	0.35±0.09 (1.00)	0.26±0.06 (0.74)	N.D.	N.D.
Vitreous body	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Retina & Choroid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Serum	0.13±0.01 (1.00)	0.03±0.03 (0.23)	N.D.	N.D.

Each value represents the mean±S.E. of 5 to 12 eyes. Figures in parentheses are expressed as the ratio to tissue concentration at 24 hr. N.D.: not detected.

Table 3 Tissue concentrations at various hours after consecutive instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution for 21 days to rabbit's eyes

Tissue	Concentration of AA-673 (ng/100mg tissue)			
	24 hr	48 hr	72 hr	168 hr
Cornea	22.44±6.96 (1.00)	3.42±0.89 (0.15)	1.24±0.05 (0.06)	0.27±0.27 (0.01)
Conjunctive	13.44±4.17 (1.00)	2.88±0.54 (0.21)	2.29±0.67 (0.17)	1.24±0.61 (0.09)
Sclera	10.61±4.06 (1.00)	1.07±0.37 (0.10)	N.D.	N.D.
Iris & Ciliary body	4.86±1.02 (1.00)	0.88±0.55 (0.18)	N.D.	N.D.
Aqueous humor	0.40±0.10	N.D.	N.D.	N.D.
Lens	1.60±0.26 (1.00)	1.16±0.03 (0.73)	0.91±0.06 (0.57)	0.54±0.04 (0.34)
Vitreous body	0.02±0.02	N.D.	N.D.	N.D.
Retina & Choroid	9.82±6.35	N.D.	N.D.	N.D.
Serum	0.66±0.17 (1.00)	0.38±0.18 (0.35)	0.11±0.06 (0.17)	N.D.

Each value represents the mean±S.E. of 5 to 6 eyes. Figures in parentheses are expressed as the ratio to tissue concentration at 24 hr. N.D.: not detected

晶体では72時間、角膜、前部強膜では168時間に検出限界値以下となった。結膜のみ168時間においてもまだ認められた。

各組織の消失速度定数(k)をFig. 3のグラフの勾配から次の式に従って求めた。 $C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$ ただし、 C_0 は初期濃度、 C_t はt日後の濃度である。その結果、角膜(24~72時間)では 1.02day^{-1} 、結膜(24~168時間)では 0.41day^{-1} 、前部強膜(24~72時間)では 1.10day^{-1} 、水晶体(24~48時間)では 0.30day^{-1} で半減期はそれぞれ0.68, 1.69, 0.63, 2.31日であった。血清では72時間にはもう認められず消失速度定数は 1.47day^{-1} (24~48時間)で、半減期は0.47日であった。

4. 21回連続点眼後の各眼組織よりの消失

21回連続点眼後、各眼組織よりのAA-673の消失をTable 3およびFig. 4に示した。その結果、AA-673は各組織において1回点眼と同様にすみやかな消失を示し、前房水、硝子体、網・脈絡膜では48時間、前部強膜、虹彩・毛様体では72時間に検出限界値以下となった。また角膜、結膜、水晶体では168時間においてもまだ認められた。

各組織の消失速度定数は角膜(24~72時間)では 1.45day^{-1} 、結膜(24~168時間)では 0.32day^{-1} 、水晶体

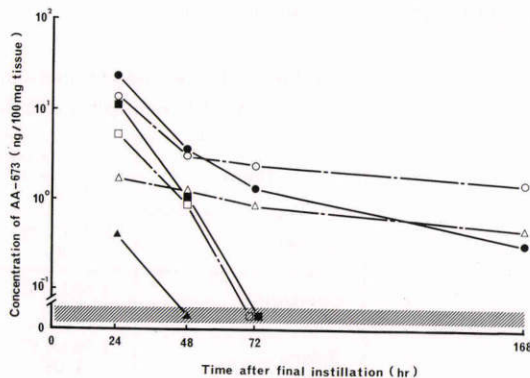


Fig. 4 Tissue concentrations in the cornea (●), conjunctiva(○), sclera (■), iris & ciliary body (□), aqueous humor (▲) and lens (△) at various hours after consecutive instillation of 1.0% AA-673 ophthalmic solution for 21 days to rabbit's eyes. Each value represents the mean of 5 to 6 eyes. ■: not detected.

(24~48時間)では 0.32day^{-1} で半減期はそれぞれ0.48, 2.17, 2.17日であった。血清では168時間に認められなくなり、消失速度定数は 1.05day^{-1} (24~48時間)で半減期は0.66日であった。

IV 考 按

1.0%AA-673点眼液を家兎眼に1回あるいは1日1回で7, 14, 21回の連続点眼を行い眼組織への蓄積性と残留性について検討した。薬物の組織への蓄積性をみるためには、1回投与後の組織内濃度を測定して濃度の推移が緩慢になった時間で検討するのが良いとされている⁴⁾。0.25%AA-673点眼液の1回点眼による結果¹⁾より濃度の推移が緩慢となる時間は24時間であると考えられ、1回あるいは連続点眼後24時間の値で蓄積性の検討を行った。

その結果、点眼を繰り返せば各点眼後24時間の値が加算されるためいずれの組織においても濃度は増加した。しかしながら、結膜、前房水、水晶体は14回の点眼で組織内濃度が定常状態になったと考えられた。連続点眼後24時間の組織内濃度で最高値を示したものと1回点眼後24時間の組織内濃度とを比較すると、蓄積率は3～8倍であった。

次に、それら蓄積性を示した組織について組織への結合の強さあるいは残留性を調べるためには21回連続点眼後の消失速度と1回点眼後の消失速度を比較すればよい⁴⁾。21回連続点眼において、最終点眼終了後168時間にAA-673が認められたのは角膜、結膜および水

晶体だけであり、それ以外の組織では最終点眼終了後72時間までにすみやかな消失がみられた。168時間にAA-673が認められた角膜、結膜および水晶体の消失速度定数と1回点眼後の消失速度定数とを比べるとそれぞれ0.7, 1.3および0.9倍であり、ほぼ変わらず残留性はないものと考えられる。

以上の結果、AA-673点眼液は連続して使用しても眼組織および血液に蓄積はされるが、その程度はわずかであり、投与中止後の残留性はないものと考えられる。

文 献

- 1) 小河貴裕, 大平光彦, 池尻芳文他: 抗アレルギー剤AA-673点眼液の眼内動態に関する検討(第1報)。家兎眼への0.25%AA-673点眼液単回点投与の吸収及び消失について。眼紀 39: 633—637, 1988.
- 2) 眞鍋禮三, 松田英彦, 桜木章三他: アレルギー性眼疾患に対する0.25%AA-673点眼液の臨床効果—Disodium Cromoglycate点眼液との比較臨床試験—。眼紀 38: 1108—1119, 1987.
- 3) 小河貴裕, 入江久子, 栗林義和: 抗アレルギー剤AA-673点眼液の家兎における眼局所毒性試験。薬理と治療 15: 3991—3999, 1987.
- 4) 南保俊雄: 連続投与実験, ラジオアイソトープ薬物代謝実験法, 東京, 1981, 丸善, 387—394.