

化学療法剤の眼内移行動態におけるメラニンの関与 (図5, 表1)

福田 正道・佐々木 一 之 (金沢医科大学眼科学教室)

The Influence of Melanin on Intraocular Dynamics

Masamichi Fukuda, Kazuyuki Sasaki

Kanazawa Medical University Department of Ophthalmology

要 約

メラニンが眼科用薬剤の眼内移行動態におよぼす影響を、新キノロン系抗菌剤 NY-198 を用いて検討した。日本在来の白色家兎眼、有色家兎眼を使用し3群の実験を行った。摘出眼球組織の NY-198 の取り込み状態は、角膜では白色、有色眼の間に差はなかったが、有色眼虹彩・毛様体の薬剤取り込みは白色眼より有意に高く、放出時間も延長した。生体レベルで全身的、および局所的に NY-198 を投与した検討でも、有色家兎眼虹彩・毛様体の薬剤取り込み量は、白色眼でのそれに比べて有意に高かった。NY-198 を含む5種の化学療法剤 OFLOXACIN, NY-198, CEFAZOLIN, LATAMOXEF, SISOMICIN について、合成メラニンとの親和性をみたが、何れも新和性を持ち8.6~75.3%の結合率を示した。メラニンと結合した前記化学療法剤の E. Coli に対する抗菌活性については、5剤中硫酸シノマイシンが60%の低下を示した。上記の結果は、化学療法剤の眼内移行動態の検討に際してはメラニンの関与も考慮すること、更に、摘出眼レベルでもこの種の検討に有用な情報が得られることを示唆したものと考える。(日眼 92:1839-1843, 1988)

キーワード：眼内動態，化学療法剤，メラニン，メラニン結合率，抗菌活性

Abstract

The influence of melanin on the intraocular dynamics of NY-198, a new quinolone antibacterial agent, was investigated in non-pigmented and pigmented rabbit eyes. Drug uptake into the cornea of the removed eye was almost the same in both non-pigmented and pigmented eyes. However, drug uptake into the iris and ciliary body and release volume and time from the iris and ciliary body in the pigmented eyes were significantly higher and longer than those in non-pigmented eyes. The uptake of a new quinolone antibacterial agent NY-198 into the cornea and iris and ciliary body, administered either systemically or locally, was examined in living rabbit eyes. The drug uptake into the iris and ciliary body in the pigmented eyes was significantly higher than that observed in non-pigmented eyes in both types of drug administration. Drug affinity for melanin was examined utilizing synthetic melanin. Regarding Ofloxacin, NY-198, Cefazolin, Latamoxef, Sisomicin, the combined ratio of drug with synthetic melanin ranged from 8.6% to 75.3%. Sisomicin showed a 60.0% reduction in antibacterial activity for E. Coli. The results suggest that melanin influences the intraocular dynamics of NY-198, and that useful information regarding its influence in the drug dynamics of the eye can be obtained from in vitro experiments. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1839-1843, 1988)

Key words: Intraocular dynamics, Chemotherapeutics, Melanin, Melanin combined ratio, Antibacterial activity

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 福田 正道
(昭和63年7月5日受付，昭和63年8月8日改訂受理)

Reprint requests to: Masamichi Fukuda, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kanazawa Medical Univ.
1-1 Daigaku, Uchinada-machi, Kahoku-gun, Ishikawa 920-02, Japan

(Received July 5, 1988 and accepted in revised form August 8, 1988)

I 緒 言

薬剤の眼内移行動態の基礎的検討の多くは白色動物眼で行なわれているが、ある種の薬剤は眼組織内のメラニン色素と非特異的に吸着する性質を有し、そのことが薬剤の眼組織への移行に影響することが知られている。抗生剤についてもこのことが Barza¹⁾により指摘され、その検討の必要性がのべられている。生体眼で見られる有色、白色眼の薬剤の移行動態の差が摘出眼レベルでの実験でも同様に検出されるならば今後のこの種の検討に役立つ筈である。抗菌活性の検討まで含めて、今回、著者らは新キノロン系抗生剤を中心にメラニン色素の眼内移行動態に及ぼす影響を検討したので以下に報告する。

II 実験材料および方法

本実験には体重2.0~3.0kgの成熟有色家兎(以下有色と略)および白色家兎(以下白色と略)(雌)30羽を使用し、実験は以下の3群に分けて行った。

実験Ⅰ—摘出眼球組織の薬剤の取り込み、および放出の検討—：有色および白色家兎眼から取り出した角膜、虹彩・毛様体を 2.6×10^{-6} MのNY-198 ([$\pm$]-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride)を含んだ Krebs-Ringer 液 (NaCl 118.05mM, KCl 4.09mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.54mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Glucose 11.10mM, NaHCO_3 25.01mM) pH7.3中に37°Cで角膜は30分、120分間、虹彩・毛様体は10分、30分、60分、120分、180分間、それぞれインキュベートし、それぞれの組織内に取り込まれたNY-198を前報²⁾に準じて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。また、これとは別に、先のNY-198-Krebs Ringer液中に予め8時間、インキュベートしておいた虹彩・毛様体を別に用意した Krebs-Ringer 1ml中に5, 10, 30, 60, 120, 180分間浸漬し、Krebs-Ringer液中に放出されたNY-198の量をHPLCにより測定した(図1)。

実験Ⅱ—生体眼における薬剤取り込みの検討—：12時間絶食させた家兎に20mg/kgのNY-198溶液を1回経口投与したもの、および10mg/0.2mlを結膜下注射したものについて前者は投与後1, 3, 24時間後後者は24時間後に眼球を摘出し、角膜、虹彩・毛様体、房水、および血清を採取し、NY-198の組織内濃度を

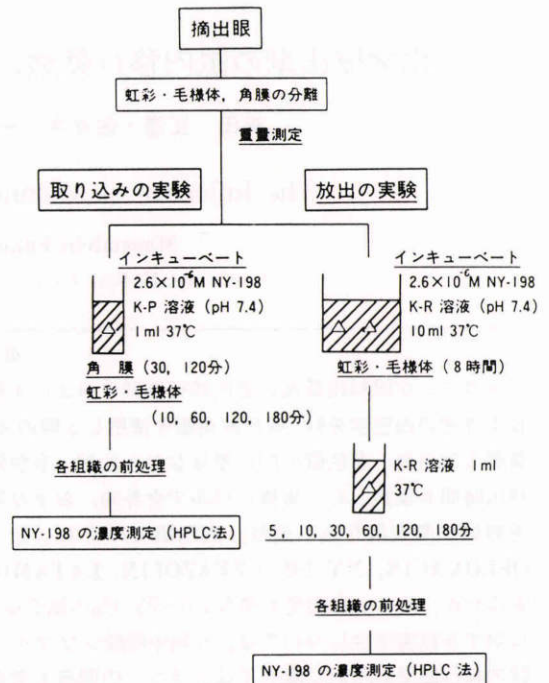


図1 摘出眼球組織のNY-198の取り込みおよび放出

HPLCで測定した。摘出眼からの角膜、虹彩・毛様体の分離は凍結下で行う著者らの方法³⁾による。

実験Ⅲ—メラニンと化学療法剤の結合率ならびにメラニン結合抗生剤の抗菌活性の検討—：Ofloxacin (OFLX), NY-198, セファゾリン (CEZ), ラタモキシフ (LMOX), 硫酸シソマイシン (SISO) の5種の化学療法剤を取り上げこれら各薬剤の原末を使用した。メラニンと薬剤との結合率の測定法は Tsuchiya らの方法⁴⁾に準じた。すなわち、薬剤(100 μ g/ml)0.2mlと合成メラニン (Sigma 社製) (100 μ g/ml) 1.8mlの溶液を混合し、37°C, 5%CO₂ガス内で18時間、反応後、遠心分離(15,000r.p.m.)30分間行った後、その上澄液について吸光度を測定した。対照として各薬剤のみを含んだ溶液について同様の操作を行い吸光度を測定した。これとは別に、各薬剤とメラニンとの混合溶液を18時間、反応後、その反応溶液をそのまま E. Coli NIHJ JC-2を指示菌とする Bioassay 法によりその抗菌活性をみた。対照は薬剤のみの溶液を Sample と同様の操作を行ったものにつきその抗菌活性をみた。

III 結 果

実験Ⅰ：角膜に取り込まれたNY-198の量は有色眼

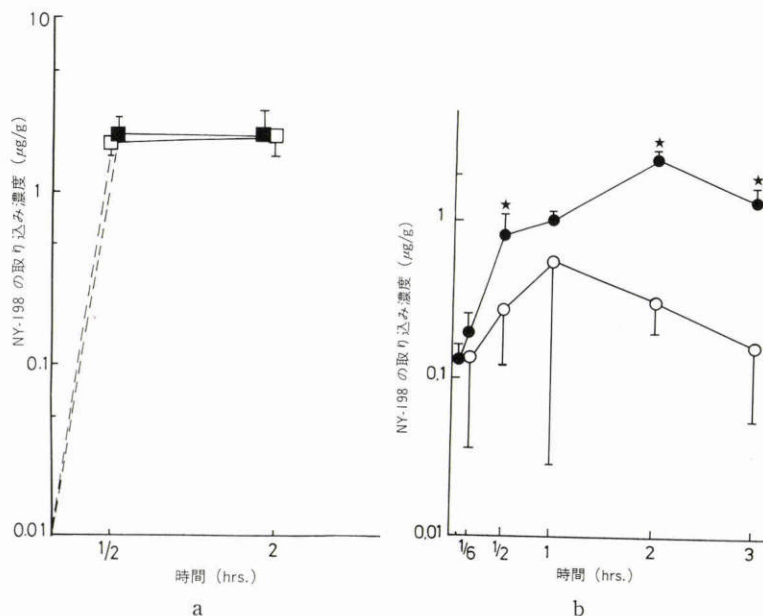


図2 NY-198の取り込み濃度 (μg/g)

(a)；角膜。■：有色家兎眼，□：白色家兎眼，(b)；虹彩・毛様体，●：有色家兎眼，○：白色家兎眼，★ $p < 0.05$, $n : 4$

と白色眼では30分，120分時点共に差は無かったが，虹彩・毛様体では30分では有色眼は $0.81 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ ，白色眼は $0.28 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ ，120分では有色眼は $2.49 \pm 0.32 \mu\text{g/g}$ ，白色眼は $0.32 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$ ，180分では有色眼は $1.37 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$ ，白色眼は $0.22 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$ であり，有色眼での薬剤の取り込み量は白色眼に比べて有意に ($p > 0.05$) 高値を示し，その差は時間の経過と共に大きくなった (図2a)。また，白色眼の虹彩・毛様体のNY-198の取り込み量の最高はインキューベート後60分値であったのに対し，有色眼では120分値とやや遅れる傾向が見られた (図2b)。虹彩・毛様体に取り込まれたNY-198の放出状態は白色眼では30分後にはほぼ100%が放出されたのに対し，有色眼では30分後では81.0%であり，180分後でもなお放出状態が継続していた (図3)。

実験II：経口投与されたNY-198の生体眼での角膜および虹彩・毛様体への薬剤の取り込みについては，角膜では60分，180分，および24時間後では有色眼と白色眼の間に有意差は見られなかった (図4a)。虹彩・毛様体は白色眼で60分に $0.60 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ ，180分で $0.60 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ ，24時間後で $0.21 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ であり，有色では60分に $2.67 \pm 1.20 \mu\text{g/g}$ ，180分で $2.45 \mu\text{g/g}$ ，24時間で $2.21 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ と各時点において有色家兎

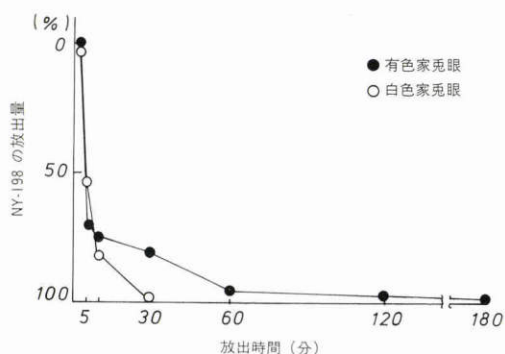


図3 摘出眼における虹彩・毛様体からのNY-198の放出量 (%)

●：有色家兎眼，○：白色家兎眼

眼は白色家兎眼における移行値よりも有意に高かった ($p < 0.005$) (図4b)。また，房水と血清内への薬剤の移行は両者間には有意差は見られなかった。

結膜下投与による虹彩・毛様体，房水および血清内のNY-198の24時間の濃度は有色ではそれぞれ $1.84 \pm 0.92 \mu\text{g/g}$ ， $0.27 \pm 0.46 \mu\text{g/ml}$ ， $0.25 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ であり，白色では $0.04 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ ，trace，traceで，白色家兎眼より有色家兎眼が有意に高値を示した ($p < 0.05$) (図5)。

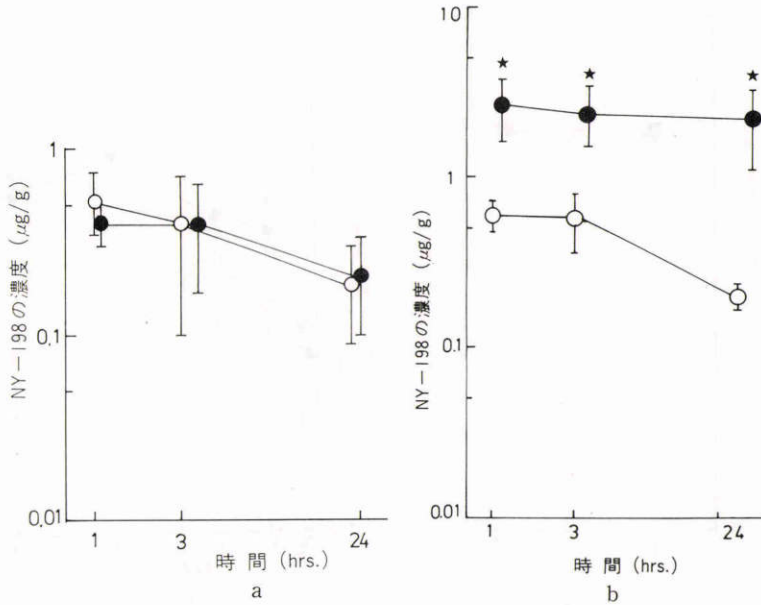


図4 生体眼における角膜および虹彩・毛様体へのNY-198の移行濃度(μg/g)
a) ; 角膜, b) ; 虹彩・毛様体, ● 有色, ○ 白色 n : 4~6

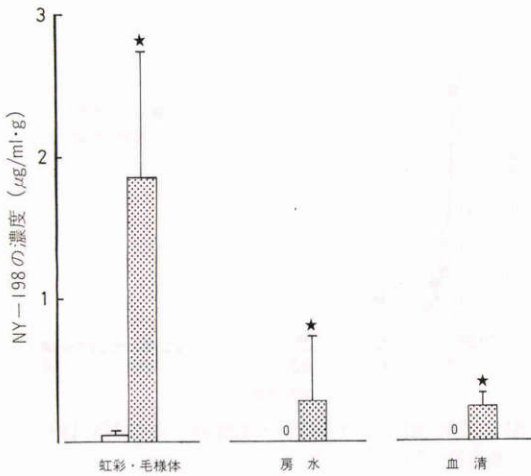


図5 生体眼における結膜下投与によるNY-198の移行状態
■ : 有色家兎眼, □ : 白色家兎眼, ★ p<0.05, n : 4

実験Ⅲ：検討した5種の化学療法剤は、すべてメラニンに親和性を示した。その親和性をメラニンとの結合率で示すとNY-198に対しては8.60%、オフロキサシンには20.2%、セファゾリンには55.3%、ラタモキシセフには38.3%、硫酸シソマイシンには75.3%であった。これらのメラニンと結合した状態での各薬剤のE. Coli に対する抗菌活性は4種薬剤についてはメラニ

表1 メラニンと化学療法剤の結合率およびメラニン結合抗菌剤の抗菌活性

薬 剤	結 合 率 (%)	活性の低下率 (%)
オフロキサシン	20.2	—
NY-198	8.6	—
セファゾリン	55.3	—
ラタモキシセフ	38.3	—
硫酸シソマイシン	75.3	60.4

ン非結合の場合と差はなかったが、硫酸シソマイシンはメラニンと結合したものが非結合の場合に比べて60.4%の抗菌活性の低下を示した(表1)。

IV 考 按

薬剤の眼内移行に関する因子として投与された薬剤血漿中の濃度、血漿蛋白結合率、血液房水柵の透過性、薬剤の眼組織における能動輸送または蓄積等が関与することが知られている。これに加えて、眼組織内のメラニン色素の非特異的な吸着による影響を指摘するものもある^{1)5)~7)}。chloroquine, phenothiazine 系薬物、β-遮断剤、ある種の抗生剤、ベンゼン核構造を有する一群の薬剤が既にこの検討の対象となっている。

抗生剤の眼内移行の検討はわが国では従来から白色家兎が主に検討のための実験動物となっていたがメラ

ニン色素の存在が抗生剤の眼内移行あるいは抗菌活性に影響するとすれば有色動物での検討結果と白色動物でのそれとの間にどれ程の差があるか知ることも必要と考える。今回取り上げた抗菌剤 NY-198 は新キノロン系の薬剤の一つであり、この系統の薬剤は最近眼科領域での化学療法剤として急速に普及しているものである。NY-198 は化学構造上はキノロン核の 6 位にフッ素、7 位にピペラジン環を有しているが、メラニンとの親和性に関しては未知の薬剤である⁸⁾。

本検討は有色家兎眼組織と白色家兎眼組織の薬剤の取り込み、放出を摘出眼組織、生体眼の二つのレベルで、更に放出については摘出眼組織について検討した。目的としたところは将来この種の検討が *in vitro* のレベルだけで可能かどうかを知ることにもあった。何れの検討も角膜における NY-198 の取り込みは有色家兎眼、白色家兎眼との間に差はなかったが虹彩・毛様体の薬剤の取り込みは有色動物では有意に高く、最高時で約 10 倍の値を示した。薬剤取り込み実験の結果は、生体眼、摘出眼組織を用いても充分薬剤の生体眼での動態を示す情報が得られることを示したものと考えた。組織内に取り込まれた薬剤の放出も虹彩・毛様体については有色家兎眼では白色家兎眼に比べ明らかに長時間にわたって放出されていた。結膜下注射は、高濃度の薬剤を眼内に投与された場合を設定して行ったものであるが、この実験では虹彩・毛様体のみならず、房水、血清レベルでも薬剤の濃度は有色家兎眼の方が白色家兎眼に比べて有意に高かった。炎症眼を含めて種々の条件下で一旦、高濃度の薬剤が眼内に取り込まれた場合は通常の白色動物眼での実験で行なわれる結果よりも更に高い濃度の薬剤が有色動物では眼内に滞留しているものと考えてよいと思う。NY-198 は眼組織内のメラニンとの親和性があるため、有色家兎眼では白色家兎眼より量的にも多く取り込まれ、しかも眼内に長く滞留したものとするが、メラニンの結合した薬剤がどれ程の抗菌活性を維持しているかを知ること臨床的には重要と考える。今回は、Tsuchiya らの方法⁴⁾に従って NY-198 を含む数種の抗生剤につき合成のメラニンとの親和性、また、Barza⁹⁾らの方法に従ってメラニンと結合した抗生剤の *E. Coli* に対する抗菌作用を検討してみた。結合率は、NY-198 の 8.60% から硫酸ソマイシンの 75.3% と薬剤による差が大きかった。抗菌活性については 5 剤中硫酸ソマイシンを除き、4 剤は活性の低下を示さなかったが、硫酸シ

ソマイシンのみは 60% の低下を示した。Barza からも各種の化学療法剤についてメラニンの結合した薬剤の抗菌活性みているがアミノグリコシド系薬剤で 50~80% の抗菌活性の低下を見ている。Kanin¹⁰⁾らは、free amino group とメラニンの結合を抗菌活性低下の一因と推定しているが、更に他の抗生剤についての検討を行った上で活性低下の原因を考えたい。何れにせよ化学療法剤もメラニンとの結合があり抗菌活性に低下を来す様な場合は、薬剤の移行量だけが臨床応用の指針にはならないことが本実験からも言えるものとする。

本実験で、NY-198 が示した有色家兎の虹彩・毛様体への移行動態、各種化学療法剤のメラニン色素に対する親和性、更に、抗菌活性へのメラニンの影響等、今回の結果は、化学療法の基礎的検討を行うにあたり、留意しなければならないいくつかの基本事項を示唆したものと考えたい。薬剤の眼内移行動態の検討の実験手技として白色家兎が用いられていることが多いが、化学療法剤に限らず各薬剤の検討にはこのことをもう一度考えてみる必要があろう。

文 献

- 1) Barza, M., Kane, A., Baum, J.: Marked differences between pigmented and albino rabbits in the concentration of clindamycin in iris and choroid-retina. *J. Infect. Dis.* 139: 203—208, 1979.
- 2) 福田正道, 周 静聖, 佐々木一之: ビリドンカルボン酸系抗菌剤 (NY-198) の眼組織内移行動態の検討。眼紀 投稿中。
- 3) 福田正道, 都筑春美, 大山智子他: 化学療法剤の眼組織内移行濃度測定法の検討。眼紀 37: 1158—1161, 1986.
- 4) Tsuchiya, M., Hayasaka, S., Mizuno, K.: Affinity of ocular acid-insoluble melanin for drugs *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 822—825, 1987.
- 5) Khalid, F., O'Connor, G.: Ocular tissue absorption of clindamycin phosphate. *Arch. Ophthalmol.* 93: 1180—1185, 1975.
- 6) Poynter, D., Martin, L.E.: Affinity of labetalol for ocular melanin. *Br. J. Clin. Pharmacol., Suppl.* 7: 711—721, 1976.
- 7) Potts, A.M.: The concentration of phenothiazines in the eye of experimental animals. *Invest. Ophthalmol.* 1: 522—530, 1962.
- 8) 松本純一: ニューキノロンの構造と薬理, 合成・構造活性, 診断と治療 74: 1316—1321, 1986.
- 9) Barza, M., Baum, J.: Inhibition of antibiotic activity *in vitro* by synthetic melanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 569—570, 1976.
- 10) Kunin, M.: Binding of antibiotics to tissue homogenates. *J. Infect. Dis.* 121: 55—64, 1970.