

糖尿病性白内障誘発ラットにおける Aldose Reductase Inhibitor の 眼内移行動態の検討 (図5, 表4)

小 島 正 美・佐々木 一 之 (金沢医科大学眼科)

The Intraocular Penetration of Aldose Reductase Inhibitor in Rat Eyes

Masami Kojima and Kazuyuki Sasaki

Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University

要 約

正常, および実験糖尿病ラットに Aldose reductase (AR) 阻害剤 (M-79175) を片眼の結膜嚢内へ局所投与し, 房水, 水晶体, 血清への本剤の移行動態を検討した. 正常群: 薬剤投与側眼の房水への最大移行濃度は15分後の $3.3 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ で投与2時間後には薬剤の残留は認められなかった. 薬剤投与側の水晶体への最大移行量は $0.59 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ of lens wet weight で投与4時間後でも微量ながら薬剤の残留が確認された. 非投与側眼の房水, 水晶体への薬剤の移行は見られなかった. 血清中には最終点眼終了5分後より薬剤は検出され, 6時間後でも残留が確認された. 糖尿病群: 薬剤投与側眼の房水中の薬剤移行パターンは正常とほぼ同様であったが, 最大移行濃度は正常群のほぼ2倍を示した. 薬剤投与側眼の水晶体への薬剤の最大移行は二峰性を示し, 投与後6時間でも薬剤の残留が確認された. 非投与側眼の房水, 水晶体には薬剤の移行は認められなかった. 血清中の薬剤の移行動態は正常群とほぼ同様であった. (日眼 92: 57—62, 1988)

キーワード: 糖尿病性白内障, ラット, 眼内移行, 高速液体クロマトグラフィー, AR 阻害剤

Abstract

We compared the intraocular penetration of aldose reductase inhibitor (M-79175, Eisai Tokyo) into the ocular tissues of diabetic and normal rats. Two groups of Sprague-Dawley male rats weighing 150g were used. Experimental diabetic cataracts were induced through i.v. injection of Streptozotocin in the diabetic group. Controls consisted of normal rats. Doses of $10 \mu\text{l}$ of a 0.05% solution of M-79175 were administered 5 times into the cul de sacs of the rat's eyes at intervals of five minutes. The M-79175 concentration was measured in the aqueous humor, crystalline lens and serum. We measured these materials 15 min., 30 min., 1 hour, 2, 3, 4, 5 and 6 hours after the final instillation. The highest concentration of M-79175 in the aqueous humor was $3.3 \mu\text{g/ml}$ 15 minutes after the final instillation in the normal group. After 2 hours no drug was detectable in the aqueous humor. In the diabetic group the pattern of drug penetration was the same as the normal group but the highest concentration of M-79175 was twice that in the normal group. The highest concentration of M-79175 in the crystalline lens was $0.59 \mu\text{g/g}$ of the lens wet weight one hour after the final instillation in the normal group. After 5 hours no drug was detectable in the normal crystalline lenses. In the diabetic group, the pattern of drug penetration showed a two-phase peak at one hour and 5 hours after the final instillation. After 6 hours the drug was detectable in the crystalline lenses of the diabetic group. Serum levels were detected from 5 minutes after the final instillation to 6 hours. The drug penetration

別刷請求先: 920-02 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 (昭和62年 6 月 8 日受付)

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

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

(Accepted June 8, 1987)

pattern was the same in the normal and diabetic groups. These results suggest that the pattern of intraocular penetration was different normal and diabetic rats. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 57—62, 1988)

Key words: diabetic cataract, rat, intraocular penetration, HPLC, Aldose Reductase Inhibitor

I 緒 言

糖尿病性眼症、特に白内障や糖尿病性網膜症に対する Aldose reductase (以下 AR と略す) 阻害剤の検討が内外で盛んに行われているが、AR 阻害剤の局所投与もその一つである。投与された薬剤が体内でどれ程の間その有効濃度を維持するかを知ることは、全身、局所投与を問わず薬物療法を行う上では基本的検討事項と考える。

著者らは先に正常家兎眼に AR 阻害剤の一つである M-79175 (エーザイ) の点眼製剤を結膜嚢内に点眼し、その眼組織内移行濃度を高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す) で検討¹⁾²⁾し、抗白内障作用を発現するのに十分な量の本剤が水晶体に移行することを確認している。この AR 阻害点眼剤が糖尿病状態では正常と比べてどのような移行動態を示すのかについては興味のあるところであるが、その種の検討はほとんどされていない。実験糖尿病性白内障の進行経過が十分に把握されている Streptozotocin 誘発糖尿病性白内障ラット³⁾を用いて、結膜嚢内に投与された AR 阻害剤の眼組織内移行動態を正常群でのそれと比較検討したので以下に報告する。

II 実験方法

実験動物には SD 系雄性ラット (体重 150g) 72 匹を使用した。動物は二群に分け、Streptozotocin を 70mg/kg を尾静脈より一回投与して、細隙灯下で水晶体に糖尿病性白内障の初期変化が認められたものを糖尿病群、無処置のものを対照群とした。

AR 阻害剤投与方法

AR 阻害剤として 0.05% M-79175 点眼液 (pH 7.0, 290mOsm/L エーザイ) を使用した。本剤 10 μ l を右眼に 5 分毎 5 回、マイクロピペットで正確に結膜嚢内に注入したものを薬剤投与側眼、左眼を非投与側眼として検討を行った。

試料採取方法

点眼終了後、5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 分の各時点で房水、水晶体、血清を採取した。試料

採取に当たっては無麻酔の状態で心臓採血による脱血屠殺後、両眼を摘出した。摘出眼球は直ちに液体窒素中で凍結した後、半解凍の状態で房水、水晶体を採取した。ラットはいずれも、一時点につき 3 匹 3 眼から 6 匹 6 眼を使用した。試料の前処理は前報²⁾に準じて行った。房水は 0.01ml を試料とし、水晶体については PBS 1.5ml (pH 7.0) を加えて homogenize した後、3 時間振盪抽出して、遠心した上清 1ml を、血清は 0.5ml をそれぞれ試料とした。これに内部標準物質として Sorbinil 50 μ g/ml を 0.1ml 加え、これに CH₃OH 0.4ml、および 1N HCl を 0.5ml 加えた後に C₂H₅OC₂H₅: CH₂Cl₂ = 3 : 2 (容量比) (以下抽出液と略す) 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 (2,800r.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 (2,800r.p.m.) を行い、これより下層の水層を得た。さらに、この水層に抽出液を 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 と抽出液を 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 3.5ml 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 CH₃CN : 20mM CH₃COONH₄ = 21 : 79 (容量比) に調製したものを 100 μ l 加え、そのうちの 80 μ l を HPLC に注入した (図 1)。

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-C₈ を使用し、移動相として CH₃CN : 20mM CH₃COONH₄ = 21 : 79 (容量比) を用い、流速 0.7~1.0ml/min の条件下で UV 285nm (0.005 AUFS) で検出した。検体の濃度算出には無処置のラットより得た試料に内部標準物質として Sorbinil、および、既知濃度の M-79175 を加えて、それぞれ房水、水晶体、血清の検量線を作製した。検出ピークの同定には重ね合わせ法⁴⁾を用い、trace は本実験系の最小有効定量量の $\ln g$ (絶対量) を代入し、平均、標準偏差を算出した。

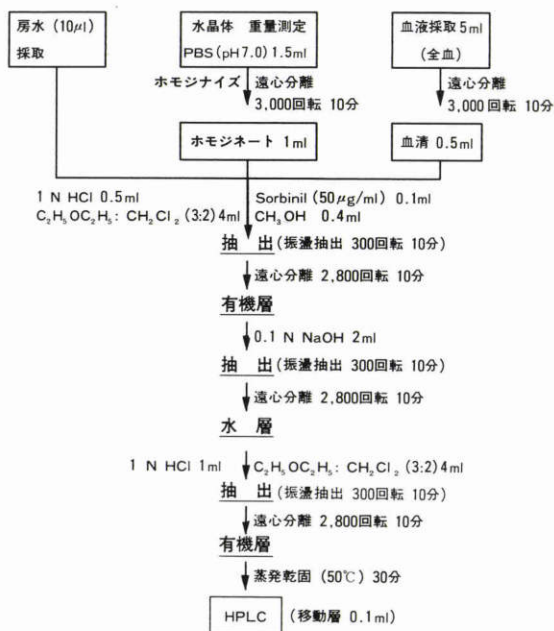


図1 試料の前処理法

表1 HPLC 測定条件

Column	: Zorbax-C8(4.6mm×15cm)
Column temp.	: 40℃
Flow rate	: 0.7~1.0ml/min.
Detection	: UV 285nm
Sensitivity	: 0.005AUFS
Sample size	: 80μl
Mobile phase	: CH ₃ CN : 20mM CH ₃ COONH ₄ = 21 : 79

III 結 果

正常群および、糖尿病群ともに房水、水晶体、血清のクロマトグラム上には、内部標準物質である 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、代謝物等によるピークは存在しなかった(図2)。検量線は M-79175 濃度と M-79175/internal standard peak 面積比との間に $\ln g \sim 100 \mu g$ まで良好な相関($r=0.998$)を示し、水晶体、血清についても同様であった($r=0.996$, $r=0.993$)。

房水内薬剤濃度

正常群の薬剤投与側の房水への移行は、最終点眼終了後15分で最大移行濃度 $3.27 \pm 2.58 \mu g/ml$ を示した後徐々に減少し、投与2時間後には薬剤は検出されなかった。糖尿病群での薬剤の移行動態は、正常群とは

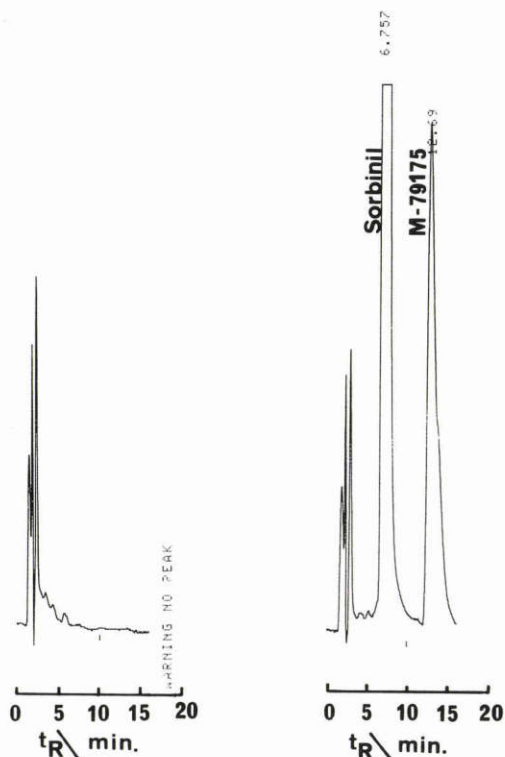


図2 房水より得られたクロマトグラム。左のクロマトグラムは無処置のコントロールのもの。右は処置したもの。

ほぼ同様のパターンを示し最終点眼終了15分で最大移行 $7.5 \pm 4.5 \mu g/ml$ の薬剤移行濃度を示し、投与2時間後にも痕跡程度の移行を認めた。非投与側の房水への薬剤の移行は正常、糖尿病群とも認められなかった(図3, 表2)。

水晶体内薬剤濃度

正常群における投与側水晶体への薬剤の移行は、最終点眼終了5分の $0.53 \pm 0.03 \mu g/g$ of lens wet weight, 60分後の最大移行量 $0.59 \pm 0.42 \mu g/g$ of lens wet weight と二峰性パターンを示し、投与4時間まで痕跡程度の移行が確認された。正常群の薬剤非投与側の水晶体への薬剤の移行は見られなかった。糖尿病群では投与側水晶体への薬剤移行動態は正常群とよく似たパターンを示し、最大移行量は最終点眼終了30分後の $0.89 \pm 0.62 \mu g/g$ of wet weight で、その後一旦減少し、投与5時間後に再び $0.60 \pm 0.61 \mu g/g$ of lens wet weight の高値を示した。投与6時間後にも定量可能な量の薬剤の残留が見られた(図4, 表3)。薬剤非投与側眼では薬剤の移行は確認されなかった。

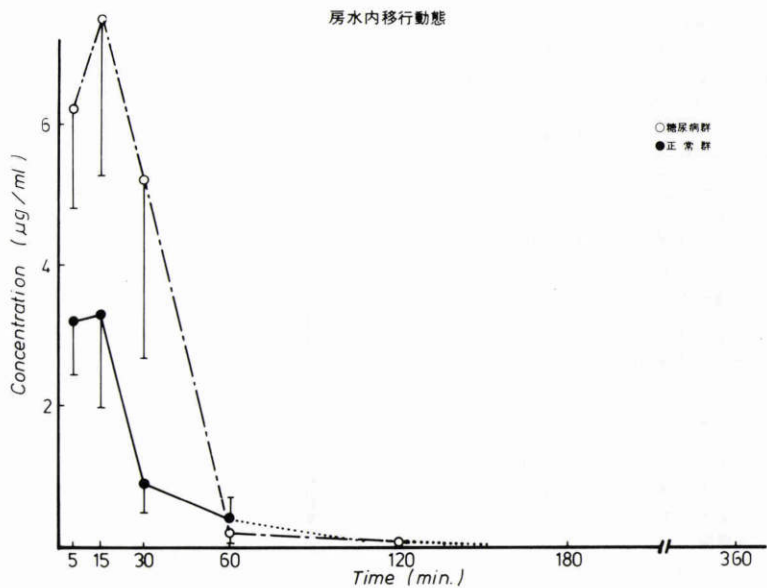


図3 房水内移行動態

表2 房水内移行動態

時間	5'	15'	30'	60'	120'	180'	240'	300'	360'
正常群 ng/ml n=3~4	3,218.8 ± 1,460.4	3,265.4 ± 2,578.9	939.3 ± 766.2	448.2 ± 590.0	—	—	—	—	—
糖尿病群 ng/ml n=4	6,186.6 ± 2,806.1	7,543.7 ± 4,473.2	5,158.9 ± 5,128.6	238.7 ± 347.2	50.0 ± 57.7	—	—	—	—

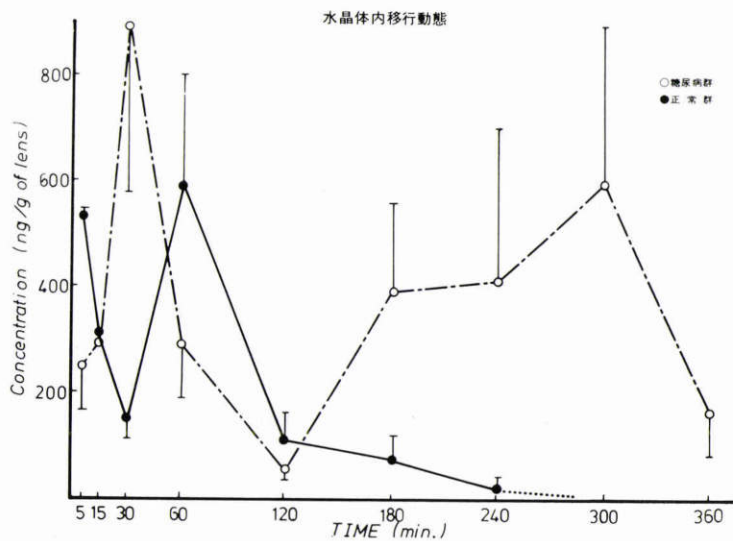


図4 水晶体内移行動態

表 3 水晶体内移行動態

時間	5'	15'	30'	60'	120'	180'	240'	300'	360'
正 常 群 ng/ml n=3	531.3 ± 31.7	309.4 ± 48.8	150.5 ± 73.2	588.1 ± 416.8	110.9 ± 100.5	79.5 ± 93.5	17.7 ± 30.7	—	—
糖尿病群 ng/ml n=4~5	251.4 ± 169.5	304.4 ± 90.0	892.4 ± 622.2	291.0 ± 202.9	57.0 ± 39.8	391.0 ± 332.4	411.2 ± 517.7	595.3 ± 612.8	164.9 ± 160.9

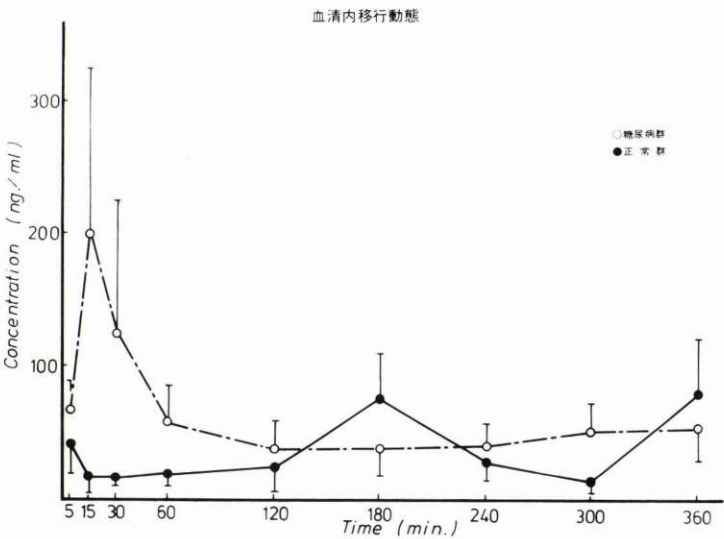


図 5 血清内移行動態

表 4 血清内移行動態

時間	5'	15'	30'	60'	120'	180'	240'	300'	360'
正 常 群 ng/ml n=3	41.1 ± 45.7	16.9 ± 24.4	16.5 ± 13.7	18.7 ± 14.5	23.6 ± 35.2	76.7 ± 66.4	27.6 ± 27.9	13.2 ± 15.8	80.3 ± 85.8
糖尿病群 ng/ml n=4~6	67.7 ± 39.3	199.8 ± 251.6	125.5 ± 198.7	57.9 ± 52.8	37.1 ± 41.2	41.1 ± 40.6	40.3 ± 34.2	52.4 ± 42.3	55.0 ± 46.9

血清内薬剤濃度

正常群、糖尿病群とも最終点眼終了5分後より血中への移行が認められ、投与6時間でも薬剤の残留が認められた(図5、表4)。

IV 考 按

糖尿病性眼合併症に対するAR阻害剤の臨床導入については、薬剤の長期連用が避けられないだけに慎重な検討が要求される。少ない投与量で糖尿病性眼合

併症を抑制しようという目的で本剤の局所投与が検討されはじめたが、未だ薬剤の眼内移行動態などについての詳細な検討までには至っていない。著者らはこれまでに点眼剤として投与されたAR阻害剤(M-79175)の眼内移行を正常家兎眼で検討し、この薬剤が眼組織内で蓄積する傾向があることを明らかにしてきた¹²⁾。これが病的状態、すなわち、糖尿病眼ではどう変化するかを検討するのが、本研究の目的とするところである。AR阻害剤の眼内移行の検討には従来、放射

線同位元素を用いる方法と高速液体クロマトグラフィー法とが用いられてきた。HPLC 法によれば、比較的簡単に薬剤の組織内濃度を測定することが可能であるが、測定感度が劣る欠点もある。HPLC によるこの種の検討では数100ng 程度が実質的な定量限界であったが、近年の測定機器の進歩のために、1ng 程度まで定量が可能となってきた。先の正常家兎眼での検討で血清内移行は痕跡程度 (trace) しか確認出来なかったもの²⁾が、本実験ではラット血清中の薬剤の移行量が定量的に測定可能となった。房水、水晶体中の薬剤の最大移行量、および薬剤の眼内残留時間ともに正常群より糖尿病群の方が高く、房水では糖尿病群は正常群の約2倍以上の薬剤が移行していたことは注目に値する。これが本剤に特異的な現象か、あるいはAR 阻害剤全般的なことかは、今後他のAR 阻害剤での検討を待たなければならないが、少なくとも本剤、ないしは同系統のAR 阻害剤に関しての薬剤の体内動態については、糖尿病状態での検討が必要であることを示唆する結果と考える。水晶体中への本剤の移行パターンが二峰性を示したことは、一旦結膜嚢内に蓄積したものが、二次的に移行したものとも考えられる。薬剤の二峰性のピーク時間が正常群と糖尿病群で時間的なずれがあったが、糖尿病状態がどれ程薬剤移行動態に関与するのか、現時点では明らかではない。前回の正常家兎眼での検討²⁾では薬剤非投与側の水晶体からも薬剤の移行が確認されたが、今回のラット眼では房水、水晶体のどちらからも薬剤非投与側で薬剤が検出されなかった。この差が薬剤投与量の差か、動物の

種差であるかはさらに検討を続ける予定である。本実験系での糖尿病群の先の形態的検討³⁾において薬効が確認された水晶体混濁分類のStage I の状態³⁾、即ち、Streptozotocin 70mg/kg 投与の条件で糖尿病誘発10日前後に出現する空胞が現れる時期のものを実験モデルとして用いたが、さらに混濁が進んだ状態では、また今回とは別の移行動態を示すことも予測される。抗白内障作用発現に要するAR 阻害剤の必要移行量を知ることは、本剤の臨床応用までに、是非とも明らかにされなければならない事項であろうが、その解明には様々な条件下での検討が必要と考える。

M-79175の御提供を頂いたエーザイ株式会社に感謝致します。

なお、本研究は文部省科学研究費62年度奨励研究第62771398号の補助を受けた。

文 献

- 1) 小島正美, 佐々木一之, 谷口智子: ARI(M-79175)の家兎眼内移行動態. 日眼 91: 643—646, 1987.
- 2) 小島正美, 佐々木一之, 谷口智子: ARI(M-79175)の家兎眼内移行動態—その2. 水晶体, 硝子体への移行—. あたらしい眼科 4: 703—706, 1987.
- 3) Sasaki K, Kuriyama H, Yen LI, Fukuda M: Studies on diabetic cataract in rats induced by Streptozotocin. I. Photodocumentation of lens opacification. Ophthal Res 15: 185—190, 1983.
- 4) 日本分析化学会関東支部編: 高速液体クロマトグラフィー—ハンドブック, 261—264, 1985.
- 5) 小島正美, 佐々木一之: Aldose reductase (AR) 阻害剤による Streptozotocin 誘発白内障の治療限界の検討. 日眼 90: 1669—1673, 1986.