

メラニン親和性, 非親和性抗菌剤の家兎眼虹彩・毛様体における動態 —有色および白色家兎眼での比較検討—

福田 正道, 佐々木一之

金沢医科大学眼科学教室

要 約

メラニンと高い親和性を持つ抗菌剤 *sparfloxacin* (SPFX), 比較的親和性の低い薬剤 *cefmenoxime* (CMX) を対象薬剤とし, その虹彩・毛様体での動態を有色, および白色家兎で検討した. 有色, 白色家兎摘出眼より取り出した虹彩・毛様体ホモジネートと検討薬剤を混合し, その水可溶性蛋白分画, および水不溶性蛋白分画中の薬剤分布状態をみると, CMX は白色, 有色共に 100% が水可溶性蛋白分画中に分布していた. SPFX は, 白色眼では水可溶性蛋白分画中にそのほとんどの分布がみられたのに対し, 有色眼では約 60% が水可溶性蛋白分画中に, 20% が水不溶性蛋白分画中に分布していた. 生体眼に対象薬剤を局所投与し, それぞれの虹彩・毛様体中へ中の移行状態をみると, SPFX は CMX と比べ有色眼組織で有意に高い値を示した. 薬剤の持つメラニン親和性の程度によりその眼内動態は, 白色動物眼, 有色動物眼で異なることが本研究では明らかにされた. この事実は眼薬理の検討では留意されるべき事項の一つと考える. (日眼会誌 96: 1229-1233, 1992)

キーワード: メラニン, 抗菌剤, 虹彩・毛様体, 有色家兎, 白色家兎

The Dynamics of Melanin-affinitive and Non-affinitive Antibacterial Agents in the Iris-Ciliary Body of Rabbit Eyes —Comparative Studies in Pigmented and Albino Rabbits—

Masamichi Fukuda and Kazuyuki Sasaki

Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University

Abstract

The differences between the drug penetration levels in the iris-ciliary bodies of *sparfloxacin* (SPFX) and *cefmenoxime* (CMX), which respectively have high and low affinity to melanin, were examined using pigmented and albino rabbit eyes. Each drug was mixed with a homogenate of the iris-ciliary bodies of pigmented and albino rabbit eye, respectively. All CMX was distributed in a water soluble protein of the above homogenate of both pigmented and albino eyes, while all SPFX was detected from the water soluble protein of the tissue homogenate of the albino eye. However, in homogenate of the pigmented eyes, 60% of the drug was detected from water soluble protein and 20% of that was detected from water non-soluble protein. In the *in vivo* study, each drug was topically administered to pigmented and albino rabbit eyes. The SPFX concentration in the iris-ciliary body was significantly higher in the pigmented than in the albino eyes. The results indicated that the intraocular dynamics of the drug which has a high affinity to melanin showed significant differences

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
(平成3年12月27日受付, 平成4年4月10日改訂受理)

Reprint requests to: Masamichi Fukuda, M.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinade-machi, Kahoku-gun, Ishikawa 920-02, Japan

(Received December 27, 1991 and accepted in revised form April 10, 1992)

between pigmented and albino rabbit eyes. This should be considered in studies of ocular pharmacology as an important factor which influences intraocular drug dynamics. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1229-1233, 1992)

Key words: Melanin, Antibacterial agents, Iris-ciliary body, Pigmented rabbit, Albino rabbit

I 緒 言

眼科用薬剤の眼内動態を知ることは、その薬剤の臨床応用の基本となるだけに、どの薬剤についても重要な検討事項である。この検討には動物眼が用いられるが、実際には家兎、主に白色家兎眼が頻用されているのが現状かと思う。著者ら¹⁾もこれまでに、様々な薬剤の眼内動態の検討に白色家兎眼を用いてきたが、対象薬剤によってはその組織内動態が有色家兎眼とは異なること、また、抗菌剤の中にはメラニンとの結合によりその抗菌活性が低下するものがあることなどを経験している。先に著者ら²⁾が報告した合成メラニンを用いた化学療法剤のメラニン親和性のスクリーニング法も、この種の研究を進めるために提唱したものである。本検討はメラニン顆粒の多い、虹彩・毛様体で薬剤(抗菌剤)の吸収・排泄が白色、有色眼でどれ程異なるのかを具体的に知る目的で行ったものである。

II 実験方法

本実験には日本在来の成熟白色家兎(以下白色と略)および成熟有色家兎(以下有色と略)(体重2.0~3.0 kg)で雌雄の区別なく使用した。実験は以下の2群に分けて行った。被験薬剤は合成メラニンとの親和性の低い薬剤である塩酸セフメノキシム原末(千寿製薬)(953 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 力価) cefmenoxime (CMX) と、合成メラニンとの親和性の高い sparfloxacin (SPFX) 原末(大日本製薬)(1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 力価)をそれぞれ蒸留水で100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に溶解し、実験A群に使用した。また実験B群では塩酸セフメノキシム点眼剤(25 mg/5 ml)(ベストロン点眼剤[®])および sparfloxacin 原末(1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 力価)を蒸留水で0.3%に溶解し、pH 7.0に調整し、使用した。

〔実験A〕家兎眼摘出虹彩・毛様体の水可溶性蛋白分画と水不溶性蛋白分画における薬剤分布の検討

正常白色、および有色家兎眼から虹彩・毛様体を一体として取り出し、この湿潤量の49倍量の蒸留水を加えて超音波(USP-50, SHIMAZU)で破砕した虹彩・毛様体ホモジネートを試料液とした。作製した虹彩・

毛様体ホモジネートは各薬剤(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と9:1の割合に混合し、薬剤の最終濃度が10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になる様に調整した。その後混合溶液を37°C、60分間インキュベートした後、12,000 g、10分間、4°Cで遠心分離し、水可溶性蛋白分画と水不溶性蛋白分画に分離した。水可溶性蛋白分画の薬剤の濃度測定は、直接その上澄液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に注入して測定した。水不溶性蛋白分画の薬剤の濃度測定は、その沈渣物に6 N KOH溶液を加え、室温で約60分間放置した後6 N HCL、および0.5 M 磷酸緩衝液(PBS)(pH 7.4)を加え激しく振盪、クロロホルム1 mlを加え遠心分離(1,000 g、10分)、減圧乾固した。これに100 μl の移動相(5%CH₃COOH: CH₃CN: CH₃OH=70:15:15)を加えてHPLCに注入し、水不溶性蛋白分画の薬剤濃度を測定した。

〔実験B〕白色、有色家兎眼の虹彩・毛様体および房水内への薬剤の動態の検討

25 mg/5 ml (0.5%) 塩酸セフメノキシム点眼剤、および0.3%、スパフロキサシン溶液を白色、有色家兎眼に1回40 μl 、5分間毎5回点眼し、1、24時間、5日目後までの虹彩・毛様体および房水内薬剤濃度を測定した。両薬剤の眼組織内濃度測定にはHPLCを用いた。使用機器は島津LC-5Aで、カラムはShimpack-CLC-ODS、移動相として(CMX; 0.01 M CH₃COOHN₄: CH₃CN=88:12)(SPFX; 5%CH₃COOH: CH₃CN: CH₃OH=70:15:15)を用いた。検出はCMX: 300 nm, SPFX: 299 nmで行った。

III 結 果

〔実験A〕家兎眼摘出虹彩・毛様体の水可溶性蛋白分画と水不溶性蛋白分画における薬剤分布の検討

白色、有色家兎眼共、CMXは水可溶性分画のみから分離された。その濃度は白色眼で10.0 \pm 0.07 $\mu\text{g}/\text{g}$ (平均値 \pm 標準偏差)、有色眼で10.15 \pm 0.31 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった(図1)。

SPFXは水可溶性分画からは白色眼で10.27 \pm 0.14 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、有色眼で5.92 \pm 0.39 $\mu\text{g}/\text{g}$ が検出された。また、白色眼では水不溶性分画中には薬剤の分布は見られな

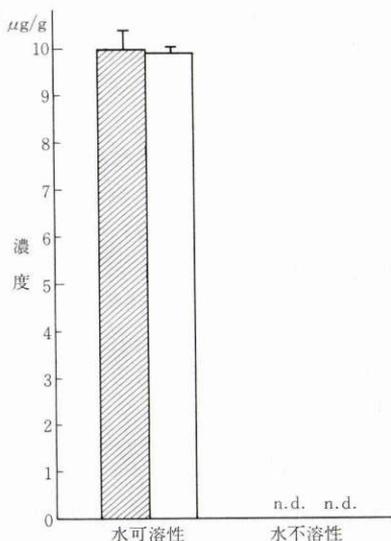


図1 CMX の抽出虹彩・毛様体の蛋白分画（水可溶性，水不溶性）における分布。
n.d.：検出限界以下。■：有色家兎，□：白色家兎
平均値±標準偏差

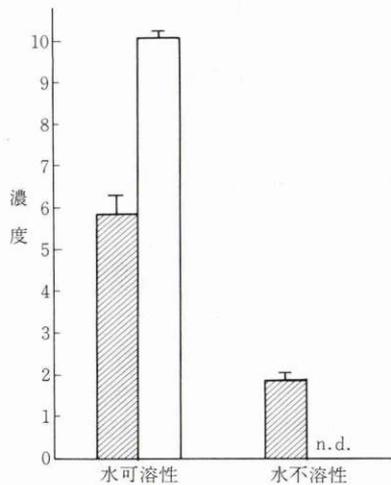


図2 SPFX の抽出虹彩・毛様体の蛋白分画（水可溶性，水不溶性）における分布。
■：有色家兎，□：白色家兎，平均値±標準偏差

かったが，有色眼では $1.97 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$ の濃度が検出された。両分画での薬剤の回収は，白色家兎眼ではほぼ100%の回収が可能であったが，有色家兎眼では78.9%であった（図2）。

〔実験 B〕白色，有色家兎眼の虹彩・毛様体および房水内への薬剤の動態の検討

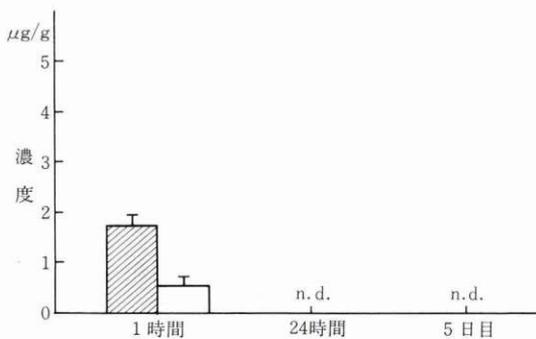


図3 CMX の虹彩・毛様体における動態。
■：有色家兎，□：白色家兎，平均値±標準偏差

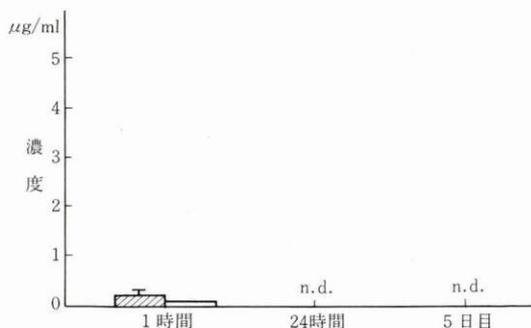


図4 CMX の房水における動態。
■：有色家兎，□：白色家兎，平均値±標準偏差

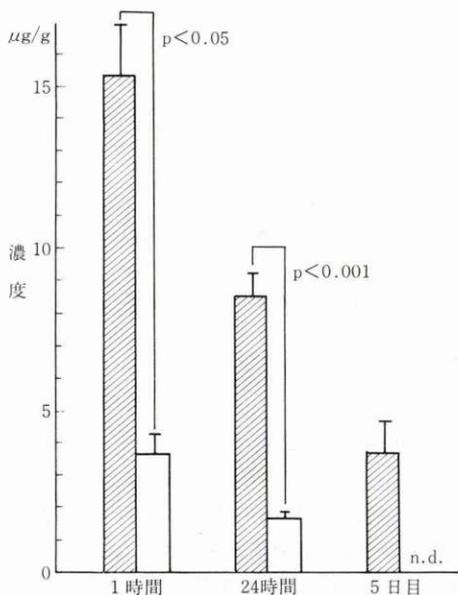


図5 SPFX の虹彩・毛様体における動態。
■：有色家兎，□：白色家兎，平均値±標準偏差

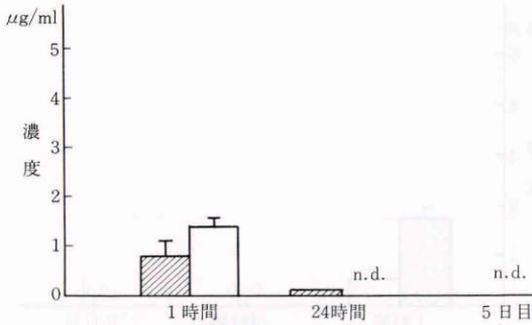


図6 SPFXの房水における動態。

■：有色家兎，□：白色家兎，平均値±標準偏差

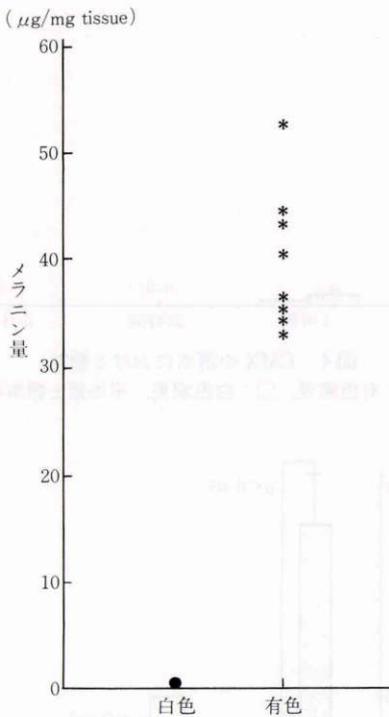


図7 家兎虹彩・毛様体における組織1mg当たりのメラニン量。

●：白色家兎，*：有色家兎

CMXは投与1時間後において、有色では $1.70 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$ ($n=4$)、白色では $0.55 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ ($n=3$)の虹彩・毛様体への移行が見られたが、それ以降では有色、白色眼ともに、薬剤は検出されなかった(図3)。房水中への移行は、投与1時間後に有色で $0.19 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ ($n=3$)、白色で $0.08 \mu\text{g/ml}$ 以下 ($n=3$)であったが、それ以降では検出されなかった(図4)。

SPFXの虹彩・毛様体への移行は、1時間有色 $15.28 \pm 6.76 \mu\text{g/g}$ ($n=4$)、白色 $3.65 \pm 0.57 \mu\text{g/g}$ ($n=4$) ($p < 0.05$)、24時間では有色 $8.50 \pm 0.70 \mu\text{g/g}$ ($n=4$)、白色 $1.53 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ ($n=3$) ($p < 0.001$)、5日目で有色 $3.75 \pm 1.06 \mu\text{g/g}$ ($n=4$)、白色検出(-) ($n=4$)と各時点において有色眼の方が白色眼に比べて有意に高値を示した(図5)。房水内への移行は投与1時間で有色で $0.80 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ ($n=4$)、白色家兎は $1.36 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ ($n=4$)であった。24時間目で有色でtrace程度($0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下) ($n=4$)の移行値が見られたが、白色で検出されなかった。5日目では両者共に検出されなかった(図6)。

IV 考 按

眼科用薬剤の眼内動態の把握は、臨床応用に先立つ不可欠な検討事項である。この検討には主として動物眼が用いられるが、これが白色動物であることが多い。この種の薬理実験を白色動物で行うことは、果たして妥当かどうかの議論が近年行われるようになってきたが³⁾⁴⁾、大勢は未だ白色動物中心の検討である。眼科領域に関連する薬剤と組織内メラニンの親和性についての検討はこれまでに多くある^{5)~7)}。Chloroquine, phenothiazine系薬剤などはメラニン親和性の高い薬剤としてよく知られたものであるが、著者ら¹⁾²⁾もこれまでに指摘してきたように、日常、眼科領域で頻用される抗菌剤の中にも同様なものがある。抗菌剤によってはメラニンとの結合によりその抗菌活性までも変動することがある¹⁾。メラニンの存在が薬効にまで影響することを考えると、白色動物眼のみで検討された薬剤の眼組織内への取り込み、あるいは排泄の動態を改めて有色動物眼でそれと比較検討することも必要ではないかと考える。本検討では、抗菌剤の中からメラニン親和性の高い薬剤(SPFX)、比較的これが低い薬剤(CMX)を各一種選び出し、この二剤について豊富なメラニン顆粒の含有がある虹彩・毛様体の薬剤の取り込みを、白色家兎眼、有色家兎眼からの摘出組織と、生体眼の、二つの異なるレベルで検討した。メラニンと抗菌剤との親和性は、前報²⁾の簡易スクリーニング法によって検討したものである。

摘出虹彩・毛様体については、水可溶性蛋白分画と水不溶性蛋白分画での薬剤分布状態を検討した。CMXは白色、有色眼共に、メラニン顆粒を含まない水可溶性蛋白分画にはほぼ100%が分布していたのに対し、SPFXは水可溶性蛋白分画には白色眼で100%、有色

眼では約60%が分布し、水不溶性蛋白分画にも約20%が認められた。この成績は、有色眼ではSPFXの虹彩・毛様体内分布は二つの異なる状態に分けて考えてよいことを示唆するものと考え、メラニンの介在はこれに大きく関与するものと想定したい。

実際に生体眼に両群の抗菌剤を点眼した際にも、白色眼、有色眼でメラニンと親和性の高いSPFXの虹彩・毛様体内の薬剤濃度分布に明らかな差が見られた。生体眼での検討は摘出眼組織を用いた成績を裏付けるものと考え、

今回の薬剤の一回(5分毎5回)投与による検討であったが、継続投与ではこの差は更に広がると思う。取り込まれた薬剤がメラニンと結合した場合、これがその後長期にわたりどのように放出されるのかが次の検討課題になろう。

抗菌剤、抗生剤も今回検討の対象としたSPFX程白色、有色動物眼の間でその動態に差があるとすると、その吸収・排泄の検討は果たして白色動物眼のみのものでよいのかという問題が今後十分に論じられねばならないと考える。単に有色家兎眼を用いるだけで、得られるデータにばらつきの多いことが予想される。事実、今回、有色家兎眼7眼の虹彩・毛様体組織内の組織重量あたりのメラニン量を測定してみたが(図7)、30~50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue とその幅は決して狭いものではなかった。理想的には純系の有色家兎眼を用いることが望まれるところであるが、これにはかなりの制約がある。本実験に先立つ予備実験で、メラニンとの親和性のないことが確認された薬剤についてはこれからも

従来通り白色動物眼を用いてもよいと思うが、僅かでも、メラニン親和性をもつ薬剤であれば、有色動物を用いることが望ましいと言うのが現時点での著者らの見解である。

文 献

- 1) Fukuda M, Sasaki K: Changes in the antibacterial activity of melaninbound drugs. *Ophthalmic Res* 22: 123-127, 1990.
- 2) Fukuda M, Sasaki K: Intraocular dynamic mode differences of new quinolone antibacterial agents between pigmented and albino rabbit eyes. *Lens Eye Toxic Res* 6: 339-351, 1989.
- 3) 福田正道, 佐々木一之: 化学療法剤の眼内移行動態におけるメラニンの関与. *日眼会誌* 92: 1839-1843, 1988.
- 4) Barza M, Kane A, Baum J: Marked differences between pigmented and albino rabbits in the concentration of clindamycin in iris and choroidretina. *J Infect Dis* 139: 203-209, 1979.
- 5) Atlasik B, Stepien K, Wilczok: Interaction of drugs with ocular melanin in vitro. *Exp Eye Res* 30: 325-331, 1980.
- 6) Potts AM: The concentration of phenothiazines in the eye of experimental animals. *Invest Ophthalmol* 1: 522-530, 1962.
- 7) Krystyna B, Tadeusz W: Studies of the mechanism of chloroquine binding to synthetic dopa-melanin. *Biochem Pharmacol* 31: 3358-3365, 1982.