

非生体眼実験系によるフルオロキノロン系抗菌剤の 眼内移行動態に関する基礎的情報把握の試み

福田 正道, 佐々木一之

金沢医科大学眼科学教室

要 約

5種のフルオロキノロン系抗菌剤について、角膜透過実験モデルを用いて家兎角膜での透過性(透過速度)を測定した。また、5種のフルオロキノロン系抗菌剤のみかけの分配係数を測定し、各薬剤の角膜透過性との相関性をみた。この実験系とは別にオフロキサシン(OFLX)とノルフロキサシン(NFLX)点眼液を家兎眼に投与した後、薬剤の眼房水中移行動態を測定し、その薬動学的パラメーターと角膜透過実験モデルで得たパラメーターを比較検討した。角膜透過実験モデルによる各薬剤の角膜透過速度係数はレボフロキサシン(LVFX)： 6.95×10^{-7} cm/s, OFLX： 6.78×10^{-7} cm/s, ロメフスキサシン(LFLX)： 3.58×10^{-7} cm/s, シプロフロキサシン(CPLX)： 2.46×10^{-7} cm/s, NFLX： 1.63×10^{-7} cm/s

であった。また、各薬剤の分配係数も LVFX：0.24, OFLX：0.23, LFLX：0.14, CPLX：0.06, NFLX：0.07であり、角膜透過速度係数と分配係数の間には高い相関性がみられた。別に行った生体眼での実験でも、OFLXの生体眼房水移行濃度(Cmax)はNFLXに比べ高かった。本検討で用いた角膜透過装置による実験結果は、生体眼房水中移行濃度を予想する上で極めて有用な情報を与えるものとする。(日眼会誌 99：532-536, 1995)

キーワード：非生体眼実験系, フルオロキノロン系抗菌剤, 角膜透過性, 眼内移行動態, 分配係数

In vitro Topically Applied Fluoroquinolone Penetration into the Anterior Chamber

Masamichi Fukuda and Kazuyuki Sasaki

Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University

Abstract

The penetration mode of five fluoroquinolone ophthalmic solutions (OFLX, NFLX, LVFX, LFLX and CPFX) through the rabbit cornea was examined with an *in vitro* experimental system. The system was an artificial anterior eye segment model made of acrylamide covered with a New Zealand albino rabbit cornea with a scleral flap. *In vivo* studies on the penetration of OFLX and NFLX ophthalmic solutions into the anterior chamber of albino rabbits were performed separately. Parameters gained from *in vivo* pharmacokinetic analysis and those from the model eye were compared. The permeability coefficients (K) (cm/s) through the cornea and partition coefficient were 6.95×10^{-7} cm/s in LVFX, 6.78×10^{-7} cm/s in OFLX, 3.58×10^{-7} cm/s in LFLX,

2.46×10^{-7} cm/s in CPFX and 0.06×10^{-7} cm/s in NFLX, and 0.24, 0.23, 0.14, 0.06 and 0.07, respectively. High correlation was seen between the corneal permeability coefficients, and the partition coefficient Cmax of OFLX obtained from the *in vivo* study was higher than that of NFLX. The applied experimental system would be a useful tool for the estimation of the *in vivo* Cmax of the examined drug. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 532-536, 1995)

Key words: Examination model in non-living eye, Fluoroquinolones, Corneal permeability, Ocular pharmacokinetics, Coefficient of permeability

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6年8月15日受付, 平成6年12月27日改訂受理)

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

(Received August 15, 1994 and accepted in revised form December 27, 1994)

I 緒 言

点眼された薬物の眼内移行状態は、その前房内移行濃度を知ること大略を評価できると思われるが、前房水中に移行した薬剤の大部分は角膜を通過して眼内に移行しているため、角膜における各薬物の透過性を把握することは、薬物の房水中移行動態を予測する上で有用な情報を与えるものと考えられる。今回、これまでに薬物の角膜透過性の検討に使用されている角膜透過性装置^{1)~4)}を用い、5種類のフルオロキノロン系抗菌剤を対象に非生体眼で点眼薬の房水内移行を定量し、その移行動態の特性を把握するとともに、2種のフルオロキノロン系抗菌剤点眼剤について、家兎生体眼への薬剤房水中移行動態を測定し、両実験系で得られた薬動学的パラメーターの相関性を検討した。

II 方 法

1. 非生体眼モデル (以下、モデル装置) によるフルオロキノロン系抗菌剤の角膜透過性の検討

1) 実験材料

使用した動物は成熟白色家兎 New Zealand 系 (以下、NZ: 雄 13 週齢, 体重 2.5~2.7 kg) である。供試薬剤はオフロキサシン (OFLX) (分子量: 361.37), ノルフロキサシン (NFLX) (分子量: 319.34), レボフロキサシン (LVFX) (分子量: 370.40), ロメフロキサシン (LFLX) (分子量: 387.81), シプロフロキサシン (CPFX) (分子量: 385.80) である。

これらの各薬剤の原末を 0.1 N NaOH 2 ml で溶解した後、全量を 100 ml に調整し、その後、人工房水 (オベガード®, MA 眼灌流量 (浸透圧比 0.86~1.14) (以下、灌流液) で薬剤の最終濃度が 0.1 mM 溶液に調整した。

2) モデル装置の作成法と検討薬剤の角膜透過性検出法

正常白色家兎に全身麻酔剤ペンタバルビタールナトリウム (ネプタール®, 注射液 50 mg/ml) を過剰投与し屠殺し、直ちに眼球を摘出し、摘出眼球から灌流液中で強角膜片を作製し、図 1 に示したモデル装置に固定した。前房側チャンバー内に灌流液 (2 ml) を加え、角膜上皮側チャンバーに上記の各薬剤を 0.1 mM 溶かした液 (2 ml) を加え、30, 60, 90, 120, 150, 180 分まで 37°C でインキュベートした。各測定時間後に前房側チャンバーから溶液 (100 μ l) を取り出し、新たに灌流液 (100 μ l) と交換した。取り出した前房側溶液をそのまま被検体とし、涙液側から前房側に移行した量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。

この実験における薬物の角膜透過係数 K は、岩田ら³⁾の方法から

$$K = V_2 / 2tA \cdot \ln (C_0 - 2C_2) / C_0 \text{ によって求めた。}$$

・涙液側の初濃度 C_0

・ t 時間後の涙液側および前房側の濃度をそれぞれ C_1 , C_2

・ t 時間後の涙液側および前房側の容積をそれぞれ V_1 , V_2 (ただし、本装置については $V_1 = V_2$ とした)

・角膜の有効面積 A

涙液側の濃度は測定中はほぼ一定に保たれているため、薬物累積透過量と時間曲線の傾きから透過速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) を求めた。また、透過係数は、透過速度を初濃度で除して求めた。

3) 分配係数測定法⁵⁾

n -オクタノールと 1/15 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて分配係数を測定した。抗菌剤の初濃度は、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように pH 7.4 磷酸緩衝液で調整した。水層、油層に用いた各々の溶媒は実験中の容積変化を最小にするために、あらかじめ両者を一昼夜飽和させて使用した。水層および油層の各溶液を正確に試験管に取り、2 時間、室温 (25 \pm 1°C) で振盪し平衡状態とした。1 時間静置後、水層を取り、1,500 rpm で 10 分間遠心し水層を定量した。また、測定操作中の抗菌剤の分解による濃度の減少を補正するため、上記と同一濃度の薬物を含む水層のみを試験管に入れ同様の操作をした後定量し、これをもって薬物初濃度 (C_i) とした。分配平衡後の水層の薬物濃度の定量値から、見かけの分配係数, apparent partition coefficient (Papp) を次式から計算した。

$$\text{Papp} = C_o / C_w$$

$$\text{Papp} = (C_i - C_w) / C_w \cdot V_w / V_o$$

本計算式では、 C および V はそれぞれ水層 (w) と油層 (o) における濃度と体積を示している。

4) 薬剤濃度定量法

薬剤濃度測定には HPLC を用いた。測定条件は上記と同様である。試料は水層 (10 μ l) を注入した。

5) 家兎生体眼内への薬剤移行動態の検討

正常白色家兎 (2.5~3.0 kg) の結膜嚢内に正確に 0.3% NFLX (バクシダール®点眼液) を 1 回 (40 μ l), または、5 分毎 5 回 (40 μ l \times 5) 点眼し、点眼後 30, 60, 120, 240 分前房水中薬剤濃度を HPLC で測定した。測定方法、および条件は既報⁶⁾に準じて行った。薬動学的パラメーターの算出には、非線型最少二乗法による山岡⁷⁾の One-compartment モデル・プログラムを用いた。

III 結 果

1. モデル装置における検討薬剤の角膜透過性

図 1 に示した角膜透過実験装置では、角膜を介して涙液側から前房側への 5 種のフルオロキノロン系抗菌剤はすべて時間とともに増加がみられたものの、その透過量には各薬剤間で差がみられ、LVFX と OFLX はほぼ同程度で、5 剤中で最も高い透過量がみられ、次いで、LFLX, CPLX の順であり、最も透過量の少ないものは NFLX であった (図 2)。さらに、透過速度を初濃度で除

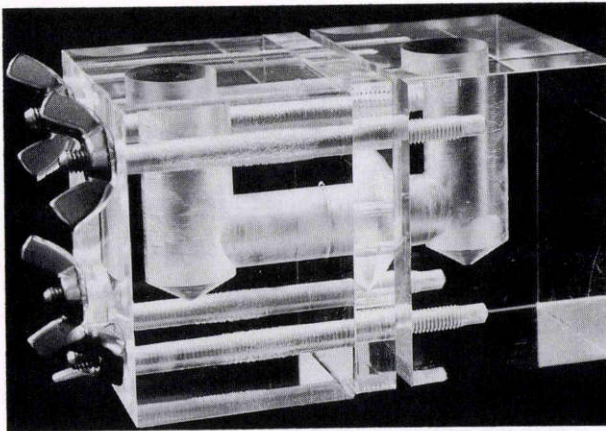


図1 角膜透過実験装置はアクリル樹脂製の二つのチャンパーから成り、摘出した強角膜片をチャンパー間にセッティングして使用する。

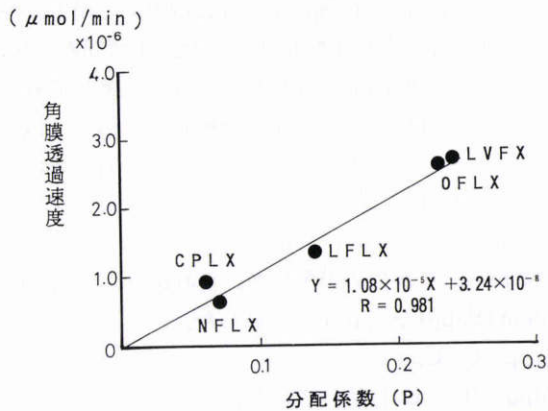


図2 角膜透過装置による5種のフルオロキノロン剤の角膜透過量。

して計算した角膜透過係数はLVFX: 6.95×10^{-7} cm/s, OFLX: 6.78×10^{-7} cm/s, LFLX: 3.58×10^{-7} cm/s, CPLX: 2.46×10^{-7} cm/s, NFLX: 1.03×10^{-7} cm/s (n=6)であった。

2. 分配係数

表1には各薬剤とn-オクタノール-水間の分配係数を示した。分配係数はLVFX 0.24, OFLX 0.23, LFLX 0.14, CPLX 0.06, NFLX 0.07 (n=3)であった。図3

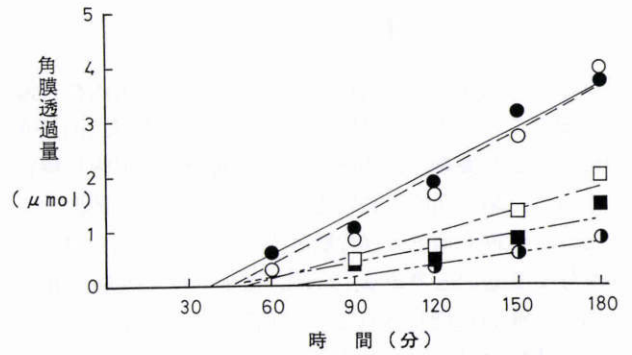


図3 種々のキノロン剤の角膜透過速度と分配係数の相関性。

白丸:レボフロキサシン(LVFX),黒丸:OFLX,白四角:ロメフスキサシン(LFLX),黒四角:シプロフロキサシン(CPLX),丸半黒:ノルフロキサシン(NFLX),n=6

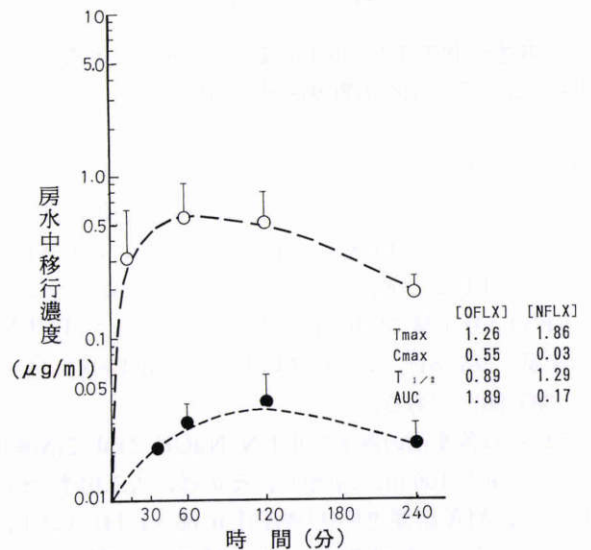


図4 0.3%NFLX点眼液と0.3%OFLX点眼液の1回点眼による家兎眼房水中移行動態。

平均値±標準偏差

白丸:OFLX,黒丸:NFLX,白色家兎(n=6~8)

は各薬剤の角膜透過速度と分配係数の相関性を示したもので、両者間には高い相関性(r=0.981)がみられた。

表1 オフロキサシン(OFLX)とノルフロキサシン(NFLX)の角膜透過性装置(in vitro系)による角膜透過係数と家兎房水中移行動態(in vivo系)による薬力学的パラメーターの比較

	<in vitro>			<in vivo>			
	角膜透過速度(μmol/min)	分配係数(P)	[点眼法]	Tmax(h)	Cmax(μg/ml)	T _{1/2} (h)	AUC(h μg/ml)
OFLX	2.56×10^{-5}	0.23	1回	1.26	0.55	0.89	1.89
			5分毎 5回	0.99	3.31	1.58	11.6
NFLX	0.62×10^{-5}	0.07	1回	1.86	0.03	1.29	0.17
			5分毎 5回	1.94	0.31	1.35	1.62

Tmax: 最高濃度到達時間 Cmax: 房水内最高濃度 T_{1/2}: 半減期 AUC: 濃度時間曲線下面積

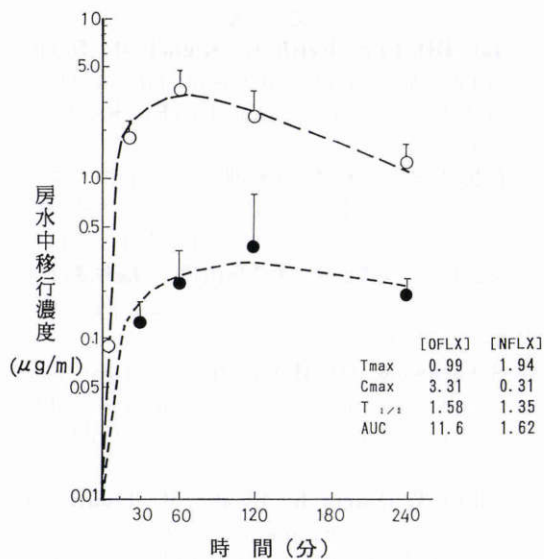


図5 0.3% NFLX 点眼液と0.3% OFLX 点眼液の5分毎5回点眼による家兎房水中移行動態。平均値±標準偏差
白丸：OFLX, 黒丸：NFLX, 白色家兎 (n=6~8)

3. 生体眼での薬剤房水中移行動態

図4は0.3% NFLX 点眼液と0.3% OFLX 点眼液の1回点眼による家兎眼房水中移行動態を示したものである(既報⁷⁾。5分毎5回点眼による家兎房水中移行濃度ともにOFLXはNFLXに比べて移行性が良好であった(n=6~8, 図5)。両薬剤の薬動学的パラメーターC_{max}, AUCともOFLXはNFLXに比べて大きかった(表1)。

IV 考 按

今回使用したモデル装置は、すでに多くの先人により検討されており¹¹⁻³⁾⁸⁾、実験装置として確立されているものである。これまでに、naphtylamine 誘導体、アニリン誘導体、β-遮断剤、各種ステロイドなどが本装置で検討されている。

本モデル装置下で実験を行う際に重要なことは、角膜に障害を与えない条件下で実験が行われることである。本実験で用いた緩衝液(眼内灌流液)は、角膜に対して的安全性がすでに確認されている⁹⁾。薬剤の濃度を各薬剤ともに0.1 mM 溶液に設定したが、この条件下で37°C, 3時間インキュベートした際の薬剤による角膜上皮および内皮細胞の障害がないことを走査型電子顕微鏡下で実験に先立ち確認しているが、実験に際して、器械的に障害を受けたと思われる角膜片(2片)については実験データから除外した。今回、成熟白色家兎の雄に限定したが、これは雌に比べて、種々の制約が少ないという一般的な理由からである。

検討した5種のフルオロキノロン系抗菌剤は化学構造上の6位へのF原子の導入によって疎水性を、7位への

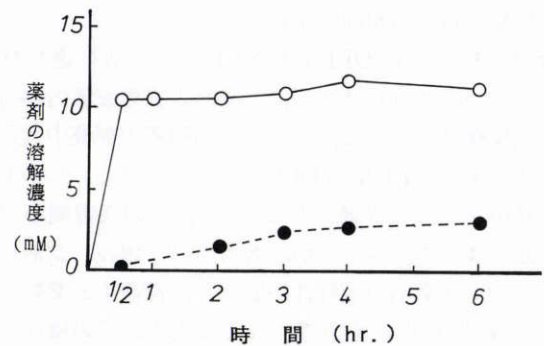


図6 OFLX とNFLX の水に対する溶解性。
白丸：OFLX, 黒丸：NFLX

ピペラジジン環の導入によって抗菌力の増強と親水性が得られ、適度の疎水性が導かれたものである¹¹⁾¹²⁾。本系剤は両性化合物で、しかも、酸塩基解離定数(pKa)が酸性側で5.7~6.5塩基側で7.9~9.0に分布し、血液中では分子型(非イオン型)で存在するため血管外移行が良好であり、多くの共通した特徴を有している。検討薬剤の分子量は319.34~387.81で、薬剤間には大きな差はない。物理化学的特性が類似した5剤ではあるが、今回の実験成績は各薬剤によって角膜透過速度に差を示した。LVFX, OFLXは同程度で最も速く、次いで、LFLX, CPFx, NFLXの順であった。角膜透過速度の高い薬剤ほど、脂溶性の指針となる分配係数は大きかった。薬物の角膜透過性には分配係数、水に対する溶解度、pKa、分子量など薬物の物理化学的特性が密接に関連することが知られているが、今回の成績は、これら薬物特性のうち分配係数が角膜透過性に深く関与していることを示したものである。著者らは、これまでにOFLXの水に対する溶解性はNFLXに比べて遥かに高いことを確認している(図6)が、この結果と今回の両薬剤の脂溶性を考慮すると、本系統の抗菌剤に共通することは、薬剤の脂溶性が高く、しかも水溶性の高い薬剤ほど、眼科用点眼薬としては角膜透過性がよく、また、点眼後の生物学的利用能パラメーターも良好であったことである。しかし、ある程度以上疎水性となると、角膜透過度は逆に低下することも指摘されている²⁾。脂溶性と水溶性のバランスが薬物の角膜透過性には重要であることを意味するものと考えられる。

生体眼での薬剤房水中移行動態の測定は、本モデル装置による実験結果がどの程度生体眼での薬剤の房水中移行動態に相関するかを知ることを意図して行ったものである。房水中への薬剤移行動態の検討には、OFLXとNFLXの2種のフルオロキノロン系抗菌点眼剤を選んだ。1回点眼群と5分毎5回点眼群の二つの異なる投与方法を用いたが、いずれの投与方法においてもT_{max}はOFLXがNFLXに比べて速く、モデル装置から得られた角膜透過速度係数と一致した。C_{max}も、角膜透過速度係数の大きいOFLXが角膜透過速度係数の小さいNFLXに比べて高値を示した。両薬剤の分配係数は角膜

速度係数と同様の傾向を示した。

今回の検討では OFLX と NFLX の 2 剤を選び検討を行ったが、著者らはすでに両薬剤の家兎涙液内移行動態を比較検討している。点眼後の結膜嚢内涙液中残留濃度は明らかに NFLX が OFLX に比べて高く、しかも長時間残留することを確認している⁶⁾。この残留機序は未だ明確にはされていないが、著者らは点眼後、涙液の緩衝作用により薬剤の溶解性が低下し、涙液中の薬物分子の分子型(非イオン型)が多くなることも、その機序の一つと考えている。この現象は、薬剤の角膜透過性にも影響されるものである。当然ながら、点眼剤の bioability にも影響する因子の一つとなる。

検討した 2 剤の生体眼での前房中移行動態から両薬剤の薬力学的パラメーターを比較すると、明らかに点眼後の生物学的利用能パラメーター、すなわち、最高房水中濃度 (Cmax)、最高房水中濃度到達時間 (Tmax) は、OFLX が NFLX に比べて良好であった。

今回の装置を使用した抗菌点眼薬の眼内動態の比較は、本検討がはじめてである。これまでは、生体眼による薬剤移行動態の実験成績が臨床応用の前段階としての基礎データとなっていた。実験動物の使用が制限されはじめた現今、基礎検討段階でのこの種のモデル装置を使う薬理学的検討法は有用な手技として応用するに値するものと考えられる。

本論文の要旨は、第 98 回日本眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Jae HO Kim, Keith G, Miguel M, David P: Solute Permeability of the corneal end Othelium and Descemet's membrane. *Exp Eye Res* 12: 231-238, 1971.
- 2) 岸田健一, 上野則夫, 大鳥利文: 14. 薬物の角膜透過に関する研究. I. 薬物の修飾がおよぼす透過性の変化について. *日眼会誌* 77: 106-110, 1973.
- 3) 岩田修造, 池本文彦, 大久保由起子, 福井成行: スルベニシリンナトリウムの点眼による眼内移行. *臨眼* 30: 257-262, 1976.
- 4) Schoenwald RD, Huang HS: Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: Physicochemical factors. *J Pharm Sci* 72: 1266-1272, 1983.
- 5) Akira T, Osamu K, Etsuko M, Tsukinaka Y: Physicochemical properties of β -lactam antibiotics: Oil-Water Distribution. *J Pharm Sci* 66: 1675-1679, 1977.
- 6) 福田正道, 佐々木一之: キノロン系抗菌剤の涙液内移行—同一薬剤の家兎およびヒト涙液内移行の比較—. *日眼会誌* 98: 721-726, 1994.
- 7) 山岡 清: マイコンによる薬物体内動態解析法. 南江堂, 1986.
- 8) 福田正道, 佐々木一之: Ofloxacin 点眼液の眼組織内移行動態の検討. *眼紀* 37: 823-828, 1986.
- 9) 東條角治, Desai DS: 眼科用プロドラッグの眼内薬物動態. *新しい眼科* 8: 945-948, 1991.
- 10) 大鳥利文, 法貴 隆, 山本佑二郎, 山本峰子, 池田雅晴: 眼内手術用灌流液についての研究. *日眼会誌* 84: 1272-1277, 1980.
- 11) 三橋 進: ニューキノロン—あすの抗菌剤をめざして—. 学会出版センター, 1991.
- 12) 藤井良知, 島田 馨: ニューキノロン剤の正しい使い方. *医薬ジャーナル*, 1991.