

研究題目 イオントフォレシスによる抗白内障薬ジスルフィラムの眼組織送達に関する研究

病院薬剤学講座 上田秀雄 (Hideo Ueda)

【緒言】

白内障は、老化による代謝異常と外的要因によって水晶体タンパク質が水溶性を失い、水晶体が混濁し視力を失う眼疾患であり、高齢人口の増加に伴う今後の患者数の増加が予想される。現在、白内障治療として重症の場合には外科的療法が行われ、比較的軽度の場合には水晶体タンパク質代謝を改善する薬物の点眼及び内服が行われている。しかしながら、眼球内部と外界とを隔てる角膜や結膜のバリア能が高く、¹⁾ また点眼した薬液の多くは鼻涙管や頬を伝って流れ出てしまうため、²⁾ 水晶体のような眼球内部の組織に効率的に薬物を送達できていない。また、内服で用いる場合には、全身レベルでの副作用の発現が懸念される。このような現状を考慮すると、より効率的な投与法の開発が望まれる。結膜や角膜を介して電氣的に薬物を送達する方法 (イオントフォレシス) は、抗生物質や抗ウイルス薬の眼組織送達を改善し、眼組織感染症に対する有用性が認められており、³⁻⁶⁾ 他の眼疾患に対する応用も期待されている。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ阻害剤であるジスルフィラム (DSF) は、点眼適用において亜セレン酸惹起白内障モデルラットにおける白内障の発生を抑制することが報告され、抗白内障薬としての有用性が報告されている。⁷⁾ DSFによる抗白内障効果は、DSFの眼粘膜透過過程で生成する活性代謝物ジエチルジチオカルバミン酸 (DDC) による活性酸素の捕捉によるものと考えられている。一方、DSFは水への溶解度が低く、水溶液としての適用には適さないため、シクロデキストリンを用いた可溶性 (包接化) した製剤⁸⁾ やリポソームに封入した製剤⁹⁾ の調製が試みられている。本研究では、白内障治療のためのイオントフォレシス法の確立を目標とし、DSFの家兎結膜透過性に対するイオントフォレシスの効果を試験した。また、シクロデキストリン包接化合物のような製剤を想定し、FITC-ラベルしたデキストランを用いイオントフォレシスの効果を見積もった。さらに、イオントフォレシスの安全性を簡便に評価するために、イオン輸送能を指標として結膜の生理機能評価を試みた。

【方法】

試薬 ジスルフィラム (DSF) 及びジエチルジチオカルバミン酸 (DDC) は和光純薬 (株) より購入した。Fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (平均分子量 4,400、FD-4)、8-bromoadenosine-3,5-cyclic monophosphate (8Br-cAMP)、およびforskolinはSigma Chemical Co., Ltd (St Louis, MO, USA) より購入した。Adenosine triphosphate (ATP)はResearch Biochemicals International (Navik, MA, USA)より購入した。その他の試薬は市販特級品またはHPLC用試薬を用いた。

実験動物 雄性日本白色種家兔（体重 2.5～3.0 kg）は、東京実験動物（株）より購入した。

緩衝液の調製 すべての実験にbicarbonated Ringer's solution (BRS、pH 7.4) を用いた。BRS は、111.5 mM NaCl、4.8 mM KCl、0.75 mM NaH_2PO_4 、29.2 mM NaHCO_3 、1.04 mM CaCl_2 、0.74 mM MgCl_2 、及び 5 mM glucoseからなる。

DSF 溶解度の測定 BRS 10 mL に DSF を懸濁して 37°C で攪拌した。36 時間後、懸濁液をメンブレンフィルター (0.45 μm) で濾過し、濾液中の DSF 濃度を HPLC にて測定した。

In vitro 結膜イオントフォレシス透過試験 Kompella らの方法 10) に従い結膜を摘出し Ussing 型チャンパー (有効拡散面積: 0.44 cm^2) に挟み、粘膜及び漿膜側を BRS で満たした。両側の液を攪拌し、また pH を 7.4 に保つために 5% O_2 /95% CO_2 でバブリングした。2 組の銀/塩化銀電極をチャンパーに挿入し、それぞれの電極は膜電位測定装置 (日本光電) に接続した。膜の近傍に挿入した銀/塩化銀電極の組合せを介して膜電位を測定し、膜から離れた位置に挿入した銀/塩化銀電極の組合せを電流適用に用いた。膜の電気生理学的パラメータ (膜電位 (PD)、短絡電流 (Isc)、及び抵抗値 (TEER)) が一定となった時点で、粘膜側を 0.1% DSF 懸濁液または 0.5% FD-4 溶液 (いずれも BRS で調製) と交換し、透過実験を開始した。経時的に漿膜側から 500 μL ずつ採取し、サンプル中の DSF 及び DDC は HPLC 法、FD-4 は蛍光分光光度法により定量した。

イオントフォレシス実験は、透過実験開始後 2 または 3 時間後から 30 分間、0.425 または 0.85 mA/cm^2 の定電流 (直流電流) を適用することにより行った。

薬物の定量 DSF 及び DDC は HPLC 法により定量した。採取したサンプル 200 μL に内標準物質のアセトニトリル溶液 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DSF に対して p-ヒドロキシ安息香酸アミル、DDC に対して p-ヒドロキシ安息香酸ヘキシル) 200 μL を混合し、定量用サンプルとした。HPLC 装置には LC-10AD (島津製作所) を使用し、カラムには Mightysil RP-18 50-2.0 (3 μm 、関東化学) を用いた。検出波長は 215 nm (UV)、移動相 (0.1% TFA:アセトニトリル、60:40) の流速は 0.5 mL/min 、温度は 50°C とした。

FD-4 は蛍光分光光度法により定量した。採取したサンプル 100 μL をホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で希釈し、蛍光分光光度計 (RF-5000、島津製作所) を用い、励起波長 495 nm、測定波長 515 nm で検出した。

電気生理学的手法による安全性の評価 上述のように家兔摘出結膜を Ussing 型チャンパーに挟み、電気生理学的パラメータが安定した時点から 30 分間、0.85 mA/cm^2 の定電流を適用した。電流適用中止 90 分後、粘膜側に能動的 Cl⁻ イオン分泌 modulator として 8Br-cAMP (0.5 mM)、forskolin (1.5 μM)、または ATP (0.5 mM) を添加し、添加後の Isc をモニターした。これら modulator 添加前後の Isc

の差 (ΔI_{sc}) 算出し、比較した。

【結果と考察】

1. DFS の結膜透過に対するイオントフォレシスの効果

37°CにおけるDSFのBRS (pH 7.4) 中溶解度は、4.10 $\mu\text{g/mL}$ だった (Table 1)。はじめに、結膜を介したDSFのイオントフォレシス輸送の基礎的なデータを得るために、0.1%の懸濁液を用いてイオントフォレシスの効果を試験した。Fig. 1は結膜の粘膜側に0.1% DSF懸濁液を適用したときの漿膜側に出現するDDCの累積量を示している。いずれの実験においても漿膜側にはDDCが検出され、DSFは検出されなかった。摘出角膜で報告されているように、^{9,11)} 結膜透過過程においてもDSFが活性代謝物であるDDCに変換されていることを示唆している。粘膜側を陰極、漿膜側を陽極としてイオントフォレシス (0.425 及び 0.85 mA/cm^2) を適用したとき、DDCの出現速度 (Fig. 1の傾き) は増大し、その効果は適用電流に依存することが明らかとなった。また、その傾きはイオントフォレシスを中止することにより回復する傾向が認められた。以上の結果から、イオントフォレシスはDDCの眼内送達を制御するための手段として有用であるものと考えられた。

Table 1 Chemical structure and physicochemical properties of DSF

Chemical Structure	Molecular weight	Solubility ($\mu\text{g/mL}$)*
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2 \quad \text{S} \quad \text{S} \quad \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \quad \quad \quad \quad \diagup \\ \text{N}-\text{C}=\text{S}-\text{S}-\text{C}=\text{N} \\ \diagup \quad \quad \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{CH}_3\text{CH}_2 \quad \quad \quad \quad \quad \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	296.54	4.10

* Solubility in BRS at 37°C

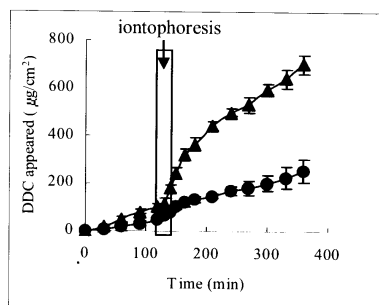


Fig. 1 Effect of iontophoresis at 0.425 (●) and 0.85 mA/cm^2 (▲) on the conjunctival transport of DSF.

一方 Fig. 2 に示したように、イオントフォレシス適用中に結膜の TEER は低下し、適用後には適用前の約 70%まで回復した。この結果は以前に観察された結果 (unpublished data) とよく一致しており、イオントフォレシスの適用が重篤な粘膜障害 (integrity の変化) を誘発しないことを示唆している。

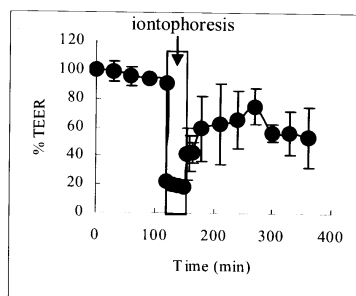


Fig. 2 Effect of iontophoresis at 0.85 mA/cm² on the conjunctival TEER.

2. FD-4 の結膜透過に対するイオントフォレシスの効果

我々の以前の検討において、粘膜側を陽極としてイオントフォレシスを適用したとき、電気浸透流の効果により D-マンニトールの結膜透過性が著しく増大することが観察された (unpublished data)。このことは、イオントフォレシスが溶液中で電荷をもたない化合物の透過促進に対しても有用であることを示唆している。一方、DSF を可溶化し安定性の向上をはかるために、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを用いた製剤化が検討されている。8) ヒドロキシβ-シクロデキストリンは溶液中で電荷をもたない比較的高分子量の化合物であるが、このような化合物の結膜におけるイオントフォレシスの効果は十分に特徴づけられていない。そこで、モデル高分子化合物として FITC ラベルしたデキストラン (平均分子量 4,400) を用い、結膜透過に対するイオントフォレシスの効果を試験した。

Fig. 3 は、粘膜側を陽極 (●, anodal iontophoresis) 及び陰極 (○, cathodal iontophoresis) としたときの FD-4 の結膜透過速度の経時変化を示している。Anodal iontophoresis を適用したとき、FD-4 の透過速度はイオントフォレシス適用時にのみ増大し、適用後には低下した。一方、cathodal iontophoresis を適用したときには透過速度の増大は認められるものの、粘膜側を陽極としたときとは明らかに異なる透過増大パターンを示した。これは、生体膜表面は生理的条件下で負電荷をもつため、12) 電流適用時に陽極から陰極方向に生じる電気浸透流により粘膜側に適用したデキストランが漿膜側に運ばれたものと考えられた。以上の結果から、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンのような包接化合物を用いた場合にも、イオントフォレシスによる薬物送達が可能になるものと考えられた。

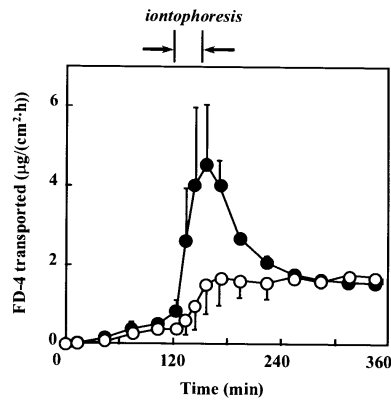


Fig. 3 Time courses of FD-4 fluxes across the conjunctiva induced by anodal (●) or cathodal (○) iontophoresis at 0.85 mA/cm² for 30 min.

3. イオン輸送能を指標とした安全性評価

Fig. 2 から推測されるように、イオントフォレシスの適用は結膜の integrity、すなわち膜構造には明らかな障害を与えないものと考えられる。しかしながら、上皮粘膜は生きた細胞層からなり、イオントフォレシス適用により機能的な障害を受けることも考えられる。そこで、結膜において能動的イオン輸送を modulate することが明らかとなっている化合物を添加し、その活性 (Isc) をモニターすることにより結膜の生理機能に対するイオントフォレシスの影響を評価した。

家兔結膜は、baselineで約 15 μ A/cm² (粘膜側が陰性) のIscを示し、この約 20%は粘膜側からの Na⁺イオンの吸収、80%は粘膜側への Cl⁻イオンの分泌により賄われている。10) 家兔結膜には Cl⁻イオンを粘膜側へ分泌するチャンネルとして PKA 感受性、PKC 感受性、および Ca²⁺ 感受性 Cl⁻チャンネルが存在していることが知られ、¹³⁾ これらチャンネルの modulator を添加することにより Cl⁻イオンの分泌が増大する。さらに、結膜の粘膜側には細胞膜には P2Y₂ 受容体が存在することが明らかとなっており、細胞外の ATP や UTP の存在により PKC および Ca²⁺ 感受性 Cl⁻分泌が増大することも知られている。¹⁴⁾ そこで、これら能動的な Cl⁻分泌の活性化能を指標として、イオントフォレシスがこれらの機能に影響するかどうかについて検討した。PKA 感受性 Cl⁻チャンネルに対する modulator として 8Br-cAMP および forskolin、PKC および Ca²⁺ 感受性 Cl⁻チャンネルに対する modulator として ATP を用いた。

Fig. 4 は、0.85 mA/cm² の定電流で 30 分間、anodal iontophoresis または cathodal iontophoresis 適用後に各 modulator を添加したときの Δ Isc を比較したものである。いずれの場合にもコントロールと有意差は認められず、電流適用後も Cl⁻分泌能は正常なレベルに保たれているものと考えられた。これらの結果から、0.85 mA/cm²、30 分までの適用電流は結膜の生理機能に対して明らかな影響を与えず、イオントフォレシスは眼組織に対する非侵襲的な薬物投与方法として有用であると思われた。

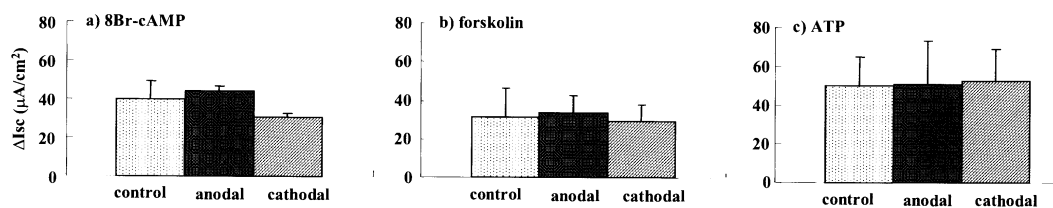


Fig. 4 Comparison of ΔI_{sc} induced by 0.5 mM 8Br-cAMP, 1.5 mM forskolin, and 0.5 mM ATP. In the iontophoresis experiments, constant current at 0.85 mA/cm² was applied for 30 min.

【まとめ】

本研究の結果から、イオントフォレシスにより抗白内障薬ジスルフィラムの結膜透過性を増大することが可能であることが明らかとなった。イオントフォレシス適用後の TEER および種々 modulator により誘導される I_{sc} の比較から、イオントフォレシスは結膜に対して明らかな障害を引き起こさないものと考えられ、眼組織に対する非侵襲的な薬物送達法として有用であることが示唆された。さらに、デキストランのような生理的条件下で電荷をもたない比較的高分子量の化合物の透過促進法としても有用であることが明らかとなり、その応用範囲は広いものと考えられた。しかしながら、ジスルフィラムのような、膜透過過程で代謝を受ける薬物については、親薬物と代謝物の透過過程についてさらに詳細な検討を加えることが必要であるものと考えられる。

【参考文献】

1. Acheampong, A.A. *et al.*, Drug Metab Dispos. 30:421-429 (2002).
2. Ikeda, H. *et al.*, Jpn.J.Hosp.Pharm. 24:596-600 (1998).
3. Yoshizumi, M.O. *et al.*, Am.J.Ophthalmol. 122:86-90 (1996).
4. Grossman, R.E. *et al.*, Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 31:909-916 (1990).
5. Rootman, D.S. *et al.*, Arch.Ophthalmol. 106:262-265 (1988).
6. Hobden, J.A. *et al.*, Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 31:1940-1944 (1990).
7. Ito, Y. *et al.*, Curr.Eye Res. 18:292-299 (1999).
8. 伊藤吉将ほか、日本薬学会 121 年会要旨集 3, p. 125 (2001).
9. Ito, Y. *et al.*, Biol.Pharm.Bull. 23:327-333 (2000).
10. Kompella, U.B. *et al.*, Curr.Eye Res. 12:1041-1048 (1993).
11. Nabekura, T. *et al.*, Biol.Pharm.Bull. 23:616-620 (2000).
12. Riviere, J.E. and Heit, M.C., Pharm.Res. 14, 687-697 (1997).

13. Shiue, M.H.I. *et al.*, *Exp.Eye Res.* 66:275-282 (1998).
14. Hosoya, K. *et al.*, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 291:53-59 (1999).