

令和元年6月11日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08432

研究課題名(和文) 眼疾患患者の微量な眼房水のミクロ環境を推察するための簡易型診断法の開発

研究課題名(英文) Development of simple type pharmaceutical diagnostics method to speculate micro environment in aqueous humor of eye disease patient

研究代表者

高村 徳人 (Takamura, Norito)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：20369169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は眼疾患患者の眼房水中アルブミン結合能の差異とその要因(眼房水中の微環境)を簡便かつ迅速に推察するための簡易型診断法の開発を目指した。この診断法は眼房水中アルブミンを一律の濃度に調製したサンプルにサイト と のサイトプローブを添加しそれぞれのサイトプローブの遊離率を比較することで、眼房水中のミクロ環境を推察できる方法である。さらに、本診断法はアルブミン結合に大きな影響を与える長鎖脂肪酸の濃度を推測できる可能性が高い。また、眼房水におけるジクロフェナクのアルブミンへの結合が長鎖脂肪酸によりサイト より に移行することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本診断法を用いれば、アルブミン結合性の高い点眼薬物の眼内での動態および薬理効果に関して有益な情報をもたらすため、眼疾患患者に対し最適な点眼薬の投与設計の施行に大いに役立つ可能性が高い。さらに、眼房水中アルブミンの微環境を迅速に把握できるため、眼疾患患者の病態の重症度を把握する方法にも利用できる可能性が高い。このことは、眼科領域への直接的な医療貢献はもとよりチーム医療における薬剤師技術を向上させる一助となるため臨床薬学教育の発展や職能拡大に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed at the development of the pharmaceutical diagnostics method to speculate the difference of the albumin binding capability and the factor (micro environment in the aqueous humor) in eye disease patient's aqueous humor handily and promptly. This diagnostics adds the site probe of site and to the sample that prepares the albumin for a uniform concentration in the aqueous humor and can compare the free fractions of each site probe. As a result, micro environment in the aqueous humor can be speculated. In addition, the diagnostic method is likely to be able to estimate the concentration of long-chain fatty acids that greatly influence albumin binding.

Moreover, it was clear that the bind to the albumin of the diclofenac in the aqueous humor shifted from site to by the long-chain fatty acids.

研究分野：アルブミンや 1-酸性糖タンパク質の結合サイトに関する研究

キーワード：眼房水中アルブミン タンパク結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬理作用部位に薬物と強く結合するアルブミンが存在する場合、薬効は著しく低下する。そのような薬理活性部位にアルブミンと薬物が共存している部位を調べた結果、眼房水中にアルブミンが含まれていることが分かり、そこにアルブミン結合性の高い薬物が点眼された場合の結合について興味をもった。そこを解明するには眼房水中のアルブミンの各々の結合サイトに影響を与える様々な内因性物質の定量が必要となった。しかしながら、これまでの検討より、眼房水の採取量が極めて微量なため、個々のサンプルについてアルブミン結合に関与する内因性物質を数種測定することも難しいことが分かった。特に、アルブミン結合に大きな影響を及ぼすと考えていた脂肪酸の測定が困難であったため、この脂肪酸濃度をサイトプローブの阻害率より簡易に推察する方法(簡易型診断法)の開発を進めることとした。本診断法は眼房水中アルブミンを一律の濃度に調製した個々のサンプルにサイト と のサイトプローブを添加するため、それぞれのサイトプローブの遊離率を比較することで、個々の眼房水中のミクロ環境の差異を推察できる可能性が高いというのも魅力的である。

2. 研究の目的

眼房水中には種々の薬物や内因性物質と結合するアルブミンが多く含まれている。眼房水中アルブミンの各結合サイトの結合能の差異は、眼疾患患者の点眼薬の薬効や眼病態の重症度に大きく関与しているものと考えられる。その解明のために平成 25-27 年度の科研費で、眼疾患患者の眼房水中アルブミン結合能の差異とその要因を推察するための診断法開発に着手しほぼ完成させた。しかし、この診断法には大きな問題があった。それは、患者からの眼房水採取は予想以上に微量であり、結合に関与する重要な内因性物質の測定がほとんどできなかった。しかも測定法が複雑で時間もかかった。しかし、眼房水中アルブミンの結合性に大きく関与しているものは主に脂肪酸であることを突き止めた。その解決のために、我々は眼房水中の脂肪酸濃度を測定しなくても推察できる実用性の高い診断法を新たに考案したので、それを構築し検証することとした。実験試料として人眼房水は少量で貴重であるためウサギ眼房水も用いて行い、同時に、人とウサギのアルブミン結合における種差も含めて検討することとした。さらに、人眼房水はジクロフェナクが点眼されたものを使用するため、ジクロフェナクの効果的な投与方法に関しても検討する。

3. 研究の方法

(1) 簡易型眼房水中診断法の構築のための人とウサギのアルブミンの種差の検討(疑似眼房水)

人とウサギのアルブミンに利用できる最適なサイトプローブ、アルブミン結合性の高い点眼薬の検索・選定のために、我々の経験を含め様々なデータベースや文献等により情報を収集した。

人とウサギのアルブミン末で調製した疑似眼房水への種々の内因性物質の影響を調べるために、人とウサギの純粋なアルブミンを 0.067 M リン酸緩衝液 (pH7.4) で一定濃度に調製した疑似眼房水にサイト特異性プローブを添加する。それに眼房水中の結合に関与する可能性の高い内因性物質(脂肪酸等)をそれぞれ添加し、それらの試料を限外濾過器(VIVACON 500)で限外ろ過し、そのろ液をUHPLC(カラムは高圧用のC18)にて測定し、各結合サイトプローブの遊離率の変動を調べた。

(2) 眼房水中の内因性物質の測定

眼房水中のアルブミン、ブドウ糖および尿素窒素は生化学検査装置ピオリス 24i で迅速に測定を行った。そして、乳酸は乳酸オキシダーゼによる酵素法、アスコルビン酸は HPLC、長鎖脂肪酸は GC-MS で測定を行った。

(3) 簡易型眼房水中診断法の構築のためのウサギ眼房水を用いた検討（ウサギ眼房水）

個々の正常ウサギ眼房水に対する本診断法の妥当性の検証のために正常な個々のウサギ眼房水中の種々の内因性物質の濃度を実際に測定した。その内因性物質の中で結合に大きな影響を及ぼす目的の内因性物質を見出し、次に、一定濃度のアルブミン（1.5 μM）におけるその目的の内因性物質の段階別濃度とサイト あるいは のプローブ遊離率より相関図を作成し、その相関図を利用してプールウサギ眼房水中の目的の内因性物質の濃度を推測する。推測値とプールウサギ眼房水中のその内因性物質の実際値とが近似となるか検証した（長鎖脂肪酸などが対象）。

(4) 人眼房水を用いたジクロフェナク点眼薬の効果的な投与法の検討

本研究は、倫理委員会で承認され、対象患者に対しインフォームドコンセントをおこなった後に実施した。白内障手術開始3時間前、2時間前、1時間前、30分前にジクロフェナク点眼剤を患者に一回一滴点眼した。白内障手術開始後前房より眼房水を採取した。その眼房水は実験に使用するまで-80 °Cで凍結保存した。

眼房水採取患者にはアルブミン結合性の高いジクロフェナク点眼薬が既に一定量投与されているため、個々およびプール人眼房水中のジクロフェナクの総濃度と遊離濃度をUHPLCで測定し結合率を算出した。さらに、プール人眼房水を用いサイト および の阻害薬を添加しジクロフェナクの遊離率より阻害の程度を比較した。

4. 研究成果

(1) 微量な眼房水のマイクロ環境を推察するための簡易型診断法の構築

本診断法の構築のためには人眼房水は極微量であるため本研究を遂行できない。したがって、ウサギ眼房水を使用した。しかしながら、人とウサギのアルブミンには種差があるため、それによるアルブミン結合の差異を検討しておく必要もある。そのために人とウサギのアルブミンに利用できる最適なサイトプローブやアルブミン結合性の高い点眼薬の検索・選定を行った。その結果、サイト プローブとしてフェニルブタゾン、バルサルタン、ワルファリン、一方、サイト プローブとしてジクロフェナク、フルルビプロフェン、スプロフェン等が使用できることが分かった。また、タンパク結合性の高い点眼薬として、ジクロフェナク、プラノプロフェン、プロムフェナク、ネバナックとその代謝体アンフェナクおよびフルルビプロフェン（国外）を対象にできることが分かった。基本的に眼房水は微量であるため、種々のサイトプローブは高圧HPLCで同時定量できることが必要不可欠である。サイトプローブとしてはバルサルタン、フェニルブタゾン、スプロフェン、ジクロフェナクおよびフルルビプロフェンが同時測定できるようになった。それにより、人とウサギの微量な眼房水中におけるアルブミンの種々の結合サイトの結合性の同時モニターが可能となり、一度に多くの内因性物質による結合阻害の情報を得ることができるようになった。ただし、人眼房水のアルブミン濃度はウサギ眼房水濃度の1/2あるいは1/3以下であるため、5種同時にサイトプローブを添加するとサイトプローブ同士で相互作用を引き起こしてしまうため、注意が必要である。

眼房水中の内因性物質については、血清中でアルブミン結合に関与していると分かっているものと既に眼房水中に多量に含まれると報告されているものとを測定対象とした。その結果、アスコルビン酸、乳酸、ブドウ糖（グルコース）、尿素、長鎖脂肪酸の存在が明らかになったため、個々のウサギ眼房水を混合し調製したプールウサギ眼房水を対象にそれらの内因性物質を測定した。その結果を示す（表1）。

表1 プールウサギ眼房水中の内因性物質の濃度

尿素窒素	5776 μM
アスコルビン酸	284 μM
乳酸	9103 μM
ブドウ糖	7497 μM
長鎖脂肪酸	13.09 μM

ただし、アスコルビン酸の濃度は保存期間が長くなるにつれ低下することが分かった。

上記の内因性物質によるサイトプローブの阻害実験より、表1の内因性物質の濃度で乳酸と長鎖脂肪酸がアルブミンの結合サイトを阻害することが分かった。ただし、眼房水において乳酸はアルブミン濃度(7.23 μM)に対し約1200倍以上も存在するため乳酸によるアルブミンの結合サイトへの影響は一定であると考えられ、個体間の差につながらないと判断した。既に、眼房水中アルブミンの個体間の差は大きいと従前の研究で判明していたため、我々はアルブミンの結合サイトの結合性の差異はアルブミンと長鎖脂肪酸の割合でほぼ決定されるという仮説を立てた。そこで、種々の眼房水中のアルブミン濃度を0.067Mリン酸緩衝液(pH7.4)で一定濃度に調製し(疑似眼房水)、それぞれのサイトプローブの阻害率から、長鎖脂肪酸濃度を推定することを考えた。アルブミン濃度を1.5 μM に設定し、サイトプローブとしてバルサルタン、フェニルブタゾン、フルルピプロフェン、ジクロフェナク、スプロフェンを用い各々0.3 μM として、それに長鎖脂肪酸であるミリスチン酸を0, 1, 2, 3, 4, 5 μM まで段階的に添加しミリスチン酸0 μM (コントロール)との差を算出した。その値と、AとBのプールのウサギ眼房水中アルブミンを0.067Mリン酸緩衝液(pH7.4)で希釈し1.5 μM にしたものに各種サイトプローブを0.3 μM になるよう添加し、それらの値とコントロールとの差より、AとBのプールのウサギ眼房水中長鎖脂肪酸濃度を推測値として算出したところ(AとBのプールのウサギ眼房水中アルブミンを希釈し1.5 μM をとしているため希釈倍率で戻す)、サイトプローブのバルサルタンよりAは12.32 μM であり、その実測値は13.09 μM となった。Bは8.84 μM であり、その実測値は12.85 μM となった。本法でもサイトプローブとしてバルサルタンを用いることでウサギ眼房水の長鎖脂肪酸値を測定できる可能性は高まった。バルサルタン以外のサイトプローブによる推測値は実測値から大きく外れていた。人眼房水に関しても最適なサイトプローブを選択することで長鎖脂肪酸値を予測できると考えている。今後、これからも検証を続けていく予定である。また、本診断法が内因性物質濃度の推測に利用できない場合も、本診断法におけるAとBのプールウサギ眼房水中アルブミンに対する種々のサイトプローブの遊離率の差異はAとBのプールウサギ眼房水中の何らかの微環境の差異を表していることになる。よって、本診断法を用いれば、アルブミン結合性の高い点眼薬物の眼内での動態および薬理効果に関して有益な情報をもたらすため、眼疾患患者に対し最適な点眼薬の投与設計の施行に大いに役立つ可能性は高い。さらに、眼房水中の微環境を迅速に把握できるため、眼疾患患者の病態の重症度を把握する方法にも利用できるかもしれない。

(2)ジクロフェナク点眼薬の効果的な投与方法

点眼されたジクロフェナクが眼房水中アルブミンに強く結合する場合、十分な効果を発揮できない可能性が高い。これまでに我々は点眼されたジクロフェナクの結合率が80%以上の患者が

存在することを見出した。したがって、そのような患者に対してはジクロフェナク結合を弱め、その遊離形濃度を増加させる必要がある。そこで、我々は、サイト II 薬物であるジクロフェナクの人眼房水中アルブミンへの結合に対する阻害薬の影響を調べることにした。その結果、ジクロフェナクのアルブミン結合への薬物による阻害の程度は同じサイト II 薬物のイブプロフェンでは著しく小さく、サイト I 薬物であるフェニルブタゾンで著しく大きいという想定外の現象が観察された（図 1）。本来、ジクロフェナクはイブプロフェンにより大きく阻害されるはずである。その原因を究明するため種々の内因性物質（アスコルビン酸、乳酸、ブドウ糖、尿素、長鎖脂肪酸）を加え調製した疑似眼房水にジクロフェナクを添加しイブプロフェンとフェニルブタゾンで阻害したところ、長鎖脂肪酸を含んだ疑似眼房水で同様の阻害現象を生じた。これは眼房水中の長鎖脂肪酸がアルブミンの構造を変化させたため、サイト I にもジクロフェナクが結合できるようになったものと考えられた。この現象は長鎖脂肪酸濃度が上昇するほど顕著となることから、眼房水中に長鎖脂肪酸が多く含まれる患者ほどジクロフェナクの結合がサイト II から I へ移行（サイト - サイト移行反応）しやすくなるものと考えられた。ただし、この現象は長鎖脂肪酸だけが引き起こしているかどうかは不明である。

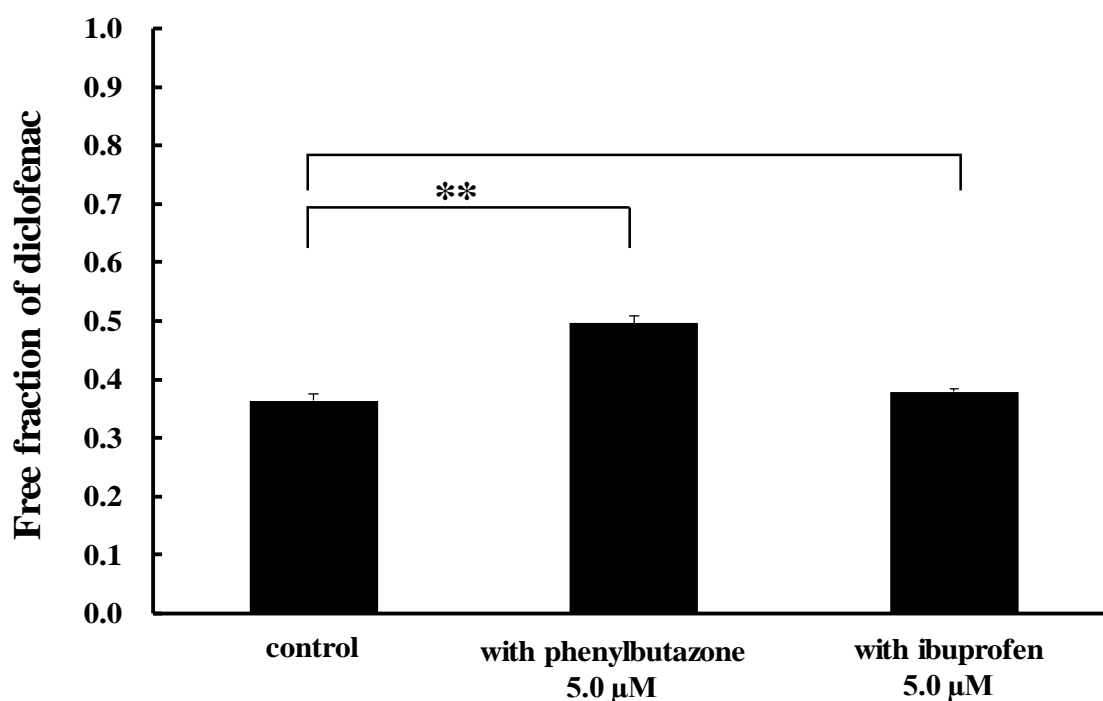


図 1. ジクロフェナクのプール人眼房水中アルブミンへの結合に及ぼすサイト II 薬物フェニルブタゾンとサイト I 薬物イブプロフェンの影響

The following concentrations were used: [pool human aqueous humor] (as albumin), 2.66 μM; [diclofenac], 0.47 μM; [phenylbutazone], 5 μM; [ibuprofen], 5.0 μM. Each column is the mean of three experiments ± S.D.. ** $P < 0.01$ significantly different from the control.

我々は本診断法で微量の眼房水より簡便に長鎖脂肪酸濃度を推定できれば、ジクロフェナク点眼薬およびその他のアルブミン結合の強い点眼薬の効果的な投与法を構築できると考えている。

〔学会発表〕(計 4 件)

高村徳人，石井紗綾，尾崎峯生，徳永仁，緒方賢次，瀬戸口奈央，大崎卓，池田龍二，有森和彦：眼房水中の微環境の差異を考慮したジクロフェナク点眼薬の効果的な投与方法，日本薬学会第 139 年会，2019.3.20-23，千葉．

高村徳人，石井紗綾，尾崎峯生，徳永仁，緒方賢次，瀬戸口奈央，大崎卓，池田龍二，有森和彦：ジクロフェナク点眼薬の眼房水中アルブミンへの結合および併用薬と脂肪酸の阻害効果，第 50 回日本薬剤師会学術大会，2017.10.8-9，東京．

高村徳人，石井紗綾，尾崎峯生，徳永仁，緒方賢次，瀬戸口奈央，大崎卓，池田龍二，有森和彦：ジクロフェナク点眼薬の効果的な投与方法とそのメカニズム，第 78 回九州山口薬学大会，2017.9.17-18，宮崎．

高村徳人，石井紗綾，尾崎峯生，大崎卓，徳永仁，緒方賢次，瀬戸口奈央，有森和彦：白内障患者の眼房水中アルブミンへのジクロフェナク結合とタンパク結合阻害を利用した投与方法とそのメカニズム，日本薬学会第 137 年会，2017.3.24-27，仙台．

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：徳永 仁

ローマ字氏名：TOKUNAGA, Jin

所属研究機関名：九州保健福祉大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60369171

研究分担者氏名：緒方 賢次

ローマ字氏名：OGATA Kenji

所属研究機関名：九州保健福祉大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90509580

(2)研究協力者

研究協力者氏名：瀬戸口 奈央

ローマ字氏名：SETOGUCHI Nao