

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460238

研究課題名(和文) 眼疾患患者の眼房水中の微環境を推察するための診断法の開発

研究課題名(英文) Development of 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) 2,700,000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薬学的診断法の開発を目指した。さらに、眼房水中におけるアルブミンに結合する点眼薬を他の阻害物質で阻害する投与方法も検討した。眼房水中に含まれる主な内因性物質の影響を最適なサイトおよびプローブを用い検討した結果、アルブミンのサイトと の阻害の程度は、眼房水中のアルブミン濃度と遊離脂肪酸濃度との割合で、推測可能であることが判明した。また、眼房水におけるアルブミンサイト薬物(ジクロフェナク点眼薬)への臨床での結合阻害剤としては、脂肪酸およびNSAIDの利用の可能性が高いものと考えられた。

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. In addition, the inhibit administration method also examined the instillation that bound to the albumin in the aqueous humor by other inhibitors. As a result of examining influence of the main endogenous substance contained in aqueous humor by using best site and probe, it turned out the level of the inhibition of site and of the albumin was to guess by the ratio between the albumin concentration and the free fatty acid concentration in the aqueous humor. Moreover, it was considered that the possibility of the use of the fatty acid and NSAID was high as a bind inhibitor to albumin site drug (diclofenac instillation) in the aqueous humor in clinical.

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 ジクロフェナク点眼薬

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群の患者は腎尿細管中に多量のアルブミンが漏れ出るため、薬理作用部位が尿細管中にある薬物で、特にアルブミン結合性の高い利尿薬は利尿耐性が生じることが報告されている。このように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が他にないかを調べた結果、眼房水中にアルブミンが多く含まれていることが分かり、そこに点眼された薬物が存在すれば同様の環境となるに違いない。したがって、採取した眼房水より眼房水中のアルブミン結合性の高い点眼薬物の動態を推察するための眼房水診断法の開発が必要である。特に、眼疾患患者に対し、アルブミン結合性の高い点眼薬を添加した場合の薬効の差異を検討するための診断法となる。さらに、本診断結果は眼疾患患者の病態の重症度の分類に利用でき、さらに、患者を追跡することで疾患の進行度や発病の予測にも利用できる可能性が高いと考えられる。このような眼科領域の研究は、超高齢化社会を迎え重度の眼疾患が急増している現在において重要な位置にあると確信する。

2. 研究の目的

眼房水中には種々の薬物と結合するアルブミンが多く含まれている。特に、眼房水中アルブミンと強く結合した薬物は、眼内で効果を発現できずにシュレム管(眼内排出口)より全身の血液中に排出される。薬物と眼房水中アルブミンの結合能の差異は、眼疾患患者の重症度や個体差による眼房水中アルブミンの差異が大きく関与しているものと考えられる。したがって、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診断法の開発を目指した。さらに、その診断法を用い眼房水中アルブミンの薬物結合阻害を利用した点眼薬の投与方法に関する基礎的検討も行い効果的な点眼薬の投与方法を考案することとした。

3. 研究の方法

(1)各種サイトプローブを用いた簡便な眼房水中診断法の開発

眼房水中アルブミンの結合サイトを最適にモニターできる可能性の高いサイトプローブおよび眼房水中組成の検索・選定は、様々なデータベースや文献等より情報を収集した。

疑似眼房水中アルブミン(本研究では fatty acid free アルブミン末や血清を pH7.4、0.067M リン酸緩衝液で希釈して調製している)に対する種々のサイトプローブの結合性は、限外濾過器として MINICENT-10(東ソー社製)を使用し、各種サイトプローブを添加

した疑似眼房水を限外濾過器に充填し、25、3000rpmで10分間遠心分離した後、それらの液を一定量採取し(ろ液中に種々の遊離サイトプローブが存在する)、島津製の高圧液体クロマトグラフィー(UHPLC)で測定を様々な移動相を調製し、簡便で迅速となるよう工夫し微量同時定量法(複数のサイトプローブを微量のサンプルよりUHPLCで一度に測定可能とする方法)となるよう行った(カラムは高圧用のC18)。また、眼房水中の微量アルブミンの定量は測定装置ピオリス24i(試薬:サイアスALB-M、関東化学)を用いサンプル0.1mlで行った。遊離脂肪酸の微量定量についてはピオリス24iを用いる以外に様々な方法を検討中である。本測定法で以下の定量を行った。眼疾患患者の眼房水にはグロブリン等のアルブミン以外のタンパク質が増加する場合があるとの報告がなされていることより、fatty acid free アルブミンにグロブリンや γ -酸性糖タンパク質(AGP)を加え濃度比率を変えた種々の疑似眼房水を調製し、それに各結合サイトプローブを一定量添加し遊離濃度を測定し結合能を算出した。さらにその疑似眼房水に各種脂肪酸を添加し、その影響も各結合サイトプローブの変動より算出した。加えて、眼房水中にはアスコルビン酸、ブドウ糖、乳酸が多量に含まれているため、それらの影響も各種サイトプローブを用い同様の測定法で行った。また、個々の患者眼房水を混ぜてプール眼房水を調製し、様々な疑似眼房水との結合能の比較を行った。

(2)ジクロフェナク点眼を行った白内障患者の房水を用いたサイト結合阻害の効果的な投与方法における基礎的検討

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。プール人眼房水の調製は眼房水量の $150\mu\text{L}$ 以下の患者サンプルを混ぜてプール眼房水を作製した。そのプール眼房水中のアルブミン濃度は $1.55\mu\text{M}$ であった。模擬眼房水の調製はアルブミンを 0.067M リン酸緩衝液(pH 7.4)で溶解し $1.55\mu\text{M}$ になるよう調製した。模擬眼房水のアルブミン濃度はここで使用するプール眼房水のアルブミン濃度と同じにした。

各患者の眼房水中ジクロフェナク総濃度の定量:検量線試料は蒸留水 $30\mu\text{L}$ に対しジクロフェナクを添加し 0.3 、 0.6 、 $0.9\mu\text{M}$ になるように調製したものを試料とした。その検量線と患者眼房水それぞれ $30\mu\text{L}$ の試料に対し、 3N 塩酸を $200\mu\text{L}$ 、シクロヘキサンを 2.5mL 添加した。そして、internal standard (IS)である hexyl 4-hydroxybenzoate の濃

度が $0.5\mu\text{M}$ になるように添加した。これを 10 分間振とうして抽出し、2970 g で 10 分間遠心分離した。有機層の上清を 2mL 採取して、それを減圧吸引し乾固させた。次に、この(乾固させた)試料を移動相で溶解し UHPLC 用の試料とした。

各患者の眼房水中ジクロフェナク遊離濃度の定量：検量線作製は一定量の 0.067M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に対しジクロフェナクの最終濃度が 0.15 、 0.3 、 $0.45\mu\text{M}$ になるように添加して調製したものを UHPLC 用の試料とした。眼房水は $55\mu\text{L}$ を MINICENT-10 (東ソー社製) に入れ遠心分離 (2270 g 10 分間遠心分離) 後、得られた濾液を UHPLC 用の試料とした。

4. 研究成果

(1) 各種サイトプローブを用いた簡便な眼房水中診断法の開発

本診断法に最適な各種サイトプローブは、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、ワルファリン等であり、一方、サイト プローブとしてはジクロフェナク、ケトプロフェン、スプロフェン、ジアゼパム、フルルピプロフェン等であった。また、眼房水中組成としては、アルブミンの他にグロブリンや遊離脂肪酸、そして多量に含まれるアスコルビン酸、ブドウ糖、乳酸などが存在することが分かった。ただし、眼房水中に存在するかは不明であったが薬物結合に重要な役割を果たしているアルブミン以外のタンパク質として AGP も実験に用いることとした。

眼疾患患者の眼房水にはグロブリン等のアルブミン以外のタンパク質が増加する場合があるとの報告がなされていることより、アルブミン、グロブリンや AGP の濃度比率を変えた種々の眼房水を調製し、サイト および の結合能を調べた結果、他のグロブリンや AGP 濃度の影響は受けなかった。さらにその疑似眼房水に各種脂肪酸を添加した結果、サイト の結合能は増加あるいは増加傾向であり、一方サイト の結合能は著しく減少した。ただし、脂肪酸の種類でサイト とへの影響の程度は異なることが判明した。

眼房水中アルブミンの各結合サイトへの阻害は、眼房水中に多量に含まれるアスコルビン酸、ブドウ糖、乳酸による影響はかなり小さく、遊離脂肪酸 (遊離脂肪酸はアスコルビン酸、ブドウ糖、乳酸の濃度に比べかなり眼房水中濃度は低い) による影響が大きいことが判明した (特にアルブミンのサイト)。したがって、眼房水中のアルブミン濃度と遊離脂肪酸濃度の割合だけで、アルブミンのサイト と 阻害の程度 (特にアルブミンのサイト) が推測できることが判明した。人眼

房水が十分に手に入らないため明言できないが、人眼房水でも類似の傾向にあると推察された。この結果をもとに、簡便な眼房水中診断法の開発を行うこととした。

(2) ジクロフェナク点眼を行った白内障患者の房水を用いたサイト 結合阻害の効果的な投与方法における基礎的検討

個々の眼房水中アルブミンへのジクロフェナク結合：これまでジクロフェナクの眼房水中アルブミンへの結合に関する報告はない。そこで、ジクロフェナクの眼房水中アルブミンに対する結合を評価するために、採取した 31 検体の患者個々の眼房水について、ジクロフェナク総濃度、ジクロフェナク遊離形濃度を測定した。それらのデータによりジクロフェナクのアルブミンへの結合率を算出した (図 1)。ジクロフェナクの眼房水中アルブミン結合率は、最高が 0.995 (99.5%) で最低が 0.085 (8.5%) であった。ジクロフェナクの結合率は個体差が著しく大きいことが示唆された。ここで、眼房水中のアルブミン とジクロフェナクの濃度について示すと、アルブミンの最高濃度は $12.8\mu\text{M}$ であり、最低濃度は $0.71\mu\text{M}$ であった。そして、ジクロフェナクの最高濃度は $0.86\mu\text{M}$ であり、最低濃度は $0.08\mu\text{M}$ であった。アルブミンおよびジクロフェナク濃度には、それぞれ大きな個体差があった。ただし、個々の患者房水においてアルブミン濃度はジクロフェナク濃度より常に高かった。

ジクロフェナクのプール眼房水中アルブミンへの結合に及ぼすイブプロフェン (サイト) の影響：イブプロフェンが疑似眼房水を用いた実験でジクロフェナクのアルブミンへの結合を阻害できることが示唆されたので、プール眼房水を用いて実験を行った。ジクロフェナクのプール眼房水中アルブミンへの結合に及ぼすサイト 結合阻害薬であるイブプロフェンの影響を検討するために、我々はジクロフェナク 遊離形濃度を測定しジクロフェナク 遊離率を算出した。その結果、ジクロフェナク遊離率はイブプロフェンの結合阻害による有意な上昇は見られなかった。(図 2)。(ただし、イブプロフェンの阻害によりジクロフェナク遊離率はわずかに増加傾向を示した)。本実験で用いたプール眼房水のジクロフェナク結合率は 0.4 (40.0%) 程度と低かったため、有意な結合阻害が生じなかったものと考えられた。

(1)、(2)より、眼房水中の各種アルブミンサイトの結合能およびその微環境はアルブミン濃度と遊離脂肪酸濃度から推察できる可能性あり、アルブミンサイト 結合への強い点眼薬にはそれを強く阻害できる最適な薬物や脂肪酸を併用点眼できれば効果を増強できるかもしれない。

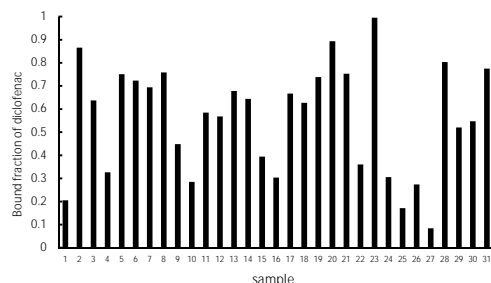


図1 31名の白内障患者の眼房水におけるジクロフェナクの結合

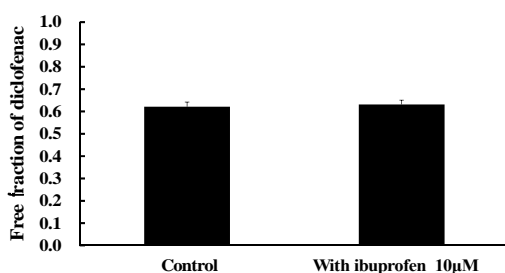


図2 白内障患者のブール眼房水中アルブミンのサイトに結合するジクロフェナクに対するイブプロフェンによる阻害の影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Takashi Osaki, Mineo Ozaki, Norito Takamura, Kenji Ogata, Jin Tokunaga, Nao Setoguchi, Kazuhiko Arimori, Albumin binding of diclofenac and the effect of a site II inhibitor in the aqueous humor of cataract patients with the instillation of diclofenac, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 査読有, 35 (4), 2014, 218-227.

DOI: 10.1002/bdd.1887

[学会発表](計5件)

Saya Ishii, Mineo Ozaki, Takashi Osaki, Norito Takamura, Kenji Ogata, Jin Tokunaga, Nao Setoguchi, Kazuhiko Arimori: Albumin-binding of diclofenac in aqueous humor of cataract patients and development of an administration method utilizing inhibition of protein-binding, Asia-ARVO 2015, 2015.2.16-19, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高村徳人, 大崎卓, 尾崎峯生, 緒方賢次, 徳永仁, 瀬戸口奈央, 石井紗綾, 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法の開発, 第76回九州山口薬学大会,

2014.11.23-24, 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

Takashi Osaki, Mineo Ozaki, Norito Takamura, Kenji Ogata, Kazuhiko Arimori, Influence of fatty acids and site inhibitors on binding behavior of diclofenac to albumin in human aqueous humor, World Ophthalmology Congress 2014, 2014.4.2-6, 帝国ホテル(東京都千代田区)

高村徳人, 大崎卓, 尾崎峯生, 緒方賢次, 徳永仁, 瀬戸口奈央, 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効果的な投与法の開発, 日本薬学会第134年会, 2014.3.28-30, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

⑤大崎卓, 尾崎峯生, 高村徳人, 徳永仁, 緒方賢次, 瀬戸口奈央, 有森和彦, 房水中アルブミンのジクロフェナクとの結合に及ぼす脂肪酸およびサイト阻害薬物の影響 房水中点眼薬の動態に関する研究, 第52回日本白内障学会総会/第28回JSCRS学術総会, 2013.6.27-29, シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県浦安市)

[その他]

ホームページ等

<http://profile.jei.ac.jp:81/public/v2kgrr/jpn/ResearcherInformation/ResearcherInformation.aspx?KYCD=103031>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 徳人(Norito Takamura)
九州保健福祉大学・薬学部・薬学科 教授
研究者番号: 20369169

(2)研究分担者

緒方 賢次(Ogata Kenji)
九州保健福祉大学・薬学部・薬学科 講師
研究者番号: 90509580

徳永仁(Tokunaga Jin)

九州保健福祉大学・薬学部・薬学科 教授
研究者番号: 60369171

(3)研究協力者

瀬戸口 奈央(Setoguchi Nao)
九州保健福祉大学・薬学部・薬学科 助教
研究者番号: 50551305