

# 局所投与によるフルコナゾールの眼内移行と前眼部への影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4542">http://hdl.handle.net/2297/4542</a>

## 局所投与によるフルコナゾールの眼内移行と前眼部への影響

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻光情報伝達学  
(旧講座名：眼科学)  
(主任：河崎一夫教授)

内 山 佳 代

抗真菌剤フルコナゾール (fluconazole, FLCZ) は、角膜真菌症やアカントアメーバ角膜炎の治療に投与され、そのすぐれた治療効果が報告されている。本研究では局所投与による FLCZ の眼内移行と前眼部におよぼす影響について検討した。実験動物には白色ウサギを用いた。0.2% FLCZ を5分ごと1時間にわたり13回点眼した群と30分ごと12時間にわたり25回点眼した群、および0.3 ml を結膜下注射した群の3群に分け、眼各組織内の FLCZ 濃度を高速液体クロマトグラフィーにより経時的に測定した。対照眼には生理食塩水を点眼した。FLCZ 点眼の前眼部におよぼす影響については、スペキュラーマイクロスコピーを用いた角膜上皮および内皮細胞密度、角膜厚、眼圧、涙液内 lactate dehydrogenase (LDH) 活性および涙液内蛋白濃度を測定することにより検討した。また FLCZ 点眼が角膜上皮創傷治癒におよぼす影響については、両眼に機械的角膜上皮剥離を行い、0.2% FLCZ 点眼群と対照群における上皮創傷治癒速度を比較することにより検討した。1時間頻回点眼群における FLCZ 濃度は、最終点眼後15～30分で、結膜、角膜、前房水、虹彩毛様体、網膜および強膜において最高値となった。12時間点眼群では、最終点眼から1時間後に結膜、角膜、前房水および水晶体前皮質に FLCZ が検出された。結膜下注射群では、前眼部組織に加えて硝子体、網膜、脈絡膜および強膜においても FLCZ が検出された。上記のいずれの投与方法でも FLCZ 濃度は、結膜、角膜および前房水においては *Candida albicans* の99% 発育阻止濃度を凌駕した。角膜上皮および内皮細胞密度、角膜厚、眼圧、涙液内 LDH 活性および蛋白濃度は、FLCZ 点眼によって明らかな影響を受けなかった。角膜上皮創傷治癒速度は、FLCZ 点眼群とコントロール群とのあいだに差はみられなかった。以上より、FLCZ は局所投与により前眼部組織内に良好に移行し副作用も示さないことから、角膜真菌症やアカントアメーバ角膜炎などの治療に有用かつ安全と考えられる。

**Key words** fluconazole, instillation, subconjunctival injection, intraocular penetration, corneal toxicity

トリアゾール系抗真菌剤のフルコナゾール (fluconazole, FLCZ) は、*Candida* 属に強い抗菌力を持ち、血中半減期が長く、全身的副作用が少なく、静脈内注射および経口投与の両者が可能であるなどの利点をもっている<sup>1)2)</sup>。さらに FLCZ は中枢神経系を含む全身の各組織によく移行し<sup>3)~5)</sup>、眼組織への移行も良好<sup>6)~8)</sup>なことから、FLCZ は真菌性眼内炎や角膜真菌症の治療に全身的に投与され、そのすぐれた治療効果が報告されている<sup>9)~20)</sup>。また FLCZ は角膜真菌症などの前眼部真菌感染症に対しては全身投与に加えて眼局所にも投与され、良好な治療成績を収めている<sup>21)~23)</sup>。局所投与された FLCZ の眼内移行については、点眼後の角膜および前房水への移行がいくつか報告されている<sup>24)~26)</sup>が、眼各組織への移行やその経時変化については明らかにされていない。そこで、角膜真菌症などの前眼部の真菌性病変に対する FLCZ 局所投与の有用性を調べる目的で、点眼および結膜下注射による FLCZ の眼内移行を検討した。FLCZ 局所投与に際しては、静脈内注射用の注射液が原液のまま点眼や結膜下注射として用いられている。FLCZ の全身的副作用は少ないといわれている<sup>27)</sup>が、このように眼局所に投与した際の眼に対する安全性については明らかにされていない。そこで

FLCZ 点眼の前眼部におよぼす影響についても検討した。さらに臨床的に FLCZ の局所投与を要する症例には角膜潰瘍や角膜びらんなどの角膜上皮障害が存在していることが多く、このような病的状態の角膜に対する FLCZ 点眼の影響を検討することも有用と考えられる。そこで FLCZ 点眼が角膜上皮創傷治癒におよぼす影響についても検討を加えた。

#### 対象および方法

##### I. 対 象

実験動物として、体重2～3 kg の白色ウサギ34匹を使用した。投与薬としては0.2% FLCZ 液 (ジフルカン<sup>®</sup>注射液0.2%, ファイザー製薬, 東京) を用いた。

##### II. 実験方法

###### 1. 1時間頻回点眼による経時的眼内移行

白色ウサギ12匹24眼を用いた。両眼に0.2% FLCZ 各50 μl を5分ごとに13回 (1時間) にわたり点眼した。点眼終了15分、30分、1, 2, 4 および8時間後に、塩酸ケタミン (ケタラール<sup>®</sup>50, 三共, 東京) とキシラジン塩酸塩 (セラクター<sup>®</sup>2% 注射液, バイエルジャパン, 東京) の7:1の混合液0.5～1.0

平成13年5月28日受付, 平成13年11月30日受理

Abbreviations : FLCZ, fluconazole; HPLC, high performance liquid chromatography; IC<sub>99</sub>, 99% inhibitory concentration; LDH, lactate dehydrogenase

ml/kgの筋肉内注射により全身麻酔を施した後、眼球結膜を採取し、ついで眼球を摘出した。その直後に心腔内より採血し、血清を遠心分離した。摘出した眼球より前房水を吸引採取した後、実体顕微鏡下で眼球を角膜、虹彩・毛様体、水晶体、硝子体、神経網膜、網膜色素上皮を含む脈絡膜、強膜および視神経の各組織に分割した。角膜をさらに直径7 mmのトレパンで打ち抜き、中央部と周辺部に分けた。また水晶体を-20℃で凍結した後に、Müllerら<sup>28)</sup>の方法に準じて直径8 mmのトレパンで赤道部と中央部に分割し、さらに中央部を前皮質部、核部、後皮質部に分割した。各検体を-80℃にて凍結保存し、FLCZ濃度測定に供した。

## 2. 結膜下注射による経時的眼内移行

白色ウサギ12匹24眼を用いた。0.2% FLCZ 0.3 mlを両眼の上耳側結膜下にそれぞれ注射した。注射終了1, 2, 4, 8および12時間後に注射部位である上耳側結膜と反対側の下鼻側結膜をそれぞれ採取し、ついで実験1と同様に角膜(中央部および周辺部)、前房水、虹彩・毛様体、水晶体(赤道部、前皮質部、核部および後皮質部)、硝子体、神経網膜、網膜色素上皮を含む脈絡膜、強膜、視神経および血清を採取した。各検体を-80℃にて凍結保存し、FLCZ濃度測定に供した。

## 3. 12時間点眼による眼内移行および安全性

白色ウサギ6匹を用いた。右眼に0.2% FLCZ、左眼に生理食塩水各50 μlを30分ごとに25回(12時間)にわたり点眼した。

### 1) 眼内移行

点眼終了1時間後に実験1と同様に結膜を採取した後、角膜(中央部および周辺部)、前房水、虹彩・毛様体、水晶体(赤道部、前皮質部、核部および後皮質部)、硝子体、神経網膜、網膜色素上皮を含む脈絡膜、強膜、視神経および血清を採取した。各検体を-80℃にて凍結保存し、FLCZ濃度測定に供した。

### 2) 安全性

点眼前および最終点眼より1時間後に、塩酸ケタミン(ケタラル<sup>®</sup>50, 三共)とキシラジン塩酸塩(セラクター<sup>®</sup>2%注射液, バイエルジャパン)の7:1の混合液0.5~1.0 ml/kgの筋肉内注射により全身麻酔を施し、下記の検査を行った。

まず、5 μl用ガラス毛细管(microcaps<sup>®</sup>, Drummond, Broomall, USA)を用い、涙液メニスカスより涙液約3 μlを採取した。採取した涙液を52 mMのリン酸緩衝液(pH 7.5)で20倍に希釈し、測定用涙液サンプルとして-20℃で保存した。

涙液を採取した後に、フルオレセインナトリウム(Fluor-I-Strip A.T.<sup>®</sup>, Bausch & Lomb Pharmaceuticals, Tampa, USA)を点眼して細隙灯顕微鏡により前眼部の観察を行うとともにフォスリットSC-1200(興和, 東京)を用いて前眼部の写真撮影を行った。ついでSMレンズ(レインボーオプティカル研究所, 東京)を使用してスベキュラーマイクロスコープ(甲南キーラー, 神戸)により角膜上皮および内皮を観察した。眼圧測定にはAlcon Applanation Pneumatograph(日本アルコン, 東京)を用い、また角膜中心部における角膜厚をパキメーターUS-2000(ニデック, 蒲郡)によって測定した。

つぎに、LDH-UVテストワコー(和光純薬工業, 大阪)を用い、Wröblewski La Due法で涙液内lactate dehydrogenase(LDH)濃度を測定した。LDH活性を国際単位(IU/l)で表した。また、プロテインアッセイキット(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)を用いてBradford法で涙液内蛋白濃度を測定した。

2群間の有意差検定にはWilcoxon順位検定を用い、危険率

5%未満を有意差ありと判定した。

## 4. 点眼が角膜上皮創傷治癒におよぼす影響

白色ウサギ4匹を使用した。塩酸ケタミン(ケタラル<sup>®</sup>50, 三共)とキシラジン塩酸塩(セラクター<sup>®</sup>2%注射液, バイエルジャパン)の7:1の混合液0.5~1.0 ml/kgの筋肉内注射により全身麻酔を施した後、0.4%オキシブプロカイン(ペノキシル<sup>®</sup>, 参天製薬, 大阪)により点眼麻酔を行った。角膜中央に直径7 mmのトレパンで浅い円形創を作成した後、角膜実質を障害しないように注意しながらスパーテルを用いて機械的に角膜上皮剥離を行った。両眼の角膜上皮欠損創作成1時間後から1時間おきに53時間にわたり、各ウサギの右眼に0.2% FLCZ、左眼に生理食塩水をそれぞれ1回50 μl点眼した。角膜上皮剥離直後ならびに剥離後3, 6, 9, 12, 15, 19, 23, 27, 33, 39, 47および53時間の各時点において、角膜上皮欠損創の観察を細隙灯顕微鏡で行うとともに前眼部をフルオレセインナトリウム(Fluor-I-Strip A.T.<sup>®</sup>, Bausch & Lomb Pharmaceuticals)にて染色しメディカルニコール(ニコン, 東京)を用いて倍率1.0倍で写真撮影した。35 mmネガフィルムから4.1倍に焼き付けた前眼部写真をカラスキャナー(JX-320M<sup>TM</sup>, シャープ, 大阪)を用いてコンピューター(Macintosh<sup>TM</sup>, Apple Computer, Cupertino, USA)に読み取り、画像処理ソフト(Adobe Photoshop<sup>TM</sup>, Adobe Systems, San Jose, USA)を用いて上皮欠損面積を計算した。また上皮欠損面積の実測値より回帰直線を求め、その傾きから創傷治癒速度を計算した。

2群間の有意差検定にはWilcoxon順位検定を用い、危険率5%未満を有意とした。

## III. FLCZ濃度の測定方法

高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)によりFLCZ濃度を測定した。

### 1. HPLC

カラムにはODS-M(内径4.6 mm, 長さ250 mm, 島津テクノサーチ, 京都)を用い、送液ユニットLC-4A(島津製作所, 京都)、紫外線吸光度検出器SPD-2AS(島津製作所)およびデータ処理装置C-R2AX(島津製作所)を使用した。移動相には0.5%酢酸アンモニウム(pH 3.8)とアセトニトリルの3:1の混合液を用い、流速を毎分1 mlとし、260 nmの吸光度を用いてFLCZ濃度を検出した。カラム温度を室温とした。

### 2. FLCZの抽出

内部標準物質であるフルコナゾール2,4-ジクロル体を80 μg/mlに溶解したメタノール溶液0.5 mlを試験管にとり、窒素気流化で溶媒を留去し、その試験管に各組織とともに0.5 N水酸化ナトリウム3 mlおよび酢酸エチル8 mlを加えて粉碎均等化し、これを10分間遠心分離した。酢酸エチル層に1 N塩酸2 mlを加え振盪、遠心分離を各5分間行った。さらに塩酸層に5 N水酸化ナトリウム1 mlおよび酢酸エチル5 mlを加えて振盪、遠心分離を各5分間行った後、酢酸エチル層を窒素ガスにて濃縮、乾固し、前述の移動層0.5 mlに溶解してHPLCによる濃度測定に用いた。測定限界は、0.1 μg/g or mlであった。

## 成 績

### I. FLCZの眼内移行

#### 1. 1時間頻回点眼による経時的眼内移行

1時間頻回点眼では、点眼終了15分後には結膜、角膜、前房水、虹彩・毛様体、網膜および強膜にFLCZが移行していた。

硝子体および血清中にはわずかに FLCZ の移行がみられた。各組織中の FLCZ 濃度の平均値は最終点眼より 15～30 分後に最高値 (0.4～33.4  $\mu\text{g/g}$  or ml) を示した。角膜、前房水、虹彩・毛様体、網膜および硝子体中の FLCZ 濃度は時間とともに減少し点眼終了 8 時間後には検出限界以下となったが、結膜および強膜では 8 時間後でそれぞれ 3.4 および 4.3  $\mu\text{g/g}$  の FLCZ が検出された (図 1)。

## 2. 結膜下注射による経時的眼内移行

結膜下注射 1 時間後に、結膜、角膜、前房水、虹彩・毛様体、硝子体、網膜、脈絡膜および強膜に FLCZ の移行 (1.8～268.3  $\mu\text{g/g}$  or ml) がみられた。また血清中にも FLCZ のわずかな移行 (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) がみられた。各組織内の FLCZ 濃度は時間と

もに減少し、注射 12 時間後にはすべての眼組織で検出限界以下であった (図 2)。

## 3. 12 時間点眼による眼内移行

FLCZ を点眼した右眼では、点眼終了 1 時間後に結膜 (0.6  $\mu\text{g/g}$ )、角膜 (9.5  $\mu\text{g/g}$ )、前房水 (1.1  $\mu\text{g/ml}$ ) および水晶体前皮質部 (0.3  $\mu\text{g/g}$ ) において FLCZ が検出された (図 3)。対照眼である左眼の眼各組織内の FLCZ 濃度は、血清中の FLCZ 濃度が最も高くなる点眼終了 1 時間後の時点においても、いずれも検出限界以下であった。

## II. FLCZ 点眼 (12 時間) による安全性の検討

### 1. 細隙灯顕微鏡検査

Draize の診断基準<sup>29)</sup>を用いて前眼部における障害を評価し

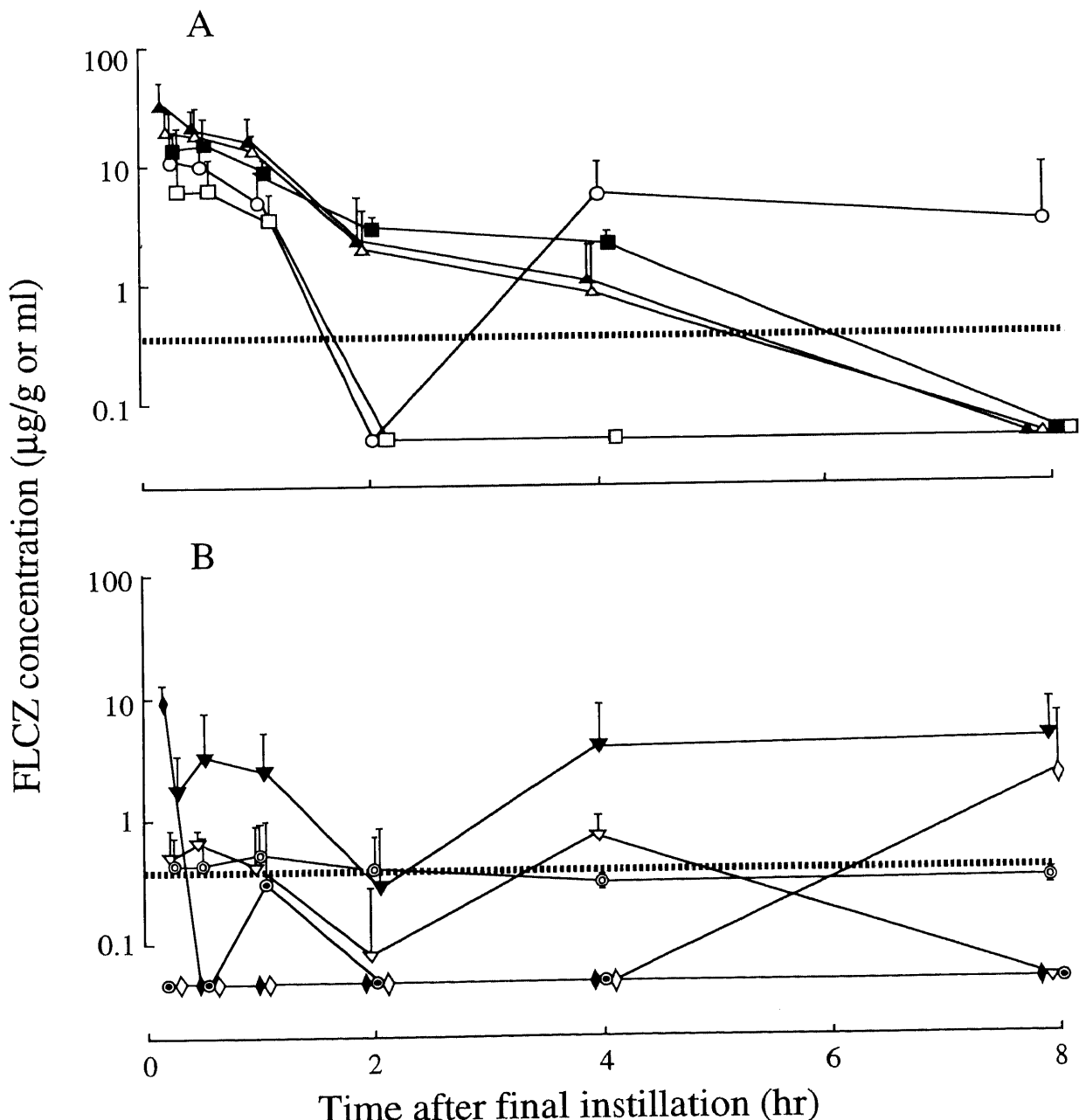


Fig. 1. FLCZ concentrations in anterior ocular tissues (A), posterior ocular tissues and serum (B) after instillations every 5 min for one hour. Each data point shows the  $\bar{x} + \text{SD}$ . ○, conjunctiva; ▲, central cornea; △, peripheral cornea; ■, aqueous humor; □, iris-ciliary body; ●, anterior lens cortex; ▽, vitreous humor; ◆, retina; ◇, choroid; ▼, sclera; ◎, serum. FLCZ was not detectable in the lens (nucleus, posterior cortex and equatorial ring) and the optic nerve. The dotted line indicates  $\text{IC}_{99}$  against *Candida albicans*.

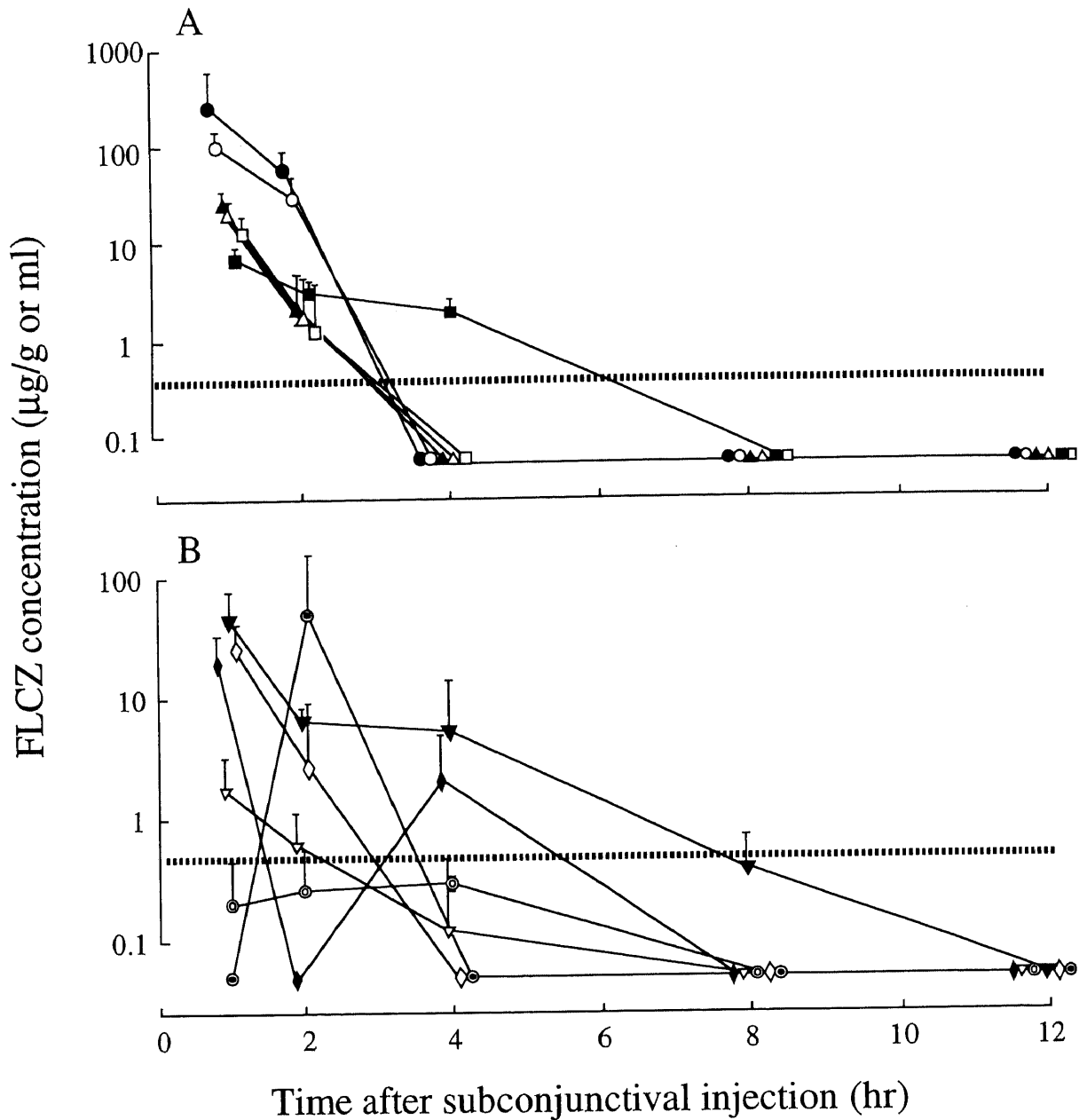


Fig. 2. FLCZ concentrations in anterior ocular tissues (A), posterior ocular tissues and serum (B) after single subconjunctival injection. Each data point shows the  $\bar{x} + SD$ . ●, upper conjunctiva; ○, lower conjunctiva; ▲, central cornea; △, peripheral cornea; ■, aqueous humor; □, iris-ciliary body; ◎, equatorial ring of the lens; ▽, vitreous humor; ◆, retina; ◇, choroid; ▼, sclera; ⊙, serum. FLCZ was not detectable in the lens (anterior cortex, nucleus and posterior cortex) and the optic nerve. The dotted line indicates IC<sub>99</sub> against *Candida albicans*.

た。FLCZ点眼群, 生理食塩水点眼群ともに, フルオレセイン染色にて軽度のびまん性表層角膜炎がみられたが, 角膜混濁や角膜浮腫はなかった。虹彩や結膜にも異常はみられなかった。

#### 2. スペキュラーマイクロスコピー

両群ともに点眼前後で角膜上皮の細胞密度, 細胞面積の変動係数および細胞の形態に明らかな変化はなかった。FLCZ点眼前後の角膜内皮細胞密度は, それぞれ  $2650 \pm 361$  および  $2680 \pm 394$  個/mm<sup>2</sup>, 生理食塩水点眼前後ではそれぞれ  $2783 \pm 355$  および  $2651 \pm 338$  個/mm<sup>2</sup> で, 両群ともに点眼前後において有意差はなかった。角膜内皮細胞面積の変動係数についても,

FLCZ点眼前後ではそれぞれ  $0.22 \pm 0.06$  および  $0.18 \pm 0.05$ , 生理食塩水点眼前後ではそれぞれ  $0.18 \pm 0.06$  および  $0.20 \pm 0.04$  で, 両群ともに点眼前後において有意差はなかった (表1)。

#### 3. 眼圧および角膜厚

FLCZ点眼群, 生理食塩水点眼群ともに点眼前後で眼圧および角膜厚に有意な変化はなかった (表1)。

#### 4. 涙液内LDH活性

FLCZ点眼前後ではそれぞれ  $919 \pm 389$  および  $980 \pm 437$  IU/l, 生理食塩水点眼前後ではそれぞれ  $1113 \pm 758$  および  $1077 \pm 678$  IU/l で, 両群ともに点眼によるLDH活性の有意な変化はみら

れなかった(表1).

5. 涙液内蛋白濃度

FLCZ点眼前後ではそれぞれ9.8±3.7および9.0±4.6 mg/ml, 生理食塩水点眼前後ではそれぞれ12.2±7.6および10.5±5.9 mg/mlで, 両群ともに点眼による蛋白量の有意な変化はみられなかった(表1).

Ⅲ. FLCZ点眼が角膜上皮創傷治癒におよぼす影響

FLCZおよび生理食塩水の点眼を行った各4眼をそれぞれFLCZ点眼群および対照群として, それぞれの群における角膜上皮欠損面積の推移を検討した. なお角膜上皮剥離直後の上皮欠損面積は必ずしも一定しないので, 各眼において上皮剥離直

後の値を100%として各測定時点における上皮欠損面積を百分率で表した.

両群の角膜上皮創傷治癒曲線には松本ら<sup>30)</sup>の報告にみられるように, 初期の比較的平坦な部分である第1相および第1相に続く直線部分である第2相がそれぞれみられたが, 第2相に続く角膜上皮創傷治癒終了までの比較的ゆるやかな曲線部分である第3相は見られなかった(図4). 本報において第1相は上皮剥離後約12時間までに相当し, 両群ともに治癒曲線は全体的に平坦な曲線を描いていた. 剥離後6, 9および12時間の各時点では両群の欠損面積比のあいだに有意差はみられなかったが, 剥離後3時間の時点においてはFLCZ点眼群では欠損面積比が

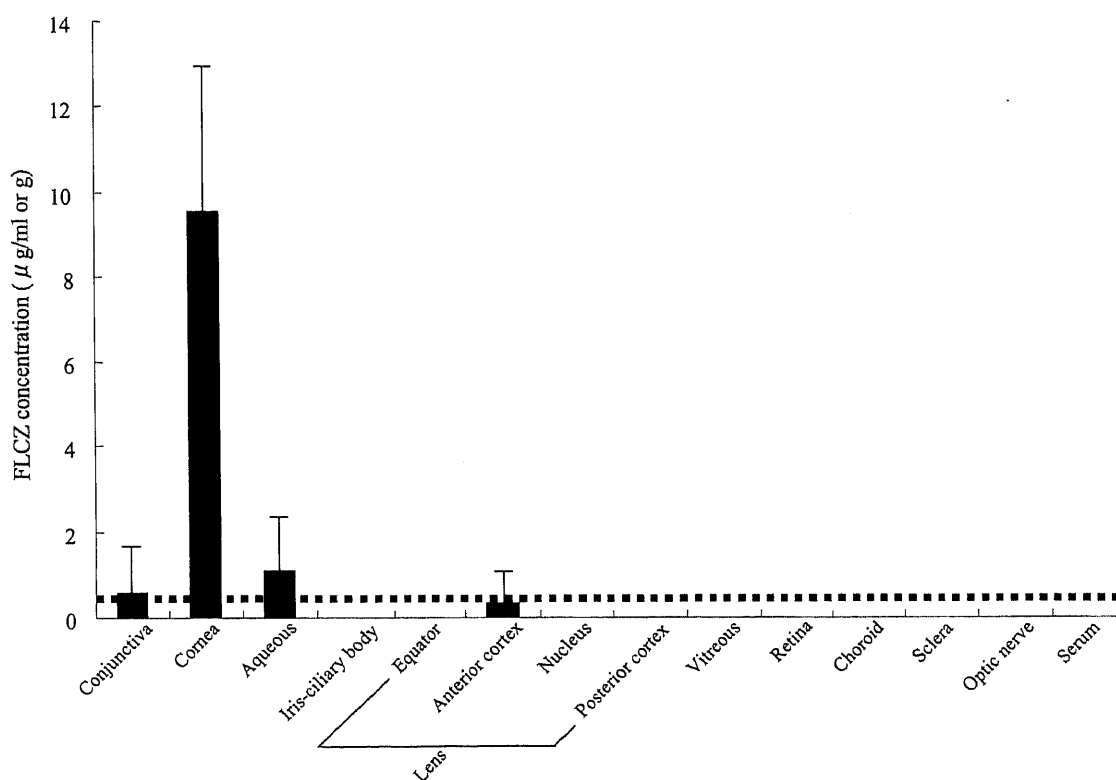


Fig. 3. FLCZ concentrations in ocular tissues and serum one hour after the final instillation of FLCZ. FLCZ was instilled every 30 min for 12 hrs. Each data point shows the  $\bar{x} \pm SD$ . The dotted line indicates IC<sub>99</sub> against *Candida albicans*.

Table 1. Corneal integrity, intraocular pressure, tear LDH activity and tear protein concentration before and after FLCZ instillations

Items of examinations	FLCZ		Saline	
	Before instillations	After instillations	Before instillations	After instillations
<b>Corneal integrity</b>				
Cell density of corneal epithelium (cells/mm <sup>2</sup> )	1245 ± 155	1285 ± 305	1248 ± 262	1240 ± 270
Coefficient of variation of corneal epithelium	0.28 ± 0.04	0.30 ± 0.08	0.28 ± 0.08	0.27 ± 0.06
Cell density of corneal endothelium (cells/mm <sup>2</sup> )	2650 ± 361	2680 ± 394	2783 ± 355	2651 ± 338
Coefficient of variation of corneal endothelium	0.22 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.18 ± 0.06	0.20 ± 0.04
Corneal thickness (μm)	393 ± 35	358 ± 22	394 ± 39	367 ± 27
Intraocular pressure (mmHg)	15.0 ± 4.8	17.8 ± 3.5	15.4 ± 4.7	16.3 ± 1.6
LDH activity in tears (IU/l)	919 ± 389	980 ± 437	1113 ± 758	1077 ± 678
Protein concentration in tears (mg/ml)	9.8 ± 3.7	9.0 ± 4.6	12.2 ± 7.6	10.5 ± 5.9

FLCZ was instilled every 30 min for 12 hrs.  
 $\bar{x} \pm SD$ .

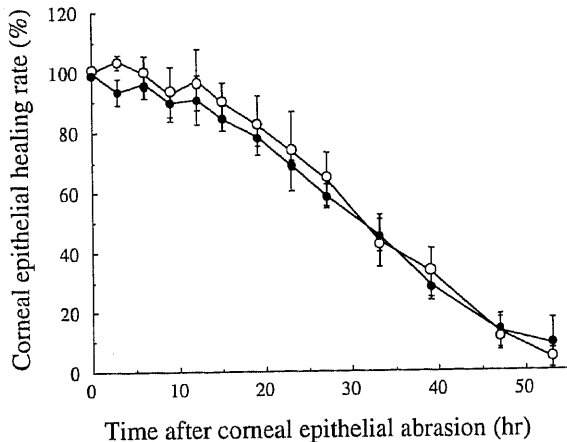


Fig. 4. Effect of topical FLCZ on corneal epithelial wound healing. FLCZ instillation was started one hour after corneal abrasion (time zero on the abscissa), and repeated every hour for 53 hrs. The ordinate shows the percentages of the denuded area over the initially abraded area. Each data point shows the  $\bar{x} \pm SD$ . No significant difference was found between the FLCZ-instilled eyes (○) and the control eyes instilled with normal saline (●).

103%と欠損面積の軽度増大がみられたのに対し、対照群では93%と急速な欠損面積の減少がみられ、両群の欠損面積比のあいだに有意差がみられた。第2相は剥離後、12～47時間に相当し、この間の角膜上皮創傷治癒速度(平均±標準偏差)は、FLCZ点眼群では $1.165 \pm 0.074 \text{ mm}^2/\text{時間}$ 、対照群では $1.264 \pm 0.119 \text{ mm}^2/\text{時間}$ であり、また各時点において両群の欠損面積比のあいだに有意差はみられなかった。

以上より、剥離後3時間の一時点を除いてFLCZ点眼群と対照群とのあいだには角膜上皮創傷治癒過程に明らかな差はみられなかった。

#### 考 察

1時間頻回点眼では、FLCZは点眼終了15分後には眼組織内および血清中に移動していた(図1)。また硝子体( $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )および血清( $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ )以外の各組織内濃度は、*Candida albicans*の99%発育阻止濃度(99% inhibitory concentration,  $IC_{99}$ )( $0.20 \sim 0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ )<sup>31)</sup>を凌駕していた(図1)。さらに点眼終了8時間後においても結膜と強膜のFLCZ濃度が高値を示した理由の一つとして、テノン嚢に取り込まれたFLCZが隣接する結膜および強膜に徐放されたことが考えられよう(図1)。これらの所見は、角膜真菌症などの前眼部の真菌感染症の治療にFLCZ点眼の有用性が期待できることを示している。

FLCZは結膜下注射によっても眼各組織内に良好に移行していた。結膜下注射では点眼と異なり網膜、脈絡膜および強膜などの後眼部組織からも多量のFLCZが検出された(図2)。検体採取する際には実体顕微鏡下でTenon嚢を強膜から可及的に除去しており、Tenon嚢に取り込まれていたFLCZが強膜の試料に混入した可能性は考えにくい。結膜下注射されたFLCZが結膜から強膜、脈絡膜、網膜へと順に眼内に浸透していった可能性が推測される。よって1回の結膜下注射でFLCZが後眼部を含めた眼組織に良好に移行することが判明した。

眼科臨床において、角膜真菌症に対し抗真菌剤を頻回点眼する場合には、30分から1時間ごとに点眼が行われている。そこで30分ごと12時間の点眼によるFLCZの眼内移行を検討した。FLCZを点眼した右眼では、点眼終了1時間後に結膜、角膜、前房水および水晶体前皮質部よりFLCZが検出された(図3)。角膜のFLCZ濃度は*Candida albicans*の $IC_{99}$ <sup>31)</sup>を十分凌駕していたが、実験1の1時間頻回点眼や実験2の結膜下注射による移行濃度と比較すると低濃度であった。

よって、角膜真菌症やアカントアメーバ角膜炎などの前眼部病変においてFLCZを局所投与する際には、頻回点眼と結膜下注射の組み合わせが効果的である。

山下ら<sup>32)</sup>によれば、白色ウサギでFLCZ 25 mg/kg静脈内注射1時間後の眼組織内のFLCZ濃度は角膜で $10.1 \mu\text{g}/\text{g}$ 、網脈絡膜で $18.8 \mu\text{g}/\text{g}$ に達するという。また阿部ら<sup>7)</sup>は、FLCZ 200 mgをヒトに静脈内注射または経口投与した場合の房水/血清濃度比が66.5～88.5%、硝子体/血清濃度比が73%ときわめて高い値をとることを報告している。したがって、FLCZの全身投与は角膜真菌症などの前眼部病変に対しても有用であることが推測される。しかし、FLCZは静脈内注射や経口投与により全身の各組織にきわめてよく移行する薬剤であり<sup>4)</sup>、全身的アレルギー発症や他の組織への副作用の危険を減少させる点からも、局所投与により病変部に眼局局的かつ高濃度に薬剤を到達させることができればより効果的かつ安全と考えられる。

そこで、FLCZ点眼の安全性について検討した。アミノ配糖体薬やピマリシンの頻回点眼を行うと、薬物の細胞毒性により角膜上皮障害を生じることが知られている<sup>33)</sup>。また薬物自体の毒性ではなく、点眼液に含まれる防腐剤による角膜上皮障害も問題とされており<sup>34)～36)</sup>、薬物を点眼するさいには角膜に対する影響を検討することが必須である。白色ウサギへの0.2% FLCZの30分ごと12時間点眼では、細隙灯顕微鏡検査、スベキュラーマイクロスコピーおよび角膜厚を指標とすると、前眼部に形態的な変化はみられなかった(表1)。また、眼圧においても点眼前後で有意な変化はなかった(表1)。涙液中のLDHや蛋白はおもに結膜や角膜に由来し、結膜や角膜が障害されると涙液中への放出が亢進しそれぞれの濃度が高くなるとされている<sup>37)～39)</sup>。これら涙液中のLDHおよび蛋白濃度についてもFLCZ点眼前後で有意な変化はなく(表1)、FLCZ点眼は結膜や角膜に明らかな影響を与えないと考えられる。

FLCZの網膜におよぼす影響は硝子体内注入<sup>32)40)</sup>や全身投与<sup>41)</sup>においては検討されているが、FLCZ点眼や結膜下注射などの局所投与においては、筆者の知る限り検討されていない。山下ら<sup>32)</sup>によると白色ウサギへのFLCZ 100～200  $\mu\text{g}$ 硝子体注入では、網膜に明らかな異常がみられなかったという。この注入されたFLCZがウサギ硝子体(容積約1.7 ml)内に均等に拡散すると仮定すると、硝子体内濃度は約60～120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。0.2% FLCZの30分ごと12時間点眼終了1時間後の硝子体内FLCZ濃度は検出限界(0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )以下であり(図3)、5分ごとの1時間頻回点眼終了4時間後においても $0.78 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ (図1)と低く、さらに結膜下注射1時間後でも $1.77 \pm 1.59 \mu\text{g}/\text{ml}$ (図2)であった。硝子体内FLCZ濃度が60～120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも網膜毒性を来さないことから<sup>32)</sup>、点眼および結膜下注射後のこのように低い硝子体内移行では、網膜には明らかな障害は生じないと推論される。

以上より、FLCZ点眼は前眼部に明らかな影響を与えず、ま

た網膜にも影響をおよぼさないと考えられることより、眼真菌感染症に安全に使用できよう。しかし、臨床的には角膜潰瘍や角膜びらんなどの角膜上皮が障害された症例に対してFLCZ点眼が用いられるので、FLCZが上皮の修復に影響を与えるか否かは重要である。

そこで次に、人工的に角膜上皮欠損創を作成し、上皮創傷治癒におよぼすFLCZの影響について検討した。その結果、角膜上皮創傷治癒曲線は2相に分けられ、FLCZ点眼群と対照群とのあいだで剥離後3時間の一時点を除いて各時点における角膜上皮欠損面積比に有意差はみられなかった(図4)。剥離後3時間では角膜上皮欠損面積比がFLCZ点眼群で100%を超え、一方対照群では93%と減少していた。角膜上皮創傷治癒過程において、上皮剥離1時間後には欠損周囲縁の角膜上皮細胞の収縮および円形化により欠損縁が平滑になり、ついで上皮細胞の移動が起こるとされている<sup>30)</sup>。最初の上皮細胞の収縮および円形化の過程では上皮欠損面積が剥離直後に比べて軽度が増大する可能性があり、これがFLCZ点眼群における初期変化の一因と考えられる。しかしこの理由からは対照群における変化(3時間後に93%へ減少)を説明することはできない。上皮剥離後の初回の測定である剥離3時間後の一時点のみで有意差が見られたことから、上皮剥離の手技の影響も関与しているかもしれない。すなわち、今回の上皮剥離にさいして用いた機械的剥離方法では、障害された角膜上皮細胞のとり残しが生じた場合には剥離後にいったん上皮欠損面積が拡大する可能性があり、また逆に角膜上皮細胞が周辺まで十分剥離されていない場合には、剥離直後には表層細胞の欠損部分がフルオレセインで染色されるものの速やかに上皮細胞の修復が起こる可能性がある。上皮剥離の方法には今回用いた機械的剥離法のほかに、アルコール<sup>42)</sup>やヨード<sup>43)</sup>などの薬物を用いる方法がある。しかしながら、薬物を用いる上皮剥離法では使用する薬物の残存上皮への影響、角膜内の残留薬物および点眼した薬剤との相互作用などを考える必要があるため、薬物点眼による上皮創傷治癒過程の検討には必ずしも適切ではないと考えて、本報では機械的方法を用いた。角膜上皮創傷治癒過程におよぼす薬物の影響を検討するさいの実験モデルの確立が今後必要であろう。

FLCZの作用機序としては、FLCZがチトクロームP-450と結合することにより真菌細胞膜の成分であるエルゴステロールの生合成を阻害するとされている<sup>44)</sup>。FLCZはDNA合成阻害作用をもたないことから、上皮創傷治癒曲線において細胞分裂相とされる第2相にFLCZが影響を与える可能性は低いと考えられる。本報においても上皮創傷治癒曲線の第2相においては、各時点での欠損面積比にはFLCZ点眼群と対照群との間に有意差はみられなかった。細胞の形態やDNA量の変化についての検討がさらに必要ではあるが、本報の結果およびFLCZの作用機序から考えて、FLCZは角膜上皮の細胞分裂にはほとんど影響をおよぼさないものと思われる。よって、FLCZ点眼は角膜上皮創傷治癒に影響をおよぼさないことが明らかとなった。

以上より、FLCZの眼局所投与では*Candida albicans*のIC<sub>99</sub><sup>31)</sup>を凌駕する良好な前眼部への移行がみられ、FLCZは角膜真菌症などの前眼部病変の治療に有効かつ安全に局所投与できることが明らかとなった。

## 結 論

局所投与によるFLCZの眼内移行や前眼部におよぼす影響に

ついて検討し、下記の結果を得た。またFLCZ点眼が角膜上皮創傷治癒におよぼす影響についてウサギ角膜上皮剥離モデルを用いて検討し、下記の結果を得た。

1. 0.2% FLCZの5分ごと1時間点眼の結膜、角膜、前房水、虹彩・毛様体、網膜および強膜のFLCZ濃度は、最終点眼より15~30分後に最高値に達した。

2. 0.2% FLCZの結膜下注射では、前眼部組織に加えて硝子体、網膜、脈絡膜および強膜においても高濃度のFLCZが検出された。

3. 0.2% FLCZの30分ごと12時間点眼の点眼終了1時間後に、結膜、角膜、前房水および水晶体前皮質部においてFLCZが検出された。

4. FLCZ点眼による前眼部への影響をスペキュラーマイクロスコピー、角膜厚、眼圧、涙液内LDH活性および涙液内蛋白濃度を指標に検討したが、点眼前後で明らかな変化はなかった。

5. FLCZ点眼は角膜上皮創傷治癒に影響をおよぼさなかった。

以上より、FLCZは局所投与により前眼部を中心として*Candida albicans*のIC<sub>99</sub><sup>31)</sup>を凌駕する濃度で眼内に十分移行し、しかも前眼部に明らかな障害をおよぼさないと考えられることより、眼真菌感染症に有効かつ安全に使用できる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚の謝意を捧げます。また直接御指導を賜りました循環医学専攻血管分子科学講座血管分子生物学の山本 博教授、金子二久博士、徐 成金博士に深謝致します。さらに水晶体の分割に御協力いただきました金沢医科大学眼科学教室佐々木一之教授ならびに小島正美博士に深謝致します。当教室では、直接御指導いただきました望月清文博士、鳥崎真人博士、山下陽子博士をはじめ、本研究に御協力下さいました棚橋俊郎学士、加藤直子博士、大久保真司博士、緒方正史博士に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Graybill JR. New antifungal agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 402-412, 1989
- 2) Humphrey MJ, Jevons S, Tarbit MH. Pharmacokinetic evaluation of UK49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 648-653, 1985
- 3) Arndt CA, Walsh TJ, McCully CL, Balis FM, Pizzo PA, Poplack D. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 157: 178-179, 1988
- 4) Walsh TJ, Foulds G, Pizzo PA. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 467-469, 1989
- 5) Foulds G, Brennan DR, Wajszczyk C, Catanzaro A, Garg DC, Knopf W, Rinaldi M, Weidler DJ. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid in humans. *J Clin Pharmacol* 28: 363-366, 1988
- 6) Savani DV, Perfect JR, Cobo LM, Durack DT. Penetration of new azole compounds into the eye and efficacy in experimental candida endophthalmitis. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 6-10, 1987
- 7) 阿部真知子, 石川明邦. フルコナゾールの房水内、硝子



体内移行. あたらしい眼科 31: 1479-1481, 1991

8) O'Day DM, Foulds G, Williams TE, Robinson RD, Allen RH, Head WS. Ocular uptake of fluconazole following oral administration. Arch Ophthalmol 108: 1006-1008, 1990

9) Good CB, Leeper HF. Profound papilledema due to cryptococcal meningitis in acquired immunodeficiency syndrome: successful treatment with fluconazole. South Med J 84: 394-396, 1991

10) Venditti M, Bernardis FD, Micozzi A, Pontieri E, Chirletti P, Cassone A, Martino P. Fluconazole treatment of catheter-related right-sided endocarditis caused by *candida albicans* and associated with endophthalmitis and folliculitis. Clin Infect Dis 14: 422-426, 1992

11) Agarwal A, Gupta A, Sakhuja V, Talwar P, Joshi K, Chugh KS. Retinitis following disseminated cryptococcosis in a renal allograft recipient. Acta Ophthalmol 69: 402-405, 1991

12) 大西克尚, 佐川卓司, 諸岡居織, 宇都裕恵, 栗原かすみ, 石橋達朗. 内因性真菌性眼内炎に対するフルコナゾールの応用. あたらしい眼科 9: 115-119, 1992

13) 兼子周一, 津島一晃, 青沼秀実, 中島 徹, 上野 真, 渡邊都緒. 真菌性眼内炎へのフルコナゾールの使用経験. 臨眼 45: 1389-1392, 1991

14) 森 健, 松村万喜子, 江部 司, 高橋まゆみ, 小原共雄, 稲垣正義, 磯沼 弘, 日比谷一郎, 浜本恒男, 渡辺一功, 池本秀雄. Fluconazoleによる深在性真菌症の治療. Jpn J Antibiot 42: 55-62, 1989

15) Laatikainen L, Tuominen M, von Dickhoff K. Treatment of endogenous fungal endophthalmitis with systemic fluconazole with or without vitrectomy. Am J Ophthalmol 113: 205-207, 1992

16) Kislá TA, Cu-Unjieng A, Sigler L, Sugar J. Medical management of beauveria bassiana keratitis. Cornea 19: 405-406, 2000

17) Amoils SP, Heney C. Acanthamoeba keratitis with live isolates treated with cryosurgery and fluconazole. Am J Ophthalmol 127: 718-720, 1999

18) Koc AN, Erkilic K, Evrensel N, Coskun A. A case of alternaria keratitis treated with fluconazole. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16: 322-323, 1997

19) Shiraiishi S, Murakami S, Miki Y. Oral fluconazole treatment of fungating candidiasis in the keratitis, ichthyosis and deafness (KID) syndrome. Br J Dermatol 131: 904-907, 1994

20) Thakar M. Oral fluconazole therapy for keratomycosis. Acta Ophthalmol 72: 765-767, 1994

21) Holgado S, Luna JD, Juarez CP. Postoperative candida keratitis treated successfully with fluconazole. Ophthalmic Surg 24: 132, 1993

22) 中川 尚, 風見宣生, 伊在井久美子, 岩崎美紀, 内田幸男, 山浦 常, 白坂 龍, 堀上英紀, 石井圭一. 初期アcantアメーバ角膜炎の2例. 日眼会誌 97: 544-550, 1993

23) Shih MH, Sheu MM, Chen HY, Lin SR. Fungal keratitis caused by candida utilis—case report. Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih 15: 171-174, 1999

24) Yee RW, Cheng CJ, Meenakshi S, Ludden TM, Wallace JE, Rinaldi MG. Ocular penetration and pharmacokinetics of topical

fluconazole. Cornea 16: 64-71, 1997

25) Behrens-Baumann W, Klinge B, Ruchel R. Topical fluconazole for experimental candida keratitis in rabbits. Br J Ophthalmol 74: 40-42, 1990

26) Klippenstein K, O'Day DM, Robinson RD, Williams TE, Head WS. The qualitative evaluation of the pharmacokinetics of subconjunctivally injected antifungal agents in rabbits. Cornea 12: 512-516, 1993

27) 渡辺一功. 抗真菌薬. 日本臨床 48: 2222-2227, 1990

28) Müller A, Möller B, Dragomirescu V, Hockwin O. Profiles of enzyme activities in bovine lenses. In O Hockwin (ed), Drug-Induced Ocular Side Effects and Ocular Toxicology, Concepts in Toxicology, vol. 4, 1st ed, p343-349, Karger, Basel, 1987

29) Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 82: 377-389, 1944

30) 松本雄二郎, 石橋康久. 角膜上皮創傷モデルの作製とその治癒過程の検討. 日眼会誌 88: 1329-1334, 1984

31) 山口英世, 内田勝久, 川崎賢二, 松永敏幸. 新トリアゾール系抗真菌剤 Fluconazole の *in vitro* の抗真菌活性. Jpn J Antibiot 42: 1-16, 1989

32) 山下陽子, 望月清文, 鳥崎真人, 小松雅樹, 棚橋俊郎, 酒井宏之. フルコナゾールの眼内移行と網膜への影響. あたらしい眼科 9: 1388-1391, 1992

33) 松本雄二郎. 角膜上皮創傷治癒過程に及ぼす各種点眼液の影響. 日眼会誌 91: 72-79, 1987

34) 鳥崎 潤. 点眼薬の防腐剤とその副作用. 眼科 33: 533-538, 1991

35) 今安正樹, 森山 剛, 濱野 孝. 涙液中の酵素活性およびアルブミン量を指標とした前眼部障害の定量的評価. 日コレ誌 33: 185-190, 1991

36) 濱野 孝, 坪田一男, 今安正樹. 点眼薬中の防腐剤が角膜上皮に及ぼす影響. 眼紀 42: 780-783, 1991

37) Fullard RJ, Carney LG. Human tear enzyme changes as indicators of the corneal response to anterior hypoxia. Acta Ophthalmol 63: 678-683, 1985

38) Fullard RJ, Carney LG. Use of tear enzyme activities to assess the corneal response to contact lens wear. Acta Ophthalmol 64: 216-220, 1986

39) 今安正樹, 平田友博, 光永サチ子, 小谷慎子, 浜野 光. 涙液中LDH活性を指標とした角膜障害度の評価. あたらしい眼科 7: 297-302, 1990

40) Schulman JA, Peyman G, Fiscella R, Small G, Coats M, Wajszczuk CP, Steahly L. Toxicity of intravitreal injection of fluconazole in the rabbit. Can J Ophthalmol 22: 304-306, 1987

41) Mochizuki K, Yamashita Y, Torisaki M, Komatsu M, Tanahashi T, Sakai H. Intraocular penetration and effect on the retina of fluconazole. Lens Eye Toxicity Res 9: 537-546, 1992

42) Cintron C, Hassinger L. A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol. Ophthalmic Res 11: 90-94, 1979

43) Moses RA, Parkison G, Schuchardt R. A standard large wound of the corneal epithelium in the rabbit. Invest Ophthalmol Visual Sci 18: 103-106, 1979

44) 森田達也, 野沢義則. ビストリアゾール抗真菌剤・フルコナゾールのステロール代謝における14-C脱メチル化阻害作

用: *Candida albicans*と肝細胞のミクロソームに対する阻害効果の差異. 真菌誌 27: 190-197, 1986

**Topical Fluconazole: High Intraocular Penetration without Corneal Toxicity** Kayo Uchiyama, Department of Ophthalmology, Clinical Neuroscience, Division of Neuroscience, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **110**, 339 — 347 (2001)

**Key words** fluconazole, instillation, subconjunctival injection, intraocular penetration, corneal toxicity

#### Abstract

Fluconazole (FLCZ) has been reported to effectively combat keratomycosis and *Acanthamoeba* keratitis. The present study investigated the intraocular penetration and corneal toxicity of topically administered FLCZ. FLCZ (0.2%) was topically administered to albino rabbit eyes either every 5 min for one hr (13 times), every 30 min for 12 hrs (25 times), or by a single 0.3-ml subconjunctival injection. The control group eyes received topical saline. Various ocular tissues and sera were sampled at various time points and assayed for FLCZ concentrations by high performance liquid chromatography. Corneal epithelial and endothelial integrity after instillation was determined by specular microscopy and ultrasonic pachymetry. Lactate dehydrogenase (LDH) activity and protein concentration in tears were determined by the methods of Wröblewski and of Bradford, respectively. Corneal epithelial healing rates in the FLCZ-instilled and control eyes were examined by corneal photography after mechanical abrasion of the corneal epithelium. For the one-hr regimen FLCZ concentration was maximal in the conjunctiva, the cornea, the aqueous humor, the iris-ciliary body, the retina and the sclera 15 to 30 min after the final instillation. For the 12-hr regimen FLCZ was detected in the conjunctiva, the cornea, the aqueous humor and the anterior lens cortex one hr after the last application. After the subconjunctival injection FLCZ was detected in the vitreous humor, the retina, the choroid and the sclera, excepting only the anterior ocular segments. For either mode of topical application, FLCZ concentration in the conjunctiva, the cornea and the aqueous humor was beyond IC<sub>99</sub> against *Candida albicans*. Corneal epithelium and endothelium, corneal thickness, intraocular pressure, LDH activity or protein concentration in tears were not significantly affected by FLCZ instillation. The corneal epithelial healing rate did not significantly differ between the FLCZ-instilled and control eyes. The high intraocular concentrations and the lack of toxicity to the anterior ocular segments indicate that topical FLCZ is effective and safe for treating keratomycosis and *Acanthamoeba* keratitis.