

眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討 ——眼内動態の定的評価法の確立

長崎大学 薬学部

中 村 純 三

The eye contains several different structures with specific physiological functions. The eye also has protective mechanisms for serving its primary function of ensuring proper vision which are responsible for cleaning the outside and inside of the eye and for eliminating foreign matter. These protective mechanisms include solution drainage, lacrimation, drug absorption via the vascularized conjunctiva, corneal barrier, melanin binding, aqueous humor flow, and the blood-eye barrier. Although protective, these mechanisms also disturb the ocular delivery and decrease the bioavailability of ophthalmic drugs. The availability and pharmacokinetics of instilled drugs in the eye is mainly controlled by three factors : (1) disposition of drugs in precorneal area, (2) the permeability of cornea, and (3) elimination of drugs from the eye.

Generally, topical application of drugs is the method of choice under most circumstances because of its convenience and safety for ophthalmic chemotherapy. However, upon instillation of an ophthalmic drug, most of it is rapidly eliminated from the precorneal area due to drainage by the naso-lacrimal duct and dilution by tear turnover ; this is readily absorbed into the systemic circulation. To be effective, most of the drug also should penetrate the tight barrier of the corneal epithelium into the inside of the eye. Such behaviour can result in poor bioavailability and increased severity in a systemic adverse effects from topically applied drugs.

The purpose of this study was to develop the quantitative assessment of drug behaviour in the eye for the safety assessment of the cosmetic compound as an index of the damage of ocular membrane. Therefore, the penetration of drugs was measured across the isolated corneal and conjunctival membranes of the albino rabbit using a two-chamber glass diffusion cell. In summary, the conjunctival and cornea of the rabbit eye are sufficiently different in permeation character to control the extent and pathway for ocular absorption of drugs.

1 緒 言

眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性を評価するためには、眼局所の解剖学および生理学的な特徴を考慮した上で、眼粘膜の薬物透過性や、眼局所における薬物動態を正確に把握し、薬物動態を評価・予測できる方法論を確立することが重要である。しかし、これらに関する系統的な研究は少ないのが現状である。

著者は、このような背景を踏まえ、眼粘膜の薬物透過性および眼局所における薬物動態を系統的に解析し、その機構や影響を及ぼす要因を検討した^{1~6)}。これらの知見を基にして、眼粘膜の薬物透過性および眼局所における薬物動態を考慮した

速度論的モデルを構築した。

2 実 験

2.1 試薬および薬液の調製

Befunolol および carteolol は、それぞれ科研製薬株式会社および大塚製薬株式会社より供与されたものを用いた。Timolol および tilisolol は、それぞれ萬有製薬株式会社および日清製粉株式会社より供与されたものを用いた。Thyrotropin-releasing hormone(TRH) および luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) は、田辺製薬株式会社より供与されたものを用いた。p-Nitrophenyl β -cellopentaoside (PNP) は、生化学工業株式会社より購入したものをを用いた。Atenolol, methylparaben および fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (平均分子量 4,400 : FD-4、平均分子量 9,400 : FD-10) は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入したものをを用いた。Salicylic acid, pindolol および o-ethoxybenzamide は、ナカライテスク株式会社



Studies on the safety assessment of the cosmetic compound as an index of the damage of ocular membrane : development of quantitative assessment of drug behaviour in the eye

Junzo Nakamura

School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University

より購入した。その他の合成試薬は市販特級品を用いた。Salicyl methionine は、当研究室で合成したものを用いた。Phosphate-buffered saline (PBS; pH7.4) は、等張リン酸緩衝液 (NaH_2PO_4 および Na_2HPO_4) と生理食塩水を 1 : 1 (v/v) で攪拌し調製した。

2.2 In vitro 眼粘膜透過実験

日本白色種雄性家兎 (体重 2.0 ~ 3.0kg) を sodium pentobarbital の過量投与により屠殺後、角膜と結膜を摘出し、拡散チャンバーに装着した。Donor 側に薬物 (5mM; β 遮断薬、0.2mM; PNP、0.5mM; TRH および LHRH、0.05mM; FITC-dextran) を含む glutathione bicarbonated Ringer's solution (GBR) を 4mL、receiver 側に GBR を 4mL 添加し、 O_2/CO_2 (95 : 5%) の混合ガスを通じながら、角膜を $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、結膜を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ でインキュベートした。経時的に receiver 側の GBR を採取した。また、角膜の上皮層をメスで剥離した上皮層剥離角膜 (scraped cornea) を用いた透過実験も同様に行った。採取試料の定量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法または蛍光光度法により行った。

2.3 分配実験

水相に 50mM phosphate buffer (pH7.4)、有機相に 1-octanol を用いた。予め水相および有機相を、それぞれ 1-octanol および pH7.4 phosphate buffer で飽和させた後、水相に β 遮断薬を 0.2mM の濃度で溶解した。水相と有機相を 1 : 1 (v/v) で混合し、5min ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) 攪拌した。みかけの分配係数 (PC) 値は、有機相添加前と添加後の水相中の薬物濃度を HPLC で測定し算出した。

2.4 代謝実験

拡散チャンバーに角膜または結膜を装着後、donor 側および receiver 側に薬物 (0.5mM; TRH および LHRH) を含む GBR を 4mL 添加した。 O_2/CO_2 (95 : 5%) の混合ガスを通じながら、角膜

を $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、結膜を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ でインキュベートし、経時的に donor 側および receiver 側の GBR を採取した。試料の定量は、HPLC 法により行った。

2.5 データ解析

膜透過パラメータは、薬物透過曲線の当てはめ計算から算出した。高速ラプラス逆変換アルゴリズムを用いた非線形最小二乗法プログラム MULTI (FILT) で膜透過パラメータを算出した。MULTI (FILT) は、京都大学大学院薬学研究科山岡清助教授より供与されたものを用いた。当てはめ計算には、パーソナルコンピュータ (PC-9821 V10 NEC) を用いた。

2.6 薬物の定量

β 遮断薬は試料溶液 (50 μL) に、0.1M HCl (50 μL) および内部標準物質 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ salicylic acid; atenolol, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ salicyl methionine; befunolol, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pindolol; carteolol, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o-ethoxybenzamide; tilisolol, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methyl paraben; timolol) の methanol 溶液 (100 μL) を加えて、微量遠心機 (M15-3 : 佐久間製作所) により、12,000xg、10min 遠心した後、得られた上澄 50 μL を HPLC (ポンプ: LC-6A (島津製作所)、検出器: RF-535 または SPD-10A (島津製作所)、オートインジェクター: AS-8010 (東ソー)、レコーダー: CR-3A (島津製作所)) により測定した。

TRH、PNP および LHRH は、試料溶液 (200 μL) に内部標準物質 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protocatechuic acid (TRH)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o-ethoxybenzamide (LHRH、PNP)) の methanol 溶液 (50 μL) を加えて、微量遠心機 (M15-3 : 佐久間製作所) により、12,000xg、10min 遠心した後、得られた上澄 (80 μL) を β 遮断薬と同様の HPLC システムで測定した。

FITC-dextran は、試料溶液 (100 μL) に、PBS (4mL) を添加し、分光蛍光光度計 (RF-1500 : 島津製作所) で測定した (蛍光測定波長 : Ex.489nm, Em.515 nm)。

3 結果

眼は、様々な生理学的機能をもった細胞や粘膜などで構成され、その構造は非常に複雑である。Fig. 1は、眼の正面図および断面図を示している。眼局所は眼球以外に、涙腺や涙小管および鼻涙管等の付属器官から構成されている。眼球の外側は、角膜および強膜などの粘膜で構成され、強膜表面および眼瞼の裏側は結膜組織で覆われている。

角膜は前眼部を構成する組織で体表面側より、角膜上皮、ボウマン膜、角膜実質、デスメ膜、および角膜内皮の5層からなる時計皿状の透明組織である。角膜上皮は5～6層からなる細胞層で、輪部で結膜上皮に移行しており再生能力が強い。角膜実質は厚さの90%を占め、コラーゲン繊維と線維芽細胞が豊富である。内皮は単層の細胞層で再生能力はない。角膜の組成は約80%が水分で、その他はコラーゲン繊維と酸性ムコ多糖の多いことが特徴である。

結膜は上皮層と結合組織である固有層からなり、血流に富んだ薄い粘膜である。眼瞼と眼球の間に入り込み結膜嚢を形成し、眼球および眼瞼の運動と形態維持に重要な働きをしている。また、結膜上皮には杯細胞が存在し、ムチンなどの粘液成分を分泌している³⁾。

一般に、薬物の眼粘膜透過は単純拡散であり、薬物の物理化学的性質が膜透過に影響を及ぼすこ

とが知られている。点眼した薬物の一部分は、角膜や結膜などの眼粘膜組織に移行した後、眼内または全身循環に吸収されるため、薬物の眼粘膜透過性を把握することは、眼内または全身循環への薬物移行性を評価する上で重要であると考えられる。

3.1 β 遮断薬の眼粘膜透過性

眼粘膜透過性を支配する薬物側の要因として、主に脂溶性および分子量の二つがあり、前者は眼粘膜に対する分配過程を決定し、後者は眼粘膜中の拡散過程を決定づけると考えられる。そこで、 β 遮断薬の眼粘膜透過性を調べ、薬物の脂溶性が眼粘膜透過性に及ぼす影響を検討した¹⁾。Table 1に示した5種類の β 遮断薬を用いて、in vitro 眼粘膜透過実験を行った。Befunolol, carteolol および timolol は、国内で緑内障治療に用いられている薬物である。Tilisolol は非選択的 β 遮断薬であり、家兎の眼圧を低下させることが報告されている。ここに示した5種類の薬物は分子量がほぼ同じであるが、1-octanol と緩衝液間の分配係数(PC) 間の対数値は、-1.5から-0.009の間で変化しており、脂溶性が異なることが認められた。

3.1.1 β 遮断薬の眼粘膜透過性

In vitro 眼粘膜透過実験は、Fig. 2に示すガラス製の拡散チャンバーを用いた。In vitro 膜透過実験は in vivo の実験系と異なり、涙液や眼房水の影響、鼻涙管への薬物排出などの影響を受けずに、一定した条件で薬物の膜透過性を評価することが可能である。家兎から摘出した眼粘膜を拡散チャンバーの中央部分に装着し、donor 側に薬物を溶解した緩衝液(4 mL)を、receiver 側に緩衝液(4 mL)のみを添加し、receiver 側の緩衝液を

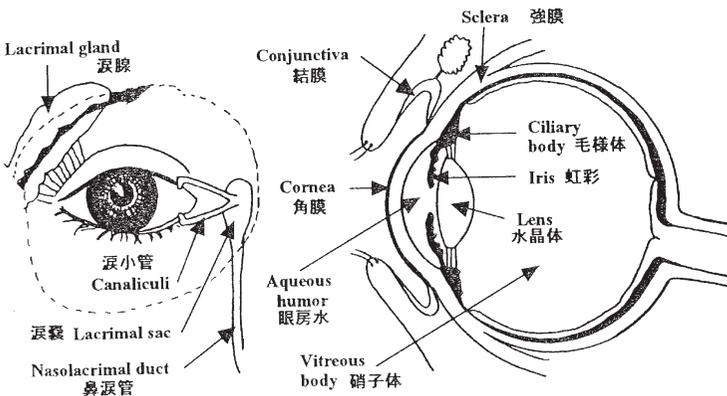
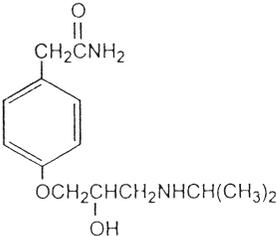
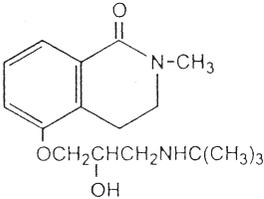
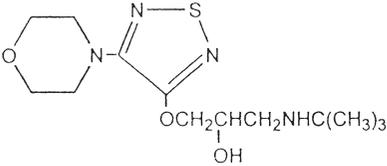
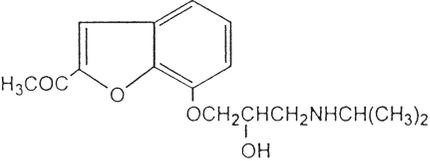


Fig. 1 Structure of eye

経時的に採取した。また、角膜では上皮層とそれ以外の層のバリアー特性を明らかにするため、上皮層を剥離した角膜についても透過実験を行った。緩衝液には、GBR を使用した。

Fig. 3は β 遮断薬の累積薬物透過量-時間曲線を示したものである。薬物適用後、累積透過曲線は一定の lag time を示した後、右上がりの直線を示した。実験開始後 240min での角膜の累積薬物

Table 1 Chemical structures and physicochemical properties of β -blockers used in vitro penetration experiment.

Drug	Structure	Molecular weight	Log PC
Atenolol		266.3	-1.5
Carteolol		292.4	-0.81
Tilisolol		304.4	-0.24
Timolol		316.4	-0.16
Befunolol		291.4	-0.009

PC: apparent partition coefficient between 1-octanol and pH 7.4 buffer at 22 °C.

透過量は、他の眼粘膜と比較して少なかった (Fig. 3 A)。上皮層を剥離した場合には、正常な角膜と

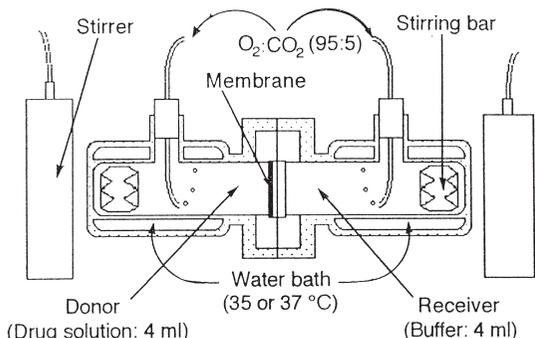


Fig. 2 Diffusion chamber for in vitro penetration experiment.

比較して、累積薬物透過量が増大する結果を示した (Fig. 3 B)。結膜の累積薬物透過量は、角膜と比較して大きな値を示した (Fig. 3 C)。

3. 1. 2 In vitro 拡散モデルと眼粘膜透過パラメータの算出

薬物の眼粘膜透過性を解析するため、Fig. 4 に示す donor 中薬物濃度を一定、receiver 側を sink condition とし、眼粘膜を一枚膜とした in vitro 拡散モデルを構築した。薬物の膜透過を拡散過程として捉えるモデルは、実際に即したモデルと考

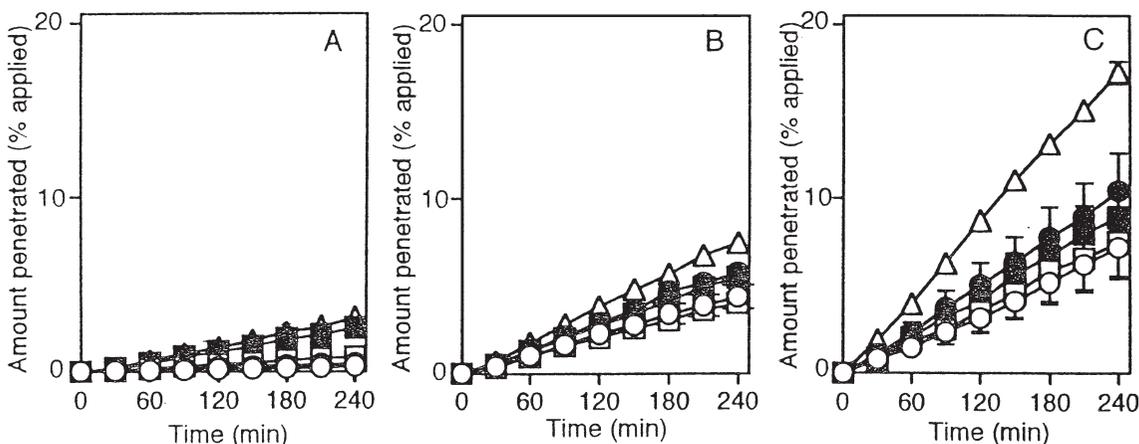


Fig. 3 Penetration profiles of β -blockers through coenea (A), scraped cornea (B) and conjunctiva (C) in albino rabbits.

(○) Atenolol, (●) carteolol, (□) tilisolol, (■) timolol, (△) befunolol. Each point represents the average of at least three experiments \pm S.E.

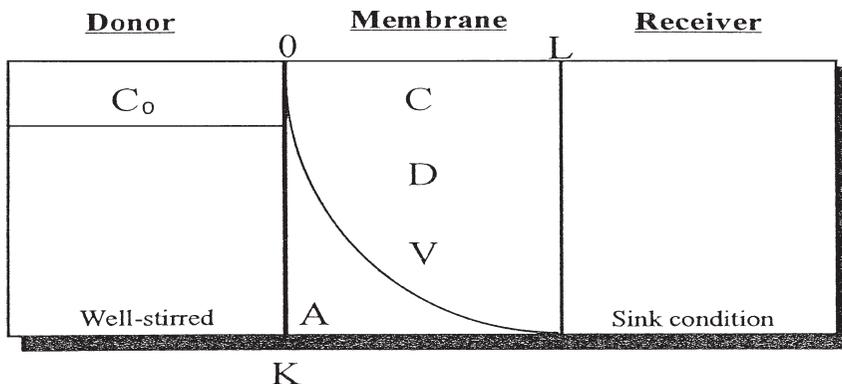


Fig. 4 In vitro diffusion model for drug penetration through ocular membrane in albino rabbits.

Abbreviation: C_0 , the initial concentration in the donor cell; C , the drug concentration in the membrane; V , the membrane volume; D , the diffusion coefficient of drug in the membrane; K , the partition coefficient of drug between the membrane and donor solution; A , the effective diffusion area; L , the effective diffusion length in the membrane.

えられ、主に経皮吸収の分野で広く使われている。このモデルを用いた解析法によって、薬液から膜への薬物分配係数および膜中の薬物拡散係数などの物理化学的パラメータを求めることができる。Receiver 側に出現する累積薬物量 (Q_{receiver}) を表すラプラス次元式を誘導すると以下ようになる。

$$Q_{\text{receiver}} = C_0 Z / s / \sinhd \quad (1)$$

$$d = L(s/D)^{0.5}$$

$$Z = KV/d$$

(1) 式中の s はラプラス演算子、 C_0 は donor 中薬物初濃度、 L は膜の厚さ、 D は拡散定数、 K は分配係数、 V は膜の容積を表す。なお、膜の中での薬物拡散距離および膜の容積を正確に求めることが困難なため、拡散パラメータ D' (D/L^2)、そして分配パラメータ K' (KV) という複合パラメータを定義した。膜透過実験で得られた累積薬物透過量 - 時間曲線を (1) 式に当てはめ、薬物が膜の

中を移動する過程を示す拡散パラメータ、および薬物が donor 側から膜に移行する過程を示す分配パラメータを、高速ラプラス逆変換を利用した非線形最小二乗法プログラム MULTI (FILT) により算出した。

Table 2 は、当てはめ計算によって得られた膜透過パラメータをまとめたものである。また、得られた拡散パラメータおよび分配パラメータから、膜透過定数 K_p ($K'D'/A$ (膜の表面積))、lag time ($1/6/D'$) を算出した (Table 2)。さらに、上皮層剥離処置による膜透過性増加の指標として、角膜に対する上皮層を剥離した角膜の膜透過定数の比 (SCCR/CR)、角膜および結膜に対する薬物移行性の指標として、結膜に対する角膜の膜透過定数の比 (CR/CJ) をそれぞれ算出した (Table 2)。角膜の lag time は、0.18hr から 0.31hr までの値を示したのに対し、上皮層を剥離した角膜ではおよそ

Table 2 Penetration parameters of β -blockers through cornea, scraped cornea and conjunctiva using in vitro diffusion model.

β -Blocker	N	Lag time (hr)	D' (hr^{-1})	$K' \times 10^2$ (cm^3)	$K_p \times 10^2$ (cm/hr)	Ratio
Cornea						
Atenolol	6	0.21	0.78	0.37	0.33	
Carteolol	6	0.31	0.53	1.0	0.61	
Tilisolol	6	0.18	0.91	0.98	1.0	
Timolol	6	0.23	0.74	3.5	3.0	
Befunolol	4	0.25	0.66	4.9	3.7	
Scraped cornea						SCCR/CR ^{a)}
Atenolol	3	0.09	1.8	2.5	5.3	16
Carteolol	6	0.10	1.7	3.6	7.0	11
Tilisolol	3	0.08	2.0	2.1	4.8	4.8
Timolol	6	0.11	1.5	3.9	6.6	2.2
Befunolol	3	0.09	1.8	4.4	9.0	2.4
Conjunctiva						CR/CJ ^{b)}
Atenolol	5	0.22	0.76	9.9	9.5	0.035
Carteolol	5	0.12	1.4	7.9	14	0.044
Tilisolol	6	0.15	1.1	6.9	10	0.10
Timolol	6	0.14	1.2	7.7	12	0.25
Befunolol	4	0.07	2.5	7.1	23	0.16

Abbreviation: N, the number of experiment; D' (D/L^2), diffusion parameter; K' (KV); partition parameter; K_p ($D'K'/A$ (surface area of ocular membrane)), permeability coefficient. ^{a)}The ratio of permeability coefficient of scraped cornea (SCCR) to that of cornea (CR). ^{b)} The ratio of permeability coefficient of cornea (CR) to that of conjunctiva (CJ).

0.1hr となり、lag time の減少が認められた。一方、上皮層を剥離することによって、ほとんどの β 遮断薬で、拡散パラメータ、分配パラメータおよび膜透過定数は増加した。SCCR/CR は、全ての β 遮断薬で 1.0 以上の値を示したが、最も水溶性の高い atenolol で 16、最も脂溶性の高い befunolol で 2.4 となり、水溶性の高いものほど大きな値を示した。

結膜の lag time は角膜の場合と同じ、若しくは小さい値を示した。結膜の拡散パラメータは atenolol の場合を除き、他の β 遮断薬では角膜よりも大きい値を示した。分配パラメータおよび膜透過定数は、全ての β 遮断薬で角膜よりも大きい値を示した。CR/CJ は薬物脂溶性が増大するに伴い、増加する傾向が認められた。

3.1.3 β 遮断薬の眼粘膜透過に及ぼす薬物脂溶性の影響

膜透過に対する薬物脂溶性の影響を解明するために、 β 遮断薬の脂溶性と、眼粘膜の膜透過定数、拡散パラメータおよび分配パラメータとの関係を示した (Fig. 5)。角膜の薬物透過定数は、 β 遮断薬の脂溶性に依存して増加する有意な相関を示した (Fig. 5A)。一方、上皮層を剥離した角膜

および結膜の薬物透過性は、角膜の場合ほど顕著な増加は認められなかった。全ての眼粘膜において、拡散パラメータは薬物脂溶性に影響を受けず、ほぼ一定の値を示した (Fig. 5B)。このことから、薬物の脂溶性は、拡散パラメータに影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、分配パラメータと薬物脂溶性の関係において、上皮層を剥離した角膜と結膜では、薬物脂溶性の影響はほとんど認められなかったのに対し、角膜の分配パラメータは、薬物の脂溶性に依存して増加した (Fig. 5C)。以上の結果から、脂溶性は主に角膜表面への分配過程に影響を及ぼすことが明らかになった。

3.2 水溶性薬物の眼粘膜透過性

一般に、ペプチド医薬品のような水溶性で比較的分子量の大きい薬物は、眼粘膜透過性が低いことが知られているものの、水溶性薬物の眼粘膜透過機構に関する情報は極めて少ない。そこで、ペプチド医薬品等のモデルとして、Table 3 に示す分子量の異なる 4 種類の水溶性薬物を使用し、眼粘膜の薬物透過性に及ぼす分子量の影響を調べた⁶⁾。今回使用した薬物の 1-octanol と緩衝液間の分配係数は 0.005 以下を示し、いずれの薬物も極めて高い水溶性を示した。

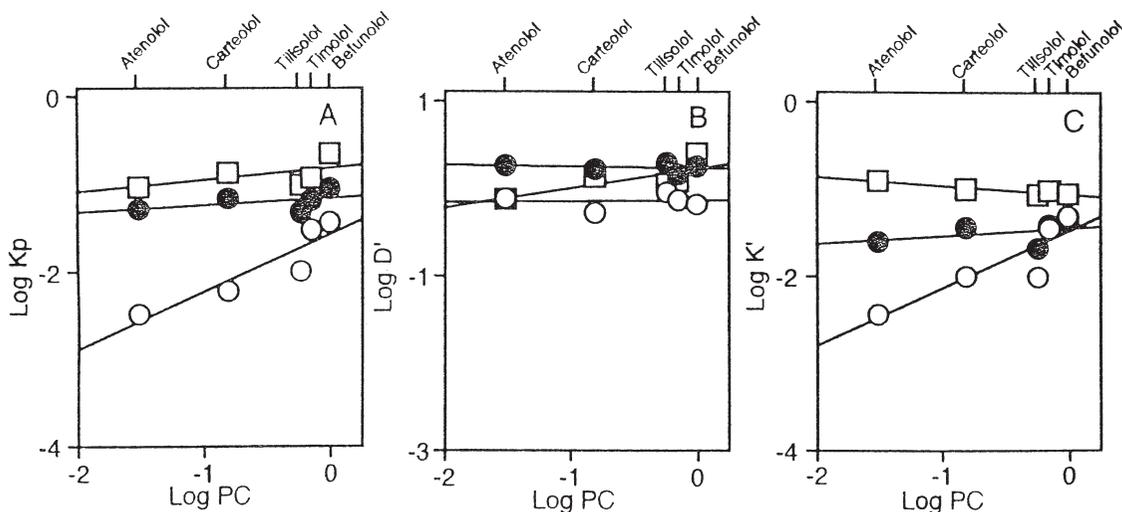


Fig. 5 Relationship between logarithmic values of apparent partition coefficient (PC) between 1-octanol and pH7.4 buffer and permeability coefficient (K_p; A), diffusion parameter (D'; B) or partition parameter (K'; C) in ocular membrane.

(○) Cornea, (●) scraped cornea, (□) conjunctiva.

3.2.1 水溶性薬物の眼粘膜透過性

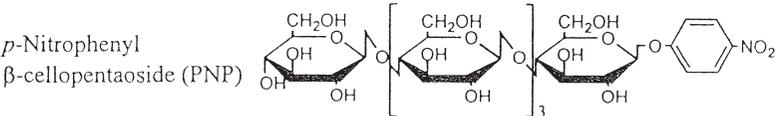
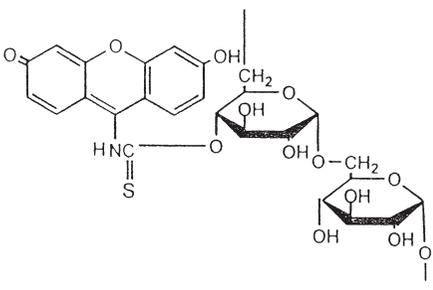
水溶性薬物の眼粘膜透過性は、Fig. 2の拡散チャンバーを用いて評価した。Fig. 6には、水溶性薬物の累積薬物透過量-時間曲線を示した。実験開始後240minの角膜の累積薬物透過量は、他の眼粘膜と比較して極めて少なかった。また、上皮層を剥離することによって、角膜における薬物透過量は顕著に増大した。全ての薬物において結膜の累積透過量は角膜よりも高い値を示した。水溶性薬物の眼粘膜組織による代謝実験を行った結果、角膜組織中でLHRHが代謝による分解を若干受けた以外は、実験開始後240minまで有意な薬物の

分解は認められなかった。

3.2.2 水溶性薬物の膜透過パラメータの算出

薬物の膜透過機構を解明するために、in vitro拡散モデルに基づく解析を行い、膜透過に関するパラメータを算出した (Table 4)。角膜のlag timeは、0.15hrから0.39hrまでの値を示したのに対し、上皮層を剥離した角膜では0.09hrから0.58hrまでの値を示した。分配パラメータおよび膜透過定数は、上皮層を剥離することにより著しく増加した。また、角膜の膜透過定数は他の粘膜と比較し

Table 3 Chemical structures and physicochemical properties of hydrophilic drugs used in vitro penetration experiment.

Drug	Structure	Molecular weight
Thyrotropin-releasing hormone (TRH)	PyroGlu-His-ProNH ₂	362.4
<i>p</i> -Nitrophenyl β-cellopentaoside (PNP)		949.8
Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)	PyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr H ₂ NGly-Pro-Arg-Leu-Gly	1182.3
Fluorescein isothiocyanate-dextran		4,400 (FD-4) 9,400 (FD-10)

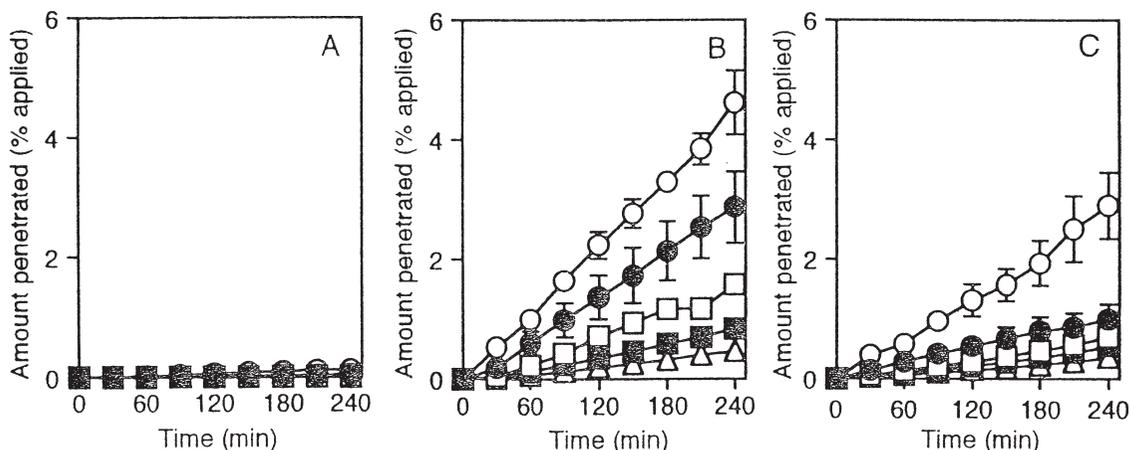


Fig. 6 Penetration profiles of hydrophilic drugs through cornea (A) , scraped cornea (B) and conjunctiva(C) in albino rabbits. (○) TRH, (●) PNP, (□) LHRH, (■) FD-4, (△) FD-10. Each point represents the average of at least three experiments \pm S.E.

Table 4 Penetration parameters of hydrophilic drugs through cornea, scraped cornea and conjunctiva using in vitro diffusion model.

Hydrophilic drug	N	Lag time (hr)	D' (hr ⁻¹)	K' x 10 ² (cm ³)	Kp x 10 ² (cm/hr)	Ratio
Cornea						
TRH	5	0.16	1.0	0.13	0.15	
PNP	6	0.15	1.1	0.04	0.06	
LHRH	7	0.39	0.43	0.03	0.02	
FD-4	5	0.33	0.51	0.03	0.02	
FD-10	4	0.26	0.65	0.02	0.01	
Scraped cornea						
						SCCR/CR ^{a)}
TRH	3	0.09	1.9	2.3	5.1	34
PNP	4	0.23	0.73	4.2	3.5	58
LHRH	4	0.44	0.38	4.5	2.0	100
FD-4	4	0.49	0.34	3.2	1.1	55
FD-10		0.58	0.29	2.2	0.63	63
Conjunctiva						
						CR/CJ ^{b)}
TRH	4	0.14	1.2	2.4	3.7	0.041
PNP	6	0.14	1.2	0.66	1.0	0.060
LHRH	6	0.19	0.88	0.84	0.94	0.021
FD-4	5	0.28	0.60	1.2	0.70	0.029
FD-10	6	0.32	0.53	0.88	0.46	0.022

Abbreviation: N, the number of experiment; D' (D/L²), diffusion parameter; K' (KV); partition parameter; Kp (D' K'/A(surface area of ocular membrane)), permeability coefficient. ^{a)}The ratio of permeability coefficient of scraped cornea (SCCR) to that of cornea (CR). ^{b)} The ratio of permeability coefficient of cornea (CR) to that of conjunctiva (CJ).

て極めて低い値を示した。SCCR/CRは、全ての薬物で高い値を示し、上皮層を剥離することにより膜透過性が顕著に増大することが明らかになった。さらに、SCCR/CRは β 遮断薬の場合と比較した結果、より大きな値になることが示された。CR/CJは、 β 遮断薬のatenololおよびcarteololと同等もしくはそれ以下の値を示した。これらのことから、角膜では、上皮層が水溶性の薬物や分子量の大きい薬物の透過に対して、強固なバリアー機能を有することが明らかになった。

結膜の拡散パラメータは、FD-10の場合を除く他の薬物では、角膜とほぼ同様の値を示した。分配パラメータおよび膜透過定数は、全ての薬物で角膜よりも大きい値を示した。

3.2.3 水溶性薬物の眼粘膜透過に及ぼす薬物分子量の影響

膜透過に及ぼす分子量の影響を調べるために、薬物の分子量と膜透過定数、拡散パラメータおよび分配パラメータとの関係を示した (Fig. 7)。全ての眼粘膜で膜透過定数は、分子量の増大に伴い減少し、これらには有意な相関が認められた。

(Fig. 7A)。拡散パラメータは、全ての眼粘膜で分子量の増加に伴い減少する傾向を示し、結膜では有意な相関を示した (Fig. 7B)。分配パラメータも拡散パラメータと同様、分子量の増加に伴い減少する傾向を示し、角膜において分子量と有意な相関が認められた (Fig. 7C)。

4 考察

得られた結果を基にして、眼粘膜透過の模式図を Fig. 8 にまとめた。角膜の構造を薬物透過性の観点から分類した場合、上皮層、実質層および内皮層の3層が薬物透過のバリアーとして機能している。上皮層は電気的膜抵抗値が高くtightな細胞層であるが、結膜の上皮層は、apical側の細胞にしかtight junctionが存在していないため、角膜に比べleakyな粘膜であることが知られている。眼粘膜の種類による透過性の違いは、このような組織学的な差違に起因していると考えられる。

生体膜を透過する薬物の透過経路は、細胞膜に分配し細胞内を通過する経路 (transcellular route) と、細胞間隙 (paracellular route) や細胞表面の孔 (pore) を通過する水溶性の経路 (aqueous route)

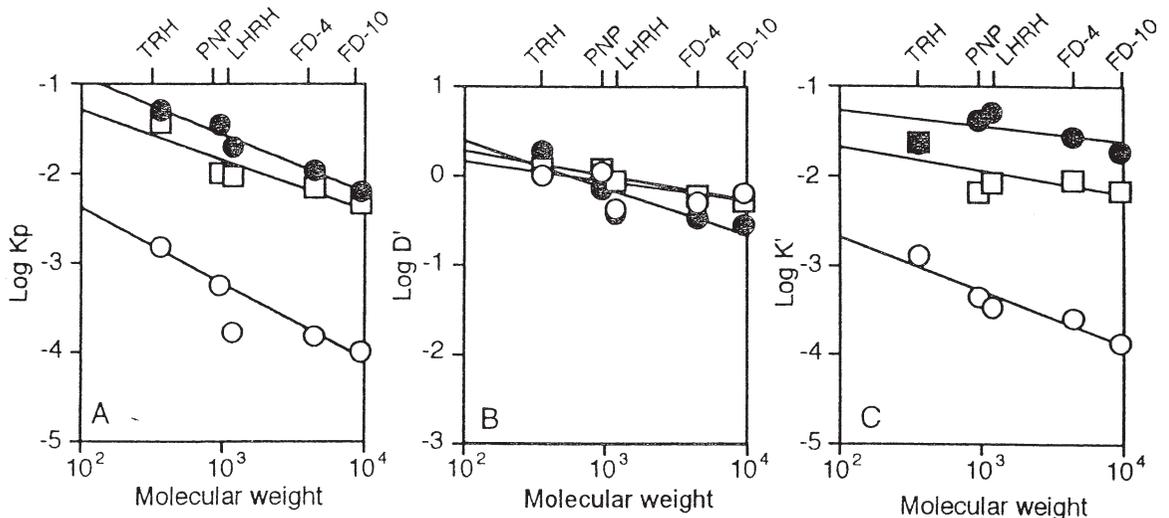


Fig. 7 Relationship between molecular weight and permeability coefficient (Kp; A), diffusion parameter (D'; B) or partition parameter (K'; C) in ocular membrane.

(○) Cornea, (●) scraped cornea, (□) conjunctiva.

● : Lipophilic drug ○ : Hydrophilic drug ⊙ : Macromolecular drug

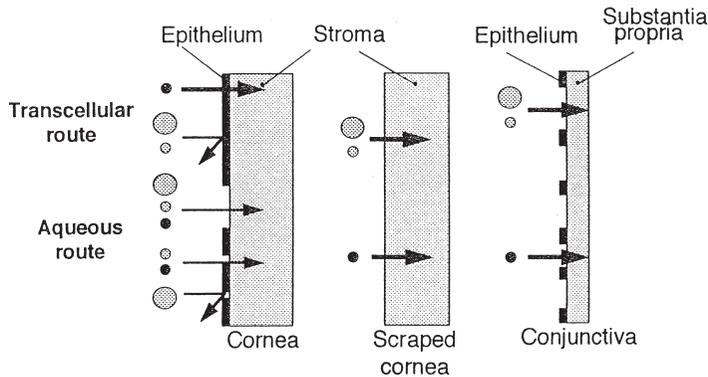


Fig. 8 Schematic representation of drug penetration mechanism through cornea, scraped cornea and conjunctiva.

が存在する。一般に、脂溶性の高い薬物は脂質成分で構成される細胞膜に分配し、transcellular routeを透過することが可能である。一方、水溶性の高い薬物は細胞膜に分配せず、主にaqueous routeを透過すると考えられる。このことから、transcellular routeおよびaqueous routeを透過できる β 遮断薬の方が、aqueous routeしか透過できない水溶性薬物よりも膜透過性が高いと考えられる。

β 遮断薬の角膜透過性は拡散過程ではなく、分配過程に依存することが明らかとなった。これは、角膜表面のほとんどが上皮細胞で覆われているため、脂溶性の変化が分配過程へ及ぼす影響が大きいとと考えられる。また、より広範囲な薬物脂溶性を有する薬物を用いた研究結果より、眼粘膜透過性と薬物脂溶性との関係には、parabolicな相関を有することが報告されている。

分配パラメータは分配係数に膜の容積、すなわち膜表面積と膜の厚さを組み込んだ複合パラメータである。また、水溶性薬物は細胞膜にほとんど分配しないことから、水溶性薬物の分配パラメータは、細胞膜に対する薬物の分配ではなく、透過できるaqueous routeの有効表面積を反映した値と考えられる。よって、拡散パラメータはaqueous route内での拡散性を反映するものと考えられる。家兎の角膜および結膜におけるaqueous routeの

pore半径は、それぞれ2.0nmおよび4.9nm、細胞間隙の面積は角膜表面積1.0cm²あたり0.019 × 10⁻³ mm²、結膜表面積1.0cm²あたり0.46 × 10⁻³ mm²と報告されていることから、角膜でのaqueous routeの占める面積は、結膜よりも極めて狭いことが明らかである。このことは、水溶性薬物の角膜の分配パラメータが、結膜と比較して小さな値を示した結果と一致している。一方、結膜は、上皮層の構造が角膜と異なり、細胞同士の接着が緩やかで、水溶性薬物の透過できる有効表面積、つまりaqueous routeの占める表面積が角膜より広いと、分配パラメータが大きい値を示したと考えられる。

上皮層を剥離することによって β 遮断薬の角膜透過性は増大し、特に水溶性薬物では顕著な増加を示した。これは、薬物透過バリアーである上皮層がなくなり、水およびcollagenで構成されている実質層への分配性が上昇したためと考えられる。また、分子量が大きい水溶性薬物では、lag timeの増加および角膜中の薬物拡散性が減少した。これは、外から膜中へ水分が流入することにより角膜実質が膨潤し、薬物の拡散距離が長くなるためと考えられる。

これらの結果は、眼粘膜の薬物透過性に加えて、眼内動態の定量的評価法を確立するための基礎的知見になりうるものと考えている。

引用文献

- 1) Sasaki H., Igarashi Y., Nagano T., et al : Penetration of β -blockers through ocular membranes in albino rabbits, J.Pharm. Pharmacol., 47, 17-21, 1995.
- 2) Sasaki H., Yamamura K., Tei C., et al : Ocular permeability of FITC-dextran with absorption promoter for ocular delivery of peptide drug, J. Drug Targeting, 3, 129-135, 1995.
- 3) Sasaki H., Nagano T., Yamamura K., et al : Ophthalmic preservatives as absorption promoters for ocular drug delivery, J. Pharm. Pharmacol., 47, 703-707, 1995.
- 4) Sasaki H., Yamamura K., Nishida K., et al : Delivery of drugs to the eye by topical application, Progress in Retinal and Eye Res, 15, 583-620, 1996.
- 5) Sasaki H., Ichikawa M., Kawakami S., et al : In-situ ocular absorption of ophthalmic β -blockers through ocular membranes in albino rabbits, J. Pharm. Pharmacol., 49, 140-144, 1997.
- 6) Sasaki H., Ichikawa M., Yamamura K., et al : Ocular membrane permeability of hydrophilic drugs for ocular peptide delivery J. Pharm. Pharmacol., 49, 135-139, 1997.