[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (4) 402-406 (1980)]

Bupranolol の角膜透過性に関する考察¹⁾

岩田修造,^{2a)} 大谷淑郎, 長田永三朗, 萩野 尚,^{2b)}
名城大学薬学部,^{2a)} 科研化学株式会社^{2b)}

Aspect on Corneal Permeability of Bupranolol¹⁾

SHUZO IWATA,^{2a)} YOSHIRO OHTANI, EIZABURO OSADA and HISASHI OGINO^{2b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University^{2a)} and Kaken Chemical Co., Ltd.^{2b)}

(Received September 25, 1979)

Because the cornea forms an important boundary tissue in the anterior eye portion, the corneal permeability of ophthalmic drugs is of great importance in drugs administered topically.

To evaluate the intraocular penetration of bupranolol, an antiglaucoma ophthalmic solution, its *in vitro* corneal permeability was examined, using excised rabbit cornea mounted on the methacrylate chamber.

Permeation time was carried out within 10—30 minutes at 35°. Permeability constants were calculated from measuring the initial amount of bupranolol (C_0), the residual amount of bupranolol in the tear-side chamber (C_1), the concentration in the aqueous-side chamber (C_2), thickness of the cornea (Δx) and corneal permeation area (A) after each permeation time. In both, tissue culture medium and ophthalmic solution, the constant of corneal permeable velocity (K) and permeability constant of the membrane (P) of bupranolol increased with permeation time, and these values did not depend on bupranolol concentration.

The present results suggest that the bupranolol compound at the precorneal pocket penetrates into the intraocular area through the cornea.

Keywords—bupranolol; corneal hydration; corneal permeability; corneal permeable velocity K ; permeability constant P

緑内障治療薬の基本的な薬理作用は房水産生の抑制あるいは排出の促進に大別され、炭酸脱水素酵素阻害剤、高浸透圧剤、交感神経刺激剤などが内服、注射そして点眼剤として繁用されている。特に最近、従来の薬剤によっても眼圧降下の認められない症例にも有効な緑内障治療薬として、 β -受容体遮断剤が注目をあび、眼圧降下作用に関する多くの研究³⁻⁵⁾が報告されている。

本研究の対象薬物とした β -受容体遮断剤の一つである 1-*tert*-butylamino-3-(2-chloro-5-methylphenoxy)-2-propanol hydrochloride (bupranolol) は Kunz⁶⁾ により合成され、Oancea⁷⁾ が他剤との併用投与により開放隅角緑内障患者での眼圧降下作用を報告したのをはじめとして、Krieglstein,⁸⁾ 高瀬⁹⁾ の点眼による局所適用の報告がある。

そこで、本薬物をはじめとして、種々なる化合物を点眼薬物として局所的に角結膜嚢内に投与し、その時の薬物の眼内移行を検討する場合、まず、第一の関門である角膜を介しての眼内移行の情報を入手しておくことが必

1) 第2回 bupranolol 研究会で発表、東京、1979年2月。

2) Location: a) Yagoto, Tenpaku-ku, Nagoya, 468, Japan; b) 2-28-8, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan.

3) K. Wettrell, M. Pandolfi, *Exp. Eye Res.*, **21**, 451 (1975).

4) M.J. Elliot, P.M. Cullen, C.I. Phillips, *Brit. J. Ophthalm.*, **59**, 296 (1975).

5) L. Bonomi, P. Steindler, *Brit. J. Ophthalm.*, **59**, 301 (1975).

6) W. Kunz, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **109**, 1573 (1969).

7) I. Oancea, *Klin. Mbl. Augenheilk.*, **167**, 618 (1975).

8) G.K. Krieglstein, J. Sold-Darseff, W. Leydecker, *Graefes Arch. Klin. exp. Ophthalm.*, **202**, 81 (1977).

9) M. Takase, S. Komuro, H. Nanba, M. Araie, *Jpn. J. Ophthalmol.*, **22**, 142 (1978).

要である。今回は、bupranolol の眼内環境に移行する基礎的挙動を明らかにする目的で、家兎角膜を供試膜として、*in vitro* における透過実験を行ない、眼内移行に関する解析の一助としたので報告する。

実験の部

試料、試薬 溶媒および試薬——すべて市販の特級規格品、水はイオン交換精製水を2回蒸留して用いた。

Bupranolol——水から2回再結晶、40°, 6 hr 減圧乾燥して用いた。C₁₄H₂₃Cl₂NO₂. mol. wt. 308.25. mp 224—225°. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{0.1N HCl}}$ nm(ϵ): 275 (1763), 282 (1612). 水に対する溶解度: 0.96% (25°).

Fig. 1. Chemical Structure of Bupranolol

Bupranolol 点眼液——Bupranolol の溶解補助剤として carboxymethyl cellulose および polysorbate 80 を用い、等張化剤には mannitol を用いた。また、粘稠化剤として methylcellulose、防腐剤として benzalkonium chloride を添加、リン酸緩衝液で pH 6.5 に調整して bupranolol 点眼液とした。

培養液——阪大微生物研究会製の Tissue Culture Medium 199 (TCM-199) を用いた。pH 7.2, 浸透圧 292 mOsm/l. TCM-199 は等張化のため塩化ナトリウムが 7% 含有されており、bupranolol の溶解度は 0.36% (35°) である。

角膜透過実験 供試動物——日本白色家兎 (2—3 kg) を性別に関係なく用いた。

強角膜剥離法——あらかじめスリットランプで無傷の角膜を保持する家兎を選別し、耳静脈から空気を注入し栓塞死後ただちに眼筋、眼球周囲を切除し、眼球後部の視神経を切断し眼球を摘出した。角膜輪部から約 2 mm 外側部に沿って強膜を切り、前眼部から水晶体、毛様体および虹彩を除去して強角膜片を得た。

角膜透過実験装置——角膜を固定するチャンバーは Fig. 2 に示す構造でメタアクリル樹脂製である。

涙液側チャンバーと房水側チャンバーは角膜で隔てられ、前者のチャンバー内には試料液を、後者のチャンバー内には培養液を入れ、攪拌子で攪拌して薬物の角膜透過性の均一化をはかり、35° で incubate した。

角膜膨潤度測定法——眼球から剥離直後の強角膜片、および角膜透過実験終了後の強角膜片を培養液で洗浄し、ただちに、角膜部分のみを直径約 8 mm の大きさに切り抜き、ろ紙でゆるくはさんで表面の付着水分を静かに取り除き、角膜湿重量 (mg wet weight) を測定した。次に膜厚を測定したのち、恒温真空乾燥器を用い五酸化リン存在下、100°, 24 hr 乾燥後の乾燥角膜重量 (mg dry weight) を測定し、次式により角膜膨潤度 (corneal hydration) を算出した。

$$\text{corneal hydration} = \frac{\text{mg wet weight} - \text{mg dry weight}}{\text{mg dry weight}} \quad (1)$$

膜厚の測定——前述の角膜湿重量測定後の角膜の厚さを dial gauge (Peacock Co. 製) で測定した。

膜面積の測定——角膜透過実験装置の角膜透過部分の有効径と膜の厚さから求めた曲率半径、および角膜中心部から求めた彎曲深度から透過部分の膜面積を算出した。

透過実験——強角膜片を培養液 (35°) で洗浄したのち、ただちに角膜透過実験装置に固定した。涙液側チャンバーに透過溶液として、bupranolol 0.1—0.3% を添加した培養液、あるいは bupranolol 0.25—1% を含有する bupranolol 点眼液の各々 2.0 ml を入れ、房水側チャンバーに培養液 2.0 ml を入れ 35° で 30 分間 incubate し、房水側に移行した bupranolol 透過量を 10 分間ごとに測定した。透過実験終了後、ただちに強角膜を装置からはずし、corneal hydration を測定すると同時に混濁の有無を観察した。

Bupranolol 濃度の測定 涙液側の濃度——Bupranolol の 0.1 N 塩酸中の紫外部最大吸収波長 (275 nm) において Beer の法則が成立し、培養液および点眼液中の基剤による定量妨害がないことを確認したので、透過実験終了後に bupranolol 添加の培養液または bupranolol 点眼液 1.0 ml を採取し、吸光度法により濃度を測定した。

房水側の濃度——透過時間 30 分までの房水側に移行した bupranolol 濃度はきわめて低いため、高感度の定

Fig. 2. Schematic Diagram of Methacrylate Chamber for Corneal Permeability in Rabbit

量法としてガスクロマトグラフィー (GC) [充填剤, 3% silicone OV-101-gaschrom Q] を検討し, 試料液をアルカリ性としたとき bupranolol は塩基になり, 内部標準 *p*-terphenyl に対するピーク高さ比と bupranolol 塩基の濃度との間に原点を通る直線関係が得られた. また, GC 法で培養液および点眼液中の基剤による定量妨害がないことを確認したので, 房水側チャンバーより採取した試料液 1.0 ml に 1% 水酸化ナトリウム 0.5 ml を加えてアルカリ性とし, *p*-terphenyl の一定量を含む chloroform 1.0 ml を加えて抽出し, chloroform 層を直接 GC に注入して濃度を測定した.

薬物透過の算出法 角膜透過実験装置中において, 角膜を隔てた涙液側の bupranolol (初濃度 C_0 , 容積 V_1) が濃度勾配により角膜内を拡散し房水側 (容積 V_2) へ移動する場合, t 時間後の涙液側および房水側の溶液中の bupranolol の濃度をそれぞれ C_1 , C_2 とすると, 角膜透過速度定数¹⁰⁾ K は式 (2) によって表わされる.

$$K = \frac{V_2}{2 \cdot A \cdot t} \ln \frac{C_0 - 2 \cdot C_2}{C_0} \quad (2)$$

A : 角膜のチャンパー中における透過面積

また, 溶質が膜を透過する速度は, 膜の面積と厚さだけでなく溶質の膜内における拡散定数, および膜の多孔度によっても大きな影響をうける. 式 (3) によって定義される P' をみかけの膜透過定数¹¹⁾ とすると,

$$P' = -\frac{1}{t(1/V_1 + 1/V_2)} \ln \left\{ \frac{1 - (C_2/C_1)}{1 + (V_2/V_1)(C_2/C_1)} \right\} \quad (3)$$

で与えられ, この P' に角膜の透過面積 A , および角膜の厚さ Δx を考慮した値を膜透過定数 P ¹¹⁾ とすれば,

$$P = P' \cdot \frac{\Delta x}{A} \quad (4)$$

となる. P の値は膜の性質と溶質の種類によって定まる定数で, 膜透過の難易をあらわすものと考えられる.

結果および考察

In Vitro 角膜の検討

角膜透過実験装置中における家兎角膜の時間的変化を検討するため, corneal hydration を指標として次の実験条件下でその変化を考察した. すなわち, 涙液側チャンパーに下に示すような溶液をそれぞれに満たし, 房水側チャンパーには常に培養液を入れて, 角膜の incubation 時間と hydration との関係を検討した.

1) 培養液のみ, 2) bupranolol 添加の培養液, 3) 点眼液の基剤のみ, 4) bupranolol 点眼液.

Table I に示す如く, incubation 30 分においても, 涙液側に培養液試料を入れた場合, corneal hydration には bupranolol の添加および無添加に差異がなく, 正常角膜の hydration 値¹²⁾ (3.34—3.54) に近似した値を示した.

一方, 点眼液基剤あるいは点眼液でもその値に大きな影響はみられず incubation 30 分においても 4.2 ± 0.2 の値を示した. また, 30 分以内では角膜混濁などが認められなかったので, 次に検討する bupranolol の透過実験では 30 分以内での透過性を検討することにした.

角膜の透明性維持の機構は, 角膜を構成する角膜上皮層および内皮層の機能により角膜実質層の含水量を常に

TABLE I. Effect of Bupranolol Concentration and Incubation Time on the Hydration of Rabbit Cornea mounted in Methacrylate Chamber at 35°

Incubation time (min)	Concn. of bupranolol in TCM-199 (%)				Concn. of bupranolol in ophthalmic solution (%)			
	0	0.1	0.2	0.3	0	0.25	0.5	1
10	3.3±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.5±0.1	3.4±0.1	3.7±0.1
20	3.4±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.5±0.1	3.5±0.1	3.5±0.1	3.6±0.1	4.0±0.1
30	3.5±0.2	3.5±0.1	3.6±0.1	3.8±0.1	3.6±0.1	3.5±0.1	3.8±0.1	4.2±0.2

Each value represents the mean ± S.D. (n=5).

10) 岩田修造, 池本文彦, “生体表面; 視覚器官における表面現象,” 中垣, 岩田編, 南江堂, 東京, 1975, p. 227.

11) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修造, 薬誌, 82, 1138 (1962).

12) 三島済一, 日本眼科紀要, 19, 1241 (1968).

一定に保持することにあり、この corneal hydration の増加は、角膜の涙液および房水側の外部環境に起因することが多くの研究によって認められている。¹³⁾ したがって、今回の *in vitro* における角膜透過実験において、まず、この corneal hydration の増加の有無を検討することにより、実験条件の良否を判定することにした。その結果、bupranolol 添加の培養液を涙液側チャンパーに入れたときも、また点眼液基剤あるいは点眼液を入れた場合でも 30 分以内の角膜 incubation では大きな corneal hydration は認められず、角膜の構造および機能に影響のないことが判明した。

Bupranolol の角膜透過性

角膜透過実験装置に固定された家兎供試角膜は、30 分以内の incubation では大きな hydration が認められなかったので、次に涙液側チャンパーに bupranolol 含有の培養液を入れ、角膜を介しての房水側チャンパーへの透過性を角膜透過速度定数 K 、および膜透過定数 P で検討した。

その結果、Fig. 3 に示す如く、 K 値および P 値は bupranolol の濃度には依存せずほぼ一定の値を示した。すなわち、 K 値では透過時間 10 分で $166 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ 前後を示し、 P 値では約 $6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ を示した。しかし、透過時間が大きくなるとともにその値は上昇した。

また、点眼液を涙液側においた場合の bupranolol の角膜透過性は Fig. 4 に示す如く、培養液を用いた時の透過性に較べて bupranolol の濃度が大きくあるにもかかわらず差異はなく、溶媒に影響されない角膜透過性を示した。しかし、この実験においても透過時間の影響は大きく、いずれの濃度においても透過時間 30 分では 10 分間に較べて、 K 値で 8—14%、 P 値では 11—18% の上昇がみられた。

以上の結果、bupranolol の角膜透過速度定数 K および膜透過定数 P は透過時間の経過とともに大となり、bupranolol の家兎角膜透過性には透過時間依存性が認められた。しかし、bupranolol の濃度の異なる培養液および点眼液で検討したにもかかわらず、透過に対する濃度依存性は認められなかった。

K および P の値が透過時間とともに増大したことは、角膜実質層の swelling およびそれに伴う角膜上皮・

Fig. 3. Corneal Permeable Velocity (K) and Permeability Constant of Membrane (P) on Bupranolol

The solutions used in this experiments were follows:
Tear side: TCM-199 solution with bupranolol.
Aqueous side: TCM-199.
Permeation time: 10 min (●), 20 min (○), 30 min (●).

Fig. 4. Corneal Permeable Velocity (K) and Permeability Constant of Membrane (P) on Bupranolol

The solution used in this experiments were follows:
Tear side: bupranolol ophthalmic solution.
Aqueous side: TCM-199.
Permeation time: 10 min (●), 20 min (○), 30 min (●).

13) たとえば, S. Mishima, T. Kudo, *Invest. Ophthalmol.*, 6, 329 (1967).

内皮の barrier 効果の減少によるものとも考えられ, bupranolol の家兎角膜透過性は膜内拡散に依存する passive transport の透過様式であることが推察される。

角膜の swelling によって物質の透過性が増大することは, 水川, 岩田¹⁴⁾ によって角膜組織内の空隙の拡大に起因することが認められており, 物質が多重層膜である角膜を透過する様式は, それぞれの構成膜における膜内拡散であることが考えられる。

このことから, 今回の bupranolol 透過の実験に際して, 膜透過定数 P を用いてその透過の難易度も検討してみた。この P は前述した如く, 膜の多孔度と溶質の種類に規定されることが多く, 一般に均一な物質で構成される膜に対しての溶質の透過性の検討に用いられているが, 今回, 組織膜とも考えられる角膜に対する透過性を P 値でもって検討したところ, 10 分間での透過性は $5.49\text{--}6.30 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ であった。この値をセルロース膜およびウシ水晶体カプセルに対する phenoxazone 化合物の膜透過定数 $P^{11,15)}$ (37° における xanthommatin の P 値はセルロース膜では $0.69 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$, カプセルでは $22.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$) と比較すると中間値を示し, これは bupranolol と xanthommatin との違いとともに, 多重構成膜である角膜の特性とも考えられる。

また, bupranolol の透過に対する透過時間依存性が, 培養液に較べて点眼液で低い傾向を示したことは, 点眼液に含まれる粘性基剤 methylcellulose の添加による粘度の上昇に伴う bupranolol の溶液内拡散速度の低下に帰因するためと考えられる。

培養液を用いた場合の bupranolol 0.2%, 透過時間 20 分における結果から, 角膜透過速度定数 K は $219 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ であるのに対して, 既に報告された家兎角膜を用いた *in vitro* における透過実験で得られた sulfanilamide ($K=10.4 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$, mol. wt. 172), *p*-aminobenzoic acid ($K=3.9 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$, mol. wt. 137)¹⁶⁾ あるいは, *in vivo* における透過実験で得られた urea ($K=2.1 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$, mol. wt. 60), thiourea ($K=2.7 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$, mol. wt. 76)¹⁷⁾ などの場合と較べて bupranolol は分子量が大きいにもかかわらず家兎角膜透過性の高い物質であることが判明した。

このことは, 角膜上皮層および内皮層に対する透過物質の解離度に起因することが認められている。たとえば salicylic acid は溶液の pH の上昇とともに, その角膜透過性は減少し, aniline は増加することが認められている。¹⁸⁾ また, homatropine 点眼液,¹⁹⁾ あるいは pilocarpine 点眼液²⁰⁾ においても, pH のアルカリ性移行によって角膜透過性が増大することが認められている。このことから, bupranolol の角膜透過性も, この pH 依存性が存在すると考えられ, 今後, この解離定数との関係を検討しておくべきであると考えられる。

小室ら²¹⁾ の家兎眼を用いた, 点眼後の bupranolol の眼内各組織への移行に関する *in vivo* の実験では, 角膜への分布が最も高く, 眼内各組織からの bupranolol の消失速度定数がほぼ等しいことから, 点眼した bupranolol の眼内への取り込みは大部分が角膜を通して行なわれているであろうと報告されている。したがって, 今回の実験で得られた bupranolol の *in vitro* における家兎角膜透過性の結果は, 臨床的に角結膜嚢内に投与された bupranolol が, 確実に角膜を通過して眼内に移行し, そして薬効を発揮することを推定させるものである。

14) 水川 孝, 岩田修造, 日本眼科学会雑誌, 71, 1069 (1967).

15) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修造, 薬誌, 83, 275 (1963).

16) 岸田健一, 上野則夫, 大鳥利文, 日眼会誌, 77, 804 (1973).

17) 三島済一, 服部英二, 山内秀泰, 日眼会誌, 75, 198 (1971).

18) D.G. Cogan, E. Hirsh, *Arch. Ophthalm.*, 32, 276 (1944).

19) V. E. Kinsey, "Physiology of the Eye," ed. by E.H. Adler, The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1965, p. 53.

20) J.W. Sieg, J.R. Robinson, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1222 (1977).

21) 小室 苑, 南波久斌, 高瀬正弥, 日眼会誌, 83, 537 (1979).