氏　　　名	皆　川　俊　哉
生 年 月 日	
本　　　籍	神奈川県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博乙第127号
学位授与の日付	平成8年9月30日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第4条第2項）
学位授与の題目	脳血栓症治療薬クリンプロストを含有するリピッドマイクロスフェアー製剤からの主薬放出特性とその血液脳関門透過機構
論文審査委員	（主査）辻　　彰 （副査）市村藤雄，五味保男 玉井郁巳，川島嘉明

学位論文要旨

Drug release profiles and mechanisms of drug delivery to the brain of lipid microspheres (LM) containing a prostaglandin (PG) I_2 analogue, clinprost (CP), were studied. Drug release of CP(LM) in the aqueous solutions and serum samples were characterized, using a newly developed polydimethylsiloxane-coated glass beads assay. CP was released from LM in serum by protein binding and hydrolysis of the drug to its active metabolite isocarbacyclin (CP-acid), as well as by dilution of LM. The binding site of CP and CP-acid on human serum albumin was identical with the possible binding site of PGI_2. The significant species differences were observed in hydrolysis of CP by esterase in whole blood and in its separated components in rats, dogs and human. *In vitro* and *in vivo* studies on the blood-brain barrier (BBB) permeability of CP(LM) revealed that CP(LM) was transported via 1) endocytosis of LM, 2) simple diffusion of CP released from LM, and 3) transport of CP-acid generated by hydrolysis of CP. The BBB permeability of CP(LM) was not reduced in forebrain ischemic rats, because the simple diffusion of CP contributed mainly to the CP(LM) transport. These observations help elucidate phenomena occurring in the body after intravenous dose of CP(LM).

【目的】

Prostaglandin I_2 (PGI_2)誘導体 clinprost (CP)は，体内において加水分解を受け活性代謝物 isocarbacyclin (CP-acid)へ変換され(Fig. 1)，PGI_2と同等の血小板凝集抑制作用，血管拡張作用及び脳機能改善作用を示す。CP は，ダイズ油及びレシチンを主成分とする oil-in-water エマルションであるリピッドマイクロスフェアー(LM)に高い親和性を有することから，静脈内投与

時 *in vivo* における薬理作用の増強が認められるが，その製剤特性及び体内動態の特性に基づく薬物送達機構については明らかにされていない。そこで本研究においては，まず CP(LM)の薬物保持様式を明らかにする目的で，① CP の吸着性に着目し新規に確立した polydimethylsiloxane 被覆グラスビーズ(PDMS-GB)測定法を用い，CP(LM)の薬物保持効率の測定と薬物放出過程の解析を行った。次いで，CP(LM)を静脈内投与後の血液中成分との相互作用を解明するため，②血清蛋白との結合様式，③ CP(LM)の血清中における薬物放出過程の解析，並びに④血液中エステラーゼによる CP から CP-acid への加水分解の種差を検討した。さらに，⑤血液脳関門(BBB)透過性を評価することにより，奏効部位の一つである脳への薬物送達機構を明らかにした。

【方法】

LM 製剤の調製：^{3}H 標識または非標識の CP または CP-acid (1～2 μg/m*l*)，並びに 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl indocarbocyanine perchlorate (DiI, 0.1 mg/m*l*)を含有する 10% (w/v) ダイズ油 LM 製剤は，French press を使用して調製した。

PDMS-GB 測定法：洗浄したグラスビーズ(1.0～1.4 mm)を PDMS で表面処理し，PDMS-GB を作成した。PDMS-GB 測定は，ガラスチューブ(3 m*l*)中 1 m*l* の試料に PDMS-GB 3 g を加えることにより開始し，激しく振とう後速やかに上清 100 μ*l* を採取し終了させた(Fig. 2)。

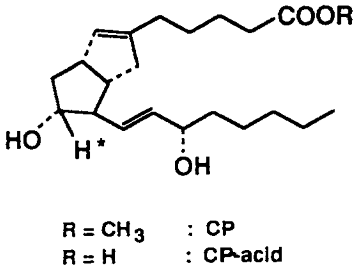

Fig. 1 Chemical structures of CP and CP-acid
* Labeled position of ^{3}H

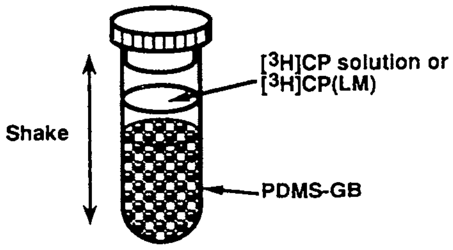

Fig. 2 Setup for PDMS-GB assay

CP(LM)の薬物放出過程の解析：[^{3}H]CP(LM)を生理食塩水で 1/100 に希釈後経時的に PDMS-GB 測定を行い，薬物放出過程の解析を行った。また，[^{3}H]CP(LM)を 20,000 g で 30 分間遠心分離しリン脂質粒子相を採取し，同様な測定を実施した。

CP 及び CP-acid の蛋白結合：[^{3}H]CP の蛋白結合率は PDMS-GB 測定法により，[^{3}H]CP-acid の結合率は限外ろ過法により測定した。なお，PDMS-GB 測定法の信頼性は，[^{3}H]ジアゼパムの蛋白結合率測定に本測定法を適用し，限外ろ過法で測定した値と比較することによりを確認した．また，ヒト血清アルブミン（HSA, fatty acid-free）との結合に対する種々リガンドの

置換作用を検討し，両薬物の結合サイトの推定を行った.

血清中における CP(LM)の薬物放出過程の解析：イヌ及びヒト血清に[^{3}H]CP(LM)を添加し，経時的に[^{3}H]CP の加水分解率を測定するとともに，PDMS-GB 測定法により薬物保持効率の測定を行った。LM 粒子に保持された[^{3}H]CP と同様に，粒子より放出され血清蛋白と結合した薬物はともに PDMS-GB へ吸着しないことから，薬物保持効率を測定するにはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加して蛋白結合を置換する工夫を加えた。なお，カラムクロマトグラフィー及びメンブランフィルターろ過法により，[^{35}S]SDS は LM 粒子に結合しないことを確認した。

血液中エステラーゼによる[^{3}H]CP 加水分解の種差：ラット，イヌ及びヒトの血液を血漿，赤血球，赤血球膜及び細胞質に分画し，[^{3}H]CP から[^{3}H]CP-acid への加水分解活性を測定し，さらに各種阻害剤を用いエステラーゼの推定を試みた。

初代培養牛脳毛細血管内皮細胞(BCECs)への取り込み：Terasaki ら[1] の方法に準じた。単層培養した初代培養 BCECs に[^{3}H]CP (35 nM), [^{3}H]CP-acid (35 nM)並びにこれらの LM 製剤(1/150 希釈)を添加し, 所定時間に取り込まれた薬物量を測定した。また, 初代培養 BCECs と DiI(LM)をインキュベートした後，フローサイトメトリー，蛍光顕微鏡による観察及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による DiI の定量を行った。

Capillary depletion 法：Shimura ら[2] の方法に準じ，ラットに[^{3}H]CP(LM)(15倍希釈)または[^{14}C]sucurose (27 mM)を持続投与後 charotid plexus を除いた脳皮質右半球を採取し，ホモジェナイズ後デキストラン密度勾配遠心分離法により毛細血管画分と脳実質画分に分離し，それぞれのみかけの分布容積(V_{dapp})を求めた。

正常及び一過性脳虚血ラットにおける *in situ* 脳潅流実験：Takasato ら[3] の方法に準じ，正常または 4 血管結紮一過性脳虚血ラットに[^{3}H]CP，[^{3}H]CP-acid，各 LM 製剤及び[^{14}C]sucrose を脳潅流し，潅流側大脳皮質半球の放射能を測定し，BBB 透過係数を求めた。

【結果及び考察】

① CP(LM)の薬物保持効率の測定と薬物放出過程の解析

CP は種々材料へ高率に吸着するため，透析法，限外ろ過法またはゲルろ過法による[^{3}H]CP(LM)の薬物保持効率の測定は困難であることから，遊離の[^{3}H]CP を定量的に PDMS-GB へ吸着させることにより薬物保持効率を測定した。10% (w/v) ダイズ油 LM の[^{3}H]CP 保持効率はほぼ 100% であった。また，生理食塩水で 1/100 に希釈後経時的に測定を行った結果，bi-exponential の薬物放出を示したことから，[^{3}H]CP は LM 中の 2 つの部位から放出されることが示唆された。さらに，[^{3}H]CP(LM)を超遠心分離しダイズ油エマルション粒子と分離したリン脂質に富む下層成分について検討した結果，[^{3}H]CP の 1 次放出を示しその薬物放出

速度係数は，[3H]CP(LM)からの薬物放出における第2相の値と近似した。これらのことから，CPはLM中のダイズ油粒子及びリン脂質粒子より放出されるものと推察された。

②血清蛋白結合率の測定

[3H]CP蛋白結合率は，0.5〜10.0 ng/*ml* において濃度に依らず，イヌ血清中で〜95%，ヒト血清アルブミン(HSA, fatty acid-free)で〜87%，ヒト血清では〜98%であった。[3H]CP-acidのラット，ウサギ，イヌ及びヒト血清中における蛋白結合率は，いずれにおいても90%以上の高い値を示した。[3H]CP及び[3H]CP-acidのHSAとの結合に対し，アスピリン，サリチル酸及びインドメタシンによる置換作用は認められなかったが，両薬物ともにクロフィブリン酸及び遊離脂肪酸による有意な置換がみられたことから，CP及びCP-acidのHSAとの結合様式はPGI_2と同様と考えられた。

③血清中における薬物放出過程の解析

[3H]CP(LM)を緩衝液中1/100に希釈した場合，薬物保持効率は速やかに低下したのち60分では平衡状態に達し，68%となった。一方，HSA溶液中では60分までほぼ一定して34〜39%を示した。さらに，イヌ及びヒト血清中における薬物保持効率は，添加1分後にそれぞれ38%及び34%を示したのち，CP-acidへの加水分解とほぼ並行し半減期100分及び27分で低下した。これらのことから，CP(LM)の血清中における薬物保持効率は，LMの希釈，CPの蛋白結合及び加水分解により低下することが明らかになった。

④血液中エステラーゼによるCPの加水分解の種差

ラット全血の[3H]CP加水分解活性は，イヌ及びヒト全血に比べそれぞれ約100倍または400倍を示し，極めて高い活性が血漿中に認められた。イヌ及びヒトの場合，血漿に比較して赤血球に加水分解活性が高かった。イヌ赤血球膜の活性は細胞質に比較して10倍高く，ヒトでは赤血球膜と細胞質の活性は同等であった。各種加水分解阻害剤を用いた検討から，ラットにおける[3H]CPの加水分解には，血漿中carboxylesterase (CarbE)，細胞質のarylesterase (ArE)の関与が示唆され，イヌの血漿及び赤血球膜では，いずれもCarbE，細胞質ではArEが加水分解に関与するものと考えられた。また，ヒト血漿，赤血球膜及び細胞質における加水分解にはそれぞれbutyrylcholinesterase, CarbE及びArEの関与が考えられた。

⑤血液脳関門透過性

初代培養牛脳毛細血管内皮細胞(BCECs)への[3H]CPの取り込みには温度及びエネルギー依存性は認められなかったが，[3H]CP(LM)の場合は温度及びダンシルカダベリンにより有意に阻害され，エンドサイトーシスによる取り込みが示唆された。このことは，蛍光標識LMが初代培養BCECsへエンドサイトーシスにより取り込まれることと符合したが，その取り込み量は[3H]CP(LM)の約10%であり，CP(LM)の取り込みにはLMから遊離したCPの単純拡散が

大きく寄与するものと考えられた。次いで，ラットを用いcapillary depletion法により*in vivo*における[^{3}H]CP(LM)のBBB透過性を検討した結果，脳実質に移行することが示された。また，*in situ*脳潅流法によりラットにおけるBBB透過係数を測定した結果，[^{3}H]CP及び[^{3}H]CP(LM)は[^{3}H]CP-acid及び[^{3}H]CP-acid(LM)に比べ明らかに高い値を示し，その透過性は一過性脳虚血ラットにおいても低下は認められなかった。これらのことから，CP(LM)のBBB透過性には，1)LMのエンドサイトーシス，2)放出されたCPの単純拡散及び3)加水分解により生じたCP-acidの移行が考えられ，このうちCPの単純拡散が大きく寄与することにより，脳障害時においても透過性は低下しないものと推察された。

【結論】

新規に確立したPDMS-GB測定法によりCP(LM)の薬物保持効率の測定が可能となり，静脈内投与後に起こり得る血液中成分との相互作用を*in vitro*において検証し，LMからの薬物放出に関わる諸因子を明らかにした。さらに，*in vivo*及び*in vitro*においてLM製剤の血液脳関門透過機構が明らかにされ，CP(LM)の脳障害治療薬としての可能性が示された。

1) T. Terasaki, S. Takakuwa, S. Moritani and A. Tsuji. Transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier: Studies with monolayers of primary cultured bovine brain capillary endotherial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258: 932-937 (1991).

2) T. Shimura, S. Tabata, T. Terasaki, Y. Deguchi and A. Tsuji. *In-vivo* blood-brain barrier tansport of a novel adrenocorticotropic hormone analogue, ebiratide, demonstrated by brain microdialysis and capillary depletion methods. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44: 583-588 (1992).

3) Y. Takasato, S. I. Rapoport and Q. R. Smith. An *in situ* brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.*, 247: H484-H493 (1984).

学位論文の審査結果の要旨

当該論文に対して，平成8年8月7日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえて，その後に開催の審査委員会において各委員から意見が述べられ，協議の結果，次の通り判定した。

リピッドマイクロスフェアー（LM）は，脂溶性薬物の炎症組織や血管損傷部位などの標的組織集積性を目的とした微粒子運搬体としての利用が注目されている。しかし，LM製剤化の対象となる薬物の脂溶性が高いために種々の材料へ吸着し，LMから放出された主薬を定量することが極めて困難であったために，LM製剤からの主薬放出特性および標的組織送達特性は明らかにされていなかった。そこで，本研究では，脳を標的組織の一つとするプロスタグランジンI_2のエステル化誘導体クリンプロスト（CP）のLM製剤CP(LM)を用いて次に示す成果を得た。

まず，LM製剤から放出されたCPを定量するためにグラスビーズ（GB）にpolydimethylsiloxane（PDMS）を皮膜した吸着体PDMS-GBを用いた斬新な測定法を確立した。この定量法を用いて，LM製剤中のCPは生理食塩水ではダイズ油粒子から速やかに放出される一方，リン脂質粒子相から緩慢に放出される二相性になることを示した。CP (LM)の血液中動態を明らかとするために，CP

のヒトおよび種々動物の血清における蛋白結合率とエステラーゼによる加水分解をPDMS-GB法を用いて測定し，その特徴を明らかにすることに成功した。以上の生理食塩水中および血清中で得られた結果を踏まえ，CP (LM) からのCP放出はLMの希釈，CPの蛋白結合に加え，エステラーズによる加水分解により促進されることを定量的に示すことができた。さらに，奏効部位である脳への送達に関して，CP (LM) は脳毛細血管内皮細胞においてLMのエンドサイトーシスによる移行，LMから放出されたCPの単純拡散による移行と加水分解で生成したCP-acidの移行によってBBBを透過して脳実質へ移行することを初代培養牛脳毛細血管内皮細胞系およびラット脳灌流系を用いて明らかにし，その透過性は脳障害時においてもほとんど低下しないことを示した。

以上の研究成果は，CPのみならず種々脂溶性薬物のLM製剤の体内動態研究とその標的組織集積性評価研究に多大に寄与すると思われ，博士（薬学）論文に値すると認める。