

新規BBBモデルの機能評価 A New BBB Model: Testing Specific Function

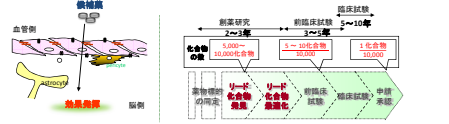
○中川慎介^{1,2}, Mária A. Deli^{2,5}, 川口裕子³, 清水谷健志³, 下野貴宣², 山口万貴子², 片岡泰文^{2,4}, 丹羽正美^{1,2}
e-mail: shin3@nagasaki-u.ac.jp

1. 長崎大 院・医歯薬・薬理学1 (医)
2. ファーマコセル(株)
3. 大日本住友製薬・薬物動態研究所・探索薬物動態研究部
4. 福岡大・薬・薬学疾患管理学
5. ハンガリーサイエンスアカデミー



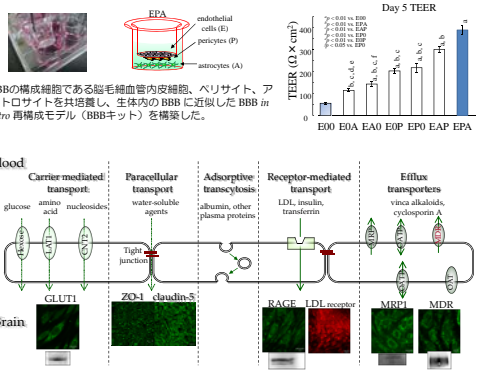
背景・目的

中枢神経作用薬の開発

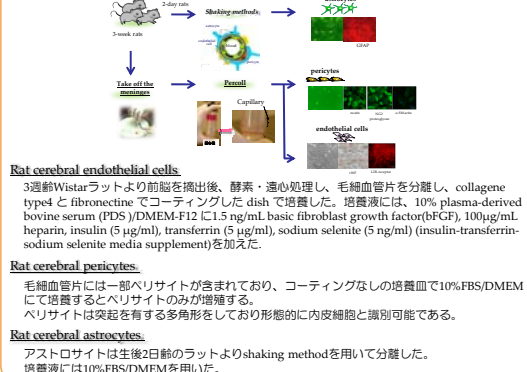


- In vitro で作用が発見された中枢神経疾患の治療薬候補であっても、実験動物に投与すると、その多くは脳に存在する関門である血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) のために脳内に移行できず、実際の治療になり得ない。
- 薬物の BBB 透過性は化学構造や分子量などから予め判断できず、脳内への移行性に一定の法則性を見出すことはできない。
- 中枢神経作用薬の開発、適正な薬物治療のためには、生体の複雑な BBB と等価のシステムを用いて、薬物の透過性を予測することが重要である。
- 脳内移行性を簡便に検定する検査キット (BBBキット) があれば、膨大な費用と時間をかけて行われていた創薬研究の効率化が図られ、より即効的で確実な創薬のスクリーニングが達成でき、中枢神経作用薬の開発に貢献できる。

in vitro BBB 再構成系 ~BBB キット~



初代培養細胞

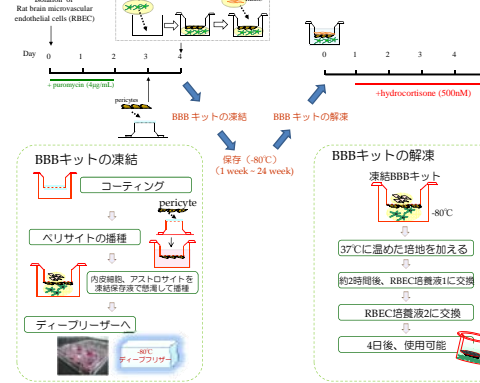


結果 1~ 凍結・解凍~

BBB キットの凍結と解凍

BBBキットの長期保存および輸送を可能とするため、凍結保存方法を構築し、その機能評価を行った。

凍結/解凍方法



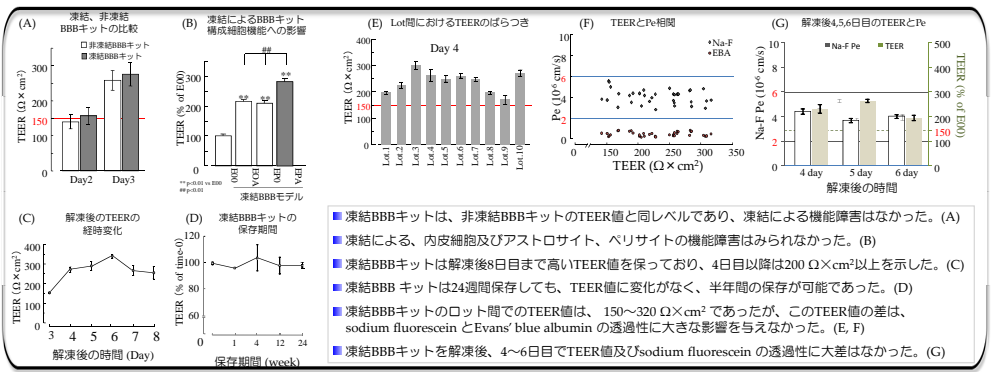
機能評価

Transendothelial electrical resistance (TEER)

TEER を EVOM resistance meter (World Precision Instruments) を用いて測定した。測定値は Ω × cm² で表した。TEER はイオン移動の指標であり、その値が高いほどバリア機能が高いことを示している。

Transcellular transport and paracellular transport

内腔側に sodium fluorescein (Na-F, MW:376Da) 及び Evans' blue albumin (EBA, MW:67kDa) を入れその透過性を検討した。Na-F は細胞間隙を透過する物質の指標で、EBA は経細胞性輸送の指標である。



結果 2~ Drug permeability assay~

既存薬物40種類の透過性検定

BBBキットの精度を確認するために、既存薬物 40 種類を用いて透過性検定を行った。検定化合物 (各 1 μM) を管腔側に入れ、20, 40, 60 分後に脳側に漏れ出てきた薬物濃度を測定し、回収率及び透過係数を算出した。

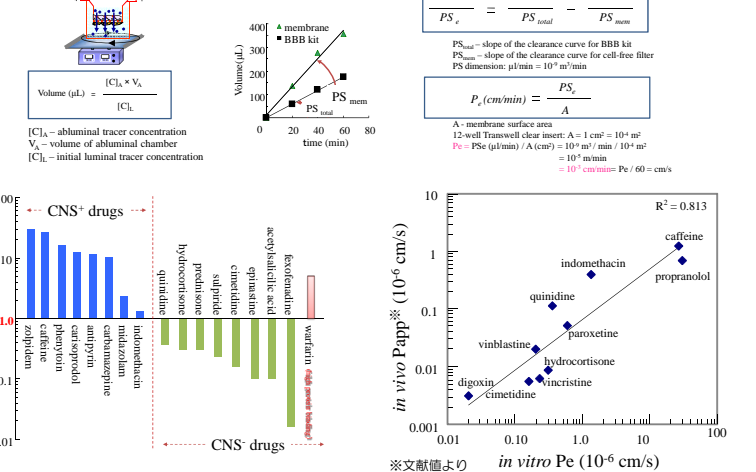
name	MW	CNS	transport	Recovery rate (%)
sulpiride	341	+	efflux; Pgp, influx; OCTN1, OCTN2, PEPT1	91.7
phenytoin	252	+	lipophilic and high protein binding	99.6
strychnine	189	+	passive lipophilic	90
carbamazepine	286	+	passive lipophilic	89.6
indometacin	388	+	passive hydrophilic	87.6
caffeine	212	+	passive lipophilic	87.5
carbamazepine	286	+	passive lipophilic	85.1
midazolam	326	+	passive lipophilic, highly permeable; Pgp substrate	84.2
propranolol	296	+	passive lipophilic	81.9
zolpidem	382	+	passive lipophilic	71.7
atenolol	226	+	passive hydrophilic, weak base	97.1
cimetidine	252	+	efflux	95.4
acetylsalicylic acid	180	+	efflux; P-gp, efflux (Oat1, Oat2)	94.2
quinidine	384	+	efflux	94
prednisone	384	+	efflux; P-gp, OATP1A2	93.1
fenofibrate	388	+	efflux; P-gp	88.2
hydrocortisone	382	+	efflux; P-gp	79.8
warfarin	346	+	lipophilic and high protein binding	72.8
quinidine	384	+	efflux	72.8

回収率 (recovery rate) の算出

薬物の溶解性や吸着等の問題による判定ミスを防ぐため、回収率 (recovery rate) を算出した。

$$\text{Recovery rate (\%)} = \frac{[\text{initial}] - [\text{final}] - [\text{adsorbed}]}{[\text{initial}]} \times 100$$

透過係数の算出

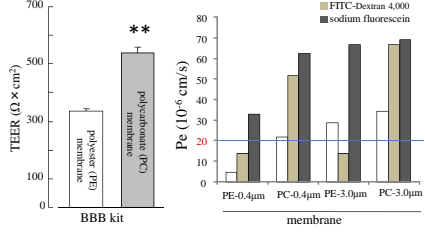


- 中枢作用性薬物と非中枢作用性薬物は透過係数により判別可能である。
- BBBキットで得られた化合物の透過係数と文献値より得られた in vivo Papp 値は良好な相関関係を示した。

Transwell® membraneの検討

Transwell® Permeable Supports

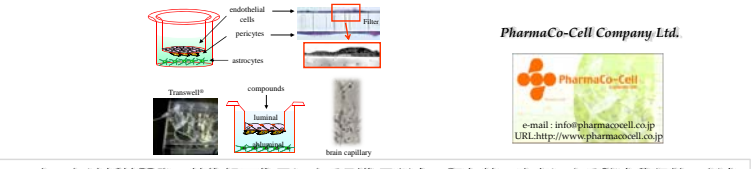
z	membrane	Pore size	Pore density
3460	Polyester (PE)	0.4 μm	4 × 10 ⁸ pores/cm ²
3401	Polycarbonate (PC)	0.4 μm	1 × 10 ⁸ pores/cm ²
3462	Polyester (PE)	3.0 μm	2 × 10 ⁸ pores/cm ²
3402	Polycarbonate (PC)	3.0 μm	2 × 10 ⁸ pores/cm ²



Polycarbonate membrane の 3.0 μm の pore size を持つ Transwell® は、分子の透過性にも対応した membrane であり、その TEER 値は polyester membrane よりも高値を示した。

Conclusion

- Transwell® 内での長期保存が可能凍結方法を構築した。
- BBBキットで得られた化合物の透過係数と文献値より得られた in vivo Papp 値は良好な相関関係を示し、実用的な薬物脳内移行性検定システムであることが実証できた。



BBBキットは新薬開発、薬物相互作用による副作用判定、既存薬の改良による脳内移行性の判定、病態モデルを用いた病態解析などに利用でき、理想的な BBB in vitro 再構成モデルである。

