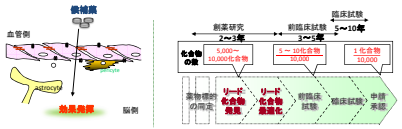
第81回日本薬理学会年会 03,17-19,2008

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㈱
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 ①

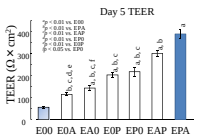
中枢神経作用薬の開発

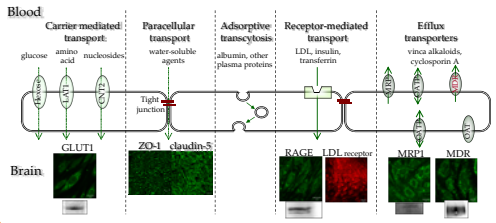


- *In vitro* で作用が発見された中枢神経性疾患の治療薬候補であっても、実験動物に投与すると、その多くは脳に存在する関門である血液脳関門（Blood-Brain Barrier; BBB）のために脳内に移行できず、実際の治療薬になり得ない。
- 薬物の BBB 透過性は化学構造や分子量などから予め判断できず、脳内への移行性に一定の法則性を見出すことはできない。
- 中枢神経作用薬の開発、適正な薬物治療のためには、生体の複雑な BBB と等価のシステムを用いて、薬物の透過性を予測することが重要である。
- 脳内移行性を簡便に検定する検査キット（BBBキット）があれば、膨大な費用と時間を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

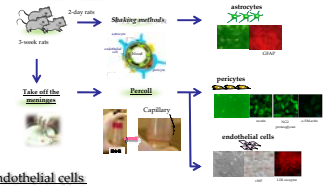
in vitro BBB 再構成系 ～BBB キット～ ②

BBBの構成細胞である脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを共培養し、生体内の BBB に近似した BBB *in vitro* 再構成モデル（BBBキット）を構築した。





初代培養細胞 ③



Rat cerebral endothelial cells

3週齢Wistarラットより前脳を摘出後、酵素・遠心処理し、毛細血管片を分離し、collagene type4 と fibronectine でコーティングした dish で培養した。培養液には、10% plasma-derived bovine serum (PDS)/DMEM-F12 に1.5 ng/mL basic fibroblast growth factor(bFGF), 100μg/mL heparin, insulin (5 μg/ml), transferrin (5 μg/ml), sodium selenite (5 ng/ml) (insulin-transferrin-sodium selenite media supplement)を加えた。

Rat cerebral pericytes

毛細血管片には一部ペリサイトが含まれており、コーティングなしの培養皿で10%FBS/DMEMにて培養するとペリサイトのみが増殖する。
ペリサイトは突起を有する多角形をしており形態的に内皮細胞と識別可能である。

Rat cerebral astrocytes

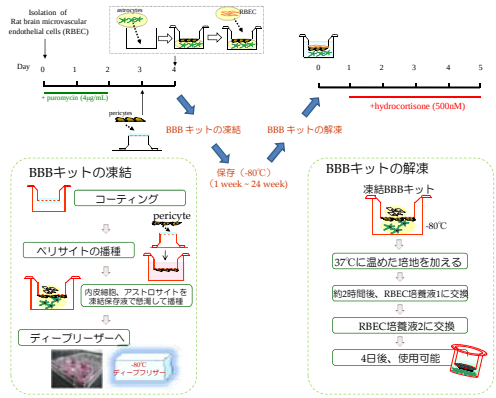
アストロサイトは生後2日齢のラットよりshaking methodを用いて分離した。
培養液には10%FBS/DMEMを用いた。

結果 1~ 凍結・解凍~ ④

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



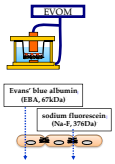
機能評価

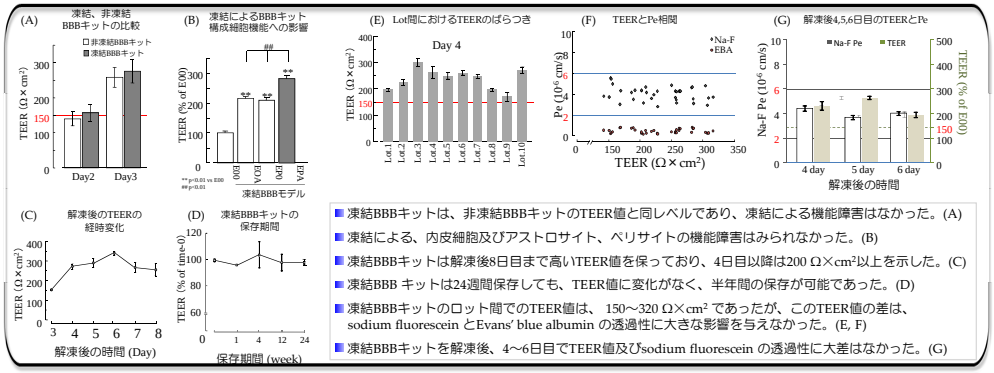
Transendothelial electrical resistance (TEER)

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、その値が高いもの程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。





- 凍結BBBキットは、非凍結BBBキットのTEER値と同レベルであり、凍結による機能障害はなかった。(A)
- 凍結による、内皮細胞及びアストロサイト、ペリサイトの機能障害はみられなかった。(B)
- 凍結BBBキットは解凍後8日目まで高いTEER値を保っており、4日目以降は200 Ω×cm²以上を示した。(C)
- 凍結BBB キットは24週間保存しても、TEER値に変化がなく、半年間の保存が可能であった。(D)
- 凍結BBBキットのロット間でのTEER値は、 150～320 Ω×cm² であったが、このTEER値の差は、sodium fluorescein とEvans' blue albumin の透過性に大きな影響を与えなかった。(E, F)
- 凍結BBBキットを解凍後、4～6日目でTEER値及びsodium fluorescein の透過性に大差はなかった。(G)

結果 2~ Drug permeability assay~ ⑤

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 1μM）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	+	lipophil and high protein binding	99.6
antipyrin	188	+	passive lipophilic	90
carisoprodol	260	+	passive lipophilic	89.6
indomethacin	358	+	passive hydrophilic	87.6
caffeine	212	+	passive lipophilic	87.5
carbamazepine	236	+	passive lipophilic	85.1
midazolam	326	+	passive lipophilic, highly permeable, Pgp substrate	84.2
propranolole	296	+	passive lipophilic	81.9
zolpidem	382	+	passive lipophilic	71.7
atenolol	226	-	passive hydrophilic, weak base	97.1
cimetidine	252	-	efflux	95.4
acetylsalicilic acid	180	-	organic anion, efflux (Oat1, Oat2)	94.2
epinastine	286	-	efflux	94
prednisone	358	-	efflux (Pgp)	93.2
fexofenadine	538	-	efflux: Pgp, OATP1A2	93.1
hydrocortisone	362	-	efflux (Pgp)	88.2
warfarin	346	-	lipophil and high protein binding	79.8
quinidine	783	-	efflux	72.8

name	MW	CNS	transport	Recovery rate (%)
risperidone	410	+	efflux	69.8
fluvoxamine	434	+	lipophil and high protein binding	63.6
trazodone	408	+	passive lipophilic	63.1
fluoxetine	346	+	lipophil and high protein binding	62.3
hydroxyzine	448	+	passive lipophilic	53
haloperidol	376	+	passive lipophilic	52.1
vincristine	923	-	efflux	64.6
digoxin	781	-	efflux	62.7
prazosin	420	-	efflux: ABCG2	57.7
vinblastine	909	-	efflux	53.5
verapamil	491	-	efflux	51.2
nortriptyrine	300	+	Influx: NET	44.4
paroxetine	375	+	lipophil and high protein binding, Pgp inhibitor but not Pgp substrate, lipid soluble	39.7
buspirone	422	+	passive hydrophilic	39.4
chlorpromazine	355	+	efflux, Pgp substrate/inhibitor	32.3
sertraline	343	+	lipophil and high protein binding, Pgp inhibitor	18.7
paclitaxel	854	-	efflux	38.4
loperamide	514	-	efflux	38.3
loratadine	383	-	efflux	16
amiodarone	682	-	efflux	4
cyclosporin	1,203	-	efflux	1.6

回収率（recovery rate)の算出

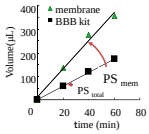
薬物の溶解性や吸着等の問題による判定ミスを防ぐため、回収率（recovery rate)を算出した。

$$\text{Recovery rate (\%)} = \frac{[\text{luminal}]^{t=60} + [\text{abluminal}]^{t=60}}{[\text{luminal}]^{t=0}} \times 100$$

透過係数の算出

$$\text{Volume } (\mu L) = \frac{[C]_A \times V_A}{[C]_L}$$

$[C]_A$ – abluminal tracer concentration
V_A – volume of abluminal chamber
$[C]_L$ – initial luminal tracer concentration

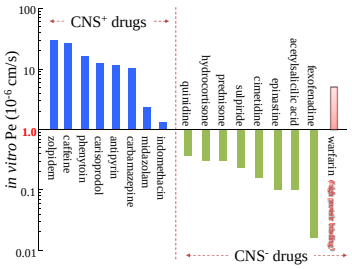


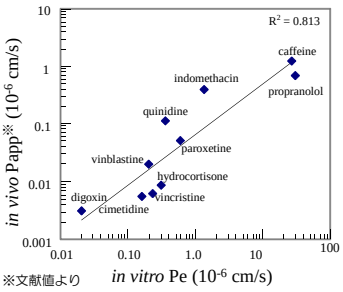
$$\frac{1}{PS_e} = \frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{mem}}$$

PS_{total} – slope of the clearance curve for BBB kit
PS_{mem} – slope of the clearance curve for cell-free filter
PS dimension: μl/min = 10⁻³ m³/min

$$P_e(cm/min) = \frac{PS_e}{A}$$

A - membrane surface area
12-well Transwell clear insert: A = 1 cm² = 10⁻⁴ m²
Pe = PSe (μl/min) / A (cm²) = 10⁻³ m³ / min / 10⁻⁴ m²
= 10⁻¹ m/min
= 10⁻³ cm/min= Pe / 60 = cm/s





※文献値より

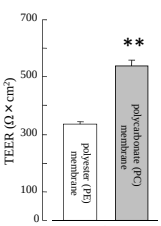
- 中枢作用性薬物と非中枢作用性薬物は透過係数により判別可能である。
- BBBキットで得られた化合物の透過係数と文献値より得られた *in vivo* 値は良好な相関関係を示した。

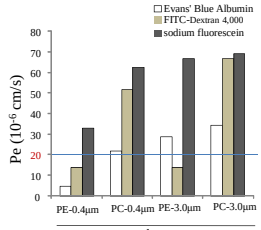
Transwell® membraneの検討 ⑥

Transwell® Permeable Supports

#	membrane	Pore size	Pore density
3460	Polyester (PE)	0.4μm	4×10⁶ pores/cm²
3401	Polycarbonate (PC)	0.4μm	1×10⁸ pores/cm²
3462	Polyester (PE)	3.0μm	2×10⁶ pores/cm²
3402	Polycarbonate (PC)	3.0μm	2×10⁶ pores/cm²

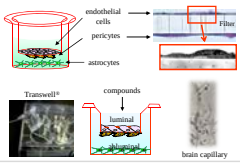
- Polycarbonate membrane の 3.0μm の pore sizeを持つ Transwell® は大分子の透過性にも対応したmembrane であり、その TEER 値は polyester membrane よりも高値を示した。





Conclusion ⑦

- Transwell®内での長期保存が可能な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。



PharmaCo-Cell Company Ltd.

e-mail : info@pharmacocell.co.jp
URL:http://www.pharmacocell.co.jp

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。