

2003 ¹²⁵I-IBZM を用いた鼻腔内投与薬剤の 中枢移行性の新規定量法の検討

寺田 理華

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：薬剤を目的部位へ送達するために最適な投与経路を選択することは非常に重要である。特に脳においては血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) により脳内への物質の輸送が厳密に制御されており、静脈内投与された薬剤の中枢移行を妨げている。近年、薬剤の投与経路として、血液を経由せずに脳脊髄液あるいは脳に直接移行する鼻腔内投与が注目されている。しかし、脳内受容体を作用点とする薬剤の鼻腔内投与後の中枢移行性と受容体結合を直接評価することは困難である。そこで本研究では、中枢移行性の標識 dopamine D2 receptor (D2R) リガンドの D2R 結合率を指標として、鼻腔内投与した薬剤の中枢移行性を間接的に定量する新たな評価法を検討した。中枢性 D2R リガンドには、高い中枢移行性と D2R 選択性が報告されている放射性ヨウ素標識 (S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrrodinyl)-methyl]benzamide (IBZM) を使用した。鼻腔内投与後の中枢移行性を評価するモデル化合物には、BBB 透過性の低い D2R 遮断薬である domperidone を使用した。マウス線条体ホモジネートを用いた D2R 結合阻害実験では、domperidone の負荷濃度に依存して ¹²⁵I-IBZM の結合率が低下することが確認できた。また、薬剤の経鼻投与方法を種々検討した結果、液剤が鼻腔内に保持されやすいカテーテル挿入経鼻投与マウスに domperidone を鼻腔内投与することによって ¹²⁵I-IBZM の D2R への結合が低下することが確認できた。以上より、¹²⁵I-IBZM の D2R 結合率の変化を指標として、鼻腔内投与した薬剤の中枢移行性および受容体親和性を間接的に定量できる可能性が示された。

I. はじめに

薬剤の投与方法には、経口や静脈内、皮下投与など様々なルートがあり、薬剤を目的部位へ送達するために最適な投与経路を選択することは非常に重要である。特に、脳においては物質の輸送が厳密に制御されており、静脈内投与で血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を透過できる薬剤はきわめて限られている。そのため、薬剤の中枢移行性を向上させる投与経路として、血液を経由せずに脳脊髄液あるいは脳に直接移行する鼻腔内投与が注目されている。しかし、鼻腔内投与した薬剤の中枢移行性を非侵襲的に直接評価するには、薬剤そのものを標識してイメージングを行う必要があり、薬剤の構造を変化させずに中枢移行性を直接評価することは、一般に困難である。

そこで、鼻腔内投与した脳内ドーパミン D2 受容体 (dopamine D2 receptor; D2R) を作用点とする薬剤の中枢移行性を間接的に評価する新たな手法として、中枢移行性の高い放射性標識 D2R リガンドの D2R 結合率を指標とすることを考えた。中枢性 D2R リガンドには、高い中枢移行性と D2R 選択性が報告されている放射性ヨウ素標識 (S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrrodinyl)-methyl]benzamide (IBZM)²⁾ を使用し、鼻腔内投与後の中枢移行性を評価するモデル化

合物には、BBB 透過性が低い D2R リガンドである domperidone を選択した。BBB 透過性の高い薬剤をモデル化合物とした場合、鼻腔内投与の際に誤飲した結果、消化管から吸収されて血中から BBB を透過して脳内 D2R に結合することで、鼻腔内投与した薬剤の中枢移行を過大評価してしまう事態を招く恐れがある。また、BBB 透過性が高い薬物であれば、鼻腔内投与を行う必要がなく静脈内投与で十分であるので、BBB 透過性が低く、鼻腔内投与でしか D2R に到達できない domperidone がモデル化合物に最適であると判断した。

本研究では、 ^{125}I -IBZM の D2R 結合率の変化を指標として、鼻腔内投与した薬剤 domperidone の中枢移行性を間接的に定量する新たな評価法の検討を目的とした。

II. In vitro D2R 結合阻害実験

(A) 実験方法と材料

マウス脳内 D2R 結合率を評価するため、D2R が高発現している線条体と D2R が発現していない小脳³⁾ を ddY マウス (オス、6 週齢、日本 SLC) より摘出し、50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4) を各組織の湿重量の 100 倍量加え、(1) ポリトロンホモジナイザー (PT-MR10-35GT, Kinematica) を用いて組織を破碎した。その後、(2) 遠心分離機 (himacCF16RX, Hitachi) を用いて 20000 G, 20 分、4 °C で遠心分離し、上清を取り除いた後、tris-HCl buffer を 400 μL 加えて上記の (1), (2) を繰り返した。2 度目の遠心分離後、上清を取り除き、assay buffer (50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) を加えてホモジナイザーで組織を破碎した後、蛋白量が 50 μg protein/50 μL となるように assay buffer で希釈し、ホモジネートを得た。このホモジネートに assay buffer 100 μL , D2R 遮断薬として domperidone (最終濃度 0.01 nM~1 mM) 100 μL を混和した後、 ^{125}I -IBZM 100 μL を加えることにより反応を開始させ、37 °C の温浴 (T-25J, Thomas) で 15 分振盪させた。その後、サンプルを 100 μL ずつ glass filter (GC-50, Advantec) に捕集して反応を停止させ、氷冷した tris-HCl buffer 1 mL で 3 度洗浄し、乾燥させた glass filter の放射能をオートウェル γ カウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka medical) で測定した。なお、投与放射能に対する glass filter で捕集した放射能の割合を受容体結合率 [%ID] として評価した。

(B) 結果と考察

線条体および小脳ホモジネートでの In vitro D2R 結合阻害実験の結果を Fig. 1 に示す。小脳では、負荷した domperidone の濃度に関わらず常に ^{125}I -IBZM の結合率が約 4 %と一定であった。一方、線条体では domperidone 無負荷の状態でも 15 %程度の結合率が確認されたが、domperidone を 10 μM 以上負荷すると小脳と同程度の結合率まで低下した。

以上より、小脳は D2R が発現しておらず D2R 特異的な結合は見られない³⁾ ため、約 4 %は非特異的な結合であることが明らかとなった。一方、線条体では D2R が高発現しており、 ^{125}I -IBZM の結合率が約 15 %であったことから、非特異的な結合を差し引いた 10 %以上が ^{125}I -IBZM の D2R への特異的な結合であることが明らかになった。また、domperidone 10 μM を負荷したことで線条体での結合率が非特異的な結合である約 4 %まで低下しており、 ^{125}I -IBZM の D2R への特異的な結合がほぼ完全に遮断されたと推測された。

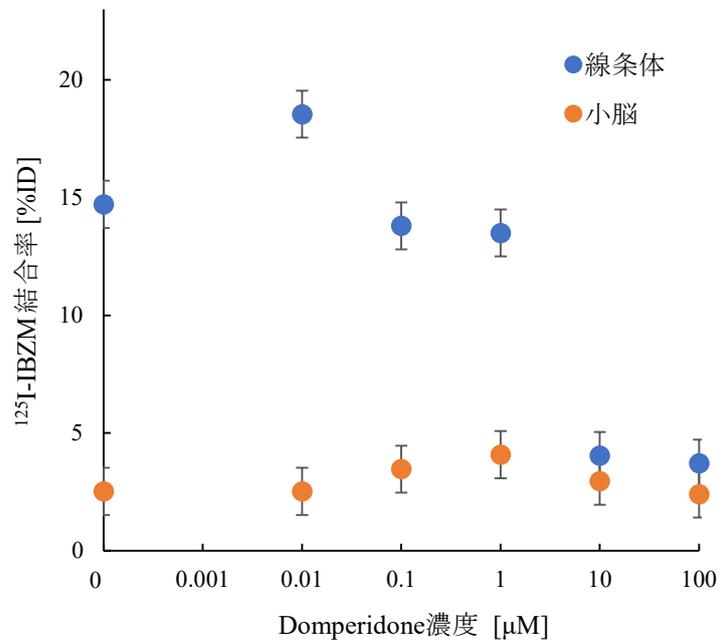


Fig. 1 In vitro D2R 結合阻害実験結果

III. In vivo D2R 結合阻害実験

(A) 実験方法と材料

マウスへの経鼻投与方法の1つである鼻孔へ薬剤を投与する点鼻では、安定した薬剤投与が困難であり、鼻腔から口腔へと流入が生じることで、鼻粘膜からの中枢移行を正確に評価できなくなる恐れがある。そのため、カテーテルをマウスの気管に入れて気道を確保したうえで、頸部の気管から上行性に鼻腔へカテーテルを挿入して薬剤を直接投与することで、液剤が鼻腔内に保持されやすいカテーテル挿入経鼻投与マウス⁴⁾を作成し、使用することとした。

4時間絶食した ddY マウス (オス、6 週齢、日本 SLC) に鼻腔内投与のためのカテーテル処置を施し、カテーテル挿入経鼻投与マウスを 12 匹作成した。これらのマウスに 8%酢酸で 7 mM に溶解した domperidone を、投与量が 2 mg/kg となるように 20 μL 鼻腔内投与し、鼻腔内投与と同時、または投与後 15 分および 30 分に、¹²⁵I-IBZM を尾静脈から 200 kBq 投与した (n=3)。Control では domperidone の代わりに生理食塩水を鼻腔内投与し、同時に ¹²⁵I-IBZM を尾静脈から投与した (n=3)。¹²⁵I-IBZM 投与から一律 30 分後に isoflurane (富士フイルム和光純薬) 麻酔下で心臓採血を行い、頸椎脱臼により屠殺した。その後、すみやかに脳を摘出後、氷冷下で、嗅球、大脳皮質、線条体、小脳、海馬、その他の脳組織に分画し、それぞれの湿重量を秤量した後、放射能を測定した。

測定した各臓器の湿重量、放射能から ¹²⁵I-IBZM の重量集積率を以下の式より算出した。

$$\text{重量集積率 } [\%ID/g] = \{ \text{組織放射能 } [cpm] / (\text{投与放射能 } [cpm] \times \text{組織重量 } [g]) \} \times 100$$

(B) 結果と考察

^{125}I -IBZM の脳組織への重量集積率を Fig. 2 に示す。Domperidone の鼻腔内投与から ^{125}I -IBZM 静注までの時間を 0 分および 30 分とした条件では、線条体への集積は control と同程度であり、集積低下は認められなかった。一方、domperidone 投与から ^{125}I -IBZM 投与までの時間を 15 分とした条件では、D2R が高発現している線条体での集積が 28.5 %低下した。

Domperidone 投与から ^{125}I -IBZM 投与までの時間を 0 分とした (同時投与した) 場合、 ^{125}I -IBZM が domperidone よりも中枢移行速度が速いため、 ^{125}I -IBZM の D2R 結合率が control に対して変化しなかったと考えられる。また、追加で検討した domperidone の投与から ^{125}I -IBZM 投与までの時間を 30 分より長くした条件においても、線条体への集積低下は確認できなかったことから、domperidone は ^{125}I -IBZM よりも D2R への親和性が低く、domperidone の投与から ^{125}I -IBZM 投与までの時間を 30 分とした条件では、domperidone が D2R から既に乖離している可能性が考えられる。Domperidone 投与から ^{125}I -IBZM 投与までの時間を 15 分とした条件でのみ線条体の集積が低下していることから、鼻腔内投与した domperidone の中枢移行性と受容体親和性を適切に評価するためにはこの条件が適していたと推測される。また、他の薬剤の中枢移行性と受容体親和性を評価する場合にも、鼻腔内投与後の経過時間の至適条件の検討が必要であると考えられた。

以上より、in vivo D2R 遮断薬負荷においても in vitro 結合阻害実験と同様に、domperidone を鼻腔内投与することで ^{125}I -IBZM の線条体 D2R への結合が低下したことから、鼻腔内投与した domperidone の中枢移行性と D2R 受容体親和性を反映した ^{125}I -IBZM の D2R 結合阻害効果を得られることが確認された。

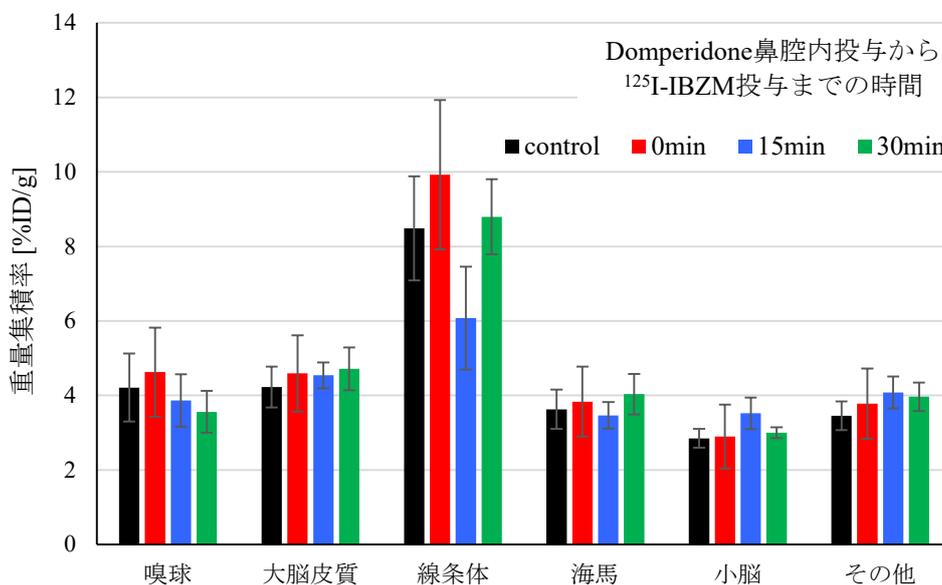


Fig. 2 各脳組織の重量集積率

IV. 結語

マウス脳組織ホモジネートを用いた *in vitro* 実験では、¹²⁵I-IBZM は D2R へ特異的に結合し、domperidone 負荷によってその結合が濃度依存的に遮断されることを確認した。また、カテーテル挿入経鼻投与マウスを用いた *in vivo* 実験でも、domperidone の鼻腔内投与から ¹²⁵I-IBZM 静注までの時間を 15 分とした条件において、D2R が高発現している線条体で ¹²⁵I-IBZM の集積が低下していることが確認された。

以上の結果より、D2R 遮断薬である domperidone を鼻腔内投与した一定時間経過後に静注した ¹²⁵I-IBZM の D2R への結合率が低下したことから、¹²⁵I-IBZM の D2R 結合率変化を指標とすることで、鼻腔内投与した薬剤の中枢移行性および受容体親和性を間接的に定量できる可能性が示された。

V. 謝辞

本研究を終えるにあたりご指導くださいました川井恵一教授、小林正和准教授、水谷明日香助教、およびご協力いただきました本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) 真田真莉子. 経鼻薬物送達の現状と将来. *Folia Pharmacol Jpn.* 150: 148-152; 2017.
- 2) Verhoeff NP, Bobeldijk M, Feenstra MG, et al. In vitro and in vivo D2-dopamine receptor binding with [¹²³I]S(-)iodobenzamide ([¹²³I]IBZM) in rat and human brain. *Nucl Med Biol.* 18(8): 837-846; 1991.
- 3) Kung MP, Kung HF, Billings J, et al. The characterization of IBF as a new selective dopamine D-2 receptor imaging agent. *J Nucl Med.* 31(5): 648-654; 1990.
- 4) Hirai S, Yashiki T, Matsuzawa T, et al. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int J Pharm.* 7(4): 317-325; 1981.