培養牛脳微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* BBB モデルに
おける liposome 封入 cisplatin 透過性の基礎的検討

案田岳夫・山下弘己・藤田英志・徳永能治・柴田尚武*

Basic experiment of BBB permeability of cisplatin encapsulated in liposome by means of in vitro BBB model with bovine brain microvessel endothelial cells

Liposomes have been proved to be effective as carriers of water-soluble drugs into the central nervous system, but the mechanisms by which water-soluble drugs encapsulated in liposomes permeate the blood-brain barrier (BBB) are not clear. In order to elucidate the mechanisms, the authors investigated the permeability of liposome encapsulated cisplatin [cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP] across *in vitro* BBB model compared with that of free CDDP. This *in vitro* BBB model consisted of primarily cultured bovine brain microvessel endothelial cell (BMEC) monolayer onto the collagen-coated polycarbonate membrane which is put in side by side diffusion cells. This *in vitro* BBB model matches *in vivo* BBB in morphology and enzymatic activity, and has been used in many transport studies.

The result showed that liposome encapsulated CDDP permeated across BMEC monolayers and the permeability was significantly attenuated by metabolic inhibitor, 2-deoxyglucose treatment ($p < 0.05$ by Student's *t*-test). Our findings confirmed that CDDP encapsulated in liposomes could be transported through BBB by way of energy-dependent transcellular pathway.

Takeo Anda・Hiromi Yamashita・
Hideshi Fujita・Yoshiharu Tokunaga・
Shobu Shibata*

key words : liposome, cisplatin, permeability,
in vitro BBB model,
energy-dependent transport

中枢神経系には血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) が存在し、血中の有害な物質から脳組織を保護する役目を担っている。しかし、中枢神経系疾患に対する薬物療法という見地からすれば、この BBB の存在は治療効率をいちじるしく低下させる原因となる。したがって、いかにして薬物の BBB 透過性を高めうるかが重要となる。脳腫瘍、特に悪性神経膠腫に対する化学療法においては、BBB を透過しうる nitrosourea 系の薬剤が好んで用いられてきたが、効果は十分でなく、新たに動注療法、腫瘍内への直接投与法、BBB disruption chemotherapy などが行われてきた。

筆者らの施設は、水溶性薬物をリポソームに封入し投与する方法を試みており、すでに脳腫瘍動物モデルにおける有効性を確認している¹⁻³⁾。さらに電顕によってリポソームが脳血管内皮細胞に endocytosis されることも証明し⁴⁻⁵⁾、drug delivery 担体としてのリポソームの可能性を示唆してきた。しかし、実際に水溶性薬物をリポソームに封入した際、その薬物の BBB 透過に関する pharmacokinetics については、筆者らの知る限りでは検討がなされていない。

この点を明らかにするため、牛脳微小血管内皮細胞 (bovine brain microvessel endothelial cells : BMEC) の初代単層培養よりなる *in vitro* BBB モデルを用い、リポソームに封入した水溶性抗癌剤シスプラチン [cis-diamminedichloroplatinum (II) : CDDP] の透過性を検討した。

方 法

(1) BMEC の分離

BMEC の分離は Audus and Borchardt の方法

* Department of Neurosurgery, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852
長崎大学医学部附属病院脳神経外科教室
Offprint requests to: Takeo Anda, Ph. D.

に準じて行った⁶⁾。

屠殺直後に摘出したウシ2頭分の大脳半球より、無菌操作にて大血管、くも膜、軟膜を除去し、灰白質のみを吸引にて収集し、細切した。これを0.5% dispase 添加 Eagle's minimum essential medium(MEM)中で37℃2時間インキュベーションし、13% dextran 溶液と混和後、9,070×gで10分間遠心し、脳微小血管を得た。

さらに脳微小血管を0.1% collagenase/dispase 添加 MEM 中で37℃5時間インキュベーションすることによって基底膜を消化し、BMEC と pericyte を分離した。

つぎに細胞懸濁液を50% Percoll 濃度勾配溶液上に乗せ、1,700×gで20分遠心して赤血球を分離し、BMECを得た。

(2) BMEC monolayer の作製

6穴プレートに、直径3μmの多数の小孔を有するポリカーボネイト膜を密着させ、ラット collagen とヒト fibronectin を被覆し紫外線滅菌を行った。このプレート上でウマ血清:10%, ヘパリン:100 μg/ml, ECGS(endothelial cell growth supplement):12 μg/ml, ゲンタマイシン:100 μg/ml を含む45% MEN, 45% F12-HAM 培地でBMEC(5×10⁴個/cm²)の初代培養を行った。

(3) CDDP 封入リポソームの調製

Szoka らの reverse-phase evaporation method に準じてリポソームを作製した⁷⁾。

ナス型フラスコ内で卵黄 phosphatidylcholine (egg-PC)30 mg の薄膜にジエチルエーテル3 ml, 5 mM のCDDP 溶液1 ml(PBS(0.01 M)に溶解)を加え、氷上でプローブ型ソニケーターによる超音波照射(40 W, 5分)を行った。これを、ロータリーエバポレーターを使用し350 mmHgで3時間エバポレーションした。vortex mixer を用いて攪拌振盪後、PBS3 ml を加えさらに3時間エバポレーションし、CDDP を封入した large unilamellar vesicle(LUV)を作製した。

free CDDP を遠心(18,000 rpm-10分×3)にて分離し、孔径400 nm のポリカーボネイトフィルターを extrusion させ、リポソーム懸濁液を調製した。

図1 BMEC monolayer grown on polycarbonate membrane is taken from the culture dish and put in side by side diffusion cell
Both chambers of the diffusion cell are filled with 3.0 ml of transport assay buffer. Whole system is kept at 37°C or 4°C and both chambers are stirred constantly.

この懸濁液中のCDDP濃度をHitachi Z-8000 Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometerにて測定し、調製後24時間以内に透過実験に使用した。

(4) 透過実験

confluent に達した培養後12~13日のBMEC monolayer をポリカーボネイト膜ごと6穴プレートより剝離し、side by side diffusion cell(図1)のチャンパー間に設置し、両チャンパーを透過実験緩衝液(NaCl:122 mM, KCl:3.0 mM, CaCl₂:1.4 mM, MgSO₄:1.2 mM, NaHCO₃:25 mM, K₂HPO₄:0.4 mM, glucose:10 mM, HEPES:10 mM)3 ml で満たし、37°Cに保温した。

CDDP 濃度として20 μM となるように、BMEC 側チャンパー(ドナーチャンパー)にリポソーム封入CDDP 懸濁液を加え、経時的(0分, 5分, 10分, 15分, 30分)にポリカーボネイト膜側チャンパー(レセプターチャンパー)から50 μl サンプリングを行い、CDDP 濃度および脂質濃度を測定した。free CDDP についても20 μM の濃度で同様の実験を行った。

なお、透過係数は次式にて算出した。

$$P = X / (S \times t \times Cd)$$

図 2

- a : Bovine brain microvessel endothelial cell (BMEC) monolayer grown in a collagen coated tissue culture dish observed with phase contrast microscopy. Cells become confluent in culture about 10 days after seeding. Each cell has a spindle like appearance.
- b : Immunohistochemistry of Factor VIII is revealed positive.

P : 透過係数 (cm/sec), X : 時間 t (sec) におけるレセプターチャンバーの CDDP 総量 (mol), S : 拡散面積 (0.636 cm^2), C_d : ドナーチャンバーの CDDP 濃度 (mol/cm^3)

またコントロールとして, collagen 被覆のみを行ったポリカーボネイト膜を用いて実験を行っ

図 3 Time-dependent CDDP transfer rate across collagen-coated polycarbonate membranes with confluent BMEC monolayers at 37°C

The data points represent the means $\pm$ SEM ($n=4-5$).

た。

つぎに, 透過がエネルギー依存性かどうかを検討するため, 透過実験緩衝液を 4°C とし, または緩衝液中の glucose (10 mM) にかえ 2-deoxy glucose (2-DG) を使用し, 透過実験を行った。

(5) 統計解析

透過係数は, means $\pm$ standard error of means (SEM) で示し, Student's t -test および Mann-Whitney U test で検定を行った。

結 果

培養開始約 10 日後, 紡錘状の BMEC は密に配列して monolayer を形成し, confluent に達した (図 2 a)。第 VIII 因子関連抗原モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色では, 高率に陽性像を示した (図 2 b)。

なお, 調製したリポソームの CDDP 封入効率は 6.8% であり, またリポソーム懸濁液中には未封入 CDDP が 30% 存在していた。

リポソーム封入 CDDP および free CDDP の 37°C における経時的 BMEC 透過率を図 3 に示した。両者間に差はみられず, 30 分の時点でいずれも 4% がレセプターチャンバーに移行した。実験

図4 Permeability coefficient of free CDDP across collagen-coated polycarbonate membranes with and without confluent BMEC monolayers at 30 minutes

Data points represent the means $\pm$ SEM (n=2-4). NB: normal transport assay buffer. 2DG: transport assay buffer containing 2-deoxyglucose (10mM) substituted for glucose

図5 Permeability coefficient of liposome encapsulated CDDP across collagen-coated polycarbonate membranes with and without confluent BMEC monolayers at 30 minutes

Data points represent the means $\pm$ SEM (n=4-5). *P<0.05 (significant difference from BMEC(+), 37°C, NB values by Student's t-test)

開始後 30 分間は透過率が時間に比例しており、透過係数が一定であることが判明したため、それぞれの CDDP の透過性については、30 分における透過係数を求め評価した。

free CDDP において、37°C かつ通常の透過実験緩衝液を使用した際の透過係数と、2-DG 使用時の、または 4°C での係数との間に有意差は認められなかった(図 4)。

一方、CDDP をリポソームに封入した場合には、透過係数は 2-DG を使用することによって、あるいは 4°C にすることによって有意に低下した(図 5)。

なお、BMEC の有無に関わらず、いずれの条件下においてもレセプターチャンパーから脂質は検出されなかった。すなわち、リポソーム自体は collagen 被覆したポリカーボネイト膜を透過できず、リポソームの BBB 透過性については、本モデルでは評価不可能であった。

考 察

1986 年、Audus and Borchardt は、牛大脳灰白質から酵素処理法により分離した BMEC をセ

ルロース板上に初代培養し、得られた BMEC 単層膜を拡散チャンパーに設置することによって *in vitro* BBB モデルを作製した⁶⁾。

その後、彼らは改良を加え⁸⁾、1990 年この *in vitro* BBB モデルを形態的、生物化学的、免疫組織化学的に検討し、review としてまとめている⁹⁾。それによると、形態的には培養 BMEC は無窓であり pinocytic vesicle は少なく、細胞結合部は tight junction で構成されている。酵素活性においても、培養 BMEC は生体内と同様に γ -glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase などを持保持しており、BBB モデルとして信頼性は高い。しかし、物質透過性は *in vivo* に比較し概して高く、彼らはこのモデルにおいて、ある程度漏れが存在することも示している。

今回、筆者らはこの *in vitro* BBB モデルを用いて、リポソーム封入 CDDP の透過性およびその機序について検討を行った。

free CDDP 透過係数は、温度変化および 2-DG による影響を受けなかった。また *in vivo* では 10^{-6} cm/sec 以下と期待される透過係数値¹⁰⁾が 10^{-4} cm/sec レベルと高値を示しており、free

CDDP が paracellular route で漏れた可能性が高いと考えられ、モデルの不完全さが示された。

BMEC 存在下 37°Cにおけるリポソーム封入 CDDP の透過係数は 1.22×10^{-4} cm/sec であり、これは懸濁液中に 30% 混入している free CDDP の paracellular leak だけによるものとは考えられず、リポソーム封入 CDDP もなんらかの機序により BMEC を透過しているものと考えられた。その透過は 2-DG によって有意に抑制されることから、エネルギー依存性 transcellular transport であり、しかもレセプターチャンパー内に脂質が検出されなかったことにより、内皮細胞を透過する際にリポソームが破壊されることが示唆された。リポソームが破壊されることおよびエネルギー依存性であることから、透過には lysosome が関与しており、さらに CDDP はレセプターチャンパー内へ、すなわち abluminal side へ exocytosis されるものと思われる¹¹⁾。リポソーム封入 CDDP は endocytosis によって BMEC 内に流入すると考えられた。

ところで、cellular internalization を抑制する 4°C の条件でも¹²⁾この透過は有意に抑制されているが、BMEC 非存在下でも透過係数が低下したことを考慮すると、この低下は cellular internalization の抑制のみによるものではなく、リポソーム自体が低温によって BMEC の表面に多量に吸着し¹³⁾、free CDDP の leak がブロックされたことも影響しているのではないかと考えられる。

今回用いた Audus, Borchardt らのモデルは、分子量の小さい CDDP (分子量 300) に対しては漏れが大きく、*in vitro* BBB モデルとしては不完全であった。*in vitro* に近い BBB モデルを確立するため、BMEC を星状膠細胞と coculture したり^{14,15)}、conditioned medium を作用させる¹⁶⁾試みがなされているが、いまだ完全なモデルは作製されていない。今後さらに改善する必要があると思われる。

結 論

BMEC monolayer を用いた *in vitro* BBB モデルを使用し、リポソーム封入 CDDP の透過性を

検討した。リポソームに封入することにより、水溶性の CDDP は transcellular transport で内皮細胞を透過することが示唆され、drug delivery system 担体としてのリポソームの可能性が考えられた。

文 献

- 1) 柴田尚武, 陣内敬文, 越智 章, 森 和夫, 佐藤智典・他: リポソーム封入シスプラチンによる脳腫瘍ターゲティング療法. 1. 構造変換リポソームと脳腫瘍指向性. DDS 5: 83-87, 1990.
- 2) 越智 章, 柴田尚武, 森 和夫, 佐藤智典, 砂本順三: リポソーム封入シスプラチンによる脳腫瘍ターゲティング療法. 2. プラチン被覆リポソームと脳腫瘍指向性. DDS 5: 261-265, 1990.
- 3) 柴田尚武, 笠 伸年, 越智 章, 陣内敬文, 佐藤智典・他: 脳腫瘍指向性リポソームの開発. DDS 7: 109-114, 1992.
- 4) 柴田尚武, 陣内敬文, 森 和夫: リポソーム封入シスプラチンの脳腫瘍血管透過性に関する超微形態学的研究. Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 29: 696-700, 1989.
- 5) Shibata, S., Ochi, A., Mori, K.: Liposomes as carriers of cisplatin into the central nervous system—Experiments with 9L gliomas in rats. Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 30: 242-245, 1990.
- 6) Audus, K. L., Borchardt, R. T.: Characterization of an *in vitro* blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. Pharm. Res. 3: 81-87, 1986.
- 7) Szoka, F., Papahadjopoulos, D.: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198, 1978.
- 8) Shah, M. V., Audus, K. L., Borchardt, R. T.: The application of bovine brain microvessel endothelial-cell monolayers grown onto polycarbonate membranes *in vitro* to estimate the potential permeability of solutes through the blood-brain barrier. Pharm. Res. 6: 624-627, 1989.
- 9) Audus, K. L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J., Borchardt, R. T.: The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. Pharm. Res. 7: 435-451, 1990.
- 10) 山口明人, 奥 直人, 砂本順三, 岩本 清, 小林俊秀: 生体膜モデル. リポソーム. (野島庄七, 砂本順三, 井上圭三・編), 南江堂, 日本, 1988, p139-151.
- 11) Sage, M. R., Wilson, A. J.: The blood-brain barrier: An important concept in neuroimaging. AJNR Am. J. Neuroradiol. 15: 601-622, 1994.
- 12) Shi, F., Bailey, C., Malick, A. W., Audus, K. L.: Biotin uptake and transport across bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. Pharm. Res. 10: 282-288, 1993.

- 13) 山口明人, 奥 直人, 砂本順三, 岩本 清, 小林俊秀 : リポソームと細胞の相互作用, リポソーム. (野島庄七, 砂本順三, 井上圭三・編), 南江堂, 日本, 1988, p183-199.
- 14) Dehouck, M. P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C., Cecchelli, R. : An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. J. Neurochem. 54 : 1798-1801, 1990.
- 15) Raub, T. J., Kuentzel, S. L., Sawada, G. A. : Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells *in vitro* : Barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. Exp. Cell Res. 199 : 330-340, 1992.
- 16) Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C. et al. : A cell culture model of the blood-brain barrier. J. Cell Biol. 115 : 1725-1735, 1991.