lipid microspheres 封入による PGI₂ 誘導体の抗血栓作用の著明な増強

五十嵐理恵・星 恵子・水島 裕^{*1)}A.K. Sim・M.E. Cleland^{*2)}

rapid communication

Marked enhancement of antithrombotic activity of a PGI₂ derivative following its incorporation into lipid microspheres Isocarbacyclin (TEI 7165), an analogue of prostacyclin, and its methylester (TEI 9090) were incorporated in lipid microspheres (LM) with a diameter of 0.2 μ m, in an attempt to increase the efficacy, probably by way of targeting the drugs to the vessel wall. When the two LM-preparations were incubated in 2% BSA-saline, it was shown that TEI 9090 was released from LM much more slowly than TEI 7165. It indicates that TEI 9090 in LM, injected intravenously, may not be released largely in plasma, and delivered to the target sites.

Compared with TEI 9090 as such, TEI 9090 incorporated in LM was more than 500 times more potent as an inhibitor of ADP-induce thrombus growth in the hamster cheek pouch model. These data suggest that prostacyclin analogues incorporated in LM may be used safely as potent antithrombotic agents in the clinical application.

Rie Igarashi・Keiko Hoshi・Yutaka Mizushima^{*1)}A.K. Sim・M.E. Cleland^{*2)}

key words: isocarbacyclin, lipid microsphere, antithrombotic effect

isocarbacyclin (TEI 7165)と、その methylester (TEI 9090)は、下記のごとき構造式を持つ PGI₂ 誘導体である。この TEI 9090 を LM に封入することにより、hamster cheek pouch model における抗血栓効果が約 500 倍に増強し、特にこの実験モデルで測定した範囲では、最強の抗血栓剤となった。なお、本研究の詳細は Prostaglandins 誌に掲載される¹⁾。

R=H : TEI 7165

R=CH₃ : TEI 9090

prostacyclin (PGI₂)は、強い血小板凝集抑制作用を持ち、ヒト体内では、動脈や脾臓などで合成される。しかし、その不安定性と全身性副作用のため、薬剤としての臨床への応用は、期待に反しむつかしい。そこで最近、副作用の少ない化学的に安定な PGI₂ 誘導体の合成が試みられている。

今回、筆者らは、化学的に安定な PGI₂ 誘導体である isocarbacyclin と、その methylester を 0.2 μ m 直径の lipid microspheres (LM) に封入し、半減期を延ばし、動脈壁へ薬物をターゲットすることで副作用を減じ、作用を増強することを試みた。LM は liposome と同様、ターゲティング療法に用いられる安全な carrier であり^{2,3)}、カラゲニン浮腫ラットの炎症部の血管壁や、動脈硬化ウサギや糖尿病ラットの動脈壁に LM が集積することが、電子顕微鏡で確認されている^{5,9)}。

すでに、筆者らが開発した、PGE₁ を LM に封入した lipo-PGE₁ は、動物においても^{4,5)}、末梢循環障害患者の臨床治療試験でも^{2,6)}、PGE₁ 単独に比しすぐれた効果をあらわしている。

以下、isocarbacyclin およびその methylester を LM に封入したことで抗血栓作用が著明に増強したことについて報告する。

方法と結果

(1) lipo 剤の作製

TEI 7165, TEI 9090 は商人(株)より供給を受けた。LM への封入は、TEI 7165, TEI 9090をそれぞれ大豆油に溶解し、レンチンとともにManton-Gaulin homogenizerでエマルジョンとし、lipo-TEI 7165, lipo-TEI 9090をこれまでと同様の方法で作製した²⁾。最終濃度は isocarbacyclin (IC) の free acid として 10 μ g/ml である。

(2) lipo-TEI 7165 と lipo-TEI 9090 の安定性

血中における lipo 剤としての安定性、すなわち、血中で LM から遊離する IC 量を予想するため、lipo-TEI 7165, lipo-TEI 9090 を 2% BSA-saline で 20 倍希釈し、1 分後と 10 分後、0.1 μ m pore size の membrane filter で濾過し、濾液中の IC 量を定量した。LM の直径は 0.2 μ m であるから、濾液中の IC 量は、BSA-saline で希釈したことにより、LM から遊離した IC 量に相当する。

つぎに lipo-TEI 9090 を 30 日間室温放置し、同様の希釈実験を行い、製剤の安定性をみた。以上の結果を表 1 に示した。

(3) 抗血栓作用の測定

lipo-IC と IC 単独について、hamster cheek pouch model による抗血栓作用を検討した。方法は、頸静脈から 10 分間薬剤を注入後、10 mM ADP で惹起した細動脈血栓に対する抑制効果を測定した^{4,7)}。下式により %

^{*1)} Department of Internal Medicine, St. Marianna University 聖マリアンナ医科大学第一内科学教室

^{*2)} Department of Biochemical Pharmacology, Inveresk Research International, Musselburgh, Scotland

図1 抗血栓効果 (hamster cheek pouch model における) mean $\pm$ SE.

TEI 7165は TEI 9090 とほぼ同じである.

□ : lipo-TEI 7165

■ : lipo-PGE₁

inhibition を算定し、結果を図1に示した。なお、参考のため、lipo-PGE₁ の30~40% inhibition level のdoseも併記した。

%inhibition

$$= \frac{\text{control growth rate} - \text{test growth rate}}{\text{control growth rate}} \times 100$$

考 察

表1において、lipo-TEI 7165はPGI₂に親和性の高いBSA-salineで希釈することにより、1分後には、ICがLMからほとんど遊離している。一方、lipo-TEI 9090のほうは10分後約50%と、LMからのICの遊離がlipo-TEI 7165に比して遅い。このことは、lipo-TEI 9090がlipo-TEI 7165よりlipo剤としてすぐれていることを示す。すなわち、血中においてlipo-TEI 9090中のTEI 9090が、かなり安定にLM中に存在し、病変部へTEI 9090がdeliveryされる可能性を示唆する。また、室温30日間放置後もlipo-TEI 9090は変化せず、製剤としての安定性もすぐれていた。

つぎに、図1に示したように、hamster cheek pouch modelにおける抗血栓効果において、lipo-TEI 9090はTEI 9090単独に比して非常に強力であった。たとえば、30~40% inhibition levelでは実に500倍も増強している。一方、lipo剤としての安定性に難のあるlipo-TEI 7165は、lipo-TEI 9090に比し効力が低く、40% inhibition levelのdoseは1.3 ng/kgで、lipo-TEI 9090の1/10の効力である。lipo-PGE₁の30~40% inhibition

表1 LMからのisocarbacyclinの遊離

	% mean $\pm$ SE	
	TEI 7165	TEI 9090
(1) 1 min incubation	88 $\pm$ 3%	23 $\pm$ 5%
10 min incubation	92 $\pm$ 8%	45 $\pm$ 9%
(2) stored for 30 days, followed by 1 min incubation		27 $\pm$ 10%

(BSA-saline 希釈による)

levelのdose(5 ng/ml)と比較しても、lipo-TEI 9090の薬効の強さがうかがえる。

この抗血栓作用の著明な増強は、LMが血管壁へ薬物をdeliveryするため、LM封入効果といえるであろう。今後は、ラジオアイソトープラベルしたTEI 9090を用いて、血管壁に主剤であるTEI 9090自身がdeliveryされていることを確かめる予定である。

以上の結果から、さまざまな循環障害や血管病の治療において、lipo-TEI 9090が安全で強力な抗血栓剤となりうると考える。

lipo剤の作製や活性測定にご協力いただいた大正製薬(株)の林英文、五藤准の両氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Mizushima, Y., Igarashi, R., Hoshi, K., Sim, A.K., Cleland, M.E., Hayashi, H., Goto, J.: Prostaglandins (in press).
- 2) Mizushima, Y., Yanagawa, A., Hoshi, K.: J. Pharm. Pharmacol. 35: 666, 1983.
- 3) Davis, S.S.: Optimization of Drug Delivery, Munksgaard, Copenhagen, 1982, p 333.
- 4) Sim, A.K., McCraw, A.P., Cleland, M.E. et al.: Arzheim.-Forsch./Drug Res. 36: 1206, 1986.
- 5) Otomo, S., Mizushima, Y., Aihara, H. et al.: Drugs Exptl. Clin. Res. 11: 627, 1985.
- 6) Hoshi, K., Mizushima, Y., Kiyokawa, S. et al.: Drugs Exptl. Clin. Res. 12: 681, 1986.
- 7) Sim, A.K., Uzan, A.: Arzheim.-Forsch./Drug Res. 29: 508, 1979.
- 8) Mizushima, Y., Hoshi, K., Shoji, Y. et al.: 6th International Conference on prostaglandins. Florence, 1986.
- 9) Mizushima, Y.: Drugs Exptl. Clin. Res. 11: 595, 1985.