

## 脳脊髄腔投与可能な DDS の開発とその脳保護効果の検討

石田 竜弘

## Development of Drug Delivery System for Intrathecal Administration and Its Therapeutic Effect on Cerebral Vasospasm and Ischemia

Tatsuhiko ISHIDA

*Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, The University of Tokushima,  
1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan*

(Received April 5, 2004)

To date, the pharmacologic approach to cerebral vasospasm and ischemia has been hampered in part by an inability to attain sufficiently high concentrations of drugs in the cerebrospinal fluid (CSF). To overcome this limitation of current drug therapy, we have developed a sustained-release preparation of the protein kinase inhibitor fasudil. Experimental cerebral vasospasm in rats and dogs was induced by double injection of autologous arterial blood into the cisterna magna. Focal cerebral ischemia in rats was induced by middle cerebral artery occlusion using an intraluminal suture technique. A single intrathecal injection of liposomal fasudil can maintain a therapeutic the drug concentration in the CSF due to the sustained-release property of liposomes, significantly decreasing intarct size of acute ischemia and decreasing vasoconstriction of the basilar artery in cerebral vasospasm. This novel approach for the treatment of cerebral vasospasm and ischemia may have significant potential for use in the clinical setting.

**Key words**—cerebral vasospasm; cerebral ischemia; subarachnoid hemorrhage; liposomal drug delivery system; fasudil

## 1. はじめに

くも膜下出血などの脳出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH), あるいは脳外科手術に伴う出血により生成された過酸化物質などにより, 遅延性の脳血管攣縮が起こることが知られている.<sup>1,2)</sup> この現象は実に全患者の3分の1に観察されており, SAHの予後の増悪のみならず, 死因の1つに数えられている.<sup>3)</sup> 一方, 脳梗塞は脳を養う血管が詰まることによって発症し, その形成過程や位置の違いによりアテローム血栓性梗塞, ラクナ梗塞, 心原性脳塞栓症の3種に分類され, 脳卒中による死亡の60%以上を占めることが知られている.

このような脳卒中 (脳梗塞, 脳出血, くも膜下出血) の予後を改善することを目的として, 血管拡張作用を持つ Ca 拮抗剤などの予防的投与が行われて

いる. しかしながら, 静脈 (動脈) 内に投与した場合, 全身への薬物の分布と血液脳関門の存在により, 脳内への薬物の分布は極めて少なくかつ一過性であり, 長期間に渡る予防効果は期待できない. 一方, 髄腔内投与は, 静脈 (動脈) 内投与と比較して顕著な薬理効果を得ることができる反面, 薬物によっては痙攣などの副作用が発現される場合が多く, さらに投与された薬物が脈絡叢あるいは末梢血管に吸収され速やかに脳脊髄腔から排出されるため, やはり長期的な予防効果を得るためには頻回あるいは持続的投与などが必要であり, 実際の臨床では不都合である. したがって, 脳脊髄液中での薬物の有効濃度の維持と脳脊髄腔への直接投与による副作用の軽減を実現し得る drug delivery system (DDS) の開発が期待されている.

## 2. 塩酸ファスジル (蛋白リン酸化阻害薬)

塩酸ファスジル (1-5-isoquinolinesulphonyl-homopiperazine (エリル)) (Fig. 1(A)) は, ベラパミル, ニフェジピンやジルチアゼムに代表される Ca 拮抗薬とは異なる新しいタイプの蛋白リン酸化酵素阻害

徳島大学薬学部薬剤学教室 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1)

e-mail: ishida@ph.tokushima-u.ac.jp

本誌総は, 平成 15 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである.

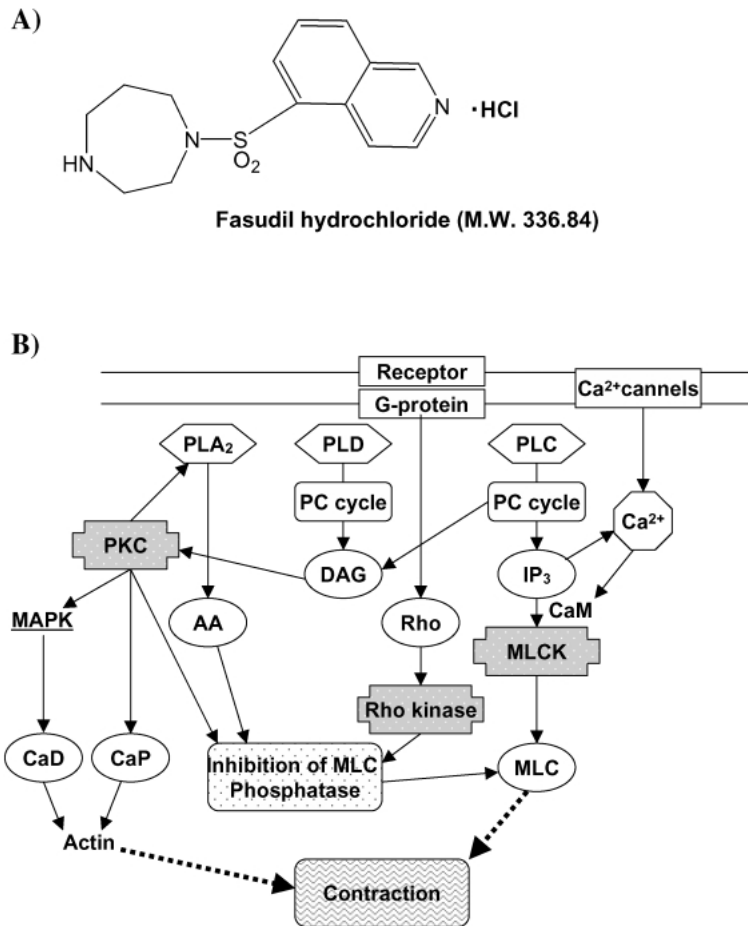


Fig. 1. Vasodilator Action of Fasudil in the Contraction of Smooth Muscle Cells

The mechanism of action of Fasudil as an antivasospastic agent is thought to be not only block of  $\text{Ca}^{2+}$  entry but also inhibition of a variety of serine/threonine protein kinases, including myosin light chain kinase (MLCK), protein kinase C (PKC), and Rho-associated kinase (Rho kinase). PI cycle: phosphatidylinositol cycle, PC cycle: phosphatidylcholine cycle, PL: phospholipase, AA: arachidonic acid, DAG: 1,2-diacylglycerol, IP<sub>3</sub>: inositoltrisphosphate, CaM: calmoduline, MAPK: mitogen-activated protein kinase, CaP: calponin.

剤である (Fig. 1 (B)).<sup>4-8)</sup> 塩酸ファスジルは血管の拡張作用に基づく脳血流改善作用, 脳神経細胞保護作用などを有する薬物<sup>8)</sup>であるため, くも膜下出血後の脳血管攣縮に対して広く使用されており, 主要な薬剤の1つになっているが, 無効例も報告されている. そのためより有効な投与方法の1つとして動注療法が試みられている.<sup>9)</sup> しかし, 頻回に投与することは現実的には無理である. 一方, カルシウム拮抗薬<sup>10-17)</sup>や NO donor<sup>18)</sup>では髄腔内直接投与により血管拡張作用が認められているが, 塩酸ファスジルでは髄腔内投与は禁忌とされている. 脳血管攣縮予防のため, カルシウム拮抗薬を末梢静脈内投与しても無効であっても, Ca拮抗薬の髄液内直接投与では有効であった動物実験が過去に報告されている.<sup>10-17)</sup> しかしながら, 例え髄腔内直接投与が可能であっても, 有効な薬物濃度を維持するために

は頻回あるいは持続的投与が必要であり, 実際の臨床では不都合である.

これらの問題を克服することを目的とし, より有効な方法として1回髄腔内投与で脳血管攣縮予防効果を有する徐放性塩酸ファスジル (リポソーム封入型塩酸ファスジル) の開発を試みた.

3. 徐放性塩酸ファスジルの作製<sup>19)</sup>とその安全性  
徐放性塩酸ファスジルは, 脂質二分子膜から成るリポソーム<sup>20)</sup>内に塩酸ファスジルを封入することにより作製した. リポソームは Allenら<sup>21)</sup>の方法により水素添加卵黄ホスファチジルコリン (hydrogenated egg phosphatidylcholine, HEPC): コレステロール (cholesterol, CHOL)=2:1で調製した. リポソームの粒子径はエクストリュージョン法により約140 nmとなるように揃えた. このリポソーム内に硫酸アンモニウム-pH 勾配法<sup>22)</sup>を用いて塩酸ファスジ

ルを封入した。<sup>19)</sup> この方法は pH 分配仮説を利用した方法であり、高い封入効率が得られる点で有利である。

リポソームへの塩酸ファスジルの封入は、リン脂質：塩酸ファスジル=1：0.3 (w/w) の比率のとき、最も効率がよいことが明らかとなった。また、封入された塩酸ファスジルは低温 (4°C) で半年以上安定にリポソーム内に保持されることが分かった。また、人工髄液中 (37°C) でのリポソームからの塩酸ファスジルの放出性を測定したところ、半減期 7.27 日で放出されることが明らかとなり、塩酸ファスジルをリポソームに内封することによりその徐放化が実現されることが明らかとなった (Fig. 2)。また、同じ条件で水溶性の高い低分子モデル化合物 (蛍光色素：カルボキシフルオロセイン) の漏出がほとんど観察されなかった (Fig. 2) ことから、塩酸ファスジルの放出はリポソーム膜の崩壊に伴うものではなく、塩酸ファスジル分子の膜透過によるものであることが示唆された。

塩酸ファスジルをリポソーム化することにより遊離型 (>0.05 mg) で観察された重篤な副作用 (痙攣 (てんかん様発作)・死亡) は認められなかった。

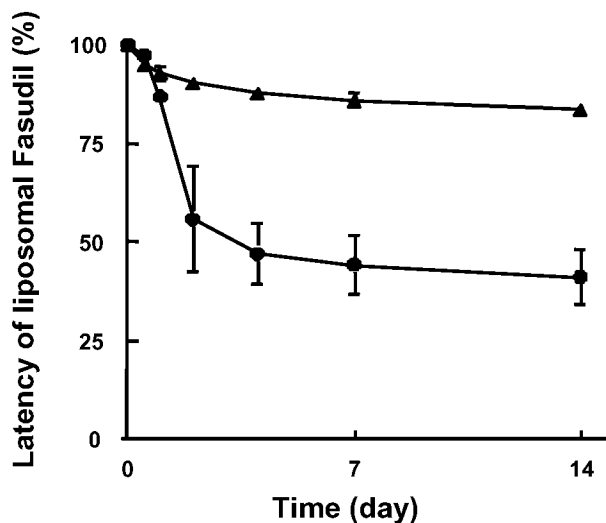


Fig. 2. Release of the Contents from either Fasudil (●) or CF (▲)-loaded Liposomes in Human CSF

Fasudil was encapsulated into preformed liposomes by means of remote-loading with an ammonium sulfate gradient. CF was passively encapsulated into the liposomes. These liposomes were incubated in human CSF at 37°C. For the fasudil-loaded liposomes, aliquots were removed at specified time points and applied to a Sepharose CL-4B column which had been equilibrated with the liposomes from the leaked drug. The latency of the drug was determined. For the CF-loaded liposomes, aliquots were removed at specified time points, to determine the increase in fluorescence due to released CF. (Cited from Ref. 19).

さらに、リポソーム化塩酸ファスジルの投与前後において、体温、血液 pH、血中酸素・二酸化炭素分圧、血圧などの生理的パラメーターの変化は観察されず、リポソームへの封入は髄腔内投与を可能にする有用な方法であることが併せて示唆された。<sup>11,12)</sup>

#### 4. くも膜下出血 (SAH) 動物モデルにおける検討<sup>23,24)</sup>

ラット及びイヌ SAH モデルは、それぞれの自己動脈血を 2 回くも膜下腔内へ投与 (2 回目は 1 回目の 48 時間後) することにより作成した。<sup>25)</sup> リポソーム化塩酸ファスジルの遅延性血管攣縮予防効果の検討は、2 回目自己血投与後に髄腔内に直接投与することで行った。また、血管攣縮抑制効果は、1 回目自己血投与 7 日後の脳底動脈径を測定することにより評価した。

ラット SAH モデルにおいて、リポソーム化塩酸ファスジルを髄腔内に投与したグループで、塩酸ファスジル未封入リポソーム (空リポソーム) を投与したグループに比べて顕著な脳底動脈攣縮抑制効果が観察された (塩酸ファスジル封入リポソーム投与：88±6.2% vs 正常ラット, 空リポソーム投与：66±9.8% vs 正常ラット,  $p<0.001$ )<sup>23,24)</sup> (Fig. 3)。

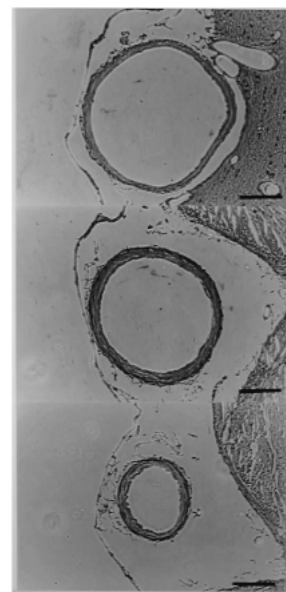
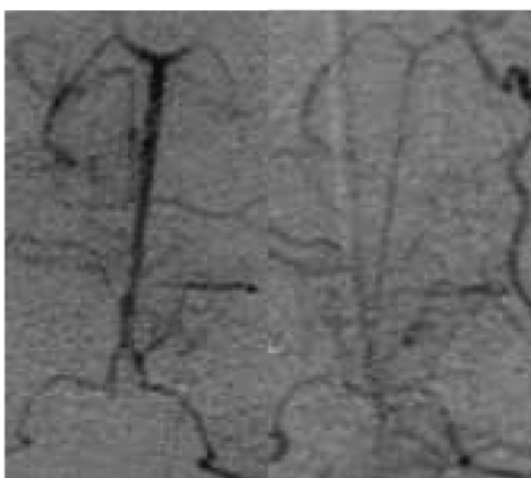


Fig. 3. Right Microscopic Evaluation of Rat Basilar Artery on 7 Days after SAH

When compared to normal caliber obtained from sham-operated group (upper), basilar artery in control group reveals not only marked vasoconstriction but also endothelial corrugation (lower). On the contrary, treatment with liposomal fasudil substantially prevents vasoconstriction on rat basilar artery (middle). Scale bar indicates 100 μm. (Hematoxylin eosin, magnification×200) (Cited from Ref. 23).

また、イヌ SAH モデルにおいても同様の治療効果（塩酸ファスジル封入りリポソーム投与：84±6.0% vs 正常ラット，空リポソーム投与：55±5.7% vs 正常ラット， $p<0.001$ ）が観察<sup>24</sup>され、リポソーム化塩酸ファスジルは大動物においても顕著な効果を発揮し得ることが示唆された（Fig. 4）。以上の結果から、リポソーム化塩酸ファスジルの脳脊髄腔内へ

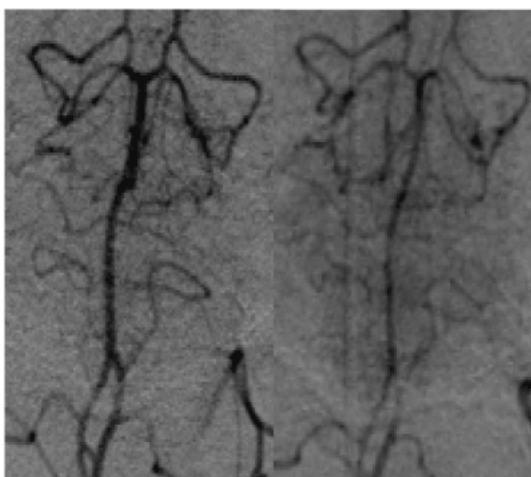
### A) Drug-free liposomes



Day 0

Day 7

### B) Liposomal fasudil



Day 0

Day 7

Fig. 4. Vertebral Angiograms Obtained on Day 0 (left) and 7 (right) from Dogs Treated with Drug-free Liposomes (A) and Liposomal Fasudil (B)

Severe vasospasm in the basilar artery is apparent in a dog treated with drug-free liposomes (A, right), whereas only mild narrowing of the basilar artery is observed in a dog treated with liposomal fasudil (B, right). (Cited from Ref. 24).

の単回投与により、SAH 後の遅延性脳血管攣縮抑制効果が得られることが示された。

先にも述べたように、塩酸ファスジルは血管平滑筋ミオシン軽鎖リン酸化酵素を阻害することにより細胞内カルシウム拮抗薬として作用すると考えられており、その薬効は脳実質内小血管よりも大きな血管の拡張、及びそれに付随した脳血流量の増大であることが知られている。したがって、SAH モデルにおける血管攣縮予防効果は、粒子状のリポソームが髄液の流れの流れて広がり髄腔内に拡散し、その過程においてリポソームから塩酸ファスジルが緩やかに放出されたことにより、脳脊髄液中で長期間（約1週間）に渡って治療有効濃度内にその濃度が維持され、塩酸ファスジルが本来持つ血管拡張作用が維持されたことによると考えられる。

### 5. 急性期脳虚血（脳梗塞）動物モデルにおける検討<sup>26</sup>

ラット急性期脳虚血（脳梗塞）モデルは、endovascular suture technique<sup>27</sup>を用い、中大脳動脈に血栓性の塞栓を形成させることにより作成した。リポソーム化塩酸ファスジルの脳保護効果は、脳梗塞部位の面積を未治療群のそれと比較することにより評価した。

実験的急性期脳梗塞モデル作成後、2時間後に髄腔内にリポソーム化塩酸ファスジルを単回直接投与し、その脳梗塞面積の拡大予防効果について評価を行った。その結果、脳梗塞作成後24時間後においても、72時間後においても、顕著な梗塞面積拡大抑制効果が観察された（24時間後評価；塩酸ファスジル封入りリポソーム投与：29±4.4% vs 空リポソーム投与：50±4.6%、 $p<0.001$ 、72時間後評価；塩酸ファスジル封入りリポソーム投与：28±3.9% vs 空リポソーム投与：50±4.6%、 $p<0.001$ ）<sup>26</sup>（Fig. 5）。以上の結果から、リポソーム化塩酸ファスジルは急性期脳虚血（脳梗塞）においても、脳脊髄腔内への単回直接投与により高い脳神経保護効果を発揮することが示された。

脳梗塞治療においては、死滅する可能性のある脳神経細胞の死を防ぐことが最も重要であるため、発症後6—8時間までが therapeutic time window とされており、この間に処置・治療を行うことが推奨されている。また、脳細胞を作用部位とする治療薬の多くは、脳内における薬物濃度が静脈内投与後に

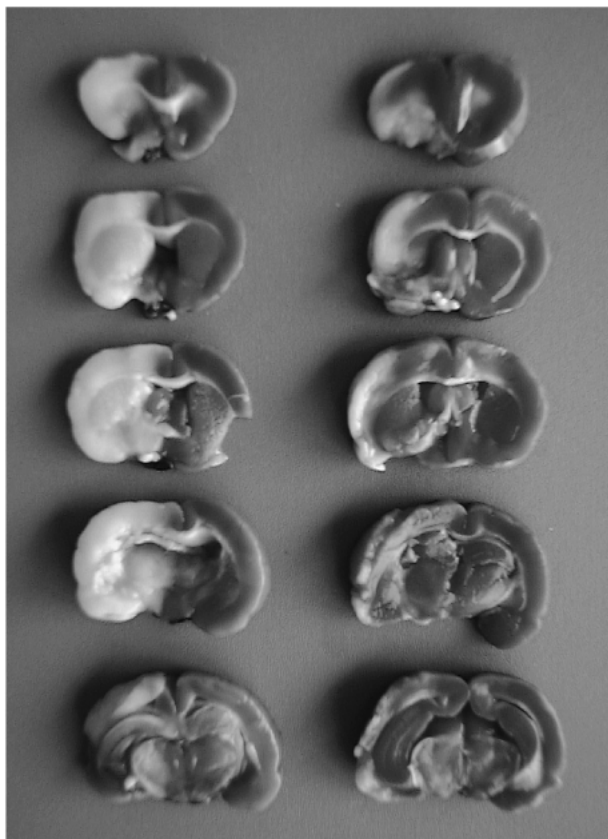


Fig. 5. Photograph of Representative Slice in the Control (left column) and Treated Rats (right column) Following Focal Cerebral Ischemia

The infarct area appears as unstained following staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Note the significant reduction of infarct area in each slice from the treated rat brain. (Cited from Ref. 26).

ける血中濃度の 10 分の 1 程度得られれば十分な薬理効果を発揮すると言われている。本検討では実験的脳梗塞発症後 2 時間経過時点で投与を行い、脳梗塞面積の拡大を抑制することができた。このことは、リポソームが脳脊髄腔内に滞留し、内封塩酸ファスジルを緩やかに放出することにより、脳脊髄液中の薬物濃度（遊離型）を therapeutic time window の間有効濃度以上で維持したことによると考えられる。

#### 6. リポソームを脳脊髄腔投与用 DDS として用いる利点

くも膜下出血後の脳血管攣縮予防に対して薬物の髄液内投与は有効であることが報告されている。<sup>27)</sup>しかし、例えば髄液内直接投与が可能であっても治療有効濃度を保つためには、脳槽・脳室内ドレナージュチューブから定速注入を行うか、又は頻回腰椎穿刺により投与することが必要であり、実際の臨床では

困難である。これらの困難を克服するために髄液内直接投与が可能な徐放化剤が開発されてきている。動物実験モデルで脳血管攣縮予防に対して calcitonin generated peptide の徐放化剤、<sup>29)</sup> パパペリンの徐放化剤、<sup>30)</sup> トロンピン阻害剤の徐放化剤、<sup>31)</sup> ニカルジピンの徐放化剤<sup>32)</sup>などの報告が見られる。しかし、これらはいずれも固形状徐放化剤であるためかならず開頭術を要する。また、固形状であるため留置した周囲はその徐放能により比較的高濃度の薬物濃度が維持されるが、留置場所から比較的離れた部位でも同様に高い薬物濃度が維持されるかどうか疑問である。一方、リポソームは液状であるためかならずしも開頭術を要しない。また髄液循環により髄液腔全体にまんべんなく拡散すると考えられるため、広範囲に渡って高い薬物濃度を維持できるものと期待される。したがって、固形状徐放化剤と比較してわれわれが開発した微粒子状製剤(リポソーム)は液状であるため、実際の臨床応用では有利であると考えられる。

#### 7. おわりに

塩酸ファスジルは痙攣の発現により脳脊髄腔内直接投与が禁忌とされている。しかし、本実験の結果、リポソームに封入し徐放性製剤とすることにより、痙攣の発現が抑制されることが明らかとなった。これは粒子状のリポソームが髄液の流れののって広く髄腔内に拡散し、その過程においてリポソームから塩酸ファスジルが緩やかに放出されることにより、脳脊髄液中で長期間に渡って治療有効濃度内に薬物濃度が維持されたことを示唆している。この結果は、副作用の発現により脳脊髄腔直接投与禁忌の薬物であっても、徐放性製剤化し、その放出速度を精密にコントロールすれば脳脊髄腔内に投与可能であり、全身投与に比べ比較的少量の薬物で高い薬理効果が得られる可能性があることを示唆している。

遅延性脳血管攣縮は SAH による死因の 1 つであり、これを予防するために薬物の長期投与が行われている。しかし、薬物の脳への移行は脳血液関門により阻まれ、最適な薬物送達法の開発が試みられている。今回われわれが開発した DDS は、脳髄腔内への単回投与により十分な効果を示した。したがって、本システムは脳への優れた薬物送達システムであり、薬物治療の最適化を実現し、患者の QOL の向上につながる有用な薬物投与方法となるものと期待

される。しかしながら、どのように脳脊髄腔からリポソームが排泄されるか、どのような徐放速度が最適であるか、さらにはこのような製剤の複数回投与は可能であるかなど、未知の点が多く残されている。今後臨床応用へと進めていく上で、このような基礎的知見の集積が必須であると考えている。

**謝辞** 本研究の遂行に当たり、徳島大学薬学部薬剤学教室 際田弘志教授から終始ご指導と激励を賜った。また、横浜市立大学医学部脳神経外科 高梨吉裕講師からは終始有益なご助言を賜った。また、カナダ・アルバータ大学医歯学部 T. M. Allen 教授, M. C. Kirchmeier 博士, アメリカ・ミシシッピ医科大学 J. H. Zhang 教授にも数々のご支援を賜った。さらに、本研究は徳島大学薬学部薬剤学教室において遂行されたが、教室の土井久子修士, 綾野早笑修士, 亀井 武学士, 富永洋子学士他, 学生諸君の多大なる協力をいただいた。これらの方々に深甚なる謝意を表する。

#### REFERENCES

- 1) Ogihara K., Aoki K., Zubkov A. Y., Zhang J. H., *Brain Res.*, **889**, 89–97 (2001).
- 2) Suzuki H., Muramatsu M., Kojima T., Taki W., *Stroke*, **34**, 2796–2800 (2003).
- 3) Adams H., Kassel N., Torner J., Haley E., *Neurology*, **37**, 1586–1591 (1987).
- 4) Asan T., Ikegami I., Satoh S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 1033–1040 (1987).
- 5) Shibuya M., Suzuki Y., Sugita K., Saitoh I., Sasaki T., Takakura K., Nagata I., Kikuchi H., Takemae T., Hidaka H., Nakashima M., *J. Neurosurg.*, **76**, 571–577 (1992).
- 6) Satoh S., Ikegami I., Suzuki S., Asano T., Shibuya M., Hidaka H., *Br. J. Pharm.*, **118**, 1592–1596 (1996).
- 7) Toshima Y., Satoh S., Ikegami I., Asano T., *Stroke*, **31**, 2245–2250 (2000).
- 8) Abe K., Misawa M., *Brain Res. Dev. Res.*, **143**, 99–104 (2003).
- 9) Nakashima S., Tabuchi K., Shimokawa S., Fukuyama K., Mineta T., Abe M., *Neurol. Med. Chir.* (Tokyo), **38**, 805–811 (1998).
- 10) Handa J., Yoneda S., Koyama T., Matsuda M., Handa H., *Surg. Neurol.*, **3**, 195–199 (1975).
- 11) Allen G. S., Ahn H. S., Presiosi T. J., *Neurol. Engl. J. Med.*, **308**, 619–624 (1983).
- 12) Voldby B., Petersen O. F., Buhl M., Jakobsen P., Ostergaard R., *Acta Neurochir.* (Wien), **70**, 243–254 (1984).
- 13) Gioia A. E., White R. P., Bakhtian B., Robertson J. T., *J. Neurosurg.*, **62**, 721–728 (1985).
- 14) Pasqualin A., Dennis G., Jennifer A., *Neurosurgery*, **29**, 183–188 (1991).
- 15) Shibuya M., Suzuki Y., Enomoto H., *Acta Neurochir.* (Wien), **131**, 19–25 (1994).
- 16) Tachibana E., Harada T., Shibuya M., Saito K., Takayasu M., Suzuki Y., Yoshida J., *Acta Neurochir.* (Wien), **141**, 13–19 (1999).
- 17) Suzuki M., Doi M., Otawara Y., Ogasawara K., Ogawa A., *Neurosurg. Rev.*, **24**, 180–184 (2001).
- 18) Thomas J. E., Rosenwasser R. H., Armanda R. A., *Stroke*, **30**, 1409–1416 (1999).
- 19) Ishida T., Takanashi Y., Doi H., Yamamoto I., Kiwada H., *Int. J. Pharm.*, **232**, 59–67 (2002).
- 20) Ishida T., Kiwada H., *Shikizai*, **72**, 184–191 (1999).
- 21) Lopes de Menezes D. E., Pilaeski K. M., Allen T. M., *Cancer Res.*, **58**, 3320–3330 (1998).
- 22) Bolotin E., Cohen R., Bar L. K., Emanuel S. N., Lasic D. D., Barenholz Y., *J. Liposome Res.*, **4**, 455–479 (1994).
- 23) Takanashi Y., Ishida T., Meguro T., Kirchmeier M. J., Allen T. M., Zhang J. H., *J. Clin. Neurosci.*, **8**, 557–561 (2001).
- 24) Takanashi Y., Ishida T., Meguro T., Kiwada H., Zhang J. H., Yamamoto I., *Neurosurgery*, **48**, 894–901 (2001).
- 25) Varsos V. G., Liszczak T. M., Han D. H., Kistler J. P., Vielma J., Black P. M. L., Heros R. C., Zervas N. T., *J. Neurosurg.*, **58**, 11–17 (1983).
- 26) Takanashi Y., Ishida T., Kirchmeier M. J., Shuaib A., Allen T. M., *Neurol. Med. Chir.* (Tokyo), **41**, 109–115 (2001).
- 27) Longa E. Z., Weinstein P. R., Carison S., Cumminus R., *Stroke*, **20**, 84–91 (1989).
- 28) Thomas J. E., Rosenwasser R. H., Armonda R. A., Harrop J., Mitchell W., Galaria I., *Stroke*, **30**, 1409–1416 (1999).
- 29) Inoue T., Shimizu H., Kaminuma T., Tajima M., Watabe K., Yoshimoto T., *Neurosurgery*,

- 
- 39, 984–990 (1996).
- 30) Shiokawa K., Kasuya H., Miyajima M., Izawa M., Takakura K., *Neurosurgery*, **42**, 109–116 (1998).
- 31) Kudo A., Suzuki M., Kudo Y., Watanabe M., Yoshida K., Doi M., Kuroda K., Ogawa A., *Cerebrovasc. Dis.*, **10**, 424–430 (2000).
- 32) Kawashima A., Kasuya H., Sasahara A., Miyajima M., Izawa M., Hori T., *Neurol. Res.*, **22**, 634–641 (2000).