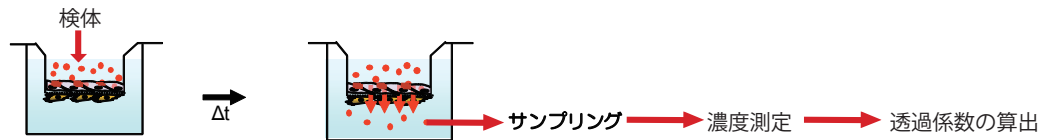


薬物脳内移行性（BBB透過性）検定について

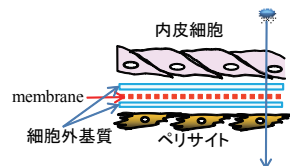
脳内移行性検定は BBB キット™ のインサート内側（血管腔側）に化合物を入れ、一定時間内に内皮細胞及びペリサイトの層を通過し、プレートのウェル内（脳実質側）に漏れ出てきた化合物濃度を測定します。測定した化合物濃度より透過係数 (Papp, Pe) を算出し、脳内移行性を判定します。



透過係数 Papp と Pe の算出

■ Papp：細胞（内皮細胞とペリサイト）とインサートメンブレン、コラーゲンなどの細胞外基質の合計

$$P_{app} (\text{cm/min}) = \frac{V_A}{A \times [C]_{\text{Luminal}}} \times \frac{\Delta[C]_{\text{Abluminal}}}{\Delta t}$$

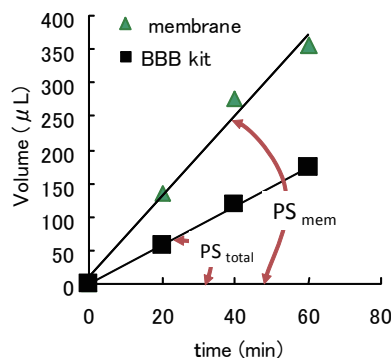


→ BBB キット (RBT-24) に使用

■ Pe：計算式により、インサートメンブレンのバリアー機能を差し引き、細胞と細胞外基質の透過係数を算出

$$\text{Volume} = \frac{[C]_{\text{abluminal}}}{[C]_{\text{luminal}}} \times V_A$$

(※) メンブレン（細胞を播種していない）インサートのみでも透過性検定を行う必要があります。



→ BBB キット (RBE-12) に使用

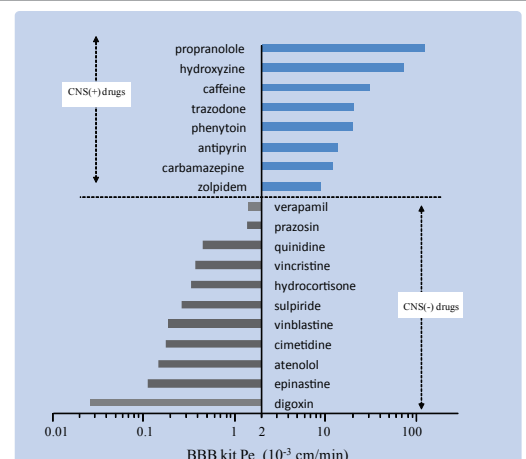
$$\frac{1}{P_{Se}} = \frac{1}{P_{Stotal}} - \frac{1}{P_{Smem}}$$

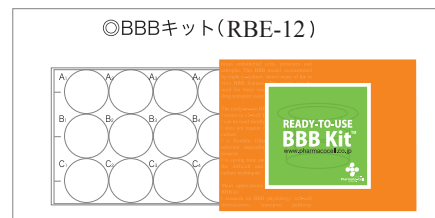
$$P_e (\text{cm/min}) = \frac{P_{Se} (\mu\text{L/min})}{A (\text{cm}^2)}$$

透過係数をもとに化合物の脳内移行性を判定

既存の薬物・化合物の当社の BBB キット™ で得られた Papp あるいは Pe 値がございましたので、具体的な数値で定量的に BBB 透過性を評価できます。

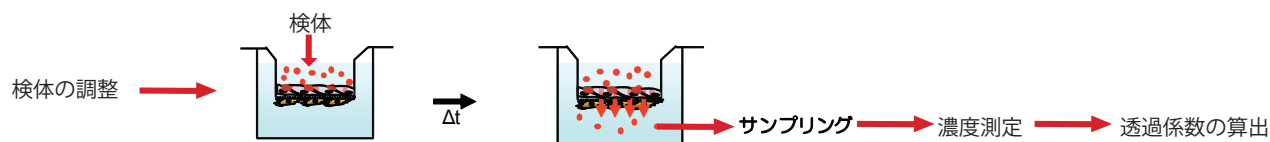
薬物・化合物を化学的に装飾するか、種々のベクター等に結合させて BBB 透過性の変化を検定する場合も、Papp の変化として定量的に評価できます。





薬物脳内移行性（BBB透過性）検定

脳内移行性検定は BBB キットのインサート内側(血管腔側)に化合物を入れ、一定時間内 (Δt) に内皮細胞及びペリサイト層の層を通過し、プレートウェル内(脳実質側)に漏れ出てきた化合物濃度を測定し、透過係数 Pe を算出することで検定いたします。



1. 検体の調整

1. Assay buffer (DPBS-H)

10 x PBS(+/-)	10 mL (10 x Dulbecco's Phosphate buffered saline)
HEPES	1 mL
d-glucose	0.45 g
DW	89 mL
Total	100 mL

(※) assay buffer

目的等に応じて DPBS-H, DMEM, DMEM/F12, RBEC 培養液なども使用可能です。

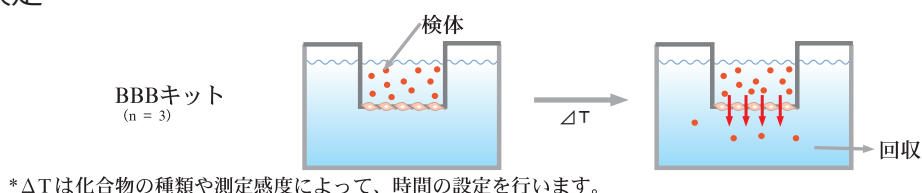
2. 各検体を assay buffer (DPBS-H) を用いて希釈し、血管側に加える溶液を調整します。

(※) 濃度測定感度、細胞障害性などにより調整する濃度を決定します。

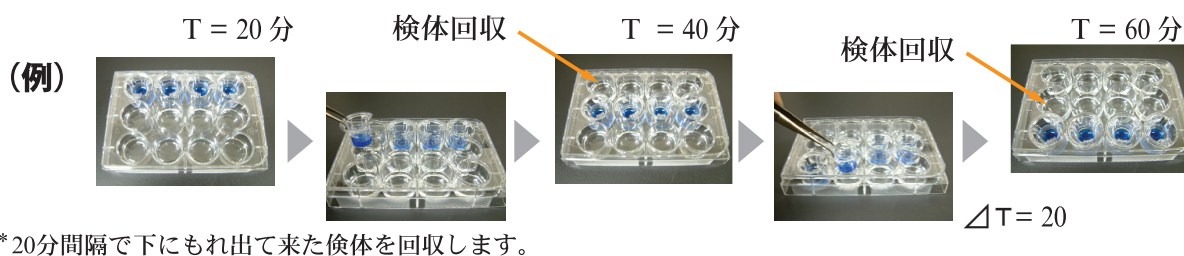
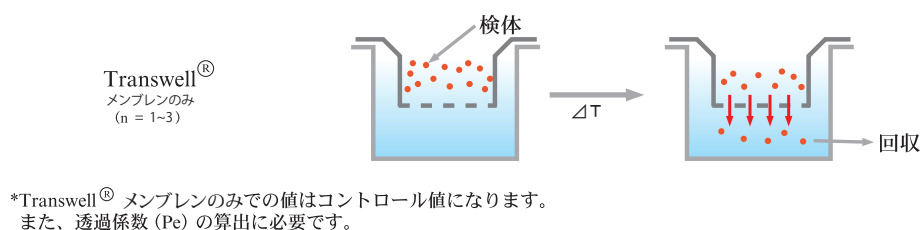
- 添加する化合物の濃度
細胞障害性がでない濃度で検定する。
- 有機溶媒濃度(化合物が有機溶媒に溶解している場合)
有機溶媒(DMSO, EtOHなど)の最終濃度は 0.5 %以下

2. 透過性検定

検定模式図1



検定模式図2



※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。

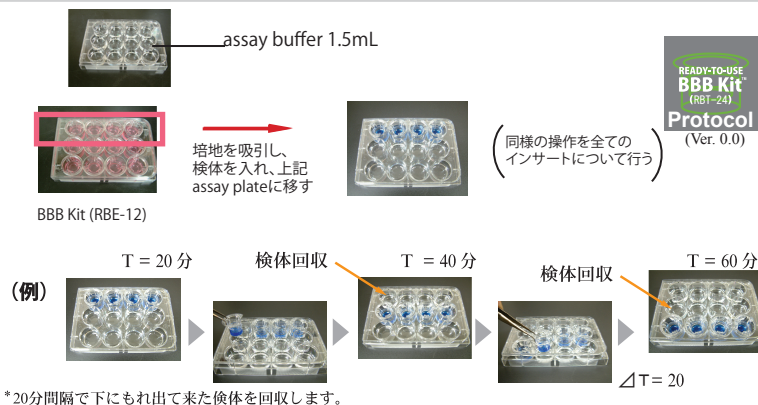


ファーマコセル株式会社

本社 / BBBラボラトリー (中央研究所)
〒852-8523 長崎県長崎市坂本1丁目12-4 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学教室
TEL: 095-819-7041 / FAX: 095-819-7044
URL: <http://www.pharmacocell.co.jp> / e-mail: info@pharmacocell.co.jp

《透過検定手順》

1. Assay buffer を別に用意した 12 well plate (assay plate) に 1.5 mL / well (注2) 入れ 37℃ で温めておきます。
2. BBB キット (RBE-12) の血管側から培地を吸い取り、37℃ で温めた検体を 0.5 mL / insert 入れます。
3. インサートを、用意しておいた 12 well plate に移し、37℃ で一定時間(※1) インキュベート。
4. インサートを取り除き、脳側に漏れ出てきた検体を回収する。
5. 回収した検体の濃度を測定し、Pe 値を算出する。



(※1) 検定時間について

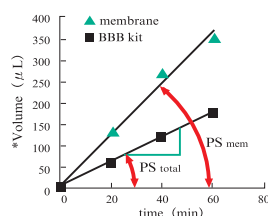
検定時間を長くすると、脳側に漏れ出てくる化合物量も多くなり、検出感度が低い化合物の濃度測定がやり易くなりますが、時間と共に BBB キットのバリアー機能 (タイトジャンクション機能) も低下し、細胞間隙輸送が亢進します。60 分以上の検定の場合は ネガティブコントロール (透過性が低い化合物) を併用することを勧めいたします。

3. 透過係数 (Pe) の算出

濃度測定の結果より、透過係数を算出

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

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



透過係数の算出方法

$$\frac{1}{P_{Se}} = \frac{1}{P_{Stotal}} - \frac{1}{P_{Smem}}$$

$$P_e (cm/min) = \frac{P_{Se} (\mu L/min)}{A (cm^2)}$$

P_{Stotal} – slope of the clearance curve for BBB kit
P_{Smem} – slope of the clearance curve for cell-free filter
PS dimension: $\mu L/min = 10^{-9} m^3/min$

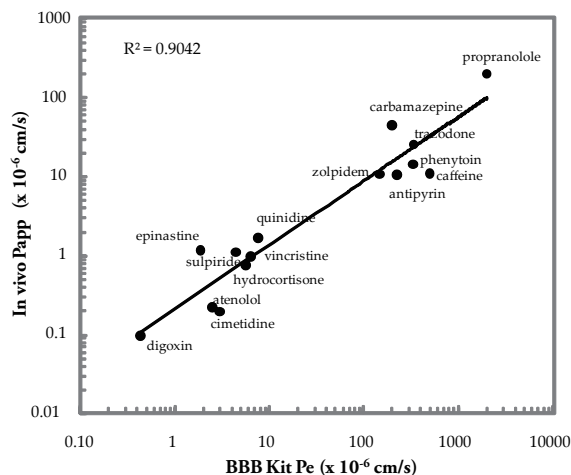
A – membrane surface area
12-well Transwell clear insert: $A = 1 cm^2 = 10^{-4} m^2$
 $P_e = P_{Se} (\mu L/min) / A (cm^2) = 10^{-9} m^3/min / 10^{-4} m^2$
 $= 10^{-5} m/min$
 $= 10^{-3} cm/min$
 $= P_e / 60 = cm/s$

4. 解析 透過係数をもとに化合物の脳内移行性を判定

濃度測定の結果から透過係数 Pe 値を算出し、既存の薬物・化合物の当社の BBB キット™ で得られた Pe 値がごございますので、具体的な Pe 値で定量的に BBB 透過性を評価できます。
薬物・化合物を化学的に装飾するか、種々のベクター等に結合させて BBB 透過性の変化を検定する場合も、Pe の変化として定量的に評価できます。

No.	name	MW	CNS	Pe (10 ⁻⁶ cm/s)	recovery rate (%)
1	antipyrin	188	+	222.51	90
2	atenolol	226	-	2.49	97.1
3	caffeine	212	+	496.67	87.5
4	carbamazepine	236	+	198.53	85.1
5	cimetidine	252	-	2.99	95.4
6	digoxin	781	-	0.44	62.7
7	epinastine	286	-	1.87	94
8	hydrocortisone	362	-	5.67	88.2
9	phenytoin	252	+	326.73	99.6
10	propranolol	296	+	1987.16	81.9
11	quinidine	783	-	7.54	72.8
12	sulpiride	341	-	4.39	91.7
13	trazodone	408	+	333.61	63.1
14	vincristine	923	-	6.32	64.6
15	zolpidem	382	+	147.36	71.7

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



《補足》

1. BBB キット (RBE-12) にはblank用の Transwell Insert が付属しております。
化合物の種類によっては、インサートメンブレン等に吸着し、検定が上手くいかない事もございます。
より正確な判定を行うには、BBB キットと共にインサートメンブレンのみの回収率の算出を行うことをお勧めいたします。
2. 12 well type BBB キット (RBE-12) では、透過係数の算出に Papp ではなく、Pe を推奨しております。これは RBE-12 で用いるインサートメンブレンのポアサイズが 0.4 μm であり、インサートメンブレンのみの抵抗 (化合物の透過性に影響を与える) が無視できないためです。
3. 検定開始時に、血管側を assay buffer 等で洗浄するとバリアー機能が低下しますので、お控え下さい。どうしても必要な場合は 1 度だけ洗浄し検定時間を短くすることをお勧めいたします。

※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。



ファーマコセル株式会社

本社 / BBBラボラトリー (中央研究所)
〒852-8523 長崎県市坂本1丁目12-4 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学教室内
TEL: 095-819-7041 / FAX: 095-819-7044
URL: <http://www.pharmacocell.co.jp> / e-mail: info@pharmacocell.co.jp