약제학회지(1990), 제 20 권 제 4 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 20, No. 4, 223-228

내인성물질의 수송계를 이용한 혈액-뇌관문에의 약물송달 V : 약물의 혈액-뇌관문 투과성에 대한 염기성 아민 및 모노카르본산 수송계의 역할

姜 英 淑
日本 大正製藥(株)総合研究所

Drug Delivery into the Blood-Brain Barrier by Endogenous Substances: A Role of Amine and Monocarboxylic Acid Carrier Systems for the Drug Transport

Young Sook Kang
Department of Drug Metabolism Research Center, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Yoshino-cho, Ohmiya 330, Japan

The contribution of endogenous transport systems to the blood-brain barrier (BBB) transport of basic and acidic drugs was studied by using a carotid injection technique in rats and an isolated bovine cerebrovascular disease state were compared between the normotensive rats (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) which have been well established as an animal model with pathogenic similarities to humans. Basic drugs such as eperisone, thiamine and scopolamine inhibited, in a concentration dependent manner the *in vivo* uptake of [^{3}H]choline through BBB, whereas amino acids and acidic drugs such as salicylic acid and valproic acid did not inhibit the uptake. The uptake of [^{3}H]choline by B-CAP increased with time and showed a remarkable temperature dependency. The uptake of [^{3}H]choline by B-CAP showed the very similar inhibitory effects as observed in the *in vivo* brain uptake, and was competitively inhibited by a basic drug, eperisone. The *in vivo* BBB uptakes of [^{3}H]acetic acid and [^{14}C]salicylic acid were dependent on pH of the injectate and the concentration of drugs. Several acidic drugs such such as salicylic acid, benzoic acid and valproic acid inhibited the *in vivo* uptake of [^{3}H]acetic acid, whereas amino acid, choline and a basic drug such as eperisone did not inhibit the uptake. The uptake of acetic acid by B-CAP was competitively inhibited by salicylic acid. The permeability surface area product (PS) through BBB for [^{3}H]choline in SHRSP was significantly lower than that in WKY. The concentration of choline in the brain dialysate in SHRSP was about half of that in WKY, while no significant difference was observed in the plasma concentration of choline between SHRSP and WKY. No significant difference was observed in the transport of monocarboxylic acids, glucose and neutral amino acid through BBB between SHRSP and WKY. From these results, it was concluded that BBB transport system of choline contributes to the transport of basic drugs through BBB, that acidic drugs can be transported via a moncarboxylic acid BBB transport system and that the specific dysfuntion of the BBB choline transport in SHRSP was ascribed to the reduction of the maximum velocity of choline concentration in the brain interstitial fluids.

혈액-뇌관문(Blood-brain barrier, 이하 BBB로 약함)에는 뇌기능의 항상성유지에 필수적인 glucose와 아미노산 등의 내인성물질을 운반하는 수종의 담체수송계가 존재한다. 일반적으로 약물은 지용성분배에 따라서만 BBB를 투과한다고 생각되어 왔다. 그러나, L-dopa 및 baclofen 등이 BBB에서

창립20년 기념학술대회(11월 24일 제약회관) 콜로퀴움에서 발표된 내용임.

중성 아미노산의 담체수송계를 통하여 수송된다고 하는 보고는 약물이 내인성물질의 담체수송계를 이용하여 BBB를 통과하는 가능성을 시사하는 것이다. 그렇지만 약물의 BBB투과와 내인성물질 수송계의 역할에 대해서 아직 명백하게 되어 있지않다. 더우기, 병태, 특히 뇌모세혈관장해시에 있어서 BBB 투과성에 대하여 외부로부터의 산소공급 또는 혈류속도등을 변화시킨 실험계를 이용한 예는 있지만, 본태성병태의 모델 동물을 이용한 뇌모세혈관계에서 평가한 예는 없다.

그래서, 본연구는 BBB에 있어서 염기성약물의 투과성에 대해서는 염기성내인성물질인 아미수송계의 역할을, 산성약물의 투과성에 대해서는 산성내인성물질인 모노카르본산 수송계의 역할을 명백히 하는 것을 목적으로 했다. 또한, 이들 내인성물질의 수송계에 뇌모세혈관장해가 미치는 영향에 대해서 뇌졸중이발증성자연발증고혈압랫트(SHRSP)를 이용하여 검토하였다.

실험방법

Brain Uptake Index(BUI)법

In vivo carotid artery injection법을 이용하여 기질로서 ^{3}H-choline(20 μCi/m*l*), ^{3}H-acid(20 μCi/m*l*), ^{14}C-salicylic acid(4 μCi/m*l*), 기준물질로서 ^{14}C-butanol(0.25 μCi/m*l*), ^{3}H-water(2O μCi/m*l*), ^{14}C-sucrose(4 μCi/m*l*)의 혼액 200 μ*l*를 랫트의 우총경동맥으로 순간투여하여 5초후의 뇌내 uptake량을 측정했다.

뇌투석 fiber 이식법

Brain microdialysis법을 이용하여 pentobarbital (50 mg/kg) 마취하에서 투석 fiber를 해마에 이식하고 유속 2.5 μ*l*/min로 cannula에 pH 7.4 Ringer-HEPES Buffer(RHB)를 유입시켜 10분 간격으로 60분간 뇌투석을 행하였다. 혈장 및 뇌투석액중의 choline은 Barnes 등의 방법에 따라 monoethylhomocholine을 내부표준물질로서 HPLC-ECD system을 이용하여 정량했다.

뇌모세혈관의 조제법

신선한 소의 대뇌를 이용하여 Pardridge 등의 mech amical homogenization법에 의하여 뇌모세혈관(B-CAP)을 조제했다. 뇌피질당수율은 약 20 mg protein/100 g cortex이였고, 조제한 B-CAP에의 L-phenylalanine의 uptake 활성은 문헌치와 거의 같았다.

B-CAP를 이용한 uptake 실험

B-CAP(200 μg)를 5분간 preincubation 한후 ^{3}H-choline(2 μCi/point)과 ^{14}C-sucrose(0.4 μCi/point), ^{3}H-acetic acid(0.5 μCi/point), ^{14}C-salicylic acid(0.3 μCi/point)을 각각 넣어 incubation했다. 일정시간 경과후 신속여과법을 이용하여 uptake 실험을 행하였다. B-CAP에의 세포외액량은 ^{14}C-sucrose의 count를 이용하여 보정했다

결과 및 고찰

A. Choine과 염기성약물

I. *In vivo*실험계

(1) Choline의 BBB 투과성에 대한 산성, 염기성약물의 영향 : Amine 수송계를 통하여 운반되는 물질로서 choline을 선택하여 여러가지 종류의 물질에 의한 저해실험을 행하였다. [^{3}H]choline의 BBB 투과는 염기성약물인 eperisone, thiamine, scopola-

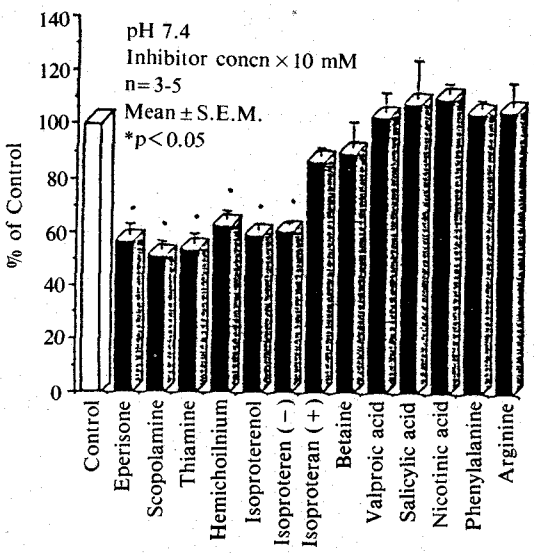

Figure 1. Inhibitory effect on [^{3}H] Choline Uptake into Brain

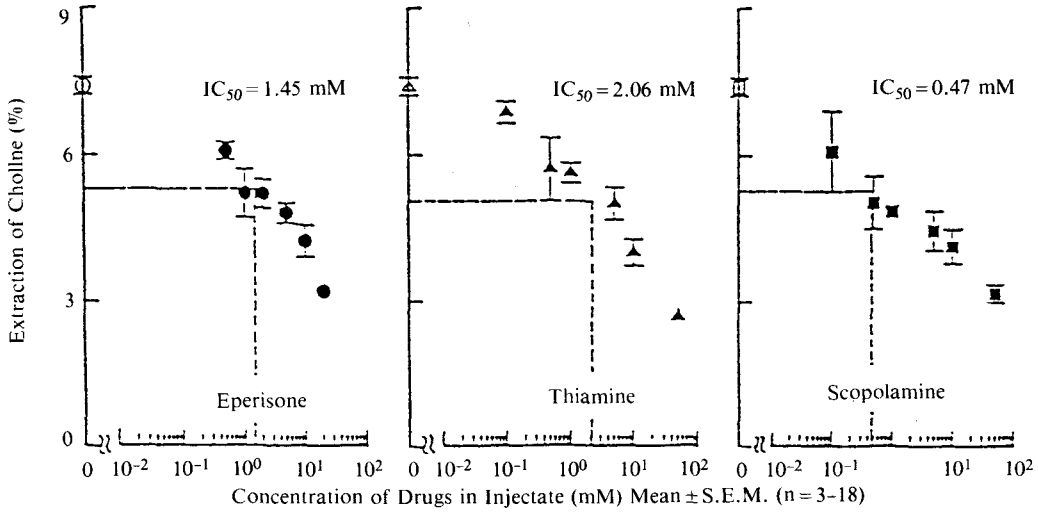

Figure 2. Time course of [^{3}H]Choline Uptake by Bovine Brain Capillaries

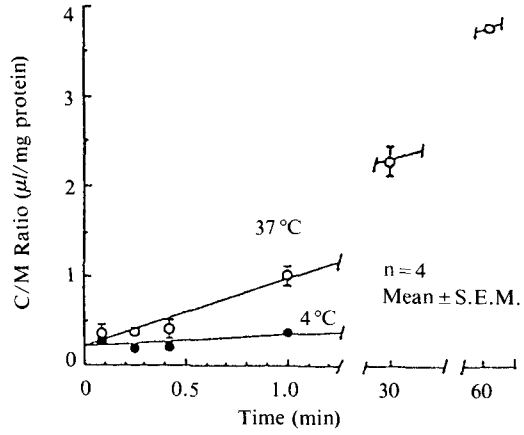

Figure 3. Concentration dependent inhibitory effect of basic drugs for [^{3}H] Choline Uptake into Brain

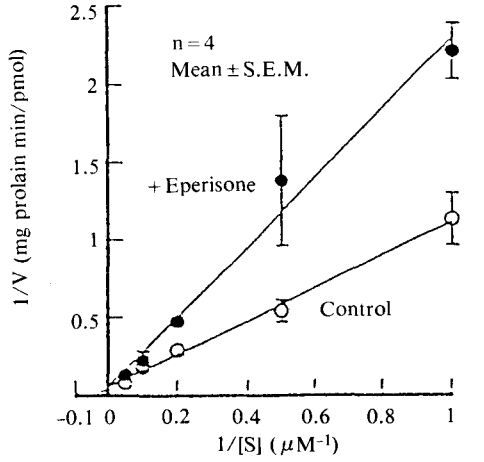

Figure 4. Lineweaver-Burk plot for [^{3}H] Choline Uptake by Bovine Brain Capillary

mine, isoproterenol, thiamine(각각 10 mM), hemicholinium-3(0.1 mM)에서 유의성 있게 저해를 받았지만, 중성 아미노산 및 염기성 아미노산의 내인성물질, salicylic acid, valproic acid 등의 산성약물, 양성 ion형 약물의 betaine에 있어서 저해는 관측되지 않았다(Fig. 1).

(2) 농도의존적 저해효과 : 중추작용형 염기성약물인 eperisone, thiamine, scopolamine 등은 어느 것의 경우에도 [^{3}H]choline의 뇌추출율을 농도의존적으로 저해했다. 그때 얻어진 각 저해제의 half inhibitory concentration(IC 50)은 각각 1.45 mM, 2.06 mM, 0.47 mM이고, choline의 Kt치(약 0.2-0.4 mM)에 가까운 값을 나타내었다(Fig. 2).

II. *In vitro*실험계

(1) Choline의 uptake : B-CAP에 대한 [^{3}H]choline의 uptake의 경시 변화를 검토한 결과 [^{3}H]choline의 uptake는 시간의존적이고 온도의존성을 나타내었다(Fig. 3).

(2) Choline의 uptake에 대한 eperisone의 저해양식 : *In vivo*에서 저해효과를 나타낸 eperisone(5 mM), thiamine(10 mM), scopolamine(10 mM), choline(10 mM) 등은 [^{3}H]choline의 B-CAP에 대한 uptake를 현저하게 저해했다. 또한 염기성약물 epe-

Table I—*Effect of Acidic and Basic Compounds on [^3H] Acetic Acid Uptake into Brain at pH 6.0*

Addition	% of Control	n
None	100	(9)
Acetic acid	55.3 ± 0.5[a)]	(3)
Valproic acid	29.8 ± 1.7[a)]	(4)
Salicylic acid	45.9 ± 2.3[a)]	(4)
Benzoic acid	38.3 ± 5.1[a)]	(4)
Nicotinic acid	43.0 ± 3.4[a)]	(4)
Penicillin G	48.5 ± 1.8[a)]	(4)
Penicillin V	47.6 ± 3.5[a)]	(4)
Propicillin	34.2 ± 3.6[a)]	(4)
Cefazolin	92.9 ± 6.4[a)]	(4)
Eperisone	91.3 ± 5.7	(3)
Choline	93.9 ± 3.7	(4)
Phenylalanine	91.6 ± 7.9	(4)

[a)] $p<0.001$

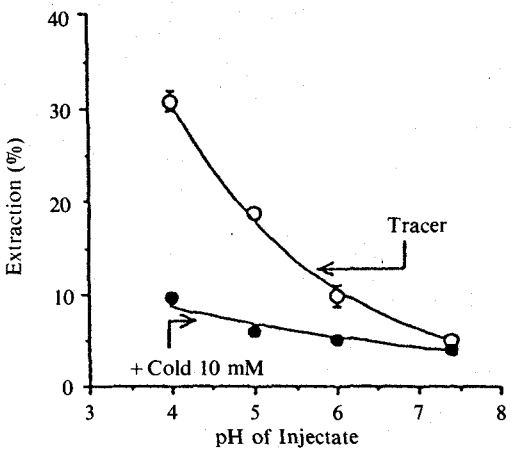

Figure 5. pH and concentration dependencies for [^{14}C] Salicyclic Acid Uptake into Brain

risone에 의해 상경적으로 저해되었고, 얻어진 저해정수(Ki)는 0.46 mM이었다(Fig. 4).

이러한 결과로부터 eperisone 등 염기성약물은 혈액-뇌관문에서 choline과 공통의 수송담체를 통하여 뇌내에 이행하는 것이 처음으로 실증되었다.

B. 모노카르본산과 산성약물

I. *In vivo*실험계

(1) Acetic acid의 BBB 투과성에 대한 산성, 염기성약물의 영향 : 모노카르본산 수송계에 대해서는 acetic acid를 기질로 선택했다. [^3H]Acetic acid의 BBB 투과는 중추작용형 산성약물인 salicylic acid (10 mM), 20 mM의 nicotinic acid, valproic acid 및 수종의 β-lactam 항생물질 등에 의해 유의하게 저해를 받았지만, 위에 적은 염기성약물 eperisone과 choline 및 amino acid에 의해 저해를 받지않았다 (Table I).

Table II—*Effect of Acidic and Basic Compounds on [^{14}C]Salicyclic Acid Uptake into Brain at pH 4.0*

Addition	% of Control
None	100
Acetic acid	26.2 ± 1.5[a)]
Valproic acid	29.8 ± 11.2[b)]
Salicylic acid	35.1 ± 3.6[a)]
L-Lactic acid	47.3 ± 2.9[c)]
D-Lactic acid	79.9 ± 16.3
Penicillin G	69.6 ± 6.7[c)]
Propicillin	47.4 ± 1.5[c)]
Cefazoline	39.3 ± 6.5[c)]
Succinic acid	105.1 ± 19.4
Citric acid	121.6 ± 20.5
Eperisone	90.3 ± 10.7
Choline	107.0 ± 6.6
Phenylalanine	107.0 ± 2.7

$n=3$

[a)] $p<0.001$, [b)] $p<0.01$, [c)] $p<0.05$

(2) pH의존성과 입체선택적 저해효과 : 산성약물의 [^3H]acetic acid, [^{14}C]salicylic acid 및 [^{14}C]nicotinic acid의 BBB 투과는 pH의존성을 나타내었고, 각각의 비표지체에 의해 저해효과를 나타내었다 (Fig. 5). 또한, [^{14}C]salicylic acid의 BBB 투과는 monocarboxylic acid 유도체만에 의해 저해되었고 입체선택적으로 담체수송된다고 보고되어 있는 lactic acid에 의해서는 입체선택적 저해효과도 관측되었다(Table II).

III. *In vitro*실험계

(1) Acetic acid의 uptake 특성과 산성약물과의 관련 : [^3H]acetic acid의 uptake는 온도의존적이고, pH의존적이었다. *In vivo*의 결과와 같이 monocarboxyl기를 갖고있는 산성약물에 의해서만 저해효과

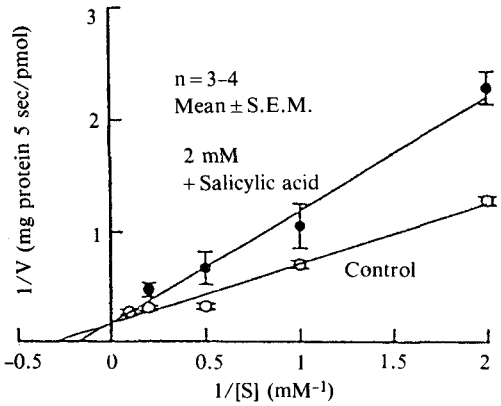

Figure 6—Lineweaver-Burk Plot for [^{3}H] Acetic Acid Uptake by Bovine Brain Capillary

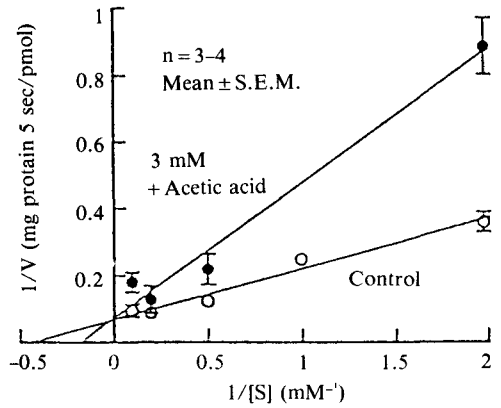

Figure 7. Lineweaver-burk plot for [^{14}C]Salicyclic Acid Uptake by Bovine Brain capillary

를 나타내었다. 또 anion exchanger의 저해제인 DIDS(1 mM)에 의해서는 영향을 받지않았지만, proton ionophore인 FCCP(0.05 mM)의 첨가에 의해 유의성 있게 감소되었다. 또한, [^{3}H]acetic acid의 초기 uptake는 salicylic acid에 의해 경합적인 저해를 받았다. 이때 계산된 salicylic acid의 저해정수 Ki는 2.56 mM이었다.(Fig. 6)

(2) Salicylic acid의 수송과 monocarboxylic acid와의 관련 : [^{3}C]salicylic acid의 초기 uptake는 pH의존성을 나타내었고, 비표지체의 salicylic acid (10 mM)에 의해 현저하게 저해되었다. 또한, acetic acid는 [^{3}C]salicylic acid를 경쟁적으로 저해하였고, 계산된 Ki치는 acetic acid의 uptake의 Kt치와 좋은 대응관계를 나타내었다 (Fig. 7).

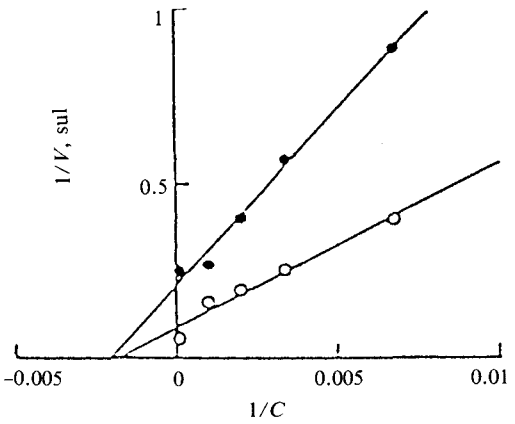

Figure 8. Lineweaver-burk plot for brain extraction of choline in normotensive WKY and SHRSP.
Open and closed circles represent the saturable brain uptake velocity of choline in WKY and SHRSP, respectively. Each point represents the mean of three rats.

Table III—*Comparison of Concentrations of Choline in Plasma and Brain Dialysate between Normotensive WKY and SHRSP*

Rats	Concentation of choline (μM)	
	Plasma	Brain dialysate
WKY	14.1±0.9 (8)	3.80±0.29 (4)
SHRSP	15.6±1.0 (8)	2.36±0.06[a] (4)

Brain dialysate was collected by the technique of brain microdialysis. The concentration of choline was determined by the HPLC-ECD method. Data are represented as the mean±S.E.M. with the number of rats in the parentheses.
[a] $p<0.01$, compared to WKY rats.

C. 병태의 영향

I. 내인성물질 수송계의 변화

뇌졸증 발생 이전의 8 weeks의 SHRSP와 정상랫트(WKY 계)를 비교검토한 결과, SHRSP군에 있어서는 혈류속도의 증가가 관측되었지만, 혈관내용적에는 유의차가 인정되지 않았다. 약물의 수송능에 대해서는 [^{3}H]acetic acid, [^{14}C]nicotinic acid, [^{14}C] salicylic acid 등의 *in vivo* BBB 투과에 있어서 양군에서 유의차가 보이지 않았기 때문에, monocarboxylic acid 수송계의 수송능에 변동은 없는 것으로 생각되었다. 또한, hexose 및 amino acid 수송계에 있어서도 유의차는 인정되지 않았지만, SHRSP군에

있어서 choline의 수송기능이 현저하게 저하되었다. [^{3}H]Choline의 BBB 수송을 속도론적으로 검토하여, choline의 수송기능저하의 원인이 수송담체에 대한 친화성의 차에 있는 것이 아니라, 최대속도의 감소인 것을 명백히 하였다.(Fig. 8)

II. 혈장 및 뇌실질세포간액중의 choline 농도의 비교

혈장중의 choline 농도에 있어서는 양군에 유의차가 보이지 않았지만, 뇌세포간액중의 choline 농도는 SHRSP군에서 유의성 있게 감소하였다(Table II). 이 감소는 BBB에 있어서 choline 수송의 최대속도의 저하에 의한 것으로 사료된다.

결 론

이상의 결과로부터, 혈액-뇌관문으로의 약물의 수송에 있어서 eperisone, scopolamine, thiamine 등의 염기성약물에는 아민 수송계가, salicylic acid, valproic acid, nicotinic acid 등의 산성약물에는 모노카르본산 수송계가 관여하고, 아민 수송계는 본태성 고혈압상태에 있어서 최대속도의 감소에 의하여 수송능이 현저하게 저하하고 있는 것을 명백히 하였다. 본 연구에서 얻어진 지견은 약물의 뇌내 이행성의 평가와 병태시에 있어서 약물의 약리작용의 예측 등에 이용될 수 있다.