

①

脳動脈瘤性クモ膜下出血後脳血管攣縮予防を目的とした組織
プラスミノゲンアクチベーター徐放性薬剤の開発とその効果

弘前大学大学院医学研究科
外科系 脳神経外科学専攻

金 奉 均

目次

	頁
I. 緒言	1
II. 実験の方法と材料	1
1. In Vitroにおけるt-PA (AK-124) の血腫溶解実験	1
- 種々投与法における比較検討 -	
1.1 イヌ動脈血血腫溶解実験	1
1.2 ヒト静脈血血腫溶解実験	3
2. t-PA (AK-124) 徐放製剤の試作	3
2.1 徐放化基剤の選定	4
2.2 各種t-PA (AK-124) 徐放製剤の試作	4
2.2.1 試作法の概要	4
2.2.2 予備試作	4
2.2.2.1 重量測定及び収率	5
2.2.2.2 <i>in vitro</i> 溶出能測定	5
2.2.2.3 72時間後の放出率	6
2.2.2.4 走査電子顕微鏡による観察	6
2.2.3 本試作	6
2.2.3.1 重量測定及び収率	7
2.2.3.2 内包率測定	7
2.2.3.3 肉眼的観察	8
2.2.3.4 t-PA MC 脳槽内投与毒性試験	8
3. t-PA 製剤の脳槽内薬物動態	8
3.1 t-PA (AK-124) 脳槽内薬物動態	9
3.2 t-PA MC 脳槽内薬物動態	11
4. クモ膜下出血後脳血管攣縮抑制効果	11
4.1 実験スケジュールの概略	11
4.2 クモ膜下出血モデル犬作成法	12
4.3 脳血管撮影法	13
4.3.1 DAY 0 Angiography	13
4.3.2 DAY 7 Angiography	13
4.4 血管径の測定	13
4.5 摘出脳標本の肉眼的観察	14
4.6 組織学的検討	14

	頁
Ⅲ. 結果	14
1. In Vitroにおけるt-PA (AK-124) の血腫溶解実験	14
- 種々投与法における比較検討 -	
1.1 イヌ動脈血血腫溶解実験	14
1.2 ヒト静脈血血腫溶解実験	14
2. t-PA (AK-124) 徐放製剤の試作	15
2.2.2 予備試作製剤	15
2.2.2.1 重量測定及び収率	15
2.2.2.2 <i>in vitro</i> 溶出能測定	15
2.2.2.3 72時間後の放出率	16
2.2.2.4 走査電子顕微鏡による観察	16
2.2.3 本試作製剤	16
2.2.3.1 重量測定及び収率	16
2.2.3.2 内包率測定	16
2.2.3.3 肉眼的観察	17
2.2.3.4 t-PA MC 脳槽内投与毒性試験	17
3. t-PA 製剤の脳槽内薬物動態	17
3.1 t-PA (AK-124) 脳槽内薬物動態	17
3.2 t-PA MC 脳槽内薬物動態	19
4. クモ膜下出血後脳血管攣縮抑制効果	19
4.1 血管径の測定	19
4.2 摘出脳標本の肉眼的観察	19
4.3 組織学的検討	20
Ⅳ. 考察	20
Ⅴ. 結語	24
Ⅵ. 謝辞	24
Ⅶ. 文献	26

I. 緒言

脳動脈瘤によるクモ膜下出血後出現する脳血管攣縮の原因は未だに不明であるが、脳主幹動脈を取り巻くクモ膜下凝血塊に由来することは、大方の意見の一致したところである。脳血管攣縮が発症すると、患者の生命・機能予後に多大な影響を及ぼす¹⁾が、現在までのところ確実な治療法は確立されていない。従って現在、その予防に主眼が置かれ、様々な方法が試みられているが中でも、脳血管攣縮発症の根本的原因である、脳主幹動脈周囲凝血塊の除去に多くの努力が払われている。その方法には手術による凝血塊除去、脳槽ドレーンの留置などがあるが、早期手術後に脳槽ドレーンから血栓溶解剤を投与し、くも膜下凝血塊を溶解・排除する方法^{2,3)}が比較的良好な成績を収め、臨床応用も行われている。しかし、脳槽ドレーン留置による頭蓋内感染の危険性、管理の煩雑さ、および血栓溶解剤投与による出血性副作用の危険性などの問題点もまた存在している。組織プラスミノゲンアクチベーター（以後：t-PA）はウロキナーゼとは異なり、フィブリンに親和性を持ち、フィブリン塊と結合することにより初めてプラスミノゲンアクチベーター活性を発現する、血栓に対する親和性が高い薬物であることから、出血性副作用発現頻度の減少および強力な血栓溶解作用を期待して用いられている報告もみられる⁴⁻¹¹⁾。しかし、t-PAの投与量・投与方法については未だ定説がなく、議論の多いところである。そこで本研究では、t-PA（AK-124）の至適投与方法決定の為、まず *in vitro* でのクモ膜下血腫モデルを作成し、種々の投与方法における血腫溶解率について比較検討した。次に、t-PA（AK-124）徐放製剤を試作し、これの薬理的評価を行った。さらに、実験動物を用いて、t-PA（AK-124）及びt-PA（AK-124）徐放製剤の髄腔内投与における髄腔内薬物動態につき比較検討した。最後に、イヌ二回自家血大槽内注入法によるクモ膜下出血モデル¹²⁾を用いて、脳血管攣縮予防に対するt-PA（AK-124）徐放製剤の有効性につき、脳血管造影および組織学的所見から検討した。

II. 実験の方法と材料

1. In Vitroにおけるt-PA（AK-124）の血腫溶解実験

- 種々投与方法における比較検討 -

1.1 イヌ動脈血血腫溶解実験

対象は体重7.8～9.5kg（平均8.7kg）の雑種成犬（雌4頭、雄2頭）計6頭である。

まず、sodium pentobarbital（Nembutal[®]、ダイナボット株式会社、大阪市中央区久太郎町4-1-3）25～30mg/kg 静注により全身麻酔後、右大腿動脈より静脈カテーテル4Fr.（アトム株式会社、東京都文京区本郷3-18-15）を約15cm挿入し、大動脈にcannulationした。これより動脈血を50ml採血し、5個の円柱状スチロール製容器それぞれに正確に10mlずつ分注した。これを37℃で24時間incubate後、上清を取り除き、固形血腫

の重量を Electric Balance (JP-300WP, Chyo Balance Corporation, 京都市南区上鳥羽清井町 40 号) にて測定した (測定値を H1 とする) 。測定後、血腫を *in vitro* クモ膜下血腫モデル (Fig.1) 内に入れ、t-PA (AK-124) を種々の方法にて投与し、24 時間後の残存血腫重量を前述の測定機器にて測定する (測定値を H2 とする) ことで、各々の血腫溶解率を求め、これらを比較検討した。なお、血腫溶解率は次式により得られる。

$$(\text{血腫溶解率}) = (1 - H2 / H1) \times 100 (\%)$$

t-PA (AK-124) は旭化成工業株式会社より提供を受けた、ヒト正常肺細胞由来の天然型 t-PA (チンキナーゼ) であり、以下の実験は全て、1Vial (以下 V と略す、1V は約 440mg) 中に 360 万国単位 (IU) の t-PA を含有する t-PA (AK-124) 製剤を用いた。

t-PA (AK-124) の投与法は、以下の 5 群である。

a). 持続投与群 (n=6)

t-PA (AK-124) 60mg (約 50 万 IU 相当) を代用髄液としての乳酸加リンゲル (ラックテック[®], 大塚製薬株式会社, 東京都千代田区神田司町 2-9) 48ml に溶解し、24 時間かけて持続投与した。

b). 分割投与群 (n=6)

乳酸加リンゲル 48ml を 24 時間持続投与しながら、t-PA (AK-124) 60mg を乳酸加リンゲル 6ml に溶解したものを実験開始時、8 時間後および 16 時間後の計 3 回、8 時間毎に 2ml ずつ分割投与した。

c). 一回大量投与群 (n=6)

重量測定後の血腫をプラスチック製シャーレへ移し、t-PA (AK-124) 60mg を乳酸加リンゲル 6ml に溶解した液を、血腫に万遍なくかけ、30 分間静置した後、乳酸加リンゲル 200ml を用いて静かに血腫を洗浄。その後血腫をクモ膜下血腫モデル内に入れ、乳酸加リンゲル 48ml を 24 時間持続投与した。

d). 乳酸加リンゲル単独持続投与群 (n=6)

乳酸加リンゲル 48ml を 24 時間持続投与した。

e). incubate 群 (n=6)

重量測定後の血腫を再び円柱状スチロール製容器に入れ、37°C で 24 時間 incubate した。

なお、a) ~ d) 群は以下のクモ膜下血腫モデルを用いている (Fig.1)。

50 ml ディスポーザブルシリンジ (株式会社ニプロ, 大阪市北区豊崎 3-3-13) の内筒を抜去し、注出口が最下位となるべくシリンジの外筒を糸で吊るした。注入口にエク

ステンションチューブ(株式会社トップ, 東京都足立区千住中居町 19-10)を接続し、チューブの他端は排液口とした。チューブ他端の排液口の高さは、シリンジおよびエクステンションチューブ内に乳酸加リンゲル液を満たした際に、シリンジ内の液量が 15ml となるように調節した。シリンジおよびエクステンションチューブ内に乳酸加リンゲル液を満たした後、重量測定後の血腫をシリンジ外筒内へ慎重に移した。a) 群は t-PA (AK-124) 含有乳酸加リンゲル液、b) ~ d) 群は乳酸加リンゲル液 48ml を各々微量輸注ポンプ(テルフュージョン・シリンジポンプ STC-521, テルモ株式会社, 東京都渋谷区幡ヶ谷 2-44-1)を用いて 2ml/hr. の速度で 24 時間持続注入した。

なお、この実験系に置いて 24 時間持続投与する代用髄液としての乳酸加リンゲル量 48ml およびシリンジ内の乳酸加リンゲル量 15ml は、ヒトの一日髄液産生量 500ml 弱および頭蓋内髄液量約 150ml の 1/10 スケールから設定したものである。また、Fisher Group 3¹³⁾ 程度のヒトクモ膜下出血における出血量は約 100ml 強程度であるとの報告¹⁴⁾ から 1/10 スケールであるイヌ動脈血 10ml を incubate して血腫を作成し、各群に用いた。t-PA (AK-124) 投与量の設定は、Findley ら⁴⁾ の術中一回大量投与後洗浄法において t-PA 原末約 10mg (約 400 ~ 500 万 IU に相当) を臨床使用していることから、その 1/10 スケールである 50 万 IU とし、t-PA (AK-124) を投与する群においては全て同一総量とした。また、c) 群において t-PA 投与から 30 分後、血腫洗浄する乳酸加リンゲル量を 200ml と設定したのは、Findley らが術中 t-PA 投与から 30 分後、1000ml ~ 2000ml の量で脳槽内洗浄する為、前述と同様に 1/10 スケール量として算出した。

1.2 ヒト静脈血血腫溶解実験

対象は健康成人男子一名である。

右正中静脈より静脈血を 50ml 採血した。その後の実験方法および使用する材料は 1.1 イヌ動脈血血腫溶解実験と全く同様で、これを 5 回繰り返した。(n=5)

2. t-PA (AK-124) 徐放製剤の試作

t-PA 脳槽内投与における出血性副作用は、脳槽内の血栓に付着していない所謂 free t-PA による可能性が考えられ¹⁵⁾、理論的にはこの free t-PA 量を少なくすることで合併症の発現頻度を減じることができると推察される。実際、このような考えで、脳槽ドレナージからの t-PA 少量・頻回投与を行った報告⁹⁾ もあるが、臨床上管理に要する膨大な労力および煩雑さなどから一般には受け入れられていないようである。以上より、t-PA 少量・頻回投与の長所を生かし、上述のような臨床上の欠点をなくす目的で、t-PA 徐放製剤の開発を進めてきた。脳動脈瘤性クモ膜下出血の手術時、破裂脳動脈瘤をクリッピングした後、クモ膜下血液を速やかに排除し脳血管攣縮発生を予防するため、脳槽内にこの t-PA 徐放製剤を投与することを目的とした。

"t-PA の徐放" を "t-PA の持続的一定濃度放出" に等しいと仮定し、1. 血腫溶解実

験を施行したが、その結果、後述の如く、血腫溶解効果の妥当性が示された為、t-PA 徐放製剤の試作を行った。

2.1 徐放化基剤の選定

ある薬物を徐放化させる際、その薬物と基剤が必要となる^{16,17)}が、“脳槽内”という特殊な環境のため、基剤の選択は限定されると考えられる。即ち、脳槽内は髄液が循環している空間であり、また酵素はほとんど存在しないと考えられているため、生体内非分解性の基剤を用いた場合、髄液循環障害を来す可能性があり、また酵素分解性の基剤の場合、分解されないまま脳槽内に残存し前述と同様に髄液循環障害を来す可能性がある。この様な理由から今回、生体内加水分解性であるポリ乳酸・グリコール酸共重合体（以下 PLGA と略す）を、脳槽内へ投与する t-PA (AK-124) 徐放製剤の基剤として選択した。

2.2 各種 t-PA (AK-124) 徐放製剤の試作

2.2.1 試作法の概要

まず小川らの方法¹⁸⁾に準じ、水中乾燥法でのマイクロカプセル（以下 MC と略す）化を試みた（Fig.2）。図に示す様に、蒸留水に溶解した t-PA を Water phase 1（以下 W1 と略す）、塩化メチレン（以下 CH_2Cl_2 と略す）に溶解した PLGA を Oil phase（以下 O と略す）、保護コロイド剤としてのポリビニルアルコール（以下 PVA と略す）水溶液を Water phase 2（以下 W2 と略す）とすれば、内水相である W1 と油相である O を乳化し W1/O emulsion とし、さらにこれと再度、外水相である W2 を乳化し W1/O/W2 emulsion とした。Oil phase 内の塩化メチレンは沸点が低い為、室温程度で脱溶媒される。この際得られる MC は粒子径の大小不同が著しく、後の薬物放出に大きなばらつきが出る事が考えられた為、ふるいにかけた。この後、遠心分離し上清を捨て蒸留水を加えることを繰り返し、PVA を洗浄除去した。これを凍結乾燥し、得られた粉末を t-PA MC 試作製剤とした。

2.2.2 予備試作

以下の a)～c) 群までの 3 製法にて試作した。

a) PLGA 4.0g 群

t-PA (AK-124 360 万単位) 2 V (約 840mg) を蒸留水 2ml に溶解し、W1 とした。PLGA (LGA-5005[®], 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町 3-1-2) 4.0g を CH_2Cl_2 (特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町 3-1-2) 10ml に溶解し O と

した。O 内に W1 を混合後、用手的に力強く攪拌し、W1 / O emulsion とした。2% PVA (一級, 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町 3-1-2) 水溶液 25ml を W2 とし、W1 / O を W2 内に入れ、マグネチック・スターラーにて徐々に 35°C まで温度を上げながら 3 時間脱溶媒攪拌した。この W1 / O / W2 emulsion を 106 μ m の試験用網ふるいにかけ、粗大粒子を除去後、冷却遠心機 (H-500R, 国産遠心器株式会社, 東京都台東区台東 2-3-9) にて、0°C で 7000rpm, 6min 遠心分離し上清を捨て蒸留水 20ml を加えることを 3 回繰り返す、PVA を洗浄除去した。最後に、同条件で遠心分離し上清を捨て液体窒素に接触させて凍結させた。その後、これを 24 時間、凍結真空乾燥装置 (DF-01G, 日本真空技術株式会社, 神奈川県茅ヶ崎市萩園 2500) を用いて凍結乾燥させた。

b) PLGA 2.0g 群

W1 / O / W2 emulsion の Oil phase は LGA-5005 [®] (和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町 3-1-2) 2.0g を CH₂Cl₂ 10ml に溶解したものとした。その他の作製法は a) 群と全く同様である。

c) PLGA 1.0g 群

W1 / O / W2 emulsion の Oil phase は LGA-5005 [®] (和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町 3-1-2) 1.0g を CH₂Cl₂ 10ml に溶解したものとした。その他の作製法は a) 群と全く同様である。

d) t-PA (AK-124) 群

2.2.2.2 *in vitro* 溶出能測定実験 (後述) の際、t-PA (AK-124) の pH に与える影響を知る目的の為、t-PA (AK-124) 400mg を乳酸加リンゲル 50ml で溶解した。

2.2.2.1 重量測定及び収率

a), b) 及び c) 群にて作製した t-PA MC 試作製剤の各々の重量を Electric Balance (JP-300WP, Chyo Balance Corporation, 京都市南区上鳥羽清井町 40 号) にて測定した。次に、a), b) 及び c) 群の各々について、作製に用いた t-PA (AK-124) 及び PLGA の合計重量に対する t-PA MC 試作製剤の重量の割合 (以下、収率とする) を求めた。

2.2.2.2 *in vitro* 溶出能測定

a), b) 及び c) 群にて作製した t-PA MC 試作製剤のうちそれぞれ 300mg, 300mg 及び 100mg を Electric Balance (JP-300WP, Chyo Balance Corporation, 京都市南区上鳥羽清井町 40 号) にて定量後、乳酸加リンゲル 50ml を入れた 100ml 容量のガラスビーカー 3 個に各々注入した。これを 37°C にて incubate し、24, 48 及び 72 時間後にそれぞれ 27

gauge 硬性針を付けた 5ml 容量デイスポーザブル シリンジ (株式会社ニプロ, 大阪市北区豊崎 3-3-13) にて 1.8ml 採取後、ガラスビーカー内の溶液を pH meter (pH meter 240, Ciba Corning Diagnostics Limited, Sudbury, Suffolk CO10 6XD, England) を用いて pH 測定した。また、pH 測定後はビーカー内に乳酸加リンゲル 1.8ml を注入する事を繰り返した。尚、採取した 1.8ml はすぐに t-PA 抗原濃度測定の為 SRL 社 (special reference laboratories: 以下 SRL と略す, 東京都新宿区西新宿 2-4-1) に提出した。また、t-PA (AK-124) の pH に与える影響を知る目的の為、d) 群について、24, 48 及び 72 時間後に pH 測定した。測定方法は上述の通りである。

t-PA 抗原濃度の測定原理は ELISA 法を用いた抗原抗体反応 (サンドイッチ法) であり、概略は次の通りである。まず、検体中の t-PA と抗ヒト t-PA 抗体と反応させ、次に酵素標識抗 t-PA 抗体を反応させサンドイッチとする。さらに基質を加えその発色より吸光度測定し、検体中の t-PA 濃度を求めるものである。

2.2.2.3 72時間後の放出率

上記予備試作製剤の作製に用いた t-PA 量に対する 72 時間後までに放出される t-PA 抗原量の割合を放出率とし、a), b) 及び c) 群の各々について求めた。放出率は次式により示すことができる。

$$\begin{aligned} \text{(放出率)} = & \text{(72時間後 t-PA 抗原濃度)} \times 50\text{ml (溶媒量)} \times \text{(試作製剤作製重量)} \div \\ & \text{(溶出能測定実験に用いた試作製剤量)} \div 21.6\text{mg (試作製剤の作製に用} \\ & \text{いた AK-124 の t-PA 量)} \times 100 (\%) \end{aligned}$$

2.2.2.4 走査電子顕微鏡による観察

上記予備試作製剤が実際にマイクロカプセル化しているか否かを確認する目的で、a) 群の一部についてその粒子表面を走査電子顕微鏡 (S-405, 日立製作所, 東京都港区虎ノ門 1-26-5) を用いて観察した。

2.2.3 本試作

2.2.2 で試作した t-PA MC の 72 時間までの t-PA 放出量が t-PA MC に含有される t-PA の総量にほぼ等しいと仮定すると、その内包率 (作製に用いた薬物総量に対する試作製剤に含有される薬物総量の割合) は著明な低値であることが予想された為、その製造方法を見直す必要性に迫られた。問題点としてまず第一に、2.2.2 の製法において W1 / O emulsion とする時、手動的に攪拌したが、この W1 / O emulsion 中の W1 は肉眼的に明らかに分かるほどの大きさであり、また大小不同が著しいものであった。この段階で W1 が大きければ、生成される t-PA MC も大きなものとなり、粒子径を整える

為、ふるいにかける際に捕らえられてしまう。また、ふるいにかける際、粒子径をある程度整えなければ、安定したt-PAの放出挙動が得られないと予想される。以上のことから、W1/O emulsion とする際に超音波撹拌を行い、W1サイズの微小化を試みた。第二に、W1/OをW2内に入れマグネチック・スターラーを用いて撹拌する際、個々のW1/Oが接触・融合するものも多々見られた。これは、W2の量が少なく、また、マグネチック・スターラーを用いての撹拌では撹拌力が弱い為、個々のW1/Oの表面に剪断力が働かず融合してしまう可能性も考えられた。以上のことから、W2量を多くし、W1/O/W2 emulsion とする際に高速乳化・分散機を用いての撹拌を行った。また、その後の脱溶媒撹拌には、マグネチック・スターラーを用いての撹拌では、マグネチック・スターラーと容器との間の摩擦により、沈殿したW1/O/W2 emulsion が破壊されてしまうことを危惧し、摩擦の生じない大きな撹拌力の期待できるアンカーミキサーを用いた。その詳細は次の通りである。

t-PA (AK-124360万単位) 約1750mgをpH4リン酸緩衝液7mlに溶解し、W1とした。PLGA (LGA-5005[®]), 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町3-1-2) 38.3gをCH₂Cl₂ (特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町3-1-2) 40mlに溶解しOとした。O内にW1を混合後、超音波ホモジナイザー (US-600CCVR, 日本精機株式会社, 東京都千代田区大手町2-6-2) にて600Wで2分間撹拌し、W1/O emulsion とした。0.25% PVA (一級, 和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町3-1-2) 水溶液18000mlをW2とし、W1/OをW2内に入れ、TKホモミックラインフローミキサー30 (特殊機化工業株式会社, 大阪市福島区海老江8-16-43) にて6000rpm, 1000ml/min. の速度で乳化・分散することでW1/O/W2 emulsion とした後、TKアンカーミキサー20ℓ容量 (特殊機化工業株式会社, 大阪市福島区海老江8-16-43) を用いて、-0.5atm., 50rpmで20分間、-0.5atm., 150rpmで90分間、さらに-0.7atm., 150rpmで120分間、10℃のもと脱溶媒撹拌した。このW1/O/W2 emulsion を150μmのステンレスメッシュ (三邦製作所, 東京都千代田区岩本町1-3-7) にかけて、粗大粒子を除去後、冷却遠心分離機 (H-7000HL, 国産遠心器株式会社, 東京都台東区台東2-3-9) にて、4℃で500rpm, 5分間遠心分離し上清を捨て蒸留水を加えることを3回繰り返して、PVAを洗浄除去した。最後に、同条件で遠心分離し上清を捨て48時間、EYELA凍結真空乾燥装置 (FD-1, 東京理科株式会社, 東京都千代田区神田富山町18) を用いて凍結乾燥させた。

2.2.3.1 重量測定及び収率

本製法にて作製したt-PAMC試作製剤の重量を測定し、収率を求めた。実験方法は、2.2.2 予備試作製剤のそれに準じた。

2.2.3.2 内包率測定

本製法にて作製した t-PA MC 試作製剤の一部をアセトニトリルに溶解して、t-PA 活性測定キット (SPECTROLYSETM/fibrin, biopool cat. no.101101, Biopool AB, P.O. BOX 7133, S-907 04 Umeå SWEDEN) に添付の緩衝液を加え、上述のキットにて t-PA 活性濃度を測定した。この際、t-PA MC の試作に用いた t-PA (AK-124) 及び PLGA の総量に対する、t-PA (AK-124) 量の割合分、t-PA MC に t-PA (AK-124) が内包されている、即ち、内包率が 100% と仮定して、10000 IU/ml となる様に検体を調製した。コントロールとして、t-PA (AK-124) を同様の方法にて、10000 IU/ml となる様に検体を調製し、t-PA 活性濃度を測定した。それぞれ 3 回繰り返し、平均値を求め、t-PA MC 活性値と t-PA (AK-124) 活性値の比率から t-PA MC の内包率を求めた。

2.2.3.3 肉眼的観察

本製法にて作製した t-PA MC 試作製剤を肉眼的に観察した。

2.2.3.4 t-PA MC 脳槽内投与毒性試験

対象は体重 6.3kg 雄及び 7.0kg 雌の雑種成犬 2 頭である。

sodium pentobarbital (Nembutal[®], ダイナボット株式会社, 大阪市中央区久太郎町 4-1-3) 25~30mg/kg 静注により全身麻酔を施し、20 gauge 硬性針にて経皮的に大槽穿刺し、4ml の髄液を排除した後、乳酸加リンゲル液 3ml に拡散した t-PA MC 0.4g を注入し、乳酸加リンゲル液 1ml を注入した。その後毎日、歩行状態を観察することで、失調・麻痺等の出現について調べた。t-PA MC 注入から 7 日目に再度 sodium pentobarbital 25~30mg/kg 静注により全身麻酔を施し、開胸後、胸部大動脈をクランプし、右心耳より脱血しながら経心的にヘパリン 1 万単位加生理食塩水 1.0 l を 130cmH₂O の圧で灌流した。引き続き、10% 等張ホルマリン液 3.5 l を同圧で灌流し固定した。延髄・頸髄移行部より吻側の中樞神経組織を取り出し、10% 等張ホルマリン液で 4 日間浸漬固定した。固定後、標本の浸透圧を上げる為、25% sucrose 溶液内に数日間浸し、前頭葉・側頭葉・頭頂葉・後頭葉・小脳・脳幹の各部位を任意に切り出し、O.C.T. Compound (Tissue-Tek[®], 三共株式会社, 東京都中央区日本橋本町 3-5-1) を満たした容器 (クリオモルド, Tissue-Tek[®], 三共株式会社, 東京都中央区日本橋本町 3-5-1) に入れ、凍結切片作製装置 (サクラ・コールドトーム CM-502[®], サクラ精機株式会社, 東京都中央区日本橋本町 3-1-9) で -25℃ に冷却後、4 μ m の切片に切断した。これを Hematoxylin-Eosin 染色し、光学顕微鏡にて組織学的検索を行った。

3. t-PA 製剤の脳槽内薬物動態

心筋梗塞時、閉塞血管の再灌流目的で t-PA の動脈内あるいは静脈内投与が施され、この際の薬物動態についてはすでに多くの報告^{19~21)}がある。しかし、脳動脈瘤性クモ

膜下出血後脳血管攣縮の予防目的で、t-PA 脳槽内投与が様々な施設で臨床使用されているにも関わらず、t-PA 脳槽内投与時の脳槽内薬物動態について詳細に調べた報告は、渉猟し得たかぎりでは未だみられない。その為、各施設で t-PA 投与量・投与方法に一定基準がない。至適投与量・至適投与法を知るための一助として、また前述の t-PA MC 試作製剤の *in vivo* での薬物動態を比較検討する目的で、実験動物を用いて以下の実験を行った。

3.1 t-PA (AK-124) 脳槽内薬物動態

対象は体重 5.0 ～ 6.9kg (平均 5.94kg) の雑種成犬 (雌 5 頭、雄 3 頭) 計 8 頭である。sodium pentobarbital (Nembutal[®], ダイナボット株式会社, 大阪市中央区久太郎町 4-1-3) 25～30mg/kg 静注により全身麻酔を施し、気管内挿管の後、人工呼吸器 (Aika ventilator R-60, 株式会社アイカ, 東京都文京区本郷 3-15-9) を用いて調節呼吸とした。また実験中、sodium pentobarbital 25～50mg を適宜、追加投与した。右鼠径部に約 3cm の皮膚切開を置き、右大腿静脈より静脈カテーテル 4Fr. (アトム株式会社, 東京都文京区本郷 3-18-15) を約 15cm 挿入し、下大静脈に cannulation した。側臥位にて、後頸部に外後頭隆起より第四頸椎棘突起に至る約 10cm の縦切開を置き、後頸筋群を正中切開し、後頭骨・環椎間の硬膜に達した後、硬膜を通して大槽を透見・確認した。この硬膜を切開し、大槽内に静脈留置カテーテル (ベニユーラ V3[®], 株式会社トップ, 東京都足立区千住中居町 19-10) を cannulation した後、6-0 絹糸にて硬膜を密を縫合した。さらに、髄液が漏れない様に硬膜縫合部を fibrin glue (ベリプラス P[®], ヘキストジャパン株式会社, 東京都港区赤坂 8-10-16) 及びアロンアルファ[®]にて密閉した (Fig. 3)。なお、静脈留置カテーテルには三方活栓を接続し、t-PA (AK-124) の注入及び髄液採取時以外は閉鎖した。この条件のもとで次の実験を行った。

1). t-PA (AK-124) 20mg 大槽内投与

体重 5.2kg の雑種成犬、雄 1 頭を用い、カテーテルより大槽内髄液 3ml を採取排除後、乳酸加リンゲル 2ml に溶解した t-PA (AK-124) 20mg を大槽内に注入した。さらに引き続き乳酸加リンゲル 1ml を注入した。t-PA (AK-124) 注入開始時を実験開始時とし、5, 15, 30, 60, 120 分後に大槽留置カテーテルよりまず 0.2ml を採取、これを破棄し、次の 1.8ml を髄液中 t-PA 抗原濃度測定用検体として採取した。採取後は、乳酸加リンゲル 2ml をこのカテーテルより注入し、これを繰り返した。また下大静脈に cannulation したカテーテルより静脈血 1.8ml を実験開始直前、開始後 60 分後および 120 分後に血漿中 t-PA 抗原濃度測定用検体として採取し、採取後はカテーテル内を乳酸加リンゲルで満たした。髄液検体は採取後、-80℃ で凍結保存し、静脈血検体は採取後、冷却遠心機 (H-500R, 国産遠心器株式会社) を用い、0℃ で 3000rpm, 10min 遠心分離し、上清をピペットで分取し、これを -80℃ で凍結保存した。その後、両検体を

SRL 社に提出し、髄液中及び血漿中 t-PA 抗原濃度を測定した。

2). t-PA (AK-124) 100mg 大槽内投与

体重 5.8kg の雑種成犬、雌 1 頭を用い、カテーテルより大槽内髄液 3ml を採取後、乳酸加リンゲル 2ml に溶解した t-PA (AK-124) 100mg を大槽内に注入した。さらに引き続き Flush 用として乳酸加リンゲル 1ml を注入した。実験開始より 10, 15, 30, 60, 120 分後に 1) と同様の方法で大槽留置カテーテルより髄液中 t-PA 抗原濃度測定用検体として採取した。なお、本実験では静脈血からの採取は行わなかった。その他の方法・手技は 1) と全く同様である。

3). t-PA (AK-124) 60mg 大槽内投与

体重 5.0kg の雑種成犬、雌 1 頭を用い、カテーテルより大槽内髄液 3ml を採取排除後、乳酸加リンゲル 2ml に溶解した t-PA (AK-124) 60mg を大槽内に注入した。さらに引き続き Flush 用として乳酸加リンゲル 1ml を注入した。実験開始より 120, 240, 360, 480 分後に大槽留置カテーテルよりまず 0.2ml を採取、これを破棄し、次の 0.8ml を髄液中 t-PA 抗原濃度測定用検体として採取した。採取後は、乳酸加リンゲル 1ml をこのカテーテルより注入し、これを繰り返した。また下大静脈に cannulation したカテーテルより静脈血 1.8ml を実験開始より 240, 360, 480 および 600 分後に血漿中 t-PA 抗原濃度測定用検体として採取した。髄液検体は採取後、-80℃ で凍結保存し、静脈血検体は採取後、冷却遠心機 (H-500R, 国産遠心器株式会社, 東京都台東区台東 2-3-9) を用い、0℃ で 3000rpm, 10min 遠心分離し、上清をピペットで分取し、これを -80℃ で凍結保存した。その後、検体を MBC 社 (株式会社三菱油化ビーシーエル: 以下 MBC と略す, 東京都板橋区志村 3-30-1) に提出し、髄液中及び血漿中 t-PA 抗原濃度を測定した。測定原理は ELISA 法によるサンドイッチ法を用いた抗原抗体反応であり、SRL 社での測定と同様である。

4). t-PA (AK-124) 16mg 大槽内投与

以上の 1) ~ 3) の実験結果から、大槽内注入した t-PA (AK-124) の多くが大槽から拡散しないまま経時的に採取される可能性が認められた為、以下の実験を行った。

大槽内 t-PA (AK-124) 注入量 16mg 及び髄液・静脈血採取時間以外の実験方法は 3) と全く同様であり、検体を MBC 社に提出し、髄液中及び血漿中 t-PA 抗原濃度を測定した。対象は体重 6.0 ~ 6.9kg の雑種成犬 5 頭であり、その内訳は次の通りである。

a) 体重 6.1kg の雑種成犬、雄 1 頭に t-PA (AK-124) 16mg を大槽内投与し、5 分後に髄液採取

b) 体重 6.9kg の雑種成犬、雌 1 頭に t-PA (AK-124) 16mg を大槽内投与し、10, 120, 240, 360 分後に髄液採取及び 10 分後に静脈血採取

c) 体重 6.3kg の雑種成犬、雌 1 頭に t-PA (AK-124) 16mg を大槽内投与し、15 分後に髄液採取

d) 体重 6.2kg の雑種成犬、雄 1 頭に t-PA (AK-124) 16mg を大槽内投与し、30, 60, 120 分後に髄液採取及び 30 分後に静脈血採取

e) 体重 6.0kg の雑種成犬、雌 1 頭に t-PA (AK-124) 16mg を大槽内投与し、60, 120, 240, 360, 480 分後に髄液及び静脈血採取

3.2 t-PA MC 脳槽内薬物動態

対象は体重 6.2, 6.3 及び 6.3kg の雑種成犬、雌 3 頭である。

3.1 t-PA (AK-124) 脳槽内薬物動態実験と同様に下大静脈に cannulation し、後頭骨・環椎間の硬膜に達した。本実験にては大槽内に cannulation せず、20 gauge 硬性針にて大槽穿刺し髄液を 4ml 採取した後、2.2 で試作した t-PA MC 400mg を乳酸加リンゲル 3ml に分散させ、大槽内に注入した。さらに引き続き乳酸加リンゲル 1ml を注入後、硬性針を抜去し、髄液漏のない様に fibrin glue にて密閉した。その後の髄液検体採取のたびに 27 gauge 硬性針にて大槽穿刺し、髄液採取後 乳酸加リンゲル 1ml を注入、硬性針を抜去し、fibrin glue にて密閉することを繰り返した。その他の髄液及び静脈血採取・処理方法は採取時間以外、3.1 3) の実験と全く同様である。各々の採取時間は次の通りである。

a). 体重 6.2kg の雑種成犬、雌 1 頭に前述の t-PA MC を大槽内投与し、1, 3 時間後に髄液採取

b). 体重 6.3kg の雑種成犬、雌 1 頭に前述の t-PA MC を大槽内投与し、6, 15, 24, 48, 60 時間後に髄液採取及び 3, 6, 15, 24, 48, 60 時間後に静脈血採取

c). 体重 6.3kg の雑種成犬、雌 1 頭に前述の t-PA MC を大槽内投与し、96, 120, 168 時間後に髄液採取

4. クモ膜下出血後脳血管攣縮抑制効果

4.1 実験スケジュールの概略

対象は体重 5.2 ~ 8.0kg (6.80±0.80) の雑種成犬 29 頭である。

sodium pentobarbital (Nembutal[®], ダイナボット株式会社, 大阪市中央区久太郎町 4-1-3) 25~30mg/kg 静注により全身麻酔を施し、脳血管撮影 (Day 0 Angiography) 施行後、クモ膜下腔内動脈血注入 (Day 0 SAH) した。48 時間後、再度クモ膜下腔内動脈血注入 (Day 2 SAH) 施行し、3 時間後、大槽内に後述の薬剤あるいは溶液を注入した。最初の血液注入から 7 日目 (Day 7) に 2 回目の脳血管撮影 (Day 7 Angiography) 後、灌流固定し、脳を取り出し、浸潤固定した。固定後、脳底動脈に関して光学顕微鏡での組織学的評価を行った。

4.2 クモ膜下出血モデル犬作成法

クモ膜下出血の作成は Two-hemorrhage Canine Model¹²⁾ に準じた。側臥位にて後頸部に外後頭隆起より軸椎棘突起に至る約 7cm の縦切開を置き、後頸筋群を正中切開し、後頭骨・環椎間の硬膜に達した。硬膜を通して大槽を透見・確認した。20 gauge 硬性針にて大槽を穿刺し、0.4ml/kg の髄液を吸引した後、脳血管撮影施行時に右椎骨動脈に留置したカテーテルより動脈血を採取。直ちに 0.4ml/kg を 20~30 秒かけて用手的にゆっくりと大槽内へ注入した (Day 0 SAH)。注入後、クモ膜下腔の血液をなるべく脳底槽に集積させるため、腹臥位で頭部が低位となる様な体位を 30 分間とった。その後、全ての創で筋層・皮膚を密に縫合した。48 時間後、右大腿動脈に cannulation し、同様の操作にて再度大槽内へ動脈血注入した (Day 2 SAH)。なお、Day 2 SAH から 3 時間後、大槽内に次のものを注入し、各々の群に分けた。

a). t-PA (AK-124) 投与群 (n=5)

AK-124 を 12mg (約 10 万 IU) を乳酸加リンゲル 2ml に溶解したものを投与する群

b). t-PA MC 投与群 (n=6)

t-PA MC 400mg (t-PA に概算して約 10 万 IU : 結果 2.2.2 から算出) を乳酸加リンゲル 2ml に浮遊拡散させた溶液を投与する群

c). PLGA MC 投与群 (n=5)

PLGA のみから成る MC (2.2.3 本試作実験と全く同じ製法にて t-PA を加えずに作製したもの) 0.4g を乳酸加リンゲル 2ml に浮遊拡散させたものを投与する群

d). 乳酸加リンゲル投与 (コントロール) 群 (n=6)

乳酸加リンゲルのみを 2ml 投与する群

e). SAH 群 (n=7)

Day 2 SAH 後何も加えない群

4.3 脳血管撮影法

4.3.1 Day 0 Angiography

仰臥位に固定し、頸部前面で正中より2横指右側に約7cmの縦切開を設け、右椎骨動脈を確保した。同動脈の起始部より約1cm吻側部から末梢に向けて静脈カテーテル4Fr. (アトム株式会社, 東京都文京区本郷3-18-15)を約5cm挿入し、脳血管撮影を施行した。終了後は、カテーテルを抜去し、カテーテル挿入部は結紮止血後、創部を密に縫合した。

4.3.2 Day 7 Angiography

DAY 7に灌流固定前、前回の創部をあけ、右椎骨動脈結紮止血部よりさらに約1cm吻側部に再度静脈カテーテル4Fr. (アトム株式会社, 東京都文京区本郷3-18-15)を約4cm末梢へ向け挿入し、脳血管撮影を施行した。なお、脳血管撮影は全て以下の条件で行った。

管球の高さはフィルム面より50cm, 電圧69KeV, 電流20mA, 撮影時間0.25sec.で、造影剤は、イオパミドール (イオパミロン 300[®], 日本シェーリング株式会社, 大阪市淀川区西宮原2-6-64) 3mlを約3秒かけて用手的に注入し、Day 0 Angiographyでは注入終了時に、Day 7 Angiographyでは注入終了から約3秒後に撮影した。

4.4 血管径の測定

Day 0及びDay 7に撮影したX線フィルムについて各々脳底動脈の径を3点 (脳底動脈先端部より5mm, 10mm, 15mmの位置)で計測し、その平均値を求め、これを脳底動脈径とした。次に、Day 0 Angiographyの脳底動脈径に対するDay 7 Angiographyのその割合をDiameter ratioとし、これを求めた。即ち、Diameter ratioは次式により求めた。

$$(\text{Diameter ratio}) = (\text{Day 7 Angiography の脳底動脈径}) / (\text{Day 0 Angiography の脳底動脈径}) \times 100 (\%)$$

このDiameter ratioをパラメーターとして、脳血管撮影上の脳血管攣縮の程度を各々比較検討した。即ち、Diameter ratioが低値である程、脳血管攣縮が強く、Diameter ratioが高値である程、脳血管攣縮が弱いとした。

なお、血管径の計測には、10倍スケール・ルーペ (ピーク・スケール・ルーペ 10×[®], PEAK, 東京都文京区湯島3-24-2)を用い、測定器の確度は0.1mmであった。

4.5 摘出脳標本の肉眼的観察

a) t-PA (AK-124) 投与群, b) t-PA MC 投与群 及び e) SAH 群の 3 群について、Day 7 Angiography 終了後、胸部大動脈をクランプし、右心耳より脱血しながら経心的にヘパリン 1 万単位加生理食塩水 1.0 l を 130cmH₂O の圧で灌流した。引き続き、10% 等張ホルマリン液 3.5 l を同圧で灌流固定した。延髄・頸髄移行部より吻側の中樞神経組織を取り出し、まず肉眼的にクモ膜下凝血塊の有無・拡がりについて観察した。

4.6 組織学的検討

前述の肉眼的観察の後、摘出脳標本を 10% 等張ホルマリン液で 4 日間浸潤固定した。固定後、標本の浸透圧を上げる為、25% sucrose 溶液内に数日間浸し、手術用顕微鏡下に脳底動脈を損傷しないように慎重に採取した。脳底動脈の一部を 5mm 程採取し、O.C.T. Compound (Tissue-Tek[®], 三共株式会社, 東京都中央区日本橋本町 3-5-1) を満たした容器 (クリオモルド、Tissue-Tek[®], 三共株式会社, 東京都中央区日本橋本町 3-5-1) に入れ、凍結切片作製装置 (サクラ・コールドトーム CM-502[®], サクラ精機株式会社, 東京都中央区日本橋本町 3-1-9) で -25°C に冷却後、3 μ m の切片に切断した。これを Hematoxylin-Eosin, Elastica-Van Gieson, Azan 染色し、光学顕微鏡にて脳底動脈を組織学的に検索した。

III. 結果

1. In Vitro における t-PA (AK-124) の血腫溶解実験

- 種々投与法における比較検討 -

1.1 イヌ動脈血血腫溶解実験

各群の平均溶解率、標準偏差は次の通りであった。a 群は 80.6 ± 12.4 (Mean \pm S.D.) %, b 群は 75.5 ± 11.9 %, c 群は 71.9 ± 6.5 %, d 群は 24.1 ± 2.1 %, e 群は 19.3 ± 2.1 % であり、a, b, c 群は各々全て d 及び e 群に対して有意差 (t-test, $p < 0.01$) をもって血腫溶解効果があった。しかし、a 群と b 群、a 群と c 群、及び b 群と c 群との対比では統計学的な有意差 (t-test) はなかったが、a 群に最も強い血腫溶解効果のある傾向が認められた。即ち、t-PA (AK-124) 持続・分割・一回大量投与の投与法の相違によるイヌ動脈血血腫溶解効果には、統計学的な差は認められなかったが、持続投与法に最も効果のある傾向が見られた (Table 1, Fig. 4)。

1.2 ヒト静脈血血腫溶解実験

各群の平均溶解率、標準偏差は次の通りであった。a群は 81.0 ± 3.1 (Mean \pm SD)%, b群は 77.9 ± 1.3 %, c群は 74.8 ± 6.3 %, d群は 24.0 ± 1.2 %, e群は 21.2 ± 1.1 %であり、a, b, c群は各々全てd及びe群に対して有意差(t-test, $p < 0.01$)をもって血腫溶解効果があった。しかし、a群とb群、a群とc群、及びb群とc群との対比では統計学的な有意差(t-test)はなかったが、a群に最も強い血腫溶解効果のある傾向が認められた。即ち、t-PA (AK-124) 持続・分割・一回大量投与の投与法の相違によるヒト静脈血血腫溶解効果には、統計学的な差は認められなかったが、持続投与法に最も効果のある傾向が見られた。これは、イヌ動脈血血腫溶解実験の結果と全く同様であり、更に本実験は同一個体よりの標本採取であるため標準偏差が少なく、ばらつきも更に少ない結果となった (Table 2, Fig. 5)。

2. t-PA (AK-124) 徐放製剤の試作

2.2.2 予備試作製剤

2.2.2.1 重量測定及び収率

a), b) 及び c) 群の各々の製法で作製した t-PA MC の重量は、0.980g, 1.275g 及び 0.350g であり、収率は、それぞれ 22 %, 52 % 及び 24 % であった。用いた t-PA 及び PLGA を無駄なく t-PA MC 作製に利用するという経済的観点から見ると、a) 及び c) 群は効率の悪い方法と思われた。

2.2.2.2 *in vitro* 溶出能試験

a) 群 24, 48 及び 72 時間後の t-PA 抗原濃度は、150、415 及び 440 ng/ml であり、pH は、6.4、4.1 及び 3.8 となった。

b) 群 24, 48 及び 72 時間後の t-PA 抗原濃度は、26.5、50.4 及び 336 ng/ml であり、pH は、6.4、6.4 及び 4.1 となった。

c) 群 24, 48 及び 72 時間後の t-PA 抗原濃度は、45.4、46.8 及び 130 ng/ml であり、pH は、6.6、6.4 及び 4.6 となった。

d) 群 24, 48 及び 72 時間後の pH は、6.6、6.5 及び 6.5 となった。

a), b) 及び c) 群は全て pH の経時的低下 (Fig. 6) と共に t-PA 抗原濃度の経時的上昇 (Fig. 7) が認められた。また、pH 低下の程度が著しい程、t-PA 抗原濃度の上昇程度も著しい結果となった。しかし、t-PA 溶液の pH は 72 時間まで経時的にほぼ不変であり、

溶液中 t-PA の経時的過程での pH への影響は殆どないものと思われた。即ち、a)、b) 及び c) 群の pH 低下の主要因は、t-PA を封入している、t-PAMC 中の PLGA または、試作過程において t-PAMC として利用されずに最終的に残存した PLGA の加水分解による、乳酸およびグリコール酸の産生によるものと考えられた。また、pH の経時的低下と共に t-PA 抗原濃度の経時的上昇が認められたことから、ある程度の t-PAMC は作製されていたと考えられた。

2.2.2.3 72時間後の放出率

a) 群は 0.33 %, b) 群は 0.33 %, c) 群は 0.11 % であり、いずれも低値を示した。また、LGA5005[®] (和光純薬工業株式会社, 大阪市中央区道修町 3-1-2) の分解速度は速いと考えられる為、t-PAMC の 72時間までの t-PA 放出量が t-PAMC に含有される t-PA の総量にほぼ等しいと仮定すると、この放出率の値が内包率にほぼ等しいということになる。

2.2.2.4 走査電子顕微鏡による観察

直径約 50 μ m 程度のほぼ球状の粒子で、その表面はほぼ平滑であった (Fig.8)。小川ら¹⁸⁾は薬物がマイクロカプセル内に封入されるとその表面が有孔性をもつことを報告しているが、この予備試作製剤の平滑な表面からは、マイクロカプセル内に t-PA があまり含有されていない可能性が示唆され、上述 2.2.2.3 の低内包率の可能性と一致しているとも考えられる所見であった。

2.2.3 本試作製剤

実験 2.2.3 において述べたように、予備試作製過程での肉眼的観察から W1/O emulsion 及び W1/O/W2 emulsion とするとき強い攪拌力が必要なことが予想され、本試作過程でこれを満足する製法に変えたが、肉眼上、各過程での乳化は著明に改善された。

2.2.3.1 重量測定及び収率

本製法にて作製した t-PAMC の重量は、40.05g であり、収率は、55.4 % であった。本製法による収率は、予備試作製剤のそれと比較し最も高値となった。

2.2.3.2 内包率測定

t-PAMC、t-PA (AK-124) の各々 3回施行した t-PA 活性濃度測定の平均値は、それぞ

れ 5666 及び 9880 IU/ml であった。よって、t-PA MC の活性内包率は、57.4% となる。もちろん評価系及び実験系が異なっている為、結果 2.2.2.3 の予備試作 t-PA MC の内包率とは単純に比較できないが、得られた結果の著しい差異及び製法過程での肉眼的観察による著明な改善から、本試作 t-PA MC の内包率が最も高値である可能性は高いと思われた。

2.2.3.3 肉眼的観察

作製された t-PA MC 試作製剤は、白色調の殆ど粘性のない粉末であった (Fig.9)。

2.2.3.4 脳槽内投与毒性試験

t-PA MC 注入から 7 日目まで毎日、歩行状態による失調・麻痺の有無について観察したが、特に異常を認めなかった。また、本実験に用いた 2 頭の前頭葉・側頭葉・頭頂葉・後頭葉・小脳及び脳幹のいずれの部位においてもクモ膜、軟膜、血管及び脳実質に病理組織学的異常を認めなかった (Fig.10)。

3. t-PA 製剤の脳槽内薬物動態

3.1 t-PA (AK-124) 脳槽内薬物動態

以下の実験結果の解釈で留意すべきは t-PA を大槽内投与し、同部位から検体を採取していることである。即ち、注入した薬剤が注入部位に留まったまま検体として採取される危険性を含んでいる。

1). t-PA (AK-124) 20mg 大槽内投与

注入開始から 5, 15, 30, 60 及び 120 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度はそれぞれ、45400、13800、12300、6050 及び 2030 ng/ml であった (Fig.11)。また、開始直前、開始後 60 及び 120 分の血漿中濃度はいずれも検出値 (1.5 ng/ml) 以下であった。製剤としての AK-124 は t-PA タンパクの安定化等の目的から、t-PA の他にヒトアルブミン及び塩化ナトリウムが多量に含有され、今回用いた AK-124 360 万 IU 製剤では、1V (約 440mg) 当たり 10.84mg の t-PA が存在している。即ち、AK-124 20mg には t-PA が 492727ng 含有されている。本実験においては 120 分までに検体として採取された t-PA の総量は、5, 15, 30, 60 及び 120 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度に採取量 1.8ml を乗じた値の総和 143244ng であり、注入した t-PA 量が 492727ng であるので、概ね 29 % の注入薬剤を採取したことになり、その中の 57 % は 5 分後に採取された。

2). t-PA (AK-124) 100mg 大槽内投与

注入開始から 10, 15, 30, 60 及び 120 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度はそれぞれ、270000、161000、134000、66300 及び 9230 ng/ml であった (Fig.11)。本実験において 120 分までに検体として採取された髄液中 t-PA の総量は、1152954ng であり、注入した t-PA 量が 2463635ng であるので、概ね 47 % の注入薬剤を採取したことになる。またその中の 42 % は 5 分後に採取された。

3). t-PA (AK-124) 60mg 大槽内投与

注入開始から 120, 240, 360 及び 480 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度はそれぞれ、26091、7303、2561 及び 1711 ng/ml であった (Fig.11)。本実験において 480 分までに検体として採取された髄液中 t-PA の総量は、30133ng であり、注入した t-PA 量が 1478181ng であるので、概ね 2 % の注入薬剤を採取したことになる。次に、注入開始から 240, 360, 480 及び 600 分後の血漿中 t-PA 抗原濃度はそれぞれ、2.585、1.682、1.137 及び 0.639 ng/ml で、全て基準値 (MBC 社にてのヒト血漿中 t-PA 抗原濃度の正常値 : 7.8 ng/ml 以下) 以下であった。

4). t-PA (AK-124) 16mg 大槽内投与

a) 5 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、31818 ng/ml であった。

b) 10, 120, 240 及び 360 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度はそれぞれ、38812、8576、258.0 及び 166.4 ng/ml であり、10 分後の血漿中 t-PA 抗原濃度は 1.0 ng/ml で、基準値以下であった。

c) 15 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、65931 ng/ml であった。

d) 30, 60 及び 120 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、43506、12952 及び 524.0 ng/ml であり、30 分後の血漿中 t-PA 抗原濃度は 0.8 ng/ml で、基準値以下であった。

e) 60, 120, 240, 360 及び 480 分後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、25024、12004、2474、619 及び 617 ng/ml であり、同採取時間の血漿中 t-PA 抗原濃度は、360 分後までは各々 0.5 ng/ml 未満であり、480 分後は 0.7 ng/ml で、全て基準値以下であった。

a)~e) の結果について、投与後 5, 10, 15, 30 及び 60 分の t-PA 抗原濃度の値から、雑種成犬の脳槽内 t-PA 薬物動態の個体差が同われた。また、その個体差及び対象が少ない為、t-PA (AK-124) 脳槽内投与時の薬物動態については明確な知見を得ることができなかったが、同一犬を用いた経時的採取による 1)~3) の実験結果のような t-PA 抗原

濃度の急激な減衰を示さないことが十分に示唆された。即ち、1)~3)の実験では、投与した t-PA の多くが検体採取の際に取り除かれた可能性もあり、その結果はなお検討すべきと考えられた。

3.2 t-PAMC 脳槽内薬物動態

a) 1 及び 3 時間後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、456.5 及び 727.0 ng/ml であった。

b) 6, 15, 24, 48 及び 60 時間後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、107, 235, 247, 267 及び 347 ng/ml と漸増し、3, 6, 15, 24, 48 及び 60 時間後の血漿中 t-PA 抗原濃度は、0.5, 0.6, 0.5, 0.6, 0.7 及び 0.8 ng/ml で、全て基準値以下であった。

c) 96, 120 及び 168 時間後の髄液中 t-PA 抗原濃度は、4.9, 2.6 及び 0.8 ng/ml と漸減し、全て低値であった。

以上より、t-PAMC の放出挙動の詳細については不明だが、少なくとも t-PAMC 試作製剤が t-PA を徐放していることが明らかとなった。

4. クモ膜下出血後脳血管攣縮抑制効果

4.1 血管径の測定

実験過程及び脳血管撮影の評価可能な a)~d)群各 5 頭ずつ及び e) 群 6 頭の計 26 頭について検討を行った (Table 3)。各群の代表的 Day 0 及び Day 7 Angiography (Fig.12~16) に示される如く、各群の Diameter ratio の平均、標準偏差は a) t-PA 投与群は 87.7 ± 5.6 (Mean \pm SD) %, b) t-PAMC 投与群は 77.8 ± 3.5 %, c) PLGAMC 投与群は 58.0 ± 7.4 %, d) 乳酸加リンゲル投与 (control) 群は 61.4 ± 4.3 %, e) SAH 群は 62.8 ± 6.2 % であった (Table 4, Fig.17)。各群間の比較では、a) t-PA 投与群は b) PLGAMC 投与群, d) control 群及び e) SAH 群に対して統計学的有意差 (t-test, $p < 0.01$) をもって Diameter ratio 値が高かった。また、b) t-PAMC 投与群も同様に c) PLGAMC 投与群, d) control 群及び e) SAH 群に対してそれぞれ統計学的有意差 (t-test, $p < 0.01$) をもって Diameter ratio 値が高かった。しかし、a) t-PA 投与群と b) t-PAMC 投与群との対比では、t-PA 投与群は t-PAMC 投与群に比して有意差をもって Diameter ratio 値が高かった。即ち、この "Two-hemorrhage Canine Model" における血管撮影上の脳血管攣縮は、t-PA 投与により最も抑制されたが、本研究において試作製した t-PAMC の投与によっても抑制できた。

4.2 摘出脳標本の肉眼的観察

各群の摘出脳標本についてクモ膜下凝血塊の残存程度を肉眼的に観察した。a) t-PA 投与群及び b) t-PA MC 投与群については、a) 群と比較すると b) 群に少量の残存凝血塊を認める傾向にはあったが、殆どの凝血塊は消失していた。c) PLGA MC 投与群、d) control 群及び e) SAH 群では、脳底槽から両側シルビウス槽に至る多量のクモ膜下凝血塊をほぼ同程度に認め、脳底動脈をはじめ脳主幹動脈はこれに包まれていた (Fig.18)。

4.3 組織学的検討

a) t-PA (AK-124) 投与群、b) t-PA MC 投与群及び e) SAH 群の 3 群について脳底動脈壁を組織学的に検索した (Fig.19, 20)。e) 群では、内皮の肥厚・内弾性板の屈曲蛇行・中膜筋層の肥厚などが認められ、従来より脳血管攣縮時に認められるとされている所見^{22~24)}に一致していた。しかし、a) 及び b) 群についてはこの様な変化は Hematoxylin-Eosin, Elastica-Van Gieson 及び Azan 染色のいずれにおいても認められなかった。

即ち、光学顕微鏡レベルでの病理組織学的検索では、" Two-hemorrhage Canine Model "において、本研究にて試作した t-PA MC の大槽内投与は、t-PA 投与と同様に脳血管攣縮の出現を予防する可能性のあることが示唆された。

IV. 考察

脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血を起こした患者の予後を大きく左右する因子には、クモ膜下出血による一次性脳損傷の他に、脳動脈瘤の再破裂及び症候性脳血管攣縮 (Symptomatic cerebral vasospasm: 以下 SVS) がある。再破裂の予防に対しては、急性期手術による破裂脳動脈瘤の処置が手術用顕微鏡の導入後、比較的安全に行われるようになった。しかし、1951 年 Ecker & Riemenschneider²⁵⁾が最初に脳血管の攣縮像を報告して以来、その原因について様々な検討がなされてきたが、未だ不明と言わざるを得ない。

クモ膜下出血患者の発症時 CT (computed tomography scan: 以下 CT) にて、クモ膜下凝血塊の量とその後の SVS の出現頻度との間には正の相関がある^{13,26)}とされ、また、そのクモ膜下血液の自然に排出される速度が速やかなほど SVS は起こりにくいとされている¹⁵⁾。こうした経験から、SVS の原因が何であれ、クモ膜下腔に存在する凝血塊にそれが由来することは大方の意見の一致するところとなり、様々な方法でクモ膜下凝血塊の除去が試みられてきたが、評価に耐え得る普遍的な凝血塊除去効果及び SVS 予防効果は得られなかった。その中で、急性期手術の際、破裂脳動脈瘤の処置後、可及的にクモ膜下凝血塊を除去することよりの SVS 発症頻度を減じられることが指摘された^{27,28)}が、手術によるクモ膜下凝血塊除去には限界があり、またその操作の際の脳損傷の可能性も危惧される。しかし、最近になり、急性期に破裂脳動脈瘤処置後、血栓溶解剤のうち、尿由来プラスミノゲンアクトベータであるウロキナーゼをドレ

ナージチューブを介して脳槽内投与することにより、クモ膜下凝血塊を溶解・排出し、SVS 予防に対し良好な成績を上げている報告^{29~31)}が散見されるようになった。施設によりウロキナーゼの投与量・投与方法はまちまちであるが、Kodama ら^{2,3)}は、一側あるいは両側のシルビウス槽内のドレナージチューブからウロキナーゼ溶液を持続注入しながら視交叉槽のドレナージチューブから排出するという脳槽灌流を用いて良好な成績を報告している。また、ごく最近になり、ウロキナーゼと比較してフィブリンに対し強い親和性を持ち、血栓上のフィブリン塊に結合することによってプラスミノゲンアクチベータ活性を発現する、血栓溶解に対し選択性の高いtPAを実験動物を用いてのクモ膜下出血モデルに投与することで、クモ膜下凝血塊を顕著に溶解し、かつ脳血管攣縮がほとんど起こらなかったとする報告がFindlay ら^{32~34)}やSeifert ら³⁵⁾によりなされた。それ以来、諸施設でtPAの臨床応用が試みられるようになった。それらの報告の多くは、tPAはウロキナーゼに比し、血栓溶解作用が強力な為、クモ膜下凝血塊溶解に必要な血栓溶解剤投与期間が短縮されたとしている。SVSは、クモ膜下出血後7日目あたりにピークを持ち、4日から14日目の間に好発する現象^{36,37)}であり、その予防には出血後、数日以内の凝血塊除去が望ましいという報告^{38,39)}も見られ、この点でクモ膜下凝血塊溶解効果の著しいtPAがウロキナーゼよりも優れていると言える。また、血栓溶解剤の投与経路である脳槽ドレナージチューブの留置期間が短縮されるということは、髄膜炎合併頻度の減少及び管理労力の削減につながるものと考えられる。しかし、血栓に対し選択性の高いはずのtPAの臨床使用では、ウロキナーゼ使用時と同様に頭蓋内出血などの出血性副作用が認められている^{4,5,9)}。これまでの報告では、tPAの投与量及び投与方法は諸施設により異なり、これと出血性副作用との間の相関を単純に比較できないが、少なくとも総投与量と副作用発現頻度との間には相関がないようである¹⁵⁾。しかし、ドレナージチューブを介しての1日複数回投与という投与方法を用いている報告からは、1回の投与量が多くなると副作用発現頻度が増加する傾向にあり、こうした経験から、tPA脳槽内投与における出血性副作用は、脳槽内の血栓に付着していない所謂free tPAによる可能性が考えられ、理論的にはこのfree tPA量を少なくすることで合併症の発現頻度を減じることができると推察される。free tPA量を少なくするには、脳槽ドレナージチューブからのtPA少量・頻回投与あるいはFindlay らが行っている術中、破裂脳動脈瘤処置後にtPAを1回大量投与し、しばらく経過した後に脳槽内を洗浄する方法が考えられる。しかし、少量・頻回投与には、髄膜炎併発の危惧及び臨床的な管理の煩雑さ・労力の増大が欠点として挙げられる。また、術中1回大量投与法ではmassiveなクモ膜下凝血塊が果たして十分に溶解されるか疑問である。この様な理由からtPAが脳槽内で少量持続的に放出され、free tPAが生じないようなtPA徐放製剤の開発が緊要な課題と考えられ、その開発を進めてきた。これまでクモ膜下出血後脳血管攣縮の予防の目的で、tPA徐放物質と思われるものを投与したという報告は、Findlay ら³³⁾及び宮本ら⁴⁰⁾のみであるが、前者はtPAの懸濁液とgel状のtPAを投与したというだけで徐放性を保持しているか否かは不明であり、後者はtPAを乳酸重合体に包埋した徐放性薬剤とし（製法については記

載されていない)、*in vitro*、及び *in vivo* での血腫溶解効果について述べているが、脳血管攣縮抑制効果については触れていない。しかし、この報告にて初めてクモ膜下出血症例に対する t-PA 徐放性薬物の投与が、クモ膜下凝血塊溶解に効果的である可能性が示され、本研究の妥当性を示唆している。

t-PA 各種投与法による血腫溶解効果の相違に関して *in vitro* での検討だが、投与量を一定とした場合、1回大量投与よりも分割頻回投与が効果的との報告^{41,42)}がある。しかし、脳槽内という髄液が循環する特殊な環境、即ち、血栓と結合していない free t-PA が流され脳槽内から消失してしまう可能性のある環境の中で、また、クモ膜下凝血塊の周囲を髄液が循環するような環境のもとでの検討は未だなされておらず、t-PA 徐放製剤開発の妥当性を得るための根拠として、この検討が必要となり、*in vitro* で脳槽内クモ膜下血腫モデルを考案して実験 1 を行った。イヌ動脈血血腫及びヒト静脈血血腫において同様の結果が示されたが、t-PA 投与量を一定とした場合、t-PA 徐放をイメージした持続投与群、3回分割投与群及び1回大量投与群の投与法の違いによる血腫溶解効果には、検討対象数が少なく統計学的有意差がなかったが、持続投与群に最も強い効果のある傾向が示された。これより、血腫溶解効果という点での t-PA 徐放製剤の有効性が伺われた。

本研究にて t-PA 徐放製剤の基剤としてポリ乳酸・グリコール酸の共重合体を選択したが、これはすでに手術用縫合糸として長年の臨床使用実績があり、生体親和性に優れ⁴³⁾、生体内で加水分解されて、生体内物質である乳酸及びグリコール酸となる安全性が極めて高いと考えられている物質である (Fig.21)。また、この分解速度は、共重合体の分子量及びポリ乳酸、グリコール酸の重合比により異なり、高分子量のもの程、分解速度が遅く、また、ポリ乳酸の重合比率が高いもの程、分解速度が遅くなる⁴⁴⁾。こうしたことから、薬物徐放の基剤としてポリ乳酸・グリコール酸の共重合体を選択した場合、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体の分子量あるいは重合比を変えることで、薬物の放出期間を変えることができ、理論上、目的とする疾患に対し適切と思われる薬物の徐放期間を得ることができると考えられている。クモ膜下出血後脳血管攣縮を予防するための凝血塊除去はクモ膜下出血発症後数日以内に行う必要があるとの報告及び SVS の発症が出血後 7日をピークとして起こることから、本研究にては t-PA の放出期間が数日あるいは長くとも 7日間という短期の徐放を計画した。そこで、市販の PLGA の中で低分子量かつグリコール酸の重合比が高い、LGA 5005[®] (分子量約 5000, グリコール酸重合比 50%, 和光純薬工業株式会社, 大阪府中央区道修町 3-1-2) を選択した。これまで、水溶性薬物については一般に、内包率が低いという問題点があったが、小川らにより W1/O/W2 emulsion を経た水中乾燥法によって、高い内包率を持った、LH-RH 誘導体であるリュウプロライドのマイクロカプセル化に成功した。この方法では、W1 にゼラチンを添加することで内水相 (W1) の粘度上昇により外水相 (W2) への薬物拡散を抑制し、高い内包率を示したが、本研究においては、ゼラチンを添加することなく、その他の方法は小川らの方法に準じて試作した。予備試作において t-PA (AK-124) を含有する MC の作製が可能であることが示された為、内包率を

高める目的で種々製法を改良し、内包率約 60% の試作製剤の作製に成功した。t-PA (AK-124) は高価な製剤であり、内包率は 100% に近い程理想的であるのは言うまでもないが、本研究の主目的は、t-PA を徐放する製剤投与にてクモ膜下出血後脳血管攣縮が抑制できるか否かをまず確認ことである為、この試作製剤を用いてその後の研究実施にあたった。今後、内包率を高める為に、t-PA 量、その溶媒量、PLGA 量、塩化メチレン量など、種々作製条件を変えた検討が必要と思われる。また、今回用いた t-PA (AK-124) は、安定化剤としてアルブミンや塩化ナトリウムなどが多く含まれ、1V (約 440mg) 中に t-PA 原末が 10.84mg しか含有されていない。一般に、W1 の溶媒量が増え、内包率が低下し、内包率を高める為に溶媒量を少なくするとその溶質である薬物量は必然的に少量とならざるを得ない。然るに、不純物を取り除いた t-PA 原末のみを用いれば、より多くの t-PA をマイクロカプセル内に内包できると考えられ、この検討も必要かと思われる。

t-PA 大槽内投与における髄腔内薬物動態の検討では、同一犬にての経時的採取の場合、投与した t-PA 量の多くを経時的に採取してしまう可能性が大きいという結果となり、適切な評価は得られなかった。一方、上記の欠点を補うべく施行した、体重を近似させた対象での、投与後短時間は一対象につき一検体という検討にても、イヌの個体差が著しいと思われる結果となり、詳細な薬物動態の評価対象となり得ず、今後対象を増やした検討が必要と思われた。しかし、この検討にて、t-PA (AK-124) の脳槽内からの消失はさほど速くないことが示唆され、クモ膜下凝血塊溶解目的で多量の t-PA を脳槽内投与した場合、血栓に付着していない free t-PA がしばらく残存し、出血性副作用を引き起こすことが予想される。

t-PA MC 大槽内投与における脳槽内薬物動態の検討では、各採取時間の t-PA 抗原濃度は 60 時間まではほぼ漸次増加し、かつ、脳槽内からの t-PA 排泄を考慮に入れると、t-PA MC は 60 時間までは漸次増加して t-PA を放出することが伺われた。t-PA MC 投与後数時間の t-PA 抗原濃度が、他のものに比して高値なのは、所謂初期バースト¹⁸⁾といわれる PLGA マトリックスからの t-PA の物理的拡散によるものなのか、イヌの個体差によるものなのかは対象が少なく判断できなかった。今後、対象を増やし、放出期間、放出速度や *in vitro* での放出性の検討も行う必要があると思われる。しかし少なくとも、t-PA MC の投与は、t-PA を単独投与するよりも低濃度で長期間、脳槽内 t-PA 濃度が維持される可能性が示された。

本試作 t-PA MC 製剤は内包率など今後改善しなければならない点及び放出期間、放出速度など明確にされていない点が存在しているが、クモ膜下出血後脳血管攣縮の予防に対し、低濃度、長期間の t-PA 投与が *in vivo* において効果的であるか否かの検討目的の為、この試作製剤を Two-hemorrhage Canine Model に投与することで比較検討した。実験的クモ膜下出血に認められる脳血管撮影上の攣縮の程度及び脳血管の組織学的所見は、実験動物の種差・クモ膜下出血の程度により、種々異なっているとされている。その中で、Two-hemorrhage Canine Model は 7 日目を極期とし脳底動脈を 60~70% に狭窄させ、ヒトにおけると同様の組織学的変化を起こすとされており、本研究

においては脳血管攣縮の程度をもって薬物効果の有無を論じるため、この実験動物モデルを用いた。その結果、このモデルに対する t-PA 投与は、これまでの報告^{35,46,46)}と同様に、脳血管攣縮を抑制したが、本試作製剤によっても、脳血管撮影上有意差をもって、また組織学的にも脳血管攣縮を抑制した。これにより、破裂脳動脈瘤によるクモ膜下出血において、動脈瘤処置後、術中 t-PA 徐放製剤を脳槽内に投与することで、その後の脳血管攣縮出現を予防する可能性が十分にあることが推察された。しかし、実験動物を用いた脳血管撮影上の検討では、統計学的有意差をもって、t-PA 投与群の方が t-PA MC 投与群に比して、脳血管攣縮がより少ない結果となり、今後 t-PA MC 投与量の増量あるいは MC 内の t-PA 内包量を高めるなどの改良・工夫が必要であると思われる。

さらに、ステロイドの髄腔内投与がクモ膜下出血後脳血管攣縮の予防に有効であるとの報告^{47~51)}があり、臨床例においても確認されている。髄腔内投与という点では t-PA と同様であり、ステロイド徐放製剤の開発及び t-PA MC との同時投与により、さらなる脳血管攣縮予防効果の向上が期待され、今後検討していきたいと考えている。

V. 結語

1. t-PA (AK-124) 持続、分割及び一回大量投与にて検討した投与法の相違による *in vitro* でのクモ膜下血腫モデルを用いた血腫溶解効果では、イヌ動脈血及びヒト静脈血血腫ともに、統計学的有意差はなかったが、持続投与群に最も血腫溶解効果がある傾向が示された。

2. ポリ乳酸・グリコール酸共重合体を基剤とする W1/O/W2 emulsion を用いた水中乾燥法により、t-PA (AK-124) を徐放する t-PA マイクロカプセル製剤を試作した。

3. t-PA マイクロカプセル試作製剤のイヌ大槽内投与における光学顕微鏡での組織学的検索において、特に毒性は認められなかった。

4. t-PA マイクロカプセル試作製剤を Two-hemorrhage Canine Model に投与することで、クモ膜下凝血塊は著しく溶解された。

5. t-PA マイクロカプセル試作製剤を Two-hemorrhage Canine Model に投与することにより、脳底動脈の血管攣縮を抑制することを脳血管撮影及び光学顕微鏡での組織学的検索にて確認した。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました脳神経外科学鈴木重晴教授並びに

岩淵隆名誉教授に対し、深謝の意を表します。また、本研究の実施にあたり御指導、御協力を頂きました蛸名国彦助教授をはじめ教室員の皆様、及び t-PA (AK-124) を御提供下さいました旭化成工業株式会社長谷川明郎氏、t-PA 抗原濃度測定に御協力下さいました三菱化成株式会社秋元周氏、及び t-PA MC 試作製剤の作製に御協力下さいました株式会社ツムラ石川和幸氏をはじめとする皆様に厚く御礼申し上げます。

VII. 文献

- 1) Saito, I., Shigeno, T., Aritake, K. et al.: Vasospasm Assessed by Angiography and Computerized Tomography. *J. Neurosurg.*, 51:466-475, 1979.
- 2) 佐々木達也, 山野辺邦美, 児玉南海雄 他: 脳血管攣縮の予防 - UK (ウロキナーゼ) および AsA (アスコルビン酸) による脳槽灌流療法 -. スパズムシンポ講演集, 脳血管攣縮, 4:200-210, 1989.
- 3) Kodama, N., Sasaki, T., Kawakami, M.: Prevention of vasospasm: Cisternal irrigation therapy with urokinase and ascorbic acid. Sano, K., Takakura, K., Kassell, N.F., Sasaki, T. (eds), *Cerebral Vasospasm*, Tokyo, University of Tokyo Press, p 292-296, 1990.
- 4) Findlay, J.M., Weir, B.K.A., Kassell, N.F. et al.: Intracisternal recombinant tissue plasminogen activator after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 75:181-188, 1991.
- 5) Zabramski, J.M., Spetzler, R.F., Lee, K.S. et al.: Phase I trial of tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 75:189-196, 1991.
- 6) Stolke, D., Seifert, V.: Single intracisternal bolus of recombinant tissue plasminogen activator in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Preliminary assessment of efficacy and safety in an open clinical study. *Neurosurgery*, 30:877-881, 1992.
- 7) Mizoi, K., Yoshimoto, T., Fujiwara, S. et al.: Prevention of vasospasm by clot removal and intrathecal bolus injection of tissue-type plasminogen activator: preliminary report. *Neurosurgery*, 28: 807-813, 1991.
- 8) Mizoi, K., Yoshimoto, T., Takahashi, A. et al.: Prospective study on the prevention of cerebral vasospasm by intrathecal fibrinolytic therapy with tissue-type plasminogen activator. *J. Neurosurg.*, 78:430-437, 1993.

- 9) 佐々木富男, 太田富雄, 菊池晴彦 他: クモ膜下出血後の脳血管攣縮に対する遺伝子組換えヒト t-PA (TD-2061) の初期臨床試験. 脳神経, 44:1001-1008, 1992.
- 10) 森本雅徳, 田邊貴丸, 有光誠人 他: クモ膜下出血後の遅発性脳血管攣縮に対する t-PA 髄腔内投与の検討. 脳卒中の外科, 19:318-322, 1991.
- 11) 佐々木富男, 高倉公朋, 太田富雄 他: クモ膜下出血後の脳血管攣縮に対する遺伝子組換えヒト t-PA の初期第Ⅱ相臨床試験. スパズムシンボ講演集, 脳血管攣縮, 8:308-312, 1993.
- 12) Varsos, V.G., Liszczak, T.M., Han, D.H. et al: Delayed Cerebral Vasospasm is not Reversible by Aminophylline, Nifedipine, or Papaverine in a "Two-hemorrhage" Canine Model. J. Neurosurg., 58:11-17, 1983.
- 13) Fisher, C.M., Kistler, J.P., and Davis, J.M.: Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computed tomographic scanning. Neurosurgery, 6:1-9, 1980.
- 14) 鈴木一郎, 富田泰彦, 本多良彦 他: 術後残存クモ膜下血腫量の検討 - Head shaking 法による脳槽灌流排液中の血球成分量の解析 -. スパズムシンボ講演集, 脳血管攣縮, 8:135-138, 1993.
- 15) 山田恭造, 太田富雄: Tissue plasminogen activator による脳血管攣縮の予防 - 投与方法と投与量についての検討 -. 脳神経, 45:809-817, 1993.
- 16) 筏 義人: DDS の分子設計. Drug Delivery System, 6:151-158, 1991.
- 17) 宮尾興平: 薬物の制御放出 (CR) 方式の分類と放出特性. 日本臨床, 47: 1229-1239, 1989.
- 18) 戸口 始, 小川泰亮, 岡田弘晃 他: 酢酸リユープロレリン徐放性注射剤. 薬誌, 111:397-409, 1991.
- 19) 成田 勉, 鈴木隆志, 近藤修平 他: 組織プラスミノゲンアクチベーター (AK-124) のラットにおける生体内動態 (1) - 単回投与による血中濃度推移、分布、代謝および排泄 -. 薬理と治療, 16:15-30, 1988.