

水溶性高分子の鼻粘膜吸収に対するポリ-L-アルギニン  
の促進機構に関する研究



甲第24号

大竹 一男

水溶性高分子の鼻粘膜吸収に対するポリ-L-アルギニン  
の促進機構に関する研究

大竹 一男

# 目次

## 総論の部

緒言	1
第 1 編 <i>In vivo</i> におけるポリ-L-アルギニンの経鼻吸収促進効果の解析	4
第 1 章 ポリ-L-アルギニンの分子量依存的な作用持続性の決定因子	5
第 1 節 分子量の異なるポリ-L-アルギニンの作用持続時間の検討	5
第 2 節 鼻粘膜表面構造の観察	13
第 3 節 ポリ-L-アルギニンの繰り返し投与の影響	15
第 4 節 鼻粘液中でのポリ-L-アルギニンの分解性の評価	20
第 5 節 本章の小括及び考察	22
第 2 編 <i>In vitro</i> におけるポリ-L-アルギニンの鼻粘膜透過促進効果の解析	28
第 1 章 ポリ-L-アルギニンによる透過促進経路の同定	29
第 1 節 FD-4 の透過経路の視覚化	29
第 2 節 電気生理学的解析	30
第 3 節 細胞間接着たん白質に対する影響	35
第 4 節 本章の小括及び考察	37
第 2 章 ポリ-L-アルギニンの促進効果のキャラクタリゼーション	39
第 1 節 ポリ-L-アルギニンの促進効果に対する部位特異性の検討	40
第 2 節 ポリ-L-アルギニンの促進効果に対する細胞内代謝の影響	44
第 3 節 本章の小括及び考察	45

第 3 章	ポリ-L-アルギニンの細胞内イベントに与える影響	49
第 1 節	ポリ-L-アルギニンの促進効果に及ぼすカルシウムの影響	50
第 1 項	細胞内カルシウムの動員系とポリ-L-アルギニンの促進効果との関連性	51
第 2 項	ポリ-L-アルギニンの促進効果に及ぼす細胞外カルシウムの影響	55
第 2 節	ポリ-L-アルギニンの促進効果に及ぼす種々キナーゼ・ホスファターゼの影響	56
第 3 節	本章の小括並びに考察	62
結論		66
謝辞		69
実験の部		70
第 1 編		70
第 1 章		70
第 2 編		75
第 1 章		75
第 2 章		80
第 3 章		82
引用文献		86

## 本論文で使用した略語一覧

- A to B, apical から basolateral への溶質輸送  
AJ, adherens junction、接着結合  
AUC, 血中濃度時間曲線下面積  
BRS, バイカーボネートリンゲル液  
B to A, basolateral から apical への溶質輸送  
Caco-2 cell, ヒト結腸癌細胞  
CLSM, 共焦点レーザー走査型顕微鏡  
DNP, 2,4-ジニトロフェノール  
F-アクチン, アクチンフィラメント  
FD, フルオレセインイソチシアネート標識デキストラン  
FI, 蛍光強度  
 $F_{\infty}$ , 生物学的利用率  
Gt, 膜コンダクタンス  
Isc, 短絡電流  
MAR, 最大吸収速度  
MBP, major basic protein  
MDCK cell, イヌ腎臓の上皮細胞  
MEK, マイトジェン活性化キナーゼ  
MLCK, ミオシン軽鎖キナーゼ  
 $P_a$ , apical 側の脂質膜を介する溶質の透過係数  
 $P_{app}$ , みかけの透過係数  
 $P_b$ , basolateral 側の脂質膜を介する溶質の透過係数  
PBS, リン酸緩衝液  
PD, 自発的膜電位  
PI3K, イノシトール-3-リン酸キナーゼ  
PKC, プロテインキナーゼC  
 $P_m$ , 全透過係数  
Poly-L-Arg (10), 分子量 8.9 kDa ポリ-L-アルギニン

Poly-L-Arg (50), 分子量 42.4 kDa ポリ-L-アルギニン

$P_{trans}$ , 細胞内経路を介する溶質の透過係数

$P_{para}$ , 細胞間隙経路を介する溶質の透過係数

SEM, 走査型電子顕微鏡

STDHF, sodium taurodihydrofusidate

TBS, トリス緩衝液

TEER, 経上皮電気抵抗

TJ, tight junction、密着結合

$T_{max}$ , 最大血中濃度到達時間

RFR, 相対的蛍光強度比

$R_a$ , apical 側の脂質膜を介する溶質の抵抗

$R_b$ , basolateral 側の脂質膜を介する溶質の抵抗

$R_m$ , 全抵抗

$R_{para}$ , 細胞間隙路の抵抗

$R_{trans}$ , 経細胞路の抵抗

## 総論の部

## 総論の部

### 緒言

一般に鼻腔から全身への薬物送達は、肝初回通過代謝がなく、鼻上皮からの透過性が高いため、低分子薬物に対しては、高い生物学的利用率が得られている。しかしながら、この鼻粘膜ルートを利用した時でさえも多くの生理活性ペプチド及びたん白質のような水溶性高分子薬物においては、投与量に見合った十分な薬理効果を得ることが出来ない現状にある [1-3]。この原因として、(1) 鼻・気管支粘膜などの呼吸上皮 (respiratory epithelium) は繊毛細胞 (ciliated columnar cell) と粘液を含む杯細胞 (mucus-containing goblet cell) の働きによって、外部から侵入した異物を積極的にろ過する機能 (mucociliary clearance) が備わっており、投与された薬物がこの働きによって除去されること [4,5]、(2) 鼻粘膜にも生理活性ペプチド及びたん白質を分解するたん白質分解酵素が存在するため、これら薬物が透過する過程で薬理活性が不活化されること [6-8]、(3) 他の粘膜に比べ高分子物質の透過速度は高いものの、薬物の分子量に依存した透過速度の指数関数的な減少が挙げられる [1,2,9]。(1) や (2) は、粘膜付着性のエマルジョンやマイクロスフィアなどの剤形工夫による鼻腔内滞留性の改善や、酵素阻害剤を添加し、主薬自身の安定性の向上について多く報告されている [10-13]。しかし (1) や (2) の改善方法は、薬物の鼻粘膜吸収速度を決定する薬物濃度に関係しており、膜透過過程における線速度 (permeability) を改善しているわけではない。一方、(3) の改善は、線速度の改善を意味し、高分子薬物の経鼻送達システムを開発していく上で、最優先事項と考えられる。その改善策の一つとして、化学的促進剤の利用が考えられる。これまで界面活性剤、胆汁酸塩、脂肪酸塩など多くの化学的促進剤候補物質がスクリーニングされてきた [14-16]。しかし



ながら、生理活性ペプチドやたん白質薬物が十分に薬理効果を発揮する程度まで化学的促進剤を添加すると、これら促進剤のほとんどは、上皮細胞に不可逆的な障害を与え、製剤開発の過程で断念され、我が国の臨床の場で用いられたことはほとんどない。

従って安全性に優れた促進剤候補物質のスクリーニングや開発が世界中、特に欧州で盛んに行われてきた。その中から、ポリカチオン性のキトサンが見出され、それを含有させたヒトインスリン (MW 5.8 kDa) やサケカルシトニン (MW 3.5 kDa) 製剤が設計され、現在、両者に関して第一相の臨床試験が実施されている [17-21]、

このような背景の中で、我々は、たん白質性医薬品の経鼻吸収性を著しく改善できる吸収促進剤として、ポリ-L-アルギニンを見出した [22]。ポリ-L-アルギニンは、生理的条件下で、分子内にプラスチャージを有しており、キトサンと類似した物理化学的特性を有している。ラット鼻腔内に、ポリ-L-アルギニンと共に分子量 3 kDa の  $\alpha$ -心房性ナトリウム利尿ペプチドやサケカルシトニンを投与すると、これらの薬理効果が、静脈内投与した場合と同程度まで達成可能であり [23]、分子量 18.8 kDa の顆粒球コロニー刺激因子では、生物学的利用率を 1% から 10% まで高めることが可能であった [24]。

一連の研究結果から、ポリ-L-アルギニンのラット *in vivo* での高分子吸収に対する促進効果は、ポリ-L-アルギニンの濃度及び分子量に依存的であり、ポリ-L-アルギニン一分子あたりの電荷密度に依存して、促進効果が増大することが示された [25]。更に、デコンボリューション法により、モデル水溶性高分子として、分子量 4.4 kDa から 167 kDa までの FITC で標識したデキストラン (FD-4 ~ -150) を用い、ポリ-L-アルギニンの促進効果を調べると、十分量の FDs が鼻腔内に残っているにも関わらず、ポリ-L-アルギニンによって増加した吸収速度が時間依存的に低下することが示された [24,25]。これらの結果は、

*in vivo* でのポリ-L-アルギニンの促進効果が、促進の強さと持続性によって決定されていることを示している。特に興味深いのは、ポリ-L-アルギニンの促進効果の持続性であり、その効果は、分子量依存的に時間の経過とともに減少することである。

加えて、ポリ-L-アルギニンは、鼻粘膜に対してほとんど障害作用が認められず、界面活性剤や胆汁酸塩のようなこれまでの化学的促進剤の吸収促進効果が、粘膜に対する不可逆的な損傷作用と密接に関連していたのとは異なり、これまで知られていない別の機構によって水溶性高分子の吸収を促進していることが推察された [22,24]。しかしながら、*in vitro* における特徴的な吸収促進効果を含み、これまでポリ-L-アルギニンの作用機構に関してはほとんど解析されていない。

そこで、本研究では、ポリ-L-アルギニンの吸収促進効果を解析した。第 1 編では、*in vivo* におけるポリ-L-アルギニンの分子量依存的な作用持続性を更に詳しく調べ、どのような因子によって決定されているかを明らかにした [26]。第 2 編では、*in vitro* におけるポリ-L-アルギニンによって促進される高分子薬物の主な輸送経路を決定し [27]、その結果に基づき、ポリ-L-アルギニンの促進効果を特徴づけ [27]、更にポリ-L-アルギニンによって生じるいくつかの細胞内イベントを明らかにした [28]。以下、検討結果を論じる。

## 第1編 *In vivo* におけるポリ-L-アルギニンの経鼻吸収促進効果の解析

Natsume ら及び Miyamoto らはラットを用いて、*in vivo* における水溶性高分子薬物 (FD-4) の経鼻吸収に対するポリ-L-アルギニンの濃度と分子量の影響を調べている [22,24,25]。様々な分子量のポリ-L-アルギニン (MW 8.9, 45.4, 92.0 kDa) を種々濃度で投与すると、FD-4 の生物学的利用率 ( $F_{\infty}$ ) は分子量と濃度に依存して増加した。また、より高分子量のポリ-L-アルギニンの方が低濃度で  $F_{\infty}$  が増加した。すなわち、高分子量のポリ-L-アルギニンの方が低いモル濃度で高い促進効果を現すことがわかった。これらの結果は、溶液中の総電荷密度よりも、ポリ-L-アルギニン一分子あたりの電荷密度に依存して促進効果が高くなることを示唆していた。同じポリカチオンである多糖類のキトサンも同じような吸収促進特性を有している [17-21]。キトサンの電荷密度は、分子内の脱アセチル化度により決定される。ほぼ同じアセチル化度を有するキトサンは、ポリ-L-アルギニンと同様に分子量依存的な促進効果を示した。一方、同じ分子量で脱アセチル化度の異なるキトサンは、脱アセチル化度の高いキトサンの方が促進効果が高かった。このように分子構造が異なってもプラス電荷という共通の特性が吸収促進効果を現すと考えられる。結果的にポリカチオンの促進効果のトリガーは、粘液及び粘膜表面のマイナス電荷を有するポリアニオン性たん白質とのイオンの相互作用であると信じられている [17-21]。粘液及び膜表面で起こる出来事が上述のような単一なことだけなのか、さらにより複雑なことで起こっているのかは詳細に検討する必要がある。

ポリ-L-アルギニンを同時投与した場合の FD-4 の吸収プロファイルをデコンボリューション法により算出すると、ポリ-L-アルギニンの濃度に依存して FD-4 の吸収量は増加するが、最大吸収速度 (MAR) はあまり変化しなかった [24,25]。一方、ポリ-L-アルギニンの分子量に依存して FD-4 の吸収量と

MAR の両方とも増加した [24,25]。これらの結果は、*in vivo* でのポリ-L-アルギニンの促進効果が、促進の強さと持続性によって決定されていることを示しており、ポリ-L-アルギニンの濃度は主に効果の持続性を、分子量は促進の強さと持続性の両方を決定していると考えられた。この分子量依存的な促進の強さは、上述した一分子あたりの電荷密度と関連しており、鼻粘膜上でのイオンの相互作用による出来事に関連して解析する必要がある。これに対して効果の持続性に関しては、一つの疑問が生じた。持続性は、逆にいうと吸収速度が時間の経過と共に徐々に低下することを意味している。この時間依存的な吸収速度の減少は、ポリ-L-アルギニンによって吸収が促進されたとしても大部分が吸収されずに鼻腔内に残存していることが予想される FD-10 ~ FD-150 においても認められた [24]。これまで用いられてきた *in vivo* 吸収実験法はポリ-L-アルギニンの効果だけを見積もるために他の要素（鼻腔内からの薬液の物理的除去や mucociliary clearance）を除いた閉鎖系とした。すなわち、なぜ閉鎖系であるにもかかわらず促進効果が時間依存的に減少したかという疑問である。

そこで本編では、ラットを用い動態学的に推察されたポリ-L-アルギニンの分子量依存的な作用持続性に関して、*in vivo* 経鼻吸収における水溶性高分子薬物の吸収性の評価から実験的に確認した。また、ポリ-L-アルギニンの時間依存的な促進効果の減少を導く主要因について調べた。

## 第 1 章 ポリ-L-アルギニンの分子量依存的な作用持続性に関する検討

### 第 1 節 分子量の異なるポリ-L-アルギニンの作用持続性に関する検討

本節では、これまでの動態学的手法によって推察されたポリ-L-アルギニン

## Pre-administration study

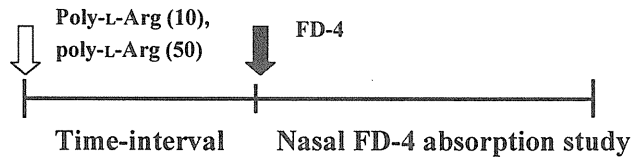


Fig.1 Experimental protocol in pre-administration study in rats.

の分子量依存的な促進効果の持続性を実験的に確認するために、これまでの FD-4 とポリ-L-アルギニンの同時投与実験とは異なる先行投与実験を行った。Fig. 1 にその実験プロトコールを示す。

先行投与実験では、まず分子量 8.9 kDa のポリ-L-アルギニン (poly-L-Arg (10)) あるいは分子量 42.4 kDa のポリ-L-アルギニン (poly-L-Arg (50)) を溶解させた生理食塩液 (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) をラット右鼻腔に先行投与し、あらかじめ設定した投与間隔の後 FD-4 生理食塩液 (16.5 mg/kg, 25  $\mu$ l) を同鼻腔に投与した。投与後の FD-4 血中濃度推移を通常の同時投与 [FD-4 (16.5 mg/kg) + poly-L-Arg (10) あるいは poly-L-Arg (50) (10 mg/ml), 25  $\mu$ l] した場合の FD-4 血中濃度推移と比較することによって、poly-L-Arg (10) 及び poly-L-Arg (50) の促進効果の持続性を評価した。なお鼻腔内に投与した薬液が繊毛運動によって咽頭側へ除去されないようにラットに外科的処置を施し、鼻腔を閉鎖系とした。もし先行投与したポリ-L-アルギニンの促進効果が前述した以外の何らかの要因によって減弱するのであれば、その後に投与した FD-4 の吸収に変化がみられると予想される。

Figs. 2 及び 3 に poly-L-Arg (10) と poly-L-Arg (50) を用いたときの FD-4 血中濃度推移を、Fig. 4 に血中濃度推移から求めた血中濃度時間曲

線下面積  $AUC_{0-9h}$  を示す。

Poly-L-Arg (10) を先行投与すると、FD-4 投与の時間間隔が長くなるほど、poly-L-Arg (10) と FD-4 を同時投与したときの FD-4 血中濃度に比べ低く推移した (Fig. 2)。Poly-L-Arg (50) も同様に投与間隔に依存して血中濃度は低下した (Fig. 3)。 $AUC_{0-9h}$  も投与間隔に依存して低下し、poly-L-Arg (10) は 4 時間、poly-L-Arg (50) は 12 時間で、FD-4 だけを投与したときの  $AUC_{0-9h}$  (破線、コントロール) とほぼ等しくなった。

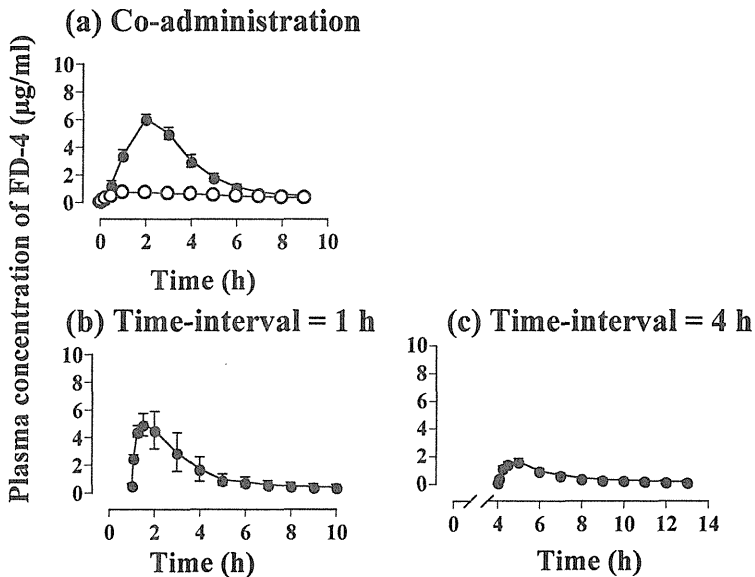


Fig. 2 Plasma concentrations of FD-4 after pre-administration with poly-L-Arg (10) in rats.

○: FD-4 alone (control), ●: co- and pre-administration of poly-L-Arg (10).  
(a): FD-4 was co-administered intranasally with poly-L-Arg (10). (b), (c):  
FD-4 was administered intranasally at time-intervals of (b) 1 h, and (c) 4 h  
after administration of poly-L-Arg (10).

Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=4).

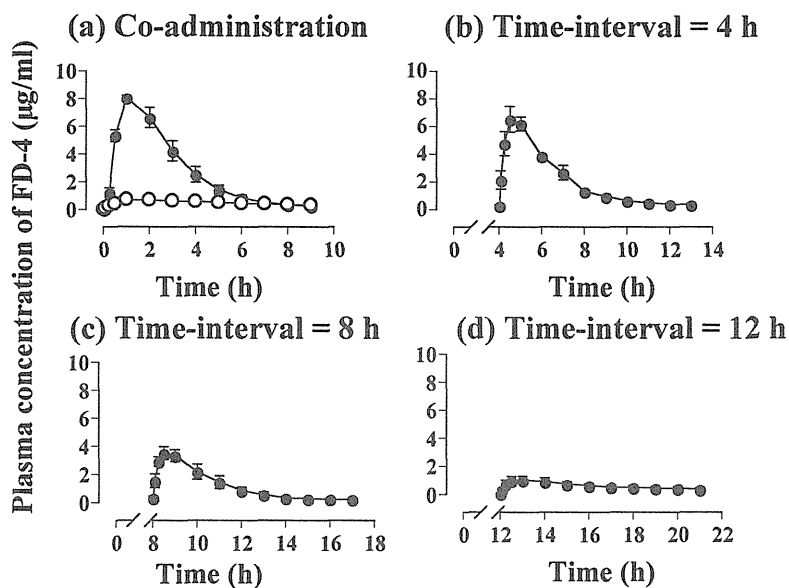


Fig. 3 Plasma concentrations of FD-4 after pre-administration with poly-L-Arg (50) in rats.

○: FD-4 alone (control), ●: co-and pre-administration of poly-L-Arg (50).

(a): FD-4 was co-administered intranasally with poly-L-Arg (50). (b), (c), (d): FD-4 was administered intranasally at time-intervals of (b) 4 h, (c) 8 h and (d) 12 h after administration of poly-L-Arg (50).

Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=4).

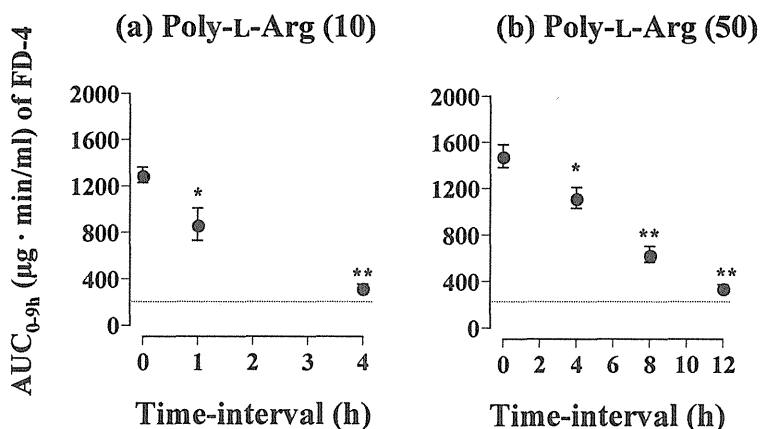


Fig. 4 Relationship between AUC<sub>0-9h</sub> of FD-4 and time after administrations of (a) poly-L-Arg (10) (10 mg/ml), (b) poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) in pre-administration study in rats. There was a significant difference between the AUC<sub>0-9h</sub> in pre-administration studies and the AUC<sub>0-9h</sub> following co-administration of FD-4 with poly-L-Arg (Student *t*-test, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001).

The dotted line represents AUC<sub>0-9h</sub> of controls.  
Data represent the mean ± S.E. (n=4).

これらの結果より、ポリ-L-アルギニンの促進効果は、投与後の時間の経過とともに減弱し、ポリ-L-アルギニンを投与しないときのコントロールレベルまで戻る、一過的なものであることがわかった。加えて動態学的に推測されたポリ-L-アルギニンの分子量依存的な促進効果の持続性について実験的に確認された。

これらの結果を、動態学的に再検証した。Figs. 2 及び 3 の結果及び FD-4 の静脈内投与で得られた速度論的パラメータを用い、デコンボリューション法により吸収プロファイルを求めた (Figs. 5 and 6)。これら吸収プロファイルで重要な点は、ポリ-L-アルギニンを先行投与したとき、吸収のラグタイムが消失すること、吸収初期に認められる MAR が投与間隔が長くなると低下すること、プロファイル後半の傾きが FD-4 のみを投与したときの傾きとほぼ同じであること、及び poly-L-Arg (10) と poly-L-Arg (50) の先行投与で FD-4 の AUC<sub>0-9h</sub> がほぼ等しくなった投与間隔 4 と 12 時間のときの吸収プロファイ



ルが FD-4 のみを投与したときの吸収プロファイルとほぼ同じであることが挙げられる。Figs. 2 及び 3 で得られたポリ-L-アルギニン先行投与時の最高血中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) の短縮は、吸収のラグタイムの消失によると考えられた。これは先行投与したポリ-L-アルギニンの効果が部分的に残っていることを示している。先行投与による MAR の低下は、ポリ-L-アルギニンの鼻腔内濃度の減少よりも、ポリ-L-アルギニンの分子量 (分子構造) に何らかの変化が起こったことを推測させる。また、吸収プロファイル後半の傾きとプロファイルの類似性は、鼻粘膜を介する FD-4 の透過性がポリ-L-アルギニン投与の時間経過に伴ってほとんど元に戻ることを示している。

以上、先行投与実験の結果より、ポリ-L-アルギニンの促進効果は、一定ではなく一過的であることが明らかとなった。また、ポリ-L-アルギニンは分子量に依存した作用持続性を示すことが確認された。しかし、このような変化は鼻粘膜の構造的な変化によっても起こる可能性がある。

そこで、ポリ-L-アルギニンの一過的な促進効果を従来の促進剤と比較するために、胆汁酸誘導体である sodium taurodihydrofusidate (STDHF, 5 mg/ml, 25  $\mu$ l) についても先行投与実験を行った。STDHF は Hosoya らの報告において、その促進効果と膜障害性が密接に関連していた促進剤の一つである [15]。Fig. 7 に STDHF に関して先行投与実験を行ったときの FD-4 の血中濃度推移を、Fig. 8 に血中濃度推移から算出された FD-4 の  $AUC_{0-9h}$  と投与間隔との関係を示す。

STDHF (5 mg/ml, 25  $\mu$ l) を先行投与した後 FD-4 を投与すると、ポリ-L-アルギニンの場合と同様に血中濃度推移、 $AUC_{0-9h}$  のいずれも低下し、投与間隔 4 時間で STDHF の促進効果がほぼ消失した。これらの結果はポリ-L-アルギニンと同様に STDHF の促進効果も一過的であることを示している。

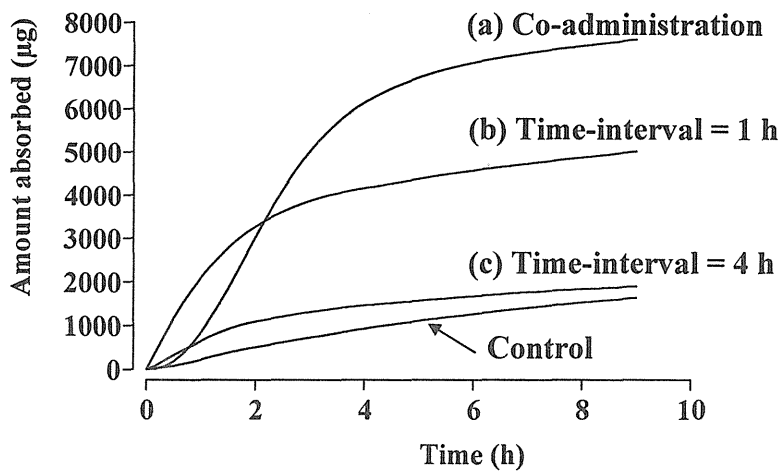


Fig. 5 Amount absorbed of FD-4 calculated by deconvolution method after pre-administration with poly-L-Arg (10) in rats. Data represent the mean (n=4).

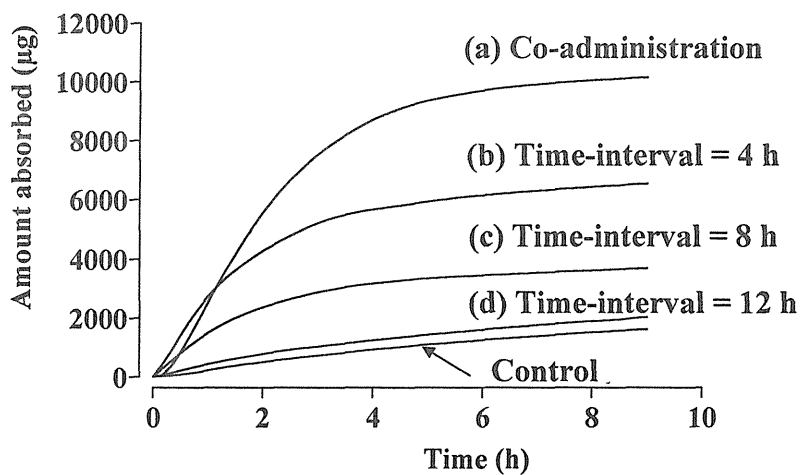


Fig. 6 Amount absorbed of FD-4 calculated by deconvolution method after pre-administration with poly-L-Arg (50) in rats. Data represent the mean (n=4).

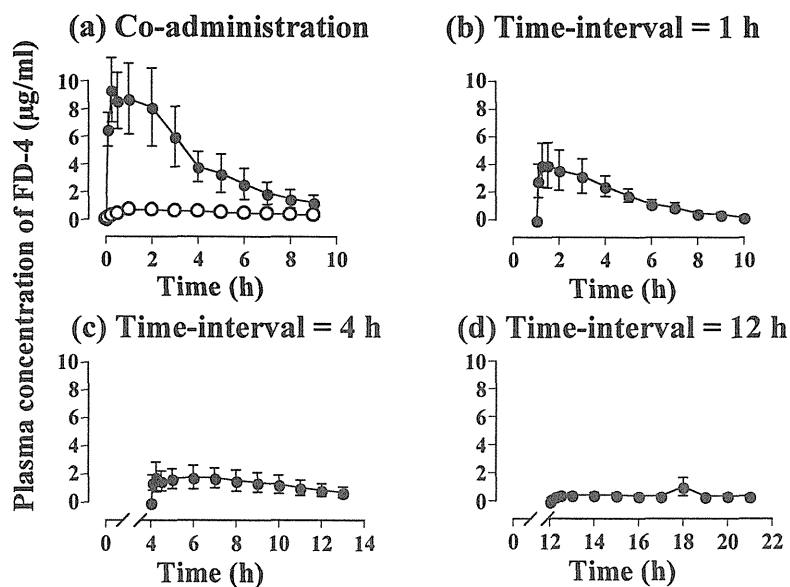


Fig. 7 Plasma concentrations of FD-4 after pre-administration with STDHF in rats.

○: FD-4 alone (control), ●: co- and pre-administration of STDHF  
 (a): FD-4 was co-administered intranasally with STDHF. (b), (c), (d): FD-4 was administered intranasally at time-intervals of (b) 1 h, (c) 4 h and (d) 12 h after administration of STDHF.  
 Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=4).

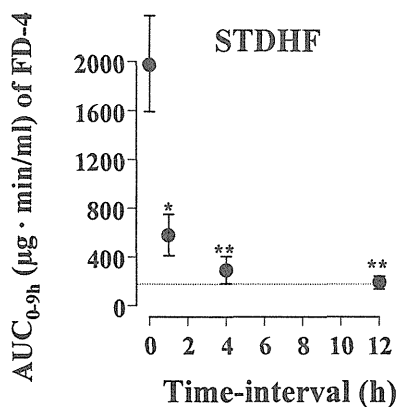


Fig. 8 Relationship between  $AUC_{0-9h}$  of FD-4 and time after administrations of STDHF (5 mg/ml) in pre-administration study in rats. There was a significant difference between the  $AUC_{0-9h}$  in pre-administration studies and the  $AUC_{0-9h}$  following co-administration of FD-4 with STDHF (Student *t*-test, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ). The dotted line represents  $AUC_{0-9h}$  of controls.  
 Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=4).

これらの促進剤の一過的な促進効果を以下のように推測した。(1) 促進剤の鼻粘膜を介する吸収による鼻腔内の濃度低下、(2) 水溶性高分子薬物の吸収を妨げるような鼻粘膜の構造的変化、(3) 鼻粘膜の上皮細胞が水溶性高分子薬物の吸収を妨げるような反応の惹起、つまり逆の細胞膜応答、(4) 鼻粘膜直下の血流の低下に伴う全身循環への薬物クリアランスの減少、(5) 時間依存的な促進剤の不活化である。

我々の以前の研究において、ポリ-L-アルギニンによって種々分子量の FDs (FD-4 ~ FD-150) の  $F_0$  は、どの分子量も増加した [24]。よって poly-L-Arg (10) と poly-L-Arg (50) 自身も吸収される可能性が考えられる。しかしながら  $F_0$  と FDs の分子量との関係から予測すると、ポリ-L-アルギニン自身の吸収が促進されたとしても、poly-L-Arg (10) では 70% 以上が、poly-L-Arg (50) では 99% 以上が鼻腔内に残存していると推察された。このためポリ-L-アルギニンでは、(1) の可能性は低いと考えられた。一方、STDHF は、分子量が 625.9 であるため比較的速やかに鼻腔内から吸収されることが予想される。Hosoya らは、以前に家兔摘出鼻粘膜を介して STDHF が胆汁酸塩であるデオキシコール酸ナトリウム (MW 432.6) よりも素早く透過することを報告している [29]。従って STDHF が一過的な促進効果を示した一つの要因として、鼻腔内から全身循環系への吸収が考えられた。

## 第 2 節 鼻粘膜表面構造の観察

本節では、前節で推測した (3) の明らかな鼻粘膜の構造変化がポリ-L-アルギニンあるいは STDHF によって起こるかを調べた。Fig. 9 に鼻粘膜上皮細胞表面構造の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す。

Poly-L-Arg (10) (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) をラット鼻腔内に投与し、4 時間後の鼻

粘膜表面は、無処置の鼻粘膜表面と比較して何ら構造的な変化を起こしていなかった (Figs. 9a,b)。更に poly-L-Arg (50) (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) をラット鼻腔内に投与し、4、8、及び 12 時間後の鼻粘膜表面に関しても poly-L-Arg (10) の場合と同様、無処置の鼻粘膜表面 (Fig. 9a) と比較して構造的変化がみられなかった (Figs. 9c,d,e)。Miyamoto らは、以前に種々分子量のポリ-L-アルギニン (20 mg/ml, 50  $\mu$ l) をラット鼻腔内に投与 9 時間後の鼻粘膜上皮層をエオジン・ヘマトキシリン染色により病理組織学的に評価したところ、明らかな組織破壊、炎症性反応がなかったことを報告している [25]。従って、ポリ-L-アルギニンの一過的な促進効果が、鼻粘膜の上皮細胞表面の明らかな構造的変化によって水溶性高分子薬物の吸収が妨げられた結果ではないと思われた。

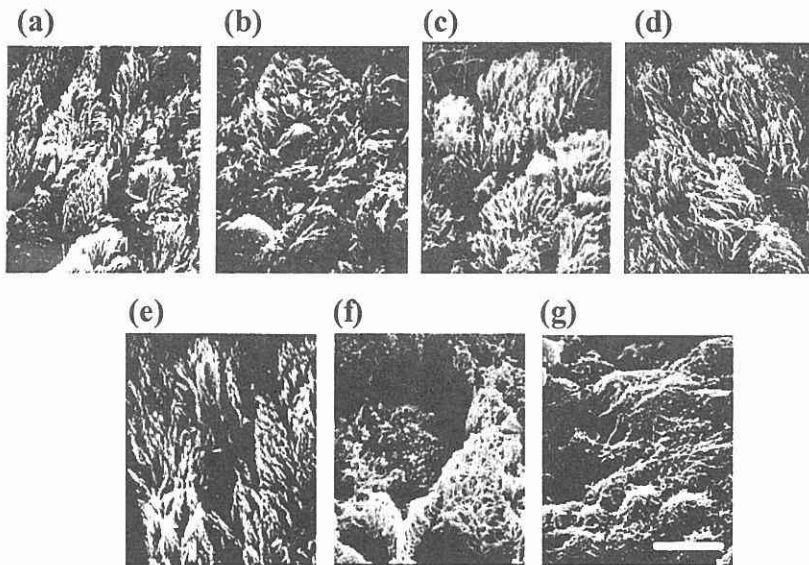


Fig. 9 Scanning electron micrographs of nasal membrane surface after treatment with or without enhancer in rats.

(a) no-treatment, (b) 4 h after administration of poly-L-Arg (10), (c) 4 h after administration of poly-L-Arg (50), (d) 8 h after administration of poly-L-Arg (50), (e) 12 h after administration of poly-L-Arg (50), (f) 15 min after administration of STDHF, (g) 2 h after administration of STDHF.

Scale bar: 7.5  $\mu$ m.

一方、STDHF (5 mg/ml, 25  $\mu$ l) をラット鼻腔内に投与し、15 分後及び2 時間の鼻粘膜表面は、明らかな構造的変化を起こしており (Figs. 9f,g)、STDHF 投与 15 分後で繊毛が絡まり上皮細胞が部分的に陥没していた。このような変化が生じたときに STDHF 投与後の FD-4 の吸収速度が最大に達した ( $T_{max}$ , 約 15 分)。よって STDHF 投与後の早い時間帯では鼻粘膜の透過を促進させるような構造変化が生じたと考えられた。これは、Martin らが、STDHF 投与 15 分後に鼻粘膜を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察したとき、FD-4 の強い蛍光が鼻粘膜断面で観察されたことから支持される [30]。一方、STDHF を 2 時間処理した場合、ほとんどの繊毛が倒れ、部分的に上皮細胞から消失している像が観察された。更に 4 時間後ではこのような構造変化が進んでいた (data not shown)。この結果から STDHF 先行投与後の一過的な促進効果は、STDHF が鼻粘膜を透過する過程で時間の経過とともに起こっている鼻粘膜構造の変化が関係している可能性が考えられた。

### 第 3 節 ポリ-L-アルギニンの繰り返し投与の影響

第 1 節において推察した理由のうち、(1) と (2) はポリ-L-アルギニンの一過的な促進効果を起こす可能性が低いと考えられた。一方、STDHF は (1) と (2) の理由が、部分的に関係していると推察された。

本節では、ポリ-L-アルギニンの一過的な促進効果が、第 1 節で推測した (3) 鼻粘膜上皮細胞が水溶性高分子薬物の吸収を妨げるような反応を惹起したことによるものか、(4) 鼻粘膜直下の血流が低下したことによるものか、あるいは (5) 時間依存的にポリ-L-アルギニンが不活化されることによるものかを明らかにするために、ポリ-L-アルギニンの繰り返し投与実験を行った。Fig. 10 にそのプロトコールを示す。Poly-L-Arg (50) (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) を右鼻腔に投与

## Repeated administration study

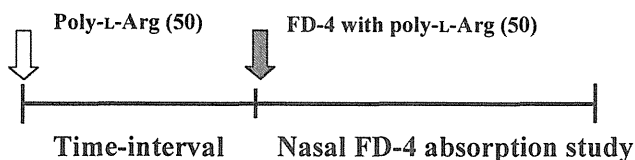


Fig.10 Experimental protocol in repeated administration study in rats.

し、一定時間経過後 poly-L-Arg (50) (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) と FD-4 (16.5 mg/kg, 25  $\mu$ l) を共に同鼻腔に投与した。ポリ-L-アルギニンとの比較のために STDHF (5 mg/ml, 25  $\mu$ l) に関しても繰り返し投与実験を行った。もし、ポリ-L-アルギニンの一過的な効果が先行投与したポリ-L-アルギニンによって推測した (3) のような鼻粘膜が吸収を妨げるような反応を起こした場合や (4) のように血流の低下による全身循環系への薬物クリアランスの低下が起こっていると、再びポリ-L-アルギニンを投与してもポリ-L-アルギニンによる促進効果は認められないと考えられる。一方、STDHF の一過的な効果が先行投与した STDHF の (1) のような吸収による効果が主であるとすると、再び STDHF を投与すると促進効果が認められ、(2) のような高分子が透過しづらいような構造変化を引き起こすとすると、再び STDHF を投与しても促進効果は認められないと考えられる。

Fig. 11 に poly-L-Arg (50) を繰り返し投与したときの FD-4 の血中濃度プロファイルを、また Fig. 12 にそのときの  $AUC_{0-9h}$  と投与間隔との関係を示す。投与間隔を 6, 12, 及び 24 時間と拡げても、poly-L-Arg (50) を再び投与すると、FD-4 の血中濃度は、通常の同時投与の場合 (time-interval = 0 h) とほとんど同じような推移を示し、最高血中濃度、 $T_{max}$  ともにほぼ同じ値となった。

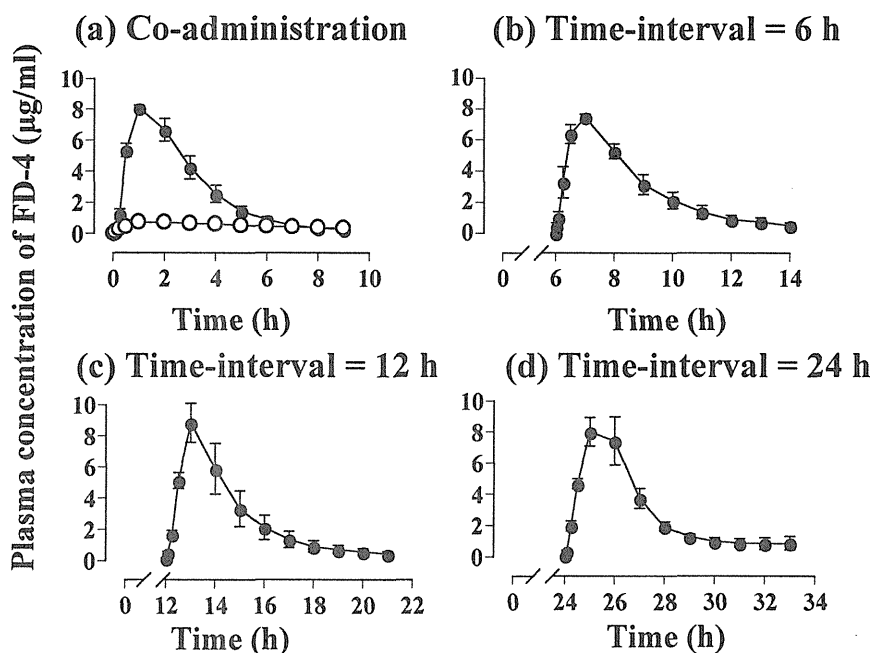


Fig. 11 Plasma concentrations of FD-4 after repeated-administration with poly-L-Arg (50) in rats.

○: FD-4 alone (control), ●: co- and repeated-administration of poly-L-Arg (50).  
 (a): FD-4 was co-administered intranasally with poly-L-Arg (50). (b), (c), (d):  
 FD-4 was administered intranasally at time-intervals of (b) 4 h, (c) 8 h and (c)  
 12 h after administration of poly-L-Arg (50).

Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=4).



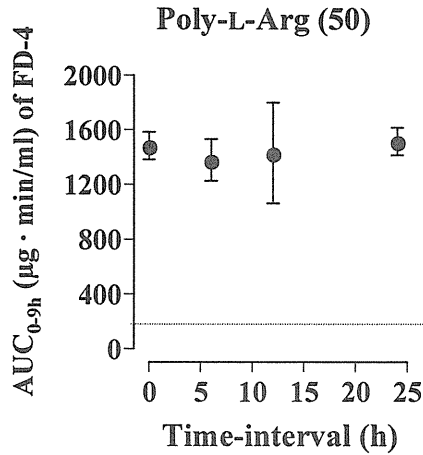


Fig. 12 Relationship between AUC<sub>0-9h</sub> of FD-4 and time after administrations of poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) in repeated administration study in rats.

There was no significant difference between AUC<sub>0-9h</sub> in repeated administration study and the AUC<sub>0-9h</sub> obtained following co-administration of FD-4 with poly-L-Arg (50).

The dotted line represents AUC<sub>0-9h</sub> of control.

Data represents the mean ± S.E. (n=4).

また、これら血中濃度プロファイルから算出した AUC<sub>0-9h</sub> も投与間隔 0 時間の時とほぼ同様の AUC<sub>0-9h</sub> となった ( $P > 0.05$ , Student's *t*-test)。加えて、Fig. 4b の結果から予測すると投与間隔が 6 時間の場合、先行投与した poly-L-Arg (50) の効果が約 50% 残存しているにもかかわらず、繰り返し投与しても、ほぼ 100% の促進効果を示した。これらの結果より、ポリ-L-アルギニンの効果は、繰り返して投与しても同じ様に高分子薬物の吸収を促進するという点で、可逆的であることがわかった。また、鼻粘膜上皮細胞の応答、あるいは血流の低下は、ポリ-L-アルギニンの促進効果が一過的であることの要因ではないと思われた。

一方、STDHF を繰り返し投与すると、FD-4 の血中濃度は、投与間隔に依存して減少し (Fig. 13)、先行投与実験の結果とほぼ同じ AUC<sub>0-9h</sub> となった

(Fig. 14)。これは STDHF の促進効果が不可逆的であることを示している。従って、STDHF が一過的な促進効果を示したのは、先行投与した STDHF の吸収によることが主な要因ではないと考えられた。ここには示さないが、粘膜の脂質二重層を主に透過する脂溶性の低分子薬物のフルルビプロフェン (MW 244.3, オクタノール/水 分配係数 3.86) を STDHF の先行投与後に投与しても良好に吸収されたことから、血流低下の影響も少ないと考えられた [31]。それゆえ、先行投与した STDHF によって鼻粘膜の上皮細胞は高分子薬物の吸収を妨げるような不可逆的な損傷を受けた可能性が高く、前節の推察を支持している。また、この繰り返し投与実験法は、新規経鼻吸収促進剤のスクリーニングにも応用できる可能性を有すると考えられた。

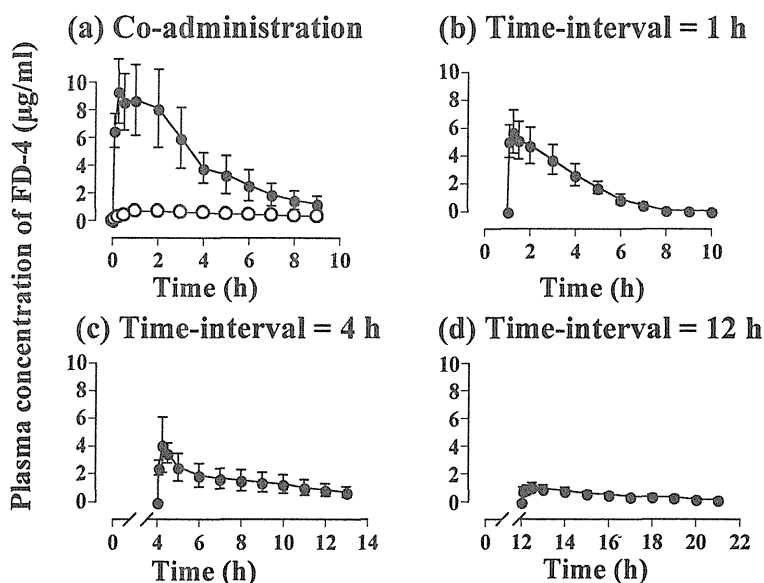


Fig. 13 Plasma concentrations of FD-4 after repeated-administration with STDHF in rats.

○: FD-4 alone (control), ●: co- and repeated-administration of FD-4.

(a): FD-4 was co-administered intranasally with STDHF. (b), (c): FD-4 was administered intranasally at time-intervals of (b) 1 h, (c) 4 h and (d) 12 h after administration of STDHF.

Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=4).

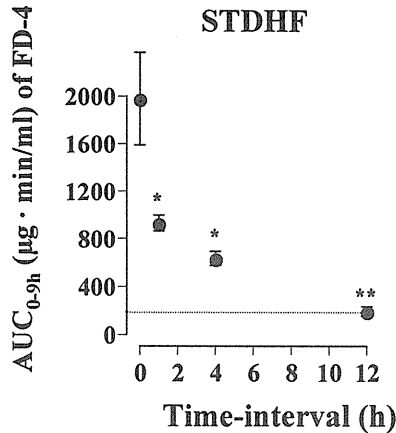


Fig.14 Relationship between AUC<sub>0-9h</sub> of FD-4 and time after administrations of STDHF (5 mg/ml) in repeated-administration study in rats. There was a significant difference between the AUC<sub>0-9h</sub> in repeated-administration studies and the AUC<sub>0-9h</sub> following co-administration of FD-4 with STDHF (Student *t*-test, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001). The dotted line represents AUC<sub>0-9h</sub> of controls. Data represent the mean ± S.E. (n=4).

#### 第 4 節 鼻粘液中でのポリ-L-アルギニンの分解性の評価

前節までの結果からポリ-L-アルギニンが一過的で可逆的な吸収促進効果を示したのは鼻腔内に投与されたポリ-L-アルギニンが時間依存的に不活化されることによることが、大きな要因である可能性が高くなった。

ポリ-L-アルギニンが不活化される可能性は、粘液成分や粘膜表面のアニオン性物質(シアロムチン等 [32])とのイオンの相互作用による複合体の形成と、ポリ-L-アルギニンの酵素的分解が考えられる [7,8]。このうち、複合体の形成は鼻腔内の活性なポリ-L-アルギニンの量(数)を減少させるため、分子量の異なるポリ-L-アルギニンを同じ濃度で投与すると、分子量の大きいポリ-L-アルギニンの方がモル濃度が低いため、フリーのポリ-L-アルギニン、すなわち活性のあるポリ-L-アルギニンの数は減少すると考えられる。よってポリ-L-アルギニンの

分子量が大きいものの方が促進効果の持続時間は短くなると考えられた。しかし、第 1 節の結果より、分子量の大きいポリ-L-アルギニンの方が促進効果の持続時間が長く、かつ Miyamoto らの検討で、poly-L-Arg (10) の促進効果とその 1/4 の濃度の poly-L-Arg (50) の促進効果がほぼ等しかったことから [24,25]、複合体形成は主な要因ではないと思われた。そこでもうひとつの可能性であるポリ-L-アルギニンの鼻腔内での酵素的な分解について検討した。その結果を Fig. 15 に示す。

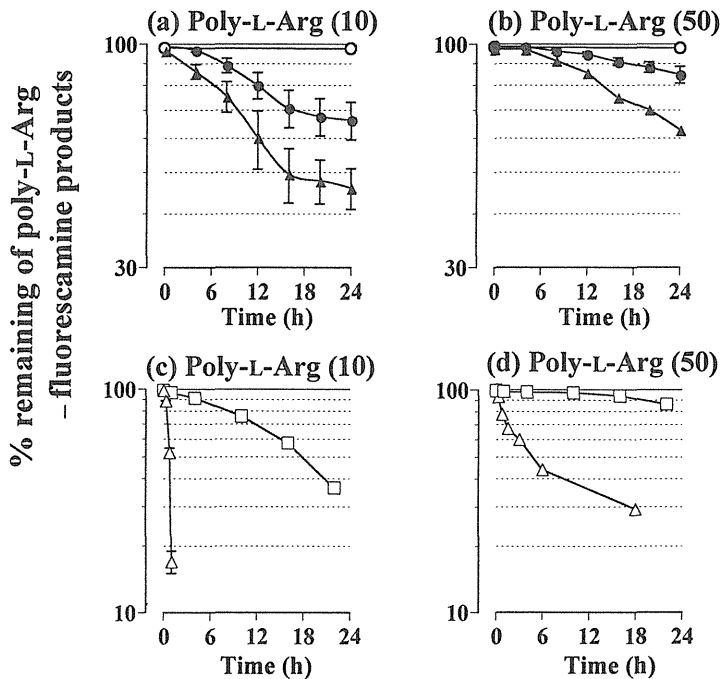


Fig. 15 Degradation of poly-L-Arg (10) (10 mg/ml) and poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) in the diluted nasal drip and Ringer solution containing trypsin.

(a) poly-L-Arg (10) in the diluted nasal drip, (b) poly-L-Arg (50) in the diluted nasal drip, (c) poly-L-Arg (10) in Ringer solution containing trypsin, (d) poly-L-Arg (50) in Ringer solution containing trypsin.

○: Ringer solution, ●: Fluid I (0.593 mg protein/150  $\mu$ l), ▲: Fluid II (1.28 mg protein/150  $\mu$ l), □: Ringer solution containing 0.055 IU trypsin, Δ: Ringer solution containing 1.1 IU trypsin.

Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=6).

Poly-L-Arg (10) (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) と poly-L-Arg (50) (10 mg/ml, 25  $\mu$ l) の両者とも、ラット 1 匹の粘液を緩衝液で希釈して調製した溶液 (Fluid I, ●) 中で経時的に分解し、その速度は poly-L-Arg (10) の方が poly-L-Arg (50) よりも速かった (Figs. 15a,b)。この傾向は、異なる活性のトリプシン (0.05 IU、1.1 IU) 溶液中でも同様であった (Figs. 15c,d)。

更にラット 2 匹分の粘液から調製した希釈溶液 (Fluid II, ▲) 中の分解速度は、Fluid I よりも速く、ポリ-L-アルギニンは、粘液に含まれる酵素の含量 (たん白質含量; Fluid I : Fluid II = 1 : 2) に依存して分解されることが明らかとなった。このことは、インタクトな粘液中ではポリ-L-アルギニンが更に速く分解されることを示している。類似した傾向が、活性の異なるトリプシン溶液中でも認められ、ポリ-L-アルギニンの分解速度は、1.1 IU のトリプシン溶液の方が 0.05 IU のトリプシン溶液よりも速かった。

以上の結果より、ポリ-L-アルギニンの吸収促進効果が一過的で、かつ可逆的であったのは、鼻腔内中での酵素的な分解によることが要因の一つであると考えられた。また、分子量が大きなポリ-L-アルギニンの方が、促進効果が持続したのは、鼻腔内での安定性が高かったことによると考えられた。

## 第 5 節 本章の小括及び考察

本章では、Miyamoto ら [24,25] によって動態学的に推察されたポリ-L-アルギニンの分子量依存的な作用持続性を、ラットを用いた *in vivo* における水溶性高分子薬物 FD-4 の経鼻吸収性の評価から実験的に確認するとともに、ポリ-L-アルギニンの時間依存的な促進効果の減少を導く主要な要因について検討した。

分子量の異なる 2 種類のポリ-L-アルギニン [poly-L-Arg (10) (10 mg/ml)

及び poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) の先行投与実験から、いずれのポリ-L-アルギニンも投与間隔が長くなるほど促進効果が減弱した。促進効果がほとんどなくなるまでに要する時間は、poly-L-Arg (50) の方が poly-L-Arg (10) よりも約 3 倍長く、ポリ-L-アルギニンは分子量に依存した作用持続性を示すことが実験的に確認された。このことは、またポリ-L-アルギニンの促進効果が一定ではなく一過的であることを示している。ポリ-L-アルギニンが示した一過的な効果は、胆汁酸誘導体である STDHF で認められた上皮細胞の不可逆的な構造変化と関連する効果ではなかった。最近、Illum らは、カチオン性ポリサッカライドであるキトサンをラット鼻腔内に先行投与し、一定時間経過後、鼻腔内にインスリンのみを投与した時の血糖降下作用を試験した [17]。その結果、キトサンは鼻粘膜を損傷せずに、キトサンの投与時間に依存してインスリン血糖降下作用が減少したことを報告した。彼らはこのキトサンの一過的な効果を tight junction の一時的な開口、あるいは吸収部位からのキトサンとインスリンの繊毛運動による除去の結果であると推察している [17]。Illum らは、無麻酔、鼻腔開放系の実験系を用いたため、一過的な効果に対する mucocillary clearance の影響は著しく大きい [13,17]。一方、著者は、麻酔、鼻腔内閉鎖系の実験系を用いたため、mucocillary clearance の影響は無視できる [13,26]。従って、この一過的な促進効果をポリ-L-アルギニンが示す主な理由として、ポリ-L-アルギニンの鼻腔内からの mucocillary clearance 以外による消失と、吸収促進に対抗する吸収抑制または現状回復を起こす鼻粘膜の反応が考えられる。後者のような逆の反応は、生体の交感神経系と副交感神経系による調節機構のようなことが想像される。このような反応が起こっている場合は、再び同じ濃度のポリ-L-アルギニンを投与しても促進効果は示さないと考えられる。一方、前者の場合は、再びポリ-L-アルギニンの促進効果が現れると考えられた。先行投与したポリ-L-アルギニンの促進効果が消失する時間に、再

びポリ-L-アルギニンを投与すると、ほぼ 100% の促進効果を示した。また、50% の効果が残存している時間にポリ-L-アルギニンを再び投与した場合や、促進効果が消失するのに要した時間の 2 倍の時間において再びポリ-L-アルギニンを投与した場合でも、100% の促進効果を示した。これらの結果は、ポリ-L-アルギニンの一過的な促進効果を示す主要因がポリ-L-アルギニンの鼻腔内からの消失によることを示唆している。加えて、ポリ-L-アルギニンを繰り返し投与しても同じ促進効果が得られたことから、吸収を促進するという点でポリ-L-アルギニンは可逆的な効果を示すことが明らかとなった。

投与したポリ-L-アルギニンが分子量依存的に鼻腔内から消失する過程の一つに、ポリ-L-アルギニンが鼻腔内から全身循環系へと吸収されることが考えられる。この場合、ポリ-L-アルギニンの分子量を考慮すると、主要因とはならない [24]。もう一つは、ポリ-L-アルギニンが何らかの要因によって不活化されることが考えられた。不活化による鼻腔内からの消失の可能性は、他のポリカチオンに関する報告からも高いと考えられる [33-35]。キトサンやポリ-L-リジンのようなポリカチオンがヒト結腸癌由来の培養上皮細胞単層 Caco-2 モデルにおいて、洗浄除去することによって、増加した上皮透過性が 24 時間以内に元のレベルにまで回復することが示された [33-35]。更に、Caco-2 モデルにおいて、キトサンを apical 側に 20 分適用した後、フレッシュなメディウムに交換しても 60 分経過した時点では、膜透過性が亢進したままであったが、キトサンを除去した後、ポリアニオン性のヘパリンを含むメディウムにて、上皮層を更に洗浄すると 60 分以内に膜透過性がコントロールレベルまで回復したことが報告された [33]。これは、メディウム中のキトサンを除去しても、上皮層表面にイオンの相互作用によって結合したキトサンまでは除去できなかったために上皮透過性の促進作用が持続したが、ポリアニオン性ヘパリンを含むメディウムで洗浄すると、より多くの上皮層表面に結合したキトサンが除去され、促進効果が減

少ししたものと推察された。このように生理的条件下で分子内にプラスチャージを多数有するポリ-L-アルギニンを含むポリカチオン性物質は、上皮表層のアニオン性部位とイオンの相互作用を起こし、上皮透過性を一時的に増加させ、それが除去されると増加した膜透過性が元のレベルに戻る特性を有すると考えられた。

このような実験的な効果の消失は、*in vivo* では、不活化のような現象によって起こると思われる。その一つに、ポリカチオンであるポリ-L-アルギニンと粘液成分の一つであるポリアニオン性のシアロムチン [32] とのイオンの相互作用による複合体の形成が考えられるが、これは分子量の異なる活性なポリ-L-アルギニンの量 (数) を相対的に減少させるため、一過的な促進効果の要因としての可能性は低いと思われた。

そこで、もう一つの可能性として考えられる poly-L-Arg (10) 及び poly-L-Arg (50) の分解性を評価した。いずれのポリ-L-アルギニンも希釈した鼻粘液中で、またトリプシン溶液中で酵素的に分解され、酵素濃度に依存して分解速度が速くなり、低分子量のポリ-L-アルギニンの方が高分子量のポリ-L-アルギニンよりも速く分解した。よってポリ-L-アルギニンが分子量依存的な一過的な促進効果を示した要因の一つとして、分子量依存的な酵素的分解が考えられた。またこの結果は、分子量の大きいポリ-L-アルギニンほど、みかけ上鼻腔内で安定であるため、効果が持続することを示している。

鼻粘液中にはマスト細胞由来のトリプシン型セリンプロテアーゼ (トリプターゼ) [7]、あるいは気道上皮由来のトリプシン様酵素 [8] が含まれており、炎症時やアレルギー患者ではその分泌量が増加することが知られている。両酵素はトリプシン同様、たん白質のアルギニン残基の c 末端側を選択的に切断するため [7,8]、投与されたポリ-L-アルギニンはおそらく、これら酵素によって主に分解するものと考えられた。Fig. 8 で示される分解性の結果は希釈粘液中



のそれであり、インタクトな粘液中では、上述した酵素によってさらに速くポリ-L-アルギニンは分解されると推察された。加えて、Fig. 8 で示されるポリ-L-アルギニンの分解プロファイルは、初期の分解速度が非常に遅いことからポリ-L-アルギニンが単純な一次分解あるいは併発分解反応によって分解されているわけではないことを示している。すなわち、この分解プロファイルは、ポリ-L-アルギニンが併発・逐次型の分解反応によって分解されている可能性が高いことを推測させる。この場合、粘液中で分解されても促進効果を現すのに十分な分子量を有する活性なポリ-L-アルギニンは、Fig. 8 で示されるより早い時期にほとんどなくなると考えられる。Miyamoto らの研究により、ポリ-L-アルギニンの分子量は促進作用の持続性に加え、効果の強さも決定していた [24,25]。加えて、L-アルギニンモノマーでは促進効果が認められていない [22]。どの程度の分子量まで、ポリ-L-アルギニンの促進効果を示すかは定かではないが、L-アルギニンダイマーやトリマーにはほとんど促進効果はないものと推察される。このように、ポリ-L-アルギニンの鼻腔内での分解は、一過的な効果を示す最も大きな因子であると考えられる。しかし、このことを確認するためには、今後どのような分解物が、どのような時間で出現するかを定量する必要がある。

以上、ポリ-L-アルギニンは、*in vivo* において分子量に依存して一過的で、かつ可逆的な促進効果を示す吸収促進剤であることが明らかとなった。

このような特性は、ペプチド及びたん白質医薬品の薬力学に合わせた投与设计が可能となり、副腎皮質刺激ホルモン (MW 4.5 kDa)、成長ホルモン (MW 22 kDa) あるいは黄体形成ホルモン (MW 29 kDa) のようにその血中濃度をパルス型にするのが望ましいものに対しては、比較的 low molecular weight のポリ-L-アルギニンを使用することで達成でき、夜間に薬理効果の持続が望まれるバソプレシン (MW 1.1 kDa) やインスリン (MW 5.8 kDa)、あるいは薬理効果の発現に有効血中濃度の長時間の持続を必要とする顆粒球コロニー刺激因子

(MW 18.8 kDa) やエリスロポエチン (MW 30 kDa) の場合には比較的高分子量のポリ-L-アルギニンを使用することで達成できると思われる。また、このような特性を有するポリ-L-アルギニンは、インターフェロン $\alpha$  (MW 20 kDa) のように生体の日周リズムにあわせた時間薬理学の概念に基づく悪性腫瘍及び慢性肝炎に対する治療設計 [36,37] においても応用可能と考えられる。従って、ポリ-L-アルギニンは、臨床的にその有用性が期待されるたん白質様水溶性高分子薬物の time-controlled transnasal delivery system の開発に有望であると思われた。

## 第2編 *In vitro* におけるポリ-L-アルギニンの鼻粘膜透過促進効果の解析

前編の結果より、ポリ-L-アルギニンの促進効果は一過的で、かつ可逆的な吸収促進剤であることが明らかとなった。

従って、界面活性剤や胆汁酸塩のような従来の化学的促進剤の吸収促進効果が粘膜に対する不可逆的な損傷作用と密接に関連していたのとは異なり、別の機構によって水溶性高分子の吸収を促進していることが推察された。しかしながら、*in vivo* における特徴的な吸収促進効果を含み、これまでポリ-L-アルギニンの作用機構に関してはほとんど解析されていない。水溶性高分子薬物が鼻腔内から全身へ移行するためにはその律速過程である鼻粘膜上皮層を透過しなければならない。薬物の上皮層を介した輸送経路は経細胞路 (transcellular route) と細胞間隙路 (paracellular route) の二つの経路が存在する。従ってポリ-L-アルギニンがどちらの輸送経路を促進しているかを調べることは、その促進機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

更に、ポリ-L-アルギニンを含むポリカチオンが鼻粘膜の上皮細胞間隙経路の透過性を主に促進する可能性が高く [33-35]、その経路における上皮バリアー能を形成する細胞間接着複合体に及ぼす影響を調査することが必要である。上皮細胞膜の隣接する細胞同士の接着は、主に tight junction (TJ) とその直下の adherens junction (AJ) によって制御されている。TJ は TJ 膜貫通型たん白質である occludin、claudin、JAM などや、TJ 裏打ちたん白質である ZO-1、ZO-2、ZO-3、7H6 などが、また AJ は AJ 膜貫通型たん白質である E-cadherin や AJ 裏打ちたん白質であるカテニンが細胞間接着分子として機能し、TJ 並びに AJ はこれら接着分子の集合体によって細胞接着複合体を形成していることが知られている [38-41]。特に、TJ は、細胞間隙部の物質透過を制限するためのバリアー機能と細胞の極性を維持するためのフ

ェンス機能を有している [39]。また AJ 構造の変化は結果的に TJ 構造の変化をもたらすことも知られている [41]。

そこで本編では、3 章に亘ってポリ-L-アルギニンの鼻粘膜透過促進効果の解析を *in vitro* 家兔摘出鼻粘膜にて行った。

## 第1章 ポリ-L-アルギニンによる透過促進経路の同定

本章では、ポリ-L-アルギニンによって促進される溶質の輸送経路を決定するために共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) にて上皮層を介した水溶性高分子 (FD-4) の蛍光像を観察した。また付随して起こるポリ-L-アルギニンによる膜たん白質の分布の変化を免疫抗体法により視覚化し、輸送経路と関連付けた。加えて、Ussing 型 diffusion chamber を用いた電気生理学的手法により、溶質の輸送パラメータと鼻粘膜の電気生理学的パラメータの関係から CLSM 観察結果の妥当性を評価した。

### 第 1 節 FD-4 の透過経路の視覚化

Fig. 16 に FD-4 (2.5 mg/ml) と MW 42.4 kDa のポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を apical 側に適用し、120 分経過した後の鼻粘膜の CLSM 画像を示す。ポリ-L-アルギニン非存在下(コントロール)において、apical 表面で細胞周辺に FD-4 の蛍光が観察された。また細胞内にもわずかに検出されたがその蛍光強度は細胞周辺よりも弱く、はっきりしなかった。これに対して、ポリ-L-アルギニン存在下では、鼻粘膜の apical 側表面から 7.2  $\mu\text{m}$  の深さまで、細胞間隙部位に強い FD-4 の蛍光が観察された。また、矢印で示したように細胞表面にみられる強い蛍光は、細胞断面 (3.6, 7.2  $\mu\text{m}$ ) では細胞間隙部位

にのみ観察された。

これらの結果より、ポリ-L-アルギニン他家兔摘出鼻粘膜において、FD-4 の細胞間隙路の輸送を優先的に促進すると考えられた。

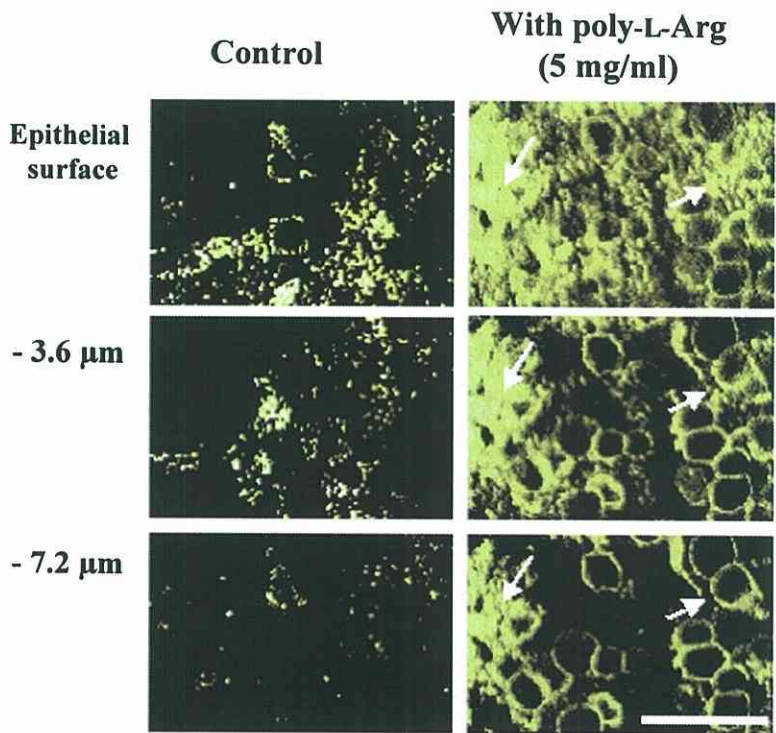


Fig.16 Confocal laser scanning microphotographs of rabbit nasal epithelium after a 120-min application of FD-4 (2.5 mg/ml) with poly-L-Arg (5 mg/ml). Series of 3 horizontal cross-sections from 0  $\mu\text{m}$  to - 7.2  $\mu\text{m}$ , taken at steps of 3.6  $\mu\text{m}$  thickness. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$ .

## 第 2 節 電気生理学的解析

前節の観察結果を電気生理学的に解析するため、Ussing 型 diffusion chamber に摘出鼻粘膜を装着し、電気生理学的パラメータ (自発的膜電位、

PD, 短絡電流、Isc、 経上皮電気抵抗、TEER) をモニターしながら、ポリ-L-アルギニンの促進効果を調べた。

鼻粘膜上皮を介する溶質の透過が単純拡散に従い、経細胞路と細胞間隙路の両方によるとすると、全透過係数  $P_m$  は、(1) 式となる。

$$P_m = (1-\alpha) P_{trans} + \alpha P_{para} \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $P_{trans}$  は細胞内経路を介する溶質の透過係数、 $P_{para}$  は細胞間隙路を介する溶質の透過係数、 $\alpha$  は全透過面積に対する間隙部の有効面積率である。経細胞路の透過性は apical 側の脂質膜と basolateral 側の脂質膜の透過抵抗が支配的であるので  $P_{trans}$  は (2) 式で表される。

$$\frac{1}{P_{trans}} = \frac{1}{P_a} + \frac{1}{P_b} \dots\dots\dots (2)$$

$$P_{trans} = \frac{P_a \cdot P_b}{P_a + P_b} \dots\dots\dots (2')$$

ここで、 $P_a$  は apical 側の脂質膜を介する溶質の透過係数、 $P_b$  は basolateral 側の脂質膜を介する溶質の透過係数である。

(1)、(2') 式より、 $P_m$  は (3) 式となる。

$$P_m = (1-\alpha) \frac{P_a \cdot P_b}{P_a + P_b} + \alpha P_{para} \dots\dots\dots (3)$$

もし、溶質の透過が経細胞路優位とすると、(3) 式は

$$P_m \doteq (1-\alpha) \frac{P_a \cdot P_b}{P_a + P_b} \dots\dots\dots (4)$$

溶質の透過が細胞間隙路優位とすると、(3) 式は

$$P_m \doteq \alpha P_{para} \dots\dots\dots (5)$$

と簡略化できる。

一方、鼻粘膜を介する全抵抗、 $R_m$  は経細胞路と細胞間隙路が並列に存在

するので (6) 式で表される。

$$\frac{1}{R_m} = \frac{1}{R_{trans}} + \frac{1}{R_{para}} \dots\dots\dots(6)$$

ここで  $R_{trans}$  は経細胞路の抵抗、 $R_{para}$  は細胞間隙路の抵抗である。ただし、apical 側の脂質膜と basolateral 側の脂質膜は直列に存在するので  $R_{trans}$  は (7) 式となる。

$$R_{trans} = R_a + R_b \dots\dots\dots(7)$$

(6)、(7) 式より  $R_m$  は、

$$\frac{1}{R_m} = \frac{1}{R_a + R_b} + \frac{1}{R_{para}} \dots\dots\dots(8)$$

となる。

本実験系で電気生理学的な手法により求まる自発的膜電位 (PD) は、apical と basolateral 側の膜電位差であり、それを打ち消すための短絡電流 ( $I_{sc}$ ) は、膜の最も leaky な部分である主に細胞間隙路のイオン輸送電流と考えられる。従って、これら 2 つのパラメータを用いてオームの法則より算出される経上皮電気抵抗 (TEER) は、(7)、(8) 式を反映せず、

$$R_m = TEER \doteq R_{para} \dots\dots\dots(9)$$

となる。一般に  $P_m$  と  $R_m$  は

$$P_m \doteq \frac{1}{R_m} \dots\dots\dots(10)$$

と表されるので、(5)、(9) 式より

$$P_m \doteq \alpha P_{para} \doteq \frac{1}{R_{para}} \dots\dots\dots(11)$$

となる。 $\alpha P_{para}$  をみかけの透過係数  $P_{app}$  とおくと

$$P_{app} \doteq \frac{1}{R_{para}} \dots\dots\dots (12)$$

となる。R<sub>para</sub> を膜コンダクタンス G<sub>t</sub> として表すと

$$R_{para} = \frac{1}{G_t} \dots\dots\dots (13)$$

となり、(12) 式は

$$P_{app} = G_t \dots\dots\dots (14)$$

となる。従って、もしポリ-L-アルギニンによって、経細胞路と細胞間隙路の両方の透過が促進される場合と経細胞路が促進される場合、すなわち (3)、(4) 式が成立する場合は、P<sub>app</sub> と G<sub>t</sub> との間には、比例関係が認められないと考えられる。一方、ポリ-L-アルギニンによって細胞間隙の FD-4 透過が促進された場合、(14) 式より P<sub>app</sub> と G<sub>t</sub> との間には直線関係が認められると考えられる。

Fig. 17 に FD-4 の累積透過量と TEER 値の経時変化を示す。

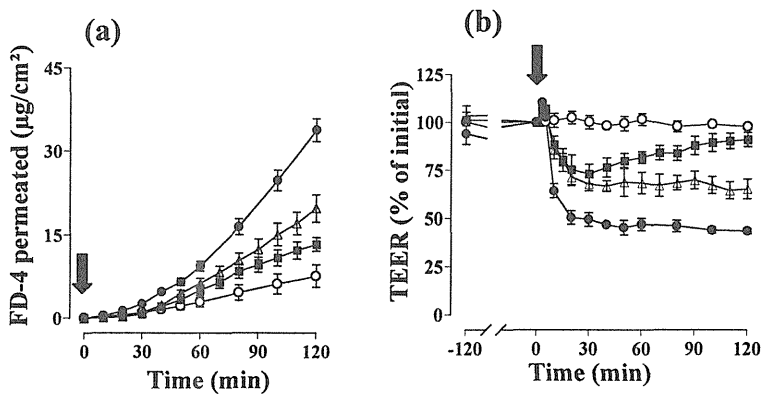


Fig.17 Effects of poly-L-Arg concentration on the FD-4 permeation (a) and TEER (b) across the rabbit nasal epithelium. (○) control; (■) with 0.05 mg/ml poly-L-Arg; (Δ) with 0.5 mg/ml poly-L-Arg; (●) with 5 mg/ml poly-L-Arg. Closed arrow: apical application of poly-L-Arg and FD-4 (2.5 mg/ml). Data represent mean ± S.E. (n=3-5).



鼻粘膜を介した FD-4 の輸送は、ポリ-L-アルギニンの濃度に依存して増加し (Fig. 2a)、TEER は濃度に依存して減少した (Fig. 2b)。これらの結果は細胞間隙路が拡がり FD-4 の透過が増加したと考えられた。そこでポリ-L-アルギニンによる透過性の増加と TEER の減少との関係について評価した。FD-4 のみかけの透過係数 ( $P_{app}$ ) は式 (15) より算出した。

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0} \dots\dots\dots (15)$$

ここで、 $dQ/dt$  ( $\mu\text{g/sec}$ ) は FD-4 の定常状態フラックスであり、 $C_0$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) は、ドナー側の初期 FD-4 濃度、 $A$  ( $\text{cm}^2$ ) は、鼻粘膜の有効表面積である。

膜コンダクタンス ( $G_t$ ) は PD と  $I_{sc}$  から計算された TEER と (13) 式より算出した。Fig. 18 に FD-4 の  $P_{app}$  と  $G_t$  との関係を示す。

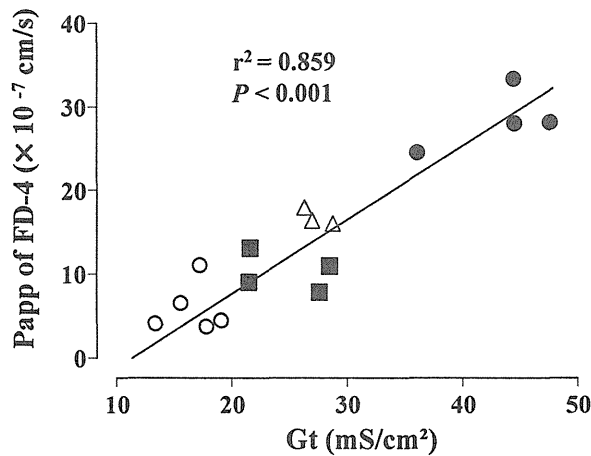


Fig.18 Relationship between  $P_{app}$  of FD-4 and  $G_t$  in individual data sets.  
 (○) control; (■) with poly-L-Arg (0.05 mg/ml); (△) with poly-L-Arg (0.5 mg/ml); (●) with poly-L-Arg (5 mg/ml).

その結果、両者の間には、良好な相関が認められた ( $r^2 = 0.859$ )。この結果よりポリ-L-アルギニンの透過促進が (3) 式、(4) 式で表されるような経細胞路優位の効果ではなく、細胞間隙路優位の効果であると考えられた。また、この結果は、前節の CLSM の結果を強く支持するものと思われる。

以上の結果より、ポリ-L-アルギニンは隣接する細胞間に何らかの影響を及ぼし細胞間隙路の抵抗を減少して、FD-4の透過性を促進したと考えられた。

なお、ポリ-L-アルギニンを低濃度で適用した場合 (0.05 mg/ml)、FD-4 輸送と TEER は、ポリ-L-アルギニン適用 90 分でコントロールレベルに回復した。(90 分から 120 分の間で算出した FD-4 の  $P_{app}$ ;  $6.6 \pm 0.8 \times 10^{-7}$  cm/s、平均 TEER;  $89.7 \pm 0.7\%$ )。

### 第 3 節 細胞間接着たん白質に対する影響

前節までのポリ-L-アルギニンによって得られた効果が、細胞間接着たん白質の分布に関係するかどうかを評価した。

Fig. 19 に家兔摘出鼻粘膜をポリ-L-アルギニンで処理した後の ZO-1 [43]、occludin [44]、E-cadherin [45] の CLSM 画像を示す。

コントロールの鼻粘膜では、これらのたん白質は、細胞-細胞連結部位に連続的なバンドとして局在していた (Figs. 19a-c)。これに対して0.5 mg/ml と 5 mg/ml のポリ-L-アルギニンを 120 分間処理すると、細胞-細胞連結部位の ZO-1、occludin、E-cadherin のバンドが減少し、細胞内に強い蛍光が観察され、これらたん白質が細胞内へ分散した (Figs. 19j-o)。一方、0.05 mg/ml ポリ-L-アルギニンにおいては、適用 30 分でこれらたん白質は細胞内へ分散したが (Figs. 19d-f)、適用 120 分では、これらたん白質の大部分は細胞間隙部位に再分布した (Figs. 19g-i)。これらの結果から、ポリ-L-アルギニンは接

着たん白質を細胞内に分散させることがわかった。また、ポリ-L-アルギニンの濃度に依存して細胞-細胞連結部位での接着たん白質の分布が変化することが示唆された。

以上の結果から、ポリ-L-アルギニンは接着たん白質を細胞内へ分散させることによって細胞間隙の結合部を開口し、FD-4 の透過を促進することが明らかとなった。

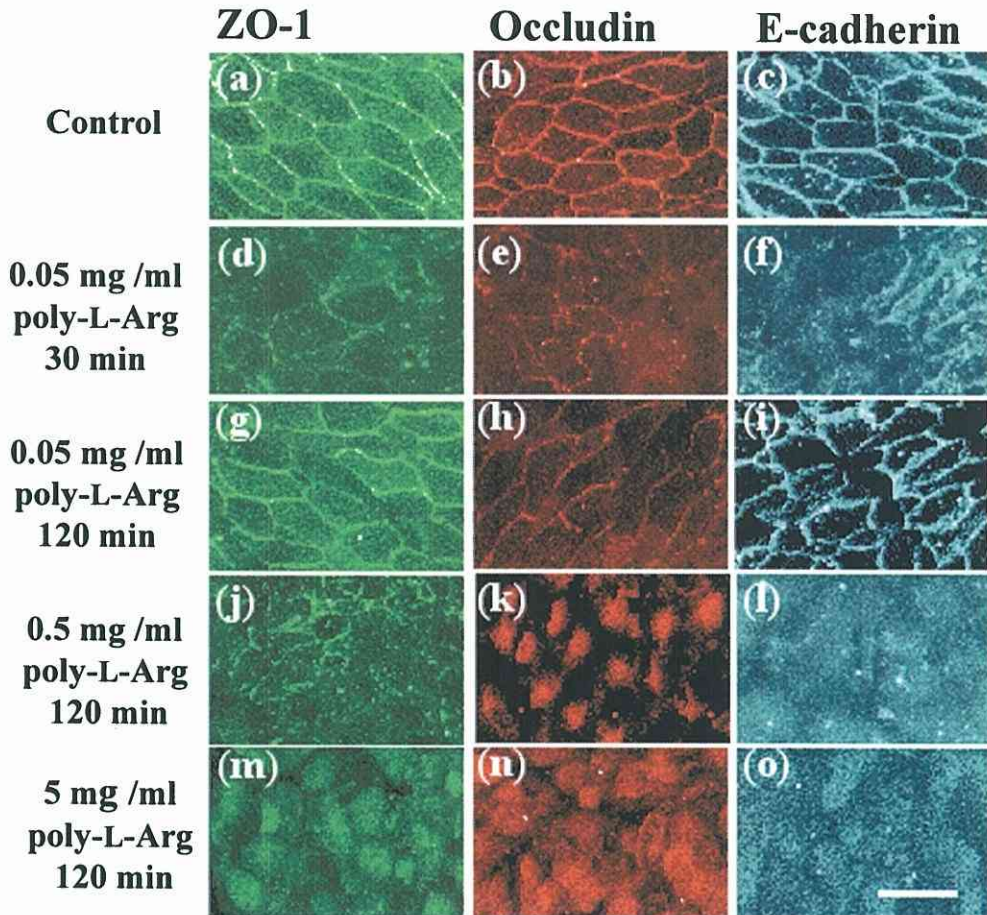


Fig.19 Immunofluorescent localization of ZO-1 (a,d,g,j,m), occludin (b,e,h,k,n) and E-cadherin (c,f,i,l,o) in rabbit nasal epithelium after treatment with poly-L-Arg in apical side. Scale bar: 15  $\mu$ m.

#### 第 4 節 本章の小括及び考察

本章において、家兎摘出鼻粘膜におけるポリ-L-アルギニンによって促進される水溶性高分子の主要な輸送経路を同定した。

ポリ-L-アルギニン存在下、FD-4 が鼻粘膜の経細胞路と細胞間隙路のどちらを介して輸送されているのかを CLSM にて観察すると、鼻粘膜断面では細胞間隙スペースのみに顕著な FD-4 の蛍光が観察された。更に 電気生理学的手法にて FD-4 の輸送経路を解析すると、ポリ-L-アルギニンの適用濃度に依存して、鼻粘膜の細胞間隙透過性の指標となる Gt が増加し、それに伴って FD-4 の鼻粘膜透過性が増加した。両者の間には良好な直線関係が認められたことから、CLSM にて観察された細胞間隙を介する FD-4 透過の妥当性が確認された。更に、細胞間接着複合体を形成する接着たん白質の分布を免疫蛍光法により観察した結果、ポリ-L-アルギニンを鼻粘膜の apical 側に適用すると、これら全ての接着たん白質が細胞-細胞連結部位から細胞内へ分散した。また、より低濃度のポリ-L-アルギニンほど、細胞周辺に残存していた。従ってポリ-L-アルギニンは、鼻粘膜において、濃度依存的に接着たん白質、特に TJ たん白質の分布を細胞-細胞連結部位から細胞内に分散させることが明らかとなった。

これらの結果は、ポリ-L-アルギニンと類似したポリカチオンの性質を有するキトサンやその誘導體 (N-トリメチルキトサン)あるいはポリ-L-リジンが、Caco-2 細胞単層やイヌ腎臓の培養上皮細胞である MDCK 細胞単層における FD-4 や  $^{14}\text{C}$ -マンニトールの透過性と Gt が直線関係にあった結果と一致する [33,45,46]。従ってポリカチオン性の物質は、上皮の種類に関係なく、その細胞間隙透過性を優先的に増加すると考えられた。

キトサンやポリ-L-リジンのようなポリカチオンは、Caco-2 細胞単層において、

TEER を減少させるが、洗浄除去することによって 24 時間以内に完全に TEER が元のレベルに回復することが示された [34,35]。本章において、0.05 mg/ml ポリ-L-アルギニンの apical 側適用 30 分後の FD-4 の透過性の増加と TEER の減少が 120 分以内に完全に元の状態に回復した。これに一致して、ZO-1、occludin、E-cadherin は、30分で細胞内に分散していたが、120分で大部分が細胞間隙部位に再局在したことから、低濃度のポリ-L-アルギニンは、本実験条件下 (120 分) では可逆的な促進効果を示すことが示唆された。一方、予備的検討において、ポリ-L-アルギニンを 30 分間適用後、ポリ-L-アルギニンを洗浄除去すると、0.5 mg/ml のポリ-L-アルギニンにおいては、80%まで TEER の回復が見られたが、5 mg/ml のポリ-L-アルギニンでは試験時間以内で回復しなかった。これはポリ-L-アルギニンが鼻粘膜表面のアニオン性分子とのイオンの相互作用による吸着を示し、洗浄除去しきれなかったものと推察される。また、本実験条件下では、ポリ-L-アルギニンの酵素的分解を最小限度に抑えるために、透過実験を行う前にフレッシュなリンゲル液に入れ換えている。このためポリ-L-アルギニンの作用が持続したものと考えられた。以前の検討において、Natsume らは、*in vitro* にて 5 mg/ml のポリ-L-アルギニンが膜成分の漏出を引き起こすような細胞障害性を示さなかったことを報告している [22]。加えて、Miyamoto らは、*in vivo* にてポリ-L-アルギニン (20 mg/ml) を鼻腔内投与後のラット鼻粘膜において、組織病理学的変化がほとんどないことも報告している [25] 更に、FD-4 吸収に対する 10 mg/ml のポリ-L-アルギニンの促進効果が、一過的で、かつ可逆的であることを前編にて明らかにした。従って、ポリ-L-アルギニンもキトサンやポリ-L-リジンと同様に、TJ を可逆的に開口させ、水溶性高分子薬物の経粘膜吸収を促進すると思われる。

以上の結果より、ポリ-L-アルギニンは、細胞間隙の接着たん白質である ZO-1、occludin、E-cadherin を細胞内へ分散させることによって隣接する細胞

間の TJ 並びに AJ を開口する結果、細胞間隙経路を拡げ、水溶性高分子薬物の透過を促進すると結論づける。

## 第2章 ポリ-L-アルギニンの促進効果のキャラクタリゼーション

前章の結果から、ポリ-L-アルギニンは鼻粘膜の細胞-細胞接着を担うたん白質を細胞内に分散させることにより高分子薬物の細胞間隙輸送を促進することが明らかとなった。このポリ-L-アルギニンによる鼻粘膜を介した高分子薬物輸送に関わる最終的な出来事がどのような過程を経て起こるかは、これまで明らかにされていない。生理医学系の分野において、遅発性のアレルギーや慢性炎症に好酸球由来のポリカチオンである major basic protein (MBP) が深く関わっていたことから、その代替物としてポリ-L-アルギニンが研究された [47,48]。しかしながら、ポリ-L-アルギニンは MBP の代替物とはならないことがわかった [49]。このことは、ポリカチオンの立体的な構造によって生体膜に対する生理作用が異なっていることを示唆している。その後、いくつかの研究グループによって、ポリカチオンの生理的意義に関していくつか特徴付けられたが [50-53]、それらの生理作用と細胞間隙輸送の促進作用との間に関連があるという報告はなされていない。

これまで述べてきたように、ポリ-L-アルギニン、キトサンといったポリカチオンが非特異的なイオンの相互作用を出発点として、細胞間隙路の高分子薬物の輸送を促進したと考えられる。このイオンの相互作用は、赤血球膜で明らかにされたように膜表面あるいはその近傍の微小なイオンの環境を変化する可能性 [54,55] やその後、TJ や AJ の接着たん白質を細胞内に分散させるようなある種の特異的な膜たん白質と相互作用する可能性がある。また、細胞間接着たん白質と直接イオンの相互作用を起こす可能性もある。前者の場合、

細胞内の閾値に達したイオン分極の発火を間接的あるいは直接的に変化させる可能性を有する。このような変化は細胞内のいくつかのイベントに影響し、細胞間接着部に変化を与えるかもしれない。従ってこのような反応が起こるためには、細胞内のイオン勾配を形成するためのエネルギー代謝が作動しなければならない。一方、後者の場合、接着たん白質がポリカチオンと複合体を形成する可能性が高い。これは接着たん白質の物性を変化させるので、直接細胞間隙路の輸送を変化させる。従ってこのような変化が起こるためには細胞間隙部にポリカチオンが存在することが重要である。このようにポリ-L-アルギニンが高分子薬物の細胞間隙輸送の促進を導くプロセスを明らかにしていくためには、ポリ-L-アルギニンの透過促進に関わる特性を決定するのが重要であると考えられる。

本章では、ポリ-L-アルギニンの促進効果がどのような条件のときに起こるかを検討した。

## 第 1 節 ポリ-L-アルギニンの促進効果に対する部位特異性の検討

ポリ-L-アルギニンの促進効果に部位特異性があるかどうかを検討した。その結果を Fig. 20 及び Table 1 に示す。ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を FD-4 と共に apical 側に適用すると、apical から basolateral (A to B) 方向への FD-4 の輸送はコントロールよりも増加し (Fig. 20a)、FD-4 の透過係数は、4.78 倍増加した (Table 1)。また、TEER は初期値の 57% まで減少した (Table 1)。

一方、ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) と FD-4 (2.5 mg/ml) を basolateral 側に適用すると、B to A への FD-4 の輸送は全く促進されず、TEER 値も変化しなかった (Fig. 20b, Table 1)。また、ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を apical

側に適用し、FD-4 (2.5 mg/ml) を basolateral 側に適用すると、B to A の FD-4 の輸送は 3.16 倍促進され (Fig. 20c)、TEER が初期値の 64% まで減少した (Table 1)。これらの結果より、ポリ-L-アルギニンは、apical 側に適用した場合のみ、両方向のFD-4の細胞間隙を介した輸送を促進することが明らかとなった

一方、前編でも使用した STDHF に関しては、apical 側、あるいは basolateral 側に適用するといずれの場合も FD-4 の透過を促進し、TEER も減少したため、部位特異的作用は認められなかった (Table 1)。

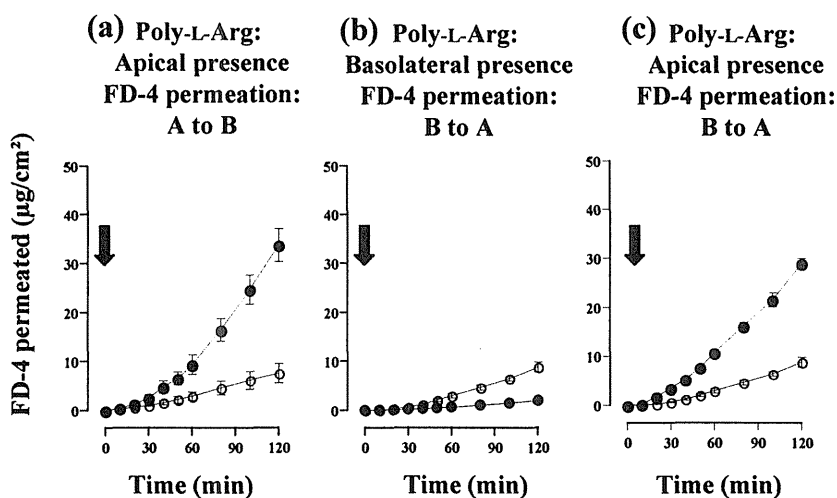


Fig.20 Effect of apical and basolateral application of poly-L-Arg on FD-4 permeation across the rabbit nasal epithelium. (○) control; (●) with 5 mg/ml poly-L-Arg. Closed arrow: apical application of poly-L-Arg and FD-4 (2.5 mg/ml). Data represent mean  $\pm$  S.E. (n=3-5).



**Table 1 Effect of apical or basolateral application of enhancers on Papp of FD-4 and TEER**

Direction of FD-4 transport	Papp (x 10 <sup>-7</sup> cm/s)	TEER (Ω · cm <sup>2</sup> )
<i>A to B direction</i>		
control (5)	5.67 ± 1.00	55.60 ± 1.17
apical 5 mg/ml poly-L-Arg (4)	27.13 ± 1.97* [478%]	31.42 ± 1.95* [57%]
apical 5 mg/ml STDHF (4)	27.74 ± 2.96* [489%]	18.37 ± 4.39* [33%]
<i>B to A direction</i>		
control (5)	6.34 ± 0.72	56.93 ± 5.83
basolateral 5 mg/ml poly-L-Arg (5)	3.41 ± 0.83* [54%]	60.45 ± 8.42 [106%]
apical 5 mg/ml poly-L-Arg (3)	20.05 ± 1.27* [316%]	36.52 ± 5.16* [64%]
basolateral 5 mg/ml STDHF (4)	32.14 ± 3.63* [507%]	25.23 ± 3.11* [44%]

A ; apical side, B ; basolateral side

Papp and average TEER were calculated from 50 min to 120 min.

\*:  $P < 0.05$  v.s. control, ( ): n, [ ]: ratio to control, Data represent the mean ± S.E.

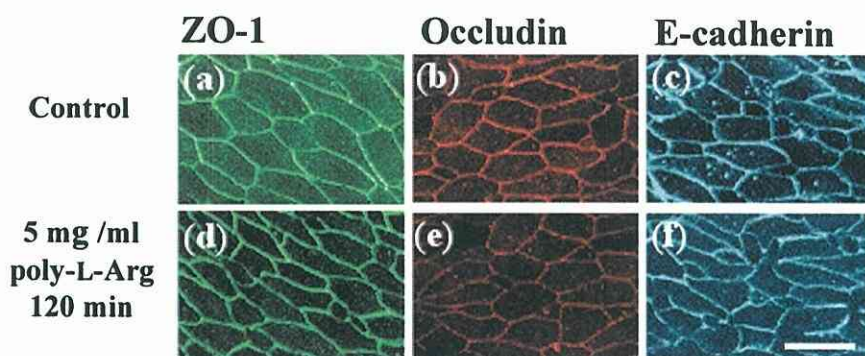


Fig.21 Immunofluorescent localization of ZO-1 (a,d), occludin (b,e) and E-cadherin (c,f) in rabbit nasal epithelium after treatment with poly-L-Arg in basolateral side. Scale bar: 15 μm.

Fig. 21 に basolateral 側にポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を適用して 120

分経過後、前節同様、ZO-1、occludin 及び E-cadherin を抗体染色したときの CLSM 像を示す。これら全てのたん白質は、ポリ-L-アルギニンを用いた apical 側に適用したときとは異なり (Figs. 19m-o 参照)、control と同様に細胞-細胞連結部位に局在していた (Fig. 21)。この結果は、ポリ-L-アルギニンを basolateral 側に適用しても接着たん白質の分布を変化させるような作用を示さないことを示唆している。従って、ポリ-L-アルギニンは部位特異的な促進効果を示すと考えられた。ポリ-L-アルギニンの効果が basolateral 側で現れなかったことは、2 つの点で重要と思われる。一つは、ポリ-L-アルギニンが直接細胞間接着たん白質に作用していないことを強く支持したことである。前節で述べたようにポリ-L-アルギニンが直接接着たん白質に作用するためには、複合体を形成し物性変化を伴う必要がある。AJ よりも basolateral 側に位置する接着部にはデスモソームと Gap junction がある。これらは TJ に比べてはるかにバリアー機能が乏しいため [38-41]、basolateral 側へポリ-L-アルギニンを適用すると、少なくとも AJ までポリ-L-アルギニンが到達しやすいと考えられる。従って E-cadherin の分布を変化させるはずであるが、E-cadherin の分布は変化しなかった。

もう一つは、apical 側の粘膜上でのみ反応が起こる可能性を高くしたことである。Apical 側の粘膜上皮に存在するチャネルたん白質やトランスポーターへの作用、あるいはポリ-L-アルギニンの pinocytosis などが考えられる。加えて、イオンの相互作用による膜表面あるいは近傍のイオン環境の微小変化は basolateral 側に適用しても起こるため、この効果が直接的でないことも示唆される。また、ここには示さなかったが、ポリ-L-アルギニンを basolateral 側に適用したとき、PD と Isc のいずれもほとんど変化がみられなかったことから [55]、起電力を生じる  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase に対する膜の外側からの作用はないと考えられた。

このようにポリ-L-アルギニンの促進効果は、細胞内代謝エネルギーを利用し、細胞内の何らかのイベントを介して起こる可能性が高いと考えられた。

## 第 2 節 ポリ-L-アルギニンの促進効果に対する細胞内代謝の影響

前節にて、ポリ-L-アルギニンの促進効果が、細胞内イベントを介して起こることが推察されたため細胞内代謝の影響を調べた。鼻粘膜をあらかじめ、代謝阻害剤である 2,4-ジニトロフェノール (DNP) や  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 阻害剤であるウアバインで前処理した後、FD-4の透過実験を行った。その結果を Fig. 22 に示す。DNP (1 mM) あるいはウアバイン (1 mM) で 30 分間前処理すると、PD と Isc が完全に消失した。この鼻粘膜にポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を FD-4 (2.5 mg/ml) と共に apical 側に適用すると、FD-4 の透過は促進されず、 $P_{app}$  は control のそれとほぼ同じであった。一方、TEER は、それぞれ 14%、39% 減少した。これらの結果は、ポリ-L-アルギニンの促進効果が細胞内代謝(バイアビリティー)と関連していることを示している。また、ウアバインで前処理した鼻粘膜において、ポリ-L-アルギニンは、FD-4 の透過性を全く促進しなかったにもかかわらず、有意に TEER を減少させた。一つの推論として、ポリ-L-アルギニンが、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase を阻害した細胞において、能動的なイオン輸送 [56] や細胞容積調節機構 [57] に関係するような他の細胞内制御過程を誘発した結果、強制電流に対する以上の電位が生じ、みかけ上 TEER が減少したことが考えられた。

以上の結果を総合すると、ポリ-L-アルギニンは細胞活動が維持された状態で透過促進効果を現し、細胞内代謝回転を何らかの形で利用するイベントを介して細胞間接着部位のたん白質を細胞内へ分散させ、高分子薬物の細胞間隙透過性を促進したと考えられた。

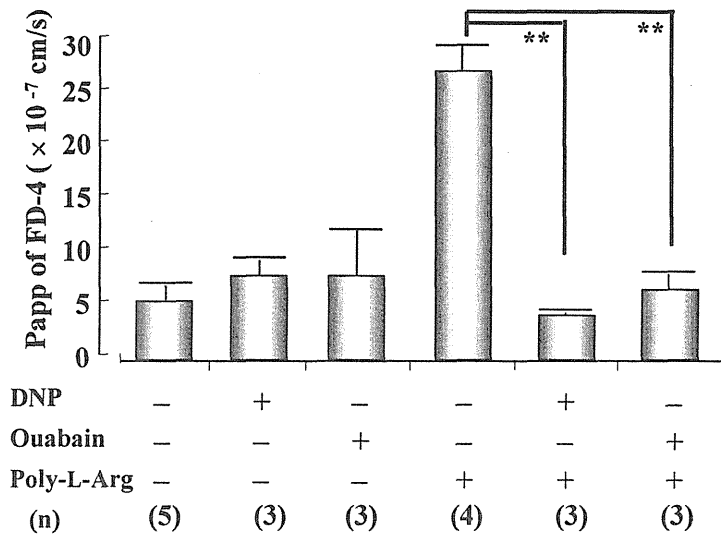


Fig.22 Effects of DNP (1mM) and ouabain (1mM) on increased FD-4 permeation induced by poly-L-Arg across rabbit nasal epithelium. There was a significant difference between the poly-L-Arg-induced increase in Papp of FD-4 pretreatment with and without metabolic inhibitors (Student *t*-test,  $**p < 0.001$ ). Data represent mean (n)  $\pm$  S.E.

### 第 3 節 本章の小括及び考察

本章では、ポリ-L-アルギニンの促進効果の特徴づけるために部位特異性と細胞内代謝能の影響に関して検討した。

ポリ-L-アルギニンは、apical 側に適用した場合のみ両方向 (A to B, B to A) の FD-4 の透過を促進し、basolateral 側に適用しても FD-4 の透過 (B to A) を促進せず、TEER も減少しなかった。更に、basolateral 側にポリ-L-アルギニンを適用しても、apical 側に適用したときにみられた ZO-1、occludin、

E-cadherin の細胞内への内在化がみられず、これら接着たん白質の分布には影響しなかった。また、ポリ-L-アルギニンの促進作用と細胞内イベントとの関連性を調査するために、細胞内代謝能を低下させた鼻粘膜にてポリ-L-アルギニンの促進効果を試験した。その結果、ポリ-L-アルギニンは DNP あるいはウアバインで前処理した鼻粘膜では FD-4 の透過性を促進しなかった。

これらの結果は、鼻粘膜上皮細胞におけるポリ-L-アルギニンの促進効果が、非特異的な膜表面のイオン環境の変化 [54,55] によって起こるものではなく、部位特異性を有することから、apical 膜上の特異的な分子とのイオンの相互作用によって起こると考えられた。更に、ポリ-L-アルギニンが直接、接着たん白質の物性を変化させる（例えば、イオンの相互作用による複合体形成）結果、これらたん白質を細胞内へ分散させるのではなく、細胞骨格たん白質（F-アクチン）の収縮、細胞間接着たん白質のリン酸化等のエネルギーに依存した細胞内イベントを介してこれらたん白質を細胞内へ内在化させると考えられた。

本研究による家兎鼻粘膜におけるポリ-L-アルギニンの部位特異的作用は、以前に MDCK 細胞単層と Caco-2 細胞単層にて報告されたポリ-L-リジンとキトサンが apical 側に適用した場合のみ TEER を減少した結果と一致した [33,45]。このように、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リジン、キトサンのようなポリカチオン性物質が共通の機構で細胞間隙透過性を促進するかどうかは明らかではないが、その物理化学的特性から apical 膜上の特異的なアニオン性分子とイオンの相互作用を起こすことが考えられる。これらポリカチオンのうち、哺乳動物の精巢中に多量に存在するポリカチオン性核たん白質であるプロタミン（アルギニン含量 70%）及びポリ-L-リジンが、腎糸球体上皮細胞単層や Caco-2 細胞単層において、apical 側でイオンの相互作用した後に、吸着介在性のエンドサイトーシス (adsorptive-mediated endocytosis) によって細胞内へ内在化した像が SEM 及び CLSM にて観察された [35,50]。これらポリカ

チオンの内在化は、4 °C [50]、あるいは細胞内代謝能を低下させた細胞 [35] では起こらなかったことから、この内在化過程に細胞内エネルギーが必要であることが推察された。更に興味深いことに、蛍光標識したポリ-L-リジンの Caco-2 細胞への内在化が分子量の大きいものほど、より効率的に細胞内へ取り込まれていることが示された [35]。これに反して、蛍光標識したキトサンは Caco-2 細胞表面のみに局在し、細胞内ではほとんど検出されなかった [33]。従って鼻粘膜におけるポリ-L-アルギニンの細胞間隙透過性の増加に対して、ポリ-L-アルギニンの内在化過程が必要であるかどうかを調べることが残されている。

生理医学系の分野において、気道過敏症や喘息患者の呼吸上皮は、不可逆的な損傷が病理所見として見受けられ、健常人と比較して多数の好酸球が浸潤していたことから、好酸球由来の MBP が気道上皮の損傷に深く関わっていると考えられた [47,48]。MBP は分子内に 1 個の酸性アミノ酸と 17 個のアルギニンを含む分子量 13.8 kDa のポリカチオン性たん白質である [47]。精製した MBP を培養家兎気道上皮細胞層に適用すると、粘膜損傷を伴って上皮透過性が亢進することが示された [48]。また、気道上皮における MBP の膜障害性を再現するために、多くの研究者によって MBP の代替物としてポリ-L-アルギニンが使用されたが、ポリ-L-アルギニンは MBP によって生じるような気道上皮の損傷を全く引き起こさず、上皮透過性を亢進させることが示された [49]。この違いは、両ポリカチオンの 2 次元あるいは 3 次元構造の違いによる細胞表層あるいは細胞内での安定性と、暴露時間に依存したサイトカイン放出等のシグナル経路が異なっていることが示唆され、これらポリカチオン間での高次構造の解析が必要であると思われた。最近、腎糸球体において、プロタミンが、ポドカリキシンと呼ばれるシアログリコプロテインとイオンの相互作用を起こした後に、糸球体の slit diaphragm と呼ばれる部位に高濃度に局在

する ZO-1 のアイソフォームたん白質を occluding-type junctions へと分布させることが報告された [53]。また様々な上皮において、カルシウムホメオスタシスに重要な役割を果たす  $\text{Ca}^{2+}$  感受性受容体 ( $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor) が膜上に局在することが報告され、カルシウムイオン、マグネシウムイオンとともにポリ-L-アルギニンが、そのリガンドとして働くことが示された [51]。また、培養した気道上皮の杯細胞において、ポリ-L-アルギニンは ATP 依存的なムチン分泌を抑制することが示された [52]。このように、ポリカチオンは上皮細胞に対して様々な生理作用を示すことが報告されたが、このような作用が細胞間隙輸送の促進作用との間に関連があるという報告はない。

鼻粘膜においてポリカチオンと特異的に相互作用する候補分子は今のところ同定されていないが、本実験により、ポリ-L-アルギニンを basolateral 側に適用した場合、PD と Isc が全く変動しなかったこと [55] や起電性の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase をウアバインで阻害した鼻粘膜では、ポリ-L-アルギニンの促進効果が現れなかったことから、apical 側の膜のみに限局するイオンポンプ、イオンチャネル、イオントランスポーター等の膜機能性たん白質が、ポリカチオンと相互作用する候補として挙げられた。これら膜機能性たん白質は apical 膜あるいは basolateral 膜に選択的にソーティングされ、TJ のフェンス機能によって拡散が制御されているために、外界との物質および情報のやりとりを不断に行うことを可能にしている。従って、ポリ-L-アルギニンは、少なくとも basolateral 側に限局している  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase に対しては直接作用しないことが示唆された。以前に我々は、ポリ-L-アルギニンを apical 側に適用すると Isc と PD が一過的に増加し、その後の PD の低下に付随して TEER が低下することを見出している [55,58,59]。加えてこの Isc の一過的な増加は apical 側に限局するクロライドチャネルとカリウムチャネルの活性化に起因することを明らかにした [58,59]。これらチャネルの活性化は細胞容積の減少 [60,61]、あるいは

は細胞内カルシウムやプロテインキナーゼ C (PKC) 等のシグナリング分子等の関与が推測される [62]。従って、これらチャネルの活性化とポリ-L-アルギニンの鼻粘膜透過促進との関連性を更に詳細に検討することが残されている。このように鼻粘膜上皮の apical 膜上において、ポリ-L-アルギニンと特異的に相互作用する特定の分子を同定するためには、更なる検討が必要であると思われる。

以上、ポリ-L-アルギニンが家兔摘出鼻粘膜において、細胞間隙透過性を促進するには、まず apical 側の構成成分である脂質、たん白質、多糖類と相互作用することが必要であり、その後の細胞内イベントを介して起こる接着たん白質の分散には、細胞内のエネルギー代謝が必要であると結論づける。

### 第 3 章 ポリ-L-アルギニンの細胞内イベントに与える影響

*In vitro* におけるこれまでの検討結果からポリ-L-アルギニンは、鼻上皮細胞の apical 膜の構成成分に作用し、エネルギーに依存した細胞内イベントを介して粘膜上皮層の細胞間隙透過性を優先的に促進することがわかった。ポリ-L-アルギニンが細胞内イベントを介して細胞間隙の透過性を増加する機構を検討するためには、上皮細胞間隙の TJ や AJ の構造的特徴や機能制御機構を理解することは重要である。

TJ は上皮細胞層の細胞接着複合体の中で最も apical 側で隣接する細胞間接着装置の一部であり [38-41]、TJ を構成する接着分子は膜貫通型たん白質、裏打ちたん白質並びに細胞骨格たん白質であるアクチンフィラメント (F-アクチン) から成る。Occludin は、claudin や JAM と共に膜貫通型たん白質に分類され、上皮バリアー能の役割を担うたん白質の一つであると考えられている [38]。ZO-1 は、ZO-2 や ZO-3 と共に



occludin や claudin の裏打ちたん白質に分類され、膜貫通型たん白質の細胞-細胞連結部位の局在性を安定化するだけでなく [38]、様々な刺激に応じて自身がシグナリング分子として働くことも想定されている [39,40]。また、ZO-1 は細胞骨格たん白質である F-アクチンと結合するサイトも有している [41]。

TJ の発生と維持は、cAMP、PKC、G-protein、ホスホリパーゼ C、ジアシルグリセロール等、様々なシグナリング分子によって調節されていることが報告されている [63-66]。特にカルシウムはシグナリング分子による調節に深く関わっており、また TJ の形成過程に必須であり細胞接着複合体の機能維持に対して中心的な役割を果たすことが知られている [38-41]。従ってポリ-L-アルギニンによって誘発される細胞内イベントにカルシウムが関係する可能性が高い。

更に TJ 接着たん白質の中で ZO-1 と occludin は、両者とも phosphoproteins であることが特徴づけられ [67-69]、上述したシグナリング分子に加えて、細胞内セリン/スレオニンキナーゼ [38-41]、チロシンキナーゼ [38-41]、マイトジェン活性化キナーゼ (MEK) [70] やイノシトール-3-リン酸キナーゼ (PI3K) [71] あるいは Rho キナーゼ [72] によってこれらたん白質がリン酸化される場合や細胞内セリン/スレオニンホスファターゼ [73] やチロシンホスファターゼ [74] によってこれらたん白質が脱リン酸化されることによって細胞内分布が変化することが報告された。従って、ポリ-L-アルギニンによって TJ の接着たん白質が細胞内に分散する過程においてリン酸の脱着が関与することが考えられる。

そこで本章では、ポリ-L-アルギニンがカルシウム依存的な機構、あるいは細胞内たん白質のリン酸化・脱リン酸化機構と関連して細胞間隙透過性を促進しているかどうかを評価した。

## 第 1 節 ポリ-L-アルギニンの促進効果に及ぼすカルシウムの影響

前述したように細胞間隙の透過性は TJ とその直下の AJ によって制限されており、これらを構成する接着たん白質は様々な細胞内シグナリング分子や化学物質によって、その発現や細胞内分布が変化することが知られている [38-41]。中でも細胞内カルシウムの動員を引き起こすカルシウムイオノフォアール [38,75] やオレイン酸塩 [76] やカプリン酸塩 [77] は、最終的に細胞骨格を形成するアクチンフィラメントを収縮させることによって、これら接着たん白質を細胞内へエンドサイトーシスさせる機構に関与することが提唱されている。そこで本節では、ポリ-L-アルギニンがカルシウム依存的な機構に関連して細胞間隙透過性を促進しているかどうかを評価した。

### 第 1 項 細胞内カルシウム動員系とポリ-L-アルギニンの促進効果との関連性

ポリ-L-アルギニンの促進効果と細胞内カルシウムの動員との関係を見積もるために以下のようなプロトコールにより透過実験を行った。FD-4 (2.5 mg/ml) のみを apical 側に適用し 90 分後、阻害剤を apical 側に加え、適当な時間 (45-90 分) 前処理した。その後、ポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を apical 側に適用した。

(15) 式に従って、FD-4 の透過係数  $P_{app}$  を算出した。阻害剤で前処理した場合やポリ-L-アルギニンの適用によって FD-4 の  $P_{app}$  と  $Gt$  がどのくらい変動するかを見積もるために、(16)、(17) 式及び (18)、(19) 式により、それぞれ透過係数比、 $P_{app}$  ratio と膜コンダクタンス比、 $Gt$  ratio を算出した。

Fig. 23に細胞内カルシウム貯蔵部位における  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤である thapsigargin (1  $\mu$ M) [78] 存在下、及び非存在下における鼻粘膜を介する

$$P_{app} \text{ ratio} = \frac{\text{inhibitor-induced } P_{app}}{\text{Baseline } P_{app}} \dots (16)$$

$$P_{app} \text{ ratio} = \frac{\text{poly-L-Arg-induced } P_{app}}{\text{Baseline } P_{app}} \dots (17)$$

$$Gt \text{ ratio} = \frac{\text{inhibitor-induced } Gt}{\text{Baseline } Gt} \dots (18)$$

$$Gt \text{ ratio} = \frac{\text{poly-L-Arg-induced } Gt}{\text{Baseline } Gt} \dots (19)$$

FD-4 透過性と TEER に対するポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) の影響を示す。

ポリ-L-アルギニンの適用によって増加した FD-4 の透過性 (Fig. 23a,●) と、減少した TEER (Fig. 23a,○) は、thapsigargin で鼻粘膜を前処理すると、TEER がわずかに上昇し、それに伴って、FD-4 の透過も低下した。しかし、その後、ポリ-L-アルギニンを適用すると、FD-4 の透過は増加し (Fig. 23b,●)、TEER も減少した (Fig. 23b,○)。この時の FD-4 の透過促進比と膜コンダクタンス比は、それぞれ 2.5 倍及び 2 倍に増加した (Figs. 24a,b 参照)。これらの結果は、ポリ-L-アルギニンの促進効果が  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤である thapsigargin で処理しても抑制されないことを示している。従って、ポリ-L-アルギニンの促進効果に細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウムの放出は関与していないと考えられた。

次にポリ-L-アルギニンの促進効果が細胞外からのカルシウム流入を介して起こっているかを調べた。

Fig. 24 にその結果を示す。受容体作動性カルシウムチャネルブロッカーである SK&F-96365 (100  $\mu$ M) [79] あるいは L-型電位依存性カルシウムチャネルブロッカーである nifedipine (50  $\mu$ M) [76] で処理した後、ポリ-L-アルギ

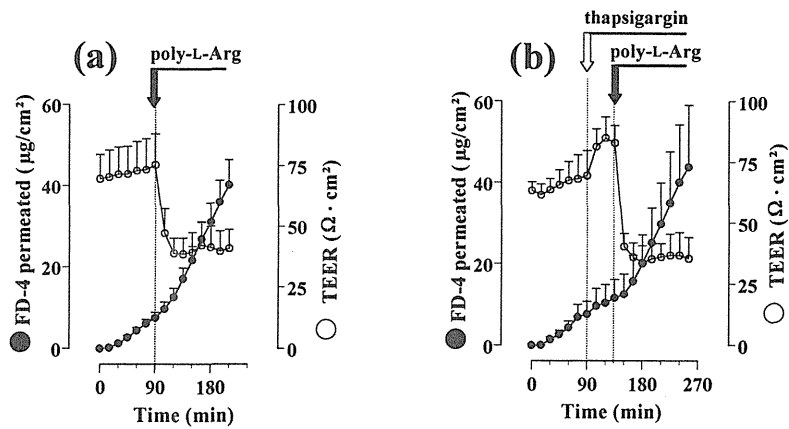


Fig.23 Effect of 0.2 mg/ml poly-L-Arg on FD-4 permeation and TEER in the presence (b) and absence (a) of 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin in the rabbit nasal epithelium.

Closed arrow; apical application of poly-L-Arg.  
 Open arrow; apical application of thapsigargin.  
 Data represent mean  $\pm$  S.E. (n=4).

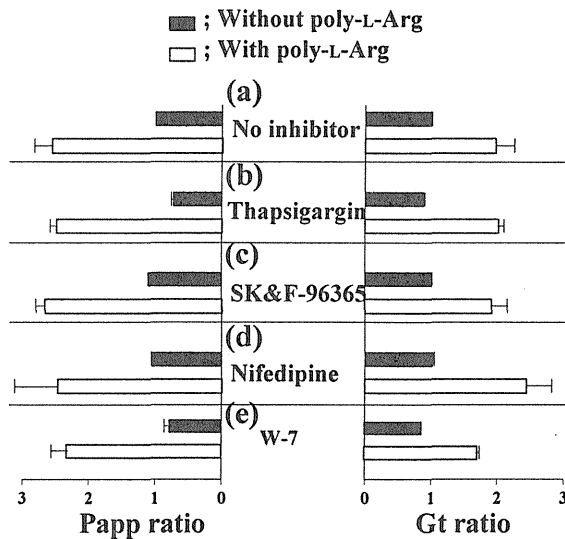


Fig.24 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization inhibitors and myosin light chain kinase inhibitor on Papp of FD-4 and Gt induced by poly-L-Arg in the rabbit nasal epithelium. Data represent mean  $\pm$  S.E. (n=4).

ニン (0.2 mg/ml) を apical 側に適用しても、FD-4 の透過と Gt は増加した (Figs. 24c,d,口)。これらの結果より、鼻粘膜の細胞外からのカルシウム流入をブロックした状態でもポリ-L-アルギニンの促進効果が生じることが示され、

少なくともこれらブロッカーに感受性のあるチャネルを介したカルシウム

の流入とポリ-L-アルギニンの促進効果には関連がないことが示唆された。ポリ-L-アルギニンの促進効果が、上述したようにカルシウムイオノフォアールやカプリン酸塩のように細胞内カルシウム動員の下流のシグナル、つまり動員されたカルシウムがカルモジュリンと複合体を形成し、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を活性化し、F-アクチンの収縮を導くことによって細胞間接着たん白質をエンドサイトーシスさせる機構 [38,77] と関連するかどうかを調べた。

鼻粘膜をカルモジュリンアンタゴニストであり、MLCK の阻害剤である W-7 (100  $\mu$ M) [38,80] で処理した後、ポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を適用した。ただし、W-7 は、単独でも高濃度では PD を著しく低下させることが知られているため [81]、W-7 の 50% 阻害濃度に近い 100  $\mu$ M の濃度で用いた。その時の FD-4 の鼻粘膜透過性と Gt の増加した割合を Fig. 24e に示す。

W-7 で処理した鼻粘膜においても、FD-4 の透過と Gt は、W-7 で処理し

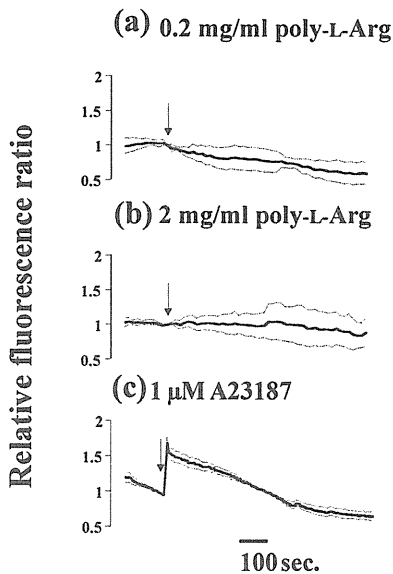


Fig. 25 Effect of A23187 and poly-L-Arg on  $[Ca^{2+}]_i$  response in the rabbit nasal epithelium. Arrows; application of poly-L-Arg or A23187. Data represent mean  $\pm$  S.E. (n=6).

ていない場合と同様に増加した (Fig. 24e)。従って、ポリ-L-アルギニンの促進効果は、MLCK の活性化を介したF-アクチンの収縮による機構と関連しないことが示唆された。

ポリ-L-アルギニンが他のカルシウム流入経路を介して、あるいは非特異的に何らかの要因により細胞内カルシウムイオンの増加を引き起こす可能性が考えられたので、カルシウム指示薬 (fluo-3) を鼻粘膜細胞に負荷した後、ポリ-L-アルギニンを適用し、CLSM にてカルシウム指示薬に由来する蛍光強度を経時的にモニターし、ポリ-L-アルギニンを鼻粘膜に適用する直前の蛍光強度に対する相対的蛍光強度比 (RFR) を算出した。なお、カルシウムイオノフォアである A23187 (1  $\mu$ M) をポジティブコントロールとして用いた。その結果を Fig. 25 に示す。

0.2 mg/ml のポリ-L-アルギニン添加では RFR の顕著な変化は認められず (Fig. 25a)。10 倍濃度のポリ-L-アルギニンの添加でも RFR に影響を及ぼさなかった (Fig. 25b)。一方、カルシウムイオノフォアである A23187 (1  $\mu$ M) では、一過的に RFR が増加した (Fig. 25c)。これらの結果は、ポリ-L-アルギニンを適用しても特定のカルシウム流入経路に加え、非特異的な何らかの要因による細胞内カルシウムイオンの増加を引き起こしていないことを示している。

以上の結果よりポリ-L-アルギニンは細胞内カルシウム動員と無関係に FD-4 の細胞間隙透過性を促進する可能性が高いと考えられた。

## 第 2 項 ポリ-L-アルギニンの促進効果に及ぼす細胞外カルシウムの影響

細胞外カルシウムは上述したように細胞間接着複合体の維持に必須であり [38-41]、*in vitro* 培養上皮細胞単層のメディアウム中のカルシウムを EDTA

によるキレート処理あるいは除去すると、これらの接着たん白質が細胞質中へ内在化することが知られている [38-41]。またキトサンやポリ-L-リジンが細胞外カルシウムを置換、あるいは除去することによってカルシウム要求性の接着たん白質を内在化することが推察された [35,82]。

そこで、ポリ-L-アルギニン

の促進効果と細胞外カルシウムとの関連性を調べるために apical 側及び basolateral 側のメディウム中のカルシウム濃度を通常 1.4 mM から 4.2 mM に増加させた後、ポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を適用した。その結果を Fig. 26 に示す。

Ussing chamber メディウム中のカルシウムを通常よりも 3 倍の濃度に変更した場合、電気生理学的パラメータはほとんど変動せず、FD-4 の鼻粘膜透過性にも影響を及ぼさなかった (Fig. 26b,■)。一方、ポリ-L-アルギニンを加えても、FD-4 の透過と Gt はやはり増加した (Fig. 26b,□)。この結果は、細胞外カルシウム、特に接着複合体の機能維持に関連するカルシウムに対して、ポリ-L-アルギニンは影響しないことを示している。この結果はまた、第 1 章で推察したポリ-L-アルギニンが接着複合体に直接作用しないという結果を支持している。

以上、第 1 及び 2 項の結果より、ポリ-L-アルギニンは、カルシウム非依存的な機構によって鼻粘膜の細胞間隙経路の透過を促進すると考えられた。

第 2 節 ポリ-L-アルギニンの促進効果に及ぼす種々キナーゼ・ホスファター

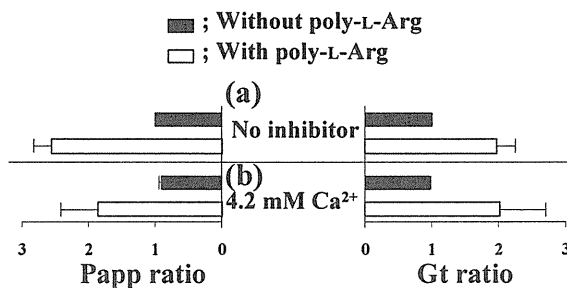


Fig.26 Effect of high concentration of Ca<sup>2+</sup> (4.2 mM) in both apical and basolateral bathing fluids on Papp of FD-4 and Gt induced by poly-L-Arg in the rabbit nasal epithelium. Data represent mean  $\pm$  S.E. (n=4).

## ゼの影響

TJ 接着たん白質の中で、ZO-1 と occludin の両たん白質は、共に、チロシン、セリン、スレオニン残基が豊富に存在する phosphoproteins であり、これらのリン酸化の程度によってその細胞内分布が制御されていることが報告されている [67-69]。両たん白質は、ポリ-L-アルギニンによっても細胞内へ分散し、DNP やウアバインによって細胞代謝能を低下させた鼻粘膜において、ポリ-L-アルギニンは細胞間隙の FD-4 の透過を促進しなかったことから、ポリ-L-アルギニンが細胞内のキナーゼ、あるいはホスファターゼの活性化に影響を及ぼしている可能性がある。

そこで本節では、ポリ-L-アルギニンの促進効果が、細胞内のキナーゼ、あるいはホスファターゼの活性化によって生じた結果であるかを検討するために細胞内のキナーゼ、またはホスファターゼを特異的に抑制する阻害剤を比較的高濃度で用いて、ポリ-L-アルギニンの促進効果が抑制されるかどうかを検討した。

Fig. 27 にポリ-L-アルギニンの促進効果に対する種々のキナーゼ、ホスファターゼの影響を示す。受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である genistein (30  $\mu$ M) [69,74] 及び非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である PP2 (50  $\mu$ M) [83] の前処理では、ポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) による促進効果を抑制しなかった。これらの結果は、ポリ-L-アルギニンの促進効果がチロシンキナーゼの活性化を介しているわけではないことを示唆している。同様にマイトジェン活性化キナーゼ (MEK) 阻害剤である PD98059 (50  $\mu$ M) [70] やイノシトール-3-リン酸キナーゼ (PI3K) 阻害剤である LY294002 (50  $\mu$ M) [71] によってもポリ-L-アルギニンの促進効果は抑制されなかった (Fig. 26)。これらの結果



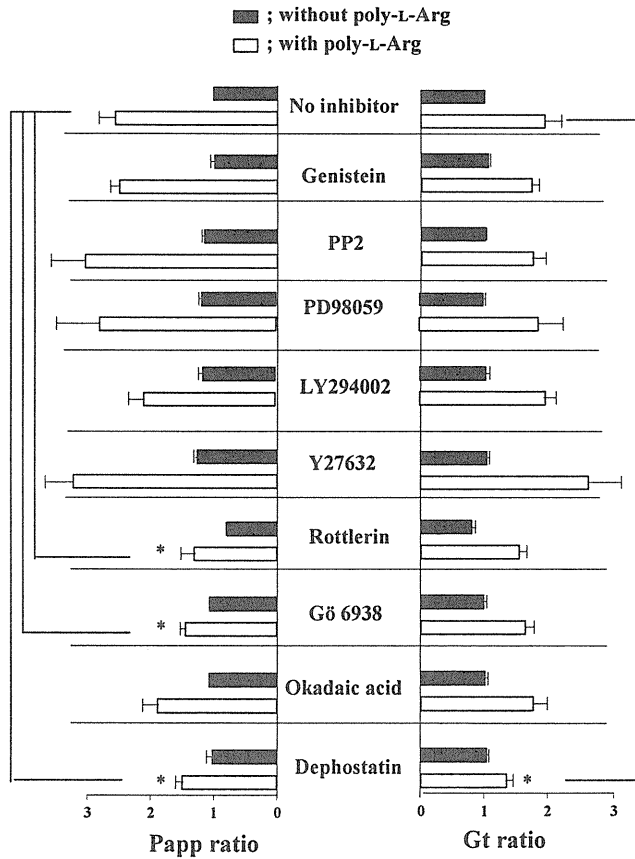


Fig.27 Effects of various kinase inhibitors on Papp of FD-4 and Gt induced by poly-L-Arg in the rabbit nasal epithelium. Data represent mean  $\pm$  S.E. (n=4).

は、ポリ-L-アルギニンの促進効果が MEK 及び PI3K のシグナル伝達経路を含むチロシンキナーゼカスケード [70,71] に関連していないことを示している。

Rho キナーゼの活性化は TJ の形成に重要な役割を示すことが示されており、この活性化は MLC ホスファターゼを抑制し、結果として MLCK を活性化することが知られている [72]。しかしながら、Rho 関連キナーゼ阻害剤である Y27632 を前処理した鼻粘膜においても、ポリ-L-アルギニンの促進効果

は抑制されなかった (Fig. 27)。

これに対して、セリン/スレオニンキナーゼ (特に PKC に対して選択性が高い) 阻害剤である rottlerin (100  $\mu$ M) [84] あるいは Gö6983 (10  $\mu$ M) [85] の前処理では、ポリ-L-アルギニンによって増加する FD-4 の透過性を有意に減少した ( $P < 0.05$ , vs no treatment)。また膜コンダクタンス比も有意ではなかったが、減少傾向にあった。よって、ポリ-L-アルギニンは、家兔摘出鼻粘膜においてこれら阻害剤に感受性のあるセリン/スレオニンキナーゼを活性化し、細胞接着たん白質のセリン/スレオニン残基をリン酸化する可能性が示唆された。さらに、ポリ-L-アルギニンによって増加する  $P_{app}$  比と Gt 比の両者は、セリン/スレオニンホスファターゼ阻害剤である okadaic acid (100 nM) [62,68] では抑制されなかったが、チロシンホスファターゼ阻害剤である dephostatin (50  $\mu$ M) [86] によって顕著に抑制された ( $P < 0.05$ , vs no treatment)。

以上の結果から、ポリ-L-アルギニンは、これら阻害剤に感受性のある細胞内のセリン/スレオニンキナーゼ (PKC) とチロシンホスファターゼの両方の活性化を引き起こす結果、FD-4 輸送を促進するものと考えられた。残念ながら、rottlerin または Gö 6983 と、dephostatin を同時に鼻粘膜に適用すると PD と TEER が著しく低下し、鼻粘膜上皮細胞のインテグリティーが維持できなかったため、両方を同時に評価することができなかった。

次にこれら阻害剤で前処理した鼻粘膜にポリ-L-アルギニンを適用したときの ZO-1 と occludin の分布を免疫蛍光法にて評価した。その結果を Fig. 28 及び Fig. 29 に示す。

セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤である rottlerin あるいは、Gö6983で前処理した鼻粘膜では、ZO-1、occludin の分布に影響を及ぼさず、これらたん白質は、コントロールと同様、細胞-細胞連結部位に連続的なバンドとして検出された (Figs. 28a,b,e,f,i,j)。これら阻害剤で処理した鼻粘膜にポリ-L-アルギニ

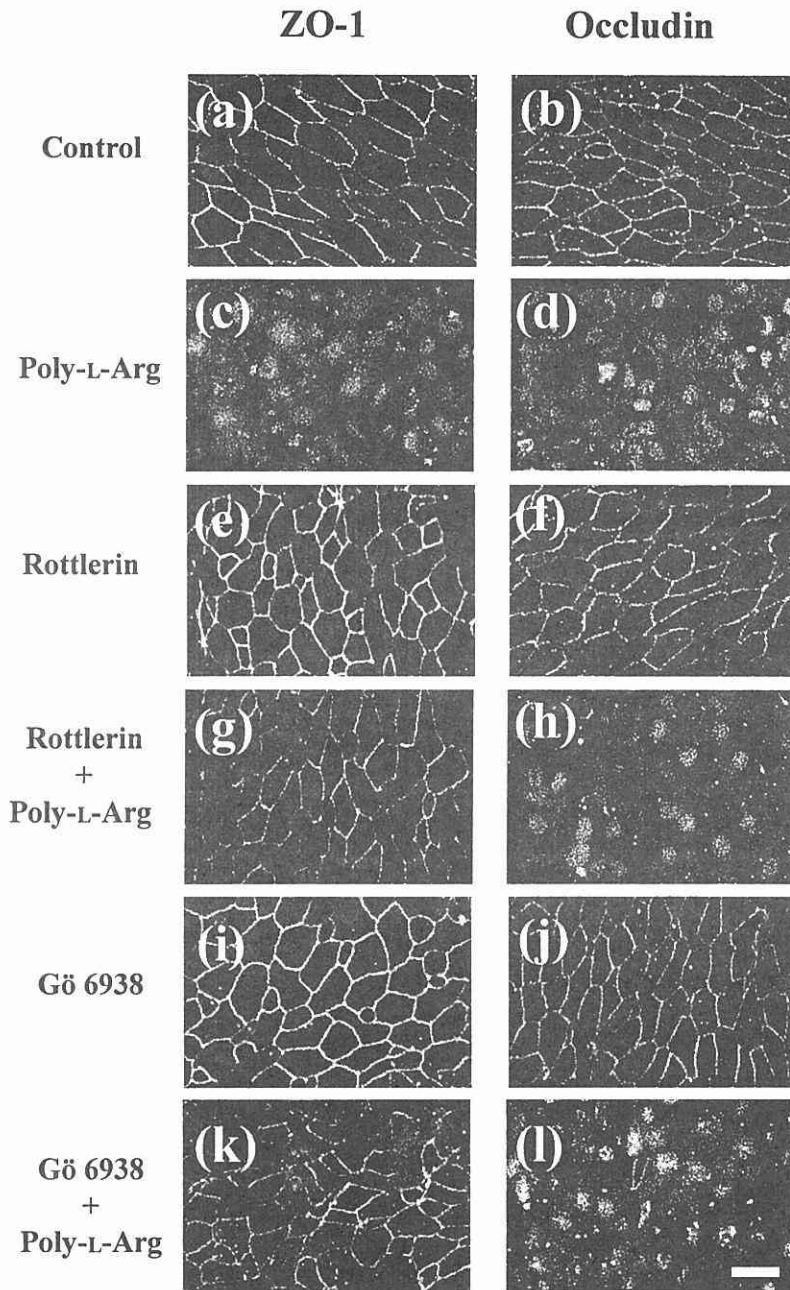


Fig.28 Effects of PKC inhibitors on poly-L-Arg-induced immunofluorescent localization of ZO-1 and occludin in the rabbit nasal epithelium.  
Scale bar: 15  $\mu$ m.

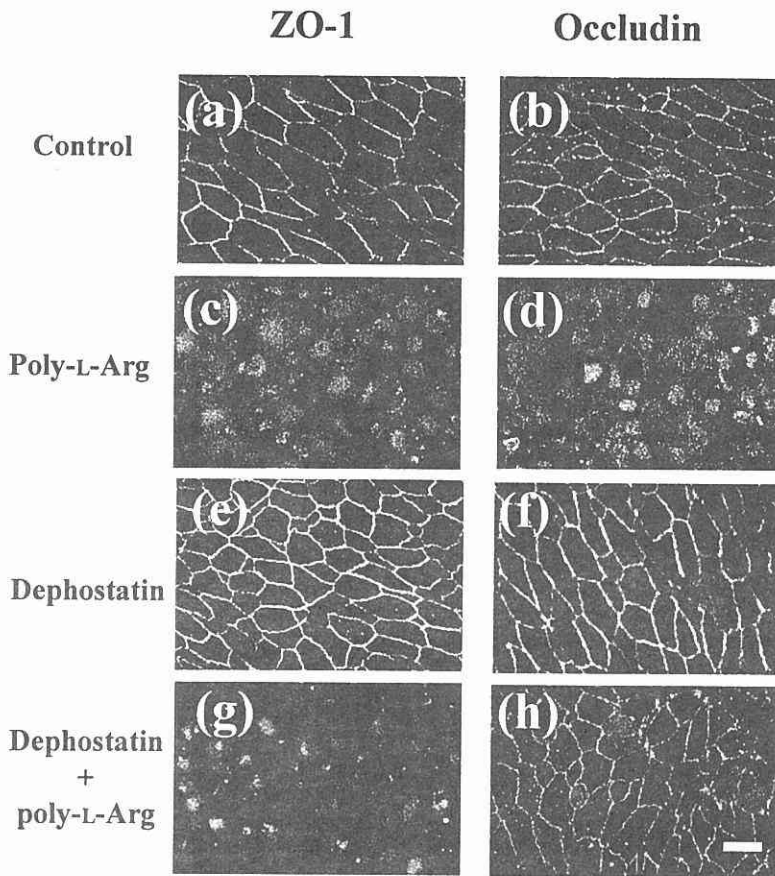


Fig.29 Effects of tyrosine phosphatase inhibitors on poly-L-Arg-induced immunofluorescent localization of ZO-1 and occludin in the rabbit nasal epithelium.

Scale bar: 15  $\mu$ m.

ン (0.2 mg/ml) を適用すると、阻害剤で処理していない鼻粘膜にポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を適用した場合と同様、occludin は細胞内へ分散した (Figs. 28d,h,l)。しかし、ZO-1 は大部分が細胞間隙部位に残存していた (Figs. 28c,g,k)。

これとは逆に、チロシン脱リン酸化阻害剤である dephostatin で処理した鼻

粘膜にポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を適用すると、ZO-1 は阻害剤で処理していない鼻粘膜にポリ-L-アルギニンを適用した場合と同様、細胞内へ分散したが (Figs. 29c, g)、大部分の occludin は細胞間隙部位に残存していた (Figs. 29d,h)。なお dephostatin を処理した鼻粘膜では、ZO-1、occludin の分布に影響を及ぼさず、コントロール同様、細胞-細胞連結部位に連続的なバンドとして検出された (Figs. 29a,b,e,f)。これらの結果は、ポリ-L-アルギニンが rottlerin や Gö6983 に感受性のあるセリン/スレオニンキナーゼ (PKC) を活性化して ZO-1 を細胞内へ分散させる一方で、dephostatin に感受性のあるチロシンホスファターゼを活性化して、occludin を細胞内へ分散させているものと考えられた。すなわち、ZO-1 のセリン/スレオニン残基のリン酸化と occludin のチロシン脱リン酸化が、これらの酵素の活性化によって起ったものと推察された。

従って、ポリ-L-アルギニンは、鼻上皮細胞の apical 膜構成成分に作用し、カルシウム非依存的な細胞内イベントを介する機構によって、ZO-1 のセリン/スレオニン残基をリン酸化する一方で、occludin のチロシン残基を脱リン酸化し、これらたん白質を細胞内へ分散させる結果、TJ が開口し、細胞間隙路が拡がり水溶性高分子薬物の透過を促進すると結論づける。

### 第 3 節 本章の小括並びに考察

本章では、ポリ-L-アルギニンの吸収促進効果が TJ の assembly と disassembly の制御に重要な役割を果たすカルシウム依存的なシグナルに関連しているかどうか、更に、TJ たん白質のリン酸化及び脱リン酸化を生じさせるようなシグナルに関連しているかどうかを検討した。

家兔摘出鼻粘膜において、ポリ-L-アルギニンによる FD-4 の促進効果は細

胞内カルシウム動員経路を阻害しても起こり、鼻粘膜にポリ-L-アルギニンを適用しても細胞内カルシウムレベルは変化しなかった。またカルシウム動員によって起こる F-アクチンの収縮を抑制する阻害剤で処理してもポリ-L-アルギニンの促進効果に影響を及ぼさなかった。これらの結果より、ポリ-L-アルギニンの促進効果に細胞内カルシウム動員系は関与しないと考えられた。

ポリ-L-アルギニンと類似した物理化学的特性を示すポリ-L-リジンやキトサンの促進効果が細胞外カルシウムの置換、あるいは消失によってカルシウム要求性の接着たん白質（おそらく E-cadherin）を細胞内へ分散されることが推察された [35,82]。そこで、ポリ-L-アルギニンの促進効果と細胞外カルシウムとの関連性を調べるために apical 側及び basolateral 側のメディウム中のカルシウム濃度を通常よりも高くしたが、ポリ-L-アルギニンの促進効果に影響しなかった。予備的検討において、メディウム中のカルシウムをフリーにした場合、Gt と FD-4 の透過性は増加した。また前章にてポリ-L-アルギニンを basolateral 側に適用した場合に E-cadherin の分布が変化しなかった。従って、ポリ-L-アルギニンの促進機構は、カルシウム要求性の接着たん白質、特に AJ からのカルシウムの置換あるいは除去によるものではないと考えられた。加えて、AJ たん白質の分散に引き続いて起こる TJ たん白質の分散による機構 [41] も否定されると思われる。

最近、PKC アイソフォームである PKC $\lambda$  あるいは PKC $\zeta$  (atypical PKC) が MDCK 細胞単層の細胞間隙部位に局限し [87]、TJ 裏打ちたん白質である ZO-2 や PAR 3、PAR 6 等の partitioning-defective たん白質と結合することが報告された [88]。これら PKC アイソフォームはカルシウム非依存的に活性化されることが知られており、TJ の発生や極性維持に影響を及ぼすと考えられている。一方、ポリ-L-アルギニンは様々な細胞種においてセリン/スレオニンキナーゼであるカゼインキナーゼや PKC、polycation-stimulated

phosphatase を活性化することが報告されている [89-91]。TJ 接着たん白質の中で ZO-1 と occludin は、両者とも phosphoproteins であることが示され [67-69]、様々なシグナリング分子によってその細胞内分布が制御されていることが知られている [63-66]。従って、ポリ-L-アルギニンの促進効果が、細胞内のキナーゼあるいはホスファターゼの活性化を引き起こす結果、これら接着たん白質を細胞内へ分散させる可能性が考えられた。そこで種々キナーゼ、ホスファターゼ阻害剤にて鼻粘膜を処理した後のポリ-L-アルギニンの促進効果を調べた。その結果、セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤とチロシンホスファターゼ阻害剤で処理した鼻粘膜において、ポリ-L-アルギニンの促進効果が顕著に低下した。従ってポリ-L-アルギニンは、細胞内でこれら阻害剤に感受性のあるセリン/スレオニンキナーゼあるいは、チロシンホスファターゼの活性化を引き起こすことが推察された。更にこれら阻害剤を前処理した鼻粘膜にポリ-L-アルギニンを適用したときの ZO-1 と occludin の分布は、セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤で処理した鼻粘膜では occludin は細胞内へ分散するが、ZO-1 は細胞-細胞連結部位に残存しており、チロシンホスファターゼ阻害剤で処理した鼻粘膜では、ZO-1 は細胞内へ分散したが、occludin は細胞-細胞連結部位に残存していた。

ZO-1 は PKC 活性化剤であるホルボールエステルによって細胞内へ分散するが [92]、TJ 発生過程における ZO-1 の TJ 方向へのソーティングの際にも PKC の活性化が必要とされている [38-40]。Occludin は分子内のリン酸化レベルが高い場合に細胞-細胞連結部位に分布し [68]、メディアム中のカルシウムの除去、あるいは細胞内 ATP レベルの低下によって分子内のリン酸化レベルが低くなり、細胞質中へ分布することが示された [68,69]。最近では、これら接着たん白質のリン酸化/脱リン酸化による membrane trafficking 機構が分子レベルで明らかにされつつある [93]。従ってポリ-L-アルギニンによ

って活性化されたセリン/スレオニンキナーゼやチロシンホスファターゼがそれぞれ ZO-1 と occludin のリン酸化・脱リン酸化レベルに影響を与えることは十分に考えられ、ポリ-L-アルギニンによって活性化される細胞内のセリン/スレオニンキナーゼとチロシンホスファターゼによって ZO-1 と occludin が細胞内へ分散することが強く示唆された。

これまでに報告されているポリカチオンによるキナーゼの活性化機構は、ポリカチオンが吸着介在性エンドサトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内で直接酵素に結合し、これらキナーゼの活性化部位をアロステリックに刺激する結果 [90,91]、あるいは細胞内でポリカチオンがキナーゼの基質を集合させる結果 [90] であると想定されている。従って、前章の考察に述べたように、ポリ-L-アルギニンの促進効果の発現に、ポリ-L-アルギニン自身の細胞内への内在化が必要かどうか、またポリ-L-アルギニンを適用した時の細胞内のキナーゼ、ホスファターゼの活性化の程度、加えて ZO-1、Occludin のリン酸化レベルを分子レベルで詳細に検討することが残されている。

以上、ポリ-L-アルギニンは鼻粘膜 apical 膜上の構成成分と相互作用し、自身の内在化あるいは、カルシウム非依存的なシグナリング分子の活性化を導くような細胞内イベントを介して、キナーゼやホスファターゼを特異的、あるいは非特異的に活性化させ、ZO-1 のセリン/スレオニン残基をリン酸化する一方で、occludin のチロシン残基を脱リン酸化し、これらたん白質を細胞-細胞連結部位から細胞内へ分散させる結果、TJ が開口し、細胞間隙路が拡がり水溶性高分子薬物の透過を促進すると結論づける。



## 結論

本研究では、これまでの研究結果を基に、*in vivo* におけるポリ-L-アルギニンの分子量に依存した促進効果の持続性に関して更に詳細に検討し、その主な要因を明らかにするとともに、ポリ-L-アルギニンがいかにして鼻からの水溶性高分子薬物の吸収を促進するかを *in vitro* にて解析し、以下の結論を得た。

(1) 鼻腔内に投与した FD-4 の吸収は、分子量 8.9 kDa の poly-L-Arg (10) 及び 42.4 kDa の poly-L-Arg (50) を併用すると、FD-4 を単独で投与した時よりも著しく増加するが、その後粘液中での酵素的な分解を主な要因として、活性なポリ-L-アルギニンが鼻腔内から徐々に減少し、その結果促進効果が減弱して、一過的な促進効果を生じたものと考えられた。従って、ポリ-L-アルギニンを再度、FD-4 と共に鼻腔内に投与すると、新たに加えられたポリ-L-アルギニンによって、同様の促進効果を示す、すなわち可逆的な効果を示したと思われた。

また、鼻腔内に投与したポリ-L-アルギニンが分子量依存的な効果を示したのは、ポリ-L-アルギニンの分子量依存的な粘液中の酵素的な分解が考えられ、分子量の大きいものほど鼻腔内で安定であったことによると推察された。このようにポリ-L-アルギニンは、一過的で、かつ可逆的な吸収促進効果を示し、その効果はポリアルギニンの種類を変えることによって調節が可能であると考えられた。このようなポリ-L-アルギニンの特性は、高分子薬物の経鼻送達の開発を進めるうえで非常に有用でありペプチド及びたん白質医薬品の薬力学に合わせた全身送達が可能であると考えられた。

(2) *In vitro* 家兔摘出鼻粘膜でのモデル水溶性高分子薬物 (FD-4) の鼻粘膜透過に及ぼすポリ-L-アルギニンの促進機構を電気生理学的手法並びに CLSM 観察により検討した結果、ポリ-L-アルギニンは適用濃度依存的に細胞間接着複合体である TJ 及び AJ の構成たん白質を細胞内へ分散させることによって鼻粘膜細胞間隙の FD-4 の透過性を優先的に高めることが明らかとなった。このような作用はポリ-L-アルギニンを basolateral 側に適用しても起こらず、apical 側に適用した場合のみ起こり、細胞内代謝が低下した鼻粘膜ではポリ-L-アルギニンの促進効果が認められないことから、ポリ-L-アルギニンの促進効果は部位特異性を示すこと、つまり粘膜上の何らかの構成成分であるリン脂質、たん白質、多糖類等に作用し、細胞内代謝に関連するような機構によって起こることが考えられた。そこでポリ-L-アルギニンの促進効果と細胞内イベントとの関連性を調査した結果、ポリ-L-アルギニンはカルシウム非依存的な機構によって細胞内のセリン/スレオニンキナーゼを活性化し、TJ の接着たん白質である ZO-1 のセリン/スレオニン残基をリン酸化することによって ZO-1 を細胞内へ分散させる一方で、細胞内のチロシンホスファターゼを活性化し、occludin のチロシン残基を脱リン酸化することによって、occludin を細胞内へ分散させる結果、細胞間隙路が拡がり、高分子薬物の透過を促進したと考えられた。

従ってポリ-L-アルギニンは、これまでの界面活性剤や胆汁酸塩とは異なり、鼻上皮細胞の生理的機能を利用した機構によって TJ 並びに AJ たん白質を細胞内に分散させ、隣接する細胞間の密着並びに接着結合を開口する結果、細胞間隙路が拡がり、水溶性高分子薬物の吸収を増加させる吸収促進剤であることが明らかとなった。

これらの知見は、臨床的にその利用が期待される生理活性ペプチドやホル

モン、ワクチン等のたん白質様水溶性高分子薬物の Transnasal delivery system の開発に有用な情報を提供するものと思われる。

## 謝辞

本研究に際し、素晴らしい研究テーマを与えていただくとともに終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 病院薬剤学講座教授 森本雍憲先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に多大なるご尽力をいただきました城西大学薬学部 薬物治療学講座講師 夏目秀視先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西大学薬学部 臨床薬物動態学講座教授 杉林堅次先生、城西大学薬学部 病院薬剤学講座講師 小林大介先生、城西大学薬学部 病院薬剤学講座助手 上田秀雄先生、城西大学大学院薬学研究科 助手 沼尻幸彦先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、有益なご助言並びにご激励を賜りました富山医科薬科大学 薬剤学研究室教授 細谷健一先生、北海道薬科大学 薬剤学研究室講師 関俊暢先生、日産化学工業株式会社 特許情報部長 宮本操博士、城西大学薬学部 病態解析学講座教授 小林順先生、城西大学薬学部 病態解析学講座講師 内田博之先生に深謝の意を表します。

実験の一部および資料の整理にご協力いただきました岩田聡子修士、佐藤いづみ修士、数野史修士、前野拓也学士にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

最後に研究室関連諸氏並びにこのご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できましたことを感謝いたします。

## 実験の部

# 実験の部

## 第 1 編

### 第 1 章

#### (1) 試薬

FD-4、ポリ-L-アルギニン塩酸塩 (分子量 8.9 kDa 及び 45.5 kDa)、トリプシン type II: [豚膵液より抽出、トリプシン活性 ( $\alpha$ -N-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステルを基質として):1,130 units/mg, pH 7.6] をシグマ-アルドリッチ (St Louis, MO, USA) より購入した。STDHF は、Leo Pharmaceuticals (Bullerup, Denmark) より分与された。フルオレサミン、塩酸 L-アルギニンを和光純薬工業 (大阪) より購入した。その他の試薬は、全て市販の特級品を使用した。

#### (2) 外科的処置

体重 240-260 g の雄性ウイスターラット (埼玉実験動物供給所、埼玉) の腹腔内にウレタン生理食塩液 (25 w/v %, 1 g/kg) を投与し麻酔した。Fig. 30 に示すようにラットを固定台に背位固定した後、Hirai らの方法 [94] に準じてラットに外科的処置を施した。まず正中線に沿って喉を切開し、気道を露出した気道を確保するために気管にポリエチレンチューブ (Hibiki No. 8) を挿管した。また Fig. 30 右のラット断面図のように

鼻腔から口腔への試験液の漏れを防ぐために食道に外径 2 mm、内径 1 mm のシリコンチューブ（先端は塞がれている）を挿管した。更に鼻腔から口腔に抜けている穴（鼻腔蓋管）にも試験液の漏出を防ぐため組織用接着剤にてシールした。この処置の後、ラットを実験に用いた。全ての実験は、城西大学の生命科学センターの動物使用マニュアルに従って行った。

### (3) *In vivo* FD-4 鼻腔内投与実験

ラットを外科的処置した後、生理食塩液に溶解させた FD-4 (16.5 mg/kg、200 mg/ml) と poly-L-Arg (10) (10 mg/ml) あるいは、poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) をポリエチレンチューブを連結させたマイクロシリンジにて右鼻腔内に共投与した (Fig. 30 参照)。

先行投与実験は、poly-L-Arg (10) (10 mg/ml)、poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) あるいは STDHF (5 mg/ml) を含有する生理食塩液 (25  $\mu$ l) をラット右鼻腔内に投与した。投与して一定の時間が経過した後、FD-4 生理食塩

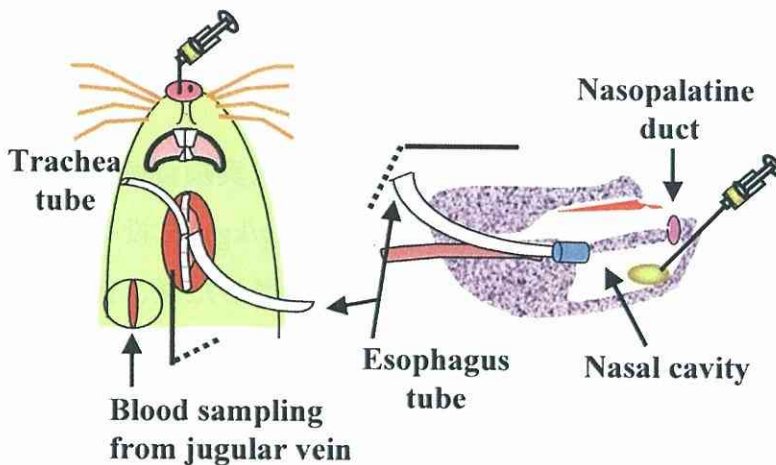


Fig. 30 Schematic representation of *in vivo* nasal absorption study in rats.

液 (16.5 mg/kg、200 mg/ml) を同鼻腔内に投与した。Poly-L-Arg (10)、poly-L-Arg (50) 及び STDHF と FD-4 の鼻腔内投与の時間間隔は、poly-L-Arg (10) の場合は、1 及び 4 時間とし、poly-L-Arg (50) の場合は、4、8、及び 12 時間とし、STDHF の場合は、1、4、及び 12 時間とした。

繰り返し投与実験は、poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) 及び STDHF (5 mg/ml) を含有する生理食塩液をラット右鼻腔内に投与し、一定時間経過後、poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) と FD-4 を含有した生理食塩液 (16.5 mg/kg、25 µl) を同鼻腔に同時投与した。時間間隔は、poly-L-Arg (50) の場合は、6、12、及び 24 時間とし、STDHF の場合は、1、4、及び 12 時間とした。

全ての実験において、経時的に血液 (0.15 ml) を右頸静脈より採血し、遠心 (4°C、18,000 × g、5 分間) することにより血漿を得た。

#### (4) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による鼻粘膜表面構造の観察

麻酔した雄性ウイスターラットを *in vivo* FD-4 鼻腔内投与実験と同様、外科的処置を施し、poly-L-Arg (10) (10 mg/ml)、poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) あるいは、STDHF (5 mg/ml) を含有する生理食塩液 (25 µl) を右鼻腔内に投与した。一定時間経過後、鼻中隔ごと取り出し、4°C で 5 時間 5% グルタルアルデヒド PBS 溶液 (pH 7.4) で組織を固定した。鼻中隔を種々濃度のエタノール (50, 70, 90, 100%, それぞれ 10 分づつインキュベート) で順次脱水した後、臨界点乾燥装置 (HCP-2、日立製作所、東京) で乾燥させた。鼻粘膜を Hitachi X-650 走査型電子顕微鏡 (Hitachi Ltd.) にて観察した。



## (5) ラット希釈粘液の調製

麻酔した雄性ウイスターラットを外科的処置の項と同様に処置した。ただし鼻粘液を得るため食道チューブの先端を塞がずに開放系で行った。

リンゲル液 [NaCl (150 mM)、 KCl (5 mM)、 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 mM)、 200  $\mu$ l, pH 7.6] を満たしたシリンジにポリエチレンチューブを連結させ食道中に挿入した。その後、リンゲル液をポリエチレンチューブを介して食道から鼻腔内に挿入した。30 分後、空気で満たしたシリンジにて両鼻腔内より希釈粘液 150  $\mu$ l を得た。この溶液を Fluid I とした。

より濃厚な鼻希釈粘液 (Fluid II) を得るために、1 匹のラットから得た Fluid I (150  $\mu$ l) に 50  $\mu$ l のリンゲル液を加え、この溶液を別のラットの鼻腔に注入した。30 分後、上述したように 150  $\mu$ l の溶液を得た。この溶液を Fluid II とした。Fluids I と II の蛋白含量は、ウシ血清アルブミンを標準として、それぞれ  $0.593 \pm 0.0465$  mg /150  $\mu$ l、 $1.275 \pm 0.0794$  mg/150  $\mu$ l であった。

## (6) ポリ-L-アルギニンの分解実験

ポリ-L-アルギニンの分解実験を Böhlen ら [95] の方法を利用して行った。Poly-L-Arg (10) (10 mg/ml) あるいは、poly-L-Arg (50) (10 mg/ml) を含有するリンゲル液 (25  $\mu$ l) に Fluid I あるいは、Fluid II (150  $\mu$ l) を加え、37 °Cでインキュベートした。経時的に 5  $\mu$ l をサンプリングし、1.5 ml の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.5)で希釈し、攪拌しながら 0.3 w/v% フルオレサミン含有 1,4-ジオキサン溶液 500  $\mu$ l を加え、37 °Cで 15 分間インキュベートした。分解したポリ-L-アルギニン-フルオレサミン生

成物と L-アルギニン-フルオレスカミン生成物由来の蛍光強度を蛍光分光光度計 (RF-5000、島津製作所、京都) にて励起波長 390 nm、蛍光波長 475 nm で測定した。この蛍光は、ポリ-L-アルギニンを含んでいない溶液から希釈粘液のバックグラウンドを差し引くことにより補正した。ポリ-L-アルギニンの分解率(% 残存率)を下記の 20 式により算出した。

$$\text{Degradation ratio} \quad (\% \text{ remaining}) = \frac{(\text{FI of L-Arg} - \text{FI of degraded poly-L-Arg})}{\text{FI of L-Arg}} \times 100 \quad \dots (20)$$

ここで FI of L-Arg は、アルギニンモノマー-フルオレスカミン生成物由来の蛍光強度であり、FI of degraded poly-L-Arg は、分解したポリ-L-アルギニン-フルオレスカミン生成物由来の蛍光強度である。

トリプシン (0.055 IU あるいは、1.1 IU) 溶液中での poly-L-Arg (10) あるいは、poly-L-Arg (50) の分解実験も同時に行った。トリプシンは、ペプチドの L-Arg の c-末端側を限定的に加水分解するため、モデルプロテアーゼとして使用した。

#### (7) FD-4 の定量

血漿をホウ砂リン酸緩衝液 (0.2 M, pH 8.5) で 100 倍希釈し、蛍光分光光度計 (RF-5000、島津製作所) にて励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nm で血漿中 FD-4 濃度を測定した。血漿データを非線形最小2乗法 (アルゴリズム ; Damping Gauss-Newton 法) により解析した。FD-4 の時間曲線下面積 (AUC<sub>0-9h</sub>) を台形公式から算出した。

#### (8) 統計処理

統計解析を Student's *t*-test にて実行した。 $p < 0.05$  を有意であると判定した。

## 第 2 編

### 第 1 章

#### (1) 試薬

FD-4、ポリ-L-アルギニン塩酸塩 分子量 42.4 kDa 及びヤギ血清は、シグマ-アルドリッチより購入した。マウス抗 ZO-1 モノクローナル抗体、マウス抗 occludin モノクローナル抗体を Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA) より購入した。ラット抗 E-cadherin モノクローナル抗体を TaKaRa Shuzo Co., Ltd (京都) より購入した。FITC-conjugated goat affinity purified antibody to IgG 及びローダミン-conjugated goat affinity purified antibody to IgG を ICN Biomedicals (Irvine, CA) より購入した。その他、全ての試薬は特級品を使用した。

#### (2) 家兔摘出鼻粘膜の調製

体重 2.5-3.0 kg の雄性日本白色種家兔（東京実験動物、東京）を、NIH の “Principles of Laboratory Animal Care” に従い [96]、炭酸ガス実験動物安楽死装置 (KN-750-1、夏目製作所、東京) にて徐々に二酸化炭素濃度を増加させ安楽死させた。鼻中隔を取り外し、鼻中隔左右の鼻粘膜（呼吸上皮）を丁寧に剥離した。余分な部位を取り除いた後、摘出した鼻粘

膜を注意深く有効透過面性  $0.5 \text{ cm}^2$  の組織用アダプターに装着し、これを Fig. 31 に示す Ussing chamber にセットした。鼻粘膜の生存性を維持させるために  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  で  $95\% \text{ O}_2 - 5\% \text{ CO}_2$  ガス気流下、pH の変動を防ぐために両サイドにバイカーボネートリンゲル液 (BRS) を  $4 \text{ ml}$  を満たした。BRS の組成は、 $\text{NaCl}$  ( $125 \text{ mM}$ )、 $\text{KCl}$  ( $5 \text{ mM}$ )、 $10 \text{ mM NaHCO}_3$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $1.2 \text{ mM}$ )、 $\text{CaCl}_2$  ( $1.4 \text{ mM}$ )、D-グルコース ( $11 \text{ mM}$ ) である。

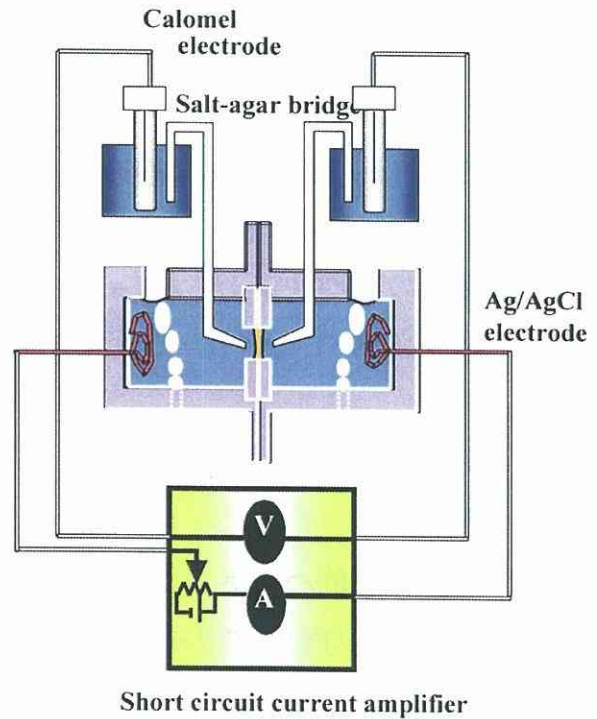


Fig. 31 Schematic representation of Ussing type diffusion chamber

### (3) 電気生理学的パラメータの測定

全ての実験を短絡電流測定装置 (CEZ-9100、日本光電、東京) を使用し、open-circuit 状態で行った。自発的膜電位 (PD) を、先端が組織の中央付近にセットした 2 対の塩橋 ( $\text{KCl}$   $4 \text{ M}$  中に  $3\%$  寒天を含む) を連結したカロメル電極にて測定した。短絡電流値 (Isc) は、それぞれのチャンバー内に  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  電極を挿入し、経時的に短時間 (約  $3 \text{ 秒間}$ ) 短絡状態に切り替えることで測定した。経上皮電気抵抗 (TEER) は、オームの法則に従い、(21) 式から算出した。

$$\text{TEER} = \frac{\text{PD}}{\text{Isc} \times A} \dots\dots\dots (21)$$

ここで A は、膜の有効透過面積 (0.5cm<sup>2</sup>) である。溶液抵抗 (< 100 Ω · cm<sup>2</sup>) を自動電位固定ユニットにて補正した。第 2 編で使用した家兔摘出鼻粘膜の平均 PD は、6.8 ± 0.8 mV、Isc は、121 ± 17 μA / cm<sup>2</sup>、TEER は、56.6 ± 5.9 Ω · cm<sup>2</sup> (n=204) であった。

#### (4) FD-4 透過実験

電気生理学的パラメータ (PD、Isc そして TEER) が定常状態に達した後 (120 分以内)、ポリ-L-アルギニンの酵素的分解を最小限にするために apical 側と basolateral 側の BRS をフレッシュな BRS に交換した。なお液交換による電気生理学的パラメータの変化がないことを確認した。FD-4 透過実験は、apical 側の BRS を FD-4 (最終濃度 2.5 mg/ml)、ポリ-L-アルギニン (最終濃度 0.05-5 mg/ml) を含む BRS (pH 7.2-7.5) に交換することにより開始した。Basolateral 側から経時的に 120 分まで 1 ml をサンプリングした。

#### (5) FD-4 の定量

サンプル 100 μl をハウ砂・リン酸緩衝液 (0.2 M, pH 8.5) で 50 倍希釈した。FD-4 の蛍光を前編と同様の方法にて測定した。

#### (6) FD-4 の輸送経路の観察

電気生理学的パラメータが安定した後、フレッシュなリンゲル液に交換した。Apical 側をポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) と FD-4 (2.5 mg/ml) を含有する BRS に交換し、120 分後、鼻粘膜を Ussing chamber から取り外し、リン酸緩衝液 [PBS、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (13 mM)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (87 mM)、NaCl (51mM)、pH 7.4] で洗浄した。その後、室温にてホルマリン (3.75%) PBS 溶液中で 8-10 時間固定し、組織を 1:1 のグリセリン PBS 溶液で満たしたスライドガラスとカバーガラスの間に挟み、鼻粘膜中の FD-4 の蛍光を前編と同様、CLSM にて観察した。共焦点イメージは、正立型顕微鏡 Zeiss Axioplan に油浸対物レンズ Zeiss Neofluar (63 倍、開口数 1.25、Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を装備した MRC-600 レーザーシヤープシステム (Bio-Rad Laboratories、Richmond、CA、USA) にて観察した。FD-4 の蛍光を 488 nm アルゴンレーザーにて励起し、全ての実験を 3 回づつ行った。

#### (7) TJ 接着たん白質と AJ 接着たん白質の分布

電気生理学的パラメータが安定した後、ポリ-L-アルギニン (0.05、0.5 及び 5 mg/ml) を apical 側に添加し、30 分及び 120 分後、鼻粘膜を Ussing chamber から取り外し、トリス緩衝液 (TBS、50 mM tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl) に  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) を含有する液 (TBS-Ca) にて 15 分間鼻粘膜を 3 回洗浄した。その後、鼻粘膜組織をホルマリン (3.75%)-TBS-Ca にて 10 分間室温で固定し、抗体の組織浸透性高めるために Triton X-100 (0.25%) を含有する TBS-Ca にて 50 分間室温にて処理した。組織をその後、50% ヤギ血清-TBS-Ca 溶液にて 30 分間ブロッキングした後、組織を一昼夜、4 °C にて各種一次抗体 (1:100 マウス抗-ZO-1

モノクローナル抗体、1:50 ラット抗-E-cadherin モノクローナル抗体、1:100 マウス抗-occludin モノクローナル抗体) を含有する 50% ヤギ血清-TBS-Ca 溶液をインキュベートした。TBS-Ca にて 15 分間、3 回洗浄後、組織を 2 時間室温にて 2 次抗体である 50 倍希釈した FITC-conjugated goat anti-mouse IgG あるいは、25 倍希釈した rhodamine-conjugated goat anti-rat IgG を含有する 50% ヤギ血清-TBS-Ca 溶液中でインキュベートした。蛍光標識した組織を細切 (4-5 mm<sup>2</sup>) し、スライドガラスとカバーガラスとの間に挟み、接着たん白質の分布を CLSM にて観察した。共焦点イメージは、MRC-600 レーザーシャープシステム (Bio-Rad Laboratories) を用い、2 次抗体の蛍光をアルゴン (488 nm) /クリプトン (568 nm) レーザーにて励起させた。画像は、0.2 μm ごとの深さの CLSM 像を 20 枚複合させたものを 1 枚の画像として表示した。全ての実験を 3 回ずつ行った。

#### (8) データ解析

FD-4 透過実験にて得られた結果より、みかけの透過係数 ( $P_{app}$ ) と TEER を算出した。0.05 mg/ml のポリ-L-アルギニンの場合、 $P_{app}$  と TEER の算出は、それぞれ 40 分から 70 分、20 分から 40 分の値から算出し、それ以外の実験は、50 分から 120 分の値から算出した。

#### (9) 統計処理

統計解析を Student's *t*-test にて実行した。 $p < 0.05$  を有意であると判定した。

## 第 2 章

### (1) 試薬

2,4-ジニトロフェノール (DNP) およびウアバインは、和光純薬工業 (大阪) から購入した。その他の試薬は、全て市販の特級品を用いた。

### (2) 家兔摘出鼻粘膜の調製

前章と同様の方法にて家兔摘出鼻粘膜の調製した。

### (3) 電気生理学的パラメータの測定

前章と同様の方法にて、電気生理学的パラメータを測定した。

### (4) ポリ-L-アルギニンの部位特異性の評価

ポリ-L-アルギニンの部位特異性を評価するために、前章と同様の方法により、家兔摘出鼻粘膜を Ussing chamber に装着し、電気生理学的に安定になった後、ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) あるいは、STDHF (5 mg/ml) と FD-4 (2.5 mg/ml) を basolateral 側に加えた。経時的に apical 側から 1 ml をサンプリングし、FD-4 の透過量を測定した。また、ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を apical 側に、FD-4 (2.5 mg/ml) を basolateral 側にそれぞれ加え、経時的に 1 ml をサンプリングした。



## (5) ポリ-L-アルギニンの促進効果に対する細胞内代謝能の影響

ポリ-L-アルギニンの作用に対する鼻粘膜の細胞内代謝能の影響を評価するために、前章同様、家兔摘出鼻粘膜を Ussing chamber に装着し、電気生理学的に安定になった後、輸送実験を開始する前に鼻粘膜を 30 分間、代謝阻害剤である DNP (1 mM) あるいは、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 阻害剤であるウアバイン (1 mM) を前処理した。DNP は、apical 側と basolateral 側の両方に適用し、ウアバインは、basolateral 側のみに適用した。この処理により、Isc は完全に消失し、TEER は、125% 増加した。フレッシュな BRS で 2 度鼻粘膜を洗浄した後、ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) あるいは、STDHF (5 mg/ml) と FD-4 (2.5 mg/ml) を apical 側に適用し、経時的に basolateral 側から 1 ml をサンプリングした。

## (6) FD-4 の定量

サンプル 100  $\mu\text{l}$  を前章と同様の方法にて測定した。

## (7) TJ 接着たん白質と AJ 接着たん白質の分布

電気生理学的パラメータが安定した後、ポリ-L-アルギニン (5 mg/ml) を basolateral 側に添加し、120 分後、鼻粘膜を Ussing chamber から取り外し、前章同様、CLSM にて ZO-1, occludin, E-cadherin の分布を観察した。

## (8) データ解析

部位特異性の実験にて得られた結果より FD-4 の Papp を 50 分から 120 分の値を用いて算出した。

## (9) 統計処理

統計解析を Student's *t*-test にて実行した。  $p < 0.05$  を有意であると判定した。

## 第 3 章

### (1) 試薬

SK&F-96365、thapsigargin、genistein、PP-2、W-7、PD98059、LY294002、Gö6983、rottlerin、okadaic acid 及び dephostatin は Calbiochem (San Diego, CA, USA) から購入した。Y27632 は Welfide (大阪) から分与された。Nifedipine、fluo 3-AM 及び A23187 は和光純薬工業 (大阪) から購入した。Y27632 は Welfide (大阪) から分与された。その他の試薬は、全て市販の特級品を用いた。

### (2) 家兔摘出鼻粘膜の調製

1 章と同様の方法にて家兔摘出鼻粘膜の調製した。

### (3) 電気生理学的パラメータの測定

1章と同様の方法にて、電気生理学的パラメータを測定した。

### (4) 阻害実験

1章同様、鼻粘膜を Ussing chamber に装着し、30分経過後、apical 側に FD-4（最終濃度 2.5 mg/ml）を加えた。90分後、阻害剤を apical 側に適用し、45-90分間インキュベートした。阻害剤として nifedipine (50 mM、45分間)、SK&F963654 (100  $\mu$ M、75分間)、thapsigargin (1  $\mu$ M、45分間)、genistein (30  $\mu$ M、75分間)、PP2 (50  $\mu$ M、45分間)、W-7 (100  $\mu$ M、90分間)、Y27632 (100  $\mu$ M、75分間)、PD98059 (50  $\mu$ M、75分間)、LY294002 (50  $\mu$ M、75分間)、Gö6983 (10  $\mu$ M、60分間)、rottlerin (100  $\mu$ M、60分間)、okadaic acid (0.1  $\mu$ M、60分間)、dephostatin (50  $\mu$ M、60分間)を使用した。その後、apical 側にポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を適用した (120分間)。Basolateral 側からは、常に 15分おきに 0.5 ml サンプルングした。

### (5) FD-4 の定量

サンプル 100  $\mu$ l を 1章と同様の方法にて測定した。

### (7) 細胞内カルシウムイオンの測定

家兎鼻中隔を取り出した後、片側の鼻粘膜を剥離し、もう片方の鼻粘

膜は鼻中隔から剥離せずに鼻中隔ごと細かく切り (4-5 mm<sup>2</sup>)、鼻粘膜の apical 側が上になるように直径 2 cm のペトリ皿と鼻中隔を組織用瞬間接着剤にて固定した。ペトリ皿に 37 °C の BRS (4 ml) で満たし、95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスでバブリングしながら 60 分間インキュベートした。その後、カルシウムフリーの BRS (-Ca<sup>2+</sup>) 液と入れ換え、カルシウム指示薬である fluo 3-AM (5 μM) を負荷して、37 °C で 60 分間インキュベートした。その後、サンプルを BRS で 2 回洗浄し、4 ml のリンゲル液を満したペトリ皿に入れた。CLSM システム (MRC-600 Lasersharp System, Bio-Rad Laboratories) を使い、488 nm のアルゴンレーザーにて鼻粘膜細胞に取り込まれているわずかなカルシウム指示薬に起因する蛍光を確認し、ペトリ皿にポリ-L-アルギニン (最終濃度 0.2 または 2 mg/ml) あるいは、カルシウムイオノフォアである A23187 (最終濃度 1 μM) を加えた。測定は 15 秒間隔で行い、画像をコンピューターに記録した。対物レンズには水浸対物レンズ (倍率 40 倍、開口数 0.8、Achromplan, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用した。得られた画像のカルシウム指示薬に起因する蛍光強度を Comos Software (Bio-Rad Laboratories) にて定量化し、相対的蛍光強度比 (RFR) を (22) 式よりで算出した。

$$RFR = \frac{(F - BG)}{(F_0 - BG)} \dots\dots\dots (22)$$

ここで、F<sub>0</sub> は、時間 0 の時の蛍光強度であり、F は、各時間での蛍光強度である。BG は、バックグラウンドの蛍光強度である。

(8) TJ 接着たん白質の分布

電気生理学的パラメータが安定した後、ポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を apical 側に添加し、120 分後、鼻粘膜を Ussing chamber から取り外し、前章同様、CLSM にて ZO-1, occludin の分布を観察した。加えて、阻害実験より得られた結果より、rottlerin (100  $\mu$ M、60 分間)、Gö6983 (10  $\mu$ M、60 分間)、dephostatin (50  $\mu$ M、60 分間) を鼻粘膜の apical 側に適用しインキュベートした。その後、ポリ-L-アルギニン (0.2 mg/ml) を apical 側に添加し、120 分後、鼻粘膜を Ussing chamber から取り外し、これらたん白質の分布を観察した。

#### (9) 統計処理

統計解析を Student's *t*-test にて実行した。 $p < 0.05$  を有意であると判定した。

## 参考論文

- [1] C. McMartin, L. E. F. Hutchinson, R. Hyde and G. E. Peters. *J. Pharm. Sci.* **76**: 535-540 (1987).
- [2] 阿久津 孝 修士論文 (1994)
- [3] 宮本 操 博士論文 (2001)
- [4] Y. W. Chien, K. S. Su, S. Chang. *Nasal Systemic Drug Delivery*. Marcel Dekker, New York (1989)
- [5] A. N. Fisher. *Chapter 3, Prog. Drug Metab.* **12**: 87-145 1990.
- [6] K. Hochestra Be, *Rhinology.* **21**: 217 (1983).
- [7] D. Proud, G. S. Bailey, R. M. Naclerio, C. J. Reynolds, A. A. Cruz, P. A. Eggleston, L. M. Lichtenstein and A. G. Togias. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **89**: 1098-1110 (1992).
- [8] K. Yamaoka, K. Masuda, H. Ogawa, K. Takagi, N. Umemoto and S. Yasuoka. *J. Biol. Chem.* **273**: 11895-11901 (1998).
- [9] K. Hosoya, H. Kubo, H. Natsume, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and S. Yamashita. *Biopharm. Drug Dispos.* **14**: 685-696 (1993).
- [10] K. Morimoto, H. Yamaguchi, Y. Iwakura, K. Morisaki, Y. Ohashi, Y. Nakai. *Pharm. Res.* **8**: 471-474 (1991).
- [11] M. D. Abd EI-Hameed, I. W. Kellaway. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* **44**: 53-60 (1997).
- [12] T. Yamamoto, Y. Maitani, T. Ando, K. Isawa, K. Takayama and T. Nagai. *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 866-870 (1998).
- [13] R. J. Soane, M. Frier, A. C. Perkins, N. S. Jones, S. S. Davis and L. Illum.

- Int. J. Pharm.* **178**: 55-65 (1999).
- [14] F. M. H. M. Merkus, N. G. M. Schipper, W. A. J. J. Hermens, V. S. G. Romeijn and J. C. Verhoef. *J. Control. Rel.* **24**: 201-208 (1993).
- [15] K. Hosoya, H. Kubo, H. Natsume, K. Sugibayashi and Y. Morimoto. *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 316-322 (1994).
- [16] E. Marttin, J. C. Verhoef, S. G. Romeijn and F. M. H. M. Merkus. *Pharm. Res.* **12** 1151-1157 (1995).
- [17] L. Illum, N. F. Farrai and S. S. Davis. *Pharm. Res.* **11**: 1186-1189 (1994).
- [18] P. Artursson, T. Lindmark, S. S. Davis and L. Illum. *Pharm. Res.* **11**: 1358-1361 (1994).
- [19] T. J. Aspen, L. Illum and Ø. Skaugrud. *Eur. J. Pharm.* **4**: 23-31 (1996).
- [20] N. G. M. Schipper, S. Olsson, J. A. Hoogstraate, A. G. de Boer and K. M. Varum. *Pharm. Res.* **19**: 998-1008 (1997).
- [21] A. M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith and L. Illum. *Pharm. Res.* **11**: 1186-1189 (2002).
- [22] H. Natsume, S. Iwata, K. Ohtake, M. Miyamoto, M. Yamaguchi, K. Hosoya, D. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto. *Int. J. Pharm.* **185**: 1-12 (1999).
- [23] 夏目 秀視, 堀 聖一, 築根 忠司, 岩田 聡子, 宮本 操, 杉林 堅次, 森本 雍憲. *Drug Delivery System* **14**: 21-25 (1999).
- [24] M. Miyamoto, H. Natsume, I. Sato, K. Ohtake, M. Yamaguchi, D. Kobayashi; K. Sugibayashi, Y. Morimoto. *Int. J. Pharm.* **226**: 127-138 (2001).
- [25] M. Miyamoto, H. Natsume, S. Iwata, K. Ohtake, M. Yamaguchi, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, M. Yamashina and Y. Morimoto. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 21-30 (2001).

- [26] K. Ohtake, H. Natsume, H. Ueda and Y. Morimoto. *J. Control. Rel.* **82**: 263-275 (2002).
- [27] K. Ohtake, T. Maeno, H. Ueda, H. Natsume and Y. Morimoto. *Pharm. Res.* **20**: 153-160 (2003).
- [28] K. Ohtake, T. Maeno, H. Ueda, H. Natsume and Y. Morimoto. *Pharm. Res. submitted*
- [29] K. Hosoya, H. Kubo, H. Natsume, K. Sugibayashi and Y. Morimoto. *Biol. Pharm. Bull.* **22**: 1089-1093 (1999).
- [30] E. Marttin, J. C. Verhoef, C. Cullander, S. G. Romeijin, J. F. Nagelkerke and F. M. Merkus. *Pharm. Res.* **14**: 631-637 (1997).
- [31] H. Natsume, K. Ohtake, D. Kobayashi and Y. Morimoto. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **27**: 814-815 (2000).
- [32] R. Larochele and B. Martineau-Doize. *Am. J. Anat.* **191**: 103-111 (1991).
- [33] N. G. M. Schipper, S. Olsson, J. A. Hoogstraate, A. G. de Boer and K. M. Varum. *Pharm. Res.* **14**: 923-929 (1997).
- [34] V. Dodane, M. A. Khan and J. R. Merwin. *Int. J. Pharm.* **182**: 21-32 (1999).
- [35] G. Ranaldi, I. Marigliano, I. Vespignani, G. Perozzi and Y. Sambuy. *J. Nutr. Biochem.* **13**: 157-167 (2002).
- [36] P. G. Adams, E. McClamrock and K. A. Foon. *New Engl. J. Med.* **312**: 443-444 (1985).
- [37] V. Bocci. *Cancer Drug Deliv.* **2**: 313-316 (1985).
- [38] S. T. Ballard, J. H. Hunter and A. E. Taylor. *Annu. Rev. Nutr.* **15**: 35-55 (1995).
- [39] B. M. Denker and S. K. Nigam. *Am. J. Physiol.* **274**: F1-F9 (1998).
- [40] M. Cereijido, J. Valdes, L. Shoshani and R. G. Contreras. *Annu. Rev. Physiol.*



- 60: 161-177 (1998).
- [41] J. L. Madara. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 143-159 (1998).
- [42] B. R. Stevenson, J. D. Siliciano, M. S. Mooseker and D. A. Goodenough. *J. Cell Biol.* **103**: 755-765 (1986).
- [43] M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita. *J. Cell Biol.* **123**: 1777-1788 (1993).
- [44] Y. Shirayoshi, A. Nose, K. Iwasaki, M. Takeichi. *Cell Struct. Funct.* **11**: 245-252 (1986).
- [45] G. T. A. McEwan, M. A. Jepson, B. H. Hirst and N. L. Simmons. *Biochem. Biophys. Acta.* **1148**: 51-60 (1993).
- [46] A. F. Kotze, H. L. Lueßen, B. J. Leeuw, A. G. de Boer, J. C. Verhoef and H. E. Junjinger. *Pharm. Res.* **14**: 1197-1202 (1997).
- [47] T. L. Masmoen, M. P. Bell, D. A. Loegering, G. J. Gleich, F. G. Prendergast and D. J. McKean. *J. Biol. Chem.* **263**: 12559-12563 (1986).
- [48] G. Gleich. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**: 422-436 (1990).
- [49] A. J. Coyle, W. Mitzner, C. G. Irvin. *J. Appl. Physiol.* **74**: 1761-1768 (1993).
- [50] M. Hammes and A. Singh. *J. Lab. Clin. Med.* **123**: 437-446 (1994).
- [51] L. Gama, L. M. Baxendale-Cox and C. E. Breitwiesser. *Am. J. Physiol.* **273**: C1168-C1175 (1997).
- [52] L. H. Ko, C. J. Lee, C. Y. Shin, M. Jo and K. C. Kim. *Am. J. Physiol.* **277**: L811-L815 (1999).
- [53] H. Kurihara. *Rinsho Byori* **48**: 491-497 (2000).
- [54] R. L. Mellgren. *Biochim. Biophys. Acta.* **1040**: 28-34 (1990).
- [55] 大竹 一男 修士論文 (1998).
- [56] M. Ropke, S. Carstens, M. Haklm and O. Frederiksen. *Am. J. Physiol.* **271**:

L637-L645 (1996).

- [57] M. A. Linshaw. *Am. J. Physiol.* **239**: F571-F577 (1980).
- [58] K. Ohtake, H. Natsume and Y. Morimoto. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **26**: 206-207 (1999).
- [59] 前野 拓也 修士論文 (2002).
- [60] E. K. Hoffmann. *Cell Physiol. Biochem.* **10**: 273-288 (2000).
- [61] T. van der Wijk, S. F. Tomassen, H. R. de Jonge and B. C. Tilly. *Cell Physiol. Biochem.* **10**: 289-296 (2000).
- [62] J. D. McCann and M. J. Welsh. *Ann. Rev. Physiol.* **52**: 115-135 (1990).
- [63] L. Gonzalez-Mariscal, B. Chavez de Ramirez and M. Cereijido. *J. Membr. Biol.* **86**: 113-125 (1985).
- [64] M. S. Balda, L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cereijido and J. M. Anderson. *J. Cell Biol.* **123**: 293-302 (1993).
- [65] R. O. Stuart and S. K. Nigam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6072-6076 (1995).
- [66] C. Saha, S. K. Nigam and B. M. Denker. *J. Biol. Chem.* **273**: 21629-21633 (1998).
- [67] K. L. Singer, B. R. Stevenson, P. L. Woo and G. L. Firestone. *J. Biol. Chem.* **269**: 16108-16115 (1994).
- [68] A. Sakakibara, M. Furuse, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka and S. Tsukita. *J. Cell Biol.* **137**: 1393-1401 (1997).
- [69] T. Tsukamoto and S. Nigam. *Am. J. Physiol.* **276**: F737-F750 (1999).
- [70] Y. Chen, G. Lu, E. E. Schneeberger and D. A. Goodenough. *Mol. Biol. Cell* **11**: 849-862 (2000).
- [71] P. L. Woo, D. Ching, Y. Guan and G. L. Firestone. *J. Biol. Chem.* **274**:

- 32818-32828 (1999).
- [72] S. V. Walsh, A. M. Hopkins, J. Chen, S. Narumiya, C. A. Parkos and A. Nusrat, *Gastroenterology* **121**: 566-579 (2001).
- [73] V. Nunbhakdi-Craig, T. Machleidt, E. Ogris, D. Bellotto, C. L. White and E. Sontag. *J. Cell Biol.* **158**: 967-978 (2002).
- [74] K. J. Atkinson and R. K. Rao. *Am. J. Physiol.* **280**: G1280-G1288562 (2001).
- [75] C. E. Palant, M. E. Duffey, B. K. Mookerjee, S. Ho and C. J. Bentzel. *Am. J. Physiol.* **245**: C203-C212 (1983).
- [76] L. Y. Wang, J. K. Ma, W. F. Pan, D. Toledo-Valasquez and Y. Rojanasakul. *Pharm. Res.* **11**: 513-517 (1994).
- [77] M. Tomita, M. Hayashi and S. Awazu. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**: 739-743 (1995).
- [78] R. O. Stuart, A. Sun, K. T. Bush and S. K. Nigam. *J. Biol. Chem.* **271**: 13636-13641 (1996).
- [79] J. E. Merritt, W. P. Armstrong, C. D. Benham, T. J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B. K. Leigh, S. A. McCarthy, K. E. Moores and T. J. Rink. *Biochem. J.* **271**: 515-522 (1990).
- [80] J. R. Turner, J. M. Angle, E. D. Black, J. L. Joyal, D. B. Sacks and J. L. Madara. *Am. J. Physiol.* **277**: C554-C562 (1999).
- [81] P. K. Rangachari, B. Donoff and D. McWade, *Biochem. Biophys. Acta.* **905**: 311-319 (1987).
- [82] D. A. Uchida, C. G. Ballowe and G. R. Cott. *Exp. Lung. Res.* **22**: 85-99 (1996).
- [83] M. C. Chen, T. E. Solomon, E. Perez Salazar, R. Kui, E. Rozengurt and A. H.

- Soll. *Am. J. Physiol.* **283**: G893-G899 (2002).
- [84] M. Gschwendt, H. J. Mueller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke and F. Marks. **199**: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93-98 (1994).
- [85] M. Gschwendt, S. Dieterich, J. Rennecke, W. Kittstein, H. J. Mueller and F. J. Johannes. *FEBS. Lett.* **392**: 77-80 (1996).
- [86] M. Imoto, H. Kakeya, T. Sawa, C. Hayashi, M. Hamada, T. Takeuchi and K. Umezawa. *J. Antibiot. (Tokyo)* **46**: 1342-1346 (1993).
- [87] V. Dodane and B. Kachar. *J. Membrane. Biol.* **149**: 199-209 (1996).
- [88] L. Gonzalez-Mariscal, A. Betanzos, P. Nava and B. E. Jaramillo. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**: 1-44 (2003).
- [89] E. Waelkens, J. Goris and W. Merlevede. *FEBS. Lett.* **192**: 317-320 (1985).
- [90] F. J. Moreno, C. G. Lechuga, M. Collado, M. J. Benitez and J. S. Jimenez. *Biochem. J.* **289**: 631-635 (1993).
- [91] P. S. Leventhal and P. J. Bertics. *J. Biol. Chem.* **268**: 3906-13913 (1993).
- [92] H. Clarke, A. P. Soler and J. M. Mullin. *J. Cell Sci.* **113**: 3187-3196 (2000).
- [93] A. Zahraoui, D. Louvard and T. Galli. *J. Cell Biol.* **151**: F31-F36 (2001).
- [94] S. Hirai and T. Mima. *Int. J. Pharm.* **9**: 165-172 (1981).
- [95] P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman and S Udenfriend. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**: 213-220 (1973).
- [96] Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *JAVMA.* **218**:669-696 (2001).

