

学位論文要旨

川島 亮

遺伝子組換えヒト成長ホルモン (rhGH) は自己注射製剤であり、痛みや投与操作の煩雑さ等により小児患者の QOL やアドヒアランスの低下を招き、治療効果にも大きく影響を及ぼす。本研究では rhGH の自己注射製剤の問題を回避するため、吸収制御型経鼻送達法に着目し、良好な成長効果が得られるように rhGH の吸収 (速度と量) 並びに作用の発現時間の制御を目的とした吸収促進剤や生体付着性物質の併用による rhGH の鼻粘膜透過性および鼻腔内滞留性の向上によるヒト成長ホルモン経鼻送達の改善効果に関して以下の 3 編に分けて検討した。

第 1 編 ラットにおける rhGH の鼻粘膜吸収に対する poly-L-arginine (PLA) の影響

麻酔下ラットの鼻腔内を閉鎖系にして rhGH-PLA 混合液を投与した結果、いずれの濃度 (0.25, 0.5, 1.0%) および分子量 (PLA (15): 14.8, PLA (150): 147.8 kDa) においても、PLA は rhGH の鼻粘膜吸収を促進した。0.25 および 0.5% PLA 併用における吸収率はほとんど変わらず、1.0% PLA 併用では大きく増大した。また、PLA (15) 併用では皮下投与と類似した一過的な、また PLA (150) 併用では緩やかに持続的な血漿中 rhGH 濃度の上昇を示した。

0.25 および 0.5% PLA は、rhGH との混合時に白濁が生じ、他の水溶性高分子薬物の吸収を促進した時とは異なる血漿中濃度推移が得られたことから、rhGH と PLA は相互作用により複合体を形成した可能性が考えられた。そこで、rhGH-PLA 混合液を遠心分離した後のそれぞれの上清中濃度を分析した。その結果、0.25 および 0.5% PLA 適用時に上清中 rhGH 濃度は低下したが、PLA 濃度に変化はなかった。そこで、PLA を添加せず rhGH コハク酸緩衝液を調製したところ、白濁が生じた。この不溶性凝集体は、添加する PLA 濃度の増大に伴い減少した。よって、0.25 および 0.5% PLA 適用時には、rhGH が不溶性凝集体を形成してフリーの rhGH が低下したことにより、PLA 濃度非依存的な吸収を示したと考えられた。また、不溶性凝集体を認めなかった 1.0% PLA (150) 含有 rhGH 混合液の限外濾過後の濾液中 rhGH および PLA 濃度は低下し、可溶性 rhGH-PLA 複合体の存在が示唆された。PLA の分子量の増大に伴う rhGH の鼻粘膜吸収の遅延は、rhGH-PLA (150) 可溶性複合体の形成により、rhGH の見かけの分子サイズが PLA (15) 併用時と比較して著しく大きくなったためと考えられた。

第 2 編 PLA 含有 rhGH 鼻腔内投与製剤の鼻粘膜吸収に及ぼす polyvinylpyrrolidone (PVP) の影響

PVP (MW : 35 kDa) の付着滞留性改善効果を明らかにするため、分子量が rhGH と類似した fluorescein isothiocyanate dextran (FD-20) を用いて、傾斜させた金属板上における滞留性およびラット腸管粘膜における接触表面積に及ぼす PVP の影響を評価した。接触表面積は吸収速度に大きく影響する。その結果、15% PVP の併用により、製剤の粘膜接触表面積を確保し、かつ滞留性を改善した。次に、麻酔下のラットを用いて、閉鎖系、および薬液が食道側へ流出できるようにした開放系において、1.0% PLA を併用した rhGH の鼻粘膜吸収に対する 15% PVP の影響を評価した。その結果、PLA (15) では、PVP の併用により rhGH の吸収が増大し、PLA (15) の粘膜透過促進効果を高めることが示されたが、明らかな鼻腔内滞留性改善効果はみられなかった。PLA (150) では、PVP の併用により極度に粘性が高まり、鼻粘膜滞留性は高まったが吸収は低下した。これには、接触吸収面積の低下や複合体の形成による rhGH の放出性の低下が関与したと考えられ、生体付着性物質を利用した経鼻吸収の改善には、高分子薬物の物性や鼻腔内の環境を考慮して製剤の組成を最適化する必要があることが明らかとなった。

第3編 下垂体切除 (Hpx) ラットにおける rhGH 経鼻投与製剤の薬理効果

1、2 編で高い吸収を示した rhGH 経鼻投与製剤を、Hpx ラットに単回投与した後の覚醒状態における血漿中 rhGH および insulin-like growth factor I (IGF-I) 濃度推移、並びに連日投与した後の体重増加および尾長の伸長を分析し評価した。その結果、血漿中 rhGH 濃度推移は上記 1、2 編の結果と同様の傾向を示し、PLA (15) 単独併用、PLA (15) および PVP 両併用、並びに PLA (150) 単独併用では、皮下投与の 1/5 の吸収率にもかかわらず、皮下投与と同等かそれ以上の薬理効果を示した。一方、持続的な血漿中 rhGH 濃度推移が得られた PLA (150) および PVP 両併用では、他の条件と比較して吸収が低く、薬理効果も低かった。また、PLA (15) 併用において、PVP を併用することで最大血漿中 rhGH 濃度が増大し吸収がやや改善したが、薬理効果にはほとんど影響がみられなかった。これにより、PLA 併用 rhGH 鼻腔内投与において、血漿中 rhGH 濃度の上昇と維持の両方が得られ、十分な薬理効果を示すことが明らかとなった。粘膜付着効果を期待した PVP については、その有効性は明確にならなかったが、条件によっては PLA のみでも粘膜付着効果が得られる可能性が示唆され、更なる処方最適化が必要と考えられる。

以上より、鼻腔内滞留性および鼻粘膜透過性を高めた rhGH の鼻腔内投与は、皮下投与に代わる送達法として十分な吸収性と薬理効果を示す実用性の高い送達法であると結論付ける。

Summary

Ryo Kawashima

Recombinant human growth hormone (rhGH) administered by a self-injection reduces not only the quality of life (QOL) and adherence in pediatric patients but also the therapeutic effect because of the pain and complicated operations. The purpose of this study is to develop the absorption (rate and quantity) and onset of action-controlled transnasal rhGH delivery system to avoid the above problems. The effects of absorption enhancer and bioadhesive material on the nasal absorption and retentivity of rhGH in nasal cavity were investigated. Furthermore, the pharmacological effect of rhGH were also evaluated using a prototype of transnasal rhGH delivery system. The findings of these studies were summarized as follows:

1. Effect of poly-L-arginine (PLA) on the nasal rhGH absorption in rats

In the every concentrations (0.25, 0.5, 1.0%) and molecular weight (PLA (15): 14.8, PLA (150): 147.8 kDa) used, PLA enhanced the nasal rhGH absorption after administration of rhGH-PLA mixture to the nasal cavity of rats in a closed system. Although the absorption rate was almost the same between 0.25 and 0.5% PLA, it was increased remarkably in 1.0% PLA. A transient increase in plasma rhGH concentration was observed in PLA (15) almost similar to the *s.c.* injection, while a delay in the rhGH absorption was observed in PLA (150).

The solution became clouded by mixing of rhGH and PLA (0.25 and 0.5%), and the plasma rhGH concentration curve after *i.n.* administration of this solution was different from other hydrophilic macromolecules. It was speculated that the complex consisting of rhGH and PLA was formed by them interaction from these results. Therefore, rhGH and PLA concentrations in the supernatant were analyzed after mixing each solutions. As a result, rhGH concentration in the supernatant was low after mixing of rhGH and PLA (0.25 and 0.5%) solutions, but PLA concentration was almost the same as prepared concentration. The formulation became clouded when rhGH was dissolved in succinate buffer without PLA. Amount of the insoluble aggregates decreased with increasing PLA concentration added to the formulation. Consequently, rhGH was not enough absorbed in 0.25 or 0.5% PLA, because free rhGH was reduced by forming insoluble aggregates. Moreover, rhGH and PLA concentrations were analyzed in the ultrafiltrate of rhGH-1.0% PLA (150) mixture, which the insoluble aggregates were not found. As a result, both concentration were also reduced in the ultrafiltrate, indicating that the soluble complex consisting of rhGH and PLA was formed. Therefore, it seems that the delay in nasal rhGH absorption in 1.0% PLA (150) was due to the increase in apparent molecular weight caused by the formation of soluble complex with rhGH.

2. Effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the nasal rhGH absorption in the formulation containing PLA

In order to determine the effect of PVP (MW: 35 kDa) on the retentivity of the formulation in

the nasal cavity, the retentivity of the formulation on the inclined metal plate and the contact surface area on the intestinal mucosa of rats were evaluated using fluorescein isothiocyanate dextran (FD-20), which the MW is similar to rhGH. As a result, 15% PVP improved the retentivity of formulation with keeping the contact surface area between the formulation and the intestinal mucosa. The effect of 15% PVP on the nasal rhGH absorption in the formulation with 1.0% PLA was evaluated in anesthetized rats in closed system or open system, which can leak the dosage formulation to esophagus side. In PLA (15), the absorption of rhGH was increased by adding PVP, that is, 15% PVP increased the absorption-enhancing effect of PLA (15), but the obvious improving effect of retentivity of the formulation in the nasal cavity was not appeared. In PLA (150), the viscosity of the formulation was excessively increased and the retentivity was improved by adding PVP, but the absorption of rhGH was decreased. It is considered that these results are caused by the reduction of the effective absorption area and the release of rhGH from the formulation by forming the complex, suggesting that the improvement of nasal rhGH absorption using the bioadhesive material requires the optimization of the composition of the formulation in consideration of the environment in the nasal cavity.

3. Pharmacological effects of the nasal formulation of rhGH in hypophysectomized (Hpx) rats

The nasal formulations showed high absorption in the above was evaluated by analyzing the plasma rhGH and insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration after single administration and body weight gain and tail length extension after daily administration in awaking Hpx rats. The plasma rhGH concentration curve showed the same tendency as the above results. In adding PLA (15) only, PLA (15)-PVP and PLA (150) only, irrespective of 1/5 of absorption rate in subcutaneous (*s.c.*) injection, the pharmacological effects showed the same as or higher than those in *s.c.* injection. In adding PLA (150)-PVP, which obtained the sustained plasma rhGH concentration, the absorption and pharmacological effects were lower than those in other intranasal (*i.n.*) administration. Although the absorption of rhGH was improved by adding PVP in PLA (15), the enhanced pharmacological effects were not observed. Therefore it was revealed that the nasal formulation of rhGH with PLA showed both increase and maintenance in plasma rhGH concentration, indicating the sufficient pharmacological effects. The adding PVP expected the mucoadhesive showed the unclear effectiveness, but it was suggested that PLA only has a mucoadhesive effect by conditions. Thus it is considered that further optimization of formulation is necessary.

It is concluded that transnasal rhGH delivery, provided that sufficiently absorption and pharmacological effect are obtained by enhancing absorption and retentivity in nasal cavity, is a promising alternative to *s.c.* injection.

論文審査の結果の要旨

遺伝子組換えヒト成長ホルモン (recombinant human growth hormone, rhGH) は、成長ホルモン分泌不全性低身長症等に用いられるが、rhGHによる低身長症治療は対象が小児であり、rhGH自己注射製剤の皮下投与は、患者及び家族への負担が大きい。そこで、新規 rhGH 投与経路として経鼻投与に着目している。

本研究では、これまでに有効性及び安全性が高い粘膜吸収促進剤として研究が進んでいる poly-L-arginine hydrochloride (PLA) を用い、rhGH の鼻粘膜からの吸収の改善を試みているが、同時に rhGH の鼻粘膜滞留性を向上させるための生体付着性物質の効果についても検討している。その研究は、主にラットを用いたものであり、動物実験として承認を受けた上で適正に実施されており、その結果は、3編に分けてまとめられている。

第1編では、rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA 添加の効果を、麻酔下のラットの閉鎖した鼻腔内に rhGH 及び PLA を投与して評価している。その結果、いずれの分子量 (15, 150 kDa) 及び濃度 (0.25, 0.5, 1.0%) の PLA においても rhGH の鼻粘膜吸収は促進されたが、1.0% PLA 併用で特に促進効果が大きく、また、PLA の分子量依存的な吸収の遅延が生じることを認めている。この血中濃度プロファイルの変化には、PLA と rhGH の相互作用が影響していると考察している。

PLA と rhGH の混合に際して、0.25 及び 0.5% PLA では白濁が生じ、1.0% PLA では生じなかったことから、rhGH と PLA の相互作用による複合体の形成を評価している。そして、上清中に溶解している rhGH と PLA の濃度と分子量の測定結果から、rhGH と PLA は可溶性の複合体を形成し、PLA は等電点付近の pH において難溶である rhGH を可溶化することを示した。また、この可溶性の複合体が PLA を rhGH に併用した際に観察された特徴的な血中濃度プロファイルに関係していると考察している。

第2編では、生体付着性物質として polyvinylpyrrolidone (PVP) を選択し、その効果を *in vitro*、*in vivo* の両実験系で検討している。傾斜したステンレス板上の移動速度とラット摘出腸粘膜上の広がりを実験する *in vitro* 実験で、15% PVP が添加条件として選択された。PVP 添加の *in vivo* 効果は、第1編で用いた閉鎖系と投与液の食道方向への移動が可能な開放系を比較することで行なわれた。薬物としては、rhGH に加えて、非代謝性の分子量 20 kDa である fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-20) も用いられ、閉鎖系から開放系に変更することによる吸収量の低下が、PVP の併用により低く抑えられるという結果を得ており、生体付着性物質の効果が示されたが、吸収量自体は、FD-20、rhGH とともに PVP 併用により必ず

高くなるわけではないことも示され、両実験系での鼻腔内環境の違いや、特に rhGH については、rhGH-PLA-PVP の 3 者間の相互作用の影響が考えられ、それについては、粘性の評価から考察を加えている。製剤の粘性の増大による有効吸収面積の低下や複合体の形成による rhGH の放出性の低下などが吸収の低下の要因として述べられている。

第 3 編では、生後 5 週目に外科的処置により下垂体を除去した Hpx ラットを用い、Hpx ラットにおける rhGH の無麻酔条件下の体内動態、鼻腔に特別な外科処置を施さず鼻腔内投与を行った rhGH の吸収動態、同様の方法で rhGH を単回鼻腔内投与した場合の血漿中 insulin like growth factor-I (IGF-I) 濃度推移、及び rhGH を連日鼻腔内投与した場合の体重及び尾長の測定結果について述べられている。

Hpx ラットに rhGH を単回静脈内投与したのちの無麻酔条件下での体内動態は、2-コンパートメントモデルに従い、その体内動態パラメータには、正常な Wistar ラットに麻酔下で投与した場合と有意差がなく、体内動態は線形であることが確認された。

rhGH を Hpx ラットに単回鼻腔内投与した場合、rhGH 単独ではほとんど吸収が確認されず、1.0%PLA の併用による吸収の改善が示されたが、第 2 編の開放系の実験で得られた吸収量と比較すると、1/2 以下であり、無麻酔条件下での体勢や体動の違いが吸収に大きく影響することを明らかにしている。rhGH の最も高い吸収量は、分子量 150 kDa の PLA を単独で併用した場合に観察され、第 1 編でも観察された PLA 併用による血中 rhGH 濃度の持続化がここでも示されたが、PVP 添加の効果は明確とはならなかった。

rhGH を鼻腔内投与したときの薬理効果が、単回投与後の血漿中 IGF-I 濃度推移、及び 10 日間連続投与における体重増加及び尾長の伸長により評価されている。その結果、比較のために行った皮下投与群より、rhGH 濃度が 1/5 程度と低いにも関わらず、rhGH と PLA を併用して鼻腔内適用した群の薬理効果は、同等かそれ以上であり、PLA が示す吸収促進作用と、rhGH と PLA 間の相互作用に起因する吸収の持続化作用がこの高い薬理作用の要因であると考察している。しかし一方で、PVP の効果が薬理作用の評価からも確認できず、経鼻適用製剤の処方最適化は、大変難しい作業であり、臨床応用につなげるためには、ヒトでの鼻腔内環境を考慮した実験系の確立などが今後必要となることも述べられている。

本研究は、rhGH の鼻腔内投与が皮下投与に代わる送達法として十分な吸収性と薬理効果を示す可能性を示すものであり、その過程で必要となる多くの重要な情報を提供している。これらのことから、本論文は、本研究科課程による博士（薬学）論文として十分な価値を有するものと判断する。