

鼻腔内滞留性および鼻粘膜透過性の向上による
ヒト成長ホルモン経鼻送達の改善に関する研究

川島 亮

目次

略語と記号	・ ・ ・ 1
緒言	・ ・ ・ 2
第1編 rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA 添加の効果	
第1章 rhGH の鼻粘膜透過に対する PLA の影響	
第1節 小緒言	・ ・ ・ 6
第2節 実験方法	
1-1-2-1 試薬	・ ・ ・ 7
1-1-2-2 実験動物	・ ・ ・ 7
1-1-2-3 rhGH 単回静脈内 (<i>i.v.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 7
1-1-2-4 rhGH 皮下 (<i>s.c.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 7
1-1-2-5 PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤の調製	・ ・ ・ 8
1-1-2-6 rhGH 閉鎖系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 8
1-1-2-7 血漿採取法	・ ・ ・ 9
1-1-2-8 血漿中 rhGH 濃度の測定	・ ・ ・ 9
1-1-2-9 動態学的解析	・ ・ ・ 9
1-1-2-10 統計解析	・ ・ ・ 11
第3節 結果	
1-1-3-1 rhGH 静脈内投与後の体内動態	・ ・ ・ 12
1-1-3-2 rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA の促進効果	・ ・ ・ 14
第4節 考察	・ ・ ・ 16
第2章 rhGH-PLA 混合液中での相互作用	
第1節 小緒言	・ ・ ・ 18
第2節 実験方法	
1-2-2-1 試薬	・ ・ ・ 20
1-2-2-2 PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤の調製	・ ・ ・ 20

1-2-2-3	rhGH 及び PLA の定量法	・ ・ ・ 20
1-2-2-4	HPLC 条件	・ ・ ・ 20
第3節 結果		
1-2-3-1	rhGH と PLA 混合後の上清中 rhGH 及び PLA 濃度	・ ・ ・ 22
1-2-3-2	経鼻投与製剤の溶液中での相互作用	・ ・ ・ 23
第4節 考察		・ ・ ・ 26

第2編 PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤の滞留性に対する PVP の効果

第1章 PLA 併用下水溶性高分子薬物の鼻粘膜吸収に及ぼす PVP の影響

第1節 小緒言		・ ・ ・ 29
第2節 実験方法		
2-1-2-1	試薬	・ ・ ・ 31
2-1-2-2	実験動物	・ ・ ・ 31
2-1-2-3	粘度の測定	・ ・ ・ 31
2-1-2-4	FD-20 経鼻投与製剤の調製	・ ・ ・ 31
2-1-2-5	粘膜接触表面積の測定	・ ・ ・ 31
2-1-2-6	滞留性の評価	・ ・ ・ 32
2-1-2-7	FD-20 単回静脈内 (<i>i.v.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 32
2-1-2-8	FD-20 閉鎖系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験 (Closed system)	・ ・ ・ 33
2-1-2-9	FD-20 開放系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験 (Open system)	・ ・ ・ 33
2-1-2-10	血漿採取法	・ ・ ・ 34
2-1-2-11	血漿中 FD-20 濃度の測定	・ ・ ・ 34
2-1-2-12	動態学的解析	・ ・ ・ 34
2-1-2-13	統計解析	・ ・ ・ 35
第3節 結果		
2-1-3-1	経鼻投与製剤の物理化学的性質に対する PVP の影響	・ ・ ・ 36
2-1-3-2	FD-20 鼻腔内投与後の体内動態に対する PVP の影響	・ ・ ・ 39
第4節 考察		・ ・ ・ 44

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

第1節 小緒言	・ ・ ・ 46
第2節 実験方法	
2-2-2-1 試薬	・ ・ ・ 47
2-2-2-2 実験動物	・ ・ ・ 47
2-2-2-3 rhGH 経鼻投与製剤の調製	・ ・ ・ 47
2-2-2-4 rhGH 閉鎖系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験 (Closed system)	・ ・ ・ 47
2-2-2-5 rhGH 開放系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験 (Open system)	・ ・ ・ 48
2-2-2-6 血漿採取法	・ ・ ・ 48
2-2-2-7 血漿中 rhGH 濃度の測定	・ ・ ・ 48
2-2-2-8 粘度の測定	・ ・ ・ 48
2-2-2-9 動態学的解析	・ ・ ・ 49
2-2-2-10 統計解析	・ ・ ・ 49
第3節 結果	
2-2-3-1 rhGH 鼻腔内投与後の体内動態に及ぼす PVP の影響	・ ・ ・ 50
2-2-3-2 rhGH 経鼻投与製剤の粘性に及ぼす PVP の影響	・ ・ ・ 53
第4節 考察	・ ・ ・ 55

第3編 下垂体摘出ラットへの rhGH 鼻腔内投与後の成長促進効果

第1章 下垂体摘出ラットにおける rhGH 鼻腔内投与後の体内動態

第1節 小緒言	・ ・ ・ 58
第2節 実験方法	
3-1-2-1 試薬	・ ・ ・ 60
3-1-2-2 実験動物	・ ・ ・ 60
3-1-2-3 頸静脈簡易カテーテル挿入術	・ ・ ・ 60
3-1-2-4 rhGH 静脈内 (<i>i.v.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 61
3-1-2-5 rhGH 皮下 (<i>s.c.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 61
3-1-2-6 rhGH 経鼻投与製剤の調製	・ ・ ・ 61
3-1-2-7 rhGH 鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験	・ ・ ・ 61
3-1-2-8 血液採取法	・ ・ ・ 62
3-1-2-9 血漿中 rhGH 濃度の測定	・ ・ ・ 62

3-1-2-10 動態学的解析	・ ・ ・ 62
3-1-2-11 統計解析	・ ・ ・ 62
第3節 結果	
3-1-3-1 rhGH 鼻腔内投与後の体内動態	・ ・ ・ 63
第4節 考察	・ ・ ・ 67
第2章 下垂体摘出ラットにおける rhGH 鼻腔内投与後の薬理効果	
第1節 小緒言	・ ・ ・ 69
第2節 実験方法	
3-2-2-1 試薬	・ ・ ・ 70
3-2-2-2 実験動物	・ ・ ・ 70
3-2-2-3 頸静脈簡易カテーテル挿入術	・ ・ ・ 70
3-2-2-4 rhGH 皮下 (s.c.) 投与実験	・ ・ ・ 70
3-2-2-5 rhGH 経鼻投与製剤の調製	・ ・ ・ 70
3-2-2-6 rhGH 鼻腔内 (i.n.) 投与実験	・ ・ ・ 70
3-2-2-7 血液採取法	・ ・ ・ 71
3-2-2-8 血漿中 IGF-I 濃度の測定	・ ・ ・ 71
3-2-2-9 rhGH 連日投与における体重及び尾長の計測	・ ・ ・ 71
3-2-2-10 薬力学的解析	・ ・ ・ 72
3-2-2-11 統計解析	・ ・ ・ 72
第3節 結果	
3-2-3-1 rhGH 鼻腔内投与後の血漿中 IGF-1 濃度推移	・ ・ ・ 73
3-2-3-2 rhGH の連日鼻腔内投与後の体重及び尾長の変化	・ ・ ・ 74
第4節 考察	・ ・ ・ 77
結論	・ ・ ・ 79
謝辞	・ ・ ・ 83
引用文献	・ ・ ・ 84

略語		記号	
FDs	Fluorescein isothiocyanate-dextran	AUC _{FD-20}	血漿中 FD-20 濃度 - 時間曲線下面積
FD-20	Fluorescein isothiocyanate-dextran (21 kDa)	AUC _{IGF-I}	血漿中 IGF-I 濃度 - 時間曲線下面積
HPLC	High performance liquid chromatography	AUC _{rhGH}	血漿中 rhGH 濃度 - 時間曲線下面積
Hpx ラット	下垂体摘出ラット	AUMC	1 次モーメント曲線下面積
IGF-I	Insulin-like growth factor I	C _{max} FD-20	最高血漿中 FD-20 濃度
<i>i.n.</i>	Intranasal	C _{max} IGF-I	最高血漿中 IGF-I 濃度
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal	C _{max} rhGH	最高血漿中 rhGH 濃度
<i>i.v.</i>	Intravenous	ER	吸収促進率
PK-PD	Pharmacokinetics-Pharmacodynamics	F _{FD-20}	FD-20 鼻腔内投与後のバイオアベイラビリティ
PLA	Poly-L-arginine hydrochloride	F _{rhGH}	rhGH 皮下 (又は鼻腔内) 投与後のバイオアベイラビリティ
PLA (15)	Poly-L-arginine hydrochloride (14.8 kDa)		
PLA (150)	Poly-L-arginine hydrochloride (147.8 kDa)	F _{o/c}	鼻腔内滞留性改善率
		MAT	平均吸収時間
PLA (150)	Poly-L-arginine hydrochloride (147.8 kDa)	MRT	平均滞留時間
		T _{max} FD-20	最高血漿中 FD-20 濃度到達時間
PLA (150)	Poly-L-arginine hydrochloride (147.8 kDa)	T _{max} IGF-I	最高血漿中 IGF-I 濃度到達時間
		T _{max} rhGH	最高血漿中 rhGH 濃度到達時間
QOL	Quality of life		
rhG-CSF	Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor		
rhGH	Recombinant human growth hormone		
<i>s.c.</i>	Subcutaneous		
SSP	Stainless steel plate		
TJ	Tight junction		

緒言

近年、多くのペプチド及びタンパク質性医薬品が開発され、実用化されている。しかし、それらの投与法のほとんどは注射によるものしかなく、疼痛を伴うほかに、注射部位の炎症や硬結、注射針等の医療廃棄物の増加、自己注射における操作の煩雑さが問題となっている¹⁻⁶⁾。自己注射製剤の多くは、先天的あるいは慢性的な疾患を有する患者に使用されており、長期の注射を強いられる患者の **quality of life (QOL)** を改善するためには、新規送達法の開発は急務である。

ペプチド性医薬品の 1 つである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、ターナー症候群、プラダーウィリー症候群及び軟骨異栄養症における低身長、**small-for-gestational age** 性低身長症、及び成人成長ホルモン分泌不全症等に用いられる⁷⁻⁹⁾。**rhGH** による低身長症治療は、成長可能な骨端線が閉鎖していない期間に限られるため、その治療の対象は小児であり、十分な効果を得るためには限られた期間における継続的な治療が必要となる¹⁰⁾。しかし、現在広く用いられている **rhGH** 自己注射製剤の皮下投与では、痛みや連日投与により患者及び家族の負担が大きく、怠薬が起きやすい⁶⁾。このように成長ホルモン分泌不全性低身長症に対する **rhGH** の治療効果は、アドヒアランスが大きく影響することが指摘されており¹¹⁻¹³⁾、非侵襲的で簡便な新規 **rhGH** 投与法を開発することにより、**QOL** の改善と治療効果の向上が期待できる。

このような背景の中、上記のような問題を回避できる新規 **rhGH** 投与経路として経鼻投与に着目した。経鼻投与の薬物吸収部位である鼻粘膜上皮組織は、絨毛構造を形成しており比較的吸収面積が大きい。加えて、上皮組織下には動脈、静脈及びリンパ管といった脈管系が非常に発達している。このため、鼻粘膜は薬物が全身循環系に移行しやすく、鼻腔内酵素も

他の経粘膜投与部位よりも比較的少ないことから¹⁴⁾、薬物の吸収部位として適している。しかし、他の経粘膜投与と同様に経鼻投与でさえも、ペプチド及びタンパク質性医薬品のバイオアベイラビリティは低く、十分な薬理効果が得られないため、ほとんど製剤化に至っていない^{15,16)}。その要因として、①水溶性高分子薬物の鼻粘膜透過における分子量依存的な制限、②絨毛上皮による *mucociliary clearance* 並びに鼻腔構造に伴う物理的クリアランスによる薬物の吸収部位からの除去、③鼻腔内の酵素による分解が考えられる。従って、これらの医薬品のバイオアベイラビリティを改善するためには、①吸収促進剤による鼻粘膜透過性の向上、②生体付着性物質による鼻粘膜滞留性の改善、③酵素阻害剤による酵素的分解の抑制の3つの方法が考えられる。Natsume らは薬物の鼻粘膜吸収性を向上させるため、これまでに有効性及び安全性の高い粘膜吸収促進剤として *poly-L-arginine hydrochloride (PLA)* を見出した¹⁷⁾。また、薬物の鼻粘膜滞留性を向上させるため、*starch* 及び *chitosan* などの生体付着性物質の利用も検討してきた^{18, 19)}。PLA は、鼻粘膜に損傷を与えることなく、組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (*Recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF*) 及び種々分子量の *Fluorescein isothiocyanate-dextrans (FDs)* といった水溶性高分子薬物の粘膜吸収を促進することを証明した^{16, 17)}。更に、Ohtake らは PLA の反復鼻腔内投与において、PLA の吸収促進効果が時間依存的かつ可逆的であることを証明した²⁰⁾。L-Arginine のポリマーである PLA は、*tight junction (TJ)* 関連タンパク質の *claudin-4*、*occludin*、*ZO-1* 及び *tricellulin*、更には *adherence junction* 関連タンパク質の *E-cadherin* 及び β -*catenin* を細胞間隙部位から消失させ、細胞間隙経路を開口させることにより、水溶性高分子の粘膜吸収を増大させることが明らかとなっている²¹⁻²⁴⁾。また、この高分子薬物の透過性の改善には、*occludin* の局在性の変化が深く関与していることも報告されている^{25,26)}。一方、入江らは、生体付着性物質の鼻粘膜滞留性評価モデルを確立し、生体付着性物質を用いた経鼻投与製剤により、吸収部位の標的化と薬物放出の制御が可能であることを示した¹⁸⁾。以上の知見から、粘膜吸収促進剤

と生体付着性物質を組合せることにより、薬物の鼻粘膜吸収性の改善並びに作用時間を制御できる安全性の高い経鼻送達法を開発することが可能であると考えられる。経鼻投与製剤中に添加される PLA や chitosan の持つ陽電荷は、rhGH の吸収速度の制御や鼻腔内滞留性の制御に関わると考えられる。鼻粘膜上皮細胞上の糖タンパク質や粘膜を被う粘液の主成分の一つである多糖類はポリアニオンであり、ポリカチオンの PLA や chitosan とのイオン相互作用が経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性と、粘液及び鼻粘膜上の薬物透過部位における rhGH の拡散性を決定すると考えられる^{27,28)}。また、rhGH も負電荷を有し、ポリカチオンと静電的な相互作用を生じ、経鼻投与製剤からの rhGH の放出速度にも影響する可能性が考えられる。近年、ポリカチオンとのイオン相互作用を利用した rhGH の徐放システムが皮下注射による侵襲的な投与法として報告されているが^{29,30)}、非侵襲的な経粘膜送達に関する報告は皆無である。

rhGH 製剤の開発においては、成長効果を最大限に発揮するための体内動態の制御も重要である。正常な成長ホルモン分泌パターンでは、血中の成長ホルモン量は夜間に急激に増加し、また日中も小さな増減を繰り返して常に血中に存在している³¹⁾。このため、rhGH 製剤は、生理的な分泌を考慮した吸収特性を示すように設計することが望ましいと考えられている。従って、経鼻投与製剤においても、薬理効果を最大限に発揮できるよう、吸収促進剤の作用発現と製剤の鼻腔内滞留性を制御することが望まれる。

本研究では、rhGH の吸収（速度と量）並びに作用の発現時間をコントロールした安全性の高い吸収制御型 rhGH 経鼻送達法を開発するため、吸収促進剤や生体付着性物質を併用して rhGH をラットの鼻腔内に投与し、rhGH の鼻粘膜吸収速度と吸収量の制御、及び鼻腔内滞留性の改善効果を検討した。吸収促進剤として前述した PLA を、生体付着性物質として Polyvinylpyrrolidone (PVP) を選択し、ラットを用いた rhGH 鼻腔内投与における動態学的・薬力学的検討を行った。第 1 編では、rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA の促進効果を評価し

た。第1編第1章では、*in vivo* ラット rhGH 閉鎖系鼻腔内投与実験により、PLA の吸収促進効果における適用濃度や分子量の影響について評価した。第1編第2章では、アニオンである rhGH とポリカチオンである PLA の混合液の調製に伴う静電的な相互作用が rhGH の吸収に与える影響について評価した。これらの検討により、以降の検討に用いる PLA の濃度及び分子量の最適化を行った。第2編では、PLA 併用下 rhGH の鼻粘膜滞留性に対する PVP の効果を評価した。第2編第1章では、水溶性高分子モデル薬物として FD-20 を用い、*in vitro* における PVP 併用による鼻粘膜滞留性及び粘膜接触表面積を評価し、PVP の最適な濃度を検討した。また、*in vivo* における鼻粘膜吸収への影響及び鼻粘膜滞留性を開放系鼻腔内投与実験において薬物動態学的に評価した。第2編第2章では、*in vivo* における PLA 併用下 rhGH の鼻粘膜吸収性に対する PVP の影響を第2編第1章と同様の方法で評価した。第3編では、低身長症モデル動物として、下垂体摘出幼若ラットを選択し、ディスペンサーを用いて rhGH 溶液を鼻腔内投与した後の無麻酔状態における rhGH の薬動学的特性を評価し (第3編第1章)、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、及び連日鼻腔内投与した場合の体重及び尾長の測定結果から薬力学的効果の評価を行った (第3編第2章)。

第1編 rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA 添加の効果

第1章 rhGH の鼻粘膜透過に対する PLA の影響

第1節 小緒言

一般に、薬物の分子量の増大並びに脂溶性度の低下に伴い鼻粘膜透過性は低下する^{16, 32)}。この分子サイズに依存した鼻粘膜透過性の低下は、水溶性高分子薬物であるペプチド及びタンパク質性医薬品を鼻腔から全身循環へ送達するときの大きな障壁となるため、分子量が約 22 kDa である rhGH の鼻粘膜吸収を高めるためには透過性の改善が特に重要であると考えられる。

L-Arginine のポリマーである PLA は、TJ 関連タンパク質の claudin-4、occludin、ZO-1 及び tricellulin、更には adherence junction 関連タンパク質の E-cadherin 及び β -catenin を細胞間隙部位から消失させ、細胞間隙経路を開口させることにより、水溶性高分子の粘膜吸収を増大させることが明らかとなっている²¹⁻²⁴⁾。特に、高分子薬物の透過には、occludin の局在性の変化が関与していることも報告されている^{25, 26)}。これまでに PLA は *in vivo* で肺、腸管及び鼻粘膜において α -ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド、サケカルシトニン、rhG-CSF 及び FDs といった 4 - 150 kDa 程度の水溶性高分子の鼻粘膜吸収を促進させることが報告されているが¹⁶⁾、薬物の鼻粘膜吸収性は薬物の分子サイズだけでなく極性や電荷等の影響も受けると考えられ、それらの因子の総合的な影響についての報告はほとんど無い。rhGH は pI が 5 程度であることから、PLA とのイオン-イオン相互作用も考えられ、その鼻粘膜吸収に対する PLA の促進効果は未だ明らかではない。

第1章では、rhGH の鼻粘膜透過に対する PLA の促進効果を明らかにするため、rhGH を種々濃度及び分子量の異なる PLA と共にラットの鼻腔内に閉鎖系の条件で投与し、rhGH の体内動態を評価した。

第2節 実験方法

1-1-2-1. 試薬

rhGH (Saizen[®]) をメルクセローノ株式会社 (東京) より購入した。Poly-L-arginine hydrochloride (PLA (15) : 14.8 kDa, PLA (150) : 147.8 kDa) 及び urethane を Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Quantikine[®] ELISA Human Growth Hormone Immunoassay kit を R&D Systems Inc. (MN, USA) から購入した。その他の試薬は全て特級品を使用した。

1-1-2-2. 実験動物

Wistar 系雄性ラット (230~330 g, 8 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入した。ラットを 3 匹/cage で飼育し、自由に食餌及び水を摂取できるようにした。ただし、実験開始 16 時間前から絶食させた。なお、本研究におけるラットを用いた全ての実験は城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認 (承認番号 : H24018, H25015, H26016, H27015) を得てから行った。

1-1-2-3. rhGH 単回静脈内 (*i.v.*) 投与実験

ラットを urethane 生理食塩液 (25 w/v%, 1.0 g/kg, *i.p.*) で麻酔し、固定板に仰臥位固定した。後述の鼻腔内投与実験と同様の生理的条件とするため、ラットに外科的処置を施し、左右頸静脈を露出した。Saizen[®]を製剤の指示通りに調整した rhGH 溶液を生理食塩液で希釈し、調製した rhGH 生理食塩液 (0.0971, 0.194, 0.583 及び 1.17 mg/kg、いずれも 1.0 mL/kg) を左頸静脈内に投与した。投与前及び投与後 4 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、右頸静脈より血液 0.1 mL を採取した。

1-1-2-4. rhGH 皮下 (*s.c.*) 投与実験

1-1-2-3 と同様に麻酔したラットを仰臥位固定した後、後述の鼻腔内投与実験と同様の生理的条件とするため、外科的処置を施し、左右頸静脈を露出した。Saizen®を製剤の指示通りに調整した rhGH 溶液を生理食塩液で希釈し、調製した rhGH 生理食塩液 (0.194 mg/kg, 1.0 mL/kg) をラットの頸背部皮下に投与した。投与前及び投与後 10 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、右頸静脈より血液 0.1 mL を採取した。

1-1-2-5. PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤の調製

予備実験において、rhGH と PLA の混合により白濁を生じたが、その程度は溶液の pH、共存する塩の種類や濃度により変化した。本研究では、鼻粘膜に刺激を与えない pH 範囲において³³⁾、白濁が比較的生じなかったコハク酸緩衝液 (50 mM, pH = 4.4) を用いて rhGH 経鼻投与製剤を調製した。

Saizen®を製剤の指示通りに調整し、rhGH 溶液 (5.83 mg/mL, pH = 6.5~8.5) を先ず得た。異なる分子量 (PLA (15): 14.8 kDa, PLA (150): 147.8 kDa) の PLA をコハク酸緩衝液 (50 mM, pH = 4.4) に溶解し、PLA コハク酸緩衝液 (PLA 濃度 : 0.5, 1.0 及び 2.0 w/v%) を調製した。rhGH 溶液と PLA コハク酸緩衝液を 1 : 1 の割合で混合し、PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤 (rhGH 最終濃度 : 2.91 mg/mL, PLA 最終濃度 : 0.25, 0.5 及び 1.0 w/v%, pH = 4.4) を調製した。

1-1-2-6. rhGH 閉鎖系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験

1-1-2-3 と同様に麻酔したラットを仰臥位固定した後、Hirai らの *in vivo* 鼻腔内投与実験法³⁴⁾ に準じて外科的処置を施し、左右頸静脈を露出した。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, 三商株式会社, 東京) を挿入した。次に鼻腔から消化管への薬液の漏出を防ぐために、先端を塞いだシリコーンチューブ (シラスコン®医療用チューブ SH No. 1, カネカメディックス株式会

社, 大阪) を食道側から鼻腔側に向けて挿入した。更に、鼻腔蓋管からの薬液の漏出を防ぐため、この部分を接着剤 (アロンアルファ[®], 東亜合成化学株式会社, 東京) で塞いだ。ディスペンサーを用いて rhGH 含有コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg) 又は異なる分子量の 0.25, 0.5 及び 1.0 w/v% PLA を併用した rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg) を左鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与後、瞬間接着剤 (アロンアルファ[®], 東亜合成化学株式会社, 東京) で鼻孔を塞いだ。その後、ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与前及び投与後から最大 16 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、右頸静脈より血液 0.1 mL を採取した。

1-1-2-7. 血漿採取法

採取した血液を 30 分以内に遠心分離 ($1,000 \times g$, 15 分, 4 °C) して血漿を得た。得られた血漿を分析するまで -20 °C で保存した。

1-1-2-8. 血漿中 rhGH 濃度の測定

血漿中 rhGH 濃度を Human growth hormone immunoassay kit を用いて ELISA 法により測定した。得られた血漿を適宜、上記キット付属の血漿用希釈液で希釈した。測定手順は上記キットのマニュアルに従った。なお、本定量キットは rat growth hormone に対して交差性を示さない³⁴⁾。

1-1-2-9. 動態学的解析

rhGH の体内動態を 2-コンパートメントモデルで解析した。静脈内投与後の血漿中 rhGH 濃度を非線形最小二乗法 (アルゴリズム; Damping Gauss-Newton 法) により解析した。皮下及び鼻腔内投与における最高血漿中 rhGH 濃度 ($C_{\max \text{ rhGH}}$)、最高血漿中 rhGH 濃度到達時間

($T_{\max \text{ rhGH}}$) を血漿中 rhGH 濃度プロファイルより求めた。台形公式により求めた最終採血時間までの血漿中 rhGH 濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{trap}) と、静脈内投与における β 相の消失パラメータ β の平均値 ($\beta = 0.969 \text{ hr}^{-1}$) を用いて (1) 式から求めた最終採血時間以降の外挿した消失相における血漿中 rhGH 濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{ext}) より、皮下及び鼻腔内投与における血漿中 rhGH 濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{rhGH}) を (2) 式から算出した。

$$AUC_{\text{ext}} = \frac{C_{\text{last}}}{\beta} \quad \dots (1)$$

$$AUC_{\text{rhGH}} = AUC_{\text{trap}} + AUC_{\text{ext}} \quad \dots (2)$$

ここで、 C_{last} は最終採血時間における血漿中 rhGH 濃度である。

また、台形公式により算出した最終採血時間までの血漿中 rhGH 濃度 \times 時間 - 時間曲線下面積 ($AUMC_{\text{trap}}$)、及び AUC_{ext} を用いて (3) 式から 1 次モーメント曲線下面積 ($AUMC$) を求め、平均滞留時間 (MRT) 及び平均吸収時間 (MAT) をそれぞれ (4) 式及び (5) 式から算出した。

$$AUMC = AUMC_{\text{trap}} + AUC_{\text{ext}} \times T_{\text{last}} \quad \dots (3)$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC_{\text{rhGH}}} \quad \dots (4)$$

$$MAT = MRT_{\text{s.c., i.n.}} - MRT_{\text{i.v.}} \quad \dots (5)$$

ここで、 T_{last} は最終採血時間である。 $MRT_{\text{s.c. or i.n.}}$ は、皮下投与又は鼻腔内投与における MRT 、 $MRT_{\text{i.v.}}$ は静脈内投与における MRT である。

静脈内投与に対する皮下及び鼻腔内投与のバイオアベイラビリティ (F_{rhGH}) を (6) 式

より算出した。

$$F_{\text{rhGH}} (\%) = \frac{\text{AUC}_{s.c., i.n.} / \text{Dose}_{s.c., i.n.}}{\text{AUC}_{i.v.} / \text{Dose}_{i.v.}} \times 100 \quad \dots (6)$$

ここで、 $\text{Dose}_{i.v.}$ 及び $\text{Dose}_{s.c., i.n.}$ はそれぞれ静脈内投与及び皮下又は鼻腔内投与量であり、 $\text{AUC}_{i.v.}$ 及び $\text{AUC}_{s.c., i.n.}$ はそれぞれ静脈内投与及び皮下又は鼻腔内投与における AUC_{rhGH} である。また、吸収促進剤併用及び非併用下の AUC_{rhGH} ($\text{AUC}_{i.n. \text{ PLA}}$ 及び $\text{AUC}_{i.n. \text{ Control}}$) より (7) 式を用いて、吸収促進率 (ER) を算出した。

$$\text{ER} = \frac{\text{AUC}_{i.n. \text{ PLA}}}{\text{AUC}_{i.n. \text{ Control}}} \quad \dots (7)$$

1-1-2-10. 統計解析

二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

1-1-3-1. rhGH 静脈内投与後の体内動態

Figure 1 に4種類の投与量 (0.0971、0.194、0.583 及び 1.17 mg/kg) で rhGH を静脈内投与した後の血漿中 rhGH 濃度推移を、Table 1 に得られた動態学的パラメータを、Figure 2 に投与量と AUC_{rhGH} の関係を示す。rhGH の体内動態は2-コンパートメントモデルで良好に表された。これらの投与量において体内動態は線形であり、各投与量における血漿中 rhGH 濃度推移の結果から算出した体内動態パラメータ k_{12} (hr^{-1})、 k_{21} (hr^{-1})、 k_{10} (hr^{-1})、 Vd_{ss} (mL) 及び CL_{tot} (mL/hr) は、それぞれ 0.86 ± 0.21 、 1.16 ± 0.07 、 5.54 ± 0.42 、 13.66 ± 1.16 及び 44.92 ± 3.61 であり、投与量による大きな違いはみられなかった。また、投与量と AUC_{rhGH} との間に有意な直線関係が認められた (Fig. 2, $R^2 = 0.999$, $P < 0.05$)。

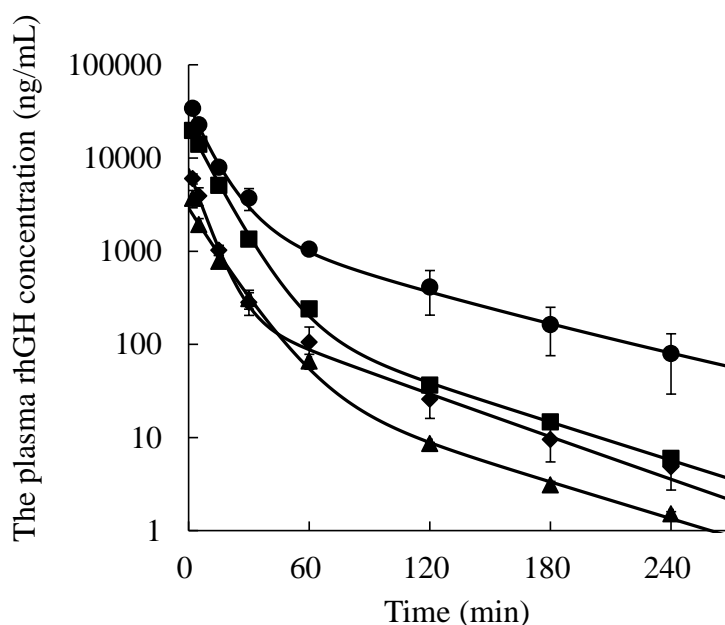


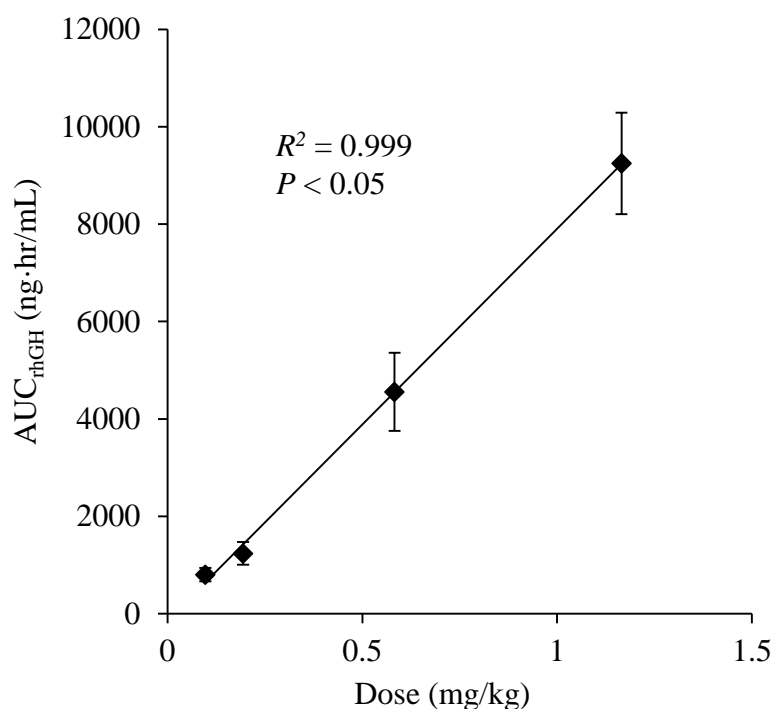
Fig. 1 Plasma rhGH concentrations after *i.v.* administration in rats

●: 1.17 mg/kg, ■: 0.583 mg/kg, ◆: 0.194 mg/kg, ▲: 0.0971 mg/kg
Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

Table 1 Pharmacokinetic parameters of rhGH after *i.v.* administration in rats

Dose (mg/kg)	0.0971	0.194	0.583	1.17
A (ng/mL)	2832.2 ± 574.4	7273.4 ± 1240.8	21424.5 ± 1451.0	36312.7 ± 4413.5
α (hr ⁻¹)	4.56 ± 0.56	8.37 ± 0.56	5.88 ± 0.69	6.86 ± 1.31
$t_{1/2\alpha}$ (hr)	0.16 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02
B (ng/mL)	51.3 ± 4.9	251.1 ± 115.6	254.9 ± 102.4	2137.1 ± 320.6
β (hr ⁻¹)	0.91 ± 0.04	1.06 ± 0.08	0.94 ± 0.06	0.97 ± 0.15
$t_{1/2\beta}$ (hr)	0.77 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.78 ± 0.14
k_{21} (hr ⁻¹)	0.98 ± 0.04	1.28 ± 0.12	0.99 ± 0.07	1.29 ± 0.17
k_{10} (hr ⁻¹)	4.24 ± 0.51	6.93 ± 0.40	5.60 ± 0.71	5.10 ± 0.97
k_{12} (hr ⁻¹)	0.25 ± 0.05	1.21 ± 0.39	0.23 ± 0.02	1.45 ± 0.41
V_1 (mL)	10.41 ± 2.36	7.88 ± 1.19	7.74 ± 0.58	7.84 ± 0.90
V_2 (mL)	2.69 ± 0.86	6.74 ± 1.14	1.78 ± 0.10	8.39 ± 2.22
Vd_{ss} (mL)	13.10 ± 3.16	14.61 ± 1.88	9.51 ± 0.68	16.23 ± 2.22
CL_{tot} (mL/hr)	42.49 ± 6.75	54.49 ± 8.29	43.98 ± 8.38	37.87 ± 4.67
AUC_{rhGH} (ng·hr/mL)	801.8 ± 137.0	1238.3 ± 232.3	4557.0 ± 803.8	9249.7 ± 1040.6

Each data represents the mean ± S.E. (n=3-4).

**Fig. 2 Relationship between dose and AUC_{rhGH} after *i.v.* administration in rats**

Each data point represents the mean ± S.E. (n=3-4).

1-1-3-2. rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA の促進効果

Figure 3 に皮下投与、及び種々濃度の PLA (15) 及び PLA (150) を併用して rhGH を鼻腔内投与した後の血漿中 rhGH 濃度推移を、Table 2 に得られた rhGH の動態学的パラメータを示す。

皮下投与後の血漿中 rhGH 濃度は、速やかに増大し ($T_{\max \text{ rhGH}}$: 1.3 時間)、 F_{rhGH} は約 28% であった。一方、rhGH 単独鼻腔内投与では、血漿中濃度の大きな上昇はみられず、 F_{rhGH} は約 2.1% と低かったが、PLA を併用した全ての条件において、血漿中 rhGH 濃度は上昇し、 AUC_{rhGH} は rhGH 単独投与と比較して有意に増大した ($P < 0.05$)。

PLA (15) 併用群では、いずれの濃度においても投与 30 分後から一過的に血漿中 rhGH 濃度が上昇し、皮下投与に類似した血漿中 rhGH 濃度推移を示した。 $C_{\max \text{ rhGH}}$ は PLA (15) 濃度依存的に増大したが、 AUC_{rhGH} には明確な濃度依存性がみられなかった。

PLA (150) 併用群では、いずれの濃度においても血漿中 rhGH 濃度が緩やかに上昇し、 $T_{\max \text{ rhGH}}$ は 6.5-8.8 時間であった。また、 $C_{\max \text{ rhGH}}$ 及び AUC_{rhGH} には明確な濃度依存性がみられなかった。

いずれの分子量の PLA においても 1.0 w/v% のとき最大の F_{rhGH} を示したが、 $T_{\max \text{ rhGH}}$ は PLA の分子量により大きく異なった。また、MRT の比較において、PLA (15) 併用群では約 4.1-5.3 時間であったが、最大の F_{rhGH} を示した 1.0 w/v% PLA (150) 併用群では 8.8 時間であり、PLA (150) の併用により持続的な rhGH 濃度が得られた。

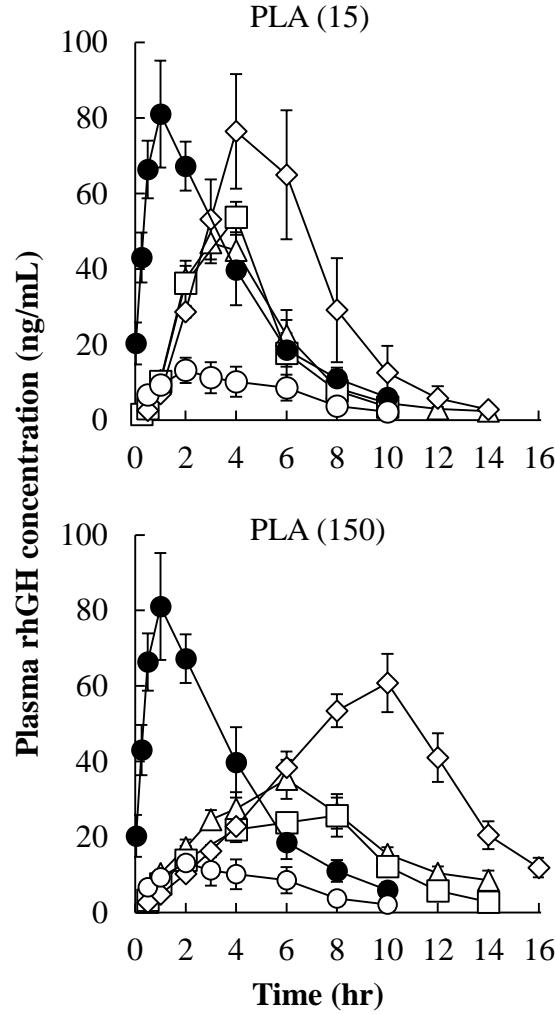


Fig. 3 Plasma rhGH concentrations after *s.c.* and *i.n.* administrations under various conditions in rats
 ●: *s.c.* injection (0.194 mg/kg), ○: rhGH only (0.583 mg/kg),
 △: with 0.25% PLA, □: with 0.5% PLA, ◇: with 1.0% PLA
 Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

Table 2 Pharmacokinetic parameters of rhGH after *i.n.* administration under various conditions in rats

Route	Dose (mg/kg)	Enhancer	C _{max} rhGH (ng/mL)	T _{max} rhGH (hr)	AUC _{rhGH} (ng · hr/mL)	MRT (hr)	MAT (hr)	F _{rhGH} (%)	ER
<i>i.v.</i>	0.194	None	—	—	1238.32 \pm 232.27	0.26 \pm 0.03	—	100.00	—
<i>s.c.</i>	0.194	None	85.24 \pm 10.77	1.25 \pm 0.24	349.85 \pm 36.41	3.17 \pm 0.33	2.91	28.25	—
<i>i.n.</i>	0.583	None (Control)	13.41 \pm 3.23	1.38 \pm 0.38	78.75 \pm 24.02	4.03 \pm 0.32	3.78	2.12	1.00
		0.25 % PLA (15)	49.00 \pm 3.77 **	3.00 \pm 0.58	242.26 \pm 27.75 **	4.60 \pm 0.19	4.34	6.52	3.08
		0.5 % PLA (15)	53.74 \pm 2.15 **	4.00 \pm 0.00	228.97 \pm 41.28 *	4.05 \pm 0.41	3.79	6.16	2.91
		1.0 % PLA (15)	76.48 \pm 15.17 **	4.00 \pm 0.00	433.02 \pm 114.54 *	5.32 \pm 0.39 *	5.06	11.66	5.50
		0.25 % PLA (150)	35.26 \pm 5.14 *	6.00 \pm 0.00	284.22 \pm 24.04 **	6.80 \pm 0.09 **	6.54	7.65	3.61
		0.5 % PLA (150)	29.26 \pm 5.19	6.00 \pm 0.73	212.80 \pm 24.60 **	6.49 \pm 0.34 **	6.23	5.73	2.70
		1.0 % PLA (150)	63.80 \pm 6.77 **	9.60 \pm 0.40	505.72 \pm 43.54 **	8.83 \pm 0.23 **	8.58	13.61	6.42

Each data represents the mean or mean \pm S.E. (n=3-6).

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ compared with the control.

第4節 考察

本章では、ラットを用いて rhGH の体内動態及び閉鎖系での鼻粘膜吸収に対する PLA の促進効果を評価した。また、rhGH の鼻粘膜吸収促進効果に対する PLA の濃度及び分子量の影響を評価した。

いずれの濃度及び分子量においても、PLA は rhGH の鼻粘膜吸収を促進した。PLA はこれまでに、分子量約 4~150 kDa までの FDs 及び約 19 kDa の rhG-CSF の鼻粘膜吸収を促進することが報告されており¹⁶⁾、これらの結果から分子量 20 kDa 程度の薬物は約 10% までバイオアベイラビリティーを増大させることが示唆されている。分子量約 22 kDa の rhGH における F_{rhGH} は、1.0 w/v% PLA (150) の併用により最大 13.6% に達し、以前の報告結果から得られるバイオアベイラビリティーとほぼ同等であったことから、rhGH は酵素的な分解を受けない FDs と同様に鼻腔内で分解の影響をほとんど受けることなく、PLA の粘膜透過促進作用により鼻粘膜吸収が増大したことが考えられた。

しかし、0.25 及び 0.5 w/v% PLA 併用による F_{rhGH} は、1.0 w/v% PLA 併用での F_{rhGH} より低く、その濃度間では F_{rhGH} がほとんど変わらなかった。これは、0.25 及び 0.5 w/v% PLA 併用での、rhGH との混合時に白濁を生じ、一方 1.0 w/v% では白濁が生じなかったことが関係していると考えられた。すなわち、低濃度の PLA を rhGH と混合するとき、不溶性の複合体を形成し、吸収に影響している可能性が考えられた。

また、分子量の異なる PLA を併用して鼻腔内投与することにより、異なるパターンの血漿中 rhGH 濃度プロファイルが得られることが明らかとなった。PLA (15) では、皮下投与と類似した一過的な上昇を示す血漿中 rhGH 濃度推移が得られ、一方、PLA (150) では緩やかに血漿中 rhGH 濃度が上昇し、持続的な推移を示した。このプロファイルの違いには、分子量の異なる PLA と rhGH の相互作用の違いが影響した可能性が考えられる。その一方で、このような様々な血中濃度プロファイルが得られたことは、PLA の分子量と濃度を適切に

選択することで rhGH の体内動態を制御可能な有用な製剤になる可能性が示唆される。以前に報告されている FDs の鼻粘膜吸収に対する PLA の促進効果の解析では、PLA の分子量による T_{\max} への影響や血中濃度プロファイルの変化はみられていない³⁶⁾。すなわち、分子量 45.5 kDa の 1.0 w/v% PLA と rhG-CSF の鼻腔内投与では T_{\max} は 2 時間で、FDs では 1～2 時間であったことが報告されている^{16, 36)}。PLA と rhGH の混合投与では、rhGH の鼻粘膜吸収性もしくは PLA の吸収促進効果に対して、PLA と FDs の混合投与とは異なる分子間相互作用の様な要因が影響を与えている可能性が考えられる。

以上より、1.0 w/v% PLA (PLA(15) 及び PLA(150)) の併用により rhGH の鼻粘膜透過は大きく改善し、更に用いる PLA の分子量により異なる血漿中 rhGH 濃度プロファイルが得られ、rhGH の体内動態を制御する、より有用な製剤になる可能性が示された。

第2章 rhGH-PLA 混合液中での相互作用

第1節 小緒言

アニオン性の rhGH とポリカチオンである PLA は、静電氣的相互作用を生じることが報告されており^{29, 30)}、第 1 章で用いた PLA 及び rhGH の混合液においても相互作用を生じ、吸収に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

In vivo 投与実験に先立って行った予備実験において、rhGH と PLA の混合により生じる白濁の程度は、溶液の pH、共存する塩の種類や濃度により変化した。rhGH を PLA でコーティングすることにより、数日間に渡って rhGH を持続的に放出する皮下注射用徐放性粒子製剤となることが報告されている^{29, 30)}。これらの粒子は、両者を混合することで負に荷電した rhGH と正に荷電した PLA が静電氣的に相互作用することにより形成されと考えられる。従って、rhGH と PLA を混合したときに観察される白濁もこの静電氣的な相互作用が原因であり、不溶性の rhGH-PLA 複合体を形成していることが予想された。rhGH 経鼻投与製剤における rhGH の複合体の形成は、溶解度の低下による rhGH の鼻粘膜からの吸収の低下や PLA の正電荷が打ち消されることによる吸収促進効果の低下が生じる可能性がある。第 1 編第 1 章においてコハク酸緩衝液 (50 mM, pH = 4.4) で調製した rhGH と PLA の混合液の一部は白濁していた。第 1 編第 1 章におけるラットを用いた PLA 併用 rhGH 鼻腔内投与実験では、いずれの濃度 (0.25~1.0 w/v%) 及び分子量 (14.8 及び 147.8 kDa) の PLA においても、rhGH 単独鼻腔内投与と比較して F_{rhGH} が有意に増大し、rhGH の経鼻送達における PLA の有用性が示唆された。しかし、混合液に生じた白濁がその効果を減弱させている可能性も考えられた。rhGH-PLA 混合液における相互作用並びに鼻粘膜吸収性への影響を明らかにすることは、徐放化などの rhGH 経鼻送達システムの機能に応用する上で極めて重要となると考えられた。そこで第 1 編第 2 章では、rhGH-PLA 混合液の遠心分離後の上清中 rhGH 及び PLA 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量し、析出物の有無によりそれぞれの成

分の相互作用を評価した。また、rhGH-PLA 混合液を限外濾過 (molecular weight cut off ; 100 kDa) した後の濾液についてゲル濾過 HPLC で分析することにより、それぞれの成分の溶液中での相互作用を評価した。

第2節 実験方法

1-2-2-1. 試薬

1-1-2-1 と同様の試薬を用いた。

1-2-2-2. PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤の調製

1-1-2-5 と同様の方法で調製した。

1-2-2-3. rhGH 及び PLA の定量法

調製した鼻腔内投与製剤を遠心分離 (1,000 × g、15 分、4°C) して得られた上清を移動相で 2 倍に希釈した後、rhGH 及び PLA 濃度を HPLC により測定した。下記の (8) 式を用いて残存率を算出した。

$$\text{Percent remaining (\%)} = \frac{\text{PLA or rhGH concentration in the supernatant}}{\text{PLA or rhGH concentration in the formulation}} \times 100 \text{ --- (8)}$$

また、rhGH 溶液をリン酸塩緩衝生理食塩液 (pH = 7.4, PBS) で希釈して調製した rhGH PBS 溶液 (2.91 mg/mL)、1.0 w/v% PLA (150) 生理食塩液及び 1.0 w/v% PLA (150) 含有 rhGH 経鼻投与製剤 (2.91 mg/mL) を遠心分離 (1,000 × g、15 分、4°C) して得られた上清 200 µL を、それぞれ限外濾過フィルター (Amicon® Ultra-0.5 100K, Millipore, MA, USA) (molecular weight cut off: 100 kDa) を用いて濾過 (14,000 × g、30 分、20°C) し、得られた濾液を HPLC により測定した。

1-2-2-4. HPLC 条件

測定には、ポンプ (LC-10AT, 島津製作所, 京都)、UV-VIS 検出器 (SPD-10A, 島津製作所,

京都)、システムコントローラー (SCL-10A vp, 島津製作所, 京都)、カラムオーブン (CTO-10AS vp, 島津製作所, 京都)、クロマトグラム用データ処理装置 (Chromato-PRO, Ver.3.3.0, ランタイムインスツルメンツ株式会社, 神奈川)、デガッサー (DGU-12A, 島津製作所, 京都) 及び HPLC カラム (PLA (15) : Asahipak GS-320 HQ (排除限界分子量 : 40,000), PLA (150) : PROTEIN KW-803 (排除限界分子量 : 170,000), 昭和電工株式会社, 東京) から構成される装置を用いた。Table 3 に HPLC の測定条件を示す。

Table 3 HPLC conditions for rhGH and PLA analyses

Mobile phase	Wave length	Flow rate	Injection volume	Column temp.
0.5 M, pH 4.0 acetate buffer : methanol (20 : 1)	230 nm	0.5 or 1.0 mL/min	20 μ L	40 $^{\circ}$ C

第3節 結果

1-2-3-1. rhGH と PLA 混合後の上清中 rhGH 及び PLA 濃度

調製した混合液中の PLA 濃度に対する遠心分離後の上清中 PLA 濃度を Figure 4a に、その残存率を Figure 4b に示す。PLA (15) 及び PLA (150) 共に、いずれの濃度においても遠心分離後の上清中の PLA 残存率がほぼ 100%であったことから、ほぼ全ての PLA が上清中に存在していた。

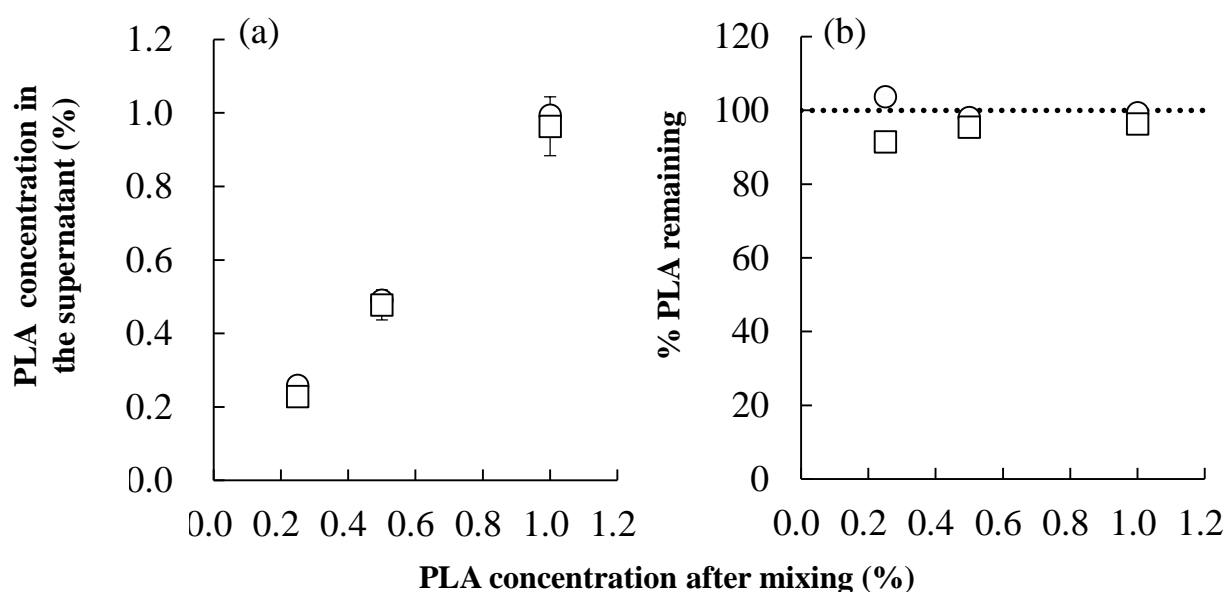


Fig. 4 Concentration (a) and percent remaining (b) of PLA in the supernatant after mixing rhGH with the PLA solution

○ ; PLA (15), □ ; PLA (150)

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

調製した混合液中の PLA 濃度に対する遠心分離後の上清中 rhGH 濃度を Figure 5a に、その残存率を Figure 5b に示す。異なった分子量の PLA 溶液を rhGH 溶液と混合すると、0.25 及び 0.5 w/v% PLA の混合では、上清中 rhGH 濃度が調製した混合液中の rhGH 濃度よりも低く、沈殿による上清中濃度の低下が示唆された。しかし、PLA 濃度が 1.0 w/v% のときの上清中 rhGH 濃度は、調製した混合液中の rhGH 濃度である 2.91 mg/mL となった。一方、PLA とは混合せずに rhGH をコハク酸緩衝液 (pH=4.4) と混合すると白濁を生じ、上清中の rhGH 濃度は約 1.0 mg/mL に低下した (Fig. 5a)。従って、PLA の添加は、rhGH との相互作用によ

り溶解性を低下させるよりはむしろ、可溶化作用を示すことが示唆された。

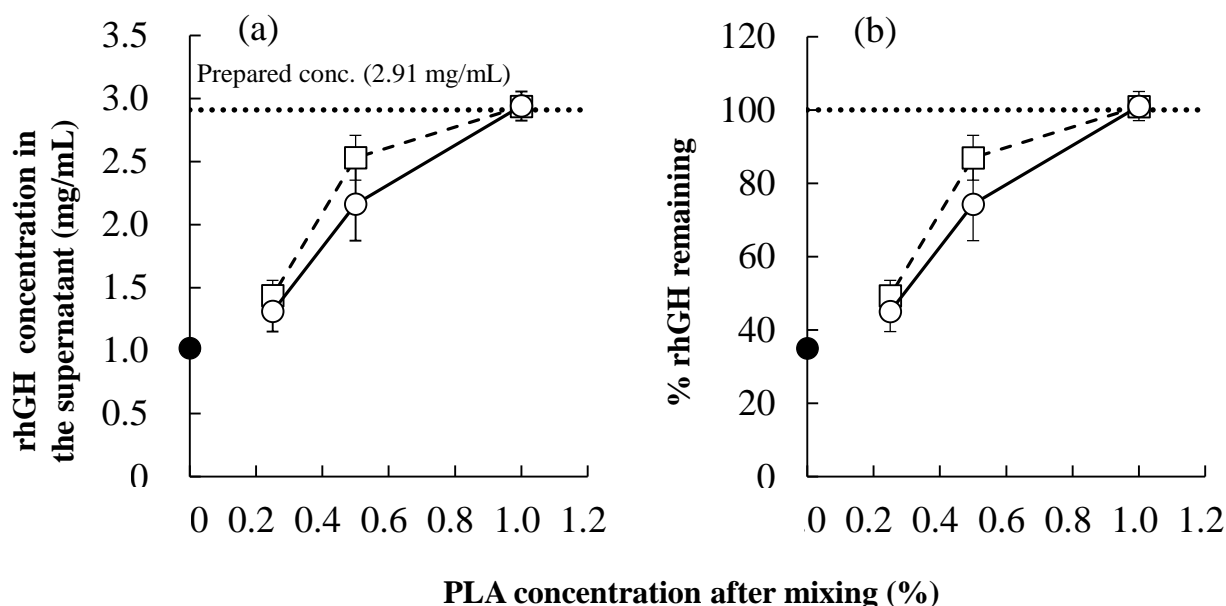


Fig. 5 Concentration (a) and percent remaining (b) of rhGH in the supernatant after mixing rhGH with the PLA solution

● ; without PLA, ○ ; PLA (15), □ ; PLA (150)

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

1-2-3-2. 経鼻投与製剤の溶液中での相互作用

rhGH-PLA 混合液における上清中 rhGH 及び PLA 濃度の測定により、PLA の濃度に依存して、rhGH の溶解性が改善したことが明らかとなった (Fig. 5)。すなわち、1.0 w/v% PLA では、混合後に rhGH の溶解度の低下は認められず、この作用には PLA (15) と PLA (150) 間で違いはなかった。しかし、*in vivo* 吸収性について PLA (15) と PLA (150) を比較すると、PLA (15) 併用群と比較して PLA (150) 併用群において T_{\max} rhGH が遅延した。1.0 w/v% PLA (150) 併用群における吸収の遅延は、溶解した状態において rhGH と PLA (150) が相互作用し、吸収に影響したことが考えられた。そこで、rhGH の見かけの分子サイズに対する PLA の影響を、1.0 w/v% PLA (150) 含有 rhGH 経鼻投与製剤を限外濾過し、ゲル濾過 HPLC を用いて濾液中の成分を分析することにより評価した。

Figure 6 に 1.0 w/v% PLA (150) 含有 rhGH 経鼻投与製剤、rhGH PBS 溶液及び PLA (150) 生理食塩液を遠心分離して得られた上清を限外濾過した後の濾液を HPLC で分析したときのクロマトグラムを、Table 4 に 1.0 w/v% PLA (150) 含有 rhGH 経鼻投与製剤、rhGH PBS 溶液及び 1.0 w/v% PLA (150) 生理食塩液の限外濾過前後のそれぞれの成分のピーク面積を示す。なお、rhGH は PBS 中ではコハク酸緩衝液中とは異なり完全に溶解した。サイズ排除カラム (プルラ

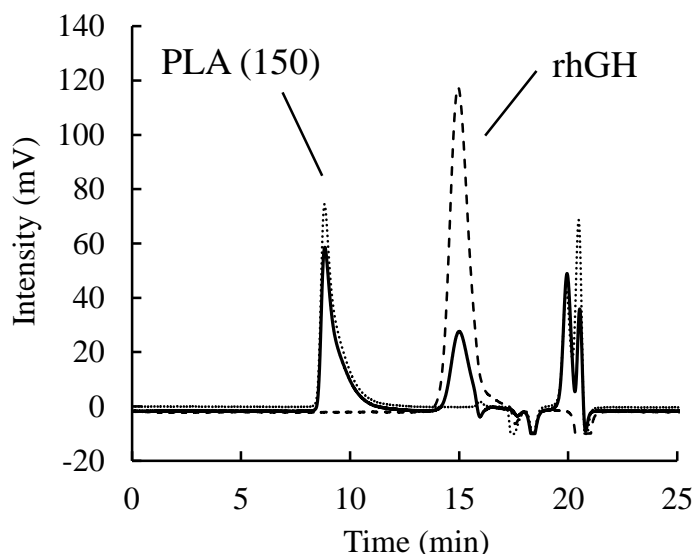


Fig. 6 Size exclusion chromatograms (Column : PROTEIN KW-803) of ultrafiltrate of supernatant after centrifuging the dosage solution with 1.0 % PLA (150) for *i.n.* administration

— ; rhGH - 1.0% PLA (150) mixture
 - - - - ; rhGH PBS solution
 ; PLA (150) solution

ンにおける排除限界分子量 : 40 kDa) による分離により rhGH (約 20 kDa) は 15 分、PLA (150) (147.8 kDa) は約 9 分に検出された。rhGH PBS 溶液及び PLA (150) 生理食塩液共に、限外濾過によりピーク面積が大きく減少した。PLA (150) は 100 kDa である分子量 cut-off 値より大きいので、分子量の小さい部分のみ濾過されたと考えられた。一方、rhGH の分子量は十分小さいので、溶液中の rhGH が、限外濾過フィルターとの相互作用や、濾過過程にお

Table 4 Peak areas of rhGH and PLA (150) of ultrafiltrate of supernatant after centrifuging the dosage solution with 1.0% PLA (150) for *i.n.* administration in the size exclusion HPLC analysis (Column : PROTEIN KW-803)

	rhGH		PLA (150)	
	Retention time (min)	Peak area	Retention time (min)	Peak area
rhGH PBS solution	15.0	17251932 ± 922720	—	—
filtrated rhGH PBS solution	15.0	6381399 ± 813715	—	—
PLA (150) NaCl solution	—	—	8.8	18569394 ± 2792036
filtrated PLA (150) NaCl solution	—	—	8.8	3729428 ± 555260
filtrated rhGH-PLA (150) preparation	15.0	1601843 ± 22211	8.8	2441620 ± 48829

Each data represents the mean ± S.E. (n=3).

ける濃縮による析出といった分子サイズ以外の要因によって溶液中から排除されたためと考えられる。rhGH と PLA (150) の混合液では、rhGH のピーク面積が rhGH PBS 溶液 (2.91 mg/mL) の約 26%に減少した。また、PLA (150) のピーク面積も 1.0 w/v% PLA (150) 生理食塩液と比較して rhGH と PLA (150) の混合液の方が小さかった (約 65%)。これは、rhGH 及び PLA (150) を混合することにより限外濾過フィルターを通過する 100 kDa 以下の rhGH 量が減少したことを示し、rhGH と PLA (150) が可溶性複合体を形成し、rhGH の見かけの分子サイズが増大してフリー体の rhGH 量が減少していることが示唆された。

第4節 考察

本章では、rhGH と PLA の混合液における両化合物間の相互作用を明らかにするため、分子量の異なる PLA と rhGH の混合液を遠心分離した後の上清中 rhGH 及び PLA 濃度を HPLC で測定し、不溶性複合体の有無により相互作用を評価した。また、不溶性複合体が認められなかった 1.0 w/v% PLA (150) 含有 rhGH 混合液を、限外濾過フィルター (molecular weight cut off : 100 kDa) を用いて濾過し、ゲル濾過 HPLC を用いて濾液を分析した。

上清中 PLA 濃度は、いずれの分子量及び濃度においても添加濃度とほぼ同等であり、不溶性の rhGH-PLA 複合体の形成による上清中 PLA 濃度の低下は認められなかった (Fig. 4)。これに対し、上清中 rhGH 濃度は、コハク酸緩衝液との混合により低下していたが、PLA 濃度の増加とともに回復した。PLA を全く含まないコハク酸緩衝液と rhGH の混合では、溶解している rhGH は調製濃度の約 1/3 に低下することがわかった。これらの結果は、不溶性の rhGH-PLA 複合体が形成されるのではなく、rhGH とコハク酸緩衝液又は、rhGH 同士で不溶性の凝集体を形成し、rhGH の溶解度が低下することを示唆している。rhGH の等電点は 5.0-5.2 付近であり、rhGH が低 pH や NaCl の存在により高次構造の変化や凝集がみられることが以前に報告されている^{37,38)}。従って、この不溶性凝集体の形成には、rhGH の等電点や共存する塩による高次構造の変化が関連している可能性が考えられた。

PLA 及び rhGH 共に溶解濃度の低下が認められなかった 1.0 w/v% PLA (150) と rhGH の混合液において、限外濾過フィルターを通過した rhGH 量が rhGH 単独の溶液と比較して顕著に減少したことから、rhGH が PLA (150) との混合液中で可溶性の複合体を形成していることが示唆された (Fig. 6, Table 4)。また、濾液中の PLA (150) のピーク面積は、PLA (150) と rhGH の混合液では PLA (150) のみの溶液と比較して約 65%に減少した (Table 4)。用いた排除カラムの限界分子量は 40 kDa であることから、このピークは PLA (150) に含まれる分子量の小さな一部が限外濾過フィルターを通過したものが主であると考えられる。しかしその

一方で、230 nm での吸光度を評価しているのみで、クロマトグラム上で PLA と rhGH を区別できていないことから、PLA(150) 中の分子量の小さな PLA と rhGH の可溶性複合体がピーク中に含まれている可能性も考えられた。

これまでのラットを用いた PLA の FDs の経鼻吸収促進効果の検討及び、家兔摘出鼻粘膜と Caco-2 細胞培養シートを用いた PLA の吸収促進メカニズムの検討から、①PLA の適用濃度及び分子量依存的な促進効果と促進効果の持続性、②TJ 関連タンパク質 (特に occludin) の局在性の変化による細胞間隙経路の開口と FDs の分子量依存的な吸収速度の改善がなされることが報告されている^{16, 17, 23-25)}。しかしながら、rhGH の経鼻吸収性及び体内動態に対する PLA の効果は、FDs から得られた結果と異なった。この違いは、不溶性凝集体及び可溶性複合体の形成が rhGH の吸収性に影響したことを示唆している。まず、PLA (15) 及び PLA (150) のいずれも rhGH の $T_{\max \text{ rhGH}}$ を FDs のそれよりも延長したのは、可溶性の rhGH-PLA 複合体を形成した結果、PLA の鼻腔内酵素による分解が PLA の分子量に依存して抑制され、rhGH が持続的に吸収されたことが主な要因と考えられた。次に、分子量の異なる 0.25 及び 0.5 w/v% PLA 併用による F_{rhGH} はほとんど変わらず、1.0 w/v% PLA 併用による F_{rhGH} が大きく増大したのは、0.25 及び 0.5 w/v% PLA の適用時には、rhGH が不溶性の凝集体を形成してフリー体の rhGH 濃度が低下したことが主な要因と考えられた。また、分子量の異なる 1.0 w/v% PLA を併用して鼻腔内投与することにより異なるパターンの血漿中 rhGH 濃度プロファイルが得られたのは、PLA と rhGH が可溶性複合体を形成し、rhGH の見かけの分子サイズが、併用する PLA の分子量に依存して増大したためと考えられた。このため、rhGH-PLA(150) 可溶性複合体の鼻粘膜透過速度は rhGH-PLA(15) 可溶性複合体より低く、PLA の分解に伴う複合体の分解、すなわち rhGH の見かけの分子サイズの減少速度も rhGH-PLA(150) 可溶性複合体の方が著しく低かったと考えられ、PLA (150) の分解に伴い、フリー体の rhGH が徐々に鼻粘膜から吸収されたと考えられる。加えて、複合体の形成は PLA の促

進効果を抑制し、PLA(150)の方がその抑制が強かったことも持続性吸収を示す要因の一つと考えられる。

以上より、rhGH 及び PLA の混合による相互作用は PLA の濃度及び分子量等によって異なるため、これらを厳密に制御することで、PLA を併用した rhGH 経鼻投与製剤投与後の血漿中 rhGH 濃度推移を制御することが可能であることが示唆された。

第2編 PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤の滞留性に対する PVP の効果

第1章 PLA 併用下水溶性高分子薬物の鼻粘膜吸収に及ぼす PVP の影響

第1節 小緒言

製剤の吸収部位への付着滞留性の改善には、粘膜付着性を有する様々な高分子添加剤を用いた微粒子やゾル、ゲルなどの利用が検討されている³⁹⁻⁴²⁾。入江らは、経鼻投与後のカルセインの血中濃度に対するモデル生体付着性物質である starch の効果を、ラットを用いた薬液が鼻腔から流出しない閉鎖系 (closed system) と、ラットを傾斜させ鼻腔から製剤が流出する開放系 (open system) の異なる2つの実験系で評価し、両実験系から得られたカルセインのバイオアベイラビリティーを比較することで、鼻腔内の有効吸収部位からの吸収性と製剤の滞留性を評価した¹⁸⁾。その結果、生体付着性物質により経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性を改善し、吸収を増大させるには、単に経鼻投与製剤に粘性を付与させるだけではなく、滞留性の改善効果と共に鼻粘膜の薬物吸収部位と製剤の接触表面積を拡大することが重要であることを明らかとしている。水溶性高分子薬物の経鼻送達においては、経粘膜透過促進剤に加えて、生体付着性物質を用いることで、さらなる吸収性の改善が期待できるが、付着滞留性の改善による水溶性高分子薬物の鼻粘膜吸収性への影響は未だ不明な点も多く、第1編で検討したカチオン性ポリマーである PLA の透過促進効果や rhGH が形成する複合体の形成に加え、吸収部位への付着状態の違いが吸収に影響する可能性が考えられた。

そこで第2編では、粘膜付着性を有し、安全性が高く、医薬品や食品の添加物として広く用いられている polyvinylpyrrolidone K25 (PVP) を選択し、rhGH に対して高い吸収促進効果が認められた 1.0 w/v% PLA (15) 又は 1.0 w/v% PLA (150) を用いた経鼻投与製剤において PVP の鼻粘膜滞留性改善効果を評価した。すなわち、第1章では rhGH の代替として同程度の分子量を有するモデル水溶性高分子薬物の fluorescein isothiocyanate dextran (FD-20) を用いて、第2章では rhGH 鼻腔内投与における PVP の鼻粘膜滞留性改善効果及び薬物吸収性

への影響を評価した。

第2節 実験方法

2-1-2-1. 試薬

Fluorescein isothiocyanate dextran (FD-20, 21 kDa) を Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Polyvinylpyrrolidone K25 (PVP, 35 kDa) を和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。Poly-L-arginine hydrochloride (PLA (15) : 14.8 kDa, PLA (150) : 147.8 kDa) 及び urethane は第1編と同様のものを使用した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2-1-2-2. 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を使用した。

2-1-2-3. 粘度の測定

付属のロータを装着 ($0.8^\circ \times R24$, $3^\circ \times R14$) したコーンプレート型回転粘度計 (RE-215L, 東機産業株式会社, 東京) に生理食塩液及び種々濃度 (10, 15 及び 20%) の PVP 含有生理食塩液 (0.4 又は 1.1 mL) を注入し、回転数を連続的に変化させて ($0 \rightarrow 100 \rightarrow 0$ rpm, 20 分, 34°C) 流動曲線を得た。得られた流動曲線の回帰直線から粘度及び降伏値を算出した。

2-1-2-4. FD-20 経鼻投与製剤の調製

FD-20、分子量の異なる PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 及び PVP をそれぞれ生理食塩液で溶解させ、最終濃度を FD-20 が 82.5 mg/mL、PLA が 1.0 w/v%、PVP が 10, 15 及び 20 w/v% となるよう混合した。PVP を含まない製剤も調製し、control とした。

2-1-2-5. 粘膜接触表面積の測定¹⁸⁾

ラットの鼻粘膜は十分な面積でないことから、小腸粘膜を実験に用いた。灌流後のラット

から小腸を切除し、約 1.5 cm ずつ輪切りにし縦方向に切開した。リンゲル液で洗浄後、同液を湿潤させた濾紙の上に小腸切片を広げ、四方を虫ピンで固定した。小腸表面の余分なリンゲル液を除去した後、ディスペンサーを用いて、1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (control)、又は種々濃度 (10, 15 及び 20 w/v%) の PVP 及び 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液を 7.5 μ L 滴下した。滴下した溶液の広がりが止まる適当な時間 (10 秒) にカメラで撮影し、Image J (画像編集フリーソフト, <http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて滴下した溶液が広がった面積を算出した。

2-1-2-6. 滞留性の評価

傾斜させた平面板を用いたゲル製剤の滞留性評価法を参考に⁴²⁾、これを改変して PVP による滞留性改善効果を評価した。すなわち、ステンレススチール板 (SSP) を 60°に傾け、ディスペンサーを用いて、1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (control)、又は種々濃度 (10, 15 及び 20 w/v%) の PVP 及び 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (82.5 mg/mL) 30 μ L を滴下した。滴下した位置から 4 cm 移動した時間を計測し、滞留時間とした。

2-1-2-7. FD-20 単回静脈内 (*i.v.*) 投与実験

ラットを urethane 生理食塩液 (25 w/v%, 1.0 g/kg, *i.p.*) で麻酔し、固定板に仰臥位固定した。後述の鼻腔内投与実験と同様の生理的条件とするため、ラットに外科的処置を施し、左右頸静脈を露出した。その後、FD-20 生理食塩液 (0.2, 2.0 及び 3.3 mg/kg, いずれも 1.0 mL/kg) を左頸静脈内に投与し、ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与前を含む 240 分までの所定の時間に右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。

2-1-2-8. FD-20 閉鎖系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Closed system)

2-1-2-7 と同様にラットに麻酔した。ラットを仰臥位固定した後、Hirai らの *in vivo* 鼻腔内投与実験法に準じて外科的処置を施し³⁴⁾、左右頸静脈を露出した。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, 三商株式会社, 東京) を挿入した。次に鼻腔から消化管への薬液の漏出を防ぐために、先端を塞いだシリコンチューブ (シラスコン®医療用チューブ SH No. 1, カネカメディックス株式会社, 大阪) を食道側から鼻腔側に向けて挿入した。更に、鼻腔蓋管からの薬液の漏出を防ぐため、この部分を接着剤 (アロンアルファ®, 東亜合成化学株式会社, 東京) で塞いだ。その後、1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (control)、又は 15 w/v% PVP 及び 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (33 mg/kg, 0.4 mL/kg) を、先端にポリエチレンチューブ (Hibiki No. 3, 三商株式会社, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて左鼻腔内の鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与前及び投与後 720 分までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。

2-1-2-9. FD-20 開放系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Open system)

2-1-2-7 と同様にラットに麻酔し外科的処置を施した後、投与した薬液が食道側に流出できるように先端を塞いでいないシリコンチューブ (シラスコン®医療用チューブ SH No. 1, カネカメディックス株式会社, 大阪) を食道側から咽頭側に向けて挿入した。その後、1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (control) 又は、15 w/v% PVP 及び 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 FD-20 生理食塩液 (33 mg/kg, 0.4 mL/kg) を先端にポリエチレンチューブ (Hibiki No. 3, 三商株式会社, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて左鼻腔内の鼻孔入口から 8 mm のところに投与した。投与から 10 秒経過した

後、固定板を 30°、更にラットの頭部を 30°に傾斜させた。投与後、ヘパリン処理した注射筒を用いて閉鎖系経鼻投与実験と同様の時間間隔で右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。

2-1-2-10. 血漿採取法

採取した血液を遠心分離 (10,500 rpm, 5 分, 4 °C) し、血漿を得た。

2-1-2-11. 血漿中 FD-20 濃度の測定

得られた血漿をホウ砂-リン酸緩衝液 (pH=8.5) で 60 倍希釈し、FD-20 の蛍光強度を分光蛍光光度計 (RF-5300PC, 島津製作所, 京都) (励起波長 495 nm, 蛍光波長 515 nm) を用いて測定し、血漿中 FD-20 濃度を算出した。

2-1-2-12. 動態学的解析

FD-20 の体内動態を 2-コンパートメントモデルで解析した静脈内投与後の血漿中 rhGH 濃度を非線形最小二乗法 (アルゴリズム; Damping Gauss-Newton 法) により解析した。鼻腔内投与における最高血漿中 FD-20 濃度 ($C_{\max \text{ FD-20}}$)、最高血漿中濃度到達時間 ($T_{\max \text{ FD-20}}$) を血漿中 FD-20 濃度プロファイルより求めた。台形公式により求めた最終採血時間までの血漿中 FD-20 濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{trap}) と、静脈内投与における β 相の消失パラメータ β の平均値 ($\beta = 0.0055 \text{ min}^{-1}$) を用いて 1-1-2-9 (1) 式により算出した AUC_{ext} より、鼻腔内投与における血漿中 rhGH 濃度 - 時間曲線下面積 ($AUC_{\text{FD-20}}$) を (9) 式から算出した。

$$AUC_{\text{FD-20}} = AUC_{\text{trap}} + AUC_{\text{ext}} \quad \cdots (9)$$

開放系経鼻投与群の $AUC_{\text{FD-20}}$ (AUC_{open}) 及び閉鎖系経鼻投与群の $AUC_{\text{FD-20}}$ (AUC_{closed}) から、改善率 ($F_{\text{o/c}}$) を (10) 式より求めた。

$$F_{o/c} (\%) = \frac{AUC_{Open}}{AUC_{Closed}} \times 100 \quad \dots (10)$$

2-1-2-13. 統計解析

二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

2-1-3-1. 経鼻投与製剤の物理化学的性質に対する PVP の影響

PVP 含有生理食塩液の粘性、粘膜接触表面積及び滞留性を評価した。Figure 7 に種々濃度 (10, 15 及び 20 w/v%) の PVP 含有生理食塩液の流動曲線を、Table 5 に種々濃度 (10, 15 及び 20 w/v%) の PVP 含有生理食塩液の粘度を示す。

いずれの PVP 濃度においても、ずり速度に対してずり応力はほぼ直線的に増大し、流動曲線の回帰直線より、降伏値はいずれもほとんど認められず、見かけ上ニュートン流動が観察された。また、粘度は PVP の濃度に依存して増大した。

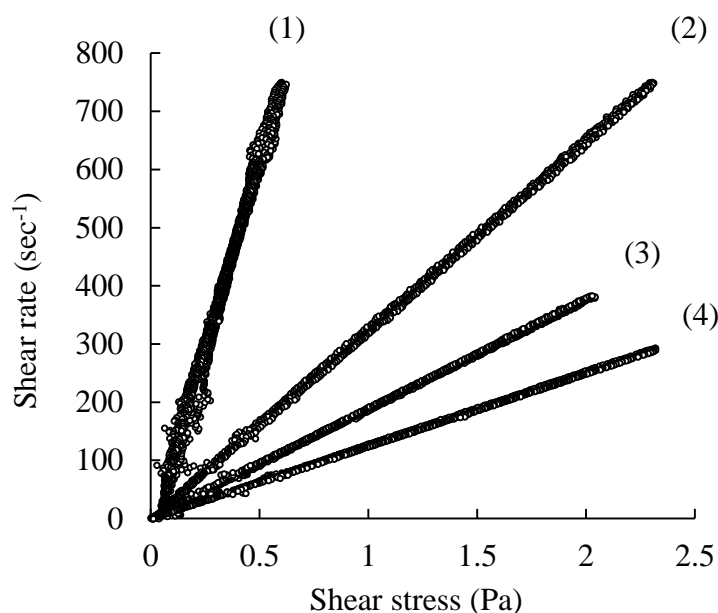


Fig. 7 Rheogram of various solutions

(1) Saline, (2) 10% PVP,
(3) 15% PVP, (4) 20% PVP

Table 5 Viscosity properties of various solutions

	Viscosity (mPa·s)	Yield value (mPa)
Saline	1.00	0.04
10% PVP	3.09	-0.01
15% PVP	5.33	-0.01
20% PVP	7.98	0.00

Figure 8 に 1.0 w/v% PLA 含有 FD-20 生理食塩液、又は種々濃度 (10, 15 及び 20 w/v%) の PVP 及び 1.0 w/v% PLA 含有 FD-20 生理食塩液を小腸切片に滴下した後の接触表面積を示す。Control 群の接触表面積はほぼ同等であったが、PLA (15) 及び PLA (150) のいずれにおいても、PVP 添加群では PVP 濃度に依存して接触表面積は減少する傾向がみられ、20 w/v% PVP 添加群は control 群と比較して有意に減少した ($P < 0.05$)。

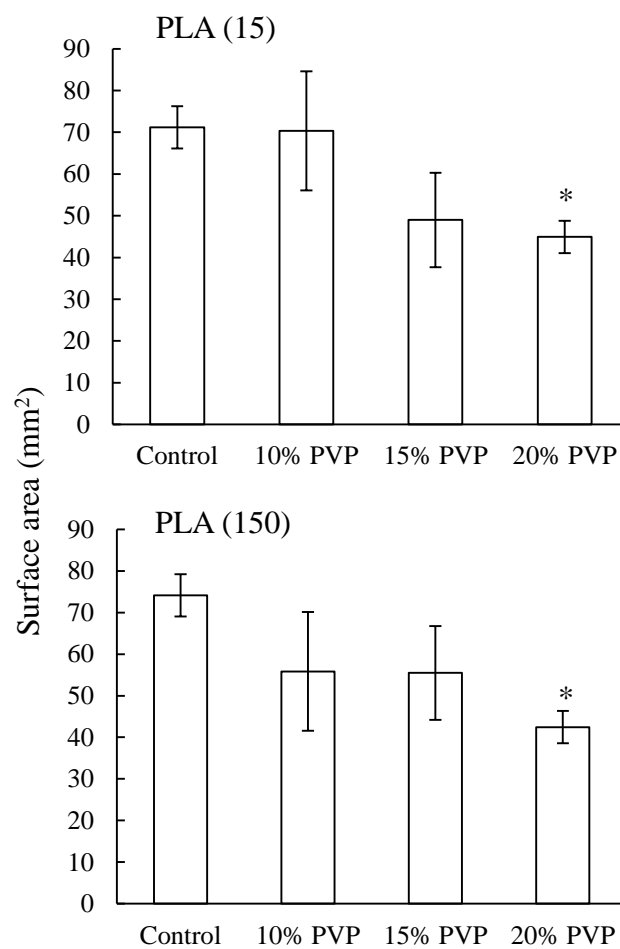


Fig. 8 Surface area between mucous membrane and various solutions

Each data column represents the mean \pm S.E. (n=4-7).

* $P < 0.05$ compared with control.

Figure 9 に 60°に傾斜させた SSP 上に滴下した 1.0 w/v% PLA 含有 FD-20 生理食塩液、又は種々濃度 (10, 15 及び 20 w/v%) の PVP 及び 1.0 w/v% PLA 含有 FD-20 生理食塩液がラットの鼻孔入口から咽頭側までの距離とほぼ同等である 4 cm を移動した時間を示す。いずれの分子量の PLA においても、PVP の添加により滞留時間は control 群と比較して延長し、その延長の程度は PVP の濃度に依存した。また、PVP の添加による滞留時間の延長効果は、PLA (150) を添加した方が PLA (15) よりも高く、分子量の大きい PLA (150) に、PVP の滞留性改善効果をより高める作用があることが示された。

PVP は、15 w/v% まで有意な粘膜接触表面積の減少を認めることなく、濃度依存的に滞留性を増大させたため、以降は 15 w/v% PVP を実験に用いた。

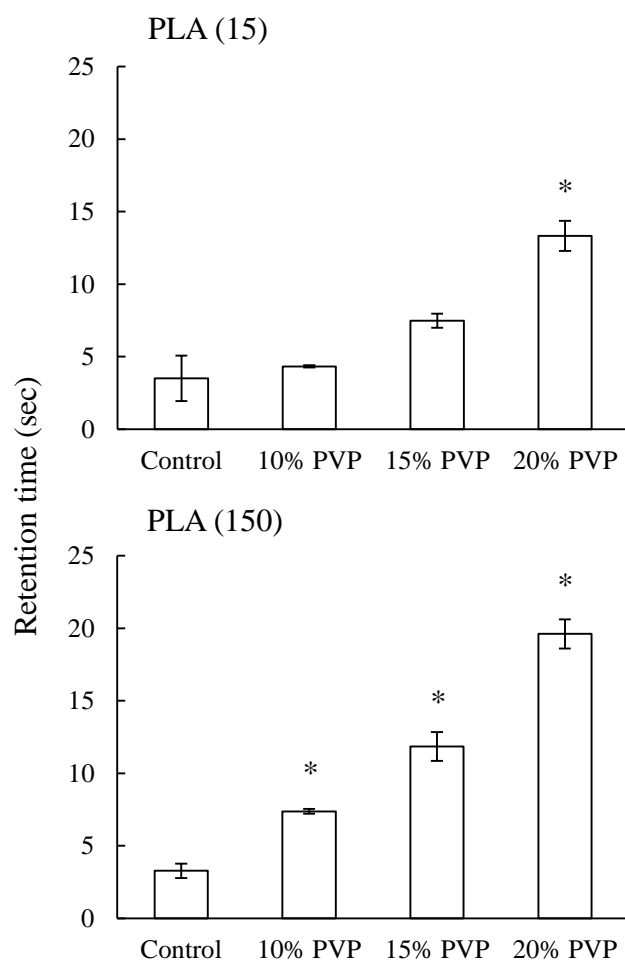


Fig. 9 Retention time of various solutions on stainless steel plate

Each data column represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

* $P < 0.05$ compared with control.

2-1-3-2. FD-20 鼻腔内投与後の体内動態に対する PVP の影響

FD-20 静脈内投与後の体内動態を評価した。Figure 10 に種々投与量で FD-20 を静脈内投与した後の血漿中 FD-20 濃度推移を、Table 6 に得られた動態学的パラメータを、Figure 11 に投与量と AUC_{FD-20} の関係を示す。いずれの投与量においても血漿中 FD-20 濃度は二相性の消失パターンを示し、2-コンパートメントモデルで良好に表された。これらの投与量において体内動態は線形であり、各投与量における血漿中 FD-20 濃度推移の結果から算出した消失パラメータ k_{12} (min^{-1})、 k_{21} (min^{-1})、 k_{10} (min^{-1})、 Vd_{ss} (mL) 及び CL_{tot} (mL/min) は、それぞれ 0.0500 ± 0.0036 、 0.0236 ± 0.0014 、 0.0208 ± 0.0011 、 37.0 ± 2.06 及び 0.253 ± 0.025 であり、投与量による大きな違いはみられなかった。また、投与量と AUC_{FD-20} との間に有意な直線関係が認められた (Fig. 11, $R^2 = 0.966$, $P < 0.05$)。

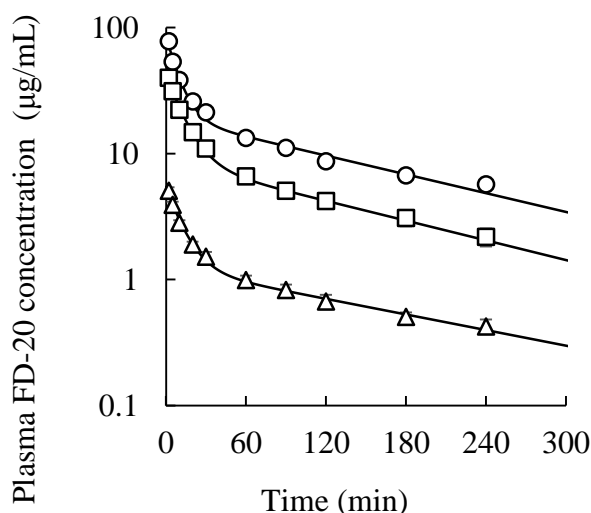
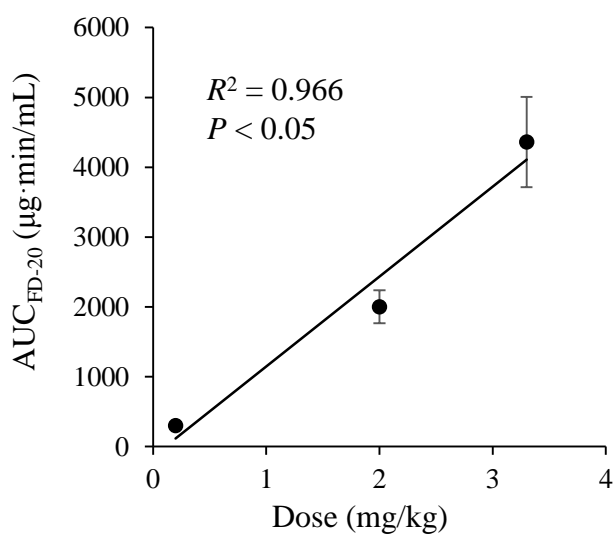


Fig. 10 Plasma FD-20 concentration after *i.v.* administration in rats and simulated line from 2-compartment model
○ ; 3.3 mg/kg, □ ; 2.0 mg/kg, △ ; 0.2 mg/kg
Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-5).

Table 6 Pharmacokinetic parameters of FD-20 after *i.v.* administration

Dose (mg/kg)	0.2	2.0	3.3
A (µg/mL)	4.2 ± 0.3	34.2 ± 2.0	66.8 ± 1.9
α (min ⁻¹)	0.0839 ± 0.0050	0.0799 ± 0.0062	0.1107 ± 0.0086
$t_{1/2\alpha}$ (min)	8.35 ± 0.49	8.93 ± 0.83	6.34 ± 0.53
B (µg/mL)	1.24 ± 0.14	8.67 ± 0.44	19.15 ± 1.77
β (min ⁻¹)	0.00475 ± 0.00014	0.00601 ± 0.00058	0.00572 ± 0.00031
$t_{1/2\beta}$ (min)	146.11 ± 4.17	119.43 ± 11.08	121.81 ± 6.95
k_{21} (min ⁻¹)	0.0228 ± 0.0019	0.0210 ± 0.0019	0.0290 ± 0.0018
k_{10} (min ⁻¹)	0.0176 ± 0.0006	0.0228 ± 0.0018	0.0219 ± 0.0017
k_{12} (min ⁻¹)	0.0483 ± 0.0034	0.0421 ± 0.0035	0.0655 ± 0.0070
V_1 (mL)	10.7 ± 0.9	14.0 ± 1.1	10.2 ± 0.4
V_2 (mL)	22.9 ± 2.3	28.0 ± 2.2	23.0 ± 1.5
Vd_{ss} (mL)	33.6 ± 3.2	42.0 ± 3.2	33.2 ± 1.6
CL_{tot} (mL/min)	0.189 ± 0.019	0.321 ± 0.039	0.224 ± 0.023
AUC_{FD-20} (µg·min/mL)	298 ± 18	2001 ± 302	4363 ± 292

Each data represents the mean ± S.E. (n=3-5).

**Fig. 11 Relationship between dose and AUC_{FD-20} after *i.v.* administration of FD-20 in rats**

Each data point represents the mean ± S.E. (n=3-5).

異なる分子量の PLA と PVP の混合システムを用いた FD-20 鼻腔内投与後の体内動態における PVP の影響を評価した。Figure 12 に 1.0 w/v% PLA 含有 FD-20 生理食塩液、又は 15 w/v% PVP 及び 1.0 w/v% PLA 含有 FD-20 生理食塩液を鼻腔内投与した後の血漿中 FD-20 濃度推移を、Table 7 に得られた動態学的パラメータを示す。

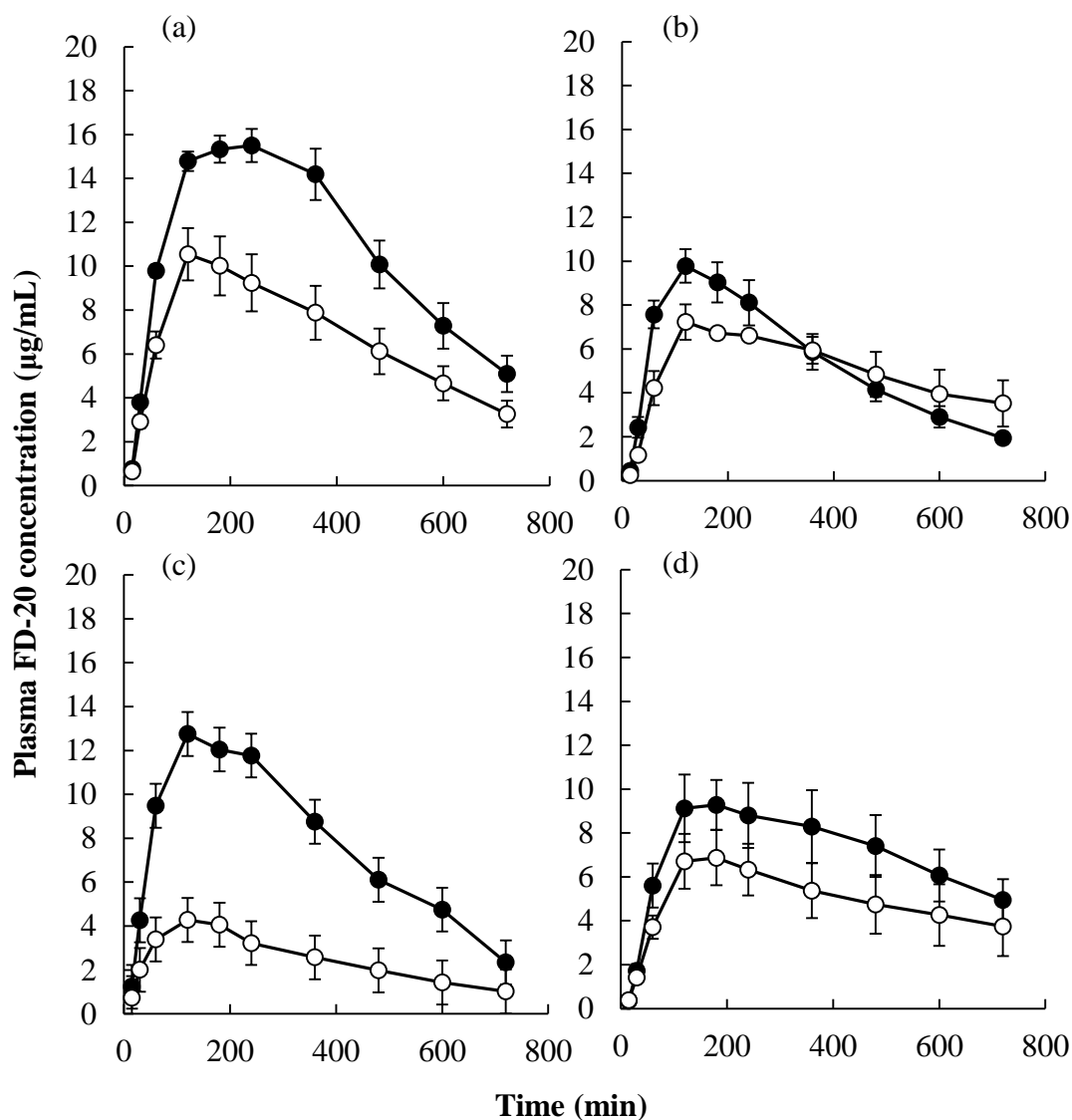


Fig. 12 Plasma FD-20 concentrations after *i.n.* administration under various conditions in rats

●: Closed system, ○: Open system

(a) With 1.0% PLA (15)

(b) With 1.0% PLA (15) and 15% PVP

(c) With 1.0% PLA (150)

(d) With 1.0% PLA (150) and 15% PVP

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

Closed system において、PLA (15) 単独併用群は PLA (150) 単独併用群より高い AUC_{FD-20} を示した。また、PVP の併用により、PLA (15) 併用群における $C_{max\ FD-20}$ 及び AUC_{FD-20} は、有意に低下し、PLA (150) 併用群の $C_{max\ FD-20}$ も低下傾向にあった。PVP の併用により $C_{max\ FD-20}$ 及び AUC_{FD-20} が低下したことから、PVP が経鼻投与製剤の粘膜接触表面積、及び PLA の吸収促進効果や PVP システムからの FD-20 及び PLA の放出を減少または低下させた可能性が考えられた。

薬液を食道側に流出できるようにした open system では、全ての条件で closed system より低い血漿中 FD-20 濃度推移を示し、 AUC_{FD-20} は低下したことから、食道側への薬液の流出により FD-20 の吸収が低下することが示された。Open system においても、PLA (15) 単独併用群は PLA (150) 単独併用群より高い AUC_{FD-20} を示した。また、PVP の併用により、PLA (15) 併用群における $C_{max\ FD-20}$ 及び AUC_{FD-20} は減少したが、PLA (150) 併用群では増大した。

PLA (15) 単独併用群の $F_{o/c}$ は 62.3% であり、PLA (150) 単独併用群の 32.7% より高く、PLA (15) は PLA (150) より open system による影響が小さいことが示された。いずれの分子量の PLA においても、15 w/v% PVP の併用により $F_{o/c}$ は増大し、粘膜吸収促進剤として異なる分

Table 7 Pharmacokinetic parameters of FD-20 after *i.n.* administration under various conditions in rats

	PLA (1.0%)	$C_{max\ FD-20}$ ($\mu g/mL$)	$T_{max\ FD-20}$ (min)	AUC_{FD-20} ($\mu g \cdot min/mL$)	$F_{o/c}$ (%)
<i>Closed system</i>					
—	PLA (15)	16.0 ± 0.8	210.0 ± 37.1	8755.9 ± 687.0	
15% PVP	PLA (15)	$10.0 \pm 0.8^*$	132.0 ± 22.4	$4279.9 \pm 424.1^*$	
—	PLA (150)	12.9 ± 1.9	140.0 ± 20.0	6006.3 ± 1190.8	
15% PVP	PLA (150)	9.7 ± 1.2	165.0 ± 28.7	6004.5 ± 1005.9	
<i>Open system</i>					
—	PLA (15)	$10.6 \pm 1.2^{**}$	140.0 ± 12.6	$5456.7 \pm 795.7^{**}$	62.3
15% PVP	PLA (15)	7.7 ± 0.5	200.0 ± 80.0	4269.9 ± 488.8	99.8
—	PLA (150)	$4.3 \pm 0.9^{**}$	140.0 ± 20.0	$1961.5 \pm 465.7^{**}$	32.7
15% PVP	PLA (150)	7.0 ± 1.3	170.0 ± 10.0	4221.5 ± 1067.7	70.3

Each data represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

* P : < 0.05 compared with the group without 15% PVP.

** P : < 0.05 compared with the closed system.

分子量の PLA を用いた水溶性高分子薬物の経鼻送達において、PVP の付着効果により製剤の鼻腔内滞留性が改善可能であることが示唆された。

第4節 考察

鼻腔内に投与された薬物は、鼻腔構造に伴う物理的クリアランスや mucociliary clearance により除去され、これらは薬物吸収特性に大きく影響する^{40,43,44)}。従って、鼻粘膜からの薬物の吸収を期待する経鼻投与製剤の開発では、製剤の付着性を高め、鼻腔内滞留性を改善するための様々な検討が行われている。しかし、ペプチドやタンパク質性医薬品の鼻粘膜吸収における鼻腔内滞留性の影響に関する知見はほとんど無い。

そこで本章では、PLA を併用した水溶性高分子モデル薬物 FD-20 の鼻腔内投与において、生体付着性物質として PVP を用い、その添加による鼻腔内滞留性の改善効果及び吸収への影響を評価した。以前に報告された starch による付着効果に関する検討では、starch 濃度の増大に伴って鼻腔内滞留性は改善したものの、強い粘性により粘膜接触表面積が減少し、薬物の鼻粘膜吸収が低下した¹⁸⁾。よって、薬物吸収に十分な接触表面積を確保しつつ滞留性を向上させる条件を用いることが、経鼻投与製剤に付与する機能として望ましいと考えられた。ラットの腸管粘膜に対する接触表面積及び傾斜させた SSP 上への付着滞留性を評価したところ、15 w/v% PVP が接触表面積をある程度確保したまま滞留性を改善した。特に PLA (150) との併用により、経鼻投与製剤の滞留性は、PLA (15) との併用よりも改善し、製剤中の PLA の分子量も滞留に関わることが考えられた。そこで 15 w/v% PVP を用いて、*in vivo* で分子量の異なる PLA を併用した FD-20 の鼻粘膜吸収に対する PVP の影響を評価した。その結果、いずれの分子量の PLA との併用においても PVP による製剤の吸収の改善効果が認められた。しかし、特に PLA (15) を単独併用した closed system において、PVP の併用により C_{\max} FD-20 及び $AUC_{\text{FD-20}}$ が低下し、PVP が経鼻投与製剤の粘膜接触表面積、及び PLA の吸収促進効果や PVP システムからの FD-20 及び PLA の放出を減少または低下させた可能性が考えられた。

また、PLA (15) 併用時の FD-20 の動態学的特性から推定した滞留性改善効果は、15 w/v%

PVP 併用時、非併用時共に PLA (150) より高く、SSP における滞留性改善効果とは一致しなかった。これは、生理的な条件において、何らかの影響により PLA (15) が経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性を高めている、もしくは PLA (150) の作用が阻害されていることが考えられる。PLA の粘膜付着性に関する報告はこれまでになされていないが、PLA と同様にカチオン性のポリマーである chitosan は、水溶性高分子薬物に対する粘膜透過促進効果だけでなく、粘膜付着効果も有することが知られている。Chitosan の有するアミノ基は、粘液の主要な構成タンパク質である mucin 分子内のシアル酸と静電的な相互作用をすることにより複合体を形成し、粘膜表面における付着効果を高めると考えられている^{27,28,45)}。Mucin との相互作用における chitosan の分子量依存性は見出されていないが⁴⁵⁾、chitosan と同様にカチオン性を有する PLA においても、mucin との相互作用により、分子量に依存して粘膜付着効果が高まったり低下したりする可能性が考えられる。

以上、1.0 w/v% PLA (15) 又は 1.0 w/v% PLA (150) 併用 FD-20 鼻腔内投与において、15 w/v% PVP を併用する効果を評価した。投与溶液が鼻腔から除去される open system において、投与溶液の鼻腔内滞留性の改善を AUC_{FD-20} の比較から評価した場合、PVP の作用は、PLA (150) 併用群では認められるものの、PLA (15) 併用群では認められず、AUC_{FD-20} が open system で最も高い条件は、PLA (15) 単独併用群だった。このことは、滞留性において PVP だけでなく PLA も関わり、両者間の相互作用、またそれに関わる PLA の分子量依存性などが複雑に関係することによると考えられた。また、滞留性における PLA の分子量依存性は、SSP 上と *in vivo* 吸収性における滞留性の結果において一致せず、生理的条件下では何らかの生体成分との相互作用も影響した可能性も考えられた。rhGH では、更に複雑な相互作用を考慮する必要があるため、次章において rhGH を用いて更に検討することとした。

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

第1節 小緒言

前章において、水溶性モデル高分子薬物 (FD-20) を、粘膜吸収促進剤である PLA と共に PVP を併用して鼻腔内投与することで、投与溶液の鼻腔内滞留性を高め、薬液が流出する条件において吸収を改善することを期待した。しかし、明確な結果は得られなかった、FD-20 は直鎖状の高分子であり、一方、rhGH は2つのジスルフィド結合により球状構造を示す⁴⁶⁻⁴⁸⁾。この立体構造の違いや rhGH と PLA 間の相互作用が、PLA 及び PVP の共存下における薬物吸収性にも影響する可能性がある。第1編の結果により、この rhGH と PLA の相互作用は、PLA (150) の併用下での rhGH の見かけの分子サイズの増大も観察され、PLA の分子量により異なる可能性がある。従って、鼻腔内投与後の血漿中 rhGH 濃度プロファイルが、PLA と PVP の併用によりどのような影響を受けるかを明らかにする必要がある。

そこで第2編第2章では、rhGH 鼻腔内投与における PVP の滞留性改善効果を明らかにするため、第1編で吸収性を大きく改善した、1.0 w/v% PLA (15) 及び 1.0 w/v% PLA (150) を併用した rhGH 鼻腔内投与における 15 w/v% PVP の滞留性改善効果を、第2編第1章と同様に open system と closed system により評価した。また、PVP を併用した rhGH-PLA 鼻腔内投与製剤の粘性には、PVP だけでなく rhGH や PLA も影響した可能性が考えられたため、回転粘度計を用いて、rhGH-1.0 w/v% PLA (150) コハク酸混合製剤並びに rhGH-1.0 w/v% PLA (150)-15 w/v% PVP コハク酸混合製剤の粘性を分析した。

第2節 実験方法

2-2-2-1. 試薬

rhGH (Saizen[®])、poly-L-arginine hydrochloride (PLA (15) : 14.8 kDa, PLA (150) : 147.8 kDa)、urethane 及び Quantikine[®] ELISA Human Growth Hormone Immunoassay kit は 1-1-2-1 と同様の試薬を使用した。Polyvinylpyrrolidone K25 (PVP, M.W. 35 kDa) は 2-1-2-1 と同様の試薬を使用した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2-2-2-2. 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を使用した。

2-2-2-3. rhGH 経鼻投与製剤の調製

Saizen[®]を製剤の指示通りに調整した (5.83 mg/mL)。異なる分子量 (PLA (15) : 14.8 kDa, PLA (150) : 147.8 kDa) の PLA 及び PVP をコハク酸緩衝液 (50 mM, pH=4.4) に溶解し、PLA コハク酸緩衝液 (2.0 及び 5.0 w/v%) 及び PVP コハク酸緩衝液 (50 w/v%) を調製した。最終濃度を rhGH が 2.91 mg/mL、PLA が 1.0 w/v%、PVP が 15 w/v% となるよう混合した。PVP を含まない製剤も調製した。

2-2-2-4. rhGH 閉鎖系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Closed system)

1-1-2-6 と同様の方法でラットに外科的処置を施した後、ディスペンサーを用いて 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 rhGH コハク酸緩衝液 (1.17 mg/kg, 0.4 mL/kg) 又は 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 及び 15 w/v% PVP を含む rhGH コハク酸緩衝液 (1.17 mg/kg, 0.4 mL/kg) を左鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与後、瞬間接着剤 (アロンアルファ[®], 東亜合成化学株式会社, 東京) で鼻孔を塞いだ。その後、ヘパリン処理した注

射筒を用いて、投与前及び投与後から最大 16 時間までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.1 mL を採取した。

2-2-2-5. rhGH 開放系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Open system)

1-1-2-6 と同様にラットに麻酔し外科的処置を施した後、投与した薬液が食道側に流出できるように先端を塞いでいないシリコンチューブ (シラスコン®医療用チューブ SH No. 1, カネカメディックス株式会社, 大阪) を食道側から咽頭側に向けて挿入した。その後、ディスペンサーを用いて 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 含有 rhGH コハク酸緩衝液 (1.17 mg/kg, 0.4 mL/kg) 又は 1.0 w/v% PLA (PLA (15) 及び PLA (150)) 及び 15 w/v% PVP を含む rhGH コハク酸緩衝液 (1.17 mg/kg, 0.4 mL/kg) を左鼻腔内の鼻孔入口から 8 mm のところに投与した。投与から 10 秒経過した後、固定板を 30°、更にラットの頭部を 30°に傾斜させた。投与後、ヘパリン処理した注射筒を用いて、閉鎖系経鼻投与実験と同様の時間間隔で右頸静脈より血液 0.1 mL を採取した。

2-2-2-6. 血漿採取法

1-1-2-7 と同様の方法で血漿を採取し、保存した。

2-2-2-7. 血漿中 rhGH 濃度の測定

1-1-2-8 と同様の方法で測定した。

2-2-2-8. 粘度の測定

付属のロータを装着 (1.0° 34' × R24) したコーンプレート型回転粘度計 (RE-215L, 東機産業株式会社, 東京) に、15 w/v% PVP コハク酸緩衝液、1.0 w/v% PLA (150) コハク酸緩衝液、

rhGH (2.91 mg/mL) と PLA (150) (1.0 w/v%) のコハク酸緩衝液、並びに rhGH (2.91 mg/mL) と PLA (150) (1.0 w/v%) と PVP (15 w/v%) のコハク酸緩衝液を注入し、回転数を連続的に変化させて (0→100→0 rpm, 20 分, 34 °C) 流動曲線を得た。得られた流動曲線の回帰直線から粘度及び降伏値を算出した。

2-2-2-9. 動態学的解析

1-1-2-9 と同様の方法で、 C_{\max} rhGH、 T_{\max} rhGH、 AUC_{rhGH} 、MRT 及び MAT を算出した。

また、開放系経鼻投与群の $F_{\text{rhGH}}(F_{\text{open}})$ 及び閉鎖系経鼻投与群の $F_{\text{rhGH}}(F_{\text{closed}})$ から、2-1-2-12 と同様に改善率 ($F_{\text{o/c}}$) を求めた。

2-2-2-10. 統計解析

二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

2-2-3-1. rhGH 鼻腔内投与後の体内動態に及ぼす PVP の影響

異なる分子量の PLA 及び PVP を併用して rhGH を鼻腔内投与した後の体内動態における PVP の影響を評価した。Figure 13 に 1.0 w/v % PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤、又は 15 w/v%

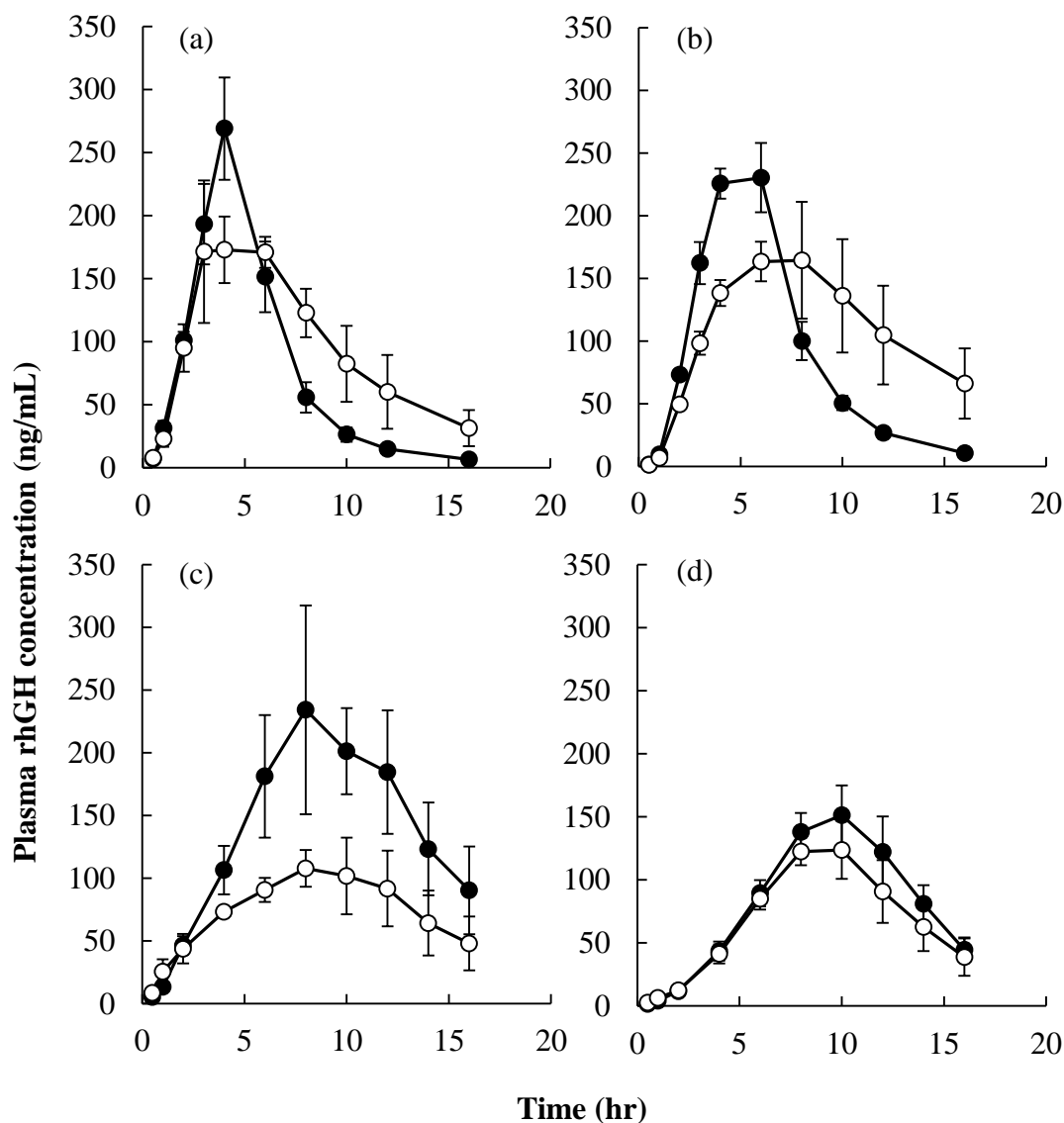


Fig. 13 Plasma rhGH concentrations after *i.n.* administration under various conditions in rats

●: Closed system, ○: Open system

(a) With 1.0% PLA (15)

(b) With 1.0% PLA (15) and 15% PVP

(c) With 1.0% PLA (150)

(d) With 1.0% PLA (150) and 15% PVP

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table 8 Pharmacokinetic parameters of rhGH after *i.n.* administration under various conditions in rats

	PLA (1.0%)	C _{max} rhGH (ng/mL)	T _{max} rhGH (hr)	AUC _{rhGH} (ng•hr/mL)	MRT (hr)	MAT (hr)	F _{rhGH} (%)	F _{o/c} (%)
<i>Closed system</i>								
—	PLA (15)	269.0 ± 40.6	4.00 ± 0.00	1256.1 ± 197.6	5.16 ± 0.09	4.87	16.9	
15% PVP	PLA (15)	239.7 ± 23.8	4.67 ± 0.67	1456.4 ± 102.1*	6.05 ± 0.18	5.75	19.6	
—	PLA (150)	285.2 ± 62.2	10.67 ± 1.33	2328.7 ± 97.1	9.40 ± 0.65	9.11	31.3	
15% PVP	PLA (150)	159.4 ± 18.3	8.67 ± 0.67	1362.0 ± 126.1*	9.72 ± 0.42	9.43	18.3	
<i>Open system</i>								
—	PLA (15)	218.9 ± 35.1	5.00 ± 1.53	1788.0 ± 118.2	7.62 ± 0.79**	7.32	24.0	142.3
15% PVP	PLA (15)	183.7 ± 36.0	6.67 ± 0.67	1825.2 ± 386.6	9.05 ± 0.43**	8.76	24.5	125.3
—	PLA (150)	119.1 ± 24.1	8.67 ± 0.67	1246.3 ± 242.4**	8.73 ± 0.57	8.43	16.8	53.5
15% PVP	PLA (150)	137.3 ± 19.3	8.67 ± 0.67	1154.4 ± 138.7	9.42 ± 0.53	9.12	15.5	84.8

Each data represents the mean ± S.E. (n=3).

* *P*: < 0.05 compared with the group without 15% PVP.

** *P*: < 0.05 compared with the closed system.

PVP 及び 1.0 w/v% PLA 含有 rhGH 経鼻投与製剤を鼻腔内投与した後の血漿中 rhGH 濃度推移を、Table 8 に得られた動態学的パラメータを示す。Closed system と open system の比較において、PLA (15) と PLA (150) では異なった影響を示し、PLA (15) では予想に反して open system で高い AUC_{rhGH} が観察され、100%を超える F_{o/c} が得られたが、PVP の併用により F_{o/c} は低下した。また、PLA (15) 併用群における open system では、closed system と比較してより持続的な血漿中濃度プロファイルが観察された。Closed system と open system では投与後の鼻腔内の粘液組成が異なり、それによって rhGH と PLA 間の相互作用が異なることも影響因子として考えられる。PLA (150) と PVP を併用すると、どちらのシステムでも PLA (150) 単独群より AUC_{rhGH} が低下したが、F_{o/c} は増大した。この AUC_{rhGH} の低下は closed system でより大きく、このことも実験処置の違いによる鼻腔内での相互作用の変化が関係するとも考えることもできる。また、FD-20 の鼻腔内投与とは異なり、PLA (150) 併用群における AUC_{rhGH} が PVP の併用により低下したことから、rhGH-PLA (150) -PVP 混合製剤では、rhGH または rhGH-PLA (150) 複合体の存在が PVP に期待される粘性にも影響した可能性や rhGH-PLA (150) 複合体の形成により PVP 溶液中における拡散性が低下した可能性が考えられた。Open system での最大の AUC_{rhGH} は、PLA (15) と PVP の併用群で観察され、PVP 併用の有効性が

確認された。PLA (15) では、PVP の併用により、closed system 及び open system 共に、 AUC_{rhGH} 及び MRT は増加した。一方、PLA (150) では、PVP の併用により closed system 及び open system 共に MRT は増加したが AUC_{rhGH} は減少した。PLA (15) もしくは PLA (150) を PVP と併用した群におけるこれらの動態パラメータの変化も、rhGH 経鼻送達の最適化のためには十分考慮されるべきと考える。

2-2-3-2. rhGH 経鼻投与製剤の粘性に及ぼす PVP の影響

2-2-3-1 において、rhGH-PLA (150) -PVP 混合製剤では、rhGH 及び PLA (150) が PVP に期待される粘性特性にも影響したと考えられ、粘性の増大や rhGH-PLA (150) 複合体の形成により PVP 溶液における拡散性が低下した可能性も考えられた。そこで、この影響を明らかにするため、回転粘度計を用いて rhGH-1.0 w/v% PLA (150) コハク酸緩衝液並びに rhGH-1.0 w/v% PLA (150)-15 w/v% PVP コハク酸緩衝液の粘性を分析した。

Figure 14 に rhGH (2.91 mg/mL) と PLA (150) (1.0 w/v%) のコハク酸緩衝液、並びに rhGH (2.91 mg/mL) と PLA (150) (1.0 w/v%) と PVP (15 w/v%) のコハク酸緩衝液の流動曲線を、Table 9 に 15 w/v% PVP コハク酸緩衝液、1.0 w/v% PLA (150) コハク酸緩衝液、rhGH (2.91 mg/mL) と PLA (150) (1.0 w/v%) のコハク酸緩衝液、並びに rhGH (2.91 mg/mL) と PLA (150)

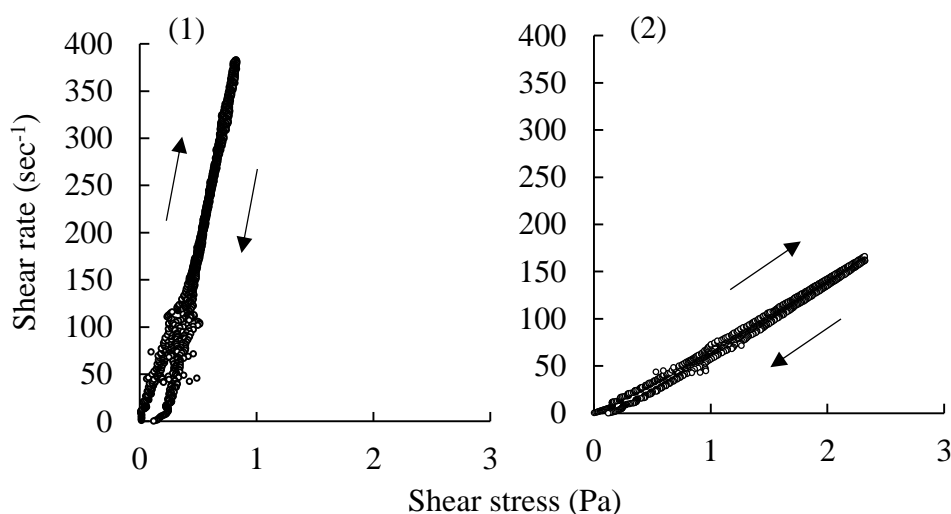


Fig. 14 Rheogram of various solutions
 (1) rhGH-1.0% PLA (150) mixture
 (2) rhGH-1.0% PLA (150) -15% PVP mixture

Table 9 Viscosity properties of various dosage solutions

	Viscosity (mPa·s)	Yield value (mPa)
15% PVP succinate solution	6.02	-0.02
1.0% PLA (150) succinate solution	1.51	0.01
rhGH-1.0% PLA (150) mixture	1.96	0.13
rhGH-1.0% PLA (150) -15% PVP mixture	13.59	0.12

(1.0 w/v%) と PVP (15 w/v%) のコハク酸緩衝液の粘度及び降伏値を示す。PVP 単独の溶液及び rhGH-PLA (150) 混合液の粘度は、それぞれ 6.02 及び 1.96 mPa·s であったのに対し、rhGH-PLA (150) -PVP 混合液では 13.59 mPa·s と高い粘度を示した。また、rhGH-PLA (150) 混合液、rhGH-PLA (150) -PVP 混合液共に、下降曲線にわずかな粘度の増大を示す上昇曲線とのずれが認められ、PVP 単独溶液及び PLA (150) 単独溶液では認められなかったわずかな降伏値がみられた。

第4節 考察

本章では、第1編で検討した 1.0 w/v% PLA (15) または 1.0 w/v% PLA (150) を併用したときの rhGH の鼻粘膜吸収に対する 15 w/v% PVP の影響を、open system と closed system の2つの系で評価した。

PLA (15) における血漿中 rhGH 濃度推移及び $F_{0/c}$ の結果から、open system では血漿中濃度推移が大きく変化し、より持続的な血漿中濃度を示した。この結果は、頭部の傾斜による鼻腔内の環境の変化が、吸収部位や投与溶液の状態に影響した可能性を示唆している。以前の研究により、ラットへの鼻腔内投与において 8.9 kDa の 1.0 w/v% PLA では投与から4時間程度、42.4 kDa の 1.0 w/v% PLA では投与から12時間程度で、PLA 非併用時と同等の鼻粘膜吸収性に戻り、この粘膜吸収促進作用の持続性には酵素による PLA の分解が影響することが報告されている²⁰⁾。1.0 w/v% PLA (15) による吸収促進作用の持続性は、8.9 kDa のそれよりも長いと考えられるが、Fig. 13 の (a) 及び (b) の結果は、open system において PLA (15) の作用がより長く持続しないと説明できない。推論の一つとしては、ラット頭部の傾斜により、薬液が複雑な構造をとる嗅神経領域に入り、その部位の酵素的環境が低いことが考えられた。Open system と closed system の2つの系において、PLA (15) 併用群では PVP の併用による AUC_{rhGH} の増加と $F_{0/c}$ の減少が認められた。これは、PVP の併用が、付着滞留性の向上だけでなく、比較的鼻腔内において分解の速い PLA (15) の徐放化による粘膜透過促進効果の持続化などが複雑に影響した結果と考えられた。第2編第1章において、PLA が粘液との相互作用を介して粘膜付着性を示す可能性について述べたが、rhGH の鼻腔内投与においても FD-20 の鼻腔内投与と同様に PLA (15) が PLA (150) より高い AUC_{rhGH} 及び $F_{0/c}$ を示し、PLA (15) が粘膜付着性と粘膜透過性の両方を向上させる可能性が示唆された。この PLA (15) の粘膜付着効果と粘膜透過促進効果は、rhGH との相互作用にも影響を受けたために FD-20 とは異なった結果が得られたと考えられ、open system と closed system における鼻腔

内環境の違いも PVP の効果に影響した可能性もある。

PLA(150) 併用群では、open system と closed system の両方のシステムにおいて AUC_{rhGH} が減少したが、 F_{oc} は増加した。これは、PLA (150) と PVP の併用では、複合体の形成により見かけの分子量が著しく増大して rhGH の放出が抑制された結果、 AUC_{rhGH} が低下したと考えられた。また、PVP は、PLA (150) 単独では PLA (15) と比較して鼻腔内の環境では不十分であった製剤の付着滞留性を補い、 F_{oc} が増加したと考えられた。PVP の併用による吸収の低下に関しては、rhGH、PLA(150) 及び rhGH-PLA(150) 複合体が PVP の有する粘性特性自体に影響した可能性も考えられた。そこで、rhGH-PLA (150) 混合液と rhGH-PLA (150) - PVP 混合液の粘性を分析した (Table 9)。その結果、1.0 w/v% PLA(150) コハク酸緩衝液の粘度は約 1.5 mPa·s、rhGH-PLA(150) 混合液の粘度は約 2.0 mPa·s であり、PLA と rhGH の相互作用の粘度への影響は少なかったが、rhGH-PLA (150) -PVP 混合液の粘度は、15 w/v% PVP コハク酸緩衝液の粘度の約 2.3 倍となり、PVP の添加により鼻腔内投与製剤の粘性は大きく増大した。PVP 単独での粘度よりも高くなるこの結果は、PVP が rhGH 及び PLA との混合において何らかの相互作用が生じている可能性を示唆している。その結果として、rhGH-PLA 複合体の吸収部位での拡散性が低下し、吸収に影響したと考えられた。経鼻製剤に過度に粘性を持たせると、薬物放出性や粘膜における吸収面積が低下し、吸収量が低下することが報告されており¹⁸⁾、rhGH-PLA(150) -PVP 混合液の鼻腔内投与においても同様に吸収が低下したと考えられる。また、rhGH-PLA(150) 混合液及び rhGH-PLA(150) -PVP 混合液では、わずかな降伏値がみられ、この特性が混合液の鼻腔内における滞留に影響した可能性が考えられた。

以上より、15 w/v% PVP を 1.0 w/v% PLA と併用することにより、rhGH 経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性や吸収性が改善する傾向が認められた。しかし、PVP の併用による影響は単純なものではなく、それゆえ、鼻腔内投与における生体付着性物質の利用には、鼻腔内投与製剤の

組成を厳密に最適化する必要があることが明らかとなった。本編で行った open system による滞留性評価結果は、覚醒状態における姿勢や体動及び mucociliary clearance により薬液が除去される条件では異なることも考えられ、本編で示したように種々要因により影響を受けやすいと考えられる鼻腔内投与製剤の組成の最適化のためには、覚醒状態や体動などが実際の投与条件に近い環境で試験を行っていくことが必要であると考えられる。

第3編 下垂体摘出ラットへの rhGH 鼻腔内投与後の成長促進効果

第1章 下垂体摘出ラットにおける rhGH 鼻腔内投与後の体内動態

第1節 小緒言

ヒト成長ホルモンは下垂体から分泌されるホルモンであり、主に肝臓におけるインスリン様成長因子 I (IGF-I) の分泌を促進することにより成長促進作用を示す。成長ホルモン分泌不全に伴う rhGH 補充療法では、正常な成長ホルモン分泌パターンである夜間の急激な血中成長ホルモン濃度の増加を再現するために夜間の投与が勧められている。rhGH 投与後の血中 rhGH 濃度推移と薬理作用の関連性に関しては、1990 年代に複数の研究が行われている⁴⁹⁻⁵³⁾。rhGH の最高血中濃度が皮下投与の 10 倍以上である静脈内投与であっても血中濃度が持続しない場合には薬理作用が認められず、10 時間程度血中濃度が持続する皮下投与や持続点滴により、間欠的な注射投与と比較して高い血中 IGF-I 濃度が得られることが報告されている⁴⁹⁻⁵³⁾。このため、近年では高い薬理効果とアドヒアランスの改善が得られるよう、血中濃度を数日間以上持続する製剤に関する研究も行われている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。しかし、それらのほとんどは注射投与によるものであり、非侵襲的な投与法に関する研究は少ない。また、その少ない例として rhGH 経鼻投与製剤に関する検討も行われているが^{57,58)}、薬物動態学的な評価だけでなく薬理効果も評価している研究は皆無である。

これまでに PLA 及び PVP を併用することにより、rhGH の鼻腔内投与において rhGH の鼻腔内滞留性及び鼻粘膜透過性を改善した。しかし、上述のように高い血中濃度が得られても薬理効果が十分発揮されない可能性もあるため、鼻腔内投与における薬理効果と体内動態の関係性を明らかにすることは重要である。これまでの *in vivo* 実験では、平井らの方法で処置を行い、麻酔下のラットを用いて動態学的な評価を行った³⁴⁾。しかし、薬物の体内動態は麻酔条件により変動することが報告されており、外科的処置を行ったラットを用いた経鼻投与においては、姿勢や体動及び mucociliary clearance の変化が薬物の鼻粘膜吸収性に大き

く影響することが指摘されていることから^{59, 60)}、外科的処置を行わないラットに鼻腔内投与し、無麻酔条件での体内動態を評価することが必要と考えられる。また、rhGH の薬理試験には、成長ホルモン分泌不全になるように下垂体を除去したラット、すなわち Hpx ラットが用いられるが、下垂体を有しないため正常な動物とはホルモン分泌が大きく異なり、rhGH の体内動態が正常ラットと異なる可能性がある。そこで、第 3 編第 1 章ではまず、薬理試験を行う場合と同条件における rhGH の体内動態を明らかにするため、外科的処置を行っていない Hpx ラットに isoflurane を用いて 5 分間程度で覚醒する麻酔下で rhGH を経鼻投与し、その後の覚醒状態における体内動態を評価した。第 2 章では、前編において rhGH の鼻腔内滞留性及び鼻粘膜吸収性を向上させた経鼻投与製剤を Hpx ラットに投与した後の薬理効果を、rhGH 単回鼻腔内投与後の血漿中 IGF-I 濃度推移、及び rhGH 連日鼻腔内投与後の体重及び尾長の測定により評価した。

第2節 実験方法

3-1-2-1. 試薬

rhGH (Saizen[®])、poly-L-arginine hydrochloride (PLA (15) : 14.8 kDa, PLA (150) : 147.8 kDa) 及び Quantikine[®] ELISA Human Growth Hormone Immunoassay kit は 1-1-2-1 と同様の試薬を使用した。Polyvinylpyrrolidone K25 (PVP, M.W. 35 kDa) は 2-1-2-1 と同様の試薬を使用した。Isoflurane (イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」) をファイザー株式会社 (東京) から購入した。その他の試薬は全て特級品を使用した。

3-1-2-2. 実験動物

生後 5 週目に外科的処置により下垂体を除去し、その後、6 日間体重増加を認めない Wistar 系雄性ラットすなわち Hpx ラット (約 100 g) を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入した。Hpx ラットを 3 匹/cage で飼育し、自由に食餌及び水を摂取できるようにした。ただし、実験開始 16 時間前から絶食させた。なお、本研究における Hpx ラットを用いた全ての実験は城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認 (承認番号 : H24018, H25015, H26016, H27015) を得てから行った。

3-1-2-3. 頸静脈簡易カテーテル挿入術

注射針 (22 G) を切断し、針基に長さ 40 cm のシリコンチューブ (外径 2 mm, 株式会社カネカ, 大阪) を接続した。接続部と反対側のチューブの先端から 23 mm のところにチューブを巻き付けストッパーとし、カテーテルを作製した。Hpx ラットを isoflurane (1.5~5%) で吸入麻酔し、左頸静脈を露出した。頸静脈の一部を切開し、ヘパリン生理食塩液で満たしたカテーテルを頸静脈から中枢側 (心臓) に向かって挿入した。ストッパーに糸をかけ、血管とともに縫合することでカテーテルを固定した。頸背部の表皮を切開後、皮下を通してカテ

ーテルの反対側の末端（注射筒を接続する部分）を切開部から取り出し、頸静脈を露出させた切開部を縫合した。

3-1-2-4. rhGH 静脈内 (*i.v.*) 投与実験

3-1-2-3 の方法で静脈にカテーテルを挿入した Hpx ラットを isoflurane (1.5～5%) で吸入麻酔した。Saizen®を製剤の指示通りに調整し、生理食塩液で希釈して調製した rhGH 生理食塩液 (0.194, 0.583 及び 2.91 mg/kg, いずれも 1.0 mL/kg) を外側尾静脈内に投与した。投与後 5 分程度で麻酔からラットは覚醒した。投与前及び投与後から 3 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、カテーテルより血液 0.1 mL を採取した。

3-1-2-5. rhGH 皮下 (*s.c.*) 投与実験

3-1-2-4 と同様の方法で静脈へのカテーテルを挿入し、同様に一時的な麻酔を行った Hpx ラットに、Saizen®を製剤の指示通りに調整し、生理食塩液で希釈して調製した rhGH 生理食塩液 (0.583, 1.0 mL/kg) を頸背部皮下に投与した。投与前及び投与後から 4 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、カテーテルより血液 0.1 mL を採取した。

3-1-2-6. rhGH 経鼻投与製剤の調製

2-2-2-3 と同様の方法で調製した。

3-1-2-7. rhGH 鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験

3-1-2-3 と同様の方法で静脈へのカテーテルを挿入し、同様に一時的な麻酔を行った Hpx ラットに、ディスペンサーを用いて、rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg)、1.0 w/v% PLA (15) もしくは 1.0 w/v% PLA (150) を含有する rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2

mL/kg)、又はそれらに更に 15 w/v% PVP を添加した rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg) を左鼻腔入口から 5.5 mm のところに投与した。投与前及び投与後から最大 12 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、カテーテルより血液 0.1 mL を採取した。

3-1-2-8. 血漿採取法

1-1-2-7 と同様の方法で血漿を採取し、保存した。

3-1-2-9. 血漿中 rhGH 濃度の測定

1-1-2-8 と同様の方法で測定した。

3-1-2-10. 動態学的解析

1-1-2-9 と同様の方法で動態学的解析を行った。

3-1-2-11. 統計解析

二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

3-1-3-1. rhGH 鼻腔内投与後の体内動態

Figure 15 に3種類の投与量 (0.194、0.583 及び 2.91 mg/kg) で rhGH を Hpx ラットに静脈内投与した後の血漿中 rhGH 濃度推移を、Table 10 に得られた動態学的パラメータを、Figure 16 に投与量と AUC_{rhGH} の関係を示す。rhGH の体内動態は2-コンパートメントモデルで良好に表された。これらの投与量において体内動態は線形であり、各投与量における血漿中 rhGH 濃度推移の結果から算出した体内動態パラメータ k_{12} (hr^{-1})、 k_{21} (hr^{-1})、 k_{10} (hr^{-1})、 Vd_{ss} (mL) 及び CL_{tot} (mL/hr) は、それぞれ 0.52 ± 0.09 、 1.36 ± 0.11 、 6.98 ± 0.84 、 3.87 ± 0.95 及び 16.50 ± 2.67 であり、投与量による大きな違いはみられなかった。また、投与量と AUC_{rhGH} との間に有意な直線関係が認められた ($R^2 = 0.998$ 、 $P < 0.05$)。1-1-3-1 に示した麻酔下 Wistar ラットにおける rhGH 静脈内投与後の体内動態パラメータとの比較を Table 11 に示す。麻酔下 Wistar

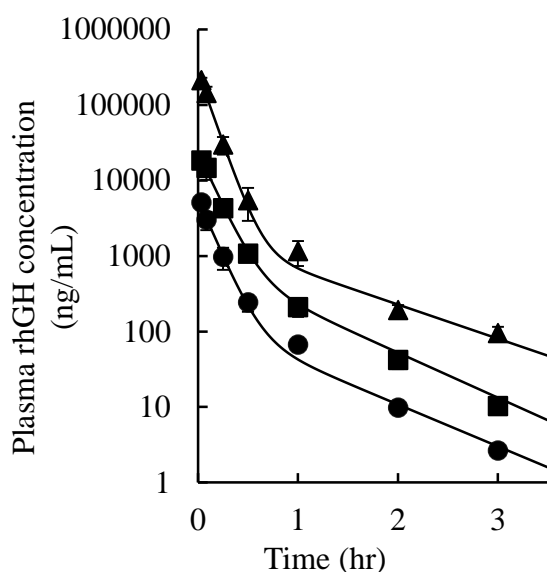


Fig. 15 Plasma rhGH concentrations after *i.v.* administration in hypophysectomized rats
● : 0.194 mg/kg, ■ : 0.583 mg/kg, ▲ : 2.914 mg/kg
Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3).

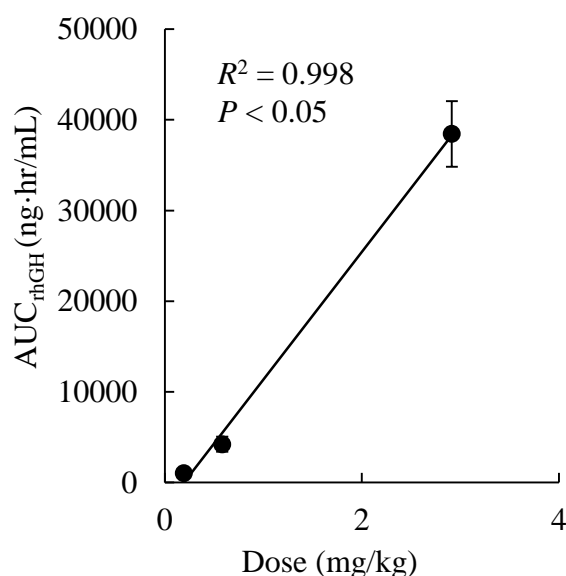


Fig. 16 Relationship between dose and AUC_{rhGH} after *i.v.* administration in hypophysectomized rats
Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table 10 Pharmacokinetic parameters of rhGH after *i.v.* administration in hypophysectomized rats

Dose (mg/kg)	0.194	0.583	2.91
A (ng/mL)	5571.6 ± 2020.2	22891.6 ± 7754.4	269560.4 ± 65317.3
α (hr ⁻¹)	7.27 ± 2.07	6.87 ± 0.98	8.76 ± 1.69
$t_{1/2\alpha}$ (hr)	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02
B (ng/mL)	138.9 ± 18.7	819.4 ± 356.5	1819.3 ± 292.1
β (hr ⁻¹)	1.28 ± 0.04	1.37 ± 0.22	1.04 ± 0.07
$t_{1/2\beta}$ (hr)	0.54 ± 0.02	0.54 ± 0.10	0.67 ± 0.05
k_{21} (hr ⁻¹)	1.44 ± 0.07	1.56 ± 0.28	1.09 ± 0.08
k_{10} (hr ⁻¹)	6.47 ± 1.85	6.11 ± 0.93	8.36 ± 1.63
k_{12} (hr ⁻¹)	0.64 ± 0.25	0.57 ± 0.13	0.35 ± 0.07
V_1 (mL)	4.36 ± 1.57	3.04 ± 0.98	1.17 ± 0.29
V_2 (mL)	1.63 ± 0.57	1.06 ± 0.29	0.34 ± 0.03
Vd_{ss} (mL)	6.00 ± 2.04	4.10 ± 1.27	1.51 ± 0.29
CL_{tot} (mL/hr)	23.52 ± 4.02	17.12 ± 3.86	8.86 ± 0.83
AUC_{rhGH} (ng·hr/mL)	1024.0 ± 97.6	4211.1 ± 818.6	38448.4 ± 3612.7

Each data represents the mean ± S.E. (n=3).

ラットの体内動態パラメータとの大きな違いはみられず、体重、下垂体除去及び麻酔状態の違いは rhGH の体内動態に影響しないと考えられた。

Figure 17 に Hpx ラットに rhGH を皮下投与、及び分子量の異なる PLA 及び PVP を併用して rhGH

Table 11 Pharmacokinetic parameters of rhGH after *i.v.* administration in anesthetized rats and hypophysectomized rats

	Anesthetized rat	Conscious Hpx rat
Weight (g)	272.57 ± 4.95	97.67 ± 0.80
k_{12} (hr ⁻¹)	0.86 ± 0.21	0.52 ± 0.09
k_{21} (hr ⁻¹)	1.16 ± 0.07	1.36 ± 0.11
k_{10} (hr ⁻¹)	5.54 ± 0.42	6.98 ± 0.84
Vd_{ss} (mL/kg)	50.93 ± 5.03	39.74 ± 9.93
CL_{tot} (mL/hr/kg)	165.05 ± 13.1	169.11 ± 27.7

Each data represents the mean or the mean ± S.E. (n=3-4).

を鼻腔内投与した後の血漿中 rhGH 濃度推移を、Table 12 に得られた rhGH の動態学的パラメータを示す。皮下投与後の血漿中 rhGH 濃度は、投与後速やかに増大し ($T_{max\ rhGH}$: 1.0 時間)、 F_{rhGH} は約 48% であった。一方、rhGH 単独鼻腔内投与では、血漿中 rhGH 濃度の大きな

増大はみられず、 F_{rhGH} は約 0.25% と urethane 麻酔下閉鎖系鼻腔内投与実験の約 1/10 の値であった。PLA を併用した全ての鼻腔内投与において、血漿中 rhGH 濃度は上昇し、 AUC_{rhGH} の増大は rhGH 単独投与と比較して有意だった ($P < 0.05$)。15 w/v% PVP を併用したときの AUC_{rhGH} は、PLA (15) 添加群で増大したが、PLA (150) では減少した。

第 1 編第 1 章の結果と同様に、PLA (15) 添加群では皮下投与に類似した速やかな血漿中

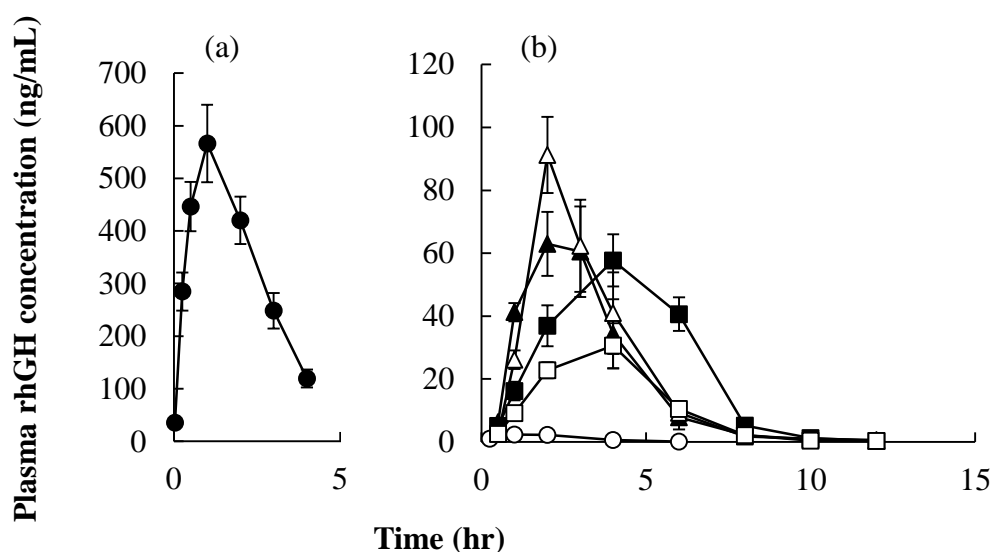


Fig. 17 Plasma rhGH concentrations after *s.c.* (a) and *i.n.* (b) administrations under various conditions in hypophysectomized rats

●: *s.c.* injection (0.583 mg/kg), ○: rhGH only (0.583 mg/kg),
▲: with 1.0% PLA (15), △: with 1.0% PLA (15) and 15% PVP,
■: with 1.0% PLA (150), □: with 1.0% PLA (150) and 15% PVP
Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table 12 Pharmacokinetic parameters of rhGH after *i.v.*, *s.c.* and *i.n.* administrations under various conditions in hypophysectomized rats

Route	rhGH Dose (mg/kg)	1.0% PLA	PVP (%)	C_{max} rhGH (ng/mL)	T_{max} rhGH (hr)	AUC_{rhGH} (ng·hr/mL)	MRT (hr)	MAT (hr)	F_{rhGH} (%)	ER
<i>i.v.</i>	0.194	—	—	—	—	1024.05 \pm 97.60	0.21 \pm 0.02	—	100.00	—
<i>s.c.</i>	0.583	—	—	566.38 \pm 73.70	1.00 \pm 0.00	1488.68 \pm 177.44	1.84 \pm 0.01	1.63	48.37	—
<i>i.n.</i>	0.583	—	—	4.04 \pm 0.35	1.17 \pm 0.44	7.72 \pm 1.71	1.77 \pm 0.30	1.57	0.25	1.00
	0.583	PLA (15)	—	65.96 \pm 10.53**	2.33 \pm 0.33	230.75 \pm 51.00*	2.92 \pm 0.20*	2.71	7.50	29.90
	0.583	PLA (15)	15	91.23 \pm 12.13**	2.00 \pm 0.00	260.67 \pm 47.25**	3.06 \pm 0.08*	2.86	8.47	33.78
	0.583	PLA (150)	—	59.92 \pm 6.06**	3.33 \pm 0.67	279.66 \pm 19.46**	4.21 \pm 0.18**	4.01	9.09	36.24
	0.583	PLA (150)	15	31.82 \pm 6.59*	2.67 \pm 0.67	129.97 \pm 9.67**	3.79 \pm 0.09**	3.59	4.22	16.84

Each data represents the mean \pm S.E. (n=3).

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ compared with the control.

rhGH 濃度の増大がみられ、一方 PLA (150) 添加群では緩やかに血漿中 rhGH 濃度が増大し、持続的な血漿中 rhGH 濃度推移を示した。PLA を併用した rhGH の鼻腔内投与での、MRT は PVP の併用の有無に関わらず皮下投与後の MRT より長かった。

第4節 考察

鼻腔内投与した薬物の体内動態は、吸収、分布及び排泄過程において麻酔の影響を大きく受ける^{59,60)}。加えて、薬理効果を評価するための成長ホルモン分泌不全性低身長モデルラットは、下垂体を外科的処置により摘出したラットであり、多くのホルモン分泌が正常ラットとは異なり、生理条件も大きく異なっていることが予想された。

従って、rhGH 鼻腔内投与による薬理効果を評価し、また同時に体内動態を測定して PK-PD (Pharmacokinetics-Pharmacodynamics) を明らかにするためには、薬理試験と同様の生理条件において rhGH の体内動態を評価する必要がある。短時間の麻酔が可能な isoflurane を使用し、頸静脈カテーテルを挿入したラットに鼻腔内投与を行い、その後の覚醒状態において経時的に採血を行った。その結果、静脈内投与後の体内動態においては、ラットの体重、下垂体切除、麻酔状態の違いによる動態パラメータの変化はほとんど認められなかった。皮下及び鼻腔内投与においては、urethane 麻酔下で行った第1編での結果と比較して MAT は短く、覚醒状態が血流などに影響し、吸収過程が異なったと考えられた。rhGH 単独鼻腔内投与における F_{rhGH} は 0.25% であり、urethane 麻酔下 (2.12%) と比較して大きく減少した。これは、覚醒状態だけでなく、体動、体位や鼻腔内の状況も異なり、本章の条件においては、すみやかに投与液が移動したことなどによる影響が考えられた。一方、PLA 併用群の F_{rhGH} は約 4.2~9.1% であり、ER は約 30 前後と高い値を示した。これは、血流や体動の条件、物理的及び mucociliary clearance の麻酔による抑制の回避のため、薬液が吸収部位から除去されやすい本章での投与条件下で、PLA と PVP の作用、すなわち、高い付着・滞留性及び透過性を与える PLA 及び PVP の効果が顕著に現れたものと考えられる。薬物が最も除去されやすい覚醒状態においても PLA 及び PVP が高い効果を発揮することは、rhGH の鼻腔内投与製剤の開発において有用な情報である。

PLA (15) 投与群は 15 w/v% PVP の併用により F_{rhGH} が増大したが、PLA (150) では減少し

た。この傾向は、第2編第2章における open system の結果と一致した。PLA (150) 投与群は、PVP を用いない場合でも F_{rhGH} の値が高く、Table 2 や Table 8 での結果と併せて考えると、PLA (150) の rhGH の経鼻吸収に対する作用は、適用条件によって大きく変動すること、そして滞留の向上を期待する PVP を必ずしも必要としないことなどが考えられる。

PLA を併用した条件において、 F_{rhGH} は最大でも皮下投与の約 1/5 であったが、MRT は全ての条件で皮下投与より長く、持続的な血漿中 rhGH 濃度推移が得られ、この持続が薬理効果に大きく影響すると考えられている⁴⁹⁻⁵³⁾。

以上より、鼻腔内投与後の覚醒状態の Hpx ラットにおける rhGH の体内動態評価において、PLA 及び PVP による鼻腔内滞留性の改善効果を含めた鼻粘膜吸収促進効果が確認でき、鼻腔内 rhGH 投与による薬理効果の評価を行うに十分な準備が整ったと考えられる。また、PVP の併用が必ずしも必要ではないという知見も重要と考えられる。

第2章 下垂体摘出ラットにおける rhGH 鼻腔内投与後の薬理効果

第1節 小緒言

成長ホルモンは脳下垂体前葉で生合成及び分泌されるホルモンであり、視床下部から分泌される成長ホルモン放出ホルモンにより生合成及び分泌が促進される。血液中へ分泌された成長ホルモンは、主に肝臓から分泌されるインスリン様成長因子 I (IGF-I) の分泌を促進させ、IGF-I が軟骨細胞の増殖を促進し、成長作用をもたらす。臨床治療においては、rhGH による成長反応を個別に判断して投与量を設定するために血中 IGF-I 濃度が測定されており⁶¹⁾、ラット等の実験動物を用いた新規 rhGH 製剤の開発においても、その有効性の評価方法として血中 IGF-I 濃度を測定することは有効である⁶²⁾。また、rhGH の薬理効果に関する研究においては、以前から成長ホルモン分泌不全モデル動物として下垂体を摘出した Hpx ラットが用いられており、皮下への rhGH の反復投与により、10 日程度の比較的短い期間で用量依存的に体重が増加する薬理作用を確認できることが明らかとなっている⁶³⁾。

そこで第3編第2章では、成長ホルモン分泌不全モデルとして Hpx ラットを用いて、これまでに検討した結果に基づき、PLA 及び PVP を併用して rhGH の鼻腔内投与を行い、その後の薬理効果を、rhGH の単回鼻腔内投与においては血漿中 IGF-I 濃度推移により、また rhGH の連日鼻腔内投与においては体重及び尾長の測定により評価した。

第2節 実験方法

3-2-2-1. 試薬

rhGH (Saizen[®])、poly-L-arginine hydrochloride (PLA (15) : 14.8 kDa, PLA (150) : 147.8 kDa) は 1-1-2-1 と同様の試薬を使用した。Polyvinylpyrrolidone K25 (PVP, M.W. 35 kDa) は 2-1-2-1 と同様の試薬を使用した。Isoflurane (イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」) は 3-1-2-1 と同様の試薬を使用した。Quantikine[®] ELISA Mouse/Rat IGF-I Immunoassay kit を R&D Systems Inc. (MN, USA) から購入した。その他の試薬は全て特級品を使用した。

3-2-2-2. 実験動物

3-1-2-2 と同様の動物を使用した。

3-2-2-3. 頸静脈簡易カテーテル挿入術

3-1-2-3 と同様の方法で Hpx ラットにカテーテルを留置した。

3-2-2-4. rhGH 皮下 (s.c.) 投与実験

3-1-2-5 と同様の方法で Hpx ラットの頸背部皮下に rhGH 生理食塩液 (0.583 mg/kg, 1.0 mL/kg) を投与した。投与前及び投与後から最大 36 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、カテーテルより血液 0.1 mL を採取した。

3-2-2-5. rhGH 経鼻投与製剤の調製

2-2-2-3 と同様の方法で調製した。

3-2-2-6. rhGH 鼻腔内 (i.n.) 投与実験

3-1-2-7 と同様の方法で Hpx ラットの左鼻腔入口から 5.5 mm のところに、ディスペンサーを用いて、分子量の異なる 1.0 w/v% PLA 含有 rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg)、分子量の異なる 1.0 w/v% PLA 及び 15 w/v% PVP を含む rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg)、又は比較のため rhGH コハク酸緩衝液 (0.583 mg/kg, 0.2 mL/kg) を投与した。投与前及び投与後から最大 36 時間までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、カテーテルより血液 0.1 mL を採取した。また、コントロール実験として、分子量の異なる 1.0 w/v% PLA 及び 15 w/v% PVP を含み、rhGH を含まないコハク酸緩衝液を調製し、同様に鼻腔内に投与した。

3-2-2-7. 血漿採取法

採取した血液を 30 分以内に遠心分離 ($2,000 \times g$, 20 分, 4 °C) した。得られた血漿を分析するまで -20 °C で保存した。

3-2-2-8. 血漿中 IGF-I 濃度測定

血漿中 IGF-I 濃度を Mouse/Rat IGF-I Immunoassay kit (R&D Systems Inc., MN, USA) を用いて ELISA 法により測定した。得られた血漿を適宜、上記キット付属の血漿用希釈液で希釈した。測定手順は上記キットのマニュアルに従った。

3-2-2-9. rhGH 連日投与における体重及び尾長の計測

購入した Hpx ラットを数日間飼育し、体重増加が無いことを確認してから、1 週間以内に実験を開始した。実験前々日に Hpx ラットの空腹時体重を測定し投与量を決定した。その後、水及び飼料は自由に摂取させた。無処置の Hpx ラットに 24 時間おき (18~20 時の間に投与) に 10 日間、3-2-2-4、及び 3-2-2-6 と同様の方法で 3-2-2-4、3-2-2-6 と同じ各試料につ

いて、皮下投与もしくは鼻腔内投与を行った。投与開始 1 日目から 11 日目まで投与直前に体重及び尾長を測定した。投与開始日における Hpx ラットの体重は 88.3～105.0 g であり、体重の群間差は統計学的に有意ではなかった。

3-2-2-10. 薬力学的解析

血漿中 IGF-I 濃度推移から最高血漿中 IGF-I 濃度 (C_{\max} IGF-I) を求め、血漿中 IGF-I 濃度 - 時間曲線下面積 ($AUC_{\text{IGF-I}}$) を台形公式により求めた。

投与開始後 11 日目までの体重と投与 1 日目の体重との差をそれぞれ算出した。また、投与後 11 日目の尾長と投与 1 日目の尾長の差を算出した。

3-2-2-11. 統計解析

二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $P < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

3-2-3-1. rhGH 鼻腔内投与後の血漿中 IGF-I 濃度推移

Figure 18 に rhGH を皮下投与、及び分子量の異なる PLA 及び PVP を併用して rhGH を鼻腔内投与した後の血漿中 IGF-I 濃度推移を、Table 13 に血漿中 IGF-I 濃度推移から得られた薬力学的パラメータを示す。PLA (15) と PLA (150) のいずれにおいても、1.0 w/v% PLA を併用して rhGH を鼻腔内投与することにより血漿中 IGF-I 濃度は上昇し、皮下投与とほぼ同等かそれ以上の血漿中 IGF-I 濃度推移を示した。前章の評価において血漿中 rhGH 濃度が低い値を示した rhGH 単独投与では、血漿中 IGF-I 濃度の大きな上昇は認められなかった。rhGH を含まない PLA 及び PVP の混合液の投与により、わずかな血漿中 IGF-I 濃度の増加がみられた。

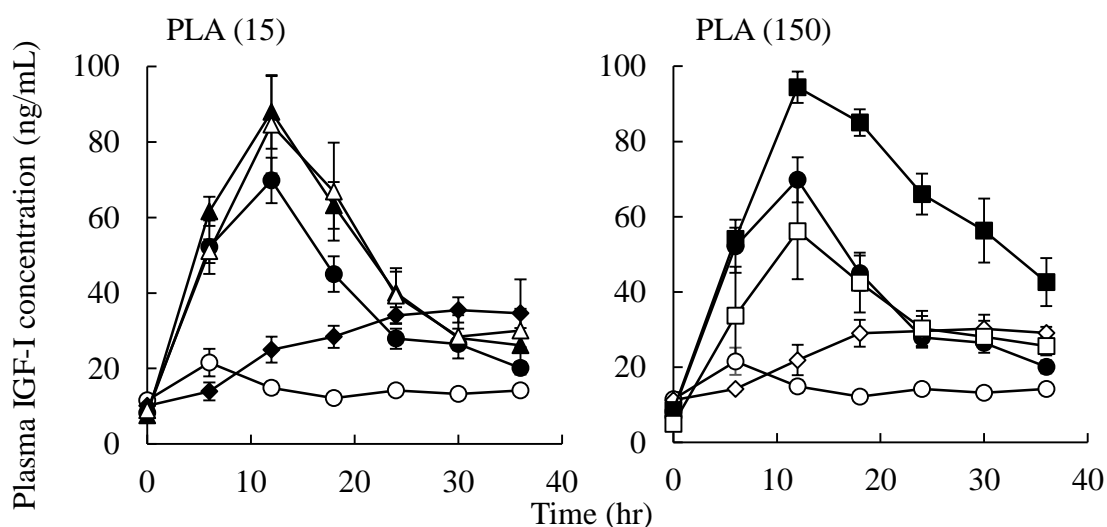


Fig. 18 Plasma IGF-I concentrations after s.c. and i.n. administrations of rhGH under various conditions in hypophysectomized rats

●: s.c. injection (0.583 mg/kg), ○: rhGH only (0.583 mg/kg), ▲: rhGH with 1.0% PLA (15), △: rhGH with 1.0% PLA (15) and 15% PVP, ■: rhGH with 1.0% PLA (150), □: rhGH with 1.0% PLA (150) and 15% PVP, ◆: 1.0% PLA (15) and 15% PVP only, ◇: 1.0% PLA (150) and 15% PVP only

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table 13 Pharmacodynamic parameters of IGF-I after *s.c.* or *i.n.* administrations of rhGH under various conditions in hypophysectomized rats

	rhGH Dose (mg/kg)	1.0% PLA	PVP (%)	C _{max} IGF-I (ng/mL)	AUC _{IGF-I} (ng·hr/mL)
<i>s.c.</i>	0.583	—	—	69.82 ± 6.00 ^b	1413.13 ± 128.33 ^b
<i>i.n.</i>	0.583	—	—	21.57 ± 3.61 ^d	533.51 ± 33.37 ^d
	0	PLA (15)	15	38.93 ± 4.77 ^{a, c}	955.48 ± 98.60 ^{a, c}
	0.583	PLA (15)	—	87.96 ± 9.79 ^b	1786.32 ± 137.19 ^b
	0.583	PLA (15)	15	84.57 ± 12.86 ^b	1738.08 ± 261.44 ^a
	0	PLA (150)	15	31.83 ± 2.98 ^d	870.14 ± 99.21 ^{a, c}
	0.583	PLA (150)	—	95.20 ± 3.46 ^{b, c}	2289.18 ± 73.04 ^{b, d}
	0.583	PLA (150)	15	56.14 ± 12.72	1235.80 ± 259.24

Each data represents the mean ± S.E. (n=3).

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ compared with rhGH only.

c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$ compared with *s.c.* injection.

3-2-3-2. rhGH の連日鼻腔内投与後の体重及び尾長変化

Figure 19 に rhGH 皮下投与及び種々rhGH 経鼻投与製剤を 10 日間投与したときの体重増加の推移を、Table 14 に投与開始から 11 日目の体重増加量と尾長の変化量を示す。IGF-I の結果と同様に、PLA を併用した rhGH の鼻腔内投与により皮下投与と同等かそれ以上の体重増加及び尾長の伸長が認められた。rhGH 単独投与及び rhGH を含まない経鼻投与製剤では、体重増加及び尾長の伸長はほとんど認められなかった。最も高い効果は、PLA (150) 単独併用群で観察され、薬理効果においては、PLA (15) と PLA (150) の両方で PVP の効果は確認できなかった。

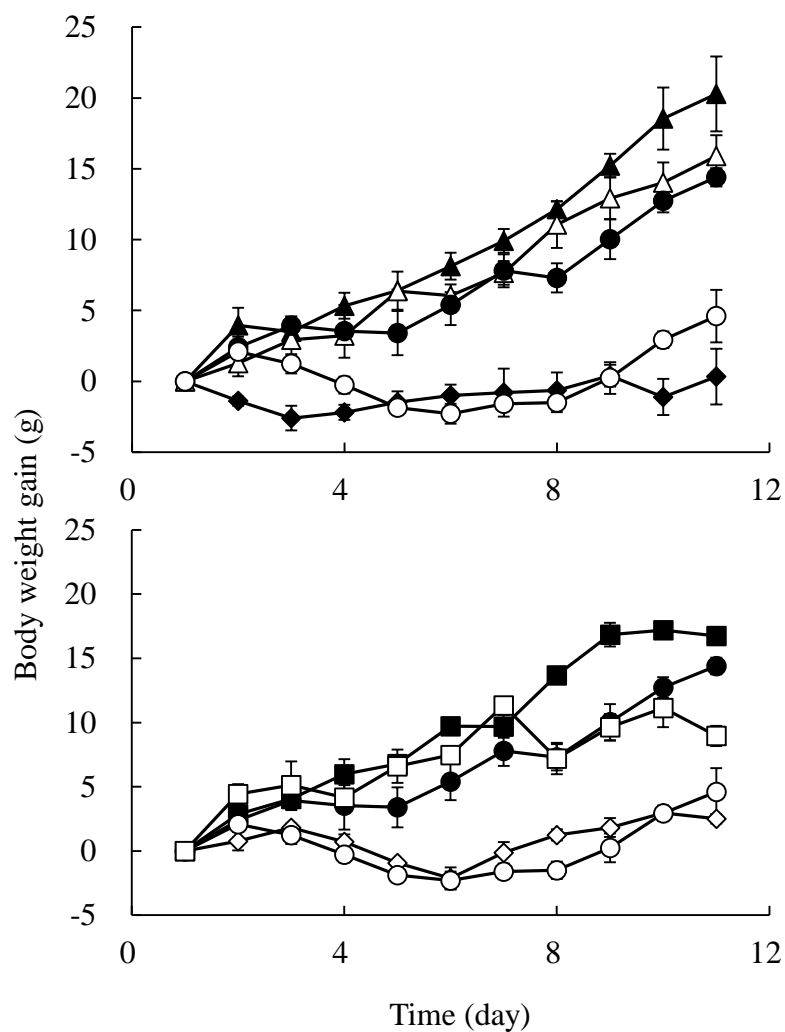


Fig. 19 Body weight gain curves by daily *s.c.* or *i.n.* administrations of rhGH under various conditions in hypophysectomized rats
 ●: *s.c.* injection (0.583 mg/kg), ○: rhGH only (0.583 mg/kg), ▲: rhGH with 1.0% PLA (15), △: rhGH with 1.0% PLA (15) and 15% PVP, ■: rhGH with 1.0% PLA (150), □: rhGH with 1.0% PLA (150) and 15% PVP, ◆: 1.0% PLA (15) and 15% PVP only, ◇: 1.0% PLA (150) and 15% PVP only
 Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table 14 Change in body weight gain and tail length extension after *s.c.* or *i.n.* administrations of rhGH under various conditions in hypophysectomized rats

	rhGH Dose (mg/kg)	1.0% PLA	PVP (%)	Body weight gain on day 11 (g)	Tail length extension on day 11 (cm)
<i>s.c.</i>	0.583	—	—	14.40 ± 0.65 ^b	0.30 ± 0.10
<i>i.n.</i>	0.583	—	—	4.60 ± 1.85 ^d	-0.10 ± 0.15
	0	PLA (15)	15	0.34 ± 1.96 ^d	0.00 ± 0.00
	0.583	PLA (15)	—	20.28 ± 2.65 ^b	0.40 ± 0.10
	0.583	PLA (15)	15	15.90 ± 1.46 ^b	0.33 ± 0.09
	0	PLA (150)	15	2.50 ± 0.36 ^d	0.03 ± 0.03
	0.583	PLA (150)	—	16.73 ± 0.61 ^{b, c}	0.37 ± 0.07 ^c
	0.583	PLA (150)	15	8.97 ± 0.78 ^d	0.17 ± 0.03 ^a

Each data represents the mean ± S.E. (n=3).

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ compared with rhGH only.

c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$ compared with *s.c.* injection.

第4節 考察

第3編第2章では、鼻腔内投与において高い rhGH の鼻粘膜透過促進作用が認められた 1.0 w/v% PLA (15) 及び PLA (150) に加えて、更に鼻腔内滞留性の改善を期待して 15 w/v% PVP を併用して、Hpx ラットに rhGH を鼻腔内投与した後の薬理効果を、単回投与後の血漿中 IGF-I 濃度推移、及び 10 日間の連日投与による体重増加及び尾長の伸長により評価した。

覚醒状態の Hpx ラットにおける動態学的な検討において、高い血漿中 rhGH 濃度推移を示した 1.0 w/v% PLA (15) 単独併用群、1.0 w/v% PLA (15) 及び 15 w/v% PVP 両併用群、並びに 1.0 w/v% PLA (150) 単独併用群では、血漿中 IGF-I 濃度の上昇、体重増加及び尾長の伸長を認め、皮下投与と同等かそれ以上の高い成長促進作用が示された。この結果は、皮下投与における F_{rhGH} (48.37%) の約 1/5～1/6 の F_{rhGH} であった PLA 及び PVP 併用鼻腔内投与群 (F_{rhGH} : 7.50-9.09%) であっても、吸収が持続的であったため、高い薬理効果が得られたと考えることができる。このような結果は、rhGH の血中濃度の高さと薬理効果の発現は必ずしも一致せず、より持続的に血中濃度を維持することにより、高い薬理効果が得られるということとして以前の報告にも述べられている^{49, 50, 52, 53})。すなわち、覚醒状態の Hpx ラットにおける皮下投与後の血漿中 rhGH 濃度は、投与後から速やかに上昇し、 $T_{max rhGH}$ は 1.0 時間、MRT は 1.8 時間であったが、これに対し高い薬理効果を示した 1.0 w/v% PLA (15) 単独併用群、1.0 w/v% PLA (15) 及び 15 w/v% PVP 両併用群、並びに 1.0 w/v% PLA (150) 単独併用群では、 $T_{max rhGH}$ はそれぞれ 2.3、2.0 及び 3.3 時間、MRT は 2.9、3.1 及び 4.2 時間であり、皮下投与より血中濃度が持続していることが、皮下投与より低い血漿中 rhGH 濃度でも高い薬理効果が得られた理由と考えられた。しかし、同様に皮下投与より長い $T_{max rhGH}$ と MRT を示した 1.0 w/v% PLA (150) 及び 15 w/v% PVP 両併用群では、他の条件ほどの薬理効果は得られなかった。これは、 $C_{max rhGH}$ や AUC_{rhGH} が他の群より特に低いためと考えられる。すなわち、十分な薬理効果を発揮するには、血漿中 rhGH 濃度の上昇と血漿中 rhGH 濃度の維持

の両方が重要であることが示唆された。また、1.0 w/v% PLA (15) 群への、PVP の併用により、薬理効果の改善はみられず、rhGH の動態のみで薬理効果を予測することは困難であることが示された。また、この薬理効果試験における PVP の効果の消失には、第 2 編第 2 章で観察された rhGH-PLA-PVP 3 者共存時の極度な粘度上昇なども関係していることが考えられた。

PLA と PVP を、rhGH を伴わずに投与した群において、12 時間以降に血漿中 IGF-I 濃度のわずかな上昇が認められた。しかしながら、体重増加や尾長の伸長における成長効果は、認められなかった。IGF-I は、肝臓以外に骨等からも合成され、成長ホルモンの制御以外に、パラクリンやオートクリン機能を有することが明らかとなってきた⁶⁴⁾。また、栄養状態等が血漿中 IGF-I 濃度に影響することも明らかとなっており⁶⁵⁾、投与によるストレスなどの何らかの影響により血漿中 IGF-I 濃度がわずかに上昇したと考えられた。

以上より、PLA 単独添加や PVP との併用による rhGH の鼻腔内投与によって、皮下投与と同等かそれ以上の血漿中 IGF-I 濃度の上昇並びに体重増加や尾長の伸長が得られ、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ことが明らかとなった。しかし、PVP の併用効果が薬理実験では確認できない、また、PLA (150) 単独で滞留性改善作用が考えられるなど不明な点も多い。今後これらの問題が明らかとなり、rhGH の鼻腔内送達を臨床応用することが可能となる日が来るものと期待できる。

結論

本研究では、rhGH の鼻腔内投与における PLA の鼻粘膜吸収促進効果並びに PVP の鼻腔内滞留性改善効果を主にラットを用いて動態学的に検討した。また、薬力学的な検討により PLA 及び PVP を利用した rhGH 鼻腔内投与の有効性を評価した。

rhGH に対する PLA の鼻粘膜吸収性促進効果はこれまでに検討されていないため、まず初めに麻酔下で鼻腔内を閉鎖系にしたラットを用いて rhGH の鼻粘膜吸収性に対する PLA の併用効果を評価し、また PLA の濃度及び分子量の影響も検討した。加えて、経鼻投与製剤における rhGH と PLA の相互作用について調査した。次に製剤の鼻腔内滞留性を高めるため、水溶性高分子薬物の鼻粘膜吸収性に対する PVP 併用の影響を、薬物自体の分解や PLA との相互作用の影響がほとんど無いと考えられる FD-20 を用いて評価した。動態学的な滞留性改善効果は、閉鎖系鼻腔内投与実験に加え、ラットを傾斜させ食道側から薬液が流出できるようにした開放系鼻腔内投与実験でも行い、両者を比較した。加えて、同様な検討を rhGH でも行った。更に、検討した rhGH 経鼻投与製剤の薬力学的評価を目的として、外科的に下垂体を切除した Hpx ラットにおいて rhGH の鼻腔内投与を行い、動態学的及び薬力学的に検討し、以下の結論を得た。

1-1. ラットにおける rhGH の鼻粘膜吸収に対する PLA の影響に関する検討

Urethane 麻酔下のラットの鼻腔内に rhGH 及び PLA の混合液を投与したとき、いずれの濃度 (0.25, 0.5, 1.0 w/v%) 及び分子量 (14.8, 147.8 kDa) においても PLA は rhGH の鼻粘膜吸収を促進した。PLA のどちらの分子量の場合でも、0.25 及び 0.5 w/v% PLA 併用における F_{rhGH} 上昇はほぼ同等であり、一方、1.0 w/v% PLA 併用ではそれより更に大きく増大した。また、PLA の分子量依存的な吸収の遅延が認められ、PLA (15) 併用では皮下投与と類似し

た一過的な血漿中 rhGH 濃度の上昇が、PLA (150) 併用では緩やかで持続的な血漿中 rhGH 濃度の上昇が観察された。このプロファイルの違いには、PLA と rhGH の相互作用が PLA の分子量により異なることが影響した可能性が考えられた。PLA の分子量と濃度を適切に選択することで様々な血漿中 rhGH 濃度プロファイルが得られることは、rhGH の体内動態が制御された、より有用な経鼻製剤になる可能性を示唆する結果である。

1-2. rhGH-PLA 混合液中での相互作用に関する検討

PLA を併用して rhGH を鼻腔内投与した実験において、rhGH と 0.25 及び 0.5 w/v% PLA の混合時に白濁が生じ、FDs とは異なるパターンの血漿中濃度プロファイルが得られたことから、rhGH と PLA の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 混合液を遠心分離後の上清中のそれぞれの濃度を分析した。その結果、いずれの分子量においても 0.25 及び 0.5 w/v% PLA の適用時に上清中 rhGH 濃度は低下したが、PLA 濃度に変化はなかった。また、PLA を添加せず rhGH をコハク酸緩衝液で希釈したところ、白濁が生じた。さらにこれらの過程で生じる不溶性凝集体は、添加する PLA 濃度の増大に伴い減少した。よって、0.25 及び 0.5 w/v% PLA の適用時には、rhGH が不溶性凝集体を形成してフリー体の rhGH が低下したことにより濃度非依存的な吸収促進効果が観察されたと考えられた。また、不溶性凝集体を認めなかった 1.0 w/v% PLA (150) 含有 rhGH 混合液を分子量 cut-off 100 kDa の限外濾過膜で濾過した後の濾液を分析したところ、rhGH と PLA の濃度は低下し、可溶性の 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。rhGH と PLA の混合による相互作用を PLA の濃度及び分子量等によって厳密に制御することで、鼻腔内投与後の血漿中 rhGH 濃度推移を制御することが可能であることが示唆された。

2. PLA を併用した rhGH 経鼻投与製剤における PVP の滞留性改善効果に関する検討

PVP の付着滞留性改善効果を明らかにするため、分子量が rhGH とほぼ同等な FD-20 を用いて、傾斜させた SSP 上における付着滞留性及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。その結果、15 w/v% PVP 併用において製剤の粘膜接触表面積が確保された状況で、付着滞留性が改善された。そこで次に、PLA の併用による FD-20 及び rhGH の鼻粘膜吸収に対する 15 w/v% PVP 添加の影響を評価した。その結果、15 w/v% PVP を 1.0 w/v% PLA と併用した多くの条件において、 F_{oc} 値で示される rhGH 経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性は改善した。しかし、PVP と PLA (15) を併用し、rhGH を鼻腔内投与した場合、PVP を用いない場合より F_{oc} が低かった。PLA (150) では、PVP の併用により F_{oc} は上昇したが、AUC は PVP により低下した。PVP と PLA (150) と rhGH の 3 者の併用は、PVP 単独の粘度から予想される以上の極度に高い粘度が認められ、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に関与したことが考えられた。以上より、鼻腔内投与における生体付着性物質を利用した吸収の改善には、鼻腔内投与製剤の組成を鼻腔内の環境を考慮して最適化する必要があることが明らかとなった。

3. Hpx ラットにおける rhGH 経鼻投与製剤の薬理効果

1.0 w/v% PLA と 15 w/v% PVP を併用して rhGH を鼻腔内投与したときの薬理効果を、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した。その結果、高い血漿中 rhGH 濃度を示した皮下投与群の 1/5 の F_{rhGH} であるにもかかわらず、1.0 w/v% PLA (15) 単独併用群、1.0 w/v% PLA (15) 及び 15 w/v% PVP 両併用群、並びに 1.0 w/v% PLA (150) 単独併用群で、皮下投与群と同等かそれ以上の血漿中 IGF-I 濃度が得られ、連日投与実験における体重増加と尾長の伸長もほぼ同等かそれ以上の結果

が得られた。この現象は、鼻腔内投与において皮下投与と比較して持続的な血漿中 rhGH 濃度推移を示したためと考えられた。しかし、1.0 w/v% PLA (150) と 15 w/v% PVP 両併用群は、持続的な血漿中 rhGH 濃度推移が得られたものの、他の PLA 併用群と比較して AUC_{rhGH} が低く、薬理効果も低かった。これは、PLA-PVP-rhGH の 3 者間の相互作用による極度に高い粘性が、rhGH の吸収を妨げた結果と考えられた。これらの結果により、十分な薬理効果を発揮するには、血漿中 rhGH 濃度の上昇と血漿中 rhGH 濃度の維持の両方が重要であり、処方最適化は大変複雑で困難なことであることが改めて示された。PLA と PVP の併用は、この実験系では、どちらの分子量の PLA の場合でも有効ではなく、PVP の併用により薬理効果は低下した。この結果は、PLA-PVP-rhGH の 3 者間だけでなく、鼻腔内の他の成分との相互作用も考慮する必要があることを示唆するものであり、よりヒトでの使用に近い実験系を用いての更なる検討が必要と考えられる。以上より、rhGH の鼻腔内投与により、皮下投与と同等かそれ以上の血漿中 IGF-I 濃度の上昇並びに体重増加や尾長の伸長が得られ、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ことが明らかとなった。その過程で、PLA の有効性は確認できたが、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。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などを視野に入れつつ、更なる処方最適化が必要と考えられる。

本研究ではラットを用いて検討を行ったが、ラットとヒトの鼻腔内構造は解剖学的に異なる。このため、rhGH 経鼻投与製剤を臨床利用していくためには、上述の通りヒトにおいて吸収性を高めるための最適化が必要であるだけでなく、それに合わせたデバイスの検討も必要となる。それらを今後検討することにより優れた rhGH 経鼻送達システムとなることが期待される。

謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座教授 夏目秀視 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して、終始御指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科病院薬剤学講座教授 上田秀雄 先生に深謝の意を表します。

本研究に際して、終始御指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科生理学講座教授 加園恵三 先生に深謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり終始研究を見守っていただき、御指導並びに有益な御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座准教授 内田昌希 先生、城西大学大学院薬学研究科製剤学講座助手 八巻努 先生にあらためて深謝の意を表します。

また、本論文作成、学位論文審査にあたり、ご教示とご校閲をいただきました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座教授 関俊暢 先生、城西大学大学院薬学研究科医薬品安全性学講座教授 金本郁男 先生、城西大学大学院薬学研究科生化学講座教授 荒田洋一郎 先生に感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に当たりご支援、ご協力をいただきました、学士 神尾良 氏、石内茉莉佳 氏、城西大学薬学部製剤学研究室 糺谷望 氏、船木匠 氏、坂下智彦 氏をはじめとする関係諸氏に感謝いたします。

引用文献

- 1) T Richardson, D Kerr. Skin-related complications of insulin therapy: epidemiology and emerging management strategies. *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**: 661-667 (2003).
- 2) D Raimier-Hall, H C Shea. Evaluation of growth hormone devices: matching devices with patients. *Pediatr Nurs.*, **41**: 72-77 (2015).
- 3) G E Macalino, K W Springer, Z S Rahman, D Vlahov, T S Jones. Community-based programs for safe disposal of used needles and syringes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **18**: S111-119 (1998).
- 4) 松浦 誠, 福山 拓秀, 佐々木 照明, 三留 省悦. インスリン自己注射器具の廃棄に関する現状と課題. 日本病院薬剤師会雑誌, **37**: 1029-1033 (2001).
- 5) 中野 玲子, 朝倉 俊成, 虎石 颯一, 武藤 達也. インスリン自己注射針の廃棄に関する実態と調査. *Prog. Med.*, **24**: 845-851 (2004).
- 6) 市江 和子, 上条 隆司, 成長ホルモン治療中の小児の家族における在宅自己注射に関する意識の検討. 小児科臨床, **65**: 237-242 (2012).
- 7) メルクセローノ株式会社. サイゼン®皮下注用 8 mg 添付文書 第 3 版 (2014).
- 8) ファイザー株式会社. ジェノトロピン®ゴークイック注用 12 mg 添付文書 第 4 版 (2015).
- 9) 日本イーライリリー株式会社. ヒューマトロップ®注射用 6 mg 添付文書 第 13 版 (2013).
- 10) 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 間脳下垂体機能障害に関する調査研究班. 成長ホルモン分泌不全性低身長症の診断の手引き (2013).

- 11) K Hartmann, J Ittner, E M Rossberg, E Schonau, R Stephan, K P Ullrich, B Hoppe, R Ramseger, J Bramswig. Growth hormone treatment adherence in prepubertal and pubertal children with different growth disorders. *Horm. Res. Paediatr*, **80**: 1-5 (2013).
- 12) 加賀 文彩, 志賀 勝秋, 金子 衣野, 児玉 浩子. 成長ホルモン治療のコンプライアンスの検討, *Prog. Med.*, **27**: 1467-1474 (2007).
- 13) W S Cutfield, J G B Derraik, A J Gunn, K Reid, T Delany, E Robinson, P L Hofman. Non-compliance with growth hormone treatment in children is common and impairs linear growth. *PloS one*, **6**: e16223 (2011).
- 14) V H Lee. Enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **5**: 69-97 (1988).
- 15) H R Costantino, L Illum, G Brandt, P H Johnson, S C Quay. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int. J. Pharm.*, **337**: 1-24 (2007).
- 16) M Miyamoto, H Natsume, I Satoh, K Ohtake, M Yamaguchi, D Kobayashi, K Sugibayashi, Y Morimoto. Effect of poly-L-arginine on the nasal absorption of FITC-dextran of different molecular weights and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in rats. *Int. J. Pharm.*, **226**: 127-138 (2001).
- 17) H Natsume, S Iwata, K Ohtake, M Miyamoto, M Yamaguchi, K Hosoya, D Kobayashi, K Sugibayashi, Y Morimoto. Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **185**: 1-12 (1999).
- 18) 入江 博美, 大竹 一男, 前野 拓也, 内田 昌希, 内田 博之, 小林 順, 夏目 秀視. カルセイン含有デンプン溶液の経鼻投与後の鼻腔滞留性とカルセイン血中動態との関係. *薬剤学*, **69**: 219-227 (2009).
- 19) M Uchida, T Katoh, M Mori, T Maeno, K Ohtake, J Kobayashi, Y Morimoto, H Natsume.

- Intranasal administration of milnacipran in rats: evaluation of the transport of drugs to the systemic circulation and central nervous system and the pharmacological effect. *Bio. Pharm. Bull.*, **34**: 740-747 (2011).
- 20) K Ohtake, H Natsume, H Ueda, Y Morimoto. Analysis of transient and reversible effects of poly-L-arginine on the in vivo nasal absorption of FITC-dextran in rats. *J. Control. Release.*, **82**: 263-275 (2002).
- 21) K Ohtake, T Maeno, H Ueda, H Natsume, Y Morimoto. Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in Vitro. *Pharm Res.*, **20**: 153-60 (2003).
- 22) K Ohtake, T Maeno, H Ueda, M Ogihara, H Natsume, Y Morimoto. Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/ threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharm Res.*, **20**: 1838-45 (2003).
- 23) T Yamaki, K Ohtake, K Ichikawa, M Uchida, H Uchida, S Oshima, K Juni, J Kobayashi, Y Morimoto, H Natsume. Poly-L-arginine-Induced internalization of tight junction proteins increases the paracellular permeability of the Caco-2 cell monolayer to hydrophilic macromolecules. *Bio. Pharm. Bull.*, **36**: 432-41 (2013).
- 24) T Yamaki, Y Kamiya, K Ohtake, M Uchida, T Seki, H Ueda, J Kobayashi, Y Morimoto, H Natsume. A Mechanism Enhancing Macromolecule Transport Through Paracellular Spaces Induced by Poly-L-Arginine: Poly-L-Arginine Induces the Internalization of Tight Junction Proteins via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Pharm Res.*, **31**: 2287-96 (2014).
- 25) R Al-Sadi, k Khatib, S Guo, D Ye, M Youssef, T Ma. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **300**: G1054–G1064 (2011).

- 26) M Saitou, M Furuse, H Sasaki, J D Schulzke, M Fromm, H Takano, T Noda, S Tsukita. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell*, **11**: 4131–4142 (2000).
- 27) C a Silva, T M Nobre, F J Pavinatto, O N Oliveira. Interaction of chitosan and mucin in a biomembrane model environment. *J. Colloid Interface Sci.*, **376**: 289-295 (2012).
- 28) C Karavasili, O L. Katsamenis, N Bouropoulos, H Nazar, P J Thurner, S M van der Merwe, D G Fatouros. Preparation and Characterization of Bioadhesive Microparticles Comprised of Low Degree of Quaternization Trimethylated Chitosan for Nasal Administration: Effect of Concentration and Molecular Weight. *Langmuir*, **30**: 12337-12344 (2014).
- 29) C Govardhan, N Khalaf, C W Jung, B Simeone, A Higbie, S Qu, L Chemmalil, S Pechenov, S K Basu, A L Margolin. Novel long-acting crystal formulation of human growth hormone. *Pharm. Res.*, **22**: 1461-70 (2005).
- 30) M R Park, C Chun, S W Ahn, M H Ki, C S Cho, S C Song. Sustained delivery of human growth hormone using a polyelectrolyte complex- loaded thermosensitive polyphosphazene hydrogel. *J. Control. Release.*, **147**: 359-367 (2010).
- 31) S Surya, K Symons, E Rothman, A L Barkan. Complex rhythmicity of growth hormone secretion in humans. *Pituitary*, **9**: 121-125 (2006).
- 32) K Hosoya, H Kubo, T Akutsu, H Natsume, K Sugibayashi, Y Morimoto. Effect of sodium taurodihydrofusidate on nasal drug delivery: differences in its concentration and penetrant molecular weight. *Arch. Pharm. Res.*, **17**: 57-59 (1994).
- 33) L Illum, N F Farraj, S S Davis. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.*, **11** 1186-1189 (1994).
- 34) S Hirai, T Yashiki, T Matsuzawa, H Miwa. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rats. *Int. J. Pharm.*, **7**:

317-325 (1981).

- 35) R&D Systems, Human growth hormone Quantikine ELISA kit Product Datasheet (2011).
- 36) M Miyamoto, H Natsume, S Iwata, K Ohtake, M Yamaguchi, D Kobayashi, K Sugibayashi, M Yamashina, Y Morimoto. Improved nasal absorption of drugs using poly-L-arginine: Effects of concentration and molecular weight of poly-L-arginine on the nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**: 21-30 (2001).
- 37) D E Otzen, B R Knudsen, F Aachmann, K L Larsen, R Wimmer. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. *Protein Sci.*, **11**, 1779-87 (2002).
- 38) F Abildgaard, A M Jørgensen, J J Led, T Christensen, E B Jensen, F Junker, H Dalbøge. Characterization of tertiary interactions in a folded protein by NMR methods: studies of pH-induced structural changes in human growth hormone. *Biochemistry*, **31**, 8587-96 (1992).
- 39) S Josea, C R Ansaa, T A Cinua, A J Chackoa, N A Aleykuttyb, S V Ferreirac, E B Souto. Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *Int. J. Pharm.*, **441**: 516-526 (2013).
- 40) M I Ugwoke, N Verbeke, R Kinget. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**: 3-21 (2001).
- 41) N G N Swamy, Z Abbasb. Mucoadhesive in situ gels as nasal drug delivery systems: an overview. *Asian J. Pharmacol.*, **7**: 168-180 (2012).
- 42) J Castile, Y H Cheng, B Simmons, M Perelman, A Smith, P Watts. Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys[®], an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **39**: 1-9 (2012).
- 43) D Inoue, T Furubayashi, K Ogawara, T Kimura, K Higaki, H Katsumi, T Sakane, A Yamamoto, Y Higashi. In vitro evaluation of nasal mucociliary clearance using excised rat nasal septum. *Bio.*

Pharm. Bull. **35**: 889-894 (2012).

- 44) L Illum, P Watts, A N Fisher, M Hinchcliffe, H Norbury, I Jabbal-Gill, R Nankervis and S S Davis. Intranasal Delivery of Morphine. *J. Pharm. Exp. Ther.* **301**: 391-400 (2002).
- 45) E M Lund, C M Westergaard, C Sander, P Madelung, J Jacobsen. A mechanistic based approach for enhancing buccal mucoadhesion of chitosan. *Int. J. Pharm.* **461**: 280-285 (2014).
- 46) A M de Vos, M Ultsch, A A Kossiakoff. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science.* **255**: 306-312 (1992).
- 47) S Aloj, H Edelhoch, The molecular properties of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* **247**: 1146-1152 (1972).
- 48) C Turner, P D Cary, B Grego, M T Hearn, G E Chapman. A proton-nuclear-magnetic-resonance study of human somatotropin (growth hormone). Assignment and properties of the histidine residues. *Biochem. J.* **213**: 107-113 (1983).
- 49) T Laursen, B Grandjean, J O Jørgensen, J S Christiansen. Bioavailability and bioactivity of three different doses of nasal growth hormone (GH) administered to GH-deficient patients: comparison with intravenous and subcutaneous administration. *Eur. J. Endocrinol.* **135**: 309-315 (1996).
- 50) J O Jorgensen, N Moller, T Lauritzen, J S Christiansen. Pulsatile versus continuous intravenous administration of growth hormone (GH) in GH-deficient patients: effects on circulating insulin-like growth factor-I and metabolic indices. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**: 1616-1623 (1990).
- 51) T Laursen, J O Jørgensen, S Susgaard, J Møller, J S Christiansen. Subcutaneous absorption kinetics of two highly concentrated preparations of recombinant human growth hormone. *Ann. Pharmacother.* **27**: 411-5 (1993).
- 52) T Laursen, J O Jorgensen, G Jakobsen, B L Hansen, J S Christiansen. Continuous infusion versus daily injections of growth hormone (GH) for 4 weeks in GH-deficient patients. *J. Clin. Endocrinol.*

Metab. **80**: 2410-2418 (1995).

- 53) T Laursen, C H Gravholt, L Heickendorff, J Drustrup, A M Kappelgaard, J O Jørgensen, J S Christiansen. Long-term effects of continuous subcutaneous infusion versus daily subcutaneous injections of growth hormone (GH) on the insulin-like growth factor system, insulin sensitivity, body composition, and bone and lipoprotein metabolism in GH-deficient adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 1222-1228 (2001).
- 54) K Fukushima, A Ise, H Morita, R Hasegawa, Y Ito, N Sugioka, K Takada. Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein drugs in rats. *Pharm. Res.* **28**: 7-21 (2011).
- 55) Y Wei, Y Wang, A Kang, W Wang, S V Ho, J Gao, G Ma, Z Su. A novel sustained-release formulation of recombinant human growth hormone and its pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profiles. *Mol. Pharm.* **9**: 2039-2048 (2012).
- 56) B L Osborn, L Sekut, M Corcoran, C Poortman, B Sturm, G Chen, D Mather, H L Lin, T J Parry. Albutropin : a growth hormone – albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *Eur. J. Pharmacol.*, **456**: 149-158 (2002).
- 57) L Illum, F Jordan, A L Lewis, CriticalSorb™: A novel efficient nasal delivery system for human growth hormone based on Solutol HS15. *J. Control. Release*, **162**: 194-200 (2012).
- 58) V M Leitner, D Gugli, A B Schnürch, Thiomers in Noninvasive Polypeptide Delivery: In Vitro and In Vivo Characterization of a Polycarbophil-Cysteine/Glutathione Gel Formulation for Human Growth Hormone. *J. Pharm. Sci.*, **93**: 1682-1691 (2004).
- 59) S H Mayor, L Illum. Investigation of the effect of anesthesia on nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharm.*, **149**: 123-129 (1997).
- 60) Y C Wong, S Qian, Z Zuo. Pharmacokinetic Comparison Between the Long-Term Anesthetized,

Short-Term Anesthetized and Conscious Rat Models in Nasal Drug Delivery. *Pharm. Res.*, **31**: 2017-2123 (2014).

- 61) C Høybye, P Cohenc, A R Hoffmand, R Rosse, B M.K. Billerf, J S Christiansen. Status of long-acting-growth hormone preparations - 2015. *Growth Horm. IGF Res.*, **25**: 201-206 (2015).
- 62) M Bielohuby, M Schaab, M Kummann, M Sawitzky, R Gebhardt, G Binder, J Frystyk, M Bjerre, A Hoeflich, J Kratzsch, M Bidlingmaier. Serum IGF-I Is Not a Reliable Pharmacodynamic Marker of Exogenous Growth Hormone Activity in Mice. *Endocrinology*, **152**: 4764-4776 (2011).
- 63) K D Jorgensen. Comparison of the pharmacological properties of pituitary and biosynthetic human growth hormone. *Acta Endocrinol.*, **114**: 124-131 (1987).
- 64) E A Parker, A Hegde, M Buckley, K M Barnes, J Baron, O Nilsson. Spatial and temporal regulation of GH-IGF-related gene expression in growth plate cartilage. *Bone*, **46**: 1380-1390 (2010).
- 65) W L Isley, L E Underwood, D R Clemmons. Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J. Clin. Invest.*, **71**: 175-182 (1983).