

難吸収性薬物の経鼻粘膜吸収制御を目的とした
PEG 修飾 poly-L-ornithine 及び poly-L-lysine の合成と
機能性評価に関する研究

神矢 佑輔

目次

略語と記号	・・・	1
緒言	・・・	2
第1章 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成及び物性評価		
第1節 小緒言	・・・	6
第2節 実験方法		
1-2-1 試薬	・・・	8
1-2-2 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成	・・・	8
1-2-3 HPLC 条件	・・・	10
1-2-4 元素分析法	・・・	10
1-2-5 TNBS assay	・・・	10
1-2-6 <i>In vitro</i> 滞留性評価	・・・	11
1-2-7 統計解析	・・・	11
第3節 結果		
1-3-1 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成	・・・	12
1-3-2 PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾数	・・・	14
1-3-3 PEG 修飾 PLO 及び PLL の <i>in vitro</i> 滞留性	・・・	17
第4節 考察	・・・	18
第2章 PEG 修飾 PLO 及び PLL の Caco-2 細胞単層膜を介した水溶性高分子 薬物の透過促進効果及び TJ 関連タンパク質の局在性への影響		
第1節 小緒言	・・・	21
第2節 実験方法		
2-2-1 試薬及び抗体	・・・	23
2-2-2 細胞培養	・・・	23
2-2-3 経上皮電気抵抗 (TEER) の測定	・・・	25
2-2-4 FD-4 透過実験	・・・	26
2-2-5 MTT assay	・・・	27
2-2-6 免疫蛍光染色法	・・・	27
2-2-7 統計解析	・・・	28

第3節	結果	
2-3-1	Caco-2 細胞単層膜における TEER 及び FD-4 透過性に対する種々 PLO 及び PLL 並びに PEG 修飾 PLO 及び PLL の影響	・・・ 29
2-3-2	種々 PLO 及び PLL 並びに PEG 修飾 PLO 及び PLL による細胞傷害性	・・・ 32
2-3-3	PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) による TJ 関連タンパク質の局在性への影響	・・・ 36
第4節	考察	・・・ 38
第3章	PLO 及び PEG 修飾 PLO の経鼻吸収促進効果及び鼻腔内滞留効果	
第1節	小緒言	・・・ 42
第2節	実験方法	
3-2-1	試薬	・・・ 44
3-2-2	実験動物	・・・ 44
3-2-3	静脈内 (<i>i.v.</i>) 投与実験	・・・ 44
3-2-4	閉鎖系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験 (Closed system)	・・・ 44
3-2-5	開放系鼻腔内 (<i>i.n.</i>) 投与実験 (Open system)	・・・ 45
3-2-6	血漿の採取	・・・ 46
3-2-7	血漿中 FD-4 濃度の測定	・・・ 46
3-2-8	動態学的解析	・・・ 46
3-2-9	統計解析	・・・ 47
第3節	結果	
3-3-1	FD-4 静脈内投与後の体内動態	・・・ 48
3-3-2	PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) の FD-4 経鼻吸収促進効果	・・・ 49
3-3-3	PEG (10)-PLO (45) の鼻腔内滞留性の評価	・・・ 52
第4節	考察	・・・ 56
結論		・・・ 60
謝辞		・・・ 65
引用文献		・・・ 66

略語		略語	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	SSP	Stainless steel plate
		TEER	Transepithelial electrical resistance
FD-4	Fluorescein isothiocyanate dextran (MW 3.4 or 3.7 kDa)	TJ	Tight junction
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography		
<i>i.n.</i>	Intranasal	記号	
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal	ER	吸収促進比
<i>i.v.</i>	Intravenous	F _{0/c}	鼻腔内滞留性改善率
mPEG (10)-NH ₂	α -Methyl- ω -aminopropoxy polyoxyethylene (MW 10.1 kDa)	G_t	膜コンダクタンス
mPEG (10)-NHS	α -Succinimidyl- ω -methoxy polyoxyethylene (MW 9.8 kDa)	$G_{t 120 \text{ min}/0 \text{ min}}$	実験開始 120 分後と開始時の G_t 比
		G_t ratio	コントロール群に対する $G_{t 120 \text{ min}/0 \text{ min}}$ 比
mPEG (10)-SH	α -Mercaptoethyl- ω -methoxy polyoxyethylene (MW 9.2 kDa)	P_{app}	みかけの透過係数
		MAR	最大吸収速度
mPEG (40)-NH ₂	α -Methyl- ω -aminopropoxy polyoxyethylene (MW 42.5 kDa)	MRT	平均滞留時間
mPEG (40)-NHS	α -Succinimidyl- ω -methoxy polyoxyethylene (MW 40.2 kDa)		
mPEG (40)-SH	α -Mercaptoethyl- ω -methoxy polyoxyethylene (MW 39.4 kDa)		
MWCO	Molecular weight cut-off		
PEG	Polyethylene glycol		
PLA	Poly-L-arginine hydrochloride		
PLL (20)	Poly-L-lysine hydrobromide (MW 21.3 kDa)		
PLL (30)	Poly-L-lysine hydrobromide (MW 30.9 kDa)		
PLO (20)	Poly-L-ornithine hydrobromide (MW 18.5 kDa)		
PLO (45)	Poly-L-ornithine hydrobromide (MW 44.9 kDa)		

緒言

一般に粘膜を介した薬物の透過は、薬物の分子量の増大及び疎水性度の低下によって制限される¹⁾。近年、インスリンをはじめとして、ソマトロピンやテリパラチド、リラグルチドなど、生理活性を有するペプチド及びタンパク質性医薬品が多く実用化されている^{2,3)}。しかし、これらの医薬品は水溶性の高分子薬物であり、消化管粘膜などの上皮粘膜を介した吸収はほとんど期待できない。そのため、投与方法はほとんどが注射によるものであり、治療は長期に亘り、且つ頻回投与が必要であるものが多く、患者自身または患者家族や介護者が投与する自己注射製剤として使われることも多い。自己注射製剤は投与に痛みを伴うだけでなく、注射部位に炎症をきたすおそれがあること、また、自己注射操作や注射針等医療廃棄物の処理が煩雑であることなど、患者への負担が大きい⁴⁻⁷⁾。そのため、それらの難吸収性薬物の注射に代わる非侵襲的な投与方法の開発は、患者の **quality of life (QOL)** の向上に大きく貢献すると考えられる。

上記のような注射投与の問題点を回避する投与経路として、経鼻投与が注目されている。鼻腔内の粘膜上皮組織は絨毛構造を有しているため、吸収に寄与する面積が比較的大きい。また、上皮組織下には脈管系が発達していることから、鼻粘膜を介して吸収された薬物は全身循環系に移行しやすい。それに加えて、鼻腔内は消化管等の他の経粘膜投与部位と比較して、タンパク質分解に関わる酵素の存在量が少ないことなどから、鼻粘膜は薬物の吸収部位として適した性質を有していると考えられる^{8,9)}。しかし、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、ほとんど製剤化に至っていない。この低いバイオアベイラビリティの要因として、①分子量依存的な粘膜透過性の制限、②粘膜上皮細胞の絨毛運動による **mucociliary clearance** 及び鼻腔構造に伴う吸収部位からの咽頭側への物理的な除去、③鼻腔内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には、(1) 経粘膜吸収促進剤の利用による薬物の鼻粘膜透過性の向上、(2) 生体付着性・粘性物質による鼻腔滞留性の向上、(3) 酵素阻害剤の利

用による酵素的分解の抑制、の3つの方法が有用であると考えられる。

水溶性高分子薬物を含む難吸収性薬物の吸収を促進する物質として、従来は界面活性剤や胆汁酸など、様々な物質が吸収促進剤の候補物質として検討されてきたが、それらは薬物の吸収を改善すると同時に、細胞質に存在する酵素や膜タンパク質の細胞外への漏出、組織学的な細胞の脱落等の傷害性が認められるものがほとんどであった¹⁰⁻¹²⁾。近年では、chitosanのようなポリカチオン性物質が吸収促進剤として見出されており、上皮粘膜にほとんど損傷を及ぼすことなく、難吸収性薬物の吸収を向上させることが報告されている¹³⁾。しかし、chitosanは溶血活性を示すことや、caspase-8のようなapoptosisに関連する細胞内のシグナル活性を増大させることが報告されており、より安全性の高い吸収促進剤の開発が求められている^{14,15)}。

Natsumeらは、有効性及び安全性ともに優れたポリカチオン性の経粘膜吸収促進剤として、poly-L-arginine (PLA)を見出した¹⁶⁾。PLAは塩基性アミノ酸であるL-arginineのホモポリマーであり、生理的条件下で正に帯電している。これまでに、PLAは上皮粘膜を傷害することなく、組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF)、サケカルシトニン(salmon calcitonin, sCT)及び α -ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(α -human atrial natriuretic peptid, α -hANP)の経鼻吸収、また、種々分子量のfluorescein isothiocyanate-dextrans (FDs)の経鼻及び経腸管吸収を促進することが報告されている^{1,16-18)}。また、PLAと同様に、塩基性アミノ酸からなるホモポリマーであり、構造及び生理的特性が類似しているpoly-L-ornithine (PLO)及びpoly-L-lysine (PLL)もまた、ラット鼻粘膜や培養細胞を介した水溶性高分子の吸収を増大させることが明らかとなっており、PLAと同様の吸収促進効果を有することが期待されている¹⁹⁻²¹⁾。Ohtakeらは、PLAの吸収促進効果が適用時間や分子量に依存的であり、且つ可逆的であることを証明した²²⁾。また、家兔摘出鼻粘膜を用いたPLAの吸収促進メカニズムに関する研究では、PLAは上皮細胞の細胞間隙部位に存在するtight junction (TJ)関連タンパク質であるoccludin及びzonula occludens-1 (ZO-1)や、adherence junction (AJ)関連タンパク質であるE-cadherinを細胞間隙部位から消失させることにより、主に細胞間隙経路を介した水溶性高分子薬物の吸収を増

大させることを明らかにしている²³⁾。ヒト結腸癌由来の細胞株である Caco-2 細胞を用いた研究においても、PLA は細胞傷害性を示すことなく水溶性高分子の透過を促進し、occludin や ZO-1 だけでなく、claudin-4 や tricellulin も細胞間隙部位から消失させること、また、それらの TJ 関連タンパク質の主な消失が分解ではなく、細胞間隙部位から細胞質内への局在変化によるものであることが証明された²⁴⁾。また、PLO は PLA よりも高い水溶性高分子の経鼻吸収促進効果を示すことや、有意な吸収促進効果を示す濃度でも鼻粘膜に対して傷害性を示さなかったことなどが明らかになっている^{25, 26)}。PLL に関しても、培養上皮細胞及び内皮細胞を介した水溶性高分子の透過性を増大させることが報告されている^{20, 21)}。従って、PLA をはじめとした塩基性アミノ酸ホモポリマーは、安全且つ優れた吸収促進効果を有していると考えられ、難吸収性薬物の経鼻送達システムの開発に有用であると考えられる。

PLA は水溶性高分子の鼻粘膜を介した吸収を促進する一方、その溶液にはほとんど粘性がない。そのため、鼻腔内に投与した薬液が咽頭側に流出することを制限しない実験系においては、PLA を含む薬液が吸収部位から除去され、投与量に見合った吸収が得られない²⁷⁾。Irie らは、生体付着性物質の鼻腔内滞留性評価モデルを確立し、経鼻吸収の改善には鼻粘膜付着滞留性を示す適度な粘性が重要であることを明らかにしている²⁸⁾。従って、難吸収性薬物の経鼻送達システムの開発においては、前述した要因①の薬物の粘膜透過性の制限に加え、要因②の薬液の吸収部位からの除去の問題を解決可能な機能を有する化合物を開発することは、効果的な製剤設計において有効であると考えられる。本研究では、吸収促進効果及び安全性に優れた塩基性アミノ酸ホモポリマーの経鼻送達における有用性を向上するために、それらの分子構造中に機能性化合物を導入することによって、鼻粘膜に対する付着滞留性を改善し、経鼻吸収促進剤に空間的且つ時間的制御機能を付与することを目的とする。

一般に、製剤の粘性や付着性を向上させる手法としては、セルロース誘導体、starch、刺激又は環境応答性ゲル化剤など、水溶性高分子を添加剤として用いた検討が広く行われている²⁹⁻³²⁾。Polyethylene glycol (PEG) は、医薬品の添加物として汎用されている水溶性高分子であり、近年では、タンパク質に PEG を結合させることにより、腎臓におけるクリアランスが低下すると共に、抗原性が低下することで分解が遅延する結果、血中滞留時間が延長す

ることに着目して、タンパク質性医薬品の PEG 修飾製剤が開発され、臨床で使用されている³³⁻³⁵⁾。このように PEG は応用性及び安全性に優れているが、以前から PEG によって修飾されたタンパク質が PEG の分子量及び修飾数に依存した粘性の増大を示すこと、また、直鎖 PEG 分子を表面に有するゲル基剤の PEG 鎖が粘膜と相互作用することで粘膜付着性を示すことが報告されている^{36,37)}。そこで本研究では、塩基性アミノ酸ホモポリマーの鼻腔内滞留性を改善するための機能性要素として PEG を選択し、PEG で修飾した塩基性アミノ酸ホモポリマーの経鼻粘膜吸収促進剤としての機能について検討した。

第 1 章では、塩基性アミノ酸ホモポリマーとして PLO 及び PLL を選択し、種々分子量比の PEG 修飾 PLO 及び PLL を合成し、PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾比及び傾斜板上での滞留性等の物性を *in vitro* において評価した。第 2 章では、Caco-2 細胞を用いて、合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL の水溶性高分子に対する透過促進効果、細胞傷害性及び TJ 関連タンパク質の局在性に及ぼす影響について評価した。第 3 章では、PLO の PEG 修飾による鼻腔内滞留性の改善効果を *in vivo* 鼻腔内滞留性評価モデルを用いて動態学的に評価した。

第1章 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成及び物性評価

第1節 小緒言

塩基性アミノ酸ホモポリマーは、上皮細胞を介した難吸収性薬物の透過性を、傷害性を示すことなく顕著に増大させる有用な吸収促進剤であるが、鼻粘膜に対する付着滞留能が低いために、開放系、すなわち、投与した薬液が鼻腔から咽頭側に流出することを制限しない実験系では、投与量に見合った吸収が得られていない²⁷⁾。そこで、修飾によって粘性及び付着性が増大することが報告されている^{36,37)}、安全性の高い水溶性高分子である PEG を用いて、塩基性アミノ酸ホモポリマーを修飾することを検討した。

塩基性アミノ酸ホモポリマーに対して機能性高分子を化学的に結合させる部位としては、側鎖あるいは末端官能基の2つが考えられる。しかし、末端同士の反応は、PEG 及び塩基性アミノ酸ホモポリマーがいずれも高分子であり、遭遇確率が極めて低く、反応性が低いと予想され、側鎖の利用が反応性の面において有利であると考えられる。加えて、Huang らは、PEG 修飾による粘膜付着性の増大は、PEG 鎖が粘膜界面に浸透することによって生じると考察しており³⁷⁾、一方、塩基性アミノ酸ホモポリマーの吸収促進効果の発現には、正電荷を有する側鎖と粘膜との相互作用が必要であると考えられていることから、末端を PEG で修飾した塩基性アミノ酸ホモポリマーの場合、PEG 鎖が粘膜界面に浸透し、粘膜付着性が増大したとしても、吸収促進効果を担う側鎖正電荷と粘膜との間には空間が生じてしまうと考えられ、効率的な吸収促進効果が得られるとは考えにくい。また、カチオン性の吸収促進剤は、鼻粘液中に含まれる mucin の負電荷部分によって正電荷が中和されることが知られており^{38,39)}、これによって吸収促進効果の減弱が生じるおそれがあるが、側鎖への複数の PEG 修飾は、この静電的相互作用を遮蔽することで、吸収促進効果の低下を抑制することも期待できる。一方、塩基性アミノ酸ホモポリマーの末端に結合した PEG 分子では、PEG 鎖の立体効果の及ぶ範囲が小さく、この正電荷の中和抑制効果は期待できない。これらのことを総合すると、側鎖の官能基は塩基性アミノ酸ホモポリマーの重合数分存在することから、部位

及び反応比は非特異的であるものの、PEG 鎖の導入に側鎖を利用することは、その吸収促進効果の発現においても有利であると考えられる。すなわち、側鎖上に複数の PEG 鎖が存在するため、上述した PEG 鎖の粘膜浸透が生じた場合に、PEG による修飾がなされていない側鎖も粘膜表面の近傍に位置する可能性が高く、PEG 鎖による粘液に対する遮蔽効果も効率的に機能することにより、側鎖の修飾により分子当たりのカチオン性は減少するものの、効率的な吸収促進効果を発現することが期待できる。そこで本研究では、塩基性アミノ酸ホモポリマーの側鎖を標的とした PEG 修飾に着目した。

PLO 及び PLL を構成する L-ornithine 及び L-lysine は、どちらも側鎖に反応性の高い第一級アミンを有し、機能性化合物によるタンパク質修飾においては、タンパク質の L-lysine 残基を標的とした報告が多数存在する⁴⁰⁻⁴²⁾。しかしながら、PLA を構成する L-arginine の側鎖はグアニジノ基であり、特異的な反応による化合物の修飾に関する報告は皆無である。事前の検討において、アミン反応性 PEG を用いて PLA の側鎖に対する導入を試みたが、導入は認められなかった。従って、本研究では塩基性アミノ酸ホモポリマーとして PLO 及び PLL を選択して、PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成を試みた。

第 1 章には、種々分子量比の PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法及び PEG 修飾比の測定方法を確立し、合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL の *in vitro* における滞留性の評価を行った結果を論述する。

第2節 実験方法

1-2-1 試薬

Poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (20) : 18.5 kDa) 及び poly-L-lysine hydrobromide (PLL (20) : 21.3 kDa) を Alamanda Polymers, Inc. (AL, USA) より購入した。Poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (45) : 44.9 kDa) 及び poly-L-lysine hydrobromide (PLL (30) : 30.9 kDa) を Sigma-Aldrich (MO, USA) より得た。 α -Succinimidyl- ω -methoxy polyoxyethylene (SUNBRIGHT ME-400TS, mPEG (40)-NHS : 40.2 kDa) 並びに SUNBRIGHT ME-100TS, mPEG (10)-NHS : 9.8 kDa) 及び α -mercaptoethyl- ω -methoxy polyoxyethylene (SUNBRIGHT ME-400SH, mPEG (40)-SH : 39.4 kDa) 並びに SUNBRIGHT ME-100SH, mPEG (10)-SH : 9.2 kDa) を日油株式会社 (東京) より購入した。2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を和光純薬工業株式会社 (大阪) より得た。2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate (MES) を株式会社同仁化学研究所 (熊本) より購入した。その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

1-2-2 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成

MES buffer (0.1 M, pH 7.0) を用いて種々ポリカチオン溶液 (50 μ M) を調製した。その溶液を用いて、対応する種々分子量の mPEG-NHS を溶解後、室温で一晩攪拌した。Table 1 に種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成に用いたポリカチオン及び PEG とその反応比を、Fig. 1 に反応機構を示す。NHS 基はアミン反応性の官能基であり、NHS 基を有するリンカー等を用いたアミド結合の形成が広く利用されている。この各反応液に対し、イオン交換スピニングカラム (Pierce Strong Cation Exchange Spin Column, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を製造会社のプロトコールに従って、繰返し 3 回適用することで、生成した PEG 修飾 PLO 及び PLL を抽出した。得られた抽出液を透析膜 (Spectra/Por[®] 7 Dialysis Membranes, RC, MWCO 8 kDa, Spectrum Laboratories, Inc., CA, USA) 内に封入し、内液の 100 倍量の distilled water (外液) 中 4°C で 24 時間透析した。透析開始後 6 時間後まで、2 時間毎に外液を全量交換した。透析終了後、内液を回収し、真空凍結乾燥機 (FreeZone 6 freeze dry systems, Labconco Corp., MO, USA) 内で凍結乾燥することで、種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL の精製乾燥末を得た。

Table 1 Materials for the synthesis of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL.

Products	Polycation	PEG	Molar ratio (polycations: PEG)
PEG (40)-PLO (20)	PLO (20)	mPEG (40)-NHS	1: 5
PEG (10)-PLO (45)	PLO (45)	mPEG (10)-NHS	1: 10
PEG (40)-PLL (20)	PLL (20)	mPEG (40)-NHS	1: 5
PEG (10)-PLL (30)	PLL (30)	mPEG (10)-NHS	1: 10

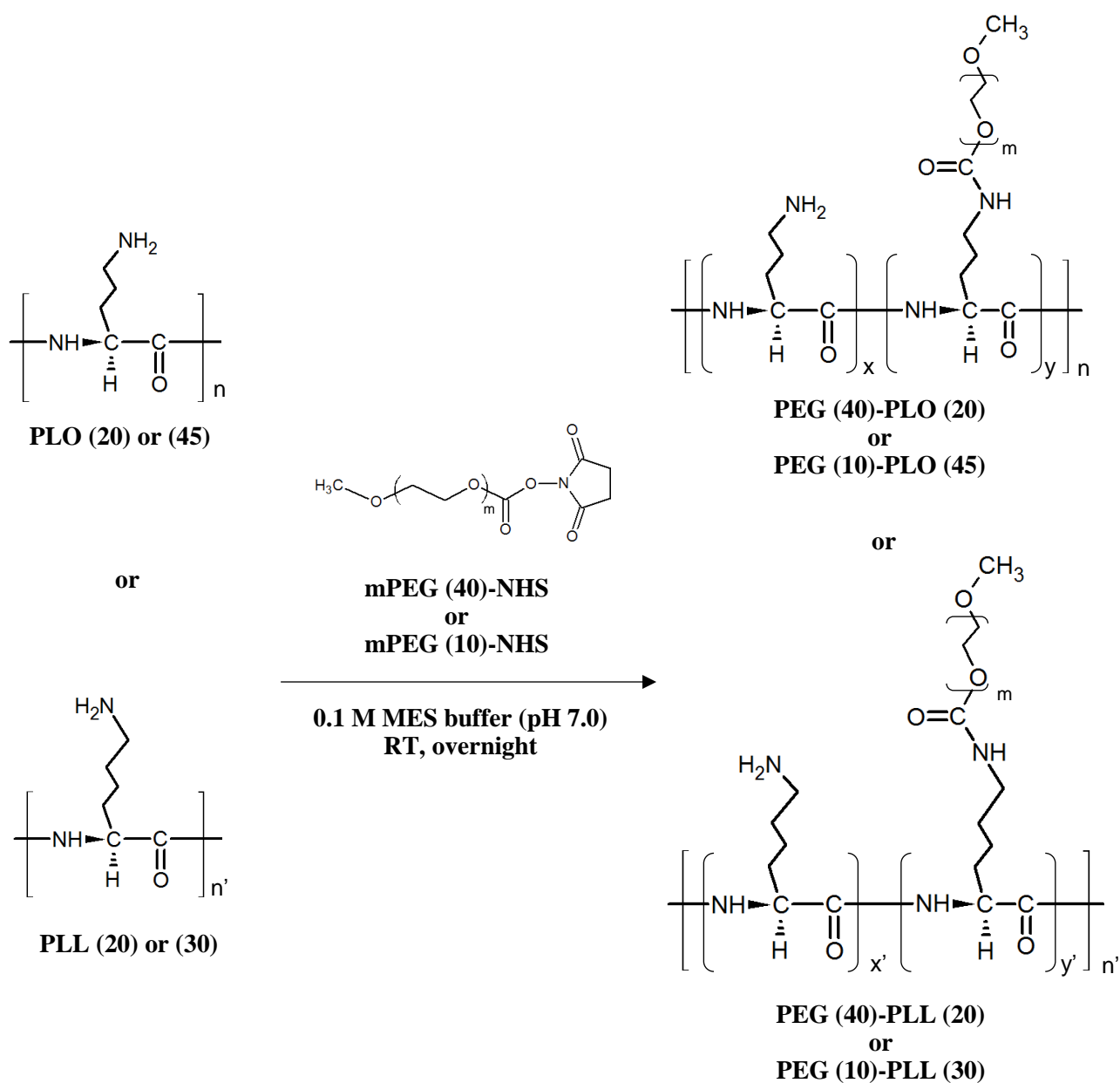


Fig. 1 Schemes of synthesis of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL.

1-2-3 HPLC 条件

種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の生成を、ポンプ (LC-10AT, 株式会社島津製作所, 京都)、マニュアルインジェクター (7125, RHEODYNE, IDEX Corp., WA, USA)、カラムオーブン (CTO-10ASVP, 株式会社島津製作所)、サイズ排除カラム (PROTEIN KW-803, 昭和電工株式会社, 東京) 及び示差屈折率検出器 (RI-101, 昭和電工株式会社) で構成される高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて評価した。Table 2 に HPLC 測定条件を示す。

Table 2 HPLC conditions for qualitative analysis of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL.

Flow rate	0.5 – 1.0 mL/min
Eluent	0.5 M sodium acetate/ acetic acid buffer (pH 4.7)
Column temperature	35°C
Injection volume	20 µL

1-2-4 元素分析法⁴³⁾

1-2-2 で調製した種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL を CHN コーダー (MT-6, ヤナコテクニカルサイエンス株式会社, 東京) を用いて元素分析し、各サンプル中の炭素 (C) と窒素 (N) の含有比率 (C/N 比) を算出した。各 PEG 修飾数における理論 C/N 比に当てはめることで、調製した種々 PEG 修飾ポリカチオンの PEG 修飾比を算出した。また、未知サンプルの測定誤差を補正するために、窒素原子を含まない PEG (mPEG (40)-SH または mPEG (10)-SH) と PLO または PLL との物理的混合物を同様の方法で測定し、得られた C/N 比を理論値と比較した。

1-2-5 TNBS assay⁴⁴⁾

96 well マイクロプレート (Non-treated, Flat-bottom) の各ウェル内に 0.1 M 4-ホウ酸ナトリウム水溶液及び 0.1 M TNBS 水溶液を、それぞれ 140 µL 及び 5 µL ずつ加えた。そこに、50–200 µg/mL に調製した種々 PEG 修飾 PLO または PLL 並びに対応する PLO または PLL

をそれぞれ 60 μL ずつ添加し、37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、直ちにマイクロプレートリーダー (Multiskan Ascent, MTX Lab Systems, FL, USA) を用いて、各サンプルの波長 450 nm における吸光度を測定した。同濃度における PEG 修飾 PLO または PLL 及び対応する未修飾の PLO 及び PLL の吸光度の減少率から、側鎖アミノ基数を算出することで、PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾比を求めた。

1-2-6 *In vitro* 滞留性評価

平板を用いたゲル製剤の *in vitro* 滞留性評価方法を改変し、PEG 修飾 PLO 及び PLL の滞留性評価を行った^{27,45)}。Figure 2 に実験の概要図を示す。PEG 修飾 PLO 及び PLL 及び対応する未修飾の PLO 及び PLL を、それぞれ 0.1% になるように distilled water で溶解し、その 35 μL を、45° に傾斜させたステンレススチール板 (SSP) 上に滴下した。滴下位置 +1 cm 地点から +4 cm 地点まで移動するのに要した時間を滞留時間とし、PEG 修飾前後での滞留時間を比較した。

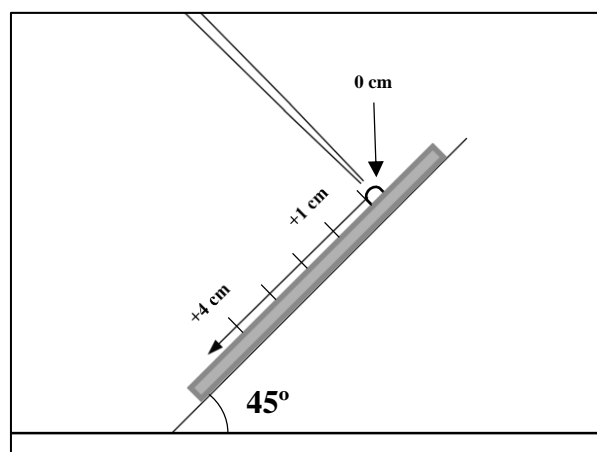


Fig. 2 Side view of the *in vitro* inclined plate test.

1-2-7 統計解析

データを平均値 \pm 標準誤差 (standard error, S.E.) で示した。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

1-3-1 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成

Figure 3 に PEG (40)-PLO (20) の合成時に用いた PLO (20)、mPEG (40)-NHS 溶液並びに反応後にスピнкаラムで抽出した溶液の HPLC クロマトグラムの典型例を、Fig. 4 に PEG (40)-PLL (20) の合成時に用いた PLL (20)、mPEG (40)-NHS 溶液並びに反応後にスピнкаラムで抽出した溶液の HPLC クロマトグラムの典型例をそれぞれ示す。PLO (20) または PLL (20) と mPEG (40)-NHS の反応により得られた生成物のピーク (Fig. 3 (c): 6.28 分、Fig. 4 (c): 7.75 分) は、それぞれの単独分析時のピーク (Fig. 3 (a) 及び (b): 9.05 分及び 7.29 分、Fig. 4 (a) 及び (b): 11.01 分及び 9.24 分) よりも早い時間に検出された。また、スピнкаラム抽出後のクロマトグラムからは、PLO (20)、PLL (20) 及び mPEG (40)-NHS 由来のピークは検出されなかった。

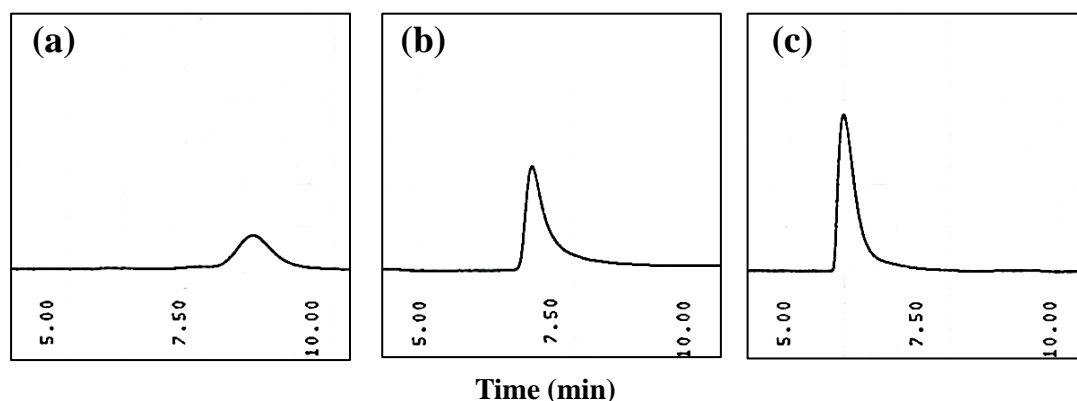


Fig. 3 HPLC chromatograms of PLO (20) (a), mPEG (40)-NHS (b) and the extracted solution by the spin column (c). flow rate = 1.0 mL/min.

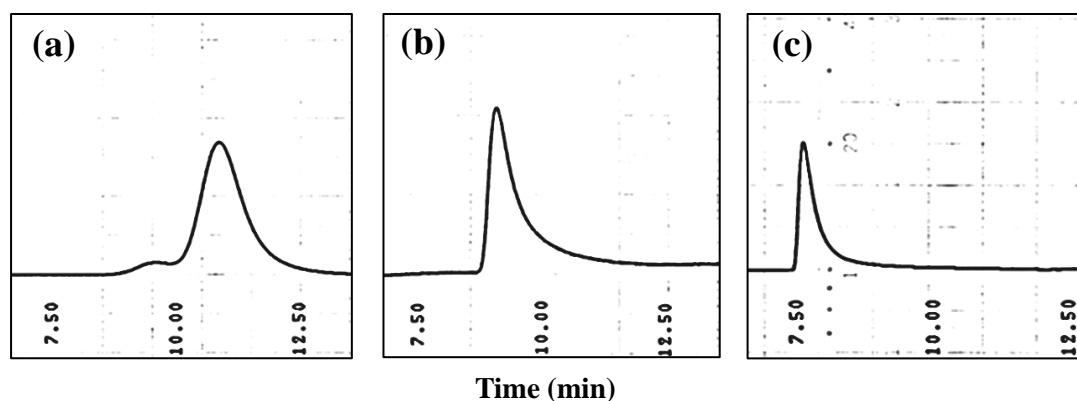


Fig. 4 HPLC chromatograms of PLL (20) (a), mPEG (40)-NHS (b) and the extracted solution by the spin column (c). flow rate = 0.8 mL/min.

Figure 5 (a) に PEG (10)-PLO (45) の合成時に用いた PLO (45)、mPEG (10)-NHS 溶液並びに反応後にスピncラムで抽出した溶液の HPLC クロマトグラムの典型例を、Fig. 5 (b) に PEG (10)-PLL (30) の合成時に用いた PLL (30)、mPEG (10)-NHS 溶液並びに反応後にスピncラムで抽出した溶液の HPLC クロマトグラムの典型例をそれぞれ示す。PLO (45) または PLL (30) と mPEG (10)-NHS の反応により得られた生成物のピーク (Fig. 5 (a) 実線: 8.87 分、Fig. 5 (b) 実線: 9.20 分) は、それぞれの単独分析時のピーク (Fig. 5 (a) 点線及び破線: 10.84 分及び 12.28 分、Fig. 5 (b) 点線及び破線: 12.09 分及び 12.28 分) よりも早い時間に検出された。また、抽出後のクロマトグラムからは、PLO (45)、PLL (30) 及び mPEG (10)-NHS 由来のピークは検出されなかった。

Figure 3, 4 及び 5 から、各スピncラム適用後の抽出液中には、合成した種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL が含有されており、未反応物は残留していないことが明らかとなった。

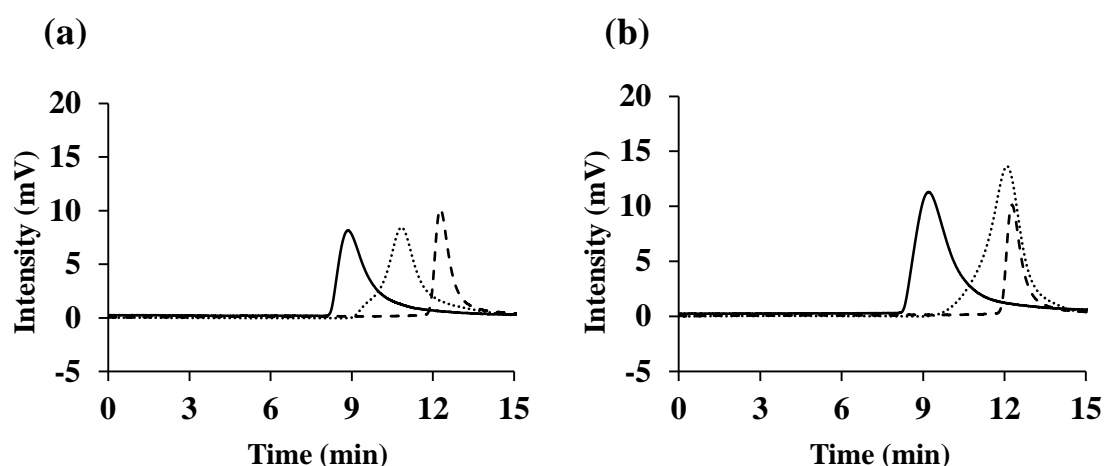


Fig. 5 HPLC chromatograms of the polycations, mPEG (10)-NHS and the extracted solutions by the spin column.

..... ; (a): PLO (45), (b): PLL (30)
 - - - - - ; (a) and (b): mPEG (10)-NHS
 ————— ; (a) and (b): Extracted solutions by the spin column
 Flow rate = 0.8 mL/min.

1-3-2 PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾数

Figure 6 に各修飾数における種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の C/N 比の理論値と、元素分析法によって算出した種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾比の結果を示す。Table 3 に示すように、元素分析法を用いて測定した PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の C/N 比はそれぞれ 38.76、31.92、9.37 及び 15.42 であった。これらの値を理論値 (Fig. 6 中 ●) より得られた回帰直線 (Fig. 6 中の点線) に当てはめて算出した PEG 修飾比は、それぞれ 3.83、3.83、8.80 及び 9.40 であった。Figure 7 に TNBS assay を行った場合の各修飾数における種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL と対応する未修飾の PLO 及び PLL との吸光度比の理論値と、TNBS assay により求めた種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾比の結果を示す。TNBS assay によって得られた吸光度から算出した PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の対応する PLO 及び PLL に対する吸光度比は、0.123、0.110、0.374 及び 0.238 であった (Table 3)。これらの値を理論値 (Fig. 7 中 ●) より得られた回帰曲線 (Fig. 7 中の破線) に当てはめて算出した PEG 修飾比は、それぞれ 3.23、4.16、8.96 及び 9.60 であった。それぞれの方法から得られた PEG 修飾比はよく一致しており、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の 1 分子当たりの平均 PEG 修飾数は、それぞれ 3 から 4 分子、3 から 5 分子、8 から 9 分子及び 9 から 10 分子であることが示され、およその分子量はそれぞれ 150,000、150,000、115,000 及び 110,000 と算出された (Table 3)。また、種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の 1 kDa あたりの側鎖アミノ基数 (NH₂ contents) を PEG 修飾前後で比較したところ、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) でそれぞれ 0.14、0.16、0.38 及び 0.27 と算出され、分子量あたりのアミノ基数は PEG 修飾によって減少した (Table 3)。

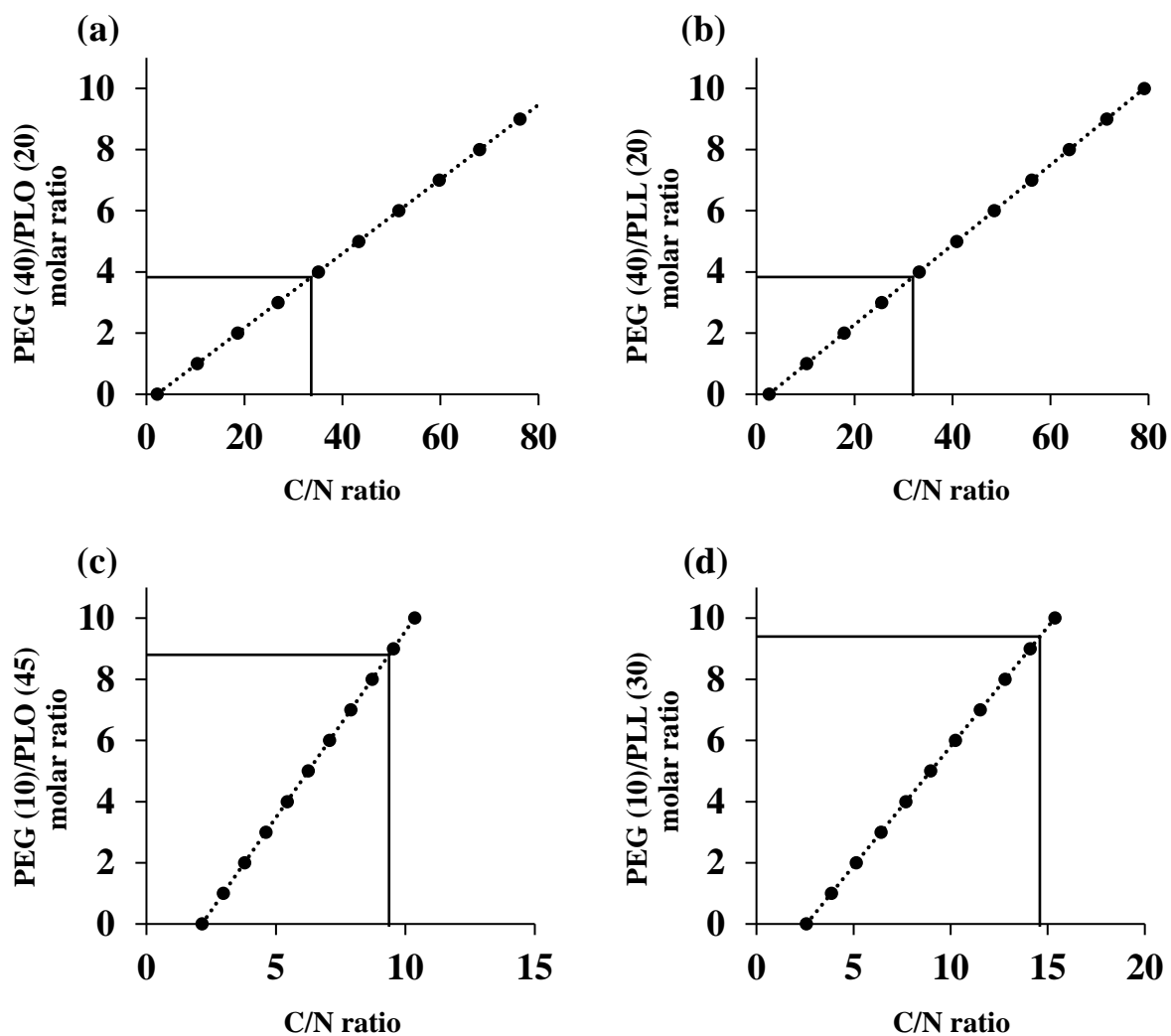


Fig. 6 Determination of PEG/polycations molar ratio of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL by the elemental analysis.

(a): PEG (40)-PLO (20), (b): PEG (40)-PLL (20), (c): PEG (10)-PLO (45), (d): PEG (10)-PLL (30)

●: theoretical value,: regression line

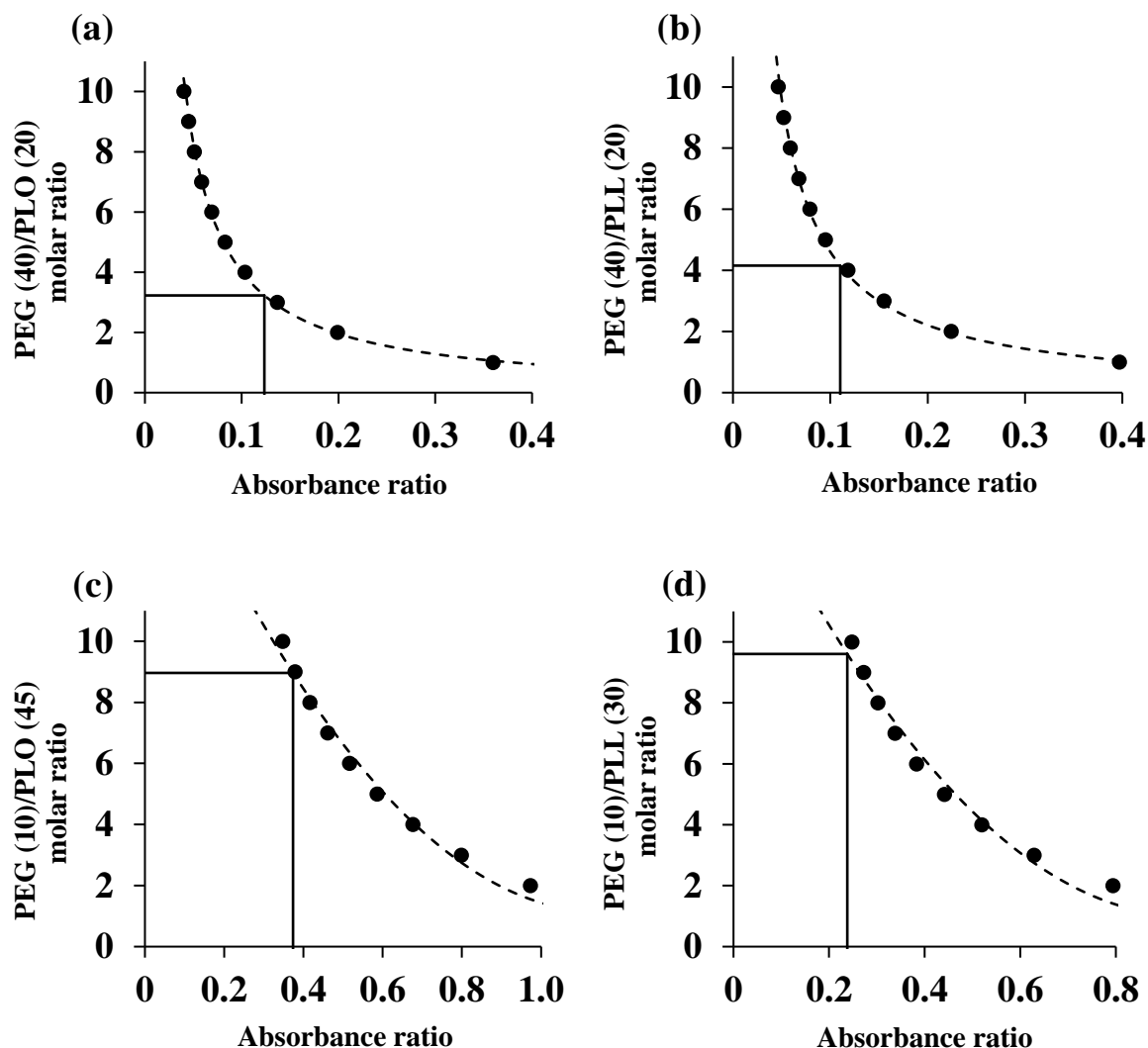


Fig. 7 Determination of PEG/polycations molar ratio of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL by the TNBS assay.

(a): PEG (40)-PLO (20), (b): PEG (40)-PLL (20), (c): PEG (10)-PLO (45), (d): PEG (10)-PLL (30)

●: theoretical value, - - : regression curve

Table 3 The physical properties of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL obtained and calculated the elemental analysis and the TNBS assay.

	Elemental analysis		TNBS assay		Containing PEG per molecule	Molecular weight (approximately)	NH ₂ group per 1 kDa (NH ₂ contents)	NH ₂ contents before the PEGylation	NH ₂ contents ratio (after/ before PEGylation)
	C/N ratio	PEGylation ratio	Absorbance ratio	PEGylation ratio					
PEG (40)-PLO (20)	38.76	3.83	0.123	3.23	3-4	150,000	0.70	5.12	0.14
PEG (40)-PLL (20)	31.92	3.83	0.110	4.16	3-5	150,000	0.74	4.78	0.16
PEG (10)-PLO (45)	9.37	8.80	0.374	8.96	8-9	115,000	1.94	5.12	0.38
PEG (10)-PLL (30)	15.42	9.40	0.238	9.60	9-10	110,000	1.30	4.78	0.27

1-3-3 PEG 修飾 PLO 及び PLL の *in vitro* 滞留性

Figure 8 に、45° に傾斜させた SSP 上に滴下した 0.1% の種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL 溶液の滞留時間と、対応する 0.1% PEG 未修飾 PLO 及び PLL 溶液の滞留時間の比（滞留時間比）を示す。いずれの PLO 及び PLL においても、PEG の修飾によりプレート滞留時間は有意に延長し、滞留時間比は約 1.5–2.3 であった。

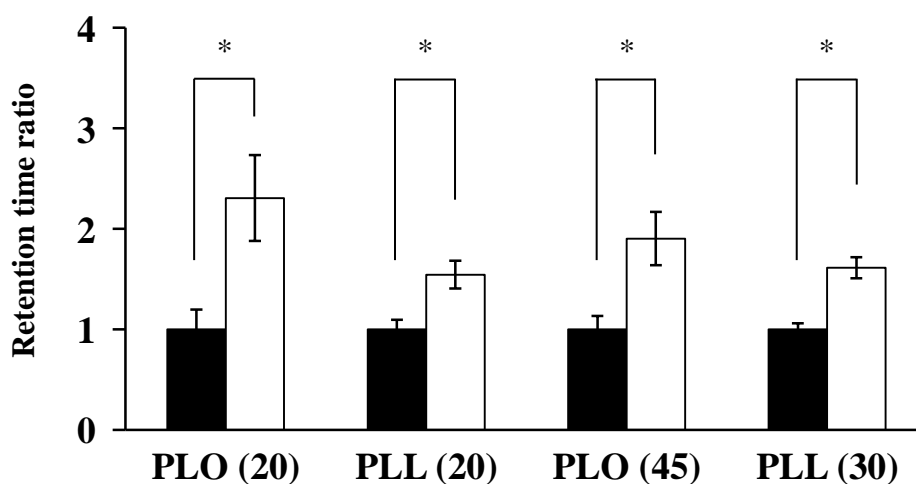


Fig. 8 Retention time ratios of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL to corresponding PLO and PLL on inclined SSP.

■: Unmodified, □: PEGylated

Each data column represents the mean \pm S.E. (n=6–8), * $p < 0.05$.

第4節 考察

第1章では、側鎖を標的とした PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法の確立と、合成した種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の物性評価を行った。

PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成には、Fig. 1 に示したように PEG 鎖の片末端をアミン反応性の NHS 基で置換した mPEG-NHS を用いた。事前の検討において、PLO 及び PLL と mPEG-NHS を Table 1 に示したモル比で反応させることで、PLO 及び PLL または PEG 由来のピークよりも早い時間に新たなピークが出現し、未反応の PLO 及び PLL 由来のピークが消失することを、サイズ排除カラムを用いた HPLC 分析によって確認した (Figs. 4 及び 5)。この新たなピークは、PLO 及び PLL に対して PEG が結合したことにより分子量の増大した PEG 修飾 PLO 及び PLL が生成したことを示しており、この反応液に対してイオン交換スピンカラムを適用し、カチオン性物質を抽出することで、生成した PEG 修飾 PLO 及び PLL を単離できることが示された。

合成した種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 修飾数の評価を、元素分析法及び TNBS assay の2つの方法で行ったところ、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても、2つの方法によって得られた PEG 修飾比は同程度の値を示した (Figs. 6 及び 7 並びに Table 3)。元素分析法は、構成元素割合の変化を基に PEG 分子数の増加の程度を評価する方法であり⁴³⁾、一方で TNBS assay は、アミノ基と反応して呈色する TNBS 試薬を用いて、その吸光度の変化から側鎖遊離アミノ基数の変化を算出し、PEG 修飾数を評価する方法である⁴⁴⁾。原理の異なる2つの方法によって得られた値が同程度であることは、得られた PEG 修飾数が適切であることを示唆していた。また、本研究で合成した PEG (40)-PLO (20) 及び PEG (40)-PLL (20) の PEG 修飾数は3 から5 であったのに対し、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の PEG 修飾数は8 から10 と高い修飾数を示した (Table 3)。事前の検討で、PLO 及び PLL と mPEG-NHS を種々の添加比で反応させたところ、PLO (20) 及び PLL (20) に対しては1:5、PLO (45) 及び PLL (30) に対しては1:10 の比で mPEG (40)-NHS または mPEG (10)-NHS を反応させることで、反応液中から未反応の PLO 及び PLL が検出されなくなることを確認していたため、本研究では上記の反応比で種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL を合成

した。従って、次章以降の結果は、未修飾の PLO 及び PLL の効果を含まない結果であると考えられる。合成される吸収促進剤の吸収促進効果や有害作用は、PEG や塩基性アミノ酸ホモポリマーの重合数に依存すると考えられるが、用いる mPEG-NHS の量を変更することで、より多くの PEG で修飾した PEG 修飾 PLO 及び PLL を合成することもでき、更に多様な検討が可能であると考えられる。今後、PEG で修飾することによる吸収の制御について最適化を行うためには、同じ分子量の PLO または PLL について、PEG の修飾数や分子量の違いが及ぼす吸収促進効果への影響を評価すること、並びに総分子量が同じで、含まれる PEG と PLO もしくは PLL の異なるものの吸収促進効果の比較などを行っていくことが必要であると考えられた。

種々 PLO 及び PLL の PEG 修飾前後での 1 kDa あたりの側鎖アミノ基数 (NH₂ contents) を比較したところ、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の PEG 修飾前に対する NH₂ contents 比はそれぞれ 0.14、0.16、0.38 及び 0.27 であった (Table 3)。このことから、PEG の修飾によって分子内のアミノ基の割合は減少すること、特に mPEG (40)-NHS で修飾したものではその減少は大きいことが示された。PLO や PLL などの塩基性アミノ酸ホモポリマーは、自身の有する正電荷が細胞表面上で何らかのイオン相互作用を引き起こすことによって、細胞間隙経路を開口させ、吸収促進効果を発揮すると考えられている⁴⁴⁾。PLO 及び PLL においては、側鎖のアミノ基が分子の正電荷を担っているため、分子内のアミノ基割合の減少は、PLO 及び PLL の吸収促進効果の低下あるいは消失を招く可能性がある。従って、PEG 修飾 PLO 及び PLL の水溶性高分子の吸収促進効果を保持しているかを確認するとともに、最適な PEG 導入率について考察することは重要である。

種々の PLO 及び PLL の付着滞留性に及ぼす PEG 修飾の影響を評価するために、SSP を用いた *in vitro* 滞留性評価を行ったところ、いずれの PLO 及び PLL においても、PEG 修飾後の滞留時間が延長した (Fig. 8)。この滞留性の増大は、PEG の修飾による PLO 及び PLL の粘性の増大に起因するものであると考えられる。*In vitro* 滞留性評価における滞留時間の延長は、*in vivo* においても付着滞留性が向上している可能性を示唆しているが、粘性の増大

やSSPにおける滞留効果の結果と *in vivo* における滞留性改善率は必ずしも一致しないことが報告されているため^{27,28)}、PEG 修飾 PLO 及び PLL の鼻粘膜付着滞留効果を評価するには、*in vivo* での検討が不可欠であると考えられる。

以上、第1章では PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法及び PEG 修飾数評価方法を確立し、PLO 及び PLL の *in vitro* での滞留性が PEG 修飾によって増大したことを確認した。第2章には、評価系として Caco-2 細胞を用いて、PEG 修飾 PLO 及び PLL の *in vitro* での水溶性高分子透過促進効果及び細胞傷害性、さらに TJ 関連タンパク質の局在性に及ぼす影響について検討した結果を論述する。

第2章 PEG 修飾 PLO 及び PLL の Caco-2 細胞単層膜を介した水溶性高分子薬物の透過促進効果及び TJ 関連タンパク質の局在性への影響

第1節 小緒言

緒言で述べたように、PLA は細胞間隙部位に局在する occludin や claudins などの TJ 関連タンパク質を内在化させ、細胞間隙経路を開口させることで、細胞傷害性を示すことなく水溶性高分子透過促進効果を示すことが報告されている^{23,24)}。一方、PLO 及び PLL においても、膜透過研究に汎用されているイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株 (MDCK 細胞) や培養角膜内皮細胞を用いた研究で、細胞間隙経路を介した透過性を増大させることが報告されている^{20,21)}。前述したように、PLA をはじめとした塩基性アミノ酸ホモポリマーは、それらの有する正電荷が細胞表面上で何らかのイオン相互作用を引き起こすことによって、細胞間隙経路を開口させ、水溶性高分子の吸収促進効果を発揮すると考えられている⁴⁶⁾。PLO 及び PLL は、それらの側鎖部分が分子全体の正電荷を担っているが、第1章で合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL は、側鎖に対して PEG を修飾している。カチオン性ポリマーと plasmid DNA の複合体 (ポリプレックス) を用いた遺伝子の細胞内送達の研究において、カチオン性ポリマーの PEG による修飾が、ポリプレックスの ζ 電位を低下し、結果として *in vitro* での遺伝子発現効率を低下させることが報告されており、これは PEG を修飾することにより、複合体のカチオン部分と細胞膜表面との静電的相互作用が低下することによるものと考察されている^{47,48)}。第1章で合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL に関しては、その分子内のアミノ基の割合が、PEG 修飾前と比較して減少したことが確認されたことから、吸収促進の力価が低下している可能性が考えられる。また、この正電荷の減少は細胞傷害性にも影響すると予想される。従って、側鎖に対する PEG 修飾が、PLO 及び PLL のもつ水溶性高分子の透過促進効果並びに細胞傷害性にどのように影響するのかを明らかにする必要がある。また、PLA と同様に塩基性アミノ酸ホモポリマーである PLO 及び PLL においても、PLA のもつ TJ 関連タンパク質の局在変化による細胞間隙経路の開口と同様の透過促進メカニズムを有することが推測されるが、PLO 及び PLL の適用が、TJ 関連タンパク質の局

在にどのように影響するかはほとんど検討されていない。

そこで第2章では、鼻粘膜上皮とは形態が異なるものの、小腸上皮様の tight な単層膜を形成することから経粘膜透過及び TJ の研究に汎用されており、また、その単層膜を介した透過性と鼻粘膜を介したラットでの吸収率が良好に相関することが知られている⁴⁹⁾ Caco-2 細胞を用いた検討の結果を論述する。すなわち、PLO 及び PLL の水溶性高分子の Caco-2 細胞単層膜透過における促進効果及び細胞傷害性に及ぼす PEG 修飾の影響、さらには、TJ 関連タンパク質の免疫蛍光染色法に基づく、PLO 及び PEG 修飾 PLO の吸収促進メカニズムの考察結果について論述する。

第2節 実験方法

2-2-1 試薬及び抗体

Fluorescein isothiocyanate dextran (MW 3.7 kDa, FD-4) を Sigma-Aldrich (MO, USA) より購入した。3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT) を株式会社同仁化学研究所 (熊本) より得た。 α -Methyl- ω -aminopropoxy polyoxyethylene (SUNBRIGHT MEPA-40T, mPEG (40)-NH₂ : 42.5 kDa) 並びに SUNBRIGHT MEPA-10T, mPEG (10)-NH₂ : 10.1 kDa) を日油株式会社 (東京) より購入した。

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、牛胎児血清 (FBS)、非必須アミノ酸 (MEM NEAA)、GlutaMAX™-1、Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti, 10,000 units/mL penicillin, 10,000 μ g/mL Streptomycin) 及び 25 μ g/mL amphotericin B)、0.25% Trypsin-EDTA、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 及び 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethaneulfonic acid Buffer Solution (HEPES) を Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) より購入した。

Mouse anti-Occludin、Mouse anti-Claudin-4、Rabbit anti-zonula occludens-1 (ZO-1)、Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG、Alexa fluor 633 goat anti-mouse IgG 及び SlowFade Diamond Antifade Mountant を Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) より購入した。

種々 PLO 及び PLL 並びに種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL は、第1章と同様のものを、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

2-2-2 細胞培養

Caco-2 細胞を American Type Culture Collection (VA, USA) より購入した。細胞培養用ディッシュ (AGC テクノグラス株式会社, 千葉) 及び DMEM を用いて、CO₂ インキュベーター (株式会社アステック, 福岡) 内で 5% CO₂ 存在下、37°C で細胞を培養した。1日もしくは2日おきに培地を交換し、細胞がセミコンフルエントの状態では Trypsin-EDTA を用いて継代した。実験には、継代数 34–52 代の細胞を使用した。Table 4 に培地の組成を示す。

Caco-2 細胞単層膜の調製には polycarbonate 膜製 (pore size : 0.4 μ m) の Transwell (Corning, NY, USA) を使用した。Figure 9 に Transwell の構造を示す。細胞は 1.0×10^5 cells/cm² になる

ように polycarbonate 膜上に播種した。培地の交換は、細胞播種後 3 日目から開始し、実験に用いるまで 1 日もしくは 2 日おきに培地を交換した。

Table 4 Composition of culture medium.

		Final concentration (%)
DMEM	13.5 g	
NaHCO ₃	2.2 g	
MEM NEAA	10 mL	1
GlutaMAX™-I	10 mL	1
Anti-Anti	10 mL	1
FBS	100 mL	10
Ultra pure water	870 mL	

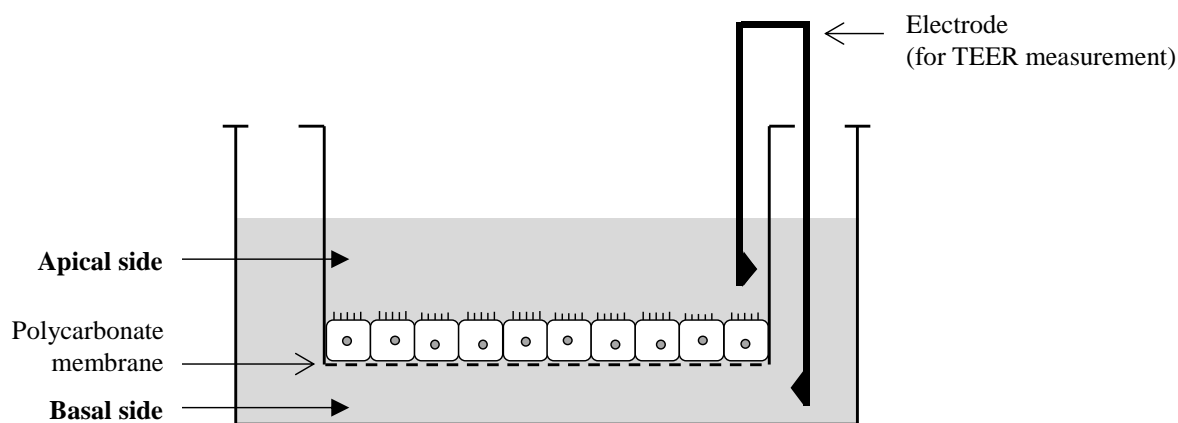


Fig. 9 Transwell used for cell experiments.

2-2-3 経上皮電気抵抗 (TEER) の測定

Caco-2 細胞を Transwell 上で 21-28 日間培養し、TJ を形成させた。Caco-2 細胞単層膜を HBSS で 2 回洗浄後、HBSS に置換して、37°C で 60 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後に TEER を測定し、これを初期 TEER 値とした。TEER の測定には、Millicell® ERS voltohmmeter (Merck Millipore Corp., MA, USA) を使用し、(1) 式を用いて Caco-2 細胞単層膜の TEER を算出した。測定は各 well につき 3 回ずつ行い、その平均値をその時間の TEER とした。

$$\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \{(\text{実測値}) - (\text{polycarbonate 膜の抵抗値})\} \times (\text{膜の表面積}) \quad \dots (1)$$

その後、Transwell の apical side に種々 PLO 及び PLL 並びに種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL (吸収促進剤) を適用し、120 分まで経時的 (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 及び 120 分) に TEER を測定した。得られた TEER から、(2) 式より膜コンダクタンス (G_t) を算出し、(3) 式より各適用条件における G_t ratio を求めた。

$$G_t \text{ (mS/cm}^2\text{)} = \frac{1}{\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2)} \quad \dots (2)$$

$$G_t \text{ ratio} = \frac{G_{t \text{ 120 min/0 min sample}}}{G_{t \text{ 120 min/0 min control}}} \quad \dots (3)$$

ここで、 $G_{t \text{ 120 min/0 min sample}}$ 及び $G_{t \text{ 120 min/0 min control}}$ は、それぞれ種々吸収促進剤適用群及び非適用群の実験開始時及び終了時 (120 分後) の G_t の比である。

なお、本研究では初期 TEER 値が $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上の Caco-2 細胞単層膜を使用した。

2-2-4 FD-4 透過実験

21-28 日間培養して TJ を形成した Caco-2 細胞単層膜を HBSS で 2 回洗浄後、HBSS に置換して、37°C で 60 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、Transwell の apical side に FD-4 溶液（最終濃度 1.0 mg/mL）及び種々の吸収促進剤を適用し、120 分まで経時的（0, 15, 30, 45, 60, 90 及び 120 分）に basal side に透過してきた FD-4 量を定量した。Basal side からサンプリングした後、直ちに fresh な HBSS をサンプリング量と同量加えた。得られたサンプルを、ホウ砂リン酸緩衝液（0.2 M Na₂B₄O₇, 0.2 M KH₂PO₄, pH 8.5）を用いて 60~100 倍に希釈した。希釈したサンプル中の FD-4 の蛍光強度を、分光蛍光光度計（RF-5300PC, 株式会社島津製作所）を用いて、励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nm の測定波長で測定した。FD-4 のみかけの透過係数（ P_{app} ）を (4) 式より求め、control 群に対する吸収促進剤適用群の P_{app} の比（ P_{app} ratio）を算出した。

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = \frac{dQ/dt}{(A \times C_0)} \quad \dots (4)$$

ここで、 dQ/dt ($\mu\text{g/sec}$) は FD-4 の定常状態におけるフラックスであり、 C_0 ($\mu\text{g/mL}$) は apical side における FD-4 の初濃度、 A (cm^2) は Caco-2 細胞単層膜を形成した Transwell の有効表面積である。

2-2-5 MTT assay

2-2-3 と同様の方法で種々の吸収促進剤を 120 分間適用した後の Caco-2 細胞単層膜を、HBSS で 1 回洗浄し、0.5 mg/mL MTT 含有 DMEM に置換して、37°C で 180 分間インキュベーションした。その後、生成したホルマザン色素を dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いて回収し、波長 540 nm における吸光度を測定した。得られた吸光度から、(5) 式より細胞生存率 (cell viability) を算出した。

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100 \quad \dots (5)$$

ここで、Absorbance_{Sample} は種々の吸収促進剤適用群の吸光度、Absorbance_{Control} は吸収促進剤非適用群の吸光度である。

2-2-6 免疫蛍光染色法

PLO (45) (1.0 μM) または PEG (10)-PLO (45) (10 μM) を 120 分間適用後の Caco-2 細胞単層膜を、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で 2 回洗浄し、固定液 (acetone: methanol= 1: 1) を用いて 4°C で 10 分間固定した。固定した細胞を PBS で 2 回洗浄し、3% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 PBS-T (0.1% Tween 20 含有 PBS) を用いて、室温で 60 分間ブロッキングした。その後、BSA 含有 PBS-T で希釈した一次抗体の anti-occludin (1: 120)、anti-ZO-1 (1: 100) または anti-claudin-4 (1: 150) を用いて、4°C で一晩インキュベーションした。PBS-T で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、BSA 含有 PBS-T で希釈した Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG または Alexa fluor 633 goat anti-mouse IgG (1: 400) を用いて、室温で 90 分間インキュベーションした。その後、PBS-T で 10 分間の洗浄を 3 回行い、退色防止用封入剤 (SlowFade Diamond Antifade Mountant) を用いてスライドガラス上に封入し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000, オリンパス株式会社, 東京) を用いて蛍光画像を取得した。取得した画像を

Image J (NIH) を用いて解析した。

2-2-7 統計解析

データを平均値 ± 標準誤差 (standard error, S.E.) で示した。各群間の差を、Dunnett の多重比較検定を用いて解析し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

2-3-1 Caco-2 細胞単層膜における TEER 及び FD-4 透過性に対する種々 PLO 及び PLL 並びに PEG 修飾 PLO 及び PLL の影響

第1章で合成した種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の *in vitro* における水溶性高分子 FD-4 の透過促進効果を評価した。Figure 10 に Caco-2 細胞単層膜に対して種々 PLO 及び PLL 並びに PEG 修飾 PLO 及び PLL を 120 分間適用後の G_t ratio を、Fig. 11 に FD-4 の P_{app} ratio をそれぞれ示す。PLO (20)、PLL (20)、PLO (45) 及び PLL (30) のいずれにおいても、適用により G_t ratio 及び P_{app} ratio が増大し、1.0 μM の濃度で十分な透過促進効果を示した。一方、PEG 修飾 PLO 及び PLL においても、適用濃度依存的に G_t ratio 及び P_{app} ratio を増大させたが、十分な透過促進効果を得るのに必要な濃度は未修飾の PLO 及び PLL と比較して増大し、PEG (40)-PLO (20) 及び PEG (40)-PLL (20) では 20 μM で、PEG (10)-PLO (45) では 10 μM で、それぞれの未修飾 PLO 及び PLL 1.0 μM と同等の透過促進効果を、PEG (10)-PLL (30) では 40 μM で、PLL (30) 0.50 μM と同等の透過促進効果を発揮することが示され、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の未修飾の PLO 及び PLL と比較したときの力価は、それぞれ 1/20、1/20、1/10 及び 1/80 であることが明らかとなった。また、PLO 及び PLL 並びに PEG 修飾 PLO 及び PLL のいずれの場合にも、 G_t ratio と P_{app} ratio がよく対応していたことから、これらの促進剤はいずれも細胞間隙透過性を高めているものと考えられた。

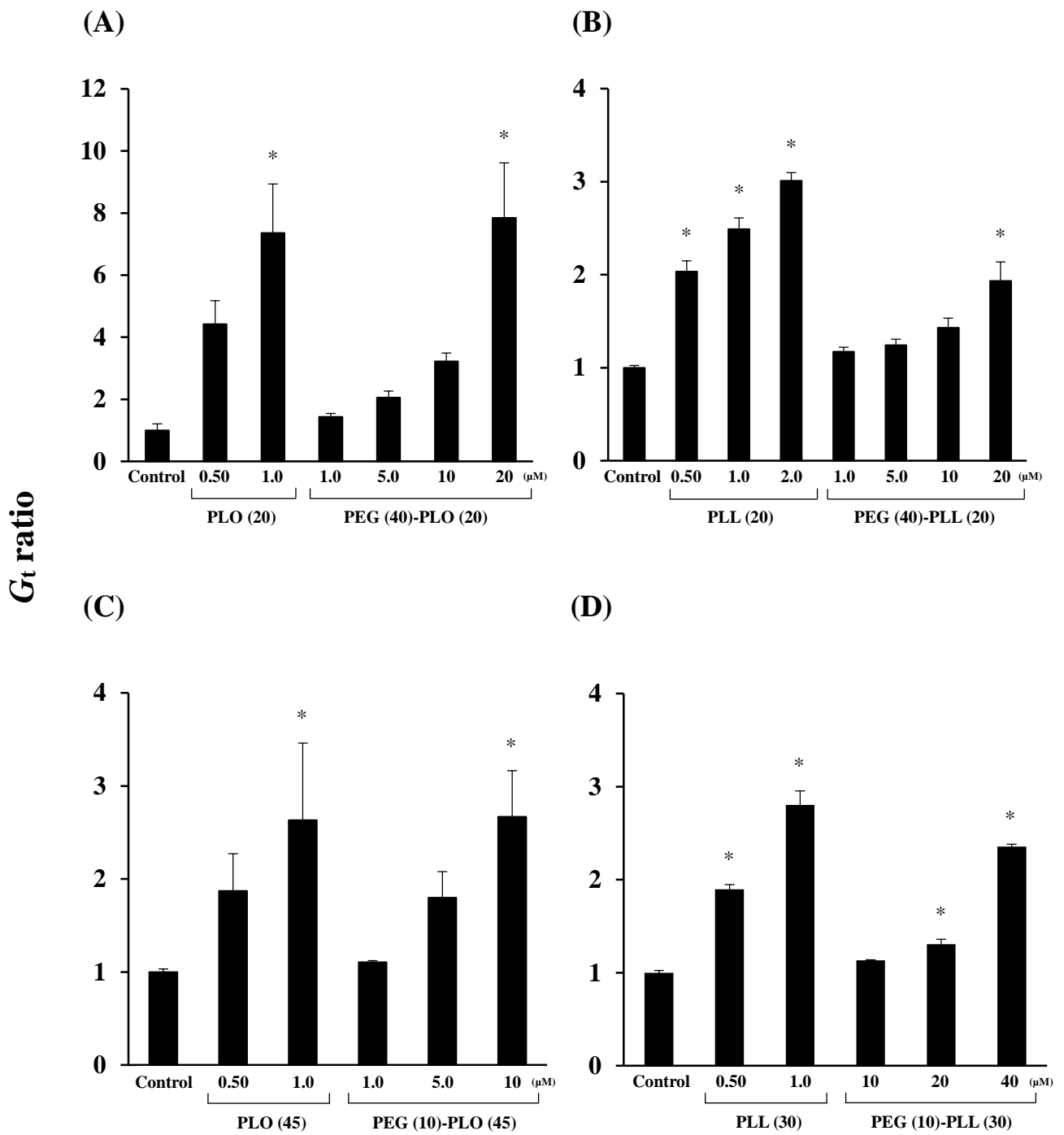


Fig. 10 Effects of various PLO and PLL, and PEGylated-PLO and PEGylated-PLL on membrane conductance (G_t) in Caco-2 cell sheets.

(A): PLO (20) and PEG (40)-PLO (20)

(B): PLL (20) and PEG (40)-PLL (20)

(C): PLO (45) and PEG (10)-PLO (45)

(D): PLL (30) and PEG (10)-PLL (30)

Each data column represents the mean \pm S.E. ($n=3-5$), $*p < 0.05$ vs Control.

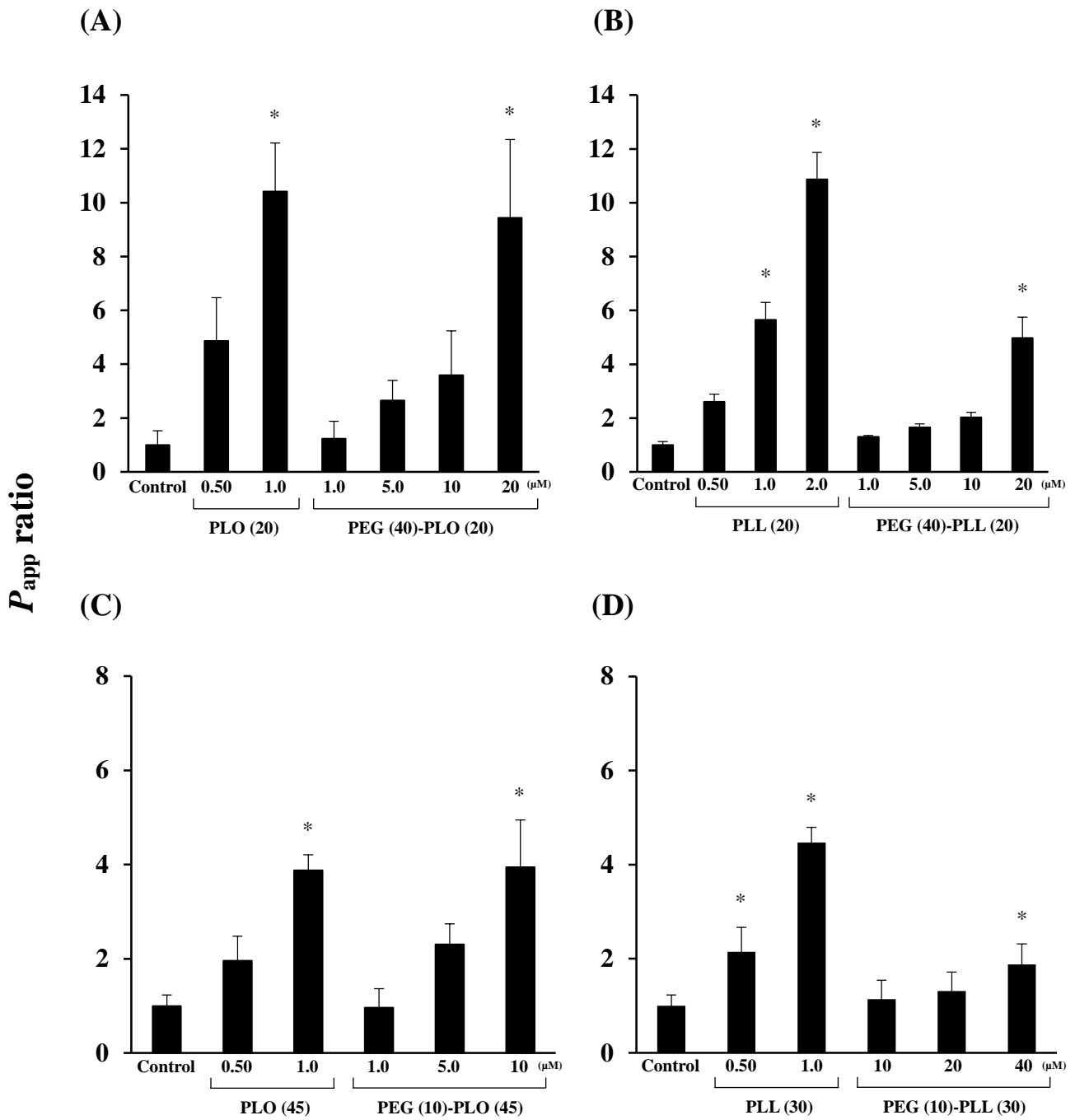


Fig. 11 Effects of various PLO and PLL, and PEGylated-PLO and PEGylated-PLL on FD-4 permeation (P_{app}) in Caco-2 cell sheets.

(A): PLO (20) and PEG (40)-PLO (20)

(B): PLL (20) and PEG (40)-PLL (20)

(C): PLO (45) and PEG (10)-PLO (45)

(D): PLL (30) and PEG (10)-PLL (30)

Each data column represents the mean \pm S.E. (n=3-5), * $p < 0.05$ vs Control.

2-3-2 種々PLO 及び PLL 並びに PEG 修飾 PLO 及び PLL による細胞傷害性

Figure 12 に Caco-2 細胞単層膜に対して種々濃度の PLO (20)、PEG (40)-PLO (20) 及び PLO (20) と mPEG (40)-NH₂ の物理的混合物を 120 分間適用後の細胞生存率を示す。PLO (20) 適用群は低濃度から適用濃度依存的に細胞生存率が低下し、mPEG (40)-NH₂ との物理的混合物である mixture 群もまた、濃度依存的に細胞生存率が低下した。一方、PEG (40)-PLO (20) 適用群では、有意な FD-4 透過促進効果を示す濃度 20 μM まで、細胞生存率をほぼ 100% に維持していた。

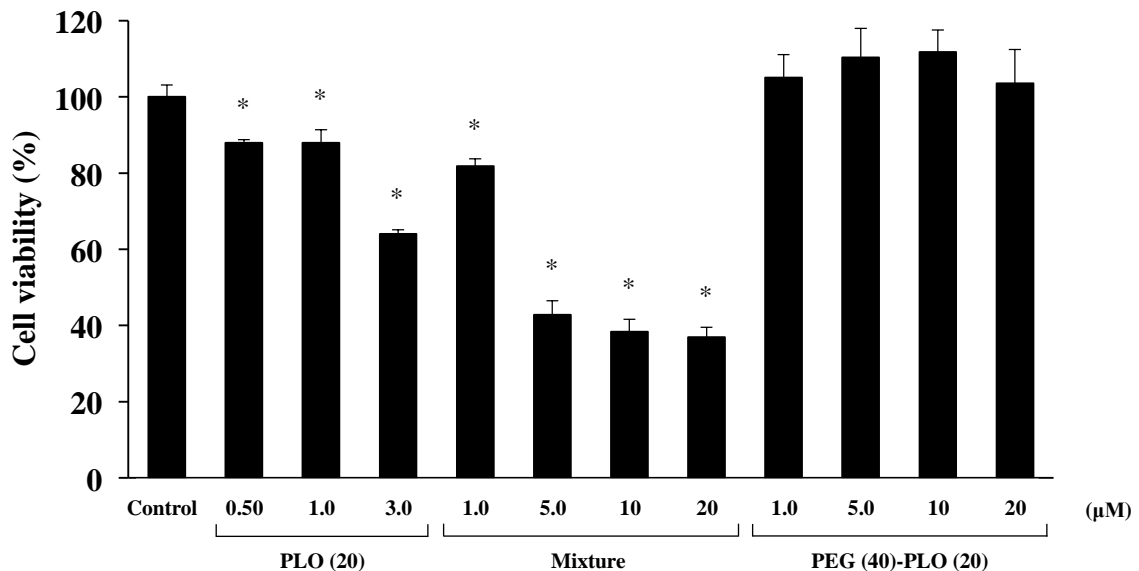


Fig. 12 Effects of PLO (20) and PEG (40)-PLO (20) on cell viability in Caco-2 cell sheets.

[Mixture] 1.0 μM : PLO (20) 1.0 μM + mPEG (40)-NH₂ 4.0 μM

5.0 μM : PLO (20) 5.0 μM + mPEG (40)-NH₂ 20 μM

10 μM : PLO (20) 10 μM + mPEG (40)-NH₂ 40 μM

20 μM : PLO (20) 20 μM + mPEG (40)-NH₂ 80 μM

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3–5), **p* < 0.05 vs Control.

Figure 13 に Caco-2 細胞単層膜に対して種々濃度の PLL (20)、PEG (40)-PLL (20) 及び PLL (20) と mPEG (40)-NH₂ の物理的混合物を 120 分間適用後の細胞生存率を示す。PLO (20) と同様に、PLL (20) 群及び mixture 群では濃度依存的に細胞生存率が低下した。しかしながら、PEG (40)-PLL (20) 適用群では、有意な FD-4 透過促進効果を示す濃度 20 μM まで、細胞生存率はほぼ 100% であった。

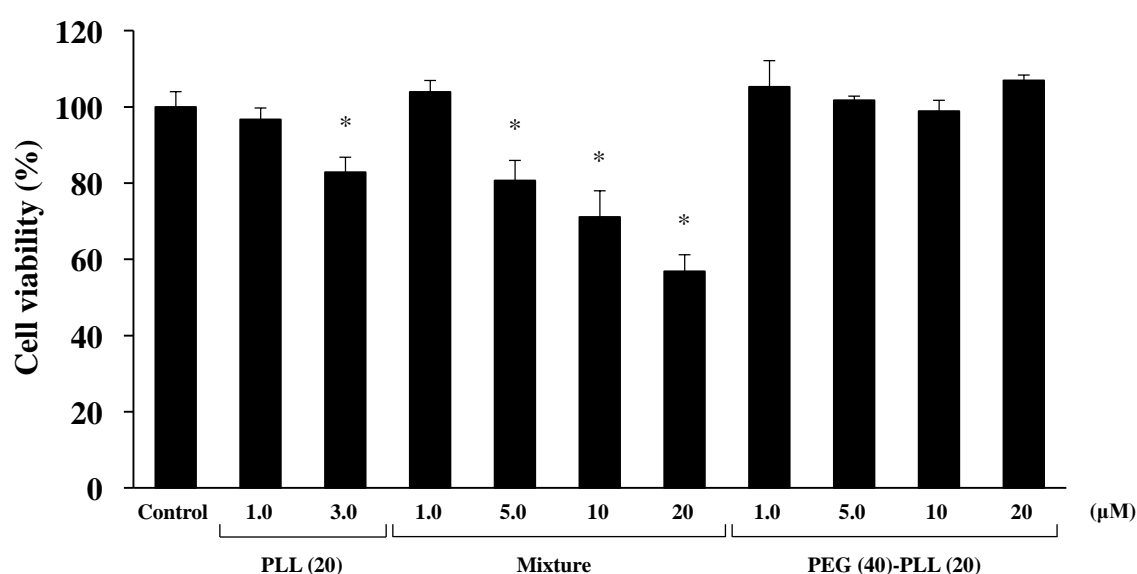


Fig. 13 Effects of PLL (20) and PEG (40)-PLL (20) on cell viability in Caco-2 cell sheets.

[Mixture] 1.0 μM : PLL (20) 1.0 μM + mPEG (40)-NH₂ 3.0 μM

5.0 μM : PLL (20) 5.0 μM + mPEG (40)-NH₂ 15 μM

10 μM : PLL (20) 10 μM + mPEG (40)-NH₂ 30 μM

20 μM : PLL (20) 20 μM + mPEG (40)-NH₂ 60 μM

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3–5), **p* < 0.05 vs Control.

Figure 14 に Caco-2 細胞単層膜に対して種々濃度の PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) を 120 分間適用後の細胞生存率を示す。PLO (45) 適用群は、0.50 μM の低濃度から適用濃度依存的に細胞生存率が低下し、1.0 μM 以上の濃度を適用した群では、細胞生存率は有意に低下した。一方、PEG (10)-PLO (45) 適用群では、PLO (45) 1.0 μM と同等で、有意な透過促進効果を示す濃度 10 μM においても、細胞生存率の有意な低下は認められなかった。同等の透過促進効果を示した PLO (45) 1.0 μM と PEG (10)-PLO (45) 10 μM の細胞生存率に有意差が認められたことから、PEG 修飾は、細胞傷害性をより効果的に減少させる作用を有すると考えることもできる。

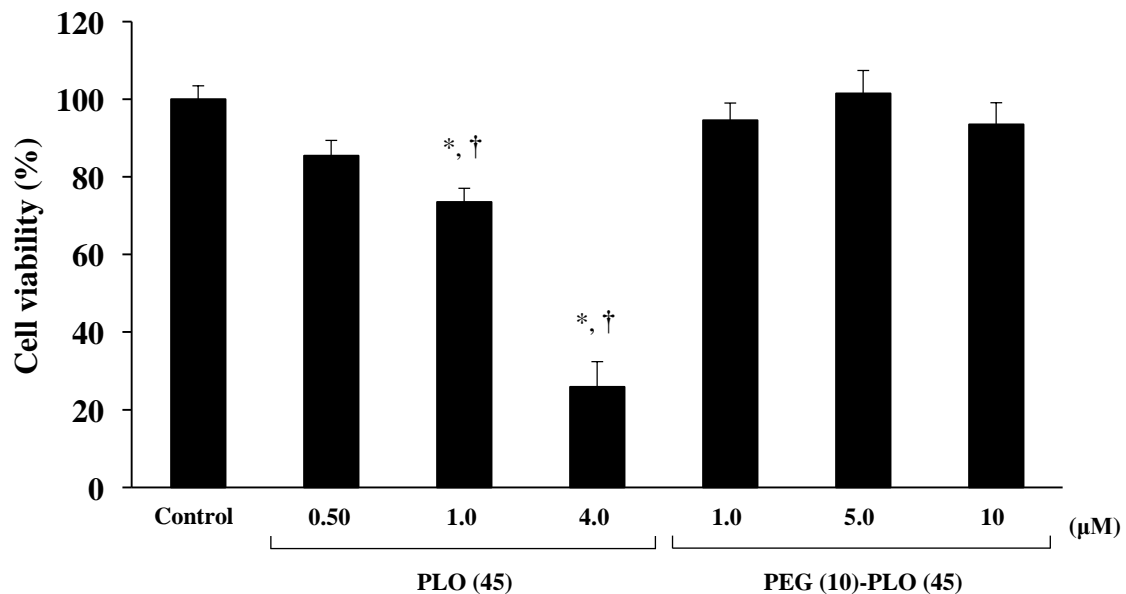


Fig. 14 Effects of PLO (45) and PEG (10)-PLO (45) on cell viability in Caco-2 cell sheets.

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

* $p < 0.05$ vs Control, † $p < 0.05$ vs PEG (10)-PLO (45) 10 μM

Figure 15 に Caco-2 細胞単層膜に対して種々濃度の PLL (30) 及び PEG (10)-PLL (30) を 120 分間適用後の細胞生存率を示す。PLL (30) 及び PEG (10)-PLL (30) 適用群では、有意な透過促進効果を示す濃度においても細胞生存率の低下は示さなかった。

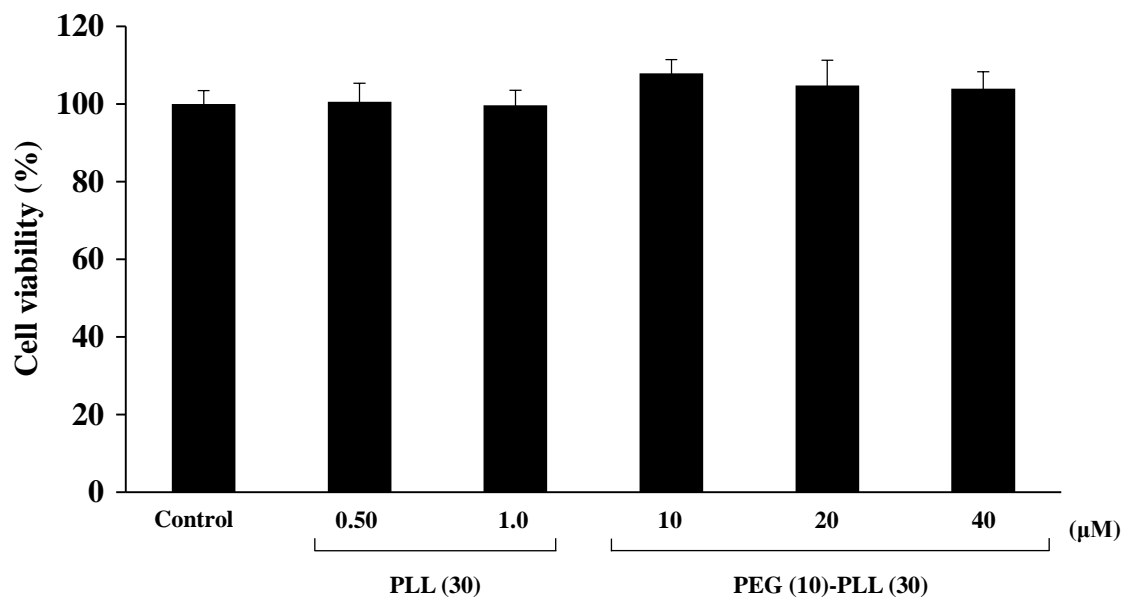
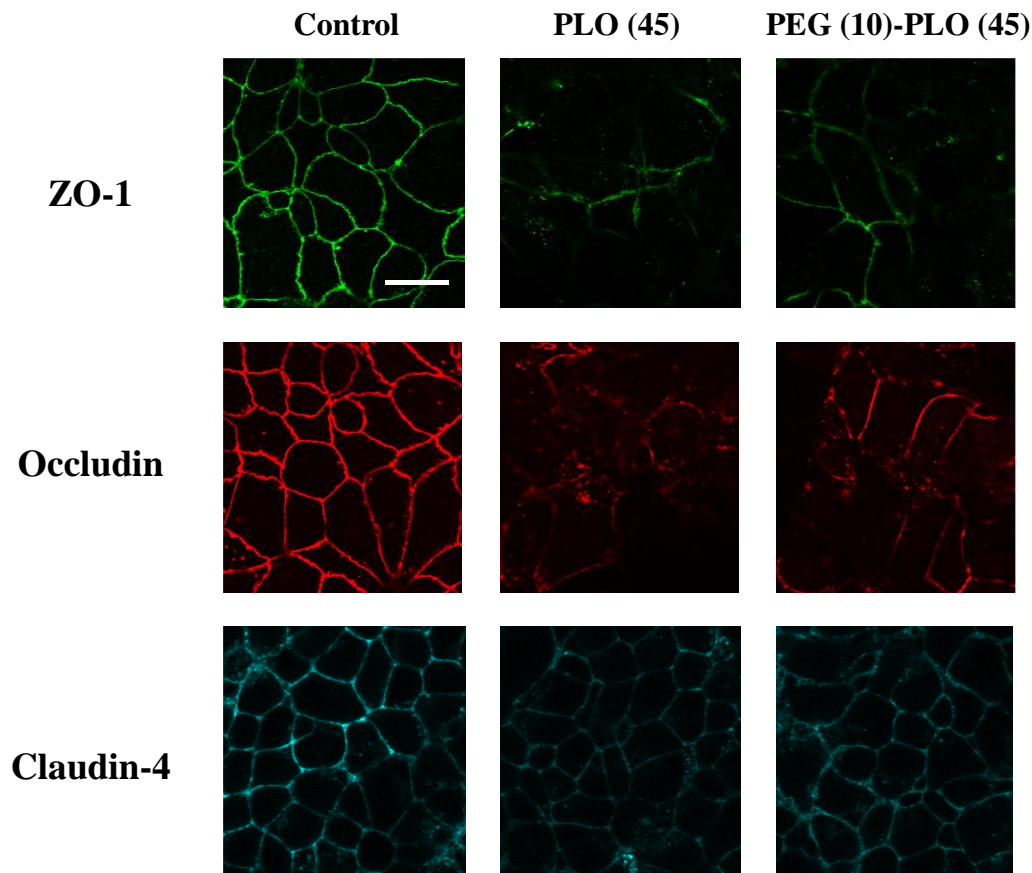


Fig. 15 Effects of PLL (30) and PEG (10)-PLL (30) on cell viability in Caco-2 cell sheets.
Each data column represents the mean \pm S.E. (n=3-5), * $p < 0.05$ vs Control.

2-3-3 PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) による TJ 関連タンパク質の局在性への影響

Caco-2 細胞単層膜において、PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) の適用による TJ 関連タンパク質の局在性への影響を免疫蛍光染色法により評価した。Figure 16 (A) に 1.0 μ M PLO (45) 及び 10 μ M PEG (10)-PLO (45) を 120 分間適用した後の TJ 関連タンパク質である ZO-1、occludin 及び claudin-4 の免疫蛍光染色画像を、Fig. 16 (B) にそれぞれのタンパク質の細胞間隙における蛍光強度をそれぞれ示す。吸収促進剤を適用していない Caco-2 細胞 (control 群) では、ZO-1、occludin 及び claudin-4 が細胞間隙部位に局在していた (Fig. 16 (A))。PLO (45) を 120 分間適用した Caco-2 細胞では、ZO-1、occludin 及び claudin-4 の細胞間隙における蛍光強度が有意に低下し、それぞれ control 群の 33.5%、52.0% 及び 82.1% であった (Fig. 16 (B))。一方、PEG (10)-PLO (45) 適用後の Caco-2 細胞においても、ZO-1 及び occludin の細胞間隙における蛍光強度は、それぞれ control 群の 53.0% 及び 67.0% と有意に低下したが、claudin-4 の蛍光強度は control 群とほぼ同等であった (Fig. 16 (B))。

(A)



(B)

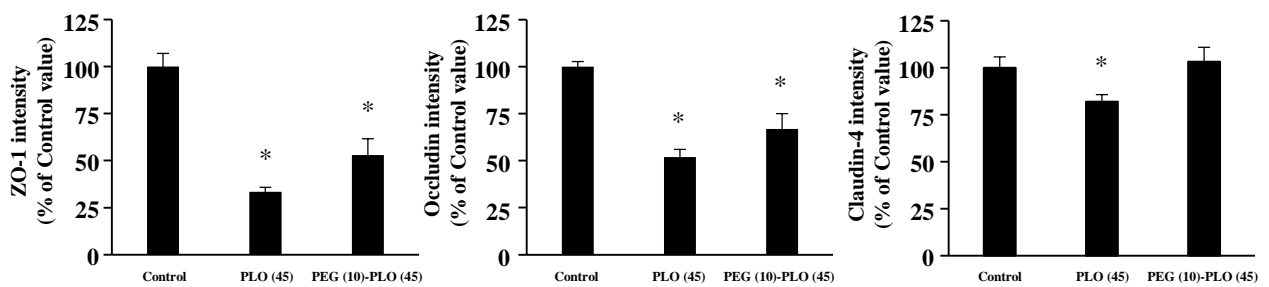


Fig. 16 Effects of PLO (45) and PEG (10)-PLO (45) on the distribution of tight junction proteins in Caco-2 cell sheets.

The distribution of TJ proteins was visualized by immunofluorescent staining after exposure to PLO (45) (1.0 μ M) and PEG (10)-PLO (45) (10 μ M). Scale bar is 20 μ m (A). The intensity of each protein at the paracellular space was calculated (B). Each data column represents the mean \pm S.E. (n=3), * $p < 0.05$ vs Control.

第4節 考察

塩基性アミノ酸ホモポリマーは、生理的条件において正に荷電しており、その正電荷が上皮粘膜と相互作用することにより、透過促進効果を発揮すると考えられている⁴⁶⁾。よって、第2章では、正電荷を担う側鎖に対する PEG 修飾が透過促進効果の発現にどのような影響を及ぼすかを検討するために、評価系として Caco-2 細胞を用いて、PEG 修飾 PLO 及び PLL の *in vitro* における水溶性高分子透過促進効果及び細胞傷害性、さらに TJ 関連タンパク質の局在に及ぼす影響について調査した。

種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL は、PEG 修飾前と同じように、TJ のバリア機能の指標である TEER の低下効果及び FD-4 の透過性増大効果を示したことから、PEG 修飾後においても細胞間隙経路を介した水溶性高分子の透過促進効果を有していた (Figs. 10 及び 11)。しかしながら、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても、有意な透過促進効果を得るのに必要な濃度は、未修飾の PLO 及び PLL と比較して増加した。第1章において、PEG 修飾 PLO 及び PLL は高分子である PEG を修飾したことによって、分子内のアミノ基の割合が減少し、吸収促進効果が低下あるいは消失している可能性があることを述べており、種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の力価の低下は、アミノ基割合の低下によるものであると考えられた。しかしながら、種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の 1 kDa あたりのアミノ基数の PEG 修飾前後における比は、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) でそれぞれ 0.14、0.16、0.38 及び 0.27 (Table 3) であったのに対して、未修飾 PLO 及び PLL と比較したときの透過促進効果は、それぞれおよそ 1/20、1/20、1/10 及び 1/80 であり、分子内アミノ基割合の減少と透過促進効果の結果は一致しなかった。PEG 修飾は分子量を増大させ (Table 3)、それにより粘液中での拡散性が低下することが考えられる。また、Mishra ら及び Holland らは、PEG 修飾ポリプレックスを用いた DNA の細胞内送達に関する研究において、PEG 修飾カチオンを用いることで遺伝子導入効率が低下したことを示しており、これは修飾された PEG 鎖の立体障害によって、細胞膜との静電的相互作用が減少することによるものであると考察されている^{47, 48)}。これらのことは、合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL においても生じ得ると考えられるため、種々 PEG 修飾 PLO 及び

PLL の力価の低下は、アミノ基割合、すなわち正電荷密度の低下に加え、分子量の増大による拡散性の低下や、PEG 鎖による正電荷の遮蔽効果が複合的な要因として作用した結果であることが推察される。しかしながら、Table 3 に示すように、同じ分子量の PEG が同数程度修飾されており、1 kDa あたりのアミノ基数及び PEG 鎖の立体障害にも大きな差がないと考えられる PEG (10)-PLO (45) と PEG (10)-PLL (30) においても、PEG 修飾後の力価の低下度が顕著に異なっていた (Fig. 11 (C) 及び(D))。このことは、PEG 修飾が透過促進強度に及ぼす影響において、PLO と PLL 間で異なる別の影響要因も存在している可能性を示している。本研究では PEG の分子量あるいは修飾数のいずれか一方が変化することによる透過促進効果への影響等は検討していないが、この点を明らかにするには、それらを含めた評価を実施することが必要であると考えられる。

種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL による細胞傷害性を MTT assay によって評価した。高濃度の未修飾 PLO 及び PLL は細胞生存率を低下させる傾向にあったが、PEG 修飾 PLO 及び PLL では、未修飾体と同等の透過促進効果を発揮することができる濃度においても、細胞傷害性を示さなかった (Figs. 12–15)。このことは、PLO や PLL の細胞傷害性は PEG の存在により低下すること、そして、塩基性アミノ酸ホモポリマーの細胞に対する傷害性は、透過促進効果の発現とは異なる機序で生じる可能性を示唆していた。また、片末端にアミノ基を有する mPEG-NH₂ と PLO あるいは PLL との物理的混合物を適用した後の細胞生存率を測定したところ、物理的混合物適用群では細胞生存率が顕著に低下した。mPEG-NH₂ を単独適用した場合には、高濃度においても細胞生存率は低下しなかったこと (data not shown) を考慮すると、PLO 及び PLL と mPEG-NH₂ が共存することによる傷害性増大の原因は不明であるが、細胞傷害性の低下には PEG が PLO 及び PLL に結合していることが重要であることが示唆された。これについて当初は、先に述べた透過促進効果と同様に、PEG の結合による分子内のアミノ基割合の低下及び PEG 鎖により正電荷の遮蔽効果を示すことによるものであると推察していたが、上述したように、PEG 修飾による吸収促進の力価の低下と細胞傷害性の低下は平行でなく、高濃度の塩基性アミノ酸ホモポリマーによって生じる細胞傷害性は水溶性高分子の透過促進効果とは異なるメカニズムで発現している可能性が

あることから、この要因を明らかにするには、塩基性アミノ酸ホモポリマーによる細胞傷害性を引き起こす細胞表面イベントや細胞内シグナルに関する、より詳細な調査が必要であると考えられる。

TJ 関連タンパク質の局在に対する PLO の影響について、免疫蛍光染色法によって視覚的に評価した。PLO (45) による TJ 関連タンパク質の蛍光の消失が PLA と同様であったことから、PLO の水溶性高分子透過促進メカニズムもまた、TJ 関連タンパク質の局在変化による細胞間隙経路の開口によるものであることが示唆された。しかしながら、claudin-4 の細胞間隙部位における蛍光強度は PLO (45) 適用後でも occludin や ZO-1 と比較して高かったことから、PLO の透過促進効果の発現には claudin-4 よりも occludin 等の寄与が大きい可能性がある。claudins は多くのサブタイプが確認されているファミリータンパク質であり、評価系として用いた Caco-2 細胞においても、claudin-1 や-2、-7 など多くの分子種が発現している^{50,51)}。そのため、PLO の透過促進効果発現における claudins タンパク質の関係を明らかにするには、claudin-4 以外の claudins 分子についても検討する必要があると考えられる。また、PLL 及び PEG 修飾 PLL においても、 G_t の増大を伴う P_{app} の増加が認められていることから、その透過促進効果の発現には、PLO や PLA と同様に細胞間隙部位の TJ 関連タンパク質の局在性に関与している可能性が高い。PLL についても、細胞間隙に対する影響を同様に検討していくことが必要である。

また、上記の透過促進機構に及ぼす PEG 修飾の影響を評価するために、PEG (10)-PLO (45) を Caco-2 細胞単層膜に同等の透過促進効果を示す濃度で適用したところ、PLO (45) 適用時と比較してやや効果が低い傾向にあったが、PEG (10)-PLO (45) によって TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位における蛍光強度は低下した。上述したように、PLO の透過促進メカニズムは、TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの局在変化によるものであることが推測され、PEG による側鎖の修飾は、PLO の透過促進メカニズム自体には影響を及ぼさないと考えられた。しかしながら、本研究における TJ 関連タンパク質の評価方法は免疫蛍光染色による半定量的なものであり、TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの局在変化以降の運命等不明な点も多い。従って、PLO 及び PEG 修飾 PLO の透過促進メカニズムのさらなる解

析には、適用後の TJ 関連タンパク質の細胞内における発現量や、細胞間隙からの消失機構に関する、より詳細な評価が必要であると考えられる。

以上より、PLO 及び PLL に対する PEG の修飾は、アミノ基割合の減少、分子量の増大及び PEG 鎖の遮蔽効果によると考えられる力価の低下を示すものの、その透過促進メカニズムには影響せず、同程度の透過促進効果を示す未修飾 PLO 及び PLL で見られた細胞傷害性が PEG 修飾により消失することが明らかとなった。PEG による修飾は、本研究の目的である塩基性アミノ酸ホモポリマーの付着滞留性の改善とは異なる様式による有効性の改善にも有用であることが示された。

第3章 PLO 及び PEG 修飾 PLO の経鼻吸収促進効果及び鼻腔内滞留効果

第1節 小緒言

PLA をはじめとする塩基性アミノ酸ホモポリマーは、上皮粘膜を傷害することなく、適用時間及び濃度に依存した水溶性高分子薬物の吸収促進効果を示し、難吸収性薬物の経鼻送達において有望な吸収促進剤である。これまでに、PLO もまた *in vivo* において PLA と同様に鼻粘膜を損傷することなく、水溶性高分子である種々分子量の FDs の経鼻吸収促進効果を示すこと、また、PLO の分子量及び適用濃度を選択することにより吸収促進効果の持続時間や吸収促進強度を制御できることが示されている^{25, 26, 52)}。

緒言で述べたように、鼻腔内に投与した薬液が咽頭側に流出することを制限しない実験系（開放系）において難吸収性薬物の吸収を改善するためには、吸収促進効果と鼻腔内滞留効果を併せもつことが求められる。従って、塩基性アミノ酸ホモポリマーの付着滞留性を向上することができれば、開放系においても十分な効果を発揮するのではないかと考え、PLO 及び PLL に対して PEG を導入することによる鼻腔内滞留性の改善を試みた。第1章及び第2章に示した検討により、PEG 修飾 PLO 及び PLL は未修飾の PLO 及び PLL と比較して透過促進作用の力価が減弱するものの、水溶性高分子の透過促進効果を保持し、*in vitro* での付着滞留性が増大していることが示された。しかし、第1章でも述べたように、*in vitro* と *in vivo* での滞留効果は必ずしも一致しないことがわかっている。そのため、滞留性の評価と、それによる吸収促進効果への影響について、*in vivo* での検討を行う必要がある。Irie らは、製剤の鼻腔内付着滞留性と投与後の薬物の血中濃度の関係を明らかにするために、ラットを用いて、鼻腔内に投与した薬液が流出しない閉鎖系（closed system）、及びラット頭部を傾斜させ、鼻腔から薬液が流出することを制限しない開放系（open system）の2つの実験系からなる *in vivo* 鼻腔内滞留性評価モデルを確立している²⁸⁾。このモデルは、閉鎖系及び開放系の双方で同様の条件の経鼻投与実験を行い、得られた薬物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滞留性の評価を可能にしている。

従って、この実験モデルを用いることで、PLO 及び PLL の PEG 修飾による鼻腔内滞留性改善効果を評価することが可能であると考えられた。

第3章には、合成した種々PEG 修飾 PLO 及び PLL の中から、第2章に示したように、PEG 修飾による透過促進効果の低下が最も小さく、且つ細胞傷害性を示さなかった PEG (10)-PLO (45) を選択し、PEG 修飾前後における経鼻吸収促進効果を比較した結果を、また、上述の *in vivo* 鼻腔内滞留性評価モデルを用いて、PEG 修飾による鼻腔内滞留性の改善効果を動態学的に評価した結果について論述する。

第2節 実験方法

3-2-1 試薬

Fluorescein isothiocyanate dextran (MW 3.4 kDa, FD-4) 及び urethane を Sigma-Aldrich (MO, USA) より購入した。PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) は、第1章と同様のものを使用した。

3-2-2 実験動物

Wistar 系雄性ラット (220–270 g, 8 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) より購入した。ラットを 3 匹/cage で飼育し、実験に使用するまで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すべての実験は、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: H25015, H26016, H27015, H27083, H28216, H28018) を得てから実施した。

3-2-3 静脈内 (*i.v.*) 投与実験

ラットを urethane 生理食塩液 (25 w/v%, 1.2 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にするために、ラットに外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出した。施術 60 分後、FD-4 生理食塩液 (3.3 mg/kg, 1.0 mL/kg) を左頸静脈内に投与した。投与前及び投与後 540 分までの所定の時間に、ヘパリン処理を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。

3-2-4 閉鎖系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Closed system)

3-2-3 と同様の方法で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た⁵³⁾。まず、正中線に沿って喉を切開し、気管を露出した。気道を確保するために、気管にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 8, 株式会社 三商, 東京) を挿入した。次いで、鼻腔から咽頭側への投与液の流出を防ぐために、シリコンゴムを用いて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, 株式会社カネカメディックス, 大阪) を鼻腔側に向けて食道内に挿入した。その後、左右の頸静脈を露出し、さらに鼻口蓋管からの投与液の漏出を防ぐために、この部分を瞬間接着剤 (アロンアルファ ゼリー状, 東亜合成株式会社, 東京) で塞いだ。施術 60 分後、先端にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 株式会社 三商, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて、種々濃度の PLO (45) または PEG (10)-PLO (45) を含有した FD-4 生理食塩液 (33 mg/kg, 0.4 mL/kg) を、左鼻腔内の鼻孔から 8 mm のところに投与した。投与直後に、瞬間接着剤 (アロンアルファ ゼリー状) で鼻孔を塞いだ。投与前及び投与後 540 分までの所定の時間に、ヘパリン処理を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。

3-2-5 開放系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Open system) ²⁸⁾

3-2-3 と同様の方法で麻酔したラットを仰臥位固定した後、3-2-4 と同様の方法で気道を確保した。次いで、鼻腔内に投与した薬液が咽頭側へ流出することを制限しないよう、先端をシリコーンゴムで塞いでいないシリコーンチューブ (シラスコン[®] 医療用チューブ SH No. 1, 株式会社カネカメディックス, 大阪) を鼻腔側に向けて食道内に挿入した。その後、左右の頸静脈を露出し、さらに鼻口蓋管からの投与液の漏出を防ぐために、この部分を瞬間接着剤 (アロンアルファ ゼリー状, 東亜合成株式会社, 東京) で塞いだ。施術 60 分後、先端にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 株式会社 三商, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて、種々濃度の PLO (45) または PEG (10)-PLO (45) を含有した FD-4 生理食塩液 (33 mg/kg, 0.4 mL/kg) を、左鼻腔内の鼻孔から 8 mm のところに投与した。投与から 10 秒後に、固定板を 30°、さらにラットの頸部を 30° 傾斜させた。投与前及び投与後 540 分までの所定の時間に、ヘパリン処理を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。

3-2-6 血漿の採取

3-2-3、3-2-4 及び 3-2-5 で得られた血液を遠心分離（15,000 rpm, 5 分間, 4°C, 回転半径 71 mm, MX-301, 株式会社トミー精工, 東京）して血漿を得た。

3-2-7 血漿中 FD-4 濃度の測定

3-2-6 で得られた血漿を、ホウ砂リン酸緩衝液（0.2 M Na₂B₄O₇, 0.2 M KH₂PO₄, pH 8.5）を用いて 100 倍に希釈した。希釈したサンプル中の FD-4 の蛍光強度を、分光蛍光光度計（RF-5300PC, 株式会社島津製作所）を用いて、励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nm の測定波長で測定し、血漿中 FD-4 濃度を算出した。

3-2-8 動態学的解析

静脈内投与後の血漿中 FD-4 濃度推移から、FD-4 の体内動態を線形 2-コンパートメントモデルで解析し、非線形最小二乗プログラム（Damping Gauss-Newton 法）を用いて種々の動態学的パラメータを算出した。鼻腔内投与後の最高血漿中 FD-4 濃度（C_{max}）及び最高血漿中 FD-4 濃度到達時間（T_{max}）を血漿中 FD-4 濃度プロファイルより算出した。最終採血時間までの血漿中 FD-4 濃度 - 時間曲線下面積（AUC₀₋₅₄₀）を台形公式により求め、(6) 式を用いてバイオアベイラビリティ（F₀₋₅₄₀）を、また、吸収促進剤併用及び非併用下の AUC₀₋₅₄₀（AUC_{i.n.sample} 及び AUC_{i.n.control}）より (7) 式を用いて吸収促進比（ER）を算出した。

$$F_{0-540} (\%) = \frac{AUC_{i.n.} / Dose_{i.n.}}{AUC_{i.v.} / Dose_{i.v.}} \times 100 \quad \dots (6)$$

$$ER = \frac{AUC_{i.n.sample}}{AUC_{i.n.control}} \quad \dots (7)$$

ここで Dose_{i.v.} 及び Dose_{i.n.} はそれぞれ静脈内及び鼻腔内投与における FD-4 の投与量である。

静脈内及び鼻腔内投与後の血漿中 FD-4 濃度プロファイルから、デコンボリューション法により FD-4 の累積吸収プロファイルを算出し、最大吸収速度 (MAR) を求めた。また、(8) 式を用いて滞留性改善率 ($F_{o/c}$) を求めた。

$$F_{o/c} = \frac{AUC_{open}}{AUC_{closed}} \times 100 \quad \dots (8)$$

ここで AUC_{open} 及び AUC_{closed} は、それぞれ開放系及び閉鎖系鼻腔内投与における AUC_{0-540} である。

3-2-9 統計解析

データを平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。各群間の差を、Dunnett の多重比較検定を用いて解析し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

3-3-1 FD-4 静脈内投与後の体内動態

FD-4 静脈内投与後の体内動態を評価した。Figure 17 に FD-4 静脈内投与後の血漿中 FD-4 濃度推移を、Table 5 に得られた FD-4 の動態学的パラメータをそれぞれ示す。静脈内投与後の血漿中 FD-4 濃度推移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。

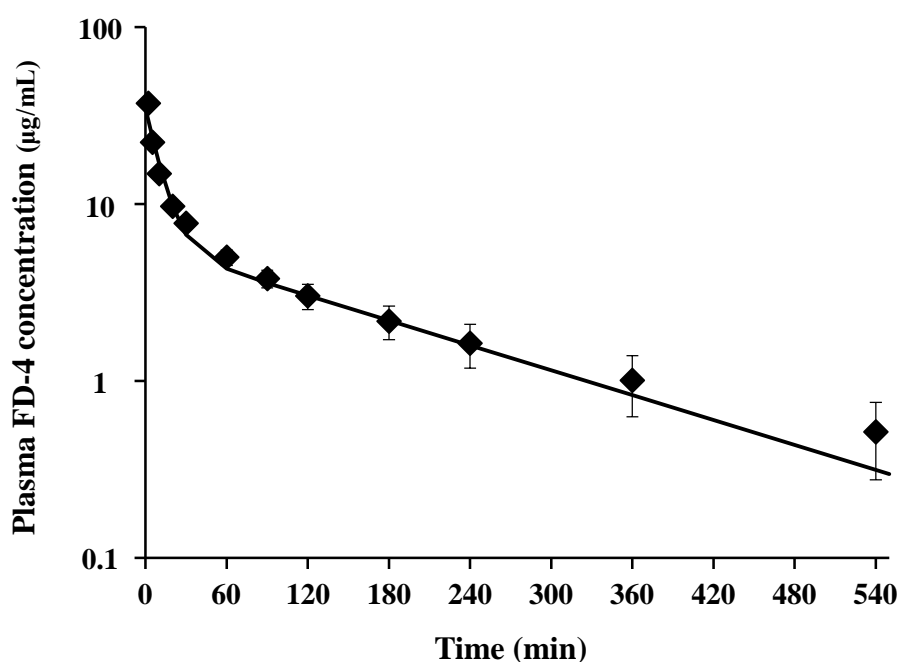


Fig. 17 Plasma FD-4 concentration after *i.v.* administration in rats and simulated line from 2-compartment model.

◆: measured value, —: fitting curve

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

Table 5 Pharmacokinetic parameters of FD-4 after *i.v.* administration in rats.

A ($\mu\text{g/mL}$)	28.64 ± 1.44	$k_{21} (\times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$	2.007 ± 0.106
$\alpha (\times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$	9.287 ± 0.302	$k_{10} (\times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$	2.459 ± 0.346
$t_{1/2\alpha}$ (min)	7.488 ± 0.242	$k_{12} (\times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$	5.361 ± 0.513
B ($\mu\text{g/mL}$)	5.808 ± 0.412	V_1 (mL)	22.73 ± 1.09
$\beta (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	5.397 ± 0.948	V_2 (mL)	60.56 ± 5.00
$t_{1/2\beta}$ (min)	141.7 ± 26.3	V_{ss} (mL)	83.28 ± 4.62
		$CL_{tot} (\times 10^{-1} \text{ mL/min})$	5.692 ± 1.073

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

3-3-2 PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) の FD-4 経鼻吸収促進効果

FD-4 経鼻吸収の促進効果は、閉鎖系実験において評価した。すなわち、3-2-4 の方法により PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) を FD-4 と併用して鼻腔内投与した後の、FD-4 の体内動態を評価した。Figure 18 に、閉鎖系において種々濃度の PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) を併用して FD-4 を鼻腔内投与した後の血漿中 FD-4 濃度推移を、Table 6 に得られた FD-4 の動態学的パラメータを、Fig. 19 に FD-4 の経鼻吸収速度の時間推移をそれぞれ示す。FD-4 の単独鼻腔内投与群では、投与後 540 分まで血漿中 FD-4 濃度はほとんど増大せず (Fig. 18 ●)、吸収プロファイルは一定した吸収速度を示す 0 次吸収であった (Fig. 19)。またそのときの F_{0-540} は 6.2% と低い値であった (Table 6)。一方、PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) 併用群では、すべての適用濃度において、血漿中 FD-4 濃度は FD-4 の単独鼻腔内投与群と比較して高く推移し (Fig. 18)、 C_{max} 、 AUC_{0-540} 及び F_{0-540} は吸収促進剤の適用濃度依存的に増大した (Table 6)。Table 6 に示すように同濃度 (0.50%) における F_{0-540} は、PLO (45) では 71.6% であるのに対し、PEG (10)-PLO (45) では 40.4% であった。また最大吸収速度である MAR は、PLO (45) 併用群では 0.25% で最大を示したが、PEG (10)-PLO (45) 併用群では適用濃度依存的に増大し、検討した最大濃度である 2.00% で最も大きな値を示した。しかし、PEG (10)-PLO (45) の MAR 値は、同程度の AUC_{0-540} を示す PLO (45) と比較して小さかった。また、Fig. 19 に示すように、PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) をいずれの濃度で併用した場合においても、FD-4 吸収速度の増大には lag time が認められた。また、PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) 併用による FD-4 吸収促進効果は、鼻腔内投与後 120 から 180 分まで持続し、その時間以降は FD-4 単独投与群とほとんど変わらない吸収速度を示した。

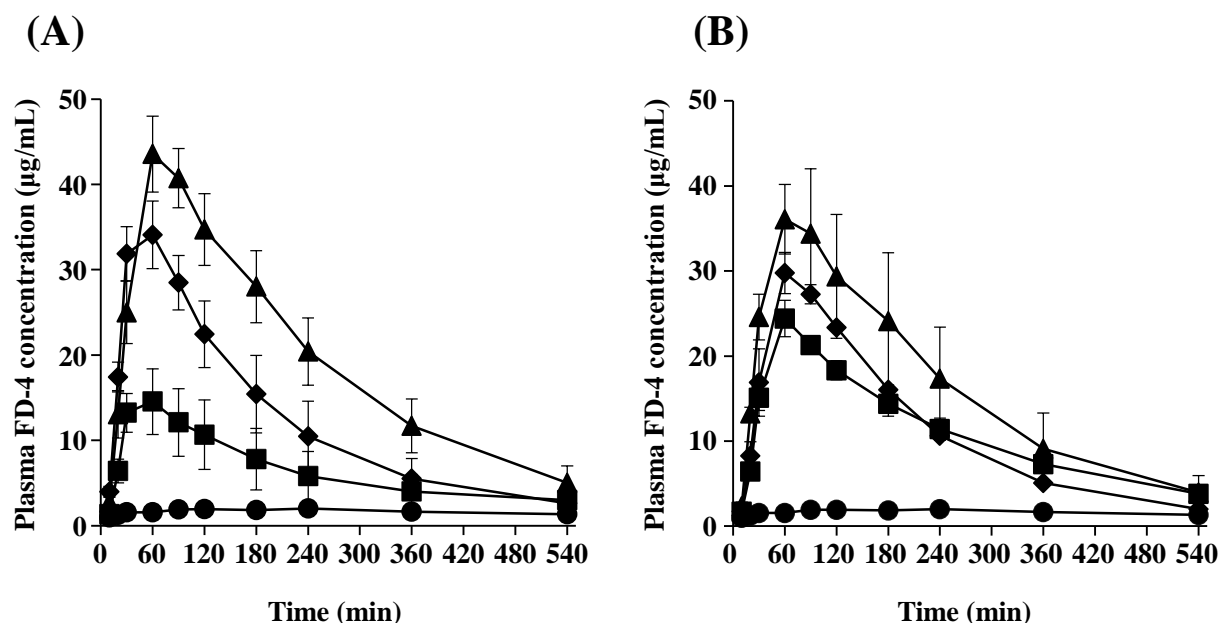


Fig. 18 Plasma FD-4 concentrations after *i.n.* administration in the closed system under various conditions in rats.

(A): With PLO (45) (●: Control, ■: 0.05%, ◆: 0.25% and ▲: 0.50%)

(B): With PEG (10)-PLO (45) (●: Control, ■: 0.50%, ◆: 1.00% and ▲: 2.00%)

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3–7).

Table 6 Pharmacokinetic parameters of FD-4 after *i.n.* administration in the closed system under various conditions in rats.

Route	Dose (mg/kg)	Enhancer	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (min)	AUC ₀₋₅₄₀ (µg·min/mL)	MRT (min)	F ₀₋₅₄₀ (%)	ER	MAR (µg/min)
<i>i.v.</i>	3.3	-	-	-	1462.9 \pm 222.6	-	-	-	-
<i>i.n.</i>	33	None (Control)	2.3 \pm 0.5	187.5 \pm 52.5	902.4 \pm 186.2	259.1 \pm 16.8	6.2	1.0	2.7
		PLO (45)							
		0.05%	16.5 \pm 3.3*	40.0 \pm 10.0*	3483.2 \pm 1283.4	189.5 \pm 14.7*	23.8	3.9	28.4
		0.25%	35.9 \pm 3.5*	60.0 \pm 9.5*	6667.6 \pm 1361.1*	153.8 \pm 14.8*	45.6	7.4	67.3
		0.50%	44.0 \pm 4.3*	82.5 \pm 14.4	10470.4 \pm 1522.8*	186.8 \pm 14.1*	71.6	11.6	56.0
		PEG (10)-PLO (45)							
		0.50%	24.4 \pm 2.1*	60.0 \pm 0.0*	5906.6 \pm 493.8*	201.4 \pm 4.7*	40.4	6.5	32.9
		1.00%	29.9 \pm 2.3*	67.5 \pm 7.5*	6064.3 \pm 332.7*	171.7 \pm 3.5*	41.5	6.7	38.4
		2.00%	38.6 \pm 5.8*	70.0 \pm 10.0	8813.2 \pm 2463.9*	173.9 \pm 18.4*	60.2	9.8	52.7

Each data represents the mean or mean \pm S.E. (n=3–7), **p* < 0.05 vs Control.

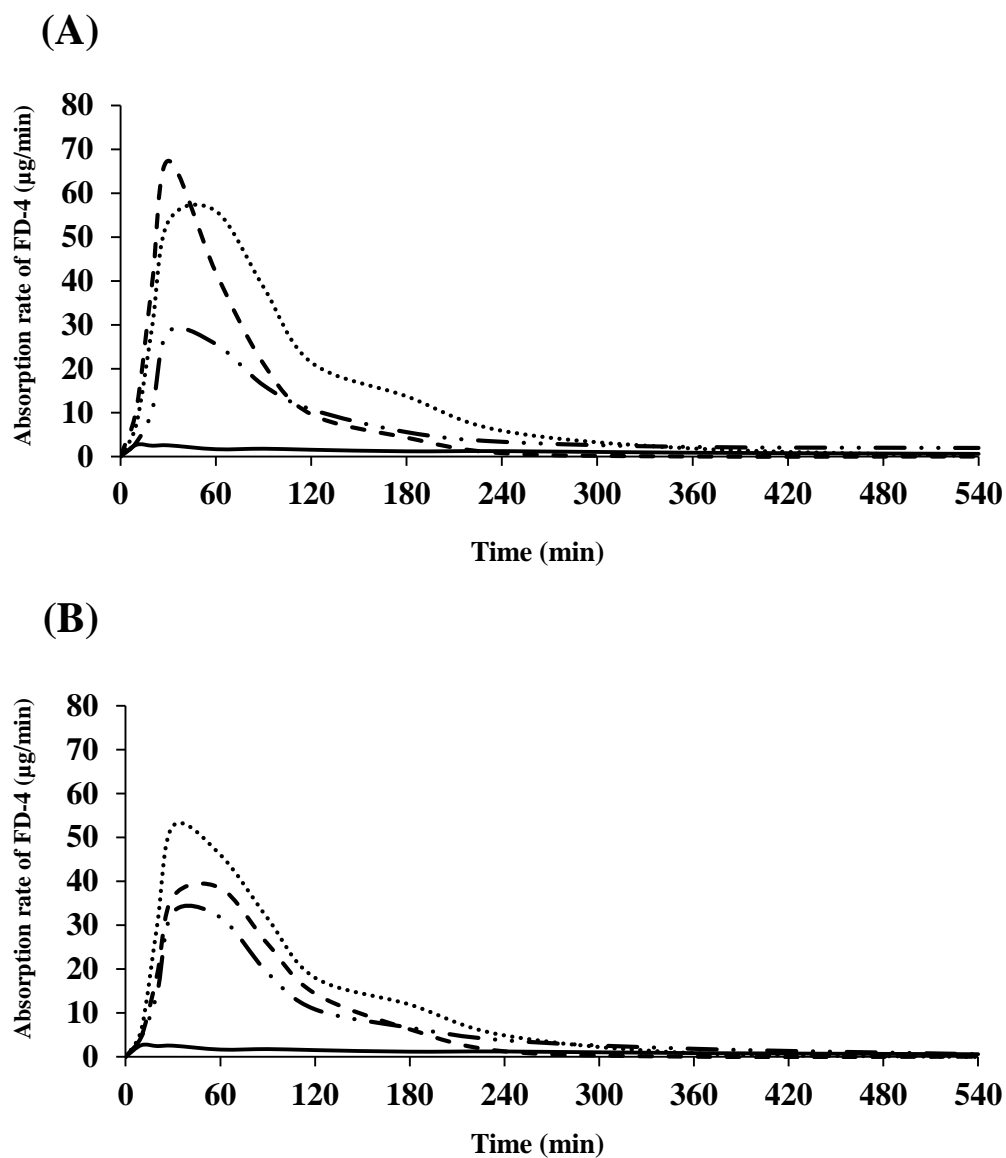


Fig. 19 Simulated absorption rate of FD-4 after *i.n.* administration in the closed system under various conditions in rats.

(A): With PLO (45) (—: Control, - · · : 0.05%, - - -: 0.25% and ·····: 0.50%)

(B): With PEG (10)-PLO (45) (—: Control, - · · : 0.50%, - - -: 1.00% and ·····: 2.00%)

Each data represents the mean (n=3-7).

3-3-3 PEG (10)-PLO (45) の鼻腔内滞留性の評価

PLO (45) の鼻粘膜滞留性に対する PEG 修飾の影響を開放系実験で評価した。Figure 20 に、開放系において種々濃度の PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) を併用して FD-4 を鼻腔内投与した後の血漿中 FD-4 濃度推移を閉鎖系と比較した結果を、Fig. 21 に FD-4 の経鼻吸収速度の時間推移の閉鎖系との比較を、Table 7 に得られた FD-4 の動態学的パラメータをそれぞれ示す。吸収促進剤を併用したすべての条件において、 T_{max} 及び MRT は閉鎖系と開放系でほとんど変わらなかったが、FD-4 単独投与群を含むすべての投与条件において、開放系での血漿中 FD-4 濃度は閉鎖系よりも低く推移し (Fig. 20)、動態学的パラメータである C_{max} 、 AUC_{0-540} 及び F_{0-540} は低下した (Table 7)。両者の差は、PEG 修飾していない PLO (45) 併用群 (0.25% 及び 0.50%) で顕著であり (Fig. 20 (A) 及び(B))、 AUC_{0-540} も開放系で明らかに低く、 F_{0c} は適用濃度 0.25% 及び 0.50% でそれぞれ 66.7% 及び 57.5% であった。開放系での PLO (45) 併用群の FD-4 吸収速度もまた、閉鎖系のそれより明らかに低く推移し (Fig 21 (B) 及び(C))、最大吸収速度である MAR 値は約 60% ほどに低下した (Table 7)。一方、PEG (10)-PLO (45) 併用群では、いずれの適用濃度においても、閉鎖系と開放系の血漿中 FD-4 濃度推移はよく一致し、 F_{0c} は適用濃度 0.50%、1.00% 及び 2.00% でそれぞれ 92.9%、89.3% 及び 94.5% と高い値を示した。PEG (10)-PLO (45) 併用群の FD-4 吸収速度も閉鎖系と開放系でよく一致し (Fig. 21 (D), (E) 及び(F))、開放系の MAR 値は閉鎖系の約 90% であった。

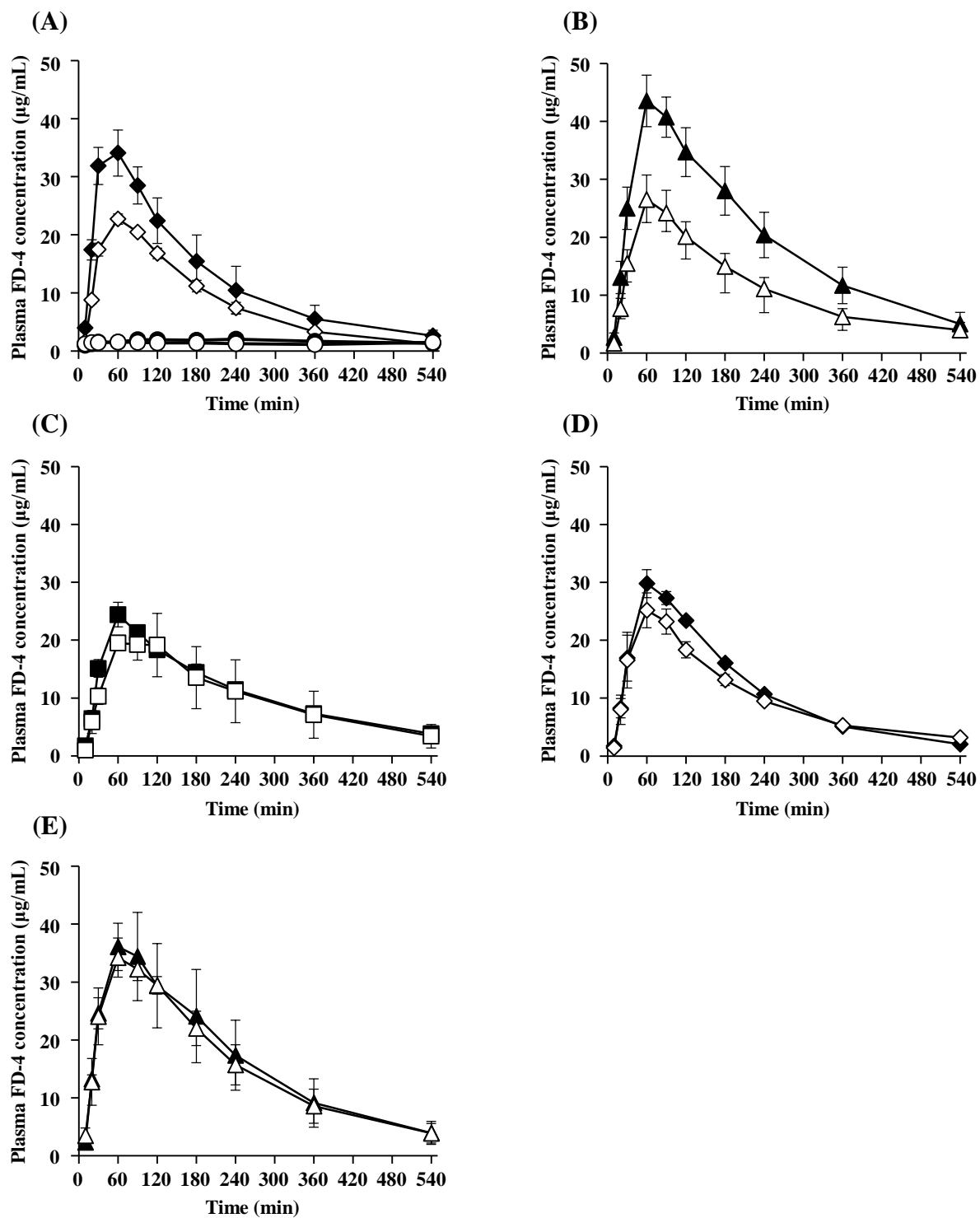


Fig. 20 Plasma FD-4 concentrations after *i.n.* administration in the closed system and the open system under various conditions in rats.

[Closed symbol]: Closed system, [Open symbol]: Open system

(A): Control (● and ○) and with 0.25% PLO (45) (◆ and ◇)

(B): With 0.50% PLO (45) (▲ and △)

(C): With 0.50% PEG (10)-PLO (45) (■ and □)

(D): With 1.00% PEG (10)-PLO (45) (◆ and ◇)

(E): With 2.00% PEG (10)-PLO (45) (▲ and △)

Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-7).

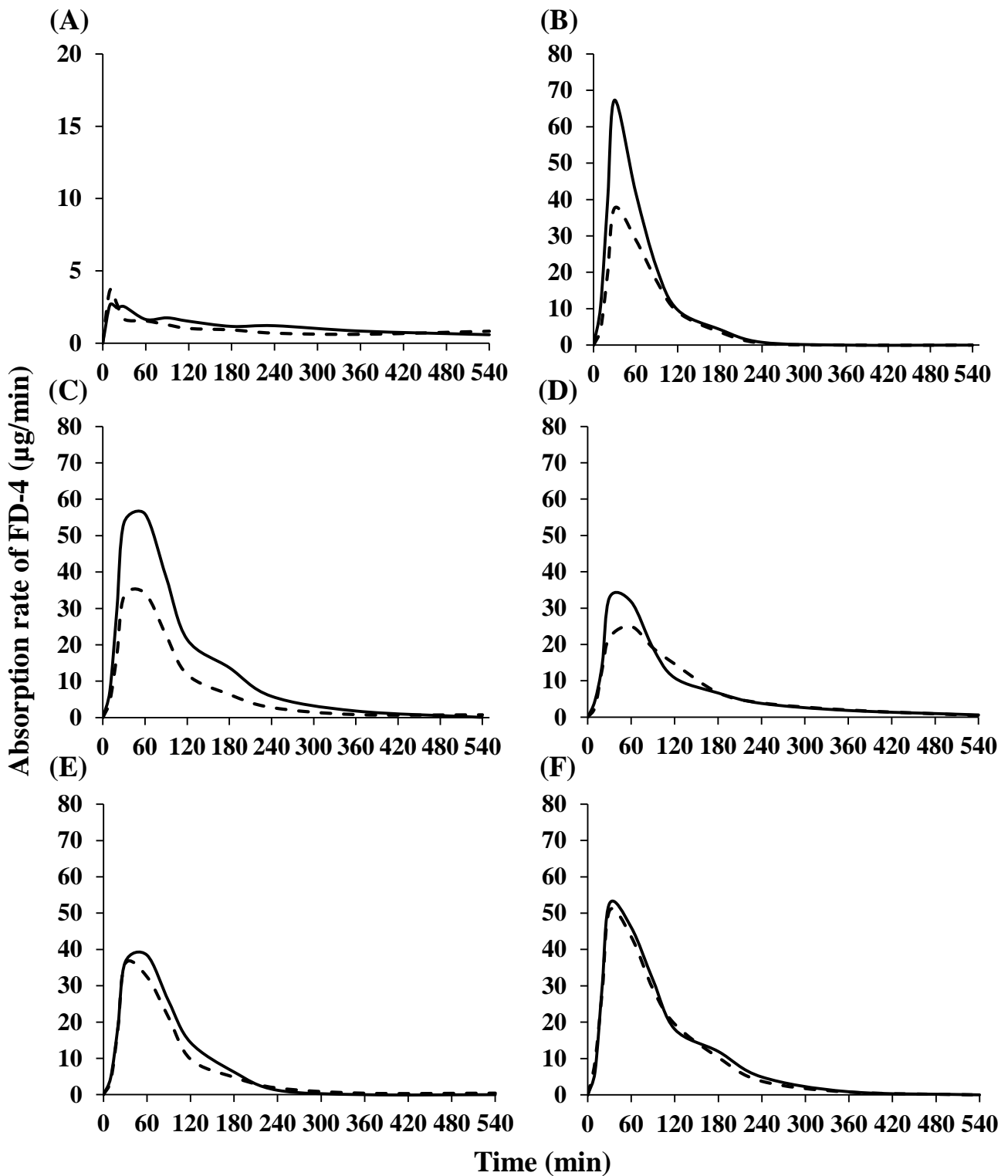


Fig. 21 Comparison of simulated absorption rate of FD-4 after *i.n.* administration in the closed system and the open system under various conditions in rats.

— : Closed system, - - - : Open system.

(A): Control, (B): 0.25% PLO (45), (C): 0.50% PLO (45), (D): 0.50% PEG (10)-PLO (45),

(E): 1.00% PEG (10)-PLO (45) and (F): 2.00% PEG (10)-PLO (45)

Each data represents the mean (n=3-7).

Table 7 Pharmacokinetic parameters of FD-4 after *i.n.* administration in the closed system and the open system under various conditions in rats.

Enhancer		C _{max} (µg/mL)	T _{max} (min)	AUC ₀₋₅₄₀ (µg/mL·min)	MRT (min)	F ₀₋₅₄₀ (%)	ER	MAR (µg/min)	F _{o/c} (%)
Closed system									
None (Control)		2.3 ± 0.5	187.5 ± 52.5	902.4 ± 186.2	259.1 ± 16.8	6.2	1.0	2.7	
PLO (45)	0.25%	35.9 ± 3.5*	60.0 ± 9.5*	6667.6 ± 1361.1*	153.8 ± 14.8*	45.6	7.4	67.3	
	0.50%	44.0 ± 4.3*	82.5 ± 14.4	10470.4 ± 1522.8*	186.8 ± 14.1*	71.6	11.6	56.0	
PEG (10)-PLO (45)	0.50%	24.4 ± 2.1*	60.0 ± 0.0*	5906.6 ± 493.8*	201.4 ± 4.7*	40.4	6.5	32.9	
	1.00%	29.9 ± 2.3*	67.5 ± 7.5*	6064.3 ± 332.7*	171.7 ± 3.5*	41.5	6.7	38.4	
	2.00%	38.6 ± 5.8*	70.0 ± 10.0	8813.2 ± 2463.9*	173.9 ± 18.4*	60.2	9.8	52.7	
Open system									
None (Control)		1.8 ± 0.5	80.0 ± 36.7	710.6 ± 135.6	269.9 ± 12.9	4.9	1.0	3.6	78.7
PLO (45)	0.25%	22.7 ± 0.9*†	60.0 ± 0.0	4448.3 ± 336.5*	159.8 ± 7.0*	30.4	6.3	37.7	66.7
	0.50%	26.5 ± 4.3*†	60.0 ± 0.0	6020.9 ± 1009.5*	189.9 ± 8.8*	41.2	8.5	34.1	57.5
PEG (10)-PLO (45)	0.50%	22.6 ± 3.8*	80.0 ± 20.0	5486.5 ± 1904.8*	190.7 ± 23.1*	37.5	7.7	25.0	92.9
	1.00%	25.1 ± 3.0*	60.0 ± 0.0	5416.5 ± 348.6*	186.9 ± 11.0*	37.0	7.6	36.1	89.3
	2.00%	35.3 ± 2.4*	80.0 ± 20.0	8328.3 ± 935.5*	182.0 ± 20.9*	56.9	11.7	50.7	94.5

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3–7),

**p* < 0.05 vs Control of each system, † *p* < 0.05 vs the same concentration in the closed system.

第4節 考察

経鼻薬物送達において、鼻腔内に投与された薬液は、*mucociliary clearance* などによって除去されることが知られており、鼻粘膜を介した薬物の吸収に大きく影響する⁵⁴⁾。そのため、薬物の経鼻吸収性の向上を目的として、付着性物質の併用やゲル化製剤など、製剤の鼻粘膜に対する付着滞留性を増大させる研究が数多く行われている^{29,30)}。

粘膜付着性物質として *starch* を用いた以前の研究では、*starch* 濃度の増大と共に粘度は増大するものの、粘度が高すぎる場合には粘膜との接触表面積の減少に起因する吸収の低下が認められ、吸収性の改善には適切な付着性が要求されることが示されている²⁸⁾。機能性分子の修飾によるタンパク質の粘性の変化に関する研究では、PEG を修飾することによってタンパク質の粘性が増大すること、また修飾する PEG の分子量や修飾数によって粘性の増大を制御できることが示されている³⁶⁾。そこで、塩基性アミノ酸ホモポリマーの鼻腔内滞留性の増大を期待して PEG 修飾 PLO 及び PLL を合成し、*in vitro* において付着滞留性を増大できることを明らかにした。第3章では、第2章において最も低濃度で有意な透過促進効果を発揮し、且つ細胞傷害性を示さなかった PEG (10)-PLO (45) を用いて、PEG 修飾による吸収促進効果への影響及び鼻腔内滞留性改善効果を、閉鎖系及び開放系における経鼻投与実験によって評価した。

開放系における PEG 未修飾の PLO (45) 併用群の T_{max} 及び MRT は閉鎖系と同程度であったが、 C_{max} 、 AUC_{0-540} 及び MAR は閉鎖系の約 60% に低下し (Fig. 20 (A) 及び(B) 並びに Table 7)、FD-4 の吸収プロファイルも低く推移した (Fig. 21 (B) 及び(C))。これは、鼻腔内に投与した FD-4 及び PLO (45) を含む薬液が、物理的なクリアランスによって咽頭側に流出したことで、吸収部位である鼻粘膜上から除去されたために、吸収促進効果が持続しなかったためであると考えられた。一方、PEG (10)-PLO (45) 併用時の血漿中 FD-4 濃度推移、種々動態学的パラメータ及び累積吸収プロファイルは、開放系と閉鎖系でほとんど同等であり、 F_{oc} も約 90% と高い滞留性改善率を示し、PEG 修飾によって PLO の滞留性が改善されたものと考えられた (Fig. 20 (C)–(E), Fig. 21 (D)–(F) 及び Table 7)。これは、第1章で述べたように、PEG 修飾による PLO (45) の粘性の増大や PEG 鎖と粘膜との相互作用に起因し

て粘膜に対する付着性が改善されたこと^{36,37)}、また、上述した PEG 鎖によって粘液中に補足されにくくなった結果、PLO と粘膜との相互作用が十分に引き起こされたことや⁵⁶⁾、粘液表面ゲル層の mucociliary clearance による除去を軽減または回避することなどが生じたことによって、開放系においても閉鎖系と同程度の吸収促進効果が発揮された可能性がある。

閉鎖系において、PLO (45) は、PLA や他の分子量の PLO と同様に、適用濃度依存的な水溶性高分子の経鼻吸収促進効果を示した^{25,55)}。このことから、PLO (45) の吸収促進強度はそれぞれの適用濃度に依存することが示された。PEG (10)-PLO (45) 併用時の AUC₀₋₅₄₀ は、PLO (45) を同濃度で併用した時と比較して低下した。この傾向は、第 2 章での Caco-2 細胞単層膜を用いた実験の結果と類似したが、PLO (45) は 0.25% (約 55 μM) で AUC₀₋₅₄₀ の有意な増大を示したのに対し、PEG (10)-PLO (45) は 1.00% (約 87 μM) で同程度の吸収促進効果を示し、*in vitro* で見られたほどの力価の低下を示さなかった。*In vivo* において *in vitro* と同等の吸収促進効果を示すには、一般に *in vitro* の約 10 倍程度の吸収促進剤が必要とされると考えられているが、これは鼻粘膜上の多量の粘液中に含まれる mucin の負電荷部分との相互作用によって、カチオンが中和されることによるものと推察される^{38,39)}。第 2 章では、*in vitro* における PEG 修飾 PLO 及び PLL の力価の低下について、PEG 修飾による正電荷密度の低下や、PEG 鎖の立体障害による上皮細胞との相互作用の減少が要因として考えられると考察した。粘膜に対する持続的な薬物送達に関する研究では、ナノ粒子の表面を PEG 修飾すると、PEG 鎖が粘液中に浸透することで粘液中に捕捉されにくくなり、粘膜への粒子の分布が改善することが報告されている⁵⁶⁾。このことから、*in vivo* 経鼻投与においてはポリカチオン性の吸収促進剤である PLO と mucin との相互作用を PEG 鎖が保護し、中和によるカチオン性の低下が軽減されることで、粘膜に到達するカチオンが増加し、*in vitro* の結果から想定されるものよりも強い吸収促進効果を示したと考えられた。

PEG (10)-PLO (45) 併用時の FD-4 の吸収速度は、PLO (45) 併用時と同様のプロファイルを示し、T_{max} 及び MRT も同程度の値であったことから、PEG (10)-PLO (45) の吸収促進効果持続時間は、用いた実験条件において PLO (45) と同等であることが示された。Ohtake らは、PLA の経鼻吸収促進効果の持続時間に関する研究で、PLA の鼻腔内での酵素的分解が、

経鼻吸収促進効果の持続時間を決定づける要因のひとつであると考察しており²²⁾、PLA と同じ塩基性アミノ酸ホモポリマーである PLO 及び PLL についても、吸収促進効果の持続時間には同様の要因が関与していると考えられた。また、PLO 及び PEG 修飾 PLO の吸収促進効果の発現には lag time が認められ、PLA や異なる分子量の PLO での報告と一致していた。この吸収促進効果の lag time は、細胞間隙経路の拡大による有効透過表面積の経時的な増加によるものであると考察されており⁵⁷⁾、上皮細胞の膜厚など病理・組織学的の変化ではないことが示されている。緒言で述べたように、医薬品に対する PEG 修飾は、一般に腎臓におけるクリアランスの低下や抗原性の低下による分解の遅延に起因する血中滞留時間の延長を期待して行われるが、近年、sCT や HIV 由来ペプチドの PEG 修飾に関する研究において、分子量 2 kDa の PEG を修飾することによって、トリプシンや鼻粘膜表面環境におけるペプチド分解に対して耐性を示すことが報告されている^{58, 59)}。そのため PEG (10)-PLO (45) では、鼻腔内に存在するトリプシン様のエンドペプチダーゼ等⁶⁰⁾による PLO (45) の分解が遅延することで、未修飾の PLO (45) と比較して経鼻吸収促進効果の持続時間が延長する可能性が考えられたが、PLO (45) の吸収促進効果の持続時間は PEG の修飾前後で変化しなかった。この原因については明らかではないが、PLO では PEG 修飾しても酵素的分解に対する耐性が得られなかったか、または、酵素的分解以外に吸収促進効果の持続時間を決定づける要因が存在する、という大きく二つの可能性が考えられた。この点を明らかにするには、鼻汁や摘出鼻粘膜中に含まれるタンパク質分解酵素を用い、PLO または PLL の PEG 修飾前後における酵素的分解に対する安定性の評価や、経鼻投与後に鼻腔内に残存している FD-4 量や PEG (10)-PLO (45) 量の評価等を行う必要がある。

しかし本研究では、PLL の PEG 修飾による *in vivo* 条件での鼻腔内滞留性改善効果は検討しておらず、また、合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL は、実際に粘膜や粘液に対する相互作用についての検討は行っていない。従って、PEG (10)-PLO (45) が開放系においても閉鎖系と同等の吸収促進効果を発揮した要因が、上述したような相互作用によるものかどうかを明らかにするには、PEG 修飾 PLL を用いた同様の評価や、PLO あるいは PLL の上皮粘膜に対する付着性や粘液中における移動度などを PEG 修飾の有無で比較・検討する必要がある。

ある。

以上より、塩基性アミノ酸のホモポリマーである PLO に対し、機能性化合物として PEG を導入することで、鼻腔滞留性が向上し、開放系においても難吸収性薬物の経鼻吸収を十分に促進することが可能な、機能性吸収促進剤として利用できることが明らかとなった。しかしながら、本検討で用いた開放系は、麻酔したラットを用いた実験系であり、覚醒下状態における mucociliary clearance の活性とは異なる可能性がある^{61,62)}。また本研究において、最適な鼻腔滞留性の向上に必要な PEG の分子量や分岐数、修飾数等の検討は行っていないため、PEG 修飾 PLO の化学構造や物理化学的性質と鼻腔滞留性改善効果及び経鼻吸収促進効果の関係をより明らかにするためには、より多様な分子を合成し、それらについて、より多角的な評価を行っていくことが重要であると考えられる。

結論

本研究では、塩基性アミノ酸のホモポリマーである PLO 及び PLL の分子構造中に、機能性側鎖として PEG を導入することにより合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL の物性、*in vitro* における水溶性高分子透過促進効果、及び *in vivo* における水溶性高分子経鼻粘膜吸収促進効果並びに鼻腔内滞留性改善効果を評価した。

経鼻薬物送達における吸収促進剤としての有用性を向上するための PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法は確立しておらず、塩基性アミノ酸ホモポリマーの PEG 修飾後の経粘膜吸収促進効果や粘膜付着滞留効果はこれまでに検討されていない。そのため、まず PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法と PEG 修飾数の評価方法を検討し、さらに *in vitro* での滞留性改善効果を評価した。次いで、PEG 修飾による透過促進効果への影響を明らかにするために、Caco-2 細胞単層膜を介した水溶性高分子の透過促進効果及び細胞傷害性等を評価した。その後、鼻腔内に投与した薬液が咽頭側へ流出することを制限した閉鎖系と、流出を制限しない開放系で *in vivo* 吸収促進効果の評価を行い、これらの吸収動態を比較することで、塩基性アミノ酸ホモポリマーの PEG 修飾による鼻腔内滞留性改善効果を評価した。これらの検討を行った結果、以下の結論を得た。

1. PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成及び物性評価

塩基性アミノ酸ホモポリマーのうち、側鎖に第一級アミンを有する PLO 及び PLL に対して、mPEG-NHS を過剰量添加し反応させることで、イオン交換スピンカラムによる分離が可能な PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法を確立した。その反応比は PLO または PLL と PEG の分子量比によって異なり、PLO (20) 及び PLL (20) に対する mPEG (40)-NHS の反応では 1:5、PLO (45) 及び PLL (30) に対する mPEG (10)-NHS の反応では 1:10 の比で反応することで、安定した PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成及び精製が可能であることを明らか

にした。これらの方法を用いて、側鎖がランダムに PEG 修飾された種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL (PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30)) の PEG 修飾数を、元素分析法及び TNBS assay の原理の異なる 2 つの方法で測定したところ、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても 2 つの方法で近似した PEG 修飾比を示したことから、これらの方法は PEG 修飾数を適切に算出することが可能であることが示された。合成した種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL の PEG 導入数は 3~10/分子であった。また、合成した種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL を用いて、傾斜させた SSP 上における滞留性を評価した結果、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても、PEG 修飾による粘性の増大に起因すると考えられる滞留時間の延長を示した。この結果は、PEG 修飾は塩基性アミノ酸ホモポリマーの付着滞留性を増大させ得ることを示唆しており、*in vivo* においても PEG 修飾 PLO 及び PLL が高い付着滞留性を有する可能性を示した。

2. PEG 修飾 PLO 及び PLL の Caco-2 細胞単層膜を介した水溶性高分子薬物の透過促進効果及び TJ 関連タンパク質の局在性への影響

これまでに、塩基性アミノ酸ホモポリマーの経粘膜吸収促進効果に及ぼす PEG 修飾の影響は報告されていないため、種々 PEG 修飾 PLO 及び PLL (PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30)) を用いて、Caco-2 細胞単層膜を介した FD-4 透過促進効果及び細胞傷害性を評価した。その結果、検討したすべての PEG 修飾 PLO 及び PLL が、PEG 修飾前と同じように適用濃度依存的な FD-4 の透過促進効果及び TEER の低下効果を示すことが確認されたが、PEG 修飾前と比較してその力価は PEG (40)-PLO (20) 及び PEG (40)-PLL (20) では約 1/20、PEG (10)-PLO (45) では約 1/10、PEG (10)-PLL (30) では約 1/80 に低下した。この力価の低下は、PEG 修飾によるアミノ基割合の低下や分子量増大による拡散性の低下、PEG 鎖の立体障害により正電荷が遮蔽されることによる上皮細胞表面との静電的相互作用の低下などによるものと考えられたが、同じ分子量の PEG

が同程度修飾された PEG (10)-PLO (45) と PEG (10)-PLL (30) 間で力価の低下度が異なったことからそれらの要因だけでは説明できず、塩基性アミノ酸ホモポリマーの透過促進メカニズムに関するさらなる調査が必要である。一方、細胞傷害性の比較において、PEG 未修飾の種々 PLO 及び PLL は、低濃度から適用濃度依存的な細胞生存率の低下を示す傾向にあったが、PEG 修飾 PLO 及び PLL 適用後の細胞生存率は、高濃度までほぼ 100% を維持しており、有意な透過促進効果を示す濃度においても細胞傷害性は認められなかった。PEG 修飾によって、透過促進効果は失われずに細胞傷害性のみが消失したことから、高濃度の塩基性アミノ酸ホモポリマーが示す細胞傷害性は、透過促進効果とは異なる機序を含んだプロセスで生じていることが示唆された。

また、透過促進メカニズムの免疫染色を用いた評価において、PLO (45) 適用後の Caco-2 細胞単層膜では、細胞間隙部位における occludin 及び ZO-1 の局在が消失したことから、PLO の水溶性高分子透過促進メカニズムもまた、PLA でこれまで報告されているように TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの局在変化に伴う細胞間隙透過性の増大によるものであることが示された。さらに、この TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの消失効果は、PEG (10)-PLO (45) においても認められたことから、PEG 修飾は塩基性アミノ酸ホモポリマーの透過促進メカニズム自体を変化させるものではないことが示唆された。しかし、重要な TJ 関連タンパク質である claudins タンパク質に関する評価が不足していることや、半定量的な評価方法であること、PLL 及び PEG 修飾 PLL での検討を行っていないことなどから、それらの点に関する今後の詳細な評価が求められる。

3. PLO 及び PEG 修飾 PLO の経鼻吸収促進効果及び鼻腔内滞留効果

塩基性アミノ酸ホモポリマーの PEG 修飾による鼻腔内滞留性改善効果への影響を明らかにするために、PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) を用いて、鼻腔内に投与した薬液が咽頭側に流出できる開放系ラット及び鼻腔内に投与した薬液が鼻腔外へ流出しない閉鎖系ラットにおいて FD-4 経鼻投与実験を行った。開放系における PLO (45) 併用経鼻投与後の FD-4

の AUC₀₋₅₄₀ は閉鎖系の約 60% となり、吸収部位からの除去によると推察される吸収促進効果の低下を示した。これに対し、PEG (10)-PLO (45) 併用経鼻投与後の FD-4 の AUC₀₋₅₄₀ は閉鎖系の約 90% であり、血漿中 FD-4 濃度推移や吸収プロファイルもまた閉鎖系と遜色のないものであったことから、PEG 修飾により優れた滞留性改善効果が得られたものと考えられた。これは、PEG 修飾による PLO の粘性の増大や、PEG 鎖と粘膜との相互作用に起因して粘膜付着性が改善されたこと、PEG 鎖の存在によって吸収促進剤の活性の中心である正電荷が粘液に捕捉されにくくなり、塩基性アミノ酸ホモポリマーの吸収促進効果の発現に重要と考えられている粘膜との静電的相互作用が十分に生じたことや、粘液表面層からの除去を回避して滞留性が改善したことなどによって、閉鎖系と同程度の吸収促進効果を発揮した可能性が考えられた。閉鎖系ラットでの検討において、PLO (45) 及び PEG (10)-PLO (45) はいずれも適用濃度依存的に FD-4 の経鼻粘膜吸収を促進したが、PEG (10)-PLO (45) は *in vitro* で確認されたほど PEG 導入による力価の低下を示さなかった。これは、粘液中の負電荷によって引き起こされる塩基性アミノ酸ホモポリマーの正電荷の中和が、PEG 鎖によって抑制されたためであると考察した。しかし、上述した滞留性改善効果や吸収促進効果に関与すると考察した相互作用は、これまでの報告や *in vitro* での結果から間接的に得た見解であり、これらの相互作用が生じて鼻腔内滞留性が改善されていることを明らかにするためには、粘膜や粘液を用いた直接的な評価が求められる。また、本研究で用いた *in vivo* 鼻腔内滞留性評価モデルは、urethane による麻酔ラットを用いた検討方法である。他の麻酔薬と比較して、urethane は気道の粘液分泌や繊毛活性に及ぼす影響が小さいという報告もあるが、mucociliary clearance の影響を詳細に評価するためには、覚醒条件における経鼻吸収効果を検討することが必要であると考えられる。それに加えて、本研究での吸収促進効果は、分子量約 4 kDa のモデル高分子における結果であり、より分子サイズが大きく、種々のアミノ酸が配列した実際のペプチド及びタンパク質性医薬品を用いた場合には、塩基性アミノ酸ホモポリマーと医薬品との相互作用や、求められる吸収促進効果や持続時間が異なることなどの影響が予想される。また、緒言で示した要因③、すなわち医薬品の酵素的分解に対する吸収促進剤の効果も評価していく必要がある。今後、生理活性ペプチド及びタンパク質性医薬品

がもつ多様な要求に対応するために、あらゆる分子量比の PEG 修飾 PLO または PLL を合成することで得て、吸収促進効果、吸収促進時間持続効果、医薬品安定性改善効果、及び粘膜付着滞留効果などに関する総合的評価を行うことが期待される。

以上より、塩基性アミノ酸ホモポリマーに対する PEG 側鎖の導入は、経鼻粘膜吸収促進効果を制御する手法として有用である可能性が示された。これまで述べてきたように、塩基性アミノ酸ホモポリマーは優れた吸収促進効果を発揮する安全性の高い吸収促進剤であると考えられているが、本研究では PLO 及び PLL を高濃度で適用した場合には *in vitro* における細胞生存率の低下をもたらすことを示した。一方、合成した PEG 修飾 PLO 及び PLL は、高濃度においても細胞傷害性を示さなかったことから、塩基性アミノ酸ホモポリマーの PEG 修飾は、生体適合性の観点からも優れた機能性を有する吸収促進剤を得る方法であると考えられる。しかしながら、本研究で行った PEG 修飾 PLO 及び PLL の安全性試験は *in vitro* での MTT assay のみであり、*in vivo* での安全性に関する評価が不足している。PLO に関しては、*in vivo* 鼻粘膜に対して傷害性を示さなかったことが報告されているが、これは単回経鼻投与後の評価であり、臨床応用を視野に入れた反復投与後の安全性については報告されていない。また、L-lysine 及び D-lysine からなるホモポリマーは液性免疫を誘導することが報告されており⁶²⁾、免疫原性を有することが示唆されているが、タンパク質に対する PEG の修飾は、一般に免疫原性を低下させることが知られており、PEG 修飾 PLL においても同様の免疫原性低下効果が見込める。今後、PEG 修飾 PLO 及び PLL の免疫原性評価や *in vivo* 鼻腔内投与後の組織学的評価を含む毒性評価、反復投与後の安全性等について詳細に評価することにより、難吸収性薬物の鼻粘膜吸収に対する優れた吸収促進剤の開発につなが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製剤学講座教授 従二和彦 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医薬品化学講座教授 坂本武史 先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御見守り頂き、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、城西大学薬学部製剤学研究室助手 八巻努 先生に深謝の意を表します。

また、本論文の作成、学位論文審査にあたり、御教示と御校閲を頂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製剤作用解析学講座教授 小林大介 先生、城西大学大学院薬学研究科病院製剤学講座教授 上田秀雄 先生に心より感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を頂きました、博士 川島亮 氏、城西大学大学院薬学研究科製剤学講座諸氏、城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座諸氏、ならびに城西大学薬学部製剤学研究室 金子侑香里 氏、雨宮怜香 氏をはじめとする関係諸氏に心より感謝致します。

最後に、本研究のために尊い命をいただきました動物たちに深く感謝し、追悼の意を表します。

引用文献

- 1) Miyamoto M., Natsume H., Satoh I., Ohtake K., Yamaguchi M., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y. 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).
- 2) Jacobsen L.V., Flint A., Olsen A.K., Ingwersen S.H. Liraglutide in type 2 diabetes mellitus: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacokinet.*, **55**: 657–672 (2016).
- 3) Kamo K., Miyakoshi N., Kasukawa Y., Nozaka K., Sasaki H., Shimada Y. Intermittent weekly administration of human parathyroid hormone (1–34) improves bone-hydroxyapatite block bonding in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Metab.*, **28**: 634–640 (2010).
- 4) Richardson T., Kerr D. Skin-related complications of insulin therapy: epidemiology and emerging management strategies. *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**: 661–667 (2003).
- 5) Macalino G.E., Springer K.W., Rahman Z.S., Vlahov D., Jones T.S. Community-based programs for safe disposal of used needles and syringes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **18**: S111–119 (1998).
- 6) 中野 玲子, 朝倉 俊成, 虎石 顕一, 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).
- 7) 市江 和子, 上條 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).
- 8) McMartin C., Hutchinson L.E.F., Hyde R., Peters G.E. Analysis of structural requirements for the absorption of drug and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.*, **76**: 535–540 (1987).
- 9) Lee V.H.L., Yamamoto A. Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **4**: 171–207 (1990).

- 10) Hosoya K., Kubo H., Natsume H., Sugibayashi K., Morimoto Y. Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using Ussing chamber technique. *Biol. Pharm. bull.*, **17**: 316–322 (1994).
- 11) Chandler S.G., Thomas N.W., Illum L. Nasal absorption in the rat. III. Effect of lysophospholipids on insulin absorption and nasal histology. *Pharm. Res.*, **11**: 1623–1630 (1994).
- 12) Marttin E., Verhoef V.C., Romeijin S.G., Merkus F.W.H.M. Effects of absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo: release of marker compounds in the nasal cavity. *Pharm. Res.*, **12**: 1151–1157 (1995).
- 13) Illum L., Farraj N.F., Davis S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.*, **11**: 1186–1189 (1994).
- 14) Zaki N.M., Mortada N.D., Awad G.A.S., ElHady S.S.A. Rapid-onset intranasal delivery of metoclopramide hydrochloride Part II: Safety of various absorption enhancers and pharmacokinetic evaluation. *Int. J. Pharm.*, **357**: 97–103 (2006).
- 15) Takimoto H., Hasegawa M., Yagi K., Nakamura T., Sakaeda T., Hirai M. *Drug Metab. Pharmacokin.*, **19**: 76–82 (2004).
- 16) Natsume H., Iwata S., Ohtake K., Miyamoto M., Yamaguchi M., Hosoya K., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y. Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **185**: 1–12 (1999).
- 17) Natsume H., Hori S., Tsukune T., Iwata S., Miyamoto M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Yamaguchi M. Improvement of pharmacological response after intranasal administration of peptide drugs by poly-L-arginine as a novel absorption enhancer in rats. *Drug Delivery System*, **14**: 21–25 (1999).
- 18) Yamaki T., Uchida M., Kuwahara Y., Shimazaki Y., Ohtake K., Kimura M., Uchida H., Kobayashi J., Ogihara M., Morimoto Y., Natsume H. Effect of poly-L-arginine on intestinal absorption of hydrophilic macromolecules in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 496–500 (2013).
- 19) 武田 里沙. 水溶性高分子薬物の鼻粘膜吸収に対する poly-L-ornithine の促進効果に関

する研究. 城西大学薬学部卒業論文 (2013).

- 20) Ma L., Kuang K., Smith R.W., Rittenband D., Iserovich P., Diecke F.P.J., Fischbarg J. Modulation of tight junction properties relevant to fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Exp. Eye Res.*, **84**: 790–798 (2007).
- 21) McEwan G.T.A., Jepson M.A., Hirst B.H., Simmons N.L. Polycation-induced enhancement of epithelial paracellular permeability is independent of tight junctional characteristics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1148**: 51–60 (1993).
- 22) Ohtake K., Natsume H., Ueda H., Morimoto Y. 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).
- 23) Ohtake K., Maeno T., Ueda H., Natsume H., Morimoto Y. Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in vitro. *Pharm. Res.*, **20**: 153–160 (2003).
- 24) Yamaki T., Ohtake K., Ichikawa K., Uchida M., Uchida H., Ohshima S., Juni K., Morimoto Y., Natsume H. Poly-L-arginine-induced internalization of tight junction proteins increases the paracellular permeability of the Caco-2 cell monolayer to hydrophilic macromolecules. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 432–441 (2013).
- 25) 金丸 達哉. 高分子薬物の経鼻吸収性に対する poly-L-ornithine の促進効果に関する研究 (1) –Poly-L-ornithine 適用濃度及び分子量の影響–. 城西大学卒業論文 (2014).
- 26) 川上 隆博. 高分子薬物の経鼻吸収性に対する poly-L-ornithine の促進効果に関する研究 (2) –Poly-L-ornithine 鼻腔内投与後の安全性 (タンパク質及び LDH の漏出性)–. 城西大学卒業論文 (2014).
- 27) 川島 亮. 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. 城西大学大学院博士論文 (2016).
- 28) Irie H., Ohtake K., Maeno T., Uchida M., Uchida H., Kobayashi J., Natsume H. Relationship between calcein disposition in nasal cavity and blood concentration after intranasal administration

- of viscous calcein-loaded starch solution in rats. *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, **69**: 219–227 (2009).
- 29) Jain A.K., Khar R.K., Ahmed F.J., Diwan P.V. Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**: 426–435 (2008).
- 30) Bertram U., Bodmeier R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: in vitro characterization of a new nasal dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **27**: 62–71 (2006).
- 31) Wu J., Su Z.G., Ma G.H. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *Int. J. Pharm.*, **315**: 1–11 (2006).
- 32) Griesenbach U., Meng C., Farley R., Wasowicz M.Y., Munkonge F.M., Chan M., Stoneham C., Sumner-Jones S.G., Pringle I.A., Gill D.R., Hyde S.C., Stevenson B., Holder E., Ban H., Hasegawa M., Cheng S.H., Scheule R.K., Sinn P.L., McCray P.B.Jr., Alton EW. The use of carboxymethylcellulose gel to increase non-viral gene transfer in mouse airways. *Biomaterials*, **31**: 2665–2672 (2010).
- 33) ファイザー株式会社. ソマバート®皮下注用 10 mg 添付文書 第4版 (2012).
- 34) 中外製薬株式会社. ペガシス®皮下注 45 µg 添付文書 第18版 (2015).
- 35) 協和発酵キリン株式会社. ジーラスタ®皮下注 3.6 mg 添付文書 第3版 (2016).
- 36) Ananda K., Manjula B.N., Meng F., Acharya V.N., Intaglietta M., Acharya S.A. Packing density of the PEG-shell in PEG-albumins: PEGylation induced viscosity and COP are inverse correlate of packing density. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **40**: 14–27 (2012).
- 37) Huang Y., Leobandung W., Foss A., Peppas N.A. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Release*, **65**: 63–71 (2000).
- 38) Pardeshi C.V., Belgamwar V.S. Controlled synthesis of *N,N,N*-trimethyl chitosan for modulated bioadhesion and nasal membrane permeability. *Int. J. Biol. Macromol.*, **82**: 933–944 (2016).
- 39) Mazoniene E., Joceviciute S., Kazlauske J., Niemeyer B., Liesiene J. Interaction of cellulose-based cationic polyelectrolytes with mucin. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **83**: 160–164 (2011).

- 40) Lee K.C., Tak K.K., Park M.O., Lee J.T., Woo B.H., Yoo S.D., Lee H.S., DeLuca P.P. Preparation and characterization of polyethylene-glycol-modified salmon calcitonins. *Pharm. Dev. Technol.*, **4**: 269–275 (1999).
- 41) Kim T.H., Jiang H.H., Lim S.M., Youn Y.S., Choi K.Y., Lee S., Chen X., Byun Y., Lee K.C. Site-specific PEGylated Exendin-4 modified with a high molecular weight trimeric PEG reduces steric hindrance and increases type 2 antidiabetic therapeutic effects. *Bioconjug. Chem.*, **23**: 2214–2220 (2012).
- 42) Sivaramakrishnan M., Kashyap A.S., Amrein B., Saenger S., Meier S., Staudenmaier C., Upton Z., Metzger F. PEGylation of lysine residues reduces the pro-migratory activity of IGF-I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**: 4734–4742 (2013).
- 43) Gol R.M., Jewrajka S.K. Facile in situ PEGylation of polyamide thin film composite membranes for improving fouling resistance. *J. Membr. Sci.*, **455**: 271–282 (2014).
- 44) Brown M.D., Schätzlein A., Brownlie A., Jack V., Wang W., Tetley L., Gray A.I., Uchegbu I.F. Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents. *Bioconjug. Chem.*, **11**: 880–891 (2000).
- 45) Castile J., Cheng Y.H., Simmons B., Perelman M., Smith A., Watts P. 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**: 816–824 (2013).
- 46) Yamaki T., Kamiya Y., Ohtake K., Uchida M., Seki T., Ueda H., Kobayashi J., Morimoto Y., Natsume H. 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**: 2287–2296 (2014).
- 47) Mishra S., Webster P., Davis M.E. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell Biol.*, **83**: 97–111 (2004).
- 48) Holland J.W., Hui C., Cullis P.R., Madden T.D. Poly (ethylene glycol)-lipid conjugates regulate the calcium-induced fusion of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and

- phosphatidylserine. *Biochemistry*, **35**: 2618–2624 (1996).
- 49) Furubayashi T., Kamaguchi A., Kawaharada K., Masaoka Y., Kataoka M., Yamashita S., Higashi Y., Sakane T. Kinetic model to predict the absorption of nasally applied drugs from in vitro transcellular permeability of drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**: 1007–1010 (2007).
- 50) Wu C.J., Mannan P., Lu M., Udey M.C. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) regulates claudin dynamics and tight junctions. *J. Biol. Chem.*, **288**: 12253–12268 (2013).
- 51) Fujita H., Sugimoto K., Inatomi S., Maeda T., Osanai M., Uchiyama Y., Yamamoto Y., Wada T., Kojima T., Yokozaki H., Yamashita T., Kato S., Sawada N., Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption between enterocytes. *Mol. Biol. Cell*, **19**: 1912–1921 (2008).
- 52) 山本 健. 種々分子量の水溶性高分子薬物の経鼻吸収性に対する poly-L-ornithine の促進効果. 城西大学薬学部卒業論文 (2015).
- 53) Hirai S., Yashiki T., Matsuzawa T., Mima H. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int. J. Pharm.*, **7**: 317–325 (1981).
- 54) Gizurarson S. The effect of cilia and the mucociliary clearance on successful drug delivery. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**: 497–506 (2015).
- 55) Miyamoto M., Natsume H., Iwata S., Ohtake K., Yamaguchi M., Kobayashi D., Sugibayashi K., Yamashita M., Morimoto Y. 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).
- 56) Xu Q., Ensign L.M., Boylan N.J., Schön A., Gong X., Yang J., Lamb N.W., Cai S., Yu T., Freire E., Hanes J. Impact of surface polyethylene glycol (PEG) density on biodegradable nanoparticle transport in mucus ex vivo and distribution in vivo. *ACS Nano*, **9**: 9217–9227 (2015).
- 57) 岩田 聡子. 経鼻吸収促進剤のスクリーニングとペプチド薬物への応用. 城西大学大学院修士論文 (1997).
- 58) Danial M., van Dulmen T.H., Aleksandrowicz J., Pötgens A.J., Klok H.A. Site-specific

- PEGylation of HR2 peptides: effects of PEG conjugation position and chain length on HIV-1 membrane fusion inhibition and proteolytic degradation. *Bioconjug. Chem.*, **23**: 1648–1660 (2012).
- 59) Na D.H., Youn Y.S., Park E.J., Lee J.M., Cho O.R., Lee K.R., Lee S.D., Yoo S.D., DeLuca P.P., Lee K.C. Stability of PEGylated salmon calcitonin in nasal mucosa. *J. Pharm. Sci.*, **93**: 256–261 (2004).
- 60) Sarkar M.A. Drug metabolism in the nasal mucosa. *Pharm. Res.*, **9**: 1–9 (1992).
- 61) Cervin A., Lindberg S. The predominant enzyme appears to be aminopeptidase among other exopeptidases and endopeptidases. *Br. J. Anaesth.*, **80**: 475–480 (1998).
- 62) Christopher A.B., Ochoa S., Krushansky E., Francis R., Tian X., Zahid M., Muñoz R., Lo C.W. The effects of temperature and anesthetic agents on ciliary function in murine respiratory epithelia. *Front. Pediatr.*, **2**: 1–9 (2014).
- 63) Sugahara T., Sasaki T., Murakami H. Enhancement of immunoglobulin productivity of human-human hybridoma HB4C5 cells by basic proteins and poly-basic amino acids. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 2212–2214 (1994).