

高分子薬物の鼻粘膜からの吸収に関する研究



乙第39号

宮本 操

# 高分子薬物の鼻粘膜からの吸収に関する研究

宮本 操

# 目次

## 総論の部

緒言	.....	1
第1章 高分子薬物の経鼻吸収性改善へのアプローチ	.....	4
第1節 経鼻吸収促進を決定する因子の検討	.....	4
1.1 鼻粘膜の透過ルートを考慮した解析	.....	4
1.2 薬物の分子量と極性の検討	.....	6
第2節 高分子モデル化合物の透過に対する吸収促進剤の影響	...	10
第3節 小括	.....	12
第2章 実用性の高い理想的な経鼻吸収促進剤の探索	.....	14
第1節 カチオン性化合物のスクリーニング	.....	14
2.1.1 カチオン性化合物の選定と促進効果の解析法	.....	15
2.1.2 FD-4の経鼻吸収に及ぼすカチオン性化合物の効果	.....	16
2.1.3 カチオン性化合物の安全性	.....	19
2.1.4 経鼻吸収促進剤としてのポリ-L-アルギニンの発見	.....	21
第2節 ポリ-L-アルギニンによる経鼻吸収性の最適化	.....	24
2.2.1 FD-4の吸収に及ぼすポリ-L-アルギニンの濃度と分子量の影響	.....	26
2.2.2 種々分子量のFDsの経鼻吸収に対するポリ-L-アルギニンの効果	.....	31
2.2.3 細胞損傷に対するポリ-L-アルギニン分子量の影響	.....	38
第3節 ポリ-L-アルギニンの経鼻吸収促進メカニズムの考察	.....	39
第4節 小括	.....	42
第3章 ペプチド医薬品の薬動学／薬力学評価による投与設計	.....	43
第1節 経鼻投与での吸収速度と薬理作用の解析	.....	43

3.1.1	$\alpha$ -hANP の i.v.投与での PK モデルの構築	.....	44
3.1.2	$\alpha$ -hANP の i.v.投与での PK-PD モデルの構築	.....	47
3.1.3	$\alpha$ -hANP の経鼻投与での吸収性評価と利尿効果	.....	52
第2節	$\alpha$ -hANP の経鼻投与での利尿効果のシミュレーション	...	54
第3節	考察および小括	.....	56
第4章	ポリ-L-アルギニンを用いた経鼻吸収剤の実用化研究	.....	58
第1節	$\alpha$ -hANP への応用	.....	58
4.1.1	ポリ-L-アルギニン併用による利尿効果	.....	59
4.1.2	PK-PD モデルの検証	.....	61
第2節	サケカルシトニンへの応用	.....	62
第3節	顆粒球コロニー刺激因子への応用	.....	65
第4節	小括	.....	68
結 論		.....	70
謝 辞		.....	73

## 実験の部

第1章	実験の部	.....	75
第2章	実験の部	.....	79
第3章	実験の部	.....	82
第4章	実験の部	.....	86
引用文献		.....	89

# 総論の部

# 総論の部

## 緒言

鼻粘膜は、生理活性ペプチドおよびタンパク性薬物のデリバリーに有用なルートの一つとして注目され、点鼻製剤として酢酸デスマプレシン、酢酸ナファレリンや酢酸ブセレリンなどが日本をはじめ<sup>1,2)</sup>、諸外国においてすでに臨床に使用されている。しかし、注射剤に比較してこれら点鼻製剤の生物学的利用率は必ずしも高いとはいえず、限られた成分に限定されているのが現状である。

鼻粘膜は多列状の、繊毛を有する円柱上皮からなり吸収に関与する表面積が大きく、粘膜下の毛細血管が豊富であるため、投与した低分子薬物の吸収性は高い。また、吸収した薬物を直接全身循環に送ることができるため、肝臓での初回通過効果を回避できる<sup>3)</sup>利点も有している。そこで、これらの鼻粘膜の吸収面の特徴を活かした、より大きな分子量のペプチドおよびタンパク性薬物の鼻粘膜吸収製剤の開発がさらに望まれている。しかしながら、高分子薬物の吸収性は低いため、ペプチドおよびタンパク性薬物の製剤設計において、なんらかの吸収性の改善が必要である。

吸収性の制御策として、代謝酵素阻害剤を用いた高分子薬物の安定化<sup>4-6)</sup>、微粒子システムや粘性ゲルを用いた鼻腔内滞留性の増強<sup>7-12)</sup>および吸収促進剤による吸収速度の増大が考えられる<sup>13-19)</sup>。吸収促進剤のスクリーニングはいままで多くの研究者により検討されてきたが、吸収の大幅な増加がみられる反面、ほとんどの促進剤は安全性の点で課題を有していて、実用化に至っていないのが現状である<sup>20)</sup>。

従来から検討されてきた化学的促進剤は様々な薬物の鼻粘膜吸収を促進するものの、内皮細胞の損傷や鼻粘膜への刺激を引き起こすことが知られている。Hosoyaら<sup>21)</sup>は、*in vitro*でのUssingチャンバー法にてモデル薬物として分子量約1万のFITC-dextran (FD-10)を用いて、これら化学的促進剤(界面活性剤、胆汁酸塩、脂肪酸、キレート剤)のウサギ摘出鼻粘膜の透過促進効果が鼻粘膜から漏出した膜成分とよく相関することを報告した。同様な相関関係はラットの小腸、大腸とCaco-2細胞単層を用いても得られており<sup>22-24)</sup>、これらの促進剤は

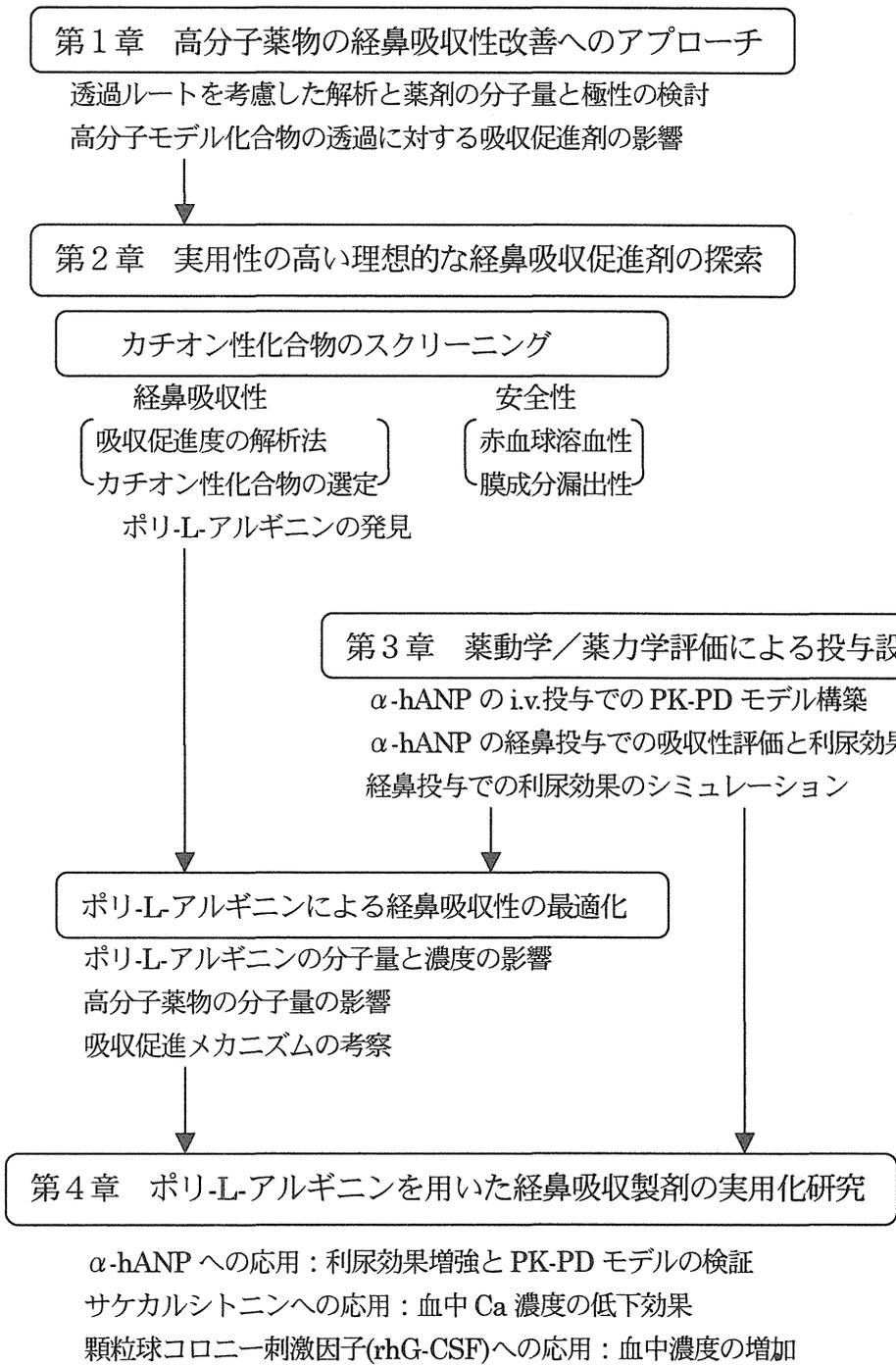
薬理的に効果を十分発揮させることができる濃度で用いると内皮細胞に損傷を与えることが知られていた。

こうした中、カチオン性の多糖類であるキトサンが粘膜傷害性をほとんど示さずに生理活性医薬品の鼻粘膜吸収性を著しく改善できることが報告された<sup>25)</sup>。そこで、著者はカチオン性物質が組織学的レベルで著しい損傷を起こすことなく、ペプチド性薬物の鼻粘膜吸収を高めることのできる吸収促進剤になり得ると考え、本研究を開始するに至った。

最終ターゲットはペプチドおよびタンパク性薬物の実用化可能な経鼻吸収剤の投与設計とした。吸収性改善研究のアプローチ法の1つとして、粘膜透過性をモデル透過物質の分子量に対しプロットすることにより分子量依存回帰曲線を求め、吸収促進剤適用後の促進効果の上昇から検討する手法が考えられる。すなわち、高分子薬物のモデル物質として酵素的に非分解性とみなせる FITC-dextran を用い、その分子量を変化させて吸収関連指標との関係を回帰曲線にてあらわす。これをコントロールとして吸収促進剤の適用により、回帰曲線のベースラインを上方に引き上げる化合物を探索する手法である。経鼻吸収での吸収関連指標として、*in vitro* 系では透過係数(P)、また *in vivo* 系ではバイオアベイラビリティ(F) が考えられた。同時に、細胞傷害性の評価方法を確立したうえで安全性面からの検討を行い、高い吸収性と安全性を兼ね備えた新しいタイプの吸収促進剤のスクリーニングをカチオン性化合物にて開始した。

本研究では、第1章において *in vitro* 系にて高分子薬物の経鼻吸収性改善へのアプローチ法の検討を行い、検討の方向性の妥当性を検証した。第2章において実用性の高い理想的な経鼻吸収促進剤の探索を、第1節にて；カチオン性化合物のスクリーニングおよび新しいタイプの経鼻吸収促進剤の発見を、第2節にて；見い出したポリ-L-アルギニンによる経鼻吸収性の最適化を検討した。第3章において製剤設計に必要な薬動学／薬力学の検討を行い、第4章においてペプチド医薬品の経鼻吸収性改善による実用化研究を  $\alpha$ -hANP 等をモデル薬物として用いたポリ-L-アルギニンの併用効果検討を行い、実用製剤化への基盤研究とした。

次頁に本研究の構成について概略した。



# 第 1 章 高分子薬物の経鼻吸収性改善へのアプローチ

鼻粘膜から薬物が吸収されるためには薬物と鼻粘膜の両者の諸因子が関与すると考えられる。すなわち、薬物では分子量（分子サイズ）、脂溶性、極性、電荷などがあり、粘膜では粘膜の組織学的構造、生理機能およびタンパク分解酵素を含めた薬物代謝などが考えられ、薬物はこれらの諸因子が複雑に絡み合って吸収されることになる。

種々化合物の経鼻吸収性について、既に *in vivo* にてラットを用いた経鼻吸収実験が行われ、吸収率と分子量の両対数との間に負の相関関係が成り立つことが報告されている<sup>19,26-29</sup>。種々溶媒中での薬物の拡散と分子量の関係が報告されており<sup>30,31</sup>、その結果は薬物の鼻粘膜あるいはその間隙部の透過性に分子量が大きく影響していることを示している。

本章では、高分子薬物の鼻粘膜の透過ルートを考慮した仮説式を立て、それを *in vitro* における鼻粘膜透過性に対する透過物質の分子量の影響および極性の影響を併せて検証する。その上で、経鼻吸収性改善へのアプローチとして吸収促進剤の添加時の変化を吸収性と安全性面から検討した。

## 第 1 節 経鼻吸収促進を決定する因子の検討

### 1.1 鼻粘膜の透過ルートを考慮した解析

鼻粘膜上皮細胞層には基底膜近傍の基底細胞、繊毛細胞、粘液分泌を行う杯細胞、無繊毛細胞が存在し、それらが一層の上皮細胞層を形成している。それぞれ隣接する細胞と *tight junction*、*adhesion belt*、*gap junction* および *desmosome* の接合部によって接着されている。これらのうち *tight junction* が最も堅固な構造を持ち細胞内への異物の進入を防ぐ機能を持つことから、細胞間隙を介する物質移動の律速部位と考えられている。

Marttin ら<sup>32</sup>は、*in vivo* ラット鼻腔内投与での種々分子量の *fluorescein isothiocyanate-labeled dextran* (*FITC-dextran* ; *FD*) の鼻粘膜透過ルートを共焦点顕微鏡を用いて視覚的に明らかにした。この高分子モデル薬物 *FD* の輸送は主に *paracellular* ルートを經由し、細胞が損傷を受けると *transcellular* ルートの

輸送が促進されたと報告している。そこで、Marttin らの結果を以下のように透過に関する仮説式を立ててその検証を試みた。

すなわち、透過物質が鼻粘膜を透過するルートとしては、上皮細胞実質部分を通る transcellular ルートと上皮細胞の間隙部を通る paracellular ルートの二つを考え、これらのルートが並列に存在し、間隙部の曲路が無視できると仮定した。この時、全透過係数  $P_{total}$  は次式によって与えられる。

$$P_{total} = (1 - \alpha)P_{trans} + \alpha P_{para} \quad (1)$$

$$= (1 - \alpha)D_{trans} K / h + \alpha D_{para} / h \quad (1)$$

ここで、 $P_{trans}$  は transcellular を透過する薬物の透過係数、 $P_{para}$  は paracellular を透過する薬物の透過係数、 $\alpha$  は全透過面積に対する間隙部の有効面積率、 $D_{trans}$  は膜中の拡散係数、 $D_{para}$  は paracellular 部の拡散係数、 $K$  は 粘膜 / medium 分配係数、 $h$  は透過距離である。

Grün ら<sup>30)</sup>や Flynn ら<sup>31)</sup>によれば溶媒中の拡散係数と分子量 (MW) の間には負の関係があり、それらは(2)式で表されることが知られている。

$$D = b MW^a \quad (2)$$

ここで  $a$  ( $a < 0$ )、 $b$  は定数である。

ペプチドやタンパク性薬物を含む高分子はその分子サイズが大きく、水溶性であるため細胞膜に分配しにくいということから主に paracellular ルートを透過し、transcellular ルートの透過は極めて少ないか、または無視できるとして  $(1 - \alpha) \ll \alpha$  と仮定すると(1)式は(3)式に変形できる。

$$P_{total} = P_{para} = \alpha D_{para} / h \quad (3)$$

この(3)式に(2)式を代入して対数をとると(4)式に変形できる。

$$\log P_{total} = a \log MW + \log (\alpha b / h) \quad (4)$$

(4)式は分子量の対数値と透過係数の対数値は直線関係にあり、(4)式の直線関係が得られれば透過物質は paracellular ルートを通っているものと考えられる。

一方、鼻粘膜は他の粘膜と比べより leaky であると考えられているが、弱解離性の低分子薬物にとっては、transcellular ルートによる輸送も非常に重要である。仮にこれら低分子薬物の輸送が主に transcellular ルートとし、 $\alpha \ll (1-\alpha)$  と仮定すると(1)式は(5)式に変形できる。

$$P_{\text{total}} = P_{\text{trans}} = (1-\alpha)D_{\text{trans}} K / h \quad (5)$$

一般に低分子薬物の分子量は 100~500 であるので、分子量の違いによる拡散係数  $D_{\text{trans}}$  の差が分配係数の差よりもそれほど大きくないと仮定し、 $D_{\text{trans}}$  を一定とみなして(5)式の対数をとると(6)式に変形できる。

$$\log P_{\text{total}} = \log K + \log [(1-\alpha)D_{\text{trans}} / h] \quad (6)$$

(6)式は分配係数の対数値と透過係数の対数値は直線関係にあることを示し、(6)式の直線関係が得られれば透過薬物は主に transcellular ルートを通っているものと考えられる。

## 1.2 薬物の分子量と極性の検討

(4)式および(6)式の検証のため、鼻粘膜透過性に対する透過物質の極性の影響と分子量の影響を検討した。透過物質の極性評価の指標としてはオクタノール/リンゲル液 分配係数の対数 ( $\log K_{\text{or}}$ ) を用いた。検討に用いた透過物質(薬物)の略名および構造式を Fig.1 に、またそれらの分子量 (MW) と  $\log K_{\text{or}}$  値を Table 1 に示した。Fig.1 の透過物質を用いて、ウサギ摘出粘膜を用いた in vitro 透過実験より得られた結果を基に、 $\log K_{\text{or}}$  と  $\log P$  の関係と  $\log MW$  と  $\log P$  の関係を求めた。

Fig.2 にモデル薬物の  $\log P_{\text{total}}$  と  $\log K_{\text{or}}$  の関係を示す。 $\log P_{\text{total}}$  と  $\log K_{\text{or}}$  の間に直線関係が認められ ( $r^2 = 0.556$ )、これら低分子化合物は transcellular ルートを通ることがわかった。低分子薬物の脂溶性の増加とともに透過係数が

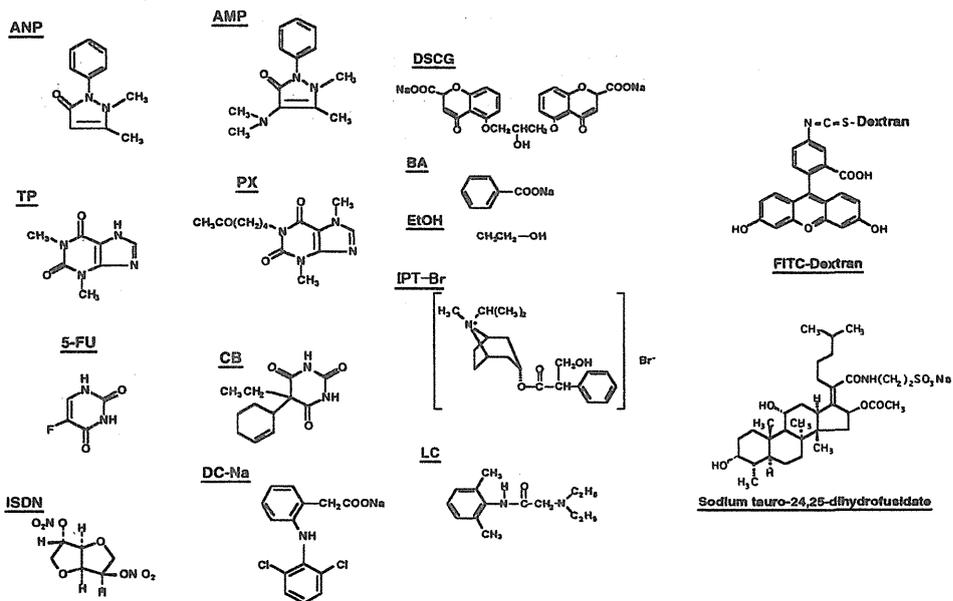


Fig.1 Chemical structures of drugs used in this study.

Table 1 MW and log Kor of drugs used in this study

No.	Drug	Abbreviation	MW	log Kor
1	Ethanol	EtOH	46.10	- 0.220
2	5-Fluorouracil	5-FU	130.08	- 0.999
3	Sodium Benzoate	BA	144.11	- 1.84
4	Theophylline	TP	180.17	- 0.111
5	Antipyrine	ANP	188.23	0.313
6	Aminopyrine	AMP	231.29	0.952
7	Isosorbide Dinitrate	ISDN	236.14	1.22
8	Cyclobarbitol	CB	236.26	1.62
9	Lidocaine	LC	243.34	2.25
10	Pentoxifylline	PX	278.31	0.387
11	Diclofenac Sodium	DC-Na	318.18	0.669
12	Ipratropium Bromide	IPT-Br	412.4	- 1.23
13	Disodium Cromoglycate	DSCG	512.3	- 3.21
	FITC-Dextran	FD	4400-71200	-----

大きくなる傾向がみられたが、分配の差ほど透過係数の差が大きくはなく、Huangら<sup>33)</sup>の in situ 実験系での報告と類似していた。このことは、各々の薬物の分子量の違いによる膜中の拡散性の影響が考えられ、それら薬物の分子量を加味しての検討も必要と考えられる。また、鼻粘膜を一枚の脂溶性膜と考えた場合、膜の脂溶性度はさほど高くないと思われ、paracellular ルートを介する輸送を無視できないと考えられた。

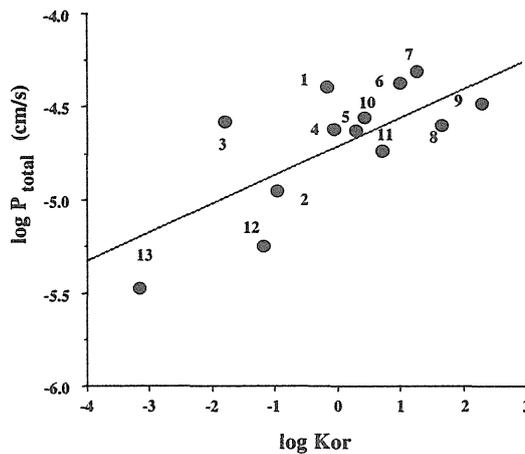


Fig.2 Relationship between  $\log P_{total}$  and  $\log Kor$ .

$$y = 0.1718 x - 4.670 \quad (r^2 = 0.556)$$

1; EtOH, 2; 5-FU, 3; BA, 4; TP, 5; ANP 6; AMP, 7; ISDN,  
8; CB, 9; LC, 10; PX, 11; DC-Na, 12; IPT-Br, 13; DSCG

Fig.3 に得られたモデル薬物の  $\log P$  と  $\log MW$  の関係を示す。FDs (MW 4.4、9.4、36.5、71.2 kDa ; FD-4、FD-10、FD-40、FD-70) についての結果は分子量の増加により透過係数の減少がみられ、両者の対数値の間には良好な直線関係がみられた( $r^2 = 0.984$ )。この結果は仮説の検証式、(4)式と一致することから、これら FDs は paracellular ルートを通っているものと推察された。すなわち、Marttinら<sup>32)</sup>が共焦点顕微鏡を用いて報告した、FDの鼻粘膜透過ルートの視覚的検討結果を仮説から数式化して実験的に検証できた。

モデル薬物 FDs のデータから求めた回帰直線(FD line)を、Fig.3 中に実線で示した。この分子量範囲では低分子薬物のうち比較的分子量が大きく水溶性の高い IPT-Br、DSCG が FD line 上に位置したが、ほとんどの低分子薬物の透過係数は FDs から求めた回帰直線からほとんど上方に位置した。このことから、上方に位置した薬物はその脂溶性を含む他の物理化学的因子、特に Fig.2 から

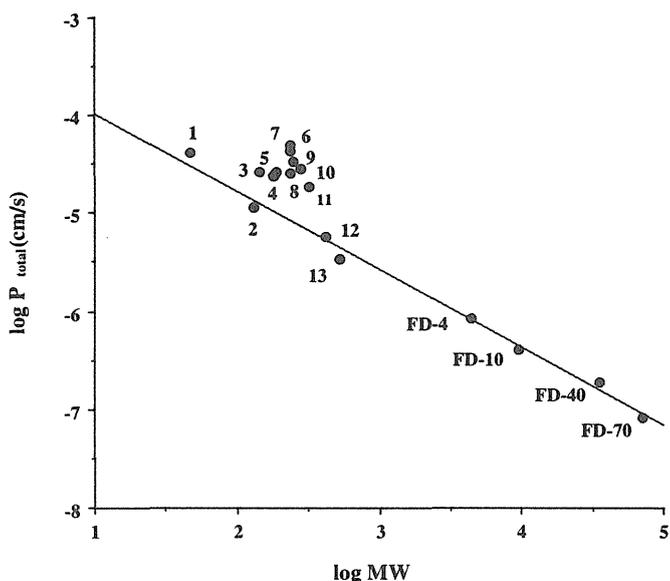


Fig.3 Relationship between  $\log P_{total}$  and  $\log MW$ .

$$y = -0.7912x - 3.193 \quad (r^2 = 0.984)$$

See the legends in Fig.2.

わかる様に膜への分配性が関与し、透過が上昇したものと考えられた。一方、下方に位置した薬物に関しては、水素結合によるみかけの分子量(分子容積)の増加、細胞間隙中の電気的な反発、細胞内への蓄積などが原因と考えられる。DSCG に関しては、medium 中ではイオン型で存在するため膜に分配しにくいと考えられ、しかも分子内にマイナスチャージを 2 つ持つために細胞間隙部のマイナス電荷と電気的な反発を受け透過係数が FD line より下になったと考えられた。

## 第2節 高分子モデル化合物の透過に対する吸収促進剤添加の影響

鼻粘膜透過促進剤としてはキレート剤、界面活性剤、胆汁酸塩およびその誘導体、酵素阻害剤などが研究されている<sup>34-36</sup>が、前節の結果から高分子化合物の吸収促進は paracellular の透過を促進させる必要がある。Baldwin ら<sup>37</sup>は Caco-2 細胞単層を用いて FD-4 の蛍光を共焦点顕微鏡にて観察し、胆汁酸誘導体の sodium tauro-dihydrofusidate (STDHF) が paracellular の透過を促進すると報告している。そこで、モデル促進剤として STDHF を用いて、透過物質の透過挙動の変化を検討した。

FD-10 の透過促進効果が最大となった STDHF 濃度を 0.5% に固定して、様々な薬物の透過実験を行ったときの薬物分子量の対数値と透過係数の対数値との関係を Fig.4 に示した。

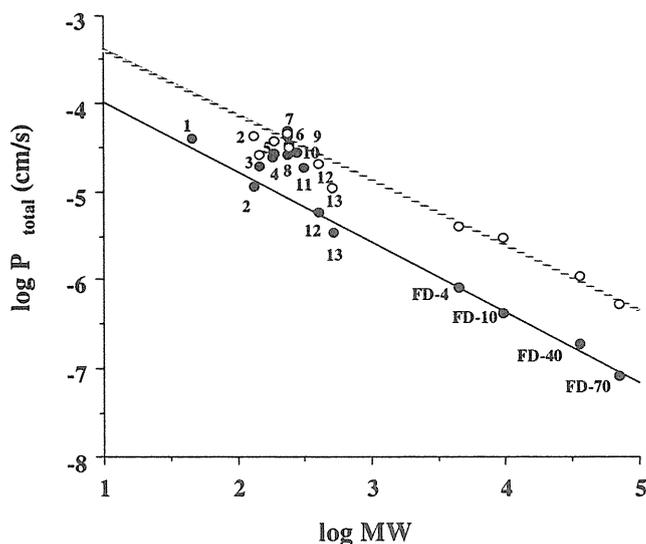


Fig.4 Relationship between  $\log P_{\text{total}}$  and  $\log MW$ .

Solid and dotted lines are regression ones from  $P_{\text{total}}$  of FITC-dextrans with and without STDHF treatment, respectively.

●; without STDHF, Solid line  $y = -0.7912x - 3.193$  ( $r^2 = 0.984$ )

○; with STDHF, Dotted line  $y = -0.7382x - 2.644$  ( $r^2 = 0.976$ )

See the legends in Fig.2.

FDs の透過において STDHF を併用投与した前後の FDs 透過量の変化(増加)を、Fig.5 a に示した。FDs と同様に 5-FU、IPT-Br、DSCG では透過係数が増加したのに対し、BA、ANP、ISDN、LC では透過性に有意な変化は認められなかった (Fig.4)。FDs から求めた paracellular の透過を表していると考えられる回帰直線( $r^2 = 0.984$ )と STDHF を適用した回帰直線( $r^2 = 0.976$ )を比較すると STDHF 処理での傾きはほとんど変わらないものの、薬物の分子量を 1 と仮定したとき得られる切片は大きくなり、これにより透過係数は大きくなった。(2)、(4)式からわかるように、切片は透過物質と細胞間隙の広さに関連した反発を表す  $b$ 、有効面積率  $\alpha$  および膜厚  $h$  に関係しているの、傾きが変わらなかったことも考え合わせると、STDHF の処理により、特に、間隙部の有効透過面積と拡散距離の減少が起こったものと考えられた。

さらにこの透過現象を明らかにするため、STDHF 投与前後の膜抵抗 ( $R_m$ ) の変化を調べ、その結果を Fig.5 b に示した。STDHF 処理により FDs の透過が増加した時、膜抵抗は急激に減少したことから、STDHF は paracellular ルートを拡大したか、または、そのルートに相当するような pore ルートを形成したものと考えられた。この結果は仮説式からの検証結果を支持しており、透過促進ルートの検討において今回の解析法は有用と考えられた。

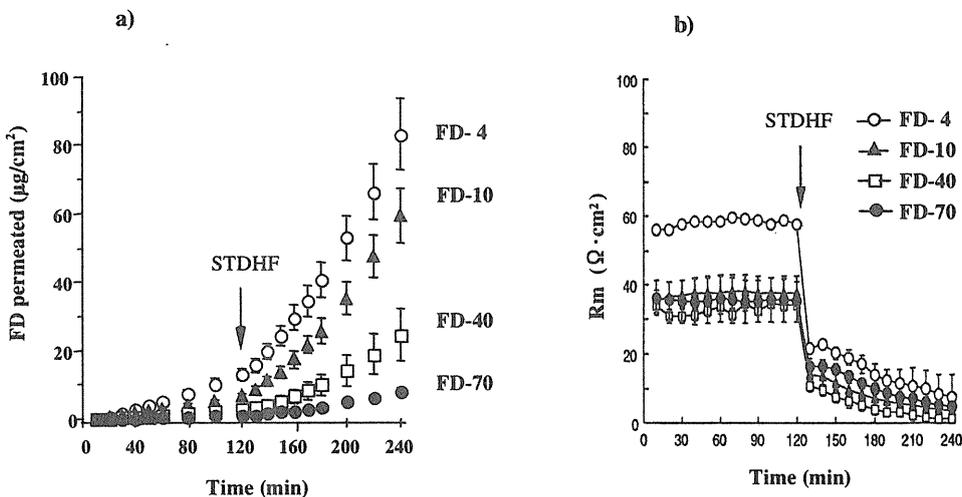


Fig. 5 Permeation profile of FDs (a) and resistance of nasal membrane (b).

一方、低分子薬物の透過性がほとんど変化しなかったことから、低分子薬物の透過は paracellular ルートの透過促進の影響を受けなかったと考えられた。

Fig.6 に FD-10 のリンゲル液を 4 時間適用 (a ; コントロール) した後、2 時間 FD-10 のリンゲル液適用後に 0.5%STDHF 含有リンゲル液を 2 時間適用 (b ; 処理) したときの電子顕微鏡写真を示す。上皮細胞上の繊毛の脱落および上皮細胞の萎縮が起こっていた。これは、0.5%STDHF を適用することで、鼻粘膜にダメージを与えていることを示している。この結果は Baldwin ら<sup>37)</sup>の結果と一致した。

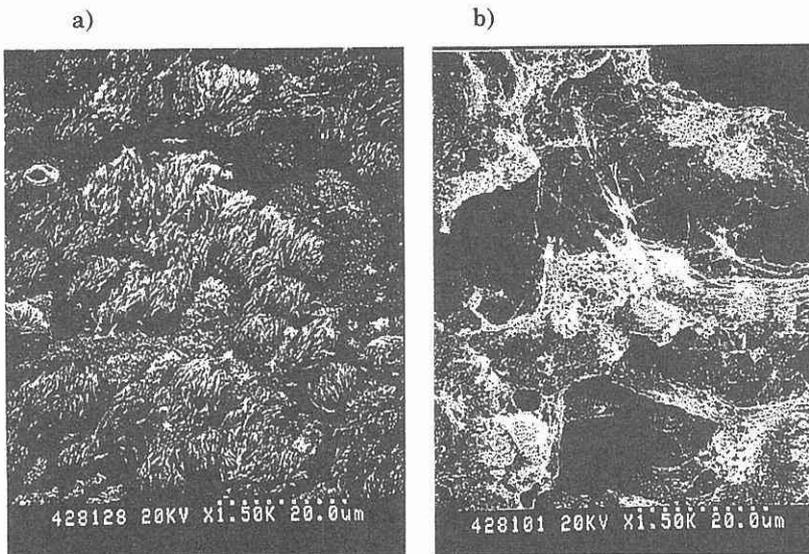


Fig. 6 Scanning electron micrograph of nasal membrane.

a) control      b) 0.5%STDHF treatment for 2hr

### 第 3 節 小括

ウサギ摘出鼻粘膜を用いて薬物の分子量と薬物透過性との関係を検討した結果、FDs(FD-4、FD-10、FD-40、FD-70)、IPT-Br(臭化イプラトロピウム)および DSCG (クロモグリク酸ナトリウム) の log P 値は log MW と直線的な関係

を示した。この回帰直線はこれらの薬物が理論的に paracellular を透過する可能性を示した。胆汁酸誘導体 STDHF をモデル促進剤として用いた場合、得られた直線は傾きが変わらず y 切片のみが大きくなり（直線は上方に平行的にシフト）、STDHF は主に有効透過面積を増加させたと考えられた。電気生理学的な膜抵抗の低下結果も加味して、paracellular 経路の吸収促進が増大することが確認された。

このことから生理活性ペプチドやタンパク性薬物の経鼻吸収の吸収性改善研究のアプローチ法の1つとして、透過性をモデル透過物質の分子量に対しプロットすることにより分子量依存回帰曲線を求め、吸収促進剤適用後の回帰曲線の変化から促進剤の促進プロファイルを判定する手法の有用性が示された。

また、鼻粘膜の顕微鏡観察から、モデル促進剤である STDHF で処理すると鼻粘膜に対して著しい損傷を与えることがわかった。このように、高分子薬物の経鼻粘膜製剤を開発するためには、高分子薬物の paracellular 経路の吸収を高め、かつ鼻粘膜に対して安全性の高い吸収促進剤を見出す必要があると考えられた。

## 第2章 実用性の高い理想的な経鼻吸収促進剤の探索

### 第1節 カチオン性化合物のスクリーニング<sup>38)</sup>

第1章で示した通り、ペプチドおよびタンパク性薬物の経鼻吸収剤の実用化にむけて、吸収性を高め、なおかつ、安全性が高い新たな吸収促進剤を見出す必要がある。高分子量薬物の経鼻吸収性を高めるためにはparacellularルートの透過を促進させる吸収促進剤の選定が必要であり、第1章 第3節で用いた胆汁酸誘導体のSTDHFでは透過を促進させるものの内皮細胞の損傷を引き起こした。このように従来より多くの化学的促進剤について検討がなされてきたが<sup>39)</sup>、鼻粘膜上皮細胞に対し影響を及ぼし刺激と損傷を引き起こすため、実用化に至っていない。

Illum ら<sup>25)</sup>はカチオン性多糖類であるキトサンが、鼻粘膜や内皮細胞への損傷を起こすことなく、インスリンの経鼻吸収性を改善することを報告している。この促進効果は mucociliary clearance を抑えることと鼻粘膜細胞間隙の tight junction の開口作用の組み合わせによると推測している。Schipper ら<sup>40)</sup>は Caco-2 細胞単層を用いて共焦点イメージング法でキトサンを併用した時の FD-4 の透過ルートを推定している。FD-4 の透過は cell-cell junction の開口により、paracellular ルートで増大することを示した。キトサンのプラス電荷は粘膜表面のマイナス電荷と相互作用し、キトサンは高分子量ゆえに膜を透過せず膜表面にとどまり、その結果として上皮細胞に損傷を与えなかったと推測している。一方、キトサンの溶解性は生理的条件下（中性領域）では非常に悪いため、溶解性を改善した N-trimethyl chitosan chloride を新規促進剤として用いて Caco-2 細胞単層にて検討した報告がある<sup>41)</sup>。この改良キトサンは pH4.0 から pH9.0 の両 pH サイドとも溶解し、Caco-2 細胞単層を介しての FD-4 透過を著しく促進した。また、カチオン性ポリマーのプロタミンが糸球体細胞培養単層にてアルブミンの濾過を促進<sup>42)</sup>し、さらに poly-L-lysine および poly-L-arginine が気道上皮細胞にてマンニトールの透過を増加<sup>43)</sup>させた報告もある。

一方、気管支喘息での気道過敏症患者の気道上皮細胞中に好酸球由来のカチオン性タンパク質 major basic protein (MBP; 分子量 13.8 kDa)が多く存在する

ことが明らかにされ<sup>44)</sup>、この MBP が気道上皮を損傷させる結果、気道応答性が増加するものと考えられていた。しかし、Coyle ら<sup>45)</sup>が MBP のカチオンの性質を保有するモデル化合物として poly-L-arginine と poly-L-lysine を MBP の代替として検討した結果、気道上皮は傷害を全く受けず粘膜損傷が認められなかったと報告している。

これらのことはカチオン性物質がペプチド薬物の鼻粘膜吸収を組織学的レベルで著しい傷害を起こすことなく高めることのできる吸収促進剤になり得る可能性を示唆している。そこで、イオン相互作用がトリガーとなっていると考え細胞表面のマイナス電荷に対し効果的にインタラクションできる化合物、すなわちカチオン性化合物の中に最適な促進剤が存在すると発想した。

そこで、粘膜透過研究において多く使用されており酵素的に非分解性であるとみなせるFD (FD-4 ; 分子量4400) を水溶性の高分子モデル透過物質として選択して、経鼻吸収におけるカチオン性化合物のスクリーニングを行なった。さらに鼻粘膜の安全性についても病理、組織学的見地からスクリーニングを実施し、促進効果と安全性の両者を兼ね備えた吸収促進剤の探索を行なった。

### 2.1.1 カチオン性化合物の選定と促進効果の解析法

カチオン性吸収促進剤候補物質として塩基性アミノ酸のL-arginine (L-Arg)、L-lysine (L-Lys)、分子量の異なる3種のpoly-L-arginine (MW 8.9、45.5、92.0 kDa ; poly-L-Arg(10)、(50)、(100))、陽イオン界面活性剤の塩化セチルピリジニウム (CPCL) および多糖類のキトサンを選定した。これまで検討されてきた促進剤として界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、polyoxyethylene-9-lauryl ether (BL-9)、胆汁酸およびその誘導体塩のsodium glycocholate (GC)、sodium taurocholate (TC)、sodium deoxycholate (DC)、sodium taurodyhydrofusidate (STDHF)、キレート剤のethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)、リン脂質のlysophosphatidylcholine (LPC) を選定して比較評価した。

吸収促進効果を吸収促進比としてあらわし、以下で計算した。

$$\text{吸収促進比} = \text{AUC}_{\text{treat}} / \text{AUC}_{\text{control}} \quad (7)$$

ここで、 $AUC_{treat}$  と  $AUC_{control}$  はそれぞれ促進剤存在下および非存在下で FD-4 を i.n.投与した後の FD-4 血漿中濃度-時間 (0-9h) 曲線下面積 (AUC) である。i.n.投与は Hirai ら<sup>46)</sup>の方法に従った。

バイオアベイラビリティ  $F_{0-9h}$  および  $F_{\infty}$  はそれぞれ  $AUC_{i.n.0-9h}$  および  $AUC_{i.n.\infty}$  の  $AUC_{i.v.\infty}$  に対する百分率から計算により求めた。また、 $AUC_{i.n.0-9h}$  は FD-4 の i.n.投与後の FD-4 血漿中濃度-時間 (0-9h) 曲線下面積を示し、 $AUC_{i.n.\infty}$  と  $AUC_{i.v.\infty}$  はそれぞれ FD-4 の i.n.および i.v.投与後の FD-4 血漿中濃度-時間 (0- $\infty$ ) 曲線下面積を示す。解析の詳細は第2節にて示した。

### 2.1.2 FD-4 の経鼻吸収に及ぼすカチオン性化合物の効果

Fig.7 に FD-4 鼻腔投与での各種カチオン性化合物と SDS(従来の促進剤の1例)を併用して鼻腔内投与した際の FD-4 の血漿中濃度-時間曲線を示す。

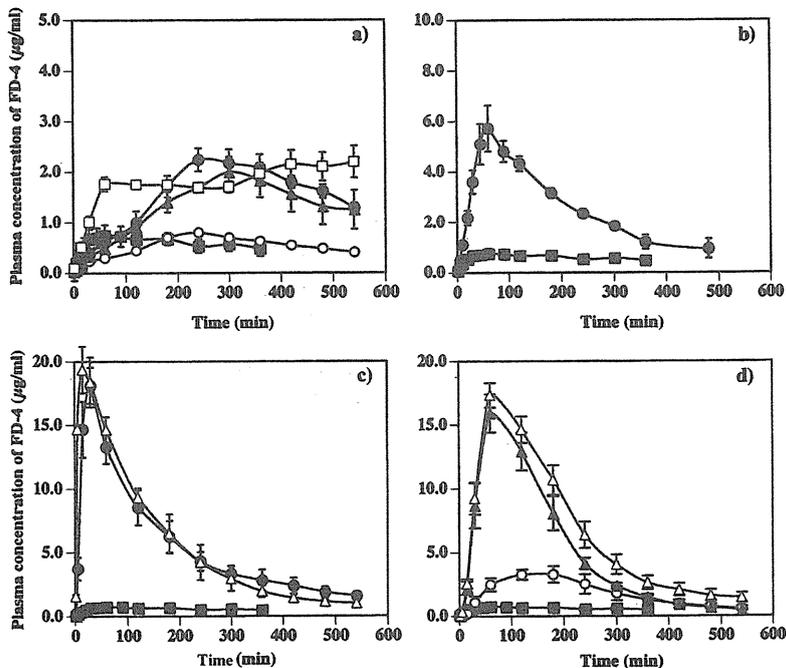


Fig.7 Plasma concentration of FD-4 after i.n. administration of FD-4 with various cationic compounds and SDS in rats.

■, control; (a) ○, 2% L-Arg; ▲, 5% L-Arg; ●, 10% L-Arg; □, 10% L-lys; (b) ●, 0.5% chitosan; (c) ●, 0.5% CPCL; △, 0.5% SDS; (d) ○, 0.5% poly-L-Arg (10); ▲, 0.5% poly-L-Arg (50); △, 0.5% poly-L-Arg (100).

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

Table 2 に FD-4 の i.v. と i.n. 投与時の薬動学的パラメーターを示す。全てのカチオン化合物は程度は異なるものの FD-4 の吸収を促進した。5%または 10% L-Arg 溶液による FD-4 の経鼻投与後の血漿中濃度は FD-4 単独(コントロール)の約 2 倍であり、そのレベルは 9 時間続いた。10% L-Lys を適用した場合もこれらのプロファイルとほとんど同じであった (Fig.7a)。ポジティブコントロールの 0.5%キトサンでは、FD-4 の  $C_{max}$  がコントロールの 7 倍高く、バイオアベイラビリティ  $F_{0-9h}$  は 22.4%であった (Fig.7b、Table 2)。キトサンでのこれらの結果は Illum ら<sup>25)</sup>の報告と類似していた。彼らの報告ではインスリンの経鼻投与において、キトサンの 0.5%以上の濃度での促進強度に本質的な差はみられなかった。0.5%CPCL において、FD-4 はすばやく吸収され  $C_{max}$  は 23 倍高かった。CPCL 処理による FD-4 の血漿中濃度とその速度論的パラメータは 0.5% SDS 適用時と非常によく似ていた (Fig.7c)。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of FD-4 after i.n. administration with various enhancers in rats

Enhancer	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{max}$ (min)	$AUC_{0-9h}$ ( $\mu\text{g min/ml}$ )	$AUC_{\infty}$ ( $\mu\text{g min/ml}$ )	$F_{0-9h}^a$ (%)	$F_{\infty}^b$ (%)
i.v. (3.3 mg/kg)	–	–	447.8 $\pm$ 37.7	450.3 $\pm$ 38.5	–	–
i.n. control (33 mg/kg)	0.8	113	292.6 $\pm$ 48.5 <sup>c</sup>	402.3 $\pm$ 122.2 <sup>c</sup>	6.5	8.9
2% L-arg	1.0	240	289.3 $\pm$ 14.9	–	6.4	–
5% L-arg	2.2	285	711.5 $\pm$ 68.4	–	15.8	–
10% L-arg	2.3	240	834.4 $\pm$ 99.9	1304.9 $\pm$ 155.5	18.5	29.0
10% L-lys	2.3	480	740.6 $\pm$ 211.1	–	16.4	–
0.5% poly-L-arg (10)	3.7	120	980.2 $\pm$ 163.8	1114.3 $\pm$ 193.9	21.8	24.7
0.5% poly-L-arg (50)	16.6	80	2785.3 $\pm$ 164.4	2831.0 $\pm$ 163.4	61.9	62.9
0.5% poly-L-arg (100)	17.3	60	3253.3 $\pm$ 116.2	3545.5 $\pm$ 93.4	72.2	78.7
0.5% CPCL	18.4	25	3036.1 $\pm$ 362.0	3533.4 $\pm$ 827.8	67.4	78.5
0.5% chitosan	5.7	60	1097.4 $\pm$ 107.8 <sup>c</sup>	1341.6 $\pm$ 82.4 <sup>c</sup>	24.4	29.8
0.5% SDS	19.4	15	3104.2 $\pm$ 323.2	3233.7 $\pm$ 563.2	68.9	71.8
0.5% STDHF	15.1	10	1634.9 $\pm$ 157.5	1706.5 $\pm$ 154.7	36.3	37.9
0.5% BL-9	9.7	26	1403.3 $\pm$ 23.5	1610.1 $\pm$ 133.8	31.2	35.8
0.5% LPC	12.7	25	1357.6 $\pm$ 177.5	1375.4 $\pm$ 182.5	30.1	30.5
0.5% DC	12.3	30	1818.2 $\pm$ 397.5	1934.9 $\pm$ 378.7	40.4	43.0
0.5% TC	1.0	195	339.1 $\pm$ 165.2	408.1 $\pm$ 183.2	7.5	9.1
0.5% GC	1.2	400	398.4 $\pm$ 203.2	–	8.8	–
0.5% EDTA	1.3	120	255.3 $\pm$ 88.1	316.7 $\pm$ 92.5	5.7	7.0

<sup>a</sup>  $F_{0-9h} = [AUC_{i.n.0-9h} / (AUC_{i.v.\infty} \times 10)] \times 100$ .

<sup>b</sup>  $F_{\infty} = [AUC_{i.n.\infty} / (AUC_{i.v.\infty} \times 10)] \times 100$ .

<sup>c</sup> Plasma concentration of FD-4 was extrapolated exponentially until 9 h or infinite time ( $\infty$ ) and then the AUC was calculated.

従来の吸収促進剤の中で SDS、DC、BL-9、LPC、STDHF は FD-4 の吸収を促進させたが、GC、TC、EDTA は促進させなかった。SDS はこれらの促進剤の中で最も高い  $F_{0-9h}$  値を示した。Poly-L-Arg の場合、促進効果はその分子量に依存した (Fig.7d)。 $T_{max}$  は 60-120 分で、CPCL や数種の従来の促進剤よりも長かった。FD-4 の高い血漿レベルはコントロールより長時間維持され、中でも 0.5%poly-L-Arg(100)はカチオン性化合物と従来の促進剤の中で最大の促進効果を示した。

Fig.8 に種々化合物の促進比 ( $AUC_{0-9h}$ ) を示す。促進効果のランクオーダーは 0.5% poly-L-Arg(100)  $\cong$  0.5% CPCL  $\cong$  0.5% SDS  $>$  0.5% poly-L-Arg (50)  $>$  0.5% DC  $\cong$  0.5% STDHF  $>$  0.5% BL-9  $\cong$  0.5% LPC  $>$  0.5% キトサン  $\cong$  0.5% poly-L-Arg(10)  $>$  10% L-Arg  $\cong$  10% L-Lys  $>$  0.5% GC  $\cong$  0.5% TC  $\cong$  0.5% EDTA であった。以上より、今回スクリーニングしたカチオン性化合物の中で、促進効果の観点から CPCL および poly-L-Arg が高分子量化合物の経鼻吸収の改善に対して有望と思われた。

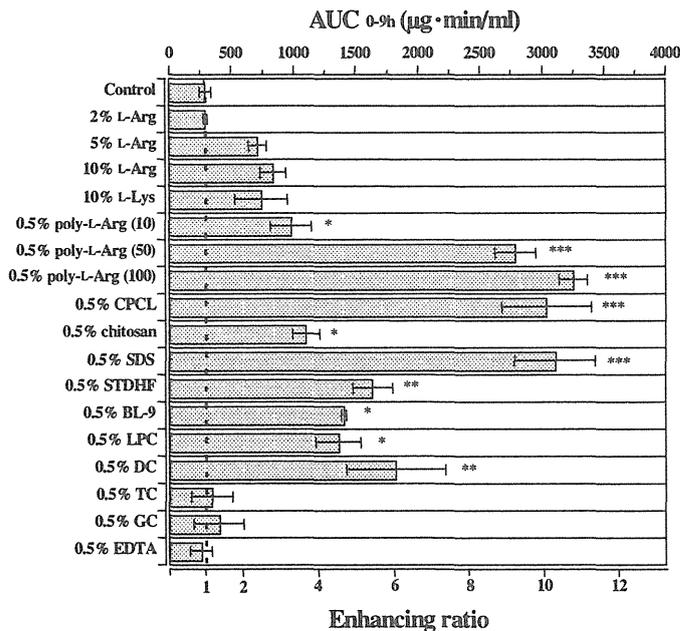


Fig.8 Enhancing ratio ( $AUC_{0-9h}$ ) of FD-4 absorption by cationic compounds and classical enhancers. Each data column represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=3-6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control for  $AUC_{0-9h}$ .

### 2.1.3 カチオン性化合物の安全性

#### 1) カチオン性化合物のラット赤血球溶血性への影響

赤血球膜を生体膜モデルとして、膜の破壊すなわち溶血作用を指標として促進剤候補物質の安全性を検討した。溶血作用は Gill ら<sup>47)</sup>の方法を採用した。吸収促進剤の適用濃度は全て 0.5%としたが、L-Arg と L-Lys はさらに 10%濃度まで実施した。Fig.9 に従来種々の促進剤とカチオン性化合物の処理によるラット赤血球の溶血率を示す。

0.5%の SDS、DC、STDHF は赤血球の溶血率がかなり高く、一方、0.5%の GC、TC、EDTA ではほとんど溶血がおこらなかった。Gill らの結果では DC と STDHF のような胆汁酸塩で溶血性が低濃度で起こることを示していたが、これは本試験結果と一致した。さらに、Hosoya ら<sup>21)</sup>の報告でのこれら促進剤を適用した際の鼻粘膜表面 SEM 観察像から求めた上皮細胞の脱離程度のランクオーダーとも一致していた。

カチオン性化合物の中で 0.5%CPCL は 70%の溶血性を示した。L-Lys と L-

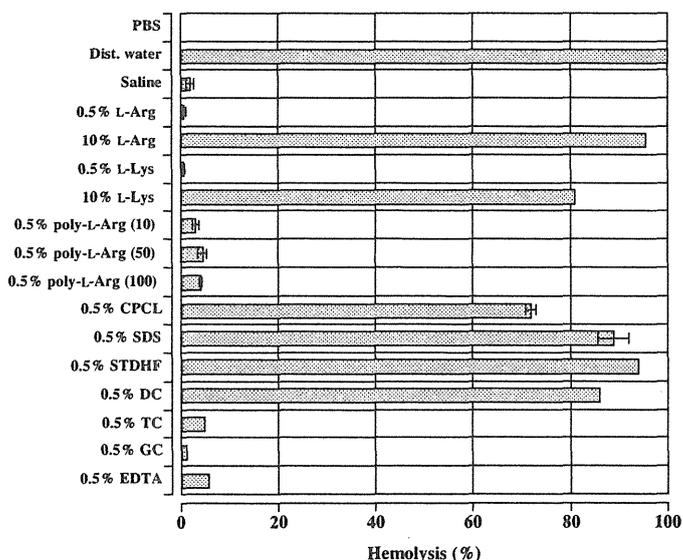


Fig.9 Hemolytic effects of cationic compounds and classical enhancers on rat erythrocytes.

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

Arg は 10%の濃度で適用すると、高い赤血球の溶血を示した。しかし、0.5% L-Arg の適用では、ほとんど溶血は認められなかったことから、溶血はこれらアミノ酸溶液が高張であったことに関係していると考えられる。他方、0.5%の poly-L-Arg(10)、(50)、(100)は、赤血球の溶血をほとんど起こさなかった。

## 2) 膜成分の漏出に対するカチオン性化合物の影響

Poly-L-Arg の促進作用が粘膜組織損傷と関連があるか否かをさらに検討するため、鼻粘膜上皮組織からの膜成分の漏出量を Ussing 拡散セルを用い in vitro 系で測定した。促進剤を 0.5%濃度で適用し、膜成分としてはタンパク質、リン脂質および乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定した。ウサギ摘出鼻粘膜からのそれらの漏出が 2 時間まで徐々に起こったため、各膜成分の漏出量は 2 時間値の重量 (mg) と LDH 活性 (U/l) にてあらわした。

Fig.10 にタンパク質、リン脂質、LDH のウサギ摘出鼻粘膜からの漏出に対するカチオン性化合物および従来の促進剤の影響について示した。タンパク質とリン脂質の漏出について、従来の促進剤の中で SDS、DC、BL-9、LPC、STDHF は漏出量が多く有意差が認められたが、EDTA と TC は有意差は認められなかった。GC はリン脂質のみを有意に漏出した。DC、STDHF、LPC の適用による LDH 活性もまた、コントロールより有意に高かった(Fig.10c)。タンパク質、リン脂質、LDH のウサギ摘出鼻粘膜からの漏出のランクオーダーは従来の促進剤の種類により異なっていた。Hosoya らが報告しているように、この差異は FD-4 吸収の促進メカニズムに関係していると考えられる。

他方、カチオン性化合物のうち、0.5%CPCL での漏出タンパク質量はコントロールより有意に高く BL-9 と SDS に類似していた。それに対し、0.5%poly-L-Arg(100)はリン脂質漏出が若干認められたものの 0.5%poly-L-Arg(10)、(50)、(100)によるタンパク質、リン脂質、LDH の漏出はコントロールとほとんど同じであった。

以上の結果より、経鼻吸収促進剤の安全性は、吸収促進剤のラット赤血球溶血性に及ぼす影響とウサギ摘出鼻粘膜からの粘膜成分 (タンパク質、リン脂質、LDH) の漏出性に及ぼす影響を検討することで評価できることが示された。カチオン性化合物の中でもとりわけ安全性の観点から poly-L-Arg は非常に有望であることがわかった。

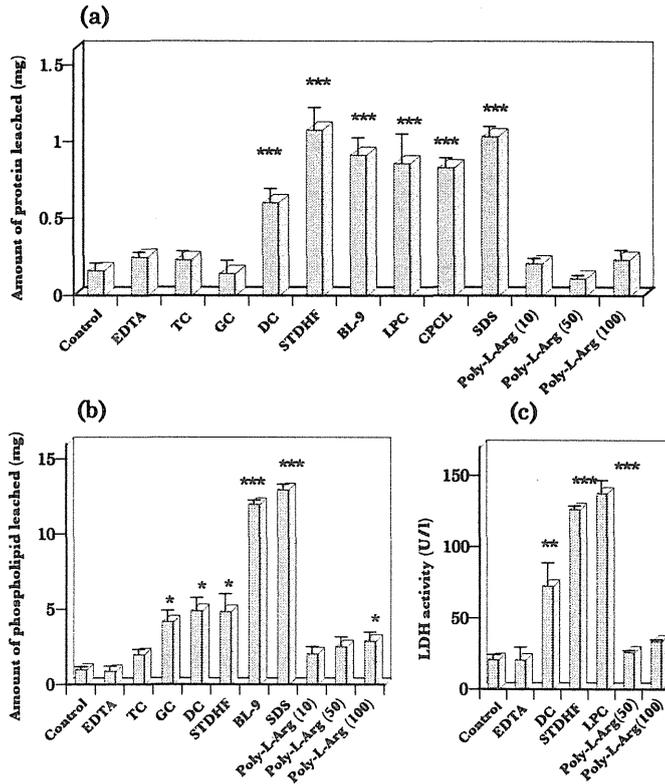


Fig.10 Leaching effects of cationic compounds and classical enhancers on isolated rabbit nasal mucosa. (a) Protein leaching; (b) Phospholipid leaching; (c) LDH leaching. Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-9). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 compared with control.

#### 2.1.4 経鼻吸収促進剤としてのポリ-L-アルギニンの発見

Fig.11 に吸収促進効果と溶血作用の関係を示す。SDS、DC、STDHF の促進比は 6~11 であったが、溶血性は 80%以上であった。また、GC、TC、EDTA は促進効果も溶血作用もほとんど示さなかった。カチオン性化合物のうち CPCL は SDS と同様に強い溶血作用を示し、溶血作用の面から吸収促進剤としての使用は難しいと考えられた。10%濃度の L-Lys、L-Arg は若干の促進効果があるものの強い溶血性を示した。

一方、poly-L-Arg(10)、(50)、(100)は顕著な赤血球の溶血はなく FD-4 の経鼻吸収を極めて強く促進した。

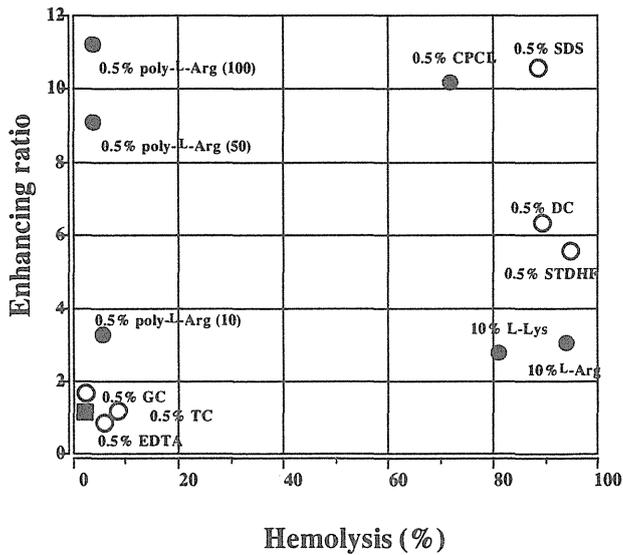


Fig. 11 Relationship between hemolysis and enhancing effect.

■, control; ○, classical enhancer; ●, cationic compound.

Fig. 12 に吸収促進効果と鼻粘膜成分の漏出性の関係を示す。従来の促進剤において、タンパク質、リン脂質、LDH の漏出は FD-4 の促進比または  $AUC_{0-9h}$  と良く相関しており、相関係数はそれぞれ 0.783( $p < 0.05$ )、0.827( $p < 0.01$ )、0.794( $p < 0.05$ )であった。

同様な関係がラットの小腸、大腸膜においても認められている<sup>22-24)</sup> ことも考慮すると、従来より検討されてきた促進剤は種差や粘膜部位に関係なく促進効果と漏出性が良く相関すると考えられた。以上より、これら促進剤を用いた場合、高分子量薬物の吸収を粘膜の損傷なしに高めることは難しいと思われた。

カチオン性化合物の中で、CPCL は SDS と同様な結果を示し、Fig. 12a に示す従来の促進剤の相関ラインの近くに位置した。この結果は、CPCL は安全性の観点からこの濃度では使用することが難しいことを示している。これに対して poly-L-Arg(10)、(50)、(100)の促進比は相関ラインからシフトしており、タンパク質、リン脂質、LDH の漏出は FD-4 の吸収促進に比べて極めて少なかった。

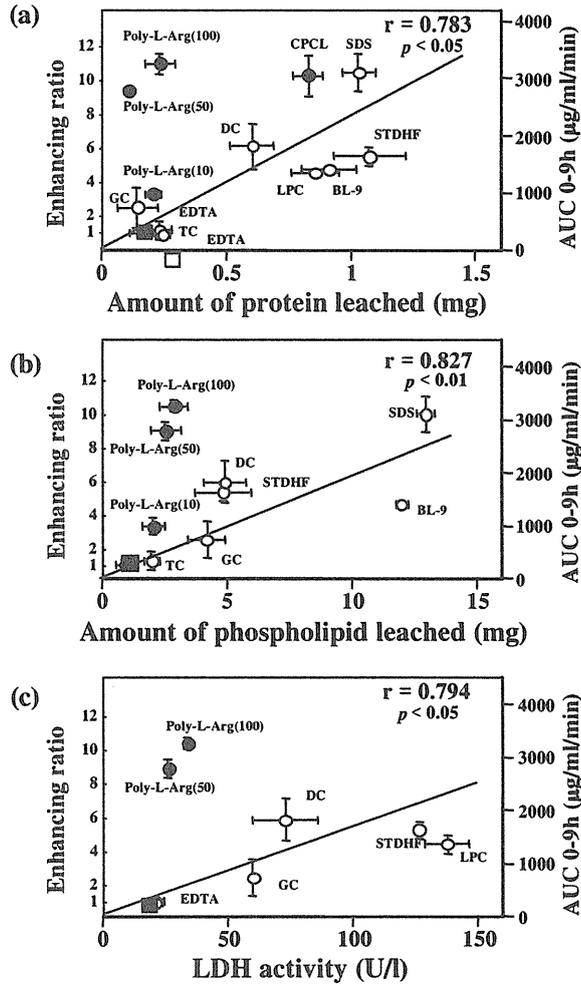


Fig.12 Relationships between leaching and enhancing effects.

■, control; ○, classical enhancer; ●, cationic compound.

(a) Protein leaching versus enhancing ratio (AUC<sub>0-9h</sub>);

(b) Phospholipid leaching versus enhancing ratio (AUC<sub>0-9h</sub>);

(c) LDH leaching versus enhancing ratio (AUC<sub>0-9h</sub>).

Regression lines were calculated using data from classical enhancers.

Each data point represents the mean ± S.E. (n=3-9).

これらの結果から、鼻粘膜投与において吸収促進効果と安全性を兼ね備えた吸収促進剤として極めて有望な poly-L-Arg を見出した<sup>48)</sup> といえる。

## 第2節 ポリ-L-アルギニンによる経鼻吸収性の最適化<sup>49,50)</sup>

第1節から poly-L-Arg は高分子量モデル薬物の経鼻吸収性を粘膜の損傷を起こすことなく著しく高めることができることを見い出した。本節では poly-L-Arg の吸収性と安全性に及ぼす様々な因子の影響をさらに詳細に検討した。

データ解析は第2章第1節と同様に以下の通り実施した。i.v.投与 (0.3、2.0、3.3 mg/kg) と i.n. (33 mg/kg)投与後の FD-4 の血漿中濃度は無限大時間 ( $\infty$ ) まで外挿して求め、また、FD-4 単独 (コントロール) の i.n.投与による FD-4 の血漿中濃度は 9h と無限大時間 ( $\infty$ ) までの2種類を求めた。FD-4 の消失キネティクスは i.v.投与の3投与量とも2-コンパートメントモデルにフィットした。Fig.13 に FD-4 の投与量と i.v.適用後の血漿中濃度の時間 (0- $\infty$ ) 曲線下面積 ( $AUC_{i.v.\infty}$ ) 間の関係を示した。 $AUC_{i.v.\infty}$  は投与量に比例し、これらの3投与量では消失キネティクスは線形であり、また薬動学的パラメータもほとんど同一であった。33 mg/kg での i.v.投与の  $AUC_{i.v.\infty}$  は  $AUC_{i.v.\infty}$  と投与量間の直線関係から外挿によって計算した。この直線関係から計算されたラット (250g) での i.v. 33 mg/kg 投与後の  $AUC_{i.v.\infty}$  は  $4600 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  であった。

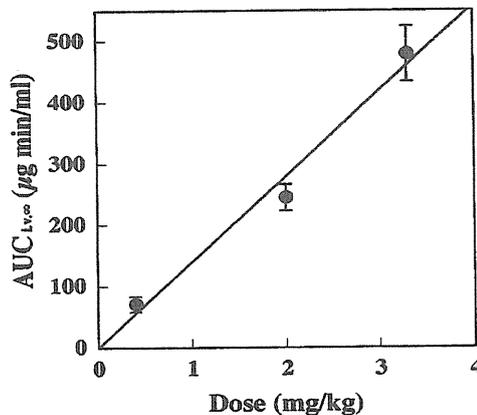


Fig.13 Relationship between the administration dose and  $AUC_{i.v.\infty}$  after intravenous administration of FD-4.

Administration doses were 0.3, 2.0 and 3.3 mg/kg in rats.

The  $AUC_{i.v.\infty}$  was proportional to the dose administered ( $r^2=0.979$ ).

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

そこで、0-9hでのバイオアベイラビリティ  $F_{0-9h}$  と  $0-\infty$ でのバイオアベイラビリティ  $F_{\infty}$ は次式で計算した。

$$F_{0-9h} (\%) = \frac{AUC_{i.n.0-9h}}{4600_{(\mu g \cdot \text{min/ml})}} \times 100 \quad (8)$$

$$F_{\infty} (\%) = \frac{AUC_{i.n.\infty}}{4600_{(\mu g \cdot \text{min/ml})}} \times 100 \quad (9)$$

ここで、 $AUC_{i.n.0-9h}$ はFD-4のi.n.投与でのFD-4血漿中濃度-時間(0-9h)曲線下面積であり、 $AUC_{i.n.\infty}$ はi.n.投与でのFD-4血漿中濃度-時間(0- $\infty$ )曲線下面積を示す。

FD-4のi.v.投与での吸収プロファイルはi.n.とi.v.データからデコンボリューション法にて計算し、i.v.データから得られた消失パラメータは $k_{12}$ 、 $k_{21}$ 、 $k_{el}$ 、 $Vd_{ss}$ 、 $CL$ がそれぞれ $0.154 \text{ min}^{-1}$ 、 $0.0621 \text{ min}^{-1}$ 、 $0.136 \text{ min}^{-1}$ 、 $45.3 \text{ ml/rat}$ 、 $1.77 \text{ ml/min}$ であった。最大吸収速度(MAR)は吸収プロファイルの傾きの最大値から求めた。

適用濃度でのpoly-L-Argの全プラス電荷密度(電荷数/ml)とpoly-L-Argの1分子当りのプラス電荷密度(電荷数/molecule)は以下の式から求めた。

$$\text{全電荷密度 (数/ml)} = \frac{\text{poly-L-Arg 濃度}}{\text{L-Arg 分子量}} \times 6.02 \times 10^{23} \quad (10)$$

$$\text{モル当りの電荷密度 (数/molecule)} = \frac{\text{poly-L-Arg の分子量}}{\text{L-Arg 分子量}} \quad (11)$$

ここで、poly-L-ArgのL-Argモノマーの分子量は156.2(L-Arg残基相当)であり、L-Argモノマーユニットにはプラス電荷1つを持つと仮定した。また、poly-L-Argのモル濃度は平均分子量を用いて計算した。

### 2.2.1 FD-4 の吸収に及ぼすポリ-L-アルギニンの濃度と分子量の影響<sup>49)</sup>

Fig.14 に poly-L-Arg の分子量および適用濃度を変えて i.n.併用投与した際の FD-4 の血漿中濃度-時間曲線を示し、Table 3 に得られた薬物動態学的パラメータを示す。

Poly-L-Arg は、0.25%poly-L-Arg(10)と 0.1%poly-L-Arg(50)を除き、適用した全ての濃度で FD-4 の吸収を促進したが、促進強度は異なっていた。FD-4 の  $AUC_{i.n.0-9h}$  と  $C_{max}$  は poly-L-Arg 濃度の増加と共に大きくなった。鼻粘膜での吸収促進比は poly-L-Arg の分子量に依存し、poly-L-Arg(50)と poly-L-Arg(100)では poly-L-Arg(10)よりも効果的であった。

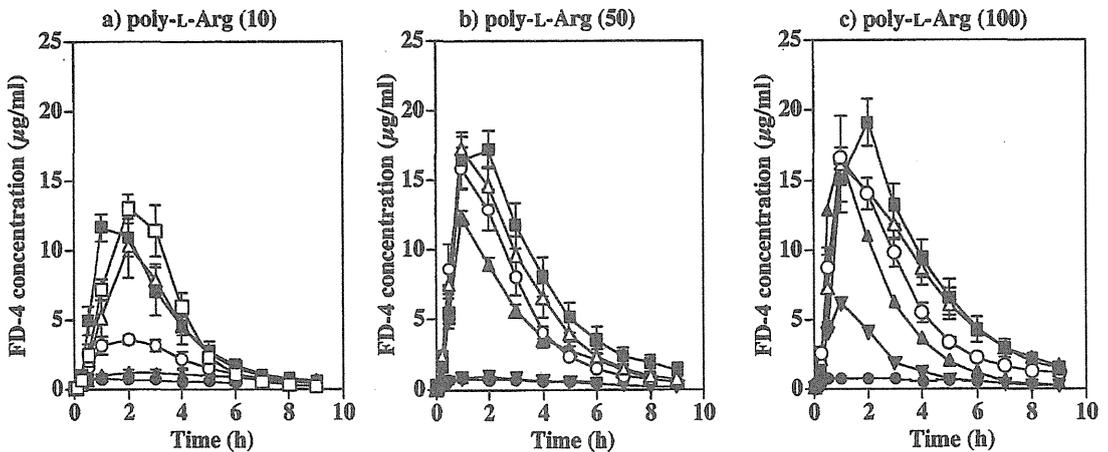


Fig.14 Plasma FD-4 concentration after intranasal co-administration with poly-L-Args of different molecular weight to rats.

- a) poly-L-Arg (10): ●, control; ▲, 0.25% (w/v); ○, 0.5% (w/v); △, 1.0% (w/v);  
 ■, 2.0% (w/v); □, 5.0% (w/v);
- b) poly-L-Arg (50): ●, control; ▼, 0.1% (w/v); ▲, 0.25% (w/v); ○, 0.5% (w/v); △, 1.0% (w/v);  
 ■, 2.0% (w/v);
- c) poly-L-Arg (100): ●, control; ▼, 0.1% (w/v); ▲, 0.25% (w/v); ○, 0.5% (w/v); △, 1.0% (w/v);  
 ■, 2.0% (w/v)

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

Table 3

Pharmacokinetic parameters of FD-4 after i.n. administration to rats

FD-4 Dose (33 mg/kg)	C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	T <sub>max</sub> (min)	AUC <sub>i.n. 0-9h</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ )	AUC <sub>i.n. 0-∞</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ )	F <sub>0-9h</sub> <sup>a</sup> (%)	F <sub>∞</sub> <sup>b</sup> (%)
control	0.8	120	292.6 ± 48.5	402.3 ± 122.2	6.4	8.7
Poly-L-Arg (10)						
0.25%	1.2	120	457.8 ± 107.3	603.3 ± 150.1	10.0	13.1
0.5%	3.5	120	965.3 ± 100.7 <sup>d</sup>	1083.6 ± 121.3 <sup>c</sup>	21.0	23.6
1.0%	10.3	120	2006.7 ± 316.3 <sup>d</sup>	2103.5 ± 337.7 <sup>d</sup>	43.4	47.0
2.0%	11.7	60	2395.4 ± 340.4 <sup>d</sup>	2507.5 ± 348.6 <sup>d</sup>	52.1	54.5
5.0%	13.0	120	2471.3 ± 291.1 <sup>d</sup>	2504.7 ± 291.7 <sup>d</sup>	53.7	54.5
Poly-L-Arg (50)						
0.1%	1.0	120	277.1 ± 23.2	320.5 ± 40.3	6.0	7.0
0.25%	12.3	60	2213.6 ± 157.7 <sup>e</sup>	2324.7 ± 123.8 <sup>e</sup>	48.1	50.5
0.5%	15.9	60	2785.2 ± 134.3 <sup>e</sup>	2867.4 ± 144.4 <sup>e</sup>	60.5	62.3
1.0%	17.4	60	3380.1 ± 366.5 <sup>e</sup>	3470.5 ± 380.8 <sup>e</sup>	73.5	75.4
2.0%	17.9	60	4000.6 ± 345.1 <sup>e</sup>	4357.3 ± 447.3 <sup>e</sup>	87.0	94.7
Poly-L-Arg (100)						
0.1%	6.1	60	875.2 ± 38.1 <sup>c</sup>	902.8 ± 38.4 <sup>c</sup>	19.0	19.6
0.25%	16.5	60	2602.3 ± 477.1 <sup>c</sup>	2648.1 ± 492.0 <sup>e</sup>	56.6	57.6
0.5%	16.6	60	3252.4 ± 133.6 <sup>e</sup>	3485.9 ± 107.2 <sup>e</sup>	70.7	75.8
1.0%	16.1	60	3970.9 ± 120.8 <sup>e</sup>	4274.3 ± 145.6 <sup>e</sup>	86.3	92.9
2.0%	19.2	120	4282.6 ± 438.0 <sup>e</sup>	4504.4 ± 495.7 <sup>e</sup>	93.1	97.9

<sup>a</sup> F<sub>0-9h</sub>(%) = [AUC<sub>i.n. 0-9h</sub>/4600 ( $\mu\text{g min/ml}$ )] × 100.

<sup>b</sup> F<sub>∞</sub>(%) = [AUC<sub>i.n. ∞</sub>/4600 ( $\mu\text{g min/ml}$ )] × 100.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$ , <sup>d</sup>  $p < 0.01$ , <sup>e</sup>  $p < 0.001$  compared with control (Student's *t*-test).

There was a significant difference between AUC<sub>i.n. 0-9h</sub> achieved for poly-L-Args of different molecular weight (two-way ANOVA,  $P < 0.0001$ ).

Fig.15 に FD-4 の F<sub>0-9h</sub> に対する種々 poly-L-Arg 濃度 (全正電荷密度)、モル濃度、poly-L-Arg 分子量 (1 分子当りの正電荷密度) とのそれぞれの関係を示す。F<sub>0-9h</sub> は濃度および poly-L-Arg 全正電荷密度の増加と共に増大した (Fig.14a)。Poly-L-Arg(10) を 5% 濃度で FD-4 に併用投与したとき、F<sub>0-9h</sub> は 53.7% であり、この値は poly-L-Arg(10) の 2% 濃度の値に相当していた (Table 3)。Poly-L-Arg(50) と poly-L-Arg(100) においても、同様な濃度および全正電荷密度依存性がみられた。異なる分子量の poly-L-Arg から得られた AUC<sub>i.n.0-9h</sub> 間には有意差が

あり (変動 two-way 解析、 $P < 0.0001$ )、poly-L-Arg(100)の  $F_{0.9h}$  は同一濃度での poly-L-Arg(50)の値より高かった。高分子量の poly-L-Arg は poly-L-Arg(10)に比べ低いモル濃度で FD-4 の吸収を十分に促進した(Fig.15b)。また、 $F_{0.9h}$  は適用されたそれぞれの濃度での poly-L-Arg の分子量 (1分子当りの正電荷密度)の増加により増大した (Fig.15c)。

これらの結果より、poly-L-Arg の適用濃度は、FD-4 の吸収の促進率を決定する重要な因子の一つであることがわかった。また、みかけ上、全正電荷密度にも依存したが第1節の結果で L-Arg モノマーの適用では 2%の濃度まで促進効果が認められなかったことから、全正電荷密度は最重要因子ではないと考えられる。また、poly-L-Arg 1分子当りの促進強度は、分子量が大きいほど増加すると思われた。

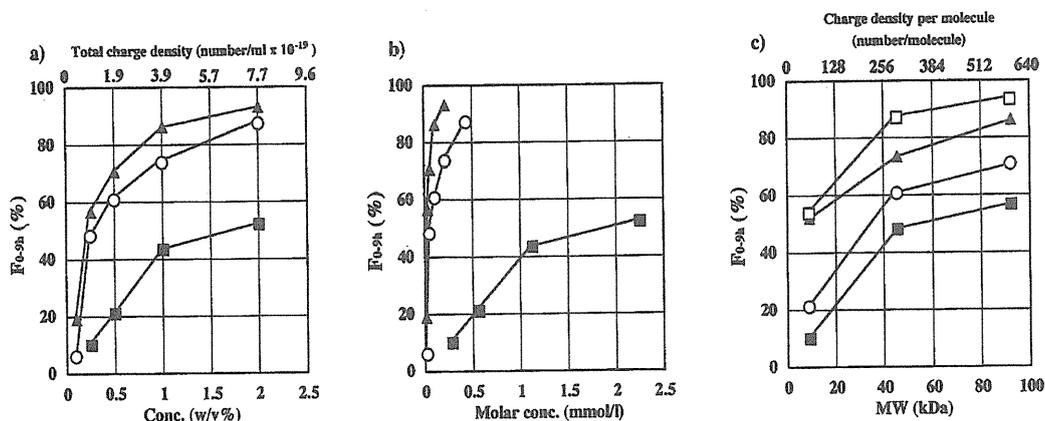


Fig.15 Relationships between the  $F_{0.9h}$  of FD-4 and the concentration (total positive charge) of poly-L-Arg, molar concentration, and molecular weight (charge density per molecule).

- a) concentration (total charge density) versus  $F_{0.9h}$ : ■, poly-L-Arg (10);  
 ○, poly-L-Arg (50); ▲, poly-L-Arg (100);  
 b) molar concentration versus  $F_{0.9h}$ :  
 ■, poly-L-Arg(10); ○, poly-L-Arg (50); ▲, poly-L-Arg (100);  
 c) molecular weight (charge density per molecule) versus  $F_{0.9h}$ : ■, 0.25% (w/v);  
 ○, 0.5% (w/v); ▲, 1.0% (w/v); □, 2.0% (w/v)  
 Each data column represents the mean value (n=3-6).

Fig.16 に FD-4 の最大吸収速度 (MAR) に対する poly-L-Arg の適用濃度 (全正電荷密度)、モル濃度、分子量 (モル当り正電荷密度) それぞれの関係を示す。Poly-L-Arg(10)での FD-4 の MAR は適用濃度に強く依存した。一方、poly-L-Arg(50)と poly-L-Arg(100)では FD-4 の MAR はほとんど同じ傾向を示し、poly-L-Arg(10)に比べ低い濃度でプラトーに達した。MAR において poly-L-Arg(50)と Poly-L-Arg(100)の間に有意差は無かった (Student's t-test  $p>0.05$ )。

一方、分子量と MAR の関係において、0.25%の濃度では、MAR は分子量に依存した。0.5%濃度以上では、poly-L-Arg(10)と poly-L-Arg(50)間では分子量に依存的であったが、poly-L-Arg(50)と(100)間では差が認められなかった。

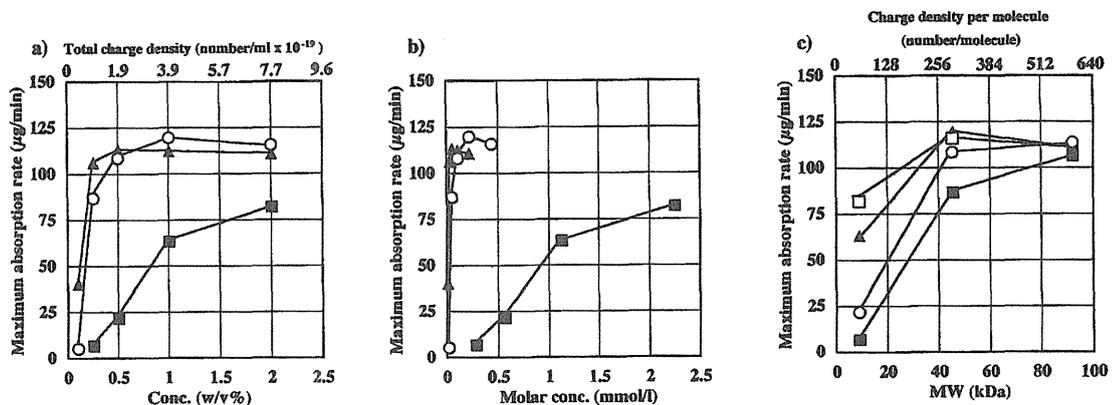


Fig.16 Relationships between the maximum absorption rate (MAR) of FD-4 and concentration (total positive charge) of poly-L-Arg, molar concentration, and molecular weight (charge density per molecule).

- a) concentration (total charge density) versus MAR: ■, poly-L-Arg (10); ○, poly-L-Arg(50); ▲, poly-L-Arg (100);
- b) molar concentration versus MAR: ■, poly-L-Arg(10); ○, poly-L-Arg(50); ▲, poly-L-Arg (100);
- c) molecular weight (charge density per molecule) versus MAR: ■, 0.25% (w/v); ○, 0.5% (w/v); ▲, 1.0% (w/v); □, 2.0% (w/v)

The maximum absorption rate after *i.n.* administration of FD-4 was calculated by means of a deconvolution method using *i.n.* and *i.v.* data, and pharmacokinetic parameters. Each data column represents the mean value (n=3-6).

Fig.17にデコンボリューション法で計算したi.n.投与後のFD-4の典型的な吸収プロファイルを示した。FD-4はコントロール溶液（FD-4単独）ではゼロ次で吸収された(Fig.17a)。しかし、3種の分子量のpoly-L-Argを1.0%濃度で併用投与したとき、いずれもFD-4はlag timeの後、増加した。MARはほとんどのケースでlag time直後に認められていることから、MARは促進強度の指標になると考えられた。また、FD-4吸収の促進効果（MARの大きさと到達した吸収量）はpoly-L-Argの分子量に依存した。FD-4のpoly-L-Arg(100)の併用投与での吸収速度は実験期間内にコントロールレベルまで戻らなかった。一方、poly-L-Arg(50)の適用濃度を変えた場合、0.1%を除きFD-4の吸収は増加し(Fig.17b)、0.25%以上の濃度でのpoly-L-Arg(50)の効果は適用濃度に依存して、長時間持続したが、この時MARはほとんど同一であった。すなわち、促進強度は適用濃度によらず、ほぼ一定であった。同様な傾向がpoly-L-Arg(100)でも認められた。

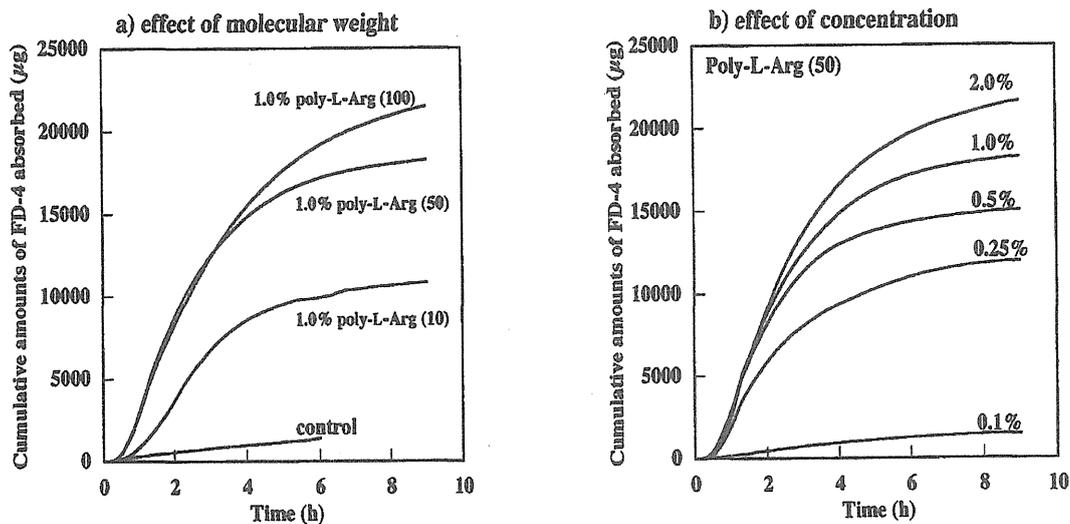


Fig.17 Simulated absorption profiles of FD-4 after i.n. co-administration with poly-L-Arg. The absorption profiles after i.n. administration of ED-4 were calculated by means of a deconvolution method using the i.n. and i.v. data, and pharmacokinetic parameters.

以上の結果を総合すると poly-L-Arg の分子量および 1 分子当りの電荷密度は、促進強度と促進効果のタイムフレームの両方に強く影響を及ぼし、適用濃度は、主に促進効果のタイムフレームに影響していると考えられた。

## 2.2.2 種々分子量の FDs の経鼻吸収に対するポリ-L-アルギニンの効果<sup>50)</sup>

前節で検討した FD-4 に加えさらに分子量の大きな FDs の単独投与での経鼻吸収性の検討を行った。まず、i.v.投与での体内動態をラット単回静脈投与にて検討した。血漿中 FD-10 および FD-40 はいずれも投与初期には速やかに消失し、その後緩やかに消失する二相性の消失パターンを示したが、FD-70 では 1 次消失に近かった。これら FD の体内動態は線形 2-コンパートメントモデルで良好にあらわされた。非線形最小二乗法 (MULTI、Damping Gauss-Newton 法) により FD-10、FD-40、FD-70 および FD-150 の薬動学的パラメータを求めた。

いずれの FD の消失相の消失速度定数 ( $\beta$ )、全身クリアランス ( $Cl_{tot}$ ) もそれぞれの分子量での FD 投与量 (0.2~2.5 mg/ml) に依存せずほぼ一定であり、分布容積も投与量によって大きな変動がみられなかった。また、投与量と  $AUC_{0-9h}$  との関係は FDs 何れも今回試験した投与量範囲内で比例関係が認められ、この濃度範囲において線形性が成立すると考えられた。

また、 $AUC_{0-9h}$  は各分子量の FD の同一投与量で比べると、分子量の増加に伴って大きくなっていることから、分子量が増加するほど消失が遅くなることが認められた。

Fig.18 にラットでの poly-L-Arg(50)を 1.0%濃度で i.n.併用投与した際の分子量の異なる FD 血漿中濃度-時間曲線を示す。poly-L-Arg(100)を 1.0%濃度で適用した場合も推移曲線は Fig.18 とほとんど同一のパターンを示した。Table 4 に FD-4 での前章のデータを含む全実験で得られた FD の薬物速度論的パラメータを示す。

どの分子量の FD においても  $C_{max}$ 、AUC は、poly-L-Arg の併用でコントロールに比べ、著しく増加した。しかし、FD の分子量が増加すると  $C_{max}$ 、AUC は

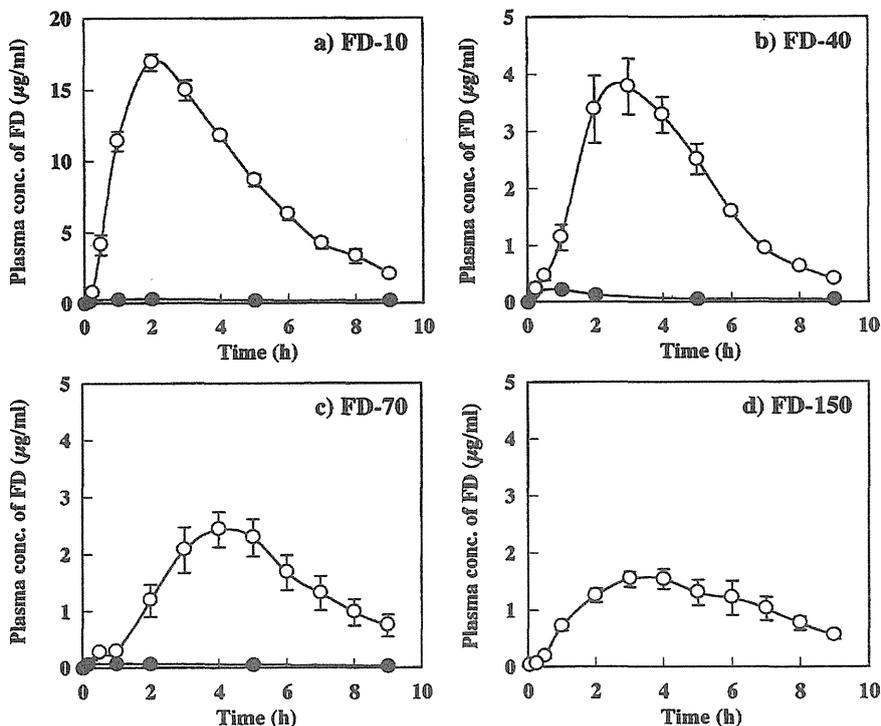


Fig.18 Plasma concentrations of FITC-dextrans after i.n. co-administration with 1.0 w/v% poly-L-Arg (50) to rats.

●: control (FITC-dextrans alone) , ○: with 1.0 w/v% poly-L-Arg (50)  
Each data point represents the mean  $\pm$  S.E (n=3-4).

小さくなり、それは分子量依存的であった。FD-150の血漿中濃度は単独投与では検出されなかったが、poly-L-Argの併用投与で驚くほど高く認められた。全てのFDsの吸収率に関してコントロール(FD単独)とpoly-L-Arg処理の $AUC_{i.n.}$ には有意差が認められた。また、 $AUC_{i.n.0-9h}$ は $AUC_{i.n.}$ と比べると、コントロールでは差が認められたが、poly-L-Argにより吸収促進されるとほぼ近い値に近づく傾向が認められた。

高分子量のFDsにおいて、 $T_{max}$ はpoly-L-Argの併用でコントロールに比べ遅延した。Fig.18からも併用時に吸収のlag timeが認められるため更に詳細に

Table 4 Pharmacokinetic parameters of FITC-dextrans of different molecular weight after i.n. co-administration with poly-L-Arg to rats

FD	enhancer	C <sub>max</sub> (μg/ml)	T <sub>max</sub> (min)	AUC <sub>0-60</sub> <sup>a</sup> (μg·min/ml)	AUC <sub>0-180</sub> <sup>a</sup> (μg·min/ml)	F <sub>0-60</sub> (%)	F <sub>0-180</sub> (%)
FD-4 <sup>b</sup>	control	0.8	120	292.6 ± 48.5	402.3 ± 122.2	6.5	8.9
	0.5% poly-L-Arg (50)	16.6	60	2785.3 ± 164.4 <sup>c</sup>	2831.0 ± 163.4 <sup>c</sup>	61.9	62.9
	1.0% poly-L-Arg (50)	17.4	60	3380.1 ± 366.5 <sup>c</sup>	3470.5 ± 380.8 <sup>c</sup>	73.5	75.4
	1.0% poly-L-Arg (100)	16.1	60	3970.9 ± 120.8 <sup>c</sup>	4274.3 ± 145.6 <sup>c</sup>	86.3	92.9
FD-10	control	0.3	120	194.4 ± 16.6	556.8 ± 19.7	0.91	2.6
	0.5% poly-L-Arg (50)	12.5	120	2925.9 ± 377.0 <sup>c</sup>	3290.6 ± 475.9 <sup>c</sup>	13.7	15.4
	1.0% poly-L-Arg (50)	16.9	120	4645.6 ± 199.9 <sup>c</sup>	5024.7 ± 255.6 <sup>c</sup>	21.8	23.6
	1.0% poly-L-Arg (100)	12.9	120	3469.0 ± 234.0 <sup>c</sup>	4138.0 ± 667.0 <sup>c</sup>	16.3	19.4
FD-40	control	0.2	60	50.7 ± 9.7	124.6 ± 45.5	0.07	0.17
	0.1% poly-L-Arg (50)	1.5	120	405.5 ± 58.1 <sup>c</sup>	546.0 ± 143.0 <sup>c</sup>	0.54	0.73
	0.25% poly-L-Arg (50)	3.4	120	737.8 ± 89.0 <sup>c</sup>	792.8 ± 99.0 <sup>c</sup>	0.98	1.05
	0.5% poly-L-Arg (50)	3.6	180	1040.0 ± 147.5 <sup>c</sup>	1270.2 ± 204.9 <sup>c</sup>	1.38	1.71
	1.0% poly-L-Arg (50)	3.8	180	1045.8 ± 73.8 <sup>c</sup>	1099.5 ± 79.0 <sup>c</sup>	1.39	1.46
	2.0% poly-L-Arg (50)	4.1	180	1130.8 ± 98.5 <sup>c</sup>	1228.7 ± 92.6 <sup>c</sup>	1.51	1.64
	0.1% poly-L-Arg (100)	1.5	120	407.0 ± 28.3 <sup>c</sup>	483.8 ± 40.1 <sup>c</sup>	0.54	0.64
	0.25% poly-L-Arg (100)	2.6	180	644.3 ± 41.2 <sup>c</sup>	746.7 ± 11.5 <sup>c</sup>	0.86	0.99
	0.5% poly-L-Arg (100)	3.2	180	1047.4 ± 125.0 <sup>c</sup>	1179.0 ± 213.0 <sup>c</sup>	1.39	1.57
	1.0% poly-L-Arg (100)	3.5	180	1078.6 ± 66.9 <sup>c</sup>	1124.0 ± 129.0 <sup>c</sup>	1.44	1.50
	2.0% poly-L-Arg (100)	3.7	180	1227.9 ± 139.0 <sup>c</sup>	1309.0 ± 216.0 <sup>c</sup>	1.63	1.74
FD-70	control	0.08	60	23.0 ± 10.1	37.80 ± 19.5	0.02	0.03
	0.5% poly-L-Arg (50)	2.4	300	838.1 ± 100.3 <sup>c</sup>	972.1 ± 89.5 <sup>c</sup>	0.59	0.69
	1.0% poly-L-Arg (50)	2.4	240	760.2 ± 127.9 <sup>c</sup>	926.7 ± 185.0 <sup>c</sup>	0.54	0.65
	1.0% poly-L-Arg (100)	2.2	180	697.4 ± 58.7 <sup>c</sup>	864.2 ± 89.9 <sup>c</sup>	0.49	0.61
FD-150	control <sup>e</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	---	---	---	---
	0.5% poly-L-Arg (50)	1.3	180	491.0 ± 87.1	671.3 ± 101.8	0.18	0.25
	1.0% poly-L-Arg (50)	1.5	240	570.7 ± 56.7	722.6 ± 35.4	0.21	0.27
	1.0% poly-L-Arg (100)	1.5	240	511.0 ± 67.0	654.7 ± 50.5	0.19	0.24

<sup>a</sup>Mean ± SE, n = 3 - 4

<sup>b</sup>Data from Miyamoto et al. (2001)

<sup>c</sup>P < 0.001, <sup>d</sup>P < 0.01 compared with control (Student's t-test)

<sup>e</sup>Plasma concentration of FD-150 was undetectable.

<sup>f</sup>Not detected

There was no significant difference between the AUC<sub>0-180</sub>s of FD-40 obtained for poly-L-Arg (50) and poly-L-Arg (100) (two-way ANOVA, P > 0.05).

検討した。FD の単回静脈内投与実験で得られた速度論的パラメータと FD 鼻腔内投与後の血中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 の吸収プロファイルを算出した。その結果を Fig.19 に示す。

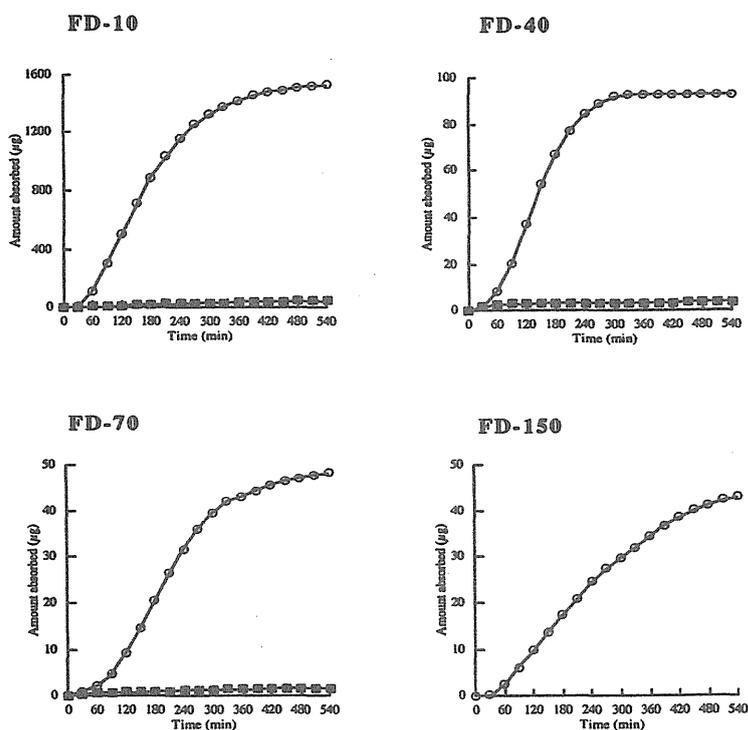


Fig.19 Absorption profiles of FDs after i.n. administration in rats.

■: control ; ○: 1% poly-L-Arg, mean±S.E., n=3-6

いずれのFDのコントロールにおいても投与直後からほぼ直線的に増加し、lag timeはほとんど認められなかった。一方、poly-L-Argを併用すると累積吸収量はどの分子量のFDにおいても増加したが、lag timeが観察された。これは、FD投与初期に吸収速度が経時的に増加していることを示している。どの場合も前節のFD-4の時と同様に時間の経過とともに吸収速度は減少し、poly-L-Argの促進効果には時間依存性が認められた。

$T_{max}$ はFD-10のとき、poly-L-Argと併用してもコントロールと変わらず、FD-40およびFD-70ではコントロールよりも延長したため、この $T_{max}$ の延長を考察した。どのFDの場合においても個々の全身クリアランス( $CL_{tot}$ )は変

わらなかったため、poly-L-Arg 併用による  $T_{max}$  の延長は吸収速度定数  $k_a$  が小さくなったことを意味することになる。FD の細胞間隙路の透過が Fick の法則に従うとすると、 $k_a$  を支配する重要なパラメータは、拡散係数  $D$ 、分配係数  $K$  および膜厚  $L$  である。このうち  $K$  と  $L$  は、poly-L-Arg で処理したとしても鼻粘膜の viability が維持されているので変化しないと仮定できるため、 $k_a$  が小さくなったのは拡散係数  $D$  が減少したと考えられる。この推論は、poly-L-Arg による吸収促進効果が、細胞間隙路の拡大によることと矛盾する。Fig.19 の結果を考え合わせると、この  $k_a$  の低下は FD の鼻粘膜からの吸収が、特に吸収初期において非線形のために生じる lag time に起因していると考えられた。一方、lag time 後の  $k_a$  の増大は細胞間隙路の拡大により FD がこの経路を通過するときの反発係数やふるい係数が減少し、結果として FD の拡散係数  $D$  はみかけ上増加して  $k_a$  が大きくなると推察される。

また、コントロールで吸収されなかった FD-150 だけが異なる吸収パターンを示した。デコンボリューション法により求められた lag time 以後の立ち上がりは吸収速度が遅いものの、ほぼ直線的に増加する傾向が認められた (Fig.19)。その結果は、高分子透過物質の分子量が 100 kDa 程度を境に poly-L-Arg の促進メカニズムが異なる可能性を示している。

Fig.20 に FD の分子量の対数に対する poly-L-Arg を併用投与したときの  $F_{\infty}$  の対数との関係を示す。 $F_{\infty}$  は FD 単独での値に比べ poly-L-Arg 併用投与で増加したが、 $F_{\infty}$  は FD 分子量の増加により指数関数的に減少した。0.5%、1.0%濃度の poly-L-Arg(50)、1.0%濃度の poly-L-Arg(100)から得られた  $F_{\infty}$  間には有意差はなく、それらの関係は類似していた。これらの結果は、poly-L-Arg は高分子物質の経鼻吸収、バイオアベイラビリティを増大させ、その効果は高分子物質の分子量に関係しており、種々分子量の高分子物質の経鼻吸収を促進することを示している。

Fig.20 のプロットは吸収促進剤を適用した回帰曲線の傾斜がコントロールの傾斜とほとんど変わらず、曲線が全体に上方へシフトした結果を示しているが、この結果は第 1 章 Fig.4 の in vitro 試験結果と類似していた。第 1 章で述べた

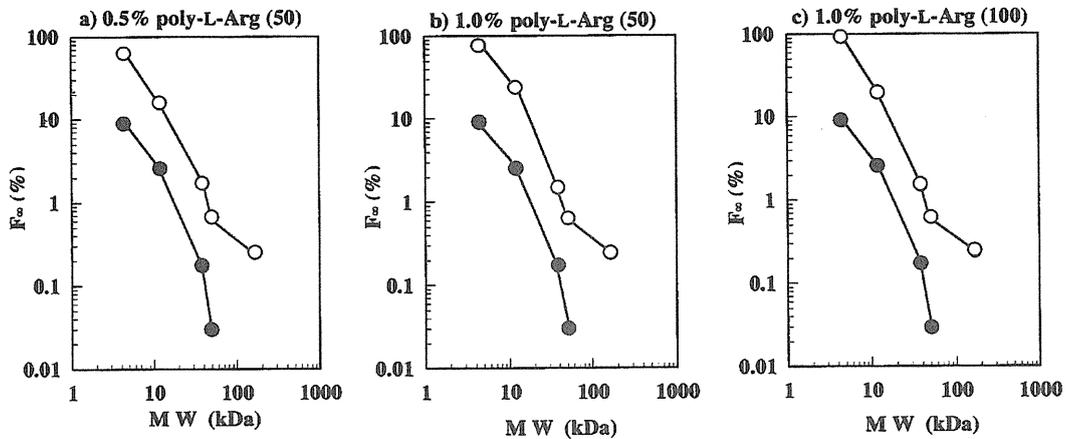


Fig.20 Relationships between the  $F_{\infty}$  and the molecular weight of FITC-dextran.

●: control(FITC-dextran alone) ; ○: with poly-L-Arg

There was no significant difference between the  $F_{\infty}$ s obtained for 0.5 and 1.0% poly-L-Arg(50), and 1.0% poly-L-Arg(100), respectively (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ )

Each data column represents the mean value ( $n=3-4$ ).

吸収促進剤が paracellular ルートを開口して吸収促進する仮説と一致し、本研究で採用した高分子薬物の経鼻吸収性の改善研究に対するアプローチ法の一つとして有用であったことが示された。今後、さらに回帰式の検証を含めた高分子側の詳細検討から吸収メカニズムに迫れる可能性が示された。

さらに、Fig.20 は透過物質のバイオアベイラビリティをどこまで高める必要があるかを判断するのに実用面で有用である。例えば、促進剤を併用しないとき、10 kDa の高分子薬物はバイオアベイラビリティが約 3% 程度である。この値は、企業化の判断においては低い数字であり、製剤開発を行なうには微妙である。一方、poly-L-Arg を併用するとこの数字は約 20% に増加し、これは極めて魅力的な数字となる。

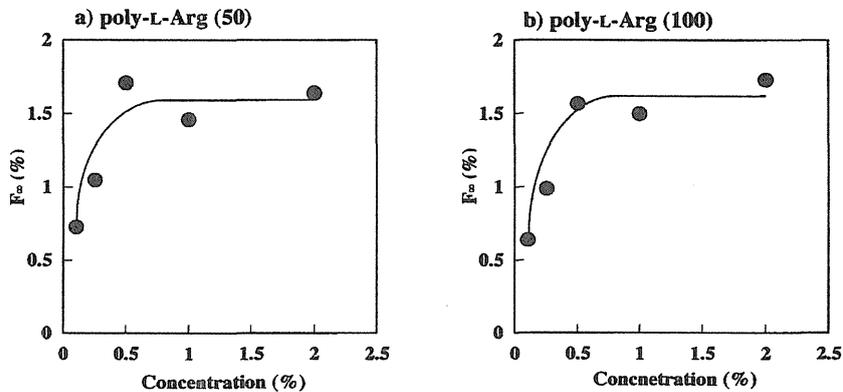


Fig.21 Relationships between the  $F_{\infty}$  of FD-40 and the concentration of poly-L-Args of different molecular weight.  
Each data column represents the mean value (n=3-4).

Fig.21 に FD-40 の  $F_{\infty}$  と poly-L-Arg 適用濃度間 の 関 係 を 示 す 。 FD-40 の  $F_{\infty}$  は poly-L-Arg 濃 度 の 増 加 に よ り 増 大 し 、 適 用 濃 度 が 0.5% 以 上 で は ど ち ら も プ ラ ト ー に な っ た 。 FD-40 の  $F_{\infty}$  の 計 算 に 用 い た  $AUC_{i.n.}$  は poly-L-Arg(50) と poly-L-Arg(100) と の 間 で 有 意 差 は 無 か っ た 。

Poly-L-Arg(50) と poly-L-Arg(100) で i.n. 併 用 投 与 し た FD-40 の  $F_{\infty}$  は 適 用 し た poly-L-Arg 濃 度 に 依 存 し て 増 加 し 、 0.5% 濃 度 で プ ラ ト ー に な っ た (Fig.21)。 前 節 Fig.15a の 結 果 か ら は FD-4 に 対 し て 2.5% 以 上 で プ ラ ト ー に 達 す る と 思 わ れ る が 、 高 分 子 量 の FD に 対 し て は poly-L-Arg の 促 進 効 果 は 濃 度 が 約 1% 前 後 で 最 大 に な る こ と を 示 し て い る 。 ま た 、 poly-L-Arg(50) と poly-L-Arg(100) に て 得 ら れ た FD-10、 FD-70、 FD-150 の  $F_{\infty}$  は ほ と ん ど 同 一 で あ っ た (Table 4)。  $F_{\infty}$  と FD の 分 子 量 の 間 の 同 様 な 関 係 が poly-L-Arg(50) と poly-L-Arg(100) の 0.5% 以 上 の 濃 度 で の 併 用 投 与 で 観 察 さ れ た (Fig.20)。

### 2.2.3 細胞損傷に対するポリ-L-アルギニン分子量の影響

Fig.22 に鼻中隔を 2%poly-L-Arg(10)、1%poly-L-Arg(50)、2%poly-L-Arg(100) に 9 時間暴露した後の顕微鏡観察での断面写真を示す。それぞれの poly-L-Arg の鼻上皮細胞への影響は未処理面と比べてもほとんど認められず、繊毛損傷が若干観られた程度であり (Fig.22b)、上皮細胞での細胞損失や形態変化は観察されなかった。繊毛の損失が若干観察されたが、繊毛は細胞表面にまだ残っていた。また、poly-L-Arg の処理と未処理のいずれの組織においても核が正常に認められた。細胞損傷の程度に poly-L-Arg 分子量の影響はみられず、また、poly-L-Arg の適用濃度を変えた場合においてもこれらの組織学的変化は極めて類似しており、poly-L-Arg の安全性が再確認された。

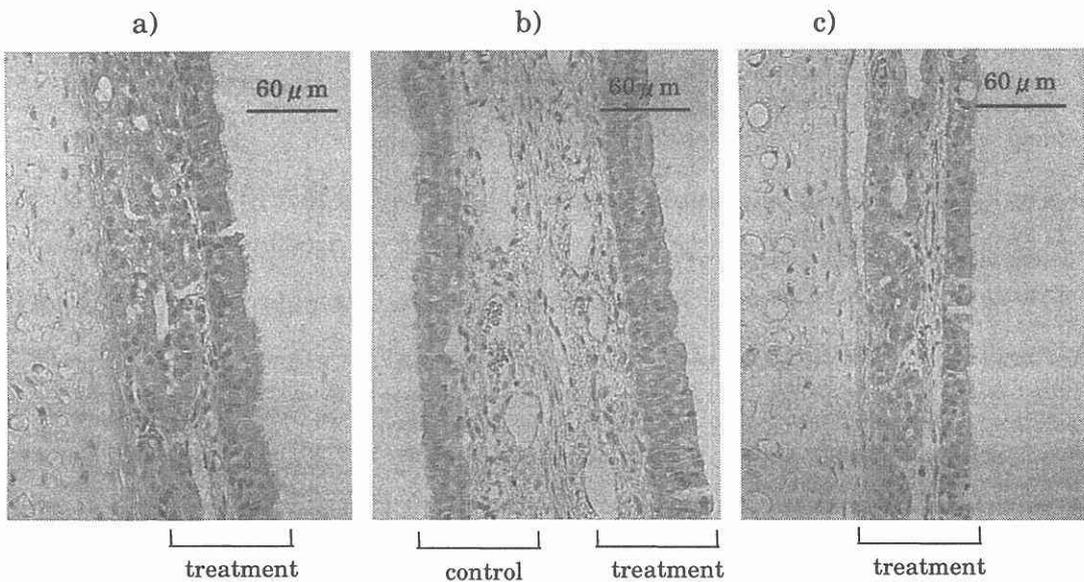


Fig.22 Microphotographs of cross-sections of the nasal septum 9h after exposure to poly-L-Args of different molecular weight.

a) 2% poly-L-Arg (10); b) 1% poly-L-Arg (50); c) 2% poly-L-Arg (100)

The nasal mucosal membrane on the left-hand-side in Fig.21b was a control (no poly-L-Arg treatment).

### 第3節 ポリ-L-アルギニンの経鼻吸収促進メカニズムの考察

経粘膜吸収に関して、高い吸収性を与える化合物は高い粘膜損傷性を与え、逆に粘膜損傷が大きい化合物は粘膜吸収性が高いと報告されている。本研究においても従来から検討されてきた吸収促進剤につき、粘膜吸収性と粘膜損傷性に高い相関があることを実験にて証明した。第1章ではモデル高分子薬物 FD の鼻粘膜吸収透過ルートが paracellular ルートであるとの仮説を立て、Ussing 型チャンバーを用いた in vitro 試験にて検証した。カチオン性化合物、特に、poly-L-Arg の経鼻吸収はこの paracellular ルートの透過を著しく促進することに対するメカニズムの考察がポイントとなり、さらに、安全性面でも説明がつかなければならない。従来の吸収促進剤と poly-L-Arg との差や poly-L-Arg 分子量やモデル高分子化合物である FD 分子量の影響を比較して考察する。

第一には吸収促進剤の保有する電気的性質が重要因子の1つと考えられる。Singhら<sup>51)</sup>はカチオン性化合物が鼻粘膜内皮細胞のマイナス電荷に相互作用し、transcellular ルートおよび/または paracellular ルートを介しての透過を増強すると報告している。しかしながら、本研究での L-Arg と poly-L-Arg 間の透過促進効果の大きな差異は静電的性質だけでは説明できない。すなわち、高分子物質の経鼻吸収の促進効果はカチオン性モノマーではなく、カチオン性ポリマーに由来することを意味していた。また、FD-4 の  $F_{0.9h}$  は poly-L-Arg 1分子当りの電荷密度（分子量）の増加により増大し、より高分子量の poly-L-Arg はより低濃度で FD-4 の吸収を促進した。それゆえ、poly-L-Arg 1分子当りの電荷密度（poly-L-Arg 1分子当りの正電荷数）は最も重要な決定因子の1つである。また、低分子量のカチオン性界面活性剤 CPCL は FD-4 を非常に大きく鼻粘膜からの吸収を促進させるにもかかわらず、溶血性、細胞膜成分の漏出面で悪影響を与えたことも考慮が必要である。ポリカチオンである poly-L-Arg は内皮細胞表面のマイナス電荷とイオン性インタラクションを起こすことが考えられ<sup>52-55)</sup>、吸収促進効果がマイナス電荷をもつヘパリンとの併用投与で消失する報告<sup>40,53)</sup>から考えて、このイオン性インタラクションが生体膜を介しての高分子物質の輸送促進の引き金と考えられた。その後の上皮細胞への作用メカニズムは低分子カチオン性化合物と異なると考えられる。

第二には、poly-L-Arg による FD-4 の  $T_{max}$  が従来の促進剤のそれに比べ遅れたことがあげられる。また、血漿中濃度 (Fig.7) からデコンボリューション法により求めた FD-4 の吸収プロファイルにおいて SDS、CPCL は lag time を認めず、一方、poly-L-Arg は Fig.17 に示すような lag time を認めた。キトサンは poly-L-Arg と同パターンで lag time を示し、L-Arg モノマーにおいては lag time は無く、直線的な吸収プロファイルを示した。前述のとおり、高分子量の FDs においても同様な結果を示した。すなわち、poly-L-Arg による細胞応答は従来の促進剤と異なっていることがわかった。poly-L-Arg による促進効果はその分子量に依存して高まったことから、高分子量の poly-L-Arg は鼻粘膜上皮細胞でのレセプター、イオンチャネル、グリコプロテイン等に対し高いアフィニティを持っていると考えられた。

第三には、FD の吸収促進に対する poly-L-Arg の効果が FD-4 と FD-40 に対して異なる点があげられる。その 1 つは、FD-4 の吸収に対する poly-L-Arg(10)、(50)、(100)の促進効果について poly-L-Arg 濃度依存性が認められたが、FD-40 の吸収に対して poly-L-Arg(50)と poly-L-Arg(100)の促進効果について有意差が観察されなかった点である。もし、poly-L-Arg が主に cell-cell junction、特にキトサンで観察された tight junction を一時的に広げる<sup>40)</sup>とすれば、高分子物質の paracellular ルートの輸送が促進される。Paracellular ルート輸送が poly-L-Arg により増加したにしても paracellular 空間溶媒中の薬物拡散は分子容積 (分子量) に依存して減少する。さらに、その際の高分子物質の拡散は反発係数によっても影響を受ける。この反発係数、すなわち、ふるい効果は分子量が増加すると大きくなると考えられるので、より分子量の高い高分子物質の細胞間隙輸送が大きく低下することになる。すなわち、FD-4 の場合、poly-L-Arg(50)および poly-L-Arg(100)のいずれにおいても、FD-4 の分子容よりもかなり大きく cell-cell junction を広げたため、poly-L-Arg の分子量に依存した促進効果が認められたと考えられる。一方、FD-40 の場合、その分子容が広がった junction スペースよりもかなり小さいとはいえ、poly-L-Arg による junction の開口による促進効果に対して FD-40 と junction スペースとの反発効果がマイナスに働いたために、poly-L-Arg の分子量の違いによる効果の差がみかけ上、認められなかったと考えられる。

2つ目は、バイオアベイラビリティ  $F_{\infty}$  に対する poly-L-Arg 濃度の影響を FD の分子量の違いで比較すると、バイオアベイラビリティ  $F_{\infty}$  の値が FD-4 と FD-40 で 50~100 倍の差があるものの、 $F_{\infty}$  の値が一定になる到達濃度に違いが認められ、それぞれ 2.0%以上と 0.5%程度であった点である。Poly-L-Arg 処理で tight junction が同様に拡張し、その後同じ時間で閉じると仮定すれば、FD-4 が早く透過すると考えられるためプラトー到達濃度は FD-4 が低いと予測されるが、結果は逆であった。このことは poly-L-Arg の分子量、濃度により tight junction の閉じる速度が異なることや透過物質と tight junction 間の相対的な大きさ-空間的広がりに関係していると考えられた。

第四には、高分子量の FD-150 血漿中濃度が単独投与において検出されなかったにもかかわらず、poly-L-Arg の併用投与において驚くほど高く認められたことを考える必要がある。可能性のある1つの理由としては、poly-L-Arg は FD-150 の経鼻吸収を単純拡散だけでなく、エンドサイトーシスにより増加させることも考えられた。

以上の考察および共同研究者である Ohtake ら<sup>56)</sup>が行なったパルス-チェイス法による poly-L-Arg の促進効果の作用持続性および可逆性に関する検討を加味して吸収促進メカニズムを総合的に考察すると以下の様に考えられる。

すなわち、poly-L-Arg のカチオン性電荷は鼻粘膜内皮細胞の表面のマイナス電荷とイオン性インタラクションして、何らかのメカニズムが働き tight junction を開口させ、しかもその後、tight junction が閉じると考えられる。Poly-L-Arg の分子量と濃度は開口の程度と開口時間（閉じるまでの時間）を制御すると考えられる。また、poly-L-Arg の安全性に対する仮説として、高分子量であるがゆえにそのままでは直接上皮細胞中に入らないことで細胞損傷性を示さず、仮に poly-L-Arg が酵素により分解されたにしても生成した L-Arg モノマーやオリゴマーが低濃度で存在することになるために細胞傷害をほとんど生じないと推定した。以上の仮説を立てることで矛盾すると思われたほとんどの現象が説明できる。

このように、静電的性質、分子サイズ、高次構造はその他の物理的性質とともに吸収メカニズムを考えるベースとなり、鼻粘膜損傷のない理想的な吸収促進効果を得るためにも、吸収メカニズムの更なる解明が必要である。そのため

にはポリカチオンである poly-L-Arg の分子量分布や組成の不均一性の考慮も必要であり、特に、poly-L-Arg のキャラクタリゼーションや投与 medium 中での高次構造などをさらに詳細に検討することがメカニズムの推定を確かにするためにも重要だと考えられる。

更には、細胞分子レベルでの tight junction の開閉メカニズムの検討が必要と思われる。特に、tight junction 構成タンパクである occludin や claudin だけでなく、ZO-1、ZO-2、ZO-3、cingulin、symplekin などの膜裏打ちタンパク質を含めた総合的な検討が必要だと考えられる。

#### 第4節 小括

カチオン性化合物のスクリーニングの結果、従来の吸収促進剤は鼻粘膜吸収性が高いと膜損傷を強く引き起こすことが相関関係にて再確認された。一方、poly-L-Arg はラット赤血球溶血性とウサギ鼻粘膜成分の漏出作用を示さず、FD-4 吸収のバイオアベイラビリティを著しく向上させることを示した。この極めて有用な効果は、従来の種々促進剤では得られていなかった。Poly-L-Arg はペプチドおよびタンパク性薬物の経鼻吸収において、促進活性と安全性のバランスの優れた実用化が極めて高い化合物だと強調できる。

Poly-L-Arg による経鼻吸収性の最適化の検討において、poly-L-Arg(50)と poly-L-Arg(100)は平均分子量で 4.3 から 167 kDA の範囲で FD の経鼻吸収を *in vivo* ラットモデルで促進した。FD の経鼻吸収の改善効果すなわちバイオアベイラビリティの向上が著しかった。バイオアベイラビリティ  $F_{\infty}$  と FD の分子量の相関からペプチドおよびタンパク性薬物の経鼻吸収実用化の可能性が示唆された。

### 第3章 ペプチド医薬品の薬動学/薬力学評価による投与設計<sup>57)</sup>

高分子医薬品の経鼻吸収製剤の実用化を目標に、前章までは経鼻吸収性を改善する手法を検討して、有効性と安全性を兼ね備えた吸収促進剤のスクリーニングとその適用条件の設定を行った。一方、実用化にむけては経鼻吸収性を最適化した高分子医薬品が薬理効果を有用なレベルで発現するか否かが重要であり、そのため、薬力学を取り入れた製剤設計の組み立てが必要となる。

しかしながら、ペプチドおよびタンパク性薬物の生理学的、薬理学的作用は標的臓器レセプターとの複雑なフィードバック相互作用を含んでいるために、それらの薬力学的 (PD) パラメータは薬物動態学的 (PK) パラメータと簡単に関係付けられなかった<sup>58)</sup>。いまだに、ペプチドおよびタンパク性薬物について経鼻投与製剤として実用化できるレベルでの製剤開発は難しいが、それは鼻粘膜を介しての透過性や吸収速度のみならず薬物の個々の生理学的、薬理学的作用に関する基礎的な情報が得られていないことも原因の1つと考えられる。

そこで、薬理作用を評価するために、モデルペプチド薬物として $\alpha$ -hANP ( $\alpha$ -human atrial natriuretic peptide、MW 3,080)<sup>59)</sup>を選択した。 $\alpha$ -hANPは28個のアミノ酸からなり<sup>60)</sup>、臨床的に様々な疾患、例えば、高血圧<sup>61,62)</sup>、うっ血性心疾患<sup>63)</sup>、腹水症や他の浮腫性疾患に使用されている。薬理作用の特徴として、血管拡張作用とナトリウム利尿作用に基づく強い血圧低下作用<sup>60)</sup>を持っている。薬理作用の指標としてその利尿作用を検討した。また、 $\alpha$ -hANPの経鼻からの投与システムの実用化は非常に意義があると考えられる。

本章では $\alpha$ -hANPのラットでのi.v.投与でのPKモデルの構築およびPK-PDモデルの構築とこれらからの利尿作用のシミュレーションを検討し、PK-PDモデルによる経鼻吸収製剤の投与設計の最適化をはかる方法を示した。

#### 第1節 経鼻投与での吸収速度と薬理作用の解析

$\alpha$ -hANPの血漿中濃度と利尿効果のタイムコースを投与実験により求め、それらに対応するPKモデルとPK-PDモデルを適切に構築したうえで、同時に微

分方程式を組み立てて評価した。血漿中濃度-時間、利尿効果-時間データは非線形最小二乗法を用いた理論式にフィットした（アルゴリズム；Damping Gauss-Newton 法）。計算には Runge-Kutta-Gill 法を用いた。また、デコンボリューション式を適用した、i.v.ボラス投与と i.n.投与後の吸収速度定数 ( $k_a$ ) は PK データ（血漿中濃度-時間データ）と PD データ（利尿効果-時間データ）から、次式にて求めた。

$$C_{in} = \int_0^t \frac{D_{in}}{D_{iv}} e^{-k_a \theta} C_{iv}(t - \theta) d\theta \quad (12)$$

$$E_{in} = \int_0^t \frac{D_{in}}{D_{iv}} e^{-k_a \theta} E_{iv}(t - \theta) d\theta \quad (13)$$

ここで、C、E、D はそれぞれ血漿中濃度、利尿効果、 $\alpha$ -hANP の i.v.と i.n.投与量である。この計算では、非線形プロセスは低投与量では寄与が小さいとして無視した。

### 3.1.1 $\alpha$ -hANP の i.v.投与での PK モデルの構築

$\alpha$ -hANP の体内動態を把握するためにラットにおける  $\alpha$ -hANP 静脈内投与実験を行いコンパートメントモデルを構築して解析した。

血漿中  $\alpha$ -hANP の消失経路は 3 種類に大別される<sup>64)</sup>。1 つはクリアランスレセプターによる細胞内取り込み機構、2 つめは薬効レセプターによる消失である。3 つめは血中に存在するタンパク分解酵素(neutral endopeptidase ; NEP)による加水分解である。前者 2 つは正常時の内因性の心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の消失の大部分に関与し、外因的に  $\alpha$ -hANP が投与されると数  $\mu$ g/kg 投与で飽和すると報告されている<sup>65)</sup>。一方、NEP は血中に多く存在し活性も高く、レセプター飽和後の主要な消失経路になっていると考えられる。これらの特徴を考慮して Fig.23 に示すコンパートメントモデルを構築した。

これは 2-コンパートメントモデルを基本とし、体循環コンパートメントからの薬物消失には 1 次消失過程と Michaelis-Menten 型消失過程の 2 種類が存在するものとした。1 次消失過程を酵素消失（速度定数、 $k_{10}$ ）、Michaelis-Menten

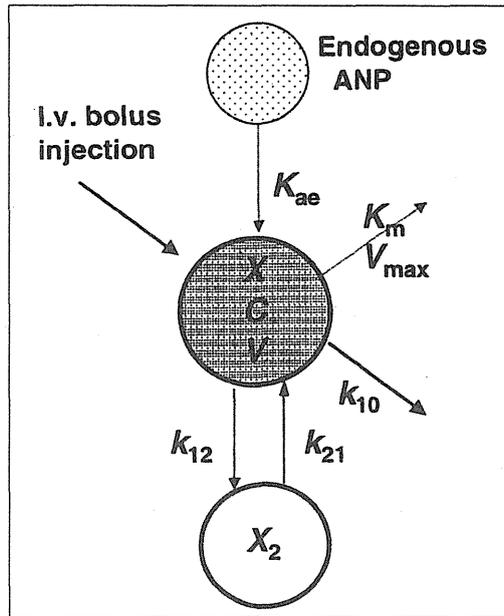


Fig. 23 Pharmacokinetic model of  $\alpha$ -hANP after intravenous injection in rats.

$k_{12}$ ,  $k_{21}$  and  $k_{10}$  are first order rate constant, and  $K_{ae}$  is zero order rate constant.

型消失をレセプターからの消失 ( $V_{max}$  と  $K_m$ ) とみなし、内因性ラット ANP (rANP) の分泌 (速度定数、 $K_{ae}$ ) は 0 次と仮定した。 $V_{max}$  は薬物消失の最大速度、 $K_m$  は  $V_{max}$  の半分の速度での血漿中濃度を表すミカエリス定数である。この解析結果としての計算曲線と実測値をプロットしたものを Fig.24 に、得られた PK パラメータを Table 5 に示した。Fig.24 に示すとおり、どの投与量においてもフィッティング線は実験データと極めて一致しており、 $\alpha$ -hANP の血漿中濃度推移はこのモデルで表現できることがわかった。

$\alpha$ -hANP は組織への分布および消失が非常に速く、消失半減期は約 5.5 分であった。みかけの分布容積は投与量  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  あたりから有意に減少するのが観察された。非線形部分の消失はパラメータ値から判断するとレセプター近傍の血漿中濃度が  $2 \text{ ng}/\text{ml}$  以上で飽和するためと考えられた。Hayashi ら<sup>64)</sup>は  $\alpha$ -hANP のレセプターへの結合定数は  $1 \text{ ng}/\text{ml}$  であり、血漿中濃度が  $4 \text{ ng}/\text{ml}$  で

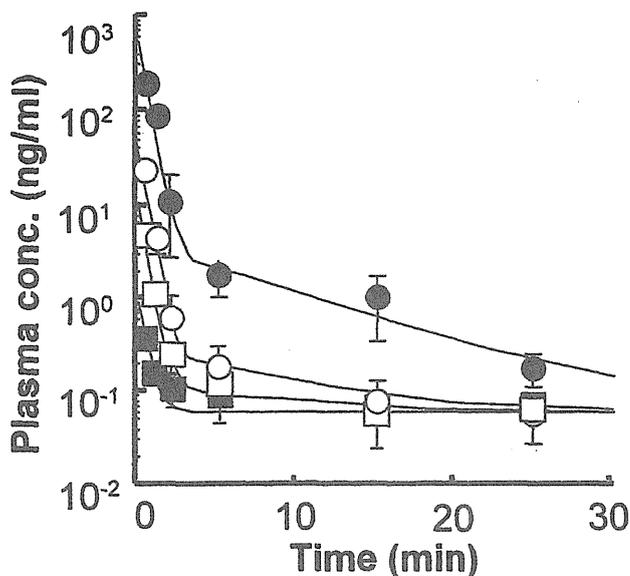


Fig.24 Time course of plasma concentration of  $\alpha$ -hANP after intravenous bolus injection in rats.

Symbols: ■ 0.2  $\mu$ g/kg, □ 2.0  $\mu$ g/kg, ○ 10  $\mu$ g/kg, ● 50  $\mu$ g/kg

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats. Solid lines were obtained by curve-fitting using following equations:

$$\frac{dC}{dt} = K_{ae} + k_{21} \frac{X_2}{V} - (k_{12} + k_{10})C - \frac{V_{max} \cdot C}{K_m + C}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}VC - k_{21}X_2$$

where each abbreviation is referred to Fig.23. The obtained PK parameters are shown in Table 5.

はレセプターの約80%が $\alpha$ -hANPで占められていると報告している。今回得られた値はこれに近いものであった。本解析において $\alpha$ -hANP消失時の血漿中濃度を考慮すると静注投与量10  $\mu$ g/kg程度まで線形消失として解析可能であると考えられた。しかし、消失全体から考えると非線形消失の寄与は非常に小さく、得られた解析結果も全体的に線形に近いものとなった。また、rANPの分泌を0次とした結果、低濃度域での $\alpha$ -hANPの曲線のあてはめも可能となった。

Table 5 Adjusted pharmacokinetic parameters of  $\alpha$ -hANP after intravenous bolus injection in rats

parameter	value
$K_{ae}$ (ng/ml/min)	0.134
$k_{12}$ (min <sup>-1</sup> )	0.186
$k_{21}$ (min <sup>-1</sup> )	0.143
$k_{10}$ (min <sup>-1</sup> )	2.142
$V_{max}$ (ng/ml/min)	$3.949 \times 10^{-3}$
$K_m$ (ng/ml)	2.102
V (ml)	45.83

### 3.1.2 $\alpha$ -hANP の i.v.投与での PK-PD モデル構築

#### 1) PD モデル構築のための投与量と薬効強度の定量的関係の検討

薬効は作用部位中の薬物濃度に依存する。Ariens らの受容体占有理論<sup>66)</sup>をはじめとして、薬効強度を薬物濃度のある関数として定量的にとらえることが行われてきた。PD モデルの構築にあたり、薬物の作用部位での濃度とコンパートメント内濃度との対応を明確にする必要がある。 $\alpha$ -hANP をラットに投与し、その薬効として利尿効果を測定した。測定時間 (min)あたりの採集尿量 ( $\mu$ l)を尿排泄速度 ( $\mu$ l/min)として求め、次式にて算出した。

$$\text{利尿効果 (\%)} = \frac{\text{測定した尿排泄速度}}{\text{コントロール尿排泄速度}} \times 100 \quad (14)$$

Fig.25 に  $\alpha$ -hANP を i.v.ボラス投与した後の利尿効果のタイムコースを示す。利尿効果の開始は非常に速く、最大効果は最初のサンプリング期間 (5分)に観察された。さらに、薬理作用 (利尿効果) は非常に速いので尿量は  $50 \mu$ g/kg 以下の静注投与では約 30 分でコントロールレベルまで回復した。利尿効果は投与量の増加により増大した。 $50 \mu$ g/kg 以上の投与量では尿排泄速度の上昇が観察されずプラトーとなり、投与量に対する最大利尿効果は 650% (最大利尿効果

75%–コントロール利尿効果 100%) であった。これは利尿効果に飽和が生じるためと考えられ、最大薬理効果( $E_{max}$ )の存在が示された。PD モデルはこれらの結果を踏まえて Hill 式 (シグモイド  $E_{max}$  モデル) を使用した。

利尿効果と血漿中濃度の関係を把握するために  $\alpha$ -hANP の i.v.連続投与 (インフュージョン) 時の利尿効果および血漿中濃度の時間推移を調べた。Fig.26 に  $\alpha$ -hANP を i.v.インフュージョンした際の血漿中濃度と利尿効果のタイムコースを示す。

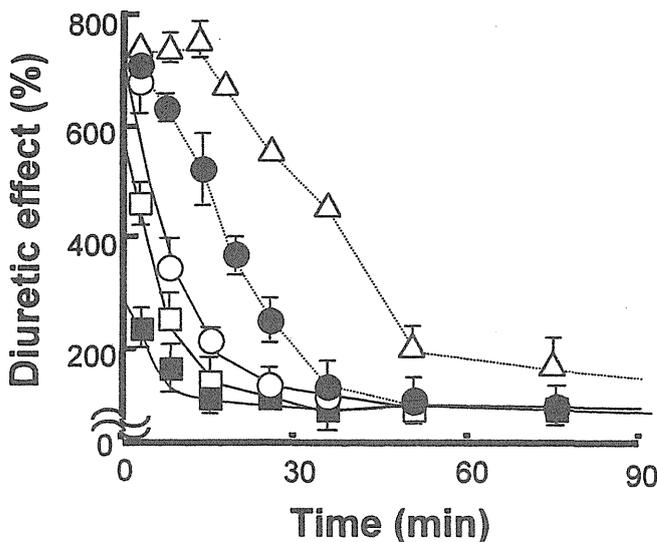


Fig.25 Time course of diuretic effect of  $\alpha$ -hANP after intravenous bolus injection in rats.

Symbols: ■ 0.2  $\mu$  g/kg, □ 2.0  $\mu$  g/kg, ○ 10  $\mu$  g/kg, ● 50  $\mu$  g/kg, △ 1000  $\mu$  g/kg

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats. Solid lines for 0.2, 2.0 and 10  $\mu$  g/kg dose were obtained by curve-fitting using following equations.

$$\frac{dC}{dt} = K_{ae} + k_{21} \frac{X_2}{V} - (k_{12} + k_{10})C$$

$$\frac{dC_e}{dt} = k_{1e}C - K_{eo}C_e$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}VC - k_{21}X_2$$

$$E = \frac{E_{max} \cdot C_e^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_e^\gamma}$$

Where Michaelis-Menten elimination kinetics were ignored to low dose.

PK parameters ( $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{10}$  and  $k_{1e}$ ) were fixed in this calculation (see Table 5).

The obtained PD parameters are shown in Table 6.

インフュージョンは実験開始後 30 分で中止した。血漿中濃度の実線はインフュージョン速度と消失PKパラメータ (Table 5) を用いて計算から求めたものである。Michaelis-Menten 消失過程はこの解析では無視した。定常状態の血漿レベルは 10 分で 0.83 ng/ml であった。それに対して、利尿効果は若干遅くれて観察され、薬理効果の定常状態レベルは約 20 分で得られ、血漿レベルと利尿効果について消失速度が異なることが観察された。

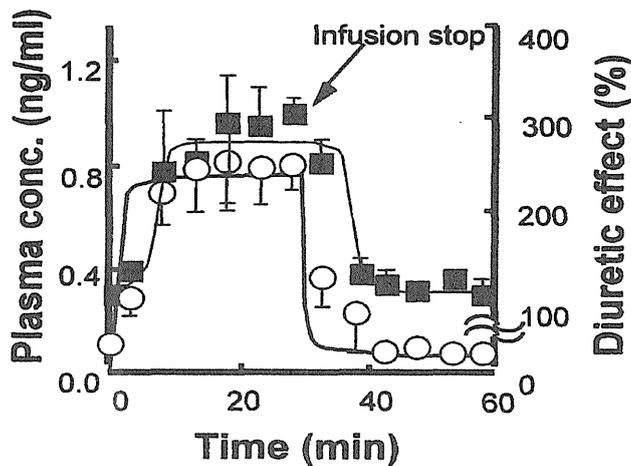


Fig.26 Time course of plasma concentration and diuretic effect of  $\alpha$ -hANP during intravenous constant in fusion in rats.

Symbols: ○ plasma concentration, ■ diuretic effect

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats. Solid lines for plasma concentration and diuretic effect were obtained by curve-fitting under fixing elimination PK parameters shown in Table 5 using following first two equations and all equations, respectively.

$$\frac{dC}{dt} = K_{inf} + K_{ae} + k_{21} \frac{X_2}{V} - (k_{12} + k_{10})C$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}VC - k_{21}X_2$$

$$\frac{dC_e}{dt} = k_{le}C - K_{eo}C_e$$

$$E = \frac{E_{max} \cdot C_e^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_e^\gamma}$$

where Michaelis-Menten elimination kinetics were ignored due to low input rate,  $K_{inf}$ .

Fig.27にそれぞれのサンプリング時間での血漿中濃度と利尿効果の関係を示す。典型的な反時計回りのヒステリシスループが観察された。このことは、薬効が血中濃度より遅れて現れていることを示しており、作用部位は血漿コンパートメント以外にあることが示唆された。次に組織（抹消）コンパートメントについて同様に調べたが、 $\alpha$ -hANPの濃度推移が非常に遅く、時計回りのヒステリシスループを示し、作用部位には該当しないことが明らかとなった。これらの結果より、 $\alpha$ -hANPの利尿効果の作用部位は細胞または血管以外の場所に存在していることが示唆された。

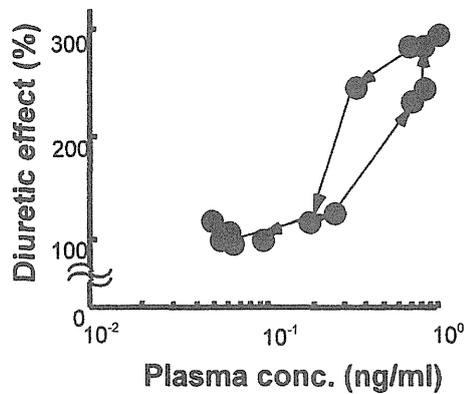


Fig. 27 Relationship between plasma concentration and diuretic effect of  $\alpha$ -hANP.

Each point is from in Fig.25.

## 2) PK-PD モデルの構築

Fig.28 にラットでの  $\alpha$ -hANP の PK-PD モデルを示す。薬理学的な作用の遅れを含む挙動を説明するために薬効コンパートメント<sup>67)</sup>を仮想した。この薬効コンパートメント ( $C_e$ ) は体循環コンパートメントと1次速度過程 (速度定数  $k_{1e}$ ) で連結し、薬効コンパートメントから1次消失 (速度定数  $k_{e0}$ ) すると仮定した。

また、薬効強度との定量関係を示す PD モデルは前述のとおり、 $E_{\max}$  を含む次の一般 Hill's 式を用いた。

$$E = \frac{E_{\max} C_e^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_e^\gamma} \quad (15)$$

ここで、 $E_{\max}$ 、 $EC_{50}$  および  $\gamma$  はそれぞれ最大薬理効果、50%を示す薬効コンパートメントの  $\alpha$ -hANP 濃度、E-Ce 関係の曲線を決定するシグモイドパラメータである。 $E_{\max}$  は Fig.25 のデータから 650%に固定した。

Fig.25 と Fig.26 の実線は i.v.ボラス投与 (0.2、2.0、10  $\mu$ g/kg) とインフュージョン投与の利尿効果-時間曲線のフィッティングを示す。i.v.ボラス投与での PD パラメータを Table 6 に示す。この PK-PD 結合モデルは i.v.投与において、どの投与量における利尿効果も表現できた。また、この PK-PD 結合モデルは  $\alpha$ -hANP の i.n.投与後の吸収速度の予測と同様に利尿効果の推定に適していると考えられた。

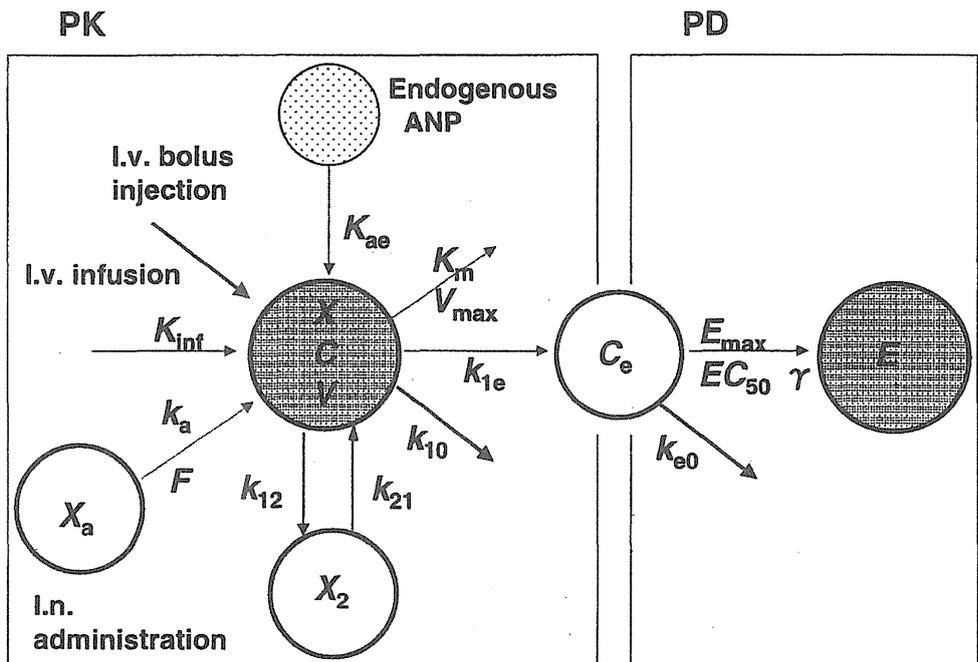


Fig. 28 Pharmacokinetic model and pharmacodynamic model of  $\alpha$ -hANP in rats.  $k_a, k_{12}, k_{21}, k_{10}$  and  $k_{1c}$  are first order rate constant, and  $K_{inf}$  and  $K_{ae}$  are zero order rate constant. The others are shown in the text.

Table 6 Adjusted pharmacodynamic parameters of  $\alpha$ -hANP after intravenous bolus injection and during constant intravenous infusion in rats

	constant infusion	bolus injection
$E_{\max}(\%)*$	650	650
$EC_{50}(\text{ng/ml})$	$0.306 \pm 0.016$	$0.344 \pm 0.022$
$\gamma$	$0.660 \pm 0.051$	$0.641 \pm 0.060$
$k_{1e}(\text{min}^{-1})$	$0.0025 \pm 0.0019$	$0.0028 \pm 0.0013$
$k_{e0}(\text{min}^{-1})$	$0.871 \pm 0.008$	$0.641 \pm 0.055$
mean $\pm$ S.E. (n=3)		

\* This value was fixed according to data in Fig.25.

### 3.1.3 $\alpha$ -hANP の経鼻投与後での吸収性評価と利尿効果

Fig.29 に  $\alpha$ -hANP の i.n.投与後の血漿中濃度のタイムコースを示す。 $\alpha$ -hANP は非常に速く血漿中に出現し、ピークは投与 1 分後に認められた。吸収速度定数  $k_a$  は(12)式を用いてデコンボリューション法により計算し、絶対的バイオアベイラビリティ  $F$  は i.v.投与と i.n.投与後の血漿中プロファイルからの AUC を求め比率から計算した。

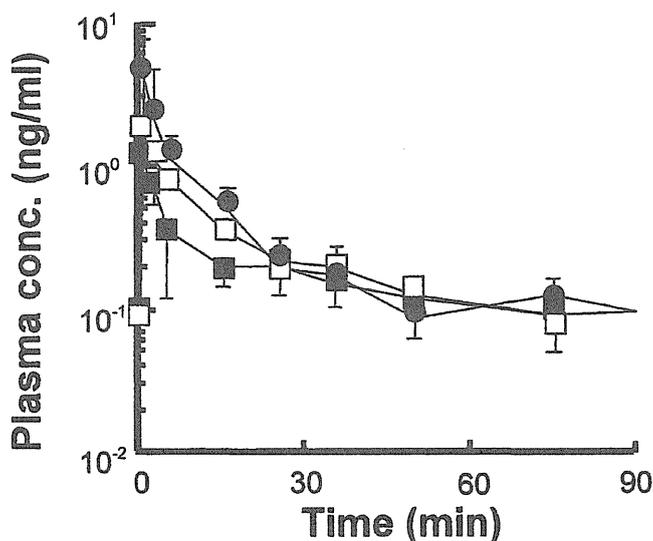


Fig.29 Time course of plasma concentration of  $\alpha$ -hANP after intranasal administration in rats.

Symbols: ■ 100  $\mu\text{g/kg}$ , □ 200  $\mu\text{g/kg}$ , ● 400  $\mu\text{g/kg}$   
Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats.

Table 7 に計算された吸収速度定数とバイオアベイラビリティを示す。吸収速度定数  $k_a$  は消失相の消失速度定数 ( $\beta$ ) より小さいので典型的なフリップフロップ現象が観察された。経鼻投与ではバイオアベイラビリティが非常に低く、2~3%であった。 $\alpha$ -hANP の経鼻吸収製剤の実用化には、この低いバイオアベイラビリティを高める必要がある。また、吸収プロファイルは少なくともこの投与量では線形であると考えられた。

Table 7 Adjusted absorption rate constant,  $k_a$  and bioavailability,  $F$  from plasma profile after intranasal administration of  $\alpha$ -hANP in rats

Dose ( $\mu$ g/kg)	$k_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$F$ (%)
100	$0.236 \pm 0.021$	3.33
200	$0.229 \pm 0.022$	2.83
400	$0.211 \pm 0.028$	2.77
mean $\pm$ S.E.(n=3)		

Fig.30 に  $\alpha$ -hANP の i.n.投与後の利尿効果のタイムコースを示す。利尿効果は  $\alpha$ -hANP の投与量の増加により増大した。最大利尿効果は血漿中の  $\alpha$ -hANP 増加レベルに比べて小さかった。吸収速度定数  $k_a$  は(13)式を用いて、確立した PK-PD モデルにより計算した。計算された速度定数は投与量が 100、200 および 400  $\mu$  g/kg ではそれぞれ 0.196、0.204、0.209  $\text{min}^{-1}$  であった。これらの値は血漿データ (PK) から計算で得られた値と非常に近かった。この結果から  $\alpha$ -hANP の経鼻投与での吸収速度定数は血漿中濃度と薬理効果のタイムコースから計算できることが確認された。Table 7 に示す同様なバイオアベイラビリティも PD データから計算できることがわかった。

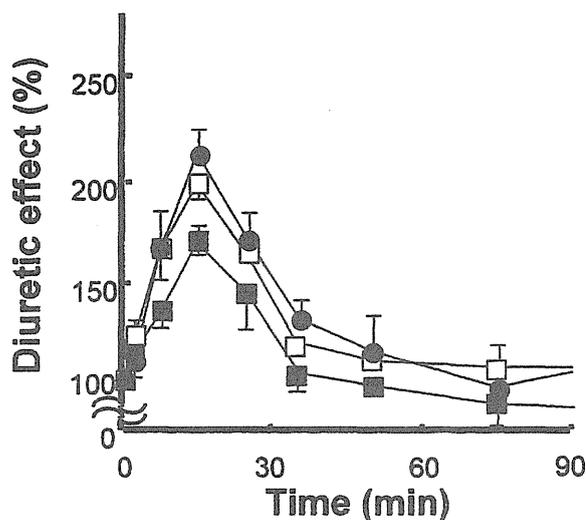


Fig. 30 Time course of diuretic effect of  $\alpha$ -hANP after intranasal administration in rats.

Symbols: ■ 100  $\mu$ g/kg, □ 200  $\mu$ g/kg, ● 400  $\mu$ g/kg

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats.

## 第2節 $\alpha$ -hANP の経鼻投与での利尿効果のシミュレーション

経鼻投与での  $\alpha$ -hANP の吸収速度定数とバイオアベイラビリティは投与システムや製剤の工夫によって改善でき、これらパラメータの影響をラットでの利尿効果により推定できる。Fig.31 は本章で確立した PK-PD モデルを用いてシミュレーション計算により得られた、これらのパラメータの利尿効果に対する影響を示した。吸収速度定数の増加は利尿効果を特に初期に促進し、一方、低い吸収速度定数は利尿作用の持続効果に適していると推定された (Fig.31a)。これらの特徴は  $\alpha$ -hANP の血漿プロファイルと同じであった (Fig.29)。

バイオアベイラビリティの増大は利尿効果を初期だけでなく後期も促進する。シミュレーションの結果として、より大きな吸収速度定数は著しい利尿作用 (短期に顕著な効果) を導き、より高いバイオアベイラビリティは持続した利尿効果を与えらる。

これらのシミュレーション結果から、 $\alpha$ -hANP の経鼻吸収においては、吸収速度定数よりバイオアベイラビリティ（吸収率）を増大させることが望ましいことが示唆された。

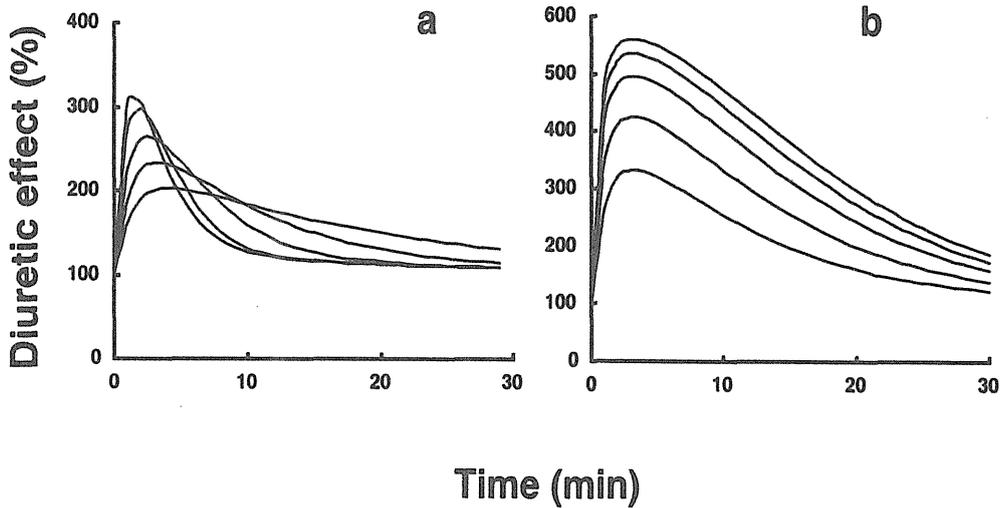


Fig.31 Influence of absorption rate constant,  $k_a$ (a) and bioavailability,  $F$  (b) on the diuretic effect of  $\alpha$ -hANP after intranasal administration in rats.

a:  $k_a = 0.1, 0.2, 0.4, 1.0$  and  $2.0 \text{ min}^{-1}$  for lower to higher lines at early period  
(for higher to lower lines at late period)( $F = 3\%$ , dose =  $100 \mu\text{g/kg}$ )

b:  $F = 10, 25, 50, 75, 100 \%$  for lower to higher lines ( $k_a = 0.2 \text{ min}^{-1}$ , dose =  $100 \mu\text{g/kg}$ )

These simulation curves were obtained by following equations.

$$\frac{dX_a}{dt} = -k_a X_a \quad (X_a = F \cdot \text{dose} \text{ at } t = 0)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_a \frac{X_a}{V} + K_{ae} + k_{21} \frac{X_2}{V} - (k_{12} + k_{10})C$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}VC - k_{21}X_2$$

$$\frac{dC_e}{dt} = k_{1e}C - k_{e0}C_e$$

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C_e^y}{EC_{50}^y + C_e^y}$$

where parameters except  $k_a$  and  $F$  were fixed to the obtained values for i.v. bolus injection.

### 第3節 考察と小括

Fig.28 に示した PK モデルと PD モデルを連結した PK-PD モデルを構築して、 $\alpha$ -hANP の経鼻投与での薬効としての利尿効果を概ね説明できることを示した。この PK-PD モデルに組み込んだパラメータを含め考察する。

静脈注射後の解析結果からレセプターによる消失は 2 ng/ml 以上の血漿中濃度で飽和することが示唆された。このレセプターからの消失は rANP の主要な消失経路となっているが、内因性 ANP の血漿中濃度は、ヒトで 0.02 ng/ml、ラットで 0.1 ng/ml 前後と微量であると報告<sup>68)</sup>されている。レセプターの密度がそれほど高くないと想像できるため、 $\alpha$ -hANP 投与後の消失はほとんどが酵素による代謝を受けて消失していると考えられる。また、本モデルでは rANP の分泌パターンを 0 次速度と仮定した。本来は生体の恒常性により、分泌パターンは厳密に制御されておりその挙動は複雑と考えられるが、内因性 ANP のレベルは非常に低いため、 $\alpha$ -hANP 投与後の体内動態および薬効に対する影響はないと仮定して解析した。

(12)式を用いたデコンボリューションは非線形 PK を持つ薬物には適用できないが、吸収過程の有無に限定されず、薬物の血漿プロファイルから吸収速度を計算するのに有用である。i.n.投与にて、(13)式を用いた利尿効果からのデコンボリューションで得られた吸収速度定数は PK データからの値と非常に近かった。これらのことから今回のアプローチは吸収速度の決定だけでなく薬効面を含む、投与システム開発での有用なツールとなることを示している。

血漿中濃度と薬効とのフィッティングについては  $\alpha$ -hANP について NONMEM 法によるポピュレーション解析にて実施された報告<sup>69)</sup>があり、体内動態の解析がなされている。しかしながら、経鼻投与における研究例はほとんどなく、本研究での血漿中濃度と利尿作用のシミュレーションパターンは Fig.30 での利尿作用と比べて  $T_{\max}$  において差が認められた。宮西ら<sup>70)</sup>は  $\alpha$ -hANP を i.v.インフュージョン投与にて試験し、血漿中濃度と利尿作用および降圧作用について PK-PD モデルを用いて解析しているが、 $T_{\max}$  において一致しなかったと報告している。今回の結果は宮西らの報告と類似していた。

今回の結果から、PK-PD 単純モデルでは限界はあるものの、製剤設計から実用化までの検討プロセスにおいて有用であることがわかった。すなわち、薬効発現時間の遅れは説明できないものの、前述のように、吸収速度定数が大きくなると利尿効果が高まり、バイオアベイラビリティの増加で利尿効果の向上と持続性が得られることがわかった。吸収促進剤の併用は吸収速度定数およびバイオアベイラビリティを増加させ、実用化レベルでの  $\alpha$ -hANP の薬理効果の発現に好ましいと想定される。また、酵素阻害剤はバイオアベイラビリティを増加させるのに有用であり、ペプチドの持続作用を保持する可能性がある。このように吸収速度定数またはバイオアベイラビリティを指標としての製剤設計の重要性が確認された。

第2章で示した poly-L-Arg を吸収促進剤として併用投与することで高分子モデル薬物の吸収速度とバイオアベイラビリティが飛躍的に高まるとの結果から、ペプチド医薬品の薬理効果も実用化レベルまで高めることができると考えられた。この poly-L-Arg を併用投与した際の薬理効果の向上に対する PK-PD モデルの検証については第3章にて示した。

#### 小括

経鼻吸収されたモデルペプチドの血漿プロファイルと薬理効果のモデリングを行うことで投与設計の最適化がはかれると考え、モデル薬物として  $\alpha$ -hANP を選び、薬理効果（利尿作用）のシミュレーション方法を検討した。ラットでの  $\alpha$ -hANP 経鼻投与における利尿作用が薬効コンパートメントや生体恒常性システムを持たせた PK-PD モデルで推測できることを示した。この PK-PD モデルは  $\alpha$ -hANP の i.v. と i.n. 投与でのどの投与量においても利尿作用の推移を表現できた。吸収速度とバイオアベイラビリティからのシミュレーションにより  $\alpha$ -hANP の i.n. 投与での利尿効果を高めるには吸収速度定数より、バイオアベイラビリティ（吸収率）を増大させることが望ましいことが推定された。PK-PD モデルを利用した経鼻吸収製剤の製剤設計は製剤化研究において有用であることが示された。

## 第4章 ポリ-L-アルギニンを用いた経鼻吸収製剤の実用化研究

前章まで、高分子量物質の経鼻吸収性の改善を目的に安全性の高い吸収促進剤候補化合物のスクリーニングを行い、poly-L-Arg が新規促進剤として最も可能性が高いことを明らかにした。しかし、モデル高分子として用いてきた FD に比べ、実際のペプチド薬物は鼻腔内および粘膜環境中の生理的諸因子に対して鋭敏に影響を受けやすい。たとえば分解酵素に対する感受性が高い場合、この酵素分解バリアーは、高分子量のペプチド薬物の粘膜吸収が分子量に依存的な透過バリアーに匹敵するほどになる場合もある。また、これらペプチド薬物のほとんどは薬動学と薬力学との関係がパラレルではなく、特に血中濃度に対する薬理効果の頭打ち現象が実際のペプチド薬物で認められることから、経鼻吸収製剤の実用化においては吸収促進のみならずあらゆる面からバイオアベイラビリティを高める必要がある。本章では現在臨床的に使用されている $\alpha$ -ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド ( $\alpha$ -hANP)、サケカルシトニン (sCT) および顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) をモデルペプチド薬物として選択し、これら薬物の鼻粘膜吸収性に対する poly-L-Arg の効果を薬理効果で確認することより実用化への可能性を検討した。

### 第1節 $\alpha$ -hANP への応用<sup>71)</sup>

$\alpha$ -hANP はヒト静脈内投与では血中半減期が非常に短く<sup>72)</sup>、また経口投与では吸収率が極めて低いことが知られていることから、製剤面から臨床応用を広げるには難しい状況にある。今まで $\alpha$ -hANP の経鼻投与システムの開発に対して基礎的検討が行われており、鼻腔内に存在する蛋白分解酵素による $\alpha$ -hANP の失活ならびに鼻粘膜中および血液中での代謝・分解などにより鼻粘膜からの吸収性は非常に低いことが明らかとなっている。そのため、吸収促進剤として胆汁酸塩の併用や酵素阻害剤の利用が試みられているが、吸収の改善は認められているものの、有用な薬理効果まで得られていないのが現状である。

そこで本節では鼻粘膜吸収促進剤として、実用化の面から可能性が極めて高

いと考えられる新たに見出した poly-L-Arg (50)を用いて、第3章で実施した  $\alpha$ -hANP の利尿効果に及ぼす影響について検討し、さらに想定した利尿効果を高めるためのシミュレーション結果を poly-L-Arg 併用効果から検証した。

利尿効果は以下に示す (16) および (17) 式より各時間間隔毎の尿排泄速度 (%) および全尿量 (全薬理効果; %) として求めた。

$$\text{尿排泄速度(\%)} = \frac{\text{処理時の尿排泄速度}}{\text{コントロール尿排泄速度}} \times 100 \quad (16)$$

$$\text{全尿量(\%)} = \Sigma [(\text{各時間間隔毎の尿排泄速度} - \text{コントロールの尿排泄速度}) \times \text{各時間間隔}] \quad (17)$$

#### 4.1.1 ポリ-L-アルギニン併用による $\alpha$ -hANP の利尿効果

Fig.32 に  $\alpha$ -hANP 100  $\mu$ g/kg を鼻腔内に投与したときの尿排泄速度の時間推移を示す。 $\alpha$ -hANP 溶液を鼻腔内に投与すると、徐々に尿排泄速度が上昇し、投与後 15 分に約 180% の最大排泄速度が得られたが、薬効の消失は速やかで

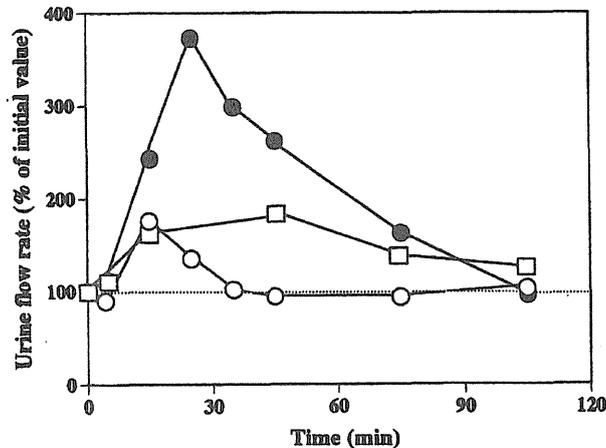


Fig.32 Urine flow rate-time curve after i.n. administration of  $\alpha$ -hANP in rats.

○ : i.n. without enhancer, □ : i.n. with bestatin,

● : i.n. with poly-L-Arg(50)

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of at least 3 experiments.

Dotted line means the control level.

40 分後にはコントロールレベルに戻った。一方、酵素阻害剤であるベスタチンを 0.1%濃度含有する  $\alpha$ -hANP (100  $\mu$ g/kg) 溶液を鼻腔内に 60  $\mu$ l/kg 投与すると、45 分後に最大尿排泄速度に達しその速度はコントロールと同程度であったが、その後約 2 時間まで持続的な効果が得られた。これに対して、1%poly-L-Arg 含有の  $\alpha$ -hANP 溶液を鼻腔内に投与すると、投与後 25 分に約 400%の最大尿排泄速度となり、投与後 100 分前後までその尿排泄増強効果は持続した (Fig.32)。

Fig.33a および b に  $\alpha$ -hANP を静脈内または鼻腔内に投与した後の投与量に対する尿排泄速度および全尿量を示す。 $\alpha$ -hANP 溶液を静脈内に投与すると、尿排泄速度および全尿量はともに投与量に対して典型的なシグモイド(S 字)曲線となり、10  $\mu$ g/kg 以上の投与量で利尿効果はほぼ一定になる傾向がみられた。

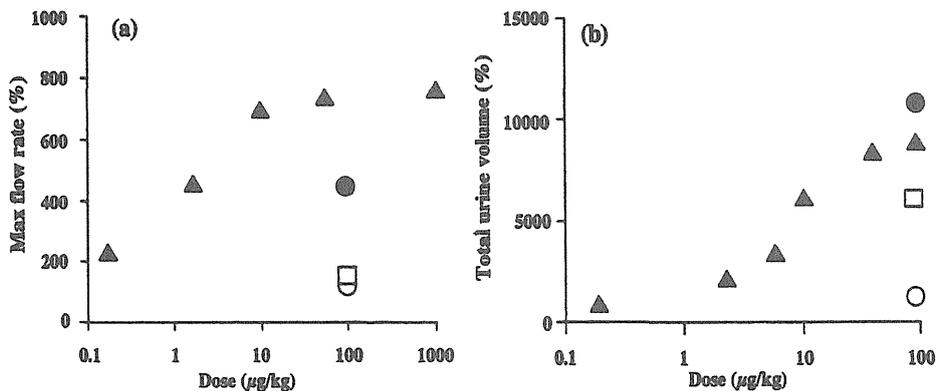


Fig.33 Dose response curve after i.v. or i.n. administration of  $\alpha$ -hANP in rats.  
 (a) : Dose vs max flow rate(%), (b) : Dose vs total urine volume(%)  
 $\blacktriangle$  : i.v. administration,  $\circ$  : i.n. without enhancer,  $\square$  : i.n. with bestatin,  
 $\bullet$  : i.n. with poly-L-Arg(50)

Fig.32 および Fig.33 の比較から、 $\alpha$ -hANP 溶液(100  $\mu$ g/kg)を鼻腔内に投与したときの最大尿排泄速度は、0.2  $\mu$ g/kg を静脈内投与したときのそれよりも小さく、また全尿量も約 1,200%とほぼ同程度であり、薬理的なバイオアベイラ

ビリティーは全尿量から見積もると2%程度と思われた。この値は、第3章で血漿中濃度から求めたバイオアベイラビリティ値とほぼ一致していた。一方、ベスタチンを併用して $\alpha$ -hANPを投与すると、 $\alpha$ -hANP単独投与と同様に最大尿排泄速度は $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈内投与時よりも小さかったが、尿量は約7,000%であり薬理的なバイオアベイラビリティーは10%前後と思われた。これは、ベスタチンにより $\alpha$ -hANPが鼻腔内および鼻粘膜中での分解が抑制された結果、intactな状態で持続的に吸収されたためと考えられる。しかし、この遅い尿排泄速度では対応すると考えられる十分な降圧作用が維持されないと思われた。このことは第3章で予測した結果、すなわち、酵素阻害剤がバイオアベイラビリティを増加するのに有用であり、バイオアベイラビリティの増加により利尿効果の向上と持続性が得られることが検証された。

これに対し poly-L-Arg(50)を1.0%濃度で鼻腔内に併用投与すると、最大尿排泄速度は静脈内投与時の $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ で得られる速度に匹敵し、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ を静脈内投与したときにみられた急激で強い利尿効果が抑えられた。しかも全尿量は $100\mu\text{g}/\text{kg}$ を静脈内投与したときの効果に等しいか、それ以上となった。これは、静脈内投与時にはこの投与量で過剰投与による薬理効果の飽和がみられるのに対し、経鼻投与では poly-L-Argの併用によって $\alpha$ -hANPの吸収が静脈内投与と比較して有効な速度で持続することにより、体内 $\alpha$ -hANP量と薬理効果の関係が比較的パラレルになったためと推察される。

#### 4.1.2 PK-PD モデルの検証

第3章第5節ではラットでの $\alpha$ -hANP経鼻投与での利尿効果の予測を、確立したPK-PDモデルを用いて行なっているが、poly-L-Argを吸収促進剤に用いた結果は作用時間の遅れがさらにみられたものの、利尿作用が増強された結果は予測と一致した。

Poly-L-Argを促進剤として用い経鼻吸収した場合、lag timeが認められたことから、Fig.27のPK-PDモデルに、このlag timeを導入してシミュレーションを行い実測値との対比をさらに詳細に検討した。投与量 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ にて、パラメータはTable 5およびTable 6の値を用い、更にパラメータとしてlag timeを14 minに設定してシミュレーションした結果をFig.34に示した。

Poly-L-Arg を促進剤として用いて経鼻投与した結果を構築した PK-PD モデルによりシミュレーションを実施したところ、実線で示すように実測値に近い値となった。この時、単独投与に比べて吸収速度定数は 2 倍程度しか増加しなかったものの、血中濃度のバイオアベイラビリティは 10 倍以上増加した。この結果は利尿効果を高める上で必要と考えられた第 3 章第 2 節でのシミュレーション結果を裏付けるものであった。

すなわち、PK-PD モデルを用いた製剤設計の最適化への有用性について検証できたことから、PK-PD モデルによる検討は投与設計における重要なファクターであることが再度示めされた。

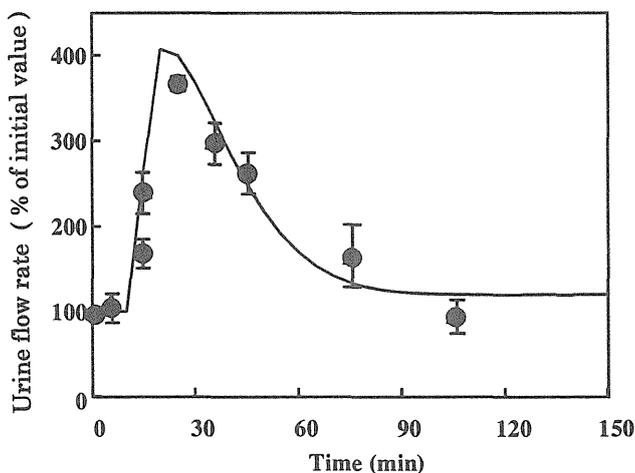


Fig.34 Urine flow rate-time curve after i.n. administration of  $\alpha$ -hANP with poly-L-Arg(50) in rats.

● : i.n. with poly-L-Arg(50) (observed)  
 Solid line : simulated curve

## 第 2 節 サケカルシトニンへの応用 <sup>71)</sup>

サケカルシトニン(sCT)は 32 個のアミノ酸からなる分子量 3,432 のペプチドホルモンであり、ページェット病および骨粗鬆症など高カルシウム血症に用い

られる治療薬である<sup>73-75)</sup>。これらの疾患は一般に長期間の治療を必要とし、投与経路は皮下および筋肉内注射で投与されている。しかしながら、注射は患者に対して苦痛を与えたり、局所的な炎症を引き起こす場合が多い。また、注射投与初期に血中濃度が高くなり吐き気や潮紅などの副作用を発現する場合がある<sup>76)</sup>。そのため sCT の新しい薬物送達法として経鼻投与が試みられてきた<sup>77,78)</sup>。鼻腔内投与における薬理的なバイオアベイラビリティは 3%程度と極めて低いため、胆汁酸塩および界面活性剤などを用いた sCT の経鼻吸収促進の研究<sup>77,78)</sup>がなされてきたが、第 2 章第 1 節で示したように、これらのほとんどは鼻粘膜損傷と吸収性の面から、実用化にほど遠いのが現状であった。

そこで本節では前節と同様に促進効果および安全性の面から経鼻吸収促進剤として現在最も可能性の高い poly-L-Arg (50)を用い、sCT の鼻粘膜吸収効果について薬理効果面から検討した。

sCT 鼻腔内投与後の血漿中 Ca レベルは投与 5 分前に測定した sCT 血漿中 Ca 濃度の百分率として計算した。また、薬理効果としての $\Delta D$  (血漿中 Ca レベルの総減少量) は 0~6 時間までの血漿中 Ca レベルの減少量とし、次式により求めた。

$$\Delta D (\%) = (AUC_b - AUC_p) / AUC_b \times 100 \quad (18)$$

ここで、 $AUC_b$  は 0~6 時間までの血漿中 Ca 濃度レベルを 100%(コントロール)としたときの血漿中 Ca 濃度-時間曲線下面積、 $AUC_p$  は sCT 鼻腔内投与後の血漿中 Ca 濃度-時間曲線下面積である。

Fig.35 および Table 8 に sCT 溶液を鼻腔内に投与したときの血中 Ca 濃度の時間推移および得られた薬力学的パラメータを示す。

sCT 溶液を鼻腔内に投与すると、血中 Ca 濃度は生理食塩水のみを投与したときにくらべ有意に低下し、最大 Ca 濃度低下効果( $D_{max}$ )が投与後 90 分に観察されコントロールレベルより 25%減少した。しかし、薬理効果は持続せず消失は速やかで投与 240 分後にはほぼコントロールレベルに戻った。この結果は Morimoto ら<sup>79)</sup>や Schipper ら<sup>80)</sup>の結果と類似していた。一方、poly-L-Arg を併用投与すると薬理効果の発現は sCT のみを投与したときより早く、血中 Ca 濃

度は投与後 180 分まで減少を続け、 $D_{\max}$  で最大 30%強の Ca 濃度の低下がみられた。また薬理効果の消失も穏やかであり、少なくとも投与 6 時間まで効果が持続していた。これらの結果より計算された sCT 溶液および poly-L-Arg 含有 sCT 溶液の  $\Delta D$  はそれぞれ 8.5 および 23.9%であり、poly-L-Arg の併用で  $\Delta D$  は約 3 倍に増加した。

Hanson ら<sup>77)</sup>は sCT の鼻腔内投与後の吸収改善に促進剤として数種の界面活性剤または胆汁酸塩を併用した結果、sCT(10 IU/kg, 生理食塩液) 鼻腔内投与後

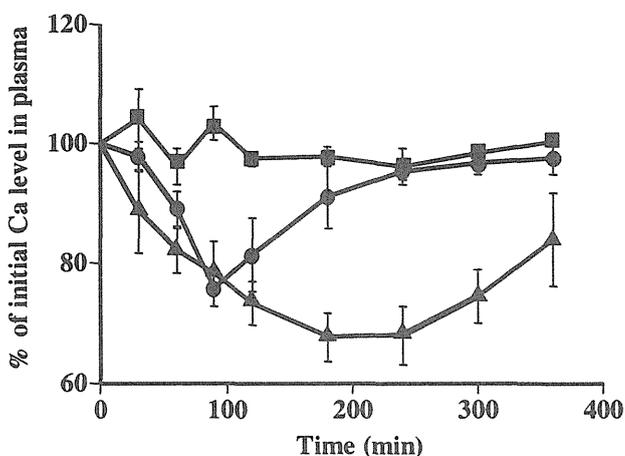


Fig.35 Plasma calcium level-time curve after i.n. administration of s-CT in rats.

■ : Control, ● : i.n. without poly-L-Arg, ▲ : i.n. with 1% poly-L-Arg(50)  
 Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of at least 3 experiments.  
 Dotted line means the control level.

Table 8 Hypocalcemic effects of sCT after i.n. administration in rats

	$D_{\max}$ (%)	$\Delta D$ (%)
without poly- L-Arg	24.2	8.5 $\pm$ 1.5
with poly- L-Arg(1.0w/v%)	32.3	23.9 $\pm$ 3.6

の血中 Ca 濃度は 1 時間で最大 17%減少し、この溶液にこれら促進剤を併用することで投与 1 時間後に  $D_{max}$  が 25%~30%になったことを報告している。Poly-L-Arg は、効果の発現が上述した促進剤よりも遅いものの、6 時間まで持続性を有するすぐれた効果を示した。Schipper ら<sup>80)</sup>の報告では、sCT の 3.35 および 13.4 IU/kg の静脈内投与で投与 4 時間までの  $\Delta D$  は約 25%であり、この投与量範囲で薬理効果の飽和が観察されている。本研究で用いた投与量 10 IU/kg での鼻腔内投与で得られた  $\Delta D$  ( 23.9%、0-4 時間では 23.5% ) と比較すると、poly-L-Arg の併用で静脈内投与に匹敵する薬理効果が得られることが示唆された。

本節で検討した poly-L-Arg の併用系では、より低 sCT 投与量でも最大の薬理効果が十分得られる可能性が高く、投与量に関する検討をさらに行うことで実用化が期待される。

### 第 3 節 顆粒球コロニー刺激因子への応用<sup>50)</sup>

顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor ; G-CSF) は、骨髄前駆細胞の増殖刺激と顆粒球コロニーの形成、分化を促進する。組み換え型ヒト G-CSF (rhG-CSF) は医薬品として急性白血病、形成不全性貧血、白血球減少症等の治療に使用されている<sup>81,82)</sup>。rhG-CSF の臨床応用は、皮下投与あるいは静脈内投与のいずれかに制限されているため、rhG-CSF を含むタンパク性医薬品の臨床使用には、コンプライアンス面から新しい投与ルートの検討が行われてきた。rhG-CSF の経口投与の可能性も報告されている<sup>83,84)</sup>が、腸管透過性が極めて低く、また、酵素および酸の分解に関連した問題がある<sup>85,86)</sup>。rhG-CSF は、肺から迅速かつ効果的に吸収されると報告があるものの、この経肺投与は、投与した薬物のほとんどが、口、気管、食道および投与用装置に付着してしまうため<sup>87-89)</sup>、実際の肺葉への薬物送達は困難を極めていいる。それゆえ rhG-CSF の新しい投与ルートとして経鼻投与の検討が求められている<sup>90-92)</sup>。

そこで、本節ではモデルタンパク性医薬品として rhG-CSF を選択し、rhG-CSF 鼻粘膜吸収に対する poly-L-Arg (50) の吸収促進効果を皮下注射レベルまで高められるか否かを検討し、更なる展開の可能性について判断した。rhG-CSF

としては175個のアミノ酸からなる分子量18,850のナルトグラスチムを用いた。

Fig.36にrhG-CSFのラットでの*i.v.*と*i.n.*投与を $15\mu\text{g/kg}$ と $50\mu\text{g/kg}$ でそれぞれ行った際の血漿中濃度-時間曲線を示し、Table 9に得られたrhG-CSFの薬物速度論的パラメータを示す。*i.v.*投与後のrhG-CSF血漿中濃度は指数関数的に低下した。消失モデルは1-または2-コンパートメントモデルにフィットし、両者のモデルから得られた消失パラメータはほとんど同一であった。

1.0 w/v%濃度のpoly-L-Arg(50)と*i.n.*で併用投与したrhG-CSF血中濃度はrhG-CSF単独投与で得られた値と比べ著しく増加した。1.0%濃度のpoly-L-Arg(50)と*i.n.*で併用投与で得られた $AUC_{\infty}$ は有意に増加した。 $F_{\infty}$ はrhG-CSFの*i.n.*投与で1-コンパートメントモデルで計算したところ、1.0%濃度のpoly-L-Arg(50)併用投与の有り無しでそれぞれ11.3と1.03%であった。これらの値は第2章第2節のFig.20 bを用いて $F_{\infty}$ とFDの関係から予測した値(11%と1%)と非常に近かった(Fig.37)。

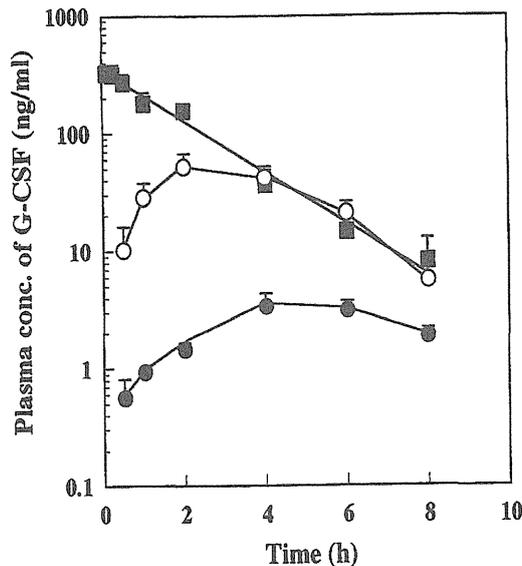


Fig.36 Plasma rhG-CSF concentration after *i.v.* and *i.n.* administration to rats.  
■: *i.v.* administration of rhG-CSF( $15\mu\text{g/kg}$ );  
●: *i.n.* administration of rhG-CSF( $50\mu\text{g/kg}$ ) alone (control);  
○: *i.n.* co-administration of rhG-CSF( $50\mu\text{g/kg}$ ) with 1.0w/v% poly-L-Arg (50)  
Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

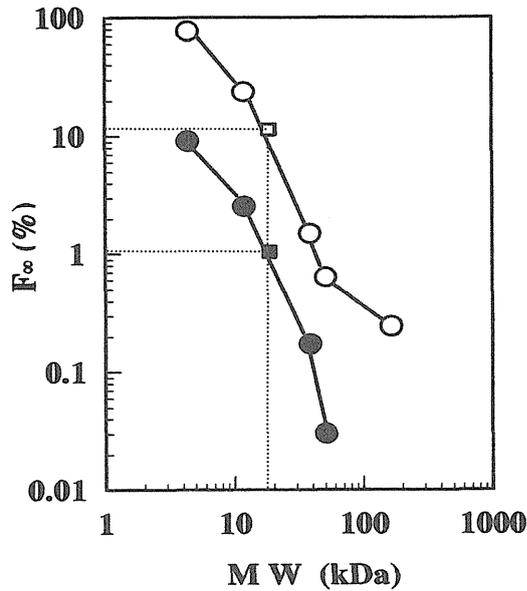


Fig. 37 Relationships between the  $F_{\infty}$  and the molecular weight of FITC-dextrans.

- : control(FITC-dextran alone);    ○: with poly-L-Arg
- :  $F_{\infty}$  of rhG-CSF without 1.0w/v% poly-L-Arg(50)
- :  $F_{\infty}$  of rhG-CSF with 1.0w/v% poly-L-Arg(50)

Fig.36 と Table 9 に示すとおり、rhG-CSF が 1.0%濃度の poly-L-Arg(50)と経鼻的に併用投与されると、その血漿中濃度は rhG-CSF 単独投与に比べ著しく増大し、その濃度レベルは長時間持続した。その結果、 $C_{max}$  と  $F_{\infty}$  はそれぞれ 16 倍、11 倍高かった。Poly-L-Arg(50)の i.n.併用投与後の rhG-CSF の  $C_{max}$  は Kuwabara ら<sup>93)</sup>の報告の rhG-CSF 単独での s.c.投与後の値とバイオアベイラビリティは異なるものの、ほとんど同じであった。ラットの i.v.投与で得られた rhG-CSF の生物学的半減期 ( $t_{1/2}$ ) とヒトでの分布容積 (Vd) から計算した全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) はヒトでの値とほとんど同じであり<sup>94)</sup>、本研究で得られたラットでの薬物動態学的パラメータは、血漿サンプルの分析法は異なるものの、ヒトへの応用に有用である。

Table 9

Pharmacokinetic parameters of rhG-CSF after *i.v.* and *i.n.* administration to rats

	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	Vd (ml)	Vd <sub>β</sub> (ml)	CL <sub>est</sub> (ml/h)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml·h)	AUC <sub>0-8h</sub> (ng/ml·h)	F <sub>0-8h</sub> <sup>a</sup> (%)	F <sub>0-∞</sub> <sup>b</sup> (%)
<i>i.v.</i> administration											
dose: 15 μg/kg											
one-compartment model	1.36	---	11.8	---	5.88	---	---	665.2 ± 30.8	678.6 ± 35.9	---	---
two-compartment model	---	1.53	---	14.6	6.65	---	---	669.9 ± 32.5	685.0 ± 37.1	---	---
<i>i.n.</i> administration											
dose: 50 μg/kg											
control	---	---	---	---	---	3.38	4	19.1 ± 5.2	23.3 ± 7.1	0.84	1.03
1% poly-L-Arg	---	---	---	---	---	53.9	2	245.0 ± 17.9 <sup>c</sup>	256.2 ± 11.6 <sup>c</sup>	10.8	11.3

<sup>a</sup>: F<sub>0-8h</sub> (%) = (AUC<sub>0-8h</sub> after *i.n.* administration / AUC<sub>0-8h</sub> after *i.v.* administration) × 15/50 × 100

<sup>b</sup>: F<sub>0-∞</sub> (%) = (AUC<sub>0-∞</sub> after *i.n.* administration / AUC<sub>0-∞</sub> after *i.v.* administration) × 15/50 × 100

<sup>c</sup>: P < 0.001 compared with control (Student's *t*-test)

The AUC represents the mean ± S.E. (n = 3).

F was calculated using the AUC<sub>0-8h</sub> after *i.v.* administration obtained from the one-compartment model.

ヒトで rhG-CSF を 1.0 μg/kg 皮下投与したとき、C<sub>max</sub> は約 1.5 ng/ml であった<sup>94)</sup>。もし、rhG-CSF 1.0 μg/kg をラットで poly-L-Arg と経鼻的に併用投与されると、本研究で得られた 50 μg/kg での C<sub>max</sub> から予測すると、C<sub>max</sub> は約 1.1 ng/ml と見積もられる。このレベルはヒトでの S.C.投与レベルとほとんど同じであり、rhG-CSF をヒトで poly-L-Arg を用い 1.0 μg/kg の投与量で経鼻投与した際の薬理学的効果は S.C.投与と同等であると推定される。このように、poly-L-Arg は rhG-CSF の経鼻吸収を実用化レベルまで高めることができると考えられた。

さらには、poly-L-Arg はタンパク性薬物やサイトカイン例えばヒト閉経期ゴナドトロピン (約 30kDa)、ソマトロピン (約 22kDa)、インターロイキン、インターフェロン (15-30kDa) などを適切に経鼻吸収させるために使用でき、様々な経鼻 DDS の開発が可能であると思われた。

#### 第4節 小括

第2章で得られた結果から、poly-L-Arg は FD の平均分子量が 4.3~167 kDa

の範囲で経鼻吸収を *in vivo* ラットモデルにて促進したため、モデル薬物として  $\alpha$ -hANP、カルシトニンおよび rhG-CSF に適用して実用化の可能性を *in vivo* 薬理作用を調べることで確認した。その結果、実用モデル薬物の3種とも実用化に求められる吸収に達していて、薬理的なバイオアベイラビリティは  $\alpha$ -hANP およびカルシトニンで静注に、rhG-CSF は筋注に匹敵しており、十分な薬理効果が得られることを示した。製剤開発上、求められるバイオアベイラビリティを10%と仮定した場合、poly-L-Arg の併用投与によって分子量 20 kDa までのペプチドおよびタンパク性薬物の経鼻吸収実用化の可能性の範囲が広がることが示唆された。

Poly-L-Arg を吸収促進剤として併用投与することで高いバイオアベイラビリティおよび薬理効果が確保され、安全性が高い経鼻吸収製剤が実用化できると結論付けられた。

## 結 論

鼻粘膜を投与経路としてのペプチドおよびタンパク性製剤の開発や実用化の試みが長い間なされてきたが、残念ながら DDS 製剤として汎用的に活用できていないのが現状である。経鼻吸収において、高い吸収性を与える化合物は高い損傷性があり、逆に損傷が大きいため粘膜炎吸収性が高いと研究報告され、考えられてきた。また、バイオアベイラビリティは必ずしも高いとはいえず、限られた成分に限定されているのが現状である。

そうした中で、カチオン性の多糖類であるキトサンが生理活性医薬品の鼻粘膜吸収性を、粘膜炎障害性をほとんど示さずに著しく改善することが報告された。著者はカチオン性物質がペプチド薬物の鼻粘膜吸収において理想的な促進剤になり得ると考え、以下の検討を積み重ねた。すなわち、1) *in vitro* 系における高分子薬物の経鼻吸収性改善へのアプローチ、2) 実用性の高い経鼻吸収促進剤の探索として、カチオン性化合物のスクリーニングおよびポリ-L-アルギニンの発見、見出したポリ-L-アルギニンによる経鼻吸収性の最適化、3) 製剤設計に必要な薬動学/薬力学モデリング、4)  $\alpha$ -hANP 等をモデル薬物として用いたポリ-L-アルギニン併用投与による *in vivo* 薬理効果の検討による実用化研究である。

以下本研究により得られた知見について要約する。

(1) 鼻腔内投与での薬物の分子量と薬物透過性との関係を *in vitro* にて検討した結果、モデル高分子薬物 FITC-dextran (FD; 分子量 4.4~71.2 kDa)、臭化イプラトロピウム (IPT-Br)、およびクロモグリク酸ナトリウム (DSCG) の  $\log P$  値は  $\log MW$  と直線的な関係を示し、この直線関係はそれら薬物が *paracellular* 経路を透過することを仮説により検証した。吸収促進剤として胆汁酸誘導体 STDHF をモデル促進剤として用いた場合、得られた直線は傾きが変わらず  $y$  切片のみが大きくなり、STDHF は主に有効透過面積を増加させたと考えられた。しかし、鼻粘膜の著しい損傷を伴っていたことから、安全に経鼻吸収性を高めるには鼻粘膜細胞を損傷することなく *paracellular* 経路の吸収を促進できる手段が必要であることが示された。

(2) 実用性の高い理想的な経鼻吸収促進剤の探索研究のベースとして、従来の吸収促進剤の特徴を検討した。安全性の評価方法としてラット赤血球溶血性およびウサギ鼻粘膜からの膜構成成分の漏出性を評価した結果、従来の吸収促進剤は鼻粘膜吸収性が高いと膜損傷を強く引き起こすことを相関関係を用いて定量的に結論付けた。一方、種々カチオン性化合物のスクリーニングの結果、ポリ-L-アルギニンがラット赤血球溶血性とウサギ鼻粘膜成分の漏出作用を示すことなく、モデル高分子薬物 FD-4 (4.4 kDa) 吸収を著しく向上させることを見出した。

(3) ポリ-L-アルギニンによる経鼻吸収性の最適化の検討から、分子量が 45.5 ~92 kDa のポリ-L-アルギニンは平均分子量が 4.4~167 kDa までのモデル薬物 FD の経鼻吸収を *in vivo* ラットモデルで著しく促進し、FD 経鼻吸収の改善効果すなわちバイオアベイラビリティの向上は極めて高いことがわかった。モデル薬物の分子量とバイオアベイラビリティとの関係を検討した結果、製剤開発上求められるバイオアベイラビリティを 10%と仮定した場合、ポリ-L-アルギニンを併用投与することによって分子量 20 kDa までのペプチドおよびタンパク性薬物の経鼻吸収製剤の実用化の可能性が示された。

(4) 経鼻吸収されたモデルペプチドの血漿プロファイルと薬理効果のモデリングを行うことで投与設計の方向性が明確化できると考え、モデル薬物として  $\alpha$ -hANP を選び、薬理効果（利尿作用）のシミュレーション方法を検討した。ラットでの  $\alpha$ -hANP 経鼻投与における利尿作用が薬効コンパートメントや生体恒常性システムを持たせた PK-PD モデルで推測できることを示した。この PK-PD モデルは  $\alpha$ -hANP の *i.v.*と *i.n.*投与でのどの投与量においても利尿作用の推移を表現できた。吸収速度とバイオアベイラビリティからのシミュレーションにより  $\alpha$ -hANP の *i.n.*投与での薬理効果（利尿効果）を推定できたことから、経鼻吸収製剤の製剤設計手法として有用であることが示された。

(5) ポリ-L-アルギニンを用いることで高分子量モデル薬物 FD の経鼻吸収性を改善でき、PK-PD モデルから薬理効果への反映が明確に示せたことから、実用モデル薬物として  $\alpha$ -hANP、カルシトニンおよび rhG-CSF を選定して、経鼻製剤実用化の可能性を *in vivo* 薬理作用を調べることで確認した。その結果、実用モデル薬物の 3 種とも実用化に求められる吸収レベルに達していて、薬理学

的なバイオアベイラビリティは $\alpha$ -hANP およびカルシトニンで静注に、rhG-CSF は筋注に匹敵しており、十分な薬理効果が得られることを示した。ポリ-L-アルギニンを吸収促進剤として併用投与することで高いバイオアベイラビリティおよび薬理効果が確保され、安全性が高い理想的な経鼻吸収製剤が実用化できると結論付けられた。

以上、ペプチドおよびタンパク質医薬品の経鼻吸収製剤として実用化が可能な投与設計に対する基盤研究ができたことから、今後益々開発要求が高まると思われる経鼻粘膜投与製剤の開発研究において、本研究は有用な知見を与えたものとする。

## 謝 辞

本研究に際し、城西大学薬学部病院薬剤学教室 森本雍憲教授には研究テーマの決定から結論に至るまで、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

また、城西大学薬学部臨床薬物動態学教室 杉林堅次教授および城西大学薬学部薬物治療学教室 夏目秀視講師には終始研究を見守っていただき、研究および実験の方向性につき、温かいご指導を賜りました。ここにあらためて感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださいました 日産化学工業株式会社 迫田良三常務取締役、藤川義弘取締役医薬品事業部長に厚く御礼申し上げます。

共同研究者として本研究の遂行に多大なるご助言をいただきました富山医科薬科大学 細谷健一教授、城西大学薬学部病院薬剤学教室 小林大介講師、西武入間病院 山科元章博士、新潟県立柏崎病院 山口正俊博士、城西大学薬学部病態解析学講座 大竹一男助手に心より感謝いたします。

また、ディスカッション等を通して研究を一層深めていただきました 城西大学薬学部病院薬剤学教室 沼尻幸彦助手、同教室 上田秀雄助手、薬剤学教室 関俊暢助手に深謝いたします。

実験および資料の整理にご協力いただきました城西大学薬学部の堀聖一修士、築根忠司修士、阿久津孝修士、岩田聡子修士、佐藤いづみ修士ならびに城西大学薬学部病院薬剤学教室教室諸氏、さらに日産化学工業株式会社 物質科学研究所物質解析研究部 織田寿久主任研究員に感謝いたします。

2001年9月

## 実験の部

# 実験の部

## 第1章 実験の部

### 1. 試薬

Fluorescein isothiocyanate-labeled dextran : FITC-dextran (FD-4 ; MW 4400、FD-10 ; MW 9400、FD-40 ; MW 36500、FD-70 ; MW 71200)、臭化イプラトロピウム(IPT-Br)、クロモグリク酸ナトリウム(DSCG)、ペントキシフィリン(PX)はシグマ社、アンチピリン(ANP)、5-フルオロウラシル(5-FU)、シクロバルピタール(CB)は東京化成工業、アミノピリン(AMP)、安息香酸ナトリウム(BA)、テオフィリン(TP)、リドカイン(LC)は和光純薬工業株式会社(大阪)、<sup>14</sup>C-エタノールは室町化学工業株式会社(東京)よりそれぞれ購入した。硝酸イソソルビド(ISDN)は東光薬品工業株式会社(東京)より、ジクロフェナクナトリウム(DC-Na)はニチバン株式会社(東京)より、sodium taurodihydrofusidate (STDHF)はLeo Pharm社(デンマーク)より分与された。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 2. オクタノール／リンゲル分配係数の測定法

予めリンゲル液を飽和させ、37℃に温めておいたオクタノールと透過実験時に適用する37℃の薬物の補正リンゲル溶液を20 mlのバイアル中に同量加え、37℃で24 hr 攪拌し、オクタノール層とリンゲル液層、それぞれの層の薬物濃度をHPLCで測定して、分配係数を求めた。EtOHの分配係数に関しては文献 [ L.G.Herbette et.al. *Biophys.J.*, 49, 91 (1986) ] のデータを用いた。

### 3. 実験動物

ウィスター系雄性ラット(250~300 g) および日本白色種雄性家兎(JW、2.3~2.5 kg)は東京実験動物(東京)からそれぞれ購入した。

#### 4. 摘出鼻粘膜の調製

体重 2.0~3.0 kg の雄性日本白色種家兔(東京実験動物)の耳介静脈から空気を注入することによりすばやく屠殺し、鼻中隔を摘出し、予め氷冷しておいたリングル液中に移した。氷冷リングル液中で鼻中隔から粘膜を剥した。

#### 5. 鼻粘膜透過実験

摘出した鼻粘膜をFig.38に示したアクリル製のUssing型chamber (有効透過面積  $0.5 \text{ cm}^2$ 、容積 11 ml) に速やかにマウントし、chamberの両側をリングル液で満たし、2 hr preincubation を行った後、粘膜側 (donor側) のリングル液を完全に抜き取り、薬物溶液を11 ml加え透過実験を開始した。このドナーセルから鼻粘膜を介してレシーバー側に透過してくる薬物をサンプリングし測定した。サンプリングは漿膜側(receiver側)から1 ml採取することにより行い、体積を一定にするために同量の新しいリングル液を戻した。採取したサンプル中の薬物濃度をHPLCで定量した。透過実験はすべて $37^\circ\text{C}$ 恒温器中で行い、粘膜への酸素の供給とchamberを満たすmediumの攪拌を行うためchamber下部から $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95:5)ガスによるbubblingを行った。

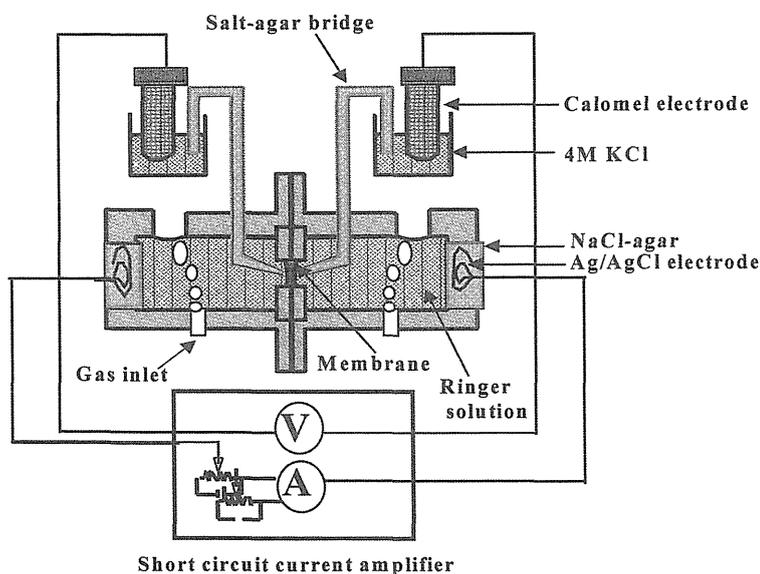


Fig. 38 Schematic representation of Ussing type diffusion chamber.

## 6. 電気生理学的パラメータの測定

Fig.38 に示した Ussing 拡散セルを用いて前項の鼻粘膜透過実験と同じ条件下、電位差測定装置 (CEZ-9100、日本光電製) を用いて、open-circuit condition で実施した。膜電位 (PD) は膜両側の近傍に設置した二つの塩橋 (3%寒天、3 M KCl) と連結したカロメル電極にて測定し、短絡電流値 ( $I_{sc}$ ) はそれぞれのチャンバー中に銀/塩化銀電極を挿入し、経時的に短時間 (約 3 秒間) short-circuit condition に切り替えることで測定した。膜抵抗 ( $R_m$ ) はオームの式に従い、 $R_m = PD / (I_{sc} \times A)$  から算出した。ここで、 $A$  は膜の有効拡散面積 ( $0.5 \text{ cm}^2$ ) であり、リングル液により生じる溶液抵抗 ( $< 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) を補正した。

## 7. 薬物定量法

FITC-dextran は分光蛍光光度計により、ANP、MP、ISDN、5-FU、TP、CB、LC、BA、PX、DSCG、IPT-Br は HPLC により、EtOH は液体シンチレーションカウンターにより定量した。

分光蛍光光度計    RF-5000    島津製作所

excitation wavelength    495 nm

emission wavelength    515 nm

サンプル 1 ml にリングル液を 4 ml 加え希釈した後に測定した。

HPLC 装置

ポンプ    LC-6A または LC-6AD    島津製作所

検出器    SPD-6A    島津製作所

データ処理    C-R3A、C-R4A または C-R6A    島津製作所

液体シンチレーションカウンター

サンプル 1 ml をシンチレーションカクテル 10 ml 中に加え攪拌し一晩暗所に静置した後シンチレーションカウンターにて測定した。

HPLC の定量条件を Table 10 に、シンチレーションカクテルの処方を Table 11 に示した。

Table 10 HPLC 定量条件 (移動層、測波長、内部標準物質の順)

ANP	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 30 : 70 ) + 5 mM Sodium dodecyl sulfate p-Hydroxybenzoic acid methyl ester	245nm
AMP	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 40 : 60 ) + 5 mM Sodium dodecyl sulfate p-Hydroxybenzoic acid methyl ester	254nm
ISDN	Water : Acetonitrile ( 50 : 50 ) p-Hydroxybenzoic acid ethyl ester	220nm
5-FU	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Methanol ( 95 : 5 ) + 1.5 mM Tetra-n-butylammonium hydrogensulfate absolute calibration method	270nm
TP	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 90 : 10 ) absolute calibration method	272nm
CB	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 65 : 35 ) + 5 mM Sodium dodecyl sulfate absolute calibration method	205nm
LC	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 70 : 30 ) + 5 mM Sodium 1-hexanesulfonate p-Hydroxybenzoic acid ethyl ester	230nm
BA	0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitrile ( 70 : 30 ) (pH 2.5) p-Hydroxybenzoic acid ethyl ester	230nm
PX	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 70 : 30 ) p-Hydroxybenzoic acid methyl ester	274nm
DSCG	5 mM Tetrabutyl ammonium : Methanol ( 60 : 40 ) absolute calibration method	329nm
IPT-Br	0.1%Phosphoric acid : Acetonitrile ( 60 : 40 ) + 5 mM Sodium dodecyl sulfate absolute calibration method	210nm

Table 11 シンチレーションカクテルの処方

Polyoxyethylene(10) octylphenyl ether	333 ml
2,5-diphenyloxazole	4.0 g
1,4-bis-2(5-phenyl-2-oxazolyl)benzene	0.4 g
Toluene	1000 ml

## 8. 電子顕微鏡写真のための鼻粘膜サンプルの調製

鼻粘膜の透過実験終了後、粘膜周囲に付着している余分な水分をキムワイプで拭き取った後、直方体の発砲スチロールの上に粘膜側を上にしてホチキスで固定した。これを等張ホルマリン液中に 24 時間浸して組織切片の固定を行った。固定した組織標本を脱水するため 50(v/v)%から順次高濃度溶液に移し最後に無水 EtOH 100% に浸し完全脱水した。脱水終了後、発砲スチロールのみを取り去り、無水酢酸イソアミル中に 24 時間以上浸した。これを臨界点乾燥をしてイオンコーターにより表面処理を施した後に電子顕微鏡写真を撮影した。

## 第 2 章 実験の部

### 1. 試薬

FITC-dextran ( FD-4 ; MW 4.4 kDa、FD-10 ; MW 12.0 kDa、FD-40 ; MW 38.3 kDa、FD-70 ; MW 50.7 kDa、FD-150 ; MW 167.0 kDa)、塩酸ポリ-L-アルギニン ( poly-L-Arg(10) ; MW 8.9 kDa、poly-L-Arg(50) ; MW 45.5 kDa、poly-L-Arg(100) ; MW 92.0 kDa )、抗凝血薬 (クエン酸デキストロースリン酸アデニン、CDP-A) およびウレタンは SIGMA 社 (St. Louis、U.S.A.) から購入した。また、L-アルギニン、L-リジンおよびキトサンは東京化成工業株式会社 (東京)、塩化セチルピリジニウムは関東化学株式会社 (東京)、ドデシル硫酸ナトリウムは和光純薬工業株式会社 (大阪)、コラーゲンは株式会社ニッピ (東京) よりそれぞれ購入した。抗凝血薬 (ノボ・ヘパリン注 1000) はヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 (東京) から購入した。さらに、BCA プロテイン・アッセイ・キットは Pierce 社 (アメリカ : 輸入元 フナコシ) から購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

### 2. 実験動物

ウィスター系雄性ラット (250~300 g) および日本白色種雄性家兎 (JW、2.3~2.5 kg) は東京実験動物 (東京) からそれぞれ購入した。

### 3. FDs の in vivo 単回静脈内投与実験法

ウィスター系雄性ラット (250~300 g) の腹腔内にウレタン生理食塩液 (25 w/v%, 1 g/kg) を投与し、麻酔した。ラットを固定台に背位固定した後、鼻腔内投与実験法と同様の生理的条件にするため気道および食道への手術を施し、右頸静脈と右大腿静脈を露出した。調製した FD-4 生理食塩液 (2.5 mg/ml、3.3 mg/kg)、調製した FD-10、FD-40 および FD-70 生理食塩液 (投与量 0.2、0.4、0.8、2.5 mg/kg) を右頸静脈へ投与し、ヘパリンで前処理した注射筒を用いて経時的に右頸静脈より採血した。1 回の採血量は 0.15 ml とした。血液は直ちに 4 °C、16,000 rpm (18,000 G) で 5 分間遠心分離し血漿を得た。

### 4. FDs の in vivo 鼻腔内投与実験法

ウィスター系雄性ラット (250~300 g) の腹腔内にウレタン生理食塩液 (25 w/v%, 1 g/kg) を投与し麻酔した。ラットを固定台に背位固定した後、Hirai らの in vivo 鼻腔内投与実験法に準じて手術を行った<sup>95)</sup>。まず、正中線に沿って喉を切開し、気道を露出した。気道を確保するために、気管にポリエチレンチューブ (Hibiki No. 8) を挿入した。次に、鼻腔から消化管への薬液の流出を防ぐために先端を塞いであるシリコンチューブ (外径 2 mm、内径 1 mm) を食道側から鼻腔側に向けて挿入した。さらに、鼻腔から口腔に抜けている穴 (鼻腔蓋管) からの薬物溶液の漏出を防ぐために、この部分を接着剤 (アロンアルファ、東亜合成化学, 東京) で塞いだ。次に、ポリエチレンチューブ (約 20cm) の先端にシリコンチューブをつけ、マイクロシリンジに接続し、シリコンチューブを左鼻孔へ挿入 (約 8 mm) し、調製した FD-4 の生理食塩液または各種促進剤を含む FD-4 生理食塩液 (投与量 33 mg/ml、濃度 20%) を鼻腔内へ投与した。促進剤種類およびその適用濃度は Table 2 に示したとおりで行なった。ヘパリンで前処理した注射筒を用いて経時的に右頸静脈より採血を行った。1 回の採血量は 0.15 ml とした。血液は直ちに 4 °C、16,000 rpm (18,000 G) で 5 分間遠心分離し血漿を得た。

### 5. FDs の定量法

血漿サンプルを (control で 160  $\mu$ l、併用系で 50  $\mu$ l) pH 8.5 のホウ砂-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

緩衝液で希釈し (control で 20、併用系で 60 倍)、サンプル中の FDs の蛍光強度を励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nm で蛍光分光光度計 (RF-5000、島津製作所) により測定した。

## 6. 赤血球溶血実験

実験の部第 2 章 4 の FDs の *in vivo* 鼻腔内投与実験法と同様に外科的手術を施し、血液を頸動脈より採血した。血液を抗凝血薬 (クエン酸デキストロースリン酸アデニン; CDP-A) と 9 : 1 の割合で混合し、遠心分離 (377G、5 分間) した。次に得られた赤血球ペレットを pH7 の等張リン酸緩衝液 (PBS) で 4 回洗浄し、赤血球ペレットを PBS で希釈し 10%赤血球標準溶液とした。各種調製した促進剤溶液 (1.75 ml) と赤血球標準溶液 (0.125 ml) を混合した。37°C で 5~10 分間インキュベートし、540G で 2 分間遠心分離した。赤血球溶血度として上清の 543 nm における吸光度を測定した (UV-160A、島津製作所)。

## 7. 膜成分漏出実験

家兎を空気閉塞により屠殺後、鼻中隔を摘出し、予め氷冷しておいたリングル液中に移し、鼻粘膜を鼻中隔軟骨から剥離した。鼻粘膜を Ussing chamber (有効透過面積; 0.5 cm<sup>2</sup>、容積; 4 ml) に速やかにマウントし、チャンパーの両側をリングル液で満たし、2 時間インキュベートを行った。その間 30 分おきに電気生理学的パラメータを読み取り鼻粘膜の *viability* をチェックした。ここで膜電位が -3mV 以上、短絡電流が 30  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> 以上、膜抵抗が 40 から 70  $\Omega$ cm<sup>2</sup> の間のものを実験に使用し、それ以外のものに関しては摘出時に問題があったものとして使用しなかった。粘膜側 (ドナー側) のリングル液を完全に抜き取り各促進剤含有リングル液 (4 ml) を加え、このときを 0 min として実験を開始した。以降、30 min ごとに 120 min までドナー側から 200  $\mu$ l をサンプリングした。本実験はすべて 37°C の恒温器中で行い、粘膜への酸素の供給とチャンパー内の溶媒を攪拌を行うため O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5) によるバブリングを行った。サンプルを定量時まで 5°C で保存した。

## 8. 漏出成分の定量

### 1) タンパク定量法

Bicinchoninate (BCA) が Cu イオンとコンプレックスを形成して紫に発色する BCA 法を採用した。発色剤 2 ml を加え、正確に 2 時間室温で放置し、562nm の吸光度を測定した (UV-160A、島津製作所)。

### 2) リン脂質定量法

Folch 法<sup>96)</sup>に従い、リン脂質が結合している他の脂質や疎水性タンパク質との各種結合力を切断して抽出して測定した。リン脂質をホスホリパーゼ D で加水分解してコリンを遊離させ、そのコリンをコリンオキシダーゼで酸化させる際に同時に生成した過酸化水素をペルオキシダーゼによりフェノールと 4-アミノアンチピリンとを酸化融合させた時の赤色色素を 562 nm にて吸光度測定して求めた。

### 3) 乳酸脱水素酵素(LDH)定量法

乳酸を基質として生成するホルマザンを比色定量する方法 (560 nm) で実施した。

## 9. 形態学的組織切片の作成

ウィスター系雄性ラットに各分子量の poly-L-Arg (0.9%生理食塩水、0.2 ml/kg) をを右鼻腔に投与し、9 時間後にラットを空気閉塞にて屠殺し鼻中隔ごと切り取り 10%ホルマリン緩衝液中に保存し固定した<sup>97)</sup>。ミクロトーム切片はヘマトキシン・エオシン染色し、左鼻腔をコントロールとして比較評価した。

## 第 3 章 実験の部

### 1. 試薬

$\alpha$ -hANP 原末 (SUN4936 ; Lot No.3689306)は、サントリー株式会社(医薬事業部、群馬)より分与された。EDTA は同仁化学研究所(東京)から、ウレタンはシグマ社(米国)からアプロチニン(生化学用)は和光純薬工業株式会社(大阪)から、日本薬局方生理食塩液および日

本薬局方リンゲル液は大塚製薬株式会社(東京)から、それぞれ購入した。その他の試薬は特級品を用いた。

## 2. 実験動物

10~12週齢(体重270~300g)のウイスター系雄性ラットを石川実験動物(埼玉)より購入して用いた。

## 3. 溶液調製法

### 1) 注射用 $\alpha$ -hANP 原液

$\alpha$ -hANP 原末 23.5 mg を正確に量り、5%マンニトール水溶液に溶解させ全量を 10 ml とした。この溶液中の  $\alpha$ -hANP 濃度は 2000  $\mu$ g/ml である。各投与量  $\alpha$ -hANP 静注実験における溶液濃度は投与ドーズに応じて希釈して使用した。点滴静注時の  $\alpha$ -hANP 濃度は 1.5  $\mu$ g/ml に調製した。

### 2) 採血用 EDTA-アプロチニン溶液

アプロチニン(生化学用)を約 2 mg と EDTA 24 mg を量り、生理食塩液に溶解させ全量を 10 ml とした。

## 4. $\alpha$ -hANP の in vivo 単回静脈内投与実験法

ウイスター系雄性ラットの腹腔内にウレタン生理食塩水溶液(25w/v%、5ml)を投与し麻酔した。ラットを固定台に背位固定した後、左右の頸静脈と左大腿静脈を露出した。調製した  $\alpha$ -hANP 溶液を左大腿静脈より投与し、EDTA-アプロチニン溶液で前処理した注射筒を用いて経時的に左右の頸静脈より採血した。1回の採血量は 0.2ml とした。血液は直ちに 4°C、16,000 rpm で 5 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿は定量時まで -20°C 以下で凍結保存した。

## 5. $\alpha$ -hANP の in vivo 静脈内定速注入実験法

ウイスター系雄性ラットの腹腔内にウレタン生理食塩水溶液(25w/v%、5 ml)を投与し麻酔した。ラットを固定台に背位固定した後、

左右の頸静脈と左大腿静脈を露出した。大腿静脈に静注針(テルモ翼付静注針; テルモ社、東京)を挿入し、調製した $\alpha$ -hANP 溶液は定速注入装置(テルフュージョンシリンジポンプ MODEL STC-525; テルモ社)を用いて注入した。注入速度は 2.4 ml/hr とした。注入開始後、EDTA-アプロチニン溶液で前処理した注射筒を用いて経時的に左右の頸静脈より採血した。 $\alpha$ -hANP の注入は 30 分で中止し、その後も経時的に採血した。1 回の採血量は 0.2 ml とした。血液は直ちに 4℃、16,000 rpm で 5 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿は定量時まで -20℃ 以下で凍結保存した。

## 6. 利尿効果測定法<sup>98,99)</sup>

ウィスター系雄性ラットの腹腔内にウレタン生理食塩水溶液(25 w/v%, 5 ml)を投与し麻酔した。ラットを固定台に背位固定した後、尿道口の上約 3 cm の腹部を正中線に沿って切開し膀胱を露出させた。膀胱に数 mm 切り込みを入れ、そこからポリエチレンチューブ(Hibiki No.3、5 cm)を挿入した。切り口を縫合糸で結んで固定し、膀胱を元の位置に戻して切開部を縫合した。尿が尿道口から出てくるのを防ぐため接着剤(アロンアルファ; 東亜合成化学、東京)で塞いだ。

次に右の大腿静脈を露出して静脈用注射針を挿入し、定速注入装置を用いて最初は 3.6 ml/hr の注入速度で 20 分間、続いて 1.8 ml/hr で 60 分間リンゲル液を前負荷した。それ以降実験終了時まで 1.5 ml/hr の速度で注入を続けた。尿はチューブの先端からあらかじめ秤量してあるマイクロチューブに採集し、その重量を測定して空の重量を差し引き尿量とした。採集された尿量に相当する水分を補うためにその都度リンゲル液を注入した。リンゲル液前負荷終了後、実験を開始する前に 20 分間の尿量を 3 度測定し、それぞれ測定時間で除した値の平均値をコントロール尿排泄速度とした。

## 7. $\alpha$ -hANP 定量法

血漿中  $\alpha$ -hANP 濃度は EIA キット( $\alpha$ -hANP テストワコー; 和光

純薬工業株式会社、大阪)を用いて定量した。本品は酵素免疫測定法(EIA)のサンドイッチ法の原理に基づく血漿中 $\alpha$ -hANP濃度測定用キットである。

#### 1)キット構成

- (1) 抗体結合固相 (抗 $\alpha$ -hANPマウスモノクローナル抗体 1.7 $\mu$ g/ビーズ)
- (2) 酵素標識抗体 (溶解時 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識抗 $\alpha$ -hANPウサギ抗体 200 $\mu$ g/ml)
- (3) 酵素標識抗体溶解用液 (0.1Mリン酸緩衝液 pH7.0)
- (4) 発色剤 (溶解時 オルトフェニレンジアミン 18.5 mmol/l)
- (5) 発色剤溶解用液 (マックルベン緩衝液 pH4.65)
- (6) 過酸化水素水
- (7) 反応停止液 (1N硫酸)
- (8) 緩衝液 0.1M (リン酸緩衝液 pH7.0)
- (9) 標準 $\alpha$ -hANP (溶解時 $\alpha$ -hANP 1000 pg/ml)
- (10) ヒト正常血清

#### 2)測定原理

試料に抗 $\alpha$ -hANPマウスモノクローナル抗体を結合させた抗体結合固相を反応させ、次に酵素(ペルオキシダーゼ)で標識した抗 $\alpha$ -hANPウサギ抗体を反応させると、『抗 $\alpha$ -hANPマウスモノクローナル抗体結合固相-試料中の $\alpha$ -hANP-酵素標識抗 $\alpha$ -hANPウサギ抗体』のサンドイッチ状の複合体が形成される(2-ステップサンドイッチ法)。抗体結合固相に結合した酵素の量は $\alpha$ -hANP量に比例するので、その酵素活性を、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素水を用いて測定し、あらかじめ既知濃度の標準液を用いて作成した検量線から試料中の $\alpha$ -hANP濃度を求める。

### 8. $\alpha$ -hANPの in vivo 鼻腔内投与実験法

実験の部第2章4と同様の外科的手術を施した後、種々濃度の $\alpha$ -hANP溶液をマイクロシリンジ(ハミルトン)を用い、片方の鼻孔より鼻腔内へ投与した。その後鼻孔を接着剤(アロンアルファ)で塞いだ。 $\alpha$ -hANP溶液を所定の濃度、投与量で投与後、EDTA-アプロチ

ニン溶液で前処理した注射筒を用いて経時的に左右の頸静脈採血した。1回の採血量は0.2 mlとした。血液は直ちに4℃、16,000 rpmで5分間遠心分離し、血漿を得た。血漿は定量時まで-20℃以下で冷凍保存した。

## 9. 解析法

コンパートメントモデル解析は、非線形最小二乗法プログラム-1を用いておこない、アルゴリズムは Damping Gauss-Newton Method を用いた。

薬効モデルの解析は、非線形最小二乗法プログラム-2を用いておこない、アルゴリズムは Damping Gauss-Newton Method を用いた。

## 第4章 実験の部

### 1. 試薬

$\alpha$ -hANP 原末 (SUN4936 ; Lot No. 3689306) はサントリー株式会社 (医薬事業部、群馬) より、また、サケカルシトニン (sCT ; Lot No. HF-s109) は帝国臓器製薬株式会社 (東京) より分与された。ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (rhG-CSF ; MW 18,850) は協和発酵工業株式会社 (東京) より分与された。塩酸ポリ-L-アルギニン、ベスタチン (BE) および EDTA は SIGMA 社 (St. Louis, U.S.A.) から購入した。アプロチニン (生化学用) および日本薬局方リンゲル液はそれぞれ和光純薬工業株式会社 (大阪) および扶桑製薬株式会社 (大阪) より購入した。牛血清アルブミン (Fraction V、Powder) は生化学工業株式会社 (東京) から購入した。抗凝血薬 (ノボ・ヘパリン注 1000) はヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 (東京) から購入した。ウレタンは Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, USA) から購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

## 2. $\alpha$ -hANP の in vivo 鼻腔内投与実験法および利尿効果測定法

実験の部第3章8と同様に $\alpha$ -hANP in vivo 鼻腔内投与を行なった。また、利尿効果の測定は実験の部第3章6同様に外科的手術を施した後、右大腿静脈を露出してポリエチレンチューブ (PE-50 ; Clay Adams, U.S.A) を挿入し、定速注入装置を用いて 3.6 ml/hr の注入速度で 20 分間、次いで 1.2 ml/hr で 60 分間リンゲル液を前負荷した。以降、実験終了時まで 1.2 ml/hr の速度で注入を続けた。リンゲル液前負荷後、 $\alpha$ -hANP 鼻腔内投与に先立ち 20 分間の尿量を 3 回測定し、尿量が安定していることを確認した後実験を開始した。その 3 回の尿量をそれぞれ測定時間で除した値の平均値をコントロール尿排泄速度とした。尿はあらかじめ秤量してあるマイクロチューブに採集し重量を測定して尿量とした。

## 3. sCT の in vivo 鼻腔内投与実験法

### 1) 投与方法と採血法

実験の部第1章4と同様に外科的手術を施した後、調製した sCT 生理食塩液または各種促進剤を含む sCT 生理食塩液 (投与量 10 IU/kg、濃度 10  $\mu$ g/ml) を鼻腔内へ投与した。ヘパリンで前処理した注射筒を用いて経時的に右頸静脈より採血を行った。1 回の採血量は 0.15 ml とした。血液は直ちに 4°C、16,000 rpm (18,000 g) で 5 分間遠心分離し血漿を得た。

### 2) Ca (カルシウム) 定量法

血漿中  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度はカルシウム C-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪) を用いて定量した。本品はキレート発色法 (オルトクレゾールフタレインコンプレキソン法 ; OCPC 法) の原理に基づく血漿中 Ca (カルシウム) 濃度測定用キットである。

試料中のカルシウムは、アルカリ性条件下で OCPC と結合して紫紅色を呈する。この紫紅色の吸光度を測定することにより試料中のカルシウム濃度を求めた。

## 4. rhG-CSF の in vivo 鼻腔内投与実験法

### 1) rhG-CSF 投与液の調製法

KW-2228 原液 (1.8 mg/ml、pH 7.0 ~ 7.5) を、1/15 mM 等張リン酸二水素

カリウムで 0.4 mg/mL に調製した。この時、塩化ナトリウムを用いて等張にした。また、投与液の pH を 1N 塩酸を用いて pH 5.0 に調製した。Poly-L-Arg(50) 併用系では、全量に対し 1 % 含有するように調製した。

## 2) in vivo 鼻腔内投与実験

ウィスター系雄性ラットにウレタン生理食塩液（投与量 1 g/kg, 濃度 25 w/v%）を腹腔内投与し、麻酔した。ラットを固定台に背位固定した後、Hirai らの in vivo 鼻腔内投与法 に準じて手術を行った。実験の部第 2 章 4 の方法と同様に、調製した rhG-CSF リン酸緩衝液 (control) または 1 % 濃度の poly-L-Arg を含む rhG-CSF リン酸緩衝液（投与量 50  $\mu$ g/kg、濃度 0.4 mg/mL）を鼻腔内に投与した。ヘパリンで前処理した硬質硝子製注射筒を用いて経時的に右頸静脈より採血を行った。1 回の採血量は 0.6 ml とし、血液はガラス試験管を用い、4  $^{\circ}$ C、2,500 rpm で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿は測定まで -20  $^{\circ}$ C 以下で、ガラス試験管中で保存した。

## 3) G-CSF の定量法

血漿サンプルをあらかじめ測定前に室温まで戻し、1 % 牛血清アルブミン (BSA) を含む 0.01 M 等張リン酸緩衝液 (pH 7.4、PBS) にて約 50 倍希釈後、測定を行った。定量には、EIA 測定キット (R&D、human G-CSF) を用いた。すべての行程を両日中に終了させ、反応後 30 分以内に測定波長 450 nm でマイクロプレートリーダー (BIO-TEX、EL312e) により測定した。全ての分注作業には、ガラス毛細管マイクロピペット (井内盛栄堂) を用いた。

## 引用文献

- 1) 日本医薬品集 24 版, 1243-1245, 1388-1389, 1681-1685, 薬業時報社 (2001)
- 2) 武永美津子, 檜垣恵, 医薬ジャーナル, **35** (7) 1759-1765 (1999)
- 3) Chien Y.W., Su K.S., Chang S.: Nasal Systemic Drug Delivery, Marcel Dekker, New York, 52-60 (1989)
- 4) Hussain M.A., Koval C.A., Shenvi A.B., Aungst B.J., *J. Pharm. Sci.* **79**, 398-400 (1990)
- 5) Morimoto K., Miyazaki M., Kakemi M., *Int. J. Pharm.* **113**: 1-8 (1995)
- 6) Machida M., Sano K., Arakawa M., Hayashi M., Awazu S., *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1375-1378 (1994)
- 7) Illum L., Farrai N.F., Fisher A.N., Gill I., Miglietta M., *J. Controlled Rel.* **29**, 133-141 (1994)
- 8) Edman P., Bjork E., Ryden L., *J. Controlled Rel.* **21**, 165-172 (1992)
- 9) Abd El-Hameed M.D., Kellaway I.W., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **44**, 53-60 (1997)
- 10) Merkus F.W., Verhoef J.C., Marttin E., Romeijn S.G., van der Kuy P.H., Hermens W.A., Schipper N.G., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**(1), 41-57 (1999)
- 11) Morimoto K., Yamaguchi H., Iwakura Y., Morisaka K., Ohashi Y., Nakai Y., *Pharm. Res.* **8**, 471-474 (1991)
- 12) Morimoto K., Morisaka K., Kamada A., *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 134-136 (1985)
- 13) Gordon G.S., Moses A.C., Silver R.D., Flier J.S., Carey M.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7419-7423 (1985)
- 14) Donovan M.D., Flynn G.L., Amidon G.L., *Pharm. Res.* **7**, 808-815 (1990)
- 15) Yamamoto T., Maitani Y., Ando T., Isowa K., Takayama K., Nagai T., *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 866-870 (1998)
- 16) Soane R.J., Frier M., Perkins A.C., Jones N.S., Davis S.S., Illum L., *Int. J. Pharm.* **178**, 55-65 (1999)
- 17) Marttin E., Verhoef J.C., Romeijn S.G., Merkus F.W.H.M., *Pharm. Res.*

- 12, 1151-1157 (1995)
- 18) Aspen T.J., Illum L., Skaugrud O., *Eur. J. Pharm. Sci.* **4**, 23-31 (1996)
- 19) Hosoya K., Kubo H., Akutsu T., Natsume H., Sugibayashi K. Morimoto Y., *Arch. Pharm. Res.* **17**, 57-59 (1994)
- 20) Merkus F.W.H.M., Schipper N.G.M., Hermens W.A.J.J., Romeijin S.G., Verhoef J.C., *J. Controlled Rel.* **24**, 201-208 (1993)
- 21) Hosoya K., Kubo H., Natsume H., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 316-322 (1994)
- 22) Uchiyama T., Yamamoto A., Hatano H., Fujita T., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1618-1621 (1996)
- 23) Yamamoto A., Uchiyama T., Nishikawa R., Fujita T., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 1285-1289 (1996)
- 24) Quan Y.S., Hattori K., Lundborg E., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A., *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 615-620 (1998)
- 25) Illum L., Farrai N.F., Davis S.S., *Pharm. Res.* **11**, 1186-1189 (1994)
- 26) McMartin C., Hutchinson L.E.F., Hyde R., Peters G.E., *J. Pharm. Sci.* **76**, 535-540 (1987)
- 27) Fisher A.N., Brown K, Davis S.S., Parr G.D., Smith D.A., *J. Pharm. Pharmacol.* **39**, 357-362 (1986)
- 28) Fisher A.N., Illum L., Davis S.S., Schacht E.H., *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 550-554 (1992)
- 29) Yamamoto A., Morita T., Hashida M., Sezaki H. *Int. J. Pharm.* **93**, 91-99 (1993)
- 30) Grün F., *Experimentia* **3**, 316-319 (1947)
- 31) Flynn G.L., Yalkowsky S.H., Roseman T.J., *J. Pharm. Sci.* **63**, 479-510 (1974)
- 32) Marttin E., Verhoef J.C., Cullander C., Romeijin S.G., Nagelkerke J.F., Merkus F.W.H.M., *Pharm. Res.* **14**, 631-637 (1997)
- 33) Huang C.H., Kimura R., Nassar R.B., Hussain A., *J. Pharm. Sci.* **74**, 608-611 (1985)

- 34) Duchenène D., Ponchel G., *Drug Dev.Ind.Pharm.* **19**, 101-122 (1993)
- 35) Gordon G.S., Moses A.C., Silver R.D., Flier J.S., Carey M.C., *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* **82**, 7419-7423 (1985)
- 36) Kissei T., Drewe J., Bantle S., Rummelt A., Beglinger C., *Pharm.Res.* **9**, 52-57 (1992)
- 37) Baldwin P.A., Klingbeil C.K., Grimm C.J., Longenecker J.P., *Pharm.Res.* **7**, 547-552 (1990)
- 38) Natsume H., Iwata S., Ohtake K., Miyamoto M., Yamaguchi M., Hosoya K., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Int.J.Pharm.* **185**, 1-12 (1999)
- 39) Agarwal V., Mishra B., *Indian J.Exp.Biol.* **37**, 6-16 (1999)
- 40) Schipper N.G.M., Olsson S., Hoogstraate J.A., de Boer A.G., Varum K.M., Artursson P., *Pharm. Res.* **14**, 923-929 (1997)
- 41) Kotze A.F., Luessen H.L., de Leeuw B.J., de Boer A.G., Verhoef J.C., Junginger H.E., *Pharm. Res.* **14**, 1197-1202 (1997)
- 42) Hammes M., Singh A., *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 437-446 (1994)
- 43) Uchida D.A., Irvin C.G., Ballowe C., Cott G.R., *Exp. Lung Res.* **22**, 85-99 (1996)
- 44) Masmoen T.L., Bell M.P., Loegering D.A., Gleich G.J., Prendergast F.G., McKean D.J., *J. Biol. Chem.* **263**, 12559-12563 (1986)
- 45) Coyle A.J., Mitzner W., Irvin C.G., *J. Appl. Physiol.* **74**, 1761-1768 (1993)
- 46) Hirai S., Yashiki T., Mima H., *Int. J. Pharm.* **9**, 165-172 (1981)
- 47) Jabbal Gill I., Illum I., Farrai N.F., de Ponti R., *Eur. J. Pharm. Sci.* **1**, 229-236 (1994)
- 48) 森本雍憲, 杉林堅次, 夏目秀視, 宮本操, 岩田聡子, 小林晃二, 特開平 10-95738 出願日 1996年9月20日
- 49) Miyamoto M., Natsume H., Iwata S., Ohtake K., Yamaguchi M., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Eur.J.Pharm.Biopharm.* **52**, 21-30 (2001)
- 50) Miyamoto M., Natsume H., Satoh I., Ohtake K., Yamaguchi M.,

- Kobayashi D., Sugibayashi K., Yamashita M., Morimoto Y., *Int.J.Pharm.*,  
in press
- 51) Singh A.K., Kasinath B.S., Lewis E.J., *Biochim. Biophys. Acta* **1120**,  
337-342 (1992)
- 52) Soane R.J., Frier M., Hinchcliffe M., Davis S.S., Illum L., *Proceed. Intern.  
Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **23**, 81-82 (1998)
- 53) Hammes M., Singh A., *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 437-446 (1994)
- 54) McEwan G.T.A., Jepson M.A., Hirst B.H., Simmons N.L., *Biochim.  
Biophys. Acta* **1148**, 51-60 (1993)
- 55) Artursson P., Lindmark T., Illum L., Davis S.S., *Pharm. Res.* **11**  
1358-1361 (1994)
- 56) Ohtake K., Natsume H., Iwata S., Kobayashi D., Sugibayashi K.,  
Morimoto Y., *Pharm. Res.* , accepted
- 57) Miyamoto M., Tsukune T., Hori S., Hayashi T., Natsume H., Sugibayashi  
K., Morimoto Y., *Biopharm. Drug Dispos.* , submitted
- 58) Mazer N.A., *J. Control Release* **11**, 343-356 (1990)
- 59) 日本医薬品集 24 版 524-525, 薬業時報社 (2001)
- 60) Kanagawa K., Matsuo H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 131-139  
(1984)
- 61) Iwao H., Fukui K., Yamamoto A., Shouji T., Abe Y., *Clin. Exp. Hypertens.*  
**A9**, 697-701 (1987)
- 62) Aras S.A., *J. Endocrinol.* **108** sub: abs., 23 (1986)
- 63) Saito Y., Nakao K., Nishimura K., *Circulation* **76**, 115-124 (1987)
- 64) 林友二郎, 大沼規夫, 金井靖, *薬物動態* **8**, 765-766 (1993)
- 65) 林友二郎, 大沼規夫, 古谷真優美, 金井靖, *薬物動態* **3**, 489-499 (1988)
- 66) Ariens E.J.: *Molecular Pharmacology*, Academic Press, New York, 119-286  
(1964)
- 67) Sheiner L.B., Stanski D.R., Vozeh S., Miller R.D., Ham J., *Clin.  
Pharmacol. Ther.* **25**, 358-371 (1979)
- 68) Yanagi T, Ishibashi M, Takaku F., *J. Clin. Invest.* **76**, 1705-1709 (1985)

- 69) Hashimoto Y., Mori S., Hama N., Nakao K., Imamura H., Yamaguchi M., Hori R., *J.Pharmacokin.Biopharm.* **21**, 281-297 (1993)
- 70) 宮西祐洋, 宮崎誠, 岩永一範, 掛見正郎, 藥物動態 **15(S)**, 244-245 (2000)
- 71) 夏目秀視, 堀聖一, 築根忠司, 岩田聡子, 宮本操, 杉林堅次, 森本雍憲, 山口正俊, *Drug Delivery System* **14**, 21-25 (1999)
- 72) Tan A.C., Russel F.G., Thien T., Benraad T.J., *Clin.Pharmacokin.* **24**, 28-45 (1993)
- 73) 日本医薬品集 24 版, 507-508, 薬業時報社 (2001)
- 74) 高橋洋夫, 島沢栄一郎, 江澤郁子, 尾形悦郎他, 薬理と治療 **13(3)**, 1513-1518 (1985)
- 75) Thamsborg G., *Dan Med Bull.* **46(2)**, 118-26 (1999)
- 76) Essenlich W., Engelbeen J.P., Stasse P., Hermans P., *Clin. Orthop.* **217**, 56-71 (1987)
- 77) Hanson M., Gazdick G., Cahill J., Augustin M.: Intranasal delivery of the peptide salmon calcitonin in *Delivery System for Peptide Drugs*. Davis S.S., Illum L., Tomlinson E. Eds., Plenum Press, New York, 233-242, (1986)
- 78) Torres-Lugo M., Peppas N.A., *Biomaterials.* **21(12)**, 1191-1196.(2000)
- 79) Morimoto K., Katsumata H., Yabuta T., Iwanaga K., Kakemi M., Tabata Y., Ikada Y., *Eur J Pharm Sci.* **13(2)**, 179-185 (2000)
- 80) Scipper N.G., Verhoef J.C., Romeijin S.G., Merkus F.W.H.M., *Calcif. Tissue Int.* **56**, 280-282 (1995)
- 81) 日本医薬品集 24 版, 1395-1396, 薬業時報社 (2001)
- 82) 石遠凱, 藤原彰, 田口鉄, *Biotherapy* **6 (7)**, 1089-1098 (1992)
- 83) Takada K., Toyama Y., Ohashi M., Yoshikawa H., Muranishi S., Shimosaka A., Kaneko T., *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 838-839 (1989)
- 84) Takada K., Nakahigashi Y., Tanaka T., Koshimoto S., Ushirogawa Y., Takaya T., *Int. J. Pharm.* **101**, 89-96 (1994)
- 85) Ushirogawa U., Nakahigashi Y., Kiriyaama A., Takada K., *Int. J. Pharm.* **81**, 133-141 (1992)

- 86) Takada K., Nakahigashi Y., Tanaka T., Koshimoto S., Ushirogawa Y., Takaya T., *Int. J. Pharm.* **101**, 89-96 (1994)
- 87) Niven R.W., Lott F.D., Cribbs J.M., *Pharm. Res.* **10**, 1604-1610 (1993)
- 88) Niven R.W., Lott F.D., Cribbs J.M., *Pharm. Res.* **11**, 1101-1109 (1994)
- 89) Johnston T.P., *J. Pharm. Sci. Technol.* **50**, 238-245 (1996)
- 90) Chien Y.W., Su K.S.E., Chang S.F.: Anatomy and physiology of the nose, nasal systemic drug delivery. Dekker, New York, 1-26 (1989)
- 91) Nomura H., Akamisaka S., Maruyama K., *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1490-1493 (1996)
- 92) Machida M., Sano K., Arakawa M., Hayashi M., Awazu S., *Pharm. Res.* **10**, 1372-1377 (1993)
- 93) Kuwabara T., Okumura S., Kobayashi S., Hirata T., *Xenobio. Metabol. Dispos.* **6**, 875-885 (1991)
- 94) Suzuki K., Tsunoo M., Shishido R., Kuwabara T., Kobayashi S., *J. Clin. Ther. Med.* **7**, 1947-1971 (1991)
- 95) Hirai T., Yashiki T., Matsuzawa T., Miwa H., *Int. J. Pharm.* **7**, 317-325 (1981)
- 96) Folch J., Ascoli I., Lee M., Meath J.A., LeBaron F.N., *J. Biol. Chem.* **191**, 833 (1994)
- 97) Gill I.J., Fisher A.N., Illum L. et.al., *Eur.J.Pharmaceut.* **1**, 237-248 (1994)
- 98) Christensen S., Steiness E., Christenssen H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**, 211-218 (1986)
- 99) de Bold A.J., Borenstein H.B., Veress A.T., Sonnenberg H., *Life Sci.* **28** 89-94 (1981)

