

## Thymidine の鼻粘膜透過に関する研究

矢島敏行・長谷川哲也・従二和彦\*<sup>1)</sup>, 実吉峯郎\*<sup>2)</sup>, 川口健夫\*<sup>1)</sup>*Nasal transport of thymidine in rats*

Nasal transport of thymidine(Thd) was investigated using *in vivo* nasal absorption technique in rats. Radio active thymidine was administered and Thd concentrations in the cerebrospinal fluid(CSF) and plasma was determined by liquid scintillation counter.

Thd concentrations in the fractionated CSF which located close to the nasal cavity following intranasal(i.n.) administration were higher than that following intravenous(i.v.) administration, thus these observation suggests Thd, like other compounds, transported from nasal cavity to CSF directly following i.n. administration.

The fractionated CSF concentration and the area under plasma concentration-time curve (AUC) following i.n. administration of Thd at 1.338 ~ 267.6 mM were determined. The relationships between both the fractionated CSF concentration and AUC, and dose of Thd seemed dose-independent, though saturation in the transport of Thd from nasal membrane to CSF and systemic circulation was observed.

The CSF concentrations and AUC following i.n. administration of Thd at a dose of 13.38 mM with 2'-deoxyuridine(dUrd, 25, 50 and 100 mM) or 2'-deoxyinosine(dIno, 50 mM) were also determined. Decrease in the concentration of CSF and AUC was observed, and the inhibitory effect of dUrd was dose-dependent. In the case of coadministration of Thd and dIno, dIno also showed an inhibitory effect for Thd transport, while the effect was less significant than that of dUrd.

These results suggests that the possibility of the presence of Thd sensitive transport systems on nasal membrane in rats, and the systems, if exist, may be useful for the delivery of nucleoside ana-

logues for central nervous system and systemic circulation via nasal membrane.

Toshiyuki Yajima · Tetsuya Hasegawa ·  
Kazuhiko Juni\*<sup>1)</sup>, Mineo Saneyoshi\*<sup>2)</sup>,  
Takeo Kawaguchi\*<sup>1)</sup>

**key words** : thymidine, nasal absorption,  
cerebrospinal fluid, deoxynucleoside transport

鼻腔と脳は解剖学的に隣接し、鼻腔と脳の周囲を満たしている脳脊髄液(CSF)との直接的なつながりが以前より報告されており<sup>1-3)</sup>、経鼻投与によって薬物を中枢神経系(CNS)へ直接、送達できる可能性がある<sup>4-6)</sup>。

筆者らはこの事実に着目し、HIV患者の多くに発症するCNSの障害、すなわちAIDS痴呆症候群(AIDS dementia complex, ADC)<sup>7,8)</sup>を対象として、HIV逆転写酵素阻害剤である3'-azido-3'-deoxythymidine(AZT)<sup>9)</sup>および2',3'-dideoxy-3'-deoxythymidine(D4T)<sup>10,11)</sup>の鼻腔内投与について検討してきた。

これらの薬物をラット鼻腔内に投与したところ、薬物が全身循環系を経由せずに直接CSF中に輸送され、鼻腔内投与が抗HIV薬のCNSへの直接的な送達法となる可能性を示した<sup>9,10)</sup>。また、本投与経路は全身循環系への送達にもすぐれ、さらに投与も簡便であることから<sup>11)</sup>、ADCの進行した患者にも有用であるかもしれない。

一方、坂根らは、鼻腔内に投与されたスルホンアミド類が直接CSFへ輸送され、その移行性が薬物の分配係数に相関し、さらにpH分配仮説にも従っていたことから、スルホンアミド類のCSFへの直接的な輸送は受動拡散によって行われていることを示唆している<sup>12)</sup>。

そこで、本研究では他の抗HIV活性を示すヌクレオシド誘導体の鼻腔内投与への応用を視野に

\*<sup>1)</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University  
城西大学薬学部

\*<sup>2)</sup> Department of Biological Sciences, Teikyo University  
of Science and Technology 帝京科学大学バイオサイ  
エンス学科

Offprint requests to : Takeo Kawaguchi, Ph. D., Fac-  
ulty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1  
Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0290

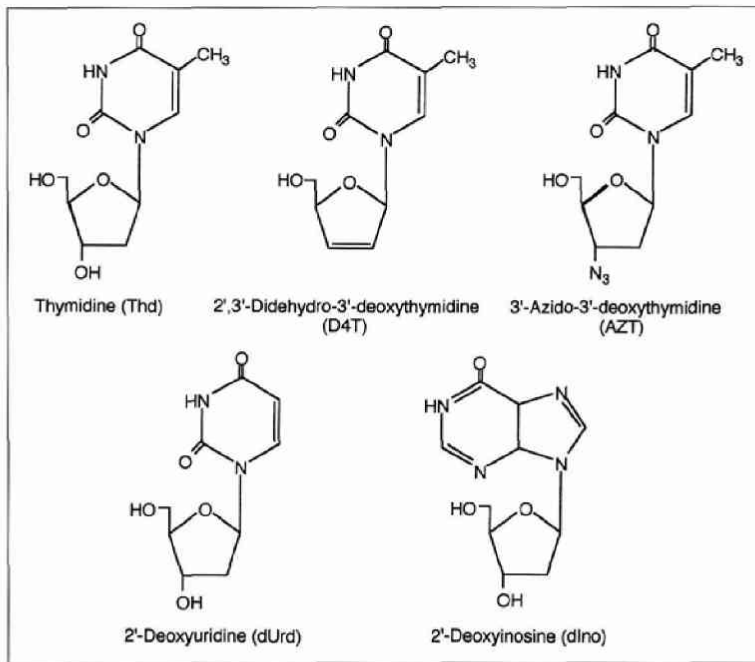


図 1 2'-デオキシヌクレオシド類の化学構造

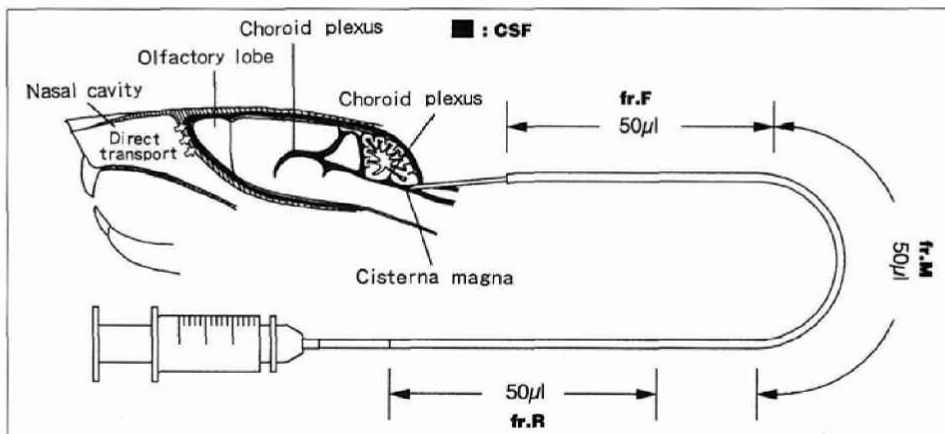


図 2 脳脊髄液の採取法およびその分割法

入れ、ヌクレオシドの鼻粘膜透過に影響を及ぼす要因に関して詳細な情報を得るために、天然型のピリミジンヌクレオシドである thymidine (Thd) を用いて以下の検討を行った。

## 方法

### (1) 試薬

[Methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (37 MBq/ml) はアマシャム(株)より購入したものを、非放射性的の thy-

midine は和光純薬工業(株)より購入したものを用いた。デオキシウリジン (2'-deoxyuridine, dUrd) はヤマサ醤油(株)、デオキシイノシン (2'-deoxyinosine, dIno) は生化学工業(株)より購入したものを用いた(図 1)。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

### (2) 鼻腔内投与と実験

ウイスター系雄性ラット(体重 230~290 g, 東京実験動物(株))を 25% ジエチルカルバマートにて

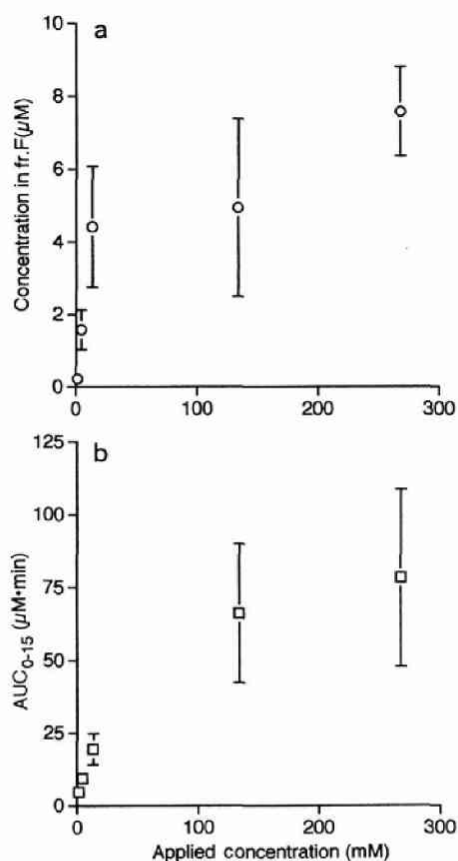


図3 Thymidine をラット鼻腔内に投与したときの投与溶液濃度と(a)15分の脳脊髄液 fr. F 中 thymidine 濃度または(b)15分までの血漿中 thymidine 濃度-時間曲線下面積(AUC<sub>0-15</sub>)との関係

平均±S.D. n=5

麻酔し、Hussain らの *in vivo* 鼻粘膜吸収実験法<sup>13)</sup>に従い手術を施し、大腿動脈に採血用のポリエチレンチューブ(SP10, 株式会社夏目製作所)を挿管した。

放射性の Thd に非放射性の Thd を適当量加え、総 Thd 濃度が 1.338~267.6 mM になるように調製した pH 7.4 等張リン酸緩衝液をラット体重 300 g あたり 100 μl でマイクロピペットを用いて鼻孔より鼻腔内に投与し、鼻孔を瞬間接着剤(アロンアルファ, 東亜合成株式会社)で塞いだ。この際、投与液はすべて溶液状態であった。

投与後 5, 10, 15 分にヘパリン処理したサンプルリングチューブに採血し、7,000×g で遠心後血漿 50 μl をとり、-40°C で保存した。また、投与後 15

分に CSF を後述する方法で採取した。

### (3) 阻害実験

上述の鼻腔内投与と実験と同様の方法で行った。投与溶液は Thd 13.38 mM に阻害剤として dUrd を 25, 50, 100 mM, あるいは dIno を 50 mM 加えた pH 7.4 等張リン酸緩衝液を用いた。

### (4) CSF 採取法

図 2 に CSF 採取法を示した。CSF は Chou & Levy による報告<sup>14)</sup>を参考にし、大槽穿刺法によって採取した。

あらかじめ切断した 25G の注射針を、1.5 m のポリエチレンチューブ(SP31, 株式会社夏目製作所)の両端に接続し、さらに注射筒(テルモ株式会社)を接続した器具を作成した。

針先をラット後頭部より大槽に穿刺し、注射筒を引くことで CSF を採取し、血液が混入してきた時点で採取を中止した。ポリエチレンチューブ中に得られた CSF は、150 μl 以上採取できたときのみサンプルとして採用し、血液が混入する直前より 50 μl をフラクション F(fr. F), つぎの 50 μl を fr. M, はじめに採取されてきた 50 μl を fr. R とした。各サンプルは -40°C で保存した。

ラットの鼻腔と脳、さらに CSF 採取部位の解剖学的な位置関係から、最初に採取されるフラクションである fr.R には CSF 分泌部位である脈絡叢付近の CSF が、逆に最後に採取されるフラクションである fr.F には CSF 採取部位から遠い位置にあたる鼻腔上部の CSF が含まれていると思われる。

### (5) 薬物の定量

各試料中の放射性は、メタノールで除蛋白後、上清を HPLC で代謝物と分離し、液体シンチレーター(NEN AQUASOL-2, 第一化学株式会社)に溶解して、液体シンチレーションカウンター(LSC 5100, アロカ株式会社)にて測定した。

HPLC システムは、ポンプ(LC10AD, 島津製作所株式会社), 検出器(SPDI0A, 島津製作所株式会社): 検出波長 265nm, フラクションコレクター(FRC10A, 島津製作所株式会社), カラム(Lichrospher 100 RP18e, 250×4 mm, 関東化学株式会社), 移動相には水:メタノール:酢酸=95:5:0.2 を用いた。

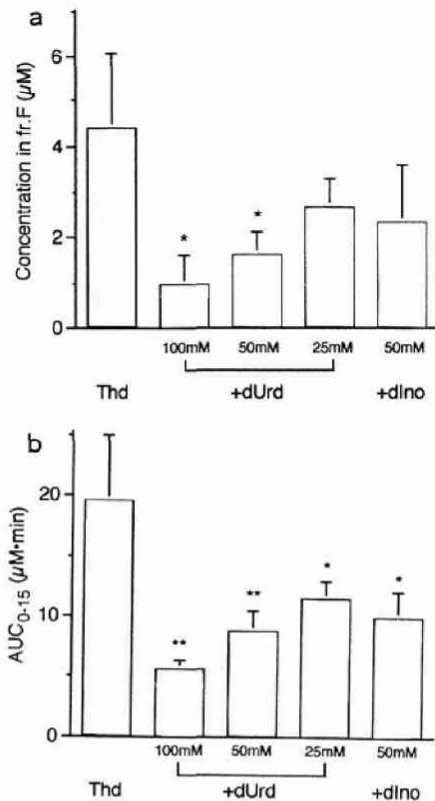


図4 Thymidine (13.38 mM) に 2'-deoxyuridine (dUrd) あるいは 2'-deoxyinosine (dIno) を併用し鼻腔内に投与したときの (a) 15 分の脳脊髄液 fr. F 中 thymidine 濃度, または (b) 15 分までの血漿中 thymidine 濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-15</sub>)

平均 ± SD, n=5, thymidine 単独投与に対する有意差を示す. \*\*p < 0.01, \* : p < 0.05

## 結果

Thd を鼻腔内に投与したとき 15 分における CSF 中濃度は, 鼻腔にもっとも近接するフラクションである fr. F の濃度が他のフラクションにくらべて有意に高い値を示したが, 静脈内投与後 15 分においては, このような現象は観察されず, 各フラクション間での差はほとんど認められなかった. この鼻腔内投与時に fr. F 中濃度が他のフラクションにくらべて高くなるという現象は, Thd の誘導体である AZT, D4T を投与したときにおいても観察されており<sup>9,10</sup>, Thd も他の誘導体と同様に CSF に直接輸送されていることが明

らかとなった.

Thd は内因性の物質で, 哺乳類動物のさまざまな原形質膜に Thd に感受性のある能動的な輸送担体が存在することが報告されており<sup>15-20</sup>, この輸送担体が鼻粘膜上にも存在し, 鼻粘膜透過性に影響を及ぼしている可能性も考えられる. そこで, その担体の存在の可能性を調べるため, Thd の投与溶液の濃度を 1.338~267.6 mM の範囲で変化させ, その影響を調べた.

Thd を鼻腔内に投与後 15 分の fr. F 濃度を投与溶液濃度に対してプロットしたところ, 投与溶液の濃度上昇に伴い, fr. F 濃度が頭打ちになる現象が観察された (図 3 a). また, 図 3 b に示したように, 鼻腔内から全身循環系への移行性の指標となる投与後 15 分までの血漿 Thd 濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-15</sub>) に関しても同様に頭打ち現象が観察され, 鼻粘膜に Thd に感受性を示す飽和性の輸送担体が存在していることが示唆された.

つぎに, この飽和性の輸送系に関してさらに詳細な情報を得るために, 阻害剤として Thd と同じピリミジンデオキシヌクレオシドとして dUrd を, プリンデオキシヌクレオシドとして dIno を選択し, 併用を行った (図 4).

図 4 a に Thd 13.38 mM に dUrd 25~100 mM, または dIno 50 mM を併用して鼻腔内に投与したときの 15 分における Thd の fr. F 中濃度を示す. dUrd 100 mM 存在下では fr. F 中 Thd 濃度が有意に低下し, 鼻腔内から CSF への直接的な輸送の阻害効果が観察された. さらに 50, 25 mM においても阻害効果がみられ, その効果は dUrd の濃度に依存的であった. 一方, dIno 50 mM 存在下においても阻害効果が認められたが, 同濃度の dUrd よりも効果は低かった. また, 全身循環への移行性に関しても, AUC<sub>0-15</sub> を指標とすると同様の関係がみられ (図 4 b), これらの結果から, 鼻粘膜に飽和性を示す輸送担体が存在していることがさらに支持された.

## 考察

鼻腔内に投与された薬物が, 全身循環系から血液-脳関門あるいは血液-脳脊髄液関門を介するこ

となしに直接 CSF へ移行するという、鼻腔と CNS の直接的なつながりが、以前より報告されている<sup>4-6)</sup>。また、鼻腔内から CSF への直接的な移行性は、薬物の物理化学的性質に依存することが報告されている<sup>12)</sup>。

D4T 133.8 mM を鼻腔内投与したとき 15 分における fr. F 濃度と<sup>10)</sup>、同投与量の Thd を投与したときの結果を比較すると、それぞれ 30.23 ± 16.56 μM, 4.93 ± 2.45 μM となり、これらのクロロフォルム/水分係数(logPC: -1.98; D4T, -3.23; Thd)の大小関係と一致していた。

しかしながら、本研究において Thd の CSF への直接的な輸送、および全身循環系への輸送に飽和がみられたこと(図 3)と、dUrd や dIno といったデオキシヌクレオシドによって Thd の輸送が阻害効果を受けたこと(図 4)から、核酸誘導体の鼻粘膜透過には受動拡散だけでなく核酸輸送系が関与している可能性が示された。

現在、哺乳類動物のさまざまな原形質膜において、核酸に関する輸送系の存在が数多く報告されている。その輸送担体は equilibrative と concentrative の二つに大きく分類され、equilibrative な輸送系は Na 非依存性の促進的な輸送系で、寛容な基質選択性を持ち、その基質選択性の違いによって二つに分類される<sup>15,16)</sup>。一方、concentrative な輸送系は Na 依存性の 2 次的な能動輸送系で、基質選択性の違いから五つのサブタイプに分類され<sup>17)</sup>、さまざまな組織においてその存在が同定されている<sup>18-20)</sup>。しかしながら、現在鼻粘膜においては、どちらの輸送系に関してもその存在は明らかではない。

本研究において、Thd に感受性のある飽和性の特殊輸送系が鼻粘膜上に存在していることが示唆され、プリンおよびピリミジンデオキシヌクレオシドによって阻害を受けることが明らかとなったが、その特徴は十分に説明されてはおらず、さらに詳細な情報を得るために検討を重ねる必要がある。この輸送担体に感受性を示すヌクレオシド誘導体を鼻腔内に適用することで、より効果的に CSF へ薬物を送達できるだけでなく全身循環系へも効率よく移行させることができるかもしれない。

## 文 献

- 1) Czerniawska A : Experimental investigation on the penetration of Au from nasal mucous membrane into cerebrospinal fluid. *Acta Otolaryngol.* 70 : 58-61, 1970.
- 2) Jackson RT, Triggles J, Arnold W : Subarachnoid space of the CNS, nasal mucosa, and lymphatic system. *Arch. Otolaryngol.* 105 : 180-184, 1979.
- 3) Bradbury MWB, Cseer HF, Westrop RJ : Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am. J. Physiol.* 240 : F329-F336, 1981.
- 4) Kumar TCA, David GFX, Umberkoman B, Saini KD : Uptake of radioactivity by body fluids and tissues in rhesus monkeys after intravenous injection or intranasal spray of tritium-rabelld oestradiol and progesterone. *Curr. Sci.* 43 : 435-439, 1974.
- 5) Kumar TCA, David GFX, Sankaranarayanan A, Puri V, Sundram KR : Pharmacokinetics of progesterone after its administration to ovariectomized rhesus monkeys by injection, infusion, or nasal spraying. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 4185-4189, 1982.
- 6) Sakane T, Akizuki M, Yoshida M, Yamashita S, Nadai T et al. : Transport of cephalixin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *J. Pharm. Pharmacol.* 43 : 449-451, 1990.
- 7) Navia BA, Jordan BD, Price RW : The AIDS dementia complex : I. Clinical features. *Ann. Neurol.* 19 : 517-524, 1986.
- 8) Price RW, Brew B, Sidtis J, Rosenblum M, Scheck AC et al. : The brain in AIDS : Central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 239 : 586-592, 1988.
- 9) Seki T, Sato N, Hasegawa T, Kawaguchi T, Juni K : Nasal absorption of zidovudine and its transport to cerebrospinal fluid in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 17 : 1135-1137, 1994.
- 10) Yajima T, Juni K, Saneyoshi M, Hasegawa T, Kawaguchi T : Direct transport of 2', 3'-dideoxy-3'-deoxythymidine(D4T) and its ester derivatives to the cerebrospinal fluid via nasal mucous membrane in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 21 : 272-277, 1998.
- 11) Yajima T, Hasegawa T, Juni K, Saneyoshi M, Kawaguchi T : Nasal absorption of 2', 3'-dideoxy-3'-deoxythymidine(D4T) and its esters in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19 : 1234-1237, 1996.
- 12) Sakane T, Yamashita S, Sezaki H : Direct drug transport from the nasal cavity to the cerebrospinal fluid : A new strategy for drug delivery to the brain. *S. T. P. Pharm. Sci.* 7 : 98-106, 1997.
- 13) Hussain A, Hirai S, Bawarshi R : Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs. *J. Pharm. Sci.* 69 : 1411-1413, 1980.
- 14) Chou RC, Levy G : Effect of heparin or salicylate infusion on serum protein binding and on concentrations of phenytoin in serum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219 : 42-48, 1981.
- 15) Crawford CR, Ng CYC, Noel LD, Belt JA : Nu-

- cleoside transport in L1210 murine leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 264 : 9732-9736, 1990.
- 16) Plagemann PGW, Wohlhueter RM, Woffendin C : Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 947 : 405-443, 1988.
  - 17) Wang J, Schaner ME, Thomassen S, Su SF, Piquette-Miller M et al. : Functional and molecular characteristics of Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporters. *Pharm. Res.* 14 : 1524-1532, 1997.
  - 18) Darnowski JW, Holdridge C, Handschumacher RE : Concentrative uridine transport by murine splenocytes : Kinetics, substrate specificity, and sodium dependency. *Cancer Res.* 47 : 2614-2619, 1987.
  - 19) Lee CW, Cheeseman CI, Jarvis SM : Na<sup>+</sup>-and K<sup>+</sup>-dependent uridine transport in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 942 : 139-149, 1988.
  - 20) Jakobs ES, Van Os-Corby DJ, Paterson ARP : Expression of sodium-linked nucleoside transport activity in monolayer cultures of IEC-6 intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 265 : 22210-22216, 1990.