

新規吸収促進剤ポリ-L-アルギニンによる ペプチド医薬品の経鼻吸収性の改善

夏目秀視・堀 聖一・築根忠司・岩田聰子^{*1)}, 宮本 操^{*2)},
杉林堅次・森本雍憲^{*1)}, 山口正俊^{*3)}

Improvement of pharmacological response after intranasal administration of peptide drugs by poly-L-arginine as a novel absorption enhancer in rats

Pharmacological responses of α -human atrial natriuretic peptide(α -hANP) and salmon calcitonin(s-CT) were estimated following intranasal (i. n.) administration with and without poly-L-arginine(poly-L-Arg) in rats. Maximum urine flow rate after i. n. administration of α -hANP(100 μ g/kg) with poly-L-Arg was 2.5 times higher than that of α -hANP alone(control) or with bestatin, an enzymatic inhibitor. Surprisingly, the total urine volume(% volume against control) for the enhancer group was comparable or more than that after i. v. injection of α -hANP(100 μ g/kg).

On the other hand, maximum decrease of plasma calcium level after i. n. administration of s-CT(10 ID/kg) with poly-L-Arg was greater than that of s-CT alone and the decreased calcium level continued until at least 6h. The total calcium decreasing until 41h was about 23.5% and the same to that after i. v. injection of s-CT alone(13.4IU/kg), as reported previously.

These results suggest that poly-L-Arg is very useful as a nasal absorption enhancer for improving pharmacological action of peptide drugs.

Hideshi Natsume • Seichi Hori •
Tadashi Tsukune • Satoko Iwata^{*1)},

Misao Miyamoto^{*2)}, Kenji Sugabayashi •
Yasunori Morimoto^{*1)}, Masatoshi Yamaguchi^{*3)}

key words : poly-L-arginine,
 α -human atrial natriuretic peptide,
salmon calcitonin, absorption enhancer, nasal delivery

鼻粘膜は、生理活性ペプチドや蛋白質医薬品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ナファレリン、酢酸ブセレリンや酢酸デスマプレシンなどが日本をはじめ、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ない、より大きな分子量の医薬品を製剤化していくためには、なんらかの吸収の改善が必要である。

吸収速度の増大策として、代謝酵素阻害剤を用いた安定化、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(mucocilliary clearanceからの回避)や吸収促進剤による線速度の制御が考えられる¹⁻⁶⁾。吸収促進剤のスクリーニングは今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粘膜障害が起こり、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状況にある^{7,8)}。

最近、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⁹⁾。筆者らもまた、カチオン性の物質をスクリーニングした結果、塩基性のポリアミノ酸であるポリ-L-アルギニン(poly-L-Arg)が、モデル水溶性高分子物質、FITC-dextran(分子量4,400, FD-4)の鼻粘膜吸収性を著しく改善し、しかも膜障害性もほとんどみられないことを見出した¹⁰⁾。それゆえ、このpoly-L-Argは、膜障害性を伴わずに高分子量の生理活性医薬品の吸収性を改善できる可能性が期待された。

そこで、モデル薬物としてヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(α -hANP)およびサーモンカル

*1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,
城西大学薬学部

*2) Analytical Division, Nissan Chemical Co. Ltd., 日産化
工(株)

*3) Prefectural Kakizaki Hospital 県立柿崎病院
Offprint requests to : Yasunori Morimoto, Ph. D. Faculty
of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1
Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0290

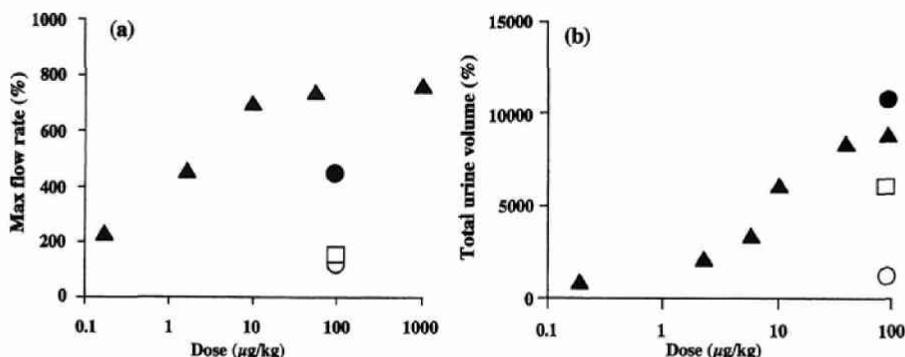


図 1 Dose response curve after i.v. or i.n. administration of α -hANP in rats

(a) : Dose vs max flow rate(%), (b) : Dose vs total urine volume(%)

▲: i.v. administration, ○: i.n. without enhancer, □: i.n. with bestatin, ●: i.n. with poly-L-Arg

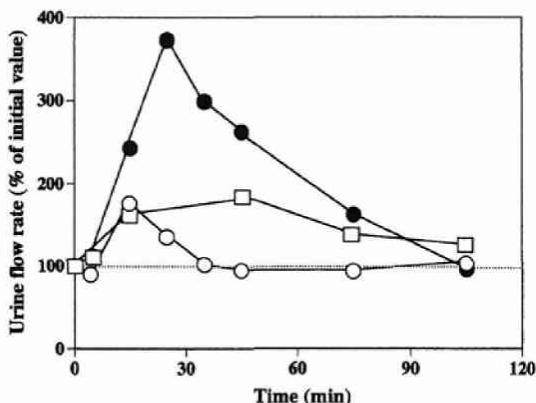


図 2 Urine flow rate-time curve after i.n. administration of α -hANP in rats

○: i.n. without enhancer, □: i.n. with bestatin,
●: i.n. with poly-L-Arg

Each value represents the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. Dotted line means the control level.

シトニン(s-CT)を選び、poly-L-Argがこれらペプチド医薬品の経鼻吸収性を改善できるかを、薬理効果を指標として調べた。

材料と方法

(1) 試薬

α -hANP および s-CT はサントリーおよび帝國臓器製薬より供与された。グリココール酸ナトリウム(GC), ベスタチン(BE)および poly-L-Arg(分子量, 45.5 kDa)は、シグマ社(米国)から購入

した。その他の試薬は、特級のものを用いた。

(2) α -hANP 静脈内投与実験および尿量の測定

雄性ウィスター系ラット(体重, 270~300 g)をウレタン麻酔し鼻腔内投与実験と同様の外科的手術を施したあと¹¹、尿道口の上約 3 cm の腹部を正中線に沿って切開し、膀胱を露出した。膀胱に切り込みを入れ、ポリエチレンチューブ(PE-50, Becton Dickinson & Co., NJ, USA)を挿入した。切り口を縫合糸で結んで固定し膀胱をもとの位置に戻して縫合したあと、尿道口を接着剤で塞いだ。次に右大腿静脈を露出してポリエチレンチューブ(PE-50)を挿入し、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)を用いて 3.6 ml/hr の速度で 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。この注入速度を維持した状態で 20 分間隔の尿量をマイクロチューブに 3 回採集し、重量を測定し尿量が安定していることを確認した。この 3 回の尿量をそれぞれ測定時間間隔で除した値の平均値をコントロール尿排泄速度とした。種々濃度の α -hANP を含有する 5% マンニトール溶液、0.5 ml/kg を左大腿静脈より投与した。適当な時間間隔ごとにマイクロチューブに採集し重量を測定した。利尿効果によって排泄された水分を補給するため、次のサンプル期間に採集された尿量と同容量のリンゲル液を注入した^{12,13}。

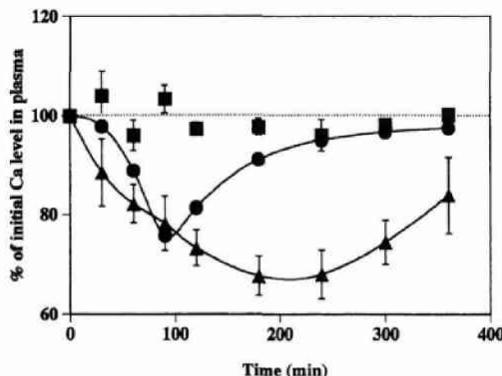


図 3 Plasma calcium level-time curve after i. n. administration of s-CT in rats

■: Control, ▲: i. n. without poly-L-Arg, ●: i. n. with poly-L-Arg

Each value represents the mean±S. E. of at least 3 experiments. Dotted line means the control level.

各時間間隔ごとの尿排泄速度(%)およびコントロール尿を差し引いた全尿量(%)は、次式により算出した。

$$\text{尿排泄速度(\%)} = \frac{\text{処理時の尿排泄速度}}{\text{コントロール尿排泄速度}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{全尿量(\%)} = \Sigma [(\text{各時間間隔毎の尿排泄速度} - \text{コントロール尿排泄速度}) \times \text{各時間間隔}] \quad (2)$$

(3) α -hANP 鼻腔内投与実験および尿量の測定

雄性ウィスター系ラット(体重、270~300 g)をウレタン麻酔したあと、Hirai らの方法に準じ外科的手術を施した¹¹⁾。簡単に、正中線に沿って喉を開き気道を露出したあと、切り込みを入れ気管にポリエチレンチューブを挿入した。次に露出した食道に先端を塞いであるシリコーンチューブを食道から鼻腔側へ挿入した。さらに、鼻腔蓋管を接着剤で塞いだ。次に、静脈内投与実験と同様に尿量を測定するための手術を施し、安定させた。コントロール尿を採取したあと、 α -hANP(100 µg/kg)を含有する5%マンニトール溶液、 α -

表 1 Hypocalcemic effects of s-CT after i. n. administration in rats

	Dmax(%)	$\Delta D(%)$
without poly-L-Arg	24.2	8.5±1.5
with poly-L-Arg(1.0 w/v%)	32.3	23.9±3.6

α -hANP(100 µg/kg)含有の1%poly-L-Arg溶液または α -hANP(100 µg/kg)含有の0.1%ペスタチン溶液、60 µl/kgを、先端にシリコーンチューブをつないだポリエチレンチューブを接続したマイクロシリンジを用いて鼻腔内に投与した。静脈内投与実験と同様に適当な時間間隔ごとに尿量を測定した。

(4) s-CT 鼻腔内投与実験および血中Ca濃度の測定

(3)と同様にラットの食道、気道を外科的に処置したあと、s-CT(10 IU/kg)を含有する生理食塩液またはs-CT(10 IU/kg)含有の1%poly-L-Arg溶液、60 µl/kgを鼻腔内に投与した。経時に頸静脈より採血し、血中Ca濃度をカルシウムC-テストワコー(和光純薬工業)を用いて定量した。s-CT鼻腔内投与後の血中Caレベルは、投与5分前に測定した血中Ca濃度の百分率として計算した。s-CTの薬理効果は、血中Caレベルの総減少量、 ΔD として次式により算出した¹⁴⁾。

$$\Delta D(%) = \frac{AUC_b - AUC_p}{AUC_b} \times 100 \quad (3)$$

ここで、AUC_bはs-CT投与前の血中Caレベル(100%)を投与後6時間まで外挿し、それをコントロールレベルとしたときの、血中Caレベル-時間曲線下面積、AUC_pはs-CT鼻腔内投与後の血中Caレベル-時間曲線下面積である。

結果と考察

(1) α -hANP投与後の利尿効果

図1aおよびbに α -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、図2に α -hANP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。

α -hANP溶液を静脈内に投与すると、尿排泄速

度、全尿量と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、 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 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(図1)。

α -hANP 溶液を鼻腔内に投与したとき、徐々に尿排泄速度が上昇し、投与後15分に約180%の最大尿排泄速度が得られたが、薬効の消失は速やかで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含有する α -hANP 溶液を鼻腔内に投与すると、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 α -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120分前後までその尿排泄増強効果は持続した(図2)。

これらの結果を静脈内投与時の薬理効果と比較した(図1)。 α -hANP 溶液($100\text{ }\mu\text{g/kg}$)を鼻腔内に投与したときの最大尿排泄速度は、 $0.2\text{ }\mu\text{g/kg}$ 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、薬理学的なバイオアベイラビリティーは0.2%前後と思われた。一方、ベスタチンを併用して α -hANP を投与すると、 α -hANP 単独投与と同様に最大尿排泄速度は $0.2\text{ }\mu\text{g/kg}$ の静脈内投与時よりも小さかったが、全尿量は約7000%であり薬理学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 α -hANP が鼻腔内および鼻粘膜中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と思われた¹⁵⁾。これに対し poly-L-Arg を併用すると、最大尿排泄速度は静脈内投与時の $2.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 弱で得られる速度に匹敵し、 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ を静脈内投与したときにみられる急激で強い利尿効果が抑えられた。しかも全尿量は $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 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 α -hANP の吸収が静脈内投与に比較して有効な速度で持続することにより、体内 α -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。これらの結果より、poly-L-Arg を併用することで、 α -hANP の鼻粘膜からの吸収が促進され、かつ有効的な薬理効果が得られる吸収速度が持続することが明らかとなった。

(2) s-CT 鼻腔内投与後の血中 Ca 濃度推移

図3および表1にs-CT 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。s-CT 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、投与後90分に最大 Ca 濃度低下効果(Dmax)が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¹⁶⁾や Schipper ら¹⁴⁾の結果と類似していた。一方、poly-L-Arg を併用すると薬理効果の発現は s-CT 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、最大30%強(Dmax)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 s-CT 溶液および poly-L-Arg 含有 s-CT 溶液の ΔD はそれぞれ8.5および23.9%であり、poly-L-Arg の併用で ΔD は約3倍に增加了。

Hanson ら¹⁷⁾は s-CT 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、s-CT(10 IU/kg 、生理食塩液)鼻腔内投与後の血中 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 Dmax が25~30%になったことを報告している。筆者らが用いた 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、持続性を有するすぐれた効果を示した。Schipper ら¹⁴⁾の報告では、s-CT 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 ΔD 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 ΔD (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。

結 語

これまで高分子量の生理活性医薬品の経鼻吸収性の改善のために、多くの研究者らによりさまざまな吸収促進剤候補物質が試験されてきた。しかし、それらの物質のほとんどは著しい吸収の改善がなされる反面、粘膜障害性を有し実用化に至っていない。今回促進剤として poly-L-Arg を用い α -hANP および s-CT を経鼻投与した結果、どちらの薬理効果も静脈内投与に匹敵するか、それ以上であった。先の筆者らの報告から、この薬理効果の改善は粘膜障害性を伴わずになされたものであり、さまざまな生理活性物質の経鼻送達システムの開発を促進するものと期待される。

文 献

- 1) Illum L, Farraj NF, Fisher AN, Gill I, Miglietta M et al.: Hyaluronic acid ester microspheres as a nasal delivery system for insulin. *J. Controlled Rel.* 29 : 133-141, 1994.
- 2) Edman P, Bjork E, Ryden L: Microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs. *J. Controlled Rel.* 21 : 165-172, 1992.
- 3) Morimoto K, Morisaka K, Kamada A: Enhancement of nasal absorption of insulin and calcitonin using polyacrylic acid gel. *J. Pharm. Pharmacol.* 37 : 134-136, 1985.
- 4) Hussain MA, Koval CA, Shenvi AB, Aungst BJ: Recovery of nasal mucosa from the effects of aminopeptidase inhibitors. *J. Pharm. Sci.* 79 : 398-400, 1990.
- 5) Gordon GS, Moses AC, Silver RD, Flier JS, Carey MC: Nasal absorption enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 7419-7423, 1985.
- 6) Donovan MD, Flynn GL, Amidon GL: The molecular weight dependence of nasal absorption: the effect of absorption enhancers. *Pharm. Res.* 7 : 808-815, 1990.
- 7) Merkus FWHM, Schipper NGM, Hermens WAJJ, Romeijn SG, Verhoef JC: Absorption enhancers in nasal drug delivery: efficacy and safety. *J. Controlled Rel.* 24 : 201-208, 1993.
- 8) Hosoya K, Kubo H, Natsume H, Sugibayashi K, Morimoto Y: Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using Ussing chamber technique. *Biol. Pharm. Bull.* 17 : 318-322, 1994.
- 9) Illum L, Farraj NF, Davis SS: Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.* 11 : 1186-1189, 1994.
- 10) Natsume H, Iwata S, Miyamoto M, Kawai T, Sugibayashi K et al.: Screening of absorption enhancer for nasal peptide and protein delivery. *Proceed. Intern. Symp. Rel. Bioact. Mater.* 23 : 481-482, 1996.
- 11) Hirai S, Yashiki T, Mima H: Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 9 : 165-172, 1981.
- 12) de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28 : 89-94, 1981.
- 13) Christensen S, Steiness E, Christensen H: Tubular sites of furosemide natriuresis in volume-replaced and volume-depleted conscious rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239 : 211-218, 1986.
- 14) Scipper NG, Verhoef JC, Romeijn SG, Merkus FWHM: Methylated β -cyclodextrines are able to improve the nasal absorption of salmon calcitonin. *Calcif. Tissue Int.* 56 : 280-282, 1995.
- 15) Kanagawa K, Matsuo H: Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide(α -hANP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 : 131-139, 1984.
- 16) Morimoto K, Miyazaki M, Kakemi M: Effects of proteolytic enzyme inhibitors on nasal absorption of salmon calcitonin in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 113 : 1-8, 1995.
- 17) Hanson M, Gazdick G, Cahill J, Augustin M: Intranasal delivery of the peptide salmon calcitonin. in *Delivery System for Peptide Drugs*, Davis SS, Illum L and Tomlinson E Eds. Plenum Press, New York, 1986, p 233-242.