

学位論文要旨

経鼻投与後の脳組織への直接移行に対する薬物の脂溶性と 特殊輸送系の影響及びアセトアミノフェン経鼻投与製剤に関する研究

小川 夏歩

全身循環系からの中樞神経系（CNS）作用薬の脳送達において、血液脳関門（BBB）は大きな障壁となる。近年、CNS 作用薬の脳送達法として経鼻投与が注目されている。経鼻投与された薬物は全身循環系からの脳移行に加えて、嗅神経や三叉神経経路を介した脳への直接移行が可能であり、素早い脳移行とそれに伴う薬理効果の発現が期待される。しかし、投与薬物の物理化学的性質や鼻粘膜上皮及び嗅球に発現する特殊輸送系に着目して脳移行を詳細に検討した研究はこれまでにほとんどない。本研究では、経鼻投与後の薬物の脳への直接移行に対する薬物の脂溶性の影響を評価し、両者の関係を明らかにすることを目的とした。また、鼻粘膜上皮及び嗅球に発現する特殊輸送系について検討し、鼻腔から脳への薬物の直接移行に対する特殊輸送系の影響を評価した。さらに CNS 作用薬であるアセトアミノフェン（APAP）を経鼻投与した後の脳作用発現部位への移行と薬理効果を評価することで経鼻投与製剤の有用性を明らかにすることを目的とした。

第 1 編 単純拡散による鼻腔から脳への薬物の直接移行に対する薬物の脂溶性の影響

全身循環系から脳への移行が単純拡散に従うと考えられる 8 種類の薬物を選択し、経鼻投与後の薬物の全身循環系及び各脳部位への移行を静脈内投与と比較した。その結果、鼻腔から全身循環系への薬物の移行は、薬物の脂溶性が増加するに従い早まる傾向にあったが、その移行は脂溶性に関係なく全ての薬物で良好であった。経鼻投与後の薬物の各脳部位への移行は、ほとんどの薬物で静脈内投与よりも素早く、経鼻投与直後では脳への各薬物の直接移行も良好であったが、経鼻投与後、時間の経過とともに静脈内投与と同程度の脳中薬物濃度推移を示した。これらの結果から、経鼻投与された薬物の一部は経鼻投与初期から BBB を介さず直接移行経路で各脳部位へ移行したが、経時的に薬物の脳への直接移行は低下し、相対的に全身循環系からの移行割合が増大することが示唆された。経鼻投与後の薬物の脳への移行において、特に嗅球中薬物濃度が他の脳部位よりも高い値を示したことから、経鼻投与された薬物は嗅上皮を介して嗅球へ直接移行した後に他の脳部位へ拡散することが考えられた。そこで、経鼻投与後の薬物の嗅球への直接移行に対する薬物の脂溶性の影響について検討した。その結果、経鼻投与後の薬物の嗅球への直接移行は薬物の脂溶性に従う傾向にあり、経鼻投与された薬物の脂溶性（薬物の分配係数を薬物の分子量で補正した対数値）と嗅球への取り込みクリアランスの対数値との間に、正の相関関係を示す傾向があった。また、脂溶性の高い薬物の方が鼻腔から全身循環系を介し嗅球へ移行する割合よりも、鼻腔から直接嗅球へ移行する割合の方が増大する傾向にあった。さらに水溶性薬物においても鼻腔から脳へ直接移行する可能性が示唆された。

第 2 編 鼻腔から嗅球への薬物の直接移行に対する特殊輸送系の影響

一般に全身循環系から脳への薬物の移行は単純拡散に従うが、BBB には種々のトランスポーターが発現しており、これらの基質になる薬物では、全身循環系から脳への移行に影響があると考えられる。特に

特殊輸送系である P-糖タンパク質や有機アニオントランスポーターの一部は BBB において全身循環系から脳への移行を妨げる障壁となっており、CNS 作用薬の脳移行を妨げる要因の 1 つとなる。鼻粘膜上皮及び嗅球にも特殊輸送系が発現している場合、鼻腔から脳への薬物の直接移行に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本編では、薬物の鼻腔から脳（嗅球）への直接移行に対する特殊輸送系の影響について検討した。その結果、鼻粘膜上皮及び嗅球においてウエスタンブロット法により P-糖タンパク質（MDR1）及び有機アニオントランスポーター（OAT1）が発現が確認され、MDR1 及び OAT1 の基質薬物であるベラパミル塩酸塩（VRP）及びフルルビプロフェン（FP）の経鼻投与後の嗅球への移行は、単純拡散に従い同程度の脂溶性を有する薬物よりも低下した。また、試験した VRP 及び FP の濃度範囲では鼻腔内への適用濃度に依存して嗅球への吸収過程に飽和が認められた。さらに基質薬物の競合阻害剤を併用することにより嗅球への薬物の移行量が増大する傾向にあったことから、MDR1 及び OAT1 はそれぞれ VRP 及び FP の鼻粘膜上皮から嗅球への直接移行及び全身循環系から嗅球への移行を制限すると考えられた。

第 3 編 中枢神経系作用薬 アセトアミノフェン（APAP）の脳への吸収動態と薬理効果の関係

前編までの結果から経鼻投与後の薬物の脳への直接移行に対する薬物の脂溶性及び特殊輸送系の影響が明らかとなり、経鼻投与された薬物は静脈内投与よりも嗅球へ素早く効率的に移行することが示された。しかし、投与された薬物が薬理効果を発現するためには嗅球だけでなく、脳の作用発現部位に薬物が移行することが重要となる。そこで本編では、中枢性解熱鎮痛薬である APAP をモデル薬物に選択し、経鼻投与後の体内動態と薬理効果について検討した。その結果、経鼻投与後の APAP は臨床現場で用いられている投与経路と比較して、素早く効率的に脳へ移行し、素早い薬理効果（解熱効果及び鎮痛効果）を示す傾向にあった。さらに、嗅上皮領域における APAP の保持時間の延長及び脳への直接移行を増強させる目的で粘膜付着性物質の polyvinylpyrrolidone（PVP, M.W. 35 kDa）及び吸収促進剤の poly-L-arginine（PLA, M.W. 44.3 kDa）を用いて、APAP の脳移行と薬理効果を検討した。その結果、APAP のみの経鼻投与と比較して、5.0 w/v% PVP 及び 0.5 w/v% PLA を併用した経鼻投与では、嗅球中 APAP 濃度が投与初期から増大し、各脳部位における APAP 濃度は少なくとも投与 30 分後まで高く推移した。それと連動するように、投与初期から優れた薬理効果を示し、持続する傾向にあった。従って、PVP 及び PLA を併用した経鼻投与では、APAP の鼻腔から脳への直接移行を増加させることによって、十分な薬理作用を発現したと考えられた。

以上の結果より、経鼻投与後の薬物の脳（嗅球）への直接移行は脂溶性に従う傾向にあったが、水溶性薬物においても鼻腔からの直接移行経路を介して効率的に脳へ送達されることが示唆された。また、鼻粘膜上皮や嗅球において特殊輸送系の発現がタンパク質レベルで確認され、これらの基質薬物では鼻腔から脳への直接移行に特殊輸送系が影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、CNS 作用薬の APAP 経鼻投与は静脈内投与と同等かそれ以上の脳内濃度及び薬理効果を示し、PVP 及び PLA を併用した経鼻投与法は、APAP の脳送達や薬理効果発現に有用であることも示唆された。従って、本システムでの経鼻投与法は、脳送達に優れた投与方法になる可能性が示唆された。

Thesis abstract

Effects of drug lipophilicity and specific transport system on direct transfer to brain tissue after intranasal administration and preparation of acetaminophen for transnasal delivery

Kaho Ogawa

The blood-brain barrier (BBB) is a major obstacle in the delivery of therapeutic drugs for diseases of the central nervous system (CNS). Recently, intranasal (*i.n.*) administration has attracted attention as a method for brain delivery of CNS agents. The drugs administered nasally are transported to the brain from the systemic circulatory system. In addition, the drugs may be transported directly to the brain via olfactory and trigeminal pathways. As a result, rapid brain transfer of the drugs is expected to be associated with pharmacological effects. However, few studies have investigated brain migration in detail, focusing instead on the physicochemical properties of the drugs administered nasally and the specific transport system expressed in the nasal epithelium and olfactory bulb (OB). The purpose of this study was to evaluate the lipophilic effect of the drug on its direct transfer to the brain after *i.n.* administration and to clarify the relationship between them. The specific transport system expressed in the nasal epithelium and OB was also examined and the effect of the specific transport system on the direct transfer of the drug from the nasal cavity to the brain was evaluated. Furthermore, this study aimed to clarify the utility of transnasal delivery system by evaluating the transition to the site of intracerebral action and the pharmacological effect of the CNS agent, acetaminophen (APAP), after *i.n.* administration.

1. The lipophilic effect of the drug on the direct transfer from the nasal cavity to the brain by passive diffusion

Eight drugs were selected whose transfer from the systemic circulatory system to the brain were thought to follow passive diffusion. Thus, the transfer to the systemic circulatory system and each brain region after *i.n.* administration was compared with intravenous (*i.v.*) administration. As a result, the transfer of the drug from the nasal cavity to the systemic circulatory system tends to accelerate as the lipophilicity of the drug increases. But the transfer is good for all drugs, regardless of lipophilicity. The transfer of the drug to each brain site after *i.n.* administration was faster than that after *i.v.* administration for most drugs, and the direct transfer of each drug to the brain immediately after *i.n.* administration was also good. However, after *i.n.* administration, the drug concentrations in the brain changed to the same level as that after *i.v.* administration over time. From these results, it was suggested that some of the drugs administered nasally were transferred to each brain region by the direct transfer route without BBB mediation from the initial stage of *i.n.* administration, but the direct transfer of the drug to the brain decreased over time, while the transfer from the systemic circulatory system relative increased. During the transfer of the drug to the brain after *i.n.* administration, the drug concentration in the OB was higher than that in other brain regions. Therefore, it was considered that the drug administered nasally was directly transferred to the OB and then diffused to other brain regions. The effect of drug lipophilicity on the direct transfer from the nasal cavity to the OB after *i.n.* administration was investigated. As a result, it appeared that the direct transfer of drug to the OB after *i.n.* administration tended to follow drug lipophilicity. There was a positive correlation between the lipophilicity of the nasally administered drug (the logarithmic value of the partition coefficient of the drug corrected by the molecular weight of the drug) and the logarithmic value of the uptake clearance into the OB. For highly lipophilic drugs, the rate of direct transfer from the nasal cavity to the OB tended to increase, rather than the rate of transfer from the nasal cavity to the OB via the

systemic circulatory system. Furthermore, water-soluble drugs may also transfer directly from the nasal cavity to the brain.

2. Effect of the specific transport system on the direct transfer of the drug from the nasal cavity to the olfactory bulb

Generally, transfer of drugs from systemic circulatory system to the brain follows passive diffusion, but various transporters are expressed in the BBB, and drugs that serve as these substrates may affect transfer to the brain. Some of the specific transport systems, such as P-glycoprotein and organic anion transporters, are barriers to the transfer from the systemic circulatory system to the brain in the BBB and are one of the factors that prevent the transfer of CNS agents to the brain. If specific transport system is expressed in the nasal epithelium and OB, it may affect the direct transfer of the drug from the nasal cavity to the brain. Therefore, the effect of this specific transport system on the direct transfer of the drug from the nasal cavity to the brain (OB) was investigated. The expression of P-glycoprotein (MDR1) and organic anion transporter (OAT1) was confirmed in the nasal mucosal epithelium and OB by western blotting. Verapamil hydrochloride (VRP) and flurbiprofen (FP) were used as the substrate drugs for MDR1 and OAT1. Translocation to the OB after *i.n.* administration of VRP and FP was reduced compared to that of similarly lipophilic drugs following passive diffusion. Saturation was observed during the absorption process to OB, depending on the concentration of VRP or FP applied to the nasal cavity within the examined concentrations. Furthermore, the combined use of competitive inhibitors of substrate drugs tended to increase the amount of drugs transferred to the OB. MDR1 and OAT1 are thought to limit the direct transfer of VRP and FP from the nasal epithelium to the OB, and the transfer of them from the systemic circulatory system to the OB, respectively.

3. Relationship between the absorption kinetics to the brain and the pharmacological effect of acetaminophen (APAP)

As a result of sections 1 and 2, the effects of lipophilicity and specific transport system on direct transfer of drug to the brain after *i.n.* administration were clarified. It was shown that the drug administered intranasally transfers to the OB faster and more efficiently than the *i.v.* administration. However, for the administered drug to produce a pharmacological effect, it must be transferred not only to the OB but also to the site of action in the brain. In this study, the transport of APAP, a central antipyretic and analgesic drug, to the brain and systemic circulation after *i.n.* administration was pharmacokinetically and pharmacodynamically investigated. Intranasal administration of APAP tended to be transferred to the brain quickly and efficiently whilst showing quick pharmacological effects (antipyretic and analgesic effects) compared with the administration route used in clinical practice. Furthermore, direct transport to the brain and the pharmacological effect after *i.n.* administration of APAP with polyvinylpyrrolidone (PVP, M.W. 35 kDa; a mucoadhesive agent) and poly-L-arginine (PLA, M.W. 44.3 kDa; an absorption enhancer) were investigated to improve retention of the dosage solution in the olfactory epithelium region and enhance the transfer of APAP to the brain. Compared with *i.n.* administration of APAP alone, *i.n.* administration with 5.0 w/v% PVP and 0.5 w/v% PLA increased the concentration of APAP in the OB from the beginning of administration and maintained the concentration of APAP in each brain region for at least 30 min after administration. In addition, the pharmacological effects were observed in the early phase of treatment, and tended to persist. Therefore, *i.n.* administration with PVP and PLA may increase the direct translocation of APAP from the nasal cavity to the brain, resulting in sufficient pharmacological effects.

論文審査の結果の要旨

鼻腔内への薬物投与は、全身循環系への速やかな薬物吸収に加え、嗅上皮から嗅球を介して脳に直接的に薬物が吸収される経路が存在することから、中枢神経作用薬を効率的に脳に送達できる投与方法として期待されている。本論文は、種々薬物の経鼻投与後の脳移行性を薬物動態学および薬理効果の観点から特徴づけることにより、脳送達を目的とした鼻腔内投与製剤の開発に有益な情報を得ている。本論文は3編からなり、第1編では分配係数の異なる種々薬物、また第2編では特殊輸送系の基質となる薬物を用いて、それぞれ鼻腔内投与後の脳組織への直接移行に対する薬物脂溶性度の影響と特殊輸送系の関与について薬物動態学的に評価している。第3編では、中枢神経系に作用する薬物としてアセトアミノフェン(APAP)を用いて鼻腔内投与後の脳移行動態と薬理効果の関係を評価するとともに、鼻腔内滞留性や鼻粘膜吸収性を改善する添加剤の影響を検討し、脳への送達を目的とした鼻腔内投与型製剤の設計に有益な情報を提供している。

第1編では、まず第1章で薬物の静脈内(*i.v.*)および鼻腔内(*i.n.*)投与後の血中濃度時間曲線下面積(AUC)に基づき、薬物が脳部位(嗅球、視床下部、海馬、線条体、大脳皮質、視床及び中脳、小脳、延髄)に送達される標的効率(DTE_{brain})を算出し、単純拡散による吸収動態について分配性の異なる薬物で比較した。特に*i.n.*投与後5分程度の初期の薬物送達は血液脳関門(BBB)を介さず嗅球へ直接移行する割合が高いことを明らかにした。嗅球への直接移行は薬物の脂溶性度が高いほど高い傾向にあり、また嗅球への移行性の高い薬物はその近傍に位置する視床下部への移行性も高いことを明らかにした。第2章では、鼻腔から嗅球への直接移行を詳細に検討するために、*i.n.*投与後の嗅球への直接移行の寄与率(DTP_{ob})、鼻腔から嗅球への取り込みクリアランス($CL_{i,n}$)、および全身循環から嗅球への取り込みクリアランス($CL_{i,v}$)を求め、薬物の分子サイズを考慮した分配係数($k/M.W.^{1/2}$)との関係を検討した。 $CL_{i,n}$ および $CL_{i,v}$ は $k/M.W.^{1/2}$ に対して正の相関を示し、 DTP_{ob} も $k/M.W.^{1/2}$ に依存する傾向にあったことから、単純拡散型の薬物の分配性は鼻腔から嗅球のような中枢神経系への吸収動態の推定に有用であることが示された。一方、本研究で用いた薬物のうち最も水溶性の高いカルボキシフルオレセイン($\log(k/M.W.^{1/2}) = -2.27$)では、分配性から推測されるより明らかに高い DTP_{ob} を示し、薬物の脂溶性度のみで吸収動態を評価できないことを示唆するデータも得られた。

鼻粘膜上皮には、P-糖タンパク質(P-gp)、多剤耐性関連タンパク質、有機アニオントランスporterなどの特殊輸送系の発現が報告され、*i.n.*投与した薬物の嗅球を含む中枢神経系への吸収動態に影響する可能性がある。第2編では、まず有機アニオントランスporter 1(OAT1)およびP-gpの鼻粘膜上皮での発現を確認し、これら輸送系の基質として知られているフルルピプロフェン(FP)およびベラパミル塩酸塩(VRP)を用い、*i.n.*投与後の嗅

球への直接移行に対する特殊輸送系の影響について検討した。FP および VRP の経鼻投与後の DTP_{ob} や CL_{i.n.} のような嗅球への直接移行の指標は、同程度の分配係数の単純拡散が主であると考えられる薬物よりも低い値を示した。それぞれ OAT1 および P-gp の競合阻害剤であるキニジンおよびプロベネシド共存下で、FP および VRP の嗅球中濃度の増大が認められたことから、これら輸送系は嗅球など中枢神経系への直接移行を制限する方向に関与し、薬物の *i.n.* 投与後の中枢での速やかな効果発現を制限する可能性があることが示された。

第 3 編では、第 1 編の吸収動態評価に用いた薬物のうち、中枢での薬理効果測定が可能な薬物として APAP を選択し、第 1 章で脳部位濃度と解熱効果および鎮痛効果との関係性を評価した。解熱効果の測定にはビール酵母投与により発熱を誘発したモデルラット、鎮痛効果にはラットの尾に熱刺激を与える Tail flick test を用いた。APAP 鼻腔内投与 10 分後の嗅球および解熱作用に関わる視床下部での濃度は、*i.v.* および直腸 (*i.r.*) 投与後より有意に高く、それに対応した速やかな解熱効果が得られた。一方、*i.n.* 投与後の鎮痛作用に関わる大脳皮質中 APAP 濃度は、*i.v.* 投与に比べて低かったが、*i.r.* 投与や経口投与よりも高く、*i.v.* 投与後に匹敵する鎮痛効果が得られた。

APAP の *i.n.* 投与により速やかな薬理効果発現が認められるが、効果は一過的であり、*i.v.* 投与に比べて必ずしも十分ではない。そこで製剤の粘度増大による鼻腔内の滞留性改善および鼻粘膜および嗅上皮を介した吸収促進を期待して、それぞれポリビニルピロリドン (PVP) およびポリ-L-アルギニン (PLA) の適用効果を検討した。PVP のみを添加した製剤の *i.n.* 投与により、嗅球、大脳皮質、および視床下部での APAP 濃度は持続化する傾向にあり、PLA のみを添加した製剤では特に嗅球中 APAP 濃度が高まることが明らかとなった。PVP と PLA を併用することにより、これら脳部位での濃度はさらに高まる傾向にあり、それと一致して解熱効果および鎮痛効果の増大と持続化が認められたことから、製剤学的工夫により *i.n.* 投与製剤の有用性を高めることができることを明らかにした。

以上、本論文の内容は *i.n.* 投与製剤投与後の脳への送達を薬物動態学的に特徴づけるとともに、薬理効果との関連性について十分な計画に基づいて研究が実施されていると認められる。本研究は脳への薬物送達を期待した鼻腔内投与型製剤開発に対して学術的に意義深く、実施された研究に対する研究倫理的な問題も指摘されない。本論文の研究成果は投稿論文として公表され、博士 (薬学) の学位を与えるに十分な要件を満たしており、論文審査結果を合格と判断する。