

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

目次

略語と記号	・・・	1
緒言	・・・	3
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		
第 1 章 種々脂溶性薬物の経鼻投与後の脳移行性について		
第 1 節 小緒言	・・・	6
第 2 節 実験方法		
1-1-2-1 試薬	・・・	7
1-1-2-2 実験動物	・・・	8
1-1-2-3 薬物の投与		
1-1-2-3 (1) 静脈内 (<i>i.v.</i>) 投与	・・・	8
1-1-2-3 (2) 経鼻 (<i>i.n.</i>) 投与	・・・	8
1-1-2-4 薬物投与後の血漿の採取	・・・	9
1-1-2-5 薬物投与後の各脳部位の採取	・・・	9
1-1-2-6 薬物の定量		
1-1-2-6 (1) 血漿中薬物濃度の測定	・・・	10
1-1-2-6 (2) 各脳部位中薬物濃度の測定	・・・	12
1-1-2-6 (3) HPLC 装置	・・・	15
1-1-2-6 (4) LC/MS/MS 装置	・・・	16
1-1-2-7 薬物動態解析		
1-1-2-7 (1) 血漿中薬物濃度推移	・・・	16
1-1-2-7 (2) 各脳部位中薬物濃度推移	・・・	17
1-1-2-8 統計解析	・・・	17
第 3 節 結果		
1-1-3-1 種々脂溶性薬物の静脈内投与後の血漿中濃度推移	・・・	18
1-1-3-2 種々脂溶性薬物の経鼻投与後の全身循環系への移行	・・・	20
1-1-3-3 種々脂溶性薬物投与後の各脳部位への移行	・・・	22
第 4 節 考察	・・・	32

第 2 章 単純拡散による鼻腔から嗅球への直接移行に対する薬物の
脂溶性の影響

第 1 節 小緒言	...	34
第 2 節 実験方法		
1-2-2-1 薬物動態解析	...	35
1-2-2-2 統計解析	...	36
第 3 節 結果		
1-2-3-1 薬物の嗅球への直接移行と脂溶性の関係	...	37
第 4 節 考察	...	39

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

第 1 節 小緒言	...	43
第 2 節 実験方法		
2-2-1 試薬	...	45
2-2-2 実験動物	...	45
2-2-3 Immunoblot analysis	...	45
2-2-4 薬物の投与	...	46
2-2-5 薬物投与後の血漿の採取	...	47
2-2-6 薬物投与後の各脳部位の採取	...	47
2-2-7 FP 及び VRP の定量		
2-2-7 (1) 血漿中薬物濃度の測定	...	47
2-2-7 (2) 各脳部位中薬物濃度の測定	...	48
2-2-7 (3) HPLC 装置	...	49
2-2-8 薬物動態解析	...	49
2-2-9 統計解析	...	49
第 3 節 結果		
2-3-1 鼻粘膜上皮及び嗅球における OAT1 及び MDR1 の発現	...	50
2-3-2 薬物の静脈内投与後の血漿中濃度推移	...	51
2-3-3 薬物の経鼻投与後の全身循環系への移行	...	52
2-3-4 薬物投与後の各脳部位への移行	...	53
2-3-5 薬物の鼻腔から嗅球への直接移行に対する特殊輸送系の影響	...	56
2-3-6 薬物の鼻腔から嗅球への移行に対する鼻腔内適用濃度の影響	...	58

2-3-7 薬物の鼻腔から嗅球への移行に対する競合阻害剤の影響	59
第 4 節 考察	60

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

第 1 章 覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の体内動態と薬理効果

第 1 節 小緒言	63
第 2 節 実験方法	
3-1-2-1 試薬	65
3-1-2-2 実験動物	65
3-1-2-3 麻酔	65
3-1-2-4 APAP の投与	
3-1-2-4 (1) 経鼻 (<i>i.n.</i>) 投与	65
3-1-2-4 (2) 静脈内 (<i>i.v.</i>)、経口 (<i>p.o.</i>) 及び直腸 (<i>i.r.</i>) 投与	65
3-1-2-5 APAP 投与後の血漿の採取	
3-1-2-5 (1) 頸静脈簡易カテーテル挿入術	66
3-1-2-5 (2) 血漿の採取	66
3-1-2-6 APAP 投与後の各脳部位の採取	66
3-1-2-7 APAP の定量	
3-1-2-7 (1) 血漿中 APAP 濃度の測定	67
3-1-2-7 (2) 各脳部位中 APAP 濃度の測定	67
3-1-2-8 APAP 投与後の薬理試験	
3-1-2-8 (1) 解熱試験	67
3-1-2-8 (2) 鎮痛試験	67
3-1-2-9 薬物動態及び薬力学解析	
3-1-2-9 (1) 血漿中 APAP 濃度推移	68
3-1-2-9 (2) 各脳部位中 APAP 濃度推移	68
3-1-2-9 (3) 解熱効果	68
3-1-2-9 (4) 鎮痛効果	69
3-1-2-10 統計解析	69
第 3 節 結果	
3-1-3-1 APAP 投与後の全身循環系への移行	70

3-1-3-2	APAP 投与後の各脳部位への移行	・・・	71
3-1-3-3	APAP 投与後の解熱効果	・・・	73
3-1-3-4	APAP 投与後の鎮痛効果	・・・	76
第 4 節	考察	・・・	78
第 2 章	APAP 経鼻投与後の脳移行に対する添加剤の影響		
第 1 節	小緒言	・・・	80
第 2 節	実験方法		
3-2-2-1	試薬	・・・	82
3-2-2-2	PLA 及び PVP 含有 APAP の調製	・・・	82
3-2-2-3	投与溶液の粘度の測定	・・・	82
3-2-2-4	投与溶液の滞留性の評価	・・・	82
3-2-2-5	実験動物	・・・	83
3-2-2-6	麻酔	・・・	83
3-2-2-7	経鼻 (<i>i.n.</i>) 投与	・・・	83
3-2-2-8	覚醒下ラットにおける PVP 含有 APAP 経鼻投与後の各脳部位 の採取	・・・	83
3-2-2-9	麻酔下ラットにおける PLA 含有 APAP 経鼻投与後の各脳部位 の採取	・・・	83
3-2-2-10	APAP の定量	・・・	84
3-2-2-11	薬物動態解析	・・・	84
3-2-2-12	統計解析	・・・	84
第 3 節	結果		
3-2-3-1	投与溶液の粘度及び滞留性	・・・	85
3-2-3-2	覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の脳移行性に対する PVP の影響	・・・	87
3-2-3-3	麻酔下ラットにおける APAP 経鼻投与後の脳移行性に対する PLA の影響	・・・	89
第 4 節	考察	・・・	90
第 3 章	覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の体内動態及び薬理効果 に対する添加剤の影響		
第 1 節	小緒言	・・・	92

第 2 節 実験方法	
3-3-2-1 試薬	．．． 93
3-3-2-2 PLA 及び PVP 含有 APAP の調製	．．． 93
3-3-2-3 実験動物	．．． 93
3-3-2-4 麻酔	．．． 93
3-3-2-5 経鼻 (<i>i.n.</i>) 投与	．．． 93
3-3-2-6 APAP 投与後の血漿及び各脳部位の採取	．．． 93
3-3-2-7 APAP の定量	．．． 94
3-3-2-8 APAP 投与後の薬理試験	．．． 94
3-3-2-9 薬物動態及び薬力学解析	．．． 94
3-3-2-10 統計解析	．．． 94
第 3 節 結果	
3-3-3-1 APAP 経鼻投与後の全身循環系への移行に対する添加剤の影響	．．． 95
3-3-3-2 APAP 経鼻投与後の各脳部位への移行に対する添加剤の影響	．．． 96
3-3-3-3 APAP 経鼻投与後の解熱効果に対する添加剤の影響	．．． 100
3-3-3-4 APAP 経鼻投与後の鎮痛効果に対する添加剤の影響	．．． 103
第 4 節 考察	．．． 105
結論	．．． 107
謝辞	．．． 111
引用文献	．．． 112

略語

ANP	Antipyrine	<i>i.v.</i>	Intravenous
APAP	Acetaminophen	LC/MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
BBB	Blood-brain barrier	LEV	Levetiracetam
BCSFB	Blood-cerebrospinal fluid barrier	MDR1	Multiple drug resistance 1
CAF	Caffeine	OAT1	Organic anion transporter 1
CF	5, (6)-carboxyfluorescein	PBC	Probenecid
CNS	Central nervous system	PBS	Phosphate-buffered saline
CP	Chloramphenicol	PHB	Phenobarbital
CSF	Cerebrospinal fluid	PLA	Poly-L-arginine
DZP	Diazepam	<i>p.o.</i>	Peroral
FP	Flurbiprofen	PVP	Polyvinylpyrrolidone
HPLC	High performance liquid chromatography	QIN	Quinidine
<i>i.n.</i>	Intranasal	SSP	Stainless steel plate
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal	VRP	Verapamil hydrochloride
<i>i.r.</i>	Intrarectal		

記号			
AUC _{analgesic}	鎮痛効果－時間曲線下面積	DTP _{ob}	鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率 (Direct transport percentage)
AUC _{antipyretic}	解熱効果－時間曲線下面積		
AUC _{brain}	脳部位中薬物濃度－時間曲線下面積	E _{max, analgesic}	最大鎮痛効果
AUC _{plasma}	血漿中薬物濃度－時間曲線下面積	E _{max, antipyretic}	最大解熱効果
CL _{i.n.}	鼻腔から嗅球への取り込みクリアランス	F	バイオアベイラビリティ
CL _{i.v.}	全身循環系から嗅球への取り込みクリアランス	log (k/M.W. ^{1/2})	薬物の分配係数 (k) を分子量 (M.W.) で補正した値の対数值
C _{max, brain}	最高脳中薬物濃度	T _{max, analgesic}	最大鎮痛効果到達時間
C _{max, plasma}	最高血漿中薬物濃度	T _{max, antipyretic}	最大解熱効果到達時間
DTE _{brain}	薬物投与後 0 分から各時間における各脳部位への標的効率 (Drug targeting efficiency)	T _{max, brain}	最高脳部位中薬物濃度到達時間
		T _{max, plasma}	最高血漿中薬物濃度到達時間
DTE _{ob}	薬物投与後 0 分から無限大時間における嗅球への標的効率 (Drug targeting efficiency)		

緒言

医薬品の研究開発は、まず医薬品の基となる新規物質の合成・探索から始まり、非臨床試験、臨床試験を経て申請・承認される。このプロセスには10年以上の期間を要するが、全ての候補化合物が承認されるわけではない。厚生労働省の発表によると、2011–2015年度の医薬品研究開発の成功率は、基礎研究から非臨床研究に進める割合が0.01%、さらに申請・承認される化合物の割合は0.004%と極端に少なく、成功確率は年々低下している¹⁾。特に中枢神経系（central nervous system, CNS）を標的とする薬物では、候補化合物が脳に移行し効果を発揮する必要があるため、その成功確率はさらに低くなると考えられる。その要因としてほとんどの薬物は、全身循環系を介して脳へ移行するため、血液脳関門（blood-brain barrier, BBB）の透過性が低く脳送達性が低いことが問題となる。すなわち、経口投与や静脈内注射等による全身循環系から脳への薬物の移行は、BBBの透過性により決定されることになる。毛細血管内皮細胞からなるBBBは非常にtightな細胞シート構造を有し、脂質膜としての性質が高いため、BBBを透過する物質は一般的に①分子量が400–500 Da未満であること、②脂溶性の高い物質であることが重要となる²⁾。従って、一般的に脂溶性化合物では脳への移行性が高く、水溶性化合物では脳への移行性が低い傾向にある。さらに毛細血管内皮細胞にはP-糖タンパク質などの排出トランスポーターの発現が報告されており、脂溶性化合物であってもその移行が制限される場合がある^{3,4)}。このように、BBBは外因性物質の侵入を制限する非常に重要なバリア機能を有する一方で、CNS作用薬の送達には大きな障壁となっている。

本邦においては、高齢化率が増加するに従いCNS疾患を有する総患者数が年々増加傾向にあるため、CNS疾患の社会的重要性が認識されつつあり、CNSを標的とした薬物の必要性が高まっている^{5,6)}。そのため、CNSで効果を発揮する治療薬の研究開発は急務である。しかし、BBBの高いバリア機構により候補化合物のほとんどが脳に移行できず、薬理作用を発揮することができないため、開発段階で候補から外されている。また、臨床現場で用いられているCNS作用薬でさえも脳に移行する薬物は投与量のほんの一部であり、疾患に

対する治療満足度または薬剤貢献度が高いものは少ない⁷⁾。

近年、BBB の透過性の問題を克服する戦略として、ナノキャリアの開発やバブルリポソームと超音波照射を組合わせた方法、毛細血管内皮細胞に存在するトランスポーターを利用して薬物の脳移行を増大させる方法など、BBB の透過性を改善させることを目的とした薬物の効率的な脳輸送の技術開発が多くの研究者によって進められている^{8,9)}。種々の BBB 透過性の問題を克服するための戦略が行われている中で、著者は効率よく薬物を脳に直接移行させる方法として、経鼻投与法に注目した。経鼻投与は非侵襲的であるため痛みを伴わず、自己投与が可能で嚥下困難な患者にも投与可能であるほか、薬物の BBB 透過に加えて鼻腔から脳へ薬物を直接送達する経路が知られている¹⁰⁾。鼻腔内の嗅上皮は、3 種類の細胞から構成されており、その 1 つに嗅細胞がある。嗅細胞は二方向に突起を伸ばしており、一方は上皮表面に伸ばしている。もう一方は嗅神経軸索を形成しており、この嗅神経軸索は篩板とよばれる薄く小さな穴をもつ骨組織を通り、扁平な楕円体の脳の一部である嗅球に繋がっている^{11,12)}。そのため、経鼻投与後の薬物は、嗅上皮や嗅神経を経て嗅球へと直接移行する可能性があり、それを示唆する論文が多数報告されている¹³⁻¹⁵⁾。また、三叉神経経路を介した脳後方の脳幹や脊髄への薬物の直接移行の可能性も示唆されている^{16,17)}。Uchida らは、うつ病誘発ラットにうつ病治療薬であるミルナシプラン塩酸塩を経鼻投与することによって、投与初期から CNS にミルナシプラン塩酸塩が移行し、薬理試験（強制水泳法）において用量依存的に無動時間が短縮したことを報告している¹⁸⁾。また Yamasue らは、自閉スペクトラム症と診断された成人男性を対象にペプチドホルモンであるオキシトシンを連日経鼻投与することで、自閉スペクトラム症の中核症状が改善するとともに脳機能も改善したことを報告している¹⁹⁾。これらの知見から、鼻腔と CNS は解剖学的に近傍に位置しているため、BBB や血液脳脊髄液関門（blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB）を介した全身循環系からの移行に加えて、嗅神経や三叉神経経路を介した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。それゆえ、経鼻投与法は薬物の脳送達において優れた投与方法であると考えられる。

しかし、経鼻投与により薬物が脳へ直接移行することは多くの研究で報告されているが、

薬物の脳への直接移行について、薬物動態学的な知見は多くなく鼻腔内に発現しているトランスポーターなどに関しても不明な点が多い。全身循環系から BBB を介した薬物の脳移行においては、ほとんどの薬物は受動拡散に従い、脂溶性の増大に伴って脳移行性が高くなるが、脳移行に特殊輸送系が関与する薬物では脂溶性に依存せず、移行性が低い場合や高い場合が起こり得る²⁰⁾。嗅上皮においても、P-糖タンパク質などの特殊輸送系が発現していることを示唆する報告があり、特殊輸送系が関与する薬物では、経鼻投与後の脳移行が脂溶性に依存しない可能性が考えられる^{21,22)}。

これまで多くの研究から、経鼻投与後の薬物は、他の投与経路に比べて脳へ移行しやすいことが報告されているが、投与する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性を詳細に検討した研究はほとんどない。そこで本研究では、物理化学的性質の中でも薬物の脂溶性に着目し、経鼻投与後の脳（嗅球）への直接移行に対する薬物の脂溶性の影響を評価し、薬物の脂溶性と脳（嗅球）移行性と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。さらに経鼻投与後の薬物の鼻腔から脳への移行動態と薬理効果との関係を評価した研究はほとんどないため、CNS 作用薬を経鼻投与した後の脳内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本研究を行った。第 1 編では、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。さらに、鼻腔からの直接移行が考えられる嗅球に焦点を当て、嗅球への直接移行と薬物の脂溶性との関係を評価した。第 2 編では、鼻粘膜上皮及び嗅球における特殊輸送系の発現を検討し、薬物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評価した。第 3 編では、CNS 作用薬であるアセトアミノフェン（APAP）を用いて経鼻投与後の脳移行動態と薬理効果との関係を明らかにするとともに、鼻腔内滞留性及び鼻粘膜吸収性を向上させる添加剤の影響を検討し、脳への薬物送達を目的とした経鼻投与製剤の有用性を評価した。

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

第 1 章 種々脂溶性薬物の経鼻投与後の脳移行性について

第 1 節 小緒言

経鼻投与は投与が簡便であり、かつ非侵襲的であることに加えて、薬物の吸収部位である鼻粘膜上皮組織は絨毛構造を有しており、吸収表面積が比較的大きいことが知られている^{23, 24)}。また、鼻腔内には他の投与経路よりもタンパク質分解酵素が比較的少なく、上皮組織の下層にはリンパ管や毛細血管が発達しているため、経鼻投与された薬物は肝初回通過効果を回避し全身循環系への移行が可能である。さらに、経鼻投与された薬物は、BBB や BCSFB を介した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直接的な脳移行も可能であり、薬物の脳送達において優れた投与方法であると考えられる。

経鼻投与された薬物が脳へ移行するには、鼻粘膜を透過し嗅上皮または呼吸上皮を透過する必要がある。嗅上皮表面に分布した薬物は経細胞経路から脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) に輸送され脳全体に分布するか、または細胞間隙経路から嗅球へ移行し他の脳部位へ拡散することが考えられる。さらにエンドサイトーシス機構により嗅細胞に取り込まれることで嗅球に輸送される嗅神経経路が考えられる。呼吸上皮表面に分布した薬物も同様に、経細胞経路や細胞間隙経路から CSF に移行するか、もしくは三叉神経経路から脳幹や脊髄に移行し脳全体に移行することが考えられる²⁵⁾。

経口投与や静脈内注射等による全身循環系から脳への薬物の移行は、BBB や BCSFB の透過性によって決定される。そのため、ほとんどの薬物の脳への移行は薬物の脂溶性に依存する。経鼻投与後の薬物の脳への移行においても、薬物の脂溶性は極めて重要な物理化学的性質であると考えられる。そこで第 1 編第 1 章では、脂溶性 (分配係数) の異なるモデル薬物 8 種類を経鼻投与した後の血漿及び各脳部位中薬物濃度推移を静脈内投与と比較することで経鼻投与後の薬物の脳移行性について評価した。

第2節 実験方法

1-1-2-1 試薬

5, (6)-carboxyfluorescein (CF)、Antipyrine (ANP) 及び urethane を Sigma-Aldrich (MO, USA) より購入した。Levetiracetam (LEV) を東京化成工業株式会社（東京）から購入した。Caffeine (CAF)、Acetaminophen (APAP)、Chloramphenicol (CP) 及び Diazepam (DZP) を富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）から購入した。Phenobarbital (PHB) をマイラン製薬株式会社（東京）から購入した。その他の試薬は全て特級品を使用した。Table 1 に用いたモデル薬物の構造式及び物理化学的性質を示す。なお、薬物の物理化学的パラメータは、化合物データベースである PubChem または文献値から引用した^{26, 27)}。また、 $\log(k/M.W.^{1/2})$ は、薬物の分配係数 (k) を薬物の分子量 (M.W.) で補正した対数値を示し、脂溶性の指標として用いた。

Table 1 Model drugs used in this study.

	5, (6)-carboxyfluorescein (CF)	Levetiracetam (LEV)	Caffeine (CAF)	Antipyrine (ANP)
M.W.	376	170	194	188
log k	-0.98	-0.60	-0.07	0.38
$\log(k/M.W.^{1/2})$	-2.27	-1.72	-1.21	-0.76
pK _a	6.50	<-2	14.0	1.40
Structure				
	Acetaminophen (APAP)	Chloramphenicol (CP)	Phenobarbital (PHB)	Diazepam (DZP)
M.W.	151	323	232	285
log k	0.46	1.14	1.47	2.82
$\log(k/M.W.^{1/2})$	-0.60	-0.11	0.29	1.59
pK _a	9.38	7.49	7.30	3.40
Structure				

1-1-2-2 実験動物

Wistar 系雄性ラット (BW: 250–300 g, 8–9 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入した。ラットを 3–4 匹/cage で飼育し、自由に食餌及び水を摂取できるようにした。ただし、実験 17 時間前から絶食させた。なお、本研究におけるラットを用いた全ての実験は城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認 (承認番号: H28017, H29022, JU18017, JU19009, JU20010, JU21010) を得てから行った。

1-1-2-3 薬物の投与

1-1-2-3 (1) 静脈内 (*i.v.*) 投与

ウレタン生理食塩液 (25 w/v%, 1.0 g/kg) をラット腹腔内に投与し、麻酔した。ラットを固定板に仰臥位固定した後、後述する経鼻投与実験と同様の生理的条件にするため、ラットに外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出して、さらにラットの頭部を 30° 傾斜させた。施術 60 分後、左頸静脈より CF (0.1 mg/mL, 0.1 mg/kg)、LEV (4.0 mg/mL, 4.0 mg/kg)、CAF (1.0 mg/mL, 1.0 mg/kg)、ANP (2.0 mg/mL, 2.0 mg/kg)、APAP (4.0 mg/mL, 4.0 mg/kg)、CP (0.6 mg/mL, 0.6 mg/kg)、PHB (0.6 mg/mL, 0.6 mg/kg) 及び DZP (0.02 mg/mL, 0.02 mg/kg) を投与した。なお、本研究で用いた全ての薬物はリン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS) に溶解させた。

1-1-2-3 (2) 経鼻 (*i.n.*) 投与

1-1-2-3 (1) と同様の方法で麻酔したラットを仰臥位固定した後、Hirai らの *in vivo* 鼻腔内投与実験法に準じて外科的処置を施した²⁸⁾。まず、正中線に沿って喉を切開し、気管を露出した。気道を確保するため、気管にポリエチレンチューブ (ヒビキポリエチレン細管 No. 8, 株式会社三商, 東京) を挿入した。次いで、鼻腔から食道側への投与溶液の流出を防ぐために、シリコーンゴム (信越シリコーン, 信越化学工業株式会社, 東京) を用いて先端を塞いだシリコーンチューブ (シラスコン® 医療用チューブ SH No. 1, 株式会社カネカメディックス, 大阪) を鼻腔側に向けて食道内に挿入した。その後、左右の頸静脈を露出した後、ラ

ットの頭部を 30° 傾斜させた。さらに鼻口蓋管からの投与溶液の漏出を防ぐために、この部分を瞬間接着剤（アロンアルファ®，東亜合成株式会社，東京）で塞いだ。施術 60 分後、先端にポリエチレンチューブ（ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 株式会社三商, 東京）を接続したマイクロシリンジを用いて、CF (0.5 mg/mL, 0.1 mg/kg)、LEV (20 mg/mL, 4.0 mg/kg)、CAF (5.0 mg/mL, 1.0 mg/kg)、ANP (10 mg/mL, 2.0 mg/kg)、APAP (20 mg/mL, 4.0 mg/kg)、CP (3.0 mg/mL, 0.6 mg/kg)、PHB (3.0 mg/mL, 0.6 mg/kg) 及び DZP (0.1 mg/mL, 0.02 mg/kg) を左鼻腔入口から 15 mm のところに投与した (Fig. 1)。投与直後に、瞬間接着剤（アロンアルファ®，東亜合成株式会社，東京）で鼻孔を塞いだ。

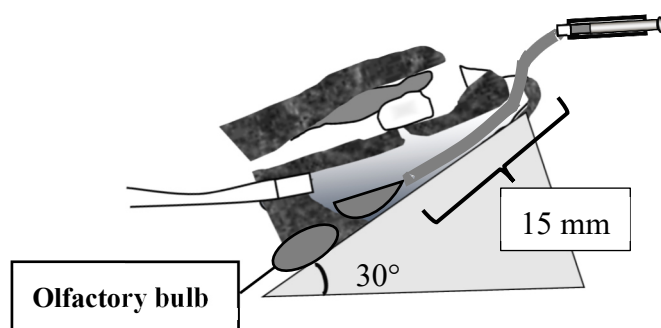


Fig. 1 Intranasal administration method.

1-1-2-4 薬物投与後の血漿の採取

各薬物を静脈内及び経鼻投与した後、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。採血した血液を直ちに遠心分離 (4°C, 20,400 g, 5 min) して血漿を得た。

1-1-2-5 薬物投与後の各脳部位の採取

各薬物を静脈内及び経鼻投与した後、所定の時間に3分間かけてPBS約150 mLをラットの左心室に注入し、灌流にて屠殺した。その後全脳を摘出し、PBSで洗浄後、Figure 2 及び Table 2 に示すように脳を I-IX の部位に分割した。各脳部位の重量を測定した後、各脳部位中薬物濃度の測定に使用した。定量するまで各脳部位を液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。なお、脳の採取はラット1匹あたり1回のため、動態解析は母集団解析とした。

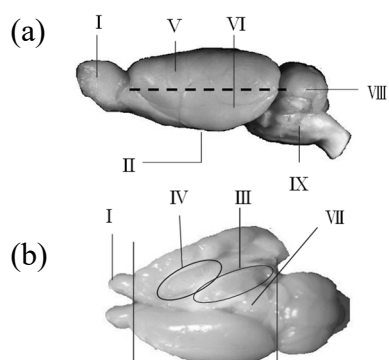


Fig. 2 View of discrete sites in the brain tissue.
 (a) Lateral view of the rat brain
 (b) Dorsal view of the rat brain

Table 2 Brain region.

I	Olfactory bulb
II	Hypothalamus
III	Hippocampus
IV	Striatum
V	Upper cortex
VI	Downside cortex
VII	Thalamus and Midbrain
VIII	Cerebellum
IX	Pons and Medulla oblongate

1-1-2-6 薬物の定量

1-1-2-6 (1) 血漿中薬物濃度の測定

1-1-2-4 で得られた血漿中の各薬物濃度を以下の操作により測定した。

CF 濃度の測定

血漿 50 μL に PBS 2.95 mL を加え、30 秒間攪拌した。分光蛍光光度計 (RF, RF-5300PC, 株式会社島津製作所, 京都) を用いて、希釈した血漿中の CF の蛍光強度を測定し (励起波長 495 nm, 蛍光波長 515 nm)、CF 濃度を算出した。

LEV 濃度の測定

血漿 50 μL にアセトニトリル 150 μL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、得られた上清 1 μL を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) に注入して、LEV 濃度を測定した。

CAF 濃度の測定

血漿 100 μL に内部標準物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルを含有する酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、有機層 800 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に移動相 100 μL を加えて溶解し、3 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 25 μL を高

速液体クロマトグラフィー／紫外可視吸光光度検出器（HPLC/UV）に注入して、CAF 濃度を測定した。

ANP 濃度の測定

血漿 100 μL にアセトニトリル 200 μL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。遠心分離により得られた上清 100 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に内部標準物質としてカフェインを含有する移動相 100 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。その上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、ANP 濃度を測定した。

APAP 濃度の測定

血漿 100 μL に内部標準物質として *m*-アセトアミドフェノールを含むアセトニトリル 200 μL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。遠心分離により得られた上清 100 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に移動相 100 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。その上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、APAP 濃度を測定した。

CP 濃度の測定

血漿 100 μL にアセトニトリル 100 μL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。遠心分離により得られた上清 100 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に内部標準物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルを含有する移動相 75 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。得られた上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、CP 濃度を測定した。

PHB 濃度の測定

血漿 100 μL にアセトニトリル 200 μL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400

g, 5 min)。遠心分離により得られた上清 200 μ L を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣にアセトニトリル 100 μ L を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。その上清 1 μ L を LC/MS/MS に注入して、PHB 濃度を測定した。

DZP 濃度の測定

血漿 100 μ L にアセトニトリル 200 μ L を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離により得られた上清 100 μ L を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣にアセトニトリル 100 μ L を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。その上清 1 μ L を LC/MS/MS に注入して、DZP 濃度を測定した。

1-1-2-6 (2) 各脳部位中薬物濃度の測定

1-1-2-5 で得られた I-IX 中の各薬物濃度を以下の操作により測定した。

CF 濃度の測定

各脳部位に超純水 15 mL/g を加え、ホモジナイザー (本体: PT10-35 GT, KINEMATICA, Swiss シャフト: PT-DA 07/2EC-F101, 7.8 mm ϕ , KINEMATICA, Swiss) を用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 500 μ L を分取した。その上清 500 μ L にアセトニトリル 1 mL を加え、5 分間攪拌した後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 35 μ L を HPLC/RF に注入して、CF 濃度を測定した。

LEV 濃度の測定

各脳部位に超純水 15 mL/g を加え、ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 300 μ L を分取した。その上清 300 μ L にアセトニトリル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 1 μ L を LC/MS/MS に注入して、LEV 濃度を測定した。

CAF 濃度の測定

各脳部位のうち、I–IV に蒸留水 20 mL/g を、V–IX に蒸留水 5 mL/g を加えた。ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）後、上清 500 µL を分取した。その上清 500 µL に内部標準物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルを含有する酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。遠心分離後、有機層 800 µL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に移動相 80 µL を加えて 1 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。得られた上清 35 µL を HPLC/UV に注入して、CAF 濃度を測定した。

ANP 濃度の測定

各脳部位のうち、I–IV に PBS 30 mL/g を、V–IX に PBS 10 mL/g を加えた。ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）後、上清 300 µL を分取した。その上清 300 µL に酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。遠心分離後、有機層 800 µL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に内部標準物質としてカフェインを含有する移動相 100 µL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。得られた上清 35 µL を HPLC/UV に注入して、ANP 濃度を測定した。

APAP 濃度の測定

各脳部位のうち、I–IV に PBS 30 mL/g を、V–IX に PBS 10 mL/g を加えた。ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）後、上清 300 µL を分取した。その上清 300 µL に 1 mol/L 塩酸 100 µL を加え、2 分間攪拌した。その後、内部標準物質として *m*-アセトアミドフェノールを含む酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した（4°C, 20,400 g, 5 min）。遠心分離後、有機層 800 µL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に移動相 75

μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、APAP 濃度を測定した。

CP 濃度の測定

各脳部位のうち、I-IV に PBS 30 mL/g を、V-IX に PBS 10 mL/g を加えた。ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 300 μL 分取した。その上清 300 μL に酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、有機層 800 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に内部標準物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルを含有する移動相 75 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、CP 濃度を測定した。

PHB 濃度の測定

各脳部位に超純水 15 mL/g を加え、ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 300 μL 分取した。その上清 300 μL に酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、有機層 800 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣にアセトニトリル 100 μL を加えて 5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 1 μL を LC/MS/MS に注入して、PHB 濃度を測定した。

DZP 濃度の測定

各脳部位のうち、I-IV に超純水 30 mL/g を、V-IX に超純水 10 mL/g を加え、ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 300 μL を分取した。その上清 300 μL に酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、有機層 800 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣にアセトニトリル 100 μL

を加えて 5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。得られた上清 1 μ L を LC/MS/MS に注入して、DZP 濃度を測定した。

1-1-2-6 (3) HPLC 装置

CF、CAF、ANP、APAP 及び CP の測定には、グラジエントポンプ (PU-2089 Plus, 日本分光, 東京)、インテリジェント紫外可視検出器 (UV-2075 Plus, 日本分光, 東京)、インテリジェント蛍光検出器 (FP-2020 Plus, 日本分光, 東京)、クロマトグラフィー用 A/D インターフェース (LC-NetII/ADC, 日本分光, 東京)、インテリジェントオートサンプラー (AS-2055 Plus, 日本分光, 東京)、カラムオープン (CO-2067 Plus, 日本分光, 東京)、クロマトグラフィーデータシステム (ChromNAV, 日本分光, 東京) 及び HPLC カラム (xBridge™ C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 150 mm または xBridge™ C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm) から構成される装置を用いた。Table 3 に HPLC の測定条件を示す。

Table 3 HPLC conditions for the analysis of model drugs.

	CF	CAF	ANP
Mobile Phase	10 mM phosphate buffer (pH 7.4) : acetonitrile = 8 : 2	50 mM phosphate buffer (pH 3.4) : methanol = 3 : 7	0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 7 : 3
Detection	Ex 495 nm Em 515 nm	UV 273 nm	UV 245 nm
Internal Standard	—	Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	Caffeine
Flow rate	1.0 mL/min	0.6 mL/min	1.0 mL/min
Column temp.	40°C	40°C	40°C
Column	C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm	C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 150 mm	C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 150 mm
	APAP	CP	
Mobile Phase	0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 9 : 1	Water : methanol = 6 : 4	
Detection	UV 245 nm	UV 278 nm	
Internal Standard	<i>m</i> -acetaminophenol	Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	
Flow rate	0.9 mL/min	1.0 mL/min	
Column temp.	40°C	40°C	
Column	C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm	C18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 150 mm	

1-1-2-6 (4) LC/MS/MS 装置

LEV、PHB 及び DZP の測定には、Prominence 送液ユニット (LC-20AD, 島津製作所, 京都)、デガッサー (DGU-20A3, 株式会社島津製作所, 京都)、Prominence オートサンプラー (STL-20AC, 株式会社島津製作所, 京都)、カラムオーブン (CTO-20A, 株式会社島津製作所, 京都)、ハイブリッドトリプル四重極リニアイオントラップ質量分析システム (4000QTRAP® LC/MS/MS, AB SCIEX, 東京) 及び HPLC カラム (xBridge™ C18, 3.5 µm, 2.1 mm I.D. × 150 mm) から構成される装置を用いた。Table 4 に LC/MS/MS の測定条件を示す。

Table 4 LC/MS/MS conditions for the analysis of model drugs.

		LEV	PHB	DZP
LC	Mobile phase	0.1% formic acid : 0.1% formic acid -acetonitrile = 8.5 : 1.5	0.1% formic acid : 0.1% formic acid -acetonitrile = 2 : 8	0.1% formic acid : 0.1% formic acid -acetonitrile = 3 : 7
	Flow rate	0.1 mL/min	0.1 mL/min	0.1 mL/min
	Column temp.	40°C	40°C	40°C
MS/MS	Q1 Mass	171.0	230.5	284.8
	Q3 Mass	126.1	187.8	153.9
	Ionization mode	ESI+	ESI-	ESI+
	Ionspray voltage	5500	-4500	5500
	Collision energy	8 eV	-16 eV	37 eV
	Declustering potential	26 V	-40 V	86 V
	Ion source temp.	600°C	600°C	600°C

1-1-2-7 薬物動態解析

1-1-2-7 (1) 血漿中薬物濃度推移

各薬物の血漿中動態を 2-コンパートメントモデルで解析した。各薬物の静脈内投与後の血漿中薬物濃度推移を非線形最小二乗プログラム (アルゴリズム: Damping Gauss-Newton 法) により解析した。各薬物の経鼻投与後の最高血漿中薬物濃度 ($C_{\max, \text{plasma}}$)、最高血漿中薬物濃度到達時間 ($T_{\max, \text{plasma}}$) を血漿中薬物濃度プロファイルより求めた。台形公式により求めた最終採血時間である 180 分 (ただし、APAP は 120 分、CP は 60 分) までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{\text{plasma } 0-180 \text{ or } 120 \text{ or } 60}$)、最終採血時間における血漿中薬物濃度 ($C_{180 \text{ or } 120 \text{ or } 60}$) 及び静脈内投与における消失相の消失パラメータ (β) の平均値を用いて無限大 (∞) 時間まで外挿したときの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{\text{plasma } 0-\infty}$) を算

出した。経鼻投与後の $AUC_{\text{plasma } 0-\infty}$ を静脈内投与後の $AUC_{\text{plasma } 0-\infty}$ で除すことによりバイオアベイラビリティ ($F_{0-\infty}$) を算出した。

1-1-2-7 (2) 各脳部位中薬物濃度推移

各薬物の静脈内及び経鼻投与後の最高脳部位中薬物濃度 ($C_{\text{max, brain}}$)、最高脳部位中薬物濃度到達時間 ($T_{\text{max, brain}}$) を各脳部位中薬物濃度プロファイルより求めた。台形公式により測定時間までの脳部位中薬物濃度－時間曲線下面積 (AUC_{brain}) を求めた。また、各脳部位への標的効率 Drug Targeting Efficiency (DTE_{brain}) を下記の (1) 式より算出した。

$$DTE_{\text{brain}} = \frac{(AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}})_{i.n.}}{(AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}})_{i.v.}} \quad \dots (1)$$

ここで AUC_{brain} 及び AUC_{plasma} は、それぞれ 0 分から各時間における各脳部位中薬物濃度－時間曲線下面積及び血漿中薬物濃度－時間曲線下面積を示す。

1-1-2-8 統計解析

データを平均値 ± 標準誤差 (standard error, S.E.) で示した。二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

1-1-3-1 種々脂溶性薬物の静脈内投与後の血漿中濃度推移

Figure 3 に用いた薬物の静脈内投与後の血漿中濃度—時間曲線を、Table 5 に得られた血漿中動態パラメータを示す。各薬物投与後の血漿中濃度推移は、血漿中濃度を対数軸で表した血漿中濃度—時間曲線で2相性が確認されたため、2-コンパートメントモデルで解析した (Fig. 3)。得られたパラメータをその後の解析に用いた (Table 5)。

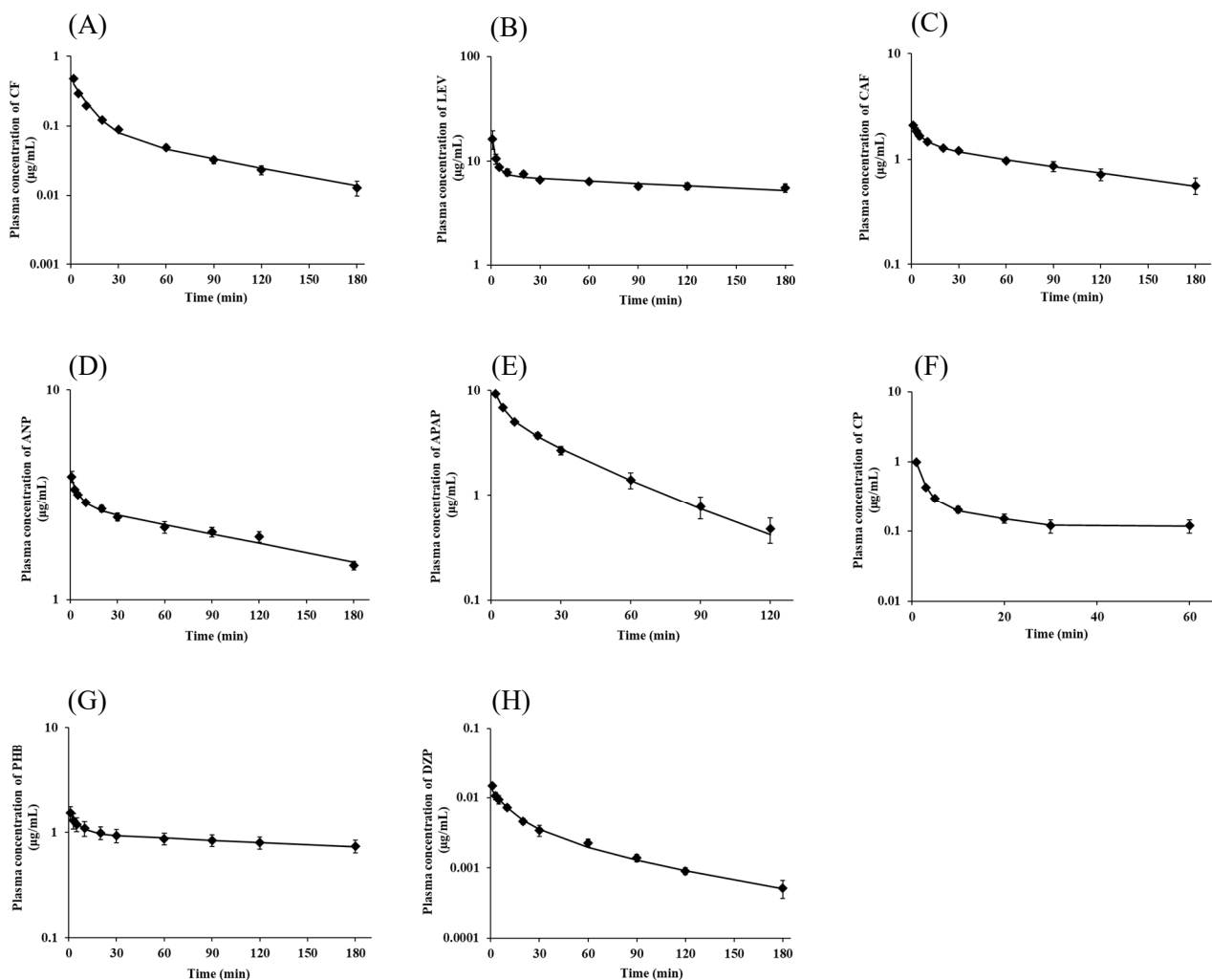


Fig. 3 Plasma concentrations after *i.v.* administration of model drugs in rats and simulated line from 2-compartment model.

(A) CF, (B) LEV, (C) CAF, (D) ANP, (E) APAP, (F) CP, (G) PHB, (H) DZP

◆: measured value, —: fitting curve

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

Table 5 Pharmacokinetic parameters of model drugs calculated from plasma data after *i.v.* administration in rats.

	CF	LEV	CAF	ANP
<i>A</i> (µg/mL)	0.301 ± 0.108	18.5 ± 9.82	1.74 ± 0.663	4.13 ± 0.355
α (min ⁻¹)	0.073 ± 0.033	0.525 ± 0.177	0.416 ± 0.345	0.253 ± 0.031
<i>t</i> _{1/2α} (min)	25.9 ± 19.1	1.91 ± 0.664	53.2 ± 22.5	3.16 ± 0.753
<i>B</i> (µg/mL)	0.180 ± 0.095	7.28 ± 0.420	1.20 ± 0.062	2.84 ± 0.208
β (min ⁻¹)	0.043 ± 0.033	0.002 ± 0.001	0.070 ± 0.030	0.004 ± 0.000
<i>t</i> _{1/2β} (min)	50.3 ± 24.8	541 ± 155	114 ± 59.3	202 ± 9.71
<i>k</i> ₂₁ (min ⁻¹)	0.028 ± 0.004	0.166 ± 0.047	0.150 ± 0.059	0.189 ± 0.071
<i>k</i> ₁₀ (min ⁻¹)	0.040 ± 0.005	0.009 ± 0.006	0.011 ± 0.003	0.005 ± 0.000
<i>k</i> ₁₂ (min ⁻¹)	0.048 ± 0.004	0.352 ± 0.164	0.324 ± 0.270	0.066 ± 0.008
<i>V</i> ₁ (mL)	583 ± 21.1	14.6 ± 3.46	105 ± 14.1	131 ± 7.12
<i>V</i> ₂ (mL)	1044 ± 87.2	22.9 ± 4.07	81.7 ± 16.4	54.6 ± 13.7
<i>V</i> _{ss} (mL)	1628 ± 103	37.5 ± 2.70	186 ± 8.12	186 ± 6.92
<i>CL</i> _{tot} (mL/min)	23.4 ± 2.48	0.069 ± 0.026	0.992 ± 0.141	0.647 ± 0.039
	APAP	CP	PHB	DZP
<i>A</i> (µg/mL)	7.42 ± 1.12	0.952 ± 0.345	1.68 ± 0.209	0.010 ± 0.001
α (min ⁻¹)	0.277 ± 0.071	0.363 ± 0.143	0.084 ± 0.003	0.107 ± 0.028
<i>t</i> _{1/2α} (min)	3.95 ± 1.47	6.56 ± 3.22	3.79 ± 0.900	8.51 ± 2.75
<i>B</i> (µg/mL)	5.49 ± 0.434	0.663 ± 0.271	0.928 ± 0.133	0.004 ± 0.001
β (min ⁻¹)	0.024 ± 0.003	0.275 ± 0.164	0.001 ± 0.000	0.011 ± 0.003
<i>t</i> _{1/2β} (min)	33.3 ± 6.43	76.2 ± 53.9	500 ± 116	75.2 ± 18.3
<i>k</i> ₂₁ (min ⁻¹)	0.127 ± 0.025	0.118 ± 0.023	0.132 ± 0.032	0.041 ± 0.015
<i>k</i> ₁₀ (min ⁻¹)	0.051 ± 0.010	0.119 ± 0.038	0.003 ± 0.001	0.031 ± 0.006
<i>k</i> ₁₂ (min ⁻¹)	0.122 ± 0.042	0.402 ± 0.081	0.088 ± 0.023	0.047 ± 0.013
<i>V</i> ₁ (mL)	21.8 ± 2.49	105 ± 11.1	129 ± 23.6	0.419 ± 0.032
<i>V</i> ₂ (mL)	17.3 ± 1.27	396 ± 107	86.2 ± 17.9	0.542 ± 0.116
<i>V</i> _{ss} (mL)	39.1 ± 2.39	501 ± 101	215 ± 41.5	0.961 ± 0.141
<i>CL</i> _{tot} (mL/min)	1.01 ± 0.109	12.4 ± 3.81	0.327 ± 0.077	0.013 ± 0.002

Each data represents the mean ± S.E. (n=3-6).

1-1-3-2 種々脂溶性薬物の経鼻投与後の全身循環系への移行

Figure 4 に用いた薬物を静脈内及び経鼻投与した後の血漿中濃度—時間曲線を、Table 6 に得られた血漿中動態パラメータを示す。全ての薬物において、経鼻投与後の $T_{\max, \text{Plasma}}$ は30分以内であり、脂溶性が増加するに従い $T_{\max, \text{plasma}}$ は短くなる傾向にあった (Table 6)。また、全ての薬物において、 $F_{0-\infty}$ は70% 以上であったことから、経鼻投与された薬物の全身循環系への移行は素早くかつ良好であった (Fig. 4 及び Table 6)。

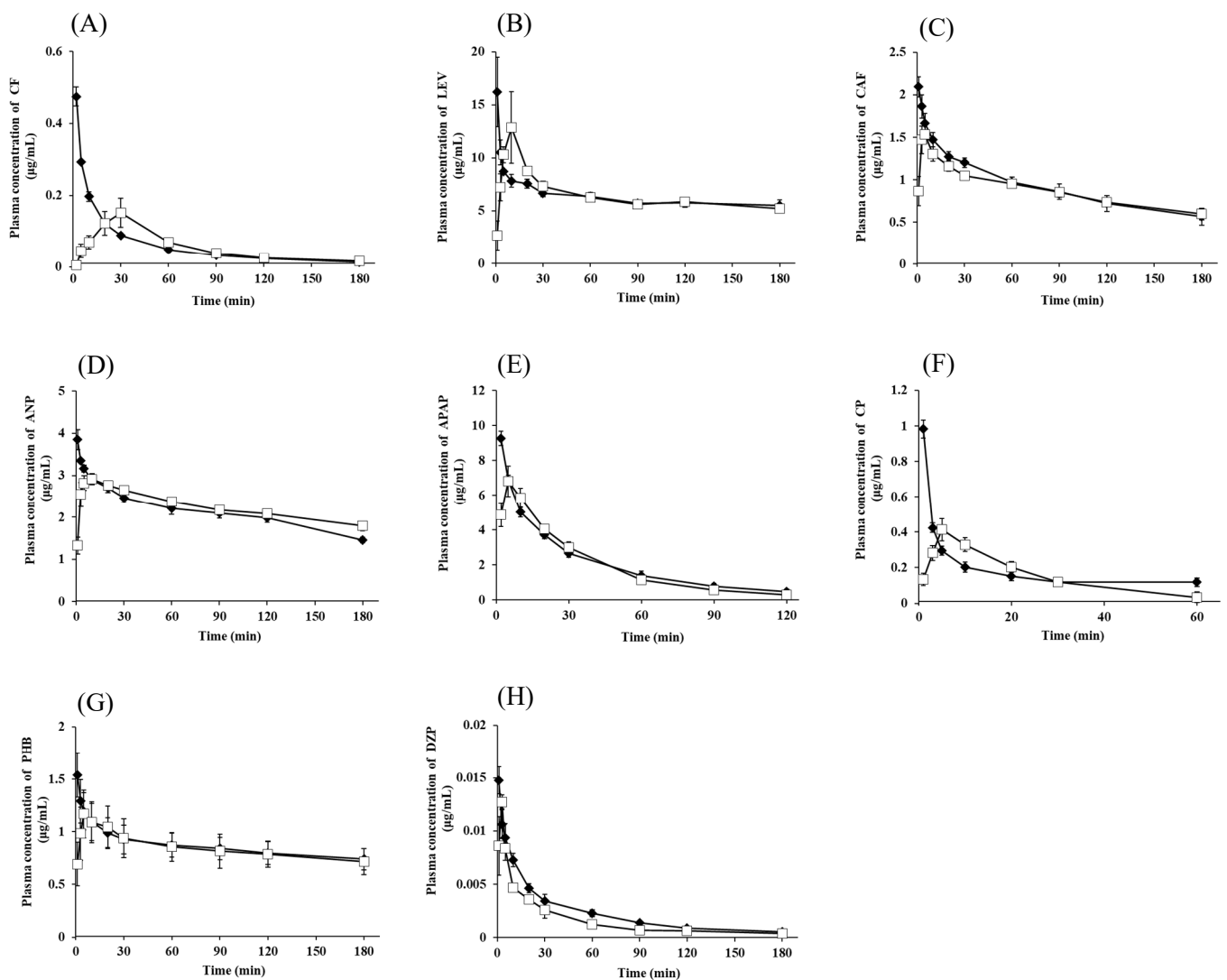


Fig. 4 Plasma concentrations after *i.v.* and *i.n.* administration of model drugs in rats.

(A) CF, (B) LEV, (C) CAF, (D) ANP, (E) APAP, (F) CP, (G) PHB, (H) DZP

◆: *i.v.* administration, □: *i.n.* administration

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

Table 6 Pharmacokinetic parameters of model drugs calculated from plasma data after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Model drug	Route	C _{max, plasma} (µg/mL)	T _{max, plasma} (min)	AUC _{plasma 0-∞} (µg•min/mL)	F _{0-∞} (%)
CF	<i>i.v.</i>	-	-	12.1 ± 1.55	-
	<i>i.n.</i>	0.152 ± 0.040	30 ± 0.0	11.0 ± 1.20	90.6
LEV	<i>i.v.</i>	-	-	5752 ± 1596	-
	<i>i.n.</i>	12.7 ± 2.28	12 ± 6.2	5741 ± 1342	99.8
CAF	<i>i.v.</i>	-	-	321 ± 97.2	-
	<i>i.n.</i>	1.65 ± 0.126	4.2 ± 0.5	297 ± 43.3	92.6
ANP	<i>i.v.</i>	-	-	863 ± 49.2	-
	<i>i.n.</i>	3.00 ± 0.110	7.5 ± 1.4	878 ± 46.3	102
APAP	<i>i.v.</i>	-	-	280 ± 35.9	-
	<i>i.n.</i>	7.06 ± 0.669	6.0 ± 1.0	255 ± 26.3	91.2
CP	<i>i.v.</i>	-	-	12.6 ± 4.50	-
	<i>i.n.</i>	0.424 ± 0.071	6.7 ± 1.1	11.7 ± 1.69	93.0
PHB	<i>i.v.</i>	-	-	704 ± 159	-
	<i>i.n.</i>	1.20 ± 0.223	6.3 ± 1.3	598 ± 104	85.0
DZP	<i>i.v.</i>	-	-	0.479 ± 0.061	-
	<i>i.n.</i>	0.013 ± 0.001	3.0 ± 0.0	0.347 ± 0.045	72.4

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-6).

1-1-3-3 種々脂溶性薬物投与後の各脳部位への移行

Figures 5–12 に用いた薬物を静脈内及び経鼻投与した後の各脳部位中濃度及び DTE_{brain} の推移を、Tables 7–14 に得られた各脳部位中動態パラメータを示す。全ての薬物で経鼻投与後の嗅球中薬物濃度は投与初期（5 分）から高い値を示した（Figs. 5–12）。さらに、 $T_{\text{max, brain}}$ が 10 分以内と素早く、静脈内投与よりも高い $C_{\text{max, brain}}$ を示す傾向にあった（Tables 7–14）。特に CF、LEV 及び PHB を除く 5 種類の薬物で経鼻投与 5 分後の嗅球中濃度は静脈内投与よりも有意に高い値を示した（Figs. 7–10 (I), 12 (I)）。また、CAF 経鼻投与後の嗅球における AUC_{brain} は静脈内投与と同程度の値を示したが（Table 9）、それ以外の薬物では静脈内投与よりも 2 倍以上高い値であった（Tables 7, 8, 10–14）。その中でも脂溶性の高い DZP や PHB は静脈内投与の約 4 倍高い値を示した（Figs. 11, 12 及び Tables 13, 14）。水溶性の高い CF や LEV においてもそれぞれ静脈内投与よりも 22 倍及び 14 倍高い嗅球における AUC_{brain} を示した（Figs. 5, 6 及び Tables 7, 8）。このことから、静脈内投与と比較して経鼻投与後の嗅球への薬物移行は脂溶性薬物だけでなく水溶性薬物においても良好であると考えられた。

各脳部位への標的効率を示す DTE_{brain} は、経鼻投与 5 分後の嗅球において CAF から DZP までの薬物で脂溶性が増大するに従い高い値を示す傾向にあった（Figs. 7–12 (I)）。最も低い値を示した CAF においても、経鼻投与 5 分後の嗅球における DTE_{brain} は 3 以上を示し、CAF の経鼻投与の方が静脈内投与よりも 3 倍以上高く嗅球に移行したことを示した（Fig. 7 (I)）。水溶性の高い CF や LEV においても経鼻投与 5 分後の嗅球における DTE_{brain} は 50 以上を示し、脂溶性の高い PHB や DZP よりも高い値を示した（Figs. 5, 6 (I)）。CAF を除いた薬物の経鼻投与 5 分後の DTE_{brain} は 9 分割にした脳部位の中で嗅球が最も高く、全ての薬物において経鼻投与後の嗅球における AUC_{brain} 及び $C_{\text{max, brain}}$ は他の脳部位よりも高い値を示す傾向にあった（Figs. 5–12 及び Tables 7–14）。このことから、経鼻投与直後では鼻腔から脳への直接移行の寄与が大きく、経鼻投与後の薬物は鼻腔から嗅球に移行した後に他の脳部位へ拡散することが考えられた。

嗅球以外の脳内薬物濃度は、嗅球ほど静脈内投与と経鼻投与で顕著な差は認められなか

ったが、いくつかの薬物投与後の脳部位において経鼻投与の方が薬物の脳移行が良好であるように考えられた。全ての薬物で視床下部における DTE_{brain} は経鼻投与 5 分後で 1 よりも高い値を示す傾向にあり、 AUC_{brain} も静脈内投与と同等の値を示した CAF、ANP 及び PHB を除く薬物で、静脈内投与よりも約 1.5 倍 (APAP) – 4 倍 (DZP) 高い値を示した (Figs. 5–12 (IV))。また、CF における経鼻投与 5 分後の DTE_{brain} は全ての脳部位で 10 を超え、 AUC_{brain} も線条体以外の脳部位で静脈内投与よりも増大した (Fig. 5 及び Table 7)。さらに、DZP における経鼻投与 5 分後の DTE_{brain} は嗅球 (I) – 線条体 (IV) で 1 より高い値を示し、経鼻投与直後では鼻腔から脳への直接移行の寄与が大きいことが示唆された (Figs. 12 (I)–(IV))。一方、大脳皮質上部 (V) – 橋・延髄 (IX) では経鼻投与 5 分後の DTE_{brain} が 1 より低い値を示したが、時間の経過に伴い経鼻投与後の脳内 DZP 濃度が静脈内投与よりも増大し DTE_{brain} が 1 を超えた (Figs. 12 (V)–(IX))。その結果として、DZP 経鼻投与後、全ての脳部位で AUC_{brain} が静脈内投与よりも増大した (Table 14)。DZP の脳内濃度推移や DTE_{brain} から、経鼻投与後の DZP は鼻腔から嗅球へ直接移行し、時間の経過とともに後方の脳部位へ移行したと推測された (Fig. 12)。DZP を除いた薬物において各脳部位における投与初期の DTE_{brain} は 1 よりも高い値を示し、経鼻投与直後では鼻腔から脳への直接移行の寄与が大きいことが示唆された。しかし、経時的に DTE_{brain} は 1 に近づくあるいは 1 以下の値を示したことから、時間の経過とともに静脈内投与と同様の脳移行の挙動を示し、全身循環系からの脳移行の寄与が大きくなったと考えられた (Figs. 5–12)。モデルとした薬物や脳部位によって DTE_{brain} の経時変化に差が認められたが、DZP のように鼻腔から脳への移行動態を推測することは出来なかった。また前述したように、三叉神経経路を介した直接移行が考えられている橋・延髄や、その周辺の視床・中脳及び小脳における薬物濃度は、嗅球ほど静脈内投与と経鼻投与で顕著な差は認められなかった。しかし、経鼻投与 5 分後の DTE_{brain} は、DZP や PHB のような脂溶性の高い薬物よりも CF、LEV 及び CAF のような水溶性の高い薬物で高い値を示す傾向にあった。

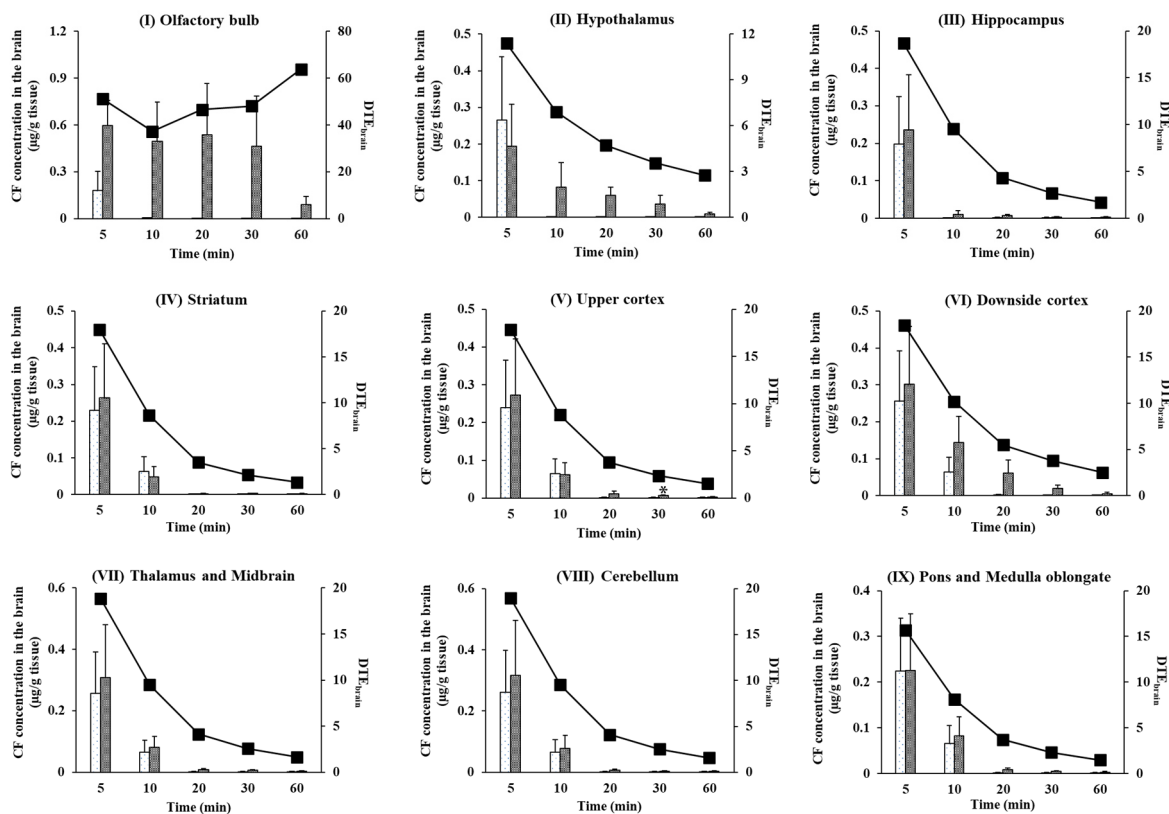


Fig. 5 CF concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=6-8).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 7 Pharmacokinetic parameters of CF in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	$C_{\max, \text{brain}}$ ($\mu\text{g/g tissue}$)	$T_{\max, \text{brain}}$ (min)	AUC_{brain} ($\mu\text{g} \cdot \text{min/g tissue}$)
<i>i.v.</i>	I	0.182 ± 0.120	< 5	1.07
	II	0.266 ± 0.172	< 5	1.40
	III	0.198 ± 0.126	< 5	1.06
	IV	0.229 ± 0.119	< 5	3.54
	V	0.240 ± 0.126	< 5	1.74
	VI	0.256 ± 0.136	< 5	1.83
	VII	0.256 ± 0.135	< 5	1.83
	VIII	0.260 ± 0.137	< 5	1.88
	IX	0.225 ± 0.115	< 5	1.68
<i>i.n.</i>	I	0.596 ± 0.160	< 5	24.2
	II	0.193 ± 0.116	< 5	3.55
	III	0.236 ± 0.147	< 5	2.03
	IV	0.263 ± 0.147	< 5	2.46
	V	0.273 ± 0.149	< 5	2.82
	VI	0.301 ± 0.157	< 5	4.43
	VII	0.308 ± 0.172	< 5	3.17
	VIII	0.316 ± 0.180	< 5	3.13
	IX	0.225 ± 0.125	< 5	2.52

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=4-9)

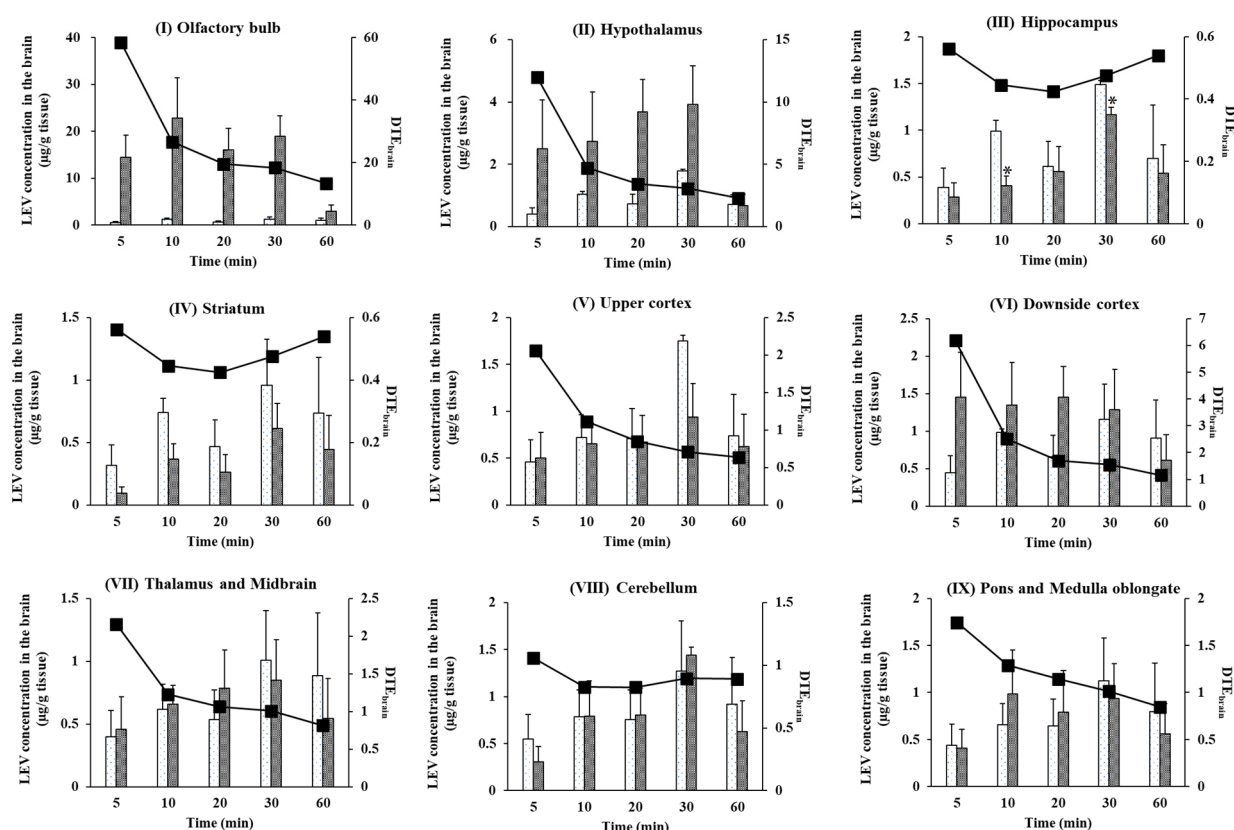


Fig. 6 LEV concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ■: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 8 Pharmacokinetic parameters of LEV in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	1.21 ± 0.231	10	56.6
	II	1.79 ± 0.0624	30	63.1
	III	1.49 ± 0.0458	30	55.7
	IV	0.957 ± 0.369	30	42.0
	V	1.75 ± 0.0626	30	60.8
	VI	1.16 ± 0.469	30	52.9
	VII	1.01 ± 0.395	30	45.3
	VIII	1.27 ± 0.535	30	55.3
	IX	1.12 ± 0.459	30	48.0
<i>i.n.</i>	I	22.8 ± 8.64	10	825
	II	3.92 ± 1.24	30	158
	III	1.17 ± 0.0763	30	41.6
	IV	0.612 ± 0.199	30	24.7
	V	0.939 ± 0.359	30	42.2
	VI	1.45 ± 0.595	10	66.7
	VII	0.850 ± 0.319	30	40.2
	VIII	1.44 ± 0.0810	30	53.8
	IX	0.983 ± 0.466	10	44.4

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

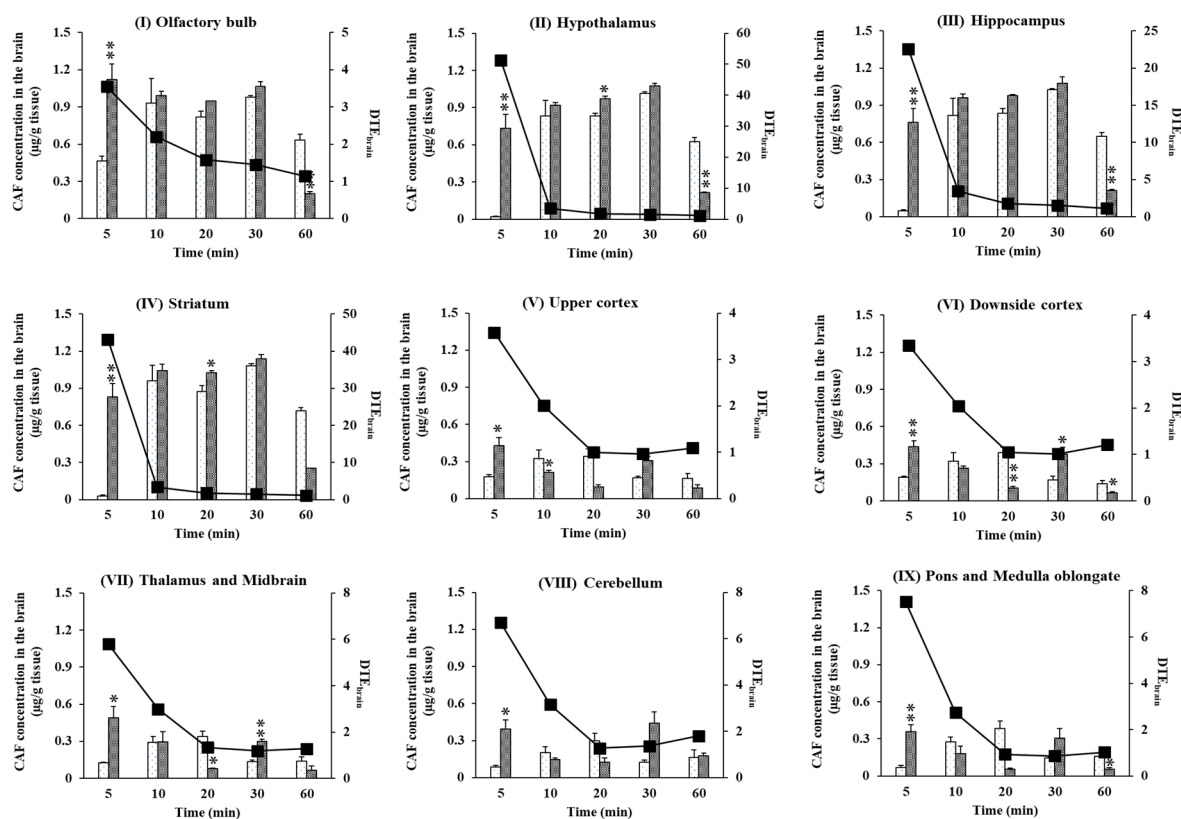


Fig. 7 CAF concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□ : *i.v.* administration, ▨ : *i.n.* administration, ■ : DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 9 Pharmacokinetic parameters of CAF in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	0.981 ± 0.0127	30	46.6
	II	1.01 ± 0.0159	30	44.2
	III	1.03 ± 0.00918	30	45.0
	IV	1.08 ± 0.0159	30	48.4
	V	0.341 ± 0.0607	20	12.6
	VI	0.392 ± 0.0395	20	12.8
	VII	0.338 ± 0.0420	20	11.0
	VIII	0.300 ± 0.0579	20	9.94
	IX	0.384 ± 0.0597	20	11.6
<i>i.n.</i>	I	1.12 ± 0.124	< 5	46.8
	II	1.07 ± 0.0219	30	45.0
	III	1.08 ± 0.0510	30	45.5
	IV	1.14 ± 0.0357	30	48.7
	V	0.427 ± 0.0683	< 5	12.2
	VI	0.435 ± 0.0496	< 5	13.7
	VII	0.491 ± 0.0888 *	< 5	12.4
	VIII	0.442 ± 0.0925	30	15.9
	IX	0.358 ± 0.0549	< 5	10.6

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

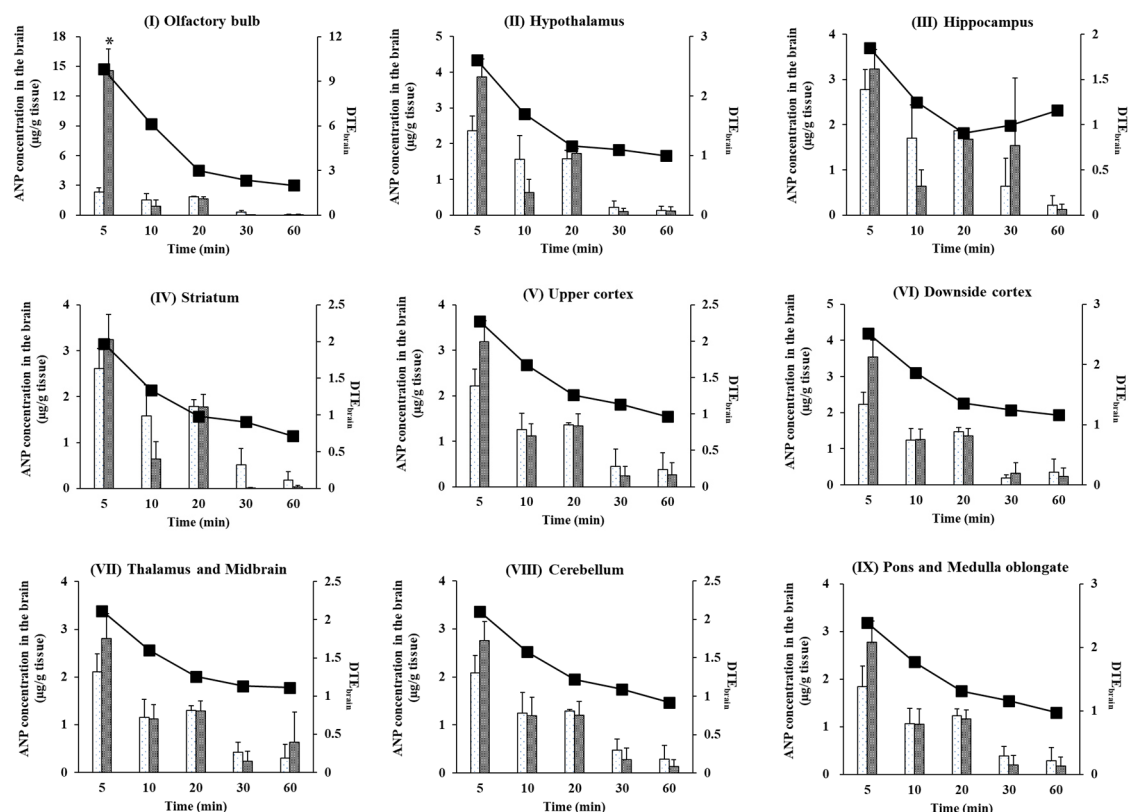


Fig. 8 ANP concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 10 Pharmacokinetic parameters of ANP in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	2.36 ± 0.425	< 5	48.6
	II	2.35 ± 0.415	< 5	45.5
	III	2.77 ± 0.447	< 5	61.3
	IV	2.61 ± 0.445	< 5	55.8
	V	2.22 ± 0.363	< 5	48.6
	VI	2.23 ± 0.332	< 5	44.2
	VII	2.11 ± 0.376	< 5	45.0
	VIII	2.08 ± 0.368	< 5	46.5
	IX	1.85 ± 0.432	< 5	41.5
<i>i.n.</i>	I	14.6 ± 2.16 *	< 5	97.0
	II	3.86 ± 0.511	< 5	45.0
	III	3.23 ± 0.439	< 5	70.4
	IV	3.24 ± 0.554	< 5	39.5
	V	3.19 ± 0.465	< 5	46.5
	VI	3.54 ± 0.473	< 5	50.8
	VII	2.81 ± 0.523	< 5	49.5
	VIII	2.76 ± 0.403	< 5	42.4
	IX	2.78 ± 0.441	< 5	40.1

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

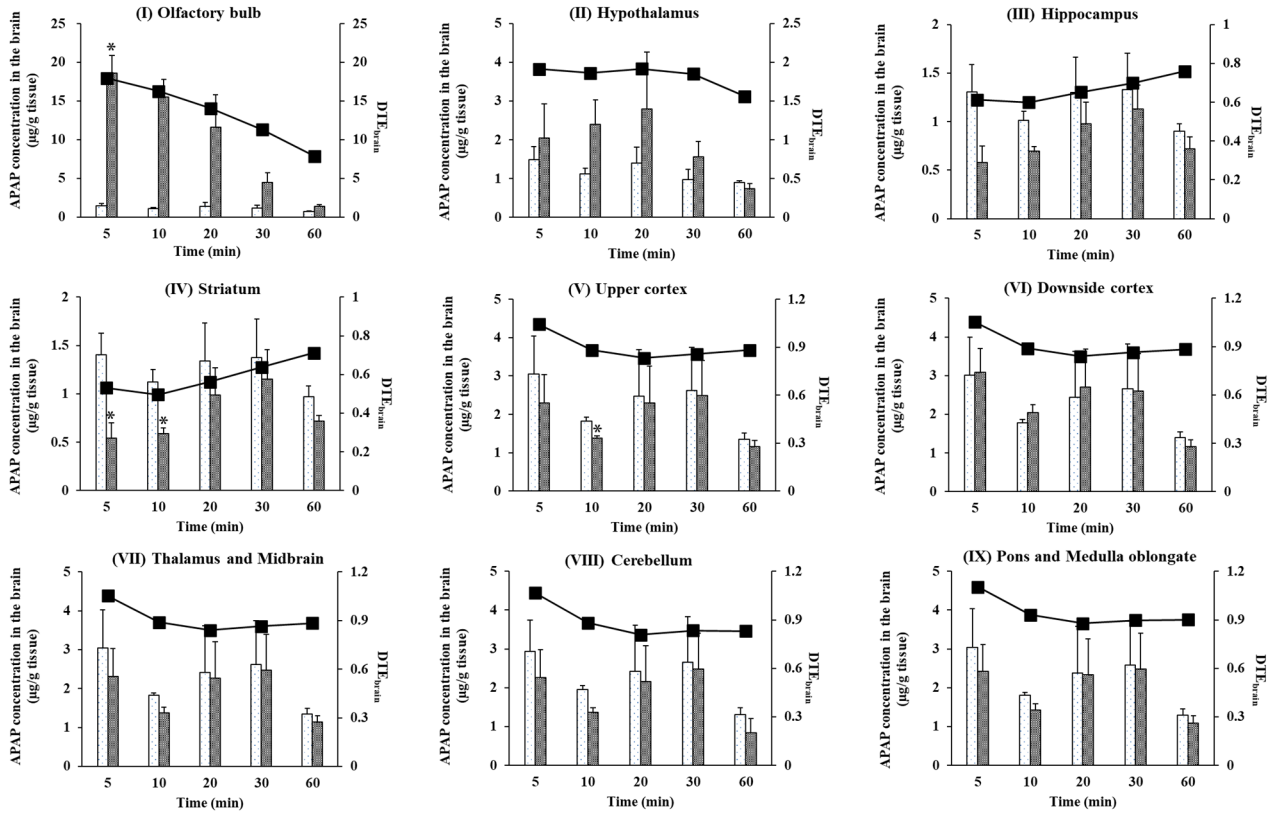


Fig. 9 APAP concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 11 Pharmacokinetic parameters of APAP in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	1.44 ± 0.280	< 5	62.5
	II	1.49 ± 0.340	< 5	62.9
	III	1.33 ± 0.379	30	67.1
	IV	1.41 ± 0.224	< 5	70.9
	V	3.05 ± 0.990	< 5	126
	VI	3.02 ± 0.983	< 5	127
	VII	3.05 ± 0.977	< 5	125
	VIII	2.93 ± 0.816	< 5	126
	IX	3.04 ± 0.988	< 5	124
<i>i.n.</i>	I	18.6 ± 2.22 *	< 5	436
	II	2.80 ± 1.46	20	98.5
	III	1.13 ± 0.246	30	51.3
	IV	1.15 ± 0.309	30	50.7
	V	2.49 ± 0.926	30	112
	VI	3.08 ± 0.617	< 5	127
	VII	2.48 ± 0.919	30	111
	VIII	2.49 ± 0.916	30	105
	IX	2.48 ± 0.928	30	112

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

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

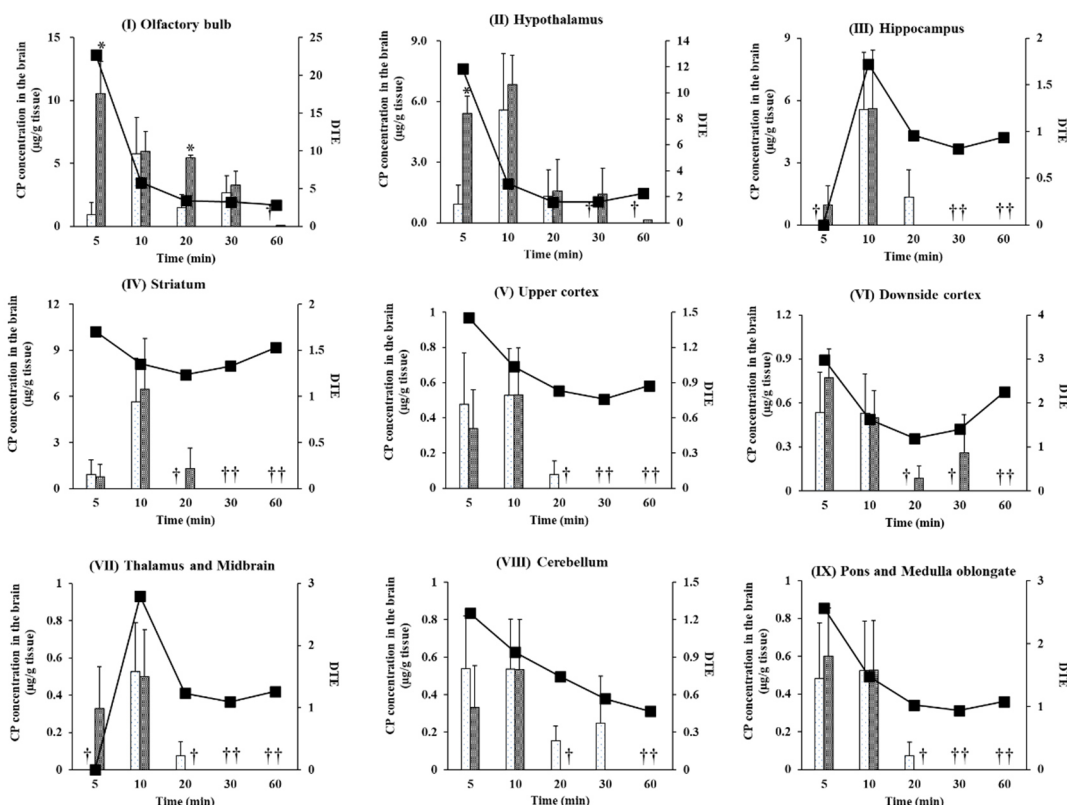


Fig. 10 CP concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

†: No detected.

Table 12 Pharmacokinetic parameters of CP in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	5.77 ± 2.89	10	114
	II	5.58 ± 2.79	10	57.4
	III	5.55 ± 2.77	10	54.9
	IV	5.65 ± 2.83	10	44.7
	V	0.530 ± 0.265	10	5.94
	VI	0.532 ± 0.276	< 5	5.31
	VII	0.527 ± 0.264	10	4.70
	VIII	0.540 ± 0.281	< 5	11.9
	IX	0.525 ± 0.262	10	5.87
<i>i.n.</i>	I	10.6 ± 2.54*	< 5	219
	II	6.83 ± 1.45	10	124
	III	5.61 ± 2.81	10	46.8
	IV	6.83 ± 1.45	10	65.6
	V	0.531 ± 0.266	10	5.68
	VI	0.772 ± 0.197	< 5	14.1
	VII	0.501 ± 0.252	10	5.40
	VIII	0.534 ± 0.267	10	5.66
	IX	0.602 ± 0.253	< 5	6.96

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

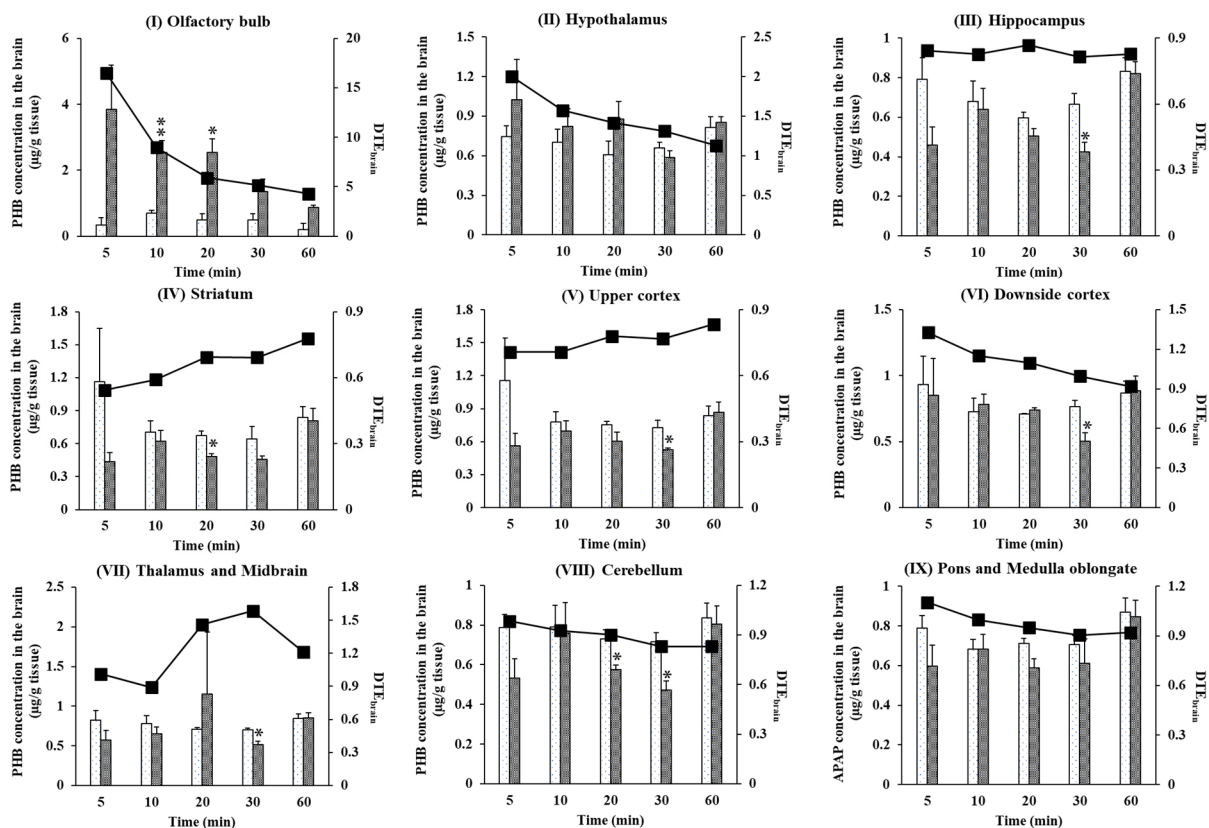


Fig. 11 PHB concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

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

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 13 Pharmacokinetic parameters of PHB in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	0.692 ± 0.0936	10	24.8
	II	0.814 ± 0.0815	60	40.5
	III	0.831 ± 0.0704	60	40.8
	IV	1.17 ± 0.481	< 5	43.4
	V	1.15 ± 0.385	< 5	46.2
	VI	0.932 ± 0.217	< 5	45.5
	VII	0.843 ± 0.0608	60	43.7
	VIII	0.836 ± 0.0752	60	44.0
	IX	0.869 ± 0.0716	60	43.4
<i>i.n.</i>	I	3.84 ± 1.34	< 5	104
	II	1.02 ± 0.304	< 5	44.5
	III	0.820 ± 0.0599	60	32.9
	IV	0.809 ± 0.111	60	32.9
	V	0.867 ± 0.0946	60	37.6
	VI	0.883 ± 0.115	60	40.7
	VII	1.16 ± 0.775	20	42.4
	VIII	0.805 ± 0.0911	60	35.6
	IX	0.845 ± 0.0840	60	38.9

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-4).

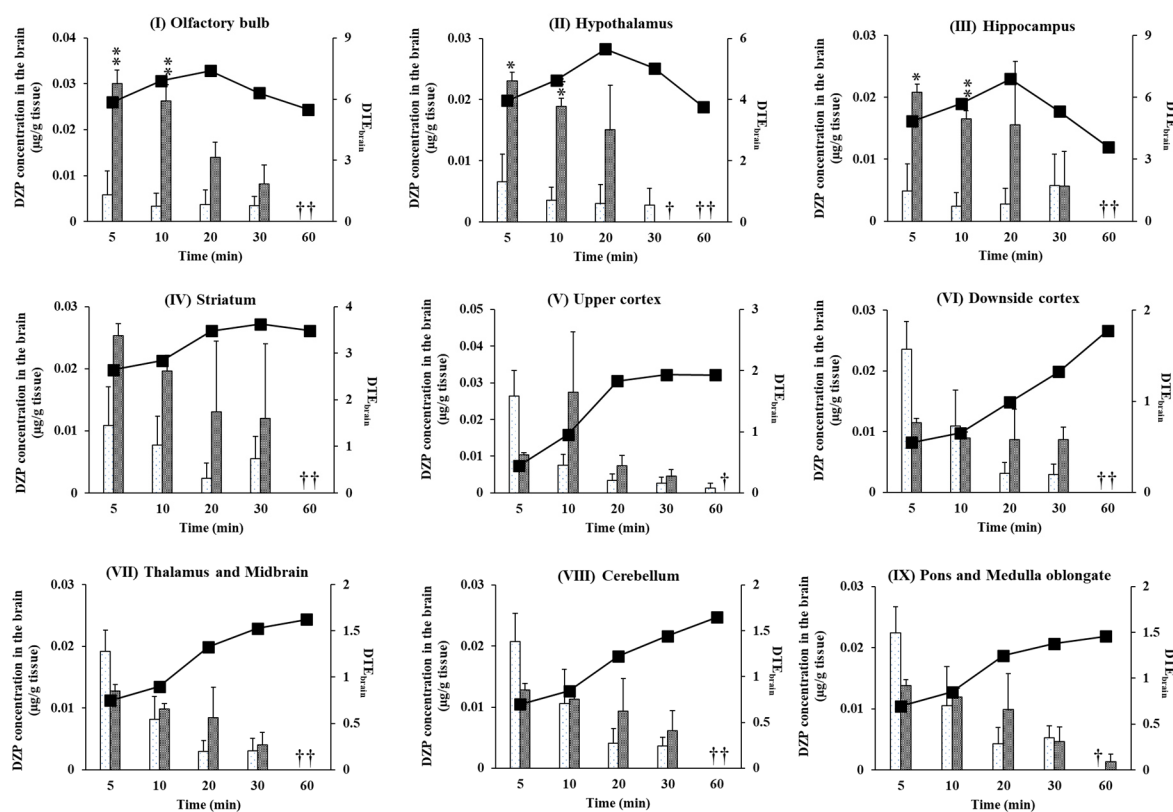


Fig. 12 DZP concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

†: No detected.

Table 14 Pharmacokinetic parameters of DZP in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	$C_{\max, \text{brain}}$ ($\mu\text{g/g tissue}$)	$T_{\max, \text{brain}}$ (min)	AUC_{brain} ($\mu\text{g}\cdot\text{min/g tissue}$)
<i>i.v.</i>	I	0.00580 ± 0.00519	< 5	0.158
	II	0.00656 ± 0.00450	< 5	0.104
	III	0.00574 ± 0.00513	30	0.185
	IV	0.0109 ± 0.00628	< 5	0.248
	V	0.0264 ± 0.00701	< 5	0.294
	VI	0.0110 ± 0.00585	< 5	0.290
	VII	0.0192 ± 0.00341	< 5	0.249
	VIII	0.0207 ± 0.00469	< 5	0.296
	IX	0.0224 ± 0.00428	< 5	0.340
<i>i.n.</i>	I	0.0263 ± 0.00345 **	< 5	0.650
	II	0.0231 ± 0.00142 *	< 5	0.408
	III	0.0208 ± 0.00132	< 5	0.496
	IV	0.0254 ± 0.00187	< 5	0.645
	V	0.0275 ± 0.0184	10	0.428
	VI	0.0115 ± 0.000718	< 5	0.384
	VII	0.0127 ± 0.00108	< 5	0.302
	VIII	0.0128 ± 0.00104	< 5	0.365
	IX	0.0138 ± 0.00102	< 5	0.371

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

第4節 考察

経鼻投与後の $T_{\max, \text{Plasma}}$ は、脂溶性の低い CF で 30 分と最も遅かったが、脂溶性の高い DZP では 3 分と最も早かったことから、薬物の脂溶性が増加するに従い鼻腔から全身循環系への薬物移行は早まることが明らかとなった。また、全ての薬物において、経鼻投与後の $F_{0-\infty}$ は 70% 以上であり、全身循環系への移行は脂溶性に関係なく良好であった。

本研究で用いたほとんどの薬物において、9 部位に分割した脳部位のうち嗅球中薬物濃度が最も高い値を示す傾向にあった。CAF 経鼻投与後の嗅球における AUC_{brain} は静脈内投与と同程度の値を示したが、それ以外の薬物では静脈内投与よりも 2 倍以上高い値を示し、脂溶性の高い DZP や PHB だけでなく、水溶性の高い CF や LEV においても静脈内投与よりも顕著に高い嗅球における AUC_{brain} を示した。このことから、静脈内投与と比較して経鼻投与後の嗅球への薬物移行は脂溶性薬物だけでなく水溶性薬物においても良好であると考えられた。また、全ての薬物において経鼻投与 5 分後の嗅球への標的効率 (DTE_{brain}) は 1 よりも高い値を示したことから、経鼻投与された薬物が全身循環系から BBB を透過して嗅球へ移行するだけでなく、鼻腔から直接嗅球へ移行することが示唆された。視床下部においても、全ての薬物で経鼻投与 5 分後の DTE_{brain} は 1 よりも高い値を示す傾向にあり、いくつかの薬物では AUC_{brain} が静脈内投与よりも約 1.5–4 倍高い値を示した。嗅神経は視床下部に投射しており、嗅球と視床下部は解剖学的にも近くに位置しているため、鼻腔から嗅球に移行した薬物が視床下部やその他の脳部位に拡散する可能性が考えられた。DZP の脳内濃度推移や DTE_{brain} からも、嗅球から後方の脳部位へ移行することが推測された。さらに、経鼻投与 5 分後の嗅球における DTE_{brain} は CAF から DZP までの薬物で脂溶性が増大するに従い高い値を示す傾向にあったことから、鼻腔から嗅球への薬物の直接移行に脂溶性が影響する可能性が示唆された。

多くの論文で報告されているように、経鼻投与後の薬物は嗅上皮または呼吸上皮を透過し、経細胞経路や細胞間隙経路及びエンドサイトーシス機構により嗅神経や三叉神経に取り込まれ、脳へ直接移行する可能性がある。本研究においても、上述したように鼻腔から嗅球への直接移行の可能性が示唆された。一方、橋・延髄においても三叉神経が走行して

いるため、鼻腔からの直接移行経路と考えられており、橋・延髄における薬物濃度も嗅球同様に他の脳部位よりも顕著に増大することが予想された。しかし、全ての薬物において、経鼻投与後の橋・延髄周辺における薬物濃度は、嗅球ほど静脈内投与と比較して顕著な差は認められなかった。本研究ではラットの頭部を 30° に傾斜させ、鼻腔入口から 15 mm のところに薬物を投与した。その結果、嗅神経領域のある嗅上皮近傍に薬物溶液が投与され、嗅球で顕著に薬物濃度の上昇が認められたと考えられた。三叉神経は 3 つに枝分かれしており、そのうち眼神経及び上顎神経は嗅上皮と呼吸上皮に分布している。前述したように本研究の投与方法では、嗅上皮近傍に薬物溶液が滞留すると予想されるが、三叉神経からの直接移行を増大させるためには嗅上皮だけでなく呼吸上皮にも薬物溶液が滞留するような製剤工夫や投与方法が必要であると考えられる。

以上の結果を踏まえ、本研究では特に薬物濃度が高い値を示した嗅球に着目した。上述したように、経鼻投与 5 分後の嗅球における DTE_{brain} は CAF から DZP までの薬物で脂溶性が増大するに従い高い値を示す傾向にあった。しかし、水溶性薬物である CF や LEV においても嗅球における DTE_{brain} は高い値を示し、薬物の脂溶性が脳（嗅球）への移行にどの程度影響するのかは明らかではない。そこで、第 1 編第 2 章では、鼻腔から嗅球への薬物の直接移行について動態解析を詳細に行い、経鼻投与後の脳（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論述する。

第2章 単純拡散による鼻腔から嗅球への直接移行に対する薬物の脂溶性の影響

第1節 小緒言

第1編第1章で得られた結果より、経鼻投与後の嗅球中薬物濃度は、他の脳部位と比較して経鼻投与初期から高い値を示し、静脈内投与と比較しても顕著に高い嗅球中薬物濃度が得られた。また、嗅球への薬物の移行は脂溶性薬物だけでなく水溶性薬物においても良好であると考えられた。さらに、経鼻投与された薬物は全身循環系へ移行した後 BBB を透過し脳へ移行するだけでなく、鼻腔から嗅球へ直接移行し、その後、他の脳部位へ拡散する可能性が考えられた。

全身循環系から脳への薬物の移行が単純拡散に従う場合、薬物の脳移行は薬物の脂溶性に依存することが知られている。しかし、経鼻投与後の薬物の脳への移行においては、主に全身循環系から脳へ移行する経路と鼻腔から脳へ直接移行する経路の2つが考えられる。従って、鼻腔から脳へ直接薬物が移行する経路が脂溶性に依存するかは明らかでないため、単に脂溶性が増大すれば経鼻投与後の薬物の脳移行も増大するとは限らない。実際に第1編第1章で得られた結果では、経鼻投与された薬物の脂溶性が増加すると嗅球への標的効率が增加する傾向にあったが、水溶性が極端に高い薬物においても経鼻投与後の嗅球への移行は良好であった。そこで第1編第2章では、経鼻投与後の薬物濃度が特に高く、直接移行経路が考えられる嗅球に焦点を当て、① 経鼻投与された薬物が静脈内投与と比較してどの程度嗅球へ移行しやすいのか、② 鼻腔から嗅球への薬物の直接移行の寄与率及び③ 鼻腔から嗅球への取り込みクリアランスについて、薬物の脂溶性との関係を検討した。

第2節 実験方法

1-2-2-1 薬物動態解析

第1編第1章で得られた各薬物の静脈内及び経鼻投与後の嗅球中薬物濃度プロファイルより消失相が確認されたため、消失相の消失速度定数を最小二乗法によって算出した。得られた消失速度定数を用いて無限大時間 (∞) まで外挿したときの嗅球中薬物濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{ob\ 0-\infty}$) を算出した。BBB の透過による影響を考慮し、薬物の嗅球への移行性を評価するため、嗅球への標的効率 Drug Targeting Efficiency (DTE_{ob}) を下記の (2) 式より算出した。

$$DTE_{ob} = \frac{(AUC_{ob\ 0-\infty}/AUC_{plasma\ 0-\infty})_{i.n.}}{(AUC_{ob\ 0-\infty}/AUC_{plasma\ 0-\infty})_{i.v.}} \quad \dots (2)$$

また、経鼻投与後の薬物移行における鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率 Direct Transport Percentage (DTP_{ob}) を下記の (3) 及び (4) 式より算出した。

$$DTP_{ob} = \frac{C_{i.n.} - C_x}{C_{i.n.}} \times 100 \quad \dots (3)$$

$$C_x = \frac{C_{i.v.}}{P_{i.v.}} \times P_{i.n.} \quad \dots (4)$$

ここで、 C_x は経鼻投与後に全身循環系から BBB を介して嗅球へ移行した薬物の $AUC_{ob\ 0-\infty}$ を、 $C_{i.v.}$ 及び $C_{i.n.}$ はそれぞれ静脈内投与及び経鼻投与後の $AUC_{ob\ 0-\infty}$ を、 $P_{i.v.}$ 及び $P_{i.n.}$ はそれぞれ静脈内投与及び経鼻投与後の $AUC_{plasma\ 0-\infty}$ を示す。

さらに、経鼻投与後の鼻腔から嗅球への移行速度及び静脈内投与後の全身循環系から嗅球への BBB を介した薬物の移行速度をそれぞれ取り込みクリアランスとして、下記の (5) 及び (6) 式より算出した。

$$CL_{i.n.} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{C_0} \quad \dots (5)$$

$$CL_{i.v.} = \frac{dQ'}{dt} \times \frac{1}{C_0'} \quad \dots (6)$$

ここで、 $CL_{i.n.}$ は鼻腔から嗅球への取り込みクリアランスを、 $CL_{i.v.}$ は静脈内投与後の全身循環系から嗅球への取り込みクリアランスを示す。また、 dQ/dt は投与後 5 分までの鼻腔内から嗅球への薬物の移行速度を、 C_0 は鼻腔内に投与した薬物の初濃度を示す。 dQ'/dt は静脈内投与後 5 分までの全身循環系から BBB を介した嗅球への薬物の移行速度を、 C_0' は静脈内投与 0 分の血漿中薬物濃度を示し、非線形最小二乗プログラム（アルゴリズム: Damping Gauss-Newton 法）により算出した分布相切片 (A) 及び消失相切片 (B) の和を用いた。

1-2-2-2 統計解析

データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。静脈内及び経鼻投与後の各脳部位への移行性の比較には、Student's-*t* 検定を用いた。薬物の脂溶性と嗅球への移行の相関性は、Pearson の検定を用いて評価した。全ての検定において、両側 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

1-2-3-1 薬物の嗅球への直接移行と脂溶性の関係

Table 15 に静脈内及び経鼻投与後の嗅球における薬物動態パラメータを、Figure 13 に薬物の分子量 (M.W.) で補正した薬物の分配係数 (k) の対数值 ($\log(k/M.W.^{1/2})$) と嗅球への直接移行 (DTE_{ob} (A)、 DTP_{ob} (B)、 $\log CL_{i.n.}$ (C) 及び $\log CL_{i.v.}$ (D)) の関係を示す。CAF を除いた薬物において、 DTE_{ob} が 1 よりも大きかったことから、経鼻投与後の嗅球への移行は静脈内投与と同等かそれ以上であり、 DTP_{ob} も 0% よりも大きかった (Table 15)。CAF よりも脂溶性が高い薬物では、特に $\log(k/M.W.^{1/2})$ が増加するに従い、 DTE_{ob} 及び DTP_{ob} が増加し、PHB 及び DZP では、 DTP_{ob} が 80% 以上と高い値を示した (Table 15 及び Figs. 13 (A), (B))。また、脂溶性の低い薬物の CF においても、 DTE_{ob} が 1 よりも大きかったことから、静脈内投与よりも経鼻投与の方が嗅球への移行が高いと考えられた。さらに、 DTP_{ob} が 95% と高い値を示したことから、経鼻投与した CF のうち 95% は全身循環系を介さず、鼻腔から直接嗅球に移行したと考えられた (Table 15)。 $\log(k/M.W.^{1/2})$ が増加するに従い $\log CL_{i.v.}$ は増加し、両者の間に有意な相関関係が認められた ($p < 0.05$)。一方、 $\log CL_{i.n.}$ においては、 $\log(k/M.W.^{1/2})$ が増加するに従い $\log CL_{i.n.}$ も増加する傾向にあったが、両者の間に有意な相関関係は認められなかった (Figs. 13 (C), (D))。

Table 15 Pharmacokinetic parameters of model drugs in the olfactory bulb after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

	Route	AUC _{ob 0-∞} (μg·min/g tissue)	DTE _{ob}	DTP _{ob} (%)	Log CL _{i.n.} (μL/min)	Log CL _{i.v.} (μL/min)
CF	<i>i.v.</i>	1.38	-	-	-	-0.132
	<i>i.n.</i>	27.6	20.0	95.0	-1.75	-
LEV	<i>i.v.</i>	812	-	-	-	-0.546
	<i>i.n.</i>	916	1.13	11.5	-1.99	-
CAF	<i>i.v.</i>	139	-	-	-	0.453
	<i>i.n.</i>	54.9	0.427	0.0	-2.38	-
ANP	<i>i.v.</i>	49.6	-	-	-	0.924
	<i>i.n.</i>	99.1	1.97	49.1	-1.70	-
APAP	<i>i.v.</i>	113	-	-	-	0.245
	<i>i.n.</i>	447	4.51	77.8	-1.87	-
CP	<i>i.v.</i>	114	-	-	-	1.07
	<i>i.n.</i>	220	3.16	68.4	-1.30	-
PHB	<i>i.v.</i>	33.1	-	-	-	0.608
	<i>i.n.</i>	142	5.05	80.2	-1.72	-
DZP	<i>i.v.</i>	0.158	-	-	-	0.954
	<i>i.n.</i>	0.650	5.67	82.4	-1.35	-

Each data represents the mean (n=3-9).

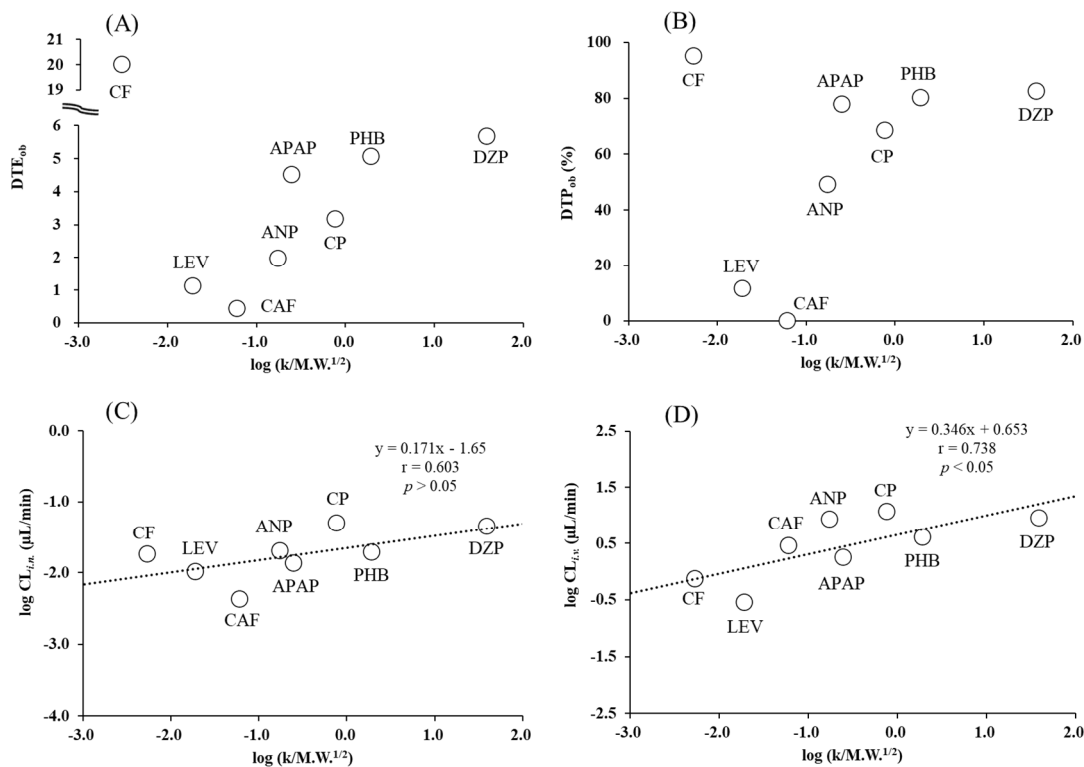


Fig. 13 Relationships between $\log(k/M.W.^{1/2})$ and DTE_{ob} (A), DTP_{ob} (B), $\log CL_{i.n.}$ (C) or $\log CL_{i.v.}$ (D) after *i.v.* and *i.n.* administration of model drugs in rats.
 $p < 0.05$ (Pearson-test).

第4節 考察

単純拡散に従うと考えられる薬物において、CAFを除いた薬物では DTE_{ob} が 1 よりも高かったことから、経鼻投与後の嗅球への移行は静脈内投与と同等かそれよりも高く、 DTP_{ob} が 0% よりも高かったことから、経鼻投与された薬物の一部は鼻腔から嗅球へ直接移行することが考えられた。また、 $\log(k/M.W.^{1/2})$ が増加するに従い $\log CL_{i.n.}$ 及び $\log CL_{i.v.}$ が増加したことから、静脈内及び経鼻投与後の薬物の嗅球への移行は脂溶性の高い薬物の方が取り込みクリアランスが高くなる傾向にあることが明らかとなった。しかし、経鼻投与後の鼻腔から脳への薬物の直接移行は、単に脂溶性に依存して DTE_{ob} 、 DTP_{ob} 及び $\log CL_{i.n.}$ が増加するのではなく、水溶性薬物においても鼻腔から脳への直接移行は良好である可能性が示唆された。特に本研究で用いた薬物のうち最も水溶性の高い CF は、特異な挙動を示した。 $\log(k/M.W.^{1/2})$ と $\log CL_{i.v.}$ の間には有意な正の相関関係が認められたことから、全身循環系から嗅球への CF の移行は他の薬物よりも遅いことが予想される。しかし、経鼻投与では、 DTE_{ob} 、 DTP_{ob} 及び $\log CL_{i.n.}$ が高い値を示したことから、水溶性の高い CF でも経鼻投与後に良好な嗅球移行を示した理由は、鼻腔内の構造にあると考えられた。

本研究では経鼻投与した薬物が容易に脳へ移行するよう投与溶液を嗅上皮に標的化した。嗅上皮は嗅細胞、支持細胞及び基底細胞から構成されており、嗅細胞は数十万種類以上の匂い物質を受容する能力を持つ神経細胞である²⁹⁾。認識できる匂い物質の中には、嗅細胞にとって有害な物質も多く存在し傷害を受ける可能性もある。嗅上皮に存在する基底細胞は新たな嗅細胞の基になる細胞であり、匂い物質の情報を絶えず脳に伝えるために古い嗅細胞は定期的に新しい嗅細胞に置き換わっている。嗅上皮においてもタイトジャンクション関連タンパク質の発現が認められているが、定期的に古くなった細胞の脱落と新たな細胞への置換が繰り返されている嗅上皮は脆弱な構造をしていると考えられている³⁰⁾。従って、血管内皮細胞の周囲を取り囲む組織が毛細血管の機能を高度に制御し、非常に Tight な細胞シート構造をしている BBB と比較すると、鼻腔から脳への薬物の直接移行は容易に起こる可能性が考えられる。また、経鼻投与されたインスリンや IgG 抗体が嗅神経、三叉神経及び血管周囲腔に沿って脳実質や脳脊髄液に移行することが報告されており、水溶性高

分子の鼻腔から脳への直接移行も示唆されている³¹⁻³⁴⁾。よって、BBBの透過性が低い水溶性薬物においても、鼻腔から脳への直接移行は容易に起こると考えられる。本研究においても、水溶性の薬物として選択したLEVやCFはDTE_{ob}が1以上であったことから、静脈内投与よりも嗅球に移行しやすいことが示唆された。特にCFにおいてはDTP_{ob}が95%と高い値を示したことから、経鼻投与されたCFのほとんどがBBBを介さず直接移行経路から嗅球に移行することが考えられた。

第1編第1章の結果から、ほとんどの薬物で経鼻投与後初期の各脳部位中薬物濃度は高く推移し、経鼻投与は静脈内投与よりも素早く脳へ薬物を移行させることが可能であると考えられた。そのため、AUC_{ob 0-∞}及びAUC_{plasma 0-∞}を用いて、静脈内投与と比較したときの経鼻投与後の脳（嗅球）への移行のしやすさをDTE_{ob}、鼻腔から嗅球へ移行した薬物量のうち、直接移行経路を介して嗅球へ移行した薬物量の割合をDTP_{ob}として算出した。経鼻投与直後の血漿中薬物濃度は吸収過程が含まれるため低く推移し、静脈内投与直後の血漿中薬物濃度は消失過程の寄与が小さいため高く推移した。また、経鼻投与直後は全身循環系から脳へ薬物が移行する割合よりも、直接移行経路で脳へ薬物が移行する割合の方が大きく、嗅球中薬物濃度は静脈内投与よりも高くなる傾向にあった。そのため、1-1-3-3で示した結果のように、経鼻投与5分後の嗅球におけるDTE_{brain}はCAFを含む全ての薬物で高い値を示した。しかし、経鼻投与後、時間の経過とともに、血漿及び嗅球中薬物濃度は静脈内投与とほぼ同等の濃度に近づき、嗅球におけるCAFのDTE_{ob}及びDTP_{ob}は静脈内投与と同等かそれよりも低い結果となった。前述したように、経鼻投与後5分の嗅球におけるDTEはCAFを含む全ての薬物で高い値を示したが、DTE_{ob}及びDTP_{ob}のみで判断するとCAFは低い値を示し、静脈内投与と経鼻投与の間で相異がないように見える。しかし、経鼻投与直後のCAFは静脈内投与よりも嗅球中濃度が有意に高かった ($p < 0.01$)。従って、CAFと同様の分配係数を有する水溶性薬物においても、経鼻投与直後では静脈内投与よりも嗅球やその他の脳部位における薬物濃度が高く推移する可能性があり、迅速な薬理作用発現が求められる薬物にも経鼻投与は有用である可能性がある。

また、静脈内及び経鼻投与後の薬物の脳（嗅球）への取り込みクリアランスをCL_{i.v.}及び

$CL_{i.n.}$ として算出した。静脈内及び経鼻投与後の全身循環系及び鼻腔から嗅球への取り込みクリアランスを詳細に評価する場合、経時的に血漿、鼻腔内及び嗅球中薬物濃度等を測定し、定常状態における膜透過過程を考えるのが一般的である。また、各組織の固有クリアランスや薬物の代謝などの物質収支を考慮する必要もある。しかし、単回投与の場合、鼻腔内薬物濃度の経時的な測定は困難であり、各組織の固有クリアランスや薬物の代謝などを考慮すると非常に煩雑となる。そこで本研究では、静脈内及び経鼻投与後に嗅球に移行した薬物の拡散や代謝などによる嗅球からの消失を無視するために、静脈内及び経鼻投与後 5 分までの時間で膜透過クリアランスを CL として算出した。 $CL_{i.v.}$ 及び $CL_{i.n.}$ はそれぞれ、全身循環系及び鼻腔から嗅球への初速度を静脈内投与直後 (0 分) の血漿中薬物濃度及び経鼻投与した薬物の初濃度で除すことで算出した。全身循環系及び鼻腔から嗅球への初速度は、膜透過過程でタイムラグが生じるために、上記で述べたような一般的な方法で膜透過クリアランスを算出した場合と比較し、数値が一致しない可能性が考えられる。しかし、本研究で用いた方法で静脈内投与後の $\log CL_{i.v.}$ と $\log (k/M.W.^{1/2})$ との間には有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。BBB 透過速度と薬物の脂溶性との間には、薬物の脂溶性が増加するに従い BBB 透過速度も増加することが報告されており、本研究で用いた $\log CL_{i.v.}$ と $\log (k/M.W.^{1/2})$ との関係も同様の傾向を示したことから、取り込みクリアランスと脂溶性との関係性を評価するために用いることが可能であると判断した。

以上、第 1 編では単純拡散に従い鼻腔から脳へ移行すると考えられる薬物について、薬物の脂溶性と鼻腔から脳への薬物の移行性との関係を明らかにすることを目的に検討を行った。経鼻投与された薬物は全身循環系から BBB を透過して嗅球へ移行するだけでなく、鼻腔から直接嗅球へ移行しさらに他の脳部位へ拡散する可能性が示唆された。また、経鼻投与後の薬物の嗅球への移行クリアランスは脂溶性の高い薬物の方が高くなる傾向にあることが明らかとなった。一方、経鼻投与後の鼻腔から嗅球への薬物の直接移行率は、単に脂溶性に依存するのではなく、水溶性薬物においても鼻腔から脳への直接移行は良好である可能性が示唆された。経鼻投与後の薬物の脂溶性と鼻腔から脳への移行性との関係を動態学的に詳細に評価した報告は少なく、本研究は CNS 作用薬の新たな製剤開発のための足

がかりになると予想される。しかし、CNS 作用薬は、単純拡散に従う薬物だけでなく種々のトランスポーターの基質になり得る薬物も含まれる。鼻粘膜上皮や嗅球においても BBB と同様に種々のトランスポーターの発現が報告されており、P-糖タンパク質などの特殊輸送系が発現している場合は、CNS 作用薬の薬理効果発現にも影響を与える可能性がある。第 2 編では鼻粘膜上皮及び嗅球における特殊輸送系の発現と、その基質になる薬物の脳移行について検討した結果を論述する。

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

第1節 小緒言

前編の結果から、主に単純拡散により鼻腔から脳へ移行すると考えられる薬物では、経鼻投与後に各脳部位へ移行することが示された。特に嗅球への移行は他の脳部位よりも顕著に高く、迅速であった。CAFを除いた薬物の経鼻投与後の嗅球への移行は、静脈内投与と同等かそれ以上であり、経鼻投与された薬物の一部はBBBを介さずに鼻腔から嗅球へ直接移行することが考えられた。また、 $\log(k/M.W.^{1/2})$ が増加するに従い、 $\log CL_{i,n}$ が増加する傾向にあったことから、経鼻投与後の薬物の嗅球への直接移行は、脂溶性の高い薬物の方が高まる傾向にあることが明らかとなった。一方、水溶性薬物であるCFにおいても、 DTE_{ob} 及び DTP_{ob} が高い値を示したことから、水溶性薬物であっても嗅球へ直接移行することが示された。全身循環系から脳へ薬物が移行する場合、多くの薬物は単純拡散に従い、BBBの透過性により、脳への移行性が決定する。一般に脂溶性の高い薬物では脳への移行性が高く、水溶性の高い薬物では脳への移行性が低くなることが報告されている²⁰⁾。しかし、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、脂溶性の高い薬物でも脳への移行が制限される場合や、水溶性の高い薬物でも脳への移行が良好な場合がある。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。一方、鼻粘膜上皮においても、DNAマイクロアレイ法や免疫組織化学染色法により、P-糖タンパク質、多剤耐性関連タンパク質及び有機アニオントランスポーター等の種々トランスポーターが発現が報告されている³⁵⁻³⁷⁾。鼻粘膜上皮に上記のような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。そこで第2編では、鼻腔から脳への薬物の直接移行を制限すると予想されるOrganic Anion Transporter 1 (OAT1)及びP-糖タンパク質であるMultiple drug resistance 1 (MDR1)の発現について評価した。また、上記の特殊輸送系の基質になることが報告されている薬物2種類(Flurbiprofen及びVerapamil hydrochloride)を経鼻投与した後の血漿及び各脳部位中薬物濃度を第1編と同様の方法で静脈内投与と比較し、

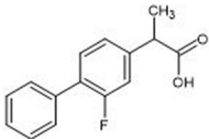
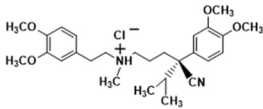
経鼻投与後の薬物の脳移行性について評価した。さらに、鼻腔から嗅球への移行に対する基質薬物の鼻腔内適用濃度及び基質薬物の競合阻害剤の影響について評価した。

第2節 実験方法

2-2-1 試薬

BCA protein assay reagent kit、Super Signal™ West Dura Traial kit 及び SLC22A6 (OAT1) polyclonal antibody を Thermo scientific (MA, USA) より購入した。MDR1/ABCB1 Rabbit mAb、 β -actin Rabbit mAb 及び Anti-rabbit IgG を Cell Signaling Technology (MA, USA) より購入した。プロテアーゼ阻害剤カクテルを Merck (NJ, USA) より購入した。Flurbiprofen (FP)、Verapamil hydrochloride (VRP)、Probenecid (PBC)、Quinidine (QIN) 及びドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。その他の試薬は全て特級品を用いた。Table 16 に用いたモデル薬物の構造式及び物理化学的性質を示す。なお、薬物の物理化学的パラメータは、化合物データベースである PubChem または文献値から引用した^{26, 38)}。

Table 16 Model drugs used in this study.

	Flurbiprofen (FP)	Verapamil hydrochloride (VRP)
M.W.	244	491
Log k	3.57	3.80
pK _a	4.42	8.89
log (k/M.W. ^{1/2})	2.38	2.66
Structure		

2-2-2 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を用いた。

2-2-3 Immunoblot analysis

ラットを PBS 約 250 mL で心灌流した後、嗅球、嗅上皮、呼吸上皮、腎臓及び肝臓を摘出し、PBS で洗浄した。各組織の湿重量を測定し、液体窒素で凍結させた。得られた組織に PBS 1 mL/g を加え、ホモジナイザーを用いて、氷冷下でホモジナイズした。なお、腎臓及び肝臓は液体窒素下、乳鉢・乳棒で粉砕した後に PBS を添加しホモジナイズした。得ら

れた混合液を遠心分離した (4°C, 20,000 rpm, 30 min) 後、沈殿物を回収した。得られた沈殿物にプロテアーゼ阻害剤含有 SDS 溶液 (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1.0 % SDS) を添加し、ホモジナイズした。その混合液を遠心分離し (4°C, 15,000 rpm, 30 min)、上清のみを採取した。BCA protein assay を用いてタンパク質量を均一に補正した。補正した上清を 2×SDS sample buffer と 1 : 1 の割合で混合し、約 95°C の水浴で 10 分間加熱したものを SDS-PAGE のサンプルとした。Polyacrylamide gel のウェルに調製したサンプル 15 μ L を添加し電気泳動を行った (200 V, 30 min)。その後、泳動したゲルを polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した (70 V, 180 min)。PVDF 膜を TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) で 30 秒間振盪して洗浄した後、PVDF 膜を 3% スキムミルクを含む TBS-T (TBS containing 0.1% Tween 20) でブロッキングした (室温, 60 min)。ブロッキング後、PVDF 膜を SLC22A6 (OAT1) polyclonal antibody (1 : 1,000)、MDR1/ABCB1 Rabbit mAb (1 : 1,000) 及び β -Actin Rabbit mAb (1 : 2,000) を含むスキムミルク含有 TBS-T で 4°C 一晩インキュベートした。インキュベート後、TBS-T で 10 分間振盪して洗浄し、この操作を 2 回繰り返した。次に上記の一次抗体に対する二次抗体 (Anti-rabbit IgG) を含む 3% スキムミルク含有 TBS-T で PVDF 膜をインキュベートした (室温, 60 min) 後、PVDF 膜を TBS で 10 分間振盪して洗浄した。Super Signal™ West Dura の enhancer solution と stable peroxide solution を 1 : 1 の割合で混合して PVDF 膜に塗布し、生じた化学発光を化学発光検出器 (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) を用いて検出した。目的タンパク質と β -actin のバンド強度を Image Lab™ Software version 5.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) を用いて定量し、各サンプル中の目的タンパク質のピクセル強度を β -actin のピクセル強度で補正した。なお、ラット 4 匹分の組織を合わせて 1 例とした。

2-2-4 薬物の投与

1-1-2-3 と同様の方法で麻酔したラットに外科的処置を施し、ラットの頭部を 30° 傾斜させた。先端にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 株式会社三商, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて、FP (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL, 0.2 mg/kg) 及び VRP

(0.25, 0.375, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL, 0.4 mg/kg) を左鼻腔入口から 15 mm のところに投与した。また、左頸静脈より FP (0.2 mg/mL, 0.2 mg/kg) 及び VRP (0.4 mg/mL, 0.4 mg/kg) を投与した。特殊輸送系の競合阻害試験では、競合阻害剤である PBC (0.4 mg/kg) または QIN (0.1 mg/kg) を左鼻腔入口から 15 mm のところに経鼻または腹腔内 (*i.p.*) に先行投与した。先行投与の 30 分後に FP (1.0 mg/mL, 0.2 mg/kg) または VRP (2 mg/mL, 0.4 mg/kg) を左鼻腔入口から 15 mm のところに経鼻投与した。

2-2-5 薬物投与後の血漿の採取

1-1-2-4 と同様の方法で各薬物を静脈内及び経鼻投与した後、経時的に右頸静脈より血液を採血し、遠心分離により血漿を得た。

2-2-6 薬物投与後の各脳部位の採取

1-1-2-5 と同様の方法で各薬物を静脈内及び経鼻投与した後、所定の時間に心灌流にてラットを屠殺し全脳を摘出した。1-1-2-5 と同様に脳を I-IX の部位に分割した (Table 2)。各脳部位の重量を測定した後、各脳部位中薬物濃度の測定に使用した。

2-2-7 FP 及び VRP の定量

2-2-7 (1) 血漿中薬物濃度の測定

2-2-5 で得られた血漿中の各薬物濃度を以下の操作により測定した。

FP 濃度の測定

血漿 100 μ L に内部標準物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルを含むアセトニトリル 200 μ L を加え、30 秒間攪拌した後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離により得られた上清 200 μ L を分取し、窒素流入下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に移動相 100 μ L を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。その上清 35 μ L を HPLC/RF に注入して、FP 濃度を測定した。

VRP 濃度の測定

血漿 100 μL にアセトニトリル 200 μL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離により得られた上清 200 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に内部標準物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルを含有する移動相 65 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。その上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、VRP 濃度を測定した。

2-2-7 (2) 各脳部位中薬物濃度の測定

2-2-6 で得られた I-IX 中の各薬物濃度を以下の操作により測定した。

FP 濃度の測定

各脳部位のうち、I-IV に蒸留水 30 mL/g を、V-IX に蒸留水 10 mL/g を加えた。ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 300 μL を分取した。その上清 300 μL に *p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルを含有する酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌した後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、有機層 800 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に移動相 100 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。その上清 35 μL を HPLC/RF に注入して、FP 濃度を測定した。

VRP 濃度の測定

各脳部位に超純水 15 mL/g を加え、ホモジナイザーを用いて、氷冷下で 60 秒間ホモジナイズした。得られた混合液を遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min) 後、上清 300 μL を分取した。その上清 300 μL に酢酸エチル 1 mL を加え、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。遠心分離後、有機層 900 μL を分取し、窒素気流下 40°C で溶媒を除去した。溶媒除去後の残渣に *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルを含有する移動相 65 μL を加えて溶解し、5 分間攪拌後、遠心分離した (4°C, 20,400 g, 5 min)。その上清 35 μL を HPLC/UV に注入して、VRP 濃度を測定した。

2-2-7 (3) HPLC 装置

1-1-2-6 (3) と同様の装置を用いて FP 及び VRP の測定を行った。Table 17 に HPLC の測定条件を示す。

Table 17 HPLC conditions for the analysis of FP and VRP.

	FP	VRP
Mobile Phase	0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 1 : 1	0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 5.5 : 4.5
Detection	Ex 262 nm Em 313 nm	UV 274 nm
Internal Standard	Isopropyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
Flow rate	1 mL/min	0.7 mL/min
Column temp.	40°C	40°C
Column	C18, 5 μm, 4.6 mm I.D.×250 mm	C18, 5 μm, 4.6 mm I.D.×250 mm

2-2-8 薬物動態解析

1-1-2-7 及び 1-2-2-1 と同様の方法で各薬物の体内動態を解析し、動態パラメータを算出した。

2-2-9 統計解析

1-1-2-8 と同様の方法でデータを解析した。

第3節 結果

2-3-1 鼻粘膜上皮及び嗅球における OAT1 及び MDR1 の発現

Figure 14 に肝臓、腎臓、嗅球、呼吸上皮及び嗅上皮における OAT1 及び MDR1 のウェスタンブロット法による画像結果と画像解析から得られたそれらの発現量を示す。OAT1 の発現は腎臓で最も多く、嗅球、呼吸上皮及び嗅上皮においては、わずかに発現が認められた。一方、MDR1 の発現は腎臓や肝臓だけでなく、嗅球や嗅上皮においても認められた。特に嗅球及び嗅上皮における MDR1 の発現は腎臓及び肝臓と同程度であった。OAT1 及び MDR1 の発現が鼻粘膜上皮及び嗅球において認められたことから、これらの特殊輸送系の基質になる薬物は、経鼻投与後の鼻腔から脳への直接移行に影響を受ける可能性が考えられた。

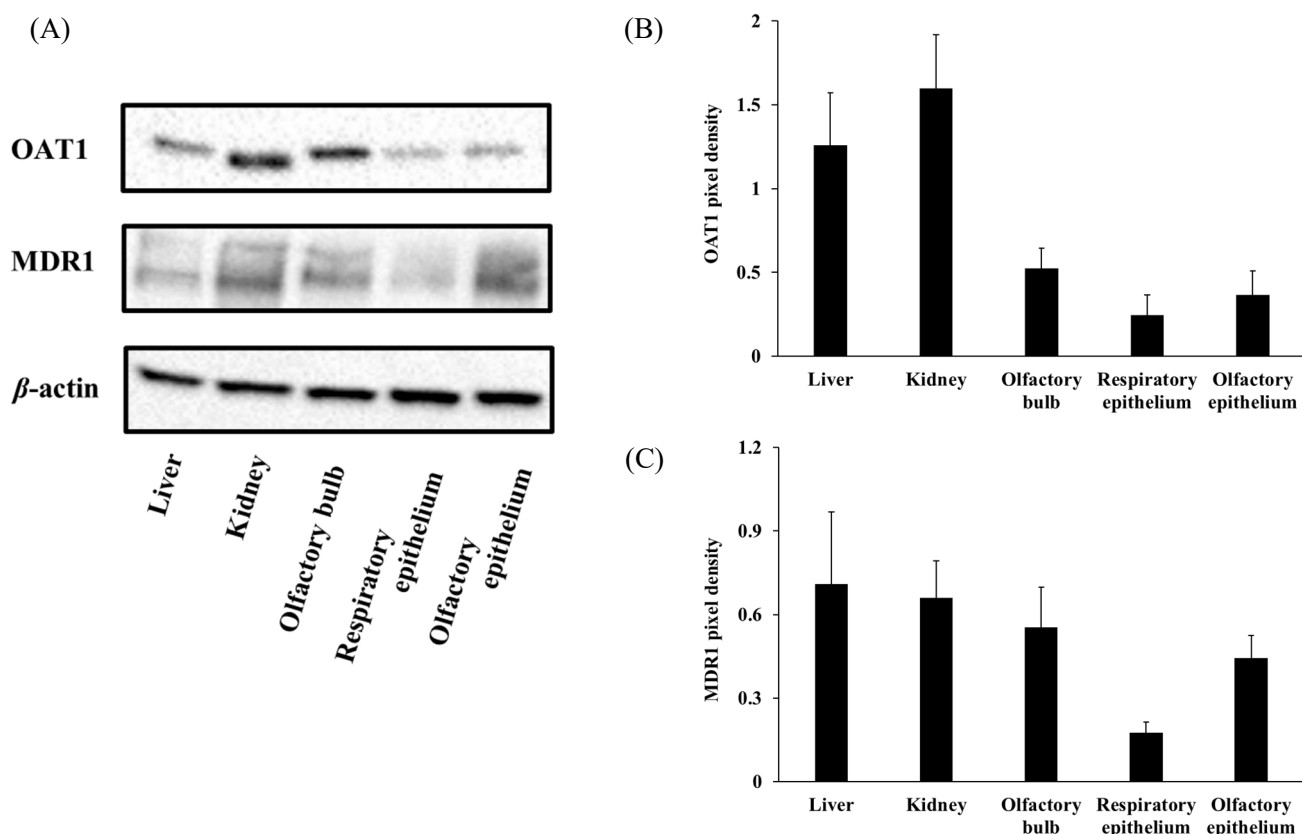


Fig. 14 The expression of OAT1 and MDR1 in each tissue of rats.
(A) OAT1, MDR1 and β -actin were detected by a Western blot analysis.
(B) The densitometry ratios represent the OAT1 expression.
(C) The densitometry ratios represent the MDR1 expression.
Each data column represents the mean \pm S.E. (n=5-6).

2-3-2 薬物の静脈内投与後の血漿中濃度推移

Figure 15 に FP 及び VRP を静脈内投与した後の血漿中濃度—時間曲線を、Table 18 に得られた血漿における動態パラメータを示す。各薬物の静脈内投与後の血漿中濃度推移は、血漿中濃度を対数軸で表した血漿中濃度—時間曲線で 2 相性が確認され、2-コンパートメントモデルで良好に表された。

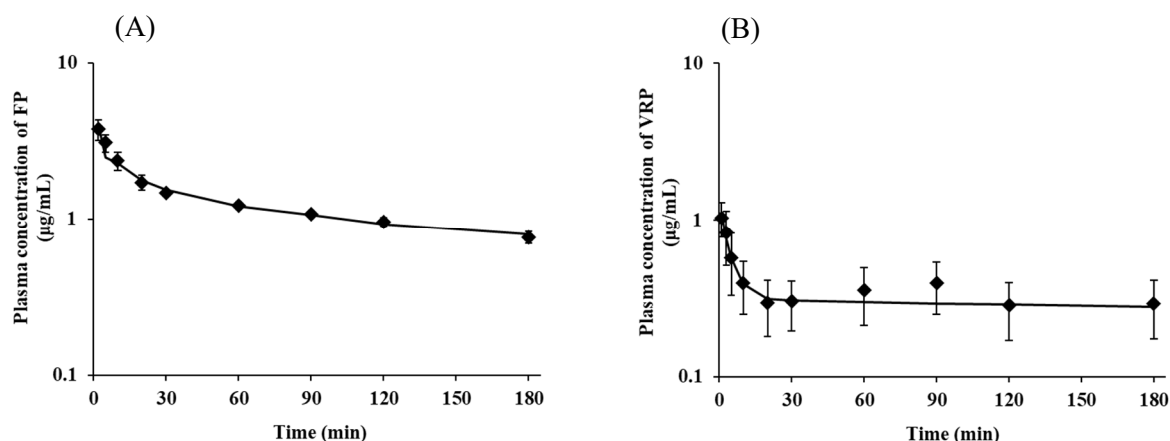


Fig. 15 Plasma concentrations after *i.v.* administration of FP and VRP in rats and simulated line from 2- compartment model.

(A) FP, (B) VRP

◆: measured value, —: fitting curve

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

Table 18 Pharmacokinetic parameters of FP and VRP calculated from plasma data after *i.v.* administration in rats.

	FP	VRP
A ($\mu\text{g/mL}$)	2.86 ± 0.400	1.13 ± 0.151
α (min^{-1})	0.118 ± 0.021	0.416 ± 0.132
$t_{1/2\alpha}$ (min)	6.33 ± 1.33	2.02 ± 0.588
B ($\mu\text{g/mL}$)	1.53 ± 0.090	0.314 ± 0.114
β (min^{-1})	0.004 ± 0.001	0.002 ± 0.001
$t_{1/2\beta}$ (min)	185 ± 28.5	697 ± 398
k_{21} (min^{-1})	0.044 ± 0.007	0.070 ± 0.008
k_{10} (min^{-1})	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.006
k_{12} (min^{-1})	0.068 ± 0.013	0.336 ± 0.128
V_1 (mL)	58.3 ± 5.79	202 ± 37.3
V_2 (mL)	88.2 ± 4.84	1155 ± 684
V_{ss} (mL)	146 ± 9.74	1357 ± 721
CL_{tot} (mL/min)	0.605 ± 0.088	2.64 ± 1.71

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

2-3-3 薬物の経鼻投与後の全身循環系への移行

Figure 16 に FP 及び VRP を静脈内及び経鼻投与した後の血漿中濃度—時間曲線を、Table 19 に得られた血漿における動態パラメータを示す。いずれの薬物においても、経鼻投与後の $T_{\max, \text{Plasma}}$ は 10 分以内であり、 $F_{0-\infty}$ は 70% 以上であったことから、経鼻投与されたこれら薬物の全身循環系への移行は素早くかつ良好であった。

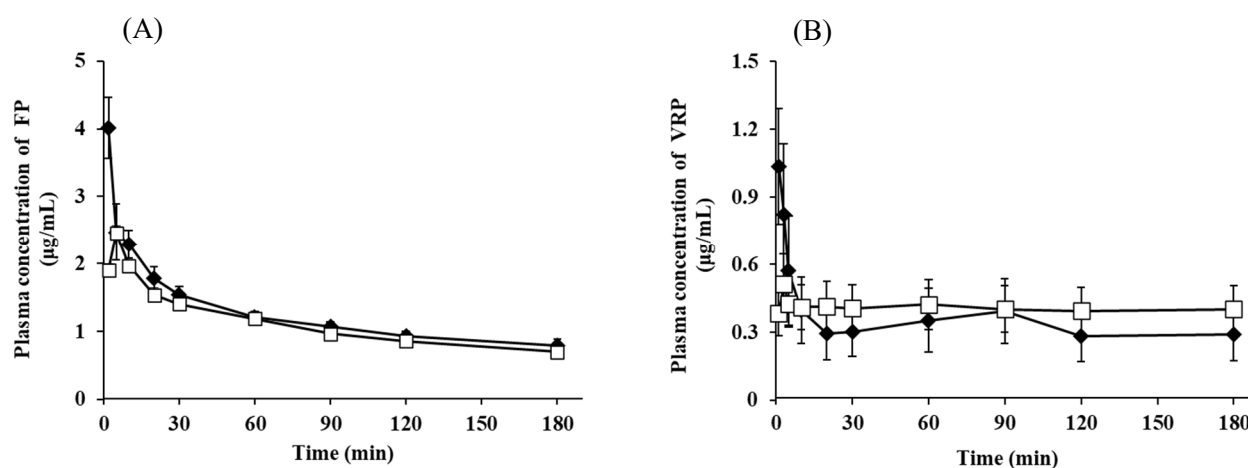


Fig. 16 Plasma concentrations after *i.v.* and *i.n.* administration of FP and VRP in rats.
 ◆: *i.v.* administration, □: *i.n.* administration
 (A) FP, (B) VRP
 Each data represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

Table 19 Pharmacokinetic parameters of FP and VRP calculated from plasma data after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

	Route	$C_{\max, \text{plasma}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$T_{\max, \text{plasma}}$ (min)	$AUC_{\text{plasma } 0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	$F_{0-\infty}$ (%)
FP	<i>i.v.</i>	-	-	438 ± 71.8	-
	<i>i.n.</i>	2.46 ± 0.111	5.0 ± 0.0	412 ± 117	94.1
VRP	<i>i.v.</i>	-	-	411 ± 255	-
	<i>i.n.</i>	0.309 ± 0.128	7.8 ± 4.1	307 ± 90.2	74.7

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

2-3-4 薬物投与後の各脳部位への移行

Figures 17 及び 18 に薬物を静脈内及び経鼻投与した後の各脳部位中濃度及び DTE_{brain} の推移を、Tables 20 及び 21 に得られた各脳部位における動態パラメータを示す。ほとんどの脳部位において、経鼻投与後の FP の濃度推移は、静脈内投与とほぼ同等であったが、嗅球 (I) 及び視床下部 (II) においては AUC_{brain} が静脈内投与よりも経鼻投与で高い値を示す傾向にあった (Fig. 17 及び Table 20)。FP 経鼻投与後の各脳部位における DTE_{brain} は 1 よりも高い値で推移したことから、経鼻投与後の FP の脳への移行は静脈内投与と同等かそれ以上であり、特に嗅球においては静脈内投与よりも経鼻投与の方が移行しやすいことが示された (Fig. 17)。

経鼻投与後の各脳部位における VRP の濃度推移は、静脈内投与とほぼ同等であった (Fig. 18 及び Table 21)。単純拡散に従い脳移行すると考えられる薬物と同様に、VRP 経鼻投与後の各脳部位における DTE_{brain} は、投与後 5 分で 1 よりも高い値を示したことから、経鼻投与直後では鼻腔から脳への VRP の直接移行の寄与が大きいことが明らかとなった。しかし、VRP 経鼻投与後のいずれの脳部位においても、経時的に DTE_{brain} は 1 に近づくあるいは 1 以下の値を示したことから、静脈内投与と同様の脳移行の挙動を示し、全身循環系からの脳移行の寄与が大きくなることが考えられた (Fig. 18)。

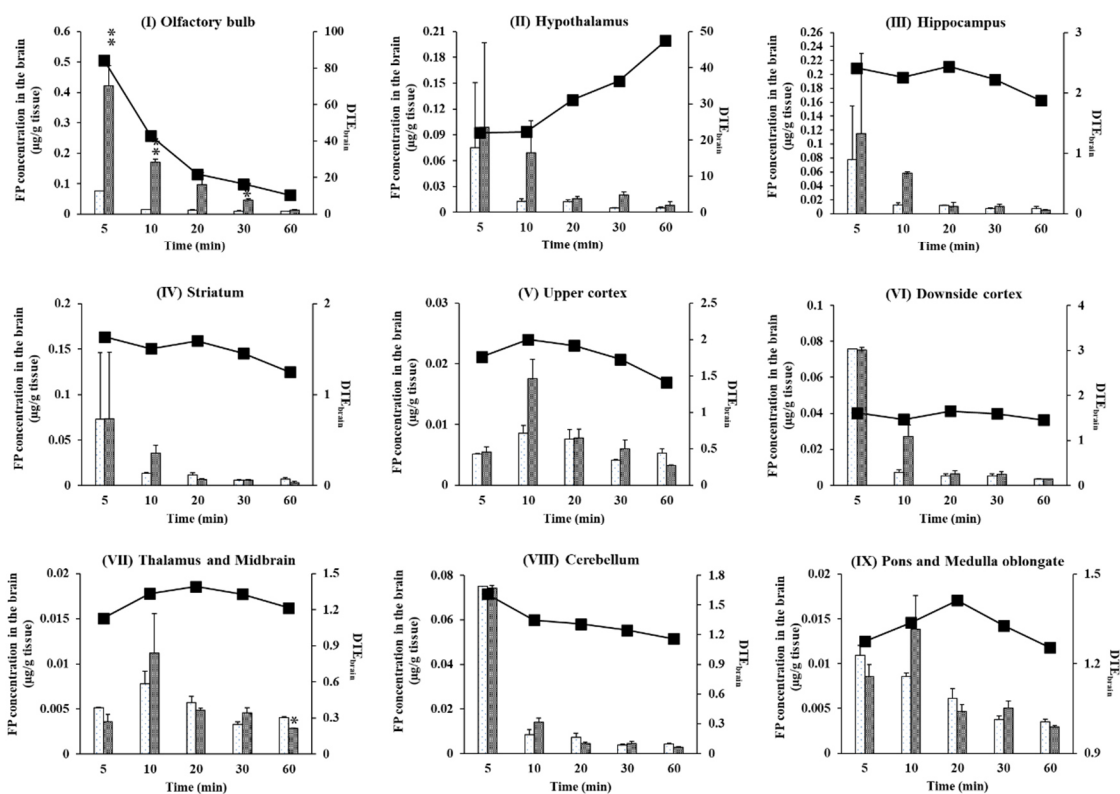


Fig. 17 FP concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-5).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

Table 20 Pharmacokinetic parameters of FP in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	0.0756 ± 0.000	< 5	0.943
	II	0.0752 ± 0.075	< 5	0.777
	III	0.0774 ± 0.077	< 5	0.859
	IV	0.0731 ± 0.073	< 5	0.801
	V	0.0086 ± 0.001	10	0.328
	VI	0.0758 ± 0.000	< 5	0.643
	VII	0.0078 ± 0.001	10	0.268
	VIII	0.0750 ± 0.000	< 5	0.648
	IX	0.0109 ± 0.001	< 5	0.308
<i>i.n.</i>	I	0.421 ± 0.068 **	< 5	5.46
	II	0.0985 ± 0.098	< 5	1.70
	III	0.115 ± 0.115	< 5	1.41
	IV	0.0734 ± 0.073	< 5	0.872
	V	0.0175 ± 0.003	10	0.405
	VI	0.0752 ± 0.002	< 5	0.817
	VII	0.0112 ± 0.004	10	0.285
	VIII	0.0742 ± 0.001	< 5	0.655
	IX	0.0138 ± 0.004	10	0.338

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-5).

** : $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

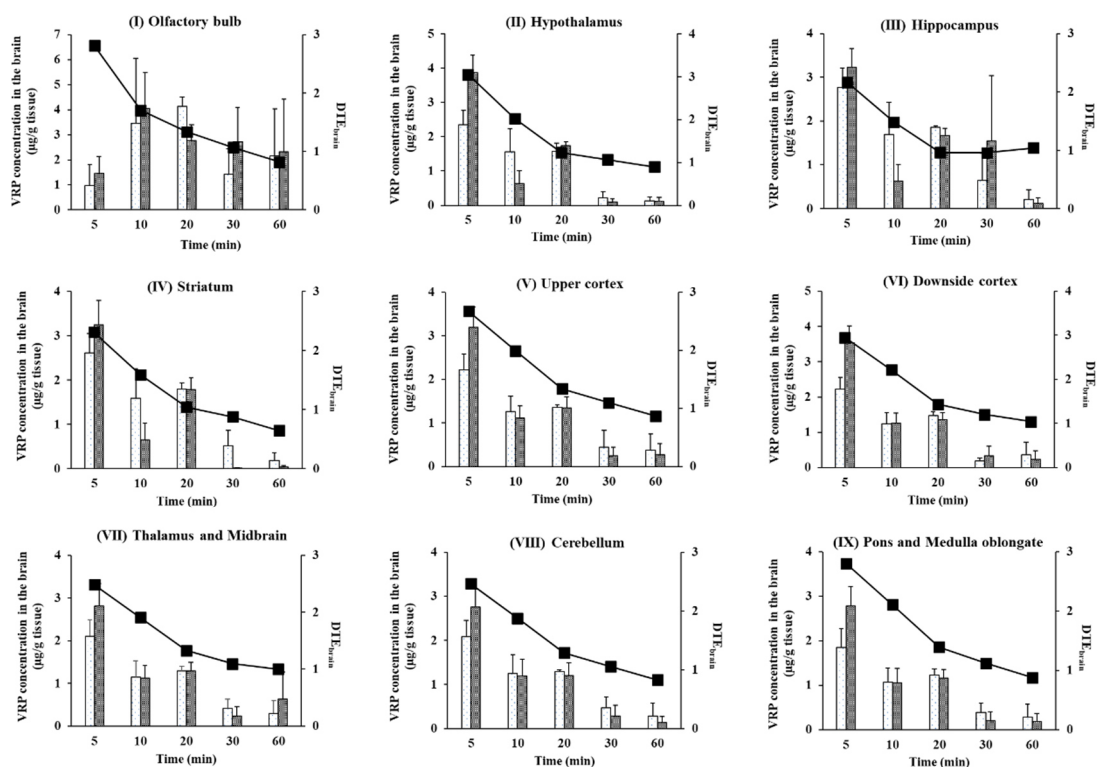


Fig. 18 VRP concentrations in the brain and DTE after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

□: *i.v.* administration, ▨: *i.n.* administration, ■: DTE_{brain}

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

Table 21 Pharmacokinetic parameters of VRP in the brain after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain} (µg·min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	4.14 ± 0.351	20	133
	II	2.35 ± 0.415	< 5	45.5
	III	2.77 ± 0.447	< 5	61.3
	IV	2.61 ± 0.445	< 5	55.8
	V	2.22 ± 0.363	< 5	48.6
	VI	2.23 ± 0.332	< 5	44.2
	VII	2.11 ± 0.376	< 5	45.0
	VIII	2.08 ± 0.368	< 5	46.5
	IX	1.85 ± 0.432	< 5	41.5
<i>i.n.</i>	I	4.05 ± 1.44	10	155
	II	3.86 ± 0.511	< 5	45.0
	III	3.23 ± 0.439	< 5	70.4
	IV	3.24 ± 0.554	< 5	39.5
	V	3.19 ± 0.465	< 5	46.5
	VI	3.54 ± 0.473	< 5	50.8
	VII	2.81 ± 0.523	< 5	49.5
	VIII	2.76 ± 0.403	< 5	42.4
	IX	2.78 ± 0.441	< 5	40.1

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-6).

2-3-5 薬物の鼻腔から嗅球への直接移行に対する特殊輸送系の影響

Table 22 に薬物の静脈内及び経鼻投与後の嗅球における動態パラメータを、Figure 19 に薬物の分配係数 (k) を薬物の分子量 (M.W.) で補正した対数值 ($\log(k/M.W.^{1/2})$) と嗅球への移行 (DTE_{ob} (A)、 DTP_{ob} (B)、 $\log CL_{i.n.}$ (C) 及び $\log CL_{i.v.}$ (D)) の関係を示す。薬物の脂溶性と DTE_{ob} または DTP_{ob} との関係性の結果から、FP または VRP の経鼻投与後の嗅球への移行は、単純拡散に従い脳移行すると考えられる同程度の脂溶性を示す薬物より下降にプロットされる傾向にあった (Figs. 19 (A), (B))。VRP における DTE_{ob} は静脈内投与と同程度の脳移行を示す 1 付近の値 (1.24) を示し、 DTP_{ob} は 19.2% と鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率が低い値を示した。一方、FP 経鼻投与後の DTE_{ob} は高い値 (4.87) を示し、 DTP_{ob} が 79.5% と BBB を介さず直接嗅球に移行した割合が高い値を示した (Table 22)。従って、FP においては、静脈内投与よりも経鼻投与の方が特殊輸送系の影響を受けずに脳へ送達される可能性が示唆された。

また、薬物の脂溶性と $\log CL_{i.v.}$ または $\log CL_{i.n.}$ との関係においても、第 1 編第 2 章の結果のような薬物の脂溶性と取り込みクリアランスの関係には従わず、単純拡散に従うほぼ同等の脂溶性薬物よりも取り込みクリアランスが低下する傾向にあった (Figs. 19 (C), (D))。これらの結果から、OAT1 及び MDR1 の基質薬物である FP 及び VRP は、特殊輸送系の影響を受けることにより、同程度の脂溶性を有し単純拡散に従い脳移行する薬物よりも鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率や取り込みクリアランスが低下する可能性が示唆された。

Table 22 Pharmacokinetic parameters of FP and VRP in the olfactory bulb after *i.v.* and *i.n.* administration in rats.

	Route	AUC _{ob 0-∞} (μg·min/g tissue)	DTE _{ob}	DTP _{ob} (%)	Log CL _{<i>i.n.</i>} (μL/min)	Log CL _{<i>i.v.</i>} (μL/min)
FP	<i>i.v.</i>	1.30	-	-	-	-0.534
	<i>i.n.</i>	5.96	4.87	79.5	-2.18	-
VRP	<i>i.v.</i>	279	-	-	-	0.891
	<i>i.n.</i>	258	1.24	19.2	-1.94	-

Each data represents the mean. (n=3-6).

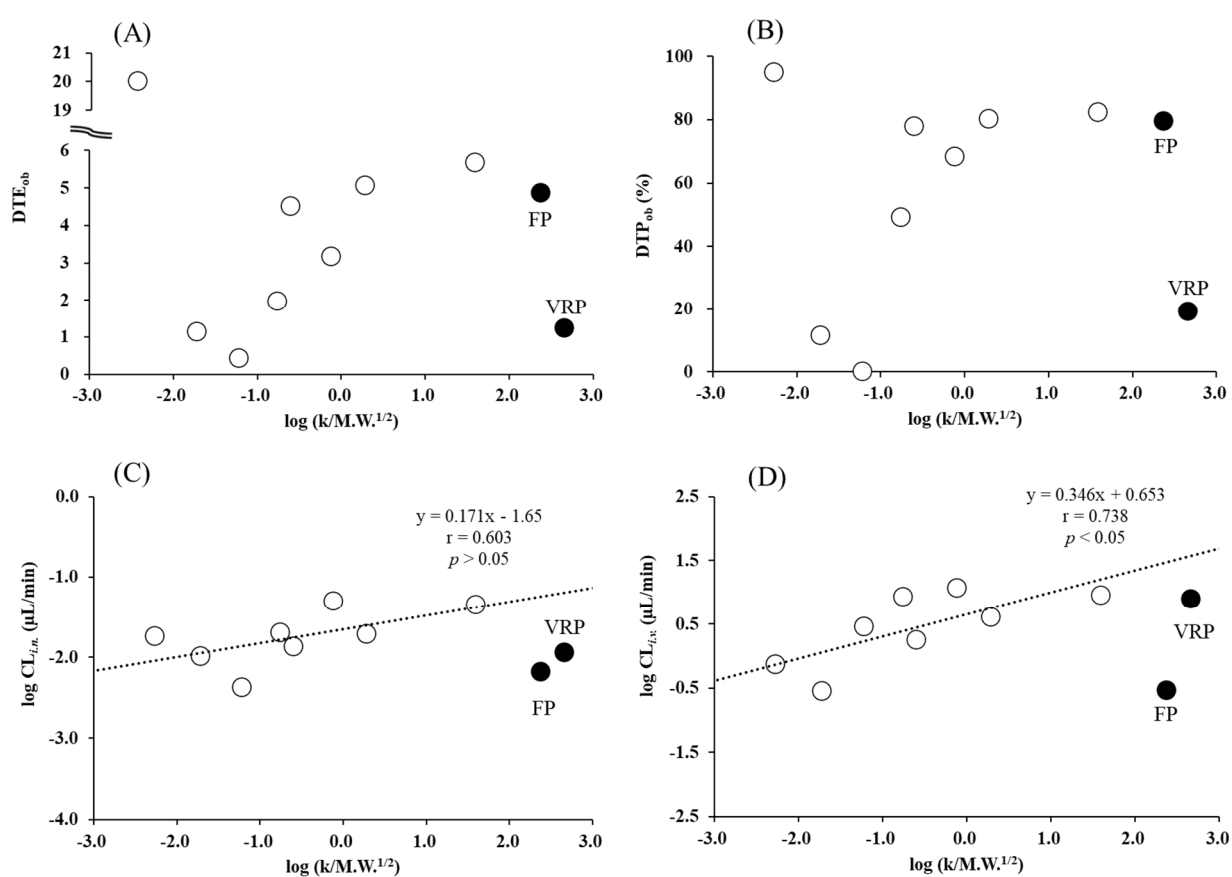


Fig. 19 Relationships between $\log(k/M.W.^{1/2})$ and DTE_{ob} (A), DTP_{ob} (B), log CL_{*i.n.*} (C) or log CL_{*i.v.*} (D) after *i.v.* and *i.n.* administration of FP and VRP in rats.
 ----- : passive diffusion

2-3-6 薬物の鼻腔から嗅球への移行に対する鼻腔内適用濃度の影響

Figure 20 に種々濃度の薬物（FP または VRP）を経鼻投与してから 5 分後の嗅球中薬物濃度を示す。FP または VRP の鼻腔内への適用濃度を増大させると嗅球中薬物濃度は増大するが、さらに適用濃度を増大させると嗅球中薬物濃度が頭打ちになる傾向にあった。これらの結果から、薬物濃度に依存して吸収過程に飽和が認められる特殊輸送系の介在が示唆され、試験した濃度範囲では OAT1 または MDR1 の作用により鼻腔から嗅球への FP 及び VRP の吸収が抑制されたと考えられた。

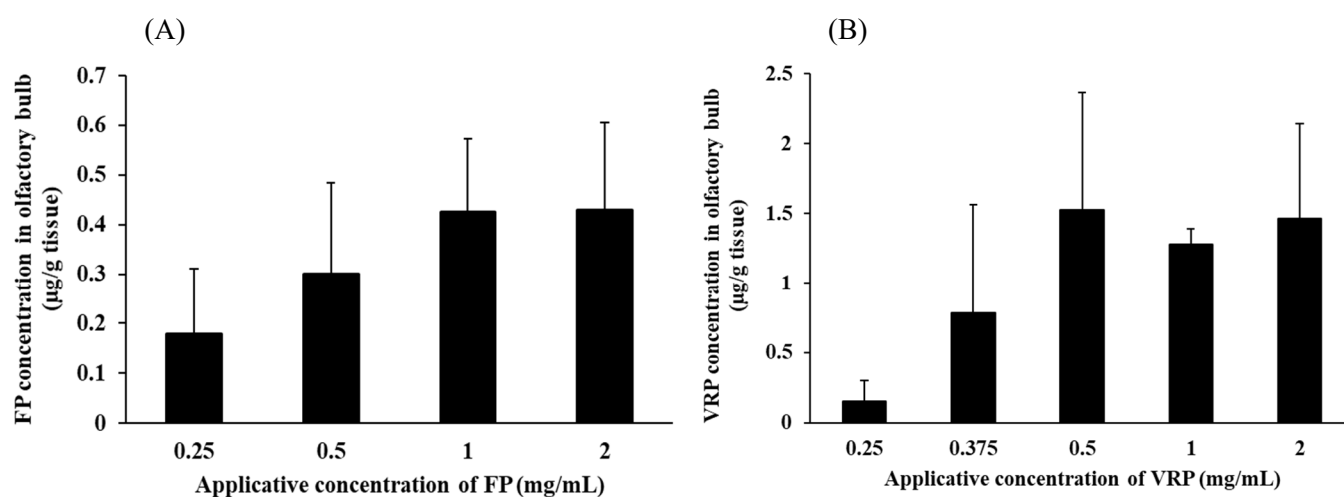


Fig. 20 Effects of applicative concentrations on the transfer to the olfactory bulb after *i.n.* administration of FP and VRP in rats.

(A) FP, (B) VRP

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

2-3-7 薬物の鼻腔から嗅球への移行に対する競合阻害剤の影響

Figure 21 に OAT1 または MDR1 の競合阻害剤（それぞれ PBC または QIN）を先行投与（*i.n.* または *i.p.*）し、FP または VRP を経鼻投与してから 5 分後の嗅球中濃度を示す。FP または VRP のみの経鼻投与と比較して、PBC または QIN を鼻腔内（*i.n.*）に先行投与した群では、嗅球中の FP または VRP 濃度がわずかに高い傾向を示した。一方、PBC または QIN を腹腔内（*i.p.*）に先行投与した群では、FP または VRP のみの経鼻投与と比較して、嗅球中の FP または VRP 濃度が増大する傾向にあった。これらの結果から、PBC または QIN が BBB に発現する OAT1 または MDR1 を競合的に阻害することで、全身循環系から脳への基質薬物の移行が増加する可能性が示唆された。また、競合阻害剤の先行経鼻投与においても、基質薬物のみの経鼻投与よりも嗅球中基質薬物濃度がわずかに増大する傾向を示したことから、鼻粘膜上皮に発現する OAT1 または MDR1 に対しても阻害効果を示す可能性が示唆された。

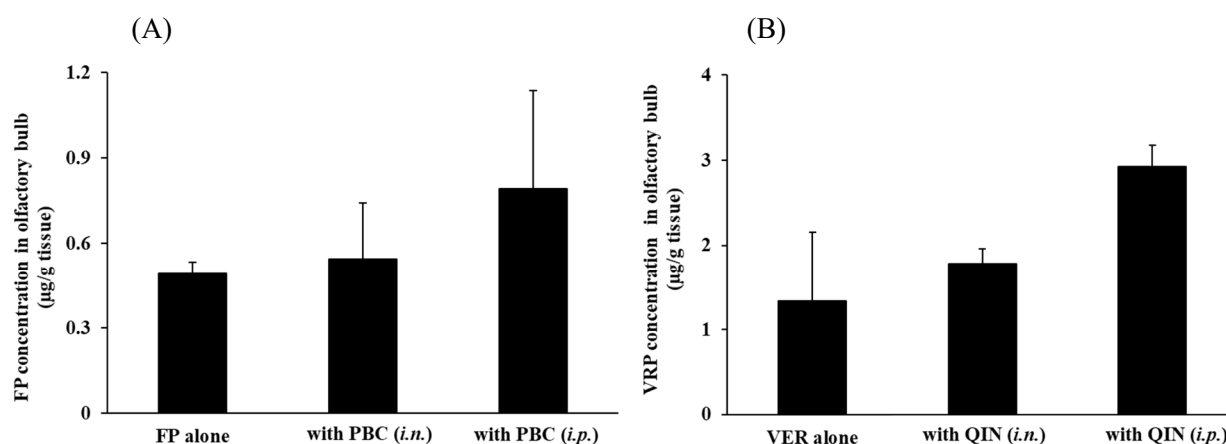


Fig. 21 Effects of competitive inhibitors (PBC and QIN) on the transfer to the olfactory bulb after *i.n.* administration of FP and VRP in rats.

(A) FP, (B) VRP

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

第4節 考察

ウエスタンブロット法により鼻粘膜上皮及び嗅球において OAT1 及び MDR1 の発現がタンパク質レベルで確認された。特に、MDR1 の嗅球及び嗅上皮での発現は、腎臓及び肝臓と同程度であったことから、これらの特殊輸送系の基質になる薬物は鼻腔から脳への移行が特殊輸送系によって影響される可能性が示唆された。また、本研究で検討した特殊輸送系は、ヒトとラットの鼻粘膜上皮において、同程度の発現が mRNA レベルで報告されている³⁵⁾。従って、ヒトにおいてもこれらの特殊輸送系の基質になる薬物は、吸収動態に影響を与える可能性があると考えられた。しかし、本研究で単離した鼻粘膜上皮には嗅上皮及び呼吸上皮細胞だけでなく、嗅神経や三叉神経、さらには血管内皮細胞も含まれる可能性があり、鼻粘膜上皮を形成するどの組織にこれらの特殊輸送系が発現しているのかは明らかではない。また、嗅球においても上記と同様に特殊輸送系の発現部位は明らかではない。特殊輸送系の影響をより詳細に評価するためには、特殊輸送系の局在を評価する必要があると考えられる。

Log $CL_{i.n.}$ と $\log(k/M.W.^{1/2})$ の関係から、経鼻投与後の FP 及び VRP は、単純拡散に従うほぼ同等の脂溶性薬物よりも $\log CL_{i.n.}$ が低下する傾向にあった。また、FP または VRP の鼻腔内への適用濃度を増大させると嗅球中薬物濃度が頭打ちになる傾向にあり、FP 及び VRP 経鼻投与後の脳への移行において、OAT1 及び MDR1 の関与が示唆された。単純拡散に従うと考えられる薬物と同様に、FP または VRP の経鼻投与後の $T_{max, Plasma}$ は 10 分以内と素早く、 $F_{0-\infty}$ は 70% 以上であったことから、全身循環系への移行は素早くかつ良好であった。また、経鼻投与後のほとんどの脳部位における FP の濃度推移は、静脈内投与後とほぼ同等であったが、嗅球 (I) 及び視床下部 (II) においては AUC_{brain} が静脈内投与よりも経鼻投与で高い値を示す傾向にあり、各脳部位における DTE_{brain} は 1 よりも高い値で推移したことから、経鼻投与後の FP の脳への移行は静脈内投与と同等かそれ以上であった。嗅球や鼻粘膜上皮における OAT1 の発現は、腎臓と比較して極わずかであったことから、OAT1 の基質になる FP においては鼻腔から嗅球への移行にほとんど制限を受けず、 DTE_{ob} が静脈内投与よりも高い値 (4.87) を示し、 DTP_{ob} が 79.5% と BBB を介さず直接嗅球に移行したことが

考えられた。経鼻投与後の各脳部位における VRP の濃度推移においては、静脈内投与とほぼ同等であった。単純拡散に従うと考えられる薬物と同様に、VRP の経鼻投与後の各脳部位における DTE_{brain} は、投与後 5 分で 1 よりも高い値を示したことから、経鼻投与直後では鼻腔から脳への VRP の直接移行の寄与が大きいことが明らかとなった。しかし、いずれの脳部位においても、経時的に DTE_{brain} は 1 に近づく、あるいは 1 以下の値を示した。経鼻投与後の VRP は時間の経過とともに静脈内投与と同様の脳移行性を示し、全身循環系からの脳移行の寄与が大きくなることが考えられた。VRP においては MDR1 の嗅球や鼻粘膜上皮における発現により、鼻腔から嗅球への直接移行が強く制限された結果、 DTE_{ob} が静脈内投与と同程度の嗅球移行を示す 1 付近の値 (1.24) を示し、 DTP_{ob} が 19.2% と鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率が低い値を示したと考えられた。BBB における OAT1 や MDR1 の発現は多くの研究で報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。さらに、これらの特殊輸送系は BBB だけでなく、BCSFB における発現も示唆されており、全身循環系から CNS への薬物輸送の制限及び CNS から全身循環系への排出促進に関与しているため、CNS 作用薬の薬理効果発現に大きな障壁となる^{42, 43)}。実際に、OAT1 及び MDR1 の基質薬物である FP 及び VRP では、分配係数から推定される鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率や取り込みクリアランスよりも値が低下する可能性が示唆された。その一方で、FP 経鼻投与後の鼻腔から嗅球への直接移行の寄与率が高く、静脈内投与時よりも嗅球への移行が良好であったことから、鼻腔内に特殊輸送系が発現している場合においても、一部の特殊輸送系は BBB に発現する特殊輸送系との発現量等の違いにより、静脈内投与などの全身循環系から脳への薬物移行よりも、経鼻投与による鼻腔から脳への薬物の直接移行の方が寄与が大きい可能性が考えられた。

OAT1 及び MDR1 の競合阻害剤である PBC または QIN を先行投与することで、基質薬物のみの投与と比べて嗅球中の基質薬物濃度が増大する傾向にあった。また、競合阻害剤を腹腔内へ先行投与することにより、鼻粘膜上皮だけでなく BBB に発現する OAT1 及び MDR1 に対し、基質薬物と阻害剤との競合が生じ、FP 及び VRP の全身循環系から脳への移行が増加したことも考えられた (Fig. 22)。競合阻害薬の腹腔内への先行投与よりも鼻腔内への先行投与における嗅球中の基質薬物濃度が低くなった要因として、競合阻害剤を先行

投与することで、基質薬物を投与する際に投与溶液が希釈されたことや、嗅上皮領域と薬物との接触が妨げられたことが考えられた。本研究では、競合阻害剤先行投与時の詳細な体内動態などを評価しておらず、競合阻害剤の影響を詳細に評価するためには、嗅球中の基質薬物濃度の測定だけでなく、血漿中動態なども検討する必要があるものの、上記の結果から特殊輸送系の基質薬物を経鼻投与する際に、競合阻害剤を併用することで脳への薬物の移行量を増大させることが可能であると考えられる。Hada らは P-糖タンパク質の基質薬物であるイマチニブを P-糖タンパク質の競合阻害剤と併用して経鼻投与することで、イマチニブのみの経鼻投与と比較して脳内のイマチニブ濃度が増大したことを報告している⁴⁴⁾。鼻腔内には数多くの特殊輸送系の発現が報告されており、特殊輸送系の基質となる薬物の経鼻投与後の鼻腔から脳への直接移行に対する特殊輸送系の影響を詳細に評価するためには、OAT1 及び MDR1 だけでなく、さらに多くの特殊輸送系について検討する必要があると考えられた。

以上、第 2 編では鼻粘膜上皮及び嗅球における特殊輸送系の発現と、特殊輸送系が関与すると考えられる薬物の鼻腔から脳への直接移行性について評価した。特殊輸送系である OAT1 及び MDR1 の発現は、鼻腔内や嗅球においても認められ、これらの基質薬物の経鼻投与では、単純拡散に従い脳へ移行する薬物よりも脳への送達性が低くなる可能性が示唆された。第 1 編及び第 2 編の結果から経鼻投与された薬物の脳への移行は静脈内投与と同等かそれ以上であることが示唆されたが、経鼻投与後の薬物が期待される薬理効果を発現するかは不明である。第 3 編では CNS 作用薬の脳移行性と薬理効果について検討した結果を論述する。

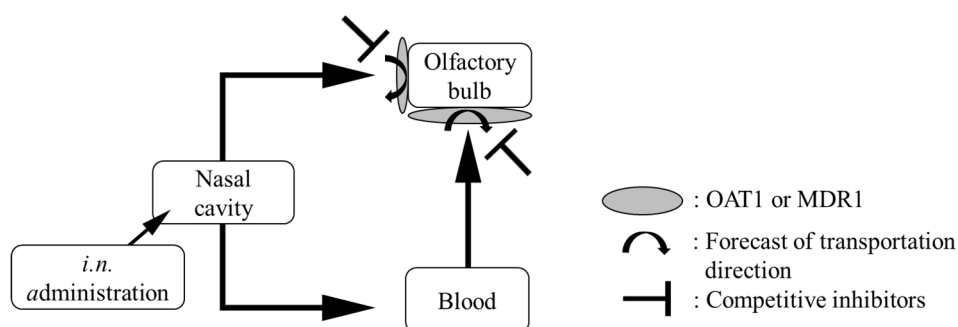


Fig. 22 Transfer of drugs to the olfactory bulb from the nasal cavity.

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

第1章 覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の体内動態と薬理効果

第1節 小緒言

前編までの結果から、静脈内投与と比較して経鼻投与された薬物は嗅球へ素早く効率的に移行することが示された。単純拡散により BBB を透過する薬物においては、嗅上皮においてもほぼ同様に脂溶性（分配係数）が増加することにより脳（嗅球）への移行が増加する傾向が示された。また、鼻腔内においても BBB と同様に有機アニオントランスポーターや P-糖タンパク質の発現が確認され、鼻腔から脳への移行が妨げられる薬物が存在することが示唆された。さらに基質になる薬物の投与濃度を増加させると脳（嗅球）への移行は頭打ちとなった。一方で、阻害剤を先行投与することでトランスポーターの機能が減弱または飽和し、脳（嗅球）への薬物の移行量が増大する可能性が示唆された。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。

また、前編までの検討においては、鼻腔からの薬物吸収のみを評価するために、食道側から先端が閉塞されたチューブを挿入することで鼻腔内を閉鎖して、投与された薬物の鼻腔から咽頭側への流出を抑制し、さらにラットを麻酔した状態を維持して評価した。しかしながら、臨床使用においては、鼻腔内を閉鎖せずに覚醒した状態で薬物が投与されており、薬物の体内動態はこれらの条件により影響を受けることが知られている⁴⁵⁾。そのため、鼻腔内を閉鎖せずに覚醒した状態のラットに薬物を経鼻投与し、体内動態及び薬理効果を検討する必要があると考えられた。

そこで第3編第1章では、単純拡散により鼻腔から脳へ直接移行すると考えられる薬物の1つである中枢性解熱鎮痛薬であり薬理効果測定が可能な薬物として 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。APAP の詳細な薬理学的メカニズムは不明であるが、視床下部の体温調節部位に作用することで解熱効果を示し、視床及び大脳皮質の疼痛閾値を変化させることによって鎮痛効果を示すと考えられている^{46, 47)}。覚醒下のラットに APAP を経鼻投与した後の血漿及び各脳部位中の APAP 濃度を測定

することで、鼻腔から血漿及び各脳部位への APAP の移行を評価した。また、経鼻投与後の薬理効果を評価することで、APAP の経鼻投与製剤の有用性を評価した。さらに APAP は古くから世界中で使用されてきた中枢性解熱鎮痛薬であり、小児から高齢者まで様々な条件の患者に広く使用されており、注射剤、経口製剤及び坐剤が臨床現場で用いられていることから、これらの投与ルートと経鼻投与を比較し検討した。そのため、各投与ルートから APAP を投与した後の嗅球、視床下部及び大脳皮質中 APAP 濃度を測定し、さらに解熱効果及び鎮痛効果を評価した。ビール酵母菌投与により発熱させたラットに APAP を投与して直腸温を測定することにより解熱効果を評価した。また、APAP 投与後、ラットの尾に熱刺激を与え、尾を揺らす、または振り上げるまでの反応時間を測定する Tail flick test を用いて鎮痛効果を評価した。

第2節 実験方法

3-1-2-1 試薬

Acetaminophen (APAP, M.W. 151.2) 及びジエチルエーテルを富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。Yeast Brewers (Lot: SLBC5519V) を Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。Isoflurane (イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」) をファイザー株式会社 (東京) から購入した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

3-1-2-2 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を使用した。

3-1-2-3 麻酔

イソフルラン (濃度: 1.5–5%, 流量: 1.5–2.0 L/min) 及びジエチルエーテルを吸入させることによりラットを麻酔した。なお、イソフルランを吸入させる際には、実験動物用イソフルラン麻酔装置 (SN-487, 株式会社シナノ製作所, 東京) を使用した。

3-1-2-4 APAP の投与

3-1-2-4 (1) 経鼻 (*i.n.*) 投与

ラットを吸入麻酔した後、頭部を 30° 傾斜させた状態で APAP (20 mg/mL) を先端に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左鼻腔入口から 15 mm のところに投与した (4 mg/kg)。投与直後に、接着剤で鼻孔を塞いだ。その後、頭部を 30° 傾斜させた状態を 5 分間維持した後に覚醒したラットをケージに戻した。

3-1-2-4 (2) 静脈内 (*i.v.*)、経口 (*p.o.*) 及び直腸 (*i.r.*) 投与

ラットを吸入麻酔した後、APAP (10 mg/mL) を尾静脈に、APAP (4 mg/mL) をディスポーザブル・フィーディングニードル (有限会社フチガミ器機, 京都) を用いて口腔から 80 mm または肛門から 15 mm のところにそれぞれ投与した (4 mg/kg)。その後、左側臥位の状態を 5 分間維持した後に覚醒したラットをケージに戻した。

3-1-2-5 APAP 投与後の血漿の採取

3-1-2-5 (1) 頸静脈簡易カテーテル挿入術

APAP を投与する前にラットに頸静脈簡易カテーテル挿入術を施した。注射針 (22 G) を切断し、針管と針基の間に長さ約 30 cm のシリコンチューブ (シラスコン® 医療用チューブ SH No. 00, 株式会社カネカメディックス, 大阪) を接続した。針管とチューブとの接続部から約 2.5 cm のところにポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 4, 株式会社三商, 東京) を巻き付けストッパーとし、カテーテルを作製した。ラットをイソフルラン (導入: 5.0%, 維持: 1.5–2.0%, 流量: 1.5–2.0 L/min) で吸入麻酔した後、左頸静脈を露出した。頸静脈の一部を切開し、ヘパリン生理食塩液 (10 単位/mL) で満たしたカテーテルチューブを頸静脈から心臓側に向け挿入した。ストッパーに縫合糸 (軟質絹製縫合糸, 夏目製作所, 東京) をかけ、頸静脈と共に縫合することでカテーテルを固定した。頸背部の表皮を切開後、皮下を通してカテーテルの反対側の末端を切開部から取り出し注射筒を接続した。頸静脈を露出させた切開部を縫合し、採血のためのルートとした。

3-1-2-5 (2) 血漿の採取

APAP 投与後、ヘパリンで前処理した注射筒を用いて、経時的 (投与後 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90 及び 120 分) に頸静脈カテーテルから血液 0.25 mL を採取した。採取した血液を直ちに遠心分離 (4°C, 20,400 g, 5 min) し、血漿 0.1 mL を得た。

3-1-2-6 APAP 投与後の各脳部位の採取

APAP 投与後所定の時間に、イソフルラン (濃度: 5%, 流量: 1.5–2.0 L/min) を吸入させることによりラットを麻酔し、ラットを心灌流にて屠殺した。その後、速やかに全脳を摘出し、PBS で洗浄後、APAP の作用部位を考慮して、嗅球 (I)、大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) を得た。各脳部位の重量を測定した後、APAP の脳内濃度の測定に使用した。定量するまで各脳部位を液体窒素で凍結し、–80°C で保存した。なお、脳の採取はラット 1 匹あたり 1 回のため、動態解析は母集団解析とした。

3-1-2-7 APAP の定量

3-1-2-7 (1) 血漿中 APAP 濃度の測定

3-1-2-5 (2) で得られた血漿中の APAP 濃度を 1-1-2-6 (1) と同様の方法で測定した。

3-1-2-7 (2) 各脳部位中 APAP 濃度の測定

3-1-2-6 で得られた各脳部位のうち、嗅球 (I) 及び視床下部 (III) に PBS 30 mL/g を、大脳皮質 (II) に PBS 10 mL/g を加えた。各脳部位中 APAP 濃度を 1-1-2-6 (2) と同様の方法で測定した。

3-1-2-8 APAP 投与後の薬理試験

3-1-2-8 (1) 解熱試験

麻酔薬による直腸温低下の影響を考慮し、解熱試験ではジエチルエーテルを吸入麻酔薬として用いた。なお、ジエチルエーテルをラットの吸入麻酔薬として使用した場合においても、APAP 投与後の体内動態に変化はないことを確認している。APAP による解熱効果をビール酵母誘発発熱試験を用いて試験した^{48,49)}。室内の温度を $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に制御して試験した。試験開始 17 時間前に、インターチェンジャブル・プローブ (バイオリサーチセンター株式会社, 名古屋) をラット直腸に挿入し、小型デジタル温度計 (バイオリサーチセンター株式会社, 名古屋) を用いて正常時直腸温を測定した。 4°C の室内で Yeast Brewers を乳鉢及び乳棒で粉碎後、25 w/v% となるように生理食塩液に懸濁させ、一時的にジエチルエーテルで吸入麻酔したラットの背部皮下に 10 mL/kg 投与した。投与してから 17 時間後に、上記と同様の方法でラットの直腸温が上昇していることを確認した。その後、再度一時的にラットをジエチルエーテルで吸入麻酔し、3-1-2-4 と同様の方法で各投与ルートから APAP を投与した。投与後、経時的 (10, 20, 30, 60, 90 及び 120 分) にラットの直腸温を上記と同様の方法で測定した。コントロールとして各投与ルートから PBS のみを投与した。

3-1-2-8 (2) 鎮痛試験

ラットをイソフルラン (導入: 5.0%, 維持: 1.5–2.0%, 流量: 1.5–2.0 L/min) で吸入麻酔し

た後、3-1-2-4 と同様の方法で APAP を投与した。鎮痛効果を Tail flick test を用いて試験した⁵⁰⁾。室内の温度を $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に、湿度を 40–70% に制御して試験した。ラットを円筒型ホルダー (KN-325-C, 夏目製作所, 東京) 内に入れ、尾が出るように固定した。ラットの尾の先から 1/3 (約 6 cm) の部を水浴 (サーマルロボ TR-1AR, アズワン株式会社, 大阪) 内の温水 ($50 \pm 0.5^\circ\text{C}$) に水面に対して垂直になるように浸け、尾を揺らす、または振り上げるまでの反応時間を経時的 (APAP 投与前及び投与後 10, 20, 30, 60, 90 及び 120 分) に測定した。コントロールとして各投与ルートから PBS のみを投与した。なお、熱による組織損傷を防ぐため熱刺激は 10 秒 (cut-off time) までとした。

3-1-2-9 薬物動態及び薬力学解析

3-1-2-9 (1) 血漿中 APAP 濃度推移

1-1-2-7 (1) と同様に、APAP の体内動態を 2-コンパートメントモデルで解析した。APAP の投与における $C_{\max, \text{plasma}}$ 及び $T_{\max, \text{plasma}}$ を血漿中 APAP 濃度プロファイルから算出した。台形公式により測定時間までの $\text{AUC}_{\text{plasma } 0-120}$ を台形公式より求め、バイオアベイラビリティ (F_{0-120}) を算出した。

3-1-2-9 (2) 各脳部位中 APAP 濃度推移

1-1-2-7 (2) と同様に、APAP 投与後の各脳部位中 APAP 濃度推移から $C_{\max, \text{brain}}$ 及び $T_{\max, \text{brain}}$ を求め、台形公式により測定時間までの $\text{AUC}_{\text{brain } 0-60}$ を求めた。

3-1-2-9 (3) 解熱効果

各時間における直腸温から正常時体温を引いた ΔT ($^\circ\text{C}$) を (7) 式より算出した。

$$\Delta T (^\circ\text{C}) = \text{Rectal temperature at each measurement point } (T_n) - \text{Normal temperature} \quad \dots (7)$$

また、解熱効果 (% Antipyretic effect) を (8) 式より算出した。

$$\% \text{ Antipyretic effect} = \frac{\text{投与直前の}\Delta T (^{\circ}\text{C}) - \text{投与後の}\Delta T (^{\circ}\text{C})}{\text{投与直前の}\Delta T (^{\circ}\text{C})} \times 100 \quad \dots (8)$$

得られた % Antipyretic effect-時間プロファイルから各投与経路における最大解熱効果 ($E_{\max, \text{antipyretic}}$) 及び最大解熱効果到達時間 ($T_{\max, \text{antipyretic}}$) を求め、解熱効果-時間曲線下面積 ($AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$) を台形公式より算出した。

3-1-2-9 (4) 鎮痛効果

鎮痛効果の薬理試験 (Tail flick test) より得られた反応時間から %MPE (percentage of maximum possible effect) を (9) 式より算出した。

$$\% \text{MPE} = \frac{\text{投与後の反応時間} - \text{投与前の反応時間}}{\text{cut-off 時間} - \text{投与前の反応時間}} \times 100 \quad \dots (9)$$

得られた %MPE-時間プロファイルから各投与経路における最大鎮痛効果 ($E_{\max, \text{analgesic}}$) 及び最大鎮痛効果到達時間 ($T_{\max, \text{analgesic}}$) を求め、鎮痛効果-時間曲線下面積 ($AUC_{\text{analgesic } 0-120}$) を台形公式より算出した。

3-1-2-10 統計解析

データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、両側 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

3-1-3-1 APAP 投与後の全身循環系への移行

Figure 23 に APAP の静脈内、経鼻、経口及び直腸投与後の血漿中濃度—時間曲線を、Table 23 に得られた血漿中動態パラメータを示す。経鼻投与後の血漿中 APAP 濃度推移は、静脈内投与後の血漿中濃度推移とほぼ同等であり、経鼻投与後の F_{0-120} は 86.3% と良好であった (Fig. 23 及び Table 23)。また、経口及び直腸投与後と比較し、経鼻投与後の $C_{\max, \text{plasma}}$ は有意に高く ($p < 0.05$)、 $T_{\max, \text{plasma}}$ も 5 分と素早かった (Table 23)。

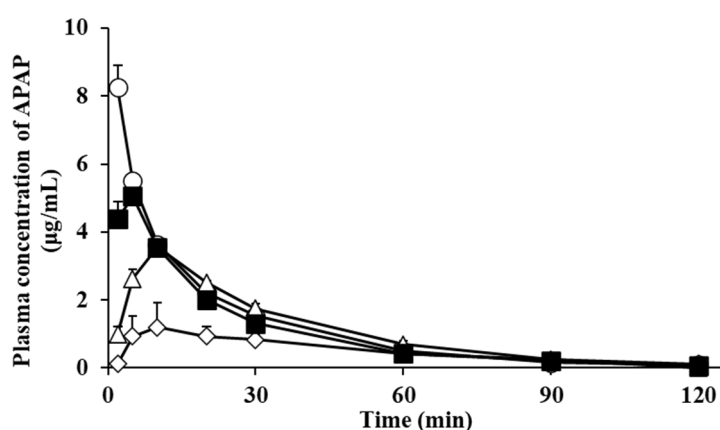


Fig. 23 Plasma APAP concentrations after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* and *i.n.* administration in awakening rats.

○: *i.v.*, ◇: *p.o.*, △: *i.r.*, ■: *i.n.*

Each data represents the mean ± S.E. (n=3-4).

Table 23 Pharmacokinetic parameters of APAP calculated from plasma data after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration in awakening rats.

Route	$C_{\max, \text{plasma}}$ (µg/mL)	$T_{\max, \text{plasma}}$ (min)	$AUC_{\text{plasma } 0-120}$ (µg·min/mL)	F_{0-120} (%)
<i>i.v.</i>	—	—	144 ± 2.45	—
<i>p.o.</i>	2.18 ± 0.624 ^b	16.7 ± 6.67	104 ± 8.00 ^a	72.3
<i>i.r.</i>	3.56 ± 0.166 ^b	10.0 ± 0.00	128 ± 4.97	88.7
<i>i.n.</i>	5.05 ± 0.421	5.00 ± 0.00	124 ± 7.06	86.3

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-4).

a: $p < 0.05$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

b: $p < 0.05$ compared with *i.n.* administration (Student's *t*-test).

3-1-3-2 APAP 投与後の各脳部位への移行

Figure 24 に APAP の静脈内、経鼻、経口及び直腸投与後の脳内濃度推移を、Table 24 に得られた脳内動態パラメータを示す。各脳部位における $T_{\max, \text{brain}}$ は経口投与後を除いて 10 分以内であった。静脈内投与後の APAP はほぼ一定の濃度で各脳部位に分布し、 $C_{\max, \text{brain}}$ は $1.59 \mu\text{g/g tissue}$ (I: 嗅球) から $2.13 \mu\text{g/g tissue}$ (II: 大脳皮質) の範囲であった (Fig. 24 及び Table 24)。また、 $AUC_{\text{brain } 0-60}$ は、 $74.9 \mu\text{g}\cdot\text{min/g tissue}$ (I: 嗅球) から $81.8 \mu\text{g}\cdot\text{min/g tissue}$ (II: 大脳皮質) の範囲であった。経鼻投与後の嗅球 (I) における $C_{\max, \text{brain}}$ は、静脈内投与と比較しておよそ 3 倍であり ($5.05 \mu\text{g/g tissue}$)、有意に高かった ($p < 0.01$)。加えて、鎮痛効果に関連する領域であると考えられる大脳皮質 (II) において、経鼻投与後の $C_{\max, \text{brain}}$ は、 $1.16 \mu\text{g/g tissue}$ であり、経口 ($0.255 \mu\text{g/g tissue}$) または直腸 ($0.745 \mu\text{g/g tissue}$) 投与と比較して有意に高かった (それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$)。また、解熱効果に関連する領域であると考えられる視床下部 (III) において、経鼻投与後の $C_{\max, \text{brain}}$ は、 $3.36 \mu\text{g/g tissue}$ であり、他の投与経路と比較して有意に高かった ($p < 0.01$, Table 24)。

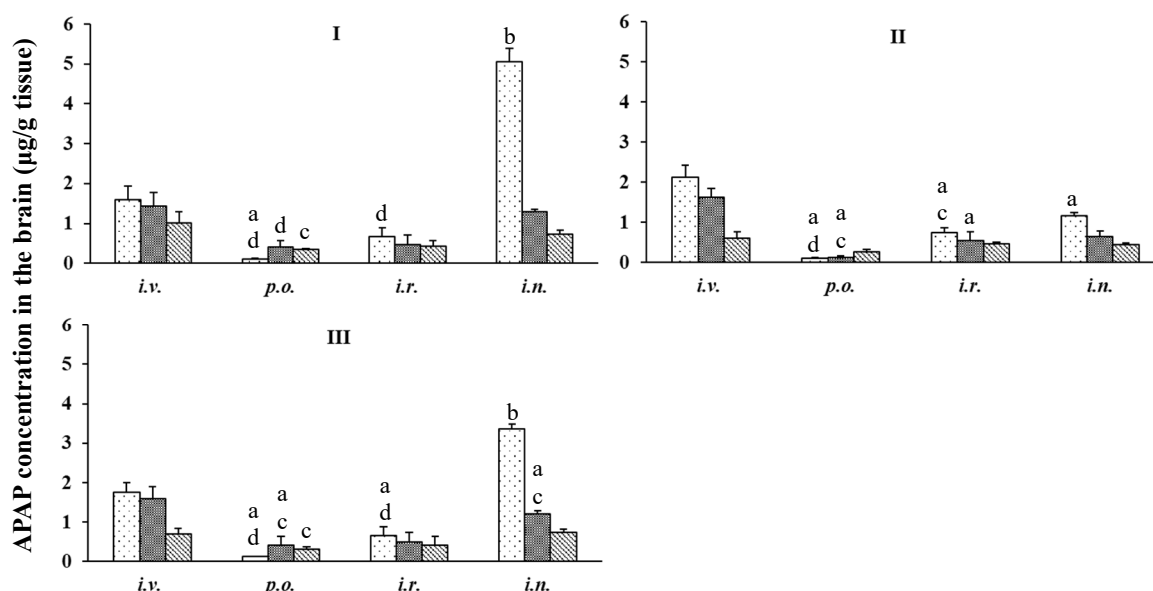


Fig. 24 APAP concentrations in the brain after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration in awakening rats. The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).

□: 10 min, ■: 30 min, ▨: 60 min

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

a : $p < 0.05$, b : $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

c : $p < 0.05$, d : $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration (Student's *t*-test).

Table 24 Pharmacokinetic parameters of APAP in the brain after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration in awakening rats.

Route	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain 0-60} (µg • min/g tissue)
<i>i.v.</i>	I	1.59 ± 0.344	< 10	74.9
	II	2.13 ± 0.295	< 10	81.8
	III	1.75 ± 0.243	< 10	76.6
<i>p.o.</i>	I	0.403 ± 0.173 ^{a, d}	30	16.8
	II	0.255 ± 0.0708 ^{b, d}	60	8.43
	III	0.420 ± 0.221 ^{a, d}	30	17.1
<i>i.r.</i>	I	0.669 ± 0.222 ^{a, d}	< 10	28.3
	II	0.745 ± 0.111 ^{a, c}	< 10	31.7
	III	0.662 ± 0.216 ^{a, d}	< 10	28.9
<i>i.n.</i>	I	5.05 ± 0.351	< 10	119
	II	1.16 ± 0.0790 ^a	< 10	40.1
	III	3.36 ± 0.121 ^b	< 10	91.7

The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).

Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-4).

a : $p < 0.05$, b : $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

c : $p < 0.05$, d : $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration (Student's *t*-test).

3-1-3-3 APAP 投与後の解熱効果

解熱試験では、イソフルランなどの吸入麻酔薬による体温の低下を考慮して、ジエチルエーテルを吸入麻酔薬として使用した。事前に吸入麻酔薬による APAP の体内動態に影響がないことを確認した。Figure 25 に Yeast Brewers の投与直前から APAP の静脈内、経鼻、経口及び直腸投与後の直腸温－時間曲線を、Figure 26 に各時間における直腸温から正常時の直腸温を引いた ΔT (°C)－時間曲線を、Figure 27 に %Antipyretic effect－時間曲線を、Table 25 に Figure 27 より算出した薬力学的パラメータを示す。いずれの投与経路においても正常時直腸温は同程度 (約 $36.4^{\circ}\text{C} \pm 0.03$) を示し、Yeast Brewers 投与 17 時間後の直腸温は正常時直腸温から 1°C 前後上昇した (Fig. 25)。APAP 経鼻投与後の $T_{\max, \text{antipyretic}}$ は 10 分以内であり、静脈内及び経口投与と比較して素早かった。また、APAP 経鼻投与後の $E_{\max, \text{antipyretic}}$ は 82.8% であり、経口 (29.6%) 及び直腸 (35.2%) 投与と比較して有意に高かった (それぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$)。さらに、APAP 経鼻投与後の $\text{AUC}_{\text{antipyretic } 0-120}$ は $1657\% \cdot \text{min}$ であり、経口 ($1163\% \cdot \text{min}$) 及び直腸 ($738.3\% \cdot \text{min}$) 投与と比較して高く、解熱効果は静脈内投与と同等もしくは、それ以上であった (Figs. 26, 27 及び Table 25)。APAP 経鼻投与後の視床下部中 APAP 濃度は経口、直腸及び静脈内投与よりも高く推移し、解熱効果においても経鼻投与の方が高い傾向を示した (Figs. 24, 27 及び Tables 24, 25)。

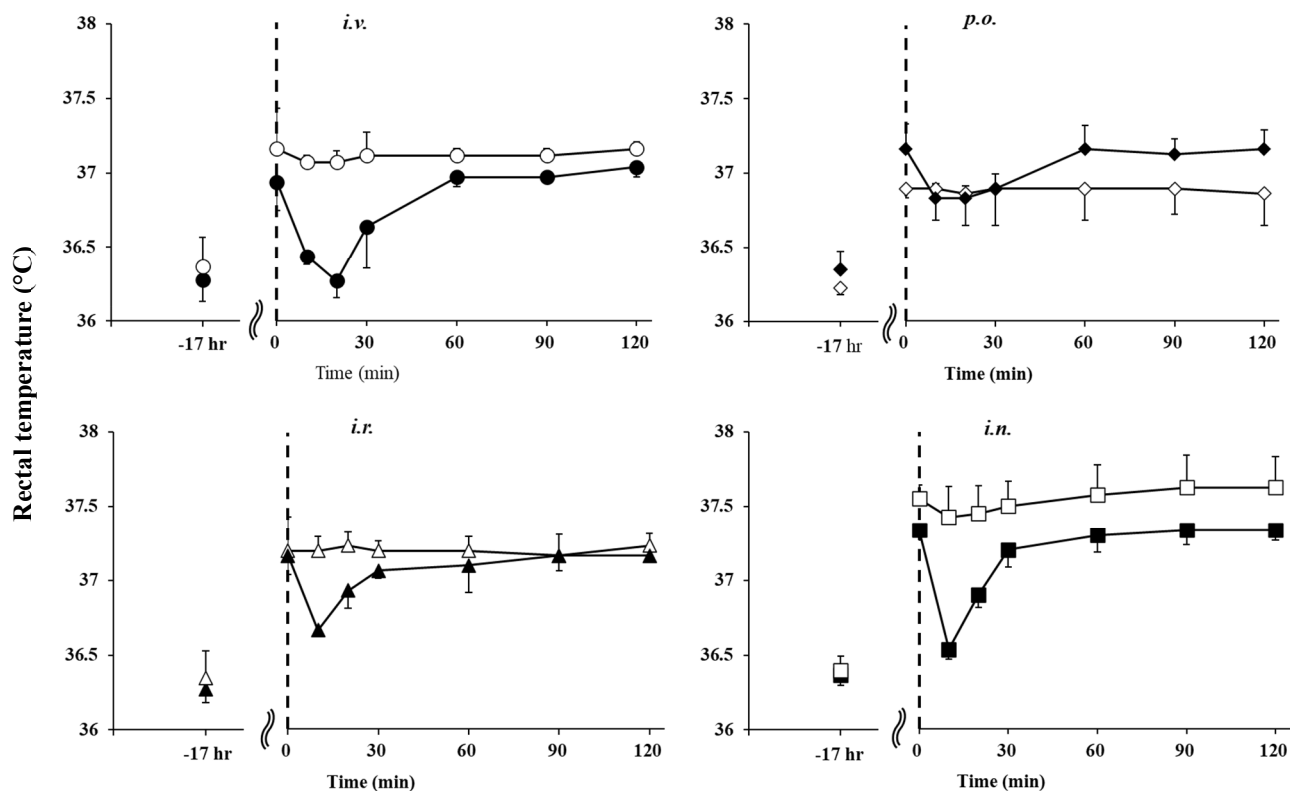


Fig. 25 Rectal temperature-time curves after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration of APAP in awakening rats.

Open symbol: control (PBS alone), Closed symbol: APAP.

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

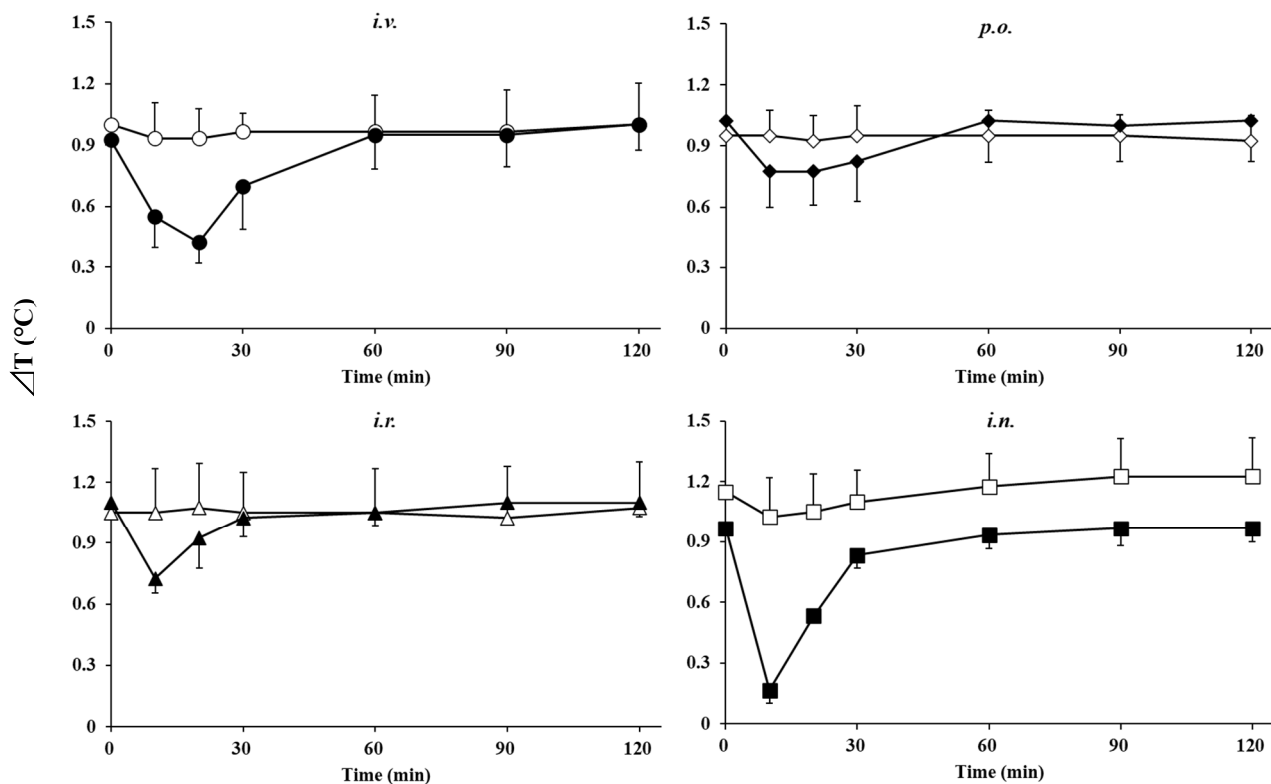


Fig. 26 ΔT (°C)-time curves after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration of APAP in awakening rats.

Open symbol: control (PBS alone), Closed symbol: APAP.

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

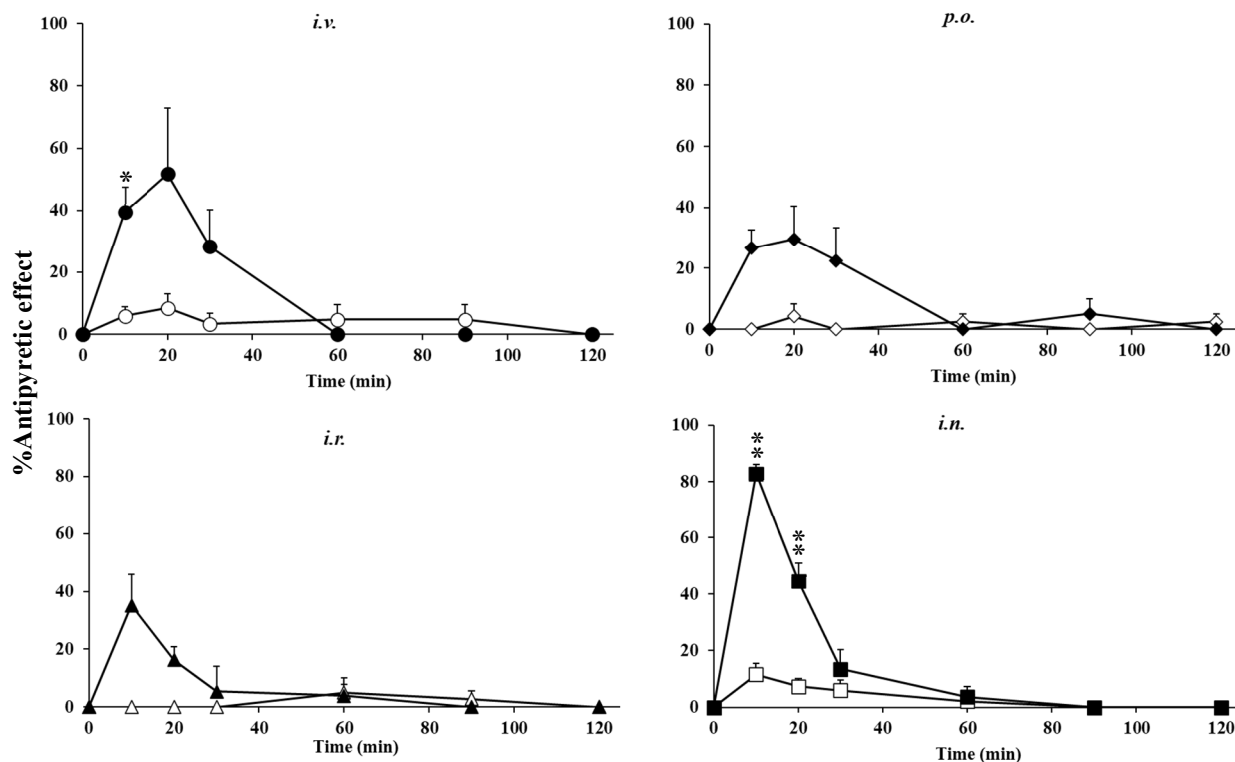


Fig. 27 Percentage antipyretic effect-time curves after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration of APAP in awakening rats.

Open symbol: control (PBS alone), Closed symbol: APAP.

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

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with administration of PBS alone (Student's *t*-test).

Table 25 Pharmacodynamic parameters of APAP after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration in awakening rats.

Route	Dosage solution	E_{\max} , antipyretic (%)	T_{\max} , antipyretic (min)	$AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$ (% \cdot min)
<i>i.v.</i>	PBS (control)	8.46 ± 4.51	20	496.0 ± 187.1
	APAP	51.7 ± 21.1	20	1479 ± 369.9
<i>p.o.</i>	PBS (control)	4.17 ± 4.17	20	154.2 ± 106.1
	APAP	29.6 ± 10.9^b	20	1163 ± 475.1
<i>i.r.</i>	PBS (control)	5.00 ± 5.00	60	233.3 ± 145.3
	APAP	35.2 ± 10.6^c	< 10	738.3 ± 199.4
<i>i.n.</i>	PBS (control)	11.7 ± 3.97	< 10	371.2 ± 108.1
	APAP	82.8 ± 3.25^a	< 10	1657 ± 320.9

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

a : $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

b : $p < 0.05$, c : $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration (Student's *t*-test).

3-1-3-4 APAP 投与後の鎮痛効果

Figure 28 に APAP の静脈内、経鼻、経口及び直腸投与後の反応時間-時間曲線を、Figure 29 に % Maximum possible effect-時間曲線を、Table 26 に得られた薬力学的パラメータを示す。いずれの投与経路においても、コントロール群 (PBS 投与群) の反応時間は実験開始から終了までほぼ一定の推移を示した (Fig. 28)。APAP 経鼻投与後の大脳皮質中 APAP 濃度は経口及び直腸投与よりも高く推移し、鎮痛効果においても経鼻投与後の $E_{max, analgesic}$ 及び $AUC_{analgesic\ 0-120}$ は、経口及び直腸投与よりも高い傾向を示した。一方で、静脈内投与 10 及び 30 分後の大脳皮質中 APAP 濃度は経鼻投与よりも有意に高い値を示したが、鎮痛効果は両投与間でほぼ同等の値であった。APAP 投与後の鎮痛効果は脳内濃度を反映するような傾向を認めたが、結果が完全に一致せず、APAP の代謝物が薬理効果に関与している可能性など何か他の要因が関係していると考えられた (Figs. 24, 29 及び Tables 24, 26)。

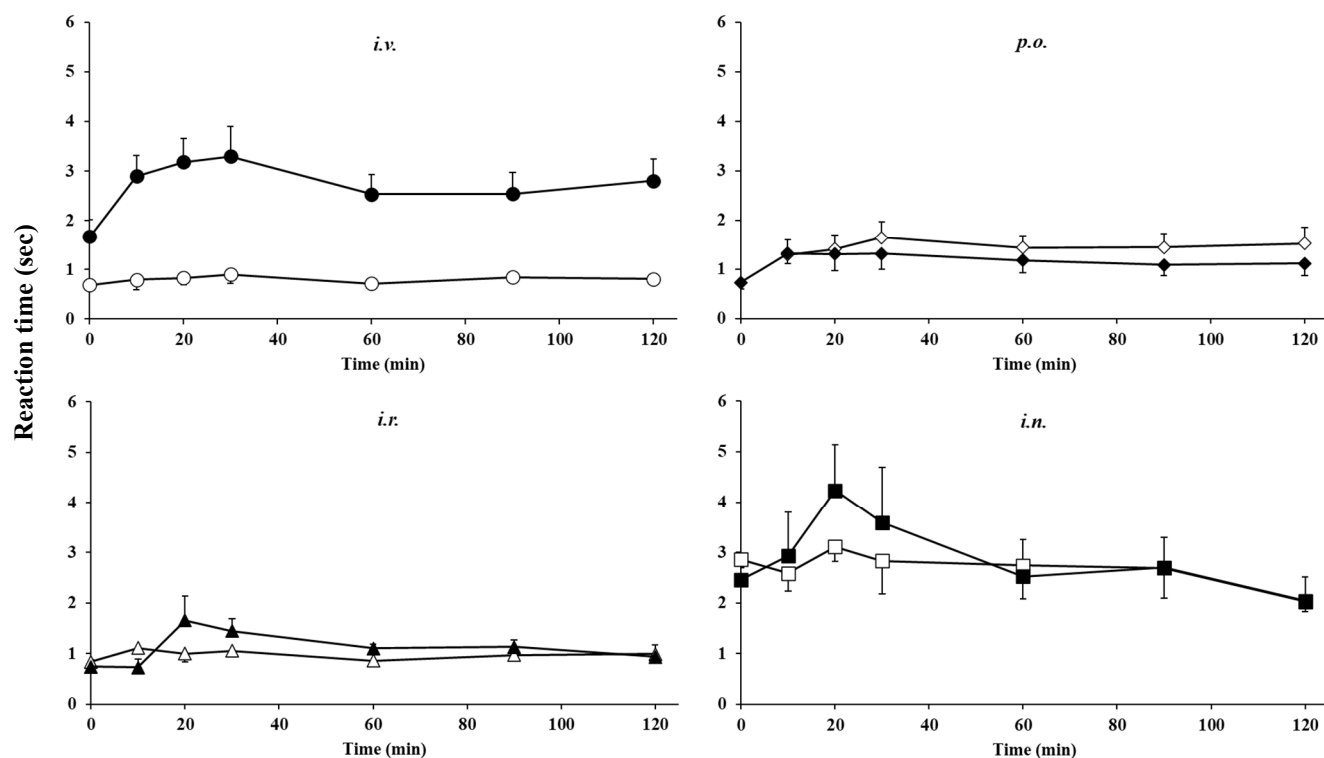


Fig. 28 Reaction time-time curves after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration of APAP in awakening rats. Open symbol: control (PBS alone), Closed symbol: APAP. Each data point represents the mean \pm S.E. (n=3-7).

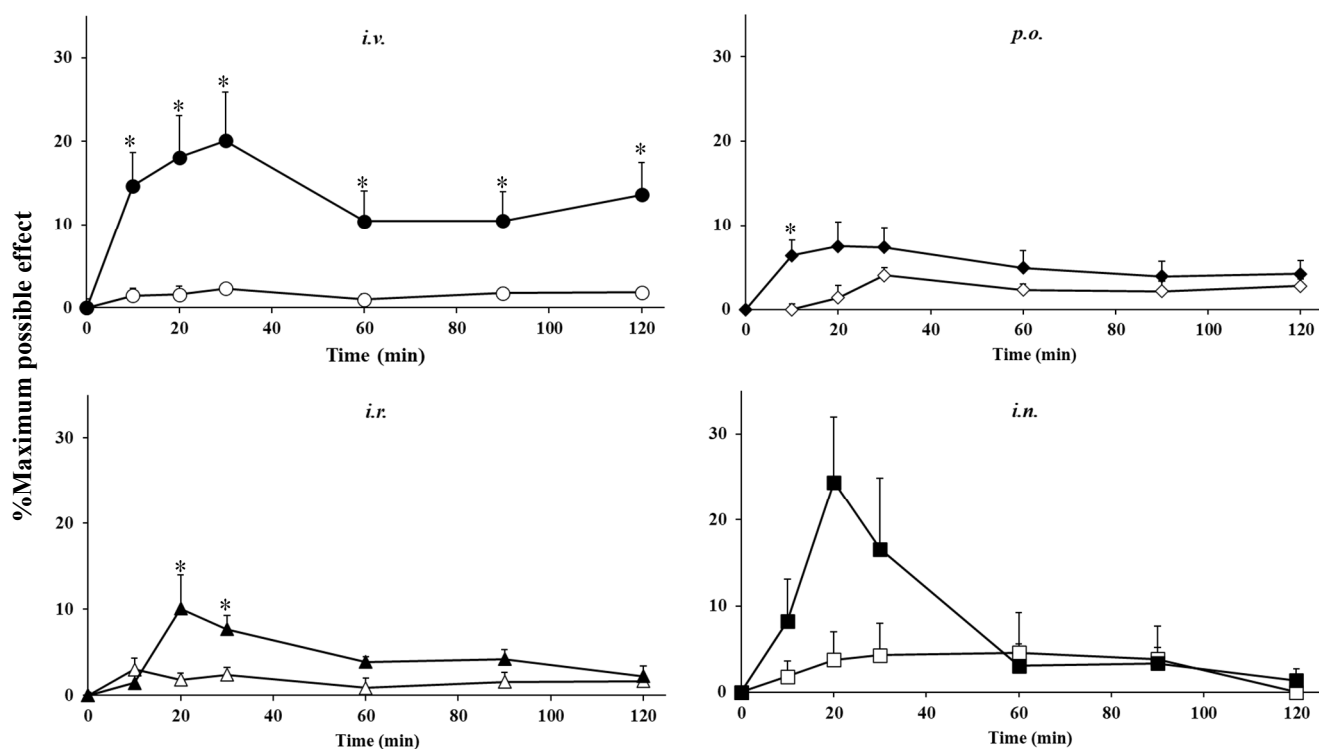


Fig. 29 Percentage analgesic effect-time curves after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration of APAP in awakening rats.

Open symbol: control (PBS alone), Closed symbol: APAP.

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

*: $p < 0.05$ compared with administration of PBS alone (Student's *t*-test).

Table 26 Pharmacodynamic parameters of APAP after *i.v.*, *p.o.*, *i.r.* or *i.n.* administration in awakening rats.

Route	Dosage solution	$E_{\max, \text{analgesic}}$ (%)	$T_{\max, \text{analgesic}}$ (min)	$AUC_{\text{analgesic } 0-120}$ (% \cdot min)
<i>i.v.</i>	PBS (control)	2.29 \pm 0.956	30	185.3 \pm 18.07
	APAP	20.1 \pm 5.77	30	1561 \pm 421.4
<i>p.o.</i>	PBS (control)	4.02 \pm 1.46	20	258.7 \pm 51.22
	APAP	7.46 \pm 2.92	20	612.6 \pm 166.7
<i>i.r.</i>	PBS (control)	3.00 \pm 0.321	< 10	192.2 \pm 71.76
	APAP	10.1 \pm 3.89	20	544.4 \pm 86.10
<i>i.n.</i>	PBS (control)	4.31 \pm 3.68	30	338.1 \pm 276.7
	APAP	24.4 \pm 7.59	20	870.0 \pm 325.2

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

第4節 考察

APAPの経鼻投与は、実際に臨床現場で用いられている経口及び直腸投与よりも素早くかつ高い血漿中濃度推移を示した (Fig. 23 及び Table 23)。また、バイオアベイラビリティは直腸投与と同等の値を示したにもかかわらず、脳への APAP の移行はほとんどすべての部位で経口及び直腸投与よりも有意に高い $C_{\max, \text{brain}}$ を示し ($p < 0.01$)、 $AUC_{\text{brain } 0-60}$ も特に嗅球 (I) で高値を示した (Fig. 24 及び Tables 23, 24)。嗅球 (I) 及び視床下部 (III) における $C_{\max, \text{brain}}$ は静脈内投与と比較しても、有意に高かった ($p < 0.01$) (Fig. 24 及び Table 24)。これらの結果から、覚醒下の条件においても経鼻投与後の APAP は嗅球へ素早く移行し、さらに嗅球以外の脳部位へも移行することが示唆された。

APAP の脳内濃度を反映するように、APAP 経鼻投与後の薬理効果は経口及び直腸投与よりも高値を示し、静脈内投与と同等かそれ以上の値を示した。ビール酵母誘発発熱ラットを用いた解熱試験において、経鼻投与後の APAP の解熱効果は $T_{\max, \text{antipyretic}}$ が 10 分以内と素早く、 $E_{\max, \text{antipyretic}}$ も経口及び直腸投与よりも有意に高く (それぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$)、静脈内投与と同程度であった。その結果、経鼻投与後の $AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$ は、経口及び直腸投与よりも高く、静脈内投与と同程度またはそれ以上の解熱効果を示した (Figs. 25–27 及び Table 25)。Tail flick test を用いた鎮痛試験においても、いずれの投与ルートでも鎮痛効果は低値を示したが、臨床で使用されている経口及び直腸投与よりも経鼻投与後の APAP の鎮痛効果の方が高く、静脈内投与と同等の $E_{\max, \text{analgesic}}$ を示した (Figs. 28, 29 及び Table 26)。以上の結果から、経鼻投与は BBB を介した脳移行に加え APAP を鼻腔から脳へ直接的に移行させることで、経口または直腸投与と比較して嗅球、さらにはその他の脳部位にも効率的に APAP を素早く送達することができ、静脈内投与よりも高い薬理効果を示したと考えられた。

しかし、経鼻投与における APAP の脳内濃度推移は、投与直後と比較してそれ以降では顕著な低下が認められた (Fig. 24)。経鼻投与後の薬理効果においても、投与後 60 分にはコントロール (PBS 投与群) と同等な薬理効果レベルまで低下し、効果が持続しなかった (Figs. 27, 29)。この要因として、鼻腔内酵素による薬物の分解や、鼻腔内の絨毛上皮によ

る mucociliary clearance 並びに鼻腔構造に伴う物理的なクリアランスによって、鼻腔内の吸収部位からの除去等が考えられる。従って、脳内における薬理作用発現部位への APAP の持続的な送達とそれに伴う薬理効果の持続を可能にするためには、粘膜付着性物質等の利用が有用と考えられる。そこで本研究では経鼻投与後の薬物の鼻腔から脳への直接移行に関与していると考えられる嗅上皮領域に薬物を長時間滞留させるために粘膜付着性物質を利用し、さらにこの領域からの APAP の吸収を増大させるために吸収促進剤を利用した。第 3 編第 2 章では、粘膜付着性物質及び吸収促進剤を用いた APAP の経鼻投与製剤を構築するために、投与溶液の物理化学的性質（粘度及び滞留性）に対する各添加剤の影響を評価するとともに、各脳部位への APAP の移行に対する各添加剤の影響について論述する。

第2章 APAP 経鼻投与後の脳移行に対する添加剤の影響

第1節 小緒言

鼻腔内に投与された薬物は、鼻粘膜の繊毛上皮による mucociliary clearance 並びに鼻腔構造に伴う物理的なクリアランスによって鼻腔から急速に除去される^{13, 51)}。従って、嗅上皮領域における薬物の保持時間を延長し、薬物の脳への直接的な輸送を増強させるプロセスが必要であると考えられた。

近年、経鼻投与された薬物の全身循環系や脳への吸収改善を目的として、chitosan や tat peptide 等を吸収促進剤として用いた研究が行われている^{18, 52, 53)}。これらの吸収促進剤は、カチオン性化合物であり、細胞膜とのイオン性相互作用を介して鼻腔内の細胞間隙を開口させ、鼻粘膜からの薬物の吸収を促進することが示唆されている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。また、経鼻投与された薬物の鼻粘膜吸収部位での滞留性を改善させる目的で、starch や polyethylene glycol 等を粘膜付着物質として用いた研究も報告されている^{57, 58)}。これらの粘膜付着性物質は、投与溶液の粘度を増加させることにより、鼻腔内での粘性を向上させることが知られている。本研究においてもこれらの添加剤を用いることによって、鼻粘膜における薬物の滞留性改善や、脳への薬物の移行量の増大が期待できると考えられた。

そこで本研究では、嗅上皮領域における薬液の滞留時間の延長と鼻粘膜からの吸収促進を期待して polyvinylpyrrolidone (PVP) 及び poly-L-arginine (PLA) を用いて検討を行った。PVP は、N-ビニル-2-ピロリドンが重合した高分子化合物であり、化粧品や医薬品の賦形剤や結合剤などの添加物としても広く用いられており、経口投与された PVP は消化管からほとんど吸収されることなく、通常用いられる用量での遺伝毒性や急性毒性の懸念が少ないと考えられている⁵⁹⁾。また、PLA は塩基性アミノ酸の L-arginine のポリマーで、カチオン性化合物である。PLA の詳細な作用機序は十分には解明されていないが、上記の chitosan や tat peptide 等と同様に、細胞膜表面上で何らかのイオン性相互作用を引き起こすことでタイトジャンクション関連タンパク質を細胞間隙から細胞内へ内在化させることにより、タイトジャンクションを一過性に開口させると考えられており、薬物の粘膜吸収を時間依存的且つ可逆的に増大させることが報告されている^{37, 60-63)}。さらに PLA は、鼻粘膜に損傷を与

えることなく、薬物の膜透過促進作用を示すことが明らかとなっている^{64, 65)}。しかしながら、PLAによる鼻粘膜透過促進効果が全身循環系への薬物の吸収促進に寄与することは明らかであるが、脳への吸収促進に対する効果は明らかではない。一方、タイトジャンクション関連タンパク質（ZO-1 及び occludin）の発現は、経鼻投与された薬物を全身循環系へ移行させるための主な吸収部位である呼吸上皮領域のみならず、脳へ薬物を直接的に移行させるための主な吸収部位である嗅上皮領域においても観察されている^{66, 67)}。従って、PLAが嗅上皮領域におけるタイトジャンクションを開口させることにより、APAPの脳への直接移行を促進することが期待できる。そこで第3編第2章では、PVP及びPLAの脳への薬物吸収促進効果を検討することで、脳への薬物送達を目的とした経鼻投与製剤の構築に有用であるかどうかについて検討した。

第2節 実験方法

3-2-2-1 試薬

Polyvinylpyrrolidone K25 (PVP, M.W. 35 kDa) を富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。Poly-L-arginine (PLA, M.W. 44.3 kDa) 及び urethane を Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。その他の試薬は 3-1-2-1 と同様の試薬を用いた。

3-2-2-2 PLA 及び PVP 含有 APAP の調製

PLA を APAP に溶解させ、それぞれ 0.5 または 1.0 w/v% PLA 含有 APAP を調製した。また、PVP を APAP に溶解させ、それぞれ 2.5、5.0 または 10 w/v% PVP 含有 APAP を調製した。さらに、5.0 w/v% PVP 含有 APAP に PLA を溶解させ、0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP 含有 APAP を調製した。

3-2-2-3 投与溶液の粘度の測定

付属のローターを装着 (0.8°×R24, 3°×R14) したコーンプレート型回転粘度計 (RE-215L, TOKISANGYOU) に APAP、2.5 及び 5.0 w/v% PVP 含有 APAP、0.5 及び 1.0 w/v% PLA 含有 APAP を 0.6 mL、10 w/v% PVP 含有 APAP を 1.1 mL それぞれ注入し、回転数を連続的に変化させて (0→100→0 rpm, 20 min, 34°C) 流動曲線を得た。得られた流動曲線の回帰直線から溶液の粘度を算出した。

3-2-2-4 投与溶液の滞留性の評価

各投与溶液の滞留性は、以前に報告された傾斜板試験に改良を加えて評価した⁵⁸⁾。ステンレススチール板 (stainless steel plate, SSP) をメタノールで洗浄し、乾燥後、プレートを 30° に傾けた。3-2-2-2 で調製した各投与溶液 (50 µL) をプレートに滴下し、5 cm 移動するのにかかる時間を測定した。

3-2-2-5 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を用いた。

3-2-2-6 麻酔

ラットを覚醒させた状態での実験ではイソフルラン（導入: 5.0%, 維持: 1.5–2.0%, 流量: 1.5–2.0 L/min）の吸入により、麻酔させた状態での実験ではウレタン（25 w/v%, 1.0 g/kg）の腹腔内投与により麻酔した。

3-2-2-7 経鼻 (*i.n.*) 投与

3-2-2-6 のようにラットに麻酔した後、頭部を 30° 傾斜させた状態で調製した PVP または PLA 含有 APAP（20 mg/mL, 4 mg/kg）を 3-1-2-4 (1) と同様の方法で経鼻投与した。覚醒させた状態での実験では APAP 投与後、頭部を 30° 傾斜させた状態を 5 分間維持した後に覚醒したラットをケージに戻した。また、麻酔させた状態での実験では実験終了までの間、頭部を 30° 傾斜させた状態を維持した。

3-2-2-8 覚醒下ラットにおける PVP 含有 APAP 経鼻投与後の各脳部位の採取

イソフルランの吸入によりラットに麻酔した後、3-1-2-4 (1) と同様に、頭部を 30° 傾斜させた状態で調製した PVP 含有 APAP を経鼻投与し、投与後 5 分間、その状態を維持して覚醒したラットをケージに戻した。投与後、所定の時間に 3-1-2-6 と同様に、ラットを灌流にて屠殺した。その後、速やかに全脳を摘出し、嗅球 (I)、大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) を得た。

3-2-2-9 麻酔下ラットにおける PLA 含有 APAP 経鼻投与後の各脳部位の採取

ウレタンの腹腔内投与によりラットに麻酔した後、1-1-2-3 (2) と同様に外科的処置を施し、頭部を 30° 傾斜させた。施術 60 分後に調製した PLA 含有 APAP を経鼻投与した。投与 10 分後に 3-1-2-6 と同様に、ラットを灌流にて屠殺した。その後、速やかに全脳を摘出し、嗅球 (I)、大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) を得た。

3-2-2-10 APAP の定量

各脳部位中 APAP 濃度の測定は、3-1-2-7 (2) と同様の方法で行った。

3-2-2-11 薬物動態解析

3-1-2-9 (2) と同様に APAP 投与後の各脳部位中 APAP 濃度推移から $C_{\max, \text{brain}}$ 及び $T_{\max, \text{brain}}$ を求め、 $AUC_{\text{brain } 0-60}$ を台形公式より算出した。

3-2-2-12 統計解析

データを平均値 ± 標準偏差 (standard deviation, S.D.) または、平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。二群間の比較には Student's *t*-test を用いて解析し、各投与溶液の粘度と滞留時間との相関性は、Pearson の検定を用いて解析した。全ての検定において、両側 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

3-2-3-1 投与溶液の粘度及び滞留性

Figure 30 に各投与溶液の流動曲線を、Figure 31 に各投与溶液の粘度と SSP 上での滞留時間との関係を、Table 27 に各投与溶液の粘度及び滞留時間を示す。いずれの溶液においても、ずり速度に対してずり応力はほぼ直線的に増大し、流動曲線の回帰直線より降伏値はほとんど認められず、見かけ上ニュートン流動に近い流動を示した (Fig. 30)。APAP に 0.5 及び 0.1 w/v% PLA を添加しても粘度に相違は認められなかったが、PVP の添加濃度を増加させることで顕著に投与溶液の粘度の上昇が認められた。また、0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP の添加により、5.0 w/v% PVP のみの添加よりもわずかに粘度が上昇した (Fig. 30 及び Table 27)。APAP に 0.5 w/v% PLA を添加しても、粘度の結果と同様に APAP のみの滞留時間と相違は認められなかったが、1.0 w/v% PLA を添加すると有意な滞留時間の延長が認められた ($p < 0.01$)。さらに PVP を添加することで有意な滞留時間の延長が認められ ($p < 0.05$)、滞留時間の延長は PVP の濃度に依存しており、10 w/v% PVP の添加で最も長い滞留時間を示した。また、0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP の添加により、5.0 w/v% PVP のみの添加と比較してわずかに滞留時間が延長した (Table 27)。投与溶液の滞留時間は粘度に比例して増加する傾向が認められ、粘度と滞留時間との間に有意な相関関係が認められた ($p < 0.01$, Fig. 30)。

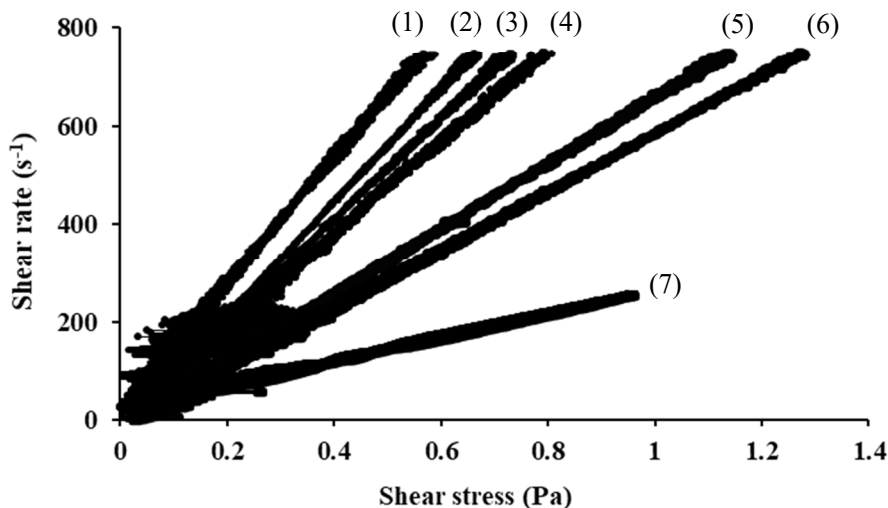


Fig. 30 Rheogram of various solutions.
 (1) APAP, (2) with 0.5% PLA, (3) with 1.0% PLA, (4) with 2.5% PVP,
 (5) with 5.0% PVP, (6) with 0.5% PLA and 5.0% PVP, (7) with 10% PVP.

Table 27 Viscosity and retention time of various solutions.

Dosage solution	Viscosity (mPa·s)	Retention time (sec)
APAP	0.771	0.990 ± 0.270
with 0.5% PLA	0.857	1.10 ± 0.415
with 1.0% PLA	0.962	1.88 ± 0.101**
with 2.5% PVP	0.980	1.89 ± 0.271**
with 5.0% PVP	1.49	3.08 ± 0.687**
with 0.5% PLA and 5.0% PVP	1.64	4.50 ± 1.30*
with 10% PVP	3.42	5.71 ± 0.960**

Each data represents the mean or mean ± S.D. (n=3-4).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with APAP alone (Student's t -test).

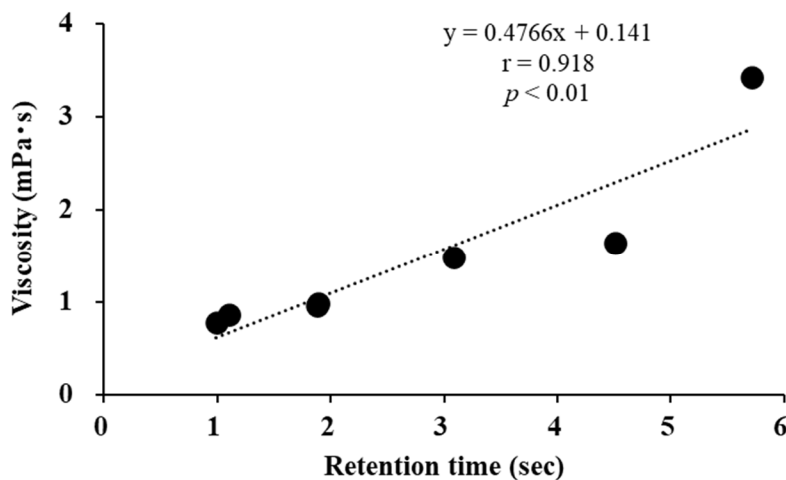


Fig. 31 Relationship between retention time and viscosity of various solutions.
 $p < 0.01$ (Pearson-test).

3-2-3-2 覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の脳移行性に対する PVP の影響

APAP 経鼻投与後の脳移行性に対する粘膜付着性物質 PVP の影響を評価するため、粘膜付着・滞留効果の評価に適したラットを覚醒させた状態で検討した。Figure 32 に覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の脳内濃度推移を、Table 28 に得られた脳内動態パラメータを示す。コントロールである APAP と比較して 2.5 w/v% PVP 添加群では、経鼻投与後 30 分における嗅球 (I) 中 APAP 濃度が有意に増大した ($p < 0.05$)。また、5.0 w/v% PVP 添加群では投与後 10 分における脳内 APAP 濃度の増大は認められなかったが、嗅球 (I) 及び視床下部 (III) における APAP 濃度推移及び $AUC_{\text{brain } 0-60}$ が APAP のみの経鼻投与と比較して顕著に増大した。さらに、2.5 w/v% PVP 添加群よりもわずかに嗅球 (I) 及び視床下部 (III) における APAP 濃度が増加する傾向にあった。しかしながら、10 w/v% PVP 添加群では 5.0 w/v% PVP 添加群とほぼ同様の脳内 APAP 濃度推移を示した (Fig. 32 及び Table 28)。10 w/v% PVP 溶液の粘度は 3.42 mPa·s であり、検討した投与溶液の中で粘度が最も高く、SSP 上での滞留性も最も高かったが、脳移行性は 5.0 w/v% PVP 添加群と同等であり、粘度増大によるさらなる効果の増大は期待できなかった (Figs. 30–32 及び Tables 27, 28)。

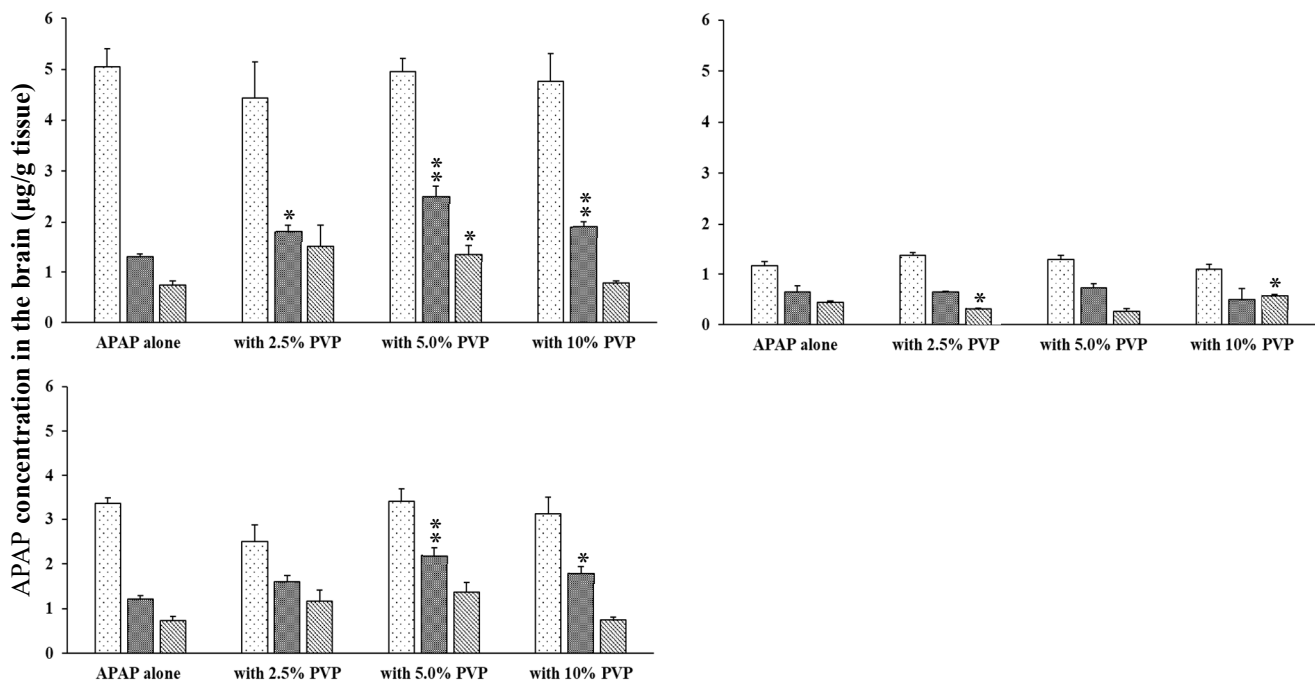


Fig. 32 APAP concentrations in the brain after *i.n.* administration with PVP in awakening rats.
 The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).
 □ : 10 min, ■ : 30 min, ▨ : 60 min
 Each data column represents the mean ± S.E. (n=3-6).
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

Table 28 Pharmacokinetic parameters of APAP in the brain after *i.n.* administration with PVP in awakening rats.

Additive agent	Brain region	$C_{\max, \text{brain}}$ ($\mu\text{g/g}$ tissue)	$T_{\max, \text{brain}}$ (min)	$AUC_{\text{brain } 0-60}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min/g}$ tissue)
—	I	5.05 ± 0.351	< 10	119
	II	1.16 ± 0.0790	< 10	40.1
	III	3.36 ± 0.121	< 10	91.7
2.5% PVP	I	4.44 ± 0.706	< 10	134
	II	1.37 ± 0.0502	< 10	41.7
	III	2.49 ± 0.382	< 10	95
5.0% PVP	I	4.96 ± 0.254	< 10	157
	II	1.28 ± 0.0807	< 10	41.4
	III	3.40 ± 0.289	< 10	126
10% PVP	I	4.77 ± 0.534	< 10	127
	II	1.10 ± 0.0868	< 10	40.5
	III	3.12 ± 0.367	< 10	103

The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).
 Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-6).

3-2-3-3 麻酔下ラットにおける APAP 経鼻投与後の脳移行性に対する PLA の影響

APAP 経鼻投与後の脳移行性に対する吸収促進剤 PLA の影響を評価するため、吸収促進効果の評価に適したラットを麻酔し鼻腔内を閉鎖した状態で検討した。Figure 33 に麻酔下ラットにおける APAP 経鼻投与 10 分後の脳内濃度を示す。APAP のみの投与と比較して、0.5 w/v% PLA 添加群では大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) における APAP 濃度が有意に増加し ($p < 0.05$)、嗅球 (I) においても増加傾向にあった。また、1.0 w/v% PLA 添加群においても、大脳皮質 (II) における APAP 濃度が有意に増加し ($p < 0.01$)、嗅球 (I) 及び視床下部 (III) においても増加傾向を示した。0.5 w/v% PLA 添加群と 1.0 w/v% PLA 添加群との間に、APAP の脳移行性に有意な差が認められなかったことから、これ以降の実験では 0.5 w/v% PLA を用いることとした (Fig. 33)。

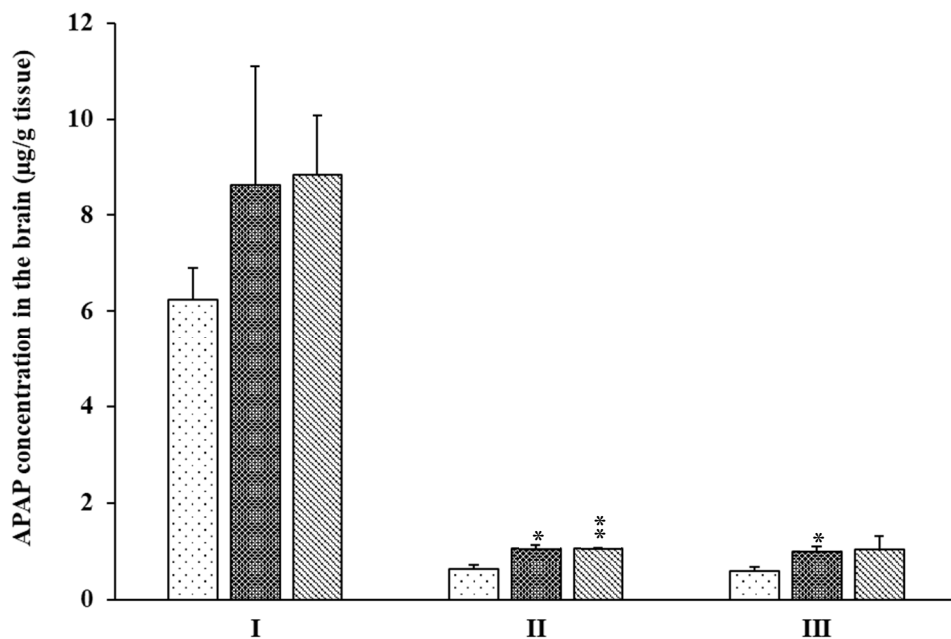


Fig. 33 APAP concentrations in the brain 10 minutes after *i.n.* administration with PLA in anesthetized rats.

The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).

□ : APAP alone, ■ : with 0.5% PLA, ▨ : with 1.0% PLA

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

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

第4節 考察

鼻腔内に投与された薬物は、鼻粘膜の繊毛運動による mucociliary clearance や鼻腔構造に伴う物理的クリアランスによって鼻腔から急速に除去されることから、これらのクリアランスは薬物の吸収に大きく影響すると考えられる。APAP のみの単回投与では素早い脳移行及び薬理効果の発現が期待できると考えられたが、その効果は投与直後のみであり、さらなる効果の増大や作用時間を延長させるためには、これらの障壁を克服する必要があると考えられた。

そこで本章では、嗅上皮領域における薬液の滞留時間の延長と薬物の脳への直接移行を増大させるために、APAP の経鼻投与において、粘膜付着性物質として PVP を、吸収促進剤として PLA を用いて、APAP の滞留性及び脳移行性への影響について評価した。本研究で用いる PVP 及び PLA 濃度を決定するために、APAP の滞留性及び脳移行性に対するこれら添加剤濃度の影響について検討した。PVP の濃度が増加するに従い、投与溶液の粘度及び滞留時間は増加する傾向にあり、2.5 w/v% PVP 添加群と比較して 5.0 w/v% PVP 添加群では嗅球 (I) 及び視床下部 (III) における $AUC_{\text{brain } 0-60}$ が増大する傾向にあった。しかしながら、5.0 w/v% PVP 添加群と 10 w/v% PVP 添加群との間に差が認められなかった (Fig. 32 及び Table 28)。以前に報告された Irie らの starch による鼻粘膜付着・滞留性を検討した研究では、starch の濃度が増加するに従い、投与溶液の粘度が増加し鼻腔内における滞留性も増加したが、粘度が増加することにより鼻粘膜と投与溶液との接触表面積が減少し、薬物の吸収が低下したことを報告している⁵⁷⁾。そのため、本研究結果においても、10 w/v% PVP を添加すると粘度が上昇したことにより鼻粘膜への投与溶液の滞留性が向上したが、鼻粘膜への接触表面積が低下することにより脳への APAP の移行が制限された可能性がある。すなわち、吸収を促進させるためには、単に投与溶液の粘度を上昇させるだけでなく、投与溶液と粘膜の接触表面積を考慮することが重要であると考えられた。そのため、これ以降の実験では、5.0 w/v% PVP を用いることとした。

一方、PLA については PLA の濃度が増加しても、投与溶液の粘度は APAP のみの溶液とほぼ同等であり、0.5 w/v% PLA 添加群における滞留性も APAP のみの溶液と同程度であっ

た。しかし、麻酔下ラットにおける PLA 含有 APAP の経鼻投与では、投与後 10 分の脳内 APAP 濃度がほとんどの脳部位で APAP のみの投与と比較して増加傾向にあった (Fig. 33)。PLA が鼻腔から脳への薬物吸収を促進するという報告はこれまでにないが、PLA を併用した APAP の経鼻投与は、PLA が嗅上皮に存在するタイトジャンクション関連タンパク質の局在を細胞間隙部から細胞内へ変化させることで、細胞間隙経路が開口し、APAP の脳への移行を増大させると考えられる。しかし、PLA の吸収促進効果が鼻腔内に投与された APAP の嗅上皮から脳への移行を直接的に増大させるのか、または APAP の呼吸上皮から全身循環系への移行を増大させることで、全身循環系から BBB を介した脳への移行を間接的に増大させるのかは不明である。そのため、PLA を併用して APAP を経鼻投与した後の APAP の全身循環系への移行についても評価する必要があると考えられた。本章において検討した 0.5 w/v% PLA 添加群と 1.0 w/v% PLA 添加群との間には、APAP の脳移行に関して差が認められなかったことから、これ以降の実験では 0.5 w/v% PLA を用いることとした。

本章では、添加剤を併用した投与溶液の粘度、滞留性及び添加剤併用後の脳内 APAP 濃度を検討することで、粘膜付着性物質として用いた PVP の鼻粘膜滞留性の改善効果や、吸収促進剤として用いた PLA の鼻粘膜吸収促進効果を確認し、脳への薬物送達を目的とした経鼻投与製剤の構築にこれらの添加剤が有用である可能性が示唆された。そこで第 3 編第 3 章では、覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の体内動態及び薬理効果に対する添加剤の影響について論述する。

第 3 章 覚醒下ラットにおける APAP 経鼻投与後の体内動態及び薬理効果に対する 添加剤の影響

第 1 節 小緒言

第 2 章では、PVP により成し遂げられる鼻粘膜滞留性の改善効果や、PLA による鼻粘膜吸収促進効果が脳への APAP 送達にどのような影響を与えるかを検討した。PVP の添加は、鼻腔内の滞留性が増加することで APAP の $AUC_{\text{brain}0-60}$ を増加させたが、 $C_{\text{max, brain}}$ は APAP のみの投与とほぼ同等であった (Tables 27, 28)。また、PLA 添加の影響について麻酔下のラットを用いて脳移行性を評価したが、PLA 溶液の粘度は APAP のみの溶液の粘度とほとんど変わらなかったことから (Table 27)、粘性がなく鼻粘膜に対する付着・滞留性が低いため、APAP のみの投与群と同様に鼻腔内の除去機構により咽頭側へ排除され、薬理効果が持続しないことが予想される。5.0 w/v% PVP 及び 0.5 w/v% PLA を併用した投与溶液では、5.0 w/v% PVP 添加群と比較して粘度及び滞留性がわずかに増大していることから (Table 27)、除去機構の影響を回避でき、さらに PLA を併用していることにより、脳内 APAP 濃度を増加させることも期待され、両添加物を組み合わせることで有用性が高まる可能性がある。そこで本章では、第 2 章で決定した 5.0 w/v% PVP または 0.5 w/v% PLA 及びその両方を併用した APAP を覚醒下のラットに経鼻投与した後の血漿及び脳内 APAP 濃度、並びに薬理効果を検討することにより、薬物の脳送達のための経鼻投与製剤開発に有用かどうかを評価した。

第2節 実験方法

3-3-2-1 試薬

3-1-2-1 及び 3-2-2-1 と同様の試薬を用いた。

3-3-2-2 PLA 及び PVP 含有 APAP の調製

3-2-2-2 と同様に、APAP、0.5 w/v% PLA 含有 APAP、5.0 w/v% PVP 含有 APAP 及び、0.5 w/v% PLA, 5.0 w/v% PVP 含有 APAP を調製した。

3-3-2-3 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を用いた。

3-3-2-4 麻酔

3-1-2-3 と同様の方法でラットを麻酔した。

3-3-2-5 経鼻 (*i.n.*) 投与

3-1-2-4 (1) と同様にラットの頭部を 30° 傾斜させた状態で調製した APAP、0.5 w/v% PLA 含有 APAP、5.0 w/v% PVP 含有 APAP または 0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP 含有 APAP (20 mg/mL, 4 mg/kg) を経鼻投与した。その後、頭部を 30° 傾斜させた状態を 5 分間維持した後、に覚醒したラットをケージに戻した。

3-3-2-6 APAP 投与後の血漿及び各脳部位の採取

APAP 投与後、3-1-2-5 と同様に左頸静脈に挿入したカテーテルから経時的に血液 0.25 mL を採取し、血漿 0.1 mL を得た。また、3-1-2-6 と同様に APAP 投与後所定の時間に全脳を摘出し、嗅球 (I)、大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) を得た。

3-3-2-7 APAP の定量

3-1-2-7 と同様の方法で血漿及び各脳部位中 APAP 濃度を測定した。

3-3-2-8 APAP 投与後の薬理試験

3-1-2-8 と同様の方法で解熱効果及び鎮痛効果を評価した。

3-3-2-9 薬物動態及び薬力学解析

3-1-2-9 と同様に血漿中 APAP 濃度及び各脳部位中 APAP 濃度を動態学的に解析し、解熱効果及び鎮痛効果を薬力学的に解析した。また、1-1-2-7 (2) と同様に各脳部位への標的効率 DTE_{brain} を算出した。

3-3-2-10 統計解析

3-1-2-10 と同様の方法で統計解析を行った。

第3節 結果

3-3-3-1 APAP 経鼻投与後の全身循環系への移行に対する添加剤の影響

Figure 34 に APAP の静脈内及び経鼻投与後の血漿中 APAP 濃度推移を、Table 29 に得られた APAP の動態学的パラメータを示す。APAP 経鼻投与後の血漿中濃度推移は、静脈内投与後の $AUC_{\text{plasma } 0-120}$ とほぼ同等であり、 F_{0-120} は 86.3% であった。また、APAP のみを経鼻投与した群と比較して、5.0 w/v% PVP を添加した群及び 0.5 w/v% PLA を添加した群では $C_{\text{max, plasma}}$ 及び $AUC_{\text{plasma } 0-120}$ が減少した。さらに、0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP の両添加剤を併用した群では $AUC_{\text{plasma } 0-120}$ 及び F_{0-120} が、5.0 w/v% PVP を添加した群及び 0.5 w/v% PLA を添加した群よりも低い値を示す傾向にあった (Fig. 34 及び Table 29)。

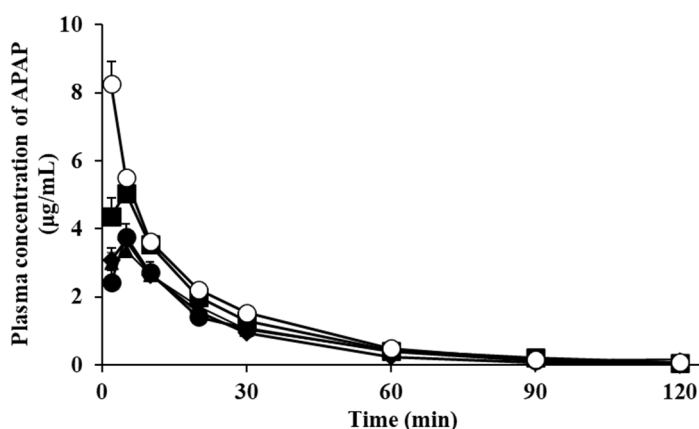


Fig. 34 Plasma APAP concentrations after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in awakening rats.

○: APAP (*i.v.*), ■: APAP (*i.n.*), ●: with 5.0% PVP, ▲: with 0.5% PLA, ◆: with 5.0% PVP and 0.5% PLA.

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

Table 29 Pharmacokinetic parameters of APAP calculated from plasma data after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in awakening rats.

Route	Additive agent	$C_{\text{max, plasma}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$T_{\text{max, plasma}}$ (min)	$AUC_{\text{plasma } 0-120}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$)	F_{0-120} (%)
<i>i.v.</i>	—	—	—	144.2 ± 2.45	—
<i>i.n.</i>	—	5.05 ± 0.421	5.0 ± 0.0	124.4 ± 7.06	86.3
	5.0% PVP	3.77 ± 0.369	5.0 ± 0.0	$95.3 \pm 1.08^{\text{a, b}}$	66.1
	0.5% PLA	$3.42 \pm 0.340^{\text{b}}$	6.7 ± 1.7	$98.1 \pm 4.19^{\text{a, b}}$	68.1
	5.0% PVP and 0.5% PLA	3.68 ± 0.252	5.0 ± 0.0	$87.1 \pm 4.18^{\text{a, b}}$	60.4

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

a : $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (Student's *t*-test).

b : $p < 0.05$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

3-3-3-2 APAP 経鼻投与後の各脳部位への移行に対する添加剤の影響

Figure 35 に APAP 経鼻投与後の各脳部位中 APAP 濃度推移を、Figure 36 に経鼻投与条件ごとの各脳部位中 APAP 濃度推移及び DTE_{brain} を、Table 30 に得られた APAP の脳内動態パラメータを示す。APAP のみを経鼻投与した群と比較して、5.0 w/v% PVP を添加した群の APAP の脳内濃度は、いずれの部位においても $C_{\text{max, brain}}$ の有意な増大は認められなかったが、嗅球 (I) において、APAP 投与後 30 及び 60 分の脳内濃度が有意に増大し (それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$)、 $AUC_{\text{brain 0-60}}$ も増加する傾向にあった (Fig. 35 (I) 及び Table 30)。さらに、大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) における APAP 投与後 30 分の脳内濃度も APAP のみを経鼻投与した群と比較して有意に増大した (それぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$, Figs. 35 (II), (III))。また、0.5 w/v% PLA を添加した群では、嗅球 (I) 及び大脳皮質 (II) における $C_{\text{max, brain}}$ が有意に増大し ($p < 0.05$)、 $AUC_{\text{brain 0-60}}$ も増加する傾向にあった (Table 30)。0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP を併用した群においては、APAP のみを経鼻投与した群と比較して、嗅球 (I) における $C_{\text{max, brain}}$ が増加傾向にあり、嗅球中 APAP 濃度は投与後 30 分で有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 35 (I) 及び Table 30))。その結果、 $AUC_{\text{brain 0-60}}$ は約 1.7 倍に増加した (Table 30)。また、大脳皮質 (II) においても、経鼻投与後 30 分まで APAP 濃度が有意に増加し ($p < 0.05$)、 $AUC_{\text{brain 0-60}}$ は約 1.5 倍高い結果となった (Fig. 35 (II) 及び Table 30)。さらに、視床下部 (III) においては、経鼻投与後 30 分の APAP 濃度が最も高く、投与後 30 分まで APAP 濃度が増加する結果となった (Fig. 35 (III) 及び Table 30)。全ての投与条件で経鼻投与 10 分後の DTE_{brain} がその他の時間 (30 及び 60 分) よりも高く、ほとんどの条件で 1 以上であったことから、経鼻投与直後の APAP の脳移行は静脈内投与よりも高いことが示された (Fig. 36)。また、APAP のみの経鼻投与では 30 分以降に DTE_{brain} が急激に低下しているのに対し、5.0 w/v% PVP のみを添加した群においては、 DTE_{brain} の経時的な減少は緩やかであった (Figs. 36 (A), (B))。また、0.5 w/v% PLA のみを添加した群では、特に嗅球において経鼻投与 10 分後の DTE_{brain} が APAP のみの経鼻投与よりも増大した (Figs. 36 (A), (C))。さらに 0.5 w/v% PLA と 5.0 w/v% PVP を併用した群においては、大脳皮質を除いて経鼻投与 60 分後まで DTE_{brain} が 2 以上であり、APAP の脳への移行が静脈内投与よりも高いことが示

された (Fig. 36 (D))。5.0 w/v% PVP のみを添加した群では、0.5 w/v% PLA のみを添加した群よりも嗅球及び視床下部における投与後 30 及び 60 分の APAP 濃度が有意に増加し ($p < 0.05$)、脳内濃度が長時間に渡り高く推移したが、投与後 10 分の嗅球中濃度は 0.5 w/v% PLA のみを添加した群の方が有意に高く ($p < 0.05$)、素早い脳内濃度上昇が得られた。0.5 w/v% PLA と 5.0 w/v% PVP を併用した群においては、投与初期からの素早い脳内濃度上昇と長時間持続する脳内濃度推移が得られ、相加的に作用しているものと考えられた (Fig. 35)。

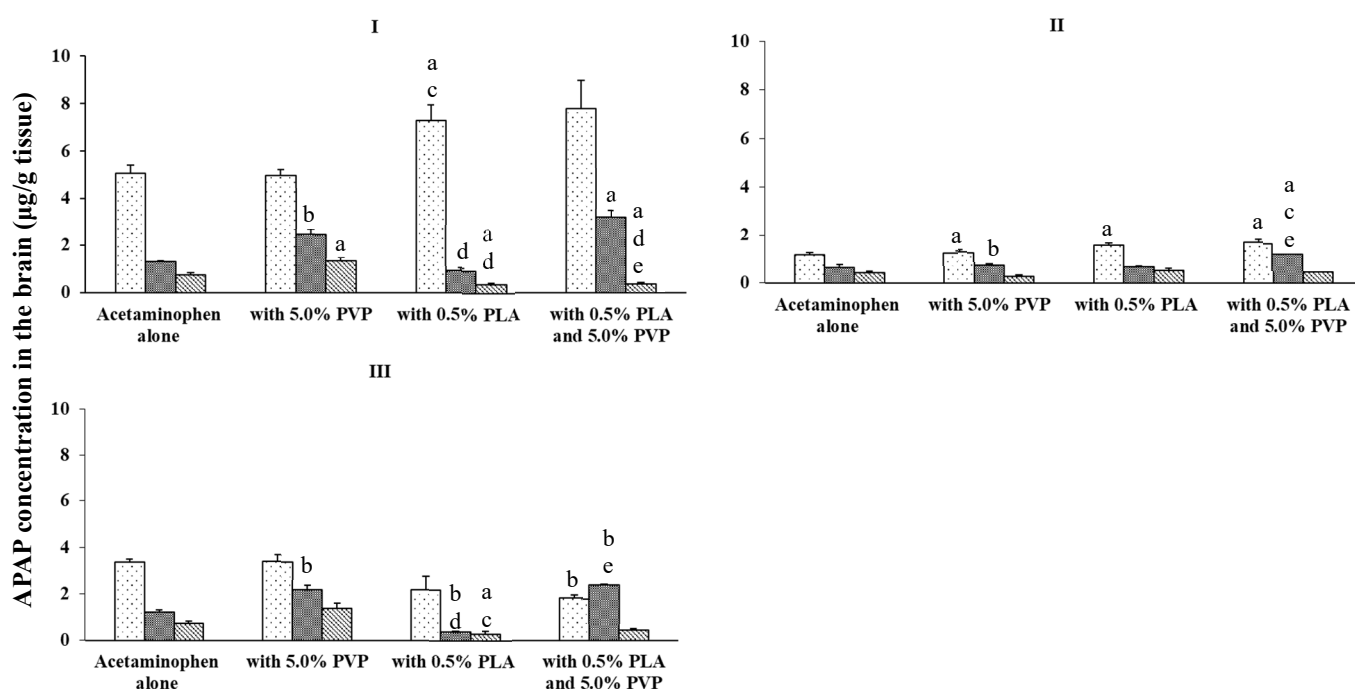


Fig. 35 APAP concentrations in the brain after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in awakening rats.

The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).

□ : 10 min, ■ : 30 min, ▨ : 60 min

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

a : $p < 0.05$, b : $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

c : $p < 0.05$, d : $p < 0.01$ compared with 5.0% PVP (Student's *t*-test).

e : $p < 0.01$ compared with 0.5% PLA (Student's *t*-test).

Table 30 Pharmacokinetic parameters of APAP in the brain after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in awakening rats.

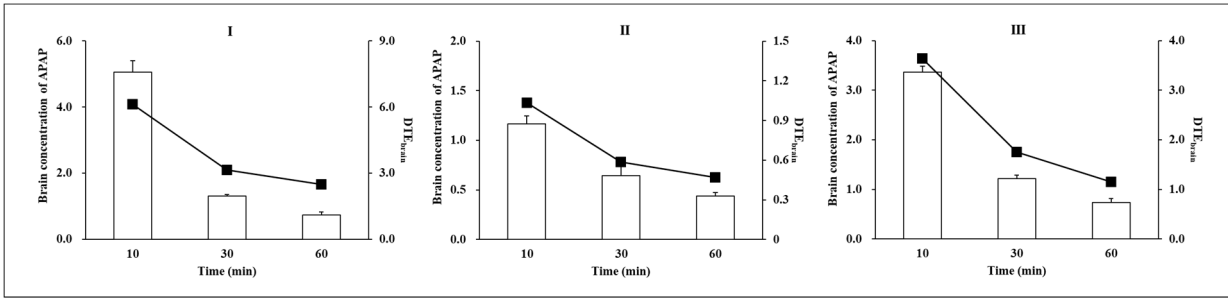
Route	Additive agent	Brain region	C _{max, brain} (µg/g tissue)	T _{max, brain} (min)	AUC _{brain 0-60} (µg·min/g tissue)
<i>i.n.</i>	—	I	5.05 ± 0.351	< 10	119
		II	1.16 ± 0.0790	< 10	40.1
		III	3.36 ± 0.121	< 10	91.7
<i>i.n.</i>	5.0% PVP	I	4.96 ± 0.254	< 10	157
		II	1.28 ± 0.0807	< 10	41.4
		III	3.40 ± 0.289	< 10	126
<i>i.n.</i>	0.5% PLA	I	7.28 ± 0.653 ^{a, b}	< 10	138
		II	1.56 ± 0.0871 ^a	< 10	47.7
		III	2.18 ± 0.581	< 10	45.9
<i>i.n.</i>	5.0% PVP and 0.5% PLA	I	7.77 ± 1.19	< 10	203
		II	1.67 ± 0.145 ^a	< 10	63.3
		III	2.44 ± 0.0103 ^a	30	95.0

The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus).
Each data represents the mean or mean ± S.E. (n=3-4).

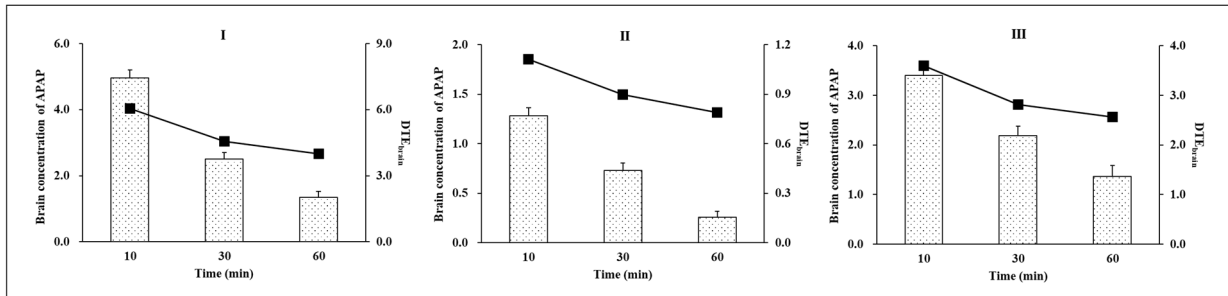
a : $p < 0.05$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

b : $p < 0.05$ compared with 5.0% PVP (Student's *t*-test).

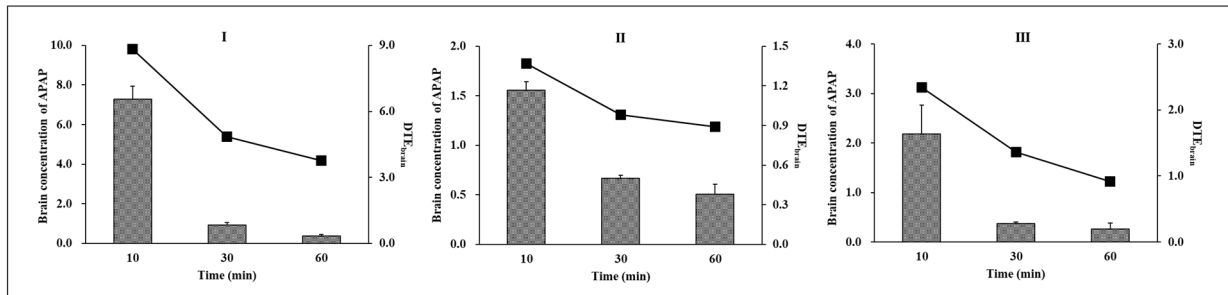
(A) APAP alone



(B) with 5.0% PVP



(C) with 0.5% PLA



(D) with 5.0% PVP, 0.5% PLA

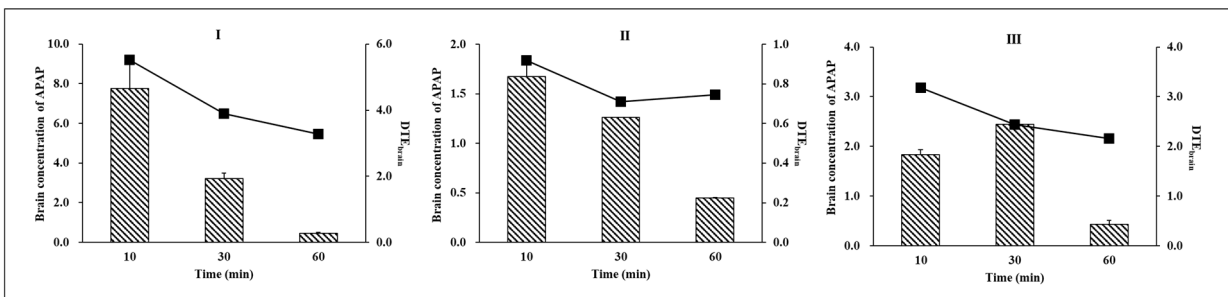


Fig. 36 APAP concentrations in the brain and DTE after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in rats.

(A) : *i.n.*, (B) : *i.n.* with 5.0% PVP, (C) : *i.n.* with 0.5% PLA, (D) : *i.n.* with 5.0% PVP and 0.5% PLA, ■: DTE.

The brain regions: I (olfactory bulb), II (cerebral cortex) and III (hypothalamus). Each data represents the mean (n=3-4).

3-3-3-3 APAP 経鼻投与後の解熱効果に対する添加剤の影響

Figure 37 に Yeast Brewers の投与直前から APAP の経鼻投与後の直腸温－時間曲線を、Figure 38 に各時間における直腸温から正常時の直腸温を引いた ΔT (°C)－時間曲線を、Figure 39 に APAP 経鼻投与後の %Antipyretic effect－時間曲線を、Table 31 に Figure 39 より算出した薬力学的パラメータを示す。APAP のみを経鼻投与した群と比較して 5.0 w/v% PVP のみを添加した群では、経鼻投与後 20 及び 30 分における解熱効果が有意に増大し ($p < 0.05$)、結果として $AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$ が約 1.5 倍増加した。PVP を添加することで、鼻腔内での APAP の滞留時間が延長し、解熱効果が延長したと考えられた。0.5 w/v% PLA のみを添加した群においては、APAP のみを経鼻投与した群と比較して $E_{\text{max, antipyretic}}$ が有意に高く ($p < 0.05$)、 $AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$ も約 2 倍増大し、有意な増加をもたらした ($p < 0.01$)。PLA を添加することで、嗅上皮から脳への APAP の直接移行を増大させ、素早い解熱効果を示したと考えられた。また、5.0 w/v% PVP と 0.5 w/v% PLA を併用した群においても、経鼻投与後 10 から 30 分までの解熱効果が有意に増加し、 $AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$ も APAP のみを経鼻投与した群より約 2.7 倍増大し ($p < 0.01$)、解熱効果の延長を示した。PVP 及び PLA を併用することで、鼻腔内滞留時間の延長と、素早い脳移行が得られ、解熱効果の増加及び延長につながったと考えられた。しかし、解熱効果の発現部位とされる視床下部中 APAP 濃度は、PVP と PLA の併用群よりも APAP のみの経鼻投与群で投与後 10 分の濃度が有意に高い結果を示し、必ずしも薬理効果発現時間と作用部位の濃度が一致しているわけではなかった (Figs. 35 (I), (III), 39)。

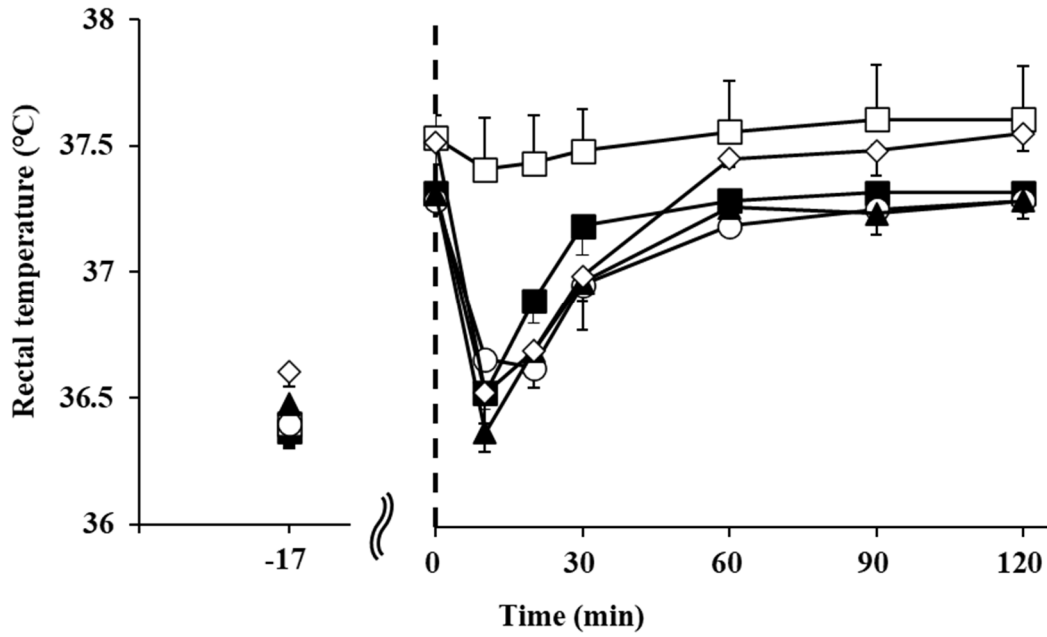


Fig. 37 Rectal temperature-time curves after *i.n.* administration of APAP with PVP and/or PLA in awakening rats.

□: PBS alone, ■: APAP, ○: with 5.0% PVP, ▲: with 0.5% PLA, ◇: with 5.0% PVP and 0.5% PLA.

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

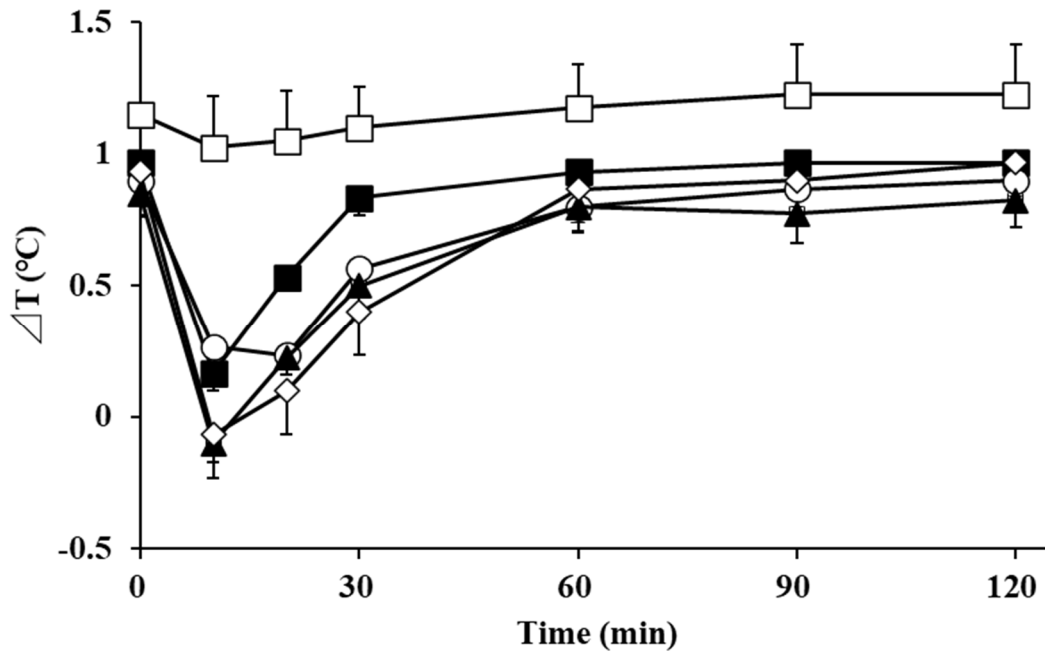


Fig. 38 ΔT (°C)-time curves after *i.n.* administration of APAP with PVP and/or PLA in awakening rats.

□: PBS alone, ■: APAP, ○: with 5.0% PVP, ▲: with 0.5% PLA, ◇: with 5.0% PVP and 0.5% PLA.

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

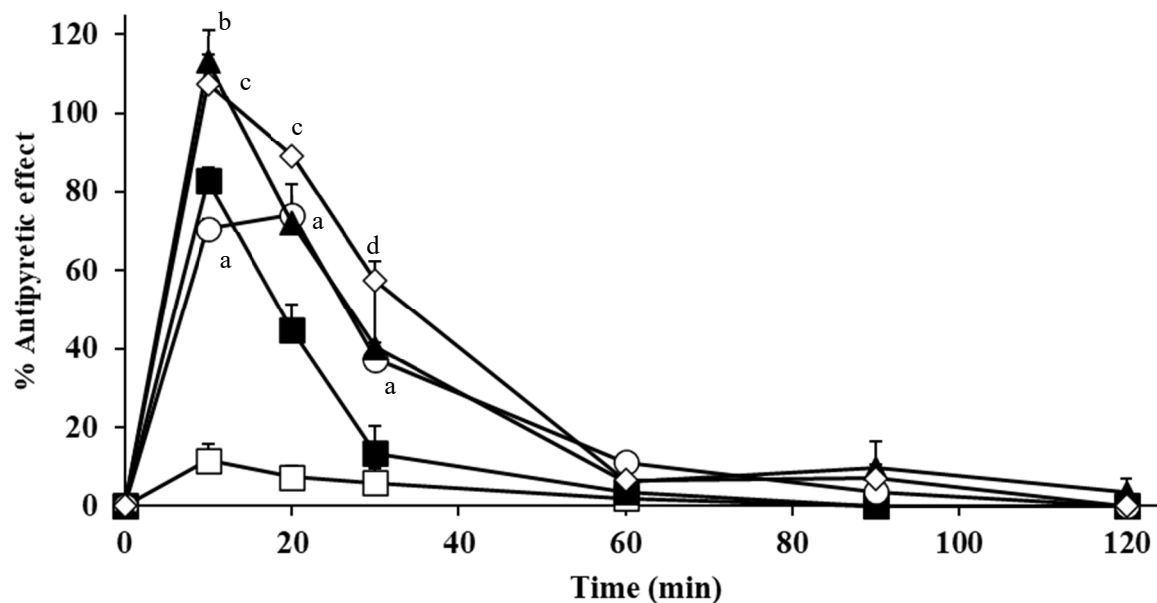


Fig. 39 Percentage of the antipyretic effect-time curves after *i.n.* administration of APAP with PVP and/or PLA in awakening rats.

□: PBS alone, ■: APAP, ○: with 5.0% PVP, ▲: with 0.5% PLA, ◇: with 5.0% PVP and 0.5% PLA.

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

a: $p < 0.05$, APAP with 5.0% PVP (○) was compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

b: $p < 0.05$, APAP with 0.5% PLA (▲) was compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

c: $p < 0.05$, d: $p < 0.01$, APAP with 5.0% PVP and 0.5% PLA (◇) was compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

Table 31 Pharmacodynamic parameters of APAP after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in awakening rats.

Route	Additive agent	E_{\max} , antipyretic (%)	T_{\max} , antipyretic (min)	$AUC_{\text{antipyretic } 0-120}$ (% \cdot min)
<i>i.n.</i>	PBS (control)	11.7 ± 3.97	< 10	371.2 ± 108.1
	-	82.8 ± 3.25	< 10	1657 ± 320.9
	5.0% PVP	74.3 ± 2.28	20	2642 ± 202.2
	0.5% PLA	$113 \pm 8.28^{a, c}$	< 10	3186 ± 224.3^b
	5.0% PVP, 0.5% PLA	$107 \pm 7.41^{a, c}$	< 10	$4529 \pm 167.4^{b, c}$

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

a : $p < 0.05$, b : $p < 0.01$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

c : $p < 0.05$ compared with 5.0% PVP (Student's *t*-test).

3-3-3-4 APAP 経鼻投与後の鎮痛効果に対する添加剤の影響

Figure 40 に APAP 経鼻投与後の反応時間—時間曲線を、Figure 41 に APAP 経鼻投与後の %Maximum possible effect—時間曲線を、Table 32 に得られた APAP の鎮痛効果における薬力学的パラメータを示す。APAP のみを経鼻投与した群と比較して 5.0 w/v% PVP のみを添加した群では、投与後 20 から 60 分までの鎮痛効果が增大する傾向にあり、 $AUC_{analgesic\ 0-120}$ も約 2 倍増大する傾向にあった。また、0.5 w/v% PLA のみを添加した群では、APAP のみを経鼻投与した群と比較して投与後初期から鎮痛効果を高く発現し、 $AUC_{analgesic\ 0-120}$ も増大する傾向にあった。さらに、0.5 w/v% PLA と 5.0 w/v% PVP を併用した群においては、0.5 w/v% PLA のみを添加した群と同様に投与初期から鎮痛効果を高く発現し、経鼻投与後 120 分においてもその効果が持続する傾向にあった。その結果、APAP のみを経鼻投与した群と比較して、 $AUC_{analgesic\ 0-120}$ が有意に増大した ($p < 0.05$)。PLA 及び PVP 併用時の鎮痛効果は、解熱効果ほど高くはないが同様の傾向を示した。また、鎮痛効果の発現部位とされる大脳皮質中 APAP 濃度推移と、鎮痛効果は類似する傾向を示すように考えられた (Figs. 35 (III), 41)。

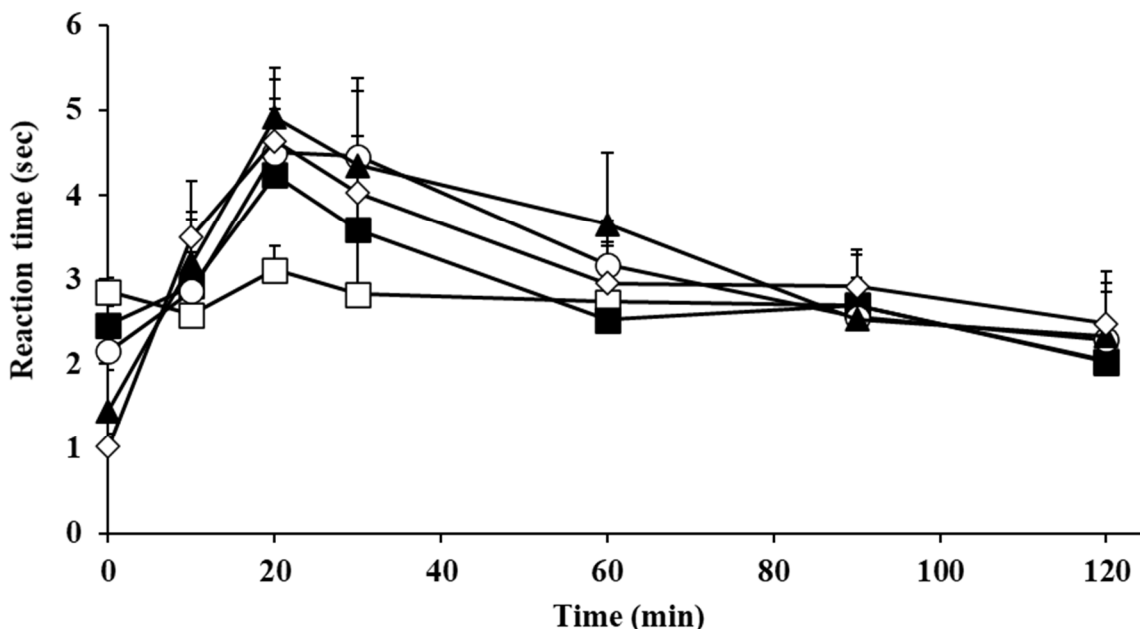


Fig. 40 Reaction time-time curves after *i.n.* administration of APAP with PVP and/or PLA in awakening rats.

□: PBS alone, ■: APAP, ○: with 5.0% PVP, ▲: with 0.5% PLA, ◇: with 5.0% PVP and 0.5% PLA.

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

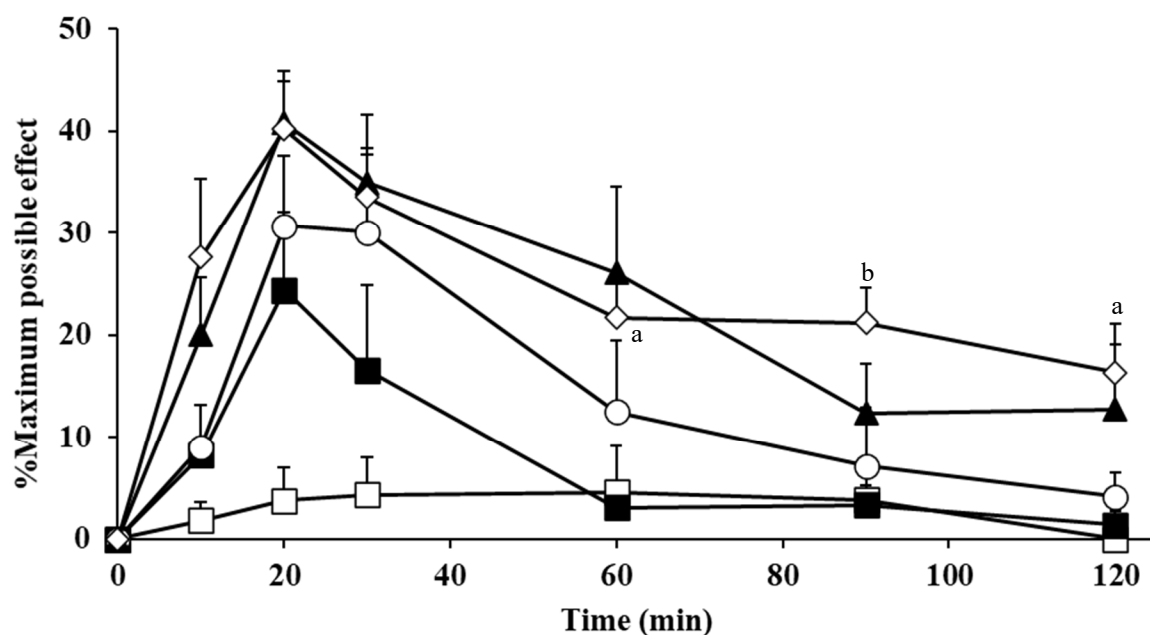


Fig. 41 Percentage of the analgesic effect-time curves after *i.n.* administration of APAP with PVP and/or PLA in awakening rats.

□: PBS alone, ■: APAP, ○: with 5.0% PVP, ▲: with 0.5% PLA, ◇: with 5.0% PVP and 0.5% PLA.

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

a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$, APAP with 5.0% PVP and 0.5% PLA (◇) was compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

Table 32 Pharmacodynamic parameters of APAP after *i.n.* administration with PVP and/or PLA in awakening rats.

Route	Additive agent	$E_{\max, \text{analgesic}}$ (%)	$T_{\max, \text{analgesic}}$ (min)	$AUC_{\text{analgesic } 0-120}$ (% \cdot min)
<i>i.n.</i>	PBS (control)	4.31 ± 3.68	30	338.1 ± 276.7
	-	24.4 ± 7.59	20	870.0 ± 325.2
	5.0% PVP	30.7 ± 6.90	20	1649 ± 513.2
	0.5% PLA	40.8 ± 5.11	20	2652 ± 544.8
	5.0% PVP, 0.5% PLA	40.1 ± 4.70	20	2878 ± 371.4 ^{a, b}

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

a : $p < 0.05$ compared with *i.n.* administration of APAP alone (Student's *t*-test).

b : $p < 0.05$ compared with 5.0% PVP (Student's *t*-test).

第4節 考察

本研究では、粘膜付着性物質として PVP を、吸収促進剤として PLA を組み合わせることで、鼻腔から脳への薬物の効率的な送達を可能とする新規経鼻投与製剤になりえることを示した。APAP のみを経鼻投与した後の血漿中 APAP 濃度推移は、静脈内投与後の血漿中 APAP 濃度推移とほぼ同等であり、経鼻投与後の F_{0-120} は 86.3% と良好であった。一方、APAP の経鼻投与において、5.0 w/v% PVP のみを添加した群では PVP が投与溶液の嗅上皮領域における粘度及び滞留性を増加させ、0.5 w/v% PLA のみを添加した群では PLA が嗅上皮領域のタイトジャンクションを開口させることで APAP の鼻腔から脳への直接的な移行を促進させたことにより、血漿中 APAP 濃度推移が APAP のみの経鼻投与よりも低下したと考えられた。さらに、0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP の両添加剤を併用した経鼻投与では F_{0-120} が 60.4% と他の併用群よりも低い値を示した。

脳内 APAP 濃度は他の投与ルートや APAP の単独経鼻投与よりも、各添加剤の併用により増加する傾向にあった。APAP のみの経鼻投与と比較して 5.0 w/v% PVP のみを添加した経鼻投与では、投与後 30 及び 60 分で嗅球 (I) における APAP 濃度が有意に高く (それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$)、その結果、 $AUC_{\text{brain } 0-60}$ のわずかな増加をもたらした。また、大脳皮質 (II) 及び視床下部 (III) における APAP 濃度は投与後 30 分で APAP のみの経鼻投与と比較して有意に増加した (それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$)。これらの結果と一致して 5.0 w/v% PVP のみを添加した経鼻投与では、解熱効果が投与後約 30 分まで、鎮痛効果が投与後約 60 分まで持続する傾向にあった。これは、PVP の添加により投与溶液の粘度が増加し、嗅上皮における投与溶液の滞留性が改善されたためと考えられた。

APAP のみの経鼻投与と比較して 0.5 w/v% PLA のみを添加した経鼻投与では、嗅球 (I) 及び大脳皮質 (II) における $C_{\text{max, brain}}$ が有意に高い結果となった ($p < 0.05$)。そのため、0.5 w/v% PLA のみを添加した経鼻投与では、投与初期から高い薬理効果が得られた。本研究ではラットの頭部を 30° 傾斜させて嗅上皮領域に近い鼻腔入口から 15 mm の位置に薬液を投与し、この状態を 5 分間維持した。それにより、経鼻投与された PLA を含む投与溶液が嗅上皮領域にターゲットされ、そして付着・滞留し、その結果、嗅上皮領域に存在するタイ

トジャンクションを一過性に開口することにより速やかな吸収増大を引き起こしているものと考えられた。

APAP のみの経鼻投与と比較して 0.5 w/v% PLA と 5.0 w/v% PVP を併用した経鼻投与では、各脳部位における APAP 濃度は少なくとも投与後 30 分まで持続した。これらの結果と一致するように、薬理効果が投与初期から得られ、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 の全身循環系を介さない鼻腔から脳への直接的な移行を増加させることによって、末梢組織へ移行することで生じる副作用を抑制しながら、十分な薬理作用を発現する可能性があると考えられる。さらに、本システムを用いた経鼻投与は痛みを伴わずに、静脈内投与と比較して遜色のない迅速で持続的な薬理効果の発現が期待できる。

以上の結果から、PVP のような鼻腔内滞留性改善物質と PLA のような鼻粘膜吸収促進剤を組み合わせることで、他の投与経路と比べて APAP の脳移行が高まり、薬理効果が延長したことから、他の投与経路の有用な代替手段となる可能性が示唆された。しかし、解熱効果の発現部位とされる視床下部中 APAP 濃度と解熱効果は必ずしも一致していないことから、作用部位での薬物濃度と薬理効果の関係については、さらなる検討が必要である。

結論

本研究では、経鼻投与後の脳への分布動態と薬理効果の関係を評価し、効率的に脳へ薬物を送達するための製剤開発に有用な情報を得ることを目的とした。そこで第 1 編では、薬物の物理化学的性質のうち脂溶性に着目し、経鼻投与後の脳（嗅球）への直接移行に対する薬物の脂溶性の影響を評価し、薬物の脂溶性と脳（嗅球）移行性との関係を明らかにすることを目的とした。第 2 編では、経鼻投与後の脳（嗅球）への直接移行に対する特殊輸送系の影響について評価した。第 3 編では、CNS 作用薬を経鼻投与した後の脳内作用発現部位への移行と薬理効果を評価することで、脳送達に適した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。

1. 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

経鼻投与後の薬物の鼻腔から脳への移行に対する薬物の脂溶性の影響を評価するために、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。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。しかし、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内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するが、経時的に薬物の脳への直接移行は低下し、全身循環系からの移行が増大することが示唆された。経鼻投与後の脳への薬物の移行において、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、経鼻投与後の嗅球への直接移行と脂溶性との関係について検討した。分配係数を分子量で補正した $\log(k/M.W.^{1/2})$ が -1.21 である CAF を除いた薬物において、経鼻投与後の嗅球への移行は静脈内投与と同等かそれ以上であり、経鼻投与された薬物の一部は BBB を介さずに鼻腔から脳へ直接移行することが明らかとなった。特に CAF よりも脂溶性が高い薬物では、脂溶性が

増加するに従い、経鼻投与後の鼻腔から脳への移行は静脈内投与よりも増加し、直接移行経路からの移行割合も増加する傾向にあった。また、脂溶性の低い薬物においても、静脈内投与よりも経鼻投与の方が嗅球への移行が高く、鼻腔から直接嗅球へ移行した割合も高い値を示した。経鼻投与された薬物の脂溶性と取り込みクリアランスとの関係は、薬物の脂溶性が増加するに従い、取り込みクリアランスも増加する傾向にあった。しかし、脂溶性の低い CF でさえも脂溶性の高い PHB と同程度の値を示した。以上より、単純拡散に従うと考えられる薬物において、経鼻投与後の嗅球への直接移行は脂溶性に従う傾向にあり、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。

2. 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

鼻粘膜上皮及び嗅球における薬物トランスポーターの発現を評価するためにウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、鼻粘膜上皮及び嗅球においてタンパク質レベルで OAT1 及び MDR1 の発現が認められ、これらの基質になる薬物は鼻腔から脳への移行が特殊輸送系により影響される可能性が示唆された。そこで、上記の特殊輸送系の基質薬物である FP 及び VRP の経鼻投与後の脳移行性を評価した。単純拡散に従う薬物と同様に、経鼻投与後の各脳部位への移行は、経鼻投与初期で静脈内投与よりも高い値を示す傾向にあったが、経時的に静脈内投与と同程度の脳内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するが、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が増大することが示唆された。また、FP 及び VRP の経鼻投与後の嗅球への直接移行に対する薬物の脂溶性の影響を検討した結果、単純拡散に従う同程度の脂溶性を有する薬物よりも下降にプロットされる傾向にあった。さらに、本研究で用いた特殊輸送系の作用を評価するために、経鼻投与後の嗅球への直接移行に対する薬物の鼻腔内適用濃度及び競合阻害剤の影響を検討した。FP 及び VRP の鼻腔内への適用濃度を増大させると嗅球中薬物濃度が頭打

ちになる傾向にあり、上記特殊輸送系の競合阻害剤を先行投与することで、嗅球中薬物濃度が増大する傾向にあった。以上の結果より、OAT1 及び MDR1 は基質薬物（それぞれ FP 及び VRP）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。しかし、一部の特殊輸送系は全身循環系から脳への薬物移行よりも、経鼻投与による鼻腔から脳への薬物の直接移行の方が嗅球への移行が良好である可能性が示唆された。さらに、特殊輸送系の基質薬物を経鼻投与する際に、競合阻害剤を併用することで脳への薬物の移行量を増大させることが可能であると考えられた。経鼻投与後の鼻腔から脳への薬物移行に対する特殊輸送系の影響を詳細に評価するためには、今後さらに多くの検討が必要であると考えられる。

3. 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

経鼻投与製剤の有用性を評価するために、CNS 作用薬である APAP をモデル薬物として選択し、臨床で利用されている投与経路と比較することで、経鼻投与後の脳移行と薬理効果を検討した。経鼻投与は他の投与経路と比較し、素早く効率的に脳へ APAP を移行させ、素早い薬理効果を示す傾向にあり、経鼻投与により脳内 APAP 濃度が高まることで薬理効果が増大することを示した。しかし、APAP のみの経鼻投与では脳内濃度の上昇とそれに伴う薬理効果の発現は投与直後のみ認められ、効果は持続しなかった。この要因として、繊毛運動によるムコシリアリークリアランスや、鼻腔内の構造によるフィジカルクリアランスにより APAP が吸収部位である嗅上皮領域から排除された可能性が考えられた。そこで、吸収促進剤である PLA 及び粘膜付着性物質である PVP を用いて、脳移行と解熱効果を検討した。まず、本研究で用いる PVP 及び PLA の濃度を決定するために、APAP の滞留性及び脳移行性に対するこれらの添加剤の濃度の影響について検討した。PVP の濃度が増加するに従い、投与溶液の粘度及び滞留時間は増加する傾向にあり、2.5 w/v% PVP 添加群と比較して 5.0 w/v% PVP 添加群では脳内 APAP 濃度が増大する傾向にあった。しかし、5.0 w/v% PVP 添加群と 10 w/v% PVP 添加群との間に有意な差は認められなかった。これらの結果から PVP 濃度が増加するに従い、粘度と *in vitro* 滞留性との間に相関関係が認められたが、実

際に鼻腔内に溶液を投与した場合には、鼻粘膜と投与溶液との接触表面積を考慮する必要があると考えられ、5.0 w/v% PVP を用いて検討することにした。また、APAP のみの経鼻投与と比較して、PLA を添加することで経鼻投与後 10 分の脳内 APAP 濃度が増大する傾向にあった。しかし、0.5 w/v% PLA 添加群と 1.0 w/v% PLA 添加群の間には、APAP の脳移行に関して有意な差は認められなかったことから、0.5 w/v% PLA を用いて検討することにした。0.5 w/v% PLA 及び 5.0 w/v% PVP の併用により、経鼻投与後の APAP の脳移行が増大かつ延長し、薬理効果も延長した。これは PVP が投与溶液の嗅上皮領域における付着・滞留性を増加させ、PLA が嗅上皮領域のタイトジャンクションを開口させることで、APAP の鼻腔から脳への直接移行を促進させ、結果として薬理効果が増大かつ持続した可能性が考えられた。以上の結果より、経鼻投与が他の投与経路よりも優れた投与経路となる可能性があり、PVP 及び PLA を併用した経鼻投与法は、薬物の脳移行に有用な投与法である可能性が示唆された⁶⁸⁾。

本研究ではラットを用いて検討したが、鼻腔内構造はラットとヒトで解剖学的に異なり、鼻粘膜上皮や嗅球に発現するトランスポーターにおいても異なる点が多い^{35, 69)}。そのため、CNS 作用薬の経鼻投与製剤を臨床応用していくためには、ヒトにおける最適な投与法、剤形等の検討が必要だけでなく、脳への薬物の送達においても最適化する必要があると考えられる。これらを検討することにより、鼻腔から脳への薬物送達に優れた経鼻送達システムになることが期待される。

謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座教授 夏目秀視 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して、終始御指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科生化学講座教授 畑中朋美 先生に深謝の意を表します。

本研究に際して、終始御指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎真理 先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御見守り頂き、御指導並びに有益な御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座准教授 内田昌希 先生、城西大学薬学部製剤学研究室助教 八巻努 先生に深謝の意を表します。

城西大学薬学部教育支援室助教 中山光治 先生には終始研究を見守って頂き、温かい御支援を賜りました。心より感謝致します。

また、本論文の作成、学位論文審査にあたり、御教示と御校閲を頂きました城西大学大学院薬学研究科病院薬剤学講座教授 上田秀雄 先生、城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂浩明 先生、城西大学大学院薬学研究科有機薬化学講座教授 山ノ井孝 先生に心より感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を頂きました、金丸達哉 博士、並びに城西大学薬学部製剤学研究室 田中梨奈 学士、諸岡里沙 学士、工藤嵩也 学士、秋山直輝 学士、市川歩 学士、飯島愛美 氏、松木健太郎 氏、徳永翔 氏、横山悠華 氏をはじめとする関係諸氏に心より感謝致します。

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

引用文献

- 1) 厚生労働省 (2018) 「研究に関する現状と最近の動向について」
<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000358539.pdf>
- 2) Pardridge WM. Blood-Brain Barrier Drug Targeting: the Future of Brain Drug Development. *Mol. Interv.*, **3**, 90–105 (2003).
- 3) Pardridge WM. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.*, **2**, 3–14 (2005).
- 4) Kushihara H. Molecular structure and drug transport of the blood-brain barrier. *Drug Deliv. Syst.*, **27**, 370–380 (2012).
- 5) 日本神経学会 (2020) 「脳神経疾患克服に向けた研究推進の提言 2020」
https://www.neurology-jp.org/images/teigen_2020.pdf
- 6) 厚生労働省 (2020) 「精神保健医療福祉のデータと政策」
<https://www.mhlw.go.jp/content/12200000/000607971.pdf>
- 7) Honma N, Miura Y, Ishige C, Ozawa K, Sekiguchi H, Kato N. 中枢神経疾患治療薬の承認審査の現状とDDSへの期待. *Drug Deliv. Syst.*, **34**, 385–388 (2019).
- 8) Xie J, Shen Z, Anraku Y, Kataoka K, Chen X. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials.*, **224**, 119491 (2019).
- 9) Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.*, **235**, 34–47 (2016).
- 10) Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res. Bull.*, **143**, 155–170 (2018).
- 11) Nibu K. Introduction to olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech.*, **58**, 133–134 (2002).
- 12) 大瀧丈二. におい受容のしくみ—嗅上皮から嗅球まで. におい・かおり環境学会誌, **35**, 170–174 (2004).
- 13) Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 614–628 (2012).
- 14) Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.*, **195**, 44–52 (2018).
- 15) Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther Deliv.*, **5**, 709–733 (2014).

- 16) Kanazawa T, Akiyama F, Kakizaki S, Takashima Y, Seta Y. Delivery of siRNA to the brain using a combination of nose-to-brain delivery and cell-penetrating peptide-modified nanomicelles. *Biomaterials.*, **34**, 9220–9226 (2013).
- 17) Johnson NJ, Hanson LR, Frey WH. Trigeminal pathways deliver a low molecular weight drug from the nose to the brain and orofacial structures. *Mol. Pharm.*, **7**, 884–893 (2010).
- 18) Uchida M, Katoh T, Mori M, Maeno T, Ohtake K, Kobayashi J, Morimoto Y, Natsume H. Intranasal administration of milnacipran in rats: evaluation of the transport of drugs to the systemic circulation and central nervous system and the pharmacological effect. *Biol Pharm Bull.*, **34**, 740–747 (2011).
- 19) Watanabe T, Kuroda M, Kuwabara H, Aoki Y, Iwashiro N, Tatsunobu N, Takao H, Nippashi Y, Kawakubo Y, Kunimatsu A, Kasai K, Yamasue H. Clinical and neural effects of six-week administration of oxytocin on core symptoms of autism. *Brain.*, **138**, 3400–3412 (2015).
- 20) Terasaki T, Kake A, Sugiyama Y. 血液脳関門とDDS. *Curr. Ther.*, **12**, 2148–2154 (1994).
- 21) Graff CL, Pollack GM. Functional evidence for P-glycoprotein at the nose-brain barrier. *Pharm. Res.*, **22**, 86–93 (2005).
- 22) Kandimalla KK, Donovan MD. Carrier mediated transport of chlorpheniramine and chlorcyclizine across bovine olfactory mucosa: Implications on nose-to-brain transport. *J. Pharm. Sci.*, **94**, 613–624 (2005).
- 23) Dahl R, Mygind N. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**, 3–12 (1998).
- 24) McMartin C, Hutchinson LEF, Hyde R, Peters GE. Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.*, **76**, 535–540 (1987).
- 25) Suzuki T, Suzuki N, Kanazawa T. Transport mechanism in the nose-to-brain drug delivery and role of nanosystems. *Oleoscience.*, **20**, 61–69 (2020).
- 26) PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 27) Uchida T, Kadhum WR, Kanai S, Todo H, Oshizaka T, Sugibayashi K. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-MTM. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **67**, 113–118 (2015).
- 28) Hirai S, Yashiki T, Matsuzawa T, Mima H. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int. J. Pharm.*, **7**, 317–325 (1981).
- 29) Crespo C, Liberia T, Blasco-Ibáñez JM, Nacher J, Varea E. Cranial Pair I: The olfactory nerve. *Anat. Rec.*, **302**, 405–427 (2019).

- 30) Kashiwayanagi M. Characteristics of olfactory epithelium and manipulations of neural functions in the brain by the intranasal administration. *YAKUGAKU ZASSHI.*, **132**, 1247–1253 (2012).
- 31) Lochhead JJ, Kellohen KL, Ronaldson PT, Davis TP. Distribution of insulin in trigeminal nerve and brain after intranasal administration. *Sci. Reports.*, **9**, 1–9 (2019).
- 32) Kumar NN, Lochhead JJ, Pizzo ME, Nehra G, Boroumand S, Greene G, Thorne RG. Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal administration: Distribution, dose-response, and mechanisms of delivery. *J. Control. Release.*, **286**, 467–484 (2018).
- 33) Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 5705–5709 (1994).
- 34) Lochhead JJ, Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration. *J. Perinatol.*, **35**, 371–381 (2015).
- 35) Al-Ghabeish M, Scheetz T, Assem M, Donovan MD. Microarray determination of the expression of drug transporters in humans and animal species used for the investigation of nasal absorption. *Mol. Pharm.*, **12**, 2742–2754 (2015).
- 36) Genter MB, Krishan M, Augustine LM, Cherrington NJ. Drug transporter expression and localization in rat nasal respiratory and olfactory mucosa and olfactory bulb. *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1644–1647 (2010).
- 37) Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T, Occludin MT. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **300**, 1054–1064 (2011).
- 38) Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Möller H, Olling M, Shah VP, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: Verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 1945–1956 (2004).
- 39) Chen X, Loryan I, Payan M, Keep RF, Smith DE, Hammarlund-Udenaes M. Effect of transporter inhibition on the distribution of cefadroxil in rat brain. *Fluids Barriers CNS.*, **11**, 25 (2014).
- 40) Sugiyama D, Kusuhara H, Shitara Y, Abe T, Meier PJ, Sekine T, Endou H, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the efflux transport of 17β -estradiol-D- 17β -glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 316–322 (2001).

- 41) Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF. Drug efflux transporters in the CNS. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 83–105 (2003).
- 42) 内田康雄. 新たな中枢関門“血液クモ膜関門”の生理学的小よび薬理学的な役割：新領域開拓における定量プロテオミクスの重要性. *Japanese Proteomics Soc.*, **5**, 1–11 (2020).
- 43) Uchida Y, Goto R, Takeuchi H, Łuczak M, Usui T, Tachikawa M, Terasaki T. Abundant expression of OCT2, MATE1, OAT1, OAT3, PEPT2, BCRP, MDR1, and XCT transporters in blood-arachnoid barrier of pig and polarized localizations at CSF- and blood-facing plasma membranes. *Drug Metab. Dispos.*, **48**, 135–145 (2020).
- 44) Hada N, Netzer WJ, Belhassan F, Wennogle LP, Gizurason S. Nose-to-brain transport of imatinib mesylate: A pharmacokinetic evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, 46–54 (2017).
- 45) Wong YC, Qian S, Zuo Z. Pharmacokinetic comparison between the long-term anesthetized, short-term anesthetized and conscious rat models in nasal drug delivery. *Pharm. Res.*, **31**, 2107–2123 (2014).
- 46) Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. *Paediatr. Anaesth.*, **18**, 915–921 (2008).
- 47) あゆみ製薬株式会社. カロナール細粒 インタビューフォーム.
- 48) Reza HM, Shohel M, Aziz SB, Pinaz FI, Uddin M, Al-Amin M, Khan IN, Jain P. Phytochemical and pharmacological investigation of ethanol extract of *cissampelos pareira*. *Indian J. Pharm. Sci.*, **76**, 455–458 (2014).
- 49) Abotsi WKM, Lamptey SB, Afrane S, Boakye-Gyasi E, Umoh RU, Woode E. An evaluation of the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic effects of hydroethanol leaf extract of *Albizia zygia* in animal models. *Pharm Biol.*, **55**, 338–348 (2017).
- 50) Singh P, Kongara K, Harding D, Ward N, Dukkipati VSR, Johnson C, Chambers P. Comparison of electroencephalographic changes in response to acute electrical and thermal stimuli with the tail flick and hot plate test in rats administered with opiorphin. *BMC Neurol.*, **18**, 43 (2018).
- 51) Gänger S, Schindowski K. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: A review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics.*, **10**, 116 (2018).
- 52) Kanazawa T, Kaneko M, Niide T, Akiyama F, Kakizaki S, Ibaraki H, Shiraishi S, Takashima Y, Suzuki T, Seta Y. Enhancement of nose-to-brain delivery of hydrophilic macromolecules with stearate- or polyethylene glycol-modified arginine-rich peptide. *Int. J. Pharm.*, **530**, 195–200 (2017).
- 53) Dharmala K, Yoo JW, Lee CH. Development of chitosan-SLN microparticles for

- chemotherapy: *In vitro* approach through efflux-transporter modulation. *J. Control. Release.*, **131**, 190–197 (2008).
- 54) Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.*, **182**, 21–32 (1999).
- 55) Zhong Y, Zhang B, Eum SY, Toborek M. HIV-1 Tat triggers nuclear localization of ZO-1 via Rho signaling and cAMP response element-binding protein activation. *J. Neurosci.*, **32**, 143–150 (2012).
- 56) Li Y, He J, Lyu X, Yuan Y, Wang G, Zhao B. Chitosan-based thermosensitive hydrogel for nasal delivery of exenatide: Effect of magnesium chloride. *Int J Pharm.*, **553**, 375–385 (2021).
- 57) 入江博美, 大竹一男, 前野拓也, 内田昌希, 内田博之, 小林順, 夏目秀視. カルセイン含有デンプン溶液の経鼻投与後の鼻腔滞留性とカルセイン血中動態との関係. *薬剤学.*, **69**, 219–227 (2009).
- 58) Kamiya Y, Yamaki T, Uchida M, Hatanaka T, Kimura M, Ogihara M, Morimoto Y, Natsume H. Preparation and evaluation of PEGylated poly-L-ornithine complex as a novel absorption enhancer. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 205–211 (2017).
- 59) Yeh JT, Chen CL, Huang KS, Nien YH, Chen JL, Huang PZ. Synthesis, characterization, and application of PVP/chitosan blended polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, **101**, 885–891 (2006).
- 60) Yamaki T, Ohtake K, Ichikawa K, Uchida M, Uchida H, Ohshima S, Juni K, Kobayashi J, Morimoto Y, Natsume H. Poly-L-arginine-induced internalization of tight junction proteins increases the paracellular permeability of the caco-2 cell monolayer to hydrophilic macromolecules. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 432–441 (2013).
- 61) Natsume H, Iwata S, Ohtake K, Miyamoto M, Yamaguchi M, Hosoya KI, Kobayashi D, Sugibayashi K, Morimoto Y. Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **185**, 1–12 (1999).
- 62) Yamaki T, Kamiya Y, Ohtake K, Uchida M, Seki T, Ueda H, Kobayashi J, Morimoto Y, Natsume H. A mechanism enhancing macromolecule transport through paracellular spaces induced by poly-L-arginine: Poly-L-arginine induces the internalization of tight junction proteins via clathrin-mediated endocytosis. *Pharm. Res.*, **31**, 2287–2296 (2014).
- 63) Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 4131–4142 (2000).
- 64) Miyamoto M, Natsume H, Iwata S, Ohtake K, Yamaguchi M, Kobayashi D, Sugibayashi K, Yamashina M, Morimoto Y. Improved nasal absorption of drugs using poly-L-arginine: Effects

- of concentration and molecular weight of poly-L-arginine on the nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 21–30 (2001).
- 65) Ohtake K, Natsume H, Ueda H, Morimoto Y. Analysis of transient and reversible effects of poly-L-arginine on the in vivo nasal absorption of FITC-dextran in rats. *J. Control. Release.*, **82**, 263–275 (2002).
- 66) Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Sam H, Horvát S, Deli MA, Mack AF. Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochem. Cell Biol.*, **130**, 127–140 (2008).
- 67) Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, **379**, 146–157 (2009).
- 68) Ogawa K, Uchida M, Yamaki T, Matsuzaki H, Kimura M, Okazaki M, Uchida H, Natsume H. Delivery of acetaminophen to the central nervous system and the pharmacological effect after intranasal administration with a mucoadhesive agent and absorption enhancer. *Int. J. Pharm.*, **594**, 120046 (2021).
- 69) Sakane T, Okabayashi S, Kimura S, Inoue D, Tanaka A, Furubayashi T. Brain and nasal cavity anatomy of the cynomolgus monkey: species differences from the viewpoint of direct delivery from the nose to the brain. *Pharmaceutics.*, **12**, 1227 (2020).