

学位論文要旨

てんかん重積状態の早期抑制を目的とした経鼻投与型ジアゼパム製剤に関する研究

渡邊 一理

緒言

てんかん重積状態 (SE) とは、5 分以上の連続する発作活動であり、その 1 次治療には、ジアゼパム (DZP) 注射液の静脈内 (*i.v.*) 投与が行われる。しかし、血管確保が困難な患者や家庭で発症した場合に対して *i.v.* 投与に代わる有効性の高い DZP 投与方法がない。そこで著者は、投与が簡便で速やかな吸収が期待できる鼻腔内 (*i.n.*) 投与に着目した。*i.n.* 投与された薬物は、鼻腔から全身循環系を経て、血液脳関門 (BBB) を通過して脳実質へ移行することが一般的である。近年、その移行経路に加えて、鼻腔から脳実質へ直接的な薬物移行 (nose-to-brain, NTB) 経路の存在が報告されているが、DZP における鼻腔から脳への移行過程および脳内分布特性については明らかになっていない。経鼻投与型製剤を開発する上で、DZP を高濃度で含有させ、かつ、速やかな粘膜透過性を期待できる剤形として、マイクロエマルジョン (ME) がある。しかし、DZP 含有 ME 製剤の *i.n.* 投与後の体内動態や薬理効果、および安定性や生体への安全性などについて総合的に評価した報告はない。さらに、鼻腔内への噴霧 (spray) 投与方法は、臨床では良く用いられるが、基礎研究レベルではその有用性に関する詳細な研究報告がない。以上のことから、本研究では、SE の早期抑制を目的とした DZP の *i.n.* 投与の有用性を明らかにし、速やかな痙攣抑制を可能にしている鼻腔から脳への移行過程および脳内分布特性を明らかにすることとした。また、DZP 含有 ME 製剤を調製し、製剤学的特性および spray による *i.n.* 投与後の薬物動態学的および薬理学的評価に基づいてその有用性を検討した。

第 1 編 DZP 注射液の *i.n.* 投与による体内動態および痙攣抑制効果

5 mg/mL DZP 注射液を滴下 (drop) により *i.n.* 投与した後の体内動態および痙攣抑制効果を評価した。DZP の *i.n.* 投与後の最高血漿中濃度 ($C_{\max, p}$) は直腸内 (*i.r.*) 投与よりも短時間で高い値となり、痙攣抑制潜時時間は有意に短縮した。全身循環を介して脳移行する *i.v.*、*i.r.* および皮下投与後の痙攣抑制潜時時間と痙攣抑制直後の血漿中濃度との関係は良好な相関を示した。一方、*i.n.* 投与後のデータは、この相関関係には一致せず、低血漿中濃度にもかかわらず高い痙攣抑制効果を示した。DZP の NTB の移行動態を評価すると、*i.n.* 投与後の各種脳組織および CSF 中の最高脳中濃度到達時間 ($T_{\max, b}$) は 3 分で得られた。これは *i.v.* 投与後の $T_{\max, p}$ の 5 分よりも短く、3 分で視床付近と三叉神経における強い蛍光シグナルが観察された Rhodamin B base を用いた蛍光イメージング解析の結果と一致していた。さらに、各種脳組織および CSF への標的効率 (Drug Targeting Efficiency, DTE) および鼻腔から各種脳組織への直接的移行の寄与率 (Direct Transport Percentage, DTP) を比較すると、三叉神経で最も高い値を示した。これらの結果は、*i.n.* 投与が DZP の速やかな全身吸収と脳移行を可能にし、特に三叉神経経路を介した直接的な脳実質への DZP の移行が速やかで高い痙攣抑制効果に関係していることを示している。

第 2 編 経鼻投与型 DZP 含有 ME 製剤の調製と体内動態および痙攣抑制評価

DZP 含有 ME 製剤の調製を試みた。ME を構成する混合物相には、油混合 (oil mix, O_{mix}) 相内の混合比率 (triacetin:benzyl alcohol = 1:1)、界面活性剤混合 (surfactant mix, S_{mix}) 相内の混合比率 (labrasol:dipropylene glycol = 1:1) を用いた。各相の混合割合 (S_{mix} 相: O_{mix} 相:水相 = 40%:30%:30%) で DZP

の溶解度が 50 mg/mL 以上の o/w 型 ME 製剤が得られた。最適化された ME 製剤は、過酷条件下（短期安定性）および室温条件下（長期安定性）のいずれも安定だった。*i.n.* 投与後の LDH 漏出率に基づき、この製剤による組織傷害は低いと考えられた。DZP 含有 ME 製剤の *i.n.* 投与による体内動態および痙攣抑制効果を DZP 注射液と比較した。5 mg/mL ME 製剤 (ME5) を *i.n.* 投与したときの血漿中、各種脳組織および CSF 中濃度は、DZP 注射液よりも有意に高かった。また、50 mg/mL ME 製剤 (ME50) では、DZP 注射液に対して投与容量が 10 分の 1 であっても DZP 注射液と同等な全身吸収性および脳移行性が得られた。このことは、ME 化による透過促進効果を裏付けている。以上の結果から、DZP の ME 製剤化は、鼻粘膜を介した吸収を高め、全身循環系および各種脳組織や CSF への移行を増大し、速やかな痙攣抑制効果を誘導していると考えられた。

第 3 編 DZP 含有 ME 製剤の鼻腔内へ spray 投与による体内動態および痙攣抑制効果

DZP 含有 ME 製剤の鼻腔内へ spray 投与 (*i.n.-spray*) による体内動態および痙攣抑制効果を、鼻腔内へ drop 投与 (*i.n.-drop*) したときと比較した。ME5 および ME50 の *i.n.-spray* 後の血漿、各種脳組織および CSF 中濃度は、*i.n.-drop* よりも有意に高かった。それに伴い、ME5 の *i.n.-spray* による痙攣抑制潜時時間は 2.2 分となり *i.n.-drop* の 3.7 分よりも有意に短かった。ME50 でも、*i.n.-spray* による痙攣抑制潜時時間は 4.4 分となり、*i.n.-drop* の 7.9 分よりも有意に短かった。濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定条件下、*i.n.-spray* および *i.n.-drop* での粘膜吸収面積と全身吸収性、脳移行性、痙攣抑制潜時時間との関係をそれぞれ比較した。各種体内動態パラメータは、鼻粘膜領域に対する粘膜表面薬物濃度の高い領域 (P1) の面積率の増加に伴い増大し、高い相関を示した。このことは、P1 面積率が全身吸収に関係する各種体内動態パラメータと関係し、高い P1 面積率が得られる *i.n.-spray* が優れた全身吸収性を示すことを示唆している。一方、各種脳組織中 DZP 濃度は、*i.n.-drop* で P1 面積率に比例して増大したが、*i.n.-spray* では *i.n.-drop* に比べてさらに高濃度側へシフトした。以上の結果から、*i.n.-spray* 投与は薬液容量が少なくても鼻粘膜全体を製剤が覆い吸収面積を確保できるため、多量の DZP 注射液を *i.n.-drop* した場合と同等の痙攣抑制効果を発揮できると考えられた。粘膜吸収面積と血漿および各種脳組織中動態、さらに痙攣抑制潜時時間のような薬理効果との関係は、より効果的な脳への薬物送達を可能にするための製剤設計に対する有益な情報となると考えられる。

結論

本研究では、*i.n.* 投与された DZP が三叉神経経路を介して SE 発作焦点と考えられる視床付近へ直接送達されていることを明らかにした。また、*i.n.* 投与という限られた製剤量で効果的に薬物送達するために、ME 製剤を *i.n.-spray* することは有用性が高いことを明らかにした。今後、SE 発作抑制に適応可能な薬物を用いて NTB を介した脳への分布特性と薬物の物理化学的性質および ME 製剤の特性との関係性を明らかにすることが有用性の高い経鼻製剤の開発に繋がると考えられる。

Thesis abstract

Development of intranasal diazepam preparation for rapid suppression in status epilepticus

Kazutoshi Watanabe

Introduction

Status epilepticus (SE) is seizure activity lasting more than 5 min. Intravenous (*i.v.*) administration of injection solution of diazepam (DZP) is chosen as the first-line of medical treatment. However, there is no effective alternatives to *i.v.* administration of DZP for the patients in home-onset cases which have difficulty for *i.v.* access. I focused on intranasal (*i.n.*) administration in the present study anticipating easy and rapid treatment for SE. For brain delivery of a drug, *i.n.* administration delivers a drug to the systemic circulation, then the drug reaches to the brain parenchyma across the blood-brain-barrier (BBB) in general. In addition to such access route, a direct nose-to-brain drug delivery (NTB) route has recently been reported. However, contribution of the NTB have not been characterized to date. Thus, the potential contribution of the NTB and intracerebral distribution after *i.n.* administration of DZP was evaluated for development of nasal administration formulations, microemulsion (ME) formulation of DZP was optimized in terms of inclusion content of DZP, stability, and biosafety. Usefulness of *i.n.* administration of ME formulations of DZP was clarified for rapid and effective suppression of SE in the present study based on pharmacokinetic, pharmacological, and pharmaceutical points of view. Nasal administration of spray type ME formulations of DZP was much effective for SE and promises as novel first-line treatment for SE.

Part 1 Pharmacokinetics and spasm suppression effect of *i.n.* administration of DZP injection

Pharmacokinetics and spasm suppression effect were evaluated after intranasal drop administration of 5 mg/mL DZP injection solution. The maximum plasma DZP concentration ($C_{\max, p}$) after *i.n.* administration was higher in earlier compared with intrarectal (*i.r.*) administration. And the spasm suppression time was significantly shortened. There was a good correlation between the spasm suppression time and the plasma concentration immediately after spasm suppression after *i.v.*, *i.r.*, and subcutaneous administrations that drugs delivery to the brain through the systemic circulation. On the other hand, the data after *i.n.* administration were shifted to a direction of high spasm suppression effect despite low plasma concentrations. The maximum brain concentration time ($T_{\max, b}$) in each brain tissues and cerebrospinal fluid (CSF) after *i.n.* administration was observed at 3 min which was the $T_{\max, p}$ of 5 min after *i.v.* administration. Such pharmacokinetic characteristics were consistent with the results of fluorescence imaging analysis using rhodamin b base after *i.n.* administration. Furthermore, comparing the target efficiency (DTE) for each brain tissues and CSF and the contribution rate of direct route from the nasal cavity to each brain tissues (DTP), the highest values were obtained in trigeminal nerve. These results indicate that *i.n.* administration can provide rapid systemic absorption and brain delivery of DZP. Potential direct delivery of DZP to the brain parenchyma via the trigeminal nerve route seems to be associated with rapid and high spasm suppression effect by *i.n.* administration.

Part 2 Preparation of intranasal DZP-containing ME preparations, pharmacokinetics and spasm suppression effect

An attempt was made to develop a DZP-containing ME formulation. ME formulation consist of oil mixed phase

(O_{mix} , triacetin:benzyl alcohol = 1:1), surfactant mixed phase (S_{mix} , labrasol:dipropylene glycol = 1:1), and water phase. An o/w type ME formulation with a DZP solubility of 50 mg/mL or more was optimised at the mixing ratio of each phase ($S_{\text{mix}}:O_{\text{mix}}:\text{water} = 40\%:30\%:30\%$). The optimized ME formulation was stable under both high temperature (short-term stability) and room temperature (long-term stability) conditions. Any indications of nasal tissue injury was not observed after *i.n.* administration based on the LDH leakage test. The pharmacokinetics and the pharmacological effect after *i.n.* administration were compared between ME formulations and injection solutions of DZP. The concentrations in plasma, each brain tissues and CSF after *i.n.* administration of 5 mg/mL ME formulation (ME5) were significantly higher than those from DZP injection solution. In addition, ME formulation containing 50 mg/mL of DZP (ME50) achieved systemic absorption and brain penetration equivalent to DZP injection intravenously, even though the dosing volume of ME formulation was one-tenth that of intravenous injection of DZP. These findings indicate that ME formulations containing DZP are promising for medical treatment of SE in terms of the enhanced nasal absorption and distribution to each brain tissue and CSF, and induction of rapid spasm suppression effect.

Part 3 Pharmacokinetics and spasm suppression effect after intranasal spray administration of DZP-containing ME preparations

Pharmacokinetics and spasm suppression effect after intranasal spray (*i.n.*-spray) and drop (*i.n.*-drop) administrations of DZP-containing ME preparations were compared. Plasma, each brain tissues and CSF concentrations from ME5 and ME50 after *i.n.*-spray were significantly higher than those from *i.n.*-drop. Spasm suppression time of 2.2 min after *i.n.*-spray of ME5 was significantly shorter than 3.7 min after *i.n.*-drop. Spasm suppression time of 4.4 min after *i.n.*-spray of ME50 was also significantly shorter than 7.9 min after *i.n.*-drop. The mucosal contact area with the ME preparations containing DZP at different concentrations (fixed dose conditions) after *i.n.*-spray and *i.n.*-drop was measured to estimate correlations with systemic absorption, brain penetration, and spasm suppression time. There was a good correlation between the area fraction of the contact surface with the preparations (P1) and each pharmacokinetic parameter. The P1 area fraction was associated with each pharmacokinetic parameter contributing to systemic absorption. In addition, higher P1 area fraction observed with *i.n.*-spray was good indication for systemic absorption of DZP. On the other hand, the DZP concentration in each brain tissues after *i.n.*-drop was increased in proportion to the P1 area ratio. Noticeably, *i.n.*-spray induced much higher concentration compared with *i.n.*-drop. These findings suggest that *i.n.*-spray can be more effective for spasm suppression effect even small dosing volume, because *i.n.*-spray covers the entire surface of the nasal mucosa. Indeed, spray administration with small volume of the ME preparation induced the same anticonvulsant effect as *i.n.*-drop of a large volume of DZP injection solution. These findings provide useful information for developing effective drug delivery system for brain delivery.

Conclusion

Pharmacokinetic and pharmacological characteristics properties after *i.n.* administration of DZP was characterized for direct delivery to the SE focus near the thalamus via the trigeminal route. The usefulness of spray administration of ME preparations was evident in terms of effective drug delivery especially in case of nasal drug delivery having the limited dosing volume in the nasal cavity. The findings in the present study provide useful information for developing the drug delivery system for effective brain delivery.

論文審査の結果の要旨

てんかん（癲癇）とは、脳内の神経細胞が過剰に興奮することにより痙攣や意識喪失などの発作を繰り返す疾患で、小児から高齢者まで全ての年代で発病し得る一般的な神経疾患の一つである。てんかんは、様々な種類に分類されるが、てんかん発作がある程度の長さ以上連続、もしくは短い発作が反復する状態をてんかん重積状態と呼ぶ。てんかん重積状態が5分以上継続すると、神経細胞に損傷を来し、重篤な後遺症を惹起、あるいは死に至る可能性があるため、早期の治療介入が必要とされている。

てんかん発作治療の第一選択は、ジアゼパムをはじめとするベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の静脈内投与であるが、医療機関以外での発症時には速やかな治療の開始は困難である。院外での発症への対応策として、坐薬や口腔粘膜投与液が上市されているが、これらの製剤は、痙攣抑制効果が低く、即効性にも改善の余地があり、また、発作時に介助者が投与することは非常に困難である。

一方、点鼻薬は、アレルギー性鼻炎などの局所治療に主に用いられ、処方薬のみならず市販薬としても販売される投与が容易な製剤である。近年、経鼻投与後の薬物の体内動態が詳細に研究され、薬物が鼻腔から全身循環系を介して脳へ移行することに加え、鼻腔から嗅神経や三叉神経、あるいはその周囲の脳脊髄液を介して脳に移行する、いわゆる *nose-to-brain* 経路の存在が報告されている。てんかん重積状態の抑制のためには、抗てんかん薬を脳実質へ速やかに移行させる必要があることから、経鼻投与は有効な投与方法となり得る。しかし、経鼻投与後の体内動態は薬物の物性に依存して変化すると予想され、抗てんかん薬の動態は未だ不明である。また、経鼻投与時の投与薬液量や吸収表面積は、狭い鼻腔に制限されることなど、経鼻投与型製剤の開発には克服すべき問題が存在する。

これらの背景のもと、渡邊氏は、てんかん重積状態の早期抑制を目的とした経鼻投与型ジアゼパム製剤の開発研究に取り組み、その成果を3編からなる論文にまとめた。以下に、その概要を示す。

第1編では、ジアゼパム注射液をラットの鼻腔内に投与し、その後の体内動態と痙攣抑制効果を静脈内投与や直腸投与と比較した。ジアゼパムの血漿中濃度は、経鼻投与後4.5分で最大値を示し、直腸投与より短時間で高濃度に達した。また、絶対的バイオアベイラビリティは約2倍となり、吸収率も高かった。投与5分後の血漿、前脳、後脳、嗅球、三叉神経および脳脊髄液中の薬物濃度を測定すると、経鼻投与後の前脳および後脳中濃度は、静脈内投与の約1/2であったが、直腸投与より約10倍高かった。また、血漿に対する各脳組織中濃度比は、経鼻投与後の値が最も高く、ジアゼパム経鼻投与にも *nose-to-brain* 経路が存在することが示唆された。実際、経鼻投与後の薬物濃度を経時的に測定すると、脳組織は血漿より早く最大濃度に達しており、静脈内投与に比した薬物の標的化効率は全ての脳組織で1以上、移行に占める *nose-to-brain* 経路の寄与率は、嗅球や三叉神経で9割以上、脳脊髄液で約7割、前脳と後脳で約4割と算出された。ペンチレンテトラゾール誘発てんかんモデルラットを用いて経鼻投与後の痙攣抑制効果を評価したところ、痙攣抑制の発現率、潜時時間ともに、静脈内投与には及ばないものの、直腸投与より高い効果が得られ、痙攣再発率は全ての投与群で最も低かった。また、種々投与方法による痙攣抑制潜時時間と血漿中薬物濃度の関係を解析すると、静脈、直腸および皮下投与では負の回帰直線が得られたが、経鼻投与は、低濃度、短時間側にシフトし、*nose-to-brain* 経路の存在が速やかな痙攣抑制発現に関与していることが推察された。さらに、脂溶性蛍光色素を用いた *ex vivo* 蛍光イメージングにより *nose-to-brain* 経路を画像化し、三叉神経を介した脳実質への移行経路の重要性を明らかにした。

第2編では、経鼻投与後の痙攣抑制効果を静脈内投与に近づけるべく、o/w型マイクロエマルジョン製剤の処方設計を行った。脂溶性の高いジアゼパムの溶解性と生体への影響を考慮し、油相にはベンジルアルコールとトリアセチンの混合液、界面活性剤相には labrasol® と補助界面活性剤ジプロピレングリコールの混合液を選択し、水相と合わせてマイクロエマルジョン形成可能な各相の混合比を探った。次に、界面活性剤相の混合比をマイクロエマルジョン化効率の高かった40%に固定して界面活性剤と補助剤の混合比を探り、ジアゼパムの溶解度が50 mg/mL以上のo/w型マイクロエマルジョンを形成可能な8種の処方を見出した。これらの処方製剤を、強力遠心試験、加熱-冷却試験、凍結-融解サイクル試験からなる短期過酷試験に供すとともに、室温で3, 6および12か月保存し、濁度、薬物含有量、ゼータ電位、粒子径および多分散指数の変化から製剤の短期および長期安定性を評価し、安定性の高かった3製剤を選択した。そのうち、経鼻投与5分後の鼻粘膜からの乳酸脱水素酵素漏出率がジアゼパム注射剤より低い製剤を最終試験製剤とし、この製剤のラットにおける体内動態と痙攣抑制効果を評価した。第1編で用いた注射液や、注射液と等しい薬液量とするために10倍に希釈した試験製剤も同時に評価した。薬物投与量や薬液量が等しいにもかかわらず、希釈製剤投与後の血漿中濃度や各脳組織濃度は注射液投与後より高く、マイクロエマルジョン化により薬物の吸収性と脳移行性が向上したが、痙攣抑制効果は両製剤で同等であった。また、投与量は等しいが、薬液量の少ない試験製剤の体内動態は、注射液と同等で、痙攣抑制効果は減弱傾向にあった。

第3編では、ジアゼパムマイクロエマルジョン製剤の体内動態と痙攣抑制効果の spray 投与による改善を目指し、これまでの drop 投与の場合と比較した。マイクロエマルジョン製剤を spray 投与することにより、第2編で用いた試験製剤とその希釈製剤とともに、drop 投与より高い吸収性と脳組織移行性を示し、痙攣抑制効果の潜時時間も短縮した。そこで次に、メチレンブルー含有マイクロエマルジョンを種々濃度で調整し、投与方法や液量による鼻腔内分散性の変化を評価した。投与量を固定して液量を変化させると、spray 投与では、全ての液量で鼻腔内全体にメチレンブルーが分散し、特に鼻腔後方に高濃度の分散が観察された。一方、drop 投与では、メチレンブルーは鼻腔内前方に留まり、その傾向は液量が小さいほど強かった。各液量における高濃度分散面積を算出し、対応する薬液量で各種ジアゼパムマイクロエマルジョン製剤を経鼻投与した際の体内動態や痙攣抑制効果との関係を解析した。ジアゼパムの吸収率や最大血漿中濃度は、投与方法にかかわらず高濃度分散面積と正の相関を示した。各脳組織や脳脊髄液中薬物濃度も分散面積の増加に伴い増加する傾向にあったが、spray 投与後のジアゼパム濃度は drop 投与より高く、痙攣抑制潜時時間もより短縮された。このことから、spray 投与では鼻腔内の嗅覚領域から三叉神経、嗅球を経て脳実質に至る nose-to-brain 経路の寄与が大きいことを示唆した。

以上、渡邊氏は、本論文において、てんかん重積状態の早期抑制を目的とした新たな経鼻投与型マイクロエマルジョン製剤の開発に至った。ジアゼパムの体内動態と痙攣抑制効果を丹念に解析することにより、速やかな脳実質への移行に経鼻投与が有効であることを示すとともに、吸収部位が鼻腔内に限定される経鼻投与の欠点を、マイクロエマルジョン化と spray 投与により克服することに成功した。これらの結果は、生物薬剤学および物理薬剤学領域において学術的に顕著な成果と言える。また、臨床現場におけるてんかん治療に貢献できる研究成果であり、てんかん発作に苦しむ多くの患者に希望を与えるものと考えられる。

本論文は、その新規性、独創性および研究意義の観点から、本研究科における課程による博士(薬学)の論文として十分に値するものと判断する。