

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

目次

総論の部	…1
緒言	…1
第1編 ジアゼパム注射液の経鼻投与による体内動態および痙攣抑制効果	…5
第1章 ジアゼパム注射液投与後の体内動態	…8
第1節 ジアゼパム注射液の経鼻、静脈および直腸内投与による 全身循環系への移行性	…8
第2節 ジアゼパム注射液の経鼻、静脈および直腸内投与による 5分後の各種脳組織および脳脊髄液への移行性	…9
第3節 ジアゼパム注射液の経鼻および静脈内投与による 60分までの各種脳組織および脳脊髄液への移行性	…14
第2章 ジアゼパム注射液投与後のペンチレンテトラゾール誘発性てんかん 重積モデルラットに対する痙攣抑制効果	…18
第1節 ジアゼパム注射液の経鼻、静脈および直腸内投与による 痙攣抑制効果	…18
第2節 ジアゼパム注射液投与後の痙攣抑制潜時時間と痙攣抑制直後の 血漿中濃度の関係	…20
第3章 脂溶性蛍光物質 Rhodamine B base を用いた <i>ex vivo</i> イメージング 解析による経鼻投与後のジアゼパム脳移行特性に関する考察	…22

第 4 章 本編の小括および考察	…25
第 2 編 経鼻投与型ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の調製と 体内動態および痙攣抑制効果	…28
第 1 章 o/w 型マイクロエマルション製剤の調製	…31
第 1 節 ジアゼパムを高濃度で溶解可能な油、界面活性剤および 補助界面活性剤の選択	…31
第 2 節 低濃度の界面活性剤でマイクロエマルションが調製可能な 界面活性剤混合相の混合割合の選択	…33
第 3 節 ジアゼパムの溶解度が 50 mg/mL 以上の o/w 型 マイクロエマルションの選択	…36
第 2 章 マイクロエマルション製剤の安定性評価	…45
第 1 節 過酷条件下における短期安定性評価	…45
第 2 節 室温条件下における長期安定性評価	…52
第 3 章 マイクロエマルション製剤の鼻粘膜に対する安全性評価	…58
第 1 節 経鼻製剤に推奨される pH 範囲の判定	…58
第 2 節 乳酸脱水素酵素漏出による鼻粘膜傷害性の評価	…59
第 4 章 ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の経鼻投与による 体内動態	…60
第 1 節 ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤およびジアゼパム 注射液の経鼻投与による全身循環系への移行性	…60

第2節	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤およびジアゼパム注射液の経鼻投与による各種脳組織および脳脊髄液への移行性	…62
第5章	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤を経鼻投与後のペンチレンテトラゾール誘発性てんかん重積モデルラットに対する痙攣抑制効果	…64
第6章	本編の小括および考察	…66
第3編	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の鼻腔内へ spray 投与による体内動態および痙攣抑制効果	…70
第1章	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の鼻腔内へ spray および drop 投与による体内動態	…73
第1節	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の鼻腔内へ spray および drop 投与による全身循環系への移行性	…73
第2節	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の鼻腔内へ spray および drop 投与による5分後の各種脳組織および脳脊髄液への移行性	…76
第2章	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤を鼻腔内へ spray および drop 投与後のペンチレンテトラゾール誘発性てんかん重積モデルラットに対する痙攣抑制効果	…79
第3章	ジアゼパム含有マイクロエマルション製剤の鼻腔内へ spray および drop による体内動態および痙攣抑制効果に対する鼻粘膜吸収領域の影響	…81

第1節	メチレンブルー溶液を用いた経鼻投与直後の鼻粘膜着色領域の解析…	81
第2節	鼻粘膜着色領域と体内動態パラメータの関係…	86
第3節	鼻粘膜着色領域と各種脳組織および脳脊髄液中濃度…	88
第4節	鼻粘膜着色領域と痙攣抑制効果…	90
第4章	本編の小括および考察…	92
結論		95
謝辞		99

実験の部	…100
第1編 実験方法	…100
第2編 実験方法	…105
第3編 実験方法	…108
引用文献	…110

総論の部

緒言

てんかん重積状態 (status epilepticus, SE) とは、5 分以上の連続する臨床的、電気生理学的な発作活動、または発作間で回復のない頻発的な発作活動である¹⁻⁴⁾。SE 発作の長期化は、死亡率の上昇および臨床転帰の悪化に関係するため、速やかな痙攣抑制が望まれる⁵⁻⁹⁾。医療機関における SE の 1 次治療は、ジアゼパム (diazepam, DZP) 注射液の静脈内 (*i.v.*) 投与が行われる¹⁰⁾。また、家庭環境で発生する SE に対しては、*i.v.* 投与に比べると痙攣抑制効果が低い DZP 坐剤による直腸内 (*i.r.*) 投与が用いられている^{10, 11)}。一方、*i.v.* 投与および *i.r.* 投与の代替方法として、口腔粘膜、経肺、および鼻腔内 (*i.n.*) 投与などが挙げられる。しかし、SE 時は、顎のくいしばりや唾液分泌過多、呼吸苦や呼吸の停止により、口腔粘膜投与や経肺投与は困難な場合がある¹²⁾。そこで、医療従事者のいない環境でも患者自身やその家族によって容易に投与可能で、速やかな効果発現を期待できる *i.n.* 投与に着目した。

SE を速やかに抑制するためには、発作焦点と考えられる脳実質に DZP を移行させる必要がある。一般に、*i.n.* 投与された薬物の脳実質への移行は、鼻腔から全身循環系を経て、その後、血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) を通過する経路が考えられる。近年、その移行経路に加えて、Fig. 1 に示すように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た¹³⁻¹⁵⁾。ヒト鼻腔には、嗅覚部および呼吸部がそれぞれ約 10% と約 90% を占め、嗅覚部には中枢に向かって嗅神経が、呼吸部には三叉神経が伸びている (Fig. 1 I and II)¹⁶⁾。*i.n.* 投与された薬物の脳実質への移行経路は、嗅神経を経て嗅球に到達し前脳付近から脳実質へ移行する嗅神経経路と、三叉神経を介して後脳付近から脳実質へ移行する三叉神経経路の存在が報告されている (Fig. 1 I and II)^{17, 18)}。さらに、これらの嗅神経や三叉神経の神経周囲腔は、脳

脊髄液 (CSF) に満たされているため、CSF を介した脳実質への移行経路 (CSF 経路) の存在も明らかにされている (Fig. 1 III)¹⁹⁾。しかし、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。

SE の早期抑制を目的とした DZP の *i.n.* 投与は上述したように投与が簡便であることに加えて、良好なバイオアベイラビリティを期待することができる。Megan らは *i.n.* 投与された薬物のバイオアベイラビリティを最適化するために、医療従事者は以下の (1)~(4) を考慮する必要があると報告した^{20~23)}。

- (1) 薬剤を限られた鼻腔容積に適用するためには、濃縮した薬剤を用いて、投与量を最小量にする必要がある²¹⁾。
- (2) 薬剤をより大きな鼻粘膜表面積に分散させるためには、経鼻型 spray デバイスを使用する必要がある²²⁾。
- (3) 薬剤を鼻腔から効率的に高い吸収性を得るためには、1 回の投与量を両方の鼻孔から投与する必要がある²³⁾。
- (4) 薬剤を適切な鼻粘膜から吸収させるためには、鼻腔内の血液や粘液などの異物を取り除く必要がある²⁰⁾。

これらは *i.n.* 投与後の全身循環系への移行性増大に主眼を置いた提案であるが、NTB 経路を利用した脳移行性の向上にも影響を及ぼす考え方である。そこで、本研究は (1) と (2) に着目して、経鼻投与型 DZP 製剤の開発とその製剤の鼻腔への投与方法について検討することとした。

(1) *i.n.* 投与した薬液を鼻腔外および消化管へ漏出することなく、限られた鼻粘膜吸収領域に適用するためには薬液量を適切にコントロールすることが重要である。そこで、DZP を濃縮させた製剤設計としてマイクロエマルジョン (Microemulsion, ME) 化に着目した。ME は油、水および界面活性剤を混合した分散液で、ミセルの直径が約 1~100 nm であり、熱力学的に安定であると定義される²⁴⁾。DZP 含有 ME 製剤に関する報告はいくつかあるが、製剤の安定性や生体への安全性、製剤適用後の体内動態や薬理効果などについて総合的に検討した報告はない²⁵⁻²⁹⁾。

(2) 臨床における薬剤の *i.n.* 投与では、主に **drop** 式および **spray** 式による方法が用いられる。**drop** 式は注射器やスポイトを用いて薬剤を数滴ずつ鼻腔に流し込むことで薬剤を注入する方法であり、**spray** 式は粘膜噴霧装置や単位用量ポンプを用いて鼻腔内に薬剤を一定量噴霧する方法である^{20,23,30-32})。 **spray** 投与は、患者がどのような態勢でも投与できるため、臨床で最もよく用いられる方法である。しかし、基礎研究レベルでは、汎用性の高いラットを用いて *i.n.* 投与後の薬物動態および薬理効果を評価することが多い。このときの *i.n.* 投与は、マイクロシリンジに取り付けたポリエチレンチューブを介してまたはマイクロピペッターに装着したチップを介して鼻孔内に適用している^{33, 34})。これらの適用方法は臨床における **drop** 投与に相当し、一般的に臨床で用いられる **spray** 式に着目した詳細な研究報告はほとんどない。

これら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、経鼻投与型 DZP 含有 ME 製剤を調製し、製剤学的、薬物動態学的、薬理学的評価から総合的に有用性を検討することとした。さらに、ME 製剤の鼻腔内へ **spray** 投与による有用性を明らかにすることとした。

第 1 編では、DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの体内動態および痙攣抑制効果を評価し、*i.v.* および *i.r.* 投与したときの結果と比較することで、その有用性を明らかにした。また、*i.n.* 投与したときの DZP の脳実質への移行に対する NTB の関与について、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から明らかにし、脂溶性蛍光物質 Rhodamine B base を用いた *ex vivo* イメージング解析により *i.n.* 投与後の DZP 脳移行特性を考察した。第 2 編では、経鼻投与型 DZP 含有 ME 製剤を調製し、製剤学的安定性および鼻粘膜に対する安全性を明らかにした。また、DZP 含有 ME 製剤を *i.n.* 投与したときの体内動態および痙攣抑制効果を第 1 編の結果と比較することで、ME 化の有用性を明らかにした。第 3 編では、ME 製剤を鼻腔内に **spray** 投与したときの体内動態および痙攣抑制効果を評価し、**drop** 投与したときの結果と比較することで、

spray 投与の有用性を明らかにした。また、DZP 濃度の異なる ME 製剤を調製し、用量固定条件下で鼻腔内に spray および drop 投与したときの粘膜吸収領域と薬物動態パラメータ、各種脳組織および CSF 中濃度および痙攣抑制効果との関係を比較し、よりよい投与条件について考察した。

以下、得られた結果について論述する。

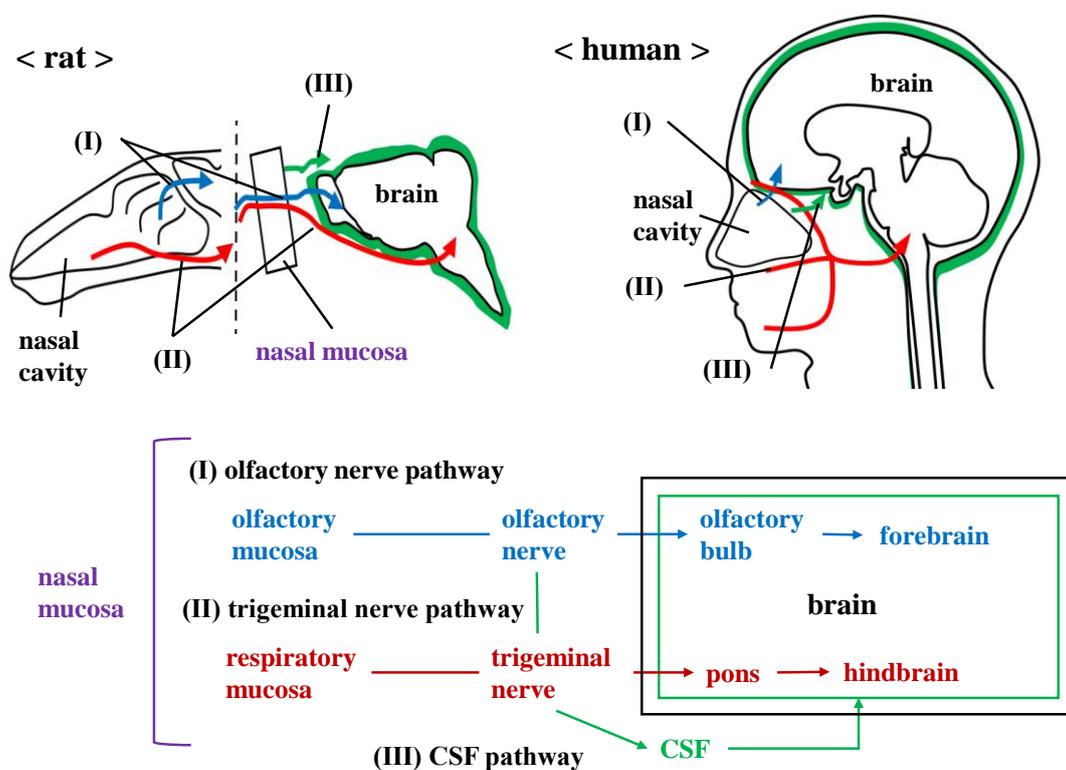


Fig. 1 Nose-to-brain pathway in rat and human.

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

医療機関では、SE に対する治療として、ベンゾジアゼピン (benzodiazepine, BZP) 系製剤の *i.v.* 投与が行われ、速やかな痙攣抑制を可能にしている³⁵⁾。家庭環境で発生した SE に対しては、医療従事者による処置を必要とするが、緊急通報から現場に到着するまでに米国では約 7.9 分³⁶⁾、日本では約 8.9 分³⁷⁾ の時間を要し、医療機関に搬送するまでにさらに時間を要する。また、SE の発症頻度は、小児や高齢者が多く、それは、心肺疾患を有する新生児で高く³⁸⁾、また、先進諸国では高齢化に伴い、特に 50 歳以上の人々で発症頻度が顕著に高くなっており³⁹⁻⁴³⁾、小児や高齢者は血管が細いことから静脈を確保することが難しく^{44,45)}、速やかな *i.v.* 投与が困難なケースもある。

DZP の *i.r.* 投与に関する臨床研究によると、*i.r.* 投与は *i.v.* 投与に比べて緩やかに血中濃度が上昇するため副作用が起きにくく、安全であると報告されている^{46,47)}。しかし、痙攣を抑制するまでに 10 分程度かかることから即効性を期待することができない⁴⁷⁾。また、公共の場における *i.r.* 投与は多くの介護者や患者が好ましくないと感じており、*i.r.* 投与に対する認識に関する調査では、51.9% が *i.r.* 投与を受けることに恥ずかしさを感じると報告している^{48,49)}。

近年、医療機関および家庭環境において、簡便に投与できる *i.n.* 投与が注目されている。一般に、*i.n.* 投与された薬物の脳実質への移行は、鼻腔から全身循環を経て、BBB を通過することで脳実質へ移行する経路に加えて、NTB 経路¹⁷⁻¹⁹⁾ の寄与も考えられる。そのため、*i.n.* 投与は、口腔粘膜、経肺および *i.r.* 投与よりも薬物の速やかな脳実質への移行が期待できる。

薬物の分配係数 ($\log P$) 値は、脂質への溶解度と薬物が生物学的障壁を越えて透過する速度を決定する⁵⁰⁾。SE 治療に用いられる DZP の $\log P$ は 2.8 で親油性が高いため、血液中から脳実質への BBB を介した高い脳移行性が期待される⁵¹⁾。実際に、DZP は、同じ BZP 系抗てんかん薬のロラゼパムやミダゾラムよりも脳移行性が高く、ヒトでは *i.v.* 投与後約 30 秒で効果発現する⁵²⁻⁵⁴⁾。このことは、DZP が全身循環系から BBB を介して脳実質へ速やかに分布することを示している。一方、Stuart らは、Wistar ラットを用いて抗うつ作用を有する GW468816 ($\log P$: 3.8) の *i.n.* 投与後の脳内動態を検討した結果、最高脳中濃度到達時間 ($T_{\max,b}$) が 1 分で、鼻腔から脳への直接的移行の寄与率 (Direct Transport Percentage, DTP) は 99.6%であると報告しており、この薬物の鼻腔から脳実質への直接移行の関与を明らかにした⁵⁵⁾。この薬物と同じ脂溶性物質である DZP も鼻腔内から脳実質へ NTB を介して速やかに移行する可能性があるが、*i.n.* 投与直後から脳内動態を評価した報告はこれまでにない。

これまでに報告されている多くの臨床研究では、DZP 製剤を *i.n.* 投与したときの速やかな全身循環系への移行について明らかにされてきた⁵⁶⁻⁶¹⁾。しかし、SE 治療ガイドラインには DZP 注射液の *i.n.* 投与は推奨されておらず、また、経鼻投与型 DZP 製剤も市場されていない。救急を要する医療現場における DZP の *i.n.* 投与を実践させるためには、*i.n.* 投与用の新たな DZP 製剤の体内動態および痙攣抑制効果に関する詳細な検討が必要である。

そこで本編では、SE の早期抑制を目的とした DZP の *i.n.* 投与の有用性を体内動態および痙攣抑制効果の観点から明らかにし、速やかな痙攣抑制を可能にす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を目的とした。

第 1 章では、DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの体内動態を *i.v.* および *i.r.* 投与したときと比較した。第 2 章では、DZP 注射液を *i.n.* 投与したときのペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発性 SE モデルラットに対する痙攣抑制効果を *i.v.* および *i.r.* 投与したときと比較した。また、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から NTB の関与を検討した。第 3 章では、脂溶性蛍光物質 Rhodamine B base を用いた *ex*

vivo イメージング解析により *i.n.* 投与後の DZP 脳移行特性を考察した。

以下、得られた結果について論述する。

第1章 DZP 注射液投与後の体内動態

第1節 DZP 注射液の *i.n.*、*i.v.* および *i.r.* 投与による全身循環系への移行性

本節では、DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの全身循環系への移行性を *i.v.* および *i.r.* 投与したときの結果と比較することで、その有用性を明らかにすることを目的とした。臨床で用いられるセルシン注射液の処方および用法用量に基づいて、5 mg/mL DZP 注射液を調製し、0.5 mg/kg で *i.n.* および *i.v.* 投与、1.0 mg/kg で *i.r.* 投与したときの体内動態を評価し、比較検討した⁶²⁾。そのときの血漿中濃度-時間プロファイルを Fig. 2 に、体内動態パラメータを Table 1 に示した。DZP を 0.5 mg/kg で *i.n.* 投与の最高血漿中濃度 ($C_{\max, p}$) は 0.323 $\mu\text{g/mL}$ で、その濃度への到達時間 ($T_{\max, p}$) は 4.5 分だった (Fig. 2 and Table 1)。これらは、*i.r.* 投与したときよりも $C_{\max, p}$ は 1.4 倍有意に上昇し、 $T_{\max, p}$ はおよそ半分に有意に短縮した (Fig. 2 and Table 1)。また、0.5 mg/kg で *i.n.* 投与および 1.0 mg/kg で *i.r.* 投与したときの AUC_{0-180} は、それぞれ 13.7 $\text{min} \cdot \mu\text{g/mL}$ および 9.9 $\text{min} \cdot \mu\text{g/mL}$ で、絶対的バイオアベイラビリティ (%*F*) はそれぞれ 20.8% および 7.5% と計算された (Table 1)。これらの結果は、*i.n.* 投与したときの量的および速度的バイオアベイラビリティが *i.r.* 投与に比べて向上し、全身循環系への吸収性が優れていることを示している。

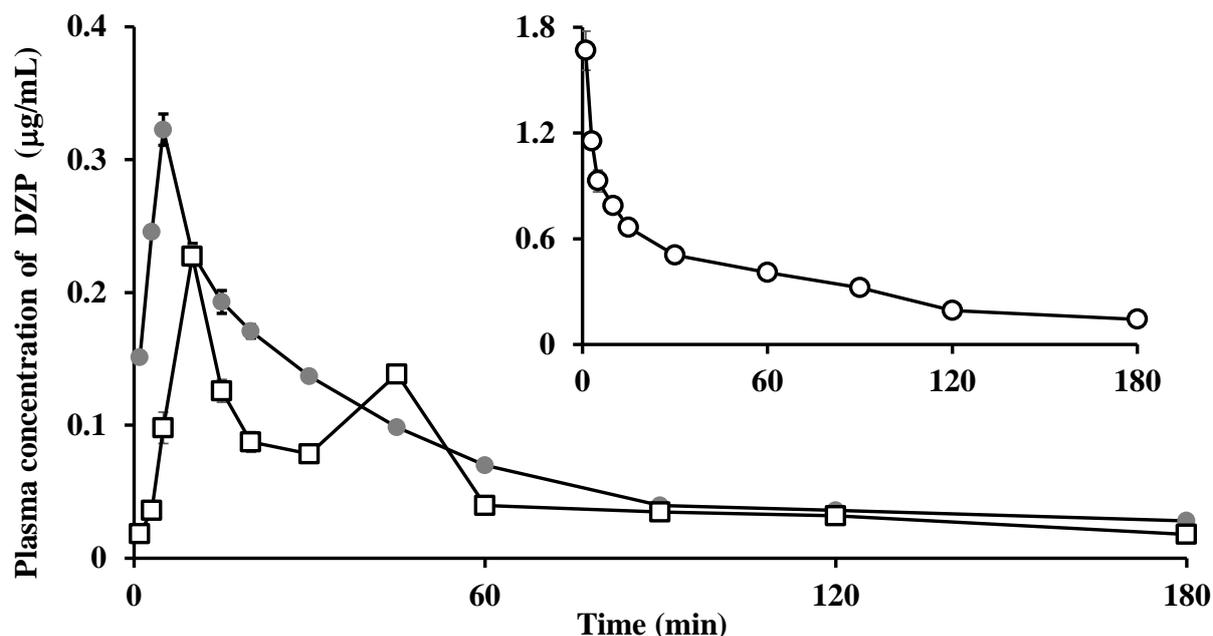


Fig. 2 Plasma concentration profiles of DZP after *i.v.*, *i.n.* (0.5 mg/kg), or *i.r.* (1.0 mg/kg) administration of DZP injection (5 mg/mL) in rats.

○ : *i.v.* administration, ● : *i.n.* administration, □ : *i.r.* administration.

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

Table 1 Pharmacokinetic parameters of DZP after *i.v.*, *i.n.* (0.5 mg/kg), or *i.r.* (1.0 mg/kg) administration of DZP injection (5 mg/mL) in rats.

Dosage form	k_a (min ⁻¹)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0 \rightarrow 180}$ (µg/mL·min)	$F_{0 \rightarrow 180}$ (%)
<i>i.v.</i>	-	-	-	65.7 ± 6.8	-
<i>i.n.</i>	0.043 ± 0.002	0.323 ± 0.016	4.5 ± 0.5	13.7 ± 0.7	20.8 ± 1.0
<i>i.r.</i>	0.020 ± 0.003	0.227 ± 0.007	10.0 ± 0.0	9.9 ± 0.6	7.5 ± 0.4

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

** : $p < 0.01$ (Tukey-Kramer test).

第2節 DZP 注射液の *i.n.*、*i.v.* および *i.r.* 投与による5分後の

各種脳組織および CSF への移行性

本節では、DZP 注射液 (5 mg/mL) を *i.n.* 投与 (0.5 mg/kg) したときの前脳、後脳、嗅球、三叉神経および CSF への移行性を、*i.v.* (0.5 mg/kg) および *i.r.* (1.0 mg/kg) 投与したときの結果と比較することで、その有用性を明らかにすることを目的とした。第1節に論述した DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの血漿における $T_{\max,p}$ が約5分後だったことから、各種脳組織および CSF 中濃度測定時間を5分に設定して検討した。

i.n.、*i.v.* および *i.r.* 投与5分後の前脳、後脳、嗅球、三叉神経および CSF 中 DZP 濃度を Fig. 3 に示した。また、そのときの血漿中濃度に対する前脳、後脳、嗅球、三叉神経および CSF 中濃度の比を Fig. 4 に示した。*i.n.*、*i.v.* および *i.r.* 投与経路間で比較すると、DZP 投与5分後の血漿、前脳および後脳中濃度において、 $i.v. > i.n. > i.r.$ 投与の順に高かった (Fig. 3a-c)。*i.n.* 投与したときの血漿中 DZP 濃度は、*i.r.* 投与したときよりも2.3倍有意に高かったが、前脳および後脳中 DZP 濃度では、*i.n.* 投与したときの方がそれぞれ6.0倍および11.8倍と有意に高く、その差は大きかった (Fig. 3b and c)。また、*i.v.* 投与後の DZP の血漿中濃度は、*i.n.* 投与よりも3.7倍大きかったにもかかわらず、前脳および後脳中濃度では2.8倍および1.9倍と血漿中濃度に比べてその差は小さかった (Fig. 3a-c)。各種脳組織への移行性の指標である前脳および後脳対血漿中濃度比は、 $i.n. > i.v. > i.r.$ 投与の順に高く、血漿および各種脳組織中 DZP 濃度のランクオーダーとは異なった (Fig. 4a and b)。

全身循環系から脳実質への移行以外に、NTB 経路を介した鼻腔から脳実質への直接移行が報告されている¹³⁻¹⁵)。その直接移行への関与が報告されている嗅球および三叉神経中 DZP 濃度を測定した結果、*i.n.* 投与では *i.v.* 投与よりもそれぞれ3.8倍および5.8倍と有意に高かった (Fig. 3d and e)。*i.n.* 投与後の血漿中濃度に対する各種脳組織および CSF 中濃度比は、*i.v.* および *i.r.* 投与したときよりも有意に高かった (Fig. 4a-e)。これらの結果は、DZP 投与5分後において、*i.n.* 投与は *i.v.* および *i.r.* 投与よ

りも高い脳移行性を示しており、鼻腔から嗅球、三叉神経および CSF を介した脳実質への直接移行が関与している可能性が示された。

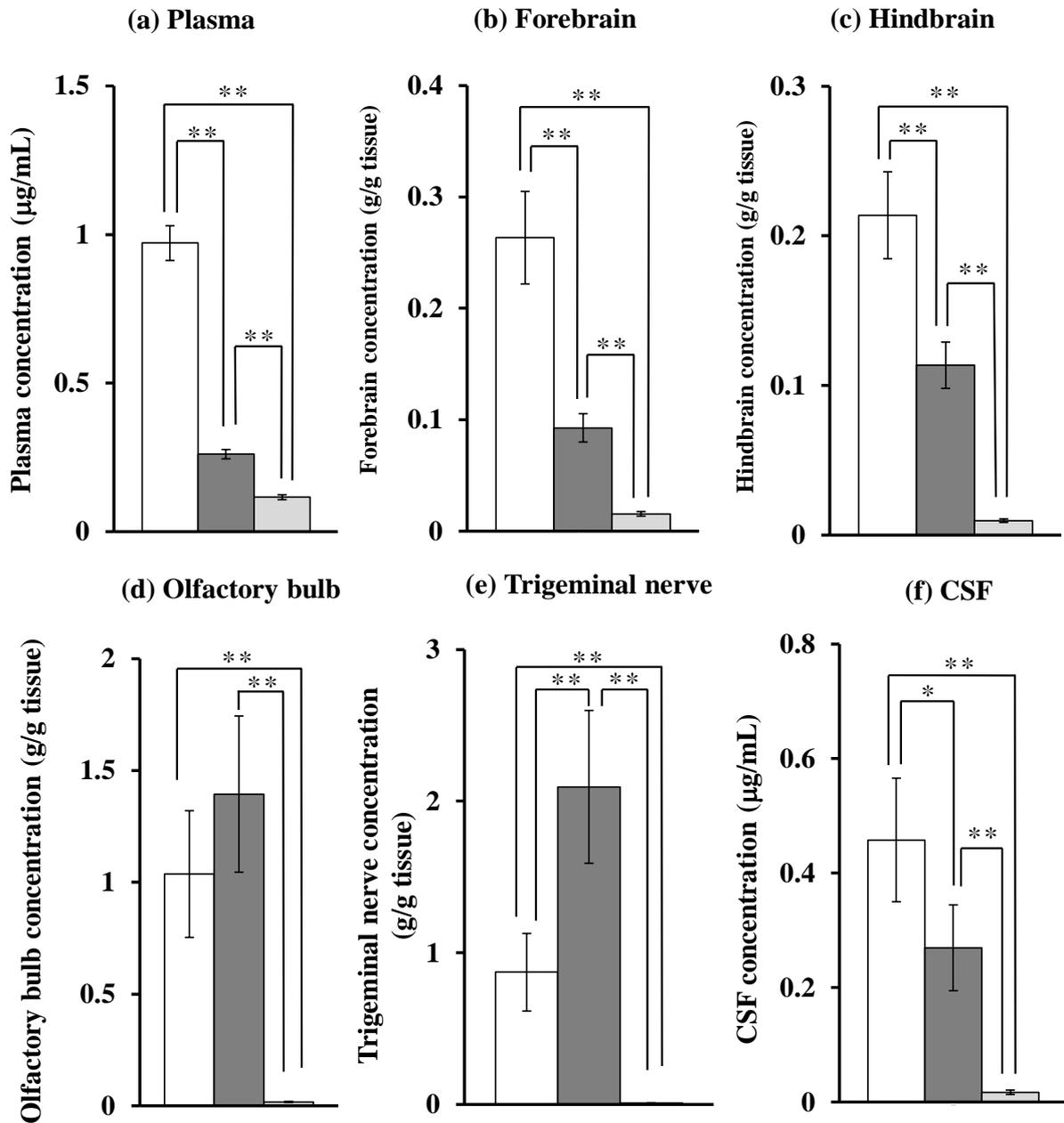


Fig. 3 DZP concentration in the (a) plasma and (b) forebrain, (c) hindbrain, (d) olfactory, (e) trigeminal nerve, and (f) CSF after *i.v.*, *i.n.* (0.5 mg/kg), or *i.r.* (1.0 mg/kg) administration of DZP injection (5 mg/mL) in rats.

□ : *i.v.* administration, ■ : *i.n.* administration, ◻ : *i.r.* administration.

Each data represents the mean S.E. (n = 3-12).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Tukey-Kramer test).

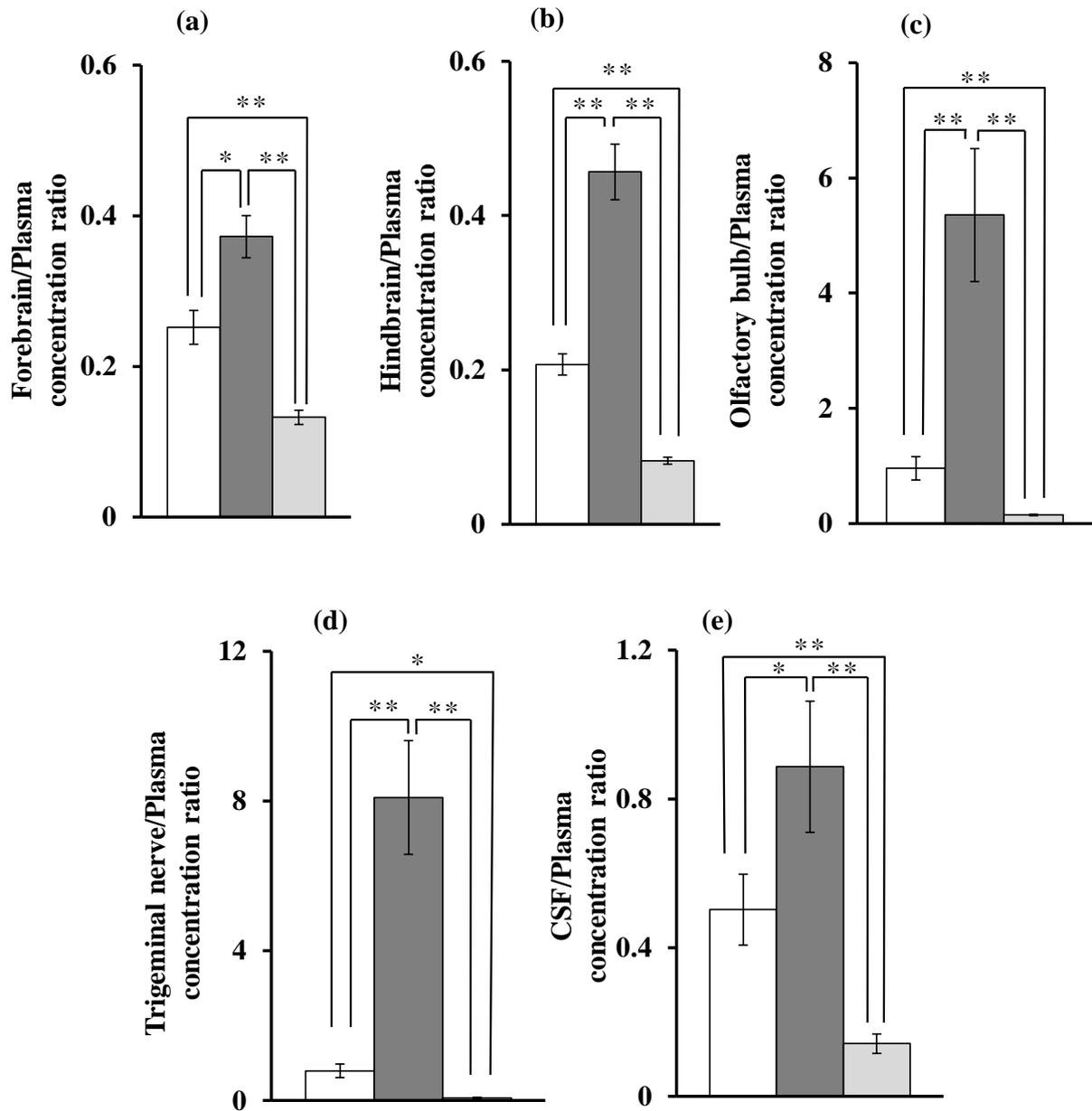


Fig. 4 Ratio of DZP concentration in the (a) forebrain, (b) hindbrain, (c) olfactory bulb, (d) trigeminal nerve, and (e) CSF to DZP concentration in the plasma after *i.v.*, *i.n.* (0.5 mg/kg), or *i.r.* (1.0 mg/kg) administration of DZP injection (5 mg/mL) in rats.

□ : *i.v.* administration, ■ : *i.n.* administration, ◻ : *i.r.* administration.

Each data represents the mean S.E. (n = 3-12).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Tukey-Kramer test).

第3節 DZP 注射液の *i.n.* および *i.v.* 投与による各種脳組織および CSF への移行性

第2節では、DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度は、*i.r.* 投与よりも有意に高く、血漿中 DZP 濃度に対する各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度は *i.v.* 投与よりも有意に高かった。このことから、*i.n.* 投与は *i.r.* 投与よりも脳移行性が高く、その移行には NTB 経路が大きく関与することが明らかになった。そこで、本節では、*i.n.* 投与したときの速やかな脳移行に対する NTB の関与を明らかにするために、各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度推移を評価し、*i.v.* 投与したときと比較した。

DZP 注射液を *i.n.* および *i.v.* 投与してから 60 分までの前脳、後脳、嗅球、三叉神経および CSF 中 DZP 濃度推移を Fig. 5 に示した。また、Table 2 に各種脳組織および CSF における投与経路別の $C_{\max, b}$ 、 $T_{\max, b}$ 、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および CSF 中への直接移行の寄与率の指標である DTP を示した。*i.n.* および *i.v.* 投与後の前脳および後脳中 DZP 濃度の $T_{\max, b}$ は 3 分だった (Fig. 5 and Table 2)。*i.v.* 投与の場合、血漿中 DZP 濃度の $T_{\max, p}$ は、投与直後と考えられ、各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度の $T_{\max, b}$ はそれよりも遅れていた (Fig. 5 and Table 2)。しかし、*i.n.* 投与後の前脳および後脳中 DZP 濃度における $T_{\max, b}$ は血漿中のそれより 5 分早かった (Fig. 5 and Table 2)。薬物が鼻腔から直接的に前脳および後脳に至る経路に存在する嗅球、三叉神経および CSF 中 DZP 濃度は、*i.n.* 投与では *i.v.* 投与よりも嗅球、三叉神経および CSF ではそれぞれ 1.2 倍、4.6 倍および 1.8 倍と有意に大きくなった (Fig. 5 and Table 2)。特に、*i.n.* 投与後の三叉神経における $T_{\max, b}$ は、*i.v.* 投与よりも早かった (Fig. 5 and Table 2)。これらの各種脳組織および CSF は、NTB に関与していることが報告されているため、各種脳組織および CSF への標的効率の指標である DTE および鼻腔から各種脳組織および CSF 中への直接移行の寄与率の指標である DTP を算出した。*i.n.* 投与は、各種脳組織および CSF

の DTE は「1」より大きく、また、*i.n.* 投与後の DTP は嗅球で 95.9%、三叉神経で 97.2%、CSF で 77.5%であった (Table 2)。これらの結果は、全身循環から BBB を介した脳実質への移行に NTB を介した直接移行も関係していることを示し、特に *i.n.* 投与の方がその直接移行の優位性が高いと示唆された。

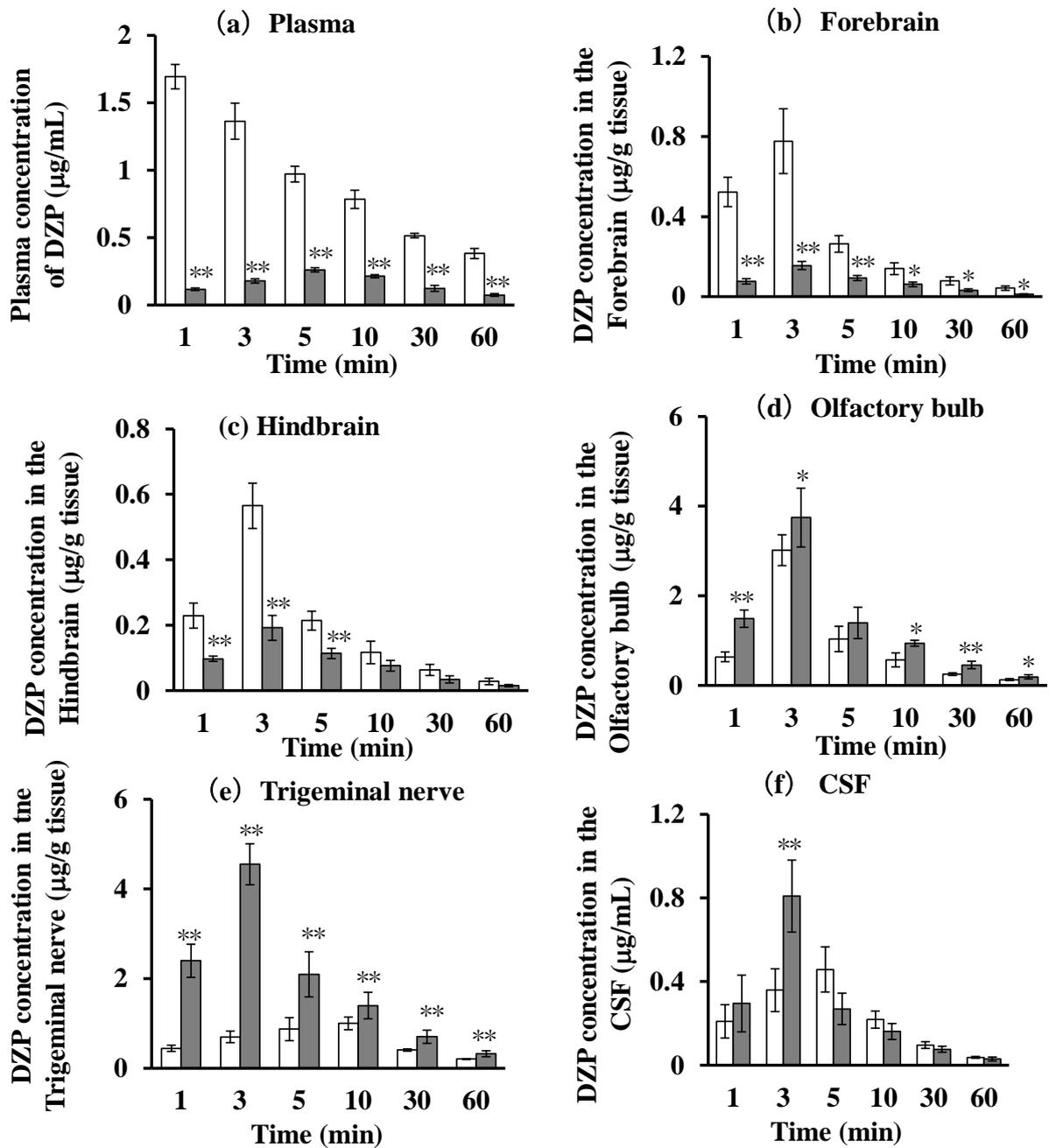


Fig. 5 DZP concentration in the (a) plasma, (b) forebrain, (c) hindbrain, (d) olfactory bulb, (e) trigeminal nerve, and (f) CSF after *i.v.* (0.5 mg/kg) or *i.n.* (0.5 mg/kg) administration (1.0 mg/kg) of DZP injection (5 mg/mL) in rats.

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

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

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared with *i.v.* administration (dunnett's multiple comparisons test).

Table 2 Pharmacokinetic parameters of DZP in the different parts of the brain and CSF after *i.v.* or *i.n.* (0.5 mg/kg) administration of DZP injection (5 mg/mL) in rats.

Brain tissue	Dosage form	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	T_{\max} (min)	DTE (%)	DTP (%)
Forebrain	<i>i.v.</i>	0.777 ± 0.134	3.0 ± 0.0	-	-
	<i>i.n.</i>	0.155 ± 0.352 **	3.0 ± 0.0	1.5	33.5
Hindbrain	<i>i.v.</i>	0.565 ± 0.069	3.0 ± 0.0	-	-
	<i>i.n.</i>	0.192 ± 0.038 **	3.0 ± 0.0	2.4	44.0
Olfactory bulb	<i>i.v.</i>	3.02 ± 0.34	3.0 ± 0.0	-	-
	<i>i.n.</i>	3.75 ± 0.658 **	3.0 ± 0.0	7.21	95.9
Trigeminal nerve	<i>i.v.</i>	1.00 ± 0.14	10.0 ± 0.0	-	-
	<i>i.n.</i>	4.55 ± 0.46 **	3.0 ± 0.0 **	8.89	97.2
CSF	<i>i.v.</i>	0.458 ± 0.108	5.0 ± 0.0	-	-
	<i>i.n.</i>	0.809 ± 0.172 **	3.0 ± 0.0 **	4.05	77.5

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

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

第2章 DZP 注射液投与後の PTZ 誘発性 SE モデルラット に対する痙攣抑制効果

第1節 DZP 注射液の *i.n.*、*i.v.* および *i.r.* 投与による痙攣抑制効果

本節では、PTZ を腹腔内投与 (120 mg/kg) して誘発させた SE モデルラットに対して、DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの痙攣抑制効果を *i.v.* および *i.r.* 投与したときと比較し、その有用性を明らかにすることを目的とした。痙攣抑制効果は、DZP 投与後にその効果が現れたラットの割合 (痙攣抑制発現率)、痙攣が抑制されるまでに要した時間 (痙攣抑制潜時時間)、痙攣抑制後に再発したラットの割合 (痙攣再発率) とした。

PTZ 誘発性 SE モデルラットに対して、DZP 注射液を *i.n.*、*i.v.* および *i.r.* 投与したときの痙攣抑制効果を Table 3 に示した。DZP を 0.5 mg/kg で *i.n.* 投与したときの痙攣抑制発現率は 80%、痙攣抑制潜時時間は 5.0 分だった (Table 3)。これに対して、*i.r.* 投与は、*i.n.* 投与の 2 倍量の 1.0 mg/kg を投与したのにもかかわらず、痙攣抑制発現率は 60%、痙攣抑制潜時時間は 15.6 分だった (Table 3)。一方、0.5 mg/kg で *i.v.* 投与したときの DZP による痙攣抑制発現率は 100% で、痙攣抑制潜時時間は 2.2 分だったことから、*i.n.* 投与による投与直後の痙攣抑制効果は *i.v.* 投与には及ばないものの、*i.r.* 投与に比べて効率的な効果を示した (Table 3)。さらに、痙攣再発率は、*i.v.* および *i.r.* 投与の場合よりも *i.n.* 投与が最も低かった (Table 3)。このことから、*i.n.* 投与したときの痙攣抑制効果は、*i.r.* 投与に比べて高く、速やかな全身循環系および各種脳組織および CSF への移行が痙攣抑制潜時時間の短縮に関係している可能性が考えられた。また、*i.n.* 投与での痙攣再発率は、*i.v.* 投与および *i.r.* 投与に比べて低く、*i.n.* 投与は痙攣の再発予防に対して有効な投与経路となる可能性が高いと考えられた。

Table 3 Seizure suppression effect 5 min after *i.v.*, *i.n.* (0.5 mg/kg), or *i.r.* (1.0 mg/kg) administration of DZP injection (5 mg/mL) in the PTZ-induced SE model rats.

Dosage form	Seizure suppression rate (%)	Seizure suppression time (min)	Seizure recurrence rate (%)
<i>i.v.</i>	100 (10/10)	2.2 ± 0.5	40 (4/10)
<i>i.n.</i>	80 (8/10)	5.0 ± 0.3	13 (1/8)
<i>i.r.</i>	60 (6/10)	15.6 ± 1.7	67 (4/6)

Each data represents the mean S.E. (n = 10).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Tukey-Kramer test).

第 2 節 DZP 注射液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の関係

本節では、DZP 注射液投与後の血漿中 DZP 濃度と痙攣抑制潜時時間の関係から、*i.n.* 投与したときの NTB 経路を介した脳実質への直接移行の関与を明らかにすることを目的とし、解析した。

PTZ 誘発性 SE モデルラットに対して各種投与経路から異なる用量で DZP を投与したときの痙攣抑制潜時時間とその直後の血漿中濃度の関係を Fig. 6 に示した。*i.v.*、*s.c.* および *i.r.* 投与では、いずれの場合も必ず全身循環に入った薬物が BBB を通過して脳実質へ移行する。これら 3 つの投与経路を対象とした血漿中 DZP 濃度と痙攣抑制潜時時間の相関解析より、それらの間にはグラフ中に実線で示した回帰直線 ($y = -16.427x + 17.445$) が得られ、両者の間に有意な負の相関が認められた (Fig. 6, $r = -0.9973$, $p = 0.00001$)。一方、*i.n.* 投与により得られたデータは、グラフ中の点線で示した回帰曲線 ($y = -12.691x + 8.698$) が得られ、実線で示される関係よりも低濃度で短時間側にプロットされた (Fig. 6)。この結果は *i.n.* 投与時では血漿中濃度から算出される痙攣抑制潜時時間よりも速やかに効果が発現したことを示し、DZP の脳への直接移行性が速やかで効果発現に関係している可能性があると考えられた。

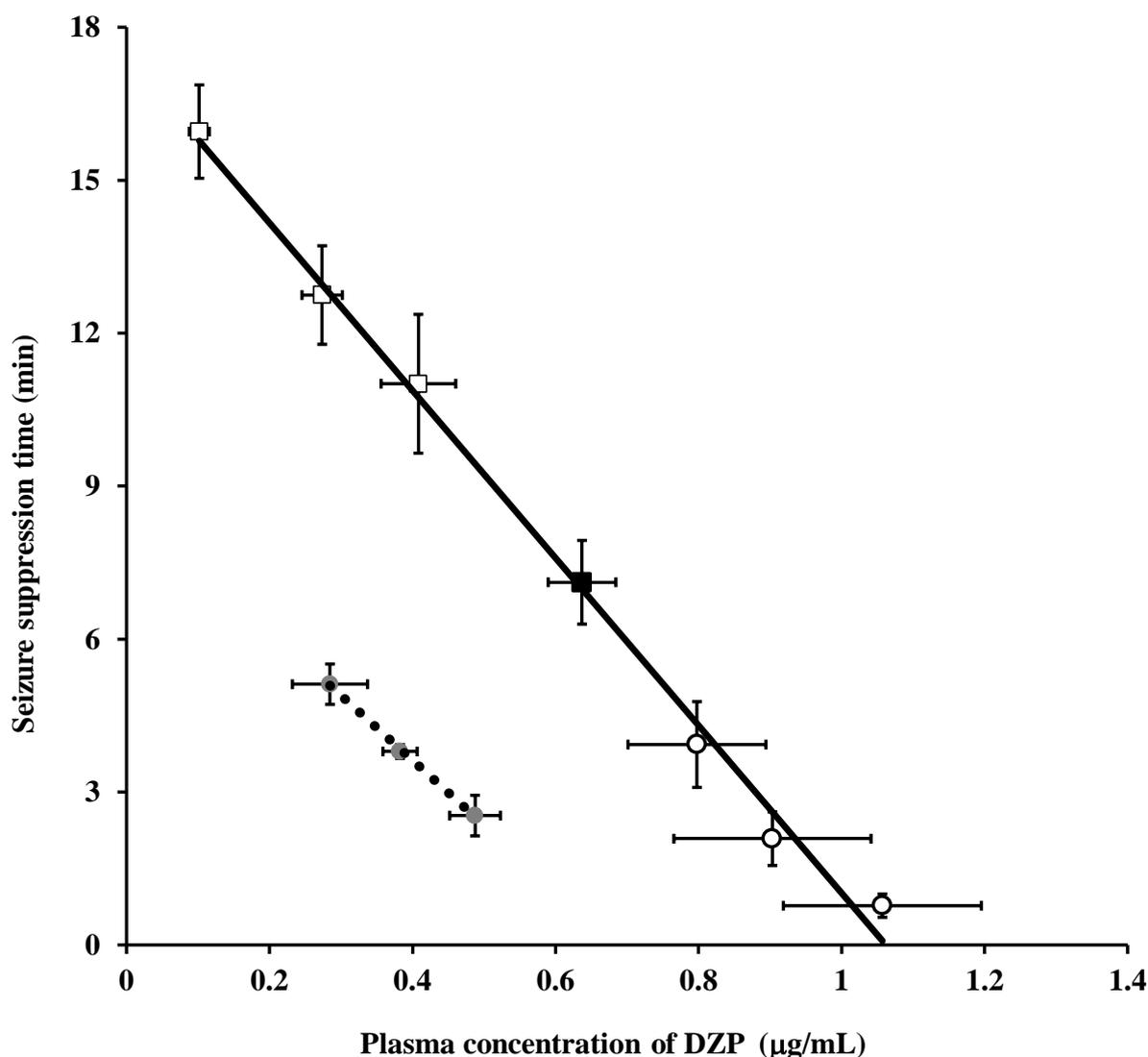


Fig. 6 Relationship between the plasma concentration of DZP immediately after seizure suppression and the seizure suppression time after *i.v.* (1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.2 mg/kg), *s.c.* (2.0 mg/kg), *i.n.* (2.0 mg/kg, 1.0 mg/kg, 0.5 mg/kg), or *i.r.* administration (4.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 1.0 mg/kg) of DZP injection (5.0 mg/mL) in SE model.

○ : *i.v.* administration, ■ : *s.c.* administration, □ : *i.r.* administration, Solid line $y = -16.427x + 17.445$ ($r^2 = 0.995$, $r = -0.9973$, p value = 0.00001).

● : *i.n.* administration, Dashed line $y = -12.691x + 8.698$ ($r^2 = 0.999$, $r = -0.9994$, p value = 0.0000005).

Each data represents the mean S.E. (n = 4-12).

第3章 脂溶性蛍光物質 Rhodamine B base を用いた *ex vivo* イメージング解析による *i.n.* 投与後の DZP 脳移行特性に関する考察

本編の第1章の第3節および第2章の第2節より、*i.n.* 投与後の DZP の脳実質への移行に NTB が関与していることが示唆された。しかし、DZP の発作抑制効果発現には発作焦点と考えられる視床付近への薬物送達が重要であるが、DZP が送達された脳領域や送達経路に関しては不明である。そこで、本章では、DZP (MW: 284.74, log P: 2.80) と分子量および log P 値が近い脂溶性蛍光物質である Rhodamine B base (RBB, MW: 444.25, log P: 2.62) を *i.n.* 投与したときの脳移行特性を *ex vivo* 蛍光イメージング画像により明らかにすることを目的とした。

RBB 溶液を *i.n.* および *i.v.* 投与後 1、3、5、10、30、60 分までに採取した各種脳組織および CSF を Fig. 7 に示したように並べて、*ex vivo* 蛍光イメージング画像を Fig. 8 に示した。*i.v.* 投与 1 分後に前脳付近に蛍光が検出され、3 分後には強い蛍光シグナルを示した (Fig. 8 A-I and II)。蛍光シグナルは、1 分から 10 分にかけて前脳から後脳へ向けて広がり、5 分後には CSF にも検出された (Fig. 8 A-I~IV)。すべての蛍光シグナルは、10 分から 30 分後にかけて減少傾向を示し、60 分後には完全に消失した (Fig. 8 A-IV~VI)。RBB 溶液を *i.n.* 投与すると、1 分後に後脳付近、三叉神経および CSF に蛍光が検出され、3 分後には三叉神経、CSF および脳実質中心の視床付近から最も強い蛍光シグナルが検出された (Fig. 8 B-I and II)。蛍光シグナルは、投与 1 分から 5 分にかけて三叉神経終末部と考えられる後脳付近から広がった (Fig. 8 B-I~III)。そして、10 分から 60 分後にかけて、その蛍光シグナルは消失傾向を示した (Fig. 8 B-IV~VI)。このような *i.n.* 投与後で観察された蛍光シグナルの挙動は、*i.v.* 投与の場合とは異なり、投与経路の違いにより薬物が送達される脳領域および脳内の分布パターンが異な

ることが明らかになった。

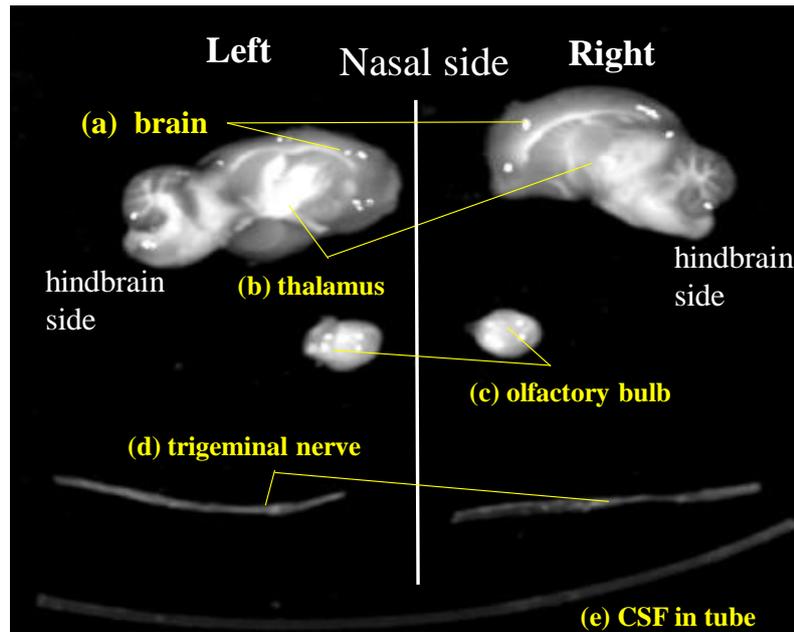


Fig. 7 Each brain tissue and CSF taken after *i.v.* or *i.n.* administration (0.5 mg/kg) of RBB solution (5 mg/mL) in rats. Each brain tissue and CSF: (a) brain, (b) thalamus, (c) olfactory bulb, (d) trigeminal nerve, (e) CSF in tube.

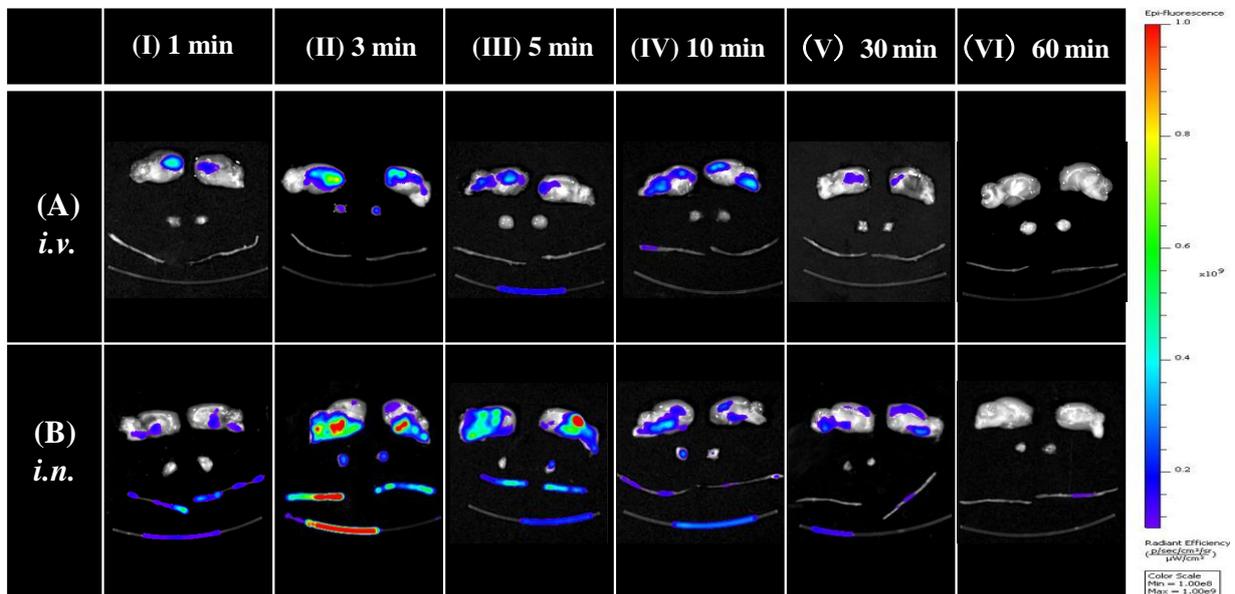


Fig. 8 *Ex vivo* fluorescence imaging of the sagittal plane of the brain hemisphere and olfactory bulb, trigeminal nerve, and CSF in the collection tube after *i.v.* or *i.n.* administration (0.5 mg/kg) of RBB solution (5 mg/mL) in rats. n = 3.

第4章 本編の小括および考察

本編では、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することを目的とし、*i.n.*投与後のDZPの全身吸収性、脳移行性および痙攣抑制効果を検討した。さらに、DZPと同じ脂溶性蛍光物質RBBを用いた各種脳組織およびCSFの*ex vivo*蛍光イメージング解析を行った。

*i.n.*投与後の血漿、各種脳組織およびCSF中DZP濃度推移は、*i.r.*投与よりも高く、このことが速やかな痙攣抑制効果に関係していると考えられた (Figs. 2 and 3, Table 3)。全身循環を介して脳へ移行することが明らかな*i.v.*、*s.c.*および*i.r.*投与後の痙攣抑制潜時時間と血漿中DZP濃度との関係は良好な負の相関を示した (Fig. 6)。*i.n.*投与後のデータはこの近似直線には一致せず、低い血漿中DZP濃度で高い痙攣抑制効果が認められた。また、*i.n.*投与後の各種脳組織およびCSF中DZP濃度の $T_{\max,b}$ は3分で、血漿中DZP濃度の $T_{\max,p}$ よりも短かった (Fig. 5 and Table 2)。このことは*ex vivo*蛍光イメージング画像の結果と同様の傾向を示した (Fig. 8)。これらの結果から、*i.n.*投与されたDZPは全身循環系への移行に加えて、脳実質への直接的な移行が示唆された。

近年、中枢神経系への直接的な薬物移行を可能にする*i.n.*投与に着目した製剤開発が行われる。*i.n.*投与された薬物は全身循環からBBBを介して脳へ移行する経路に加えて、嗅球、三叉神経およびCSFを介して脳に直接的に移行することが報告される³¹⁻³³⁾。本研究においてDZPを*i.n.*投与後の嗅球、三叉神経およびCSFのDTEは全て1を超えたことからNTB経路の関与が示唆され、DTPでは全て高い割合を示したことから、全身循環からBBBを介した脳への移行よりもNTB経路の寄与が大きいことが示唆された。しかし、Kaurrらは、DZPの*i.n.*投与後の脳組織におけるDTEおよびDTPは、0.99および0.48となり、脳への有意で直接的な移行はないことを報告した²⁶⁾。この相違した要因として大きく2つのことが考えられる。1つ目は、Kaurrらが

i.n. 投与後 5、10、20、40、および 60 分の脳中濃度を測定したが、本研究では *i.n.* 投与後 1、3、5、10、30 および 60 分の脳中濃度を測定した。その理由は、PTZ 誘発性 SE モデルラットに対して DZP を *i.n.* 投与後の痙攣抑制時間は約 5 分であることを明らかにし、5 分よりも早い時間における脳組織中濃度が重要であると考えたからである。従って、脳組織採取時間を 1 分と 3 分に設定した。その結果、*i.n.* 投与時の各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度の $T_{\max, b}$ は 3 分となり、5 分に比べて 1 分と 3 分の各種脳組織中濃度は高かった (Fig. 5 and Table 2)。このことは、DZP の *i.n.* 投与したときの速やかな脳移行を評価するうえで 5 分以前のデータの重要性を示している。従って、Kaurr らは脳組織濃度の高い 5 分以前のデータを反映していないことが、各パラメータ値に影響し、ひいては NTB の関与がないという結論に至ったと考えられる。

本編において、*i.n.* 投与後の嗅球、三叉神経および CSF 中 DZP 濃度のピークは 3 分に到達し、三叉神経の $C_{\max, b}$ は嗅球および CSF よりも高かった (Fig. 5 and Table 2)。また、蛍光イメージング画像において、*i.n.* 投与 1 分から 3 分にかけて三叉神経および三叉神経終末部と考えられる脳領域から強い蛍光が検出された (Fig. 8 B-I and II)。さらに、嗅球、三叉神経および CSF の 1 分および 3 分での蛍光シグナルは三叉神経が最も強かった (Fig. 8 B-I and II)。これらのことから、*i.n.* 投与後の DZP は、速やかに三叉神経を介して脳実質へ移行していると考えられ、DTP および DTE の値からも三叉神経が嗅球および CSF よりも直接的な脳移行の寄与が大きいことが示唆された (Table 2)。鼻腔内の呼吸上皮を神経支配する三叉神経は、三叉神経節に入り、最初のニューロンが三叉神経主感覚核に投射し、次のニューロンが三叉神経毛帯を介して視床に投射している⁶³⁾。Akita らは、GLP-2 誘導体を *i.n.* 投与 3 分後から三叉神経主感覚領域に分布することを明らかにし、STELLA Fluor 600 蛍光標識 GLP-2 誘導体を *i.n.* 投与 5 分後には三叉神経節および三叉神経毛帯から蛍光が検出したと報告した⁶³⁾。さらに、GLP-2 誘導体を *i.n.* 投与 5 分後に三叉神経の神経線維から蛍光が検出され、*i.n.* 投与後の GLP-2 誘導体は三叉神経の細胞に取り込まれ、三叉神経主感覚核に到達した可能性があることを報告した⁶³⁾。我々の結果はこれらの報告と同様に *i.n.* 投与後の三叉

神経による速やかな薬物移行を示したと考えられる。さらに、三叉神経は、三叉神経主感覚領域から三叉神経毛帯を介して視床に到達することから、PTZにより誘発させた SE の発作焦点は視床付近と報告されている⁶⁴⁾。そのため、DZP の速やかな痙攣抑制効果は、DZP を視床付近に移行させる必要がある。*i.n.* 投与された DZP は三叉神経を介して視床付近に到達し、速やかな痙攣抑制効果を現している可能性が考えられた。

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 痙攣抑制効果

SE 治療に用いられる 5 mg/mL DZP 注射液の *i.v.* 投与用量は、0.5 mg/kg である⁶²⁾。例えば、体重 70 kg の成人の場合、7000 μ L を投与することとなる。救急医療の現場において、注射液を *i.v.* 投与から *i.n.* 投与に代替した際の推奨容量は、咽頭側への薬液の漏出を抑えられる鼻孔あたり約 500 μ L とされている⁶⁵⁾。そのため、7000 μ L を一度に *i.n.* 投与することは現実的に不可能である。

臨床では、注射液を鼻孔あたり 500 μ L を複数回に分けて、全量を投与することがあると報告されている⁶⁵⁾。全量 7000 μ L を *i.n.* 投与するときは、1 回の投与につき 500 μ L を鼻孔に投与できるため、これを鼻孔に 12 回繰り返す (500 μ L/1 回 \times 12 回 = 7000 μ L) ことになる。しかし、SE の速やかな痙攣抑制を目的としたとき、投与回数の増加は薬理作用が発現するまでの時間を遅延するため、分割投与は有用性が低いと考えられる。そこで、5 mg/mL の DZP 溶液を 10 および 20 倍濃縮させた 50 および 100 mg/mL の製剤を用いたとき、成人男性 (体重 70 kg) に対する投与容量は 700 および 350 μ L となる。本編における予備実験において、試験した添加剤の中で、最も高い DZP 溶解度を示したのは benzyl alcohol の 94.8 mg/mL であり、100 mg/mL の製剤を調製することは困難であると考えた。一方、成人男性 (体重 70 kg) に対する投与量が 700 μ L となる 50 mg/mL の DZP 製剤は、両側の鼻孔に 350 μ L ずつ投与することを前提とすると有用性が高く、調製可能であると考えられた。

単独の添加剤を高濃度で用いることで溶質の溶解性を高めることが可能だが、高濃度の添加剤は生体膜への傷害性および全身吸収後の赤血球に対する溶血作用により

免疫系への影響が懸念される⁶⁶⁻⁶⁸)。そこで、優れた DZP の溶解性と生体への影響を考慮して ME 化に着目した。

難溶性薬物 DZP を 50 mg/mL 以上の濃度で溶解可能な ME を調製するためには、ME を構成する油 (Oil, O) 相、界面活性剤 (Surfactant, S) 相および水 (Water, W) 相のうち O 相および S 相に用いる添加剤は、DZP を高濃度で溶解可能なものを用いる必要がある。そこで、O 相および S 相をそれぞれ 2 種類の添加剤を混合することとし、油相は 2 種類の油を混合した (Oil mix, O_{mix}) 相、界面活性剤および補助界面活性剤を混合した (Surfactant mix, S_{mix}) 相とした。補助界面活性剤とは界面活性剤同士のミセル形成を補助することで、低濃度の界面活性剤で ME を調製することが可能になる⁶⁹)。これまでに DZP 含有 ME 製剤の製剤学的な安定性および鼻粘膜への安全性を評価した研究報告はない。

近年、中枢疾患に対する治療薬を微粒子送達システムを利用することにより脳に薬物を標的化できる可能性が報告されている⁷⁰⁻⁷⁵)。Jigar らは、疼痛治療薬トラマドールの ME 化した製剤を *i.n.* 投与したときの脳中濃度はトラマドール溶液よりも有意に増大したと報告した⁷⁶)。トラマドール (MW: 299.84, log P: 3.08) と同等な低分子脂溶性薬物の DZP (MW: 284.74, log P: 2.80) も ME 化により速やかな各種脳組織および CSF への移行性が期待できる。また、Li らや Kaur らは、DZP 含有 ME 製剤の *i.n.* 投与による速やかな全身循環系への移行性については報告しているが、脳移行性や痙攣抑制効果に関する詳細な検討は行われていない^{25, 26})。

そこで、本編では、臨床で用いられる DZP 注射液の *i.v.* 投与量を適切な鼻腔内容量に調製するため、ME に対する DZP の溶解度が 50 mg/mL 以上で、製剤学的に安定性が高く、かつ鼻粘膜に対して安全性の高い DZP 含有 ME 製剤を調製することとした。また、DZP 含有 ME 製剤を *i.n.* 投与したときの体内動態および痙攣抑制効果から、ME 化の有用性を明らかにすることとした。

第 1 章では、DZP に対して高い溶解度を示す油、界面活性剤および補助界面活性剤を選択し、生体への影響を考慮して低濃度の界面活性剤で ME が調製可能な S_{mix} 相の混

合割合を選択した。その S_{mix} 相混合割合を一定にして S_{mix} 相内の界面活性剤および補助界面活性剤を示す o/w 型 ME を選択した。第 2 章では、第 1 章で選択したいくつかの ME の中から、過酷条件下の短期間安定性および室温条件下の長期安定性が高い ME を選択した。第 3 章では、第 2 章で選択したいくつかの ME の中から、鼻粘膜に対する安全性が高い ME を選択した。第 4 章では、第 3 章で最適化した DZP 含有 ME 製剤の *i.n.* 投与による体内動態を DZP 注射液の結果と比較することで、その有用性を検討した。第 5 章では、DZP 含有 ME 製剤の *i.n.* 投与による痙攣抑制効果を DZP 注射液の結果と比較することでその有用性を検討した。

以下、得られた結果について論述する。

第1章 o/w 型 ME 製剤の調製

第1節 DZP を高濃度で溶解可能な油、界面活性剤および補助界面活性剤の選択

難溶性薬物 DZP を 50 mg/mL 以上の濃度で溶解可能な ME を調製するためには、DZP を高濃度で溶解可能な ME を構成する O 相および S 相に用いる添加剤が必要である。そこで本節では、入手しやすい添加剤および Gattefosse 株式会社より提供された添加剤の中から DZP の溶解度が高い添加剤を明らかにすることを目的とした。

各種油における DZP の溶解度を Table 4 に示した。DZP の溶解度は benzyl alcohol (Ba) > triacetin (Ta) > oleic acid (Oa) の順に高い値が得られた (Table 4)。Ba は医療用医薬品の注射用剤として使用が認められていること、さらにアメリカ食品医薬品局は、Ta の生体への安全性が高いと報告していることから、これらの混合溶液を O_{mix} 相として用いることとした⁷⁷⁾。次に、各種界面活性剤に対する DZP の溶解度および Hydrophilic-Lipophilic-Balance (HLB) を Table 5 に示した。DZP の溶解度は transcuto1[®] HP (Tra) > capryol 90[™] (Cap) > labrasol[®] (Lab) の順に高い値が得られた (Table 5)。Tra および Cap は、HLB が 4 および 5 であることから w/o 型の乳化剤に適しており、Lab は、HLB が 12 であることから o/w 型の乳化剤に適している (Table 5)。本編では、難溶性薬物 DZP を内相に溶解させた o/w 型 ME 製剤の開発を目的としているため、本節では、DZP を高濃度で溶解可能で、o/w 型に適した HLB をもつ Lab を選択した。また、Table 6 に示したように、補助界面活性剤に対する DZP の溶解度は、dipropylene glycol (Dpg) > propylene glycol (Pg) > ethanol (Et) の順に高かったことから、最も高い溶解度を示した Dpg を選択した (Table 6)。従って、Lab と Dpg の混合溶液を S_{mix} 相として用いることとした。

Table 4 Solubility of various oils in DZP.

Oil	Solubility (mg/mL)
Benzyl alcohol	94.8 ± 2.4
Ethyl laurate	23.7 ± 3.9
Oleic acid	26.2 ± 3.5
Triacetin	40.1 ± 2.7

Data represent mean ± S. D. (n = 3).

Table 5 Solubility of various surfactants in DZP.

Surfactant	Solubility (mg/mL)	HLB
Capryol 90 TM	72.0 ± 0.7	5
Capylol [®] PGMC	60.3 ± 2.5	6
Labrafac TM Lipophile WL 1349	22.4 ± 1.5	1
Labrafac TM PG	28.5 ± 3.2	1
Labrafil [®] M 1994 CS	22.8 ± 0.4	9
Labrafil [®] M 2125 CS	32.0 ± 2.9	9
Labrasol [®]	63.9 ± 1.0	12
Lauroglycol TM 90	46.7 ± 2.9	3
Lauroglycol TM FCC	34.9 ± 3.0	5
Maisine [®] CC	34.5 ± 2.2	1
Peceol TM	29.9 ± 2.4	1
Plurol [®] Oleique CC 497	7.6 ± 0.4	3
Transcutol [®] HP	95.2 ± 2.8	4
Tween80	39.6 ± 1.3	15
Span60	31.4 ± 3.2	9

Data represent mean ± S. D. (n = 3).

Table 6 Solubility of various co-surfactants in DZP.

Co-surfactant	Solubility (mg/mL)
Propylene glycol	42.2 ± 2.7
Dipropylene glycol	51.2 ± 1.2
Ethanol	40.9 ± 2.5

Data represent mean ± S. D. (n = 3).

第2節 低濃度の界面活性剤で ME が調製可能な S_{mix} 相の混合割合の 選択

高濃度の界面活性剤は、生体膜に対する傷害性および生体膜透過後、血液中の赤血球を溶解することにより免疫機能に影響を及ぼすことが知られている^{66, 78-80}。そこで、ME による生体への影響を低くするためには、製剤中の界面活性剤量をできる限り少なくした ME 製剤を調製する必要がある。本節では、低濃度の界面活性剤で ME が調製可能な S_{mix} 相の混合割合を選択することを目的とした。

S_{mix} 相の Lab と Dpg の混合比率を A (1 : 3) 、 B (1 : 2) 、 C (2 : 3) 、 D (1 : 1) 、 E (3 : 2) 、 F (2 : 1) および G (3 : 1) と変化させたときの擬似 3 元系状態図における ME 領域を Fig. 9 に示した。また、 S_{mix} 相の A~G の比率のそれぞれ S_{mix} 0~100% (10%間隔) のときの最大 ME 出現数に対する実際の ME 出現数を Table 7 に示した。この例として、 S_{mix} 相の混合比率 A (1 : 3) で S_{mix} 10%のときの最大 ME 出現数は、① O_{mix} 80% : W10%、② O_{mix} 70% : W20%、③ O_{mix} 60% : W30%、④ O_{mix} 50% : W40%、⑤ O_{mix} 40% : W50%、⑥ O_{mix} 30% : W60%、⑦ O_{mix} 20% : W70%、⑧ O_{mix} 10% : W80%の 8 パターンが考えられ、実際の ME 出現数は、 O_{mix} 80% : W10%の 1 パターンのため、1/8 と示す (Table 7)。 S_{mix} 相の混合比率 A~G に移行することによって、ME 領域は油相割合の高い領域では縮小傾向にあり、油相割合の低い領域では拡大傾向にあった (Fig. 9)。このことは、 S_{mix} 相の混合比率 A から G に従って o/w 型への乳化作用が高い Lab 濃度が高まることによって領域が拡大したと考えられる。また、 S_{mix} 相の A~G の比率に対して S_{mix} 0 から 100%のときの最大 ME 出現数に対する実際の ME 出現数では、 S_{mix} 50%以上であれば全ての比率で ME が形成されたが、 S_{mix} 30%以下では ME が形成しにくいことが明らかになった (Table 7)。そこで、 S_{mix} 40%では各比率平均で 80%以上の ME が形成されることから、以後の検討からは S_{mix} 40%に固定して ME 製剤を調製することとした。

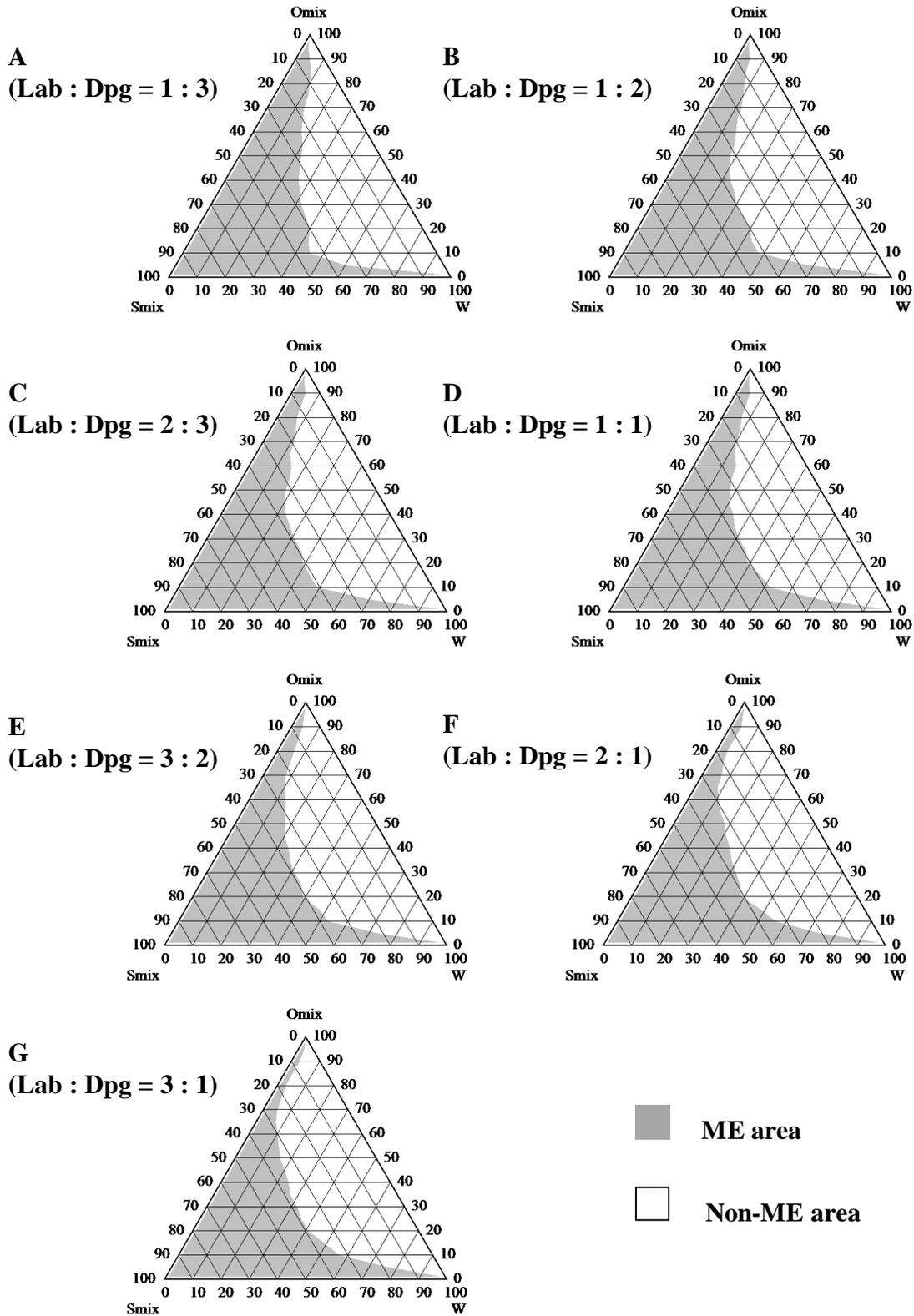


Fig. 9 ME area when O_{mix} phase ($T_a : B_a = 1 : 1$), S_{mix} phase (Lab : Dpg = (A) 1 : 3, (B) 1 : 2, (C) 2 : 3, (D) 1 : 1, (E) 3 : 2, (F) 2 : 1, (G) 3 : 1), Water phase (Purified water) are mixed.

Table 7 The actual number of ME occurrences relative to the maximum number of ME occurrences when oil and water are changed in 10% increments at each rate from 0 to 100% (every 10%) of S in A to G of the three-phase diagram.

Percentage of S_{mix}	A	B	C	D	E	F	G
0%	-	-	-	-	-	-	-
10%	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
20%	1/7	1/7	1/7	1/7	0/7	0/7	0/7
30%	2/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
40%	4/5	4/5	3/5	4/5	4/5	4/5	5/5
50%	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
60%	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
70%	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
80%	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
90%	-	-	-	-	-	-	-
100%	-	-	-	-	-	-	-

第3節 DZP の溶解度が 50 mg/mL 以上の o/w 型 ME の選択

第2節の結果より、 S_{mix} 相の混合割合を 40% に固定することとし、本節では、 S_{mix} 相の Lab および Dpg の混合比率を A(1:3)、B(1:2)、C(2:3)、D(1:1)、E(3:2)、F(2:1) および G(3:1) の7種類について、それぞれ① S_{mix} 40% : O_{mix} 50% : W 10%、② S_{mix} 40% : O_{mix} 40% : W 20%、③ S_{mix} 40% : O_{mix} 30% : W 30%、④ S_{mix} 40% : O_{mix} 20% : W 40%、⑤ S_{mix} 40% : O_{mix} 10% : W 50% の5点 (合計: 7種類×5点=35点) の混合液を調製し、濁度 0 の ME、その乳化型が o/w 型、DZP 溶解度が 50 mg/mL 以上の ME を選択することを目的とした。

A (Lab : Dpg = 1 : 3) における疑似 3 元状態図を Fig. 10 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および多分散指数 (polydispersity index, PDI) を Table 8 に示した。A1～A4 は、濁度 0 の粒子径 25 nm 以下の ME が調製された (Fig. 10 and Table 8)。A1 および A2 の外相は、油であったが、A2 と A3 の間で転相し、A3 および A4 の外相は水となり o/w 型 ME であった (Fig. 10 and Table 8)。A3 は、DZP 溶解度が 50 mg/mL 以上となり、A3 のみがすべての要件を満たした (Table 8)。

B (Lab : Dpg = 1 : 2) における疑似 3 元状態図を Fig. 11 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および PDI を Table 9 に示した。B6～B9 は、濁度 0 の粒子径 50 nm 以下の ME が調製された (Fig. 11 and Table 9)。B6 および B7 は、w/o 型、B8 および B9 は o/w 型 ME であった (Fig. 11 and Table 9)。B8 では DZP 溶解度が 50 mg/mL 以上となり、B8 のみがすべての要件を満たした (Table 9)。

C (Lab : Dpg = 2 : 3) における疑似 3 元状態図を Fig. 12 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および PDI を Table 12 に示した。C11～C13 は、濁度 0 の粒子径 40 nm 以下の ME が調製された (Fig. 12 and Table 10)。C11 および C12 は、w/o 型、C13 は o/w 型 ME であった (Fig. 12 and Table 10)。C13 では、DZP 溶解度 50 mg/mL 以上の ME が得られ、C13 のみがすべての要件を満たした (Table 10)。

D (Lab : Dpg = 1 : 1) における疑似 3 元状態図を Fig. 13 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および PDI を Table 11 に示した。D16～D18 および D20 は、濁度 0 の ME が調製された (Fig. 13 and Table 11)。D16 および D17 は、w/o 型、D18 および D20 は o/w 型 ME であった (Fig. 13 and Table 11)。D18 は、DZP 溶解度が 50 mg/mL 以上の ME が得られ、D18 のみがすべての要件を満たした (Table 11)。

E (Lab : Dpg = 3 : 2) における疑似 3 元状態図を Fig. 14 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および PDI を Table 12 に示した。E21～E23 および E25 は、濁度 0 の ME が調製された (Fig. 14 and Table 12)。E21 および E22 は、w/o 型、E23 および E25 は o/w 型 ME であった (Table 12)。E23 は、DZP 溶解度が 50 mg/mL 以上の ME が得られ、E23 のみがすべての要件を満たした (Fig.14 and Table 12)。

F (Lab : Dpg = 2 : 1) における疑似 3 元状態図を Fig. 15 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および PDI を Table 13 に示した。F26～F28 および F30 は、濁度 0 の ME が調製された (Fig. 15 and Table 13)。F26 および E27 は、w/o 型、F28 および F30 は o/w 型 ME であった (Fig. 15 and Table 13)。F28 のみが DZP 溶解度 50 mg/mL 以上の ME が得られ、F28 のみがすべての要件を満たした (Table 13)。

G (Lab : Dpg = 3 : 1) における疑似 3 元状態図を Fig. 16 に示し、濁度、乳化型、溶解度、粒子径および PDI を Table 14 に示した。G31～G34 は、濁度 0 の ME が調製された (Fig. 16 and Table 14)。G31 および G32 は w/o 型、G33 から G35 は o/w 型であった (Fig. 16 and Table 14)。G33 および G34 は、DZP 溶解度 50 mg/mL 以上の ME が得られ、G33 および G34 がすべての要件を満たした (Table 14)。

以上の結果より、A3、B8、C13、D18、E23、F28、G33 および G34 が DZP 溶解度が 50 mg/mL 以上の o/w 型 ME であることが明らかになり、第 2 章で製剤学的安定性を評価することとした。

Phase diagram symbol: A

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 1 : 3

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

○ : o/w type of Non-ME prot

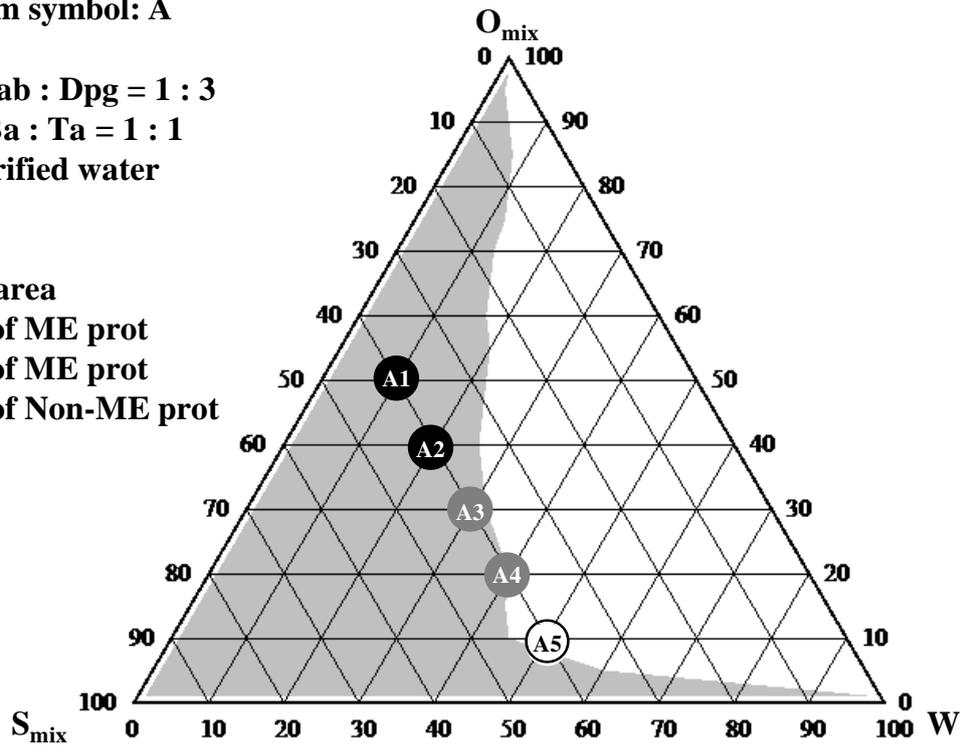


Fig. 10 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 1 : 3), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 8 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size, and PDI of No. A1, A2, A3, A4, and A5 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
A1	0.0 ± 0.0	w/o	124.2 ± 2.3	24.1 ± 28.8	0.34 ± 0.30
A2	0.0 ± 0.0	w/o	91.3 ± 2.0	23.5 ± 10.8	0.28 ± 0.03
A3	0.0 ± 0.0	o/w	51.5 ± 1.6	13.4 ± 4.7	0.25 ± 0.07
A4	0.0 ± 0.0	o/w	31.6 ± 2.0	16.4 ± 7.9	0.27 ± 0.09
A5	1.8 ± 0.0	o/w	18.6 ± 1.2	3256.7 ± 2033.2	0.16 ± 0.10

Data represent mean ± S. D. (n = 3) .

Phase diagram symbol: B

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 1 : 2

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

○ : o/w type of Non-ME prot

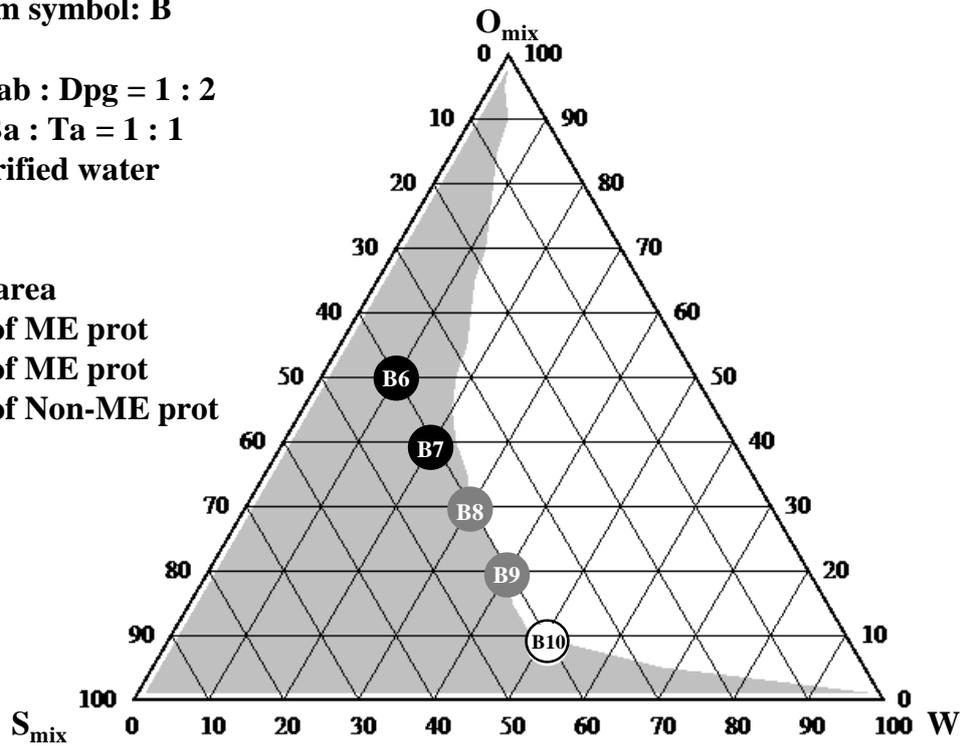


Fig. 11 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 1 : 2), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 9 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size and PDI of No. B6, B7, B8, B9, B19 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
B6	0.0 ± 0.0	w/o	128.7 ± 1.3	47.1 ± 53.0	6.17 ± 8.98
B7	0.0 ± 0.0	w/o	95.2 ± 1.4	250.4 ± 411.9	0.32 ± 0.25
B8	0.0 ± 0.0	o/w	56.6 ± 2.9	20.7 ± 2.0	0.28 ± 0.01
B9	0.0 ± 0.0	o/w	36.6 ± 1.0	46.3 ± 3.6	0.19 ± 0.01
B10	1.8 ± 0.0	o/w	20.5 ± 1.5	2580.0 ± 2090.6	0.30 ± 0.07

Date represent mean ± S. D. (n = 3) .

Phase diagram symbol: C

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 2 : 3

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

○ : o/w type of Non-ME prot

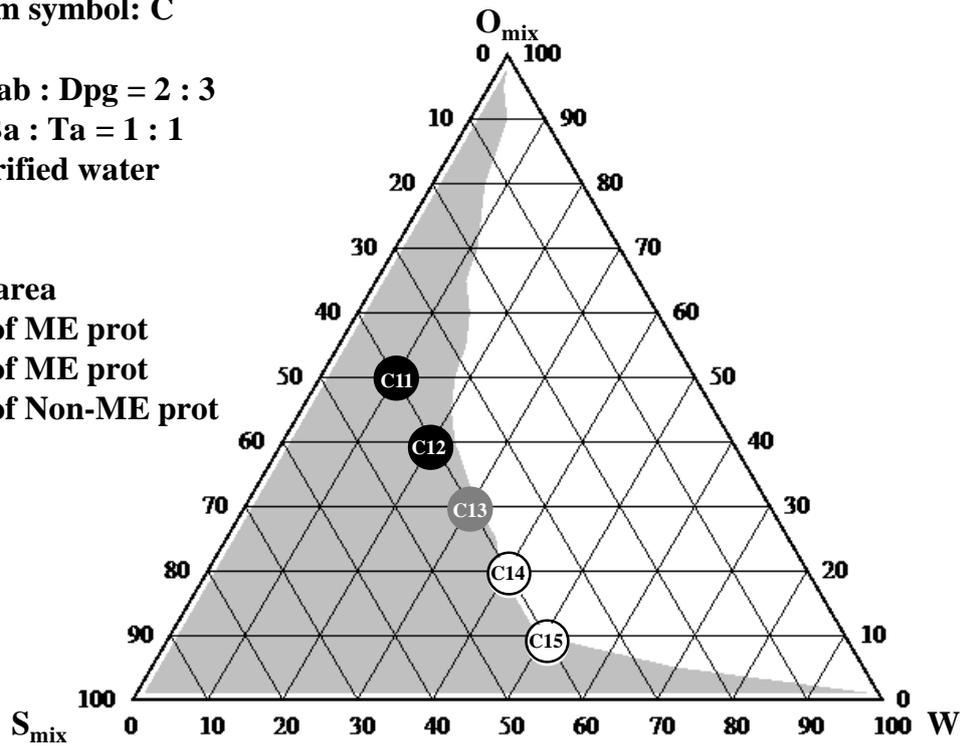


Fig. 12 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 2 : 3), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 10 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size, and PDI of No. C11, C12, C13, C14, and C15 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
C11	0.0 ± 0.0	w/o	134.2 ± 2.3	8.2 ± 2.5	0.16 ± 0.03
C12	0.0 ± 0.0	w/o	102.1 ± 1.3	23.0 ± 1.8	0.16 ± 0.05
C13	0.0 ± 0.0	o/w	61.9 ± 1.4	34.0 ± 13.3	0.21 ± 0.06
C14	1.9 ± 0.0	o/w	47.9 ± 3.9	2873.3 ± 637.4	0.70 ± 0.76
C15	1.8 ± 0.0	o/w	22.6 ± 2.9	486.7 ± 67.7	1.11 ± 0.48

Data represent mean ± S. D. (n = 3) .

Phase diagram symbol: D

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 1 : 1

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

○ : o/w type of Non-ME prot

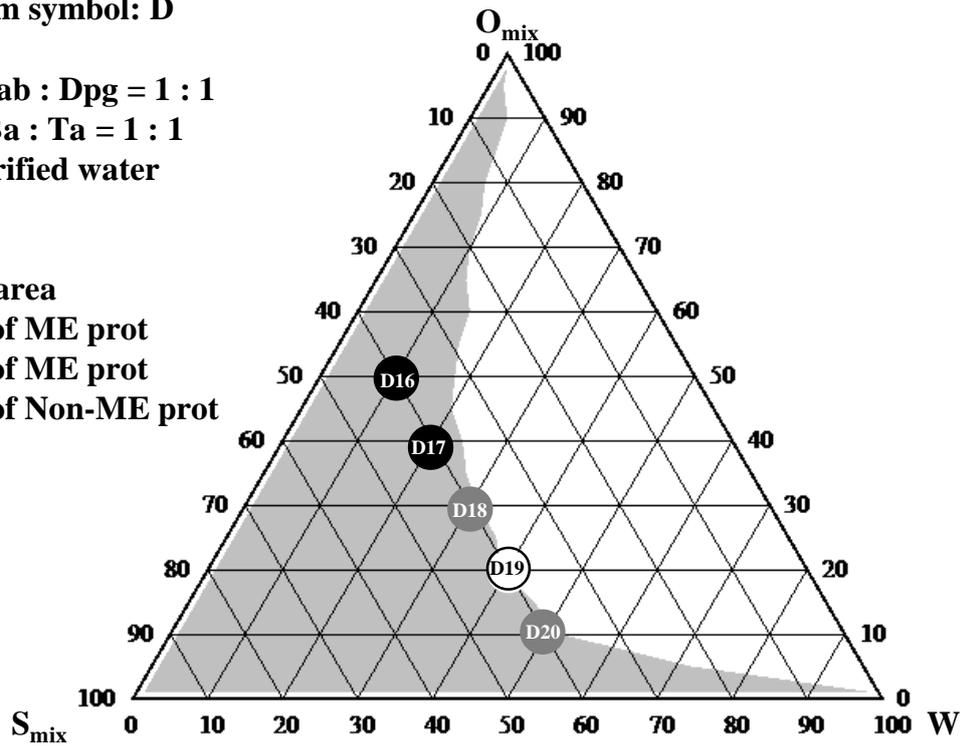


Fig. 13 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 1 : 1), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 11 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size, and PDI of No. D16, D17, D18, D19, and D20 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
D16	0.0 ± 0.0	w/o	137.6 ± 1.2	42.1 ± 36.3	0.46 ± 0.34
D17	0.0 ± 0.0	w/o	108.2 ± 1.0	14.4 ± 2.7	0.29 ± 0.00
D18	0.0 ± 0.0	o/w	65.4 ± 2.0	41.7 ± 1.6	0.19 ± 0.01
D19	1.8 ± 0.0	o/w	53.2 ± 2.6	224.0 ± 7.0	0.03 ± 0.02
D20	0.0 ± 0.0	o/w	24.7 ± 1.7	79.4 ± 3.4	0.14 ± 0.03

Data represent mean ± S. D. (n = 3) .

Phase diagram symbol: E

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 3 : 2

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

○ : o/w type of Non-ME prot

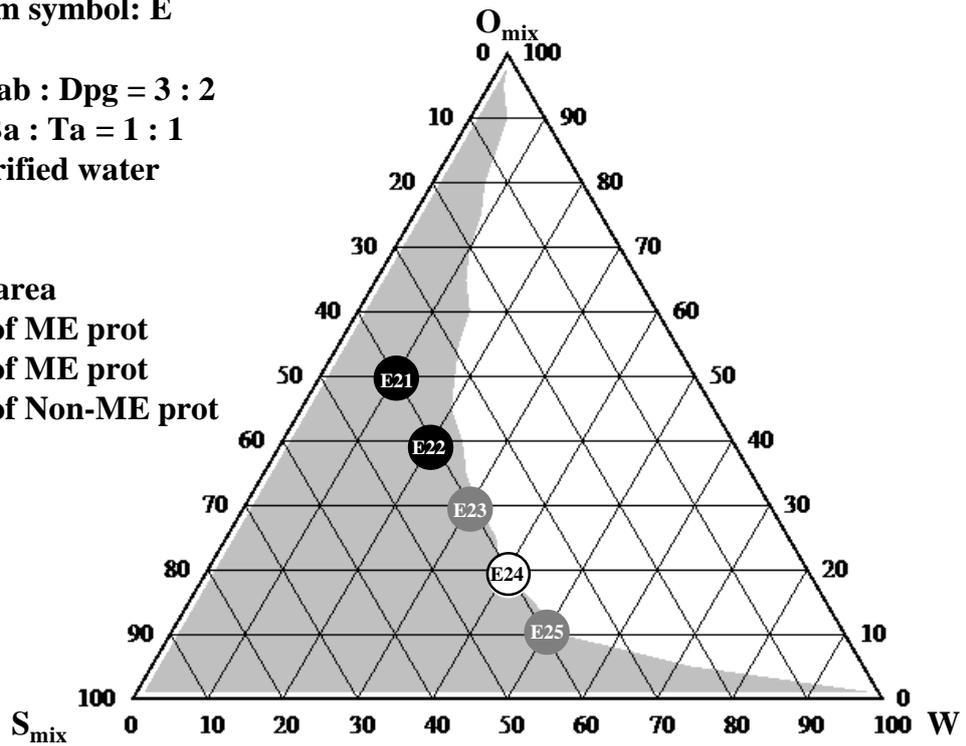


Fig. 14 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 3 : 2), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 12 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size, and PDI of No. E21, E22, E23, E24, and E25 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
E21	0.0 ± 0.0	w/o	141 ± 2.8	89.5 ± 3.3	0.19 ± 0.09
E22	0.0 ± 0.0	w/o	110.2 ± 1.9	26.1 ± 3.6	0.13 ± 0.03
E23	0.0 ± 0.0	o/w	72.3 ± 2.1	93.3 ± 9.7	0.10 ± 0.01
E24	1.8 ± 0.0	o/w	56.7 ± 4.0	1024.3 ± 800.7	0.85 ± 0.34
E25	0.0 ± 0.0	o/w	25.0 ± 1.7	91.7 ± 2.4	0.10 ± 0.02

Data represent mean ± S. D. (n = 3) .

Phase diagram symbol: F

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 2 : 1

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

○ : o/w type of Non-ME prot

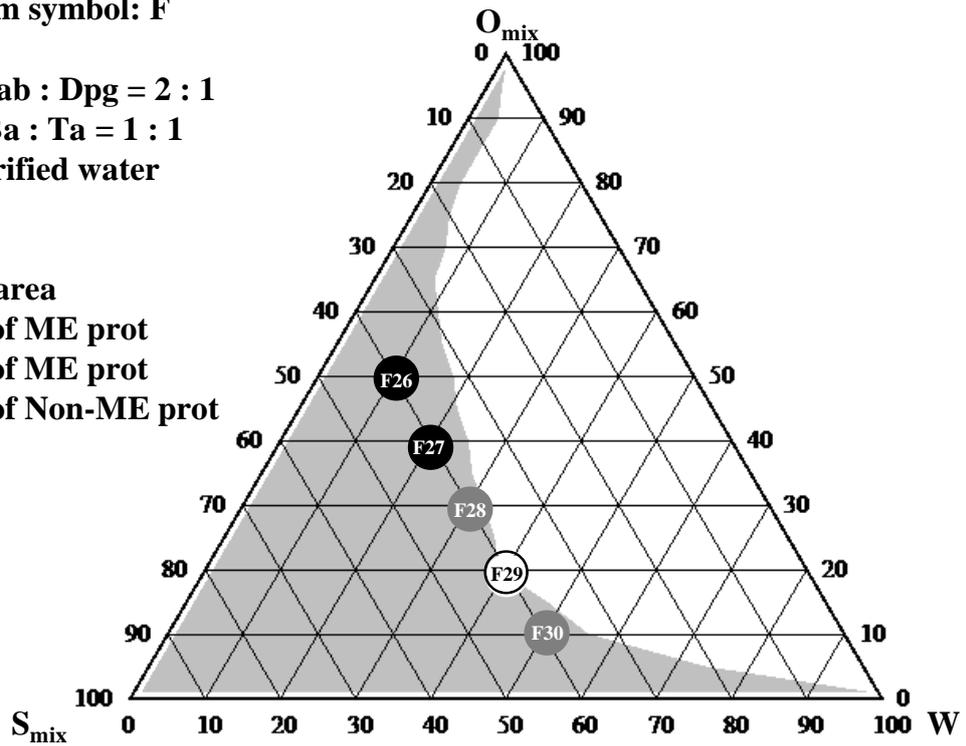


Fig. 15 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 2 : 1), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 13 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size, and PDI of No. F26, F27, F28, F29, and F30 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
F26	0.0 ± 0.0	w/o	148.0 ± 3.0	73.7 ± 71.3	0.44 ± 0.25
F27	0.0 ± 0.0	w/o	115.3 ± 4.2	51.1 ± 25.9	0.20 ± 0.08
F28	0.0 ± 0.0	o/w	78.1 ± 3.3	92.4 ± 9.7	0.11 ± 0.00
F29	1.9 ± 0.0	o/w	61.0 ± 2.3	321.0 ± 17.7	0.95 ± 0.09
F30	0.0 ± 0.0	o/w	27.9 ± 2.6	95.6 ± 0.6	0.10 ± 0.01

Data represent mean ± S. D. (n = 3) .

Phase diagram symbol: G

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 3 : 1

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

W Phase: Purified water

■ : ME area

□ : Non-ME area

● : w/o type of ME prot

● : o/w type of ME prot

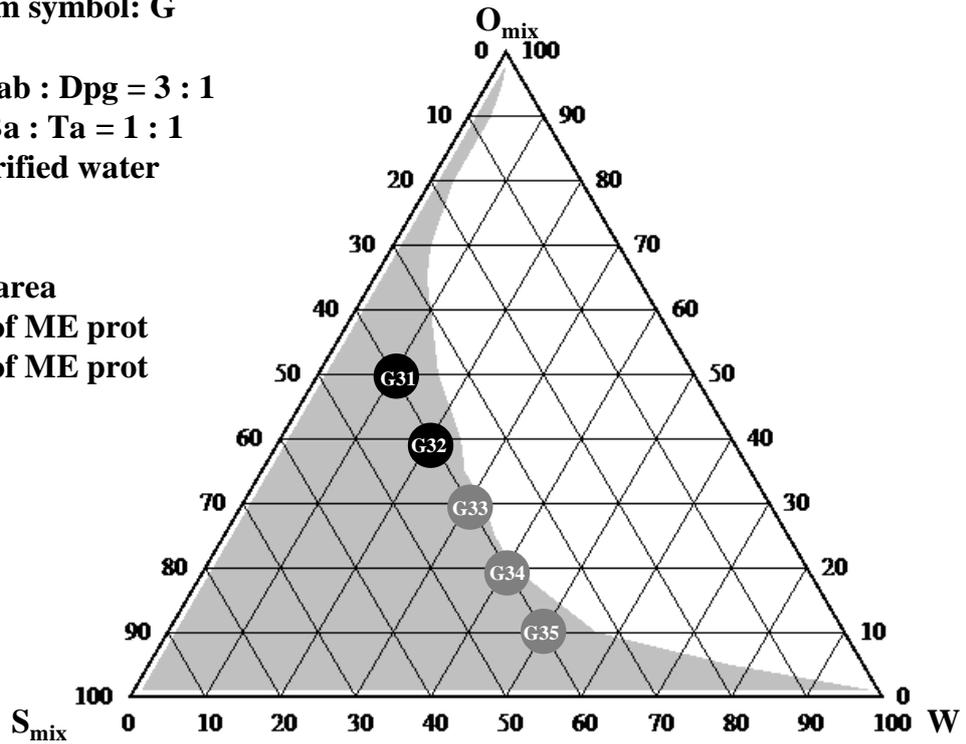


Fig. 16 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 3 : 1), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and W Phase (Purified water) are mixed.

Table 14 Turbidity, Emulsifying type, Solubility, Particle size, and PDI of No. G31, G32, G33, G34, and G35 in the three-phase region.

No.	Turbidity	Emulsifying type	Solubility (mg/mL)	Particle size (nm)	PDI
G31	0.0 ± 0.0	w/o	150.4 ± 4.1	157.0 ± 137.0	0.31 ± 0.06
G32	0.0 ± 0.0	w/o	124.3 ± 1.2	57.8 ± 70.4	0.26 ± 0.06
G33	0.0 ± 0.0	o/w	83.7 ± 2.9	42.8 ± 4.2	0.23 ± 0.01
G34	0.0 ± 0.0	o/w	67.1 ± 4.1	156.0 ± 15.4	0.03 ± 0.01
G35	0.0 ± 0.0	o/w	29.0 ± 2.5	96.3 ± 0.7	0.13 ± 0.02

Data represent mean ± S. D. (n = 3) .

第2章 ME 製剤の安定性評価

第1節 過酷条件下における短期安定性評価

第1章の結果より、A3、B8、C13、D18、E23、F28、G33 および G34 が DZP を 50 mg/mL 以上溶解させる o/w 型 ME であることが明らかになった。本節では、これらを試験製剤として次の過酷条件下における短期安定性を評価することを目的とした。

強力遠心試験 (25°C, 3000 rpm, 30 min) 、加熱-冷却サイクル試験 (45°C 2day+4°C 2 day, 6 cycle) および凍結-融解サイクル試験 (-70 °C 2day+室温 2 day, 3 cycle) 後の各試験製剤における濁度、DZP 含有率、ゼータ電位、粒子径および PDI を Table 15 に示し、それらの粒度分布を Fig. 17~24 に示した。

強力遠心試験後、全ての試験製剤で濁度 0 の ME が維持され、DZP 含有率は 98% 以上を維持した (Table 15)。また、A3、B8、C13、D18、E23 および F28 のゼータ電位、粒子径および PDI は試験前と比べてほとんど変化は認められなかった (Table 15)。一方、G33 および G34 の粒度分布は、試験前と比べてばらつきが現れた (Figs. 23 and Fig. 24)。全ての試験製剤の中で D18 および F28 は、試験前後に限らず単峰性の粒度分布が得られ、PDI の変動はわずかであった (Figs. 20 and 22, Table 15)。また、E23 の試験後の粒度分布は二峰性を示したが、DZP 含有率は 99.8% であり試験製剤の中で最も高かった (Fig. 21 and Table 15)。これらの結果は、強力な重力が ME に加えられてもその形態が維持され、大きな薬物変動は生じなかったことを示しており、特に D18、F28 および E23 は、他の試験製剤と比べて製剤学的安定性が高かった。

加熱-冷却サイクル試験後、G33 および G34 は、濁度が高値を示し、白濁したことからエマルジョン化したことが考えられたが、その他の試験製剤は濁度 0 であったことから ME が維持されていた (Table 15)。試験後の DZP 含有率は、A3、B8、C13、G33 および G34 で低下し、特に G33 および G34 の DZP 含有率の大きな低下は、ME からエマルジョンへの状態変化の影響を受けていると考えられる (Table 15)。試験後の

D18、E23 および F28 の DZP 含有率は 90%以上を示し、特に D18 は試験前と比べてほとんど変化がなく、その他のゼータ電位、粒子径および PDI もほとんど変化は認められなかった (Table 15)。さらに、試験前後と同様な単峰性の粒度分布が得られた (Figs. 20~23)。これらのことから、多くの試験製剤は加熱-冷却により ME の組成が変動し、製剤学的安定性に影響を及ぼした。しかし、D18、E23 および F28 は他の試験製剤と比べて製剤学的安定性が高いことが示された。

凍結-融解サイクル後、全ての試験製剤は、濁度 0 の ME が維持されていたが、DZP 含有率は、A3、B8、C13、G33 および G34 で大きく低下した (Table 15)。しかし、試験後の DZP 含有率は、加熱融解サイクル試験と同様に、D18>E23>F28 の順で高く、特に D18 は約 98%であったことから試験前に比べてほとんど変化はなかった (Table 15)。さらに、試験前後と同様な単峰性の粒度分布が得られた (Fig. 20)。以上の結果より、過酷条件下における短期安定性から、全ての試験製剤の中で特に D18、E23 および F28 の製剤学的安定性が高いことが示された。

Table 15 Turbidity, residual rate, zeta potential, particle size and PDI of immediately after preparation of ME and after the stability tests (Centrifugation cycle, Freeze-thaw cycle, and Heating and cooling cycle) of No. A3, B8, C13, D18, E23, F28, G33, and G34.

No.	Pharmaceutical parameters	Immediately after preparation	Centrifugation cycle	Freeze-thaw cycle	Heating and cooling cycle
A3	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	98.1 ± 0.8	83.3 ± 2.4	72.7 ± 3.6
	Zeta potential (mV)	-1.6 ± 0.4	0.2 ± 1.8	-0.6 ± 0.2	-0.6 ± 0.1
	Particle size (nm)	19.3 ± 0.3	19.5 ± 2.6	16.0 ± 0.4	75.3 ± 61.7
	PDI	0.32 ± 0.00	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.18 ± 0.03
B8	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	98.5 ± 0.9	85.9 ± 3.2	78.1 ± 2.5
	Zeta potential (mV)	0.1 ± 0.5	0.5 ± 0.5	-0.33 ± 0.18	-0.19 ± 0.31
	Particle size (nm)	24.0 ± 1.0	23.0 ± 2.0	24.4 ± 5.5	39.0 ± 25.7
	PDI	0.35 ± 0.03	0.28 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.10 ± 0.02
C13	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	98.4 ± 0.8	88.9 ± 2.1	83.7 ± 2.7
	Zeta potential (mV)	-0.0 ± 0.4	-0.4 ± 0.4	-0.7 ± 0.1	-0.6 ± 0.8
	Particle size (nm)	28.0 ± 0.6	37.0 ± 24.9	26.3 ± 0.7	22.4 ± 0.5
	PDI	0.27 ± 0.00	0.26 ± 0.07	0.26 ± 0.00	0.26 ± 0.01
D18	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.7 ± 0.4	99.1 ± 1.6	97.5 ± 1.2
	Zeta potential (mV)	-0.2 ± 0.9	-0.6 ± 1.3	-0.5 ± 0.3	-0.2 ± 0.2
	Particle size (nm)	41.9 ± 1.1	43.9 ± 1.4	38.1 ± 0.7	35.7 ± 1.6
	PDI	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
E23	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.8 ± 0.3	96.6 ± 2.9	95.9 ± 2.1
	Zeta potential (mV)	-0.2 ± 0.8	0.3 ± 1.1	-0.1 ± 0.2	-0.2 ± 0.3
	Particle size (nm)	84.6 ± 42.5	35.7 ± 3.3	70.2 ± 3.2	21.3 ± 3.5
	PDI	0.11 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.36 ± 0.08
F28	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.1 ± 0.9	96.0 ± 4.0	93.1 ± 4.7
	Zeta potential (mV)	-0.4 ± 0.5	-0.9 ± 0.8	-0.1 ± 0.2	-0.5 ± 0.6
	Particle size (nm)	73.5 ± 2.6	68.6 ± 1.5	65.3 ± 2.7	44.5 ± 1.9
	PDI	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.24 ± 0.01
G33	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.2 ± 0.6	78.1 ± 2.6	70.9 ± 3.0
	Zeta potential (mV)	-0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.8	-0.5 ± 0.1	-0.3 ± 0.4
	Particle size (nm)	71.3 ± 2.6	43.4 ± 43.0	4560.0 ± 1037.9	445.0 ± 30.8
	PDI	0.15 ± 0.01	0.26 ± 0.22	1.17 ± 0.79	0.96 ± 0.11
G34	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	98.1 ± 0.7	72.7 ± 2.6	67.6 ± 2.8
	Zeta potential (mV)	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.5	-0.6 ± 0.3	-0.4 ± 0.1
	Particle size (nm)	81.6 ± 5.1	150.0 ± 127.2	2231.0 ± 558.1	354.0 ± 50.5
	PDI	0.07 ± 0.06	0.31 ± 0.11	0.13 ± 0.09	0.86 ± 0.11

Data represent mean ± S. D. (n = 3).

— A3 (n=1) — A3 (n=2) — A3 (n=3)

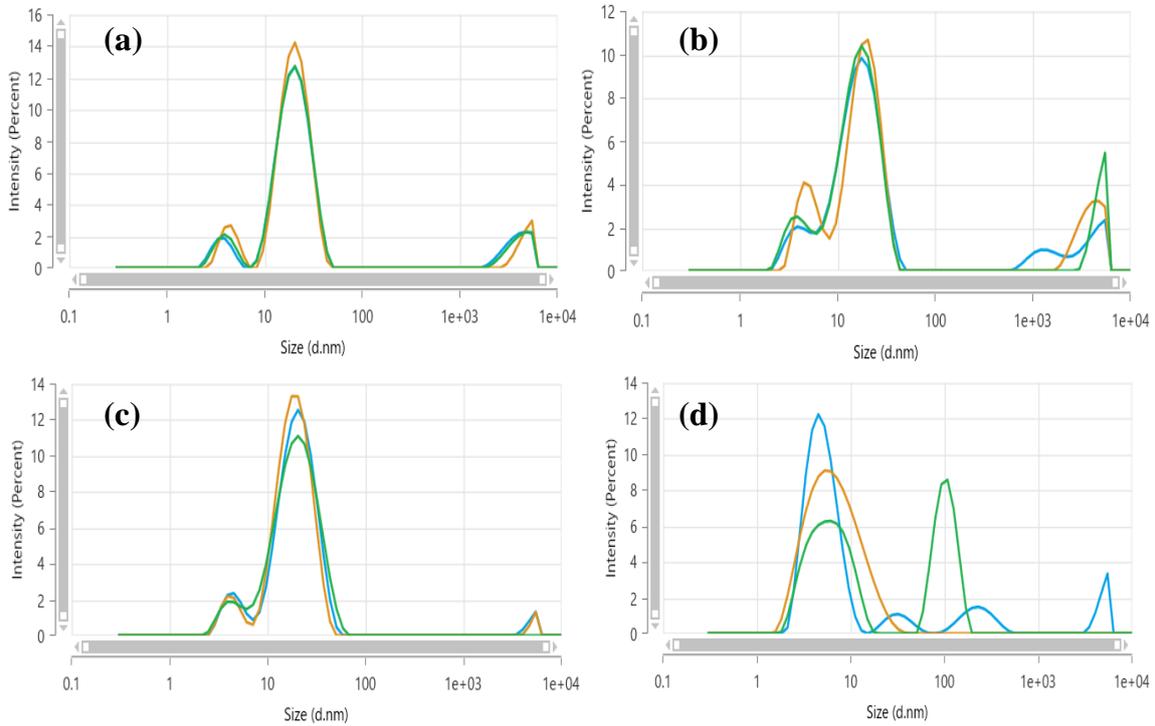


Fig. 17 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. A3.

— B8 (n=1) — B8 (n=2) — B8 (n=3)

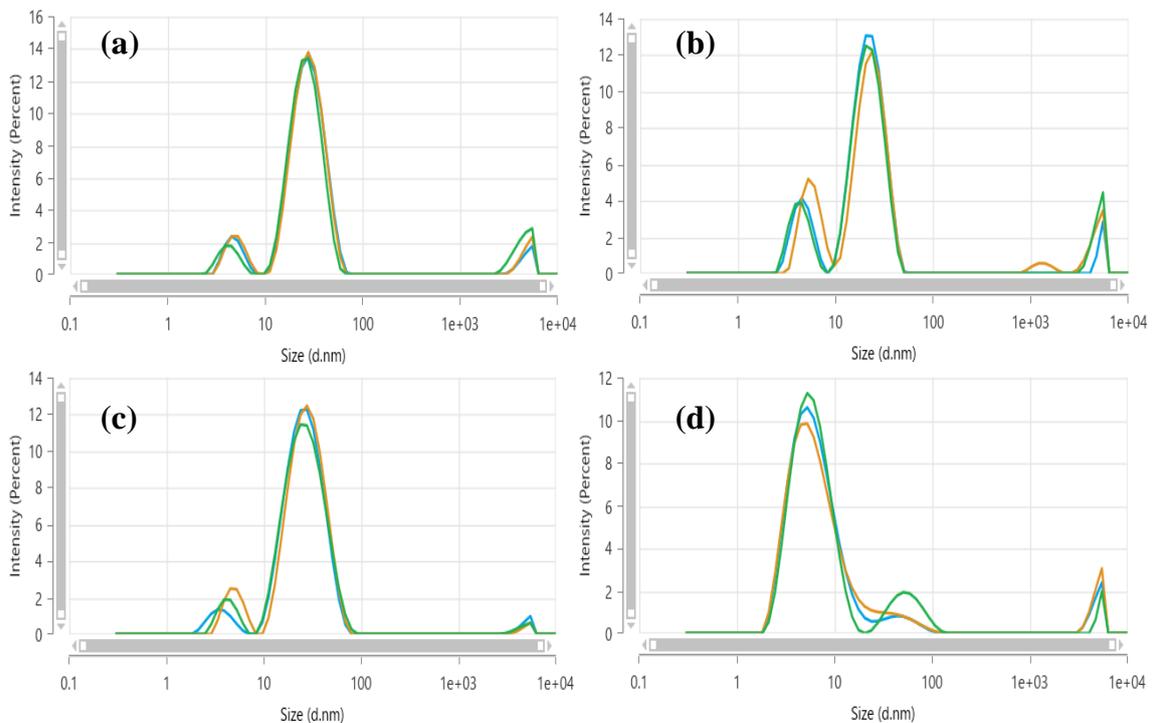


Fig. 18 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. B8.

— C13 (n=1) — C13 (n=2) — C13 (n=3)

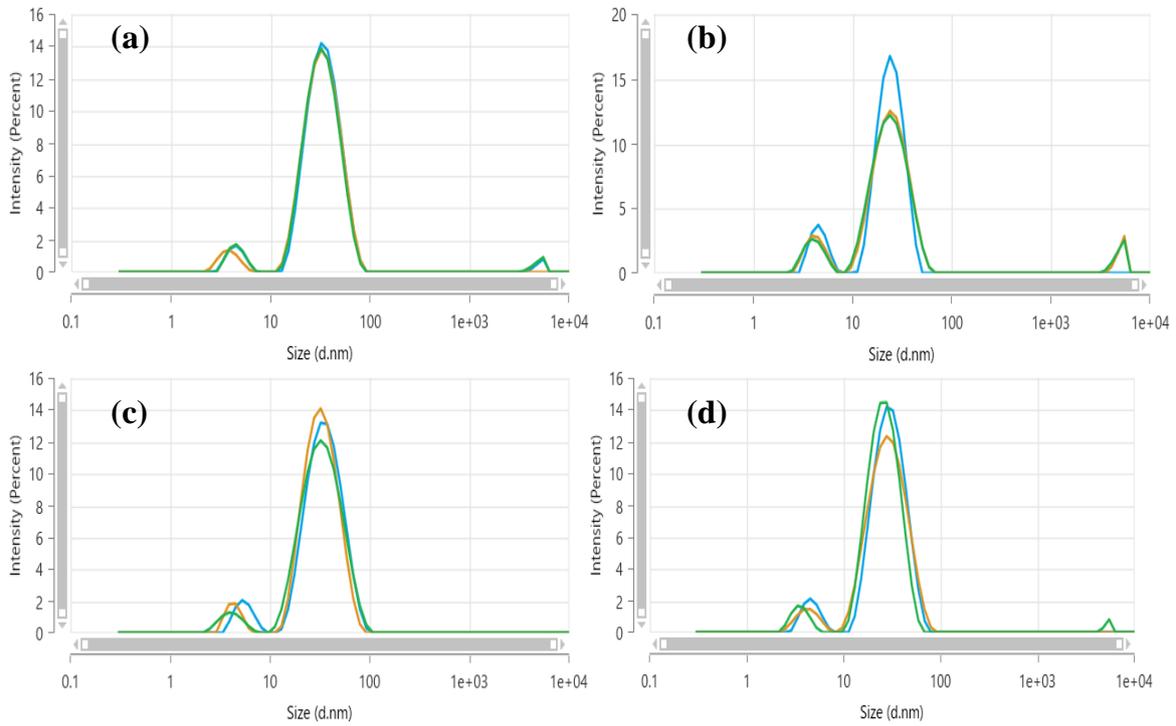


Fig. 19 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. C13.

— D18 (n=1) — D18 (n=2) — D18 (n=3)

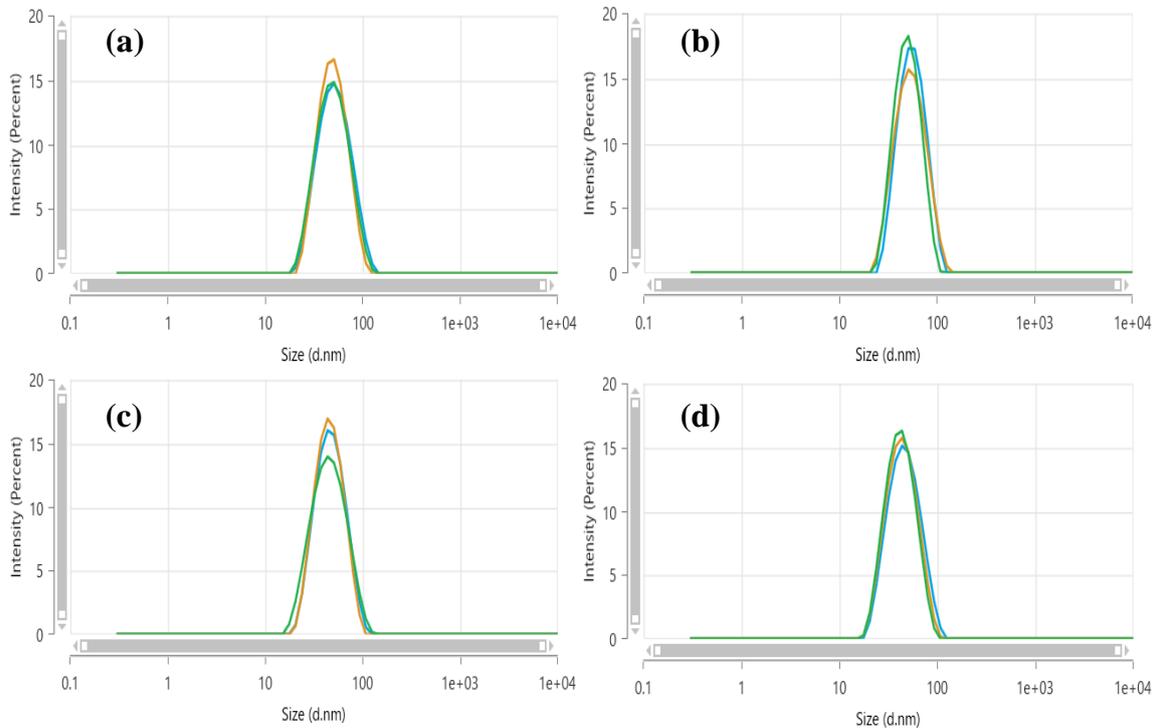


Fig. 20 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. D18.

— E23 (n=1) — E23 (n=2) — E23 (n=3)

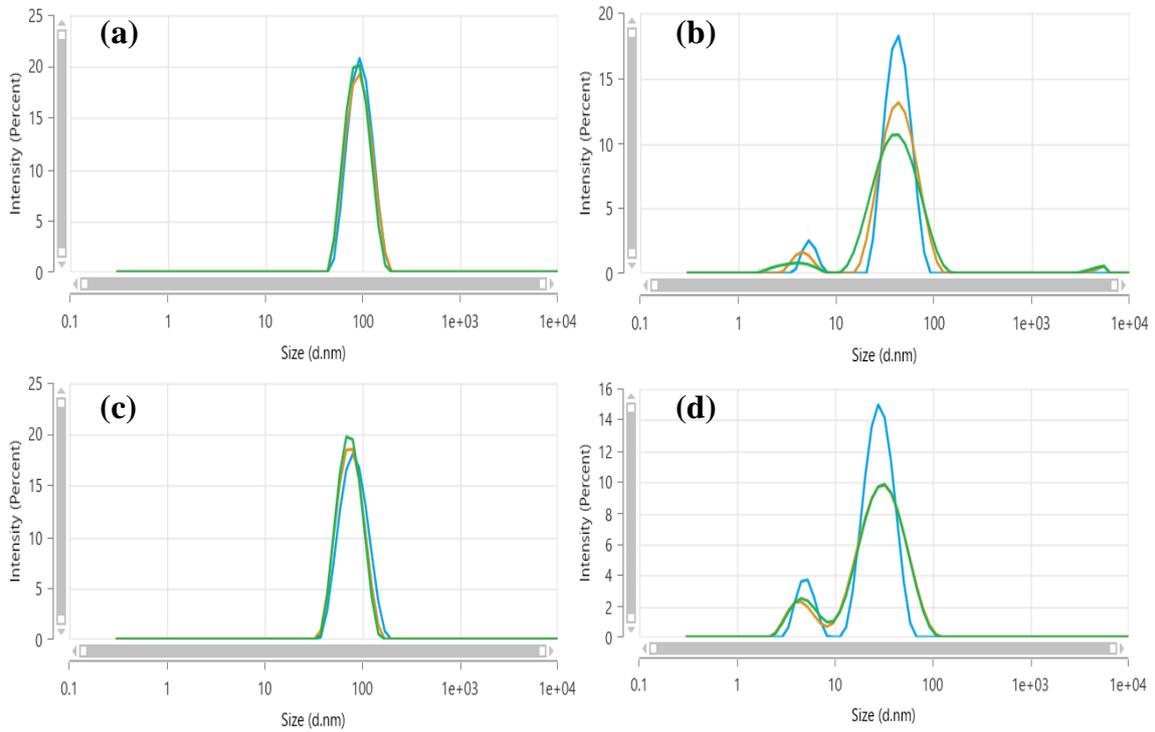


Fig. 21 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. E23.

— F28 (n=1) — F28 (n=2) — F28 (n=3)

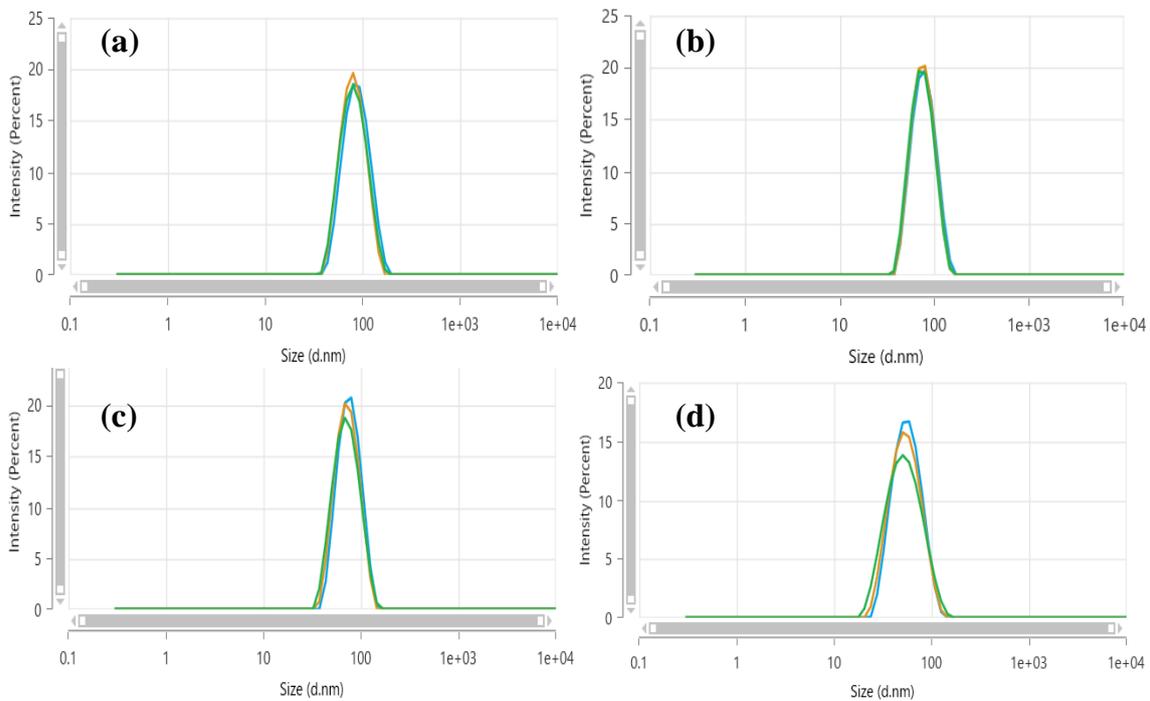


Fig. 22 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. F28.

— G33 (n=1) — G33 (n=2) — G33 (n=3)

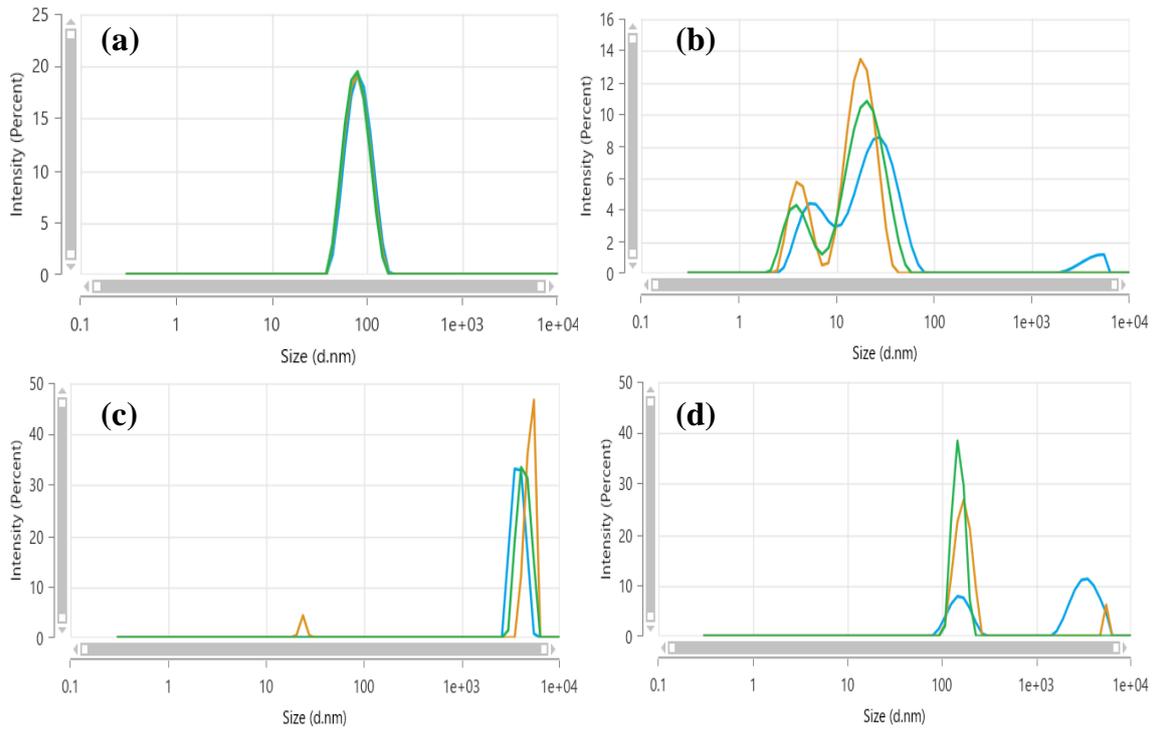


Fig. 23 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. G33.

— G34 (n=1) — G34 (n=2) — G34 (n=3)

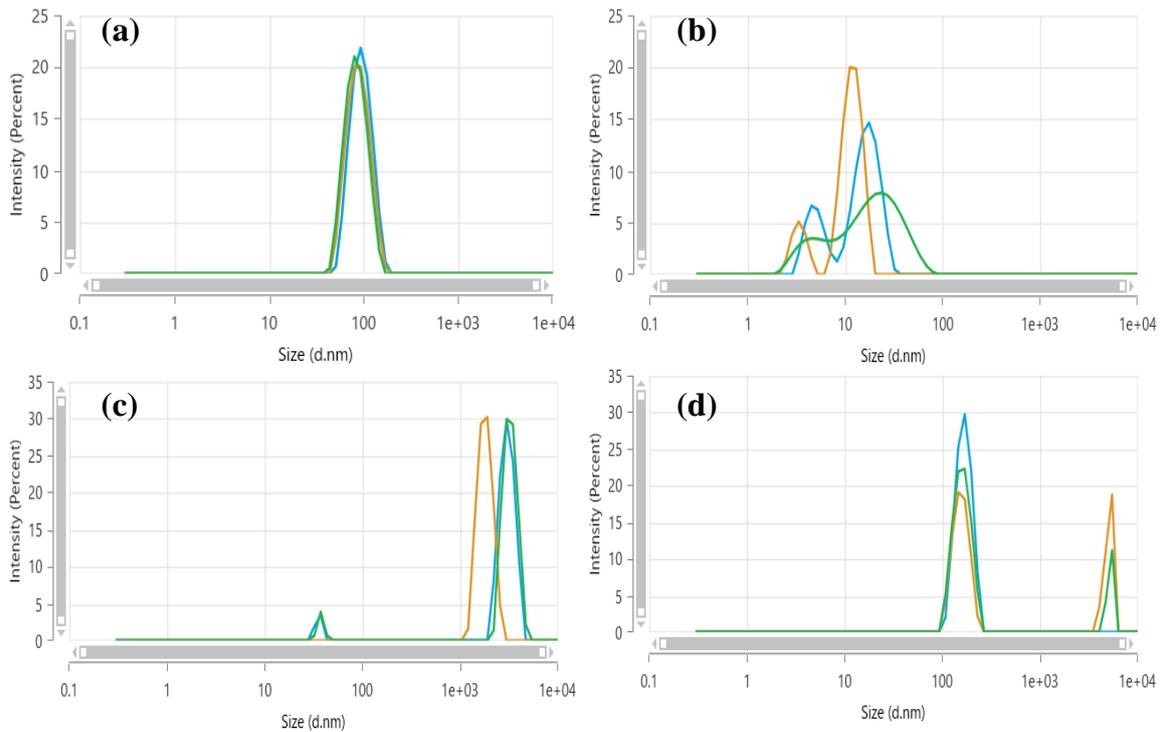


Fig. 24 Particle size distribution of (a) before the test, (b) Centrifugation cycle, (c) Freeze-thaw cycle, and (d) Heating and cooling cycle of No. G34.

第2節 室温条件下における長期安定性評価

第1節では、A3、B8、C13、D18、E23、F28、G33 および G34 の過酷条件下における短期安定性を評価した。本節では、これらの試験製剤を次の室温条件下における長期安定性を評価することを目的とした。

室温条件下での3か月、6か月および12か月後の濁度、DZP含有率、ゼータ電位、粒子径、PDIおよび粒度分布をTable 16 および Fig. 25 から Fig. 32 に示した。

3か月後、全ての試験製剤は濁度0のMEであり、粒子径、PDIおよび粒度分布にほとんど変化がなかった (Table 16 and Fig. 25 a and b~32)。また、DZP含有率も全ての試験製剤が95%以上を示した (Table 16)。これらのことから、室温条件下の3か月間ではMEの形態は変化せず、薬物変動も少ないことが示された。

6か月後、G34の濁度は1.8を示し、試験前と比べて粒子径は約22.8倍、PDIは約37倍が大きくなり、単峰性から二峰性の粒度分布に変化した (Table 16 and Fig. 32 a and c)。このことはG34がMEからエマルジョンへ変化したことを示す。一方、DZP含有率はD18>E23>F28の順で高く、特にD18は粒子径およびPDIにもほとんど変化が認められず、単峰性の粒度分布を維持していた (Table 16, Fig. 28 a and c)。

12か月後、G33の濁度は1.9となりMEからエマルジョンに変化した (Table 31)。DZP含有率は試験前と比べるとG34は70%台まで低下し、A3、B8、C13、G33は80%台に低下した (Fig. 32 a and d, 25~27, 31)。一方、F28、E23およびD18は94.1%、96.1%および99.1%であり、特にD18は試験前と比べて製剤学的パラメータはほとんど変化が認められなかった (Fig. 28 a and d~30)。

以上の結果より室温条件下における長期安定性は全ての試験製剤の中で特にD18、E23およびF28の製剤学的安定性が高いことが明らかになり、この結論は、第1節の短期安定性と同様であった。従って、次章からはD18、E23およびF28の安全性を評価することとした。

Table 16 Turbidity, residual rate, zeta potential, particle size, and PDI of (a) immediately, (b) 3 months, (c) 6 months (d) 12 months after preparation of No. A3, B8, C13, D18, E23, F28, G33, and G34.

No.	Pharmaceutical parameters	Immediately after preparation	3 months	6 months	12 months
A3	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.6 ± 0.3	93.9 ± 0.8	83.5 ± 1.9
	Zeta potential (mV)	0.25 ± 0.29	-0.66 ± 0.63	-0.27 ± 0.54	-0.84 ± 0.70
	Particle size (nm)	13.4 ± 4.7	14.8 ± 6.2	20.8 ± 15.4	66.5 ± 67.5
	PDI	0.25 ± 0.07	0.19 ± 0.05	0.22 ± 0.16	0.21 ± 0.15
B8	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.6 ± 0.1	96.6 ± 1.5	85.5 ± 2.9
	Zeta potential (mV)	0.06 ± 0.02	-0.06 ± 0.33	0.01 ± 0.37	-0.50 ± 0.32
	Particle size (nm)	20.7 ± 2.0	17.7 ± 0.7	25.8 ± 7.0	126.5 ± 181.4
	PDI	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.08	0.28 ± 0.02
C13	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.6 ± 0.2	97.1 ± 0.3	88.5 ± 0.7
	Zeta potential (mV)	0.59 ± 0.17	-0.12 ± 0.60	-0.10 ± 0.13	-0.23 ± 0.44
	Particle size (nm)	34.0 ± 13.3	36.3 ± 0.8	37.1 ± 0.4	325.4 ± 306.9
	PDI	0.21 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.40 ± 0.40
D18	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.2	99.6 ± 0.3	99.1 ± 0.8
	Zeta potential (mV)	0.74 ± 0.39	0.01 ± 0.51	-0.28 ± 0.28	-0.33 ± 0.39
	Particle size (nm)	41.7 ± 1.6	41.1 ± 2.4	39.9 ± 2.7	38.7 ± 2.1
	PDI	0.19 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.02
E23	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.9 ± 0.1	99.5 ± 0.6	96.1 ± 3.7
	Zeta potential (mV)	0.09 ± 0.15	-0.83 ± 0.52	-0.73 ± 1.04	0.11 ± 0.28
	Particle size (nm)	93.3 ± 9.7	80.7 ± 106.8	95.0 ± 111.3	216.4 ± 333.2
	PDI	0.10 ± 0.15	0.30 ± 0.10	0.25 ± 0.13	0.44 ± 0.28
F28	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	99.8 ± 0.3	99.3 ± 0.2	94.1 ± 1.7
	Zeta potential (mV)	0.00 ± 0.02	0.06 ± 0.30	0.29 ± 0.18	0.15 ± 0.30
	Particle size (nm)	92.4 ± 9.7	69.6 ± 2.7	151.0 ± 3.5	169.0 ± 41.4
	PDI	0.11 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.53 ± 0.15	0.25 ± 0.10
G33	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.0
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	97.3 ± 0.9	92.4 ± 1.5	82.0 ± 1.1
	Zeta potential (mV)	-0.00 ± 0.01	0.05 ± 0.42	-0.38 ± 0.12	-0.10 ± 0.42
	Particle size (nm)	42.8 ± 4.2	144.7 ± 3.5	153.3 ± 6.7	3303.6 ± 5582.7
	PDI	0.23 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.62 ± 0.04	0.29 ± 0.21
G34	Turbidity	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.9 ± 0.1
	Residual rate (%)	100.0 ± 0.0	95.4 ± 1.6	91.0 ± 1.8	79.2 ± 3.3
	Zeta potential (mV)	0.03 ± 0.05	-0.16 ± 0.08	0.35 ± 0.31	-0.19 ± 0.63
	Particle size (nm)	156.0 ± 15.4	150.3 ± 6.7	1585.3 ± 784.5	1640.0 ± 658.7
	PDI	0.03 ± 0.01	0.62 ± 0.05	1.1 ± 0.33	1.14 ± 0.84

Data represent mean ± S. D. (n = 3).

— A3 (n=1) — A3 (n=2) — A3 (n=3)

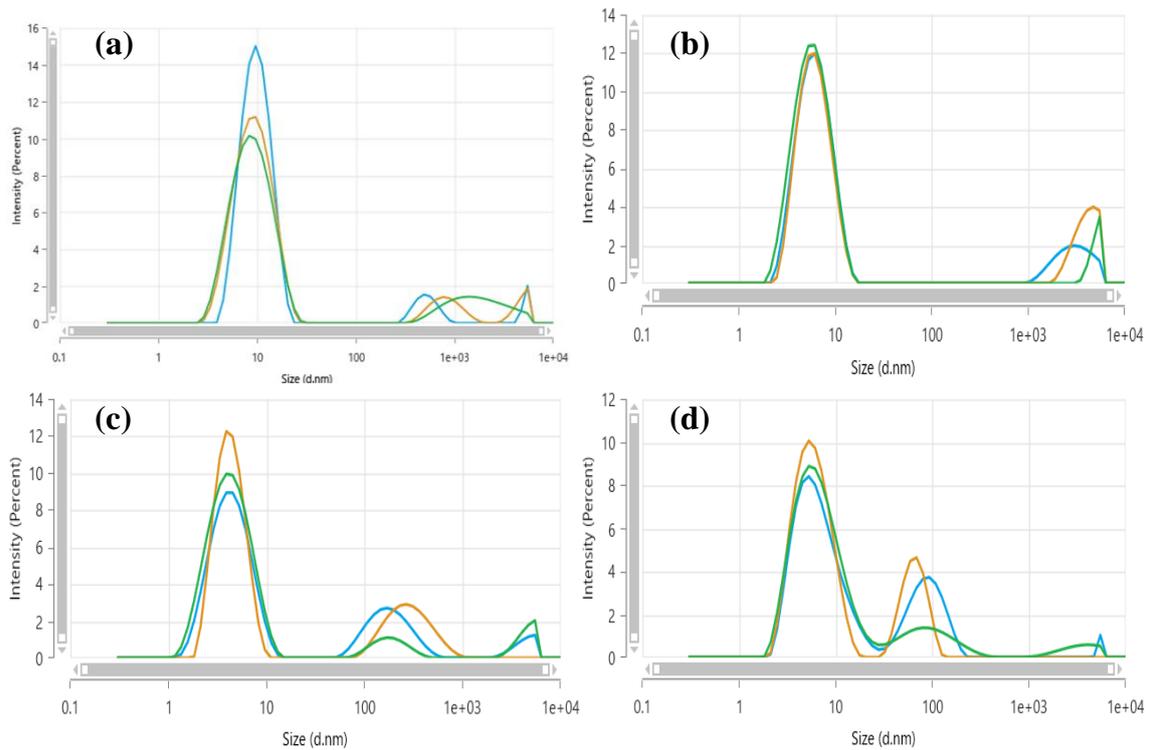


Fig. 25 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. A3.

— B8 (n=1) — B8 (n=2) — B8 (n=3)

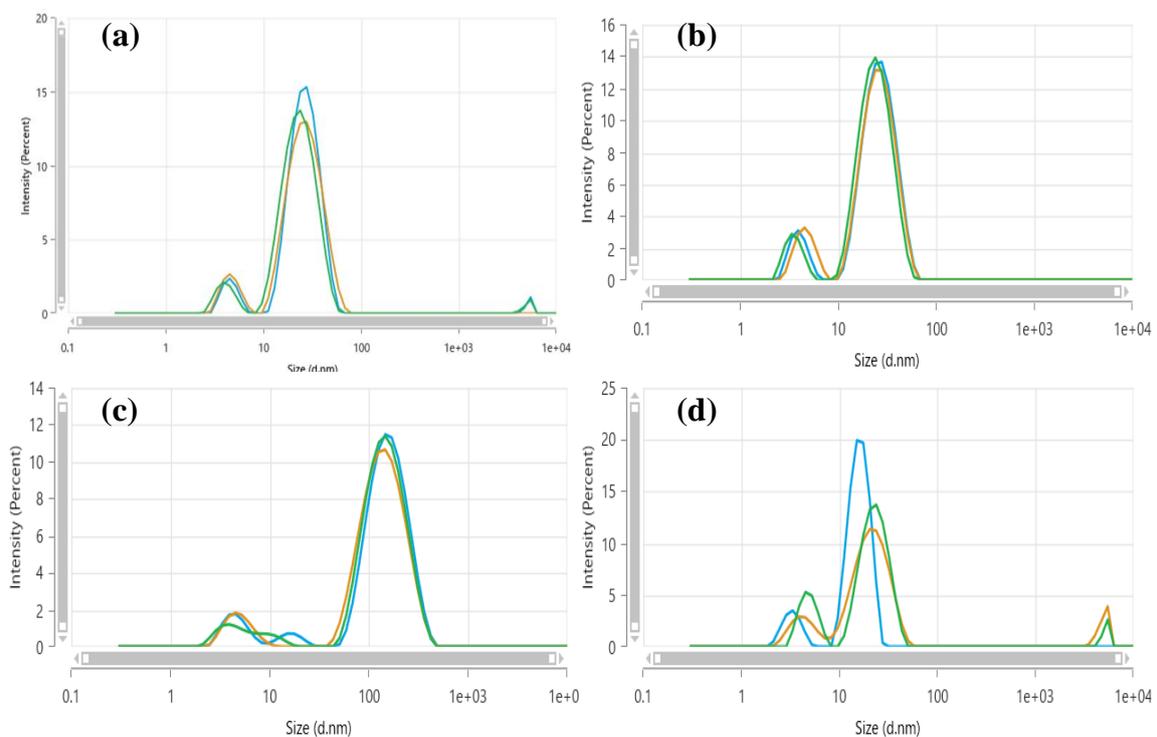


Fig. 26 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. B8.

— C13 (n=1) — C13 (n=2) — C13 (n=3)

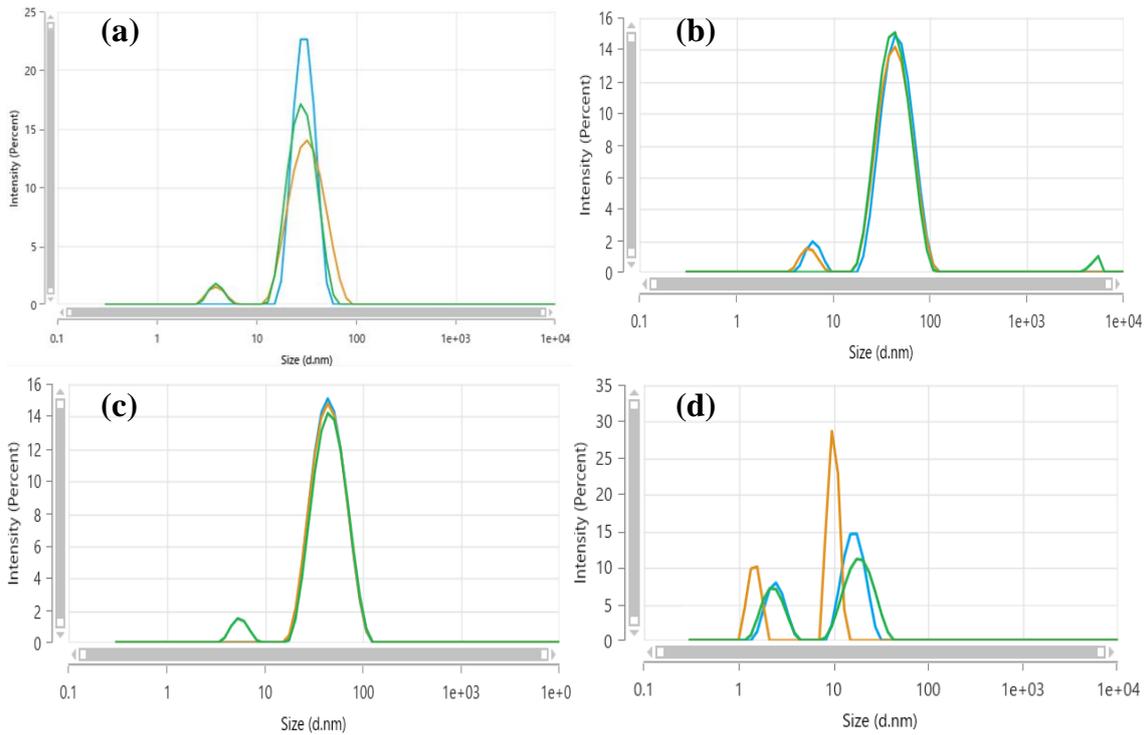


Fig. 27 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. C13.

— D18 (n=1) — D18 (n=2) — C18 (n=3)

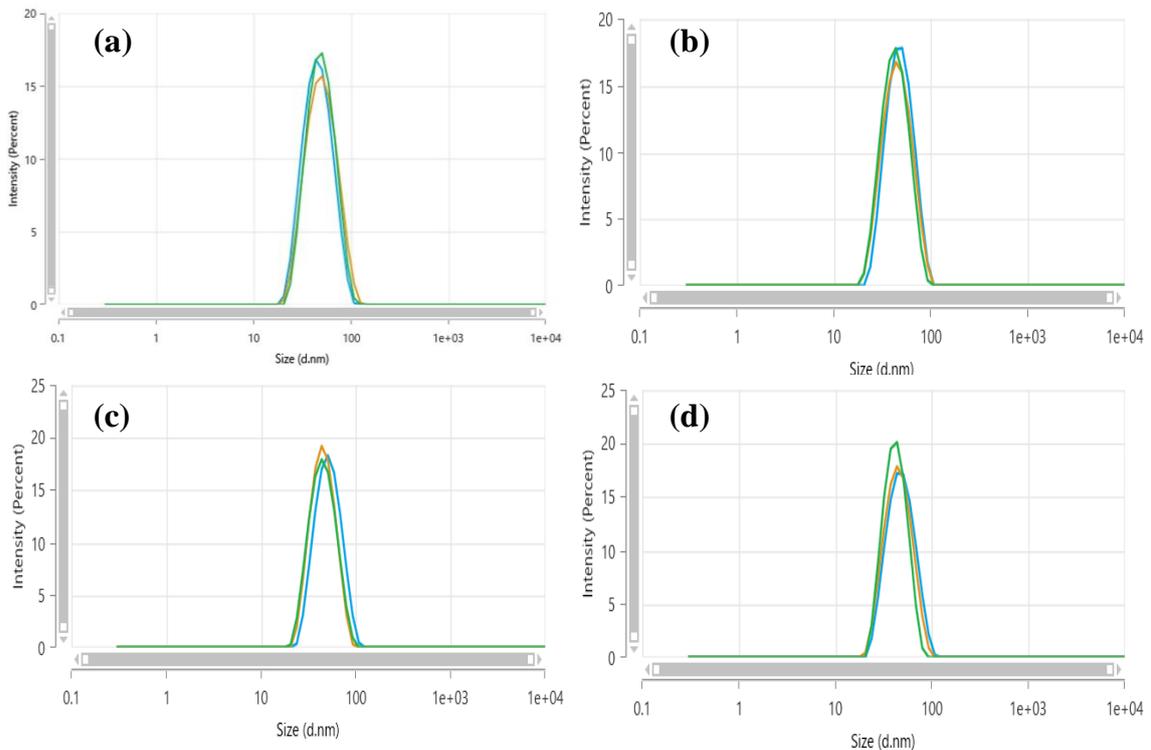


Fig. 28 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. D18.

— E23 (n=1) — E23 (n=2) — E23 (n=3)

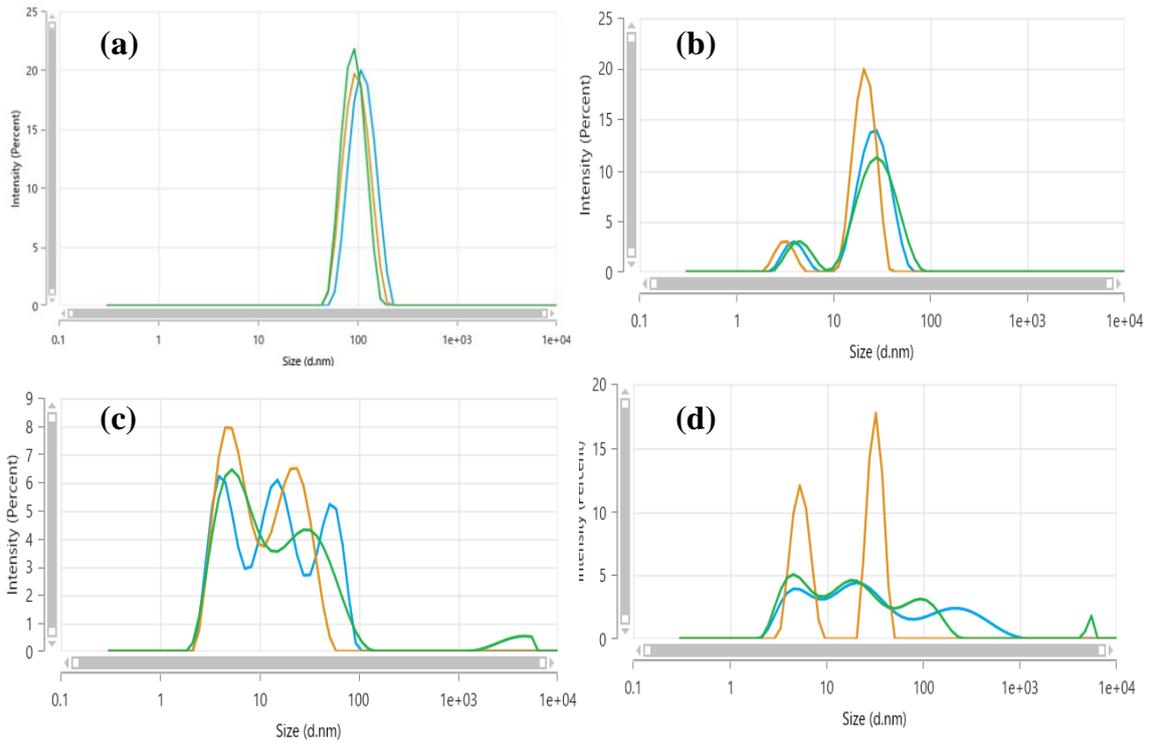


Fig. 29 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. E23.

— F28 (n=1) — F28 (n=2) — F28 (n=3)

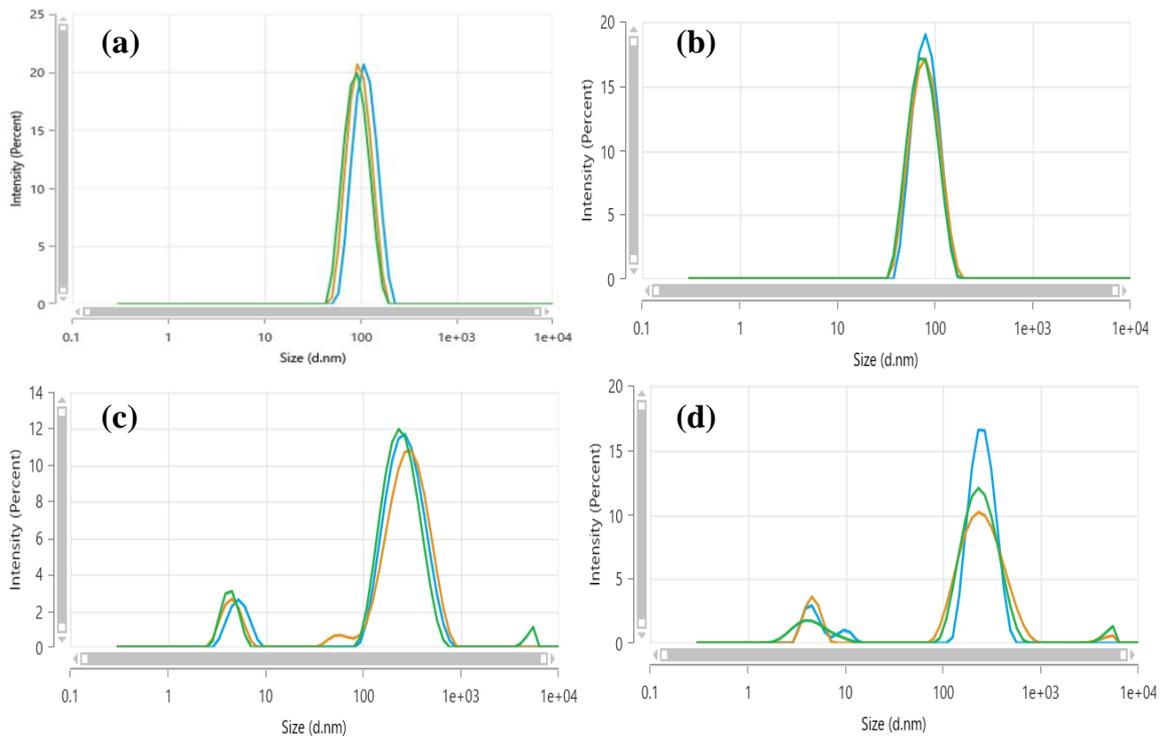


Fig. 30 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. F28.

— G33 (n=1) — G33 (n=2) — G33 (n=3)

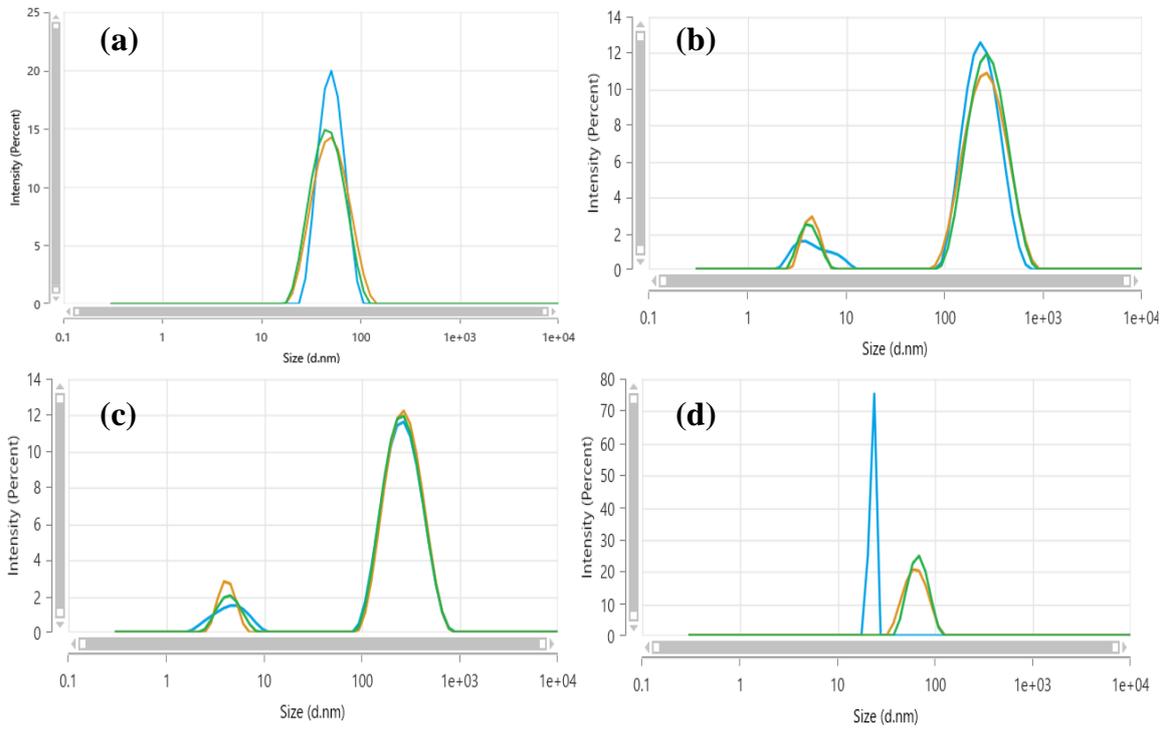


Fig. 31 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. G33.

— G34 (n=1) — G34 (n=2) — G34 (n=3)

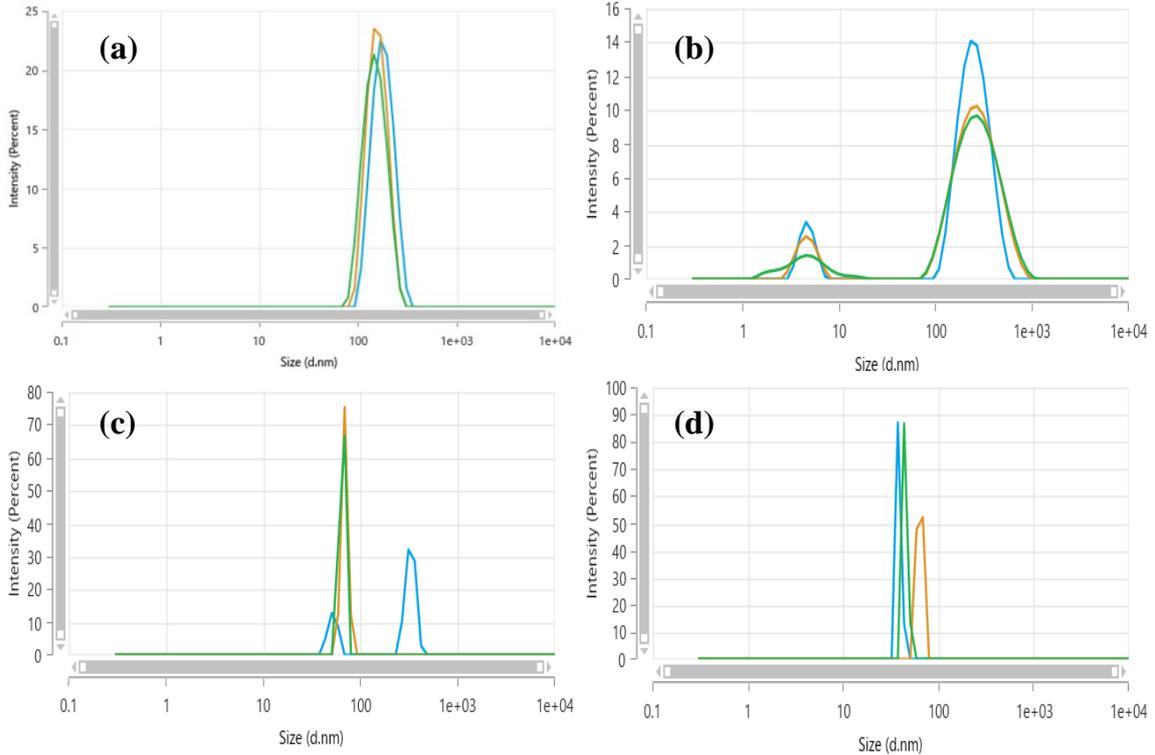


Fig. 32 Particle size distribution of (a) before the test, (b) 3 months later, (c) 6 months later, and (d) 12 months later of No. G34.

第3章 ME 製剤の鼻粘膜に対する安全性評価

第1節 経鼻製剤に推奨される pH 範囲の判定

第2章の結果より、D18、E23 および F28 の ME 製剤は製剤学的に安定性が高いことが明らかになった。本章では、安全性が最も高いと考えられる試験製剤を選択することを目的として、上記の試験製剤の中から鼻粘膜に対する安全性を評価した。点鼻製剤は、pH4.5 から 6.5 に調整することが推奨されており、その理由としては極端に低いか高い pH の場合は、鼻粘膜に傷害を起こす可能性がある⁸¹⁾。試験製剤の pH 測定結果を Fig. 33 に示した。E23 および F28 の pH は推奨される pH 範囲よりも低い値を示したが、D18 は推奨される pH 範囲内の値を示した (Fig. 33)。この結果は、D18 が経鼻製剤用の基剤として利用できる可能性が示唆された。

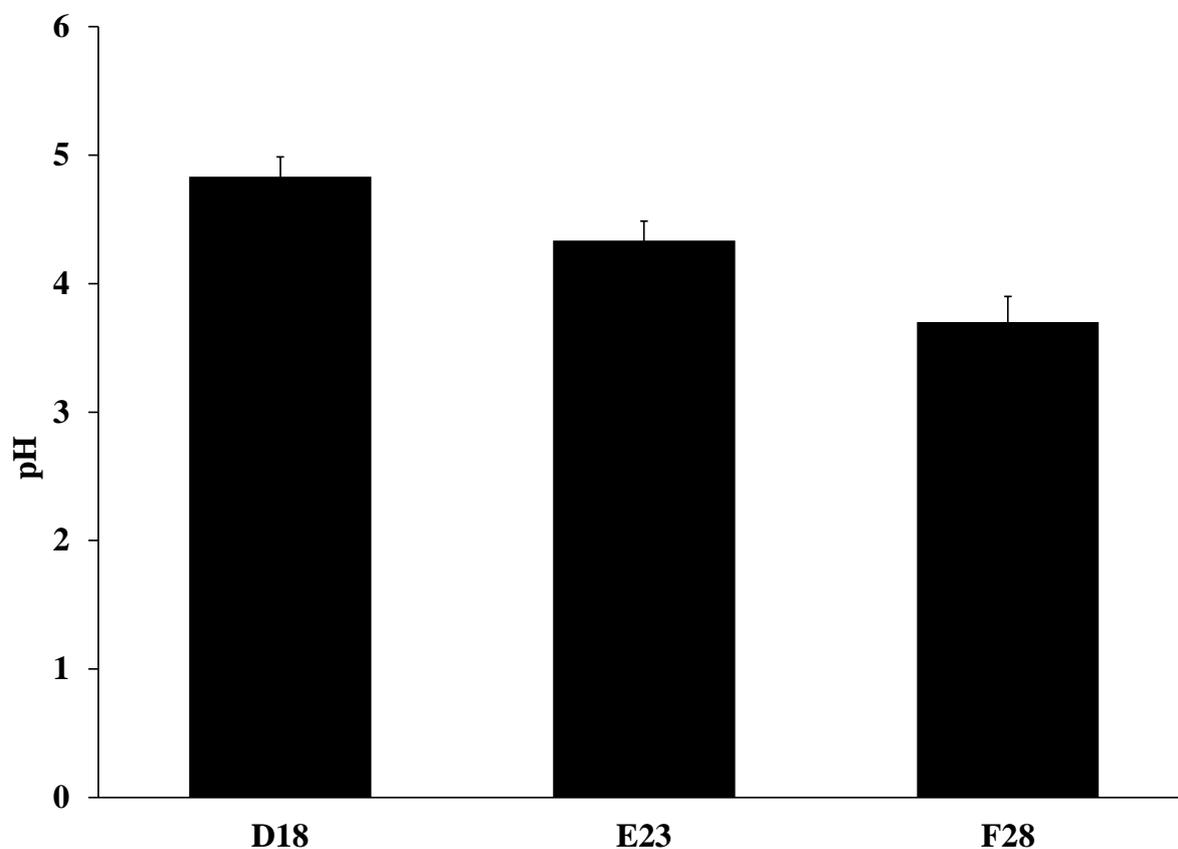


Fig. 33 pH values of No. D18, E23 and F28. Data represent mean ± S. D. (n = 3).

第2節 乳酸脱水素酵素漏出による鼻粘膜傷害性評価

本節では、D18、E23 および F28 の ME 製剤の鼻粘膜に対する傷害性を、*i.n.* 投与 5 分後に生理食塩液を用いて鼻粘膜から漏出した乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) を回収し、LDH 漏出率を算出することで、明らかにすることを目的とした。コントロールは第1編で用いた DZP 注射液、ネガティブコントロールには生理食塩液、ポジティブコントロールには鼻粘膜傷害性を示すと報告されている 1%タウロ-24,25 ジヒドロフシジン酸 (STDHF) を用いた⁸²⁾。その結果を Fig. 34 に示した。D18、E23 および F28 の *i.n.* 投与による 5 分後の LDH 漏出率は、それぞれ 3.0、4.6 および 6.2% となった (Fig. 34)。一方、DZP 注射液は 5.0%、1%STDHF は 10%の LDH 漏出率を示した (Fig. 34)。試験した中で最も LDH 漏出率が低かった D18 は DZP 注射液よりも有意に低かった (Fig. 34)。このことから第4章では、ラットに *i.n.* 投与する試験製剤は D18 の ME 製剤を用いることとした。

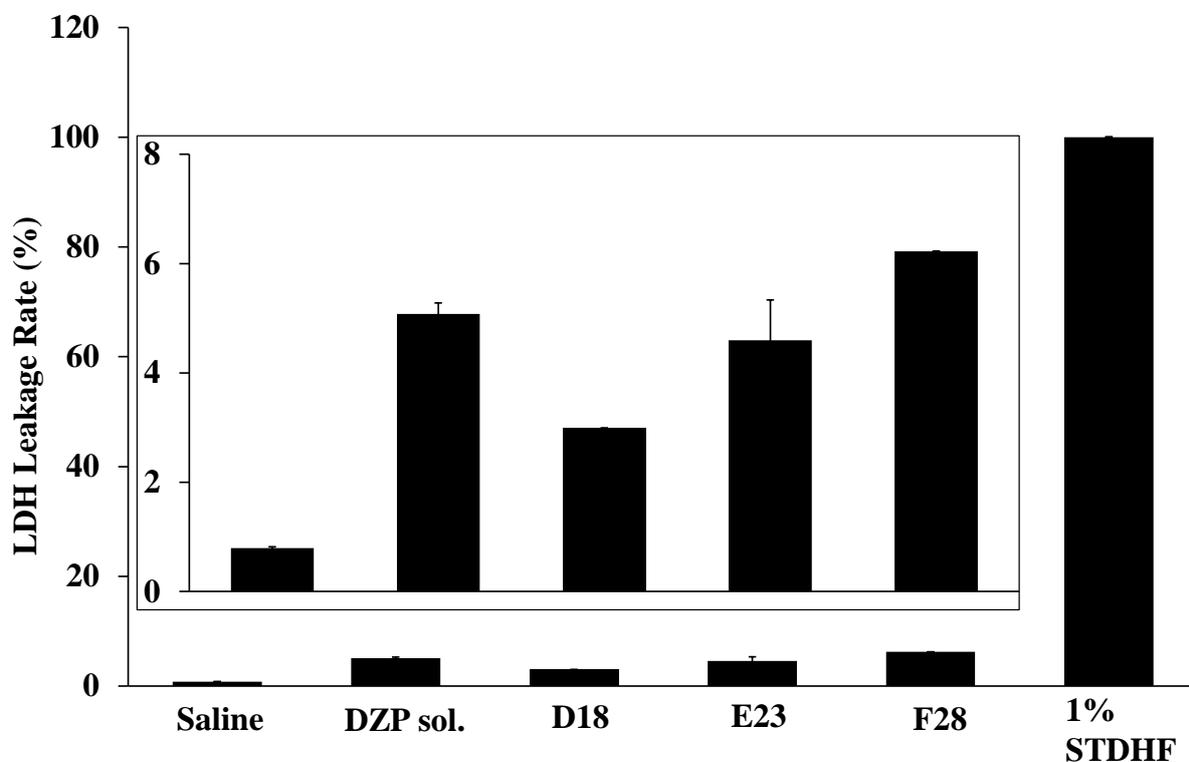


Fig. 34 LDH leakage rate from nasal mucosa 5 min after *i.n.* administration of Saline, DZP solution, No. D18, E23, F28, and 1%STDHF. Data represent mean \pm S. E. (n = 3).

第4章 DZP含有ME製剤の*i.n.*投与による体内動態

第1節 DZP含有ME製剤およびDZP溶液の*i.n.*投与による

全身循環系への移行性

これまでの実験結果より、最適化したD18をDZP含有ME製剤として、ME50 (50 mg/mL) を調製し、0.5 mg/kg で*i.n.*投与したときの全身循環系への移行性を明らかにすることを目的とした。また、薬物吸収性に対するME化の影響を明らかにするために、比較対象をDZP注射液 (5 mg/mL) として、それと同じDZP含有濃度に調製したME5 (5 mg/mL) を用いた。ME5 およびME50 を*i.n.*投与するときの投与容量は、ME5 ではDZP注射液と同容量、ME50 ではその10分の1容量となる。

DZP含有ME製剤を*i.n.*投与したときの血漿中濃度-時間プロファイルを Fig. 35 に、体内動態パラメータを Table 17 に示した。*i.n.*投与において、ME50 は、DZP注射液の投与液量の10分の1容量にもかかわらず、 k_a 、 $C_{\max, p}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow 180}$ および $F_{0 \rightarrow 180}$ がそれぞれDZP注射液のときと同等の値を示し、 $T_{\max, p}$ は2分間の有意な短縮が認められた (Table 17)。一方、ME5 およびDZP注射液は、 $C_{\max, p}$ への到達時間は変わらなかったが、ME5 での k_a および $C_{\max, p}$ はDZP注射液のそれらより有意に高くなった (Fig. 35 and Table 17)。ME5 を投与したときの $AUC_{0 \rightarrow 180}$ および $F_{0 \rightarrow 180}$ は、27.2 min · $\mu\text{g/mL}$ および 32.8% であり、DZP注射液を投与したときのそれらに比べて有意に上昇した (Table 17)。

これらの結果は、ME化によりDZPの全身吸収性が向上し、鼻腔内への製剤の適用容量の減量に有用な製剤学的工夫となり得ると考えられた。

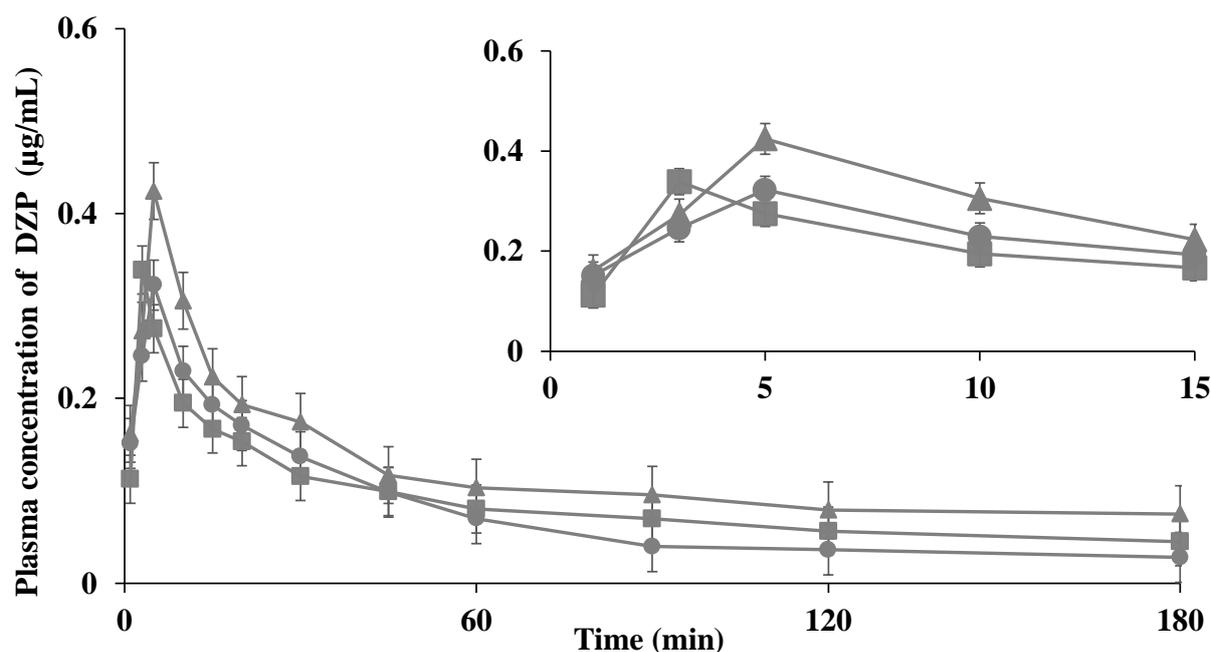


Fig. 35 Plasma concentration profiles of DZP after *i.n.* administration (0.5 mg/kg) of DZP injection (5 mg/mL) or ME formulations (ME5, ME50) in rats.
 ● : DZP injection, ▲ : 5 mg/mL (ME5), ■ : ME50 (50 mg/mL).
 Each data represents the mean S.E. (n = 3-4).

Table 17 Pharmacokinetic parameters of DZP after *i.n.* administration (0.5 mg/kg) of DZP injection (5 mg/mL) or ME formulations (ME5, ME50) in rats.

Test formulation	ka (min ⁻¹)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0 \rightarrow 180}$ (µg/mL·min)	$F_{0 \rightarrow 180}$ (%)
DZP injection	0.034 ± 0.000	0.322 ± 0.011	5.0 ± 0.0	21.7 ± 2.4	26.2 ± 3.0
ME5	0.065 ± 0.001	0.424 ± 0.011	5.0 ± 0.0	27.2 ± 1.5	32.8 ± 1.8
ME50	0.042 ± 0.000	0.320 ± 0.020	3.0 ± 0.0	17.5 ± 1.5	21.2 ± 1.8

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

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *n.s.* : not statistically significant (Tukey-Kramer test).

第2節 DZP含有ME製剤およびDZP注射液の*i.n.*投与による5分後の各種脳組織およびCSFへの移行性

DZP含有ME製剤として、ME50 (50 mg/mL) を調製し、0.5 mg/kg で*i.n.*投与による5分後のDZPの各種脳組織およびCSFへの移行性を明らかにすることを目的とした。また、薬物吸収性に対するME化の影響を明らかにするために、比較対象をDZP注射液 (5 mg/mL) として、それと同じDZP含有濃度に調製したME5 (5 mg/mL) を用いた。

ME5とME50およびDZP注射液を用いて、0.5 mg/kg で*i.n.*投与5分後の全脳、後脳、嗅球、三叉神経およびCSF中濃度をFig. 36に示した。DZP注射液の10分の1容量のME50を*i.n.*投与5分後の各種脳組織およびCSF中DZP濃度は、DZP注射液と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 36 b~f)。一方、ME5は、DZP注射液と比較して前脳および後脳中のDZP濃度がそれぞれ1.9倍と有意に高く (Fig. 36 b, c)、前脳および後脳に至る経路に存在する嗅球、三叉神経およびCSF中のDZP濃度も1.6倍、2.2倍および1.5倍有意に上昇した (Fig. 36 d~f)。*i.n.*投与後の全ての試験製剤は、前脳よりも後脳中DZP濃度が高いことから、後脳領域への移行に関与する三叉神経中DZP濃度が最も高く、次に前脳領域への移行に関与する嗅球中DZP濃度が高かった (Fig. 36)。

これらの結果は、ME5がDZP注射液と比較して脳移行性が高く、さらに投与容量がDZP注射液の10分の1容量のME50においてDZP注射液と同等な脳移行性を示したことから、ME化は全身循環系への吸収性だけでなく脳移行性を向上させる可能性があると考えられた。

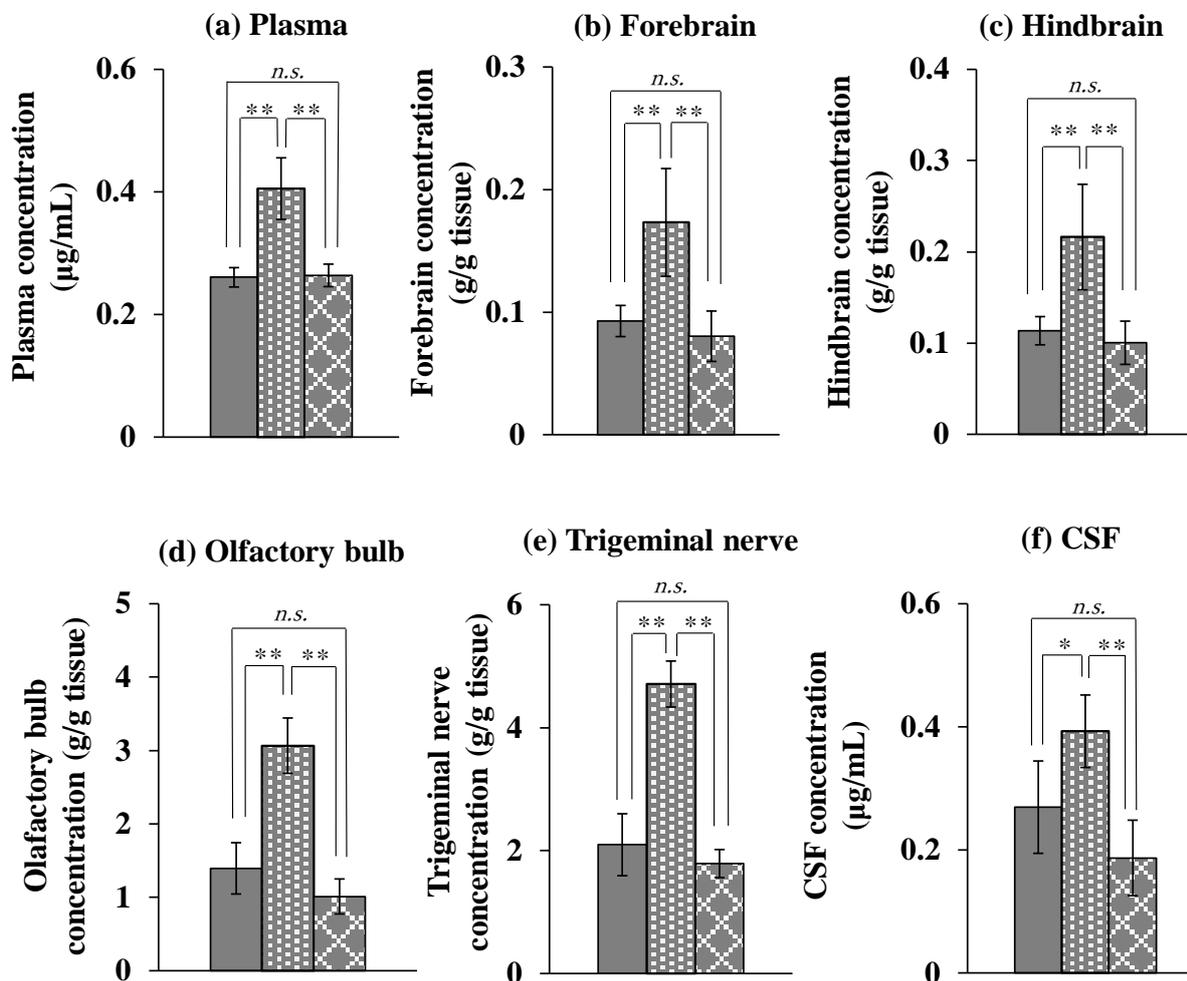


Fig. 36 DZP concentration in the (a) plasma, (b) forebrain, (c) hindbrain, (d) olfactory bulb, (e) trigeminal nerve, and (f) CSF 5 minutes after *i.v.* or *i.n.* administration (0.5 mg/kg) of DZP injection (5 mg/mL) or ME formulations (ME5, ME50) in rats.

■ : DZP injection, ▨ : 5 mg/mL (ME5), ▩ : 50 mg/mL (ME50).

Each data represents the mean S.E. (n = 3-12).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *n.s.* : not statistically significant (Tukey-Kramer test).

第5章 DZP 含有 ME 製剤の *i.n.* 投与後の PTZ 誘発性 SE モデルラットに対する痙攣抑制効果

ME50 を *i.n.* 投与したときの DZP の痙攣抑制効果を明らかにすることを目的とした。また、薬物吸収性に対する ME 化の影響を明らかにするために、ME5 (5 mg/mL) と同じ DZP 濃度である DZP 注射液を比較対象として用いた。

ME50、ME5 および DZP 注射液を *i.n.* 投与したときの DZP の痙攣抑制効果を Table 18 に示した。ME50 を *i.n.* 投与したときの痙攣抑制発現率は 50%を示し、痙攣抑制潜時時間は DZP 注射液よりも 5.7 分有意な延長が認められた (Table 18)。また、*i.n.* 投与したときの痙攣再発率は DZP 注射液では 40%であるのに対して、ME50 および ME5 では同じ 0%だった (Table 18)。一方、DZP 注射液および ME5 を *i.n.* 投与したとき、痙攣抑制発現率は 100%だったが、ME5 を投与したときの痙攣抑制潜時時間は DZP 注射液に比較して 1.5 分有意に延長した (Table 18)。

これらの結果より、投与容量の大きい ME5 は DZP 注射液と同等の効果を示したが、投与容量が 10 分の 1 容量の ME50 の *i.n.* 投与ではその効果が減弱することが明らかになった。

Table 18 Seizure suppression effect 5 minutes after *i.n.* administration (0.5 mg/kg) of DZP injection (5 mg/mL) or ME formulations (ME50, ME5) in the PTZ-induced SE model rats.

Test formulation	Seizure suppression rate (%)	Seizure suppression time (min)		Seizure recurrence rate (%)
ME50	50 (3/6)	7.9 ±1.8	**	0 (0/3)
ME5	100 (6/6)	3.7 ±0.5	**	0 (0/6)
DZP solution	100 (10/10)	2.2 ±0.5	**	40 (4/10)

Each data represents the mean S.E. (n = 6-10).
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Tukey-Kramer test).

第6章 本編の小括および考察

本編では、臨床で用いられる DZP 注射液 (5 mg/mL) の *i.v.* 投与量 (0.5 mg/kg) を鼻腔内へ適用可能な容量に調整するため、ME に対する DZP の溶解度が 50 mg/mL 以上で、製剤学的に安定性が高く、かつ鼻粘膜に対して安全性の高い DZP 含有 ME 製剤の開発を検討した。さらに、各種 ME の中から最適化した DZP 含有 ME 製剤を *i.n.* 投与したときの体内動態および痙攣抑制効果を DZP 注射液と比較することで ME 化の有用性を検討した。

各種 ME の中から最適化した ME 製剤の疑似 3 元状態図、製剤学的パラメータおよび粒度分布をそれぞれ Fig. 37、Table 19 および Fig. 38 に示した。最適化した各相の混合割合は S_{mix} 相 (Lab:Dpg = 1:1) 40%、 O_{mix} 相 30% および W 相 30% で、ME に対する DZP の溶解度が 50 mg/mL 以上の o/w 型製剤を調製することができた (Fig. 37 and Table 19)。Li らは S_{mix} 相 (tween80:propylene glycol:ethanol = 31%:31%:8%) 濃度 70%、Kaur らは S_{mix} 相 (labrasol:transcutol:ethanol = 25%:37.5%:12.5%) 濃度 75% の DZP 含有 ME 製剤を調製したことを報告している^{25,26}。これらの研究報告と比較すると、本研究で最適化した DZP 含有 ME 製剤は 30% 以上の界面活性剤濃度を抑えて調製することができた。70% 以上の S_{mix} を含有した ME は鼻粘膜に対して傷害を伴うことで吸収が促進することが考えられるため、鼻粘膜傷害性を評価する必要があるが、これらの報告はそれに関する試験は実施していない。本研究では、鼻粘膜傷害性の評価として、ME 製剤の *i.n.* 投与による 5 分後の鼻粘膜からの LDH 漏出率を評価した。その結果、最適化した DZP 含有 ME 製剤は 1%STDHF よりも LDH 漏出率が著しく低く、臨床で用いられる DZP 注射液よりも低いことが明らかになった (Fig. 34)。このことから、本研究で最適化した DZP 含有 ME 製剤は比較的安全性が高いことが示され、粘膜傷害を引き起こすことなく薬物の速やかな吸収を可能にすると考えられた。

DZP 注射液 (5 mg/mL) と同濃度の ME5 (5 mg/mL) を *i.n.* 投与 (0.5 mg/kg) したと

きの血中濃度、各種脳組織および CSF 中濃度は、ME5の方がDZP注射液よりも有意に高く、ME化により全身吸収性および脳移行性が向上することが明らかになった。また、DZP注射液(5 mg/mL)に対して投与容量が10分の1のME50(50 mg/mL)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とも、ME化による吸収促進効果を裏付けている。これらのことから、DZP注射液よりもME化した製剤は、鼻粘膜を介した透過性を高めることで、全身循環への移行を促進し、LiやKaurらの報告と一致した^{25, 26)}。さらに、本検討ではME化による脳移行性の亢進についても新たに明らかにした。*i.n.*投与後のDZPの各種脳組織およびCSFへの移行は、三叉神経>嗅球>CSF>後脳>前脳の順でDZP濃度が高く、この傾向が全ての試験製剤で同様であったことから、DZPの鼻腔から各種脳組織およびCSFへの移行分布が明らかになった。特に、後脳領域に関与する三叉神経中DZP濃度が高いことから、*i.n.*投与後の速やかな痙攣抑制効果に起因するNTBは三叉神経経路による影響の可能性が考えられた。

S_{mix} Phase: Lab : Dpg = 1 : 1

O_{mix} Phase: Ba : Ta = 1 : 1

Water Phase: Purified water

■: ME area

□: Non-ME area

●: $S_{mix} : O_{mix} : W$

= 40% : 30% : 30%

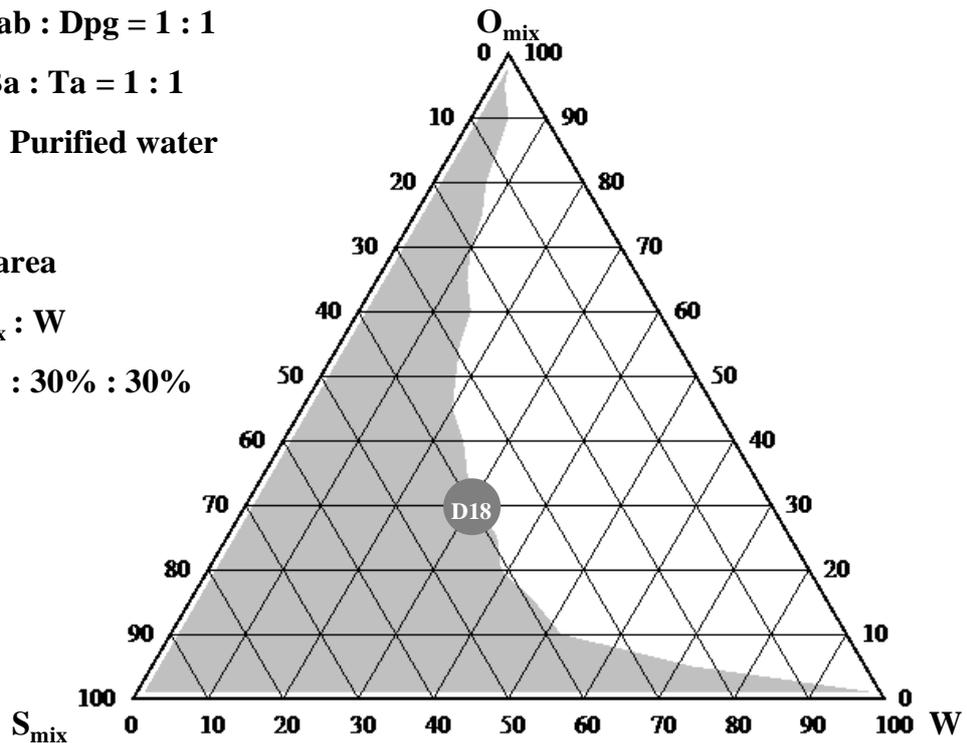


Fig. 37 Three-phase region when S_{mix} Phase (Lab : Dpg = 1 : 1), O_{mix} Phase (Ba : Ta = 1 : 1), and Water Phase (Purified water) are mixed.

Table 19 Solubility, Viscosity, Zeta potential, Particle size, and PDI of No. 18 in the three-phase region.

No.	Solubility (mg/mL)	Viscosity (mpa·s)	Zeta potential (mV)	Particle size (nm)	PDI
D18	65.4 ± 2.0	2.9 ± 0.0	0.3 ± 0.8	41.8 ± 1.3	0.20 ± 0.01

Data represent mean ± S. D. (n = 3-6).

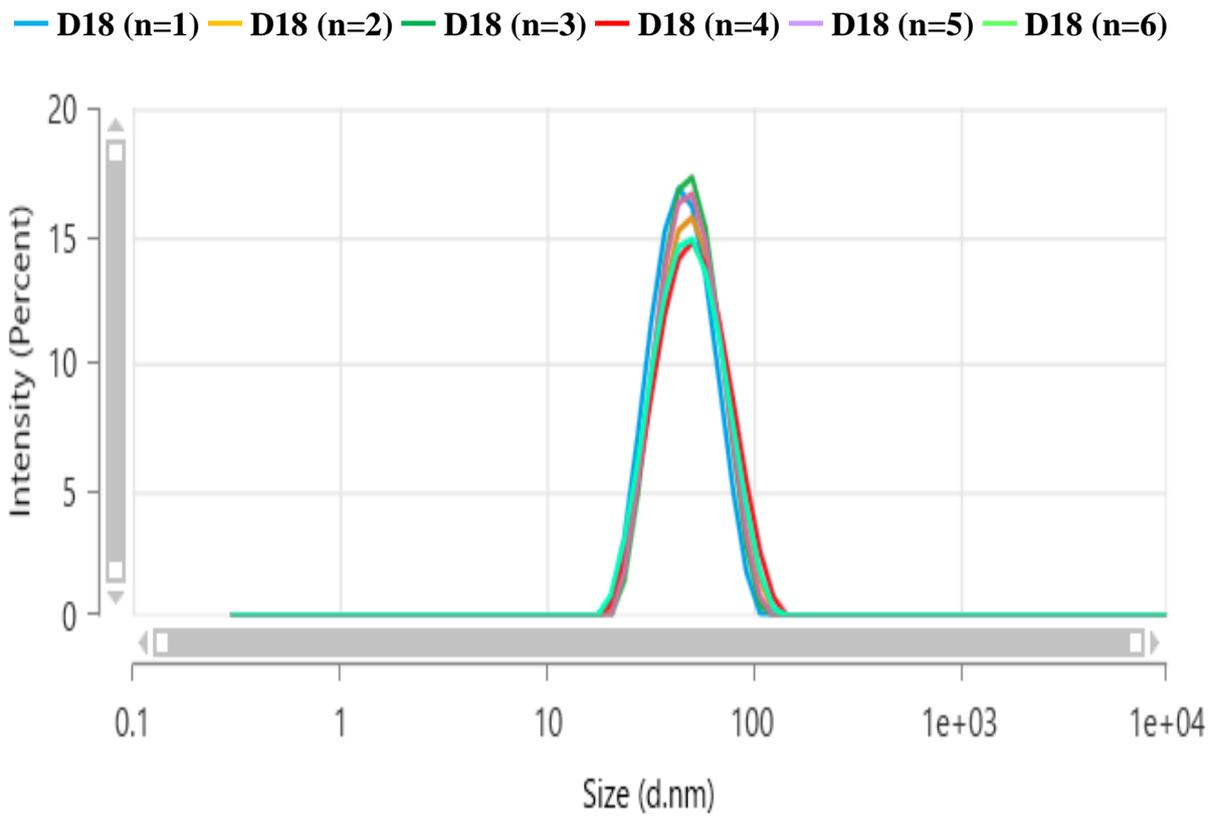


Fig. 38 Particle size distribution of No. D18.

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

臨床における薬剤の *i.n.* 投与は、主に drop 式または spray 式による方法が一般的である。drop 式は、注射器やスポイトを用いて数滴ずつ鼻腔に流し込むことで薬剤を注入する方法である²⁰⁾。この方法は、spray 投与よりも液滴が大きいため、投与容量や投与速度によっては不快に感じやすく、頭の位置が不適切な場合は、薬剤が鼻腔外および咽頭側へ流出する可能性がある^{20, 83, 84)}。一方、spray 式は、粘膜噴霧装置や単位用量ポンプを用いて鼻腔内に直接薬剤を一定量噴霧する方法である^{20, 30-32)}。この方法は、鼻腔内へ細かい霧状にして適用することによって、薬剤の鼻腔外および咽頭側への流出が少なくなり、鼻粘膜全体から吸収されるため、バイオアベイラビリティの向上を期待できる⁸⁵⁻⁸⁷⁾。また、spray 投与は、患者がどのような態勢でも投与することができるため、投与者側の技術的な訓練を必要としない。そのため、spray 投与が最もよく用いられる鼻腔内投与方法である。一方、非臨床試験では、*i.n.* 投与後の薬物動態および薬理効果を評価するために汎用性の高いラットを用いることが多い。このときの *i.n.* 投与方法は、マイクロシリンジに取り付けたポリエチレンチューブ、またはマイクロピペッターに装着したチップを介してラット鼻孔内に適用する^{33, 34)}。第2編の第4章および第5章では、本編で用いた DZP 含有 ME 製剤をラット鼻孔内に drop 投与し、薬物動態および痙攣抑制効果を評価した。その結果、5 mg/mL の ME 製剤を適用したときでは、同濃度の DZP 注射液を投与したときと比較して DZP の全身循環への移行および脳移行が向上し、同等な痙攣抑制効果を示した (Figs. 35 and 36, Table 18)。一方、50 mg/mL の ME 製剤を適用したときでは痙攣抑制効果の低下が認められた (Table 18)。このときの投与容量は 5 mg/mL の試験製剤を投与したときの 10 分の 1 と

なることから投与方法を工夫することによって薬物動態および痙攣抑制効果を改善できる可能性があると考えた。

これまでにいくつかの臨床研究から、鼻腔内への *spray* 投与は、*drop* 投与よりも速やかに全身循環系へ移行し、バイオアベイラビリティが上昇することから、その要因の一つとして粘膜吸収領域の拡大が影響していると報告されている⁸⁵⁻⁸⁷⁾。しかし、粘膜吸収領域の拡大と脳実質への薬物移行性との関係は報告されていない。また、ラットを用いた基礎研究においても鼻腔内への *drop* 投与に比べて、鼻腔内への *spray* 投与は、粘膜吸収領域がどの程度拡大し、その領域拡大が全身吸収性および脳移行性にどの程度影響を及ぼしているのかについて詳細に検討された報告はない。さらに、鼻腔の呼吸部からは全身への移行、嗅覚部からは脳への移行が高いと解剖学的な観点から論述されることがあるが、前述の領域拡大が呼吸部および嗅覚部からの全身循環系への移行や脳実質への直接移行との関係について詳細に検討した報告はない。

そこで本編では、DZP 含有 ME 製剤を鼻腔内に *spray (i.n.-spray)* 投与したときの薬物動態および痙攣抑制効果を鼻腔内へ *drop (i.n.-drop)* 投与したときと比較することでその有用性を検討した。さらに、DZP を *i.n.* 投与したときの体内動態および薬理効果に対する粘膜吸収領域の影響を明らかにすることを目的として、濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定 (0.5 mg/kg) 条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの粘膜吸収面積と全身吸収性、脳移行性および痙攣抑制効果との関係をそれぞれ評価した。

第 1 章では、DZP 含有 ME 製剤を *i.n.-spray* 投与したときの薬物動態を *i.n.-drop* 投与と比較することでその有用性を検討した。第 2 章では、第 1 章と同様に試験製剤を投与し痙攣抑制効果から *i.n.-spray* 投与の有用性を検討した。第 3 章では、濃度の異なるメチレンブルー含有 ME 溶液 (50 mg/mL: ME50、20 mg/mL: ME20、10 mg/mL: ME10、5 mg/mL: ME5) を用量固定 (0.5 mg/kg) 条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与し、粘膜着色領域を観察した。粘膜着色領域の測定は最も濃い領域 (P1) と薄い領域 (P2) に分け、さらにそれらの合計領域についてそれぞれの面積率を算出した。その P1 面

積率と濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定 (0.5 mg/kg) 条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの血漿中濃度および体内動態パラメータとの関係性を検討した。また、P1 面積率と各種脳組織中濃度および痙攣抑制潜時時間との関係性を検討した。

以下、得られた結果について論述する。

第 1 章 DZP 含有 ME 製剤の鼻腔内へ spray および drop 投与による体内動態

第 1 節 DZP 含有 ME 製剤の鼻腔内へ spray および drop 投与による全身循環系への移行性

本節では DZP 含有 ME 製剤 (5 mg/mL: ME5、50 mg/mL: ME50) の *i.n.*-spray 投与による全身循環系への移行性を *i.n.*-drop 投与したときと比較した。

ME5 を *i.n.*-spray および *i.n.*-drop 投与したときの血漿中濃度-時間プロファイルを図 39 に、体内動態パラメータを Table 20 に示した。また、ME50 を *i.n.*-spray 投与および *i.n.*-drop 投与したときの血漿中濃度-時間プロファイルを図 40 に、体内動態パラメータを Table 21 に示した。ME5 を用いて *i.n.*-spray 投与したときの 1、3 および 5 分後の血漿中濃度は、*i.n.*-drop 投与よりも有意に高く、*i.n.*-spray 投与での k_a は、*i.n.*-drop 投与時よりも有意に高かった (Fig. 39 and Table 20)。すなわち、*i.n.*-spray 投与したときの血漿中濃度は速やかに上昇し、5 分以降は *i.n.*-spray と *i.n.*-drop 投与ともに同様な推移で低下した (Fig. 39)。*i.n.*-spray 投与したときの AUC_{0-180} および F_{0-180} は、*i.n.*-drop 投与よりも有意に高かった (Table 20)。また、ME5 と 10 分の 1 の投与容量の ME50 を用いた *i.n.*-spray および *i.n.*-drop 投与したときの比較では、ME5 を用いたときと同様な傾向が認められた (Figs. 39 and 40, Tables 20 and 21)。

以上のことから、製剤中の DZP 濃度にかかわらず、*i.n.*-spray 投与は、*i.n.*-drop 投与に比較して全身吸収性が向上した。さらに、*i.n.*-spray 投与は、少量の投与容量であっても速やかな吸収性が得られたことから、鼻粘膜吸収領域に対して広く薬液を適用できていると考えられた。

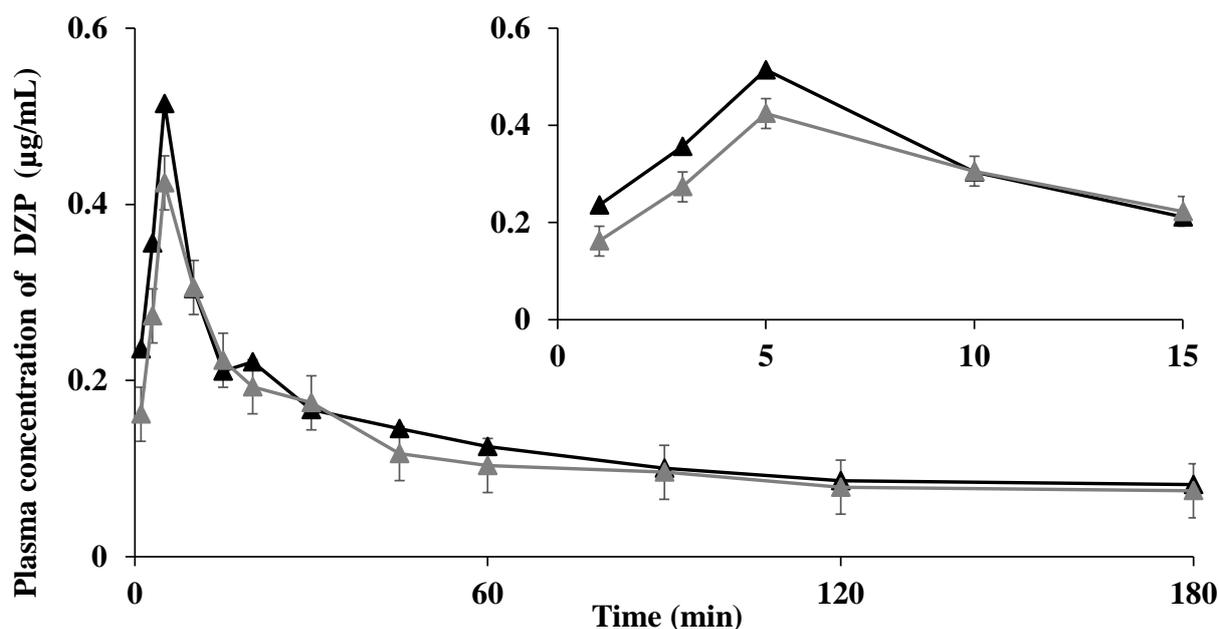


Fig. 39 Plasma concentration profiles of DZP after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME5) in rats.

▲ : *i.n.*-spray administration ▲ : *i.n.*-drop administration.

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

Table 20 Pharmacokinetic parameters after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME5) in rats.

Dosage form	k_a (min^{-1})	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	T_{\max} (min)	$AUC_{0 \rightarrow 180}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$)	$F_{0 \rightarrow 180}$ (%)
<i>i.n.</i> -spray	0.070 * ± 0.001	0.514 * ± 0.008	5.0 <i>n.s.</i> ± 0.0	30.3 * ± 2.8	36.6 * ± 3.3
<i>i.n.</i> -drop	0.065 ± 0.001	0.424 ± 0.011	5.0 ± 0.0	27.2 ± 1.5	32.8 ± 1.8

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

* : $p < 0.05$, *n.s.* : not statistically significant, compared with *i.n.*-drop administration (student's t-test).

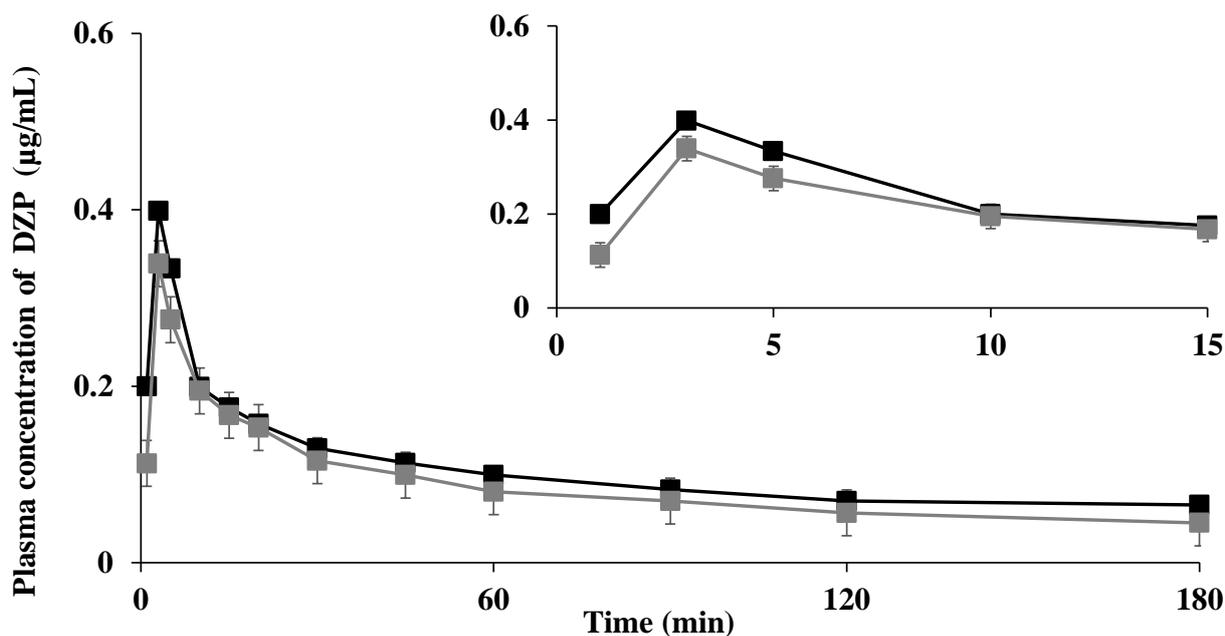


Fig. 40 Plasma concentration profiles of DZP after *i.n.-spray* or *i.n.-drop* administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME50) in rats.

■ : *i.n.-spray* administration. ■ : *i.n.-drop* administration.

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

Table 21 Pharmacokinetic parameters after *i.n.-spray* or *i.n.-drop* administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME50) in rats.

Dosage form	k_a (min ⁻¹)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0 \rightarrow 180}$ (µg/mL·min)	$F_{0 \rightarrow 180}$ (%)
<i>i.n.-spray</i>	0.055 * ± 0.002	0.337 * ± 0.062	3.0 <i>n.s.</i> ± 0.0	22.0 * ± 3.0	26.6 * ± 3.7
<i>i.n.-drop</i>	0.042 ± 0.000	0.320 ± 0.020	3.0 ± 0.0	17.5 ± 1.5	21.2 ± 1.8

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

* : $p < 0.05$, *n.s.* : not statistically significant, compared with *i.n.-drop* administration (student's t-test).

第 2 節 DZP 含有 ME 製剤の鼻腔内へ spray および drop 投与による

各種脳組織および CSF への移行性

本節では、DZP 含有 ME 製剤 (5 mg/mL: ME5、50 mg/mL: ME50) の *i.n.*-spray 投与による 5 分後の各種脳組織および CSF への移行性を *i.n.*-drop 投与したときと比較した。

ME5 および ME50 を *i.n.*-spray または *i.n.*-drop 投与したときの各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度を Fig. 41 および Fig. 42 に示した。ME5 を用いて *i.n.*-spray 投与したときの各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度は、*i.n.*-drop 投与よりも全て有意に高かった (Fig. 41 b~f)。そのときの血漿中 DZP 濃度は、*i.n.*-drop 投与よりも *i.n.*-spray 投与の方が 1.2 倍有意に高かったが、嗅球、三叉神経および CSF 中濃度では *i.n.*-spray 投与のときの方が *i.n.*-drop 投与のときよりもそれぞれ 2.8 倍、2.2 倍および 2.5 倍を示し、血漿中濃度に比べてその差は大きくなった (Fig. 41 a, d~f)。ME50 を用いて *i.n.*-spray 投与および *i.n.*-drop したときの各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度の比較では、投与容量に関係なく ME5 の結果と同様な傾向が認められた (Fig. 42 b~f)。

以上のことから、製剤中の DZP 濃度にかかわらず、*i.n.*-spray 投与は *i.n.*-drop 投与に比較して脳移行性が向上した。

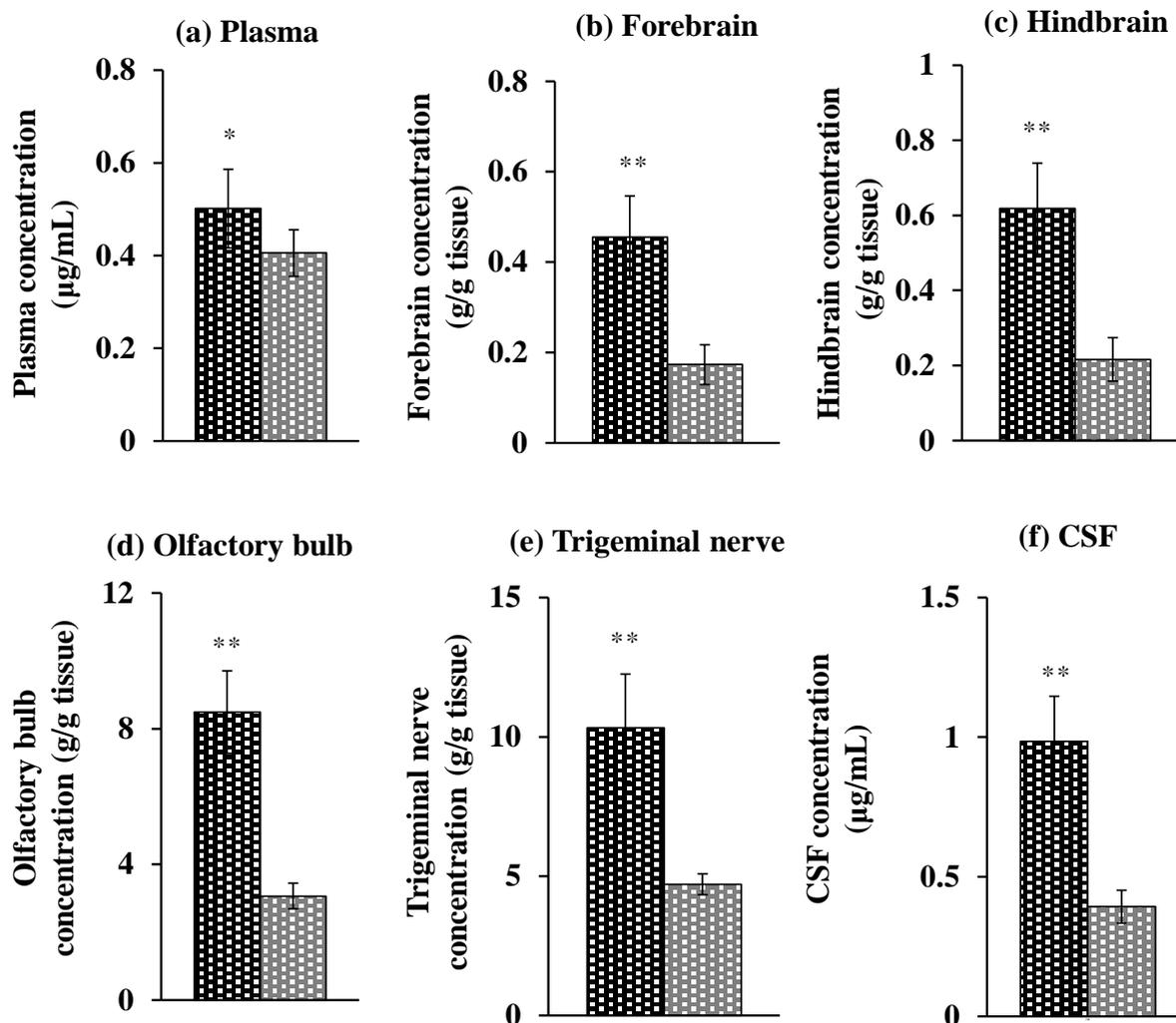


Fig. 41 DZP concentration in the (a) plasma, (b) forebrain, (c) hindbrain, (d) olfactory bulb, (e) trigeminal nerve, and (f) CSF 5 minutes after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME5) in rats.

▨: *i.n.*-spray administration, ▩: *i.n.*-drop administration

Each data represents the mean S.E. (n = 3-12).

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

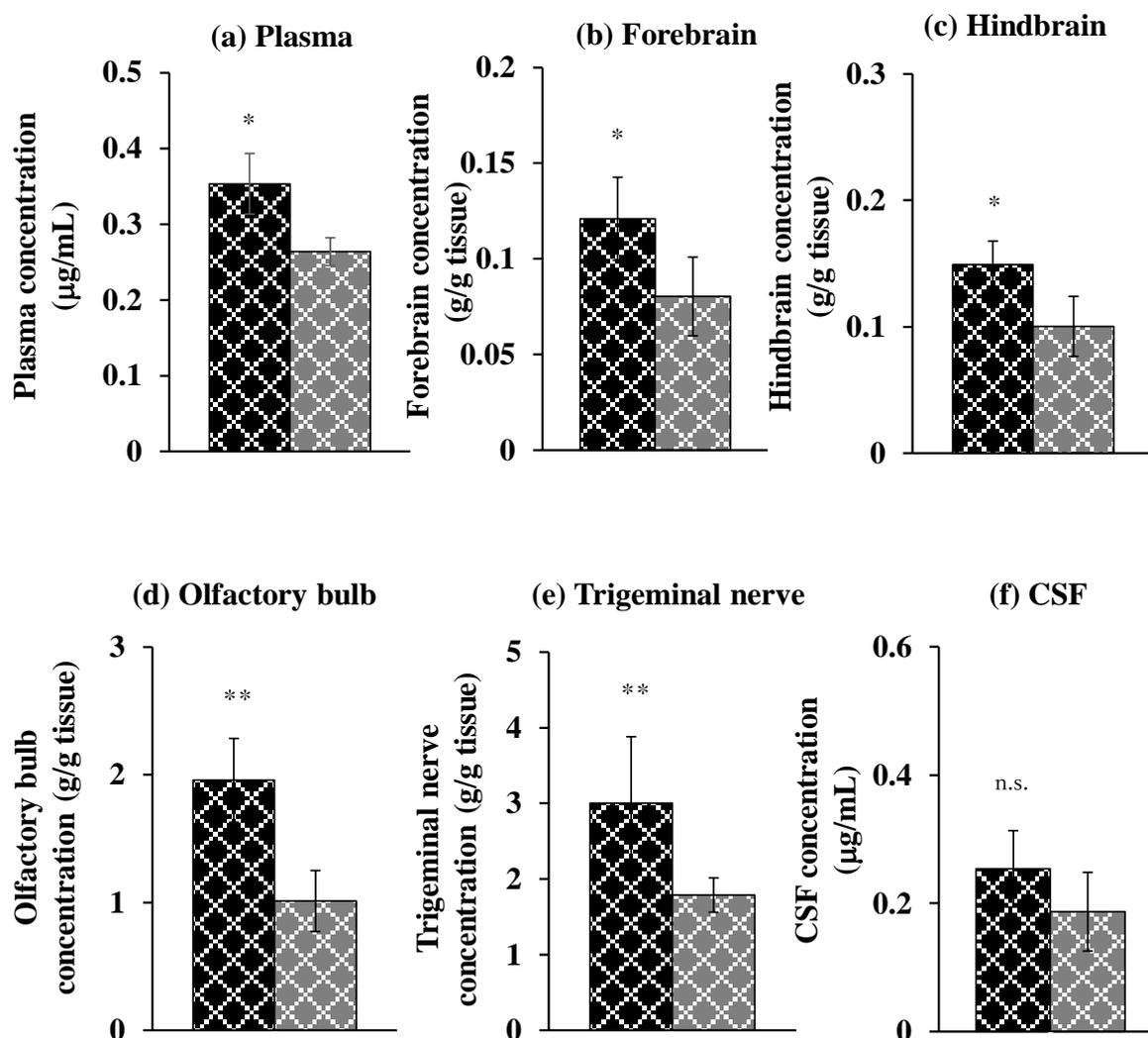


Fig. 42 DZP concentration in the (a) plasma, (b) forebrain, (c) hindbrain, (d) olfactory bulb, (e) trigeminal nerve, and (f) CSF 5 minutes after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) or ME formulations (ME50) in rats.

▨ : *i.n.*-spray administration, ▩ : *i.n.*-drop administration

Each data represents the mean S.E. (n = 3-12).

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

第2章 DZP含有ME製剤を鼻腔内へ spray および drop 投与後のPTZ誘発性SEモデルラットに対する痙攣抑制効果

本節では、DZP含有ME製剤(5 mg/mL: ME5、50 mg/mL: ME50)の鼻腔内へ spray 投与したときの痙攣抑制効果を鼻腔内へ drop 投与したときと比較した。

ME5およびME50を*i.n.-spray* または*i.n.-drop* 投与したときの痙攣抑制効果を Table 22 および Table 23 に示した。ME5を用いて*i.n.-spray* 投与したときの痙攣抑制発現率および痙攣再発率はいずれも*i.n.-drop* 投与と同じく100%および0%だった。*i.n.-spray* 投与したときの痙攣抑制潜時時間は*i.n.-drop* 投与よりも1.5分有意に短縮した(Table 22)。また、ME50を*i.n.-spray* 投与したときの痙攣抑制発現率は100%で痙攣抑制潜時時間は4.3分となり、*i.n.-drop* 投与したときに比べて痙攣抑制効果は向上した(Table 23)。

以上のことから、製剤中のDZP濃度にかかわらず、*i.n.-spray* 投与は*i.n.-drop* 投与に比較して高い痙攣抑制効果を示した。さらに、ME5の10分の1の投与容量のME50は少量の薬液であるが、*i.n.-spray* 投与により鼻粘膜吸収領域に対して全体的に薬液を適用することで痙攣抑制潜時時間が短縮したことが考えられた。

Table 22 Seizure suppression effect 5 min after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME5) in the PTZ-induced SE model rats.

	<i>i.n.</i> -spray	<i>i.n.</i> -drop
Seizure suppression rate (%)	100 (6/6)	100 (6/6)
Seizure suppression time (min)	2.2 ± 0.2 *	3.7 ± 0.5
Seizure recurrence rate (%)	0 (0/6)	0 (0/6)

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

* : $p < 0.05$, compared with *i.n.*-drop administration (student's t-test).

Table 23 Seizure suppression effect 5 min after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulations (ME50) in the PTZ-induced SE model rat.

	<i>i.n.</i> -spray	<i>i.n.</i> -drop
Seizure suppression rate (%)	100 (6/6)	50 (3/6)
Seizure suppression time (min)	4.3 ± 0.3 *	7.9 ± 1.8
Seizure recurrence rate (%)	17 (1/6)	0 (0/3)

Each data represents the mean S.E. (n = 10).

* : $p < 0.05$, compared with *i.n.*-drop administration (student's t-test).

第3章 DZP 含有 ME 製剤の鼻腔内へ spray および drop による体内動態および痙攣抑制効果に対する鼻粘膜吸収領域の影響

第1節 メチレンブルー溶液を用いた *i.n.* 投与直後の鼻粘膜着色領域の解析

本章では、DZP を *i.n.* 投与したときの体内動態および痙攣抑制効果に対する粘膜吸収領域の影響を明らかにすることを目的とし、第1節では、濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤 (5 mg/mL: ME5、10 mg/mL: ME10、20 mg/mL: ME20、50 mg/mL: ME50) を用量固定 (0.5mg/kg) 条件下で *i.n.*-spray および *i.n.*-drop 投与したときの粘膜吸収領域を評価した。

鼻粘膜着色領域を評価するために、メチレンブルー含有 ME 溶液を用量固定条件下で濃度の異なる染色液として調製した。Fig. 43 に示すように、メチレンブルー含有 ME 溶液を *i.n.* 投与したときの着色された鼻粘膜表面を露出した。画像解析ソフトを用いて輝度を測定し、輝度 0-120 を示す濃い部分 (黒色領域) を P1、輝度 120-170 を示す薄い部分 (灰色領域) を P2 に分類して評価した。メチレンブルー含有 ME 溶液を *i.n.*-spray 投与したときの粘膜着色領域画像および粘膜着色面積率を Fig. 44 および Table 24 に示した。また、*i.n.*-drop 投与したときの同様の結果を Fig. 45 および Table 25 に示した。*i.n.*-spray 投与では、投与容量によらず薬剤が広範囲かつ鼻腔後方まで広がり、合計面積率は、ほぼ 100% で一定だった (Figs. 44 and 46, Table 24)。しかし、最も少ない投与容量である ME50 を *i.n.*-drop 投与したときの合計面積率は 16.8% だった (Table 25)。Fig. 44 および 45 の比較からも明らかなように、少ない投与液を鼻腔内に投与する場合は *i.n.*-spray 投与の方が *i.n.*-drop 投与よりも粘膜吸収領域全体に適用可能である (Figs. 44 and 45)。また、*i.n.*-drop 投与では P1 面積が鼻腔前方にとどまっているの

に対して (Fig. 45)、*i.n.*-spray 投与では鼻腔後方まで拡大していた (Fig. 44)。Fig. 46 および Fig. 47 は、投与容量と合計面積率および P1 面積率の関係を示した。*i.n.*-spray 投与後の P1 面積率は、投与容量の増加に伴って上昇し (Figs. 44, 45, and 47, Table 24)、*i.n.*-drop 投与では投与容量の増加に伴って合計面積率および P1 面積率が上昇した (Figs. 45~47, Table 24)。2つの投与形態に共通する投与容量と P1 面積率が比例関係であることに着目し、本章の第 1 節以降の検討からは P1 面積率との関係性を評価することとした。

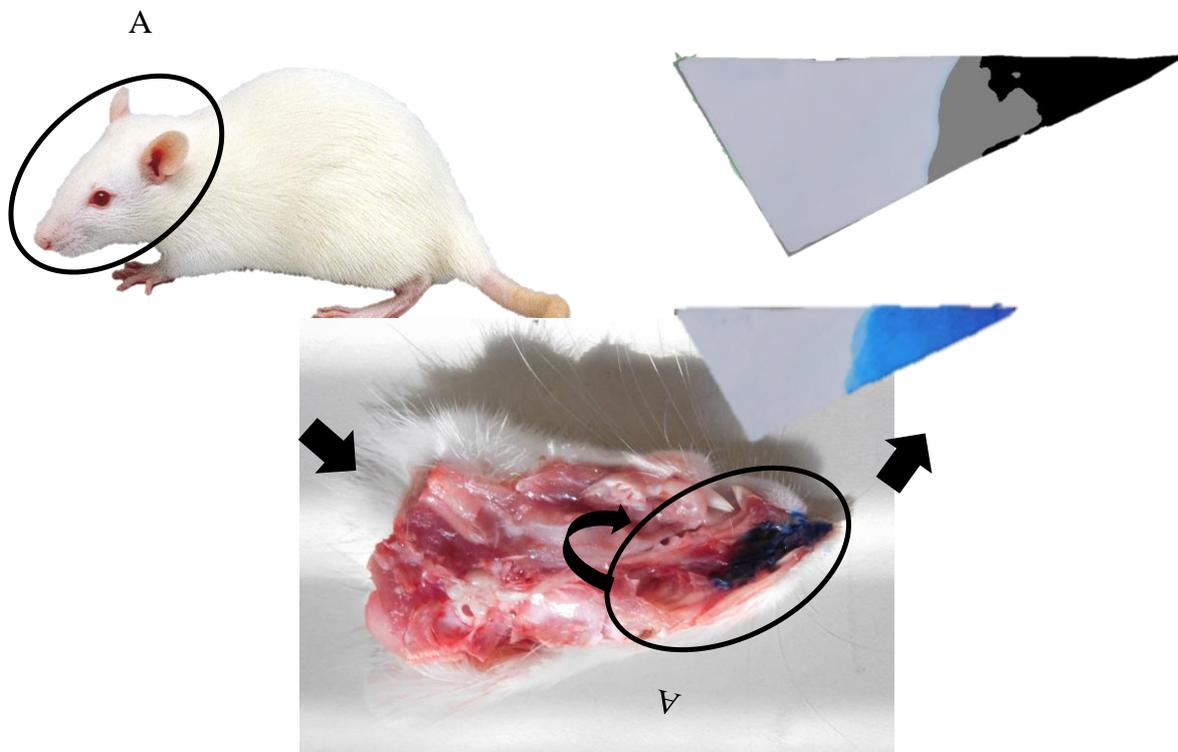


Fig. 43 Measurement of colored area of nasal mucosa after *i.n.* administration of methylene blue solution in rats.

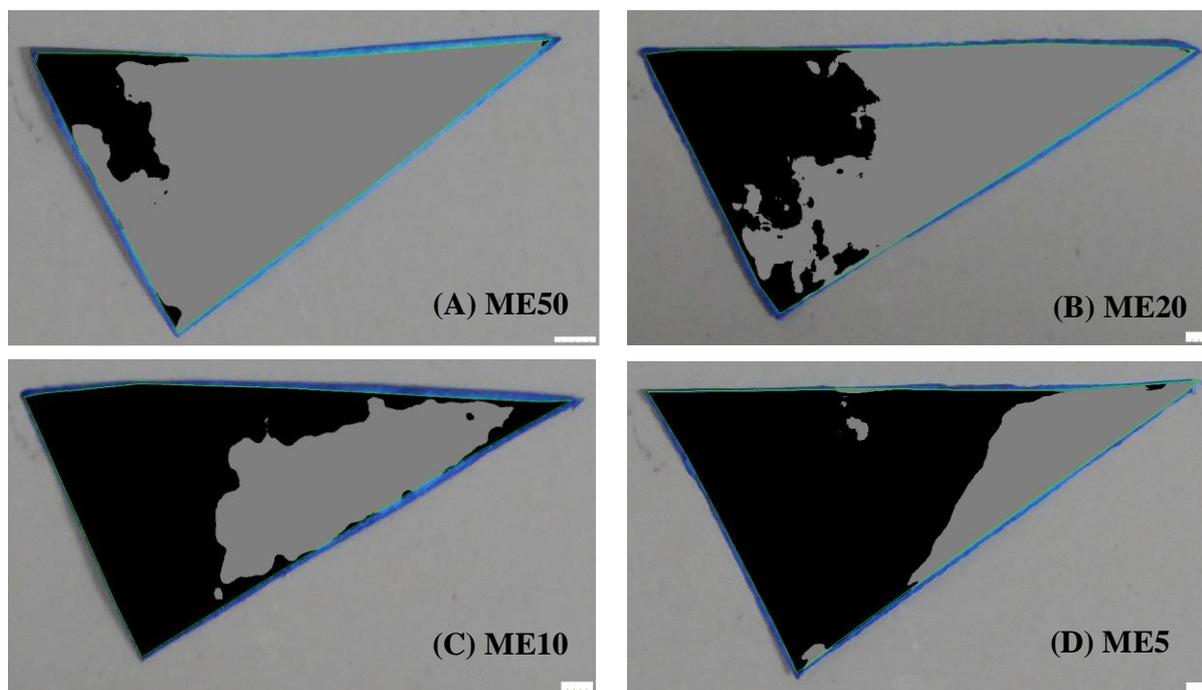


Fig. 44 Binary color map of methylene blue distribution on nasal mucosa immediately after *i.n.-spray* administration (0.5 mg/kg) of ME formulation in rats.

ME formulation : (A) ME50, (B) ME20, (C) ME10, (D) ME5.

■ P1 area : dark area showing luminance 0-120.

■ P2 area : thin area showing luminance 120-170.

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

Table 24 Coverage rate of methylene blue on nasal mucosa immediately after *i.n.-spray* administration (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats.

Test formulation	P1 area (%)	P2 area (%)	Total (%)
ME50	10.6 ± 1.5	89.2 ± 1.4	99.9 ± 0.1
ME20	41.2 ± 1.2	85.8 ± 1.2	100.0 ± 0.0
ME10	68.8 ± 2.1	31.2 ± 2.1	100.0 ± 0.0
ME5	80.9 ± 1.9	19.1 ± 1.9	100.0 ± 0.0

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

** : $p < 0.01$, *n.s.* : not statistically significant (Tukey-Kramer test).

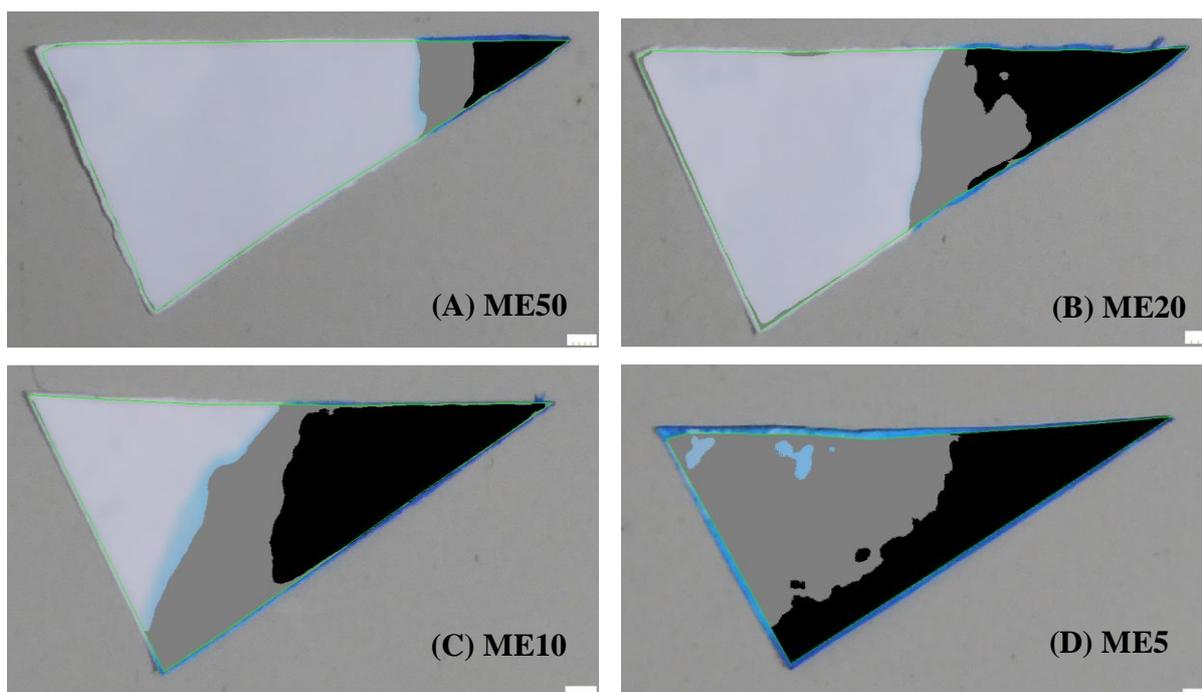


Fig. 45 Binary color map of methylene blue distribution on nasal mucosa immediately after *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulation in rats.

ME formulation : (A) ME50, (B) ME20, (C) ME10, (D) ME5.

■ P1 area : dark area showing luminance 0-120

■ P2 area : thin area showing luminance 120-170

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

Table 25 Coverage rate of methylene blue on nasal mucosa immediately after *i.n.*-drop administration (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats.

Test formulation	P1 area	P2 area	Total
ME50	6.3 ± 0.9	10.4 ± 4.2	16.8 ± 2.9
ME20	18.8 ± 3.2	11.6 ± 5.5	30.4 ± 3.9
ME10	32.3 ± 0.8	28.8 ± 0.8	61.0 ± 2.4
ME5	47.3 ± 2.5	48.0 ± 5.0	95.3 ± 2.9

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

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *n.s.* : not statistically significant (Tukey-Kramer test).

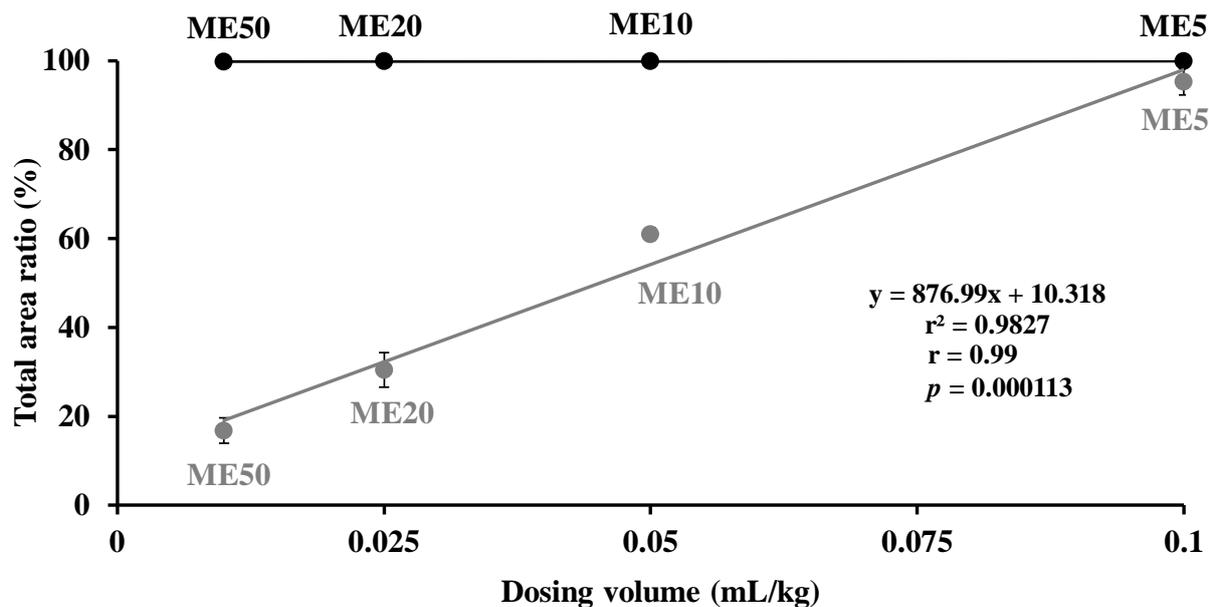


Fig. 46 Relationship between *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration dosing volume (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats and colored Total area ratio on nasal mucosa.

● : *i.n.*-spray administration. ● : *i.n.*-drop administration.

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

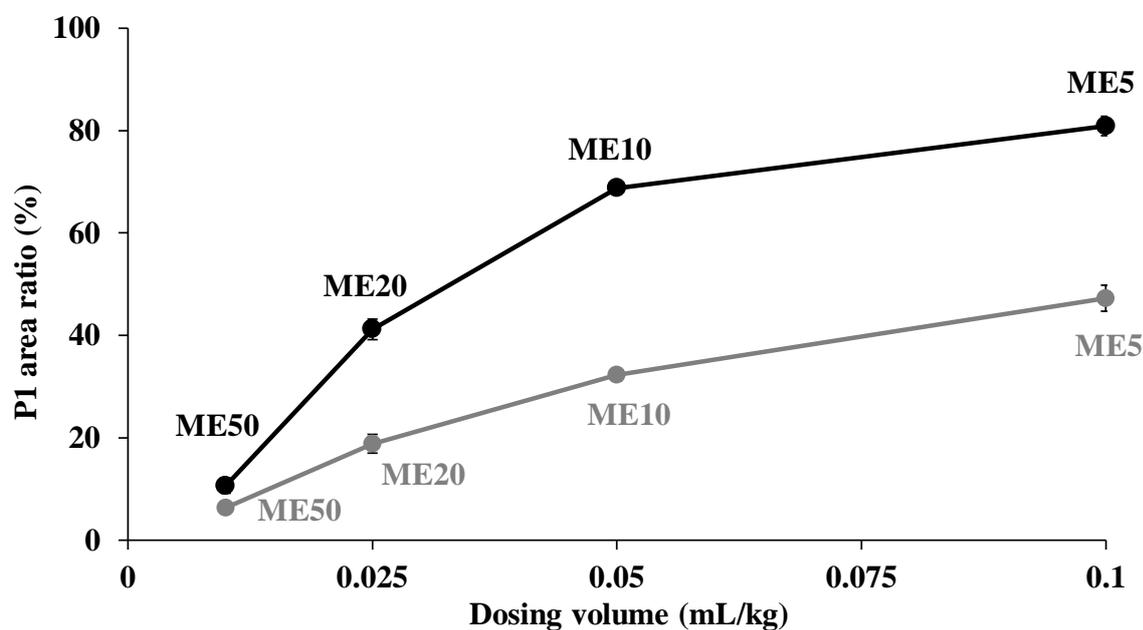


Fig. 47 Relationship between *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration dosing volume (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats and colored P1 area ratio on nasal mucosa.

● : *i.n.*-spray administration. ● : *i.n.*-drop administration.

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

第 2 節 鼻粘膜着色領域と体内動態パラメータの関係

本節では、濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの体内動態パラメータの関係を評価した。

濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの全身吸収性に関する体内動態パラメータである ka 、 $C_{\max.p}$ 、 $AUC_{0\rightarrow 180}$ および F と P1 面積率との関係を Fig. 48 に示した。*i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの各種体内動態パラメータと P1 面積率の間にはグラフ中に実線で示すような回帰直線が得られ、有意な正の勾配を有する相関が認められた (Fig. 48 a~d)。

以上のことから、全身吸収性に関する体内動態パラメータは、投与方法に関わらず P1 面積率に強く依存することが明らかになった。

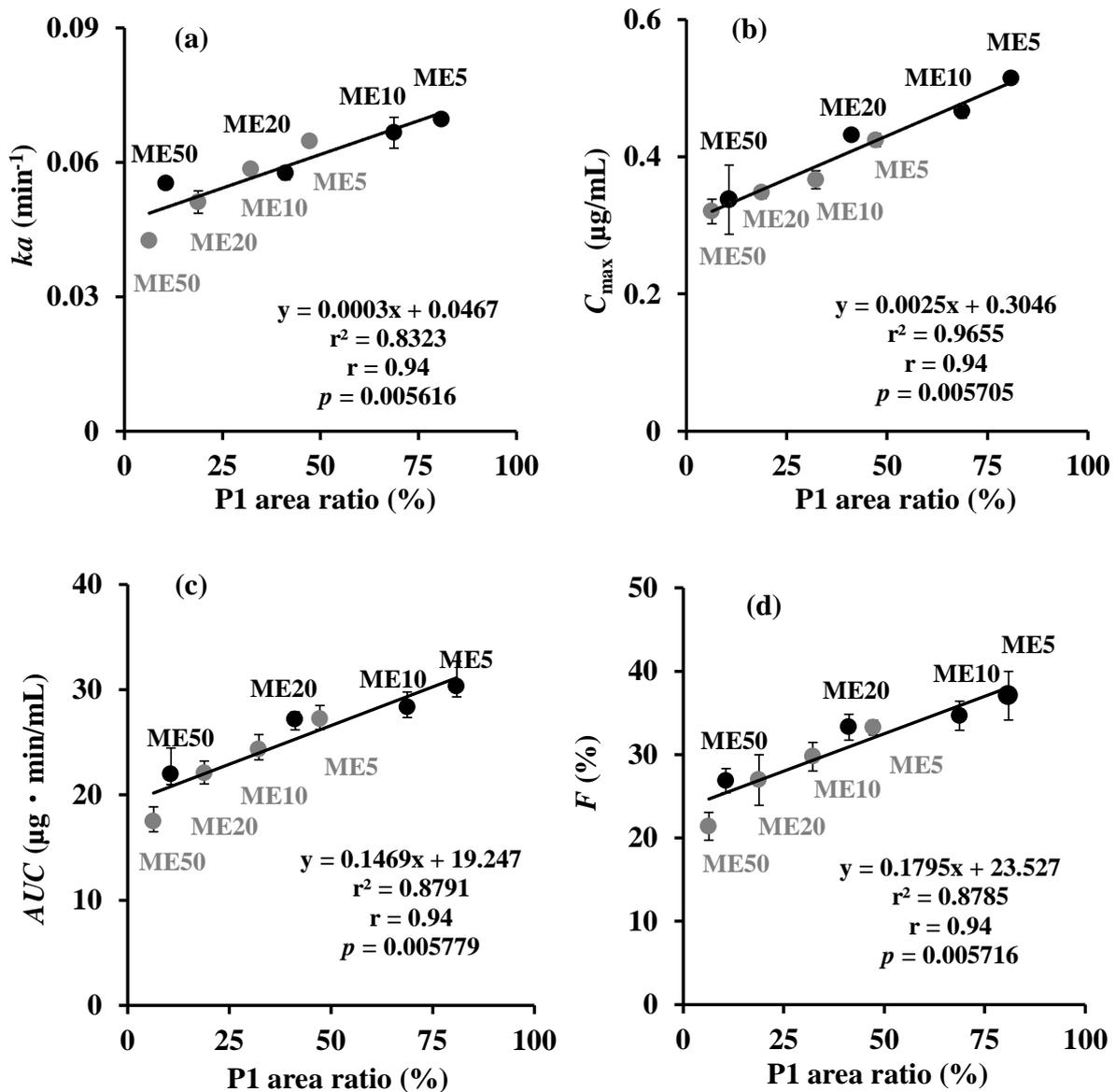


Fig. 48 Relationship between Pharmacokinetic parameters after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration volume (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats and colored P1 area ratio on nasal mucosa.

Pharmacokinetic parameters : (a) ka , (b) C_{\max} , (c) AUC , (d) F .

● : *i.n.*-spray administration. ● : *i.n.*-drop administration.

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

第3節 鼻粘膜着色領域と各種脳組織およびCSF中濃度の関係

本節では、濃度の異なるDZP含有ME製剤を用量固定条件下で*i.n.-spray*および*i.n.-drop*投与したときの鼻粘膜着色領域と各種脳組織およびCSF中濃度の関係进行评估した。

濃度の異なるDZP含有ME製剤を用量固定条件下で*i.n.-spray*および*i.n.-drop*投与したときのP1面積率と前脳、後脳、三叉神経、嗅球、CSFおよび血漿中濃度との関係をFig. 49に示した。*i.n.-drop*投与では、前脳、後脳、三叉神経、嗅球およびCSF中濃度とP1面積率の間にはそれぞれのグラフ中の灰色の実線で示すような回帰直線が得られ、有意な正の勾配を有する相関が認められた (Fig. 49 a~e)。この関係は吸収に関する各種体内動態パラメータとの関係と同様な傾向を示した (Fig. 48)。また、*i.n.-spray*投与したときの各種脳組織中濃度はP1面積率の増加に対して指数関数的に増大し、*i.n.-drop*投与したときとその傾向は異なった (Fig. 49 a~e)。

以上のことから、投与方法の違いは、P1面積率の大きさに影響を及ぼし、その結果として各種脳組織への薬物送達の違いに関係していることが明らかになった。

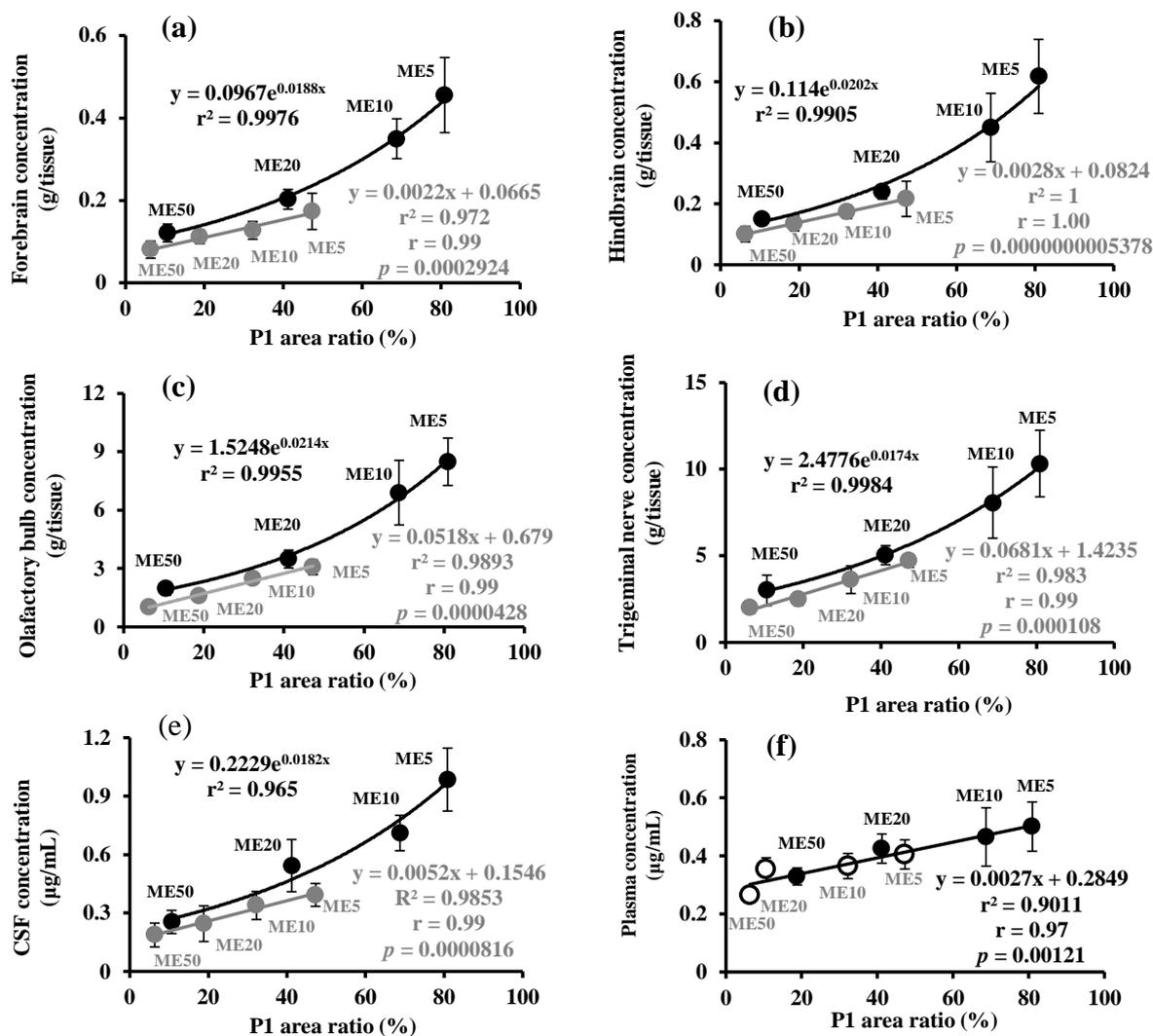


Fig. 49 Relationship between in the various brain tissues concentration after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration volume (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats and colored P1 area ratio on nasal mucosa.

Various brain tissues : (a) forebrain, (b) hindbrain, (c) olfactory bulb, (d) trigeminal nerve, (e) CSF concentration and (f) Plasma

● : *i.n.*-spray administration. ● : *i.n.*-drop administration.

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

第4節 鼻粘膜着色領域と痙攣抑制効果の関係

本節では、濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの鼻粘膜着色領域と痙攣抑制効果の関係を評価した。

濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの P1 面積率と痙攣抑制潜時時間との関係を Fig. 50 に示した。ME50 を *i.n.-drop* 投与したときの痙攣抑制潜時時間は 7.9 分を示したが、痙攣抑制発生率は 50% (6 例中の 3 例) と実験した条件の中で著しく低かった (Fig. 50)。その他 ME20、ME10 および ME5 を *i.n.-drop* 投与したときの痙攣抑制発生率は 100% であるため、ME50 のプロットを除外し、ME20、ME10 および ME5 を対象に解析した (Fig. 50)。その結果、*i.n.-drop* 投与後の痙攣抑制潜時時間と P1 面積率の間には有意な負の相関が認められた (Fig. 50)。一方、*i.n.-spray* 投与は *i.n.-drop* 投与の直線性よりも痙攣抑制時間の短時間側にシフトし、この挙動は第 3 節で示した *i.n.-spray* 投与したときの各種脳組織中濃度の変化に対応していると示唆された。

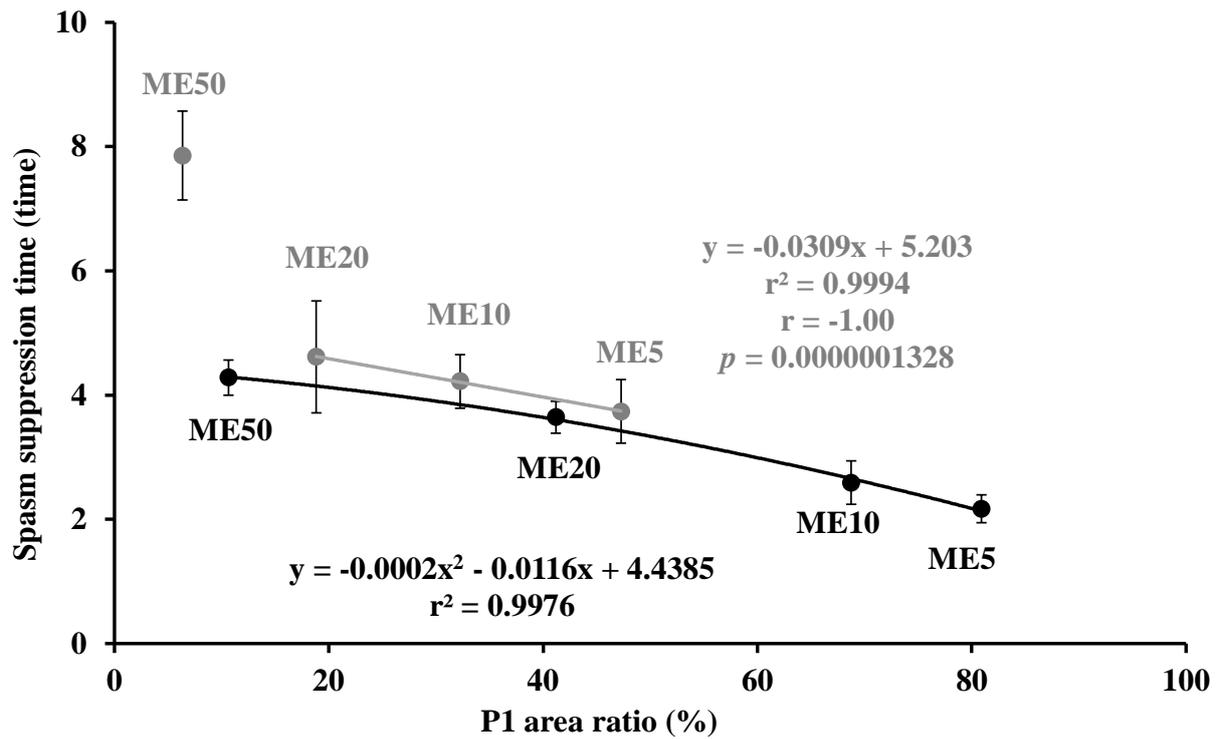


Fig. 50 Relationship between Spasm suppression time after *i.n.*-spray or *i.n.*-drop administration volume (0.5 mg/kg) of ME formulation (ME50, ME20, ME10, ME5) in rats and colored P1 area ratio on nasal mucosa.

● : *i.n.*-spray administration, ● : *i.n.*-drop administration.

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

第4章 本編の小括および考察

本編では、DZP 含有 ME 製剤 (5mg/mL: ME5、50 mg/mL: ME50) の *i.n.*-spray 投与による体内動態および痙攣抑制効果を *i.n.*-drop 投与したときと比較することでその有用性を検討した。ME5 および ME50 の *i.n.*-spray 投与による血漿、各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度は、*i.n.*-drop 投与よりも有意に高く、*i.n.*-spray 投与により全身吸収性および脳移行性が向上することが示唆された (Figs. 39 and 40, Tables 20 and 21)。それに伴い、ME5 の *i.n.*-spray 投与による痙攣抑制潜時時間は 2.2 分となり *i.n.*-drop 投与の 3.7 分よりも有意に短縮した (Table 22)。さらに、その結果は臨床で用いられる DZP 注射液を *i.v.* 投与したときと同等であった (Table 3)。一方、ME50 の *i.n.*-spray 投与による痙攣抑制潜時時間は 4.4 分となり、*i.n.*-drop 投与の 7.9 分よりも有意に短縮した (Table 23)。これは *i.n.*-drop 投与では粘膜吸収領域に対する製剤適用領域が狭いため DZP の粘膜透過が制限され、*i.n.*-spray 投与に比べて痙攣抑制時間が延長したと考えられた。Hardy や Bryant の臨床研究では、薬液の *i.n.*-drop 投与は *i.n.*-spray 投与よりも鼻腔内全体に適用できず、鼻腔外に薬液が漏出すると報告されている^{88,89)}。また、*i.n.*-drop は *i.n.*-spray よりもバイオアベイラビリティが低くなると Peter らは報告した⁸⁶⁾。ラットを用いた本研究では、これらの臨床研究と同様に *i.n.*-spray 投与によるバイオアベイラビリティの向上が明らかになった。さらに、本研究は薬物の体内動態だけではなく、薬理効果においても *i.n.*-spray 投与の有用性を明らかにすることができた。

Jeal らや Yates らの臨床研究では、*i.n.*-spray 投与したトリアムシノロン、フルチカゾンおよびベクロメタゾンの C_{max} および AUC は、用量依存的に増大することを報告した⁹⁰⁻⁹²⁾。これは、粘膜吸収領域に対する製剤適用領域の拡大によるものと考えられるが、その影響について詳細な研究報告はない。そこで本研究では、DZP の *i.n.*-spray および *i.n.*-drop 投与による体内動態および痙攣抑制効果に対する粘膜吸収領域の影響を明らかにすることを目的とした。DZP 含有 ME 製剤 (5 mg/mL: ME5、10 mg/mL:

ME10、20 mg/mL: ME20、50 mg/mL: ME50) を用量固定 (0.5mg/kg) 条件下で濃度の異なる *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの粘膜吸収面積と全身吸収性、脳移行性および痙攣抑制潜時時間との関係をそれぞれ評価した。各種体内動態パラメータは、P1 面積率の増加に伴い直線的に上昇し、高い相関を示した (Fig. 48)。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の向上に関係し、高い P1 面積率が得られる *i.n.-spray* 投与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* 投与では P1 面積率に比例して増大したが、*i.n.-spray* 投与では *i.n.-drop* 投与に比べて各種脳組織中の DZP 濃度は P1 面積率の上昇に伴ってより大きな高濃度側への変化が認められた (Fig. 49)。このことは、*i.n.-spray* 投与後の脳への直接移行に関わる因子として P1 面積率だけではなく、特に P1 面積率の高いときにより強く影響を受ける他の何らかの要因が関係していると考えられた。鼻腔内は、三叉神経支配を受ける呼吸領域と嗅覚神経および三叉神経支配を受ける嗅覚領域から構成されている⁹³⁻⁹⁵⁾。Fig. 44 および 45 より、P1 領域は、*i.n.-drop* 投与において、鼻腔前方の呼吸領域に、*i.n.-spray* 投与では鼻腔後方の嗅覚領域に存在していた。これらのことから、前者では三叉神経を介し、後者では嗅球と三叉神経を介して脳実質へ移行すると推察された。

i.n. 投与された薬物の大部分は、鼻腔の呼吸粘膜から吸収されて全身循環系へ移行する⁹⁶⁾。しかし、一部の薬物は、薬剤を飲み込み、消化管から吸収されることもある⁹⁷⁾。また、鼻腔の嗅覚粘膜から吸収されて、嗅球を介して脳実質へ移行する薬物もある⁹⁶⁾。この直接的な脳実質への移行に関わる NTB 経路は、動物研究で実証されており⁹⁸⁾、それがヒトにも存在することが示唆されている⁹⁹⁾。このことから、*i.n.* 投与された薬物は鼻腔後方の嗅覚粘膜から吸収され、速やかに脳実質に移行する可能性があると考えられている。本研究の結果では、DZP は鼻腔前方に存在する呼吸粘膜から吸収され、三叉神経を介した脳実質への移行が示唆された。このことより、速やかな脳実質への移行を期待できる NTB 経路を利用するためには、薬剤の標的部位を嗅覚領域だけではなく呼吸領域にも拡大することが重要であると考えられた。

以上のことから、*i.n.-spray* 投与は薬液の容量が少なくても鼻粘膜全体に行き渡り、吸収面積を確保することによって高い吸収性を担保し、DZP 注射液を *i.v.* 投与したときと同等の優れた痙攣抑制効果が得られると考えられた。

結論

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、経鼻投与型 DZP 含有 ME 製剤を調製し、製剤学的、薬物動態学的、薬理学的評価から総合的に有用性を検討することとした。さらに、経鼻投与型 ME 製剤の spray 投与による有用性を明らかにすることとした。

第 1 編では、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を *i.v.* および *i.r.* 投与と比較することでその有用性を検討した。第 2 編では、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効果を DZP 注射液と比較することでその有用性を検討した。第 3 編では、ME 製剤の *i.n.*-spray 投与による体内動態および痙攣抑制効果を *i.n.*-drop 投与と比較することでその有用性を検討した。

1. 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

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を評価した。DZP の *i.n.* 投与後の $C_{\max, p}$ は *i.r.* 投与よりも高く、短時間で到達し、血漿中、各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度は有意に上昇した (Figs. 1 and 2)。痙攣抑制潜時時間と痙攣抑制直後の血中 DZP 濃度の関係性を評価した。全身循環を介して脳移行する *i.v.*、*s.c.* および *i.r.* 投与後の血漿中濃度と痙攣抑制潜時時間との関係は良好な相関を示したが、*i.n.* 投与時のデータは、この近似直線には一致せず、低血中濃度で高い痙攣抑制効果が認められた (Fig. 4)。DZP の NTB の移行過程を評価した。*i.n.* 投与後の各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度の $T_{\max, b}$ は 3 分で、血中濃度の $T_{\max, p}$ の 5 分よりも短かった (Fig. 4)。蛍光イメージング画像においても同様の傾向を示した (Fig. 7)。また、DTE および DTP は三叉神経が最も高かった (Table 2)。これらの結果から、DZP の *i.n.* 投与は、*i.r.* 投与よりも体内動態および痙攣抑制効果における有用性が高く、*i.n.* 投与後の DZP は、

NTB 経路を効率的に利用し、特に三叉神経経路の寄与が高いことが明らかになった。

2. 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効果

臨床で用いられる DZP 注射液の *i.v.* 投与容量を鼻腔内へ投与可能な容量に調整するため、DZP の溶解度を 50 mg/mL 以上にし、製剤学的な安定性が高く、かつ鼻粘膜に対して安全性の高い DZP 含有 ME 製剤を開発することとした。その結果、ME を構成する O_{mix} 相内の混合比率 (Tri:Ba = 1:1)、S_{mix} 相内の混合比率 (Lab:Dpg = 1:1) を選択し、各相の混合割合 (S_{mix} 相:O_{mix} 相:W 相 = 40%:30%:30%) として DZP の溶解度が 50 mg/mL 以上の o/w 型 ME 製剤を調製できた (Fig. 36)。最適化された ME 製剤は、過重力負荷条件下の安定性、過酷条件下の短期安定性および室温条件下の長期安定性のいずれの場合でも試験前の製剤学的評価と比較してほとんど変化はなかった。さらに、その製剤を *i.n.* 投与したときの LDH 漏出率は、鼻粘膜傷害を示す 1%STDHF と比較すると 20 分の 1 以下だった (Fig. 33)。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 注射液と比較することでその有用性を評価した。DZP 注射液と同濃度の 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、ME5 の方が DZP 注射液よりも有意に高く、ME 化により全身吸収性および脳移行性が向上することが明らかになった (Figs. 34 and 35)。また、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とも、ME 化による吸収促進効果を裏付けている。以上の結果から、最適化された DZP 含有 ME 製剤は、製剤学的に安定性が高く、鼻粘膜に対して安全性が高いことが明らかになった。さらに、その製剤は、DZP 注射液よりも ME 化により鼻粘膜を介した透過を高めることで、全身循環系および各種脳組織および CSF への移行を促進し、速やかな痙攣抑制効果を誘導していると考えられた。

3. 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 *i.n.-spray* 投与による体内動態および痙攣抑制効果を *i.n.-drop* 投与したときと比較することでその有用性を評価した。ME5 および ME50 の *i.n.-spray* 投与による血漿、各種脳組織および CSF 中 DZP 濃度は、*i.n.-drop* 投与よりも有意に高かった (Figs. 38 and 39)。それに伴い、ME5 の *i.n.-spray* 投与による痙攣抑制潜時時間は 2.2 分となり *i.n.-drop* 投与の 3.7 分よりも有意に短縮した (Table 22)。さらに、その結果は臨床で用いられる DZP 注射液を *i.v.* 投与したときと同等であった (Table 3)。一方、ME50 の *i.n.-spray* 投与による痙攣抑制潜時時間は 4.4 分となり、*i.n.-drop* 投与の 7.9 分よりも有意に短縮した (Table 23)。DZP の *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与による体内動態および痙攣抑制効果に対する粘膜吸収領域の影響を明らかにすることを目的とした。濃度の異なる DZP 含有 ME 製剤を用量固定条件下で *i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与したときの粘膜吸収面積と全身吸収性、脳移行性および痙攣抑制潜時時間との関係をそれぞれ評価した。各種体内動態パラメータは、P1 面積率の増加に伴い直線的に上昇し、高い相関を示した (Fig. 46)。このことは、P1 面積率が全身吸収に関する各種体内動態パラメータの向上に関係し、高い P1 面積率が得られる *i.n.-spray* 投与が優れた全身吸収性を示すことを示唆している (Fig. 46)。一方、各種脳組織中 DZP 濃度は、*i.n.-drop* 投与で P1 面積率に比例して増大したが、*i.n.-spray* 投与で *i.n.-drop* 投与に比べて各種脳組織中の DZP 濃度の高濃度側へシフトし、P1 面積率の上昇に伴ってより大きな高濃度側への変化が認められた (Fig. 47)。このことは、*i.n.-spray* 投与後の脳への直接移行に関わる因子として P1 面積率だけではなく、特に P1 面積率の高いときにより強く影響を受ける他の何らかの要因が関係していると考えられた。

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に行き渡り、吸収面積を確保することによって高い吸収性を担保し、DZP 注射液を *i.n.-drop* 投与したときと同等の優れた痙攣抑制効果が得られると考えられた。また、粘膜吸収面積と血漿、各種脳組織中濃度および痙攣抑制潜時時間との関係は、より効率的な脳移行を可能にするための製剤設計および製剤適用容量に対する知見を与え、DZP 製剤開発や経鼻型デバイス開発において有益な情報となり得ると考えられる。

本研究ではラットを用いて検討したが、ヒト鼻腔の上皮構造はラットと異なり、解剖生理学的分類における呼吸領域はヒトでは 90%であるのに対してラットでは 50%であり、嗅覚領域はヒトでは 10%であるのに対してラットでは 50%である⁹³⁻⁹⁵⁾。呼吸領域には主に三叉神経が伸びており、ラットよりも大きい呼吸領域をもつヒトでは、より三叉神経の関与する可能性があり、機能的領域の割合が全身吸収性および脳移行性に影響する可能性が考えられる。しかし、本研究では、ヒトよりも小さい呼吸領域をもつラットにおいて三叉神経による関与が大きいことが明らかになったため、呼吸領域が大きいヒトの場合では、本研究の同等以上の三叉神経の関与の可能性が考えられ、DZP を *i.n.*-spray 投与したときの SE の早期抑制発現に関連する可能性がある。

近年、中枢神経系への直接的な薬物送達を可能にする *i.n.* 投与製剤の開発が注目されている^{70-76,100)}。本研究では、新たに *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が示され、それが速やかな薬理効果の発現に影響している可能性が考えられる。今後、三叉神経をはじめ NTB 経路を介した脳への分布特性を明らかにすることにより、薬物の作用点を考慮した経鼻送達が可能になるかもしれない。さらに、SE 発作抑制に適応可能な DZP 以外の薬物を用いて NTB を介した脳への分布特性と薬物の物理化学的な性質との関係性を明らかにすることにより、*i.n.* 投与に適した薬物の選択と製剤開発が可能になり、有効性の高い経鼻的治療法の提供につながるものと考えられる。

謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 病院薬剤学講座教授 上田秀雄 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薬学部 薬剤学講座教授 関俊暢 先生に感謝の意を表します。

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薬学部 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、研究テーマの決定から結論に至るまで御指導並びに有益な御助言を賜りました城西大学薬学部 病院薬剤学講座准教授 木村聡一郎 先生に深甚なる謝意を表します。

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薬学部 病院薬剤学講座助教 間祐太郎 先生に感謝の意を表します。

また、本論文の作成、学位論文審査にあたり、御校閲並びに御教示を賜りました城西大学薬学部 生化学講座教授 畑中朋美 先生、城西大学薬学部 臨床薬理学講座教授 木村光利 先生、城西大学薬学部 臨床病理学講座准教授 渡辺知恵 先生に感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、御協力並びに御支援いただきました城西大学薬学部 薬剤学講座 小川夏歩 博士、城西大学薬学部 病院薬剤学講座 遠城聡子 博士、城西大学薬学部 病院薬剤学研究室 鈴木翔子 学士、伊藤摩耶 学士、大島香保 学士、李佳怜 学士、遠藤美波 学士、新井雄也 学士、早川修平 学士、齊藤世華 氏、守重紗英 氏、長澤千春 氏をはじめとするてんかん重積チームおよび Nose-to-Brain チームの関係諸氏に心より感謝いたします。

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。

実験の部

第 1 編 実験方法

1.1 試薬

DZP、安息香酸、エタノール、水酸化ナトリウム、プロピレングリコール、Ba、塩酸は FUJIFILM 和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。HPLC 用のアセトニトリルとメタノールは関東化学株式会社 (東京、日本) から購入した。ペントバルビタールナトリウム (PEN)、PTZ は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。生理食塩水は大塚製薬株式会社 (東京、日本) から購入した。RBB はシグマアルドリッチ株式会社 (ミズーリ州セントルイス、米国) から入手した。その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

1.2 試薬の調製

DZP 溶液は DZP 50 mg、安息香酸 428 mg、水酸化ナトリウム 130.5 mg をそれぞれ秤量し、10 mL メスフラスコに入れた。少量の注射用水をメスフラスコに加え、軽く混和し安息香酸および水酸化ナトリウムを溶解した。続いて、プロピレングリコール 4 mL、エタノール 1 mL、Ba 0.15 mL を加え十分攪拌後、注射用水で全量調製した。溶液の色は透明な淡黄色～黄色を示した。RBB 溶液は DZP 注射液と同様の手順で溶解液を調製し、5 mg/mL になるように RBB を溶解した。

1.3 動物

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、体重: 160 g-200 g) は、三協ラボサービス株式会社 (東京、日本) から購入した。ラットを 3-4 匹/cage で飼育し、自由に食餌および水を摂取できるようにした。動物は実験 24 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動物実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学実験動物実験委員会 (JU19016、JU20019、JU21019、JU22021) の承認を得て実施した。

1.4 薬物動態

動物は PEN 溶液を用いて 50 mg/kg で腹腔内 (*i.p.*) 投与して麻酔した。DZP 投与量は *i.v.* および *i.n.* 投与では 0.5 mg/kg、*i.r.* 投与では 1.0 mg/kg に設定した。*i.v.* 投与は左頸静脈カニューレから DZP 溶液を投与した。*i.n.-spray* 投与は左鼻腔に噴霧器 (KN-34700-2, 夏目製作所, 東京) を挿入し、その先端から 10 mm にセットした。その噴霧器を介して DZP 溶液を *i.n.* 投与した。*i.n.-drop* 投与は左鼻腔に注射チューブを挿入し、その先端を鼻腔から 10 mm にセットした。そのチューブを介して DZP 溶液を *i.n.* 投与した。*i.r.* 投与は肛門に注射チューブを挿入し、その先端を肛門から 20 mm にセットした。そのチューブを介して DZP 溶液を *i.r.* 投与した。血漿中動態を評価するため、ヘパリン処理したシリンジを右頸静脈に挿入し、0.4 mL 採取し、同量の生理食塩液を充填したシリンジに付け替えてフラッシュした。投与 1、3、5、10、15、20、30、45、60、90、120、180 分後に血液を採取し、直ちに遠心分離 (25°C, 8000 rpm, 15 分) して、0.2 mL の血漿サンプルを得た。

上述の検討とは別に前脳、後脳、嗅球、三叉神経および CSF 中薬物濃度を評価するため、DZP 投与 5 分後に大槽カニューレから脳脊髄液 (CSF) を 100 μ L 採取し、血液採取後にリン酸緩衝生理食塩水で心灌流して、前脳、後脳、嗅球および三叉神経を摘出した。また、脳内動態評価するため、DZP を各種投与条件で 1、3、5、10、30、60 分後に大槽カニューレから CSF 100 μ L を収取し、心灌流後に、前脳、後脳、嗅球および三叉神経を摘出した。

これらのサンプルは測定するまで -70°C で冷凍保存した。

1.5 薬理効果

PTZ 誘発性 SE モデルラットは、覚醒下ラットに PTZ 120 mg/kg を *i.p.* 投与してから約 1 分後、強直間代性痙攣が誘発され、これが 5 分間持続した個体とした。PTZ 誘発性 SE モデルラットを作成後、DZP 0.5 mg/kg を *i.v.*、*i.n.-spray* および *i.n.-drop* 投与、DZP 1.0 mg/kg を *i.r.* 投与した後 90 分までラットの行動を観察し、Table 26 に示すラシーンスケール¹⁰¹⁾の重症度分類に基づいて評価した。DZP 投与後に強直間代性痙攣が消失した場合を痙攣抑制と判断し、DZP 投与後から痙攣が消失するまでの時間を痙攣抑制潜時時間とした。また、痙攣抑制発現率は、痙攣抑制効果を示した個体数を DZP 投与した全ての個体数で除して求めた。さらに、痙攣抑制後に再発したラットの割合を痙攣再発率とした。各種投与条件における DZP の痙攣抑制潜時時間と痙攣抑制直後の血漿中濃度の関係を検討するため、PTZ 誘発性 SE モデルラットに対して、DZP 溶液を *i.v.* (1.0 mg/mL、0.5 mg/mL および 0.2 mg/kg)、*i.n.* (2.0 mg/kg、1.0 mg/kg および 0.5 mg/kg)、*i.r.* (4.0 mg/kg、2.0 mg/kg、1.0 mg/mL) および皮下 (*s.c.*, 2.0 mg/kg) 投与後の痙攣抑制潜時時間を計測し、直ちに尾静脈から血液を採取して痙攣抑制直後の血漿中濃度とした。

Table 26 Severe symptom classification of seizures in PTZ induced SE model rats.

Scale	Seizure intensity
1	Sudden behavioral arrest and/or motionless staring
2	Facial jerking with muzzle or muzzle and eye
3	Neck jerks
4	Clonic seizure in a sitting position
5	Convulsions including clonic and/or tonic-clonic seizures while lying on the belly and/or pure tonic seizures
6	Convulsions including clonic and/or tonic-clonic seizures while lying on the side and/or wild jumping

1.6 *ex vivo* 蛍光イメージング

麻酔下ラットに RBB 溶液を用いて 0.5 mg/kg で *i.v.* および *i.n.* 投与した。投与 1、3、5、10、30、60 分後に安楽死させ、直ちに CSF を採取した。その後、頭部を断頭し、嗅球、三叉神経および全脳を摘出した。全脳は鼻腔から咽頭側に向かって分割し、左右両側の脳内部を露出させ、Fig. 7 に示すように各種脳組織および CSF を並べた。蛍光画像は IVIS spectrum によって取得した。撮影条件は Excitation Filter/Emission Filter を 500 nm/580 nm に設定し、Field of View は 6.5 cm × 6.5 cm、Subject height は 1.0 cm とした。

1.7 定量方法

CSF サンプルは遠心分離 (25°C, 8,000 rpm, 15 分) で得られた上清 10 µL を高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) に注入して CSF 濃度とした。血漿サンプルは解凍後、アセトニトリルを血漿に対して 1:1 の比率で添加してタンパク質を除去した。低温で 15 分間保存後に、遠心分離 (4°C, 12,800 rpm, 15 分) で得られた上清 10 µL を HPLC に注入して DZP 濃度を測定した。各種脳組織は解凍後に、秤量し、組織 1 g に対して 3 mL のアセトニトリルを加え、ホモジナイズ (氷冷下、21,000 rpm, 1 分) し、混合組織液とした。その後、遠心分離 (4°C, 12,800 rpm, 15 分) 後、得られた上清 10 µL を HPLC に注入した。使用した HPLC 装置は、UV-VIS 検出器 (2489 UV/可視検出器)、カラムオーブン (アライアンスカラムヒーター)、HPLC 用カラム (Mightysil RP-18、5 µm、4.6 mmid × 250 mm、関東ケミカル株式会社、東京、日本)。HPLC カラムは、リン酸緩衝液、アセトニトリル、メタノール (5:4:1) で 1.0 mL/min の流速で溶出し、UV 検出器を 231 nm の波長に設定し、カラム温度を 40°C に維持した。

1.8 薬物動態パラメータ解析

各種投与条件で投与後の血漿中濃度プロファイルから最高血漿中濃度 ($C_{\max, p}$) および最高血漿中濃度到達時間 ($T_{\max, p}$) を求め、台形法により測定時間までの血漿中薬物濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{0-180}) を求めた。

また、バイオアベイラビリティ (F) は下記の (1) 式より算出した。

$$F = \frac{AUC_{i.n. \text{ or } i.r.}/D_{i.n. \text{ or } i.r.}}{AUC_{i.v.}/D_{i.v.}} \times 100 \quad eq.(1)$$

DZP を投与後の最高各種脳組織中濃度 ($C_{\max, b}$)、最高各種脳組織中薬物濃度到達時間 ($T_{\max, b}$) を各種脳組織中薬物濃度プロファイルにより求めた。また、台形法により 60 分までの各種脳組織中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC_{brain}) を求めた。さらに、各種脳組織および CSF への標的効率 Drug Targeting Efficiency (DTE) を下記の (2) 式より算出した¹⁰²⁾。

$$(2) \quad DTE = \frac{(AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}})_{i.n.}}{(AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}})_{i.v.}}$$

また、鼻腔から各種脳組織への直接的移行の寄与率 Direct Transport Percentage (DTP) を下記の (3) 及び (4) 式より算出した¹⁰²⁾

$$DTP (\%) = \frac{B_{i.n.} - B_x}{B_{i.n.}} \times 100 \quad eq.(3)$$

$$B_x = \frac{B_{i.n.}}{P_{i.v.}} \times P_{i.n.} \quad eq.(4)$$

二群間の比較には Student's t-test および Dunnett's multiple comparisons test、多重比較には Turkey test を用いて解析し、両側 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ を有意とみなした。

第 2 編 実験方法

2.1 試薬

オレイン酸、ジプロピレングリコール、Tween80、Span60、スダン III、メチレンブルーは FUJIFILM 和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。ラウリン酸エチル、Ta は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。Capryol 90™、Capyol® PGMC、Labrafac™ Lipophile WL 1349、Labrafac™ PG、Labrafil® M 1994 CS、Labrafil® M 2125 CS、Labrasol®、Lauroglycol™ 90、Lauroglycol™ FCC、Maisine® CC Peceol™、Plurol® Oleique CC 497、Transcutol® HP は Gattefosse 株式会社より提供された。タウロ 24,25-ジヒドロフシジン酸ナトリウム (Sodium taurodihydrofusidate: STDHF) は California Biotechnology 株式会社より提供された。その他は【1.1】と同様な試薬を用いた。

2.2 DZP 溶液の調製

【1.2】と同様な方法で調製した。

2.3 疑似 3 元状態図の作成

O 相に用いる添加剤を 5% から 90% (5% 間隔) までとしたとき、S_{mix} 相に用いる各種添加剤と精製水 (W 相) の割合を 1% ずつ変えて調製したエマルジョンを攪拌下、25℃ でインキュベートし、24 時間後に濁度計 (CO8000 Biowave Cell Density Meter、フナコシ株式会社、東京) で濁度を測定した。濁度が水と等しいものを ME、その他のものをエマルジョンとして相図を作成した。さらに、ME の乳化型を判別するために、水溶性物質のメチレンブルー溶液と脂溶性物質スダン III をそれぞれシャーレに満たし、ME を滴下したときの拡散性を観察し、o/w 型および w/o 型を判別した。

2.4 製剤学的評価

溶解度測定は各種添加剤および ME に過剰量の DZP を添加し、25°Cでインキュベートした。24 時間後、遠心分離を行い、上澄みを希釈して、DZP 濃度を HPLC で測定した。ME の粒子径、PDI、粒度分布およびゼータ電位はゼータサイザー (Zetasizer 3000 HAS, Malvern, UK)、粘度は回転粘度計 (RE-215 形粘度計、東機産業株式会社、東京)、pH は卓上型 pH メータ (LAQUA-PH-SE、株式会社堀場アドバンスドテクノ、京都) を用いて測定した。

2.5 安定性評価

過酷条件下における短期安定性評価において、強力遠心試験ではサンプルを室温条件下で遠心分離 (25°C, 3000 rpm, 30 分) することにより、過度な重力負荷を加えた¹⁰³⁾。加熱-冷却サイクル試験ではサンプルを冷蔵庫条件 (-4°C) 下で 2 日間、次に恒温器 (45°C) 条件下で 2 日間の保存を 1 サイクルとし、加熱と冷却を 6 サイクル繰り返した¹⁰⁴⁾。凍結-融解サイクル試験ではサンプルを冷凍庫 (-70°C) 条件下に 2 日間、次に室温で 2 日間の保存を 1 サイクルとし、凍結と融解を 3 サイクル繰り返した¹⁰⁵⁾。サンプルはそれぞれの試験において濁度、ゼータ電位、粒子径、PDI および粒度分布を測定した。また、試験前に DZP 含有 ME 溶液 50 mg/mL を調製し、HPLC 測定後の DZP 含有量を 100%としたときのそれぞれ試験後の DZP 含有量の割合を薬物残存率として算出した。

室温条件下における長期安定性評価において、サンプルを室温条件下で 3 か月、6 か月、12 か月保存し、それぞれ濁度、DZP 残存率、ゼータ電位、粒子径、PDI および粒度分布を測定した。

2.6 動物

【1.3】と同様な動物を用いた。

2.7 鼻粘膜傷害性評価

鼻粘膜からの LDH の漏出を傷害性の指標とした。麻酔下のラットの気管を切開しチューブを挿入した。また、気管から咽頭部に向けてカニューレ処置を施し、さらに鼻腔に回収用のチューブをセットした。DZP 溶液の *i.n.* 投与 (DZP 0.5 mg/kg) 5 分後に、咽頭部側から生理食塩液を 100 μ L 投与し、鼻腔の回収用チューブから生理食塩液を全量回収した。回収液中の LDH 活性を Cytotoxicity LDH Assay kit-WST を用いて測定した。粘膜傷害を伴うことで透過促進効果が報告されている STDHF1%⁷⁸⁾ を投与したときの粘膜傷害率を 100%として、*i.n.*-spray 投与および *i.n.*-drop 投与による DZP 溶液および生理食塩液投与後の粘膜傷害率 (%) を算出した。

2.8 サンプル処理および定量方法

【1.7】と同様な方法で実験した。

2.9 解析

データを平均値 \pm 標準偏差 (standard deviation, S.D.) で示した。

第3編 実験方法

3.1 試薬

メチレンブルーを FUJIFILM 和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。

その他は【1.1】と同様な試薬を用いた。

3.2 試薬の調製

DZP 含有 ME 製剤は、Tri 15.0% (v/v)、Ba 15.0% (v/v)、Lab 20.0% (v/v)、Dpg 20.0% (v/v)、H₂O 30.0%(v/v) を混合した溶媒に、DZP 濃度が 5 mg/mL (ME5) および 50 mg/mL (ME50) になるように溶解し調製した。【3.2】と同様な調製方法で、ME5 および ME50 に加えて、10 mg/mL (ME10) および 20 mg/mL (ME20) の DZP 溶液を調製した。また、鼻粘膜への染色液として【3.2】と同様な溶媒に、メチレンブルーが 5 mg/mL (ME5)、10 mg/mL (ME10) 、20 mg/mL (ME20) および 50 mg/mL (ME50) になるように溶解し、メチレンブルー溶液を調製した。

3.3 動物実験

【1.3】と同様な動物を用いた。

3.4 薬物動態

【1.4】と同様な方法で実験した。

3.5 薬理効果

【1.5】と同様な方法で実験した。

3.6 定量方法

【1.7】と同様な方法で処理および定量した。

3.7 薬物動態パラメータ解析

【1.8】と同様な方法で解析した。

3.8 メチレンブルー溶液適用後の鼻粘膜画像解析

5 mg/mL のメチレンブルー染色液を 0.5 mg/kg で *i.n.*-spray または *i.n.*-drop 投与直後に投与側の鼻腔を摘出した。Fig. 43 に示すように、鼻腔をかたどった三角形の紙を鼻腔に 10 秒間転写させ、これを鼻粘膜着色領域として撮影した。画像解析ソフトウェア Image-Pro® (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) で着色領域および濃淡画像の解析を行い、着色部分の面積率を鼻腔内面積に対する比率として算出した。撮影日および撮影時間、場所は同一であり、環境による明るさの影響は一定とした。

引用文献

- 1) Gretchen MB, Rodney B, Jan C, Brian A, Thomas PB, Tracy G, Suzette ML, James JR, Lori S, Michael RS, David MT, Paul MV. Guidelines for the Evaluation and Management of Status Epilepticus. *Neurocrit Care.*, **17**, 3-23 (2012).
- 2) Eugen T, Hannah C, Dale H, Andrea OR, Ingrid ES, Shlomo S, Simon S, Daniel HL. A definition and classification of status epilepticus-Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia.*, **56**, 1515-1523 (2015).
- 3) Daniel HL, Thomas B, Robert LM. It's Time to Revise the Definition of Status Epilepticus. *Epilepsia.*, **40**, 120-122 (1999).
- 4) Jan C, Joshua NG. Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. *Neurocrit Care.*, **27**, 152-158 (2017).
- 5) Stéphane L, Bruno M, Nicolas B, Jose A, Pierre F, Philippe M, François H. Outcomes in 140 critically ill patients with status epilepticus, *Intensive Care Med.*, **34**, 476-480 (2008).
- 6) Legriel S, Azoulay E, Resche RM, Lemiale VM, Mourvillier B, Kouatchet AM, Troché G, Wolf M, Galliot R, Dessertaine GM, Combaux DM, Jacobs FM, Beuret P, Megarbane B, Carli P, Lambert YM, Bruneel F, Bedos JP. *Crit. Care Med.*, **38**, 2295-2303 (2010).
- 7) Frans BS, Willy OR, Harry M. Generalized Convulsive Status Epilepticus: Causes, Therapy, and Outcome in 346 Patients. *Epilepsia.*, **35**, 1104-1112 (1994).
- 8) Claassen J, Hirsch LJ, Emerson RG, Bates JE, Thompson TB, Mayer SA. Continuous EEG monitoring and midazolam infusion for refractory nonconvulsive status epilepticus. *Neurology.*, **57**, (2001).
- 9) Rossetti AO, Hurwitz S, Logroscino G, Bromfield EB. Prognosis of status epilepticus: role of aetiology, age, and consciousness impairment at presentation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **77**, 611-615 (2006).

- 10) 日本神経学会 (2018), 「てんかん診療ガイドライン 2018」
https://www.neurology-jp.org/guidelinem/epgl/tenkan_2018_08.pdf
- 11) Eriksson K, Metsäranta P, Huhtala H, Auvinen A, Kuusela AL, Koivikko M. Treatment delay and the risk of prolonged status epilepticus. *Neurology.*, **65**, (2005).
- 12) Elisabeth R, Jean MT, Gérard P. Pharmacokinetic Optimisation of Benzodiazepine Therapy for Acute Seizures. *Clin Pharmacokinet.*, **36**, 409-424 (1999).
- 13) Bappaditya C, Bapi G, Keithanchali M, Pinaki S, Uttam KM, Hira C. Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing challenges. *Int. J. Pharm.*, **565**, 258-268 (2019).
- 14) Mukta A, Swarnlata S, Shailendra S, Sophia GA, Mahavir BC, Sunday AS, Amit A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release.*, **281**, 139-177 (2018).
- 15) Mitchel JRR, Elizabeth CM. Emerging Insights for Translational Pharmacokinetic and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies: Towards Prediction of Nose-to-Brain Transport in Humans. *AAPS J.*, **17**, 493-505 (2015).
- 16) 鈴木豊史, 金澤貴憲, 鈴木直人. 鼻から脳への薬物送達における輸送機構とナノシステムの役割, *オレオサイエンス*, **20**, 61-69 (2020).
- 17) Fukuda M, Kanazawa T, Iioka S, Oguma T, Iwasa I, Masuok S, *et al.* Quantitative analysis of inulin distribution in the brain focused on nose-to-brain route via olfactory epithelium by reverse esophageal cannulation. *J Control Release.*, **332**, 493-501 (2021).
- 18) Ozgur E, Ayhan S, Cansel KO, Ali O, Berk AG, Mehmet O *et al.* Nose to brain delivery of eletriptan hydrobromide nanoparticles: Preparation, in vitro/in vivo evaluation and effect on trigeminal activation. *J Drug Deliv Sci Technol.*, **59**, (2020).
- 19) Inoue D, Furubayashi T, Tanaka A, Sakane T, Sugano K. Effect of Cerebrospinal Fluid Circulation on Nose-to-Brain Direct Delivery and Distribution of Caffeine in Rats. *Mol. Pharm.*, **17**, 4067-4076 (2020).

- 20) Megan C, Suprat SW, Jeremy H. Safety and efficacy of intranasally administered medications in the emergency department and prehospital settings. *Am J Health Syst Pharm.*, **72**, 1544-1554 (2015).
- 21) Dale O. Intranasal administration of opioids/fentanyl-Physiological and pharmacological aspects. *Eur. J. Pain Suppl.*, **4**, 187-190 (2010).
- 22) Cormick ASMM, Thomas VL, Berry D, Thomas PW. Plasma concentrations and sedation scores after nebulized and intranasal midazolam in healthy volunteers. *Br J Anaesth.*, **100**, 631-636 (2008).
- 23) Teleflex. LMA MAD Nasal: needle-free intranasal drug delivery.
https://www.teleflex.com/usa/en/product-areas/anesthesia/atomization/mad-nasal-device/AN_ATM_Anesthesia-MAD-Nasal-User-Guide_MC_MC-001925_Rev1.pdf
- 24) Jack HS, Walter S, Leon MP. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. *J. Phys. Chem.*, **63**, 1677-1680 (1959).
- 25) Li L, Nandi I, Kim KH. Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. *Int. J. Pharm.*, **26**, 77-85 (2002).
- 26) Kaur P, Kim K. Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. *Int. J. Pharm.*, **19**, 27-35 (2008).
- 27) Sheetal P, Tapan S, Viral J, Sachin N, Ambikanandan M. Microemulsion based intranasal delivery system for treatment of insomnia. *Drug Deliv.*, **16**, 128-34 (2009).
- 28) Srividya R, Krishnaveni J. Brain targeting of chitosan-based diazepam mucoadhesive microemulsions via nasal route: formulation optimization, characterization, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.*, **45**, 147-158 (2019).
- 29) Sagar SB, Vikas D, Nitin M, Nithya JG, Urmila MT, Padma VD. Nose-to-Brain Delivery of Diazepam from an Intranasal Aqua-Triggered In-Situ (ATIS) Gelling Microemulsion:

- Monitoring Brain Uptake by Microdialysis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, **45**, 785-799 (2020).
- 30) Becton, Dickinson and Company. BD Accuspray nasal spray system.
<http://valeriy-kolesnik.narod.ru/pdf/Accuspray.pdf>
- 31) Go Medical. Nasal Spray PCA.
<http://www.gomedical.com.au/products/patient-controlled-anaesthesias-pca/nasal-spray>
- 32) Kurve Technology Inc. ViaNase.
www.kurve.com/pdf/ViaNaseDataSheet.pdf
- 33) Paramjeet K, Kwonho K. Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. *Int. J. Pharm.*, **364**, 27-35 (2008).
- 34) Jian W, Shigeko S, Yoshiharu D, Dianzhou B, Yasuhiko T, Kazuhiro M. Aminated gelatin as a nasal absorption enhancer for peptide drugs: evaluation of absorption enhancing effect and nasal mucosa perturbation in rats. *JPP*, **54**, 181-188 (2002).
- 35) Shery RH, Syndi S, John P. Benzodiazepine use in seizure emergencies: A systematic review. *E&B.*, **63**, 109-117 (2016).
- 36) Howard KM, Shannon NM, Brian H, Brendan GC, Tara H, Jason S. Emergency Medical Services Response Times in Rural, Suburban, and Urban Areas. *JAMA Surg.*, **152**, 983-984 (2017).
- 37) 総務省 (2021) 「令和 3 年版 救急・救助の現況」
https://www.fdma.go.jp/pressrelease/houdou/items/211224_kyuuki_1.pdf
- 38) Shavonne LM, Hannah CG, Renée AS, Sonia B, Taeun C, Catherine C, Maria RC, Monica EL, Charles EM, Janet SS, Cameron T, Courtney JW, Rui X, Nicholas SA. Characteristics of Neonates with Cardiopulmonary Disease Who Experience Seizures: A Multicenter Study. *J. Pediatr.*, **242**, 67-73 (2022).
- 39) Markus L, Eugen T, Giada G, Georg Z, Cristina F, Alexandra R, Gudrun K, Caroline N,

- Rudolf K, Julia H, Giorgi K, Claudia G, Judith D, Helmut FN, Georg P. Epidemiology of status epilepticus in adults: A population-based study on incidence, causes, and outcomes. *Epilepsia.*, **60**, 53-62 (2019).
- 40) Devender B, Achille ET, Claude M, Benoît M, Didier M, Pierre J, Pierre MP. First-ever population-based study on status epilepticus in French Island of La Reunion (France)- Incidence and fatality. *seizure.*, **23**, 769-773 (2014).
- 41) Cheung TO, Shew MS, Ching FT, Yi SW, Solomon CCC. Age-Dependent Sex Difference of the Incidence and Mortality of Status Epilepticus: A Twelve Year Nationwide Population-Based Cohort Study in Taiwan. *PLoS One.*, **10**, (2015).
- 42) Vittorio G, Elisa F, Vincenza CM, Franco G, Raffaella F, Ilaria C, Enrico G. Incidence of status epilepticus in southern Europe: a population study in the health district of Ferrara, Italy. *Eur Neurol.*, **59**, 120-126 (2008).
- 43) Bhavpreet SD, Krystal H, Fred R. The Epidemiology of Status Epilepticus in the United States. *Neurocrit Care.*, **20**, 476-483 (2014).
- 44) Alvin IC, Max LB, Timothy JM, Martin LY. Real-time Needle Steering in Response to Rolling Vein Deformation by a 9-DOF Image-Guided Autonomous Venipuncture Robot. *HHS Public Access.*, 2633-2638 (2015).
- 45) Kuensting LL, Deboer S, Holleran R, Shultz BL, Steinmann RA, Venella J. *J Emerg Nurs.*, **35**, 419-424 (2009).
- 46) Dieckman RA. Rectal diazepam for prehospital pediatric status epilepticus. *Ann Emerg Med.*, **23**, 216-224 (1994).
- 47) Suresh KA, Robert LK, Richard CB, Vijay DI, James CC. Epilepsia. A pilot study assessing the bioavailability and pharmacokinetics of diazepam after intranasal and intravenous administration in healthy volunteers. *Epilepsia.*, **33**, 353-358 (1992).
- 48) Bassel AK, James W, Joanne R, Kevin DW, Glenn CP, Rajesh BS, Nancy AS, Kenneth S, Veeraindar G, Carl LR. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of a

- diazepam auto-injector administered by caregivers to patients with epilepsy who require intermittent intervention for acute repetitive seizures. *Epilepsia.*, **54**, 1968-1976 (2013).
- 49) Atum WO. Adult patient perceptions of emergency rectal medications for refractory seizures. *E&B.*, **3**, 535-538 (2002).
- 50) Suresh KA, James CC. Development of benzodiazepines for out-of-hospital management of seizure emergencies. *AAN*, **5**, 80-85 (2015)
- 51) Maria ECP, Devasish B, Adrià MD, Mayte GA, Josep ER. Direct injection micellar liquid chromatographic determination of benzodiazepines in serum. *J. Chromatogr. B.*, **780**, 241-249 (2002)
- 52) Rey E, Tréluyer JM, Pons G. Pharmacokinetic optimization of benzodiazepine therapy for acute seizures. Focus on delivery routes. *Clin Pharmacokinet*, **36**, 409-424 (1999).
- 53) Mark A. Benzodiazepines for prolonged seizures. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.*, **95**, 183-189 (2010).
- 54) Greenblatt DJ, Divoll M. Diazepam versus lorazepam: relationship of drug distribution to duration of clinical action. *Adv. Neurol.*, **34**, 487-491 (1983)
- 55) Stuart TC, Joanne W, Susan TF, Kevin DR, Lisbeth I, Stanley SD. Evaluation of Direct Transport Pathways of Glycine Receptor Antagonists and an Angiotensin Antagonist from the Nasal Cavity to the Central Nervous System in the Rat Model. *Pharm. Res.*, **25**, 1531–1543 (2008).
- 56) Gregory DC, Daniel T, James WW, Edward RH, Michael RS, Kore L, Jay D, Charles D, Adrian LR, Enrique C. Lack of observed tolerance to diazepam nasal spray (Valtoco[®]) after long-term rescue therapy in patients with epilepsy: Interim results from a phase 3, open-label, repeat-dose safety study. *E&B.*, **120**, 1-5 (2021).
- 57) Adrian LR, Enrique C, Edward TM. Improvement of Intranasal Drug Delivery with Intravail[®] Alkylsaccharide Excipient as a Mucosal Absorption Enhancer Aiding in the Treatment of Conditions of the Central Nervous System. *Drugs R D.*, **21**, 361–369 (2021).

- 58) Sarina T, Luana PK, Richard EL, Barry K, Adrian LR, Enrique C. Evaluation of Pharmacokinetics and Dose Proportionality of Diazepam After Intranasal Administration of NRL-1 to Healthy Volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **9**, 719-727 (2020).
- 59) Herbert RH, Michael RS, Adrian LR, Gary B, Enrique JC. Assessment of pharmacokinetics and tolerability of intranasal diazepam relative to rectal gel in healthy adults. *Epilepsy Res.*, **108**, 1204-1211 (2014).
- 60) Michael RS, Kevin FH, Gregory K, Hussam SE, Herbert RH, Adrian LR, Gary B, David S, Enrique JC. Dosing feasibility and tolerability of intranasal diazepam in adults with epilepsy. *Epilepsia*. **55**, 1544-1550 (2014).
- 61) Suresh KA, Robert LK, Richard CB, Vijay DI, James CC. A pilot study assessing the bioavailability and pharmacokinetics of diazepam after intranasal and intravenous administration in healthy volunteers. *Epilepsy Res.*, **105**, 362-367 (2013).
- 62) 武田薬品工業株式会社, インタビューフォーム, セルシン[®]注射液.
- 63) Akita T, Oda Y, Kimura R, Nagai M, Tezuka A, Shimamura M, Washizu K, Oka JI, Yamashita C., Involvement of trigeminal axons in nose-to-brain delivery of glucagon-like peptide-2 derivative. *J Control Release.*, **351**, 573-580 (2022).
- 64) Marek AM, James AF. Anterior thalamic mediation of generalized pentylenetetrazol seizures. *Brain Res.*, **399**, 211-223 (1986).
- 65) Daniel ST, Maria I, Daniel BF, John B, Joshua K, Bruce L, Peter SD. Optimal Volume of Administration of Intranasal Midazolam in Children: A Randomized Clinical Trial. *Ann Emerg Med.*, **69**, 600-609 (2017).
- 66) Shivam U, Ankit P, Pratik J, Upadhyay UM, Chotai NP. Intranasal drug delivery system- A glimpse to become maestro. *JAPS*. **1**, 34-44 (2011).
- 67) Ogiso T, Iwaki M, Yamamoto M. Hemolysis induced by Benzyl Alcohol and Effect of the Alcohol on Erythrocyte Membrane. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2404-2415 (1983).
- 68) Isomaa B, Hägerstr H, Paatero G. Shape transformations induced by amphiphiles in

- erythrocytes. *BBA.*, **889**, 93-103 (1987).
- 69) AnanY, Abraham A, Nissim G. Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **209**, 71-81 (2002).
- 70) Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, **379** 146-157 (2009).
- 71) Liu Z, Jiang M, Kang T, Miao D, Gu G, Song Q, Yao L, Hu Q, Tu Y, Pang Z, Chen H, Jiang X, Gao X, Chen J. Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of NAP peptide following intranasal administration. *Biomaterials.*, **34**, 3870-3881 (2013).
- 72) Mistry A, Glud SZ, Kjems J, Rande J, Howard KA, Stolnik S, Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J. Drug Target*, **17**, 543-552 (2009).
- 73) Bhavna, Sharma V, Ali V, Baboota S, Ali J. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for nose to brain delivery of a cholinesterase inhibitor. *Indian J Pharm Sci.*, **69**, 712-713 (2007).
- 74) Bshara H, Osman R, Mansour S, Shamy AEHAE. Chitosan and cyclodextrin in intranasal microemulsion for improved brain bupirone hydrochloride pharmacokinetics in rats. *Carbohydr. Polym.*, **99**, 297-305 (2014).
- 75) Kozlovskaya L, Kaoud MA, Stepensky D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *J Control Rel.*, **189**, 133-140 (2014).
- 76) Lalani J, Baradia D, Lalani R, Misra A. Brain targeted intranasal delivery of tramadol: comparative study of microemulsion and nanoemulsion. *Pharm. Dev. Technol.*, **20**, 992-1001 (2015).
- 77) Fiume MZ, Final report on the safety assessment of triacetin. *Int. J. Toxicol.*, **22**, 1-10 (2003).

- 78) Catin MM, Cherif AA, Pougna AL, Perrin C. Hemolysis by surfactants-A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **228**, 1-16 (2016).
- 79) Shalel S, Streichman S, Marmur A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. *J Colloid Interface Sci.* **252**, 66-76 (2002).
- 80) Masjedi M, Montahaei T. An illustrated review on nonionic surfactant vesicles (niosomes) as an approach in modern drug delivery: Fabrication, characterization, pharmaceutical, and cosmetic applications. *J Drug Deliv Sci Technol.*, **61**, (2021).
- 81) Degenhard M, Gerallt W, Matthias B. Intranasal Drug Administration - An Attractive Delivery Route for Some Drugs. *drug discov. dev.*, 299-300 (2015).
- 82) Emmeline M, Verhoef JC, Stefan GR, Frans WHMM. Effects of Absorption Enhancers on Rat Nasal Epithelium in Vivo: Release of Marker Compounds in the Nasal Cavity. *Pharm. Res.*, **12**, 1151-1157 (1995).
- 83) Bommer R. Latest advances in nasal drug-delivery technology. *Med. Device Technol.*, **10**, 22-28 (1999).
- 84) Paul M, Fenna AE, Barbara M, Wytske JF. Influence of anatomy and head position on intranasal drug deposition. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, **263**, 827-832 (2006).
- 85) Hardy JG, Lee SW, Wilson CG. Intranasal drug delivery by spray and drops. *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 294-297 (1985).
- 86) Peter TDY, Richard CB. Systemic bioavailability of fluticasone propionate administered as nasal drops and aqueous nasal spray formulations, *Br J Clin Pharmacol.*, **51**, 103-105 (2001).
- 87) Henry RJ, Ruano N, Casto D, Wolf RH. A pharmacokinetic study of midazolam in dogs: nasal drop vs. atomizer administration. *Pediatr Dent.*, **20**, 321-326 (1998).
- 88) Hardy JG, Lee SW, Wilson CG. Intranasal drug delivery by spray and drops. *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 294-297 (1985).
- 89) Bryant ML, Brown P, Gurevich N, McDougall IR. Comparison of the clearance of

- radiolabelled nose drops and nasal spray as mucosally delivered vaccine. *Europa PMC*. **20**, 171-174 (1999).
- 90) Jeal W, Diana F. Triamcinolone Acetonide. *Drugs*. **53**, 257-280 (1997).
- 91) Yates PTD, Baker RC. Systemic bioavailability of fluticasone propionate administered as nasal drops and aqueous nasal spray formulations. *Br J Clin Pharmacol.*, **51**, 103-105 (2008).
- 92) Yates PTD, Price AC, Sisson JR, Pereira A, Dallow N. Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man. *Br J Clin Pharmacol.*, **51**, 400-409 (2002).
- 93) Jeffrey JL, Robert GT. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 614-628 (2012).
- 94) Landis MS, Boyden T, Pegg, S. Nasal-to-CNS drug delivery: Where are we now and where are we heading? An industrial perspective. *Ther. Deliv.*, **3**, 195-208 (2012).
- 95) Gizurarson S. Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Curr. Drug Deliv.*, **9**, 566-582 (2012).
- 96) Westin UE, Boström E, Gråsjö J, Udenaes MH, Björk E. Direct Nose-to-Brain Transfer of Morphine After Nasal Administration to Rats. *Pharm. Res.*, **23**, 565-572 (2006).
- 97) Dale O, Hjortkjaer R, Kharasch ED. Nasal administration of opioids for pain management in adults. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **46**, 759-770 (2002).
- 98) Mathison S, Nagilla R, Kompella UB. Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: fact or fiction?. *J Drug Target*. **5**, 415-441 (1995).
- 99) Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality?. *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 3-17 (2004).
- 100) 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**, 1-9 (2021).
- 101) Annika L. Paolo FF, Gilles VL. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.*, **98**, 579-586 (2009).
- 102) Luba K, Mohammed AK, David S, Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route, *J Control Release*, **189**, 133-140 (2014).
- 103) Ambade KW, Jadhav SL, Gambhire MN, Kurmi SD, Kadam VJ, Jadhav KR. Formulation and evaluation of flurbiprofen microemulsion. *Curr Drug Deliv*, **5**, 32-41 (2008).
- 104) Adnan A, Mohammad R, Farhan JA, Zeenat I, Roop KK, Aqil M, Sushama T. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, **10**, 69-76 (2009).
- 105) Begoña B, Marco AM, Gloria F, Ma PB, Paloma F. Amphotericin B in Oil-Water Lecithin-Based Microemulsions: Formulation and Toxicity Evaluation. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1178-1185 (2002).

