

# 学位論文要旨

## テリパラチドの経鼻吸収に対するポリカチオンの促進作用と ラットにおける骨形成作用に関する研究

大森 慈大

骨粗鬆症治療薬のテリパラチド酢酸塩 (hPTH) は、一定の血中濃度を保つように持続投与した場合に骨吸収促進作用を示すが、その皮下注射製剤のように一過的に血中濃度が上昇し、それを間欠的に投与した場合に骨形成促進作用を示す。しかし、皮下注射製剤における痛みや投与操作の煩雑さ等は、アドヒアランスの低下を招き、治療効果に影響を及ぼす。本研究では、皮下注射製剤の問題を回避できる経鼻製剤に着目し、骨形成促進作用が得られるように吸収制御した hPTH 経鼻製剤を開発するため、ポリカチオン性吸収促進剤及び粘膜付着性物質の併用による hPTH の鼻粘膜透過性及び滞留性の改善効果、並びにそれらの併用経鼻投与における hPTH の薬理効果に関して以下の 3 編に分けて検討した。

### 第 1 編 hPTH の経鼻吸収に対するポリカチオン性吸収促進剤の効果

ポリカチオン性吸収促進剤である poly-L-arginine (PLA) は、分子量及び適用濃度依存的に水溶性高分子薬物を促進することが明らかとなっているが、同促進剤である poly-L-ornithine (PLO) については報告されていなかった。PLO の経鼻吸収促進効果を明らかにするため、分子量が hPTH (4.4 kDa) とほぼ同等であることに加え、薬物自体の代謝及び分解がほとんど無い fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, ca. 4 kDa) を用いて、鼻腔内を閉鎖した麻酔下ラットに種々分子量 (約 5, 20, 80 kDa) 及び濃度 (0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0%) の PLO を併用経鼻投与した後の FD-4 の動態学的パラメータを調査した。PLO は分子量及び適用濃度依存的に FD-4 の経鼻吸収を促進したが、適用濃度が 0.5% 付近のとき、PLO の吸収促進効果が最大に達した。また、PLO 適用濃度依存的にその吸収促進効果が延長したことから、PLO の適用濃度は促進効果の持続性に影響すると推察された。従って、PLO による水溶性高分子薬物の経鼻吸収促進効果は、PLO の分子量及び適用濃度の変更により調節可能であることが示された。

上記の調査及び Natsume らの報告から、それぞれ吸収促進効果が高かった分子量約 80 kDa の PLO (PLO (80)) 及び分子量約 50 kDa の PLA (PLA (50)) を用いて、hPTH の経鼻吸収性に対するこれら促進剤の効果を調査した。また、hPTH 皮下投与後の結果と比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を検討した。hPTH 単独経鼻投与は、皮下投与に比べ最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) 及びバイオアベイラビリティ ( $F$ ) が半分以下と低いうえ、一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇を示さなかったことから、骨同化作用を得るには不適切であると考えられた。PLA (50) 及び PLO (80) は、hPTH の経鼻吸収を適用濃度依存的に促進し、一部の条件を除いて皮下投与以上の  $C_{max}$  及び  $F$  を示したことに加え、皮下投与に類似した一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇を示した。平均滞留時間 ( $MRT$ ) 値において、上記の吸収促進剤の併用経鼻投与は、皮下投与に比べて高く、経鼻投与後の血漿中 hPTH 濃度推移が皮下投与に比べて持続的であることが示された。投与間隔の調節により hPTH が骨同化作用を示すことが報告されていることから、上記の促進剤を併用した hPTH の経鼻投与で骨同化作用を得るためには、投与間隔を調節する必要性が示唆された。

### 第 2 編 hPTH の経鼻吸収に対するポリカチオン性吸収促進剤及び polyethylene glycol (PEG) の併用効

## 果

PEG の鼻粘膜滞留性改善効果を検討するため、溶液の粘度及びラット腸管粘膜における粘膜接触面積に及ぼす PEG 添加の影響を評価した。PEG は、濃度依存的 (0, 1 及び 5%) に溶液の粘度を増大させたが、いずれの濃度でも粘膜接触面積にほとんど影響しなかった。次に、PLO 併用下における FD-4 の経鼻吸収性に対する PEG 添加の影響を評価した。PEG は、濃度依存的に FD-4 の鼻粘膜滞留性を改善したことから、粘度の増大により水溶性高分子薬物の鼻粘膜滞留性を改善したと推察された。

FD-4 の鼻粘膜滞留性改善効果が最も高かった 5% PEG を用いて、同様な検討を hPTH でも行った。5% PEG の添加は、0.5% PLO 併用下では hPTH の鼻粘膜滞留性を改善したが、1.0% PLO 併用下ではその効果が認められなかった。これは、5% PEG の添加による鼻粘膜滞留性改善効果に比べて、高濃度の PLO の併用による hPTH の鼻粘膜透過性改善効果が上回ったものと推察された。従って、ポリカチオン性吸収促進剤及び粘膜附着性物質を併用した経鼻投与における hPTH の吸収性改善には、併用するこれら物質の濃度などを最適化する必要性が示された。

### 第 3 編 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨代謝に対する hPTH 経鼻投与の有効性の評価

作製した卵巣摘出骨粗鬆症モデルラット (OVX ラット) を用いて、種々添加物 (PLA (50)、PLO (80) 及び PEG) を併用して hPTH を 3 ヶ月間経鼻投与した後の骨に対する薬理効果を、脛骨及び腰椎の骨密度、並びに血漿中骨代謝マーカー濃度 (血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度) を測定することで評価した。また、hPTH 皮下投与後の結果と比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性やその使用におけるプロトコルの構築について考察した。上述した MRT の結果から、週 1 回投与を、hPTH の骨同化作用が認められる週 3 回投与に加えて行った。hPTH の週 1 回皮下投与において、上記の両部位で骨密度改善作用を示さなかったが、その週 3 回皮下投与では両部位で強力な骨密度改善作用を示した。上述の物質の併用経鼻投与を含め hPTH の経鼻投与のほとんどは、投与頻度に関係なく、いずれの部位でも週 3 回皮下投与に匹敵する骨密度改善作用を示さなかった。PLO (80) を併用した hPTH の週 1 回経鼻投与は、その週 3 回皮下投与とほぼ同程度に脛骨の皮質骨密度を改善したが、週 3 回皮下投与に匹敵する程度までその他の部位の骨密度 (脛骨の海綿骨、腰椎の皮質及び海綿骨) を改善しなかった。骨形成マーカーである血漿中 osteocalcin 濃度において、骨密度改善作用を示した hPTH の週 3 回皮下投与群と PLO (80) を併用した hPTH の週 1 回経鼻投与で顕著に高い値を示した。骨吸収マーカーである血漿中 CTX-I 濃度において、本試験群の中で hPTH の週 3 回皮下投与群が顕著に低い値を示した。これらの結果から、hPTH の週 3 回皮下投与は、骨形成促進及び骨吸収抑制作用を發揮したため、結果的に強力な骨密度改善作用を示したと推察された。また、hPTH の抗骨粗鬆症効果が骨形成促進作用だけでなく、骨吸収抑制作用も関与している可能性が示唆され、hPTH の血中動態特性がそれら作用を決定づけたと考えられた。更に、投与間隔の延長により hPTH 経鼻投与で骨密度改善作用が得られたと考えられ、皮下及び経鼻投与における hPTH の血中動態特性の差が骨の部位 (脛骨及び腰椎) に対する作用を決定づけたと推察された。今後、以上の結果を基に、皮質及び海綿骨のいずれでも骨同化作用が得られる hPTH の経鼻投与製剤を開発するために更なる検討が必要である。

以上より、ポリカチオン性吸収促進や PEG を併用した hPTH の経鼻投与は、投与間隔を調節することで、皮下注射に代わる送達法として十分な吸収性及び骨同化作用が得られる可能性が示された。

## Thesis abstract

### Enhancement effect of polycationic compounds on nasal absorption of teriparatide and its osteogenic action in rats

Shigehiro Omori

Teriparatide acetate (hPTH), an osteoporotic agent, exerts bone resorption-promoting action when injected continuously to keep the constant plasma concentration, but exerts osteogenic action when injected intermittently to elevate the plasma concentration transiently in the case of subcutaneous (*s.c.*) injection. Pain and complicated operation in *s.c.* injection decrease medication adherence of patients and affect the therapeutic effect. In this study, we therefore aimed to develop the absorption- (rate and quantity) controlled nasal hPTH formulation, which can avoid the above problems, to obtain the osteogenic action. The effects of a polycationic and a mucoadhesive material on the nasal permeability and the retentivity of hPTH in the rat nasal cavity were investigated. Moreover, the pharmacological effect of hPTH was evaluated using a prototype of the nasal hPTH formulation. The findings of these studies were summarized as follows:

#### 1. Effect of a polycationic compound on the nasal hPTH absorption in rats

Despite the nasal absorption enhancement of poly-L-arginine (PLA), a polycationic compound, was dependent on the molecular weight (MW) and concentration, the relationship between the effect of poly-L-ornithine (PLO), a polycationic compound, on the absorption and MWs and concentrations of PLO remains unclear. We therefore examined the effect of the different MWs and concentrations of PLO (MW: 5, 20 and 80 kDa, concentration: 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0%) on the *in vivo* nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, *ca.* 4 kDa) used as a model drug, which has similar MW to hPTH (4.4 kDa) and are metabolized and decomposed little *in vivo*. PLO enhanced the nasal absorption of FD-4 in MW- and concentration-dependent manners, but its enhancement peaked near 0.5%. The enhancement of PLO was also prolonged with increasing concentration, suggesting that the persistence of the effect may be attributed to the concentration. These findings showed that the nasal absorption-enhancing effect of PLO can be controlled by regulating its MW and concentration.

In turn, we examined the enhancing effects of PLO (80 kDa; PLO (80)) and PLA (50 kDa; PLA (50)), which showed the high effects in the above and the previous reports from Natsume *et.al* respectively, on the *in vivo* nasal absorption of hPTH. The possibility of developing nasal hPTH formulation was investigated by comparing between the results after intranasal (*i.n.*) and *s.c.* injections of hPTH. The maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the absolute bioavailability ( $F$ ) of hPTH after the *i.n.* injection of hPTH alone were not only nearly half compared to the *s.c.* injection, but not showed a transient elevation in plasma hPTH concentration, suggesting that *i.n.* injection of hPTH alone was inappropriate to obtain osteogenic action. PLA (50) and PLO (80) enhanced the nasal absorption of hPTH in a concentration-dependent manner and elevated the plasma hPTH profile transiently similar to that of the *s.c.* injection. The mean residence times (*MRTs*) of hPTH obtained from the *i.n.* co-injections with the above enhancers were longer compared to that of the *s.c.* injection, indicating that plasma hPTH profile after the *i.n.* injection was more continuous. However, it has been reported that hPTH exerts the osteogenic action by regulating the dosage interval. Therefore, these results suggested that regulating the dosage interval of *i.n.* co-injection of hPTH with the polycationic enhancers was required to obtain bone anabolic action.

#### 2. Combined effects of a polycationic compound and polyethylene glycol (PEG) on the nasal absorption of

### **hPTH in rats**

We evaluated the effect of PEG (10 kDa), a mucoadhesive compound, on the retentivity of the formulation in the nasal cavity by evaluating the viscosity and the contact surface area on the rat intestinal mucosa of the formulation containing PEG. Despite PEG concentration-dependently increased the viscosity of the formulation, slightly affected the contact surface area at any concentration used (0, 1 and 5%). The nasal absorption was improved by the *i.n.* co-injection with PEG in a concentration-dependent manner. These results showed that PEG improved the retentivity of the formulation in the nasal cavity mainly by increasing the viscosity.

A similar investigation was performed for hPTH using 5% PEG which showed the highest improvement in the above experiment. Despite an addition of 5% PEG to the nasal formulation improved the nasal hPTH absorption in combination with 0.5% PLO (80), its effect was not observed in combination with 1.0% PLO (80). This result suggested that the enhancing effect of PLO with high concentration on the nasal permeability of hPTH was higher than the improvement of the nasal retention of hPTH by adding 5% PEG, and the optimization of the formulation component such as the concentrations of polycationic enhancer and the mucoadhesive material is required to improve the nasal hPTH absorption.

### **3. Evaluation of the efficacy of nasal hPTH injection on bone turnover in model rats of postmenopausal osteoporosis**

The pharmacological effect of the nasal hPTH injection with different additive agents (PLA (50), PLO (80), and PEG) was evaluated by measuring the bone mineral density (BMD) of the left tibia and the lumbar spine and plasma bone turnover marker concentrations (plasma osteocalcin and CTX-I concentrations, as indices of bone formation- and resorption-promoting action of hPTH respectively) in model rats of postmenopausal osteoporosis. The possibility of developing nasal hPTH formulation and the protocol for its use were investigated by comparing between the results after *i.n.* and *s.c.* injections of hPTH. Based on the above results of *MRT*, once-weekly injection of hPTH was performed in addition to 3 times-weekly injection of that which exerted osteogenic action. Although the once-weekly (1×/w) *s.c.* injection of hPTH improved the cortical and cancellous BMDs in the above sites slightly, 3 times-weekly (3×/w) *s.c.* injection of that improved significantly. Almost the *i.n.* injection of hPTH improved the both BMDs in the above sites slightly regardless of the injection interval, but the improvement was not comparable to that of the 3×/w *s.c.* injection. The 1×/w *i.n.* co-injection of hPTH with 1.0% PLO (80) improved the cortical BMD in the left tibia significantly, the improvement was almost the same as that of the 3×/w *s.c.* injection. However, the cancellous BMD in the left tibia and the both BMD in the lumbar spine was slightly improved by the 1×/w *i.n.* co-injection of hPTH with 1.0% PLO (80). The plasma osteocalcin concentration in the group which showed the significant BMDs improvement was higher than that in other groups. The plasma CTX-I concentration in the group injected hPTH 3×/w via *s.c.* was lower than that in other groups. These results suggested that the potent BMD improvement in 3×/w *s.c.* injection of hPTH was due to osteogenic and resorption-suppressing action. The action of hPTH was seemed to be determined by the difference in pharmacokinetic characteristics of hPTH between the *s.c.* and *i.n.* injections as well as the injection interval.

Further investigation was required to develop the nasal hPTH formulation exerting bone anabolic action in the cortical and cancellous bone.

## 論文審査の結果の要旨

超高齢者社会において、骨粗鬆症の治療及び予防は重要な課題である。破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成による骨リモデリングがバランスよく適度な速度で行われることで、骨はその強度が一定に保たれている。現在の骨粗鬆症の第一選択薬であるビスホスホネート製剤及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター製剤は破骨細胞による骨吸収を強力に抑制することで骨密度増加作用を示すが、これらは骨形成も抑制するため、結果的に骨の脆弱性を増大させる可能性がある。ヒト副甲状腺ホルモンのアナログ製剤であるテリパラチド酢酸塩 (Human parathyroid hormone (1-34), hPTH, 4.4 kDa) は、強力な骨形成促進作用を示す唯一の骨粗鬆症治療薬である。hPTH は、その薬理作用が血中濃度推移により異なり、持続的な推移では骨吸収促進作用を示す一方で、一過的に血中濃度が上昇するような推移を間欠的に生じさせた場合骨形成促進作用を示す。既存の hPTH 皮下投与製剤は、理想的な血中濃度推移を示すが、投与に伴う痛み、注射部位の炎症及び感染症のリスク増大、自己注射における操作の煩雑さが問題となる。

本論文では、ラットを用いて、hPTH の経鼻投与におけるポリカチオン性吸収促進剤 (ポリ-L-アルギニン及びポリ-L-オルニチン、PLA 及び PLO) の経鼻吸収促進効果、並びにポリエチレングリコール (PEG) の鼻粘膜滞留性改善効果を薬物動態学的に評価し、また、薬力学的な検討を通じて、上記の物質を併用した hPTH 経鼻投与製剤開発の可能性について考察している。論文は、その内容について3編に分けて論述している。

第1編では、PLA 及び PLO の経鼻吸収促進効果について検討している。試験には hPTH だけでなく薬物自体の代謝及び分解がほとんど生じない FITC-デキストラン (FD-4, 4.0 kDa) も用いられている。経鼻投与した薬液が咽頭側へ流出できないように鼻腔内を閉鎖したラット (閉鎖系) に、FD-4 もしくは hPTH を吸収促進剤とともに経鼻投与し、それらの血中濃度推移から促進剤の効果を判定している。ウレタン麻酔下のラットの鼻腔内に FD-4 と共に種々分子量 (5, 20 及び 80 kDa) 及び濃度 (0.025, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1.0%) の PLO を投与した場合、PLO は FD-4 の経鼻吸収を促進し、PLO の適用濃度が 0.5% 付近のときに PLO の吸収促進効果が最大に達することを示した。また、PLO の適用濃度の増加に伴ってその吸収促進効果が延長することから、PLO の適用濃度は吸収促進効果の持続性にも影響すると推察している。

hPTH の薬理作用に関する過去の知見から、hPTH が骨形成促進及び骨密度増加作用を示すためには、hPTH の最高血中濃度 ( $C_{max \text{ hPTH}}$ )、血中 hPTH 濃度が維持している時間 ( $MRT_{\text{hPTH}}$ ) 及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が重要であることが示されており、hPTH 単独の経鼻投与は  $C_{max \text{ hPTH}}$  の上昇が不十分で  $MRT_{\text{hPTH}}$  の値も高く、hPTH 単独の経鼻投与は骨形成作用を得るには不適切であると判定している。一方、PLA (50 kDa) (0.25, 0.5 及び 1.0%) 及び PLO (80 kDa) (0.1, 0.25, 0.5 及び 1.0%) 併用 hPTH 経鼻投与は、一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇及び速やかな消失を示したことから、皮下投与製剤に代わる有用な新規デリバリーシステムとなる可能性があると述べている。

第2編では、hPTH の経鼻吸収に対するポリカチオンの作用における PEG の併用効果を検討している。経鼻投与した薬液が咽頭側へ流出可能なように鼻腔内を閉鎖しないラット (開放系) に、FD-4 もしくは hPTH を吸収促進剤とともに経鼻投与し、閉鎖系と比較することで PEG の効果を判定している。FD-4 を用いた開放系での検討において鼻粘膜滞留性改善効果が最も高かった 5% PEG を PLO(80 kDa) と併用し、hPTH の経鼻吸収性を無麻酔条件でラットを用いて評価している。hPTH と 0.5% PLO の併用下において 5% PEG の添加が hPTH の鼻粘膜滞留性を改善させた一方で、1.0% PLO 併用下ではその効果が認められなかった。これは、高濃度の PLO の併用による hPTH の鼻粘膜透過性改善効果が高く、PEG の添加による鼻粘膜滞留性改善効果が現れなかったことによると推察している。

第3編では卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨代謝に対する hPTH 経鼻投与の有効性を評価している。作製した卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットを用いて、種々添加物 (PLA (50 kDa)、PLO (80 kDa)、PEG) を併用して hPTH を3ヶ月間、週1及び3回経鼻投与することによる薬理効果を、脛骨及び腰椎の骨密度、並びに血漿中骨代謝マーカー濃度を指標として hPTH 皮下投与後の結果と比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を考察している。その結果、PLO を併用した hPTH の週1回経鼻投与群においては、脛骨の皮質骨密度が有意に高く、健常ラットと同程度の値を示すことを明らかにしている。

本論文での研究はラットを用いたものであり、ラットとヒトの解剖学的な鼻腔内構造及び骨代謝は異なるが、hPTH 経鼻投与製剤を臨床応用するために必要となるいくつかの重要な情報を本論文は含んでおり、その中で行われている実験の方法やデータ解析の手法も妥当なものである。したがって本論文は、博士 (薬学) の学位を与えるのに十分なものである。