

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

# 目次

略語と記号	・・・	1
緒言	・・・	2
第1編 hPTHの経鼻吸収に対するポリカチオンの効果		
第1章 モデル水溶性高分子薬物の経鼻吸収に対する PLO の効果		
第1節 小緒言	・・・	7
第2節 実験方法		
1-1-2-1 試薬	・・・	8
1-1-2-2 実験動物	・・・	8
1-1-2-3 FD-4 静脈内 ( <i>i.v.</i> ) 投与実験	・・・	8
1-1-2-4 FD-4 閉鎖系経鼻 ( <i>i.n.</i> ) 投与実験	・・・	8
1-1-2-5 血漿採取	・・・	9
1-1-2-6 血漿中 FD-4 濃度の測定	・・・	9
1-1-2-7 動態学的解析	・・・	9
1-1-2-8 統計解析	・・・	10
第3節 結果		
1-1-3-1 FD-4 静脈内投与後の血中動態	・・・	11
1-1-3-2 FD-4 の経鼻吸収に対する PLO の分子量及び適用濃度の影響	・・・	12
第4節 考察	・・・	15
第2章 hPTHの経鼻吸収に対する PLA 及び PLO の効果		
第1節 小緒言	・・・	18
第2節 実験方法		
1-2-2-1 試薬	・・・	20
1-2-2-2 実験動物	・・・	20
1-2-2-3 hPTH 麻酔下静脈内 ( <i>i.v.</i> ) 投与実験	・・・	20
1-2-2-4 hPTH 麻酔下経鼻 ( <i>i.n.</i> ) 投与実験	・・・	21
1-2-2-5 hPTH 麻酔下皮下 ( <i>s.c.</i> ) 投与実験	・・・	21
1-2-2-6 血液処理及び血漿採取	・・・	21
1-2-2-7 血漿中 hPTH 濃度の測定	・・・	22

1-2-2-8	動態学的解析	・・・22
1-2-2-9	統計解析	・・・22
第3節 結果		
1-2-3-1	hPTH 麻酔下静脈内投与後の血中動態	・・・24
1-2-3-2	hPTH 麻酔下経鼻投与後の血中動態に対する PLA 及び PLO の効果、並びに皮下投与との比較	・・・25
第4節 考察		
・・・27		

## 第2編 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

### 第1章 モデル水溶性高分子薬物の経鼻吸収に対する PLO と PEG の併用効果

第1節 小緒言		・・・30
第2節 実験方法		
2-1-2-1	試薬	・・・32
2-1-2-2	実験動物	・・・32
2-1-2-3	粘度の測定	・・・32
2-1-2-4	粘膜接触表面積の測定	・・・32
2-1-2-5	FD-4 閉鎖系経鼻 ( <i>i.n.</i> ) 投与実験 (Closed system)	・・・33
2-1-2-6	FD-4 開放系経鼻 ( <i>i.n.</i> ) 投与実験 (Open system)	・・・33
2-1-2-7	血漿採取	・・・34
2-1-2-8	血漿中 FD-4 濃度の測定	・・・34
2-1-2-9	動態学的解析	・・・34
2-1-2-10	統計解析	・・・34
第3節 結果		
2-1-3-1	経鼻投与溶液の物理化学的性質に対する PEG 添加の影響	・・・35
2-1-3-3	FD-4 経鼻投与後の血中動態に対する PLO 及び PEG の影響	・・・37
第4節 考察		・・・41

### 第2章 hPTH の経鼻吸収に対する PLO と PEG の併用効果

第1節 小緒言		・・・44
第2節 実験方法		
2-2-2-1	試薬	・・・46
2-2-2-2	実験動物	・・・46

2-2-2-3	hPTH 麻酔下静脈内 ( <i>i.v.</i> ) 投与実験	・ ・ ・ 46
2-2-2-4	hPTH 麻酔下経鼻 ( <i>i.n.</i> ) 投与実験	・ ・ ・ 46
2-2-2-5	hPTH 麻酔下皮下 ( <i>s.c.</i> ) 投与実験	・ ・ ・ 47
2-2-2-6	頸静脈簡易カテーテル挿入術	・ ・ ・ 47
2-2-2-7	hPTH 覚醒下静脈内 ( <i>i.v.</i> ) 投与実験	・ ・ ・ 47
2-2-2-8	hPTH 覚醒下経鼻 ( <i>i.n.</i> ) 投与実験	・ ・ ・ 48
2-2-2-9	hPTH 覚醒下皮下 ( <i>s.c.</i> ) 投与実験	・ ・ ・ 48
2-2-2-10	血液処理及び血漿採取	・ ・ ・ 49
2-2-2-11	血漿中 hPTH 濃度の測定	・ ・ ・ 49
2-2-2-12	動態学的解析	・ ・ ・ 49
2-2-2-13	統計解析	・ ・ ・ 49

### 第3節 結果

2-2-3-1	hPTH 静脈内投与後の血中動態に及ぼす麻酔の違い並びに鼻腔への外科的処置の有無による影響	・ ・ ・ 50
2-2-3-2	hPTH 経鼻投与後の血中動態に対する PLO 及び PEG の影響、並びに皮下投与との比較	・ ・ ・ 52

### 第4節 考察

## 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

### 第1章 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの作製

第1節	小緒言	・ ・ ・ 59
第2節	実験方法	
3-1-2-1	試薬	・ ・ ・ 63
3-1-2-2	実験動物	・ ・ ・ 63
3-1-2-3	卵巣摘出術及び偽手術	・ ・ ・ 63
3-1-2-4	体重測定及び健康状態の確認	・ ・ ・ 64
3-1-2-5	尾静脈採血	・ ・ ・ 64
3-1-2-6	血漿中骨代謝マーカー濃度の測定	・ ・ ・ 64
3-1-2-7	骨密度の測定	・ ・ ・ 65
3-1-2-8	統計分析	・ ・ ・ 65
第3節	結果	
3-1-3-1	体重に及ぼす卵巣摘出の影響	・ ・ ・ 66

3-1-3-2	骨代謝及び骨密度に及ぼす卵巣摘出の影響	・・・67
第4節	考察	・・・69
第2章	卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットにおける経鼻投与後のhPTHの薬理効果	
第1節	小緒言	・・・71
第2節	実験方法	
3-2-2-1	試薬	・・・73
3-2-2-2	実験動物	・・・73
3-2-2-3	体重測定及び健康状態の確認	・・・74
3-2-2-4	hPTH経鼻( <i>i.n.</i> )投与	・・・74
3-2-2-5	hPTH皮下( <i>s.c.</i> )投与	・・・74
3-2-2-6	尾静脈採血	・・・75
3-2-2-7	血漿中骨代謝マーカー濃度の測定	・・・75
3-2-2-8	骨密度の測定	・・・75
3-2-2-9	統計分析	・・・75
第3節	結果	
3-2-3-1	体重に及ぼすhPTH経鼻投与の影響	・・・76
3-2-3-2	骨代謝及び骨密度に対するhPTH経鼻投与の効果	・・・77
第4節	考察	・・・80
結論		・・・86
謝辞		・・・91
引用文献		・・・92

略語		略語	
BA	Bioavailability	<i>s.c.</i>	Subcutaneous
BMD	Bone mineral density	SERMs	Selective estrogen receptor modulators
BPs	Bisphosphonates	TJ	Tight junction
CT	Computed tomography	記号	
CTX-I	Type I collagen cross-linked C-telopeptide	$AUC_{FD-4}$	血漿中 FD-4 濃度－時間曲線下面積
EDTA・2NA	Ethylenediamine- <i>N, N, N', N'</i> -tetraacetic acid disodium salt	$AUC_{hPTH}$	血漿中 hPTH 濃度－時間曲線下面積
FDs	Fluorescein isothiocyanate-dextran	C.Th	皮質骨厚
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran ( <i>ca.</i> 4 kDa)	$C_{max FD-4}$	最高血漿中 FD-4 濃度
hPTH	Human parathyroid hormone	$C_{max hPTH}$	最高血漿中 hPTH 濃度
<i>i.n.</i>	Intranasal	$F_{aw/an}$	覚醒下影響率（麻酔下投与群に対する覚醒下投与群のバイオアベイラビリティの比）
<i>i.v.</i>	Intravenous	$F_{FD-4}$	FD-4 経鼻投与後のバイオアベイラビリティ
OVX ラット	卵巣摘出ラット	$F_{hPTH}$	hPTH 経鼻（又は皮下）投与後のバイオアベイラビリティ
PEG	Polyethylene glycol	$F_{o/c}$	鼻粘膜滞留性改善率（閉鎖系投与群に対する開放系投与群のバイオアベイラビリティの比）
PLA	Poly-L-arginine hydrochloride	$AR_{max FD-4}$	FD-4 経鼻投与における最大吸収速度
PLA (50)	Poly-L-arginine hydrochloride (50 kDa)	$AR_{max hPTH}$	hPTH 経鼻投与における最大吸収速度
PLO	Poly-L-ornithine hydrobromide	$MRT_{FD-4}$	FD-4 投与後の平均滞留時間
PLO (5)	Poly-L-ornithine hydrobromide (5.8 kDa)	$MRT_{hPTH}$	hPTH 投与後の平均滞留時間
PLO (20)	Poly-L-ornithine hydrobromide (18.5 kDa)	$T_{max FD-4}$	最高血漿中 FD-4 濃度到達時間
PLO (80)	Poly-L-ornithine hydrobromide (78 kDa)	$T_{max hPTH}$	最高血漿中 hPTH 濃度到達時間
PVP	Polyvinylpyrrolidone	$T_{max hPTH}$	最高血漿中 hPTH 濃度到達時間

## 緒言

本邦において、年々増加している高齢化率に伴って骨粗鬆症の患者数も増加傾向にあり、その数は1,300万人を超える<sup>1)</sup>。骨粗鬆症は骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患である。骨粗鬆症が原因で生じる骨折のうち、最も重篤な大腿骨頸部骨折は高齢者の寝たきりに繋がり、患者の quality of life (QOL) を著しく低下させる<sup>2)</sup>。更に、骨粗鬆症誘発性の脊椎骨折により activities of daily living (ADL) が低下するだけでなく、認知機能が悪化し易いことが報告されている<sup>3)</sup>。従って、超高齢者社会の本邦において、骨粗鬆症の治療及び予防は医療のみならず社会的にも重要な課題である。

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により、絶えず古い骨から新しい骨に置換されており、この機構を骨リモデリングという。通常、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、骨強度が一定に保たれている。しかし、必須栄養素（カルシウム、ビタミンD及びビタミンK等）の欠乏、並びに加齢に伴う筋力低下や寝たきりといった不動による骨に対する力学的負荷の減少が骨リモデリングのバランスを骨吸収に傾け、骨粗鬆症を誘発すると考えられている<sup>2)</sup>。現在、骨粗鬆症の第一選択薬として、ビスホスホネート製剤 (Bisphosphonates, BPs) 及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター (Selective estrogen receptor modulators, SERMs) が用いられている。両製剤は破骨細胞による骨吸収を強力に抑制することで、高い骨密度増加作用を示す<sup>2)</sup>。しかし、これらの骨吸収抑制薬は骨形成も抑制するため、骨リモデリング速度の低下により骨質を劣化させ、結果的に骨の脆弱性を増大させる可能性がある<sup>4)</sup>。

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、前述の骨吸収抑制薬と異なり、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<sup>2,5,6)</sup>。一般に、副甲状腺ホルモンは破骨細胞の骨吸収並びに腎臓における活性型ビタミンD<sub>3</sub>の合成を促進することで、血中カルシウム濃度を上昇させることが知られている。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、一過的に上昇するような推移を示す投与方法でこれを間欠的に投与したときは骨形成促進作用を示す<sup>7-10)</sup>。hPTH 皮下投与製剤は、前述の理想的な血中濃度推移である一過的な上昇とその後の低下が得られるため、骨折リスクの高い骨粗鬆症治療に用いられている<sup>5,6)</sup>。更に、hPTH 皮下投与製剤は、BPs や SERMs に比べ骨量増加作用が高いことに加え、骨リモデリング速度を高めることで骨質改善作用を示すことから<sup>5,6,11,12)</sup>、BPs や SEMRs に代わる骨粗鬆症治療薬のスタンダードになることが期待されている。しかし、皮下投与製剤は投与に伴う痛みがアドヒアランスを低下させるだけでなく、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っている<sup>13-17)</sup>。また、骨粗鬆症などの慢性疾患における自己注射は長期間の注射を患者に強いるためアドヒアランスが低下し易く、疾患の治療効果に影響を与える可能性が指摘されている<sup>18,19)</sup>。そのため、皮下投与製剤に代わる非侵襲的且つ簡便な hPTH の新規投与剤形の開発は、骨粗鬆症患者の QOL を向上させるために必要である。

このような背景を踏まえ、上記の問題を回避できる新規 hPTH 投与製剤として、経鼻投与製剤に着目した。経鼻投与は投与が簡便であることに加え、薬物の吸収部位である鼻粘膜上皮組織は、小腸と同様に多くの微絨毛を有するため、比較的吸収面積が大きい<sup>20-22)</sup>。また、上皮組織下には脈管系（動脈、静脈、リンパ管）が発達しているため、経鼻投与された薬物は、全身循環系に移行しやすく、肝初回通過効果を回避できる。加えて、他の経粘膜投与部位と比較してタンパク質分解酵素の存在量が少ないことから、鼻粘膜は全身循環系をターゲットした薬物の吸収部位として適している。しかし、他の経粘膜投与と同様に鼻粘膜でさえも、hPTH を含むペプチド及びタンパク質性医薬品のバイオアベイラビリティ (Bioavailability, BA) は低く、十分な薬理効果が得られないため、その改善を目的とした多くの研究例が報告されているが、そのほとんどが製剤化に至るまでのレベルになっていない<sup>23,24)</sup>。BA が低い要因として、①薬物の鼻粘膜透過性における分子量依存的な制限、②鼻粘膜上皮の微絨毛による mucociliary clearance 並びに鼻腔構造に伴う咽頭側への物理的除去機構 (Pharynx clearance)、③鼻腔内酵素による薬物の分解が考えられる。従って、これら医薬品の BA を改善するために、(1) 経粘膜吸収促進剤の利用による薬物の鼻粘膜透過性の向上、(2) 粘膜付



着性あるいは粘性物質の利用による薬物の鼻粘膜滞留性の向上、(3) 分解酵素阻害剤の利用による薬物分解の抑制、の3つの方法が有用であると考えられる。また、hPTH 経鼻投与製剤の開発において、hPTH の骨に対する作用は前述の通りその血中動態特性に左右されることから<sup>7-10)</sup>、骨同化作用を示すように血中動態を制御できる製剤学的工夫が必要である。

Natsume らは水溶性高分子薬物の経鼻吸収を改善するため、これまでに有効性及び安全性の高い粘膜吸収促進剤としてカチオン性ポリマーの poly-L-arginine (PLA) を見出した<sup>25)</sup>。塩基性アミノ酸の L-arginine のポリマーである PLA は、生理的条件下においてプラスチャージを有する。これまでに、PLA は鼻粘膜に対してほとんど損傷を与えることなく、組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF, *ca.* 18.8 kDa) 及び種々分子量の fluorescein isothiocyanate-dextran (FDs, *ca.* 4~160 kDa) といった水溶性高分子化合物の経鼻吸収を促進することが報告されている<sup>24,25)</sup>。更に、その吸収促進効果が PLA の分子量や適用濃度に依存すること、並びに時間依存的且つ可逆的であることが示されている<sup>26,27)</sup>。PLA は tight junction (TJ) 関連タンパク質の claudin-4、occludin、ZO-1 及び tricellulin、更には adherence junction 関連タンパク質の E-cadherin 及び  $\beta$ -catenin を細胞間隙部位から消失させ、細胞間隙経路を開口させることにより、水溶性高分子薬物の粘膜吸収を増大させることが明らかとなっている<sup>28-30)</sup>。また、PLA は上記 TJ 関連タンパク質を分解するのではなく、主に細胞間隙部位から細胞内へ局在性を変化させることで、細胞間隙部位から消失させることが証明された<sup>30,31)</sup>。近年、Natsume らは、PLA と同様に塩基性アミノ酸の L-ornithine のポリマーである poly-L-ornithine (PLO) について検討を進めている。すなわち、Kamiya らは、PLO がモデル水溶性高分子薬物の FD (FD-4, MW *ca.* 4.0 kDa) の経鼻吸収を促進することを報告している<sup>32)</sup>。また、PLO においても、TJ 関連タンパク質である claudin-4 及び occludin の局在性を変化させることで、水溶性高分子薬物の粘膜透過性を増大させることが明らかとなっている。更に、PLO は有意な吸収促進効果を示す濃度でも鼻粘膜に対して傷害性をほとんど示さないことが報告されている<sup>33)</sup>。しかしながら、カチオン性ポリマーの PLA 及び PLO 溶液はほとんど粘性がないため、カチオン性ポリマーを含む薬液が前述の②により吸収部位である鼻腔から咽頭側に流出・除去され、*in vitro* で観察される

粘膜透過性の増大に見合った吸収の改善が得られない<sup>32)</sup>。Irie らは、生体付着性物質の *in vivo* 鼻粘膜滞留性評価モデルを確立し、粘性物質を用いた経鼻投与製剤が吸収部位の標的化及び薬物放出を制御できることを示した<sup>34)</sup>。また、Kawashima らは、吸収促進剤の PLA に加えて粘性物質の polyvinylpyrrolidone (PVP) をラット鼻腔内に併用投与することで、組換えヒト成長ホルモン (Recombinant human growth hormone, rhGH) の経鼻吸収性を制御できることを示した<sup>35)</sup>。

以上の知見を踏まえ、本研究では、骨同化作用が得られるよう血中動態を制御した hPTH 経鼻投与製剤の開発を目的とし、ポリカチオン性吸収促進剤及び粘膜付着性物質を併用して hPTH をラットに経鼻投与し、hPTH の動態学的及び薬力学的検討を行った。第 1 編では、hPTH の経鼻吸収に対するポリカチオン性吸収促進剤である PLA 及び PLO の促進効果を評価した。PLA は上述の通り吸収促進効果はその分子量及び適用濃度に依存することが明らかとなっているが<sup>26)</sup>、PLO について検討されていなかった。そこで第 1 編第 1 章では、モデル水溶性高分子薬物として hPTH と同等の分子量を有する FD-4 を用いて、PLO の *in vivo* 吸収促進効果における分子量及び適用濃度の影響を評価した。第 1 編第 2 章では、hPTH の *in vivo* 経鼻吸収に対する PLA 及び PLO の効果を評価した。第 2 編では、ポリカチオン性吸収促進剤として PLO を選択し、粘膜付着性を有し、医薬品添加物として用いられる polyethylene glycol (PEG) を利用して、PLO による hPTH の鼻粘膜透過性改善効果に対する PLO の滞留性改善作用の効果を検討した。第 2 編第 1 章では、PEG を添加した溶液の粘度及び粘膜接触表面積を評価した。また、上述した *in vivo* 鼻粘膜滞留性評価モデルを用いて、PLO 併用下における FD-4 の経鼻吸収に対する PEG の影響を評価することで、PEG の最適な濃度を検討した。第 2 編第 2 章では、覚醒状態のラットを用いて、PLO 併用下における hPTH の経鼻吸収に対する PEG の影響を評価した。第 3 編では、骨粗鬆症モデルラットにポリカチオン性吸収促進剤 (PLA 及び PLO) や PEG と共に hPTH を経鼻投与し、ラットの骨密度及び骨代謝に対する影響を検討した。第 3 編第 1 章では、骨粗鬆症モデルラットとして、閉経後骨粗鬆症を模倣した卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットを選択し、卵巣摘出後 3 ヶ月のラットの骨密度及び血中骨代謝マーカー濃度値を評価することで、本モデルラットの作製

を確認した。第3編第2章では、第1章で作製した卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに種々添加物を併用して hPTH を3ヶ月間経鼻投与し、第1章と同様に骨密度及び血中骨代謝マーカー濃度値を評価することで、経鼻投与における hPTH の作用を薬力学的に評価した。

## 第1編 hPTHの経鼻吸収性に対するPLOの効果

### 第1章 モデル水溶性高分子薬物の経鼻吸収に対するPLOの効果

#### 第1節 小緒言

一般に、薬物の粘膜透過性は分子量及び水溶性の増大に伴って低下するため、水溶性高分子であるペプチド及びタンパク質性医薬品の鼻粘膜透過性は低い。また、これら医薬品の原末は高価であることから、鼻粘膜透過性の乏しさによるBAの低さが経鼻投与製剤を開発するうえで大きな障壁となっており、タンパク質性医薬品であるhPTH (MW 4.4 kDa) においても、鼻粘膜透過性の改善が特に重要であると考えられる。

ポリカチオンであるPLA及びPLOは、claudin-4やoccludinといったTJ関連タンパク質の細胞局在性を変化させ、細胞間隙経路を開口させることで、種々水溶性高分子薬物の粘膜透過性を増大させることが明らかとなっている<sup>28-31)</sup>。また、これらポリカチオンが十分な促進効果を示す濃度でも鼻粘膜に対して傷害性をほとんど示さないことが報告されている<sup>24, 25, 26, 33)</sup>。更に、PLAはその吸収促進効果が分子量及び適用濃度に依存すること、並びに時間依存的且つ可逆的であることが示されている<sup>26, 27)</sup>。従って、吸収促進効果及び安全性の両方を兼ね揃えたPLA及びPLOは、hPTHの経鼻投与製剤の開発において有用な吸収促進剤であると考えられる。緒言で述べたように、hPTHの薬理作用はその血中動態により変化することから、血中動態を制御できる製剤学的工夫が必要であるが、併用するPLAの分子量及び適用濃度を調節することでhPTHの血中動態を制御できる可能性がある。

PLOは予備検討の段階でその吸収促進効果がPLAより高いことが分かっていたが<sup>36)</sup>、吸収促進効果に対するその分子量及び適用濃度による影響について検討されていなかった。そこで本章では、PLOによる水溶性高分子薬物の経鼻吸収促進効果を明らかにするため、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、hPTHと同等の分子量を有するモデル水溶性高分子薬物であることに加え、薬物自体の代謝及び分解がほとんどないFD-4 (MW ca. 4.0 kDa) と共に種々分子量及び濃度のPLOを鼻腔内投与し、FD-4の血中動態を評価した。

## 第2節 実験方法

### 1-1-2-1 試薬

Poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (5) : 5.8 kDa, PLO (20) : 18.5 kDa, PLO (80) : 78 kDa) を Alamanda Polymers, Inc. (AL, USA) より購入した。Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, 4.0 kDa) 及び urethane を Sigma-Aldrich Co. (MO, USA) より得た。その他の試薬は全て特級品を使用した。

### 1-1-2-2 実験動物

Wistar 系雄性ラット (240–280 g, 8 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入した。ラット 3 匹/cage で飼育し、実験に使用するまで自由に食餌及び水を摂取できるようにした。ただし、実験開始 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すべての実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認 (承認番号: H25015, H26016, H27015, H28016, H29021, JU18016) を得てから実施した。

### 1-1-2-3 FD-4 静脈内 (*i.v.*) 投与実験

ウレタン生理食塩液溶液 (25%, 1.0 g/kg) をラット腹腔内に投与し、麻酔した。ラットを仰臥位固定した後、後述の経鼻投与実験と同様の生理的条件にするため、ラットに外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出した。その後、FD-4 生理食塩液溶液 (3.3 mg/kg, 1.0 mL/kg) を左頸静脈に投与した。投与直前及び投与後 540 分までの所定の時間に、ヘパリン処理した注射筒を用いて、右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。

### 1-1-2-4 FD-4 閉鎖系経鼻 (*i.n.*) 投与実験

1-1-2-3 と同様の方法で麻酔したラットを仰臥位固定した後、Hirai らの *in vivo* 経鼻投与実験法に準じてラット気道及び食道に外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出した<sup>37)</sup>。まず、正中線に沿って喉を切開し、気管を露出した。気管にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No.8, 株式会社 三商, 東京) を挿入することで、気道を確保した。次にシリ

コーンゴムを用いて先端を塞いだシリコーンチューブ（シラスコン® 医療用チューブ SH No. 1, 株式会社カネカメディックス, 大阪）を食道側から鼻腔側に向けて挿入することで、鼻腔から消化管への投与液の漏出を防止した。更に、鼻口蓋管からの投与液の漏出を防ぐため、この部分を接着剤（アロンアルファ®, 東亜合成株式会社, 東京）で塞いだ。その後、先端にポリエチレンチューブ（ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 長さ 4 cm, 株式会社 三商, 東京）を接続したマイクロシリンジを用いて、種々分子量（PLO (5) : 5.8 kDa, PLO (20) : 18.5 kDa, PLO (80) : 78 kDa）及び濃度（0.025, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1.0%）の PLO を含有する FD-4 生理食塩液溶液（33 mg/kg, 0.4 mL/kg）を左鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与直後に、上記の接着剤で鼻孔を塞ぐことで、鼻腔内を閉鎖した。その後、ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 540 分までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。また、FD-4 のみを含む生理食塩液を同様に投与した群を control 群とした。

#### 1-1-2-5 血漿採取

1-1-2-3 及び 1-1-2-4 で得られた血液を遠心分離（15,000 rpm, 5 分間, 4°C, 回転半径 71 mm, MX-301, 株式会社トミー精工, 東京）して血漿を得た。

#### 1-1-2-6 血漿中 FD-4 濃度の測定

ホウ砂リン酸緩衝液（0.2 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5）を用いて、1-1-2-5 で得られた血漿を 60 倍希釈した。分光蛍光光度計（RF-5300PC, 株式会社島津製作所）を用いて、希釈したサンプル中の FD-4 の蛍光強度を測定し（励起波長 495 nm, 蛍光波長 515 nm）、血漿中 FD-4 濃度を算出した。

#### 1-1-2-7 動態学的解析

血漿中 FD-4 濃度推移をノンコンパートメント法で解析し、最高血漿中 FD-4 濃度（ $C_{max}$  FD-4）、最高血漿中 FD-4 濃度到達時間（ $T_{max}$  FD-4）及び平均滞留時間（ $MRT$  FD-4）を算出した。最終採血時間までの血漿中 FD-4 濃度－時間曲線下面積（ $AUC$  FD-4）を台形公式により求め、

FD-4 経鼻投与における絶対的バイオアベイラビリティ ( $F_{FD-4}$ ) を算出した。また、FD-4 の速度論的パラメータを算出するため、非線形最小二乗プログラム (Damping Gauss-Newton 法、重み=1/C<sup>2</sup>) を用いて、FD-4 静脈内投与後の血中動態を 2-コンパートメントモデルで解析した。得られた速度論的パラメータと経鼻投与後の血漿中 FD-4 濃度推移から、デコンボリューション法により FD-4 の累積吸収プロファイルを作成し、最大吸収速度 ( $AR_{max\ FD-4}$ ) を求めた。

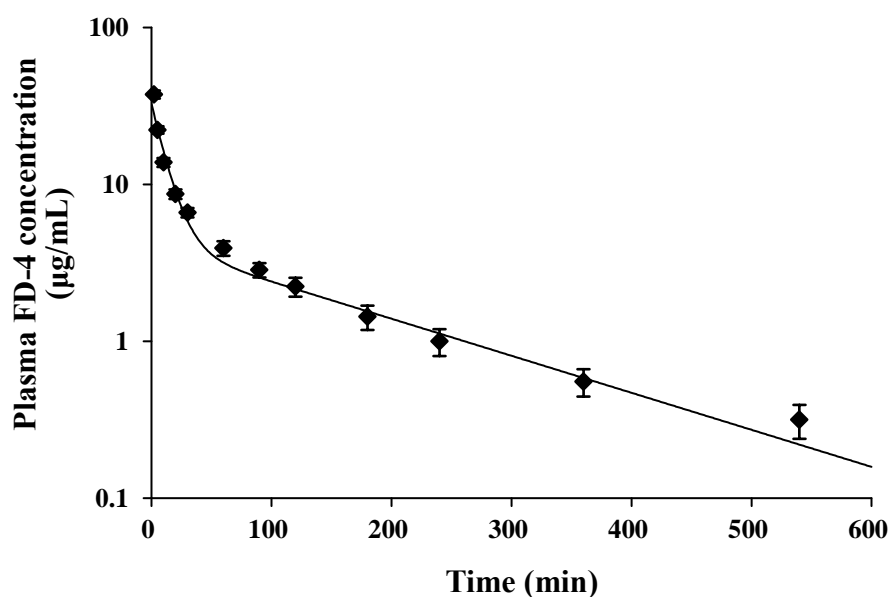
#### 1-1-2-8 統計解析

データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。各群間の動態学的パラメータを一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析した後、Williams の多重比較検定及び Tukey-Kramer 法を用いて解析した。更に、種々分子量の PLO を併用した経鼻投与により得られた動態学的パラメータの比較に二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いた。なお、全ての統計解析は R software (version 3.5.1 for Windows ; <https://www.R-project.org/>) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計的有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 1-1-3-1 FD-4 静脈内投与後の血中動態

FD-4 静脈内投与後の血中動態を評価した。Figure 1 に FD-4 静脈内投与後の血漿中 FD-4 濃度推移を、Table 1 に得られた FD-4 の動態学的パラメータを示す。静脈内投与後の血漿中 FD-4 濃度推移は典型的な二相性の消失パターンを示し、2-コンパートメントモデルで良好に表された。



**Fig. 1 Plasma FD-4 concentration after *i.v.* administration in rats and simulated line from 2-compartment model.**

◆ : measured value, — : fitting curve

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

**Table 1 Pharmacokinetic parameters of FD-4 calculated from plasma data after *i.v.* administration in rats.**

$A$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$28.57 \pm 2.52$	$k_{21}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.015 \pm 0.001$
$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.083 \pm 0.007$	$k_{10}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.030 \pm 0.003$
$t_{1/2\alpha}$ (min)	$8.54 \pm 0.68$	$k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.044 \pm 0.006$
$B$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$4.13 \pm 0.60$	$V_1$ (mL)	$28.03 \pm 2.64$
$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.0054 \pm 0.0005$	$V_2$ (mL)	$80.74 \pm 11.14$
$t_{1/2\beta}$ (min)	$133.85 \pm 15.92$	$Vd_{ss}$ (mL)	$108.77 \pm 13.21$
		$CL_{tot}$ (mL/min)	$0.824 \pm 0.091$

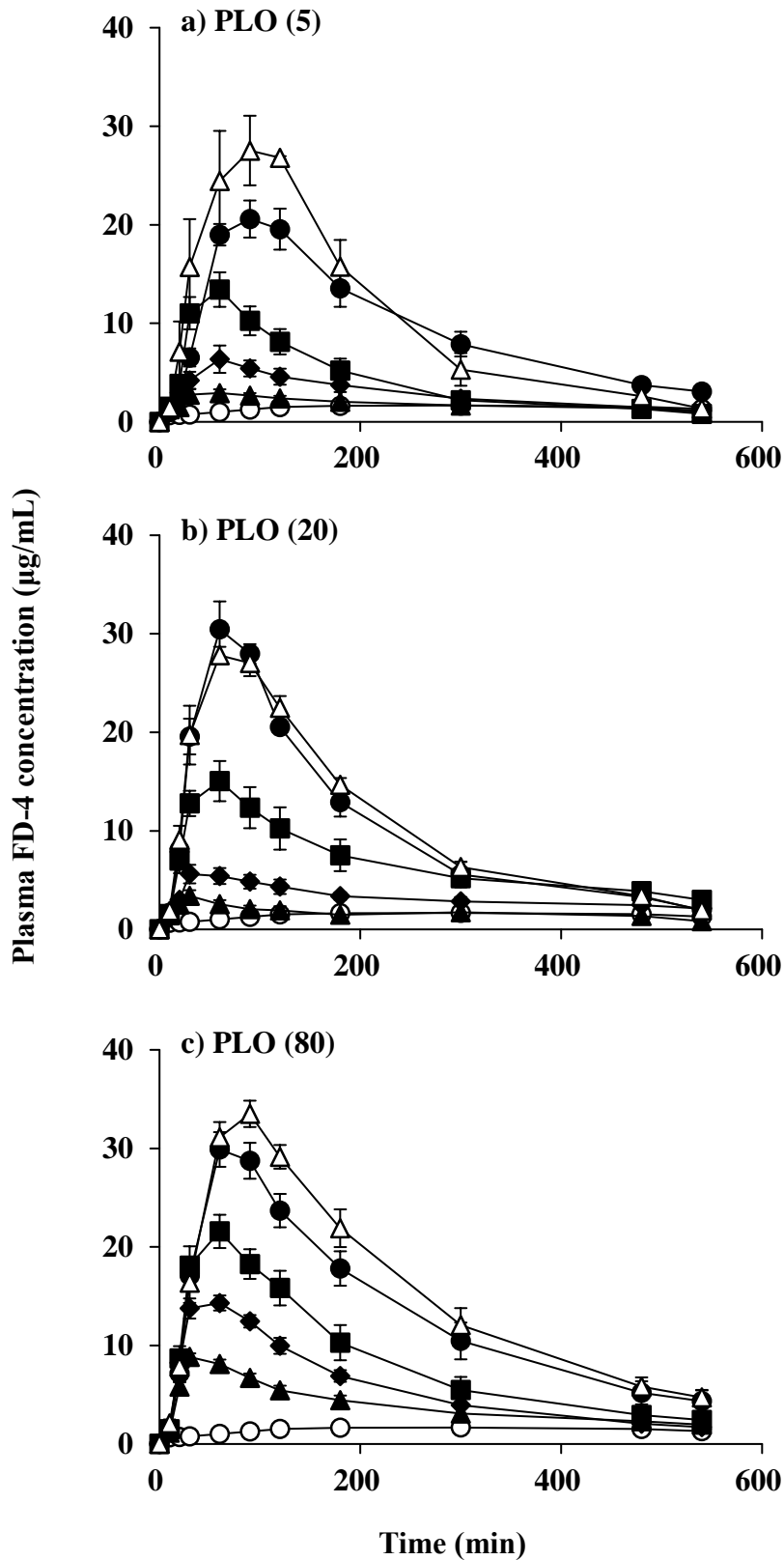
The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3).



### 1-1-3-2 FD-4 経鼻吸収に対する PLO の分子量及び適用濃度の影響

FD-4 経鼻投与後の血中動態に対する PLO の分子量及び適用濃度の影響を動態学的に評価した。Figure 2 に種々分子量及び濃度の PLO と共に FD-4 を経鼻投与した後の血漿中 FD-4 濃度推移を、Figure 3 にデコンボリューション法により求めた経鼻投与後の FD-4 の典型的な累積吸収プロファイルを、Table 2 に得られた FD-4 の動態学的パラメータを示す。

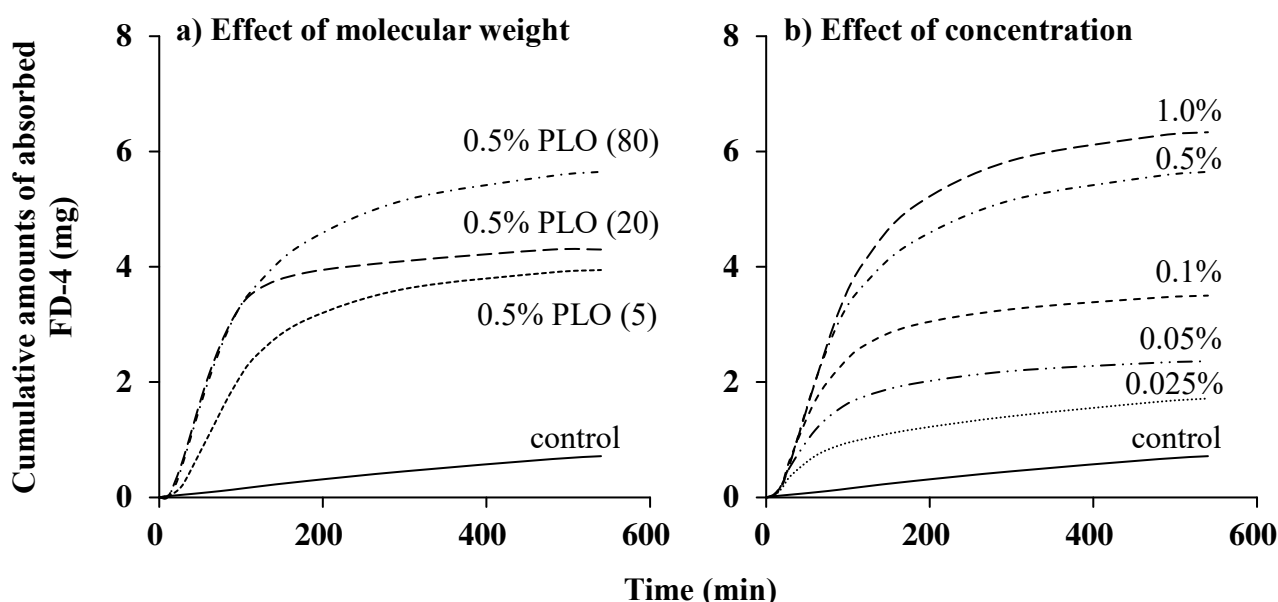
FD-4 単独の経鼻投与群 (control 群) において、投与後 540 分まで血漿中 FD-4 濃度はほとんど増加せず (Fig. 2)、FD-4 累積吸収プロファイルは投与直後から直線的に増大するゼロ次吸収を示した (Fig. 3)。また、control 群の  $F_{FD-4}$  及び  $AR_{max\ FD-4}$  はそれぞれ 6.5% 及び 2.0  $\mu\text{g}/\text{min}$  と低値であった (Table 2)。一方、PLO 併用群では、いずれの分子量及び適用濃度においても  $F_{FD-4}$  及び  $AR_{max\ FD-4}$  は control 群と比較して高く、その中でも 1.0% PLO (80) 併用群のそれらパラメータはそれぞれ 65.9% 及び 45.8  $\mu\text{g}/\text{min}$  と非常に高い値を示した。また、0.025% PLO (5) 及び PLO (20) を除き、全ての分子量及び適用濃度で血漿中 FD-4 濃度推移が著しく上昇し、 $C_{max\ FD-4}$  及び  $AUC_{FD-4}$  は control 群と比較して有意に増大した (Williams test,  $p < 0.05$ )。その中でも、1.0% PLO (80) 併用群の  $C_{max\ FD-4}$  及び  $AUC_{FD-4}$  が最も高く、control 群のそれらに比べてそれぞれ約 18.1 及び 10.2 倍高かった。いずれの分子量の PLO においても、 $C_{max\ FD-4}$  及び  $AUC_{FD-4}$  は適用濃度依存的に増大し、 $T_{max\ FD-4}$  は延長する傾向にあった。しかしながら、同一分子量の 0.5 及び 1.0% PLO 併用群の間ではそれらのパラメータに大きな差は認められなかった (Tukey-Kramer,  $p > 0.05$ )。異なる分子量の PLO から得られた  $AUC_{FD-4}$  間には有意な差が認められ (two-way ANOVA,  $p < 0.001$ )、PLO (80) の  $F_{FD-4}$  は同一適用濃度の PLO (5) に比べて高い値を示した。FD-4 の累積吸収プロファイルにおいて、種々分子量の PLO を 0.5% で併用投与したとき、いずれも lag time 直後に FD-4 の吸収量が増大し始め、 $AR_{max\ FD-4}$  の値は lag time 直後に観察され、その後吸収速度は FD-4 単独経鼻投与と同等程度まで徐々に低下した (Fig. 3a)。また、 $AR_{max\ FD-4}$  及び FD-4 累積吸収量は PLO の分子量及び適用濃度に依存した (Figs. 3a and 3b)。MRT<sub>FD-4</sub> において、PLO (20) は適用濃度依存的に減少する傾向を示したが、PLO (5) 及び PLO (80) ではその傾向を示さなかった。また、PLO の分子量依存的な MRT<sub>FD-4</sub> の変化は認められなかった (two-way ANOVA,  $p > 0.05$ )。



**Fig. 2** Plasma FD-4 concentrations after *i.n.* co-administration with PLO of different molecular weights and concentrations under closed system in rats.

○: control (FD-4 alone), ▲: 0.025% PLO, ◆: 0.05% PLO, ■: 0.1% PLO, ●: 0.5% PLO, △: 1.0% PLO.

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3-6).



**Fig. 3** Simulated absorption profiles of FD-4 after *i.n.* co-administration with PLO of different molecular weights and concentrations in rats.

The absorption profiles after *i.n.* administration of FD-4 were calculated using a deconvolution method with the *i.n.* and *i.v.* data and the elimination parameters.

The results were expressed as the mean value (n=3-6).

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of FD-4 after *i.n.* co-administration with PLO of different molecular weights and concentrations in rats.

Route	Dose (mg/kg)	Enhancer	$C_{max\text{ FD-4}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$T_{max\text{ FD-4}}$ (min)	$AUC_{\text{FD-4}}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ )	$MRT_{\text{FD-4}}$ (min)	$F_{\text{FD-4}}^a$ (%)	$AR_{max\text{ FD-4}}$ ( $\mu\text{g/min}$ )
<i>i.v.</i>	3.3	-	-	-	1142 $\pm$ 107	100 $\pm$ 9	-	-
<i>i.n.</i>	33	None (control)	1.9 $\pm$ 0.3	252 $\pm$ 48	796 $\pm$ 92	288 $\pm$ 3	6.5	2.0
		<b>PLO (5)</b>						
		0.025%	3.1 $\pm$ 0.4	60 $\pm$ 13	965 $\pm$ 94	227 $\pm$ 13	7.8	5.9
		0.05%	6.6 $\pm$ 1.4*	75 $\pm$ 7	1558 $\pm$ 321*	196 $\pm$ 13	12.7	9.6
		0.1%	13.9 $\pm$ 1.8***	50 $\pm$ 6	2285 $\pm$ 422*	149 $\pm$ 11	18.6	25.7
		0.5%	22.2 $\pm$ 1.6***	90 $\pm$ 9	5123 $\pm$ 514***	201 $\pm$ 12	41.6	27.2
		1.0%	29.4 $\pm$ 2.6***	100 $\pm$ 20	5614 $\pm$ 774***	157 $\pm$ 12	45.6	37.6
		<b>PLO (20)</b>						
		0.025%	3.5 $\pm$ 0.6	35 $\pm$ 5	913 $\pm$ 226	220 $\pm$ 15	7.4	6.8
		0.05%	6.3 $\pm$ 0.7*	45 $\pm$ 10	1726 $\pm$ 185*	228 $\pm$ 18	14.0	12.8
		0.1%	15.3 $\pm$ 2.0**	48 $\pm$ 7	3567 $\pm$ 492***	201 $\pm$ 17	29.0	31.1
		0.5%	30.8 $\pm$ 2.7***	70 $\pm$ 8	5507 $\pm$ 426***	160 $\pm$ 13	44.8	46.7
		1.0%	29.8 $\pm$ 0.7***	65 $\pm$ 9	5758 $\pm$ 167***	165 $\pm$ 7	46.8	47.0
		<b>PLO (80)</b>						
		0.025%	8.9 $\pm$ 0.3**	40 $\pm$ 6	2114 $\pm$ 198*	206 $\pm$ 11	17.2	20.0
		0.05%	15.2 $\pm$ 0.6***	55 $\pm$ 9	3091 $\pm$ 170**	180 $\pm$ 4	25.1	31.6
		0.1%	21.7 $\pm$ 1.7***	54 $\pm$ 6	4472 $\pm$ 623***	176 $\pm$ 10	36.3	43.7
		0.5%	30.0 $\pm$ 1.8***	65 $\pm$ 5	7057 $\pm$ 708***	193 $\pm$ 11	57.4	45.8
		1.0%	34.5 $\pm$ 0.9***	80 $\pm$ 6	8110 $\pm$ 596***	195 $\pm$ 9	65.9	45.8

The results were expressed as the mean or mean  $\pm$  S.E. (n=3-6).

$^aF_{\text{FD-4}}(\%) = [AUC_{i.n.}/(AUC_{i.v.} \times 10)] \times 100$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with *i.n.* control. There was a significant difference among the  $AUC_{\text{FD-4}}$  values for PLO of different molecular weights (two-way ANOVA,  $p < 0.001$ ).

#### 第4節 考察

ペプチド及びタンパク質性医薬品を含む水溶性高分子薬物は鼻粘膜透過性が乏しいため<sup>23,24)</sup>、これら医薬品の経鼻投与製剤の開発において粘膜吸収促進剤の併用を考慮する必要がある。Chitosan や PLA といったカチオン性ポリマーは、鼻粘膜に対してほとんど傷害性を示すことなく、種々水溶性高分子薬物の鼻粘膜透過性を促進することが明らかとなっている<sup>24,38)</sup>。更に、これらポリマーの吸収促進効果はその分子量及び適用濃度に依存することが示されている<sup>26,39)</sup>。従って、カチオン性ポリマーの分子量及び適用濃度はその吸収促進効果と密接に関係している。Oda らは、PLO が細胞傷害性を示すことなく、2型肺胞細胞における FITC-insulin の取り込みを促進したことを報告している<sup>40)</sup>。また、*in vivo* ラットモデルにおいて、PLO の併用経肺投与により insulin の血糖降下作用が増大することが示されている<sup>40)</sup>。更に、Kamiya らは、PLO が FD-4 の *in vivo* 経鼻吸収を改善することを報告している<sup>32)</sup>。しかし、PLO の経鼻吸収促進効果と分子量及び適用濃度の関係性は報告されていない。

ポリカチオン性吸収促進剤である PLA と rhGH の併用経鼻投与においては、PLA と rhGH (pI: 5.1) の静電的な相互作用により複合体が形成された結果、見かけ上の rhGH の分子量が増大し、rhGH の吸収が持続的に吸収促進されることが報告されている<sup>35)</sup>。hPTH の pI は 8.4 であることから、ポリカチオン性吸収促進剤との静電的相互作用の可能性は低いと考えられるが、鼻粘膜表面を含めた3者間の何かしらの相互作用による経鼻吸収への影響が生じることも考えられた。また、薬物の経鼻吸収における mucociliary clearance 及び pharynx clearance といった薬物除去機構の影響や、タンパク質性医薬品である hPTH の鼻腔内のタンパク質分解酵素による分解の影響が考えられた。hPTH を含めたタンパク質性医薬品は高価であり、様々な条件で *in vivo* 投与実験を行うには不適である。

以上のことを踏まえて本章では、PLO による水溶性高分子薬物の *in vivo* 経鼻吸収促進効果を評価するため、外科的処置により薬物が咽頭側へ流出しないように鼻腔内を閉鎖した麻醉下ラット並びに、モデル水溶性高分子薬物として hPTH とほぼ同等の分子量を有することに加え、薬物自体の代謝及び分解がほとんどない FD-4 を用いて、FD-4 の *in vivo* 経鼻吸収に対する種々分子量及び適用濃度の PLO の促進効果を動態学的に評価した。

PLO を併用した経鼻投与は一部の条件を除き、いずれの PLO 適用濃度においても血漿中 FD-4 濃度を増大させた。また、PLO 適用濃度依存的に血漿中 FD-4 濃度が増大したことから、PLO の適用濃度は吸収促進効果の強度を決定づける重要な因子であることが示めされた。しかしながら、同一分子量の PLO において、適用濃度が 0.5 及び 1.0% のとき FD-4 の動態学的パラメータに僅かな変化しか認められなかったことから、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と考えられた。また、PLO 適用濃度の増加に伴って  $T_{max\text{FD-4}}$  が延長したことから、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された。PLA の併用経鼻投与に関する過去の研究において、FD-4 の  $T_{max}$  は PLA 濃度の増大に伴って延長し、PLA の経鼻吸収促進効果は鼻腔内のタンパク分解酵素の分解により減弱することが示されている<sup>26, 27)</sup>。従って、PLA と同様に塩基性アミノ酸のポリマーである PLO においても鼻腔内の酵素により段階的に分解されると考えられ、高濃度の PLO は低濃度のそれと比較して分解により多くの時間を要したため、結果的に  $T_{max\text{FD-4}}$  が延長したと推察された。PLO の分解性とその吸収促進効果の強度及び持続性との関係について、今後更なる検討が必要である。

異なる分子量の PLO を適用して得られた  $AUC_{\text{FD-4}}$  間に有意な差が認められ、より高分子量の PLO は効率的に FD-4 の経鼻吸収を促進したことから、PLO は分子量依存的な促進効果を示すと考えられた。従って、前述した chitosan や PLA といったカチオン性ポリマーと同様に、PLO の吸収促進効果の強度はその分子量及び濃度を変更することにより調節可能であることが示された。

第 1 章では、PLO による水溶性高分子薬物の *in vivo* 経鼻吸収促進効果を評価するため、モデル薬物として hPTH とほぼ同等の分子量を有することに加え、鼻腔内酵素により分解されない FD-4 を用いたが、タンパク質医薬品である hPTH は鼻腔内のタンパク質分解酵素により分解される可能性を考慮する必要がある。

そこで第 2 章では、第 1 章において吸収促進効果が最も高かった PLO (80) を、Natsume らの PLA に関する報告から吸収促進効果及び安全性の観点から分子量約 50 kDa の PLA (PLA (50)) を選択し<sup>24-27)</sup>、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に

について論述する。

## 第2章 hPTHの経鼻吸収に対するPLA及びPLOの効果

### 第1節 小緒言

副甲状腺ホルモンは骨に作用して骨吸収を促進することに加え、腎臓に作用してカルシウム再吸収を促進する<sup>41)</sup>。また、腎臓における活性型ビタミンD<sub>3</sub>の合成を促進することで、食物中のカルシウムの腸管吸収を増大させ、血中カルシウム濃度を上昇させることが知られている。副甲状腺ホルモンはアミノ酸84個で構成される分子量約9.4 kDaのペプチドホルモン(PTH(1-84))であり、そのN末端側のアミノ酸配列は異なる種間で高い相同性を示す。N末端側の34個のアミノ酸であるPTH(1-34)はPTH(1-84)と同程度のPTH受容体結合能並びに血中カルシウム濃度及び骨代謝の調節作用を有することから、human PTH(1-34)(hPTH)が骨粗鬆症治療薬として用いられている<sup>5,6)</sup>。骨において、副甲状腺ホルモンは、骨芽細胞の骨形成並びに破骨細胞の骨吸収を促進することで、骨リモデリング速度を調節している。また、hPTHの骨に対する作用は、その血中動態特性の違いにより異なることが古くから知られている<sup>7-10)</sup>。すなわち、hPTHを点滴静注のように持続的な血中濃度推移を示すように投与したとき、骨吸収促進効果が骨形成促進作用を上回り、結果的に骨密度の減少を示す。一方、hPTHを皮下投与のように一過的な血中濃度の上昇とその後の低下を示し、それが間欠的に生じるように(フォルテオ®:1日1回皮下投与製剤, テリボン®:週1回皮下投与製剤)したとき、骨形成促進作用が強く発揮され、結果的に骨密度の増加を示す。

骨粗鬆症治療の第一選択薬として用いられるBPs及びSERMsと比較して、hPTH皮下投与製剤は骨密度増加作用が高いことが示されている<sup>5,6,11,12)</sup>。しかしながら、hPTHは皮下投与製剤しかなく、苦痛に伴うコンプライアンスの低下、自己注射の煩雑さなどの問題点から、非侵襲的且つ簡便なhPTHの経鼻投与製剤の開発に着目した。hPTHの経鼻投与製剤に関する研究はこれまでに数件しか報告されておらず、これらの知見は十分とは言い難い<sup>42-45)</sup>。その中でも、ヒトにおけるhPTHの経鼻投与に関する研究において、皮下投与と比較して経鼻投与が高い骨量増加作用を示し、これは経鼻投与が皮下投与より一過的な血中濃度の上昇及び速やかな消失を示したことに起因する可能性が報告されている<sup>44)</sup>。しかしながら、上記の研究において、hPTHの経鼻投与が骨量増加作用を示すために要する投与量は皮下投与の約

50倍であった。タンパク質性医薬品である hPTH は、骨粗鬆症治療の第一選択薬である BPs 及び SERMs と比べて薬価が高いうえ、粘膜を介した透過性が低い。また、上述のように hPTH の薬理作用はその血中動態に左右されることが知られていることから<sup>7-10)</sup>、hPTH の経鼻投与製剤の開発において、経鼻吸収を促進するだけでなく、骨形成促進作用を示すように血中動態を制御できる製剤学的工夫が必要である。L-Arginine のポリマーである PLA は鼻粘膜に対してほとんど傷害を与えることなく、種々水溶性高分子薬物の経鼻吸収を一過的に促進する<sup>24-27)</sup>。また、第1章において、L-ornithine のポリマーである PLO が hPTH と同等の分子量を有するモデル水溶性高分子薬物である FD-4 の経鼻吸収を一過的に促進することを示した。更に、これらポリマーは分子量及び適用濃度を変更することにより、その吸収促進効果の強度及び持続性を調節可能である。従って、PLA 及び PLO を用いることで、hPTH の皮下投与と同様に一過的な血漿中濃度の上昇が得られ、骨形成促進作用を示す有用な hPTH の経鼻投与製剤になり得ると考えられる。

そこで本章では、第1章において最も吸収促進効果が高かった PLO (80) を、Natsume らの PLA に関する報告から吸収促進効果及び安全性の観点から分子量約 50 kDa の PLA (PLA (50)) を選択し<sup>24-27)</sup>、種々濃度の PLA (50) 又は PLO (80) と共に hPTH をラット鼻腔内に投与し、hPTH の血中動態を評価した。また、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査するため、hPTH 皮下投与後の動態学的パラメータと比較した。



## 第 2 節 実験方法

### 1-2-2-1 試薬

テリパラチド酢酸塩 (Human parathyroid hormone (1-34) : hPTH, 4.4 kDa) 原末は、旭化成ファーマ株式会社 (東京) より分与された。Poly-L-arginine hydrochloride (PLA (50), 44.3 kDa)、aprotinin from bovine lung を Sigma-Aldrich Co. (MO, USA) から購入した。Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid disodium salt (EDTA・2NA) を和光純薬工業株式会社 (大阪) より得た。High Sensitivity Human PTH (1-34) ELISA<sup>®</sup> kit を Immutopics Inc. (CA, USA) から購入した。Poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (80), 78 kDa) 及び urethane は 1-1-2-1 と同様のものを、その他の試薬は全て特級品を使用した。

### 1-2-2-2 実験動物

Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット (200–230 g, 10 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入し、ラットの飼育及び管理は 1-1-2-2 と同様に行った。なお、本研究におけるラットを用いたすべての実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認 (承認番号: H25015, H26016, H27015, H28016, H29021, JU18016) を得てから実施した。

### 1-2-2-3 hPTH 麻酔下静脈内 (*i.v.*) 投与実験

1-1-2-4 と同様の方法で麻酔したラットを仰臥位固定した後、後述の経鼻投与実験と同様の生理的条件とするため、気道及び食道に外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出した。その後、先端に注射針 (25 G) を連結したポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 長さ 4 cm, 株式会社 三商, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて、左頸静脈内に hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を投与した。投与後、氷冷下で冷却した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 180 分までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.20 mL を採取した。なお、hPTH は、プラスチックやガラスに吸着する性質を有しており、上述のマイクロシリンジにも約 10~20% 程度吸着するが、1 回共洗いすることでそれを防げる

ことが報告されている<sup>46)</sup>。そこで、hPTH の投与量の損失を防ぐため、hPTH 投与前にマイクロシリンジを同投与溶液で 1 回共洗いした<sup>46)</sup>。

#### 1-2-2-4 hPTH 麻酔下経鼻 (*i.n.*) 投与実験

1-1-2-4 と同様の方法でラットを麻酔し、外科的処置を施した。その後、ポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No.3, 長さ 4 cm) を接続したマイクロシリンジを用いて、種々濃度の PLA (50) 又は PLO (80) (PLA (50) : 0.25, 0.5 及び 1.0 %, PLO (80) : 0.1, 0.25, 0.5 及び 1.0 %) を含有する hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を 1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしてから、左鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与直後に、1-1-2-4 と同様の方法で鼻孔を塞ぐことで、鼻腔内を閉鎖した。その後、氷冷下で冷却した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 180 分までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.20 mL を採取した。また、hPTH のみを含む生理食塩液を同様に投与した群を control 群とした。

#### 1-2-2-5 hPTH 麻酔下皮下 (*s.c.*) 投与実験

1-1-2-4 と同様の方法で麻酔したラットを仰臥位固定した後、上述の経鼻投与実験と同様の生理的条件とするため、気道及び食道に外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出した。その後、先端に注射針 (25 G) を連結したポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No.3, 長さ 4 cm) を接続したマイクロシリンジを用いて、hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を 1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしてから、頸背部皮下に投与した。投与後、氷冷下で冷却した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 180 分までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.20 mL を採取した。

#### 1-2-2-6 血液処理及び血漿採取

1-2-2-3、1-2-2-4 及び 1-2-2-5 で得られた血液を、タンパク質分解酵素阻害剤の aprotinin (5,000 KIU/mL, 25 µL) 及び血液凝固阻害剤の EDTA・2NA (EDTA として 10 mg/mL, 25 µL) 含有生理食塩液を入れたタンパク質低吸着性マイクロチューブ (プロテオセーブ® SS, 住友

ベークライト株式会社, 東京)に移し、緩やかに転倒混和した。その後、直ちに遠心分離(1,000 g, 10 分間, 4°C, 回転半径 71 mm, MX-301, 株式会社トミー精工, 東京)し、血漿 0.10 mL を得た。得られた血漿を後述の血漿中 hPTH 濃度の測定を行うまで、-80°C で保存した。

#### 1-2-2-7 血漿中 hPTH 濃度の測定

High Sensitivity Human PTH (1-34) ELISA kit を用いて 1-2-2-6 で得られた血漿中の hPTH 濃度を ELISA 法により測定した。得られた血漿を適宜、上記キット付属の血漿用希釈液で希釈した。測定手順は上記キット付属のマニュアルに従った。なお、本定量キットの測定感度及び定量限界は、それぞれ 0.9 及び 39–50 pg/mL である。Intact rat PTH (1-84) に対して重量及びモル基準でそれぞれ 6.8 及び 3.0% の交差反応性を示すが<sup>47)</sup>、hPTH を用いた全ての実験において hPTH 投与直前の血漿サンプルで Intact rat PTH (1-84) は検出されなかった。

#### 1-2-2-8 動態学的解析

血漿中 hPTH 濃度推移をノンコンパートメント法で解析し、最高血漿中 hPTH 濃度 ( $C_{max\text{ hPTH}}$ )、最高血漿中 hPTH 濃度到達時間 ( $T_{max\text{ hPTH}}$ ) 及び平均滞留時間 ( $MRT_{\text{hPTH}}$ ) を算出した。最終採血時間までの血漿中 hPTH 濃度–時間曲線下面積 ( $AUC_{\text{hPTH}}$ ) を台形公式により求め、hPTH 皮下及び経鼻投与における絶対的バイオアベイラビリティ ( $F_{\text{hPTH}}$ ) を算出した。hPTH の速度論的パラメータを算出するため、非線形最小二乗プログラム (Damping Gauss-Newton 法、重み=1/ $C^2$ ) を用いて、hPTH 静脈内投与後の血中動態を 2-コンパートメントモデルで解析した。得られた速度論的パラメータと経鼻投与後の血漿中 hPTH 濃度推移から、デコンボリューション法により hPTH の累積吸収プロファイルを作成し、最大吸収速度 ( $AR_{max\text{ hPTH}}$ ) を求めた。

#### 1-2-2-9 統計解析

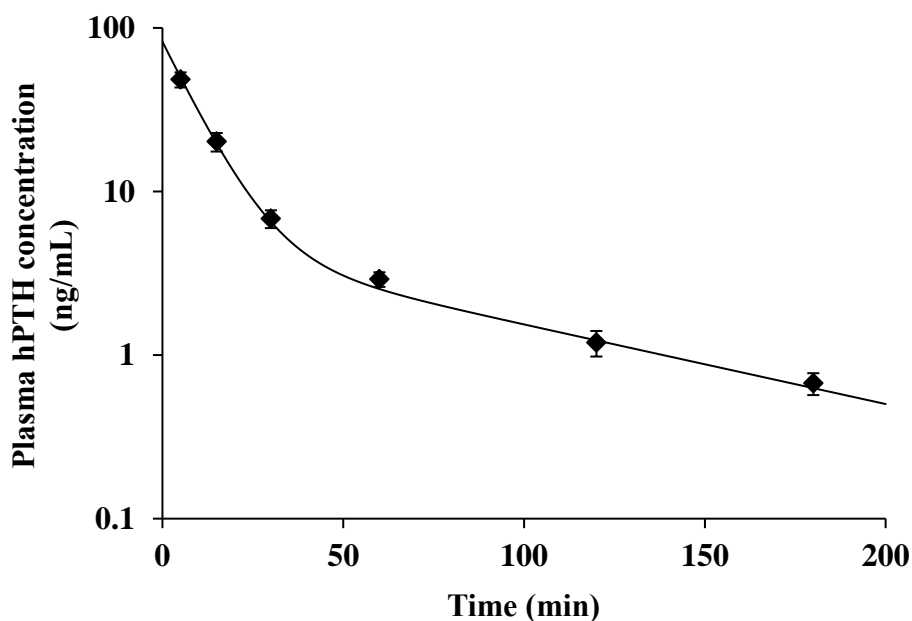
データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。各群間の動態学的パラメータの分散を一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析した後、多群間の差を Dunnett の多重比較検定を用

いて解析した。なお、全ての統計解析は R software (version 3.5.1 for Windows ; <https://www.R-project.org/>) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計的有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 1-2-3-1 hPTH 麻酔下静脈内投与後の血中動態

麻酔下ラットに hPTH を静脈内投与した後の血中動態を評価した。Figure 4 に hPTH 静脈内投与後の血漿中 hPTH 濃度推移を、Table 3 に得られた hPTH の動態学的パラメータを示す。静脈内投与後の血漿中 hPTH 濃度推移は二相性の消失パターンを示し、2-コンパートメントモデルで良好に表された。



**Fig. 4** Plasma hPTH concentration after *i.v.* administration in anesthetized rats and simulated line from 2-compartment model.

◆ : measured value, — : fitting curve

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

**Table 3** Pharmacokinetic parameters of hPTH calculated from plasma data after *i.v.* administration in anesthetized rats.

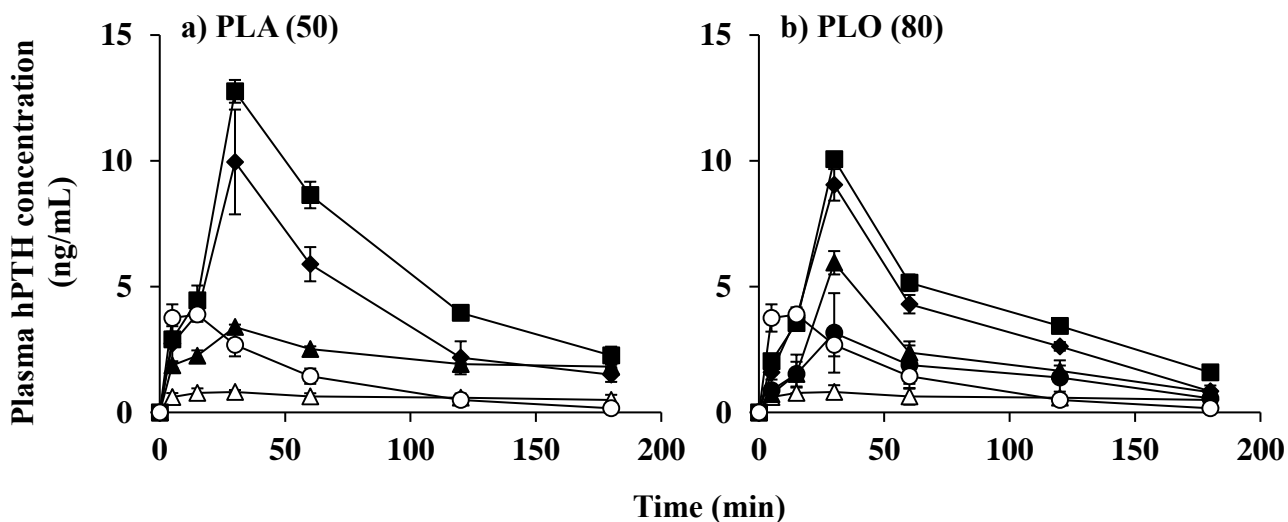
$A$ (ng/mL)	$77.69 \pm 6.91$	$k_{21}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.017 \pm 0.002$
$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.107 \pm 0.012$	$k_{10}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.072 \pm 0.008$
$t_{1/2\alpha}$ (min)	$6.720 \pm 0.677$	$k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.030 \pm 0.006$
$B$ (ng/mL)	$4.711 \pm 0.611$	$V_1$ (mL)	$34.31 \pm 2.28$
$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.011 \pm 0.001$	$V_2$ (mL)	$60.57 \pm 10.42$
$t_{1/2\beta}$ (min)	$63.24 \pm 5.26$	$Vd_{ss}$ (mL)	$94.87 \pm 12.19$
		$CL_{tot}$ (mL/min)	$2.424 \pm 0.239$

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

### 1-2-3-2 hPTH 麻酔下経鼻投与後の血中動態に対する PLA 及び PLO の効果、並びに皮下投与との比較

hPTH 経鼻投与後の血中動態に対する PLA (50) 及び PLO (80) の適用濃度の影響を動態学的に評価した。また、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査するため、hPTH 皮下投与後の動態学的パラメータと比較した。Figure 5 にラットに hPTH を皮下投与、及び種々濃度の PLA (50) 又は PLO (80) と共に hPTH を経鼻投与した後の血漿中 hPTH 濃度推移を、Table 4 に得られた hPTH の動態学的パラメータを示す。

皮下投与群は投与直後に素早く血漿中 hPTH 濃度が上昇し、その後速やかに消失する一過的な推移を示した (Fig. 5)。また、経鼻投与群と比較して、皮下投与群の  $T_{max\text{hPTH}}$  は約 13 分と早かった (Table 4)。hPTH 単独の経鼻投与 (control) は、投与後 180 分まで血漿中 hPTH 濃度はほとんど上昇せず、持続的な推移を示した。また、経鼻投与の control における  $C_{max\text{hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  は皮下投与と比較してそれぞれ約 0.33 及び 0.56 倍と低い値を示した。一方、PLA (50) 及び PLO (80) はいずれの適用濃度においても血漿中 hPTH 濃度を上昇させ、 $C_{max\text{hPTH}}$  及び  $AUC_{\text{hPTH}}$  は control 群と比較して有意に高い値を示した (Dunnett's test,  $p < 0.05$ )。ま



**Fig. 5 Plasma hPTH concentrations after *s.c.* and *i.n.* administrations in anesthetized rats.**

○: *s.c.*, △: *i.n.* control (hPTH alone), ●: *i.n.* with 0.1% PLO (80),  
▲: *i.n.* with 0.25% PLA (50) or PLO (80), ◆: *i.n.* with 0.5% PLA (50) or PLO (80),  
■: *i.n.* with 1.0% PLA (50) or PLO (80).

The results were expressed as the mean ± S.E. (n=3-6).

**Table 4 Pharmacokinetic parameters of hPTH after *i.v.*, *s.c.* and *i.n.* administrations in anesthetized rats.**

Route	Dose (µg/kg)	Enhancer	$C_{max \text{ hPTH}}$ (ng/mL)	$T_{max \text{ hPTH}}$ (min)	$AUC_{\text{hPTH}}$ (ng·min/mL)	$MRT_{\text{hPTH}}$ (min)	$F_{\text{hPTH}}^a$ (%)	$AR_{max \text{ hPTH}}$ (ng/min)	
<i>i.v.</i>	14.1	-	-	-	1173 ± 77	26.0 ± 2.5	-	-	
<i>s.c.</i>	14.1	-	4.3 ± 0.4*	13 ± 3	237 ± 41*	43.4 ± 4.0	20.2	-	
<i>i.n.</i>	14.1	None (control)	1.3 ± 0.1	30 ± 0	154 ± 0	78.4 ± 0.1	13.1	4.7	
		PLA (50)							
		0.25%	3.4 ± 0.1*	30 ± 0	401 ± 13*	57.0 ± 0.3	34.2	14.1	
		0.5%	10.4 ± 1.6**	30 ± 0	736 ± 42**	63.7 ± 5.4	62.7	35.3	
		1.0%	12.8 ± 0.5**	30 ± 0	1058 ± 33**	69.5 ± 0.3	90.2	37.9	
		PLO (80)							
		0.1%	3.2 ± 0.8*	30 ± 0	281 ± 70*	70.9 ± 2.6	24.0	11.1	
		0.25%	6.4 ± 0.5**	30 ± 0	423 ± 35*	72.6 ± 4.2	36.1	21.4	
		0.5%	9.0 ± 0.6**	30 ± 0	639 ± 45**	65.6 ± 0.5	54.4	36.1	
		1.0%	10.6 ± 0.5**	30 ± 0	790 ± 16**	69.6 ± 1.5	67.3	36.9	

The results were expressed as the mean or mean ± S.E. (n=3-6).

$^a F_{\text{hPTH}} (\%) = (AUC_{i.n. \text{ or } s.c.} / AUC_{i.v.}) \times 100.$

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with *i.n.* control.

た、PLA (50) 及び PLO (80) 適用濃度依存的に  $C_{max \text{ hPTH}}$ 、 $AUC_{\text{hPTH}}$  及び  $AR_{max \text{ hPTH}}$  が増大した。ポリカチオン性吸収促進剤併用群の中で、1.0% PLA (50) 併用群の  $C_{max \text{ hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  が最も高く、皮下投与群と比較してそれぞれ約 3.0 及び 4.5 倍高い値を示した。また、0.25% PLA (50) 併用群を除き、PLA (50) 及び PLO (80) 併用群は皮下投与に類似した一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇及び速やかな消失を示した。0.25% PLA (50) 併用群はその他吸収促進剤併用群と同様に投与後 30 分まで血漿中 hPTH が上昇したが、その後投与後 180 分まで血漿中 hPTH 濃度がほとんど減少せず、持続的な推移を示した。全ての経鼻投与群の  $T_{max \text{ hPTH}}$  及び  $MRT_{\text{hPTH}}$  はそれぞれ約 30 及び 60 分であり、PLA (50) 及び PLO (80) 適用の影響は認められなかった (Dunnett's test,  $p > 0.05$ )。  $MRT_{\text{hPTH}}$  の比較において、皮下投与群では約 43.4 分であったが、最大の  $F_{\text{hPTH}}$  を示した 1.0% PLA (50) 併用群では約 69.5 分であり、皮下投与と比較して経鼻投与後の血漿中 hPTH 濃度推移は持続する傾向を示した。

## 第4節 考察

タンパク質性医薬品である hPTH 皮下投与製剤の薬価は 1 日当たり約 2000 円と他の骨粗鬆症治療薬に比べて高いことに加え (BPs : 1 日当たり約 50 円、SERMs : 1 日当たり約 120 円)、粘膜を介した透過性が低い。また、緒言で述べたように hPTH の骨に対する作用はその血中動態に左右されることが知られているが<sup>7-10)</sup>、現在に至るまで hPTH が骨同化作用を示す最適な血中動態に関する報告はほとんどない。これらの要因が経鼻投与製剤を含む hPTH の Drug Delivery System (DDS) 製剤の開発を困難にさせていると考えられる。しかしながら、hPTH の血中動態とその薬理効果の関係に関する研究の蓄積により、hPTH が効率的な骨同化作用を示し得る血中動態がある程度推測でき、製剤開発に繋がると期待できる。

ラット及びヒトにおける hPTH 皮下投与は、投与後速やかに血中濃度が上昇し、その後消失する一過的な推移を示し、投与量依存的に骨密度を増加させる<sup>5,6)</sup>。一方、ラット又はヒトの静脈内及び皮下に hPTH を持続的に投与した場合、投与量に関係なく血中カルシウム濃度の上昇並びに骨密度の低下をもたらす<sup>7,48,49,50)</sup>。これらの知見は、hPTH が骨同化作用を示すうえで、血中 hPTH 濃度が上昇することだけでなく、 $C_{max\ hPTH}$  に到達した後に減少することが重要である可能性を示唆している。

Dobnig らは、異なる投与持続時間で hPTH をラットに皮下投与し、投与開始後 1 週間の骨組織に与える影響を解析した<sup>7)</sup>。その結果、1 日 1 回 1 時間 hPTH を持続的に皮下投与した群は、1 日 1 回急速単回皮下投与した群と同等以上の骨同化作用を示した。一方、1 日 1 回 2 時間 hPTH を持続的に皮下投与した群は溶媒投与群と同等の骨量であり、骨同化作用を示さなかった。近年、Shimizu らは、シリンジポンプを用いて異なる投与持続時間でラット大腿静脈に留置したカテーテルを介して hPTH を静脈内投与し、Dobnig らが得た結果と同様に 1 日 1 時間投与した群において骨同化作用を示したことを報告している<sup>10)</sup>。Frolik らは、1 日当たりの hPTH 総投与量が同じとなるよう異なる投与間隔でラット皮下に投与し、骨密度が増加した群において血中 hPTH 濃度が基礎濃度 (rat intact PTH : 10-60 pg/mL) まで低下するために要した時間は 3 時間以内であったことを報告した<sup>8)</sup>。これらの知見は、hPTH の投与により血中濃度が上昇した後に基礎濃度まで低下する時間が hPTH の骨に対する作



用を決定し、その時間はより短いことが骨同化作用を発揮するうえで重要であることを示唆している。

しかしながら、上述したヒトへの hPTH の持続投与実験において、投与中止直後から血中骨形成マーカー濃度が投与前以上に増大したことが報告されている<sup>50)</sup>。また、Etoh らは、ラットに週 1 回 24 時間 hPTH を持続的に皮下投与した後に 6 日間休薬することで、週 1 回又は 3 回単回皮下投与に比べて高い骨同化作用が得られたことを報告している<sup>49)</sup>。一方、Kostenuik らは、PTH と IgG-Fc 領域の融合タンパクである (PTH-Fc) を創製し、その薬効を intact PTH と比較した<sup>51)</sup>。PTH-Fc は intact PTH と同等の PTH 受容体の活性化能を有するが、その血中濃度は intact PTH に比べ高濃度のまま約 30 倍の長さで持続的に推移した。興味深いことに、PTH-Fc の週 1 回又は 2 回投与は投与量依存的な骨量増加作用が認められ、intact PTH の連日皮下投与よりその作用は強力であった。これらの知見は、高濃度の血中 hPTH 濃度が持続した場合でも、投与間隔を拡げて休薬時間を延長することで hPTH の骨同化作用が得られることを示唆している。従って、血中 hPTH 濃度の高さ ( $C_{max\ hPTH}$ )、血中 hPTH 濃度が高く維持している時間 ( $MRT_{hPTH}$ ) 及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が hPTH の骨同化作用を発揮及び最大化させるために重要であると考えられる。

以上のことを踏まえ、本章では hPTH の *in vivo* 経鼻吸収に対する種々濃度の PLA (50) 及び PLO (80) の促進効果を動態学的に評価し、hPTH 皮下投与後の動態学的パラメータと比較することで hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査した。hPTH の皮下投与は、投与直後に素早く血漿中濃度が上昇し、その後速やかに消失する一過的な推移を示した。これは既に骨粗鬆症治療薬として使用されているフォルテオ® やテリボン® におけるヒト皮下投与後の血漿中濃度推移の傾向と一致する<sup>5,6)</sup>。hPTH 単独の経鼻投与は皮下投与に比べ  $F_{hPTH}$  が約半分程度と低いことに加え、一過的な血漿中濃度の上昇及び速やかな消失が認められなかったことから、hPTH 単独の経鼻投与は骨形成亢進作用を得るには不適切であると考えられた。一方、PLA (50) 及び PLO (80) の併用は適用濃度依存的に hPTH の経鼻吸収を促進し、いずれの適用濃度においても皮下投与と同等以上の  $C_{max\ hPTH}$  及び  $F_{hPTH}$  を示した。最大の  $F_{hPTH}$  を示した 1.0% PLA (50) を併用した経鼻投与は、皮下投与のそれに比べ約 4.5 倍高い値であ

ったことから、PLA(50) 又は PLO(80) を併用した経鼻投与は皮下投与に比べ hPTH 投与量を最大 1/5 程度に削減できる可能性が示唆された。PLO 吸収促進に関するこれらの結果は、前章で得られた FD-4 経鼻投与における吸収促進の結果と同様の傾向を示した。また、一部を除き、PLA(50) 又は PLO(80) を併用した経鼻投与は、皮下投与に類似した一過的な血漿中濃度の上昇を示したことから、皮下投与と同等以上の骨同化作用が期待される。しかしながら、 $MRT_{hPTH}$  において、hPTH の経鼻投与は皮下投与に比べ高い値を示し、皮下投与より血漿中 hPTH 濃度推移が持続する傾向を示した。上述したように hPTH が骨同化作用を示すためには、血中 hPTH 濃度の高さ ( $C_{max\ hPTH}$ )、血中 hPTH 濃度が高く維持している時間 ( $MRT_{hPTH}$ )、及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が重要である。そのため、PLA(50) 又は PLO(80) を併用した hPTH の経鼻投与においては、投与間隔を適切に調節することが骨同化作用を得るために重要であると考えられた。以上、PLA(50) 又は PLO(80) を併用した hPTH 経鼻投与製剤は、皮下注射製剤に代わる新規デリバリーシステムとなる可能性が示された。

本章では、PLA 及び PLO の水溶性高分子薬物に対する *in vivo* 経鼻吸収促進効果を評価するため、経鼻投与した薬液が食道側へ流出しないように鼻腔内を閉鎖した麻酔下ラットを用いた。しかし、hPTH の薬理試験を実施する際、長期間 hPTH を覚醒状態のラットに投与する必要があり、長期間ラット鼻腔内を閉鎖することは困難であることから、鼻腔内を閉鎖しない覚醒状態のラットを用いて hPTH 経鼻投与後の血中動態を評価する必要性が考えられた。鼻腔内を閉鎖しないラットにおいて、緒言で述べた mucociliary clearance や pharynx clearance といった鼻腔内における薬物の除去機構が hPTH 経鼻投与後の血中動態と、それに基づく薬理作用に影響することが予想される<sup>53)</sup>。そこで、第 2 編ではポリカチオン性吸収促進剤として PLO を選択し、更に上記薬物の除去機構をコントロールできる粘膜付着性物質として医薬品添加物等に使用される polyethylene glycol (PEG) を用いて、PLO 併用下における hPTH の経鼻吸収性に対する PEG の影響について論述する。

## 第2編 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

### 第1章 モデル水溶性高分子薬物の経鼻吸収に対するPLOとPEGの併用効果

#### 第1節 小緒言

PLAやPLOをはじめとする塩基性アミノ酸のホモポリマーは、緒言で述べたように傷害性を示すことなく、水溶性高分子薬物の鼻粘膜透過性を増大させる<sup>24-27,32,33</sup>。また、第1編において、PLA(50)又はPLO(80)を併用した経鼻投与はhPTHの経鼻吸収を増大させ、皮下投与に類似した一過的な血漿中濃度の上昇及び速やかな消失が得られたことから、皮下注射製剤に代わる有用なhPTH経鼻投与製剤となる可能性を示した。しかしながら、第1編では水溶性高分子薬物に対するPLA(50)及びPLO(80)の*in vivo*経鼻吸収促進効果を評価するため、鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出しないよう鼻腔内を閉鎖し、且つ麻酔したラットを用いたが、hPTHの薬理試験を実施する際に長期間hPTHを覚醒状態のラットに投与する必要があり、ラット鼻腔内を閉鎖する実験は長期間の実施には不適合である。また、薬物の血中動態は麻酔条件により大きく影響を受けることが報告されていることから<sup>52</sup>、鼻腔内を閉鎖しない覚醒状態のラットを用いてhPTHの血中動態も評価する必要がある。しかし、それらを考慮した実験法においては、PLAやPLOの溶液は粘性がなく鼻粘膜に対する付着滞留性が低いため<sup>32</sup>、鼻腔内に投与した薬液が鼻粘膜上皮の微絨毛によるmucociliary clearance並びに鼻腔構造に伴う咽頭側への物理的除去機構(Pharynx clearance)により、鼻腔から咽頭側(食道側)に流出し、hPTHの経鼻吸収性に影響を与えることが予想される<sup>53</sup>。そのため、上記薬物の除去機構による影響を回避できる製剤学的工夫が必要である。

一般に、経鼻投与製剤の吸収部位である鼻粘膜への付着滞留性を改善させる手法として、セルロース誘導體、starch、刺激又は環境応答性ゲル化剤などの粘性あるいは粘膜付着性を有する様々な高分子添加剤が広く利用されている<sup>54-57</sup>。Irieらは、生体付着性物質の*in vivo*鼻粘膜滞留性評価モデルを確立し、粘性物質を用いた経鼻投与製剤が吸収部位への標的化及び薬物放出を制御できること、並びに経鼻吸収の改善には鼻粘膜付着滞留性を示す適度な粘

性が重要であることを明らかにしている<sup>34)</sup>。Kawashima らは、吸収促進剤の PLA に加えて粘性物質の PVP をラット鼻腔内に併用投与することで、組換えヒト成長ホルモン (rhGH) の経鼻吸収性を制御できることを示した<sup>35)</sup>。以上の知見を踏まえ、PLA や PLO といったポリカチオン吸収促進剤に加えて、粘性あるいは粘膜付着性物質を用いることで、hPTH の鼻粘膜透過性及び鼻粘膜滞留性を制御した有用な経鼻投与製剤になると考えられる。

Polyethylene glycol (PEG) は医薬品添加物として汎用されており、安全性に優れていることが知られている。また、直鎖 PEG 分子を有する基剤は PEG 鎖が粘膜と相互作用することで粘膜付着性を示すことが報告されている<sup>58)</sup>。そこで第 2 編では、吸収促進剤として PLO を選択し、PLO 併用下における hPTH の経鼻吸収性に対する PEG の影響を評価した。すなわち、第 1 章では hPTH の代替として同等の分子量を有するモデル水溶性高分子薬物の FD-4 を、第 2 章では hPTH を、それぞれ経鼻投与したときの血中動態に対する PLO 及び PEG の影響を評価した。

## 第2節 実験方法

### 2-1-2-1 試薬

Polyethylene glycol (PEG, 10 kDa) を日油株式会社（東京）から購入した。Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, 4.0 kDa)、poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (20) : 18.5 kDa, PLO (80) : 78 kDa) 及び urethane は 1-1-2-1 と同様のものを、その他の試薬は全て特級品を使用した。

### 2-1-2-2 実験動物

1-1-2-2 と同様の実験動物を使用した。なお、本研究におけるラットを用いたすべての実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認（承認番号: H27083, H28018, H29023）を得てから実施した。

### 2-1-2-3 粘度の測定

付属のロータ（0.8°×R24）を装着したコーンプレート型回転粘度計（RE-215L, 東機産業株式会社, 東京）に生理食塩液、1 又は 5% PEG 含有生理食塩液を 0.6 mL 注入し、回転数を連続的に変化させて（0→100→0 rpm, 34°C, MODE : SLOPE, RANGE : LOW, UPTIME : 10 分, DOWNTIME : 10 分）流動曲線を得た。得られた流動曲線の回帰直線から、各溶液の粘度及び降伏値を算出した。

### 2-1-2-4 粘膜接触表面積の測定

ラット鼻粘膜では十分な面積が確保できないことから、ラット小腸粘膜を実験に用いた。1-1-2-3 と同様の方法でラットを麻酔し、リン酸塩緩衝生理食塩液（pH 7.4, PBS）で心灌流した後の小腸を切除した。注射筒を用いて小腸内をリンゲル液で洗浄した後、約 1.5 cm ずつ輪切りにし縦方向に切開した。更にリンゲル液で洗浄後、同液を湿潤させた濾紙の上に小腸切片を広げ、四方を虫ピンで固定した。小腸表面の余分なリンゲル液を除去した後、マイクロピペッターを用いて FD-4 生理食塩液溶液、0.1 又は 0.5% PLO (20) 含有 FD-4 生理食塩

液溶液、0.1% PLO (20) 及び 1% PEG 含有 FD-4 生理食塩液溶液並びに 0.5% PLO (20) 及び 5% PEG 含有 FD-4 生理食塩液溶液 (FD-4 濃度 : 165 mg/mL) を 7.5  $\mu$ L 滴下した。滴下後 60 秒までの所定の時間に小腸切片上の溶液を撮影し、Image J version 1.8.0 for Windows (画像解析フリーソフト, <https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて溶液の広がった面積を接触表面積として算出した。

#### 2-1-2-5 FD-4 閉鎖系経鼻 (*i.n.*) 投与実験 (Closed system)

1-1-2-3 と同様の方法でラットを麻酔し、仰臥位固定した。1-1-2-4 と同様の方法で気道及び食道に外科的処置を施した後、左右の頸静脈を露出した。その後、先端にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 長さ 4 cm, 株式会社 三商, 東京) を接続したマイクロシリンジを用いて、0.1 又は 0.5% PLO (PLO (20) 及び PLO (80)) 含有 FD-4 生理食塩液溶液、0.1% PLO (PLO (20) 及び PLO (80)) 及び 1% PEG 含有 FD-4 生理食塩液溶液並びに 0.5% PLO (PLO (20) 及び PLO (80)) 及び 5% PEG 含有 FD-4 生理食塩液溶液 (33 mg/kg, 0.4 mL/kg) を左鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与直後に、1-1-2-4 と同様の方法で鼻孔を塞ぐことで、鼻腔内を閉鎖した。その後、ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 540 分までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。また、FD-4 のみを含む生理食塩液を同様に投与した群を control 群とした。

#### 2-1-2-6 FD-4 開放系鼻腔内 (*i.n.*) 投与実験 (Open system)

1-1-2-3 と同様の方法で麻酔したラットを仰臥位固定し、1-1-2-4 と同様の方法でラット気道に外科的処置を施した。その後、投与した薬液が食道側に流出できるように先端を塞いでいないシリコンチューブ (シラスコン<sup>®</sup> 医療用チューブ SH No. 1, 株式会社カネカメディックス, 大阪) を食道側から鼻腔側に向けて挿入し、固定板を 30°、さらにラットの頭部を 30° に傾斜させた<sup>34,35)</sup>。その後、左右の頸静脈を露出し、先端にポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 長さ 4 cm) を接続したマイクロシリンジを用いて、2-1-2-5 と同様の種々添加剤含有 FD-4 生理食塩液溶液 (33 mg/kg, 0.4 mL/kg) を左鼻腔入口から 8 mm の

ところに投与した。投与後、ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 540 分までの所定の時間に、右頸静脈より血液 0.15 mL を採取した。また、FD-4 のみを含む生理食塩液を同様に投与した群を control 群とした。

#### 2-1-2-7 血漿採取

2-1-2-5 及び 2-1-2-6 で得られた血液を 1-1-2-5 と同様の方法で遠心分離し、血漿を得た。

#### 2-1-2-8 血漿中 FD-4 濃度の測定

ホウ砂リン酸緩衝液 (0.2 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5) を用いて、2-1-2-7 で得られた血漿を 60 倍希釈した。その後、希釈したサンプル中の FD-4 の蛍光強度を 1-1-2-6 と同様の方法で測定し、血漿中 FD-4 濃度を算出した。

#### 2-1-2-9 動態学的解析

1-1-2-7 と同様の方法で FD-4 の種々動態学的パラメータを算出した。更に、開放系経鼻投与群の  $AUC_{FD-4}$  ( $AUC_{open}$ ) 及び閉鎖系経鼻投与群の  $AUC_{FD-4}$  ( $AUC_{closed}$ ) から、(1) 式を用いて滞留性改善率 ( $F_{o/c}$ ) を求めた。

$$F_{o/c} = \frac{AUC_{open}}{AUC_{closed}} \times 100 \quad \cdots (1)$$

#### 2-1-2-10 統計解析

データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。PEG 併用経鼻投与群と PEG 非併用経鼻投与群間の動態学的パラメータの分散を一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析した後、Student's *t*-test を用いて解析した。また、経鼻投与溶液の接触表面積の比較には Tukey-Kramer 法を用いて解析した。なお、全ての統計解析は R software (version 3.5.1 for Windows; <https://www.R-project.org/>) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計的有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 2-1-3-1 経鼻投与溶液の物理化学的性質に対する PEG 添加の影響

PEG 含有生理食塩液の粘性及び粘膜接触表面積を評価した。Figure 6 に生理食塩液及び種々濃度の PEG 含有生理食塩液の流動曲線を、Table 5 に流動曲線の回帰直線から得られた生理食塩液及び種々濃度の PEG 含有生理食塩液の粘度を示す。

いずれの PEG 濃度においても、ずり応力とずり速度の間には原点を通る直線関係があり、流動曲線の回帰直線より降伏値 (0.02 mPa 以下) はいずれもほとんど認められず、ほぼニュートン流動特性を示した (Fig. 6 and Table 5)。また、溶液の粘度は PEG 濃度に依存して増大し、生理食塩液の粘度に比べ、1 及び 5% PEG 溶液でそれぞれ約 1.3 及び 2.7 倍増大した。

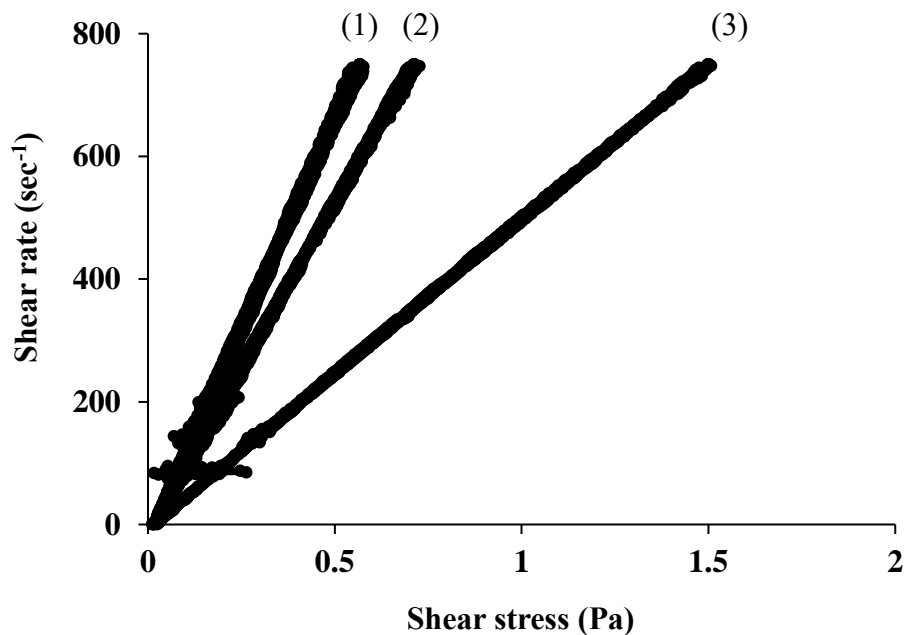


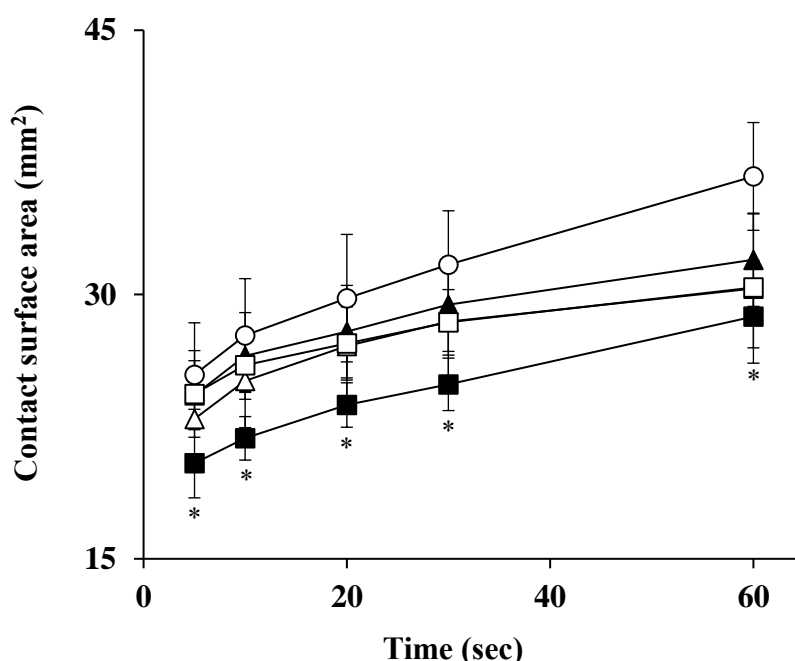
Fig. 6 Rheogram of the various solutions.  
(1) Saline, (2) 1% PEG, (3) 5% PEG

Table 5 Viscosity properties of the various solutions.

Solution	Viscosity (mPa · s)
Saline	0.73
1% PEG	0.93
5% PEG	1.98



Figure 7 に FD-4 生理食塩液溶液、異なる濃度で PLO (20) や PEG を含有させた FD-4 生理食塩液溶液を小腸切片に滴下した後の接触表面積の経時変化を示す。いずれの溶液も時間の経過に伴い僅かに接触表面積は増大し、その速度は PLO (20) 又は PEG の含有による影響が認められなかった (Tukey Kramer's test,  $p > 0.05$ )。また、いずれの時点においても、種々濃度の PLO (20) や PEG を含有させた溶液の接触表面積は、FD-4 生理食塩液溶液と比較して僅かに低く、一部を除き各溶液間で有意な差が認められなかった (Tukey Kramer's test,  $p > 0.05$ )。0.5% PLO (20) 及び 5% PEG 含有溶液の粘膜接触表面積においては、滴下 5 秒後から 60 秒後に至るまで、FD-4 生理食塩液溶液と比較して有意に低い値が観察されたが (Tukey Kramer's test,  $p < 0.05$ )、いずれの時点でも 0.5% PLO (20) 含有溶液のそれと有意な差が認められなかった (Tukey Kramer's test,  $p > 0.05$ )。従って、PEG の添加の有無による粘膜接触表面積に対してほとんど影響しないことが示された。しかし、PEG の添加による接触表面積の僅かな変化が水溶性高分子薬物の経鼻吸収性に影響する可能性を考慮し、次の *in vivo* 投与実験で評価した。



**Fig. 7 Contact surface area between mucous membrane and the various solutions.**

○: Only FD-4, △: 0.1% PLO (20), ▲: 0.1% PLO (20) and 1% PEG,

□: 0.5% PLO (20), ■: 0.5% PLO (20) and 5% PEG

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3-6).

\* $p < 0.05$  compared with only FD-4 solution (Tukey-Kramer).

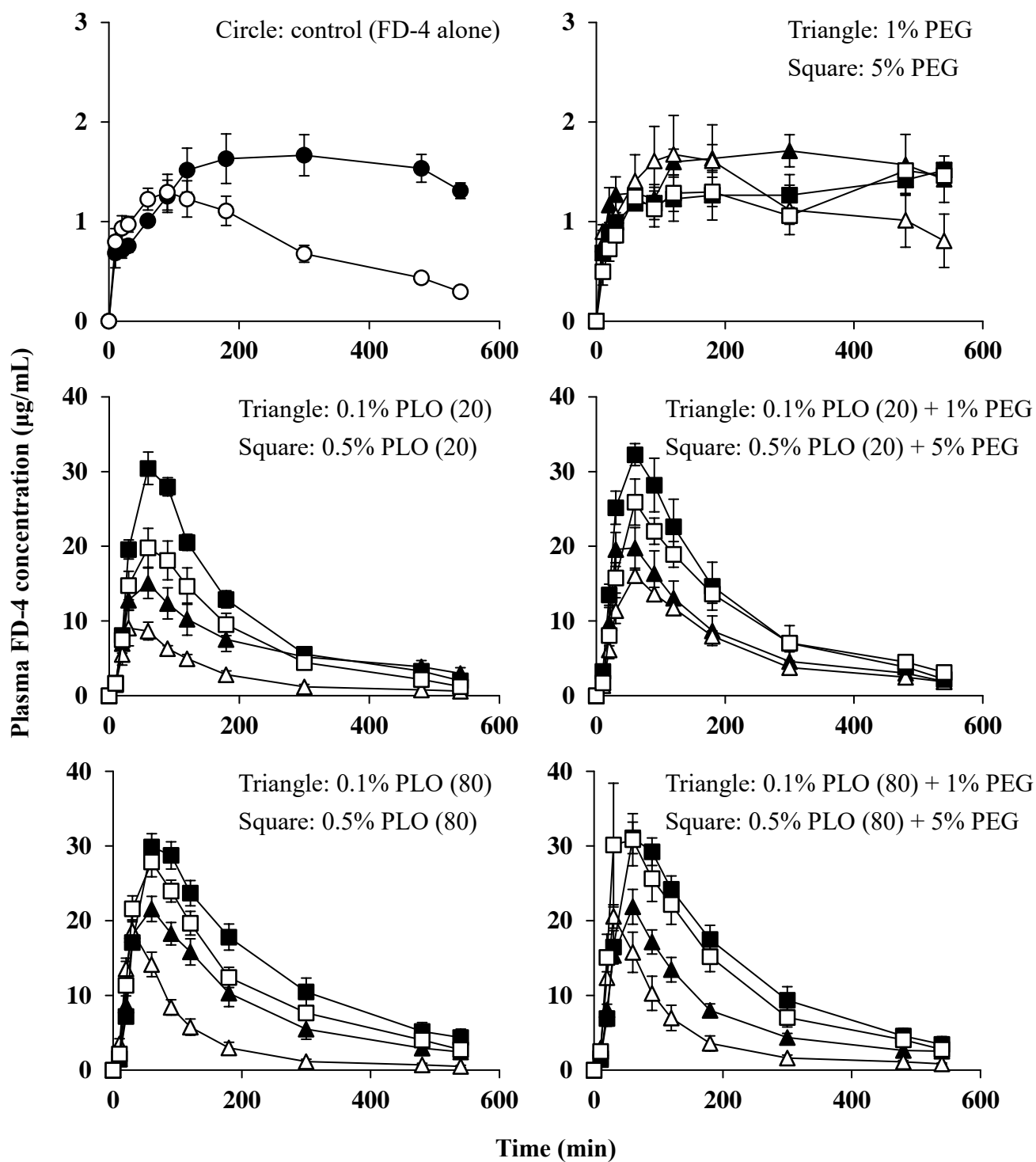
### 2-1-3-3 FD-4 経鼻投与後の血中動態に対する PLO 及び PEG の影響

鼻腔に投与した薬液が食道側へ流出しない閉鎖系 (Closed system) と流出できる開放系 (Open system) となるようにそれぞれ外科的処置したラットに、FD-4 を経鼻投与したときの PLO 及び PEG の効果を動態学的に評価した。Figure 8 に種々条件で FD-4 を経鼻投与した後の血漿中濃度推移を、Table 6 に得られた FD-4 の動態学的パラメータを示す。

鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出しない閉鎖系において、FD-4 単独の経鼻投与群 (control 群) と PEG 併用群の血漿中 FD-4 濃度推移及び FD-4 の動態学的パラメータに差はほとんど認められなかった (Fig. 8 and Table 6, Students's *t*-test,  $p > 0.05$ )。すなわち、閉鎖系条件下において、FD-4 の経鼻吸収に対する PEG の影響はほとんどないことが示唆された。いずれの分子量の PLO 併用群においても同様の傾向が認められ、PLO 単独併用群と PLO 及び PEG 併用群における FD-4 の動態学的パラメータはほぼ同等な値を示した (Students's *t*-test,  $p > 0.05$ )。すなわち、閉鎖系条件下において、PEG の併用は PLO の FD-4 経鼻吸収促進効果に対してほとんど影響しないことが示唆された。

鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出できる開放系において、全ての条件で閉鎖系と比較して血漿中 FD-4 濃度は低く推移し、 $C_{max\text{ FD-4}}$  及び  $AUC_{\text{FD-4}}$  は低い値を示したことから、鼻腔内から食道側への薬液の流出が示唆された (Fig. 8 and Table 6)。特に開放系における FD-4 単独の経鼻投与 (control) の  $AUC_{\text{FD-4}}$  は閉鎖系に比べて顕著に低く、閉鎖系の 50% 程度であった。また、0.5% PLO (80) 単独併用群を除き、PEG 非併用群における開放系の  $AUC_{\text{FD-4}}$  は閉鎖系に比べ有意に低い値を示した (Students's *t*-test,  $p < 0.05$ )。一方、PEG 単独併用群において、開放系の血漿中 FD-4 濃度推移は閉鎖系と近似し、閉鎖系及び開放系により得られた  $AUC_{\text{FD-4}}$  の比である滞留性改善率 ( $F_{o/c}$ ) は control 群と比較して高い値を示した。また、5% PEG 単独併用群の  $F_{o/c}$  は 93.3% であり、1% PEG 単独併用群の 81.3% より高かった。PLO 併用群においても同様の傾向が認められ、PEG の更なる併用は開放系の血漿中 FD-4 濃度推移を閉鎖系のそれに近似させ、開放系による  $AUC_{\text{FD-4}}$  の低下を抑えることで  $F_{o/c}$  を増大させた。また、0.1% PLO (80) 及び 1% PEG 併用群を除き、PEG を併用した同一条件において閉鎖及び開放系の  $C_{max\text{ FD-4}}$  間及び  $AUC_{\text{FD-4}}$  間に有意な差は認められなかった (Students's *t*-

test,  $p > 0.05$ )。いずれの分子量の PLO においても、1% PEG 併用群に比べ 5% PEG 併用群の  $F_{0/c}$  は高く、その中でも 0.5% PLO (80) 及び 5% PEG 併用群の  $F_{0/c}$  は 92.4% と高い値を示した。これらの結果は PEG の併用が薬液の鼻腔内から食道側への流出を抑制したことを示唆した。開放系における PEG 非併用群の  $MRT_{FD-4}$  は閉鎖系のそれと比較して低下傾向であったが、PEG 併用群の  $MRT_{FD-4}$  は閉鎖及び開放系の間に大きな差は認められなかった (Students's  $t$ -test,  $p > 0.05$ )。PLO (20) 単独併用群において、0.5% 併用群の  $F_{0/c}$  は 70.3% であり、0.1% 併用群の 40.7% より高い値を示した。PLO (80) 単独併用群においても同様の傾向が認められ、PLO 適用濃度の増加に伴い  $F_{0/c}$  は増大した。



**Fig. 8** Effects of PLO and PEG on the plasma FD-4 concentration after *i.n.* administration under closed and open systems in rats.

Closed symbol: Closed system, Open symbol: Open system

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3-6).

**Table 6 Pharmacokinetic parameters of FD-4 after *i.n.* co-administration with PLO and PEG under closed and open systems in rats.**

Additive agent	$C_{max \text{ FD-4}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$T_{max \text{ FD-4}}$ (min)	$AUC_{\text{FD-4}}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ )	$MRT_{\text{FD-4}}$ (min)	$F_{\text{FD-4}}^a$ (%)	$F_{o/c}^b$ (%)
<b>Closed system</b>						
None (control)	1.9 ± 0.3	252 ± 48	796 ± 92	288 ± 3	6.5	—
1% PEG	2.0 ± 0.2	255 ± 86	804 ± 69	277 ± 11	6.5	—
5% PEG	1.7 ± 0.1	450 ± 52	697 ± 39	289 ± 6	5.7	—
<b>PLO (20)</b>						
0.1% PLO	15.3 ± 2.0	48 ± 7	3567 ± 492	201 ± 17	29.0	—
0.1% PLO + 1% PEG	21.0 ± 2.6	40 ± 6	3986 ± 786	162 ± 11	32.4	—
0.5% PLO	30.8 ± 2.1	70 ± 6	5507 ± 390	160 ± 8	44.8	—
0.5% PLO + 5% PEG	33.0 ± 1.9	70 ± 6	6259 ± 1073	153 ± 15	50.9	—
<b>PLO (80)</b>						
0.1% PLO	21.7 ± 1.7	54 ± 6	4472 ± 623	176 ± 10	36.3	—
0.1% PLO + 1% PEG	21.9 ± 2.3	59 ± 2	3857 ± 370	174 ± 11	31.3	—
0.5% PLO	30.0 ± 1.8	65 ± 5	7057 ± 708	193 ± 11	57.4	—
0.5% PLO + 5% PEG	31.1 ± 2.1	70 ± 6	6862 ± 736	185 ± 11	55.8	—
<b>Open system</b>						
None (control)	1.4 ± 0.2	98 ± 27	415 ± 41**	210 ± 5	3.4	52.1
1% PEG	1.8 ± 0.4	110 ± 33	654 ± 148	240 ± 9	5.3	81.3
5% PEG	1.6 ± 0.2	420 ± 92	651 ± 97	287 ± 5	5.3	93.3
<b>PLO (20)</b>						
0.1% PLO	10.0 ± 1.9	45 ± 9	1452 ± 153*	145 ± 18	11.8	40.7
0.1% PLO + 1% PEG	16.1 ± 0.7	61 ± 4	3299 ± 229	176 ± 15	26.8	82.8
0.5% PLO	19.9 ± 2.6**	65 ± 5	3905 ± 579*	162 ± 6	31.7	70.9
0.5% PLO + 5% PEG	25.9 ± 3.1	49 ± 4	5505 ± 462	186 ± 6	44.7	87.9
<b>PLO (80)</b>						
0.1% PLO	18.6 ± 1.5	33 ± 4	1993 ± 281*	113 ± 10	16.2	44.6
0.1% PLO + 1% PEG	20.6 ± 1.6	29 ± 1	2357 ± 398*	129 ± 5	19.2	61.1
0.5% PLO	27.9 ± 2.0	60 ± 0	5690 ± 440	176 ± 7	46.3	80.6
0.5% PLO + 5% PEG	34.4 ± 6.9	55 ± 7	6338 ± 911	166 ± 9	51.5	92.4

The results were expressed as the mean or mean ± S.E. (n=3-6).

$$^aF_{\text{FD-4}} (\%) = [AUC_{i.n.} / (AUC_{i.v.} \times 10)] \times 100.$$

$$^bF_{o/c} (\%) = (AUC_{\text{FD-4}} \text{ in open system} / AUC_{\text{FD-4}} \text{ in closed system}) \times 100.$$

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with the same concentration in closed system (Student's *t*-test).

#### 第4節 考察

鼻腔内に投与された薬物は、鼻粘膜上皮の微絨毛による mucociliary clearance 並びに鼻腔構造に伴う咽頭側への物理的除去機構（Pharynx clearance）により除去され、これらは薬物の経鼻吸収性に大きな影響を与える<sup>53)</sup>。また、ポリカチオン性吸収促進剤である PLA や PLO の溶液は粘性がほとんどなく鼻粘膜滞留性が低い。そのため、薬液が鼻腔内から食道側へ流出できる開放系において、薬液が鼻腔内から食道側へ流出できない閉鎖系で得られる程のポリカチオンの吸収促進効果が得られていない<sup>32)</sup>。そのため、鼻粘膜を介した薬物の吸収を期待する経鼻投与製剤の開発において、製剤の鼻粘膜に対する付着滞留性を高めることで、鼻粘膜滞留性を改善する試みが様々検討されている<sup>54-57)</sup>。しかしながら、粘膜吸収促進剤の併用下におけるペプチド及びタンパク質性医薬品の経鼻吸収性に対する鼻粘膜滞留性改善の効果に関する明確な知見はほとんどない。

そこで本章では、ポリカチオン性吸収促進剤である PLO を併用したモデル水溶性高分子薬物 FD-4 の経鼻投与において、粘膜付着性物質である PEG の添加による鼻粘膜滞留性の改善効果及び経鼻吸収促進作用に対する影響を評価した。Irie らの starch を用いた鼻粘膜付着効果に関する検討において、starch 濃度に依存して鼻粘膜滞留性は改善したが、高い粘性は粘膜接触表面積を減少させ、薬物の経鼻吸収性が低下したと報告している<sup>34)</sup>。従って、薬物の吸収に十分な接触表面積が得られ、鼻粘膜滞留性を向上させる適度な粘性を示す条件が経鼻投与製剤に重要であると考えられた。そのため、回転粘度計を用いて PEG 溶液の粘度を測定し、*in vivo* 経鼻投与実験に用いた PEG 含有あるいは非含有の投与溶液をラット小腸粘膜に滴下した後の接触表面積に対する PEG の影響を評価した。PEG 溶液の粘度は濃度依存的に増大した。また、PEG を添加した溶液は接触表面積が僅かに低下したが、PEG を添加していない溶液と有意な差は認められなかった。PEG の添加による接触表面積の僅かな変化が水溶性高分子薬物の経鼻吸収性に影響する可能性を考慮し、鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出しないよう鼻腔内を閉鎖した系（Closed system）を用いて、PLO 非併用又は併用下における FD-4 経鼻投与後の血中動態に対する PEG の影響を調査した。閉鎖系において、PLO 併用の有無に関わらず、PEG 併用群及び非併用群における FD-4 の動態学的パラメータ

に差はほとんど認められなかった。前述した粘膜接触表面積の結果と総合して、PEG の添加とそれに伴う接触表面積の僅かな低下は、FD-4 の経鼻吸収並びに PLO の FD-4 経鼻吸収促進作用に対してほとんど影響しないと考えられた。

鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出できるよう鼻腔内を閉鎖しない系 (Open system) において、全ての条件で閉鎖系と比較して血漿中 FD-4 濃度推移及び  $F_{FD-4}$  が低下した。特に、0.5% PLO (80) 単独併用群を除き、PEG 非併用群における開放系の  $AUC_{FD-4}$  は閉鎖系に比べ有意に低い値を示した。この低下は FD-4 等を含む薬液が鼻腔内から食道側へ流出したことによるものと考えられた。PEG 非併用群において、閉鎖系及び開放系により得られた  $AUC_{FD-4}$  の比である滞留性改善率 ( $F_{o/c}$ ) は、0.5% PLO 単独併用群を除いて約 50% 程度であったことから、 $F_{FD-4}$  は薬液の鼻腔内から食道側への流出により、吸収に寄与する FD-4 量あるいは吸収促進に関わる PLO 量が半分程度に低下したことが考えられた。PLO 単独併用群において、0.1% 併用群に比べ 0.5% 併用群の  $F_{o/c}$  は高い値を示した。第 1 編において PLO の適用濃度は吸収促進効果の強度及び持続性を決定づける要因であったことから、高濃度の PLO は開放系により鼻腔内から食道側へ流出するが、低濃度の PLO と比較して FD-4 の吸収促進効果を示すために十分な量の PLO が鼻腔内に残存したため、開放系による影響が小さかったと考えられた。

PEG 併用群において、開放系における血漿中 FD-4 濃度推移は閉鎖系と類似し、 $F_{o/c}$  は PEG 非併用群と比較して 80~90% と高い値を示した。また、0.1% PLO (80) 及び 1% PEG 併用群を除き、全ての PEG 併用群で閉鎖及び開放系の  $C_{max FD-4}$  間及び  $AUC_{FD-4}$  間に有意な差は認められなかった。加えて、5% PEG 併用群の  $F_{o/c}$  は 1% PEG 併用群に比べて高い値を示したことから、PEG の添加による投与溶液の粘性の増加が鼻粘膜滞留性を改善し、結果的に  $F_{FD-4}$  の改善に繋がったと考えられた。直鎖 PEG 分子を含有する基剤は PEG 鎖が粘膜と相互作用することで粘膜付着性を示すことが報告されていることから<sup>58)</sup>、PEG の添加による粘性の増加だけでなく、鼻腔内に投与された PEG が鼻粘膜と相互作用することで FD-4 及び PLO の鼻粘膜滞留性を改善した可能性も考えられた。

以上、本章では PLO 及び PEG を併用したシステムは、水溶性高分子薬物の鼻粘膜透過性

及び滞留性を改善できる有用性の高い経鼻送達システムとなり得ることが示された。次章では、鼻粘膜滞留性改善効果が最も高かった 5% PEG を選択し、覚醒状態のラットを用いて hPTH の経鼻吸収性に対する PLO 及び PEG の影響について論述する。



## 第2章 hPTHの経鼻吸収性に対する PLO と PEG の併用効果

### 第1節 小緒言

骨において、hPTHは骨形成及び骨吸収の両方を促進するが、どちらの作用が発揮されるかはhPTHの血中動態特性により決定される<sup>7-10)</sup>。一般に、持続的な血中hPTH濃度推移では骨吸収促進作用を示す一方で、一過的に血中hPTH濃度が上昇し、これが間欠的に生じたときは骨形成促進作用を示す。従って、hPTHの経鼻投与製剤の開発において、hPTHの血中動態を制御できる製剤学的工夫が必要である。

第1編において、ポリカチオン性吸収促進剤であるPLA(50)又はPLO(80)を併用した経鼻投与は、hPTHの経鼻吸収を改善し、皮下投与に類似した一過的な血漿中濃度の上昇及び速やかな消失が得られたことから、皮下注射製剤に代わる有用なhPTH経鼻投与製剤となる可能性を示した。しかしながら、第1編では上記のポリカチオン性吸収促進剤の経鼻吸収促進効果を評価するため、鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出しないよう鼻腔内を閉鎖し、且つ麻酔したラットを用いた。一方、ヒトへの臨床使用においては、hPTHをはじめとする薬物は覚醒状態で投与あるいは服用される。薬物の血中動態は麻酔条件により大きく影響を受けることから<sup>52)</sup>、鼻腔内を閉鎖しない覚醒状態のラットを用いてhPTHの血中動態を評価する必要があるが、PLAやPLOの溶液は鼻粘膜滞留性が低いため<sup>32)</sup>、mucociliary clearanceやpharynx clearanceといった薬物の除去機構による鼻腔から咽頭側への流出により、hPTHの吸収量が低下することが予想される<sup>53)</sup>。前章において、ポリカチオン性吸収促進剤であるPLOと粘膜付着性物質であるPEGを併用した経鼻投与は、hPTHと同等の分子量を有するモデル水溶性高分子薬物であるFD-4の鼻粘膜透過性及び滞留性を高め、経鼻吸収性を改善できることを見出した。従って、PLOとPEGを併用することで、鼻粘膜透過性及び滞留性の両方において機能する有用なhPTHの経鼻投与製剤になることが期待される。

hPTHに関する過去の知見から、血中hPTH濃度の高さ( $C_{max\ hPTH}$ )、血中hPTH濃度が高く維持している時間( $MRT_{hPTH}$ )、及び休薬時間(投与間隔)がhPTHの骨形成促進作用を発揮及び最大化させる重要な因子であると考えられる<sup>48-51)</sup>。しかしながら、現在に至るまでhPTHが骨形成促進作用を示す最適な血中動態特性に関する明確な情報は示されていない。

そのため、覚醒状態のラットにおいて、ポリカチオン性吸収促進剤(PLA(50) 及び PLO(80))のみを適用した hPTH の経鼻投与が結果として骨形成促進作用を示す可能性もあり、PEG の併用の必要性については慎重に議論する必要がある。また、吸収促進剤をはじめとした添加物を併用した hPTH の経鼻投与について報告されている知見はごく僅かであり<sup>45)</sup>、様々な添加物を併用して hPTH を経鼻投与したときの血中動態に関する新たな知見は、hPTH の経鼻投与製剤化において重要であると考えられる。

以上のことを踏まえ、本章では一時的な麻酔が可能なイソフルランを用いて、頸静脈カテーテルを挿入したラットに上記のポリカチオン性吸収促進剤 (PLA (50) 及び PLO (80)) や PEG と共に hPTH を経鼻投与し、その後鼻腔を閉鎖せずに薬液が鼻腔外に流出可能な覚醒状態で経時的に採血を行うことで、hPTH の血中動態に対するポリカチオン性吸収促進剤及び PEG の影響を調査した。また、第 1 編第 2 章で得られたウレタンで麻酔したラット鼻腔を外科的処置により閉鎖し、薬液が鼻腔から流出不可能な麻酔状態における結果と比較することで、麻酔の違い並びに鼻腔への外科的処置の有無による影響を評価した。更に、hPTH 皮下投与後の動態学的パラメータと比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を考察した。

## 第2節 実験方法

### 2-2-2-1 試薬

イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」をファイザー株式会社（東京）から購入した。Poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (80), 78 kDa) 及び polyethylene glycol (PEG, 10 kDa) は、それぞれ 1-1-2-1 及び 2-1-2-1 と同様のものを使用した。また、テリパラチド酢酸塩 (hPTH, 4.4 kDa) 原末、poly-L-arginine hydrochloride (PLA (50), 44.3 kDa)、aprotinin from bovine lung、ethylenediamine-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid disodium salt (EDTA・2NA) 及び High Sensitivity Human PTH (1-34) ELISA<sup>®</sup> kit は 1-2-2-1 と同様のものを、その他の試薬は全て特級品を使用した。

### 2-2-2-2 実験動物

1-2-2-2 と同様の実験動物を使用した。なお、本研究におけるラットを用いたすべての実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認（承認番号: H25015, H26016, H27015, H28016, H29021, JU18016）を得てから実施した。

### 2-2-2-3 hPTH 麻酔下静脈内 (*i.v.*) 投与実験

1-1-2-4 と同様の方法でラットを麻酔及び外科的処置を施し、仰臥位固定した。その後、1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしたマイクロシリンジを用いて、1-2-2-3 と同様の方法で左経静脈内に hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を投与し、採血を行った。

### 2-2-2-4 hPTH 麻酔下経鼻 (*i.n.*) 投与実験

1-1-2-4 と同様の方法でラットを麻酔及び外科的処置を施し、仰臥位固定した。その後、1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしたマイクロシリンジを用いて、1-2-2-4 と同様の方法で 0.5 及び 1.0% PLA (50) 又は PLO (80) を含有する hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を左鼻腔入口から 8 mm のところに投与し、採血を行った。投与直後に、1-1-2-4 と同様の方法で鼻孔を塞ぐことで、鼻腔内を閉鎖した。また、hPTH のみを含む生理食塩液を同様に投

与した群を control 群とした。

#### 2-2-2-5 hPTH 麻酔下皮下 (s.c.) 投与実験

1-1-2-4 と同様の方法でラットを麻酔及び外科的処置を施し、仰臥位固定した。その後、1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしたマイクロシリンジを用いて、1-2-2-5 と同様の方法で頸背部皮下に hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を投与し、採血を行った。

#### 2-2-2-6 頸静脈簡易カテーテル挿入術

注射針 (22 G) を切断し、針基に長さ約 40 cm のシリコンチューブ (シラスコン® 医療用チューブ SH No. 00, 株式会社カネカメディックス, 大阪) を接続した。接続部と反対側のチューブの先端から約 25 mm のところにポリエチレンチューブ (ヒビキ ポリエチレン細管 No.4, 長さ 1 mm, 株式会社 三商, 東京) を巻き付けストッパーとし、カテーテルを作製した。ラットをイソフルラン (麻酔導入 : 5.0%, 麻酔維持 : 1.5–2.0%, 流量 : 1.5–2.0 L/min) で吸入麻酔し、右頸静脈を露出した。頸静脈の一部を切開し、脱気した生理食塩液を満たしたカテーテルチューブを頸静脈から心臓側に向けて挿入した。ストッパーに縫合糸 (軟質絹製縫合糸, 夏目製作所, 東京) をかけ、頸静脈と共に縫合することでカテーテルを固定した。頸背部の表皮を切開後、皮下を通してカテーテルの反対側の末端を切開部から取り出し、注射筒に接続した。その後、頸静脈を露出させた切開部を縫合した。

#### 2-2-2-7 hPTH 覚醒下静脈内 (i.v.) 投与実験

2-2-2-6 の方法で頸静脈にカテーテルを挿入したラットをイソフルラン (麻酔導入 : 5.0%, 麻酔維持 : 1.5–2.0%, 流量 : 1.5–2.0 L/min) で一時的に麻酔し、仰臥位固定した。その後、1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしたマイクロシリンジを用いて、頸静脈カテーテルを介して hPTH 生理食塩液溶液 (14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg) を右頸静脈内に投与した。投与後、後述の経鼻投与実験と同様の生理的条件にするため、麻酔状態を 1 分間維持し、覚醒したラットをゲージに戻した。なお、投与後 5 分程度で麻酔からラットは覚醒した。その後、氷冷下で冷却

した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 180 分までの所定の時間に、カテーテルを介して血液 0.20 mL を採取した。

#### 2-2-2-8 hPTH 覚醒下経鼻 (*i.n.*) 投与実験

2-2-2-6 の方法で頸静脈にカテーテルを挿入し、2-2-2-4 と同様の方法で一時的に麻酔したラットを仰臥位固定した。その後、ポリエチレンチューブ（ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 長さ 4 cm）を接続したマイクロシリンジを用いて、0.5 又は 1.0% PLA (50) 含有 hPTH 生理食塩液溶液、0.5 又は 1.0% PLO (80) 含有 hPTH 生理食塩液溶液、0.5% PLO (80) 及び 5% PEG 含有 hPTH 生理食塩液溶液並びに 1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 含有 hPTH 生理食塩液溶液（14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg）を 1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしてから、左鼻腔入口から 8 mm のところに投与した。投与後、仰臥位を維持するために麻酔状態を 1 分間維持し、覚醒したラットをゲージに戻した。その後、氷冷下で冷却した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 180 分までの所定の時間に、カテーテルを介して血液 0.20 mL を採取した。また、hPTH のみを含む生理食塩液を同様に投与した群を control 群とした。

#### 2-2-2-9 hPTH 覚醒下皮下 (*s.c.*) 投与実験

2-2-2-6 の方法で頸静脈にカテーテルを挿入し、2-2-2-4 と同様の方法で一時的に麻酔したラットを仰臥位固定した。その後、先端に注射針（25 G）を連結したポリエチレンチューブ（ヒビキ ポリエチレン細管 No. 3, 長さ 4 cm）を接続したマイクロシリンジを用いて、hPTH 生理食塩液溶液（14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg）を 1-2-2-3 と同様の方法で共洗いしてから、頸背部皮下に投与した。投与後、上述の経鼻投与実験と同様の生理的条件にするため、麻酔状態を 1 分間維持し、覚醒したラットをゲージに戻した。その後、氷冷下で冷却した注射筒を用いて、投与直前及び投与後 180 分までの所定の時間に、カテーテルを介して血液 0.20 mL を採取した。

### 2-2-2-10 血液処理及び血漿採取

2-2-2-4、2-2-2-5 及び 2-2-2-6 で得られた血液を、1-2-2-6 と同様の方法で処理した後に血漿を採取し、後述の血漿中 hPTH 濃度の測定を行うまで-80°C で保存した。

### 2-2-2-11 血漿中 hPTH 濃度の測定

2-2-2-7 で得られた血漿中の hPTH 濃度を 1-2-2-7 と同様の方法で測定した。

### 2-2-2-12 動態学的解析

1-2-2-8 と同様の方法で hPTH の種々動態学的パラメータを算出した。更に、覚醒下投与群の  $AUC_{\text{hPTH}}$  ( $AUC_{\text{awaking}}$ ) 及び第 1 編第 2 章で得られた麻酔下投与群の  $AUC_{\text{hPTH}}$  ( $AUC_{\text{anesthetized}}$ ) から、(2) 式を用いて覚醒下影響率 ( $F_{\text{aw/an}}$ ) を求めた。

$$F_{\text{aw/an}} = \frac{AUC_{\text{awaking}}}{AUC_{\text{anesthetized}}} \times 100 \quad \dots (2)$$

### 2-2-2-13 統計解析

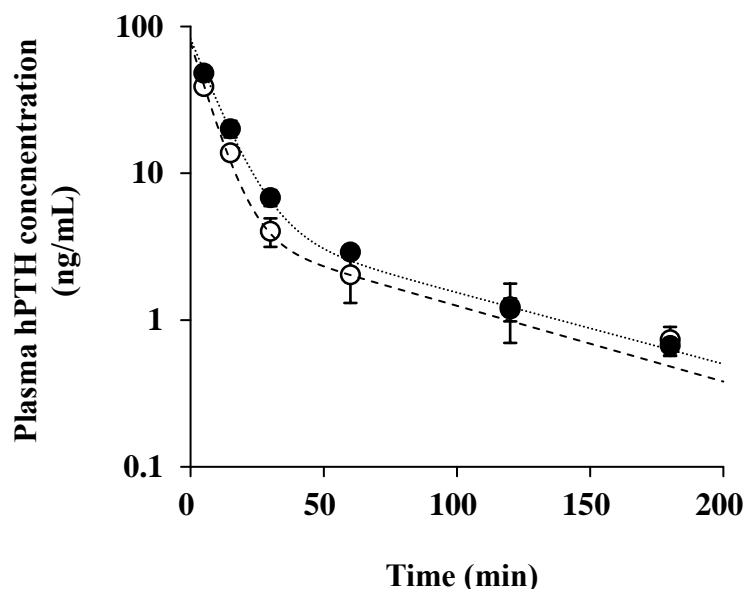
データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。各群間の動態学的パラメータの分散を一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析した後、control 群と PLA (50) 及び PLO (80) 併用経鼻投与群間の差を Dunnett の多重比較検定を用いて解析した。また、麻酔及び覚醒下投与で得られた動態学的パラメータの差を Student's *t*-test を用いて解析した。なお、全ての統計解析は R software (version 3.5.1 for Windows ; <https://www.R-project.org/>) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計的有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 2-2-3-1 hPTH 静脈内投与後の血中動態に及ぼす麻酔の違い並びに鼻腔への外科的処置の有無による影響

外科的処置により鼻腔内を閉鎖していない覚醒状態のラットに hPTH を静脈内及び皮下投与した後の血中動態を評価し、第1編第2章で得られた外科的処置により鼻腔内を閉鎖した麻酔状態における hPTH の動態学的パラメータと比較することで、hPTH 静脈内及び皮下投与後の血中動態に対する麻酔及び外科的処置の違いによる影響を調査した。Figure 9 に麻酔及び覚醒状態における静脈内投与後の血漿中 hPTH 濃度推移を、Table 7 に得られた hPTH の動態学的パラメータを示す。

覚醒状態において、静脈内投与後の血漿中 hPTH 濃度推移は麻酔状態で得られた結果と同様に二相性の消失パターンを示し、2-コンパートメントモデルで良好に表された (Fig. 9)。覚醒状態における静脈内投与後の血漿中 hPTH 濃度推移は、麻酔状態と比較して僅かに低い傾向を示したが、有意な差は認められなかった (Students's *t*-test,  $p > 0.05$ )。また、覚醒状態



**Fig. 9 Plasma hPTH concentrations after *i.v.* administration in anesthetized and awaking rats.**

Closed symbol: measured value in anesthetized rats

Open symbol: measured value in awaking rats

Dotted line: simulated line from 2-compartment model in anesthetized rats

Dashed line: simulated line from 2-compartment model in awaking rats

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3-5).

**Table 7 Pharmacokinetic parameters of hPTH calculated from plasma data after *i.v.* administration in anesthetized and awaking rats.**

	Anesthetized rat	Awaking rat
$A$ (ng/mL)	77.69 ± 6.91	73.93 ± 5.44
$\alpha$ (min <sup>-1</sup> )	0.107 ± 0.012	0.143 ± 0.012
$t_{1/2\alpha}$ (min)	6.720 ± 0.677	4.899 ± 0.378
$B$ (ng/mL)	4.711 ± 0.611	4.107 ± 1.269
$\beta$ (min <sup>-1</sup> )	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.002
$t_{1/2\beta}$ (min)	63.24 ± 5.26	60.53 ± 7.73
$k_{21}$ (min <sup>-1</sup> )	0.017 ± 0.002	0.019 ± 0.002
$k_{10}$ (min <sup>-1</sup> )	0.072 ± 0.008	0.089 ± 0.008
$k_{12}$ (min <sup>-1</sup> )	0.030 ± 0.006	0.047 ± 0.017
$V_1$ (mL)	34.31 ± 2.28	41.41 ± 2.93
$V_2$ (mL)	60.57 ± 10.42	98.02 ± 26.22
$Vd_{ss}$ (mL)	94.87 ± 12.19	139.43 ± 24.09
$CL_{tot}$ (mL/min)	2.424 ± 0.239	3.723 ± 0.558
$AUC_{hPTH}$ (ng·min/mL)	1173 ± 77	947 ± 135

The results were expressed as the mean ± S.E. (n=3-5).

において、コンパートメントモデル解析により得られた hPTH 静脈内投与における動態学的パラメータは麻酔状態とほぼ同等の値を示した (Table 7)。

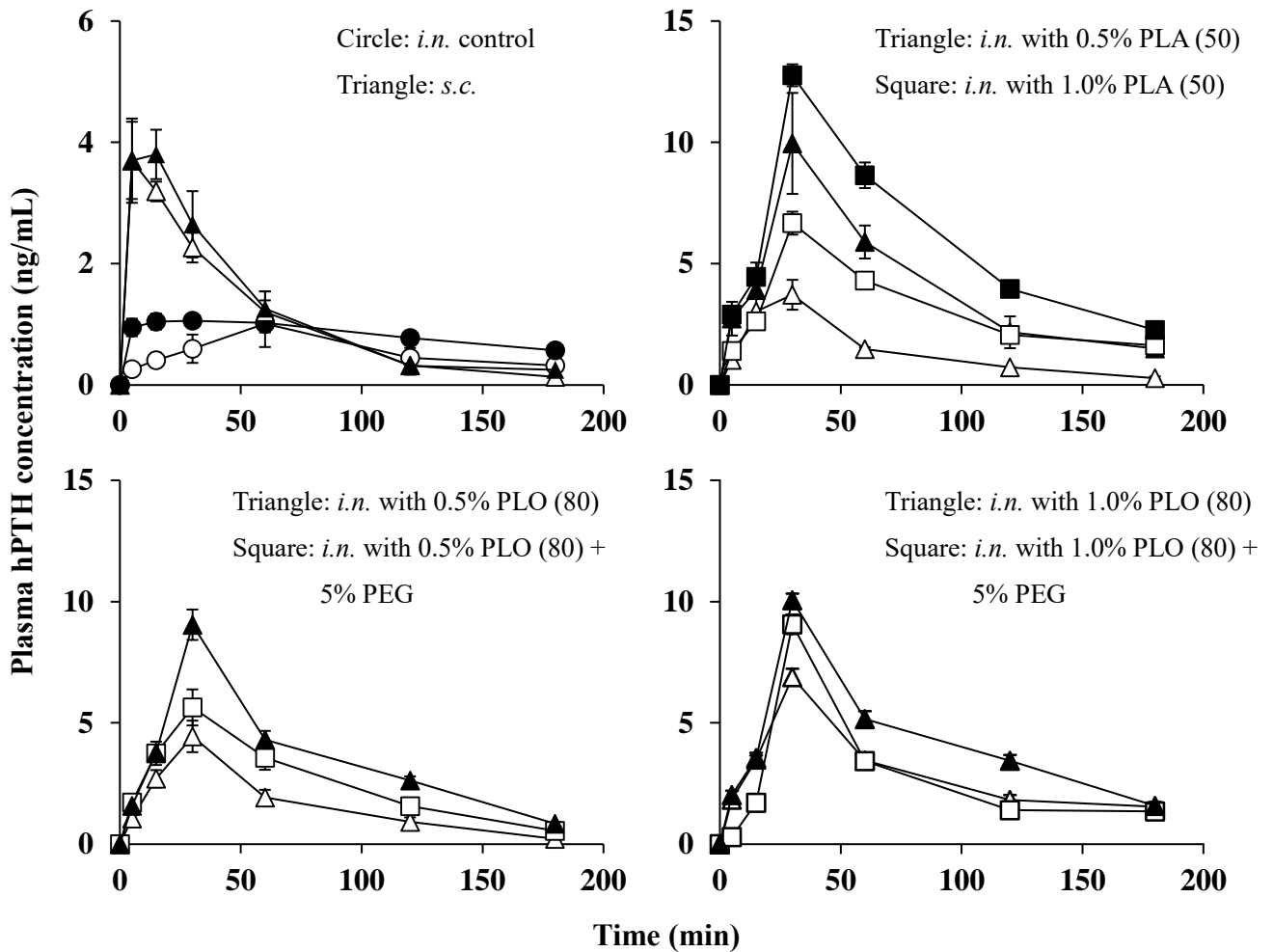


### 2-2-3-2 hPTH 経鼻投与後の血中動態に対するポリカチオン及び PEG の影響、並びに皮下投与との比較

外科的処置により鼻腔内を閉鎖せず、投与時にイソフルランで一時的に麻酔したラットに hPTH を経鼻投与し、その後自発的に覚醒させたとき（覚醒状態）の血中動態に対するポリカチオン性吸収促進剤（PLA (50) や PLO (80)）及び PEG の影響を評価した。また、第 1 編第 2 章で得られた外科的処置により鼻腔内を閉鎖し、麻酔状態（ウレタン麻酔）における hPTH の動態学的パラメータと比較することで、hPTH 経鼻投与後の血中動態に対する麻酔の違い並びに鼻腔への外科的処置の有無による影響を調査した。更に、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査するため、hPTH 経鼻及び皮下投与の動態学的パラメータを比較した。Figure 10 に麻酔及び覚醒状態における皮下及び経鼻投与後の血漿中 hPTH 濃度推移を、Table 8 に麻酔及び覚醒状態における種々投与経路により得られた hPTH の動態学的パラメータを示す。

皮下投与において、上述した静脈内投与と同様に、麻酔及び覚醒状態における皮下投与後の血漿中 hPTH 濃度推移及び動態学的パラメータに差がほとんど認められなかった（Fig. 10 and Table 8, Students's *t*-test,  $p > 0.05$ ）。すなわち、覚醒状態においても、hPTH の皮下投与は、投与直後に素早く血漿中 hPTH 濃度が上昇し、その後速やかに消失する推移を示した。

鼻腔内を閉鎖していない覚醒状態のラットにおいて、hPTH のみを経鼻投与した群（control 群）の  $T_{max\text{hPTH}}$  は鼻腔内を閉鎖した麻酔状態に比べ延長したが、 $AUC_{\text{hPTH}}$  は僅かに減少する程度であり、その他の動態学的パラメータ及び血漿中 hPTH 濃度推移に大きな変化は認められなかった（Students's *t*-test,  $p > 0.05$ ）。また、覚醒状態においても、麻酔状態と同様に hPTH 単独の経鼻投与は投与後 180 分まで血漿中 hPTH 濃度がほとんど上昇せず、control 群の  $C_{max\text{hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  は皮下投与に比べて低い値を示した（Dunnett's test,  $p < 0.05$ ）。一方、ポリカチオン性吸収促進剤（PLA (50) 及び PLO (80)）のみを併用した群において、覚醒状態における血漿中 hPTH 濃度推移は麻酔状態と比べて低く、覚醒状態で得られた  $C_{max\text{hPTH}}$  及び  $AUC_{\text{hPTH}}$  は麻酔状態のそれと比べ有意に低い値を示した（Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ）。また、麻酔及び覚醒状態への hPTH 投与により得られた  $AUC_{\text{hPTH}}$  の比である覚醒下影響率（ $F_{\text{aw/an}}$ ）が約



**Fig. 10 Plasma hPTH concentrations after *i.n.* and *s.c.* administrations in anesthetized and awaking rats.**

Closed symbol: measured value in anesthetized rats

Open symbol: measured value in awaking rats

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3-6).

50%であったことから、ポリカチオン性吸収促進剤併用群における覚醒状態の  $F_{\text{hPTH}}$  は、麻酔状態の半分程度に低下した。しかしながら、覚醒状態において、上記のポリカチオン性吸収促進剤の併用は、適用濃度依存的に血漿中 hPTH 濃度を上昇させ、control 群と比較して  $C_{\text{max hPTH}}$  及び  $AUC_{\text{hPTH}}$  を有意に増大させた ( $p < 0.05$ , Dunnett's test)。また、いずれのポリカチオン吸収促進剤においても、覚醒状態における  $MRT_{\text{hPTH}}$  が control 群と比較して短縮する傾向を示し、皮下投与に類似した一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇及び速やかな消失を示した。 $F_{\text{aw/an}}$  は PLA (50) 又は PLO (80) 適用濃度依存的に増大し、同一濃度のポリカチオン吸収促進剤併用群で比較したとき、PLO (80) 併用群の  $F_{\text{aw/an}}$  は PLA (50) 併用群に比べ高い値を示した。

**Table 8 Pharmacokinetic parameters of hPTH after *i.v.*, *s.c.* and *i.n.* administrations in anesthetized and awaking rats.**

Route	Dose (μg/kg)	Additive agents	$C_{max}$ hPTH (ng/mL)	$T_{max}$ hPTH (min)	$AUC_{hPTH}$ (ng · min/mL)	$MRT_{hPTH}$ (min)	$F_{hPTH}^a$ (%)	$F_{aw/an}^b$ (%)
<i>anesthetized</i>								
<i>i.v.</i>	14.1	-	-	-	1173 ± 77	26.0 ± 2.5	-	-
<i>s.c.</i>	14.1	-	4.3 ± 0.4*	13 ± 3	237 ± 41*	43.4 ± 4.0	20.2	-
<i>i.n.</i>	14.1	None (control)	1.4 ± 0.1	30 ± 5	137 ± 15	73.7 ± 2.2	11.7	-
		0.5% PLA (50)	10.4 ± 1.6*	30 ± 0	736 ± 42*	63.7 ± 5.4	62.7	-
		1.0% PLA (50)	12.8 ± 0.5*	30 ± 0	1058 ± 33*	69.5 ± 0.3	90.2	-
		0.5% PLO (80)	9.0 ± 0.6*	30 ± 0	639 ± 45*	65.6 ± 0.5	54.4	-
		1.0% PLO (80)	10.6 ± 0.5*	30 ± 0	790 ± 16*	69.6 ± 1.5	67.3	-
<i>awaking</i>								
<i>i.v.</i>	14.1	-	-	-	947 ± 135	26.5 ± 3.6	-	80.7
<i>s.c.</i>	14.1	-	3.9 ± 0.5 <sup>†</sup>	8 ± 3	195 ± 36 <sup>†</sup>	41.3 ± 7.5	20.6	82.3
<i>i.n.</i>	14.1	None (control)	1.0 ± 0.3	60 ± 0	103 ± 20	79.7 ± 2.3	10.9	75.1
		0.5% PLA (50)	3.7 ± 0.5 <sup>†</sup>	25 ± 5	244 ± 12 <sup>†</sup>	57.0 ± 3.0	25.7	33.1
		1.0% PLA (50)	6.7 ± 0.5 <sup>†</sup>	30 ± 0	559 ± 9 <sup>†</sup>	72.0 ± 0.6	59.1	52.8
		0.5% PLO (80)	4.5 ± 0.6 <sup>†</sup>	25 ± 5	290 ± 28 <sup>†</sup>	56.7 ± 2.3	30.6	45.4
		0.5% PLO (80) + 5% PEG	5.6 ± 0.7 <sup>†</sup>	30 ± 0	458 ± 49 <sup>†</sup>	62.4 ± 4.3	48.3	71.7
		1.0% PLO (80)	6.9 ± 0.2 <sup>†</sup>	30 ± 0	523 ± 21 <sup>†</sup>	68.9 ± 1.3	55.2	66.2
		1.0% PLO (80) + 5% PEG	8.9 ± 0.5 <sup>†</sup>	30 ± 0	510 ± 12 <sup>†</sup>	64.2 ± 1.0	53.8	64.6

The results were expressed as the mean or mean ± S.E. (n=3-6).

<sup>a</sup> $F_{hPTH}$  (%) = ( $AUC_{i.n. \text{ or } s.c. hPTH} / AUC_{i.v. hPTH}$ ) × 100.

<sup>b</sup> $F_{aw/an}$  (%) = ( $AUC_{hPTH}$  in awaking rats /  $AUC_{hPTH}$  in anesthetized rats) × 100.

\*  $p < 0.05$  compared with *i.n.* control in anesthetized rats (Dunnett's test).

<sup>†</sup>  $p < 0.05$  compared with *i.n.* control in awaking rats (Dunnett's test).

0.5% PLO (80) 及び 5% PEG 両併用群の血漿中 hPTH 濃度推移は、覚醒状態の 0.5 % PLO (80) 単独併用群に比べて高く、麻酔状態の 0.5% PLO (80) 単独併用群の推移に近づいた。また、 $F_{aw/an}$  において、0.5% PLO (80) 単独併用群では 45.4% であったが、5% PEG の更なる併用により 71.7% に増大した。一方、1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 両併用群において、 $C_{max}$  hPTH は麻酔状態の 1.0% PLO (80) 単独併用群に近似したが、 $AUC_{hPTH}$  は覚醒状態の 1.0% PLO (80) 単独併用群とほぼ同等の値を示した。いずれの PLO (80) の適用濃度においても、5% PEG の更なる併用は、 $MRT_{hPTH}$  に対して影響をほとんど示さなかった。しかしながら、1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 両併用群の  $C_{max}$  hPTH 及び  $F_{hPTH}$  は、覚醒状態における経鼻投与群の中で特に高く、皮下投与群と比較してそれぞれ約 2.3 及び 2.6 倍高い値を示した。

麻酔及び覚醒状態のいずれにおいても、皮下投与群の  $MRT_{hPTH}$  は約 40 分であったが、上記のポリカチオン性吸収促進剤を併用した経鼻投与群では約 60 分であり、皮下投与群と比較してそれらの併用経鼻投与群の血漿中 hPTH 濃度推移が持続する傾向を示した。

#### 第4節 考察

ペプチド及びタンパク質性医薬品といった水溶性高分子薬物の経鼻吸収は、その分子量が大きく水溶性が高いために乏しく<sup>23,24)</sup>、吸収性を改善させる製剤学的工夫が必要である。また、タンパク質性医薬品である hPTH の薬理作用がその血中動態特性により異なることから<sup>7-10)</sup>、目的とする骨同化作用を発揮できる新規 hPTH 経鼻投与製剤を開発するためには、吸収性の改善だけでなく血中動態の制御が求められる。第1編第2章において、PLA (50) や PLO (80) といったポリカチオン性吸収促進剤を併用した経鼻投与は、hPTH の経鼻吸収を改善し、骨同化作用を示すことが知られる皮下投与に類似した一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇及び速やかな消失を示した。従って、PLA (50) 又は PLO (80) を用いた hPTH の経鼻投与製剤は、骨同化作用が期待でき、皮下注射製剤に代わる有用な新規投与剤形となる可能性が示された。しかしながら、第1編では鼻腔内に投与した薬液が食道側へ流出しないよう鼻腔内を閉鎖し、且つ麻酔したラットを用いたが、ヒトへの臨床使用では hPTH をはじめとする薬物は覚醒状態で投与あるいは服用される。また、鼻腔内を閉鎖しない条件において、鼻腔内に投与された薬物は mucociliary clearance や pharynx clearance により鼻腔から食道側に流出するため、それらは薬物の経鼻吸収性に大きな影響を与える<sup>53)</sup>。経鼻投与した薬液が食道側に流出できるよう外科的処置したラットを用いた第2編第1章において、ポリカチオン性吸収促進剤である PLO と粘膜付着性物質である PEG を併用した経鼻投与は、hPTH と同等の分子量を有するモデル水溶性高分子薬物である FD-4 の鼻粘膜透過性及び鼻粘膜滞留性を高め、経鼻吸収性を改善できることを明らかにした。以上のことを踏まえて本章では、一時的な麻酔が可能なイソフルランを用いて、頸静脈カテーテルを挿入したラットに上記のポリカチオン性吸収促進剤 (PLA (50) 及び PLO (80)) や PEG と共に hPTH を経鼻投与し、その後鼻腔を閉鎖せずに覚醒状態で経時的に採血を行うことで、hPTH の血中動態に対するポリカチオン性吸収促進剤及び PEG の影響を調査した。

しかしながら、上記の薬物の除去機構だけでなく、麻酔条件の違いが薬物の血中動態に大きく影響する<sup>52)</sup>。そこで、鼻腔内を閉鎖した麻酔状態と、鼻腔内を閉鎖していない覚醒状態のラットに異なる経路から hPTH を投与した後の血中動態を比較することで、hPTH の血中

動態に対する麻酔の違い並びに鼻腔への外科的処置の有無による影響を調査した。静脈内及び皮下投与において、麻酔及び覚醒状態における血漿中 hPTH 濃度推移及び動態学的パラメータに差がほとんど認められなかった。従って、麻酔の違い並びに鼻腔への外科的処置の有無は、hPTH の血液からの消失及び皮下吸収に対してほとんど影響しないことが示唆された。

hPTH 単独の経鼻投与において、鼻腔内を閉鎖していない覚醒状態における  $F_{\text{hPTH}}$  は鼻腔内を閉鎖した麻酔状態に比べて僅かに低下しただけであり、覚醒状態の影響は軽微であった。これは FD-4 を用いた第 2 編第 1 章における FD-4 単独経鼻投与の結果と異なる。しかし、FD-4 経鼻投与では、ウレタン麻酔したラットの鼻腔内に投与した薬液が流出しやすいよう外科的処置し、仰臥位固定した。一方、本章ではイソフルランによる一時的な麻酔だけでなく、頸静脈カテーテル処置することでラットを自由に行動できるようにした。そのため、本章の条件において、薬物の違いや覚醒状態による生理的条件の変化だけでなく、体動や体位の変化により、第 2 編第 1 章の条件と比較して投与された薬液が鼻腔内を移動しやすかったことなどが考えられた。麻酔及び覚醒状態のいずれにおいても、ポリカチオン性吸収促進剤 (PLA (50) 及び PLO (80)) を併用した経鼻投与は血漿中 hPTH 濃度を著しく上昇させたが、覚醒状態における血漿中濃度は麻酔状態より低い推移を示した。上記のポリカチオン性吸収促進剤併用経鼻投与群において、麻酔及び覚醒状態下の hPTH 投与により得られた  $AUC_{\text{hPTH}}$  の比である覚醒下影響率 ( $F_{\text{aw/an}}$ ) が約 50% であったことから、覚醒状態の  $F_{\text{hPTH}}$  が麻酔状態の半分程度に低下した。上述した hPTH 単独の経鼻投与の結果と総合して、覚醒状態に伴う mucociliary clearance や pharynx clearance は投与された hPTH だけでなく、共に投与されたポリカチオン性吸収促進剤も同様に鼻腔内から食道側へ流出されるため、覚醒状態下の影響が hPTH 単独の経鼻投与に比べて大きかったと考えられた。 $F_{\text{aw/an}}$  は PLA (50) 又は PLO (80) 適用濃度依存的に増大し、第 2 編第 1 章における滞留性改善率 ( $F_{\text{oc}}$ ) と同様の傾向を示した。従って、高濃度のポリカチオン性吸収促進剤は、鼻腔内を閉鎖していない覚醒状態において鼻腔内から食道側に流出するが、低濃度のそれと比較して hPTH の吸収促進効果を示すために十分な量が鼻腔内に残存したため、覚醒状態の影響が小さかったと考えられた。また、同一適用濃度のポリカチオン吸収促進剤併用群を比較したとき、PLA (50) の  $F_{\text{aw/an}}$  は

PLO (80) よりも低い値を示した。これは第 1 編第 2 章で示したように、PLA (50) による hPTH の経鼻吸収促進効果が PLO (80) に比べて高かったため、PLA (50) は覚醒状態に伴う薬液の流出による影響を受けやすかったと考えられた。しかしながら、覚醒状態においても、PLA (50) 又は PLO (80) を併用した経鼻投与は、適用濃度依存的に  $C_{max \text{ hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  を増大させ、皮下投与と同等以上の値を示した。また、皮下投与に類似した一過的な血漿中 hPTH の上昇及び速やかな消失を示したことから、PLA (50) 又は PLO (80) と共に hPTH を経鼻投与することで皮下投与と同等以上の骨形成促進作用が期待された。

0.5% PLO (80) 併用群において、5% PEG を添加することにより、麻酔状態における PLO (80) 単独併用群の血漿中 hPTH 濃度推移に近づき、 $F_{aw/an}$  を約 30% 増大させた。これは FD-4 を用いた第 2 編第 1 章と同様の結果であったことから、PEG の添加による投与溶液の粘性の増加が鼻粘膜滞留性を改善し、結果的に  $F_{\text{hPTH}}$  を改善したと考えられた。一方、1.0% PLO (80) 併用群では、5% PEG を添加することにより、麻酔状態における PLO (80) 単独併用群の  $C_{max \text{ hPTH}}$  に近づいたが、上記のような  $F_{aw/an}$  の増大効果が認められなかった。第 2 編第 1 章においても同様の傾向が認められ、高濃度の PLO 併用群における FD-4 の滞留性改善率 ( $F_{oc}$ ) は、低濃度のものと比較して PEG の添加により増大しにくい傾向を示した。従って、1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 併用群において、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 適用による hPTH の鼻粘膜透過性改善効果が上回ったため、 $F_{aw/an}$  の増大が認められなかったと推察された。PLO (80) 及び PEG を併用して経鼻投与した全ての条件で、 $C_{max \text{ hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  は皮下投与と同等以上の値を示し、血漿中 hPTH 濃度推移は皮下投与と同様に一過的に上昇した後に低下した。特に、1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 併用群の  $C_{max \text{ hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  が皮下投与群より約 2 倍高い値を示したことから、本条件において皮下投与よりも約 2 倍高い骨同化作用が期待される。しかしながら、麻酔及び覚醒状態のいずれにおいても、ポリカチオン性吸収促進剤を併用した hPTH 経鼻投与群の  $MRT_{\text{hPTH}}$  は皮下投与と比較して高い値を示し、皮下投与より血漿中 hPTH 濃度推移が持続する傾向を示した。hPTH の薬理作用に関する過去の知見から、hPTH が骨形成促進作用及び骨密度増加作用を示すためには、血中 hPTH 濃度の高さ ( $C_{max \text{ hPTH}}$ )、血中 hPTH 濃度が高く維持している時間

( $MRT_{hPTH}$ ) 及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が重要である<sup>48-51)</sup>。そのため、ポリカチオン性吸収促進剤を併用した hPTH の経鼻投与において、骨形成促進作用を発揮させるためには、皮下投与と比較して休薬時間の延長、すなわち投与間隔の延長が必要となる可能性がある。言い換えれば、皮下投与より低頻度の投与により骨形成促進作用が得られる有用な hPTH 経鼻投与製剤となる可能性を示唆している。

以上、本章において PLA (50) 及び PLO (80) 適用濃度の調節又は 5% PEG の添加により、hPTH の経鼻吸収性及び鼻粘膜滞留性を制御できるだけでなく、骨同化作用の発揮が期待できる有用性の高い hPTH 経鼻投与製剤となる可能性が示された。次編では、本章において皮下投与とほぼ同等の  $C_{max\ hPTH}$  及び  $F_{hPTH}$  を示した 0.5% PLA、それらの値が皮下投与よりも約 2 倍高かった 1.0% PLO (80)、並びに 1.0% PLO (80) 併用経鼻投与と比較して  $C_{max\ hPTH}$  のみが高かった 1.0% PLO (80) 及び 5% PEG を選択し、これら条件で hPTH を経鼻投与したときの骨への薬理作用について論述する。

### 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

#### 第1章 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの作製

##### 第1節 小緒言

時間経過に伴って古く脆い骨は、破骨細胞により壊され（骨吸収）、骨芽細胞により新しく硬い骨に置換される（骨形成）。この骨吸収と骨形成のサイクルを骨リモデリングといい、血中カルシウム濃度及び骨の物理的強度（骨強度）を一定に維持するため、通常このサイクルがバランスよく適切な速度で制御されている。骨強度は骨密度 (bone mineral density, BMD) と骨質 (bone quality) によって規定され、それらの骨強度に対する寄与率はそれぞれ 70 及び 30% とされている<sup>2)</sup>。骨密度は、古くから骨強度を規定すると考えられていたが、近年骨密度と独立した因子として骨質が骨強度に関与していることが見出され<sup>2,4)</sup>、骨粗鬆症の治療及び予防において関心が向けられている。骨密度は単位面積又は単位体積あたりの骨に含まれるヒドロキシアパタイトの量であり、骨質は骨となる素材の質（材質特性）並びに骨の微細構造（構造特性）のことである<sup>11,59)</sup>。骨の材質特性は、骨に含まれるコラーゲンの性質、骨の石灰化度、及び骨の微細損傷の度合いによって規定される<sup>11)</sup>。骨は外側の皮質骨並びに内側の海綿骨に大別され、皮質骨は層板状で硬い一方、海綿骨は網目状で柔軟であるといった特徴を有する。そのため、骨の構造特性（硬さ及び柔軟性）は、皮質骨の多孔度、菲薄度、並びに海綿骨の骨梁構造によって規定される<sup>59)</sup>。通常、骨強度を規定する骨密度及び骨質は、骨リモデリングが適切に行われることで正常且つ一定に保たれている。しかし、遺伝的要因や生活習慣（食事、運動、喫煙及び飲酒など）を含む様々な要因が骨リモデリングのバランスを骨吸収に傾けることで、骨密度の低下並びに骨質の劣化をもたらし、最終的に骨粗鬆症を誘発する<sup>2)</sup>。その中でも、閉経に伴うエストロゲンの欠乏、骨に必要な栄養素（カルシウム、ビタミン D 及びビタミン K 等）の摂取不足、並びに加齢に伴う筋力低下や寝たきりといった不動による骨への力学的負荷の減少が、骨粗鬆症を誘発する大きな要因であると考えられている。



上述の通り骨粗鬆症を誘発する要因が多岐にわたるため、骨粗鬆症に対する薬物等の作用を評価する様々な骨粗鬆症モデル動物が確立されている<sup>60,61)</sup>。骨粗鬆症モデルとして、卵巣摘出モデルをはじめ、老化型モデル、不動化モデル、及び精巣摘出モデルなどがある。現在、骨粗鬆症患者の中で閉経後骨粗鬆症の割合が最も高いため<sup>2)</sup>、骨粗鬆症に関する研究において閉経後骨粗鬆症を模倣した卵巣摘出モデルが汎用されている<sup>61)</sup>。女性ホルモンであるエストロゲンは、卵巣内の卵胞で産生及び分泌され、骨吸収を担う破骨細胞のエストロゲン受容体に結合することで、破骨細胞による骨吸収を抑制する<sup>62)</sup>。閉経期の女性において、卵胞はほぼ枯渇するため、破骨細胞機能の抑制因子であるエストロゲンの分泌が低下あるいは停止した結果、骨吸収が優位となり骨粗鬆症（閉経後骨粗鬆症）を発症する。閉経は加齢により生じる回避不可能な女性特有の事象であり、骨に対する影響が大きいため、閉経後骨粗鬆症が骨粗鬆症の大部分を占める。卵巣摘出モデルは、実験動物の卵巣を摘出することで、人為的にエストロゲンを枯渇させ、閉経後骨粗鬆症の状態を模倣している。hPTHの皮下投与製剤をはじめとした骨粗鬆症治療薬の創薬過程において、本モデルを用いた薬効評価が実施されており、治療薬候補の最適化や薬効プロファイルの解析などが行われている<sup>60)</sup>。

エストロゲンは上述した骨代謝だけでなく、脂質及び糖代謝に深く関わっており、エストロゲンの枯渇は脂質異常症及び糖尿病のリスクファクターである<sup>63-65)</sup>。卵巣摘出術を施したラットは、偽手術（卵巣摘出術と同様に開腹後、卵巣を摘出せずに開腹部を縫合する手術）を施したラットと比較して皮下脂肪の量が多く、体重が増大する傾向を示すことが知られている<sup>66)</sup>。エストロゲンの枯渇は破骨細胞による骨吸収を亢進させるが、体重の増大は骨への力学的負荷を高めることで骨芽細胞による骨形成を亢進させる<sup>2)</sup>。骨粗鬆症モデル動物を用いた研究では、骨粗鬆症の治療評価における体重増加の影響を避けるため、モデル動物の体重を経時的に測定し、制限給餌を行うことで体重管理する方法が一般的である<sup>60,61)</sup>。

骨粗鬆症の治療効果を判定するためには骨強度を測定する必要があり、骨強度の直接的な測定には屈曲試験法が用いられている<sup>60)</sup>。しかしながら、骨の屈曲試験法は摘出した骨を測定するため、薬物等の経時的な治療効果を評価できない。一方、骨強度は骨密度及び骨質によって規定され、これらパラメータは骨を摘出することなく測定及び評価できる。そのため、

骨密度及び骨質を測定することで、経時的な強度の評価が可能となる。一般に、骨密度の測定は二重 X 線吸収法 (dual energy X-ray absorptiometry, DXA) 及びコンピューター断層撮影法 (computed tomography, CT) が用いられている。DXA は迅速且つ簡便に測定できるため、臨床における骨粗鬆症治療薬の効果の判定に使用されている。しかしながら、DXA は骨を 2 次元的に撮影するため平面上の骨密度値 (面積骨密度値) しか得られないが、CT は骨を 3 次元的に撮影するため DXA に比べ測定に時間を要する一方で、立体的な骨密度値 (体積骨密度値) を得られるだけでなく骨の 3 次元情報を得ることができる。この CT で得られた骨の 3 次元情報から、骨質における構造特性を評価できるため、骨粗鬆症治療薬の臨床及び非臨床試験における薬効評価に使用されている<sup>60)</sup>。

また、血中あるいは尿中の骨代謝マーカー濃度の測定結果は、骨質に関与する骨リモデリングの間接的な評価に利用できる<sup>2,60)</sup>。骨代謝は骨形成及び骨吸収に大別され、骨代謝マーカーも同様に骨形成及び骨吸収マーカーが存在する。Osteocalcin は、骨芽細胞でのみ産生及び分泌されるタンパク質であり、骨における非コラーゲン性タンパク質の 10~20% を占める<sup>67-69)</sup>。ビタミン K 依存的に  $\gamma$ -カルボキシル化された osteocalcin は、ヒドロキシアパタイトに対する親和性が向上し、骨に蓄積されるため、カルシウムを骨に蓄積させる役割を担っている。また、副甲状腺ホルモンやビタミン D により刺激された骨芽細胞は、osteocalcin を活発に産生し、骨形成の過程でその一部が血中に放出されるため、osteocalcin が骨形成マーカーの 1 つとして利用されている<sup>67-69)</sup>。骨吸収マーカーである I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (Type I collagen cross-linked C-telopeptide, CTX-I) は、骨の主要な構成成分である I 型コラーゲン分子 C 末端側の架橋構造を含む骨吸収産物の 1 つであり、破骨細胞活性と相関する<sup>70)</sup>。また、CTX-I など架橋部位を含むコラーゲン分解産物は、骨吸収の評価に対する感度が高いことが知られている<sup>70)</sup>。上記のことから、osteocalcin 及び CTX-I は、hPTH の週 1 回皮下投与製剤であるテリボン<sup>®</sup> の非臨床試験における薬理評価に用いられている<sup>6)</sup>。

以上のことを踏まえ、本章では前編で選択した hPTH 経鼻投与システムの薬理効果を評価するため、健常ラットに卵巣摘出術あるいは偽手術を施し、各術後に測定した体重、血漿中骨代謝マーカー濃度 (血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度) 及び骨質の情報を含む骨密度測

定値（CT 測定値）をそれぞれ比較することで、卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの作製を確認した。

## 第2節 実験方法

### 3-1-2-1 試薬

Rat Osteocalcin (BGP) ELISA system<sup>®</sup> 及び RatLaps<sup>™</sup> (CTX-I) EIA kit をそれぞれ GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 (東京) 及び Immundiagnostic systems Ltd. (Baldon, UK) から購入した。Aprotinin from bovine lung 及び ethylenediamine-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid disodium salt (EDTA・2NA) は 1-2-2-1 と同様のものを使用した。また、イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」は 2-2-2-1 と同様のものを使用し、その他試薬は全て特級品を使用した。

### 3-1-2-2 実験動物

SD系雌性ラット (BW: 190–220 g, 10 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入した。長期飼育するためラットを 2 匹/cage で飼育し、自由に食餌 (CE-2, 日本クレア株式会社, 東京)<sup>71)</sup> 及び水を摂取させた。ただし、後述の卵巣摘出後 2 週以降から卵巣摘出及び偽手術ラット群間の体重に差が生じ始めたため<sup>60, 61)</sup>、卵巣摘出ラットに制限給餌を行った。すなわち、偽手術ラット 1 匹当たりの 1 日摂食量を測定し、同等量の食餌を卵巣摘出ラットに給餌した。なお、卵巣摘出ラットは給餌した食餌をその翌日早朝には概ね全て摂食していた。本研究における動物実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験委員会の承認 (承認番号: H25015, H26016, H27015, H28016, H29021, JU18016) を得てから行った。

### 3-1-2-3 卵巣摘出術及び偽手術

イソフルラン (麻酔導入: 5.0%, 麻酔維持: 1.8-2.4%, 流量: 1.5-2.0 L/min) で一時的に吸入麻酔したラットの両側腹部を切開し、卵巣を露出した。卵巣の栄養血管を縫合糸 (軟質絹製縫合糸, 夏目製作所, 東京) で結紮した後に、卵巣を摘出した。その後、切開部を縫合したラットを OVX ラットとした。同様に麻酔したラットの両側腹部を切開後、体外に露出させた卵巣を摘出せずに腹腔内へ戻し、切開部を縫合した偽手術ラットを Sham ラットとした。施術後に吸入麻酔を中止し、覚醒したラットが術後 1 時間以内に異常行動を起こさないことを確認し、飼育ケージ内に移した。

#### 3-1-2-4 体重測定及び健康状態の確認

ラットの体重は骨密度に影響を与えることが報告されていることから<sup>60, 61)</sup>、術後毎週 OVX 及び Sham ラットの体重を測定した。その際、ラットの健康状態を目視にて複数の観察者により確認した。なお、術直後から術後 2 日程度までラットは踞っていたが、術後 4 日以降から活発に動いており、その後の状態にも異常は観察されなかった。

#### 3-1-2-5 尾静脈採血

術後 3 ヶ月にイソフルラン（麻酔導入：5.0%，麻酔維持：1.5-2.0%，流量：1.5-2.0 L/min）で一時的にラットを吸入麻酔し、EDTA・2Na 処理した注射筒を用いて尾静脈から血液 0.20 mL を採取した。その後、覚醒したラットを飼育ゲージに戻した。採取した血液と、アプロチニン（5,000 KIU/mL, 25  $\mu$ L）及び EDTA・2Na（EDTA として 10 mg/mL, 25  $\mu$ L）含有生理食塩液を緩やかに転倒混和した。その後、遠心分離（1,000 g, 10 分間, 4°C, 回転半径 71 mm, MX-301, 株式会社トミー精工, 東京）し、血漿 0.10 mL を得た。得られた血漿を後述の骨代謝マーカー濃度の測定まで、-80°C で保存した。なお、血漿中骨代謝マーカー濃度は日内変動することから、採血は午後 0~2 時以内に行った。

#### 3-1-2-6 血漿中骨代謝マーカー濃度の測定

3-1-2-5 で得られた血漿中の骨代謝マーカー濃度を ELISA 法により測定した。骨代謝マーカーとして骨形成マーカーの osteocalcin 及び骨吸収マーカーの CTX-I について、それぞれ Rat Osteocalcin (BGP) ELISA system 及び RatLaps<sup>TM</sup> (CTX-I) EIA kit を用いて測定した。得られた血漿を適宜、上記の各キット付属の血漿用希釈液で希釈した。測定手順は上記の各キット付属のマニュアルに従った。なお、各定量キットの測定感度はそれぞれ 0.05 及び 4.5 ng/mL であった。また、Rat Osteocalcin (BGP) ELISA system における測定内及び測定間の変動係数はそれぞれ 10% 未満であり、RatLaps<sup>TM</sup> (CTX-I) EIA kit ではそれぞれ 10 及び 15% 未満であった。

### 3-1-2-7 骨密度の測定

術後 3 ヶ月にイソフルラン（麻酔導入：5.0%，麻酔維持：1.5-2.0%，流量：1.5-2.0 L/min）で一時的にラットを吸入麻酔し、小動物 X 線 CT 装置（Latheta LCT-100；日立アロカメディカル株式会社、東京）を用いて、腰椎（L4 及び L5）及び左脛骨を近位端よりそれぞれ 1 及び 2 mm ごとに 20 slices を断層撮影した。その後、覚醒したラットをゲージに戻した。なお、解像度 480×480 pixels、管電圧 50 kV、及び管電流 1 mA の条件で撮影した。上記の測定装置付属の CT 画像解析ソフト（LaTheta software version 1.40）を用いて得られた断層撮影画像を解析し、各パラメータ（全骨密度（Integral BMD）、皮質骨密度（Cortical BMD）、海綿骨密度（Cancellous BMD）、平面骨密度（Plane BMD）、皮質骨厚（Cortical bone thickness, C.Th）、最小断面 2 次モーメント（Minimum cross-sectional moment of inertia, MCMI）及び断面 2 次極モーメント（Polar moment of inertia, PMI））を算出した。ここで、全骨密度は皮質骨及び海綿骨を含む骨全体の体積骨密度を、皮質骨密度は皮質骨の体積骨密度を、海綿骨密度は海綿骨の体積骨密度を、平面骨密度は DXA 装置で得られる面積骨密度に相当するものを、C.Th は皮質骨の厚さを表す。また、MCMI 及び PMI はそれぞれ曲げ及び捻じれに対する強さを表す力学的指標であり、これらの値が高いほど骨が曲げ及び捻じれに対して強いことを意味する。

### 3-1-2-8 統計分析

ラット体重の経時的推移を平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で、その他データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。2 群間の比較に Student's *t*-test を用いて解析し、 $p < 0.05$  を統計的有意とみなした。なお、全ての統計解析は R software (version 3.5.1 for Windows ; <https://www.R-project.org/>) を用いて行った。

### 第3節 結果

#### 3-1-3-1 体重に及ぼす卵巣摘出の影響

卵巣摘出術及び偽手術の各ラット群における体重を比較することで、ラット体重に及ぼす卵巣摘出の影響を調査した。Figure 11にOVX及びShamラットにおける体重の推移を示す。

術後1週におけるOVXラットの体重はShamラットとほとんど差が認められなかった (Fig. 11)。いずれのラット群においても体重は術後12週まで経時的に増加したが、術後2週から両群の間に差が認められ、術後3週から12週までOVXラットの体重はShamラットと比較して有意に高い値を示した (Student's *t*-test,  $p > 0.05$ )。本実験の条件において、OVXラットの摂食量はShamラットと同等となるように術後2週から制限給餌していることから、本章の小緒言で述べたように、卵巣摘出は、ラットの新陳代謝を変化させることで、体重を増加させることが示めされた。このOVXラットにおける体重の高さが骨に対する力学的負荷を高め、骨形成を促進し、OVX及びShamラット間における骨強度の差が小さくなり、薬理効果を評価するモデルとして不適切となっていないかを、次に確認した。

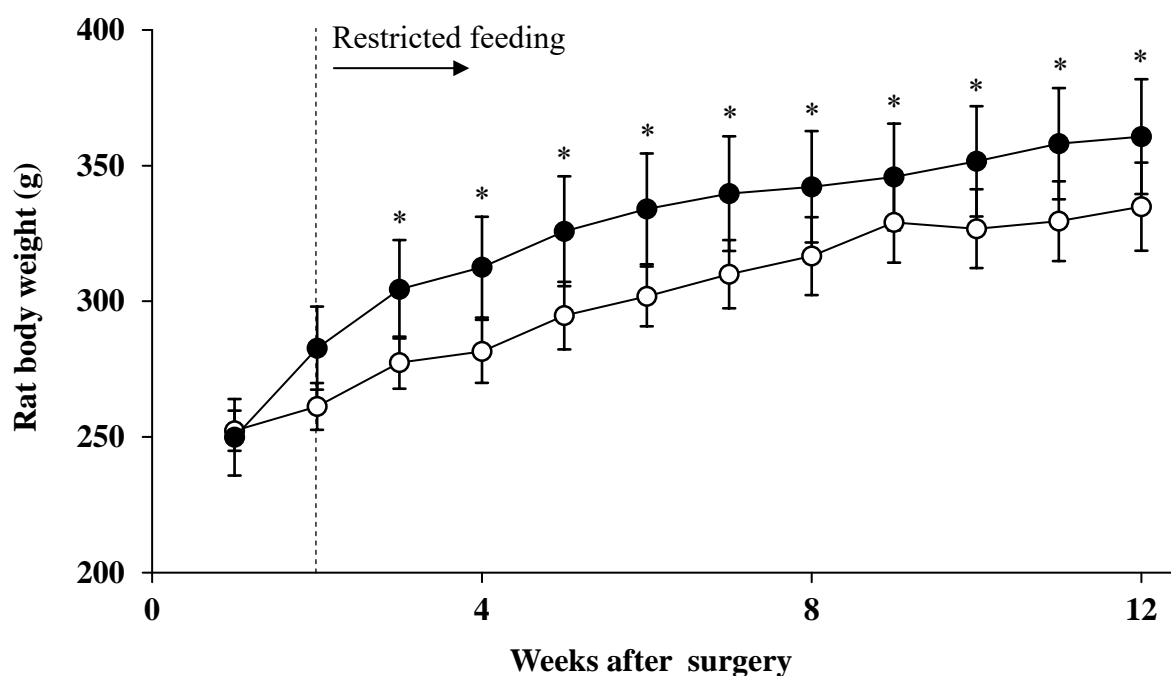


Fig. 11 Profile of body weight after ovariectomy and sham surgery in rats.

○: Sham, ●: OVX.

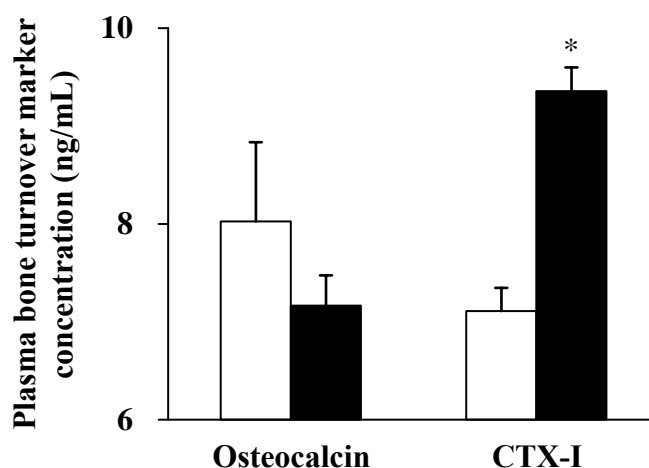
The results were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (Sham: n=8, OVX: n=76).

\* $p < 0.05$  compared with Sham.

### 3-1-3-2 骨代謝及び骨密度に及ぼす卵巣摘出の影響

卵巣摘出術及び偽手術の各ラット群における血漿中骨代謝マーカー濃度（血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度）及び骨密度を比較することで、骨代謝及び骨密度に及ぼす卵巣摘出の影響を調査した。Figure 12 に術後 3 ヶ月における OVX 及び Sham ラットの血漿中骨代謝マーカーを、Figure 13 に CT 測定で得られた上記ラット群の左脛骨及び腰椎の骨密度を、Table 9 に CT 測定で得られた骨の各パラメータを示す。

OVX ラットにおいて、骨吸収マーカーである CTX-I は Sham ラットに比べ有意に高い値を示した一方で（Student's *t*-test,  $p < 0.001$ ）、骨形成マーカーである osteocalcin は低い傾向を示した（Fig. 12, Student's *t*-test,  $p > 0.05$ ）。また、左脛骨及び腰椎のいずれにおいても、OVX ラットにおける骨密度（全骨、皮質骨、海綿骨及び平面骨密度）は Sham ラットのそれと比較して有意に低く（Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ）、海綿骨密度は顕著に低い値を示した（Fig. 13 and Table 9）。更に、それぞれ物体の曲げ及び捻じれに対する力学的指標である MCMi 及び PMI は、OVX ラットの方が Sham ラットに比べて有意に低い値を示した（Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ）。一方、いずれの骨部位においても、OVX 及び Sham ラット間の C.Th に差はほとんど認められなかった（Student's *t*-test,  $p > 0.05$ ）。



**Fig. 12 Effects of ovariectomy on bone turnover markers in rats.**

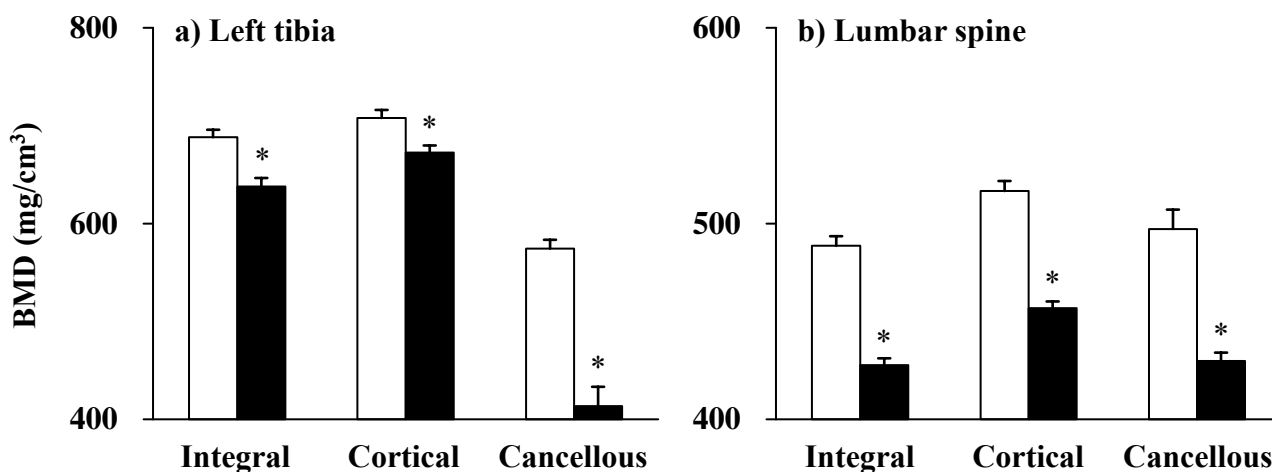
White column: Sham, Black column: OVX

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E.

(Sham: n=8, OVX: n=76).

\* $p < 0.05$  compared with Sham.





**Fig. 13** Effects of ovariectomy on bone mineral density (BMD) at various bone sites in rats. White column: Sham, Black column: OVX  
The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (Sham: n=8, OVX: n=76).  
\* $p < 0.05$  compared with Sham.

**Table 9** Effects of ovariectomy on bone parameters at various bone sites in rats.

	Left tibia		Lumbar spine	
	Sham	OVX	Sham	OVX
<b>Plane BMD (mg/cm<sup>2</sup>)</b>	176.6 $\pm$ 1.8	160.4 $\pm$ 2.9*	144.6 $\pm$ 2.3	124.0 $\pm$ 1.4*
<b>C.Th (cm)</b>	0.158 $\pm$ 0.001	0.160 $\pm$ 0.001	0.151 $\pm$ 0.001	0.154 $\pm$ 0.001
<b>MCMI (mg <math>\cdot</math> cm)</b>	0.654 $\pm$ 0.030	0.541 $\pm$ 0.031*	3.714 $\pm$ 0.098	3.206 $\pm$ 0.072*
<b>PMI (mg <math>\cdot</math> cm)</b>	2.730 $\pm$ 0.068	2.291 $\pm$ 0.097*	9.566 $\pm$ 0.281	7.955 $\pm$ 0.170*

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E. (Sham: n=8, OVX: n=76).  
\* $p < 0.05$  compared with Sham.

## 第4節 考察

本章では、ラットを用いて前編で選択した hPTH 経鼻投与システムの薬理効果を評価するため、健常ラットに卵巣摘出術あるいは偽手術を施し、各術後に測定した体重、血漿中骨代謝マーカー濃度（血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度）及び骨密度（CT 測定値）をそれぞれ比較することで、卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの作製を確認した。

支持組織の1つである骨は、重力や身体運動といった外部からの力学的負荷に反応して骨形成を促す機構が備わっており、この機構によって力学的負荷に応じた骨強度の変化が生じる<sup>2,72</sup>。活発な身体運動は骨に対する力学的負荷が増加するため骨強度を増大させる一方で、長期臥床はその力学的負荷が減少するため骨強度を低下させる<sup>73,74</sup>。卵巣ホルモンであるエストロゲンは、骨吸収を担う破骨細胞の抑制作用だけでなく、脂質及び糖代謝の亢進作用を有する<sup>62-65</sup>。そのため、卵巣を摘出しエストロゲンを人為的に枯渇させた卵巣摘出動物（OVX 動物）において、健常あるいは偽手術動物（Sham 動物）に比べ骨吸収が亢進して骨密度が低下するだけでなく、体重が増大しやすくなることが知られている<sup>60,61,66</sup>。しかしながら、上述の力学的負荷の観点から、試験動物及び対照動物間における体重の差は骨粗鬆症に対する薬物等の評価を困難にさせる。そのため、骨粗鬆症モデル動物を用いた試験において、骨粗鬆症に対する試験の評価がしやすいように実験動物に対して食餌量の制限（制限給餌）や Ca 低含有の食餌の給餌が一般的に行われている<sup>60,61</sup>。しかしながら、卵巣摘出術直後からの制限給餌は、手術創の治癒を遅延させ、実験動物の健康状態を損なう可能性が考えられた。そこで本章では、術後2週から偽手術を施したラット（Sham ラット）の摂食量を測定し、それと同等量となるよう卵巣摘出術を施したラット（OVX ラット）に制限給餌を行った。術後1週において、OVX 及び Sham ラット間の体重に差はほとんど認められなかった。いずれのラット群も経時的に体重は増加したが、術後2週から両群の間に差が認められ、術後3週から OVX ラットの体重は Sham ラットと比較して有意に高く、術後12週（本章の hPTH 投与開始0日）まで継続した。この結果は、卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇が脂質及び糖代謝を鈍らせ、体重を増加させることを示している。

上述のように、OVX ラットの体重は Sham ラットに比べ有意に高い値を示した一方で、

皮質骨及び海綿骨の割合がそれぞれ高い脛骨及び腰椎のいずれにおいても、OVX ラットの骨密度（全骨、皮質骨、海綿骨及び平面骨密度）は Sham ラットと比較して有意に低い値を示した。その中でも、OVX ラットにおける海綿骨密度の低下が著しく、これは皮質骨に比べ海綿骨の骨代謝回転が高いことに起因したと考えられた<sup>2)</sup>。それを裏付けるように、上記の骨部位において、皮質骨の厚さを示す C.Th については、上記ラット両群間で差がほとんど認められなかった。OVX ラットの骨代謝マーカーにおいて、骨形成マーカーである osteocalcin は Sham ラットに比べ低い傾向を示し、骨吸収マーカーである CTX-I は Sham ラットに比べ有意に高い値を示した。以上のことから、卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇は破骨細胞による骨吸収を亢進させることで骨密度を低下させ、その骨密度に対する影響は体重増加の影響より大きいことが示された。これらの結果は骨粗鬆症モデルラットの特徴に関する報告と一致している<sup>60,61)</sup>。更に、それぞれ物体の曲げ及び捻じれに対する力学的指標である MCMi 及び PMI において、OVX ラットの方が Sham ラットと比較して有意に低い値を示した。本章の小緒言で述べたように、骨強度は骨密度と骨質により規定され<sup>2, 4, 11, 59)</sup>、これら力学的指標も皮質骨及び海綿骨密度だけでなく、骨質に関与する皮質骨の厚さ (C.Th) 並びに海綿骨の骨梁構造などを反映している。OVX 及び Sham ラットの C.Th はほぼ同等であったことから、OVX ラットにおける MCMi 及び PMI の低さは、Sham ラットと比較して骨の曲げ及び捻じれといった力学的負荷に対して脆弱であることを意味し、海綿骨の網目状構造における連結点の減少並びに連結距離の減少が生じていることを示唆している。従って、卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇は、骨吸収を亢進させ、骨密度及び骨質の両面から骨強度を低下させることが示された。

以上のことから、卵巣摘出後 3 ヶ月経過により骨吸収が亢進した卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットを作製できたと判断し、次章において本モデルラットを用いて hPTH 経鼻投与システムの骨に対する影響について論述する。

## 第2章 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットにおける経鼻投与後の hPTH の薬理効果

### 第1節 小緒言

副甲状腺ホルモンの骨に対する作用は多彩であり、その受容体を有する細胞は骨代謝や骨強度を管理する骨細胞並びに骨形成を担う骨芽細胞である。副甲状腺ホルモンは、骨芽細胞に作用してその細胞膜上に receptor activating NF $\kappa$ B ligand (RANKL) の発現を促進する一方で、osteoprotegrin (OPG) の分泌を抑制する<sup>4)</sup>。骨芽細胞膜上に発現した RANKL は、破骨前駆細胞膜に存在する RANKL 受容体 (RANK) と結合することで成熟破骨細胞への分化を誘導する。また、RANKL は成熟破骨細胞の骨吸収活性を維持することが知られており、抗 RANKL 抗体製剤が多発性骨髄腫、固形癌骨転移、骨粗鬆症などの治療に用いられている。骨芽細胞から分泌される OPG は、RANKL に対するデコイ受容体であり、上述の RANKL の作用を阻害する。従って、副甲状腺ホルモンは、骨芽細胞への作用を介して破骨細胞の分化及び活性を促進し、骨吸収を亢進させる。

骨は無機成分であるヒドロキシアパタイト並びに、有機成分であるコラーゲン及びタンパク質を含む骨基質から構成されており、その比率はそれぞれ約 80 及び 20% といわれている<sup>2,4)</sup>。骨基質にはインスリン様増殖因子 (Insulin-like growth factor, IGF) をはじめ、形質転換増殖因子  $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、繊維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor, FGF) などが含まれ、これら物質は骨吸収により骨の外へ放出され、骨に存在する様々な細胞に作用する。骨基質成分の多くは、骨形成促進作用を有することから、骨吸収に対するフィードバック機構を担っていると考えられている。そのため、副甲状腺ホルモンは、骨吸収を促進し、骨の外へ放出された骨基質を介して骨代謝を調節し、骨強度を一定に維持している。また、副甲状腺ホルモンは、骨芽細胞に作用し、骨芽細胞の未熟前駆細胞である前骨芽細胞の分化促進、骨芽細胞の休止細胞である lining cell の骨芽細胞への分化促進、骨芽細胞のアポトーシス抑制、骨基質の産生促進を介して複合的に骨形成促進作用を示す<sup>2,4,5,6)</sup>。

骨細胞は、骨形成に伴い骨の内部に埋没されて分化した骨芽細胞であり、円柱状あるいは扁平状の骨芽細胞とは異なり樹状突起を介して複数の骨細胞同士でネットワークを形成している。骨細胞が特異的に分泌するスクレロスタチンは、骨細胞の近傍に存在する骨芽細胞に

作用して骨形成を抑制することが明らかとなっている<sup>2,4)</sup>。副甲状腺ホルモンは、骨細胞に作用してスクレロチンの分泌を抑制することにより、骨形成を促進することが示されている<sup>2,4)</sup>。

このように、副甲状腺ホルモン及びそのアナログ製剤である hPTH の骨への作用は、骨吸収及び骨形成促進作用に大別されるが、前述したように hPTH の血中動態特性の違いによりいずれかの作用が強く発揮される<sup>7-10)</sup>。一般的に、持続的な血中 hPTH 濃度推移では骨吸収促進作用を示す一方で、一過的に血中 hPTH 濃度が上昇し、これが間欠的に生じたとき骨形成促進作用を示す。第 2 編第 2 章で示したように、タンパク質性医薬品である hPTH は鼻粘膜透過性及び滞留性が低く、その単独経鼻投与群の血漿中 hPTH 濃度は皮下投与よりも低く持続的に推移した。従って、hPTH 単独経鼻投与は骨形成促進及び骨密度増加作用を期待する上で不適切と考えられた。また、第 2 編第 2 章において、ポリカチオン性吸収促進剤である PLA (50) 及び PLO (80) は hPTH の鼻粘膜透過性を増大させ、更に粘膜附着性物質である PEG は hPTH の鼻粘膜滞留性を改善することで hPTH の経鼻吸収を増大させることを示したが、これら物質を併用した hPTH の経鼻投与における  $MRT_{hPTH}$  は皮下投与と比較して長く、皮下投与より血漿中 hPTH 濃度推移が持続することが示された。hPTH の薬理作用に関する過去の知見から、hPTH が骨形成促進作用及び骨密度増加作用を示すためには、血中 hPTH 濃度の高さ ( $C_{max,hPTH}$ )、血中 hPTH 濃度が高く維持されている時間 ( $MRT_{hPTH}$ )、及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が重要である<sup>48-51)</sup>。そのため、上記の物質を併用した hPTH の経鼻投与が骨形成促進作用を発揮させるためには、皮下投与と比較して休薬時間の延長することなど、投与プロトコルの最適化が必要となる可能性が考えられる。

そこで本章では、これまでに検討した結果に基づき、第 3 編第 1 章で作製した 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 ヶ月間週 1 及び 3 回経鼻投与した後の骨に対する薬理効果を、血漿中骨代謝マーカー濃度 (血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度) 及び骨密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。

## 第2節 実験方法

### 3-2-2-1 試薬

Poly-L-ornithine hydrobromide (PLO (80), 78 kDa) 及びイソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」はそれぞれ 1-1-2-1 及び 2-2-2-1 と同様のものを使用した。また、テリパラチド酢酸塩 (hPTH, 4.4 kDa) 原末、poly-L-arginine hydrochloride (PLA (50), 44.3 kDa)、aprotinin from bovine lung 及び ethylenediamine-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid disodium salt (EDTA・2NA) は 1-2-2-1 と同様のものを使用し、その他の試薬は全て特級品を使用した。

### 3-2-2-2 実験動物

Figure 13 に hPTH 経鼻投与の薬力学的試験における実験スキームを示す。第3編第1章で作製した Sham 及び OVX ラットを使用し、食餌及び水の供給、並びに飼育を 3-1-2-2 と同様の方法で行った。なお、OVX ラットについて、第3編第1章で測定した卵巣摘出後 12 週 (後述の hPTH 投与開始 0 日) の体重、血漿中骨代謝マーカー濃度及び骨密度が均一となるよう 10 群に分け、後述の hPTH 経鼻及び皮下投与実験を行った。

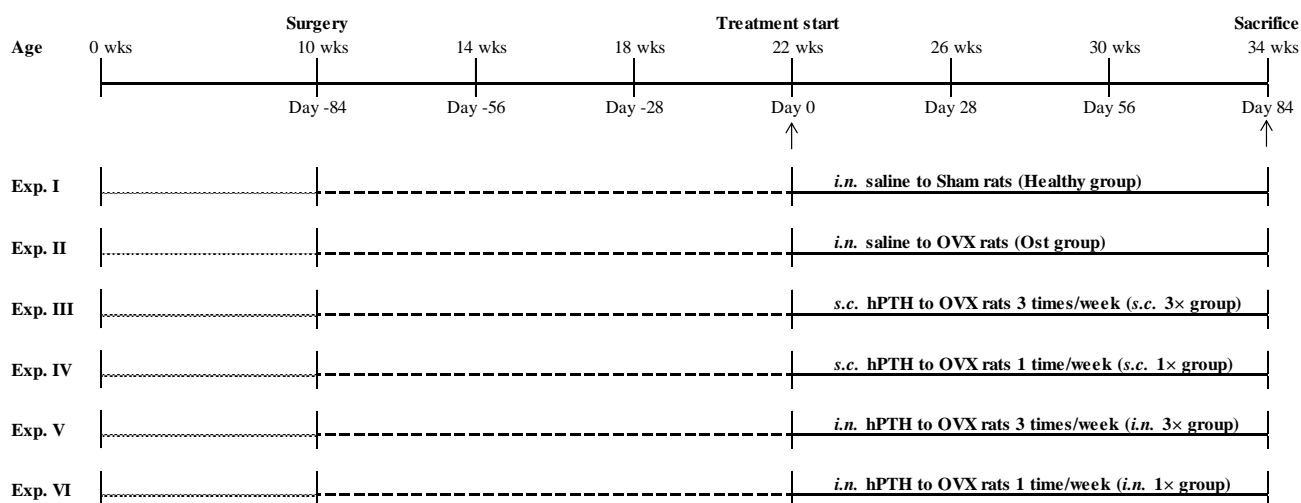


Fig. 13 Study designs of 6 experiments.

10 weeks-old female rats were underwent bilateral ovariectomized (OVX) or Sham surgery (Sham) and were divided into groups ( $n = 8$ ) 84 days (3 months) after surgery. Then, these rats were treated with *s.c.* hPTH, *i.n.* vehicle (saline) or *i.n.* hPTH (with/without the nasal absorption enhancer) 1 or 3 times a week for 84 days (3 months).

Dotted line: no treatment, dashed line: OVX or Sham surgery, continuous line: vehicle or hPTH treatment, arrow: CT scan and blood collection from teail vein.

### 3-2-2-3 体重測定及び健康状態の確認

3-1-2-4 と同様の方法でラット体重の測定及び健康状態の確認を行った。なお、本実験を通じてラットの状態に異常は観察されなかった。

### 3-2-2-4 hPTH 経鼻 (*i.n.*) 投与

イソフルラン（麻酔導入：5.0%，麻酔維持：2.0-2.5%，流量：1.5-2.0 L/min）で OVX ラットを一時的に吸入麻酔した。その後、ポリエチレンチューブ（ヒビキ ポリエチレン細管 No. 4, 長さ 4 cm, 株式会社 三商, 東京）を連結したマイクロシリンジを用いて、hPTH 生理食塩液溶液、0.5% PLA (50) 含有 hPTH 生理食塩液溶液、並びに 1.0% PLO (80) 含有 hPTH 生理食塩液溶液を 1-2-2-3 と同様に共洗いしてから、ラット左鼻腔入口から 8 mm のところに 3 ヶ月間週 1 回（毎週金曜日）投与した。それぞれの群を *i.n. control* 1×/w 群、*i.n. with PLA* 1×/w 群及び *i.n. with PLO (80)* 1×/w 群とした。投与後、仰臥位を維持するために麻酔状態を 1 分間維持し、覚醒したラットをゲージに戻した。また、hPTH 生理食塩液溶液、0.5% PLA (50) 含有 hPTH 生理食塩液溶液、1.0% PLO (80) 含有 hPTH 生理食塩液溶液、並びに 1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 含有 hPTH 生理食塩液溶液（14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg）を上述と同様の方法で 3 ヶ月間週 3 回（毎週火曜、木曜及び土曜日）投与した群をそれぞれ *i.n. control* 3×/w 群、*i.n. with PLA (50)* 3×/w 群、*i.n. with PLO (80)* 3×/w 群及び *i.n. with PLO (80)+PEG* 3×/w 群とした。更に、生理食塩液を OVX 及び Sham ラットに 3 ヶ月間週 3 回投与した群をそれぞれ osteoporosis 群（Ost 群）及び Healthy 群とした。なお、投与後 5 分程度で麻酔からラットは覚醒した。

### 3-2-2-5 hPTH 皮下 (*s.c.*) 投与

3-2-2-4 と同様の方法を用いてイソフルランで吸入麻酔した OVX ラットの頸背部皮下に、先端に注射針（25 G）及びポリエチレンチューブ（ヒビキ ポリエチレン細管 No. 4, 長さ 4 cm）を連結したマイクロシリンジを用いて、hPTH 生理食塩液溶液（14.1 µg/kg, 0.2 mL/kg）を 1-2-2-3 と同様に共洗いしてから 3 ヶ月間週 1 及び 3 回投与した。それぞれの群を *s.c.* 1×/w

群及び *s.c.* 3×/w 群とした。投与後、上述の経鼻投与実験と同様の負荷とするため、麻酔状態を1分間維持し、覚醒したラットをゲージに戻した。

### 3-2-2-6 尾静脈採血

投与後3ヶ月（術後6ヶ月）に3-1-2-5と同様の方法で採血及び遠心分離を行い、得られた血漿を後述の血漿中骨代謝マーカー濃度の測定を行うまで-80°Cで保存した。

### 3-2-2-7 血漿中骨代謝マーカー濃度の測定

3-2-2-6で得られた血漿中の osteocalcin 及び CTX-I 濃度を3-1-2-6と同様の方法でそれぞれ測定した。

### 3-2-2-8 骨密度の測定

投与後3ヶ月（術後6ヶ月）に3-1-2-7と同様の方法で、ラット腰椎（L4及びL5）及び左脛骨の断層撮影及び解析を行い、骨の各パラメータを算出した。

### 3-2-2-9 統計分析

ラット体重を平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で、その他データを平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。各処置群間の骨密度値及び血漿中骨代謝マーカー濃度値の分散を一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析した後に、各処置群間の差を Tukey-Kramer 法を用いて解析した。なお、全ての統計解析は R software (version 3.5.1 for Windows ; <https://www.R-project.org/>) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計的有意とみなした。

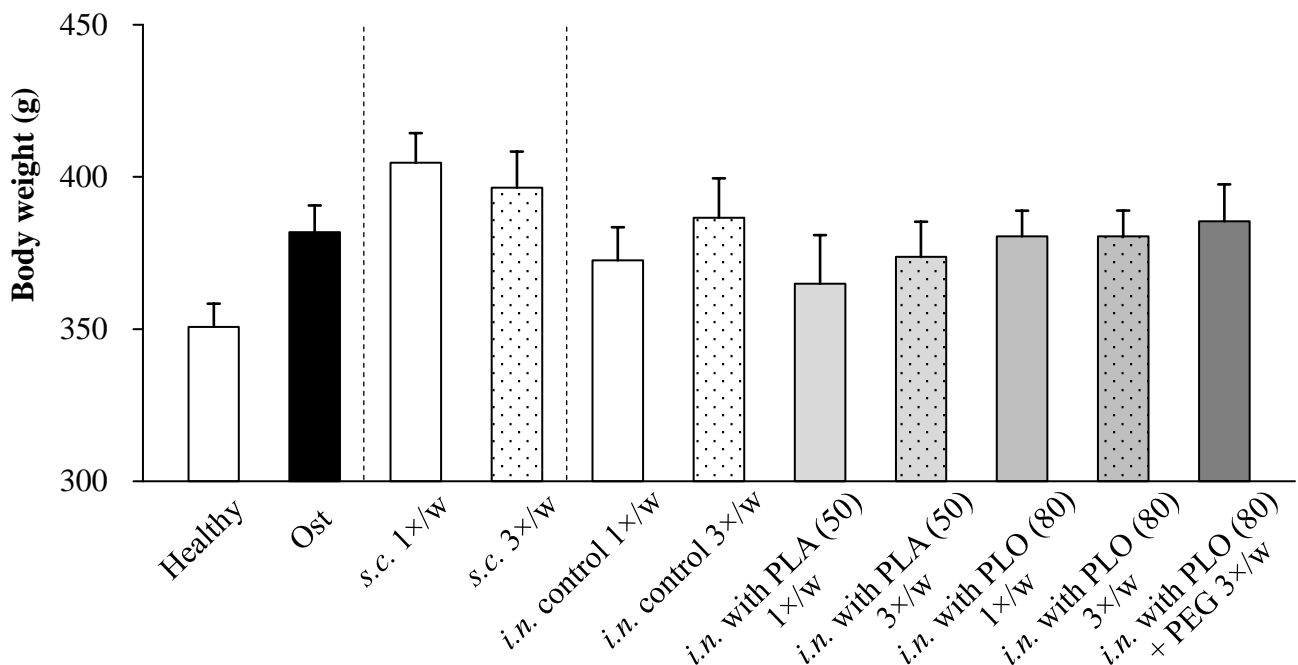


### 第3節 結果

#### 3-2-3-1 体重に及ぼす hPTH 経鼻投与の影響

前章で作製した OVX ラットに hPTH を 3 ヶ月間経鼻投与したときの体重に及ぼすポリカチオン性吸収促進剤 (PLA (50) や PLO (80))、及び PEG の影響を調査した。また、OVX ラットに hPTH を皮下投与した群、並びに OVX 及び Sham ラットにそれぞれ生理食塩液を投与した Ost 及び Healthy 群と比較することで、hPTH 経鼻投与が及ぼす体重の影響を調査した。Figure 14 に種々条件下でラットに 3 ヶ月間処置した後の体重を示す。

前章の結果と同様に、全てのラット群の体重は処置開始後 3 ヶ月まで経時的に増加し (data not shown)、全ての OVX ラット処置群の体重は Healthy 群と比較して高い傾向を示した (Fig. 14)。しかし、OVX ラット処置群間の体重に大きな差は認められなかった。これらの結果から、hPTH の皮下及び経鼻投与は、ラット体重にほとんど影響しないことと考えられた。



**Fig. 14 Body weights 3 months after s.c. and i.n. administrations of hPTH in rats.**  
The results were expressed as the mean ± S.D. (n=4-8).

### 3-2-3-2 骨代謝及び骨密度に対する hPTH 経鼻投与の効果

前章で作製した OVX ラットに hPTH を 3 ヶ月間経鼻投与した後の骨代謝及び骨密度に対するポリカチオン性吸収促進剤 (PLA (50) や PLO (80))、及び PEG の効果を評価した。また、OVX ラットに hPTH を 3 ヶ月間皮下投与した群と比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査した。Table 10 に CT 測定で得られた各ラット群の左脛骨及び腰椎の各パラメータ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) を示す。

Sham ラットに生理食塩液を 3 ヶ月間投与した Healthy 群と比較して、OVX ラットに生理食塩液を投与した Ost 群における脛骨及び腰椎の骨密度は有意に低い値を示した。また、Ost 群の血漿中骨代謝マーカー濃度において、骨形成マーカーである osteocalcin は Healthy 群に比べ低い傾向を、骨吸収マーカーである CTX-I は有意に高い値を示した。これらの結果は、前章における卵巣摘出術あるいは偽手術後 3 ヶ月 (本章における hPTH 投与開始 0 日目) の結果と一致した。

hPTH を週 1 回皮下投与した群 (*s.c.* 1×/w 群) において、一部を除き脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) は、Ost 群と比べ有意に高い値を示したが、Healthy 群よりも低い傾向を示した。一方、hPTH を週 3 回皮下投与した群 (*s.c.* 3×/w 群) では、脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) が Ost 群と比較して有意に高く、Healthy 群とほぼ同等の値を示した。血漿中 osteocalcin 濃度において、Ost 及び Healthy 群と比較して (Ost 群: 5.88 ng/mL, Healthy 群: 7.01 ng/mL)、両皮下投与群のいずれも高く (*s.c.* 1×/w 群: 11.58 ng/mL, *s.c.* 3×/w 群: 12.46 ng/mL)、*s.c.* 1×/w 群に比べ *s.c.* 3×/w 群がやや高い値を示した。血漿中 CTX-I 濃度においては、Ost 群と *s.c.* 1×/w 群がほぼ同等な値を示した一方で (Ost 群: 10.37 ng/mL, *s.c.* 1×/w 群: 10.68 ng/mL)、*s.c.* 3×/w 群がこれら群より低い値を示した (*s.c.* 3×/w 群: 9.27 ng/mL)。

hPTH のみを週 1 回経鼻投与した群 (*i.n.* control 1×/w) において、脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) は、Ost 群と比較してやや高かったが、Healthy 群と比較して有意に低い値を示した。骨代謝マーカーにおいて、上述の hPTH 皮下投与群と同様に、*i.n.* control 1×/w 群の血漿中 osteocalcin 濃度は、Ost 及び Healthy 群に比べ高い傾向を示した。また、*i.n.*

control 1×/w 群の血漿中 CTX-I 濃度は、Ost 群とほぼ同等の値であり、Healthy 群と比較して有意に高い値を示した。hPTH のみを週 3 回経鼻投与した群 (*i.n.* control 3×/w) においても、上述した *i.n.* control 1×/w 群とほぼ同等な脛骨及び腰椎の骨密度値（全、皮質及び海綿骨密度値）並びに血漿中 CTX-I 濃度値が示されたが、全ての条件の中で最も高い血漿中 osteocalcin 濃度値を示した。

hPTH と共にポリカチオン性吸収促進である PLO (80) を週 1 回経鼻投与した群 (*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群) において、脛骨の全骨密度及び皮質骨密度はそれぞれ 691.2 及び 723.8 mg/cm<sup>3</sup> であり、Ost 群のそれぞれ 643.2 及び 684.6 mg/cm<sup>3</sup> と比較して有意に高く、Healthy 群のそれぞれ 701.6 及び 724.6 mg/cm<sup>3</sup> とほぼ同等の値を示した。しかし、*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群におけるその他骨密度（脛骨の海綿骨密度、並びに腰椎の全、皮質及び海綿骨密度）は、Ost 群と比較して高い傾向を示したが、Healthy 群と比較して低い傾向を示した。これに対して、hPTH を PLO (80) と共に週 3 回投与した群 (*i.n.* with PLO (80) 3×/w 群) では、上述の週 1 回投与群 (*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群) と異なり、脛骨及び腰椎における骨密度（全、皮質及び海綿骨密度）は、Ost 群とほぼ同等な値であり、Healthy 群と比較して有意に低い値を示した。また、PLA(50) や、PLO (80) 及び PEG を併用した経鼻投与群においても、脛骨及び腰椎の骨密度（全、皮質及び海綿骨密度）は、Ost 群とほぼ同等な値であり、Healthy 群と比較して低い傾向を示した。血漿中骨代謝マーカー濃度において、ポリカチオン性吸収促進剤や PEG を併用した経鼻投与群の Osteocalcin 濃度は、Ost 及び Healthy 群より高い傾向を示した。また、上記の経鼻投与群の血漿中 CTX-I 濃度は、Ost 群とほぼ同程度の値を示し、Healthy 群より有意に高い値を示した。ポリカチオン性吸収促進剤や PEG を併用した経鼻投与群間を比較したとき、血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度のいずれも、*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群で最も高い値が観察された。また、脛骨及び腰椎で高い骨密度（皮質、海綿及び全骨密度）を示した *s.c.* 3×/w 群の血漿中 osteocalcin 濃度と比較して、*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群は、ほぼ同等の値を示した。

**Table 10 Bone mineral density (BMD) and plasma bone turnover marker concentrations 3 months after s.c. and i.n. administrations of hPTH in rats.**

	Healthy	Ost	s.c. 1×/w	s.c. 3×/w	i.n. control 1×/w	i.n. control 3×/w	PLA (50) 1×/w	PLA (50) 3×/w	PLA (80) 1×/w	PLA (80) 3×/w	i.n. with PLO (80) 1×/w	i.n. with PLO (80) 3×/w	i.n. with PLO (80) + PEG 3×/w
<b>Left tibia</b>													
Integral BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	701.6 ± 7.9	643.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	666.9 ± 5.6	706.9 ± 12.1 <sup>b</sup>	671.8 ± 6.1	661.3 ± 14.3 <sup>a</sup>	651.7 ± 4.8 <sup>a</sup>	663.2 ± 6.9 <sup>a</sup>	691.2 ± 10.8 <sup>b</sup>	654.9 ± 4.6 <sup>a</sup>	646.5 ± 8.3 <sup>a</sup>		
Cortical BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	724.6 ± 7.1	684.6 ± 4.3 <sup>a</sup>	701.3 ± 5.3	731.6 ± 10.2 <sup>b</sup>	697.2 ± 6.0	696.1 ± 12.0	686.9 ± 4.4 <sup>a</sup>	699.2 ± 6.6	723.8 ± 9.9 <sup>b</sup>	687.9 ± 4.3 <sup>a</sup>	685.2 ± 6.7		
Cancellous BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	571.3 ± 16.3	400.9 ± 11.1 <sup>a</sup>	457.6 ± 12.5 <sup>a</sup>	565.2 ± 29.7 <sup>b</sup>	452.8 ± 28.3 <sup>a</sup>	457.2 ± 26.9 <sup>a</sup>	425.3 ± 16.6 <sup>a</sup>	451.9 ± 13.9 <sup>a</sup>	461.2 ± 18.3 <sup>a</sup>	449.4 ± 12.0 <sup>a</sup>	416.5 ± 18.4 <sup>a</sup>		
Plane BMD (mg/cm <sup>2</sup> )	185.5 ± 2.7	164.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	170.5 ± 3.3 <sup>a</sup>	183.8 ± 4.6 <sup>b</sup>	167.9 ± 1.7 <sup>a</sup>	169.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	164.0 ± 3.4 <sup>a</sup>	174.2 ± 3.8	177.7 ± 4.2	171.3 ± 2.1	169.3 ± 5.7		
C.Th (cm)	0.159 ± 0.001	0.161 ± 0.000	0.161 ± 0.001	0.159 ± 0.001	0.163 ± 0.001	0.160 ± 0.000	0.163 ± 0.001	0.161 ± 0.001	0.162 ± 0.001	0.160 ± 0.001	0.164 ± 0.001		
MCMI (ng·cm)	0.718 ± 0.020	0.595 ± 0.024	0.689 ± 0.044	0.709 ± 0.035	0.695 ± 0.028	0.643 ± 0.027	0.661 ± 0.043	0.637 ± 0.032	0.651 ± 0.044	0.663 ± 0.030	0.683 ± 0.026		
PMI (ng·cm)	3.145 ± 0.088	2.551 ± 0.096	2.904 ± 0.213	3.076 ± 0.161	3.094 ± 0.134	2.717 ± 0.106	2.984 ± 0.233	2.865 ± 0.186	2.924 ± 0.176	2.988 ± 0.160	3.156 ± 0.137		
<b>Lumbar spine</b>													
Integral BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	508.2 ± 5.0	418.6 ± 4.5 <sup>a</sup>	445.1 ± 6.7 <sup>a</sup>	494.3 ± 13.9 <sup>b</sup>	431.1 ± 9.7 <sup>a</sup>	450.6 ± 15.5 <sup>a</sup>	424.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	439.0 ± 7.7 <sup>a</sup>	443.9 ± 6.8 <sup>a</sup>	434.5 ± 4.6 <sup>a</sup>	424.1 ± 4.2 <sup>a</sup>		
Cortical BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	536.4 ± 5.1	448.1 ± 4.8 <sup>a</sup>	472.7 ± 6.2 <sup>a</sup>	523.1 ± 13.9 <sup>b</sup>	460.4 ± 9.3 <sup>a</sup>	479.6 ± 15.2 <sup>a</sup>	453.8 ± 5.3 <sup>a</sup>	468.1 ± 7.6 <sup>a</sup>	473.1 ± 6.3 <sup>a</sup>	463.7 ± 3.7 <sup>a</sup>	452.6 ± 3.9 <sup>a</sup>		
Cancellous BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	384.8 ± 9.1	296.8 ± 6.0 <sup>a</sup>	334.2 ± 10.1 <sup>a</sup>	375.3 ± 18.1 <sup>b</sup>	312.0 ± 10.3 <sup>a</sup>	326.3 ± 16.0 <sup>a</sup>	301.0 ± 6.0 <sup>a</sup>	310.6 ± 9.9 <sup>a</sup>	327.9 ± 8.0 <sup>a</sup>	315.1 ± 10.0 <sup>a</sup>	308.8 ± 7.1 <sup>a</sup>		
Plane BMD (mg/cm <sup>2</sup> )	150.7 ± 3.2	119.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	130.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	148.0 ± 6.2 <sup>b</sup>	127.2 ± 3.1 <sup>a</sup>	131.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	120.4 ± 2.7 <sup>a</sup>	124.2 ± 3.4 <sup>a</sup>	130.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	127.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	126.1 ± 1.7 <sup>a</sup>		
C.Th (cm)	0.152 ± 0.001	0.153 ± 0.002	0.152 ± 0.001	0.150 ± 0.001	0.150 ± 0.001	0.153 ± 0.002	0.129 ± 0.026	0.152 ± 0.001	0.151 ± 0.001	0.152 ± 0.001	0.156 ± 0.002		
MCMI (ng·cm)	4.404 ± 0.142	3.253 ± 0.131 <sup>a</sup>	3.661 ± 0.210	4.476 ± 0.267 <sup>b</sup>	3.562 ± 0.160	3.902 ± 0.207	3.171 ± 0.071 <sup>a</sup>	3.350 ± 0.204 <sup>a</sup>	3.695 ± 0.223	3.485 ± 0.243 <sup>a</sup>	3.767 ± 0.117		
PMI (ng·cm)	11.402 ± 0.438	8.032 ± 0.336 <sup>a</sup>	9.239 ± 0.566 <sup>a</sup>	11.638 ± 0.737 <sup>b</sup>	8.923 ± 0.432 <sup>a</sup>	9.629 ± 0.570	8.062 ± 0.244 <sup>a</sup>	8.350 ± 0.507 <sup>a</sup>	9.448 ± 0.580	8.761 ± 0.569 <sup>a</sup>	9.073 ± 0.226		
<b>Bone turnover marker</b>													
Osteocalcin (ng/mL)	7.01 ± 1.06	5.88 ± 0.70	11.58 ± 1.59	12.46 ± 1.85	11.53 ± 1.34	17.87 ± 0.85 <sup>a,b</sup>	10.79 ± 0.97	8.14 ± 1.54	12.62 ± 1.11	9.76 ± 1.94	9.77 ± 1.95		
CTX-1 (ng/mL)	8.25 ± 0.12	10.37 ± 0.37 <sup>a</sup>	10.68 ± 0.38 <sup>a</sup>	9.27 ± 0.15 <sup>a</sup>	11.61 ± 0.32 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.20 <sup>a</sup>	11.31 ± 0.28 <sup>a</sup>	10.15 ± 0.21 <sup>a</sup>	12.35 ± 0.33 <sup>a</sup>	11.11 ± 0.54 <sup>a</sup>	10.70 ± 0.55 <sup>a</sup>		

The results were expressed as the mean ± S.E. (n=4-8).

<sup>a</sup>p < 0.05 compared with Healthy (Tukey-Kramer's test).

<sup>b</sup>p < 0.05 compared with Ost (Tukey-Kramer's test).

#### 第4節 考察

hPTH の薬理作用に関する過去の知見から、hPTH が骨形成促進作用及び骨密度増加作用を示すためには、血中 hPTH 濃度の高さ ( $C_{max\ hPTH}$ )、血中 hPTH 濃度が高く維持している時間 ( $MRT_{hPTH}$ ) 及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が重要である<sup>48-51)</sup>。第2編第2章において、ポリカチオン性吸収促進剤 (PLA 及び PLO)、及び PEG を併用した hPTH の経鼻投与における  $C_{max\ hPTH}$  は皮下投与と同等以上の値を示したが、 $MRT_{hPTH}$  は皮下投与と比較して長く、皮下投与より血漿中 hPTH 濃度推移が持続することから、投与間隔を延長することなどの投与プロトコルの最適が必要であると考えられた。そこで本章では、hPTH の経鼻投与による薬理評価を目的として、投与間隔をより延長した週1回投与を、本実験で用いた hPTH の投与量において皮下投与で骨密度増加作用が報告されている週3回投与に加えて行った<sup>6, 75)</sup>。すなわち、hPTH 単独の経鼻投与に加えて、第2編第2章において、皮下投与とほぼ同等の  $C_{max\ hPTH}$  及び  $F_{hPTH}$  を示した 0.5% PLA (50)、それらの値が皮下投与の約2倍高かった 1.0% PLO (80)、並びに 1.0% PLO (80) 併用経鼻投与と比較して更に  $C_{max\ hPTH}$  が高かった 1.0% PLO (80) 及び 5% PEG 併用経鼻投与について、第3編第1章で作製した卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに hPTH を3ヶ月間週1あるいは3回経鼻投与した後の薬理効果を、血漿中骨代謝マーカー濃度 (血漿中 osteocalcin 及び CTX-I 濃度) 及び骨密度を測定することで評価した。そして、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。なお、骨代謝回転の指標である骨単位活性化率は、6~9ヶ月齢の卵巣摘出ラットで 0.87~1.62 回/年、閉経後骨粗鬆症女性の腸骨で 0.18~0.69 回/年と報告されている<sup>6)</sup>。すなわち、ラットの骨代謝回転はヒトに比べ3倍程度速く、ラットにおける週3回投与はヒトにおける週1回投与に、ラットにおける週1回投与はヒトにおける月1回程度に相当すると考えられた。

OVX 及び Sham ラットにそれぞれ生理食塩液を3ヶ月間経鼻投与した Ost 及び Healthy 群において、前章における卵巣摘出術及び偽手術3ヶ月後 (本章における hPTH 投与開始0日目) と同様の結果が得られた。すなわち、Ost 群の脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) は、Healthy 群と比較して有意に低い値を示した。また、Ost 群の血漿中 osteocalcin

濃度は Healthy 群と比較して低い傾向を、血漿中 CTX-I 濃度は有意に高い値を示した。従って、本章においても卵巣摘出モデルラットの作製が改めて確認された。

hPTH を週 1 回皮下投与した群 (*s.c.* 1×/w 群) において、脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) は Ost 群に比べて高い値を示したが、Healthy 群より低い傾向を示した。一方、週 3 回皮下投与した群 (*s.c.* 3×/w 群) は、脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) が Ost 群に比べて有意に高く、Healthy 群とほぼ同等の値を示した。この結果から、hPTH の週 1 回皮下投与は、その週 3 回皮下投与と比較して、投与間隔の延長による休薬時間が長くなり、hPTH による骨形成促進作用が発揮されている時間が短かったため、結果的に骨密度改善作用が低下したと考えられた。hPTH の皮下投与における投与間隔の延長、すなわち休薬時間の延長が hPTH の骨密度改善作用を減弱することが示された。血漿中骨代謝マーカー濃度において、両皮下投与群の血漿中 osteocalcin 濃度が Ost 群に比べて高く、*s.c.* 1×/w 群より *s.c.* 3×/w 群の方が高い値を示した。この結果から、投与間隔に関係なく皮下投与された hPTH は、骨形成促進作用を発揮していることが示唆された。また、hPTH の週 1 回皮下投与と比較して、その週 3 回皮下投与の方がより強力な骨形成促進作用が発揮されていることが考えられた。一方、血漿中 CTX-I 濃度において、*s.c.* 1×/w 群と Ost 群がほぼ同等な値を、*s.c.* 3×/w 群は Ost 群に比べて低い値を示した。また、この結果から、hPTH の週 1 回皮下投与は骨吸収に対して影響しなかった一方で、hPTH の週 3 回皮下投与は骨吸収を抑制したと推察された。一般的に、hPTH は、骨形成及び骨吸収の両方を促進するが、間欠的に投与したときに骨形成促進作用が骨吸収促進作用より優位となり、結果的に骨密度及び骨強度増加作用を示す<sup>5-10)</sup>。Shiraki らは、ヒトに hPTH の週 1 回皮下投与製剤を単回投与し、その後 14 日間の血漿中骨代謝マーカー濃度推移を報告している<sup>76)</sup>。そこで、血漿中骨形成マーカー濃度は hPTH 投与直後に低下した後に増加する一方で、血漿中骨吸収マーカー濃度は hPTH 投与直後に増加した後に低くなることが示されている<sup>76)</sup>。また、Sugimoto らは、ヒトへの hPTH の週 1 回皮下投与製剤の反復投与試験において、上述した Shiraki らの単回投与と同様の傾向が認められ、その反応性は減弱することなく蓄積することを報告している<sup>77)</sup>。これらの報告は、ヒトへの hPTH の週 1 回皮下投与において、骨形成は持続的に促進される

一方で、骨吸収は一過的に促進された後に抑制されることを示唆している。上述したように、hPTH において、ヒトへの週 1 回投与がラットへの週 3 回投与に相当すると考えられ<sup>6)</sup>、ヒトへの週 1 回皮下投与における血漿中骨代謝マーカー濃度の傾向は、本実験のラットへの週 3 回皮下投与のそれと一致した<sup>76,77)</sup>。従って、ラットへの hPTH の週 1 回皮下投与は、hPTH による骨形成促進作用が発揮される期間が短く、休薬期間中の卵巣摘出による骨吸収亢進作用が相対的に強かったため、結果的に Healthy 群と同程度まで骨密度を改善しなかったと考えられた。また、ラットへの hPTH の週 3 回皮下投与は、骨形成促進作用が発揮される期間がその週 1 回皮下投与に比べて長いだけでなく、骨形成促進及び骨吸収抑制作用が発揮されたため、結果的に Healthy 群と同程度まで骨密度を改善したと考えられた。

hPTH のみを週 1 及び 3 回経鼻投与した群 (*i.n.* control 1×/w 及び 3×/w) において、一部を除き脛骨及び腰椎の骨密度 (全、皮質及び海綿骨密度) は、Ost 群と比較してやや高い傾向を示したが、Healthy 群と比較して有意に低い値を示した。これらの結果は、主に hPTH 単独経鼻投与の  $C_{max\text{hPTH}}$  が皮下投与より低いため、骨密度改善作用が発揮されなかったと考えられた。骨代謝マーカーにおいて、上記の hPTH 単独経鼻投与群の血漿中 osteocalcin 濃度は、Ost 及び Healthy 群に比べ高く、*i.n.* control 1×/w において本実験の処置群の中で最も高い値が観察された。hPTH 単独経鼻投与群の血漿中 CTX-I 濃度は、Ost 群とほぼ同等の値であり、Healthy 群と比較して有意に高い値を示した。hPTH 投与による骨形成作用と血漿中 osteocalcin 濃度は、正に相関することが知られているが<sup>6,67,68,69)</sup>、*i.n.* control 1×/w の骨密度の結果と異なる。上述したように、卵巣摘出ラットにおける骨代謝回転速度は、ヒトのそれに比べて速いが、0.87~1.62 回/年と非常に遅いため、薬物等による骨粗鬆症治療の評価には比較的長期間の試験が必要とされている<sup>6,60)</sup>。本邦における「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン」においても、卵巣摘出ラットなどの齧歯類を用いた骨に対する薬物などの評価には、半年あるいは年単位の試験の実施が推奨されている<sup>60)</sup>。しかし、hPTH 皮下投与においては、比較的短期間 (約 3 ヶ月) で卵巣摘出ラットに対して骨密度増加作用を示すことから<sup>6)</sup>、本章では hPTH 投与 3 ヶ月後の薬理効果を評価した。従って、*i.n.* control 1×/w において、高い血漿中 osteocalcin 濃度を示していたことから、骨形成促進作用が発揮

されていたが、 $C_{max\text{hPTH}}$  が低いためにその作用が弱く、骨密度改善作用を示すには試験期間が十分ではなかった可能性が考えられた。

PLO (80) を併用して週 1 回投与した群 (*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群) を除き、ポリカチオン性吸収促進剤や PEG を併用した hPTH 経鼻投与群の脛骨及び腰椎の骨密度 (皮質、海綿及び全骨密度) は、投与間隔に関係なく、Ost 群と比較して高い傾向を示したが、Healthy 群と比較して有意に低い値を示した。一方、*i.n.* with PLO (80) 1×/w 群では、腰椎の骨密度 (皮質、海綿及び全骨密度) は、その他経鼻投与群と同様に Ost 群に比べ高い傾向を示したが、脛骨の皮質骨密度及び全骨密度は、Ost 群と比較して有意に高く、Healthy 及び *s.c.* 3×/w 群とほぼ同等の値を示した。すなわち、PLO (80) を併用した hPTH の週 1 回経鼻投与は、週 3 回皮下投与とほぼ同程度の皮質骨密度改善作用が得られることが示された。上述したように、ラットにおける週 1 回投与がヒトにおける月 1 回程度に相当すると考えられ<sup>6)</sup>、PLO (80) を併用した hPTH の週 1 回経鼻投与は、既存の hPTH 皮下注射製剤 (連日及び週 1 回投与製剤) より低頻度の投与回数で骨密度改善作用が得られる可能性を示唆した。第 2 編第 2 章における  $MRT_{\text{hPTH}}$  が PLO (80) 併用群とほぼ同程度の PLA (50) 併用群において、投与間隔の延長により hPTH の骨密度改善作用が認められなかった。血中 hPTH 濃度の高さ ( $C_{max\text{hPTH}}$ ) は、hPTH の骨形成促進作用に対して正に働くと考えられ<sup>5, 6)</sup>、第 2 編第 2 章において PLA (50) 併用群の  $C_{max\text{hPTH}}$  が PLO (80) 併用群に比べ 1/2 程度と低く、骨形成促進作用がより弱かったため、結果的に骨密度改善作用が得られなかったと推察された。PLA による吸収促進効果の強度は、その分子量及び適用濃度に依存することから<sup>26, 27)</sup>、併用経鼻投与する PLA の分子量及び適用濃度、並びに投与間隔を調節することで、骨同化作用が得られると考えられた。

血漿中骨代謝マーカー濃度において、ポリカチオン性吸収促進剤 (PLA 及び PLO) や PEG を併用した経鼻投与群は、Ost 及び Healthy 群より高い血漿中 osteocalcin 濃度値を示した。その経鼻投与群の中でも、骨密度改善作用を示した、*i.n.* with PLO (80) 1×/w 及び *s.c.* 3×/w 群は、血漿中 osteocalcin 濃度が顕著に高く、両群間がほぼ同程度の値を示した。血漿中 CTX-I 濃度において、いずれの経鼻投与群も Ost 群とほぼ同程度の値を、Healthy 群より有意に高



い値を示した。副甲状腺ホルモンの過剰症である原発性副甲状腺機能亢進症において、hPTH を持続投与したときと同様に骨吸収が亢進し、主に皮質骨の骨量及び骨密度が低下する。一方、hPTH の皮下投与製剤は、骨形成を促進することで、主に海綿骨の骨量及び骨密度を増加させる<sup>5,6)</sup>。従って、hPTH の血中動態特性の違いは、骨形成及び骨吸収促進作用といった薬理作用の発揮だけでなく、皮質骨や海綿骨といった骨の種類に対する作用の方向性も決定していると考えられた。すなわち、PLO (80) を併用した経鼻投与群において、腰椎と比較して皮質骨の割合が多い脛骨に対して hPTH による骨密度改善作用が強く発揮されたが、投与間隔が延長されたことで、その作用が変化すると推察された。

以上のことから、ポリカチオン性吸収促進剤を併用した hPTH の経鼻投与は、投与間隔を調節することで、皮下投与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。ポリカチオン性吸収促進剤の有効性は確認されたが、粘膜付着効果を期待した PEG については、PLO (80) 及び PEG を併用した hPTH 経鼻投与は週 3 回投与しか行わなかったため、その有効性が明確にならなかった。PLO のみを併用した経鼻投与において、投与間隔を週 3 回から週 1 回に減らすことで骨密度改善作用を示したことから、PLO 及び PEG を併用した経鼻投与においても、投与間隔を調節することでその作用が期待でき、更なる検討が必要である。hPTH 製剤において、血中 Ca 濃度は本製剤の安全性を考えるうえで重要であるが、本章では血漿中骨代謝マーカー濃度を測定する都合上サンプル量が不足し、測定できなかった。本実験に用いた OVX ラットの摂食量、体重及び目視した健康状態は、生理食塩液を投与した群 (Ost 群) と差がほとんどなかったことから、その懸念はほぼないと考えられるが、hPTH 経鼻投与における安全性に関する評価が必要である。更に、ヒトへの臨床応用を考慮したとき、ラットとヒトの鼻腔内構造は解剖学的に異なることから、ヒトにおける hPTH 経鼻投与後の血中動態特性はラットと異なる可能性がある。また、骨粗鬆症の研究に汎用されるラットを含む齧歯類は、一生に渡り骨量が増大し続けるモデリング動物である<sup>60,61)</sup>。一方、ヒトを含む霊長類は、成長期までモデリングが、それ以降はリモデリングが主体である<sup>2,60)</sup>。すなわち、ラットにおける骨代謝の大部分は、モデリングの割合が高く、ヒトと異なるため、齧歯類に用いた条件をヒトに適用することが難しいとされている。

そのため、本邦における「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン」において、骨粗鬆症治療薬候補の効果をモデル動物で検討する際には、少なくともモデリング動物とリモデリング動物を含んだ 2 種類を用いることが推奨されている<sup>60)</sup>。しかしながら、本研究における hPTH 経鼻投与製剤化の検証プロセスは、リモデリング動物においても同様に適用可能であり、今後これらの問題が明らかとなり、hPTH 経鼻投与製剤が臨床応用できる日が来るものと期待される。

## 結論

本研究では、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 (PLA 及び PLO) の経鼻吸収促進効果、並びに PEG の鼻粘膜滞留性改善効果を動態学的に評価した。また、薬力学的な検討を通じて、上記の物質を併用した hPTH 経鼻投与の有効性を評価した。

hPTH の経鼻吸収に対する上記のポリカチオン性吸収促進剤の効果は、これまでに検討されていなかった。また、PLA はその分子量及び適用濃度依存的に水溶性高分子薬物の経鼻吸収を促進することが、PLO については報告されていなかった。そこで、まず初めに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、hPTH とほぼ同等の分子量を有することに加え、薬物自体の代謝及び分解がほとんど無い FD-4 と共に異なる分子量及び濃度の PLO を経鼻投与することで、水溶性高分子薬物の経鼻吸収性に対する PLO の効果を動態学的に評価し、また PLO の分子量及び適用濃度の影響も検討した。上述の検討及び PLA に関する過去の知見を踏まえて、hPTH 経鼻投与に用いる PLA 及び PLO の分子量を選択し、hPTH の経鼻吸収性に対する PLA 及び PLO の効果を動態学的に評価した。次に、hPTH の鼻粘膜滞留性を高めるために、粘膜付着性物質である PEG を用いて、水溶性高分子薬物の経鼻吸収に対する PEG の影響を、モデル水溶性高分子薬物である FD-4 を用いて動態学的に評価した。動態学的な滞留性改善効果は、閉鎖系経鼻投与に加え、ラットを傾斜させて食道側から投与溶液が流出できるようにした開放系経鼻投与も行い、両者を比較することで評価した。更に、同様な検討を hPTH でも行った。最後に、これまで検討した hPTH の経鼻投与条件の薬力学的評価を目的として、卵巣摘出することで骨粗鬆症を誘導したラットに hPTH を 3 ヶ月間経鼻投与し、以下の結論を得た。

### 1. hPTH の経鼻吸収に対するポリカチオンの効果

PLO による水溶性高分子薬物の経鼻吸収促進効果を明らかにするため、分子量が hPTH 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 FD-4 を用いて、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 を投与した後の FD-4 の動態学的パラメータを評価した。一部の条件を除き、PLO は FD-4 の経鼻吸収を促進し、その吸収促進効果は PLO の分子量及び適用濃度に依存した。しかしながら、0.5 及び 1.0% PLO 併用群における FD-4 の動態学的パラメータに大きな差が認められなかったことから、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と考えられた。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したことから、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された。従って、PLO の水溶性高分子薬物の経鼻吸収促進効果の強度は、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。

FD-4 を用いた検討において吸収促進効果が最も高かった分子量約 80 kDa の PLO (PLO (80)) と、Natsume らの報告から吸収促進効果及び安全性が高かった分子量約 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検討した。また、皮下投与後の血漿中 hPTH 濃度推移と比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査した。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、血中 hPTH 濃度の高さ (最高血漿中 hPTH 濃度 ( $C_{max\text{hPTH}}$ ))、血中 hPTH 濃度が高く維持している時間 (hPTH の血中滞留時間 ( $MRT_{\text{hPTH}}$ )) 及び休薬時間 (投与間隔) の最適化が重要である。hPTH 単独の経鼻投与は皮下投与に比べ  $C_{max\text{hPTH}}$  及びバイオアベイラビリティ ( $F_{\text{hPTH}}$ ) が半分以下と低いうえ、皮下投与に類似した一過的な血漿中 hPTH 濃度の上昇及び速やかな消失を示さなかったことから、hPTH 単独の経鼻投与は骨形成及び骨密度増加作用を得るには不適切であると考えられた。一方、いずれの濃度においても、PLA (50) (0.25, 0.5 及び 1.0%) 及び PLO (80) (0.1, 0.25, 0.5 及び 1.0%) は hPTH の経鼻吸収を促進し、それらの促進効果は適用濃度依存的であった。一部の条件を除き、PLA (50) 又は PLO (80) を併用した経鼻投与は、皮下投与以上の  $C_{max\text{hPTH}}$  及び  $F_{\text{hPTH}}$  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 濃度の上昇及び速やかな消失を示した。血漿中 hPTH 濃度推移の持続性を示す  $MRT_{\text{hPTH}}$  値において、上記の吸収促進剤を併用した経鼻投与は、

皮下投与に比べて高く、皮下投与より血漿中 hPTH 濃度推移が持続的する傾向を示した。しかしながら、投与間隔を調節することで hPTH が骨密度増加作用を示すことから、PLA (50) 又は PLO (80) を併用した hPTH の経鼻投与は、投与間隔を調節することで骨形成及び骨密度増加作用が得られる可能性を示唆した。従って、PLA (50) 又は PLO (80) を併用した hPTH 経鼻投与製剤は、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示された。

## 2. 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

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表面積に及ぼす PEG 添加の影響を評価した。いずれの濃度 (1 及び 5%) においても、PEG は、経鼻投与液の粘膜接触表面積を僅かに低下した程度であり、濃度依存的に溶液の粘度を増大させた。次に、PEG の添加による接触表面積の僅かな変化が水溶性高分子薬物の経鼻吸収性に影響する可能性を考慮し、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 を併用した全ての条件において、 $F_{0/c}$  値で示される FD-4 の鼻粘膜滞留性が改善され、その改善効果は併用する PEG 濃度 (1 及び 5%) に依存した。従って、PEG は、主に粘度を増大させることで、水溶性高分子薬物の鼻粘膜滞留性を改善すると推察された。

FD-4 を用いた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 を用いて、PLO 併用下における hPTH の経鼻吸収性に対する PEG 添加の影響を評価した。また、皮下投与後の hPTH の動態学的パラメータと比較することで、hPTH の経鼻投与製剤化の可能性を調査した。0.5% PLO 併用下において、5% PEG の添加が hPTH の鼻粘膜滞留性改善効果の指標である  $F_{aw/an}$  値を増大させた一方で、1.0% PLO 併用下ではその効果が認められなかった。これは、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、経鼻吸収促進剤及び粘膜付着性物質を併用した経鼻投与における吸収性の改善には、併用するこれら物質の濃度などを最適化する必要があることが示された。

### 3. 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及びその偽手術ラットを用いて、種々添加物 (PLA(50)、PLO(80)、及びPEG) を併用して hPTH を3ヶ月間週1及び3回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。hPTH を週1回皮下投与した群において、皮質骨及び海綿骨の割合がそれぞれ高い脛骨及び腰椎の骨密度が卵巣摘出骨粗鬆症ラットに生理食塩液を経鼻投与した群 (Ost 群) より高かったが、偽手術を施したラットに生理食塩液を経鼻投与した群 (Healthy 群) より低い値を示した。一方、hPTH を週3回皮下投与した群における脛骨及び腰椎の骨密度は、Ost 群より有意に高く、Healthy 群とほぼ同等な値を示した。骨形成マーカーである血漿中 osteocalcin 濃度において、両皮下投与群は、Ost 群よりも高く、Healthy 群とほぼ同等の値を示した。一方、骨吸収マーカーである血漿中 CTX-I 濃度において、hPTH の Ost 群と週1回皮下投与した群は同程度であった一方で、hPTH を週3回皮下投与した群はそれら群と比較して低い値が観察された。また、これらの結果から、hPTH の週1回皮下投与は骨形成を促進したが、休薬期間中の卵巣摘出による骨吸収亢進作用が hPTH の骨形成促進作用より強く発揮されたため、結果的に hPTH の骨密度改善作用が得られなかったと推察された。また、hPTH の週3回皮下投与は、骨形成促進作用だけでなく骨吸収抑制作用を示したため、強力な骨密度改善作用が得られたと考えられた。経鼻投与において、一部の条件を除き、hPTH 単独、及び上記の吸収促進剤や PEG を併用した hPTH の経鼻投与は、投与頻度に関係なく、Ost 群に比べやや高い骨密度値を示したが、hPTH の週3回皮下投与に匹敵する骨密度値を示さなかった。PLO(80) 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 Ost 群より有意に高く、Healthy 群及び週3回皮下投与群と同程度の値を示したが、その他骨密度値 (脛骨の海綿骨密度値、並びに腰椎の全、皮質及び海綿骨密度値) は、上述した経鼻投与群と同様の傾向を示した。血漿中骨代謝マーカー濃度において、

ポリカチオン性吸収促進剤（PLA 及び PLO）や PEG を併用した経鼻投与群は、Ost 及び Healthy 群より高い血漿中 osteocalcin 濃度値を示した。その経鼻投与群の中でも、骨密度改善作用を示した、PLO (80) を併用した hPTH の週 1 回経鼻投与群並びに hPTH の週 3 回皮下投与群は、血漿中 osteocalcin 濃度が顕著に高く、両群間がほぼ同程度の値を示した。血漿中 CTX-I 濃度において、いずれの経鼻投与群も Ost 群とほぼ同程度の値であり、Healthy 群より有意に高い値を示した。これらの結果から、hPTH の経鼻投与における血漿中 hPTH 濃度推移が皮下投与より持続的であったことから、投与間隔を延長することで hPTH の骨密度改善作用が発揮されたと考えられた。また、皮下及び経鼻投与における hPTH の血中動態特性の差が骨形成及び骨吸収促進作用といった薬理作用の発揮だけでなく、皮質骨や海綿骨といった骨の種類に対する作用の方向性も決定していると考えられた。すなわち、PLO (80) を併用した経鼻投与群において、腰椎と比較して皮質骨の割合が多い脛骨に対して hPTH による骨密度改善作用が強く発揮されたが、投与間隔が延長されたことで、その作用が変化すると推察された。

以上のことから、ポリカチオン性吸収促進剤を併用した hPTH の経鼻投与は、投与間隔を調節することで、皮下投与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。PLO の有効性は確認されたが、粘膜付着効果を期待した PEG については、PLO (80) 及び PEG を併用した hPTH 経鼻投与は週 3 回投与しか行わなかったため、その有効性が明確にならなかった。PLO のみを併用した経鼻投与において、投与間隔を週 3 回から週 1 回に減らすことで骨密度改善作用を示したことから、PLO 及び PEG を併用した経鼻投与においても、投与間隔を調節することでその作用が期待でき、更なる検討が必要である。

本研究ではラットを用いて検討を行ったが、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。このため、hPTH 経鼻投与製剤を臨床応用するためには、上述のように、ヒトにおいて hPTH の吸収性を制御する製剤学的工夫が必要なだけでなく、ヒトと同等の鼻腔内構造及び骨代謝を有する霊長類（サルなど）における検討も必要となる。それらを今後検討することにより、優れた hPTH 経鼻送達システムとなることが期待される。

## 謝辞

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

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

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

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

また、本論文の作成、学位論文審査にあたり、ご教示とご校閲をいただきました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座 関俊暢 先生、城西大学大学院薬学研究科有機薬科学講座 山ノ井孝 先生、城西大学大学院薬学研究科食毒性学講座 和田政裕 先生に感謝の意を表します。

テリパラチド酢酸塩原末を提供していただき、本研究の機会を与えてくださいました 旭化成ファーマ株式会社 島津正康 医薬営業本部長、青木喜和 医薬事業推進総部長に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を頂きました、博士 川島亮 氏、博士 神矢佑輔 氏、城西大学大学院薬学研究科製剤学講座諸氏、ならびに城西大学薬学部製剤学研究室諸氏をはじめとする関係諸氏に心より感謝致します。

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



## 引用文献

- 1) 内閣府(2017)「第1章高齢化の状況(第一節)」, < [http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2017/html/gaiyou/s1\\_1.html](http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2017/html/gaiyou/s1_1.html) > 2018年6月11日アクセス.
- 2) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作製委員会. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版.
- 3) KH Chang, CJ Chung, CL Lin, FC Sung, TN Wu, CH Kao. Increased risk of dementia in patients with osteoporosis: a population-based retrospective cohort analysis. *AGE*, **36**: 967-975 (2014).
- 4) M Saito, S Mori, T Mashiba, S Komatsubara, K Marumo. Collagen maturity, glycation indeced-pentosidine, and mineralization are increased following 3-year treatment with incadronate in dogs., *Osteoporos. Int.*, **19**: 1343-1354 (2008).
- 5) 日本イーライリリー株式会社. ファルテオ®皮下注キット 600 µg インタビューフォーム.
- 6) 旭化成ファーマ株式会社. テリボン®皮下注用 56.5 µg インタビューフォーム.
- 7) H Dobnig, R T Turner. The Effects of Programmed Administration of Human Parathyroid Hormone Fragment (1-34) on Bone Histomorphometry and Serum Chemistry in Rats. *Endocrinology*, **138**: 4607-4612 (1997).
- 8) C A Frolik, E C Black, R L Cain, J H Satterwhite, P L Brown-Augsburger, M Sato, J M Hock. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone*, **33**: 372-379 (2003).
- 9) T Yamamoto, T Hasegawa, M Sasaki, H Hongo, K Tsuboi, T Shimizu, M Ota, M Haraguchi, M Takahata, K Oda, PH Luiz de Freitas, A Takakura, R Takao-Kawabata, Y Isogai, N Amizuka. Frequency of Teriparatide Administration Affects the Histological Pattern of Bone Formation in Young Adult Male Mice. *Endocrinology*, **157**: 2604-2620 (2016).
- 10) M Shimizu, H Noda, E Joyashiki, C Nakagawa, K Asanuma, A Hayasaka, M Kato, M Nanami, M

- Inada, C Miyaura, T Tamura. The Optimal Duration of PTH (1–34) Infusion Is One Hour per Day to Increase Bone Mass in Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**: 625-630 (2016).
- 11) M Saito, K Marumo. The effects of parathyroid hormone (teriparatide) on bone quality in osteoporosis. *CLINICAL CALCIUM*, **22**: 45-57 (2012).
- 12) M Saito, K Marumo, Y Kida, C Ushiku, S Kato, R Takao-Kawabata, T Kuroda. Changes in the contents of enzymatic immature, mature, and non-enzymatic senescent cross-links of collagen after once-weekly treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months contribute to improvement of bone strength in ovariectomized monkeys. *Osteoporos. Int.*, **22**: 2373-2383 (2011).
- 13) T Richardson, D Kerr. Skin-related complications of insulin therapy: epidemiology and emerging management strategies. *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**: 661-667 (2003).
- 14) D Raimier-Hall, H C Shea. Evaluation of growth hormone devices: matching devices with patients. *Pediatr Nurs.*, **41**: 72-77 (2015).
- 15) G E Macalino, K W Springer, Z S Rahman, D Vlahov, T S Jones. Community-based programs for safe disposal of used needles and syringes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **18**: S111-119 (1998).
- 16) 松浦 誠, 福山 拓秀, 佐々木 照明, 三留 省悦. インスリン自己注射器具の廃棄に関する現状と課題. 日本病院薬剤師会雑誌, **37**: 1029-1033 (2001).
- 17) 中野 玲子, 朝倉 俊成, 虎石 顕一, 武藤 達也. インスリン自己注射針の廃棄に関する実態と調査. *Prog. Med.*, **24**: 845-851 (2004).
- 18) L Drudge-Coates. Improving management of patients with advanced cancer. *Patient Prefer. Adherence*, **4**: 415 (2010).
- 19) M Peyrot, RR Rubin, DF Kruger, LB Travis. Correlates of insulin injection omission. *Diabetes Care*, **33**: 240–245 (2010).
- 20) N Mygind, R Dahl. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **29**: 13-38 (1998).
- 21) A S Harris. Review: Clinical opportunities provided by the nasal administration of peptides. *J.*

*Drug Target.*, **1**: 101-116 (1993).

- 22) C McMartin, L E F Hutchinson, R Hyde, G E Peters. Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.*, **76**: 535-540 (1987).
- 23) H R Costantino, L Illum, G Brandt, P H Johnson, S C Quay. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int. J. Pharm.*, **337**: 1-24 (2007).
- 24) M Miyamoto, H Natsume, I Satoh, K Ohtake, M Yamaguchi, D Kobayashi, K Sugibayashi, Y Morimoto. Effect of poly-L-arginine on the nasal absorption of FITC-dextran of different molecular weights and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in rats. *Int. J. Pharm.*, **226**: 127-138 (2001).
- 25) H Natsume, S Iwata, K Ohtake, M Miyamoto, M Yamaguchi, K Hosoya, D Kobayashi, K Sugibayashi, Y Morimoto. Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **185**: 1-12 (1999).
- 26) M Miyamoto, H Natsume, S Iwata, K Ohtake, M Yamaguchi, D Kobayashi, K Sugibayashi, Y Morimoto. Improved nasal absorption of drugs using poly-L-arginine: effects of concentration and molecular weight of poly-L-arginine on the nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 21–30 (2001).
- 27) K Ohtake, H Natsume, H Ueda, Y Morimoto. Analysis of transient and reversible effects of poly-L-arginine on the *in vivo* nasal absorption of FITC-dextran in rats. *J. Control. Release*, **82**: 263-275 (2002).
- 28) K Ohtake, T Maeno, H Ueda, H Natsume, Y Morimoto. Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in Vitro. *Pharm Res.*, **20**: 153-60 (2003).
- 29) K Ohtake, T Maeno, H Ueda, M Ogihara, H Natsume, Y Morimoto. Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/ threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharm Res.*, **20**: 1838-45 (2003).
- 30) T Yamaki, K Ohtake, K Ichikawa, M Uchida, H Uchida, S Oshima, K Juni, J Kobayashi, Y

- Morimoto, H Natsume. Poly-L-arginine-Induced internalization of tight junction proteins increases the paracellular permeability of the Caco-2 cell monolayer to hydrophilic macromolecules. *Bio. Pharm. Bull.*, **36**: 432-41 (2013).
- 31) T Yamaki, Y Kamiya, K Ohtake, M Uchida, T Seki, H Ueda, J Kobayashi, Y Morimoto, H Natsume. A Mechanism Enhancing Macromolecule Transport Through Paracellular Spaces Induced by Poly-L-Arginine: Poly-L-Arginine Induces the Internalization of Tight Junction Proteins via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Pharm Res.*, **31**: 2287-96 (2014).
- 32) Y Kamiya, T Yamaki, S Omori, M Uchida, K Ohtake, M Kimura, H Yamazaki, H Natsume. Improved intranasal retentivity and transnasal absorption enhancement by PEGylated poly-L-ornithine. *Pharmaceuticals*, **11**, (2018).
- 33) 川上 隆博. 高分子薬物の経鼻吸収性に対する poly-L-ornithine の促進効果に関する研究 (2) –Poly-L-ornithine 経鼻投与後の安全性 (タンパク質及び LDH の漏出性) –. 城西大学卒業論文 (2014).
- 34) 入江 博美, 大竹 一男, 前野 拓也, 内田 昌希, 内田 博之, 小林 順, 夏目 秀視. カルセイン含有デンプン溶液の経鼻投与後の鼻腔滞留性とカルセイン血中動態との関係. *薬剤学*, **69**: 219-227 (2009).
- 35) 川島 亮. 鼻粘膜滞留性および鼻粘膜透過性の向上によるヒト成長ホルモン経鼻送達の改善に関する研究. 城西大学大学院博士論文 (2016).
- 36) 武田 里沙. 水溶性高分子薬物の経鼻吸収に対する poly-L-ornithine の促進効果に関する研究. 城西大学薬学部卒業論文 (2013).
- 37) Hirai S., Yashiki T., Matsuzawa T., Mima H. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int. J. Pharm.*, **7**: 317–325 (1981).
- 38) L Illum, N F Farraj, S S Davis. Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs. *Pharm. Res.*, **11**: 1186-1189 (1994).
- 39) T J Aspden, L Illum, Skaugrud. Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *Eur. J. Pharm.*

- Sci.*, **4**: 23-31 (1996).
- 40) K Oda, R Yumoto, J Nagai, H Katayama, M Takano. Enhancement effect of poly(amino acid)s on insulin uptake in alveolar epithelial cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27**: 570–578 (2012).
- 41) J M Hock. Anabolic actions of PTH in the skeletons of animals. *J Musculoskel Neuron Interact*, **2**: 33-47 (2001).
- 42) R U Agu, S Valiveti, D C Earles, M Klausner, P J Hayden, D P Wermeling, A L Stinchcomb. Intranasal delivery of recombinant human parathyroid hormone [hPTH (1-34)], teriparatide in rats. *Endocr. Res.*, **30**: 455-467 (2004).
- 43) T Matsumoto, M Shiraki, H Hagino, H Iinuma, T Nakamura. Daily nasal spray of hPTH (1-34) for 3 months increases bone mass in osteoporotic subjects: a pilot study. *Osteoporos. Int.*, **17**: 1532-1538 (2006).
- 44) K Sato. Therapeutic agents for disorders of bone and calcium metabolism. Development of nasal formulation of hPTH (1-34). *CLINICAL CALCIUM*, **17**: 64-71 (2007).
- 45) H Uchida, M Kondoh, T Hanada, A Takahashi, T Hamakubo, K Yagi. A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem. Pharmacol.*, **79**: 1437-1444 (2010).
- 46) 丸山 晶子. Human parathyroid hormone (1-34) 製剤の経鼻送達システムの開発に関する研究. 城西大学薬学部卒業論文 (2013).
- 47) Immunotopics Inc. High Sensitivity Human PTH (1-34) ELISA kit Product Datasheet (2013).
- 48) T Uzawa, M Hori, S Ejiri, H Ozawa. Comparison of the effects of intermittent and continuous administration of human parathyroid hormone (1–34) on rat bone. *Bone*, **16**:477-484 (1995).
- 49) M Etoh, A Yamaguchi. Repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals exerts anabolic effects on rat bone. *J. Bone Miner. Metab.*, **28**: 641–649 (2010).
- 50) P Morley, J F Whitfield, G E Willick, V Ross, S MacLean, R J Isaacs, E Mendoza, J R Barbier. Prolonged low-dose infusion of human parathyroid hormone does not increase femoral cancellous bone volume in ovariectomized rats. *Eur. J. Endocrinol.*, **141**: 70–74 (1999).

- 51) P J Kostenuik, S Ferrari, D Pierroz, M Boussein, S Morony, K S Warmington, S Adamu, Z Geng, M Grisanti, V Shalhoub, S Martin, G Biddlecome, G Shimamoto, T Boone, V Shen, D Lacey. Infrequent Delivery of a Long-Acting PTH-Fc Fusion Protein Has Potent Anabolic Effects on Cortical and Cancellous Bone. *J. Bone Min. Res.*, **22**: 1534–1547 (2007).
- 52) Y C Wong, S Qian, Z Zuo. Pharmacokinetic Comparison Between the Long-Term Anesthetized, Short-Term Anesthetized and Conscious Rat Models in Nasal Drug Delivery. *Pharm. Res.*, **31**: 2017-2123 (2014).
- 53) S Gizurason. The effect of cilia and the mucociliary clearance on successful drug delivery. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**: 497–506 (2015).
- 54) S Josea, C R Ansa, T A Cinua, A J Chackoa, N A Aleykuttyb, S V Ferreirac, E B Souto. Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *Int. J. Pharm.*, **441**: 516-526 (2013).
- 55) M I Ugwoke, N Verbeke, R Kinget. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**: 3-21 (2001).
- 56) N G N Swamy, Z Abbas. Mucoadhesive in situ gels as nasal drug delivery systems: an overview. *Asian J. Pharmacol.*, **7**: 168-180 (2012).
- 57) J Castile, Y H Cheng, B Simmons, M Perelman, A Smith, P Watts. Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys<sup>®</sup>, an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **39**: 1-9 (2012).
- 58) Y Huang, W Leobandung, A Foss, N A Peppas. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Release*, **65**: 63–71 (2000).
- 59) I Masako. Parathyroid hormone as a Bone anabolic agent -Effect of PTH on bone structural properties-. *CLINICAL CALCIUM*, **22**: 37-43 (2012).
- 60) 医薬審 第 742 号 厚生省医薬安全局審査管理課通達, 骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン 1999 年版.
- 61) 東 由明. 骨粗鬆症モデル動物と骨粗鬆症治療薬の研究開発動向. *日薬理誌*, **130**: 201-

205 (2007).

- 62) S Khosla, E J Atkinson, L J Melton. Effect of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**: 1522-1527 (1997).
- 63) M E Mendelsohn, R H Karas. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.*, **340**:1801-1811 (1999).
- 64) K L Margolis, D E Bonds, R J Rodabough, L Tinker, L S Phillips, C Allen, T Bassford, G Burke, J Torrens, B V Howard. Effect of estrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the women's health initiative hormone trial. *Diabetologia*, **47**: 1175-1187 (2004).
- 65) A M Kanaya, D Herrington, E Vittinghoff, F Lin, D Grady, V Bittner, J A Cauley, E Barrett-Connor. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the heart and estrogen/progesterone replacement study: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, **138**: 1-9 (2003).
- 66) H Li-Kun, K Fumi, O Hiromichi. Effects of Long-Term Administration of Caffeine on Fat Storage in Ovariectomized Rats. *YAKUGAKU ZASSHI*, **124**: 841-846 (2004).
- 67) T Ichikawa, K Horie-Inoue, K Ikeda, B Bruce, I Staoshi. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, **281**: 16927-16934 (2006).
- 68) M Takahashi, K Naitou, T Ohishi, K Kushida, M Miura. Effect of vitamin K and/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **54**: 219-224 (2001).
- 69) S Tanaka, K Narusawa, H Onishi, M Miura, A Hijioka, Y Kanazawa, S Nishida, S Ikeda, T Nakamura. Lower osteocalcin and osteopontin contents of the femoral head in hip fracture patients than osteoarthritis patients. *Osteoporos. Int.*, **22**: 587-597 (2011).
- 70) R E Burgeson. New collagens, new concepts. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **4**:552-77 (1988).

- 71) CLEA Japan, Inc. 「マウス・ラット・ハムスター用 CLEA Rodent Diet CE-2 (飼育繁殖用)」, < <http://www.clea-japan.com/Feed/ce2.html> > 2018年6月11日アクセス.
- 72) H M Frost. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner.*, **2**: 73-85 (1987).
- 73) F A Syed, A C Ng. The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr. Osteoporos. Rep.*, **8**: 235-40 (2010).
- 74) A D Leblanc, V S Schneider, H J Evans, D A Engelbretson, J M Krebs. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J. Bone miner. Res.*, **5**: 843-50 (1990).
- 75) R Takao-Kawabata, Y Isogai, A Takakura, Y Shimazu, E Sugimoto, O Nakazono, I Ikegaki, H Kuriyama, S Tanaka, H Oda, T Ishizuya. Three-times-weekly administration of teriparatide improves vertebral and peripheral bone density, microarchitecture, and mechanical properties without accelerating bone resorption in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, **97**: 156-168 (2015).
- 76) M Shiraki, T Sugimoto, T Nakamura. Effects of a single injection of teriparatide on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.*, **24**: 219-226 (2013).
- 77) T Sugimoto, T Nakamura, Y Nakamura, Y Isogai, M Shiraki. Profile of changes in bone turnover markers during once-weekly teriparatide administration for 24 weeks in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos. Int.*, **25**: 1173-1180 (2014).