

経鼻投与製剤における水溶性シクロデキストリンの 溶解補助剤としての有用性

浅井 和範

目次

略号表	1
序論	2
第1章 薬物血中濃度分析における固相抽出法を用いたセミマイクロ高速 液体クロマトグラフィーの有用性	4
第1節 フェニトイン分析におけるセミマイクロ高速液体クロマトグ ラフィーとコンベンショナル高速液体クロマトグラフィーの 比較	7
第2節 固相抽出による血清中フェニトインおよびカルバマゼピン前 処理法の開発	9
第3節 血清試料処理における固相抽出カラム固相へのタンパク質吸 着の検討	12
第4節 薬物回収率に及ぼす薬物添加血清試料の反復処理の影響	14
第5節 本章のまとめ	16
第6節 実験の部	18
第2章 ラット鼻粘膜に対する水溶性シクロデキストリンの影響に関す	

る組織学的検討	2 2
第1節 水溶性シクロデキストリン、デオキシコール酸ナトリウムおよびポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテルの浸透圧	2 4
第2節 <i>In vivo</i> 単回経鼻投与実験	2 6
第3節 <i>In vivo</i> 繰り返し経鼻投与実験	3 3
第4節 本章のまとめ	3 6
第5節 実験の部	3 8
第3章 水溶性シクロデキストリン包接デキサメタゾンの経鼻投与における有用性の評価	4 1
第1節 水溶性シクロデキストリンによるデキサメタゾンの溶解性の改善	4 2
第2節 改良 <i>in situ</i> 薬物滞留法によるモノマルトシル β -シクロデキストリン包接デキサメタゾンの経鼻吸収性	4 4
第3節 モノマルトシル β -シクロデキストリン包接デキサメタゾン経鼻投与による脳浮腫の改善	4 8
第4節 本章のまとめ	5 1
第5節 実験の部	5 3
第4章 総括および結論	5 9

謝辞.....	6 1
---------	-----

引用文献.....	6 2
-----------	-----

文献リスト.....	7 1
------------	-----

略号表

本論文においては、以下の略号を使用する。

AT	アトム多用途チューブ
BA	bioavailability
CyD	cyclodextrin
FPIA	fluorescence polarization immunoassay
GCyD	mono-maltosyl β -CyD
HE	hematoxylin and eosin (staining)
HPCyD	hydroxypropyl β -CyD
HPLC	high-performance liquid chromatography
Laureth-9	polyoxyethylene-9-laurylether
PAS	periodic acid-Schiff (staining)
PE	ポリエチレンチューブ
RMCyD	randomly methylated β -CyD
SDC	sodium deoxycholate
SPE	solid phase extraction
T _{max}	maximum drug concentration time
TDM	therapeutic drug monitoring

序論

鼻腔は、骨および軟骨の壁でできた腔が粘膜で被われていて、眼窩と口腔との間を占め気道の起始部をなすとともに嗅覚を司っている。鼻腔の上部はきわめて薄い篩板で大腦と分離し、篩板を通じて、血管、リンパ管、神経などの交流があるので鼻と脳とは密接な関係にある。

鼻腔は経口投与で十分なバイオアベイラビリティー生物学的利用能（BA）が得られない場合や¹⁾、注射以外の投与経路が望ましい場合に比較的簡便に使用できること²⁾、薬物吸収性が良いこと³⁾から薬物投与部位として有望視されている。また、ある種の薬物については、鼻腔投与が薬物の脳への送達に有利であると報告されている⁴⁻⁶⁾。

一方、鼻腔を鼻腔内の局所的治療以外の薬物投与部位としてみたとき、その腔内は容積が小さいことから、投与できる薬物量には制限が生じる³⁾。さらに、難溶性の薬物は溶解性を改善し、できれば溶出過程の不要な液剤とすることが望ましい。また、ラットなどの小動物を用いた経鼻吸収の検討においては、薬物投与量が制限されることになり薬物動態などの評価が困難となる場合が少なくない。

そこで本研究では、汎用型的高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用しながら、微量の血清試料から薬物を高感度で定量できる、スクリーニングに適した分析方法の開発を試み、固相抽出法を用いたセミマイクロ HPLC の有用

性を検討した。次に、薬物を鼻腔での吸収に適した製剤として投与することを目的として、高濃度の水溶性シクロデキストリン（CyD）溶液による薬物の溶解性の改善を試み、まず高濃度水溶性 CyD による鼻粘膜傷害性を、ラットを用いた組織学的検討により評価した。次に、高濃度水溶性 CyD 溶液により難溶性薬物デキサメタゾンの溶解性の改善を図り、平井ら⁷⁾および相川ら⁸⁾の鼻粘膜吸収実験法を改良した *in situ* 薬物滞留法で、ラットにデキサメタゾンを経鼻投与し、血中薬物動態、および凍結脳損傷モデルにおける脳浮腫抑制効果を検討した。そして、水溶性 CyD による溶解性の向上と経鼻投与が、デキサメタゾンの脳への適用における新たな治療戦略となる可能性について評価した。

第1章 薬物血中濃度分析における固相抽出法を用いた セミマイクロ高速液体クロマトグラフィーの有用性

小動物を用いた鼻粘膜吸収実験における体内動態の解析にあたっては、投与される薬物の量および採取できる生体試料の量ともに制限があるため、より高感度な測定方法が要求される。また、生体試料には多数の成分が共存しているために、いかに選択性・特異性の高い分析法であっても夾雑物の影響なしに目的の薬物のみを測定できる方法はほとんどない。さらに、小動物を用いた鼻粘膜吸収実験をスクリーニング試験に利用することを想定した場合、汎用性のある分析法・分析機器を使用し、併せて低コスト化することが望まれる。

汎用性の高い分析法として HPLC があるが、その高感度化を目的として、マイクロカラム（内径 1 mm 以下）を利用した研究が報告されてきた⁹⁻¹²⁾。おもに濃度感応型検出器を使用する HPLC では、導入した試料の希釈過程が小さいほど高感度で分析が可能となる。しかし、マイクロカラム HPLC は汎用型 HPLC（コンベンショナルカラム HPLC）に比較して、導入できる試料の容量ははるかに小さく、さらに試料拡散を小さくするための専用配管と低流量（通常 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度）が送液可能な専用ポンプが必要となる。したがって、現在も広く使用されるには至っていない。

一方、内径 2mm 前後のセミマイクロカラムはコンベンショナルカラム HPLC の装置を利用することが可能で、質量感度においてはマイクロカラム HPLC に

及ばないものの、コンベンショナルカラム HPLC と比較して明らかに有利である。薬物動態研究のみならず臨床における治療薬物モニタリング（TDM）など血液中薬物を分析対象とする場合、セミマイクロカラムの利用は試料血液量を少量に抑えられるという点で有用性が高いと考えられる¹³⁾。

また、HPLC で生体試料を分析する場合は前処理が必須であり、その分析全体に対する比重は大きい。迅速性や簡便性などの有用性を HPLC に求めれば、前処理法にも同様の有用性が要求され、両者が組み合わされて初めて有用な HPLC 分析法になると考えられる。すでに広い分野で精製または濃縮の手段として用いられている固相抽出 solid phase extraction（SPE）は、液体クロマトグラフィーの原理を利用した試料前処理法であり¹⁴⁻¹⁷⁾、従来の液-液抽出法で問題となるエマルジョンの形成がなく再現性に優れるなどの特徴を有し、種々の固相を目的とする物質に応じて選択できる応用性の高い前処理法である。さらに、前処理方法のデザインによっては分析時間の短縮も可能である。

本章では、SPE の抽出過程において、SPE カラムの充填剤である固相に対して、血清タンパク質の吸着抑制などの適当な処理を行い、さらに、セミマイクロカラム HPLC を使用して測定される薬物の検出感度を向上させ、分析に要する生体試料の容量を減少させることにより、SPE カラムの反復使用が可能になるかを検討した。モデル薬物としては、フェニトインおよびカルバマゼピンを使用した。フェニトインおよびカルバマゼピンは、TDM の対象となる薬物でもあることから、分析に使用する血清試料の容量は、蛍光偏光免疫測定法

fluorescence polarization immunoassay (FPIA) と同程度の $50\mu\text{L}$ とした。

第 1 節 フェニトイン分析におけるセミマイクロ HPLC とコンベンショナル HPLC の比較

フェニトインのセミマイクロ HPLC とコンベンショナル HPLC での分析条件を Table 1 に、また、フェニトイン標準液 ($20\mu\text{g/mL}$) をそれぞれの条件で分析したときのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。セミマイクロ HPLC における検量線（内部標準法）は、フェニトイン濃度 $1\sim 200\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性を示し、フェニトインと内部標準物質セコバルビタールの分離は良好で、ピーク面積比（フェニトイン／セコバルビタール）は 1.80 であった。

セミマイクロ HPLC は、コンベンショナル HPLC と比較して注入できる試料の容量が少ないが、許容負荷量は検量線から推定できるので、試料の希釈、または注入量の調節により元の生体試料の薬物濃度に関係なく利用可能と考えられる。Fig. 1 に示すようにフェニトインの検出時間はコンベンショナル HPLC で 14.78min、セミマイクロ HPLC では 2.88min と分析時間（内部標準が検出されるまでの時間を含む）は約 80% 短縮された。これにより移動相溶媒の消費量も約 80% 削減できた。検出感度は、セミマイクロ HPLC がピーク高さ比で 3.97 倍高かった。

Table 1 HPLC conditions

	Semi-micro HPLC	Conventional HPLC
Column	Mightysil RP-18 (2mmØ×150mm)	Shim-pack CLC-ODS (6mmØ×150mm)
Mobile phase	20mM phosphate buffer (pH6.8): acetonitrile=24:76	20mM phosphate buffer (pH6.8): acetonitrile=24:76
Flow rate	0.5mL/min	0.5mL/min
Column temp.	50°C	50°C
Detector	220nm	220nm

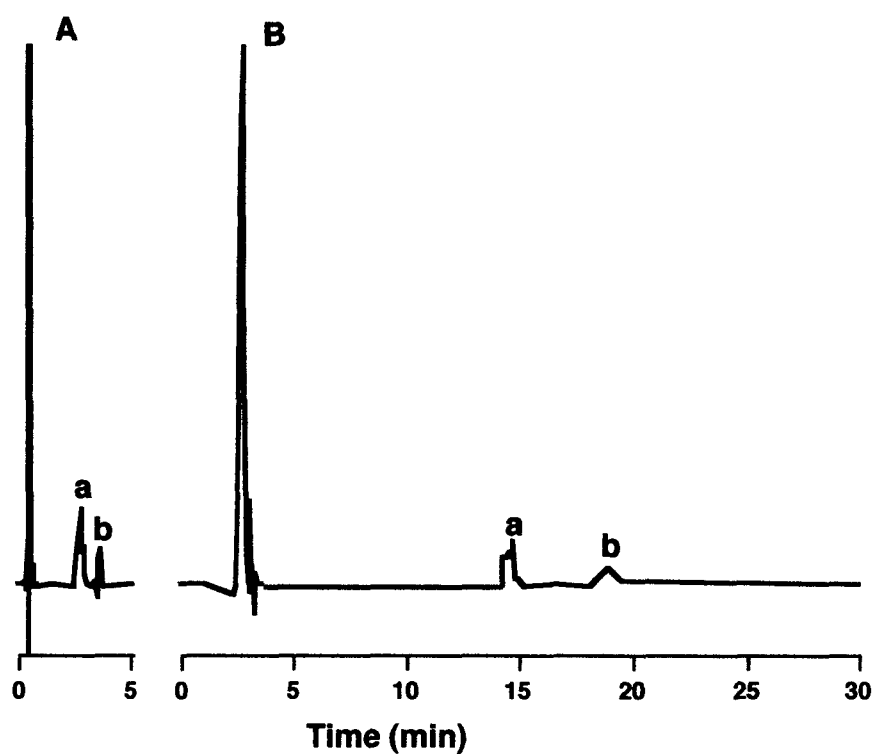


Fig. 1 Chromatograms of phenytoin (DPH) and secobarbital (SB) analyzed by semi-micro (A) or conventional (B) HPLC
a ; DPH (20µg/ml), b ; SB (20µg/ml). (A), (B) ; 0.08AUFS.

第 2 節 SPE による血清中フェニトインおよび カルバマゼピン前処理法の開発

逆相系充填剤を用いる SPE の基本的な抽出手順^{18,19)}に従ってアイソルート C18 (充填剤量 50mg) およびオアシス HLB (充填剤量 30mg) を用いて、フェニトインおよびカルバマゼピン標準液を前処理したところ、約 100% の回収率が得られた。血清試料に対しては、SPE カラムの充填剤である固相によるフェニトインおよびカルバマゼピンの保持を安定させる目的で、Table 2 に示すように抽出方法を改良した。3 名のボランティア (男性、平均年齢 38.3 歳) から採血した血液を遠心分離して得た血清を、本改良 SPE 法で前処理しセミマイクロ HPLC で分析したところ、アイソルート C18 を用いた場合 (Fig. 2-A) も、オアシス HLB を用いた場合も、クロマトグラムにフェニトイン、カルバマゼピン、内部標準のセコバルピタールおよびシクロバルピタールの検出に妨害となるピークはみられなかった。

そこで、本改良 SPE 法によりフェニトインおよびカルバマゼピン添加血清を前処理して、回収性を検討した。Fig. 2 にフェニトイン (D: 抽出 1 回目、E: 抽出 30 回目) およびカルバマゼピン (B: 抽出 1 回目、C: 抽出 30 回目) 添加血清を、アイソルート C18 で前処理し、セミマイクロ HPLC で分析したときのクロマトグラムを示した。また、Table 3 に示すようにフェニトイン、カルバマゼピンともに良好な回収率、再現性が得られた。今回の分析条件では血清

試料 50 μ L を使用しているが、これは一般の FPIA 法に要する血清試料と同量である。

Table 2 Solid phase extraction procedure

Procedure	Solvent	Volume
Conditioning	methanol	1mL×2
Equilibration 1	distilled water	1mL×1
Equilibration 2	20mM phosphate buffer (pH 6.8)	1mL×1
Application	sample+I.S. solution ^{a)}	1.05mL×1
Wash	20mM phosphate buffer (pH 6.8)	1mL×2
Elution	methanol	0.2mL/0.5mL×1 ^{b)}

a) Sample: serum 50 μ L, I.S. solution: 20mM phosphate buffer (pH 6.8) containing internal standard (secobarbital (phenytoin)/cyclobarbital (carbamazepine))

b) 0.2mL(phenytoin), 0.5mL (carbamazepine)

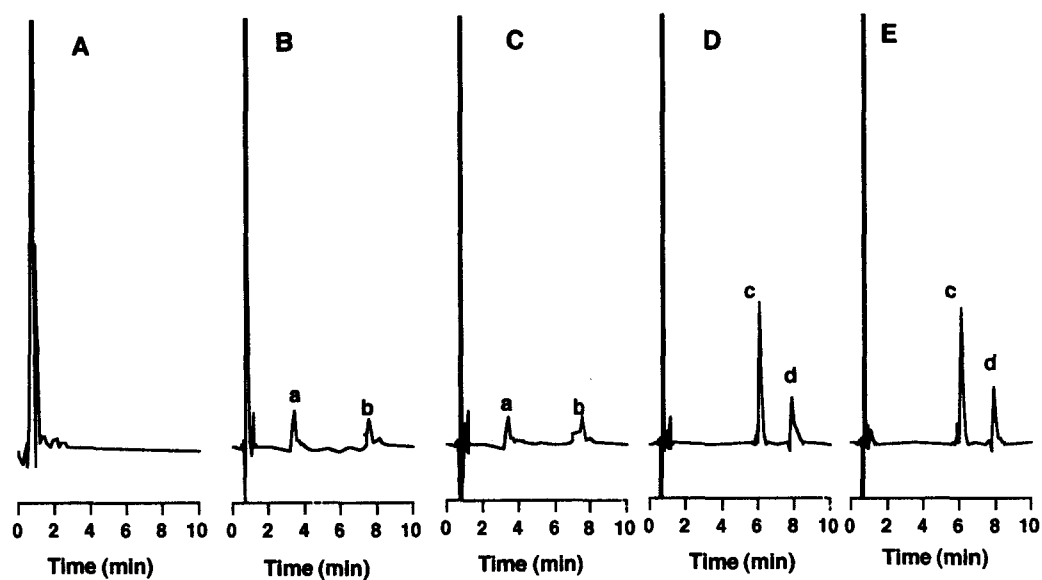


Fig. 2 A: Chromatogram of blank human serum from the first extraction with C18-SPE column.
 B: Chromatogram of human serum spiked with carbamazepine from the first extraction with C18-SPE column.
 C: Chromatogram of human serum spiked with carbamazepine from the 30th extraction with C18-SPE column.
 D: Chromatogram of human serum spiked with phenytoin from the first extraction with C18-SPE column.
 E: Chromatogram of human serum spiked with phenytoin from the 30th extraction with C18-SPE column.

^a carbamazepine (20 μ g/ml), ^b internal standard: cyclobarbital(100 μ g/mL)

^c phenytoin (20 μ g/ml), ^d internal sandard: secobarbital (20 μ g/ml).

A, B, C, D, E; 0.04AUFs

Table 3 Analytical recovery of phenytoin and carbamazepine from human serum at various concentrations using SPE column

Drug	SPE column	N	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)(mean \pm SD)	RSD (%)
Phenytoin	Isolute C18	3	2.0	85.1 \pm 3.20	3.76
		3	5.0	89.6 \pm 0.22	0.24
		3	10.0	86.4 \pm 0.94	1.08
		3	20.0	83.5 \pm 2.89	3.46
		3	40.0	94.0 \pm 1.08	1.15
	Oasis HLB	3	2.0	90.9 \pm 8.58	9.44
		3	5.0	104.6 \pm 2.26	2.16
		3	10.0	101.2 \pm 1.59	1.57
		3	20.0	106.6 \pm 4.53	4.25
		3	40.0	108.1 \pm 9.59	8.87
Carbamazepine	Isolute C18	3	2.0	115.9 \pm 3.06	2.64
		3	5.0	113.5 \pm 8.40	7.40
		3	10.0	103.7 \pm 12.2	11.7
		3	20.0	117.1 \pm 5.39	4.60
		3	40.0	86.7 \pm 10.7	12.4

第 3 節 血清試料処理における SPE カラム固相 へのタンパク質吸着の検討

ヒト血清を希釈せずに用いて、SPE カラム（ボンドエルト C18）固相へのタンパク質の残存を検討した。Table 4 に、ヒト血清 750 μ L を SPE カラム（n=3）に 10 回適用し通過してきた試料中、および 10 回適用後に、その SPE カラムをミリ Q 水で洗浄した洗浄液中のタンパク質およびアルブミン濃度を示した。ヒト血清適用 1～3 回の SPE カラム通過血清試料において、タンパク質量にわずかな減少がみられるが、アルブミン量には変化はみられなかった。

SPE カラムのシリカ系固相は充填剤量の 5 % 程度の物質を保持できるとされ²⁰⁾、本実験では、SPE カラムにヒト血清試料を 1～3 回適用する間に、2.5mg 程度のタンパク質が固相に保持され充填剤量の許容負荷量に達したものと思われた。一方、ヒト血清試料 10 回適用後の 1 回目の洗浄液中に 2.25mg 相当のタンパク質が検出され、2 回目の洗浄液にはほとんど検出されていないことから、ヒト血清適用初期に通過血清試料のタンパク質量が減少したのは、固相によるタンパク質の比較的弱い保持と、SPE カラムの充填剤の粒子間に存在する空間の影響と考えられた。すなわち、シリカ系の固相では平均粒子径が 40～60 μ m の充填剤が使用されているため、50mg の固相では約 60 μ L の、固相粒子間および固相表面の細孔が作る空間が存在する。従って、試料を適用後に空気を通して、水系の試料を完全に流出させるのは比較的困難である。僅かに吸

着するタンパク質が分析に影響する場合には、分析対象となる薬物の保持に影響せず、タンパク質の変性を起こさない洗浄液の適切な選択が必要と考えられる。

本実験の結果より、SPE カラムに逆相系のなかでも比較的保持力の強いオクタデシル基を有する充填剤を用いた場合、タンパク質を含む試料を処理してもタンパク質の変性を起こさないように、SPE カラムに導入し洗浄することにより、その影響をわずかなものにすることができると考えられた。

Table 4 The concentration of protein and albumin
in eluent passed through SPE column

Steps of extraction	Sample number		
	1	2	3
	Protein concentration(g/dL) / Albumin concentration(g/dL)		
Sample serum	7.1 / 4.7	7.1 / 4.7	7.1 / 4.7
Apply 1	7.0 / 4.7	6.9 / 4.7	7.0 / 4.8
Apply 2	7.1 / 4.8	7.1 / 4.7	7.0 / 4.8
Apply 3	7.0 / 4.7	7.1 / 4.7	7.1 / 4.8
Apply 4	7.2 / 4.8	7.1 / 4.8	7.1 / 4.7
Apply 5	7.1 / 4.8	7.1 / 4.7	7.1 / 4.8
Apply 6	7.1 / 4.8	7.0 / 4.7	7.2 / 4.8
Apply 7	7.1 / 4.8	7.1 / 4.7	7.1 / 4.8
Apply 8	7.0 / 4.7	7.1 / 4.9	7.1 / 4.8
Apply 9	7.1 / 4.7	7.1 / 4.8	7.2 / 4.8
Apply 10	7.1 / 4.8	7.1 / 4.7	7.1 / 4.7
Wash 1	0.3 / 0.1	0.3 / 0.1	0.3 / 0.1
Wash 2	0.1 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0

第 4 節 薬物回収率に及ぼす薬物添加血清試料 の反復処理の影響

Fig. 3 にアイソルート C18 およびオアシス HLB を用いて、フェニトインおよびカルバマゼピン添加血清 ($20.0\mu\text{g/mL}$) $50\mu\text{L}$ を、各 SPE カラムを用いて 1 本あたり連続 30 回の前処理を実施したときの、それぞれの薬物の回収率を示した。2 種類の SPE カラムにおいて、反復した抽出回数の増加にともなうフェニトインの回収率の低下は認められなかった。アイソルート C18 を用いたカルバマゼピンの回収率は、若干の減少を示したが、フェニトイン、カルバマゼピンともに 30 回の連続抽出においても良好な回収率を認めた。

本実験では、SPE カラムで血清を含む試料を抽出しても、抽出過程を適切に設定すれば、目的とする薬物の回収率を低下させずに繰り返し前処理可能であることが示された。また、セミミクロ HPLC を使用することにより薬物の検出感度を上げ、それによって、SPE カラムで処理する血清試料の容量を $50\mu\text{L}$ と少量に抑えることができ、SPE カラムの充填剤への負担を軽減したことも、高い回収率を維持した要因と考えられた。

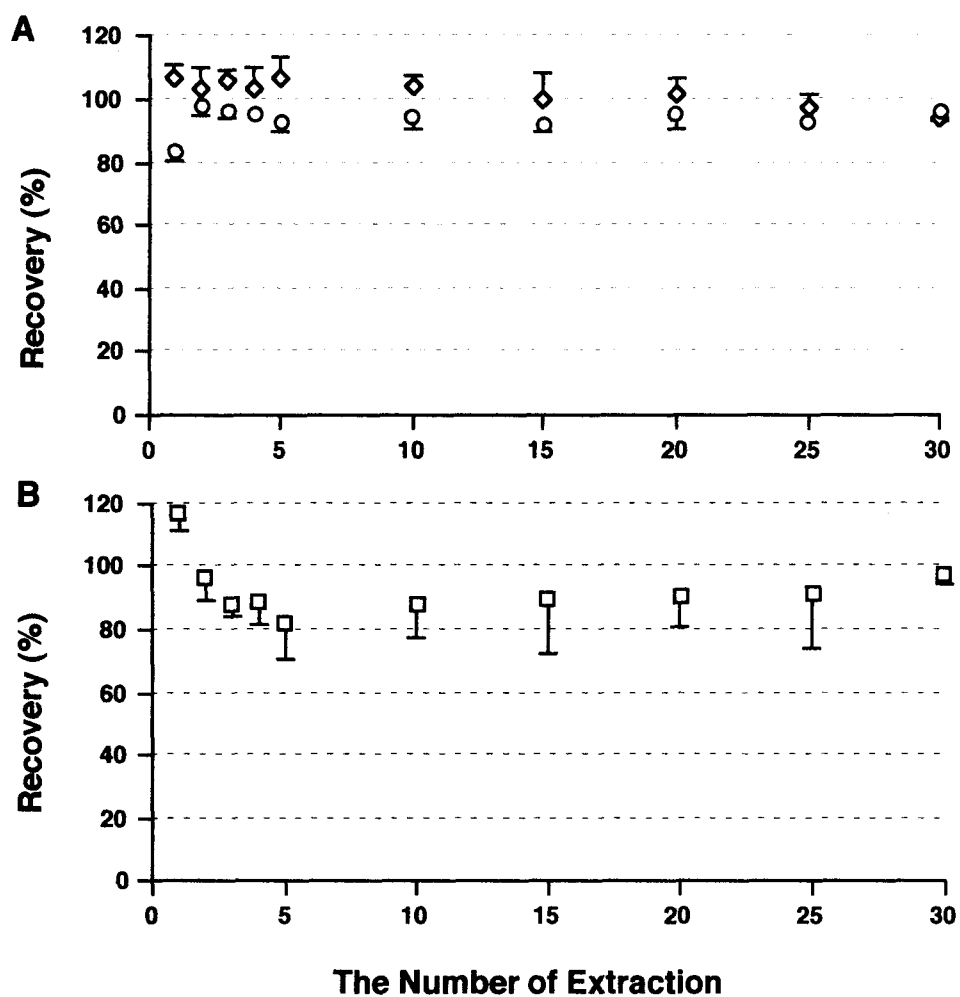


Fig. 3 Influence of re-using of SPE columns on the recovering rate

Each value represents the mean \pm S.D. of three SPE columns.

A; recovering rate of phenytoin using Isolute C18 (○) or

Waters HLB (◇), B; recovering rate of carbamazepine using

Isolute C18 (□).

第 5 節 本章のまとめ

本章では、小動物を用いた鼻粘膜吸収実験のためのスクリーニング試験への利用を想定した、汎用性があり、低コスト化が可能な分析法を開発することを目的とし、固相抽出法を用いたセミマイクロ高速液体クロマトグラフィーの有用性について検討し、次のような知見を得た。

[1] フェニトイン分析におけるセミマイクロ HPLC とコンベンショナル HPLC

の比較検討の結果、微量の薬物をわずかな生体試料から分析するには、汎用性のある HPLC の装置をほぼそのまま利用できて、高感度化が可能なセミマイクロ HPLC が有用であると考えられた。さらに、セミマイクロ HPLC は分析時間・溶媒消費量を削減でき、低コスト化に有利である。

[2] SPE による血清中フェニトインおよびカルバマゼピンの前処理法の開発から、比較的簡単な改良により薬物回収率が良好な抽出法が得られた。

[1] のセミマイクロ HPLC を利用することにより、血清試料 50 μ L からフェニトイン、カルバマゼピンともに再現性よく良好に回収された。血清試料 50 μ L は、一般の蛍光偏光免疫測定法に要する血清試料と同量である。

[3] 血清試料処理における SPE カラム固相へのタンパク質吸着の検討を、

シリカゲル基材にオクタデシルシランを結合させた C18 固相を用いて行った。一般的に使用される C18 は、逆相系の固相の中では無極性官能基との無極性相互作用が、最も強い。しかし、血清試料適用後に、純水にて洗浄すればタンパク質の固相への吸着は、きわめてわずかであることが示された。

[4] SPE カラムによる薬物添加血清試料の反復処理における薬物の回収率への影響を検討した。フェニトインおよびカルバマゼピンの添加血清を試料として、[2] で開発した抽出法を用い、セミミクロ HPLC で分析したところ、同一の SPE カラムを連続 30 回使用しても、回収率の低下が生じないことが示された。

以上より、固相抽出とセミミクロ HPLC を併用することは、微量の薬物を含む少量の生体試料からの分析において、汎用性が高く、低コスト化も可能な方法であり、小動物を用いた鼻粘膜吸収実験におけるスクリーニング試験に有用と考えられた。

第 6 節 実験の部

[1] 装置

HPLC には、島津製作所（京都）の送液ポンプ（LC-9A）2 基、オートサンプラー（SIL-6B）、紫外可視分光光度検出器（SPD-6A）（セミマイクロ用フローセルを使用）、カラムオーブン（CTO-6A）、システムコントローラー（SCL-6B）、クロマトデータ処理装置（CR-4AX）を使用した。また、血清の総タンパク質量とアルブミン量は、HITACHI 7150 Automatic Analyzer（日立製作所、東京）にて測定した。

[2] HPLC 用分析カラム

セミマイクロ用カラムには Mightysil RP-18（2.0mm \varnothing ×150mm、関東化学（株）、東京）を、コンベンショナル用カラムには Shim-pack CLC-ODS（6.0mm \varnothing ×150mm、島津製作所）を使用した。いずれのカラムも、エンドキャッピング処理されたオクタデシル基結合シリカゲル（粒子径 5 μ m）が充填されたものである。また、本研究ではガードカラムは、使用しなかった。

[3] SPE カラム

SPE カラムには、アイソルート C18／50mg およびボンドエルート C18／50mg（（株）ユニフレックス、東京）、オアシス HLB／30mg（日本ウォーターズ（株）、東京）のリザーバー容量 1mL の製品を使用した。

[4] 薬物

フェニトイン原薬は大日本製薬（株）（大阪）、カルバマゼピン原薬はノバルティスファーマ（株）（東京）より恵与されたものを使用した。セミマイクロ HPLC にて内部標準物質として用いたシクロバルビタールおよびセコバルビタールは、東京化成工業（株）（東京）の製品を使用した。HPLC の移動相溶媒に用いたアセトニトリル、および SPE の溶出や標準液の調製に用いたメタノールは HPLC 用（和光純薬工業（株）、大阪）を、その他の試薬は市販特級品を使用した。水は、常水を蒸留・イオン交換後にミリ Q 純水装置（日本ミリポア（株）、東京）にて精製して使用した。

[5] 試料および試料の前処理

フェニトイン標準液は、原薬を乾燥（105°C, 2hr）後一定量を量り、メタノールに溶解し、使用時まで4℃で保存した。ヒト血清は、健常成人ボランティア3名から採血した血液を室温にて30分間放置後、遠心分離し上清として得た。フェニトインおよびカルバマゼピン添加血清は、それぞれフェニトインまたはカルバマゼピンのメタノール溶液を添加（0.5% v/v）して、振盪混合後、10分間室温放置することにより調製した。

[6] フェニトイン分析におけるセミマイクロ HPLC とコンベンショナル HPLC の比較

セミマイクロカラムを用いた HPLC でフェニトイン標準液を分析し、コンベンショナルカラムを用いた場合と、分析時間、検出感度を比較検討した。

[7] SPE による血清中フェニトインおよびカルバマゼピン前処理法の開発

ヒト血清、フェニトインおよびカルバマゼピン添加ヒト血清を試料として逆相系 SPE カラム（アイソルート C18 およびオアシス HLB）による前処理法を開発した。この方法によりフェニトインおよびカルバマゼピン添加血清（2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μ g/mL）各 3 試料を前処理し、セミマイクロ HPLC で分析してフェニトインおよびカルバマゼピンの添加回収率を求めた。

[8] 血清の前処理における SPE カラム充填剤へのタンパク質残存の検討

分析カラムに限らず、充填剤へのタンパク質の吸着などは劣化の原因となる。そこで、SPE カラム充填剤へのタンパク質の残存を、アイソルート C18 と同等製品のボンドエリート C18 を用いて検討した。メタノール、次いでミリ Q 水を通したボンドエリート C18 に、ヒト血清 750 μ L を適用し、SPE カラムからの通過液をタンパク質量およびアルブミン量測定用の試料とした。この操作を各カラム毎に 10 回繰り返す、それぞれの通過液を試料とした。また、ヒト血清 10 回適用後に SPE カラムをミリ Q 水 750 μ L にて 2 回洗浄し、それぞれの洗浄液を試料とした。初めに適用したヒト血清、SPE カラムの各通過液および洗浄液中の総タンパク

質量とアルブミン量を測定し、それぞれの SPE カラム固相への残存を検討した。

[9] SPE カラムによるヒト血清試料の反復前処理におけるフェニトインおよびカルバマゼピンの回収率への影響

アイソルート C18 およびオアシス HLB を用いてフェニトインおよびカルバマゼピン添加血清 (20.0 μ g/mL) 50 μ L を試料に、それぞれの SPE カラム 1 本当たり連続 30 回の前処理を施行し、反復前処理におけるフェニトインおよびカルバマゼピンの回収率を検討した。

第2章 ラット鼻粘膜に対する水溶性 CyD の影響に関する 組織学的検討

経鼻投与は、鼻腔の血管網の発達した鼻粘膜^{21, 22)}や優れた粘膜透過性²³⁾により、非経口投与の中でも理想的な投与経路と思われる。加えて経鼻投与は、初回通過効果³⁾や消化管で酵素分解され易い薬物の減少を回避でき、しかも使用時に疼痛を伴わない投与方法である。さらに、鼻腔に投与された薬物が脳脊髄液へ直接分布し、続いて脳へ分布することを示唆する報告がみられる²⁴⁻²⁷⁾。これらの報告から、たとえば抗てんかん薬のような中枢神経系に作用する薬物の、新たな投与経路になり得ると考えられる。しかし、これらの薬物は一般的に難溶性であり、経鼻投与に適した液剤の製剤化は困難である。

水溶性 CyD を用いた薬物の溶解性改善の報告は数多くみられ²⁸⁾、難溶性薬物の溶解性を改善し液状製剤を作るために、有用な溶解改善剤と考えられる。さらに、溶解改善剤として使用した幾つかの水溶性 CyD については、薬物の粘膜透過性を増大させるとの報告もある²⁹⁻³¹⁾。したがって、幾つかの吸収促進剤について報告されているような重度の粘膜傷害^{32, 33)}を起こさないことが確認されれば、水溶性 CyD は経鼻投与製剤の調製に有用と思われる。しかし、水溶性 CyD の鼻粘膜傷害性に関する組織学的検討、さらに、安全が保証される水溶性 CyD の濃度に関する正確な情報は限られている。それゆえに、ヒドロキシプロピル β -CyD (HPCyD) やランダムメチル化 β -CyD (RMCyD) など

の水溶性 CyD のラット鼻粘膜に対する組織学的影響を、*in vivo* 単回およびくり返し経鼻投与実験を行い光学顕微鏡で評価した。また、経鼻投与した薬液に対する鼻粘膜の微細構造の変化を評価するために、走査型電子顕微鏡も使用した³⁴⁾。デオキシコール酸ナトリウム sodium deoxycholate (SDC) とポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル polyoxyethylene-9-laurylether (Laureth-9)³⁵⁾を、水溶性 CyD の鼻粘膜への影響と比較するためのポジティブコントロールとして用いた。

第 1 節 水溶性 CyDs、SDC および Laureth-9 の浸透圧

3 種の水溶性 CyD 溶液 (A) と SDC および Laureth-9 溶液 (B) の、濃度と浸透圧の関係を Fig. 4 に示した。SDC と Laureth-9 の浸透圧は、濃度に対して直線的な比例関係を示したが、水溶性 CyD 溶液の浸透圧は、濃度に対して直線的な比例関係を示さなかった。組織学的検討に用いた試料溶液 (Table 5) は、15% w/v 以上の RMCyD 溶液を除いて等張以下の浸透圧を示した。

低張液や高張液は、等張液に対して鼻粘膜上皮細胞の構造に影響を与えるとの報告³⁶⁻³⁸⁾があるため、組織学的検討においてはこれら試料溶液を、リン酸緩衝液により等張化した。

Table 5 Experimental conditions in the in vivo exposure study

Compound	Concentration (%w/v)	Nasal exposure time (min)
Laureth-9	1	5
SDC	1	5
β -CyD	1.5	5
HPCyD	5	5
	20	5
	10	30
	10	60
RMCyD	5	5
	20	5
	10	30
	10	60

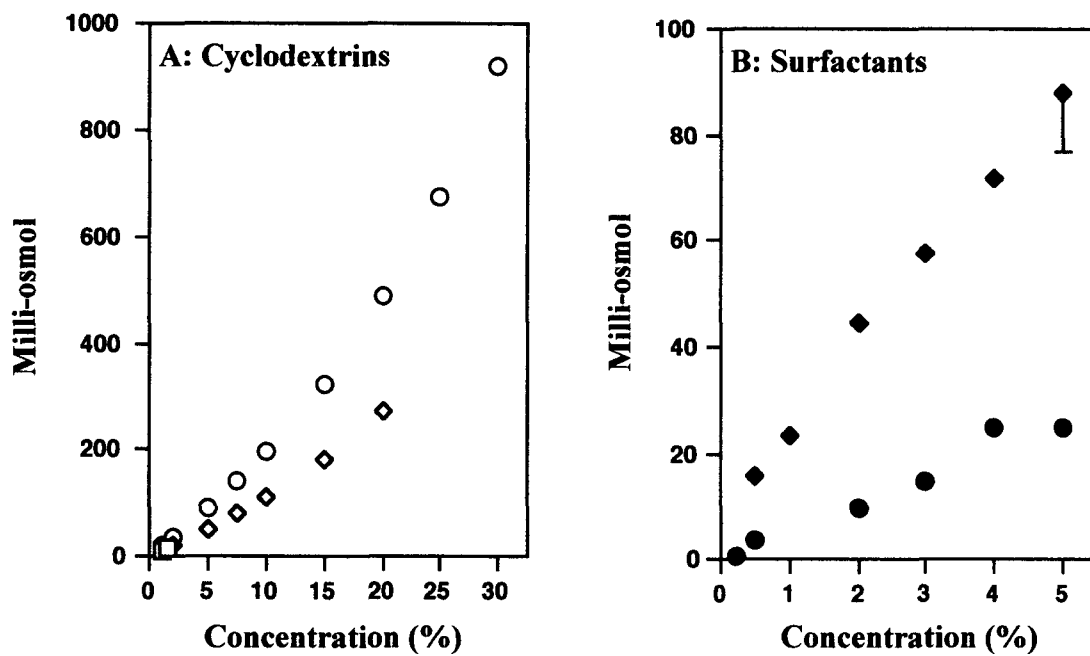


Fig. 4 (A) The osmolarities of β -CyD (□), HPCyD (◇) and RMCyD (○) in purified water at 25°C, (B) The osmolarities of SDC (◆) and laureth-9 (●) in purified water at 25°C. Each data are mean \pm SD (n=3).

第 2 節 *In vivo* 単回経鼻投与実験

コントロール群のラット鼻中隔中央部付近は、典型的な呼吸器系の上皮細胞で被われている (Fig. 5-A1 and -B1)。これは、線毛が密集した多列線毛上皮細胞である。1%w/v SDC および Laureth-9 溶液投与群では、薬液を 5 分間鼻腔に適用すると著しい傷害が認められる (Fig. 5-A2 and -A3)。これらの群では、上皮の破壊が激しく、多列線毛上皮細胞が完全に脱落している部分も見られる。これら、ポジティブコントロールとしての SDC および Laureth-9 溶液投与群が示した鼻粘膜傷害性の結果は、既存の報告^{32, 33)}と一致する。一方、1.5%w/v β -CyD 溶液投与群では、薬液を 5 分間鼻腔に適用しても鼻粘膜上皮細胞への影響は認められない (Fig. 5-A4 and -B2)。HPCyD 溶液の 5 分間適用群では、鼻粘膜上皮細胞にわずかな粘液分泌の増加が見られるものの、明らかな傷害は見られず、さらに高濃度の 20%w/v 投与群においても大きな組織学的影響は認められない (Fig. 5-A5, -A6 and -B3)。しかし、RMCyD 溶液の 5 分間適用群では、鼻粘膜上皮細胞に明らかな変化が認められた (Fig. 5-A7 and -A8)。この変化は PAS 染色により、鼻粘膜上皮細胞の粘液分泌亢進によるものと考えられた (Fig. 5-B4)。また、20%w/v RMCyD 溶液投与群では、上皮細胞の厚みにわずかに減少が見られた。

さらに長時間にわたって薬液を鼻腔に適用した場合、すなわち 10%w/v HPCyD 溶液を 30 分間および 60 分間適用した群では、わずかな上皮細胞の厚

みの減少と粘液分泌の亢進が見られた (Fig. 6-A1, -A2 and -B1)。10%w/v RMCyD 溶液の 30 分間および 60 分間滞留群では、鼻粘膜上皮細胞に 5%w/v RMCyD 溶液の 5 分間滞留群と同様の変化が見られた (Fig. 6-A3, -A4 and -B2)。すなわち、粘液分泌は亢進しているが、上皮細胞の脱落や厚みの減少は認められない。

Fig. 7 の A1 と A2 は、等張緩衝液をラットの鼻腔に滞留 (コントロール群) させた後に鼻腔右外側壁中央付近を、走査型電子顕微鏡で観察したものである。走査型電子顕微鏡は、光学顕微鏡と比べて鼻粘膜の多列線毛上皮細胞の組織学的変化、とくに線毛の変化をより明確で精密に捕らえることができる。コントロール群では、線毛が密集している様子が見られ (Fig. 7-A1 and -A2)、1.5%w/v β -CyD 溶液の 5 分間滞留群でも同様の上皮の状態が観察される (Fig. 7-B1 and -B2)。5 および 20%w/v HPCyD 溶液を 5 分間滞留させた群でも、コントロール群と同様に鼻粘膜上皮の形態的变化は見られない (Fig. 8-A1 and -A2)。加えて、10%w/v HPCyD 溶液を 30 分間および 60 分間滞留させた群でも、鼻粘膜上皮に大きな変化は認められない (Fig. 9-A1 and -A2)。また、5%w/v RMCyD 溶液の 5 分間滞留群でも、明らかな変化は見られず (Fig. 8-B1)、10%w/v RMCyD 溶液の 30 分間および 60 分間滞留群でも大きな変化は見られない (Fig. 9-B1 and -B2)。しかし、20%w/v RMCyD 溶液の 5 分間滞留群は、鼻粘膜上皮に大きな変化をもたらした (Fig. 8-B2)。線毛は抜け落ち、上皮に大きな亀裂が観察される。

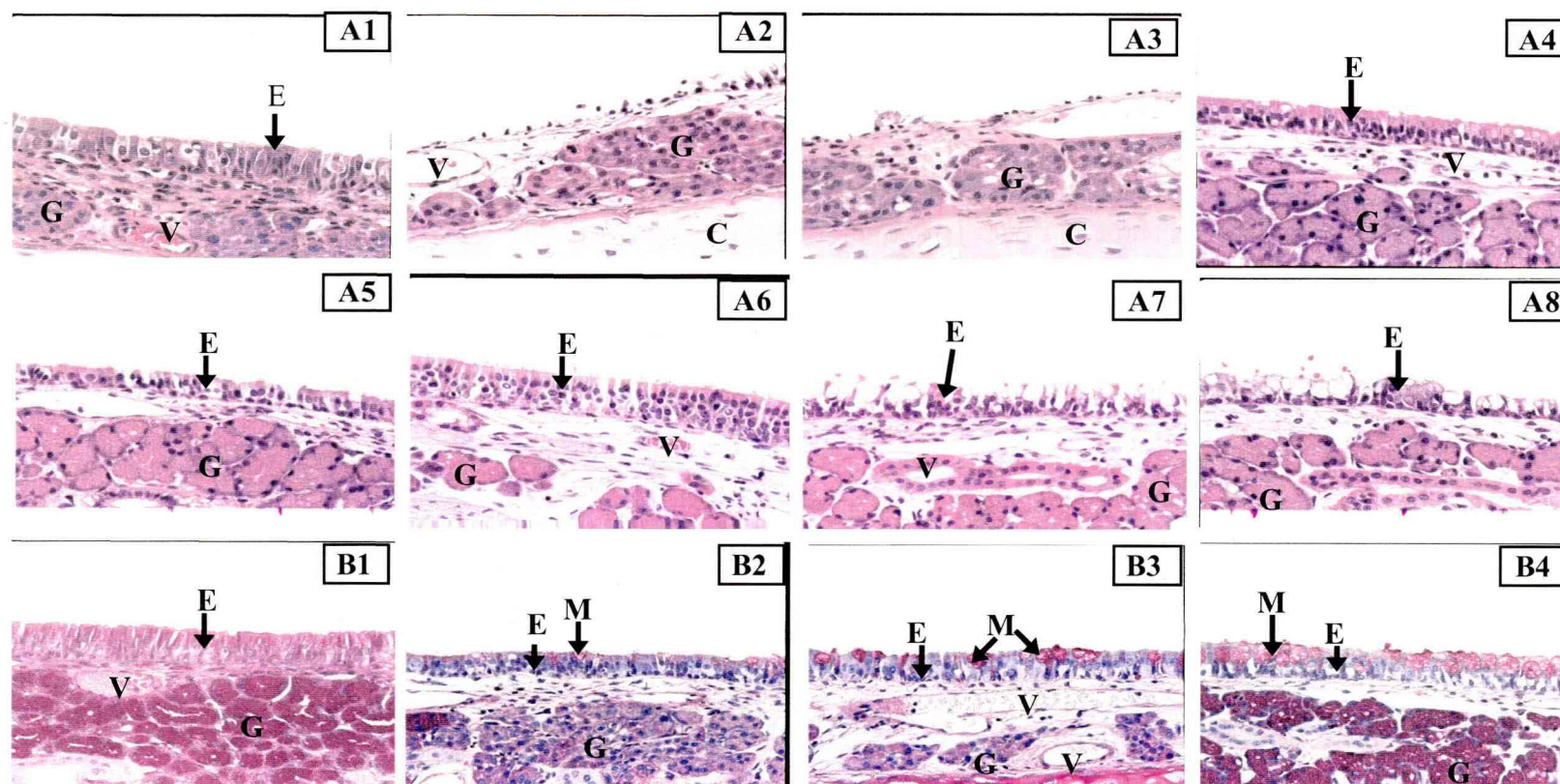


Fig. 5 A: The optical microscopic photos of a HE stained vertical section of the medial region of nasal septum of rat after a 5 min exposure of isotonic phosphate buffer solution (A1), 1%w/v Laureth-9 (A2), 1%w/v SDC (A3), 1.5%w/v β -CyD (A4), 5%w/v HPCyD (A5), 20%w/v HPCyD (A6), 5%w/v RMCyD (A7) and 20%w/v RMCyD (A8). B: The optical microscopic photos of a PAS stained vertical section of the medial region of nasal septum of rat after a 5 min exposure of isotonic phosphate buffer solution (B1), 1.5%w/v β -CyD (B2), 5%w/v HPCyD (B3) and 5%w/v RMCyD (B4).

C: Cartilage, E: Ciliated pseudostratified columnar epithelium, G: Glandular tissue, M: Discharged mucous, V: Vascular sinus (400 \times).

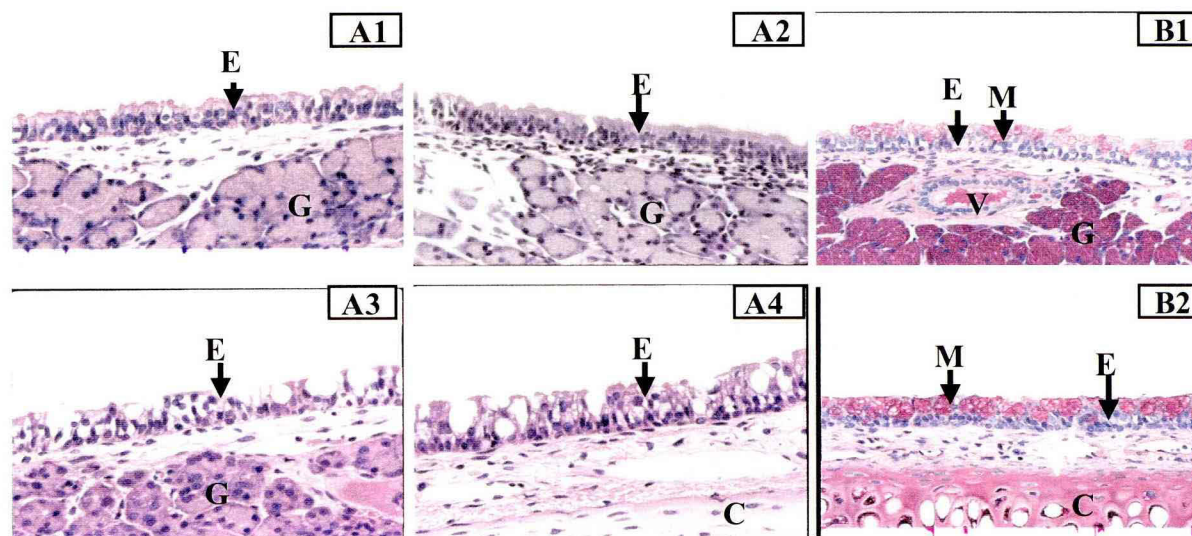


Fig. 6 A: The optical microscopic photos of a HE stained vertical section of the medial region of nasal septum of rat after a 30 min exposure (A1), a 60 min exposure (A2) of 10%w/v HP-CyD solution, and a 30 min exposure (A3) or a 60 min exposure (A4) of 10%w/v RMCyD solution
B: The optical microscopic photos of a PAS stained vertical section of the medial region of nasal septum of rat after a 30 min exposure of 10%w/v HPCyD solution (B1) and a 30 min exposure of 10%w/v RM-CyD solution (B2)
C: Cartilage, E: Ciliated pseudostratified columnar epithelium, G: Glandular tissue, M: Discharged mucous, V: Vascular sinus (400×) .

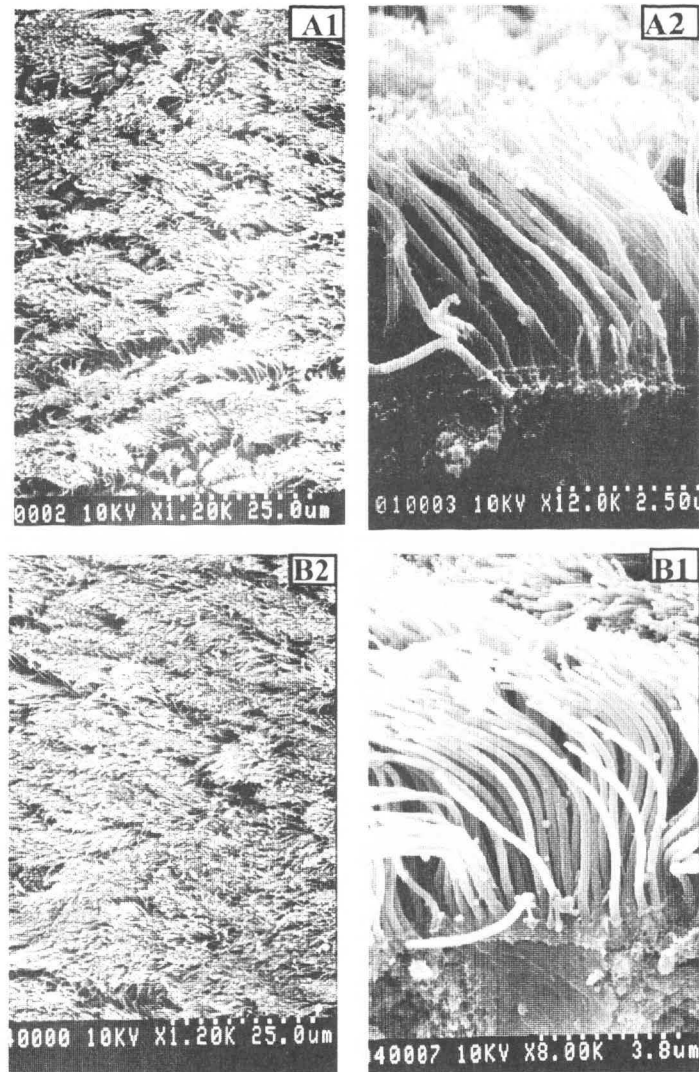


Fig. 7 The scanning electron microscopic photos of the medial region of lateral wall of rat nasal cavity after a 5 min exposure of isotonic phosphate buffer solution (A1: 1200 \times , A2: 12000 \times) and 1.5%w/v β -CyD solution (B1: 1200 \times , B2: 8000 \times)

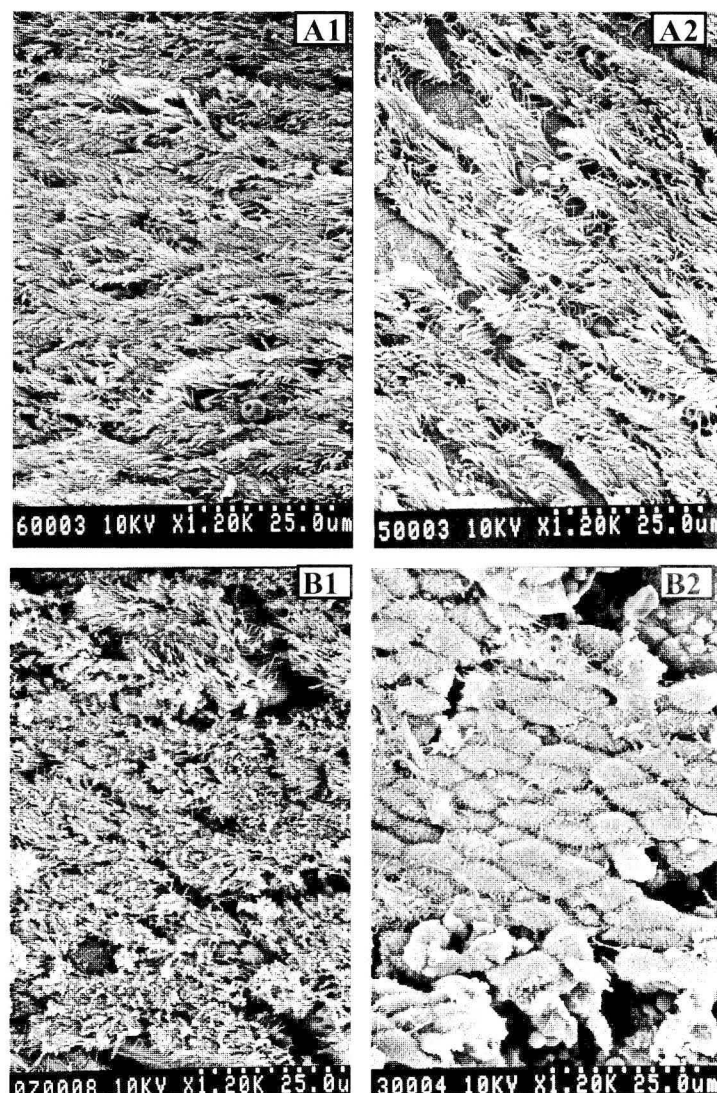


Fig. 8 The scanning electron microscopic photos of the medial region of lateral wall of rat nasal cavity after a 5 min exposure of 5% w/v HPCyD (A1), 20%w/v HPCyD solution (A2), 5%w/v RMCyD (B1) and 20%w/v RMCyD solution (B2) (1200×)

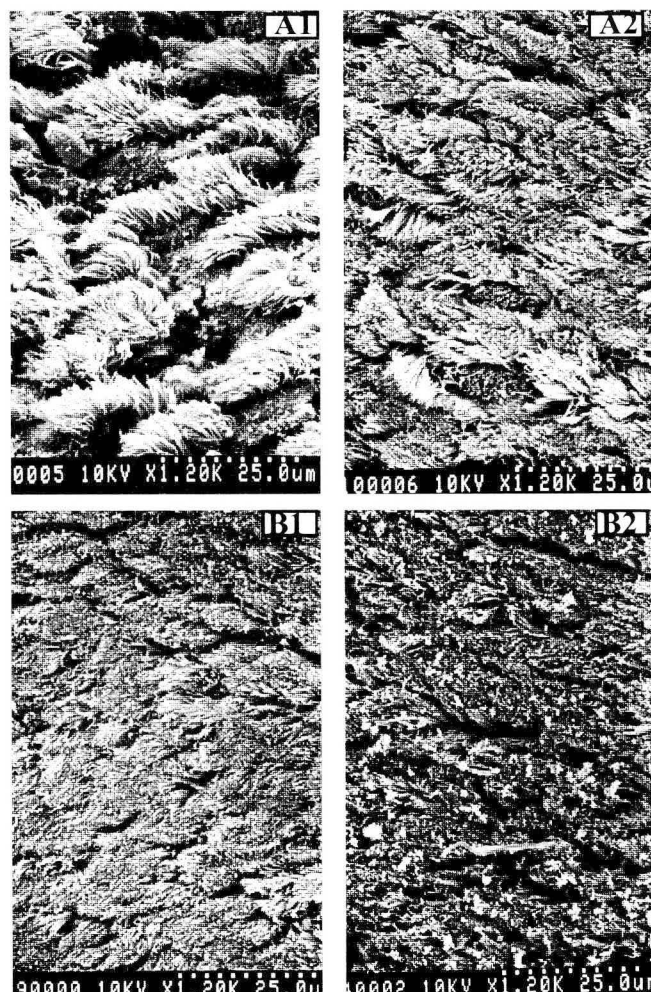


Fig. 9 The scanning electron microscopic photos of the medial region of lateral wall of rat nasal cavity after exposure to 10%w/v HPCyD solution for 30 min (A1), 60 min (A2) and 10%w/v RMCyD solution for 30 min (B1), 60 min(B2) (1200×)

第 3 節 *In vivo* 繰り返し経鼻投与実験

Fig. 10 の A1 に、20 μ L の等張緩衝液 (pH 7.4) をラットの右側鼻腔に投与し、5 分間適用後の鼻腔中央付近の垂直切断面を示した。右側の鼻中隔は、多列線毛上皮細胞に被われていた (Fig. 10-A1, -A2)。20 μ L の 1%w/v Laureth-9 溶液を 1 日 1 回、7 日間投与した群では、薬液投与した右側の鼻中隔と鼻甲介表面の上皮細胞の破壊が見られた (Fig. 10-B1, -B2)。これは、1%w/v Laureth-9 溶液の 5 分間適用実験の結果とほぼ一致していた。一方、20 μ L の 5, 10 および 20%w/v RMCyD 溶液を 1 日 1 回、7 日間投与した各群は、薬液投与した右側の鼻中隔と鼻甲介表面の上皮細胞にいずれも傷害を与えなかった (Fig. 11-A1, -B1, -C1)。また、RMCyD 溶液の *in vivo* 単回経鼻投与 5 分間適用実験で見られた粘液分泌亢進 (Fig. 6-B2) は、RMCyD 溶液 20 μ L の繰り返し経鼻投与では見られなかった (Fig. 11-A2, -B2, -C2)。この結果は、2%w/v dimethyl β -CyD をヒトに対して一日 2 回、数カ月間経鼻投与した検討と一致する³⁹⁾。*In vivo* 投与では、鼻腔内における薬液の希釈や線毛運動によるクリアランスによって、局所濃度が低下することが知られており²³⁾、このことが、鼻粘膜への影響を低下させていると考えられる。メチル化 CyD は CyD の中でも、もっとも強い吸収促進効果を示し、実際、ジメチル β -CyD と RMCyD は 2~5% の低濃度の範囲で有効であることが報告されている⁴⁰⁾。このことから推測して、 β -CyD 溶液や高濃度 HPCyD 溶液を *in vivo* 投与しても、鼻粘膜への影響は極めて少ない

と考えられる。

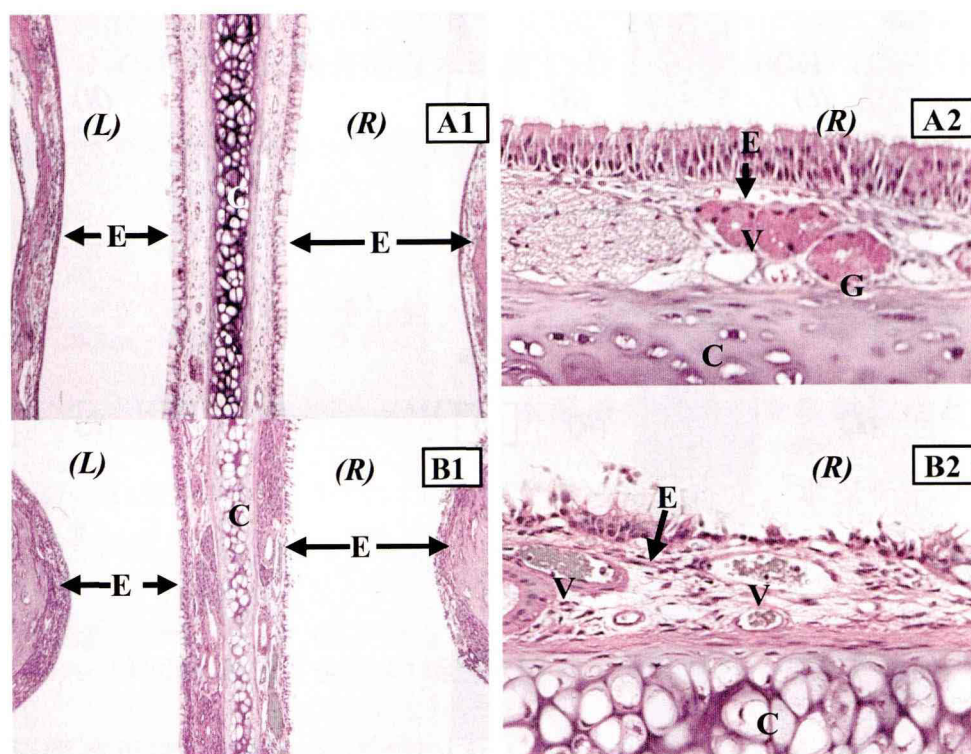


Fig. 10 The optical microscopic photos of a HE stained vertical section of the medial region of the rat nasal cavity (A1 and B1) (40×) and septum (A2 and B2) (400×) A: 5 min after single dosing of 20μL of isotonic phosphate buffer solution into the right nasal cavity (R). B: 24 hr after 7 times repeated dosing of 20μL of 1%w/v laureth-9 into the right nasal cavity (R). C: Cartilage, E: Ciliated pseudostratified columnar epithelium, G: Glandular tissue, V: Vascular sinus.

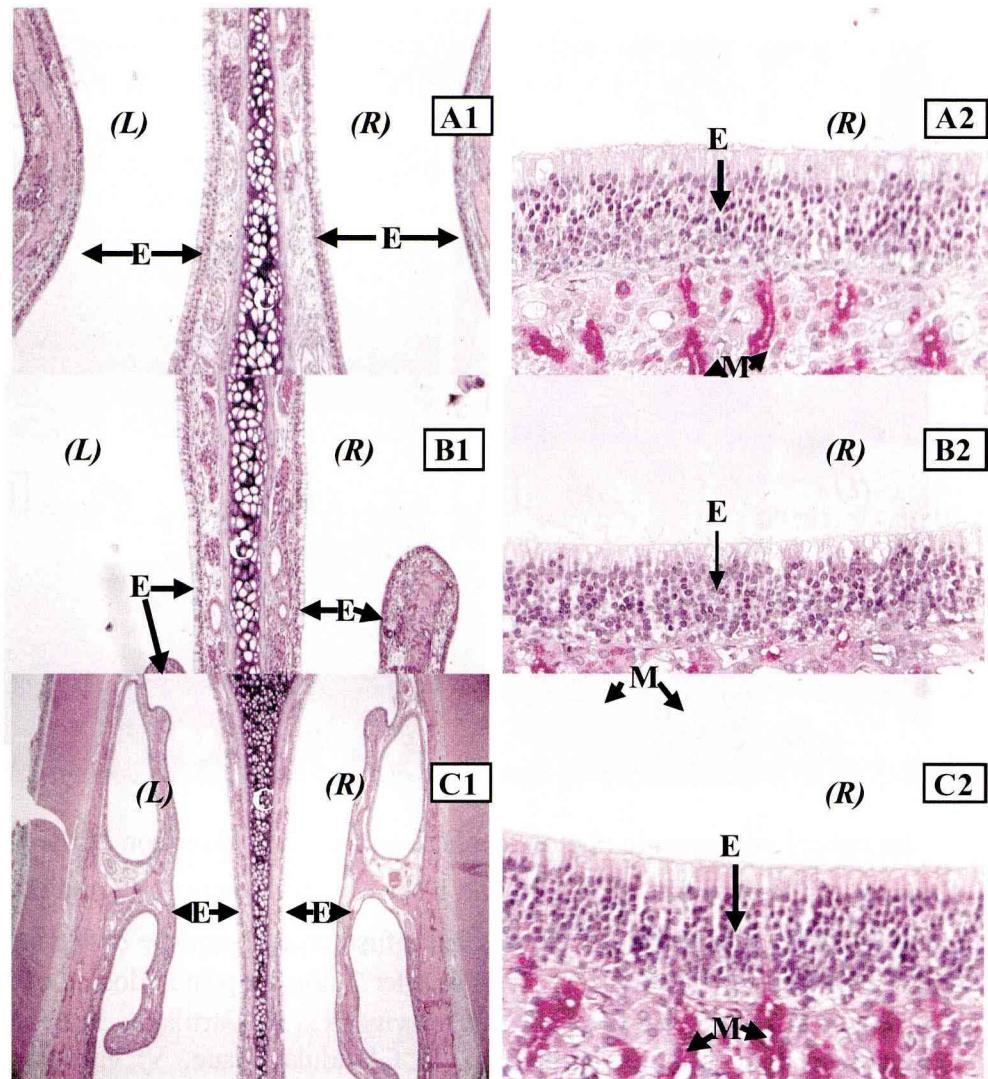


Fig. 11 The optical microscopic photos of a HE stained vertical section of the medial region of the rat nasal cavity at 24 hr after 7 times repeated dosing of 20 μ L of 5%w/v (A1), 10% w/v (B1) and 20%w/v RMCyD (C1) into the right nasal cavity (R) (40 \times), and the optical microscopic photos of a PAS stained vertical section of the medial region of the rat nasal septum at 24 hr after 7 times repeated dosing of 20 μ L of 5%w/v (A2), 10%w/v (B2) and 20%w/v RMCyD (C2) into the right nasal cavity (R) (400 \times) C: Cartilage, E: Ciliated pseudostratified columnar epithelium, M: Discharged mucous

第 4 節 本章のまとめ

本章では、 β -CyD 並びに代表的な水溶性 CyD として HPCyD および RMCyD を選択し、これら水溶性 CyD の高濃度溶液がラットの鼻粘膜へ及ぼす影響を組織学的に検討し、次のような知見を得た。

- [1] β -CyD、HPCyD および RMCyD 水溶液の浸透圧を検討したところ、20%w/v RMCyD 溶液を除いて低張であった。また。ポジティブコントロールの SDC および Laureth-9 の 1%w/v 溶液も低張であった。
- [2] *In vivo* 単回経鼻投与実験の結果、 β -CyD については 1.5%w/v 溶液の 5 分間適用で、HPCyD については 20%w/v 溶液の 5 分間適用および 10%w/v 溶液の 60 分間適用まで、鼻粘膜上皮細胞に対する傷害性は見られなかった。一方、光学顕微鏡による検討において RMCyD は 20%w/v 溶液の 5 分間適用および 10%w/v 溶液の 30、60 分間適用で、鼻粘膜上皮細胞の破壊は見られないものの、粘液分泌の著しい亢進が見られた。さらに、走査型電子顕微鏡により線毛の脱落が生じていることが確認された。
- [3] *In vivo* 繰り返し経鼻投与実験から、ポジティブコントロールの Laureth-9 の 1%w/v 溶液を 1 日 1 回 20 μ L、7 日間投与すると、鼻粘膜は激しく傷害されるが、RMCyD の 20%w/v 溶液を 1 日 1 回 20 μ L、7 日間投

与しても光学顕微鏡による検討においては鼻粘膜上皮細胞の破壊は見られず、粘液分泌の亢進も起こらないことが確認された。

以上により、20%w/v 以下の HPCyD 溶液および 10%w/v 以下の RMCyD 溶液は、*in vivo* の条件に沿った使用においては、繰り返し投与をしても鼻粘膜に傷害を与えないことが示された。したがって、高濃度水溶性 CyD 溶液は、難溶性薬物の経鼻投与製剤における溶解改善剤として有用であると考えられた。

第 5 節 実験の部

[1] 試料

Laureth-9 と SDC は、和光純薬工業（株）より購入して使用した。 β -CyD、HPCyD（MS=0.9）および RMCyD（DS=1.8）は、塩水港精糖（株）（東京）から恵与されたものを使用した。その他の試薬は、市販特級品を使用した。

[2] 薬液の調製

高濃度の RMCyD を除くすべての試料溶液は、等張液となるように濃度を調節したリン酸緩衝液（pH 7.4）に試料を溶解して調製した。試料溶液の調製濃度は w/v% で表し、Table 5 に示した。

[3] 薬液の浸透圧

試料溶液の浸透圧を、浸透圧自動分析装置（Auto & STAT OM-6010、京都第一科学（株）（京都））にて測定した。

[4] *In vivo* 単回経鼻投与実験

In vivo 単回経鼻投与実験は、鼻腔への薬液の滞留時間の調節を容易にするために、平井らの方法⁷⁾に改良を加えて行った。実験には、Wistar 系雄性ラット（体重 230～250g、三協ラボサービス（株）（東京））を使用した。ラットは、実験前夜から水のほかは絶食とした。また、動物実験は星薬科大学動物実験指針を遵守して行った。

In vivo 単回経鼻投与実験の手順は、まずラットをペントバルビタール（大日本製薬（株）（大阪））腹腔内注射（60mg/kg）にて麻酔し、仰向けに恒温板に固定して、呼吸管理のため気管切開してカテーテルを留置した。つぎに、部分切開した食道からカテーテル（インターメディック・ポリエチレンチューブ：クレイアダムス（USA））を挿入して先端を後鼻孔まで到達させた。薬液投与は、この食道カテーテルを用いて行った。コントロール群のラットには、等張のリン酸緩衝液を投与した。薬液投与群は、5、30 または 60 分間滞留後に、生理食塩水で除去した。その後、ラットの鼻中隔と両側鼻腔壁を摘出して、組織標本とした。

[5] *In vivo* 繰り返し経鼻投与実験

In vivo 繰り返し経鼻投与実験では、とくに手術は施さず、薬液の経鼻投与時に Wistar 系雄性ラット（230～250g）をジエチルエーテルにて麻酔し、仰向けに固定して行った。薬液には、Laureth-9 の 1%w/v 溶液、RMCyD の 5、10 および 20%w/v 溶液を使用し、1 日 1 回 20 μ L を右側鼻腔に 7 日間投与した。最終投与から 24 時間後に、鼻腔組織を摘出し組織標本とした。なお、ラットは薬液投与時を除き、餌・水を自由に摂取させた。

[6] 光学顕微鏡による組織学的検討

摘出した鼻腔組織は、中性ホルマリン緩衝液にて洗浄し、同液にて 1 週間固定（室温）した。その後脱灰し、定法にしたがって、組織標本を

作成した。鼻中隔からは3箇所横断切片を作り、HE染色した。また、同じ箇所の切片で粘液分泌を確認するために、PAS染色⁴¹⁾した標本も作成した。

[7] 走査型電子顕微鏡による組織学的検討

上述の方法で24時間前固定した鼻腔組織を、1%w/v オスミウム酸にて1時間追加固定（室温）した。その後、定法に従い走査型電子顕微鏡用標本とした。走査型電子顕微鏡（日立 S-800）にて鼻腔側壁の中央部付近を観察した。

第3章 水溶性シクロデキストリン包接デキサメタゾンの 経鼻投与における有用性の評価

鼻腔は、経口投与で十分な BA が得られない場合や¹⁾、注射以外の投与経路を望む場合に比較的簡便に使用できること²⁾、薬物吸収性が良いこと³⁾等から薬物投与部位として有望視されている。また、ある種の薬物については、鼻腔投与が薬物の脳への送達に有利であると報告されている⁴⁻⁶⁾。一方、鼻腔は容積が著しく小さいことから、投与できる薬物量には制限がある³⁾。本章では、まず水溶性 CyD を用いて難溶性薬物デキサメタゾンの溶解性を改善し、経鼻投与可能なデキサメタゾン高濃度水溶液の調製の可能性について検討した。また、デキサメタゾンは静脈内投与では脳移行性が低いことが知られている⁴²⁾。したがって、水溶性 CyD で溶解性を改善したデキサメタゾンのラット経鼻投与後の血中薬物動態、およびラットの凍結脳損傷モデルにおける脳浮腫抑制効果を評価することにより、水溶性 CyD による溶解性の向上と経鼻投与が、デキサメタゾンの脳への適用における新たな治療戦略となる可能性について検討した。

第 1 節 水溶性 CyD によるデキサメタゾンの溶解性の改善

Table 6 に水溶性 CyD を溶解補助剤としてデキサメタゾンの溶解性を改善した結果を示した。デキサメタゾンの溶解度は、水溶性 CyD により著しく上昇し、HPCyD の添加で 86.4 倍に、RMCyD、モノマルトシル β -CyD (GCyD) でそれぞれ 148.3、160.0 倍に増大した。水溶性 CyD を利用して難溶性薬物の溶解性を向上させる検討は、これまでに数多く報告されているが⁴³⁻⁴⁵⁾、これらの水溶性 CyD 濃度は概ね 2% 程度までとなっている。経鼻投与では、鼻腔内に適用できる薬剤の容量に制限があるため、高濃度の薬物溶液が求められる。同時に、水溶性 CyD で難溶性薬物の溶解性を向上させるには、より高濃度の水溶性 CyD 溶液が必要となる。本研究で用いたデキサメタゾンは、難溶性であるために、鼻腔投与に適用できる程の高濃度の薬物溶液を調製するためには水溶性 CyD のような適切な溶解補助剤が必要である。今回、溶解補助剤として使用した HPCyD、RMCyD および GCyD は、粘膜等の組織傷害が比較的少ないと報告されている水溶性 CyD であり、前 2 者は、著者らが行った鼻腔内滞留系を用いたラット鼻粘膜傷害に関する検討で、15% 溶液まで粘膜障害性を示さない事が明らかとなっている⁴⁶⁾。また、*in vivo* 繰り返し経鼻投与時において、20% 溶液でも重篤な粘膜傷害を示さないことを確認している。特に、GCyD は種々の毒性評価において、HPCyD と同等以上の安全性が認められている⁴⁷⁾。本実験でデキサメタゾンの溶解性改善に使用した水溶性 CyD 濃

度（100mM）は 13～15％に相当し、安全に使用できる範囲であると考えられる。

いずれの水溶性 CyD もデキサメタゾンの溶解度を著しく向上させたが(Table 6)、中でも GCyD を用いた群では最も高い濃度のデキサメタゾン水溶液（1.57％）が得られた。通常治療に用いられるデキサメタゾン量は 0.5～8mg であり、これに相当するデキサメタゾン-GCyD 溶液の容量は 30～500 μ L 程度である。このことは、水溶性 CyD によって溶解性を改善することにより、臨床でのデキサメタゾン経鼻投与剤を開発できる可能性を示唆するものである。

Table 6 Solubilization of dexamethasone with water-soluble cyclodextrins at 25°C

Cyclodextrines	Concentration of dexamethasone (%)
-----	0.01 ^{a)}
HPCyD	0.86
RMCyD	1.48
GCyD	1.57

^{a)} The Merck Index 10th Edition

第2節 改良 *in situ* 薬物滞留法によるデキサメタゾン-GCyD の経鼻吸収性

デキサメタゾン経鼻投与液の調製には、最も高い溶解度が得られた GCyD を用いた。Fig. 12 に、デキサメタゾン-GCyD 水溶液経鼻投与群およびデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与群の血清中デキサメタゾン濃度—時間推移を示した。デキサメタゾン-GCyD 水溶液の経鼻投与では、投与直後より血清中デキサメタゾン濃度の上昇がみられ、最高血中濃度到達時間 maximum drug concentration time (Tmax) は 120 分であった。また、Table 7 に各投与群の血清中薬物濃度—時間曲線下面積 (AUC)を示した。デキサメタゾン-GCyD 水溶液経鼻投与群 (0.628mg/kg) の AUC はデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与群 (0.628mg/kg) とほぼ同等であり、経鼻投与でほぼ 100%の BA が得られた。一方、投与量を増加したデキサメタゾン-GCyD 水溶液経鼻投与群 (1.256mg/kg) の AUC は、同 0.628mg/kg の AUC に対して 57.9%の増加に留まった。

デキサメタゾン-GCyD 溶液を、改良 *in situ* 薬物滞留法で経鼻投与した結果、血清中デキサメタゾン濃度は速やかに上昇し、0.628mg/kg 投与群ではデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与に匹敵する BA が得られた(Fig. 12、Table 7)。デキサメタゾンの鼻腔からの吸収過程は、適用部位と鼻粘膜脈管系等との間の濃度勾配によって推進される受動拡散と考えられる。し

たがって、1.256mg/kg 投与群の AUC が 0.628mg/kg 投与群の 57.9% 増に留まったのは、経鼻投与の薬液濃度ではなく容量を倍にして投与したことが、原因の 1 つと考えられた。

各群ともに血清中薬物濃度のバラツキは少なく、また、固相抽出法-セミミクロ HPLC 法を用いることによって、少量の血清試料からデキサメタゾン濃度を、精度良く測定することができた。さらに、本実験において開発した改良 *in situ* 薬物滞留法は、経鼻投与する薬液の容量調節に優れ、アトム多用途チューブ (AT) から薬液の再投与も容易であり、経鼻吸収実験に対して有用性が高いと考えられる。

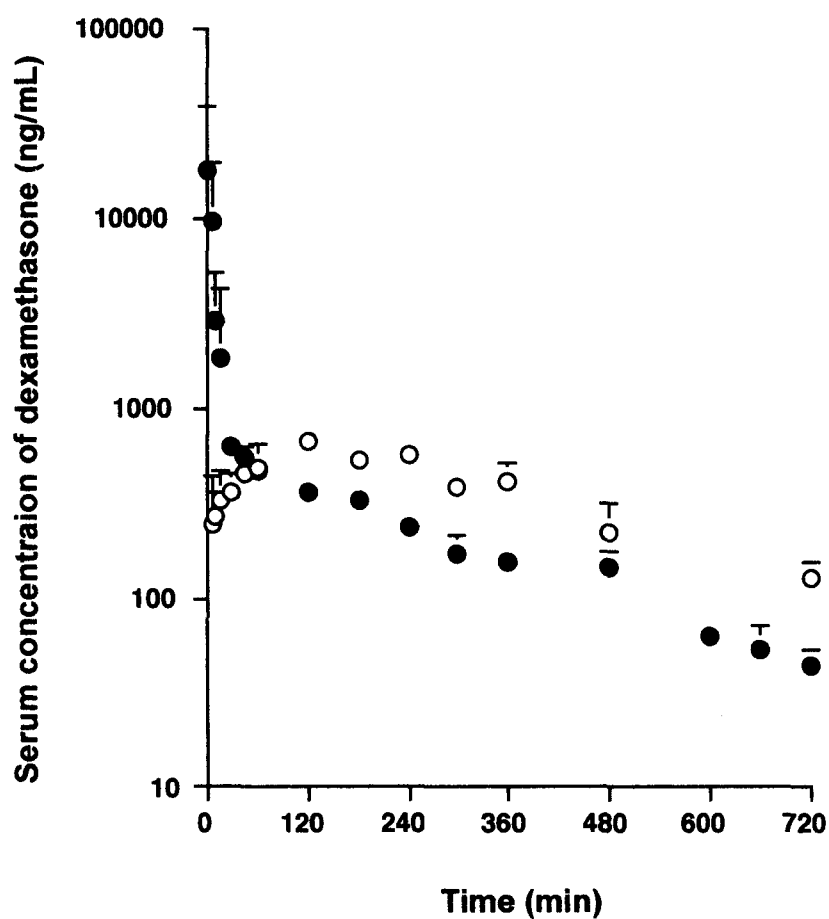


Fig. 12 Serum level-time profiles of dexamethasone after intranasal (i.n.) or intravenous (i.v.) administration to rats at a dose of 0.628mg/kg dexamethasone
 ○: i.n. administration of dexamethasone mono-maltosyl β -cyclodextrin clathrate (dexamethasone 15.7mg/ mL) (n=4). ●: i.v. administration of dexamethasone sodium phosphate (dexamethasone 3.3mg / mL) (n=3~4).
 Each value represents the mean \pm SD.

Table 7 AUC of dexamethasone following intranasal or intravenous administration to rats

Group	Compound	Dose (mg/kg)	AUC _{0-720min} (ng * hr/mL)
Intravenous administration	Dexamethasone-PNa ^{a)}	0.628	4481.4 ± 550.4
<hr/>			
Intranasal administration	Dexamethasone-GCD ^{b)}	0.628	4315.6 ± 253.2
	Dexamethasone-GCD ^{b)}	1.256	6813.5 ± 189.9

Each value represents the mean ± SE (n=4).

^{a)} Decadron-phosphate injection (dexamethasone (3.3mg/mL))

^{b)} Dexamethasone (15.7mg/mL)

第3節 デキサメタゾン-GCyD 経鼻投与による脳浮腫の改善

Table 8 に、偽手術群、コントロール群、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与群およびデキサメタゾン-GCyD 経鼻投与群の凍結脳損傷作成 18 時間後の脳浮腫の程度を示した。コントロール群に比較してデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与群では、26%程度の脳浮腫改善が認められた。一方、デキサメタゾン-GCyD 経鼻投与群では、脳浮腫はほぼ完全に改善されていることが示された。

デキサメタゾンは、強力な抗炎症作用を有する合成副腎皮質ホルモンで、種々の炎症性疾患やアレルギー疾患等とともに原発性・転移性脳腫瘍による脳浮腫⁴⁸⁾の治療にも使用されているが、前述したように、注射および経口投与では脳への分布は低い⁴²⁾。これは、blood-brain barrier と P-glycoprotein による能動的排泄機構のためと考えられている⁴⁹⁾。一方、幾つかの薬物において、鼻腔投与が薬物の脳への送達に有利であるとの報告がある⁴⁻⁶⁾。そこで、ラット凍結脳損傷モデルを用いてデキサメタゾン-GCyD 溶液の経鼻投与の有用性に関して検討した。ラット凍結脳損傷モデルに対するデキサメタゾンの静脈内投与では、Meinig らの報告⁵⁰⁾によると脳浮腫を 20~30%改善するためにヒト換算で 500mg/body 程度もの投与を必要としている。これは、本研究におけるデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与(1.6mg/kg×5 回)の結果とも一致している。一方、静脈内投与群と比べバラツキは見られるものの、

デキサメタゾン-GCyD 溶液(1.6mg/kg×5 回)の経鼻投与により、強い脳浮腫改善効果が認められた。この結果は、Fig. 12 に示した良好な経鼻吸収を裏付けるとともに、静脈内投与では移行性が低い⁴²⁾とされるデキサメタゾンの脳への効率的な送達の可能性を示唆している。

Table 8 The values of Sw (%) of the rat traumatized hemisphere

Group	Compound	Dose (mg/kg)	Sw (%) ^{a)}
Sham-operation	— — — — —	— — — — —	1.2±1.4
Control	— — — — —	— — — — —	6.7±2.8
Intravenous administration	Dexamethasone-PNa ^{b)}	1.6×5 times	5.0±1.4
Intranasal administration	Dexamethasone-GCD ^{c)}	1.6×5 times	-0.8±6.1

Each value represents the mean±SD (n=3~6).

^{a)} Sw (%): degree of the traumatized hemisphere swelling calculated with Eq. 1

^{b)} Decadron[®] phosphate injection (dexamethasone (3.3mg/mL))

^{c)} Dexamethasone (15.7mg/mL)

第 4 節 本章のまとめ

本章では、水溶性 CyD の GCyD を用いて難容性薬物デキサメタゾンの溶解性を改善し、経鼻投与可能なデキサメタゾン高濃度水溶液の調製の可能性について検討した。また、デキサメタゾンは静脈内投与では脳移行性が低いため、GCyD で溶解性を改善したデキサメタゾンを経鼻投与し、血中薬物動態、ラットの凍結脳損傷モデルにおける脳浮腫抑制効果を評価して、水溶性 CyD による溶解性の向上と経鼻投与ルートを選択が、デキサメタゾンの脳への適用における新たな治療戦略となるかを検討した。

[1] 水溶性 CyD を用いることで、デキサメタゾンの溶解性は著しく増大し、デキサメタゾンの経鼻投与製剤化の可能性が示唆された。

[2] GCyD を用いて溶解性を改善したデキサメタゾン-GCyD を経鼻投与すると、血清中デキサメタゾン濃度は速やかに上昇し、AUC はデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液の静脈内投与に匹敵する値が得られた。

[3] ラットの凍結脳損傷モデルに、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液を静脈内投与しても十分な脳浮腫抑制効果は得られないが、デキサメタゾン-GCyD を経鼻投与したところ、顕著な脳浮腫抑制効果の得られることが示された。

以上のことより、難容性薬物デキサメタゾンの溶解性を GCyD により改善することで、経鼻投与でデキサメタゾンの良好な吸収が得られ、デキサメタゾンの脳移行性を示唆する脳浮腫改善効果が得られた。したがって、GCyD で溶解性を改善したデキサメタゾンの経鼻投与製剤は、脳浮腫に対する新たな治療戦略になると考えられる。

第 5 節 実験の部

[1] 試料

薬物：デキサメタゾン生化学用（和光純薬工業）およびデカドロン注射液（デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液、デキサメタゾン 3.3mg/mL）（萬有製薬(株)、東京）を購入し使用した。メチルプレドニゾロンは Sigma-Aldrich Co. (USA) の製品を使用した。HPCyD (MS=0.9) および RMCyD (DS=1.8) は塩水港精糖(株) (東京)より恵与されたものを、GCyD (M.W.=1459.3) は同社より購入したものをそれぞれ使用し、アセトニトリルは HPLC 用（関東化学）を、その他の試薬は市販特級品をそのまま使用した。水は蒸留してイオン交換後、ミリ Q 純水装置（日本ミリポア）で精製して用いた。

動物：Wistar 系雄性ラット、体重 260～280g（三協ラボサービス(株)、東京）を使用した。実験 6 時間前からは絶食とし、飲水のみとした。動物実験は星薬科大学動物実験指針を遵守して行った。

材料：ポリエチレンチューブ (PE) は、日本ベクトン・デッキンソン(株)(東京)製を、アトム多用途チューブ(AT)は、アトムメディカル(株)(東京)製を使用した。HPLC 分析の前処理には、固相抽出カラム：アイソルート C18 50mg／1 mL ((株)ユニフレックス) を使用した。

[2] 装置

デキサメタゾンおよび CyD と包接化したデキサメタゾンの水溶液中での紫外吸収スペクトルは、紫外可視分光光度計 UV-2200（島津製作所(株)、京都）で測定した。血清中デキサメタゾン濃度の分析は、HPLC LC-9A、紫外可視分光光度検出器 SPD-6AV（島津製作所）のフローセルをセミマイクロ用に交換して行った。骨窓の作成には、ミニモ精密加工用ドリル（ミニター(株)、東京）を使用した。

〔3〕改良 *in situ* 薬物滞留法

平井ら⁷⁾および相川ら⁸⁾の鼻粘膜吸収実験法を、経鼻投与した薬液の滞留時間の調節および繰り返し投与の簡便化を目的として改良した。すなわち、ラットをウレタン麻酔(800mg/kg、*i.p.*)下、恒温板に仰向けに固定し頸部を切開した。気道に PE-205(内径 1.57mm)を挿管したのち、鼻口蓋をアロンアルファ（三共(株)、東京）で閉塞し、食道から PE-205 を後鼻孔まで挿入留置する。次に、食道に留置した PE-205 に AT 4Fr(外径 1.35mm、先端の開口部を閉じ、先端やや後方の側面に新たな開口部を作成したもの (Fig. 13-b))を挿入して改良 *in situ* 滞留系を作成した。薬液の投与は、シリンジに接続した AT 先端を食道留置の PE-205 より鼻腔内に出して行い、その AT の先端を PE-205 の先端まで戻すことで鼻腔を閉じた系とした (Fig. 13-c)。

〔4〕水溶性 CyD によるデキサメタゾンの溶解性の改善

過量のデキサメタゾンが分散した水性懸濁液(40mM)に一定量の水溶性

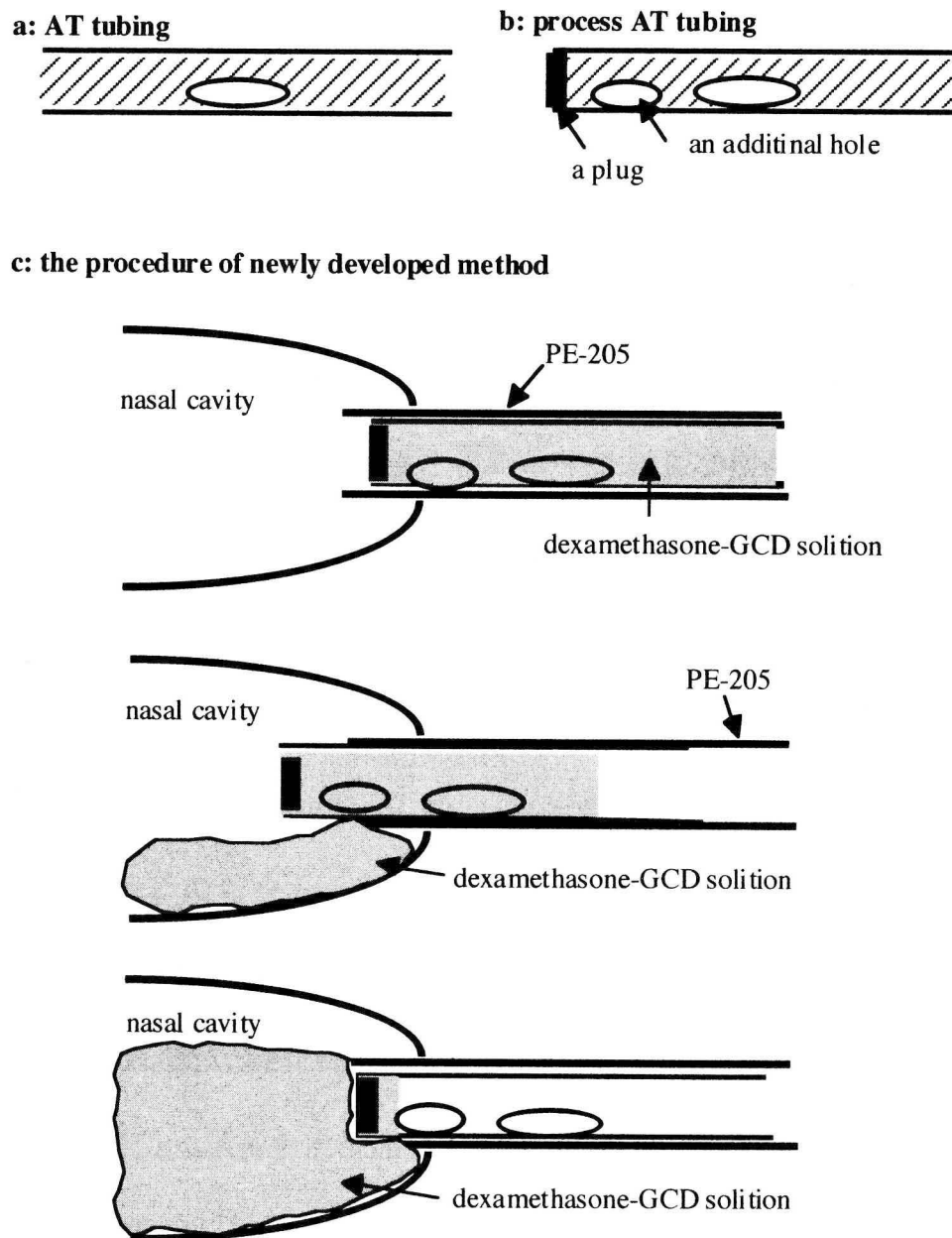


Fig. 13 Schematic representation the apparatus and procedure used for an improved *in situ* nasal deposit method

CyD(HPCyD、RMCyD および GCyD)(100mM)を加え、25℃において 24 時間スターラーで混合した後、その一部を遠心分離し、上澄をろ過してデキサメタゾン濃度を吸光度(242nm)測定法により定量した。

[5] 改良 *in situ* 薬物滞留法によるデキサメタゾン-GCyD の経鼻吸収性の評価

ウレタン麻酔(800mg/kg、*i.p.*)下、改良 *in situ* 薬物滞留法による手術を施し仰向けに固定したラットに、デキサメタゾン-GCyD 水溶液を経鼻投与し、薬液を鼻腔内に 12 時間滞留させ、経時的に頸静脈より採血した。血液は遠心分離後、血清を分取し分析まで-20℃で凍結保存した。また、同様に手術を施したラットに、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液を頸静脈より投与後、経時的に頸静脈より採血した。

[6] 血清中デキサメタゾン濃度の測定

血清中デキサメタゾン濃度は、著者らが開発した固相抽出法 (Table 9) (内部標準：メチルプレドニゾロン)で血清を前処理した後、セミマイクロ HPLC にて測定した。カラムは、Mightysil RP-18(5 μ m、2.0×150mm、関東化学(株)、東京)を用い、カラム温度は 50℃とした。移動相は、アセトニトリル：リン酸ナトリウム緩衝液(10mM、pH=7.1)=30：70 を用い、波長 240nm の吸光度を測定した。

[7] 凍結脳損傷モデル⁵¹⁾の作成

改良 *in situ* 薬物滞留法による手術を施したラットを仰向けに固定して、

Table 9 Solid phase extraction procedure

Procedure	Solvent	Volume
Conditioning	methanol	1mL×2
Equilibration	distilled water	1mL×2
Application	sample+ I.S. solution ^{a)}	1mL×1
Rinse	distilled water	1mL×2
Wash 1	hexane	0.1mL×1
	distilled water	1mL×1
Wash 2	chloroform	0.1mL×1
	distilled water	1mL×1
Wash 3	3.0% THF	1mL×1
	7.5% acetonitrile	1mL×1
	10.0% methanol	1mL×1
Elution	methanol	0.1mL×1

a) Sample = serum 0.2mL + internal standard solution (methylpredonisolone 1μg /mL methanol) 0.1mL+ saturated sodium chloride solution 0.7mL

頭皮正中切開にて頭蓋骨を露出し、左頭頂部にドリルで径 5mm の骨窓を作成した。この際、処置部分を生理食塩水で冷却し、脳の熱損傷を避け、硬膜を傷つけないように注意した。液体窒素で冷却した直径 4mm のステンレス棒を、骨窓部分の硬膜に 60 秒間接触させることで凍結脳損傷モデルを作成した。

[8] デキサメタゾン-GCyD 経鼻投与による脳浮腫の改善

ウレタン麻酔(800mg/kg、*i.p.*)下、ラットに改良 *in situ* 薬物滞留法による手術を施した。偽手術群は、前述に従い頭蓋骨に骨窓を形成後、頭皮を縫合した。コントロール群は、同様に骨窓を形成し、凍結脳損傷を与えた。デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム塩溶液静脈内投与群およびデキサメタゾン-GCyD 水溶液経鼻投与群は、同薬液を凍結脳損傷作成 2 時間前、作成時、作成 2、10 および 16 時間後の計 5 回投与した。経鼻投与の 2 回目以降は、前回投与の薬液を鼻腔からドレナージ後新たな薬液を投与した。それぞれ凍結脳損傷作成または骨窓形成より 18 時間後に大腦を摘出し、左右脳半球に分けて質量を量り、以下の式¹⁵⁰⁾により脳浮腫の程度 (Sw) を算出した。

式 1 : $Sw (\%) = (\text{左脳半球質量} - \text{右脳半球質量}) \times 100 / \text{右脳半球質量}$

第 4 章 総括および結論

薬物を経口投与した時の吸収は、薬物の溶解性、膜透過性、初回通過効果や、投与される側の生理的因子に依存して決まる。鼻腔は消化による分解や初回通過効果を回避できることなど生理学的・解剖学的特徴から、一部のホルモン・ペプチドなどに限らず、多くの薬物の適用部位として有望と考えられる。しかし、鼻腔という小さな空間に適用できる容量には制限があり、難溶性薬物の適用は困難と考えられてきた。そこで、経鼻投与製剤開発における、水溶性 CyD による溶解性の改善の有用性について検討した。

まず、経鼻投与では適用できる薬物量に制限があるため、薬物動態の検討に適した微量分析方法の開発を試みた。SPE とセミマイクロ HPLC の組み合わせによる方法は、汎用性を保ちながら、微量の薬物の定量が可能で経鼻吸収実験の動態研究に有用な分析方法であることを明らかにした（第 1 章）。

次に、水溶性 CyD 自体による鼻粘膜傷害性をラットを用いて検討した。HPCyD では 20%w/v 以下、RMCyD 溶液は 10%w/v 以下の使用においては、繰り返し投与をしても鼻粘膜に傷害を与えないことが示された。したがって、高濃度水溶性 CyD 溶液は、難溶性薬物の経鼻投与製剤における溶解改善剤として有用であることが示唆された（第 2 章）。

難溶性薬物デキサメタゾンの溶解性を GCyD により改善することで、経鼻投与で良好な吸収が得られ、デキサメタゾンの脳移行性を示唆する脳浮腫改善

効果が得られた。このことから、GCyD で溶解性を改善したデキサメタゾンの経鼻投与製剤は、脳浮腫に対する新たな治療戦略になると考えられた（第 3 章）。

以上の結果から、水溶性 CyD は経鼻投与を指向した難溶性薬物の溶解性の改善に有用であり、とくに GCyD を用いたデキサメタゾンの経鼻投与は、脳浮腫に対する新たな治療戦略になる可能性が示された。

謝 辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導を賜りました星薬科大学薬剤学教室 高山幸三教授、森下真莉子助教授に深く感謝致します。

本研究の推進および実施にあたり、終始御指導と御協力を賜りました松戸市立病院薬局 勝田栄男元薬局長代理に心より御礼申し上げます。

本研究の実施と発表の機会を与えてくださいました松戸市立病院薬局 窪田盛厚元薬局長、沖田良子前薬局長、水野恵司薬局長に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、多大な御助力を頂きました松戸市立病院病理科 細田周二博士に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、御助言、御協力を賜りました星薬科大学薬剤学教室の皆様にも深く感謝致します。

引用文献

- 1) Wyss PA, Rosenthaler J, Nuesch E and Aellig WH: Pharmacokinetic investigation of oral and i.v. dihydroergotamine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* **41**: 597-602, 1991.
- 2) Merkus FW, Verhoef JC, Romeijn SG and Schipper NG: Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats. *Pharm Res* **8**: 588-92, 1991.
- 3) Chein YW, Su KSE and Chang S-F: Nasal systemic drug delivery. *Drugs and the pharmaceutical sciences* 39(Marcel Dekker, Inc. New York): 1-19, 1989.
- 4) Kumar TCA, David GFX, Sankaranarayanan A and Puri V, Sundram KR: Pharmacokinetics of progesterone after its administration to ovariectomized rhesus monkeys by injection, infusion, or nasal spraying. *Proc Natl Acad Sci* **79**: 4185-4189, 1982.
- 5) Pardridge WM: Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr Rev* **7**: 314-330, 1986.
- 6) Sakane T, Akizuki M, Yoshida M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M, Sezaki H: Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid

- directly from the nasal cavity. *J Pharm Pharmacol* **43**: 449-451, 1991.
- 7) Hirai S, Yashiki T and Matsuzawa T: Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int J Pharm* **7**: 317-325, 1981.
- 8) Aikawa K, Takahashi M, Uda H, Tanaka S, Yoshida T and Tsuchida S: Effect of pharmaceutical properties on disappearance rate of chlorphenir-amine malate from nasal cavity in rats in in situ nasal deposit method. *YAKUZAIGAKU* **51**: 205-211, 1991.
- 9) Liu JP, Shiota O and Novotny M: Separation of fluorescent oligosaccharide derivatives by microcolumn techniques based on electrophoresis and liquid chromatography. *J Chromatogr* **559**: 223-235, 1991.
- 10) Okujava VM, Chankvetadze BG, Rukhadze MD, Rogava MM and Tkesheliadze NB: Use of normal-phase microcolumn high-performance liquid chromatography for the study of hydrolytic stability, metabolic profiling and pharmacokinetics of an antiepileptic drug, benzonal. *J Pharm Biomed Anal* **9**: 465-473, 1991.
- 11) Kennedy RT, Oates MD, Cooper BR, Nickerson B and Jorgenson JW: Microcolumn separation and the analysis of single cells.

Science **246**: 57-63, 1989.

- 12) Cobb KA, Novotny M: High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography, using immobilized trypsin for protein digestion. *Anal Chem* **61**: 2226-2231, 1989.
- 13) Shiota O, Suzuki A, Kanda T, Ohtsu Y and Yamaguchi M: Low concentration drug analysis by semi-microcolumn liquid chromatography with a polymer-coated mixed-function precolumn. *J Microcol Sep* **7**: 29-35, 1995.
- 14) Magdic S and Pawliszyn JB: Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* **723**: 111-122, 1996.
- 15) Gorecki T and Pawliszyn J: Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction. Part 1. Theoretical considerations. *Analyst* **122**: 1079-1086, 1997.
- 16) Lord HL and Pawliszyn J: Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction. *Anal Chem* **69**: 3899-3906, 1997.
- 17) Grote C and Pawliszyn J: Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal Chem* **69**: 587-596, 1997.

- 18) Hartley R, Lucock M, Cookman JR, Becker M, Smith IJ, Smithells RW and Forsythe WI: High-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and carbamazepine 10, 11-epoxide in plasma and saliva following solid-phase sample extraction. *J Chromatogr* **380**: 347-356, 1986.
- 19) Good TJ and Andrews JS: The use of bonded-phase extraction columns for rapid sample preparation of benzodiazepines and metabolites from serum for HPLC analysis. *J Chromatogr Sci* **19**: 562-566, 1981.
- 20) 久保博昭監修, “固相抽出法ハンドブック”, (株) ユニフレックス, 東京, 1986.
- 21) Drettner B and Aust R: Plethysmographic studies of the blood flow in the mucosa of the human maxillary sinus. *Acta Otolaryngol* **78**: 259-263, 1974.
- 22) Kunlien JA, Schiratzki H and Drettner B: Blood flow in the rabbit maxillary sinus mucosa. *Acta Otolaryngol* **99**: 144-153, 1985.
- 23) Gizurarson S: The relevance of nasal physiology to the design of drug absorption studies. *Adv Drug Del Rev* **11**: 329-347, 1993.
- 24) Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M and Sezaki H: The transport of a drug to the cerebrospinal fluid

- directly from the nasal cavity: the relation to the lipophilicity of the drug. *Chem Pharm Bull* **39**: 2456-2458, 1991.
- 25) Throne RG, Emory CR, Ala TA and Frey WH 2nd: Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res* **692**: 278-282, 1995.
- 26) Sakane T, Yamashita S, Nadai T and Sezaki H: Direct drug transport from the nasal cavity to the cerebrospinal fluid: a new strategy for drug delivery to the brain. *STP Pharm Sci* **7**: 98-106, 1997.
- 27) Chou K-J and Donovan MD: Distribution of antihistamines into the CSF following intranasal delivery. *Biopharm Drug Disposition* **18**: 335-346, 1997.
- 28) Rjewski RA and Stella VJJ: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci* **85**: 1142-1169, 1996.
- 29) Hermens WAJJ, Deurloo MJM, Romeyn SG, Verhoef JC and Merkus FWHM: Nasal absorption enhancement of 17 β -estradiol by dimethyl- β -cyclodextrin in rabbits and rats. *Pharm Res* **7**: 500-503, 1990.
- 30) Shao Z, Krishnamoorthy R and Mitra AK: Cyclodextrins as nasal

- absorption promoters of insulin: mechanistic evaluations. *Pharm Res* **9**: 1157-1163, 1992.
- 31) Matsubara K, Abe K, Irie T and Uekama K: Improvement of nasal bioavailability of luteinizing hormone-releasing hormone agonist, buserelin, by cyclodextrins derivatives in rats. *J Pharm Sci* **84**: 1295-1300, 1995.
- 32) Richardson JL, Minhas PS, Thomas NW and Illum L: Vaginal administration of gentamicin to rats. Pharmaceutical and morphological studies using absorption enhancers. *Int J Pharm* **56**:29-35, 1989.
- 33) Hersey SJ and Jackson RT: Effect of bile salts on nasal permeability in vitro. *J Pharm Sci* **76**: 876-879, 1987.
- 34) Ennis RD, Borden L and Lee WA: The effects of permeation enhancers on the surface morphology of the rat nasal mucosa: a scanning electron microscopy study. *Pharm Res* **7**:468-475, 1990.
- 35) Chandler SG, Illum L and Thomas NW: Nasal absorption in the rat. I : a method to demonstrate the histological effects of nasal formulations. *Int J Pharm* **70**: 19-27, 1991.
- 36) Ohwaki T, Ando H, Watanabe S and Miyake Y: Effects of dose, pH and osmolarity on nasal absorption of secretin in rats. *J Pharm Sci*

74: 50-52, 1985.

- 37) Ohwaki T, Ando H, Kakimoto F, Uesugi K, Watanabe S and Miyake Y, Kayano M: Effects of dose, pH and osmolarity on nasal absorption of secretin in rats. 2: histological aspects of the nasal mucosa in relation to the absorption variation due to the effects of pH and osmolarity. *J Pharm Sci* **76**: 695-698, 1987.
- 38) Pujara C, Shao Z, Duncan MR and Mitra AK: Effects of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: biochemical evaluation. *Int J Pharm* **114**: 197-203, 1995.
- 39) Hermens WA, Belder CW, Merkus JM, Hooymans PM, Verhoef J and Merkus FW: Intranasal estradiol administration to oophorectomized women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **40**: 35-41, 1991.
- 40) Marttin E, Verhoef J, Romeijn SG and Merkus FW: Effect of absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo: release of marker compounds in the nasal cavity. *Pharm Res* **12**: 1151-1157, 1995.
- 41) Hayama M: PAS(periodic acid-Schiff) staining. *Medical Technol* **17**: 543-547, 1989.
- 42) Mineo T: Metabolic fate of synthetic glucocorticoids in the rat. *Nippon*

Naibunpi Gakkai Zasshi **52**: 1243-1268,1976.

- 43) Kanai A, Alba RM, Takano T, Kobayashi C, Nakajima A, Kurihara K, Yokoyama T and Fukami M: The effect on the cornea of alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporin eye drops. *Transplant Proc* **21**: 3150-3152, 1989.
- 44) Usayapant A, Karara AH and Narurkar MM: Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclo-dextrin on the ocular absorption of dexamethasone and dexamethasone acetate. *Pharm Res* **8**: 1495-1499, 1991.
- 45) Brewster ME, Anderson WR, Estes KS and Bodor N: Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. *J Pharm Sci* **80**: 380-383, 1991.
- 46) Asai K, Morishita M, Katsuta H, Hosoda S, Shinomiya K, Noro M, Nagai T and Takayama K: The effects of water-soluble cyclodextrins on the histological integrity of the rat nasal mucosa. *Int J Pharm* **246**: 25-35, 2002.
- 47) Irie T and Uekama K:Pharmaceutical application of cyclodextrins.3. toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* **86**: 147-162, 1997.
- 48) Gurcay O, Wilson C, Barker M and Eliason J: Corticosteroid effect on transplantable rat glioma. *Arch Neurol(Chicago)* **24**: 266-269, 1971.
- 49) Schinkel AH, Wagenaar E, Deemter L, Mol CAAM and Borst P: Absence of the mdrla P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* **96**: 1698-1705,

1995.

50) Meinig G and Deisenroth K: Dose-response relation for dexamethasone in cold lesion-induced brain edema in rats. *Adv Neurol* **52**: 295-300, 1990.

51) Eroglu H, Kas HS, Oner L, Turkoglu OF, Akalan N, Sargon MF and Ozer N: The in-vitro and in-vivo characterization of PLGA:L-PLA microspheres containing dexamethasone sodium phosphate. *J Microencapsul* **18**: 603-612, 2001.

論文リスト

本論文は、以下の発表論文から構成されている。

- 1) 薬物血中濃度分析における固相抽出法を用いたセミマイクロ高速液体クロマトグラフィーの有用性, 浅井和範, 勝田栄男, 森下真莉子, 高山幸三, 永井恒司, *病院薬学*, **26**, 219-226 (2000)
- 2) The effects of water-soluble cyclodextrins on the histological integrity of the rat nasal mucosa, K. Asai, M. Morishita, H. Katsuta, S. Hosoda, K. Shinomiya, M. Noro, T. Nagai and K. Takayama, *Int. J. Pharm.*, **246**, 25-35 (2002)
- 3) 水溶性シクロデキストリン包接デキサメタゾンの経鼻投与における有用性の評価, 浅井和範, 水野恵司, 森下真莉子, 高山幸三, *Drug Delivery System*, **20**, 461-466 (2005)

『経鼻投与製剤における水溶性シクロデキストリンの
溶解補助剤としての有用性』

浅井 和範

正誤表

ページ	行	誤	正
5	14	SPE カラム	SPE カートリッジ
5	17	SPE カラム	SPE カートリッジ
9	7	SPE カラム	SPE カートリッジ
11	Fig.2, legend 1	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
11	Fig.2, legend 3	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
11	Fig.2, legend 5	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
11	Fig.2, legend 6-7	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
11	Fig.2, legend 8-9	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
12	Table3, title 2	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
13	1	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	4	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	5	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	6-7	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	8	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	10	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	11	SPE カラム	SPE カートリッジ
13	16	SPE カラム	SPE カートリッジ
14	4	SPE カラム	SPE カートリッジ
14	6	SPE カラム	SPE カートリッジ
14	Table4, title 2	C18-SPE column	C18-SPE cartridge
15	5	SPE カラム	SPE カートリッジ
15	7	SPE カラム	SPE カートリッジ
15	11	SPE カラム	SPE カートリッジ
15	14	SPE カラム	SPE カートリッジ
15	15	SPE カラム	SPE カートリッジ
16	Fig.3, legend 1	C18-SPE columns	C18-SPE cartridges
16	Fig.3, legend 2	C18-SPE columns	C18-SPE cartridges
17	20	SPE カラム	SPE カートリッジ
18	9	SPE カラム	SPE カートリッジ
19	17	SPE カラム	SPE カートリッジ
21	6	SPE カラム	SPE カートリッジ
21	11	SPE カラム	SPE カートリッジ
21	13	SPE カラム	SPE カートリッジ
21	16	SPE カラム	SPE カートリッジ
21	18	SPE カラム	SPE カートリッジ
21	20	SPE カラム	SPE カートリッジ
22	1	SPE カラム	SPE カートリッジ
22	6-7	SPE カラム	SPE カートリッジ