

氏名（本籍）	中村宏司	（鹿児島県）
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	甲第85号	
学位授与年月日	平成14年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Nasal Drug Delivery Using Mucoadhesive pH-Sensitive Polymers and β -Sitosterol β -D-Glucoside	
論文審査委員	主査	教授 高山幸三
	副査	教授 福井哲也
	副査	教授 中陳静男

論文内容の要旨

鼻粘膜は、経口投与に代わる全身性の薬物送達期待される新しい薬物適用部位として注目を集めている。これは、鼻粘膜に投与された薬物は肝臓での代謝を受けることなく循環血中に入り、吸収速度が速く、吸収率にも優れていることによる。しかし、鼻は外界に接する呼吸器官であり、吸収面積にも限りがあることから一般に有効量の薬物を望ましい血中濃度パターンで体内に送達させることは困難である。薬物の持続的吸収や生物学的利用能の改善のために生体付着性高分子や吸収促進剤が用いられているが、これらの多くは鼻粘膜傷害を引き起こすことが報告されている。従って、投与剤形の修飾に加え、安全で有効な高分子ならびに吸収促進剤を探索することが重要課題となっている。

本研究では、全身性の効果を期待し得る経鼻投与剤形を実現する上でポリメタクリル酸にポリエチレングリコールをグラフト重合して得られる新規生体付着性 pH 応答性高分子 P(MAA-g-EG)の経鼻吸収担体への応用を試みるとともに、 β -シトステロール β -D-グルコシド (Sit-G)の薬物鼻粘膜吸収促進作用を詳細に調べ、薬物経鼻吸収送達システムの創製を指向した基礎検討を実施した。

喘息および鼻炎治療薬であるブデソニドは、その多くが肝臓で代謝されるため、経口投与では十分な薬効が得られない。そこで、生物学的利用能の改善と薬物血中濃度の持続化を目的とし、P(MAA-g-EG)を担体とする経鼻吸収システムの開発を試みた。P(MAA-g-EG)は、酸性で収縮し、中性付近では膨潤して粘膜付着性を示す pH 応答性高分子である。中性条件下で薬物を取り込ませた P(MAA-g-EG)粉末を投与すると、鼻粘膜上に付着して薬物を長時間保持するため、持続的な薬物吸収が可能になると考えられる。始めに P(MAA-g-EG)へのブ

デソニドの封入に及ぼすエタノールの影響について検討した。ブデソニドは水に難溶性の化合物であり溶解度を上げるためにはエタノール等の溶媒が必要である。しかし、エタノールを用いると水溶液に比べて封入率は低下する傾向が見られた。これは、エタノールにより高分子の膨潤が阻害されたことによる。種々の予備検討から、エタノール 25%含有 pH 7.4 緩衝液中でブデソニドと P(MAA-g-EG)の重量比 3:1 が最適な条件であることを見いだした。この条件下で、P(MAA-g-EG)へのブデソニドの取り込みは約 50 %まで上昇した。このようにして得られた試料粉末の *in vitro* 薬物放出性を検討した結果、ブデソニドは 30 分で約 60%放出し、その後、さらに持続的な放出性を示した。同一試料粉末をウサギ鼻粘膜に投与した結果、血中薬物濃度は約 45 分で最大値を示し、その後 8 時間まではほぼ一定の値を維持し、生物学的利用能は 83.9%と高い値を示した。以上より、ブデソニド含有 P(MAA-g-EG)粉末製剤の鼻粘膜への適用は、高い生物学的利用能と持続的な薬物吸収を可能にすることが示唆された。

これまでに Sit-G は鼻粘膜傷害を惹起することなくインスリンの経鼻吸収を著しく促進することが報告されている。本研究では、モデル薬物としてベラパミルおよび FITC デキストラン 4,400 (FD-4)を用い、粉末製剤および懸濁液剤としてウサギの鼻腔より投与したときの Sit-G の吸収促進作用とその作用機構を検討した。また、Sit-G のアグリコンである β -シトステロール (Sit)を比較のため用いた。ベラパミルおよび FD-4 の経鼻吸収は Sit-G によってコントロールに比べ約 2 倍増加し、また、Sit-G の吸収促進作用は Sit よりも強いことが明らかとなった。これらはインスリンで得られた結果と良く一致していたことから、Sit-G および Sit の吸収促進作用はインスリンに特異的ではなく、性質の異なる多くの薬物に対して利用し得ることが示唆された。

吸収促進剤は、粘膜の細胞膜（経細胞経路）と細胞間隙（細胞間隙経路）に作用するものに大別される。本研究では、Sit-G および Sit の作用機構を調べる目的で細胞膜に対する作用を脂質二重膜構造をもつリポソームを用い、また細胞間隙に対する作用を摘出ウサギ鼻粘膜を用いて検討した。

促進剤の脂質二重膜への影響を検討するために、Sit-G あるいは Sit をカルセイン封入リポソームとともにインキュベーションし、カルセインの漏出を指標としてその影響を評価した。リポソームからのカルセインの漏出に対する作用は、Sit-G が Sit より強く、これはウサギでの経鼻吸収における促進作用の強さと一致した。従って、Sit-G は細胞膜の構造を不安定化し、薬物の粘膜吸収を促進することが示唆された。

細胞間隙には親水性薬物の透過を制限するタイトジャンクションが存在し

ており、ある種の促進剤は主にタイトジャンクションを開くことによって薬物の透過を促進していることが知られている。タイトジャンクションの開口には細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の増加が関与していることから、Sit-G による $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した。Sit-G 添加後、 Ca^{2+} を含む溶液中では $[Ca^{2+}]_i$ の増加が見られたが、 Ca^{2+} を含まない場合には $[Ca^{2+}]_i$ は増加せず、その後溶液中に Ca^{2+} を加えると $[Ca^{2+}]_i$ の増加が観察された。これらの結果より Sit-G によって鼻粘膜の脂質膜構造が不安定化され、細胞外液から Ca^{2+} の流入が起こることが示唆された。次に、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加がタイトジャンクションの開口に関与しているか否かをより直接的に調べるために、Ussing チャンバーシステムを用いた膜抵抗値 (TEER) の変化ならびに FD-4 の透過性を測定した。Sit はコントロールに比べ、TEER を減少して FD-4 の透過を促進し、一方 Sit-G は TEER を減少させず FD-4 の透過を促進することが認められた。TEER の減少はタイトジャンクションの開口の指標となることが知られている。さらに、Sit-G での透過実験終了後の鼻粘膜を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて FD-4 の透過経路を観察すると、細胞内に FD-4 の蛍光が観察された。以上より、Sit は主に粘膜細胞間隙経路を介して、一方 Sit-G は、主に経細胞経路を介して薬物の透過性を促進していることが示唆された。

Sit-G および Sit は鼻粘膜吸収促進剤として有効であるが、粒子サイズ $75\mu\text{m}$ 程度の粒子が分散した懸濁液 (SP) では、経鼻投与された後鼻粘膜上での分散状態は不均一である。そこで、Sit-G および Sit のナノパーティクル (NP) の調製を試みた。Sit あるいは Sit-G にオレイン酸ナトリウムを添加し、modified ethanol injection 法により粒子径 80nm 程度の NP を調製することができた。この Sit-G および Sit NP 懸濁液に FD-4 を溶解し、ウサギの鼻腔より投与して、FD-4 の経鼻吸収性を調べ、SP 懸濁液と比較した。その結果、Sit および Sit-G NP では SP に比較して FD-4 の経鼻吸収性が増大し、微粒子化による促進効果が見られた。Ussing チャンバーによる検討から、Sit-G NP は一時的に TEER を減少し、FD-4 の透過を促進することが認められた。glucose/ Na^+ cotransporter の阻害剤を添加すると FD-4 の透過促進効果は阻害されず、TEER の減少作用のみが完全に抑制された。一方、Sit NP では促進剤 FD-4 の透過性と TEER はほとんど変化しなかった。Sit-G NP は、Sit-G SP に比べて粘膜の近傍まで接近できるためより強い吸収促進作用を示したものと推察される。さらに、glucose 残基をもつ Sit-G では、NP 化によって glucose/ Na^+ cotransporter に認識されるようになることが示唆された。

以上より、粘膜付着性 pH 応答性高分子の P(MAA-g-EG) にブデソニドを含有

させた粉末製剤は、ウサギに経鼻投与後、血中薬物濃度の持続性と高い生物学的利用能を示し、粘膜付着性と pH 応答性を持つ新規高分子化合物の経鼻吸収送達への応用の可能性が見いだされた。

Sit-G および Sit の鼻粘膜吸収促進作用はインスリンのみならずベラパミルや FD-4 においても同様に認められ、その作用機構は、Sit では薬物の細胞間隙経路の透過を、一方 Sit-G では経細胞経路の透過を促進することが示唆された。さらに、剤形の工夫による吸収改善を試みた結果、Sit-G では、ナノパーティクル化による促進作用の増強効果が認められ、種々の薬物に対する優れた経鼻吸収促進剤としての有用性が明らかにされた。

Grafted copolymer of PMAA and PEG in a 1:1 ratio

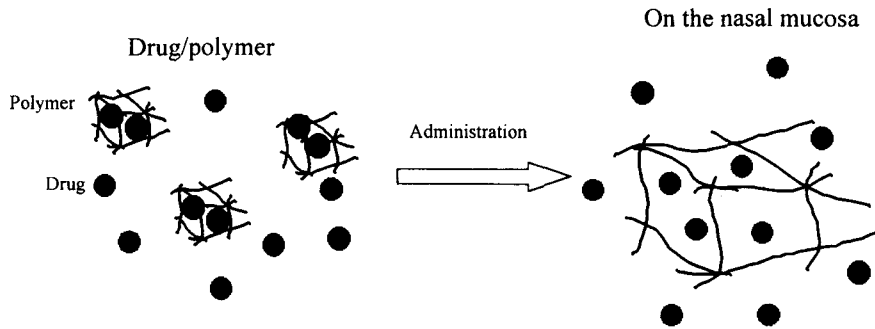
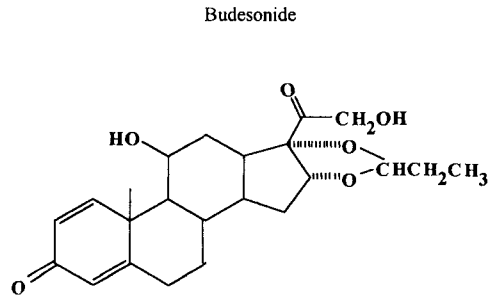
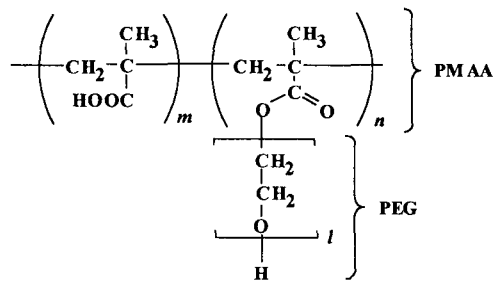


Figure 1. Structure of P(MAA-g-EG) copolymer and budesonide, and characteristics of P(MAA-g-EG)

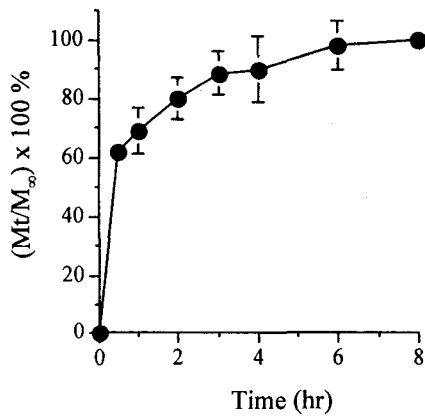


Figure 2. Release profiles of budesonide from polymer microparticles plotted as a function of time.

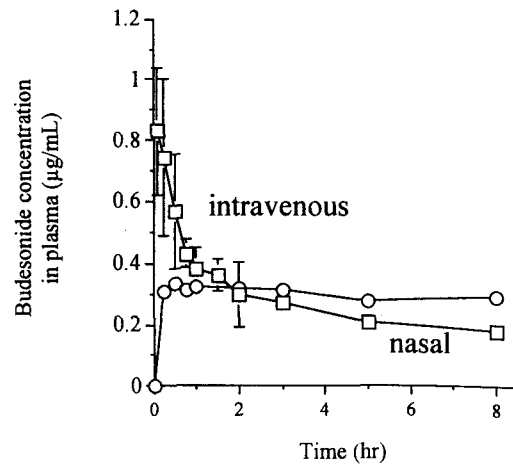


Figure 3. Plasma concentration profiles after intravenous administration of budesonide solution and intranasal administration of budesonide/polymer at a dose of 2 mg/kg budesonide in rabbits

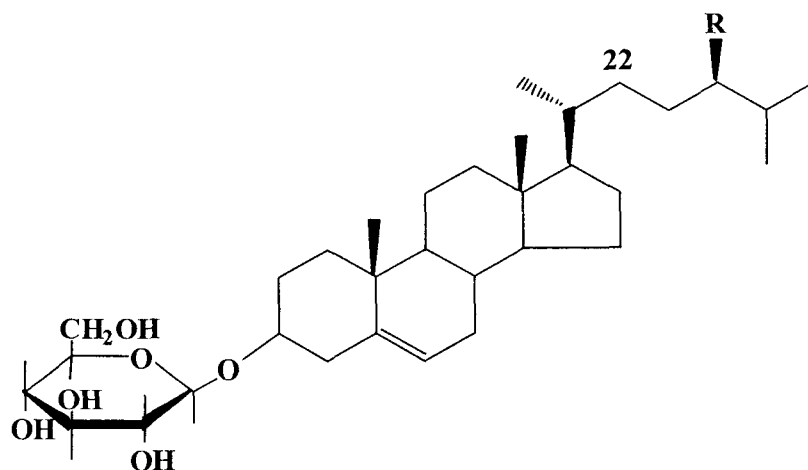


Figure 4. Chemical structure and components of β -sitosterol β -D-glucoside

Table 1. Bioavailability of various dosage form of insulin, verapamil and FD-4 formulae with enhancers following intranasal administration in rabbits

Drug	Dose (kg)	Dosage form	Enhancer	F ^{a)} (%)
Insulin	10 IU	Suspension ^{b)}	10 % w/v oleic acid	3.2 \pm 1.4
			1 % w/v Sit-G	11.3 \pm 1.6
			Lactose (control)	39.8 \pm 3.4
Verapamil	0.75 mg	Powder ^{c)}	SG	60.4 \pm 3.5
			Sit-G	90.7 \pm 9.8
			Lactose (control)	4.1 \pm 1.1
		Powder ^{d)}	Sit	6.9 \pm 0.4
			Sit-G	8.3 \pm 1.0
			Solution	PBS (control)
FD-4	1 mg	Solution	1.0 % w/v C10	8.2 \pm 2.9
			Suspension	
		SP ^{b)}	0.05 % w/v Sit	5.8 \pm 0.9
			0.05 % w/v Sit-G	8.9 \pm 0.4
		NP ^{e)}	0.05 % w/v Sit	9.2 \pm 0.8
0.05 % w/v Sit-G	11.7 \pm 0.7			

a) F from 0 to 8 hr for insulin, from 0 to infinity for verapamil and from 0 to 3 hr for FD-4.

b) Particles are less than 75 μ m.

c) verapamil:enhancers = 1:3 weight

d) FD-4:enhancer = 1:2 weight

e) The size of nanoparticle is about 80 nm.

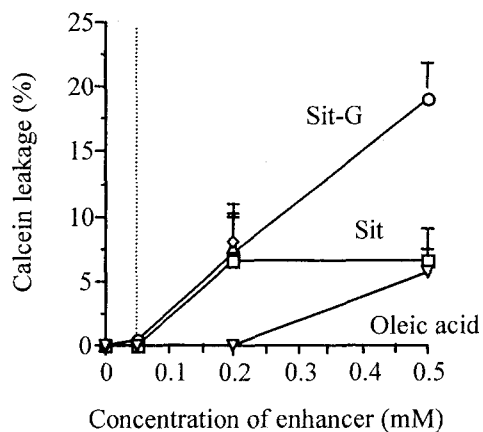


Figure 5. Effect of various enhancers on calcein leakage from liposomes with entrapped calcein in incubation in methanol-1/10 PBS (1:1) at 37 °C for 60 min

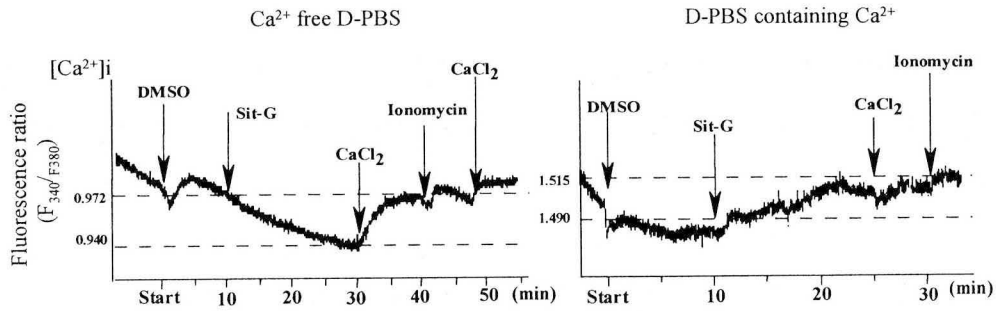


Figure 6. The effect of 50 μM Sit-G on intracellular calcium concentrations in the excised nasal mucosa from rabbits
 The arrows indicate the time of addition of 1 % DMSO (2 mL), 200 μM Sit-G (50 μL), 200 mM CaCl_2 (50 μL), and 26 μM ionomycin (4 mL).

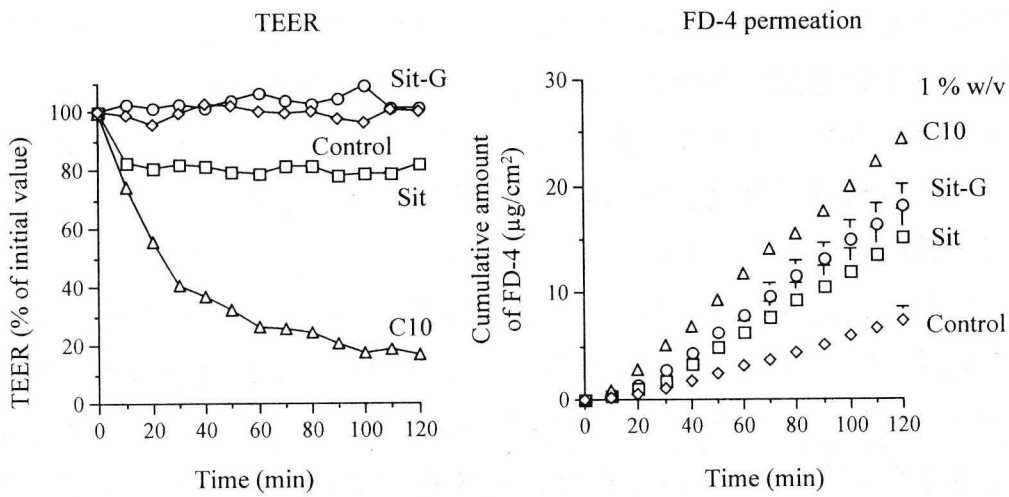


Figure 7. Effects of enhancers on TEER and FD-4 permeation through the excised nasal mucosa in rabbits by the addition of enhancers

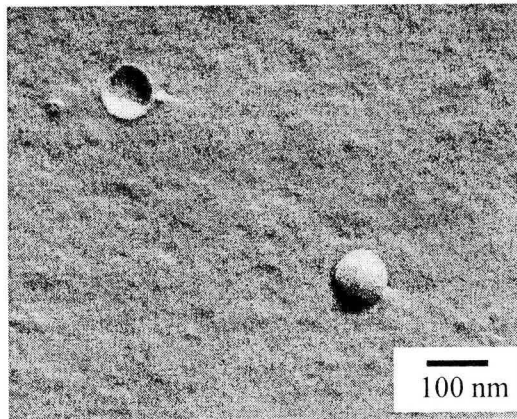


Figure 8. Observation of Sit-G nanoparticles by freeze fracture (magnification $\times 100,000$)

論文審査の結果の要旨

鼻粘膜は、経口投与に代わる全身性の薬物送達が期待される新しい薬物適用部位として注目を集めている。これは、鼻粘膜に投与された薬物が肝臓での代謝を受けることなく循環血液中に入り、吸収速度が速く、吸収率にも優れていることによる。しかし、鼻は外界に接する呼吸器官であり、吸収面積にも限りがあることから、一般に有効量の薬物を望ましい血液中濃度パターンで体内に送達させることは困難である。薬物の持続的吸収や生物学的利用能の改善のために生体付着性高分子や吸収促進剤が用いられているが、これらの多くは鼻粘膜に対し障害を引き起こすことが知られている。したがって投与剤形の修飾に加え、安全で有効な高分子ならびに吸収促進剤を見いだすことが、全身性の効果を期待し得る経鼻投与剤形を実現する上で重要な課題となっている。

本研究では、ポリメタクリル酸にポリエチレングリコールをグラフト重合して得られる新規粘膜付着性pH応答性高分子P (MMA-g-EG) の、経鼻吸収担体への応用が試みられるとともに、 β -シトステロール β -D-グルコシド (Sit-G) の薬物鼻粘膜吸収促進作用が調べられ、薬物鼻粘膜吸収システムの創製を指向した基礎検討が行われた。以下に本研究により得られた知見を要約する。

P (MMA-g-EG) の担体としての可能性：喘息および鼻炎治療薬であるブデソニドの生物学的利用能の改善ならびに薬物血中濃度の持続化を目的とし、P (MMA-g-EG) を担体とする経鼻吸収システムの開発が試みられた。種々の予備的検討からブデソニド含有P (MMA-g-EG) 粉末製剤の最適調製条件が確立され、この製剤は高い生物学的利用能と持続的な薬物吸収を可能にすることが示された。

Sit-Gの吸収促進作用：Sit-Gは鼻粘膜に障害性を惹起することなくインスリンの吸収を著しく促進することが報告されている。本研究では、モデル薬物としてベラパミルおよびFITCデキストラン4400 (FD-4) を用い、粉末製剤および懸濁液剤として投与されたときのSit-Gの促進作用がウサギにより検討された。比較のためにSit-Gのアグリコンである β -シトステロール (Sit) が用いられた。その結果、Sit-Gの吸収促進作用はSitよりも強く、またその作用はインスリンに特異的ではなく、性質の異なる多くの薬物に対して応用し得ることが示唆された。

Sit-Gの作用機構：吸収促進剤の作用機構は、粘膜の細胞膜（経細胞経路）と細胞間隙（細胞間隙経路）に作用するものに大別される。本研究では、経細胞

経路に対する作用を調べるためにその構造を模倣し得るリポゾームが、また細胞間隙に対する作用を調べるために摘出ウサギ鼻粘膜が用いられた。その結果、Sit-Gは、主に経細胞経路を介して、一方、Sitは主に細胞間隙経路を介して薬物の透過性を促進することが明らかにされた。

微粒子化による吸収改善: Sit-GおよびSitの更なる吸収促進作用の増強を目的として、微粒子化による経鼻投与後の鼻粘膜上での分散性の向上が図られた。その結果、改良エタノールインジェクション法を用いることにより、Sit-GおよびSitのナノパーティクル (NP) の調製が可能となり、NP化によって薬物経鼻吸収を大幅に改善できることが見いだされた。Sit-G NPでは、粘膜上で均一に分散しやすく、さらに粘膜の近傍に接近しやすくなるため、より強力な促進作用が得られたものと推測される。またグルコース残基をもつ Sit-Gでは、NP化によってグルコース / Na⁺ コトランスポーターに認識されるようになることも示された。

以上のように本研究では、P (MMA-g-EG) の薬物鼻粘膜吸収担体としての有用性が示されるとともに、Sit-Gの経鼻吸収促進作用とその機構が明らかにされている。有効性と安全性に優れる経鼻投与剤形を確立するための基盤となる有益な知見が得られており、その内容は博士の学位を授与するに相応しいものと判断される。