The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ペプチド性薬物の経鼻吸収を目指した新規製剤設計に関する研究
Author(s)	松山, 貴広
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2166
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

ペプチド性薬物の経鼻吸収を目指した
新規製剤設計に関する研究

2007 年

松山　貴広

目次

略語一覧 3
緒論 5
本論 8
第I章　粘液溶解剤NACを用いた粉末製剤によるペプチド性薬物の経鼻吸収の改善 8
第 1 節　ラットにおけるサケカルシトニンの吸収評価 10
第 2 節　イヌにおけるサケカルシトニンの吸収評価 15
第 3 節　ヒト副甲状腺ホルモン（1-34）とヒトインスリンの吸収評価 17
第 4 節　粘膜刺激性の評価 20
第 5 節　小括 22
第II章　粘液溶解剤NACを用いた粉末製剤によるペプチド性薬物の経鼻吸収における粉末特性の影響 23
第 1 節　粉末賦形剤の吸水性の影響 24
第 2 節　NAC量の影響 30
第 3 節　粒子サイズの影響 31
第 4 節　小括 33
第III章　粘液溶解剤NACと非イオン性界面活性剤Laureth-25 を用いた液体製剤によるペプチド性薬物の経鼻吸収の改善 34
第 1 節　ラットにおけるFD-4 の吸収評価 35
第 2 節　ラットにおけるサケカルシトニンの吸収評価 39
第 3 節　粘膜刺激性の評価 42
第 4 節　小括 44
結論 45
実験の部 46
第I章　実験の部 46
第II章　実験の部 51
第III章　実験の部 53

謝辞 56
引用文献 57

略語一覧

QOL	quality of life
DDS	drug delivery system
NAC	N-acethyl-L-cystein
TX-100	tritonX-100
SCT	salmon calcitonin
PTH	human parathyroid hormone (1–34)
INS	human insulin
SGC	sodium glycocholate
AUC	area under the curve
SD	standard deviation
S.C.	subcutaneous injection
I.V.	intravenous injection
MW	molecular weight
HCO	hydrogenated castor oil
$CaCO_3$	calcium carbonate
Laureth-25	polyoxyethylene (25) lauryl ether
FITC	fluorescein isothiocyanate
FD-4	FITC-dextran 4kDa
Laureth-9	polyoxyethylene (9) lauryl ether
HPLC	high performance liquid chromatography
NIH	national institutes of health

緒論

20 世紀後半以降のバイオテクノロジーの著しい進展により，多くの生理活性ペプチド及び蛋白質が医薬品として臨床の場に供されるようになった［1-3］．これら生理活性ペプチド及び蛋白質の多くは，分子量が数千から数万と比較的大きいことや，蛋白分解酵素で速やかに分解されることから，経口投与してもバイオアベイラビリティが極端に低く［4］，医薬品としての開発は，ほとんど注射製剤に限られているのが現状である．しかしながら，注射製剤は患者にとって苦痛を強いられる等，一般に受け入れられ難いことや，QOL（quality of life）の低下につながることから，注射に代わるペプチド性薬物の投与ルートの探索や各種ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が盛んに行われている［4,5］．

注射に代わる投与ルートの中で，経鼻投与ルートは，薬物の吸収部位である鼻粘膜が血管系に富んでおり，細胞間隙が比較的ルーズであるため，薬物の吸収が容易であり［6］，吸収された薬物は肝初回通過効果を受けることがないため［7］，薬物を効率的に利用することができ，さらに，患者のセルフメディケーションが可能で，コンプライアンスの改善にもつながるため［8］，ペプチド性薬物のプロミッシングな投与ルートとして注目されている［9］．

ヒトの鼻腔容積は 16～19 mL，表面積は約 150 cm^2と言われ，解剖学的には呼吸部と嗅覚部に分類される．ヒトの場合，呼吸部は 98%以上の面積を占め，その上皮粘膜は絨毛上皮構造を成し，主に 4 種類の細胞，すなわち，繊毛細胞，非繊毛細胞，杯細胞（Goblet cell），及び未分化の基底細胞から構成される（Fig. 1）［10］．鼻の特徴的な構造として，これら上皮細胞層の表面は，5～10 μmの厚さの粘液層に覆われており，この粘液層は繊毛の規則的な運動によって毎分 5～6 mmの速度で咽頭部方向へ移動していることが知られている．これは粘液繊毛クリアランス（mucociliary clearance）［11］と言われ，吸気と共に吸い込んだ塵や外来異物を除去するために備わっている物理的な生体防御機構である．粘液層の主成分は水（～95%）、及びムチン（～2%）と呼ばれる分子量数十万以上の糖蛋白質であり，杯細胞から分泌されるムチンは，ジスルフィド結合やイオン結合によりクロスリンク

して粘液層に適度な粘度を付与し，粘液バリアーを形成している．

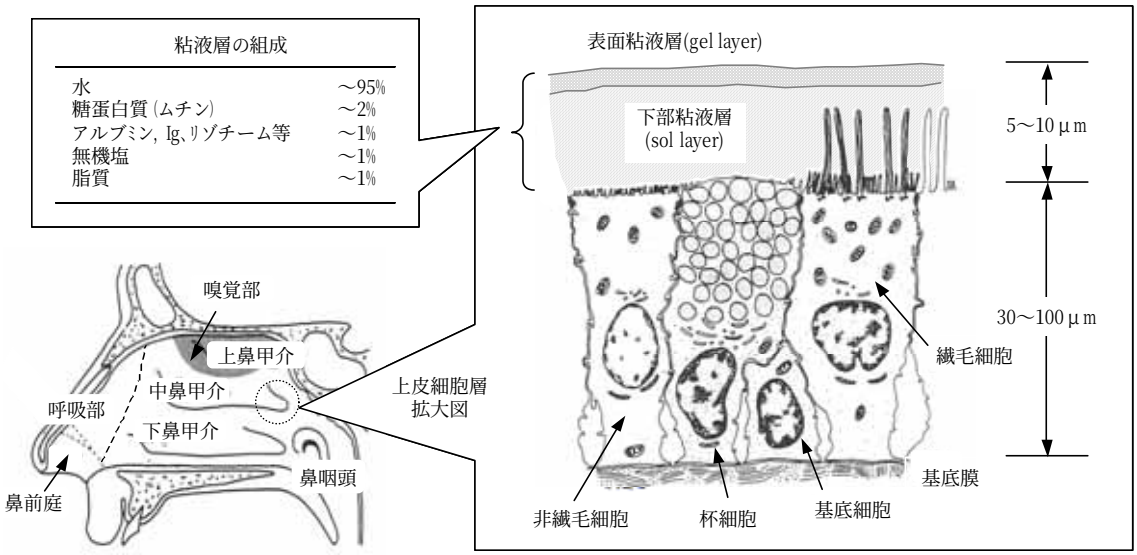

Fig. 1. Physiological structure of nasal cavity and mucosa

近年ペプチド性薬物の経鼻投与に関する研究が精力的に行われるようになり［12-15］, ペプチド性薬物のバイオアベイラビリティを高める方策が多数報告されている．例えば，鼻粘膜上皮細胞の細胞膜の流動性を高めたり［16-23］，タイトジャンクションを一時的に開いたり［24-26］，さらに蛋白分解酵素を阻害する［15,27,28］等種々のメカニズムに基づく吸収促進剤の利用が検討されている［29,30］．しかしながら，バイオアベイラビリティ改善効果の高い吸収促進剤は，ほとんど例外なく鼻粘膜への刺激性や傷害性も高いため，実際に医薬品として使用することができない［31］．ペプチド性薬物の経鼻製剤を広く臨床の場で用いるためには，十分なバイオアベイラビリティを確保しつつ，刺激性や傷害性を最小限に押さえることがキーポイントとなる．

著者らの研究グループでは, 強力な粘液溶解剤である N-アセチル-L-システイン（NAC）と，非イオン性界面活性剤である TritonX-100（TX-100）を共に作用させたとき, ペプチド性薬物の消化管吸収が大幅に改善されることを見出した［32,33］. 今回, 消化管ではなく, ペプチド性薬物の吸収に有利な点の多い鼻腔に着目して, NAC を吸収促進剤として，ペプチド性薬物の経鼻吸収製剤に適用した．NAC は粘

液ムコ多糖のジスルフィド結合を開裂させ, 速やかに粘液層を液状化させる［34］. その結果，粘膜上へ薬物が効率よく拡散し，吸収が促進されると考えられる．このような吸収促進メカニズムのため，鼻粘膜への刺激性や傷害性が少ないことが期待され，実際に，長年の臨床使用経験により，NAC の粘膜投与時の安全性は十分に確立されている［35］.

本論文では，上記コンセプトに基づくペプチド経鼻製剤によって，ペプチド性薬物のバイオアベイラビリティを改善することが可能か，並びに，鼻粘膜への刺激性や傷害性の有無を確認するために，ラット，ウサギ，イヌを用いて評価した．さらに, 粉末の特性や NAC 量等がペプチド性薬物の吸収に与える影響を評価することにより，製剤設計の最適化を行った．また，気管支炎の患者等では，粉末が鼻腔を経由して肺に達した場合［36］，発作を起こす危険性があるため，粉末製剤を投与することは好ましくない．そのため，液体製剤についても処方設計を行った.

以下，これらの結果について三章にわたり論述する.

本論

第 I 章　粘液溶解剤 NAC を用いた粉末製剤によるペプチド性薬物の経鼻吸収の改善

鼻粘膜は消化管粘膜に比べると膜構造が比較的ルーズであり薬物透過性が高く，鼻粘膜の下は血管系に富んでいるため，分子量の大きいペプチド性薬物の速やかな吸収が期待でき［6］，鼻腔から吸収された薬物は直接全身循環血へ移行するため，肝初回通過効果を回避し高いバイオアベイラビリティが期待できる．さらに，経鼻投与は投与が容易で自己投与が可能なためコンプライアンスが改善し，注射のように苦痛を伴わないため QOL の改善にもつながることから，経鼻投与はペプチド性薬物の投与ルートとして有望であると考えられる．

しかしながら，Fig. 2 に示すように，ペプチド経鼻投与を実用化するためには，越えなくてはならない壁がいくつか存在する．

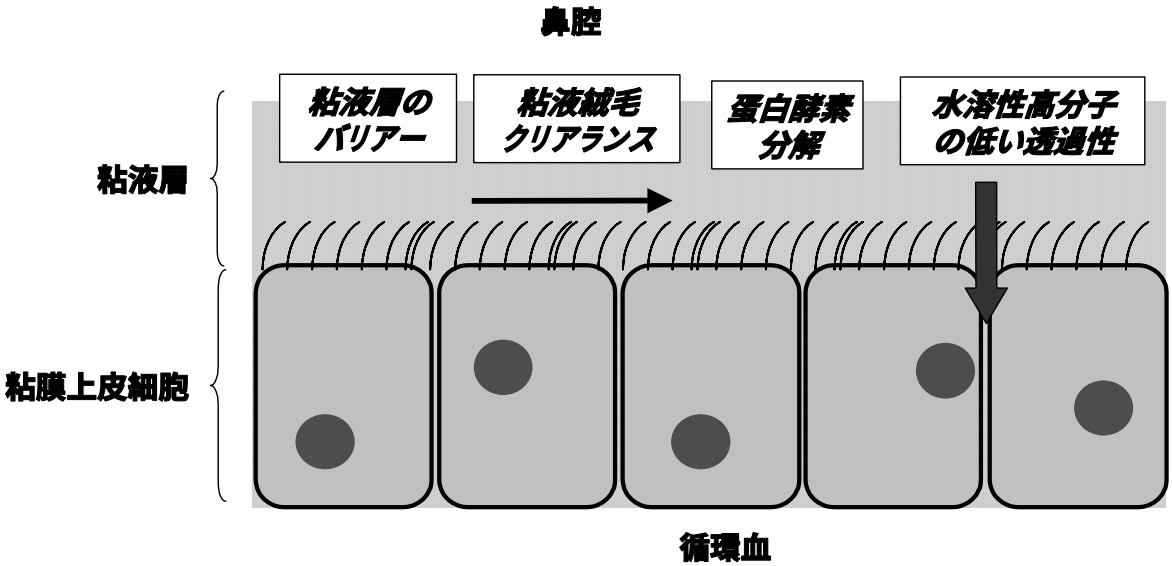

Fig. 2. Schematic representation of barriers on nasal absorption of peptide

鼻粘膜上皮細胞層の表面は，5～10 μm の厚さの粘液層に覆われており，この粘液層はその成分の分子量数十万以上の糖蛋白質であるムコ多糖により，ジスルフ

ィド結合やイオン結合のクロスリンクが形成され，適度な粘度を付与されている．そのため粘液バリアーが形成され，ペプチド性薬物の拡散が妨げられる．さらに，粘液層は繊毛の規則的な運動によって毎分 5〜6 mm の速度で咽頭部方向へ移動しており，この粘液繊毛クリアランス（mucociliary clearance）［11］は，吸気と共に吸い込んだ塵や外来異物を除去するための物理的な生体防御機構であるが，鼻粘膜に投与された薬物も粘液繊毛クリアランスにより速やかに排除される．また，粘液層には種々の蛋白分解酵素が存在し，ペプチド性薬物はこの蛋白分解酵素によって速やかに分解され，効力を失ってしまう［37,38］．さらに，水溶性の高いペプチド性薬物は細胞膜を直接透過することができないため，細胞間経路の寄与が大きいと考えられるが，分子量閾値は 1,000 程度と言われているため，それより分子量の大きい薬物は鼻粘膜透過性が非常に低い．

このような問題点を克服し，ペプチド性薬物の経鼻吸収を実現するために，以下に示した戦略に基づいて新規ペプチド経鼻製剤を処方設計した．まず，1 点目は粉末の適用である．粉末として鼻腔に薬物を投与すると，鼻腔内の限られた水分で薬物が溶解するため，局所的な高濃度が達成でき，この高い濃度グラジエントにより，分子量が比較的大きいペプチド性薬物でも鼻粘膜を透過することが期待できる．2 点目は非吸水性の粉末を賦形剤として使用することである．このタイプの賦形剤は鼻腔内の水分をトラップせず，薬物が溶解するための水分が確保できるため，速やかな薬物の溶解とそれに伴う薬物吸収が期待できる．速やかに薬物が吸収されれば，粘液繊毛クリアランスで鼻腔から排除されることを回避することが可能となる．3 点目は吸収促進剤として粘液溶解剤 NAC（Fig. 3）の利用である．NAC はムコ多糖のジスルフィド結合を切断し鼻粘液の粘度を低下させ，その結果粘液バリアーが消失又は減弱し，ペプチド性薬物の拡散を促進することができると考えられる．さらに，薬物が鼻粘膜上で粉末や高濃度溶液で存在することと，速やかに薬物が吸収されることにより，ペプチド性薬物が蛋白分解酵素によって分解される確率を小さくすることができると考えられる．

本章ではこのような戦略に基づいて処方設計された，NAC と非吸水性の賦形剤を含んだ新規ペプチド経鼻製剤をラット又はイヌに経鼻投与し，サケカルシトニン（SCT，分子量 3432），ヒト副甲状腺ホルモン 1-34（PTH，分子量 4118）又はヒ

トインスリン（INS，分子量 5750）の吸収が改善するかを検討した．さらに鼻粘膜への刺激性・傷害性の有無を評価することによって，本製剤処方の実用性を検討した．

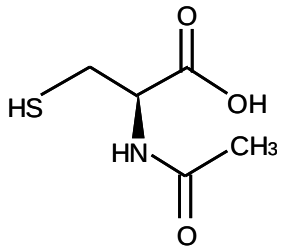

Fig. 3. The chemical structure of N-Acetyl-L-Cystein (NAC)

第 1 節　ラットにおけるサケカルシトニンの吸収評価

SCT の経鼻吸収に及ぼす投与形態（粉末か液体）と粘液溶解剤 NAC の影響を調べるため，4 種の製剤―NAC ありなしの 2 種の粉末製剤と 2 種の液体製剤―を調製して，ラットに投与した．絶対バイオアベイラビリティと相対バイオアベイラビリティを算出するため，同じ量の SCT を静脈内及び皮下投与した．その結果，Formulation-L（SCT 生理食塩水溶液）は 2 時間にわたって 50 ng/ml 以下の血漿中濃度を維持し（Fig. 4），絶対バイオアベイラビリティは 7.4%であった（Table 1）．Formulation-LN は SCT と NAC を含む生理食塩水溶液であるが, バイオアベイラビリティは 15.7%であり，Formulation-L の 2 倍に上昇した．このように NAC は以前報告されているように［39］，吸収促進剤として作用することが確認された．Formulation-P は SCT とエチルセルロースを含む粉末処方であるが，投与 10 分後に明らかな吸収ピークを示し（Fig. 4），バイオアベイラビリティは 11.9%であった（Table 1）．このことから粉末処方は溶液処方より吸収性に優れていることが示された．SCT と NAC とエチルセルロースを含む粉末処方である Formulation-PN は，投与後 5 分で速やかな吸収ピークを示し, バイオアベイラビリティは 30%であり，Formulation-L の約 4 倍であった（Table 1，Fig. 4）．ペプチド性薬物の最も一般的な投与ルートである皮下投与では，投与後 20 分で吸収ピークが出現しバイオアベイラビリティは 47.3%であった．このように Formulation-PN は皮下投与より速く吸収され，皮下投与に近いバイオアベイラビリティを示すことが明らかとなった．

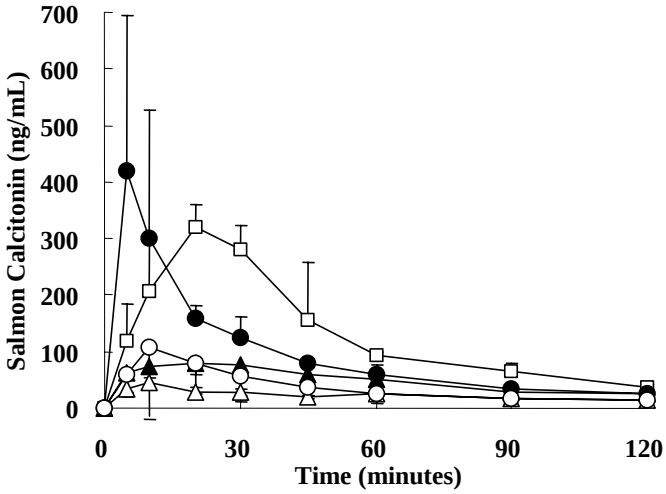

Fig. 4. Comparison of plasma concentration – time profiles following nasal administration of liquid and powder formulations, and subcutaneous administration (□) of 0.1 mg of salmon calcitonin in rats.
△; Formulation-L (liquid formulation with SCT in saline), ▲; Formulation-LN (liquid formulation with SCT and NAC in saline), ○; Formulation-P (powder formulation with SCT and ethylcellulose), ●; Formulation-PN (powder formulation with SCT, NAC and ethylcellulose).
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4-5).

Table 1. Bioavailabilities of salmon calcitonin after nasal administration of liquid and powder formulations, and subcutaneous administration containing 0.1 mg of salmon calcitonin in rats.

Formulation	Enhancers	$AUC_{0\text{-}120}$ (ng/ml·min)	Bioavailability (%)
Formulation-L	None	2796 ± 329	7.4 ± 0.9
Formulation-LN	NAC	5960 ± 1526	15.7 ± 4.0 [a]
Formulation-P	None	4513 ± 3207	11.9 ± 8.4
Formulation-PN	NAC	11376 ± 3247	30.0 ± 8.6 [b, c, d]
S.C. administration		17983 ± 2925	47.3 ± 7.7
I.V. administration		37981 ± 6218	100.0 ± 16.4

Data represent the mean ± SD (n = 4-5).
Statistical analysis was performed using Student's *t* test. [a] $P < 0.05$ versus Formulation-L. [b] $P < 0.01$ versus Formulation-L. [c] $P < 0.01$ versus Formulation-LN. [d] $P < 0.01$ versus Formulation-P.

また，吸収促進剤として一般的に用いられるグリココール酸ナトリウム（SGC）

［40, 41］を 0.15 mg 含む SCT の粉末製剤をラットに投与し，同じ量の NAC を含む粉末製剤と比較したとき, SCG と NAC は同様に速やかな吸収が認められ, Cmax は同等であった（Fig. 5）．しかしながらバイオアベイラビリティに関しては，NAC を含む処方の 30.0% ± 8.6% (n = 5)に対して, SGC を含む処方は 18.0% ± 0.5% (n = 4)であり有意に低くなった.

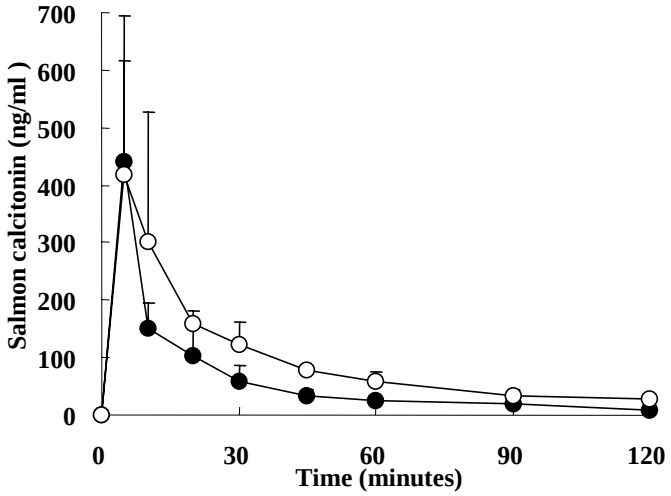

Fig. 5. Comparison of plasma concentration – time profiles of salmon calcitonin following nasal administration of powder formulations containing NAC (○) or sodium glycochorate (●) in rats.
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4-5).

市販のSCT経鼻スプレーであるミアカルシン®をラットに経鼻投与し， NACを含む粉末製剤と比較したとき，ミアカルシン®は 2 時間にわたって低い血漿中濃度推移を維持し, バイオアベイラビリティは 7.7% ± 2.1% (n = 5)であった. 一方, NAC を含む粉末製剤では速やかな吸収が認められ, バイオアベイラビリティは 25.7% ± 9.7% (n = 5)であった（Fig. 6）.

NAC を含む粉末処方であるFormulation-PNは，SCTの高いバイオアベイラビリティを達成し，皮下投与よりも速やかな吸収ピークを与えることが可能であった．加えて，一般的な吸収促進剤SGCや市販のSCT経鼻スプレーミアカルシン®と比較したベンチマーキング試験でも，本粉末処方の優位性が証明された．Formulation-PとFormulation-LNはFormulation-Lよりわずかにバイオアベイラビリティを改善したに過ぎなかったことから，Formulation-PNの吸収改善効果はNACの粘液溶解作用

と粉末処方の相乗効果によるものと考えられた.

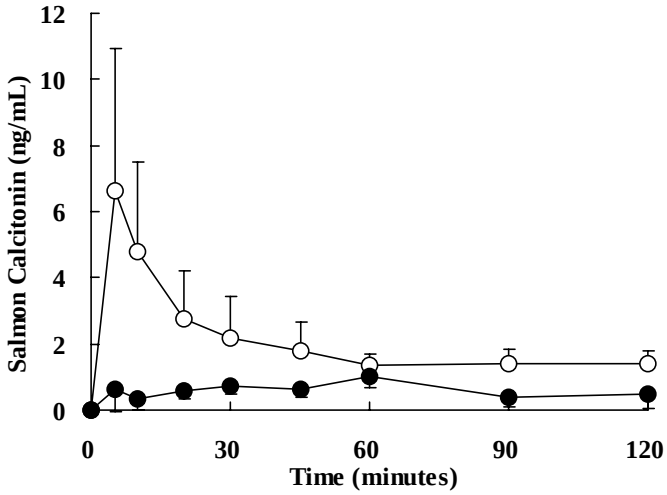

Fig. 6. Comparison of plasma concentration – time profiles of salmon calcitonin following nasal administration of powder formulations containing NAC (○) or Miacalcin (●) in rats.
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 5).

O'Hagan らは溶液処方において，NAC を添加することによってヒト成長ホルモンの経鼻投与時のバイオアベイラビリティをある程度（12%）改善することを報告している［39］．NAC は粘液中のムコ多糖のジスルフィド結合を切断して，小さいサブユニットに分解することによって粘液の粘度を低下させる［42］．また，NAC は Na（＋）チャンネンをダウンレギュレートし，粘膜表面上の液体量をコントロールすることによって粘液の粘度を低下させているという報告もある［46］.

なお，NAC はジスルフィド結合を切断するため，分子内にジスルフィド結合を持つ SCT が NAC によって分解され不活化されることが危惧される．そこで NAC を含む粉末処方と液体処方での SCT の安定性を測定したところ，粉末処方をシリカゲル入りのデシケーターで保存したとき，室温でも 2 週間以上安定であり，液体処方では 4℃で半減期が 7.6 時間，25℃で半減期が 0.47 時間であった．実際の投与にあたっては，粉末処方は投与前日に調製し投与までシリカゲル入りのデシケーター中で保存し，液体処方は投与直前に調製し投与まで氷上で保存したため，NAC によるジスルフィド結合の切断はほぼ無視できると考えられる.

水不溶性の粉末製剤は液体製剤より優れた経鼻吸収を達成することができるこ

とが報告されているが［44］，本検討においても粉末製剤のほうが，液体製剤よりも高いバイオアベイラビリティが得られた（Table 1）．粉末製剤は溶液製剤よりも吸収部位近傍に留まりやすく，粘液繊毛クリアランスによる排除を遅らせるため，吸収改善効果が認められると考察されている［44,45］．しかしながら，本粉末製剤は速やかな吸収を示すことから（Fig. 4），吸収部位へ滞留することによる寄与は小さいと考えられ，むしろ，粉末製剤が吸収部位近傍で薬物の局所高濃度を形成し，高濃度グラジエントにより薬物吸収を促進する効果の方が大きいと思われる．また，NAC も速やかに溶解するため，吸収部位近傍の粘液バリアーを低減又は消失させて，薬物が粘膜上皮細胞表面に接近することを可能としていると考えられる．このように，薬物高濃度グラジエントと NAC の粘液溶解作用の相乗効果によって，薬物の吸収が促進されたと考えられる．このメカニズムが正しいならば，粘膜付着性粉末等を添加することは，粘膜付着性粉末が鼻粘膜の液体を吸収して，薬物や NAC の速やかな溶解を妨げる恐れがあるため，かえってバイオアベイラビリティの低下を招く可能性がある．

より優れた粉末経鼻製剤を開発するためには，鼻腔での水不溶性粉末の役割を深く理解して，製剤を最適化することが重要であると考えられる．

第 2 節　イヌにおけるサケカルシトニンの吸収評価

ビーグル犬の鼻腔容積はヒトに近いことから，ヒトへ実際に投与する量の粉末を投与することができ，さらに，ヒト投与用の粉末デバイスを用いて評価することができるため，NAC を含む粉末経鼻処方をイヌに投与してバイオアベイラビリティを評価した．Formulation-L と Formulation-PN を 0.3 mg SCT／head の投与量でイヌに経鼻投与し，比較のために SCT 溶液を皮下投与した．その結果，Formulation-L は 2 時間にわたり低い血漿中濃度を維持し（Fig. 7），絶対バイオアベイラビリティは 8.7%であった（Table 2）．このことから，溶液製剤での SCT の経鼻吸収はイヌ，ラット両方で低いことが確認された．一方，Formulation-PN は速やかな血漿中濃度のピークを示し（20 分），バイオアベイラビリティは Formulation-L の 2.9 倍の 24.9%であった．なお皮下投与時は 45 分で血漿中濃度のピークを示し，バイオアベイラビリティは 50.9%であった．このようにイヌにおいても，NAC を含む粉末製剤では皮下投与より速やかに吸収され，皮下投与の約半分もの高いバイオアベイラビリティが得られることが確認された．

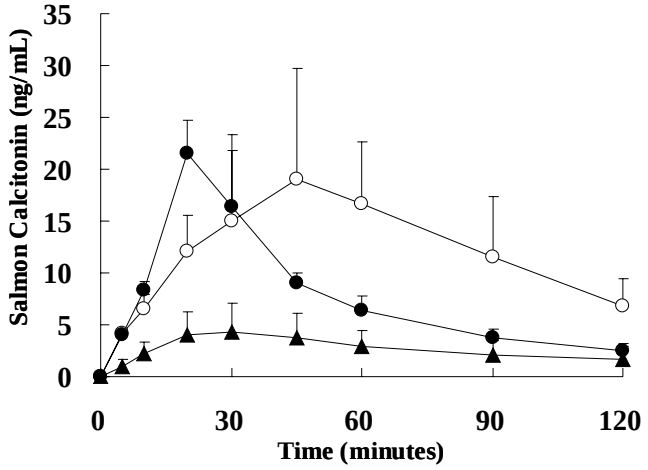

Fig. 7. Comparison of plasma concentration – time profiles following nasal administration of liquid and powder formulations, and subcutaneous administration (○) of 0.3 mg of salmon calcitonin in dogs.
▲; Formulation-L, ●; Formulation-PN.
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4).

Table 2. Bioavailabilities of salmon calcitonin after nasal administration of liquid and powder formulations, and subcutaneous administration containing 0.3 mg of salmon calcitonin in dogs.

Formulation	Enhancers	$AUC_{0\text{-}120}$ (ng/ml·min)	Bioavailability (%)
Formulation-L	None	326 ± 187	8.7 ± 5.0
Formulation-PN	NAC	931 ± 132	24.9 ± 3.5 [a]
S.C. administration		1908 ± 576	50.9 ± 15.4
I.V. administration		3747 ± 645	100.0 ± 17.2

Data represent the mean ± SD (n = 4).
Statistical analysis was performed using Student's *t* test. [a] $P < 0.01$ versus Formulation-L.

動物試験からヒトへの直接の外挿は困難ではあるが［46］，絶対バイオアベイラビリティ及び相対バイオアベイラビリティはラットとイヌで類似しており，溶液製剤に対するバイオアベイラビリティの改善率もイヌとラットで類似していたことから，本製剤によるペプチド性薬物の吸収改善効果には種差が小さく，ヒトにおいても同様の効果が得られることが示唆された.

第 3 節　ヒト副甲状腺ホルモン（1-34）とヒトインスリンの吸収評価

NACを含む粉末製剤が他のペプチド性薬物へも適用可能かを調べるために，2種のモデルペプチドPTHとINSの経鼻吸収性を評価した．両薬物の粉末製剤はSCT処方と同じ, エチルセルロースを賦形剤, NACを粘液溶解剤とする方法で調製し，ラットに経鼻投与した．PTHとINSの液体製剤は，両薬物を生理食塩水に溶解することにより調製し，比較のためにラットに経鼻投与した．なお，絶対バイオアベイラビリティを求めるため，同じ投与量の溶液を静脈内投与した．PTHの血漿中濃度推移をFig. 8 に，INSの血漿中濃度推移をFig. 9 に示し，AUC_{0-120}と絶対バイオアベイラビリティをTable 3 に示した．Fig. 8, 9 に示したように，両粉末製剤共に速やかな吸収が見られ，SCTと同様に投与後 30 分以内に明確な吸収ピークが認められた．絶対バイオアベイラビリティはPTHで 28.2%，INSで 23.4%と算出され，どちらもSCTと非常に近い値であった．一方，両薬物の溶液処方は低い血漿中濃度を維持し，明確な血漿中濃度のピークが認められなかった．バイオアベイラビリティはPTHで 8.5%，INSで 10.5%であり，溶液処方についてもSCTと同様の吸収プロファイルとバイオアベイラビリティであった．

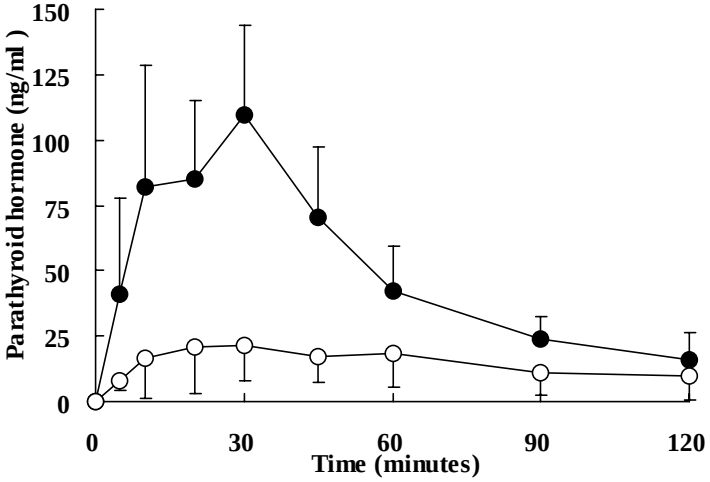

Fig. 8. Comparison of plasma concentration – time profiles in rats following nasal administration of liquid or powder formulations containing 0.1 mg of human parathyroid hormone (1–34).
○ Liquid formulation; ● Powder formulation containing N-acetyl-L-cysteine.
Data represent mean plasma concentrations ± SD (n = 7).

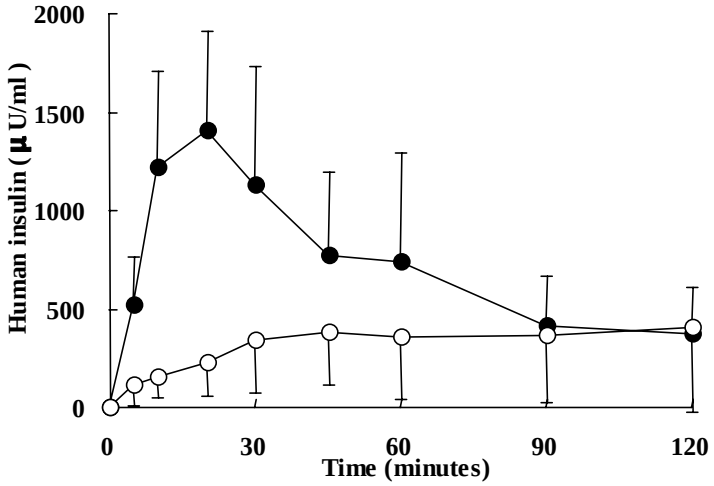

Fig. 9. Comparison of plasma concentration – time profiles in rats following nasal administration of liquid or powder formulations containing 0.1 mg of human insulin.
○ Liquid formulation; ● Powder formulation containing N-acetyl-L-cysteine.
Data represent mean plasma concentrations ± SD (n = 7).

Table 3. Bioavailabilities of human parathyroid hormone (1–34) (PTH) or human insulin (INS) in rats after nasal administration of liquid and powder formulations containing 0.1 mg of either drug.

Peptide	Formulation	Enhancer	$AUC_{0\text{-}120}$ (ng/ml·min or μU/ml·min)	Bioavailability (%)
PTH	Liquid	None	1803 ± 953	8.5 ± 4.5
	Powder	NAC	6001 ± 1394	28.2 ± 6.5 [a]
	I.V. administration		21289 ± 2874	100.0 ± 13.5
INS	Liquid	None	39083 ± 33309	10.5 ± 8.9
	Powder	NAC	87198 ± 39510	23.4 ± 10.6 [a]
	I.V. administration		340670 ± 56517	100.0 ± 16.6

Data represent means ± SD (n = 7).
Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. [a] $P < 0.01$ versus liquid formulation.

このように PTH （MW 4118）と INS（MW 5750）についても，NAC を含む粉末製剤によって経鼻投与したとき，SCT（MW 3432）と同等の良好なバイオアベイラビリティが得られた．本粉末製剤によって SCT を投与したとき，ラットとイヌのバイオアベイラビリティは類似しており，ヒトにおいても同等のバイオアベ

イラビリティが得られることが示唆された．それゆえ PTH と INS についても，臨床的に十分なバイオアベイラビリティが得られることが期待できる．しかしながら，SCT と INS は分子内にジスルフィド結合を持っているため，NAC を含む粉末製剤によって鼻腔内に投与した時, 吸収される過程で NAC によってジスルフィド結合が切断され，ELISA で検出したものはインタクトなペプチドではなく薬効を示さない可能性がある．そこでラットに NAC を含む粉末製剤によって SCT を経鼻投与した後に，SCT の薬効であるカルシウムの低下作用を調べたところ，定性的ではあるが Fig. 10 に示したように SCT と NAC を含む粉末製剤は血中カルシウム濃度を低下させたことから，ELISA で検出された SCT は薬効を保持したものであることが示唆された．

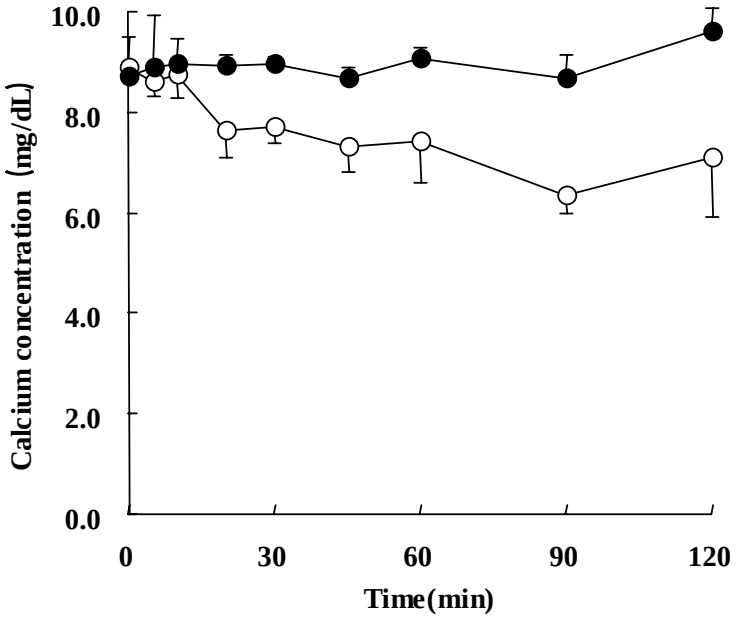

Fig. 10. Plasma concentration of calcium in rats following nasal administration of powder formulation containing SCT and NAC (○) or saline (●).
Data represent mean plasma concentrations ± SD (n = 3).

これら 3 種のペプチドの間で，小さいながらもバイオアベイラビリティの分子量依存性が見られ，その関係には直線性が認められた．これは薬物の分子量が大きくなるほど膜透過性が低下するという，よく知られた事実を反映しているものと考えられる．以上の結果より，本粉末経鼻製剤は種々のペプチド性薬物の経鼻投与に，広く適用可能であることが示唆された．

第 4 節　粘膜刺激性の評価

NAC はムコ多糖のジスルフィド結合を開裂させ，速やかに粘液層を液状化させるため［34］，粘液バリアーが低減し，薬物吸収が促進されると考えられる．このような吸収促進メカニズムのため，鼻粘膜への刺激性や傷害性が少ないことが期待され，実際に長年の臨床使用経験により，NAC の粘膜投与時の安全性は十分に確立されている［35］．またエチルセルロースは不活性な粉末であり，医薬品添加剤として長年使用されていることから，NAC を含む粉末製剤の経鼻投与時の安全性に問題はないと考えられる．このことを確かめるためウサギを用いた 2 種の粘膜刺激性試験を実施した．1 つは 8 日間連続投与時の鼻粘膜の病理試験であり，もう 1 つは眼粘膜への一次刺激性試験である．

NAC を 0.15 mg 又は 0.25 mg 含む粉末をそれぞれ 3 匹のウサギに連続 8 日間経鼻投与した．病理試験の結果を Table 4 にまとめ，代表的な鼻腔の切断面を Fig. 11 に示したが，鼻道，軟口蓋，咽喉頭，気管及び肺共に病理学的，解剖学的な異常は認められず，鼻粘膜に関しては粉末を投与していない左側の鼻腔と比べて変化は見られなかった．眼粘膜への一次刺激性試験についても刺激，膨張，赤化，涙液分泌は全く認められなかった．これらの結果から，NAC を含む粉末製剤は粘膜に全く刺激性がないか，あっても無視できる程度であることが示唆された．

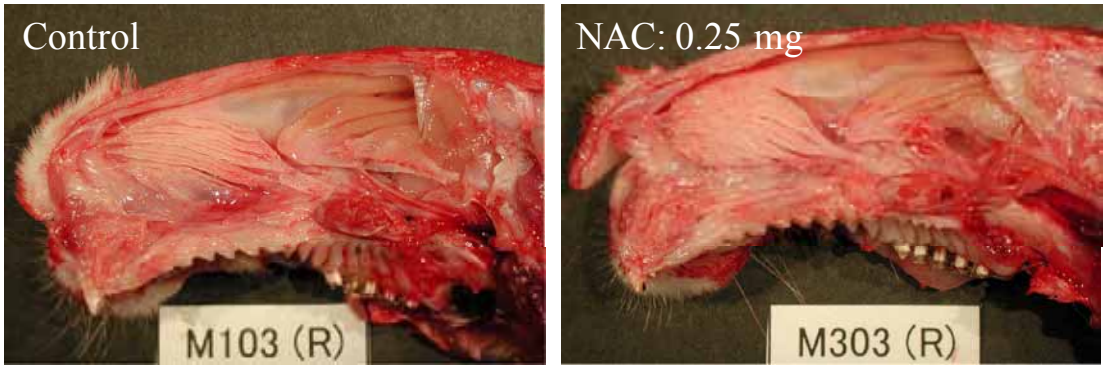

Fig.11. Cross-sectional photographs of nasal cavity in rabbits after the administration of SCT powdery formulation.
Upper; the nasal formulation without NAC was administered for 8 days (control).
Lower; the nasal formulation containing 0.25 mg of NAC was administered for 8 days.

Table 4. Pathological abnormality in nasal cavity and related tissues or organs after multiple nasal administrations of powdery formulation with NAC to rabbits for eight consecutive days

NAC	0.15 mg			0.25 mg		
	M101	M102	M103	M201	M202	M203
Neatus (left: part of administration)						
Nasoturbinate, ventral	N	N	N	N	N	N
Nasoturbinate, dorsal	N	N	N	N	N	N
Nasoturbinate, medial	N	N	N	N	N	N
Nasoturbinate, internal	N	N	N	N	N	N
Meatus, ventral	N	N	N	N	N	N
Nasoseptum	N	N	N	N	N	N
Neatus (right: no treatment)						
Nasoturbinate, ventral	N	N	N	N	N	N
Nasoturbinate, dorsal	N	N	N	N	N	N
Nasoturbinate, medial	N	N	N	N	N	N
Nasoturbinate, internal	N	N	N	N	N	N
Meatus, ventral	N	N	N	N	N	N
Nasoseptum	N	N	N	N	N	N
Soft palate	N	N	N	N	N	N
Laryngopharynx	N	N	N	N	N	N
Trachea	N	N	N	N	N	N
Lung	N	N	N	N	N	N

N : Negative,

第 5 節　小括

本章の結果をまとめると, NAC を含む粉末経鼻製剤はラット及びイヌにおいて, 皮下投与と同等のレベルまで SCT の吸収を改善した．この吸収改善効果は NAC の粘液溶解作用と粉末処方による局所高濃度の相乗効果によるものと思われた．バイオアベイラビリティはラットとイヌで類似していたことから，本製剤によるペプチド性薬物の吸収改善効果は種差が小さく，ヒトにおいても同様の効果が得られることが示唆された．

また，PTH（分子量 4118）と INS（分子量 5750）についても，NAC を含む粉末製剤を用いて経鼻投与したとき，SCT（分子量 3432）と同等の良好なバイオアベイラビリティが得られたことから，本粉末経鼻製剤は種々の中鎖ペプチド性薬物の経鼻投与に，広く適用可能であることが示唆された．

さらにウサギを用いた鼻粘膜及び眼粘膜への刺激性試験の結果，本粉末経鼻製剤の粘膜への傷害性や刺激性は全く無いか，あっても無視できる程度であることが示唆された．

以上の結果から，本製剤処方はペプチド性薬物の経鼻投与に広く適用できると考えられた．

第II章　粘液溶解剤NACを用いた粉末製剤によるペプチド性薬物の経鼻吸収における粉末特性の影響

前章においてNACを含む粉末製剤によって，ペプチド性薬物の経鼻吸収が大幅に改善されることが示された．この改善効果は，第一に粉末製剤として薬物を鼻腔に投与したことに起因すると思われる．鼻腔内の限られた水分で薬物が溶解するため，局所的な高濃度が形成され，この高い濃度グラジエントにより，分子量が比較的高いペプチド性薬物でも鼻粘膜を透過することが可能であったと考えられる．また，非吸水性の粉末を賦形剤として使用したことによって，鼻腔内の水分を粉末がトラップせず，薬物が溶解するための水分が確保でき，速やかに薬物が溶解し，結果的に迅速な薬物吸収が達成されたと考えられる．速やかな薬物吸収により，粘液繊毛クリアランスで鼻腔から排除されることを回避できると考えられる．さらに吸収促進剤として粘液溶解剤NACを利用することにより，ムコ多糖のジスルフィド結合を切断し，鼻粘液の粘度を低下させ，その結果粘液バリアーが消失又は減弱し，ペプチド性薬物の拡散が促進されたと考えられる．すなわち,薬物の高い濃度グラジエントと,NACの粘液溶解作用の組み合わせによって,高いバイオアベイラビリティが達成されたと考えられる（Fig. 12）.

これまでに炭酸カルシウム［44,45］，結晶セルロース［47,48］，ヒドロキシプロピルセルロース［48］，カーボポール［49］，乳糖［50］，β－シクロデキストリン［51,52］等を粉末経鼻投与製剤の賦形剤として用いたとき，ペプチド性薬物の鼻粘膜からの吸収が増大すると報告されている．吸収が増大するメカニズムとしては，粉末は溶液と比べてペプチド性薬物の安定性に有利に働くことや，鼻粘膜上での滞留時間が延長することによると考察されている［44,45,53］.

本検討に用いたNACを含む粉末製剤は速やかな薬物吸収を示すため，鼻粘膜上での滞留時間が延長し，吸収が増大したとは考えにくい．上記で考察したように，速やかな薬物の溶解による高濃度グラジエントの形成等が主な要因であると考えられる．いずれにしても，吸収改善効果を最大化するためには，粉末賦形剤の選択は重要であると思われる．本章では種々の賦形剤を用いた粉末製剤の経鼻吸収性を調べることによって，メカニズムの検証を行うとともに，製剤処方の最適化

を行った.

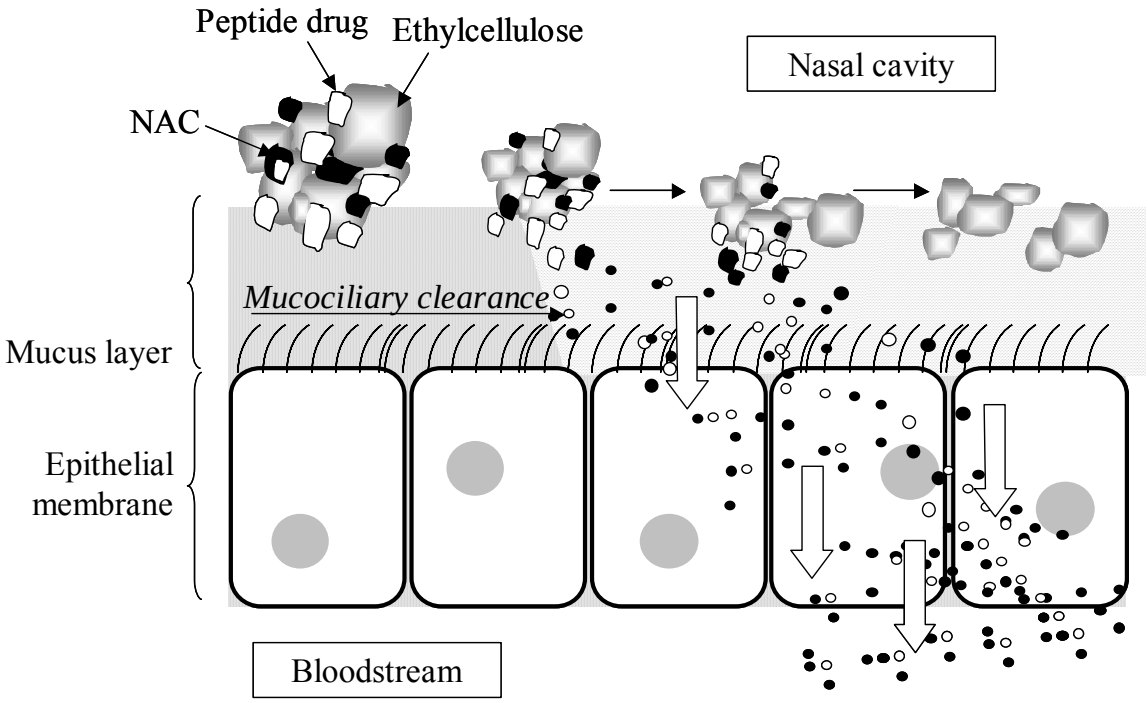

Fig. 12. Possible mechanism for the improved nasal bioavailability of peptide drug delivered in a powder formulation with ethylcellulose and N-acetyl-L-cysteine.

第 1 節　粉末賦形剤の吸水性の影響

粉末経鼻製剤の賦形剤として非吸水性の粉末が，薬物吸収を改善する上で有利に働くことを確かめるために，エチルセルロースと乳糖の 2 種の粉末をモデル賦形剤としてラットでのSCTの経鼻吸収を比較した. これらの粉末は完全に異なる物理的性質を有しており，乳糖は非常に水に溶けやすいが，エチルセルロースは水に溶解しない上に，疎水性で水を吸収しない性質を有している．本比較試験ではNAC以外に，ペプチド性薬物の吸収促進剤として汎用されているグリココール酸ナトリウム（SGC）を用いた．血漿中濃度推移をFig. 13AとFig. 13Bで比較したが，いずれもエチルセルロースを含む処方の方が，乳糖を含む処方より速やかな吸収とピーク時の高い血漿中濃度が認められた. $AUC_{0–120}$とバイオアベイラビリティはTable 5 にまとめたが，NACを含むエチルセルロース処方は，NACを含む乳糖処方の 2.9 倍のバイオアベイラビリティを示し，SGCを含むエチルセルロース処方も，

SGCを含む乳糖処方の 1.4 倍のバイオアベイラビリティを示した．この結果より，吸収促進剤の種類に関わらず，水溶性の粉末より水不溶性の粉末を賦形剤として用いた方が，経鼻投与時のバイオアベイラビリティを改善する効果が高いことが示された．

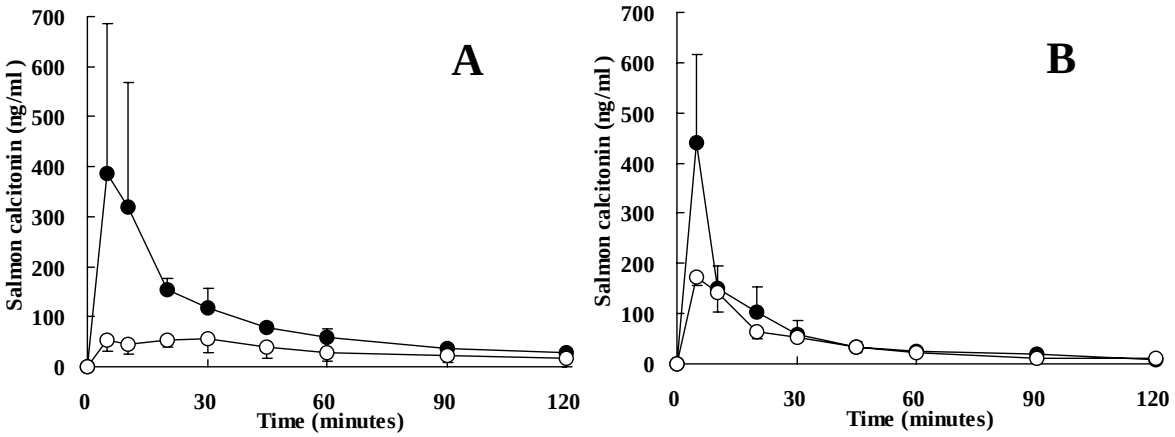

Fig. 13. Comparison of plasma concentration – time profiles following nasal administration of powder formulations containing ethylcellulose (●) or lactose (○) filler, 0.1 mg of salmon calcitonin, and absorption enhancer (N-acetyl-L-cysteine, NAC; or sodium glycocholate, SGC) in rats.
Panel A, NAC; panel B, SGC.
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4 or 5).

Table 5. Bioavailabilities of salmon calcitonin in rats after nasal administration of powder formulations containing ethylcellulose or lactose.

Filler	Enhancer	$AUC_{0\text{-}120}$ (ng ml^{-1} min^{-1})	Bioavailability (%)
Ethylcellulose	NAC	11376 ± 3247	30.0 ± 8.6 [a]
Lactose	NAC	3984 ± 1810	10.5 ± 4.8
Ethylcellulose	SGC	6832 ± 196	18.0 ± 0.5 [b]
Lactose	SGC	4749 ± 586	12.5 ± 1.5

Data represent means ± SD (n = 4 or 5).
Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. [a] $P < 0.01$ versus formulation with lactose and N-acetyl-L-cysteine. [b] $P < 0.05$ versus formulation with lactose and glycocholate.

次に，種々の水不溶性の粉末賦形剤のペプチド経鼻吸収に及ぼす影響を調べるために，6 種類の賦形剤，硬化ヒマシ油（HCO），炭酸カルシウム（$CaCO_3$），タル

ク，結晶セルロース，マイクロセラック，エチルセルロースを用い，SCTとNACを含む粉末製剤をラットに経鼻投与した．これらの賦形剤の水への親和性はそれぞれ異なっており，その指標としてTakedaらの方法［54］に従い測定した吸水速度を用い，それらの値をTable 6 にまとめた．これら 6 種の賦形剤を用いた粉末製剤を投与したときのSCT血漿中濃度推移をFig. 14 に示し，AUC_{0-120}と絶対バイオアベイラビリティをTable 6 にまとめた．予想どおり粉末賦形剤の種類によってSCTの吸収は大きく異なり，エチルセルロースが最も高いバイオアベイラビリティを示した．吸水速度の小さい賦形剤であるエチルセルロース，HCO，タルク及び$CaCO_3$は 20～30%の高いバイオアベイラビリティを示し，吸水速度の大きい 2 種の賦形剤，結晶セルロースとマイクロセラックのバイオアベイラビリティはそれぞれ 15.3%と 7.5%とかなり低かった．Table 6 に示したSCTのバイオアベイラビリティをそれぞれの粉末賦形剤の吸水速度に対してプロットしたところ，Fig. 15 に示したように，かなり良好な直線関係が得られた．この傾向は粉末賦形剤の水への親和性及び吸水性が，バイオアベイラビリティに影響を与える主要な要因であることを示しており，本粉末経鼻製剤による吸収改善の推定メカニズムを支持する結果が得られた．

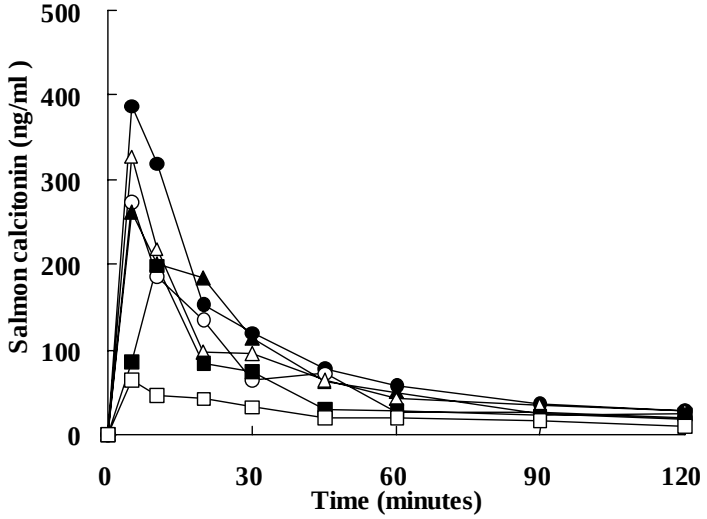

Fig. 14. Comparison of plasma concentration － time profiles in rats following nasal administration of powdery formulations with various water-insoluble fillers: ethylcellulose (●), hydrogenated castor oil (○), talc (▲), calcium carbonate (△), crystalline cellulose (■), or Microcelac (□). Each formulation contained 0.1 mg of salmon calcitonin and 1.5 mg of N-acetyl-L-cysteine.
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4 or 5).

Table 6. Bioavailabilities of salmon calcitonin in rats after nasal administration of powder formulations containing various fillers and N-acetyl-L-cysteine.

Filler	Water absorption speed (mm/min)	Water absorbability	$AUC_{0\text{-}120}$ (ng ml^{-1} min^{-1})	Bioavailability (%)
Ethylcellulose	0.0	non	11288 ± 3621	29.7 ± 9.5 [a,c]
Hydrogenated castor oil	0.0	non	8227 ± 4298	21.7 ± 9.2 [b]
Talc	0.2	poor	8841 ± 1508	23.3 ± 4.0 [a]
Calcium carbonate	4.7	poor	8712 ± 3167	22.9 ± 8.3 [b]
Crystalline cellulose	38.0	medium	5802 ± 3301	15.3 ± 8.7
Microcelac	70.0	high	2856 ± 832	7.5 ± 2.2

Data represent means ± SD (n = 4 or 5).
Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. [a] $P < 0.01$ versus Microcelac. [b] $P < 0.05$ versus Microcelac. [c] $P < 0.05$ versus crystalline cellulose.

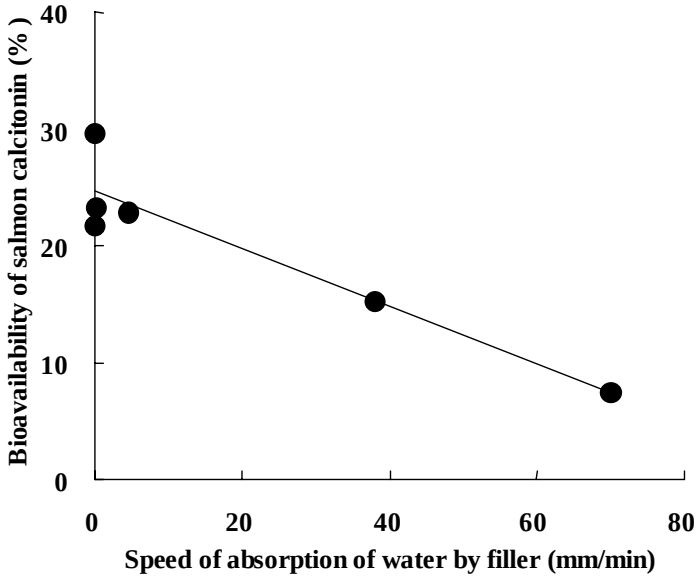

Fig. 15. Influence of water absorbability of filler in the powder formulation on nasal bioavailability of salmon calcitonin.
Data represent mean bioavailabilities of salmon calcitonin (n = 4 or 5).

第I章で検討した結果より，NACを含む粉末製剤はNACを含む液体製剤より，ペプチド性薬物の経鼻吸収性が高かった．本検討では賦形剤として用いる粉末の種類が，経鼻投与時のバイオアベイラビリティに大きく影響することを明らかにし

た．この知見は以前に報告されたことと本質的に一致する．実際，Ishikawaらは$CaCO_3$を含む粉末製剤では，鼻腔内での薬物滞留時間が延長することによって，バイオアベイラビリティが改善すると述べている［44,45］．また，Sakagamiらは粉末製剤中のポリマーの粘膜付着性が増大するほど，バイオアベイラビリティは増大すると述べている［55］．吸収部位近傍での薬物滞留時間の延長が，バイオアベイラビリティ改善のための重要な因子かもしれないが［56,57］，NACとエチルセルロースを含む粉末製剤では，薬物血漿中濃度の増加は吸収のごく初期段階で見られ，薬物の滞留時間の延長により吸収が増大した訳ではない．このことは，エチルセルロースが粘膜付着性をほとんど有していないことと，鼻粘膜上での粘液繊毛クリアランスにより，速やかに吸収部位から薬物が排除される［58］という事実からも支持される．

NAC とエチルセルロースを含む粉末製剤による吸収改善効果の最もふさわしい推定メカニズムは，吸収近傍でのペプチド性薬物濃度の増大である．粉末製剤の調製において，薬物と NAC 粒子はエチルセルロース粒子の表面に付着している．鼻腔へ投与後，この粒子は粘液層上に分散し，粘液繊毛クリアランスにより咽喉頭へ移動する．このプロセスの中で，NAC 粒子は粘液中の水分によって速やかに溶解し，粘液中のムコ蛋白のジスルフィド結合を切断し［45］，効果的に粘液を液状化し粘液バリアーを低減又は消失させる．薬物粒子もまた速やかに溶解し，局所的な高濃度グラジエントを形成し，それが粘膜上皮細胞を透過するための強力な駆動力となっている．このように局所高濃度による駆動力の増大と，粘液バリアーの減少が相乗効果的に働くことにより，粘膜上皮細胞の薬物透過性が増大すると考えられる．さらに，薬物が高濃度で存在することにより，蛋白分解酵素の作用が飽和して，酵素による分解を受ける確率が減少している可能性もある．以上の推定メカニズムによって，NAC を含む粉末製剤によるペプチド性薬物の劇的な吸収促進を説明することは可能である．

上記の推定メカニズムに従えば，粉末製剤の主な組成である賦形剤の物理化学的性質は非常に重要である．親水性で吸水性の高い賦形剤を用いると，鼻腔内の水分を速やかに吸収し，薬物や NAC の溶解を妨げるかもしれないし，もし薬物が溶解したとしても，賦形剤が薬物溶液を吸い込んでしまう恐れがある．それに対

して, 親水性が低く非吸水性の賦形剤を用いると, 鼻腔内の水分は全て薬物と NAC の溶解に使うことができる.

さらなるエビデンスが必要ではあるが，これまでに得られたデータはすべて, 上記メカニズムを支持している.

第 2 節　NAC 量の影響

SCT の経鼻吸収に及ぼす NAC 量の影響を調べるために, NAC 量を 0 mg, 0.05 mg, 0.10 mg，0.15 mg 又は 0.25 mg に変動させた 5 種の SCT（1.0 mg/dose）を含む粉末処方を調製し，ラットに経鼻投与した．その結果，NAC 量を増やすほどバイオアベイラビリティは上昇したが，NAC 量が 1.5mg 以上ではバイオアベイラビリティは約 35%で飽和に達した（Fig. 16）.

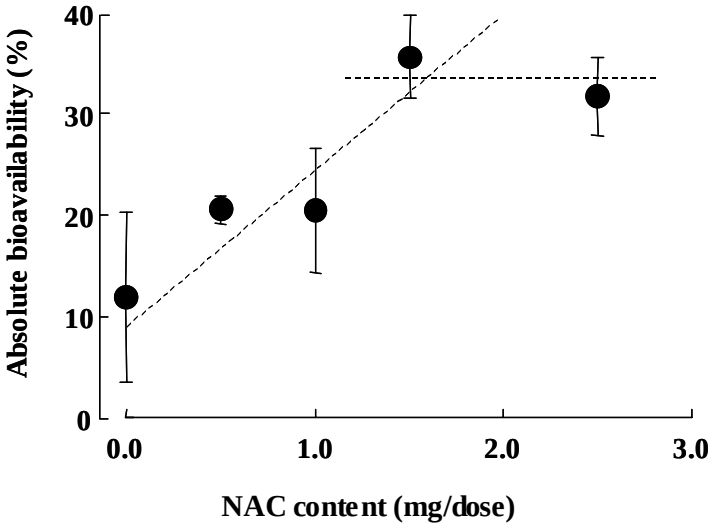

Fig. 16. Influence of NAC amount in the powder formulation on nasal bioavailability of salmon calcitonin.
Data represent the mean absolute bioavailabilities of salmon calcitonin ± SD (n = 4).

第 3 節　粒子サイズの影響

SCT の経鼻吸収に及ぼす粉末賦形剤の粒子径の影響を調べた. 平均粒子径 76 μm のエチルセルロースを，45 μm 以下，75–106 μm 及び 150–250 μm の 3 つの異なる粒子サイズに篩い分けした．これらの分子サイズの粒子を賦形剤として用い，SCT を含む 3 種の処方，Formulation-S, Formulation-M 及び Formulation-L を調製し，ラットに経鼻投与した．Table 7 にバイオアベイラビリティと各処方の平均粒子径をまとめたが，化学組成は同一であるにも係らず，粒子径が小さい粉末賦形剤を用いた処方の方が，より高いバイオアベイラビリティが得られることが明らかになった．なお，Formulation M の平均粒子径は篩い分けしていないエチルセルロースの平均粒子径とほぼ等しく，両者のバイオアベイラビリティも近い値であった（30.0%及び 28.6%）.

Table 7. Bioavailabilities of salmon calcitonin after nasal administration of powder formulations containing ethylcellulose of different particle sizes.

Formulation	Particle size range (μm)	Average particle size (μm)	Bioavailability (%)*
Formulation-S	< 45	34.2	35.1 ± 7.5
Formulation-M	75-106	80.6	28.6 ± 9.5
Formulation-L	150-250	172.4	22.0 ± 6.1

*Data represent means ± SD (n = 4 or 5).

最も小さい粒子サイズのエチルセルロースを用いた粉末製剤が，最も高いバイオアベイラビリティを示したことは理にかなっているように思われる．というのは，粒子サイズが小さい程，粉末粒子の比表面積が増大し，薬物がより溶解しやすくなるからである．さらに，粉末の飛散性の影響も無視できないと思われる．なぜなら，鼻腔内に投与するとき同じ空気圧で噴射すると，大きい粉末粒子より小さい粉末粒子ほど鼻腔内で広範に飛散することができ，結果としてより効率的に吸収部位に分散することができると考えられるからである.

現在得られているデータだけでは，粒子サイズの影響を正確に見積もることは

難しいが，粒子サイズの影響が粉末経鼻製剤を設計する上で，重要な要因の 1 つであることは間違いないと思われる．

第 4 節　小括

本章の結果をまとめると，NAC を含む粉末経鼻製剤において，粉末の物理化学的及び粉体工学的性質が，ペプチド性薬物の経鼻吸収に大きく影響していることが示された．種々の水不溶性粉末の中で，エチルセルロースのような親水性が低く非吸水性の粉末が，ペプチド性薬物のバイオアベイラビリティを大幅に改善し，実用的な粉末経鼻製剤に用いる賦形剤の最適な候補であることを見出した．NAC を含む粉末製剤によって示された吸収改善効果は，薬物の局所高濃度による膜透過駆動力の増大と，NAC による粘液バリアーの減少が相乗効果的に働くことによるという，推定メカニズムによって説明することができる．

また，上記の賦形剤の選択以外にも，NAC 量や粉末の粒子サイズ等の因子が，粉末製剤の処方を最適化する上で重要であることが示された．

第 III 章　粘液溶解剤 NAC と非イオン性界面活性剤 Laureth-25 を用いた液体製剤によるペプチド性薬物の経鼻吸収の改善

前章までに，NAC を用いた粉末製剤が，ペプチド性薬物の経鼻吸収を大幅に改善し，しかも，鼻粘膜への刺激性や傷害性がほとんどないことが示され，本粉末製剤がペプチド性薬物の経鼻投与に広く適用可能であることが示唆された．しかしながら，粉末製剤を鼻腔に投与したとき，一部の粉末粒子が咽頭を経由して肺に達し［38］，気管支炎の患者等では発作を起こす危険性がある．そのため，粉末製剤と同様の有効性・安全性を示す液体製剤が望まれるところである．

これまでの検討で，溶液製剤では NAC の吸収改善効果は，粉末製剤で見られるほど強力でなく，かなり限られたものであることが示された．そのため，NAC 以外にもう 1 成分の吸収促進剤を加えて, 2 成分の相乗効果によって液体製剤におけるペプチド性薬物の吸収を改善することを企図した．著者らの研究グループでは，消化管において NAC と非イオン性界面活性剤である TX-100 を共に作用させたとき，ペプチド性薬物の吸収が大幅に改善されることを見出した［32,33］．このように NAC と TX-100 の組み合わせによって吸収が増大するのは, TX-100 単独では粘液バリアーによって粘膜表面にほとんど到達できず，十分な吸収促進効果を示すことが出来ないが，NAC が共存することによって，粘液層が液状化して粘液バリアーが消失するため，TX-100 が粘膜表面に効率的に到達することが可能となる．そのため自身の界面活性作用により粘膜の脂質二重膜を流動化させ，ペプチド性薬物の膜透過性を高めていると考えられる．このコンセプトを消化管粘膜でなく鼻粘膜に適用するに当たり，TX-100 では粘膜刺激性が強すぎて，消化管より敏感な鼻粘膜には不適当であると考えられたので，TX-100 よりマイルドな種々の界面活性剤を，NAC 共存下での薬物吸収の促進効果を指標としてスクリーニングしたところ，非常にマイルドな非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレン（25）ラウリルエーテル（Laureth-25, Fig. 17）が優れた吸収促進効果を示すことを見出した．

本章では NAC と Laureth-25 の組み合わせによる，ペプチド性薬物の経鼻吸収改善効果を検証すると共に，処方の最適化による製剤設計を行った．さらに，鼻粘

膜への刺激性を検討することによって，本液体製剤の実用性について評価した．

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{10}\text{-}O\text{-}(CH_2CH_2O)_{25}\text{-}H$$

Fig. 17. The chemical structure of polyoxyethylene (C25) lauryl ether (Laureth-25)

第 1 節　ラットにおける FD-4 の吸収評価

NACとLaureth-25 の組み合わせによる，経鼻吸収改善効果を検証するために，モデル薬物としてFITCデキストラン（FD-4）を含む 4 種の液体製剤を調製して，ラットに経鼻投与した．また，絶対バイオアベイラビリティを算出するため，同じ量のFD-4 を静脈内投与した．FD-4 の血漿中濃度推移をFig. 18 に示し，AUC_{0-120}と絶対バイオアベイラビリティをTable 8 に示した．Formulation-C（FD-4 の生理食塩水溶液）は 2 時間にわたって約 1 μg/mlの低い血漿中濃度が持続し，バイオアベイラビリティは 8.2%であった. Formulation-NはFD-4 とNACを含む生理食塩水溶液であるが，Formulation-Cと類似した血漿中濃度推移を示したものの，バイオアベイラビリティはわずかに上昇し 11.5%であった．このことからNAC単独ではFD-4 の吸収をほとんど改善しないことが示された．Formulation-LはFD-4 とLaureth-25 を含む生理食塩水溶液であるが，バイオアベイラビリティは約 2 倍（15.8%）に上昇したことから, Laureth-25 等の非イオン性界面活性剤は経鼻吸収を促進することが示された．しかしながら，この吸収促進効果には明らかなラグタイムが認められ（Fig. 18），粘液バリアーによりLaureth-25 の粘膜表面への接近が妨げられ，粘膜上皮細胞の構造変化による吸収促進効果の発現に遅れが生じたことが示唆された. NACとLaureth-25 の両方を含むFormulation-LNを投与したとき, FD-4 は速やかに吸収され高い血漿中濃度の持続が認められた. バイオアベイラビリティは 40.0%であり，Formulation-Cの 4.9 倍まで上昇した．NAC単独やLaureth-25 単独では顕著な吸収改善を示さなかったことを考慮すると，この吸収改善効果はNACの粘液溶解作用とLaureth-25 の界面活性作用が相乗効果的に働いた結果であると考えられる. すなわちNACにより粘液バリアーが消失し, Laureth-25 が容易に粘膜上皮細胞表面に接近できたためと考えられる.

NACの作用メカニズムは粘液成分であるムコ多糖のジスルフィド結合を切断することによって，粘液を流動化する［45］ことに基づいていると考えられるが，最近，NACがNa^+チャンネンをダウンレギュレートすることによって，粘膜表面の液体量を調節し，結果的に粘液の粘度を低下させるという報告がある［43］．なお，NACの作用により分子が粘膜上皮細胞表面に接近しやすくなることは，嚢胞性線維症の遺伝子治療において，NAC処理の後に遺伝子導入ベクターを作用させると，遺伝子発現量が大幅に上昇するという実験的結果［59］からも傍証されている．

なお，Formulation-LN において FD-4 血漿中濃度が 2 時間にわたって，高い値で維持されていることに注意する必要がある．これは血漿中 FD-4 濃度を測定した蛍光光度計の感度が，エンザイムイムノアッセイのように高くないため，かなり高濃度の FD-4 を投与せざるを得ず，結果的に投与部位での FD-4 の吸収が飽和して，このような長時間にわたって血漿中濃度が維持するという薬物動態プロファイルが見られたものと思われる．

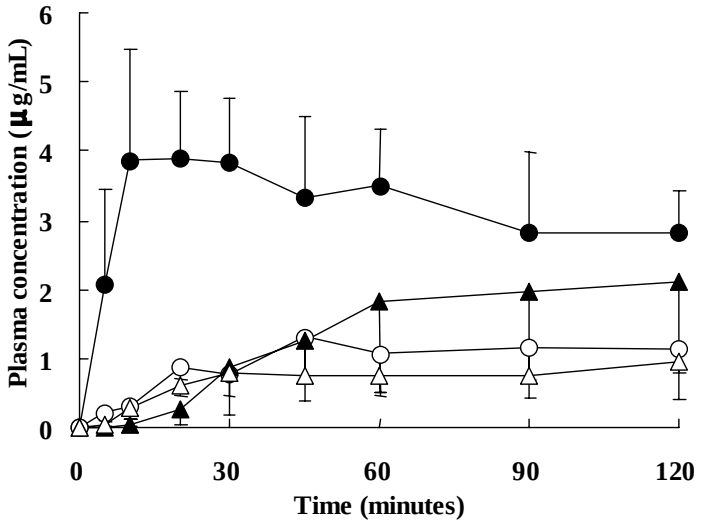

Fig. 18. Comparison of plasma concentration – time profiles following nasal administration of various aqueous formulations containing 2.5 mg of FD-4.
△; Formulation-C (saline solution of FD-4), ▲; Formulation-L (saline solution of FD-4 containing Laureth-25), ○; Formulation-N (saline solution of FD-4 containing NAC), ●; Formulation-LN (saline solution of FD-4 containing NAC and Laureth-25).
Data represent mean plasma concentrations of FD-4 ± SD (n = 4).

Table 8. Bioavailabilities of FD-4 after nasal administration of various aqueous formulations containing 2.5 mg FD-4.

Formulation	Enhancers	$AUC_{0\text{-}120}$ (μg/ml·min)	Bioavailability (%)
Formulation-C	None	84 ± 4	8.2 ± 0.6
Formulation-N	5% NAC	117 ± 59	11.5 ± 5.6
Formulation-L	5% Laureth-25	165 ± 109	15.8 ± 11.0
Formulation-LN	5% NAC + 5% Laureth-25	382 ± 74	40.0 ± 5.5 [a, b, c]
I.V. administration		955 ± 57	100.0 ± 6.0

Data represent the mean ± SD (n = 4).
Statistical analysis was performed using Student's *t* test. [a] $P < 0.01$ versus Formulation-C.
[b] $P < 0.01$ versus Formulation-N. [c] $P < 0.05$ versus Formulation-L.

Laureth-25 濃度を 5%に固定して，NAC 濃度を上昇させたときの FD-4 のバイオアベイラビリティ変化を Fig. 19 示し，NAC 濃度を 5%に固定し，Laureth-25 濃度を上昇させたときの FD-4 バイオアベイラビリティの変化を Fig. 20 に示した. FD-4 のバイオアベイラビリティは NAC 濃度の上昇に従い直線的に上昇したが，NAC 濃度が 2%と 5%ではほぼ同じバイオアベイラビリティであったため，吸収促進効果は 2%以上で飽和すると思われた（Fig. 19）．また，Laureth-25 濃度の上昇に従いバイオアベイラビリティは直線的に上昇し，Laureth-25 濃度が 1%以上でほぼ飽和することが認められた（Fig. 20）．これらの結果から，FD-4 のバイオアベイラビリティの最大値は 40%程度であり，両吸収促進剤 NAC と Laureth-25 の濃度の適当な組み合わせによって，最大のバイオアベイラビリティ達成できることが示された．さらに，NAC と Laureth-25 の両方の濃度を変動させたとき，1% NAC と 1% Laureth-25 の組み合わせでは，バイオアベイラビリティは 9.9% ± 6.5%であり，2% NAC と 2% Laureth-25 の組み合わせでは，バイオアベイラビリティ 19.6% ± 0.5%であった．それゆえ，最大の吸収促進効果を得るためには，NAC 又は Laureth-25 のどちらか一方の濃度を 5%にすることが必要であることが分かった.

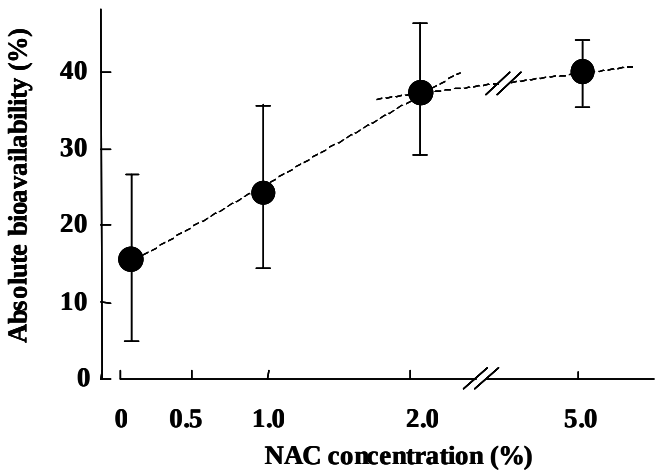

Fig. 19. Influence of NAC concentration in the formulation on nasal bioavailability of FD-4 at a fixed Laureth-25 concentration of 5%.
Data represent the mean plasma concentrations of FD-4 ± SD (n = 4).

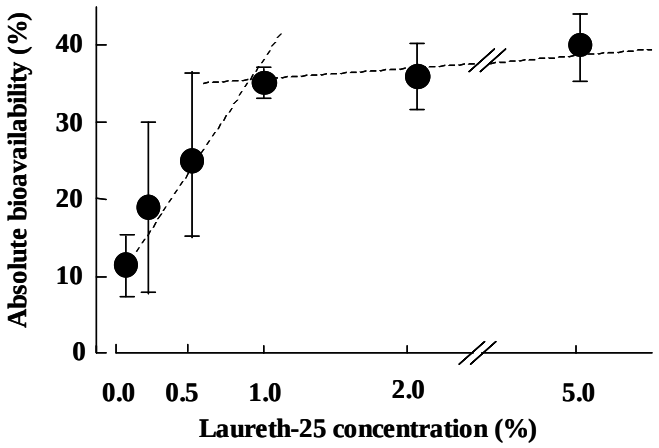

Fig. 20. Influence of Laureth-25 concentration in the formulation on nasal bioavailability of FD-4 at a fixed NAC concentration of 5%.
Data represent the mean plasma concentrations of FD-4 ± SD (n = 4).

第 2 節　ラットにおけるサケカルシトニンの吸収評価

NACとLaureth-25 の吸収促進効果がペプチド性薬物にも適用可能かを調べるために，モデルペプチドとしてSCTを用い，ラットの経鼻吸収性を検討した．薬物としてFD-4 の代わりにSCTを含んでいることを除いては，Table 8 と同じ 4 種の液体処方を調製し，ラットに経鼻投与した．SCTの血漿中濃度推移をFig. 21 に比較し，$AUC_{0–120}$と絶対バイオアベイラビリティをTable 9 にまとめた．Formulation-C（SCTの生理食塩水溶液）は 2 時間にわたって低い血漿中濃度が持続し，バイオアベイラビリティは 7.4%であった．Formulation-NはSCTとNACを含む生理食塩水溶液であるが，FD-4 の場合と異なりバイオアベイラビリティはFormulation-Cの約 2 倍の15.7%に上昇した．このことからNACによる粘膜上皮細胞上の粘液層の除去が，SCTの経鼻吸収において重要な役割を果たしていることが示唆された．Formulation-LはSCTとLaureth-25 を含む生理食塩水溶液であるが，バイオアベイラビリティは 12.3%に上昇したことから，非イオン性界面活性剤のLaureth-25 がSCTの経鼻吸収を促進することが示された．NAC と Laureth-25 の両方を含むFormulation-LNを投与したとき, FD-4 の場合と同様にSCTの速やかな吸収と高い血漿中濃度が認められ，バイオアベイラビリティは 20.6%に上昇した．

SCT の経鼻吸収における NAC と Laureth-25 の組み合わせによる吸収促進効果を，ペプチド性薬物の吸収促進剤として汎用されるグリココール酸ナトリウム（SGC）［60,61］と比較したところ，1% SGC を用いたときのバイオアベイラビリティは 18.7% ± 2.7% (n = 4)であり，5% NAC と 1% Laureth-25 を用いたときのバイオアベイラビリティ 19.7% ± 6.6% (n = 4)とほぼ同等であった．

さらに，NACとLaureth-25 の組み合わせによる吸収促進効果を，市販のSCT経鼻スプレーであるミアカルシン®と比較した．5 μlのミアカルシン®（10 μg SCTに相当）をラットに経鼻投与したとき，SCTの血漿中濃度は 2 時間にわたって低い値を維持し（Fig. 22），バイオアベイラビリティは 7.7% ± 2.1% (n = 4)であった．それに対して 10 μg SCTと 5% NACと 1% Laureth-25 を含む溶液処方をラットに投与したとき，バイオアベイラビリティは 26.8% ± 2.2 % (n = 4)とミアカルシン®の 3.5 倍に上昇した．

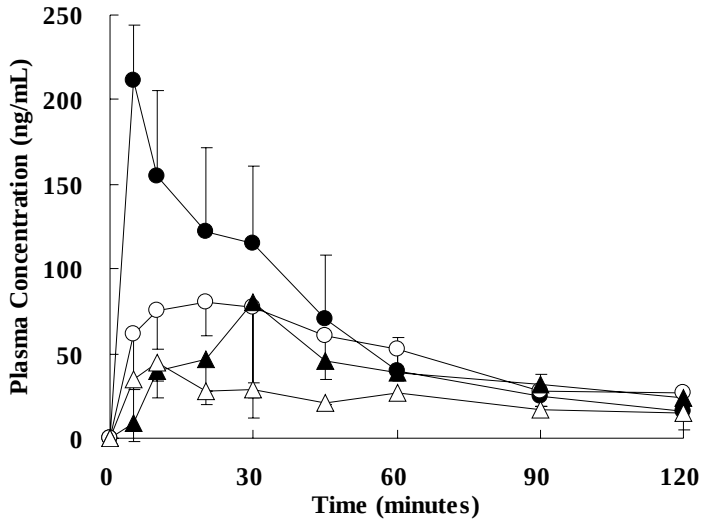

Fig. 21. Comparison of plasma concentration – time profiles following nasal administration of various aqueous formulations containing 0.1 mg of salmon calcitonin.
△; Formulation-C, ▲; Formulation-L, ○; Formulation-N, ●; Formulation-LN.
Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4)

Table 9. Bioavailabilities of salmon calcitonin after nasal administration of various aqueous formulations containing 0.1 mg salmon calcitonin.

Formulation	Enhancers	$AUC_{0\text{-}120}$ (μg/ml·min)	Bioavailability (%)
Formulation-C	None	2796 ± 329	7.4 ± 0.9
Formulation-N	5% NAC	5960 ± 1526	15.7 ± 4.0 [a]
Formulation-L	5% Laureth-25	4664 ± 939	12.3 ± 2.5 [a]
Formulation-LN	5% NAC + 5% Laureth-25	7809 ± 2793	20.6 ± 7.4 [a]
I.V. administration		37981 ± 6218	100.0 ± 16.4

Data represent the mean ± SD (n = 4).
Statistical analysis was performed using Student's *t* test. [a] $P < 0.05$ versus Formulation-C.

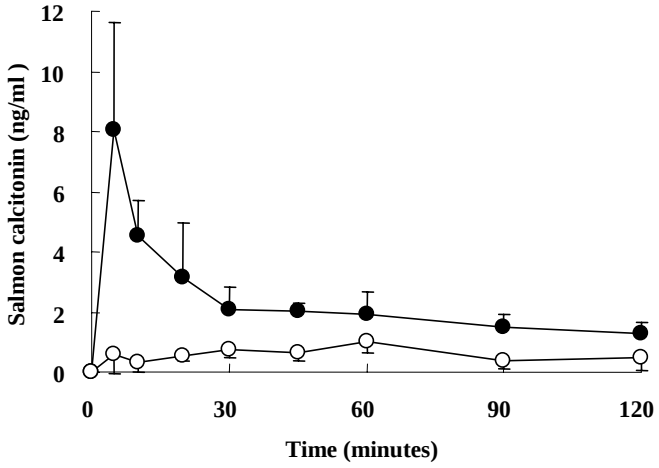

Fig. 22. Comparison of plasma concentration – time profiles of salmon calcitonin following nasal administration of powder formulations containing NAC (●) or Miacalcin (○) in rats.

Data represent mean plasma concentrations of salmon calcitonin ± SD (n = 4).

第 3 節　粘膜刺激性の評価

バイオアベイラビリティ改善効果の高い吸収促進剤を臨床的に用いる場合，膜透過性の上昇する程，粘膜上皮細胞の組織学的傷害性を伴うことが指摘されており［20,31］，とりわけ鼻粘膜へ適用したときは，よりいっそうの局所刺激性や不快感を引き起こす恐れがある［17,21］. それゆえ実用性の観点から, NAC と Laureth-25 の局所刺激性を，溶血活性と鼻粘膜からのリン脂質の溶出の 2 つの方法で評価した.

Fig. 23 は Laureth-25 と他の 3 種の吸収促進剤の溶血活性の濃度推移を示したものである．Laureth-9 は 0.01%以下の非常に低い濃度で 100%の溶血活性を示し，デオキシコール酸は 0.05%, グリココール酸は 0.2%以上の濃度で 100%の溶血活性を示したのに対して, Laureth-25 は 5%以上の濃度でも全く溶血活性を示さなかった. このことから Laureth-25 は非常にマイルドな界面活性剤であり，鼻粘膜投与時の安全性が高い化合物であることが示された．次に，生理食塩水，5% NAC と 1% Laureth-25 を含む生理食塩水及び 1%デオキシコール酸を含む生理食塩水の 3 種の溶液をラットに経鼻投与して, 2 時間後に鼻粘膜から遊離したリン脂質の濃度により粘膜傷害性を評価した（Table 10）．1%デオキシコール酸の投与では，かなり高い濃度のリン脂質が検出され，鼻粘膜に多大なダメージを与えていることが示されたが，5% NAC と 1% Laureth-25 を共に投与したときのリン脂質濃度は，生理食塩水のみを投与したときの値と同等であった. 以上の結果から, NAC と Laureth-25 を含む溶液処方による鼻粘膜への傷害性は全く無いか，あっても無視できる程度であることが示唆された.

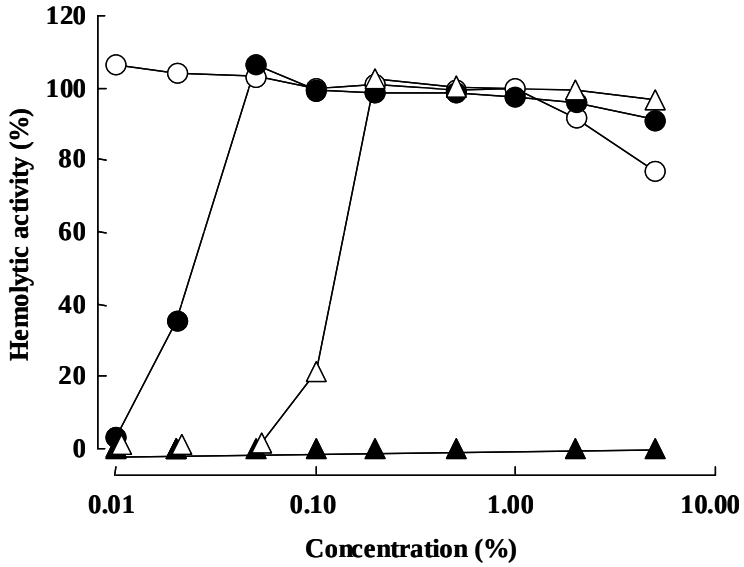

Fig. 23. Hemolytic activity – concentration profiles of various surfactants in saline. ○; Laureth-9, ●; Deoxycholate Sodium, △;Glycocholate Sodium, ▲; Laureth-25.

Table 10. Release of phospholipids from mucous membranes after nasal administration of saline with or without enhancers.

	Phospholipid concentration (mg/dl)
Saline	14.6 ± 4.2
1% Deoxycholate Sodium	27.4 ± 6.9 [a]
1% Laureth-25 + 5% NAC	16.0 ± 2.8 [b]

Data represent the mean ± SD (n = 6).
Statistical analysis was performed using Student's *t* test.
[a] $P < 0.01$ versus saline. $P < 0.01$ versus 1% Deoxycholate Sodium.

第 4 節　小括

本章の結果をまとめると，液体製剤において NAC 以外に，マイルドな非イオン性界面活性剤 Laureth-25 を吸収促進剤としてもう 1 成分加えることにより，粉末製剤と同等の吸収改善効果が得られることが示された．この NAC と Laureth-25 の組み合わせによる相乗効果は，NAC と Laureth-25 の濃度に依存して発現し，両吸収促進剤の濃度を最適化することによって，膜透過性の低い FD-4 や SCT の経鼻吸収を最大化することが可能であった．

また，溶血活性と鼻粘膜からのリン脂質の溶出の結果から，NAC と Laureth-25 を含む液体製剤の鼻粘膜への刺激性や傷害性は，非常に小さいことが示唆された．

以上の結果から，本液体製剤はペプチド性薬物の経鼻投与製剤として広く使用可能であると考えられた．

結論

NAC の粘液溶解作用を利用した, ペプチド性薬物の新規経鼻製剤の創製を試み, 以下の結論を得た.

1. エチルセルロースを賦形剤として用い, NAC を吸収促進剤として含む粉末製剤が，ペプチド性薬物の経鼻吸収を大幅に改善できることを見出した.

2. 本粉末製剤を投与したとき，鼻粘膜への刺激性や傷害性は全く無いか，あってもほとんど無視できる程度であることを，病理組織学検査及び眼粘膜への一次刺激性試験より明らかにし，本処方がペプチド性薬物の経鼻投与に広く適用可能であることを示した.

3. 粉末経鼻製剤において吸水性の小さい賦形剤を用いるほど，ペプチド性薬物の吸収が上昇することを示し，製剤設計する上で賦形剤の選択が重要であることが明らかにした．また賦形剤の選択以外に，NAC 量や粉末の粒子径が，製剤処方を最適化する上で重要な因子であることを明らかにした.

4. 液体製剤においては，NAC 以外にマイルドな非イオン性界面活性剤 Laureth-25 を，吸収促進剤としてもう１成分加えることにより，粉末製剤と同等の吸収改善効果が得られることを見出し，本溶液製剤の鼻粘膜刺激性や傷害性も非常に小さいことを明らかにした.

以上，本研究により得られた知見は，今後様々な生理活性ペプチドの経鼻製剤を開発する上で，有益な情報とヒントを提供するものと思われる.

実験の部

第 I 章　実験の部

【実験材料】

サケカルシトニン（SCT，平均粒子径：36.6 μm）とヒト副甲状腺ホルモン 1-34（PTH）はBachem Bioscienceより購入した．ヒトインスリン（INS），N-アセチル-L-システイン（NAC，平均粒子径：45.8 μm）及びグリココール酸ナトリウム（SGC）はSigma-Aldrichより購入した. エチルセルロース（Ethocel standard premium, 10 cP, 平均粒子径：76.0 μm）はDow Chemicalより供与された．ミアカルシン®（SCT経鼻投与スプレー）はNovartis Pharmaceuticalsより購入した．SCTエンザイムイムノアッセイキットとPTHエンザイムイムノアッセイキットはPeninsula Laboratoriesから, INSエンザイムイムノアッセイキットはWako Pure Chemical Industrieからそれぞれ購入した．その他全ての化合物は試薬グレードのものを使用した.

【経鼻投与製剤の調製】

(1) SCT

粉末製剤は 1.0 mg の SCT と 27.5 mg のエチルセルロースを 1.5 mg の NAC 添加あり，なしの両条件で，ポリプロピレンチューブ中で均一になるように攪拌することにより調製した．レーザー回折粒子径測定装置（SALD-1100，島津）で測定した粉末製剤の平均粒子径は 73.2 μm であったことより, 凝集は起こっていないことが示唆された．また，蒸留水に分散させた後，HPLC により SCT の含量均一性を評価したところ，標準偏差は 9.8%（n=5）であり，重大な含量不均一がないことが示された.

溶液製剤は 1.0 mg の SCT を 2.5 mg の NAC 添加あり，なしの両条件で，50 μl の生理食塩水に溶解することにより調製した．静脈内投与及び皮下投与のためには，SCT の 0.2%生理食塩水溶液を調製した

粉末製剤を室温でシリカゲル入りのデシケーター中で保存したとき, 2 週間以上

安定であった．しかしながら，NACはSCTのジスルフィド結合を切断するため，溶液製剤中でのSCTの$T_{1/2}$は 25 °Cで 0.47 時間, 4 °Cで 7.6 時間であった. それゆえ，粉末製剤は投与前日に調製し，室温でシリカゲル入りのデシケーター中で保存し，溶液製剤は投与直前に調製し，使用するまで氷上で保存した.

(2) PTH 及び INS

粉末製剤は 1.0 mg の PTH 又は INS と 27.5 mg のエチルセルロースを 1.5 mg の NAC 添加あり，なしの両条件で，ポリプロピレンチューブ中で均一になるように攪拌することにより調製した．溶液製剤は 1.0 mg の PTH 又は INS を 50 µl の生理食塩水に溶解することにより調製した. 静脈内投与及び皮下投与のためには, PTH 又は INS の 0.2%生理食塩水溶液を調製した．粉末製剤は投与前日に調製し，室温でシリカゲル入りのデシケーター中で保存し，溶液製剤は投与直前に調製し，使用するまで氷上で保存した.

【動物実験】

すべての実験は The Principles of Laboratory Animal Care（NIH publication no. 85-23, revised 1985）に準じて実施し，各プロトコールは田辺製薬（株）内の動物実験倫理委員会の審査を経て承認されたものである.

(1) ラット試験

ラット試験は Hirai らの方法［16］を改変して実施した．体重 200 g から 250 g の Wistar 系雄性ラット（Nippon SLC）を 20 時間絶食させた後，ペントバルビタールナトリウムを 50 mg/kg の投与量で皮下投与して麻酔した．次にラットの気管を切開し，気道にポリエチレンチューブを挿入して気道確保した後，片方の端に封をしたポリエチレンチューブを食道から挿入し，鼻腔の出口を塞いだ（Fig. 24）. この処置によって，薬物が気道や肺に漏れて薬物吸収量を高く見積もることを避けることができる．粉末製剤は 3 mg（ペプチド性薬物として 0.1 mg）を，Toda ら［62］のデバイスを少し改変したものを用いて片方の鼻腔に投与した．このデバイスを簡単に記載すると，使い捨てマイクロピペットチップに結合したポリエチ

レンチューブに粉末を詰め込み，シリンジで圧縮した空気を 3 方コックの解放により噴出させ，このことによって粉末を噴射した（Fig. 25）．投与した粉末量は投与前の粉末を詰め込んだピペットチップとポリエチレンチューブの重量から，投与後の空のピペットチップとポリエチレンチューブの重量を差し引くことにより算出した．溶液製剤は 5 μl（ペプチド性薬物として 0.1 mg）を，マイクロピペットを用いて片方の鼻腔に投与した．

絶対バイオアベイラビリティを測定するため，Wister 系雄性ラットを上記の方法で麻酔して，0.1 mg のペプチド性薬物を静脈内投与した．さらに，相対バイオアベイラビリティを測定するために，同じ投与量でペプチド性薬物を皮下投与した．血漿サンプルはヘパリン処理したシリンジで頚静脈より 100 μl 採取し，12,000 rpm で 3 分間遠心分離することにより得た．この血漿サンプルは測定するまで −20 °C で冷凍保存した．なお，血漿中の薬物濃度はエンザイムイムノアッセイキット（定量限界：SCT；0.31 ng/ml，PTH；1.6 ng/ml，INS；10 μU/ml，検出限界：SCT；0.16 ng/ml，PTH；0.78 ng/ml，INS；10 μU/ml）により測定した．

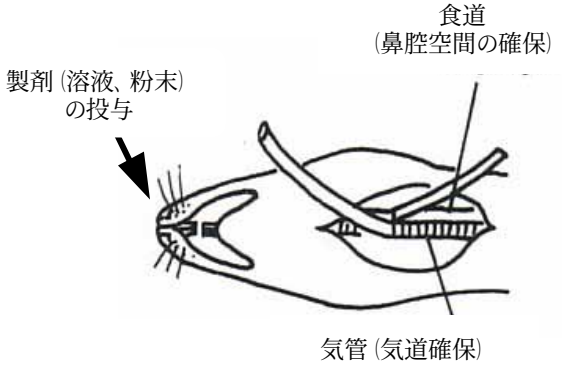

Fig. 24. Experimental methods for nasal administration to rat

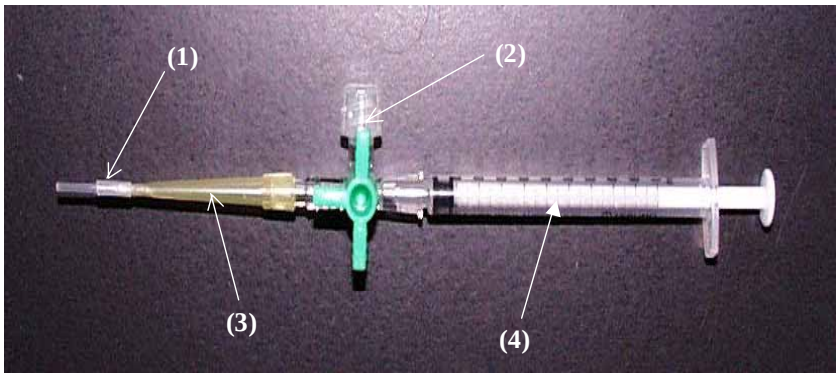

Fig. 25. Hand-made nasal powder device used for rat administration study
(1) Polyethylene tube, (2) Three-way cock, (3) Pipette tip, (4) Plastic syringe (1 ml)

(2) イヌ試験

体重 13 kg から 15 kg の雄性ビーグル犬（Kitayama Labs）を 20 時間絶食させ，ペントバルビタールナトリウムを 40 mg/kg の投与量で皮下投与することによって麻酔した．粉末処方では，9 mg の経鼻製剤（SCT として 0.3 mg）を，Pfeiffer 社の Bi-Dose Nasal Powder デバイス（Fig. 26）を用いて鼻腔に投与した．このデバイスは動物実験用に改良されたもので，鼻の穴にフィットするノズルと，圧縮空気で粉末を噴射するための手動ポンプが装着されている．溶液処方では，100 µl の溶液（SCT として 0.3 mg）を，マイクロピペットを用いて鼻腔に投与した．絶対バイオアベイラビリティを見積もるために, 0.3 mg の SCT をイヌ後肢静脈に投与した．さらに相対バイオアベイラビリティを見積もるために，同じ投与量の SCT を皮下に投与した．1 ml の血液をヘパリン処理したシリンジで後肢静脈から採取し，12,000 rpm で 3 分間遠心することによって血漿サンプルを得た. 血漿サンプルは測定するまで−20 °C で凍結保存した．血漿中の SCT 濃度はエンザイムイムノアッセイキット（定量限界：0.31 ng/ml，検出限界：0.16 ng/ml）により測定した．

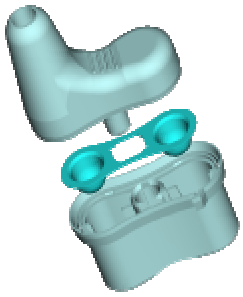

Fig. 26. Bi-Dose Nasal Powder device for nasal administration of powder formulation to dog

【データ解析】

120 分までの血漿中濃度－時間曲線の曲線下面積（$AUC_{0–120}$）は，台形法により算出した．バイオアベイラビリティは経鼻又は皮下投与後の平均$AUC_{0–120}$を，静脈投与後の平均$AUC_{0–120}$で除することにより算出した．

【ウサギ眼粘膜の刺激性試験】

ウサギ眼粘膜の刺激性試験は Draiz らの方法［63］に従って行った．日本白色ウサギ（Kitayama Labs）は清浄で空調管理されたチャンバー内で，適度の餌を与え自由に動けるようにして飼育した．2 種類の粉末製剤（0.15 又は 0.25 mg の NAC を含む）3 mg を，それぞれの製剤につき 3 羽のウサギに，ラット試験で用いたデバイスを用いて右目の結膜嚢に噴射した．下まぶたを眼からゆっくりと離し，製剤を投与し，その後 1 秒間まぶたを閉じた．1，2，3，4，7 日後に刺激，膨張，赤化，涙液分泌の有無を検査した．

【ウサギ鼻粘膜の病理学的試験】

本試験に各 3 羽の日本白色ウサギを用いた. 2 種類の粉末製剤（0.15 又は 0.25 mg の NAC を含む）3 mg を，8 日間連続で 1 日 1 回右側鼻腔に投与した．9 日目に放血死させた後，頭部を左右半分に切断し，鼻道，軟口蓋及び咽喉頭の粘膜を肉眼により病理検査した．頭部，気管及び肺は緩衝液により中性にした 10%ホルマリンに浸漬して固定した後，気管と肺は肉眼により病理検査した．腹部鼻甲介及び中部鼻甲介を 1 cm 幅で切断した後粘膜をはがし，ヘマトキシリン－エオジンで染色し，顕微鏡により病理組織学的検査を行った．

第II章　実験の部

【実験材料】

炭酸カルシウム（$CaCO_3$）はSigma-Aldrichより購入した．結晶セルロース（Avicel PH-101）はAsahi Kaseiより供与された．タルクと硬化ヒマシ油（HCO）はNippon TalcとKawaken Fine Chemicalsからそれぞれ購入した．マイクロセラック（結晶セルロースと乳糖を 25:75 の比で混合しスプレードライしたもの）はMeggleから購入した．その他全ての化合物は試薬グレードのものを使用した．

【経鼻投与製剤の調製】

10 mgのSCTを含むエタノール／水（3：7）溶液 300 μlを，90 mgの粉末賦形剤（エチルセルロース，HCO，タルク，$CaCO_3$，結晶セルロース，マイクロセラック）に添加し，一夜減圧乾燥した．このSCT含有粉末 10 mgと 18.5 mgの賦形剤，さらにメノウ乳鉢で粉砕したNAC 1.5 mgを，ポリエチレンチューブ中で激しく撹拌することにより均一に混合した．乳糖又はエチルセルロースを賦形剤として用いたときのSCT経鼻吸収を比較するためには，乳糖がエタノール／水（3：7）溶液に溶けることを避けるために，投与製剤は単純混合により調製した．方法を簡単に記載すると，1.0 mg のSCTと 27.5 mgの賦形剤（乳糖又はエチルセルロース）を，1.5 mgのNAC又はSGCの添加あり，なしの条件下，ポリエチレンチューブ中で激しく撹拌することにより均一に混合した．SCTの経鼻投与後のバイオアベイラビリティに及ぼすNAC量の影響を調べるために，種々の量のNACとエチルセルロースを混合した（NAC量：0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 mg）．さらに，溶液処方は 1.0 mgのSCTを 50 μlの生理食塩水に溶解することにより調製した．粉末製剤は投与前日に調製し，室温でシリカゲル入りのデシケーター中で保存し，溶液製剤は投与直前に調製し，使用するまで氷上で保存した．

【ラット試験】

体重 200 g から 250 g の Wistar 系雄性ラット（Nippon SLC）を 20 時間絶食させた後，ペントバルビタールナトリウムを 50 mg/kg の投与量で皮下投与して麻酔し

た．第 1 章実験の部で記載した方法でラットを処置し，粉末製剤 3 mg（SCT として 0.1 mg）を既述の経鼻投与デバイスを用いて片方の鼻腔に投与した．溶液製剤は 5 μl（SCT として 0.1 mg）を，マイクロピペットを用いて片方の鼻腔に投与した．また，絶対バイオアベイラビリティを測定するために，0.1 mg の SCT を静脈内投与した．血漿サンプルはヘパリン処理したシリンジで頚静脈より 100 μl 採取し，12,000 rpm で 3 分間遠心分離することにより得た．この血漿サンプルは測定するまで−20 °C で冷凍保存した．なお，血漿中の SCT 濃度はエンザイムイムノアッセイキット（定量限界：0.31 ng/ml，検出限界：0.16 ng/ml）により測定した．

【データ解析】

120 分までの血漿中濃度－時間曲線の曲線下面積（$AUC_{0–120}$）は，台形法により算出した．バイオアベイラビリティは経鼻又は皮下投与後の平均$AUC_{0–120}$を，静脈投与後の平均$AUC_{0–120}$で除することにより算出した．

【粉末の吸水速度の測定】

粉末の吸水速度は Takeda らの方法［57］に従って測定した（Fig. 27）．崩壊試験用のガラスチューブ（内径 2.1 cm，長さ 7.8 cm）の一方の端をろ紙で蓋をして，粉末賦形剤 10 g を入れた後，粉末が均一に充填されるように 5 分間タッピングした．その後シャーレに 1 cm の深さで水をはり，ガラスチューブのろ紙で覆った側の端を 10 分間水に浸した．ガラスチューブに充填した粉末が吸った水の高さを測定し，1 分間当たりに粉末が吸った水の高さで吸水速度を表した．

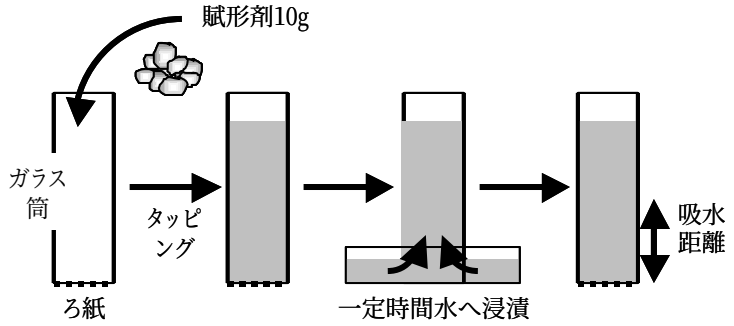

Fig. 27. Measurement of water absorption speed of powder

第 III 章　実験の部

【実験材料】

FITC デキストラン（FD-4）は Sigma-Aldrich より購入した．ポリオキシエチレン（25）ラウリルエーテル（Laureth-25）とポリオキシエチレン（9）ラウリルエーテル（Laureth-9）は Nikko Chemicals より供与された．コール酸ナトリウムとリン脂質測定キットは Wako Pure Chemical Industrie から購入した. その他全ての化合物は試薬グレードのものを使用した.

【経鼻投与製剤の調製】

FD-4 又は SCT の経鼻吸収における NAC と Laureth-25 の組み合わせの効果を調べるために，4 種の液体処方を調製してラットに投与した．Formulation-N は粘液溶解剤として NAC を含んだ処方で, Formulation-L は非イオン性界面活性剤として Laureth-25 を含んだ処方で，Formulation-LN は NAC と Laureth-25 両方を含んだ処方で，Formulation-C は吸収促進剤を含まない処方である．経鼻投与製剤は 25 mg の FD-4 又は 1.0 mg の SCT を NAC 又は Laureth-25 の添加あり，なしの両条件で，50 μl の生理食塩水に溶解することにより調製した. FD-4 の経鼻投与後のバイオアベイラビリティに及ぼす NAC 又は Laureth-25 濃度の影響を調べるために，種々の濃度の NAC と Laureth-25 を混合した処方を調製した（0%，1%，2%，5%）．さらに，静脈内投与ために，SCT の 0.2%生理食塩水溶液を調製した．なお，経鼻投与製剤は投与直前に調製し，実験に使用するまで氷上で保存した.

【ラット試験】

体重 200 gから 250 gのWistar系雄性ラット（Nippon SLC）を 20 時間絶食させた後，ペントバルビタールナトリウムを 50 mg/kgの投与量で皮下投与して麻酔した．第 1 章実験の部で記載した方法でラットを処置し，経鼻投与製剤 5 μl（FD-4 として 2.5 mg，　SCTとして 0.1 mg）を，マイクロピペットを用いて片方の鼻腔に投与した．比較試験のために，ミアカルシン®10 μl （SCTとして 10 μg）を投与した．また，絶対バイオアベイラビリティを測定するために，50 mg/kgの投与量でFD-4

又は 0.1 mgのSCTを静脈内投与した．血漿サンプルはヘパリン処理したシリンジで頚静脈より 100 μl採取し，12,000 rpmで 3 分間遠心分離することにより得た．この血漿サンプルは測定するまで−20 °Cで冷凍保存した．

【血漿中 FD-4 及び SCT 濃度の測定】

FD-4 濃度測定のために，20 μl の血漿サンプルを 680 μl の 0.1 N 炭酸水素ナトリウムで希釈し，蛍光光度計により FD-4 濃度を測定した（励起波長：495 nm，測定波長 515 nm）．血漿中の SCT 濃度はエンザイムイムノアッセイキット（定量限界：0.31 ng/ml，検出限界：0.16 ng/ml）により測定した．

【データ解析】

120 分までの血漿中濃度－時間曲線の曲線下面積（$AUC_{0–120}$）は，台形法により算出した．バイオアベイラビリティは経鼻又は皮下投与後の平均$AUC_{0–120}$を，静脈投与後の平均$AUC_{0–120}$で除することにより算出した．

【吸収促進剤の溶血活性の測定】

生理食塩水に懸濁させた 10%ラット赤血球 100 μl を，生理食塩水で種々の濃度に希釈した吸収促進剤 4.9 ml に添加した．この試験液を 37 °C で 10 分間静置した後，12 000 rpm で 3 分間遠心分離した．上清の 540 nm の吸光度を測定し，赤血球を蒸留水で希釈したときの吸光度（100%溶血活性）と比較することにより，溶血活性を決定した．

【鼻粘膜から遊離したリン脂質の測定】

体重 200 g から 250 g の Wistar 系雄性ラット（Nippon SLC）を 20 時間絶食させた後，ペントバルビタールナトリウムを 50 mg/kg の投与量で皮下投与して麻酔した．第 1 章実験の部で記載した方法でラットを処置し，5 μl の吸収促進剤溶液を，マイクロピペットを用いて片方の鼻腔に投与した．2 時間後，食道から鼻腔の出口へ挿入したカニューレを通して, 200 μl の生理食塩水を 3 回注入することにより鼻腔内を洗浄した．ラットの鼻の穴から染み出てくる洗浄液を回収し，この洗浄液

中のリン脂質濃度をリン脂質測定キットにより測定した.

謝辞

本研究に際し，終始御懇意篤なる御指導と御鞭撻を賜りました，大阪大学大学院薬学研究科・中川晋作教授に衷心より感謝の意を表します．また，御指導，御助言を賜りました，大阪大学大学院薬学研究科・山元弘教授，松田敏夫教授，土井健史教授に心から御礼申し上げます．さらに，御指導，御助言を賜りました，大阪大学大学院薬学研究科・岡田直貴講師，吉岡靖雄講師，同研究科助手・向洋平博士に心から御礼申し上げます．

本研究の機会を与えられ，特段の御便宜を賜りました，田辺製薬株式会社社長・葉山夏樹氏及び開発本部長・柳澤憲一氏に厚く御礼申し上げます．また，本研究に御理解と激励を賜りました，元田辺製薬株式会社製剤研究所長・吉野廣祐博士，元同研究所主幹部員・鈴木健彦氏，ならびに直接御指導，御助言を賜りました，田辺製薬株式会社 CMC 研究所製剤研究部主幹部員・山原弘博士，元同研究部主任研究員・堀切勇児博士，研究企画部・松川泰久博士に心から御礼申し上げます．さらに，本研究に御協力頂きました元製剤研究所 DDS ユニット，CMC 研究所製剤研究部及び安全性研究所の皆様に心から感謝致します．

引用文献

1) 日経バイオテク年鑑 99：研究開発と市場・産業動向，医療局ニュースセンター日経バイオテク（編），日経 BP 社，(1998) 11–406
2) J.E Talmadge, The pharmaceutics and delivery of therapeutics polypeptides and proteins, Adv. Drug Delivery Rev. 10 (1993) 247–299.
3) M.M. Struck, Biopharmaceutical R&D success rates and development times: a new analysis provides benchmarks for the future, Biotechnology 12 (1994) 674–677.
4) A. Yamamoto, Improvement of transmucosal absorption of peptide and protein drugs, Drug Delivery System 15 (2000) 507–519.
5) V.H.L. Lee, Peptide and protein drug delivery: past, present and future, in V.H.L. Lee, M. Hashida, Y. Mizushima (ed.), Trend and future perspectives in peptide and protein drug delivery, Harwood Academic Publishers GmbH, (1995) 3–19.
6) C. McMartin, L. E. Hutchinson, R. Hyde and G. E. Peters, Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity, J. Pharm. Sci. 76 (1987) 535-540.
7) A.S. Harris, Review: clinical opportunities provided by the nasal administration of peptides, Drug Target 1 (1993) 101–116.
8) C.R. Behl, H.K. Pimplaskar, A.P. Sileno, J. deMeireles, V.D. Romeo, Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 29 (1998) 89–116.
9) 森本一洋，薬局 56 (2005) 2453-2455.
10) R. Dahl and N. Mygind, Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease, Adv. Drug Delivery Rev. 29 (1998) 3-12.
11) F. W. Merkus, J. C. Verhoef, N. G. Schipper and E. Marttin, Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, Adv. Drug Delivery Rev. 29 (1998) 13-38.
12) A.E. Pontiroli, A. Calderara, G. Pozza, Intranasal drug delivery: Potential advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic perspective, Clin. Pharmacokinet. 17

(1989) 299–307.

13) A.E. Pontiroli, Peptide hormones: review of current and emerging uses by nasal delivery, Adv. Drug Delivery Rev. 29 (1998) 81–87.

14) T. Morita and H. Yamahara, in Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 2nd Edition (J. Swarbrick and J. C. Boylan ed.), Marcel Dekker Inc, New York (2004) 1-11.

15) 山本昌, 薬学雑誌 121 (2001) 929-948.

16) S. Hirai, T. Yashiki, H. Mima, Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants, Int. J. Pharm. 9 (1981) 173–184.

17) R. Salzman, J.E. Manson, G.T. Griffing, R. Kimmerle, N. Ruderman, A. McCall, E.I. Stoltz, C. Mullin, D. Small, J. Armstrong, et al., Intranasal aerosolized insulin: mixed-meal studies and long-term use in type I diabetes, N. Engl. J. Med. 312 (1985) 1078–1084.

18) F. Ahsan, J. Arnold, E. Meezan, D.J. Pillion, Enhanced bioavailability of calcitonin formulated with alkylglycosides following nasal and ocular administration in rats, Pharm. Res. 18 (2001) 1742–1746.

19) G.S. Gordon, A.C. Moses, R.D. Silver, J.S. Flier, M.C. Carey, Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82 (1985) 7419–7423.

20) M. Mishima, Y. Wakita, M. Nakano, Studies on the promoting effects of medium chain fatty acid salts on the nasal absorption of insulin in rats, J. Pharmacobiodyn. 10 (1987) 624–631.

21) J.P. Longenecker, A.C. Moses, J.S. Flier, R.D. Silver, M.C. Carey, E.J. Dubovi, Effects of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep, J. Pharm. Sci. 76 (1987) 351–355.

22) W.A. Lee, R.D. Ennis, J.P. Longenecker, P. Bengtsson, The bioavailability of intranasal salmon calcitonin in healthy volunteers with and without a permeation enhancer, Pharm. Res. 11 (1994) 747–750.

23) L. Illum, N.F. Farraj, H. Critchley, B.R. Johansen, S.S. Davis, Enhanced nasal

absorption of insulin in rats using lysophosphatidylcholine, Int. J. Pharm. 57 (1989) 49–54.

24) Y.V.R. Prasad, Y.S.R. Krishnaiah, S. Satyanarayana, Intranasal drug delivery systems; an overview, Indian J. Pharm. Sci. 58 (1996) 1–8.

25) C.R. Behl, H.K. Pimplaskar, A.P. Sileno, W.J. Xia, W.J. Gries, J.C. deMeireles, V.D. Romeo, Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients, Adv. Drug Deliv. Rev. 29 (1998) 117–133.

26) S. C. Chen, K. Eiting, K. Cui, A. K. Leonard, D. Morris, C. Y. Li, K. Farber, A. P. Sileno, M. E. Houston Jr, P. H. Johnson, S. C. Quay and H. R. Costantino, Therapeutic utility of a novel tight junction modulating peptide for enhancing intranasal drug delivery, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 1364-1371.

27) K. Morimoto, H. Yamaguchi, Y. Iwakura, M. Miyazaki, E. Nakatani, T. Iwamoto, Y. Ohashi and Y. Nakai, Effects of proteolytic enzyme inhibitors on the nasal absorption of vasopressin and an analogue, Pharm. Res. 8 (1991) 1175-1179.

28) S. C. Raehs, J. Sandow, K. Wirth and H. P. Merkle, The adjuvant effect of bacitracin on nasal absorption of gonadorelin and buserelin in rats, Pharm. Res. 5 (1988) 689-693.

29) U. B. Kompella and V. H. Lee, Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations, Adv. Drug Delivery Rev. 46 (2001) 211-245.

30) 山本昌, Drug Delivery System 20 (2005) 404-415.

31) E. Marttin, J.C. Verhoef, S.G. Romeijn, F.W. Merkus, Effects of absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo: release of marker compounds in the nasal cavity, Pharm. Res. 12 (1995) 1151–1157.

32) S. Takatsuka, T. Morita, A. Koguchi, Y. Horikiri, H. Yamahara, H. Yoshino, Synergistic absorption enhancement of salmon calcitonin and reversible mucosal injury by applying a mucolytic agent and a non-ionic surfactant, Int. J. Pharm. 316 (2006) 124–130.

33) S. Takatsuka, T. Kitazawa, T. Morita, Y. Horikiri, H. Yoshino, Enhancement of

intestinal absorption of poorly absorbed hydrophilic compounds by simultaneous use of mucolytic agent and non-ionic surfactant, Eur. J. Pharm. Biopharm. 62 (2006) 52–58.

34) G.N. Melville, S. Ismail, C. Sealy, Tracheobronchial function in health and disease. Effect of mucolytic substances, Respiration. 40 (1980) 329–336.

35) Package insert, Mucomyst® (acetylcysteine solution, USP), Apothecon, revised January 2001.

36) M. Sakagami, W. Kinoshita, K. Sakon and Y. Makino, Fractional contribution of lung, nasal and gastrointestinal absorption to the systemic level following nose-only aerosol exposure in rats: a case study of 3.7- micro m fluorescein aerosols. Arch. Toxicol. 77 (2003) 321-329.

37) V. H. Lee, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier System 5 (1998) 69-97.

38) M. A. Sarkar, Drug metabolism in the nasal mucosa, Pharm. Res. 9 (1992) 1-9.

39) D.T. O'Hagan, H. Critchley, N.F. Farraj, A.N. Fisher, B.R. Johansen, S.S. Davis, L. Illum, Nasal absorption enhancers for biosynthetic human growth hormone in rats, Pharm. Res. 7 (1990) 772–776.

40) M. A. Bagger, H. W. Nielsen, E. Bechgaard, Nasal bioavailability of peptide T in rabbits: Absorption enhancement by sodium glycocholate and glycofurol, Eur. J. Pharm. Sci. 14 (2001) 69-74.

41) K. Hosoya, H. Kubo, H. Natsume, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Evaluation of bile acids and fusidate derivative as nasal absorption enhancers using an electrophysiological technique, Biol Pharm Bull. 22 (1999) 1089-1093.

42) G.N. Melville, S. Ismail, C.Sealy, Tracheobronchial function in health and disease. Effect of mucolytic substances, Respiration. 40 (1980) 329-336.

43) T. Rochat, J.S. Lacroix, L. Jornot, N-acetylcysteine inhibits Na^+ absorption across human nasal epithelial cells, J. Cell Physiol. 201 (2004) 106-116.

44) F. Ishikawa, M. Katsura, I. Tamai, A. Tsuji, Improved nasal bioavailability of elcatonin by insoluble powder formulation, Int. J. Pharm. 224 (2001) 105–114.

45) F. Ishikawa, M. Murano, M. Hiraishi, T. Yamaguchi, I. Tamai and A. Tsuji, Insoluble

powder formulation as an effective nasal drug delivery system, Pharm. Res. 19 (2002) 1097-1104.

46) S. Gizurarson, Animal models for intranasal drug delivery studies, Acta Pharm. Nord. 2 (1990) 105-122.

47) D. Teshima, A. Yamauchi, K. Makino, Y. Kataoka, Y. Arita, H. Nawata, R. Oishi, Nasal glucagon delivery using microcrystalline cellulose in healthy volunteers, Int. J. Pharm. 233 (2002) 61–66.

48) Y. Suzuki, Y. Makino, Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer, J. Cont. Rel. 62 (1999) 101–107.

49) C. Callens, E. Pringels, J. P. Remon, Influence of multiple nasal administrations of bioadhesive powders on the insulin bioavailability, Int. J. Pharm. 250 (2003) 415–422.

50) R. J. Garmise, K. Mar, T. M. Crowder, C. R. Hwang, M. Ferriter, J. Huang, J. A. Mikszta, V. J. Sullivan, A. J. Hickey. Formulation of a dry powder influenza vaccine for nasal delivery, AAPS PharmSciTech. 10 (2006) E19.

51) A. De Ascentiis, R. Bettini, G. Caponetti, P.L.Catellani, M.T.Peracchia, P. Santi, P. Colombo, Delivery of nasal powders of beta-cyclodextrin by insufflation, Pharm Res. 13 (1996) 734–738.

52) N. G. Shipper, S. G. Romeijn, J. C. Verhoef, F. W. Merkus, Nasal insulin delivery with dimethyl-beta-cyclodextrin as an absorption enhancer in rabbits: Powder more effective than liquid formulations, Pharm. Res. 10 (1993) 682–686.

53) A. E. Pontiroli, M. Alberetto, A. Calderara, E. Pajetta, G. Pozza, Nasal administration of glucagon and human calcitonin to healthy subjects: A comparison of powders and spray solutions and of different enhancing agents, Eur. J. Clin. Pharmacol. 37 (1989) 427–430.

54) 竹田善男，奥田昌功，成宮悟史，福森義信，第 16 回製剤と粒子設計シンポジウム講演要旨集 (1999) 163-167.

55) M. Sakagami, W. Kinoshita, K. Sakon, J. Sato, Y. Makino, Mucoadhesive beclomethasone microspheres for powder inhalation: their pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation, J. Control. Release 80 (2002) 207–218.

56) M. I. Ugwoke, R. U. Agu, N. Verbeke and R. Kinget, Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives, Adv. Drug Delivery Rev. 57 (2005) 1640-1665.

57) 並木徳之, 薬局 56 (2005) 2427-2431.

58) F. W. Merkus, J.C. Verhoef, Nasal drug delivery: trends and perspectives; in J. Swarbrick, J. C. Boylan (Eds.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Vol. 10, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, pp. 191–221.

59) S. Ferrari, C. Kitson, R. Farley, R. Steel, C. Marriott, D.A. Parkins, M. Scarpa, B. Wainwright, M.J. Evans, W.H. Colledge, D.M. Geddes, E.W. Alton, Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium, Gene Ther. 8 (2001) 1380-1386.

60) A.E. Pontiroli, M. Alberetto, A. Secchi, G. Dossi, I. Bosi, G. Pozza, Insulin given intranasally induces hypoglycaemia in normal and diabetic subjects, Br. Med. J. 284 (1982) 303–306.

61) A.E. Pontiroli, M. Alberetto, G. Pozza, Intranasal calcitonin and plasma calcium concentrations in normal subjects, Br. Med. J. 290 (1985) 1390–1391.

62) H. Todo, H. Okamoto, K. Iida, K. Danjo, Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats, Int. J. Pharm. 220 (2001) 101–110.

63) J.H. Draize, E.A. Kelley, The urinary excretion of boric acid preparations following oral administration and topical applications to intact and damaged skin of rabbits, Toxicology 1 (1959) 267-276.