

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790153

研究課題名（和文） 鼻腔内投与型医薬品開発における投与条件の最適化に関する研究

研究課題名（英文） Optimization of nasal administering conditions with the formulation development.

研究代表者

古林 呂之（FURUBAYASHI TOMOYUKI）

就実大学・薬学部・薬学科・講師

研究者番号：00399156

研究成果の概要（和文）：物性の異なる薬物に対する最適製剤条件の選択システムの構築を目的として、粉末製剤からの薬物吸収について詳細な検討を行った。製剤の鼻腔内滞留性と製剤からの薬物溶出のバランスが経鼻吸収率を決定する重要な因子であることを解明し、鼻腔内滞留性の制御による吸収改善の可能性を見出すことができた。また、経鼻吸収性を評価するための培養細胞種における膜透過性の組織間差を明らかにし、既存の経鼻吸収性評価システムの精度向上に繋がる知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In order to establish the evaluation system to optimize the nasal formulation, drug absorption from the powder formulations following nasal administration was investigated. The balance of the nasal residence of the drug and the dissolution from powder in the nasal cavity was an important factor to determine the nasal drug absorption. This finding suggested the feasibility that the nasal absorption is improved by controlling the nasal residence time of powder formulation. On the other hand, it was clarified that the transcellular permeability of the drug is dependent on the origin of the cell used for in vitro study. This finding would lead to renewing and improving the estimation system for nasal drug absorption, which had been previously established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：経鼻吸収、mucociliary clearance、粉末製剤、吸収評価システム

1. 研究開始当初の背景

鼻腔内投与型製剤は、注射剤のような痛みを伴わないことに加え、投与方法が比較的簡

便であることから、嚥下困難な高齢患者や、消化器疾患や高度の介護を要するなど、薬物の経口服用が極めて困難な患者に対して、介

護者による簡便な投与が可能である。近い将来、我が国が迎える超高齢化社会において高齢の要介護患者の増加は避けられない現実であり、これら患者の治療に携わる介護者の負担を軽減できる手段の一つとしても、鼻腔内投与法の普及および鼻腔内投与型医薬品の開発を推進することの意義は大きい。将来、鼻腔内投与が広く一般に受け入れられ、活用されるためには、より多くの鼻腔内投与型医薬品が開発され、その技術と有用性が認知される必要がある。

医薬品開発の主流を占める経口医薬品の開発では、開発初期の段階で薬物の経口投与後の消化管吸収性を迅速かつ簡便に予測するための評価システムについて、ヒト大腸癌由来上皮細胞株 (Caco-2) を用いた研究が盛んに進められてきた。その成果は、製薬企業の開発研究や各研究機関での基礎研究に利用され、経口医薬品候補の選定にかかる時間を大幅に短縮し、開発の迅速化に大きく貢献している。一方、鼻腔内投与型医薬品の開発を支援するシステムは存在せず、未だ時間と労力のかかる実験動物による評価が中心に行われている。消化管吸収性の推定と同様に、培養細胞による迅速な経鼻吸収性評価システムの構築は、鼻腔内投与型医薬品の開発スピードを一段と高める有用な手段になると考えられる。

研究代表者は、鼻腔内投与後の薬物吸収率を Caco-2 細胞層に対する膜透過性から推定できる評価システムを構築している。このシステムは、生体の防御機能の一つである mucociliary clearance (MC) の影響を考慮している。MC は、外気とともに鼻腔内に吸引された外来異物を速やかに胚細胞から分泌された粘液と共に咽頭側に排出する機能であり、鼻腔内へ投与された薬物も同様に、MC により咽頭側へ排出されることを報告している。また、この排出機能が、鼻腔内投与後の薬物吸収率の不安定さに深く関与していると考えられ、細胞層に対する透過性が同程度の薬物であっても、*in vivo* 鼻腔内投与と実験から得られた薬物吸収率と評価システムによる推定吸収率に大きな差が生じる例も確認している。MC による粘液の移動に関する報告は多数存在するが、生理的条件に近いとは言えず、また、鼻腔内に投与された薬物の排出と吸収率について詳細に検討された報告はほとんどない。評価システムの推定精度を向上させるためにも MC の関与について詳細な検討が必要と考えられる。

一方、鼻腔内投与型製剤の開発では、多くの場合、薬物の鼻腔内滞留性を改善するために、粉末製剤や粘性溶液の投与が検討される。研究代表者は、製剤添加物により変化する製剤の物性が薬物経鼻吸収性に及ぼす影響を検討し、投与液の粘性が薬物の経鼻吸収動態

の変動要因となることを明らかにした。その変動は必ずしも経鼻吸収にとって有利な結果とは限らず、薬物ごとに最適な粘性条件が存在することを示唆する結果であった。このように、鼻腔内投与後の薬物吸収率の変動には、薬物の膜透過に加え MC に対する製剤特性の関与が重要であることを明らかにしてきた。また、鼻腔内投与される製剤には粉末状製剤も視野に入れる必要がある。その場合、鼻腔内に投与された薬物の粉末製剤からの溶出性・溶解性を考慮する必要があり、MC による咽頭への排出が経鼻吸収に大きく影響すると考えられる。種々の薬物に対して最適な製剤選択及び安定した経鼻吸収を実現するためにも、薬物の経鼻吸収に対する MC の影響と製剤特性を系統的に検討することが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、患者の QOL の改善を含め、多くの有用性が期待できる鼻腔内投与製剤の開発を支援するシステムを開発し、今後の鼻腔内投与の発展に貢献することを目的としている。現在、鼻腔内投与型製剤開発が抱える問題として、鼻腔内投与後の薬物吸収率の変動が挙げられる。本研究は、鼻腔内の生体機能と薬物の鼻腔内動態の関係について詳細に検討を行い、経鼻吸収率の変動要因を明らかにすると共に、薬物の経鼻吸収動態に対する製剤物性の影響を明らかにし、薬物ごとに異なる最適製剤条件の選択システムの構築を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 生理的条件における MC の評価手法の確立と速度論的解析 鼻腔内投与後の薬物の吸収動態に対する MC の影響を詳細に検討するためには、基準となる MC による排出速度を、生理的条件に近い状態で求めることが重要である。実験動物 (Wistar 系雄性ラット、8-10 週齢) の鼻中隔を用いた *in vitro* 実験により、直接、MC による粘液及び物質の移動を観察し、その排出速度と薬物吸収の関係を解析した。

ラット鼻腔から採取した鼻中隔上に、蛍光ビーズ (粒子径 6 μm 、Fluoresbrite® YG microspheres, Poly Sciences, Inc.) の懸濁液を滴下し、蛍光ビーズの移動を CCD カメラ (HITACHI) が装着された顕微鏡 (Leica Microsystems) を用いて経時的に画像を撮影し、移動距離と時間から移動速度を求めた。

MC の駆動力である繊毛細胞の繊毛運動 (ciliary beat frequency: CBF) を評価するために、高速度カメラ (株式会社アルゴ) を装着した倒立型顕微鏡 (Olympus) を用いてラット鼻中隔の繊毛細胞を撮影 (100 枚 / 1 秒間) した。繊毛の前後運動により画像上にでき

る明暗の差を高速度カメラに付属のアプリケーション (EPIX) により数値化し、その振幅数から CBF を求めた。

及び の手法を用いて MC 及び CBF の変動を評価した。また、評価には MC 及び CBF を変動させることが報告されている製剤添加物 (保存剤) 及び各種薬物に β -アドレナリン (β -AR) 遮断薬、 β -AR 刺激薬、コリン作動薬、抗コリン薬を用いた。

(2) 鼻腔内投与後の粉末製剤の鼻腔内挙動 粉末製剤からの薬物吸収は、吸収過程以前に溶解過程が存在するため、特に溶解速度の遅い薬物では鼻腔内滞留時間が経鼻吸収率に大きな影響を与えると考えられる。鼻腔内投与後の粉末製剤からの薬物吸収の関係を明らかにする必要がある。しかしながら、ラットを用いた粉末製剤の経鼻投与実験は、生理機能を維持した条件下での薬物投与が困難であり、その評価法は未だ確立されていない。そこで、本研究では粉末製剤経鼻投与後の薬物吸収性を評価するための実験手法の検討を行った。

MC 機能を保持したラット鼻腔内投与実験手法の確立：粉末製剤からの薬物吸収を評価するための実験手法を考案し、粉末製剤の噴霧量、噴出に必要な圧縮空気量、投与状態などの実験条件を設定した。実験にはジエチルエーテル麻酔下で採血用のカニューレを施したラット (Wistar, 雄性、8-10 週齢) を用いた。粉末薬物の投与は、麻酔状態下のラット胸部を圧迫し、呼吸を極短時間停止させた状態で鼻孔から粉末の薬物を投与した。投与に用いたデバイスは圧縮空気の噴出に伴い粉末が鼻腔内に投与されるよう設計した。溶解性及び膜透過性が高い antipyrin を用いて、投与条件の妥当性を検証した。採取した血液サンプルは遠心分離し、上清 (血漿) 中の薬物濃度を LC/MS (API 1100, Agilent Technologies, Boeblingen, Germany) により定量した。

粉末製剤の鼻腔内挙動： の手法を用いて、蛍光微粒子を粉末製剤のマーカースとして混合した乳糖をラット鼻腔内に噴霧投与した。投与後、鼻腔内に残存する微粒子を蛍光分光光度計により定量し、得られた残存率を時間に対してプロットした。

溶解性及び膜透過性の異なるモデル薬物 (griseofulvin, acyclovir) を用いて、 の手法を用いて粉末製剤 (散剤、顆粒剤) からの薬物経鼻吸収性を評価した。

(3) 製剤添加物及び各種薬物による MC の変動と薬物吸収の関係 MC の変動と溶液 (norfloxacin) または粉末状製剤 (acyclovir) からの薬物吸収率の関係を明らかにするために、MC を低下させる 2,4-dinitrophenol

(DNP) propranolol 及び MC を亢進させる terbutaline を鼻腔に前投与したラット (Wistar, 雄性、8-10 週齢) を用いて、*in vivo* 経鼻吸収実験を行った。投与後、経時的に血液を採取し、遠心分離により得られた上清 (血漿) 中の norfloxacin は蛍光検出器を備えた HPLC (島津製作所)、acyclovir は LC/MS (API 1100, Agilent Technologies, Boeblingen, Germany) により定量した。

(4) 薬物の細胞層透過性における組織間差の検討 Transwell (12-well type) 上に単層状に培養したヒト気道上皮細胞株 (Epi-Airway®, MatTek 社) を用いて薬物の膜透過性を評価した。実験には、 $[^3\text{H}]$ -inulin、 $[^{14}\text{C}]$ -mannitol、atenolol、antipyrin、sulfanilic acid、acyclovir、methotrexate、quinidine を用い、30-60 分の粘膜側から漿膜側への透過を、 $[^3\text{H}]$ -inulin と $[^{14}\text{C}]$ -mannitol は液体シンチレーションカウンター、その他の薬物は LC-MS/MS (PE SCIEX API 3000, Agilent Technologies, Boeblingen, Germany) により定量し、透過速度から膜透過性を算出した。得られた各薬物の膜透過性をヒト大腸癌由来上皮細胞株 (Caco-2) に対する膜透過性と比較し、膜透過性の組織差を調査した。

4. 研究成果

(1) 生理的条件における MC の評価手法の確立と速度論的解析

蛍光ビーズを MC のマーカースとして、ラット鼻中隔表面にリン酸緩衝液の懸濁液として 0.2 μL 滴下し、経時的にビーズの移動を、CCD カメラを装着した蛍光顕微鏡下で観察した。鼻中隔を摘出直後に測定した MC の速度は $1.43 \pm 0.12 \text{ mm/min}$ であった。しかしながら、摘出した鼻中隔を未処置で用いた場合、MC は短時間で低下した。生理学的な見知から、組織への血液の供給が途絶えたことによる粘液分泌の低下が原因と考えられる。このような摘出早期の MC の低下は、評価のバラツキの原因となることが予想される。そこで、鼻中隔表面に人工鼻粘液層として 4% mucin 溶液を滴下すると、約 2 時間に渡り MC を維持できることを明らかにした (Fig. 1)。またこの結果は、MC の機能維持には鼻粘膜表面の粘液層の保持状態が深く関わっており、保持状態により MC の速度が変化することを意味している。鼻腔内投与後の薬物吸収動態に影響を与える因子に関する重要な知見を得ることができた。

ラット鼻腔から摘出した鼻中隔表面の繊毛運動を、高速度カメラを装着した顕微鏡下で 100 枚/秒の速度で撮影した。繊毛運動により生じるコントラストの変化を数値化し、時間に対してプロットした波形から求めた CBF は $8.49 \pm 0.38 \text{ Hz}$ であった。報告値 (8~10

H_z)と同様の結果から、本により CBF を簡便に評価できる手法を確立することができた。

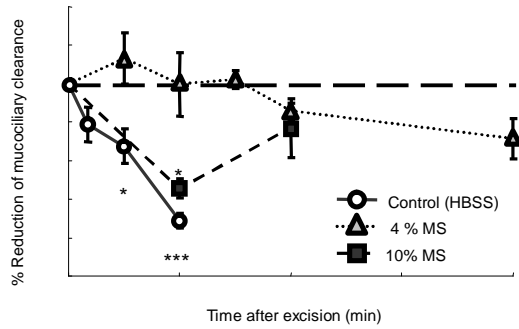


Fig. 1 Maintenance of mucociliary clearance with mucin solution applied on the surface of nasal septum. Results are expressed as the mean \pm S.E.. ***;<0.005, **;<0.05 compared with 0 min at each condition

及び で確立した *in vitro* MC 評価法の有用性を評価するため、MC を変動させることが知られている塩化 benzalkonium chloride (BZC) β -AR 作動薬 (terbutaline, salbutamol) β -AR 遮断薬 (propranolol, atenolol) コリン作動薬 (acetylcholine) 及び抗コリン薬 (atropine) を用いて、MC の変動を検討した。その結果、MC を低下させる BZC 及び β -AR 遮断薬、抗コリン薬については作用濃度依存的な MC の低下が観察された。また、MC を亢進させる β -AR 刺激薬及び acetylcholine では、MC の上昇が認められたが濃度依存性は低かった。同じ薬物を用いて CBF を評価した結果、MC 同様、CBF の亢進及び低下の両現象を観察することができたが、BZC を除いて濃度依存性は低かった。また、MC 及び CBF の間には一定の直線関係が確認された (Fig.2)。MC の変動を評価することが可能となり、薬物の経鼻吸収を推定する評価システムへの応用が期待できる。

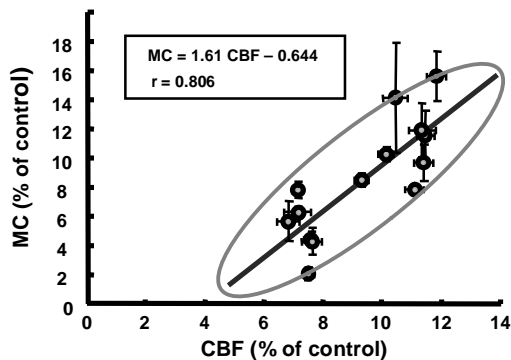


Fig.2 Correlation between mucociliary clearance (MC) and ciliary beat frequency (CBF). Data are expressed as the mean \pm S.E. of three to five independent experiments.

(2) 鼻腔内投与後の粉末製剤の鼻腔内挙動 MC 機能を保持したラット鼻腔内投与実験手法の確立：溶解性及び膜透過性が高く、定量的に鼻腔内投与ができれば 100% の吸収が予想される antipyrin の粉末を、考案した方法に従い投与した結果、bioavailability は約 100% となり、投与条件に問題のないことを確認した。したがって、粉末製剤をラット鼻腔内に定量的に投与する条件を次のように決定した。

- ・投与デバイスには、シリンジ先端に装着した三方活栓の先に、粉末を充填したピペットマン用チップを装着した装置を用いる。
- ・粉末製剤の投与質量は約 1 mg とする。
- ・噴霧時のシリンジ内圧縮空気量は 1 mL とする。
- ・投与時、ラット胸部を圧迫することで一時的に呼吸を止める。

蛍光微粒子を含む乳糖を鼻腔内に投与した後の微粒子の鼻腔内残存率は、投与 5 分後には約 50% にまで低下し、非線形最小二乗法プログラム (MULTI) による解析から、微粒子の消失は 2 相性を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。この結果は、溶液を投与した際の消失 (データ表示なし) よりも速く、粉末あるいは顆粒などの固形製剤は溶液製剤よりも短い時間で MC により速やかに鼻腔内からクリアされることを示唆しており、特に、溶解度が低く、膜透過性の低い薬物では、経鼻投与後の薬物吸収性が MC の影響を顕著に受ける可能性が示唆された。本検討により、投与された粉末製剤の鼻腔内動態が明らかとなり、鼻腔内投与型の粉末状製剤設計における重要な知見を得ることができた。

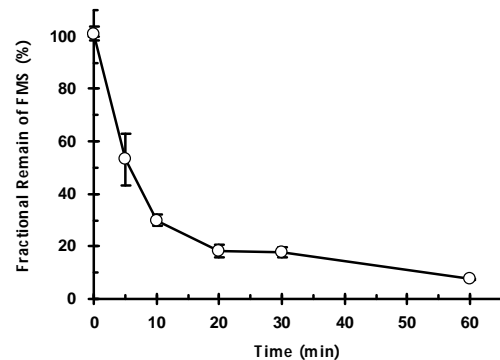


Fig. 3 Clearance profile of fluorescent microsphere (FMS) from rat nasal cavity. Results are expressed as the mean \pm S.E..

膜透過性が高く、水への溶解度が低い griseofulvin 粉末を経鼻投与した場合、血中濃度推移は 2 つのピークを示した (Fig. 4)。2 つ目のピークは、MC により咽頭へ排出された griseofulvin 粉末の消化管移行後の吸収によるものと考えられ、溶解速度が遅い薬物に特徴的な吸収パターンを観察することが

できた。

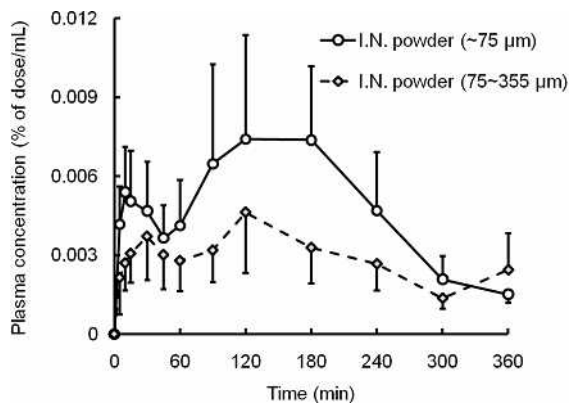


Fig. 4 Plasma concentration-time profiles of griseofulvin following nasal applications of powder formulations with different particle sizes to rats. Results are expressed as the mean \pm S.E..

Keys; I.N., intranasal

また、膜透過性が低く、水への溶解度が比較的高い acyclovir 粉末の経鼻投与では、溶液投与に比べて吸収率は低下したが、acyclovir を 10% 含有する顆粒の経鼻投与では、吸収率の増大が観察された (Fig. 5)。鼻腔内で溶解した薬物量に依存する結果であり、経鼻吸収における粉末投与量と吸収率の関係が評価できた。

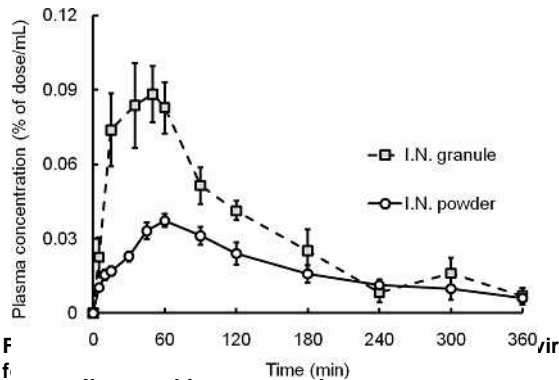


Fig. 5 Plasma concentration-time profiles of acyclovir following nasal applications of granule to rats. Results are expressed as the mean \pm S.E.. Keys; I.N., intranasal

得られた結果は、粉末製剤の鼻腔内投与後の吸収動態を明確にするものであり、本検討において確立した新規の実験手法を用いることにより初めて得られる情報である。経鼻投与を目的とした医薬品の粉末製剤設計にとって極めて有用な知見が得られる本評価方法の有用性を明らかにすることができた。

(3) 製剤添加物及び各種薬物による MC の変動と薬物吸収の関係

(1) で MC の低下を示した Propranolol (0.1 mM) 処理後のラット鼻腔に

norfloxacin を投与した場合、control 群 (propranolol 未処理群) に対して、吸収率が 1.45 倍に上昇した。MC の低下による norfloxacin の鼻腔内滞留性が延長した結果と考えられた。また同様に、terbutaline (1 mM) 処理後では MC が亢進するため、吸収率は約 50% に低下した (Fig. 6)。

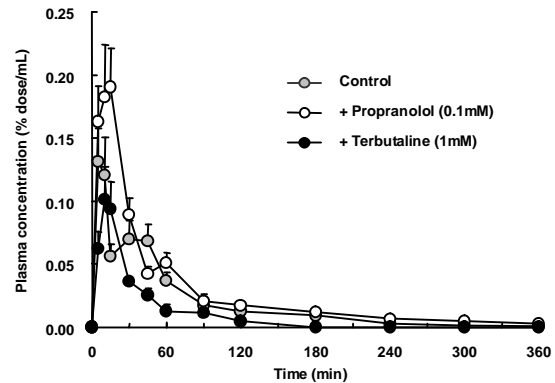


Fig. 6 Effect of treatment with propranolol and terbutaline on plasma concentration-time profiles of norfloxacin following nasal applications of solution to rats. Results are expressed as the mean \pm S.E.*

さらに繊毛細胞内エネルギーを枯渇させる DNP 処理後のラット鼻腔に蛍光微粒子を投与し、鼻腔内残存率の経時変化を確認したところ、DNP 処理群では、control 群に比較して蛍光微粒子の消失が遅延し、鼻腔内残存率が 50% に達する時間は約 1.8 倍に延長することが明らかとなった。同様の条件で鼻腔内を DNP 処理したラットに acyclovir 粉末を経鼻投与した結果、 C_{max} の上昇と T_{max} の延長が観察され、吸収率は約 1.2 倍に増大した (Fig. 7)。

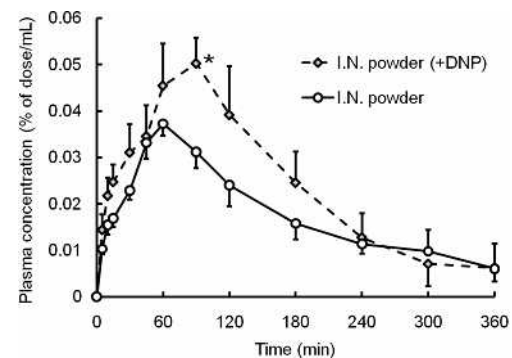


Fig. 7 Effect of the treatment with 2,4-dinitrophenol (DNP) on plasma concentration-time profiles of acyclovir following nasal applications of powder to rats. Results are expressed as the mean \pm S.E.*; $p < 0.05$, compared with control. Keys; I.N., intranasal

以上の結果から、溶液製剤及び粉末製剤の鼻腔内投与では、MC の低下により投与製剤の鼻腔内滞留時間が延長し、薬物の経鼻吸収

を増大させることが明らかとなった。MC の低下を制御することにより吸収性を改善できる可能性が示唆され、特に、投与後に溶解過程が必要な粉末製剤からの薬物吸収を改善する場合に、MC の制御が有効な手段の一つであることを見出すことができた。

(4) 薬物の細胞層透過性における組織間差の検討

各種薬物を用いて評価した EpiAirway® に対する膜透過性を Caco-2 透過性と比較した結果 (Table)、膜透過過程が細胞間隙経路を単純拡散で透過する [³H]-inulin、[¹⁴C]-mannitol、atenolol は、Caco-2 透過性に比べて高い膜透過性を示した。これは消化管に比べて鼻粘膜が leaky な構造であることと一致する結果と考えられる。また、経細胞経路で透過する sulfanilic acid、acyclovir は共に同程度の膜透過性を示したが、antipyrin のみ約 3 倍程度高い透過性を示した。原因は不明であるが、元来、antipyrin の透過性が高いため *in vivo* における吸収性に大きな影響はないと考えられる。Methotrexate では Caco-2 細胞に対して高い透過性を示した。Methotrexate は小腸上皮細胞基底膜側に存在する葉酸輸送系により血管側へ能動的に輸送されることが報告されている。EpiAirway® ではこの輸送系の発現が低いことが考えられる。これらの結果より、鼻粘膜からの吸収率評価では、細胞間隙を透過経路とする薬物に対して Caco-2 細胞では評価に相違が生じている可能性があり、今後、EpiAirway® による透過データを追加し、経鼻吸収性評価システムへ適用することで精度の改善が期待される。

Table Comparison of permeability of drugs across EpiAirway® and Caco-2 monolayer

Drugs	EpiAirway®		Caco-2	
	Papp(cm/s)*	s.e.**	Papp(cm/s)*	s.e.**
Atenolol	2.40	7.44	2.10	2.50
antipyrine	48.1	71.5	16.8	13.0
Acyclovir	2.99	7.25	1.37	0.72
Sulfanilic acid	2.78	4.88	3.68	3.96
Methotrexate	1.26	1.64	5.95	2.17
Inulin	2.83	2.02	0.34	0.09
Mannitol	4.93	9.85	0.91	0.14

*: x 10⁶ ** : x 10⁷

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

・研究の方法・結果(1)(3)につき、投稿準備中

[学会発表](計9件)

井上大輔、ほか鼻腔内繊毛運動評価系の確率及び繊毛運動と経鼻吸収性との関係、日本薬物動態学会 第24回年会、2009年11月27日、国立京都国際会館(京都)
 龍田涼佑、粉末製剤からの *in vivo* 薬物経鼻吸収性評価システムの開発、日本薬物動態学会 第24回年会、2009年11月27日、国立京都国際会館(京都)

古林呂之、Establishment of kinetic model for estimating the drug absorption from viscous formulation following nasal application.、2009 AAPS Annual Meeting and Exposition、2009年11月12日、Los Angeles Convention Center (Los Angeles, CA, USA)

龍田涼佑、Evaluation on the *in vivo* nasal absorption of the drug from a dry powder formulation、2009 AAPS Annual Meeting and Exposition、2009年11月12日、Los Angeles Convention Center (Los Angeles, CA, USA)

井上大輔、Establishment and characterization of an *in vitro* evaluation system on the nasal mucociliary clearance ~ Correlation between mucociliary clearance and ciliary beat frequency ~、2009 AAPS Annual Meeting and Exposition、2009年11月9日、Los Angeles Convention Center (Los Angeles, CA, USA)

古林呂之、薬物の経鼻吸収性評価システムの開発 ~ 粘性製剤からの薬物吸収性評価 ~、第25回日本DDS学会、2009年7月3日、東京ドームホテル(東京)

井上大輔、Establishment and characterization of an *in vitro* evaluation system on the nasal mucociliary clearance、2008 AAPS Annual Meeting and Exposition、2008年11月18日、Georgia World Congress Center (Atlanta, GA, USA)

古林呂之、Influence of formulation viscosity on drug absorption following nasal application in rats.、2008 AAPS Annual Meeting and Exposition、2008年11月17日、Georgia World Congress Center (Atlanta, GA, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古林 呂之 (FURUBAYASHI TOMOYUKI)

就実大学・薬学部・講師

研究者番号：00399156

(2) 研究協力者

井上 大輔 (INOUE DAISUKE)

岡山大学・大学院自然科学研究科・大学院生 (H20)

龍田 涼佑 (TATSUTA RYOUSUKE)

岡山大学・大学院自然科学研究科・大学院生