

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460201

研究課題名(和文) 頸部リンパ節発症疾病に対する直接的薬物治療を目的とした経鼻送達ルートに関する研究

研究課題名(英文) Study on the nasal delivery route for the medical treatment for the cervical lymph node disease

研究代表者

古林 呂之 (FURUBAYASHI, TOMOYUKI)

就実大学・薬学部・准教授

研究者番号：00399156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：頸部リンパ節(CLN)発症疾病治療に対する経鼻ルートの優位性を明らかにする為、抗がん剤経鼻投与後のCLN移行性及び舌癌マウスのCLN転移抑制効果の検討を行った。モデル薬物の全てにおいて、鼻腔内投与後のCLN移行性は静脈内投与に比較して高く、特にmethotrexate及びetoposideでは、投与後90分までのCLN推移から算出した移行量の比は2.6及び1.7倍となった。両薬物を、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を舌部に移植したCLN癌転移モデルマウスの鼻腔内及び腹腔内に反復投与した結果、MTXでは経鼻投与群においてCLNへの転移抑制効果が25%向上し、経鼻ルートの優位性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The cervical lymph node (CLN) receives the metastasis of the cancer and the inflammation by bacterial or virus infection arising in the head, nose, ear and throat. Our previous investigations suggested that nasal administration to rats enable the direct delivery of some model drugs to CLN. In this study, we investigated the direct transport of some additional model drugs to CLN through the nasal mucosa of mice in order to clarify the physicochemical property of drug suitable for the direct transport to CLN, and the inhibitory effect of the antitumor drug applied nasally on the cancer metastasis to the CLN using an orthotropic implantation mice model.

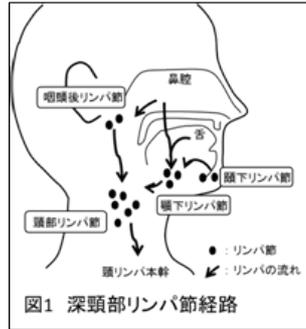
Intranasal administration is useful for the efficient delivery of drugs such as MTX to the CLN. MTX concentrations after nasal administration were increased in a dose-dependent manner. These findings suggest the feasibility of the effective therapy for the CLN metastasis by nasal administration of antitumor drugs.

研究分野：医療系薬学

キーワード：経鼻吸収 頸部リンパ節 リンパ節転移 鼻腔内投与

1. 研究開始当初の背景

頸部には、頭頸部や鼻腔、口腔からの細菌やウイルスなどの病原体の侵入に備え、リンパ網が発達しており、多くのリンパ節が存在する。特に、頸部リンパ節 (CLN: cervical lymph node) は、頭、口腔、舌、鼻腔、咽頭を上流として各所のリンパが集まる部位であり (図1)、頸リンパ本幹へと繋がることから、耳鼻咽喉・頭頸部領域において臨床的に最も重要なリンパ節群とされている。



CLN腫脹の原因は、耳鼻咽喉、口腔、歯科領域を上流とした感染性の炎症であることがほとんどであるが、腫脹するリンパ節群は原発病変部によりおおそ決まっているため、治療対象が特定されやすい部位でもある。また、CLN群は、耳鼻咽喉及び隣接領域に発生した癌の転移先ともなり、外科的治療では原発巣の切除のみならず、転移のない場合にも後発性転移を懸念してCLN群の郭清術が実施される場合も多い。しかし、リンパ節郭清と予後の関係については十分に明らかにされておらず、郭清の賛否は分かれている。化学療法による治療も実施されるが、全身循環系からのCLNへの薬物送達効率は低く、また、全身への副作用発現を覚悟しなければならない。薬物をCLNに直接送達することができれば、化学療法における副作用の軽減及び治療成績の向上が期待できる。さらに、CLNへは、頸下リンパ節及び咽頭後リンパ節からのリンパが集まることから、薬物を鼻腔からCLNへ流すことにより、CLNに起こる上流域からの感染による炎症に対する治療も可能になると考えられる。

我が国の口腔・咽頭癌の発生率と死亡率は年々増加する傾向にあり、罹患患者数は、2002年には1万人を超え、2009年には10,915人となった。また、2009年の死亡数は6546人である。肺がんや、胃がんなどに比べると低い数値ではあるが、この数字は将来更に増加すると予測されている⁶⁾。口腔・咽頭癌の予後を決定する因子としてCLNへの転移が重要であり、治療では原発巣の外科的除去に加え、CLN転移を懸念して根治的頸部郭清術が施されることも多いが、郭清と予後の関係性は十分とは言えず、実施に対する賛否は分かれている。また、郭清術後の患者のQOLは一般的に著しく低い。CLNを含めた頭頸部癌の治療戦略として、癌特異ペプチドや α -galactosylceramideのパルス投与により免疫を活性化させた抗原提示細胞を下鼻甲介粘膜下に投与し、CLN内で特定の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導することにより治療する臨床試験が千葉大学医学部のグ

ループを中心に進められているが、治療成績が十分であるとの報告には至っていない。CTL療法に加え、薬物による治療法が併用できればより高い治療成績が得られると考えている。また、本研究は癌治療だけでなく、感染による炎症性疾患やその他CLNに発症する疾患の治療対象にできることから応用性は広い。本研究課題が発展すれば、薬物の移行性が悪い為に外科的手術に依存している疾患治療や合併症を抑えながら自然治療を待つ治療の根本的な解決方法となり、患者のQOLの向上に大いに貢献できる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、鼻腔内投与後の薬物の吸収動態を明らかにし、薬物の物理化学的性質から鼻腔内投与後の薬物吸収を予測するためのシステム構築及び鼻腔内薬物吸収動態制御を目的として研究を推進してきた。その中で、鼻腔内に投与した薬物が鼻粘膜透過後に直接的にCLNへ移行することを明らかにし、CLNへの直接的な薬物治療の可能性を見出した。鼻腔内投与により薬物をCLNに送達可能であること、また、転移癌に対する治療への期待が望めることから、より多種の抗癌剤について検討を進める価値があると考えられる。さらに、CLNには種々の感染による炎症性の疾患があり、これら疾患に対する薬物治療への期待もできる。本研究では、種々の物理化学的性質を有する薬物について鼻腔内投与によるCLNへの薬物送達を調査し、その結果を総合的に解析することで、薬物の鼻粘膜吸収過程におけるリンパ管移行の選択メカニズムを明らかにし、CLNへの薬物の効率的、選択的送達を可能にすると共に、CLNに起こる種々の疾患に対する直接的な治療及び全身性の副作用の軽減を実現する治療法確立の足掛かりにすることを目指している。

3. 研究の方法

(1) CLN中薬物濃度推移の速度論的解析：
ジエチルエーテル麻醉下、Wister系雄性ラット(200~250g)の左大腿静脈に採血用カニューレ挿管を施した後、リン酸緩衝生理食塩液で溶解したmethotrexate(MTX)を鼻腔内に5 μ L(1mg/mL)及び静脈内に250 μ L(20 μ g/mL)を投与した。薬物投与後はラットをボルマングージに拘束し、覚醒下、経時的に採血を行った。採取した血液から遠心分離により血漿を分取し、除タンパク処理を施した後、蒸発乾固したものを血漿試料とした。また、投与一定時間後に頸部筋層を剥離して左右リンパ節を摘出し、各々の湿質量を測定した。摘出リンパ節をメタノール中でホモジナイズし、遠心分離により得た上清を蒸発乾固したものをCLN試料とした。血漿試料及びCLN試料をLC/MS移動相(50mMギ酸アンモニウム:メタノール=7:3)に溶解し、LC/MS(Agilent 1100 Series LC/MSD, Agilent)

により定量した。CLN 移行量の算出では、以前に測定したリンパ組織 1 g あたりの血管内体積 ($1047 \pm 7.3 \mu\text{L/g tissue}$, $n=16$) よりリンパ節中血管内 MTX 量を算出し、実測値から差し引くことで真のリンパ移行量を求めた。速度論的解析：実測値をもとに非線形速度論解析プログラム WinNonlin により、リンパ節移行に関する PK-パラメータの解析を行った。

(2) 各種モデル薬物の CLN 移行性の比較：モデル薬物には、azithromycin (AZM)、irinotecan (IRT)、etoposide (ETP) 及び saquinavir (SQV) を選択した。30% urethane 麻酔下、ddY 系雄性マウス (18~23 g) にリン酸緩衝生理食塩液で溶解した AZM 及び IRT (各 $5.00 \mu\text{g}$)、ETP 及び SQV (各 $3.75 \mu\text{g}$) を鼻腔内及び静脈内に投与した。ETP 及び SQV の投与液には溶解補助剤として polyethylene glycol 400 を鼻腔内投与では 20%、静脈内投与では 5% 添加した。投与後、経時的に採取した血液から遠心分離により血漿を分取し、除タンパク処理を施した後、蒸発乾固したものを血漿試料とした。また、投与一定時間後に頸部筋層を剥離して左右 CLN を摘出し、各々の湿質量を測定した。摘出 CLN をメタノール中でホモジナイズし、遠心分離により得た上清を蒸発乾固したものを CLN 試料とした。血漿試料及び CLN 試料を LC/MS 移動相 (50 mM ギ酸アンモニウム：メタノール = 7:3) に溶解し、LC/MS (Agilent 1100 Series LC/MSD, Agilent) により定量した。CLN 移行量の算出ではマウスの尾静脈に Fluorescein isothiocyanate-dextran 100 のリン酸緩衝溶液を急速静注した 2 分後の CLN 中及び血漿中蛍光強度から求めた、CLN 1 g あたりの血管体積 ($0.10 \pm 0.01 \text{ mL/g tissue}$, $n=6$) より CLN 中血管内 MTX 量を算出し、実測値から差し引くことで真の CLM 移行量を求めた。

(3) 舌癌由来 CLN 転移抑制効果における鼻腔内投与の有効性：ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (OSC-19) を舌部に移植した BALB/c スードマウスの鼻腔内及び腹腔内に MTX を反復投与し、OSC-19 の CLN への転移を病理診断により評価し、投与経路間での CLN 転移数の割合の差を抑制の指標とした。なお、MTX は (1) の結果で得られた CLN 内濃度推移の速度論パラメータから、OSC-19 移植後 3 日目から 3 日ごとに 1 回 $18 \mu\text{g}$ の反復投与とした。21 日目に CLN を採取し、採取した CLN は 4% ホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、切片作成後、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色により病理診断用標本とした。

4. 研究成果

(1) CLN 中薬物濃度推移の速度論的解析：静脈内投与後 10 分までの高い血中濃度状態において CLN 中 MTX 濃度は経鼻投与の方が高く、また、CLN 中濃度推移の立ち上がりの傾きからも静脈内投与に比べて経鼻投与による優位性が観察された (図 2)。さらに、両投与群の血中及び CLN 中濃度推移から算

出した投与後 180 分までの血中濃度時間曲線下面積 (AUC) を比較すると、血中濃度基準では同程度であるが、CLN 中濃度基準では経鼻投与の方が静脈内投与よりも約 2.6 倍高くなり、経鼻投与の優位性が示された。さらに、図 3 に示す鼻腔内投与後の吸収及び CLN 移行モデルに基づき、in vivo 実験で得られた値を用いて WinNonlin による解析を行った結果、鼻粘膜を介する CLN 移行定数 (k_N) は全身循環血を介した CLN 移行定数 (k_p) よりも大きくなること示された (図 4)。CLN への MTX の送達ルートとしての経鼻投与の優位性を明らかになった。また k_N より、CLN 中 MTX の半減期を計算すると 72.9 min となり、全身循環血中からの消失半減期約 9.4 min に比べて長いことから、経鼻投与により、全身循環血中の MTX 濃度の極端な上昇を抑えながら CLN 節選択的に MTX を送達でき、さらに、より長い時間 MTX を作用させることができる可能性が示唆された。

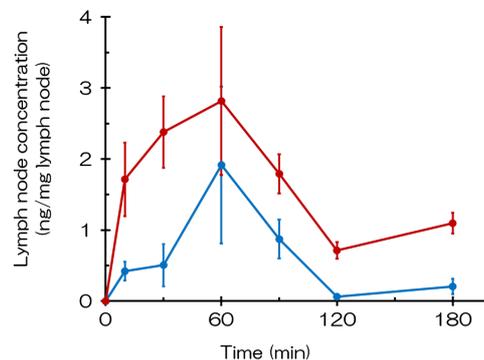
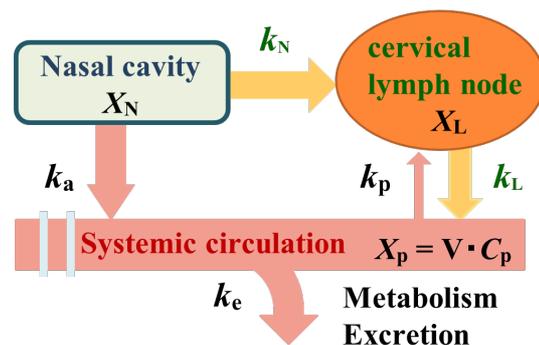


図2 MTXの静脈内及び鼻腔内投与後の頸部リンパ節移行推移



Mass Balance式

$$\text{血液: } \frac{dX_p}{dt} = V \cdot \frac{dC_p}{dt} = k_L \cdot X_L + k_a \cdot X_N - (k_e + k_p) X_p$$

$$\text{リンパ節: } \frac{dX_L}{dt} = k_N \cdot X_N + k_p \cdot X_p - k_L \cdot X_L$$

$$\text{鼻腔: } \frac{dX_N}{dt} = -(k_e + k_p) X_p$$

※初期条件: $t=0$ で、 $X_N = \text{dose}$ (投与量)、 $X_p = X_L = 0$

V : distribution volume (mL) k_N : Nasal-CLN constant (min^{-1})
 k_e : elimination constant (min^{-1}) k_L : CLN-systemic constant (min^{-1})
 k_a : absorption constant (min^{-1}) k_p : Systemic-CLN constant (min^{-1})

図3 MTX鼻腔内後の吸収及びCLN移行モデルとPKパラメータ

表1 WinNonlinによるPKパラメータの解析結果

| Parameters | min ⁻¹ ± S.E. |
|------------|--------------------------|
| k_e | 0.0638 ± 0 |
| k_a | 0.0951 ± 0.0182 |
| k_N | 0.0058 ± 0.0010 |
| k_L | 0.0075 ± 0.0022 |
| k_D | 0.00035 ± 0.00034 |

(2) 各種モデル薬物のCLN移行性の比較：
 静脈内及び鼻腔内投与後の血漿中濃度推移から算出したAUCより、ETP、SQV及びAZMの鼻腔内投与後のバイオアベイラビリティは、それぞれ、0.45、0.54及び0.94となったが、IRTでは鼻腔内投与後の血漿中濃度は検出限界以下であった。(図4、表2)

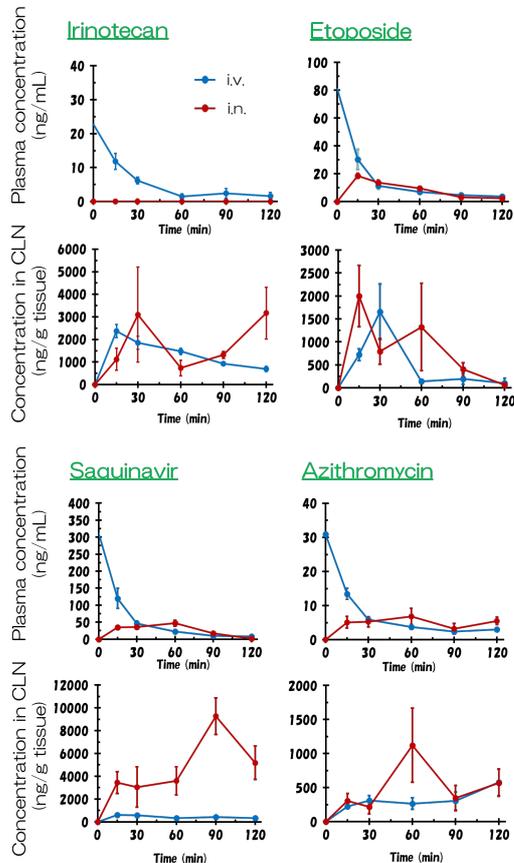


図4 静脈内及び鼻腔内投与後のモデル薬物の血漿中濃度及びCLN内濃度

表2 静脈内及び鼻腔内投与後の血中及びリンパ節中濃度時間曲線下面積(AUC_{0-∞}及びAUC₀₋₁₂₀)の比較

| Drugs | Route | AUC _{0-∞} (μg·min/mL) | F | AUC ₀₋₁₂₀ (μg·min/g CLN) | AUC比(R) |
|-------|-------|--------------------------------|-------|-------------------------------------|---------|
| IRT | I.V. | 0.685 | - | 159.7 | 1.23 |
| | I.N. | - | - | 195.8 | |
| ETP | I.V. | 7.55 | 0.448 | 59.63 | 1.68 |
| | I.N. | 3.38 | | 100.5 | |
| SQV | I.V. | 2.24 | 0.544 | 49.75 | 11.7 |
| | I.N. | 1.22 | | 583.3 | |
| AZM | I.V. | 1.02 | 0.941 | 36.98 | 1.72 |
| | I.N. | 0.955 | | 62.00 | |

全てのモデル薬物において、静脈内及び鼻

腔内投与後にCLN中への出現が認められ(図4) 投与後120分までのCLN中濃度時間曲線下面積AUC_Lの比(R)は1以上の値を示し(表2) 特にSQVでは、R値が極めて高く、良好なCLN移行が観察され、CLN送達における経鼻ルートの顕著な優位性が示された。

IRTの鼻腔内投与では、血漿中にIRTは検出されなかった。IRTの血中からの速い消失が要因として挙げられる。一方で、CLN中には静脈内投与時よりも高い値のIRTが検出されたことは、鼻粘膜を介したCLNへの直接的なルートの存在を裏付ける結果と考えられた。

(3) 舌癌由来CLN転移抑制効果における鼻腔内投与の有効性：OSC-19を移植した舌癌転移モデルマウスにMTXを経鼻及び腹腔内投与した。腹腔内投与群では採取CLN8個中7個にOSC-19の転移が確認された。一方、鼻腔内投与群では採取CLN8個中6個にOSC-19の転移が確認され、腹腔内投与に対して14%の抑制率となった。両投与群間で有意な差は認められなかったが、投与量の増量やスケジュールの変更により改善が見込まれる結果であった。

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)

[学会発表](計9件)

1) 古林呂之、比嘉海夢、田中晶子、草森浩輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、井上大輔 経鼻ルートを介したモデル薬物の頸部リンパ節移行性及びがん転移抑制性
 日本薬学会第136年会 平成28年3月27日~29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区みなとみらい)

2) Tomoyuki Furubayashi, Akiko Tanaka, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto, Daisuke Inoue
 Comparison of the Direct Transport of Some Model Drugs to Cervical Lymph Nodes through Nasal Mucosa in Mice III
 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition 2015, October 25~29th 2015, Orange County Convention Center (Orlando, FL, USA.)

3) 遠藤友里、井上大輔、草森浩輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、古林呂之 経鼻ルートを介した各種モデル薬物のリンパ節移行性の比較
 日本薬学会第135年会 平成27年3月26日~28日、神戸学院大学・兵庫医療大学(兵庫県神戸市中央区港島)

4) Tomoyuki Furubayashi, Endo Yuri, Inoue Daisuke, Shingaki Tomotaka, Kusamori Kosuke,

Katsumi Hidemasa, Sakane Toshiyasu, Yamamoto Akira, Niwa Toshiro
American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition 2014, November 2~6th 2014, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA.)

5) 古林呂之、井上大輔、正子裕太、遠藤友里、新垣友隆、草森浩輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、丹羽俊朗
経鼻ルートを介した各種モデル薬物の頸部リンパ節移行性の比較(2)
第30回日本DDS学会学術集会 平成26年7月30日~31日、慶應義塾大学薬学部(東京都港区芝公園)

6) 古林呂之、井上大輔、正子裕太、遠藤友里、新垣友隆、草森浩輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、丹羽俊朗
経鼻ルートを介した各種モデル薬物の頸部リンパ節移行性の比較
日本薬剤学会第29回年会 平成26年5月20日~22日、ソニックシティービル(埼玉県さいたま市大宮区桜木町)

7) Tomoyuki Furubayashi, Yuta Masago, Daisuke Inoue, Tomotaka Shingaki, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto, Yutaka Higashi
Pharmacokinetic Analysis on the Direct Transport of Methotrexate (MTX) to the Cervical Lymph Node through Nasal Mucosa of Rats.
American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition 2013, November 10~14th 2013, Henly B. Gonzales Convention Center (San Antonio, TX, USA.)

8) 正子裕太、古林呂之、新垣友隆、勝見英正、坂根稔康、山本昌、丹羽俊朗
薬物の頸部リンパ節移行における経鼻ルートの有用性
第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 平成25年10月26日~27日、松山大学(愛媛県松山市文京)

9) 古林呂之、正子裕太、田中智也、赤木由佳、井上大輔、新垣友隆、勝見英正、坂根稔康、山本昌、東豊
Methotrexate の頸部リンパ節送達に関する速度論的アプローチ(2)
第29回日本DDS学会学術集会 平成25年7月4日~5日、京都テルサ(京都府京都市南区東九条下殿田町)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古林 呂之(FURUBAYASHI TOMOYUKI)
就実大学・薬学部・准教授
研究者番号：00399156

(3) 連携研究者

坂根 稔康(SAKANE TOSHIYASU)
京都薬科大学・准教授
研究者番号：50215638