

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590161

研究課題名（和文）薬物の経鼻吸収メカニズムの解明とリンパ移行性の最適化に関する研究

研究課題名（英文）Study of the mechanism of drug nasal absorption and optimization of the drug delivery to the cervical lymph node through the nasal membrane.

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

研究成果の概要（和文）：薬物の経鼻吸収性と mucociliary clearance の関係を明らかにし、経鼻吸収性の改善のために投与製剤の鼻腔からの排出を抑える対応が有効であることを示した。その一つとして粘膜付着性添加剤を含む粉末状製剤化は有効であるが、膜透過性及び溶解速度が低い薬物では逆に吸収が低下することもあり、添加剤利用の条件設定の重要性を明らかにすることができた。さらに、鼻腔内投与により methotrexate が頸部リンパ節へ送達されることを明らかにし、リンパ節への癌転移などの治療の可能性を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：It was clarified that the relation between the intranasal absorption and mucociliary clearance of the drug, and shown that the efficacy of suppressing the clear from the nasal cavity of a formulation for the improvement of the intranasal drug absorption. Though preparing the powder formulation including the mucous membrane adhesiveness additive was effective as a means of improving the intranasal drug absorption, it was cleared that the intranasal absorption of the drug with low permeability and low dissolution rate might become low oppositely. Thus, it was shown the importance of the select of the additive. In addition, it was clarified that methotrexate was delivered to the cervical lymph node after the intranasal administration, and was able to find the possibility of the treatment such as the cancer metastasis to the cervical lymph node.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

鼻腔内投与型製剤は、注射のような痛みを伴わず、投与方法が比較的簡便なことから、

嚥下困難な高齢患者、消化器疾患や寝たきりなど、薬物の経口服用が極めて困難な高度要介護患者に対して、介護者による簡便な反復投与が可能である。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意義は大きいと考えられる。一方、小児、特に乳幼児に目を向けると、苦みや不快な味、違和感などから服用直後の吐き出しや、服用を嫌がって暴れるために必要量が服用できないという、保護者が頭を痛めている話が多く聞かれる。特に抗菌薬など、コンプライアンスの低下が問題になるケースもあるため、服用の補助としてゼリー剤の使用や、ジュースに混ぜるなどの対応が試みられているが、その効果は十分ではないのが現状である。乳幼児に対して適正に薬物投与するための、いわゆる“子育て世代”を支援する一助としても鼻腔内投与型製剤は経口製剤に替わる剤形として期待できる。将来、鼻腔内投与が広く一般に受け入れられ、上記のような形で活用されるためにも、今後、より多くの鼻腔内投与型医薬品が上市され、その技術と有用性が認知される必要がある。

研究代表者は、これまでに、鼻腔内投与型医薬品の開発を支援する『経鼻吸収性評価システム（評価システム）』の開発及び鼻腔内投与後の薬物吸収動態の解明とその制御を主眼に研究を進め、ラット鼻腔内投与後の薬物吸収率とヒト大腸癌由来細胞（Caco-2）層に対する薬物の膜透過性との相関から評価システムを構築し、薬物の鼻腔内投与の可能性を判断するツールとしてその有用性を示してきた（Furubayashi, T. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1007, 2007, Furubayashi, T. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 608, 2007）。平成 20 年度には、科学研究費補助金若手研究（B）の交付を受け、鼻腔内投与後の薬物吸収動態に影響を及ぼす因子、つまり薬物吸収率のバラツキの原因となる鼻腔内の繊毛細胞による非特異的異物排除機能 mucociliary clearance（MC）について、生体側と製剤側の両面から詳細に検討した。その結果、生体に対してより安全で効果的な投与条件など、経鼻吸収における問題を解決する糸口を見出すに至った。また、ヒト気道上皮由来の培養細胞を用いて、薬物の膜透過性を Caco-2 細胞層透過性と比較した結果、輸送担体を介した薬物の透過性に相違を認めた。鼻粘膜と消化管に発現している輸送担体が異なることは、両組織における報告から明らかであり（Bremer, S. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **206**, 137, 1992, Wioland, M.A. *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 1215, 2000, Perloff, M.D. *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* **42**, 1269, 2002）、担体輸送される薬物の膜透過性の相違は想定内であった。尤も、経鼻吸収性の評価には呼吸器由来の細胞を用いることが望ましいが、ヒト正常呼吸器由来の培養

細胞はなく、また、評価に用いたヒト気道上皮培養細胞の実験系は比較的新しく（Chemuturi, N., V. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 1976, 2005）、現在、米国企業が透過実験キットとして培養済みの細胞を米国内試験機関に送付する体系をとっているため、汎用性が低い。これまでに蓄積されているデータ数や今後の実験の利便性を考慮し、汎用性のある評価システムとするために Caco-2 細胞層を利用してきたが、呼吸器粘膜透過性との相違についてはまだ検討が不十分である。組織間の透過性の相違を十分に検討し、その差を解釈するデータを評価システムに反映できれば、より精度の高いシステムになると考えている。

経鼻吸収については、ある種の薬物が鼻腔内投与後に鼻粘膜下リンパ管に移行し、下流の頸部リンパ節へ移行することが知られている。頸部リンパ節は、頭、口腔、舌、鼻腔、咽頭を上流として浅頸部及び深頸部リンパ節に分類され、特に深頸部リンパ節は各所リンパが集合するため、上流組織に発症した炎症や癌の転移部位となる。研究代表者が推進してきた鼻腔内薬物吸収動態制御の研究成果に加え、吸収過程におけるリンパ管移行の選択メカニズムが明らかになれば、頸部リンパ節への薬物の効率的、選択的送達が可能となり、癌の転移抑制又はリンパ節転移に対する直接的な治療と副作用の軽減につながると期待できる。

薬物の経鼻吸収は、ペプチド性医薬品など経口投与が困難な医薬品の投与経路として、また、上述したリンパ管及び脳脊髄液への移行経路（T. Shingaki. *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **377**, 85, 2009）として期待され、一時期、盛んに研究されていたが、現在、本邦ではこれらを対象とした研究は非常に少ない。期待した程の薬物移行や薬理効果が得られず、断念された結果と考えられるが、これまでの研究の焦点は薬物の移行量や薬理効果を評価することに置かれていたために、鼻腔内投与後の薬物吸収動態が十分に解明されてこなかったことも一因と考えられる。一方、欧米では、近年ますます研究が盛んであり、経鼻投与後の脳送達や経鼻ワクチン開発に関する研究も多くみられるが、いずれも対象薬物のみに限られた部分的な議論であり、多くの薬物に対して鼻腔内投与剤形の最適化や経鼻吸収性の制御を可能にする系統的な成果に至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、経鼻吸収過程における薬物及び製剤と輸送担体の関係を、培養細胞を用いて検討し、薬物経鼻吸収性評価システムの改良と薬物の経鼻吸収制御法の確立を目的と

している。また、各種薬物、製剤添加物及び剤形が MC に及ぼす影響を調査し、薬物の経鼻吸収性との関係性を明らかにする。さらに、鼻粘膜透過後のリンパ管移行選択性と製剤特性の関係を明らかにし、鼻粘膜を介した頸部リンパ節へのより選択的、効率的な薬物送達の実現を目指す。

3. 研究の方法

1) 薬物のヒト気道上皮培養細胞層透過性における排泄トランスポーターの影響：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®, Mat Tek 社) を用いて薬物の膜透過性を評価した。実験には、P-glycoprotein (p-gp) の基質である talinolol (TLL) 及び verapamil (VPM) を用い、30-60 分の粘膜側から漿膜側 (A to B) 及び漿膜側から粘膜側 (B to A) への透過を、LC-MS/MS (PE SCIEX API 3000, Agilent Technologies, B oeblingen, Germany) により定量し、両方向への透過速度から膜透過性 (P_{appA-B} 、 P_{appB-A}) 及び p-gp などの排出トランスポーターの寄与の基準となる efflux ratio (P_{appB-A}/P_{appA-B}) を算出した。

2) MC の変動と薬物経鼻吸収性：鼻粘膜繊毛細胞の繊毛運動による MC の変動と nolfroxasin (NFX) の経鼻吸収性の関係について検討した。MC を低下させる propranolol (PPL) 及び atenolol (ATL)、MC を亢進させる terbutaline (TBL) 及び salbutamol (SBM) を鼻腔に前投与したラット (Wistar、雄性、8-10 週齢) を用いて、NFX の *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 NFX は蛍光検出器を備えた HPLC (島津製作所) により定量した。

3) 粉末状製剤からの薬物溶出性及び膜透過性評価：経鼻吸収量の増大が期待できる粉末製剤に関して、鼻粘膜上の少量の水分に対する粉末製剤からの薬物溶出性と生体膜透過の関係性を明らかにするための *in vitro* 評価方法についての検討を行った。

製剤添加物の水分保持能：遠心チューブに装着したフィルター (孔径 0.22 μm) 上に製剤添加物 (乳糖、デキストラン、ヒプロメロース、CMC-Na) を 20 mg のせ、リン酸緩衝液 (pH7.4) 400 μL を加えて遠心分離により緩衝液を分離した。添加液量と分離後の液量の差から添加物に保持された水分量を算出した。

***In vitro* 膜透過実験**：定法により作成した MDCK 細胞層を用いた。試験液で馴化した後、試験液を除去した状態の粘膜側に acyclovir (ACV) 原末と製剤添加物の混合粉末を直接添加し、経時的な漿膜側への ACV 移行量を評価した。

4) 鼻粘膜を介した methotrexate の頸部リンパ節移行性評価：Diethyl ether 麻酔下、Wistar ラットの静脈内及び鼻腔内に methotrexate (MTX) のリン酸緩衝液を投与した。静脈内及び鼻腔内への投与量は、投与後の血中濃度時間曲線下面積 (AUC) が同程度となるよう、それぞれ 0.25 mg/kg 及び 0.05 mg/rat とした。また、高用量条件として、鼻灌流実験及び静脈内持続注入実験を行った。灌流実験では、MTX のリン酸緩衝液 (1mg/mL) 0.25 mL を 0.1 mL/min の速度で鼻腔内灌流し、持続注入では、MTX のリン酸緩衝液 (0.15 mg/mL) 0.3 mL を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で後肢大腿静脈内に注入した。30 分経過後、左右頸部のリンパ節を採取した。リンパ節中 MTX は、リンパ節を methanol で抽出し、蒸発乾固後に移動相で再溶解したものを LC/MS で定量した。リンパ節中の血管内 MTX は、他の実験で求めた係数により補正した。

5) 頸部リンパ節への癌転移抑制における経鼻ルートへの有用性評価：舌癌マウスの CLN への癌転移抑制における経鼻ルートへの有用性を明らかにするために、舌癌モデルの作成及び抗腫瘍薬 methotrexate (MTX) の鼻腔内投与時の CLN 癌転移抑制効果を評価した。**頸部リンパ節転移癌モデルの作成**：ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 (HSC-2) 及びヒト舌癌由来細胞株 (OSC-19) は、10% 牛胎児血清を加えたイーグル最小必須培地で CO₂ インキュベータ内で継代培養し、移植時には 8×10^6 cells/mL の細胞懸濁液として、その 0.025 mL を 5 週齢のヌードマウス (雌、BALB/c nu/nu) の舌に移植した。移植 4 週後の舌部への生着及び CLN への転移を組織学的に評価した。

MTX 鼻腔内投与による CLN への癌転移抑制効果の評価：上記のモデル性確認の結果から、頸部リンパ節転移モデルの作成には OSC-19 を用いた。OSC-19 は、ヌードマウスの舌部へ移植後、3~4 日で舌部に生着し、1 週間で浸潤が始まり、3 週間後には 80~90% のマウスに CLN への転移が認められることが明らかにされている (Kawashiri S. *et al.*, *Eur J Cancer B Oral Oncol.*, 31, 216, 1995)。また、MTX の投与は、成人では 5~10 mg/day を週に 3~6 回注射する。これらを元にモデルマウスへの投与条件は、投与量は体重によるスケールダウンをして鼻腔内に 18 μg を OSC-19 移植 3 日後から、5, 7, 11, 13, 15, 18, 20 日目に 1 日 1 回とした。また、対照として腹腔内に同様の用量を同じタイミングで投与した。

4. 研究成果

1) 薬物のヒト気道上皮培養細胞層透過性における排泄トランスポーターの影響：ヒト気

道上皮細胞層 (EpiAirway™) に対する透過性を評価するために、試験を Absorption system 社 (米国) に委託した。P-glycoprotein (P-gp) の基質薬物である TLL の efflux ratio は 20.7 となり、EpiAirway™ の P-gp による輸送系の存在が示された。一方、VPM の efflux ratio は 1.37 と低く、P-gp による輸送はほとんど示されなかった。VPM については実験に用いる濃度により P-gp の影響が示されない場合があるとの報告もある。しかし、今回の実験条件はそれを考慮して設定した濃度条件であり、EpiAirway™ の P-gp 発現の程度が低いことを示す結果とも考えられる。詳細については、今後の検討で明らかにできればと考えている。以上、排出輸送担基質薬物の細胞層透過性の絶対値には差があるものの、透過機構には EpiAirway と Caco-2 細胞層に類似性があり、P-gp 基質薬物の気道上皮層に対する膜透過を Caco-2 で代替できる可能性を見出すことができた。

2) MC の変動と薬物経鼻吸収性：血漿中濃度推移より算出した NFX の bioavailability (BA) は、各 MC 変動薬物の作用に応じた変化を示し、MC による排出速度の上昇に伴って BA が低下し、逆に排出速度の低下に伴い BA が上昇することが明らかとなった。このことは、MC の変動により、NFX の鼻腔内滞留性が変化し、その結果として、NFX の BA が変動することを明確に示しており、経鼻投与後の *in vivo* 薬物吸収が鼻腔内 MC と密接に関連していることが明らかとなった。特に粘膜透過性の低い薬物や粉末投与時に溶出の遅い薬物では BA の大きな変動に繋がると考えられ、経鼻吸収性評価において、MC に対する主薬の作用のみならず、製剤添加物などの影響を考慮することの重要性を示す結果と考えられる。

3) 粉末状製剤からの薬物溶出性及び膜透過性評価：溶解性の高い乳糖では水分が保持されなかったが、デキストランやヒプロメロース、CMC-Na では緩衝液の保持能は高かった。また、ACV を高分子添加物と混合した場合に ACV の膜透過が低下し、製剤添加物の水分保持能と一定の関係性が示唆された。粘性を示す高分子はその付着性により MC による鼻腔からの排泄を遅延させると考えられるが、粉末状製剤の薬物吸収において主薬の溶出性に影響を与えることがあり、添加物によっては投与した製剤の鼻腔内滞留性が延長しても、必ずしも吸収性が向上するとは限らないことを示す結果と考えられる。

4) 鼻粘膜を介した methotrexate の頸部リンパ節移行性評価：MTX のリン酸緩衝溶液をラット鼻腔内に灌流投与した後の MTX の頸部リンパ節への移行量は、点滴静注投与後の移行性に比べて有意に高くなることが示された。また、MTX のリン酸緩衝溶液のラッ

ト鼻腔内単回投与実験の結果も、同様に、急速静脈内投与に比べて高いリンパ節移行性を示した。両実験において、投与後の血中濃度推移から算出した AUC を基準にリンパ節移行性を評価すると、明らかに鼻腔内投与が有効であり、MTX が鼻粘膜を透過した後に粘膜下の毛細リンパを経て頸部リンパ節に集積することが明らかとなった。さらに、粉末状 MTX の投与 30 分後の CLN への移行量は溶液投与に比べて 2.1 倍上昇し、単発投与でも鼻粘膜透過量を増大させれば CLN への移行量の増大が可能であることが明らかとなった。

5) 頸部リンパ節への癌転移抑制における経鼻ルートへの有用性評価：頸部リンパ節 (CLN) 転移癌モデルの作成：HSC-2 及び OSC-19 の懸濁液をヌードマウスの舌部へ移植し、4 週後に病理診断を行った。HSC-2 では舌部への生着は観察されたが、CLN への転移は確認できなかった。一方、OSC-19 では移植した全てのヌードマウスにおいて左右またはどちらか一方の CLN への転移が確認された。これらの結果より、CLN への癌転移に対する経鼻ルートの有用性評価には OSC-19 を用いて転移癌モデルを作成することとした。

MTX 鼻腔内投与による CLN への癌転移抑制効果の評価：頸部リンパ節転移モデルの作成に、予想外に時間がかかったため、本検討の実施がずれ込んだ。現在、評価実験を進めているが、本報告書の提出には間に合わない。結果は学会や論文等で発表する予定である。

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 1 件)

- ① Inoue D., Furubayashi T., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., Shingaki T., Kimura S., Tanaka A., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Higashi Y., In vitro evaluation of the ciliary beat frequency of the rat nasal epithelium using a high-speed digital imaging system., *Biological and Pharmacetical Bulletin*, **36**, 966-973 (2013)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 古林呂之、田中智也、赤木由佳、井上大輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、新垣友隆、東豊、鼻粘膜を介した methotrexate の頸部リンパ節送達に関する速度論的評価、第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2012 年 11 月 23 日、京都大学 (京都市)
- ② 秋山誠樹、日笠優子、松村華菜子、古林呂之、井上大輔、田中晶子、勝見英正、坂根稔康、山本昌、東豊、粉末状固形薬物の経

鼻吸収性予測のための薬物溶出性評価方法の確立～難溶解性薬物の溶出変化と膜透過～、第51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、2012年11月11日、島根県民会館(松江市)

- ③赤木由佳、田中智也、辻佑香里、古林呂之、井上大輔、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、第51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、2012年11月11日、島根県民会館(松江市)
- ④古林呂之、田中智也、赤木由佳、辻佑香里、井上大輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、東豊、粘膜を介した頸部リンパ節への薬物送達に関する検討、第28回日本DDS学会学術集会、2012年7月5日、札幌コンベンションセンター(札幌市)
- ⑤井上大輔、古林呂之、勝見英正、坂根稔康、山本昌、大河原賢一、木村聰城郎、檜垣和孝、東豊、粉末状製剤の鼻腔内滞留性の変動が与える薬物経鼻吸収性への影響、第28回日本DDS学会学術集会、2012年7月4日、札幌コンベンションセンター(札幌市)
- ⑥津間香織、長野愛、平松未智瑠、井上大輔、古林呂之、坂根稔康、山本昌、大河原賢一、檜垣和孝、東豊、粉末製剤化医薬品の経鼻吸収性に与える鼻腔内繊毛運動の影響、日本薬剤学会第27年、2012年5月26日、神戸国際会議場(神戸市)
- ⑦日笠優子、秋山誠樹、田中晶子、松村華菜子、古林呂之、井上大輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、東豊、粉末状固形薬物の経鼻吸収性予測のための薬物溶出性評価方法の確立、日本薬剤学会第27年、2012年5月26日、神戸国際会議場(神戸市)
- ⑧田中智也、赤木由佳、辻佑香里、古林呂之、井上大輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、東豊、鼻粘膜を介したmethotrexateの頸部リンパ節送達に関する検討、日本薬剤学会第27年、2012年5月24日、神戸国際会議場(神戸市)
- ⑨Inoue D., Furubayashi T., Katsumi H., Sakane T., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., and Higashi Y., New concept for the prediction of nasal drug absorption under altered nasal mucociliary function., 2011 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2011年10月27日, Walter E. Washington Convention Center (Washington, D.C., USA)
- ⑩ Furubayashi T., Tatsuta R., Inoue D., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., and Higashi Y., Development of an evaluation system on *in vivo* nasal absorption of drugs from a dry powder formulation IV., 2011 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2011年10月25日,

Walter E. Washington Convention Center (Washington, D.C., USA)

- ⑪井上大輔、古林呂之、勝見英正、坂根稔康、山本昌、大河原賢一、木村聰城郎、檜垣和孝、東豊、鼻腔内投与後の薬物経鼻吸収と繊毛運動との関係、日本薬剤学会第26年会、2011年5月29日、タワーホール船堀(東京)
- ⑫西山典子、松村華菜子、古林呂之、井上大輔、勝見英正、坂根稔康、山本昌、大河原賢一、木村聰城郎、檜垣和孝、東豊、粉末製剤鼻腔内投与後の薬物吸収に対する粘膜表面水分量の影響、日本薬学会第131年会、2011年3月29日、ツインメッセ静岡(静岡市)
- ⑬Inoue D., Furubayashi T., Katsumi H., Sakane T., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., and Higashi Y., Development of *in vitro* evaluation systems on mucociliary function and relationship between intranasal drug absorption and mucociliary function., 2010 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2010年11月16日, Ernest N.Morial Convention Center (Louisiana, USA)
- ⑭ Furubayashi T., Tatsuta R., Inoue D., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., and Higashi Y., Development of an evaluation system on *in vivo* nasal absorption of drugs from a dry powder formulation III., 2010 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2010年11月16日, Ernest N.Morial Convention Center (Louisiana, 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) 研究分担者

井上 大輔 (INOUE DAISUKE)
就実大学・薬学部・助手
研究者番号：50550620

東 豊 (HIGASHI YUTAKA)
就実大学・薬学部・教授
研究者番号：90127697