

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590187

研究課題名(和文) 抗認知症薬の経鼻投与の効果・臨床応用への可能性の検討

研究課題名(英文) Efficacy of intranasal administration of anti-dementia drugs and its possibility for clinical applications

研究代表者

鈴木 裕介 (SUZUKI, YUSUKE)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90378167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗認知症薬の新たな投与経路としての経鼻投与のヒトへの臨床応用の可能性を探求するべく、動物(ラット)を対象にした基礎実験を実施した。ラット(WKY)をランダムにドネペジル塩酸塩低用量、高用量、蒸留水(対照群)のいずれかを経口あるいは経鼻で投与する6群に割り付け、投与後1時間の時点でラットの血中、脳組織(海馬、線条体)におけるコリンエステラーゼ(ChE)活性の比較を行った。線条体においては経鼻投与は経口投与と比較して有意にChE活性の低下が観察されたが、海馬では低下傾向にとどまった。本結果を基に、投与する薬剤の溶媒を再考し、2種類の行動実験により投与経路の空間記憶に与える影響を検討する。

研究成果の概要(英文)：In order to develop novel drug delivery system of anti-dementia drugs and examine its utility for clinical application, we carried out basic experiments using rats. Rats were randomly assigned to six groups, who were administered either high or low dose of donepezil hydrochloride and administration of saline served as controls. Drugs were administered either orally or intra-nasally, and serum or tissue (hippocampus and striate body) choline esterase (ChE) activity at one hour after administration were compared. While in the striate body, ChE was significantly reduced when drugs were administered intra-nasally compared with oral administration, such significant difference was not observed in the hippocampus. Therefore we recognized the necessity to develop solution optimal for intranasal administration of the anti-dementia drugs in order to increase the proportion of direct transport of the drugs to the brain. Behavioral experiments using two different instruments are under way.

研究分野：老年医学 医療薬学

キーワード：経鼻投与法 抗認知症薬 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

近年の報告によれば、全国ですでに400万人を超えているのではないかとされる認知症患者の数は、その有病率および患者数は今後も増加の一途をたどることが予想されており、認知症ケアへの対策は高齢化する社会の喫緊の課題である。認知症の治療は包括的な戦略が必要であるが、抗認知症薬による薬物療法は治療の中核をなしており、認知症のなかでもっとも多いとされるアルツハイマー型認知症の進行を遅延させる効果に関する論拠の十分な蓄積がある。現時点において認知症の薬物療法の中核をなしているのはコリン仮説に基づくアセチルコリン系の神経伝達を改善する薬剤コリンエステラーゼ阻害薬 (ChEI) による認知症の中核症状に対するアプローチである。一方、近年はアルツハイマー型認知症の発症機序が徐々に解明されつつあり、現時点ではその主流となっているアミロイドカスケード仮説に基づいたアルツハイマー型認知症の根本治療戦略として、アミロイドあるいはタウ蛋白のクリアランスを目的とした薬剤の開発が、全世界的に多くの注目を集めている。しかしながらアミロイドワクチン療法をはじめとするいわゆる根本治療の概念に則った薬剤の臨床試験の結果は、当初期待されたほど芳しいものではなく、薬物療法の中核は依然としてChEIによるコリン作動性神経の活性化により病状の進行を遅延させることにある。現行のChEIは内服による経口投与あるいは経皮吸収剤による貼付剤であるが、双方とも一旦末梢循環を通った後に中枢神経へ移行し、薬理作用を発現する機序を有する。従ってこれらの投与方法においては、程度の差こそあれfirst pass metabolismによる影響を排除しきれない。実際、経口のChEIにおいては頻度の高い末梢の消化管への好ましくない作用、即ち悪心、嘔吐、下痢、食思不振などを免れ得ないため、多くの患者さんにとってせっかくChEIによる中枢への薬効が期待されながら、服用の継続を断念せざるを得ない症例が数多く存在するのも事実である。抗認知症薬の選択肢が限られる現状において、いかに安全かつ効率よく薬効を発現させるかは喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では認知症治療においておそらく当面は薬物療法の中核であろうChEIの新たなドラッグデリバリーシステムを確立し、その有用性を検証することにより広く臨床応用される道を拓くことにある。好ましい薬物療法における薬剤はその薬理作用や代謝における特性もさることながら、標的組織に効果的に薬剤が輸送され途中の経路で代謝による影響を受けないこと、薬物による有害事象が最小限に抑えられることが最も優先されると考える。特に認知症を有する患者群は一般的に高齢であり、薬物代謝において肝腎など

の臓器機能の影響を受けやすく結果的に有害事象の発現も若年者と比較してより多く見られるのが通常である。本研究期間内にChEIの経鼻投与のヒトへの臨床応用の準備段階として、ラットを用いた薬理、行動実験により経鼻投与と経口投与の比較を行い、その有用性および問題点について考察を行う。

3. 研究の方法

実験には雄性SPF Wster系ラット(7週齢 体重220~250g)を使用した。ラットを無作為に2群に分け、一方の群にはキスカル酸による内側中隔野破壊手術を施行し、残りの群のラットに偽手術を施行し、十分な回復期を与えた後、行動実験による評価を行った。

(1) 手術(コリン系障害モデルの作成)
動物の体重を個別に測定し、ペンタバルビタールナトリウム (Somnopenyl PENTOBARBITAL SODIUM、共立製薬株式会社)の50~60mg/kgを腹腔内投与して麻酔した。麻酔したラットを脳定位固定装置に固定し、頭皮を切開して頭蓋骨に小孔(直径約2mm)を開け、0,08Mのキスカル酸を満たしたシリンジに接続した針(33ゲージ)を定位的に内側中隔野の標的部位脳座標 (AP 0,0mm, LR ±3.2mm, 角度23度、V 7,2mm)にキスカル酸(0.3125 μl, 0,05 μmol/大脳半球 / 総液量0,625 μl)を0.11 μl/minの速度で約2,85min/半球かけて両側性に注入した。偽手術群では、標的部位の上4mmの位置まで針を挿入するのみで、薬物は注入しなかった。

(2) 塩酸ドネペジル投与による行動実験
中核野破壊を行った後、少なくとも10日間以上の回復期間において、Novel object recognition test(新奇物体認識試験)を施行した。ドネペジル塩酸塩を蒸留水で、0,1mg/μlで溶解、0,5mg/kg群(低濃度群)2,0mg/kg群(高濃度群)に割り付け、探索試行の1時間前に経口投与群 5ml/kg、経鼻投与群 30 μl/kgをそれぞれ投与した。ラットはランダムに2群に割り付けそれぞれ経口、経鼻投与を行った。偽手術-生理食塩投与群の動物には、被験薬の場合と同じ投与スケジュールで生理食塩水のみを経口、経鼻にて投与した。

Novel object recognition test

1日目: 訓練試行のない装置で10分間自由行動(馴化訓練)

2日目: 記憶の形成 オブジェクトA.B(両新奇) 2つオープンフィールドの中に等間隔で置き、10分間の自由探索時間内に、各オブジェクトの探索時間を測定。試行の開始1時間前に、薬剤投与を行う

3日目: 記憶の保持 2つのオブジェク

トのうち、1つを新奇オブジェクトCと置換した装置内で10分間自由探索させ、新しい物体C、既知Bへの各探索行動・探索時間の増減を測定し、記憶学習の指標とする。

評価法：各オブジェクトの探索時間/総探索時間を%で表し、3日目の新奇オブジェクトの探索時間比率を学習指標とする。

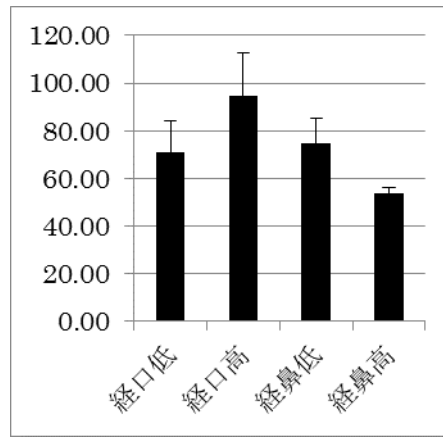
(3) AchE 活性の測定

AChE 活性は、Elleman らの方法に従って測定した。この方法は、アセチルチオコリンが AChE により加水分解されて生成するリオコリンと 5,5'-ジチオビス-2-ニトロベンゾエートの黄色アニオンの分光光度計を用いて 412 nm の波長の吸光度で測定するものである。AChE 活性測定には『Amplite Colorimetric Acetylcholinesterase Assay Kit』(AAT Bioquest, Inc. 米)を使用した。探査試行後5日間休薬した後に、ラットを断頭し、両側の海馬、線条体を摘出した後に液体窒素中で凍結して、分析まで-80℃で保存した。測定には各右脳を用いた。右海馬、右線条体を融解し、Kitの組織融解液 600 μl 中でホモジナイザーペッセルを使いホモジナイズし、遠心分離した上清を test sample とした。AChE reaction mixture(50ul) AChE test samples (50ul) Incubate 遮光 室温 30分 測定 405nm (BIO RAD iMark Microplate Reader)測定開始後1分から2分までの1分間の吸光度変化量(A405nm/min)を AChE 活性として表した。

4. 研究成果

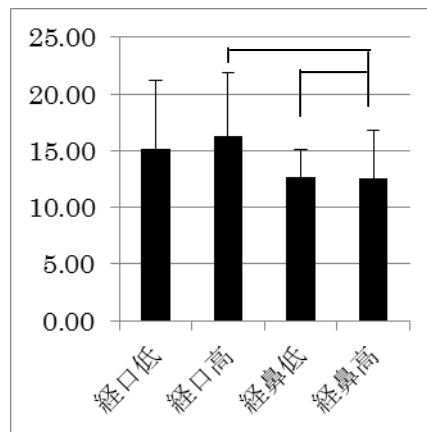
(1) 組織内 AchE 活性の比較

測定行動実験施行前に、経鼻による ChE 阻害薬の投与の末梢血、脳内の ChE 活性に与える影響を評価した。末梢血中の ChE 活性はドネペジルの投与量、経口、経鼻の差異に関わらず、有意な差異は観察されなかった。一方、脳内各部位における ChE 活性の比較においては、海馬では薬剤濃度、投与方法による群間差は認めなかったが(図1)、線条体においては経鼻高濃度投与群において経鼻低濃度、経口高濃度と比較して有意に ChE 活性の抑制が観察された(図2)。



(図1) 海馬 ChE 活性比較

n.s. by Kruskal Wallis test (n=10)



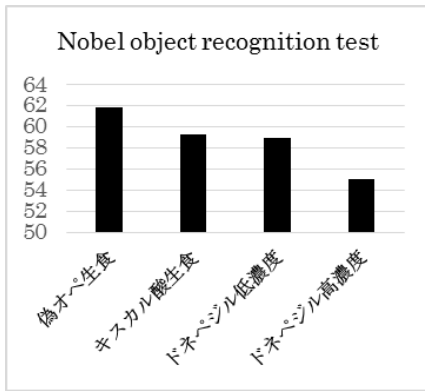
(図2) 線条体 ChE 活性比較

Kruskal Wallis $p=0.02$

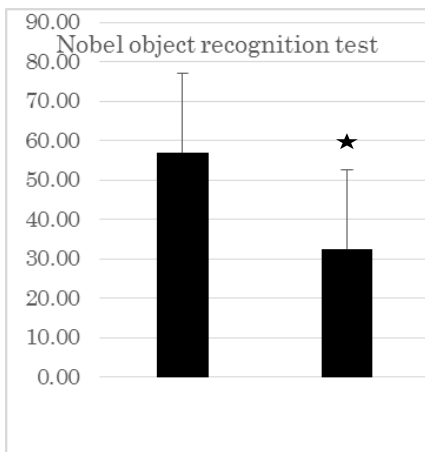
$p=0.16$ vs 経鼻低 $p=0.16$ vs 経口高

(2) 行動実験の結果

新奇物体認識試験(Novel object recognition test)では3日目の新奇物体への探索率の比較を行った。経口ドネペジル投与での比較においてキスカル酸による中隔野障害による影響が有意に観察されなかったのに加えて、ドネペジル投与群において障害からの回復の傾向が観察されなかった(図3)。そこで行動実験の評価系における問題を再検証した結果次の点が指摘された 提示する物体の妥当性の問題(提示する物体に嗜好性がみられる) 初回の提示から新奇物体の提示までの時間(過去の文献においては短い時間でより新奇性への指向が観察される)その他、既知物体の嗅覚への影響や配置などをコントロール必要が認識された。以上の観点からキスカル酸による障害を正確に評価するべく再度2群での比較を行ったところ、キスカル酸群における新奇物体への嗜好性の有意な低下が観察された(図4)。現在、経口、経鼻投与群による認知行動障害からの回復の比較実験を準備中である。



(図3) 経口投与での群間比較
n.s. Kruskal Wallis



(図4)キスカル酸と対照群の比較(n=6)
★ p < 0.05 t-test

(3) 総括

本研究においては当初、抗認知症薬の経鼻投与の効果の有効性を検証することを研究の主目的に置いたが、その点においては研究の目的は達成され得なかった。しかしながら、経鼻によるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の投与により血中の活性に有意な差を与えない範囲で脳組織中のChE活性が経口の同容量と比較してより強い阻害が関されたことは、経鼻投与という抗認知症薬のドラッグデリバリーにける一定の利点を示唆する。この点については今後、薬物動態や至適な用量設定について更なる検討を必要とする。今回の行動実験においては物体の選択や評価手順など様々な修正点が発見され、当初予定されていた経鼻投与と経口投与の比較実験まで至ることができなかったが、今後の研究の方向性に大変重要な示唆を与える機会を得られたと考える。今回対象とした抗認知症薬より低分子量のペプチドホルモンであるインスリンの経鼻投与が認知症患者の認知機能改善に寄与しているという近年の報告¹⁾を考慮すれば、本研究をさらに進めることにより、抗認知症薬の新たなデリバリーシステムの開発により、安全かつ有効な薬物療法の開発につながる事が期待される。経鼻投与の最大の課題はいかに確実に鼻粘膜から逆行性に中枢へ薬剤を移行させら

れるかである。この点において至適な薬物の担体の開発は経鼻投与において肝要な点であり現在、本研究代表者はナノ懸濁液²⁾を溶媒とした抗認知症薬の経鼻投与法の確立を目指して研究を続行中である。

<引用文献>

Freiherr J et al. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence CNS Drugs 27(7), 2013, 505-514

Bhavna S et al. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. Int J Biol Macromolecules 57, 2014, 418-425

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Shiraishi N, Suzuki Y et al. The effect of additional training on motor outcomes at discharge from recovery phase rehabilitation wards -A survey from multi-center stroke data bank in Japan- PLOS ONE 13;9(3) 2014 doi: 10.1371/journal.pone (査読有)

鈴木裕介 高齢者の薬物療法ガイドライン Geriatric Medicine 52(8) 955-958, 2014 (査読無)

Makino T, Umegaki H, Suzuki Y, Yanagawa M, Nonogaki Z, Nakashima H, Kuzuya M. Relationship between small cerebral white matter lesions and cognitive function in patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. Geriatr Gerontol Int. 2013 Nov 12. doi: 10.1111/ggi (査読有)

鈴木裕介 海外の薬剤アドヒアランスに関する取り組み Progress in Medicine 33(6) 65-68 2013 (査読無)

〔学会発表〕(計4件)

中嶋宏貴、梅垣宏行、牧野多恵子、柳川まどか、野々垣禪、鈴木裕介、葛谷雅文 アルツハイマー型認知症患者の時計描画試

験と脳血流の関連

第 56 回日本老年医学会学術集会 平成 26 年
6 月 12 日～14 日 福岡国際会議場（福岡県
福岡市博多区）

鈴木裕介、梅垣宏行、広瀬貴久、葛谷雅文
物忘れ「相談ノート」を利用した認知症診療
-塩酸メマンチンの投与前後の症状評価

第 56 回日本老年医学会学術集会 平成 26 年
6 月 12 日～14 日 福岡国際会議場（福岡県
福岡市博多区）

牧野多恵子、梅垣宏行、鈴木裕介、柳川ま
どか、野々垣禅、中嶋宏貴、葛谷雅文
白質病変・生活習慣病が認知機能の縦断的変
化に及ぼす影響

第 56 回日本老年医学会学術集会 平成 26 年
6 月 12 日～14 日 福岡国際会議場（福岡県
福岡市博多区）

柳川まどか、梅垣宏行、牧野多恵子、野々
垣禅、中嶋宏貴、一柳知里、鈴木裕介、葛谷
雅文

アルツハイマー型認知症および MCI 患者にお
ける糖尿病の影響の検討

第 56 回日本老年医学会学術集会 平成 26 年
6 月 12 日～14 日 福岡国際会議場（福岡県
福岡市博多区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 裕介 (SUZUKI YUSUKE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90378167

(2) 研究分担者

梅垣 宏行 (UMEGAKI HIROYUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40345898