

論文の内容の要旨

氏名：福田 光 良

博士の専攻分野の名称：博士 (薬学)

論文題名：新規経鼻投与方法による水溶性中分子の鼻から脳への分布評価に関する研究

【背景および目的】

近年、医薬品のモダリティは低分子から中・高分子へとパラダイムシフトしている。なかでも中分子の範囲 (分子量: 600–10000) に含まれるペプチド (中分子ペプチド) は、固有の受容体に対して結合するため低分子医薬品よりも高い活性を示し、低分子医薬品の毒性の原因となる異物の代謝プロセスを引き起こさず、全身性の副作用を起こしにくいという利点から、医薬品の新規モダリティとして期待されている。しかし、多くの中分子ペプチドは血液-脳関門 (BBB) を通過できない。そのため、全身投与から中分子ペプチドを中枢に送達することは困難であった。中分子ペプチドを脳に選択的に送達する技術の開発は、脳疾患に対する治療薬の創製に貢献する有望な糸口になる。

脳に薬物を送達させる投与方法として、経鼻投与が注目されている。経鼻投与には、BBB を回避して鼻腔内から脳に直接つながる経路 (Nose-to-Brain 経路) が存在する。Nose-to-Brain 経路は、嗅神経、三叉神経、ならびに脳脊髄液 (CSF) を介した複数の経路が関与することが知られている。これらの経路を介した薬物送達は、静脈内投与 (IV) に対する経鼻投与後の相対的な脳への薬物送達効率 (%DTE) ならびに脳への全薬物送達量に対する Nose-to-Brain 経路の寄与率 (%DTP) のような定量的な指標を用いることで、鼻から脳への移行性を相対的に評価できる。しかし、中分子ペプチドを経鼻投与した研究では、これらの指標を用いることなく、主に薬効薬理試験に焦点が当てられていた。経鼻投与には、薬液による鼻腔内滞留性の違い、細菌やウイルスのような外来異物を鼻腔から咽頭側に排除する生体防御機構 (粘液繊毛クリアランス)、さらに経鼻投与技術が確立されていないため実験者間での技術の相違などの要因がある。さらに、中分子ペプチドの経鼻投与における定量的解析は、低分子医薬品に比べて中分子ペプチドの脳への分布が低いことから、経鼻投与された中分子ペプチドの脳内分布に関する定量的な評価が困難であった。そのため、これらの要因を克服し、Nose-to-Brain 経路を定量的に評価するための方法を確立する必要がある。

本研究では、鼻から脳への水溶性中分子送達に関する分布を定量的に明らかにすることを目的に、新規経鼻投与方法の開発とその方法を用いた定量的な体内分布の評価を試みた。第1章では、新規経鼻投与方法を開発するために、新規経鼻投与方法による投与速度および投与液量の制御が、脳への水溶性中分子の分布に及ぼす影響について評価した。第2章では、第1章で開発した新規経鼻投与方法を用いて、水溶性中分子の体内分布を定量的に評価した。

第1章 食道逆挿管鼻腔内投与方法の開発^{1,2)}

【方法】

薬液による鼻腔内滞留性の違い、粘液繊毛クリアランス、ならびに実験者間による経鼻投与技術の相違の要因を克服し、Nose-to-Brain 経路を定量的に評価するため、新規に考案した食道逆挿管鼻腔内投与方法 (Reverse 法) を用いて経鼻投与した (Fig. 1)。Reverse 法は、食道に挿入したカニューレをマイクロシリンジポンプに設置したシリンジに連結させることで、鼻腔内に薬液を投与した。中分子ペプチドは、一般的に水溶

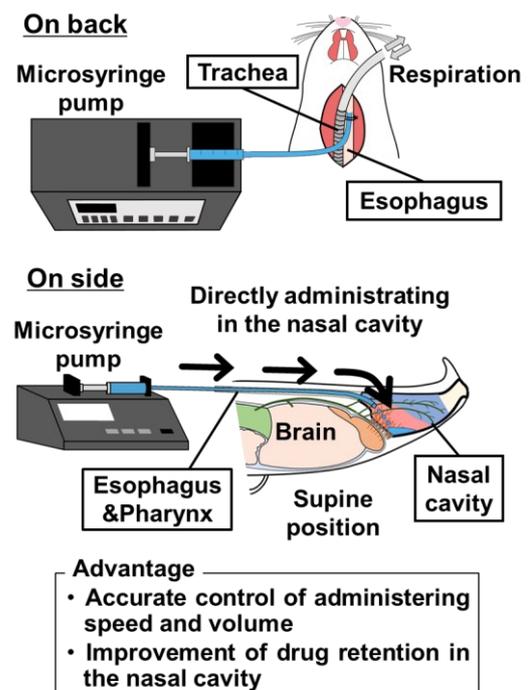


Fig. 1 Intranasal administration by reverse cannulation from the airway side through the esophagus (Reverse).

性が高いこと、ペプチダーゼなどの生体内に存在する酵素によって分解されてしまうことなどから、中分子ペプチドのモデル化合物として、ペプチダーゼなどの酵素によって分解されない、かつ BBB 非透過性の水溶性中分子であるイヌリンを使用した。吸入麻酔下で Reverse 法を用いて、仰向けにしたマウスの鼻腔内に放射性標識されたイヌリンを投与した。Reverse 法の投与 60 分後における脳および嗅球の放射活性から分布量を算出し、投与速度および液量が脳への移行性に及ぼす影響を評価した。

【結果および考察】

鼻腔内は 2 種類の鼻粘膜から構成されており、嗅神経が豊富に分布する嗅粘膜と三叉神経が豊富に分布する呼吸粘膜が存在する。Reverse 法では、食道から挿入したカニューレ先端を嗅粘膜表面まで到達させるため、この方法によって、嗅粘膜部分に薬液を直接投与できることが明らかとなった。

Reverse 法における投与速度が、イヌリンの脳組織分布量に及ぼす影響を検討した。Reverse 法を用いて薬液の投与速度を 5 から 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ に増加させたところ、500 $\mu\text{L}/\text{min}$ におけるイヌリンの分布量 (%ID/g tissue) は、5 $\mu\text{L}/\text{min}$ に比べて、脳で 30% および嗅球で 50% それぞれ低下する傾向を示した (Fig. 2A & 2B)。薬液の投与速度を増加させると、鼻腔内全体に薬液が拡散し、薬液が嗅粘膜および呼吸粘膜の両方から体内に吸収される。呼吸粘膜は、嗅粘膜に比べて、親水性かつ分子量の大きい化合物の血管透過性が高いことが報告されている。このことから、呼吸粘膜から吸収されたイヌリンが、血中に分布することによって、イヌリンの脳への分布は低下することが示唆された。本結果より、仰向けにしたマウスに対して、高速かつ短時間ではなく低速かつ持続的に薬液を経鼻投与することで、イヌリンの鼻から脳への分布は向上することが示唆された。

経鼻投与する薬液量を 3 μL から 25 μL に増加させたところ、脳および嗅球へのイヌリンの分布量は 2 倍以上に増加した (Fig. 3A & 3B)。マウスの鼻腔内容積は約 30 μL であり、その鼻腔の表面を占める嗅粘膜と呼吸粘膜の比率は 1:1 であることが報告されている。Reverse 法は、嗅粘膜部分に薬液を直接滴下する方法であり、薬液の嗅粘膜への分布を増大させる。したがって、Reverse 法を用いて仰向けにしたマウスの嗅粘膜部分を満たす薬液量を投与すると、イヌリンの脳内分布量は向上することが示唆された。

よって、Reverse 法による経鼻投与時の投与速度と投与液量は、水溶性中分子の鼻から脳への移行に寄与する因子であることが示唆された。

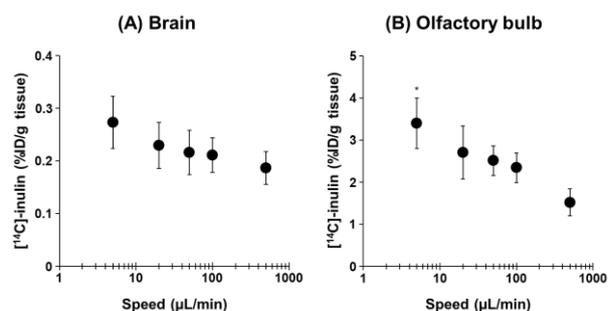


Fig. 2 Effect of the administration speed on inulin distribution in the brain and the olfactory bulb after 60 min by the Reverse. * $p < 0.05$ compared with 500 $\mu\text{L}/\text{min}$.

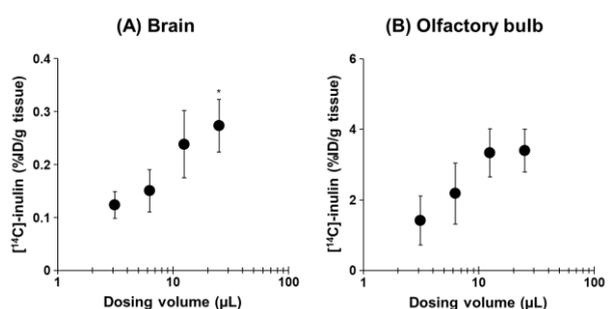


Fig. 3 Effect of the administration volume on the distribution of $[^{14}\text{C}]$ -inulin in the brain and the olfactory bulb after 60 min of the Reverse. * $p < 0.05$ compared with 3 μL .

第 2 章 鼻から脳への送達経路を介した水溶性中分子の定量的な分布評価²⁾

【方法】

吸入麻酔下、イヌリンを以下の条件 (投与速度: 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、投与液量: 25 μL) の Reverse 法で投与した後の組織中、CSF および血漿中の放射活性から分布量を算出した。また、一般的な経鼻投与方法であるマイクロピペット投与方法 (MP 法) についても分布量を算出し、Reverse 法と比較した。さらに、Reverse 法と IV による経時的分布から薬物濃度-曲線下面積 (AUC) を求め、IV に対する Reverse 法による投与の %DTE ならびに %DTP をそれぞれ算出した。

%DTE は全身投与時と経鼻投与時の脳への相対的な薬物曝露量であり、式 (1) を用いて算出した。

$$\%DTE = (AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}})_{\text{IN}} / (AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}})_{\text{IV}} \times 100 \dots \text{式 (1)}$$

ここで、 AUC_{brain} は脳における薬物濃度-時間曲線下面積、 AUC_{plasma} は血漿における薬物濃度-時間曲線下面積、IN は Reverse 法による経鼻投与、および IV は静脈内投与を表す。

$\%DTP$ は、脳への全体的な薬物送達量に対して、Nose-to-Brain 経路で脳に到達したと推定される薬物量の割合であり、式 (2) と式 (3) を用いて算出した。

$$\%DTP = (B_{\text{IN}} - B_{\text{X}}) / B_{\text{IN}} \times 100 \dots \text{式 (2)}$$

$$B_{\text{X}} = B_{\text{IV}} / P_{\text{IV}} \times P_{\text{IN}} \dots \text{式 (3)}$$

ここで、 B_{X} は Reverse 法による経鼻投与後に全身循環を介した脳における AUC の割合、 B_{IN} は Reverse 法による経鼻投与後の経時的な AUC_{brain} 、 P_{IV} は IV 後の経時的な AUC_{plasma} 、 P_{IN} は Reverse 法を用いた経鼻投与後の経時的な AUC_{plasma} を表す。

【結果および考察】

Reverse 法により投与したイヌリンの脳および嗅球の経時的分布を評価したところ、60 分付近で最大となる時間推移を示した (Fig. 4A & 4B)。この結果から、イヌリンの脳の経時的分布から $\%DTE$ と $\%DTP$ を算出したところ、それぞれ 1478% と 93% であった。 $\%DTE$ は 100% を超えると IV よりも効率的に脳内へ薬物を送達できることを示している。したがって、Reverse 法による脳への移行が、全身投与よりも Nose-to-Brain 経路を利用して水溶性中分子を約 15 倍効率的に脳内へ送達できることを定量的に示した。

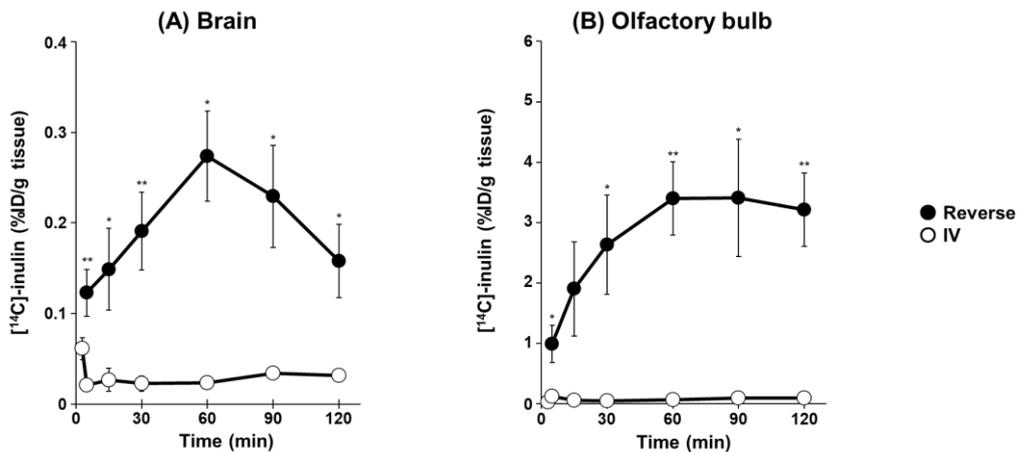


Fig. 4 Concentration-time profiles [^{14}C]-inulin in the brain and the olfactory bulb after the Reverse.
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Reverse 法による投与後において、脳内のイヌリン分布が 60 分でピークを示したことから、その時点における脳、食道、ならびに Nose-to-Brain 経路に関わる嗅球、三叉神経および CSF 内のイヌリン分布を評価した。Reverse 法の投与 60 分後による脳および嗅球内分布は、MP 法と比較して 2 倍以上の高い分布を示した (Fig. 5A & 5B)。それに対して、三叉神経および CSF におけるイヌリンの分布は、Reverse 法および MP

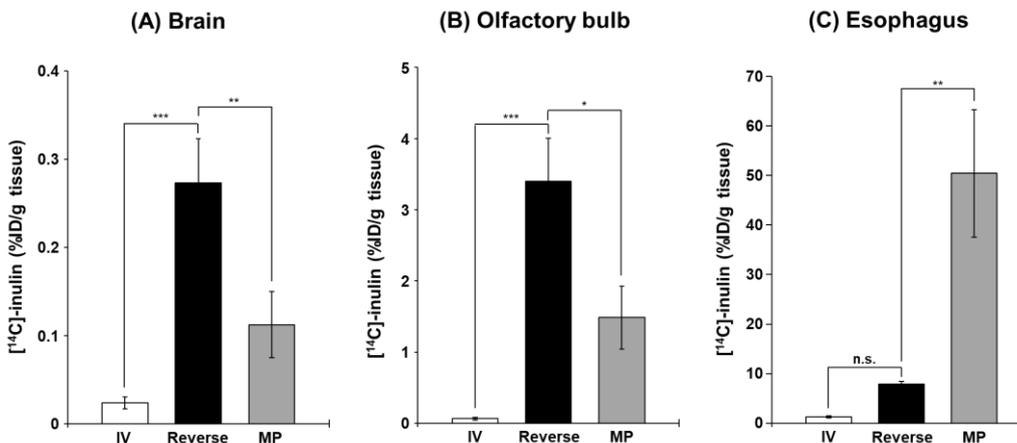


Fig. 5 The biodistribution of [^{14}C]-inulin at 60 min after the Reverse.
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$ followed by Dunnett's test.

法による投与間で有意な差が認められなかった。経鼻投与は、嗅粘膜から嗅神経に沿った細胞外輸送によって脳へ送達されることが報告されている。したがって、Reverse 法は、嗅粘膜領域における薬液の滞留性を増大させることにより、水溶性中分子の鼻から脳への移行性は有意に向上することが示唆された。末梢組織として食道におけるイヌリンの分布を評価したところ、Reverse 法による投与 60 分後の分布は、約 7%ID/g tissue を示したのに対し、MP 法による分布は約 50%ID/g tissue であった (Fig. 5C)。この結果より、Reverse 法を用いることで、これまで経鼻投与の課題であった食道側への薬液の流出を抑えられることが示唆された。

【結論】

本研究では、鼻から脳への水溶性中分子送達に関する分布を定量的に明らかにするため、新規経鼻投与方法である Reverse 法を開発した。Reverse 法を用いることで、水溶性中分子の鼻から脳への移行性に投与速度と投与液量が影響すること、ならびに鼻から脳への送達経路を介した水溶性中分子の分布を定量的に評価できることを明らかとした。今後は、本研究で開発した Reverse 法による鼻から脳への分布評価を基盤として、実際に中分子ペプチドの体内分布を評価することにより、脳に選択的かつ効果的に中分子ペプチドを送達する経鼻投与製剤の開発の一助となることが期待される。

【研究成果の掲載誌】

- 1) Takanori Kanazawa, **Mitsuyoshi Fukuda**, Naoto Suzuki, Toyofumi Suzuki. Novel methods for intranasal administration under inhalation anesthesia to evaluate nose-to-brain drug delivery. *Journal of Visualized Experiments*. 2018; 141: e58485.
- 2) **Mitsuyoshi Fukuda**, Takanori Kanazawa, Shingo Iioka, Takayuki Oguma, Ryohei Iwasa, Saki Masuoka, Naoto Suzuki, Yasuhiro Kosuge, Toyofumi Suzuki. Quantitative analysis of inulin distribution in the brain focused on nose-to-brain route via olfactory epithelium by reverse esophageal cannulation. *Journal of Controlled Release*. 2021; 332: 493-501.