

2017 年度 博士学位論文

処方設計による粉末製剤化医薬品の経鼻吸収性の最適化
—賦形剤・結合剤による薬物吸収性の制御の可能性—

京都薬科大学大学院薬学研究科

田中 晶子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Akiko Tanaka, Tomoyuki Furubayashi, Akifumi Matsushita, Daisuke Inoue, Shunsuke Kimura, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Nasal absorption of macromolecules from powder formulations and effects of sodium carboxymethyl cellulose on their absorption. *PLoS One*. **2016**, 11, e0159150. [第 2 章]
- 2) Akiko Tanaka, Tomoyuki Furubayashi, Hitomi Yamasaki, Katsuko Takano, Mayuko Kawakami, Shunsuke Kimura, Daisuke Inoue, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. The enhancement of nasal drug absorption from powder formulations by the addition of sodium carboxymethyl cellulose. *IEEE. Trans. Nanobioscience*. **2016**, 15, 798-803. [第 2 章]
- 3) Akiko Tanaka, Tomoyuki Furubayashi, Manami Tomisaki, Mayuko Kawakami, Shunsuke Kimura, Daisuke Inoue, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Nasal drug absorption from powder formulations: The effect of three types of hydroxypropyl cellulose (HPC). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 96, 284-289. [第 3 章]
- 4) Akiko Tanaka, Tomoyuki Furubayashi, Yuki Enomura, Tomoki Hori, Rina Shimomura, Chiaki Maeda, Shunsuke Kimura, Daisuke Inoue, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Nasal drug absorption from powder formulations: Effect of fluid volume changes on the mucosal surface. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 212-219. [第 1 章]

目 次

略語一覧.....	1
要旨.....	3
序論.....	7
本論	
第 1 章 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす乳糖の影響.....	13
第 1 節 薬物の <i>in vivo</i> 経鼻吸収に及ぼす乳糖の影響	
第 2 節 薬物の <i>in vitro</i> 細胞層透過及び細胞表面水分量に及ぼす乳糖の影響	
2-1 <i>in vitro</i> 細胞層透過実験	
2-2 細胞表面水分量の変化	
第 3 節 薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす乳糖の影響	
第 4 節 製剤添加物の粘膜障害性	
第 5 節 小括	
第 2 章 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす結合剤 CMC-Na の影響.....	33
第 1 節 薬物の <i>in vivo</i> 経鼻吸収に及ぼす CMC-Na の影響	
第 2 節 薬物の細胞層透過に及ぼす CMC-Na の影響	
第 3 節 薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす CMC-Na の影響	
第 4 節 高分子薬物の経鼻吸収に及ぼす CMC-Na の影響	
第 5 節 CMC-Na の毒性評価	
5-1 CMC-Na の粘膜障害性	
5-2 鼻腔生理機能に及ぼす CMC-Na の影響	
第 6 節 小括	
第 3 章 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす HPC の影響.....	53
第 1 節 薬物の <i>in vivo</i> 経鼻吸収に及ぼす HPC の影響	
第 2 節 粘性溶液における薬物の溶解と拡散性	
第 3 節 薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす HPC の影響	
第 4 節 HPC の粘膜障害性	
第 5 節 小括	
総括.....	67
引用文献.....	71
謝辞.....	79

略語一覽

AAC	area above the curve
AIC	air-interface condition
α -MEM	α -minimum essential medium
CBF	ciliary beat frequency
CMC	carboxymethyl cellulose
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FD	fluorescein isothiocyanate-dextran
GOD	glucose oxidase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HPC	hydroxypropyl cellulose
HPLC	high performance liquid chromatography
LDH	lactate dehydrogenase
MC	mucociliary clearance
MDCK	Median-Darby canine kidney
MS	mucin solution
NFX	norfloxacin
PBS	phosphate buffered saline
PXC	piroxicam
S.E.	standard error of mean
STP	sumatriptan

TM

transport medium

WF

warfarin

要 旨

【背景・目的】

近年、全身作用を期待する薬物の投与部位として、鼻腔が注目を集めている。鼻腔内投与の利点として、非侵襲的であること、薬物吸収が経口投与と比較して良好かつ速やかであること、肝初回通過効果を回避できることなどが挙げられる。

鼻腔内に投与される剤形として、溶液製剤、ゲル製剤、粉末製剤などがあるが、中でも粉末製剤は投与量の確保、保存時の薬物安定性などの利点が多い。粉末製剤を鼻腔内投与した場合、鼻腔内で固体医薬品が溶解過程を経て溶液状態となり、溶解した薬物が全身循環血へ吸収される。したがって、鼻腔内での溶解が吸収を決定する因子として重要である。一方、鼻粘膜に投与された溶液製剤や固体薬物粒子は表面を覆う粘液とともに、繊毛上皮細胞の繊毛運動により鼻腔後方に運ばれ、消化管へ移行する。この繊毛運動による異物の除去は mucociliary clearance (MC) と呼ばれ、鼻腔内投与後の薬物吸収を支配する因子として重要である。粉末製剤には製剤添加物が含まれることが多く、製剤添加物はこのような鼻腔内投与後の吸収を支配する薬物の溶解や MC に影響を与える可能性が高い。さらに、製剤添加物は鼻粘膜表面に直接投与されるため、薬物吸収に及ぼす影響が消化管吸収以上に大きいと考えられる。そこで本研究では、製剤添加物による薬物吸収の制御の可能性を評価するために、鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす製剤添加物の影響を系統的に評価した。

【実験方法】

鼻腔内投与後の薬物吸収に影響を与える製剤添加物として、乳糖及び CMC-Na、hydroxypropyl cellulose (HPC) を選択した。さらに、メカニズムを検討するために、重合度が異なる3種類の HPC (重合度の低いものから、HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H)) 及び NaCl を用いた。また、薬物としては、溶解度・膜透過性の異なる warfarin (WF、高溶解度&高透過性)、piroxicam (PXC、低溶解度&高透過性)、norfloxacin (NFX、高溶解度&低透過性)、sumatriptan (STP、高溶解度&低透過性)を選択した。

In vivo 動物実験：Wistar 系雄性ラットの鼻腔内に薬物原末 0.5 mg あるいは粉末製剤 1 mg (原末 0.5 mg、製剤添加物 0.5 mg の混合製剤) を投与し、下肢大腿動脈に施したカニューレから経時的に採血を行った。血漿中濃度は HPLC により測定した。

In vitro 細胞層透過実験：モデル細胞として Median-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用い、その単層膜を調製した。鼻腔内の生理的条件を考慮し、透過実験は apical 側細胞層を空気に接触させた条件 (air interface condition, AIC 条件) で行った。Apical 側細胞層表面に薬物

原末 0.5 mg あるいは各種粉末製剤 1 mg を噴霧投与し、その後、経時的に basal 側よりサンプリングを行った。薬物の定量は HPLC により行った。

細胞表面水分量の変化：鼻粘膜表面における水分量変化を予測するために AIC 条件の MDCK 単層膜に製剤添加物を噴霧投与した。その後、apical 側に平均分子量 4 kDa の FITC 標識デキストラン (FD4) 溶液を添加した。その後、細胞層表面の液体を回収し、FD4 の希釈率より水分量を算出し、表面水分量の経時変化を求めた。

In vivo 鼻腔内滞留性：Wistar 系雄性ラットの鼻腔内に平均分子量 70 kDa の FITC 標識デキストラン (FD70; 非吸収性マーカー) と薬物原末及び各種製剤添加物を含む粉末製剤 1 mg を噴霧投与した。噴霧 5、10、30 分後、Hirai らの方法に準じてラットの頸部、食道及び気管にカニューレションを施した。頸部食道に挿入したチューブより粘液除去剤として dithiothreitol (10 mM) を含む PBS を注入し、鼻腔内を洗浄した。洗浄液を回収し、洗浄液に含まれる蛍光強度を測定し、FD70 量を算出した。

【結果・考察】

(1) 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす乳糖の影響（粘膜表面水分量に及ぼす影響）

まず、製剤添加物として、賦形剤として汎用される乳糖を選択し、薬物吸収に及ぼす影響を検討した。鼻腔は消化管内と比較して、薬物が溶解する粘膜表面水分量が非常に少ないことから、消化管内での溶出とは大きく異なる可能性が高い。特に、乳糖の場合、粘膜局所における濃度が高くなり、高い浸透圧が発生すると予想される。その結果、水分の移動が生じ、粘膜表面の水分量が増大する可能性が高いと考えられる。そこで、様々な物性の低分子薬物 (WF、PXC、NFX) をモデル薬物として、これらの吸収に対する乳糖の影響を系統的に評価した。ラット鼻腔内投与後の PXC の吸収は乳糖により改善され、さらに NaCl による改善がより顕著であった。PXC と同様、NFX の吸収は乳糖、NaCl によって改善され、乳糖の影響がより顕著であった。対照的に、WF の吸収は両添加物を添加しても変化しないか、若干低下する傾向が観察された。そのメカニズムを検討するために、MDCK 細胞単層膜を用いて薬物透過実験を行った。乳糖、NaCl により、すべてのモデル薬物の膜透過量が増大した。また、細胞表面水分量は乳糖、NaCl の添加により増大し、NaCl による増大の程度が大きかった。一方、*in vivo* 鼻腔内滞留性を検討したところ、10 分後の鼻腔内残存率は薬物原末で約 50%、乳糖添加で 20%、NaCl で 0% であり、乳糖、NaCl により、鼻腔からの製剤の消失が促進されることが明らかとなった。

以上の結果より、乳糖及び NaCl による鼻粘膜表面の水分量の増大は薬物の溶解や膜透過には有利に作用するが、鼻腔内滞留性を低下させるために、薬物によっては吸収低下を惹起

する可能性が示された。

(2) 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす結合剤 CMC-Na の影響

結合剤として CMC-Na を用い、モデル薬物の鼻腔内投与後の吸収への影響を評価した。CMC-Na を含む粉末製剤をラット鼻腔内に投与した後の PXC、NFX の吸収は CMC-Na により有意に増大し、WF の吸収は低下した。一方、AIC 条件の MDCK 単層膜に粉末製剤を噴霧し、その後の薬物透過を検討した。その結果、薬物透過量に及ぼす CMC-Na の影響は観察されなかった。そこで、ラットを用いて粉末製剤の *in vivo* 鼻腔内滞留性を評価したところ、CMC-Na により製剤の鼻腔からの消失が遅延する傾向が観察された。したがって、CMC-Na による吸収増大は少量の粘液に CMC-Na が溶解することで、製剤の粘度が高まり、鼻腔内滞留性が亢進した結果と考えられた。次に、*insulin* 及び FD4 などの高分子薬物の経鼻吸収に及ぼす CMC-Na の影響についても検討を行った。その結果、低分子薬物と同様、CMC-Na によりこれら高分子の吸収促進が認められた。

以上の知見から、CMC-Na は薬物の分子量に関係なく、その鼻腔内滞留性を向上させ、薬物の経鼻吸収を改善可能であることが示された。

(3) 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす重合度の異なる HPC の影響（鼻腔内滞留性に及ぼす影響）

第二章における検討から、結合剤 CMC-Na が鼻腔内滞留性の向上とそれに伴う吸収の改善に有用であることが明らかとなった。そこで、第三章では薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす結合剤による粘度の影響を詳細に評価するため、重合度の異なる 3 種類の結合剤 HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H) の影響を検討した。ラット鼻腔内投与後の WF の吸収は、いずれの HPC を添加した場合においても低下した。PXC の吸収は、HPC (M) 添加時に増大したが、対照的に HPC (H)、HPC (SL) 添加時には低下した。また、HPC (H) を添加した PXC 投与後の血漿中濃度の立ち上がりには *lag time* が観察された。一方、STP の吸収は、HPC (SL) の添加により若干の吸収低下が観察されたが、HPC (M)、HPC (H) を添加した場合、STP の吸収率は単独投与時のそれぞれ 1.4 倍、2.5 倍に増大した。これらの検討を通じて、薬物吸収に及ぼす HPC の影響が薬物により異なることが明らかとなった。次に、そのメカニズムを検討するために、各種 HPC 溶液内における薬物の拡散性を比較・検討した。コントロールである PBS と比較して、HPC 溶液中での薬物の拡散性は低下し、さらに、その低下の程度は HPC の重合度の増大に伴い、より顕著であった。ラットを用いて薬物の *in vivo* 鼻腔内滞留性を評価したところ、PXC 単独投与の場合、投与 10 分後の鼻腔内残存率は 20% にまで低下し

たのに対して、HPC を添加した場合、HPC の重合度の増大に伴い、鼻腔内滞留性は顕著に向上した。HPC の溶解による製剤の粘性変化に伴い、鼻腔内滞留性、基剤内拡散性、有効表面積などの様々な因子が変動すると考えられ、こうした変動が薬物吸収に影響を与えた原因と考えられる。

以上の知見より、HPC の重合度が高いほど、薬物の鼻腔内滞留性が増大した一方で、薬物の拡散速度が低下したことから、薬物吸収に対する HPC の影響には、正の影響（鼻腔内滞留性の改善）と負の影響（溶解した製剤における薬物拡散性の低下）があり、薬物の生体膜透過性に応じて、両者の影響の程度が異なるために、薬物吸収に対する HPC の影響が薬物によって異なる可能性が明らかとなった。

【総括】

以上の結果より、鼻腔内投与後の薬物吸収は製剤添加物により制御できる可能性が示唆された。鼻粘膜上の水分量を変化させる乳糖などの製剤添加物は鼻腔内における薬物の溶解量の改善に有用であるが、水分量増大による MC 促進の影響も考慮する必要がある。一方、結合剤である CMC-Na や HPC は鼻腔内滞留性を向上することで薬物吸収を改善可能であるが、鼻腔内における薬物の溶解や膜透過への影響を考慮する必要がある。すなわち、鼻腔内投与後の薬物吸収は鼻腔内における薬物の溶解、膜透過及び鼻腔内滞留性により大きく影響を受け、吸収を制御するためには、薬物の物性に応じた適切な製剤添加物を選択する必要があることが示された。本知見は、経鼻投与型粉末製剤の製剤設計に有用な情報を提供するものと考えられる。

序 論

序 論

近年、全身作用を期待する薬物の投与部位として鼻腔が注目されている¹⁾。経口投与と比較して、鼻腔内投与後の薬物吸収は良好かつ速やかであることから²⁻⁴⁾、制吐剤や疼痛剤などの緊急性を要する製剤の投与部位として、また、門脈血を介さずに全身循環へ移行することから⁵⁾、肝初回通過効果の影響を受けやすい薬物の代替投与部位として注目されている。さらに、非侵襲的で注射剤のような痛みを伴わず、寝たきり高齢者など、経口製剤の服用が難しい患者に対して、介護者による投与も可能である。欧米では、制吐剤のグラニセトロン⁶⁾、オピオイド系鎮痛薬であるモルヒネやフェンタニル、骨粗鬆症治療薬のカルシトニン⁷⁻¹¹⁾などが市販または開発中である。しかしながら、国内の経鼻投与製剤の多くは局所作用を目的とした製剤で、花粉症などの鼻炎を対象とする抗アレルギー薬である¹²⁾。全身作用を目的とした製剤としては、中枢性崩尿症治療薬のデスマプレシン酢酸塩¹³⁻¹⁴⁾、子宮内膜症治療薬のブセレリン酢酸塩¹⁵⁾などが上市されているが、いまだ実用化された製剤の数は少ないのが現状である。

鼻腔内に投与される剤形としては、溶液製剤¹⁶⁻¹⁷⁾、ゲル製剤¹⁸⁾、粉末製剤¹⁹⁻²⁰⁾などが挙げられるが、臨床で汎用される製剤は溶液製剤である。しかしながら、粉末製剤には、投与量が確保できること、保存時の薬物安定性が良いことなど²¹⁾、多くの利点がある。また、溶液製剤には保存剤としてベンザルコニウム塩化物が添加されることが多く、界面活性作用を有するため、繊毛運動の低下や繰り返し投与による粘膜障害性が懸念されている²²⁻²⁷⁾。一方、粉末製剤では保存剤を添加する必要がないため、安全性にも優れていると考えられる。さらに、薬物の粘膜付着性を増大させるために粉末製剤が選択されることがある²⁸⁻³²⁾。現在、国内で市販されている経鼻投与型粉末製剤には、アレルギー性鼻炎治療薬であるリノコート®やエリザス®などが挙げられ、粉末製剤の有用性が活かされている³³⁾。

一般に、鼻腔内に異物が吸入されると、サイズ 5 μm 以上の粒子の多くは鼻粘膜に付着し、それよりも小さい粒子は肺や気管支に付着することが知られている。鼻粘膜に付着した粒子は、その後、Fig. 1 に示すように粘膜を覆う繊毛上皮細胞の繊毛運動により鼻腔後方に運ばれ、後鼻腔、咽頭を経て消化管に移行する。この繊毛運動によ

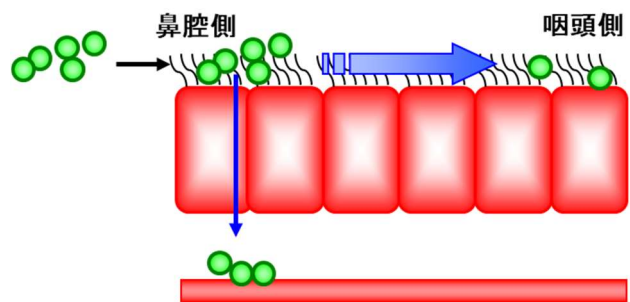


Fig. 1 Clearance mechanism of applied powder out of the nasal cavity

る異物の除去は mucociliary clearance (MC) と呼ばれ、薬物の鼻腔内滞留性を支配する因子として重要である³⁴⁻³⁶。

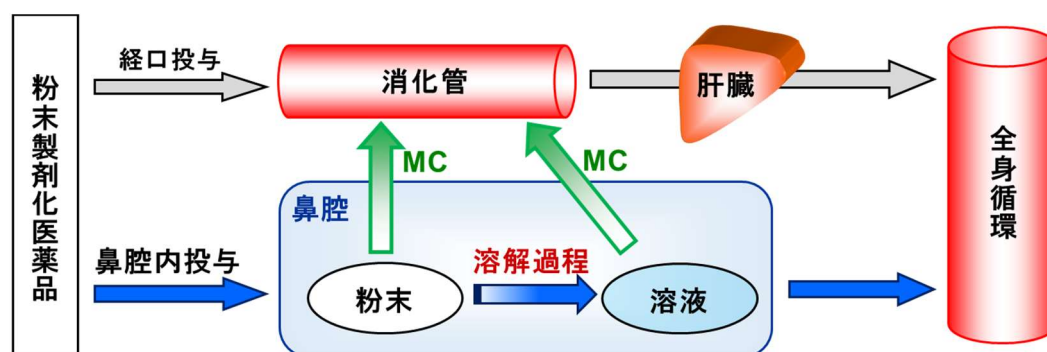


Fig.2 Drug absorption and disposition after nasal and oral administrations

Fig. 2 に示すように、内用固形製剤を経口投与した場合、製剤は消化管で崩壊し、薬物が溶出した後、吸収され、全身循環へと移行する。一方、鼻腔内投与した場合、鼻腔内で粉末医薬品が溶解過程を経て溶液状態となり、溶解した薬物が全身循環血へ吸収される。つまり、

溶液製剤とは異なり、粉末製剤の吸収過程の前には固体薬物の溶解過程が存在する。したがって、鼻腔内の薬物の溶解が吸収を決定する因子の一つとして重要である。また、粉末製剤には製剤添加物が含まれることが多く、MC や薬物の溶解に影響を与える可能性が高い。さらに、製剤添加物は鼻粘膜表面に直接投与されるため、薬物吸収に対する製剤添加物の影響が消化管吸収以上に大きい可能性が考えられる。

本研究では、モデル薬物として、溶解度・膜透過性に基づき、Table 1 に示す warfarin (WF、高溶解度&高透過性)、piroxicam (PXC、低溶解度&高透過性)、norfloxacin (NFX、高溶解度&低透過性)、sumatriptan (STP、高溶解度&低透過性) の 4 種類を選択した。

Table 1 Chemical structures and physicochemical properties of model drugs

Model drug	Chemical structures of model drugs	MW
Warfarin	<chem>CC(=O)C(O)c1ccc2c(c1)c(=O)oc2</chem>	308.3 (C ₁₉ H ₁₆ O ₄)
Piroxicam	<chem>CN(C)S(=O)(=O)c1ccc2c(c1)c(O)c(NC(=O)c3ccncc3)c2</chem>	331.4 (C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S)
Norfloxacin	<chem>CN1CCNCC1c2cc(F)c3c(c2)c(=O)c(C(=O)O)c3N(C)C</chem>	319.3 (C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃)
Sumatriptan	<chem>CN(C)CCc1c2c(c3ccccc13)sc(CS(=O)(=O)C)c2</chem>	295.40 (C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₂ S)

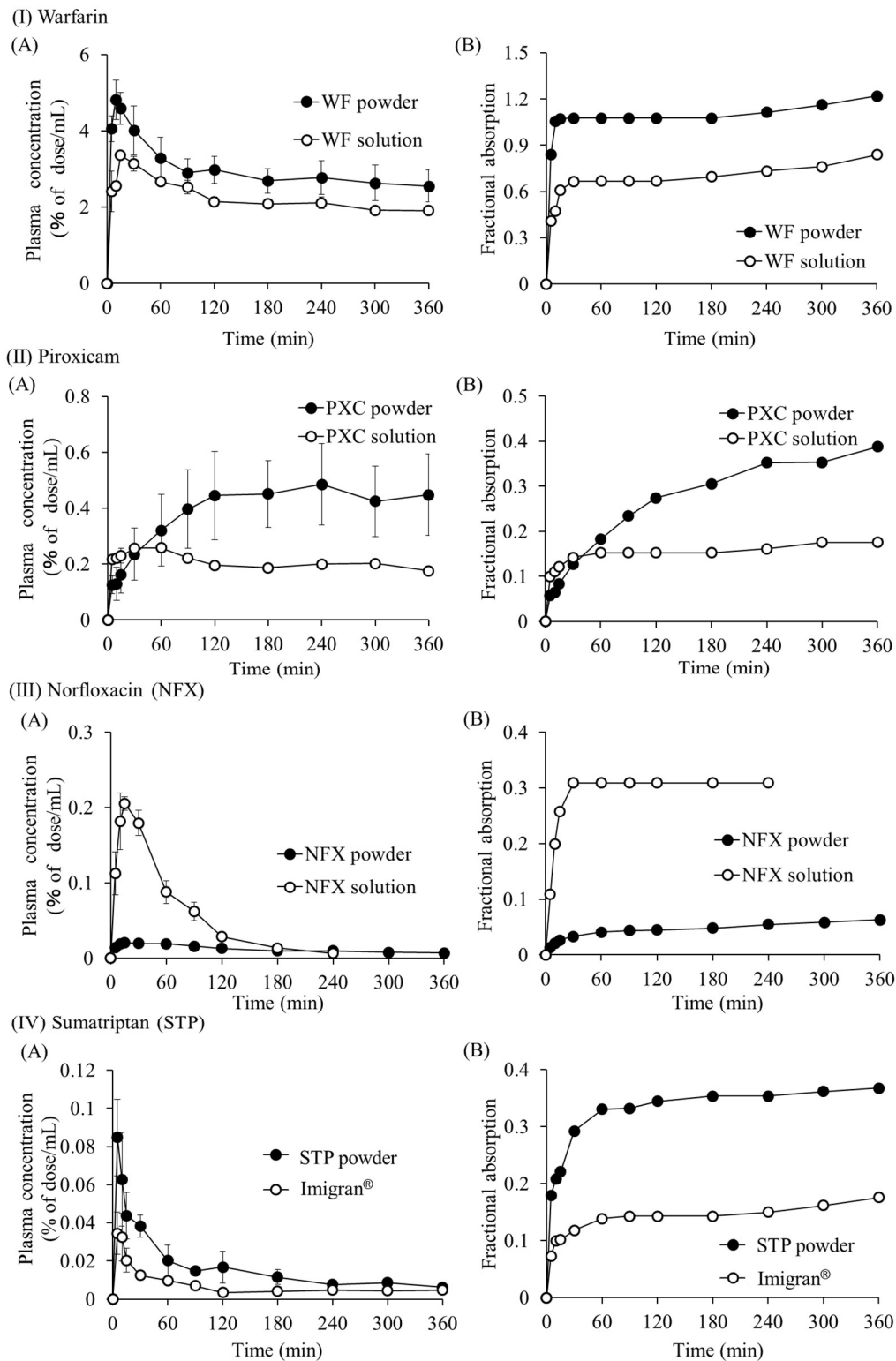


Fig. 3 (A) Plasma concentration-time profiles of model drugs following nasal applications of solution or powder (B) Changes in the fractional absorption of model drugs as a function of time following nasal applications of solution or powder to rats

Keys : (○) Solution. (●) Bulk powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 2

溶液製剤と異なり、粉末製剤には吸収過程の前に溶出過程が存在する。そこで、基礎的情報として、これら薬物の溶液あるいは粉末製剤をラット鼻腔内に投与した後の血漿中濃度の経時変化を測定した。Fig. 3 (I) に WF、Fig. 3 (II) に PXC、Fig. 3 (III) に NFX、Fig. 3 (IV) に STP の結果を示す。また、左側 (A) には血漿中薬物濃度変化を、右側 (B) には deconvolution 法により算出した吸収率の経時変化を示す。なお、STP の水溶液には現在臨床で用いられている Imigran® を選択した³⁷⁾。溶解度の良好な WF、STP では粉末製剤投与後の血漿中濃度は、溶液投与時と比較して高く、さらに持続的であった。一方、NFX では、溶液製剤投与後の吸収率は、投与約 30 分後に約 30% に上昇したが、粉末製剤を投与した場合の吸収率は投与後 30 分で約 3% に過ぎなかった。NFX の消化管からの吸収率は低いことが知られていることから、溶液投与後に吸収された NFX の多くは、鼻腔から吸収された結果と考えられる。また、PXC では、投与 30 分までは粉末製剤と比較して、溶液製剤投与後の血漿中濃度が高く、30 分以降は粉末製剤投与群の濃度が高かったことから、NFX と同様、溶液製剤からの吸収に関しては、消化管に比べて鼻腔からの吸収が良好であることが示された。以上の結果から、溶液製剤と粉末製剤投与後の吸収を比較すると、WF、STP のような溶解度が良好な薬物の場合、鼻粘膜表面における濃度が高く、さらに鼻腔内滞留性が向上にするために、溶液製剤と比較して粉末製剤投与後の吸収が良好であることが示唆された。また、溶解度が低い薬物に関して、粉末製剤投与後の吸収が低い理由は、鼻腔内で薬物が溶解しにくいためと考えられる。

汎用されている製剤添加物の中から、本研究では、賦形剤として、乳糖を、結合剤として、sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) 及び hydroxypropyl cellulose (HPC) を選択した。これらの製剤添加物と薬物原末を含む粉末製剤を鼻腔内に投与した後の吸収を *in vivo* 動物実験で検討した。その後、膜透過、薬物の溶解、鼻腔内滞留性、製剤中での拡散の観点から、*in vitro* 細胞層透過実験をはじめとする様々な実験系を用いて、個々の製剤添加物の薬物吸収に対する影響を詳細に検討することで、メカニズムの解明を試みた。最後に、得られた情報をもとに、製剤添加物による鼻腔内投与後の薬物吸収の制御の可能性を評価した。

以下、得られた知見を 3 章にわたり、論述する。

第 1 章

鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす乳糖の影響

第 1 章 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす乳糖の影響

第 1 章では、賦形剤として汎用される乳糖の影響を検討した。エリザス® では、主薬であるデキサメタゾンシペシル酸エステル
の他に、この乳糖水和物が含まれており、乳糖は水溶性の低分子糖類である。

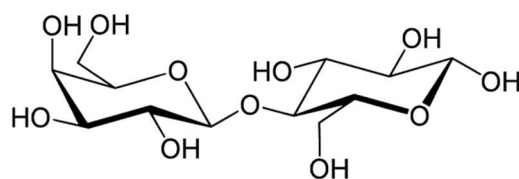


Fig. 4 Structure of lactose

薬物と乳糖を含む粉末製剤を鼻腔内投与すると、固体薬物と乳糖が鼻腔内で溶出して、溶液となる。その後、溶解した薬物が全身循環血に吸収される。消化管内と比較して、薬物が溶解する粘膜表面水分量が非常に少ないことが鼻腔の特徴であり、消化管内での溶出とは大きく異なる可能性が高い。特に、乳糖の場合、粘膜局所における濃度が高くなり、高い浸透圧が発生すると予想される。その結果、水分の移動が生じ、粘膜表面の水分量が增大する可能性が高い³⁸⁾。そこで、式量が小さく、さらに溶解すると電離し、より高い浸透圧が生じると考えられる NaCl を乳糖の比較対象

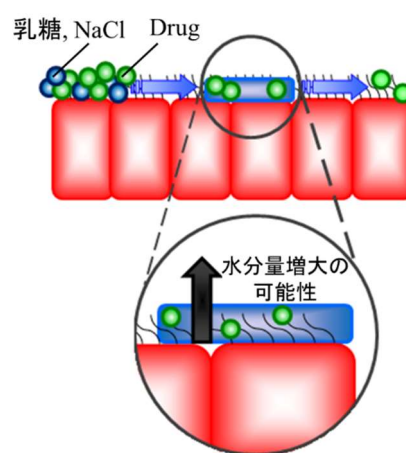


Fig. 5 Scheme representing the various processes of the drug after nasal administration with lactose

として選択した。モデル薬物としては、WF、PXC、NFX の 3 種類を選択し、これらの薬物を鼻腔内投与した後の吸収に及ぼす影響を系統的に検討した。

第 1 節 薬物の *in vivo* 経鼻吸収に及ぼす乳糖の影響

【目的】

本節では、乳糖、NaCl の薬物吸収に及ぼす影響を *in vivo* 動物実験で検討した。製剤添加物の影響をより詳細に明らかにするために、モデル薬物としては、PXC、WF、NFX を用いて、薬物の物性との関係も含めて検討した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 器具

polyethylene tube SP31 (nontoxic medical grade, I.D.:0.5 mm, O.D.:0.8 mm) は夏目製作所（東京）より購入した。

2. 実験動物

Wistar 系雄性ラット (8 週令、220-250 g) は (株) 清水実験材料 (京都) より購入した。動物実験はすべて京都薬科大学動物倫理委員会のガイドラインにしたがって実施した。

3. 試薬

WF、PXC、NFX、乳糖、NaCl は和光純薬工業株式会社より購入した。

実験方法

1. 粉末製剤の調製

薬物原末と乳糖あるいは NaCl を質量比 1:1 で混合した。混合粉体の粒子径を揃えるために、それぞれの粉末を混合前に乳鉢・乳棒を用いて粉碎した。薬物原末、乳糖、NaCl の一次粒子径を顕微鏡により観察したところ、それぞれ約 5 - 10 μm 、100 - 200 μm 、100 - 200 μm であった。

2. 粉末製剤のラット鼻腔内への投与

ソムノペンチル[®] (52 mg/kg、共立製薬 (株)) 麻酔下、Wistar 系雄性ラット (体重 220 - 250 g) を固定台に背位固定し、下肢大腿骨動脈に採血用カニューレーション (SP-31) を施した。噴霧に用いたデバイスを Fig. 6 に示す。デバイスは、三方活栓を介して、1 mL シリンジと先端を斜めにカ



Fig. 6 The device for administration of drug powder into rat nasal cavity

ットしたチップ (200 μL , Yellow Tips, ワトソン) を接続している³⁹⁾。チップ内部に薬物原末あるいは乳糖または NaCl を 50% 含む粉末製剤 1 mg を充填し、1 mL の圧縮空気で伏臥位のラットの鼻腔に噴霧投与した。粉末噴霧前後のチップ質量の相違から、噴霧量を算出した。投与後はボールマンゲージ (KN-326-III、夏目製作所) に拘束し、覚醒下、経時的に大腿動脈より採血を行った。得られた血液試料を 16,000 g で 5 分間遠心分離後、得られた血漿 100 μL を測定試料とした。血漿試料は分析時まで -40 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

3. 試料の前処理

得られた血漿試料 100 μ L に対し、1 mL の acetonitrile を加えて攪拌し、除タンパク処理した。その後、16,000 g で 5 分間遠心分離し、得られた上清 1 mL を回収し、60°C で蒸発乾固した。残渣を 100 μ L の HPLC 移動相に再溶解し、測定試料とした。

4. 定量

試料の薬物濃度が検量線の濃度範囲に収まるように、HPLC 移動相で各試料を希釈した後、以下の HPLC 条件にて定量を行った。

HPLC 定量条件

<WF>

HPLC system	; LC-20 (SHIMADZU)
Column	; Wakopak [®] (4.6×150 mm, Wako Pure Chemical)
Mobile Phase	; 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) /10 mM tetrabutyl ammonium (TBA) : methanol = 50:50
Flow rate	; 1.0 mL/min
Wave length	; Excitation / Emission = 310 nm/390 nm
Column temperature	; 40°C

<PXC>

HPLC system	; LC-10A (SHIMADZU)
Column	; Wakopak [®] (4.6×150 mm, Wako Pure Chemical)
Mobile phase	; 50 mM KH ₂ PO ₄ (pH2.5) / acetonitrile = 68 / 32
Flow rate	; 1.0 mL/min
Wave length	; 326 nm
Column temperature	; 40°C

<NFX>

HPLC system	; LC-20 (SHIMADZU)
Column	; Inertsil [®] ODS-4 (3 μ m, 4.6×150 mm, GL Science)
Mobile phase	; 0.1M acetic acid (pH 2.62) / acetonitrile = 80 / 20
Flow rate	; 1.0 mL/min
Wave length	; Excitation / Emission = 278 nm / 448 nm
Column temperature	; 40°C

5. データ解析

すべてのデータは平均値 \pm S.E. として、表示した。吸収率は WinNonlin[®] (Ver. 6.3, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) を用いて deconvolution 法に基づき算出した。

【結果・考察】

1-a Warfarin

WF を含む各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を Fig. 7 (A) に、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を Fig. 7 (B) に示す。乳糖及び NaCl を添加した場合、原末と比較して、血漿中薬物濃度及び吸収率に若干減少する傾向が観察されたが、顕著な相違は観察されなかった。薬物原末投与時の吸収率は 100% 以上、添加物含有製剤投与時の吸収率もほぼ 100% である。いずれの製剤に関しても、WF の全量が吸収されると考えられる。したがって、WF の吸収に及ぼす乳糖及び NaCl の影響はほとんどみられないことが明らかとなった。

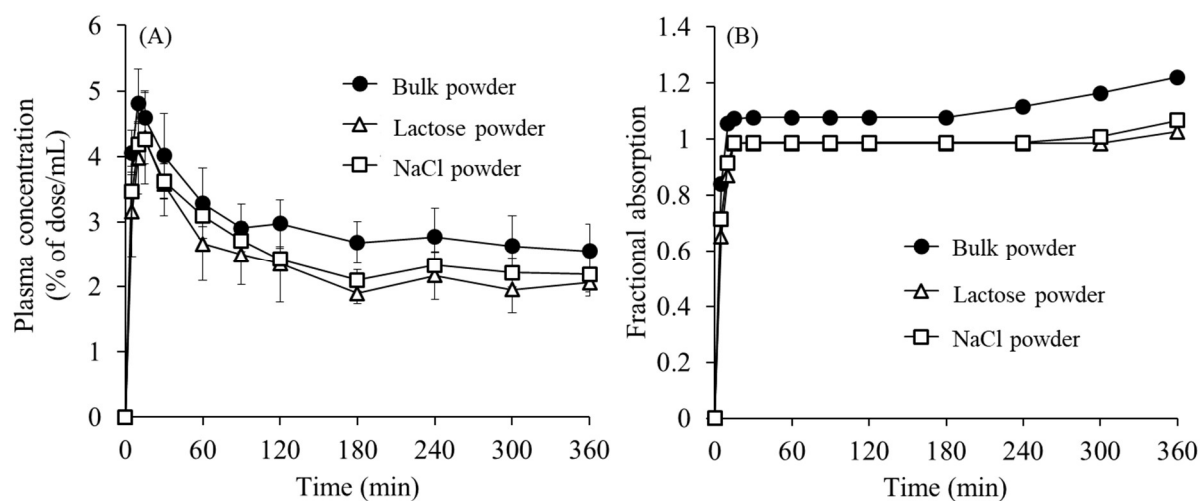


Fig. 7 (A) Effect of lactose and NaCl on the plasma concentration profiles of warfarin after nasal administration of powder formulations
(B) Changes in the fractional absorption of warfarin as a function of time after nasal administration of powder formulations

Keys: ●; Bulk powder, △; Lactose powder, □; NaCl powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Biol. Pharm. Bull., Fig. 4

1-b Piroxicam

PXC を含む各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を Fig. 8 (A) に、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を Fig. 8 (B) に示す。NaCl を添加した場合、原末と比較して、投与直後より吸収率の増大が観察された。PXC の溶解度は低いため、鼻粘膜表面水分量の増大により、薬物の溶解量が増大した結果として説明が可能である。一方、乳糖添加製剤投与後の吸収は、投与 30 分以降、増大することが明らかとなった。投与後 30 分が経過すると、製剤の大部分は消化管に移行していると考えられるため、この増大は鼻腔からの吸収増大に起因するものではないと考えている。投与 30 分以降の吸収増大は消化管吸収における個体差と考えられ、PXC の吸収に対する乳糖の影響は小さいことが示唆された。

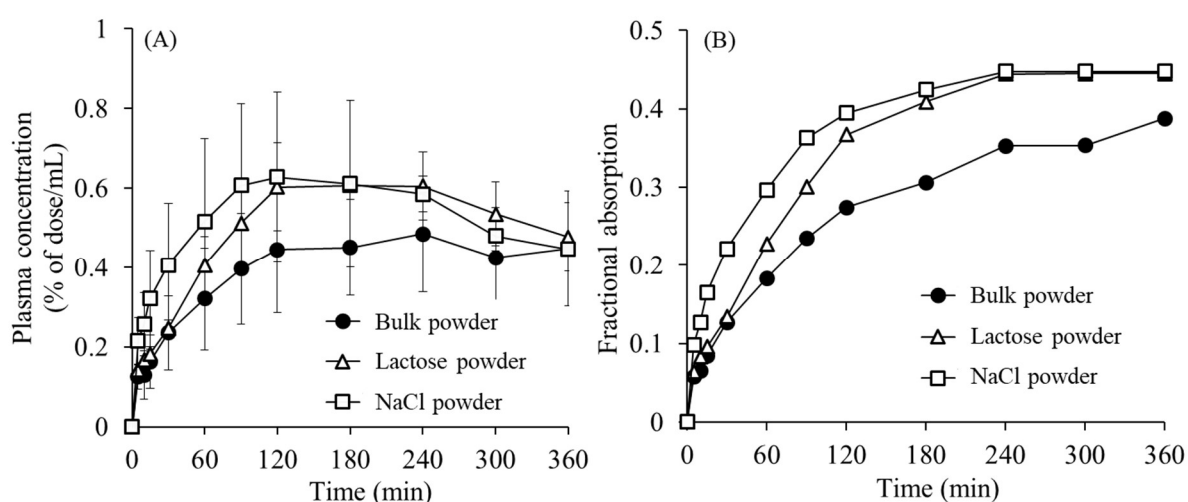


Fig. 8 (A) Effect of lactose and NaCl on the plasma concentration profiles of piroxicam after nasal administration of powder formulations
(B) Changes in the fractional absorption of piroxicam as a function of time after nasal administration of powder formulations

Keys: ●; Bulk powder, △; Lactose powder, □; NaCl powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Biol. Pharm. Bull., Fig. 4

1-c Norfloxacin

Fig. 9 (A) に NFX を含む各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を、Fig. 9 (B) に deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を示す。いずれの製剤を投与した場合でも、投与後 120 分までの血漿中濃度、吸収率に大きな相違は観察されず、NFX の鼻腔からの吸収に対して、乳糖、NaCl は影響を与えないことが明らかとなった。

NaCl を添加した場合のみ、投与 120 分以降の血漿中濃度が高く、吸収率も 120 分以降少しずつ増大している。投与後、120 分が経過すると、MC により、製剤の大部分は消化管に

移動していると考えられ、吸収率の増大は消化管吸収の増大に起因すると考えられる。NaClにより、消化管からの吸収が増大する理由は不明である。

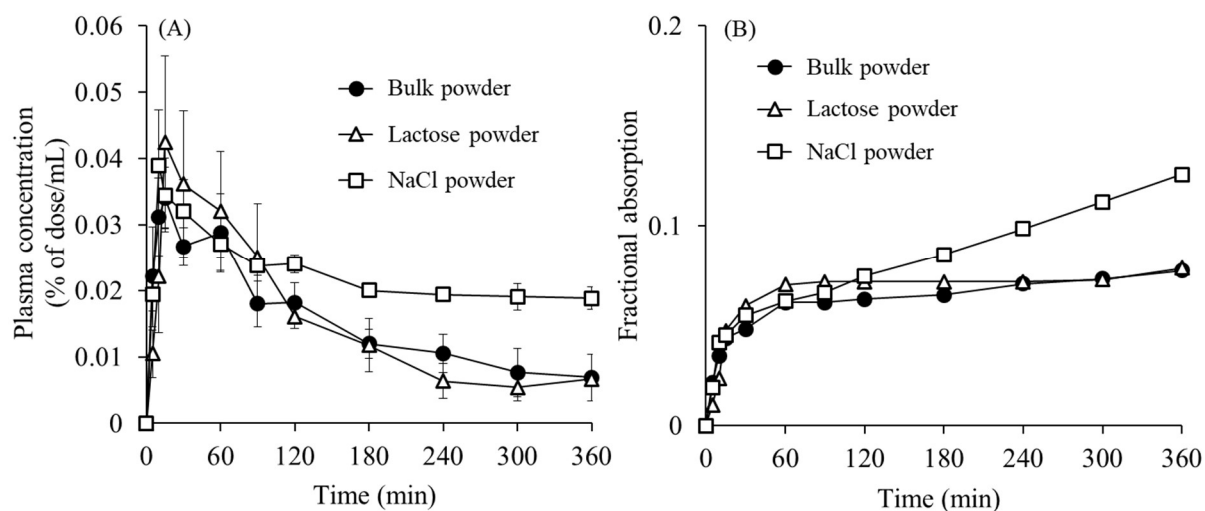


Fig. 9 (A) Effect of lactose and NaCl on the plasma concentration profiles of norfloxacin after nasal administration of powder formulations (B) Changes in the fractional absorption as a function of time after nasal administration of powder formulations

Keys: ●; Bulk powder, △; Lactose powder, □; NaCl powder.

Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

Biol. Pharm. Bull., Fig. 4

第 2 節 薬物の *in vitro* 細胞層透過及び細胞表面水分量に及ぼす乳糖の影響

【目的】

第一節での検討結果を、モデル薬物の物性（分子量、水への溶解性など）とあわせて、総合的に考察すると、薬物の経鼻吸収に及ぼす乳糖、NaCl の影響は細胞表面の水分量の変化を介する可能性が高いと考えられる。そこで本節では、各種製剤適用後の細胞層を介した薬物透過を検討すると同時に、メカニズムを明らかにするために、非吸収性マーカーを用いて、*in vitro* において細胞層表面水分量の変化を測定した。

2-1 *In vitro* 細胞層透過実験

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 器具

FALCON® Cell culture insert (0.4 μm pore size) と FALCON® Companion Plate 6 well は BECTON DICKINSON 社より購入した。培養フラスコは Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。

2. 試薬

α -MEM、antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10,000 U/mL penicillin、10 mg/mL streptomycin、25 mg/mL amphotericin B、0.85% 食塩水含有)、0.25% trypsin / 1 mM EDTA solution、fetal bovine serum (FBS) は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。その他の試薬については特級試薬を用いた。なお、本研究において使用した FBS は全て 56°C で 30 分間、非働化処理したものをを用いた。

3. 培養細胞

Medin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞は大日本住友製薬株式会社（大阪）より供与を受けた。

4. 細胞培養

MDCK 細胞⁴⁰⁻⁴¹⁾ は 10% FBS、1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution 含有 α -MEM 培地を用い、37°C、5% CO₂ 存在下、培養フラスコ内で培養し、継代はおよそ 3 日おきに行った。Subconfluent に達した MDCK 細胞を 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA を用いて剥離後、 2×10^5 cells/mL/well で culture insert に播種した。培地交換は 2 日毎に行い、播種後、37°C、5% CO₂ 環境下で 10 日間培養した。

実験方法

1. Transport medium の調製

136.9 mM NaCl、5.36 mM Na₂HPO₄、0.44 mM KH₂PO₄、0.41 mM MgSO₄、19.5 mM Glucose、1.26 mM CaCl₂、0.49 mM MgCl₂、4.17 mM NaHCO₃ 及び 10 mM HEPES を精製水に溶解し、pH 7.4 に調整した。

2. 透過実験

MDCK 単層膜を transport medium (TM) で洗浄後、apical 側の TM をすべて除去し、basal 側にのみ 4 mL の TM を添加した。静水圧の影響を排除するために、外径 3 mm のシリコ

ンチューブを用いて細胞層の位置を調整し、細胞層と basal 側液面の高さを一致させた。Apical 側に薬物原末あるいは、乳糖あるいは NaCl を 50% 含む粉末 1 mg をシリンジと三方活栓を組合せたデバイス (Fig. 4) で細胞層表面に噴霧し、実験を開始した。経時的に basal 側より 200 μ L ずつ採取した後、等量の TM を添加した。なお、鼻腔の粘膜表面に存在する水分の量はごくわずかと考えられるため、本実験では、apical 側に薬液を添加しない air-interface condition (AIC) で実験を行った (Fig. 10)。

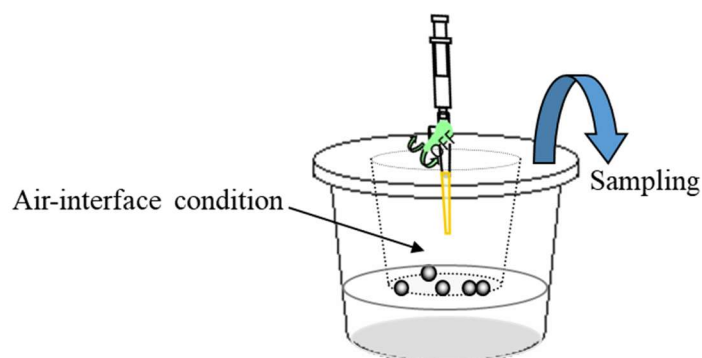


Fig. 10 *In vitro* transport study under air-interface condition
IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 1

鼻腔内の温度は 25 - 37°C、湿度は 35 - 80% と報告されている⁴²⁾。そこで、実験中は細胞層周辺の温度を 37°C 前後に維持した。また、AIC 状態で実験を行っているため、湿度が低い場合、細胞層の乾燥の影響を無視できないと考えられる。そこで、細胞の乾燥を防ぐために、加湿器を用いて、細胞層周囲の湿度を 80 - 90% に維持した。

3. 定量

試料の薬物濃度が検量線の濃度範囲に収まるように、HPLC 移動相で各試料を希釈した後、前節で示した HPLC 条件にて定量を行った。

【結果・考察】

各種粉末製剤を細胞層表面に噴霧した後の透過プロファイルを Fig. 11 に示す。乳糖あるいは NaCl を添加した場合、薬物原末と比較して、いずれの薬物の透過量も増大した。特に、PXC、NFX では、実験開始直後から増大が観察され、6 時間後の透過量は薬物原末の約 2～3 倍であった。これらの知見は、*in vivo* 動物実験で得られた乳糖、NaCl を添加することにより吸収が増加した知見を支持する結果と考えられる。WF と比較すると、PXC、NFX の溶解度は低いため、乳糖、NaCl の溶解に伴う水分量の上昇によって、薬物の溶解量が増大し、その結果、透過量が上昇したと考えられる。

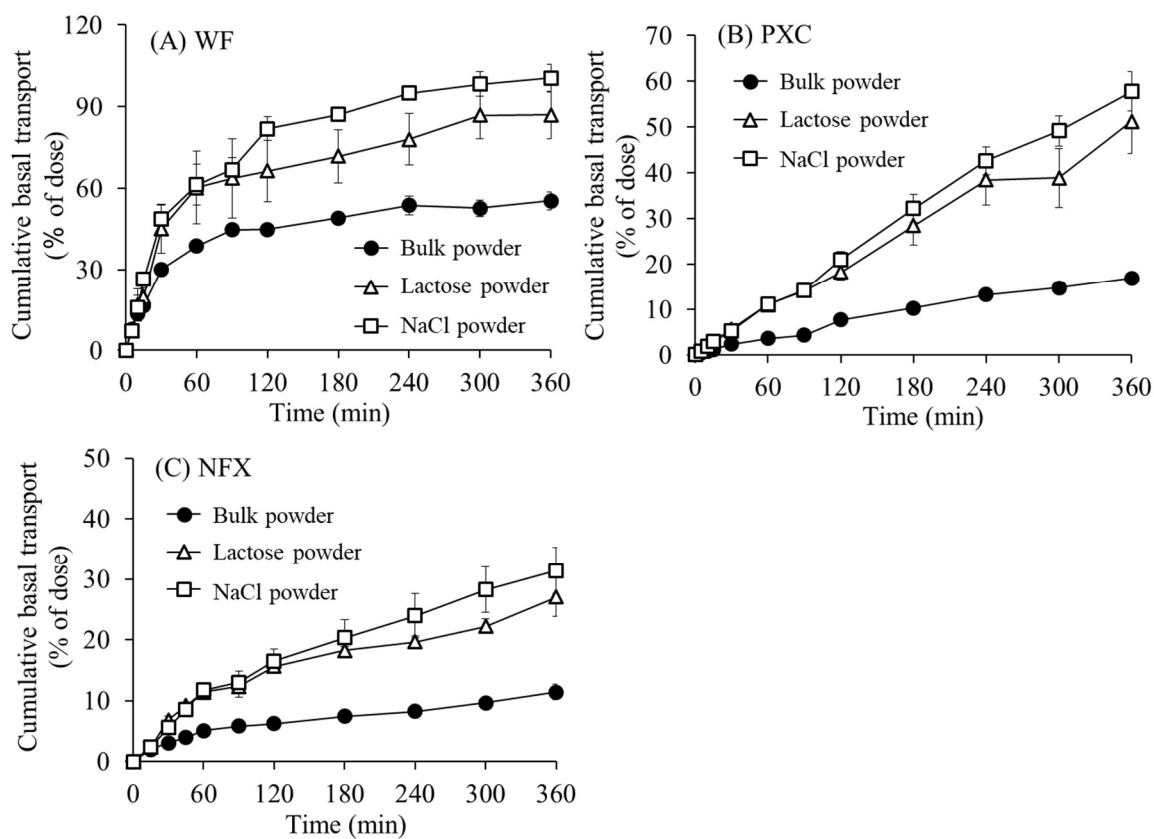


Fig. 11 Transepithelial transport of the model drugs across MDCK monolayers after spraying powder formulations onto the monolayer surface

Keys: ●; Bulk powder, △; Lactose powder, □; NaCl powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Biol. Pharm. Bull., Fig. 3

2-2 細胞表面水分量の変化

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 器具

前節の実験材料に準じた。

2. 試薬

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD4, 平均分子量: 4 kDa) は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。

3. 培養細胞、細胞培養

前節の実験材料に準じた。

実験方法

1. 細胞表面水分量変化の測定方法

In vitro 細胞層透過実験と同様、MDCK 単層膜を TM で洗浄後、apical 側の TM をすべて除去し、basal 側に 4 mL の TM を添加した。静水圧の影響を排除するために、外径 3 mm のシリコンチューブを用いて細胞層の位置を調整し、細胞層と basal 側液面の高さを一致させた。シリンジと三方活栓を組合せたデバイス (Fig. 4) を用いて、細胞層表面 apical 側に乳糖、NaCl 各 1 mg を噴霧し、実験を開始した。経時的に、apical 側に濃度 1 mg/mL の FD4 溶液 30 μ L を添加し、細胞層表面になじませた後、FD4 を含む表面溶液を回収した。

2. 試料の処理

得られた試料を 16,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた上清 10 μ L を回収した。

3. 測定

マイクロプレートリーダーを用いて、蛍光強度 (Excitation: 485 nm, Emission: 535 nm) を測定した。

4. データ解析

FD4 溶液の希釈率により、細胞表面水分量を算出し、control との差を細胞表面水分量の変化とした。

【結果・考察】

細胞層表面の水分量に対する乳糖、NaCl の影響を Fig. 12 に示す。細胞層表面水分量は乳糖の噴霧 15 分後に約 15 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 増大した。その後は順次低下し、60 分後の増大は約 5 $\mu\text{L}/\text{mg}$ であった。一方、NaCl の噴霧 15 分後に細胞層表面水分量は 75 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 増加し、その後は徐々に低下したが、投与 60 分後においても、増加量は約 40 $\mu\text{L}/\text{mg}$ であった。

NaCl の式量 (58.5) は乳糖の分子量 (342) に比較して小さく、さらに溶解すると、 Na^+ と Cl^- に電離する。NaCl の電離度を 100% とし、同じ質量の乳糖、NaCl で比較すると、NaCl による浸透圧の増大の程度は理論上、乳糖の 11.7 倍に達する。予想通り、乳糖に比較して、NaCl による細胞層表面水分量の変化が大きいことが明らかとなった。

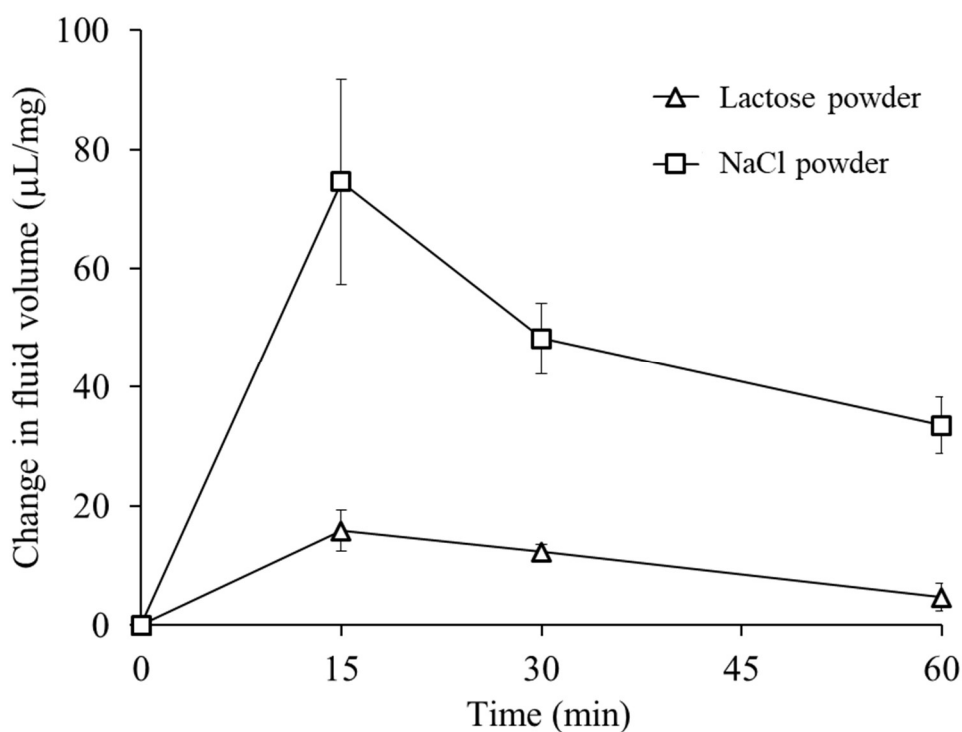


Fig. 12 Effect of lactose and NaCl on the fluid volume on the surface of MDCK monolayers

Keys : \triangle ; Lactose powder, \square ; NaCl powder

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Biol. Pharm. Bull., Fig. 2

第 3 節 薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす乳糖の影響

【目的】

鼻粘膜に付着した粉末製剤中の薬物は、溶解後、鼻腔から吸収されると同時に、一部は MC により、鼻腔後方に輸送され、後鼻腔、咽頭を経て嚥下され、消化管へと移行する。消化管からの薬物吸収と鼻腔からの薬物吸収は異なるため、鼻腔内滞留性は鼻腔内投与後の薬物吸収を支配する因子の一つである。第 1 節、第 2 節の検討で、添加物により、細胞層表面の水分量が増加し、薬物吸収が変動することが明らかとなったが、水分量の変化は製剤の鼻腔内滞留性を変化させる可能性が考えられる。そこで、本節では、非吸収性マーカーを用いて、*in vivo* で製剤の鼻腔内滞留性に及ぼす製剤添加物の影響を検討した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 器具、実験動物

前節の実験材料に準じた。

2. 試薬

FD70 (平均分子量: 70 kDa) は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。その他の試薬は前節の実験材料に準じた。

実験方法

1. 粉末製剤の調製

NFX : FD70 : 添加物 = 4 : 1 : 5 の質量比で各粉末を混合した。

2. 実験動物、*in vivo* 粉末鼻腔内投与、粉末製剤の噴霧方法

前節の実験材料に準じた。

3. 実験方法

Diethylether 麻酔下、体重 220 - 250 g の Wistar 系雄性ラットを固定台に背位固定し、各種粉末製剤 1 mg を前節の投与方法に準じて、鼻腔内投与した。その後、以下に示す方法で経時的に試料を採取した。麻酔により繊毛運動が低下するという報告があることから、試料採取直前に、ラットを麻酔した。

4. 試料採取方法

Hirai らの方法⁴³⁾に準じて、頸部食道及び気管にポリエチレンチューブによるカニューレションを施した (Fig. 13)。さらに、鼻腔蓋管を介した洗浄液の口腔内への漏出を防ぐため、外科

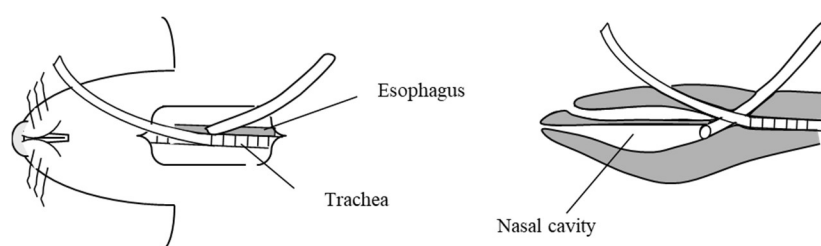


Fig. 13 Schematic diagram of *in situ* nasal absorption study using rats operated surgically on the trachea and esophagus

用アロンアルファ® (第一三共株式会社、東京) により、鼻腔蓋を閉じた。頸部食道に挿入したチューブに注射筒を接続し、粘液溶解剤 dithiothreitol (10 mM) を含む生理食塩水を鼻腔内に注入し、10 分間放置した。10 分後、さらに生理食塩水を注入し、合計 8 mL の生理食塩水で鼻腔内を洗浄した。洗浄液を全て回収し、体積を正確に 10 mL に調整した。この溶液の一部を測定に供した。

5. 定量

マイクロプレートリーダーを用いて、蛍光強度 (Excitation : 485 nm, Emission : 535 nm) を測定することにより、FD70 の濃度を算出した。

【結果・考察】

FD70 の鼻腔内残存量の経時変化を Fig. 14 に示す。薬物原末の場合、FD70 の残存率は投与後 10 分に約 54% にまで低下した。乳糖を添加した場合、投与後 10 分の FD70 の鼻腔内残存率は約 20% と低く、製剤の鼻腔内滞留性が低下することが明らかとなった。さらに、NaCl を添加した場合、投与 5 分後の FD70 の残存率は約 5%、10 分後には FD70 は検出されなかった。これは、鼻腔内の水分量が上昇し、鼻腔外への消失が速まったことに起因すると考えられる。

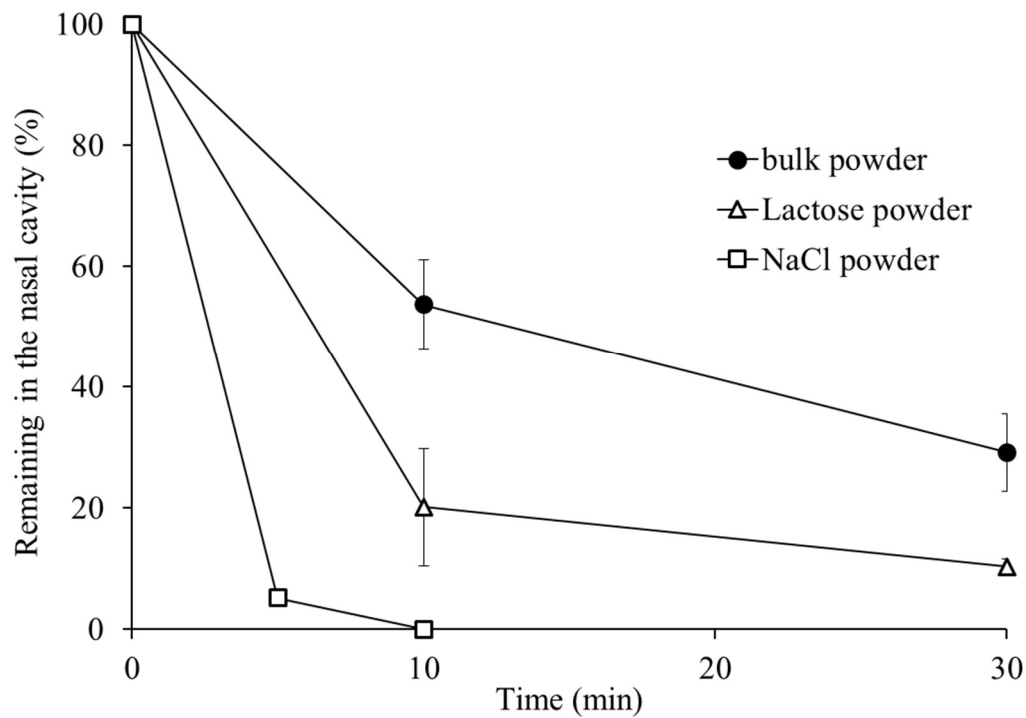


Fig. 14 Effect of lactose and NaCl on the clearance of FD70 from the rat nasal cavity
 Keys: ●; Bulk powder, △; Lactose powder, □; NaCl powder.
 Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three rats.
Biol. Pharm. Bull., Fig. 5

第 4 節 製剤添加物の粘膜障害性

【目的】

本節では、簡便に測定できる安全性評価の指標として汎用される lactate dehydrogenase (LDH) の活性を指標として、単回投与時の乳糖、NaCl の毒性評価を行った⁴⁴⁻⁴⁵⁾。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 試薬

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)[®] はロシュダイアグノスティックス株式会社 (東京) より購入した。

2. 実験動物

前節の実験材料に準じた。

実験方法

1. 鼻腔内投与実験

Pentobarbital (52 mg/kg) 麻酔下、体重 220 - 250 g の Wistar 系雄性ラットを固定台に背位固定し、各種添加物 1 mg を 前述の投与方法に準じて、鼻腔内に投与し、6 時間放置した。その後、Hirai らの鼻粘膜吸収実験に準じて頸部に手術を行った。ラット頸部を切開し、気管にポリエチレンチューブ (O.D. 2 mm, No.6, Hibiki) を挿入し、自発的な呼吸を確保した。食道から鼻腔に、ポリエチレンチューブを挿入した。鼻腔蓋管を介した洗浄液の口腔内への流出を防ぐため、鼻腔蓋を外科用アロンアルファ[®] (第一三共株式会社、東京) により閉鎖した。Control 群に関しては、添加物を投与せず、頸部の手術のみを行った。

2. 鼻腔内洗浄液の回収

食道に挿管したポリエチレンチューブを介して、PBS 8 mL で鼻腔を洗浄し、洗浄液をすべて回収し、その体積を正確に 10 mL に調整した。この溶液の一部を LDH 活性の測定に供した。

3. LDH 活性の測定

鼻腔内洗浄液中の LDH 活性は Cytotoxicity Detection Kit (LDH)[®] を用いて測定した。490 nm の吸光度はマイクロプレートリーダー (SPECTRAFLUOR Plus, TECAN, Switzerland) を用いて測定した。

【結果・考察】

ラットに各種添加物を投与し、その後、覚醒下においた。6 時間後の鼻腔内洗浄液の LDH 活性を Fig. 15 に示す。LDH 活性は control 群と比較して、いずれの添加物投与群でも顕著な相違は観察されず、各種添加物の毒性は極めて小さいことが示唆された。本結果より、各種添加物の添加による薬物吸収の増大は、細胞障害性に起因しないことが明らかとなった。

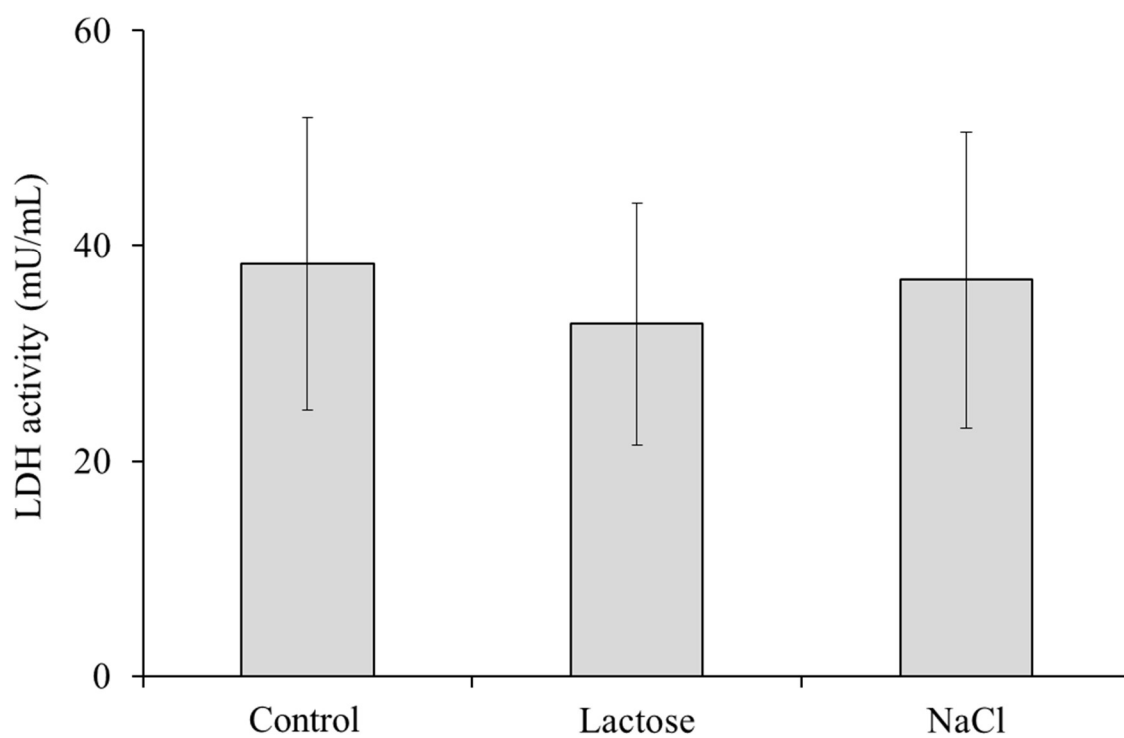


Fig. 15 LDH activities in the nasal lavage fluid after a single nasal administration of various bulk powders

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Biol. Pharm. Bull., Fig. 6

第 5 節 小括

本章では、賦形剤として利用される乳糖の薬物吸収に対する影響を検討した。乳糖は医薬品の製造の他、希釈散の調製にも用いられており、汎用される賦形剤である。第 17 改正日本薬局方によると、製剤添加物は「その製剤の投与量において薬理作用を示さず、無害でなければならない。また、添加剤は有効成分の治療効果を妨げるものであってはならない」とされている。しかしながら、消化管内と鼻腔内の環境は、内容物、蠕動運動、繊毛運動の有無等、大きく異なっており、経口投与では全く影響がない製剤添加物であっても、鼻腔内投与すると、様々な影響を及ぼす可能性が考えられる。研究開始当初、消化管内に比べて、水分に乏しいという鼻腔内環境と乳糖の物性（低分子量と水に対する高い溶解度）から、乳糖の溶解後に生じる浸透圧とそれに伴う水分量の変動を予想していた。予備実験の結果、予想通り、水分量の変化を示唆する結果を得ることができた。これらの結果より、水分量の変化をより詳細に検討できるように、比較対象の添加物（化合物）として、乳糖よりも水分に対する影響が大きいと予想される NaCl を用いて、研究を行った。

第 1 節では、薬物原末に添加物を添加した際の *in vivo* 吸収を評価した。*In vivo* 吸収実験の結果、乳糖、NaCl 含有製剤の鼻腔内投与後の薬物吸収に、薬物の物性に応じた相違が観察された。溶解度が低い PXC では、添加物により吸収量が増大したが、溶解度が高い WF では、添加物による吸収量への影響は認められなかった。本結果より、薬物吸収に対する製剤添加物の影響は、薬物の物性に依りて異なることが明らかとなった。

第 2 節では、これらの現象について詳細な検討を行うため、まず、*in vitro* 細胞層透過実験を行った。その結果、添加物を添加した場合、原末と比較して、いずれの薬物においても、細胞層透過量は増大した。中でも、NaCl を添加した場合の増大の程度が顕著であった。

第 3 節では、これらの影響のメカニズムを探るために、添加物による粘膜表面の水分量の変化を *in vitro* 実験系を用いて、検討した。乳糖、NaCl を添加した場合、細胞表面水分量は有意に増大した。添加物の溶解に伴い、浸透圧が増大した結果、水分が *apical* 側に漏出した結果と考えられる。乳糖は分子量 342 の非電解質、NaCl は分子量 58 の電解質である。同じ質量の両添加物がすべて溶解・電離した場合、NaCl の溶解に伴う浸透圧の変化は、乳糖の約 12 倍大きいと計算される。乳糖に比べて、NaCl の影響が顕著である要因は、NaCl による浸透圧増大の程度が大きいと考えられる。粘膜表面水分量の増大は、溶解度が低い薬物の溶解量の増大につながり、その結果、透過量が増大すると期待される。つまり、表面水分量の増大は第 2 節で得られた *in vitro* 細胞層透過実験の結果の一部を支持する知見と考えられる。

第 4 節では、製剤の鼻腔内滞留性に注目した。*In vivo* 動物実験の結果、乳糖、NaCl 添加時に製剤の鼻腔内滞留性が低下した。また、低下の程度は第 3 節の検討で明らかとなった表面の水分増大量に相関しており、NaCl 添加時の滞留性の低下の程度がより顕著であった。添加剤の溶解に伴う水分量の増大により、薬物の咽頭側への移動が容易になり、その結果、滞留性が低下した可能性が考えられた。鼻腔からの薬物吸収は消化管からの薬物吸収に比べて、一般に、良好かつ速やかであるため、製剤の鼻腔内滞留性の低下は、薬物の物性によっては吸収低下を惹起する。添加物による製剤の鼻腔内滞留性の低下は、第 1 節の *in vivo* 吸収に関する結果の一部を支持する知見と考えられる。最後に、各種添加物の毒性評価を行った結果、各種添加物の添加による薬物吸収の増大は細胞障害性に起因しないことが明らかとなった。

以上の結果より、乳糖及び NaCl による鼻粘膜表面の水分量の増大は、薬物吸収に対して、正負両面の影響を及ぼすことが明らかとなった。薬物溶解量の改善は、粘膜表面の少量の水分に対して、溶解しきれない溶解度が低い薬物に対してのみ、その吸収を改善する。一方、製剤の鼻腔内滞留性の低下はいずれの薬物に対しても、吸収を低下

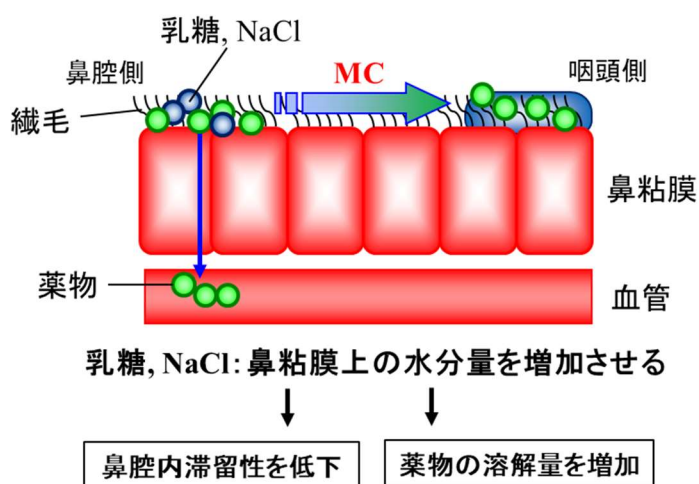


Fig. 16 Factors affecting the absorption after nasal coadministration of lactose or NaCl

させる。正負両面の影響のいずれか顕著な影響が、実際の薬物吸収に対する影響として観察される。すなわち、乳糖、NaCl によって、吸収が改善される薬物は PXC のような溶解度が低く、膜透過性が高い薬物と考えられ、薬物の溶解度を考慮して、製剤添加物を使い分ける必要があることが明らかとなった。

第 2 章

鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす結合剤 CMC-Na の影響

第 2 章 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす結合剤 CMC-Na の影響

一般に鼻腔内投与後の薬物吸収を改善するためには、ゲル製剤の他、溶液製剤に粘膜付着性ポリマーやキトサン等の正電荷をもつ水溶性ポリマーを含有させた製剤を用いて、鼻腔内滞留性を改善する等々の手法が用いられる⁴⁶⁻⁴⁹⁾。しかしながら、薬物吸収と製剤の粘性との関係を検討した報告は散見されるものの、粘性製剤からの薬物吸収と薬物物性との関係を検討した報告は少ない。特に、投与後に製剤の粘性が増大するようにポリマーを添加した粉末製剤からの薬物吸収を検討した報告は皆無に等しい。

第 2 章では、液状製剤の粘性付与のために用いられる CMC-Na（結合剤）を製剤添加物として⁵⁰⁾、薬物を含む粉末製剤に添加し、薬物吸収を検討した。鼻腔内投与後、CMC-Na は鼻粘膜表面の水分に溶解し、鼻腔内において製剤の粘度を高めることが期待される。鼻粘膜表面の水分量はきわめて少ないため、粘性液状製剤よりも粘度が高まる可能性が高い。モデル薬物として WF、PXC、NFX を選択し、鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす CMC-Na の影響を評価すると共に、そのメカニズムの解明を行った。さらに、応用の可能性を探るために、insulin 及び FD4 を高分子モデル薬物として用い、高分子医薬品の吸収に対する影響も評価した。

第 1 節 薬物の *in vivo* 経鼻吸収に及ぼす CMC-Na の影響

【目的】

本節では、CMC-Na の薬物吸収に及ぼす影響を *in vivo* 実験系で検討した。製剤添加物 CMC-Na の影響をより詳細に明らかにするために、モデル薬物としては、水に対する溶解度、生体膜透過性がそれぞれ異なる PXC、WF、NFX を用いて、薬物の物性との関係も含めて検討した。

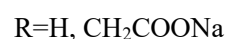
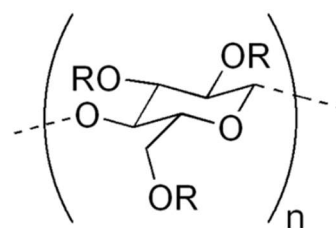


Fig. 17 Structure of CMC-Na

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 実験動物

前節の実験材料に準じた。

2. 試薬

CMC-Na は和光純薬工業株式会社より購入した。

実験方法

1. 投与粉末の調製

CMC-Na と薬物原末を質量比 1:1 で混合した。粒子径の相違をなくするために、それぞれの粉末を混合する前に、乳鉢・乳棒を用いて粉碎した。

2. *In vivo* 動物実験

前章の実験方法に準じた。

【結果・考察】

1-a Warfarin

Fig. 18 (A) には、WF の各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を、Fig. 18 (B) には、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を示す。原末投与の場合、投与 10 分後に吸収率は 100% に達した。CMC-Na を添加した場合、原末投与の場合と同様、投与 10 分後に吸収率は最高値に到達したものの、100% には到達せず、約 90% であった。CMC-Na により、WF の吸収は若干低下することが明らかとなった。

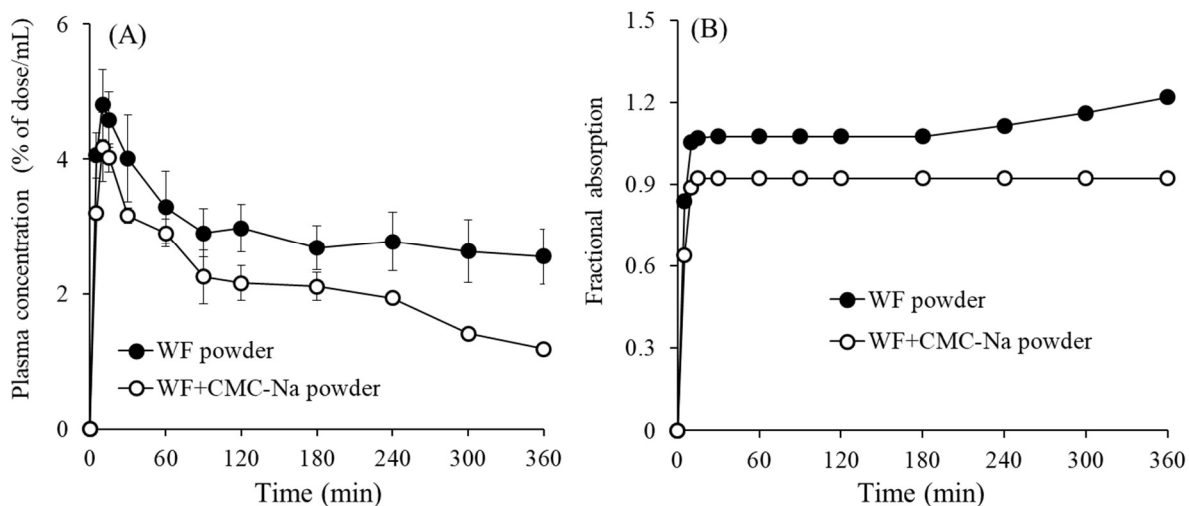


Fig. 18 Effects of CMC-Na on (A) the profiles of the plasma concentrations and (B) changes in the fractional absorption of warfarin after nasal administration of powder formulation to rats

Keys: ●; WF powder, ○; WF + CMC-Na powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 3

1-b Piroxicam

PXC の各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を Fig. 19 (A) に、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を Fig.19 (B) に示す。CMC-Na を添加した場合、投与 30 分後までの PXC の血漿中濃度が原末投与時よりも速やかに増大し、薬物吸収が促進されたことが明らかとなった。吸収率の経時変化からも明らかのように、両製剤ともに、投与後 180 分で吸収は終了するが、CMC-Na により吸収率が約 10% 増大することが明らかとなった。

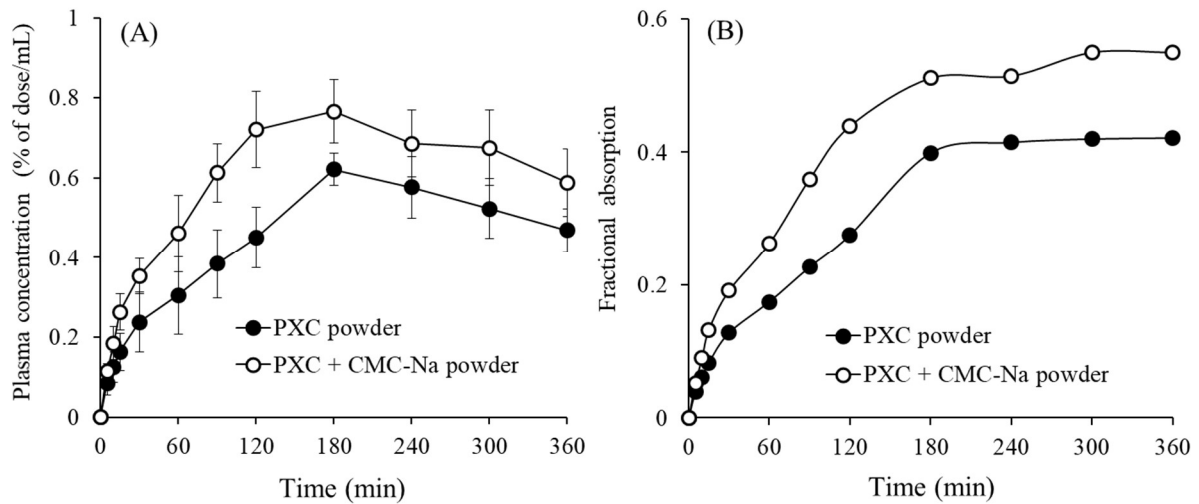


Fig. 19 Effects of CMC-Na on (A) the profiles of the plasma concentrations and (B) changes in the fractional absorption of piroxicam after nasal administration of powder formulation to rats

Keys: ●; PXC powder, ○; PXC + CMC-Na powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 3

1-c Norfloxacin

Fig. 20 (A) は、各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の NFX の血漿中濃度の経時変化を、Fig. 20 (B) は、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を示す。両製剤ともに、血漿中濃度の立ち上がりは速やかで、投与後 30 分までは吸収率も速やかに増大した。投与 60 分以降の吸収率の増大は、消化管からの吸収によると考えられることから、消化管吸収にも相違が観察されるものの、PXC と同様、CMC-Na を添加することによって、NFX の鼻腔からの吸収が増大することが明らかとなった。

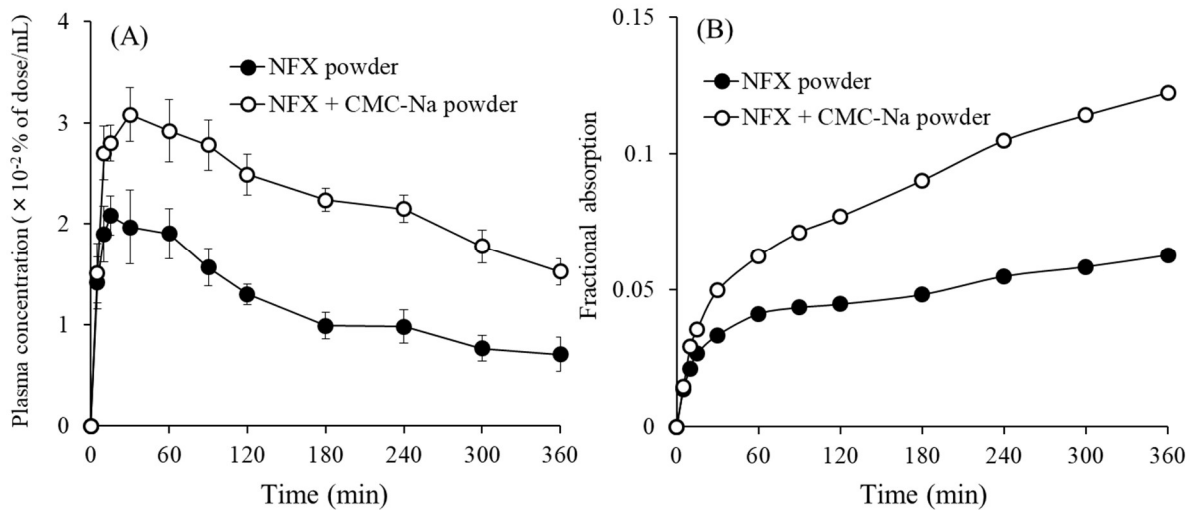


Fig. 20 Effects of CMC-Na on (A) the profiles of the plasma concentrations and (B) changes in the fractional absorption of norfloxacin after nasal administration of powder formulation to rats

Keys: ●; NFX powder, ○; NFX + CMC-Na powder.

Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 3

第 2 節 薬物の細胞層透過に及ぼす CMC-Na の影響

【目的】

第 1 章の検討でも明らかとなったが、製剤添加物は薬物の吸収と密接な関係がある様々な因子に影響を与える。第 1 節では動物実験を用いて検討を行ったが、想定される血漿中濃度は、生じうるすべての影響を受けた結果である。吸収変動のメカニズムを考察するためには、個々の因子の影響を個別に評価する必要がある。第 2 節では、薬物の膜透過に対する影響のみを評価可能な *in vitro* 細胞層透過実験を行い、薬物の生体膜透過に及ぼす CMC-Na の影響を検討した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 器具、試薬、培養細胞、細胞の培養

前節の実験材料に準じた。

実験方法

1. Transport medium の調製、透過実験、定量

前章の実験方法に準じた。

【結果・考察】

各種粉末製剤を細胞層表面に噴霧した後の薬物の透過プロファイルを図 21 に示す。CMC-Na を添加した場合、原末と比較して、いずれの薬物においても透過量は同程度で、薬物の細胞層透過に相違は観察されなかった。

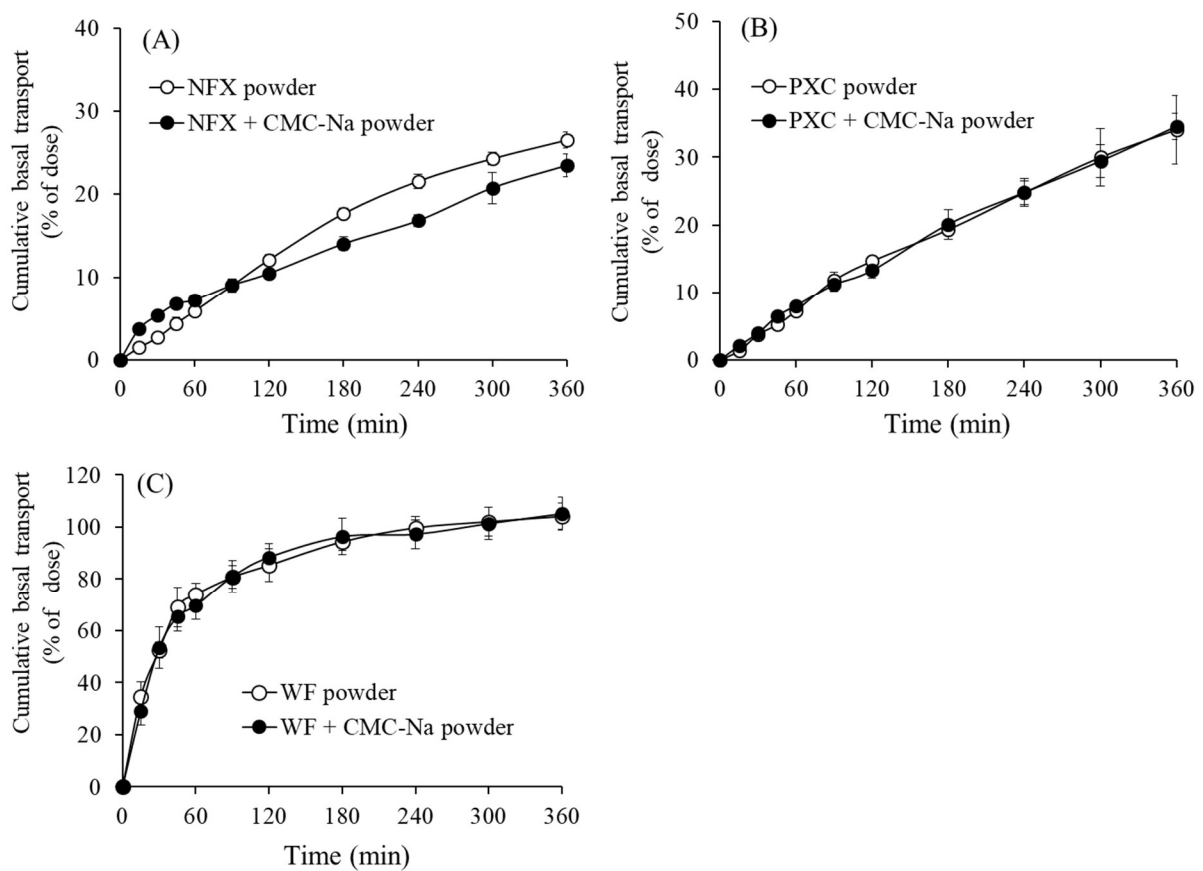


Fig. 21 Transepithelial transport of (A) norfloxacin, (B) warfarin and (C) piroxicam across MDCK monolayers after insufflation of powder formulations onto the surface of monolayers

Keys: ○; Bulk powder, ●; Drug + CMC-Na powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 4

第 3 節 薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす CMC-Na の影響

【目的】

粘膜表面の薬物濃度や吸収表面積が異なるため、鼻腔からの薬物吸収は消化管からの薬物吸収とは異なり、一般に速やかかつ良好である。したがって、製剤の粘度や繊毛運動の影響を受けて変化する薬物の鼻腔内滞留性は、鼻腔内投与後の薬物吸収に大きな影響を与える。第 3 節では、第 1 章と同様の動物を用いた *in vivo* 実験系を用いて、非吸収性マーカ含有製剤を鼻腔内投与した後の鼻腔内滞留性に及ぼす CMC-Na の影響を評価した。

【実験材料と実験方法】

実験材料

1. 器具、実験動物、試薬

前節の実験材料に準じた。

実験方法

1. 粉末製剤の調製

NFX : FD70 : CMC-Na = 4 : 1 : 5 (質量比) で各粉末を混合した。

2. 実験動物、粉末の鼻腔内投与、粉末の噴霧、実験方法、試料採取、定量

前節の実験方法に準じた。

【結果・考察】

FD70 の鼻腔内残存量の経時変化を Fig. 22 に示す。なお、CMC-Na の control として、starch (デンプン) を添加した。Starch を添加した製剤の消失に薬物原末との相違は観察されなかった。また、投与後 10 分、30 分の starch 含有製剤の鼻腔内残存率はそれぞれ約 55%、20% であった。一方、CMC-Na 含有製剤の残存率は約 90%、55% であり、CMC-Na の添加により、製剤の鼻腔内滞留性が改善され、投与 30 分後においても、投与した薬物の 50% 以上が鼻腔内に残存していることが明らかとなった。

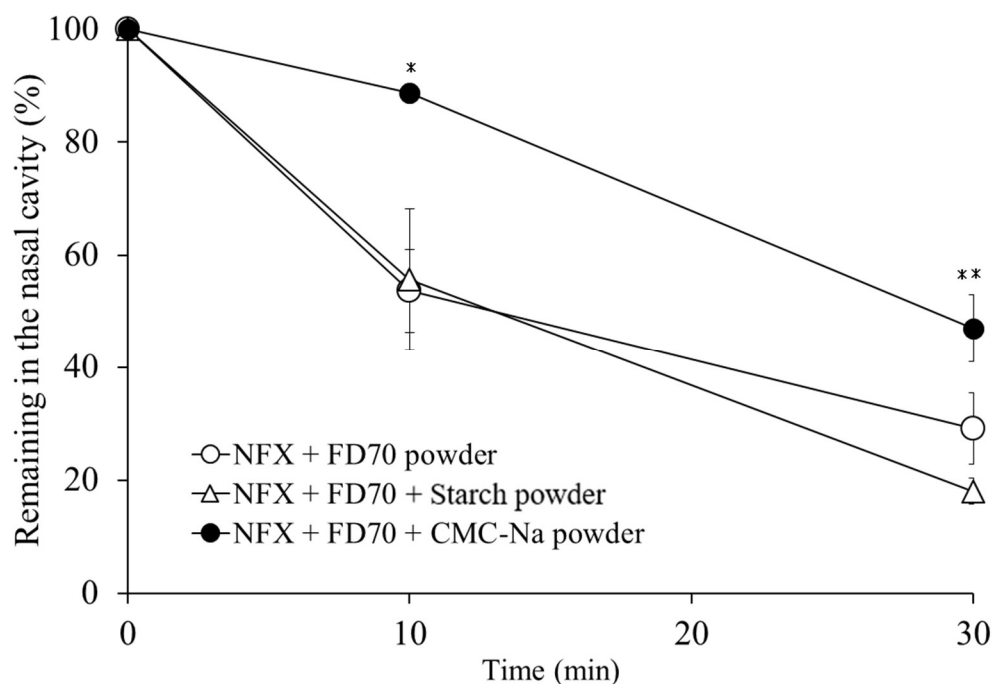


Fig. 22 Effect of CMC-Na on the clearance of the formulation from the nasal cavity

Keys : ○; NFX + FD70 powder, △; NFX + FD70 + Starch powder, ●; NFX + FD70 + CMC-Na powder. * $p < 0.05$. 10 min: NFX + FD70 + CMC-Na powder compared with NFX + FD70 powder, 30 min: NFX + FD70 + CMC-Na powder compared with NFX + FD70 + starch powder.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

IEEE. Trans. Nanobioscience., Fig. 5

第 4 節 高分子薬物の経鼻吸収に及ぼす CMC-Na の影響

【目的】

CMC-Na は PXC、NFX の吸収を顕著に改善することが明らかとなった。近年、鼻腔は高分子薬物であるインスリンやカルシトニンなどのペプチド製剤の投与部位として注目されていることから^{51, 52)}、ペプチドなどの高分子薬物の吸収に及ぼす CMC-Na の影響は非常に興味深い。そこで、高分子のモデルとして、いずれも分子量が約 4 kDa の insulin 及び FD4 を選択し、高分子薬物の吸収に対する CMC-Na の促進効果を検討した。

【実験材料と実験方法】

実験材料

1. 器具、実験動物

前述の実験材料に準じた。

2. 試薬

Porcine Insulin はナカライテスク株式会社 (京都) より、fluorescein isothiocyanate-dextran (FD4) は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より、Glucose CII-test Wako[®] 及び グラザイム[®] Insulin-EIA TEST は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。その他の試薬は前述の実験材料に準じた。

実験方法

1. 投与液、粉末製剤の調製

(1) 急速静脈内投与液

FD4 投与液は PBS を用いて、濃度 1 mg/mL となるように調製した。

(2) 鼻腔内投与液

Insulin、FD4 の投与液は pH7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) を用いて、濃度 20 mg/mL、125 mg/mL となるように調製した。

(3) 鼻腔内投与粉末製剤

製剤添加物含有製剤は質量比 1:1 で、原末と CMC-Na を混合した。

2. 急速静脈内投与

第 1 章の実験方法に準じた。200 µg/rat の FD4 を頸静脈より急速投与した。

3. 溶液の鼻腔内投与

前述の実験方法に準じた。

4. 粉末製剤の鼻腔内投与

前述の方法に準じた。

5. 定量

(1) Glucose の定量

ムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ (GOD) 法に基づき、Glucose C II-test Wako[®] を用いて、血漿中 glucose 濃度を測定した。

(2) Insulin の定量⁵³⁻⁵⁵⁾

ワンステップ・サンドイッチ酵素免疫測定法に基づき、グラザイム[®] Insulin-EIA TEST を用いて、血漿中 insulin 濃度を測定した。

(3) FD4 の定量

マイクロプレートリーダー (SPECTRAFLUOR Plus, TECAN, Switzerland) を用いて、Ex. 488 nm、Em. 520 nm の波長で、蛍光強度を測定することにより FD4 濃度を算出した。

6. データ解析

前述のデータ解析に準じた。insulin 投与時の薬理効果の指標として、area above the curve (AAC)⁵⁶⁾ 及び $D\%$ (area above the hypoglycemic effect (%)-time curve)⁵⁷⁾ を用いた。 $D\%$ は投与後の血漿中 glucose 濃度-時間曲線より、以下の式に基づいて算出した。

$$D(\%) = \left[1 - \frac{AUC_{0 \rightarrow 180}}{100\% \times 180 (\text{min})} \right] \times 100$$

【結果・考察】

4-a FD4

FD4 鼻腔内投与後の血漿中濃度の経時変化を Fig. 23 (A) に、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を Fig. 23 (B) に示す。CMC-Na 含有粉末製剤を投与した場合、溶液、starch 含有粉末製剤投与時と比較して、FD4 の血漿中濃度は高く、CMC-Na 含有粉末製剤、starch 含有粉末製剤投与時の吸収率は溶液投与時と比較して、それぞれ 1.4 倍、1.1 倍であった。

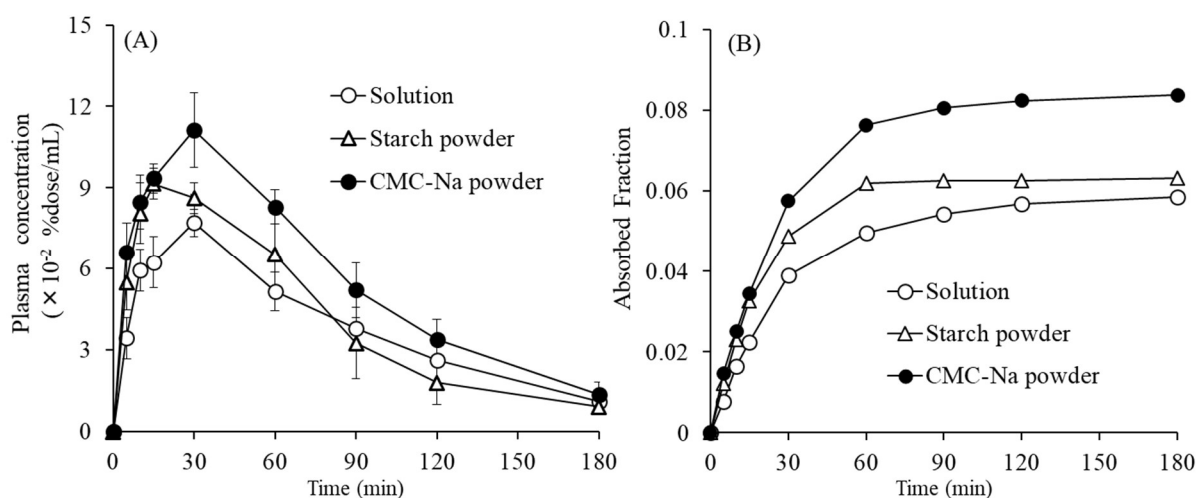


Fig. 23 (A) The concentration of FD4 in the plasma and (B) changes in the fraction of FD4 absorbed after nasal administration of various formulations to rats

Keys: ○; Solution, △; Starch powder, ●; CMC-Na powder

Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

PLoS One., Fig. 1

4-b Insulin

Fig. 24 (A) に insulin 鼻腔内投与後の insulin 血漿中濃度の経時変化を、Fig. 24 (B) に血糖値の経時変化を示す。また、Table 2 に AAC、D% 及び AUC を示す。

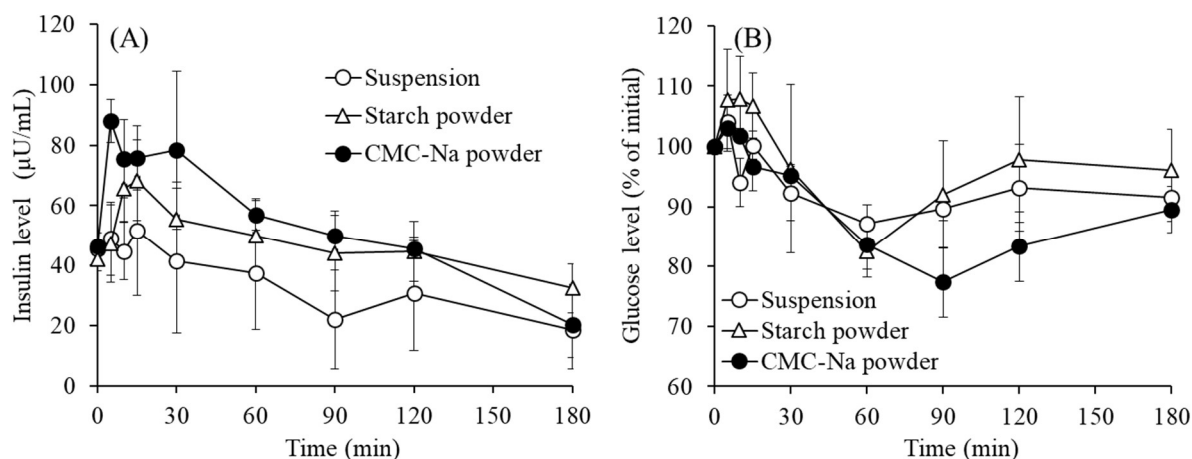


Fig. 24 The plasma level of (A) insulin and (B) glucose after nasal administration of various insulin formulations to rats

Keys; ○, Suspension; △, Starch powder; ●, CMC-Na powder.

Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

PLoS One., Fig. 2

CMC-Na 含有粉末製剤を投与した場合、溶液、starch 含有粉末製剤の投与時と比較して、高い血漿中 insulin 濃度が観察された。CMC-Na 含有粉末製剤、starch 含有粉末製剤投与時の D% は溶液投与時と比較して、それぞれ 11.3%、6.1% 増大した。また、CMC-Na を添加した場合、溶液及び starch を添加した場合に比べて、glucose 濃度の低下が長時間、持続することが明らかとなった。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of insulin and glucose after nasal administration of suspension, starch powder and CMC-Na powder

Formulation	$AUC_{\text{insulin}, 0 \rightarrow 180}$ ($\mu\text{U} \cdot \text{min}/\text{mL}$)	$AAC_{\text{glucose}, 0 \rightarrow 180}$ ($\% \cdot \text{min}$)	D (%)	Dose of insulin (μg)
Suspension	5758 ± 2387	1602.0 ± 477.4	8.9 ± 2.7	500
Starch powder	8420 ± 1505	1894.8 ± 779.8	15.0 ± 6.8	335 ± 20.2
CMC-Na powder	9331 ± 312	2380.5 ± 570.3	20.2 ± 5.4	373 ± 26.2

Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

PLoS One., Table 1

第 5 節 CMC-Na の毒性評価

CMC-Na は、古くから経口投与製剤の結合剤として汎用されており、長期の使用実績により、安全性は十分に確認されている。しかしながら、経口投与とは異なり、鼻粘膜は高濃度の CMC-Na と接触するため、粘膜障害性が惹起されるリスクが懸念される。そこで、本章では CMC-Na の毒性評価を行った。

5-1 CMC-Na の粘膜障害性

【目的】

本節では、第 1 章での検討と同様、測定が簡便な LDH 活性を指標に、安全性の評価を行った。単回投与時のみでなく、頻回投与時の粘膜障害性についても検討した。

【実験材料と実験方法】

実験材料

1. 試薬

LDH-cytotoxic Wako[®] は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。

2. 実験動物

Wistar 系雄性ラットは前章と同様に (株) 清水実験材料 (京都) より購入した。動物実験はすべて京都薬科大学動物倫理委員会のガイドラインにしたがって実施した。

実験方法

1. 鼻腔内投与実験

(1) 前処理群 (単回投与)

Pentobarbital 麻酔下、体重 220 - 250 g の Wistar 系雄性ラットを固定台に背位固定し、Hirai らの鼻粘膜吸収実験に準じて頸部に手術を行った。ラット頸部を切開し、気管にポリエチレンチューブ (O.D. 2 mm, No.6, Hibiki) を挿入し、自発的な呼吸を確保した。食道から後鼻腔にもポリエチレンチューブを挿入した。鼻腔蓋管を介した洗浄液の口腔内への流出を防ぐため、鼻腔蓋を外科用アロンアルファ[®] (第一三共株式会社、東京) により閉鎖した。そして、

各種製剤添加物 1 mg あるいは PBS 5 μ L を前述の投与方法に準じて、鼻腔内に投与し、6 時間後に LDH 活性測定用の試料を採取した。

(2) 直前処理群 (単回投与)

Diethylether 麻酔下、体重 220 - 250 g の Wistar 系雄性ラットを固定台に背位固定し、各種製剤添加物 1 mg あるいは PBS 5 μ L を前述の投与方法に準じて鼻腔内投与した。その後 6 時間は、覚醒下においた。投与 6 時間後、前述した Hirai らの方法に準じて手術を行った。さらに、上記 (1) と同様、鼻腔蓋管を介した洗浄液の口腔内への流出を防ぐため、鼻腔蓋を外科用アロンアルファ[®] (第一三共株式会社、東京) により閉鎖した。

(3) 連続投与

各種製剤添加物 1 mg あるいは PBS 5 μ L を前述の投与方法に準じて 1 日 1 回 7 日間の連続鼻腔内投与を行った。投与後 8 日目に、前述した Hirai らの方法に準じて手術を行った。

2. 鼻腔内洗浄液の回収

食道に挿管したポリエチレンチューブを介して、PBS 8 mL で鼻腔を洗浄し、洗浄液を全て回収し、メスフラスコを用いてその体積を正確に 10 mL に調整した。この溶液の一部を LDH 活性の測定に供した。

3. LDH 活性の測定

洗浄液中の LDH 活性は LDH-cytotoxic Wako[®] を用いて測定した。590 nm の吸光度はマイクロプレートリーダー (SPECTRAFLUOR Plus, TECAN, Switzerland) を用いて測定した。

【結果・考察】

5-a-1 単回投与

Fig. 25 に、前処理群 (CMC-Na 単回投与後、食道にカニューレを施し、その 6 時間後に試料を採取) 及び直前処理群 (CMC-Na の投与後、覚醒状態で 6 時間後放置し、試料の採取直前に食道、気管への手術) の LDH 活性を示す。前処理群では、PBS 及び starch (control) 投与群と比較して、LDH 活性に相違は観察されなかった。同様に、直前処理群でも、LDH 活性に顕著な相違は観察されなかった。

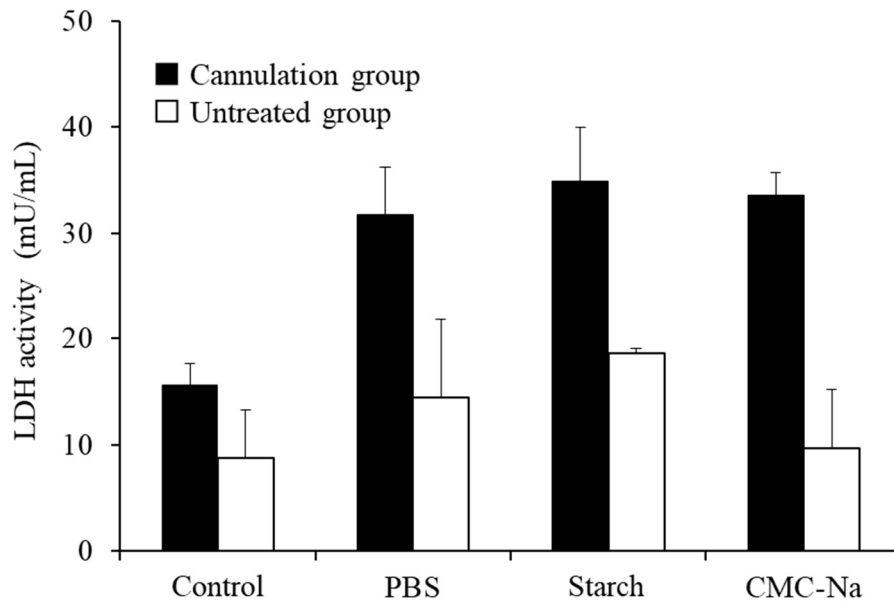


Fig. 25 LDH activities in the nasal lavage fluid after single nasal administration of powder formulations containing CNC-Na

Keys: ■, Cannulation group; □, Untreated group.

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

PLoS One., Fig. 5

5-a-2 連続投与

Fig. 26 に 7 日間 1 日 1 回、CMC-Na の連続投与を行った後の LDH 活性を示す。各群の LDH 活性に顕著な相違は観察されなかった。

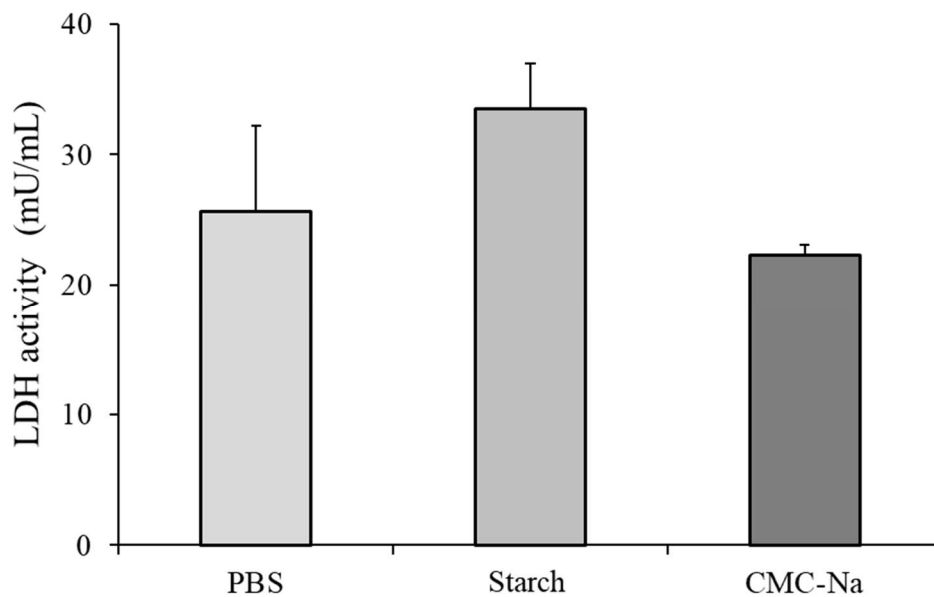


Fig. 26 LDH activities in the nasal lavage fluid after repeated nasal administration of powder formulations containing CNC-Na

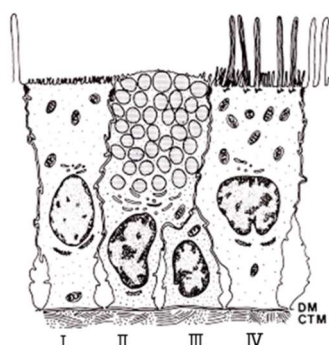
Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

PLoS One., Fig. 4

5-2 鼻腔生理機能に及ぼす CMC-Na の影響

【目的】

Fig. 27 のように上皮細胞層の表面は 5-10 μm の厚さの粘液層に覆われており、この粘液層は繊毛の規則的な運動によって、5 - 6 mm/min の速度で咽頭部方向へ移動していることが知られている⁵⁸⁻⁶⁹⁾。障害性の



- I. Nonciliated columnar cell with microvilli
- II. Goblet cell with mucous granules and a well developed Golgi apparatus
- III. Basal cell
- IV. Ciliated columnar cell with many mitochondria in the apical part

Fig. 27 Schematic representation of the histological structure of the nasal epithelium

評価として、LDH 活性や組織切片などの観察による細胞障害性の評価も重要であるが、鼻腔においては、MC という生理機能に対する障害も重要と考えられる。MC を評価する方法として、微粒子の移動速度を MC の指標とする方法⁷⁰⁻⁷²⁾の他に、繊毛運動が有する繊毛の運動性を指標として、間接的に MC を評価する方法⁷³⁻⁷⁵⁾が報告されている。この間接的な方法では、周期的な繊毛運動の振動数、ciliary beat frequency (CBF) を測定することで繊毛の運動性を数値化し、これを MC の指標にする。本節では、簡便に MC を測定できる方法として、ポリスチレン製の蛍光微粒子を粘液層移動のマーカとして用いる方法を採用し、粉末製剤の投与前後で MC を測定し、MC への影響の有無を評価した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 試薬

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) は Gibco 社より、Mucin, from Pig Stomach は和光純薬工業株式会社（大阪）より、Fluoresbrite YG microspheres は Poly Science, Inc. (Warrington, Pennsylvania, USA) より、それぞれ購入した。

2. 実験動物

Wistar 系雄性ラットは前章と同様に、(株) 清水実験材料（京都）より購入した。動物実験は全て京都薬科大学動物倫理委員会のガイドラインにしたがって実施した。

実験方法

1. Mucin 溶液の調製

ブタ胃由来の Mucin を濃度 2% となるように HBSS に分散させ、2-3 時間十分に攪拌した。その後、13,000 rpm で 20 分間遠心し、その上清を採取した。採取した上清を再び 13,000 rpm で 20 分間遠心した後の上清を mucin 溶液 (MS) とした。

2. 蛍光ビーズ懸濁液の調製

MC のマーカーとして、粒子径 $20\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズ (Fluoresbrite YG microspheres, Poly Science, Inc.) を用い、MS に懸濁させた。

3. ラット鼻中隔を用いた *in vitro* MC 評価法

Pentobarbital 麻酔下、Wistar 系雄性ラット (220–250 g) を断頭し、頭部を切開し、鼻中隔を摘出した (Fig. 28)。

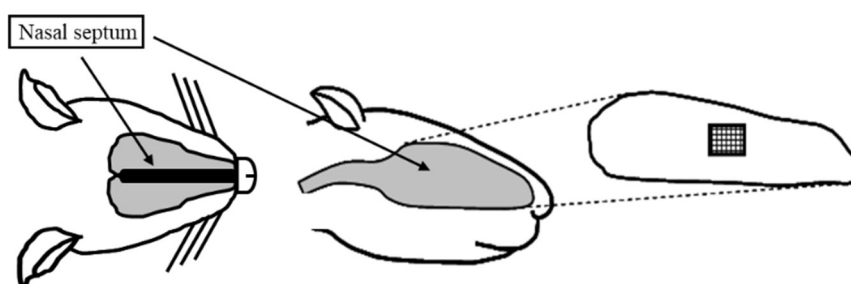


Fig. 28 Location of nasal septum in the rat head and nasal cavity

摘出した鼻中隔を咽頭側が上になるように傾斜 (角度約 40°) させて、ディッシュ内に保持した。このディッシュを USB 顕微鏡ステージ上に設置し、鼻中隔の粘膜表面に、マイクロシリンジを用いて、mucin 溶液 $1\ \mu\text{L}$ を滴下し MS の補充を行った。MS が鼻中隔粘膜全体へ広がるまで静置した後、マイクロシリンジを用いて、蛍光ビーズ懸濁液 $0.5\ \mu\text{L}$ を滴下した。懸濁液の広がりに伴い、短時間、蛍光ビーズが粘膜上を広がるため、その広がりが終わるのを確認した。その後、鼻中隔表面の繊毛運動により移動する蛍光ビーズを観察し、その移動を 3 秒間隔

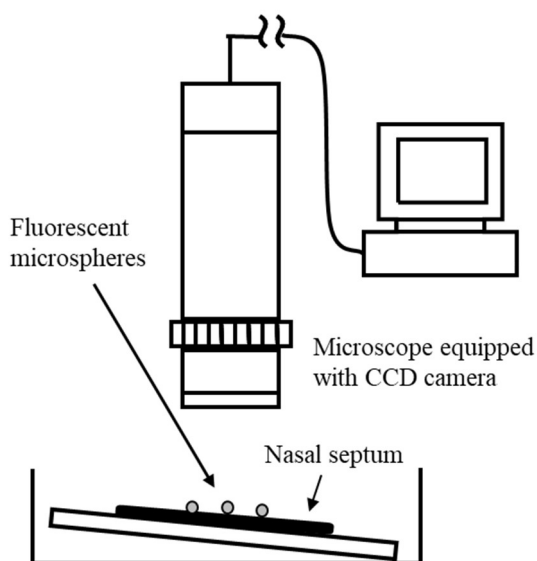


Fig. 29 *In vitro* evaluation system on the nasal mucociliary clearance

で画像撮影した。画像撮影は蛍光顕微鏡に設置した CCD カメラ (HITACHI 社) により行い、5 分間撮影を行った (Fig. 29)。なお、繊毛運動により蛍光ビーズが重力に逆らって動くように、鼻中隔の咽頭側を上に向けて傾斜させているため、重力の影響はないものと考えられる。

4. MC の算出

粉末製剤の投与 360 分後に鼻中隔を摘出し、上述の方法で 3 秒間隔で表面蛍光ビーズの移動の様子を撮影した。得られた画像より、各 3 秒間の蛍光ビーズの移動速度を算出し、30 秒間における平均移動速度を算出し、MC とした。なお、control としては、何も投与しないラットより鼻中隔を摘出し、MC を測定した。

【結果・考察】

CMC-Na 投与群の MC は control と相違は観察されず、CMC-Na は鼻腔の持つ生理機能に対する障害も惹起しないことが明らかとなった。

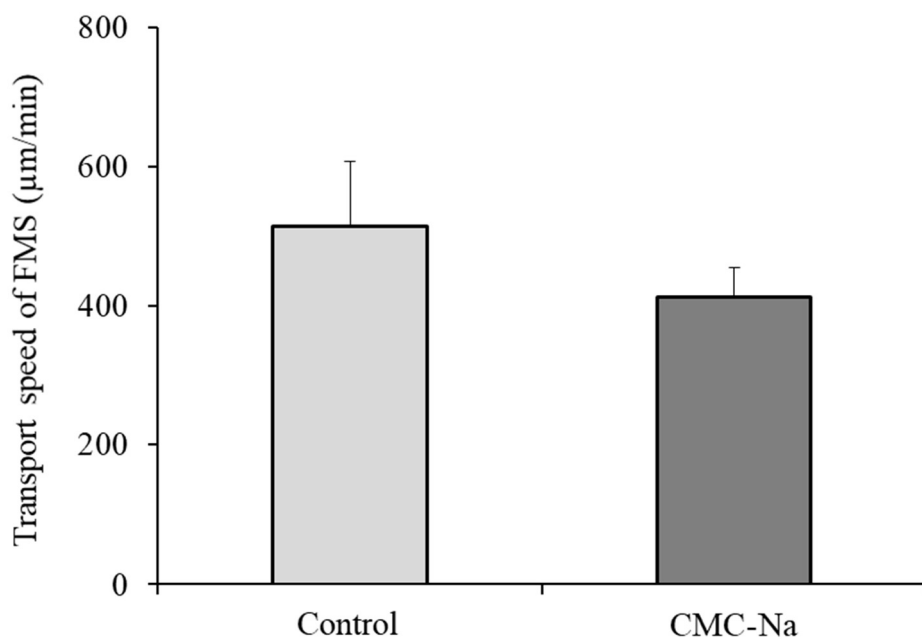


Fig. 30 The effect of CMC-Na on the mucociliary clearance after nasal administration of the powder containing CMC-Na
Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.
PLoS One., Fig. 5

第 6 節 小括

第 2 章では、結合剤として用いられている CMC-Na を選択した⁵⁰⁾。CMC-Na は、液状製剤に粘度を賦与するためにも用いられ、鼻腔からの薬物吸収に影響を与える因子の一つである製剤の鼻腔内滞留性を変化させると予想される。

まず、動物実験で *in vivo* 吸収を評価したところ、薬物原末と比較して、CMC-Na は PXC、NFX の吸収を増大させることが明らかとなった。一方、WF に関しては、吸収の低下が観察された。そのメカニズムに対する基礎的情報を得るため、*in vitro* 細胞層透過実験及び *in vivo* 鼻腔内滞留性を評価した。*In vitro* 細胞層透過実験の結果、いずれの薬物の細胞層透過量も CMC-Na 添加による変化は観察されなかった。*In vivo* 鼻腔内滞留性を評価したところ、CMC-Na は FD70 の鼻腔内滞留性を顕著に延長した。これは少量の粘液に CMC-Na が溶解することで、製剤の粘度が高まった結果と考えられ、PXC、NFX で観察された *in vivo* 吸収の増大は薬物の鼻腔内滞留性に基づくと考えられる。一方、WF ではその吸収が低下したが、その理由として、ゲル内での拡散性が顕著に低下し、その影響が鼻腔内滞留性の向上を上回ったためと考察している。

CMC-Na の添加により、低分子薬物の吸収が改善されたことから、次に、高分子薬物に対する CMC-Na の影響を評価するために、分子量約 4 kDa の高分子モデル薬物 insulin 及び FD4 の吸収に対する促進効果を検討した。低分子薬物と同様に、CMC-Na による吸収促進作用が観察され、高分子薬物の吸収に対しても、鼻腔内滞留性の改善が吸収改善に有効であることが改めて確認された。吸収促進効果を比較すると、低分子薬物に比べて、これら高分子薬物の吸収促進の程度は小さかった。

最後に、CMC-Na の局所障害性について検討を行った。生理条件下での単回投与、連続投与いずれの場合も、control と CMC-Na 投与群の鼻腔内洗浄液中 LDH 活性に顕著な相違は観察されなかった。また、鼻腔にカニューレを施し、鼻腔内に製剤を滞留させた場合、control と比較して、CMC-Na では約 2 倍の LDH 活性が認められた。LDH 活性が増大したことは事実であるが、LDH 活性値は小さく、さらに PBS 群 及び starch 群 との差も小さかったことから、障害の程度は小さいと考えている。MC は吸収部位から製剤そのものを消失させるため薬物吸収にとってはマイナス因子であるが、製剤の長期にわたる鼻腔内貯留を防ぐという点で、製剤の局所障害性を予防する機能を持つことが明らかとなった。

一般に、正常な MC 機能を維持するためには、繊毛の活性や粘液層の性質が正常であることが重要とされ、これらの因子の何れが変動しても、MC の機能は大きく低下することが報告されて

いる⁷⁴⁻⁷⁸⁾。しかしながら、CMC-Na 投与後の MC は control と相違がなく、鼻腔の持つ生理機能に対する障害も惹起しないことが明らかとなった。

以上、粉末製剤に添加された CMC-Na は、障害性を惹起せずに、低分子薬物、高分子薬物の吸収を改善することが明らかとなった。

第 3 章

鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす HPC の影響

第 3 章 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす HPC の影響 (鼻腔内滞留性に及ぼす影響)

第 2 章の検討より、結合剤が薬物の鼻腔内滞留性の向上とそれに伴う吸収の改善に有用であることが明らかとなった。第 3 章では、薬物の鼻腔内滞留性に及ぼす結合剤の影響をより詳細に評価するため、重合度の異なる 3 種類の結合剤 HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H)⁸¹⁾ の影響を検討した。モデル薬物としては、WF、PXC、STP の 3 種類を選択し、これら薬物の鼻腔内投与後の吸収に及ぼす HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H) の影響を系統的に評価した。Fig. 32 に 3 種類の HPC の溶液の粘度の濃度依存性を示す。溶液の粘度の大小関係は、いずれの濃度においても、重合度の大小関係と一致し、HPC (SL) < HPC (M) < HPC (H) である。

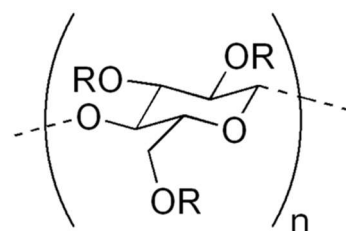


Fig. 31 Structure of HPC

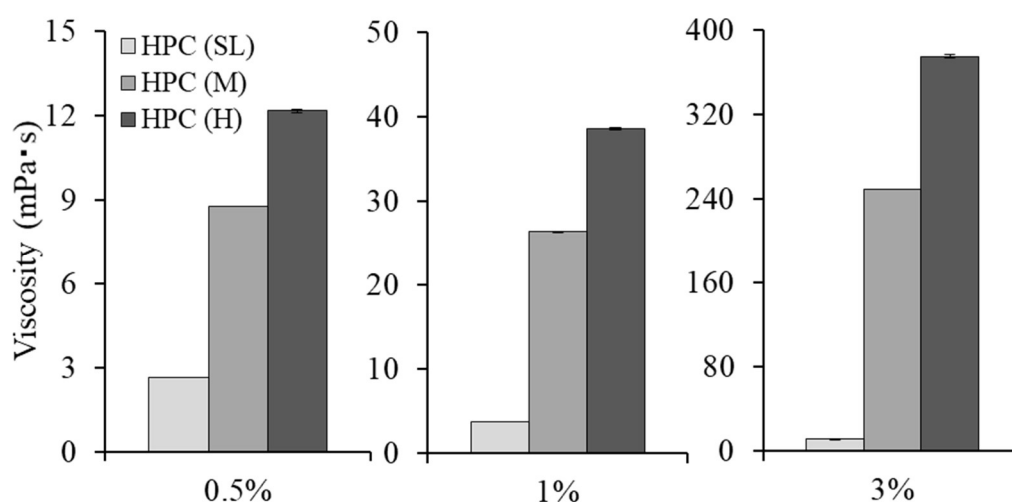


Fig. 32 The viscosity of 0.5%, 1% and 3% solution of HPC (SL), HPC (M) and HPC (H)

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three determinations.
Eur. J. Pharm. Sci., Fig. 1

第 1 節 薬物の *in vivo* 経鼻吸収に及ぼす HPC の影響

【目的】

本節では、水に対する溶解度、生体膜透過性がそれぞれ異なる PXC、WF、STP をモデル薬物として用い、薬物吸収に対する HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H) の影響を *in vivo* 動物実

験で検討した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット (8 週令、220-250g) は (株) 清水実験材料 (京都) より購入し、京都薬科大学 動物倫理委員会のガイドラインに従って、全ての動物実験を実施した。

2. 試薬

重合度の異なる 3 種類の hydroxypropyl cellulose (HPC (SL), HPC (M), HPC (H)) は日本曹達株式会社より提供を受けた。

実験方法

1. 実験方法、試料の前処理

前章の実験方法に準じた。

2. 定量

STP の定量は以下の条件の HPLC で行った。なお、WF、PXC に関しては、前章の条件に準じた。

<STP>

HPLC system	; Shimadzu Prominence
Column	; COSMOSIL C ₁₈ -PAQ (4.6 × 150 nm)
Mobile phase	; NH ₄ HPO ₄ (pH 3.3) / acetonitrile = 93 / 7
Flow rate	; 1.0 mL/min
Wave length	; 228 nm
Column temperature	; 40°C

3. データ解析

前章に準じて、deconvolution 法⁴⁹⁾に基づき、加藤らが開発した EXCEL マクロプログラム “DECON” を用いて、鼻腔内投与後の吸収率を算出した。

【結果・考察】

3-a Warfarin

WF を含む各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を Fig. 33 (A) に、deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を Fig. 33 (B) に示す。原末と比較して、いずれの HPC を添加した場合でも、血漿中薬物濃度及び吸収率が低下することが明らかとなった。

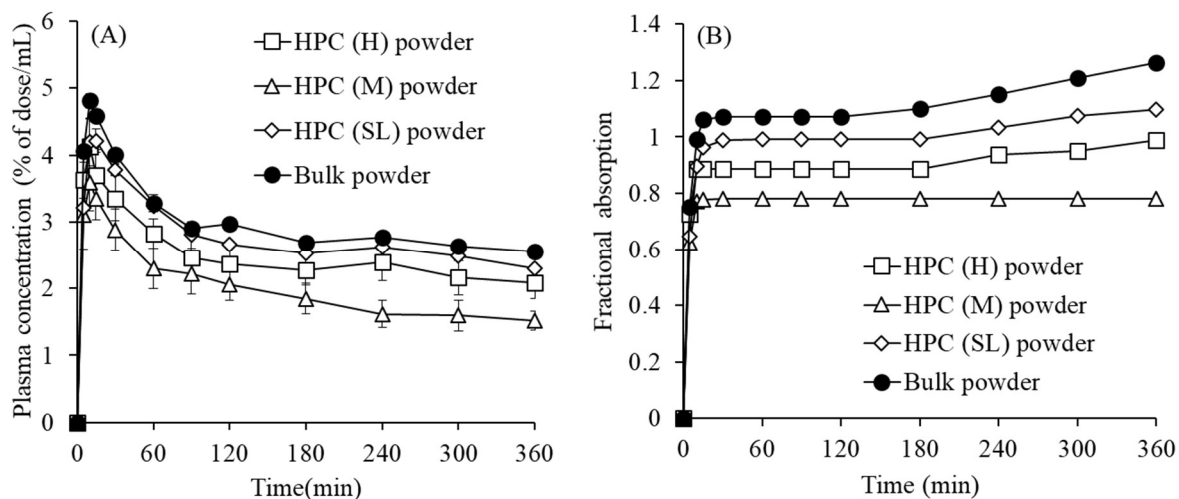


Fig. 33 Effects of HPCs on (A) the profiles of the plasma concentrations and (B) changes in the fraction absorbed after nasal administration of powder formulations of warfarin to rats

Keys: □; HPC(H) powder, △; HPC(M) powder, ◇; HPC(SL) powder, ●; Bulk powder.
Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.
Eur. J. Pharm. Sci., Fig. 3

3-b Piroxicam

Fig. 34 (A) に PXC を含む各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を、Fig. 34 (B) に deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を示す。原末と比較して、HPC (M) 添加時には PXC の血漿中薬物濃度及び吸収率が増大したが、対照的に HPC (H)、HPC (SL) 添加時には、血漿中薬物濃度及び吸収率が減少した。また、HPC (H) 添加時の血漿中濃度の立ち上がりには約 10 分の lag time が観察された。

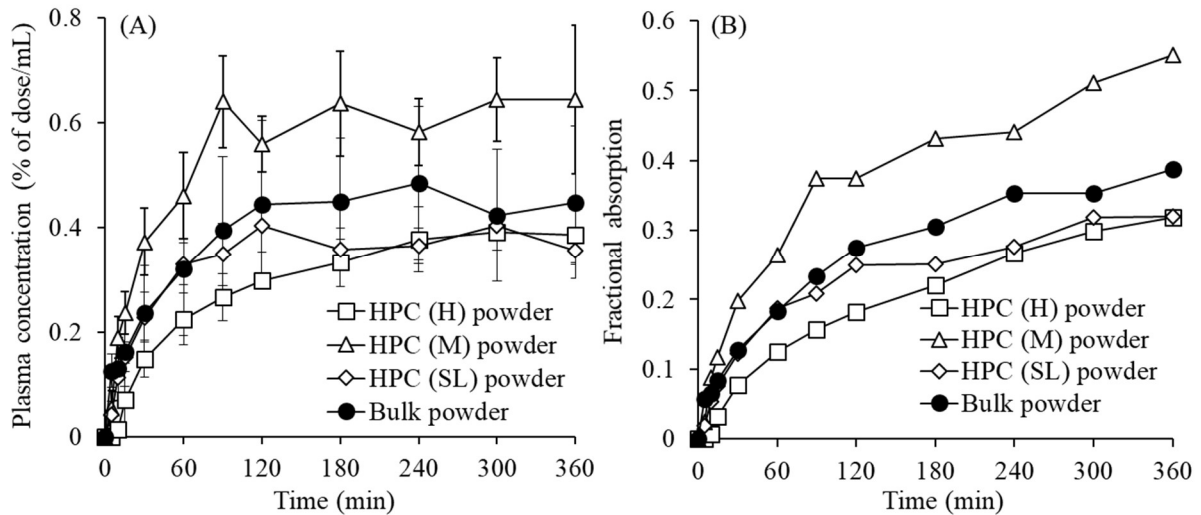


Fig. 34 Effects of HPCs on (A) the profiles of the plasma concentrations and (B) changes in the fraction absorbed after nasal administration of powder formulations of piroxicam to rats

Keys: □; HPC (H) powder, △; HPC (M) powder, ◇; HPC (SL) powder, ●; Bulk powder.
 Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.
Eur. J. Pharm. Sci., Fig. 4

3-c Sumatriptan

Fig. 35 (A) は STP を含む各種粉末製剤を鼻腔内投与した後の血漿中濃度の経時変化を、Fig. 35 (B) は deconvolution 法により求めた吸収率の経時変化を示す。HPC (SL) を添加した場合、原末投与と比較して、吸収に若干の低下が観察されたが、HPC (M)、HPC (H) を添加した場合、STP の血漿中濃度、吸収率ともに顕著に増大し、吸収率はそれぞれ原末の 1.4 倍、2.5 倍であった。STP では、添加する HPC の重合度が高いほど、吸収改善の程度が大きいことが明らかとなった。

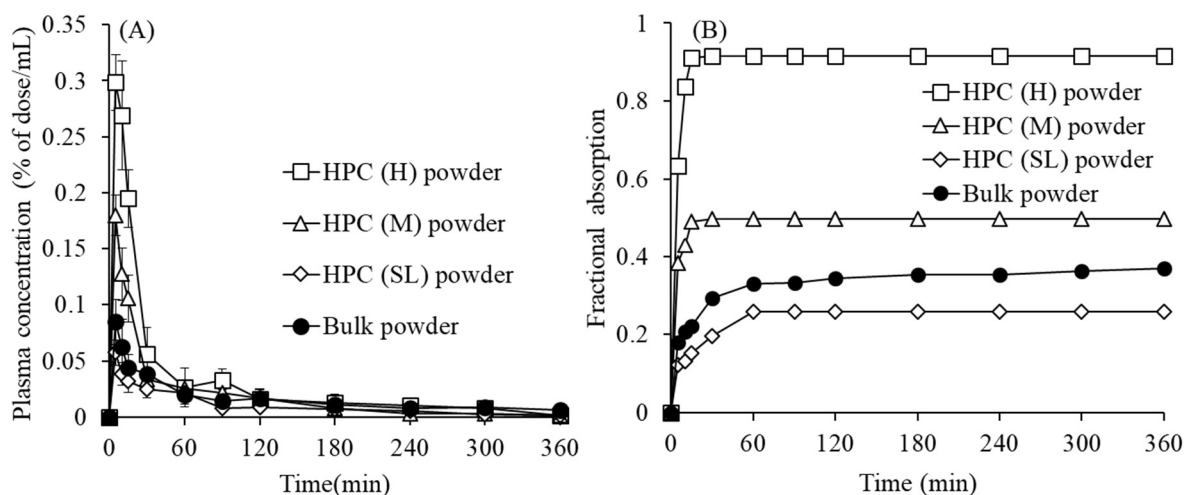


Fig. 35 Effects of HPCs on (A) the profiles of the plasma concentrations and (B) changes in the fraction absorbed after nasal administration of powder formulations of sumatriptan to rats

Keys: □; HPC (H) powder, △; HPC (M) powder, ◇; HPC (SL) powder, ●; Bulk drug powder. Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

Eur. J. Pharm. Sci., Fig. 5

以上、WF、PXC、STP に関する結果から、薬物吸収に対する 3 種類の HPC の影響は薬物の物性によって異なることが明らかとなった。

第 2 節 粘性溶液における薬物の溶解と拡散性

【目的】

第 1 節の検討で、薬物の物性により、その吸収に対する HPC の影響が異なることが明らかとなった。観察された影響の中で、特に特徴的と考えられる WF の *in vivo* 吸収の低下、HPC(H) 添加時に観察された血漿中 PXC 濃度の立ち上がりのラグタイムのメカニズムを検討した。メカニズムの可能性として、基剤内での薬物の拡散性の低下を仮定し、本節では HPC 溶液中での固体薬物の溶解とその後の拡散性に関して検討を行った。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 器具

前節の実験材料に準じた。

2. 試薬

等張リン酸緩衝液 (PBS) を用いて、HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H) の濃度 3% の溶液を調製した。

実験方法

1. 実験方法

細胞を播種していないカルチャーインサートをそのまま用いた。Apical 側に各種 HPC 溶液 2 mL を添加し、basal 側に PBS 3 mL を添加した。シリンジと三方活栓を組合せたデバイス (Fig.6) で、PXC 原末 1 mg を apical 側の 3% HPC 溶液表面に噴霧し、実験を開始した。経時的に basal 側より 200 μ L ずつ採取した後、等量の PBS を添加した。

2. PXC の定量

前章の HPLC の分析条件に準じて定量を行った。

【結果・考察】

Fig. 36 に各種 HPC 溶液中における PXC の溶解とその後の拡散性を検討した結果を示す。Control (PBS) と比較して、HPC 溶液中における PXC の溶解速度と拡散が低下すること、さらに、低下の程度は HPC の重合度の増大に準じて大きいことが明らかとなった。本知見は鼻腔内の水分に溶解した後の粘度が高いほど、粉末薬物の溶解速度と拡散性が低下する可能性を示唆していると考えられる。

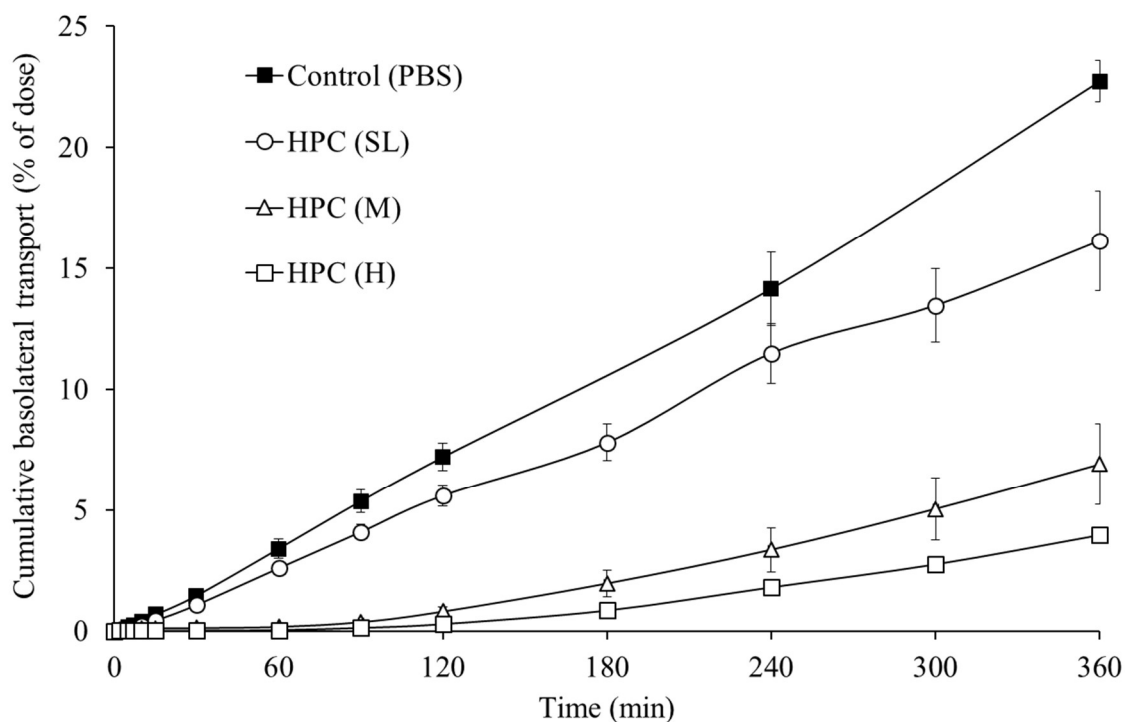


Fig. 36 Dissolution and diffusion profiles of piroxicam in 3% HPC solutions
 Keys: ■; Control (PBS), ○; HPC (SL), △; HPC (M), ◇; HPC (H)
 Results are expressed as the mean ± S.E. of at least three experiments.

第 3 節 製剤の鼻腔内滞留性に及ぼす HPC の影響

【目的】

第 1 節の結果から、HPC の添加により、薬物の *in vivo* 吸収が変動し、その変動は薬物の物性及び HPC の重合度によって、異なることが明らかとなった。そのメカニズムを探るために、本節では、製剤の鼻腔内滞留性に対する HPC の影響を検討した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 実験器具、実験動物、試薬

前章の実験材料に準じた。

実験方法

1. 粉末製剤の調製

PXC : FD70 = 9 : 1、PXC : FD70 : HPC = 4 : 1 : 5 の質量比で各粉末を混合した。

2. *In vivo* 粉末鼻腔内投与、粉末製剤の噴霧方法、実験方法、定量

前章の実験方法に準じた。

【結果・考察】

FD70 の鼻腔内残存量の経時変化を Fig. 37 に示す。原末を投与した場合、10 分後の残存率は 20% にまで低下した。HPC を添加した場合、鼻腔内残存率は高く、さらに、HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H) と重合度の増大に伴って、製剤の鼻腔内滞留性が向上することが明らかとなった。Fig. 32 のデータからも明らかなように、重合度が高い HPC ほど、鼻腔内水分に溶解した後の粘度が高いためと考えられる。

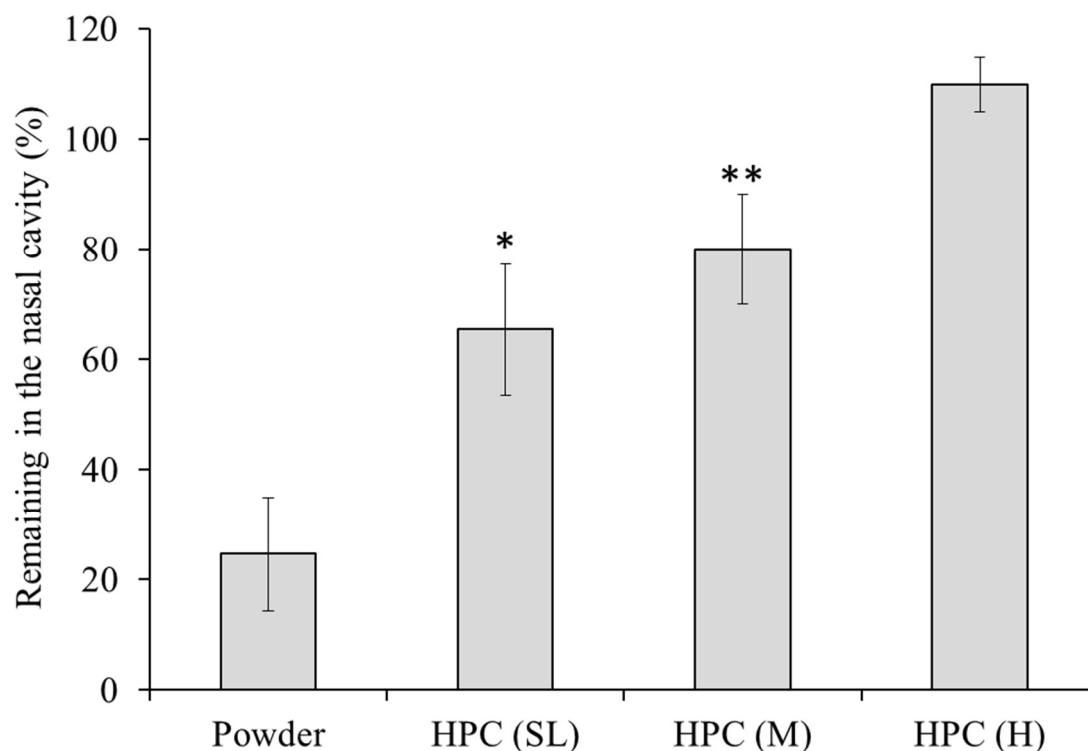


Fig. 37 Effect of HPCs on the clearance of the formulation from the nasal cavity

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significantly different from powder (control)

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Eur. J. Pharm. Sci., Fig. 6

第 4 節 HPC の粘膜障害性

【目的】

本節では、LDH 活性を指標に HPC 単回投与時の粘膜障害性について検討した。なお、製剤添加物を投与前に気道にカニューレションを施すことにより、鼻腔内に長時間滞留させた際の障害性もあわせて評価した。

【実験材料・実験方法】

実験材料

1. 試薬

前章の実験材料に準じた。

2. 実験動物

Wistar 系雄性ラットは前章と同様に（株）清水実験材料（京都）より購入した。動物実験はすべて京都薬科大学動物倫理委員会のガイドラインにしたがって実施した。

実験方法

1. 鼻腔内投与実験、鼻腔内洗浄液の回収、LDH 活性の測定

前章の実験方法に準じた。

【結果・考察】

製剤の投与後、食道にカニューレションを施し、その後、6 時間麻酔下に維持した動物における障害性の検討結果 (LDH 活性) を Fig. 38 に示す。いずれの HPC を投与した場合でも、PBS 投与群 (control) と比較して、LDH 活性に顕著な相違は観察されず、HPC の毒性は極めて小さいことが示された。

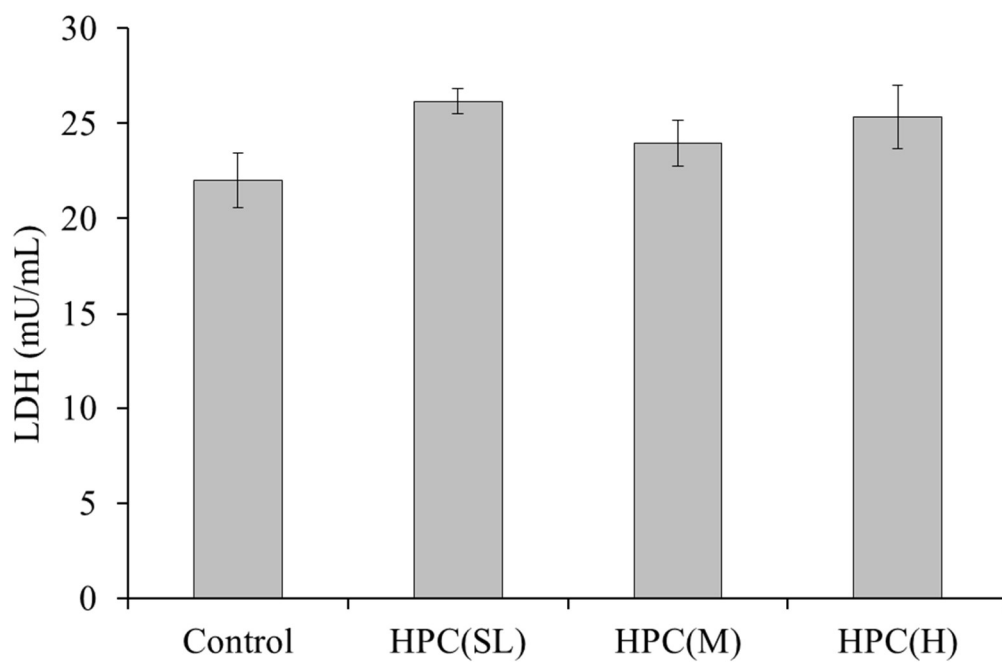


Fig. 38 LDH activities in the nasal lavage fluid after nasal administration of HPC powders

Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Eur. J. Pharm. Sci., Fig. 7

第5節 小括

本章では、薬物吸収に対する結合剤の影響をより詳細に検討するために、重合度の異なる3種類の HPC⁸¹⁾ を用いて、*in vivo* 吸収を評価するとともに、そのメカニズムを検討した。

第1節では、薬物原末に HPC を添加した際の *in vivo* 吸収を評価した。いずれの HPC を添加した場合においても、薬物原末と比較して、WF の吸収は低下した。一方、PXC の吸収は、HPC (SL) 添加時には、大きな相違は観察されなかったが、HPC (M) を添加した場合には吸収が顕著に増大した。対照的に HPC (H) を添加した場合、PXC の血漿中濃度推移に lag time が観察されるとともに、吸収が低下した。STP の吸収は、HPC (SL) を添加した場合に、若干の低下が観察されたが、HPC (M)、HPC (H) を添加した場合、血漿中濃度、吸収率ともに顕著に増大し、吸収率はそれぞれ原末の 1.4 倍、2.5 倍であった。添加する HPC の重合度が高いほど、STP の吸収は改善されることが明らかとなった。

第2節では、そのメカニズムを解明するために HPC 溶液中での薬物の溶解・拡散性を評価した。PXC をモデル薬物として検討した結果、HPC の重合度の増大に伴い、その溶液中での PXC の溶解・拡散性は低下した。したがって、WF の吸収の低下や PXC で観察された lag time は HPC 基剤中での薬物の溶解・拡散性の低下が原因である可能性が考えられた。

第3節では、製剤の鼻腔内滞留性に注目した。原末の場合、鼻腔内残存率は投与 10 分後に 20% にまで低下したが、HPC を添加した場合の鼻腔内残存率は高く、さらに HPC (SL)、HPC (M)、HPC (H) と重合度の増大に伴って、製剤の鼻腔内滞留性はより改善されることが明らかとなった。これは、重合度が高い HPC ほど、鼻腔内の水分に溶解した後の粘度が高いためと考えられる。

第4節では、LDH 活性を指標に HPC の毒性評価を行った。いずれの HPC 投与群においても、LDH 活性に、PBS 投与群 (control) との顕著な相違は観察されず、HPC の毒性は極めて低く、安全な製剤添加物であることが明らかとなった。

以上、第1節で3種類の HPC の薬物吸収に対する影響が薬物の溶解性や膜透過性などの物性によって異なることが示された。そのメカニズムとしては、以下に記す可能性が考えられる。鼻腔内に投与された HPC を含む粉末製剤は、まず鼻腔内の水分に溶解する。薬物は粘性基剤内で溶解し、基剤内を拡散して、上皮細胞層の表面に到達し、その後、膜透過過程を経て吸収される。また、溶解、拡散、上皮層の透過時においても、MC により薬物は製剤ごと鼻腔から排泄される。PXC は溶解度が低く、膜透過性が良好であるため、溶解過程あ

るいは基剤内での拡散過程が律速となり、特に、溶解や拡散の変化の影響を強く受けると考えられる。そのため、HPC (M) の添加時には、鼻腔内滞留性の改善の影響が強く、HPC (SL) に比べて、吸収が改善されるが、HPC (H) の添加時には、製剤の粘度が非常に高まるため、滞留性の改善以上に、溶解性や拡散性の低下の程度が顕著となり、その結果、吸収が低下したと考えている。WF は溶解度・膜透過性ともに良好

であるため、基剤内拡散過程が吸収の支配因子と考えられる。一方、STP の場合、溶解度は良好であるが、膜透過性が極めて低いため、膜透過過程が吸収過程全体の律速過程であり、製剤の鼻腔内滞留性の影響を強く受けると考えられる。したがって、鼻腔内での製剤粘性が高いと考えられる HPC (H) 添加時に、吸収がより顕著に改善されたと考えている。つまり、薬物吸収を改善する最適な製剤添加物を選択するためには、個々の薬物の律速過程と製剤添加物の個々の過程への影響を総合的に考慮する必要があることが示唆された。

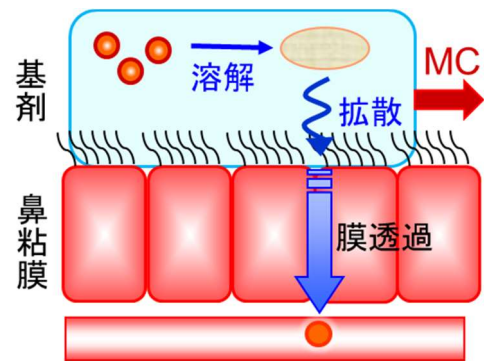


Fig.39 Scheme representing the various processes of the drug after nasal administration with HPC

総括

総 括

本研究では、賦形剤として乳糖、結合剤として CMC-Na、HPC を選択し、粉末製剤を鼻腔内投与した後の薬物吸収に及ぼすこれら製剤添加物の影響について検討を行った。

その結果、以下の知見・結論を得た。

1. 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす乳糖の影響（粘膜表面水分量に及ぼす影響）

乳糖を含む粉末製剤は鼻腔内投与後、細胞表面水分量が増大するため、薬物の溶解量と鼻腔内滞留性が変化し、その結果、薬物の物性に応じた吸収量の変化が生じることが示された。したがって、粉末製剤化医薬品の経鼻吸収に対する乳糖のような賦形剤の影響は、溶解した薬物量の改善（吸収の改善要因）と鼻腔内滞留性の低下（吸収の低下要因）のバランスによって決定されることが明らかとなった。

2. 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす結合剤 CMC-Na の影響

CMC-Na は鼻腔内滞留性の向上を通じて、膜透過性が低い低分子薬物やペプチドなどの高分子薬物の経鼻吸収を改善させることが明らかとなった。一方で、溶解度・膜透過性ともに高い WF のような薬物では、溶解した基剤内での薬物の拡散性の低下が顕著で、その結果、薬物吸収が低下する可能性が示された。

3. 鼻腔内投与後の薬物吸収に及ぼす各種 HPC の影響（鼻腔内滞留性に及ぼす影響）

第 2 章で用いた CMC-Na では、添加の有無に伴う変動のみから、定性的な考察のみが可能であったが、3 種類の HPC を利用することで、半定量的な考察が可能となった。

CMC-Na や HPC のような水溶性高分子で、溶解した後、製剤の粘性を高めるような製剤添加物は、製剤の鼻腔内滞留性と投与後の製剤中での薬物拡散性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。このような製剤添加物を使用して、薬物の吸収改善を試みる場合、両者のバランスを考慮することが重要であることが示された。

以上の結果より、鼻腔内投与後の薬物吸収は、薬物の溶解度、膜透過性や製剤の粘度に依存する鼻腔内滞留性に依りて、製剤添加物により、大きく変動することが示された。鼻腔内投与後の吸収を制御するためには、各薬物の吸収に対する律速過程を考慮して、薬物の物性に依りて適切な製剤添加物を選択する必要性が示唆された。これらの知見は、製剤添加物による鼻腔内投与後の薬物吸収制御の可能性を示唆するものである。

以上、本研究を通して得られた知見は鼻腔内投与型粉末製剤の処方設計に必要かつ重要な基礎的情報を提供すると考えられる。

引用文献

引用文献

- 1) Bitter C., Suter-Zimmermann K., Surber C.: Nasal drug delivery in humans. *Current Problems Dermatol.*, **40**, 20–35 (2011).
- 2) McMartin C., Hutchinson L. E., Hyde R., Peters G. E.: Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.*, **76**, 535-554 (1987).
- 3) Charlesworth B. R., Dowson A. J., Purdy A., Becker W. J., Boes-Hansen S., Färkkilä M.: Speed of onset and efficacy of zolmitriptan nasal spray in the acute treatment of migraine: a randomised, double blind, placebo-controlled, dose-ranging study versus zolmitriptan tablet. *CNS Drugs.*, **17**, 653–667 (2003).
- 4) Horak F., Zieglmayer U. P., Zieglmayer R., Kavina A., Marschall K., Munzel U., Petzold U.: Azelastine nasal spray and desloratadine tablets in pollen-induced seasonal allergic rhinitis: a pharmacodynamic study of onset of action and efficacy. *Curr. Med. Res. Opin.*, **22**, 151–157 (2006).
- 5) Harris A. S.: Review: clinical opportunities provided by the nasal administration of peptides. *J. Drug Target.*, **1**, 101-106 (1993).
- 6) Janknegt R., Pinckaers J. W., Rohof M. H., Ausems M. E., Arbouw M. E., van der Velden R. W., Brouwers J. R.: Double-blind comparative study of droperidol, granisetron and granisetron plus dexamethasone as prophylactic anti-emetic therapy in patients undergoing abdominal, gynaecological, breast or otolaryngological surgery. *Anaesthesia.*, **11**, 1059-1068 (1999).
- 7) Richert L., Uebelhart B., Engelhardt M., Azria M., Rizzoli R.: A randomized double-blind placebo-controlled trial to investigate the effects of nasal calcitonin on bone microarchitecture measured by high-resolution peripheral quantitative computerized tomography in postmenopausal women Study protocol. *Trials.*, **13**, 9-19 (2008).
- 8) Halkin V., Reginster J. Y.: Efficacy and tolerability of calcitonin in the prevention and treatment of osteoporosis. *BioDrugs.*, **10**, 295-300 (1998).
- 9) Tafazal S. I., Ng L., Sell P.: Randomised placebo-controlled trial on the effectiveness of nasal salmon calcitonin in the treatment of lumbar spinal stenosis. *Eur. Spine. J.*, **16**, 207-212 (2007).
- 10) Hinchcliffe M., Jabbal-Gill I., Smith A.: Effect of chitosan on the intranasal absorption of salmon calcitonin in sheep. *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 681-687 (2005).
- 11) Peichl P., Marteau R., Griesmacher A., Kumpan W., Schedl R., Prosquil E., Fasol P., Bröll H.: Salmon calcitonin nasal spray treatment for postmenopausal women after hip fracture with total hip arthroplasty. *J. Bone. Miner. Metab.*, **23**, 243-252 (2005).

- 12) Aneeza W. H., Husain S., Rahman R. A., Van D. D., Abdullah A., Gendeh B. S.: Efficacy of mometasone furoate and fluticasone furoate on persistent allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy Rhinol.*, **4**, e120–e126 (2013).
- 13) Joukhadar C., Schenk B., Kaehler S. T., Kollenz C. J., Bauer P., Muller M., Eichler H. G.: A replicate study design for testing bioequivalence: a case study on two desmopressin nasal spray preparations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **59**, 631-636 (2003).
- 14) Ulsoy S., Ovali E., Aydin F., Erem C., Ozdemir F., Kaynar K.: Hemostatic and Fibrinolytic Response to Nasal Desmopressin in Hemodialysis Patients. *Med Princ Pract.*, **13**, 340-345 (2004).
- 15) Buckett W. M., Bentick B., Shaw R. W.: Induction of the endogenous gonadotrophin surge for oocyte maturation with intra-nasal gonadotrophin-releasing hormone analogue (buserelin): effective minimal dose. *Hum Reprod.*, **13**, 811-814 (1998).
- 16) Peichl P., Griesmacher A., Kumpan W., Schedl R., Prosquil E., Bröll H.: Clinical outcome of salmon calcitonin nasal spray treatment in postmenopausal women after total hip arthroplasty. *Gerontology*, **51**, 242–252 (2005).
- 17) Ulusoy S., Ovali E., Aydin F., Erem C., Ozdemir F., Kaynar K.: Hemostatic and fibrinolytic response to nasal desmopressin in hemodialysis patients. *Med. Princ. Pract.*, **13**, 340–345 (2004).
- 18) Testosterone nasal gel (Natesto) for hypogonadism. *Med. Lett. Drugs Ther.*, **57**, 73–74 (2015).
- 19) Pozzoli M., Rogueda P., Zhu B., Smith T., Young P. M., Traini D., Sonvico F.: Dry powder nasal drug delivery: challenges, opportunities and a study of the commercial Teijin Puvlizer Rhinocort device and formulation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **42**, 1660–1668 (2016).
- 20) Obaidi M., Offman E., Messina J., Carothers J., Djupesland P. G., Mahmoud R.A.: Improved pharmacokinetics of sumatriptan with Breath Powered™ nasal delivery of sumatriptan powder. *Headache*, **53**, 1323–1333 (2013).
- 21) Huang J., Garmise R. J., Crowder T. M., Mar K., Hwang C. R., Hickey A. J., Mikszta J. A., Sullivan V. J.: A novel dry powder influenza vaccine and intranasal delivery technology: induction of systemic and mucosal immune responses in rats. *Vaccine*, **23**, 794–801 (2004).
- 22) Liebert M. A.: Final report on the safety assessment of benzalkonium chloride. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **8**, 589-625 (1989).
- 23) Merkus F. W. H. M., van de donk H. J. M.: Does the intranasal application of drugs damage ciliary movement? *Clin. Pharmacol. Ther.*, **31**, 250 (1982).
- 24) Graf P.: Rhinitis medicamentosa: aspects of pathophysiology and treatment. *Allergy.*, **52**, 28-34 (1997).

- 25) Graf P.: Adverse effects of benzalkonium chloride on the nasal mucosa: allergic rhinitis and rhinitis medicamentosa. *Clin. Ther.*, **21**, 1749-1755 (1999).
- 26) Richards D. H.: Preservation of nasal sprays [letter]. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 595-596 (2000).
- 27) Graf P.: Benzalkonium chloride as a preservative in nasal solutions: re-examining the data. *Respir. Med.*, **95**, 728-733 (2001).
- 28) Lee W. A., Narog B. A., Patapoff T. W., Wang Y. J.: Intranasal bioavailability of insulin powder formulations: effect of permeation enhancer-to-protein ratio. *J Pharm. Sci.*, **80**, 725-729 (1991).
- 29) Ishikawa F., Katsura M., Tamai I., Tsuji A.: Improved nasal bioavailability of elcatonin by insoluble powder formulation. *Int. J. Pharm.*, **224**, 105-114 (2001).
- 30) Matsuyama T, Morita T, Horikiri Y, Yamahara H, Yoshino H.: Improved nasal absorption of salmon calcitonin by powdery formulation with N-acetyl-L-cysteine as a mucolytic agent. *J. Control. Release*, **115**, 183-188 (2006).
- 31) Pringels E., Callens C., Vervaet C., Dumont F., Slegers G., Foreman P., Remon J. P.: Influence of deposition and spray pattern of nasal powders on insulin bioavailability. *Int. J. Pharm.*, **310**, 1-7 (2006).
- 32) Ishikawa F., Murano M., Hiraishi M., Yamaguchi T., Tamai I., Tsuji A.: Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system. *Pharm. Res.*, **19**, 1097-1104 (2002).
- 33) Tiozzo Fasiolo L., Manniello M. D., Tratta E., Buttini F., Rossi A., Sonvico F., Bortolotti F., Russo P., Colombo G.: Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **113**, 2-17 (2017).
- 34) Merkus F. W., Verhoef J. C., Schipper N. G., Marttin E.: Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, **29**, 13-38 (1998).
- 35) Schipper N. G. M., Verhoef J. C., Merkus F. W. H. M.: The nasal mucociliary clearance: Relevance to nasal drug delivery. *Pharmaceutical Res.*, **8**, 807-814 (1991).
- 36) Ugwoke M. I., Verbeke N., Kinget R.: The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 3-21 (2001).
- 37) Jovicić, A., Raicević, R., Bosković, B.: Analgesic efficacy of Famalgin and Imigran in patients with acute migraine attacks. *Vojnosanit. Pregl.*, **56**, 255-261 (1999).
- 38) Inokuchi H., Takei T., Aikawa K., Shimizu M.: The effect of hyperosmosis on paracellular permeability in Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 328-334 (2009).

- 39) Tsukamoto M., Okuda T., Okamoto H., Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M.: Bovine serum albumin as a lyoprotectant for preparation of DNA dry powder formulations using the sprayfreeze drying method. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1178–1181 (2012).
- 40) Irvine J. D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J. W., Selick H. E., Grove J. R.: MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 28-33 (1999).
- 41) Volpe D. A.: Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J. Pharm. Sci.*, **97**, 712-725 (2008).
- 42) 高橋長雄監修 : からだの地図帳,講談社, 22-23 (1989).
- 43) Hirai S., Mima T.: *Int. J. Pharm.*, **9**, 165-172 (1989).
- 44) Graziani G., D'Argenio G., Tuccillo C., Loguercio C., Ritieni A., Morisco F., Del Vecchio Blanco C., Fogliano V., Romano M.: Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut.*, **54**, 193–200 (2005).
- 45) Kürti L., Veszelka S., Bocsik A., Dung N. T., Ozsvári B., Puskás L. G., Kittel A., Szabó-Révész P., Deli M. A.: The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier. *Toxicol. In Vitro*, **26**, 445–454 (2012).
- 46) Dyawanapelly S., Koli U., Dharamdasani V., Jain R., Dandekar P.: Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins. *Drug Deliv. Transl. Res.*, **6**, 365–379 (2016).
- 47) Barbi Mda S., Carvalho F. C., Kiill C. P., Barud Hda S., Santagneli S. H., Ribeiro S. J., Gremião M. P.: Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for zidovudine nasal delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **15**, 865–874 (2015).
- 48) Hansen K., Kim G., Desai K. G., Patel H., Olsen K. F., Curtis-Fisk J., Tocce E., Jordan S., Schwendeman S. P.: Feasibility investigation of cellulose polymers for mucoadhesive nasal drug delivery applications. *Mol. Pharm.*, **12**, 2732–2741 (2015).
- 49) Bhandwalkar M. J., Avachat A. M.: Thermoreversible nasal in situ gel of venlafaxine hydrochloride: formulation, characterization, and pharmacodynamic evaluation. *AAPS PharmSciTech*, **14**, 101–110 (2013).
- 50) Rajendran N.N., Natarajan R., Sakthikumar T.: Effect of processing and polymer variables on in vitro release of metoprolol succinate extended release tablets. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2**, 3136–3142 (2011).

- 51) Sintov A. C., Levy H. V., Botner S.: Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies. *J. Control. Release*, **148**, 168-76 (2010).
- 52) Cho W., Kim M. S., Jung M. S., Park J., Cha K. H., Kim J. S., Park H. J., Alhalaweh A., Velaga S. P., Hwang S. J.: Design of salmon calcitonin particles for nasal delivery using spray-drying and novel supercritical fluid-assisted spray-drying processes. *Int. J. Pharm.*, **478**, 288-296 (2015).
- 53) He L., Gao Y., Lin Y., Katsumi H., Fujita T., Yamamoto A.: Improvement of pulmonary absorption of insulin and other water-soluble compounds by polyamines in rats. *J. Control. Release*, **122**, 94–101 (2007).
- 54) Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terada A., Suzuki T.: Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1016–1021 (1997).
- 55) Liu F. Y., Shao Z., Kildsig D. O., Mitra A. K.: Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.*, **10**, 228–232 (1993).
- 56) Yamamoto A, Taniguchi T., Rikyuu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M.: Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.* **11**, 1496–1500 (1994).
- 57) Fetih G., Habib F., Okada N., Fujita T., Attia M., Yamamoto A.: Nitric oxide donors can enhance the intestinal transport and absorption of insulin and [Asu(1,7)]-eel calcitonin in rats. *J. Control Release.*, **106**, 287–297 (2006).
- 58) Rathbone M. J., Hadgraft J.: Absorption of drugs from the human oral cavity.: *Int. J. Pharm.* **74**, 9–24 (1991).
- 59) Creeth J. M.: Constituents of mucus and their separation. *Br. Med. Bull.*, **34**, 17–24 (1978).
- 60) Roussel P., Degand P., Lamblin G., Laine A., Lafitte J. J.: Biochemical definition of human tracheobronchial mucus. *Lung*, **154**, 241–260 (1978).
- 61) Jeffery P. K.: The origins of secretions in the lower respiratory tract. *Eur. J. Respir. Dis.*, **71**, 34–42 (1987).
- 62) Ryley H. C., Brogan T. D.: Quantitative immunoelectrophoretic analysis of the plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis. *J. Clin. Pathol.*, **26**, 852–856 (1973).
- 63) Brogan T. D., Ryley H. C., Neale L., Yassa J.: Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma, and chronic bronchitis. *Thorax.*, **30**, 72–79 (1975).

- 64) Ryley H. C.: An immune electrophoretic study of the soluble secretory proteins of sputum. *Biochim. Biophys. Acta.*, **271**, 300–309 (1972).
- 65) Widdicombe J. G.: Role of lipids in airway function. *Eur. J. Respir. Dis.*, **71**, 197–204 (1987).
- 66) Chernick W. S., Barbero G. J.: Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics.*, **24**, 739–745 (1959).
- 67) Slomiany A., Murty V. L. N., Aono M, Snyder C. E., Herp A., Slomiany B. L.: Lipid composition of tracheobronchial secretions from normal individuals and patients with cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **710**, 106–111 (1982).
- 68) Spicer S. S., Martinez J. R.: Mucin biosynthesis and secretion in the respiratory tract. *Environ. Health Perspect.*, **55**, 193–204 (1984).
- 69) Sanderson M. J., Sleight M. A.: Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J. Cell Sci.*, **47**, 331–347 (1981).
- 70) Liote' H., Zahm J., Pierrot D., Puchelle E.: Role of mucus and cilia in nasal mucociliary clearance in healthy subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **140**, 132-136 (1989).
- 71) Batts A. H., Marriott C., Martin G. P., Wood C. F., Bond S. W.: The effect of some preservatives used in nasal preparations on the mucus and ciliary components of mucociliary clearance. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 145-151 (1990).
- 72) Lin S. Y., Amidon G. L., Weiner N. D., Goldberg A. H.: Viscoelasticity of cellulose polymers and mucociliary transport on frog palates. *Int. J. Pharm.*, **95**, 57-65 (1993).
- 73) Gilain L., Zahm J. M., Pierrot D., Fuchey C., Peynegre R., Puchelle E.: Nasal epithelial cell culture as a tool in evaluating ciliary dysfunction. *Acta. Otolaryngol.*, **113**, 772-776 (1993).
- 74) Gyi A., Ocallaghan C., Langton J. A.: Effect of halothane on cilia beat frequency of ciliated human respiratory epithelium *in vitro*. *Br. J. Anaesth.*, **73**, 507-510 (1994).
- 75) Selwyn D. A., Gyi A., Raphael J. H., Key A., Langton J.A.: A perfusion system for in vitro measurement of human cilia beat frequency. *Br. J. Anaesth.*, **76**, 111-115 (1996).
- 76) Wanner A.: Clinical aspects of mucociliary transport. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **116**, 73–125 (1977).
- 77) Schipper N. G. M., Verhoef J., Merkus F. W. H. M.: The nasal mucociliary clearance: Relevance to nasal drug delivery. *Pharm. Res.*, **8**, 807-814 (1991).
- 78) List S. J., Findlay B. P., Forstner G. G., Forstner J. F.: Enhancement of the viscosity of mucin by serum albumin. *Biochem. J.*, **175**, 565-571 (1978).

- 79) Corbo G. M., Foresi A., Bonfitto P., Mugnano A., Agabiti N., Cole P. J.: Measurement of nasal mucociliary clearance. *Arch. Dis. Child.*, **64**, 546-550 (1989).
- 80) Van Ree J. H. L., Van Dishoeck H. A. E.: Some investigations on nasal ciliary activity. *Pract. Otorhinolaryngol.*, **24**, 383-390 (1962).
- 81) Diós P., Pernecker T., Nagy S., Pál S., Dévay A.: Influence of different types of low substituted hydroxypropyl cellulose on tableting, disintegration, and floating behaviour of floating drug delivery systems. *Saudi. Pharm. J.*, **23**, 658–666 (2015).

謝辭

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学薬剤学分野 山本 昌教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するに当たり、直接の御指導、御助言を賜りました、神戸薬科大学製剤学研究室 坂根 稔康教授に謹んで感謝致します。さらに、種々の貴重な御指導、御助言を賜りました、京都薬科大学薬剤学分野 森下 将輝助教、就実大学 薬学部 古林 呂之准教授、井上 大輔助教に謹んで感謝の意を表します。

特別研究員 DC2 に採用頂き、研究奨励金、特別研究員奨励費の支給により、研究活動に専念できる環境と研究遂行のための経済的支援を賜りました日本学術振興会に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、多大なる御協力、御助言を頂きました、山崎 仁美学士、高野 佳津子学士、松下 明史学士、榎村 由貴学士、富崎 麻奈未学士、川上 真由子学士、堀 智貴学士、前田 千晶氏をはじめとする京都薬科大学薬剤学分野の諸氏に心より感謝致します。

2016 年度ソロプチミスト京都奨学生に採用頂き、生活面での経済的支援を賜りました、国際ソロプチミスト京都に深く感謝致します。

研究に専念できる時間と自由を与えて下さり、終始温かく見守って下さった、父 順夫、母 恵子に心から感謝致します。

2018 年 3 月 田中 晶子