

## 博士(薬学)(課程)

### 水溶性高分子の鼻粘膜吸収に対するポリ-L-アルギニンの促進機構に関する研究

大竹 一男

一般に鼻腔から全身への薬物送達は、肝初回通過代謝がなく、鼻上皮からの透過性が高いため、低分子薬物に対しては、高い生物学的利用率が得られている。しかしながら、この鼻粘膜ルートを利用した時でさえも多くの生理活性ペプチド及びたん白質のような水溶性高分子薬物においては、投与量に見合った十分な薬理効果を得ることが出来ない現状にある。その改善策の一つとして、化学的促進剤の利用が考えられる。これまで界面活性剤、胆汁酸塩、脂肪酸塩など多くの化学的促進剤候補物質がスクリーニングされてきた。しかしながら、生理活性ペプチドやたん白質薬物が十分に薬理効果を発揮する程度まで化学的促進剤を添加すると、これら促進剤のほとんどは、上皮細胞に不可逆的な障害を与え、製剤開発の過程で断念され、我が国の臨床の場で用いられたことはほとんどない。このような背景の中で、我々は、たん白質性医薬品の経鼻吸収性を著しく改善できる吸収促進剤として、ポリ-L-アルギニンを見出した。

本研究では、これまでの研究結果を基に、*in vivo*におけるポリ-L-アルギニンの分子量に依存した促進効果の持続性に関して更に詳細に検討し、その主な要因を明らかにするとともに、ポリ-L-アルギニンがいかにして鼻からの水溶性高分子薬物の吸収を促進するかを *in vivo* にて解析し、以下の結論を得た。

(1) ポリ-L-アルギニンの分子量依存的な作用持続性を、ラットを用いた *in vivo*における水溶性高分子薬物 FD-4 の経鼻吸収性の評価から実験的に確認するとともに、ポリ-L-アルギニンの時間依存的な促進効果の減少を導く主な要因について検討した。鼻腔内に投与した FD-4 の吸収は、分子量 8.9kDa の poly-L-Arg(10)及び 42.4kDa の poly-L-Arg(50)を併用すると、FD-4 を単独で投与した時よりも著しく増加するが、ポリ-L-アルギニンの先行投与実験によって、その後粘液中での酵素的な分解を主な要因として、活性なポリ-L-アルギニンが鼻腔内から徐々に減少し、その結果促進効果が減弱して、一過的な促進効果を生じたものと考えられた。従って、ポリ-L-アルギニンを再度、FD-4 と共に鼻腔内に投与する繰り返し投与実験により、新たに加えられたポリ-L-アルギニンによって、同様の促進効果を示す、すなわち可逆的な効果を示したと思われた。

また、鼻腔内に投与したポリ-L-アルギニンが分子量依存的な効果を示したのは、ポリ-L-アルギニンの分子量依存的な粘液中の酵素的な分解が考えられ、分子量の大きいものほど鼻腔内で安定であったことによると推察された。

このようにポリ-L-アルギニンは、一過的で、かつ可逆的な吸収促進効果を示し、その効果はポリアルギニンの種類を変えることによって調節が可能であると考えられた。このようなポリ-L-アルギニン

の特性は、高分子薬物の経鼻送達の開発を進めるうえで非常に有用でありペプチド及びたん白質医薬品の薬力学に合わせた全身送達が可能であると考えられた。従って、ポリ-L-アルギニンは、臨床的にその有用性が期待されるたん白質様水溶性高分子薬物の time-controlled transnasal delivery system の開発に有望であると思われる。

(2) ポリ-L-アルギニンの促進効果は一過的で、かつ可逆的な吸収促進剤であることが(1)により明らかとなった。従って、ポリ-L-アルギニンは界面活性剤や胆汁酸塩のような従来の化学的促進剤の吸収促進効果が粘膜に対する不可逆的な損傷作用と密接に関連していたのとは異なり、別の機構によって水溶性高分子の吸収を促進していることが推察された。しかしながら、*in vivo* における特徴的な吸収促進効果を含み、これまでポリ-L-アルギニンの作用機構に関してはほとんど解析されていない。そこでポリ-L-アルギニンの鼻粘膜透過促進効果の解析を *in vivo* 家兔摘出鼻粘膜にて行った。

モデル水溶性高分子薬物 (FD-4) の鼻粘膜透過に及ぼすポリ-L-アルギニンの促進機構を電気生理学的手法並びに共焦点顕微鏡観察により検討した結果、ポリ-L-アルギニンは適用濃度依存的に細胞間接着接合体である tight junction 及び adherens junction の構成たん白質 ZO-1 (220kDa) と occludin (65kDa) を細胞内へ分散させることによって鼻粘膜細胞間隙の FD-4 の透過性を優先的に高めることが明らかとなった。このような作用はポリ-L-アルギニンを basolateral 側に適用しても起こらず、apical 側に適用した場合にのみ起こり、細胞内代謝が低下した鼻粘膜ではポリ-L-アルギニンの促進効果が認められないことから、ポリ-L-アルギニンの促進効果は部位特異性を示すこと、つまり粘膜上の何らかの構成成分であるリン脂質、たん白質、多糖類等に作用し、細胞内代謝に関連するような機構によって起こることが考えられた。そこでポリ-L-アルギニンの促進効果と細胞内イベントとの関連性を調査した結果、ポリ-L-アルギニンはカルシウム非依存的な機構によって細胞内のセリン/スレオニンキナーゼを活性化し、TJ の接着たん白質である ZO-1 のセリン/スレオニン残基をリン酸化することによって ZO-1 を細胞内へ分散させる一方で、細胞内のチロシンホスファターゼを活性化し、occludin のチロシン残基を脱リン酸化することによって、occludin を細胞内へ分散させる結果、細胞間隙路が拡がり、高分子薬物の透過を促進したと考えられた。

従ってポリ-L-アルギニンは、これまでの界面活性剤や胆汁酸塩とは異なり、鼻上皮細胞の生理的機能を利用した機構によって tight junction 並びに adherens junction たん白質を細胞内に分散させ、隣接する細胞間の密着並びに接着結合を開口する結果、細胞間隙路が拡がり、水溶性高分子薬物の吸収を増加させる吸収促進剤であることが明らかとなった。

これらの知見は、臨床的にその利用が期待される生理活性ペプチドやホルモン、ワクチン等のたん白質様水溶性高分子薬物の transnasal delivery system の開発に有用な情報を提供すると思われる。