

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

福田 光良

2022

## 目 次

第1章 序論.....	1
第1-1節 ペプチド医薬品の脳送達的重要性.....	2
第1-2節 中分子ペプチドの脳への送達における経鼻投与の有用性.....	3
第1-3節 Nose-to-Brain 経路における定量的評価の重要性.....	6
第1-4節 本研究の目的.....	7
第2章 食道逆挿管鼻腔内投与法の開発.....	9
第2-1節 緒言.....	10
第2-2節 実験方法.....	13
第2-3節 結果.....	17
第2-4節 考察.....	21
第2-5節 小括.....	23
第3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.....	24
第3-1節 緒言.....	25
第3-2節 実験方法.....	27
第3-3節 結果.....	30
第3-4節 考察.....	37
第3-5節 小括.....	41
第4章 総括.....	42
参考文献.....	44
謝辞.....	61

## 略語一覽

AD: Alzheimer's disease

ANOVA: analysis of variance

ASD: Autism spectrum disorder

AUC: area under the curve

BBB: blood-brain barrier

BCSFB: blood-cerebrospinal fluid barrier

CBD: Cognitive and behavior disorders

CSF: cerebrospinal fluid

DB: Diabetes

GHD: Growth hormone deficiency

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

ID: injected dose

IFN $\beta$ -1b: interferon beta-1b

IGF-1: insulin-like growth factor-1

IV: intravenous

MCC: mucociliary clearance

MDD: Major depressive disorder

Mw: molecular weight

MP: micropipette

n.s.: not significant

OB: Obesity

PBS: phosphate buffered saline

PD: Parkinson's disease

%DTE: drug targeting efficiency percentage

%DTP: nose-to-brain direct transport percentage

P-gp: P-glycoprotein

PTSD: Post-traumatic stress disorder

SCZD: Schizophrenia

SD: Sexual dysfunction.

SE: standard error

## 第 1 章

### 序 論

## 第 1-1 節 ペプチド医薬品の脳送達の重要性

ペプチドを代表とする中分子医薬品は、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 [1,2]. なかでもペプチド医薬品は、1923 年にインスリンが糖尿病治療に対する医薬品に承認されたことから始まり、20 世紀後半に種々の生体由来のペプチドが医薬品として実用化された [3]. ペプチド医薬品の世界市場は、2016 年に 2500 億円を超えて [4–6], 2020 年までに 100 種類以上のペプチド医薬品が承認されており、今後さらなる市場の拡大が予想されている [7].

しかし、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) やパーキンソン病 (Parkinson's disease, PD) などの脳疾患を標的としたペプチド医薬品の研究開発は困難をとまなっている. 分子量 (Molecular weight, Mw) が 600–10,000 の範囲に含まれるペプチド (中分子ペプチド) は、受容体や酵素などを創薬標的として作用する. 脳を標的としたペプチド医薬品が開発されにくい原因として、中分子ペプチドは、一般的に細胞膜を通過できない [8]. そのため、中分子ペプチドの治療への応用は、皮下または静脈内注射などの非経口投与が必要となる. しかし、これらの投与方法は、医療者の手を介して患者に投与する場面が大半であるため、患者の利便性を損なう. 中分子ペプチドの血中を介した投与は、Mw が大きいこと、電荷を帯びていること、親水性であること、ならびに血中に存在するペプチダーゼなどの酵素に分解されやすいことが、脳へ送達させる過程で欠点となり得る [9]. また、脳には血液-脳関門 (blood-brain barrier, BBB), および血液-脳脊髄液関門 (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB) が存在する (Fig. 1-1) [10,11]. BBB の主な構成要素は、

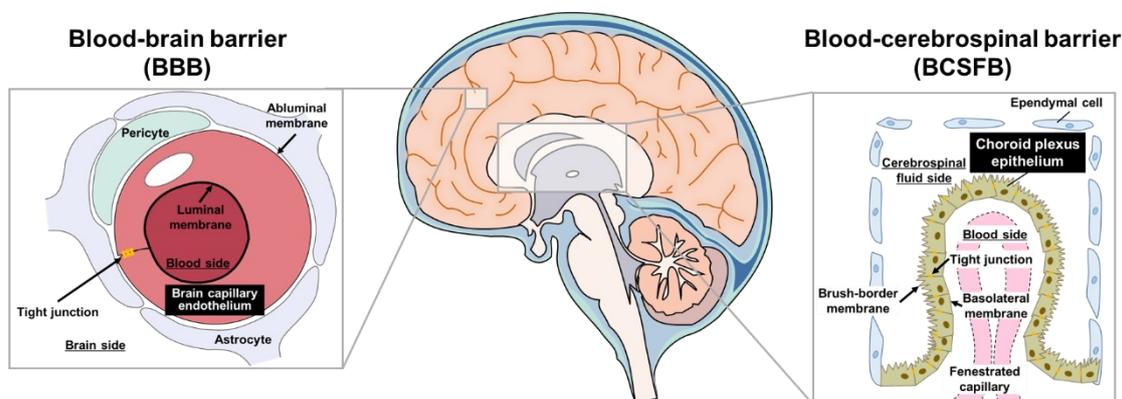


Fig. 1-1. Structure of BBB and BCSFB.

血管内皮細胞に加えて、星状膠細胞、周皮細胞である。そのなかでも循環血液と脳内の中分子ペプチドの輸送を厳密に制限するのに最も重要な役割を果たしているのが、脳の毛細血管内皮細胞の密着結合である [12]。BCSFB では、脳室に存在する脈絡叢上皮細胞間の密着結合がその役割を担っている [13]。そのため、中分子ペプチドを脳へ送達させるためには、BBB または BCSFB などのバリア機能を突破または回避する必要がある。中分子ペプチドの脳室内投与や脳実質への直接投与は、上述したような欠点を回避できるが、これらの投与方法は侵襲的で費用のかかる方法であるため、ヒトへの複数回の適用は現実的でない。このような背景から、脳疾患を標的とした中分子ペプチドの開発は困難であった。したがって、中分子ペプチドを脳に選択的かつ効率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。

## 第 1-2 節 中分子ペプチドの脳への送達における経鼻投与の有用性

従来、鼻腔内経路は、鼻漏、鼻づまり、副鼻腔炎、鼻腔感染症などの鼻に局限した疾患を治療するために利用されてきた。その後、経鼻投与は、注射などを用いた投与の代わりに、低分子医薬品、中分子ペプチド、およびタンパク質などの薬物の全身作用に利用されている [9,14]。また、経鼻投与には、BBB や BCSFB 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 経路の存在は、Faber がウサギの鼻孔に色素を投与することで初めて報告された [15]。この Nose-to-Brain 経路は、嗅神経系を介した経路、三叉神経系を介した経路、ならびに脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) を介した経路が含まれる [16,17]。さらに、経鼻投与は、i) 非侵襲的、ii) 患者のコンプライアンスが良好、iii) 投与が簡便、iv) 肝臓での初回通過効果による代謝を受けないなどの利点を有している [18-20]。これらの利点があることから、鼻腔内への薬物投与は、BBB を回避して中分子ペプチドを脳に送達させる非侵襲的な方法として急速に普及している [17,21,22]。実際に、中分子ペプチドの経鼻投与は、自閉症に対してオキシトシン [23]、摂食の調節に対してガラニン様ペプチド [24]、脳虚血性障害に対してエキセンジン-4 [25]、アルツハイマー型認知症に対してインスリン [26]、およびハンチントン病に対してインスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) [27] がその治療や進行の予防に有効であることが報告されている。

鼻から脳への薬物送達に関する研究において、マウスやラットなどのげっ歯類からサル

やヒトなどの霊長類への種を超えた検討が進められている [28]. 例えば、サルに経鼻投与されたインターフェロン  $\beta$ -1b (interferon beta-1b, IFN $\beta$ -1b, Mw: 18,500) は、三叉神経や嗅神経を介して脳の嗅球や脳幹に速やかに分布することが示されている [29]. Born らは、ヒトにインスリン (Mw: 5,808) やメラノコルチン (4-10) (Mw: 962) の中分子ペプチドを経鼻投与した後、CSF へ効率的に送達されることを明らかにし、彼らはヒトにおける嗅覚経路の存在を初めて証明した [16]. Table 1-1 に示すように、いくつかの中分子ペプチドが鼻から脳への薬物送達において臨床段階に進んでいる。なかでも、インスリンおよびオキシトシンの中分子ペプチドは、第 IV 相試験にまで到達していること [30–32] から、経鼻投与は、中分子ペプチドを脳へ送達させる有用な手段として期待されている。

**Table 1-1. Peptide drugs under clinical studies by intranasal administration.**

Peptide drug	Mw	Disease	Stage of development	Reference
NAP neuropeptide	824	AD	I	[33]
		AD, SCZD	II	[34,35]
Hexarelin	887	GHD	I	[36]
Melanocortin (4–10)	962	OB	I	[16,37–39]
			II	[37]
Oxytocin	1,007	CBD, ASD, PTSD, SD, SCZD	I	[40–49]
			II	[49–55]
			III	[56–58]
			IV	[30,31]
Arginine-vasopressin	1,028	CBD, pro-social effects	I	[16,44,59–62]
Hypocretin-I (Orexin A)	3,500	OB, AD, PD, narcolepsy	I	[63–65]
Cholecystokinin	3,931	CBD	I	[66,67]
			II	[68]
Neuropeptide Y	4,255	OB	I	[37]
		AD, PD, MS, SCZD, MDD	I	[16,37,77,69–76]
Insulin	5,808	AD, OB	II	[37,69,84,72,74,78–83]
		AD	III	[69,85,86]
		OB	IV	[32]

AD: Alzheimer’s disease, ASD: Autism spectrum disorder, CBD: Cognitive and behavior disorders, DB: Diabetes, GHD: Growth hormone deficiency, MDD: Major depressive disorder, OB: Obesity, PD: Parkinson’s disease, PTSD: Post-traumatic stress disorder, SCZD: Schizophrenia, SD: Sexual dysfunction.

### 第 1-3 節 Nose-to-Brain 経路における定量的評価の重要性

BBB の回避を可能とする経鼻投与は、中分子ペプチドなどを脳に送達させる非侵襲的な方法として急速に普及しているものの、経鼻投与による脳への効率的な薬物送達を可能にするメカニズムに関して、未だに解明されていない点がある。その原因として、鼻から投与された薬物が脳実質や CSF にどのくらい送達されるのか、ならびに Nose-to-Brain 経路がそれらの部位に送達されるのにどの程度関係しているのか、げっ歯類でさえ、定量的な動態に関する報告は依然として少ないことが挙げられる [87]。

Merkus らは、Nose-to-Brain 経路を証明するために必要な研究の原則を提唱している [88]。その原則は、i) 投与量および濃度の選択、ii) 同一製剤を静脈内投与して得られたデータとの比較、iii) 血漿中及び中枢神経系における薬物動態の解析、iv) 投与した薬物の脳内分布の評価である。近年、鼻から脳への薬物送達の程度を定量的に示す指標が提案されている。Nose-to-Brain 経路を介した薬物送達は、静脈内投与 (intravenous, IV) に対する経鼻投与後の相対的な脳への薬物送達効率 (drug targeting efficiency percentage, %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 (nose-to-brain direct transport percentage, %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 [89,90]。これらの定量的な指標は、Merkus らが提唱した原則を満たすことによって算出できる。

Table 1-2 に、Kozlovskaya らの報告 [87] から、中分子量の薬物または化合物を経鼻投与した時の%DTE および%DTP が示されたものをまとめた。しかし、これらの論文は、脳または CSF および全身循環におけるモデル化合物の濃度対時間曲線下面積 (area under the curve, AUC) を報告しているか、または AUC を求めるのに必要な定量的データを用いて、Kozlovskaya らが%DTE ならびに%DTP を算出した文献も含んでいる。実際に原著論文の中でこれらの指標を示しているのは、Dhuria らの文献のみである [91]。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ことから、定量的な評価が困難であった。このような背景から、これまでの研究では主に薬効薬理試験に焦点が当てられていた。そのため、Nose-to-Brain 経路を定量的に評価できる方法を確立することは、中分子ペプチドの経鼻投与製剤を広く臨床の場で用いるために必要な課題を明らかにする方策となり得る。

**Table 1-2. Summary and analysis outcomes for the individual publications of middle-sized peptides.**

Cargo	Mw	%DTE	%DTP	Reference
DiR	1,013	7,357 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	[92]
Hydroxocobalamin	1,346	101 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	[93]
		84 <sup>b</sup>	-19 <sup>b</sup>	[94]
Ergoloid mesylate	2,041	351 <sup>b</sup>	71 <sup>b</sup>	[95]
FITC-dextran	3,000	115 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	[96]
<sup>125</sup> I-vasoactive intestinal peptide	3,326	629 <sup>b</sup>	84 <sup>b</sup>	[97]
Hypocretin-1	3,562	443 <sup>c</sup>	77 <sup>c</sup>	[91]
Dextran (FD-4)	4,400	180,109 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	[98]

<sup>a</sup>: These data were calculated by me based on the data of alone DiR. <sup>b</sup>: These data were calculated by Kozlovskaya et al. based on the data of each reference. <sup>c</sup>: These data were calculated by Dhuria et al.

#### 第 1-4 節 本研究の目的

近年、中分子ペプチドを鼻から脳へ送達するための研究分野は、現在までに得られている Nose-to-Brain 経路の知見から、経鼻投与した薬物が脳に届けられるのに嗅神経経路、三叉神経経路、および CSF 経路が関与していることは確かである。しかし、膨大な実験的研究が行われているにもかかわらず、経鼻投与による脳への薬物送達の効率性について定量的に評価しているものはほとんどない。中分子ペプチドは、一般的に水溶性が高いこと、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の特徴を持つ。実際に中分子ペプチドを使用すると酵素による分解の影響なども考慮しなければならないため、今回は中分子ペプチドのモデル化合物として、水溶性中分子であるイヌリンを使用した。イヌリンは、ペプチダーゼなどの酵素によって分解されない Mw 5,000 の水溶性中分子である。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。第二章では、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。第三章では、第二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。さらに、新規に開発した経鼻投与方法による投与後の水溶性中分子であるデキストランの脳内分布局在をイメージング観察して、イヌリンの定量的な体内分布と比較した。

## 第2章

### 食道逆挿管鼻腔内投与法の開発

## 第2-1節 緒言

ペプチドなどの中分子医薬品は、現在治療法のない難治性の脳疾患に対する新たな治療薬として期待されている [1,2]. しかし、それらの多くは水溶性中分子であるため、BBBの障壁により、静脈内投与や経口投与で血液から脳内に送り込むことは極めて困難である [10,11]. 近年、BBBを回避した治療薬の鼻から脳への送達経路として、経鼻投与の有用性が報告されている [99–101]. しかし、Nose-to-Brain 経路における定量的な分析に関する報告は比較的少ない [87]. Nose-to-Brain 経路に関して定量的に評価した報告が少ない原因は、以下の理由によるものと考えられる. 経鼻投与には、i) 薬液による鼻腔内滞留性の違い、ii) 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, mucociliary clearance, MCC), iii) 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 [17,28]. 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. また、鼻腔内は大きく分けて2種類の鼻粘膜で構成されている (Fig. 2-1) [102]. 嗅神経が豊富に

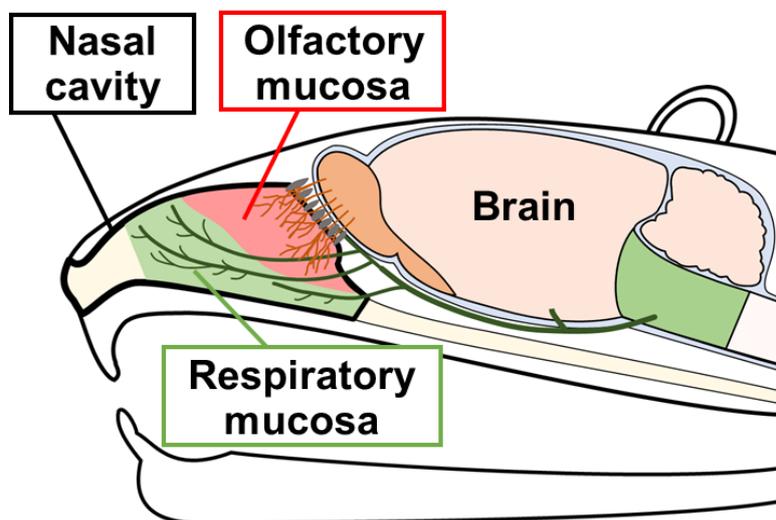


Fig. 2-1. Schematic drawing of the nasal mucosa in mice.

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 [103]. 鼻から脳へ薬物が吸収される過程で経路内における薬物の吸収に影響を及ぼす因子として、薬物の物理化学的因子、鼻腔内生理学的因子、頭部の位置、投与用量、投与方法などの実験的な要因、

浸透促進剤や粘膜付着性物質の含有などの製剤的な要因，経鼻投与デバイスに関連する因子が挙げられる [104-106]。これらの中の投与方法や投与条件（投与速度や投与液量）は，薬液の鼻腔内における分布が異なるため，Nose-to-Brain 経路を介した輸送に影響を及ぼすことが想定されるものの，これまで検討されていない。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開発する必要がある。

このような背景から，これらの経鼻投与の投与条件や投与方法は，中分子候補薬の鼻から脳への移行に影響を及ぼす可能性があるとして仮説を立てた。MCC が経鼻投与後の薬物吸収に影響を及ぼす点 [107] に着目し，その影響を抑えるために Hirai らのラット鼻腔内灌流法 [108] を参考に新規経鼻投与方法である食道逆挿管鼻腔内投与方法 (Reverse 法) を考案した。Reverse 法による経鼻投与は，吸入麻酔下で食道側から鼻腔内にカニューレを挿入し，連結したマイクロシリンジポンプで薬物を鼻粘膜の嗅粘膜部分に直接滴下する方法である。Reverse 法の最大の利点は，経鼻投与時の投与速度および投与する薬液量を機械的にコントロールできることである。さらに，食道側から鼻腔内部までカニューレを挿入することで，食道側への薬液の流出を抑制し，薬液の鼻腔内への滞留性を向上させる。この Reverse 法を用いることで，実験者間による技術の相違に伴う分布の変動を克服することが期待できる。

天然の  $\alpha$ -アミノ酸のみから構成されるペプチドは，生体内に存在するプロテアーゼやペプチダーゼなどの加水分解酵素により容易に分解される [9]。そのため，経口投与や経静脈内投与したペプチドは，標的部位に送達される前に加水分解酵素による代謝や排泄の影響を受けやすい [109,110]。実際にペプチドを経鼻投与して生体内の分布を評価するためには，鼻粘膜上に存在する加水分解酵素などの影響を考慮しなければならない。そこで本研究では，ペプチダーゼなどの生体内に存在する酵素による分解や代謝などを考慮せずに，経鼻投与後の脳への分布評価が可能なイヌリン (Mw: 5,000) を使用した。イヌリンは，末端のグルコースにフルクトースのモノマーが重合したポリマーである [111]。また，イヌリンは膵臓や小腸の刷子縁膜上に存在する酵素で消化されないため，イヌリンは難消化性ポリマーに分類される [112]。さらに，イヌリンは，血液-脳関門非透過性分子として知られている。イヌリンの Mw は，オキシトシン (Mw: 1,007)，ヒポクレチン (Mw: 3,500)，エキセンジン (Mw: 4,186) や，インスリン (Mw: 5,808) のような中分子ペプチドの多くと同じ分子量域に含まれる [113]。そのため，イヌリンは，今回の方法で Nose-to-Brain 経路を定量的に評価するためのペプチドのモデル分子とする利点を有していると考えた。

本章では，新規経鼻投与方法を開発するために，Reverse 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 2-2 節 実験方法

### 1. 使用試薬

[Carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]-inulin-Carboxyl ( $^{14}\text{C}$ -inulin, イヌリン, Mw 5,000, 2 mCi/g, 純度 > 99%) は, American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA) より購入した. イヌリンの放射活性は 10 mCi/mmol であり, 構造式を Fig. 2-2 に示す. イヌリンは, 投与液調製時まで  $4^{\circ}\text{C}$  の条件下で保存した. 他の試薬は試薬品として市販されているものを実験に使用した.

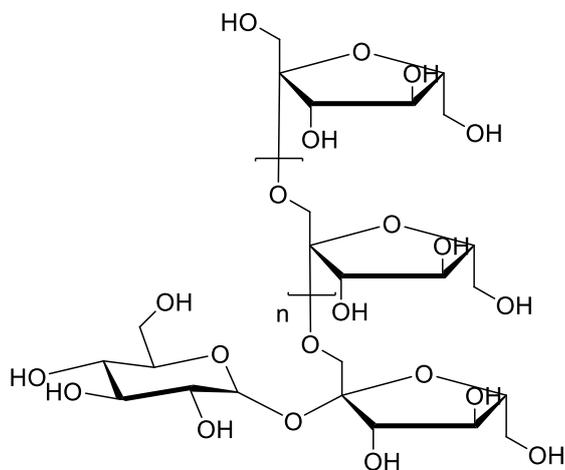


Fig. 2-2. Chemical structure of inulin.

### 2. 実験動物

動物実験の実施は, 日本大学動物実験委員会 (東京, 日本) の審議を経て承認を受けた. 実験動物は, 4 週齢の ddY マウスを日本エスエルシー株式会社 (静岡, 日本) より購入した. マウスは, 温度  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 10\%$ , 照明点灯時間 8:00–20:00 (12 時間) の環境下で飼育し, 固形飼料 MF (オリエンタル酵母株式会社, 東京) および水を自由に摂取させた. マウスは少なくとも 3 日間の予備飼育後, 体重 25–35 g のマウスを実験に使用した.

### 3. 経鼻投与

#### 3.1. 食道逆挿管鼻腔内投与法 (Reverse 法)

Reverse 法は, 以下の手順に従って実施した. イソフルランで吸入麻酔されたマウスの気道にポリエチレンチューブ (i.d., 0.58 mm; o.d., 0.97 mm) を挿入し気道を確保した (Fig. 2-

3). その後、食道から鼻腔に向けてカニューレ (i.d., 0.28 mm; o.d., 0.61 mm) を挿入した。マウスを仰向けのまま、食道側のカニューレにマイクロシリンジポンプをセットし、薬液を一定速度で鼻腔内へ投与した。投与する薬液は、イヌリンをリン酸緩衝生理食塩液 (phosphate buffered saline, PBS) で  $2 \mu\text{Ci}/\text{mL}$  ( $200 \mu\text{M}$ ) に調製した。鼻から脳移行に及ぼす投与速度の影響を検討するために、薬液の投与速度は、 $5\text{--}500 \mu\text{L}/\text{min}$  の範囲で変化させた。この時、薬液の投与容量は、 $0.05 \mu\text{Ci}/\text{mouse}$  となるように、 $25 \mu\text{L}$  で投与した。鼻から脳移行に及ぼす投与容量の影響を調べるために、各投与液を  $0.05 \mu\text{Ci}/\text{mouse}$  となるように調製したものを、 $3.125\text{--}25 \mu\text{L}$  の範囲で変化させ、 $5 \mu\text{L}/\text{min}$  の速度で投与した。投与後、一定時間後に、心臓から血液を採取した。得られた血液は遠心分離し、血漿を得た。灌流処置を行わないマウスらは、血漿を採取直後に断頭して組織を摘出した。灌流処置を行うマウスの各組織は、ペリスタポンプを用いて血液の色が除けるまで心臓から全身灌流を行った後に摘出した。

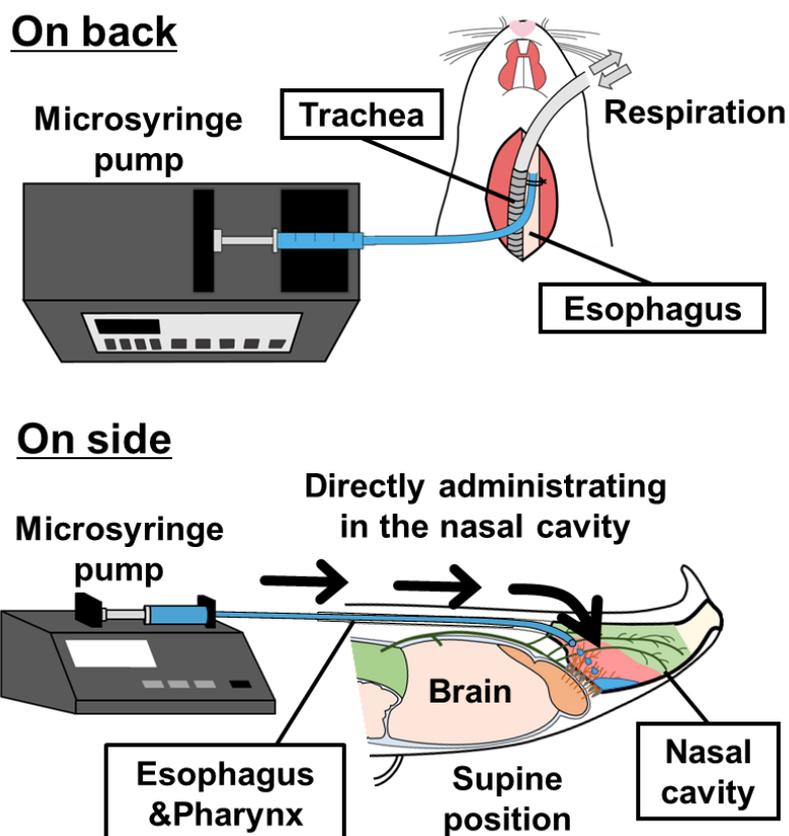
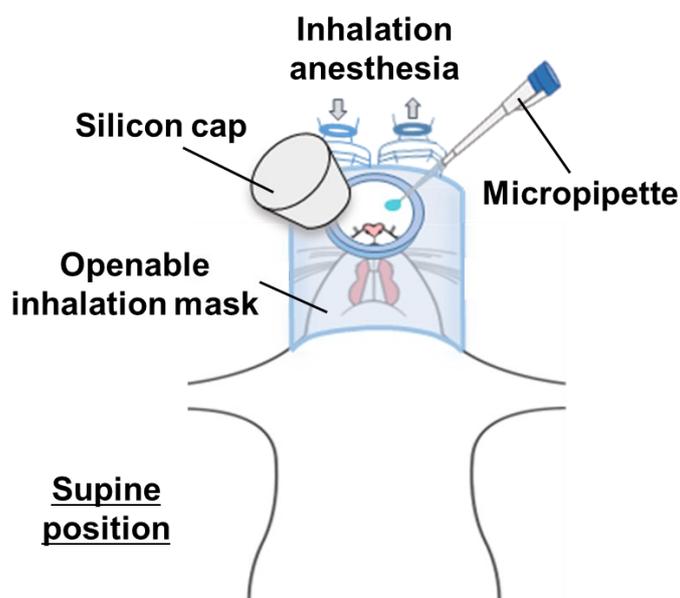


Fig. 2-3. Intranasal administration by reverse cannulation from the airway side through the esophagus (Reverse).

### 3.2. マイクロピペットを用いた点鼻投与方法 (MP 法)

イソフルランの吸入麻酔下、マウスの鼻部を経鼻用麻酔マスク (SN-487-70-09, シナノ製作所, 東京) で覆い、シリコン栓を開いたあとでマイクロピペットを用いて、薬液を片鼻腔に 2  $\mu$ L ずつ計 25  $\mu$ L を 30 秒毎に交互に投与した (Fig. 2-4). この時、液の濃度は PBS で 2  $\mu$ Ci/mL (200  $\mu$ M) に調製した. 薬液は、マイクロチップの先端からの液滴を鼻腔付近に近づけ、マウスの呼吸に同調しながらマウスが自発的に吸引するようなタイミングで投与した. 血液および各組織は、上記の Reverse 法による投与と同様な方法で採取した.



**Fig. 2-4. Intranasal administration using a micropipette (MP) covered with an openable inhalation mask.**

### 4. 放射活性の測定

組織は、湿重量を測定後、55°C で 1–2 時間かけて 1 mL Solusol™ (National Diagnostics, GA, USA) で溶解させ、その後シンチレーションカクテルである Hionic-fluor™ (Waltham, MA, USA) を 10 mL 加えた. 血漿サンプルには Pico-fluor™40 (Waltham, MA, USA) を 3 mL 加えた. 血漿および組織中のイヌリンの放射活性は、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 4810TR, PerkinElmer® Ltd., MA, USA) を用いて 2 サイクル、5 分間測定した. 計数効率の補正は、外部線源法によって行った. 組織中、血漿ならびに投与液の放射活性は、測定された 2 サイクルの放射活性の平均値を用いた.

## 5. データ解析

投与された薬物量 (injected dose, ID) に対する組織中または血液に分布したイヌリンの割合 (%ID/g tissue または %ID/mL plasma) は、組織 1 g または血液 1 mL あたりのイヌリンの放射活性を投与された薬液中のイヌリンの放射活性で除することで、それぞれの値を算出した。

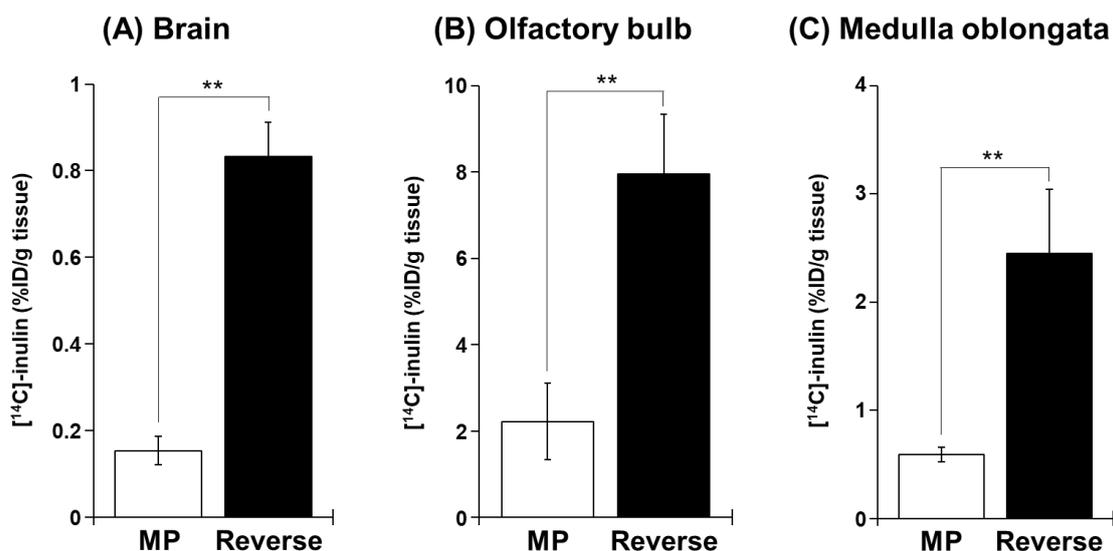
## 6. 統計解析

統計解析には BellCurve for Microsoft Excel<sup>®</sup>を用いた。2 群間の平均間の差の有意性を評価するために、Student's *t*-検定 (*t*-test) を用いて解析した。2 群以上のグループの平均間の差の有意性は、一元配置分散分析 (Analysis of variance, ANOVA) に続いて Dunnett's 検定を用いて決定した。差は  $p < 0.05$  で統計的に有意であると判断した。

## 第2-3節 結果

### 1. Reverse 法と MP 法の違いにおける脳組織分布への影響

げっ歯類に対する経鼻投与は、マイクロピペットがよく利用されている。この投与方法は、両鼻腔に対して少量 (5  $\mu\text{L}$  以下) の薬液を複数回投与したり、実験動物の鼻腔内の体積に相当する薬液量を両鼻腔に投与するなど様々な報告がある [17,28,114–116]。これらの経鼻投与の投与条件や投与の仕方は、中分子薬物の鼻から脳への移行に影響を及ぼす可能性があるかと仮説を立てた。はじめに、MP 法および新たに開発した Reverse 法による投与が脳組織分布に及ぼす影響を検討した。Fig. 2-5 に、それぞれの経鼻投与方法を用いて投与 15 分後における脳、嗅球および延髄のイヌリン分布を示す。いずれの部位においても Reverse 法による投与後のイヌリン分布は MP に比べて、約 4 倍以上高い値を示した。

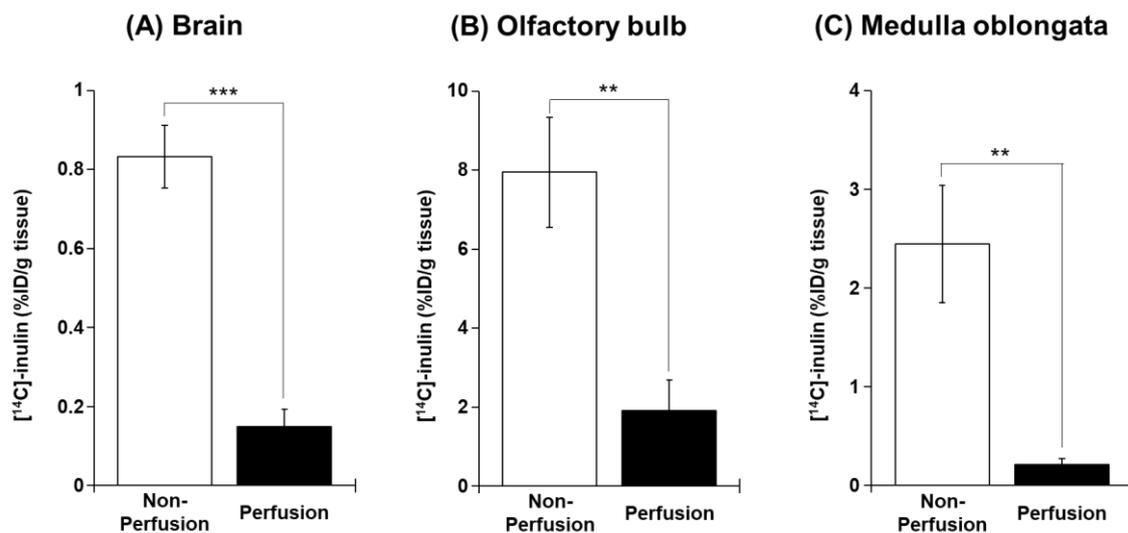


**Fig. 2-5. The brain distribution of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin at 15 min after Reverse.** The Reverse method was administered to mice under inhalation anesthesia at the dosing speed of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  and a dose solution of 25  $\mu\text{L}$ . Mice were sacrificed 15 min after Reverse was begun. The distribution of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin in the brain (A), the olfactory bulb (B), and the medulla oblongata (C) showed as %ID/g tissue after the treatment. Each point represents mean  $\pm$  SE ( $n = 4-5$ ). The significance of the difference in the mean values between the two groups at the same time was made using  $t$ -tests.  $** p < 0.01$ . Abbreviations: MP, micro pipette; Reverse, reverse cannulation; SE, standard error.

### 2. Reverse 法における全身灌流による脳分布への影響

脳は著しく豊富な血管分布を有しているため、脳の血液循環は他の臓器に比べて多い特

徴を持つ [117]. 経鼻投与後, 薬物は鼻粘膜から吸収され体内に分布する. Nose-to-Brain 経路のように鼻から脳へ直接移行する経路も存在するが, 血中に移行することも考えられる. 本研究で用いたイヌリンは, BBB を透過しないため脳内の血管容積マーカーとしても用いられている [118,119]. つまり, 一度血管内に分布したイヌリンは脳組織に移行することはない. Fig. 2-5 の検討では, 経鼻投与後の断頭を行う前に緩衝液などを用いた全身灌流処置を行っていないため, 脳内に存在する血管に分布したイヌリンも含めた放射活性量を測定し, 脳内分布として算出していることが考えられた. そこで, 経鼻投与 15 分後に心臓から全身灌流を処置した群および非灌流群におけるイヌリンの脳内分布への影響を検討した. Fig. 2-6 に Reverse 法における投与 15 分後に未処置群と灌流処置群の脳, 嗅球および延髄のイヌリン分布をそれぞれ示す. いずれの部位においても灌流処置を行った群のイヌリン分布は未処置群に比べて, 75–90%有意に減少した.

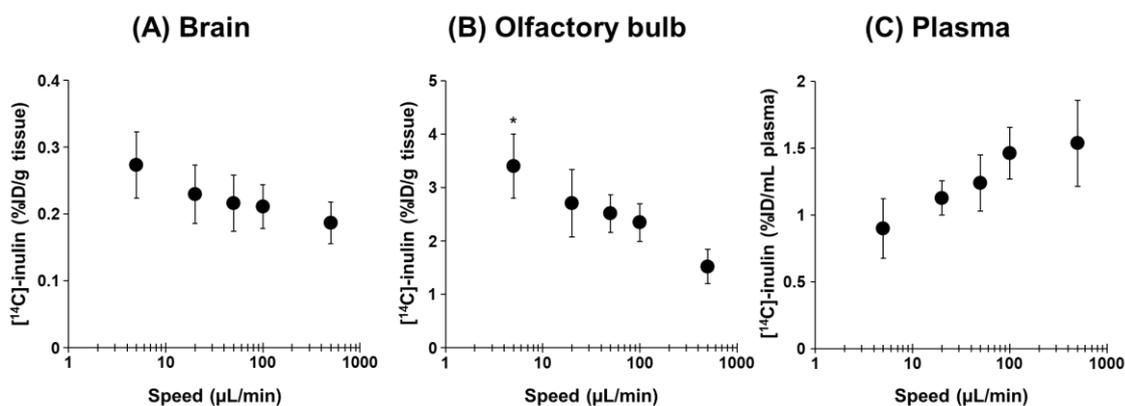


**Fig. 2-6. Effect of the systemic perfusion on inulin distribution in the brain after 15 min by the Reverse method.** The Reverse method was administered to mice under inhalation anesthesia at the dosing speed of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  and a dose solution of 25  $\mu\text{L}$ . Mice were sacrificed 15 min after Reverse was begun. In perfusion group, each tissue was obtained after systemic perfusion from the heart using a peristaltic pump until the blood was decolorized. The distribution of [<sup>14</sup>C]-inulin in the brain (A), the olfactory bulb (B), and the medulla oblongata (C) showed as %ID/g tissue after the treatment. Each point represents mean  $\pm$  SE (n = 5–6). The significance of the difference in the mean values between the two groups at the same time was made using *t*-tests. \*\*\**p* < 0.001, \*\**p* < 0.01. Abbreviations: Reverse, reverse cannulation; SE, standard error.

### 3. Reverse 法におけるイヌリンの脳組織分布に及ぼす投与速度の影響

Fig. 2-6 の結果より, Reverse 法による投与後に灌流処置を行うことで, 脳の血管内容積に存在するイヌリンを取り除けることが示唆されたことから, 以降の検討では投与後に心臓からの全身灌流を全ての個体で実施した.

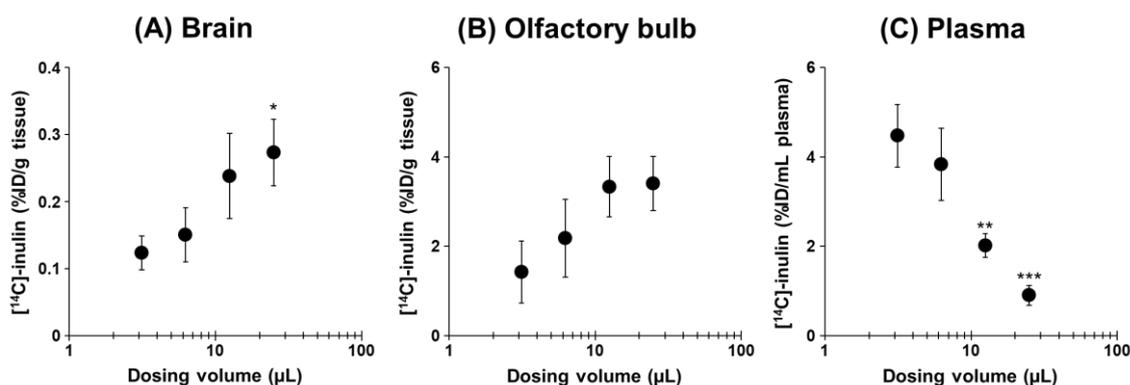
Reverse 法の経鼻投与における利点は2つある. 一つは, 経鼻投与における投与速度や投与液量をコントロールすることができる. 二つ目は, 食道側からカニューレを挿管して薬液を鼻腔側に送液することから, MCC の流れに逆行し, MCC の影響を減少できる可能性がある. そこで, 本研究では, Reverse 法におけるイヌリンの脳組織分布量に及ぼす投与速度の影響を検討した. Fig. 2-7 に, Reverse 法による 60 分後における脳組織および血漿中のイヌリン分布に及ぼす投与速度の影響を示す. Reverse 法における投与速度が 5 から 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  に増加するにつれて, 嗅球および脳におけるイヌリンの分布量は, 30 および 50%, それぞれ低下する傾向を示した (Fig. 2-7A & 2-7B). 嗅球への分布量は, 脳のそれに比べて, いずれの投与速度においても, 約 10 倍高い値であった. 一方, 血漿への分布は投与速度の増加にともない増大する傾向を示した (Fig. 2-7C).



**Fig. 2-7. Effect of the administration speed on inulin distribution in the brain and plasma after 60 min by the Reverse method.** Drug doses of 25  $\mu\text{L}/\text{mouse}$  were administered in each mouse under inhalation anesthesia at changing administration speed from 5 to 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  with the Reverse method. Mice were sacrificed 60 min after the Reverse method was begun. The brain (A), olfactory bulb (B), and plasma (C) radioactivities were expressed as a percentage of injected dose (%ID/g) tissue or %ID/mL plasma after Reverse in mice. Each point represents mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ). The significance of the differences in the mean values of multiple groups versus 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  was made using an analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's test. \*  $p < 0.05$ . Abbreviations: Reverse, reverse cannulation; SE, standard error.

#### 4. Reverse 法におけるイヌリンの脳組織分布に及ぼす投与液量の影響

Fig. 2-7 の結果から、投与速度を低下させることでイヌリンの脳への分布が増大したことから、投与速度は  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  に設定し投与液量の影響を検討した。Fig. 2-8 に、Reverse 法による投与 60 分後における脳組織および血漿中のイヌリン分布に及ぼす投与液量の影響を示す。経鼻投与する薬液量を  $3.125 \mu\text{L}$  から  $25 \mu\text{L}$  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. 2-8A & 2-8B)。嗅球への分布量は、いずれの投与液量においても、脳への分布量に比べ約 10 倍以上高い値であった。一方、血漿へのイヌリンの分布量は、経鼻投与する薬液量の増加につれて減少した (Fig. 2-8C)。体重  $30 \text{g}$  のマウスにおける鼻腔内容積は、 $30 \mu\text{L}$  であることから [102]、Reverse 法では、マウス鼻腔内容積に近い薬液量 ( $25 \mu\text{L}$ ) を投与することで、鼻から脳組織へイヌリンの分布量が向上することが明らかとなった。



**Fig. 2-8. Effect of the administration volume on the distribution of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin in brain tissue and plasma after 60 minutes of Reverse.** The Reverse method was administered to mice under inhalation anesthesia at the dosing speed of  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  with a dose solution changing from  $3.125$  to  $25 \mu\text{L}$ . Mice were sacrificed 60 min after Reverse was begun. The distribution of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin in the brain (A), the olfactory bulb (B), and the plasma (C) showed as %ID/g tissue or %ID/mL plasma after the treatment. Each point represents mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ). The significance of the differences in the mean values of multiple groups versus  $3.125 \mu\text{L}$  was made using an analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's test. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . Abbreviations: Reverse, reverse cannulation; SE, standard error.

## 第2-4節 考察

創薬モダリティとしてペプチドのような中分子薬物は、静脈内投与後による中枢移行性が低いことから、脳疾患の領域における医薬品開発の障害になっている [10,11]. 経鼻投与は、静脈内投与による痛みを伴わず、BBB を回避可能な経路を持つことから、ペプチドの脳送達のための有望な投与方法になり得る [113]. そこで、鼻から脳への移行を複雑にしている原因の1つである薬液の食道への流出に着目した. Reverse 法では、食道側からカニユーレを挿入し、マイクロシリンジポンプに取り付けたシリンジと連結させた. この処置によって、食道への投与液の流出を抑制することが期待できる.

はじめに、中分子の経鼻投与後の脳への分布を定量することが可能か検討するために、Reverse 法ならびに MP 法におけるインスリンの脳への分布を定量的に評価した. インスリンは、インスリン (Mw: 5,808) やエキセジン (Mw: 4,186) などのペプチド薬の分子量域であること、BBB 非透過性分子として知られていること [118,119], 生体で代謝されないため、投与後の代謝を考慮する必要がなく分布の定量に向いていること [120], などの利点を持つことから今回モデル分子として使用した. その結果、Reverse 法および MP 法による投与後の脳、嗅球、および延髄におけるインスリンの組織内分布の分布量を検出することができた (Fig. 2-5). さらに、Reverse 法による投与後のインスリン分布は MP 法に比べて、約4倍以上高い値を示した. このように、Reverse 法による経鼻投与において、組織分布を検出できたことから、Reverse 法は、今後の経鼻投与後の組織内分布を評価するうえで有用な方法であることが示唆された.

次に、脳実質側に分布するインスリンを評価するために、経鼻投与の一定時間後に脳を摘出する直前に全身灌流処置を行った. 経鼻投与された薬液の一部は、粘膜固有層に到達した後、鼻血管に吸収され、薬液が全身に分布する [121]. 鼻から脳への分布を評価するにあたって、インスリンのような BBB を透過しない物質は、脳の血管内に残存するインスリンを排除する必要がある. 全身灌流処置を行うことで、血管内に存在する薬液を排除して、脳実質側にのみ存在する薬液を評価した. その結果、灌流処置後の脳組織へのインスリン移行は、灌流処置を施さなかった脳組織に比べて 75-90%程度減少した (Fig. 2-6). したがって、経鼻投与したインスリンの多くが脳血管内に分布していることが示唆された. このことから、以降のインスリン分布評価の実験では、組織を摘出する前に全身灌流の処置を施した.

Reverse 法は、吸入麻酔下でげっ歯類への経鼻投与を可能とし、マイクロシリンジポンプを用いて薬物の投与速度と薬液量の両者を機械的に調節できる利点を有する. 投与速度お

よび薬液量の2つの因子が経鼻投与による中分子の脳への薬物移行を特徴づけると仮説を立てた。

中分子の経鼻投与後の脳への分布に及ぼす投与速度の影響を明らかにするために、イヌリンの脳への分布を定量的に評価した。投与液の総量を、高速かつ短時間による経鼻投与あるいは低速かつ持続的な経鼻投与のどちらの条件がイヌリンの脳への分布を増大させるか検討した。その結果、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した (Fig. 2-7A & 2-7B)。これに対して、500  $\mu\text{L}/\text{min}$  の速度に設定して3秒間で速やかに投与した場合、鼻腔内から循環血液中への移行が増えた結果 (Fig. 2-7C)、脳組織におけるイヌリンの分布量が低下した。この実験における最も速い投与速度 (500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) では、全薬液量が鼻腔内に速やかに流入すると同時に、嗅粘膜に加えて呼吸粘膜にも広く分布する。呼吸粘膜にはフェネストラが多く存在するため、呼吸粘膜に付着した薬液は、嗅粘膜に比べて循環血液中へ流出しやすい [103]。したがって、Reverse 法による経鼻投与において投与速度が速い場合には、呼吸粘膜上から血中への薬液の流出により、脳への水溶性中分子の分布を低下させることが示唆された。

経鼻投与後の脳への分布に及ぼす投与液量の影響を明らかにするために、イヌリンの脳への分布を定量的に評価した。Reverse 法において投与する速度を一定に設定したとき、鼻腔内に流入する薬液量の増大は脳組織へのイヌリンの分布を増加させ、一方血中へのイヌリンの分布は減少させることが示唆された (Fig. 2-8)。マウスの鼻腔容積は約 30  $\mu\text{L}$ 、その鼻腔の表面積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 [102]。仰向けにしたマウスに対して、MCC に逆行するように食道側から鼻腔側へ 25  $\mu\text{L}$  の薬液を5分間投与することで、薬液は呼吸粘膜上まで拡がらず、主に鼻腔上部に位置する嗅粘膜表面からの鼻から脳への経路を介して効率的に移行することが示唆された。

## 第2-5節 小括

新規経鼻投与方法である Reverse 法を用いて、経鼻投与方法の違い、全身灌流、投与速度および投与液量の影響を脳内分布から検討し、以下の知見を得た。

1. Reverse 法を用いた経鼻投与 15 分後の脳へのインスリンの移行量は、MP 法に比べて 3 倍以上向上した。
2. 経鼻投与後の全身灌流を行うことで、血管内容積に分布していたインスリンが除去されて、脳の分布量は低下した。
3. Reverse 法を用い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、インスリンの鼻から脳への分布は増加傾向だった。
4. Reverse 法を用いて嗅粘膜部分を満たす薬液量を投与することにより、インスリンの脳内分布量は向上した。

以上より、水溶性中分子を用いた経鼻投与において Reverse 法は、脳内分布を評価するのに有用であることが示唆された。さらに、Reverse 法による投与時の投与速度ならびに投与液量は脳への移行に関与することが示唆された。

### 第3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

### 第3-1節 緒言

BBB を回避して鼻から脳に薬物を直接送達できる Nose-to-Brain 経路が注目されている [101,122]. Nose-to-Brain 経路には、嗅神経、三叉神経、ならびに CSF を介した複数の経路が関与する (Fig. 3-1) [16,17]. 嗅神経経路を利用した水溶性中分子の移行は、鼻腔内に存在

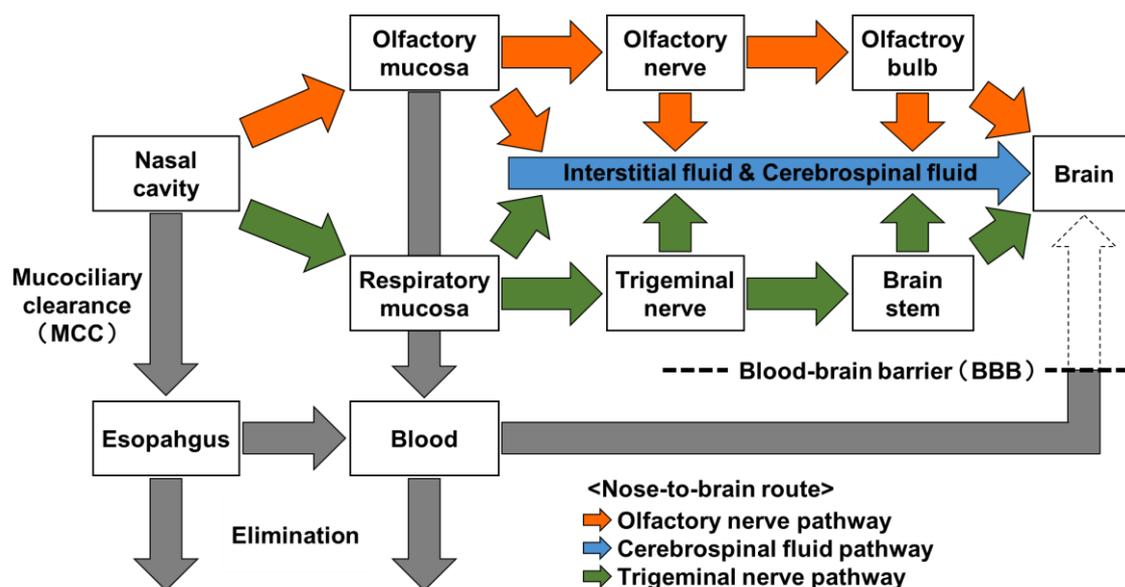


Fig. 3-1. Representative route of nose-to-brain.

する嗅粘膜から吸収されて嗅神経を介することで、嗅球または脳実質へ送達される経路である [123]. 三叉神経は鼻腔内の嗅粘膜および呼吸粘膜にそれぞれ分布しており、これらの鼻粘膜を経由して、橋などの脳幹部に直接到達する。そのため、経鼻投与された水溶性中分子は、三叉神経経路を介して鼻腔内に投与された薬物が直接脳幹などの脳の後方や脊髄に送達される。しかし、三叉神経経路の寄与は十分に理解されておらず、嗅覚経路よりも脳への移行における関連性が低いと考えられている [113]. CSF 経路は、嗅粘膜と呼吸粘膜から吸収された水溶性中分子が間質液や脳脊髄液に分布して脳全体に送達される。一方で、鼻腔に投与された水溶性中分子は鼻粘膜上に存在する MCC によって、食道側に除去されるため脳への移行が著しく制限される。

また、鼻腔からの薬物吸収は、薬物の Mw に反比例する。Mw が 300 未満の薬物のほとんどは、鼻腔から容易に吸収される [124] のに対し、中高分子量の薬物 (Mw 600 以上) は、鼻腔内での吸収が著しく低下する [125]. 嗅粘膜は、経鼻吸収された薬物が脳へ移行しや

すいため、嗅粘膜を通過する鼻腔内輸送は、脳標的化のために注目されている [2,126,127].

Nose-to-Brain 経路を利用した薬物送達は、 $\%DTE$  および $\%DTP$  のような定量的な指標を使用して、ナノキャリアや剤形の相違による鼻から脳への送達性が議論されている [87]. しかし、経鼻投与には、薬液による鼻腔内滞留性の違い [128], 外来異物を鼻腔から咽頭側に排除する機構である MCC の影響 [129], さらに確立された経鼻投与技術が存在しないため実験者間での技術の相違 [123] などがある. 本研究では、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、Reverse 法を用いて、鼻から脳への水溶性中分子分布を向上できる経鼻投与条件を第二章で明らかにした. しかし、これらの投与条件が鼻から脳への移行を向上させたことを示しているものの、 $\%DTE$  や $\%DTP$  のような定量的な指標を用いた評価および他の組織への分布について示していない.

そこで本章では、第二章で開発した新規経鼻投与法を用いて、水溶性中分子の体内分布を定量的に評価した.

## 第3-2節 実験方法

### 1. 使用試薬

[Carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]-inulin-Carboxyl ( $^{14}\text{C}$ -inulin, イヌリン, Mw 5,000, 2 mCi/g, 純度 > 99%) は, American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA) より購入した. Dextran, Alexa Fluor™ 680 (デキストラン, Mw 3,000) は, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した. 他の試薬は試薬品として市販されているものを実験に使用した.

### 2. 実験動物

動物実験の実施は, 日本大学動物実験委員会 (東京, 日本) の審議を経て承認を受けた. 実験動物は, 4 週齢の ddY マウスを日本エスエルシー株式会社 (静岡, 日本) より購入した. マウスは, 温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 10\%$ , 照明点灯時間 8:00–20:00 (12 時間) の環境下で飼育し, 固形飼料 MF (オリエンタル酵母株式会社, 東京) および水を自由に摂取させた. マウスは少なくとも 3 日間の予備飼育後, 体重 25–35 g のマウスを実験に使用した.

### 3. 経鼻投与

#### 3.1. Reverse 法

Reverse 法は, 第二章と同様の処置を施した. Reverse 法によって投与してから一定時間後に断頭後, 脳を摘出した. 放射活性による定量的な生体内分布評価において投与する薬液は, イヌリンを, PBS で  $2 \mu\text{Ci/mL}$  ( $200 \mu\text{M}$ ) に調製した. 鼻から各組織への移行を検討するために, 薬液の投与速度は,  $5 \mu\text{L/min}$  で行った. 薬液の投与容量は,  $0.05 \mu\text{Ci/mouse}$  となるように,  $25 \mu\text{L}$  で投与した. 投与してから一定時間後に, 心臓から血液を採取した. 得られた血液は遠心分離し, 血漿を得た. 各組織は, ペリスタポンプを用いて血液の色が脱色するまで心臓から全身灌流後に摘出した. 対照実験として, IV は, 経鼻投与と同等の蛍光量または放射活性量になるように調製した薬液量をマウスの尾静脈から一定時間かけて投与した. Reverse 法による投与および IV されたマウスの CSF は大そうに挿入した注射針 (30G) 連結カニューレ (i.d., 0.28 mm; o.d., 0.61 mm) からゆっくり吸引することで採取した. 予備実験より, 前述の薬液の放射活性では, 経鼻投与において十分な検出感度が得られなかったことから,  $0.25 \mu\text{Ci/mouse}$  となるように別に調製した薬液を Reverse 法による投与または IV した.

### 3.2. MP 法

MP 法は、第二章と同様の処置を施した。血液および各組織は、上記の Reverse 法と同様な方法で採取した。

### 4. Reverse法による投与後の脳蛍光イメージングの*ex vivo*観察

吸入麻酔下のマウスに、デキストラン (280 nM) を含有するヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸 (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid, HEPES) 溶液 (25  $\mu$ L) を5  $\mu$ L/minの速度で、Reverse法にて投与した。蛍光イメージングの*ex vivo*観察で投与する薬液は、デキストラン (280 nM) をHEPES溶液 (25  $\mu$ L) で調製した。対照実験では、Reverse法と同等の蛍光量をIVした。脳内イメージングの測定には、In-vivo Xtreme II (Bruker, MA, USA) とIVIS Lumina III In Vivo Imaging System (CLS136334, PerkinElmer, MA, USA) をそれぞれ使用した。脳は上述した方法に従って摘出し、In-vivo Xtreme IIで脳の上部から観察した。画像は、679 nm励起および702 nm蛍光フィルター、露光時間：10秒、F/Stop=2の条件で取得した。Reverse法の投与60分後における脳のサジタル切片のイメージングは、経鼻投与の組織分布解析で良く使用されているIVIS Lumina III In Vivo Imaging Systemを使用した [130–132]。サジタル切片は、頭頂葉から見てブレグマから右に2 mmの部分のスライスした。画像の取得は、In-vivo Xtreme IIの撮影条件に一致するよう設定した。蛍光画像は、Living Image® 4.7.2 ソフトウェア (PerkinElmer® Ltd., Waltham, MA, USA) を用いて解析した。

### 5. 放射活性の測定

組織は、湿重量を測定後、55°C で1–2時間かけて1 mL Solusol™ (National Diagnostics, GA, USA) で溶解させ、その後シンチレーションカクテルである Hionic-fluor™ (Waltham, MA, USA) を10 mL 加えた。血漿およびCSF サンプルには Pico-fluor™40 (Waltham, MA, USA) を3 mL 加えた。血漿、組織、およびCSF 中のイヌリンの放射活性は、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 4810TR, PerkinElmer® Ltd., MA, USA) で測定した。

### 6. データ解析

IDに対する組織中、CSF中または血液に分布したイヌリンの割合 (%ID/g tissue, %ID/mL CSFまたは%ID/mL plasma) は、組織 1 g, CSF 1 mLまたは血液 1 mLあたりのイヌリンの

放射活性を投与された薬液中のイヌリンの放射活性で除することで、それぞれの値を算出した。脳、CSFまたは血液中におけるAUCは0–120分までのそれぞれの%IDから線形台形法により算出した。ただし、IV直後(0分)における%ID/mL plasmaは投与3および5分後の値から外挿して求めた。%DTEは、経鼻投与時の血中に対する脳あるいはCSFのAUCを、IV時のそれらの値で除することから得た [87,89]。

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

ここで、 $AUC_{\text{brain}}$ は脳における薬物濃度-時間曲線下面積、 $AUC_{\text{CSF}}$ はCSFにおける薬物濃度-時間曲線下面積、 $AUC_{\text{plasma}}$ 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, すなわち、鼻から脳への直接経路を介して脳に到達する薬物の相対量は、式 (2) および式 (3) を用いて算出した [90]。

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

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

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

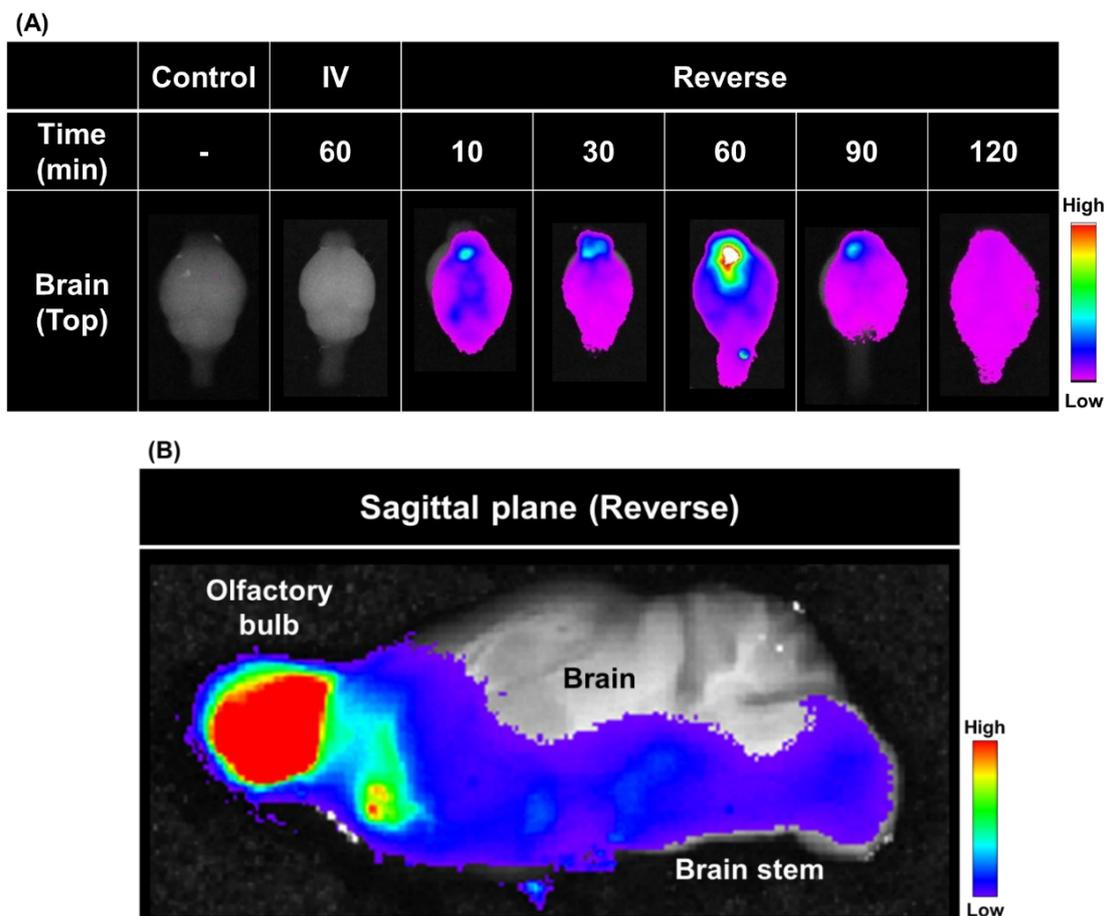
## 7. 統計解析

統計解析にはBellCurve for Microsoft Excel®を用いた。2群間の平均間の差の有意性を評価するために、Student's *t*-testを用いて解析した。2群以上のグループの平均間の差の有意性は、ANOVAに続いてDunnnett's検定を用いて決定した。差は $p < 0.05$ で統計的に有意であると判断した。

### 第3-3節 結果

#### 1. 蛍光標識トレーサーによる Reverse 法を用いた経鼻投与後の脳組織の蛍光イメージング

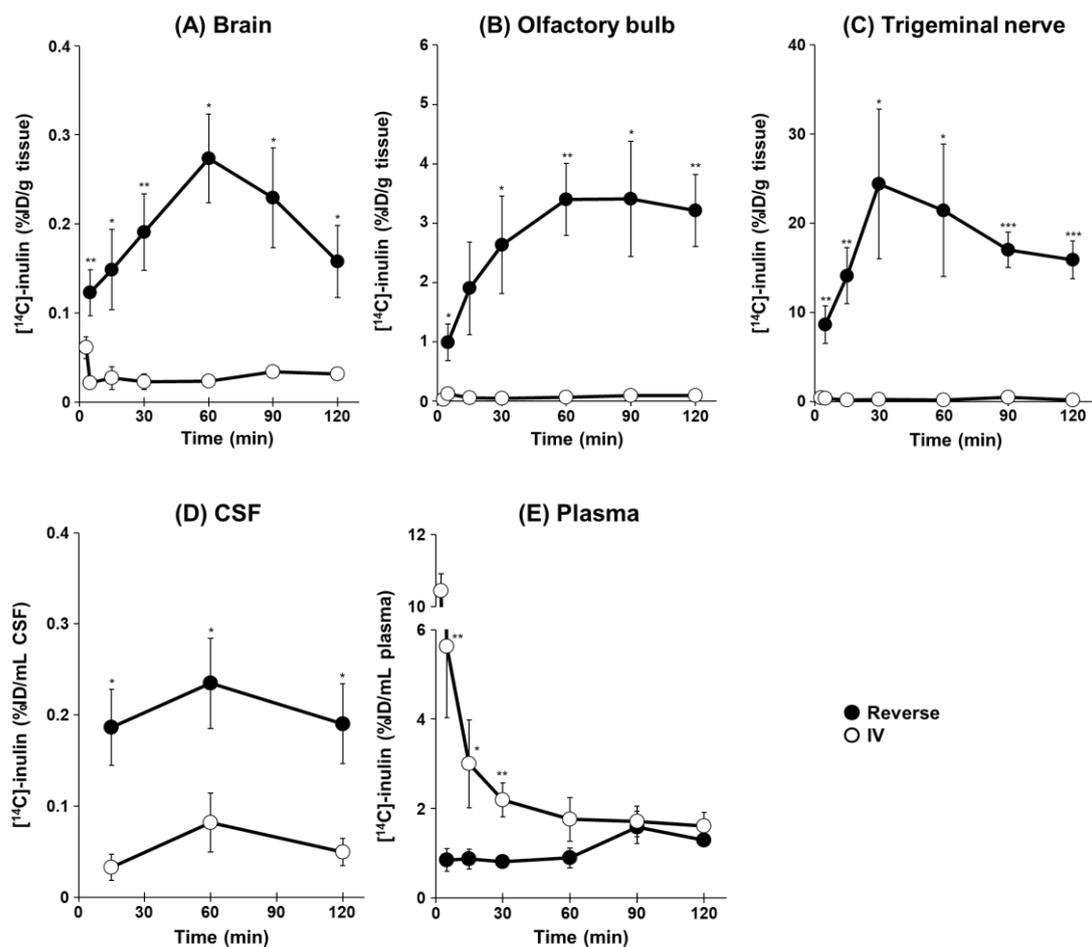
イヌリンと Mw が異なる他の水溶性中分子も Reverse 法を用いた経鼻投与後の脳内局在を調査するため、Mw 3,000 のデキストランを用いて脳イメージング観察を行った。Reverse 法による投与後のデキストランのイメージングは、60 分において嗅球や大脳周辺領域に最も強い蛍光が観察された (Fig. 3-2A)。蛍光分布が最も強かった投与 60 分において脳矢状断面を観察したところ、嗅神経からつながる嗅球、ならびに大脳の前方領域に特に強い蛍光が見られた (Fig. 3-2B)。



**Fig. 3-2. Dextran observation of fluorescence imaging administering by the Reverse method.** Each mouse was administered dose at a constant speed of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , with a dosage volume of 25  $\mu\text{L}$  during Reverse while under anesthesia. (A) The excised brain was observed from the top. In contrast, an equivalent fluorescence dose of dextran was IV administered to Reverse. The excised brain was observed from the top using In vivo Xtreme II. (B) Sagittal plane imaging of the brain at 60 min after administrating by Reverse was observed using IVIS Lumina III In Vivo Imaging System. Abbreviations: Reverse, reverse cannulation; IV, intravenous; dextran, Alexa Fluor 680-labeled dextran (Mw: 3,000).

## 2. Reverse 法による投与後の脳組織および CSF におけるイヌリンの分布量の時間推移

Fig. 3-3 に、Reverse 法による投与後のイヌリンの脳組織、三叉神経、CSF および血漿中分布の時間推移を示す。イヌリンの分布量は Reverse 法の投与後、脳および嗅球で 60–90 分、三叉神経で 30 分、および CSF で 60 分に最大となる時間推移をそれぞれ示した (Fig. 3-3A, 3-3B, 3-3C & 3-3D)。Reverse 法における CSF 中へのイヌリンの分布量は、投与後ほぼ一定の値 (約 0.2%ID/mL CSF) であり (Fig. 3-3D)、血中への分布も一定の範囲内で推移した (Fig. 3-3E)。全身投与に対する経鼻投与後の相対的な脳への薬物送達効率 (%DTE) と脳への全薬物送達量に対する Nose-to-Brain 経路の寄与率 (%DTP) は、それぞれ 1,478%と 93%であった。脳脊髄液に対しても、これらの値を同様に算出したところ、%DTE および%DTP はそれぞれ、611%および 84%であった (Table 3-1)。



**Fig. 3-3. Concentration-time profiles  $[^{14}\text{C}]$ -inulin in brain tissue, trigeminal nerve, CSF, and the plasma after Reverse.** The Reverse method ( $\bullet$ ) was performed at the dosage volume of  $25\ \mu\text{L}$  and the constant speed of  $5\ \mu\text{L}/\text{min}$ . IV ( $\circ$ ) was administered at an equivalent to radioactivity dose to the Reverse method. Each graph shows distribution of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin in the brain (A), the olfactory bulb (B), the trigeminal nerve (C), the CSF (D), or the plasma (E). Each point represents mean  $\pm$  SE ( $n = 5\text{--}6$ ). The significance of the difference in the mean values between the two groups at the same time was made using  $t$ -tests.  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ . Abbreviations: Reverse, reverse cannulation; IV, intravenous; CSF, Cerebrospinal fluid; SE, standard error.

**Table 3-1. Pharmacokinetic parameter in the brain and CSF after [<sup>14</sup>C]-inulin administration through Reverse.**

Section	Route	AUC <sub>brain</sub> (%ID/g brain · min)	AUC <sub>CSF</sub> (%ID/g brain · min)	AUC <sub>brain</sub> /AUC <sub>plasma</sub> (%)	AUC <sub>CSF</sub> /AUC <sub>plasma</sub> (%)	%DTE	%DTP
Brain	Reverse	24.52 ± 5.50	–	18.95 ± 0.25	–	1478.49 ± 188.49	93.24 ± 0.77
	IV	3.33 ± 0.82	–	1.28 ± 0.13	–	–	–
CSF	Reverse	–	23.63 ± 5.15	–	18.26 ± 0.15	610.97 ± 99.26	83.63 ± 2.29
	IV	–	7.76 ± 1.57	–	2.99 ± 0.40	–	–

Each value represents the mean ± SE (n = 5–6).

Drug Targeting Efficiency Percentage (%DTE): Relative exposure of the brain to the drug following intranasal administration versus systemic administration was calculated using Equation (1). Nose-to-brain Direct Transport Percentage (%DTP): The relative amount of drugs reaching the brain via the nose-to-brain pathway was calculated using Equations (2) and (3). AUC<sub>brain, or CSF</sub> represents area under the curve of the brain or the CSF. Abbreviations: AUC, area under the curve; Reverse, reverse cannulation; IV, intravenous; CSF, Cerebrospinal fluid.

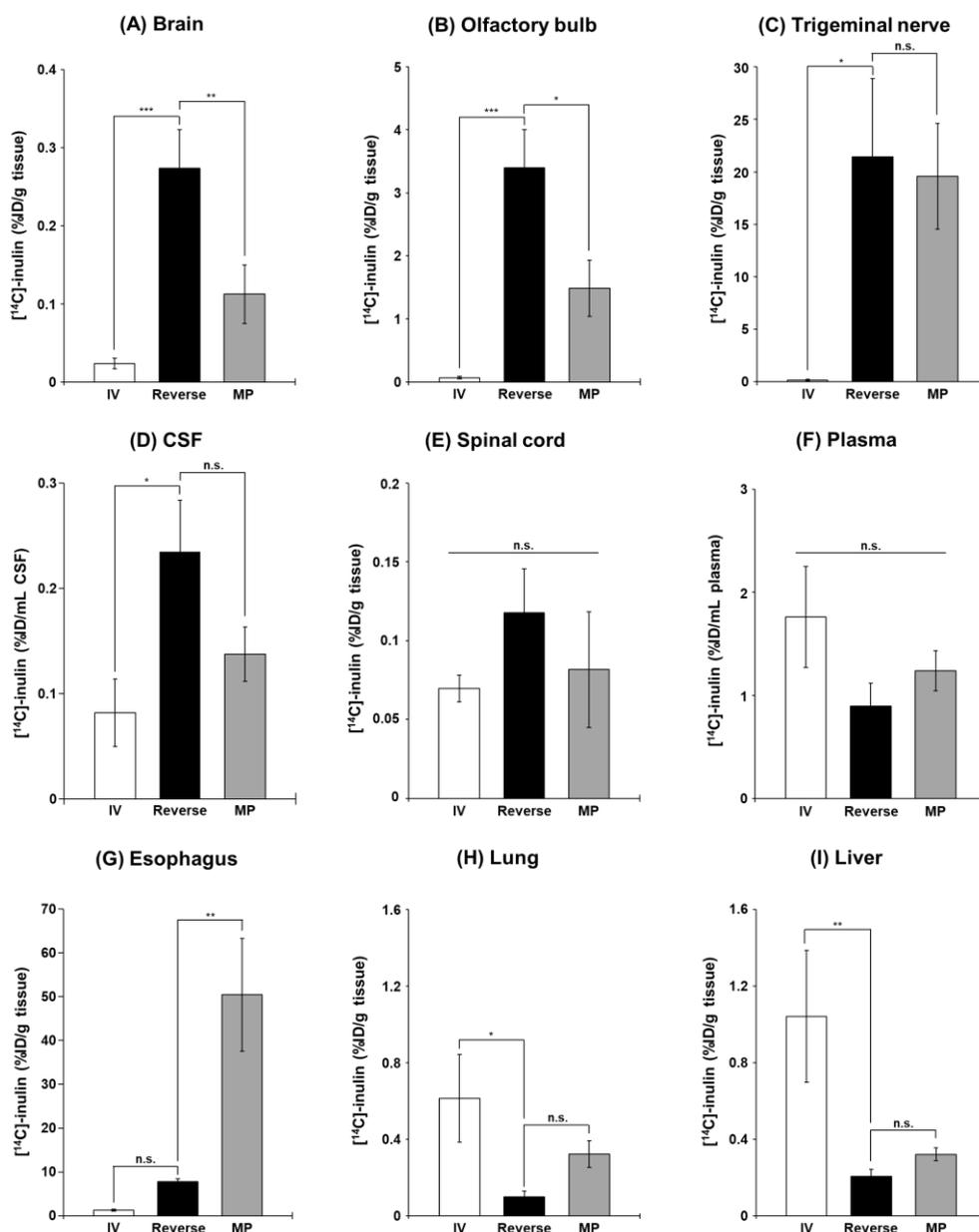
### 3. Reverse 法におけるイヌリンの体内分布

Fig. 3-4 に, Reverse 法による投与 60 分後におけるイヌリンの体内分布を示す. MP 法は, Reverse 法と同等な薬液量になるように全量 25  $\mu\text{L}$  を 30 秒毎に 2  $\mu\text{L}$  を左右の鼻腔へ交互に投与した. Reverse 法による脳および嗅球へのイヌリンの分布量は, 投与 60 分後において MP 法のそれらより, 約 2 倍有意に高い値を示した (Fig. 3-4A & 3-4B). これに対して, 三叉神経と CSF におけるイヌリンの分布量は, Reverse 法および MP 法との間でほぼ同等であった (Fig. 3-4C & 3-4D). Reverse 法で測定したすべての組織の中で, 三叉神経は最も高い分布 (約 20%ID/g tissue) であった.

脊髄におけるイヌリンの分布量は, Reverse 法と MP 法の間で有意な差を示さなかった (Fig. 3-4E). Reverse 法における血中への分布は, MP 法に比べて, 約 30%低い値であった (Fig. 3-4F).

一般に, 経鼻投与された薬物は鼻腔内で MCC により食道側に排出されるが, Reverse 後の食道へのイヌリンの分布量は, MP 法に比べて, 約 15%と極めて低かった (Fig. 3-4G). 同様に, 代表的な末梢組織である肺と肝臓においても分布量に有意な差はないものの, Reverse 法によるイヌリンの分布量は MP 法と比較して, 減少する傾向であった (Fig. 3-4H & 3-4I).

さらに, Reverse 法ならびに MP 法における経鼻投与後のイヌリンの脳, 嗅球, 三叉神経, CSF および血液中への移行量を Table 3-2 にまとめた. Reverse 法と MP 法による経鼻投与間で比較したところ, Reverse 法による脳および嗅球への分布は MP 法に比べて 2 倍以上高い値を示したのに対し, 三叉神経, CSF および血漿への分布はほとんど差が認められなかった.



**Fig. 3-4. The biodistribution of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin at 60 min after Reverse.** The Reverse method was administered to mice at the dosing speed of  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  and the doing volume of  $25 \mu\text{L}$ . In the MP method, a total volume of  $25 \mu\text{L}$  administration solution was given at 30 sec intervals, via  $2 \mu\text{L}$  doses. These were given in alternating nostrils. The IV injection was given through the tail vein at an equivalent to radioactivity dose to the IN administration. Mice were sacrificed 60 min after administration. White bar, black bar, or gray bar expresses IV injection, Reverse, or MP, respectively. Each graph shows radioactivity of  $[^{14}\text{C}]$ -inulin in the brain (A), the olfactory bulb (B), the trigeminal nerve (C), the CSF (D), the spinal cord (E), the plasma (F), and peripheral tissues (G–I). Each bar represents mean  $\pm$  SE ( $n = 5-6$ ). The significance of the differences in the mean values of multiple groups was made using an analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's test,  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ,  $n.s.p > 0.05$ , versus Reverse. Abbreviations: CSF, Cerebrospinal fluid; IV, intravenous; Reverse, reverse cannulation; MP, micro pipette; SE, standard error; n.s., not significant.

**Table 3-2. The distribution of [<sup>14</sup>C]-inulin in the tissue, CSF and plasma at 60 min after intranasal administration methods.**

<b>Method</b>	<b>Brain (%ID/g tissue)</b>	<b>Olfactory bulb (%ID/g tissue)</b>	<b>Trigeminal nerve (%ID/g tissue)</b>	<b>CSF (%ID/mL CSF)</b>	<b>Plasma (%ID/mL plasma)</b>
<b>Reverse</b>	<b>0.27 ± 0.05*</b>	<b>3.40 ± 0.60*</b>	<b>21.5 ± 7.42</b>	<b>0.24 ± 0.05</b>	<b>0.90 ± 0.22</b>
<b>MP</b>	<b>0.11 ± 0.04</b>	<b>1.49 ± 0.44</b>	<b>19.6 ± 5.06</b>	<b>0.14 ± 0.03</b>	<b>1.24 ± 0.19</b>

Each value represents the mean ± SE (n = 6). The significance of the difference in the mean values between the two groups at the same time was made using *t*-tests. \**p* < 0.05. Abbreviations: CSF, Cerebrospinal fluid; Reverse, reverse cannulation; MP, micro pipette; SE, standard error.

### 第3-4節 考察

Reverse 法によって水溶性中分子を投与すると、脳領域の中でどのような分布を示すかを特徴づけるために、Mw 3,000 のデキストランを用いて経時的な脳内の分布局在を *ex vivo* で観察した。イヌリンと同様に多糖類の構造を有するデキストランは、経鼻投与後の脳および脳脊髄液への分布評価 [23,133] を参考に、今回モデル分子として用いた。その結果、60 分において嗅球や大脳前方領域の範囲にわたって最も強い蛍光が観察された (Fig. 3-2A & 3-2B)。Kanazawa らの報告では、Mw 10,000 の水溶性物質デキストラン (AD-10K) の経鼻投与では蛍光が検出されなかったのに対し、鼻から脳への薬物輸送を促進できるナノキャリア (stearyl-arginine-rich peptide) に搭載した AD-10K の分布は現在の結果に一致して、嗅球部分に強い蛍光が認められた [134]。この結果は、第二章で検討した Reverse 法における投与速度の結果 (Fig. 2-6A & 2-6B) の嗅球へのイヌリン量が脳部位に比べて大きかったことを支持している。Thorne らは、IGF-1 を経鼻投与した際のサジタル切片の分布を評価した [17]。IGF-1 はポリペプチドで構成されており、イヌリンと同様に水溶性中分子である。現在の結果 (Fig. 3-2) は Thorne らの結果と同様に、嗅球部位に最も分布していた。したがって、水溶性中分子における脳への移行性は、嗅粘膜から吸収されて最も分布しやすい嗅球に送達されることが示唆された。

イヌリンは Reverse 法による投与後、脳および嗅球で 60 分付近にピークを示す時間推移が観察された (Fig. 3-3A & 3-3B)。%DTE は経鼻投与における脳への移行性において、薬物が脳内に送達する効率の良さを示す。すなわち、この値が 100% を超える場合、経鼻投与が IV に比べて効率良く脳に分布することを意味する。Reverse 法による本実験から得られた脳におけるイヌリンの %DTE は、1,478% であった。したがって、Reverse 法を用いた経鼻投与は、IV に比べ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。タンパク質である線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, Mw: 18,000) の大脳に対する %DTE は 272% であることから [135]、Reverse 法は MP 法による経鼻投与に比べて、Nose-to-Brain 経路を直接介して、水溶性中分子を脳内に効率よく送達できうることが示唆された。Reverse 法によるイヌリンの %DTP は脳において 93% であった (Table. 3-1)。この結果はイヌリンの 90% 以上が Nose-to-Brain 経路を直接経由したことを意味する (Table. 3-1)。アミノ酸ペプチドであるヒポクレチン (Mw: 3,562, オクタノール-水分配係数 0.232) やオキシトシン (Mw: 1,007) の %DTP は約 80% であった [23,91]。したがって、Reverse 法を用いたイヌリンの脳への移行は、マイクロピペットを用いた経鼻投与によるヒポクレチ

ンに比べて、嗅粘膜からの吸収により Nose-to-Brain 経路の利用率を高めたことを示唆している。

げっ歯類に対する経鼻投与方法には、研究グループ間で少量 (約 5  $\mu\text{L}$ ) で複数回あるいは 2 回程度で投与方法がこれまでに報告されている [17,28,114-116]。本研究では、液量 2  $\mu\text{L}$  を 30 秒間隔で片鼻腔に交互に全量 25  $\mu\text{L}$  を投与方法を選択した。この経鼻投与方法を用いて、イヌリンの体内分布量について、Reverse 法と比較した。Reverse 法は、脳への移行量が最も高くなった投与方法: 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  と投与方法: 25  $\mu\text{L}$  で検討した。両者の経鼻投与方法に要する時間はどちらも 6 分以内に終わる。その結果、Reverse 法の投与方法 60 分後における脳および嗅球へのイヌリン分布は、MP 法より有意に高かった (Fig. 3-4A & 3-4B)。鼻から脳へ薬物を送達する直接経路には神経経路および CSF 経路がある [17,29,136]。神経経路には、嗅神経および三叉神経が存在する。一方で、三叉神経および CSF への分布は、Reverse 法と MP 法との間に有意な相違は認められなかった (Fig. 3-4C & 3-4D)。主に嗅粘膜には嗅神経、呼吸粘膜には三叉神経が豊富に存在する [103]。嗅粘膜から吸収された後、傍細胞または経細胞のいずれかで薬物は輸送され、神経組織に沿って神経周膜腔に存在する間質液に到達する。これらが CSF に連続している [137]。嗅神経経路とは別の、もう 1 つの神経経路である三叉神経経路は、鼻粘膜の呼吸粘膜から三叉神経を經由して後脳の脳幹に到達する。鼻から脳への輸送において三叉神経は、主に呼吸粘膜から脳幹へ突出している [19]。そのため、三叉神経は橋や延髄、脊髄への分布に深く関与すると考えられる。CSF はグリンパティック機構によって脳周囲を循環する [138]。この機構は、血管がポンプの役割を果たし血管周囲の間質液を移動させる [139]。そのため、水溶性高分子である immunoglobulin G は経鼻投与方法後に血管周囲腔内に存在することが共焦点レーザー走査型顕微鏡から明らかになっている [140]。したがって、Mw が 5,000 程度の水溶性物質は経鼻投与方法後に脳血管周囲腔内へ分布し、グリンパティック機構によって CSF を循環して脳に分布すると考えられる。Reverse 法は主に、呼吸粘膜から三叉神経経路ではなく、嗅粘膜を介して嗅球側から CSF または脳実質に移行することが示唆された。しかし、経鼻投与方法後のイヌリンの CSF への移行が嗅球や三叉神経に比べて限定的であることから、イヌリンの脳への経鼻投与方法のメカニズムは、CSF の寄与が低いと考えられる。Reverse 法を用いた投与方法 60 分後における脊髄へのイヌリンの分布量は、MP 法による投与方法後の分布と有意な相違は認められなかった (Fig. 3-4E)。Reverse 法では、MP 法による脳への分布量 (0.11%ID/g tissue, Fig. 3-4A) より約 3 倍高いイヌリンの分布 (0.27%ID/g tissue) であった。Kamei らは、イン

スリン (Mw: 5,808) をマイクロピペットにより 10  $\mu$ L 経鼻投与したところ、60 分後におけるその脳内分布は 0.05%ID/g tissue 以下であったことを報告している [26]。Mw が近いからといって、本結果が必ずしもフォールディングや立体構造を形成する中分子ペプチドに外挿できるとは限らない。しかし、今回のイヌリンは、経鼻投与 15–60 分後の早期にかけて、脳や嗅球部位で高い分布が見られた。イヌリンの嗅球内分布は脳内分布に比べて約 10 倍の濃度を示しており、インスリン (嗅球: 約 0.06%ID/g, 脳: 約 0.005%ID/g) [26] やエキセンジン (嗅球: 約 2%ID/g, 脳: 約 0.1–0.2%ID/g) [141] の報告に類似していた。

さらに、Reverse 法は血漿中や食道、肺および肝臓のような末梢組織へのイヌリンの分布量を MP 法より減少させた (Fig. 3-4F, 3-4G, 3-4H & 3-4I)。鼻腔内の薬物は MCC によって鼻腔から咽頭側へ流れ、消化管に排出される [142]。本研究における Reverse 法は、カニューレを食道側から挿入し薬物を鼻腔内に投与する。Reverse 法は食道へのイヌリンの分布量を MP 法より減少させた (Fig. 3-4G)。そのため、MCC の抑制を誘起させることで、咽頭側へのイヌリン流出の抑制につながると考えられた。これらの結果より、Reverse 法は、げっ歯類において Nose-to-Brain 経路を介した薬物デリバリーの評価に効果的な経鼻投与方法であることが示唆された。

これらの結果から、本研究で開発した Reverse 法による 2 つのモデル分子の知見は、Nose-to-brain 経路を利用した脳疾患治療のための中分子ペプチドの開発基盤となり、非常に有用であると考えている。しかし、トランスポーターが存在するため BBB 透過性の高いインスリンや P-糖タンパク質 (P-glycoprotein, P-gp) の基質であるシクロスポリンに対しては、本結果のイヌリンやデキストランから得られた結果をそのまま外挿することは難しい。経鼻投与においてもトランスポーターの関与が議論されており [28]、インスリンはトランスポーターを介して BBB を透過するため、イヌリンとは異なる挙動となる可能性がある。さらに、低分子の P-gp 基質の分布動態に関する報告はあるものの [28]、中分子のシクロスポリン (Mw: 1,202) などを用いた分布動態に関する報告はほとんどない。シクロスポリンは鼻粘膜にも局在している P-gp の細胞外排出機構によって鼻から脳への輸送を制限されてしまうため、イヌリンの Nose-to-Brain 分布よりも低い値を示す可能性があり、今後調査する必要があると考えている。Reverse 法は侵襲性の高い経鼻投与方法である。今後の脳疾患に対する中分子ペプチドの非侵襲的な経鼻投与方法では、鼻腔内での薬液滞留性を有する粘膜付着剤 [143,144] や脳への移行性を向上させるナノ粒子 [145,146] を利用することで、Reverse 法のように脳への移行性を向上できるであろう。また、神経ペプチドを模倣

した医薬品を脳へ送達させる研究は、ペプチダーゼなどのペプチド分解酵素に対する耐性やBBBを通過できるような特徴を付与することで進められている [147–150]。これらの知見を踏まえた中分子ペプチドの経鼻投与アプローチに関する研究は、脳疾患治療に対する中分子ペプチドの鼻から脳へのデリバリーを向上させるためのメカニズムを解明する糸口となるであろう。

### 第3-5節 小括

第二章で開発した Reverse 法を用いて、水溶性中分子の体内分布を検討して以下の知見を得た。

1. Mw 3,000 でのデキストランの投与は、投与後 60 分において嗅球および大脳の前方に高い分布が観察された。
2. Reverse 法は、IV に比べてイヌリンを約 15 倍効率的に脳内へ送達できることを定量的に示した。
3. 脳に分布した 90%以上のイヌリンが Nose-to-Brain 経路を介して輸送されたことを定量的に示した。
4. 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、イヌリンの鼻から脳への移行性は有意に向上した。
5. イヌリンの三叉神経への移行量は高いものの、脳への移行は低いことから三叉神経経路による脳への移行の寄与は低いことを示唆した。
6. Reverse 法は、ピペットによる経鼻投与の課題であった食道側への薬液の流出を約 1/6 にまで減少させた。

以上、Reverse 法を用いた経鼻投与は、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が示唆された。

## 第4章

### 総括

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 法を用いて、水溶性中分子の鼻から脳への分布評価を検討し、以下の知見を得た。本研究の結果の概要を Fig. 4-1 に示した。

1. 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を明らかとした。
2. Reverse 法を用いることで、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。

上記の研究により、Reverse 法を用いた水溶性中分子の鼻から脳への移行経路が定量的に示された。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剤の開発の一助となることが期待される。

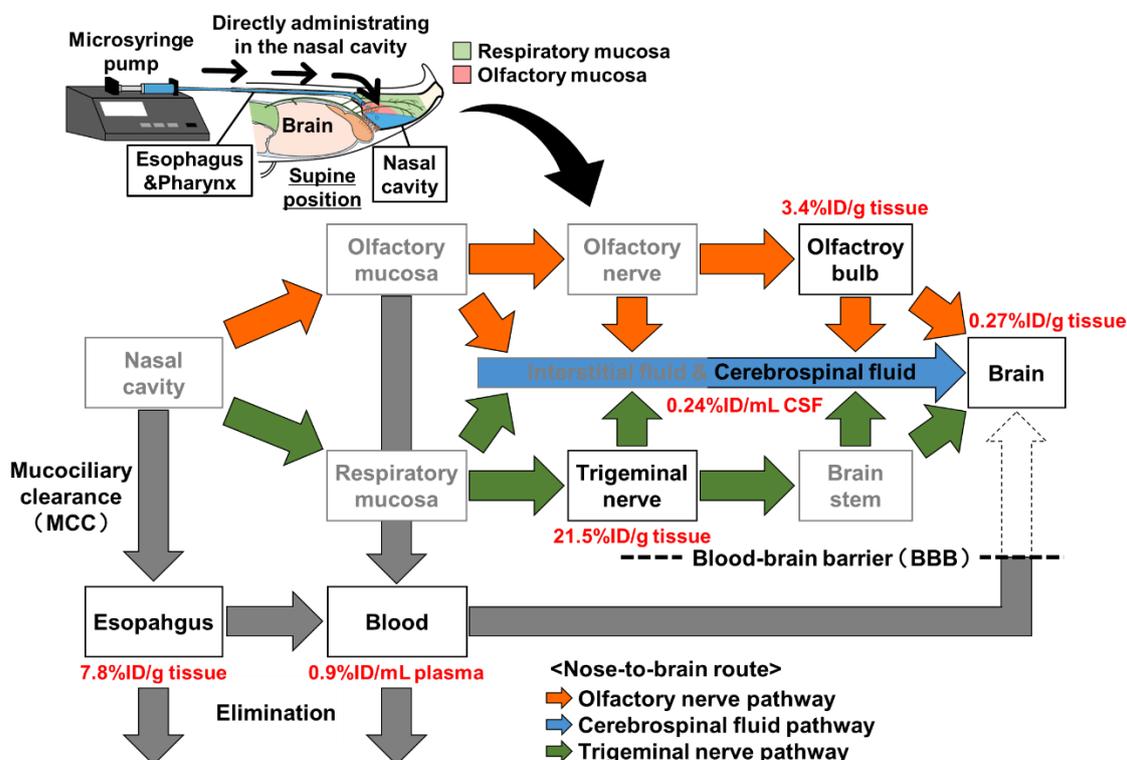


Fig. 4-1. A schematic diagram showing nose-to-brain route with the Reverse method.

## 参 考 文 献

- [1] A.A. Kaspar, J.M. Reichert, Future directions for peptide therapeutics development, *Drug Discov. Today*. **18** (2013) 807–817. doi: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
- [2] D.J. Craik, D.P. Fairlie, S. Liras, D. Price, The Future of Peptide-based Drugs, *Chem. Biol. Drug Des.* **81** (2013) 136–147. doi: 10.1111/cbdd.12055.
- [3] A. Henninot, J.C. Collins, J.M. Nuss, The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future?, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 1382–1414. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00318.
- [4] J.L. Lau, M.K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorganic Med. Chem.* **26** (2018) 2700–2707. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
- [5] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatisky, Synthetic therapeutic peptides: science and market, *Drug Discov. Today*. **15** (2010) 40–56. doi: 10.1016/j.drudis.2009.10.009.
- [6] A.C.L. Lee, J.L. Harris, K.K. Khanna, J.H. Hong, A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 1–21. doi: 10.3390/ijms20102383.
- [7] V. D'Aloisio, P. Dognini, G.A. Hutcheon, C.R. Coxon, PepTherDia: database and structural composition analysis of approved peptide therapeutics and diagnostics, *Drug Discov. Today*. **26** (2021) 1409–1419. doi: 10.1016/j.drudis.2021.02.019.
- [8] V.H.L. Lee, A. Yamamoto, Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **4** (1989) 171–207. doi: 10.1016/0169-409X(89)90018-5.
- [9] L. Illum, Nasal drug delivery - possibilities , problems and solutions, *J. Control. Release.* **87** (2003) 187–198. doi: 10.1016/S0168-3659(02)00363-2.
- [10] A. Mistry, S. Stolnik, L. Illum, Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs, *Int. J. Pharm.* **379** (2009) 146–157. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.019.
- [11] W.M. Pardridge, The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development, *Neurotherapeutics.* **2** (2005) 3–14. doi: 10.1016/0378-5173(81)90009-0.
- [12] P. Berndt, L. Winkler, J. Cording, O. Breitkreuz-Korff, A. Rex, S. Dithmer, V. Rausch, R. Blasig, M. Richter, A. Sporbert, H. Wolburg, I.E. Blasig, R.F. Haseloff, Tight junction proteins at the blood–brain barrier: far more than claudin-5, *Cell. Mol. Life Sci.* **76** (2019)

- 1987–2002. doi: 10.1007/s00018-019-03030-7.
- [13] H. Wolburg, W. Paulus, Choroid plexus: Biology and pathology, *Acta Neuropathol.* **119** (2010) 75–88. doi: 10.1007/s00401-009-0627-8.
- [14] L. Illum, Nasal drug delivery - Recent developments and future prospects, *J. Control. Release.* **161** (2012) 254–263. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.024.
- [15] W.M. Faber, The nasal mucosa and the subarachnoid space, *Am. J. Anat.* **62** (1937) 121–148. doi: 10.1002/aja.1000620106.
- [16] J. Born, T. Lange, W. Kern, G.P. McGregor, U. Bickel, H.L. Fehm, Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain, *Nat. Neurosci.* **5** (2002) 514–516. doi: 10.1038/nn0602-849.
- [17] R.G. Thorne, G.J. Pronk, V. Padmanabhan, W.H. Frey, Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration, *Neuroscience.* **127** (2004) 481–496. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.029.
- [18] F. Malerba, F. Paoletti, S. Capsoni, A. Cattaneo, Intranasal delivery of therapeutic proteins for neurological diseases, *Expert Opin. Drug Deliv.* **8** (2011) 1277–1296. doi: 10.1517/17425247.2011.588204.
- [19] F. Erdő, L.A. Bors, D. Farkas, Á. Bajza, S. Gizurarson, Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting, *Brain Res. Bull.* **143** (2018) 155–170. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.009.
- [20] H.O. Ammar, M. Haider, M. Ibrahim, N.M. El HOFFY, In vitro and in vivo investigation for optimization of niosomal ability for sustainment and bioavailability enhancement of diltiazem after nasal administration, *Drug Deliv.* **24** (2017) 414–421. doi: 10.1080/10717544.2016.1259371.
- [21] U. Westin, E. Piras, B. Jansson, U. Bergström, M. Dahlin, E. Brittebo, E. Björk, Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents, *Eur. J. Pharm. Sci.* **24** (2005) 565–573. doi: 10.1016/j.ejps.2005.01.009.
- [22] P. Merkus, F.A. Ebbens, B. Muller, W.J. Fokkens, The “best method” of topical nasal drug delivery: comparison of seven techniques, 2006.
- [23] A. Tanaka, T. Furubayashi, M. Arai, D. Inoue, S. Kimura, A. Kiriyama, K. Kusamori, H. Katsumi, R. Yutani, T. Sakane, Delivery of Oxytocin to the Brain for the Treatment of Autism

- Spectrum Disorder by Nasal Application, *Mol. Pharm.* **15** (2018) 1105–1111. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00991.
- [24] H. Kageyama, K. Shiba, S. Hirako, N. Wada, S. Yamanaka, Y. Nogi, F. Takenoya, N. Nonaka, T. Hirano, S. Inoue, S. Shioda, Anti-obesity effect of intranasal administration of galanin-like peptide (GALP) in obese mice, *Sci. Rep.* **6** (2016) 1–11. doi: 10.1038/srep28200.
- [25] X. Li, N. Wang, X. Luo, S. Zhou, L. Wang, H. Zhang, X. Ma, J. Meng, D. Qu, Y. Liu, Intranasal Delivery of Exendin-4 Confers Neuroprotective Effect Against Cerebral Ischemia in Mice, *AAPS J.* **18** (2015) 385–394. doi: 10.1208/s12248-015-9854-1.
- [26] N. Kamei, M. Takeda-Morishita, Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides, *J. Control. Release.* **197** (2015) 105–110. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.11.004.
- [27] C. Lopes, M. Ribeiro, A.I. Duarte, S. Humbert, F. Saudou, L. Pereira De Almeida, M. Hayden, A.C. Rego, IGF-1 intranasal administration rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice, *Mol. Neurobiol.* **49** (2014) 1126–1142. doi: 10.1007/s12035-013-8585-5.
- [28] S. Iwasaki, S. Yamamoto, N. Sano, K. Tohyama, Y. Kosugi, A. Furuta, T. Hamada, T. Igari, Y. Fujioka, H. Hirabayashi, N. Amano, Direct Drug Delivery of Low-Permeable Compounds to the Central Nervous System Via Intranasal Administration in Rats and Monkeys, *Pharm. Res.* **36** (2019) 76. doi: 10.1007/s11095-019-2613-8.
- [29] R.G. Thorne, L.R. Hanson, T.M. Ross, D. Tung, W.H. Frey, Delivery of interferon- $\beta$  to the monkey nervous system following intranasal administration, *Neuroscience.* **152** (2008) 785–797. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.013.
- [30] D. Walega, Effects of intranasal oxytocin on satiety signaling in people with schizophrenia, *Clin. Identifier NCT01614093.* <https://Clinicaltrials.Gov/Ct2/Show/NCT01614093>. (2012).
- [31] B. MPRC, University of Maryland, The effect of intranasal oxytocin on pain sensitivity and threshold, *NCT02550093.*, *Clin. Identifier* <https://Clinicaltrials.Gov/Ct2/Show/NCT02550093?Term=nasal+and+peptid>. (2015).
- [32] S. Gancheva, C. Koliaki, A. Bierwagen, P. Nowotny, M. Heni, A. Fritsche, H.U. Häring, J. Szendroedi, M. Roden, Effects of intranasal insulin on hepatic fat accumulation and energy metabolism in humans, *Diabetes.* **64** (2015) 1966–1975. doi: 10.2337/db14-0892.
- [33] I. Gozes, B.H. Morimoto, J. Tiong, A. Fox, K. Sutherland, D. Dangoor, M. Holser-Cochav,

- K. Vered, P. Newton, P.S. Aisen, Y. Matsuoka, C.H. Van Dyck, L. Thal, NAP: Research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP), *CNS Drug Rev.* **11** (2005) 353–368. doi: 10.1111/j.1527-3458.2005.tb00053.x.
- [34] A. Georgiades, V.G. Davis, A.S. Atkins, A. Khan, T.W. Walker, A. Loebel, G. Haig, D.C. Hilt, E. Dunayevich, D. Umbricht, M. Sand, R.S.E. Keefe, Psychometric characteristics of the MATRICS Consensus Cognitive Battery in a large pooled cohort of stable schizophrenia patients, *Schizophr. Res.* **190** (2017) 172–179. doi: 10.1016/j.schres.2017.03.040.
- [35] B.H. Morimoto, D. Schmechel, J. Hirman, A. Blackwell, J. Keith, M. Gold, D. Schmechel, L. Kirby, L. Huszar, D. Walling, K. Pai, C. Huffman, L. Harper, L. McGill, M. Stedman, N. Vatakis, J. Winston, G. Gerard, J. Ross, J. Ross, Mohammed Bari, M. Farmer, S. Thein, A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose, randomized study to evaluate the safety, tolerability and effects on cognition of AL-108 after 12 weeks of intranasal administration in subjects with mild cognitive impairment, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **35** (2013) 325–339. doi: 10.1159/000348347.
- [36] E. Ghigo, E. Arvat, L. Gianotti, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenghi, F. Camanni, Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78** (1994) 693–698. doi: 10.1210/jcem.78.3.8126144.
- [37] M. Hallschmid, C. Benedict, J. Born, H.L. Fehm, W. Kern, Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man, *Physiol. Behav.* **83** (2004) 55–64. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.023.
- [38] S. Rüdiger, P. Boris, M. Mölle, H.L. Fehm, J. Born, Event-related brain potentials and working memory function in healthy humans after single-dose and prolonged intranasal administration of adrenocorticotropin 4–10 and desacetyl-alpha-melanocyte stimulating hormone, *J. Clin. Psychopharmacol.* **20** (2000) 445–454. doi: 10.1097/00004714-200008000-00009.
- [39] P. Wellhöner, R. Hörster, F. Jacobs, F. Sayk, H. Lehnert, C. Dodt, Intranasal application of the melanocortin 4 receptor agonist MSH/ACTH(4-10) in humans causes lipolysis in white adipose tissue, *Int. J. Obes.* **36** (2012) 703–708. doi: 10.1038/ijo.2011.105.
- [40] D.S. Quintana, L.T. Westlye, D. Alnæs, Ø.G. Rustan, T. Kaufmann, K.T. Smerud, R.A. Mahmoud, P.G. Djupesland, O.A. Andreassen, Low dose intranasal oxytocin delivered with

- Breath Powered device dampens amygdala response to emotional stimuli: A peripheral effect-controlled within-subjects randomized dose-response fMRI trial, *Psychoneuroendocrinology*. **69** (2016) 180–188. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.04.010.
- [41] M. Kosfeld, M. Heinrichs, P.J. Zak, U. Fischbacher, E. Fehr, Oxytocin increases trust in humans, *Nature*. **435** (2005) 673–676. doi: 10.1038/nature03701.
- [42] C.A. Pedersen, K.L. Smedley, J. Leserman, L.F. Jarskog, S.W. Rau, A. Kampov-Polevoi, R.L. Casey, T. Fender, J.C. Garbutt, Intranasal Oxytocin Blocks Alcohol Withdrawal in Human Subjects, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **37** (2013) 484–489. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01958.x.
- [43] M. Tachibana, K. Kagitani-Shimono, I. Mohri, T. Yamamoto, W. Sanefuji, A. Nakamura, M. Oishi, T. Kimura, T. Onaka, K. Ozono, M. Taniike, Long-term administration of intranasal oxytocin is a safe and promising therapy for early adolescent boys with autism spectrum disorders, *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* **23** (2013) 123–127. doi: 10.1089/cap.2012.0048.
- [44] C.A. Murgatroyd, A. Hicks-Nelson, A. Fink, G. Beamer, K. Gurel, F. Elnady, F. Pittet, B.C. Nephew, Effects of chronic social stress and maternal intranasal oxytocin and vasopressin on offspring interferon- $\gamma$  and behavior, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7** (2016) 1–11. doi: 10.3389/fendo.2016.00155.
- [45] J. Leppanen, V. Cardi, K.W. Ng, Y. Paloyelis, D. Stein, K. Tchanturia, J. Treasure, Effects of Intranasal Oxytocin on the Interpretation and Expression of Emotions in Anorexia Nervosa, *J. Neuroendocrinol.* **29** (2017) 1–13. doi: 10.1111/jne.12458.
- [46] L.F. Jarskog, C.A. Pedersen, J.L. Johnson, R.M. Hamer, S.W. Rau, T. Elliott, D.L. Penn, A 12-week randomized controlled trial of twice-daily intranasal oxytocin for social cognitive deficits in people with schizophrenia, *Schizophr. Res.* **185** (2017) 88–95. doi: 10.1016/j.schres.2017.01.008.
- [47] M. Sack, D. Spieler, L. Wizelman, G. Epple, J. Stich, M. Zaba, U. Schmidt, Intranasal oxytocin reduces provoked symptoms in female patients with posttraumatic stress disorder despite exerting sympathomimetic and positive chronotropic effects in a randomized controlled trial, *BMC Med.* **15** (2017) 1–11. doi: 10.1186/s12916-017-0801-0.
- [48] T. Li, X. Chen, J. Mascaro, E. Haroon, J.K. Rilling, Intranasal oxytocin, but not vasopressin,

- augments neural responses to toddlers in human fathers, *Horm. Behav.* **93** (2017) 193–202. doi: 10.1016/j.yhbeh.2017.01.006.
- [49] D.R. Williams, P.C. Bürkner, Effects of intranasal oxytocin on symptoms of schizophrenia: A multivariate Bayesian meta-analysis, *Psychoneuroendocrinology*. **75** (2017) 141–151. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.10.013.
- [50] A.J. Guastella, A.L. Howard, M.R. Dadds, P. Mitchell, D.S. Carson, A randomized controlled trial of intranasal oxytocin as an adjunct to exposure therapy for social anxiety disorder, *Psychoneuroendocrinology*. **34** (2009) 917–923. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.01.005.
- [51] A.J. Guastella, S.L. Einfeld, K.M. Gray, N.J. Rinehart, B.J. Tonge, T.J. Lambert, I.B. Hickie, Intranasal Oxytocin Improves Emotion Recognition for Youth with Autism Spectrum Disorders, *Biol. Psychiatry*. **67** (2010) 692–694. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.020.
- [52] J.D. Woolley, O. Lam, B. Chuang, J.M. Ford, D.H. Mathalon, S. Vinogradov, Oxytocin administration selectively improves olfactory detection thresholds for lyral in patients with schizophrenia, *Psychoneuroendocrinology*. **53** (2015) 217–222. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.12.018.
- [53] H. Kosaka, Y. Okamoto, T. Munesue, H. Yamasue, K. Inohara, T. Fujioka, T. Anme, M. Orisaka, M. Ishitobi, M. Jung, T.X. Fujisawa, S. Tanaka, S. Arai, M. Asano, D.N. Saito, N. Sadato, A. Tomoda, M. Omori, M. Sato, H. Okazawa, H. Higashida, Y. Wada, Oxytocin efficacy is modulated by dosage and oxytocin receptor genotype in young adults with high-functioning autism: a 24-week randomized clinical trial, *Transl. Psychiatry*. **6** (2016) e872. doi: 10.1038/tp.2016.152.
- [54] D.A. Muin, S. Sheikh Rezaei, M. Tremmel-Scheinost, M. Salama, A. Luger, M. Wolzt, P.W. Husslein, M. Bayerle-Eder, Men’s sexual response to female partner’s intranasal oxytocin administration for hypoactive sexual desire disorder: an open prospective cohort study, *Fertil. Steril.* **107** (2017) 781-787.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.003.
- [55] K.J. Parker, O. Oztan, R.A. Libove, R.D. Sumiyoshi, L.P. Jackson, D.S. Karhson, J.E. Summers, K.E. Hinman, K.S. Motonaga, J.M. Phillips, D.S. Carson, J.P. Garner, A.Y. Hardan, Intranasal oxytocin treatment for social deficits and biomarkers of response in children with autism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114** (2017) 8119–8124. doi: 10.1073/pnas.1705521114.
- [56] A.J. Guastella, K.M. Gray, N.J. Rinehart, G.A. Alvares, B.J. Tonge, I.B. Hickie, C.M. Keating,

- C. Cacciotti-Saija, S.L. Einfeld, The effects of a course of intranasal oxytocin on social behaviors in youth diagnosed with autism spectrum disorders: A randomized controlled trial, *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* **56** (2015) 444–452. doi: 10.1111/jcpp.12305.
- [57] M. van Zuiden, J.L. Frijling, L. Nawijn, S.B.J. Koch, J.C. Goslings, J.S. Luitse, T.H. Biesheuvel, A. Honig, D.J. Veltman, M. Olf, Intranasal Oxytocin to Prevent Posttraumatic Stress Disorder Symptoms: A Randomized Controlled Trial in Emergency Department Patients, *Biol. Psychiatry.* **81** (2017) 1030–1040. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.11.012.
- [58] I. Gordon, A. Jack, C.M. Pretzsch, B. Vander Wyk, J.F. Leckman, R. Feldman, K.A. Pelphrey, Intranasal Oxytocin Enhances Connectivity in the Neural Circuitry Supporting Social Motivation and Social Perception in Children with Autism, *Sci. Rep.* **6** (2016) 1–14. doi: 10.1038/srep35054.
- [59] J. Yang, L. Lu, H.C. Wang, H.Q. Zhan, G.F. Hai, Y.J. Pan, Q.Q. Lv, D.X. Wang, Y.Q. Wu, R.R. Li, L. Xue, X.H. Wang, X.M. Deng, X.F. Liu, Y.N. Qian, Z.K. Deng, Z.J. Zhang, X.H. Zhan, X.J. Zhou, G.L. Wang, J.X. Zhai, J.C. Wang, Effect of intranasal arginine vasopressin on human headache, *Peptides.* **38** (2012) 100–104. doi: 10.1016/j.peptides.2012.07.029.
- [60] J.K. Rilling, A.C. DeMarco, P.D. Hackett, R. Thompson, B. Ditzen, R. Patel, G. Pagnoni, Effects of intranasal oxytocin and vasopressin on cooperative behavior and associated brain activity in men, *Psychoneuroendocrinology.* **37** (2012) 447–461. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.07.013.
- [61] R. Pietrowsky, C. Strüben, M. Mölle, H.L. Fehm, J. Born, Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: Evidence for a direct nose-brain pathway for peptide effects in humans, *Biol. Psychiatry.* **39** (1996) 332–340. doi: 10.1016/0006-3223(95)00180-8.
- [62] A.J. Guastella, A.R. Kenyon, G.A. Alvares, D.S. Carson, I.B. Hickie, Intranasal Arginine Vasopressin Enhances the Encoding of Happy and Angry Faces in Humans, *Biol. Psychiatry.* **67** (2010) 1220–1222. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.03.014.
- [63] P.C. Baier, S.L. Weinhold, V. Huth, B. Gottwald, R. Ferstl, D. Hinze-Selch, Olfactory dysfunction in patients with narcolepsy with cataplexy is restored by intranasal Orexin A (Hypocretin-1), *Brain.* **131** (2008) 2734–2741. doi: 10.1093/brain/awn193.
- [64] P.C. Baier, M. Hallschmid, M. Seeck-Hirschner, S.L. Weinhold, S. Burkert, N. Diessner, R.

- Göder, J.B. Aldenhoff, D. Hinze-Selch, Effects of intranasal hypocretin-1 (orexin A) on sleep in narcolepsy with cataplexy, *Sleep Med.* **12** (2011) 941–946. doi: 10.1016/j.sleep.2011.06.015.
- [65] S.L. Weinhold, M. Seeck-Hirschner, A. Nowak, M. Hallschmid, R. Göder, P.C. Baier, The effect of intranasal orexin-A (hypocretin-1) on sleep, wakefulness and attention in narcolepsy with cataplexy, *Behav. Brain Res.* **262** (2014) 8–13. doi: 10.1016/j.bbr.2013.12.045.
- [66] H. Denecke, N. Czehak, R. Pietrowsky, Dose-response relationships of intranasal cholecystokinin and the P300 event-related brain potential, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **73** (2002) 593–600. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00823-7.
- [67] H. Denecke, F. Meyer, J. Feldkamp, R. Fritzen, R. Pietrowsky, Repetitive intranasal administration of cholecystokinin potentiates its central nervous effects, *Physiol. Behav.* **83** (2004) 39–45. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.021.
- [68] R. Pietrowsky, L. Claassen, H. Frercks, H.L. Fehm, J. Born, Time course of intranasally administered cholecystokinin-8 on central nervous effects, *Neuropsychobiology.* **43** (2001) 254–259. doi: 10.1159/000054899.
- [69] A. Hamidovic, Position on zinc delivery to olfactory nerves in intranasal insulin phase I-III clinical trials, *Contemp. Clin. Trials.* **45** (2015) 277–280. doi: 10.1016/j.cct.2015.08.011.
- [70] J. Freiherr, M. Hallschmid, W.H. Frey, Y.F. Brünner, C.D. Chapman, C. Hölscher, S. Craft, F.G. De Felice, C. Benedict, Intranasal insulin as a treatment for alzheimer’s disease: A review of basic research and clinical evidence, *CNS Drugs.* **27** (2013) 505–514. doi: 10.1007/s40263-013-0076-8.
- [71] C. Benedict, M. Hallschmid, A. Hatke, B. Schultes, H.L. Fehm, J. Born, W. Kern, Intranasal insulin improves memory in humans, *Psychoneuroendocrinology.* **29** (2004) 1326–1334. doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.04.003.
- [72] M.A. Reger, G.S. Watson, W.H. Frey, L.D. Baker, B. Cholerton, M.L. Keeling, D.A. Belongia, M.A. Fishel, S.R. Plymate, G.D. Schellenberg, M.M. Cherrier, S. Craft, Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype, *Neurobiol. Aging.* **27** (2006) 451–458. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.016.
- [73] C. Benedict, W. Kern, B. Schultes, J. Born, M. Hallschmid, Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin, *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab.* **93** (2008) 1339–1344. doi: 10.1210/jc.2007-2606.
- [74] A. Bohringer, L. Schwabe, S. Richter, H. Schachinger, Intranasal insulin attenuates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress, *Psychoneuroendocrinology*. **33** (2008) 1394–1400. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.08.002.
- [75] X. Fan, P.M. Copeland, E.Y. Liu, E. Chiang, O. Freudenreich, D.C. Goff, D.C. Henderson, No effect of single-dose intranasal insulin treatment on verbal memory and sustained attention in patients with schizophrenia, *J. Clin. Psychopharmacol.* **31** (2011) 231–234. doi: 10.1097/JCP.0b013e31820ebd0e.
- [76] V. Schöpf, K. Kolldorfer, M. Pollak, C.A. Mueller, J. Freiherr, Intranasal insulin influences the olfactory performance of patients with smell loss, dependent on the body mass index: A pilot study, *Rhinology*. **53** (2015) 371–378. doi: 10.4193/Rhino15.065.
- [77] S. Dash, C. Xiao, C. Morgantini, K. Koulajian, G.F. Lewis, Intranasal insulin suppresses endogenous glucose production in humans compared with placebo in the presence of similar venous insulin concentrations, *Diabetes*. **64** (2015) 766–774. doi: 10.2337/db14-0685.
- [78] W. Kern, J. Born, H. Schreiber, H.L. Fehm, Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men, *Diabetes*. **48** (1999) 557–563. doi: 10.2337/diabetes.48.3.557.
- [79] C. Benedict, M. Hallschmid, K. Schmitz, B. Schultes, F. Ratter, H.L. Fehm, J. Born, W. Kern, Intranasal insulin improves memory in humans: Superiority of insulin aspart, *Neuropsychopharmacology*. **32** (2007) 239–243. doi: 10.1038/sj.npp.1301193.
- [80] R.I. Henkin, Intranasal insulin: From nose to brain, *Nutrition*. **26** (2010) 624–633. doi: 10.1016/j.nut.2009.08.003.
- [81] M. Hallschmid, S. Higgs, M. Thienel, V. Ott, H. Lehnert, Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women, *Diabetes*. **61** (2012) 782–789. doi: 10.2337/db11-1390.
- [82] P. Novak, D.A.P. Maldonado, V. Novak, Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy: A double-blinded placebo-controlled pilot study, *PLoS One*. **14** (2019) 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0214364.
- [83] H. Zhang, Y. Hao, B. Manor, P. Novak, W. Milberg, J. Zhang, J. Fang, V. Novak, Intranasal

- insulin enhanced resting-state functional connectivity of hippocampal regions in type 2 diabetes, *Diabetes*. **64** (2015) 1025–1034. doi: 10.2337/db14-1000.
- [84] D. Kellar, S.N. Lockhart, P. Aisen, R. Raman, R.A. Rissman, J. Brewer, S. Craft, Intranasal Insulin Reduces White Matter Hyperintensity Progression in Association with Improvements in Cognition and CSF Biomarker Profiles in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease, *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **3** (2021) 240–248. doi: 10.14283/jpad.2021.14.
- [85] S. Craft, R. Raman, T.W. Chow, M.S. Rafii, C.K. Sun, R.A. Rissman, M.C. Donohue, J.B. Brewer, C. Jenkins, K. Harless, D. Gessert, P.S. Aisen, Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial, *JAMA Neurol.* **77** (2020) 1099–1109. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1840.
- [86] M.A. Reger, G.S. Watson, P.S. Green, L.D. Baker, B. Cholerton, M.A. Fishel, S.R. Plymate, M.M. Cherrier, G.D. Schellenberg, W.H. Frey, S. Craft, Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid- $\beta$  in memory-impaired older adults, *J. Alzheimer's Dis.* **13** (2008) 323–331. doi: 10.3233/JAD-2008-13309.
- [87] L. Kozlovskaya, M. Abou-Kaoud, D. Stepensky, Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route, *J. Control. Release.* **189** (2014) 133–140. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.053.
- [88] F.W.H.M. Merkus, M.P. van den Berg, Can nasal drug delivery bypass the blood-brain barrier?, *Drugs R D.* **8** (2007) 133–144. doi: 10.2165/00126839-200708030-00001.
- [89] H.H.S. Chow, Z. Chen, G.T. Matsuura, Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats, *J. Pharm. Sci.* **88** (1999) 754–758. doi: 10.1021/js9900295.
- [90] Q. Zhang, X. Jiang, W. Jiang, W. Lu, L. Su, Z. Shi, Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain, *Int. J. Pharm.* **275** (2004) 85–96. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.01.039.
- [91] S.V. Dhuria, L.R. Hanson, W.H. Frey, Intranasal drug targeting of hypocretin-1 (orexin-A) to the central nervous system, *J. Pharm. Sci.* **98** (2009) 2501–2515. doi: 10.1002/jps.21604.
- [92] Z. Wen, Z. Yan, R. He, Z. Pang, L. Guo, Y. Qian, X. Jiang, L. Fang, Brain targeting and toxicity study of odorranalectin-conjugated nanoparticles following intranasal administration,

- Drug Deliv.* **18** (2011) 555–561. doi: 10.3109/10717544.2011.596583.
- [93] P. Merkus, H.J. Guchelaar, D.A. Bosch, F.W.H.M. Merkus, Direct access of drugs to the human brain after intranasal drug administration?, *Neurology*. **60** (2003) 1669–1671. doi: 10.1212/01.WNL.0000067993.60735.77.
- [94] M.P. Van den Berg, P. Merkus, S.G. Romeijn, J.C. Verhoef, F.W. Merkus, Hydroxocobalamin uptake into the cerebrospinal fluid after nasal and intravenous delivery in rats and humans., *J. Drug Target.* **11** (2003) 325–331. doi: 10.1080/10611860310001640075.
- [95] J. Chen, X. Wang, J. Wang, G. Liu, X. Tang, Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of ergoloid mesylate by the microdialysis method in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68** (2008) 694–700. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.013.
- [96] J.P.M. in 't Veen, M.P. van den Berg, S.G. Romeijn, J.C. Verhoef, F.W.H.M. Merkus, Uptake of fluorescein isothiocyanate-labelled dextran into the CSF after intranasal and intravenous administration to rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **61** (2005) 27–31. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.02.015.
- [97] X. Gao, B. Wu, Q. Zhang, J. Chen, J. Zhu, W. Zhang, Z. Rong, H. Chen, X. Jiang, Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration, *J. Control. Release.* **121** (2007) 156–167. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.026.
- [98] S. Horvát, A. Fehér, H. Wolburg, P. Sipos, S. Veszeka, A. Tóth, L. Kis, A. Kurunczi, G. Balogh, L. Kürti, I. Eros, P. Szabó-Révész, M.A. Deli, Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72** (2009) 252–259. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.10.009.
- [99] L.R. Hanson, W.H. Frey, Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease, *BMC Neurosci.* **9** (2008) 1–4. doi: 10.1186/1471-2202-9-s3-s5.
- [100] C.D. Chapman, W.H. Frey, S. Craft, L. Danielyan, M. Hallschmid, H.B. Schiöth, C. Benedict, Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans, *Pharm. Res.* **30** (2013) 2475–2484. doi: 10.1007/s11095-012-0915-1.
- [101] L. Illum, Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system., *Eur. J. Pharm. Sci.* **11** (2000) 1–18. doi: 10.1016/S0928-0987(00)00087-7.

- [102] M.J.R. Ruigrok, E.C.M. de Lange, Emerging Insights for Translational Pharmacokinetic and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies: Towards Prediction of Nose-to-Brain Transport in Humans, *AAPS J.* **17** (2015) 493–505. doi: 10.1208/s12248-015-9724-x.
- [103] N.N. Kumar, M. Gautam, J.J. Lochhead, D.J. Wolak, V. Ithapu, V. Singh, R.G. Thorne, Relative vascular permeability and vascularity across different regions of the rat nasal mucosa: Implications for nasal physiology and drug delivery, *Sci. Rep.* **6** (2016) 1–14. doi: 10.1038/srep31732.
- [104] N.R. Hussein, H.K. Omer, A.M.A. Elhissi, W. Ahmed, Advances in nasal drug delivery systems, *Adv. Med. Surg. Eng.* (2020) 279–311. doi: 10.1016/b978-0-12-819712-7.00015-2.
- [105] R.C. Dhakar, S.D. Maurya, V.K. Tilak, A.K. Gupta, A review on factors affecting the design of nasal drug delivery system, *Int. J. Drug Deliv.* **1** (2011) 194–208. doi: 10.5138/ijdd.v3i2.214.
- [106] C.R. Behl, H.K. Pimplaskar, A.P. Sileno, J. DeMeireles, V.D. Romeo, Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29** (1998) 89–116.
- [107] D. Inoue, A. Tanaka, S. Kimura, A. Kiriya, H. Katsumi, A. Yamamoto, K. Ichi Ogawara, T. Kimura, K. Higaki, R. Yutani, T. Sakane, T. Furubayashi, The relationship between in vivo nasal drug clearance and in vitro nasal mucociliary clearance: Application to the prediction of nasal drug absorption, *Eur. J. Pharm. Sci.* **117** (2018) 21–26. doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.032.
- [108] S. Hirai, Y. Takatsuka, T. Matsuzawa, H. Mima, Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat, *Int. J. Pharm.* **7** (1981) 317–325. doi: 10.1016/0378-5173(81)90058-2.
- [109] W. Cheng, L.Y. Lim, Peroral delivery of peptide drugs, *Am. Pharm. Rev.* **11** (2008) 165–177. doi: 10.2165/00063030-200519030-00003.
- [110] B.J. Bruno, G.D. Miller, C.S. Lim, Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery, *Ther. Deliv.* **4** (2013) 1443–1467. doi: 10.4155/tde.13.104.
- [111] S.W. Cui, K.T. Roberts, Dietary Fiber. Fulfilling the Promise of Added-Value Formulations, *Mod. Biopolym. Sci.* (2009) 399–448. doi: 10.1016/B978-0-12-374195-0.00013-6.
- [112] D. Mudgil, S. Barak, Classification, technological properties, and sustainable sources, *Diet. Fiber Prop. Recover. Appl.* (2019) 27–58. doi: 10.1016/B978-0-12-816495-2.00002-2.
- [113] E. Samaridou, M.J. Alonso, Nose-to-brain peptide delivery - The potential of nanotechnology,

- Bioorganic Med. Chem.* **26** (2018) 2888–2905. doi: 10.1016/j.bmc.2017.11.001.
- [114] M. Van Woensel, N. Wauthoz, R. Rosière, V. Mathieu, R. Kiss, F. Lefranc, B. Steelant, E. Dilissen, S.W. Van Gool, T. Mathivet, H. Gerhardt, K. Amighi, S. De Vleeschouwer, Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration, *J. Control. Release.* **227** (2016) 71–81. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.032.
- [115] E. Joachim, R. Barakat, B. Lew, K.K. Kim, C.M. Ko, H. Choi, Single intranasal administration of 17 $\beta$ -estradiol loaded gelatin nanoparticles confers neuroprotection in the post-ischemic brain, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **29** (2020) 102246. doi: 10.1016/j.nano.2020.102246.
- [116] L.W. Fan, K. Carter, A. Bhatt, Y. Pang, Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats, *Neural Regen. Res.* **14** (2019) 1046–1051. doi: 10.4103/1673-5374.250624.
- [117] H. Kobayashi, H. Yokoo, T. Yanagita, A. Wada, Regulation of brain microvessel function, *Folia Pharmacol. Jpn.* **119** (2002) 281–286. doi: 10.1254/fpj.119.281.
- [118] K. Ohno, K.D. Pettigrew, S.I. Rapoport, Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **4** (1978). doi: 10.1152/ajpheart.1978.235.3.h299.
- [119] T. Suzuki, C. Zaima, Y. Moriki, T. Fukami, K. Tomono, P-glycoprotein mediates brain-to-blood efflux transport of buprenorphine across the blood-brain barrier, *J. Drug Target.* **15** (2007) 67–74. doi: 10.1080/10611860601141606.
- [120] Z. Qi, I. Whitt, A. Mehta, J. Jin, M. Zhao, R.C. Harris, A.B. Fogo, M.D. Breyer, Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **286** (2004) 590–596. doi: 10.1152/ajprenal.00324.2003.
- [121] T. Suzuki, N. Suzuki, T. Kanazawa, Transport Mechanism in the Nose-to-Brain Drug Delivery and Role of Nanosystems, *Oleoscience.* **20** (2020) 61–69. doi: 10.5650/oleoscience.20.61.
- [122] S. Gänger, K. Schindowski, Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa, *Pharmaceutics.* **10** (2018) 116. doi:

10.3390/pharmaceutics10030116.

- [123] S.V. Dhuria, L.R. Hanson, W.H. Frey, Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations, *J. Pharm. Sci.* **99** (2010) 1654–1673. doi: 10.1002/jps.21924.
- [124] L. Illum, The nasal delivery of peptides and proteins, *Trends Biotechnol.* **9** (1991) 284–289. doi: 10.1016/0167-7799(91)90091-U.
- [125] T. Sakane, M. Akizuki, Y. Taki, S. Yamashita, H. Sezaki, T. Nadai, Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs, *J. Pharm. Pharmacol.* **47** (1995) 379–381.
- [126] J.J. Lochhead, R.G. Thorne, Intranasal delivery of biologics to the central nervous system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64** (2012) 614–628. doi: 10.1016/j.addr.2011.11.002.
- [127] D. Mittal, A. Ali, S. Md, S. Baboota, J.K. Sahni, J. Ali, Insights into direct nose to brain delivery: Current status and future perspective, *Drug Deliv.* **21** (2014) 75–86. doi: 10.3109/10717544.2013.838713.
- [128] M.I. Ugwoke, R.U. Agu, N. Verbeke, R. Kinget, Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** (2005) 1640–1665. doi: 10.1016/j.addr.2005.07.009.
- [129] E. Marttin, N.G.M. Schipper, J. Coos Verhoef, F.W.H.M. Merkus, Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29** (1998) 13–38. doi: 10.1016/S0169-409X(97)00059-8.
- [130] F. Sousa, H.K. Dhaliwal, F. Gattacceca, B. Sarmento, M.M. Amiji, Enhanced anti-angiogenic effects of bevacizumab in glioblastoma treatment upon intranasal administration in polymeric nanoparticles, *J. Control. Release.* **309** (2019) 37–47. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.07.033.
- [131] G.L. See, F. Arce, S. Dahlizar, A. Okada, M.F.B.M. Fadli, I. Hijikuro, S. Itakura, M. Katakura, H. Todo, K. Sugibayashi, Enhanced nose-to-brain delivery of tranilast using liquid crystal formulations, *J. Control. Release.* **325** (2020) 1–9. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.028.
- [132] Y.S. Kim, D.K. Sung, H. Kim, W.H. Kong, Y.E. Kim, S.K. Hahn, Nose-to-brain delivery of hyaluronate – FG loop peptide conjugate for non-invasive hypoxic-ischemic encephalopathy therapy, *J. Control. Release.* **307** (2019) 76–89. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.021.
- [133] V. Bourganis, O. Kammona, A. Alexopoulos, C. Kiparissides, Recent advances in carrier

- mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **128** (2018) 337–362. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.05.009.
- [134] T. Kanazawa, M. Kaneko, T. Niide, F. Akiyama, S. Kakizaki, H. Ibaraki, S. Shiraishi, Y. Takashima, T. Suzuki, Y. Seta, Enhancement of nose-to-brain delivery of hydrophilic macromolecules with stearate- or polyethylene glycol-modified arginine-rich peptide, *Int. J. Pharm.* **530** (2017) 195–200. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.077.
- [135] C. Zhang, J. Chen, C. Feng, X. Shao, Q. Liu, Q. Zhang, Z. Pang, X. Jiang, Intranasal nanoparticles of basic fibroblast growth factor for brain delivery to treat Alzheimer’s disease, *Int. J. Pharm.* **461** (2014) 192–202. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.049.
- [136] J.A. Falcone, T.S. Salameh, X. Yi, B.J. Cordy, W.G. Mortell, A. V. Kabanov, W.A. Banks, Intranasal administration as a route for drug delivery to the brain: Evidence for a unique pathway for albumin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **351** (2014) 54–60. doi: 10.1124/jpet.114.216705.
- [137] S. Mathison, R. Nagilla, U.B. Kompella, Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: fact or fiction?, *J. Drug Target.* **5** (1998) 415–441. doi: 10.3109/10611869808997870.
- [138] M. Nedergaard, Garbage truck of the brain, *Science.* **340** (2013) 1529–1530. doi: 10.1126/science.1240514.
- [139] L.E. Bilston, D.F. Fletcher, A.R. Brodbelt, M.A. Stoodley, Arterial pulsation-driven cerebrospinal fluid flow in the perivascular space: A computational model, *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **6** (2003) 235–241. doi: 10.1080/10255840310001606116.
- [140] N.N. Kumar, J.J. Lochhead, M.E. Pizzo, G. Nehra, S. Boroumand, G. Greene, R.G. Thorne, Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal administration: Distribution, dose-response, and mechanisms of delivery, *J. Control. Release.* **286** (2018) 467–484. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.08.006.
- [141] W.A. Banks, M.J. During, M.L. Niehoff, Brain Uptake of the Glucagon-Like Peptide-1 Antagonist Exendin(9-39) after Intranasal Administration, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309** (2004) 469–475. doi: 10.1124/jpet.103.063222.
- [142] X. Hua, K.L. Zeman, B. Zhou, Q. Hua, B.A. Senior, S.L. Tilley, W.D. Bennett, Noninvasive real-time measurement of nasal mucociliary clearance in mice by pinhole gamma scintigraphy,

- J. Appl. Physiol.* **108** (2010) 189–196. doi: 10.1152/jappphysiol.00669.2009.
- [143] S.R.K. Vaka, S.M. Sammeta, L.B. Day, S.N. Murthy, Delivery of nerve growth factor to brain via intranasal administration and enhancement of brain uptake, *J. Pharm. Sci.* **98** (2009) 3640–3646. doi: 10.1002/jps.21674.
- [144] R. Pathak, R. Prasad Dash, M. Misra, M. Nivsarkar, Role of mucoadhesive polymers in enhancing delivery of nimodipine microemulsion to brain via intranasal route, *Acta Pharm. Sin. B.* **4** (2014) 151–160. doi: 10.1016/j.apsb.2014.02.002.
- [145] E. Ahmad, Y. Lv, Q. Zhu, J. Qi, X. Dong, W. Zhao, Z. Chen, W. Wu, Y. Lu, TAT modification facilitates nose-to-brain transport of intact mPEG-PDLLA micelles: Evidence from aggregation-caused quenching probes, *Appl. Mater. Today.* **19** (2020) 100556. doi: 10.1016/j.apmt.2020.100556.
- [146] Y. Li, C. Wang, S. Zong, J. Qi, X. Dong, W. Zhao, W. Wu, Q. Fu, Y. Lu, Z. Chen, The trigeminal pathway dominates the nose-to-brain transportation of intact polymeric nanoparticles: Evidence from aggregation-caused quenching probes, *J. Biomed. Nanotechnol.* **15** (2019) 686–702. doi: 10.1166/jbn.2019.2724.
- [147] T.A. Gudasheva, P. Povarnina, I.O. Logvinov, T.A. Antipova, S.B. Seredenin, Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats, *Drug Des. Devel. Ther.* **10** (2016) 3545–3553. doi: 10.2147/DDDT.S118768.
- [148] T.A. Gudasheva, P.Y. Povarnina, A.A. Volkova, S.V. Kruglov, T.A. Antipova, S.B. Seredenin, A nerve growth factor dipeptide mimetic stimulates neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampus and striatum of adult rats with focal cerebral ischemia, *Acta Naturae.* **11** (2019) 31–37. doi: 10.32607/20758251-2019-11-3-31-37.
- [149] C. Ai, X. Li-Jing, T. Yu, M. Meng, The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury, *Biomed. Reports.* **1** (2013) 167–176. doi: 10.3892/br.2012.48.
- [150] S. Yamaguchi, S. Ito, T. Masuda, P.O. Couraud, S. Ohtsuki, Novel cyclic peptides facilitating transcellular blood-brain barrier transport of macromolecules in vitro and in vivo, *J. Control. Release.* **321** (2020) 744–755. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.03.001.

## 学術雑誌掲載論文目録

本学位論文は、学術雑誌に掲載された下記の論文を基礎とするものである。

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.

## 謝 辞

本研究は、日本大学大学院薬学研究科薬剤学研究室において行われたものであり、研究を遂行するに際し終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜り、さらに本論文の御校閲を戴きました日本大学薬学部薬剤学研究室教授 鈴木豊史 博士に、ここに謹んで厚く御礼申し上げます。

また、本研究遂行の過程において終始有益な御助言と御協力を戴きました静岡県立大学薬学部創剤科学分野准教授 (前日本大学薬学部薬剤学研究室専任講師) 金沢貴憲 博士に謹んで感謝の意を表します。実験に際して多大の有益、かつ的確な御助言を戴きました日本大学薬学部薬剤学研究室助教 鈴木直人 博士に心より感謝致します。

本研究の一部を協力してくれた日本大学薬学部薬剤学研究室の卒業生に心から感謝致します。

本論文を作成するにあたり多くの御指導および御助言を頂きました日本大学薬学部薬理学研究室教授 小菅康弘 博士に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました日本大学薬学部薬品物理化学研究室教授 藤井まき子 博士、および日本大学薬学部臨床薬物動態学研究室教授 松本宜明 博士に深く感謝の意を表します。

本研究は、公益社団法人日本薬学会の研究奨励支援事業である日本薬学会長井記念研究奨励金の支援を受けたものであり、大学院での研究生活における経済的支援を賜り、本事業に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行期間中暖かく見守り続け、絶え間ない激励を贈ってくれた両親や姉達に心より感謝致します。