

N-アセチル-*L*-システインの経鼻投与に
細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリアを
併用した鼻から脊髄への薬物送達に関する研究

藏 野 匠

2023

目次

第1章 緒論.....	1
第2章 鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性の探索.....	6
2-1 序論.....	7
2-2 実験方法.....	9
2-3 結果.....	14
2-4 考察.....	21
2-5 小括.....	25
第3章 <i>N</i> -acetyl-L-cysteine にナノキャリアを併用した経鼻投与による鼻から脊髄への薬物送達.....	26
3-1 序論.....	27
3-2 実験方法.....	29
3-3 結果.....	35
3-4 考察.....	43
3-5 小括.....	47
第4章 総括.....	48
参考文献.....	50
謝辞.....	61

略語一覽

ALS: amyotrophic lateral sclerosis

fALS: familial amyotrophic lateral sclerosis

sALS: sporadic (idiopathic) amyotrophic lateral sclerosis

SOD1: copper/zinc superoxide dismutase

NAC: *N*-acetyl-L-cysteine

BBB: blood-brain barrier

DDS: drug delivery system

CSF: cerebrospinal fluid

PVS: perivascular space

AUC: the area under the plasma concentration time curve

PCL: polycaprolactone

PLGA: poly(lactic-*co*-glycolic acid)

PEG: polyethylene glycol

PEG-PCL: polyethylene glycol-polycaprolactone

CPP: cell-penetrating peptide

siRNA: small interfering RNA

RI: radioisotope

STR: stearic acid

AD: alexa-dextran

DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane

DOPS: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine

DOPC: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-hosphocholine

DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]

ATTO-DOPE: ATTO fluorescent dye-labeled 1, 2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

PDI: polydispersity index

SD: standard deviation

PBS: phosphate buffered saline

SE: standard error

one-way ANOVA: one-way analysis of variance

OB: olfactory bulb

BS: brainstem

CSpC: cervical spinal cord

SSpC: sacral spinal cord

ESR: electron spin resonance

TNF- α : tumor necrosis factor- α

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

IP: intraperitoneal

IN: intranasal

第 1 章

緒論

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位および下位運動ニューロンの選択的な変性により筋萎縮と筋力低下をきたし、呼吸筋麻痺のため死に至る進行性の神経変性疾患である。臨床的には、上位運動ニューロンが障害されることによる腱反射亢進および Babinski 徴候と、下位運動ニューロンが障害されることによる嚥下障害、構音障害および舌の筋萎縮がみられる。発症年齢の中央値は 54 歳であり、発症後の生存期間は 2~5 年とされている[1]。ALS は、家族性 ALS (familial amyotrophic lateral sclerosis: fALS) と孤発性 ALS (sporadic (idiopathic) amyotrophic lateral sclerosis: sALS) に大分され、約 90%は sALS、残りの約 10%は家族歴を伴う fALS である。fALS の 20%の患者では、銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (copper/zinc superoxide dismutase: SOD1) をコードする遺伝子の突然変異が原因であると報告されている[2]。現在、SOD1 遺伝子の 93 番目のコドンがグリシンからアラニンへ変異した SOD1 (SOD1^{G93A}) を過剰発現させたトランスジェニックマウス (G93A マウス) が、ALS モデルマウスとして病態メカニズムの検討や治療薬の開発研究に広く用いられている。これまでに、G93A マウスを用いた研究により ALS の原因仮説として、酸化ストレスの亢進、ミトコンドリア機能障害、興奮毒性、神経炎症、そしてタンパク質の凝集などが関与することが提唱されており、これら複数の原因により ALS の病態が形成されると考えられている[3]。また、これらの原因仮説をもとに、グルタミン酸受容体非競合的遮断薬であるリルゾールやフリーラジカル除去剤であるエダラボンが開発された。リルゾールは生存期間の中央値を 2~3 か月延命させる効果[4]、エダラボンは日常生活の程度を評価する尺度である ALS 機能評価スケールのスコアの低下を抑制する効果[5]を有し、これらの薬物は ALS の進行を部分的には抑制する。そのため、各国で ALS に対する治療薬として認可されているものの、それぞれの治療効果は限局的であるため十分であるとは言えない。

酸化ストレスはそれ自身が運動ニューロンの変性に関与するだけでなく、グルタミン酸による興奮毒性や神経炎症などを増悪させる[6]。そのため、エダラボンなどをはじめとする抗酸化作用を有する薬物が、ALS の治療薬あるいは候補薬として注目されている[7]。そのなかの 1 つである、水溶性化合物の N-acetyl-L-cysteine (NAC) は、ALS の原因遺伝子である SOD1^{G93A} を導入したヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) で生じる活性酸素種の増加を低減させる[8]。また、ALS 患者や G93A マウスの脊髄で増加する 4-hydroxy-2-nonenal によって誘発される神経細胞死に対しても、*in vitro* では顕著な細胞保護作用を示すことが報告されている[9]。そのため、NAC は ALS の有望な候補薬と考え

られ、様々な研究が行われているものの、*in vivo* ではその効果が乏しい。NAC を麻痺がおこる直前の 120 日齢の G93A マウスに飲水投与または皮下投与しても、生存期間を延長させるほどの治療効果はない[10]。このように *in vitro* では顕著な効果を示す薬物が、*in vivo* では期待する効果を発揮できない要因は、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) や血液脳脊髄液関門などの障壁により、循環血液中から脳や脊髄への薬物移行が制限されるからである[11]。実際、NAC のような水溶性化合物は、健常マウスに腹腔内投与または静脈内投与しても脳や脊髄には移行しない[12]。ALS は脊髄の下位運動ニューロンの変性が病態形成の中心となるため、薬物を脳だけでなく、腰髄などの中樞神経系の深部領域まで送達する必要がある。そのため、ALS の病変部位である脊髄に drug delivery system (DDS) を応用し NAC を送達できれば、ALS に対する有効な薬物治療になることが期待される。

近年、経鼻投与は、BBB を回避して鼻から脳へ薬物を直接移行可能な経路が存在することから、脳へ薬物を送達する投与経路として注目されている[13][14][15]。鼻から脳へ薬物が移行する経路としては、嗅神経を介した嗅神経経路、三叉神経を介した三叉神経経路および脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) へ移行する CSF 経路が知られている。鼻腔内に投与された抗体、インスリンおよびデキストランといった水溶性化合物は、嗅粘膜に存在する嗅神経または呼吸粘膜に存在する三叉神経の神経周囲腔や血管周囲腔 (perivascular space: PVS) を満たす間質液を通り、脳実質や CSF 中へと送達されると考えられている[16][17][18]。実際に、げっ歯類[16][19][20]、非ヒト霊長類[21]およびヒト[22]で BBB の透過が困難な抗体やタンパク質のようなバイオ医薬が経鼻投与後に鼻から脳へ移行する。経鼻投与には、肝臓における初回通過効果の回避や全身性副作用の発現リスクの低下といった利点もある。加えて、投与が簡便であり自己投与が可能のため、患者のアドヒアランスの向上が期待できる。しかしながら、鼻から脳への移行経路を利用した薬物送達は、粘液繊毛クリアランスや鼻粘膜上皮がその移行の障害となるため、脳内に送達される薬物のバイオアベイラビリティは 0.1%以下である[23]。これらの障害を克服するための、鼻から脳への効率的な薬物送達戦略の 1 つとして、経鼻投与にナノキャリアを利用する研究が盛んである[24][25]。

経鼻投与に利用されるナノキャリアは、脂質をベースとしたナノキャリアとポリマーをベースとしたナノキャリアの大きく 2 つに分類できる。脂質ベースのナノキャリアは主にリン脂質とコレステロールから構成されており、脂質二重層を持つ球形の小胞であ

るリポソーム、固体脂質のコアを持つ固体脂質ナノ粒子および固体と液体脂質のコアを持つナノ構造脂質キャリアなどが挙げられる[26]。経鼻投与に脂質をベースとしたナノキャリアを利用した例としては、認知症治療薬であるドネペジル（コリンエステラーゼ阻害剤）を含有したリポソームをラットに経鼻投与したところ、ドネペジル単独の溶液を経鼻投与した場合と比較して、脳内の薬物血中濃度時間曲線下面積（the area under the plasma concentration time curve: AUC）が2倍に増加した研究がある[27]。ポリマーベースのナノキャリアは、生分解性および生体適合性ポリマーから構成されており、そのポリマーとしては、ポリカプロラクトン（polycaprolactone: PCL）、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体（poly(lactic-co-glycolic acid): PLGA）およびポリエチレングリコール（polyethylene glycol: PEG）などが用いられる[28]。経鼻投与にポリマーをベースとしたナノキャリアを利用した例としては、PEGとPCLの共重合体であるポリエチレングリコール-ポリカプロラクトン（polyethylene glycol-polycaprolactone: PEG-PCL）から構成される高分子ナノミセルに、細胞透過性ペプチド（cell-penetrating peptide: CPP）を修飾することで、鼻粘膜を効率的に透過し、脳へ到達した研究がある[29]。他にも、ナノキャリアを利用することで、ロチゴチン[30]やリバスチグミン[31]などの低分子薬物のみならず、塩基性線維芽細胞増殖因子[32]や甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログ[33]などのペプチドおよび messenger RNA[34]や small interfering RNA (siRNA) [35]などの核酸を鼻から脳へ送達可能であり、幅広い医薬品モダリティに対応することができる。また、経鼻投与にナノキャリアを利用する研究が標的とする疾患はアルツハイマー病[36]、パーキンソン病[37]および膠芽腫[38]のような脳の中樞神経系疾患であり、これら中樞神経系疾患に対する治療効果を検討したものが多い。しかしながら、脊髄への薬物送達を目的としたナノキャリアや脊髄疾患治療を標的とした薬物送達に関する研究は極めて少ない。

本研究では、鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性を探索することから、NACにナノキャリアを併用した経鼻投与がALSの病勢進展に対して抑制を示す有用な薬物送達法になるかを明らかにすることを目的とした。第2章では、異なる表面電荷およびPEG修飾または未修飾の蛍光標識ナノキャリアを調製し、それらを食道逆挿管鼻腔内投与法による経鼻投与後の脳および脊髄における分布について *ex vivo* イメージングで観察した。さらに、放射性同位体（radioisotope: RI）標識ナノキャリアを調製し、それらを経鼻投与後の経時的な脳および脊髄内分布について、定量的に解析し、

比較した。第3章では、ナノキャリアにNACを搭載することが可能であるかはその物性から評価した。またNACを搭載したナノキャリアの繰り返し経鼻投与がG93Aマウスの生存期間に及ぼす影響を検討した。さらに、健常マウスに対してNACを搭載したナノキャリアを単回経鼻投与した際の組織内分布を定量的に測定した。

第 2 章

鼻から脊髄への薬物送達に適した
ナノキャリアの表面特性の探索

2-1 序論

ナノキャリアを利用した経鼻投与において、鼻から脊髄への効率的な送達はナノキャリアの特性に依存すると考えられる。ナノキャリアの特性としては、粒子径、表面電荷、表面修飾および親水性または疎水性などが挙げられる。このうち、粒子径および親水性または疎水性に関しては、鼻から脳への移行に影響を及ぼす。

異なるサイズのナノエマルジョンをラットに経鼻投与し、蛍光イメージングにより生体内分布を評価したところ、粒子径が 100 nm のナノエマルジョンは嗅神経経路または三叉神経経路に沿って脳内へ送達されたが、粒子径が 900 nm のナノエマルジョンは脳内へ送達されなかった[39]。同様に、ラットを用いた別の研究では、粒子径 100 nm のナノキャリアは経鼻投与後に脳内に送達されたが、粒子径 600 nm または 560 nm のナノキャリアは脳内に送達されなかった[40][41]。このように、ナノキャリアの粒子径は鼻から脳への送達において、影響を与える重要な因子であることが明らかとなっている。親水性または疎水性ナノキャリアについて、経鼻投与後の分布を比較した研究では、アルギニンをベースとした塩基性ペプチド(CH₂R₄H₂C)に、疎水性のステアリン酸(stearic acid: STR)を修飾した疎水性ナノキャリア(STR-CH₂R₄H₂C)または親水性の PEG-PCL を修飾した親水性ナノキャリア(PEG-PCL-CH₂R₄H₂C)が用いられた。それぞれのナノキャリアと alexa-dextran (AD) との複合体を調製し、経鼻投与後の脳内分布を蛍光イメージングにより観察した結果、STR-CH₂R₄H₂C では嗅球において強い蛍光が観察されたのに対して、PEG-PCL-CH₂R₄H₂C では後脳あるいは脳全体で蛍光が観察された[42]。このように、ナノキャリアの特性に応じて、鼻から脳への移行経路および移行部位が異なる。しかし、どのような表面特性を持つナノキャリアが鼻から脊髄への送達に適しているか明らかではない。

脂質をベースとした代表的なナノキャリアの1つであるリポソームは、表面特性を自由に制御できるうえに、PEG 修飾による生体内安定性の向上や抗体修飾により疾患部位への特異的な送達が可能[43]、といった利点がある。そのため、中枢神経系疾患治療における鼻から脳への移行を促進するナノキャリアの応用として、盛んに研究されている[44]。また、リポソームは上記の利点に加えて鼻腔内での薬物の分解を防ぐことや、薬物の持続的な放出が可能である[45]。したがって、経鼻投与にリポソームを利用することで低分子薬物[46]、ペプチド[36]および核酸[34]などの幅広い水溶性および脂溶性薬物の生理活性を保持したまま脳へ送達可能である。そこで、リポソームをモデルキャリ

アとして用いて、表面電荷や PEG 修飾が鼻から脊髄へのナノキャリアの分布に及ぼす影響を評価した。

2-2 実験方法

1. 使用試薬および機器

放射性 ^3H 標識-コレステロール (^3H -コレステロール) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。コレステロール、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) および 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。ATTO fluorescent dye-labeled 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (ATTO-DOPE) は ATTO-TEC (Siegen, Germany) から購入した。リポソームの調製に使用したロータリーエバポレーターシステムは、CCA-1113 recirculating chiller (東京理化器械株式会社、東京、日本)、ロータリー式エバポレーター (REN-1000) (AGC テクノグラス株式会社、静岡、日本)、濃縮装置用真空コントローラー (NVC-3000) (東京理化器械株式会社、東京、日本)、Dry Fast Ultra Diaphragm Pump 2032 (ガードナー・デンバー株式会社、神奈川、日本) である。リポソームの微小化には Qsonica Sonicator Q125 (WAKEN B TECH CO., Ltd.、京都、日本) を用いた。

2. 実験動物

動物実験の実施は、日本大学動物実験委員会の承認 (AP18PHA003-2 & AP18PHA011-2) を受けた後に行った。4 週齢の ddY マウス (雄性) を日本エスエルシー株式会社 (静岡、日本) より購入した。実験動物は制御された条件下 (温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクル (照明点灯時間午前 8 時~午後 8 時)) で飼育し、飼料および水を自由に摂取できるようにした。ddY マウスは少なくとも 3 日間の予備飼育後、体重 30 g に到達したマウスを実験に使用した。

3. リポソームの調製

Table 1 に、*ex vivo* イメージングおよび定量的な組織内分布の解析に用いたリポソームの組成を示す。DOTAP、DOPC、DOPS、コレステロールおよび DSPE-PEG₂₀₀₀ それぞれにクロロホルムを加えストック溶液 (5 mg/mL) とし、 -20°C で保存した。 ^3H -コレステロールはクロロホルムを加えストック溶液 (0.05 mCi/mL) とし、 -20°C で保存した。試験管内で総リン脂質 : コレステロール : DSPE-PEG₂₀₀₀ : ATTO-DOPE = 3 : 2 : 0.5 :

0.025 のモル比となるように加え、混合した。ロータリーエバポレーターを用いて、クロロホルムを完全に留去させ、脂質薄膜を形成した。この脂質薄膜を超純水で水和後、混合物をボルテックスし、完全に溶解させた。水和させた混合物に対して 1 秒間超音波照射 (94 W)、1 秒間照射停止を 1 サイクルとし 10~20 サイクルの超音波処理を行い、目的とする粒子径が得られるまで超音波処理を行った。調製された蛍光標識リポソームを、蛍光イメージングによる *ex vivo* 観察に用いた。さらに、総リン脂質 : コレステロール : DSPE-PEG₂₀₀₀ = 3 : 2 : 0.5 のモル比の組成に対して、³H-コレステロールを 2.5 μCi 加え、上記と同様の方法で RI 標識リポソームを調製し、定量的な組織内分布の解析に用いた。また、中性電荷の蛍光標識リポソームおよび RI 標識リポソームにおいては、DSPE-PEG₂₀₀₀ を加えない PEG 未修飾リポソームを作成した。各リポソームは 0.5 mL ずつ調製した。

Table 1. Composition of each liposome per 0.5 mL, expressed as μmol and μCi .

Liposomes		DOTAP (μmol)	DOPC (μmol)	DOPS (μmol)	Cholesterol (μmol)	DSPE- PEG ₂₀₀₀ (μmol)	ATTO- DOPE (μmol)	[³ H]- Cholesterol (μCi)
Positive	Fluorescent	2	1	—	2	0.5	0.025	—
	RI						—	2.5
Neutral	Fluorescent	—	3	—	2	0/0.5	0.025	—
	RI						—	2.5
Negative	Fluorescent	—	1	2	2	0.5	0.025	—
	RI						—	2.5

=

4. リポソームの物理化学的特性評価

上記で調製したリポソームの粒子径、多分散指数 (polydispersity index: PDI) およびゼータ電位は Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) を用いて 3 回測定し、平均値±標準偏差 (standard deviation: SD) を結果に示した。

5. 経鼻投与

経鼻投与は食道逆挿管鼻腔内投与法により行った[47]。食道逆挿管鼻腔内投与法は、以下の手順に従い実施した。イソフルランによる吸入麻酔を受けたマウスを仰臥位で静置し、喉元の皮膚を切開し、食道と気管を露出させた。ポリエチレンチューブ (内径 0.58 mm、外径 0.97 mm) を、気管に挿入することで気道を確保した。その後、食道から鼻腔内に向けてカニューレ (内径 0.28 mm、外径 0.61 mm) を挿入した。挿入したカニューレの反対側をマイクロシリンジポンプに接続した。投与液はカニューレを介して食道側から鼻腔内に向けて、5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の一定速度で 25 μL をマウス 1 匹に対して投与した。これまでに、体重 30 g のマウスの鼻腔内容積は約 30 μL であると報告されている[48]。また、鼻腔内容積に近い投与量では、脳への分布が向上することが報告されている[47]。これらの理由から、本検討では投与量を 25 μL とした。予備検討を行い、鼻腔から余剰な投与液が漏れださないことを確認した。*Ex vivo* 蛍光イメージングの検討では、蛍光標識脂質を 0.05 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ の濃度で投与した。定量的な組織内分布の解析では、 ^3H -コレステロールを 7 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ の濃度で投与した。

6. 蛍光イメージングによる *ex vivo* 観察

蛍光標識リポソームを経鼻投与し、60 分または 120 分後にペリスタポンプを用いて血液の色が脱色するまでリン酸緩衝生理食塩液 (phosphate buffered saline: PBS) で心臓から全身灌流を行い、組織表面、CSF 中および脳と脊髄の血管内に含まれるリポソームを可能な限り除去した。その後、断頭をして脳および脊髄を摘出し、各組織を PBS で十分に洗浄した。蛍光イメージング装置 In-Vivo Xtreme II により、脳および脊髄における ATTO-DOPE の蛍光を検出した。この時、脳は脳底側を観察した。蛍光の検出には 630 nm の励起フィルターと 700 nm の蛍光フィルターを用い、露光時間は 10 秒とした。

7. RI 標識リポソームを経鼻投与後の組織中放射活性の分布

RI 標識リポソームの経鼻投与終了 60 分、90 分または 120 分後に、上記と同様な方法で全身灌流を行った後、断頭をして脳、脊髄および三叉神経を摘出し、PBS で組織の洗浄を行った。脳から嗅球を分画した後、これまでの報告を参考に[49]、ノギスを用いてブレグマからの距離を測定し、ブレグマから+0.4 mm および-0.5 mm の範囲の脳組織を前脳 (forebrain) と定義し、ブレグマから-0.5 mm および-0.7 mm の範囲の脳組織を後脳 (hindbrain) と定義した。その後、前脳と後脳に分割した。また、ブレグマから-0.7 mm 以降の脳組織を延髄と定義し、脊髄と合わせて延髄脊髄 (bulbospinal tract) と定義した。その後、摘出した各組織の湿重量を測定した。

8. [³H]の放射能の測定および計算方法

得られた各組織には、組織溶解剤である Solusol™ (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) を加え、55°C で完全に溶解させた。その後、組織に HIONIC-FLOUR™ (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) を加え、測定用の試料を調製した。組織中の[³H]-コレステロールの放射活性を、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 4810TR, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) で測定した。各試料における[³H]-コレステロールの分布を、組織 1 g あたりの投与量に対する割合 (%ID/g tissue) で示した。

9. 統計解析

統計解析は GraphPad PRISM 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均±SD または標準誤差 (standard error: SE) で示した。2 群間の比較は、Student's の *t* 検定を用いて行った。3 群間以上の比較は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) を用いて解析し、その後 Tukey による多重比較検定を行った。その差が $p < 0.05$ の場合には統計的に有意であると判断した。

2-3 結果

1. 調製したリポソームの物性評価

調製したリポソームの平均粒子径、PDI およびゼータ電荷を Table 2 に示す。PEG 修飾正電荷リポソーム (PEG-Positive)、PEG 修飾負電荷リポソーム (PEG-Negative)、PEG 修飾中性電荷リポソーム (PEG-Neutral) および PEG 未修飾中性電荷リポソーム (Non-PEG-Neutral) の平均粒子径は 80~90 nm、粒子分布の幅を示す PDI は 0.22~0.26 と同程度の値を示した。一方、ゼータ電位に関して、PEG-Positive は +28.8 mV、PEG-Negative は -39.3 mV と絶対値の大きな電荷をそれぞれ示し、PEG-Neutral と比較して有意に高いまたは低いゼータ電位を示した。PEG 修飾を行ったリポソームのゼータ電位を電気泳動法により測定すると、生理的 pH でわずかに負電荷を帯びることが知られている [50]。本検討においてもこれまでの報告と同様に、PEG-Neutral のゼータ電位は -18.9 mV と負電荷を示した。また、Non-PEG-Neutral のゼータ電位は、-7.8 mV を示した。これまでに、-10 mV~+10 mV のゼータ電位を持つナノキャリアは中性電荷とみなされ、ゼータ電位の絶対値が 10 mV を超えるナノキャリアは正または負電荷とみなされると報告されている [51]。よって、調製したリポソームは粒子径および PDI が同程度であり、表面電荷のみが異なることを明らかとした。

Table 2. Mean particle diameter, PDI and zeta-potential of all liposomes.

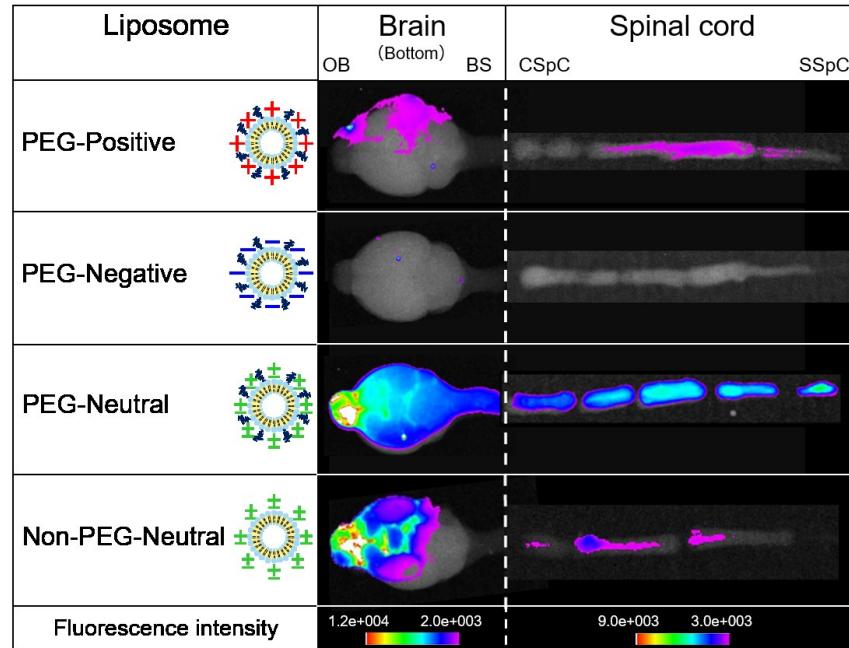
Liposomes	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PEG-Positive	80.1 ± 0.4	0.234 ± 0.009	+28.8 ± 0.50*
PEG-Negative	86.4 ± 1.1	0.260 ± 0.010	-39.3 ± 1.14*
PEG-Neutral	89.7 ± 2.3	0.256 ± 0.004	-18.8 ± 0.38
Non-PEG- Neutral	84.0 ± 0.9	0.222 ± 0.028	-7.8 ± 0.17#

The particle size, PDI and zeta potential of liposomes were measured three times with a Zetasizer Ultra. Each data was expressed as mean ± SD ($n = 3$). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$ in comparison with PEG-Neutral. Significant differences in zeta potential between PEG-Neutral and Non-PEG- Neutral were analyzed using a t -test. # $p < 0.05$.

2. 表面電荷および PEG 修飾が鼻から脳および脊髄へのナノキャリアの分布に及ぼす影響

蛍光標識リポソームを経鼻投与し、60 分後または 120 分後の時点における、脳および脊髄の蛍光標識リポソームの分布をそれぞれ Fig. 1 に示す。60 分後において、PEG-Positive は、脳側部および腰髄周辺で低度の蛍光が観察され、PEG-Neutral は脳および脊髄全体で蛍光が観察された。一方で、PEG-Negative は蛍光が全く観察されなかった (Fig. 1A)。120 分後においては、PEG-Positive は嗅球での蛍光の局在が観察され、60 分後の蛍光と同程度の蛍光が脳および脊髄全体で観察された。また、PEG-Negative においても PEG-Positive と同程度の蛍光が脳および脊髄全体で観察された。これに対して、PEG-Neutral では、PEG-Positive および PEG-Negative と比較して脳および脊髄で強い蛍光が広く分布していた (Fig. 1B)。Non-PEG-Neutral は 60 分後および 120 分後どちらにおいても脳前方においてのみ、強い蛍光の局在が観察された (Fig.1A, B)。脳および脊髄内の蛍光は時間の経過とともに強くなっていることから、リポソームは鼻から脳へ継続的に移行し、実質内を拡散していることが示された。また、各リポソームにおいて、脳と脊髄における蛍光が同時に観察されたことから、経鼻投与後は脳と脊髄に一樣に分布すると考えられる。これらの結果から、ナノキャリアの電荷を中性電荷にすることに加え、その表面に PEG を修飾することが、脊髄の広範囲に薬物を効率的に送達するために必要な特性であることが明らかとなった。

(A) 60 min



(B) 120 min

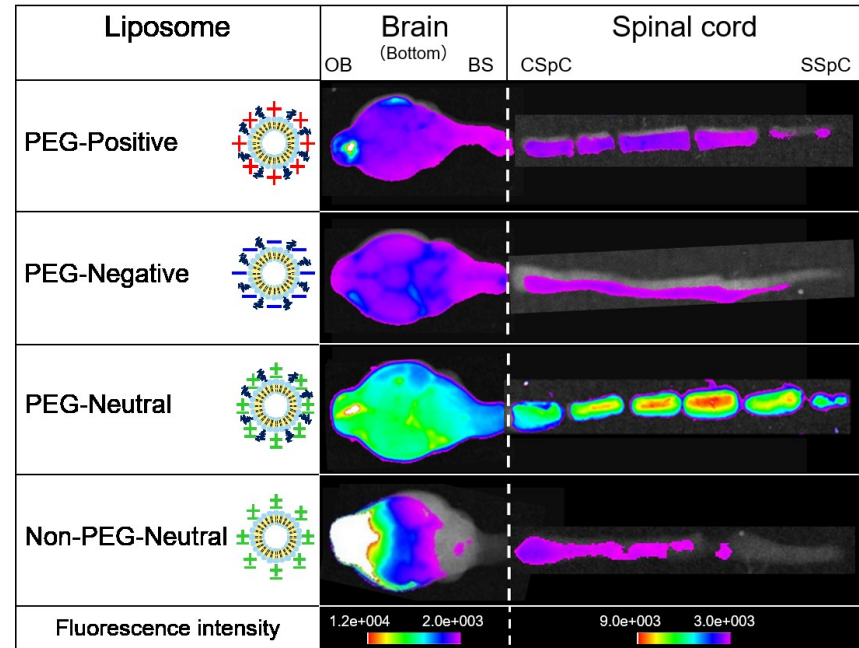


Figure 1. Fluorescence imaging of brain and spinal cord after intranasal administration of fluorescently labeled liposomes. Each mouse was administered a total volume of 25 μL solution at a constant speed of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The brain and spinal cord were obtained 60 (A) or 120 min (B) after intranasal administration and observed using Xtreme II. The basal side of the brain was observed. OB, olfactory bulb; BS, brainstem; CSpC, cervical spinal cord; SSpC, sacral spinal cord.

3. RI 標識リポソームを経鼻投与後の組織内分布評価

RI 標識リポソームを経鼻投与し、一定時間後に摘出した各組織における $[^3\text{H}]$ の分布を Fig. 2 に示す。各電荷のリポソームの前脳における $[^3\text{H}]$ -コレステロールの分布量は、投与 60 分後から 120 分後にかけてほとんど変化しなかった (Fig. 2A)。後脳および延髄脊髄では、PEG-Neutral は投与 60 分後から 90 分後にかけて $[^3\text{H}]$ -コレステロールの分布量が増加し、90 分後において分布量のピークが見られた (Fig. 2B, C)。この時、後脳および延髄脊髄における PEG-Neutral の分布量は、最も低い移行性を示した PEG-Positive の 3.2 倍、4.5 倍と有意に向上した。また、PEG-Neutral は特に、後脳および延髄脊髄においては他のリポソームと比較して、顕著に高い分布を示した。嗅球では、PEG-Positive および PEG-Neutral は投与 90 分に分布量のピークが見られたが PEG-Negative では投与 60 分後から分布量は変化しなかった (Fig. 2D)。PEG-Neutral の三叉神経への分布量は、PEG-Positive または PEG-Negative と比較して投与 60 分後から高い分布量を維持した (Fig. 2E)。

PEG-Neutral または Non-PEG-Neutral を経鼻投与し、90 分後の各組織における $[^3\text{H}]$ の組織内分布の結果を Fig. 3 に示す。中性電荷リポソームに PEG 修飾を施すことで、脳および脊髄内分布は有意に向上し、特に分布量が向上した部位は後脳および延髄脊髄であった。後脳および延髄脊髄における分布量は、PEG-Neutral ではそれぞれ 0.41 ± 0.14 、 $0.10 \pm 0.01\% \text{ID/g tissue}$ であり、Non-PEG-Neutral ではそれぞれ 0.04 ± 0.02 、 $0.01 \pm 0.01\% \text{ID/g tissue}$ であった。これらの部位における PEG-Neutral の分布量は、Non-PEG-Neutral の 10 倍と大きく向上した。経鼻投与されたリポソームが嗅神経を介して移行した場合に到達する部位である嗅球、ならびに鼻腔内から脳内への移行に関与する三叉神経では、有意な差は認められず、PEG 修飾の有無にかかわらずほぼ同等な分布を示した。したがって、PEG 修飾は嗅球および三叉神経へ移行後の、脳および脊髄への分布に重要であることが明らかとなった。

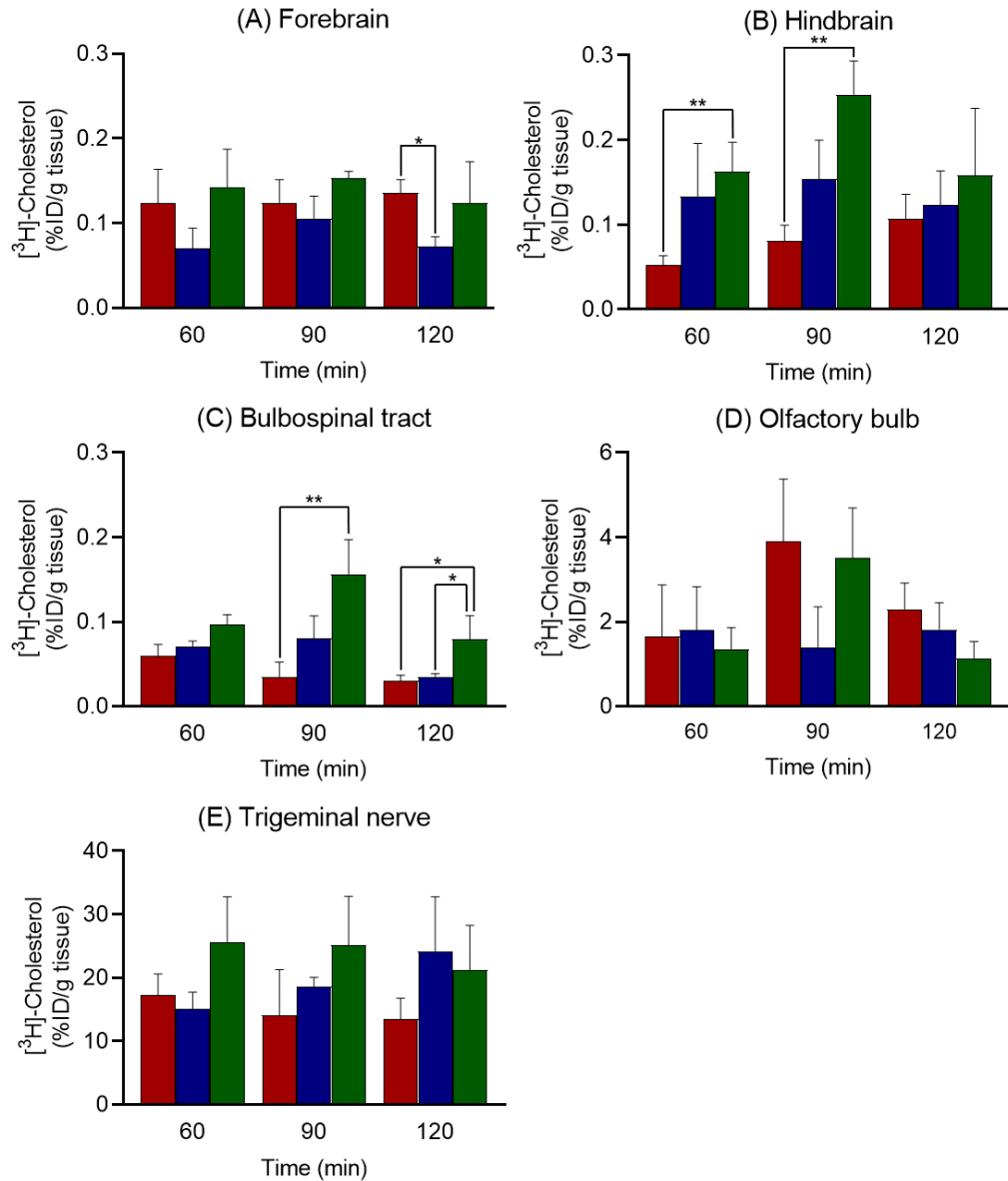


Figure 2. Distribution of $[^3\text{H}]$ -cholesterol after intranasal administration of RI-labeled liposomes with different surface charges. Each tissue was obtained at 60, 90, and 120 min after intranasal administration of PEG-Positive, PEG-Negative, and PEG-Neutral in a total volume of 25 μL solution at a constant speed of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ and measured by a liquid scintillation counter. The radioactivity of $[^3\text{H}]$ -cholesterol in the forebrain (A), hindbrain (B), bulbospinal tract (C), olfactory bulb (D), and trigeminal nerve (E) are shown as percent injected dose per gram tissue (%ID/g tissue). Red, blue, and green bars represent PEG-Positive, PEG-Negative, and PEG-Neutral, respectively. Each bar presents the mean \pm SE ($n = 4$). All data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

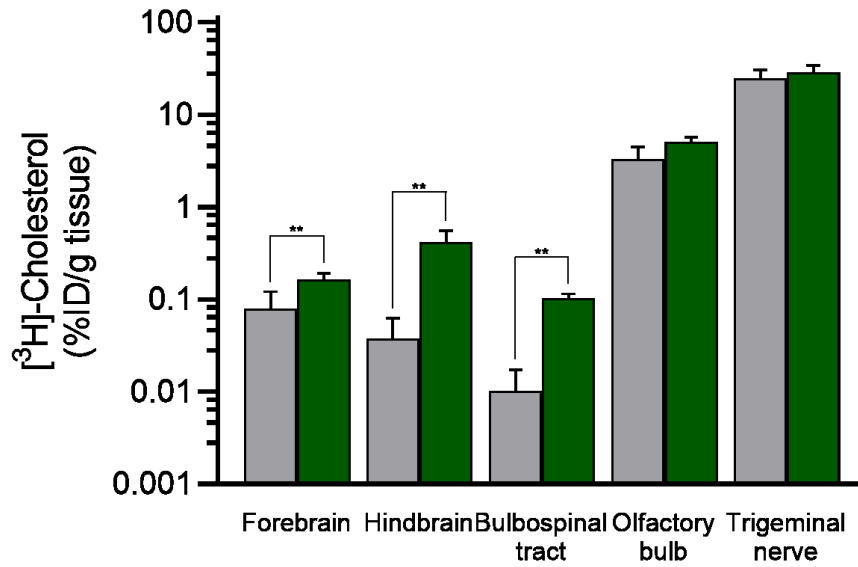


Figure 3. Distribution of [³H]-cholesterol after intranasal administration of RI-labeled neutral liposomes with or without PEG modification. The distribution of [³H]-cholesterol in the forebrain, hindbrain, bulbospinal tract, olfactory bulb, and trigeminal nerve at 90 min after intranasal administration of PEG-Neutral or Non-PEG-Neutral was measured using a liquid scintillation counter and is shown as a percent injected dose per gram tissue (%ID/g tissue). Gray and green bars represent Non-PEG-Neutral or PEG-Neutral respectively. Each bar presents mean \pm SE ($n = 4$). Data were analyzed using Student's *t*-test, ** $p < 0.01$.

2-4 考察

鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性を探索するために、PEG-Positive、PEG-Negative、PEG-Neutral、および Non-PEG-Neutral を経鼻投与し、脳および脊髄における各リポソームの分布を観察した。これまでに、正電荷ナノキャリアと負電荷ナノキャリアの鼻腔内滞留性[52]、鼻粘膜透過性[53]および脳内動態の比較[54]は行われているが、中性電荷を持つナノキャリアに関しては報告がない。

本研究で使用した各リポソームは平均粒子径が 80~90 nm、PDI が 0.22~0.26 と同程度の値を示した。一方、ゼータ電位では、正または負に荷電したリポソーム (PEG-Positive および PEG-Negative) は、それぞれ絶対値の大きな電荷を示した。中性電荷リポソームは、PEG 修飾ではわずかに負電荷を示し、PEG 未修飾では中性電荷を示した。DSPE-PEG を用いた PEG 修飾リポソームは、電気泳動法を原理とするゼータ電位測定において生理的 pH で負電荷を帯びる[50]。しかしながら、PEG 修飾を行ったリポソームの表面電荷を、電気泳動法または電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) 法それぞれの方法で測定し、比較した研究では、電気泳動法では負電荷を示すが、ESR 法では PEG 修飾によりリポソームの表面電荷は変化しないことが明らかとなっている[55]。その報告では、PEG 修飾によってリポソーム表面のバルク層の粘度が変化するために、電気泳動時の移動速度が低下し、見かけ上は表面電荷が変化したような結果が得られたと考察されている。本研究におけるゼータ電位は電気泳動法の原理に基づいて測定しているため、実際に PEG-Neutral は PEG 修飾による表面電荷の変化が生じていないものと推察される。

Ex vivo イメージングの結果から、ナノキャリアの電荷を中性電荷にすることに加え、その表面に PEG を修飾することが、脊髄に薬物を効率的に送達するために必要な特性であることが明らかとなった (Fig. 1)。PEG-Neutral の脳および脊髄の広範囲への分布は、三叉神経や脳実質内および CSF 中での拡散によるものと考えられる。これまでに、経鼻投与後の脳内における薬物の拡散は、部分的に脳血管の PVS を介して行われることが報告されている[18]。経鼻投与された薬物がどのように PVS へ移行するかは不明である。しかし、経鼻投与された蛍光標識 immunoglobulin G は PVS に存在していることが、共焦点レーザー顕微鏡により観察されている[16]。この PVS には間質液が流れており、絶えず CSF と循環している[56]ため、これらはほぼ同等なものみなすことができる。PEG 修飾された中性電荷ナノキャリアは、PEG による立体的な安定性の寄与によ

り脳内環境を模した人工 CSF 中での凝集を防ぐことが可能なため、電荷を持つナノキャリアよりも安定性が高い[57]。したがって、PEG-Neutral は PVS や神経周囲腔を流れる間質液中での安定性も同様に高いと考えられ、電荷をもつリポソームより脳および脊髄内の拡散に適していると示唆される。また、PEG 修飾をすることによりマイクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆体細胞および神経細胞への取り込みが減少し、ナノキャリアの細胞外でのアベイラビリティが向上することが報告されている[58]。よってこれらの報告から、PEG-Neutral は PVS を介して脳および脊髄全体に広く分布し、マイクログリア等に取り込まれることなく拡散することが示唆された。

次に、各電荷をもつ RI 標識リポソームの組織内分布では、PEG-Positive と PEG-Negative を比較した場合、嗅球および前脳では PEG-Positive の分布量が高く、後脳、延髄脊髄および三叉神経では PEG-Negative の分布量が高かった (Fig. 2)。したがって、主に PEG-Positive は嗅神経経路により脳へ送達され、PEG-Negative は三叉神経経路により脳および脊髄へ送達されると考えられる。対照的に、キトサンでコーティングされた正電荷ナノキャリアは、主に三叉神経経路を介して移行するのに対し、コーティングされていない負電荷ナノキャリアは嗅神経経路を介して移行する[54]。この検討では、正電荷ナノキャリア (213 nm) と負電荷ナノキャリア (118 nm) の粒子径が大きく異なるため、表面電位の影響に加えて粒子径の影響を受けていたものと考えられる。また、キトサンをコーティングすることで脳内への移行および分布が変化した可能性も考えられる。

PEG-Neutral は、嗅球では 60 分から 90 分にかけて分布量が増大したこと、および三叉神経では 60 分から 120 分にかけて PEG-Positive および PEG-Negative よりも高い値を維持したことから、PEG-Neutral の脳および脊髄への移行は嗅神経経路を介した速い移行と三叉神経経路を介した一定速度の移行の両方が関与していると考えられる (Fig. 2D, E)。中性電荷のナノキャリアは粘膜中で静電的相互作用を受けないため、効率的に拡散することが可能であること[59]、中性電荷をもつ PEG 修飾ナノキャリアは脳実質内を効率的に拡散すること[60]および PEG 修飾ナノキャリアは粒子状態を保ったまま三叉神経経路優位で脳幹に移行すること[61]がそれぞれ報告されている。本研究においても、PEG-Neutral は、PEG-Positive または PEG-Negative と比較して、脳および脊髄内を効率的に拡散することが明らかとなった (Fig. 1)。加えて、PEG-Neutral の三叉神経への分布は Non-PEG-Neutral と同程度であったが、PEG-Neutral の後脳および延髄脊髄への分布

量は Non-PEG-Neutral の 10 倍と有意に増加した (Fig. 3)。三叉神経を介した脳への移行経路には、三叉神経内の PVS と神経周囲腔が関与している[19]。PEG-Neutral は、PEG 修飾の立体安定性により、タンパク質などの吸着・凝集を防ぐ[57]。そのため、PEG-Neutral は、Non-PEG-Neutral と比較して、間質液で満たされた三叉神経の PVS や神経周囲腔を効率よく拡散することができるため、後脳および延髄脊髄への移行が促進されたものと示唆される。このことから、後脳および延髄脊髄において PEG-Neutral が 90 分にピークを示した理由として、経鼻投与後 60 分から 90 分にかけて嗅神経経路を介した嗅球への移行が急激に増加し、嗅球へ移行したリポソームは前脳内を拡散し、90 分後に後脳および延髄脊髄まで速やかに移行したことに加えて、三叉神経経路を介した後脳および延髄脊髄への移行が考えられる (Fig. 2B, C)。

PEG-Positive においても PEG-Neutral と同様に嗅球において 60 分から 90 分にかけて分布が増加したが、脳および脊髄においてピークを示さなかった (Fig. 2D)。これは、Convection Enhanced Delivery を介して正電荷ナノキャリアを投与すると、非特異的な結合により投与部位で留まることが報告されている[62]ことから、PEG-Positive は嗅神経を介して到達する嗅球において滞留したため、脳内の拡散が起きなかったと考えられる。また、負電荷ナノキャリアは、髄腔内投与後に、PVS により速やかに除去される[63]。PEG-Neutral は CSF 中でのリポソームの凝集が抑制されることや脳実質内での効率的な拡散が可能といった利点を持つため、正または負に帯電したリポソームと比較して脳および脊髄への分布が高い。一方で、PEG-Positive および PEG-Negative は中性電荷を持つ利点を得られなかったため、PEG-Neutral と比較して、脳および脊髄への分布が低かったと考えられる。本研究では、脳および脊髄へ分布したリポソームの細胞内取り込みを検証することができなかった。最も高い分布が見られた PEG-Neutral は、中性電荷と PEG 修飾の両者を有するため、細胞膜との相互作用を受けず、細胞内取り込みは低いものと推察される。実際に、細胞内取り込みは負電荷または中性電荷リポソームと比較して正電荷リポソームが優れており、PEG 修飾により細胞内取り込みが減少することが報告されている[64]。PEG-Neutral の細胞内取り込みを高めるためには、表面電荷の反転[65]や PEG 化と脱 PEG 化のバランスを最適化する[66]等の最適化が必要となり、細胞内取り込みについて今後さらなる検討が必要であると考えている。

以上より、PEG-Neutral は、嗅神経経路および三叉神経経路を介して脳および脊髄へ送達され時間経過とともに脳および脊髄全体へ広く分布したことから、脳および脊髄の

広範囲へ薬物を送達するキャリアとして、今回検討したリポソームの中では PEG-Neutral が最も優れていることが示唆された。

2-5 小括

異なる表面電荷リポソームおよび PEG 修飾または未修飾リポソームを用いて、鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性の探索を行い、以下の知見を得た。

1. PEG-Neutral は、PEG-Positive および PEG-Negative と比較して脳および脊髄で強い蛍光が広く分布していた。
2. Non-PEG-Neutral は前方においてのみ、強い蛍光の局在が観察されたのに対して、PEG-Neutral では脳および脊髄全体で強い蛍光が観察された。
3. PEG-Neutral は、嗅神経経路および三叉神経経路を介して脳および脊髄へ送達された。

以上より、ナノキャリアの電荷を中性電荷にすることに加え、その表面に PEG を修飾することが、脊髄に薬物を効率的に送達するために必要な特性であることが示唆された。

第3章

NACにナノキャリアを併用した 経鼻投与による鼻から脊髄への薬物送達

3-1 序論

ポリマーベースのナノキャリアである PEG-PCL に着目した。PEG-PCL は、水中で自己会合することにより疎水基 (PCL) 同士が集合し、親水基 (PEG) が外側に配位することで高分子ナノミセルを形成する。PEG-PCL は、高い生体適合性と生分解性および血中において長時間循環する特性を有するため DDS に汎用されている[67]。PEG-PCL は経鼻投与に利用されるナノキャリアでもある。経鼻投与された PEG-PCL がナノキャリアの状態を保ったまま脳へ移行可能であるか、またどのような経路を介して脳へ移行するかを蛍光イメージングにより評価した研究では、三叉神経を介してナノキャリアの状態を保ったまま鼻腔内から脳幹へ送達されることが明らかとなっている[61]。安全性に関する検討では、メタクリル酸共重合体で機能化した PCL ナノカプセルをラットに対して7日間連続で投与した際に、鼻粘膜の組織学的な変化は認められず、安全性が高い[68]。しかし、欠点として、PEG-PCL は高分子ナノミセルを形成した際に、PEG 鎖がその表面に存在しているため、細胞膜との相互作用が低下し、細胞への取り込みが低減することが懸念される[69]。この問題の解決策としては CPP の利用が挙げられる。

CPP は、アルギニンに富む構造を特徴とする塩基性ペプチドである。代表的な CPP としては、ヒト免疫不全ウイルス 1 型の Tat タンパク質に由来するペプチド (Tat: GRKKRRQRRRPPQ)、オクタアルギニン (R8: RRRRRRRR) およびショウジョウバエのアンテナペディアホメオドメインタンパク質に由来する塩基性ペプチド (penetratin: RQIKIWFQNRRMKWKK) などが挙げられる。CPP は細胞内への高い移行率を示すため、ペプチドやオリゴヌクレオチドの細胞内導入に用いられている[70][71]。また、PEG-PCL に Tat を結合した細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリア (PEG-PCL-Tat: PPT) のように、CPP のナノキャリアへの修飾も報告されている。PPT は、エンドサイトーシスの 1 つであるマクロピノサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、ミセル表面に水溶性化合物を搭載したまま、鼻粘膜を効率的に透過し、脳の広範囲へ送達が可能である[72]。また、一過性中大脳動脈閉塞モデルラットに対して、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α) を標的とした siRNA である siTNF- α をミセル表面に搭載した PPT の経鼻投与は、再灌流に伴う脳内 TNF- α 濃度の増加を有意に低減することが報告されている[73]。加えて、カンプトテシンをミセル内部に内封した PPT または Raf-1 を標的とした siRNA (siRaf-1) をミセル表面に搭載した PPT を脳腫瘍モデルラットに対して経鼻投与することで、生存期間を有意に延長することが報告されている

[74][75][76]。

そこで、高分子ナノミセル (PPT) の表面に、NAC を搭載することが可能であるかをその物性から評価した。また、NAC を搭載した PPT の経鼻投与が、ALS の病勢進展に対して抑制を示す有用な薬物送達法になるかを明らかとするため、G93A マウスの生存期間および健常マウスにおける組織内分布について検討した。

3-2 実験方法

1. 使用試薬

PEG-PCL は、Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI, USA) より、Tat (GRKKRRQRRRG) は、BEX Co. (東京、日本) よりそれぞれ購入した。NAC は Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI, USA) より購入した。*N*-Acetyl-L-cysteine [cystein-1-¹⁴C] ([¹⁴C]-NAC, molecular weight: 163.1, 55 mCi/mmol, 純度>98%) は、American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, 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. PPT の合成

Tat 30 mg と PEG-PCL 100 mg を *N,N*-dimethylformamide 3 mL に溶解し、超音波処理により完全に溶解させた。この溶液に、Water Soluble Carbodiimide と 4-dimethylaminopyridine を加え、攪拌させながら室温下で 24 時間反応させることで、Tat の C 末端である Gly-COOH と PEG-PCL における PCL の-OH 末端をエステル結合させた。反応液を有機溶媒用透析膜 (Spectra/Por[®] Dialysis Membranes, Molecular weight cut-off: 3.5 kDa) に移し、マグネチックスターラー上 (150 rpm) で攪拌した。透析膜内の有機溶媒が超純水に置換されるまで、超純水を一定時間ごとに入れ換えながら透析を行い、その後凍結乾燥により PPT を得た。

3. NAC/PPT 溶液の調製

1.5 mg または 7.5 mg の PPT に 300 μ L の 10 mM ヒドロキシエチルピペラジンエタンサルホン酸 (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) (HEPES) 緩衝液 (pH 7.4) を加え、それぞれピペットで完全に溶解させることで、5 mg/mL または 25 mg/mL の濃度の PPT 溶液を調製した。NAC はあらかじめ 10mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) に溶解し、100 mg/mL の濃度のストック溶液を調製した。NAC 溶液には、100 mg/mL のストック溶液またはストック溶液を 5 倍希釈した 20 mg/mL の NAC 溶液を用いた。この NAC 溶液 (20 または 100 mg/mL) を、PPT 溶液 (5 または 25 mg/mL) に穏やかに滴下しながら等量を加えて混合した。得られた溶液を室温 (25°C) で 30 分間静置することで、溶液中の NAC 濃度が 10 mg/mL である 0.2 mg NAC/PPT (0.2NAC/PPT)、または 50 mg/mL である 1 mg NAC/PPT (NAC/PPT) を得た。0.2NAC/PPT および NAC/PPT 溶液では、PPT (1.5 または 7.5 mg) と NAC (6 または 30 mg) の重量比は 1 : 4 であった。NAC

を含む PPT 溶液は、調製後、直ちに実験に使用した。なお、NAC を含まない PPT 溶液 (12.5 mg/mL) は、PPT 溶液 (25 mg/mL) を 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で希釈することで調製した。

4. NAC/PPT の物性測定

PPT 溶液および NAC/PPT 溶液の平均粒子径、PDI およびゼータ電位は、適切な測定濃度範囲内に希釈したのちに Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) を用いて 3 回測定し、平均値±SD を結果に示した。

5. 実験動物

動物実験の実施は、日本大学動物実験委員会の承認 (AP19PHA026-1 & AP20PHA006-1) および遺伝子組み換え実験安全委員会の承認 (2004 薬 003-3) を受けた後に行った。すべての動物は制御された条件下 (温度 23±1°C、相対湿度 50±10%、12 時間の明暗サイクル (照明点灯時間午前 8 時～午後 8 時)) で飼育され、飼料と水を自由に摂取できるようにした。

5.1 G93A マウス

B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1Gur を Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入し、自家繁殖した雄性的 G93A マウスを用いた。G93A マウスは雄の G93A マウスに雌の野生型マウスを交配させることで得た。なお、G93A マウスの遺伝子型は、これまでに報告されている方法[77]に従って決定した。本研究では、性差を考慮して、体重 25～30 g の雄マウスのみを使用した。

5.2 ddY マウス

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、少なくとも 3 日間の予備飼育の後、体重 25～35 g に到達したマウスを実験に使用した[78]。

6. 経鼻投与

イソフルラン (導入 4%、維持 2%) 吸入麻酔下のマウスの鼻部を、経鼻投与用麻酔マ

マスク (SN-487-70-09、シナノ製作所、東京、日本) で覆った。マスクのシリコン栓を開けた後、マイクロピペットを用いて、片鼻腔に投与液 1 μ L ずつを 30 秒毎に交互に 10 分かけて総量 20 μ L を経鼻投与した。投与液は、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あるいは同期させることで、自発的に吸引するようなタイミングで投与した。マウス 1 匹に対して 0.2NAC/PPT または NAC/PPT 溶液を総量 20 μ L で経鼻投与することで、NAC 量として 0.2 mg または 1.0 mg がマウスに与えられた。

7. 薬物投与と生存期間の評価

生存期間の解析のために、合計 108 匹の G93A マウスを Table 3 に示すように 6 つのグループに無作為に振り分けた。薬物の投与は、ALS 発症直後である 105 日齢[79]から開始し、エンドポイントまで繰り返し (平日 5 日間) 行った。ただし、105 日齢が日本の休日または祝日にあたる場合は、106 日齢または 107 日齢から薬液の投与を開始した。なお、エンドポイントはマウスを横に倒したときに 30 秒以内に起き上がることができない場合と定義し[80]、この時点で CO₂ による安楽死処置を行った。生存期間中央値は各群の G93A マウスが 50%死亡するまでの期間を示し、平均生存期間は各群の G93A マウスがエンドポイントに到達した日数の平均を示す。表 3 における経鼻投与を行った群 (Group3~6) では、投与中または麻酔から覚醒するまでの間に自発呼吸が認められない個体があった。その個体は、統計解析から外した。

Table 3. Grouping and treatments of G93A mice.

Groups	Labels	Route of Administration	Dosing Volume (μ L)	NAC (mg/mice)	PPT (mg/mice)	Number of Animals
1	Untreated	—	—	—	—	20
2	NAC-IP	IP	100	1.0	—	20
3	NAC-IN	IN	20	1.0	—	16
4	PPT	IN	20	—	0.25	19
5	0.2NAC/PPT	IN	20	0.2	0.05	17
6	NAC/PPT	IN	20	1.0	0.25	16

IP, intraperitoneal; IN, intranasal

8. ddY マウスにおける¹⁴C]-NAC/PPT を経鼻投与後の分布評価

8.1. ¹⁴C]-NAC/PPT 溶液の調製

NAC を 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、ストック溶液 (200 mg/mL) とした。PPT を 1.25 mg 秤量し、10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を 50 μ L 加え、ピペティングにより完全に溶解させ PPT 溶液を調製した。25 μ L のストック溶液に¹⁴C]-NAC を含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を 25 μ L 加えることで、NAC 溶液 (標識体の NAC として 20 μ Ci/mL、非標識体の NAC として 100 mg/mL) を調製した。PPT 溶液に NAC 溶液を緩やかに滴下して混合した後、室温で 30 分間静置することにより、溶液中の¹⁴C]-NAC 濃度が 10 μ Ci/mL かつ NAC 濃度が 50 mg/mL となる¹⁴C]-NAC/PPT 溶液を調製した。

NAC 溶液に等量の 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を加えることで、¹⁴C]-NAC および NAC 濃度が¹⁴C]-NAC/PPT 溶液と同等である¹⁴C]-NAC 溶液を調製した。¹⁴C]-NAC/PPT または¹⁴C]-NAC 溶液を、マウス 1 匹に対して 20 μ L 投与することで、NAC として 1 mg を投与した。

8.2. ¹⁴C]-NAC/PPT を経鼻投与後の ddY マウスにおける血漿中放射活性の経時的推移

¹⁴C]-NAC または¹⁴C]-NAC/PPT 溶液を経鼻投与終了後、0、3、15、30、60 および 90 分後に ddY マウスの尾静脈から経時的に血液を約 50 μ L ずつ採取した。得られた血液を遠心分離 (15 分、2100 \times g) することで、約 20 μ L の血漿を得た。

9. ¹⁴C]-NAC/PPT を経鼻投与後の ddY マウスにおける CSF および組織中放射活性の分布

¹⁴C]-NAC 単独または¹⁴C]-NAC/PPT 溶液の経鼻投与後の CSF および組織中の¹⁴C]放射活性は、投与後 3 分または 60 分の時点で測定した。CSF は、大槽に挿入した針 (30 G) に連結したカニューレを介して、ゆっくりと吸引することで、約 20 μ L 採取した。血漿は、マウスの心臓血を約 0.5 mL 採取後、遠心分離 (15 分、2100 \times g) することで得た。次に、ペリスタポンプを用いて血液の色が脱色するまで PBS による全身灌流を行った後に、三叉神経、脳 (延髄を除く)、延髄および脊髄 (胸髄および腰髄) を摘出した。その後、摘出した各組織の湿重量を測定した。

10. [¹⁴C]の放射能の測定および計算方法

得られた各組織には、組織溶解剤である Solusol™ (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) を加え、55°C で完全に溶解させた。その後、組織に HIONIC-FLOUR™ (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) を、血漿には PICO-FLOUR™40 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) をそれぞれ加え、[¹⁴C]-NAC の放射活性を液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 4810TR, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) で測定し、[¹⁴C]-NAC の分布を組織 1 g あたりの投与量に対する割合 (%ID/g tissue) または、血漿 1 mL または CSF 1 mL あたりの投与量に対する割合 (%ID/mL plasma または %ID/mL CSF) で示した。また、経時的に採取した血漿の %ID/mL plasma の値を用いて、台形法により AUC₀₋₉₀ を算出した。

11. 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。値は平均値±SD または SE で示した。2 群間における平均値の差の有意性は Student's *t* 検定を用いて解析した。3 群間以上の比較は、one-way ANOVA を用いて解析し、その後 Tukey による多重比較検定を行った。 Kaplan-Meier 法による生存期間の比較は、Log-rank 検定を行い、その後 P 値を調整するために、Bonferroni 補正を手動で行った。その差が $p < 0.05$ の場合には統計的に有意であると判断した。

3-3 結果

1. NAC/PPT の物性評価

PPT、0.2NAC/PPT および NAC/PPT の平均粒子径、PDI およびゼータ電位を測定した結果を Table 4 に示す。0.2NAC/PPT および NAC/PPT の平均粒子径および PDI 値は、PPT と比較して有意な差は認められなかった。一方で、NAC/PPT のゼータ電位は、正電荷を示した PPT および 0.2NAC/PPT のそれと比較して有意に減少しており、中性電荷とみなされる +9 mV を示した。また、PPT と NAC の複合体は、NAC の濃度依存的にゼータ電位が減少した。

Table 4. Particle diameter, PDI, and zeta potential of PPT, 0.2NAC/PPT, and NAC/PPT.

Nanocarrier	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PPT	285 ± 6.1	0.496 ± 0.016	+ 14.1 ± 0.12
0.2NAC/PPT	270 ± 8.7	0.612 ± 0.104	+ 12.9 ± 0.45
NAC/PPT	294 ± 7.2	0.541 ± 0.106	+ 9.29 ± 0.52*

The particle size, PDI, and zeta potential of PPT, 0.2NAC/PPT, and NAC/PPT were measured three times using a Zetasizer Ultra. Data are expressed as mean±SD ($n = 3$). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$ in comparison with PPT or 0.2NAC/PPT.

2. G93A マウスの生存期間に及ぼす NAC の影響

Fig. 4A に Kaplan-Meier 曲線で示したように、生存期間中央値は、未処置群が 126.0 日、NAC-IP 群が 126.5 日、PPT 群が 128.0 日、0.2NAC/PPT 群が 130.0 日となり、いずれの群の間にも差は認められなかった (untreated vs NAC-IP, $p = 1.0000$; untreated vs PPT, $p = 1.0000$; untreated vs 0.2NAC/PPT, $p = 1.0000$; NAC-IP vs PPT, $p = 1.0000$; NAC-IP vs 0.2NAC/PPT, $p = 0.9675$; PPT vs 0.2NAC/PPT, $p = 1.0000$)。マウス 1 匹に対して NAC を 0.2 mg 投与した 0.2NAC/PPT 群は、未処置群と比較して差は認められない (untreated vs 0.2NAC/PPT, $p = 1.0000$) が、これに対して、マウス 1 匹に対して NAC を 1.0 mg 投与した NAC/PPT 群の生存期間中央値は 137.5 日となり、未処置群と比較して生存期間を 11.5 日間、有意に延長した (untreated vs NAC/PPT, $p = 0.0345$)。このことから、ナノキャリアとして PPT を用いた NAC の経鼻投与において、NAC の濃度依存的に生存期間が延長することが明らかとなった (Fig. 4A)。また、NAC-IN 群の生存期間中央値は 133.5 日であり、NAC-IP 群と比較すると有意に延長した (NAC-IN vs NAC-IP, $p = 0.0015$) もの、NAC-IN および NAC-IP 群は、未処置群と比較すると、どちらも差は認められなかった (untreated vs NAC-IN, $p = 0.5955$; untreated vs NAC-IP, $p = 1.0000$) (Fig. 4A)。

同様に、Fig. 4B に示したように平均生存期間の解析も行った。平均生存期間は、未処置群が 128.5 ± 6.1 日、NAC-IP 群が 126.8 ± 4.7 日、PPT 群が 127.8 ± 4.4 日および 0.2NAC/PPT 群が 129.9 ± 4.6 日となり、いずれの群の間にも差は認められず、この結果は Fig. 4A と同様であった。これに対して、NAC/PPT 群の平均生存期間は 135.6 ± 9.4 日であり、未処置群の平均生存期間と比較して、有意に延長しており、ここでも NAC の濃度依存的に生存期間が延長することが示された ($135.6 \text{ days vs } 128.5 \text{ days}$, $p = 0.0042$; Fig. 4B)。また、NAC-IN 群の平均生存期間は 133.9 ± 3.3 日であり、NAC-IP 群の平均生存期間と比較して有意に延長したが、NAC-IN 群および NAC-IP 群は、未処置群と比較すると、どちらも有意な差が認められなかった。未処置群と比較して、平均生存期間が有意に延長した群は NAC/PPT 群のみであったことから、PPT を併用した経鼻投与が、生存期間を延長させるために最も有効であることが示された。

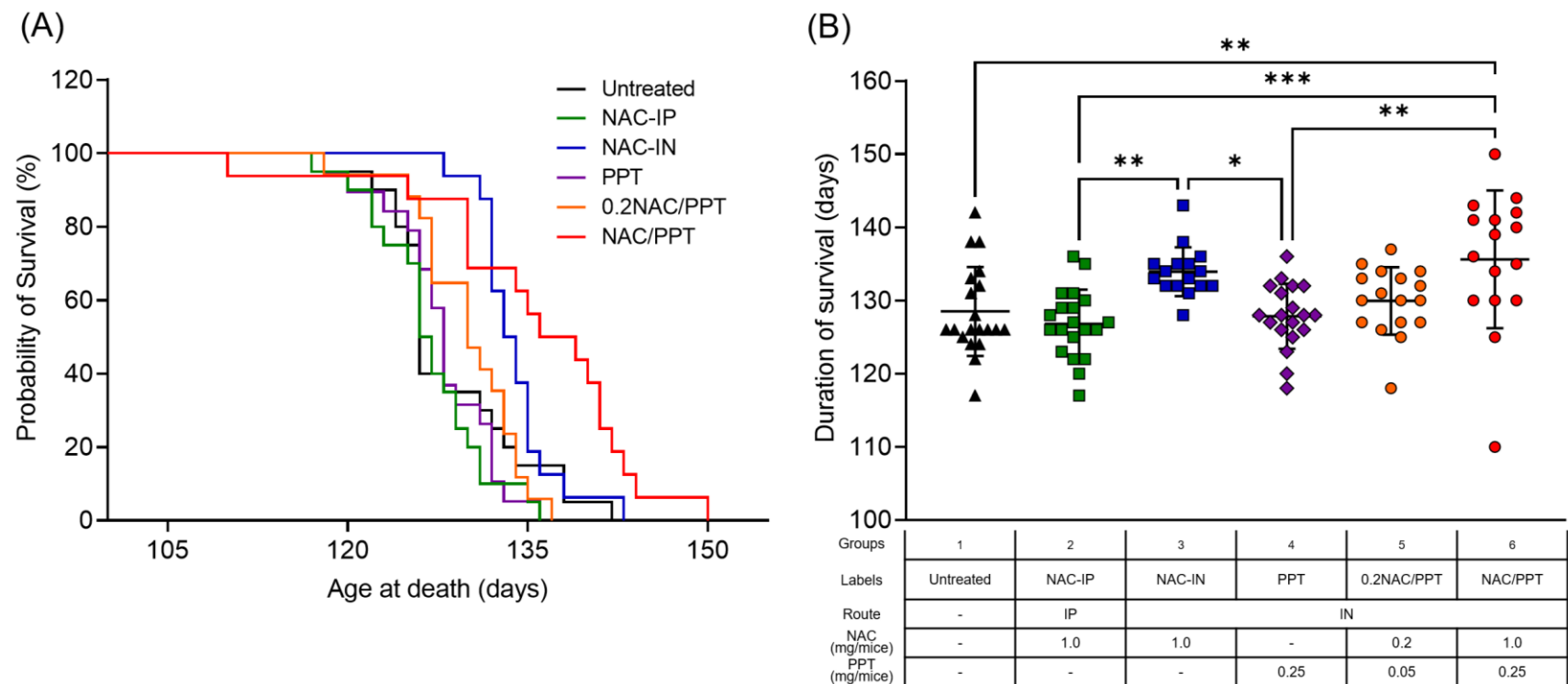


Figure 4. Lifespan of G93A mice treated with intranasal administration of NAC/PPT. G93A mice were treated with NAC-IP (1 mg), NAC-IN (1 mg), PPT (IN), 0.2NAC/PPT (IN; 0.2 mg), or NAC/PPT (IN; 1 mg), starting at a late symptomatic stage (15 weeks old). (A) Survival curves were analyzed using Kaplan–Meier survival analysis with the log-rank test; (B) The graph shows the lifespan comparative result. The values are presented as mean±SD. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3. ddY マウスに ^{14}C -NAC/PPT を単回経鼻投与した際の血漿中薬物濃度推移

^{14}C -NAC/PPT を経鼻投与後の血漿中薬物濃度推移を Fig. 5A に示す。 ^{14}C -NAC/PPT を投与後の最高血漿中薬物濃度 (C_{\max}) は、 $1.81 \pm 0.7\% \text{ID/mL plasma}$ であり、同一時間での ^{14}C -NAC 単独投与後のそれよりわずかに高い傾向を示した。 ^{14}C -NAC/PPT 投与群では、経鼻投与後初期の時間（経鼻投与開始から 10 分後および 13 分後）において、 ^{14}C -NAC 投与群よりも血漿中濃度が高い傾向を示した。投与 30 分以降から 90 分（経鼻投与開始後、40 分から 100 分）の間では、 ^{14}C -NAC/PPT 投与群の血漿中濃度は、 ^{14}C -NAC 投与群との間に濃度の差はなく、時間と共にどちらも同様な推移で減衰した (Fig. 5A)。これら 2 群間の血漿中濃度には、いずれの時点においても有意な差は認められなかった。 ^{14}C -NAC/PPT 投与後の AUC_{0-90} は、 $75\% \text{ID/mL plasma} \cdot \text{min}$ であり、 ^{14}C -NAC 投与群との間に有意な差はなかった (Fig. 5B)。

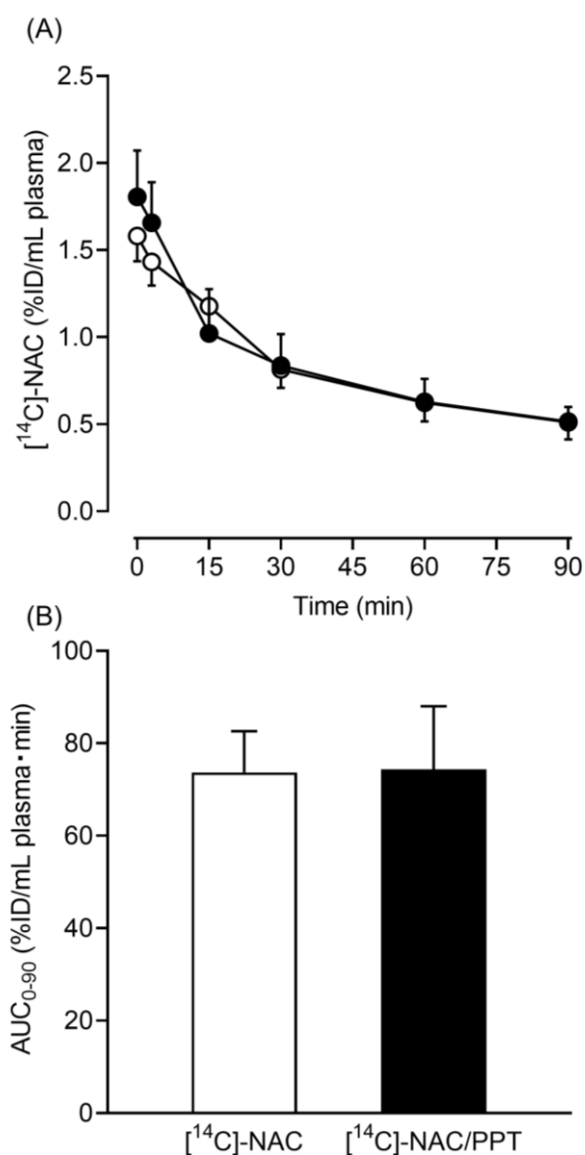


Figure 5. Concentration-time profiles of $[^{14}\text{C}]\text{-NAC}$ in plasma after a single intranasal administration to ddY mice and the area under the plasma concentration time curve (AUC). (A) Plasma was obtained from the blood collected at the designated time after the intranasal administration of $[^{14}\text{C}]\text{-NAC}$ (\circ) or $[^{14}\text{C}]\text{-NAC/PPT}$ (\bullet). The %ID in mL plasma represents the ratio of the distribution in plasma to the dosing volume of an intranasally administered drug. Values represent the mean \pm SE ($n = 6$ or 7); (B) AUC_{0-90} was calculated using a linear trapezoidal method and values for plasma concentration to the last time point ($t = 90$ min) were obtained. Values represent the mean \pm SE ($n = 6$ or 7). The significant differences in mean plasma concentrations at the same time or AUC_{0-90} between the two groups were analyzed using a t -test.

4. ddY マウスに[14C]-NAC/PPT を単回経鼻投与後の組織内薬物分布

[14C]-NAC/PPT を経鼻投与後の組織内分布を Fig. 6 に示す。三叉神経または嗅球における[14C]-NAC の分布量に関して、投与 3 分後では[14C]-NAC/PPT 投与群および[14C]-NAC 投与群どちらもほぼ同等の値を示したが、投与 60 分後における[14C]-NAC/PPT 投与群の[14C]-NAC の分布量は、[14C]-NAC 投与群と比較して 40%低かった (Fig. 6A)。投与 3 分後および 60 分後の脳、延髄、脊髄および CSF などの中枢領域における[14C]-NAC の分布量は、いずれの時間および組織においても[14C]-NAC 投与群と比較して[14C]-NAC/PPT 投与群の方が高い傾向を示した (Fig. 6B)。脳、延髄、脊髄および CSF において、投与 3 分後の[14C]-NAC の最も高い分布量は[14C]-NAC/PPT 投与群の CSF における値であり、その値は $0.62 \pm 0.16\%ID/mL$ CSF であった。また、同様に、投与 60 分後の[14C]-NAC の最も高い分布量は、[14C]-NAC/PPT 投与群の脊髄における値であり、その値は $0.46 \pm 0.09\%ID/g$ tissue であった (Fig. 6B)。[14C]-NAC 投与群と比較して、[14C]-NAC/PPT 投与群の[14C]-NAC の分布量が大きく向上した部位は、投与 3 分後の脳および投与 60 分後の CSF であり、それぞれ 1.4 倍に向上した (Fig. 6B)。[14C]-NAC/PPT 投与群において、脊髄への[14C]-NAC の分布は時間と共に増加し、その分布量は、投与 3 分後では脳および延髄へのそれとほぼ同等であったが、投与 60 分後では脳および延髄のそれと比較してそれぞれ 1.5 倍および 2.4 倍高かった (Fig. 6B)。

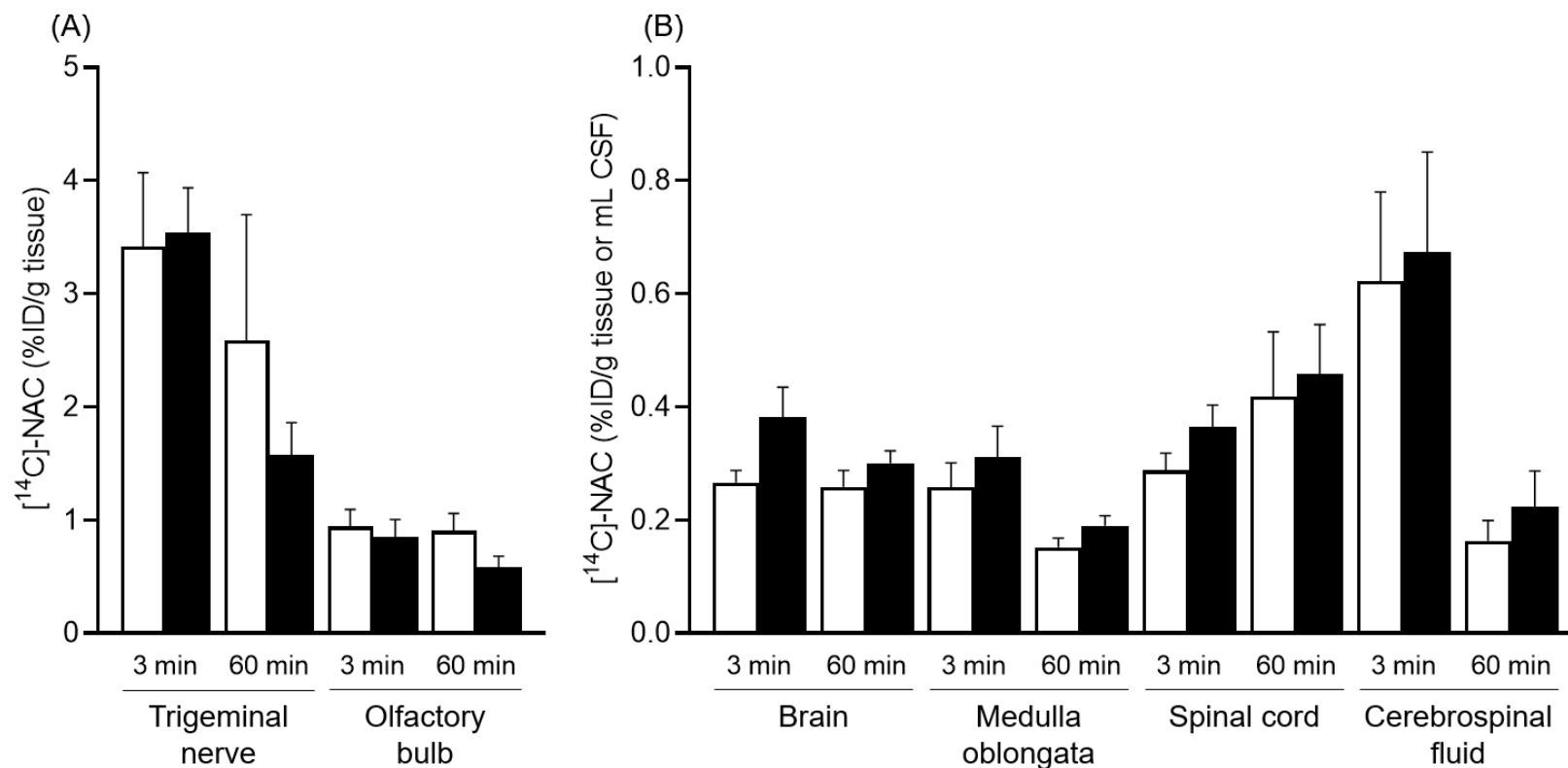


Figure 6. Tissue distribution of $[^{14}\text{C}]\text{-NAC}$ after a single intranasal administration to ddY mice. Each tissue and CSF was collected 3 or 60 min after the intranasal administration of $[^{14}\text{C}]\text{-NAC}$ or $[^{14}\text{C}]\text{-NAC/PPT}$. (A and B) The opened and closed columns represent $[^{14}\text{C}]\text{-NAC}$ and $[^{14}\text{C}]\text{-NAC/PPT}$, respectively. Each column presents the mean \pm SE ($n = 8-11$). Significance was assessed using a t -test.

3-4 考察

リポソームは、NAC のような水溶性化合物を脂質二重層の内水相に取り込むことが可能であるが、一般に薄膜水和法では内水相の体積よりも外水相の体積の方が大きいため、水溶性化合物の封入率は低いことが懸念される。そこで、ポリマーベースのナノキャリアである PPT に着目した。

NAC/PPT は、等量の NAC と PPT を 4 : 1 の重量比で混合することにより調製した。NAC は水溶性化合物であるため、ミセルである PPT の内部に内封することができない。これまでに、正電荷を持つ Tat と負電荷を持つプラスミド DNA や siRNA との間に静電的相互作用を駆動力とした複合体を形成することが報告されている[73][81]。NAC は、中性付近の pH では負に荷電している[82]。本研究においても NAC は pH 7.4 の 10 mM HEPES 緩衝液に溶解させているため、Tat の持つ正電荷と NAC の持つ負電荷の間で静電的相互作用が起こり、NAC の一部が PPT の表面に保持されたことで、電荷の中和による NAC の濃度依存的なゼータ電位の低下が起こったと考えられる。経鼻投与に利用されるナノキャリアの粒子径は 50~500 nm と報告されている[25]。NAC/PPT の PDI 値は、0.5 をわずかに上回ったが、推奨される値 (<0.5) [83]に近い値であった。NAC/PPT は表面特性として、中性電荷および PEG 修飾を有していることから、鼻から脊髄への移行を促進する物性であると期待される。

そこで、NAC/PPT の経鼻投与が G93A マウスの生存期間に及ぼす影響を検討した。このとき、NAC 単独の腹腔内投与、NAC および PPT 単独の経鼻投与についても検討した。NAC-IP 群および NAC-IN 群はいずれも、未治療群と比較して有意な差を示さなかったことから、投与経路を経鼻投与に変更しただけでは、NAC は治療効果を示さないことが明らかとなった (Fig. 4)。また、PPT 群も未治療群と比較すると有意な差が認められず、ナノキャリアのみである PPT は、治療効果がないことも確認された。一方で、NAC を搭載した PPT を経鼻投与することで、NAC の濃度依存的に生存期間が延長し、未治療群と比較して、NAC/PPT 群では生存期間の中央値が 11.5 日間 (9.1%)、平均生存期間を 7.1 日間 (5.5%)、有意に延長した (Fig. 4A)。これまでの ALS に対する NAC の予防的治療効果の検討では、G93A マウスに対して 4~5 週齢から 1%の NAC 溶液を飲料水として投与することで、未処置群の平均生存期間が 127.9 日であったのに対して、NAC 投与群の平均生存期間は 136.8 日であり、8.6 日間 (6.7%) 延長することが報告されている[84]。生存期間は、本研究結果では 7.1 日間の延長であり、上記の検討では 8.6

日間の延長であったことから、NAC を搭載した PPT の経鼻投与を ALS 発症後から開始した場合でも、予防的治療効果とほぼ同等の治療効果を示すことが明らかとなった。また、現在、我が国や米国で ALS 治療薬として承認されているリルゾールとエダラボンを、ALS 発症後のモデルマウスに投与した例では、これまでに、生存期間の延長は認められない。例えば、運動機能の低下を示した時期の G93A マウスに対して、飲料水としてリルゾールの投与を開始したのでは生存期間の延長は認められない[85]。同様に、エダラボンにおいても、後肢の筋力低下が認められた G93A マウスにエダラボンを腹腔内投与しても、生存期間を延長しない[86]。そのため、NAC/PPT を経鼻投与することで、ALS 治療薬であるリルゾールの飲水投与やエダラボンの腹腔内投与を行った *in vivo* 研究を凌ぐ治療効果を示すことが示唆された。孤発性の ALS の場合、有用な早期診断法は確立されておらず、運動機能障害等を発症した後に ALS と診断され、薬物治療を開始するケースが大部分である。以上のように、PPT の経鼻投与は、ALS 治療に対して運動機能障害発症後も有用な薬物送達戦略となることが示唆された。

次に、NAC/PPT 群は、未治療群と比較して有意な生存期間の延長が認められたことから、*ddY* マウスを用いて、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT を単回経鼻投与したときの血漿中薬物濃度の推移および組織内分布を検討した。はじめに、血漿中薬物濃度の推移を検討した結果、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT 投与群では、経鼻投与後初期の時間（経鼻投与開始から 10 分後および 13 分後）において、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC 投与群よりも高い血漿中薬物濃度が認められ、投与 30 分後以降では $[^{14}\text{C}]$ -NAC 投与群と同様な薬物動態を示した。この結果から、経鼻投与後初期は NAC と PPT との相互作用が維持されるものの、30 分後以降ではこの相互作用が消失していることが推察された (Fig. 5A)。

さらに、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT を単回経鼻投与したときの、組織内薬物分布の検討を行った。 $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT 投与群の三叉神経および嗅球における $[^{14}\text{C}]$ -NAC 投与群の分布量は、投与 3 分後では $[^{14}\text{C}]$ -NAC 投与群とほぼ同等の値を示したが、投与 60 分後においてはその分布量が低かった (Fig. 6A)。この理由として、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT 投与群の投与 60 分後では、すでに鼻腔内から三叉神経経路および嗅神経経路を介して脳および延髄へ移行していたため、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT 投与群の三叉神経および嗅球における $[^{14}\text{C}]$ -NAC の分布量が低かったと考えられる。実際に、投与 3 分後における $[^{14}\text{C}]$ -NAC/PPT 投与群の脳、延髄、脊髄および CSF への $[^{14}\text{C}]$ -NAC の分布量は、 $[^{14}\text{C}]$ -NAC 投与群のそれと比較して、それぞれ 1.4 倍、1.2 倍、1.3 倍および 1.1 倍に増加した。これは、蛍光物質である AD

と PPT の複合体は経鼻投与 15 分後に嗅球で蛍光が認められ、60 分後では嗅球および脳幹で蛍光が認められたことから、嗅神経経路および三叉神経経路を利用し脳内に移行する、これまでの報告からも裏付けられる[72]。[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群は、投与後初期の時間から血中への移行を示したことと同様に、脳、延髄、脊髄および CSF への移行も投与後初期の時間から行われていたことが明らかとなった。

[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群では、[¹⁴C]-NAC 投与群と比較して、脳、延髄、脊髄および CSF のすべてにおいて[¹⁴C]-NAC の分布量が高く、投与 3 分後および投与 60 分後における[¹⁴C]-NAC の最も高い分布量は、それぞれ[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群の CSF および脊髄であった。加えて、[¹⁴C]-NAC 投与群に対する[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群の相対的な分布率が最も向上したのは CSF であった (Fig. 6B)。CSF から脳組織への移行は、PVS 内の間質液と CSF の循環機構であるグリンパティックシステム[87]を介して行われていると考えられる。一方で、脳から脊髄への移行経路に関しては、脊髄への分布に脳内での薬物拡散がどのような影響を及ぼすかは不明なままである。しかし、PVS は脊髄の白質および灰白質内の血管に存在することに加えて、大槽内に投与されたトレーサーが PVS で確認されている[88]。また、大槽内に投与された蛍光標識したトレーサーは、投与 10 分後では軟膜に接する脊髄表面で観察され、投与 70 分後では脊髄の深部組織である灰白質を含む脊髄全体で観察された[89]。上記の報告では、トレーサーの蛍光強度は投与 70 分後で最大となったことから、脊髄実質への移行は時間に依存することが明らかとなり、加えて、PVS に沿って脊髄実質に分布することが示唆されている。本研究においても、脊髄への分布量は投与 3 分後と比較して投与 60 分後の方が高く、時間依存的に増加していることから、[¹⁴C]-NAC の CSF から脊髄への移行も同様にグリンパティックシステムを介して行われていると推察される。よって、[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群は、[¹⁴C]-NAC 投与群と比較して CSF における[¹⁴C]-NAC の分布量が大きく向上したことに伴い、脳、延髄および脊髄への移行が向上したことが示唆された (Fig. 6B)。また、グリンパティックシステムは脊髄からのクリアランスにも関与している[89]ことから、脊髄へ移行した[¹⁴C]-NAC の一部はグリンパティックシステムによりクリアランスされると考えられる。

単回投与では脳、延髄、脊髄および CSF において、[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群と[¹⁴C]-NAC 投与群の間に有意な差は認められなかった。そのため、生存期間の検討では NAC-IN 群と NAC/PPT 群に差が認められなかったと考えられる。しかし、[¹⁴C]-NAC/PPT 投与群

は ^{14}C -NAC 投与群と比較して、 ^{14}C -NAC の分布量が増加する傾向を示したため、生存期間の検討において NAC/PPT を頻回投与した NAC/PPT 群においてのみ、未処置群と比較して生存期間が延長したと推察される。

3-5 小括

NAC を搭載した PPT の経鼻投与が、ALS の病勢進展に対して抑制を示す有用な薬物送達法になるかを明らかとするため、G93A マウスの生存期間および組織分布について検討し、以下の知見を得た。

1. NAC/PPT は中性電荷および PEG 修飾を有することから、鼻から脊髄への NAC の送達を促進する可能性が示唆された。
2. NAC/PPT の繰り返し経鼻投与は、G93A マウスの生存期間を延長するために有用な薬物送達法であることを明らかとした。
3. NAC/PPT を単回経鼻投与後の脳、延髄、脊髄および CSF などの中枢領域における [¹⁴C]-NAC の分布量は、いずれの時間および組織においても [¹⁴C]-NAC 投与群と比較して高い傾向を示した。

以上より、表面特性として中性電荷と PEG 修飾の両者を有する NAC/PPT の繰り返し経鼻投与は、G93A マウスの生存期間を延長させるために有用な薬物送達法であることが明らかとなった。

第 4 章

総括

本研究では、鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性の探索することから、NAC にナノキャリアを併用した経鼻投与が鼻から脊髄への薬物送達法になるか明らかとすることを目的とし、表面電荷および PEG 修飾が分布に及ぼす影響と NAC/PPT を経鼻投与した G93A マウスの生存期間および組織分布について検討し、以下の知見を得た。

1. 中性電荷および PEG 修飾が、脊髄に薬物を効率的に送達するために必要なナノキャリアの特性であることを明らかにした。
2. 表面特性として中性電荷と PEG 修飾の両者を有する NAC 搭載高分子ナノミセルの繰り返し経鼻投与は、G93A マウスの生存期間を延長させるために有用な薬物送達法であることを明らかにした。

上記の研究より、表面電荷および PEG 修飾は、鼻から脊髄への効率的な送達に影響を及ぼす因子であり、表面特性として中性電荷と PEG 修飾の両者を有するナノキャリアを利用した経鼻投与は、ALS に対する有用な薬物送達法であることが示された。今後は、PPT の最適化を図り、鼻から脊髄への移行を向上させることで、脊髄疾患治療を標的とする有用な薬物送達戦略となることが期待できる。

参考文献

- [1] J.D. Rothstein, Edaravone: A new drug approved for ALS, *Cell*. **171** (2017) 725. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.011.
- [2] J.P. Taylor, R.H. Brown, D.W. Cleveland, Decoding ALS: from genes to mechanism, *Nature*. **539** (2016) 197–206. doi: 10.1038/nature20413.
- [3] R. Bonafede, R. Mariotti, ALS Pathogenesis and Therapeutic Approaches: The Role of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **11** (2017) 1–16. doi: 10.3389/fncel.2017.00080.
- [4] R.G. Miller, J.D. Mitchell, D.H. Moore, Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (2012). doi: 10.1002/14651858.CD001447.pub3.
- [5] K. Abe, M. Aoki, S. Tsuji, et al., Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *The Lancet Neurology*. **16** (2017) 505–512. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30115-1.
- [6] S.C. Barber, P.J. Shaw, Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target, *Free Radical Biology and Medicine*. **48** (2010) 629–641. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018.
- [7] S. Carrera-Juliá, M.L. Moreno, C. Barrios, et al., Antioxidant Alternatives in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comprehensive Review, *Frontiers in Physiology*. **11** (2020) 1–30. doi: 10.3389/fphys.2020.00063.
- [8] S. Beretta, G. Sala, L. Mattavelli, et al., Mitochondrial dysfunction due to mutant copper/zinc superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis is reversed by N-acetylcysteine, *Neurobiology of Disease*. **13** (2003) 213–221. doi: 10.1016/S0969-9961(03)00043-3.
- [9] M. Arakawa, Y. Ito, N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: Basic and clinical pharmacology, *Cerebellum*. **6** (2007) 308–314. doi: 10.1080/14734220601142878.
- [10] D. Jaarsma, H.J. Guchelaar, E. Haasdijk, et al., The antioxidant N-acetylcysteine does not delay disease onset and death in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral

- sclerosis, *Annals of Neurology*. **44** (1998) 293. doi: 10.1002/ana.410440229.
- [11] W.M. Pardridge, The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development, *NeuroRX*. **2** (2005) 3–14. doi: 10.1602/neurorx.2.1.3.
- [12] L.I. McLellan, A.D. Lewis, D.J. Hall, et al., Uptake and distribution of N -acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations, *Carcinogenesis*. **16** (1995) 2099–2106. doi: 10.1093/carcin/16.9.2099.
- [13] K. Ogawa, N. Kato, S. Kawakami, Recent Strategies for Targeted Brain Drug Delivery, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **68** (2020) 567–582. doi: 10.1248/cpb.c20-00041.
- [14] M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf, et al., Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs., *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. **281** (2018) 139–177. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.05.011.
- [15] T.P. Crowe, M.H.W. Greenlee, A.G. Kanthasamy, et al., Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain, *Life Sciences*. **195** (2018) 44–52. doi: 10.1016/j.lfs.2017.12.025.
- [16] N.N. Kumar, J.J. Lochhead, M.E. Pizzo, et al., Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal administration: Distribution, dose-response, and mechanisms of delivery, *Journal of Controlled Release*. **286** (2018) 467–484. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.08.006.
- [17] J.J. Lochhead, T.P. Davis, Perivascular and Perineural Pathways Involved in Brain Delivery and Distribution of Drugs after Intranasal Administration, *Pharmaceutics*. **11** (2019) 598. doi: 10.3390/pharmaceutics11110598.
- [18] J.J. Lochhead, D.J. Wolak, M.E. Pizzo, et al., Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration, *Journal of Perinatology*. **35** (2015) 371–381. doi: 10.1038/jcbfm.2014.215.
- [19] J.J. Lochhead, K.L. Kellohen, P.T. Ronaldson, et al., Distribution of insulin in trigeminal nerve and brain after intranasal administration, *Scientific Reports*. **9** (2019) 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-39191-5.

- [20] A. Tanaka, T. Furubayashi, M. Arai, et al., Delivery of Oxytocin to the Brain for the Treatment of Autism Spectrum Disorder by Nasal Application, *Molecular Pharmaceutics*. **15** (2018) 1105–1111. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00991.
- [21] M.J. Stenslik, A. Evans, F. Pomerleau, et al., Methodology and effects of repeated intranasal delivery of DNSP-11 in awake Rhesus macaques, *Journal of Neuroscience Methods*. **303** (2018) 30–40. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.03.006.
- [22] J. Born, T. Lange, W. Kern, et al., Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain, *Nature Neuroscience*. **5** (2002) 514–516. doi: 10.1038/nm849.
- [23] L. Illum, Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **11** (2000) 1–18. doi: 10.1016/S0928-0987(00)00087-7.
- [24] E. Samaridou, M.J. Alonso, Nose-to-brain peptide delivery – The potential of nanotechnology, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **26** (2018) 2888–2905. doi: 10.1016/j.bmc.2017.11.001.
- [25] M.L. Borrajo, M.J. Alonso, Using nanotechnology to deliver biomolecules from nose to brain — peptides, proteins, monoclonal antibodies and RNA, *Drug Delivery and Translational Research*. **189** (2021) 133–140. doi: 10.1007/s13346-021-01086-2.
- [26] D.K. Mishra, R. Shandilya, P.K. Mishra, Lipid based nanocarriers: a translational perspective, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. **14** (2018) 2023–2050. doi: 10.1016/j.nano.2018.05.021.
- [27] A.K. Al Asmari, Z. Ullah, M. Tariq, et al., Preparation, characterization, and in vivo evaluation of intranasally administered liposomal formulation of donepezil, *Drug Design, Development and Therapy*. **10** (2016) 205–215. doi: 10.2147/DDDT.S93937.
- [28] D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam, et al., Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date, *Pharmaceutical Research*. **33** (2016) 2373–2387. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5.
- [29] T. Kanazawa, F. Akiyama, S. Kakizaki, et al., Delivery of siRNA to the brain using a combination of nose-to-brain delivery and cell-penetrating peptide-modified nanomicelles, *Biomaterials*. **34** (2013) 9220–9226. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.036.
- [30] C. Bi, A. Wang, Y. Chu, et al., Intranasal delivery of rotigotine to the brain with

- lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment, *International Journal of Nanomedicine*. **Volume 11** (2016) 6547–6559. doi: 10.2147/IJN.S120939.
- [31] Z.-Z. Yang, Y.-Q. Zhang, Z.-Z. Wang, et al., Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration, *International Journal of Pharmaceutics*. **452** (2013) 344–354. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.009.
- [32] Y.Z. Zhao, M. Lin, Q. Lin, et al., Intranasal delivery of bFGF with nanoliposomes enhances in vivo neuroprotection and neural injury recovery in a rodent stroke model, *Journal of Controlled Release*. **224** (2016) 165–175. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.017.
- [33] S. Kaur, P. Manhas, A. Swami, et al., Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues, *Chemical Engineering Journal*. **346** (2018) 630–639. doi: 10.1016/j.cej.2018.03.176.
- [34] H.K. Dhaliwal, Y. Fan, J. Kim, et al., Intranasal Delivery and Transfection of mRNA Therapeutics in the Brain Using Cationic Liposomes, *Molecular Pharmaceutics*. **17** (2020) 1996–2005. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00170.
- [35] M. Van Woensel, N. Wauthoz, R. Rosière, et al., Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration, *Journal of Controlled Release*. **227** (2016) 71–81. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.032.
- [36] X. Zheng, X. Shao, C. Zhang, et al., Intranasal H102 Peptide-Loaded Liposomes for Brain Delivery to Treat Alzheimer's Disease, *Pharmaceutical Research*. **32** (2015) 3837–3849. doi: 10.1007/s11095-015-1744-9.
- [37] Z. Wen, Z. Yan, K. Hu, et al., Odorranalectin-conjugated nanoparticles: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on Parkinson's disease following intranasal administration, *Journal of Controlled Release*. **151** (2011) 131–138. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.02.022.
- [38] X.T. Li, R.J. Ju, X.Y. Li, et al., Multifunctional targeting daunorubicin plus quinacrine liposomes, modified by wheat germ agglutinin and tamoxifen, for treating brain glioma and glioma stem cells, *Oncotarget*. **5** (2014) 6497–6511. doi: 10.18632/oncotarget.2267.

- [39] E. Ahmad, Y. Feng, J. Qi, et al., Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: Cargoes but not vehicles, *Nanoscale*. **9** (2017) 1174–1183. doi: 10.1039/c6nr07581a.
- [40] T. Kanazawa, H. Taki, K. Tanaka, et al., Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration, *Pharmaceutical Research*. **28** (2011) 2130–2139. doi: 10.1007/s11095-011-0440-7.
- [41] M.J. Kubek, A.J. Domb, M.C. Veronesi, Attenuation of Kindled Seizures by Intranasal Delivery of Neuropeptide-Loaded Nanoparticles, *Neurotherapeutics*. **6** (2009) 359–371. doi: 10.1016/j.nurt.2009.02.001.
- [42] T. Kanazawa, M. Kaneko, T. Niide, et al., Enhancement of nose-to-brain delivery of hydrophilic macromolecules with stearate- or polyethylene glycol-modified arginine-rich peptide, *International Journal of Pharmaceutics*. **530** (2017) 195–200. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.077.
- [43] B.S. Pattni, V. V. Chupin, V.P. Torchilin, New Developments in Liposomal Drug Delivery, *Chemical Reviews*. **115** (2015) 10938–10966. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00046.
- [44] D. Vieira, L. Gamarra, Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier, *International Journal of Nanomedicine*. **Volume 11** (2016) 5381–5414. doi: 10.2147/IJN.S117210.
- [45] S. Hong, K.T. Oh, H. Choi, Liposomal Formulations for Nose-to-Brain Delivery : Recent Advances and Future Perspectives, (2019) 1–18.
- [46] J.-W. Guo, P.-P. Guan, W.-Y. Ding, et al., Erythrocyte membrane-encapsulated celecoxib improves the cognitive decline of Alzheimer’s disease by concurrently inducing neurogenesis and reducing apoptosis in APP/PS1 transgenic mice, *Biomaterials*. **145** (2017) 106–127. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.023.
- [47] M. Fukuda, T. Kanazawa, S. Iioka, et al., 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*. **332** (2021) 493–501. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.02.024.
- [48] 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, *The AAPS Journal*. **17** (2015) 493–505. doi: 10.1208/s12248-015-9724-x.
- [49] E. Lonn, E. Koskela, T. Mappes, et al., Balancing selection maintains polymorphisms at neurogenetic loci in field experiments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **114** (2017) 3690–3695. doi: 10.1073/pnas.1621228114.
- [50] M.C. Woodle, L.R. Collins, E. Sponsler, et al., Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential, *Biophysical Journal*. **61** (1992) 902–910. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81897-0.
- [51] M.J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, et al., Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles, *Journal of Controlled Release*. **172** (2013) 782–794. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.013.
- [52] M.Q. Le, R. Carpentier, I. Lantier, et al., Residence time and uptake of porous and cationic maltodextrin-based nanoparticles in the nasal mucosa: Comparison with anionic and cationic nanoparticles., *International Journal of Pharmaceutics*. **550** (2018) 316–324. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.054.
- [53] S.L. Law, K.J. Huang, H.Y. Chou, Preparation of desmopressin-containing liposomes for intranasal delivery, *Journal of Controlled Release*. **70** (2001) 375–382. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00369-2.
- [54] A. Bonaccorso, T. Musumeci, M.F. Serapide, et al., Nose to brain delivery in rats: Effect of surface charge of rhodamine B labeled nanocarriers on brain subregion localization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **154** (2017) 297–306. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.035.
- [55] K. Arnold, O. Zschoernig, D. Barthel, et al., Exclusion of poly(ethylene glycol) from liposome surfaces, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1022** (1990) 303–310. doi: 10.1016/0005-2736(90)90278-V.
- [56] L. Yang, B.T. Kress, H.J. Weber, et al., Evaluating glymphatic pathway function utilizing clinically relevant intrathecal infusion of CSF tracer, *Journal of Translational Medicine*. **11** (2013) 107. doi: 10.1186/1479-5876-11-107.
- [57] C. Curtis, D. Toghiani, B. Wong, et al., Colloidal stability as a determinant of nanoparticle behavior in the brain, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **170** (2018)

- 673–682. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.050.
- [58] S.I. Jenkins, D. Weinberg, A.F. Al-Shakli, et al., ‘Stealth’ nanoparticles evade neural immune cells but also evade major brain cell populations: Implications for PEG-based neurotherapeutics, *Journal of Controlled Release*. **224** (2016) 136–145. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.013.
- [59] A.-C. Groo, K. Mircheva, J. Bejaud, et al., Development of 2D and 3D Mucus Models and Their Interactions with Mucus-Penetrating Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules, *Pharmaceutical Research*. **31** (2014) 1753–1765. doi: 10.1007/s11095-013-1280-4.
- [60] E.A. Nance, G.F. Woodworth, K.A. Sailor, et al., A Dense Poly(Ethylene Glycol) Coating Improves Penetration of Large Polymeric Nanoparticles Within Brain Tissue, *Science Translational Medicine*. **4** (2012) 149ra119-149ra119. doi: 10.1126/scitranslmed.3003594.
- [61] Y. Li, C. Wang, S. Zong, et al., The Trigeminal Pathway Dominates the Nose-to-Brain Transportation of Intact Polymeric Nanoparticles: Evidence from Aggregation-Caused Quenching Probes, *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **15** (2019) 686–702. doi: 10.1166/jbn.2019.2724.
- [62] J.A. MacKay, D.F. Deen, F.C. Szoka, Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating, *Brain Research*. **1035** (2005) 139–153. doi: 10.1016/j.brainres.2004.12.007.
- [63] X. Gu, Q. Song, Q. Zhang, et al., Clearance of two organic nanoparticles from the brain via the paravascular pathway, *Journal of Controlled Release*. **322** (2020) 31–41. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.03.009.
- [64] C.R. Miller, B. Bondurant, S.D. McLean, et al., Liposome-cell interactions in vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes, *Biochemistry*. **37** (1998) 12875–12883. doi: 10.1021/bi980096y.
- [65] Y. Feng, G. Qin, S. Chang, et al., Antitumor effect of hyperoside loaded in charge reversed and mitochondria-targeted liposomes, *International Journal of Nanomedicine*. **16** (2021) 3073–3089. doi: 10.2147/IJN.S297716.

- [66] S.-D. Li, L. Huang, Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting, *Journal of Controlled Release*. **145** (2010) 178–181. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.03.016.
- [67] P. Grossen, D. Witzigmann, S. Sieber, et al., PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application, *Journal of Controlled Release*. **260** (2017) 46–60. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.05.028.
- [68] F.N. Fonseca, A.H. Betti, F.C. Carvalho, et al., Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine, **11** (2014) 1–10. doi: 10.1166/jbn.2014.2078.
- [69] A. Verma, F. Stellacci, Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions, *Small*. **6** (2010) 12–21. doi: 10.1002/smll.200901158.
- [70] S. Futaki, I. Nakase, Cell-Surface Interactions on Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Allow for Multiplex Modes of Internalization, *Accounts of Chemical Research*. **50** (2017) 2449–2456. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00221.
- [71] M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, et al., Cell-penetrating peptides, *Trends in Pharmacological Sciences*. **21** (2000) 99–103. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01447-4.
- [72] T. Kanazawa, F. Akiyama, S. Kakizaki, et al., Delivery of siRNA to the brain using a combination of nose-to-brain delivery and cell-penetrating peptide-modified nanomicelles, *Biomaterials*. **34** (2013) 9220–9226. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.036.
- [73] T. Kanazawa, T. Kurano, H. Ibaraki, et al., Therapeutic Effects in a Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Rat Model by Nose-To-Brain Delivery of Anti-TNF-Alpha siRNA with Cell-Penetrating Peptide-Modified Polymer Micelles, *Pharmaceutics*. **11** (2019) 478. doi: 10.3390/pharmaceutics11090478.
- [74] H. Taki, T. Kanazawa, F. Akiyama, et al., Intranasal delivery of camptothecin-loaded tat-modified nanomicells for treatment of intracranial brain tumors, *Pharmaceutics*. **5** (2012) 1092–1102. doi: 10.3390/ph5101092.
- [75] T. Kanazawa, K. Morisaki, S. Suzuki, et al., Prolongation of life in rats with malignant glioma by intranasal siRNA/drug codelivery to the brain with cell-penetrating peptide-modified micelles, *Molecular Pharmaceutics*. **11** (2014) 1471–1478. doi: 10.1021/mp400644e.

- [76] T. Kanazawa, H. Taki, H. Okada, Nose-to-brain drug delivery system with ligand/cell-penetrating peptide-modified polymeric nano-micelles for intracerebral gliomas, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **152** (2020) 85–94. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.05.001.
- [77] E. Tokuda, S.-I. Ono, K. Ishige, et al., Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis, *Toxicology*. **229** (2007) 33–41. doi: 10.1016/j.tox.2006.09.011.
- [78] T. Kurano, T. Kanazawa, A. Ooba, et al., Nose-to-brain/spinal cord delivery kinetics of liposomes with different surface properties, *Journal of Controlled Release*. **344** (2022) 225–234. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.03.017.
- [79] C. Cheroni, M. Peviani, P. Cascio, et al., Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome, *Neurobiology of Disease*. **18** (2005) 509–522. doi: 10.1016/j.nbd.2004.12.007.
- [80] Y. Kosuge, E. Kaneko, H. Nango, et al., Bidens pilosa Extract Administered after Symptom Onset Attenuates Glial Activation, Improves Motor Performance, and Prolongs Survival in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2020** (2020). doi: 10.1155/2020/1020673.
- [81] I.A. Ignatovich, E.B. Dizhe, A. V. Pavlotskaya, et al., Complexes of Plasmid DNA with Basic Domain 47-57 of the HIV-1 Tat Protein Are Transferred to Mammalian Cells by Endocytosis-mediated Pathways, *Journal of Biological Chemistry*. **278** (2003) 42625–42636. doi: 10.1074/jbc.M301431200.
- [82] Y. Samuni, S. Goldstein, O.M. Dean, et al., The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. **1830** (2013) 4117–4129. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.016.
- [83] P.C. Pires, A.O. Santos, Nanosystems in nose-to-brain drug delivery: A review of non-clinical brain targeting studies, *Journal of Controlled Release*. **270** (2018) 89–100. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.047.
- [84] O.A. Andreassen, A. Dedeoglu, P. Klivenyi, et al., N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of familial amyotrophic

- lateral sclerosis., *Neuroreport*. **11** (2000) 2491–3. doi: 10.1097/00001756-200008030-00029.
- [85] M.C. Hogg, L. Halang, I. Woods, et al., Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models, *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. **19** (2018) 438–445. doi: 10.1080/21678421.2017.1407796.
- [86] H. Ito, R. Wate, J. Zhang, et al., Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice, *Experimental Neurology*. **213** (2008) 448–455. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.07.017.
- [87] J.J. Iliff, M. Wang, Y. Liao, et al., A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid, *Science Translational Medicine*. **4** (2012) 147ra111-147ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.
- [88] M.A. Lam, S.J. Hemley, E. Najafi, et al., The ultrastructure of spinal cord perivascular spaces: Implications for the circulation of cerebrospinal fluid, *Scientific Reports*. **7** (2017) 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-13455-4.
- [89] F. Wei, C. Zhang, R. Xue, et al., The pathway of subarachnoid CSF moving into the spinal parenchyma and the role of astrocytic aquaporin-4 in this process, *Life Sciences*. **182** (2017) 29–40. doi: 10.1016/j.lfs.2017.05.028.

学術雑誌掲載論文目録

本論文は、次の論文を基礎とするものである。

1. Kurano T, Kanazawa T, Ooba A, Masuyama Y, Maruhana N, Yamada M, Iioka S, Ibaraki H, Kosuge Y, Kondo H, Suzuki T. Nose-to-brain/spinal cord delivery kinetics of liposomes with different surface properties. *J Control Release*. 2022; **344**:225-234.
2. Kurano T, Kanazawa T, Iioka S, Kondo H, Kosuge Y, Suzuki T. Intranasal administration of *N*-acetyl-L-cysteine combined with cell-penetrating peptide-modified polymer nanomicelles as a potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmaceutics*. 2022; **14**:2590.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲をいただきました日本大学 薬学部 薬剤学研究室 教授 鈴木 豊史 先生に衷心より深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、研究全体の計画や遂行および学術論文の執筆など、さまざまな面において御指導・御鞭撻を賜り、激励の言葉をかけてください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 先生に謹んで深く感謝の意を表します。さらに、実験に際して種々の有益なる御助言・御指導を賜りました日本大学 薬学部 薬剤学研究室 専任講師 鈴木 直人 先生に深謝致します。ならびに、本研究の一部にご協力いただきました日本大学 薬学部 薬剤学研究室の卒業生と静岡県立大学 薬学部創剤科学分野 飯岡 真吾氏に心から感謝致します。

G93A マウスの生存期間に及ぼす NAC の影響を評価するにあたり、G93A マウスのご供与と実験方法に関する多くの御指導・御鞭撻を賜り、また研究者としての心構えをご教授いただいた日本大学 薬学部 薬理学研究室 教授 小菅 康弘 先生に深く御礼申し上げます。

本論文を審査していただき、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 先生、ならびに日本大学 薬学部 臨床薬物動態学研究室 教授 松本 宜明 先生に深謝いたします。

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援を受けたものであり、経済的支援を賜り、心より感謝いたします。また、特別研究員 DC2（令和3年度）に採用していただき、研究奨励金および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心より感謝いたします。

最後に、私の学生生活および研究活動を温かく見守り、支え続けてくれた両親と家族に心から感謝いたします。