

鼻から脳への薬物送達を促進するイオン液体の創製と 中枢疾患治療への応用

和歌山県立医科大学 薬学部 薬剤学研究室
福田 達也

1. はじめに

イオン液体 (IL) はカチオンとアニオンの組合せからなる 100°C 以下で液体状態をとる有機塩と称され、薬物の可溶化や安定化、皮膚や粘膜等のバリア透過性を向上できるため、薬物送達システム (DDS) 応用に向けた研究が盛んに行われている¹⁾。DDS 研究の最大の課題として、血液脳関門 (BBB) 突破による脳への薬物送達の実現がある。その背景として、中枢疾患治療を目的に開発される医薬品の 99% 以上が BBB を透過できないことがある²⁾。ゆえに、BBB を回避し鼻粘膜から脳へ直接薬物を送達可能な Nose-to-Brain (N2B) 経路が注目される (図 1) が、薬物をそのままの形で投与した場合の移行性は投与量の約 0.2% とされ、障壁となる鼻粘膜の効率的な突破技術が必須となる³⁾。IL は高い粘性により皮膚/粘膜滞留性を示すことから、鼻粘膜へ適用後も優れた粘膜滞留性・透過性による脳への薬物送達性の増大が期待できるが、IL の経鼻投与による N2B 経路を介した薬物送達と疾患治療を行った例は存在せず、鼻粘膜や脳へ毒性を示さずに脳内薬物送達を実現する IL の開発が求められる。本研究では、生体適合性のあるカチオン、および吸収促進剤としての実績のあるアニオンを用いた IL を作製し、N2B 経路へ適用可能な高い鼻粘膜透過性と安全性を有する新規 IL を創製することを目指した。さらに、本 IL と低分子・高分子脳保護薬の分子間相互作用等の物性解析、IL を用いた脳保護薬の効率的送達による脳梗塞治療を達成し、中枢薬物送達に資する IL 技術の基盤構築を目的とした。

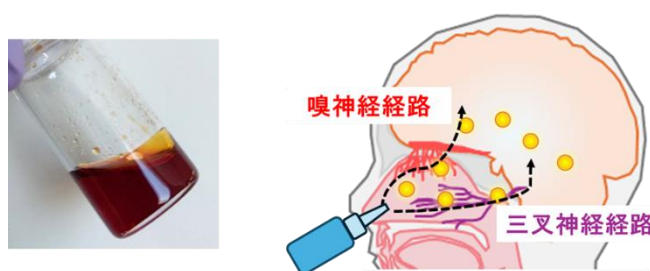


図 1. イオン液体の外観と Nose-to-Brain 経路を介した脳内薬物送達のイメージ図

2. イオン液体 (IL) の合成と物性および *in vitro* における生体適合性の評価

IL の合成には、カチオンとして、重炭酸コリン (Cho)、アセチルコリン (Ace)、また当研究室でこれまでに有用性を報告してきた⁴⁾、エチレングリコールアミン骨格を有する 2-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)ethanamine (Eth) を使用した。また、アニオンとして、IL として皮膚疾患に対する臨床試験に進んでいるゲラン酸 (Ger) や⁵⁾、経皮吸収促進剤などへの有用性が

知られるリノール酸 (Lin) やオレイン酸 (Ole)、オクタン酸 (Oct) 等の様々な鎖長を有する脂肪酸類を使用した。IL は、カチオンとアニオンを 1:2 のモル比で 1 時間攪拌混合した後、60°C で 2 時間エバポレーションすることで溶媒を留去した。そして、60°C で 2 日間真空乾燥することにより各 IL を合成した。その結果、3 種類のカチオン、10 種類のアニオンの組み合わせから、15 種類の室温で液体あるいはゲルとなる IL の合成に成功した。これらの IL について、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) による測定を行ったところ、IL 化による C=O ピーク (1650 cm^{-1} 付近) の消失と N-O ピークの出現 (1550 cm^{-1} 付近)、が観察され、カチオン由来の N、およびアニオン由来の C-O を介した静電的相互作用の形成が確認された。また、 ^1H 核磁気共鳴法 (NMR) 解析の結果、IL の形成によってプロトンのピークが低磁場側にシフトしている IL 種が確認された。また、粘度を測定したところ、IL に特徴的な高い粘度が認められた。これらの検討結果より、本研究で使用したカチオンとアニオン間での IL の形成が確認された。

次に、RAW264 マウスマクロファージ様細胞および Calu-3 肺胞上皮腺がん細胞に対して、上記検討で見出した IL を培地中へ一定濃度で希釈し、細胞へ 3 時間処理した後、21 時間後 (IL 処理開始 24 時間後) の細胞生存率を WST-8 アッセイにより評価した。その結果、15 種類のうち 8 種類の IL が、対照群と比較して 24 時間後においても細胞生存率が 70-80% を維持していた。8 種類の IL の内訳は、Cho-Ger、Cho-Oct、Cho-デカン酸 (Dec)、Ace-Ger、Ace-Oct、Ace-Lin、Eth-Ger、Eth-Oct (カチオン-アニオン) である。以上の結果より、これら 8 種類の IL を、以降の *in vivo* における脳内薬物送達性、および薬効解析の評価に使用した。

3. 各 IL の薬物溶解性改善効果

IL は難水溶性の薬物に適用することで、水に対する溶解性改善効果を発揮することが知られる⁶⁾。そこで、アルツハイマー型認知症治療薬であるリバスチグミン (RIV) をモデル薬物として使用し、各 IL による水への溶解性改善効果を評価した。本検討は、RIV を超純水および超純水に対して 10 w/v% で懸濁させた IL 溶液に飽和量以上加え、24 時間室温にて攪拌混合、遠心分離後の上清中の RIV 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定することで行った。その結果、IL によって RIV の水への溶解性 (14 mg/mL) が 500 mg/mL 以上と 30 倍以上に増大した。このことから、各 IL の成分が水中で RIV と相互作用を形成し、それによって水への溶解性が向上することが示唆された。経鼻投与による N2B 経路を介した脳内薬物送達においては、粘液柔毛クリアランスによる薬物の迅速な排出や、薬物の鼻粘膜に対する低い透過性、鼻腔内の限られた体積に起因する投与量の制限、などの課題が存在する⁷⁾。IL による RIV の溶解性改善効果によって、限られた体積の鼻腔内に対して、一度の噴霧で高用量の薬物を投与でき、それにより効率的な脳内送達が可能となることが考えられる。

4. RIV@IL の経鼻投与後の活性評価と脳内薬物量評価

2. の検討で見出した 8 種の候補 IL を 20 w/v% で超純水中に溶解し、そこに RIV を混合することで、RIV@IL を調製した。調製した RIV@IL (2 mg/mL as RIV) を微量噴霧器 (Micro FPS; 東レ・プレジジョン株式会社) を用いて BABL/c マウス (6-7 週齢、雄) の鼻腔内に対して片鼻 5 μL ずつ、合計 10 μL 投与し、経鼻投与 1、3 時間後に脳を摘出し、

Acetylcholinesterase (AChE) Activity Assay Kit (Sigma) により脳内 AChE 活性を評価した。RIV は AChE 阻害することで、アルツハイマー病の病態下において脳内に不足した Ach を増加させることで、アルツハイマー病症状の改善効果を示す⁸⁾。3. の検討で、IL による RIV の溶解性改善効果が認められたものの、経鼻投与によって高用量の RIV を脳内送達したところ、過剰に AChE が阻害され、それによりマウスが死亡した。そのため、本検討では RIV 濃度として 2 mg/mL に濃度を設定し、実験を行った。その結果、投与後 1 時間後では、対照群である RIV 水溶液および RIV@IL 群間で同様な AChE 阻害活性が認められ、50-60% の阻害効果が発揮された。一方で、3 時間後においては、RIV 水溶液において 15% の阻害活性にまで低下していた一方で、Cho-Ger、Eth-Ger、および Eth-Oct を用いた RIV@IL 投与群では 30-40% の阻害活性と、有意に高い薬効が認められた。経鼻投与された低分子薬物の脳内移行は比較的速やかであることが知られるが、IL を適用することで、RIV の薬効の即効性を維持したまま、持続性を持たせることが可能であることが示唆された。

RIV@IL による AChE 阻害活性の増大が認められた IL について、次に、RIV@IL を経鼻投与した一定時間後の、鼻粘膜および脳内の RIV 量を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) にて測定した。鼻粘膜について評価したところ、特に Eth-Ger、Eth-Oct 投与群において RIV 量の増大、すなわち鼻粘膜に対する滞留性向上が認められ、これが AChE 阻害効果の持続性に寄与したことが示唆された。そこで次に、脳内薬物濃度を評価したところ、期待に反して、RIV の脳内移行量にはほとんど差が認められなかった。一方で、AChE 阻害活性と強い相関が報告されている代謝物⁹⁾について測定したところ、RIV@IL による高い AChE 阻害活性が認められた 3 時間後において、代謝物の量が有意に増加していた。このことから、鼻粘膜へ滞留した RIV@IL が N2B 経路を介して徐々に脳内へ移行し、それにより高い AChE 阻害活性を示していたことが示唆された。

5. 各 IL を経鼻投与後の脳・鼻粘膜に対する安全性の評価

4. の検討において高い AChE 阻害活性を発揮した IL、すなわち Cho-Ger、Eth-Ger、Eth-Oct、およびリン酸緩衝生理食塩水を BALB/c マウスへ経鼻投与した 24 時間後の脳および鼻粘膜を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した後の組織の状態を顕微鏡にて観察した。その結果、脳においては全ての投与群において目立った組織傷害が認められなかった。鼻粘膜については、PBS、Eth-Ger、および Eth-Oct 投与群においては目立った組織傷害が認められなかった一方、Cho-Ger 投与群において一部膜の乱れが観察された。このことから、開発した IL のうち、特に Eth-Ger、Eth-Oct は経鼻投与後も組織傷害を誘起しない、生体適合性の高い IL であることが示唆された。

9. まとめ

本研究では、複数のカチオンとアニオンを組み合わせることで 15 種の室温で液体、あるいはゲルになる IL を合成することに成功し、その中で生体適合性が高く、また薬物の鼻粘膜滞留性や脳内移行性を向上可能な IL を複数見出すことに成功した。以上より、IL を薬物の溶媒として使用することで、N2B 経路を介した効率的な脳内薬物送達が可能であることが示唆された。

本検討では IL に溶解する薬物として低分子化合物である RIV を使用したが、今後核酸医薬などの高分子医薬へ IL を適用することで、様々な創薬モダリティを効率的に脳内送達可能な IL システムの開発を目指し、検討を行う予定である。

謝辞

本研究は（公益財団法人）天野工業技術研究所、2025 年研究助成を受けて実施されました。

参考文献

- 1) Curreri A.M., Mitragotri S., Tanner E.E.L. “Recent Advanced in Ionic Liquids in Biomedicine”, *Advanced Science*, 8, e2004819 (2021).
- 2) Pandit R., Chen L., Gotz J. “The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 165-166, 1-14 (2020).
- 3) Fukuta T., Oku N., Kogure K. “Application and Utility of Liposomal Neuroprotective Agents and Biomimetic Nanoparticles for the Treatment of Ischemic Stroke”, *Pharmaceutics*, 14, 361 (2022).
- 4) Fukuta T., Yoshimura K., Ihara R., Minoura K., Ikeda-Imafuku M, Kadota K. “Intracerebral delivery of the ionic liquid form of edaravone via nose-to-brain delivery route for treating cerebral ischemia/reperfusion injury”, *Journal of Controlled Release*, 383, 113834 (2025).
- 5) Ko J., Mandal A., Dhawan S., Shevachman M., Mitragotri S., Joshi N. “Clinical translation of choline and geranic acid deep eutectic solvent”, *Bioengineering & Translational Medicine*, 6, e10191 (2020).
- 6) Shi Y., Zhao Z., Gao Y., Pan D.C., Salinas A.K., Tanner E.E.L., Guo J., Mitragotri S. “Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes”, *Journal of Controlled Release*, 322, 602-609 (2020).
- 7) Lochhead J.J., Thorne R.G. “Intranasal delivery of biologics to the central nervous system”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 614-628 (2012).
- 8) Chopade P., Chopade N., Zhao Z., Mitragotri S., Liao R., Suja V.C. “Alzheimer’s and Parkinson’s disease therapies in the clinic”, *Bioengineering & Translational Medicine*, 8, e10367 (2022).
- 9) Enz A., Chappuis A., Dattler A. “A simple, rapid and sensitive method for simultaneous determination of rivastigmine and its major metabolite NAP 226-90 in rat brain and plasma by reversed-phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry”, *Biomedical Chromatography: BMC*, 18, 160-166 (2004).