

## 生理活性ペプチドの経粘膜吸収改善に関する生物薬剤学的研究

山本 昌

京都薬科大学薬剤学教室, 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

## Improvement of Transmucosal Absorption of Biologically Active Peptide Drugs

Akira YAMAMOTO

*Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi,  
Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan*

(Received August 31, 2001)

Peptide and protein drugs are becoming a very important class of therapeutic agents. However, the oral bioavailability of peptide and protein drugs is generally poor because they are extensively degraded by proteases in the gastrointestinal tract or impermeable through the intestinal mucosa. For the systemic delivery of the peptide and protein drugs, parenteral administration is currently required to achieve their therapeutic activities. However, this administration is poorly accepted by patients and may cause allergic reactions and serious side effects. Therefore, various approaches have been examined to overcome the delivery problems of these peptides when they are administered into the gastrointestinal tract and other mucosal sites. These approaches include (1) to use additives such as absorption enhancers and protease inhibitors, (2) to develop an administration method for peptides that can serve as an alternative to oral and injection administration, (3) to modify the molecular structure of peptide and protein drugs to produce prodrugs and analogues, and (4) to use the dosage forms to these peptide drugs. In this study, we demonstrated that the transmucosal absorption of various peptides including insulin, calcitonin, tetragastrin and thyrotropin releasing hormone (TRH) could be improved by the use of these approaches. Therefore, these approaches may give us basic information to improve the transmucosal absorption of peptide and protein drugs.

**Key words**—drug absorption; transmucosal absorption; peptide drug delivery; absorption enhancer; colon-specific drug delivery; pulmonary absorption

## 1. はじめに

近年、微量で強力な生理活性を有するペプチドが数多く発見され、また遺伝子組換え技術や細胞融合などのバイオテクノロジーの急速な進歩によるペプチドの大量供給が可能になり、これら生理活性ペプチドを医薬品として疾病の治療に応用しようとする試みがなされている。しかしながら、こうしたペプチド性医薬品を経口投与しても十分な吸収率が得られないことが知られている。<sup>1,2)</sup>この原因は、これらペプチド性医薬品が消化管内の消化酵素やタンパク分解酵素により速やかに分解を受けたり、あるいは水溶性で高分子であるため消化管粘膜を透過しにくいことによると考えられる。<sup>1,2)</sup>このため、これら医薬品の投与法は、臨床上ほとんどすべてが筋肉投与、皮下投与及び静脈内投与などの注射による投与に限られているのが現状である。しかしながら、こ

れら注射による投与は、患者に苦痛を伴い、またアレルギー反応やアナフィラキシーショックなどの重篤な副作用を発現するという欠点を有する。そこで最近では、こうした注射に代わる投与経路として経口投与をはじめとする経粘膜投与が注目されているが、注射に比べると十分な吸収率が得にくいのが現状である。したがって、現在では経口並びに経粘膜投与後の生理活性ペプチドの吸収率を改善するため、種々の方法が試みられているが、それらを大別すると、(1)吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤などの製剤添加物の利用、<sup>1-36)</sup>(2)薬物の新規投与経路の開発、<sup>37-47)</sup>(3)薬物の分子構造修飾、<sup>48-69)</sup>(4)薬物の剤形修飾<sup>70-81)</sup>に分類できる。そこで本稿では、これらペプチド性医薬品の経粘膜吸収改善に関する4つの方法について我々の研究室で検討した結果を中心に紹介する。

## 2. 製剤添加物の利用

**2-1. 吸収促進剤** 生理活性ペプチドの吸収を改善するためには、消化管やその他の吸収部位におけるこれらペプチドの粘膜透過性を一過性に上昇させる添加物を利用する場合がある。こうした作用を有する添加物を総称して吸収促進剤 (absorption enhancers, absorption promoters) と呼ぶ。現在までに多くの物質が吸収促進剤として利用されているが、代表的なものには界面活性剤、胆汁酸、キレート剤、脂肪酸などがあげられる。<sup>1)</sup>

Table 1 に各種吸収促進剤を利用した生理活性ペプチドの吸収改善の例を示しているが、インスリン、カルシトニンなどの生理活性ペプチドの吸収改善に種々の吸収促進剤が利用されていることがわかる。

吸収促進剤の効果は、吸収促進剤自体の物性、適用部位差、種差などにより左右されることが知られている。<sup>1,2)</sup> すなわち、吸収促進剤の物性に関しては胆汁酸を用いた場合、胆汁酸の疎水性が高いほどインスリンに対する吸収促進効果が大きいことが、また対象薬物の分子量により吸収促進効果が大きく変動することが報告されている。また、一般に消化管に吸収促進剤を適用した場合、大腸における吸収促進効果が小腸に比べ顕著に発現することが見い出されている。<sup>27)</sup>

Figure 1 は、*in vitro* Ussing chamber 法を用いて各種吸収促進剤存在下における thyrotropin releasing hormone (TRH) 類縁体の azetirelin の空腸及び結腸粘膜透過量を 2 時間までプロットした結果を示したものである。空腸ではいずれの促進剤を用いても、促進剤未添加の場合と比較して azetirelin の透過性の改善は認められなかったのに対し、結腸においてはいずれの促進剤を併用しても明らかな透過性の上昇が見られている。中でもアルキルサッカライドであるラウリルマルトシドを共存させた系では、他の促進剤と比較して高い吸収促進効果が認められた。Table 2 には各種吸収促進剤存在下における各グラフの直線部分の傾きから算出した azetirelin の

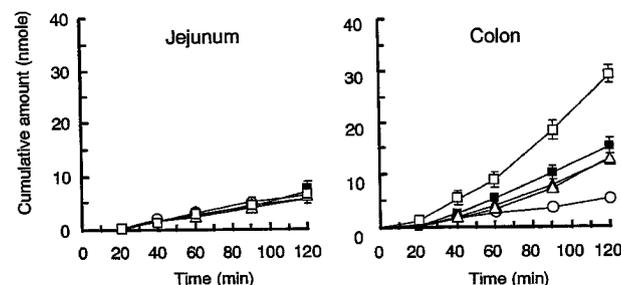


Fig. 1. Effect of Absorption Enhancers on the Transport of Azetirelin across the Jejunal and Colonic Membranes of Rats  
Keys: (○) Control, (▲) EDTA, (△) Sodium glycocholate (NaGC), (■) Citric acid (CA), (□) n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (LM).

Table 1. Enhancement of Absorption of Peptides/Proteins by Various Absorption Enhancers

Peptides/proteins	Absorption enhancers	Animals
Insulin	Various surfactants	Rabbits
	Bile acid	
	Phospholipid	
	Enamine derivatives	Rabbits, rats, dogs
	Sodium salicylate	Dogs
	Sodium 5-methoxysalicylate	
Gastrin	Sodium 5-methoxysalicylate	Rats
Pentagastrin		
Lysozyme	Enamine derivatives	Rabbits
Heparin		
(Asu <sup>1,7</sup> )-eel calcitonin	Enamine derivatives	Rats
	Sodium salicylate	
Human epidermal growth factor	Sodium caprate	Rats
	CMC Na	
Interferon (human fibroblast interferon)	Mixed micelle (linoleic acid, HCO60)	Rats
Des-enkephalin- $\gamma$ -endorphin	Medium-chain glyceride	Rats
	Na <sub>2</sub> EDTA	

Table 2. Effect of Absorption Enhancers on Papp of Azetirelin across the Jejunal and Colonic Membranes of Rats

Enhancer	Jejunum		Colon	
	Papp ( $\times 10^{-6}$ cm/sec)	Ratio	Papp ( $\times 10^{-6}$ cm/sec)	Ratio
Control	4.60 $\pm$ 0.46	1.00	3.42 $\pm$ 0.22	1.00
EDTA 10 mM	4.31 $\pm$ 0.09 <sup>n.s.</sup>	0.94	7.06 $\pm$ 0.72 <sup>**</sup>	2.06
NaGC 10 mM	4.36 $\pm$ 0.49 <sup>n.s.</sup>	0.95	8.07 $\pm$ 0.76 <sup>**</sup>	2.36
CA 10 mM	4.69 $\pm$ 0.57 <sup>n.s.</sup>	1.02	9.01 $\pm$ 0.71 <sup>***</sup>	2.63
LM 10 mM	4.10 $\pm$ 0.68 <sup>n.s.</sup>	0.89	16.49 $\pm$ 0.47 <sup>***</sup>	4.82

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

(n.s.) : not significant, (\*\*):  $p < 0.01$ , (\*\*\*) :  $p < 0.001$ , compared with the control.

見かけの透過係数 (Papp) を示している。空腸における Papp は、いずれの促進剤を添加した系でも control と比較して差がなく、吸収促進剤の効果は認められなかった。一方、結腸における Papp の値は各種吸収促進剤の共存下で有意に増大したが、中でもラウリルマルトシドの効果は他の吸収促進剤と比較して大きく、control と比べて 4.8 倍の増加が認められた。

次に、*in vitro* Ussing chamber 法で検討した各促進剤について、さらに *in situ* closed loop 法により検討を行った。Figure 2 は、azetirelin (投与量 0.5 mg/kg) の小腸 (空腸部) 及び大腸 loop からの吸収に対する各種吸収促進剤の効果を示している。用いた促進剤の添加濃度は、*in vitro* と同じく 10 mM とした。その結果、小腸においてはラウリルマルトシドの存在下で明らかな血漿中濃度の増大が認められたものの他の吸収促進剤についてはほとんど効果が認められなかった。一方、大腸においてはいずれの促進剤の系でも control と比較して血漿中 azetirelin 濃度の有意な上昇が認められ、中でもラウリルマルトシドは投与直後から、他の促進剤と比較して顕著な吸収促進効果を示した。Table 3 には 60 分までの血漿中濃度推移から求めた AUC の値をまとめて示している。小腸では LM の共存系でのみ、control 群と比較して約 3.5 倍の AUC の増大が認められた。一方、大腸においては同じくラウリルマルトシドを適用した際に顕著に高い吸収促進効果が得られ、control 群と比較して AUC は 36 倍上昇した。以上の結果、全般的にいずれの促進剤においても結腸における azetirelin に対する吸収促進効果が空腸に比べより顕著に発現することが認めら

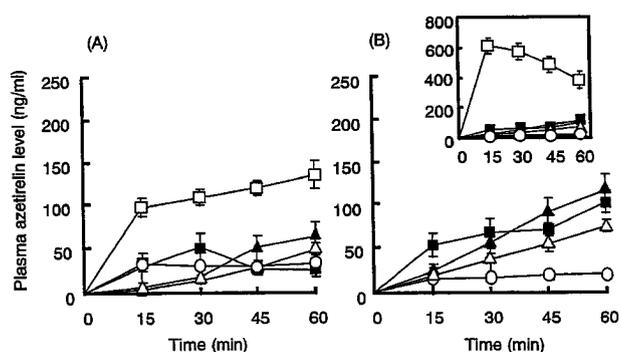


Fig. 2. Effect of Absorption Enhancers on the Small (A) and Large (B) Intestinal Absorption of Azetirelin in Rats  
Keys: (○) Control, (▲) EDTA, (△) Sodium glycocholate (NaGC), (■) Citric acid (CA), (□) n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (LM) Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-5 animals.

れ、従来の報告と一致することが確認できた。

吸収促進剤の吸収促進機構の詳細については、まだ明らかでないものも多いが、キレート剤の一種である EDTA は、細胞間の接合部位の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを除去することにより細胞間隙を広げ薬物の透過を促進すると考えられている。<sup>2)</sup> 一方、オレイン酸などの不飽和脂肪酸は、脂質二重膜に作用し、その流動性を高めることにより吸収を改善することが知られている。<sup>2)</sup> また最近では膜の SH 基タンパクが重要な役割を果たしていることも認められている。<sup>2)</sup>

吸収促進剤が実際に臨床応用された例としては、アンピシリン及びセフトチゾキシムの小児用坐剤に添加されたカプリン酸ナトリウムがある。このように難吸収性の抗生物質の吸収改善に吸収促進剤が利用されているが、一般的には促進効果が強い添加物は、同時に粘膜傷害性や刺激性のみられるものが多い。

Table 3. Effect of Absorption Enhancers on  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  of Azetirelin after Administration into the Small and Large Intestinal Loops of Rats

Enhancer	Small intestine		Large intestine	
	$AUC_{0-60 \text{ min}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ )	Ratio	$AUC_{0-60 \text{ min}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ )	Ratio
Control	$1.70 \pm 0.07$	1.00	$0.77 \pm 0.28$	1.00
EDTA 10 mM	$1.49 \pm 0.44^{\text{n.s.}}$	0.88	$3.35 \pm 0.61^{**}$	4.33
NaGC 10 mM	$1.03 \pm 0.07^{**}$	0.61	$2.14 \pm 0.37^*$	2.76
CA 10 mM	$1.68 \pm 0.39^{\text{n.s.}}$	0.99	$3.53 \pm 0.64^{**}$	4.56
LM 10 mM	$5.88 \pm 0.43^{**}$	3.46	$27.97 \pm 2.24^{**}$	36.32

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–5 animals.

(n.s.) : not significant, (\*) :  $p < 0.05$ , (\*\*) :  $p < 0.01$ , compared with the control.

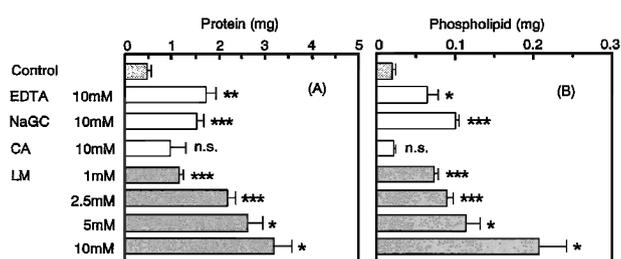


Fig. 3. Release of Protein (A) and Phospholipid (B) from the Large Intestinal Membrane in the Presence of Various Absorption Enhancers

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 animals. (n.s.) not significant, (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ , compared with the control.

Figure 3は、ラット大腸 loop 内に促進剤を 3 時間滞留させた際の粘膜からのタンパク質及びリン脂質の漏出量を測定した結果を示したものである。促進剤の添加濃度を 10mM にそろえて比較した場合、タンパク質、リン脂質ともクエン酸が最も小さく、その粘膜傷害性は用いた吸収促進剤の中で最も低いことが示された。また、ラウリルマルトシドは 10mM では用いた促進剤の中で最も大きな傷害性を示したが、添加濃度を下げるにつれてその傷害性は低下し、1mM 添加時では EDTA やグリココール酸ナトリウムの 10mM 添加時と比較して同等あるいはそれ以下であった。

Figure 4は、各種吸収促進剤の大腸における有効性と安全性の関係を表すため、control に対する azetirelin の AUC の改善比を縦軸に、また control に対するタンパク質及びリン脂質の漏出量の比をとってプロットしたものである。これらの図において左上に位置するような吸収促進剤ほど、その効果が粘膜傷害性に比較して大きいこととなる。各促進剤

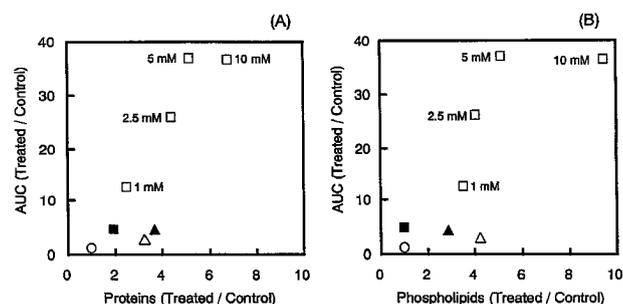


Fig. 4. Correlation between AUC of Azetirelin and Release of Protein (A) and Phospholipid (B) from the Large Intestinal Membrane in the Presence of Various Absorption Enhancers by *in situ* Closed Loop Experiments

Enhancers except LM were used at the concentration of 10 mM.

Keys: (○) Control, (▲) EDTA, (△) Sodium glycocholate (NaGC), (■) Citric acid (CA), (□) n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (LM).

のプロットの位置関係から明らかなように、ラウリルマルトシドは 5mM 以下の比較的 low 濃度において、その傷害性に比較して高い促進効果を示した。しかしながら、こうした低濃度のラウリルマルトシドを除き、吸収促進剤の促進効果と粘膜傷害性の間には比較的良好な相関関係がみられ、促進効果の強い添加物は同時に粘膜傷害性も有していることがわかる。したがって、今後さらに促進効果が強く、なおかつ粘膜傷害性の少ない理想的な吸収促進剤の開発が期待される。

最近、一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) が細胞間経路の tight junction を開口させ、水溶性薬物の透過性を増大させることが報告されている。<sup>32)</sup> すなわち、宇都口らは、インスリンの直腸吸収に及ぼす NO 供与体の影響について検討し、S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) などの NO 供与体がインスリンの直腸吸収を増大させることを明らかにし

ている。<sup>32)</sup> また、彼らは、これら NO 供与体の消化管粘膜への傷害性についても検討し、その傷害性は臨床応用されているカプリン酸ナトリウムよりも軽微であることも報告している。<sup>32)</sup> また、我々も同様に NO 供与体による吸収促進効果が *in vitro* 吸収実験系においてもみられることを明らかにしている。<sup>28)</sup>

一方、Junginger らのグループは、キトサン並びにその誘導体が、Caco-2 細胞において難吸収性薬物の消化管吸収性を増大させることを報告している。<sup>33,34)</sup> これら新規添加物の安全性についてはさらに検討する必要があると思われるが、こうした新しいタイプの添加物が難吸収性薬物の吸収促進剤として利用できればペプチド性医薬品の経口投与製剤の開発にもつながるものと期待される。

さらに、最近の研究では難吸収性薬物として知られている薬物のうち、一部の薬物は消化管から吸収された後、再び P 糖タンパク質などの排出輸送系により消化管管腔内に排出されて見掛け上吸収が悪く考えられている薬物も少なくない。したがって、こうしたタイプの薬物は、P 糖タンパク質などの排出輸送系を抑制すれば、経口投与後の消化管吸収性を改善することができると考えられる。

Borchardt らは、Caco-2 細胞系において非イオン性界面活性剤の一種である cremophor EL が P 糖タンパク質により排出されることが知られているモデルペプチドの排出を抑制することにより apical 側から basolateral 側への輸送を増大させることを明らかにしている。<sup>35,36)</sup> また、我々も、ペプチドではないが、P 糖タンパク質の基質である rhodamine123 の消化管での排泄が非イオン性界面活性剤により抑制されることを見出しており、これら界面活性剤を用いれば消化管における薬物の排出輸送を抑制でき、消化管吸収の改善につながるものと期待される。

**2-2. タンパク分解酵素阻害剤** 生理活性ペプチドの中には、分子量が比較的小さく膜透過性自体はそれほど悪くないにもかかわらず、実際には経口投与後ほとんど吸収されないものが見受けられる。この原因の 1 つはこれらペプチドが、消化管内や肝臓において代謝を受け、分解されることによる。こうしたペプチドの例としては、消化管内で分解されやすいインスリン、エンケファリンなどがあ

げられる。したがって、こうした生理活性ペプチドの消化管吸収を改善するためには、これらタンパク分解酵素の活性を抑制するタンパク分解酵素阻害剤の利用が有力な手段となる。<sup>1)</sup>

Table 4 は、現在までに生理活性ペプチドの吸収改善に利用されている各種タンパク分解酵素阻害剤の例をまとめたものである。Table 4 に示したように、吸収促進剤の場合と同様、種々のタンパク分解酵素阻害剤が生理活性ペプチドの吸収改善に利用されていることがわかる。

こうした酵素阻害剤は(1)ペプチドの分解に関与する酵素の活性を阻害する、(2)ペプチドの安定性を増大させる、(3)ペプチドの粘膜透過性を改善するという 3 つの過程によりペプチドの経粘膜吸収性を改善するものと考えられる。そこで本項ではこれら(1)-(3)の過程についてインスリンをモデルペプチドとして用いた例を紹介する。

まず我々は、消化管各部位における各種タンパク分解酵素活性の測定を行った。Figure 5 は、小腸粘膜ホモジネート、小腸管腔内液、大腸粘膜ホモジネート、大腸管腔内液、肺組織ホモジネートにおける各種タンパク分解酵素活性を測定した結果を示したものである。本実験では endopeptidase として trypsin 及び chymotrypsin, elastase を、exopeptidase (aminopeptidase) として aminopeptidase N、

Table 4. Enhancement of Intestinal Absorption of Peptides/Proteins by Various Protease Inhibitors

Peptides/proteins	Protease inhibitors	Animals
Insulin	Soybean trypsin inhibitor	Rats
Insulin, Pancreatic RNase	Aprotinin	Rats
Insulin	Aprotinin	Rats
Insulin	FK-448	Rats Dogs
Vasopressin and 1-Di-amino-8-D-arginine vasopressin	Aprotinin	Rats
Leu-enkephalin and analogues	Amastatin	Rats
Granulocyte colony-stimulating factor	Ovalbumin, Casein, Mucin, Keratin	Rats
Insulin	Soybean trypsin inhibitor, Chymostatin, Aprotinin, Bowman-Birk inhibitor	Rats
Insulin	Soybean trypsin inhibitor, Bacitracin, Aprotinin	Rats

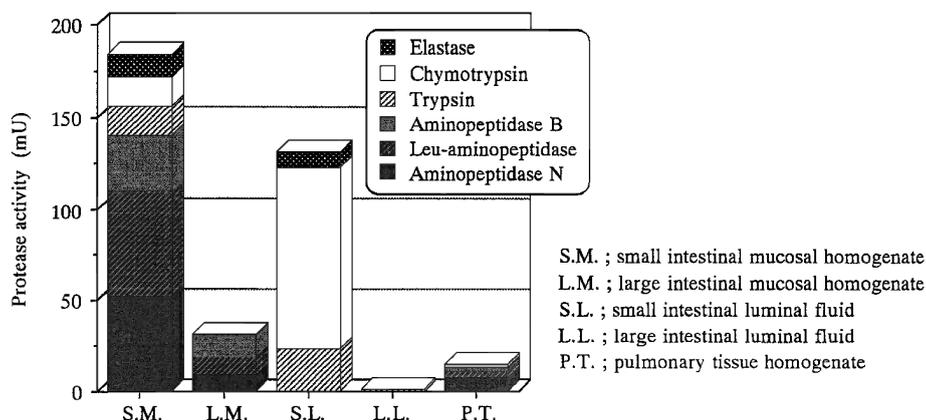


Fig. 5. Net Activities of Various Proteases along the Intestine and Lung of Rats  
The data represent the average hydrolysis rates (mU). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

leucine aminopeptidase 及び aminopeptidase B の活性を測定し、これらの値に各組織中におけるタンパク量をかけあわせ、各タンパク分解酵素の総量について示した。これにより投与されたペプチドがどの部位で実際に分解を多く受ける可能性があるかを推測できると考えられる。その結果、小腸では粘膜ホモジネート、管腔内液の両部位でタンパク分解酵素の活性が高く、対照的に大腸では極めて低いことが認められた。またこれらの部位における全酵素量を比較すると、小腸におけるタンパク分解酵素活性量は、大腸の粘膜中に比べ約 6 倍、管腔内液中で約 250 倍となり、極めて多いことが確認された。また、小腸管腔内液中において chymotrypsin が、また小腸粘膜ホモジネートにおいて aminopeptidase N 及び leucine aminopeptidase が比較的高い活性を有していることが明らかとなり、これらのことよりペプチド分解の面から考慮すると大腸はペプチドの投与経路として有用な部位であることが示唆された。肺においても種々のタンパク分解酵素の存在が明らかとなったが、小腸と比較するとその活性は低く、大腸と同様に肺もペプチドの投与経路として有用な経路の 1 つであると考えられる。また、消化管各部位における酵素分布を比較したところ、管腔内には endopeptidase、粘膜内には aminopeptidase が多く存在することが確認され、過去の報告と一致した結果が得られた。

Figure 6 は、消化管におけるタンパク分解酵素活性に及ぼすタンパク分解酵素阻害剤の阻害効果について検討した結果を示している。小腸管腔内液中で高い活性が認められていた trypsin, chymotrypsin,

elastase 活性は、serine protease inhibitor である大豆トリプシンインヒビター (0.1 mM)、アプロチニン (0.1 mM) により約 60% からほぼ完全に阻害された。また、trypsin 活性に対しては、同様に serine protease inhibitor であるメシル酸カモスタット (0.1 mM) によって約 97% が阻害され、後に示すインスリンの吸収実験又は安定性実験で得られた結果と非常によく一致する結果となった。しかしながら、バシトラシン及びグリココール酸ナトリウムには高濃度でも顕著な抑制効果は認められず、これらタンパク分解酵素阻害剤では小腸管腔内液中のタンパク分解酵素を阻害するには不十分であることが示唆された。一方、aminopeptidase である aminopeptidase N, leucine aminopeptidase は、serine protease inhibitor (0.1 mM) により阻害されなかったのに対し、バシトラシン (1.0 mM)、グリココール酸ナトリウム (1.0 mM) により顕著に阻害された。Aminopeptidase B に関しては、タンパク分解酵素阻害剤の阻害効果が確認されたものの阻害率は低く、特異性については確認できなかった。このように、小腸管腔内液中に存在する trypsin, chymotrypsin, elastase 活性は、大豆トリプシンインヒビター、カモスタットなどの serine protease inhibitor により、また aminopeptidase N, leucine aminopeptidase などの aminopeptidase 活性は、バシトラシン、グリココール酸ナトリウムにより有意に阻害されることが明らかとなり、タンパク分解酵素阻害剤による酵素活性の阻害に特異性がみられることが明らかとなった。

以上のことから、消化管に存在するタンパク分解

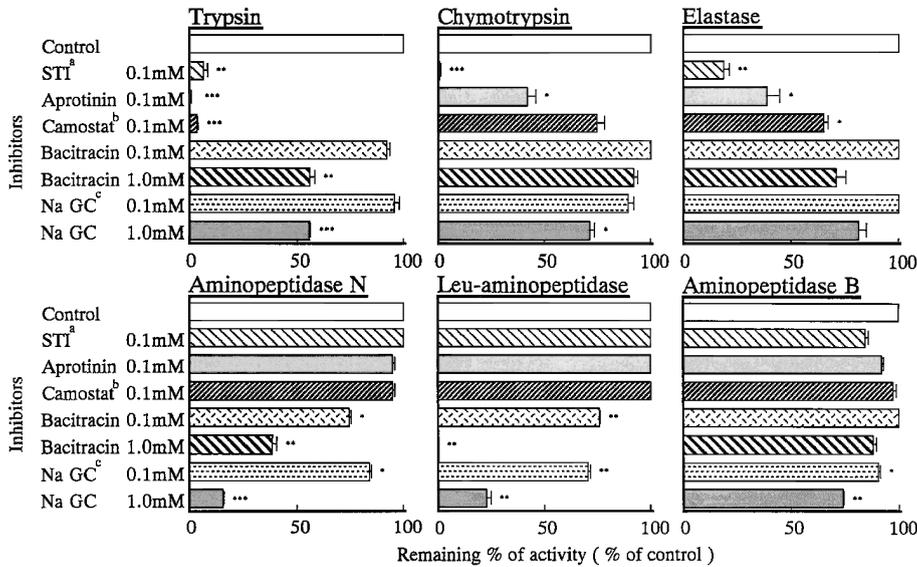


Fig. 6. Effect of Various Protease Inhibitors on Protease Activities in the Small Intestinal Fluids and Mucosal Homogenates of Rats  
 a) Soybean trypsin inhibitor, b) camostat mesilate, c) sodium glycocholate. Results are expressed as the mean±S.E. of three experiments. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ , compared with the control.

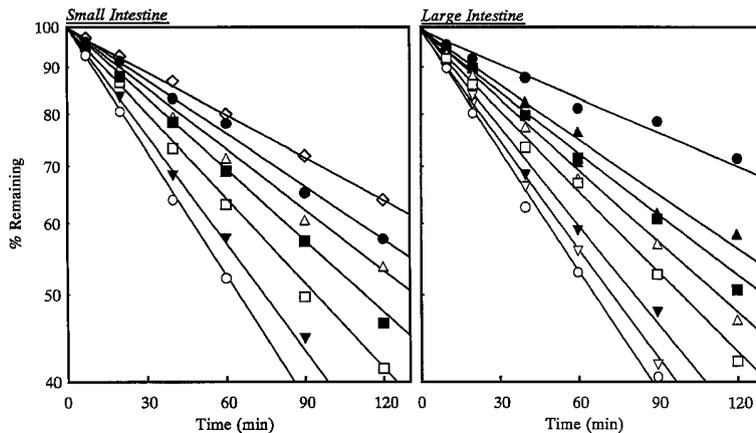


Fig. 7. Effect of Various Protease Inhibitors on the Degradation of Insulin in the Small and Large Intestinal Mucosal Homogenates  
 Keys: (○) Control, (△) 20 mM sodium glycocholate (NaGC), (◇) 50 mM sodium glycocholate (NaGC), (□) 10 mg/ml aprotinin, (■) 20 mM camostat mesilate, (▽) 1.5 mg/ml soybean trypsin inhibitor, (▼) 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor, (▲) 10 mM bacitracin, (●) 20 mM bacitracin. Each point represents the mean of three experiments.

酵素の分布並びにその酵素活性の抑制に有効な酵素阻害剤の種類が明確になったので、次に実際のペプチドの安定性に及ぼす各種タンパク分解酵素阻害剤の影響について検討した。

Figure 7は小腸及び大腸粘膜ホモジネート中におけるインスリンの分解に及ぼす各種タンパク分解酵素阻害剤の影響の経時変化を示したものである。図から明らかなように、小腸及び大腸いずれの部位においてもインスリンの分解は、グリココール酸ナトリウムやバシトラシンなどのタンパク分解酵素阻害剤により顕著に抑制され、これら阻害剤は消化管に

おいてインスリンの分解を抑制し吸収を改善することが示唆された。

また、Table 5は各種タンパク分解酵素阻害剤存在下におけるインスリンの分解半減期  $T_{1/2}$  を示している。種々のタンパク分解酵素阻害剤を添加したときの小腸粘膜ホモジネート中におけるインスリンの分解半減期は 50 mM グリココール酸ナトリウム > 20 mM バシトラシン > 20 mM グリココール酸ナトリウム > 20 mM メシル酸カモスタット > 10 mg/ml アプロチニン > 10 mg/ml 大豆トリプシンインヒビターの順で延長した。また大腸粘膜ホモジネート

Table 5. Effects of Protease Inhibitors on Half-Lives of Insulin Hydrolysis in Homogenates of the Small and Large Intestines

	Small intestine		Large intestine		
	T <sub>1/2</sub> (min)	Ratio	T <sub>1/2</sub> (min)	Ratio	
Control	66.1±3.8	1.0	71.3±2.6	1.0	
NaGC <sup>a)</sup>					
	(20 mM)	144.0±4.0***	2.2	111.9±2.3***	1.6
	(50 mM)	187.3±6.5***	2.8	—	—
Aprotinin	(10 mg/ml)	98.4±5.7	1.5	103.0±4.7*	1.5
Camostat	(20 mM)	113.6±2.2***	1.7	137.8±6.6**	1.9
STI <sup>b)</sup>	(1.5 mg/ml)	—	—	81.7±9.1	1.2
	(10 mg/ml)	74.3±4.6	1.1	89.9±1.0*	1.3
Bacitracin	(10 mM)	—	—	168.2±8.9**	2.4
	(20 mM)	165.2±3.2***	2.5	301.3±4.2***	4.2

a) Na Glycocholate. b) Soybean trypsin inhibitor.

The T<sub>1/2</sub> values are expressed as the mean±S.E. of 3 experiments.

(\*) :  $p < 0.05$ , (\*\*) :  $p < 0.01$ , (\*\*\*) :  $p < 0.001$ , compared with the control.

中においても、インスリンの分解半減期はタンパク分解酵素阻害剤の添加により約 1.5–4.2 倍延長し、有意な分解酵素阻害効果を示した。したがって小腸及び大腸両粘膜ホモジネート中におけるインスリンの安定性は、各種タンパク分解酵素阻害剤により改善され、その効果に部位差は認められないことが明らかとなった。また今回使用した阻害剤の中では 20 mM バシトラシンの分解抑制効果が最大となった。

次に小腸管腔内液中におけるインスリンの安定性に及ぼす各種タンパク分解酵素阻害剤の効果を検討したところ、インスリンは管腔内液中では非常に不安定で、速やかに分解されることが明らかとなった。またインスリンの分解半減期は、endopeptidase を顕著に阻害する 10 mg/ml 大豆トリプシンインヒビターを併用した場合に、有意な延長が確認された。また、同様の検討を大腸管腔内液を用いて行った結果、インスリンの分解はほとんど確認されなかった。

さらにこうした知見を元にインスリンの消化管吸収に及ぼす各種タンパク分解酵素阻害剤の影響について検討した。吸収実験は、*in situ* 腸管ループを用い、小腸並びに大腸にループを作成後、ループ内に薬液を投与することにより行った。その結果、小腸ループ内にインスリンを単独投与しても血糖降下作用は観察されなかった。また、小腸において、インスリンに各種タンパク分解酵素阻害剤を併用した場合においてもほとんど血糖値の低下はみられず（図

には示していない）、これら阻害剤はインスリンの小腸からの吸収を改善しないことが明らかとなった。一方、大腸において同様の実験を行ったところ、インスリンの単独投与では小腸と同様、血糖降下作用は観察されなかったのに対し、グリココール酸ナトリウム、メシル酸カモスタット及びバシトラシンなどのタンパク分解酵素阻害剤の併用により顕著な血糖降下作用が観察された (Fig. 8)。

Table 6 は、インスリンの小腸及び大腸吸収における各種タンパク分解酵素阻害剤の効果を投与後 4 時間までの血糖値の面積減少率 (D%) 及び薬理学的利用能 (PA%) を指標としてまとめたものである。この表より、これらタンパク分解酵素阻害剤の効果は小腸よりも大腸部において顕著にみられ、インスリンの消化管吸収に及ぼすタンパク分解酵素阻害剤の効果に部位差がみられることが明らかとなった。

さらに、最近、こうしたタンパク分解酵素阻害剤の一部が、消化管内で安定な水溶性物質の吸収を増大させる作用を有することも知られている。<sup>14,15)</sup>

Figure 9 は、フェノールレッドの小腸並びに大腸投与後の血漿中濃度に及ぼす各種タンパク分解酵素阻害剤の効果を示したものである。小腸におけるフェノールレッドの吸収は、タンパク分解酵素阻害剤である 10 mM, 20 mM バシトラシンの添加によりコントロールに比べ増大したが、大豆トリプシンインヒビター、アプロチニンの場合には吸収促進効果は認められなかった。また、大腸においても同様の傾

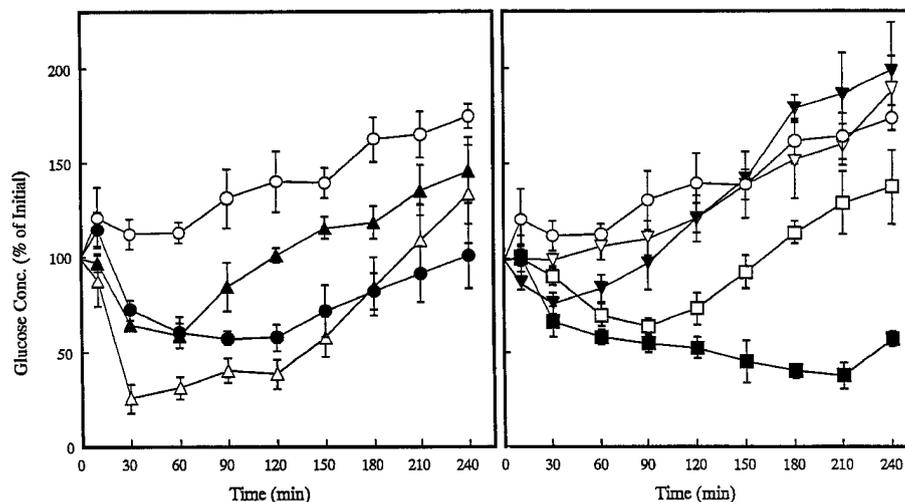


Fig. 8. Concentration-Time Profiles of Glucose in Plasma after Large Intestinal Administration of Insulin in the Presence of Various Protease Inhibitors

Keys: (○) Control, (△) 20 mM sodium glycocholate (NaGC), (▲) 10 mM bacitracin, (●) 20 mM bacitracin, (□) 10 mg/ml aprotinin, (■) 20 mM camostat mesilate, (▽) 1.5 mg/ml soybean trypsin inhibitor, (▼) 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor. Each point represents the mean ± S.E. of 4 rats.

Table 6. Effects of Various Protease Inhibitors on the Small and Large Intestinal Absorption of Insulin

Protease inhibitors	Conc.	Small intestine		Large intestine	
		D%	PA% <sup>c)</sup>	D%	PA% <sup>c)</sup>
Control	—	0.00	0.00	0.00	0.00
NaGC <sup>a)</sup>	20 mM	2.32 ± 1.14	0.26	45.31 ± 4.05**	5.13
	50 mM	2.89 ± 1.18	0.33	—	—
Aprotinin	10 mg/ml	0.22 ± 0.22	0.03	14.38 ± 2.42*	1.63
Camostat	20 mM	1.19 ± 0.87	0.13	44.79 ± 4.88*	5.07
STI <sup>b)</sup>	1.5 mg/ml	—	—	0.95 ± 0.44	0.11
	10 mg/ml	0.84 ± 0.33	0.10	6.23 ± 2.19	0.70
Bacitracin	10 mM	—	—	11.69 ± 1.86*	1.32
	20 mM	0.00	0.00	30.99 ± 1.98**	3.51

a) Na Glycocholate. b) Soybean trypsin inhibitor. c) Pharmacological availability % =  $\frac{\% \text{G.I.}}{\text{D}\% \text{I.V.}} \times \frac{\text{Dose I.V.}}{\text{Dose G.I.}} \times 100$

The D% values are expressed as the mean ± S.E. of 4 rats.

(\*) :  $p < 0.05$ , (\*\*) :  $p < 0.01$ , compared with the control.

向がみられたが、大腸では 20 mM のバシトラシンを併用した際のフェノールレッドの血漿中濃度が、他の阻害剤併用時に比べ顕著に高くなった。フェノールレッドは消化管内で安定であり、また同様の結果が消化管で安定な水溶性高分子物質である fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (平均分子量約 4,000, FD4) でも観察されている。したがって、これら阻害剤の一部が本来のタンパク分解酵素阻害作用のみならず吸収促進作用も有していると考えられる。

### 3. 薬物の新規投与経路の開発

従来、経口投与でほとんど吸収されない薬物は、注射により投与されることが一般的であったが、注射は患者に苦痛を伴い、また頻回投与の際のアレルギー反応や局所組織への傷害性などの副作用が発現する可能性がある。そこで現在、こうした経口や注射に代わる投与経路として、鼻、口腔、眼、肺、膣、直腸などの各種粘膜吸収経路を利用する研究が進められている。<sup>4)</sup> こうした粘膜吸収部位は消化管と形態学的に異なり、また消化酵素による分解を受けないため、経口投与で吸収されにくい薬物でも吸

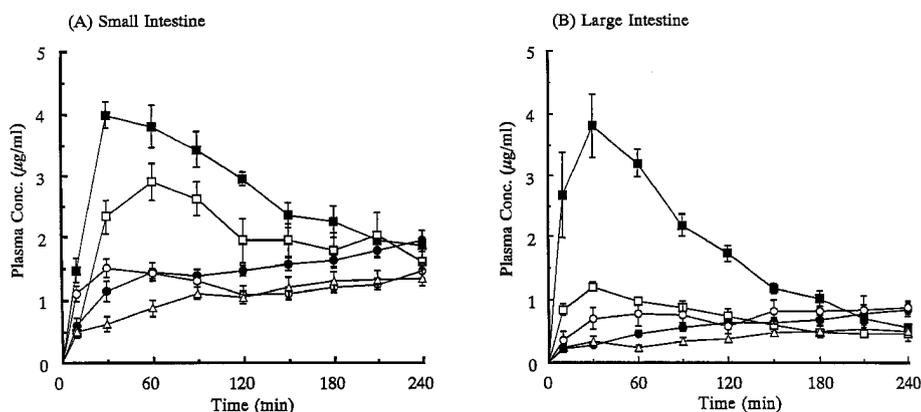


Fig. 9. Plasma-Concentration-Time Profiles of Phenol Red after (a) Small or (b) Large Intestinal Administration in the Presence of Various Protease Inhibitors

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four experiments. Keys: (●) Control, (□) 10 mM bacitracin, (■) 20 mM bacitracin, (○) 0.5 mg/ml aprotinin, (△) 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor.

収される可能性がある。また経粘膜から吸収された薬物は肝臓を経ることなく直接全身循環に到達するため、肝臓での初回通過効果を受けやすい薬物にとっても好都合である。

これら投与経路のうち、薬物の経肺吸収は、比較的高分子薬物に対しても透過性が良好であることから生理活性ペプチドの全身作用を期待した投与経路として注目されている。<sup>44)</sup> 薬物の経肺吸収性が良好な原因は、肺の上皮細胞が非常に薄い構造を有しており、肺胞腔内と毛細血管との間の距離は極めて短いことと肺胞の数は非常に多く、その総表面積は極めて広いことによると考えられている。

Table 7は、カルシトニンの経肺吸収に及ぼす各種吸収促進剤の影響を示したものである。この場合、経肺吸収実験は、*in vivo* 気管内投与法により行い、血漿中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定することによりカルシトニンの経肺吸収性を評価した。その結果、カルシトニンの経肺吸収は、キレート剤である EDTA を併用しても大きな影響が認められなかったが、ラウリルマルトシド、グリココール酸ナトリウム、脂質-界面活性剤混合ミセルである mixed micelle (MM) の併用により顕著に増大することが明らかとなった。<sup>47)</sup> こうした結果は、従来消化管からほとんど吸収されない高分子の生理活性ペプチドの臨床適用に際し、新しい投与方法の可能性を示唆するものと考えられる。また、インスリンに関しても、その経肺吸収が各種吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤の併用により増大することが報告されている。<sup>40)</sup> したがって、従来消化管からほとんど吸収

Table 7. Effects of Various Absorption Enhancers on the Pulmonary Absorption of ECT

Absorption enhancers	Conc.	% Reduction of Ca conc. (A%)	PA% <sup>a)</sup>
Control		3.5 $\pm$ 1.3	13.2
LM	1 mM	11.9 $\pm$ 1.3**	44.7
	5 mM	20.1 $\pm$ 1.1***	75.6
	10 mM	21.7 $\pm$ 2.4***	81.7
NaGC	10 mM	14.1 $\pm$ 2.0**	52.9
MM	10 mM	13.9 $\pm$ 2.2**	52.3
EDTA	10 mM	6.4 $\pm$ 0.8	24.0

(\*\*):  $p < 0.01$ , (\*\*\*) :  $p < 0.001$ , compared with the control.

The A% values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of 4 experiments.

<sup>a)</sup> Pharmacological availability % =  $\frac{\text{A\% pul.}}{\text{A\% i.v.}} \times \frac{\text{Dose i.v.}}{\text{Dose pul.}} \times 100$

されない生理活性ペプチドをはじめとする高分子薬物や難吸収性薬物の吸収改善を達成する上で、経肺投与は極めて有力な投与方法であると考えられる。

さらに、最近、アフリカツメガエルの肺組織、ヒト肺癌細胞由来の上皮様細胞株 A549 細胞、ラット肺胞培養上皮細胞膜 (Rat alveolar epithelial cell monolayers, RAEM) を用いた薬物の *in vitro* 肺上皮細胞透過実験方法が確立され、これら *in vitro* 実験法により得られた結果は、*in vivo* の実験結果と極めて高い相関性が認められることが明らかになっている。したがって、今後これら *in vitro* 実験系も薬物の経肺吸収性を評価する有用な方法になるものと考えられる。

#### 4. 薬物の分子構造修飾

前項で示したように、吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤などの添加物を利用する生体側の修飾は

ペプチド性医薬品の吸収改善に極めて有用なアプローチである。しかしながら、こうした添加物は、対象とする薬物のみならず、産生毒素、ウイルスなどの他の有害物質の吸収とも増大させる可能性を併せ持っており、ペプチド性医薬品の選択的な吸収改善という点では有効なアプローチとは言い難い。また、これら添加物は消化管吸収部位に適用する際、一時的にせよ粘膜への傷害性を発現させる可能性があり、有効でなおかつ安全性の高い理想的な添加物は現在のところ開発されていない。そこで、最近、ペプチド性医薬品の分子構造自体を化学修飾し、プロドラッグやアナログを合成することにより吸収を改善する試みがなされている。こうした観点から、我々は本来投与部位において不安定で吸収性の悪いインスリン、カルシトニン、エンケファリン、テトラガストリン、thyrotropin releasing hormone (TRH) などの各種生理活性ペプチドの分子構造に鎖長の異なる脂肪酸により化学的に修飾を施し、これら生理活性ペプチドの投与部位における安定性や吸収性の改善を試みてきた。<sup>48-61)</sup> 本稿では各種ペプチド性医薬品のうち、インスリンのアシル化誘導体の吸収性、安定性について紹介する。

まず、モデルペプチドであるインスリン (bovine insulin; MW = 5730) に鎖長の異なる脂肪酸を導入することによりアシル化インスリンを合成した。脂肪酸として、C<sub>6</sub> のカプロン酸、C<sub>12</sub> のラウリン酸、C<sub>16</sub> パルミチン酸を選び、これら脂肪酸をアジド法によりそれぞれ 1 あるいは 2 分子導入した Cap-1, Cap-2, Lau-1, Lau-2, Pal-1, Pal-2 を合成した (Fig. 10)。

脂肪酸修飾を施した後のインスリンの残存活性は、それぞれの未修飾ペプチドを静脈内投与後の薬理活性 (血糖降下作用) を 100% として評価した (Fig. 11)。その結果、全体的に脂肪酸の個数及び炭素鎖長の増大に伴いそれらの活性は低下する傾向を示したが、Cap-1, Cap-2, 及び Lau-1 は比較的高い活性を保持していることが確認された。

そこで次に薬理活性が比較的保持されていたインスリンのカプロイル誘導体を選び、消化管吸収性を検討した。Figure 12, Table 8 は 20 IU/2 ml のインスリン及びそのカプロイル誘導体をラット小腸及び大腸ループ投与後の血漿中グルコース濃度の時間推移とこれより得られる PA% を示している。小腸で

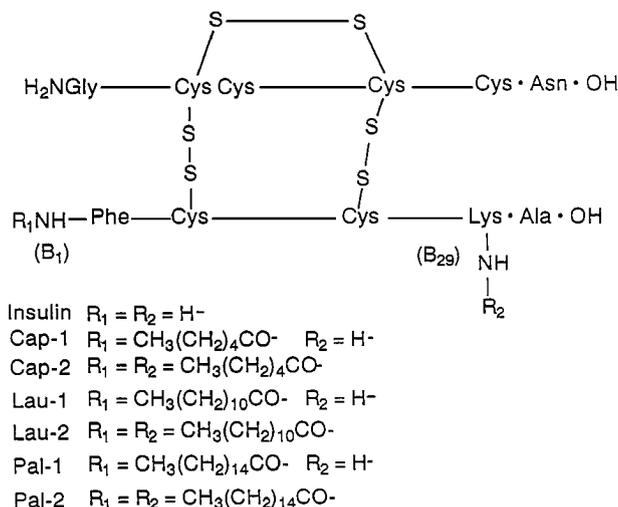


Fig. 10. Structure of Insulin and Its Acyl Derivatives

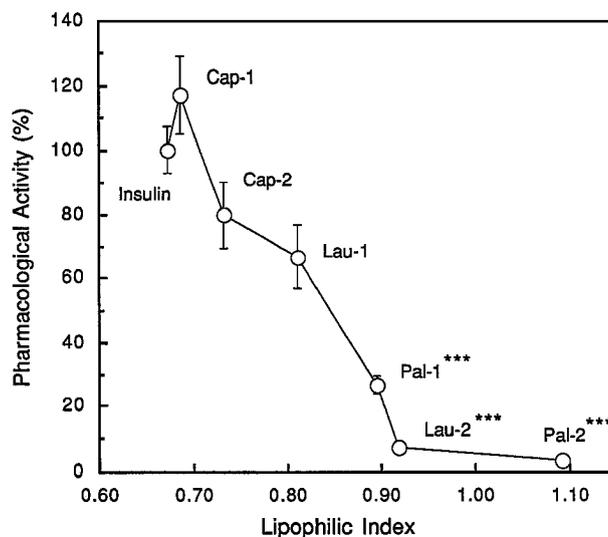


Fig. 11. Correlation between Relative Pharmacological Activity and Lipophilic Index of Various Acyl Derivatives of Insulin Following Intravenous Injection in Rats

Error bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three rats. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , significantly different from native insulin.

の Cap-1 及び Cap-2 の PA% は、未修飾インスリンと比較して 4.8 倍、7.2 倍とそれぞれ高い値を示したが、それらの PA% は約 0.16% であり、脂肪酸修飾により吸収は改善されたものの十分な吸収率は得られなかった。一方、Cap-2 の大腸ループ投与後の PA% は、もとのインスリンと比べ 11.7 倍高い値を示し、約 1.06% にまで改善された。

次にこれらカプロイル化インスリンの粘膜透過性について *in vitro* Ussing chamber 法を用いて検討した。Figure 13 はインスリン及びカプロイル化イン

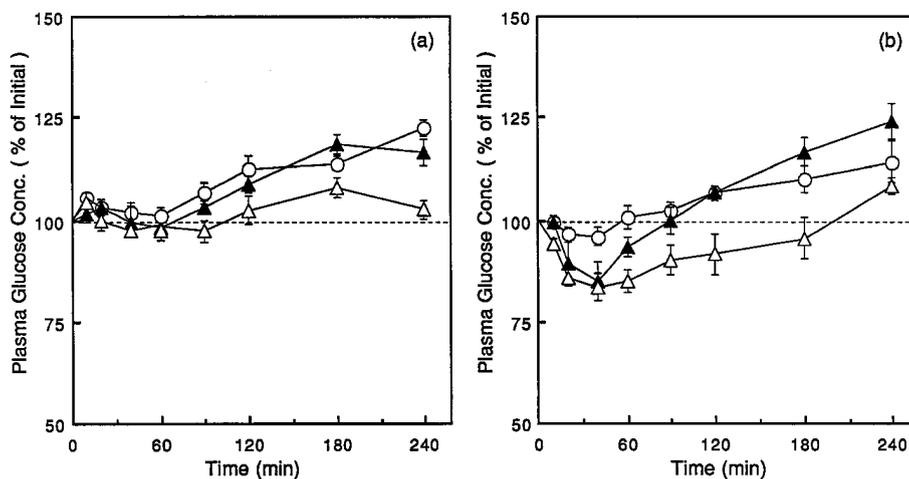


Fig. 12. Plasma Glucose Profiles after (a) the Small and (b) the Large Intestinal Administration of Insulin and Its Caproyl Derivatives to Rats

The error bar represents the mean  $\pm$  S.E. of four rats. Keys: (○) native insulin, (▲) Cap-1, (△) Cap-2.

Table 8. Absorption Characteristics of Insulin and Its Caproyl Derivatives from the Small and Large Intestines

	% <sub>min</sub>	T <sub>min</sub> (min)	P.A. (%) <sup>a)</sup>	Ratio
<u>Small intestine</u>				
Native insulin	98.3 $\pm$ 1.06	35.0 $\pm$ 17.5	0.021 $\pm$ 0.017	1.0
Cap-1	93.2 $\pm$ 1.14	42.5 $\pm$ 10.2	0.104 $\pm$ 0.041	4.8
Cap-2	95.3 $\pm$ 1.62	57.5 $\pm$ 17.1	0.160 $\pm$ 0.055	7.2
<u>Large intestine</u>				
Native insulin	95.3 $\pm$ 1.23	40.0 $\pm$ 7.07	0.091 $\pm$ 0.036	1.0
Cap-1	80.7 $\pm$ 1.75	35.0 $\pm$ 4.33	0.294 $\pm$ 0.052*	3.2
Cap-2	80.4 $\pm$ 2.45	70.0 $\pm$ 15.0	1.064 $\pm$ 0.315*	11.7

a) Pharmacological availability (%)

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

(\*) :  $p < 0.05$ , significantly different from native insulin.

スリンの十二指腸及び結腸粘膜透過性を、Table 9 はこれら各条件における薬物の透過係数  $P_{app}$  を示している。十二指腸、結腸ともにこれらペプチドの透過性は  $Cap-2 > Cap-1 > Insulin$  の順となり、Fig. 12 の *in situ* ループ内投与実験の結果と同様の傾向が確認された。また十二指腸における Cap-1 及び Cap-2 の粘膜透過係数 ( $P_{app}$ ) はインスリンと比較してそれぞれ 2.1 倍、3.4 倍、また結腸におけるこれら誘導体の透過係数はそれぞれ 4.4 倍、7.8 倍の値を示した。以上の結果からこうしたインスリンの粘膜透過性は脂肪酸修飾による脂溶性の増大により顕著に改善されることが明らかとなった。

次に、小腸管腔内及び小腸粘膜ホモジネート中における各種脂肪酸修飾インスリン誘導体の安定性実

験について検討を行うとともに、インスリンの安定性及び会合性に及ぼす脂肪酸修飾の影響を円二色性 (CD) スペクトルを用いて検討した。Table 10 にインスリン及び脂肪酸修飾インスリンの小腸管腔内液中及び小腸粘膜ホモジネート中での分解半減期を示した。モノアシル化体においては脂肪酸の鎖長の増大に伴い、分解半減期の延長傾向が認められるのに対し、ジアシル化体においては未修飾インスリンと同程度若しくは逆に分解が促進される傾向が認められた。Figure 14 にインスリン及び各脂肪酸修飾インスリンの CD スペクトルを示した。インスリンは pH 7 付近においては大部分が 6 量体で存在することが知られているが、その 6 量体はまず B-鎖の C 末端側同士の疎水結合により 2 量体が形成され、

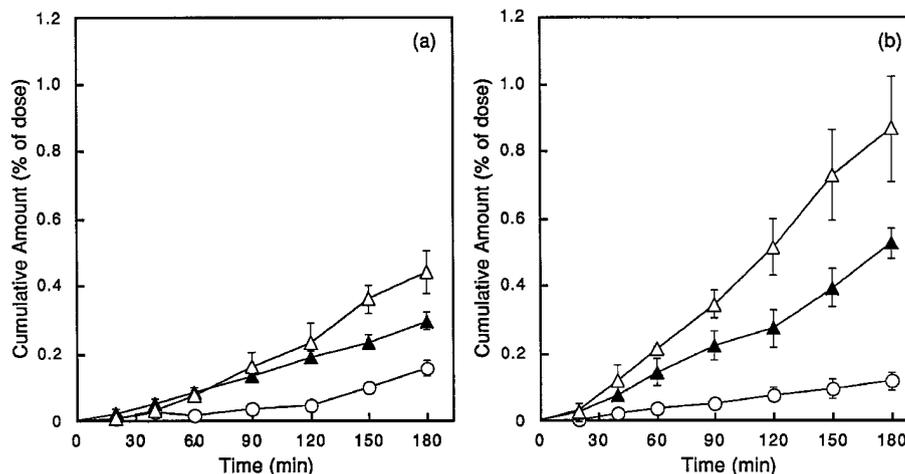


Fig. 13. Transport of Insulin and Its Acyl Derivatives across (a) the Duodenal and (b) Colonic Mucous Membranes  
Error bar represents the mean  $\pm$  S.E of three or four rats. Keys: (○) native insulin, (▲) Cap-1, (△) Cap-2.

Table 9. Apparent Permeability Coefficients of Insulin and Its Caproyl Derivatives across the Duodenal and Colonic Mucous Membranes

	$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/sec)	Ratio	% in 3 hr	Ratio	Lag time (min)
<u>Duodenum</u>					
Native insulin	$0.485 \pm 0.099$	1.0	$0.154 \pm 0.026$	1.0	$27.9 \pm 7.39$
Cap-1	$1.008 \pm 0.059^{**}$	2.1	$0.297 \pm 0.026^{**}$	1.9	$11.1 \pm 5.81$
Cap-2	$1.667 \pm 0.209^{**}$	3.4	$0.440 \pm 0.062^{**}$	2.9	$29.4 \pm 3.44$
<u>Colon</u>					
Native insulin	$0.405 \pm 0.109$	1.0	$0.114 \pm 0.027$	1.0	$24.5 \pm 7.46$
Cap-1	$1.763 \pm 0.178^{***}$	4.4	$0.523 \pm 0.044^{***}$	4.6	$16.8 \pm 6.04$
Cap-2	$3.050 \pm 0.721^{**}$	7.8	$0.866 \pm 0.156^{**}$	7.6	$16.4 \pm 6.99$

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 3–4 experiments.

(\*\*) :  $p < 0.01$ , (\*\*\*) :  $p < 0.001$ , significantly different from native insulin.

Table 10. Half-Lives for Proteolysis of Insulin and Its Acyl Derivatives in the Homogenates of Various Intestinal Mucosae

	Duodenum		Jejunum		Ileum	
	$T_{1/2}$ (min)	Ratio	$T_{1/2}$ (min)	Ratio	$T_{1/2}$ (min)	Ratio
Native insulin	$58.0 \pm 2.3$	1.00	$20.5 \pm 1.7$	1.00	$63.0 \pm 1.1$	1.00
Cap-1	$72.4 \pm 5.7$	1.21	$28.8 \pm 1.4^*$	1.41	$82.9 \pm 4.2^*$	1.32
Cap-2	$68.4 \pm 4.4$	1.18	$27.9 \pm 4.1$	1.36	$26.0 \pm 0.4^{***}$	0.41
Lau-1	$143.2 \pm 4.6^{***}$	2.47	$20.3 \pm 3.9$	0.99	$107.5 \pm 9.3^*$	1.71
Lau-2	$29.8 \pm 1.7^{***}$	0.51	$6.9 \pm 1.0^{**}$	0.34	$21.2 \pm 2.4^{***}$	0.34
Pal-1	$199.3 \pm 15.7^{**}$	3.44	$35.2 \pm 3.7^*$	1.72	$152.7 \pm 6.4^{***}$	2.42

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

(\*) :  $p < 0.05$ , (\*\*) :  $p < 0.01$ , (\*\*\*) :  $p < 0.001$ , significantly different from the half-life for proteolysis of native insulin.

その後 B-鎖の C 末端側 (B<sub>23-28</sub>) と B 鎖の N 末端側に存在する芳香族アミノ酸残基間の疎水結合により 4 量体, 6 量体が形成されることが明らかとなり、この疎水結合が anti-parallel  $\beta$  構造をとるこ

とにより 270 nm 付近に円二色性を示すようになる。したがって、270 nm 付近の負の吸収スペクトルの減衰はインスリンの会合が抑制されていることを示唆する。モノアシル化体, ジアシル化体双方と

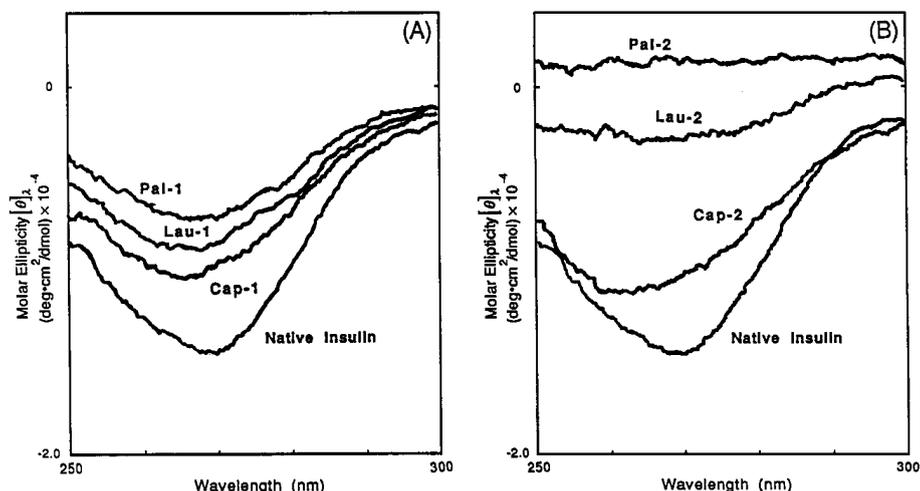


Fig. 14. The Circular Dichroic Spectra of 0.05 mM (A) Insulin and Monoacyl Derivatives and (B) Insulin and Diacyl Derivatives

も 270 nm 付近の負の吸収スペクトルの減衰が認められ、とくに Lau-2, Pal-2 ジアシル化体において顕著であった。こうした結果は、インスリンの会合性が脂肪酸修飾、とりわけ B<sub>1</sub>-Phe と B<sub>29</sub>-Lys への脂肪酸の導入により顕著に抑制されることを示すものであり、ジアシル化体は B<sub>29</sub>-Lys に導入された脂肪酸による立体障害が 2 量体の形成を、モノアシル化誘導体の場合は B<sub>1</sub>-Phe に導入された脂肪酸が 2 量体形成後の 4 量体、6 量体の形成を立体的に障害していると考えられる。よって、ジアシル化体が小腸管腔内及び粘膜ホモジネート中で不安定であった主要因が会合性の抑制によることが示唆された。しかしながら、モノアシル化体においてもその会合性が若干抑制されているにもかかわらず、未修飾インスリンよりも安定であったことから必ずしも会合性のみで説明することはできず、脂肪酸の導入による分解酵素に対する抵抗性が増大することも無視できないと思われる。このように、インスリンのアシル化修飾は、安定性に対し不利になる場合もみられるが、吸収性に関しては増大がみられることからインスリンの消化管吸収の改善に有用な方法であると考えられる。

同様の結果が、カルシトニン、<sup>56)</sup> テトラガストリン、<sup>50,53,60)</sup> エンケファリン<sup>56)</sup> や担体輸送により輸送される thyrotropin releasing hormone (TRH)、<sup>57)</sup> phenylalanyl-glycine (Phe-Gly)<sup>58)</sup> についても認められ、これらアシル化誘導体の吸収性は、元のペプチドに比べ増大することが明らかとなっている。した

がって、脂肪酸修飾によるアプローチは、受動輸送で輸送されるペプチドの消化管吸収改善のみならず、担体輸送で輸送されるペプチドに対しても有効な方法であると思われる。

また、最近、分子生物学の発展に伴い、消化管に各種のトランスポーターやレセプターが存在することが明らかになり、こうした生体の基質認識特性を利用して薬物の透過性を改善する試みもなされている<sup>62-69)</sup>。

### 5. 薬物の剤形修飾

薬物が消化管やその他の粘膜吸収部位において分解されやすい場合、投与部位に存在する分解酵素との接触を防止する剤形修飾が 1 つの有力な方法となる。こうした剤形修飾を試みる場合、通常、薬物を脂質分散系であるリポソームやエマルジョンに包含させることが多い。こうした剤形にインスリンなどの薬物を封入し、経口投与すると水溶液では消化管内で分解されやすい薬物が安定化され、吸収される。特に、最近、こうした生理活性ペプチドを消化酵素などの分解酵素が少なく分解されにくい大腸に特異的に送達し、大腸から薬物を吸収させる試みがなされている。<sup>74)</sup> こうした方法には pH 依存型の放出制御剤や時間依存型の放出制御剤や大腸で親薬物に変換するプロドラッグが用いられている場合が多い。また、大腸に豊富に存在する腸内細菌の酵素により分解するアゾポリマーでコーティングしたペレットを用いてインスリンの大腸特異的送達を試みる例も報告されている。<sup>76)</sup>

一方、最近、我々は大腸に存在する腸内細菌により特異的に崩壊するキトサンを素材としたカプセルを用い、インスリンの大腸からの吸収性が改善できることを見出した。<sup>70)</sup> すなわち、キトサンは、エビやカニの甲羅から取れる天然の多糖類であり、現在手術の縫合糸などの材料にも用いられている極めて安全性の高い物質であるが、この物質は大腸に豊富に存在する腸内細菌により特異的に崩壊することが知られている。したがって、このキトサンを用いてカプセルを調製すれば、このカプセルは腸内細菌の少ない胃や小腸では崩壊せず、大腸部位で特異的に崩壊し、内容薬物を放出することが期待できる。

キトサンは、キチンのアミノ基を脱アセチル化して得られるものであり、同じ多糖であるセルロースに類似している。本研究では分子量約 43,000、脱アセチル化度 83% のキトサンを用いてカプセルを調製した。また、本研究において、大腸特異的送達

法に用いたキトサンカプセルの断面図を Fig. 15 に示した。本研究では、アイセロ化学より供与された長径 3.5 mm、短径 1.6 mm のキトサンカプセルを用い、カプセル内に薬物を封入した。また、経口投与後、カプセルが胃内で崩壊するのを防ぐため、カプセル表面に hydroxypropylmethyl cellulose phthalate で腸溶性コーティングを施した。

Figure 16 に 8 時間絶食 Wistar 系雄性ラットにキトサンカプセルを経口投与後の消化管内移動について検討した結果を示した。カプセルの大部分は 0.5、1 時間後に胃に存在し、2、4、5 時間後には、カプセルのすべてが小腸に移行した。その後、8、10 時間後には盲腸から大腸部位に移行し、14 時間後には体外に排泄されていることが確認された。

以上の結果、キトサンカプセルは経口投与後、0-2 時間後は胃に残留し、2-6 時間で小腸部位に、それ以降は大腸部位に到達し、12 時間後まで大腸内を速やかに移行した後、体外に排泄されることが確認された。

キトサンカプセルからの内容薬物の放出試験は、日本薬局方回転バスケット法により行った。Figure 17 は、5(6)-carboxyfluorescein (CF) 封入キトサンカプセルからの CF の放出-時間曲線を示したものである。リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中では、内容薬物である CF の放出はほとんど確認されず、カプセルの崩壊はみられなかった。これに対して、経口投与時の体内動態を考慮して 0-2 時間目までは局方第 1 液、2-6 時間目までは局方第 2 液、6-12 時間目までは大腸内容物懸濁液中で溶出試験を行った結果、カプセルが大腸部位に存在していると考えられる 6 時

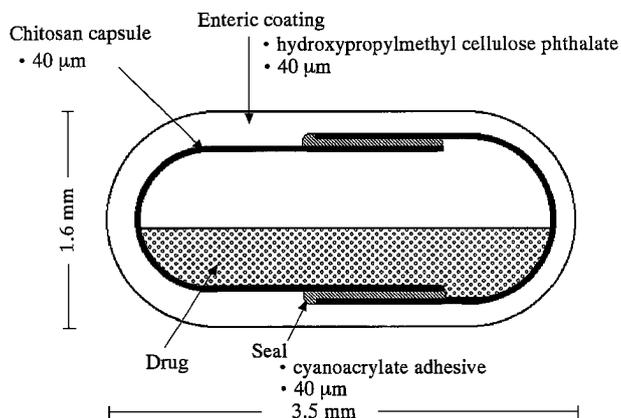


Fig. 15. Cross Section of Chitosan Capsules

hr	Stomach	S.I.1 <sup>a</sup>	2	3	4	5	6	7	8	Cecum	L.I.b	Ex. <sup>c</sup>
0.5	●●●●●●											
1	●●●●●●	●	●	●	●							
2					●	●●	●●●●●●	●				
4								●●●●	●●●●	●●		
5								●●●●●●●●	●●	●		
6									●●●●	●●●●●●		
8										●●●●●●●●		
10										●●●●●●●●	●●●	
12											●●●●●	●●●●●
14												●●●●●●●●

Fig. 16. Gastrointestinal Transit of Chitosan Capsules  
Key: a) small intestine, b) large intestine, c) excretion.

間目に大腸内容物懸濁液に置換することにより急激なCFの放出がみられ、カプセルが腸内細菌で特異的に崩壊することが明らかとなった。また、図には示していないが、大腸内容物懸濁液中におけるキトサンカプセルの表面構造について電子顕微鏡を用いて撮影した結果からもカプセルの経時的な崩壊が観察された。これらの結果より、経口投与したキトサンカプセルは大腸部位に到達した後、腸内細菌の作用で崩壊し、内容薬物を放出することが示唆された。

Figure 18 は、キトサンカプセル内に生理活性ペプチドのモデルとしてインスリンを封入し、インスリンの大腸からの吸収性を、キトサンカプセル経口投与後の(a)血漿中インスリン濃度一時間推移曲

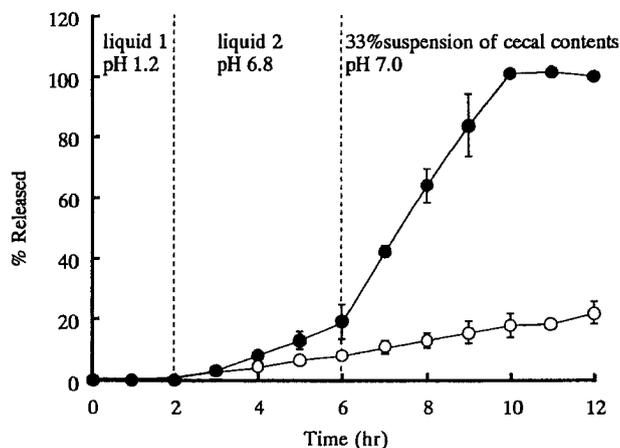


Fig. 17. Release of 5(6)-Carboxyfluorescein from Chitosan Capsules

Keys: (●) Liquid 1 (J. P.)→Liquid 2 (J. P.)→33% suspension of cecal contents, (○) phosphate buffered saline (pH 6.0). Results are expressed as the mean±S.E of two or four experiments.

線、(b)血糖値一時間推移曲線により示したものである。インスリンを封入したゼラチンカプセルを経口投与した結果、ほとんど血漿中インスリンのピーク及び血糖値の降下は確認されなかった。しかしながら、インスリンを封入したキトサンカプセルを経口投与した場合、血漿中インスリンピークは観察されなかったが、若干の血糖値の低下が観察された。一方、インスリン及び吸収促進剤であるグリココール酸ナトリウムを同時に封入したキトサンカプセルを経口投与した結果、顕著な血漿中インスリン濃度が観察された。さらに、インスリンにグリココール酸ナトリウム以外の添加物であるオレイン酸ナトリウムやアプロチニンを経口投与した結果についてもインスリンの吸収改善が達成できていることが知られている。

こうしたキトサンカプセルによるインスリンの大腸特異的送達並びに吸収改善の機構について Fig. 19 に図示した。すなわち、インスリン水溶液並びにインスリン封入ゼラチンカプセルを経口投与した(a)の場合、インスリンは胃、小腸部位において各種タンパク分解酵素により代謝され、循環血中に吸収されないため、血糖降下作用を示さない。これに対し、(b)のようにインスリンをキトサンカプセルに封入して経口投与を行った結果、インスリンは、胃、小腸部位においてカプセル中に存在するため、これらの部位で各種タンパク分解酵素による代謝を回避し、大腸部位に吸収されたと考えられる。その後、キトサンカプセルは大腸部位において大腸管腔内の腸内細菌により特異的に崩壊し、カプセルから

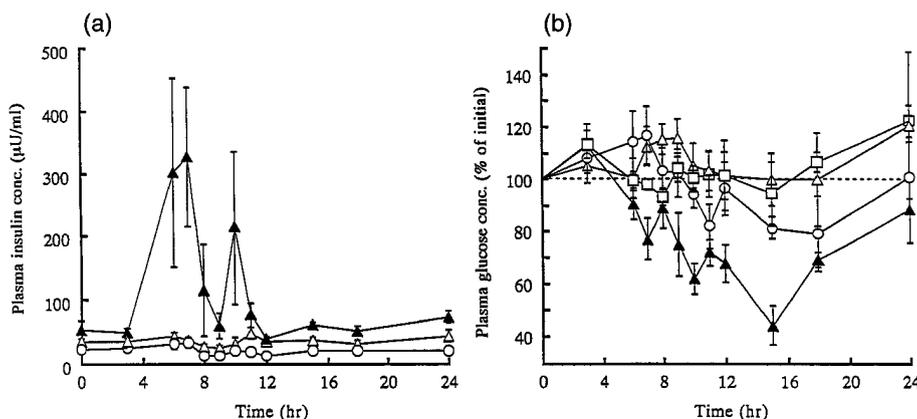


Fig. 18. Plasma Insulin (a) and Glucose (b) Concentrations after the Oral Administration of Chitosan Capsules

Keys: (△) solution (insulin 20IU), (□) gelatin capsules (insulin 20IU), (○) chitosan capsules (insulin 20IU), (▲) chitosan capsules (insulin 20IU; sodium glycocholate 9.8 mg).

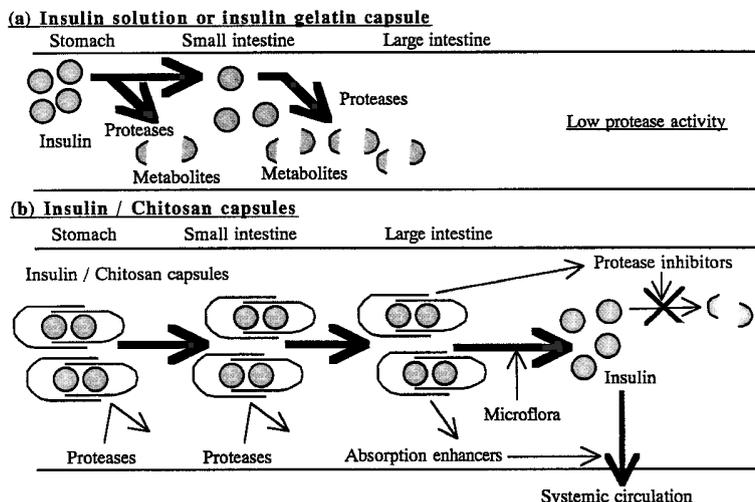


Fig. 19. Schematic Representation of Colon Specific Delivery of Insulin Using Chitosan Capsules

放出されたインスリンが循環血中に吸収されると考えられる。さらに、インスリンと共に併用した吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤によりインスリンの安定性や吸収性がさらに増大したものと考えられる。したがって、こうしたキトサンカプセルを用いた大腸特異的送達法を用いれば、インスリンをはじめとする生理活性ペプチドの経口投与製剤の開発につながる可能性があると思われる。

この他に、こうした生理活性ペプチドを不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、表面修飾リポソーム、ナノパーティクル、ナノスフェアなどの剤形を利用して吸収改善した例も報告され、<sup>77-81)</sup> こうした方法も有力な方法になりうると思われる。

## 6. おわりに

以上、本稿では、生理活性ペプチドの経粘膜吸収改善方法として、(1)吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤による生理活性ペプチドの消化管吸収性の改善、(2)生理活性ペプチドの経肺吸収、(3)脂肪酸修飾による生理活性ペプチドの消化管吸収性の改善、(4)キトサンカプセルを用いた生理活性ペプチドの大腸特異的送達法の開発に関する概略を中心に述べてきた。こうした生理活性ペプチドの各種吸収改善法は、現在未だ実用化されていないものが多いが、今後、こうした基礎的知見を踏まえてこれら生理活性ペプチドの経口製剤を始めとする経粘膜吸収製剤が開発されることが期待される。また、このような方法により、ペプチド性医薬品の経粘膜投与が可能になれば、これら医薬品の適用範囲は広がり、多くの

疾病の治療薬となることが予想される。

**謝辞** 本総説で紹介した研究は、主に京都薬科大学薬剤学教室（旧製剤学教室）で行われたものであり、終始御指導と御助言を賜りました京都薬科大学名誉教授村西昌三先生、藤田卓也助教授、村上正裕講師（現天籐製薬株式会社）、岡田直貴助手に深謝致しますと共に実験に協力頂きました多くの教室員の諸氏に厚く御礼申し上げます。また、生理活性ペプチドのアシル化修飾の共同研究として多大なる御支援を賜りました京都薬科大学薬品化学教室の木曾良明教授並びにその教室員の諸氏に心から感謝致します。さらに、キトサンカプセルをご供与頂いたアイセロ化学株式会社の鈴木 勉氏、松本隆幸氏、塚本善紀氏、寺部 亮氏に深謝致します。なお、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、私立薬科大学等経常費補助金特別補助（高度化推進研究）、上原記念生命科学財団研究助成金、三共生命科学財団研究助成金、中富健康科学振興財団研究助成金の援助のもとに行われました。ここに記して深く感謝の意を表します。

## REFERENCES

- 1) Lee V. H. L., Yamamoto A., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **4**, 171-207 (1990).
- 2) Lee V. H. L., Yamamoto A., Kompella U. B., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **8**, 91-192 (1991).

- 3) Yamamoto A., Luo A. M., Dodda-Kashi, S., Lee V. H. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**, 249–255 (1989).
- 4) Hayakawa E., Yamamoto A., Shoji Y., Lee V. H. L., *Life Sci.*, **45**, 167–174 (1989).
- 5) Yamamoto A., Hayakawa E., Lee V. H. L., *Life Sci.*, **47**, 2465–2474 (1990).
- 6) Hayakawa E., Chien D.-S., Inagaki K., Yamamoto A., Wang W., Lee V. H. L., *Pharm. Res.*, **9**, 769–775 (1992).
- 7) Yamamoto A., Hayakawa E., Kato Y., Nishiura A., Lee V. H. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 25–31 (1992).
- 8) Muranishi S., Yamamoto A., Okada H., “Biological Barriers to Protein Delivery,” ed. by Audus K.L., Raub, T. J., Plenum Press, New York, 1993, pp. 199–227.
- 9) Okagawa T., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Shimura T., Tabata S., Kondo S., Muranishi S., *Life Sci.*, **55**, 677–683 (1994).
- 10) Sasaki I., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Nakamura E., Imasaki H., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1256–1261 (1994).
- 11) Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyuu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **11**, 1496–1500 (1994).
- 12) Muranishi S., Yamamoto A., “Drug Absorption Enhancement-Concepts, Possibilities, Limitations and Trends,” ed. by deBoer A., Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1994, pp. 67–100.
- 13) Sasaki I., Tanaka K., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 976–979 (1995).
- 14) Gotoh S., Nakamura R., Nishiyama M., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 794–796 (1995).
- 15) Gotoh S., Nakamura R., Nishiyama M., Quan Y.-S., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 858–862 (1996).
- 16) Yamamoto A., Uchiyama T., Nishikawa R., Fujita T., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1285–1289 (1996).
- 17) Uchiyama T., Yamamoto A., Hatano H., Fujita T., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1618–1621 (1996).
- 18) Tozaki H., Emi Y., Horisaka E., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 164–168 (1997).
- 19) Sugiyama T., Yamamoto A., Kawabe Y., Uchiyama T., Quan Y.-S., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 812–814 (1997).
- 20) Sasaki I., Tamura T., Shibakawa T., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **14**, 1004–1007 (1997).
- 21) Yamamoto A., Okagawa T., Kotani A., Uchiyama T., Shimura T., Tabata S., Kondo S., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 1057–1061 (1997).
- 22) Uchiyama T., Kotani A., Kishida T., Tatsumi H., Okamoto A., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 448–452 (1998).
- 23) Quan Y.-S., Hattori K., Lundborg E., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 615–620 (1998).
- 24) Tozaki H., Odoriba T., Iseki T., Taniguchi T., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 913–920, (1998).
- 25) Quan Y.-S., Fujita T., Tohara D., Tsuji M., Kohyama M., Yamamoto A., *Life Sci.*, **64**, 1243–1252 (1999).
- 26) Sasaki I., Tozaki H., Matsumoto K., Ito Y., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 611–615 (1999).
- 27) Uchiyama T., Sugiyama T., Quan Y.-S., Kotani A., Okada N., Fujita T., Muranishi S., Yamamoto A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1241–1250 (1999).
- 28) Yamamoto A., Tatsumi H., Maruyama M., Uchiyama T., Okada N., Fujita T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 84–90 (2001).
- 29) Kimura T., Murakawa Y., Ohno M., Ohtani S., Higaki K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 611–618 (1997).
- 30) Taki Y., Sakane T., Nadai T., Sezaki H., Amidon G. L., Langguth P., Yamashita S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, 373–377 (1995).
- 31) Morishita M., Morishita I., Takayama K., Machida Y., Nagai T., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 68–72 (1993).
- 32) Utoguchi N., Watanabe Y., Shida T., Matsumoto M., *Pharm. Res.*, **15**, 870–876 (1998).
- 33) Kotze A. F., de Leeuw B. J., Lueßen H. L., de

- Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Int. J. Pharm.*, **159**, 243–245 (1997).
- 34) Kotze A. F., Lueßen, H. L., de Leeuw B. J., de Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Pharm. Res.*, **14**, 1197–1202 (1998).
- 35) Nerurkar M. M., Burton P. S., Borchardt R. T., *Pharm. Res.*, **13**, 528–534 (1996).
- 36) Nerurkar M. M., Ho N. F. H., Burton P. S., Vidmar T. J., Borchardt R. T., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 813–821 (1997).
- 37) Ohtani T., Murakami M., Yamamoto A., Takada K., Muranishi S., *Int. J. Pharm.*, **77**, 141–150 (1991).
- 38) Morita T., Yamamoto A., Hashida M., Sezaki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 259–262 (1993).
- 39) Yamamoto A., Morita T., Hashida M., Sezaki H., *Int. J. Pharm.*, **93**, 91–99 (1993).
- 40) Yamamoto A., Umemori S., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 14–18 (1994).
- 41) Morita T., Yamamoto A., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H., *Pharm. Res.*, **11**, 909–913 (1994).
- 42) Fukuda Y., Tsuji T., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 891–894 (1995).
- 43) Hanatani K., Takada K., Yoshida N., Nakasuji M., Morishita Y., Yasako K., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Drug Targeting*, **3**, 263–271 (1995).
- 44) Yamamoto A., Fujita T., Muranishi S., *J. Controlled Release*, **41**, 57–67 (1996).
- 45) Okumura S., Fukuda Y., Takahashi K., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **13**, 1247–1251 (1996).
- 46) Okumura S., Tanaka H., Shinsako K., Ito M., Yamamoto A., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **14**, 1282–1285 (1997).
- 47) Yamamoto A., Okumura S., Fukuda Y., Fukui M., Takahashi K., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1144–1147 (1997).
- 48) Hashizume M., Douen T., Murakami M., Yamamoto A., Takada K., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 555–559 (1992).
- 49) Yamada K., Murakami M., Yamamoto A., Takada K., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 717–721 (1992).
- 50) Tenma T., Yodoya E., Tashima S., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **10**, 1488–1492 (1993).
- 51) Muranishi S., Yamamoto A., “Topics in Pharmaceutical Sciences 1993,” ed. by Crommelin D. J. A., Midha K. K., Nagai T., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1994, pp. 372–382.
- 52) Asada H., Douen T., Mizokoshi Y., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **11**, 1115–1120 (1994).
- 53) Yodoya E., Uemura K., Tenma T., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1509–1513 (1994).
- 54) Asada H., Douen T., Waki M., Adachi S., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 682–687 (1995).
- 55) Setoh K., Murakami M., Araki N., Fujita T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 808–811 (1995).
- 56) Fujita T., Fujita T., Morikawa K., Tanaka H., Iemura O., Yamamoto A., Muranishi S., *Int. J. Pharm.*, **134**, 47–57 (1996).
- 57) Tanaka K., Fujita T., Yamamoto Y., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1283**, 119–126 (1996).
- 58) Fujita T., Morishita Y., Ito H., Kuribayashi D., Yamamoto A., Muranishi S., *Life Sci.*, **61**, 2455–2465 (1997).
- 59) Yamamoto A., Muranishi S., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **28**, 275–299 (1997).
- 60) Fujita T., Kawahara I., Quan Y.-S., Hattori K., Takenaka K., Muranishi S., Yamamoto A., *Pharm. Res.*, **15**, 1387–1392 (1998).
- 61) Uchiyama T., Kotani A., Tatsumi H., Kishida T., Okamoto A., Okada N., Murakami M., Fujita T., Muranishi S., Yamamoto A., *Pharm. Res.*, **17**, 1461–1467 (2000).
- 62) Tamai I., Nakanishi T., Nakahara H., Sai Y., Ganapathy V., Leibach F.H., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1542–1546 (1998).
- 63) Mizuma T., Ohta K., Koyanagi A., Awazu S., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 854–857 (1996).
- 64) Mizuma T., Koyanagi A., Awazu S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1335**, 111–119 (1997).
- 65) Nomoto M., Yamada K., Haga M., Hayashi M., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 326–332 (1998).
- 66) Kramer W., Wess G., Enhnen A., Falk E., Hoffman A., Neckermann G., Schubert G., Urmann M., *J. Controlled Release*, **46**, 17–30 (1997).

- 67) Swaan P. W., Szoka F. C., Oie S., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **20**, 59–82 (1996).
- 68) Russel-Jones G. J., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **15**, 557–586 (1998).
- 69) Shah D., Shen W-C., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1306–1311 (1996).
- 70) Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1016–1021 (1997).
- 71) Tozaki H., Fujita T., Odoriba T., Terabe A., Suzuki T., Tanaka C., Okabe S., Muranishi S., Yamamoto A., *Life Sci.*, **64**, 1155–1162 (1999).
- 72) Tozaki H., Fujita T., Komoike J., Kim S.-H., Terashima H., Muranishi S., Okabe S., Yamamoto A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 257–261 (1999).
- 73) Tozaki H., Fujita T., Odoriba T., Terabe A., Okabe S., Muranishi S., Yamamoto A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1107–1112 (1999).
- 74) Yamamoto A., Tozaki H., Okada N., Fujita T., *S. T. P. Pharma Sciences*, **10**, 23–34 (2000).
- 75) Tozaki H., Nishioka J., Komoike J., Okada N., Fujita T., Muranishi S., Kim S.-I., Terashima H., Yamamoto A., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 89–97 (2001).
- 76) Saffran M., Kumar G. S., Savariar C., Burnham J. C., Williams F., Neckers D. C., *Science*, **233**, 1081–1084 (1986).
- 77) Suzuki A., Morishita M., Kajita M., Takayama K., Isowa K., Chiba Y., Tokiwa S., Nagai T., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1196–1202 (1998).
- 78) Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., *Pharm. Res.*, **13**, 896–901 (1996).
- 79) Iwanaga K., Ono S., Narioka K., Morimoto K., Kakemi M., Yamashita S., Nango M., Oku N., *Int. J. Pharm.*, **157**, 73–80 (1997).
- 80) Sakuma S., Suzuki N., Kikuchi H., Hiwatari K., Arikawa K., Kishida A., Akashi M., *Int. J. Pharm.*, **149**, 93–106 (1997).
- 81) Damge C., Vranckx H., Balschmidt P., Couvreur P., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1403–1409 (1997).