

糖尿病モデルラットを用いたインシュリン含有複合脂質膜の 経口治療に関する基礎的研究

中島健太郎, 宮城 誠, 後藤浩一, 松本陽子, 上岡龍一*

Hybrid Liposomes as a Drug Carrier for the Oral Administration of Insulin in Diabetic Rats

Kentarou NAKASHIMA, Makoto MIYAGI, Koichi GOTO,
Yoko MATSUMOTO, and Ryuichi UEOKA*

*Division of Applied Chemistry, Sojo University Graduate School, 4-22-1 Ikeda,
Kumamoto 860-0082, Japan*

(Received October 21, 2003; Accepted January 26, 2004)

It is known that hybrid liposomes composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and micellar surfactant (Tween 20) are effective for encapsulating drugs and for the treatment of meningeal gliomatosis *in vivo* without toxicity. In this study, we attempted to use these hybrid liposomes as a drug carrier system for the oral administration of insulin using diabetic model rats. The noteworthy aspects were as follows: (a) The hybrid liposomes of 90 mol% DMPC/10 mol% Tween 20 were stable and uniform for more than 4 weeks. (b) The blood glucose level of diabetic model rats decreased after the oral administration of hybrid liposomes including insulin. These results suggest that the oral administration of hybrid liposomes including insulin should be effective for the treatment of diabetes.

Key words—hybrid liposome; insulin; oral administration; drug carrier

緒 言

糖尿病の治療において最も重要なことは、いかに血糖値をコントロールするかである。特に、インシュリン依存型糖尿病 (IDDM) における血糖値の制御には、定期的なインシュリンの注射が必要不可欠である。慢性的に血糖値の高い状態が続くと、失明、腎不全、神経障害などの合併症を引き起こすことが危惧される。また、血糖値が非常に高い状態になると昏睡に至り死亡するケースもある。

インシュリンは膵臓で産生され、唯一血糖値を低下させる生理活性を持つタンパク性ホルモンである。タンパク質であるがゆえに、経口投与しても消化管内の酵素によって分解されてしまい、現在の投与法は注射にならざるを得ない。しかも、その回数には1日に数回に及ぶこともあり、患者さんの生活の質 Quality of Life (QOL) を大きく損ねている。そこで、本研究では、ハイブリッド型リポソームを用

いることにより、インシュリンの新しい経口投与方法を開発することを目標とし、基礎的データを蓄積した。

リポソームは、ドラッグデリバリーシステムのキャリアーとして広く用いられているが、¹⁾ 最近筆者らは、ベシクル分子とミセル分子を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで得られるハイブリッド型リポソームを開発した。このハイブリッド型リポソームは、組成比や成分を変えることで、形状、サイズ、相転移温度をコントロールすることができる。²⁾ 生体適合性に優れ、調製の際に有機溶媒の混入がないことなどから、医療分野における新しい素材としてその有用性が期待されている。既に、脂溶性抗がん剤のドラッグキャリアーとしてハイブリッド型リポソームを用い、髄腔内投与により脳腫瘍モデルラットに対する顕著な延命効果が得られている。³⁾ 適切な素材や組成のハイブリッド型リポソームは、種々のがん細胞に対して高い増殖抑制効果を示すことが明らかとなっている。⁴⁻⁶⁾ 担がんマウスを用いた動物実験からは、ハイブリッド型リポソームの腹腔内

投与により顕著な延命効果が得られ^{7,8)} 正常動物による安全性試験により副作用がないことが明確となっている。⁸⁾ さらに、生命倫理委員会で承認後悪性リンパ腫の患者に静脈投与し、高い安全性及び固形リンパ腫の顕著な縮小効果が得られている。⁹⁾

本論文では、これまで髄腔内投与や腹腔内投与で治療効果のあったハイブリッド型リポソームを今回初めて経口投与に用い、インシュリン含有ハイブリッド型リポソームの安定性及び糖尿病モデルラットに対する治療効果について報告する。

実験の部

1. 試料 L- α -ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) は、市販品 (日本油脂) をそのまま使用した。ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20) は、市販品 (ナカライテスク) をそのまま使用した。インシュリンは、市販品 (仔牛膵臓より抽出, 力価 15 U/ml, Sigma) をそのまま使用した。

2. インシュリン溶液の調製 インシュリンを 0.01 M の塩酸 0.5 ml に溶解させた後、リン酸緩衝水溶液 4.5 ml を加えインシュリン溶液とした。

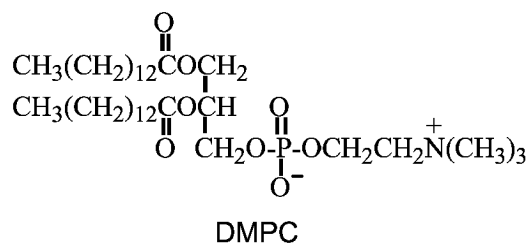
3. ハイブリッド型リポソームの調製 ハイブリッド型リポソームは、リン酸緩衝水溶液中で DMPC 及び Tween 20 を 90 mol% DMPC/10 mol% Tween 20 の組成で、45°C, 窒素雰囲気下で 1 min/1 ml 間超音波照射 (Yamato Bransonic Model B2210: 90 W) することによって調製し、孔径 0.45 μ m フィルターで濾過滅菌し試験溶液とした。インシュリン含有ハイブリッド型リポソームは、インシュリン溶液に脂質及び界面活性剤を加え、超音波照射することによって調製した。

4. ハイブリッド型リポソームのみの人工胃液及び人工腸液中での安定性 人工胃液及び人工腸液として、内用固形剤の崩壊性試験に用いられる第 1 液及び第 2 液¹⁰⁾ を膜安定性の実験に使用した。

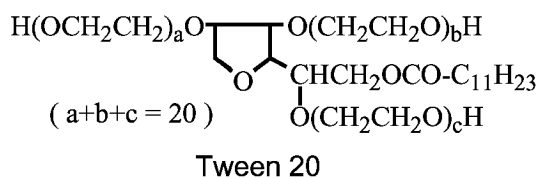
4-1. 人工胃液 (第 1 液) 塩化ナトリウム 0.1 g に 1 M の塩酸 1.2 ml を加えて、イオン交換水で全量を 50 ml とし、37°C で pH が約 1.4 となるように調整した。

4-2. 人工腸液 (第 2 液) リン酸二水素カリウム 0.544 g を少量のイオン交換水に溶解させた後、0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液 5.9 ml を添加し、イ

Phospholipid



Surfactant



オン交換水で全量 50 ml とした。この溶液は、37°C で pH が約 6.8 となるように調整した。

以上の人工胃液及び人工腸液を用いてハイブリッド型リポソームを 10 倍に希釈し、膜サイズの経時変化を測定した。

5. 膜サイズの測定 ハイブリッド型リポソームの膜サイズは、サブミクロンサイザー (Brookhaven BI-90) を用い、動的光散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を出力 35 mW で用い、散乱角 90° で測定し、得られた拡散係数 (D) から、Eq. 1 (Stokes-Einstein の式) に従い、膜の直径 (d_{hy}) を求めた。

$$d_{hy} = kT/3\pi\eta D \quad (1)$$

ここで、 k は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。

6. 糖尿病モデルラットの作成 8 週齢の雄性 Wistar ラットを九動株式会社より購入し、6 週間の予備飼育後に実験に使用した。温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の条件下で、1 ケージ 3 匹で飼育し、実験前日まで水及び飼料は自由摂取とした。血糖値の測定前 18 時間は絶食としたが、水は自由に与えた。糖尿病を発症させるためにストレプトゾトシン (STZ) を用いた。これは一般に糖尿病モデル動物の作成に用いられている薬物であるが、用いる動物の種類や系統、週齢などにより適切な投与量が異なると思われた。そこで、今回は 1 群 3 匹の 3 グループに対し、それぞれ STZ を 30, 50, 70 mg/kg 単回

投与した。STZ 投与から 14 日後までの血糖値を測定した。なお、採血は、ラットの尾静脈にシリンジの針を挿入して行った。

7. *In vivo* での治療実験 糖尿病モデル動物として、前述のストレプトゾトシン (STZ) を投与後、14 日間経過した雄性 Wistar ラットを用いた。飼育条件は前述の通りである。この糖尿病モデルラットに、インシュリン含有ハイブリッド型リポソームを金属製ゾンデを用いて胃に投与後、生化学自動分析装置 (富士ドライケム 3030) により 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 時間後の血液中のグルコース濃度 (血糖値) を測定した。

結果と考察

1. ハイブリッド型リポソームの安定性 結果を Fig. 1(A) に示す。インシュリン含有 DMPC/10 mol% Tween 20 ハイブリッド型リポソームは、リン酸緩衝水溶液中で調製後直径約 210 nm の約 1 週間以上安定な膜を形成することが明らかとなった。また、経口投与した場合を想定して、人工胃液及び

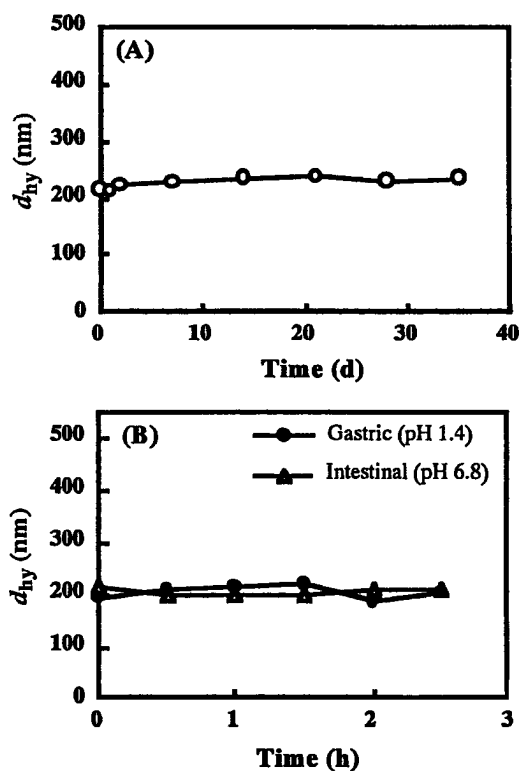


Fig. 1. Time Courses of d_{hy} Change for Hybrid Liposomes Including Insulin in (A) -PBS and (B) Artificial Gastric and Intestinal Juice Solutions
DMPC = 5.00×10^{-3} M, Tween 20 = 5.56×10^{-4} M, Insulin = 15 U/ml.

人工腸液中での安定性についても検討した。ここで、液体を摂取した場合、胃及び腸に滞留する時間は約 2 時間程度であると推測されるので、測定時間を 2.5 時間までとした。Figure 1(B) に示すように、人工胃液 (pH 1.4) 及び人工腸液 (pH 6.8) 中のいずれの場合も安定であった。

2. 糖尿病モデルラットの作成 STZ 投与後の血糖値経時変化を Fig. 2 に示す。最も高い STZ 投与量である 70 mg/kg 投与群では、体重の減少が著しく、衰弱しており、3 日後には死亡した。STZ 50 mg/kg 投与群においても、3 匹中 2 匹が 5 日後には死亡した。これらのラットの尿中のグルコース濃度を測定したところ、600 mg/dl 以上と非常に高い値を示し、高血糖による昏睡から死亡に至ったものと考えられた。一方、STZ 30 mg/kg 投与群では異常はみられなかった。また、血糖値は平均で約 200 mg/dl と高血糖になっていた。したがって、Wistar ラットに対して適切な STZ 投与量は 30 mg/kg 程度であることが明らかとなった。

3. *In vivo* での治療実験 前述の糖尿病モデルラットのうち生き残った 4 匹に対し、インシュリン含有ハイブリッド型リポソームを経口投与し、血糖値の経時変化を調べた。投与後の血糖値の変化を Eq. 2 で示す。ここで、

$$\text{血糖値変化 (\%)} = \frac{\text{Glu Conc.}_t}{\text{Glu Conc.}_0} \times 100 \quad (2)$$

Glu Conc.₀ は未投与の血糖値、Glu Conc._t は、時間 t での血糖値である。投与時の血糖値を 100% として、血糖値の経時的変化を Fig. 3 に示す。すべ

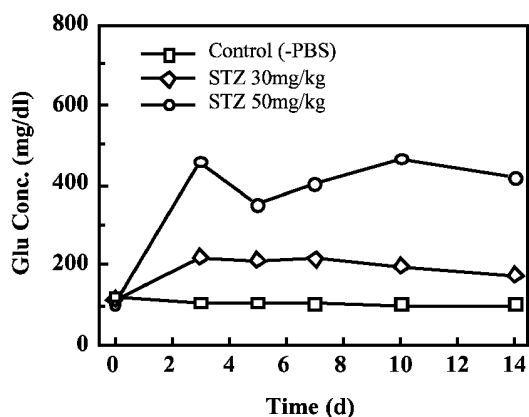


Fig. 2. Time Courses of Blood Glucose Concentration Change for Rats after Intravenous Administration of Streptozotocin

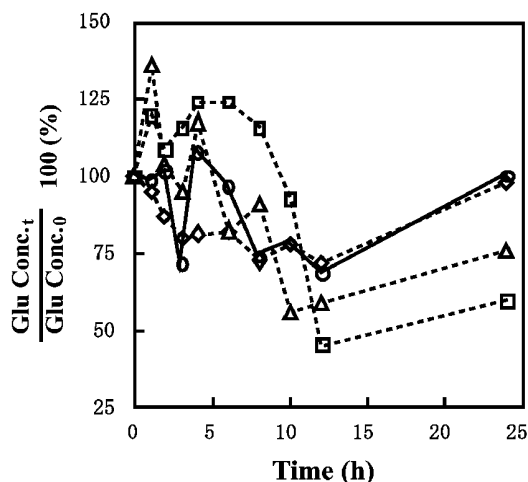


Fig. 3. Time Courses of Blood Glucose Concentration Change for Diabetics Model Rats after Oral Administration of Hybrid Liposomes Including Insulin

DMPC= 5.00×10^{-3} M, Tween 20= 5.56×10^{-4} M, Insulin=15 U/ml, Dose: 240 U/kg.

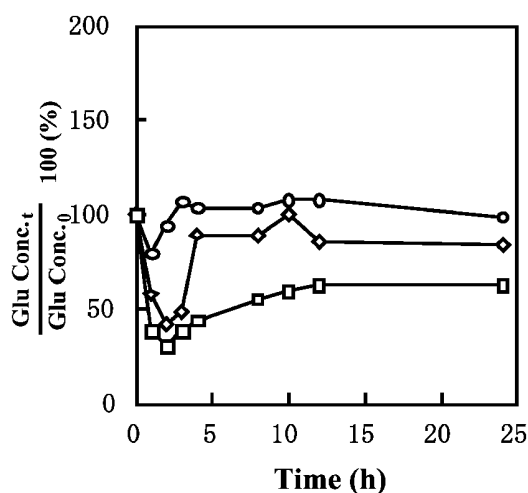


Fig. 4. Time Courses of Blood Glucose Concentration Change for Normal Rats after Oral Administration of Hybrid Liposomes Including Insulin

DMPC= 5.00×10^{-3} M, Tween 20= 5.56×10^{-4} M, Insulin=15 U/ml, Dose: 240 U/kg.

でのラットにおいて徐々に血糖値が減少した。絶対値からも3匹が正常値に近い値となった。正常ラットに対しても同様の実験を行った。結果を Fig. 4 に示す。血糖値は一時的に減少するものの、ほぼ正常値の範囲内であり、低血糖の症状などは観察されなかった。

結 論

インシュリンを経口投与するためのドラッグキャ

リアーとして、ハイブリッド型リポソームを用い、消化管内の pH 変化に耐え得るかどうかを検討し、糖尿病モデルラットに対する治療実験を行ったところ、以下のような知見が得られた。

- (1) インシュリン含有ハイブリッド型リポソームは、1週間以上安定な膜を形成し、人工胃液及び人工腸液中においても安定であることが明らかとなった。
- (2) 糖尿病モデルラットに対してインシュリン含有ハイブリッド型リポソームを経口投与したところ、血糖値の減少がみられた。

以上の結果は、ハイブリッド型リポソームがインシュリンの経口投与を可能にする可能性を示唆している。

謝辞 熊本大学医学部代謝内科学教室の荒木栄一教授には有益な御助言を戴いた。動物実験に関しては、薬物安全性試験センターの金納明宏博士にお世話になった。感謝の意を表します。本研究の一部は、文部科学省科学研究費(No. 14350439, 15500335)の補助によるものであることを付記します。

REFERENCES

- 1) Lasic D. D., "Liposomes: from Physics to Application," Elsevier, Amsterdam, New York, Tokyo, 1993, pp. 261-286.
- 2) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- 3) Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y., *Cancer Res.*, **56**, 3986-3992 (1996).
- 4) Ueoka R., Matsumoto Y., Oyama H., Takekuma H., Iio M., Iwahara M., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640-4643 (1988).
- 5) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Ueoka R., *Yakugaku Zasshi*, **119**, 280-287 (1999).
- 6) Matsumoto Y., Kato T., Suzuki H., Hirose S., Naiki Y., Hirashima M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 4650-4652 (2000).
- 7) Kanno A., Tsuzaki K., Miyagi M., Matsumoto Y., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013-1014 (1999).

-
- 8) Ichihara H., Nagami H., Yamamoto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 25–34 (2003).
 - 9) Ueoka R., Matsumoto Y., Ichihara H., Kiyokawa T., American Chemical Society, *Biological Engineering*, 2002, pp. 177–189.
 - 10) Society of Japanese Pharmacopoeia, “Nihon Yakkyokuho Kaisetsusho,” 11nd ed., Hirokawa Publishing Co., Tokyo, 1986, p. 349.