

新規吸収促進剤大豆由来ステロールグルコシド
を用いたインスリン経鼻吸収剤

星薬科大学
図書館



0000060095

山本 知永

新規吸収促進剤大豆由来ステロールグルコシド
を用いたインスリン経鼻吸収製剤

本文中において以下の略号を用いた。

AUC :血中インスリン濃度一時間曲線 100%ライン下面積

AUG :血中グルコース濃度一時間曲線 100%ライン下面積

Bras :brassicasterol

Camp :campesterol

CMC-Na :カルボキシメチルセルロースナトリウム

CP :カルボキシビニルポリマー105

HPC :ヒドロキシプロピルセルロース

NaGC :グリココール酸ナトリウム

PBS :リン酸塩緩衝生理食塩液

SG :大豆由来ステロールグルコシド混合物

Sit : β -sitosterol

Sit-G : β -sitosterol β -glucoside

SS :大豆由来ステロール混合物

Stig :stigmasterol

目 次

| | |
|---|----|
| 緒言 | 1 |
| 第1章 点眼と経鼻投与 | 6 |
| 第1-1節 序論 | 6 |
| 第1-2節 実験の部 | 7 |
| 第1-3節 結果の部 | 11 |
| 1-3-1 水性液剤における点眼と経鼻投与におけるインスリンの 吸収性 | 11 |
| 1-3-2 油性液剤における点眼と経鼻投与におけるインスリンの 吸収性 | 11 |
| 第1-4節 まとめ | 19 |
| 第2章 各種剤形と吸収促進剤 | 20 |
| 第2-1節 序論 | 20 |
| 第2-2節 実験の部 | 21 |
| 第2-3節 結果の部 | 26 |
| 2-3-1 水性液剤におけるSGおよびSSのインスリン 経鼻吸収促進作用 | 26 |
| 2-3-2 油性液剤におけるSGおよびSSのインスリン 経鼻吸収促進作用 | 29 |

| | | |
|---------|--------------------------------|----|
| 2-3-3 | 粉末製剤における SG のインスリン | |
| | 経鼻吸収促進作用 | 33 |
| 第 2-4 節 | まとめの部 | 39 |
| 第 3 章 | SG と SS の吸収促進機構 | 41 |
| 第 3-1 節 | 序論 | 41 |
| 第 3-2 節 | 実験の部 | 42 |
| 第 3-3 節 | 結果の部 | 46 |
| 3-3-1 | In vitro における SG および SS のインスリン | |
| | 膜透過促進作用 | 46 |
| 3-3-2 | SG とインスリンの相互作用 | 48 |
| 3-3-3 | SG と鼻粘膜の相互作用 | 50 |
| 第 3-4 節 | まとめの部 | 56 |
| 第 4 章 | SG 含有インスリン製剤の繰り返し投与における | |
| | 吸収性と安全性 | 57 |
| 第 4-1 節 | 序論 | 57 |
| 第 4-2 節 | 実験の部 | 58 |
| 第 4-3 節 | 結果の部 | 61 |
| 4-3-1 | 単回投与による SG の鼻粘膜組織障害性 | 61 |
| 4-3-2 | SG 含有インスリン粉末製剤の繰り返し投与による | |
| | 経鼻吸収性 | 65 |
| 4-3-3 | 繰り返し投与による鼻粘膜組織障害性 | 69 |

| | | |
|---------|-------|----|
| 第 4-4 節 | まとめの部 | 71 |
| 第 5 章 | 総括と結論 | 73 |
| 謝辞 | | 77 |
| 参考文献 | | 78 |

緒言

近年、日本の食生活が欧米化することで、国内の糖尿病患者数の動向は、1960年には37000人程度であったが、1985年には734000人と約20倍になり、患者数はなお上昇を続け、現在では600万人を越えている^{1,2)}。現在、治療方法としては、インスリン等の注射が主として行われている。

一般に水溶性の高い薬物では経口投与した場合、消化管からの吸収速度が非常に遅い。特にペプチド性薬物は分子量が大きく消化管粘膜の浸透性が悪く、消化管内のタンパク分解酵素の作用や肝臓による初回通過効果を受けるため、消化管系からの吸収の生物学的利用能は低い。したがってペプチド性薬物の投与は現在の臨床において、皮下、筋肉および静脈内等の注射にほぼ限定されている。また、ペプチド性薬物は長期投与されることが多いため、注射部位における組織の肥厚、重篤な副作用や合併症等が引き起こされる可能性が高い。これらのことから、注射による投与方法は患者に苦痛を強いることだけでなく、ノンコンプライアンスの原因ともなる。そこで、患者の生活の質の向上のためにも注射剤に代わる投与経路の開発が強く望まれており、現在までに口腔³⁾、鼻⁴⁻¹¹⁾、膣^{12,13)}、直腸^{12,13)}、眼¹⁴⁻¹⁷⁾、肺¹⁸⁾等の各種粘膜や皮膚¹⁹⁾からの投与が検討されてきているが、なかでも鼻および肺粘膜は吸収性が比較的良好であることから有望視されている。特に鼻粘膜は、薬物を吸収するのに十分大きな表面積と発達した血管があり、その吸収は肝臓の初回通過効果を回避して全身循環に薬物を直接送ることができる利点をもっている。

また、投与方法も簡便で患者のコンプライアンスも得やすく、比較的容易に製剤の調製や投与装置を工夫することができることや、薬物の吸収性が静脈注射に匹敵するくらい速いことから、モニタリングしながら、経鼻投与することもできる。

かつて、鼻腔内への薬物の投与は耳鼻咽喉科領域における表面麻酔剤、血管収縮剤、アレルギー性鼻炎用の抗炎症剤および脱顆粒防止剤、副鼻腔炎および術後処置のための抗生物質等の局所作用を目的とした点鼻剤としてしか用いられてなかった。しかし、前述のように経鼻投与により薬物が良好に吸収されることが知られるようになってから、経鼻投与は全身作用を期待して多くの試みがなされ、薬物送達システムの一分野となっている。

しかし、ペプチド性薬物の経鼻吸収性は経口投与に比較して有効であるものの、注射による投与と比較すると、必ずしも十分な吸収率であるとは言い難い。これは、薬物が親水性で分子量が大きいだけでなく、鼻腔での酵素分解や線毛等によるクリアランスにより、吸収部位から排除されるためである。

したがって、ペプチド性薬物の経鼻吸収性を高めるために、マイクロスフィア等の特異な運搬体の利用²⁰⁾、吸収促進剤²¹⁾やタンパク分解酵素阻害剤²²⁾の併用、薬物の吸収部位での滞留性の向上を工夫した剤形、ペプチド性薬物の分子構造の化学修飾²³⁾等の試みがなされ、様々な研究が行われている。

現在、ペプチド性薬物の経鼻吸収における吸収促進剤としては、イオン性および非イオン性界面活性剤²⁴⁾、サポニン類²⁵⁾、シクロデキストリ

ン²⁶⁾、中鎖脂肪酸類、グリチルリチン酸およびその誘導体²⁷⁾、胆汁酸塩類^{28,29)}およびアルキルグルコシド類³⁰⁾等について検討がなされている。しかし、これらの吸収促進剤は粘膜や線毛等に対する刺激性も報告されており³¹⁻³⁵⁾、安全性がまだ確立されていない。

また、鼻腔内沈着性、広域分布性³⁶⁻³⁸⁾、局所選択性³⁶⁻³⁸⁾、局所的高濃度、薬物放出性、粘液および粘膜中の安定性が得られる投与剤形等も検討されている。吸収促進剤を用いたペプチド性薬物製剤の多くは溶液の状態で滴下あるいは噴霧されたものである。また、これに対し、粉末製剤として投与する試みもなされている¹⁰⁾。すなわち、液状製剤として経鼻投与した場合には、薬物はおよそ30分程度で、その大半が口腔に流出してしまう欠点をもっているが³⁹⁾、薬物に高分子を配合し、鼻腔内に微粉末として投与すると流出されにくく、鼻腔内における薬物の滞留時間が延長されるという利点がある¹⁰⁾。

このように経鼻投与については、幅広い剤形等の研究が既になされているが、ペプチド性薬物の吸収において油性液剤を用いた報告はほとんどなされていない。

そこで、本研究では、インスリンを既に点眼剤として使用されている点眼油を用いて、薬物を家兎の眼に投与することにより、結膜からの吸収(結膜の系)、鼻涙管を経由しての鼻粘膜からの吸収(結膜および鼻粘膜の系)、および鼻腔への投与による鼻粘膜のみからの吸収(鼻粘膜の系)を比較し、インスリンの経鼻吸収における点眼からの貯留性の影響について検討した⁴⁰⁾。

植物油中に微量に含有するステロール類、特に大豆由来ステロールグ

ルコシド混合物 (SG) は、大豆の油滓より抽出して得られるステロイド配糖体で^{41,44)}、基本骨格にステロイド骨格をもつ β -sitosterol、campesterol、stigmasterol および brassicasterol をそれぞれ 49.9%、29.1%、13.8% および 7.2% 含むモノグルコシド混合物であり、そのステロール混合物 (SS) は SG のアグリコンである (Fig. 1)⁴⁵⁾。SG は保湿性に富んでいることから、化粧品分野において皮膚または粘膜の保湿剤として用いられ研究がなされているが^{41,42,46,47)}、薬物の粘膜の吸収促進剤として用いた研究はいまだ報告されていない。

これらの SG および SS を新規吸収促進剤として用い、液状製剤や粉末製剤にすることでインスリンの経鼻吸収性の向上について検討を行った。また、各種投与剤形の検討を行い、粉末製剤における賦形剤としての SG の有用性も検討した。さらに、摘出鼻粘膜を用いた *in vitro* のインスリン膜透過実験より、SG の吸収促進機構を調べ、SG 含有インスリン製剤の短期間の繰り返し投与におけるインスリン吸収性と鼻粘膜に対する安全性についても検討した。

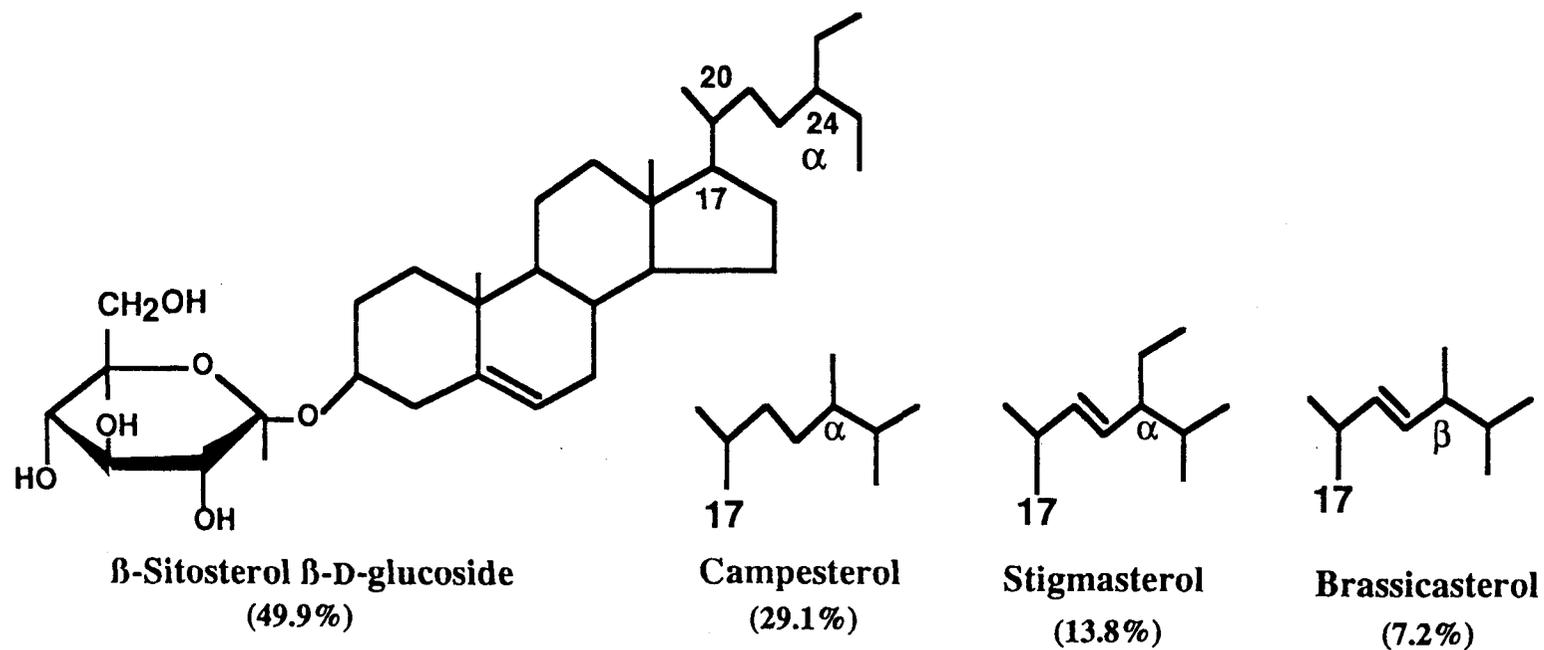


Fig. 1. Chemical structures of components of a soybean-derived sterylglucoside mixture (SG).
Numbers in parentheses represent the ratio in SG.

第 1 章 点眼と経鼻投与

第 1-1 節 序論

緒言でも述べたように、経鼻投与については幅広い剤形等の研究が既になされているが³⁶⁻³⁹⁾、ペプチド性薬物の吸収において油性液剤を用いた研究の報告はほとんどなされていない。また、インスリン等の分子量が 1 万を越えるペプチド性薬物自身は経鼻吸収性が乏しく、なんらかの吸収促進剤を併用しなければならないのが現状である。

本章では、吸収促進剤を用いずに油性基剤のもつ吸収促進作用を利用して、インスリンを経鼻吸収させる試みを検討した。また、薬物を点眼すると、涙液は鼻涙管を經由して鼻粘膜に到達することを利用し、鼻粘膜から薬物を徐々に吸収させるために、眼を薬物の貯留庫としようとした。そこで、既に点眼剤として使用されている点眼油を用いて、インスリン含有点眼油を家兎の眼に投与することにより、結膜からの吸収(結膜の系)、鼻涙管を經由しての鼻粘膜からの吸収(結膜および鼻粘膜の系)、および鼻腔への投与による鼻粘膜のみからの吸収(鼻粘膜の系)を比較検討し、インスリンの経鼻吸収における点眼からの貯留性の影響について検討した。

第 1-2 節 実験の部

1-2-1 試薬の部

インスリンは、bovine pancreas (24.4 IU/mg)で SIGMA CHEMICAL CO. 製を、流動パラフィン(日本薬局方品)は岩井化学薬品工業(株)製を、ゴマ油(日本薬局方品)は宮澤薬品(株)製を、ラッカセイ油(日本薬局方品)は小境製薬(株)製を用いた。その他、試薬は全て特級品を用いた。

1-2-2 試料調製

点眼油は油性懸濁液剤で、200号メッシュで篩過した粒子サイズ75 μ m以下のインスリン40.0 mgを、植物油または流動パラフィン10.0 mLに攪拌子とスターラーを用いて溶解または懸濁して調製した。人工涙液は、ホウ酸2.0 g、塩化ナトリウム0.8 g、過マンガン酸カリウム0.01 gを滅菌精製水に溶解して調製した。インスリン含有人工涙液は、人工涙液10.0 mLにインスリン40.0 mgを加えて溶解して調製した。

1-2-3 投与方法

結膜および鼻粘膜の系においては、日本白色雌性家兎(体重2.5~3.0 kg、埼玉実験動物(株))の片眼に各インスリン製剤(10.0 IU/kg)を約250 μ L投与した。その際、調製した各種製剤をマイクロチップを先端に装着させた注射筒に充填し、家兎の下眼瞼の内側に投与した。結膜の系においては、家兎の鼻涙管に先を閉じた直径1.05 mmのポリエチレンチューブを挿入して閉鎖した後、結膜および鼻粘膜の系と同様の方法で点眼した。

鼻粘膜の系においては、長さ 10.0 cm の同ポリエチレンチューブを結膜の系で用いた注射筒の先端に装着し、チューブの先端を家兎の鼻腔に直接 2.0 cm 挿入し、鼻腔内へ投与した。

1-2-4 血糖値の測定

家兎の耳静脈から血液を 1.0 mL 採血し、その血液を 2 分間遠心分離 (3000×g) し、得られる血漿を試料とした。その試料をグルコース B-テストワコー (和光純薬工業 (株) 製) を用いて血糖値 (血中グルコース濃度) を測定した。

1-2-5 生物学的利用能の算出

血中グルコース濃度について、インスリン製剤投与後得られる血中グルコース濃度-時間曲線において、0 時間値の血中グルコース濃度を 100% とし、100% ライン下面積 (AUG) を求めた。測定はインスリン製剤投与後 0 時間値から 6 時間値までとし、台形法により算出した。薬理学的生物学的利用能は、インスリンを 0.5 IU/kg (dose_{i.v.}) 静脈注射することにより得られる 100% ライン下面積と比較して式 (1) により求めた。

$$\text{薬理学的生物学的利用能 (D)} = (\text{AUG}_{i.n.} / \text{dose}_{i.n.}) / (\text{AUG}_{i.v.} / \text{dose}_{i.v.}) \quad (1)$$

ここで添字の i.n. は経鼻投与、i.v. は静脈内投与を示す。また、経鼻投与後の血中のインスリン濃度を EIA 法により測定して、インスリン濃度-時間曲線を求めた。このインスリン濃度-時間曲線下面積 (AUC) と、

血中グルコース濃度を指標とした AUG を比較すると、Fig. 2 のように流動パラフィン、ラッカセイ油およびゴマ油の油性液剤において、血糖低下作用の AUG とインスリン濃度による AUC には良好な相関性 ($r=0.988$) が認められた。したがって、今後インスリンの薬理効果作用によって吸収性を評価することにした。

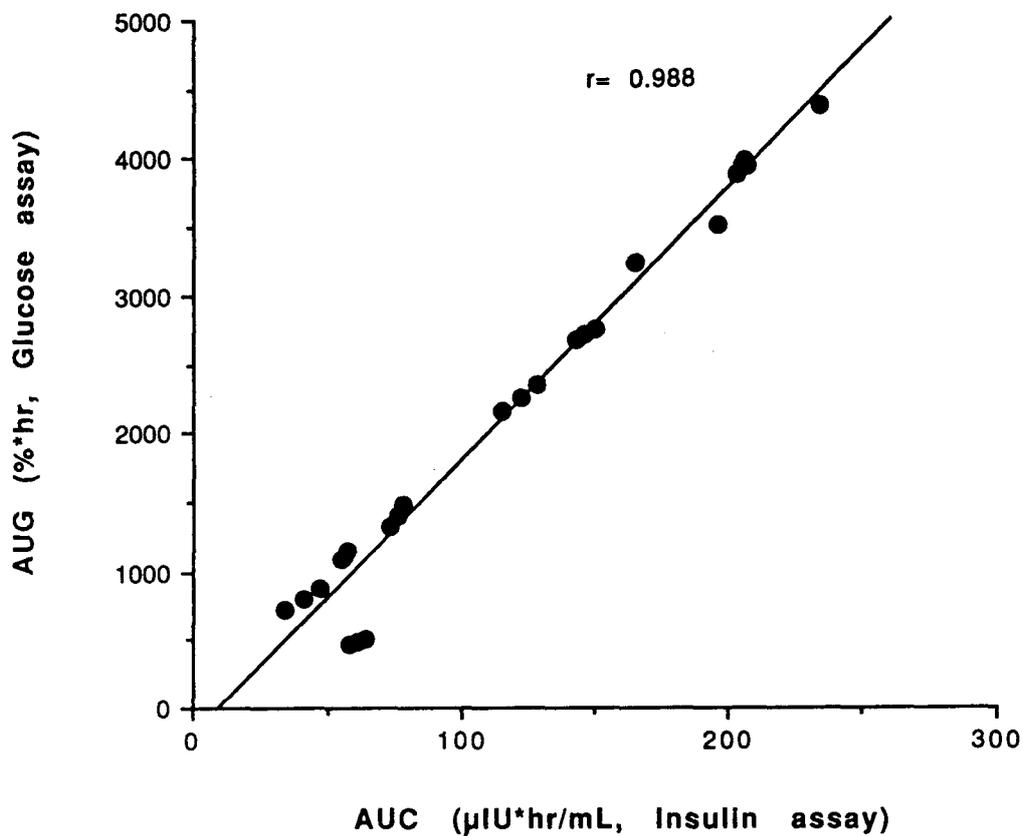


Fig. 2. Relationship between AUC of insulin concentration and AUG of glucose concentration after nasal administration in rabbits. The dose contained insulin oily suspension (peanut and sesame oils, 10.0 IU/kg). Line was determined by the linear least squares method using experimental mean values.

第 1-3 節 結果の部

1-3-1 水性液剤における点眼と経鼻投与におけるインスリンの吸収性

点眼液を眼に投与すると、薬物は製剤から涙液に分配し、その涙液は鼻涙管を経由して鼻粘膜へ送られると考えられる。そこでインスリン含有人工涙液を調製し、結膜および鼻粘膜の系、結膜の系、および鼻粘膜の系の3種の投与系において、インスリンの粘膜吸収性を比較した(Fig. 3)。

鼻粘膜の系では投与後1時間で一過性の血糖低下作用を示したが、結膜および鼻粘膜の系では、他の系よりも薬効に持続性があり、投与後6時間値においても血糖値は元に戻らなかった。したがって涙液を利用して鼻涙管を経由した投与方法は、血糖低下作用の持続性を示すことが示唆された。

1-3-2 油性液剤における点眼と経鼻投与におけるインスリンの吸収性

油性基剤は、涙液に比べ粘性があるが、流動性もあり、さらに、鼻涙管は親油性が高いことから、薬物を下眼瞼の内側に貯留させることにより、薬物は容易に鼻涙管へ移行し、一部は結膜から吸収されるものの、直ちに鼻粘膜から吸収されると期待される。

そこで流動パラフィン、ゴマ油およびラッカセイ油を用いたインスリン含有点眼油を調製し、前項と同様に3種の系においてインスリンの粘膜吸収性を比較した。各点眼油における結果を Fig. 4、5および6に示す。

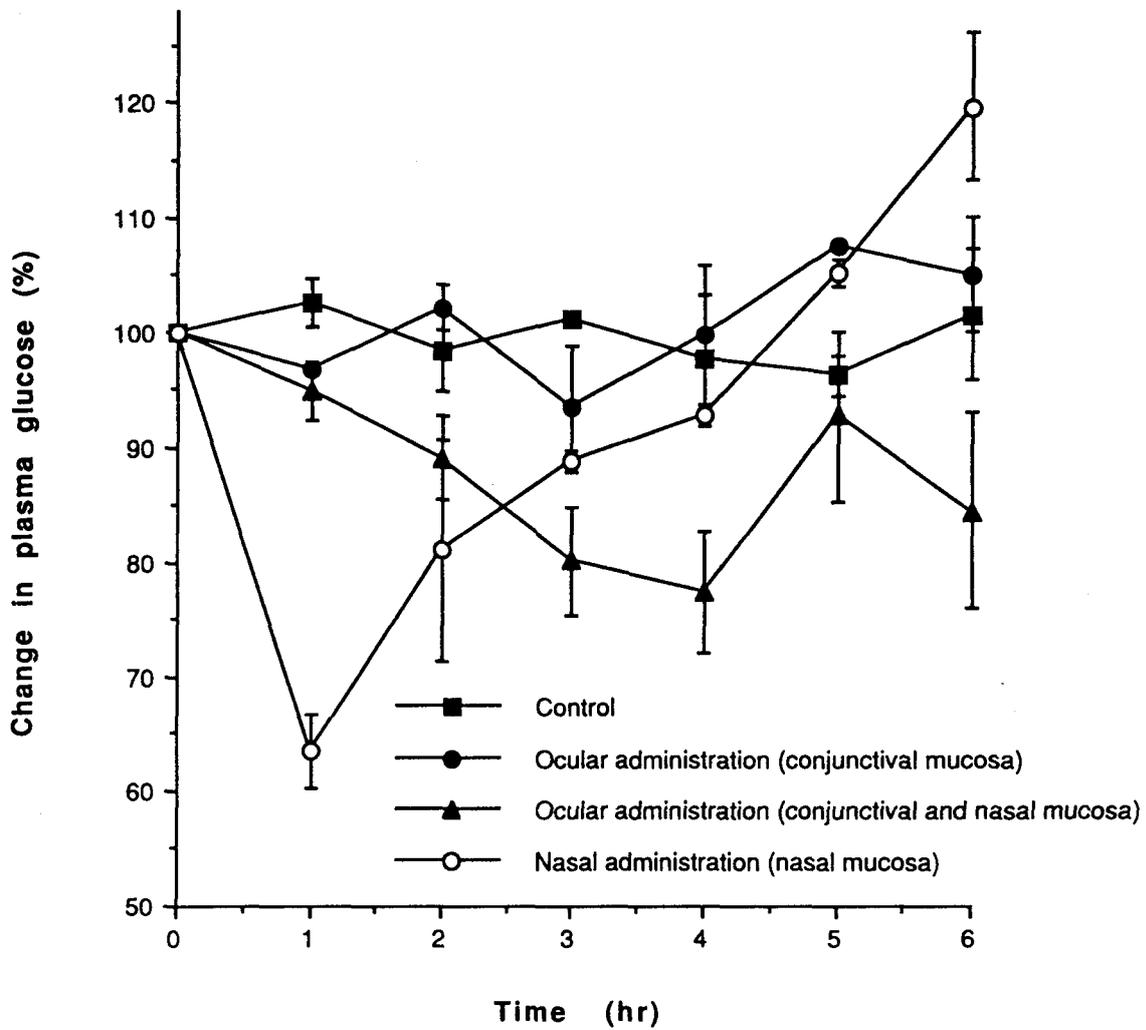


Fig. 3. Plasma glucose level after ocular and nasal administrations of insulin suspension in the artificial tear solution (10.0 IU/kg).

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

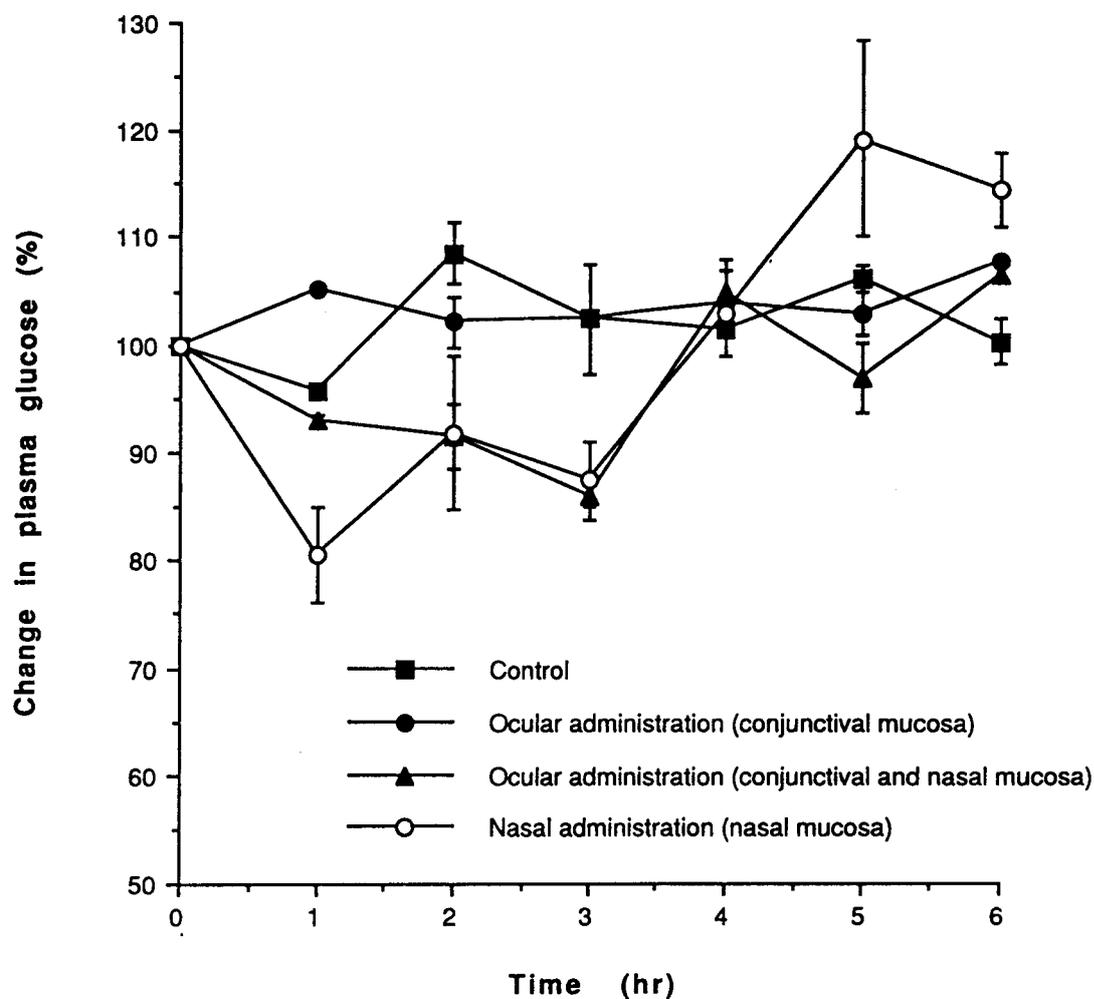


Fig. 4. Plasma glucose level after ocular and nasal administrations of insulin suspension in liquid paraffin (10.0 IU/kg).

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

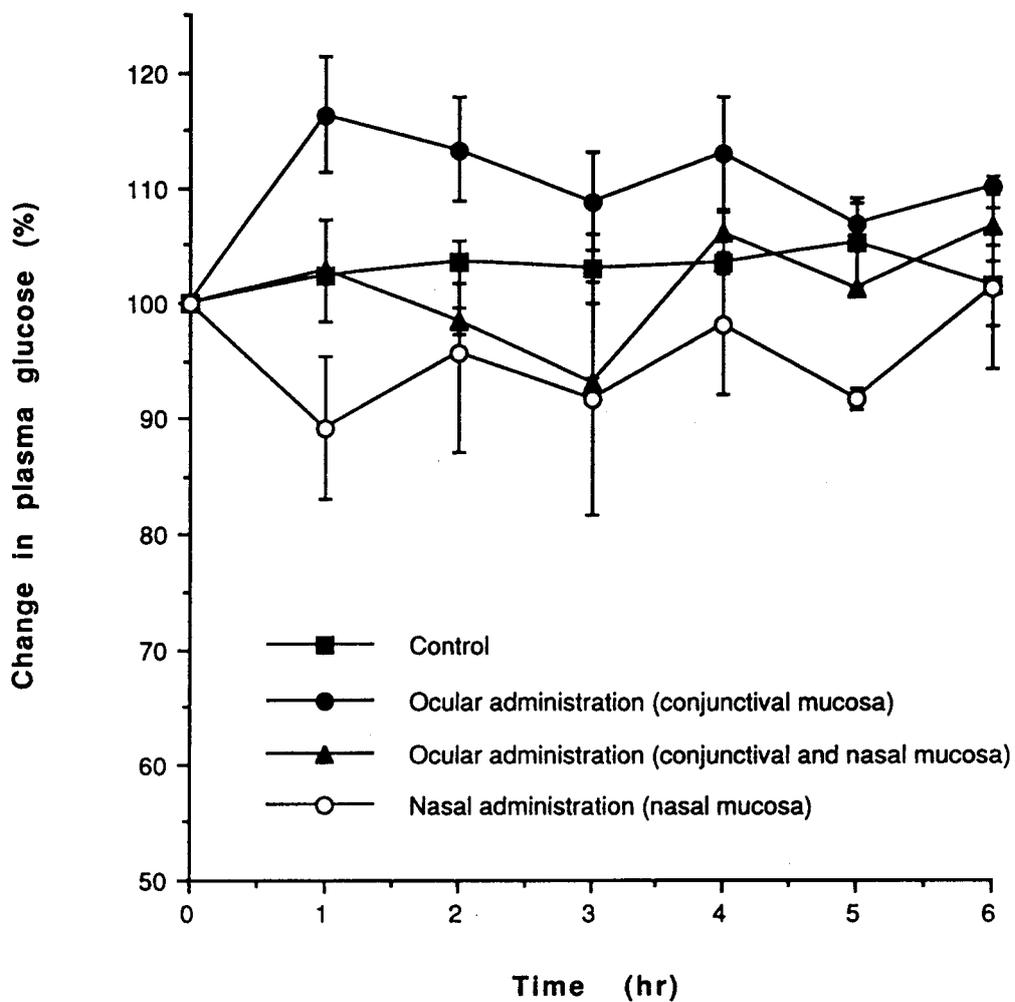


Fig. 5. Plasma glucose level after ocular and nasal administrations of insulin suspension in sesame oil (10.0 IU/kg).

Each value represents the mean±S.D. (n=3).

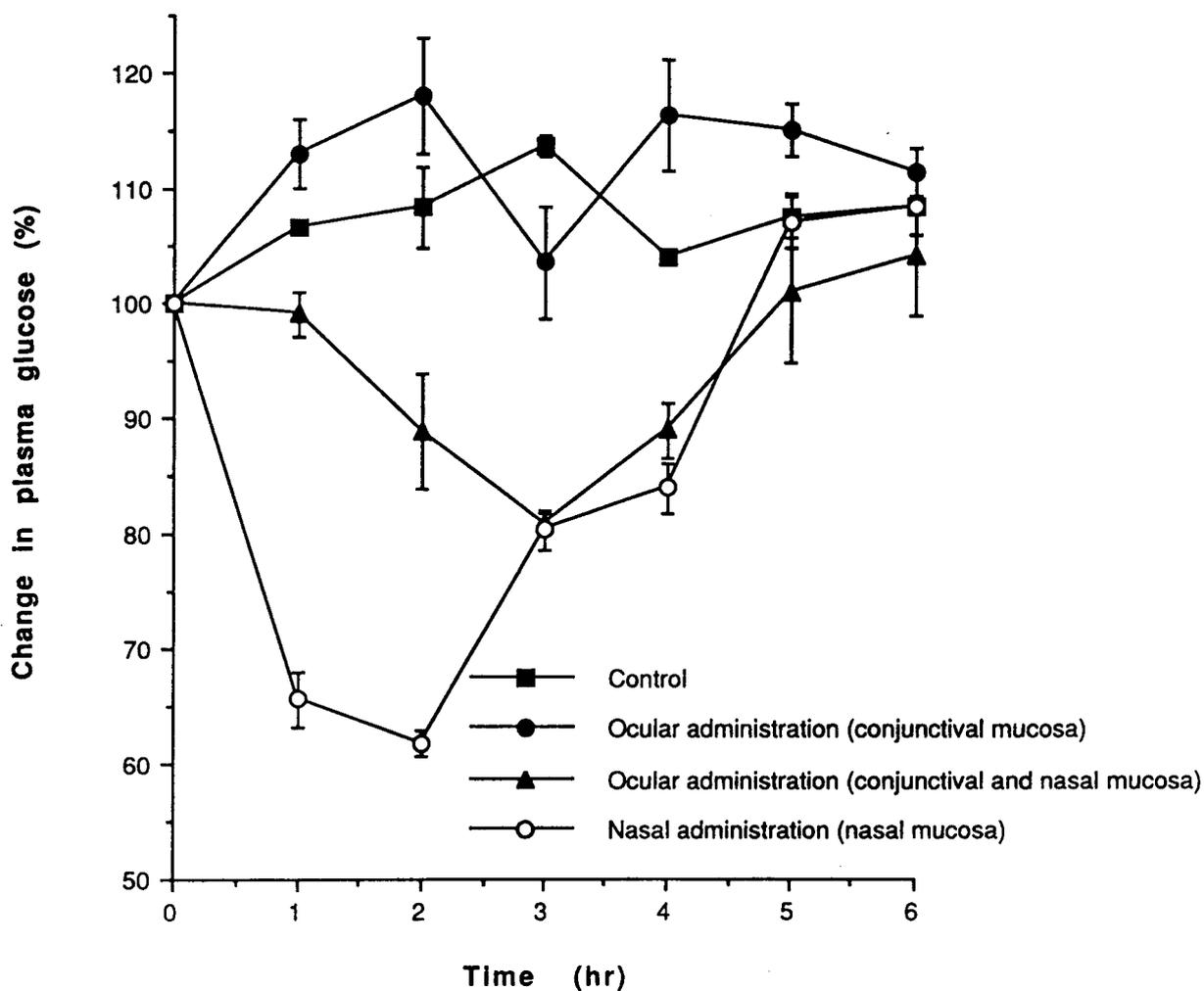


Fig. 6. Plasma glucose level after ocular and nasal administrations of insulin suspension in peanut oil (10.0 IU/kg).

Each value represents the mean±S.D. (n=3).

AUG 値は直接鼻粘膜に投与した系(鼻粘膜の系)が一番大きかったが、最大血糖低下作用時間は、鼻涙管を経由する系では投与後 3 時間、鼻粘膜の系では 1~2 時間であった。このように、薬物を鼻涙管経由で吸収させると AUG 値は鼻粘膜の系よりも劣るが、血糖低下作用の持続性を示すことが明らかとなった。

また、インスリン含有ゴマ油およびラッカセイ油の点眼油によって、インスリンが各粘膜から吸収されたことは、Table 1 に示すように⁴⁸⁾、油の含有するリノール酸とオレイン酸、特にオレイン酸のモノ、ジ、トリの混合グリセリド類の比率が他の植物油に比べ大きく、ここでは結果を示さなかったが、これらの含有率の低い大豆油や菜種油等の点眼油ではインスリンの粘膜吸収がほとんど認められなかったことから、これらのグリセリド類がインスリンの粘膜吸収性に関与していると推察された^{49,50)}。また、流動パラフィンは常温で液体の炭化水素(1分子中の炭素数 15~20 くらい)の混合物であり、リノール酸やオレイン酸を含まないが、吸収促進作用に寄与していると推察された。

ここで、これまでの結果の生物学的利用能と既にインスリンの吸収促進剤としてよく報告されているグリココール酸ナトリウム(NaGC)^{28,29)}を 1.0%含むリン酸塩緩衝生理食塩液(PBS,pH7.31)で調製したインスリン製剤を経鼻投与した場合(鼻粘膜の系のみ)とを比較した(Fig. 7)⁵¹⁾。

鼻粘膜の系において、点眼油の中ではラッカセイ油、流動パラフィン、ゴマ油の順で生物学的利用能は高く、ラッカセイ油は人工涙液や NaGC 含有 PBS 製剤よりも高い生物学的利用能を示した。これにより、インスリンの経鼻吸収においてラッカセイ油は有効な基剤であると考察された。

Table 1 Composition and property of oily materials

| Oily material | Viscosity η ($10^{-6}\text{m}^2\text{s}^{-1}$, 37°C) | Specific gravity d_{44}^{20} | Composition of fatty ester in glyceride (%) | | Total sterols in oil (mg/g) |
|---------------|---|-----------------------------------|--|---------------|-----------------------------------|
| | | | oleic acid | linoleic acid | |
| Sesame oil | 38.0 | 0.914~0.921 | 37~49 | 35~48 | 13.2 |
| Peanut oil | 44.8 | 0.909~0.916 | 53~71 | 13~27 | 5.8 |
| Soybean oil | 28.9 | 0.916~0.922 | 15~33 | 43~56 | 7.9 |
| Rape seed oil | 50.9 | 0.906~0.920 | 12~18 | 12~16 | 8.8 |

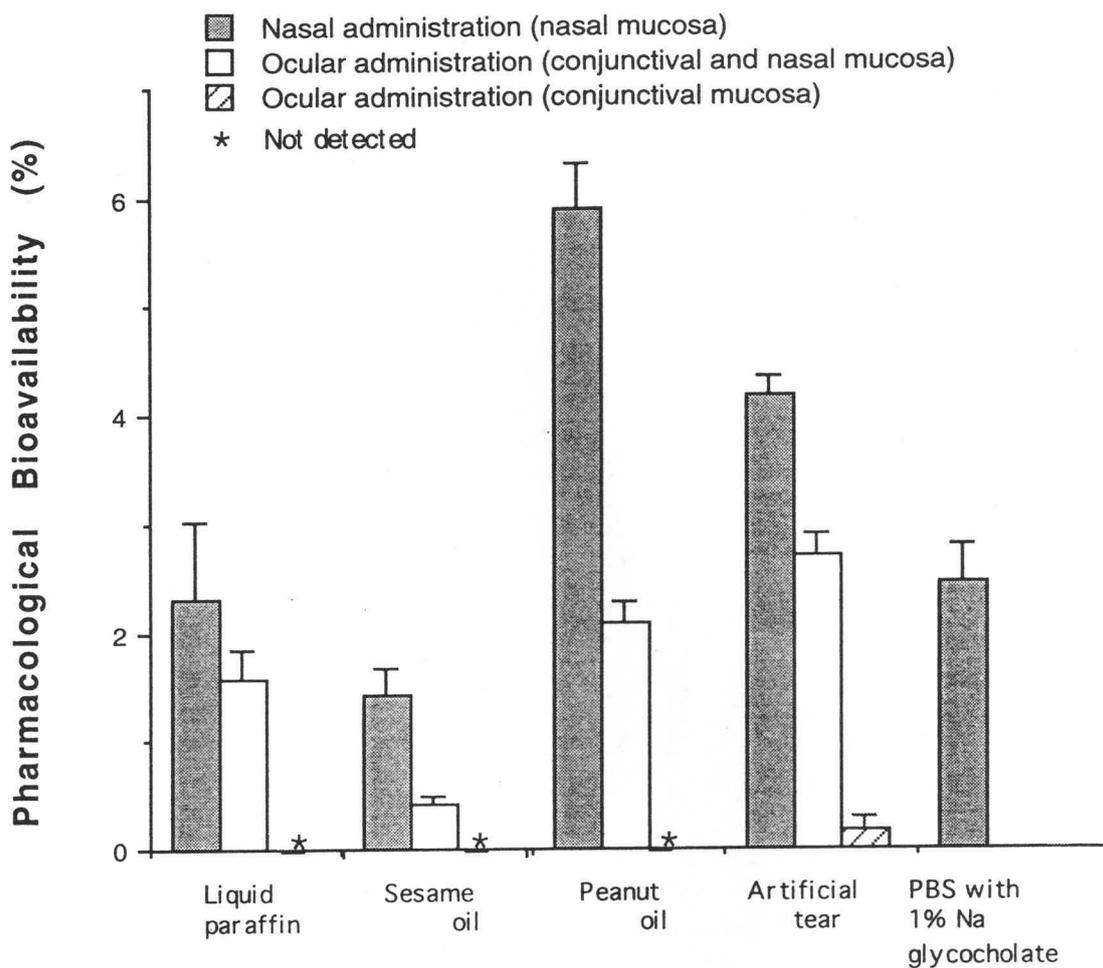


Fig. 7. Pharmacological bioavailability after nasal administrations of insulin suspension in various oils and artificial tear solution (10.0 IU/kg). Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

第 1-4 節 まとめの部

インスリンを含有した点眼油を点眼すると、インスリンは結膜から吸収された。なかでも流動パラフィン、ゴマ油およびラッカセイ油において吸収が認められた。ゴマ油およびラッカセイ油では、成分中に含まれるリノール酸とオレイン酸、特にオレイン酸のグリセリド類の比率が大きいことによるものと推察された。

人工涙液を用いることで、インスリンは結膜だけでなく鼻粘膜からも吸収されたことから、インスリンは製剤から涙液に分配し、その涙液は鼻涙管を經由して鼻粘膜へ送られることが明らかとなった。そこで、インスリンの点眼油を用いて点眼と経鼻投与による吸収性を比較した。

点眼し鼻涙管を經由する系(結膜および鼻粘膜からの吸収)では、最大血糖低下作用を示した時間は投与後 3 時間であり、経鼻投与の鼻粘膜の系では 1~2 時間であった。このことから、薬物を点眼し鼻涙管を經由させる系では、鼻粘膜の系より血糖低下作用の持続性を示すことが明らかとなった。

点眼は、点眼油から涙液への薬物の放出を改善すれば、眼を薬物の貯留庫とし、吸収促進剤を用いずにインスリンの吸収性を持続させることが可能である。このように、点眼して涙液から鼻涙管を經由し経鼻吸収させることは薬物の投与経路として有用である。

しかしながら、インスリンの吸収性を示す生物学的利用能は鼻粘膜に直接投与したものが最も大きかったことから、次章では経鼻投与において各種剤形と吸収促進剤を用いて吸収性を高めることにした。

第 2 章 各種剤形と吸収促進剤

第 2-1 節 序論

SGは、大豆より抽出して得られるステロイド配糖体で、ステロイド骨格を基本骨格にもつモノグルコシド混合物である大豆由来ステロールグルコシドであり、SSはSGのアグリコンであるステロールである。特にSGは保湿性に富んでいることから、化粧品分野において皮膚または粘膜の保湿剤として用いる研究はなされているが^{41,42,46,47}、薬物の粘膜吸収における吸収促進剤として用いた研究はいまだ報告されていない。そこで、本章ではSGおよびSSを新規吸収促進剤として用いたインスリンの液状製剤や粉末製剤を調製し、これらの経鼻吸収性の向上について検討を行った。さらに、粉末製剤における賦形剤としてのSGの有用性も検討した。

第 2-2 節 実験の部

2-2-1 試薬の部

インスリンは、bovine pancreas (24.4 および 25.7 IU/mg) および porcine pancreas (27.8 IU/mg) で SIGMA CHEMICAL CO. 製を、流動パラフィン(日本薬局方品)は岩井化学薬品工業(株)製を、ラッカセイ油(日本薬局方品)は小境製薬(株)製を用いた。SG および SS(大豆由来ステロールグルコシド混合物およびそのステロール、Fig. 1)は、龍角散(株)より提供していただいた。また、 β -sitosterol- β -glucoside (Sit-G) も龍角散(株)で合成し提供していただいた。 β -sitosterol (Sit)、campesterol (Camp)、stigmasterol (Stig) および brassicasterol (Bras) はタマ生化学(株)製を用いた。L-グルタミン酸、ステアリン酸アルミニウムおよびカルボキシビニルポリマー-105 (CP) は和光純薬工業(株)製を、ムチン (bovine submaxillary glands) は SIGMA CHEMICAL CO. 製を、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) は日本曹達(株)製を、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) は国産化学(株)製を、アルブミン (bovine albumin) は IRVINE SCIENTIFIC 製を、NaGC はナカライテスク(株)製を用いた。その他の、試薬は全て特級品を用いた。

2-2-2 試料調製

1) 液状製剤の調製

インスリン水性懸濁液製剤はインスリン 20.0 mg および吸収促進剤 50.0 mg を PBS (pH 7.31) 5.0 mL 中に溶解または微細均等に懸濁させ、

調製した。

油性懸濁液製剤は前述の「1-2-2 試料調製」の点眼油の調製方法にしたがって調製した。

2)粉末製剤の調製

物理的混合製剤は、インスリン 10.0 mgと SG 90.0 mgを混合して 200 号メッシュで篩過して調製した。

凍結乾燥製剤は、Chart 1に示すように、インスリン 2～10 mgを 0.1 N 塩酸 200 μ Lを加えて溶解し、200 mLの精製水を加え、さらに賦形剤を加えて溶解した。この溶液に 0.1 N 水酸化ナトリウムを 200 mL加えて pH7.4に調整した。次に 70 mgの吸収促進剤と 20 mgの賦形剤を加えて攪拌し、微細均等に懸濁した。この懸濁液を凍結乾燥し、200 号メッシュで篩過して粉末製剤を調製した。

2-2-3 投与方法

1)液状製剤の投与方法

液状製剤は前述の「1-2-3 投与方法」の項に準じて投与した。

2)粉末製剤の投与方法

液状製剤で用いたポリエチレンチューブを先端に装着した注射筒の中に各種粉末製剤を約 10.0 mg装填し、チューブの先端を家兎の鼻腔に直接 2.0 cm挿入した。投与の際、注射筒に 2連球を接続し、空気を注射筒内に送り込むことで粉末製剤を鼻腔内へ投与した^{28,52)}。

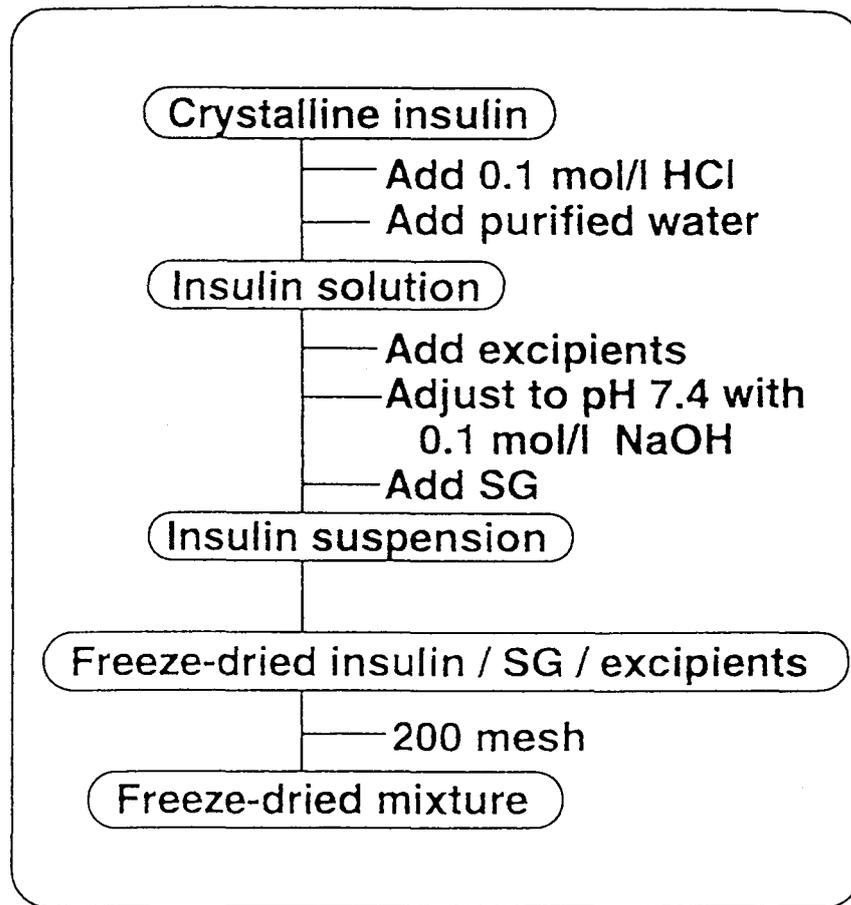


Chart 1 Method of Preparation of Freeze-dried Insulin Mixture

2-2-4 血糖値の測定

血糖値の測定は前述の「1-2-4 血糖値の測定」の項と同様に測定した。

2-2-5 血中インスリン濃度の測定

血中インスリン濃度の測定は前述の「1-2-4 血糖値の測定」の項と同様にして得られる血漿を試料とした。その試料(100 μ L)をインスリン・EIA「ダイナボット」(ダイナボット(株)製)を用いて血中インスリン濃度を測定した。

2-2-6 生物学的利用能の算出

血中グルコース濃度からの薬理学的生物学的利用能は、前述の「1-2-5 生物学的利用能の算出」の項と同様に算出した。

血中インスリン濃度については、インスリン製剤投与後得られる血中インスリン濃度-時間曲線において、曲線下面積(AUC)を台形法により求めた。生物学的利用能は、血中グルコース濃度と同様、インスリンを0.5 IU/kg 静脈注射することにより得られるAUCと比較して、式(2)により求めた。

$$\text{生物学的利用能}(F) = (\text{AUC}_{i.n.}/\text{dose}_{i.n.})/(\text{AUC}_{i.v.}/\text{dose}_{i.v.}) \quad (2)$$

2-2-7 HPLCによるSSの各成分の定量

SSの各成分は以下の条件でHPLCにより定量した。

検出器:紫外吸光度計 SPD-6AV(島津製作所製)、測定波長:210 nm、

検出感度:0.08 AUFS、クロマトパック:C-R6A (島津製作所製)、移動相:
CH₃OH、移動相流速:0.5 mL/min、カラム:内径 4.6 mm、長さ 150 mm
の C-18 カラム (ODS-2、YMC 社製)、カラム温度: 40 ℃。

2-2-8 統計学的解析

得られたデータの統計学的評価は、Studentの *t* 検定を行い、*p* 値 0.05
と 0.01 以下を有意とした。

第 2-3 節 結果の部

2-3-1 水性液剤における SG および SS のインスリン経鼻吸収促進作用

水性懸濁液製剤において、SG 濃度のインスリン経鼻吸収促進作用への影響について検討した (Fig. 8)。SG が 1.0% 以下の濃度では濃度と AUG との間に相関性が認められたが、1.0% を越えるとその吸収促進作用に飽和がみられた。これは、投与部位である鼻粘膜の有効面積がほぼ一定であるために、SG の濃度を上げて鼻粘膜と接触できる SG の量が限られ、その作用が飽和になったと推察された。

次に、1% SG および SS 含有インスリン水性懸濁液剤における薬理学的生物学的利用能から経鼻吸収促進作用を比較すると、SG の方が SS よりもその作用は高い傾向がみられた (Fig. 9)。

また、SG は Fig. 1 に示すような混合物であり、SS はそのアグリコンの混合物であることから⁵³⁻⁵⁸⁾、SS の各成分を 1.0% 添加した水性懸濁液剤を用いて、各成分の吸収促進作用の比較を行った (Fig. 9)。

SS の各成分による吸収促進作用の強さは、薬理学的生物学的利用能から $Sit \geq Camp > Stig$ の順に大きくなった。ペプチド性薬物の経鼻吸収促進剤として、最近注目されているアルキルグルコシドにおいては、アルキル鎖の長さや c.m.c. 濃度は促進効果に関係がみられなかったことが報告されている^{31,59)}。しかし、SS の成分においては、促進効果の高い順は、HPLC で測定した各成分の疎水性の高い順と一致した (各成分の保持時間; Sit: 20.5 min, Camp: 18.6 min, Stig: 17.0 min)。したがって、疎水性の高い成分が吸収促進作用が高いと考察された。また、SS の各成分の

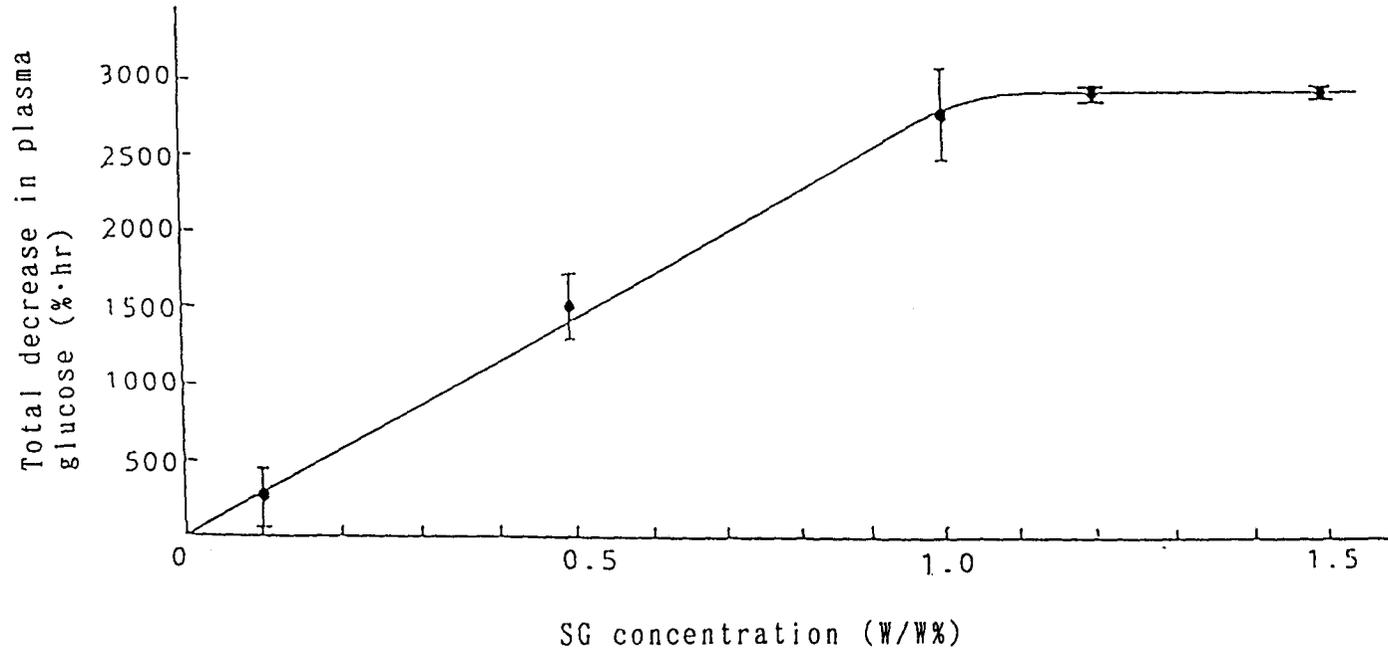


Fig. 8. Effect of the concentration of SG in an insulin suspension in phosphate-buffered saline on total decrease in plasma glucose. The curve was determined by the linear least-squares method using experimental mean values (10.0 IU/kg).

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

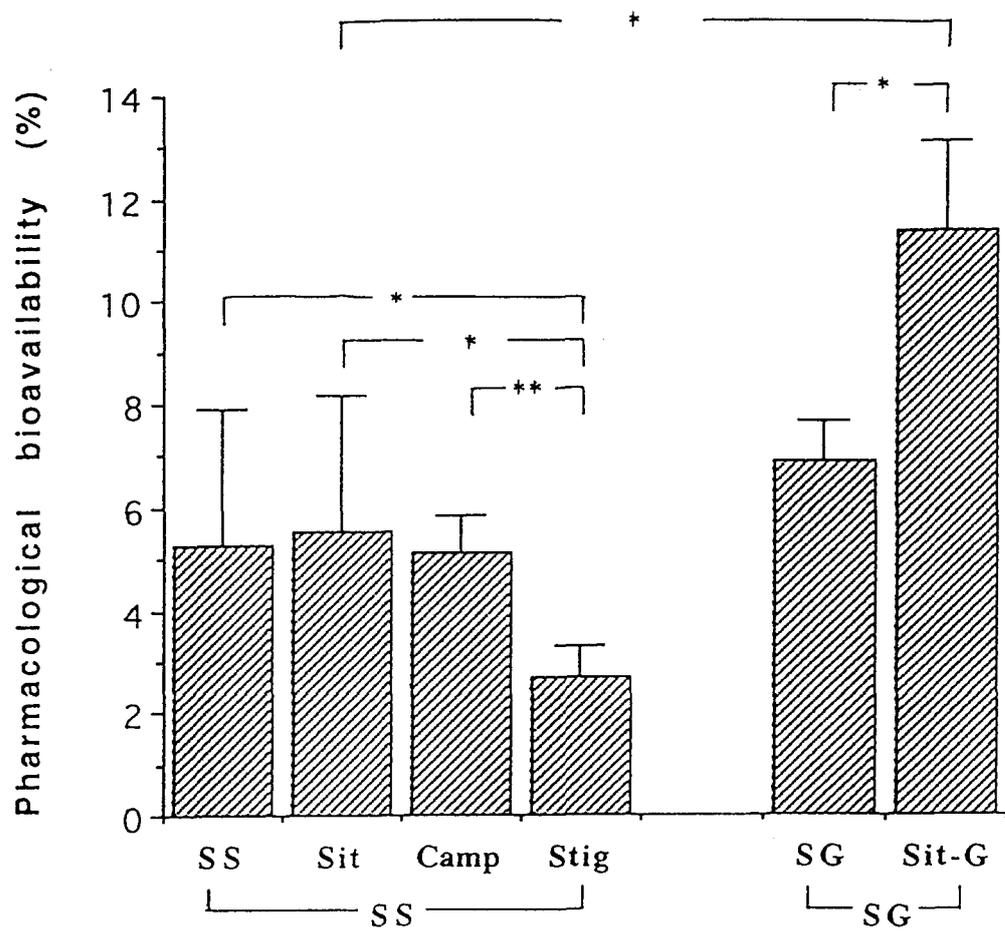


Fig. 9. Pharmacological bioavailability of nasally administered insulin (10.0 IU/kg) in PBS containing 1.0 % of each component of SS or SG.

Each value represents the mean±S.D. (n=3~4).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control.

混合率と各成分の薬理学的生物学的利用能との値から、混合物であるSSの生物学的利用能の理論値を算出すると、SSの実測値(5.3%)に近い値(4.6%)となった。各成分の促進作用は各々影響していないと推察した。

そこでSGについては、SSの成分の中で最も高い吸収促進作用を示したSitに対応するSit-Gを1.0%添加した水性懸濁液剤で検討を行った(Fig. 9)。その結果、Sit-Gが混合物であるSGよりも有意に高い促進作用を示し、さらに、Sit-GはそのアグリコンであるSitよりも有意に高い促進作用を示した($p < 0.05$)。SGの薬理学的生物学的利用能は6.7%であり、Sit-Gでは11.3%を示した。

SGおよびSSはこのように鼻粘膜には吸収促進作用が認められたが、角質化した口腔粘膜においては吸収促進作用がほとんど認められなかったことから⁶⁰⁾、SGのステロール部分は疎水性の粘膜部位に、グルコシド部分は他の部位、例えば親水性の粘液等に関与していると推察した。D.J.Pillionら⁵⁹⁾はアルキルグルコシド類の吸収促進剤において、同じアルキル鎖でも結合している糖の種類により、その効果に差があることを報告している。これは、吸収促進効果に糖の関与があることを示唆し、このSGの結果によく対応した。

2-3-2 油性液剤におけるSGおよびSSのインスリン経鼻吸収促進作用

油性懸濁液製剤において、非植物性油である流動パラフィンを用いてSGおよびSSのインスリン経鼻吸収促進効果を検討した(Table 2)。

流動パラフィンにおいても、水性懸濁液製剤の場合と同様、SGの方がSSよりも吸収促進作用が強く、SGを1.0%添加すると薬理学的生物学的

利用能は3.4倍の8.3%の値に上昇した。また、この値は水性懸濁製剤で得られる生物学的利用能よりも高くなった(6.7%)。

これは、SG等のステロールグルコシドには保湿効果があることが報告されており^{38,39)}、化粧品分野において有用性が研究されていることから、SGが鼻粘膜の細胞に何らかの作用を及ぼし、親油性の高い細胞間隙等において油性溶液がインスリンの運搬媒体として作用したためと推察した。したがって、インスリンの運搬媒体としては水溶液よりも油性溶液の方が有効であることがこれらの結果から推察された。

次に油性懸濁液製剤において、インスリンの経鼻吸収性に最も促進効果があったラッカセイ油を用いて、SGおよびSSのインスリンの経鼻吸収性について検討を行った(Table 2)。

生物学的利用能は流動パラフィンるときと同様に、ラッカセイ油のみでは6.9%であったが、SGを1.0%添加することで1.7倍の11.6%となった。さらに、SGとSSを3.5%添加したが、水性懸濁液製剤るときと同様に、SGにおいては、吸収促進作用に飽和が認められたが、SSではわずかな増加がみられた。

さらにインスリンの生物学的利用能を向上させるために、製剤の粘膜上での滞留時間の延長と鼻粘膜上のタンパク分解酵素阻害による改善を検討した。まず、ラッカセイ油製剤をより鼻粘膜上に滞留させるために基剤の粘性を上げようとした。1.0% SG添加ラッカセイ油にチキソトロピー化剤のステアリン酸アルミニウムを添加してインスリンの経鼻吸収性を試みた(Table 3)⁶¹⁾。しかし、インスリンの経鼻吸収性は低下した。

Table 2. AUG, AUC and bioavailability after nasal administration of insulin in liquid paraffin and peanut oil containing the SG or SS in rabbits (10.0 IU/kg).

| Enhancer | AUG (0-6hr) glucose assay (%*hr) | AUC (0-6hr) insulin assay (μ IU*hr/mL) | Bioavailability | |
|-------------------------|--|---|------------------------|------------------------|
| | | | glucose assay (D %) | insulin assay (F %) |
| •i. v. (0.5 Iu/kg) | 1899.6 \pm 7.4 | 87.9 \pm 9.1 | | |
| •Liquid paraffin system | | | | |
| None | 800.5 \pm 80.3 | 40.6 \pm 6.4 | 2.1 \pm 0.21 | 2.3 \pm 0.71 |
| 1.0% SG | 2727.0 \pm 33.5 | 146.2 \pm 3.6 | 7.2 \pm 0.09 | 8.3 \pm 2.22 |
| 1.0% SS | 1404.5 \pm 72.2 | 75.5 \pm 2.6 | 3.7 \pm 0.19 | 4.3 \pm 1.15 |
| •Peanut oil system | | | | |
| None | 2264.5 \pm 97.1 | 121.8 \pm 6.5 | 6.0 \pm 0.04 | 6.9 \pm 1.88 |
| 1.0% SG | 3947.5 \pm 47.6 | 204.8 \pm 1.5 | 10.4 \pm 0.13 A | 11.6 \pm 3.10 |
| 3.5% SG | 3516.1 \pm 78.2 | 195.8 \pm 2.6 | 9.3 \pm 0.21 | 11.1 \pm 2.97 |
| 1.0% SS | 3257.5 \pm 30.5 | 165.4 \pm 3.9 | 8.6 \pm 0.09 | 9.4 \pm 2.52 |
| 3.5% SS | 3958.0 \pm 40.1 | 206.7 \pm 3.8 | 10.4 \pm 0.21 B | 11.8 \pm 3.14 |

Each value represents the mean \pm S. D. (n=3).
A and B values are not significant (p>0.05).

Table 3. AUG, AUC and bioavailability after nasal administration of insulin with 1.0% (w/v) SG in peanut oil containing additives in rabbits (10.0 IU/kg).

| Additives | AUG (0-6hr) glucose assay (%*hr) | AUC (0-6hr) insulin assay (μ IU*hr/mL) | Bioavailability | |
|--------------------------------|--|---|------------------------|------------------------|
| | | | glucose assay (D %) | insulin assay (F %) |
| 1.0% SG | 3947.5 \pm 47.6 | 204.8 \pm 1.5 | 10.4 \pm 0.13 A | 11.6 \pm 3.10 |
| 0.5% glutamic acid (+ 1.0% SG) | 4372.0 \pm 46.0 | 233.5 \pm 2.9 | 11.5 \pm 0.13 B | 13.3 \pm 3.54 |
| 1.0% glutamic acid (+ 1.0% SG) | 1115.0 \pm 32.2 | 55.8 \pm 1.2 | 2.9 \pm 0.09 | 3.2 \pm 0.85 |
| 1.0% Al stearate (+ 1.0% SG) | 494.0 \pm 20.0 | 61.2 \pm 3.2 | 3.0 \pm 0.08 | 3.5 \pm 0.95 |

Each value represents the mean \pm S. D. (n=3-4).

A and B values are significant (p<0.05).

これは、鼻粘膜上における製剤の滞留性は増加したが、基剤中の SG だけでなくインスリン分子の拡散も低下したためと推察した。

次に鼻粘膜上に存在するペプチダーゼによるインスリンの分解を阻害するために、1.0% SG 添加ラッカセイ油にさらにタンパク分解酵素阻害剤の L-グルタミン酸を添加した (Table 3)⁶²⁾。その結果、0.5% L-グルタミン酸添加製剤においては、血糖低下作用に若干の改善がみられたが、生物学的利用能では有意な差が認められなかった。また、1.0% L-グルタミン酸添加製剤においては、基剤中に含まれるインスリン含量よりも L-グルタミン酸添加量の方が極めて多いために、鼻粘膜上においてインスリンが L-グルタミン酸と競合したために、インスリンの鼻粘膜吸収性が低下したものと推察される。

2-3-3 粉末製剤における SG のインスリン経鼻吸収促進作用

粉末製剤の調製には代表的なものとして物理的混合と凍結乾燥法の 2 種類がある。そこで、粉末製剤の調製方法によるインスリンの経鼻吸収性の比較を行った。吸収促進剤である SG を賦形剤として用い、物理的混合製剤では 10.0 IU/kg、凍結乾燥製剤では 2.0 IU/kg の用量で SG 含有インスリン製剤を投与し、血糖値の時間推移を調べた (Fig. 10)。

物理的混合製剤では 10.0 IU/kg を投与しても、ほとんど血糖低下作用が認められなかった。それに対し、凍結乾燥製剤では 2.0 IU/kg のインスリンの投与で、大きな血糖低下作用が認められた。また、そのときの生物学的利用能は、物理的混合製剤では 2.67% であったのに対し、凍結乾燥製剤では 26.3% と物理的混合製剤のときよりも 10 倍も高い値を示

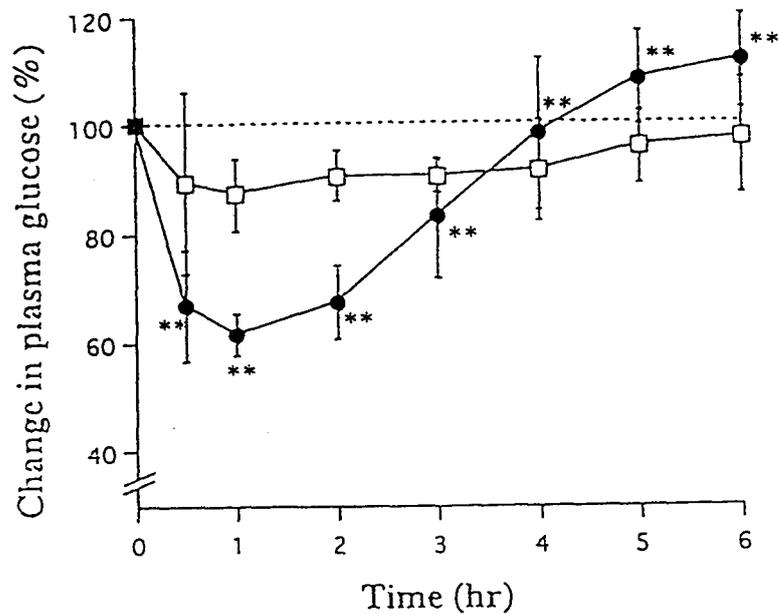


Fig. 10. Effect of physical and freeze-dried mixtures of bovine insulin with SG (insulin : SG = 2 : 90, weight) on plasma glucose after nasal administration.

Each value represents the mean±S.D. (n=3).

**p < 0.01 versus physical mixture.

□, physical mixture (10.0 IU/kg); ●, freeze-dried mixture (2.0 IU/kg).

し、両製剤間において有意な差がみられた($p < 0.01$)。これは、凍結乾燥によってSGの粒子の表面にインスリンが非結晶形で均一に付着しているためと推察された。

インスリンの経鼻吸収性を向上させるためには、促進剤による粘膜透過性と粘膜部位での薬物の滞留性を改善する必要がある。そこで、賦形剤に粘膜付着性高分子のCP、HPCおよびCMC-Na、粘液成分のムチン、インスリンの安定化作用のある牛血清アルブミンを用いた。インスリン:SG:賦形剤の重量比率2:70:20の粉末製剤と対照としてインスリン:SGの重量比率2:90の粉末製剤を調製した。2.0 IU/kgで各種インスリン粉末製剤の投与後の血糖値の推移をFig. 11に、血中グルコース濃度-時間曲線の100%ライン下面積(AUG)と、そこから求められる薬理的生物学的利用能(D%)をTable 4に示す。

賦形剤がSGのみの製剤やCMC-Naを用いた製剤は、投与後約1時間に、CPやムチンを用いた製剤では投与後約2時間に最大血糖低下作用を示した。特に、CPを用いた粉末製剤において、投与後薬6時間にわたって最も吸収促進効果の持続が認められた。薬理的生物学的利用能(D%)は、SGのみの場合の26.3%に対して、CPで37.5%、ムチンで31.1%、HPCで31.8%まで上昇した。

N.G.M.Schipperら⁶³⁾は、家兎におけるジメチル β -シクロデキストリンの粉末製剤によるインスリン経鼻吸収で、13%の薬理的生物学的利用能を、また、W.A.Leeら⁵³⁾は羊においてタウロジヒドロフシジン酸ナトリウムの粉末製剤によるインスリン経鼻吸収で、31.5%の薬理的生物学的利用能を報告している。

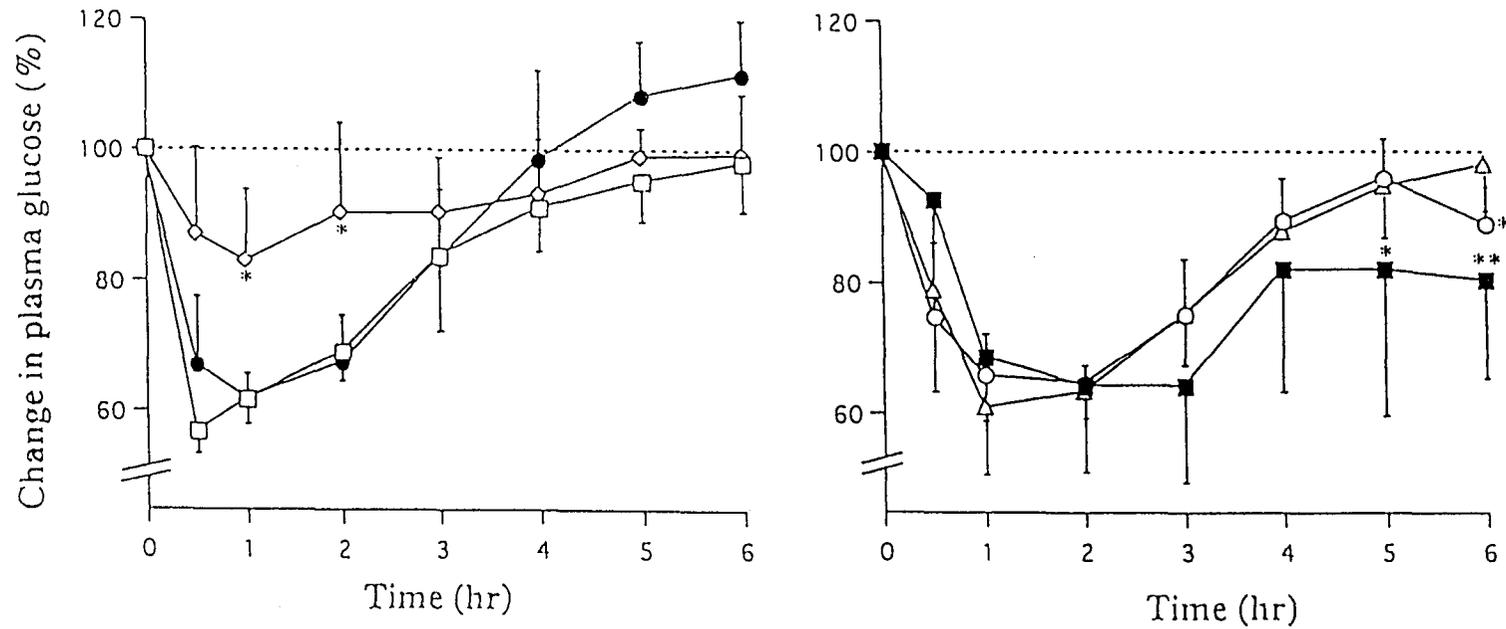


Fig. 11. Effects of various excipients in the freeze-dried mixture of bovine insulin, SG and excipients (2 : 70 : 20) on the plasma glucose after nasal administration (2.0 IU/kg).
 SG : mixture of insulin and SG (2 : 90).
 Each value represents the mean \pm S.D. (n=3-4).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus SG.

□, CMC-Na; ◇, albumin; ●, SG; ■, CP; ○, mucin; △, HPC.

Table 4. Effects of various excipients in a freeze-dried mixture of insulin, SG and excipients (2 : 70 : 20, 2 IU/kg) on total fall of the glucose reduction-time (AUG) and the pharmacological bioavailability (D %).

| Excipients | AUG(0-6hr) | D %(0-6hr) |
|--------------|--------------|------------|
| -- (SG only) | 100.7 ± 25.2 | 26.3 ± 0.3 |
| CP | 143.7 ± 72.9 | 37.5 ± 0.8 |
| Mucin | 119.2 ± 35.0 | 31.1 ± 0.4 |
| HPC | 121.9 ± 21.9 | 31.8 ± 0.2 |
| CMC-Na | 108.9 ± 8.5 | 28.4 ± 0.1 |
| Albmin | 51.3 ± 34.7 | 13.4 ± 0.4 |

} *

Each value represents the mean ± S.D. (n=3-4). *p<0.05

しかし、Table 4 から、賦形剤が SG 単独のものは牛血清アルブミン以外の賦形剤と統計学的には有意な差がなく、SG は CP やムチン、HPC 等と吸収促進効果はほぼ同等であった。これは、噴霧容器からの SG 含有製剤の分散性、鼻腔内での製剤の分散性、SG 上のインスリンの分散性がよいことや、また、SG の保湿性も鼻粘膜上への製剤の滞留性の向上に關与しているのではないかと推察した。したがって、SG は吸収促進剤だけでなく、粉末製剤における賦形剤としての有用性も示唆された。

第 2-4 節 まとめの部

SG の家兎におけるインスリンの鼻粘膜吸収促進作用が、水性液剤、油性液剤および粉末製剤の 3 種の剤形で認められた。

水性液剤において、SG は、ある一定の濃度に達すると吸収促進作用に飽和が認められた。また、SG の経鼻吸収促進作用が SS よりも高い傾向がみられた。SS の各成分における吸収促進作用の強さは、 $Sit \geq Camp > Stig$ の順に強かった。これは、各成分の疎水性の高い順と一致した。したがって、疎水性の高い促進剤が吸収促進作用が高いと考察された。しかし、疎水基をもつ SG は SS より吸収促進作用が高く、SG の薬理学的生物学的利用能は 6.7% であり、さらにその成分の Sit-G では 11.3% であった。これから、SG の吸収促進作用は、疎水基部分だけではなくグルコシド部分も寄与していると推察された。

油性液剤において、非植物性油である流動パラフィンにおいても、SG を添加すると薬理学的生物学的利用能は 3.4 倍の 8.3% に上昇した。最もインスリンの経鼻吸収性に促進効果があったラッカセイ油においても、SG を 1.0% 添加することで生物学的利用能は 1.7 倍の 11.6% となった。

1.0% SG 添加ラッカセイ油製剤に、さらにタンパク分解酵素抑制作用のある L-グルタミン酸と粘性を高めるためにステアリン酸アルミニウムを各々添加し、経鼻吸収性の向上を検討した。L-グルタミン酸添加では血糖低下作用に若干の改善が認められたが、生物学的利用能 (13.3%) では有意な差が認められず、またステアリン酸アルミニウム添加においても油の粘度が上昇し、鼻粘膜上で製剤の滞留性が増したものの製剤中のイ

ンスリンの拡散が低下し、インスリンの経鼻吸収性の向上がみられなかった。

粉末製剤において、調製方法では、物理的混合製剤よりも凍結乾燥製剤の方がインスリンの経鼻吸収性が高いことが明かとなった。これは、凍結乾燥をすることでSGの粒子の表面にインスリンが非結晶形で均一に付着しているためと推察された。また、SGとインスリンの他にCPやムチンを賦形剤として添加することにより、最大血糖低下作用時間の遅延や効果の持続を示し、薬理的生物学的利用能は、各々35.7%、31.1%まで上昇した。SG単独の粉末製剤は、CPやムチン、HPC等を含む粉末製剤の薬理的生物学的利用能と有意差がなかったことから、SGは吸収促進剤としてだけでなく、粉末製剤における賦形剤としても有用性が高いことが示唆された。

剤形別にSGの吸収促進作用を薬理的生物学的利用能で比較すると、粉末製剤(26.3%)、ラッカセイ油性液剤(10.4%)、水性液剤(6.7%)の順であった。これは、粉末製剤が液状製剤よりも鼻腔内における滞留性が長いことに起因していると推察した。また、油性液剤の方が水性液剤に比べて吸収促進効果が高かったのは、油自体に吸収促進作用があるためと推察した。

第 3 章 SG と SS の吸収促進機構

第 3-1 節 序論

本章では SG および SS の吸収促進作用機構を調べた。一般に吸収促進剤の作用機構は、薬物との相互作用と、鼻粘膜組織に作用するものの 2 種類に大別することができる。

ここではまずインスリンと SG の相互作用、すなわち、インスリンのモノマー化について検討した⁶⁴⁾。鼻粘膜の脂質への作用については、*in vitro* におけるインスリンの膜透過実験を行った⁶⁴⁾。

一般に薬物の鼻粘膜吸収は細胞膜への pH-分配仮説に従う受動拡散による経細胞ルートと考えられているが、インスリンのように高分子の薬物の透過は細胞間の密着結合(タイトジャンクション)の間隙から透過する細胞間隙ルートと考えられている。このタイトジャンクションはカルシウムイオンを介した接着分子により固く結合されており、このカルシウムイオン濃度が低下すると結合部が開くと考えられている⁶⁵⁾。そこで、1.0% SG 含有インスリン PBS 溶液を用いて、インスリンの鼻粘膜透過性における鼻粘膜中のカルシウムイオンの影響を検討した⁶⁶⁾。

第 3-2 節 実験の部

3-2-1 試薬の部

インスリンは、bovine pancreas (24.4 および 25.7 IU/mg) で SIGMA CHEMICAL CO.製を、流動パラフィン(日本薬局方品)は岩井化学薬品工業(株)製を、ラッカセイ油(日本薬局方品)は小境製薬(株)製を用いた。SG および SS(大豆由来ステロールグルコシド混合物およびそのステロール、Fig. 1)は、龍角散(株)より提供していただいた。L-グルタミン酸、n-カプリル酸およびラウリルアルコールは和光純薬工業(株)製を、NaGC はナカライテスク(株)製を用いた。その他、試薬は全て特級品を用いた。

3-2-2 試料調製

水性懸濁液製剤および油性懸濁液製剤は前述の「1-2-2 試料調製」の液状製剤の調製法にしたがって調製した。

3-2-3 in vitroにおけるインスリンの膜透過性実験の方法

人工膜にはセルロースメンブランフィルター(RS型、ザルトリウス(株)製)を用いた。脂質膜は、カプリル酸とラウリルアルコールを重量比 4 : 0.92 で混合し、30℃に加温した脂質溶液中に5分間人工膜を浸してから、取り出してろ紙にはさんで過剰の脂質を拭き取ったものを用いた^{40,67,68})。また、鼻粘膜は家兔をエーテル麻酔後、過飽和塩化カリウム水溶液を用いて安楽死させ、直ちに摘出した。

膜透過実験は内田らの方法に準じて行った^{29,67,69)}。ドナーセルにはインスリンをPBSに懸濁させた溶液を、レシーバーセルにはPBSをそれぞれ6.0 mL用いた。セルを37℃の恒温槽中に固定し、実験中はドナーセルおよびレシーバーセルに攪拌子を入れ、スターラーで攪拌した⁶⁵⁾。実験開始後、経時的にレシーバー溶液の一部を採取し、3時間までのインスリン透過量をEIA法またはHPLC法で定量した。

インスリン透過量を時間に対してプロットし、その直線の傾きから、(3)式にしたがってインスリンの膜透過係数(K)を算出した。

$$J = (dC_r/dt) \cdot V/S = KC_d \quad (3)$$

ここで、Jはフラックス、Sは有効拡散面積、Vはレシーバー溶液の体積、 C_d は、PBSにおけるインスリンの溶解度、 C_r はレシーバー中のインスリン濃度、tは時間である。なお、 C_d の値は、コントロールのPBSでは38.3 IU/mL、1.0% SG含有PBSでは34.7 IU/mL、1.0% SS含有PBSでは30.4 IU/mLであった。また、SGおよびSSのPBSへの溶解度(37℃)は、1.26 mg/mLと1.11 mg/mLであった。したがって、1.0% SGやSS含有PBSは懸濁液である。

3-2-4 in vivo における家兎への製剤の投与方法

液状製剤は前述の「1-2-3 投与方法」の項に準じて投与した。

3-2-5 血糖値の測定

血糖値の測定は前述の「1-2-4 血糖値の測定」の項と同様に測定した。

3-2-6 インスリン濃度の測定

1)EIA 法

前述の「2-2-5 血中インスリン濃度の測定」の項に準じて試料中のインスリン濃度を測定した。

2)HPLC 法

試料中に含まれるインスリンを以下の条件で HPLC により、絶対検量線法により定量した⁷⁰⁾。

検出器:紫外部吸光光度計 SPD-6AV (島津製作所製)、測定波長:220 nm、
検出感度:0.08 AUFS、クロマトパック:C-R6A (島津製作所製)、移動相:
水相:アセトニトリル混液(69:31)、ただし水相は NaCl 0.1 mol と
トリフルオロ酢酸 0.7 mL を精製水 700 mL に溶解して調製したもの。移
動相流速:1.0 mL/min、カラム:内径 4.6 mm、長さ 150 mm の C-18 カラ
ム (AP-302、YMC 社製)、カラム温度:室温。

3-2-7 円偏光二色性分析

インスリンの PBS 溶液(0.5 mg/mL)、SG を飽和させた PBS 溶液、およ
び対照として NaGC の 2.5、10、20 mM PBS 溶液を調製した。これらを
円偏光二色性分光偏光計(JASCO Model J600、日本分光工業(株)製)
を用い、波長 300 nm~250 nm の範囲、スキャンスピード 10 nm/min で、
スキャンした。セルは層長 1.0 cm の石英セルを用いて測定した。測定値

から分子楕円率 $[\theta]_{\lambda}$ への変換はコンピューターを用いて、 $[\theta]_{\lambda} = \theta_{\lambda} / (C \cdot l)$ (θ は波長 λ における楕円率、 C はインスリン濃度(d mol/L)、 l はセルの層長)の式により求めた。

3-2-8 統計学的解析

「2-2-8 統計学的解析」の項と同様に解析した。

第 3-3 節 結果の部

3-3-1 In vitroにおける SG および SS のインスリン膜透過促進作用

SG および SS の吸収促進機構解明のために in vitro におけるインスリンの膜透過実験を行った。1.0% SG および SS 添加インスリン PBS の人工膜、脂質膜および家兎の摘出鼻粘膜における 3 時間までのインスリンの膜透過量を測定した。なお、インスリンの測定には、人工膜においてはインスリンの透過性が高かったため、HPLC により測定し、脂質膜および鼻粘膜においては透過性が低かったため、EIA 法により測定した。

Fig. 12 に示すように、人工膜においては、コントロールおよび SG 添加においてインスリンは透過し、SS を添加するとインスリンの透過性は低下した。これは、1.0% SS は過飽和状態のため SG より溶解性の低い SS が膜に吸着してインスリンの膜透過を阻害しているためと推察された。また、SG とコントロールのインスリンの膜透過係数に有意な差が認められなかった。一方、脂質膜および鼻粘膜においては、コントロールではインスリンの透過はみられなかったが、SG および SS を添加するとインスリンの透過が有意に上昇し ($p < 0.001$)、これらの膜透過促進作用は、SS よりも SG の方が有意に高いことが明らかとなった ($p < 0.001$)。これは、SS よりも SG の方が脂質への親和性が高いためと推察された。また、このインスリンの膜透過促進作用は、SG 添加と SS 添加時のインスリンの膜透過係数における比 (SG/SS) が、脂質膜において 2.17、鼻粘膜において 2.06 と近い値であったことから、SG は鼻粘膜の脂質への作用が大きく、タンパク分解酵素阻害作用は小さいのではないかと推察された。

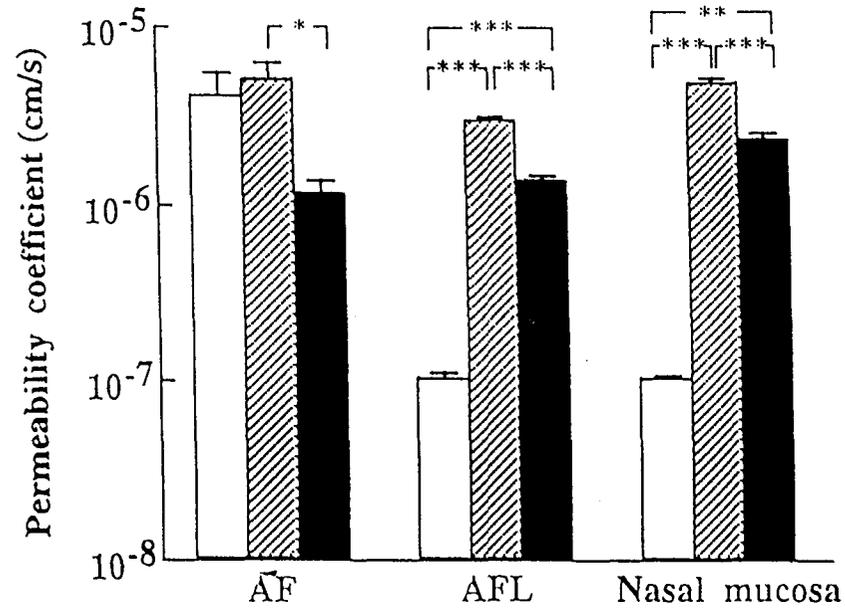


Fig. 12. Permeability coefficient of insulin in PBS with 1.0 % SG or SS through the artificial membrane with and without soaked lipids (AFL, AF), and the nasal mucosa; control (□), 1.0 % SG (▨) or 1.0 % SS (■).

Each value represents the mean±S.D. (n=3).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-3-2 SGとインスリンの相互作用

インスリン分子は亜鉛イオンの存在で6量体へ自己重合することが知られている⁶⁴⁾。インスリン分子は、曲がった構造をもつA鎖とB鎖を含む α -ヘリックス構造であるが、二つの非平行なB鎖の-COOH末端の間の β -構造で、疎水性相互作用と4個の水素結合により2量体を形成する。亜鉛イオンは、B10もしくはB5のヒスチジン残基のイミダゾール基を通して連結させる。このような特徴から、6量体インスリンの解離は円二色性スペクトルにより測定することができる。インスリンの経鼻膜吸収促進剤として有効であると報告されているNaGC⁷¹⁾やドデシル硫酸ナトリウム⁷²⁾等は、その促進機構の一つとして、インスリンの重合の解離作用、すなわちモノマー化が報告されている。

そこで、SGとインスリンの相互作用について、円二色性スペクトルを用いて検討した。円二色性スペクトルにおいて276 nmの負の極大吸収は、逆平行の β -構造を形成しているB23-28の芳香族残基の寄与によるものである⁷¹⁾。したがって、このピークの増強は重合の解離と相関するといわれている。そこで、インスリンのPBS溶液、SGを飽和させたインスリンPBS溶液およびNaGCを添加したインスリンPBS溶液のスペクトルを測定した(Fig.13)。

対照として用いたNaGC 2.5 mmol/L (Fig. 13C)においては、276 nmのピークはインスリン溶液(Fig. 13A)とほぼ同様であったが、10、20 mmol/Lと添加量を増加すると(Fig. 13D,E)、この極大吸収波長は小さくなった。一般に、NaGCは水分子と強力な水素結合を形成し、またミセルを形成してその疎水性中心部分に脂肪族や芳香族側鎖を包含すること

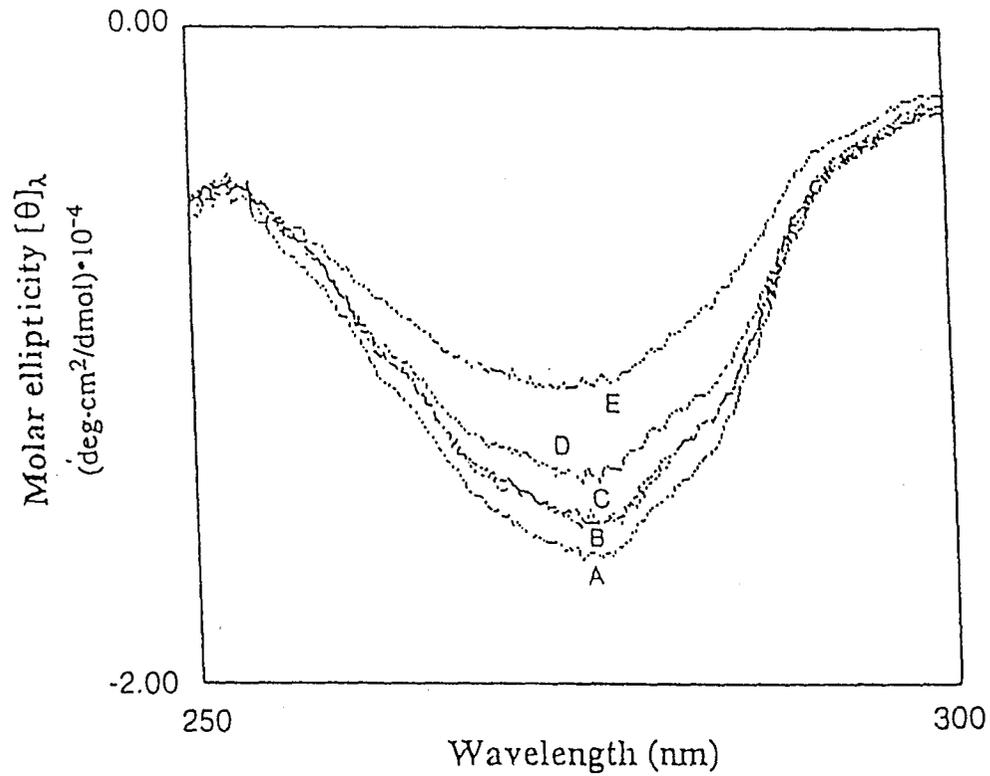


Fig. 13. Effects of SG and sodium glycocholate (NaGC) on the circular dichroism spectra of insulin in PBS.

A: 0.5 g/L insulin solution, B: saturated with SG (0.092 mmol/L), C: containing 2.5 mmol/L NaGC, D: containing 10 mmol/L NaGC, E: containing 20 mmol/L NaGC.

によりインスリン分子の重合を解離するといわれている⁷¹⁾。

一方、SGを飽和させたインスリン溶液(Fig. 13B)では、インスリン溶液とほぼ同じピークを示した。したがって、SGはインスリン分子のモノマー化作用をもたないことが推察された。経鼻膜吸収促進剤として知られているシクロデキストリンもインスリンの重合解離作用をもたないことが報告されており⁷²⁾、経鼻吸収促進の作用機構は主として薬物への作用によるものではないと推察された。

3-3-3 SGと鼻粘膜の相互作用

吸収促進剤は、鼻粘膜に対して非可逆的なダメージを与えることによりその作用を示すことが多い。そこでSGによって引き起こされる鼻粘膜組織変化を、SGを経鼻投与後にインスリンを経鼻投与し、その吸収性から調べた。まずSGを8 mg経鼻投与した後、30分および60分後にインスリン2 mgを経鼻投与し、SGとインスリンの同時投与の場合と比較した。なお、SGとインスリンの同時投与は、SGを投与した直後にインスリンを投与した。その結果をTable 5に示す。SGはインスリンと同時に投与すると最も高いAUGおよび薬理学的生物学的利用能を示し、SG投与30分後にインスリンを投与した場合でも経鼻吸収促進作用は認められた。また、SG投与60分後にインスリンを投与した場合では、30分後にインスリンを投与した場合に比べ顕著にその作用は減少し、その作用はほとんど認められなかった。これにより、SGは鼻粘膜に対して一過性に作用し、安全な促進剤であると推察された。

Table 5. Duration of the effect of SG in the powder dosage form on total fall of the glucose reduction-time (AUG) and the pharmacological bioavailability (D %).

| Time (min) | AUG(%*hr) | D %(0-6hr) |
|------------|---------------|------------|
| 0 | 1504.0 ± 93.0 | 2.0 ± 0.12 |
| 30 | 1067.0 ± 57.2 | 1.4 ± 0.08 |
| 60 | 284.0 ± 75.2 | 0.4 ± 0.10 |

SG (8 mg) was administered at 0, 30, or 60 min prior to the administration of insulin (2 mg, 20.0 IU/kg).

Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

家兎の鼻腔を 0.05 M の塩化カルシウム溶液で洗浄し、5 分後に 1% SG 含有インスリン PBS 製剤を投与して得られる血糖低下作用を洗浄未処理のものと比較した (Fig. 14)。塩化カルシウム溶液の洗浄未処理では、インスリン製剤投与後 1 時間で最大 60% まで血糖低下作用を示したが、洗浄すると血糖低下作用は有意に抑制され、投与後 2 時間で約 10% の血糖低下作用が認められた。これは、SG が鼻粘膜の細胞間隙におけるタイトジャンクションの開閉に関与するカルシウムイオンに作用し、カルシウムイオンと複合体を形成するためと推察された。

さらに Table 3 で示したように血糖低下作用を促進した L-グルタミン酸を添加して同様の検討を行った (Fig. 15)。

塩化カルシウム溶液の洗浄処理後では L-グルタミン酸と SG 含有インスリン PBS 製剤による血糖低下作用は、未洗浄のときよりも抑制された。しかし、この血糖低下抑制作用は有意な差ではなかった。この現象はラッカセイ油製剤においても同様の結果が得られた (Fig. 16)。

これらの結果より、SG は鼻粘膜におけるタイトジャンクションの開閉に関与するカルシウムイオンとの複合体形成作用を有するが、タンパク分解酵素阻害剤の L-グルタミン酸にはその作用はないことが示唆された。

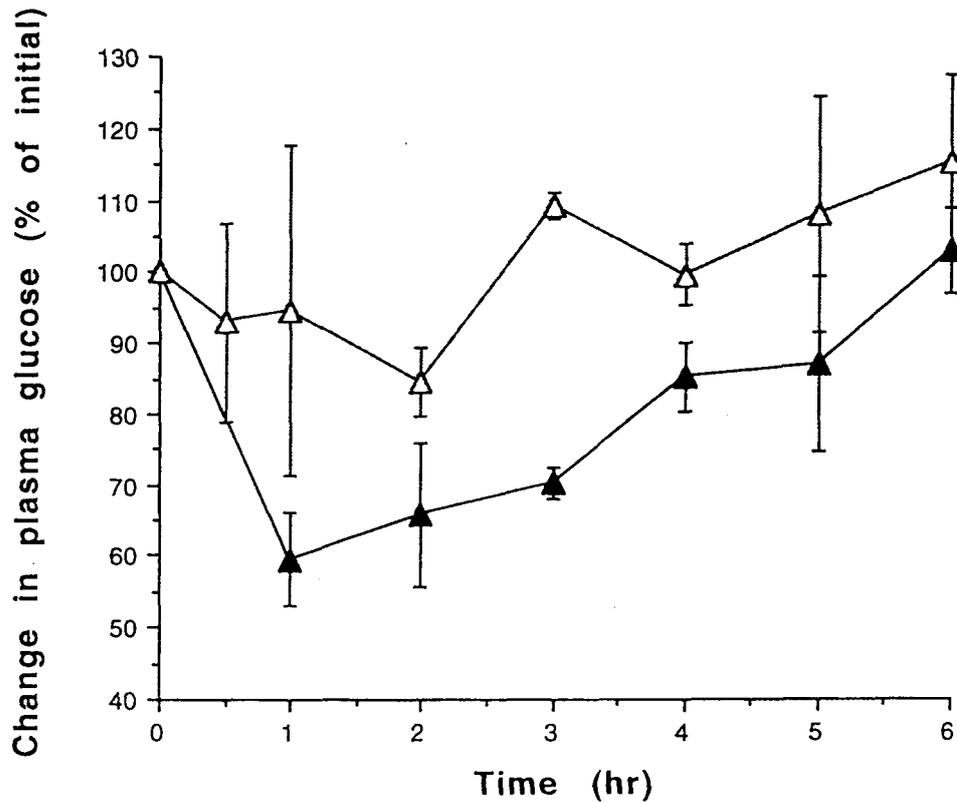


Fig. 14. Plasma glucose level after nasal administration of the insulin suspension in phosphate-buffered saline with 1.0 % (w/v) of SG 5min after pre-administration of 0.05 M CaCl₂ (10.0 IU/kg). (▲) No pre-administration; (△) pre-administration of CaCl₂. Each value represents the mean±S.D. (n=3).

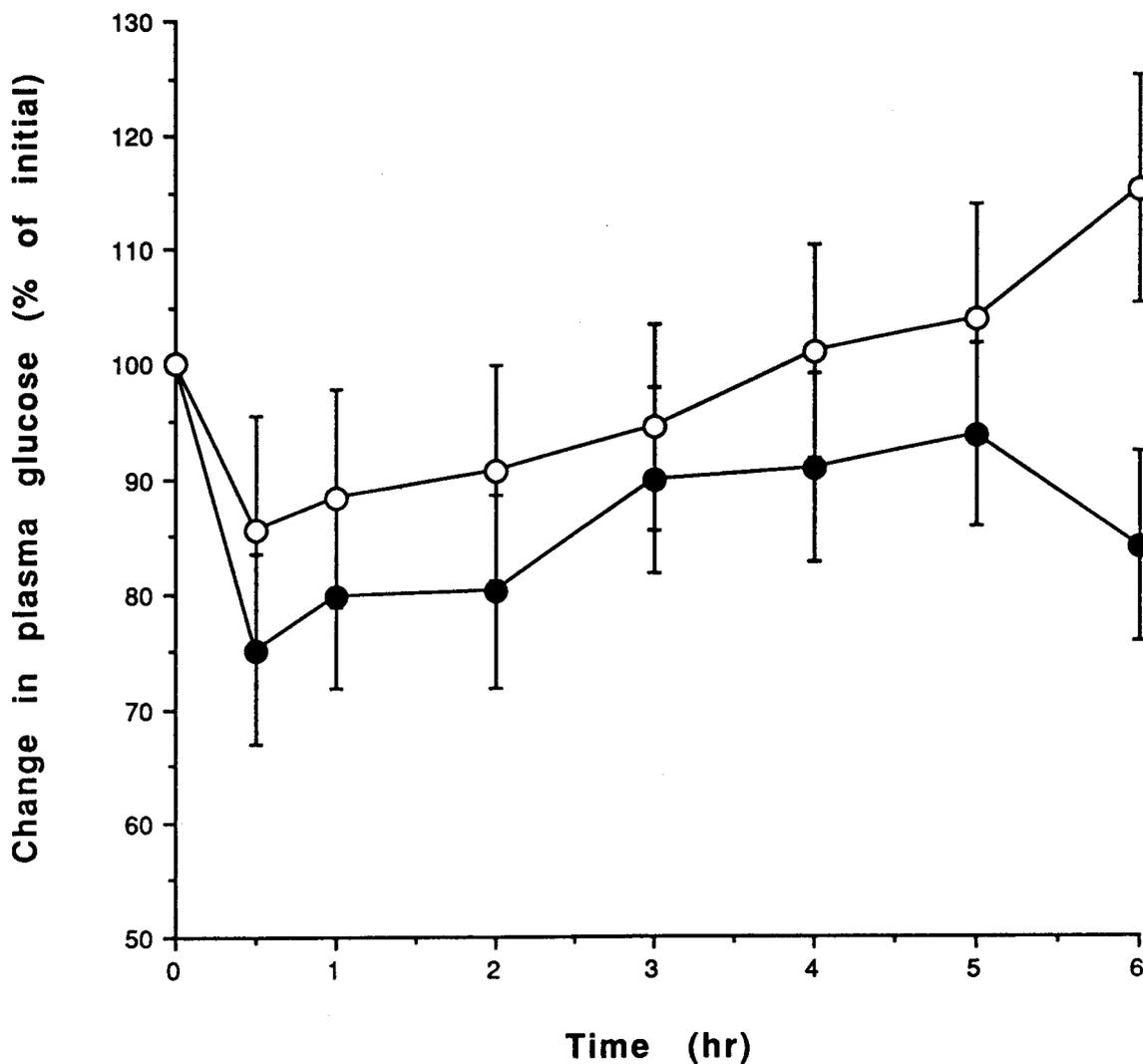


Fig. 15. Plasma glucose level after nasal administration of the insulin suspension in phosphate-buffered saline with 1.0 % (w/v) of SG and 0.5 % (w/v) L-glutamic acid 5 min after pre-administration of 0.05 M CaCl₂ (10.0 IU/kg). (●) No pre-administration; (○) pre-administration of CaCl₂. Each value represents the mean±S.D. (n=3).

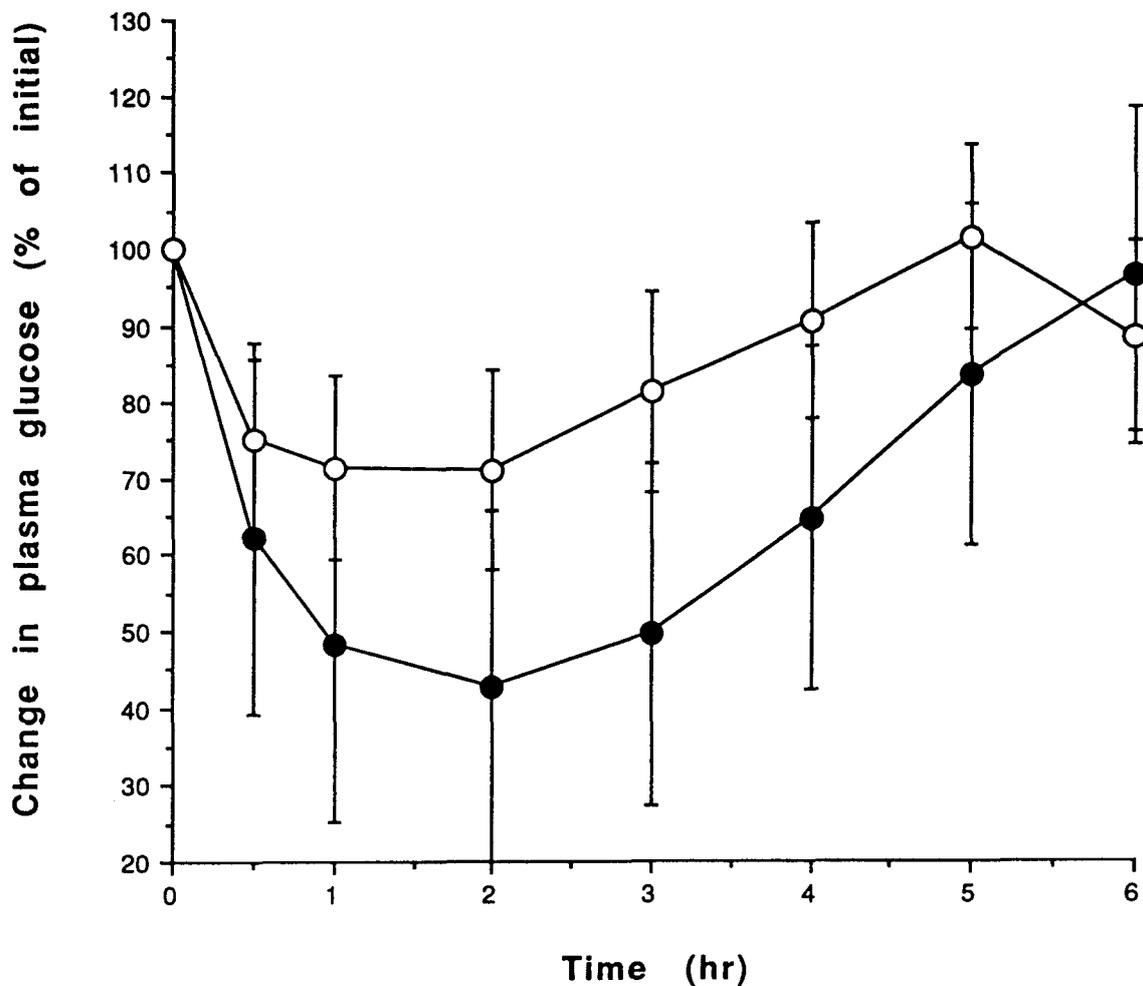


Fig. 16. Plasma glucose level after nasal administration of the insulin suspension in peanut oil with 1.0 % (w/v) of SG and 0.5 % (w/v) L-glutamic acid 5 min after pre-administration of 0.05 M CaCl₂ (10.0 IU/kg). (●) No pre-administration; (○) pre-administration of CaCl₂. Each value represents the mean±S.D. (n=3).

第 3-4 節 まとめの部

第 2 章では、*in vivo* 実験より SG の方が SS より経鼻吸収促進作用が高いことが認められたが、*in vitro* の鼻粘膜透過実験からも同じ傾向が認められた^{64,66,74)}。

これは、SG および SS が鼻粘膜の脂質に作用するためと推察された。この結果は、村松ら⁷⁵⁾の報告による、ジパルミトイルホスファチジルコリンで調製したリポソームに SG を添加すると、リポソームのゲル-液晶相転移温度が低下し、封入された薬物が漏れやすくなることから、SG は脂質の流動性を上げていることともよく対応した。また、円偏光二色性測定から、SG がインスリンのモノマー化作用を示さないことも明らかとなった。さらに、SG が鼻粘膜のタイトジャンクションのカルシウムイオンとの複合体形成作用を示し、インスリンの膜透過を促進しすることが明らかとなった。しかし、SG の膜への作用は一過性であり、SG は安全な促進剤であると推察された。

第 4 章 SG 含有インスリン製剤の繰り返し投与における吸収性と安全性

第 4-1 節 序論

これまでに SG および SS が、家兎においてインスリンの経鼻吸収促進作用を有し、既に報告されている NaGC 等の吸収促進剤より高い吸収促進効果を示すことを明らかにした^{64,66)}。また、これらの吸収促進作用のメカニズムは、これらが一過性に鼻粘膜のタイトジャンクションのカルシウムイオンと複合体形成作用を示し、また、鼻粘膜の脂質にも作用することを明らかにした⁷⁴⁾。

これまでの結果は、単回投与による吸収促進剤としての有効性を示し、安全性の面においては保証されていない。

そこで本章においては、臨床試験の第一段階として、短期間における SG 含有インスリン製剤の繰り返し投与を行い、インスリンの経鼻吸収性と鼻粘膜に対する障害性について検討した。

第 4-2 節 実験の部

4-2-1 試薬の部

インスリンは、bovine pancreas (25.7 IU/mg) および porcine pancreas (27.8 IU/mg) で SIGMA CHEMICAL CO. 製を、ラッカセイ油 (日本薬局方) は小境製薬 (株) 製を用いた。SG は、龍角散 (株) より提供していただいた。また、NaGC は SIGMA CHEMICAL CO. 製を用いた。その他の、試薬は全て特級品を用いた。

4-2-2 試料調製

水性懸濁液製剤および油性懸濁液製剤は、前述の「1-2-2 試料調製」の液状製剤の調製法にしたがって調製した。

4-2-3 投与方法

液状製剤および粉末製剤の投与方法は、前述の「2-2-3 投与方法」の投与方法に準じて投与した。

4-2-4 血糖値の測定

血糖値の測定は、前述の「1-2-4 血糖値の測定」の項と同様に測定した。

4-2-5 血中インスリン濃度の測定

血中インスリン濃度の測定は、前述の「3-2-6 インスリン濃度の測定」

の項と同様に測定した。

4-2-6 in vivo における家兎への製剤の投与方法

各インスリン製剤は、前述の「1-2-3 投与方法」の項に準じて投与した。

4-2-7 生物学的利用能の算出方法

薬理学的生物学的利用能と生物学的利用能は、前述のそれぞれ「1-2-5 生物学的利用能の算出」と「2-2-6 生物学的利用能の算出」の項と同様に算出した。

4-2-8 鼻粘膜に対する刺激性の評価

1) 単回投与

製剤投与後 30 分または 1 時間経過した後、家兎をエーテル麻酔し、過飽和塩化カリウムにより安楽死させ、直ちに鼻中隔を摘出した。鼻中隔は、中性 10% の炭酸緩衝ホルマリン溶液で少なくとも 24 時間処理し、組織を固定した。中央部分を鼻粘膜表面に対して垂直に切断し、幅 4 mm の組織切片とした。組織切片は、EDTA 法により脱灰後、常法にしたがってパラフィン蠟で固定し、約 3 μm のパラフィン切片を作成して、Hematoxylin and Eosin 染色を施した。これらの切片を顕微鏡下で観察し、同じ家兎で製剤を投与した側の鼻粘膜と、投与していない側の鼻粘膜の組織（コントロール）を定性的に比較した。

2) 連続投与

製剤投与後 3 日目および 5 日目に、家兎をエーテル麻酔した後、過飽

和塩化カリウムにより安楽死させ、直ちに鼻中隔を摘出した。以下、上述の単回投与した場合と同様にした。

4-2-9 統計学的解析

「2-2-8 統計学的解析」の項と同様に解析した。

第 4-3 節 結果の部

4-3-1 単回投与による SG の鼻粘膜組織障害性

第 2 章の各種インスリン製剤や SG 添加製剤においてウサギ鼻粘膜におけるインスリン吸収促進作用が認められたことから、SG による鼻粘膜の組織障害性を検討した。

まず、試験した製剤中、最もインスリンの経鼻吸収性の高かったラッカセイ油製剤について、ラッカセイ油のみ、インスリン含有ラッカセイ油および SG 添加インスリン含有ラッカセイ油を経鼻投与後、最大薬理効果がみられた投与後 1 時間における鼻中隔を摘出し、その組織の比較を行った (Fig.17)。また、経鼻吸収促進剤として有効であるが、粘膜組織障害性も既に報告されている 1% NaGC 含有 PBS 製剤²⁰⁾についても検討を行った (Fig.18)。 Fig.17 (a) は、対照として無処置の鼻粘膜であり、ラッカセイ油製剤を投与したものでは (Fig.17(b,c,d))、鼻粘膜上皮細胞において軽度の炎症が認められた。一方、1% NaGC PBS 製剤においては炎症だけでなくびらんまで認められた (Fig.18)。また、SG 含有インスリン-ラッカセイ油製剤では (Fig.17(d))、ラッカセイ油単独のときの結果 (Fig.17(b)) と同程度の症状が鼻粘膜上で認められ、有意な差は認められなかった。これにより、インスリンと SG は、ラッカセイ油による鼻粘膜への刺激性を増長することはないと推察された。

次に、インスリン単独粉末、SG 単独粉末およびインスリンと SG の混合粉末製剤 (2 : 8) の 3 製剤について検討した (Fig. 19)。なお、SG 単独粉末においては、投与後 1 時間値だけでなく、30 分値についても検討を

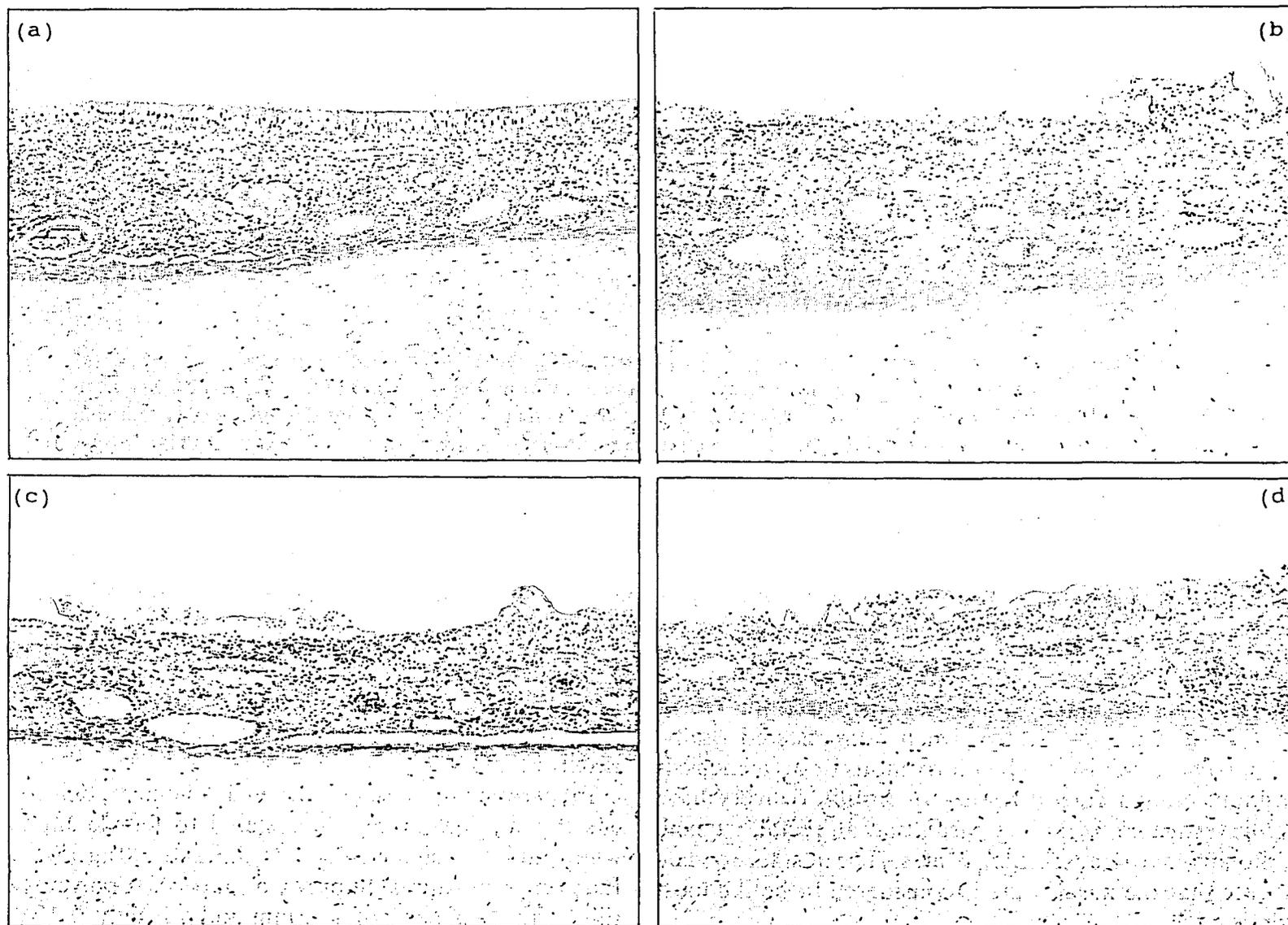


Fig. 17. Microscopic photographs of nasal mucosa 1 hr after administration of 250 μ L of the liquid dosage form (H and E Stain, $\times 100$). (a) control (untreated, normal respiratory epithelium), (b) peanut oil, (c) insulin in peanut oil, (d) insulin with SG in peanut oil.

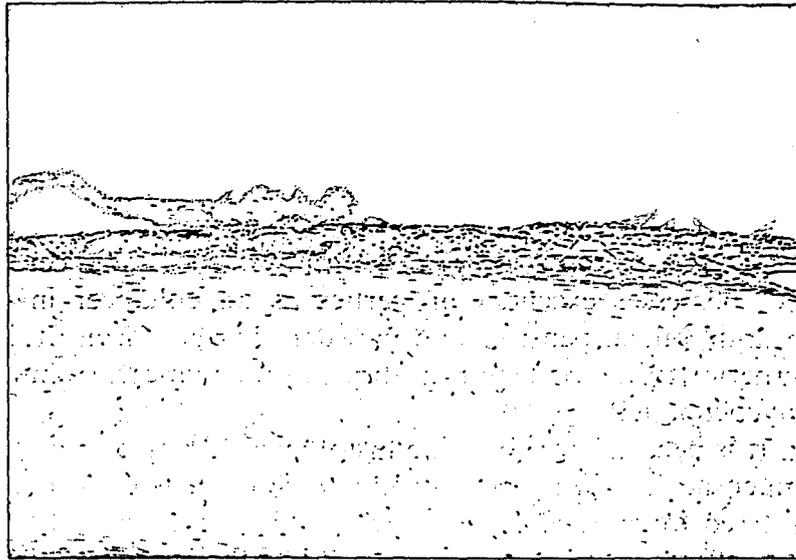


Fig. 18. Microscopic photographs of nasal mucosa 1 hr after administration of 250 μ L of 1.0 % sodium glycocholate in PBS solution (H and E Stain, $\times 100$).

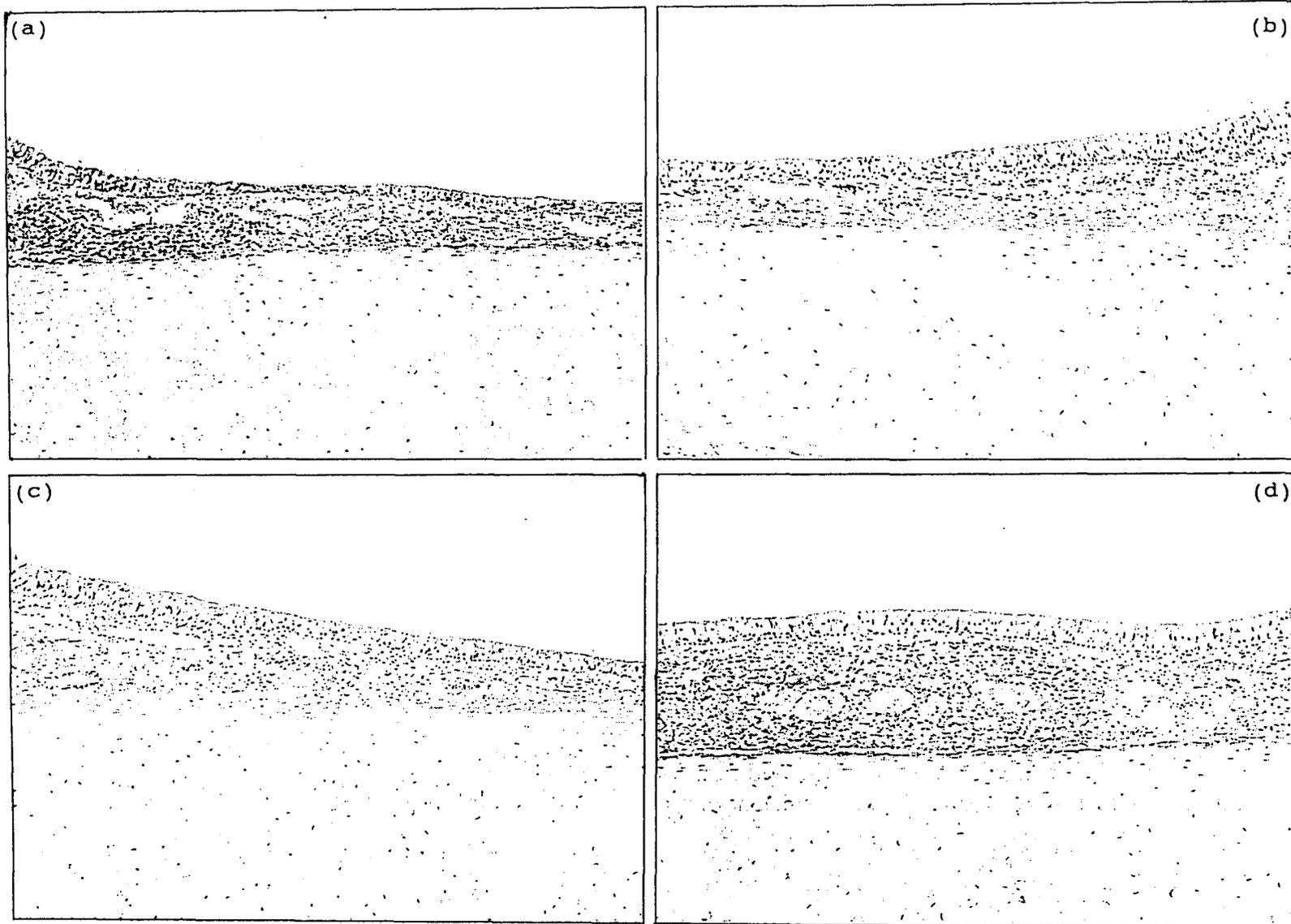


Fig. 19. Microscopic photographs of nasal mucosa 0.5 and 1 hr after administration of 10 mg of powder dosage form (H and E Stain, $\times 100$). (a) insulin (1 hr), (b) SG (0.5 hr), (c) SG (1 hr), (d) insulin and SG (2 : 8, weight, 1 hr).

行った(Fig.19, Table 6)。

インスリン単独粉末においては、無処置群(Fig.17(a))と同様、病理組織学上、形態変化が認められなかった(Fig.19(a))。SG単独粉末においては、経鼻投与後30分値および1時間値ともにSGの鼻粘膜への接触時間に関係なくインスリン単独粉末と同様に、病理組織学上、鼻粘膜上皮細胞に形態変化が認められなかった(Fig.19(b,c))。さらに、インスリンとSGの混合粉末製剤においても各々の単独粉末のときと同様、鼻粘膜上皮細胞に形態変化が認められなかった(Fig.19(d))。

4-3-2 SG含有インスリン粉末製剤の繰り返し投与による経鼻吸収性

前項で、SG添加インスリン製剤の単回投与においては、SGの鼻粘膜に対する刺激性が認められなかった。しかし、実際にペプチド製剤が臨床の場で用いられる場合は、連続投与されることが多い。そこで、SG添加インスリン粉末製剤の連続投与によるインスリンの経鼻吸収性への影響を検討するために、まず、製剤の1日1回、5日間の短期間の繰り返し投与を行った(Fig. 20)。

その結果、血中インスリン濃度は5日目まで全て投与後30分で最大血中濃度Cmaxを示し、ほぼ一定の値が認められた(Fig. 20(a), $p>0.05$)。また生物学的利用能(F%)は、平均で約25.0%であった(Table 7, $p>0.05$)。

それに対応して薬理効果も、各投与日とも投与後約2時間で平均して約70%の血糖低下作用を示し、一定の薬理効果を示した(Fig.20(b), $p>0.05$)。また薬理学的生物学的利用能は約61.6%と非常に高い値を示した(Table 7)。

Table 6. Histopathological findings of nasal mucosae of insulin peanut oil suspension and powder dosage forms.

| Histopathological Findings | Prep. Animal No. | Control | | I | | II | | III | | IV | | V | | VI | | VII | | VIII | |
|---|------------------|---------|---|---|---|----|---|-----|---|----|----|----|----|----|----|-----|----|------|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Degeneration of epithelium | | - | - | + | + | + | + | ++ | + | ++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inflammatory cell infiltration in lamina propria mucosa | | - | - | ± | ± | ± | ± | ± | ± | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Erosion in mucosa | | - | - | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Abbreviations: -, no change; ±, very slight; +, slight; ++, moderate;

I, peanut oil; II, insulin in peanut oil; III, insulin and SG in peanut oil; IV, sodium glycocholate;

V, insulin powder; VI, SG powder (0.5 hr); VII, SG powder (1 hr); VIII, insulin and SG,

Nasal mucosae were excised at 1 hr except for group VI (0.5 hr).

Each finding is the result of duplicate experiments.

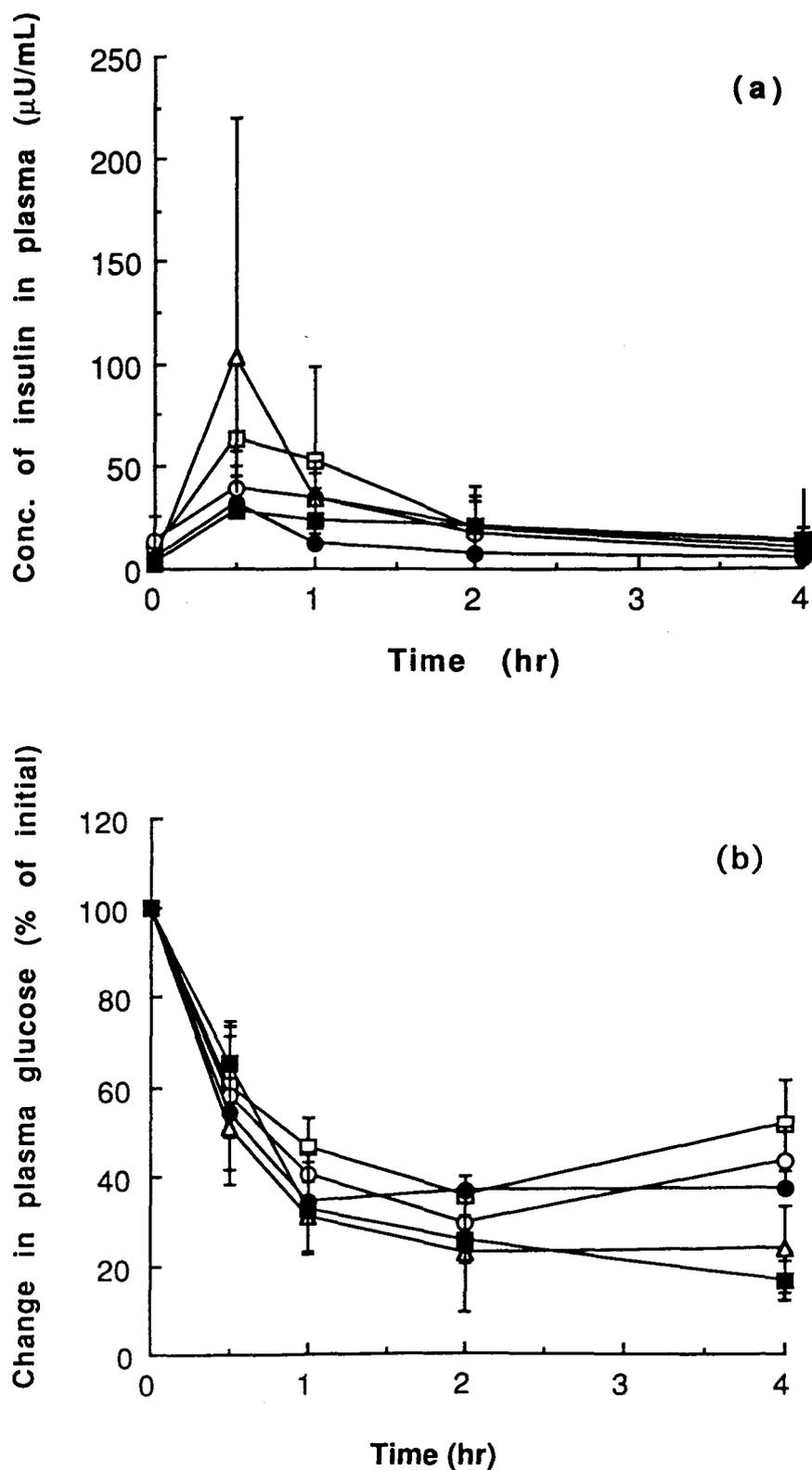


Fig. 20. Efficacy of porcine insulin powder with SG (insulin : SG = 2 : 90) prepared by freeze-drying in a subchronic study. Rabbits received drug for 5 successive days (2.0 IU/kg). Data represent blood insulin (a) and blood glucose (b) on day 1, 2, 3, 4, or 5 (mean ± S.D.; n=3). □, day 1; ○, day 2; △, day 3; ■, day 4; ●, day 5.

Table 7. Effects of continuous administration of insulin powder (2.0 IU/kg) on the pharmacological bioavailability (D %) and the bioavailability (F %).

| Administration day | D %(0-4hr) | F %(0-4hr) |
|--------------------|------------|-------------|
| 1st | 52.9 ± 4.9 | 31.0 ± 16.4 |
| 2nd | 58.8 ± 5.6 | 16.0 ± 4.8 |
| 3rd | 69.2 ± 8.4 | 43.0 ± 27.3 |
| 4th | 67.7 ± 4.1 | 25.8 ± 15.5 |
| 5th | 59.2 ± 5.1 | 9.2 ± 8.4 |
| Ave. | 61.6 ± 8.1 | 25.0 ± 18.5 |

Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

これらの結果より、単回投与だけでなく、繰り返し投与においても SG が鼻粘膜細胞に対して刺激性がないことが明らかにされた。

4-3-3 繰り返し投与による鼻粘膜組織障害性

前項の吸収性ととも、繰り返し投与における SG の鼻粘膜組織障害性を SG 含有インスリン粉末製剤を経鼻投与後、3日目および5日目の家兎の鼻中隔を摘出して検討した。

Fig. 21に、投与後3日目および5日目の同じ家兎の製剤投与側と無処置側(対照群)を各々示す。製剤を投与した鼻粘膜の組織切片(Fig. 21(b,d))は、対照群(Fig. 21(a,c))と同様、鼻粘膜上皮細胞に投与処置に起因する形態変化が認められなかった(Fig. 21)。

SG 含有インスリン粉末製剤の繰り返し投与において、SG は鼻粘膜細胞に対して組織学的変化を生じないことから、SG の吸収促進剤としての安全性を明らかにした。

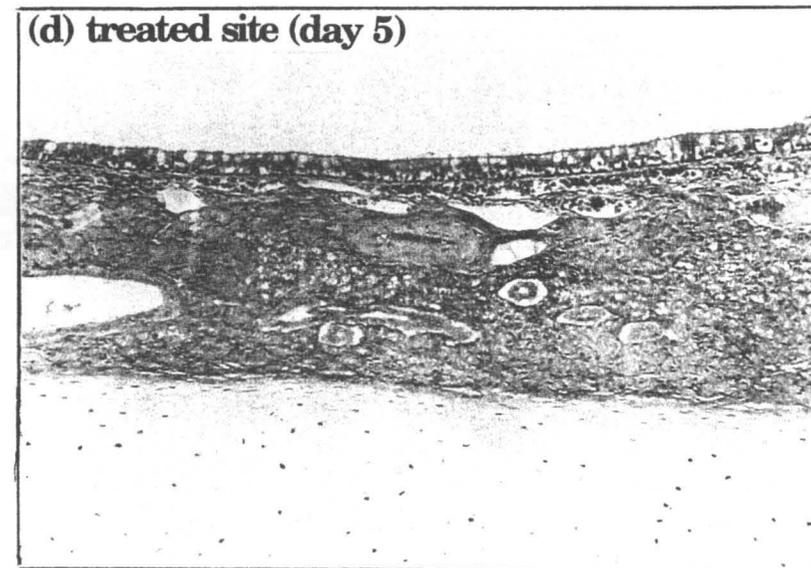
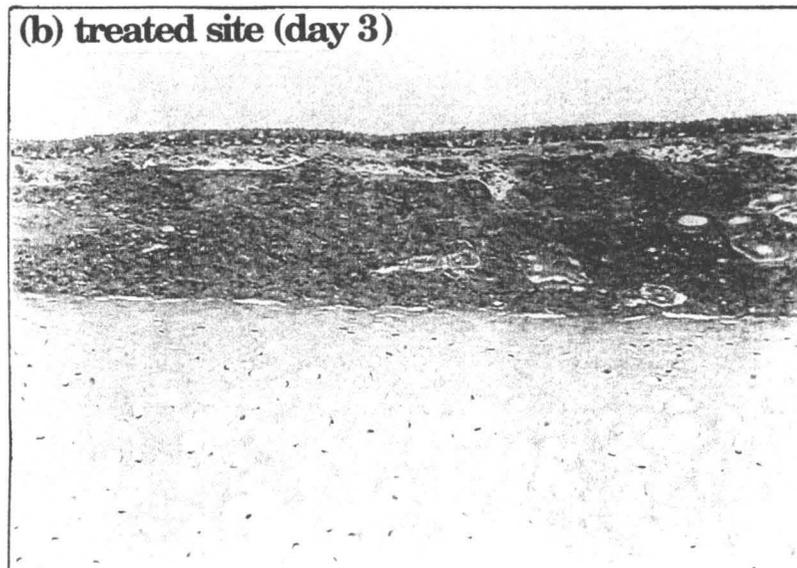
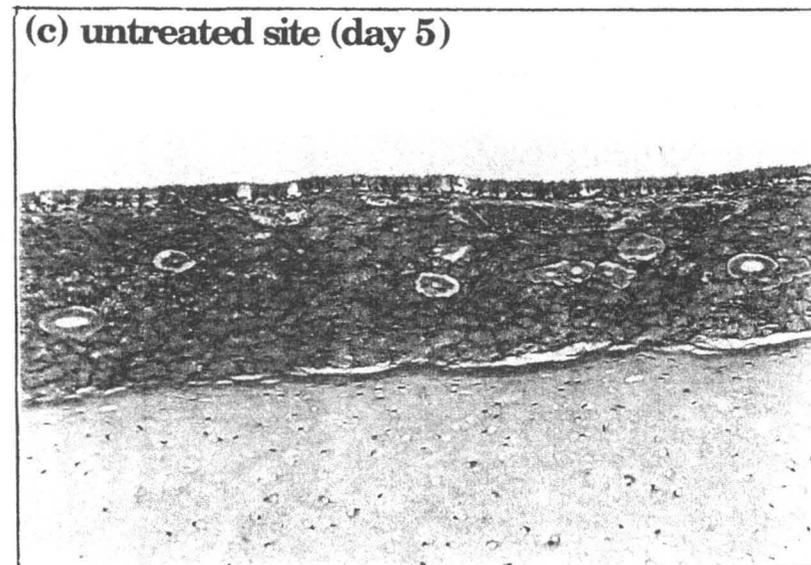
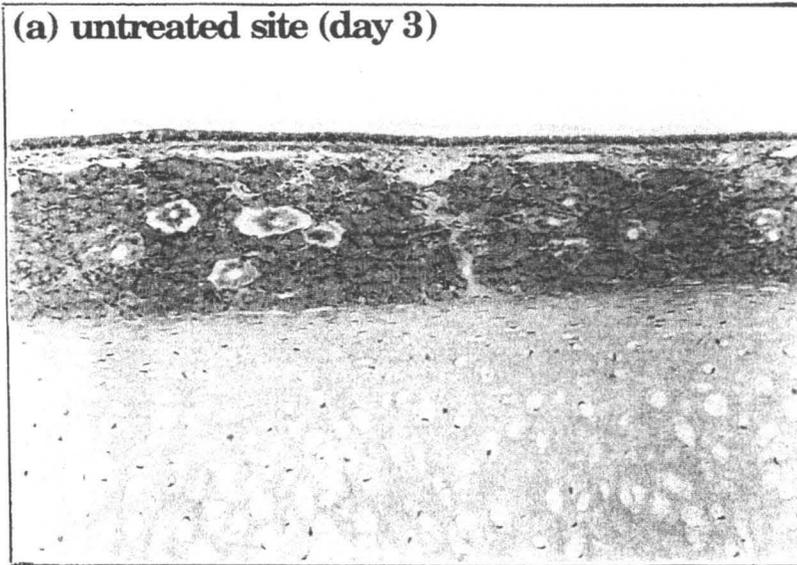


Fig. 21. Microscopic photographs of nasal mucosa on day 3 or 5 after continuous administration of porcine insulin powder with SG (insulin : SG = 2 : 90) prepared by freeze-drying (H and E Stain, $\times 100$). (a) untreated site (day 3), (b) treated site (day 3), (c) untreated site (day 5), (d) treated site (day 5).

第 4-4 節 まとめの部

インスリン吸収促進作用を示す大豆ステロールグルコシド(SG)によるウサギ鼻粘膜の組織障害性について検討を行った⁷⁶⁾。ラッカセイ油製剤を経鼻投与した場合には、鼻粘膜上皮細胞において軽度の炎症が認められたが、粘膜組織障害性が既に報告されている 1.0%グリココール酸ナトリウム PBS 製剤においては炎症だけでなくびらん状態まで認められた。それに対し、インスリンおよび SG は無処置群と同様病理組織学上、鼻粘膜上皮細胞に変化が認められなかった。

また臨床における連続投与を考え、SG 添加インスリン粉末製剤を 5 日間繰り返し投与することで鼻粘膜への経鼻吸収性と安全性への影響について検討を行った⁷⁴⁾。血中インスリン濃度においては、5 日間投与後約 30 分で最大血中濃度を示し、ほぼ一定の値が認められた ($p > 0.05$)。また生物学的利用能は平均約 25.0%であった。それに対応して薬理効果は、投与後約 2 時間で平均で約 70%の最大血糖低下作用を示した ($p > 0.05$)。また薬理学的生物学的利用能は、平均で約 61.6%であった。

また、この製剤投与後 3 日目および 5 日目におけるウサギ鼻中隔を摘出し、顕微鏡下で観察したところ、いずれの投与日においても鼻粘膜の炎症およびびらん状態等、処置に起因した形態変化は何等認められなかった。

第 3-4 節より⁶⁶⁾、SG の吸収促進機構は鼻粘膜中の脂質やタイトジャンクションのカルシウムイオンに一過性に作用し、膜への作用が示唆された。しかし、SG 含有インスリン粉末製剤の短期間での繰り返し投与にお

いては、病理組織学的検査により鼻粘膜への障害性は認められず、インスリンの経鼻吸収性にも変化が認められないことから、SGは安全かつ有用な吸収促進剤であることが明らかにされた。

第 5 章 総括と結論

薬物を点眼すると、涙液は鼻涙管を經由して鼻粘膜に到達する。眼を
経鼻吸収の薬物の貯留庫とし、ここから薬物を徐々に放出させること
によって、鼻粘膜から持続的に薬物を吸収させようとした。人工涙液を
用いたインスリン製剤を点眼すると、インスリンは結膜だけでなく鼻
粘膜においても吸収が確認されたことから、薬物は涙液に溶解し鼻
涙管を經由して鼻粘膜へ送られて吸収されることを明かとした。点
眼で鼻涙管を經由して鼻粘膜からも吸収される系でのインスリンの
薬理効果は、経鼻投与系よりも持続性を示した。したがって、点
眼剤から涙液への薬物の放出を改善すれば、吸収促進剤を用いず
にインスリンの吸収性を高めることが可能であると考察された。
しかし、インスリンの薬理効果は直接経鼻投与したものが最も
大きくなった。

大豆ステロールグルコシド(SG)およびそのアグリコン(SS)は、
油性および水性インスリン懸濁液剤と粉末製剤においてインス
リンの経鼻吸収促進作用を示した。インスリン-リン酸塩緩衝
生理食塩液(PBS)懸濁液剤において 1.0%以下の SG 濃度
では SG 濃度とインスリンの血糖低下作用に相関性が認められ、
SG の濃度が 1.0% を越えるとその作用は飽和した。また 1.0%
SG および SS 含有水性インスリン PBS 懸濁液剤において、そ
の経鼻吸収促進作用の比べると、SG の方が SS よりもその作用
が高い傾向を示した。

さらに SS の各成分による吸収促進作用の強さは β -sitosterol \geq
campesterol > stigmasterol の順であり、各成分の疎水性の高い順と

一致した。すなわち SS では疎水性の高い成分が吸収促進作用が高いことを明らかにした。

油性液剤では、流動パラフィン製剤やラッカセイ油製剤に 1.0% SG を添加すると、それぞれ SG 無添加時の 3.4 倍の 8.3% と 1.7 倍の 11.6% の薬理的・生物学的利用能が得られた。また SG と SS の吸収促進作用は、水性液剤と同様に SG の方が SS より大きいことが明らかとなった。

製剤中の薬物の安定性を考えて、粉末製剤についても検討した。調製方法において、物理的混合よりも凍結乾燥の方がインスリンの経鼻吸収性が高いことを明らかにした。また、SG 含有凍結乾燥製剤は、1.0% SG 含有 PBS 溶液製剤と比較して生物学的利用能は約 2～3 倍に上昇した。また、SG とインスリンの製剤の血糖低下作用の持続性を上げるためにカルボキシビニルポリマーやムチンを添加した製剤とその血糖低下作用の持続性を比較した。この結果より SG は賦形剤としても有用性が高いことを明らかにした。

SG と SS の吸収促進機構を、摘出ウサギ鼻粘膜とツーチャンバーセルを用いたインスリンの *in vitro* 膜透過実験によって調べた。1.0% SG 含有インスリン PBS におけるインスリン膜透過係数は、1.0% SS 含有のほぼ 2.1 倍で、*in vivo* と同様に SG の方が SS よりも吸収促進作用が高いことと対応した。また、SG および SS はセルロース人工膜においてはインスリンの透過を促進せず、脂質を添加した人工膜や摘出鼻粘膜においては透過を促進したことから、鼻粘膜中の脂質に作用することが示唆された。

一般に薬物の鼻粘膜吸収は pH-分配仮説に従う受動拡散によるものと

考えられているが、インスリンのように高分子の薬物の透過は細胞間を透過すると考えられる。そこで、1.0% SG 含有インスリン PBS を用いて、インスリンの鼻粘膜透過性におけるカルシウムイオンの影響を検討した。家兎の鼻腔を 0.05 M の塩化カルシウム溶液で洗浄後、1.0% SG 含有インスリン PBS を投与すると、未処理のものに比べて血糖低下作用は有意に抑制された。これにより、SG が粘膜細胞間隙におけるタイトジャンクションの開閉に関与するカルシウムイオンに作用し、複合体を形成する能力を有することが示唆された。

SG における鼻粘膜の組織障害性について、上項の各種インスリン製剤について検討を行った。製剤投与後、直ちにウサギ鼻中隔を摘出し、顕微鏡下で観察したところ、ラッカセイ油のみやインスリンや SG 含有ラッカセイ油では鼻粘膜上皮細胞において軽度の炎症が認められたが、粘膜組織障害性が既に報告されている 1.0% グリココール酸ナトリウム含有 PBS においては炎症だけでなくびらん状態まで認められた。それに対し、インスリンおよび SG 単独粉末においては無処置群と同様、病理組織学上鼻粘膜上皮細胞に変化が認められず、SG 含有インスリン製剤においてもインスリンのみの場合と同様、鼻粘膜上皮細胞に変化は認められなかった。

また臨床において、インスリン製剤は長期間投与されることが多いことから、SG 含有インスリン粉末製剤を 5 日間繰り返し投与し、鼻粘膜への安全性と経鼻吸収性の予備的検討を行った。その結果、血中インスリン濃度は投与後約 30 分で最大血中濃度を示し、生物学的利用能は平均で約 25.0% を示した。それに対応して薬理効果は、投与後約 2 時間で最大

血糖低下作用を示し、薬理的・生物学的利用能は、約 61.6%と非常に高い値を示した。

また、この製剤投与後の鼻粘膜の病理組織学的検査結果について、投与後 3 日目および 5 日目のいずれの投与日においても、鼻粘膜の炎症およびびらん状態等、処置に起因した形態変化は何等認められなかった。

これらの結果から、SG は安全で有効な吸収促進剤であることが示唆された。今後はこの吸収促進剤を用いた製剤の実用化が期待される。

謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学薬剤学教室永井恒司教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、絶えざる御助言、御指導をいただきました星薬科大学薬剤学教室高山幸三助教授、米谷芳枝講師、ならびに星薬科大学薬剤学教室の諸氏に感謝致します。

鼻粘膜組織の検定を行っていただきました株式会社日本生物科学センター磯和弘一博士に感謝致します。

本研究において大豆ステロールグルコシド等を供給していただきました株式会社龍角散三竹茂夫氏に感謝致します。

また、本研究において御協力いただきました村松和則氏、安藤多恵子氏、市川久仁子氏、ならびに伊藤肖次氏に感謝致します。

参考文献

- 1) 国民衛生の動向 厚生の指標 (臨時増刊) 36 433 (1989)
- 2) 金澤康徳, 糖尿病, 39 165-170 (1996)
- 3) T. Nagai, R. Konishi, *J. Contr. Rel.*, 6 353-360 (1987)
- 4) E. Björk, P. Edman, *Int. J. Pharm.*, 62 187-192 (1990)
- 5) S. Hirai, T. Yashiki, T. Matsuzawa, H. Mima, *Int. J. Pharm.*, 7 317-325 (1981)
- 6) R. J. Schilling, A. K. mitra, *Int. J. Pharm.*, 62 53-64 (1990)
- 7) Y. Kaneko, *Acta Pharm. Suec.*, 20 379-388 (1983)
- 8) N. Paquot, A. J. Scheen, P. frachimont, P. J. Lefebvre, *Diabete and Metabolisme (Paris)*, 14 31-35 (1988)
- 9) R. E. Gibson, L. S. Olanoff, *J. Contr. Rel.*, 6 361-366 (1987)
- 10) T. Nagai, Y. Nishimoto, N. Nambu, Y. Suzuki, K. Sekine, *J. Contr. Rel.*, 1 15-22 (1984)
- 11) N. F. Farraji, B. R. Johansen, S. S. Davis, L. Illum, *J. Contr. Rel.*, 13 253-261 (1990)
- 12) A. Yamamoto, E. Hayakawa, V. H. Lee, *Life Sciences*, 47 2465-2474 (1990)
- 13) B. J. Aungst, N. J. Rogers, E. Shefter, *J. Pharmacor. Exp. Ther.*, 244 23-27 (1988)
- 14) G. Dumortier, M. Zuber, F. Chast, P. Sandouk, J. C. Chaumeil, *Int. J. Pharm.*, 59 1-7 (1990)

- 15) G. Puglisi, S. Spampinato, G. Giammona, R. Pignatello, T. Bachetti, S. Mangiafico, G. Mazzone, *Drug Des. Del.*, **5** 341-352 (1989)
- 16) A. Yamamoto, S. D. Kashi, V. H. L. Lee, *J. Pharmacor. Exp. Ther.*, **249** 249-255 (1989)
- 17) R. Gurny, H. Ibrahim, A. Aebi, P. Buri, C. G. Wilson, N. Washington, P. Edman, O. Camber, *J. Contr. Rel.*, **6** 367-373 (1987)
- 18) H. Yoshida, K. Okumura, R. Hori, I. Anmo, H. Yamaguchi, *J. Pharm. Sci.*, **68** 670-671 (1979)
- 19) B. Kari, *Diabetes*, **35** 217-221 (1986)
- 20) L. Rydén, P. Edman, *Int. J. Pharm.*, **83** 1-10 (1992)
- 21) M. Machida, S. Awazu, *Biol. Pharm. Bull.*, **17** 1375-1378 (1994)
- 22) A. Morita, T. Morita, M. Hashida, H. Sezaki, *Int. J. Pharm.*, **93** 91-99 (1993)
- 23) H. Asada, T. Douen, M. Waki, S. Adachi, T. Fujita, A. Yamamoto, S. Muranishi, *J. Pharm. Sci.*, **84** 682-687 (1995)
- 24) S. G. Chandler, L. Illum, N. W. Thomas, *Int. J. Pharm.*, **76** 61-70 (1990)
- 25) D. J. Pillion, J. Recchia, P. Wang, D. J. Marciani, C. R. Kensil, *J. Pharm. Sci.*, **84** 1276-1279 (1995)
- 26) Z. Shao, R. Krishnamoorthy, A. K. Mitra, *Pharm. Res.*, **9** 1157-1163 (1992)
- 27) P. M. Reardon, C. H. Gochoco, K. L. Audus, G. Wilson, P. L. Smith, *Pharm. Res.*, **10** 553-561 (1993)

- 28) N. Uchida, Y. Maitani, Y. Machida, M. Nakagaki, T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **74** 95-103 (1991)
- 29) S. Hirai, T. Yashiki, H. Mima, *Int. J. Pharm.*, **9** 165-170 (1981)
- 30) B. J. Aungst, *Int. J. Pharm.*, **105** 219-225 (1994)
- 31) F. W. H. M. Merkus, N. G. M. Schipper, W. A. J. J. Hermens, S. G. Romeijn, J. C. Verhoef, *J. Contr. Rel.*, **24** 201-208 (1993)
- 32) S. Gizurason, C. Marriot, G. P. Martin, E. Bechgaard, *Int. J. Pharm.*, **65** 243-247 (1990)
- 33) W. A. J. J. Hermens, P. M. Hooymans, J. C. Verhoef, F. W. H. M. Merkus, *Pharm. Res.*, **7** 144-146 (1990)
- 34) S. G. Chandler, L. Illum, N. W. Thomas, *Int. J. Pharm.*, **76** 61-70 (1991)
- 35) F. W. H. M. Merkus, N. G. M. Schipper, J. C. Verhoef, *J. Contr. Rel.*, **41** 69-75 (1996)
- 36) J. G. Hardy, S. W. Lee, C. G. Wilson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37** 294-297 (1985)
- 37) A. S. Harris, I. M. Nilsson, Z. G. Wagner, U. Alkner, *J. Pharm. Sci.*, **75** 1085-1088 (1986)
- 38) Y. Sakakura, K. Ukai, Y. Majima, S. Murai, Y. Miyoshi, *Acta. Otolaryngol.*, **96** 167-173 (1983)
- 39) V. H. L. Lee, *Pharm. Int.*, **7** 208-212 (1986)
- 40) T. Yamamoto, Y. Maitani, Y. Machida, T. Nagai, *S. T. P. Pharma Sciences*, **4** 133-138 (1994)

- 41) 川真田正信, 牛丸絃一, 高橋豊, 佐野彰, 特許公報 昭 53-20567
(1978)
- 42) 佐田雅宏, 阿部隆, 公開特許公報(A) 昭 62-72604 (1989)
- 43) 太幡利一, 田中満男, 余田和明, 飯尾利弘, 薬学雑誌 99 315-318
(1979)
- 44) M. Lepage, *J. Lipid Res.*, 5 588-591 (1964)
- 45) 菅野道廣, 今泉勝巳, コレステロール, 三共出版, 4-9 (1986)
- 46) M. D. Ivorra, M. Paya, A. Villar, *Pharmazie* 45 271-274 (1990)
- 47) 太田静行, 油化学, 19 835-841 (1970)
- 48) 第13改正日本薬局方解説書, 廣川書店刊行 D-359, 649, 787, 1117,
(1996)
- 49) D. Amdidouche, S. Liotet, H. Dutertre, J. C. Chaumeil, *S. T. P. Pharma Sci.*, 2 49-52 (1992)
- 50) K. Higaki, N. Takechi, M. Kato, M. Hashida, H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.*, 79 334-338 (1990)
- 51) 森田孝広, 山本晶, 橋田充, 瀬崎仁, *Drug Delivery System*, 6 207-211 (1991)
- 52) Y. Maitani, T. Igawa, Y. Machida, T. Nagai, *Drug Design Del.*, 4 109-119 (1989)
- 53) W. A. Lee, B. A. Narog, T. W. Patapoff, Y. J. Wang, *J. Pharm. Sci.*, 80 725-729 (1991)
- 54) I. Kayali, T. Suhery, S. E. Friberg, F. A. Simion, L. D. Rhein, *J. Pharm. Sci.*, 80 428-431 (1991)

- 55) 化学大辞典 共立出版社 116, 364, 674 (1978)
- 56) T. Kiribuchi, T. Mizunaga, S. Funahashi, *Agr. Biol. Chem.*, **30**
770-778 (1966)
- 57) 片山真之, 油化学, **20** 695-699 (1971)
- 58) 岡芳子, 桐山修八, 吉田昭, 栄養と食塩, **25** (1972)
- 59) D. J. Pillion, J. A. Atchison, C. Gargiulo, R. Wang, P. Wang, E.
Meezan, *Endocrinology*, **135** 2386-2391 (1994)
- 60) M. Kitano, Y. Maitani, T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, in print
- 61) 後藤茂, 永井恒司, 林信一, 新総合薬剂学 <II>, 医歯薬出版 (株)
77 (1982)
- 62) A. Ruland, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.*, **72** 149-155 (1991)
- 63) N. G. M. Schipper, S. G. Romeijn, J. C. Verhoef, F. W. H. M. Merkus,
Pharm. Res., **10** 682-686 (1993)
- 64) T. Ando, Y. Maitani, T. Yamamoto, K. Takayama, T. Nagai, *Biol.*
Pharm. Bull., **21** 862-865 (1998)
- 65) M. Bhat, D. T. Velasquez, L. Wang, C. J. Malanga, J. K. H. Ma,
Y. Rojanasakul, *Pharm. Res.*, **10** 991-997 (1993)
- 66) Y. Maitani, T. Yamamoto, K. Takayama, T. Nagai, *Int. J. Pharm.*,
117 129-137 (1995)
- 67) Y. Maitani, N. Uchida, M. Nakagaki, T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **69**
21-27 (1991)
- 68) M. Yamazaki, Y. Nagashiki, Y. Higashi, K. Kitao, N. Yata, A.
Kamada, 薬剂学, **34** 153-159 (1974)

- 69) Y. Maitani, S. Asano, S. Takahashi, M. Nakagaki, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **40** 1569-1572 (1992)
- 70) H. Nakazawa, M. Nagase, 薬学雑誌, **106** 398-405 (1986)
- 71) Y. Li, Z. Shao, A. K. Mitra, *Pharm. Res.*, **9** 864-869 (1992)
- 72) Z. Shao, Y. Li, R. Krishnamoorthy, T. Chermak, A. K. Mitra, *Pharm. Res.*, **10** 243-251 (1993)
- 73) T. Irie, K. Wakamatsu, H. Arima, H. Aritomi, K. Uekama, *Int. J. Pharm.*, **84** 129-139 (1992)
- 74) T. Yamamoto, Y. Maitani, T. Ando, K. Isowa, K. Takayama, T. Nagai *Biol. Pharm. Bull.*, **21** 866-870 (1998)
- 75) K. Muramatsu, Y. Maitani, Y. Machida, T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **107** 1-8 (1994)
- 76) T. Yamamoto, Y. Maitani, K. Isowa, T. Nagai, *Biol. Pharm. Bull.*, **18** 887-890 (1995)