

氏名（本籍）	山本 知永	（東京都）
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	乙 第95号	
学位授与年月日	平成11年3月13日	
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当者	
学位論文の題名	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	
論文審査委員	主査	教授 永井 恒司
	副査	教授 辻 勉
	副査	助教授 上田 晴久

論文内容の要旨

近年、日本の食生活が欧米化することで、糖尿病患者数は、現在では600万人を越えなお急増している。一般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初回通過効果を受けるため、消化管から殆ど吸収されない。したがって現在の臨床におけるペプチド性製剤はほとんど注射剤であり、インスリンも注射で投与されている。しかし、これは患者に苦痛を強い、また重篤な副作用が起こる可能性も高い。そこで、患者の生活の質の向上のためにも新しい投与方法が望まれ、注射剤に代わる投与経路の開発が行われている。なかでも鼻や肺からの投与は、それらの粘膜の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い。

本研究では、薬物にインスリンを用い、家兎の鼻腔および眼に薬剤を投与することにより、インスリンの鼻粘膜吸収における鼻涙管経由の点眼からの貯留性の影響を検討した。また、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 β -sitosterol、campesterol、stigmasterolおよびbrassicasterolの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(SG)とそのアグリコンであるステロール(SS)を新規吸収促進剤として用い、インスリンの経鼻吸収性向上について検討した。さらに、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の有用性を調べた。またSGの吸

収促進機構と SG 含有インスリン製剤の短期間での繰り返し投与におけるインスリンの吸収性と鼻粘膜に対する安全性も検討した

1. 点眼と経鼻投与

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。点眼によって鼻粘膜から薬物を徐々に吸収させるために、眼を薬物の貯留庫にしようとした。家兎においてインスリンの点眼油を眼と鼻からそれぞれ投与すると、血糖の低下がみられ、体内に吸収された。さらにインスリンの人工涙液を点眼すると、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にした。このように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推察された。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。そこで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ようとした。

2. 各種剤形と吸収促進剤

剤形としては油性および水性インスリン懸濁液剤と粉末製剤を、促進剤としては SG、SS やインスリンの吸収促進剤として報告されているグリココール酸ナトリウムを用いて比較検討した。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、1.0% を越えるとその作用は飽和することが判明した。また 1.0% SG および SS 含有インスリン PBS 懸濁液剤において、SG の方が SS よりも経鼻吸収促進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。

インスリンの流動パラフィン、ゴマ油、ラッカセイ油性液剤において、1.0% グリココール酸ナトリウム含有インスリン PBS 懸濁液剤より、高いインスリンの吸収が認められた。さらに、流動パラフィン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% の薬理学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、水性液剤の場合と同様に SG の方が SS より高い結果となった。経鼻吸収性が最も高かったラッカセイ油に 1.0% SG を添加し、さらにタンパク分解酵素阻害作用のある L-

グルタミン酸や油の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。

製剤中の薬物の安定性や投与後の薬物の滞留性を考えて、粉末製剤を検討した。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かにした。SG含有凍結乾燥製剤の生物学的利用能は、1.0% SG含有PBS懸濁液剤の約2~3倍に上昇した。また、SG含有インスリン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賦形剤として添加した。この結果、SGは賦形剤としても有用性が高いことを明らかにした。

3. SGとSSの吸収促進機構

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パ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-分配仮説における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膜のタイトジャンクションから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。

4. 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

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、薬理学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学的変化は何等認められなかった。

これらの結果から、鼻粘膜は点眼に比べ極めて薬物の吸収性が高い部位であることが明らかとなった。また、SGおよびSSは水性および油性基剤中、さらには粉末製剤中でも吸収促進剤として有効であり、また、粉末製剤では賦形剤としても有効であることが明らかとなった。それら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することが示唆された。しかし、短期間でのSG含有インスリン粉末製剤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、インスリンの吸収性に変化がないことから、SGは安全で有効な吸収促進剤と考えられる。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。

論文審査の結果の要旨

本論文は、大豆由来ステロールグルコシド(SG)およびそのアグリコンであるステロール(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結果をまとめたものである。その内容を要約すると以下のようなになる。

1. 家兎においてインスリンの点眼油を眼と鼻からそれぞれ投与すると、血糖の低下が認められた。また、インスリンは結膜だけでなく鼻粘膜においても吸収されたことから、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にした。また、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推察された。
2. SGおよびSSは、各種剤形においてインスリンの経鼻吸収促進作用を示し、SGの方がSSよりもその作用が高い傾向を示した。また、インスリン水性懸濁液剤において、1.0%以下のSG添加濃度では濃度と血糖低下作用に相関性が認められた。SSの各成分による吸収促進作用の強さは、各成分の疎水性の高い順と一致した。さらに、粉末製剤については、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が明かとなり、SGは賦形剤としての有用性も認められた。
3. In vitroにおける摘出したウサギ鼻粘膜を用いたインスリンの膜透過実験によりSGおよびSSは鼻粘膜中の脂質に作用することが示唆された。また、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0.05M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とから、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することが示唆された。
4. SGにおける鼻粘膜の組織障害性について、各種インスリン製剤を用いて繰り返し投与を行って検討したところ、SGは病理組織学的検査において、ウサギ鼻粘膜上皮細胞への組織障害性を認めなかった。また、臨床の場におけるインスリン製剤のほとんどが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日間繰り返し経鼻投与した結果、血中インスリン濃度および血糖低下推移は5日間を通して有意な差はなく、生物学的利用能は平均で25.0%と高い値を示した。

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。

以上のように本論文は新しい知見を含み、インスリンの投与方法の開発に有用な情報を提供している。記述は正確であり、表現も適正である。よって本論文は博士（薬学）の学位論文に充分値するものと判定した。