

氏名(本籍)	青木 芳延	(東京都)	
学位の種類	博士(薬学)		
学位記番号	乙 第155号		
学位授与年月日	平成18年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者		
学位論文の題名	Role of the Mucous/Glycocalyx Layers in Absorption of Insulin from Small Intestine		
論文審査委員	主査	教授 高山 幸三	
	副査	教授 中 陳 静 男	
	副査	教授	米 谷 芳 枝

論文内容の要旨

糖尿病の治療において広く利用されているインスリン製剤は、そのほとんどが注射剤であるため、投与に伴う苦痛や煩雑さなどから患者のコンプライアンスの低下を招くことがある。これに対し、経口投与製剤は食物の摂取と同じ経路をとることから投与が自然で簡便である。さらに消化管から吸収された後、門脈を経て肝臓にいたる経路は、インスリン本来の膵臓から門脈を経て肝臓にいたる生理学的な経路に近似するため、従来、注射に代わる最も望ましい投与剤形であると考えられてきた。しかしながら、一般に、インスリンを含めペプチド/タンパク薬物の吸収は、消化管からの吸収過程に存在する多くの透過障壁によって著しく制限される。それゆえ、十分な薬理学的効果を得るインスリンの経口投与製剤を開発するためには、吸収過程における透過障壁の存在を十分に理解することが肝要である。近年、消化管粘膜上皮細胞上の粘液/グライコカリックス層(mucous/glycocalyx層:M/G層)がアミノ酸などの栄養素及び高分子化合物などの吸収に重要な役割を担っていることが報告されており、これらM/G層がインスリンなどのペプチド/タンパク薬物の吸収に対しても透過障壁として影響を与える可能性が示唆されている。しかしながら、これらM/G層の透過障壁としての本質について十分な研究は行われていない。そこで本研究では、インスリンの消化管からの吸収におけるM/G層の影響、及びそれら透過障壁の部位差について詳細な検討を行った。さらにM/G層に近接するbrush border membrane enzyme(BBME)のインスリンの消化管からの吸収に対する影響についても検討を加えた。

最初に、M/G層を除去したラット回腸による*in situ loop*吸収実験から、インスリンの吸収に対するM/G層の影響を評価した。吸収の比較対照には非ペプチド性水溶性高分子である分子量4400、20000及び40000の各種FITC-dextran(FDs)を用いた。M/G層の除去は、これら層の構成成分の一つと考えられるヒアルロナン(HA)を分解する酵素ヒアルロニダーゼ(HAase)により腸管内を前処理することで行った。前処理方法には腸管内にHAase溶液を還流させる方法(Perfusion)につ

いて最初に検討し、さらに、*in vivo*により近い適用条件を想定してHAase溶液を腸管内に貯留させる方法(Exposure)を検討した。また、HAase前処理によるM/G層の消失を顕微鏡下で観察するとともに、M/G層除去に伴う小腸上皮細胞内外のintegrityへの影響を以下の方法により検証した。すなわち、上皮細胞からのLactate dehydrogenase(LDH)の漏出、顕微鏡観察及び小腸粘膜の膜抵抗値などの生化学的、組織化学的及び電気生理化学的な手法を適用した。その結果、M/G層を除くことでラット回腸からのインスリンの吸収は著しく増加したが、FDsの吸収に変化は認められなかった。また、いずれの前処理法においてもM/G層除去による小腸上皮細胞内外のintegrityへの影響はなかった。これらのことから、M/G層はインスリンの吸収に対して透過抵抗となるが、FDsのような非ペプチド性水溶性高分子に対しては透過抵抗とならないことが明らかとなった。

これまでに報告されたM/G層の物理化学的及び生理学的な特性から、M/G層のインスリンの吸収に対する透過障壁の本質は、拡散抵抗及び酵素分解であることが推察された。そこで次に、M/G層を除去したラット回腸粘膜におけるインスリンの*in vitro*透過挙動、及びHAase前処理の際に回収したM/G層分画中でのインスリンの*in vitro*分解挙動を比較することで、インスリンの吸収に対するM/G層の拡散抵抗及び酵素分解による透過障壁としての影響を評価した。*In vitro*透過挙動は細胞間隙経路(paracellular pathway)の透過マーカーとしてFITC-dextran 4400(FD-4)及び経細胞経路(transcellular pathway)の透過マーカーとしてアンチピリンを用い比較検討した。その結果、インスリンのみかけの透過係数はM/G層を除くことで著しく増加したのに対して、FD-4及びアンチピリンの各透過マーカーはM/G層を除いても変化を認めなかった。一方、インスリンはM/G層分画中で速やかに分解した。これらのことから、M/G層はインスリンの吸収に対して拡散障壁ではなく酵素分解による透過障壁として寄与することが明らかとなった。また、インスリン(分子量6000)及びFD-4(分子量4400)は同等の分子量を持つ水溶性高分子薬物であるため細胞間隙経路を介した拡散(透過)に支配される。したがって、M/G層を除いた場合、両者のみかけの透過係数は同等になると考えられる。しかしながら、M/G層を除いた場合でもインスリンのみかけの透過係数はFD-4に比べて優位に小さくなった。このことから、M/G層とは別にインスリンの透過経路上に存在するBBMEが酵素分解の透過障壁として影響を及ぼしていると推察された。これまでにインスリンを分解するBBMEの一つとしてinsulin degrading enzyme (IDE)が報告されている。そこで次に、M/G層を除去したラット回腸による*in situ loop*吸収実験において、IDEに対して阻害作用を有するアプロチニンを同時投与し、インスリンの吸収に対するBBMEの影響を評価した。その結果、アプロチニンの併用によってインスリンの吸収は、M/G層を除去した際のインスリンの吸収に対して相加的に増加した。また、アプロチニンの投与量のある一定量まで増すことでインスリンの吸収は飽和を示した。このことから、BBMEがインスリンの吸収に対する透過抵抗として寄与することが明らかとなった。

これまでに、インスリンのラット小腸における吸収は小腸下部の方が大きいとの報告があり、小腸部位間でのインスリンに対する透過抵抗の差が示唆されている。そこで次に、回腸と同様、十二指腸及び空腸についても、M/G層を除去したラット小腸粘膜におけるインスリンの*in vitro*透過挙動、及びHAase前処理の際に回収されたM/G層分画中でのインスリンの*in vitro*分解挙動を比較した。これより、小腸各部位におけるインスリンの吸収に対するM/G層の拡散抵抗及び酵素分解による透過障壁としての寄与、及び部位間でのそれら透過抵抗の大きさの相対的關係を評価した。M/G層の除去は、回腸と同様、*in situ loop*により腸管内をHAaseで前処理することでを行い、M/G層の消失及びそれに伴った小腸上皮細胞内外のintegrityへの影響を併せて検証した。また、*in vitro*透過挙動は回腸と同様、透過マーカーにFD-4及びアンチピリンを用い比較評価した。その結果、十二指腸及び空腸いずれの部位においても、回腸と同様にM/G層分画中でのインスリンの分解は速やかであり、また、インスリンのみかけの透過係数はM/G層を除くことで著しく増加する一方、対照としたFD-4及びアンチピリンはM/G層を除いても変化を認めなかった。また、M/G層除去によっても小腸上皮細胞内外のintegrityは保持されていた。よって、いずれの小腸部位においても、M/G層はインスリンの吸収に対して拡散障壁ではなく酵素分解による透過障壁として寄与することが明らかとなった。また、M/G層分画中でのインスリンの1次分解による半減期は各部位間のインスリンに対するM/G層の酵素分解による透過障壁としての相対的強度關係を反映すると考えられ、その關係は十二指腸>空腸>回腸となることから、小腸上部ほど透過抵抗が増大することが示唆された。一方、M/G層を除いた場合のインスリンのみかけの透過係数はFD-4に比べて小さく、回腸と同様にM/G層とは別にインスリンの透過経路上に存在するBBMEが酵素分解の透過障壁として影響を与えていることが推察された。ここで、各部位間でのインスリンの相対的なみかけの透過係数の大きさは、十二指腸<空腸<回腸となったが、FD-4のみかけの透過係数は部位間での差が認められなかったことから、BBMEによる透過抵抗は十二指腸>空腸>回腸と小腸上部ほど増大することが示唆された。したがって、インスリンの透過に対するM/G層及びBBMEのいずれの透過抵抗も小腸上部ほど増大することが明らかとなり、これら透過抵抗の部位差は過去に報告された小腸各部位でのインスリンの吸収に差が見られる要因の一つになっていると考えられた。

以上、本研究によって、いずれの小腸部位においても、M/G層は拡散障壁ではなく酵素分解による透過障壁として、また、BBMEも透過障壁としてインスリンの吸収に対して大きく影響を与えることが明らかとなった。さらに、M/G層及びBBMEとも、それらの透過抵抗の強さは小腸上部ほど増大することが明らかとなった。これらの知見は、M/G層及びBBMEのような透過抵抗を制御することにより、インスリンの経口吸収を治療上有効なレベルまで高めることができるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

近年、消化管粘膜上皮細胞上の粘液／グライコカリックス層（mucous/glycocalyx層：M/G層）がアミノ酸などの栄養素及び高分子化合物などの吸収に重要な役割を担っていることが報告されており、これらM/G層がインスリンなどのペプチド／タンパク薬物の吸収に対しても透過障壁として影響を与える可能性が示唆されている。しかしながら、これらM/G層の透過障壁としての本質について十分な研究は行われていない。そこで本研究では、インスリンの消化管からの吸収におけるM/G層の影響、及びそれら透過障壁の部位差について詳細な検討を行った。さらにM/G層に近接するbrush border membrane enzyme (BBME) のインスリンの消化管からの吸収に対する影響についても検討し、以下の知見が得られた。

最初に、M/G層を除去したラット回腸による *in situ loop* 吸収実験から、インスリンの吸収に対するM/G層の影響を評価した。吸収の比較対照には非ペプチド性水溶性高分子である分子量4400、20000及び40000の各種FITC-dextran (FDs) を用いた。M/G層の除去は、ヒアルロニダーゼ (HAase) により腸管内を前処理することで行った。その結果、M/G層を除くことでラット回腸からのインスリンの吸収は著しく増加したが、FDsの吸収に変化は認められなかった。また、いずれの前処理法においてもM/G層除去による小腸上皮細胞内外のintegrityへの影響はなかった。これらのことから、M/G層はインスリンの吸収に対して透過抵抗となるが、FDsのような非ペプチド性水溶性高分子に対しては透過抵抗とならないことが明らかとなった。

これまでに報告されたM/G層の物理化学的及び生理学的な特性から、M/G層のインスリンの吸収に対する透過障壁の本質は、拡散抵抗及び酵素による分解であることが推察された。そこで次に、M/G層を除去したラット回腸粘膜におけるインスリンの *in vitro* 透過挙動、及びHAase前処理の際に回収したM/G層分画中でのインスリンの *in vitro* 分解挙動を比較することで、インスリンの吸収に対するM/G層の拡散抵抗及び酵素分解による透過障壁としての影響を評価した。その結果、M/G層とは別にインスリンの透過経路上に存在するBBMEが分解酵素の透過障壁として影響を及ぼしていることが明らかとなった。

これまでに、インスリンのラット小腸における吸収は小腸下部の方が大きいとの報告があり、小腸部位間でのインスリンに対する透過抵抗の差が示唆されている。そこで次に、回腸と同様、十二指腸及び空腸についても、M/G層を除去したラット小腸粘膜におけるインスリンの *in vitro* 透過挙動、及びHAase前処理の際に回収されたM/G層分画中でのインスリンの *in vitro* 分解挙動を比較した。その結果、十二指腸及び空腸いずれの部位においても、回腸と同様にM/G層分画中でのインスリンの分解は速やかであり、また、インスリンのみかけの透過係数はM/G層を除くことで著しく増加する一方、対照としたFD-4及びアンチピリンはM/G層を除いても変化を認めなかった。また、M/G層除去によっても小腸上皮細胞内外の *integrity* は保持されていた。よって、いずれの小腸部位においても、M/G層はインスリンの吸収に対して拡散障壁ではなく酵素分解による透過障壁として寄与することが明らかとなった。また、M/G層分画中でのインスリンの1次分解による半減期は各部位間のインスリンに対するM/G層の酵素分解による透過障壁としての相対的強度関係を反映すると考えられ、その関係は十二指腸>空腸>回腸となることから、小腸上部ほど透過抵抗が増大することが示唆された。一方、M/G層を除いた場合のインスリンのみかけの透過係数はFD-4に比べて小さく、回腸と同様にM/G層とは別にインスリンの透過経路上に存在するBBMEが酵素分解の透過障壁として影響を与えていることが推察された。ここで、各部位間でのインスリンの相対的なみかけの透過係数の大きさは、十二指腸<空腸<回腸となったが、FD-4のみかけの透過係数は部位間での差が認められなかったことから、BBMEによる透過抵抗は十二指腸>空腸>回腸と小腸上部ほど増大することが示唆された。したがって、インスリンの透過に対するM/G層及びBBMEのいずれの透過抵抗も小腸上部ほど増大することが明らかとなり、これら透過抵抗の部位差は過去に報告された小腸各部位でのインスリンの吸収に差が見られる要因の一つになっていると考えられた。

以上、本研究によって、いずれの小腸部位においても、M/G層は拡散障壁ではなく分解酵素による透過障壁として、また、BBMEも透過障壁としてインスリンの吸収に対して大きく影響を与えることが明らかとなった。さらに、M/G層及びBBMEとも、それらの透過抵抗の強さは小腸上部ほど増大することが明らかとなった。これらの知見は、M/G層及びBBMEのような透過抵抗を制御することにより、インスリンの経口吸収を治療上有効なレベルまで高める可能性を示唆するものである。