

氏名（本籍）	大貫義則	（神奈川県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第160号	
学位授与年月日	平成18年9月6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	Intestinal insulin delivery using water-in-oil-in-water multiple emulsion	
論文審査委員	主査	教授 高山幸三
	副査	教授 米谷芳枝
	副査	教授 杉山清

論文内容の要旨

糖尿病はインスリン作用の不足によって生じる全身性の代謝異常であり、慢性の高血糖を特徴とする。多くの場合、それ自体は自覚症状がないものの、長期にわたって高血糖が持続すると網膜症、腎炎、神経障害などに代表される重大な合併症を引き起こす。近年、糖尿病の患者数は飛躍的に増大しており、またその発症には生活習慣が密接に関与することから、わが国を含め世界中で深刻な社会問題になっている。インスリンは血糖値を低下させるペプチドホルモンであり、糖尿病治療において最も重要な治療薬である。臨床で用いられるインスリン製剤は今のところ皮下注射などの注射製剤に限られ、患者のコンプライアンス改善などの観点から注射剤に代わる投与経路の開発が強く望まれている。言うまでもなく、経口投与製剤は食物の摂取と同じ経路をとるため、薬物の投与が自然で簡便であり、さらに消化管から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しているため、注射に代わる最も望ましい投与剤形であると言える。しかしながら、インスリンは分子量の大きい水溶性薬物であるため消化管からの吸収性は非常に低く、また腸管内の酵素によって速やかに分解を受けてしまうことから、インスリン製剤の経口製剤化は非常に困難である。こうした問題点を克服し、効率よくインスリンを消化管から吸収させるために、**water-in-oil-in-water (W/O/W)** 形複合エマルションの薬物キャリアーとしての有用性に着目した。W/O/W 形複合エマルションは、その内水相にインスリンを封入することで、インスリンの酵素による分解を防ぎ、さらに油相および水相を有するため、様々な成分との併用が可能である。本研究では、膜機能を修飾し、機能性脂質として知られるエイコサペンタエン酸(EPA)およびドコサヘキサエン酸(DHA)などを添加したインスリンエマルションを調製し、消化管粘膜からのインスリンの吸収性に優れた経粘膜製剤の開発を試みた。

検討として、まず *in vivo* および *in situ loop* インスリン吸収実験を行い、エマルション製剤に

よる血糖低下作用および添加した不飽和脂肪酸の吸収促進作用を明らかにした。オレイン酸、EPA および DHA などの不飽和脂肪酸を添加したインスリンエマルジョンをラットの直腸に投与した結果、投与直後から急激な血中インスリン濃度の上昇および血糖値の低下が認められ、コントロールと比較して著しいインスリン吸収性の改善が認められた。また、いずれの製剤も薬理作用はインスリンの投与量に依存的であった。不飽和脂肪酸による吸収促進作用を比較したところ、DHA による作用が最も強く、非常に少量の DHA を製剤に添加するだけで十分な作用を期待できることが明らかとなった。また DHA によるインスリン吸収促進作用は DHA グリセリドや中鎖脂肪酸(カプリン酸やラウリン酸)による作用よりもはるかに強力であった。次に、消化管投与部位差による作用の違いを明らかにするため、ラットの回腸、結腸および直腸部に作成した loop 内に製剤を投与し、血糖低下作用を評価した。その結果、回腸に比べ、直腸や結腸といった消化管下部に製剤を投与した場合に、より強力な血糖低下作用が発現することが明らかになった。さらに、実際のインスリン製剤の使用を考慮し、ラットを用いてインスリンエマルジョンの連続投与実験を行い、血糖低下作用の変化および投与部位の組織障害性を評価した。その結果、10 日間連続投与した場合でも、著明な血糖低下作用が維持されることが明らかになった。また、連続投与後のラットから直腸を摘出し、光学顕微鏡で組織観察を行ったところ、製剤の適用に伴う直腸粘膜への障害性はほとんど認められなかった。製剤としての更なる改良を目的として、エマルジョンに Pluronic F127(PF127)ハイドロゲルを添加したゲル製剤を調製し、製剤からのインスリン放出性を制御することを試みた。その結果、PF127 添加エマルジョンでは、血糖値低下作用が大幅に持続することが明らかになった。

多価不飽和脂肪酸によるインスリン吸収促進作用の作用機構については、未だ不明な点が多いものの、これまでの報告や検討から、細胞間隙経路よりもむしろ経細胞経路への作用が関係していると考えられている。経細胞経路の薬物透過には、膜流動性など脂質二重膜の膜物性が深く関与しているため、脂質二重膜モデルとしてリポソームを用い、多価不飽和脂肪酸による脂質二重膜への作用を詳細に検討した。まず、dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)を構成成分とするリポソーム懸濁液に、脂肪酸懸濁液または脂肪酸含有エマルジョンを添加し、インキュベーションしてリポソームに脂肪酸を取り込ませた。一定時間後、リポソームの相転移温度、膜中に標識した蛍光プローブ(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH)の蛍光異方性および detergent insolubility を測定した。その結果、オレイン酸、EPA および DHA などの不飽和脂肪酸懸濁液を適用すると、適用した脂肪酸の用量に依存した相転移温度および蛍光異方性の低下が認められた。また、不飽和脂肪酸を適用したリポソームに非イオン性界面活性剤である Triton X-100 を処置したところ、そのほとんどが可溶化を受け、detergent insolubility が著しく低い値となった。これらの結果から、不飽和脂肪酸の適用によって脂質二重膜の膜流動性が著しく増大することが明らかになった。

また、リポソームへの脂肪酸の取り込み量はいずれも同程度であったにもかかわらず、DHA および EPA などの多価不飽和脂肪酸による作用の方がオレイン酸に比べて強力であった。このことから、不飽和脂肪酸による膜への作用は不飽和度など脂肪酸の分子構造に依存していることが考えられる。こうした脂肪酸による作用はエマルションとして適用した場合にも、同様に認められた。不飽和脂肪酸による脂質二重膜への作用強度は、先のインスリン吸収促進作用と極めてよく一致しており、不飽和脂肪酸の脂質二重膜への作用が吸収促進作用と深く関与している可能性が示唆された。

以上の検討から、主に不飽和脂肪酸を添加したインスリンエマルションは、経粘膜投与製剤として有用性が高いと考えられるが、一方で、様々な成分や工程から調製されるエマルション製剤は、調製時の種々の要因がその製剤特性に複雑に影響することが予想される。したがって、不飽和脂肪酸のような膜修飾物質以外にも血糖低下作用に寄与する要因が存在する可能性は十分考えられる。また一方で、製剤開発を考えた場合、薬理作用以外にも製剤安定性など留意しなければならない製剤特性は数多い。つまり、要因と特性の因果関係を理解し、調製条件を最適な条件に設定することで優れた製剤が得られると考えられる。そこで、実験計画法に基づいて調製条件と特性との関係について検討し、さらに当教室により開発された新規処方最適化手法によって血糖低下作用や製剤安定性が高度に制御された最適な製剤処方の探索を行った。実験としては、直交表にしたがって調製条件を割り付けた 16 種類のインスリンエマルションを調製し、エマルション中に分散する油滴(W/O エマルション)の粒子径、粘度、製剤安定性および血糖低下作用を測定した。測定結果を分散分析により解析した結果、粒子径および粘度などの製剤物性は調製条件によって有意に変化し、特に粘度には様々な要因が大きく寄与することが明らかになった。製剤安定性についても様々な要因による寄与が認められ、さらに粘度が高くなる条件と製剤が安定化する調製条件がよく一致していることから、これらの特性は相互に強く相関していることが示唆された。血糖低下作用に対しては、オレイン酸の寄与が著しく大きいことが明らかとなった。これらの結果に基づいて、次に血糖低下作用および製剤安定性に優れるインスリンエマルションの最適処方を探した。分散分析による解析結果から、製剤の血糖低下作用はインスリン吸収促進作用を有するオレイン酸の添加の有無によって決まることが明らかになったため、まず最適なオレイン酸添加量についての検討を行った。製剤中オレイン酸濃度の異なるインスリンエマルションの血糖低下作用を評価したところ、血糖低下作用は製剤中オレイン酸濃度が 2% のときに最も効果的に発現されることが明らかになった。最適なオレイ

ン酸濃度を維持しつつ、製剤安定性の最も高くなる調製条件を最適処方として探索を行った。すなわち、先の解析で寄与率の高かった攪拌時間と外水相濃度を 2 次複合球形実験に割り付け、10 種類のインスリンエマルジョンを調製して、それらの製剤安定性を評価した。得られた結果にマルチスプライン補間を適用して応答曲面を同定し、最適処方を予測した。最適処方について確認実験を行ったところ、予測値と実測値は高度に一致し、薬理作用および製剤安定性が高度に制御されたインスリン含有エマルジョンの最適化処方を見出すことができた。

本研究により、機能性脂質として知られる多価不飽和脂肪酸による優れたインスリン消化管吸収促進作用およびその機構を明らかにした。また、目的に合わせて様々な製剤特性を付与し得る W/O/W 形複合エマルジョンはインスリン消化管デリバリーのための薬物キャリアーとして有用であることを明らかにした。以上の知見はインスリンなどのペプチド薬物の経口製剤化研究に大きく貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

インスリン製剤は、臨床での使用が注射に限られており、注射に代わる新しい投与経路の開発が強く望まれている。その投与経路としては経口投与が最も望ましいものの、インスリンはタンパク分解酵素による分解を受けやすく、消化管からの吸収性も著しく低いため、経口投与時のバイオアベイラビリティは著しく低い。本研究では water-in-oil-in-water (W/O/W) 形複合エマルジョンにインスリンを封入し、さらにエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などの多価不飽和脂肪酸を吸収促進剤として用いることで、効率よく消化管粘膜からインスリンを送達可能な剤形の開発を試み、多くの基礎的知見が得られた。以下に本研究の内容を要約する。

インスリンの粘膜吸収における多価不飽和脂肪酸の影響：*in vivo*および*in situ* loopインスリン吸収実験を行い、エマルジョン製剤による血糖低下作用および添加した不飽和脂肪酸によるインスリン吸収促進作用を明らかにした。様々な処方により調製したインスリン含有エマルジョンをラット直腸に投与したところ、EPAおよびDHAなどの多価不飽和脂肪酸添加エマルジョンが、著しい血清インスリン濃度の増大と、それに伴う強力な血糖低下作用を示した。中でも、DHA添加エマルジョンによる血糖低下作用は非常に強力であり、少量のDHAを製剤に添加することで十分な吸収促進作用を期待できることが明らかになった。また、実際の製剤の使用を考慮して、10日間の連続投与実験を行った。その結果、インスリン含有エマルジョンによる著明な血糖低下作用は、組織障害性を伴うことなく、安定に維持されることが明らかになった。さらに、インスリン含有エマルジョンにハイドロゲルを添加することで、持続的な血糖低下作用が認められ、製剤による作用発現時間を制御できることが明らかになった。

多価不飽和脂肪酸による脂質二重膜の構造変化：多価不飽和脂肪酸によるインスリン吸収促進作用の作用機構については、未だ不明な点が多いものの、これまでの検討から、経細胞経路への作用に起因すると考えられている。経細胞経路の薬物透過には、膜流動性など脂質二重膜の膜物性が深く関与しているため、脂質二重膜モデルとしてリポソームを用い、多価不飽和脂肪酸による脂質二重膜への作用を詳細に検討した。様々な脂肪酸懸濁液をリポソームに適用し、相転移温度、蛍光異方性および detergent insolubility などの物性値を評価したと

ころ、オレイン酸、EPAおよびDHAなどの不飽和脂肪酸が、脂質二重膜の膜流動性を著しく増大させることが明らかになった。特に、多価不飽和脂肪酸による作用は非常に強力なことが見出された。また不飽和脂肪酸のリポソームへの取り込み量はほぼ一定であったことから、この膜流動化作用は脂肪酸の分子構造に起因していることが示唆された。実際の適用剤形であるエマルジョンに多価不飽和脂肪酸を添加してリポソームに適用したところ、懸濁液と同様に非常に強力な膜流動化作用が認められ、膜に十分作用できることが明らかになった。

W/O/W形複合エマルジョンの調製条件の最適化：インスリン含有エマルジョンは、様々な成分や工程から調製されており、そうした調製時の要因が薬理効果などの特性に複雑に関与していると考えられる。そこで、本研究では、実験計画法に基づいて要因と特性との因果関係を明らかにし、血糖低下作用と製剤安定性に優れるインスリン含有エマルジョンの調製条件を探索した。L16直交表に基づいて調製したモデル製剤の特性値を分散分析により解析した結果、血糖低下作用には製剤への吸収促進剤の添加が最も大きく影響することが明らかになり、また製剤安定性には様々な要因が複雑に影響していることが示された。得られた知見をもとに、マルチスプライン補間を応用した処方最適化検討を行い、血糖低下作用および製剤安定性が高度に制御されたインスリン含有エマルジョンの最適調製条件を決定した。

本研究により、機能性脂質として知られる多価不飽和脂肪酸による優れたインスリン消化管吸収促進作用およびその機構が明らかにされた。また、目的に合わせて様々な製剤特性を付与し得るW/O/W形複合エマルジョンは、インスリン消化管デリバリーのための薬物キャリアーとして有用であることが示された。以上の知見は、インスリンなどペプチド薬物の経口製剤化研究に大きく貢献するものと考えられ、博士(薬学)の学位にふさわしい内容である。