

氏名(本籍)	後藤 貴裕	(東京都)
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第105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1項該当者	
学位論文の題名	Application of novel pharmaceutical carrier systems to oral insulin delivery	
論文審査委員	主査	教授 高山 幸三
	副査	教授 辻 勉
	副査	助教授 伊藤 清美

## 論文内容の要旨

### 1. はじめに

遺伝子工学や分子生物学の進展によりインスリンや成長ホルモンといった微量で強力な生理活性を有するペプチドの大量供給が可能となり、医薬品として様々な治療への応用が期待されている。しかしこれらバイオ医薬の多くは生体内で非常に不安定であり、その投与方法としては臨床上、筋肉投与、皮下投与、および静脈内投与などの注射による投与を余儀なくされている。注射による投与は作用が最も的確に現れる利点を有しているが、患者の肉体的、精神的苦痛やアレルギー反応等の副作用発現の危険性から、これに代わる投与方法の開発が強く望まれている。特に、経口投与をはじめとする経粘膜投与は、投与の簡便性や患者の Quality of life の改善のため非常に有用性が高い投与方法であると考えられる。しかしながら、ペプチド、タンパク薬物の多くは、親水性薬物のため生体膜透過性が非常に低く、また消化管内での酵素による分解を受けやすいという欠点を有している。これらの生体膜からの吸収を改善するための製剤学的手法として、吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤の併用、ペプチドの分子構造の化学修飾、リポソーム、高分子キャリアなどの担体によるペプチド、タンパク薬物の剤形修飾等が用いられている。しかし、このように様々な検討がされているものの吸収率は依然として低く、いまだに実用の域に達する製剤は得られていない。

本研究はバイオ医薬の消化管吸収を改善する方法としてスマートハイドロゲル: poly(methacrylic acid-grafted-ethylene glycol) (P(MAA-g-EG))および膜融合リ

ポソームに着目し、その経口送達キャリアとしての有用性を代表的ペプチド薬物であるインスリンをモデルペプチドとして検討した。

## 2. スマートハイドロゲルのインスリン経口送達システムへの応用

スマートハイドロゲルは優れた放出制御性、粘膜付着性およびタンパク分解酵素阻害作用を同時に有している多機能性の薬物送達キャリアであることが当教室のこれまでの検討から明らかにされてきた。インスリンを封入したスマートハイドロゲル(Insulin loaded P(MAA-g-EG): ILP)は、正常および1型糖尿病ラットにおいて経口投与時の薬理的利用率を著しく改善し、約4%まで上昇させることが報告されている。本研究ではインスリン経口吸収性をさらに改善することを目的として、P(MAA-g-EG)のMAA:EGのモル比および粒子径がインスリン経口吸収性に及ぼす影響について *in vivo* 吸収実験により検討した。その結果、EGのモル比が高いものの方が強い血糖低下作用を示し、MAA:EG=1:1のILPが最も良好な血糖低下作用を示すことが明らかとなった。また、ILPの粒子サイズの減少によりインスリン経口吸収性が増大し、SS-ILP (<53  $\mu\text{m}$ )は最も強い血糖低下作用を示し、10 IU/kg 投与時で約10%の薬理的利用率が得られることが明らかとなった。同様にSS-ILPは1型および2型糖尿病ラットにおいても持続的かつ強力な血糖低下作用を示すことが明らかとなった。さらに、SS-ILPを連続投与時の血糖低下作用について糖尿病ラットを用いて検討した結果、SS-ILPは1型および2型糖尿病ラットいずれにおいても、食餌後の血糖上昇を抑制し、持続的な血糖低下作用を示すことが明らかとなった。

粘膜付着性を有するキャリアは胃腸管部位での滞留時間を増加させ、生物学的利用率を改善できることから、生理活性ペプチドなどの生体からの吸収が乏しい薬物にとって有用であると報告されている。本研究で用いたスマートハイドロゲルは消化管粘膜への付着性を有し、インスリンの経口吸収改善作用に寄与していると考えられている。そこで、スマートハイドロゲルの粘膜付着挙動を明らかにするため、P(MAA-g-EG)のMAA:EGのモル比および粒子径が消化管移動および十二指腸への付着性に及ぼす影響について検討した。その結果、MAA:EGのモル比は消化管移動および粘膜付着性に影響を及ぼすことが明らかとなり、特にMAA:EG=1:1で最も高い消化管滞留性および粘膜付着性が認められた。これはスマートハイドロゲルのPEG鎖が粘液と相互浸透したことによる

と推察される。また、粒子サイズもスマートハイドロゲルの消化管移動および粘膜付着性に影響を及ぼし、粒子径<53  $\mu\text{m}$  のスマートハイドロゲルが最も高い粘膜付着性および消化管滞留性を示すことが明らかとなった。これは粒子サイズの減少とともにスマートハイドロゲルが mucous/glycocalyx 層のより深部に侵入したことによると考えられる。以上より ILP のインスリン吸収改善機構として消化管粘膜への付着性の関与が示唆された。

また、スマートハイドロゲルの消化管粘膜への傷害性を、小腸粘膜からの乳酸脱水素酵素(LDH)の漏出および膜抵抗値より検討した。その結果、スマートハイドロゲルは LDH を小腸管腔内に漏出せず、膜抵抗値も変化しないことから、粘膜に対する安全性の高いことが明らかとなった。

以上の結果より SS-ILP は経口投与で良好な血糖コントロールを可能とするインスリン製剤となり得るものと考えられる。

### 3. 膜融合リポソームのインスリン経口送達システムへの応用

膜融合リポソームはセンダイウイルスが有する細胞膜融合能をリポソームに付与させたものであり、細胞膜に結合し融合することでリポソーム内に封入された物質を直接かつ効率よく細胞内に導入できるキャリアである。本研究ではインスリンの極めて低い膜透過性を改善する方法として、膜融合リポソームに着目し、消化管粘膜へのインスリン送達キャリアとしての有用性を *in situ* 吸収実験により検討した。一方、膜融合リポソームを用いて消化管粘膜へ薬物送達を行う場合、上皮細胞上に存在する mucous/glycocalyx 層が膜融合リポソームの上皮細胞への接近を妨げ、融合の障壁となる可能性が考えられる。この mucous/glycocalyx 層は消化管組織をヒアルロニダーゼで前処理することで、膜の integrity を損なうことなく除去させることが可能である。そこで、ヒアルロニダーゼ前処理法を用いて、センダイウイルスの消化管粘膜への膜融合能に及ぼす mucous/glycocalyx 層の影響についても検討した。*In situ* 吸収実験の結果、膜融合リポソームは回腸部からのインスリン吸収改善作用を示さなかった。また、回腸部におけるセンダイウイルスの融合能はヒアルロニダーゼ前処理によりさらに上昇した。このことから、mucous/glycocalyx 層がセンダイウイルスの粘膜融合の障壁となり、膜融合リポソームの回腸粘膜への薬物送達効率を低下させたと考えられる。一方、結腸および直腸部では膜融合リポソームはインス

リン吸収を増大させ、強い血糖低下作用を示すことが明らかとなった。

また、膜融合リポソームにより消化管上皮細胞に導入されたインスリンは、細胞質内に存在する *insulin degrading enzyme (IDE)* により分解を受ける可能性が考えられる。そこで、膜融合リポソームに *IDE inhibitor* を併用した場合のインスリン吸収改善作用についても検討した。その結果、膜融合リポソームに *IDE inhibitor* を併用することにより、膜融合リポソームによる吸収促進効果を著しく増大できることが明らかとなった。

さらに、膜融合リポソームの消化管粘膜への傷害性を検討するため、消化管粘膜からの *LDH* の漏出量を測定した。膜融合リポソームは消化管粘膜から *LDH* の漏出させないことから、消化管粘膜への傷害性はほとんど認められないことが明らかとなった。

以上より、膜融合リポソームは結腸および直腸部においてインスリンの消化管吸収性を改善し得る、経粘膜適用キャリア素材となる可能性が示唆された。

#### 4. まとめ

本研究の結果から、*SS-ILP* および膜融合リポソームはインスリン経口送達システムの構築に有用性が高いことが明らかとなった。しかしながら、*SS-ILP* はインスリンの経口バイオアベイラビリティを著しく改善したものの、皮下投与に匹敵する吸収率を得るためにはインスリン自身の膜透過性を改善する新たな方法論の導入が必須である。一方、膜融合リポソームはインスリンの膜透過性を上昇させる手法として非常に有用ではあるが、結腸送達の技術を組み合わせる必要がある。このように有用性の高いキャリア素材の開発およびその特性を明らかにすることによって、バイオ医薬の経口投与を可能にする多機能性送達システムが実現できるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ペプチド薬物の多くは、注射による投与を余儀なくされている。注射による投与は、患者の苦痛やアレルギー反応等の副作用発現の危険性から、新しい投与方法の開発が望まれている。経口投与をはじめとする経粘膜投与は、特に有用性が高いものと考えられる。本研究はペプチド薬物の消化管吸収を改善する方法としてスマートハイドロゲル: poly(methacrylic acid-grafted-ethylene glycol) (P(MAA-g-EG))および膜融合リポソームに着目し、その経口送達キャリアとしての有用性を代表的ペプチド薬物であるインスリンを用いて検討したものである。

スマートハイドロゲルは優れた放出制御性、粘膜付着性およびタンパク分解酵素阻害作用を同時に有している多機能性の薬物送達キャリアである。インスリンを封入したスマートハイドロゲル(Insulin loaded P(MAA-g-EG): ILP)は、正常および1型糖尿病ラットにおいて経口投与時の薬理学的利用率を著しく改善し、約4%まで上昇させることが報告されている。本研究ではインスリン経口吸収性をさらに改善することを目的として、P(MAA-g-EG)のMAA:EGのモル比および粒子径がインスリン経口吸収性に及ぼす影響を *in vivo* 吸収実験により検討した。その結果、EGのモル比が高いものの方が強い血糖低下作用を示し、MAA:EG=1:1のILPが最も良好な血糖低下作用を示すことが明らかとなった。また、ILPの粒子サイズの減少によりインスリン経口吸収性が増大し、SS-ILP (<53  $\mu\text{m}$ )は最も強い血糖低下作用を示し、10 IU/kg投与時で約10%の薬理学的利用率が得られた。同様にSS-ILPは1型および2型糖尿病ラットにおいても持続的かつ強力な血糖低下作用を示した。さらに、SS-ILPを連続投与時の血糖低下作用について糖尿病ラットを用いて検討した結果、SS-ILPは1型および2型糖尿病ラットいずれにおいても、食餌後の血糖上昇を抑制し、持続的な血糖低下作用を示すことが明らかとなった。粘膜付着性を有するキャリアは胃腸管部位での滞留時間を増加させ、生物学的利用率を改善できることから、生理活性ペプチドなどの生体からの吸収が乏しい薬物にとって有用であると報告されている。そこで、スマートハイドロゲルの粘膜付着挙動を明らかにするため、P(MAA-g-EG)のMAA:EGのモル比および粒子径が消化管移動および十二指腸への付着性に及ぼす影響について検討した。その結果、MAA:EGのモル比は消化管移動および粘膜付着性に影響し、MAA:EG=1:1で最も高い消化管滞留性および粘膜付着性を示した。これはスマートハイドロゲルのPEG鎖が粘液と相互浸透したことによると推察される。また、粒子径<53  $\mu\text{m}$ のスマートハイドロゲルが最も高

い粘膜付着性および消化管滞留性を示すことが明らかとなった。これは粒子サイズの減少とともにスマートハイドロゲルがmucous/glycocalyx層のより深部に侵入したことによると考えられる。スマートハイドロゲルの消化管粘膜への傷害性を、小腸粘膜からの乳酸脱水素酵素(LDH)の漏出および膜抵抗値より検討した。その結果、スマートハイドロゲルはLDHを小腸管腔内に漏出せず、膜抵抗値も変化しないことから、粘膜に対する安全性の高いことが明らかとなった。

膜融合リポソームはセンダイウイルスが有する細胞膜融合能をリポソームに付与させたものであり、細胞膜に結合し融合することでリポソーム内に封入された物質を直接かつ効率よく細胞内に導入できるキャリアである。本研究では、消化管粘膜へのインスリン送達キャリアとしての有用性を *in situ* 吸収実験により検討した。さらに、ヒアルロニダーゼ前処理法を用いて、センダイウイルスの消化管粘膜への膜融合能に及ぼすmucous/glycocalyx層の影響についても検討した。In situ 吸収実験の結果、膜融合リポソームは回腸部からのインスリン吸収改善作用を示さなかった。また、回腸部におけるセンダイウイルスの融合能はヒアルロニダーゼ前処理によりさらに上昇した。このことから、mucous/glycocalyx層がセンダイウイルスの粘膜融合の障壁となり、膜融合リポソームの回腸粘膜への薬物送達効率を低下させたと考えられる。一方、結腸および直腸部では膜融合リポソームはインスリン吸収を増大させ、強い血糖低下作用を示すことが明らかとなった。膜融合リポソームにより消化管上皮細胞に導入されたインスリンは、細胞質内に存在する insulin degrading enzyme (IDE)により分解を受ける可能性が考えられる。そこで、膜融合リポソームにIDE inhibitorを併用した場合のインスリン吸収改善作用についても検討した。その結果、IDE inhibitorの併用により、膜融合リポソームによる吸収促進効果を著しく増大できることが明らかとなった。さらに、膜融合リポソームの消化管粘膜への傷害性を検討するため、消化管粘膜からのLDHの漏出量を測定した。LDHの漏出は見られなかったことから、膜融合リポソームは消化管粘膜に対して傷害性を示さないものと考えられる。

本研究は、SS-ILPが経口投与で良好な血糖コントロールを可能とするインスリン製剤となり得ることを示すとともに、膜融合リポソームが結腸および直腸部においてインスリンの消化管吸収性を改善し得ることを明らかにしたものである。