

Ussing chamber system を用いたインスリンの
鼻粘膜透過性評価久保浩之^{*1,2)}, 細谷健一・夏目秀視^{*2)}, 杉林堅次・森本雅憲^{*2,3)}Evaluation of insulin permeation across the rabbit
nasal mucosa using the Ussing chamber system

Permeation of insulin across the nasal mucosa, a desirable absorption site for peptide and protein drugs to avoid their first-pass effect and gastrointestinal degradation, excised from rabbits and the effect of bile salts as permeation enhancers on it were evaluated by using Ussing chamber system.

Insulin was degraded in this system, and the degradation in the mucosal side was slightly sooner than that in the serosal side. Every bile salt (0.5 %) used in this study reduced transmucosal electrical resistance (R_m) and enhanced insulin permeation. The degradation of insulin in the mucosal side was inhibited by addition of a bile salt, sodium taurodi-hydrofusidate. These results suggest that the Ussing chamber system becomes a useful tool to evaluate the enzymatic barrier function of nasal mucosa.

Hiroyuki Kubo^{*1,2)}, Ken-ichi Hosoya ·
Hideshi Natsume^{*2)}, Kenji Sugibayashi ·
Yasunori Morimoto^{*2,3)}

key words : nasal mucosa, in vitro permeation,
insulin, Ussing chamber, bile salt

鼻粘膜はペプチド性および蛋白質性薬物の投与部位として注目を集め、これまでさまざまな角度から薬物の吸収性に関する研究がなされている。しかしながらこれまでの報告は、*in vivo*¹⁻³⁾ および *in situ*⁴⁻⁶⁾ 実験系を用いて行われたものがほとんどであり、吸収のメカニズムや吸収促進剤の粘膜に与える影響等を基礎的かつ広汎に検討するためには、より簡便で再現性のある *in vitro* 実験系^{7,8)}が必要とされてきた。筆者らはこれまでに家兎より摘出した鼻粘膜を Ussing chamber(図1)

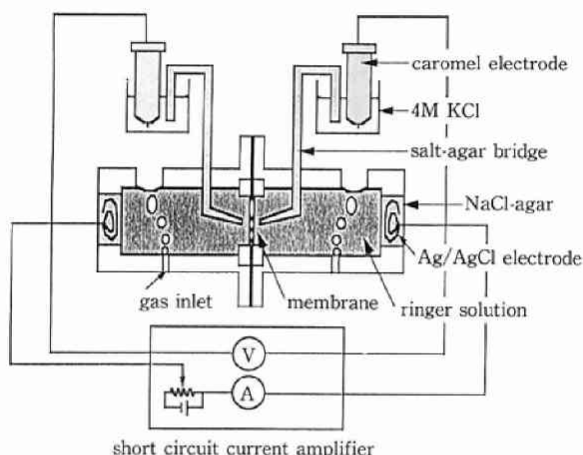


図1 Schematic diagram of the Ussing chamber system

に装着し、粘膜のバイオピリティを保ちながらモデル薬物の透過性や種々の透過促進剤の粘膜に与える影響について検討を行い、本実験系の有用性を報告してきた^{9,10)}。

今回は、モデル薬物としてヒトインスリンを用いて鼻粘膜透過性を評価し、さらにその透過性に及ぼす透過促進剤の影響について検討を行った。

材料と方法

(1) 鼻粘膜の摘出

鼻粘膜は雄性家兎(日本白色種、体重 2~3 kg)の鼻中隔から剥離して Ussing chamber の中央に挟んだ。セルの両側にはグルコース (11 mM) を含んだリンゲル液(GRS)を充たし、酸素(95 % O_2 / 5 % CO_2)を供給した。鼻粘膜のバイオピリティは、経時的に膜電位と短絡電流を測定することによりチェック¹¹⁾し、両値より膜抵抗(R_m)を算出した。

^{*1)} Tsukuba Laboratories, Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc. 久光製薬(株)筑波研究所

^{*2)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University 城西大学薬学部製剤学教室

^{*3)} Life Science Research Center, Josai University 城西大学生命科学研究センター

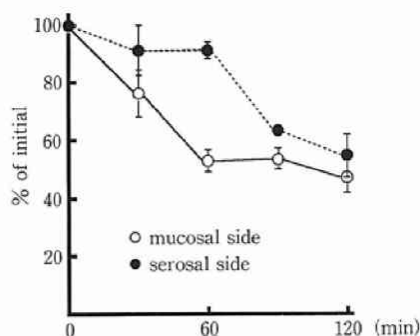


図2 Degradation of insulin in mucosal and serosal sides
The data are expressed as mean \pm SE (n=3~5).

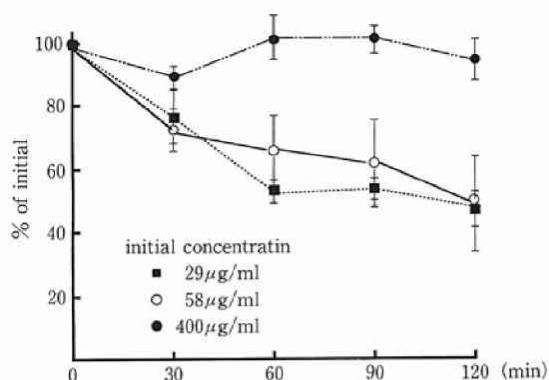


図3 Effect of initial concentration of insulin on its degradation in mucosal side
The data are expressed as mean \pm SE (n=3~5).

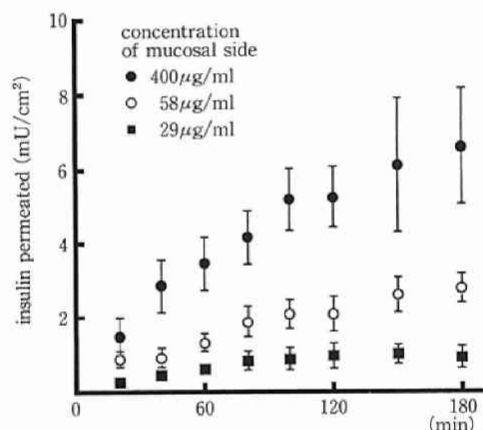


図4 Permeation profile of insulin across the rabbit nasal mucosa
The data are expressed as mean \pm SE (n=3~5).

(2) インスリンの透過性評価

r-ヒトインスリン(和光純薬)をGRSで各濃度(29, 58 および 400 $\mu\text{g/ml}$)に希釈し、粘膜側に注入した。その後経時的に漿膜側からサンプリングを行い、透過量を測定した。また透過促進剤として胆汁酸塩[Sodium glycocholate(GC), Sodium taurocholate(TC), Sodium deoxycholate(DC), Sodium taurodi hydrofusidate(STDHF)]を用い、インスリン透過に与える影響を検討した。なおSTDHFはLeo Pharmaceuticals社(デンマーク)より供与された。インスリンの定量は、Glazyme-INSULIN EIA TEST(和光

純薬)により行った。

(3) インスリンの分解性評価

各濃度のインスリン溶液を粘膜側、漿膜側に同時に注入して、経時的にインスリン濃度を測定した。

結果と考察

(1) インスリンの分解性と透過性の評価

ペプチド性薬物を粘膜に適用する場合、適用部位での酵素による分解が問題となる。図2に粘膜側、漿膜側のインスリン濃度の経時変化を示す(両側インスリン濃度: 29 $\mu\text{g/ml}$)。インスリンは粘膜側、漿膜側で徐々に分解され、粘膜側では2時間後には初期濃度の約50%になった。なお、粘膜側での分解は漿膜側より速やかであった。図3に粘膜側インスリン濃度と分解性の関係を示す。高濃度(400 $\mu\text{g/ml}$)の場合には、2時間後においても濃度の低下は観察されず、分解の飽和が示唆された。また、図4には各濃度のインスリン溶液を適用した時の透過プロファイルを示す。インスリン濃度が29および58 $\mu\text{g/ml}$ においてはその透過は定常状態には達せず、400 $\mu\text{g/ml}$ において定常状態が得られた。これは粘膜側濃度の低下に起因するものと考えられた。以上の結果から摘出鼻粘膜の酵素的バリアの評価における本実験系の有用性が示唆された。なお以後の透過実験には400 $\mu\text{g/ml}$ のインスリン溶液を用いた。

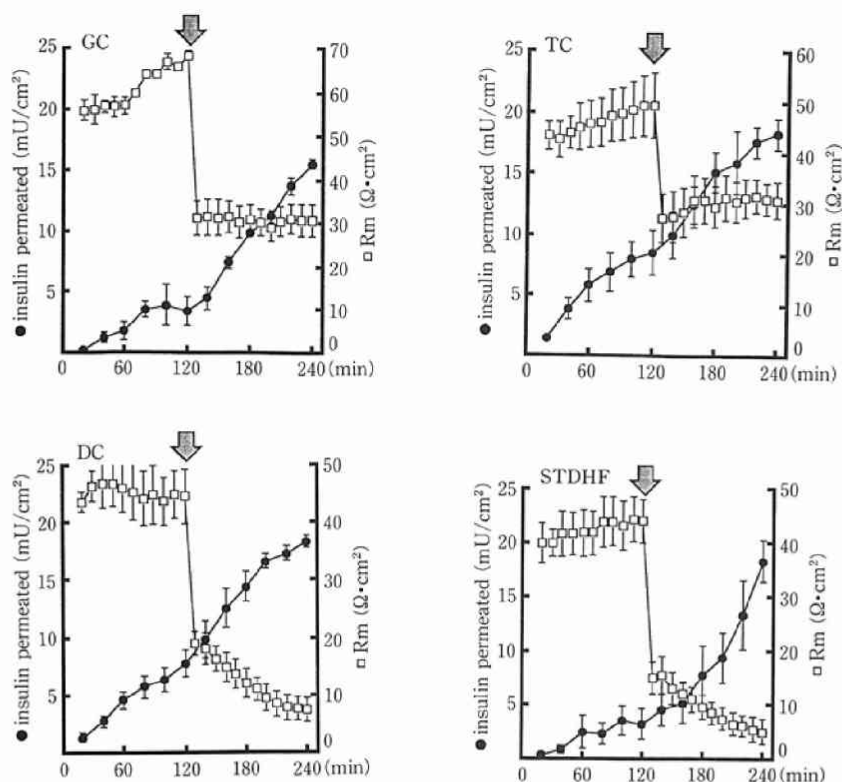


図 5 Effect of bile salts on insulin permeation and Rm profile

The data are expressed as mean \pm SE (n=3~5).

↓ : Replacement of the insulin solution to the insulin solution containing bile salts (0.5%)

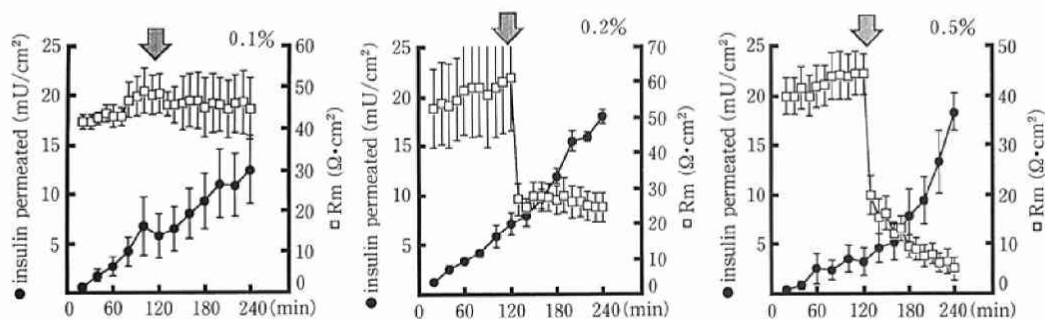


図 6 Effect of STDHF concentration on insulin permeation and Rm profile

The data are expressed as mean \pm SE (n=3~5).

↓ : Replacement of the insulin solution to the insulin solution containing bile salt (0.1~0.5%)

(2) インスリンの透過性および膜抵抗(Rm)に与える胆汁酸塩の影響

図 5 にインスリン透過と Rm の経時的变化に対する 4 種胆汁酸塩の影響を示す。図中の矢印は、インスリン溶液から 0.5%胆汁酸塩含有インスリ

ン溶液に交換した時を示す。各胆汁酸塩を添加した瞬間に Rm は顕著に低下し、かつインスリンの透過速度が増加した。GC および TC を適用した場合には Rm は急激に低下するものの、その後はほぼ一定に保たれた。これに対し、DC および

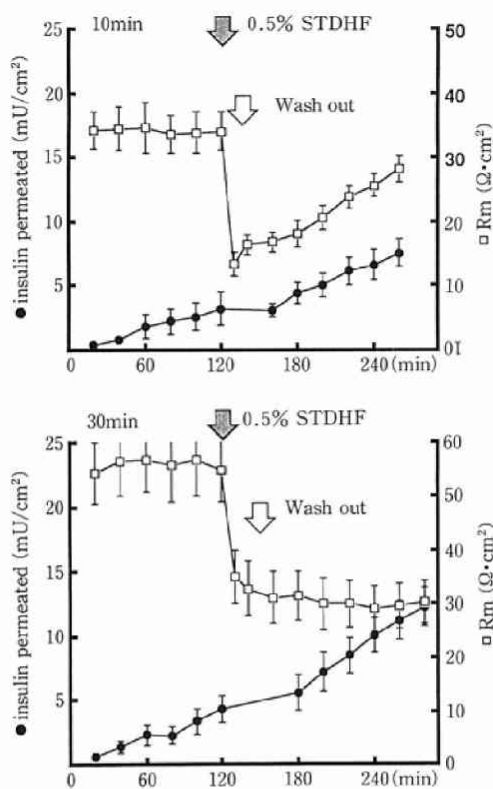


図7 Effect of pretreatment time with STDHF(0.5%) on insulin permeation and Rm profile

The data are expressed as mean \pm SE (n=3 ~5).

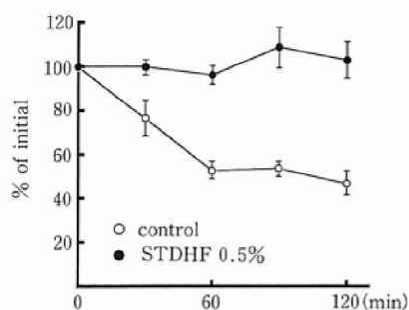


図8 Effect of STDHF on the stability of insulin in mucosal side

The data are expressed as mean \pm SE (n=3~5).

Initial concentration of insulin was 29 μ g/ml.

表1 Effect of bile salts on the apparent solubility of insulin

	apparent solubility (mU/ml)
control	1.95 \pm 0.11*
GC(0.5%)	3.08 \pm 0.10
TC(0.5%)	3.13 \pm 0.16
DC(0.5%)	4.19 \pm 0.15
STDHF(0.5%)	3.43 \pm 0.04

* Apparent solubility of insulin after incubation without bile salt at 37°C for 1 hour (mean \pm SE n=3~5)

STDHFを適用したときは Rm は急激に低下した後に徐々に低下した。これらは、すでに報告した FITC-Dextran(分子量 9400, FD 10)使用時の挙動とはほぼ一致するものであった⁹⁾。しかし、DC および STDHF 適用後の FD 10 の透過は GC および TC を用いた時より顕著に促進された。これに対し、インスリンの透過促進は 4 種の胆汁酸塩の間で顕著な差は観察されなかった。

FD 10 は酵素によって分解されない物質であると考えられ、このため透過に対するバリア能は鼻粘膜の構造変化に大きく依存するものと思われる。したがって、粘膜に対して構造的ダメージを与える dihydroxy 体の胆汁酸塩^{12~14)}である DC や STDHF は FD 10 の透過をより顕著に促進したものと考えられる。一方、インスリンの透過に対しては構造的バリア能に加え、酵素的バリア能

もはたらいていると考えられるため、Rm の挙動と透過の促進の関係が FD 10 の場合と異なったものと考察された。

図6および図7に STDHF の適用濃度の影響および前処理時間の影響について示す。図6より明らかに、Rm は STDHF の適用濃度に依存して大きく減少した。また 0.5% の STDHF で 10 分間前処理を行った場合、Rm 値はこの促進剤の wash out 後に徐々に元のレベルにまで回復した(図7)。さらにこの時膜電位および短絡電流についても回復が観察され、粘膜のバリア能が可逆的に回復しているものと考えられた。一方、処理時間を 30 分としたときには Rm は wash out の後も回復せず、粘膜に対して不可逆的な変化を与えたことが示唆された。なお、この前処理実験においてインスリンの顕著な透過促進はみられなかつ

た。

(3) インスリンの分解性および溶解度に与える胆汁酸塩の影響

ラット鼻粘膜のホモジネートを用いた実験で胆汁酸塩がインスリンの分解を抑制することが報告されている¹⁵⁾。本実験においても粘膜側でのインスリンの分解が0.5%のSTDHFを添加することにより、抑えられた(図8)。また、インスリンの見かけの溶解度は4種の胆汁酸塩の添加によりそれぞれ上昇していることが示され(表1)、インスリンの透過促進機構として鼻粘膜への直接的な作用のみならず、鼻粘膜側での分解抑制、溶解度の上昇という間接的作用も働いていることが示唆された。なお、今回の実験ではインスリンの鼻粘膜透過過程での分解に関しては分離評価がなされていないため、この点を考慮した検討が今後必要とされる。

まとめ

今回の結果から鼻粘膜の*in vitro*における酵素的バリア能の評価の可能性が示され、本実験系は経鼻吸収製剤の開発において鼻粘膜のバリア能(構造的、酵素的)に関する有用な情報を提供するものと考えられた。

文 献

- Hussain, A. A., Kimura, R., Huang, C. H. : Nasal absorption of testosterone in rats. *J. Pharm. Sci.* 73 : 1300-1301, 1984.
- Hirai, H., Yashiki, T., Mima, H. : Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 9 : 165-172, 1981.
- Shipper, N. G. M., Hermens, W. A. J. J., Romeyn, S. G., Verhoef, J., Merkus, F. W. H. M. : Nasal absorption of 17-beta estradiol and progesterone from a dimethyl-cyclodextrin inclusion formulation in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 64 : 61-66, 1990.
- Tengamnuay, P., Mitra, A. K. : Bile salt-fatty acid mixed micelles as nasal absorption promoter of peptides I : Effects of ionic strength, adjuvant composition and lipid structure on the nasal absorption of [D-Arg]² Kyotorphin. *Pharm. Res.* 7 : 127-133, 1990.
- Gibson, R. E., Olanoff, L. S. : Physicochemical determinants of nasal drug absorption. *J. Controlled Release* 6 : 361-366, 1987.
- Huang, C. H., Kimura, R., Nasser, R. B., Hussain, A. A. : Mechanism of nasal absorption of drug I : Physicochemical parameters influencing the rate of *in situ* nasal absorption of drugs in rats. *J. Pharm. Sci.* 74 : 608-611, 1985.
- Uchida, N., Maitani, Y., Machida, Y., Nakagaki, M., Nagai, T. : Influence of bile salts on the permeability of insulin through the nasal mucosa of rabbits in comparison with dextran derivatives. *Int. J. Pharmaceut.* 74 : 95-103, 1991.
- Hersey, S. J., Jackson, R. T. : Effect of bile salts on nasal permeability *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* 76 : 876-879, 1987.
- Kubo, H., Hosoya, K., Natsume, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y. : *In vitro* permeation of several model drugs across the rabbit nasal mucosa. *Int. J. Pharmaceut.* (in press).
- Hosoya, K., Kubo, H., Natsume, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Yamashita, S. : The structural barrier of absorptive mucosae : Site difference of the permeability of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran. *Biopharm. Drug Dispos.* (in press).
- Phipps, R. J., Nadel, J. A., Davis, B. : Effect of alpha-adrenergic stimulation on mucus secretion and on transport in cat trachea *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121 : 359-365, 1980.
- Ennis, R. D., Borden, L., Lee, W. A. : The effect of permeation enhancers on the surface morphology of the rat nasal mucosa. *Pharm. Res.* 7 : 468-475, 1990.
- Coleman, R., Holdsworth, G., Finean, J. B. : Detergent extraction of erythrocyte ghosts comparison of residues after cholate and Triton X-100 treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 436 : 38-44, 1976.
- Gordon, G. S., Moses, A. C., Silver, R. D., Flier, J. S., Carey, M. C. : Nasal absorption of insulin : Enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 7419-7423, 1985.
- Hirai, S., Yashiki, T., Mima, H. : Mechanisms for the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharmaceut.* 9 : 173-184, 1981.