

## インスリンの経鼻デリバリーに関する基礎的研究

関 俊 暢

## Basic Studies on the Nasal Delivery of Insulin

Toshinobu Seki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University; 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

(Received July 30, 2012)

Nasal absorption of insulin was discussed to develop a delivery system that targets the systemic circulation or central nervous system. Formation of insulin dimer and hexamer affects not only the diffusivity but also the membrane permeability of insulin *via* aqueous channels. The Renkin function was used to evaluate penetration pathways of hydrophilic compounds containing insulin through aqueous channels, and pore size and occupancy of the pathways were obtained as the membrane parameters on the basis of the function. Cationic polymers applied on the mucosal membranes as penetration enhancers increased the number of pathways for the hydrophilic compounds in the tight junctions, which suggested that these compounds could be sufficient as additives for the nasal delivery of insulin. However, excess interaction of the cationic enhancers with anionic insulin suppressed insulin permeation, and protection of insulin against degradation in the permeation process was required to improve the nasal absorption. PEGylation of insulin could be a possible way to improve the nasal delivery of insulin. In addition, combination of PEGylated insulin and modified cyclodextrin, which form pseudorotaxanes, can be applicable for further modification of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of insulin. Such well-designed complex systems may be required for specific delivery of insulin to the central nervous system.

**Key words**—insulin; nasal absorption; Renkin function; PEGylation; absorption enhancer

## 1. はじめに

鼻腔下部の大部分を占める呼吸部粘膜は、厚さ50–70  $\mu\text{m}$  の多列絨毛上皮であり、粘膜下に脈管系が非常に発達していることから、薬物を全身循環系に吸収させるのに有利な特徴を有している。既に、酢酸デスマプレシンや酢酸ブセレリンなど、分子量 (molecular weight; *MW*) が1000を超える薬物の製剤化がなされており、インスリンについても吸収を促進させる方法を適用することで、鼻腔内適用後に血糖降下作用が観察されることは、既に多くの研究者により確認されている。しかし、安全かつ確実に患者の血糖値をコントロールできるようなインスリンの鼻腔内適用方法は確立しておらず、そのために検討すべき項目はまだ多くある。筆者はこれま

で、鼻腔内や肺胞内に適用したインスリンの吸収動態の解析とそれを改善するための方法について種々検討を行ってきた。1–6)

一方、鼻腔の上部には嗅神経が発達しており、その部位から吸収された薬物の一部が、全身循環系に移行することなく、直接的に脳に移行して作用を発揮し得ることが明らかとなってきた。7–9) 血管から脳への薬物の移行は、血液脳関門の存在により制限されており、*MW* が大きく水溶性の薬物の脳内への送達は一般に難しいと考えられていることから、この鼻腔からの直接的な脳内薬物送達は、中枢神経系で効果を発現することが期待される薬物の新しい投与経路としても注目されている。

最近、アルツハイマー症の治療において、インスリンを鼻腔内に投与することで、それが脳内に移行して、認知機能障害の進行抑制に効果を示したことが報告された。10,11) この新しい治療法は、現在まだ有効な治療法が確立しているとは言い難いアルツハイマー症の患者やその家族にとって朗報であり、そ

The author declares no conflict of interest.

城西大学薬学部 (〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

e-mail: sekt1042@josai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第132年会シンポジウム S29 で発表したものを中心に記述したものである。

の確立は急務である。その中で最も重要な課題の1つに、中枢移行と全身移行のバランスの制御が挙げられる。全身循環に移行したインスリンは、血糖降下作用を発現し、これはアルツハイマー症の治療においては副作用になる。いかに全身性の副作用を発現させることなく、十分量のインスリンを脳内に送達させるかが、製剤開発において最も重要なことの1つとなろう。

先に述べたように、筆者はこれまでインスリンを鼻腔内に投与することで、効果的に全身循環系に移行させ、いかに血糖値を低下させるかを検討してきた。一方、インスリンのアルツハイマー症治療のための鼻腔内投与製剤の開発は、これと全く異なる方向性をもって進めなければならない。しかし、インスリンという薬物の物理化学的特徴と粘膜層を透過するという物理現象のみに着目した場合、両者には多くの共通点も存在すると考えられ、あらためてインスリンがどのように粘膜を透過するかについて詳細に検討することで、効果的にそれを脳内に送達するための重要なことのいくつかも明らかになると考えられる。本稿では、筆者がこれまで行ってきたインスリンの鼻腔内投与後の吸収動態の解析とその促進法について主に述べ、最後に選択的に脳内で効果を発現させるための方法について考えを述べる。

## 2. インスリンの薬物としての物理化学的特徴と予想される吸収における障壁

インスリンは、膵臓が分泌するペプチドホルモンであり、 $MW$ が約6 kDa、等電点が5.3で、中性では負の電荷を有する。また、中性領域では6量体を形成することも知られている。インスリンを粘膜に適用した場合、粘膜上に存在するプロテアーゼ、ペプチダーゼにより分解を受けること、また、 $MW$ が大きく膜透過性が低いことが、製剤設計上問題となる。特に会合体形成による見かけの $MW$ の増加は、透過性の確保という点で大変不利となる。インスリンのような薬物が、上皮細胞層の細胞内を活性が保たれた状態で透過し、血液や他の組織に移行することは大変困難であり、吸収の主要な経路は上皮細胞の間隙部、すなわち細胞間隙経路 (paracellular pathway) になると考えられる。したがって、インスリンが細胞間隙経路をどの程度透過し、その際どの程度の酵素分解を受けるのかを明らかにすることで、インスリン送達における障壁の本質が明ら

かとなり、それらを克服する手段を講ずることで、効果的効率的なインスリンデリバリーシステムが構築できると考えられる。インスリンの会合状態の制御、酵素分解からの保護、粘膜の細胞間隙透過経路の開口などが、その手段として期待できる。

## 3. インスリンの会合状態と膜透過性の関係

上皮細胞層の細胞間隙経路は、狭い水孔状の透過経路と考えることができるため、Renkin式 [Eq. (1)] を用いた解析により、その特徴付けが可能となる。<sup>2,12)</sup> すなわち、拡散係数と分子半径が既知の2種のマーカー分子の透過係数の比較から、その透過経路の有効半径( $r_p$ )と開口部の面積分率( $A_p/A$ )—経路の長さ( $\Delta x$ )比を求めることができる。

$$\frac{P}{D_{sol}} = \frac{A_p}{A \cdot \Delta x} (1-u)^2 \times (1-2.109 \cdot u + 2.09 \cdot u^2 - 0.95 \cdot u^3) \quad (1)$$

ここで、 $D_{sol}$ はマーカー分子の拡散係数、 $P$ は観察される膜透過係数である。また、 $u$ は拡散係数から計算できるマーカー分子の半径( $r$ )と $r_p$ の比であり( $u=r/r_p$ )、2種類のマーカー分子の適用により、膜の特性を表すパラメータとして、 $r_p$ と $A_p/A/\Delta x$ の値が計算できる。さらに、薬物の $MW$ と拡散係数の値には、Eq. 2に示されるような関係があるので、 $r_p$ と $A_p/A/\Delta x$ の値が既知であれば、逆にその膜の透過性を $MW$ の値から透過係数 $P$ の値として予測することもできる。<sup>13)</sup>

$$\text{Log } D = -0.434 \text{ Log } MW - 4.059 \quad (2)$$

インスリンの場合、先に述べたように溶液中で会合体を形成するため、拡散係数 $D$ の実測が必要であるが、その実測値を用いることで、Eq. 2より拡散対応分子量の値が計算でき、その値と $MW$ の比較からインスリンの透過過程における会合の状態を評価することも可能となる。

これらの解析方法の妥当性を検証するため、セルロース透析膜を用いたモデル実験を行った。その結果をTable 1に示す。インスリンの拡散係数 $D$ の



関 俊暢

城西大学薬学部薬品物理化学講座 教授 (薬学博士)。城西大学薬学部を1985年卒業、北海道薬科大学の講師、准教授を経て(2002-2008年)、2008年4月より現職。2005-2006年にはスイス連邦工科大学チューリッヒ校に留学。専門は、拡散と分子間相互作用を利用した薬物の放出制御。

Table 1. Calculated and Observed Permeability of Insulin through Model Cellulose Membranes

	Diffusivity, $D$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )		Permeability coefficient ( $\text{cm}/\text{s}$ )			
			membrane A <sup>b</sup> $r_p=4.39$ nm $A_p/A/\Delta x=13.3$ $\text{cm}^{-1}$		membrane B <sup>b</sup> $r_p=5.21$ nm $A_p/A/\Delta x=7.1$ $\text{cm}^{-1}$	
	calculated <sup>a</sup>	observed	calculated <sup>c</sup>	observed	calculated <sup>c</sup>	observed
monomer	$2.13 \times 10^{-6}$	—	$4.18 \times 10^{-6}$	—	$3.25 \times 10^{-6}$	—
observed	—	$1.14 \times 10^{-6}$	$1.70 \times 10^{-7}$	$1.64 \times 10^{-7}$	$2.33 \times 10^{-7}$	$3.15 \times 10^{-7}$
hexamer	$1.01 \times 10^{-6}$	—	$7.12 \times 10^{-8}$	—	$1.07 \times 10^{-7}$	—

<sup>a</sup> calculation using  $\text{Log} D = -0.434 \text{Log} MW - 4.059$ . <sup>b</sup> membrane parameters were obtained using  $P$  of 6-CF and FD10. <sup>c</sup> calculation based on the Renkin function using the membrane parameters and calculated or observed  $D$  value of insulin.

実測の結果、その値は4量体に対応する  $MW$  であった。pH 7.4 の溶液中では、インスリンは6量体として主に存在しているが、拡散や膜透過はより運動性が高い種の影響が大きくなるので、この場合共存する2量体の影響が大きくなり、平均として4量体を示唆する結果が得られたと考えられる。6-カルボキシフルオレセイン (6-carboxyfluorescein; 6-CF,  $MW=376$ ) と  $MW=9500$  の FITC-デキストラン (FD10) をマーカーとして膜透過パラメータを決定した透析膜におけるインスリンの透過係数  $P$  の実測値は、拡散係数  $D$  の実測値に基づいて予測した値とよく一致した。この結果は、インスリンがその会合状態に依存した透過特性を持つこと、そしてインスリンの膜透過性を評価する際には、その会合状態を考慮することが重要であることを示唆している。

#### 4. 鼻粘膜の細胞間隙経路のキャラクタリゼーションと吸収促進剤によるその修飾

細胞間隙経路は、ある均一な大きさを持つ円筒形の経路ではないので、Renkin 式が直接当てはめられる訳ではないが、それは先に例で示した透析膜の場合も同じであり、この解析法では、水孔経路における透過を透過物と経路壁間の摩擦が関与する部分と関与しない部分に分けるために、 $r_p$  と  $A_p/A/\Delta x$  の2つのパラメータを用いている。そして、その摩擦の程度によって見かけ上の値として  $r_p$  の値が決定される。 $r_p$  の値はある種の平均値であり、その値は用いたマーカー分子の大きさに依存する。ただし、多くの粘膜の上皮細胞層において、少なくとも2種類の大きさ ( $r_p$ ) が異なる経路が存在するとしてデータを解析すると、比較的広い分子量範囲においてモデルが透過係数の実測値をよく説明すること

が知られている。<sup>14)</sup> われわれの研究グループでも、半径 0.5 nm と 5 nm 程度の透過経路の和として、2つの Renkin 式の足し算により透過係数  $P$  を予測すると、 $MW$  100–5000 の範囲でよい一致が得られることを確認している。<sup>15)</sup>

インスリンのように大きな分子の場合、2種類の大きさの異なる経路のうち、大きい経路についてのみ考えればよいことになる。そして、インスリンを含めたペプチド・タンパク性医薬品の透過を促進する吸収促進剤の多くは、細胞間隙経路を開口すると考えられており、その作用は大きい経路における  $r_p$  若しくは  $A_p/A/\Delta x$  の変化として観察されると期待できる。もし、吸収促進剤が1つ1つの透過経路を大きくする作用があるのであれば、その変化は  $r_p$  の変化として検出でき、また、 $r_p$  の値に変化がなく  $A_p/A/\Delta x$  の値のみ大きくなった場合、透過経路の数が増えたと解釈することができる。これらの情報は、吸収促進剤の作用機構を理解する上で、また用いた吸収促進剤によりどの程度の大きさの薬物まで吸収促進が期待できるか予想するために役立つ。

非代謝性の細胞間隙透過マーカーとして  $MW$  が異なる FITC-デキストラン (FD4–FD70) を用い、ラットの鼻腔内に適用して得られた吸収クリアランス ( $CL_A$ ) の値から  $r_p$  と  $A_p/A/\Delta x$  の値を求め、ポリ-L-アルギニン (poly-L-arginine; PLA) の影響を評価した。<sup>6)</sup> その結果を Fig. 1 に示す。マーカー分子の拡散係数  $D$  と吸収クリアランス  $CL_A$  の関係は、FD4–FD70 の範囲で、Renkin 式によりよく説明されており、オープンシンボルの値を用いて計算した  $r_p$  と  $A_p/A/\Delta x$  の値は、コントロールの条件でそれぞれ 5.28 (nm), 0.78 (cm) であった。一方、吸収促進剤として PLA 0.5% を共存させた場合、 $r_p$  と  $A_p/A/\Delta x$

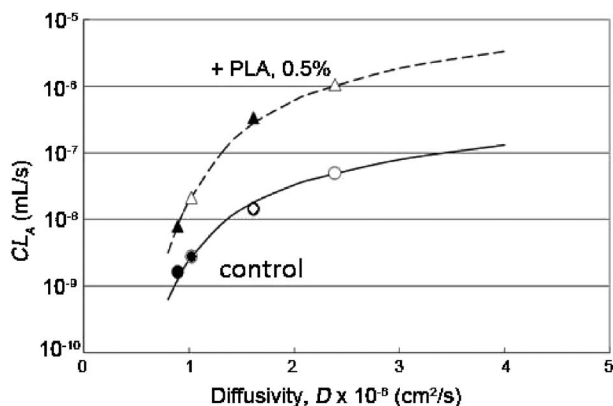


Fig. 1. Relationship between Diffusivity ( $D$ ) and Absorption Clearance ( $CL_A$ ) of FD after Nasal Application in Rats

○, ●; Control; △, ▲; poly-L-arginine (PLA, 0.5%) as an absorption enhancer. ○, △ were used to calculate the parameters for the simulation curves based on the Renkin function.

$\Delta x$  の値は、それぞれ 4.94 (nm), 1.85 (cm) であった。  $r_p$  が大きくなることなしに吸収が増大していることから、大きい透過経路の数が増えたと考えられる。細胞間隙の透過経路が、小さい径のルートと大きい径のルートの 2 状態で存在し、それが相互に変換可能で、吸収促進剤がその変換に係わるとするモデルによって、この現象は説明可能である。

PLA を始めとするカチオン性の吸収促進剤は、多くの場合 PLA と同様に  $r_p$  を変化させずに透過ルートを増やすことで吸収を促進する。そして、その作用の強さはカチオンの電荷密度に依存する。われわれの研究グループでも、エチレンジアミン化ゼラチン、スペルミン化ゼラチン、スペルミン化プルラン、スペルミン化デキストランなどの検討において、その傾向を確認している。<sup>1-5)</sup> 細胞表面は負に帯電しているため、カチオン性吸収促進剤が細胞表面と相互作用し、それが吸収促進につながるシグナルを発生させていると思われる。

### 5. インスリンの粘膜透過性の Renkin 式を用いた予測

Renkin 式を用いた解析では、透過パラメータを得ることで、Fig. 1 に示すようなシミュレーションカーブを描くことができ、拡散係数既知の薬物の透過速度の予測が可能となる。インスリンの場合も拡散係数の実測値を用いて、透過性の予測が可能となるが、その予測値は吸収過程での分解などを考慮しない値であり、実測の透過性はその分解などの影響に依存して低くなる。

気道上皮のモデルとしてよく用いられている Calu-3 細胞を用い、その透過特性の Renkin 式による解析とインスリン透過性の評価を *in vitro* の系で行った。Calu-3 細胞単層膜の大きい細胞間隙透過経路における  $r_p$  と  $A_p/A/\Delta x$  の値は、インスリンとイソマルトースを透過マーカーとして用いた実験の結果から、コントロールの条件でそれぞれ 4.08 (nm), 0.09 ( $\text{cm}^{-1}$ )、吸収促進剤として PLA 0.5% を共存させた場合で、それぞれ 4.72 (nm), 0.84 ( $\text{cm}^{-1}$ ) であった。そしてこれらのパラメータを用いることで、インスリンが 4 量体相当の大きさとしてふるまった場合、インスリンの透過係数  $P$  の値は、コントロールの条件で  $7.41 \times 10^{-10} \text{ cm/s}$ 、吸収促進剤として PLA 0.5% を共存させた条件で、 $1.63 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$  となり、その促進効果は最大 22 倍になると予測される。また、コントロールの条件でも、インスリンが単量体として存在していれば、その透過係数  $P$  の値は  $2.33 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$  となり、そのことでも大きな透過の改善が期待できることが予想される。

### 6. インスリンをラット鼻腔内に適用した後の血糖降下効果

実際に *in vivo* において、インスリンを鼻腔内に適用した場合、吸収過程における分解や他の要因によって、前項で予測されるよりインスリンの吸収は低くなると考えられる。また、吸収促進剤の効果は、*in vivo* 固有の要因に関係して、予測と異なることも考えられる。すなわち、吸収促進剤が細胞間隙経路の透過性を高めるだけでなく、例えば分解酵素阻害作用を併せ持つ場合には予想より高い効果が、逆にインスリンと直接相互作用して拡散運動性を減少させる場合などは効果が予測より低くなる。したがって、これら予測と実測の比較から得られる情報は、吸収改善における問題点を明らかにし、製剤をより確かなものへと仕上げていく上で大変有用となる。

インスリンを電荷密度が異なるいくつかの吸収促進剤とともにラット鼻腔内に適用し、その後の血糖値の低下の程度から吸収促進の効果を検討した。それに際しては、以下に定義される  $D\%$  の値を用いた。<sup>1)</sup>

$$D\% = \frac{AUC_c - AUC_s}{AUC_c} \times 100 \quad (3)$$

ここで、 $AUC_c$  はコントロール条件における実験

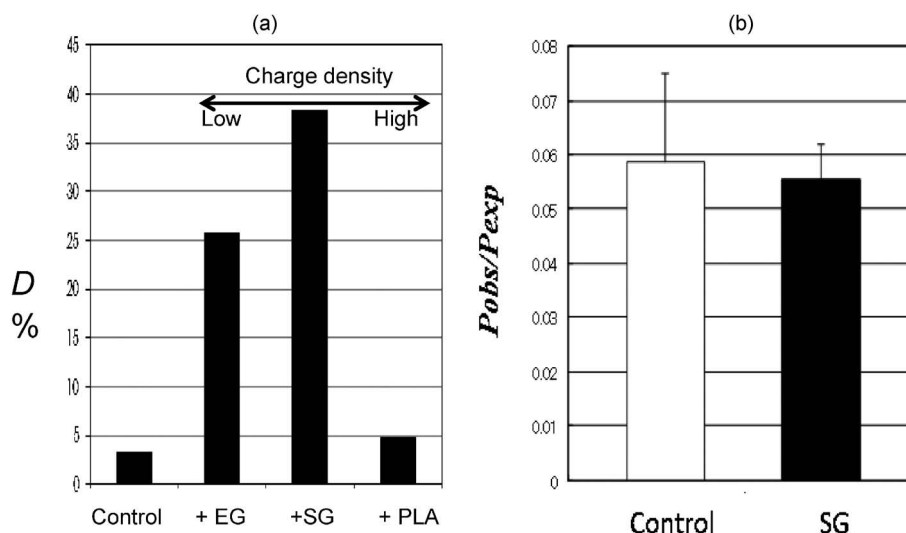


Fig. 2. Hypoglycemic Effect of Insulin after Nasal Application in Rats (a) and Ratio of Observed and Expected Permeability ( $P_{obs}/P_{exp}$ ) of Insulin through the Calu-3 Cell Monolayers (b)

(a) 0.2% absorption enhancers (ethylene glycol-gelatin (EG), spermine-gelatin (SG) or poly-L-arginine (PLA)) was co-applied with 10 IU/kg (100 IU/mL) insulin into the nasal cavity of rats.

$$D\% = \frac{AUC_c - AUC_s}{AUC_c} \times 100$$

(b) The expected permeability was calculated using membrane parameters of the Calu-3 cell monolayers based on the Renkin function. The effect of 0.2% SG on the ratio was examined.

時間範囲での血中グルコース濃度-時間曲線下面積,  $AUC_s$  はインスリン適用時の血中グルコース濃度-時間曲線下面積である. この  $D\%$  の値は, インスリンによって血糖値が低くなるほど高い値となる. Figure 2(a) に各種促進剤の併用による  $D\%$  の値の変化を示す. 用いた吸収促進剤の中で, スペルミン化ゼラチン (spermine-gelatin; SG) が最もインスリンに対して吸収促進効果が高く, インスリンへの適用においては, 吸収促進剤の電荷密度に至適値があることが示唆された. それ自身が電荷を有しない一般的な細胞間隙透過マーカーでは, そのような至適値が観察されないことから, インスリンの有する負電荷と促進剤の正電荷が相互作用し, それが吸収促進効果の減弱をもたらしていると考えられる. また, 最も効果が高かった SG について, Renkin 式に基づく予測値と実測値の比較を行った結果, 実測値は予測値の 1/10 以下であり, SG によるその値の改善は認められなかった [Fig. 2(b)]. 実測値を予測値に近づけるようなさらなる吸収の改善には, インスリンの分解からの保護も重要であると考えられる.

#### 7. インスリンの経鼻吸収における特性と改善すべき問題

これまで述べてきたことのまとめとして, インス

リンの経鼻吸収における特性と改善すべき問題を Table 2 に示す. まず, インスリンはその会合によって拡散性が低下し, それに依存して膜透過性も低下する. したがって, インスリンを単量体となるような条件にするだけでも透過性の改善が期待できる. 超速効型のインスリンアナログの使用はその 1 つの方法である. また, インスリンの粘膜透過性は, Renkin 式を用いて予測されるよりはるかに低く, 透過過程での分解や不可逆的な結合などによる損失が生じていると考えられる. 分解酵素の阻害剤を併用することやインスリンを保護するような適用方法の工夫が必要かもしれない. さらに, インスリンは中性の pH 領域で負電荷を有するため, カチオン性の吸収促進剤とイオン-イオン相互作用し, そのことがインスリンの吸収の低下, 吸収促進効果の減弱につながる. 適切な電荷密度を有する促進剤の使用, 若しくはカチオン性でない他の機構を有する吸収促進剤の使用も考える必要があるかもしれない.

#### 8. ポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) 化インスリンの利用

水溶性高分子でタンパク質を修飾し, 生体内での安定性を向上させるバイオコンジュゲーションは, タンパク性医薬品の機能改善において有効であることが知られており, 特に PEG 鎖を修飾する PEGy-

Table 2. Problems in Nasal Application of Insulin Using Cationic Enhancers

Diffusion as dimer or hexamer	→	avoidance of the association Use of rapid-acting analogues?
Strong interaction with cationic enhancers	→	suppression of the interaction Use of different enhancers?
Degradation in permeation process	→	inhibition of the degradation Use of protease inhibitors?

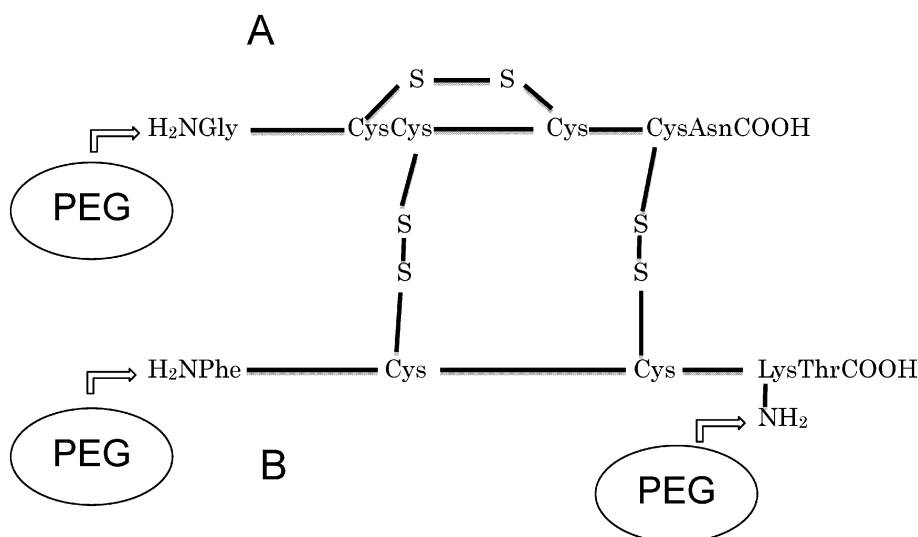


Fig. 3. Possible Introduction of PEG Chains to Insulin

lation, すなわち PEG 化は, インターフェロン- $\alpha$  に適用され, 臨床上的の有効性が確認されている.<sup>16)</sup> 通常, PEG 化によって静脈注射後の血中濃度の持続化が期待されるが, その作用の一部は分解酵素からの保護によるものなので, 粘膜上に適用された場合, 吸収過程における失活を防ぐ作用も期待できる. 一方, PEG 化は  $MW$  の増加をもたらすので, その点においては吸収において不利にはたらく. ただし, インスリンの場合には, 通常会合体を形成しており, インスリンの化学修飾は会合体形成抑制にはたらく場合もあるので, PEG 化によって吸収が増加することも期待できる.

これらを背景に, インスリンの PEG 化を行い, その吸収特性について検討を行った (未発表のデータ). Figure 3 にインスリンの PEG 鎖導入部について示す. PEG 鎖の導入を, アミノ基を介して行う場合, インスリンの A 鎖, B 鎖のそれぞれの N 末端, それらに加え B 鎖の 29 番目のリジンの計 3 カ所に導入することが可能である. そのうち, A 鎖の N 末端への導入は活性の低下から好ましくな

Table 3. Diffusivity ( $D$ ) of PEGylated Insulins

	$D$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	Calculated MW <sup>a</sup>	Estimated aggregate <sup>b</sup>
insulin	$1.14 \times 10^{-6}$	21928	tetramer
mono-PEG insulin	$1.03 \times 10^{-6}$	27327	tetramer
di-PEG insulin	$1.61 \times 10^{-6}$	9880	monomer
tri-PEG insulin	$1.54 \times 10^{-6}$	10924	monomer

<sup>a</sup> calculation using  $\text{Log} D = -0.434 \text{Log} MW - 4.059$ . <sup>b</sup> MW of single PEG chain is 2000.

く, 一方, B 鎖の 29 番目のリジンへの導入は 6 量体形成の元となる 2 量体の形成を防ぐ効果が期待できる.<sup>17)</sup>

インスリンに対して,  $MW$  2000 の PEG をランダムに導入し, その導入率について逆相 HPLC にて分析した結果, 1 置換体 11%, 2 置換体 67%, 3 置換体 22% で PEG 化インスリンが得られることが明らかとなった. これらについて, 拡散係数  $D$  を測定し, その結果に基づいて推定した会合状態を Table 3 に示す. 1 置換体については, 未修飾インスリンと同様に, 拡散性から推定される平均会合状

態は4量体であったのに対し、2置換体及び3置換体では単量体であると推定され、PEG鎖導入によりMWが大きくなっているにもかかわらず、拡散性及びそれに関係する膜透過性については、未修飾のインスリンと比較して高くなることが期待される。

### 9. PEG化によるインスリンとカチオン性吸収促進剤間の相互作用の制御

インスリンの経鼻吸収において、カチオン性吸収促進剤が十分に効果を発揮しない理由の1つに中性でアニオンとして存在するインスリンと吸収促進剤の過度な相互作用が挙げられる。タンパク質のPEG化は他の成分との相互作用において抑制的にはたらくことが多いので、PEG化インスリンではカチオン性吸収促進剤との相互作用が低下していることが予想される。そこで、PEG化インスリンの透析膜を介する放出へのPLAの影響を未修飾のインスリンの場合と比較した。その結果をFig. 4に示す。PLA共存時のPEG化インスリンの放出は、インスリン単独よりは低いものの、インスリンとPLAの共存時よりは高く、PEG化が好ましくない吸収促進剤との過剰な相互作用を低下させる作用を有することが示された。

### 10. PEG化インスリンをラット鼻腔内に適用した後の血糖降下効果

吸収促進剤としてPLAを併用し、PEG化インス

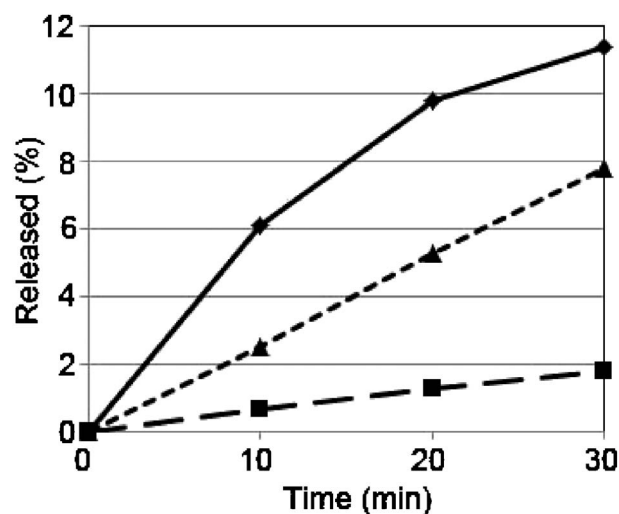


Fig. 4. *In Vitro* Release Profiles of Insulin or PEG-Insulin  
Insulin solution (33.3 IU/mL, 100  $\mu$ L) was applied on a cellulose membrane (MWCO=50000) and the insulin release *via* the membrane into PBS (pH 7.4) was evaluated at 37°C. ◆, insulin; ■, insulin+0.5% poly-L-arginine (PLA); ▲, PEG-insulin+0.5% PLA. FITC labeled insulin and PEG-insulin were used for the determination.

リンをラット鼻腔内に適用した後の血糖降下効果を調べた結果をFig. 5に示す。インスリンにPLAを併用しても血糖降下作用はほとんど得られないのに対して、PEG化インスリンの場合、単独使用でもある程度の効果を示し、PLAの効果もより顕著にあらわれることが示された。インスリンのPEG化によって、インスリンの透過過程における分解が減少し、また単量体が増えることで拡散性が増加したことが、単独使用でも効果を示すことに、また、PLAとの相互作用が低く抑えられたことがPLAの効果であらわれたことに、それぞれ関係すると考えられる。現在用いているPEG化インスリンは、置換度が異なるものを含む混合物であり、その中には薬理活性が低下しているものも含まれている。また、PEG化によってどの程度透過過程での分解からの保護がなし得ているかも不明である。今後、それらを含めより詳細に検討を行っていくことが、すぐれたインスリン製剤とするためには必要である。

### 11. インスリンの脳選択的デリバリーのために

これまで述べてきたことは、インスリンをいかに鼻腔内から体循環血流中に送り込むかに関することであり、脳内への送達は考慮していない。鼻腔から脳への移行の主な経路は、上皮層の細胞間隙を経て神経の外側を拡散する経路と神経末端から神経細胞内に取り込まれてその中を軸索輸送により運ばれる経路であると考えられているが、それらの寄与につ

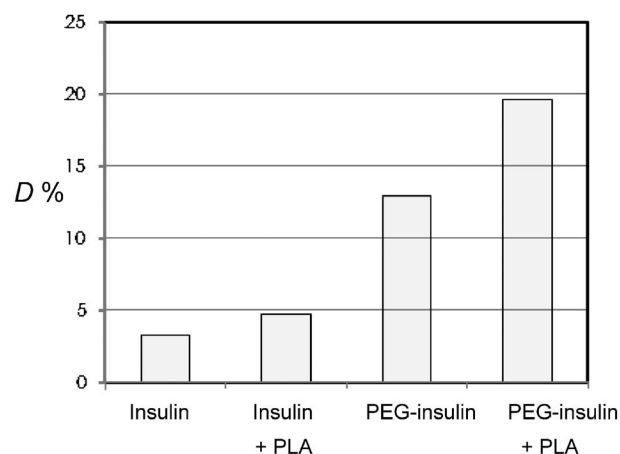


Fig. 5. Effect of Poly-L-arginine (PLA) on the Hypoglycemic Action of Insulin or PEG-Insulin after Nasal Application in Rats

Insulin (10 IU/kg) or PEG-insulin (equivalent as protein) was applied to nasal cavity of rats with or without PLA (0.5%).

$$D\% = \frac{AUC_c - AUC_s}{AUC_c} \times 100$$

いてはまだ十分分かっていない。いずれにせよ、脳内に送達する場合であっても粘液層を含む上皮細胞層に存在するバリアーを克服する必要がある点は共通している。脳への送達における固有の問題は、選択性をそれにいかに付与し、脳内のみにも効果的に送達するかになる。インスリンの PEG 化体は、シクロデキストリンと相互作用し、擬口タキサン構造を形成することが知られている。その構造はインスリンの更なる分解からの保護に有効であるが、用いるシクロデキストリンに機能性を付与する側鎖を導入することで、例えば、中枢選択性のリガンドを用いて選択性を得る、脳内でのみ活性体を放出するようにデザインする、血中では活性体を放出することなく速やかに消失するように設計する、などの分子デザインが可能となるかもしれない。われわれの研究グループでは、刺激に应答して PEG 化インスリンを放出するシステムについて、現在研究を行っている。

**謝辞** ここで示した研究は、北海道薬科大学及び城西大学薬学部の在籍期間を通じて行ってきたものであり、その過程でご指導頂いた、元北海道薬科大学 森本一洋教授（現帝京平成大学薬学部）、城西大学薬学部 森本雍憲教授、夏目秀視教授に深謝いたします。また、実験に協力頂いた両大学の諸氏にお礼申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Seki T., Kanbayashi H., Nagao T., Chono S., Tomita M., Hayashi M., Tabata Y., Morimoto K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 510–514 (2005).
- 2) Seki T., Kanbayashi H., Nagao T., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1393–1401 (2006).
- 3) Seki T., Kanbayashi H., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *Int. J. Pharm.*, **338**, 213–218 (2007).
- 4) Seki T., Fukushi N., Chono S., Morimoto K., *J. Control. Release*, **125**, 246–251 (2008).
- 5) Morimoto K., Fukushi N., Chono S., Seki T., Tabata Y., *Die Pharmazie*, **63**, 180–184 (2008).
- 6) Seki T., Hosoya O., Natsume H., Sato I., Egawa Y., Nakagawa H., Juni K., Morimoto Y., *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **19**, 331–335 (2009).
- 7) Seki T., Sato N., Hasegawa T., Kawaguchi T., Juni K., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1135–1137 (1994).
- 8) Vaka S. R. K., Sammeta S. M., Day L. B., Murthy S. N., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3640–3646 (2009).
- 9) Illum L., *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 762–765 (2004).
- 10) Craft S., Baker L. D., Montine T. J., Minoshima S., Watson G. S., Claxton A., Arbuckle M., Callaghan M., Tsai E., Plymate S. R., Green P. S., Leverenz J., Cross D., Gerton B., *Arch. Neurol.*, **69**, 29–38 (2012).
- 11) Francis G. J., Martinez J. A., Liu W. Q., Xu K., Ayer A., Fine J., Your U. I., Glazner G., Hanson L. R., Frey W. H., Toth C., *Brain*, **131**, 3311–3334 (2008).
- 12) Renkin E. M., *J. Gen. Physiol.*, **20**, 225–243 (1954).
- 13) Hosoya O., Chono S., Saso Y., Juni K., Morimoto K., Seki T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1501–1507 (2004).
- 14) Tomita M., Sawada T., Ogawa T., Ouchi H., Hayashi M., Awazu S., *Pharm. Res.*, **9**, 648–653 (1992).
- 15) Seki T., Harada S., Hosoya O., Morimoto K., Juni K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 163–166 (2008).
- 16) Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Ikemizu S., Yamamoto Y., Shibata H., Nishibata T., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 808–814 (2004).
- 17) Asada H., Mizokoshi Y., Douen T., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S., *Pharm. Res.*, **11**, 1115–1120 (1994).