

平成 22年 6月 2日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19760556

研究課題名 (和文) 糖尿病治療のためのパッチ型経口投与製剤の開発

研究課題名 (英文) Development of mucoadhesive oral patches for diabetes care

研究代表者

通阪 栄一 (TOORISAKA EIICHI)

大分大学・工学部・助教

研究者番号：40363543

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、糖尿病治療薬であるインスリンの経口投与製剤の開発を目指した。インスリンは、消化管内での分解と腸管膜の低透過性から、経口投与することは一般的に困難とされている。そこで、インスリンの分解からの保護と腸での吸収性を向上させるために、界面活性剤による複合化と粘膜付着性パッチへの封入を試みた。その結果、製剤は腸粘膜への長時間に渡る付着性を有し、直接粘膜中へインスリンを放出することが可能となった。また界面活性剤により親油化されたインスリンは、腸管膜透過性が向上した。

研究成果の概要 (英文)：

An oral dosage form of insulin is thus desirable to achieve a safe and convenient insulin delivery that leads to high patient compliance. However, there are several barriers for the oral delivery of insulin such as enzymatic degradation in the gastrointestinal (GI) tract and low permeability across the intestinal mucosa. In this study, a new type of mucoadhesive patches for oral insulin dosage was prepared. The advantages of the mucoadhesive patch system are as follows: (1) patch can maintain its position in small intestine for a few hours; (2) drug release is a unidirectional way toward intestine mucosa ; (3) drug impermeant layer can protect from degradation by proteolytic enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：医用工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：インスリン，ドラッグデリバリー，経口投与，粘膜付着性，糖尿病

1. 研究開始当初の背景

現在、糖尿病治療薬であるインスリンの投与は皮下注射で行われることが一般的であるが、頻繁な投与が必要であり、患者は苦痛を強いられる。そのため、患者の負担を大きく軽減できる経口製剤が望まれている。経口製剤は投与が容易であり、高い Quality of Life (QOL) を維持できるため、長期投与に適している。しかし、これまでに研究された経口インスリン製剤は Bioavailability (BA) が低く、その変動が大きいため、血糖値のコントロールは困難であった。経口インスリン製剤開発における技術的障害は、インスリンがタンパク質であるため消化管内に存在する消化酵素やタンパク分解酵素による分解を受けやすいことと、水溶性の高分子であるために腸内の膜透過性が低いことである。

近年、経口製剤に粘膜付着性を付与する研究が数多く報告されている。この粘膜付着性により薬物吸収部位である小腸内に製剤を長時間滞留させ、薬物の BA の向上と持続的な薬効を目指している。これまでに、腸粘膜付着性高分子により表面をコーティングした微粒子製剤や表面に粘膜付着層を有するシート型製剤の開発等が行われている。

2. 研究の目的

筆者はこれまでにインスリンを腸管から吸収させるキャリアとして S/O/W (Solid-in-Oil-in-Water) 型エマルジョンを開発した³。これはインスリンの周囲を界面活性剤でコーティングすることでインスリンを親油化し、O/W 型エマルジョンの油相に溶解させたものである。S/O/W 型エマルジョンを糖尿病モデルのラットに投与すると、長時間にわたる血糖値の低下効果を示し、製剤として有効であることが確認されている。

これはエマルジョンによる消化管中での薬物の保護効果とインスリンの親油化による腸管膜透過性の向上によるためであった。しかし、それでもまだインスリンの BA は十分ではなく、その効果は注射投与に比べはるかに劣っていた。S/O/W エマルジョンは腸内に到達後、油相が分解され内封インスリンを放出する。この時、界面活性との複合化が維持されているものは腸粘膜から吸収されやすいが、大部分のインスリンから界面活性剤が剥離され親油化した効果が十分に働いていないことが予想された。

そこで本研究では、インスリンの経口投与における BA を向上させるために、親油化したインスリンを直接腸粘膜へ放出可能なパッチ型の腸粘膜付着性製剤の開発を検討した。

3. 研究の方法

(1) 粘膜付着性製剤の開発

5wt%エチルセルロースをアセトンに溶解させ、円形シリコン枠（直径 6.0 mm、厚さ 1.0 mm）に滴下し、室温で2時間乾燥させた。次に 3 wt%粘膜付着性高分子水溶液をエチルセルロース層上に滴下し、一昼夜凍結乾燥することで粘膜付着性パッチを調製した。

続いて、パッチ中に封入する S/O サスペンションを調製した。インスリン（ウシ膵臓由来）水溶液 5ml と 10wt%デカグリセリンエルカ酸エステルを溶解させたヘキサン溶液 10ml をホモジナイザーで高速攪拌し W/O エマルジョンを調製した。そのエマルジョンを一昼夜凍結乾燥することで界面活性剤-インスリン複合体を得た。この複合体に大豆油を加え、超音波照射することにより S/O サスペンションを調製した。

最後に、S/O サスペンションをパッチ中の粘膜付着性高分子層へ含浸させ、粘膜付着性

製剤を調製した。1個の製剤中のインスリン量が7Uとなるよう調整した。パッチ型製剤の表面,断面の構造はSEMを用いて観察した。

(2) 粘膜付着性評価

製剤の粘膜付着性の評価には, 雄性 Wister 系ラット (150g-170g) の小腸を用いた。ラット小腸の漿膜側をコルク板に付着させピンで固定した後, そのコルク板をボンドでビーカーに貼り付けた。ビーカー中の腸管膜が浸るまでリン酸緩衝液 (pH6.8) を加えた。そして, パッチ型製剤を水中の腸粘膜表面に付着させた後, すぐに溶液を 125rpm で攪拌し, 粘膜表面から剥離するまでのパッチの付着時間を測定した。

(3) インスリン吸収性の *in vitro* 評価

雄性 Wister 系ラット (150g-170g) の十二指腸, 空腸, 回腸を摘出し, 切り開いてシート状にした。それぞれの粘膜筋板を剥離した後, 粘膜表面にパッチ型製剤を付着させた。その腸管膜を水平拡散セルで挟み固定した後, セルにリン酸緩衝液を注いだ。セル中の緩衝液の温度は 37°C に維持された。腸粘膜側の溶液を腸液とみため腸液と腸管膜透過後の溶液を時間毎に採取し, 製剤から腸液中に漏洩したインスリン量と腸管膜を透過したインスリン量を測定した。用いたインスリンは FITC 標識されているため, インスリンの検出には蛍光分光光度計 (励起波長 494nm, 発光波長 513nm) を用いた。

(4) インスリン吸収性の *in vivo* 評価

予め頸静脈にカニューレーションした Wister 系雄性ラット (160g-190g) を 16 時間以上絶食させた後, 麻酔下で開腹し, 十二指腸, 空腸, 回腸部を 8cm 間隔で縫合糸により結紮した。それぞれの部位に数 mm の切れ目を入れ, 3 個の粘膜付着性製剤 (7U/個) を直接腸へ投与した。切り開いた部分を縫合した後, 時間毎に頸静脈から採血し血中インス

リン濃度を ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) パッチ型製剤の特性

調製した腸粘膜付着性パッチ型製剤 (図 1 (a)) は, 粘膜付着層と薬物不透過層の 2 層で構成されている (図 1 (b))。薬物不透過層は $100 \mu\text{m}$ 程度の厚みのエチルセルロースで器状に成型されている。その内部に粘膜付着性高分子で調製した多孔性粘膜付着層を配置した。多孔性粘膜付着層表面とパッチ型製剤の断面の SEM 写真をそれぞれ図 1 (c) と図 1 (d) に示す。

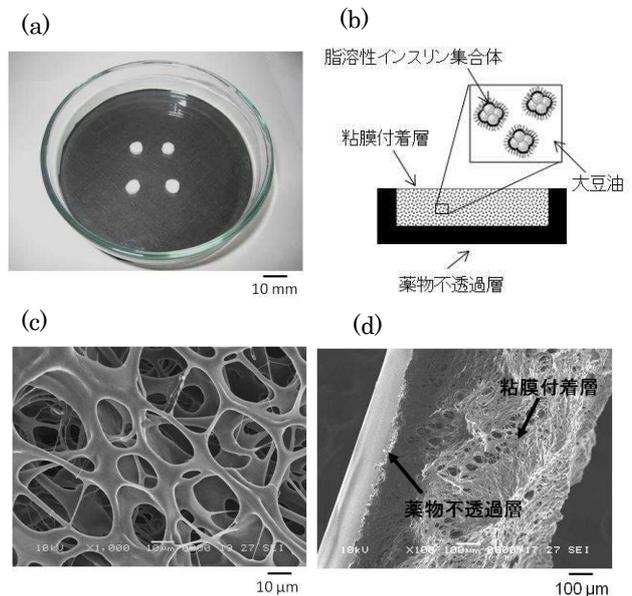


図 1 粘膜付着性製剤

(a) 粘膜付着性製剤の写真, (b) 粘膜付着性製剤念図, (c) 粘膜付着層表面の SEM 写真, (d) 断面の SEM 写真

本研究では, 粘膜付着性高分子として表 1 に示す高分子を用いて製剤を調製した。それぞれ調製した製剤を, 水中での耐久性, 粘膜付着層への油の浸透性, そしてラット腸粘膜への付着性から評価した。水中での製剤の形状変化を観察したところ, キトサンとカルボポールを用いたものは大きく膨潤し製剤の

形状が維持できないことが判明した。また、製剤中への油の浸透性を検討したところ、HEC を用いた製剤中へは油をほとんど含浸できないことが分かった。腸粘膜への付着性に関しては、キトサンの付着力が他の高分子と比較して格段に強いことが分かった。続いて、HPC、CMC、カルボポール、HEC の順に粘膜付着性が高かった。本製剤で期待するインスリンデリバリーを実現するためには、十分量のS/O サスペンションを含浸でき、水中での形状変化が少なく、腸粘膜に長時間付着することが必要と考える。これらのことから、粘膜付着性高分子としてHPCを利用したパッチ型製剤がインスリンの経口デリバリーに適していると判断した。

表1 粘膜付着性高分子の特性

粘膜付着性高分子	耐久性	大豆油浸透性	粘膜付着時間[h]
キトサン	×	○	>100
HPC ^a	○	○	4.88±1.11
CMC ^b	○	○	3.13±0.48
カルボポール	×	○	1.50±0.41
HEC ^c	○	×	1.38±0.25

^a ヒドロキシプロピルセルロース, ^b カルボキシメチルセルロース, ^c ヒドロキシエチルセルロース

(2) パッチ型製剤による腸管膜透過特性

ラット腸管膜（空腸）を用いてパッチ型製剤によるインスリン透過性の評価を行った。まず、S/O サスペンションをパッチ型製剤へ組み込むことによる効果を検討した。S/O サスペンション（界面活性剤でコーティングしたインスリンが分散した大豆油）を粘膜付着層に組み込んだ製剤、インスリン粉末と界面活性剤を分散させた大豆油を組み込んだ製剤、そしてインスリン水溶液を用いてそれぞれのインスリン腸管膜透過性を比較した。そ

の結果を図2に示す。インスリン等のタンパク性薬物は水溶性高分子であるため腸上皮細胞透過性が低い。そのため水溶液では、インスリンはほとんど透過しなかった。油中にインスリンを分散させただけのパッチ製剤は、わずかに透過が確認された。これはパッチ製剤により、インスリンを腸上皮細胞近傍に集積できるため、水溶液と比べて腸管膜透過性が向上したためだと考えられる。一方、S/O サスペンションを組み込んだ製剤では、劇的に腸管膜透過性が向上することが確認された。これは、パッチ製剤によるインスリンの集積効果に加えて、パッチが腸粘膜に付着することにより、S/O サスペンションが粘膜へ接触できるようになったことで、製剤から直接粘膜中へ親油化インスリンの分配が可能となったためと考えられる。

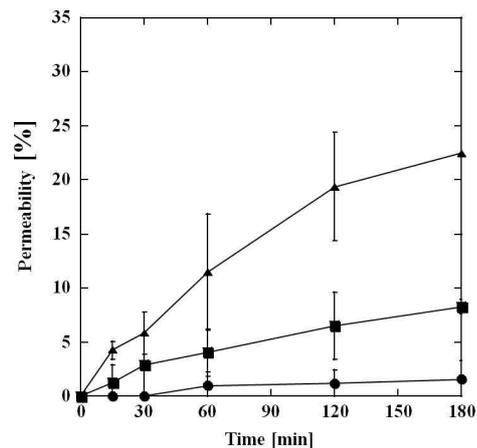


図2 インスリンの腸管膜透過特性

(▲) S/O サスペンションを内封した製剤, (■) 粉末インスリン分散溶液を内封した製剤, (●) インスリン水溶液, 値は平均値±SD, N=3

続いて、薬物不透過層の効果を検討した。図3 (a)に製剤から腸液へのインスリンの漏洩挙動を、図3 (b)に腸管膜の透過挙動を示す。図3 (a)に示されるように、粘膜付着層だけのパッチ製剤からは時間とともに腸液

ヘインスリンが漏洩することが示唆されたが、パッチ製剤を薬物不透過層で覆うことでインスリンの漏洩はほとんど生じなくなることが確認された。一方、インスリンの腸管膜の透過に関しては、粘膜付着層だけを使用した場合でもインスリンの透過が確認されたが、薬物不透過層で覆うことにより、その透過が大きく促進されることが判明した。この結果から、薬物不透過層は腸粘膜に付着した製剤からのインスリン漏洩を抑制するとともに粘膜中へのインスリン放出を可能にし、腸管膜透過速度を向上させることが確認された。

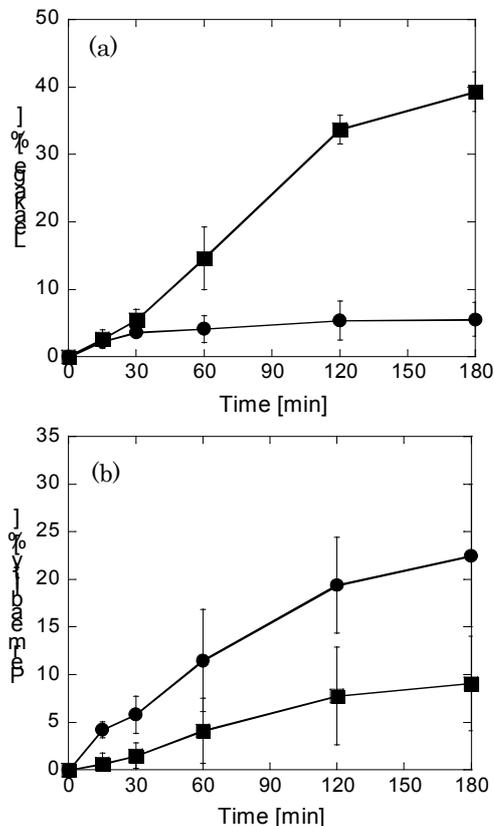


図3 インスリンの漏洩挙動と腸管膜透過挙動

(a)人工腸液へ漏洩したインスリン量, (b)腸管膜を透過したインスリン量, (●)粘膜付着層+薬物不透過層, (■)粘膜付着層のみ, 値は平均値±SD, N=3

(3) 十二指腸, 空腸, 回腸におけるインス

リン吸収性の比較

十二指腸, 空腸, 回腸の各部位に付着した粘膜付着性製剤によるインスリン吸収性を *in vitro*, *in vivo* の両面から評価した。まず, 摘出したラット腸管膜を拡散セルに挟みインスリン吸収性の *in vitro* 評価を行った。図4に示されるように, インスリンの膜透過性は, 高い方から空腸, 回腸, 十二指腸の順になることが分かる。同様に, ラットの腸内へ製剤を直接投与した場合のインスリン吸収性の *in vivo* 評価を図5に示す。 *In vitro* の検討と同様に空腸で最もインスリンが吸収されることが分かった。このことは, 空腸特異的に吸着する製剤を設計することができれば, より効果的にインスリンを体内に吸収できる可能性を示している。

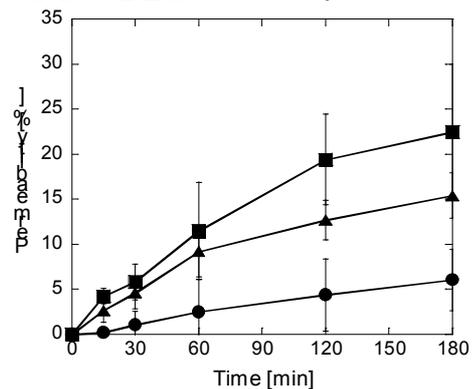


図4 小腸各部位のインスリン透過性 (●) 十二指腸, (■)空腸, (▲)回腸, 値は平均値±SD, N=3

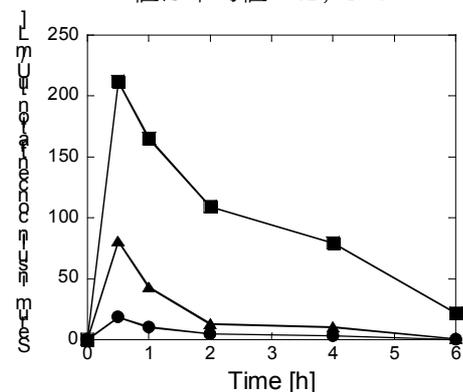


図5 腸管各部位へ製剤投与後の血中インスリン濃度

(●) 十二指腸, (■)空腸, (▲)回腸

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

通阪栄一, 平田誠, 羽野忠, 神谷典穂, 後藤雅宏, 多孔性シリカ粒子を利用した経口用製剤の開発, 化学工学シンポジウムシリーズ, 査読無, **80**, 170-176 (2008)

T. Takei, M. Yoshida, N. Hayashi, C. Hatana ka, E. Toorisaka, Y. Hatate, Core-shell micro bioreactor encapsulated denitrifying bacteria for nitrate-nitrogen treatment, ITE-IBA lett, Batt, NEW Tech. Med, 査読有, **1**, 60-64 (2008)

Development of inorganic microcapsules for the oral delivery of a hydrophilic drug, Eiichi Toorisaka, Makoto Hirata, Tadashi Hano, Solvent Extraction: Fundamentals to Industrial applications (ISEC'08), 査読有, **2**, 997-1002 (2008)

[学会発表] (計48件)

通阪栄一・前田 歩, 小野浩重, 平田 誠, 神谷典穂, 後藤雅宏, 薬物の吸収改善を目指した粘膜付着性製剤の開発, 化学工学会第75年会, 2009年3月20日, 鹿児島

通阪栄一, 渡辺貴久美, 小野浩重, 平田 誠, 神谷典穂, 後藤雅宏, インスリンの吸収改善を目指した粘膜付着性製剤の開発, 第25回日本DDS学会, 2009年7月3日, 東京

渡辺貴久美, 通阪栄一, 小野浩重, 平田誠, 神谷典穂, 後藤雅宏, 薬物の吸収性向上を目指した粘膜付着性製剤の開発, 化学工学会第40回秋季大会, 2008年9月24日, 仙台

渡辺貴久美, 通阪栄一, 平田誠, 神谷典穂, 後藤雅宏, 親水性薬物を封入した徐放性PLGA粒子の開発, 第24回日本DDS学会, 2008年6月29日, 東京

渡辺貴久美, 通阪栄一, 平田 誠, 羽野 忠, 神谷典穂, 後藤雅宏, シリカ粒子を利用した経口型インスリン製剤の開発, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2007年11月26日

渡辺貴久美, 通阪栄一, 平田 誠, 羽野 忠, 神谷典穂, 後藤雅宏, S/O/W型エマルジョンを利用した徐放性PLGAカプセルの開発, 化学工学会第39回秋季大会, 2007年9月14日, 北海道

インスリンを封入した経口用シリカ製剤の開発, 通阪栄一, 中島佑子, 小野浩重, 平田 誠, 羽野忠, 神谷典穂, 後藤雅宏, 第23回日本DDS学会, 2007年6月15日, 熊本

渡辺貴久美, 通阪栄一, 平田 誠, 羽野 忠, 神谷典穂, 後藤雅宏, S/O/Wエマルジョンを利用した徐放性高分子カプセルの開発, 第23回日本DDS学会, 2007年6月15日, 熊本

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: O/W型エマルジョン製剤

発明者: 後藤雅宏, 通阪栄一, 神一優子, 小野浩重, 有森和彦

権利者: 株式会社産学連携機構九州

種類: 特許

番号: 第4426749号

取得年月日: 平成21年12月18日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

通阪 栄一 (TOORISAKA EIICHI)

大分大学・工学部・助教

研究者番号: 40363543

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: