

短 報

インスリン封入 S/O/W 型エマルジョンによる 消化管吸収改善に関する検討

小野 浩重¹⁾*, 清水 正高²⁾

¹⁾ 就実大学薬学部薬物療法設計学研究室, ²⁾ 宮崎県工業技術センター

Improving insulin enteral absorption using solid-in-oil-in-water emulsion for the oral administration in streptozotocin diabetic rats

Hiroshige Ono¹⁾*, Masataka Shimizu²⁾

¹⁾ *Laboratory of Pharmacotherapy design, Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Shujitsu University,*

²⁾ *Miyazaki Prefectural Industrial Technology Center*

(Received 31 October 2016; accepted 28 November 2016)

Abstract: Oral bioavailability of insulin is generally very low because they are extensively degraded by proteases in the gastrointestinal tract and impermeable through the intestinal mucosal membrane. Therefore various approaches have been examined to overcome the delivery problems of insulin. In the present study, we have developed a novel emulsion as an insulin carrier. We examined the stability of solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion prepared by the shirasu porous glass (SPG) membrane. In addition, the potential of the S/O/W emulsion was validated by plasma insulin levels and hypoglycemic activity in the streptozotocin-induced diabetic rat. In the present study, elevated plasma insulin levels were observed up to 0.5 hr after oral administration at the all dosage, especially the insulin level of oral administration of the S/O/W emulsion were higher than insulin solution and water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion. Moreover, the increase in plasma glucose level was prevented by oral preparation of insulin S/O/W emulsion. However, the effects of S/O particle size of the S/O/W emulsion on insulin absorption have not been evaluated. These finding suggested that the S/O/W emulsion is potentially applicable for the oral delivery of insulin.

Keywords: solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsions; insulin, absorption; oral delivery

緒言

糖尿病患者におけるインスリン療法は、イン

スリン分泌が枯渇している1型糖尿病患者にと
って絶対的適応である。一方、2型糖尿病患者に

対するインスリン療法は相対的適応であり、従来は経口血糖降下薬で血糖コントロールが得られなくなった場合の最終手段として開始されていた。しかしながら、近年、糖毒性を積極的に解除させて膵β細胞のインスリン分泌機能を回復することを目的とした早期のインスリンの導入や、経口血糖降下薬に加えて持効型インスリンを併用する BOT (basal supported oral therapy)の導入が推奨されている¹⁾。また、インスリン非依存状態であっても進行した合併症がみられる患者、重度の肝・腎障害がある場合、妊娠合併症や近日外科手術が予定されている場合などはインスリン治療が優先される。

従来のインスリン治療は患者自身による皮下注射であり、厳密な血糖コントロールが難しく、手技上の煩雑さや同一頻回投与によるインスリンリポハイパートロフィーと呼ばれる皮下脂肪の肥大などの問題がある。また、高齢者のインスリン自己注射患者では、認知機能障害、視覚障害、麻痺などの理由で自己注射が困難になった場合、インスリン療法を中止するか家族や介護者による注射を検討する必要がある。

こうした問題を解決するため、インスリンの非注射剤の研究開発が盛んにおこなわれており、経肺剤や経鼻剤など、非侵襲的剤が検討されている²⁾。近年、米国で速効型の吸入インスリン剤が承認されたが、長期間使用による安全面での課題が指摘されており³⁾、経口型インスリン剤の開発が期待されている。

インスリンを経口投与した場合、消化管粘膜透過性が低ばかりでなく、消化管内において種々の蛋白分解酵素による分解を受けるため、バイオアベイラビリティが著しく低い。インスリンの吸収率を改善する種々の方法の一つとして、消化管部位に存在する分解酵素との接触を防止する剤形修飾が有力な方法となる。これまで、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン^{4,5)}、表面修飾リポソーム^{6,7)}、ナノパーティクル⁸⁾、ナノスフェア⁹⁾などの剤形を利用して吸収改善

した例が報告されているが、これらの製剤はインスリンの安定性には寄与するものの、剤形に包含させることで十分な吸収が得られない可能性がある。また、消化管移動速度に個人差などのバラつきが多いことも指摘されている¹⁰⁾。さらに、消化管粘膜に取りこまれる粒子の割合は、薬物の粒子径に大きく影響することが報告されている^{11,12)}。

これまで我々はシラス多孔質ガラス (shirasu porous glass ; SPG)を用いた膜乳化法による W/O/W エマルジョンの微粒子設計技術¹³⁾を応用し、微細均一なエマルジョンの開発を行ってきた。今回、インスリンを内水相に含有させた water-in-oil-in-water (W/O/W) エマルジョン及び粒子径の異なる 2 種類の solid-in-oil-in-water (S/O/W)エマルジョンを調製し、*in vitro*でのインスリン放出特性を検討した。また、糖尿病誘発ラットに各種製剤の経口投与を行い、インスリンの血中濃度及び血糖降下作用よりインスリン経口剤のキャリアとしての有用性を評価した。

方法

1. インスリン含有エマルジョンの調製

1) W/O/W エマルジョンの調製

インスリン粉末を 4.9%グルコース水溶液に溶解した水溶液を内水相とし、大豆油に油性界面活性剤シヨ糖エルカ酸エステル(ER-290)を添加した油相に滴下しながらホモミキサーで分散乳化(W/O)した後、SPG膜(平均細孔径 0.8μm)を用いて単分散 W/O/W エマルジョンを調製した。得られたエマルジョンはレーザー回折/散乱式粒度分布測定装置 (SALD-2000;島津製作所)を用いて粒径分布を測定した。

2) S/O/W エマルジョンの調製

油相の界面活性剤にはテトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステル(TGCR)を使用して上記と同様の方法で W/O エマルジョンを調製し、エバポレーターにより窒素ガス雰囲気下で脱水処理して得られた S/O エマルジョンを分散相とす

る粗な S/O/W エマルションを予備乳化して調製した。これを SPG 膜 (平均細孔径 0.36 μ m、0.8 μ m) に透過し、単分散 S/O/W エマルションを生成した。調製実験フローを図 1 に示す。

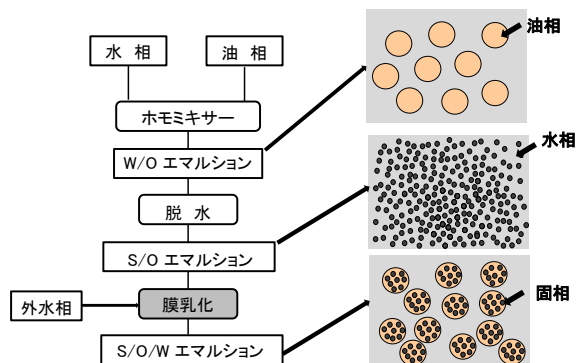


図 1 S/O/W エマルションの調製フロー

2. インスリン含有 S/O/W エマルションの安定性評価

レーザー回折/散乱式粒度分布測定装置を用い、S/O/W エマルションの油層(S/O エマルション)の粒径分布を測定した。また、同分布測定データより累積粒度分布曲線における積算量が 10%, 50%, 90% を占める時の粒子径を $^{10}D_p$, $^{50}D_p$, $^{90}D_p$ として示し、S/O/W エマルション調製後の外水相中での S/O エマルションの粒子径の単分散性のパラメーターとして粒径分散係数 (δ) = $(^{90}D_p - ^{10}D_p) / ^{50}D_p$ により算出した。

3. 動物実験

Wistar 系雄性ラット (180~200 g) にストレプトゾシン 55 mg/kg(sigma)を尾静脈投与し、7 日後に糖尿病を誘発 (空腹時血糖値 200 mg/dL 以上のラットを使用) させた後、経口ゾンデを用いて W/O/W エマルション(油相平均粒子径 1.02 μ m)及び 2 種類の S/O/W エマルション(油相平均粒子径 0.42 μ m, 1.09 μ m), 各 100 units/kg を経口投与後、5 分, 30 分, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6 時間後に頸静脈より採血して血漿中のインスリン濃度及び血糖値を測定した。なお、対照群には内水相として調製したインスリン粉末を 4.9% グルコース水溶液に溶解した水溶液を用い、インスリン水溶液とした。また、経口投与製剤の麻酔による体内動態への影

響を考慮し、前処置として頸静脈にカニューレを挿入した後に背部皮下にバスキュラーアクセスポートを埋め込み、無麻酔下で採血を行った。本実験は、就実大学研究倫理安全委員会の承認を得て実施した。

4. インスリン血中濃度及び血糖値の測定

血漿中のインスリン濃度は、IMX アナライザー (インスリン・ダイナパック: ダイナボット社製) を用いたエンザイムイムノアッセイ法により測定した。また、血清中の血糖値は GL-NEW TEST (ミズホ: ミズホメディー社製) を用いた酵素法により測定を行った。得られたデータ値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.D.) で表し、Student's-test を用いて統計学的処理を行った。

結果・考察

今回、2 種類の SPG 膜 (平均細孔径 0.36 μ m または 0.8 μ m) を用いてインスリン含有エマルションを調製した結果、単分散 W/O/W エマルション及び平均粒子径 0.42 μ m, 1.09 μ m の単分散 S/O/W エマルションが得られた。S/O/W エマルションの安定性の指標として、平均粒子径及び粒径分散係数 (δ) を検討した結果、S/O エマルションの粒子径は調製後 6 ヶ月後までバラつきが見られず、単分散であることが認められた (図 2)。これまで、我々は膜乳化法を用いて微細均一なエマルションの開発を行ってきた。しかしながら、調製後に内水相のインスリンが油相を拡散透過する漏洩等の問題により、長期安定性に優れた W/O 粒子径 0.5 μ m 以下の W/O/W エマルションの調製が困難であった。今回、予め調製した W/O エマルションを脱水することでインスリン水溶液を固相化した後、S/O エマルションを分散相とする粗な S/O/W エマルションを予備乳化して調製し、これを SPG 膜に透過することにより微細均一で安定したエマルションを調製することが可能となった。

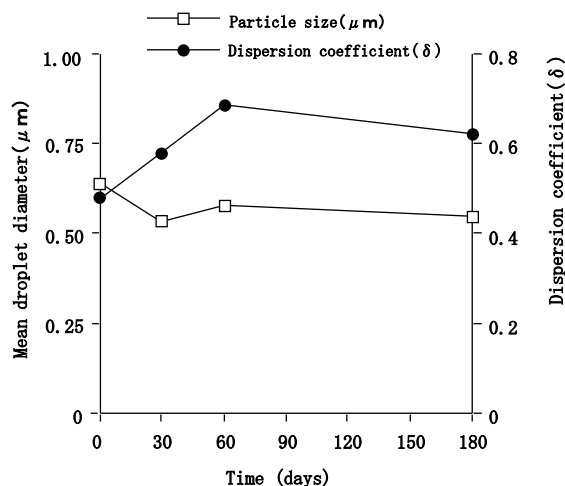


図2 S/O エマルジョンの平均粒子径分布及び
粒径分散係数

調製条件の異なるインスリン含有エマルジョンの吸収への影響を検討するため、経口投与後の血中インスリン濃度を検討した結果(図3), 平均粒子径 1.02 μm の単分散 W/O/W エマルジョン投与群の最高血中濃度到達時間(Tmax)は S/O/W エマルジョン投与群と同様の投与 5 分後であり、その後著しい低下を示した。一方, S/O/W エマルジョン投与群は粒径による有意差は認められなかったものの, W/O/W エマルジョン投与群に比べて投与 2 時間後まで徐放性がみられ, 血中濃度の増加を示した。

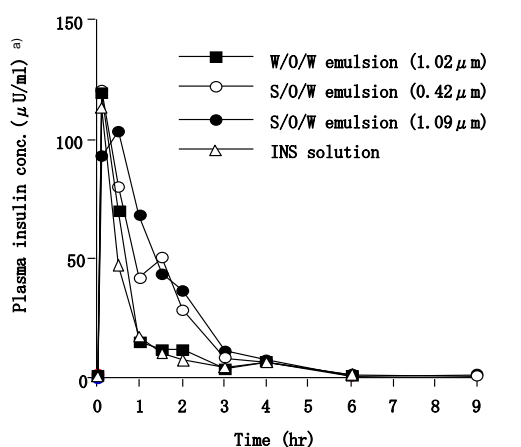


図3 各種インスリン製剤投与後の血中インスリン濃度

各種インスリン製剤投与における血糖値への影響を検討した結果(図4), インスリン水溶液投与群では血糖値の増加傾向を示した。一方, W/O/W エマルジョン投与群では, 僅かに血糖値の降下傾向が認められたものの投与 4 時間後までインスリン水溶液との有意差は認められなかった。これに対し, S/O/W エマルジョンではインスリン水溶液投与群に比べて投与 2, 3, 6 時間後において有意な血糖降下作用が認められたが, S/O/W エマルジョンの粒径による有意差は認められなかった。

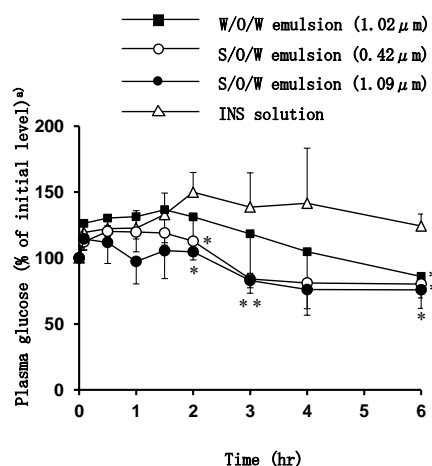


図4 各種インスリン製剤投与後の血糖値

今回, S/O/W エマルジョン投与群では W/O/W エマルジョン投与群に比べて僅かにインスリン吸収率の増加及び血糖降下作用が認められた。先に実施した W/O/W エマルジョンの pH に対する安定性をエマルジョンからの漏洩率により検討した結果では, pH9.0 でのインキュベート 1 日後の漏洩率が 0.54%であったのに対して pH4.0 では 9.3%を示しており, W/O/W エマルジョンは酸性条件下で有意なインスリンの漏出傾向が認められている¹⁴⁾。従って, 生体内での胃部での pH が 1~3 であることを考慮した場合, W/O/W エマルジョン投与群では投与直後よりエマルジョンから漏洩したのに対し, S/O/W エマルジョン投与群では胃部でエマルジョンからの漏洩が少なかったことに加え, S/O/W エマルジョンは消化管

での再分散による徐放性を示したことにより、小腸上部でのインスリンの吸収が増加したものと考えられる。

一方、粒子径の異なる2種類のS/Oエマルションを用いた吸収性の検討では、S/O/Wエマルション投与群での粒子径による有意差は認められなかった。しかしながら、先に実施したS/O/Wエマルション(平均粒子径 8.69 μ m)の投与では殆ど吸収されなかったのに対し、粒子径を1.0 μ m程度に小さくすることにより僅かながら吸収率の増加及び血糖値の上昇抑制効果を示すことが認められた¹⁵⁾。

インスリンの等電点はpH5.3~5.5であり、水溶液中ではこの範囲のpHで沈殿するが、pH4以下またはpH7以上では溶解度が高い。しかしながら、インスリンは小腸において各種タンパク分解酵素の影響を受ける¹⁶⁾ことから、種々のキャリアを用いた研究が実施されているが、そのキャリアの溶解性が問題となる。

薬物の小腸からの吸収は、主に溶解性と膜透過性によって決定される。この2つの因子の高低をもとに薬物を4つのクラス(クラス1:高い溶解性, 高い膜透過性, クラス2:低い溶解性, 高い膜透過性, クラス3:高い溶解性, 低い膜透過性, クラス4:低い溶解性, 低い膜透過性)に分け、クラスごとに薬物の吸収特性を明らかにした理論が、Biopharmaceutics Classification System(BCS)である。現在、BCSは、新薬メーカーの経口製剤開発の実現可能性を推定する指針の1つとして利用されている¹⁷⁾。近年、インスリンを効率よく吸収させるため、バイオ粘着の性質を有するPBMAD (poly-butadiene-maleic anhydride-co-L-DOPA)を用いることにより、小腸の粘膜上皮層に付着させてインスリンの吸収を促す製剤開発が進んでおり¹⁸⁾、この製剤は膜透過性の向上に主眼をおいたものである。

微細化は溶解速度を増す技術であり、薬物の吸収改善に有効であると考えられている¹⁹⁾。本研究で用いたS/O/Wエマルションは、単分散性

で安定性に優れた微細な製剤であり、溶解度の向上させるための一手法である。今後は、溶解性の向上とともに、膜透過性や薬物吸収に影響を与える消化酵素等の影響を考慮し、最適な製剤条件を検討する必要がある。

引用文献

- 1) 矢藤繁:次世代の2型糖尿病薬物治療 かわりつつある糖尿病薬物治療の現状 インスリンへの移行 BOT, Mebio, 28(4), 61-67 (2011).
- 2) Ledet G., Graves R.A., Bostanian L.A., Mandal T.K. : A second-generation inhaled insulin for diabetes mellitus. American Journal of Health-System Pharmacy, 72(14), 1181-1187(2015)
- 3) 尾関哲也:経肺投与型製剤の進歩—インスリン吸入剤を主に—, 第5回日本くすりと糖尿病学会学術集会講演要旨集, pp.66 (2016).
- 4) Matsuzawa A., Morishita M., Takayama K., Nagai T. : Absorption of insulin using water-in-oil-in-water emulsion from an enteral loop in rat. Biol. Pharm. Bull., 18(12) 1718-1723 (1995).
- 5) Suzuki A., Morishita M., Kajita M., Takayama K., Isowa K., Chiba Y., Tokiwa S., Nagai T. : Enhanced colonic and rectal absorption of insulin using a multiple emulsion containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. J. Pharm. Sci., 87, 1196-1202(1998).
- 6) Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y. : Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. Pharm Res., 13, 896-901 (1996).
- 7) Iwanaga K, Ono S, Narioka K, et al. : Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes 'improvement of stability of insulin in GI tractz. ', Int J Pharm., 157(1)73-80 (1997).
- 8) Sakuma S, Suzuki N, Kikuchi H, Hiwatari K, Arikawa K, Kishida A, Akashi M. : Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel

- graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. *Int. J. Pharm.*, 149, 93-106(1997)
- 9) Carino G.P., Jacob J.S., Mathiowitz E.: Nanosphere based oral insulin delivery. *J. Control. Rel.*, 65, 261-269(2000).
- 10) 山本昌 : 吸収改善 (生体膜透過促進), 永井恒司編, *DDS の基礎と開発*, pp.19-33 (2006).
- 11) Florence A.T, Hillery A.M, Hussain N., Jani P.U. : Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption 'Studies on particle uptake and fate. ' *J. Control. Release*, 36, 39-46 (1995).
- 12) Morishita M., Goto T., Peppas N.A., Joseph J.I., Torjman M.C., Munsick C., Nakamura K., Yamagata T., Takayama K., Lowman A.M.: Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels ' effect of particle size on insulin enteral absorption. ' *J. Control. Release*, 97, 115-124(2004).
- 13) 中島忠夫, 清水正高, 久木崎雅人 : 膜, pp.278(1999).
- 14) Ono H., Yamasaki K., Kashiwagi S., Arimori K., Matsuda S., Shimizu M.: New approach for oral insulin preparation with emulsion as drug carrier. *Proceeding of the 36th SPG forum, international*. 31-34 (2001)
- 15) Toorisaka E., Ono H., Arimori K., Kamiya N., Goto M.: Hypoglycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion. *Int. J. Pharm.*, 252, 271-274(2003)
- 16) 山本昌編 : 演習で理解する生物薬剤学, pp.301 廣川書店, 2009.
- 17) Hansmann S., Darwich. A., MarqolsKee A., Dressman J. : Forecasting oral absorption across biopharmaceutics classification system classes with physiologically based pharmacokinetic models. *J. Pharm. Pharmacol.* 68(12), 1501-1515(2016).
- 18) Reineke J., Cho D.Y., Dingle Y.L., Cheifetz P., Laulicht B., Lavin D., Furtado S., Mathiowitz E. : Can bioadhesive nanoparticles allow for more effective particle uptake from the small intestine? *J. Control. Release*. 170(3), 477-484(2013).
- 19) 佐久間信至 : 製剤技術による薬物吸収改善, 高倉喜信編, *図解で学ぶ DDS*, pp.64-71 (2010).