キトサンカプセルを用いた生理活性ペプチドの 大腸特異的送達法の開発

東崎英之・山本 昌・村西昌三*

Chitosan capsules for colon-specific drug delivery : Improvement of insulin absorption from the rat colon

We reviewed the effectiveness of chitosan capsules for colon-specific delivery of insulin. The release of drug from the chitosan capsules was markedly increased in the presence of rat cecal contents, although no release from the capsules was observed in an artificial gastric juice and an artificial intestinal juice. The results of swelling and elongation tests using the chitosan film strongly suggested that chitosan capsules were degraded by the microorganisms in rat cecal contents. The intestinal absorption of insulin following oral administration of chitosan capsules containing insulin with or without additives was investigated by an *in vivo* rat absorption experiment. A marked decrease in plasma glucose level was observed following administration of the capsules containing 20 IU insulin and Na-glycylcholate as compared with the capsules containing insulin only. These results suggested that chitosan capsule could be a useful carrier for colon-specific delivery of peptides including insulin.

Hideyuki Tozaki・Akira Yamamoto・Shozo Muranishi*

key words : insulin, colon specific drug delivery,
protease inhibitor, chitosan, capsules

近年、微量で強力な生理活性をもつペプチドが数多く発見され、また遺伝子組換え技術や細胞融合などのバイオテクノロジーの急速な進歩によるペプチドの大量供給が可能になり、これら生理活性ペプチドを医薬品として疾病の治療に応用しようとする試みがなされている^{1,2)}。しかしながら、一般にこれらペプチドは経口投与しても消化管からはほとんど吸収されないことが知られている。これはこれらペプチドが、消化管内で消化酵素やタンパク分解酵素により分解を受けやすいことや、ペプチド自体が水溶性や高分子であるため膜透過性が低いことに起因すると考えられる³⁾。そのため、現在ペプチドの投与は皮下、筋肉および静脈内投与などの注射に限定されているが、これ

ら注射による投与は患者に苦痛を伴い、また頻回投与の際にはアレルギー反応などの副作用の発現も考慮しなければならない。そこで最近では、経口投与後の生理活性ペプチドの吸収率を改善するため、種々のアプローチが試みられているが、いまだ満足すべき結果は得られていないのが現状である⁴⁻¹²⁾。

大腸は、腹腔の外周に沿って蹄鉄形に走る小腸よりも太い消化管であり、ヒト大腸の長さは約1.5 mである。大腸の生理作用は、主として水や電解質の吸収であるが、絨毛が存在しないため有効表面積が小さく、薬物吸収への寄与は小さいと考えられていた¹³⁻¹⁵⁾。しかしながら、近年、大腸は小腸にくらべタンパク分解酵素活性が低く、また製剤の移動が少なく管腔内での薬物の高い濃度を保持でき、十分な吸収能力が存在することから、通常経口投与が困難なペプチド性医薬品の有効な吸

* Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607 京都薬科大学製剤学教室
Offprint requests to : Akira Yamamoto, Ph. D.

図 1 Chemical structure of chitin and chitosan

図 2 Scheme of chitosan capsule

収部位として注目されるようになってきている^{16~18)}。さらに筆者らは、吸収促進剤およびタンパク分解酵素阻害剤の作用が、大腸において小腸よりも効果が高いことを明らかにしてきた^{3,4,18,36)}。

そこでペプチドを標的部位である大腸になるべく特異的に送達することが重要であるが、こうした薬物の大腸デリバリーを達成するためには胃、小腸を経て大腸に至るまでの消化管の種々の生理的環境、あるいは消化管内通過時間などの諸条件を十分考慮した投与法を確立することが必要になる。

現在、研究されている主な大腸特異的送達法の

システムとして、時間制御型製剤¹⁹⁾、プロドラッグ²⁰⁾、生分解性ゲル製剤²¹⁾、大腸内圧崩壊型製剤^{22,23)}、大腸特異的に崩壊するポリマーを用いた製剤^{16,24)}などがあげられる。これら製剤のうち、現在までのところ、時間制御型製剤に関する研究が数多くなされているが、カプセル経口投与後の消化管内移動は食餌の影響を受けやすく、また個体差が大きいなどの難点が存在することが知られている。また大腸特異的に崩壊するポリマーとして、最近、大腸に豊富に存在する腸内細菌により崩壊するアゾポリマーが注目されているが、このポリマーは天然由来のものでなく、その適用に際しては安全性に関する検討が必要である。

一方、キトサンは従来から抗癌剤の高分子修飾や、人工皮膚に用いられているエビ、カニの甲殻から取れる天然素材であるが、近年、大腸に存在する各種腸内細菌により分解されることが知られている²⁵⁾。また、キトサンは変異原性試験、急性毒性試験、亜急性試験、慢性毒性試験、発熱性試験、溶血性試験、アレルギー性試験のいずれにも適合することが知られており、安全性が高い高分子素材であることが確認されている²⁵⁾。

そこで、本研究では胃、小腸で分解を受けずに大腸に到達し、大腸に存在する腸内細菌の作用により崩壊されるカチオン性高分子であるキトサンに注目し、キトサンを用いた大腸崩壊性カプセル

hr	Stomach	S.I. ^a	2	3	4	5	6	7	8	Cecum	L.I. ^b	Ex. ^c
0.5	●●●●●●●●											
1	●●●●●●●●	●	●	●	●							
2					●	●●	●●●●●●●●	●				
4								●●●●●●●●	●●●●●●●●	●●		
5								●●●●●●●●	●●	●		
6									●●●●●●●●	●●●●●●●●		
8									●●●●●●●●	●●●●●●●●		
10									●●●●●●●●	●●●●●●●●		
12											●●●●●●●●	●●●●●●●●
14												●●●●●●●●

a: small intestine, b: large intestine, c: excretion

図 3 Gastrointestinal transit of chitosan capsules

図 4 Release of CF from chitosan capsules by Japan pharmacopoeia (J.P.) rotating basket method

を作成し、モデル薬物としてインスリンを選択し、大腸特異的送達法の開発を試みたので紹介する。

大腸特異的送達法に用いたキトサンカプセルの構造

キトサンは、キチンのアミノアセチル基を脱アセチル化して得られるものであり、図 1 に示すような化学構造を有しており、同じ多糖であるセルロースに類似している。本研究においては分子量 43,000、脱アセチル化度 83% のキトサンを用いてカプセルを作成した。

本研究において、大腸特異的送達法に用いたキトサンカプセルの断面図を図 2 に示した。キトサンカプセルは、アイセロ化学より供与されたものを用いた。本研究では、長径 3.5 mm、短径 1.6 mm

のキトサンカプセル内に薬物を封入した。また、経口投与後カプセルが胃内で崩壊するのを防ぐため、カプセル表面に hydroxypropylmethyl cellulose phthalate で腸溶性コーティングを施した。

In vivo 消化管内移動

図 3 に 8 時間絶食 Wistar 系雄性ラットにキトサンカプセルを経口投与後の消化管内移動について検討した結果を示した。カプセルの大部分は投与 0.5, 1 時間後に胃に存在し、2, 4, 5 時間後には、カプセルのすべてが小腸内に移行した。その後、8, 10 時間後には盲腸から大腸部位に移行し、14 時間後には体外に排泄されていることが確認された。

以上の結果より、キトサンカプセルは経口投与後、0～2 時間は胃に残留し、2～6 時間で小腸部位に、それ以降は大腸部位に到達し、12 時間後まで大腸内を緩やかに移行した後、体外に排泄されることが確認された。

キトサンカプセルからの内容薬物の放出試験

キトサンカプセルからの内容薬物の放出試験は、日本薬局方回転バスケット法により行った。図 4 は、5(6)-carboxyfluorescein (CF) 封入キトサンカプセルからの CF の放出-時間曲線を示したものである。リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中では、内容薬物である CF の放出はほとんど確認されず、カプセルの崩壊はみられなかった。これに対して、経口投与時の体内移動を考慮して 0～2 時間目ま

図5 Swelling and elongation strength of chitosan films in the presence or absence of *Bacteroides Vulgatus* solution²⁵⁾

では局方第1液, 2～6時間目までは局方第2液, 6～12時間目までは大腸内容物懸濁液^{26,27)}中で溶出試験を行った結果, カプセルが大腸部位に存在していると考えられる6時間目に大腸内容物懸濁液に置換することにより急激なCFの放出がみられ, カプセルが腸内細菌で特異的に崩壊することが明らかとなった。

また, 図には示していないが, 大腸内容物懸濁液中におけるキトサンカプセルの表面構造を, 電子顕微鏡を用いて撮影した結果からもカプセルの経時的な崩壊が観察された。これらの結果より, 経口投与したキトサンカプセルは大腸部位に到達した後, 腸内細菌の作用で崩壊し, 内容薬物を放出することが示唆された。

キトサンフィルムを用いたキトサン崩壊メカニズム

図5は腸内細菌の優勢菌種として *Bacteroides Vulgatus* (*B. Vulgatus*) を選択し, *B. Vulgatus* 存在下もしくは非存在下におけるキトサンフィルムの水膨潤度, および引っ張り強度について検討を行った結果を示している。 *B. Vulgatus* を含まないコントロール液中では, 24時間目までキトサンフィルムの水膨潤度に変化はみられず, また引っ張り強度も低下しなかった。これに対し, *B. Vulgatus* 液中において, キトサンフィルムは7時間目あたりから水膨潤度の増大, 引っ張り強度の

低下が確認された。この結果より, キトサンフィルムは腸内細菌の作用により膨潤し, 崩壊されることが示唆された。

一方, 消化管内存在する炭水化物およびアミノ酸が, 腸内細菌により短鎖脂肪酸に変化し, この生成により盲腸および結腸管腔内におけるpHが約6.5, もしくはそれ以下の酸性に低下することが報告されている^{15,28)}。キトサンはカチオン性高分子であるため, 結腸に移行した後, これら有機酸によりpHが低下し影響を受けることが考えられる。したがって, こうした腸内細菌によるpHの低下によるキトサンカプセルの崩壊の可能性について図6で検討を行った。

本研究では腸内細菌によって産生される代表的な有機酸として, 酢酸, プロピオン酸, リンゴ酸の緩衝液を用いた。いずれの有機酸緩衝液を用いて検討を行った場合においても, pHの低下とともにキトサンフィルムの水膨潤度の増加が確認され, こうした有機酸との接触によりキトサンが崩壊することが示唆された。また, 図6にpHの異なる酢酸緩衝液中におけるキトサンフィルムの水膨潤度について検討した結果を示した。その結果, pHの低い酢酸緩衝液中におけるキトサンフィルムの水膨潤度は, pHの高い緩衝液に比べ短時間で顕著に増加することが明らかとなり, pHの低下によるキトサンの崩壊が示唆された。

さらにキトサンの崩壊メカニズムについて詳細

図 6 Swelling ratios of chitosan films at different pHs in various buffer solutions

図 7 Elongation strength of chitosan films at different pHs in the presence or absence of *Bacteroides Vulgatus*²⁵⁾

に検討を行うため、酢酸緩衝液、*B. Vulgatus* 液、およびその上清中におけるキトサンフィルムの引っ張り強度に及ぼす pH の影響について検討を行った(図 7)。 *B. Vulgatus* 液およびその上清にキトサンフィルムを浸漬した結果、pH の低下とともに引っ張り強度の急激な低下が確認された。また、その低下は上清に比較して *B. Vulgatus* 液のほうが顕著であった。このことから、キトサンフィルムの崩壊には腸内細菌の存在が重要であることが示唆された。

一方、酢酸緩衝液に浸漬したキトサンフィルム

の引っ張り強度は pH 6.5 までまったく変化しないことから、*B. Vulgatus* 液およびその上清中でみられたこれらの変化は、腸内細菌によって産生された有機酸以外にもなんらかの因子がキトサンフィルムの構造に影響を与えること、つまり腸内細菌自身もしくは腸内細菌からの産生物質によりキトサンが崩壊することが示唆された。

キトサンカプセル経口投与後のインスリンの消化管吸収

図 8 にインスリン 20 IU 水溶液、インスリン 20 IU を封入したゼラチンカプセル、およびキトサンカプセル経口投与後の血糖値時間推移曲線を示した。インスリン水溶液およびインスリンをゼラチンカプセルに封入して経口投与した場合、ほとんど血糖降下作用は確認されなかった。これに対して、キトサンカプセルに封入したインスリンを経口投与した場合、pharmacological availability % (PA%) は 1.6% を示し、キトサンカプセルを用いたインスリンの大腸特異的送達法の効果が確認された。また、筆者らの以前の実験では大腸ループにインスリン 20 IU 水溶液を投与した場合、まったく血糖値の降下が観察されなかったが³¹⁸⁾、本実験ではキトサンカプセルを用いてインスリン 20 IU を経口投与した結果、若干の血糖降下が確認された。これはキトサンカプセル中にインスリンが

- Solution (Insulin 20 IU)
 ▽ Gelatin capsules (Insulin 20 IU)
 ● Chitosan capsules (Insulin 20 IU)

Results are expressed as the mean $\pm$ SE of 5 experiments.

図 8 Concentration-time profiles of glucose in plasma after oral administration of chitosan capsules containing insulin

- Insulin 20 IU
 ● Insulin 20 IU + Bacitracin 14 mg
 △ Insulin 20 IU + Aprotinin 4.0 mg
 ■ Insulin 20 IU + Soybean trypsin inhibitor 3.0 mg

Results are expressed as the mean $\pm$ SE of 5 experiments.

図 9 Concentration-time profiles of glucose in plasma after oral administration of chitosan capsules containing insulin and protease inhibitors

包含されているため、インスリンの酵素分解が抑制されたためであると考えられる。またカプセルの素材であるキトサン自身が tight junction を開口し、吸収促進効果を発現することが報告されていることから²⁹⁾、キトサンがインスリンの大腸からの吸収を若干改善し、血糖値を低下させた可能性もあると考えられる。

つぎにインスリンと各種タンパク分解酵素阻害剤をキトサンカプセルに添加封入することにより

- Insulin 20 IU
 ■ Insulin 20 IU + n-dodecyl- β -D-malto-pyranoside 10mg
 ● Insulin 20 IU + Sodium oleate 6.1 mg
 ▲ Insulin 20 IU + Sodium glycocholate 9.8 mg

Result are expressed as the mean $\pm$ SE of 5 experiments.

図 10 Concentration-time profiles of glucose in plasma after oral administration of chitosan capsules containing insulin and absorption enhancers

血糖降下の増強を試みた。図 9 は、インスリンおよび各種タンパク分解酵素阻害剤を封入したキトサンカプセルを経口投与した後の血糖値の経時変化について示したものである。インスリン 20 IU を封入したキトサンカプセルを経口投与した場合、カプセルが大腸部位に到達している 8 時間目以降に若干の血糖値の降下が確認された。これに対し、インスリン 20 IU と bacitracin 14 mg, soybean trypsin inhibitor (STI) 3.0 mg, aprotinin 4.0 mg を併用した場合に血糖降下作用の増強が認められた。

図 10 は、インスリンおよび各種吸収促進剤を封入したキトサンカプセルを経口投与した後の血糖値の経時変化について示したものである。インスリンに各種吸収促進剤を併用しキトサンカプセルに封入した場合、血糖降下作用が増大したが、特に、インスリン 20 IU および sodium glycocholate 9.8 mg を併用した場合に有意な血糖降下作用が確認された。また、sodium oleate 6.1 mg を併用した場合、若干の血糖降下作用の増強が認められたが、n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (LM) 10 mg の併用ではコントロールの場合とほぼ同等の血糖降下作用を示し、LM の吸収促進効果はほとんどみられなかった。

図 11 にインスリン、および各種添加剤を封入し

* $p < 0.05$, compared with chitosan capsules (Insulin 20 IU).

a: Sodium glycocholate, b: Sodium oleate, c: N-Dodecyl- β -D-maltopyranoside, d: Soybean trypsin inhibitor

Results are expressed as the mean $\pm$ SE of 5 experiments.

図 11 Pharmacological availability (PA%) of insulin including various additives after oral administration of chitosan capsules

△ Solution (Insulin 20 IU)

○ Chitosan capsules (Insulin 20 IU)

▲ Chitosan capsules (Insulin 20 IU + Sodium glycocholate 9.8 mg)

Results are expressed as the mean $\pm$ SE of 5 experiments.

図 12 Concentration-time profiles of insulin in plasma after oral administration of chitosan capsules containing insulin and sodium glycocholate

たキトサンカプセル経口投与後の血糖降下率 (D%) から算出した PA% をまとめた。インスリンおよび各種タンパク分解酵素阻害剤、各種吸収促進阻害剤を併用した場合に PA% の増加が認められた。その効果は、吸収促進剤では sodium glycocholate > sodium oleate > LM、タンパク分解酵素阻害剤では bacitracin > aprotinin > STI の順を示した。なかでもキトサンカプセルにインスリン 20 IU, sodium glycocholate 9.8 mg を封

入した場合、もっとも大きい血糖降下作用 (PA% = 3.49%) を示し、インスリン 20 IU のみをキトサンカプセルに封入した場合に対して有意な PA% の増加が確認された。インスリンおよび各種添加物を含有したキトサンカプセル経口投与後の血糖降下作用は、sodium glycocholate > aprotinin > STI であったが、筆者らはすでに大腸内容物中におけるインスリンの分解抑制効果は aprotinin > STI > sodium glycocholate = control の順であることを確認している。

また、Yamamoto らは、sodium glycocholate が大腸粘膜中におけるインスリンの分解をほとんど抑制しないことを明らかにしている¹⁸⁾。こうした結果にもかかわらず、*in vivo* 経口投与においてもっとも大きな血糖降下作用を示したことから、インスリンの大腸部位からの吸収には、sodium glycocholate の leucine aminopeptidase 阻害作用¹⁷⁾よりも吸収促進作用³⁰⁾が大きく作用したと考えられる。

Bacitracin は leucine aminopeptidase 阻害作用^{31,32)}、STI、aprotinin は trypsin, chymotrypsin 阻害作用³³⁾を有することから、本研究ではこれらタンパク分解酵素阻害剤が、大腸部位でキトサンカプセルから放出されたインスリンの大腸管腔内液中酵素、大腸内容物中酵素²⁷⁾、大腸粘膜酵素¹⁸⁾による分解を抑制した結果、血糖降下作用を増強し

図 13 Proposed mechanism of colon specific delivery of insulin by chitosan capsules

たと考えられる。また、最近 bacitracin は吸収促進作用も報告されており^{34,35)}、bacitracin がインスリンの大腸粘膜透過性を増大させた可能性も考えられる。

一方、LM は界面活性作用を有するアルキルサッカライドであり、吸収促進剤としての利用が考えられている。Murakami らは、インスリンの直腸からの吸収が LM (10 mM) の併用により顕著に増大することを報告している³⁶⁾。しかし、今回の検討では LM の併用による PA% の増加はまったくみられなかった。この結果は、LM の溶解性が低いことや、カプセルからの LM とインスリンの放出との間にタイムラグが生じたことなどが推察される。また、sodium oleate は炭素鎖が 18 の不飽和脂肪酸であり、吸収促進作用を有することが報告されている³⁷⁾。本検討では、sodium oleate の吸収促進作用によりインスリンの吸収が促進された結果、PA% が増加したと考察される。

上記の実験の結果、もっとも顕著な血糖値の低下を示したインスリン、および sodium glycocholate を封入したキトサンカプセルを経口投与

した後の血中インスリン濃度を測定した(図 12)。インスリンおよび sodium glycocholate を封入したキトサンカプセルが大腸部位に到達する 6 時間目以降に血中インスリン濃度の上昇が確認され、キトサンカプセル経口投与後の消化管内移動実験(図 3)、および血糖値測定実験の結果(図 10)と一致する結果が得られた。また、血中インスリンのピークはキトサンカプセル経口投与後 12 時間目には低下しているが、薬理作用である血糖値の低下は約 24 時間にわたり継続していること(図 10)が確認された。

キトサンカプセル経口投与後にインスリンが吸収されるまでのメカニズム

以上の結果より、インスリンおよび各種添加物を封入したキトサンカプセルを経口投与した後に、インスリンが全身循環系に吸収されるまでのメカニズムを推測し図 13 に示した。

キトサンカプセルは経口投与後、まず胃から小腸部位へと移行する。その際、胃内容物排泄速度(GER)がカプセルの体内移動に影響を及ぼすと

考えられる。小腸部位に移行したキトサンカプセルは、表面の腸溶性コーティングが溶解し、大腸部位へ移行する。大腸部位に存在する各種腸内細菌は、炭水化物を発酵することでリンゴ酸、酢酸、乳酸などの短鎖脂肪酸を産生し、管腔内の pH を低下させることが知られている^{15,28)}。この pH 低下および腸内細菌自身の作用が相乗的に働くことにより、安定なフィルムを構成していたカチオン性高分子であるキトサン膜が膨潤し、キトサンカプセルは崩壊すると考えられる。こうしてキトサンカプセルが崩壊することにより内容薬物であるインスリン、および各種添加物が大腸管腔内中に放出される。さらにインスリンは、タンパク分解酵素阻害剤による管腔内酵素、大腸内容物中酵素、大腸粘膜酵素の阻害作用や、吸収促進剤による吸収促進作用により大腸管腔内から全身循環系に移行すると考えられる。

おわりに

キトサンカプセルを用いたインスリンの大腸特異的送達法について検討を行ってきた結果、キトサンカプセルはインスリンの大腸特異的送達法に有用であることが確認された³⁸⁾。また、こうした生理活性ペプチドの経口投与製剤の臨床応用が可能になれば、インスリンやカルシトニンを在宅で投与でき、糖尿病や骨粗鬆症患者にとって朗報になると思われる。

今後、潰瘍性大腸炎の治療薬などの大腸局所作用薬³⁹⁻⁴²⁾についても検討を行っていく予定であるが、本研究の結果は、ペプチド性医薬品の経口投与製剤を開発するうえで有用な基礎的知見を提供するものと思われる。

本研究に際し、実験の一部にご協力頂きました村上正裕助手、藤田卓也助手、谷口寿生、江見泰治、堀坂恵里、躍場朋和、小茂池潤太、圓山貴子、多田知加、渡辺 憲、多田由美諸氏、およびキトサンカプセルの作成に協力して頂きましたアイセロ化学(株) 荻野義昇、杉山忠宏、寺部 亮、松本隆幸、鈴木 勉様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Davis SS, Illum L, Tomlinson E : Delivery Systems for Peptide Drugs. Plenum Press, 1986.
- 2) Lee VHL : Ophthalmic delivery of peptides and proteins. *Pharm. Tech.* 11 : 26-38, 1987.
- 3) Lee VHL, Yamamoto A : Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Adv. Drug Delivery Rev.* 4 : 171-207, 1990.
- 4) Muranishi S : Absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7 : 1-33, 1990.
- 5) Hastwell J, Lynch S, Fox R, Williamson R, Mackay M : Enhancement of human calcitonin absorption across the rat colon in vivo. *Int. J. Pharm.* 101 : 115-120, 1994.
- 6) Hashizume M, Douen T, Murakami M, Yamamoto A, Takada K, Muranishi S : Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 44 : 555-559, 1991.
- 7) Yamada K, Murakami M, Yamamoto A, Takada K, Muranishi S : Improvement of intestinal absorption of thyrotropin-releasing hormone by chemical modification with lauric acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 44 : 717-721, 1992.
- 8) Tenma T, Yodoya E, Tashima S, Fujita T, Murakami M, Yamamoto A, Muranishi S : Development of new lipophilic derivatives of tetragastrin : Physicochemical characteristics and intestinal absorption of acyl-tetragastrin derivatives in rats. *Pharm. Res.* 10 : 1488-1492, 1993.
- 9) Shichiri M, Shimazu Y, Yoshida Y, Kawamori R, Fukuchi M : Enteral absorption of water-in-oil-in water insulin emulsions in rabbits. *Diabetologia* 10 : 317-321, 1974.
- 10) Weingarten C, Moufitti A, Delattre J, Puisieux F, Couvreur P : Protection of insulin from enzymatic degradation by its association to liposomes. *Int. J. Pharm.* 26 : 251-257, 1985.
- 11) Asada H, Douen T, Mizokoshi Y, Fujita T, Murakami M, Yamamoto A, Muranishi S : Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine : Relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution. *Pharm. Res.* 11 : 1115-1120, 1994.
- 12) Asada H, Douen T, Waki M, Adachi S, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S : Absorption characteristics of chemically modified insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. *J. Pharm. Sci.* 84 : 682-687, 1995.
- 13) Friend DR : Colon-specific drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 7 : 149-199, 1991.
- 14) Randall JM : The colon as a site for drug delivery. *J. Contr. Rel.* 22 : 15-34, 1992.
- 15) Faigle JW : Drug metabolism in the colon wall and lumen. In *colonic drug absorption and metabolism*. (ed. Bieck PR), Marcel Dekker Inc., New York, 1993, p 29-54.
- 16) Saffran M, Kumar GS, Savariar C, Burnham JC, Williams F, Neckers DC : A new approach to the oral administration of insulin and other peptide

- drugs. *Science* 233 : 1081-1084, 1986.
- 17) Yamamoto A, Hayakawa E, Lee VHL : Insulin and proinsulin proteolysis in mucosal homogenates of albino rabbit : Implications in peptide delivery from non-oral routes. *Life Sci.* 47 : 2465-2474, 1990.
- 18) Yamamoto A, Taniguchi T, Rikyu K, Fujita T, Murakami M, Muranishi S : Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.* 11 : 1496-1500, 1994.
- 19) Ishibashi T, Hatano H, Matukawa Y, Mizobe M, Kobayashi M, Yoshino H : Design and evaluation of a new capsule-type dosage form for colon-targeted delivery of drugs. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23 : 594-595, 1996.
- 20) Fedorak RN, Haeberlin B, Empey LR, Cui N, Nolen III H, Jewell LD, Friend DR : Colonic delivery of dexamethasone from a prodrug accelerates healing of colitis in rats without adrenal suppression. *Gastroenterology* 108 : 1688-1699, 1995.
- 21) Ghandehari H, Kopeckova P, Yeh P-Y, Ellens H, Smith PL, Kopecek J : Oral colon-specific protein and peptide delivery : polymer system and permeability characteristics. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23 : 59-60, 1996.
- 22) Takaya T, Niwa K, Matsuda K, Danno N, Takada K : Evaluation of pressure-controlled colon delivery capsule made of ethylcellulose. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23 : 603-604, 1996.
- 23) Crison JR, Siersma PR, Taylor MD, Amidon GL : Programmable oral release technology, PORT Systems® : A novel dosage form for time and site specific oral drug delivery. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22 : 278-279, 1995.
- 24) Kimura Y, Makita Y, Kumagai T, Yamane H, Kitao T, Sasatani H, Kim SI : Degradation of azo-containing polyurethane by the action of intestinal flora : its mechanism and application as a drug delivery system. *Polymer* 33 : 5294-5299, 1992.
- 25) 藤井 尊 : キトサンを用いた大腸崩壊性硬カプセル. *化学工業* 58 : 811-819, 1991.
- 26) Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S : Metabolism of peptide drugs by the microorganisms in rat cecal contents. *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 929-931, 1995.
- 27) Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S : Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat cecal contents : Implications in peptide delivery to the colon. *J. Pharm. Pharmacol.* 49 : 164-168, 1997.
- 28) Pye G, Evans DF, Ledingham S, Hardcastle JD : Gastrointestinal intraluminal pH in normal subjects and those with colorectal adenoma or carcinoma. *Gut* 31 : 1355-1357, 1990.
- 29) Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Illum L : Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11 : 1358-1361, 1994.
- 30) Hersey SJ, Jackson RT : Effect of bile salts on the nasal permeability in vitro. *J. Pharm. Sci.* 76 : 876-879, 1987.
- 31) Roth RA : Bacitracin : An inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 : 431-438, 1981.
- 32) Raehs SC, Sandow J, Wirth K, Merkle HP : The adjuvant effect of bacitracin on nasal absorption of gonadorelin and buserelin in rats. *Pharm. Res.* 5 : 689-693, 1988.
- 33) Morimoto K, Yamaguchi H, Iwakura Y, Miyazaki M, Nakatani E, Iwamoto T, Ohashi Y, Nakai Y : Effects of proteolytic enzyme inhibitors of the nasal absorption of vasopressin and analogue. *Pharm. Res.* 8 : 1175-1179, 1991.
- 34) Gotoh S, Nakamura R, Nishiyama M, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S : Does bacitracin have an absorption-enhancing effect in the intestine? *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 794-796, 1995.
- 35) Gotoh S, Nakamura R, Nishiyama M, Quan YS, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S : Effects of protease inhibitors on the absorption of phenol red and fluorescein isothiocyanate dextrans from the rat intestine. *J. Pharm. Sci.* 85 : 858-862, 1996.
- 36) Murakami M, Kusano Y, Takada K, Muranishi S : Assessment of enhancing ability of medium-chain alkyl saccharides as new absorption enhancers in rat rectum. *Int. J. Pharm.* 79 : 159-169, 1992.
- 37) Fukui H, Murakami M, Yoshikawa H, Takada K, Muranishi S : Studies on the promoting effect of lipid-surfactant mixed micelles on intestinal absorption of colloidal particles. Dependence of particle size and administration site. *J. Pharmacobio-Dyn.* 10 : 236-242, 1987.
- 38) Tozaki H, Komoike J, Tada C, Maruyama T, Terabe A, Suzuki T, Yamamoto A, Muranishi S : Chitosan capsules for colon-specific drug delivery : Improvement of insulin absorption from the rat colon. *J. Pharm. Sci.* (In press).
- 39) Hobson CH, Butt TJ, Ferry DM, Hunter J, Chadwick VS, Broom MF : Enterohepatic circulation of bacterial chemotactic peptide in rats with experimental colitis. *Gastroenterology* 94 : 1006-1013, 1988.
- 40) Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallage JL : Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96 : 795-803, 1989.
- 41) Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada J-R : Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 31 : 539-544, 1990.
- 42) Leduc LE, Su KC, Guth E, Reedy T, Guth PH : Effects of cyclooxygenase and lipoxigenase inhibition on eicosanoids and healing of acetic acid colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 38 : 289-294, 1993.