インスリンの経鼻吸収促進剤としてのグリチルリチン類の検討

三嶋基弘・岡田真弥・中野真汎^{*1)}、柴田承二^{*2)}*Studies on glycyrrhetinate and its derivatives as nasal absorption promoter of insulin*

We studied the promoting effect of glycyrrhetinate and its derivatives on nasal absorption of insulin in rats. These derivatives can be divided into two groups based on mother structural skeleton. One group is 3-O-ester derivatives of glycyrrhetinate and the other group is 3-O- and 30-O-ester derivatives of a hydrogenated glycyrrhetinate analog. The former group consists of G2 2K, GA Na, GA-MHS 2Na and GA-HPh 2Na and the latter group consists of DG-DHPh 2Na, HomAD-DHPh 2Na and HetAD-DHPh 2Na. These derivatives significantly promoted nasal absorption of insulin and decreased plasma glucose levels in rats. We found that the optimum concentration of these derivatives such as GA-MHS 2Na, GA-HPh 2Na and DG-DHPh 2Na was about 1%. The promoting effect of glycyrrhetic ester groups on nasal absorption of insulin in rats is $GZ\ 2K < GA\ Na < GA-MHS\ 2Na < GA-HPh\ 2Na$. These results indicated that strength of the promoting effect differed by 3-O-ester groups. On the other hand, hydrogenated glycyrrhetic ester analogs were more effective than the glycyrrhetic ester group. Particularly, DG-DHPh 2Na and HomAD-DHPh 2Na were significantly promoted nasal absorption of insulin in rats, and bioavailability in the presence of these promoters was comparable to that following intravenous injection. It is indicated that glycyrrhetinate and its derivatives can be applicable to promotion of nasal absorption of insulin.

Motohiro Mishima・Shinya Okada・
Masahiro Nakano^{*1)}, Shoji Shibata^{*2)}

key words : insulin, nasal absorption, absorption promoter, glycyrrhetinate

医薬品には、インスリンやグルカゴンなどのペプチドホルモン製剤があり、その投与は注射によって行われている。特に、インスリン依存型糖尿病患者では、インスリンの注射が長期に及ぶため、注射時の疼痛、注射部位の組織の肥厚や萎縮が懸念される。最近これらにかわる投与経路として、直腸¹⁻³⁾、鼻腔⁴⁻⁹⁾、口腔¹⁰⁾などの粘膜吸収が研究されてきた。単独ではほとんど吸収されないペプチド類も界面活性作用などのある物質の添加により、吸収が促進されることがわかり、多くの吸収促進剤がみいだされてきた。これらの吸収促進剤のなかで、胆汁酸塩^{4,5)}やサポニン類^{5,6,11)}がインスリンの吸収を促進することが報告されているが、本研究でも、胆汁酸に構造が類似し、サポニン類でもある生薬甘草成分のグリチルリチンやグリチルレチン酸に吸収促進作用があることを発見した。

また、グリチルリチンやグリチルレチン酸には、抗炎症作用があり¹²⁾、粘膜に対する刺激性も比較的弱いものと考えられる。

本研究では、インスリンの経鼻吸収をさらに促進させることを目指し、図1に示す5種のグリチルレチン酸の誘導体である glycyrrhetic acid 3-O-monoheemisuccinate 2Na (GA-MHS 2Na), glycyrrhetic acid 3-O-hemiphthalate 2Na (GA-HPh 2Na), 18 β -olean-12-ene-3 β , 30-diol 3 β , 30-di-O-hemiphthalate 2Na (DG-DHPh 2Na), 18 β -olean-9(11)12-diene-3 β , 30-diol 3 β , 30-di-O-hemiphthalate 2Na (HomAD-DHPh 2Na) および olean-11, 13(18)-diene-3 β , 30-diol 3 β , 30-di-O-hemiphthalate 2Na (HetAD-DHPh 2Na) について、ラットを用いた *in vivo* 実験で検討した。

^{*1)} Department of Pharmaceutical Services, Kumamoto University Hospital, 1-1-1 Honjo, Kumamoto, 860, Japan¹⁾ 熊本大学医学部附属病院薬剤部

^{*2)} Laboratory of Natural Medicinal Materials, Minophagen Pharmaceutical Co., 3-2-7, Yotsuya, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan²⁾ ミノファージェン製薬本舗柴田天然薬物研究室

		abbreviation	R ₁	R ₂
Ia	glycyrrhizic acid 2K	GZ 2K	-O (C ₈ H ₇ O ₆ K ₂) ₂	-COOH
Ib	glycyrrhetic acid Na	GA Na	-OH	-COONa
Ic	glycyrrhetic acid 3-O-mono-hemisuccinate 2Na	GA-MHS 2Na	-OOCCH ₂ CH ₂ COONa	-COONa
	glycyrrhetic acid 3-O-hemiphthalate 2Na	GA-HPh 2Na		-COONa
II	18β-olean-12-ene-3β, 30-diol 3β, 30-di-O-hemiphthalate 2Na	DG-DHPh 2Na		
III	18β-olean-9(11) 12-diene-3β, 30-diol 3β, 30-di-O-hemiphthalate 2Na	HomAD-DHPh 2Na		
IV	olean-11, 13(18)-diene-3β, 30-diol 3β, 30-di-O-hemiphthalate 2Na	HetAD-DHPh 2Na		

図 1 chemical structures of derivatives of glycyrrhetinate

材料と方法

本研究では、ミノファージェン製薬本舗より供与されたグリチルリチン類を使用した。

経鼻投与液は、pH 7.4 の0.01Mリン酸緩衝液またはグリチルリチン類を種々の濃度に添加した同緩衝液にウシインスリン(Sigma 社)を 100 U/ml となるように溶解し、インスリン溶液を調製した。

動物実験は、体重 200~250 g の Wistar 系雄性ラットを 1 夜絶食し、Hussain らの方法¹³⁾に準じ外科的処置を施したあと、*in vivo* 鼻粘膜吸収実験を行った。各インスリン溶液 0.1 ml/kg を鼻腔内に投与し、大腿静脈より経時的に採血した。

インスリンの血中濃度測定は、酵素免疫法(和光

純薬)により、血糖値はムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法(和光純薬)により測定した。

グリチルリチン類の吸収促進機構を検討する手始めとして、Ca²⁺キレート能¹⁴⁾、ロイシン・アミノペプチターゼ(LAP)活性阻害能¹⁵⁾および溶血性¹⁶⁾について検討した。また、すでに吸収促進剤として知られている中鎖脂肪酸であるカプリル酸 Na, カプリン酸 Na, およびラウリン酸 Na と比較した。

結 果

インスリンの経鼻吸収に及ぼす 3 種のグリチルリチン類の至適添加濃度について検討した結果を

図2 effect of concentration of promoters on nasal absorption of insulin (10 U/kg) in rats, (mean $\pm$ SEM, n=3~5)

図3 change in plasma IRI levels in rats after nasal administration of insulin (10 U/kg) with 1% promoters, n=3~6

図4 change in plasma glucose levels in rats after nasal administration of insulin (10 U/kg) with 1% promoters, n=3~6

図2に示す。

インスリン 10 U/kg 投与時のグリチルリチン類の添加濃度を0から4時間目までのインスリンの血中濃度—時間曲線下面積(AUC)で比較すると、GA-MHS 2Na および GA-HPh 2Na のいずれも添加濃度が1%のときに AUC は最大となり、2%では逆に減少した。また、DG-DHPh 2Na では0.5%と1%で AUC はほぼ同程度であった。したがって、これらの誘導体の至適添加濃度は1%であることが示唆された。そこで、5種のグリチルリチン類の添加濃度を1%(ただし、HetAD-DHPh 2Na は0.5%溶液)とし、インスリン 10 U/kg を鼻腔内に投与したときのインスリンの血中濃度—時間曲線を図3に示し、このときの血糖値の推移を図4に示す。インスリンの血中濃度は、GA-MHS 2Na では投与後15分で最高

値に達し、その濃度は約0.75 mU/mlであり、GA-HPh 2Na, HetAD-DHPh 2Na, HomAD-DHPh 2Na および DG-DHPh 2Na 添加時では、投与後30分でいずれも最高血中濃度に達し、その濃度はおのおの約0.92, 2.20, 3.80, 4.09 mU/mlであった。また、血糖値は、GA-MHS 2Na では投与後30分目にもっとも減少し、投与前の血糖値にくらべ約73%減少し、GA-HPh 2Na, HetAD-DHPh 2Na, HomAD-DHPh 2Na および DG-DHPh 2Na 添加時では投与後1時間目にもっとも減少し、投与前の血糖値にくらべおのおの約77%, 67%, 66%, 64%減少した。

以上の結果およびインスリンの投与量を2 U/kg, 5 U/kg としたときのインスリンの吸収率と血糖値の減少率(D%)を表1に示す。各グリチルリチン類とも投与量の増加とともに AUC も増加

表 1 absorption promoting effect of glycyrrhetic acid derivatives on insulin after nasal administration in rats

	promoter concn (%)	insulin dose (U/kg)	$t_{\max}$ (min)	$C_{\max}^{*1)}$ ($\mu\text{U/ml}$)	insulin ^{*1)} AUC_{0-4} ($\text{h}\cdot\mu\text{U/ml}$)	bioavail ^{*2)} ability (%)	$D^{*1,3)}$ (%)
none (control)	—	—	—	—	29±5.1	—	—
nasal							
none	—	10	60	49±11	172±14	2.0	3.9±11.0
GZ 2K	1.0	10	120	187±9	544±59	7.3	51.7±2.0
GA Na	0.5	10	30	228±59	498±141	6.6	40.0±7.6
GA-MHS 2Na	1.0	2	15	132±37	164±27	9.5	47.8±2.7
	1.0	5	15	247±35	301±27	7.7	54.9±5.3
	1.0	10	15	744±112	967±93	13.2	74.2±2.6
GA-HPh 2Na	1.0	2	5	92±4	249±43	15.5	50.6±4.3
	1.0	5	5	115±36	302±43	7.7	53.2±6.7
	1.0	10	30	922±182	1,571±136	21.7	81.6±1.8
DG-DHPh 2Na	1.0	2	15	183±14	172±21	10.1	35.3±4.9
	1.0	5	30	655±190	862±231	23.5	45.4±9.6
	1.0	10	30	4,092±946	6,678±1,095	91.4	71.9±4.2
HomAD-DHPh 2Na	1.0	2	15	176±34	178±16	10.5	24.9±3.9
	1.0	5	15	968±157	909±114	24.8	56.7±3.1
	1.0	10	30	3,794±351	6,922±1,176	97.2	61.8±2.0
HetAD-DHPh 2Na	0.5	10	30	2,214±287	4,332±940	60.7	70.3±4.6
i. v.	—	5	—	—	3,576±507	100	81.8±1.0
s. c.	—	5	15	3,352±1,017	1,456±260	40.2	76.2±4.4

*1) Each value is mean±S. E. M. for 3 to 6 animals.

*2) bioavailability : $(\text{AUC}_{\text{nasal}} - \text{AUC}_{\text{control}}) / (\text{AUC}_{\text{i. v.}} - \text{AUC}_{\text{control}}) \times 100$

*3) D is relative decrement of plasma glucose levels.

表 2 gram ions sequestered by 1 mol of promoters

promoter	Ca^{2+} (M)
	promoter (M)
GZ 2K	0.4237
GA Na	0.2533
GA-MHS 2Na	0.2284
GA-HPh 2Na	0.1874
HomAD-DHPh 2Na	0.1818
HetAD-DHPh 2Na	0.3380
DG-DHPh 2Na	0.2731
Na caprylate	0.0214
Na caprate	0.3508
Na laurate	0.4164

表 3 inhibitory effect of promoters on the leucine aminopeptidase activity in the rat nasal mucosa

promoter	IC_{50} (mM)
GZ 2K	1.079
GA Na	5.338
GA-MHS 2Na	0.064
GA-HPh 2Na	0.400
HomAD-DHPh 2Na	2.446
HetAD-DHPh 2Na	0.562
DG-DHPh 2Na	1.037
Na caprylate	43.747
Na caprate	10.911
Na laurate	34.388

したが、特に DG-DHPh 2Na および HomAD-DHPh 2Na での増加はいちじるしく、10 U/kg 投与でのインスリンの吸収率はのおおの約 91% および 97% であった。

一方、血糖値の減少率は、インスリン 5 U/kg 投与で約 50% であり、10 U/kg 投与で、約 60~80%

であった。したがって、DG-DHPh 2Na および HomAD-DHPh 2Na を 1% 添加することにより、インスリンの経鼻吸収はいちじるしく改善され、十分な血糖値の減少効果が得られることが示唆された。

グリチルリチン類の Ca^{2+} キレート能を表 2 に

表 4 effects of several promoters on hemolytic activity

promoter	hemolytic activity ED ₅₀ (ml/mg)
GZ 2K	<0.02
GA Na	1.10
GA-MHS 2Na	0.34
GA-HPh 2Na	4.31
HomAD-DHZh 2Na	13.33
HetAD-DHPh 2Na	128.21
DG-DHPh 2Na	238.10
Na caprylate	0.11
Na caprate	0.74
Na laurate	5.56

示す。Ca²⁺キレート能は0.18から0.43の間にあり、中鎖脂肪酸とほぼ同程度であった。

グリチルリチン類のLAP活性阻害能を表3に示す。50%阻害(IC₅₀)は0.05から5.5 mMの間にあった。中鎖脂肪酸にくらべ、非常に強く阻害することが認められた。

グリチルリチン類の溶血性を表4に示す。GZ 2Kは50%溶血(ED₅₀)が0.02 ml/mg以下となり、溶血が認められなかった。GA-MHS 2NaはED₅₀が0.34 ml/mg、GA-HPh 2Naは4.31 ml/mg、HomAD-DHPh 2Naは13.33 ml/mgであり、中鎖脂肪酸にくらべて溶血性は弱かったが、HetAD-DHPh 2NaおよびDG-DHPh 2Naは、おのおの128, 238 ml/mgと高い値を示した。

考 察

本研究室では、インスリンの経鼻吸収において、中鎖脂肪酸の至適添加濃度が1%であることをすでに報告した⁸⁾が、グリチルリチン類の至適添加濃度も、中鎖脂肪酸同様1%付近であることが示唆された。また、各グリチルリチン類を1%添加(HetAD-DHPh 2Naは0.5%溶液)したときのインスリンの血中濃度は、インスリン非投与群(control)やインスリン単独投与群(none)にくらべ、グリチルリチン類添加群で、いずれもいちじるしく高いインスリンの血中濃度が得られた。

本研究で用いたグリチルリチン類は、図1に示すようにその構造から二つに分類できる。一つはグリチルレチン酸を母核とし、その3位のOH基が修飾されたものと、もう一つはグリチルレチン

酸の母核が異なり、3位のOH基と30位のCH₂OH基が修飾されたものである。前者の吸収促進効果は、3位のOH基に付いたエステル体の違いによって差が認められ、GZ 2K<GA Na<GA-MHS 2Na<GA-HPh 2Naの順にインスリンの吸収は促進された。

一方、後者の誘導体は、前述の誘導体にくらべ、遥かにインスリンの吸収促進効果は強く、HetAD-DHPh 2Na<DG-DHPh 2Na<HomAD-DHPh 2Naの順であり、特に、DG-DHPh 2NaとHomAD-DHPh 2Na添加群において、もっとも高いインスリンの血中濃度が得られた。このインスリンの吸収に伴い、投与後30分～1時間でいちじるしい血糖値の減少が認められた。また、インスリンの投与量を、2, 5, 10 U/kgと変化させた場合、5 U/kgまでは用量依存的にAUCも増加したが、10 U/kgになるとAUCはいちじるしく増加したが、血糖値は容量依存的には低下しなかった。これは、インスリンの血中濃度がある濃度以上になると、インスリンレセプターに飽和がおこりその結果、血糖値の減少作用にも限界が生じてくるためであると考えられる。

薬物の吸収経路には、細胞間ルートと細胞内ルートの二つが知られている。細胞間ルートの吸収促進機構の一つに、吸収促進剤が細胞間の密着を保持するのに重要な役割をするCa²⁺やMg²⁺とキレートを形成し、細胞間隙が拡大し、吸収を促進すると考えられている¹⁴⁾。

グリチルリチン類のキレート能は、中鎖脂肪酸と同程度のキレート能を示すことが認められた。しかし、キレート能がもっとも高いGZ 2Kでは、インスリンの吸収はもっとも低く、キレート能がほぼ同程度のHomAD-DHPh 2NaとGA-HPh 2Naでは、インスリンの吸収はHomAD-DHPh 2NaがGA-HPh 2Naより約4.4倍高い結果となった。

また、グリチルレチン酸母核をもつ誘導体および母核が異なる誘導体にわけてみると、筆者らの予想と逆に、キレート能が低いほうがインスリンの吸収が良好であった。また、細胞間ルートを考えた場合、インスリンなどのペプチドを分解するLAPは鼻粘膜にも存在し、本酵素がインスリンのバイオアベイラビリティを低下させると考えら

れている。平井らは胆汁酸塩類に LAP 活性阻害作用のあることを報告している⁵⁾。そこで、LAP 活性阻害についても検討を試みた。グリチルリチン類の LAP 活性阻害は、中鎖脂肪酸にくらべ、かなり強かった。

グリチルリチン類の粘膜に対する作用を調べるために、赤血球の溶血性について検討した。溶血活性(ED₅₀)は、DG-DHPh 2Na, HetAD-DHPh 2Na, および HomAD-DHPh 2Na が中鎖脂肪酸にくらべかなり大きかった。溶血には浸透圧の関与が考えられるが、グリチルリチン類の浸透圧には差が認められず、グリチルリチン類による溶血は、浸透圧による影響よりも膜に対する直接作用によるものと思われる。

以上、グリチルリチン類の吸収促進機構についていくつか検討したが、今回の実験では、明確な結論には到達していない。しかし、グリチルリチン類がインスリンの吸収をいちじるしく促進させ、HomAD-DHPh 2Na や DG-DHPh 2Na 添加時には静注に匹敵する吸収率が得られたことは、インスリン点鼻の実用化に向けて1歩前進したと考えられる。

今後、吸収促進機構および鼻粘膜に対する刺激性について、さらに検討を加える必要がある。

文 献

- 1) Ichikawa, K. et al.: Rectal absorption of insulin suppositories in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 314-318, 1980.
- 2) Nishihata, T. et al.: Enhanced rectal absorption of insulin and heparin in rats in the presence of non-surfactant adjuvants. *J. Pharm. Pharmacol.* 33: 334-335, 1981.
- 3) Morimoto, K. et al.: Possible mechanisms for the enhancement of rectal absorption of hydrophilic drugs and polypeptides by aqueous polyacrylic acid gel. *J. Pharmacobio-Dyn.* 10: 85-91, 1987.
- 4) Hirai, S. et al.: Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 9: 165-172, 1981.
- 5) Hirai, S. et al.: Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharmaceut.* 9: 173-184, 1981.
- 6) Su, K. S. E. et al.: Nasal delivery of polypeptides. I. Nasal absorption of enkephalins in rats. *J. Pharm. Sci.* 74: 394-398, 1985.
- 7) Su, K. S. E. et al.: Intranasal delivery of peptides and proteins. *Pharmacy Int.* 7: 8-11, 1986.
- 8) Mishima, M. et al.: Studies on the promoting effects of medium chain fatty acid salts on the nasal absorption of insulin in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 10: 624-631, 1987.
- 9) Mishima, M. et al.: Promotion of nasal absorption of insulin by glycyrrhetic acid derivatives. I. *J. Pharmacobio-Dyn.* 12: 31-36, 1989.
- 10) Ishida, M. et al.: New mucosal dosage form of insulin. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 810-816, 1981.
- 11) Hirai, S. et al.: Nasal absorption of insulin in dogs. *Diabetes.* 27: 296-299, 1978.
- 12) 富澤摂夫, 原 幸男: Glycyrrhetic acid 誘導体の抗炎症作用. *応用薬理* 11: 677-692, 1976.
- 13) Hussain, A. et al.: Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs. *J. Pharm. Sci.* 69: 1411-1413, 1980.
- 14) 矢田 登・他: 吸収促進剤の作用機構. 第14回薬物代謝と薬効毒性シンポジウム要旨集, 1982, p 91-94.
- 15) 竹中守人, 高橋 浩: 新しい血清 leucine aminopeptidase 測定法. *医学と生物学* 65(4): 74-77, 1962.
- 16) 小木曾太郎: 赤血球の溶血活性測定法. *生物薬剤学実験マニュアル*. (後藤 茂編), 清至書院, 1985, p 103-104.