インスリンおよびカルシトニンの経鼻吸収に及ぼす
アズレンスルホン酸ナトリウムの吸収促進効果永野弘子・中野眞汎^{*1)}、三嶋基弘・都築脩三^{*2)}Hiroko Nagano・Masahiro Nakano^{*1)},
Motohiro Mishima・Osami Tsuzuki^{*2)}key words : insulin, calcitonin,
nasal absorption, absorption promoter,
sodium guaiazulene sulfonate

Studies on promoting effect of sodium guaiazulene sulfonate on nasal absorption of insulin and calcitonin

The promoting effect of sodium guaiazulene-3-sulfonate (AZ) on nasal absorption of insulin and calcitonin was studied in rats. The promoting effect of AZ was compared with two established nasal absorption promoters i. e. sodium caprate (Na Cap) and glycyrrhetic acid 3-O-monohephthalate disodium (GA-MHPH 2Na).

The nasal absorption of insulin was estimated from plasma immunoreactive insulin and changes in glucose levels. Plasma glucose level was decreased by intranasal administration of 10 U/kg insulin with 1% AZ. The extent of total decrement of glucose level to control was 51% and comparable to that with 1% Na Cap. The addition of 1% AZ to the nasal formulations enhanced insulin bioavailability from 3.7% to 27.6%.

The nasal absorption of salmon calcitonin was evaluated from serum calcitonin and changes in calcium levels. Serum calcium levels were decreased by intranasal administration of 10 U/kg salmon calcitonin in the presence of two already known promoters as effectively as intramuscular administration of the same dose. The addition of 1% AZ also showed the same extent of decrease as these; the extent of total decrement of serum calcium level to control was 26.6%.

The optimum concentration of AZ was about 1%. Intranasal administration of 1% AZ alone hardly changed plasma glucose level and serum calcium level from control. Hence, promoting effect of AZ on nasal absorption of insulin and calcitonin was proved. These findings indicate that AZ can be safe and effective nasal absorption promoter of peptides.

ペプチド類医薬品の注射以外の投与法の開発が望まれ、経皮吸収¹⁾ および経粘膜吸収の検討が進められている。後者の粘膜部位としては、直腸²⁾、腔³⁾、口腔⁴⁾、鼻⁵⁾、肺⁶⁾、眼⁷⁾ などが研究されている。ペプチド類は、これらの粘膜から単独でほとんど吸収されないが、吸収促進剤の添加により、良好な bioavailability を得ることが可能となった。

当研究室では、各種粘膜のなかでも吸収性が比較的良好である鼻粘膜に注目し、吸収促進剤の検討を進めてきた。しかし、平井ら⁸⁾ は、インスリンの鼻粘膜からの吸収は静注に対し 5% 程度と報告しており、吸収促進剤の添加は不可欠である。これまでにペプチド類の経鼻吸収促進剤として、界面活性剤、胆汁酸塩、サポニン類⁹⁾、中鎖脂肪酸塩⁹⁾、抗生物質であるバシトラシン¹⁰⁾ やフシジン酸誘導体¹¹⁾、アプロチニン¹²⁾ などの蛋白分解酵素阻害薬、グリチルリチン類¹³⁾、リソホスファチジルコリン¹⁴⁾、シクロデキストリン誘導体¹⁵⁾ など数多くの物質が検討されてきたが、臨床的に実用化されるに至っていない。その要因の一つとして、これらの促進剤を併用した製剤は、吸収性は良好でも粘膜刺激性の点で解決されていないことがあげられる。

そこで、本研究では、吸収性および安全性の点でよりすぐれた新しい吸収促進剤の探索を目的として、アズレンスルホン酸ナトリウム (AZ) に着眼し、インスリンおよびカルシトニンの経鼻吸収促進効果について、ラットを用いた *in vivo* 鼻粘膜

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

^{*2)} Department of Biopharmaceutics, Daiichi College of Pharmaceutical Sciences 第一薬科大学製剤学教室

吸収実験で検討した。

方法

(1) 吸収促進剤

日本新薬より供与されたアズレンスルホン酸 Na(AZ)を使用した。また、AZとの比較検討のため既知の吸収促進剤として、カプリン酸 Na(Na Cap, 東京化学工業)およびグリチルレチン酸 3-0-モノヘミフタレート 2Na(GA-MHPh 2Na, ミノファージェン製薬から供与)を使用した。

(2) 試料溶液

インスリン溶液は、ウシインスリン(和光純薬)を用い、既報⁹⁾の方法により調製した。カルシトニン溶液は、帝国臓器より恵与されたサケカルシトニン(SCT)溶液を用いて pH 7.4 のSCT 投与液となるよう調製した。ただし、SCT 溶液調製時に用いる容器は、すべてシラン処理をした⁴⁾。

(3) *in vivo* 鼻粘膜吸収実験

インスリン吸収実験では Wistar 系(体重 200～250 g)雄性ラットを、カルシトニン吸収実験では SD 系(5 週齢)雄性ラットを用いた。実験法は Hussain ら¹⁶⁾の方法に準じて行い、投与液量はインスリンおよびカルシトニンともに 0.1 ml/kg とした。ただし、カルシトニン吸収実験中はラットの体表を 37°C に保った。

また、静注および筋注時は鼻粘膜吸収実験と同様の手術を施し、それぞれ尾静脈、太股部筋肉内より投与した。血液は大腿静脈より経時的に採取し、血中濃度を測定した。血漿インスリン濃度は enzyme immunoassay 法(ダイナボット社)により、血清カルシトニン濃度は radioimmunoassay 法(ペニン斯拉社)により定量した。また、血糖値および血清カルシウム濃度は、おのおの市販の測定キット(和光純薬)により定量した。

有意差検定は、Student's *t*-test により行った。

結果

インスリンおよびカルシトニンの鼻粘膜吸収に及ぼす AZ の吸収促進効果について、既知の吸収促進剤である Na Cap および GA-MHPh 2Na と比較した結果を図 1 および図 2 に示す。1% AZ の添加は、インスリンの鼻粘膜吸収をいちじるしく促進し、投与後 2 時間目で血糖値は約 50% 減少

図 1 Plasma glucose levels after intranasal administration of insulin(10U/kg) in the presence of several absorption promoters in rats(n=3~5)

図 2 Serum calcium levels after intramuscular(i. m.) and intranasal(i. n.) administration of salmon calcitonin(10U/kg) in the presence of several absorption promoters in rats(n=3~5)

し、4 時間目でも減少率は約 40%であった(図 1)。また、その血糖降下作用は、1% GA-MHPh 2Na には及ばなかったが、1% Na Cap にほぼ匹敵し、4 時間目までの total の血糖値の減少率は 51.4%であった(表 1)。

カルシトニンの鼻粘膜吸収は、1% GA-MHPh 2Na および 1% Na Cap の添加により、いずれも同量のカルシトニン筋注時に匹敵する血清 Ca 濃度低下作用を示した。1% AZ の添加は、これら 2 種の促進剤にくらべて、血清 Ca 濃度の回復はやいものの、4 時間目までの total の血清 Ca 濃

表 1 Promoting effect of AZ on nasal absorption of insulin in rats

route	promoter		insulin dose U/kg	t _{max} min	C _{max} ^{*1)} μU/ml	IRI AUC ₀₋₄ ^{*4)} h · μU/ml	bioavailability %	D ^{*1,2)} %
	compound	conc. %						
intranasal	none (control)	0	0	—	—	-1.6±4.5	—	0
	none	0	10	120	29±9.0	94±37	3.7	13.9±5.1
	AZ	0.5	10	15	143±39	170±40	6.6	36.6±9.4
		0.75	10	15	194±27	182±43	7.1	43.9±8.5 ^{*3)}
		1.0	10	15	570±107	706±135 ^{*3)}	27.6	51.4±3.0 ^{*3)}
		1.5	10	15	589±88	523±106 ^{*4)}	20.4	46.0±7.3 ^{*4)}
		1.0	0	—	—	-2.5±16	—	3.3±8.5
		1.0	2	5	94±7.3	38±8.1	7.4	27.8±13.1
		1.0	5	15	282±47	249±30 ^{*3)}	19.5	34.5±10.1
	Na Cap	1.0	10	15	178±22	187±21	7.3	54.0±2.1 ^{*5)}
	GA-MHPh 2Na	1.0	10	30	908±180	1563±123 ^{*5)}	61.0	85.8±2.3 ^{*5)}
i. v.	—	—	2	—	—	512±130 ^{*3)}	100	62.2±3.6 ^{*5)}

*1) : Each value is the mean±SEM of 3 to 6 animals.

*2) : D is the extent of decrease in plasma glucose levels.

Significantly different from none(10 U insulin alone), *3) : P<0.05, *4) : P<0.01, *5) : P<0.001

表 2 Promoting effect of AZ on nasal absorption of SCT in rats

route	promoter		SCT dose U/kg	t _{max} min	C _{max} ^{*1)} pg/ml	SCT AUC ₀₋₄ ^{*1)} h · pg/ml	D ^{*1,2)} %
	compound	conc. %					
intranasal	none (control)	0	0	—	—	334±25	0
	none	0	10	15	11.8±3.7	359±21	10.7±3.0
	AZ	0.25	10	—	—	—	19.3±3.2
		0.5	10	—	—	—	20.3±3.8
		0.75	10	—	—	—	23.6±5.2
		1.0	10	15	44.2±2.9 ^{*5)}	623±29 ^{*5)}	26.6±2.6 ^{*3)}
		1.0	0	—	—	—	8.6±2.2
		1.0	2.5	—	—	—	11.6±2.6
		1.0	5	—	—	—	14.1±6.5
		1.0	7.5	—	—	—	16.9±3.1
	Na Cap	1.0	10	—	—	—	27.7±1.3 ^{*4)}
	GA-MHPh 2Na	1.0	10	—	—	—	31.1±1.0 ^{*4)}
i. m.	—	—	0.5	—	—	—	0.3±4.2
	—	—	5	—	—	—	10.2±4.4
	—	—	10	—	—	—	27.9±7.7

*1) : Each value is the mean±SEM of 3 to 5 animals.

*2) : D is the extent of decrease in serum calcium levels.

Significantly different from none(10U SCT alone), *3) : P<0.05, *4) : P<0.01, *5) : P<0.001

度の減少率は 26.6%であり, GA-MHPh 2Na の 31.1%, Na Cap の 27.7% とほぼ同程度であった (図 2, 表 2)。

一方, AZ 単独経鼻投与では, 血糖値および血清 Ca 濃度にほとんど影響を及ぼさなかった。したがって, AZ がインスリンおよびカルシトニンの

鼻粘膜吸収を促進することが明らかとなった。

そこで, AZ の吸収促進効果について詳細に検討した。まず, インスリン溶液への AZ の添加濃度の影響を図 3 に示す。AZ の添加濃度は 0.5, 0.75, 1.0 および 1.5%とし, 各濃度の AZ 添加インスリン経鼻投与後の血漿中インスリン濃度を(a)

図3 Change in plasma IRI levels(a) and plasma glucose levels(b) after intranasal administration of 10U/kg insulin in the presence of various concentrations of AZ in rats (n=3~5)

図4 Change in plasma IRI levels(a) and plasma glucose levels(b) after intranasal administration of several doses of insulin with 1% AZ in rats (n=3~4)

に、血糖値推移を(b)に示す。両者はよく相関しており、1.0%添加時に最大の吸収量を示し、血糖値の減少率も同様であった。このときのインスリンの bioavailability は、静注に対し、インスリン単独経鼻投与時に 3.7%であったのが、1% AZ 添加により 27.6%まで増大した(表1)。

そこで、AZ の添加濃度を 1%と定め、インスリンの投与量と吸収量および薬理効果の関係を図4に示す。インスリンの投与量を 2, 5, および 10 U/

kg とし、1% AZ 添加インスリン経鼻投与後の血漿中インスリン濃度を(a)に、血糖値推移を(b)に示す。インスリンの投与量の増加に伴いインスリンの吸収量は増大し、血糖値減少率も同様に増大した。また、インスリン吸収量は、AZ 無添加のインスリン 10 U/kg 単独経鼻投与時に対して、5 U/kg 投与ですでに有意に増大した(表1)。

カルシトニン溶液への AZ の添加濃度の影響を図5に示す。AZ の添加濃度は 0.25, 0.5, 0.75 お

図5 Change in serum calcium levels after intranasal administration of 10U/kg SCT in the presence of various concentrations of AZ in rats (n=3~5)

図6 Change in serum calcium levels after intranasal administration of several doses of SCT with 1% AZ in rats (n=3~5)

図7 Change in serum SCT levels after intranasal administration of 10U/kg SCT with and without 1% AZ in rats (n=3~4, mean±SEM)

1%付近にあると考えられる。

これらの結果より、AZの添加濃度を1%と定め、カルシトニンの投与量と薬理効果の関係を図6に示す。カルシトニン投与量を2.5, 5, 7.5および10 U/kgとし、1% AZ添加カルシトニン経鼻投与後の血清Ca濃度推移を示す。その減少率は投与量の増加に伴い増大し、その最大値は10 U/kg投与時で26.6%を示した(表2)。そこで、血清Ca濃度減少率の最大値を示した1%AZ添加時の、カルシトニン経鼻投与後の血清中カルシトニン濃度時間推移を図7に示す。カルシトニンの血清中濃度は投与15分後に最大となり、AUC値ともに、カルシトニン単独経鼻投与時に対し、有意に増大した(表2)。

考 察

本研究により、AZはインスリンおよびカルシトニンの鼻粘膜吸収においてすぐれた促進効果を示すことが明らかとなった。

当研究室では、甘草成分であるグリチルリチン類やグリチルレチン酸誘導体がインスリンの経鼻吸収を促進させることを以前に報告した¹³⁾。

本研究で吸収促進剤としての検討を行ったAZは、カミツレの有効成分として知られる“アズレン”の誘導体で、グリチルリチン類と同様に抗炎症作用を示すものである¹⁸⁾。グリチルリチン類の吸収促進機構については、膜に対する直接作用とペプチド分解酵素の阻害作用などを指摘してはい

および1.0%とし、各濃度のAZ添加カルシトニン経鼻投与後の血清Ca濃度推移として示す。血清Ca濃度の減少率は、AZの添加濃度増加に伴い増大し、1%添加時に最大値を示した。AZの水に対する溶解度は約1.4%で、溶媒中に存在するイオン濃度の上昇に伴い、溶解度はいじむるしく減少すると報告されている¹⁷⁾。本研究で用いた10 mMリン酸緩衝液中でのAZの溶解度は1.4%以下になり、1.5%添加時ではAZが過飽和状態にあったためにインスリンの吸収量が減少したと考えられ、カルシトニン投与時にはAZ添加濃度の上限を1%とした。インスリンおよびカルシトニンの吸収において両方ともに、1%添加時に最大の効果を示していることから、AZの至適添加濃度は

るが、明確な機構解明には至っていない。AZの吸収促進機構については今後の検討事項であるが、両者とも消炎作用、抗潰瘍作用などを示し、膜の修復促進に寄与する作用がある。その反面、膜に対してなんらかの作用を及ぼし、一時的にでも膜構造をルーズにしていると考えられる吸収促進剤としての作用も発揮するということは、非常に興味深いものである。抗炎症作用を示すAZは、抗潰瘍剤以外にも口腔錠や点眼剤などの製剤として市販されている。その医薬品としての非臨床試験において、眼粘膜刺激作用、口腔粘膜障害作用は認められていないことから、鼻粘膜に対する刺激性も比較的弱いものと考えられる。この点からも、AZが安全かつ有効な新規の吸収促進剤となりうる事が示唆された。

しかし、インスリンやカルシトニンなどのペプチド類医薬品は、临床上、多くの場合長期投与を必要としているため、長期投与における鼻粘膜に対する刺激性、障害性について、今後さらに検討を加える必要がある。

文 献

- 1) Ogiso, T., Iwaki, M., Yoneda, I., Horinouchi, M., Yamashita, K.: Percutaneous absorption of calcitonin and hypocalcemic effect in rat. *Chem. Pharm. Bull.* 39 : 449-453, 1991.
- 2) Morimoto, K., Hama, I., Nakamoto, Y., Takeeda, T., Hirano, E. et al.: Pharmaceutical studies of polyacrylic acid aqueous gel bases: absorption of insulin from polyacrylic acid aqueous gel bases following rectal administration in alloxan diabetic rats and rabbits. *J. Pharmacobio-Dyn.* 3 : 24-32, 1980.
- 3) Morimoto, K., Takeeda, T., Nakamoto, Y., Morisaka, K.: Effective vaginal absorption of insulin in diabetic rat and rabbits using polyacrylic acid aqueous gel bases. *Int. J. Pharmaceut.* 12 : 107-111, 1982.
- 4) Nakada, Y., Awata, N., Nakamichi, C., Sugimoto, I.: The effect of additives on the oral mucosal absorption of human calcitonin in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11 : 345-401, 1988.
- 5) Hirai, S., Ikenaga, T., Matsuzawa, T.: Nasal absorption of insulin in dogs. *Diabetes* 27 : 296-299, 1978.
- 6) Adjei, A., Doyle, R., Pratt, M., Finley, R., Johnson, E.: Bio availability of leuprolide following intratracheal administration to beagle dogs. *Int. J. Pharmaceut.* 61 : 135-144, 1990.
- 7) Yamamoto, A., Luo, A. M., Dodda-kashi, S., Lee, V. H. L.: The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249 : 249-255, 1989.
- 8) Hirai, S., Yashiki, O., Mima, H.: Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 9 : 165-172, 1981.
- 9) Mishima, M., Wakita, Y., Nakano, M.: 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.
- 10) Raehs, S. C., Sandow, J., Wirth, K., Markle, H. P.: The adjuvant effect of bacitracin on nasal absorption of gonadorelin and buserelin in rats. *Pharm. Res.* 5 : 689-693, 1988.
- 11) Longenecker, J. P., Moses, A. C., Flier, J. S., Silver, R. D., Carey, M. C. et al.: Effects of sodium taurodehydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep. *J. Pharm. Sci.* 76 : 351-355, 1987.
- 12) Aungust, B. J., Rogers, N. J.: Site dependence of absorption-promoting actions of laureth-9, Na salicylate, Na₂ EDTA, and aprotinin on rectal, nasal and buccal insulin delivery. *Pharm. Res.* 5 : 305-308, 1988.
- 13) Mishima, M., Okada, S., Wakita, Y., Nakano, M.: Promotion of nasal absorption of insulin by glycyrrhetic acid derivatives. I. *J. Pharmacobio-Dyn.* 12 : 31-36, 1989.
- 14) Illum, L., Farraj, N. F., Critchley, H., Johansen, B. R., Davis, S. S.: Enhanced nasal absorption of insulin in rats using lysophosphatidylcholine. *Int. J. Pharmaceut.* 57 : 49-54, 1989.
- 15) Merkus, F. W. H. M., Verhoef, J. C., Romeijn, S. G., Schipper, G. M.: Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats. *Pharm. Res.* 8 : 588-592, 1991.
- 16) Hussain, A., Hirai, S., Bawarshi, R.: Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs. *J. Pharm. Sci.* 69 : 1411-1413, 1980.
- 17) Seki, J., Mukai, H., Sugiyama, M.: Studies on the absorption of sodium guaiazulene-3-sulfonate. II. Absorption mechanism from nasal and intestinal membrane. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8 : 337-343, 1985.
- 18) 山崎英正, 入野昭三, 宇田昭夫, 内田可亮, 大野博之・他: Guaiazulene の薬理, 特に抗炎症作用と Histamine 遊離抑制作用. *日薬理誌* 54 : 362-377, 1958.