◇◇平成 8 年度日本薬物動態学会奨励賞受賞論文◇◇

生理活性ペプチドの経粘膜吸収改善に関する研究

山本 昌

Improvement of Transmucosal Absorption of Peptide and Protein Drugs

Akira YAMAMOTO

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto

Summary: It is well known that the oral bioavailability of peptide and protein drugs is generally poor because they are extensively degraded by proteases in the gastrointestinal tract and impermeable through the intestinal mucosa. Consequently, although the clinical administration of peptides is presently limited to administration by injection, such frequent administration subjects the patients to considerable pain, and there is also the possibility of the manifestation of serious side effects. Therefore, various approaches have been examined to overcome the delivery problems of these peptides. These approaches include (1) to use additives such as absorption enhancers and protease inhibitors, (2) to develop an administration method for peptides that can serve as an alternative to oral and injection administration, (3) to modify the molecules of peptide and protein drugs to produce prodrugs and analogues, and (4) to use the dosage forms to these peptide drugs. Of all these approaches, we examined the approaches (1)–(3) and demonstrated that transmucosal absorption of various peptides such as insulin, calcitonin, tetragastrin and thyrotropin releasing hormone (TRH) could be improved by using these approaches. Therefore, these approaches may give us basic information to improve the transmucosal absorption of peptide and protein drugs.

Key words: Drug absorption, Transmucosal absorption, Peptide drug delivery, Peptide stability, Absorption enhancement, Absorption enhancer, Protease inhibitor, Pulmonary absorption, Chemical modification, Acylation

はじめに

近年、微量で強力な生理活性を有するペプチドが数多く発見され、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。しかしながら、こうしたペプチド性医薬品は経口投与後、消化管内の消化酵素やタンパク分解酵素により速やかに分解を受けたり、あるいは水溶性で高分子であるため消化管粘膜を透過しにくいことが知られている。このため、これら医薬品の経口投与後の吸収率は十分でなく、これら医薬品の投与法は臨床上ほとんどすべてが筋肉投与や皮下投与などの注射に限られているのが現状である。しかしながら、これら注射による投与は患者に苦痛を伴い、また重篤な副作用を発現するという欠点を有する。そこで最近では経口ならびに経粘膜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。これらのアプローチは、(1) 吸収促進剤、タンパク分解酵素阻害剤などの添加物の利用¹⁻¹³⁾、(2)

生理活性ペプチドの新規投与経路の開発¹⁴⁻²²⁾、(3) 生理活性ペプチドの化学修飾²³⁻³²⁾、(4) 生理活性ペプチドの剤形修飾などに分類できる。これらアプローチのうち、我々は主に(1)~(3)について検討してきた。そこで本稿では、タンパク分解酵素阻害剤による生理活性ペプチドの消化管吸収性の改善、生理活性ペプチドの経肺吸収、大腸特異的送達法の開発、ならびに脂肪酸修飾による生理活性ペプチドの消化管吸収性の改善についての成果の概略について紹介する。

タンパク分解酵素阻害剤による生理活性ペプチドの消化管吸収改善

既に述べたように、生理活性ペプチドは経口投与後、安定性や消化管粘膜透過性が低く、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^{4,5)}。そのため現在、ペプチド性医薬品の経口投与後の吸収率を改善する方法の一つとして、各種吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤などの添加物の利用が試みられている。このうち、タ

ンパク分解酵素阻害剤の利用は、特に消化管内で比較的不安定な生理活性ペプチドの吸収改善に有効であると思われるが、これら酵素阻害剤によるペプチドの消化管吸収改善を左右する要因やその吸収改善機構について現在までに系統的に研究した例はほとんど認められなかった。我々はこうした観点からインスリン、カルシトニンの消化管吸収に及ぼす各種タンパク分解酵素阻害剤の影響について検討し、これらペプチドの大腸からの吸収が小腸に比べ各種阻害剤により顕著に改善され、タンパク分解酵素阻害剤の効果が部位差がみられることを見いだした¹⁰⁾。Fig. 1 はインスリンの消化管吸収に及ぼすタンパク分解酵素阻害剤の影響について検討したものである。吸収実験は *in situ* 腸管ループ法を用い、小腸ならびに大腸にループを作成後、ループ内に薬液を投与することにより行った。その結果、小腸ループ内にインスリンを単独投与しても血糖降下作用は観察されなかった。また小腸において、インスリンに各種タンパク分解酵素阻害剤を併用した場合においてもほとんど血糖値の低下はみられず、これら阻害剤はインスリンの小腸からの吸収を改善しないことが明らかとなった。一方、大腸において同様の実験を行ったところ、インスリンの単独投与では小腸と同様、血糖降下作用は観察されなかったのに対し、sodium glycocholate, camostat mesilate および

bacitracin などのタンパク分解酵素阻害剤の併用により顕著な血糖降下作用が観察された。したがってインスリンの場合、タンパク分解酵素阻害剤の効果は小腸よりも大腸において顕著に発現することが明らかとなった。また、こうした酵素阻害剤の効果は、酵素阻害剤の濃度や対象となるペプチドの種類に依存することが明らかとなった。一方、消化管腔内、消化管粘膜中におけるこれらペプチドの安定性を評価したところ、これらペプチドの安定性が各種タンパク分解酵素阻害剤により抑制されることが認められた^{9,10)}。したがって、これらタンパク分解酵素阻害剤は、ペプチドを安定性を改善することにより吸収性を増大させることが示唆された。さらに最近我々は、こうしたタンパク分解酵素阻害剤の一部が、消化管内で安定な水溶性薬物の吸収を増大させる作用を有することを見いだした¹³⁾。Fig. 2 は phenol red の小腸ならびに大腸投与後の血漿中濃度に及ぼす各種蛋白分解酵素阻害剤の効果を示したものである。小腸における phenol red の吸収はタンパク分解酵素阻害剤である 10 mM, 20 mM bacitracin の添加によりコントロールに比べ増大したが、STI, aprotinin の場合には吸収促進効果は認められなかった。また、大腸においても同様の傾向がみられたが、大腸では 20 mM の bacitracin を併用した際の phenol red の血漿中濃度が他の阻害剤併用時に

Fig. 1 Concentration-time profile of glucose in plasma after large intestinal administration of insulin in the presence of various protease inhibitors. (○) Control, (△) 20 mM Na-glycocholate, (▲) 10 mM bacitracin, (●) 20 mM bacitracin, (□) 10 mg/ml aprotinin, (■) 20 mM camostat mesilate, (▽) 1.5 mg/ml soybean trypsin inhibitor, (▼) 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor. The glucose concentrations were expressed as percentage values of that at time zero. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 4 rats.

Fig. 2 Plasma concentration-time profiles of phenol red after (a) small or (b) large intestinal administration in the presence of various protease inhibitors. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. (○) Control, (□) 10 mM bacitracin, (■) 20 mM bacitracin, (○) 0.5 mg/ml aprotinin, (△) 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor.

比で顕著に高くなった。Phenol red は消化管内で安定であり、また同様の結果が消化管で安定な水溶性高分子物質である fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (平均分子量約4,000, FD-4) でも観察されたことから、これら阻害剤が本来のタンパク分解酵素阻害作用のみならず吸収促進作用も有していることが明らかとなった。

生理活性ペプチドの新規投与経路の開発 (経肺吸収ならびに大腸特異的送達法)

生理活性ペプチドの経口、注射以外の投与部位として、現在までに鼻、口腔、眼、腔、直腸などの各種粘膜吸収部位が検討されている。しかしながらこれら吸収経路からのペプチドの吸収率は、注射による投与の場合に比較すると十分でなく、より吸収の良好な経粘膜吸収経路の開発が望まれている。

こうした観点から、我々は生理活性ペプチドの注射以外の投与部位として、解剖学的に薬物の吸収部位として有望な肺に着目し、生理活性ペプチドの経肺吸収に関して *in vivo* および *in vitro* の両面から系統的な検討を行った¹⁴⁻²²⁾。まず *in vivo* 実験系においてインスリン、カルシトニンなどの生理活性ペプチドの経肺吸収性を検討し、これら薬物の経肺吸収が消化管をはじめとする他の経粘膜吸収経路に比べきわめて良好であることを明らかにした。また、これらペプチドの経肺吸収性が各種吸収促進剤ならびにタンパク分解酵素阻害剤の併用により改善され、なかでも吸収促進剤である n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (LM) やタンパク分解酵素阻害剤であ

る bacitracin の併用により顕著な改善が認められ、その吸収性は静脈内投与時に匹敵することが明らかとなった^{17,18)}。Table I はカルシトニンの経肺吸収に及ぼす各種吸収促進剤の影響を示したものである。この場合、経肺吸収実験は *in vivo* 気管内投与法により行い、血漿中の Ca^{2+} 濃度を測定することによりカルシトニンの経肺吸収性を評価した。その結果、カルシトニンの経肺吸収はキレート剤である EDTA, sodium salicylate (Na-Sal), および脂肪酸である sodium Caprate (Na-Cap) を併用しても影響が認められなかったが、LM, sodium glycocholate (Na-GC), 脂質-界面活性剤混合ミセルである mixed micelle (MM) の併用により顕著に増大す

Table I Effects of Various Absorption Enhancers on the Pulmonary Absorption of [Asu¹⁻⁷]eel-calcitonin

Absorption Enhancers	Conc.	%Reduction of Ca Conc. (A%)	PA% ^{a)}
Control		3.5 $\pm$ 1.3	13.2
LM	1 mM	11.9 $\pm$ 1.3**	44.7
	5 mM	20.1 $\pm$ 1.1***	75.6
	10 mM	21.7 $\pm$ 2.4***	81.7
Na-GC	10 mM	14.1 $\pm$ 2.0**	52.9
MM	10 mM	13.9 $\pm$ 2.2**	52.3
EDTA	10 mM	6.4 $\pm$ 0.8	24.0

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, compared with the control.

The A% values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of 4 experiments.

a) Pharmacological availability % = $\frac{\text{A\% pul.} \times \text{Dose i.v.}}{\text{A\% i.v.} \times \text{Dose pul.}} \times 100$

Fig. 3 Pharmacological availability (P.A. %) of insulin administered orally with various additives using chitosan capsules. a) Sodium glycocholate, b) Sodium oleate, c) n-dodecyl- β -D-maltopyranoside, d) Soybean trypsin inhibitor. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, compared with the administration of chitosan capsules (insulin 20 IU). Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

ることが明らかとなった。こうした結果は、従来消化管からほとんど吸収されない高分子の生理活性ペプチドの臨床適用に際し、新しい投与方法の可能性を示唆するものと考えられる。

一方、我々は最近、アフリカツメガエルの肺組織、ヒト肺癌細胞由来の上皮様細胞株 A-549 細胞、ラット肺細胞培養上皮細胞膜 (RAEM) を用いた薬物の *in vitro* 肺上皮細胞透過実験法を確立し、各種薬物の肺組織透過性やその透過性に及ぼす各種添加物の影響について検討した²¹⁾。その結果、これら方法により得られた結果は、*in vivo* の実験結果ときわめて高い相関性が認められることが明らかになった。したがってこうした結果から、今回得られた *in vitro* の情報を *in vivo* で経肺投与後のペプチド性医薬品の体内動態解析にフィードバックすることが可能であり、これら *in vitro* 実験系はペプチド性医薬品の経肺吸収性をスクリーニングするための有力な評価系になるものと考えられる。

さらに近年、生理活性ペプチドをタンパク分解酵素活性の低い大腸に特異的に送達する試みがなされているが、我々は大腸に存在する腸内細菌により特異的に崩壊するキトサンを素材としたカプセルを用い、インスリンの大腸からの吸収性を改善できることも明らかにしている。Fig. 3 にインスリンおよび各種添加剤を封入し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 pharmacological availability (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インスリン単独に比べて 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 > n-dodecyl- β -D-maltopyranoside、タンパク分解酵素阻害剤では bacitracin > aprotinin > soybean trypsin inhibitor の順となった。中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。したがってこうした生理活性ペプチドの経口投与製剤が可能になれば、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。

脂肪酸を用いた化学修飾による生理活性ペプチドの消化管吸収の改善

生理活性ペプチドの消化管吸収を改善する方法として、吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤などの添加物を利用する方法とともにペプチド自体の分子構造に修飾を加え、その物理化学的性質を変化させる化学修飾の方法が挙げられる。この方法はペプチドの選択的な吸収改善が達成でき、粘膜への傷害性が少ないことからきわめて有用な方法であると思われる。こうした観点から我々はインスリン、テトラガストリンなどの各種生理活性ペプチドに鎖長の異なる各種脂肪酸を導入し、消化管吸収の改善を試みた²³⁻³²⁾。一例としてインスリン (bovine insulin; MW = 5730) の場合について紹介する。まずインスリンに鎖長の異なる脂肪酸を導入することによりアシルインスリンを合成した。この際、脂肪酸として C6 のカプロン酸、C12 のラウリン酸、C16 のパルミチン酸を選び、これら脂肪酸をアジド法によりそれぞれ 1 あるいは 2 分子導入した Cap₁-Ins, Cap₂-Ins, Lau₁-Ins, Lau₂-Ins, Pal₁-Ins, Pal₂-Ins を合成した²⁷⁾ (Fig. 4)。脂肪酸修飾を施した後のペプチドの残存活性は、それぞれの未修飾ペプチドを静脈内投与後の薬理活性 (血糖降下作用) を 100% として評価した。その結果、全体的に脂肪酸の個数および炭素鎖長の増大に伴いそれらの活性は低下する傾向を示したが、Cap₁-Ins, Cap₂-

Ins : $R_1 = R_2 = H -$
 Cap₁-Ins : $R_1 = CH_3(CH_2)_4CO- \quad R_2 = H -$
 Cap₂-Ins : $R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_4CO-$
 Lau₁-Ins : $R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_{10}CO- \quad R_2 = H -$
 Lau₂-Ins : $R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_{10}CO-$
 Pal₁-Ins : $R_1 = CH_3(CH_2)_{14}CO- \quad R_2 = H -$
 Pal₂-Ins : $R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_{14}CO-$

Fig. 4 Structure of insulin and its acyl derivatives.

Fig. 5 Transport of insulin and its acyl derivatives across (a) the duodenal and (b) the colonic mucous membrane. The error bar represents the mean $\pm$ S.E. of three or four experiments. (○) Native insulin, (▲) Cap₁-Ins, (△) Cap₂-Ins

Ins, および Lau₁-Ins は比較的高い活性を保持していることが確認された²⁹⁾。

そこで次に薬理活性が比較的保持されていたインスリンのカプロイル誘導体を選び、消化管吸収性を検討した。その結果、小腸での Cap₁-Ins および Cap₂-Ins の Pharmacological availability % (PA%) は、未修飾インスリンと比較して4.8倍、7.2倍とそれぞれ高い値を示したが、それらの PA% は約0.16%であり、脂肪酸修飾により吸収は改善されたものの十分な吸収率は得られなかった。一方、Cap₂-Ins の大腸ループ投与後の PA% は、もとのインスリンと比べ11.7倍高い値を示し、約1.06%にまで改善された²⁹⁾。

次にこれらカプロイル化インスリンの粘膜透過性について *in vitro* Ussing chamber 法を用いて検討した。Fig.

5 はインスリンおよびカプロイル化インスリンの十二指腸ならびに結腸粘膜透過性を示したものである。十二指腸、結腸ともにこれらペプチドの透過性は Cap₂-Ins > Cap₁-Ins > インスリンの順となり、*in situ* ループ内投与実験の結果と同様の傾向が確認された。また十二指腸における Cap₁-Ins および Cap₂-Ins の粘膜透過係数 (Papp) はインスリンと比較してそれぞれ2.1倍、3.4倍、また結腸におけるこれら誘導体の透過係数はそれぞれ4.4倍、7.8倍の値を示した²⁹⁾。以上の結果からこうしたインスリンの粘膜透過性は脂肪酸修飾による脂溶性の増大により顕著に改善されることが明らかとなった。

次に小腸管腔内および小腸粘膜ホモジネート中における各種脂肪酸修飾インスリン誘導体の安定性実験について検討を行うとともに、インスリンの安定性および会合

Table II Half-lives for proteolysis of insulin and its acyl derivatives in the homogenates of various intestinal mucosae

	Duodenum		Jejunum		Ileum	
	$t_{1/2}$ (min)	Ratio	$t_{1/2}$ (min)	Ratio	$t_{1/2}$ (min)	Ratio
Native insulin	58.0 ± 2.3	1.00	20.5 ± 1.7	1.00	63.0 ± 1.1	1.00
Cap ₁ -Ins	72.4 ± 5.7	1.21	28.8 ± 1.4*	1.41	82.9 ± 4.2*	1.32
Cap ₂ -Ins	68.4 ± 4.4	1.18	27.9 ± 4.1	1.36	26.0 ± 0.4***	0.41
Lau ₁ -Ins	143.2 ± 4.6***	2.47	20.3 ± 3.9	0.99	107.5 ± 9.3*	1.71
Lau ₂ -Ins	29.8 ± 1.7***	0.51	6.9 ± 1.0**	0.34	21.2 ± 2.4***	0.34
Pal ₁ -Ins	199.3 ± 15.7**	3.44	35.2 ± 3.7*	1.72	152.7 ± 6.4***	2.42

Results are expressed as means ± S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the half-life of proteolysis of native insulin.

Fig. 6 Circular dichroic spectra of 0.05 mM (A) insulin and monoacyl derivatives and (B) insulin and diacyl derivatives.

性に及ぼす脂肪酸修飾の影響を円二色性 (CD) スペクトルを用いて検討した²⁷⁾。Table II にインスリンおよび脂肪酸修飾インスリンの小腸管腔内液中および小腸粘膜ホモジネート中での分解半減期を示した。モノアシル化体においては脂肪酸の鎖長の増大に伴い分解半減期の延長傾向が認められるのに対し、ジアシル化体においては未修飾インスリンと同程度もしくは逆に分解が促進される傾向が認められた。そこでこうしたジアシル化インスリンの低い安定性についてさらに検討するため、インスリンおよび各脂肪酸修飾インスリンの会合性を CD スペクトルを用いて検討した (Fig. 6)²⁷⁾。インスリンは pH 7 付近においては大部分が 6 量体で存在することが知られているが、その 6 量体はまず B-鎖の C 末端側同士の疎水結合により 2 量体が形成され、その後 B-鎖の C 末端側 (B23-28) と B 鎖の N 末側に存在する芳香族アミノ酸残基間の疎水結合により 4 量体、6 量体が形成

されることが明らかとなっており、この疎水結合が anti-parallel β 構造をとることにより 270 nm 付近に円二色性を示すようになる。したがって 270 nm 付近の負の吸収スペクトルの減衰は、インスリンの会合が抑制されていることを示唆する。モノアシル化体、ジアシル化体双方とも 270 nm 付近の負の吸収スペクトルの減衰が認められ、特に Lau₂-Ins, Pal₂-Ins のジアシル化体において顕著であった (Fig. 6)²⁷⁾。こうした結果はインスリンの会合性が脂肪酸修飾、とりわけ B1-Phe と B29-Lys への脂肪酸の導入により顕著に抑制されることを示すものであり、ジアシル化体は B29-Lys に導入された脂肪酸による立体障害が 2 量体の形成を、モノアシル化誘導体の場合は B1-Phe に導入された脂肪酸が 2 量体形成後の 4 量体、6 量体の形成を立体的に障害していると考えられる。したがって、ジアシル化体が小腸管腔内および粘膜ホモジネート中で不安定であった主要因が

会合性の抑制によることが示唆された。しかしながら、モノアシル化体においてもその会合性が若干抑制されているにもかかわらず、未修飾インスリンよりも安定であったことから必ずしも会合性のみで説明することはできず、脂肪酸の導入による分解酵素に対する抵抗性が増大することも無視できないと思われる。このように、インスリンのアシル化修飾は安定性に対し不利になる場合もみられるが、吸収性に関しては増大がみられることからインスリンの消化管吸収の改善に有用な方法であると考えられる。

同様の結果がアミノ酸4個から構成されているテトラペプチドであるテトラガストリンについても認められ、アシル化誘導体の吸収性はもとのペプチドに比べ増大することが明らかとなった^{25,28)}。また、これら誘導体の吸収促進機構を解析したところ、脂肪酸修飾による薬物の脂溶性の増大とともに各種タンパク分解酵素に対する安定性が増大することが明らかとなった。さらに、Caco-2 培養細胞系を用いた実験においても脂肪酸修飾テトラガストリンの透過性が増大することが明らかとなったが、この結果をモデルを用いて解析したところ、これら修飾ペプチドの透過性の増大には修飾による安定性の増大や誘導体自身の透過促進作用が大きく寄与していることが認められた。

一方、担体輸送により輸送される TRH³²⁾、Phenylalanyl-glycine (Phe-Gly) の透過性も脂肪酸修飾により増大し、brush border membrane vesicle (BBMV) を用いた取り込み実験から、脂肪酸修飾 Phe-Gly はもとの化合物と同様、小腸に存在するオリゴペプチドトランスポーターを介して一部輸送されている可能性が示唆された。したがって脂肪酸修飾によるアプローチは、受動輸送で輸送されるペプチドの消化管吸収改善のみならず、担体輸送で輸送されるペプチドに対しても有効な方法であると思われる。但し、こうしたペプチドの脂肪酸修飾による消化管吸収の改善の効果は、用いたペプチドの種類、脂肪酸の鎖長、導入部位などに依存するため、それぞれのペプチドに対して最適の条件を選択する必要があると思われる。

おわりに

以上、本稿ではタンパク分解酵素阻害剤による生理活性ペプチドの消化管吸収性の改善、生理活性ペプチドの経肺吸収、大腸特異的送達法の開発、ならびに脂肪酸修飾による生理活性ペプチドの消化管吸収性の改善に関する概略について述べてきた。こうした各種アプローチは現在いまだ動物実験の段階であるが、本研究で得られた知見はこれら生理活性ペプチドの経口製剤を始めとする経粘膜吸収製剤を開発する上で有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

謝 辞：本研究は、京都薬科大学製剤学教室において行われたものであり、研究を遂行するにあたり終始御指導御鞭撻を賜りました京都薬科大学製剤学教室教授村西昌三先生に衷心より感謝申し上げます。また、研究に御協力いただいた教室員の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yamamoto, A., Luo, A. M., Dodd-Kashi, S. and Lee, V. H. L.: The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**: 249-255 (1989).
- 2) Hayakawa, E., Yamamoto, A., Shoji Y. and Lee, V. H. L.: Effect of sodium glycocholate and polyoxyethylene-9-lauryl ether on the hydrolysis of varying concentrations of insulin in the nasal homogenates of the albino rabbit. *Life Sci.*, **45**: 167-174 (1989).
- 3) Yamamoto, A., Hayakawa, E. and Lee, V. H. L.: Insulin and proinsulin proteolysis in mucosal homogenate of the albino rabbit: implication in peptide delivery from nonoral routes. *Life Sci.*, **47**: 2465-2474 (1990).
- 4) Lee, V. H. L. and Yamamoto, A.: Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **4**: 171-207 (1990).
- 5) Lee, V. H. L., Yamamoto, A. and Kompella, U. B.: Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **8**: 91-192 (1991).
- 6) Hayakawa, E., Chien, D.-S., Inagaki, K., Yamamoto, A., Wang W. and Lee, V. H. L.: Conjunctival penetration of insulin and peptide drugs in the albino rabbit. *Pharm. Res.*, **9**: 769-775 (1992).
- 7) Yamamoto, A., Hayakawa, E., Kato, Y., Nishiura, A. and Lee, V. H. L.: A mechanistic study on enhancement of rectal permeability to insulin in the albino rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**: 25-31 (1992).
- 8) Muranishi, S., Yamamoto, A., and Okada, H.: Rectal and Vaginal Absorption of Peptides and Proteins. in Audus K. L. and Raub, T. J. (eds.): *Biological Barriers to Protein Delivery*, Plenum Press, New York, pp. 199-227 (1993).
- 9) Okagawa, T., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Shimura, T., Tabata, S., Kondo, S. and Muranishi, S.: Susceptibility of ebitride to proteolysis in rat intestinal fluid and homogenates and its protection by various protease inhibitors. *Life Sci.*, **55**: 677-683 (1994).
- 10) Yamamoto, A., Taniguchi, T., Rikyu, K., Tsuji, T., Fujita, T., Murakami, M. and Muranishi, S.: Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.*, **11**: 1496-1500 (1994).
- 11) Muranishi, S. and Yamamoto, A.: Mechanisms of Absorption Enhancement through Gastrointestinal Epithelium. in deBoer, A. (ed.): *Drug Absorption Enhancement—Concepts, Possibilities, Limitations and Trends*, Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 67-100 (1994).
- 12) Sasaki, I., Tanaka, K., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Intestinal absorption of azetirelin, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogue. II. *In situ* and *in vivo* absorption characteristics of

- azetirelin from the rat intestine: *Biol. Pharm. Bull.*, **18**: 976-979 (1995).
- 13) Gotoh, S., Nakamura, R., Nishiyama, M., Quan, Y.-S., Fujita, T., Yamamoto, A. and 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).
 - 14) Ohtani, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Takada, K. and Muranishi, S.: Effect of absorption enhancers on pulmonary absorption of water-soluble macromolecules. *Int. J. Pharm.*, **77**: 141-150 (1991).
 - 15) Morita, T., Yamamoto, A., Hashida, M. and Sezaki, H.: Effects of various absorption promoters on pulmonary absorption of drugs with different molecular weights. *Biol. Pharm. Bull.*, **16**: 259-262 (1993).
 - 16) Yamamoto, A., Morita, T., Hashida, M. and Sezaki, H.: Effect of absorption promoters on the nasal absorption of drugs with various molecular weights. *Int. J. Pharm.*, **93**: 91-99 (1993).
 - 17) Yamamoto, A., Umemori, S. and Muranishi, S.: Absorption enhancement of intrapulmonary administered insulin by various absorption enhancers and protease inhibitors in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**: 14-18 (1994).
 - 18) Morita, T., Yamamoto, A., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: Improvement of the pulmonary absorption of (Asu¹⁻⁷)-eel calcitonin by various protease inhibitors in rats. *Pharm. Res.*, **11**: 909-913 (1994).
 - 19) Fukuda, Y., Tsuji, T., Fujita, T., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Susceptibility of insulin to proteolysis in rat lung homogenate and its protection from proteolysis by various protease inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**: 891-894 (1995).
 - 20) Hanatani, K., Takada, K., Yoshida, N., Nakasuji, M., Morishita, Y., Yasako, K., Fujita, T., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Molecular weight-dependent lymphatic transfer of fluorescein isothiocyanate-labeled dextrans after intrapulmonary administration and effects of various absorption enhancers on the lymphatic transfer of drugs in rats. *J. Drug Targeting*, **3**: 263-271 (1995).
 - 21) Okumura, S., Fukuda, Y., Takahashi, K., Fujita, T., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Transport of drugs across the *Xenopus* pulmonary membrane and their absorption enhancement by various absorption enhancers. *Pharm. Res.*, **13**: 1257-1261 (1996).
 - 22) Yamamoto, A., Fujita, T., and Muranishi, S.: Pulmonary absorption enhancement of peptides by absorption enhancers and protease inhibitors. *J. Controlled Release*, **41**: 57-67 (1996).
 - 23) Hashizume, M., Douen, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Takada, K. and Muranishi, S.: Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**: 555-559 (1992).
 - 24) Yamada, K., Murakami, M., Yamamoto, A., Takada, K. and Muranishi, S.: Improvement of intestinal absorption of thyrotropin-releasing hormone by chemical modification with lauric acid. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**: 717-721 (1992).
 - 25) Tenma, T., Yodoya, E., Tashima, S., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. and 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).
 - 26) Muranishi, S. and Yamamoto, A.: Modification of Peptides for Intestinal Delivery. in Crommelin, D. J. A. Midha, K. K. and Nagai, T. (eds.) *Topics in Pharmaceutical Sciences 1993*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 372-382 (1994).
 - 27) Asada, H., Douen, T., Mizokoshi, Y., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. and 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).
 - 28) Yodoya, E., Uemura, K., Tenma, T., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Enhanced permeability of tetragastrin across the rat intestinal membrane and its reduced degradation by acylation with various fatty acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**: 1509-1513 (1994).
 - 29) Asada, H., Douen, T., Waki, M., Adachi, S., Fujita, T., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and the large intestine. *J. Pharm. Sci.*, **84**: 682-687 (1995).
 - 30) Setoh, K., Murakami, M., Araki, N., Fujita, T., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Improvement of transdermal delivery of tetragastrin by lipophilic modification with fatty acids. *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**: 808-811 (1995).
 - 31) Fujita, T., Fujita, T., Morikawa, K., Tanaka, H., Iemura, O., Yamamoto, A. and Muranishi, S.: Improvement of intestinal absorption of human calcitonin by chemical modification with fatty acids: Synergistic effects of acylation and absorption enhancers. *Int. J. Pharm.*, **134**: 47-57 (1996).
 - 32) Tanaka, K., Fujita, T., Yamamoto, T., Murakami, M., Yamamoto, A. and Muranishi, A.: Enhancement of intestinal transport of thyrotropin-releasing hormone via a carrier-mediated transport system by chemical modification with lauric acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1283**: 119-126 (1996).