S1-09

表面修飾化リポソームを用いたペプチドの消化管吸収性の改善

○岩永 一範¹⁾, 小野 聡¹⁾, 成岡 浩二¹⁾, 森本 一洋¹⁾, 掛見 正郎¹⁾,
山下 伸二²⁾, 奥 直人³⁾

¹⁾大阪薬科大学 薬剤学教室, ²⁾摂南大学・薬, ³⁾静岡県立大学・薬

IMPROVEMENT OF GASTROINTESTINAL ABSORPTION OF PEPTIDE DRUGS BY USING SURFACE COATING LIPOSOMES

Kazunori IWANAGA¹⁾, Satoshi ONO¹⁾, Kohji NARIOKA¹⁾, Kazuhiro MORIMOTO¹⁾, Masawo KAKEMI¹⁾, Shinji YAMASHITA²⁾ and Naoto OKU³⁾

¹⁾Osaka Univ. of Pharm. Sci., ²⁾Setsunan Univ., ³⁾Univ. of Shizuoka

【目的】近年、ペプチド性薬物が多数開発され、今後、医薬品全体に占める割合がますます高くなることが期待される。しかし、これらの薬物は消化管膜透過性が低く、また消化管内酵素により速やかに分解されるため、経口投与後のBioavailabilityは極めて低い。その改善策として微粒子を用いた経口投与製剤の開発が試みられており^{1,2)}、その1つにリポソームの応用が挙げられる。現在、リポソームはAmphotericin B等の有用な静注用製剤として注目を集めており、すでに臨床への応用が始まっている³⁾。一方、リポソームはリン脂質より構成されるため、経口投与製剤として用いた場合、消化管内での分解が問題とされてきた。また投与後の消化管内挙動に関しても系統的な報告は行われていない。従ってリポソームを経口投与製剤として利用するためにはリポソームの消化管内挙動を把握し、安定性の向上を図る必要がある。

本研究では生体由来のムチン糖鎖あるいはPEGによって表面修飾を施したリポソームにモデルペプチドとしてインスリンを封入し、表面修飾化リポソームのペプチド性薬物の経口投与製剤としての有用性を評価した。

【方法】1. 表面修飾化リポソームの調製

Table 1に示す脂質組成のリポソームをVortex法により調製した⁴⁾。

Table 1. The Lipid Composition of Liposomes

	DPPC	Chol	SA	Cetyl-mucin (mg/mL)	DSPE-PEG
(+)-Lip	10	10	1	—	—
Mucin-Lip	10	10	1	1	—
PEG-Lip	10	10	—	—	1

Each value was expressed as a molar ratio.

2. in vivo 経口投与実験

Wistar系雄性ラット(280-320g)に無麻酔・非拘束下、インスリン水溶液(Solution: pH7.4)あるいはインスリン封入リポソームを経口投与した(100 IU/kg)。経時的に頸静脈よ

り採血を行い、血漿中グルコース濃度をGlucose oxidase法により定量した。

3. リポソームの消化管内安定性

pH2.0緩衝液または胆汁酸塩溶液中におけるリポソームからのインスリンの放出を経時的に測定した。あるいはラットから得た小腸内容液にインスリン水溶液あるいはインスリン封入リポソームを添加し、インスリンの分解を経時的に測定した。

4. 消化管内移行性の評価

In vivo実験 ¹⁴C-DPPCで膜ラベルしたリポソームをラットに投与した後、経時的に屠殺し、消化管を分割した。各部位(胃～結腸)に残存する放射活性を測定することによりリポソームの消化管内移行性を評価した。

In situ実験 ラットの十二指腸及びその下部20cmを用いて単回灌流実験を行った。十二指腸側からインスリン封入リポソームをbolus投与し、流出液を経時的にサンプリングした。サンプル中のインスリン量を測定し、得られたoutflow patternにMoment解析を適用することにより消化管内移行特性について検討した。

【結果及び考察】インスリンをリポソームに封入して経口投与することにより、血糖低下効果が観察され、特にPEG-Lip投与時に薬効が持続化することが明らかとなった(Fig.1)。

Fig.1 Changes of Hypoglycemic Effects after Oral Administration of Insulin Encapsulated in Various Liposomes
Each data was expressed as the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments.

そこで、まずpH2.0あるいは胆汁酸塩溶液を用いて、*in vivo*におけるリポソームからのインスリンの放出性を検討した。いずれの溶液中においても表面修飾化リポソームはインスリンを徐々に放出したのに対して、非修飾化リポソームは胆汁酸溶液中でバースト現象が観察された。さらに小腸内容液中におけるインスリンの安定性を検討したところ、表面修飾化リポソームにインスリンを封入することによりインスリンの分解は顕著に抑制された(Fig.2)。これは非修飾化リポソームの場合、胆汁によりリポソームがバーストを起こし、漏出したインスリンが酵素分解を受けたのに対して、修飾化リポソームでは胆汁とリポソーム脂質膜との直接的な相互作用が回避されるため、インスリンはリポソーム内に安定な状態で保持されているものと考えられる。

Fig.2 Degradation of insulin in the intestinal fluid obtained in rats
Each data was expressed as the mean $\pm$ S.E. of 3-4 experiments.

次にリポソームの消化管内移行性に及ぼす表面修飾の影響について種々の検討を行った。各リポソームをラットに*in vivo*経口投与した際、インスリンの消化管内移行性はPEG-Lip < Mucin-Lip < (+)-Lipの順に低いことが明らかとなった。さらに詳細な解析を行うため*in situ*実験系による検討を行った結果、PEG-Lipは他の

リポソームと比較して消化管管腔内において大きな広がりを示し、平均通過時間の遅延が示された(Fig.3)。またリポソーム自体と内封したインスリンの移行性を比較したところ (+)-Lip適用時のみ両者の移行性に差が認められ、消化管管腔内において(+)-Lipが崩壊している可能性が示唆された。

Fig.3 Comparison of Moment Parameters of Insulin Obtained from Single-pass Perfusion Experiments
Each bar was expressed as the mean $\pm$ S.E. of 3-6 experiments.

一方、粘液層を除去した小腸を用いて同様の検討を行ったところ、PEG-Lip自体の平均通過時間が顕著に低下した。これはPEG修飾を施すことによりリポソーム表面に水和層が形成され、消化管粘液層とリポソームの相互作用が上昇することに起因しているものと推察される。

【結論】以上の結果より、インスリンを表面修飾化リポソーム、特にPEG-Lipに封入して経口投与した際、消化管内におけるインスリンの安定性の改善、及び消化管粘液層との相互作用の増大によるリポソームの移行性低下によって血糖低下効果が持続することが明らかとなった。表面修飾化リポソームを経口投与製剤として用いることは、ペプチド性薬物の消化管吸収性の改善において極めて有用な方法であると考えられる。

【ABSTRACT】 The potency of surface coating liposomes with some materials was investigated for oral delivery of peptide drugs by using insulin as a model peptide. When insulin solution was orally administered to rats, no hypoglycemic effect was observed. In contrast, mucin-coated liposome (Mucin-LIP) and PEG-coated liposome (PEG-Lip) prolonged the decrease in the glucose level after administration. Surface coating liposomes showed the slow release of insulin in the bile salt solution, whereas non-coated liposome was burst by the bile salts. Furthermore, insulin encapsulated in surface coating liposomes was stable even in the intestinal fluid. From the results of the study for the intestinal transit of liposomes, it was clarified that surface coating liposomes, especially PEG-Lip, much delayed the mean transit time of insulin. In conclusion, both the improvement of insulin stability in GI tract and the slow transit by the encapsulation of insulin in surface coating liposomes achieved the longer duration of oral hypoglycemic activity of insulin. The surface coating should be the potential way to add desirable functions to the liposome for oral drug delivery.

【REFERENCES】

- 1) P. Jenkins et al., *J. Control. Release*, **29**, 339-350 (1994).
- 2) C. Damge et al., *Diab. Nutr. Metab.*, **8**, 3-9 (1995).
- 3) R.N. Davidson et al., *Lancet*, **337**, 1061-1062 (1991).
- 4) K. Iwanaga et al., *Int. J. Pharm.*, *in press*.