

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・藤田卓也・山本 昌・村西昌三^{*1)},
寺部 亮・松本隆幸・鈴木 勉^{*2)}

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

Recently, there is increasing interest in the targeting of peptide and protein drugs to the colon because of the low activity of proteolytic enzymes in the colon. Therefore, many dosage forms such as a time controlled-release dosage form and a pH-sensitive coating dosage form were examined for the specific drug delivery to the colon. However, these approaches have recently been shown to lack site specificity, since the variability of pH and small intestinal transit time of these dosage forms were observed. On the other hand, chitosan, which is one of the polysaccharides widely in nature, is known to be specifically degraded by microorganisms distributed in the colon.

In this study, therefore, we prepared chitosan capsules containing insulin and examined the effectiveness of these capsules to colon-specific delivery of insulin.

The chitosan capsules containing CF or insulin were obtained from Aicello Chemical Co., Ltd. (Toyohashi, Japan). The mean diameter and weight of these capsules were 3.5×1.6 mm and 1.2–1.5 mg, respectively. The surface of these capsules was coated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate as enteric coating material. The release studies of drug from the chitosan capsules were carried out using Japan Pharmacopoeia (J. P.) rotating basket method. 5(6)-Carboxyfluorescein (CF), which was encapsulated in the chitosan capsules was used as a water soluble model compound.

No release of CF from the capsules was observed in liquid 1 as an artificial gastric juice (pH1) and liquid 2 as an artificial intestinal juice (pH7). However, the release of CF was markedly increased in the presence of rat cecal contents.

These findings suggested that the chitosan capsules were degraded by the microorganisms in rat cecal contents. The effectiveness of the chitosan capsules to the colon specific delivery of insulin was investigated by an *in vivo* absorption experiment. A marked decrease in plasma glucose levels was observed following oral administration of these capsules containing 20 IU insulin and Na-glycocholate, as compared with the capsules containing lactose or insulin only. In addition, the chitosan capsules containing insulin and Na-glycocholate were more effective for reducing the plasma glucose levels than the gelatin capsules containing the same components.

Thus, this capsule may be a useful carrier for colon-specific delivery of peptides including insulin.

Hideyuki Tozaki・Akira Yamamoto・
Takuya Fujita・Shozo Muranishi^{*1)},
Akira Terabe・Takayuki Matsumoto・
Tutomu Suzuki^{*2)}

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

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の投与法は、ほとんどすべてが注射による投与に限られているのが現状である。そこで最近では、各種投与経路¹⁻⁷⁾における生理活性ペプチドの吸収率または経口投与後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⁸⁻²²⁾。

^{*1)} Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University 京都薬科大学製剤学教室

^{*2)} Aicello Chemical Company, Toyohashi 441-11 アイセロ化学㈱

Offprint requests to: Hideyuki Tozaki, Ph. D., Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Misasagi-Nakauchi-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607

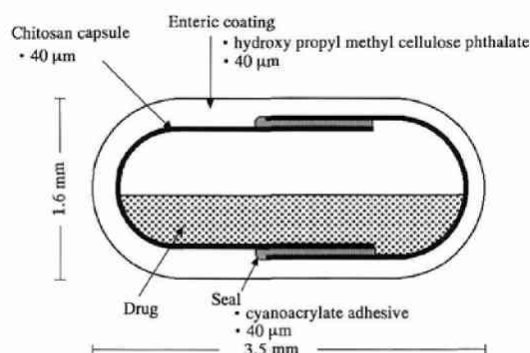


図1 Scheme of chitosan capsule

大腸は解剖学的にみて消化管の下部に位置し、水、電解質の吸収や排泄物の貯留という生理作用を司っている。したがって、腸内細菌によりペプチドが分解されること^{14,15)}を除けば、消化管の上部に位置する小腸に比較して、消化酵素や胆汁、膵液などの分泌液の影響を受けにくく、生理活性ペプチドが、この部位で比較的安定に存在できると考えられる。そこで、経口投与された生理活性ペプチドを、胃や小腸で分解酵素に曝されることなく大腸部に移行させるシステム、すなわち生理活性ペプチドの大腸特異的送達システムを開発^{22,23)}することができれば、これらペプチドの経口投与後の吸収性を飛躍的に改善できるものと思われる。しかしながら、現在報告されているシステムは、時間制御型や pH 依存型の放出制御製剤が多く^{25~28)}、経口投与後の消化管内移動や消化管内の pH が変化した場合、大腸以外の部位で内容薬物が放出する可能性がある。一方キトサンは、エビ、カニの甲羅から取れるキチンのアミノアセチル基を脱アセチル化した多糖類であり、従来から人工皮膚、手術用縫合糸、抗癌剤の高分子化修飾等に用いられてい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特異的に分解することが明らかになっている。

そこで本研究では、生理活性ペプチドのモデルとしてインスリンを選択し、インスリンを封入したキトサンカプセルを経口投与して、インスリンの大腸特異的送達ならびに吸収性の改善を試みた。

方法

(1) キトサンカプセルの調製

図1は、キトサンカプセル断面図を示したものである。キトサンカプセルはアイセロ化学(株)より供与されたものを用いた。経口投与後、カプセルが胃内で崩壊するのを防ぐため、カプセル表面にヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートで腸溶性コーティングを施した。

(2) キトサンカプセルの消化管移動実験

キトサンカプセルの消化管移動実験は、カプセルを経口投与後、経時的に開腹してカプセルの消化管内の存在位置を確認することにより行った。この際、胃、大腸、盲腸は一つの部位として評価したが、小腸の場合は全体を8部位に分割し、それぞれの部位におけるカプセルの個数を数えた。

(3) キトサンカプセルから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、カプセル内にモデル薬物である5(6)-carboxyfluorescein(CF)を封入し、日本薬局方回転バスケット法により行った。試験液は、カプセルの経口投与後の消化管内移動を考慮して、局方第1液、局方第2液および33%腸内細菌液を用いた^{14,15)}。

(4) 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実験

in vivo 経口投与実験は、Wistar 系雄性ラット(200~270 g)に、エーテル麻酔下カニューレを用いてカプセルを経口投与することにより行った。カプセル内には、薬物としてインスリン 20 IU、および蛋白分解酵素阻害剤として sodium glycocholate 9.75 mg, bacitracin 14.21 mg をそれぞれ封入した。カプセル投与後、経時的に血液を頸静脈よりサンプリングし、遠心分離後、血漿中グルコース濃度をグルコースオキシダーゼ法を用いて測定を行った。

結果と考察

(1) *In vivo* 消化管内移動実験

図2は、キトサンカプセルの経口投与後の消化管内移動を検討した結果を示したものである。キトサンカプセルの消化管内移動は、カプセルの経

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

a : Small Intestine

b : Large Intestine

c : Excretion

図 2 Gastrointestinal transit of chitosan capsules

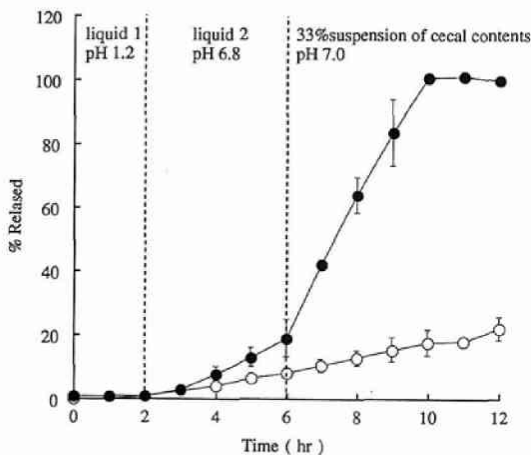


図 3 Release of CF from chitosan capsules by Japan Pharmacopoeia (J. P.) rotating basket method

● : liquid 1 (J. P.) → liquid 2 (J. P.) → 33 % suspension of cecal contents

○ : Phosphate buffered saline (pH 6.0)

Results are expressed as the mean ± SE of 2-4 experiments.

口投与後、それぞれの部位におけるカプセルの個数を数えることにより評価した。その結果、カプセルは経口投与後 0～2 時間目までは胃に、2～6 時間目までは小腸部位に、6～12 時間目までは大腸部位に存在し、12 時間目以降は体外に排泄されることが明らかとなった。

(2) キトサンカプセルからの内容薬物の放出試験

図 3 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(PBS)中においては少量の CF の漏出がみられたが、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 時間目までは腸内細菌液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 時間目以降に急激な 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 4 に示す、腸内細菌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のち、大腸に存在する腸内細菌により崩壊し、内容薬物を放出することが示唆された。本研究では腸内細菌によるキトサンカプセルの崩壊のメカニズムについては検討していないが、筆者らの予備実験では、キトサンは酸性条件下において引っ張り強度が低下し、水膨潤度が上昇することから、崩壊しやすくなることが確認されている。また、消化管内に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 5.5 に低下することが報告されている。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の崩壊の可能性につ

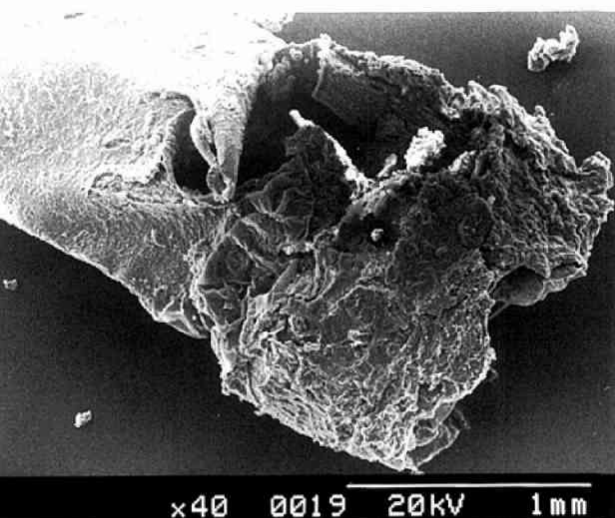


図4 Scanning electron microscopic photograph of chitosan capsule in the presence of 33% suspension of rat cecal contents (Magnitude: $\times 40$)

いても今後検討していく予定である。

(3) 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実験

図5は、インスリンおよび sodium glycocholate または bacitracin を封入したキトサンカプセルを経口投与したあとの、血糖値の経時変化について示したものである。図5上に示すように、カプセル投与を行わないコントロール、乳糖のみを封入したキトサンカプセル、インスリン 20IU を封入したキトサンカプセルを経口投与した場合は、いずれも顕著な血糖値の降下は確認されなかった。このことから、実験手順に血糖値を降下させる因子が含まれていないこと、キトサンカプセル自身に血糖降下作用がないことが認められた。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¹³⁾が、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、カプセルの素材であるキトサン自身が tight junction を開くことによる吸収促進効果²⁹⁾を有することが報告されていることから、キトサンがインスリンの大腸からの吸収を若干改善

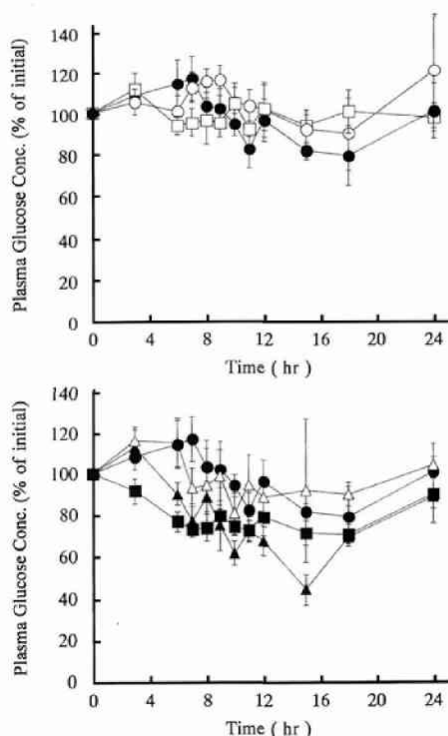


図5 Concentration-time profiles of glucose in plasma after oral administration of chitosan capsules containing insulin with or without protease inhibitors

- : Control
- : Chitosan capsules only
- : Chitosan capsules (Insulin 20 IU)
- △: Gelatin capsules (Insulin 20 IU, Na-GC* 9.75 mg)
- ▲: Chitosan capsules (Insulin 20 IU, Na-GC* 9.75 mg)
- : Chitosan capsules (Insulin 20 IU, Bacitracin 14.21 mg)

Results are expressed as the mean $\pm$ SE of 3-7 experiments.

*Sodium glycocholate

し、血糖値を低下させた可能性があると考えられる。

これに対し、インスリンと各種蛋白分解酵素阻害剤をキトサンカプセルに同封することにより、血糖降下の増強を試みた。図5下に、黒三角で示すインスリン 20 IU と sodium glycocholate 9.75 mg を同封したキトサンカプセル、および黒四角で示すインスリン 20 IU と bacitracin 14.21 mg

を同封したキトサンカプセルを経口投与した場合に、カプセルが大腸部位に到達する6時間目以降で顕著な血糖降下が認められた。また、有意な血糖降下を示した黒三角と同様の処方を、ゼラチンカプセルに封入して経口投与した場合、キトサンカプセルの場合に対して血糖値の降下はそれほど観察されず、キトサンカプセルを用いた大腸特異的送達法の効果が認められた。

今回、蛋白分解酵素阻害剤として用いた bacitracin は、glutathione insulin transhydrogenase (GIT), leucine aminopeptidase 阻害作用を有する^{30,31)}として報告されている。また、当研究室における検討で、leucine aminopeptidase 活性は結腸粘膜および管腔内に少量ではあるが存在していることが確認されていることから、インスリンの吸収過程における分解を抑制した結果、血糖降下作用が増強したと考えられる。さらに最近筆者らは、高濃度の bacitracin が蛋白分解酵素阻害作用に加えて吸収促進作用も併せ持つことを確認³²⁾していることから、bacitracin がインスリンの消化管粘膜透過性を増大させた可能性もあると思われる。

一方、本研究において、bacitracin と同様に蛋白分解酵素阻害剤としてキトサンカプセルに同封した sodium glycocholate は、顕著な血糖値の降下を示した。Sodium glycocholate は、当研究室における以前の検討において、大腸粘膜および腸内細菌によるインスリンの分解を抑制しなかったことから、sodium glycocholate は蛋白分解酵素阻害剤としてよりも吸収促進剤¹⁷⁾としての効果のほうが大きく作用したと考察される。

結 論

以上の結果より、つぎのような結論が得られた。

① キトサンカプセルは経口投与後、0～2時間で胃に、2～6時間で小腸部位に、6～12時間で大腸部位に存在することが認められた。

② キトサンカプセルは、大腸部位に存在する腸内細菌により特異的に崩壊し、内容薬物を放出することが明らかとなった。

③ インスリンを封入したキトサンカプセルを

経口投与後、血糖値は顕著に低下し、その効果は、各種蛋白分解酵素阻害剤の併用により増強されることが認められた。

こうした知見より、キトサンカプセルは生理活性ペプチドの大腸特異的送達法を達成するうえで、きわめて有用な素材となりうることが示唆された。

本研究に際し、実験の一部にご協力頂きました、江見泰治、堀坂恵里、小茂池潤太、圓山貴子、多田知加諸氏に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yamamoto, A., Umemori, S., Muranishi, S.: Absorption enhancement of intrapulmonary administered insulin by various absorption enhancers and protease inhibitors in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 14-18, 1994.
- 2) Fukuda, Y., Tsuji, T., Fujita, T., Yamamoto, A., 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.
- 3) Hirai, S., Yashiki, T., Mima, M.: Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in the dog. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 63: 53-67, 1981.
- 4) Yamamoto, A., Luo, M. A., 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.
- 5) Hersey, S. J., Jackson, R. T.: Effect of bile salts on the nasal permeability *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* 76: 876-879, 1987.
- 6) Gordon, G. S., Moses, A. C., Silver, R. D., Flier, J. S., Carey, M. C.: Nasal absorption of insulin: Enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7419-7423, 1985.
- 7) Morimoto, K., Yamaguchi, H., Iwakura, Y., Miyazaki, M., Nakatani, E. et al.: Effects of proteolytic enzyme inhibitors of the nasal absorption of vasopressin and analogue. *Pharm. Res.* 8: 1175-1179, 1991.
- 8) Tenma, T., Yodoya, E., Tashima, S., Fujita, T., Murakami, M. et al.: 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) Yodoya, E., Uemura, K., Tenma, T., Fujita, T., Murakami, M. et al.: 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.
- 10) Asada, H., Douen, T., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. et al. : 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.
- 11) Fujita, T., Kawahara, I., Yamamoto, M., Yamamoto, A., Muranishi, S. : Comparison of the permeability of macromolecular drugs across cultured intestinal and alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Sci.* 1 : 231-234, 1995.
- 12) Okagawa, T., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Shimura, T. et al. : Susceptibility of ebitaride to proteolysis in rat intestinal fluid and homogenates and its protection by various protease inhibitors. *Life Sci.* 55 : 677-683, 1994.
- 13) Yamamoto, A., Taniguchi, T., Rikyuu, K., Tsuji, T., Fujita, T. et al. : Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.* 11 : 1496-1500, 1994.
- 14) Tohzaki, 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.
- 15) Sasaki, I., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Nakamura, E. et al. : Intestinal absorption of azetirelin, A new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogue. I. Possible factors for the low oral bioavailability in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 17 : 1256-1261, 1994.
- 16) Lee, V. H. L., Yamamoto, A. : Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Adv. Drug Delivery Rev.* 4 : 171-207, 1990.
- 17) Muranishi, S. : Absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7 : 1-33, 1990.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Morishita, M., Morishita, I., Takayama, K., Machida, Y., Nagai, T. : Site-dependent effect of aprotinin, sodium caprate, Na₂ EDTA and glycocholate on the intestinal absorption of insulin. *Biol. Pharm. Bull.* 16 : 68-72, 1993.
- 21) Kidron, M., Bar-On, H., Berry, E. M., Ziv, E. : The absorption of insulin from the various regions of the rat intestine. *Life Sci.* 31 : 2837-2841, 1982.
- 22) Saffran, M., Bedra, C., Kumar, G. S., Neckers, D. C. : Vasopressin : A model for study of effects of additives on the oral and rectal administration of peptides drugs. *J. Pharm. Sci.* 77 : 33-38, 1988.
- 23) Mooter, G. V., Samyn, C., Kinget, R. : Azo polymers for colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.* 87 : 37-46, 1992.
- 24) Saffran, M., Kumar, G. S., Savaia, C., Burnham, J. C., Williams, F., Neckers, D. C. : A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science* 233 : 1081-1084, 1986.
- 25) Ashford, M., Fell, J. T., Attwood, D., Sharma, H., Woodhead, P. J. : An *in vitro* investigation into the suitability of pH dependent polymers for colonic targeting. *Int. J. Pharm.* 95 : 193-199, 1993.
- 26) Ashford, M., Fell, J. T., Attwood, D., Sharma, H., Woodhead, P. J. : An *in vivo* investigation into the suitability of pH dependent polymers for colonic targeting. *Int. J. Pharm.* 95 : 193-199, 1993.
- 27) Rubinstein, A., Radai, R., Ezra, M., Pathak, S., Rokem, J. S. : *In vitro* evaluation of calcium pectinate : A potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharm. Res.* 10 : 258-263, 1993.
- 28) Peeters, R., Kinget, R. : Film-forming polymers for colonic drug delivery : I. Synthesis and physical and chemical properties of methyl derivatives of Eudragit S. *Int. J. Pharm.* 94 : 125-134, 1993.
- 29) Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S. S., Illum, L. : Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11 : 1358-1361, 1994.
- 30) Roth, R. A. : Bacitracin : An inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 : 431-438, 1981.
- 31) Raehs, S. C., Sandow, J., Wirth, K., Merkle, H. P. : The adjuvant effect of bacitracin on nasal absorption of gonadorelin and buserelin in rats. *Pharm. Res.* 5 : 689-693, 1988.
- 32) Gotoh, S., Nakamura, R., Nishiyama, M., Fujita, T., Yamamoto, A., Muranishi, S. : Does bacitracine have an absorption-enhancing effect in the intestine ? *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 794-796, 1995.