

20050025PA

厚生労働科学研究研究費補助金  
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

活性蛋白の非注射型ナノDDS製剤

(H16-トランス-007)

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成18(2006)年 3月

## 目次

### I. 総括研究報告書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

活性蛋白の非注射ナノDDS製剤

主任研究者 水島裕（東京時警戒医科大学DDS研究所所長）

### II. 分担研究報告書

#### 1. 炭酸カルシウム・ナノパーティクルに封入したインスリン製剤の 経皮吸収について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

上野晃憲（東京慈恵会医科大学DDS研究所・客員教授）

水島 裕（東京慈恵会医科大学DDS研究所・所長）

#### 2. 健康人でのナノインスリン経皮吸収の試み・・・・・・・・・・・・ 27

上野幸生（株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発部・主席研究員）

鈴木 潤（株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発本部・本部長）

#### 3. 蛋白医薬のDDS製剤化についての基礎的研究・・・・・・・・・・・・ 33

水島 徹（熊本大学大学院医学薬学研究部・教授）

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・ 41

### IV. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

# I. 総括研究報告書

## 活性蛋白の非注射型ナノDDS製剤

主任研究者

水島 裕

東京慈恵会医科大学DDS研究所所長

研究要旨

作製条件の検討結果にしたがって作成したインスリンを含むナノ粒子（ナノインスリン）は、均一な粒子であって、封入されたインスリンに変性は認められない。マウス背部皮膚に塗布した実験では、血中インスリン濃度の上昇と血糖値の持続的な下降が観察された。ボランティアの前腕内側に塗布したとき、有意な血糖値低下を認めなかった。

分担研究者

上野 晃憲 東京慈恵会医科大学DDS研究所・客員教授

鈴木 潤 株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発本部・本部長

上野 幸生 株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発部・主席研究員

水島 徹 熊本大学医学薬学研究部・教授

A. 目的

これまで開発してきた技術を応用して活性をもつ蛋白質をナノ粒子化することにより、経皮・経粘膜の吸収を飛躍的に上昇させる技術の開発を試みる。本年度については、動物での実験結果を踏まえて、ヒトでの検証を行うことを目的とした。なお、詳細な内容については分担研究者の報告に記載したので、本総括報告においては簡潔に記載するに留める。

## B. 研究方法

1. 蛋白質のフォールディングを調節して製剤を作製することの利点などについて基礎的な情報を集積した。
2. 昨年度の本研究によって得られたナノ粒子の作製条件に基づいて、インスリンと亜鉛、ミリスチン酸、Tween80、炭酸カルシウムを用いることによりナノインスリン粒子の作製を行った。このナノインスリン粒子の物理的な性質について調べた。
3. ナノインスリン粒子に封入したインスリンに変性などが生じていないかを検討した。
4. 動物実験を行って、ナノインスリンの有効性や安全性について調べた。正常マウスと糖尿病モデルマウスを用いて、比較した。
5. ボランティアを募り、ヒトにこのナノインスリン粒子を適用し、その安全性と有効性について調べた。

## C. 研究成果

1. 本年度は、蛋白医薬そのものではなくNSIDsの場合で検討をおこなった。誘導される分子シャペロンの種類ならびにその性質について検索を行い、この分子シャペロンが蛋白のフォールディングと関係があることを示唆する結果を得た。
2. 作製条件を決定して、ナノインスリン粒子の作製を行った。粒子径測定器を用いてナノインスリン粒子の径の測定とそのばらつきを調べたが、平均して約200から300nmの粒子径であった。そのばらつきはおおきいものではなかった。また、電子顕微鏡による観察においても、均一な粒子であることが証明され、おおきな凝集塊は見受けられていない。
3. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて、ナノインスリンに封入したインスリンを分析したところ、モノマーインスリンと同一の保持時間に単一のピークが認められた。また、ナノインスリン粒子から放出させたインスリンを抗体を用いたELISAで測定したところ、十分な量の検出が可能であった。

4. 動物実験として、正常動物としてd d Yマウス、糖尿病モデルマウスとしてd B/d Bマウスとk k A yマウスの合計3系統のマウスを用いて、ナノインスリンを背部皮膚に塗布したところ、血中インスリン濃度の上昇と血糖値の有意な低下を認めた。この血糖値低下はナノインスリン粒子の塗布後6時間後においても認められた。一方、モノマーインスリンの皮下投与では6時間後にはコントロールと同値に戻っていた。また、このナノインスリン粒子の皮膚への塗布によっては、塗布部位に特に変化は認めなかった。
5. 健常ボランティア2名（男性、71歳と64歳）の前腕内側にナノインスリンを塗布して、時間を追って血糖値を測定した。塗布後5時間まで測定を行ったが、インスリンを投与していないコントロールの時間経過と比較して有意な低下は認められていない。

#### D. 考察

蛋白医薬（インスリン）をナノ粒子化することに成功し、現段階では均一な粒子（ナノインスリン）が作製可能となっている。蛋白のフォールディングを調節出来るようになれば、さらに効率の良い粒子作製が可能になると考えられる。本年度行ったマウスの皮膚へのナノインスリン塗布の実験においては、インスリンの吸収と血糖値低下が観察されたが、ヒトにおいては観察されていない。皮膚構造の違いによるかもしれないが、さらに粒子作製の検討を行う必要があるかもしれない。しかし、この大きさのナノインスリンを別の部位の皮膚に適用して検討することも必要かもしれない。また、別の投与経路（例えば、経肺投与など）での可能性について検討する価値はあると思われる。

#### E. 結論

昨年度までの条件検討の成果に基づいて、均一なナノインスリン粒子が作製された。マウスを用いた動物実験においてこのナノインスリン粒子の経皮吸収を示唆する結果が得られ、また血中血糖値低下という作用の確認がなされた。平成18年度に予定していたヒトでの試験を本格的に始める前に、ボランティアを募ってプレリミナリーに試みる事ができた。ヒトの前腕からの吸収が低いために、血糖値降下までの観察はなされなかった。

以上の研究成果を総合的に見てみると、本年度の研究は実施計画に従って順調

に進捗したと思われる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 水島 裕 抗加齢医療とは 日本医事新報 4236、1-11, 2006
2. 水島 裕 アンチエイジング医療と再生医療 はじめに 医学のあゆみ 214, 127-129, 2005
3. 水島 裕 炎症性・免疫疾患に対するステロイド療法のこつ ステロイドの使い方 こつと落とし穴 (中山書店) 112-113, 2006
4. 水島 裕、桧垣恵 DDS研究のあゆみとわが国の貢献 Pharm.Tech. Japan 21(12), 21(12), 2005
5. Higaki M., Kameyama M., Udagawa M., Asano S., Yamaguchi Y., Igarashi R., and Mizushima Y. Transdermal delivery of CaCO<sub>3</sub>-nanoparticles containing insulin In submission
6. Mizushima Y., Ikoma T., Tanaka J., Hishi K., Ishihara T., Ogawa Y. and Ueno A. Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs Control. Release (In press)
7. Ishihara T., Izumo N., Higaki M., Shimada E., Hagi T., Mine L., Ogawa Y., and Mizushima Y. Role of Zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile J. Control. Release 105, 68-76, 2005
8. Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., and Mizushima Y. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticle for a new delivery system. J. Control. Release, 103, 93-98, 2005.

9. Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res* 65, 1868-1876, 2005
- 1 0. Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* 50, 1641-1646, 2005
- 1 1. Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., and Mizushima, T. Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin. *Dig. Dis. Sci.* 50, 1927-1937, 2005
- 1 2. Sone, M., Hayashi, H., Yamamoto, H., Hoshino, T., Mizushima, T., and Nakashima, T. Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. *Hearing Research* 204, 140-146, 2005
- 1 3. Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Nanba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S. and Mizushima, T. Involvement of intracellular  $Ca^{2+}$  levels in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem* 280, 31059-31067, 2005
- 1 4. Ushijima, H., Tanaka, K., Takeda, M., Katsu, T., Mima, S. and Mizushima, T. Geranylgeranylacetone protects membranes against non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Mol. Pharmacol.* 68, 1156-1161, 2005
- 1 5. Tsutsumi, S., Namba, T., Tanaka, K., Ishihara, T., Arai, Y., Aburaya, M., Suzuki, K., Hoshino, T. and Mizushima, T. Celecoxib up-regulate endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced



apoptosis in human gastric cells. Oncogene, (in press)

学会発表（会長講演・特別講演・招待講演・シンポジウムのみ）

- 1 水島裕（特別講演） ナノテクノロジー国の政策と抗炎症・再生医療への応用 第26回日本炎症・再生医学会 7月 2005（東京）
- 2 水島裕（記念講演） 大学からの医療産業への貢献（財）医療機器センタ創立20周年記念講演会 7月 2005（東京）
- 3 水島裕（教育講演） ナノテクノロジー・国の政策とDDS応用の最近の進歩 7月 2005 第21回日本DDS学会
- 4 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導薬による保護 愛媛県病院薬剤師会学術講演会（2005）（愛媛）
- 5 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 北海道大学での特別講演（2005）（札幌）
- 6 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 大正富山製薬（株）研究所での特別講演（2005）（さいたま）
- 7 Tohru Mizushima Induction of Claudin-4 by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Its Contribution to Their Chemopreventive Effect. Digestive Disease Week (2005) (Chicago)
- 8 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 熊本県薬剤師会総会特別講演（2005）（熊本）
- 9 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 京都薬科大学での特別講演（2005）（京都）
- 10 水島徹 熊本大学薬学部創薬研究センター新設紹介・副作用のない NSAIDs の開発 熊本大学イブニングセミナー（2005）（東京）
- 11 水島徹 HSP 誘導剤と創薬 再春寒製薬（株）での招待講演（2005）（熊本）

- 12 水島徹 HSP 誘導剤とその臨床応用 日本癌学会ランチョンセミナー (2005) (札幌)
- 13 Tohru Mizushima Inhibition of amyloid- $\beta$  production by endoplasmic reticulum chaperones. Second International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine (2005) (Tomar)
- 14 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導による胃粘膜保護 名古屋大学医学部での招待講演 (2005) (名古屋)
- 15 水島徹 熊本大学附属創薬研究センターについて 創薬拠点形成シンポジウム (2005) (熊本)
- 16 水島徹 NSAIDs の新たな薬理作用と毒性のない HSP 誘導薬の臨床応用 第一製薬 (株) での招待講演 (2005) (東京)
- 17 水島徹 NSAIDs による TJ 関連遺伝子誘導と抗癌作用 日本分子生物学会での招待講演 (2005) (福岡)

#### H. 知的財産権の出願・登録

該当なし。

## Ⅱ. 分担研究報告書

# 炭酸カルシウム・ナノパーティクルに封入した インスリン製剤の経皮吸収について

分担研究者

上野晃憲（東京慈恵会医科大学DDS研究所・客員教授）

水島 裕（東京慈恵会医科大学DDS研究所・所長・客員教授）

## 要旨

本研究においてこれまでに報告した炭酸カルシウムでできたナノパーティクルにインスリンを封入した製剤（ナノインスリン、インスリンとして $200\mu\text{g}$ ）をマウスの背部に塗布することによって吸収されるかどうかについて、血清インスリン濃度を測定して検討した。また、血中グルコース濃度測定も行った。実験は、正常の ddY マウスだけでなく、dB/dB マウスと kKAY マウスも用いてモノマーインスリン（現製剤）を皮下投与（ $3\mu\text{g}$ ）して同様の実験を行い、比較した。皮下投与のモノマーインスリンは、投与後 20 分で血清濃度のピークを示したが、ナノパーティクルの経皮投与では投与後 4 時間後にピークを示した。血中グルコースについては、皮下投与では 1 時間後に作用がピークとなり、経皮投与では 6 時間後でも血糖低下作用が認められた。この実験結果は、3 種類のマウスで大きな違いは認められなかった。本研究で作製したナノインスリン製剤は、生体において経皮吸収されることが示された。この結果から、ヒトにおいても経皮吸収される可能性が十分考えられる。

## A. 目的

昨年度までの成果としてはインスリンのナノ粒子作製の条件検討がある。この最適と思われる条件に基づいてナノインスリンを作製した。ヒトへの応用という観点から、その粒子が非注射の製剤として利用できるのかについて検討する

段階であると思われるので、本年度は生体に対して効果を有するものであるかの検討を行うことを主な目的とした。

つまり、このナノインスリンが果たして経皮吸収可能であるのかについて、マウスを動物モデルとして使用することにより検索した。正常のマウスと糖尿病モデルマウスでその効果を比較することによって、違いの有無についても検討を行った。

## B. 材料と方法

### 1. 試薬

リコンビナントのインスリンと界面活性剤の Tween80 は ICN Pharmaceutical Inc.より購入した。その他の試薬は和光純薬工業より購入した。

### 2. 動物

正常マウスとしての ddY マウス (8 週令、オス) は、日本 SLC より購入した。糖尿病のモデルマウスとしての dB/dB マウス (10 週令、オス) および kkAY マウス (12 週令、オス) は、日本クレアより購入した。購入してから、1 週間の予備飼育を行い実験に使用した。実験前日に、マウス背部の毛を電気バリカンで刈った。実験開始 1 時間前より、絶食として準備した。

### 3. ナノインスリンの調整

インスリンのナノ粒子の作製条件については昨年度に報告したが、本年度もその条件に則り作製をした。以下に簡単に作製方法を述べる。塩化亜鉛 (599  $\mu\text{g}$ ) とインスリン (1 mg) を混和してインスリン-亜鉛複合体を作製した。それに 500  $\mu\text{g}$  のミリスチン酸ナトリウムとアセトンに溶解した Tween80 を加えて室温で 15 分間攪拌して、懸濁液とした。この懸濁液を蒸留水中に滴下することにより、ナノ粒子を作製した。その後 30 分間攪拌を続けてから、塩化カルシウムを加えてさらに 30 分間攪拌することにより炭酸カルシウムで被覆されたナノインスリン粒子を作製した。この粒子懸濁液を 20,000 g 15 分の遠心を行うことにより、カルシウム被覆されていない粒子を除去した。沈殿した炭酸カルシウム被覆ナノインスリン粒子を凍結乾燥させて保存した。

### 4. ナノインスリン粒子の様子

まず、以上のように作製したナノインスリン粒子の粒子径とその分布状態について、光散乱法によって調べた。ナノインスリン粒子に封入されたインスリン量を推定するために、遠心で除去された上清中に存在するカルシウム被覆され

ていない粒子やその他のフリーのインスリンの量を測定した。その定量にはHPLCを用いた。標準品としてモノマーインスリンを用いて、その保持時間から同定した。

## 5. マウス背部皮膚への投与実験

実験計画は東京慈恵会医科大学動物実験指針に従い、実験動物委員会の承認を受けておこなった。

ナノインスリン（インスリン量として200 $\mu$ g）またはモノマーインスリン（200 $\mu$ g）を白色ワセリン100mg中に拡散させた。これをddYマウスの背部皮膚に塗布した。塗布面積としては約1.5平方cmである。塗布後2,4,6,8時間後に腹部大動脈より全採血を行い、血清を得た（各群4例）。

血清中のインスリンレベルについてはELISAキットを用いて測定した。結果はIU/mlとして表した。このキットを用いての検出限界は、0.25 $\mu$  IU/mlである。正常マウスでのコントロール値は、7.8 $\mu$  IU/mlであった。血清中インスリン濃度を測定し投与後6時間までの値から、AUC値（ $\mu$  IU $\cdot$ hr/ml）を計算した。このAUCをナノインスリンの経皮投与の場合と皮下投与の場合それぞれで求めてから、相対的なバイオアベイラビリティ（BA）を計算式により算出した。

## 6. 血糖値の変動について

血糖値の変動については、1匹の動物の時間的な推移を調べる実験を行った。実験のひとつは、ナノインスリンの用量反応の関係を調べた。用いた動物はddYマウスであった。ポジティブコントロールとしてモノマーインスリンを3 $\mu$ gを皮下投与し、投与後30分、1時間、2時間、4時間、6時間に尾静脈より採血を行った。またナノインスリンは0、50、100、200 $\mu$ gと4用量に変化させて、それぞれを100mgの白色ワセリンに拡散させてマウスの背部皮膚に全量を塗布した。塗布後2時間、4時間、6時間後に尾静脈から採血を行った。

もうひとつの実験は、200 $\mu$ gのナノインスリンを用いて、動物による違いがあるかを検討した。特に、正常動物と糖尿病モデル動物で違いがあるかについて検討した。用いた動物は、正常な動物としてddYマウス、糖尿病モデルマウスとしてdB/dBマウスおよびkkAyマウスの2種を用いた。採血は尾静脈から行った。比較する目的で、モノマーインスリン3または5 $\mu$ gを皮下投与し、投与後30分、1時間、2時間、4時間、6時間に採血した。ナノインスリンについては、塗布後2時間、4時間、6時間後に採血を行った。

## C. 研究成果

### 1. ナノインスリン粒子の性質について

昨年度の粒子作製条件検討で最終的な作製方法として報告した方法で作製した炭酸カルシウムを被覆したナノインスリン粒子の形状について、電子顕微鏡写真を撮った。図1に示したように、 $1\mu\text{m}$ よりもはるかに小さい粒子が作製されていることが判明した。ほとんどダマになることなく、均一な粒子として作製されていると思われた。

作製したナノインスリン粒子の大きさを光散乱法によって測定解析を行った。粒子分布の実験結果については、その解析結果の例を図2に示した。図2に示すように、散乱強度分布から求めた平均粒子径は $417\text{nm}$ で、重量換算分布では $380\text{nm}$ 、個数換算分布では $377\text{nm}$ であった。標準偏差は、いずれの分布においても約 $50\text{nm}$ 程度であり、上記の平均粒子径はほぼ一致していると考えている。また、ヒストグラムからも明らかのように、ナノインスリン粒子の粒子径は $300$ から $500\text{nm}$ の範囲にあることが明らかとなった。

ナノインスリン粒子作製時に、炭酸カルシウム被覆粒子に取り込まれなかったインスリン量を測定して最終的に粒子内に取り込まれたインスリン量を計算した。取り込み率は約 $50\%$ 程度であった。

図3に示したように、ナノインスリン粒子内に存在するインスリンをHPLCにより同定してみた。図3の左側には、標準品としてモノマーインスリンのHPLC分析結果を示した。ナノインスリン粒子のHPLCクロマトグラムから明らかであるが、標準品と同じ保持時間に認められるピークのみが検出された。この実験結果から、凝集や変性することなくナノ粒子内にインスリンが封入されていることが考えられた。

### 2. 血清インスリン濃度の測定

ナノインスリン ( $200\mu\text{g}$ ) を経皮投与した場合とモノマーインスリン ( $3\mu\text{g}$ ) の皮下投与した場合の血清中のインスリン濃度を測定し、ナノインスリン粒子が吸収されるかどうかについて検討を行った。その時間的推移について、図4に示した。皮下投与したモノマーインスリンにおいては、投与後20分での値が一番高く ( $462.6 \pm 20.9\mu\text{IU/ml}$ 、その後急激な減少があって3時間後にはほとんど検出されない状況であった。一方、ナノインスリンについては2時間、4時間、6時間、8時間で測定したが、塗布後4時間目にピークを迎えた。そのときのピーク値は  $67.1 \pm 25.9\mu\text{IU/ml}$  であった。2時間後、6時間後では、血清インスリン濃度の測定が可能であったが、8時間後には検出限界に近い値であった。AUCを計算したところ、経皮投与のナノインスリンでは  $264.8\mu\text{IU/hr/ml}$  であり、皮下投与したモノマーイ

ンスリンでは431.3  $\mu$  IU/hr/mlであった。経皮投与ナノインスリンのバイオアベイラビリティ（BA、Bioavailability）は0.9%であった。

### 3. 血糖値の測定

#### ①正常マウスにおける用量依存性

正常マウスとして ddYマウスを選び、実験をおこなった。経皮投与したナノインスリンの用量は、50, 100, 200  $\mu$ gである。対照（ベヒクル、Vehicle）として基材のワセリンのみを同量（ナノインスリン量0）、マウスの背部皮膚に塗布した。比較する目的で、ポジティブコントロールとして、現製剤のモノマーインスリン（3  $\mu$ g）を皮下投与した。投与前（直前、0time）の血糖値は平均値で133.9 mg/dlであった。血糖値の実験結果を比較する目的で、測定値そのものではなく、投与前の値を100%として換算した値を求めた。その結果を図5に示した。

実験中も絶食状態にしておいたため、実験開始6時間後では、ベヒクルにおいてもわずかな血清血糖値の低下を認めた。しかし有意性は認めなかった。皮下投与したモノマーインスリンでは、血清血糖値は注射1時間後に64%減少し、6時間後にはベヒクルのレベルに戻った。ナノインスリンの経皮投与については、徐々に血糖値の低下を認めた。観察時間の6時間後においてもその低下は継続していた。示した結果で明らかなように、50  $\mu$ gのときは6時間目で、100  $\mu$ gのときは4時間後から、200  $\mu$ gのときは2時間後から、統計学的に有意性のある血糖値低下であった。200  $\mu$ gの4時間後が最も低下した結果となったが、そのときの低下は48.3%であった。図には示さないが、インスリンを含まないナノ粒子（ブランク粒子）のみ、または生理的食塩水の経皮投与によっては、血糖値の低下は認めなかった。

この実験結果から、モノマーインスリンの皮下投与に対する相対的バイオアベイラビリティを計算してみると、50  $\mu$ gでは2.0%、100  $\mu$ gでは2.9%、200  $\mu$ gでは4.3%であった。

#### ②正常マウスと糖尿病モデルマウスとの比較

上記の実験において正常マウスでナノインスリンの経皮投与により血糖値の低下を認めたが、糖尿病モデルのマウスで違いがあるかについて予備的に検討を行った。糖尿病モデルマウスとして2系統のマウスを用いた。ナノインスリンの腹部皮膚への投与量は、すべて200  $\mu$ gとして統一した。また、比較対照としてモノマーインスリン（ddY：3  $\mu$ g、dB/dBとkkAy：5  $\mu$ g）を皮下投与した。インスリン投与後6時間まで観察を行った。

その結果を図6に示した。上段の ddYマウス、中段の dB/dBマウス、下段



の k k A y マウスのいずれにおいても、皮下投与モノマーインスリンにより血糖低下が生じ、そのパターンは類似していた。この実験においても、実験開始 1 時間前より絶食を継続しているため、4 時間後および 6 時間後においてコントロール（インスリン無投与）血糖低下傾向があった。ナノインスリン投与では、いずれのマウスにおいても血糖低下が認められ、コントロールよりも強い低下が認められる結果であった。糖尿病モデルの 2 系統のマウスのインスリン投与前（0 time）の血糖値の値は、正常の d d Y マウス（133.9 mg/d l）に比べて、d B/d B マウスと k k A y マウスでそれぞれ 414.3 mg/d l と 384.0 mg/d l と高値であった。したがって、ナノインスリンのマウスの背部皮膚に投与したとき、糖尿病モデル（2 系統とも）においては相当の血糖低下作用となることが明らかとなった。

この実験結果を基に 6 時間までの AUC 値を計算して比較した。表 1 に数値をまとめたが、血糖降下作用としての AUC は、モノマーインスリンにおいては 3 系統のマウスで差がないように思われた。ナノインスリン粒子の塗布においても 3 系統では大きな差は認めなかった。

#### D. 考察・

昨年度の作製方法の検討の結果を踏まえて均一な粒子作製がなされた。また、その粒子径は測定値より約 300 nm 程度であった。少し経皮吸収させるには大きな粒子径であると考えられた。

液体クロマトグラフィーの溶出パターンにおいて、ナノインスリン粒子は単一のピークしか認められなかった。また、血中のインスリン濃度測定を E L I S A を用いて行ったが、充分測定可能であった。このことは、インスリンの免疫原性は変化していないと考えることができる。これらのことから判断して、粒子内に封入されたインスリンは変性することなく活性を持ったものとして存在していると考えられる。

この粒子をマウスの皮膚に適用した結果、血中のインスリン濃度の上昇と血中グルコース濃度の低下が認められたので、経皮吸収は生じていたと考えることができる。正常マウスにおいても、糖尿病モデルマウスにおいても、血中グルコース低下が同じように認められたので、このナノインスリン粒子の作用には系統差（種差）はないと考えられる。また、糖尿病モデルマウスの高血糖値を低下させる作用が 2 系統のマウスで明らかとなったことから、糖尿病の治療に用いることは可能であるかもしれない。

このナノインスリンの血糖低下作用は、3 系統のマウスとも、ナノインスリン塗布後 4 時間後や 6 時間後で認められる。今年度の研究ではどれくらいの持続性

があるのかまで明らかにできなかったが、かなりの持続性があると期待される。皮下注射の場合は4時間後では元に戻ってしまうことを併せて考えると、このナノインスリン粒子は持続的な製剤の性質も併せ持っていると考えられる。

しかし、バイオアベイラビリティが2～3%と計算されるので、もう少しこの割合を上げる必要があると考えられる。経皮吸収の効率を上げるためには、もう少し小さな粒子径である必要があるかもしれない。実際、本研究の分担研究者が所属するLTTバイオファーマでは、蛋白質ではないが脂溶性の物質を封入したカルシウム被覆100nm程度の粒子を経皮吸収させる化粧品として開発し、現在市販されている。

このカルシウム被覆のナノインスリンをマウス皮膚にワセリンに混ぜて塗布したが、特に皮膚症状は認められなかった。したがって安全なナノ粒子であると考えられる。

#### E. 結論

本研究で検討した作製条件で作製されたナノインスリン粒子は、インスリンを変性することなく封入したものであり、動物実験で経皮吸収されて血糖値低下作用を示すことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. M. Higaki, M. Kameyama, M. Udagawa, S. Asano, Y. Yamaguchi, R. Igarashi, T. Ishihara, and Y. Mizushima. Transdermal delivery of CaCO<sub>3</sub>-nanoparticles containing insulin. (in press)

2. Mizushima Y., Ikoma T., Tanaka J., Hishi K., Ishihara T., Ogawa Y. and Ueno A. Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs. J. Control. Release (in press)

3. Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., and Mizushima Y. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticle for a new delivery system. J. Control. Release, 103, 93-98, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録  
なし。

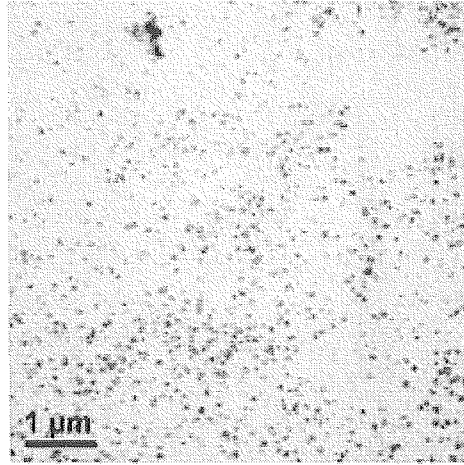


図1 ナノインスリン粒子の電子顕微鏡写真