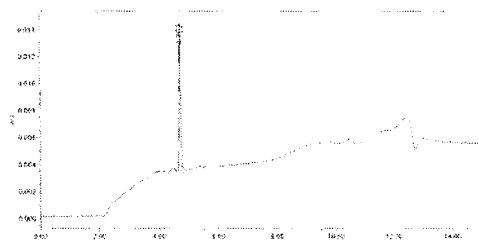


峰番号	保持時間 (分)	面積	%面積	高さ	積分	検出
1	8.703	26294	100.00	143.82	180514	100%

Standard



峰番号	保持時間 (分)	面積	%面積	高さ	積分	検出
1	8.703	10000	100.00	143.82	180514	100%

Sample

図3 液体クロマトグラフィーの溶出パターン  
 左側：モノマーインスリン      右側：ナノインスリンからのインスリン

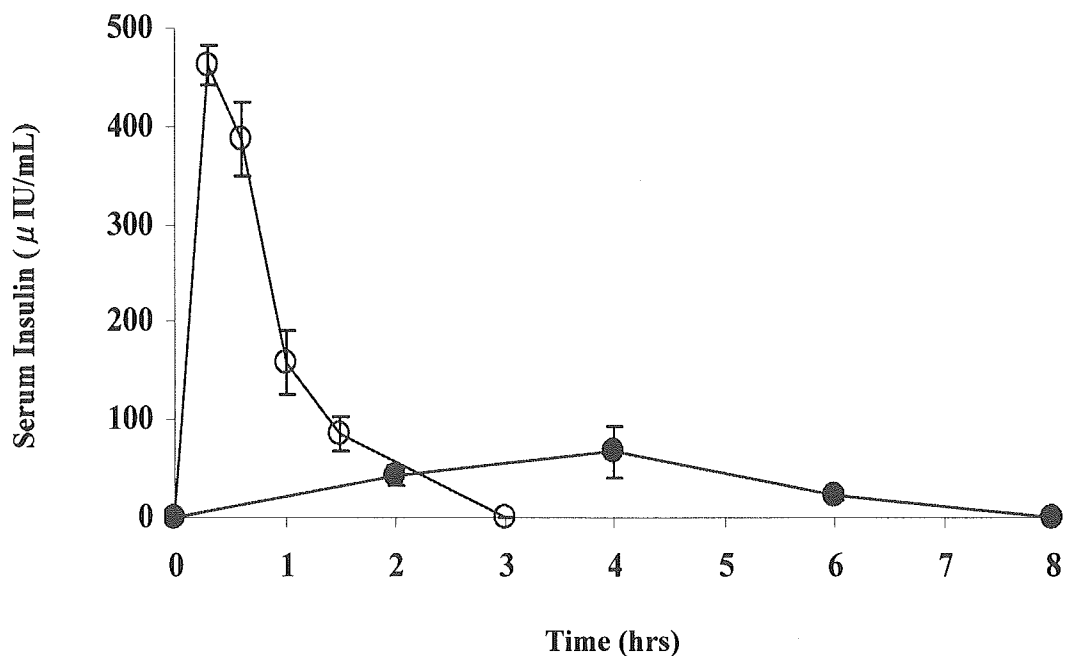


図4 ナノインスリン粒子の正常マウスの背部皮膚塗布による血中インスリン濃度の変化  
 白丸：モノマーインスリンを皮下投与した場合、黒丸：ナノインスリン粒子をワセリンに混ぜてマウス背部皮膚に塗布した場合。

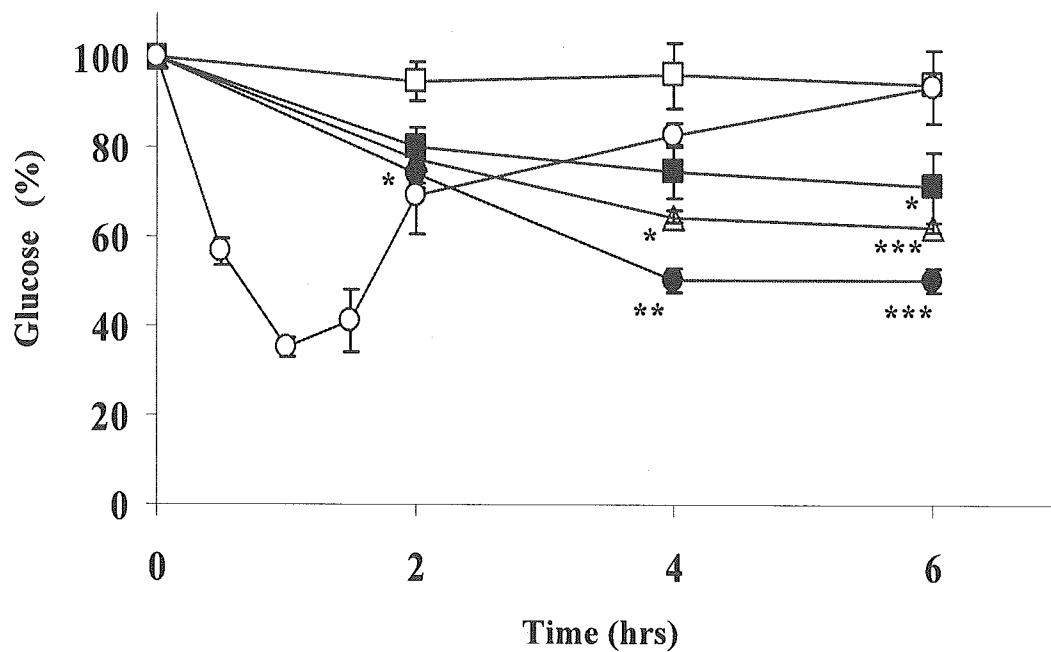


図5 インスリン投与後の血糖値の時間的推移

白丸：モノマーインスリンを  $3 \mu\text{g}$  皮下投与した場合、  
 白四角：ナノインスリン量を 0 にしたワセリンのみの塗布をした場合、  
 黒四角：ナノインスリン量を  $50 \mu\text{g}$  にして塗布した場合、  
 白三角：ナノインスリン量を  $100 \mu\text{g}$  にして塗布した場合、  
 黒丸：ナノインスリン量を  $200 \mu\text{g}$  にして塗布した場合。

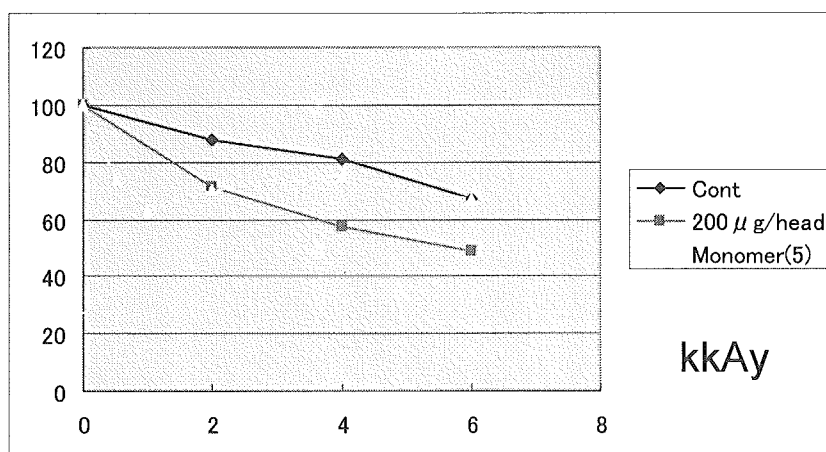
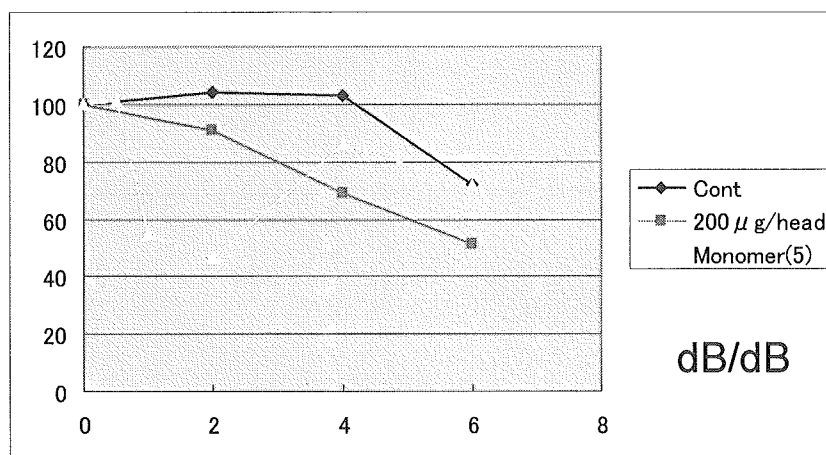
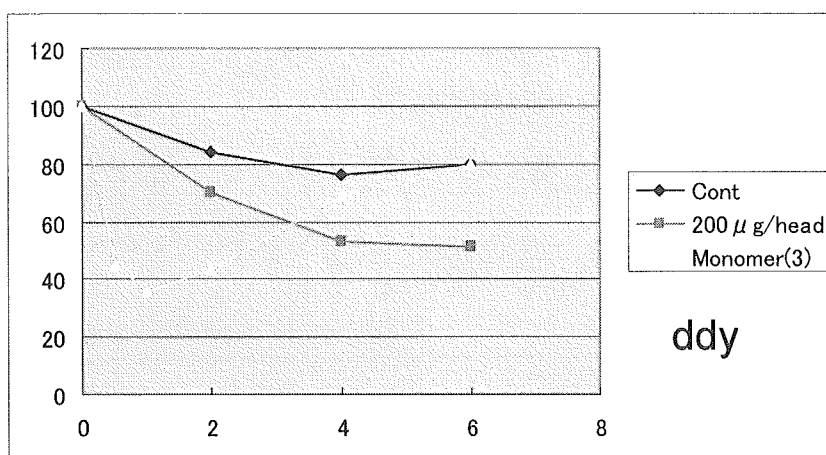


図6 インスリン投与のマウスによる違い  
 正常マウス：d d Y，糖尿病モデルマウス：d B / d Bとk k A y

表1 ナノインスリン投与のAUC比較

### 血糖降下作用 (AUC) と Insulin 吸収量 (AUC)

	n数	Monomer (s.c.)		Nano insulin (dermal)		Dose比率
		Dose ( $\mu$ g/head)	AUC (比較)	Dose ( $\mu$ g/head)	AUC (比較)	
— 血糖降下作用 —						
ddY	20	3	27.8	200	22.2	83
dB/dB	7	5	25.1	200	18.2	55
kkAy	7	5	24.4	200	17.1	57
— Insulin 吸収 —						
ddY	4~5 (13)	3	11.9	200	7.2	110

## 健康人でのナノインスリン経皮吸収の試み

分担研究者

株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発部<sup>1)</sup>、研究開発本部<sup>2)</sup>

上野幸生<sup>1)</sup>、鈴木 潤<sup>2)</sup>

### 要旨

ナノインスリンを用いて、ヒトでの適用を試みた。ナノインスリンをワセリンを基材として、皮膚適用可能な製剤化を図った。健康人2名のボランティア（男性）に対して、前腕内側に塗布してから血糖値を測定した。適用量として、200Uと500Uの2用量を用いた。適用後2時間、4時間、5時間の血糖値を自己血糖測定と同様にして測定した。結果は、吸収があまり良くないためと考えられるが、インスリンを投与していないコントロールと比較して有意な低下は認めなかった。

### A. 目的

これまでのマウスを用いた皮膚適用実験の結果から、ナノインスリン粒子が吸収されている可能性が考えられる。また、粒子内に封入したインスリンにおいても失活することがないことも明らかにされている。しかし、バイオアベイラビリティは低く2%程度であった。マウスの皮膚の構造とヒトの皮膚構造にある程度の違いがあることは明らかであるが、充分皮膚からの吸収が可能ではないかと考えている。もし、注射以外の投与方法でヒトにおいて効果が認められるのであれば、現在皮下注射を余儀なくされているインスリンの投与方法の画期的な改善が期待される。そこで、インスリンの注射以外による投与方法として、最初の段階として経皮吸収について検討を行うこととした。適用部位としては、簡便性を考慮して前腕内側で行うこととした。

## B. 研究方法

### 1. ナノインスリンの作製

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。

インスリン200 Uまたは500 Uを投与する計画を立て、同量のワセリン塗布を行うので、それに合わせて含有インスリン量を変えたものを塗布前日に調整した。

### 2. 投与の試み

上記製剤をヒトに適用して、その血糖値を測定することにより、安全性・有効性について検索した。計画は社内IRBに諮った。ボランティアとして、2名が参加した。1名は71歳男性（飯○岩○）で、もう1名は64歳男性（小○章○）である。両名とも、糖尿病履歴は無く、定期的健康診断において健康であると判定されていて、肥満ではない。また、両名とも喫煙歴はない。プロトコル、薬剤についての安全性、応急処置の準備と対処などについてその他の説明資料を提示しながら、十分に説明を行った。その後両名からインフォームドコンセントをとった。

株式会社LTTバイオフーマの嘱託社員の関野 一（医師）が責任医師として参加し、試験中は立ち会った。試験実施においては、低血糖発生の可能性を考慮して、緊急の糖分補給ができる体制を整えた。緊急時には、東京慈恵会医科大学病院への搬送ができるよう準備も整えた。

薬剤のワセリン（インスリンを含む・含まないにかかわらず）を左前腕内側に面積約50  $\text{cm}^2$ （6  $\text{cm} \times 8 \text{cm}$ ）に関野医師によって塗布した。採血は、塗布と反対側の右手第2指から採血用穿刺器具（穿刺針ウルトラファインランセット）により行い、グルコカード（チップ）に移した後に血糖測定装置（ダイアメータ、アベンティスファーマ社製）を用いて測定した。これは、糖尿病患者の日常の血糖測定と同一の方法である。

両名とも、実施当日は午前6時30分までに朝食を済ませ、実施中に昼食並び

に間食は摂っていない。水ならびにお茶類（糖分を含まないもの）については摂取を自由とした。午前8時50分にインスリン投与の前値を測定した。その後、午前9時に塗布を行った。採血と血糖測定は、塗布後2時間目、4時間目、5時間目とした。採血・血糖測定時にはインタビューを行い、その症状などについての聴取を行った。実施中は、ボランティアの両名とも安静を保った。この試みは、3日間行った。1日目においてはインスリンの入っていないワセリンを塗布した。2日目はインスリン200Uを含むナノインスリンを塗布し、3日目は500Uに増量した。

### C. 研究成果

実施した3日間においては、2名のボランティアは体調には問題はなかった。3日間を通じて実施中の各時間に実施したインタビューにおいても何らの訴えもなかった。また、低血糖症状が生じて、処置するような事態には至らなかった。3日間の塗布において、ワセリン（ナノ9ンスリンを含む）の塗布部位に有害的な症状は出現しなかった。

血糖値の測定は各時間2回もしくは3回行ない、その平均値をデータとした。1日目の前値は、一人（は118mg/dlで、もう一人は108mg/dlであった。2日目はそれぞれ104mg/dlと100mg/dl、3日目は98mg/dlと121mg/dlであった。いずれも正常値からのスタートであった。実施時間の5時間の間摂食をしていないので、1日目のコントロールにおいても血糖値の下降が観察された。被験者（飯○岩○）については、5時間後に90mg/dlまで徐々に低下した。被験者（小○章○）については92mg/dlとなった。2日目は200Uを塗布して血糖値の測定を行ったところ、両名ともゆっくりとした血糖値低下を認めた。しかし、この低下は1日目のコントロールと比べて、有意に低下することはなかった。3日目は500Uに増量して実施したが、やはり観察されたゆっくりとした血糖値低下の程度は1日目のコントロールと差があるようには見受けられなかった。

### D. 考察

マウス背部皮膚への適用におけるバイオアベイラビリティ（BA）が約2%程度であったことを考慮して、ヒトへの適用用量を200Uと500Uに設定して、試みを行った。この試みについては2名で行ったため信頼度には欠けるものの、2名のいずれもがインスリン投与によるはっきりとした効果が認められなかったことから、このナノインスリン粒子の前腕内側塗布では吸収が悪か



った可能性が想定される。

経皮の吸収については、部位によってかなりの差があることが知られている。表1に示したように、前腕内側からのヒドロコルチゾンの吸収を1としたとき、陰囊では4.2、顎では1.3、額では6、頭皮では3.6と報告されている。このナノインスリン製剤の投与（適用）部位をこのような部位に設定すれば、吸収についてはかなりの改善が望めるところであろう。しかし、上記部位は実際の適用部位としてはあまり適当でない点や、前腕内側での結果から考慮しても、このままのナノインスリン粒子では適当でないのかもしれない。

2006年になって吸入インスリン製剤が米国FDAで認可された。この製剤は、1～5  $\mu\text{m}$ の粒子径で、吸収率が約6%であるとされている。しかし、この製剤についての経肺投与での問題点も指摘されている。本ナノインスリンの粒子径は300 nm程度であるので経肺投与での吸収効率を考えると、適切な大きさであり、またこの様な欠点の克服は可能であろうと考えている。

#### E. 結論

ボランティアの前腕内側にナノインスリンを塗布して血糖値を刑事的に測定したが、実験に用いたインスリン量では有意な血糖値低下作用は認めなかった。これは、バイオアベイラビリティが低いためであろうと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 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・登録状況

なし。

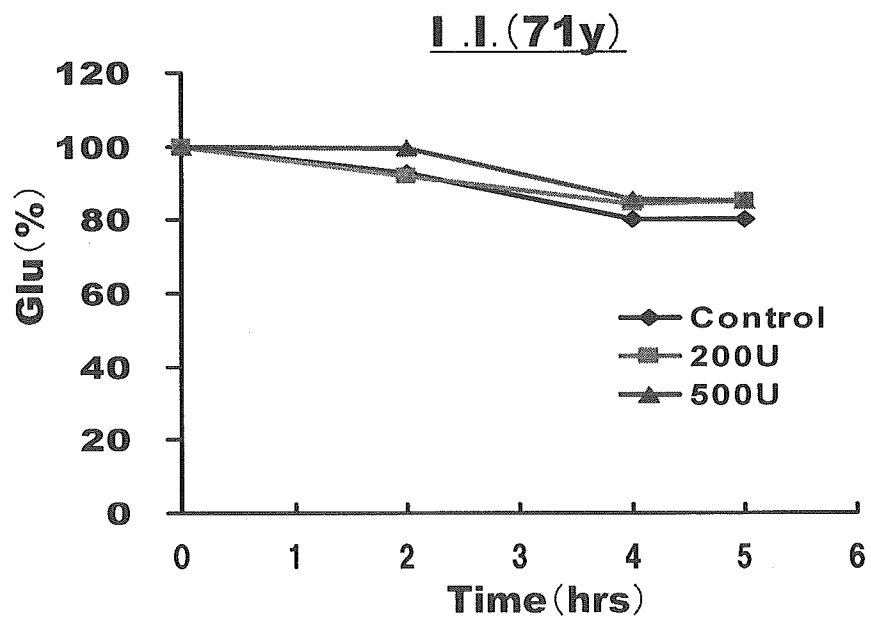
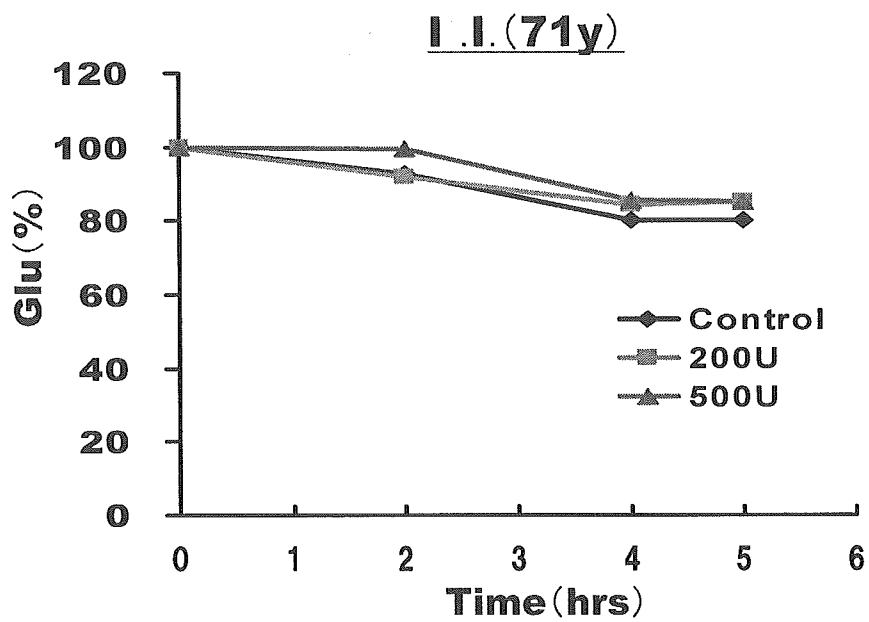


図 ボランティアの前腕内側へのナノインスリン塗布の試み

表 皮膚からの吸収の部位による違い  
(ハイドロコルチゾンの場合)

部位	吸収率 (前腕を1.0とする)
陰囊	4.2
顎	1.3
額	6
眼窩	3.6
頭皮	3.5
背部	1.7
前腕 (外側)	1.1
前腕 (内側)	1.0
手掌	0.83
足首	0.42
足底	0.14

## 蛋白医薬のDDS製剤化についての基礎的研究

分担研究者

水島 徹

熊本大学大学院医学薬学研究部教授

### 研究要旨

我々は非注射型ナノ DDS 製剤の開発には、蛋白質の高次構造を制御する蛋白質、分子シャペロンの研究、特に分子シャペロン誘導剤の発見が重要であると考え、研究を行っている。今年度我々は、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) が小胞体シャペロンを誘導することを発見し、その分子機構を解明した。

#### A. 研究目的

細胞内には蛋白質が正しいフォールディング (高次構造・折り畳み構造) をとるのを積極的に助けている一群の蛋白質 (分子シャペロン) が存在する。分子シャペロンは、合成されたばかりの蛋白質が正しいフォールディングをとることを助けるだけでなく、ストレスによってそのフォールディングが異常になってしまった蛋白質を正常に戻すことも出来る。このように分子シャペロンは細胞内で蛋白質の品質管理を行っている興味深い分子群である。

そこで我々は、分子シャペロンを利用して、蛋白質に正しいフォールディングをとらせる技術を開発している。この技術は非注射型ナノ DDS 製剤を開発するために大変重要であると考えられる。

#### B. 研究方法

##### NSAIDs誘導性遺伝子の検索

我々が開発したストレス遺伝子チップを使って、NSAIDs誘導性遺伝子の検索を行った。

## NSAIDsによる小胞体シャペロン誘導機構の解明

モルモット胃粘膜初代培養細胞を用いて、各種阻害剤の効果などを調べた。

### C.研究結果

胃粘膜細胞を NSAIDs で処理し、誘導される遺伝子をストレス遺伝子チップを使って網羅的に解析した。その結果 GRP78 など、小胞体シャペロン遺伝子を複数同定し、NSAIDs が小胞体シャペロンを誘導することが初めて分かった。

次に NSAIDs による小胞体シャペロン誘導メカニズムについて検討した。我々は細胞内カルシウム濃度上昇の関与を考えた。それはカルシウムイオノフォアなどにより細胞内カルシウム濃度を上昇させた時、小胞体シャペロンが誘導されることを根拠としている。実際に我々は調べた限り全ての NSAIDs により細胞内カルシウム濃度が上昇すること、及び細胞内でカルシウムをキレートしその効果を消失させる BAPTA-AM により、NSAIDs による小胞体シャペロン誘導が抑制されることを見出した。以上の結果は、NSAIDs による小胞体シャペロン誘導に、細胞内カルシウム濃度の上昇が関与していることを示している。

次に我々は NSAIDs による細胞内カルシウム濃度の上昇メカニズムを検討した。我々は、我々は NSAIDs が膜リン脂質と相互作用するという論文に注目し、NSAIDs が膜傷害性を持ち、これが細胞内カルシウム濃度の上昇の原因ではないかと考えた。そこで 10 種類以上の NSAIDs を用いて、その膜傷害性と小胞体シャペロン誘導性(細胞内カルシウム濃度の上昇)の相関性を調べた。その結果、調べた限り全ての NSAIDs は小胞体シャペロンを誘導するだけでなく、赤血球からのヘモグロビンの漏出を促進し膜傷害性を持つことが分かった。さらに蛍光物質であるカルセインを封入したリポソーム(リン脂質のみから成る)を用いて、カルセインの漏出を指標とした膜傷害試験を行った。その結果、全ての NSAIDs がカルセインを漏出させ、NSAIDs はリン脂質(細胞膜上の蛋白質ではなく)をターゲットとして、膜傷害を起こすことが分かった。さらに、これら NSAIDs による膜傷害性と細胞内カルシウム濃度の上昇は大変よく相関しており、NSAIDs はその膜傷害性を介して、細胞内カルシウム濃度の上昇させることが強く示唆された。

#### D.考察

以上の結果からNSAIDsが小胞体シャペロンを誘導すること、及びこの誘導が、NSAIDsの膜傷害性による、細胞内カルシウムの上昇によることがわかった。

#### E.結論

本研究で発見した NSAIDs が小胞体シャペロンを誘導することは、活性蛋白の非注射型ナノDDS製剤に有用であると考えている。

#### F.健康危険情報

該当なし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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<sup>2+</sup> levels in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 31059-31067. (2005)

6. 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)
7. 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. (2005).

学会発表 (招待講演のみ)

- 18 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)
- 19 水島徹 NSAIDs 研究の新展開 北海道大学での特別講演 (2005) (札幌)
- 20 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)
- 21 Tohru Mizushima Induction of Claudin-4 by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Its Contribution to Their Chemopreventive Effect. Digestive Disease Week (2005) (Chicago)
- 22 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)
- 23 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)
- 24 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)
- 25 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)
- 26 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)
- 27 Tohru Mizushima Inhibition of amyloid- $\beta$  production by endoplasmic reticulum chaperones. Second International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine (2005) (Tomar)
- 28 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)
- 29 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)

- 30 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)
- 31 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)
- 32 水島徹 熊本大学附属創薬研究センターについて 住友会招待講演 (2006) (熊本)
- 33 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 第 15 回熊本県臨床薬学フォーラムでの招待講演 (2006) (熊本)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
水島 裕	抗加齢医療とは	日本医事新報	4236	1-11	2005
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
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
水島 裕、桧垣 恵	DDS研究のあゆみとわが国の貢献	<i>Pharm. Tech. Japan</i>	21(12)	1945-1948	2005
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	<i>In submission</i>			
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	<i>Control. Release</i>	(In press)		2006
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	<i>J. Control. Release</i>	105	68-76	2005

Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., and Mizushima Y.	Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticle for a new delivery system.	<i>J. Control. Release,</i>	103	93-98,	2005.
Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect	<i>Cancer Res</i>	65	1868-187 6	2005
Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	50	1641-164 6	2005
Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., and <u>Mizushima, T.</u>	Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	50	1927-193 7	2005

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.	<i>Hearing Research</i>	204	140-146	2005
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.	<i>J. Biol. Chem</i>	280	31059-31067	2005
Ushijima, H., Tanaka, K., Takeda, M., Katsu, T., Mima, S. and Mizushima, T.	Geranylgeranylacetone protects membranes against non-steroidal anti-inflammatory drugs.	<i>Mol. Pharmacol.</i>	68	1156-1161	2005
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.	<i>Oncogene</i>	in press.		2005