

学位論文題名

新規シンナモイル・フェニルアラニン誘導体による  
インスリンの消化管吸収促進と血糖調節作用

学位論文内容の要旨

I. 緒言

現在、インスリン依存型および非依存型糖尿病患者に使用されているインスリン製剤は注射剤のみである。インスリン注射剤は、投与方法の利便性が著しく改善され、薬物コンプライアンスも向上してきた。しかしながら、現在のインスリン療法は、皮下組織あるいは末梢静脈内にインスリンを投与せざるを得ないため、生理的な内因性インスリンの膵臓からの分泌や肝臓への標的化を考慮するならば、消化管から吸収された外因性インスリンが門脈を経由して最初に肝臓へ移行し、肝臓においてインスリン作用が発揮され、血糖制御が可能な手段である経口ルートが望ましいと考えられる。

このような観点から、多くの研究者らにより経鼻、経肺、直腸、子宮内、経口投与など注射以外の投与ルートの可能性について研究されてきた。しかしながら、これら非注射によるインスリン療法には分解による失活などの未解決の問題が多く残されており、特にインスリンの経口投与法は臨床実用の域に達していないのが現状である。

本研究ではインスリンの経口投与を臨床可能にするための基礎的知見を得るために、シンナモイル・フェニルアラニン(Cin-Phe)誘導体によるインスリンの腸管吸収促進作用をインスリン分解抑制作用およびインスリンの吸収動態の面から解析した。さらに、糖尿病モデル動物における血糖調節作用についても検討したので報告する。

II. 対象と方法

1. シンナモイル・フェニルアラニン誘導体

Cin-Phe誘導体として主にN- $\alpha$ -Chloro-cinnamoyl-D-phenylalanine (A-3989)とN- $\alpha$ -Chloro-4-methyl-cinnamoyl-D-phenylalanine (A-4266)を用いた。上記の化合物を含む約80種類の誘導体は味の素株式会社中央研究所から供与された。

2. インスリン・シンナモイル・フェニルアラニンニン(IN・Cin-Phe)誘導体溶液の調製

インスリンとしてブタインスリン(Connaught社製)およびヒトインスリン(Novo社製)を用いた。なお、インスリンは0.05N-HClで溶解し、Cin-Phe誘導体は0.1N-NaOHで溶解後、0.01Mリン酸緩衝液-0.9%生理食塩液(PBS)で希釈した。これらの溶解液を氷冷下で等量(1:1)で混合した後、PBSで希釈しIN・Cin-Phe誘導体調製液として用いた。

3. 動物

6週齢の雌ICR-CD1マウス(体重15-20g)および8週齢の雌Wistar系ラット(体重150-200g)を用い、16-18時間絶食後、実験に使用した。糖尿病モデル動物としては、常法に従って、Streptozotocin(Sigma社製)をマウスは120mg/kg、ラットは65mg/kgを尾静脈より1回注射し、注射後7日ないし10日目にSTZ誘発糖尿病動物を得、実験に使用した。さらに、ブドウ糖負荷試験において2g/kgのブドウ糖を腹腔内投与することにより、耐糖能試験を行いその耐糖能の程度を確認した。

4. マウス腸管内酵素によるインスリン分解の測定

絶食後の雌ICR-CD1マウスの全腸管粘膜を擦過した後5mlのPBSでホモジナイズし、遠心分離後の

上清を得、Lichrorep DIOLカラムを用いたHPLCで精製した。このブールした精製酵素(タンパク濃度:160 ug/ml)をインスリン(1.25 U/ml)分解の検討に供した。なお、インスリン濃度はRadio-immunoassay (RIA法)で2抗体法を用いたインスリン“栄研”キットにより測定した。

#### 5. マウスおよびラットにおけるインスリン経口投与賦活効果の検討

種々のインスリンおよびIN・Cin-Phe誘導体調製液を経口、十二指腸、空腸、回腸および筋肉内投与し、投与後所定時間毎に動物を屠殺後、頸動脈血および門脈血を採取し、血清を分離した。血清中のブドウ糖濃度は常法に従って、酵素法(GOD-PAP法)により測定した。一方、血清中のインスリン濃度としてIRIレベルを測定し、インスリンの吸収量は台形法により血清中濃度下面積(AUC)として求め、さらに、インスリンの生物学的利用率(Bioavailability)は、十二指腸投与時のIN・Cin-Phe誘導体調製液のAUCと筋肉内注射時のAUCの比( $AUC_{i.d.}/AUC_{i.m.}$ )および投与量から求めた。

### III. 結果

1. マウス消化管内酵素によるIN・Cin-Phe誘導体調製液のインスリン分解抑制作用を検討した結果、濃度に依存して阻止作用が認められたことから十二指腸投与の有効性が示唆された。
2. 正常マウスにおけるIN・Cin-Phe誘導体調製液の十二指腸投与により、インスリン吸収促進効果による顕著な血糖降下作用が認められた。これらのインスリン血中濃度曲線から求めたAUCより、インスリンのBioavailabilityは約30%と良好な吸収性を示した。
3. STZ誘発糖尿病およびSTZ誘発亜糖尿病動物におけるブドウ糖負荷試験においてもIN・Cin-Phe誘導体の経口投与および十二指腸投与によりインスリン吸収促進効果による血糖調節が可能であった。
4. STZ誘発糖尿病ラットを用いたインスリンの腸管吸収部位の検討では、十二指腸あるいは空腸部位の方が回腸部位より吸収能が良いことを確認できた。
5. IN・Cin-Phe誘導体調製液の腸管吸収後の門脈血および末梢血のインスリン動態の解析をSTZ亜糖尿病ラットで検討した結果、経口投与後15分後と比較すると門脈血のインスリン濃度が末梢血の濃度より約8倍高いことが認められた。

### IV. 考察

本研究では、インスリンの吸収効率を高め、吸収速度の調節が可能でかつ長期連用でも安全性の高いインスリン経口投与賦活剤を開発することを目的とし、IN・Cin-Phe誘導体調製液のインスリン経口投与賦活化作用について検討した。消化管内での安定性についての結果から、これら誘導体のマウス消化管内酵素に対するインスリン分解抑制作用が認められ、かつその作用は濃度に依存することが明らかとなった。これらCin-Phe誘導体によるインスリン分解抑制機序については未だ解明されていない点が多いが、少なくともTrypsin活性にはほとんど影響しないが、Chymotrypsin活性に対し阻止作用( $IC_{50}$ : 4.44 mg/ml)を示すことも判明している。また、Shillingらのインスリン生物活性の保持には胃酸による分解と小腸上部における $\alpha$ -chymotrypsinからの防御が共に必要であるとの知見とも一致している。インスリンの凝集によるタンパク分解酵素に対する影響およびインスリン分子サイズの増大が、少なくとも一部paracellular透過による吸収を妨げるという可能性の点からも、Cin-Phe誘導体によりインスリンは余り不活性化されずに生物活性の保持された状態で消化管内に存在していることが示唆された。一方、IN・A-3989およびIN・A-4266調製液を絶食マウスに十二指腸投与したところ、顕著なインスリン吸収促進効果と血糖降下作用を示した。インスリンの血中濃度曲線からAUCを求め、Bioavailabilityを計算したところ、約30%と良好な吸収性を示した。正常状態のみではなくSTZ誘発糖尿病動物においても、これらIN・A-3989およびIN・A-4266調製液はインスリン活性保持作用による血糖降下作用を示し、かつ、ブドウ糖負荷試験においてもIN・A-4266調製液は耐糖能異常を改善する作用を有していた。また、IN・Cin-Phe誘導体調製液によるインスリンの腸管吸収促進作用は回腸部位に比べ十二指腸あるいは空腸部位の方がインスリン吸収能に優れていることがSTZ糖尿病ラットで確認できた。これらの結果は、インスリンの胃酸による分解を抑制し、十二指腸部位に送り込むことがIN・Cin-Phe誘導体によるインスリンの吸収ひいては活性発現を著しく高めることを強く示唆するものである。STZ亜糖尿病ラットにおけるIN・Cin-Phe誘導体調製液の経口投

与後15分後で比較すると門脈血のインスリン濃度が末梢血の濃度より約8倍高いことが認められ、Cin-Phe誘導体(150 mg/kg)のみの経口投与により、絶食マウスにおいてインスリン濃度および血糖に対し何等の影響も及ぼさなかったという事実からも、膵臓から分泌された内因性のインスリンではなく、少なくとも投与されたインスリンが消化管から吸収され門脈に移行したという証明となり得ると考えられる。Cin-Phe誘導体によるインスリンの吸収促進メカニズムおよび投与量の設定などについては多くの基礎的検討が必要であるが、糖尿病モデル動物を用いて得られたIN・Cin-Phe誘導体調製液の有効性の結果は、インスリンの腸溶性製剤を含めた経口投与製剤のための基礎的知見として極めて有用と思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 勝 巳  
副 査 教 授 齋 藤 秀 哉  
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学位論文題名

## 新規シンナモイル・フェニルアラニン誘導体による インスリンの消化管吸収促進と血糖調節作用

現在、インスリン依存型および非依存型糖尿病患者に使用されているインスリン製剤は注射剤のみである。インスリン注射剤は、投与方法の利便性が著しく改善され、薬物コンプライアンスも向上してきたが、現在のインスリン療法は皮下組織あるいは末梢静脈内にインスリンを投与せざるを得ないため種々の問題点がある。生理的な内因性インスリンの膵臓からの分泌や肝臓への標的化を考慮するならば、消化管から吸収された外因性インスリンが門脈を経由して最初に肝臓へ移行し、肝臓においてインスリン作用が発揮され、血糖制御が可能な経口ルートが望ましいと考えられる。

このような観点から、申請者は、インスリンの経口投与を臨床上可能にするための基礎的知見を得るために、シンナモイル・フェニルアラニン(Cin-Phe)誘導体によるインスリンの腸管吸収促進作用をインスリン分解抑制作用およびインスリンの吸収動態の面から解析し、糖尿病モデル動物における血糖調節作用についても検討を加えた。

Cin-Phe誘導体として主にN- $\alpha$ -Chlorocinnamoyl-D-phenyl-alanine (A-3989)とN- $\alpha$ -Chloro-4-methyl-cinnamoyl-D-phenylalanine (A-4266)を用い、インスリンはブタインスリン(Connaught社製)およびヒトインスリン(Novo社製)を用いた。動物は、6週齢の雌ICR-CD1マウス(体重15-20g)および8週齢の雌Wistar系ラット(体重150-200g)を用い、16-18時間絶食後、実験に使用した。糖尿病モデル動物としては、常法に従ってStreptozotocin(Sigma社製)を尾静脈より1回注射し、STZ誘発糖尿病動物を得た。マウスおよびラットにおけるインスリン経口投与賦活効果の検討において、種々のインスリンおよびIN-Cin-Phe誘導体調製液を経口、十二指腸、空腸、回腸および筋肉内投与し、投与後所定時間毎に動物を屠殺後、頸動脈血および門脈血を採取し、血清中のインスリン濃度とブドウ糖濃度を測定し効果を判定した。

マウス消化管内酵素によるIN-Cin-Phe誘導体調製液のインスリン分解抑制作用の検討より、濃度に依存して阻止作用が認められたことから十二指腸投与の有効性が示唆された。これらCin-Phe誘導体によるインスリン分解抑制機序については未だ解明されていない点が多いが、少なくともTrypsin活性にはほとんど影響しないが、Chymotrypsin活性に対し阻止作用(IC<sub>50</sub>; 4.44 mg/ml)を示すことが判明している。従って、Cin-Phe誘導体によりインスリンは生物活性を保持した状態で消化管内に存在していることが示唆された。また、正常マウスにおけるIN-Cin-Phe誘導体調製液の十二指腸投与により、インスリン吸収促進効果による顕著な血糖降下作用を認めた。これらのインスリン血中濃度曲線から求めたAUCより、インスリンのBioavailabilityは約30%と良好な吸収性を示した。

さらに、STZ誘発糖尿病動物におけるブドウ糖負荷試験においてもIN・Cin-Phe誘導体の経口投与および十二指腸投与によりインスリン吸収促進効果による血糖調節が可能であった。STZ誘発糖尿病ラットを用いたインスリンの腸管吸収部位の検討では、十二指腸あるいは空腸部位の方が回腸部位より吸収能が良いことも確認できた。

これらの結果は、インスリンの胃酸による分解を抑制し、十二指腸部位に送り込むことがIN・Cin-Phe誘導体によるインスリンの吸収ひいては活性発現を著しく高めることを強く示唆するものである。また、STZ垂糖尿病ラットにおけるIN・Cin-Phe誘導体調製液の経口投与後15分後と比較すると門脈血のインスリン濃度が末梢血の濃度より約8倍高いことが認められ、Cin-Phe誘導体(150 mg/kg)のみの経口投与により、絶食ラットにおいてインスリン濃度および血糖に対し何等の影響も及ぼさなかったという事実からも、膵臓から分泌された内因性のインスリンではなく、少なくとも投与されたインスリンが消化管から吸収され門脈に移行したという証明となり得ると思われる。

これらの結果は、IN・Cin-Phe誘導体を凍結乾燥品とし腸溶性顆粒あるいは錠剤として製剤化するための基礎的知見として極めて有用であると考えられる。

審査員一同は、これらのインスリンの消化管からの吸収促進と血糖調節にかんする基礎的検討の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。