

アルキル化 $\beta$ -シクロデキストリンの  
経口製剤への応用に関する基礎的研究

乙第3号

1990

上野 雅 男

アルキル化 $\beta$ -シクロデキストリンの  
経口製剤への応用に関する基礎的研究

1990

上野 雅男

# 目次

総論の部 .....	1
緒言 .....	1
第一編 水溶性薬物担体としてのメチル化 $\beta$ -CyDの有用性 .....	4
第一章 ビタミンE誘導体の溶解性並びにバイオアベイラビリティの向上 .....	6
(1) DM- $\beta$ -CyDと $\alpha$ -トコフェロールエステルの複合体形成 .....	6
(2) 溶解挙動 .....	11
(3) <i>In Vivo</i> 吸収挙動 .....	13
(4) 小括 .....	15
第二章 コエンザイムQ <sub>10</sub> の溶解性並びにバイオアベイラビリティの向上 .....	16
(1) 溶解挙動 .....	16
(2) <i>In Vivo</i> 吸収挙動 .....	20
(3) 小括 .....	21
第三章 メナキノン-4の吸収特性並びに薬理効果の向上 .....	22
(1) MK-4とDM- $\beta$ -CyDとの複合体形成 .....	23
(2) 溶解挙動 .....	27
(3) <i>In Vivo</i> 吸収挙動 .....	28
(4) 血液凝固活性 .....	29
(5) MK-4の吸収経路に及ぼすDM- $\beta$ -CyDの影響 .....	31
(6) 小括 .....	34
第四章 第一編の考察 .....	35
第二編 疎水性薬物担体としてのエチル化 $\beta$ -CyDの有用性 .....	39
第一章 エチル化 $\beta$ -CyDの物理化学的性質 .....	40
(1) 溶解性 .....	40
(2) 安定性 .....	42
(3) 界面活性 .....	42

(4) 水分含量	42
(5) 小括	44
第二章 硝酸イソソルビドの徐放化	45
(1) 複合体の調製	45
(2) 溶出挙動	48
(3) 小括	49
第三章 <i>In Vivo</i> 吸収挙動	50
(1) カプセル剤投与の場合	50
(2) 錠剤投与の場合	50
(3) 小括	53
第四章 第二編の考察	54
<b>結論の部</b>	<b>57</b>
謝 辞	59
<b>実験の部</b>	<b>60</b>
第一編に関する実験	60
第二編に関する実験	68
引用文献	72

## 総論の部

### 緒言

近年、ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery Systems; DDSと略記) の概念に基づく新しい投与形態の研究開発が活発に行なわれており、疾病の多様化や高齢化に対応した理想的な治療システムとして人類の健康の維持と増進に大きく貢献するものと期待されている。<sup>1-3)</sup> この DDS 構築の基本となるのは、放出制御や標的指向化用の素材となる薬物担体の有効利用にあると言っても過言ではない。そのような機能性製剤素材は、安全性、生体適合性、安定性、経済性などを具備しなければならないが、日進月歩の科学技術はいずれこれらの課題を克服するものと思われる。

分子カプセルとも呼ばれるシクロデキストリン (cyclodextrin; CyDと略記) は、デンプンに酵素 (たとえば, cyclodextrin-glycosyl transferase) を作用させて得られる環状のオリゴ糖であり、分子内に疎水性の空洞を有し、空洞の外側は親水性で、水中油型のミセルに似た機能を示す単分子的ホスト分子に分類される。<sup>4-6)</sup> 通称天然 CyD と呼ばれる同族体にはグルコース 6 個からなる  $\alpha$ -CyD, 7 個からなる  $\beta$ -CyD, 8 個からなる  $\gamma$ -CyD の 3 種がよく知られている。<sup>5)</sup>  $\alpha$ -CyD は空洞径が小さいためゲスト薬品は小さいものに限られる。 $\beta$ -CyD は安価で包接対象は広いが、水への溶解度が低いのが欠点である。空洞径の大きな  $\gamma$ -CyD は溶解性や安全性に優れるが、量産性に課題がある。これら CyD の疎水空洞内にゲスト分子が取り込まれて包接複合体 (inclusion complex) を形成すると、ゲスト分子の性質は様々に変化する。この現象はプロスタグランジン E 類の可溶化や安定化に利用され、医薬品としてわが国で初めて製剤化された。<sup>7-9)</sup> これを契機に、CyD は新薬の開発段階から積極的に利用され、難水溶性薬品の可溶化、不安定な薬品の安定化、液状薬品の粉体化・揮散性の抑制、粉体の凝集性・流動性の改善、水溶性薬品の放出制御、バイオアベイラビリティの改善、局所刺激性の軽減などへの利用が検討されている。<sup>10-14)</sup> 最近、国内では防御機構増強型胃潰瘍治療薬である塩酸ベネキサート及び抗狭心症薬であるニトログリセリンの舌下錠<sup>15)</sup> が、イタリアでは非ステロイド性消炎

鎮痛薬ピロキシカムの製剤化に $\beta$ -CyD を用いた経口投与製剤が開発された。このように現在では使用前例のある $\alpha$ -または $\beta$ -CyD が各種製剤に汎用されているが、今後 DDS などの薬物担体として多様な用途に対応するには、天然 CyD の物性を改良し、機能性を高める必要がある。

天然 CyD の化学修飾においては、経済性・汎用性などの面から $\beta$ -CyD (Fig. 1) を原料に用いて様々な誘導体が構築されている。<sup>16-25)</sup> その中で $\beta$ -CyD の水酸基にメチル基またはエチル基を導入したいわゆるアルキル化 $\beta$ -CyD の特異な物性は、セルロース誘導体の場合と対比されながら近年特に注目を集めている。

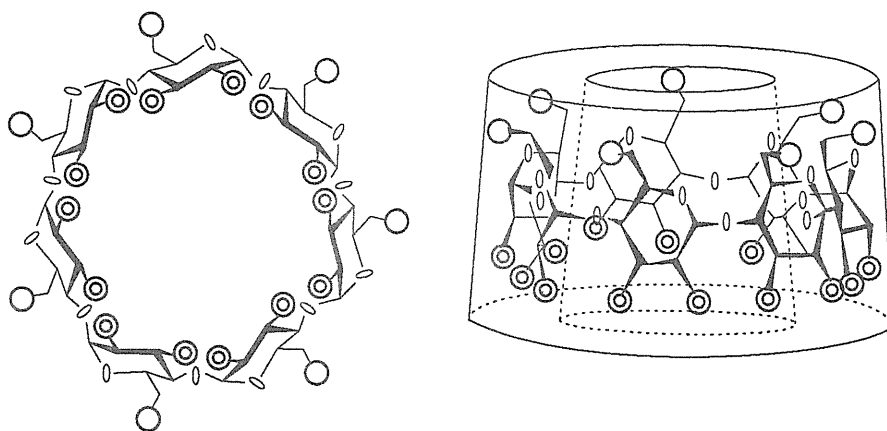


Fig. 1. Chemical Structure of  $\beta$ -CyD

たとえば、 $\beta$ -CyD を構成するグルコースの水酸基 (2, 3, 6 位) をメチル化すると、水にも油にも溶けやすくなり、空洞の疎水空間が広がって包接機能も著しく増大する。<sup>26-28)</sup> 一方、 $\beta$ -CyD の水酸基にエチル基を導入すると、メチル化体とは対照的に難水溶性となり、置換度が増すにつれて水溶性は低下する。<sup>29, 30)</sup> これらアルキル化 $\beta$ -CyD は適度な界面活性を有し、酸や $\alpha$ -amylase による分解を受けにくく、吸湿性も小さいことなど $\beta$ -CyD の欠点が改善されることから、各種製剤への有効利用が期待されている。<sup>31)</sup>

そこで、本研究においては難水溶性薬物に対して可溶化作用を有する親水性のホスト分子の中から heptakis(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CyD と略記) を選び、また、水溶性薬物の徐放化に有用性が期待される疎水性ホスト分子として heptakis(2,6-di-O-ethyl)- $\beta$ -cyclodextrin (DE- $\beta$ -CyD と略記) を用いて、経口投与における製剤特性の向上に関する基礎的検討を行なった。DM- $\beta$ -CyD による可溶化を対象とする薬物には、脂溶性薬物であるビタミンEのエステル類 ( $\alpha$ -tocopheryl acetate,  $\alpha$ -tocopheryl nicotinate; VE エステルと略記)<sup>32)</sup> ビタミンK<sub>2</sub>の活性体として知られるメナキノン-4 (menaquinone-4; MK-4 と略記)<sup>33)</sup> コエンザイムQ<sub>10</sub> (ubidecarenone; CoQ<sub>10</sub> と略記)<sup>34)</sup> を用いて水溶性の複合体形成を明らかにするとともに、溶解性改善に伴うバイオアベイラビリティの向上を企図した。一方、DE- $\beta$ -CyD による徐放化の対象としては硝酸イソソルビド (isosorbide dinitrate; ISDN と略記)<sup>35)</sup> を用いて、難水溶性の複合体形成を明らかにし、溶解速度の制御による徐放化を企図した。本研究で対象とした脂溶性薬物は経口投与(特に、空腹時もしくは胆汁分泌欠損状態)において極めて難吸収性であり、また、低融点のため製剤操作上不都合な点が多いことが知られている。ISDN は抗狭心症薬として現在汎用されているが、生物学的半減期が短く投与頻度が多いことから、製剤加工的な工夫により薬効の持続が望まれている。これら薬物とアルキル化 $\beta$ -CyD との水溶液中における複合体形成に関しては T. Higuchi ら<sup>36)</sup> により確立された溶解度法を適用し、特に DM- $\beta$ -CyD 系における高次の複合体形成を定量的に検討した。また、固体状態における相互作用の検討には主に熱分析と粉末X線回折を適用した。さらに、混練法により調製した固体複合体をビーグル犬またはラットに経口投与し、DM- $\beta$ -CyD の場合は溶解性および吸収性の改善、DE- $\beta$ -CyD 複合体の場合は血中濃度の持続効果を薬物単独投与時の場合と比較検討した。

その結果、DM- $\beta$ -CyD は難水溶性薬物の速溶解性担体として、また、DE- $\beta$ -CyD は徐放化用担体として経口投与で所期の目的を達成できることが *in vitro* および *in vivo* 実験から示唆され、本研究においてアルキル化 $\beta$ -CyD の機能性製剤素材としての有用性の一端を明らかにすることができた。

## 第一編 水溶性薬物担体としてのメチル化 $\beta$ -CyD の有用性

現在汎用されている  $\beta$ -CyD は有機溶媒にはほとんど溶けず、また水への溶解度 (1.85 g/dl, 25 °C) にも難点があり、製剤添加物として用途に制限があることが指摘されている。<sup>30, 31)</sup> 近年、水溶性誘導体としてヒドロキシアルキル化  $\beta$ -CyD<sup>19-21)</sup>、分岐  $\beta$ -CyD<sup>22, 23)</sup>、メチル化  $\beta$ -CyD<sup>26-28)</sup> などが注目され、機能性素材として製剤への有効利用が期待されている。代表的なメチル化  $\beta$ -CyD として、 $\beta$ -CyD の 2, 6 位の水酸基をメチル化した DM- $\beta$ -CyD および  $\beta$ -CyD の全ての水酸基をメチル化した heptakis(2, 3, 6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (TM- $\beta$ -CyD と略記) の 2 種がよく知られている (Table 1)。TM- $\beta$ -CyD は構成単位であるグルコース水酸基間の水素結合を形成できないため、環構造は著しく歪んでおり、空洞内部に突き出した 3 位のメチル基が立体障害となって、包接能は若干低下する。<sup>37)</sup> 一方、DM- $\beta$ -CyD は 3 位の水酸基が残存するため分子内外で水素結合が可能であり、 $\beta$ -CyD の構造に類似した円錐台形のバケツ形構造をとっている。しかも空洞がより深くなって疎水空間が大きいため、包接能は  $\beta$ -CyD よりも優れている。<sup>38)</sup>

これらメチル化  $\beta$ -CyD は天然  $\beta$ -CyD に比べて著しく異なる物性を有する (Table 1 参照)。<sup>38)</sup> たとえば、メチル化  $\beta$ -CyD は水にも有機溶媒にも溶け易く、低い吸湿性と高い界面活性を有する。メチル化  $\beta$ -CyD の水への溶解挙動は天然  $\beta$ -CyD と対照的に冷水によく溶ける発熱溶解であり、高温では非イオン性界面活性剤の場合と類似の曇点現象を示す。 $\beta$ -CyD のグリコシド結合は  $\alpha$ -amylase で分解されるが、メチル化  $\beta$ -CyD は基質特異性により酵素分解を受け難い。<sup>31)</sup>

$\beta$ -CyD は急性および慢性毒性試験の結果、安全性が高く、消化管からはほとんど吸収されずに消化管内の酵素や腸内細菌によって開環後、グルコースと同様な吸収・分布・排泄挙動を示すことが既に報告されている。<sup>39)</sup> 一方、メチル化  $\beta$ -CyD の安全性や吸収挙動の詳細は未解明であるが、局所傷害性の指標となる溶血活性や筋肉刺激性は  $\beta$ -CyD よりも強く、安全性に若干問題があるため、注射剤用の薬物担体としては好ましくないものと考えられている。<sup>30)</sup> さらに、上釜らの最近の報告によると、DM- $\beta$ -CyD は経口投与では消化管からほとんど吸



収されず、腸内細菌でも分解を受けずに intact な状態で糞便中に排出されることが確かめられている。<sup>40)</sup> このように、メチル化  $\beta$ -CyD は経口投与では安全性に支障のない機能性製剤素材として天然  $\beta$ -CyD よりも有用性が高いものと考えられる。

そこで本研究では、親水性のメチル化  $\beta$ -CyD 誘導体の中から、疎水空間が大きく包接機能に優れる DM- $\beta$ -CyD を選んだ。可溶化を対象とする薬物には脂溶性薬物である VE のエステル類 ( $\alpha$ -tocopheryl acetate,  $\alpha$ -tocopheryl nicotinate),<sup>32)</sup> メナキノン-4 (MK-4),<sup>33)</sup> コエンザイム Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>)<sup>34)</sup> をモデル薬物に選び、まずこれら薬物と DM- $\beta$ -CyD との水溶性の複合体形成を明らかとし、さらに、溶解性改善に伴うバイオアベイラビリティの向上を企図した。以下に各薬物ごとに検討結果を詳述する。

Table 1. Some Physicochemical and Biological Properties of Methylated  $\beta$ -CyDs

Property	$\beta$ -CyD	DM- $\beta$ -CyD	TM- $\beta$ -CyD
Number of glucose unit	7	7	7
Internal cavity diameter ( $\text{\AA}$ ) <sup>a)</sup>	6	6	4-7
Melting point ( $^{\circ}\text{C}$ )	280	295-300	157
$[\alpha]_D^{25}$ <sup>b)</sup>	163	160	158
Water content (%) <sup>c)</sup>	16.2	2.8	1.6
Solubility (g/dl) <sup>b)</sup>	1.85	57	31
Surface tension (mN/m) <sup>d)</sup>	71	62	56
Half life of ring opening (h) <sup>e)</sup>	5.4	8.0	1.7
50% Hemolysis (mM) <sup>f)</sup>	5.0	1.0	2.5

a) Estimated by the Corey-Pauling-Koltun (CPK) model.

b) In water at 25  $^{\circ}\text{C}$ .

c) At 75% relative humidity. Determined by Karl-Fischer method.

d) Concentration of CyDs was 0.1 mM.

e) In 1.0 N HCl at 60  $^{\circ}\text{C}$ .

f) Human erythrocytes (0.25%) in pH 7.4 isotonic phosphate buffer at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

## 第一章 ビタミンE誘導体の溶解性並びにバイオアベイラビリティの向上

脂溶性ビタミンE誘導体である $\alpha$ -トコフェロールエステルの経口投与による吸収率は、絶食時や胆汁分泌のない状態で極めて低く、その一つの理由として消化管内での低い溶解性によることが知られている。<sup>41, 42)</sup> 著者は可溶化剤の検索に関する予備的な実験から、天然 CyD では $\alpha$ -トコフェロールエステルの溶解性がほとんど改善されないことを見出した。そこで本研究では、DM- $\beta$ -CyD との複合体形成を利用して酢酸 $\alpha$ -トコフェロールおよびニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール (Fig. 2) の溶解性並びにバイオアベイラビリティの向上を目的として以下の検討を行った。

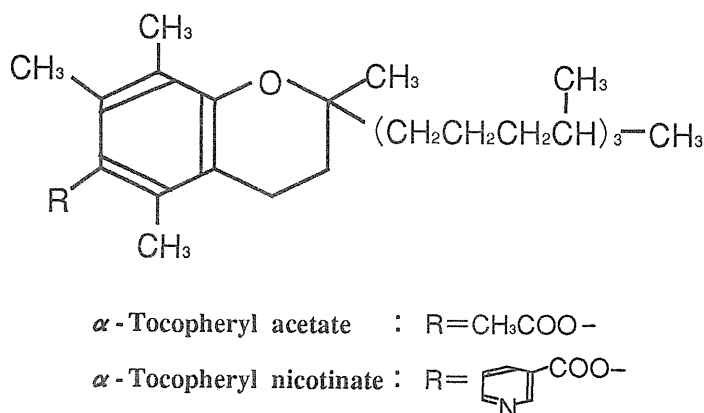


Fig. 2. Chemical Structure of  $\alpha$ -Tocopheryl Esters

### (1) DM- $\beta$ -CyD と $\alpha$ -トコフェロールエステルの複合体形成

DM- $\beta$ -CyD による $\alpha$ -トコフェロールエステルの溶解度相図を Fig. 3 に示す。エステル類の水への低い溶解度は DM- $\beta$ -CyD との複合体形成により著しく改善された。たとえば、各薬物の溶解度は 0.1 M の DM- $\beta$ -CyD 添加により  $10^5$  倍以上増大した。このような顕著な可溶化効果は従来の薬物/CyD系では例のない初めての知見である。

Fig. 3 において, DM- $\beta$ -CyD の添加濃度の増加につれて薬物の溶解度が指数関数的に上昇する溶解度曲線は, T. Higuchi らが定義した  $A_p$  型に分類され,<sup>36)</sup> 高次の複合体形成を示唆する。そこで, 高次複合体の安定度定数を決定するため, 上昇曲線を定量的に解析した。すなわち, ゲスト薬物 G とホスト分子 C が 1 : n モル比で逐次的に包接複合体を形成すると仮定した場合, その化学量論的な関係は式 (1) で示され, 各安定度定数 ( $K_{1:n}$ ) は式 (2) で定義される。<sup>43)</sup>

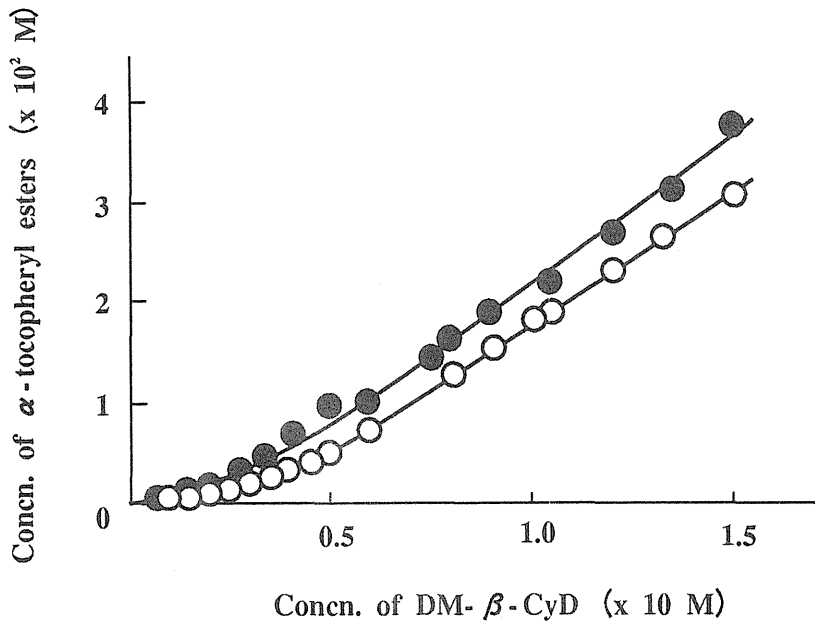
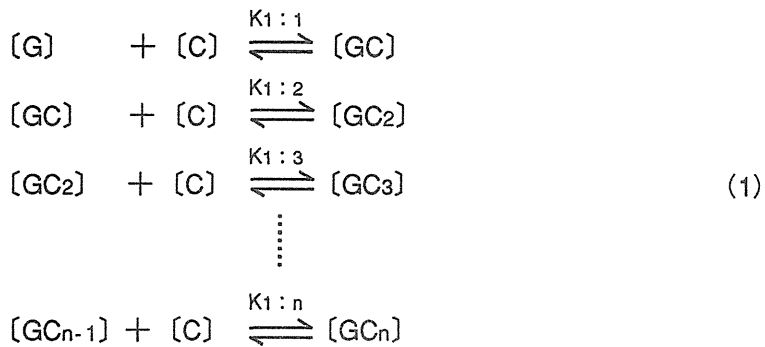


Fig. 3. Phase Solubility Diagrams of  $\alpha$ -Tocopheryl Ester-DM- $\beta$ -CyD System in Water at 25 °C

○:  $\alpha$ -tocopheryl acetate, ●:  $\alpha$ -tocopheryl nicotinate.



$$\begin{aligned}
K_{1:1} &= \frac{[GC]}{[G][C]} \\
K_{1:2} &= \frac{[GC_2]}{K_{1:1}[G][C]^2} \\
K_{1:3} &= \frac{[GC_3]}{K_{1:1}K_{1:2}[G][C]^3} \\
&\vdots \\
K_{1:n} &= \frac{[GC_n]}{K_{1:1}K_{1:2}\cdots K_{1:n-1}[G][C]^n}
\end{aligned} \tag{2}$$

$$G_t = [G] + [GC] + [GC_2] + \cdots + [GC_n] \tag{3}$$

$$C_t = [C] + [GC] + 2[GC_2] + \cdots + n[GC_n] \tag{4}$$

$$\begin{aligned}
G_t &= [G_0] + K_{1:1}[G_0][C_f] + K_{1:1}K_{1:2}[G_0][C_f]^2 + \cdots \\
&\quad + K_{1:1}K_{1:2}\cdots K_{1:n}[G_0][C_f]^n
\end{aligned} \tag{5}$$

$$\begin{aligned}
C_t &= [C_f] + K_{1:1}[G_0][C_f] + 2K_{1:1}K_{1:2}[G_0][C_f]^2 + \cdots \\
&\quad + nK_{1:1}K_{1:2}\cdots K_{1:n}[G_0][C_f]^n
\end{aligned} \tag{6}$$

ここで  $[G]$ ,  $[C]$  は遊離型のゲスト分子及び CyD のモル濃度を表わし、 $G_t$  及び  $C_t$  は CyD 存在下の  $G$  の総濃度及び CyD の添加濃度とし、 $[G]$  に関する  $n$  次の多項式によってそれぞれ表される。これらの平衡式を解析するために、式 (2) を式 (3)、(4) に代入するとそれぞれ式 (5)、(6) が得られる。この場合、 $[G]$  は  $[C]=0$  における  $G$  の溶解度  $G_0$  に相当し、 $[C]$  は濃度  $C_t$  における free の  $C$  である  $[C_f]$  に相当する。従って、遊離型 CyD 濃度  $[C_f]$  がわかれば、非線形最小二乗法で式 (5) を処理することにより、各安定度定数を正確に算出できる。

$[C_f]$  に関する最初の近似値を得るには、 $[C_f]$  を既知の  $[C_t]$  で代入することにより、式 (5) から  $[C_t]$  と既知の  $G_t$  と  $G_0$  値を用いて simplex 法<sup>44, 45)</sup> を適用し、予備的に安定度定数を見積ることができる。その計算値を用いてさらに、 $[C_f]$  はみかけの安定度定数と既知の  $C_t$  と  $G_0$  値を用いて式 (6) から  $[C_f]$  の高次方程式の解として算出される。このような操作を各安定度定数の取れん値が得られるまで式 (5)、(6) を用いて反復使用し、算出された各複合体の真の安定度定数を Table 2 に示す。この解析法によると、Fig. 3 の実験条件下では (DM- $\beta$ -CyD の添加濃度：  $0 \sim 1.0 \times 10^{-2}$  M),  $\alpha$ -トコフェロールエステル と DM- $\beta$ -CyD との間で 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 モル比の複合体が主に形成されるものと推定される。Table 2 から明らかなように、両薬物に関する  $K_{1:2}$  値は  $K_{1:1}$  および  $K_{1:3}$  に比べて極めて大きく、モル比 1 : 2 の複合体が最も安定なことが示唆された。このモル比 1 : 2 の包接様式は  $\alpha$ -トコフェロ

Table 2. Stability Constants<sup>a)</sup> of  $\alpha$ -Tocopheryl ester-DM- $\beta$ -CyD Complexes in Water at 25 °C

System	$K_{1:1}$ ( $M^{-1}$ )	$K_{1:2}$ ( $M^{-1}$ )	$K_{1:3}$ ( $M^{-1}$ )	$G_0$ <sup>b)</sup> (M)
$\alpha$ -Tocopheryl nicotinate	20	1540000	1	$1.97 \times 10^{-7}$
$\alpha$ -Tocopheryl acetate	300	172000	70	$1.07 \times 10^{-7}$

a)  $K_{1:n}$  : Stability constant of 1 : n (drug : DM- $\beta$ -CyD) complexes.

b)  $G_0$  : Solubility of the drugs in water at 25 °C.

ールエステル/DM- $\beta$ -CyD 複合体に対する CPK (Corey-Pauling-Koltun) 分子モデルの空間的な関係の検討からも支持される。

そこで、以下の実験では 1 : 2 モル比からなる  $\alpha$ -トコフェロールエステル/DM- $\beta$ -CyD 複合体を混練法<sup>46)</sup> で調製し使用した。なお、固体状態における相互作用は示差熱分析 (DTA) および粉末 X 線回折法により推定した。

代表例として、ニコチン酸  $\alpha$ -トコフェロール/DM- $\beta$ -CyD 系の DTA 曲線を Fig. 4 に示す。エステルの融点に相当する 45 °C の吸熱ピークは複合体形成により完全に消失した。また、Fig. 5 に示す複合体の粉末 X 線パターンはゲストとホスト分子の物理的混合物の場合とは明らかに異なっていた。これらの結果は  $\alpha$ -トコフェロールエステルと DM- $\beta$ -CyD が固体状態において相互作用していることを示唆する。<sup>47)</sup>

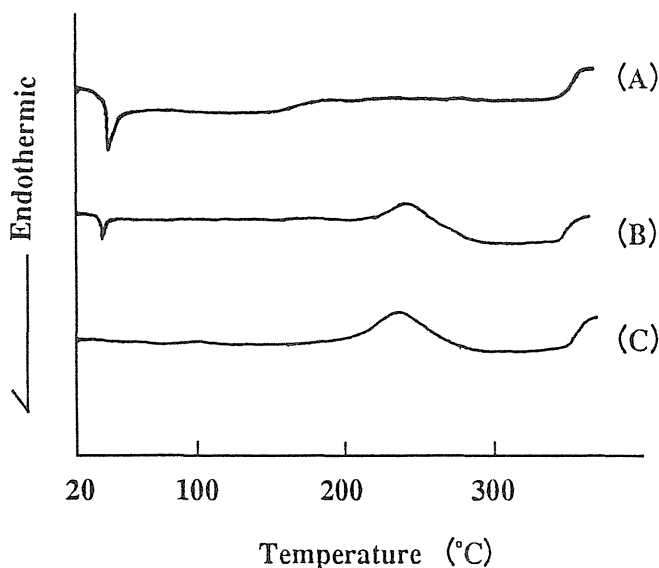


Fig. 4. DTA Thermograms of  $\alpha$ -Tocopheryl Nicotinate-DM- $\beta$ -CyD System

- (A) :  $\alpha$ -tocopheryl nicotinate,
- (B) : physical mixture,
- (C) : complex.

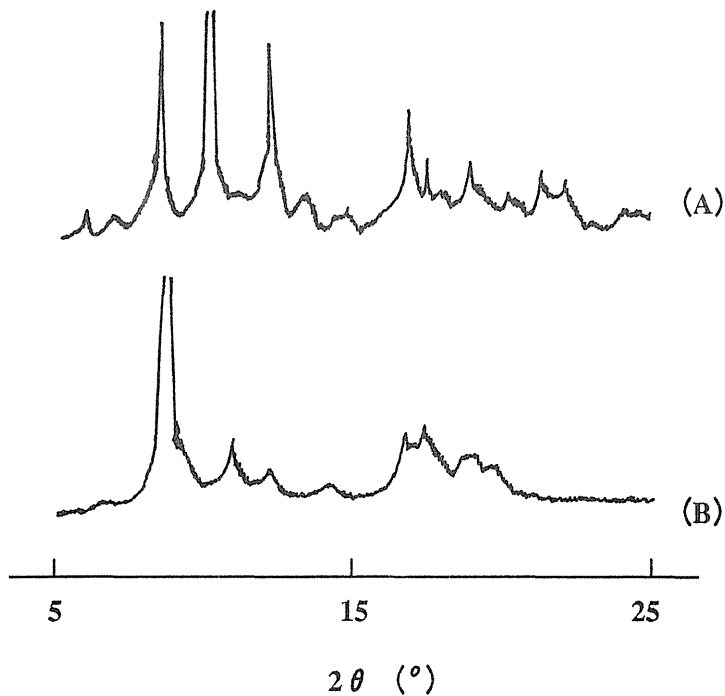


Fig. 5. Powder X-Ray Diffractograms of  $\alpha$ -Tocopheryl Nicotinate-DM- $\beta$ -CyD System

(A) : physical mixture,  
 (B) : complex.

## (2) 溶解挙動

Fig. 6 は日本薬局方 (JP XI) の崩壊試験用第 1 液 (pH 1.2) におけるニコチン酸  $\alpha$ -トコフェロールとその DM- $\beta$ -CyD 複合体の溶解挙動を示す。ニコチン酸  $\alpha$ -トコフェロール単独の場合、この実験条件では溶解速度が著しく小さく、薬物濃度は検出限界以下であった。<sup>48)</sup> 一方、酢酸  $\alpha$ -トコフェロールおよび

ニコチン酸  $\alpha$ -トコフェロール/DM- $\beta$ -CyD 複合体からの各薬物の溶出率は Fig. 3 から予測されるように、その高い水溶性に由来し顕著に上昇した。溶出がピークに達した後の薬物濃度の減少は、過飽和状態において複合体が解離し、そのとき生じる難水溶性の遊離形ゲスト薬物の析出によるものと推定される。<sup>49)</sup> 同様に、JP XI の第 2 液 (pH 6.8) に対する溶出試験の場合も  $\alpha$ -トコフェロールエステル/DM- $\beta$ -CyD 複合体の急速な溶解とそれに伴う薬物濃度の減少が観測された。

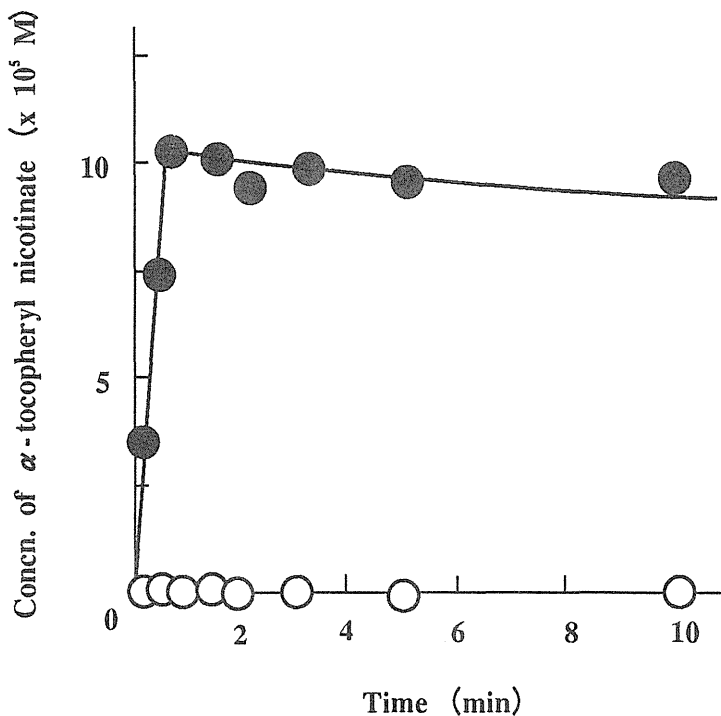


Fig. 6. Dissolution Profiles of  $\alpha$ -Tocopheryl Nicotinate and Its DM- $\beta$ -CyD Complex in the Medium of JP XI First Fluid at 37 °C, Measured by the Dispersed Amount Method  
○ :  $\alpha$ -tocopheryl nicotinate, ● : complex.



### (3) In Vivo 吸収挙動

ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールとその DM- $\beta$ -CyD 複合体を空腹時のビーグル犬に経口投与し、薬物単独投与の場合との吸収挙動を比較した。

Fig. 7 は薬物およびその DM- $\beta$ -CyD 複合体 (100 mg/body) を充填したゼラチン硬カプセルを経口投与後のニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールの平均血漿レベルを示す。既に知られているように、ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールの吸収率は空腹時の経口投与において極端に低いことが本実験でも観察された。

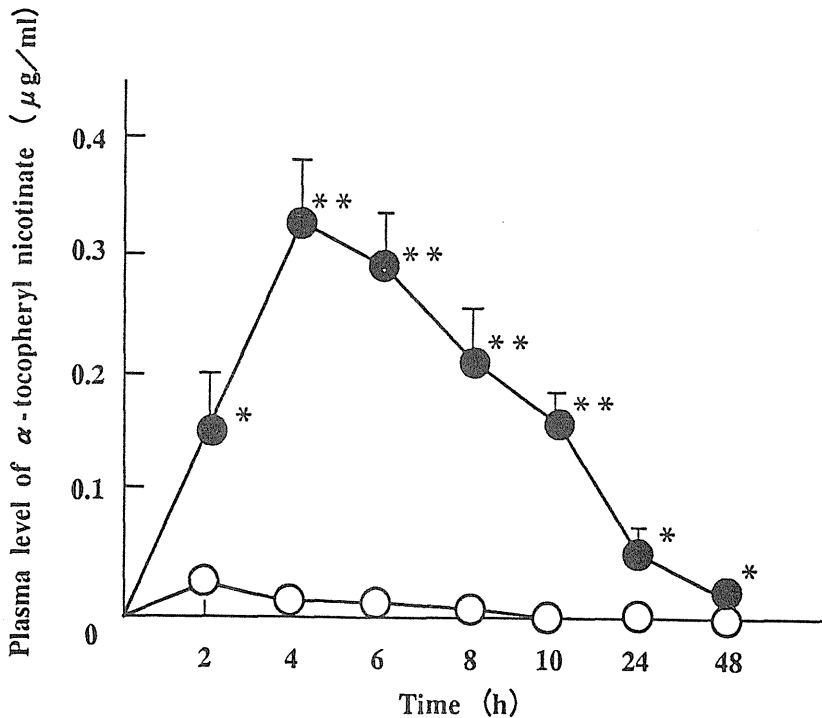


Fig. 7. Plasma Levels of  $\alpha$ -Tocopheryl Nicotinate Following Oral Administration of Capsules Containing  $\alpha$ -Tocopheryl Nicotinate or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 100 mg drug) to Dogs

○:  $\alpha$ -tocopheryl nicotinate, ●: complex.

\* $p < 0.05$  ● versus ○, \*\* $p < 0.01$  ● versus ○.

Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 6 dogs.

一方、薬物を DM- $\beta$ -CyD 複合体として投与した場合、ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールの血漿レベルは顕著に上昇した。すなわち、薬物単独投薬時の最高血漿レベル ( $C_{max}$ ) は  $3.67 \pm 0.80$  h で  $0.020 \pm 0.008$   $\mu\text{g/ml}$  を示したのに対して、複合体の  $C_{max}$  値は  $4.00 \pm 0.4$  h で  $0.344 \pm 0.039$   $\mu\text{g/ml}$  を示した。複合体を経口投与後 48 h までの血中濃度時間曲線下面積 (AUC) はニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール単独の場合に比べて約 70 倍に増大した。このような吸収性の増大は、他の添加剤を用いても例を見ない顕著な効果である。

#### (4) 小 括

$\alpha$ -トコフェロールエステルの水への溶解度は DM- $\beta$ -CyD との複合体形成により著しく増大した。例えば、0.1 M の DM- $\beta$ -CyD 存在下に於て、約  $10^5$  倍の増大を示した。 $\alpha$ -トコフェロールエステル/DM- $\beta$ -CyD 系の溶解度相図は、T. Higuchi ら<sup>36)</sup> の分類による A<sub>p</sub> 型を示し、高次複合体の安定度定数を溶解度曲線のカーブフィッティングにより決定し、ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール/DM- $\beta$ -CyD のモル比 1 : 2 の固体複合体は混練法により調製した。複合体化により薬物の溶解性は著しく増大し、絶食時のビーグル犬に経口投与した場合、複合体のバイオアベイラビリティは薬物単独に比べて約 70 倍増大した。

## 第二章 コエンザイム Q<sub>10</sub> の溶解性並びにバイオアベイラビリティの向上

CoQ<sub>10</sub> は細胞呼吸系における酸化還元に関与する電子伝達体として、生体組織に広く分布している。現在臨床的には虚血性心疾患、高血圧性心疾患などに伴う浮腫、肺うっ血、抗狭心症薬として汎用されているが、<sup>50, 51)</sup> 空腹時に経口投与すると CoQ<sub>10</sub> のバイオアベイラビリティは極端に低いことが知られている。<sup>52)</sup> その主な理由として、CoQ<sub>10</sub> の化学構造 (Fig. 8) から類推されるように、長いイソプレノイド鎖に由来する疎水性のため、水への溶解度が極めて低いことである。<sup>53)</sup> そこで本章では、DM-β-CyD との複合体形成を利用して CoQ<sub>10</sub> の溶解性の改善によるバイオアベイラビリティの向上を企図した。なお、以下の実験では CoQ<sub>10</sub> の光分解<sup>54)</sup> を避けるため、遮光条件下で行なった。

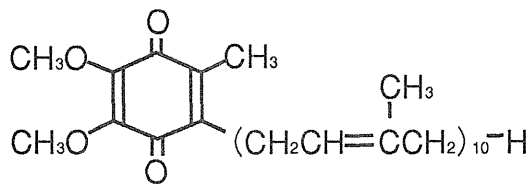


Fig. 8. Chemical Structure of CoQ<sub>10</sub>

### (1) 溶解挙動

DM-β-CyD による CoQ<sub>10</sub> の可溶化現象を前章と同様に溶解度法により検討した。Fig. 9 は 25 °C における CoQ<sub>10</sub>/DM-β-CyD 系の溶解度相図を示す。CoQ<sub>10</sub> の低い溶解度は DM-β-CyD 添加により著しく上昇することが明らかである。たとえば、CoQ<sub>10</sub> の溶解度 ( $2.0 \times 10^{-10}$  M) は 0.04 M の DM-β-CyD 添加により  $2 \times 10^6$  倍増大した。DM-β-CyD の可溶化能は既に報告されているケノデオキシコール酸の場合<sup>53)</sup> よりもかなり高いことは注目値する。Fig. 9 の溶解度曲線は T. Higuchi らによる A<sub>p</sub> 型に分類され、<sup>36)</sup> 高次の複合体形

成を示唆している。そこで、第一章において示したように相図の上昇曲線を非線形最小二乗法により解析し、高次複合体の安定度定数を算出した。その結果、モル比 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 および 1 : 4 (ゲスト:ホスト) 複合体の安定度定数はそれぞれ  $700 \text{ M}^{-1}$ ,  $380 \text{ M}^{-1}$ ,  $116800 \text{ M}^{-1}$ ,  $1.0 \text{ M}^{-1}$  となり、1 : 3 モル比の  $\text{CoQ}_{10}/\text{DM-}\beta\text{-CyD}$  複合体の安定度定数は他の組成比からなる複合体よりも著しく大きな値が得られた。この事実は長い側鎖を有する  $\text{CoQ}_{10}$  の包接に 3 分子の  $\text{DM-}\beta\text{-CyD}$  が関与し、可溶性複合体を形成することを示唆する。そこで、以下の実験ではモル比 1 : 3 の固体複合体を混練法により調製し、固体状態における相互作用を粉末X線回折法により検討した。

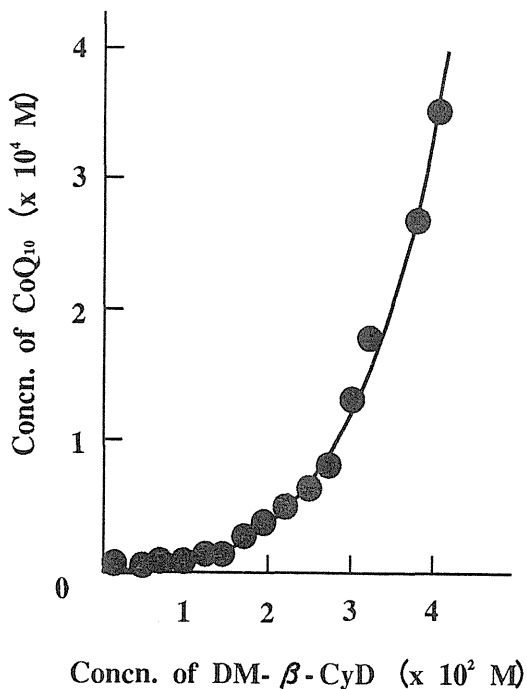


Fig. 9. Phase Solubility Diagram of  $\text{CoQ}_{10}$ - $\text{DM-}\beta\text{-CyD}$  System in Water at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Fig. 10 は  $\text{CoQ}_{10}$ /DM- $\beta$ -CyD 系の複合体と物理的混合物の粉末X線回折図を示す。物理的混合物の回折パターンは各成分を重ね合わせたパターンが得られた。一方、複合体の回折パターンは物理的混合物のそれとは明らかに異なり、新しい固相の形成を示唆している。また、ブロードなピークを与えることから、複合体化により薬物の結晶性が低下しているものと推定される。<sup>47)</sup>

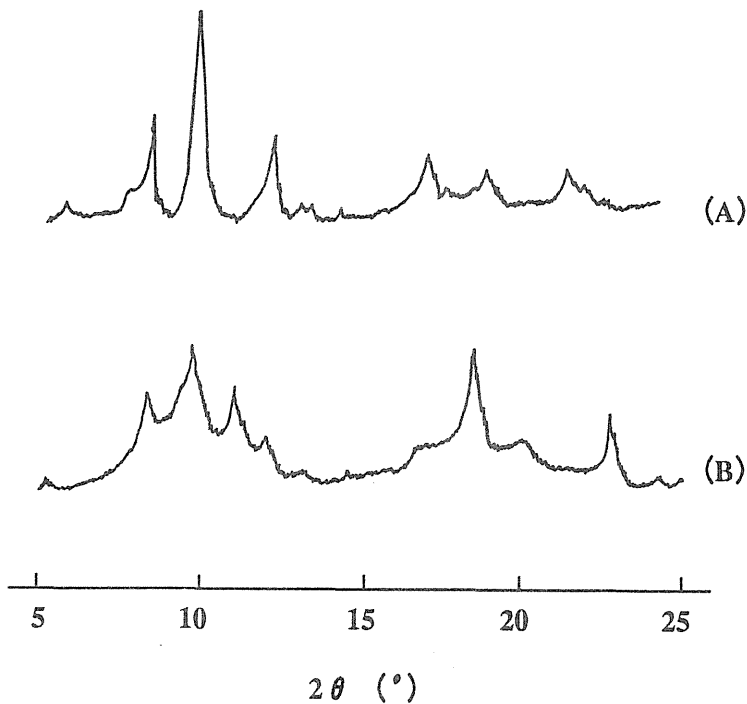


Fig. 10. Powder X-Ray Diffractograms of  $\text{CoQ}_{10}$ -  
DM- $\beta$ -CyD System

- (A) : physical mixture,
- (B) : complex.

Fig. 11 はモル比 1 : 3 複合体の水溶液中での溶解挙動を示す。CoQ<sub>10</sub> 自体はその低い溶解度により溶解速度も極めて遅く、一方、DM-β-CyD 複合体は薬物単独よりも著しく速く溶解した。この溶解速度の増大は、Fig. 9, Fig. 10 から予測されるように、複合体化による薬物の溶解度の上昇、ぬれの改善、結晶化度の低下などに起因するものと考えられる。

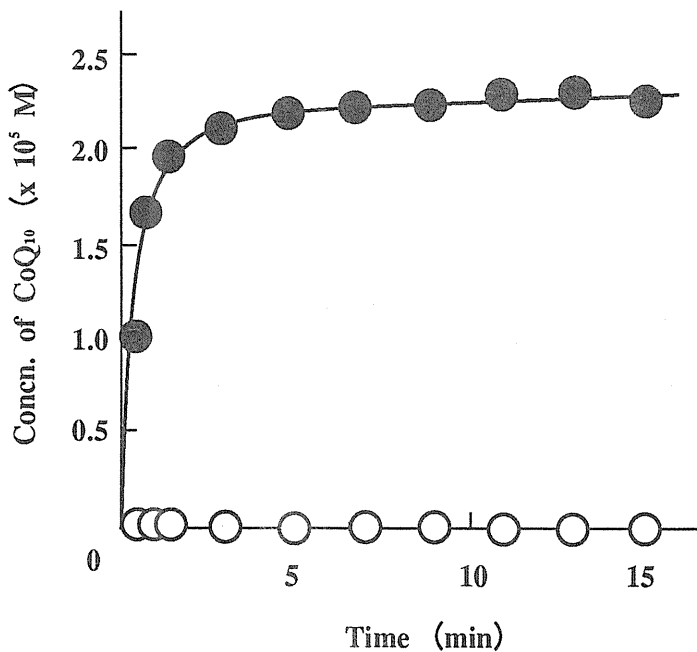


Fig. 11. Dissolution Profiles of CoQ<sub>10</sub> and Its DM-β-CyD Complex in Water at 37 °C

○: CoQ<sub>10</sub>, ● complex.

## (2) In Vivo 吸収挙動

CoQ<sub>10</sub>/DM-β-CyD 複合体の吸収特性を評価するため、空腹時のビーグル犬を用いて薬物単独投与の場合と比較した。Fig. 12 は CoQ<sub>10</sub> およびその DM-β-CyD 複合体を経口投与後の血漿中の CoQ<sub>10</sub> レベルを示す。CoQ<sub>10</sub> 単独を犬に経口投与した場合、血漿中の内因性の CoQ<sub>10</sub> には変化が見られず、CoQ<sub>10</sub> はほとんど吸収されないことが示唆された。一方、DM-β-CyD 複合体を投与すると血漿中 CoQ<sub>10</sub> レベルは上昇した。この血漿中レベルの上昇は消化管内での DM-β-CyD の大きな可溶化効果に起因するものと推定される。従って、DM-β-CyD は CoQ<sub>10</sub> の溶解度や溶解速度を向上させ、それに伴いバイオアベイラビリティが改善されたものと考えられる。

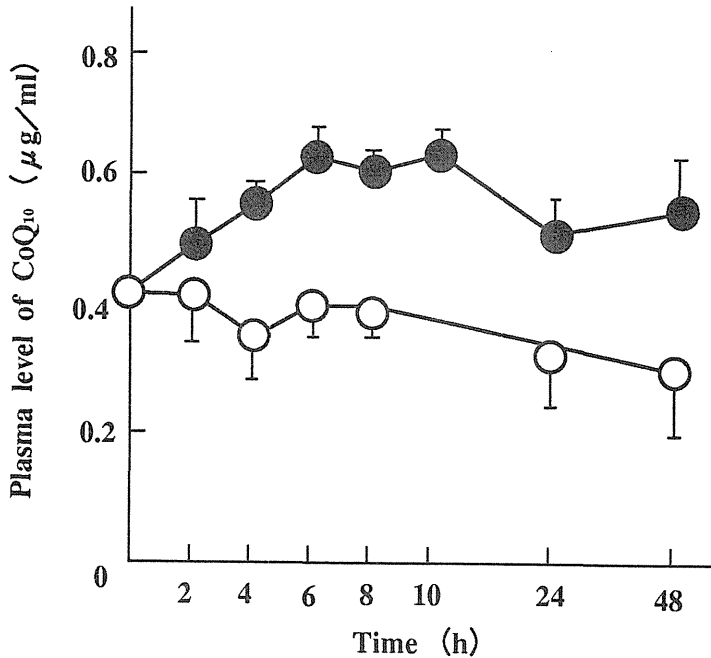


Fig. 12. Plasma Levels of CoQ<sub>10</sub> Following Oral Administration of Capsules Containing DM-β-CyD Complex (equivalent to 30 mg drug) to Dogs

○ : endogenous CoQ<sub>10</sub>, ● : complex.

Values represent the mean ± S.E. of 4 dogs.



### (3) 小 括

脂溶性のコエンザイム $Q_{10}$  ( $CoQ_{10}$ ) と  $DM-\beta-CyD$  との複合体形成について溶解度法により検討した結果、 $CoQ_{10}$  の水に対する溶解度は、たとえば、 $0.04\text{ M}$  の  $DM-\beta-CyD$  添加によって約  $2 \times 10^5$  倍上昇した。 $CoQ_{10}/DM-\beta-CyD$  系の溶解度曲線は典型的な  $A_p$  型を示し、高次の複合体形成が示唆された。 $A_p$  型相図を非線形最小二乗法で処理した結果、主な複合体の化学量論は  $1:3$  ( $CoQ_{10} : DM-\beta-CyD$ ) と推定され、その安定度定数は  $116800\text{ M}^{-1}$  と大きな値が得られた。 $CoQ_{10}/DM-\beta-CyD$  複合体の溶解速度は薬物単独よりも極めて大きく、絶食時の犬への経口投与においてバイオアベイラビリティの改善が認められた。

### 第三章 メナキノン-4 の吸収特性並びに薬理効果の向上

ビタミンKは1929年、H. Damによって血液凝固に関与するビタミン（Koagulation vitamin）として発見された脂溶性ビタミンであり、K<sub>1</sub>からK<sub>7</sub>までの存在が知られている。<sup>55)</sup> 天然には、植物由来のK<sub>1</sub>（phylloquinone）と動物の腸内細菌によって産生されるK<sub>2</sub>（menaquinone）が存在する。ビタミンK<sub>2</sub>はキノン骨格に isopentyl 基がついた多数の同族体が存在し、近年、新生児の低プロトロンビン血症や外科手術時の出血予防及び治療などに用いられている。しかしながら、ビタミンK<sub>1</sub> およびK<sub>2</sub>は脂溶性であり、空腹時の胆汁分泌の少ない状態、胆道閉塞症、脂肪吸収障害などの場合、経口投与時のバイオアベイラビリティは極めて低く、光や熱に不安定なことが知られている。<sup>56, 57)</sup> 従って、これら脂溶性ビタミンの製剤特性の改善は実際製剤上重要な課題であり、近年ビタミンK<sub>1</sub>については界面活性剤などを用いて溶解性、安定性、吸収性の改善に関する検討が行われている。<sup>58, 59)</sup> そこで本研究では、ビタミンK<sub>2</sub>類の中で経口投与時の薬理活性が高いとされている menaquinone-4（MK-4, Fig. 13 参照）<sup>60)</sup> を対象薬物に選び、DM-β-CyD との複合体形成に伴う MK-4 の溶解性の改善による経口投与時の吸収挙動の変化について検討を行った。

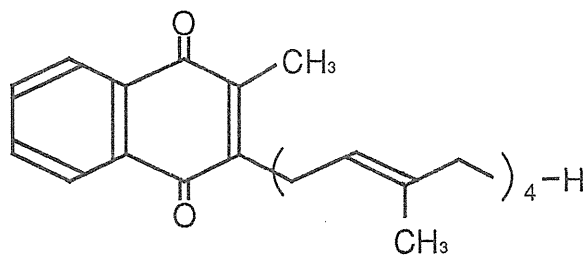


Fig. 13. Chemical Structure of MK-4

(1) MK-4 と DM- $\beta$ -CyD との複合体形成

3種のビタミンK類 ( $K_1$ , MK-4,  $K_3$ ) と DM- $\beta$ -CyD との複合体形成について、溶解度法, DTA および粉末X線回析により検討した。Fig. 14 に DM- $\beta$ -CyD 添加によるビタミンK類の溶解度変化を示す。脂溶性のビタミン $K_1$  および MK-4 の溶解度相図は前章で述べた脂溶性薬物の場合と同様に  $A_p$  型を示すことから、水溶液中において脂溶性ビタミン $K_1$  および MK-4 は DM- $\beta$ -CyD と高次の複合体を形成することが示唆された。一方、ビタミン $K_3$  の溶解度相図は  $A_L$  型を示し、モル比 1 : 1 の複合体形成が示唆された。<sup>36)</sup>

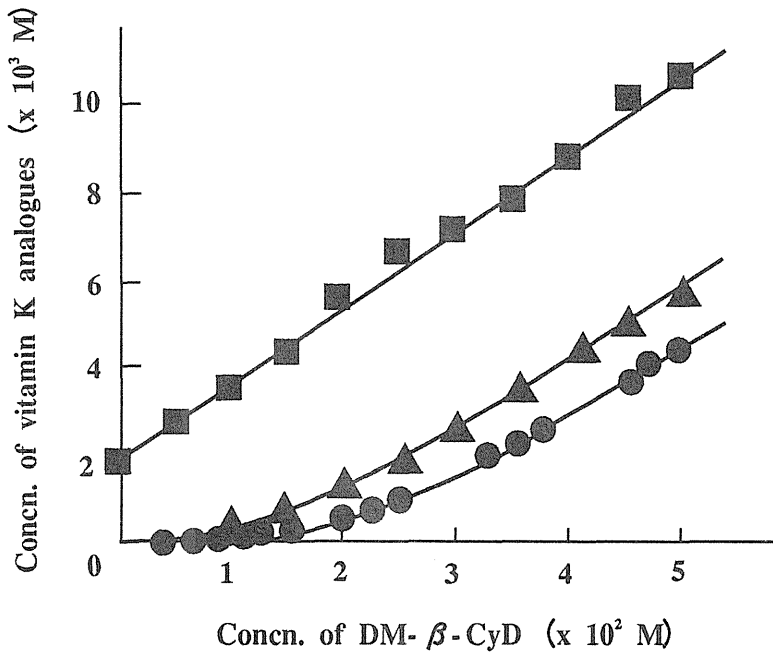


Fig. 14. Phase Solubility Diagrams of Vitamin K-DM- $\beta$ -CyD System in Water at 25 °C

▲: vitamin  $K_1$ , ●: vitamin  $K_2$  (MK-4), ■: vitamin  $K_3$ .

そこで、脂溶性のビタミンK<sub>1</sub> および MK-4 については逐次的な高次複合体の形成を仮定して、第1章で述べたように相図の曲線を非線形最小二乗法により解析し、高次複合体の安定度定数を算出した。Table 3 に示すように、MK-4 と DM-β-CyD とのモル比 1 : 3 の複合体の安定度定数は 46400 M<sup>-1</sup> と最も大きく、他のモル比からなる複合体の安定度定数は無視できるほど小さいことから、水溶液中では主に 1 : 3 の複合体を形成するものと推定される。同様に、ビタミンK<sub>1</sub> と DM-β-CyD はモル比 1 : 2 の複合体形成が示唆された。なお、このような組成比の相違は、ゲスト薬物の化学構造や側鎖の立体的な相違を微妙に反映しているものと考えられる。そこで、本章ではモル比 1 : 3 の MK-4/DM-β-CyD 複合体について以下の検討を行った。

Table 3. Stability Constants<sup>a)</sup> of Vitamin K Analogues-DM-β-CyD Complexes in Water at 25 °C

System	K <sub>1:1</sub> (M <sup>-1</sup> )	K <sub>1:2</sub> (M <sup>-1</sup> )	K <sub>1:3</sub> (M <sup>-1</sup> )	K <sub>1:4</sub> (M <sup>-1</sup> )	G <sub>0</sub> <sup>b)</sup> (M)
Vitamin K1	410	21800	5	ND	3.5 x 10 <sup>-7</sup>
Vitamin K2 (MK-4)	40	1100	46400	1	6.7 x 10 <sup>-8</sup>
Vitamin K3	120	ND	ND	ND	1.8 x 10 <sup>-3</sup>

a) K<sub>1:n</sub> : Stability constant of 1 : n (drug : DM-β-CyD) complexes.

b) G<sub>0</sub> : Solubility of the drugs in water at 25 °C.

Fig. 15 は混練法により調製した複合体および物理的混合物の粉末X線回折パターンを示す。物理的混合物の回折パターンは、MK-4 および DM- $\beta$ -CyD 両成分の回折パターンの単純な和として観察された。一方、複合体では各成分の特性ピークが消失し、各成分とは異なる回折パターンを示すことから、固体状態における相互作用が示唆された。<sup>47)</sup>

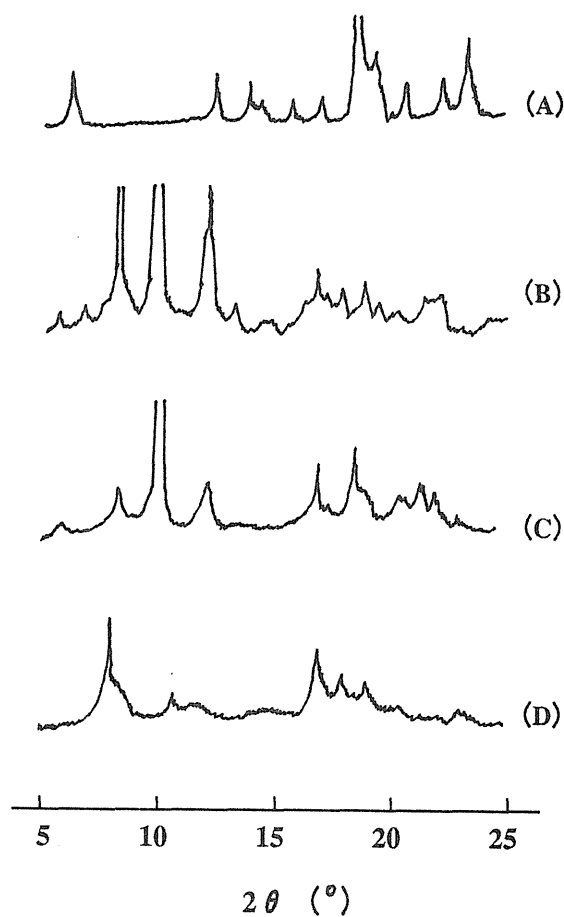


Fig. 15. Powder X-Ray Diffractograms of MK-4-  
DM- $\beta$ -CyD System  
(A) : MK-4, (B) : DM- $\beta$ -CyD,  
(C) : physical mixture, (D) : complex.

Fig. 16 は MK-4/DM- $\beta$ -CyD 系の DTA 曲線を示す。MK-4 の融解に基づく 42 °C 付近の吸熱ピークは DM- $\beta$ -CyD との物理的混合物に観察されるのに対して、複合体ではそのピークは消失した。従って、MK-4 は固体状態に於て DM- $\beta$ -CyD と熱的に安定な複合体を形成するものと推定された。

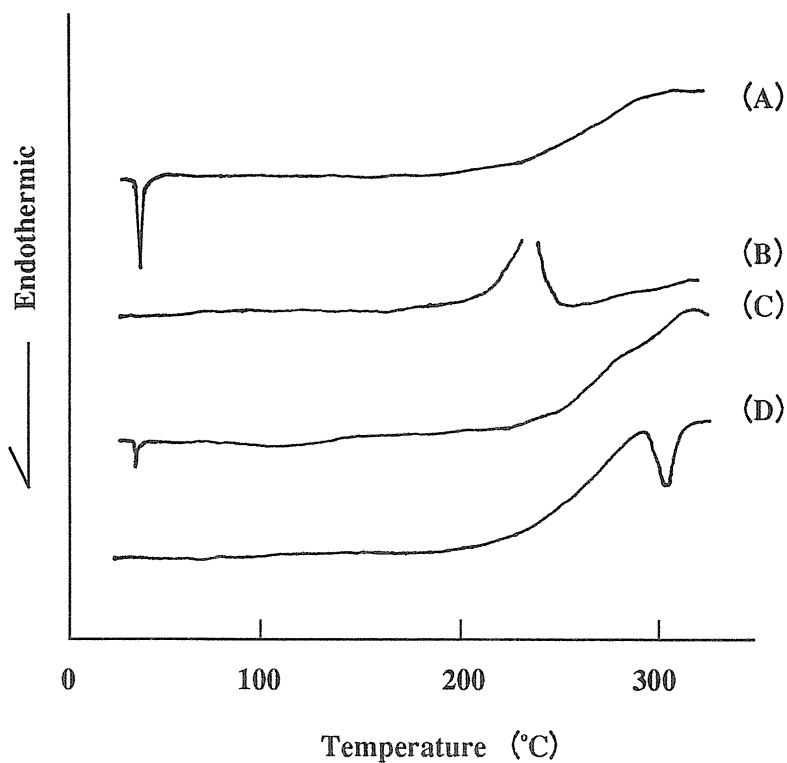


Fig. 16. DTA Thermograms of MK-4-DM- $\beta$ -CyD System

(A) : MK-4, (B) : DM- $\beta$ -CyD,  
(C) : physical mixture, (D) : complex.

## (2) 溶解挙動

Fig. 17 はデンプンを賦形剤とした MK-4 およびその DM- $\beta$ -CyD 複合体をゼラチン硬カプセルに充填し、カプセルからの MK-4 の JP XI 崩壊試験用第 1 液中への溶解挙動を示す。MK-4 単独に比べて、DM- $\beta$ -CyD 複合体化による薬物の著しい溶解性の改善が認められた。前章で述べたように、このような溶解性の向上は DM- $\beta$ -CyD との複合体形成による MK-4 の溶解度の上昇、ぬれ、分散性の改善などが寄与しているものと推定される。

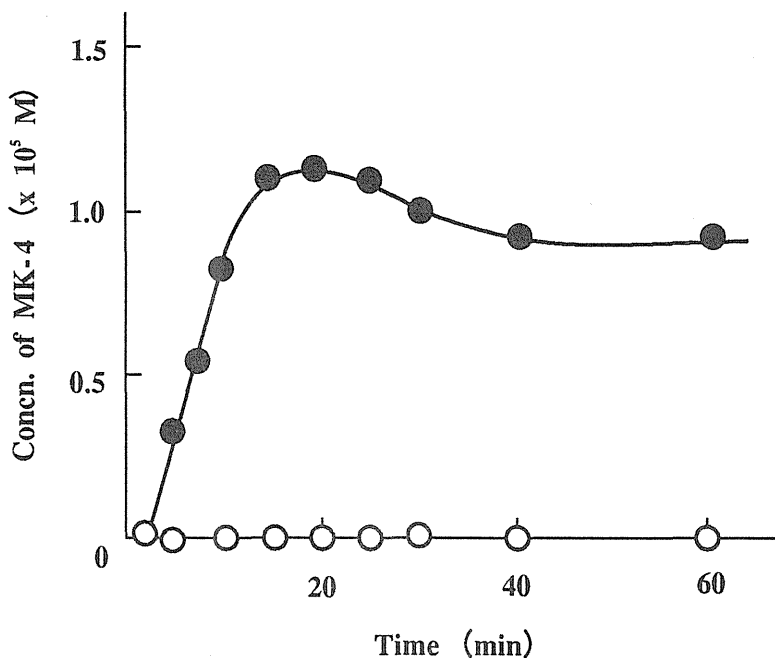


Fig. 17. Release Profiles of MK-4 from Capsules Containing MK-4 or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 50 mg drug) in JP XI First Fluid at 37 °C, Measured by the Paddle Method

○ : MK-4, ● : complex.

### (3) In Vivo 吸収挙動

前述の *in vitro* 溶出試験の結果から、MK-4 を DM- $\beta$ -CyD 複合体として経口投与すると吸収性の増大が期待されるため、MK-4 単独または DM- $\beta$ -CyD 複合体を充填したゼラチン硬カプセルをビーグル犬に経口投与後の薬物の吸収挙動を比較した。MK-4 として 60 mg 相当量のデンプン混練物または DM- $\beta$ -CyD 複合体カプセルを 12 時間絶食させたビーグル犬に経口投与後の平均血漿中 MK-4 濃度の経時変化を Fig. 18 に示す。投与後 1 時間以降の MK-4 の血漿中濃度は、薬物単独に比べて DM- $\beta$ -CyD 複合体で有意に増大した。

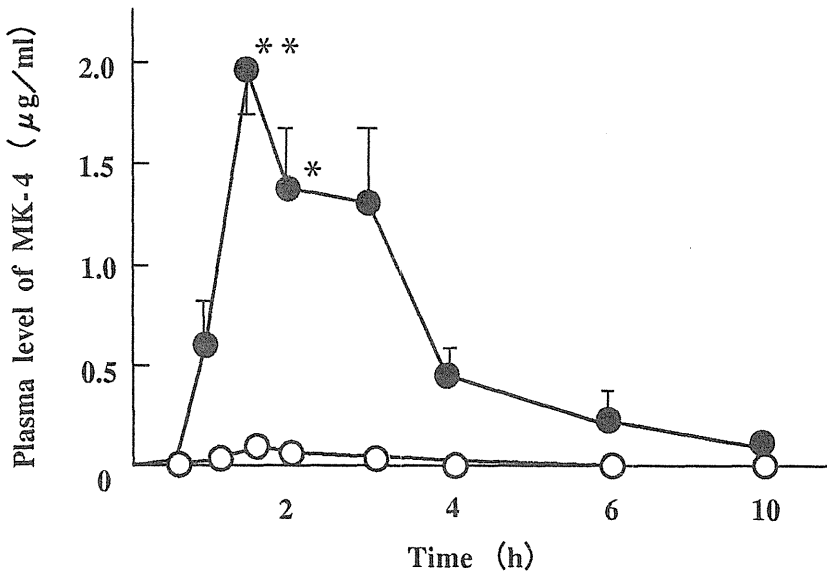


Fig. 18. Plasma Levels of MK-4 Following Oral Administration of MK-4 or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 60 mg drug) to Dogs

○: MK-4, ●: complex.

\* $p < 0.05$  ● versus ○, \*\* $p < 0.01$  ● versus ○.

Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 6 dogs.



Table 4 は Fig. 18 のデータを解析して得られたバイオアベイラビリティパラメータを示す。MK-4 単独に比べて複合体投与により最高血漿中濃度 (C<sub>max</sub>) は約 17 倍, 血中濃度時間曲線下面積 (AUC) は約 19 倍 にそれぞれ増大し, DM-β-CyD 複合体化による顕著なバイオアベイラビリティの向上が認められた。

Table 4. Pharmacokinetic Parameters of MK-4 or Its DM-β-CyD Complex Following Oral Administration (equivalent to 60 mg MK-4) to Dogs

System	C <sub>max</sub> (μg/ml)	t <sub>max</sub> (h)	AUC (h · μg/ml)
MK-4 <sup>a)</sup>	0.121±0.031	2.6±0.4	0.267±0.050
DM-β-CyD complex	2.085±0.282*	1.9±0.3	5.154±1.018**

a) Diluent : starch.

Each value represents the mean ± S.E. of 6 dogs.

\* : p < 0.01 versus MK-4. \*\* : p < 0.05 versus MK-4.

#### (4) 血液凝固活性

複合体形成に伴う MK-4 のバイオアベイラビリティの向上を薬理効果の面から評価するため, 低プロトロンビン血症ビーグル犬を用いて血液凝固活性を比較検討した。<sup>61)</sup> Fig. 19 は 12 時間絶食したワルファリン誘発性低プロトロンビン血症ビーグル犬に MK-4 として 130 mg 相当量のデンプン混練物および DM-β-CyD 複合体を経口投与後の血液凝固活性値の経時変化を示す。なお, 経口投与はワルファリンナトリウム 1 mg/kg を静注後最も活性値が低下する 36 時間目に行い, 血液凝固活性 (PCA) はプロトロンビン時間 (PT) の測定により評価した。MK-4 単独投与では投与後 4 時間目から活性が上昇し, 以後徐々に回復するのに対して, DM-β-CyD 複合体の場合, 投与後 1 時間目から急激に活性が上昇し, 2 時間後で既に PCA 50% まで回復した。この複合体投与の結果は, MK-4 (1 mg/Kg) を静注した際の活性値の上昇に類似した速効性のパターンを示している。

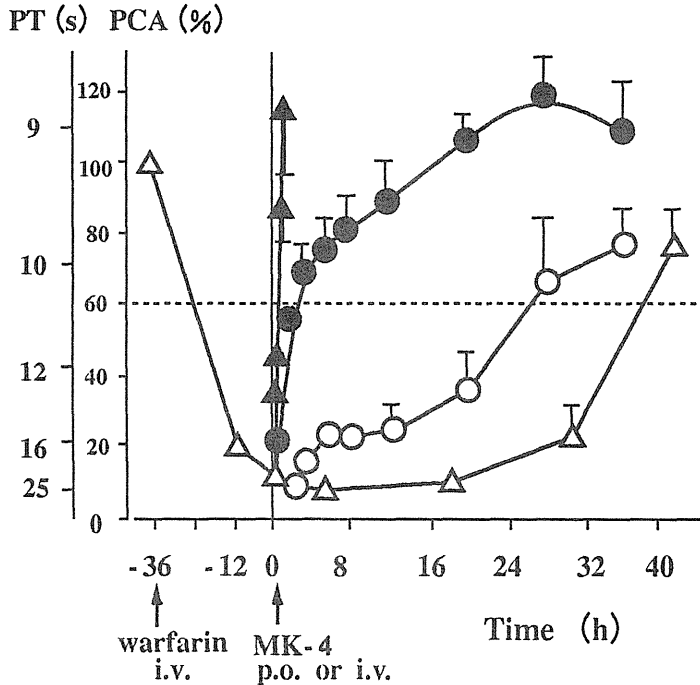


Fig. 19. Coagulation Recoveries of Warfarin-induced Hypoprothrombinemia Following Oral Administration of MK-4 or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 130 mg drug) to Dogs  
 $\Delta$  : control,  $\blacktriangle$  : i.v. injection (13 mg MK-4),  
 $\circ$  : MK-4,  $\bullet$  : DM- $\beta$ -CyD complex.  
 PCA : prothrombin complex activity, PT : prothrombin time.  
 Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 dogs.

Table 5 は血液凝固活性値の正常値と異常値の境界を PCA 60% とし,<sup>62)</sup> MK-4 投与直後から正常値まで回復するのに要する時間 (TPCA 60) を各試料について算出した結果を示す。Table 5 から明らかなように、MK-4 単独の TPCA 60% 値は 27 時間となり、自然回復の 36.6 時間 (Table 5 の control 参照) と有意な差がないのに対して、複合体ではわずか 3.3 時間となり、MK-4 単独に比べて著しい作用の増強が認められた。このように、薬理効果の面からも DM- $\beta$ -CyD 複合体化による MK-4 のバイオアベイラビリティの改善が認められた。

Table 5. Coagulation Recoveries of Warfarin-induced Hypoprothrombinemia Following Oral Administration of MK-4 or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 130 mg MK-4) to Dogs

System	TPCA 60 <sup>a)</sup> (h)
Control	36.6 $\pm$ 0.9
Injection (i.v.) <sup>b)</sup>	0.9 $\pm$ 0.1
MK-4 <sup>c)</sup>	27.0 $\pm$ 4.2
Complex	3.3 $\pm$ 1.1*

a) TPCA 60 : Time required for PCA to return to 60%.

b) Dose equivalent to 13 mg MK-4.

c) Diluent : starch.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4 dogs.

\* :  $p < 0.01$  versus MK-4.

#### (5) MK-4 の吸収経路に及ぼす DM- $\beta$ -CyD の影響

脂溶性ビタミン類は絶食時にはほとんど吸収されないが、摂食時には分泌された胆汁により薬物が可溶化され、主にリンパ系を介して吸収されることが知られている。<sup>93)</sup> しかしながら、Fig. 18 および Fig. 19 に示したように、絶食時において複合体投与により高い血漿中濃度と薬理効果の増強が観察された。これは主に DM- $\beta$ -CyD 複合体化による薬物の溶解性の向上に伴う吸収量の増大に起因するものと考えられるが、その際 DM- $\beta$ -CyD が薬物の吸収経路にも何らかの変化を及ぼす可能性が予想される。そこで、MK-4 の吸収経路に及ぼす DM- $\beta$ -CyD の影響についての予備的知見を得るため、胸管リンパを導出したラットを

用いて胆汁存在下および非存在下における MK-4 の血漿中濃度とリンパ移行量を比較検討した。

Fig. 20 は、胆汁分泌状態の正常なラットに MK-4 および DM- $\beta$ -CyD 複合体を経口投与後の MK-4 の血漿中濃度並びにリンパへの移行量の時間推移を示す。MK-4 および DM- $\beta$ -CyD 複合体いずれの場合も MK-4 は血漿中にはほとんど検出されなかった。しかし、リンパ液中にはいずれの場合も検出され、その移行量は DM- $\beta$ -CyD 複合体の方が MK-4 単独よりもわずかに多くなる傾向が見られた。これらの知見から、胆汁分泌時には、MK-4 は胆汁により混合ミセルを形成して吸収され、その際 MK-4 はカイロミクロンに取り込まれてリンパ系へ移行し、溶解性に優れる複合体の方がその移行量が多いものと推察される。

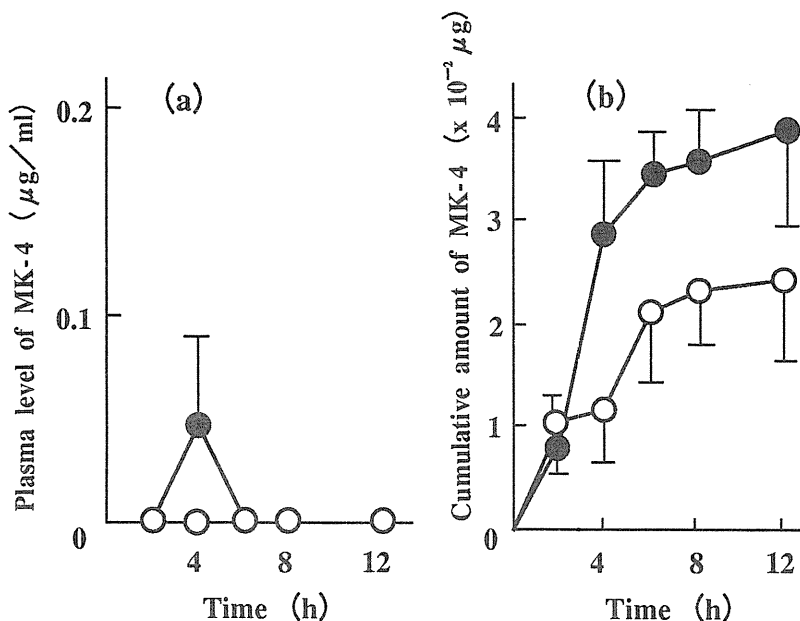


Fig. 20. Plasma Levels (a) and Cumulative Amount of MK-4 in Lymph (b) Following Oral Administration of MK-4 or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 10 mg/kg drug) to Rats

○: MK-4, ●: complex.

Values represent of the mean  $\pm$  S.E. of 3 rats.

次に消化管内に胆汁の存在しない条件を設定するため、ラットの胆管を導出して胆汁を体外へ排出させながら Fig. 20 と同様の検討を行った。Fig. 21 から明らかなように、薬物単独投与では胆汁による混合ミセルが形成されないため、血漿中およびリンパ液中に MK-4 は検出されなかった。しかしながら、溶解性に優れる DM- $\beta$ -CyD 複合体投与では MK-4 の吸収が見られ、Fig. 20 の胆汁存在時とは明らかに異なり、血漿中への MK-4 の移行が観察された。

以上の知見から、複合体投与の場合は胆汁の有無にかかわらずバイオアベイラビリティが向上し、Fig. 19 のような薬理効果の増強として観察されたものと推定される。

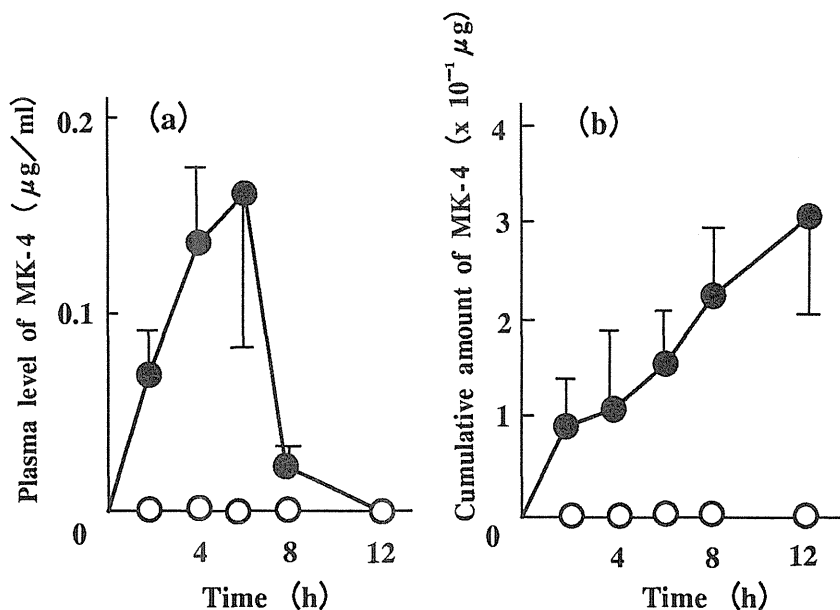


Fig. 21. Plasma Levels (a) and Cumulative Amount of MK-4 in Lymph (b) Following Oral Administration of MK-4 or Its DM- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 10 mg/kg drug) to Rats under Bile Duct Cannulation

○: MK-4, ●: complex.

Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 rats.

## (6) 小 括

MK-4 は水溶液中および固体状態において DM- $\beta$ -CyD と水溶性の高次複合体を形成し、顕著な溶解性の改善が認められた。A<sub>p</sub> 型溶解度相図の解析から、主な複合体の化学量論比は 1 : 3 (MK-4/DM- $\beta$ -CyD) であり、その安定度定数は  $46400 \text{ M}^{-1}$  と極めて大きな値が得られた。そこで、1 : 3 固体複合体を混練法により調製し、その溶解性、吸収性、薬理活性を MK-4 単独の場合と比較した。複合体をビーグル犬およびラットに経口投与後の血漿中 MK-4 濃度は薬物単独に比べて増大し、特に空腹時および胆汁欠損時に顕著であった。また、ビーグル犬を用いた *in vivo* 吸収実験並びに血液凝固活性の評価実験から、複合体を経口投与時の MK-4 のバイオアベイラビリティの改善に伴うプロトロンビン時間の著しい短縮が確かめられた。さらに、胆管を導出したラットによる吸収挙動の検討に基づいて、複合体投与時においてはリンパ系に加えて門脈系を介した吸収が認められた。その結果、初回通過効果により MK-4 が肝代謝を受ける際に薬理活性を発現し、<sup>64, 65)</sup> 速効性を示すものと予測された。これらの知見は、脂溶性ビタミン類を DM- $\beta$ -CyD 複合体として経口固形製剤に応用する際に、特に吸収の悪い空腹時や胆汁欠損状態においても注射剤に匹敵するほどの大きなバイオアベイラビリティが得られることを示唆するものである。

#### 第四章 第一編の考察

脂溶性薬物は絶食時にはほとんど吸収されないため、経口投与におけるバイオアベイラビリティに変動を生じやすいことが知られている。中でも、脂溶性ビタミンは低融点で取扱に不便であり、難水溶性のため可溶化剤として界面活性剤が使用されているが、剤形によっては安全性の面から使用に制限がある。<sup>66)</sup> そこで第一編では、水溶性アルキル化  $\beta$ -CyD 誘導体の中から比較的嵩だかいホスト分子に対して優れた包接能を有する DM- $\beta$ -CyD に着目して、<sup>67)</sup> 経口投与用の機能性製剤素材としての有用性の評価を行なった。本研究では上記の難点を有する脂溶性のモデル薬物として、 $\alpha$ -トコフェロールエステル、CoQ<sub>10</sub>、MK-4 の 3 種を選び、DM- $\beta$ -CyD との包接複合体形成に伴う溶解性およびバイオアベイラビリティの向上を企図した。

まず、水溶液中における複合体形成を明らかにするため溶解度法を適用し、溶解度相図を作成した結果、脂溶性薬物/DM- $\beta$ -CyD 系はいずれも T. Higuchi らの分類による A<sub>p</sub> 型を示し、可溶性の高次複合体の形成が示唆された。たとえば、0.04 M の DM- $\beta$ -CyD 添加によって CoQ<sub>10</sub> の水に対する溶解度は約  $2 \times 10^6$  倍も上昇した。各溶解度曲線を非線形最小二乗法で処理し安定度定数を算出すると、 $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$  オーダーの大きな値が得られ、従来知られているものよりもかなり安定で水溶性の高い複合体形成が示唆された。<sup>68)</sup> 高次複合体の包接モル比にはゲスト分子の立体的な関係が反映され、 $\alpha$ -トコフェロールエステル/DM- $\beta$ -CyD 系では 1 : 2、CoQ<sub>10</sub>/DM- $\beta$ -CyD 系では 1 : 3、MK-4/DM- $\beta$ -CyD 系では 1 : 3 モル比の複合体が主として形成されるものと推定された。なお、固体状態の相互作用は粉末 X 線回折および熱分析により確認した。

上記組成からなる脂溶性薬物/DM- $\beta$ -CyD 複合体は混練法により調製し、薬物単独と溶解挙動を比較した結果、いずれの薬物でも顕著な溶解速度の増大が認められた。そこで、各複合体を絶食時のビーグル犬に経口投与し薬物単独の場合と比較すると、特にニコチン酸  $\alpha$ -トコフェロール複合体では約 70 倍のバイオアベイラビリティの改善が認められた。また、MK-4/DM- $\beta$ -CyD 系について、ビーグル犬を用いた血液凝固活性の評価実験から、複合体を経口投与時の MK-4

の吸収性改善に伴うプロトンピン時間の著しい短縮が確かめられた。

このように、3種の脂溶性薬物はDM-β-CyDとの複合体形成によりいずれも顕著なバイオアベイラビリティの向上が認められた。Fig. 22は、CyD複合体の溶解と解離を伴う消化管吸収挙動を模式化したものである。通常、溶解性が大で安定度定数の小さい複合体ほど消化液中では遊離形ゲスト薬物の濃度が多くなるため、消化管吸収に有利になる。<sup>139</sup>しかしながら、今回のDM-β-CyD複合体の安定度定数は極めて大きな値を有することから、Fig. 22の機構では十分に説明することは困難である。特に空腹時や胆汁分泌のない場合に観察される複合体の高い吸収性には競合包接など他の要因<sup>69</sup>や複雑な吸収経路が関与しているものと考えられる。

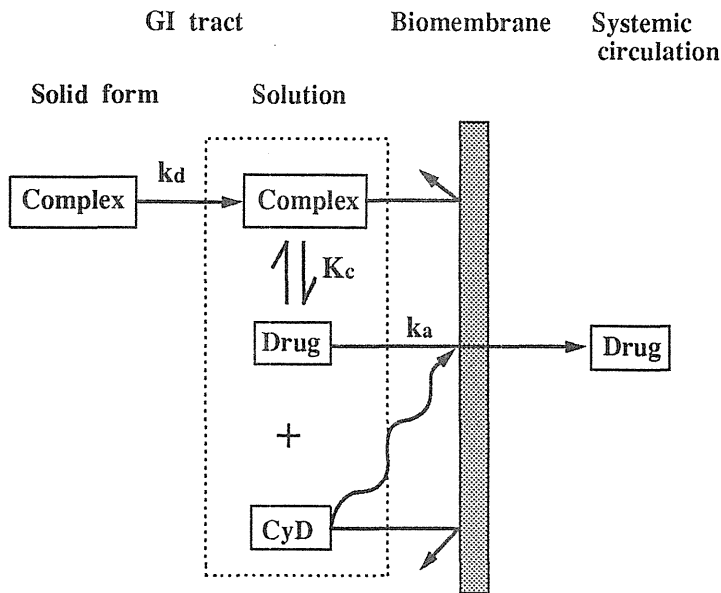


Fig. 22. Factors Affecting Drug Absorption involving  
CyD Complexation

$k_d$ : dissolution rate constant,  $K_c$ : stability constant,  
 $k_a$ : absorption rate constant.



既に述べたように、脂溶性のビタミン類は絶食時にはほとんど吸収されないが、摂食時には分泌された胆汁により薬物が可溶化され、主にリンパ系を介して吸収されることが知られている。<sup>63)</sup> そこで、空腹時および胆汁欠損時における DM- $\beta$ -CyD の顕著な吸収改善効果を明らかにするため、胆管を導出したラットによる吸収挙動を比較検討した。その結果、複合体投与時においてはリンパ系に加えて門脈系を介した吸収の可能性が示唆された (Fig. 20, 21 参照)。

Fig. 23 は Fig. 21, 22 の知見に基づいて消化管内における脂溶性ビタミン類 (FV) の溶解性並びに吸収経路に及ぼす DM- $\beta$ -CyD 包接の影響を模式化したものである。

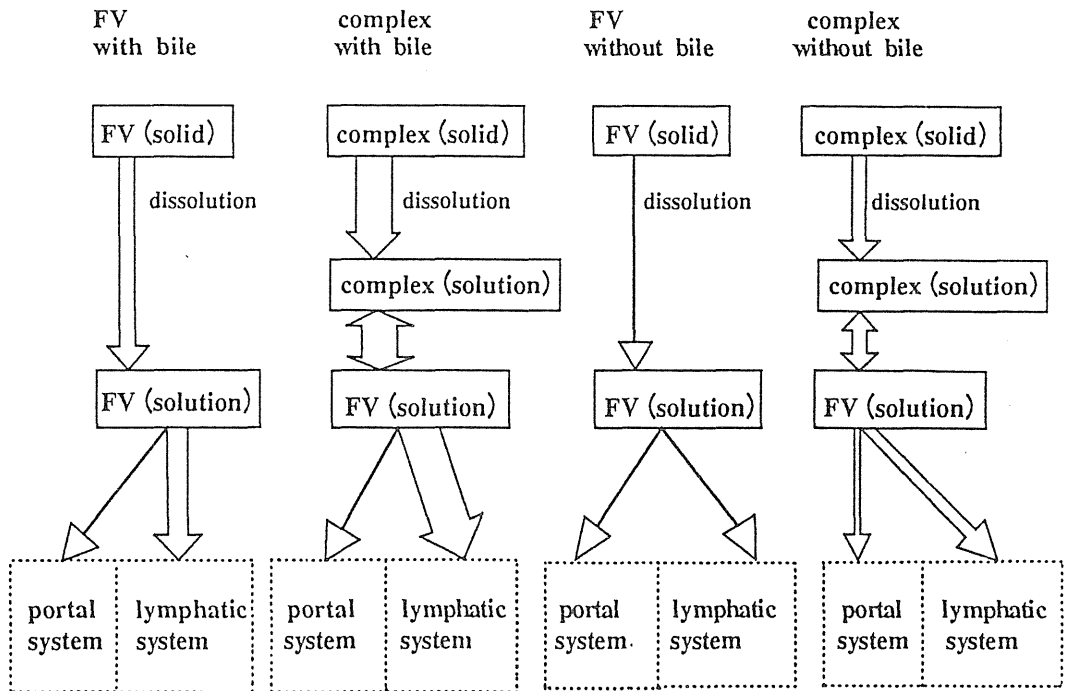


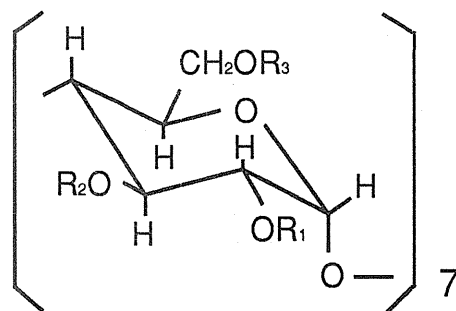
Fig. 23. Possible Absorption Behaviors of FV after Oral Administration of FV or Its DM- $\beta$ -CyD Complex to Rats in the Presence or Absence of Bile

Fig. 23 において、まず胆汁分泌時には、FV は胆汁により混合ミセルを形成して吸収され、その際 FV はカイロミクロンに取り込まれてリンパ系へ移行するものと考えられる。一方、複合体投与の場合は FV 単独と同様の挙動を示すが、DM- $\beta$ -CyD 複合体化による溶解性の向上のため、吸収量は増大するものと考えられる。次に、胆汁非存在下における FV 単独投与の場合、胆汁による混合ミセルが形成されないためほとんど吸収は起こらず、バイオアベイラビリティが低下する。一方、複合体の場合、FV の溶解性の向上により吸収量は増大し、さらに、その吸収経路は胆汁分泌状態とは異なり、門脈系へもある程度移行するものと予想される。その結果、MK-4 の場合のように薬理効果の増強 (Fig. 19 参照) として観察されたものと推定される。

このように、脂溶性薬物を DM- $\beta$ -CyD 複合体として経口固形製剤に応用する際に、特に吸収の悪い空腹時や胆汁欠損状態においてもバイオアベイラビリティの向上を予期させるものである。今後 DM- $\beta$ -CyD を実際製剤に使用するには特に安全性に関する詳細な検討が必要であるが、経口投与ではほとんど安全性に問題はないとされており、<sup>27)</sup> 近い将来非イオン界面活性剤に代わる機能性製剤素材として有効利用が期待される。

## 第二編 疎水性薬物担体としてのエチル化 $\beta$ -CyD の有用性

$\beta$ -CyD の水酸基にエチル基を導入した誘導体 (DE- $\beta$ -CyD および heptakis(2, 3, 6-tri-O-ethyl)- $\beta$ -cyclodextrin (TE- $\beta$ -CyD と略記) ; Fig. 24) は, 第一編で述べたメチル化  $\beta$ -CyD とは対照的に難水溶性であり, 水溶性薬物の徐放性担体として製剤への有効利用が期待される。そこで本編では, 疎水性のアルキル化  $\beta$ -CyD の機能性製剤素材としての有用性を明らかにするため, エチル化  $\beta$ -CyD についてそれらの各種物理化学的性質を天然  $\beta$ -CyD およびメチル化  $\beta$ -CyD と比較し, さらに, 吸収が速いため徐放化が望まれている抗狭心症薬硝酸イソソルビド (ISDN)<sup>70, 71)</sup> をモデル薬物に用いて, *in vitro* 放出挙動およびラットを用いた *in vivo* 吸収挙動を比較検討した。



DE- $\beta$ -CyD :  $R_1=R_3=C_2H_5$ ,  $R_2=H$ ,

TE- $\beta$ -CyD :  $R_1=R_2=R_3=C_2H_5$

Fig. 24. Chemical Structure of DE- and TE- $\beta$ -CyDs

## 第一章 エチル化 $\beta$ -CyD の物理化学的性質

Table 6 は本研究で用いたエチル化  $\beta$ -CyD の種々の物性値を天然  $\beta$ -CyD およびメチル化  $\beta$ -CyD と比較したものである。エチル化  $\beta$ -CyD の水への溶解度，融点，表面張力，水分含量，環開裂反応速度はいずれも天然  $\beta$ -CyD やメチル化  $\beta$ -CyD とは明らかに異なる性質を有している。以下に，製剤素材の評価において重要な指標となる溶解性，安定性，界面活性，吸湿性に関する検討結果を述べる。

Table 6. Some Physicochemical Properties of Methylated and Ethylated  $\beta$ -CyDs

CyDs	Melting point (°C)	Solubility <sup>a)</sup> in water (g/dl)	Surface <sup>b)</sup> tension (mN/m)	Water <sup>c)</sup> content (%)	Half <sup>d)</sup> life (h)
$\beta$ -CyD	280	1.85	71.9	16.2	5.4
DM- $\beta$ -CyD	295-300	57	67.8	2.8	8.0
TM- $\beta$ -CyD	157	31	62.5	1.6	1.7
DE- $\beta$ -CyD	255	0.0050	52.5	1.1	12.2
TE- $\beta$ -CyD	60	0.0018	53.2	0.8	9.7

a) At 25 °C.

b) Concentration of CyDs was 1.0  $\mu$ M.

c) At 75% relative humidity. Determined by Karl-Fischer method.

d) Ring opening rate in 1.0 N HCl at 60 °C.

### (1) 溶解性

三種の  $\beta$ -CyD 同族体について，水への溶解度 (25°C) を比較した。天然  $\beta$ -CyD の溶解度 (1.85 g/dl) <sup>9)</sup> を基準にすると，DM- $\beta$ -CyD で約 31 倍，TM- $\beta$ -CyD で約 17 倍水溶性が増加した。一方，DE- $\beta$ -CyD では約 1/360，TE- $\beta$ -CyD では約 1/1000 に低下した。化学修飾によるこのような溶解度変化は，セルロースのアルキル置換体であるメチルセルロースやエチルセルロースの場合

72) とそれぞれ類似の挙動を示している。Fig. 25 は水-エタノール混液に対する各種  $\beta$ -CyD の溶解度を示す。エタノール濃度の増加に伴い、天然  $\beta$ -CyD および DM- $\beta$ -CyD の溶解度はいずれも低下し、一方、DE- $\beta$ -CyD では増大する傾向を示した。この結果は  $\beta$ -CyD を基準とした場合、メチル化  $\beta$ -CyD は親水性のホスト分子に、一方、エチル化  $\beta$ -CyD は疎水性のホスト分子に分類されることを示唆するものである。

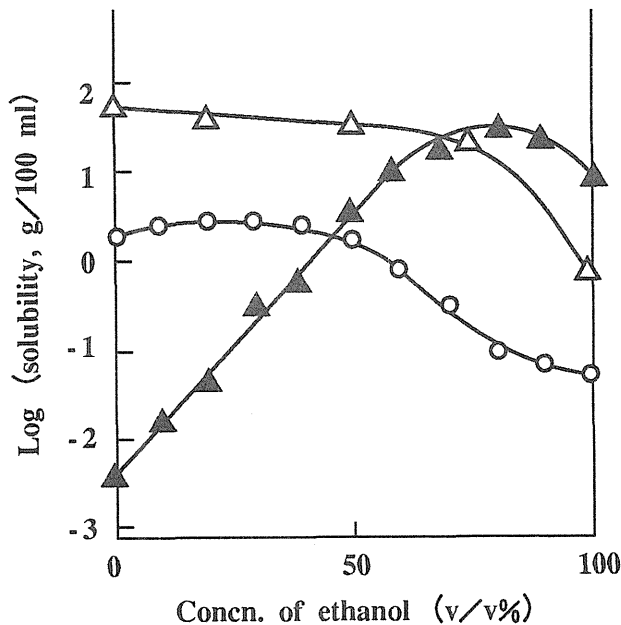


Fig. 25. Solubilities of  $\beta$ -CyDs in Water-Ethanol at 25 °C

○:  $\beta$ -CyD, ▲: DE- $\beta$ -CyD, △: DM- $\beta$ -CyD.

## (2) 安定性

天然  $\beta$ -CyD のグリコシド結合は熱やアルカリには比較的安定であるが、強酸性条件下では加水分解され、開環することが知られている。<sup>69)</sup> そこで、過酷な酸性条件 (60 °C, 1 N HCl 溶液中) における加水分解挙動を intact な CyD 濃度を追跡することにより比較検討した。その結果、各 CyD の環開裂反応の半減期は、TM- $\beta$ -CyD ( $t_{1/2} = 1.7$  h) <  $\beta$ -CyD ( $t_{1/2} = 5.4$  h) < DM- $\beta$ -CyD ( $t_{1/2} = 8.0$  h) < TE- $\beta$ -CyD ( $t_{1/2} = 9.7$  h) < DE- $\beta$ -CyD ( $t_{1/2} = 12.2$  h) の順に長くなり、特に DE- $\beta$ -CyD は酸加水分解を受けにくいことが判明した。

## (3) 界面活性

Fig. 26 は 25 °C において  $0 \sim 3 \times 10^{-6}$  M の濃度範囲での各種  $\beta$ -CyD 水溶液の表面張力の変化を示す。この濃度範囲において、天然  $\beta$ -CyD 溶液の表面張力は変化しなかった。一方、 $\beta$ -CyD 誘導体水溶液の表面張力は濃度の増加と共に減少し、DE- $\beta$ -CyD の表面張力は  $\beta$ -CyD や DM- $\beta$ -CyD よりも顕著に低かった。たとえば、 $1.0 \times 10^{-6}$  M 溶液の表面張力 ( $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) は  $\beta$ -CyD (71.9) > DM- $\beta$ -CyD (67.8) > DE- $\beta$ -CyD (52.5) の順に減少した。このことは、エチル化  $\beta$ -CyD はメチル化  $\beta$ -CyD よりも界面活性が大きいことを示唆している。

## (4) 水分含量

天然  $\beta$ -CyD は通常の保存条件下では吸湿し、固体表面において加水分解を受けやすい薬物 (アスピリン,<sup>73)</sup> カルモフル<sup>74)</sup> など) の反応を加速することが知られており、粉体特性の面からも好ましくない。そこで、25 °C, 75 % R.H. 下における各 CyD 粉末の水分含量を測定し、吸湿性の指標とした。Table 6 から明らかなように、メチル化およびエチル化  $\beta$ -CyD の水分含量は、 $\beta$ -CyD に比べて著しく低く、通常の保存条件下では吸湿性は小さいことが判明した。

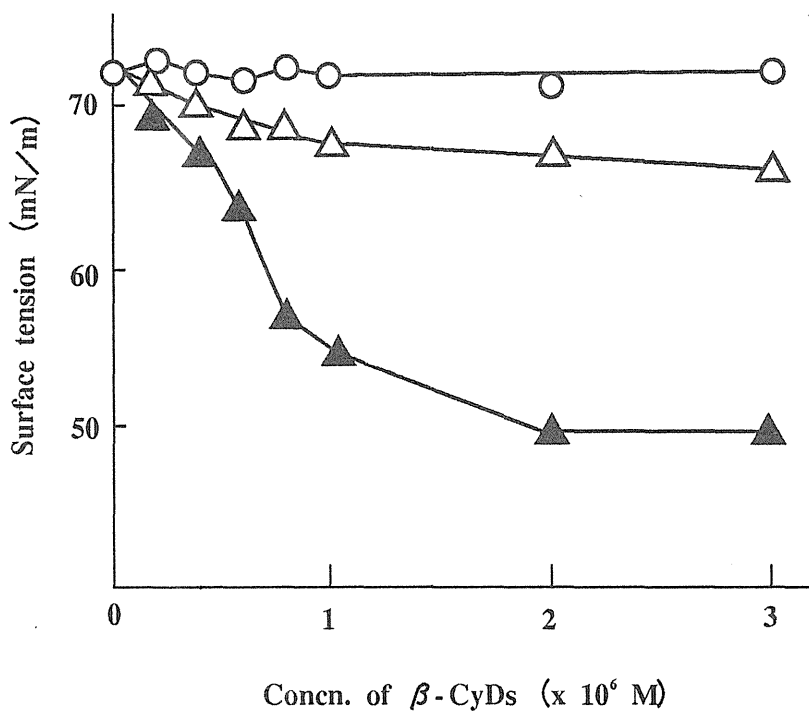


Fig. 26. Surface Tension Profiles of  $\beta$ -CyDs in Water at 25 °C

O:  $\beta$ -CyD,  $\blacktriangle$ : DE- $\beta$ -CyD,  $\Delta$ : DM- $\beta$ -CyD.

#### (4) 小 括

本章では、エチル化 $\beta$ -CyD の溶解性、安定性、界面活性、水分含量などを天然 $\beta$ -CyD およびメチル化 $\beta$ -CyD と比較し、物性面から製剤素材としての有用性を評価した。エチル化 $\beta$ -CyD の主な特徴として、エチル基の置換数が増すにつれて水溶性は低下し、酸加水分解性は置換基の立体障害による CyD 環の歪の影響を反映して、TE- $\beta$ -CyD の方が DE- $\beta$ -CyD よりも環開裂しやすいことが明らかとなった。また、エチル化 $\beta$ -CyD は界面活性を有し、水分含量は少ないことが確かめられた。このように、エチル化 $\beta$ -CyD は天然およびメチル化 $\beta$ -CyD とは異なる物性を有し、特に溶解性の面から放出制御用の薬物担体として製剤への有効利用が示唆された。



## 第二章 硝酸イソソルビドの徐放化

前章で述べたように、エチル化  $\beta$ -CyD は疎水性の機能性素材として製剤への有効利用が期待される。そのホスト分子としては、包接能の面から TE- $\beta$ -CyD よりも立体障害性の少ない DE- $\beta$ -CyD の方が望ましいが、放出制御を企図する場合は、水溶性の低い TE- $\beta$ -CyD と適宜使い分ける必要がある。エチル化  $\beta$ -CyD の包接対象としては、ゲスト分子の化学構造が立体的に嵩だかくない薬物が望ましいものと考えられる。このような観点から、本研究でモデル薬物に用いた硝酸イソソルビド (ISDN, Fig. 27) はニトログリセリンと同様に血管拡張薬、抗狭心症薬として現在広く使用されているが、難水溶性 (0.83 mg/ml 25 °C) で生物学的半減期が短い (48 分)<sup>75)</sup> ことから、様々な徐放化の工夫が行われている。そこで本章では、主として ISDN/DE- $\beta$ -CyD 系について複合体を調製し、*in vitro* 溶出挙動およびラットを用いた *in vivo* 吸収挙動を検討し、徐放性薬物担体としてのエチル化  $\beta$ -CyD の有用性を基礎的に評価した。

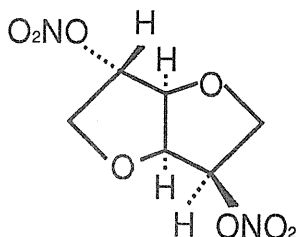


Fig. 27. Chemical Structure of ISDN

### (1) 複合体の調製

エチル化  $\beta$ -CyD 自体はかなり難水溶性であり、その複合体からの薬物の放出性および経口投与時の吸収性は低くなるものと予想される。そこで、まずモル比 1 : 1 複合体を調製し、溶出および吸収挙動に関する予備実験を行なった。その結果、ISDN の溶出速度は極めて遅く、血漿レベルも低すぎる事が判明した。

従って、本研究では ISDN と DE- $\beta$ -CyD とのモル比を 2 : 1 に設定し、混練法で調製した複合体を以下の実験に使用した。

Fig. 28 は ISDN/DE- $\beta$ -CyD 系 (モル比 2 : 1) の粉末 X 線回折パターンを示す。物理的混合物の回折パターンは各成分の単なる和として観察されたが、複合体の場合は ISDN に特有な回折ピーク ( $2\theta = 17^\circ, 20^\circ$ ) が消失し、非晶質化が起きていることが示唆された。Fig. 29 は ISDN/DE- $\beta$ -CyD 系の DTA 曲線を示す。物理的混合物は  $70^\circ\text{C}$  付近に薬物の融解に由来する吸熱ピークを与え、このピークは複合体化により完全に消失した。これらの結果から、ISDN と DE- $\beta$ -CyD は固体状態で相互作用し、結晶状態に何らかの変化を起しているものと推定された。

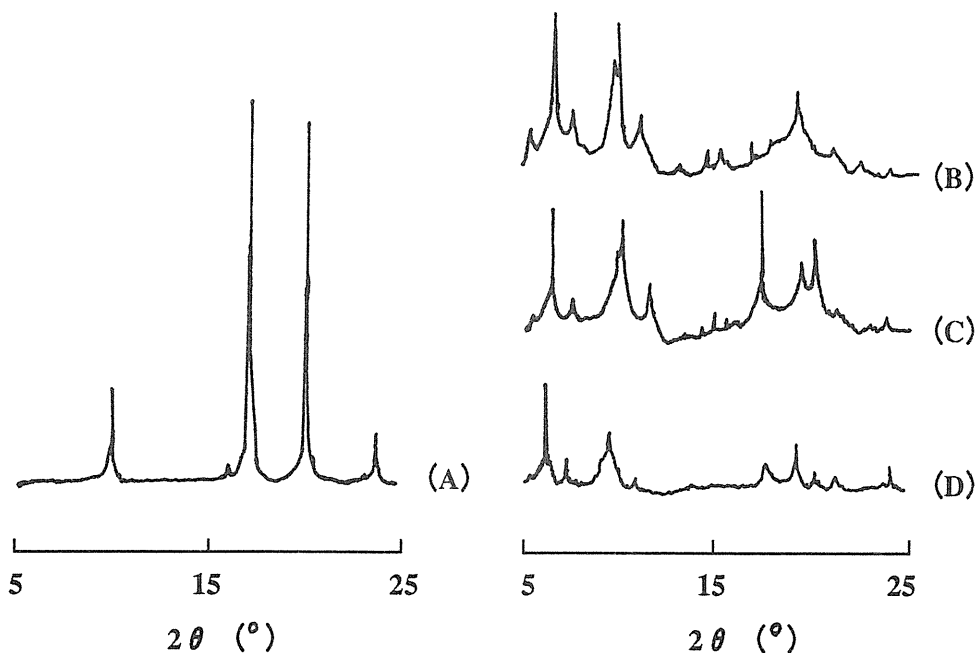


Fig. 28. Powder X-Ray Diffractograms of ISDN-DE- $\beta$ -CyD System

(A) : ISDN, (B) : DE- $\beta$ -CyD,  
(C) : physical mixture, (D) : complex.

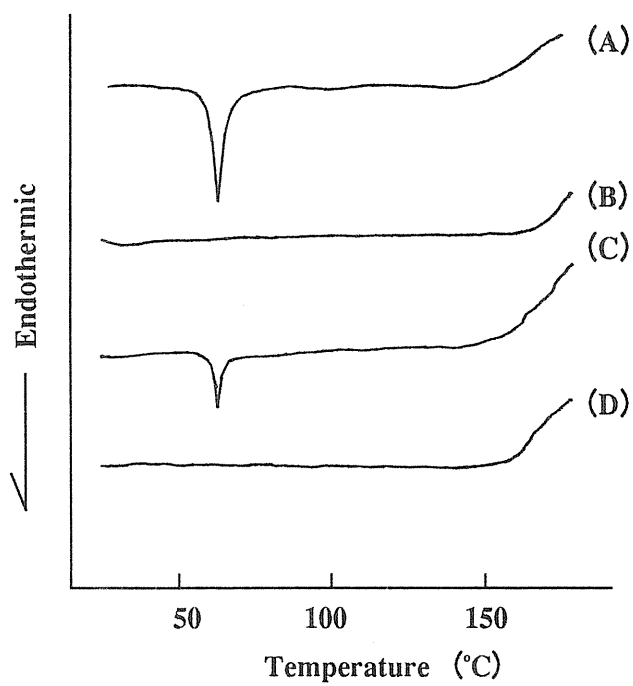


Fig. 29. DTA Thermograms of ISDN-DE-  $\beta$ -CyD System

(A) : ISDN, (B) : DE-  $\beta$ -CyD,

(C) : physical mixture, (D) : complex.

## (2) 溶出挙動

Fig. 30 は ISDN 単独およびその DE- $\beta$ -CyD 複合体についてゼラチン硬カプセルおよび錠剤からの 37 °C における JP XI 第 1 液への溶出挙動を示す。DE- $\beta$ -CyD 複合体はカプセルおよび錠剤とも、薬物単独に比べて薬物を非常にゆっくりと溶出することが確かめられた。

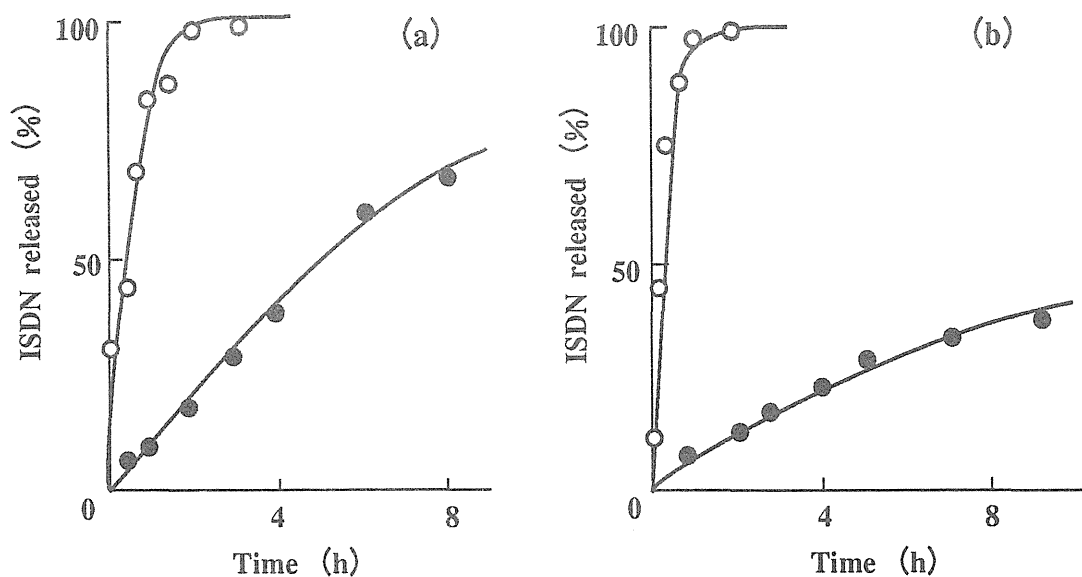


Fig. 30. Release Profiles of ISDN from Capsule (a) and Tablet (b) Containing ISDN or Its DE- $\beta$ -CyD Complex in JP XI First Fluid at 37 °C, Measured by Paddle and Rotating-Basket Method, Respectively

○ : ISDN, ● : complex.

### (3) 小 括

ISDN/DE- $\beta$ -CyD 複合体（モル比 2 : 1）を混練法により調製し，固体状態における相互作用を DTA および粉末X線回折法により確認した。この複合体を打錠成形または硬カプセルに充填し，それらの溶出挙動を ISDN 単独と比較した。その結果，疎水性の DE- $\beta$ -CyD 複合体化により各製剤からの薬物放出は著しく遅延し，徐放化が達成された。

### 第三章 In Vivo 吸収挙動

前章では、疎水性のホスト分子である DE- $\beta$ -CyD との複合体形成によって ISDN の溶解性が低下し、カプセルならびに錠剤からの薬物溶出速度が減少することを明らかにした。これらの知見は、DE- $\beta$ -CyD 複合体を経口投与した際に血漿中薬物濃度の持続化を期待させるものである。そこで本章では、薬物単独ならびに ISDN/DE- $\beta$ -CyD 複合体（モル比 2 : 1）をカプセルまたは錠剤として、ラットに経口投与後の血漿中薬物濃度を比較検討した。

#### (1) カプセル剤投与の場合

Fig. 31 は、ラットに ISDN またはその DE- $\beta$ -CyD との複合体の粉末をカプセル (1.0 mg/body) に充填し、経口投与後の平均血漿レベルの時間推移を示す。Table 7 は Fig. 31 および ISDN の静脈内投与（実験の部参照）のデータから得られたバイオアベイラビリティパラメーターをまとめたものである。なお、血中における ISDN の平均滞留時間 (MRT) および時間的分散 (VRT) はモーメント解析法により計算した。<sup>45)</sup> ISDN 単独を投与した場合、血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) および吸収率 (F) はそれぞれ  $42.0 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  ならびに 61 % であった。一方、DE- $\beta$ -CyD 複合体では吸収率は増加し、持続化の指標である最高血漿中濃度到達時間 ( $t_{\text{max}}$ )、MRT、VRT はいずれも増大した。すなわち、 $t_{\text{max}}$  は MRT および VRT 値と同様に、薬物単独よりも約 1.2 倍大きく、in vitro における徐放性の溶出パターンが in vivo データによく反映された。

#### (2) 錠剤投与の場合

Fig. 32 は、ラットに ISDN またはその DE- $\beta$ -CyD との複合体の錠剤 (2.5 mg/body) を経口投与後の平均血漿レベルの時間推移を示す。ISDN 単独では投与後 1 時間以内に最高血漿中濃度 ( $C_{\text{max}}$ ) を与えるが、薬物の消失が速く ( $t_{\text{max}} =$  約 16 分、血漿中の生物学的半減期は約 30 分)、24 時間後には血漿中に ISDN を観察することができなかった (検出感度  $< 2 \text{ ng}/\text{ml}$ )。一方、DE- $\beta$ -CyD 複合体では血漿中の ISDN 濃度は低い、比較的一定の濃度レベルを長

時間維持している。Table 7 は Fig. 32 および ISDN の静脈内投与（実験の部参照）のデータから得られたバイオアベイラビリティパラメーターをまとめたものである。DE- $\beta$ -CyD 複合体では薬物単独投与に比べて AUC ならびに F 値は低下したが、MRT ならびに VRT は極めて大きく、ISDN が血漿中に長時間存在することが予測された。たとえば、複合体の  $t_{max}$ , MRT, VRT 値は薬物単独の場合よりも大きくなったが（それぞれ、約 4.4 倍、3.5 倍、5 倍）、 $C_{max}$  および AUC 値は約 1/8, 約 1/2 にそれぞれ減少した。

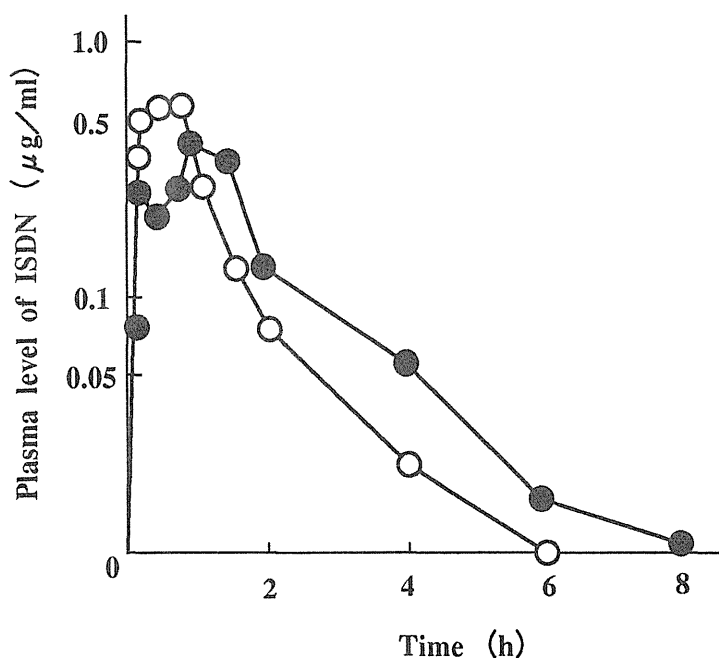


Fig. 31. Plasma Levels of ISDN Following Oral Administration of Capsules Containing ISDN or Its DE- $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 1.0 mg drug) to 4 Rats

○ : ISDN, ● : complex.

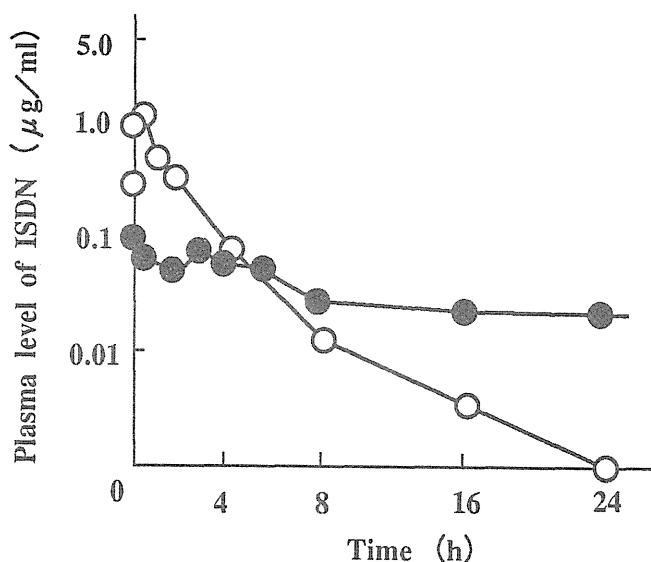


Fig. 32. Plasma Levels of ISDN Following Oral Administration of Compressed Tablets Containing ISDN or Its DE-  $\beta$ -CyD Complex (equivalent to 2.5 mg drug) to 7 Rats

○ : ISDN, ● : complex.

Table 7. Pharmacokinetic Parameters of ISDN Following Oral Administration of Capsules or Tablets Containing ISDN or Its DE-  $\beta$ -CyD Complex to Rats

System	$C_{max}$ (ng/ml)	$t_{max}$ (min)	AUC <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ )	MRT (min)	VRT ( $\text{min}^2$ )	F <sup>b)</sup> (%)
Capsule						
ISDN	690 $\pm$ 60	38 $\pm$ 8	42.0 $\pm$ 1.5	60 $\pm$ 6	3500 $\pm$ 10	61
complex	680 $\pm$ 230	45 $\pm$ 18	41.0 $\pm$ 8.0	110 $\pm$ 5	8900 $\pm$ 2400	59
Tablet						
ISDN	1030 $\pm$ 340	16 $\pm$ 3	112.4 $\pm$ 30.0	150 $\pm$ 30	32000 $\pm$ 10000	65
complex	130 $\pm$ 40	70 $\pm$ 55	45.6 $\pm$ 3.0	530 $\pm$ 100	160000 $\pm$ 41000	26

a) Up to 8 h and 24 h post-administration of the capsule and tablet, respectively.

b) Absorption ratio :  $(\text{AUC}_{po}/\text{AUC}_{iv}) \times (\text{Div}/\text{Dpo}) \times 100$ .

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.



### (3) 小 括

ISDN 単独および ISDN/DE- $\beta$ -CyD 複合体をラットに経口投与後、ISDN の血漿中濃度時間推移を比較した結果、*in vivo* 実験においても徐放化を確かめることができた。今回観察された DE- $\beta$ -CyD の徐放化効果には複合体形成による薬物の溶解性の低下に加えて、薬物の消化管内移動性の変化、DE- $\beta$ -CyD の消化管に対する直接作用、複合体と製剤構成材料（賦形剤やカプセル基剤）との相互作用などの複雑な要因が関与しているものと推測される。このように、本研究で得られた知見は DE- $\beta$ -CyD が ISDN の放出制御用担体となる得ることを示唆している。

#### 第四章 第二編の考察

本研究で対象とした ISDN はニトログリセリンに匹敵するほどの速効性の抗狭心症薬として汎用されているが、経口投与では 2~3 時間しか薬効が持続しないため安定した治療効果を期待するには頻回投与を余儀なくされ、また、狭心症発作の予防を目的とする上でも作用時間の長いニトロ製剤の開発が望まれている。<sup>70,71)</sup> 近年の製剤技術や製剤素材の進歩によって、ワックスマトリックス型の徐放性錠剤 (フランドル<sup>®</sup>) やシェラックと高分子素材で ISDN に薄い皮膜を施した小粒子をカプセルに充填した長時間作用型徐放性製剤 (ニトロール R<sup>®</sup>) が開発され、1 日 2 回投与で治療が可能になった。さらに最近では、ISDN を粘着テープに高分子と共に塗布したいわゆる持続型経皮吸収製剤 (フランドルテープ<sup>®</sup>) が開発された。このテープ剤は皮膚に貼付後 48 時間も安定した血漿中濃度の維持が認められ、使用性の面でも著しい改善がみられる。<sup>76)</sup> このように徐放性製剤の構築には機能性高分子の利用は不可欠であり、放出制御用の新しい高分子素材が近年次々と開発されている。<sup>1-3)</sup> 経口固形製剤用の高分子は、不溶性高分子、ゲル形成性高分子、徐溶解性高分子、腸溶性高分子、生体内分解性高分子などに分類され、それぞれ特有の機能を有することから、使用目的に応じて様々な放出制御製剤が開発されている。<sup>2)</sup> しかし、特に合成高分子を実際製剤に利用する際の最大の課題は、分子量分布の精密な制御、安全性、体内動態の正確な把握などが困難なことである。本研究では、放出制御用素材としては低分子量であるが、純品が得られ、機能性に富み、安全性の面からも難点の少ない  $\beta$ -CyD 誘導体に着目し、経口投与用の徐放化用素材としての有効利用を企図した。従来の CyD の実際製剤への応用は、主として水溶性 CyD による難水溶性薬物の溶解性やバイオアベイラビリティの改善に関する検討が多くなされているが、<sup>11-14)</sup> 疎水性誘導体の製剤への応用はほとんどなされていない。そこで著者は、経済性の面から安価な  $\beta$ -CyD を始発原料として、この  $\beta$ -CyD の 2, 3, 6 位の水酸基にエチル基以上のアルキル基を導入すると水溶性の低いホスト分子が得られることに着目して、<sup>16)</sup> 特に包接対象が広いエチル化  $\beta$ -CyD を検討対象に選んだ。さらに、エチル化  $\beta$ -CyD の本来の包接機能を保持するには、環を構成するグルコースの全ての水酸基をエチル化した TE- $\beta$ -CyD よりも 3 位水酸

基が未置換の誘導体である DE- $\beta$ -CyD の方が立体障害性が少なく、複合体形成に有利であると考えた。

このような背景のもと、第二編の第一章では主に DE- $\beta$ -CyD の溶解性、安定性、界面活性、水分含量などを天然  $\beta$ -CyD および DM- $\beta$ -CyD と比較し、物性面から製剤素材としての有用性を評価した。その結果、エチル基の置換数が増すにつれて水溶性は低下し、酸加水分解性は立体障害による  $\beta$ -CyD 環の歪の影響を反映して、TE- $\beta$ -CyD の方が DE- $\beta$ -CyD よりも環開裂しやすいことが明らかとなった。また、エチル化  $\beta$ -CyD は界面活性を有し、水分含量は小さいことが確かめられた。このように、エチル化  $\beta$ -CyD は天然  $\beta$ -CyD およびメチル化  $\beta$ -CyD とは著しく異なる物性を有し、特に DE- $\beta$ -CyD は溶解性や包接能の面から放出制御用の薬物担体として好ましいものと考えた。なお、水溶液中における ISDN と DE- $\beta$ -CyD との相互作用については、ホスト分子が難水溶性であるため定量的な検討は困難であった。そこで第二章では、混練法により ISDN /DE- $\beta$ -CyD 複合体（モル比 2 : 1）を調製し、固体状態における相互作用を熱分析および粉末 X 線回折法により明らかにした。この複合体を打錠成形または硬カプセルに充填し、それらの溶出挙動を ISDN 単独と比較すると、DE- $\beta$ -CyD 複合体化によって特に錠剤からの薬物放出は著しく遅延することが確かめられた。これらの知見に基づいて、第三章では ISDN 単独および ISDN/DE- $\beta$ -CyD 複合体をカプセル剤または錠剤としてラットに経口投与し、ISDN の血漿中濃度時間推移を比較した。その結果、両剤形とも *in vitro* 放出挙動を反映して、*in vivo* 吸収においても複合体化による ISDN の徐放化が達成された。その際、DE- $\beta$ -CyD の徐放化効果には複合体形成による薬物の溶解性の低下に加えて、消化管内移動性の変化、DE- $\beta$ -CyD の消化管に対する直接作用、複合体と製剤構成材料（賦形剤やゼラチンカプセル基剤など）との相互作用などの要因が複雑に関与しているものと推測された。

以上述べたように、本研究において初めて DE- $\beta$ -CyD が水溶性薬物の放出制御用担体として利用可能なことを明らかにすることができた。今回の基礎的知見が端緒となって、上釜らはカルシウム拮抗薬塩酸ジルチアゼム、<sup>77)</sup> 生理活性ペプチド酢酸ブセレリン（LH-RH のアゴニスト）<sup>78)</sup> などの各種水溶性薬物の徐放化においても DE- $\beta$ -CyD が有用な薬物担体となり得ることを最近報告して

いる。製剤素材としてのエチル化 $\beta$ -CyDの今後の利用展開としては、疎水性のDE- $\beta$ -CyDとDM- $\beta$ -CyDのような水溶性の誘導体を併用することによって、投与後速やかに有効血中濃度に到達させ、バイオアベイラビリティを低下させることなく、持続性を示すようなより精密な放出制御製剤の設計が可能になるものと考えられる。その際、CyD誘導体を利用する最大のメリットは、分子カプセルとしての包接機能の発現によって高分子や他の添加物にはみられない付加的効果を期待することであり、今後の研究の進展が待たれる。

## 結論の部

最近の製剤技術の進歩はめざましいものがあり、プロスタグランジンや生理活性ペプチドのように微量で強力な活性を有し、極めて不安定な薬物でも有効性、安全性、使用性に優れる製剤が開発されるようになった。また、既存の薬物につきも機能性に富む製剤素材と組み合わせて、新薬に匹敵または凌駕するような製剤の開発が活発に行なわれている。このように新しい医薬品製剤の開発は製剤技術の進歩とともに添加物の改良・開発に負うところが大きく、目的に応じて添加物をいかにうまく使い分けられるかが製剤の良否を決定する重要な部分を占めている。<sup>79)</sup> 分子カプセルとも呼ばれる天然 CyD は無限の可能性を秘める機能性製剤素材として古くから注目されてきた。近年、プロスタグランジン/CyD 包接化合物製剤の開発を契機に、 $\alpha$ -および $\beta$ -CyD が医薬品添加物として公定書（日本薬局方外医薬品添加物規格）に記載され、新薬や OTC 製剤の開発に広く利用されている。さらに、医薬への用途開発が進むにつれて現在汎用されている天然 CyD の物性や包接能に限界があることが明らかになり、種々の誘導体が構築されるようになった。

そこで、本研究ではアルキル化 $\beta$ -CyD に着目し、親水性誘導体として DM- $\beta$ -CyD、疎水性誘導体として DE- $\beta$ -CyD を用いて経口投与製剤用の薬物担体としての有効利用に関する基礎的検討を行なった。以下に本研究で得られた主な知見を要約する。

第一編では、DM- $\beta$ -CyD を用いて代表的な脂溶性薬物である $\alpha$ -トコフェロールエステル、CoQ<sub>10</sub>、MK-4 の溶解性およびバイオアベイラビリティの改善を企図した。その結果、3 種の難水溶性薬物はいずれも DM- $\beta$ -CyD と水溶性の高次複合体を形成し、顕著な溶解速度の増大が認められた。これら固体複合体を混練法により調製し、空腹時のビーグル犬に経口投与すると、薬物単独投与に比べて著明な吸収性の改善が見られ、MK-4 については薬理効果の増大も確かめられた。そこで、空腹時および胆汁欠損時における DM- $\beta$ -CyD の吸収改善機構を明らかにするため、胆管を導出したラットを用いて吸収挙動を検討した結果、複合体の場合は通常のリンパ系ルートに加えて門脈系を介した吸収ルートの可能性が示唆された。従って、脂溶性薬物を DM- $\beta$ -CyD 複合体として経口投与すると、

空腹時においてもバイオアベイラビリティが改善され、吸収率にバラツキの少ない製剤が得られるものと推定された。

第二編では、まずエチル化  $\beta$ -CyD の製剤素材としての基本的な特性（溶解性、安定性、界面活性、水分含量）を明らかにし、さらに、DE- $\beta$ -CyD を用いて抗狭心症薬 ISDN の徐放化を企図した。その結果、ISDN は DE- $\beta$ -CyD と難水溶性の複合体を形成し、薬物放出速度を顕著に減少させた。ISDN/DE- $\beta$ -CyD 複合体（モル比 2 : 1）を混練法により調製し、カプセルおよび錠剤としてラットに経口投与後の吸収挙動を比較すると、両剤形とも *in vivo* 吸収挙動には *in vitro* 放出性の変化が反映され、ISDN の徐放化が確かめられた。

上述のように、本研究ではアルキル化  $\beta$ -CyD の中で対照的な性質を有するメチル化およびエチル化  $\beta$ -CyD について、経口投与用薬物担体としての有用性の一端を明らかにすることができた。これら新素材を今後実際製剤に応用するには、安全性、生体適合性、量産性などに関する詳細なデータを集積する必要があるが、今回の基礎的知見は、機能性製剤素材としての  $\beta$ -CyD 誘導体の用途を拡大する上で新たな端緒を開いたものと考えられる。

## 謝 辞

本研究課題を御与え下さり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜った恩師熊本大学薬学部上益兼人教授に衷心から謝意を表します。

本研究の発表の機会を御与え下さると共に、本論文の御校閲を賜り、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を頂いた城西大学薬学部森本雍憲教授に衷心より謝意を表します。

また、本研究に御協力下さいました熊本大学薬学部平山文俊助教授、日清製粉（株）中央研究所井實孝則博士に謹んで厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行の機会を御与え下さると共に、終始御理解と御助言、御協力を賜りました日清製粉（株）常務取締役中央研究所所長杉橋孝夫氏、同常務取締役府川秀明博士、同小林昭男第二研究所所長、並びにエチル化 $\beta$ -シクロデキストリンの合成を担当して頂いた同化学研究室豊田 仁博士、田原吉幸氏に謹んで厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に御協力下さいました熊本大学薬学部製剤学研究室菊池正彦博士、平嶋直樹氏、堀内保秀氏、阿部憲太郎氏、城西大学薬学部製剤学教室の皆様、日清製粉（株）中央研究所製剤研究室室員の皆様に心から感謝申し上げます。

## 実験の部

### 第一編に関する実験の部

#### 第一章に関する実験の部

##### 試料および溶媒

酢酸 $\alpha$ -トコフェロール、ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールは日清製粉（株）製、DM- $\beta$ -CyD は東進ケミカル（株）製を水から再結晶して使用した。その他の試薬および溶媒は分析用特級品を使用し、水はイオン交換後石英製蒸留装置を用いて 2 回蒸留したものを使用した。

##### 溶解度測定

$\alpha$ -トコフェロールエステル類の溶解度測定は、T. Higuchi らの方法<sup>36)</sup>に従って実施した。すなわち、過剰量の $\alpha$ -トコフェロールエステル類を種々濃度の DM- $\beta$ -CyD 水溶液に添加し、25 °C 暗所で振盪した。なお、この条件下では $\alpha$ -トコフェロールエステル類の分解は観察されなかった。系が溶解平衡に達してから（約 2 週間）、遠心分離して、上清を綿栓付きピペットで濾取し、正確にメタノールで希釈し、 $\alpha$ -トコフェロールエステル類の濃度を分光光度計（日立 55S 型）で測定した [ $\lambda_{\max} = 284 \text{ nm}$ （酢酸 $\alpha$ -トコフェロール）， $\lambda_{\max} = 263 \text{ nm}$ （ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール）]。

##### 複合体の調製

$\alpha$ -トコフェロールエステル/DM- $\beta$ -CyD の固体複合体は混練法<sup>46)</sup>により調製した。たとえば、モル比 1 : 2 のニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール（1.0 g）と DM- $\beta$ -CyD（5.96 g）に少量の水（10ml）を加えてスラリー状とし、さらに 40 分間練合した。このペーストを減圧下 3 日間室温で乾燥した。

##### 粉末 X 線回折

粉末 X 線回折パターンは、ガイガーフレックス 2012 型回折計（理学電機(株)



)を用いて次の条件で測定した：X-線；Ni フィルター Cu-K $\alpha$ 線 (1.452 Å )，管電圧；30 kv，管電流；20 mA；走査角度；1°/min，回折角 (2 $\theta$ )；5～25°，時定数；1 s，走査速度；1.0/min。

### 示差熱分析

示差熱分析 (DTA) は島津 DT-20B を用いて測定した。標準物質は $\alpha$ -アルミナを用い，昇温速度 10 °C/min で操作した。

### 溶出試験

粉末試料： $\alpha$ -トコフェロールエステル類およびその複合体粉末試料からの溶出挙動は，第十一改正日本薬局方 (JP XI) 溶出試験法のパドル法 (第 2 法) に準じて測定した。すなわち，37 °C の循環水を通じたジャケットビーカー (内径 3 cm，内容積 50 ml) に JP XI 崩壊試験用第 1 液 25 ml を入れ，粉末試料 (ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール 20 mg 相当量，<100 メッシュ) を加え，回転数 91 rpm で攪拌した。経時的に綿栓付きピペットで試料溶液 3 ml を採取し，薬物濃度を測定した。濾液が乳化しているものは，二波長分光光度計 (日立 55S 型) で測定した ( $\lambda_1 = \lambda_{\max}$  [酢酸 $\alpha$ -トコフェロール：284 nm，ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール：263 nm] と  $\lambda_2 = 350$  nm を使用)。

カプセル：硬ゼラチンカプセルからの $\alpha$ -トコフェロールエステルの溶出挙動は JP XI 溶出試験の回転バスケット法 (第 1 法) に準じて，回転数 75 rpm で測定した。たとえば，被験カプセル (JP XI, 00 号硬カプセル，容積：0.93 cm<sup>3</sup>) に DM- $\beta$ -CyD 複合体 (298 mg [50 mg の $\alpha$ -トコフェロールエステル相当量，<100 メッシュ]) または物理的混合物 (50 mg の薬物と 248 mg と うもろこしデンプンの混合物) をそれぞれ充填し，JP XI 崩壊試験用第 1 液 500 ml 中に入れ，37 °C で測定した。ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールの定量は，上記の方法と同様に二波長分光光度計 (日立 55S 型) で測定した。

### In Vivo 吸収実験

6 頭の雄性ビーグル犬 (体重 9.6～12.5 kg) を約 12 h 絶食させ後，被検薬

物（粉末<100 メッシュ）を投与した。薬物の体内蓄積の影響を除くため、2 週間の休薬期間を置いた。ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロールおよびその DM- $\beta$ -CyD 複合体（100 mg ニコチン酸 $\alpha$ -トコフェロール相当量/body）を水 100 ml とともに経口投与し、7 ml の血液を一定時間毎に採血した。抗血液凝固剤としてヘパリンナトリウムを使用した。血漿中のニコチン $\alpha$ -酸トコフェロールは、下記の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法で測定した。<sup>48)</sup>

### HPLC 条件

血漿（0.5 ml）および内部標準液（d- $\gamma$ -tocopheryl nicotinate の n-ヘキサン溶液，100 ng/50  $\mu$ l）を血漿処理用デイスポーサブルチューブ（Extube CE1001, Analytichem International）に注入し，n-ヘキサン 4.0 ml を用いて妨害物質を除去後，メタノール飽和 n-ヘキサン 3.0 ml で 2 回抽出した。この抽出液を遠心濃縮機用小試験管に集め，減圧遠心濃縮後，得られた残留物を n-ヘキサン（50  $\mu$ l）に再溶解し，その 10  $\mu$ l を HPLC に注入分析した。HPLC 条件は次の通りである：ポンプおよび検出器；日本分光（株）製（TRIROTAR-V, UVIDEC-100V），カラム；LiChrosorb Si 60（5  $\mu$ m, 4.66 mm  $\phi$  x 250 mm），移動相；エタノール/n-ヘキサン（0.5 : 99.5），流速；1.0 ml/min，検出；264 nm。

## 第二章に関する実験の部

### 試料および溶媒

CoQ<sub>10</sub> は日清製粉（株）製，DM- $\beta$ -CyD は東進ケミカル（株）製を水から再結晶して使用した。その他の試薬および溶媒は分析用特級品を使用し，水はイオン交換後石英製蒸留装置を用いて 2 回蒸留したものを使用した。

### 溶解度測定

CoQ<sub>10</sub> の溶解度測定は T.Higuchi らの方法<sup>36)</sup> に従って実施した。各種濃度の DM- $\beta$ -CyD を含む水溶液に過剰量（5.0 mg）の CoQ<sub>10</sub> を加え，暗所におい

て 25 °C で振盪した。この実験条件下では CoQ<sub>10</sub> の分解は観察されなかった。試料が溶解平衡に到達後（約 2 週間），その一定量を遠心分離後ピペットで分取し，綿栓濾過を行った。濾液が乳化した試料については，前述と同様に二波長分光光度計（日立 55S 型）を用いて吸光度を測定し，検量線から薬物濃度を算出した。

### 複合体の調製

モル比 1 : 3 の CoQ<sub>10</sub>/DM-β-CyD 複合体は混練法<sup>46)</sup>により調製した。たとえば，CoQ<sub>10</sub> (1.0 g) と DM-β-CyD (4.6 g) の混合物を少量の水（約 4.0 ml）を用いて泥状とし，暗所で約 40 分間十分に練合した。これを減圧下，室温で 3 日間乾燥した。

### 粉末 X 線回折

第一章に記載した方法と同様に測定した。

### 溶出試験

複合体の溶解速度は粉末法<sup>50)</sup>により測定した。実験条件は次の通りである：粉末試料；CoQ<sub>10</sub> (30 mg < 100 メッシュ) または CoQ<sub>10</sub> 30 mg に相当する複合体 (< 100 メッシュ)，溶出液；水 100 ml，温度；37 °C，攪拌速度；91 rpm。CoQ<sub>10</sub> の濃度は前記二波長分光光度計（日立 55S 型）を使用し，275 nm で測定した。なお，CoQ<sub>10</sub> の光分解<sup>54)</sup>を避けるため，実験は暗所で実施した。

### In Vivo 吸収実験

雄性ビーグル犬（体重 10.0~15.0 Kg）4 頭を薬物投与前 30 時間絶食させ，使用した。薬物の体内蓄積の影響を除くため，2 週間の休薬期間を置いた。ゼラチン硬カプセル（容積；0.95 cm<sup>3</sup>，JP XI No.00 号）に充填した CoQ<sub>10</sub> またはその DM-β-CyD 複合体の粉末（CoQ<sub>10</sub> として 30 mg 相当量/body）を水 25 ml とともに経口投与し，5 ml の血液を一定時間毎に採血した。抗血液凝固剤としてヘパリンナトリウムを使用した。血漿中の CoQ<sub>10</sub> は下記の HPLC 法で

測定した。

### HPLC 条件

血漿 (0.5 ml) をメタノール (2.0 ml) および内部標準液 (2,3,5-trimethyl-6-nonaprenyl-1,4-benzoquinone の *n*-ヘキサン溶液, 0.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ) と一緒に混合し, その混液から *n*-ヘキサン (5.0 ml) で CoQ<sub>10</sub> を抽出した。有機層 (4.0 ml) を減圧下で蒸発乾固し, 残留物を 0.01 % 塩化第二鉄を含むエタノール (50  $\mu\text{l}$ ) に再溶解し, その 10  $\mu\text{l}$  を HPLC で分析した。なお, 塩化第二鉄は少量残存する還元型 CoQ<sub>10</sub> の酸化用に添加されている (還元型の 275 nm における UV 吸収は CoQ<sub>10</sub> の 1/10 程度であるため)。HPLC 条件は次の通りである: ポンプおよび検出器; 日本分光 (株) 製 (TRIROTAR-V, UVIDEC-100V), カラム; Fine Pack C18 S (10  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mm), 移動層; メタノール/*n*-ヘキサン (4 : 1), 流速; 1.0 ml/min, 検出; 275 nm。

## 第三章に関する実験の部

### 試料および溶媒

MK-4 は日清製粉 (株) 製, DM- $\beta$ -CyD は東進ケミカル (株) 製を使用した。その他の試薬および溶媒は, すべて市販特級品を用いた。溶媒としての水はイオン交換精製水を 2 回蒸留して用いた。

### 溶解度の測定

MK-4 の溶解度測定は T. Higuchi らの方法<sup>36)</sup> に従って実施した。すなわち, MK-4 の一定過剰量を共栓付試験管に入れ, 種々の濃度の DM- $\beta$ -CyD 溶液を添加して密栓し, 溶解平衡に達するまで (25  $^{\circ}\text{C}$ , 2 週間) 遮光条件下で振盪した。遠心分離後, 上澄液を綿栓付ピペットで濾過し, メタノールで希釈後, MK-4 の吸収極大波長 (248 nm) における吸光度を測定して, 検量線から MK-4 濃度を求めた。なお, 本実験条件下では MK-4 の分解は起こらないことを確認

した。

## 固体複合体の調製

モル比 1 : 3 の MK-4 と DM- $\beta$ -CyD をメノウ乳鉢中で混和し、水を適量加え、ペースト状になるまで（約 40 分）練合した。得られた複合体は室温で 3 日間減圧乾燥し、100 メッシュで篩過し、ふるい下部分の粉末を以下の実験に用いた。

## 粉末 X 線回折および熱分析

第一章に記載した方法と同様に測定した。

## 溶出試験

粉末試料（MK-4 50 mg 相当量）を JP XI の 00 号ゼラチン硬カプセルに充填した。溶出試験は JP XI 溶出試験第 2 法（パドル法）に準じて、遮光条件下で行った。検液は綿栓付ピペットおよびミリポアフィルター（ $\phi$  0.45  $\mu$ m）で濾過後、MK-4 濃度を求めた。測定条件は以下の通りである。溶出液：JP XI 第 1 液（pH 1.2, 500 ml），パドル回転数：100 rpm，温度：37  $^{\circ}$ C，定量用 UV 測定波長：270 nm。

## In Vivo 吸収実験

実験動物：生後約 1 年の雄性ビーグル犬（体重 13-15 Kg）を投与前 12 時間絶食させて用いた。なお、ビーグル犬には水を自由に摂取させた。投与方法：粉末試料（MK-4 60 mg 相当量）を 000 号カプセル（JP XI）2 個に均等に充填し、水 100ml と共に経口投与した。試料投与後、経時的に前肢静脈から 3.8 % クエン酸ナトリウム 0.3 ml とともに血液 2.7 ml を採血後、遠心分離（3000 rpm, 10 min）し、血漿を採取し、血漿中の薬物濃度を測定した。

血漿中 MK-4 濃度の測定：血漿 0.5 ml に精製水 0.2 ml，イソプロピルアルコール 0.8 ml，内部標準物質（ビタミン K<sub>1</sub>）を含んだ n-ヘキサン 4 ml を加えて振盪後、遠心分離し、上澄 3.0 ml を減圧留去後、残渣に移動相と同一組成の混液 0.1 ml を加え、その 30  $\mu$ l を検液として下記の HPLC により MK-4

を定量した。

HPLC 条件：ポンプ；日本分光（株）製 BIP-1 型，カラム；Cica-Merck LiChrosorb Si60（5  $\mu$ m, 4 mm  $\phi$  X 250 mm），検出器；日本分光（株）製 UVIDEC-100V，検出；270 nm，移動相；酢酸エチル/n-ヘキサン（2：98）混液，流速：1.0 ml/min の条件下で測定した。

### 薬理活性の測定

低プロトロンビン血症犬の調製：生後約 1 年の雄性ビーグル犬（体重 13～15 Kg）を用い，生理食塩水に溶解させた抗凝血薬ワーファリンナトリウム（1.0 mg/Kg）を前肢静脈より静注し，実験的低プロトロンビン血症犬を作製した。<sup>59)</sup> 投与方法：粉末試料はそれぞれ MK-4 として 130 mg 相当量をカプセル 2 個に分割・充填し，ワーファリン処理後 36 時間目に経口投与した。また，MK-4 の静脈内投与は市販の塩化カリウム注射液（ケイツー注射液<sup>R</sup>，エーザイ（株））を用い，MK-4 として 12.0 mg 相当量を投与した。血液は経時的に採取し，血液凝固能を測定した。なお，ビーグル犬はいずれの場合も投与前 12 時間絶食させた。

### 血液凝固活性（プロトロンビン複合体活性，PCA）の評価

PCA は血液凝固時間（プロトロンビン時間，PT）を Quick 1 段法で測定することにより評価した。<sup>81)</sup>

PT 測定法：血液 2.7 ml をクエン酸ナトリウム 0.3 ml と共にビーグル犬の前肢静脈から採血し，遠心分離（3000 rpm, 10 min）後，血漿を分取した。その血漿 75  $\mu$ l を生理食塩水 75  $\mu$ l で希釈したものとプロトロンビン測定試薬 シンプラスチン-A（General Diagnostics Co.）0.2 ml をそれぞれガラス試験管に入れ，プレインキュベート（37  $^{\circ}$ C, 3 min）した。インキュベート後，上記希釈血漿 0.1 ml を取り，プロトロンビン試薬中に添加後から凝血を生じるまでの時間を測定し，PT 値とした。

PT に対する PCA の標準曲線：ワーファリン処理前のビーグル犬から採血し，分離した血漿を正常血漿とした。生理食塩水による 2 倍希釈血漿を 100%

PCA として、それをさらに生理食塩水で希釈することにより PCA が 6.25, 12.5, 25.0, 50.0% の希釈血漿を調製し、それぞれの PT を測定して PCA 標準曲線を作成した。<sup>82)</sup> この曲線を用いて各ビーグル犬の PT を PCA 値に変換した。

### In Vivo 吸収実験

12 時間絶食した Wistar 系雄性ラット（体重 200～250 g）をペントバルビタール麻酔下開腹後、Bollman らの方法<sup>83)</sup> により胸管リンパにポリエチレンチューブ（PE50）を挿入結索し、リンパ液を採取した。また、胆汁非存在のラットを設定するため、薬物投与前にラットをエーテル麻酔下、常法に従い胆管にポリエチレンチューブ（PE10）を挿入結索し、胆汁を体外へ導出させた。麻酔覚醒後、MK-4 として 10 mg/Kg 相当量の粉末試料を生理食塩水 1 ml と共に強制的に経口投与した。リンパ液は 2 時間毎に回収し、薬物の移行量を測定した。血液は 2 時間毎に頸静脈より 0.6 ml 採取し、薬物濃度を測定した。

### 血漿およびリンパ液中の薬物濃度の測定

血漿の場合は、試料 0.3 ml に精製水 0.2 ml，イソプロピルアルコール 0.5 ml，内部標準物質および n-ヘキサン 4 ml を加えた。リンパ液の場合は、試料 0.5 ml に精製水 0.5 ml，イソプロピルアルコール 0.5 ml，内部標準物質および n-ヘキサン 4 ml を加えた。これらの混液を振盪し、上澄液について、前記ビーグル犬における血漿中薬物濃度の定量的場合と同様に MK-4 濃度を測定した。

## 第二編に関する実験の部

### 第一章に関する実験の部

#### 試料および溶媒

$\beta$ -CyD, DM- $\beta$ -CyD は日本食品化工(株) および東進ケミカル(株) 製をそれぞれ、水から 2 回再結晶して用いた。DM- $\beta$ -CyD は微量成分である TM- $\beta$ -CyD などのメチル化  $\beta$ -CyD のいくつかの混合物であることを HPLC<sup>84)</sup> および secondary ionization 質量分析法<sup>85)</sup> で確認した。その他の試薬および溶媒は分析用市販特級品を用いた。溶媒としての水はイオン交換精製水を 2 回蒸留後使用した。

#### DE- $\beta$ -CyD の合成

Szejtli ら<sup>86)</sup> の方法に準じて、ジエチル硫酸法で合成した。すなわち、 $\beta$ -CyD 50 g にジメチルスルホキシド 500 ml およびジメチルホルムアミド 500 ml を加え、0 °C に冷却し、アルゴン気流下酸化バリウム 100 g, 水酸化バリウム 8 水和物 100 g を加えて 30 分間攪拌した。0 °C において、ジエチル硫酸 200 ml を 2 時間かけて滴下し、攪拌しながら一昼夜還流した。反応後アンモニア水 100 ml を 30 分滴下し、3 時間攪拌して中和後、ジメチルホルムアミドを留去した。その残渣の酢酸エチル抽出液を水洗した後脱水し、酢酸エチルを留去して粗 DE- $\beta$ -CyD 25 g を得た。この粗結晶から未反応物および副反応物を除くため、カラムによる二段階精製(オープンカラム: Art. 7734 シリカゲル, 中圧カラム: Art. 9385 シリカゲル)を行なった後、再結晶(*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 10 : 1)した(物性値は Table 6 参照)。

#### 各種 $\beta$ -CyDs の物性測定

(1) 表面張力: 島津(株) 製 du Nouy 表面張力計を用い、 $0.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  の精度で測定した(25 °C)。

(2) 比施光度: 試料溶液(1.0 mM, 50 v/v% エタノール水溶液, 25 °C)を日



本分光（株）製 DIP-360 デジタルポーラリメータを用いて  $\pm 0.002^\circ$  の精度で測定した。

(3) 溶解度：各種  $\beta$ -CyD 誘導体の過剰量を水または種々の濃度のエタノール/水混合溶液中に加え、 $25^\circ\text{C}$  で 2 週間振盪した。溶液中の  $\beta$ -CyD 濃度は上記旋光計で測定し、検量線から濃度を算出した。

(4) 含水率：粉末試料 (<100 メッシュ) を秤量ビンに精秤し、恒量 ( $25^\circ\text{C}$ ) になるまで放置した (約 1 週間)。さらに、その試料を減圧乾燥器 (田葉井製, LHV-110 型) を用いて恒量になるまで乾燥後 ( $25^\circ\text{C}$ )、重量測定を行い、重量の減少から含水率を求めた。

(5) 開環速度の測定： $\beta$ -CyD 類の開環速度定数は、未反応の  $\beta$ -CyD 類を HPLC で経時的に追跡することにより算出した。すなわち、 $1.0\text{ N}$  塩酸水溶液  $85\text{ ml}$  を共栓付三角フラスコに入れ、 $60^\circ\text{C}$  に保温した後、あらかじめ同一温度に保温した  $\beta$ -CyD 類溶液 ( $80\%$  エタノール水溶液) を加え (DE- $\beta$ -CyD の最終濃度：約  $2.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ , TE- $\beta$ -CyD の最終濃度：約  $6.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ , エタノールの最終濃度： $0.2\text{ v/v}\%$ )、反応を開始した。経時的に反応溶液  $0.5\text{ ml}$  を採取し、氷冷下  $10\text{ N}$  水酸化ナトリウム水溶液  $0.5\text{ ml}$  を加えて反応を停止させた。内部標準物質 (DE- $\beta$ -CyD には TE- $\beta$ -CyD, TE- $\beta$ -CyD には DE- $\beta$ -CyD を使用) を添加後、酢酸エチル  $4.0\text{ ml}$  を加えて各  $\beta$ -CyD を抽出し、その  $3.0\text{ ml}$  を減圧留去した。残渣に HPLC の移動相と同一組成の混液  $150\ \mu\text{l}$  を加え、その  $40\ \mu\text{l}$  を HPLC に注入した。HPLC の測定条件は次の通りである。ポンプ；日立 655A-11 型液体クロマトグラフ，検出器；昭和電工（株）製 Shodex RI SE-31 示差屈折計，カラム；LiChrosorb RP-18 ( $10\ \mu\text{m}$ ,  $4\text{ mm i.d.} \times 250\text{ mm}$ )，移動相；アセトニトリル/エタノール (5：2) 混液，流速； $0.8\text{ ml/min}$ 。

## 第二章に関する実験の部

### 試料および溶媒

硝酸イソソルビド (ISDN) はトーアエイヨー (株) 製を使用した。その他の試薬および溶媒は分析用市販特級品を用いた。溶媒としての水はイオン交換精製水を 2 回蒸留後使用した。

### 複合体の調製

モル比 2 : 1 からなる ISDN/DE- $\beta$ -CyD 複合体は混練法<sup>46)</sup> で調製した。たとえば、0.2 g の ISDN と 0.65 g の DE- $\beta$ -CyD に 50% エタノール水溶液約 1.5 ml を加え、60 分間練合した後、室温で 1 日減圧乾燥した。

### 粉末X線回折および熱分析

第一編第一章に記載した方法と同様に測定した。

### 溶出試験

ISDN の硬カプセルおよび錠剤の溶出速度は、JP XI 溶出試験法の回転バスケット法 (第 1 法) で測定した。硬ゼラチンカプセル (JP XI, 3 号, 容量 0.3 cm<sup>3</sup>) に粉末試料 (10 mg の ISDN または相等量の複合体, <100メッシュ) を充填した。錠剤は、乳糖で希釈した ISDN (20 mg 含有) または複合体を総重量 200 mg とし、100 メッシュで篩過後、直径 10 mm の大きさに圧縮成形した。その他の実験条件は次の通りである。溶出試験装置：東京理化 (株) 製 DE-1S 型, 溶出液：pH 1.2 の崩壊試験用第 1 液 (JP XI), 温度：37 °C, 回転数：100 rpm, 採液：綿栓付きフィルターを通し 0.5 ml サンプルングし、*n*-ヘキサン/クロロホルム/エタノール混液 (20 : 3 : 2) 4 ml を加え、フルルビプロフェン (内部標準物質) を添加し、振とう後有機層 (3 ml) を減圧留去する。その残渣をエタノール/0.06 M リン酸 (4 : 1) 100  $\mu$ l に溶解し、50  $\mu$ l を HPLC で分析した。HPLC 条件は次の通りである。ポンプ；日立 (株) 製 655A 型 (UV 検出器付き), カラム；Zorbax-CN (5  $\mu$ m, 4 mm i.d., 150 mm, Dupont), 移動層；エタノール/0.06 M リン酸 (4 : 1), 流速；1.0

ml/min, 検出波長 ; 240 nm.

### 第三章に関する実験の部

#### In Vivo 吸収実験

実験動物は, Wistar 系雄性ラット (体重 150~200 g) を使用し, 投薬前 24 h 絶食させた. 投与試料: カプセル; 1 mg の ISDN または等量の複合体 (> 100 メッシュ) を充填したゼラチンミニカプセル (21 mm<sup>φ</sup>, エランコ製), 錠剤; 2.5 mg 含有 (総重量 25 mg, >100 メッシュ) の ISDN または等量の複合体を直径 4 mm に打錠成形した. これらカプセルまたは錠剤はカテーテルを用いて水 1ml とともに手術用鉗子を用いてラットに経口投与した. 静脈注射は, ISDN 0.8 mg/ml を含有する 10% エタノール/生理食塩水を尾静脈に 1.0 mg/kg 相当量を注射した.<sup>87)</sup>

#### 血漿中濃度の測定:<sup>88)</sup>

測定前にラットを軽くエーテル麻酔し, クエン酸塩入り注射器を用いて 0.6 ml の血液を心臓から直接採取した. 採取した血液は 10 分間遠心後 (1500 × g), 内部標準物質 (硝酸イソマンニット) および 0.3 ml の硝酸アンモニウム液を 0.3 ml の血漿中に加えた後, 硝酸イソソルビドを 6 ml の n-ヘキサンで抽出し, 有機層 5 ml を減圧除去した. 残渣を 40 μl 酢酸エチルで溶解し, その 4 μl をガスクロマトグラフィ (GC) で分析した. GC の条件は次の通りである. ガスクロマトグラフィ; <sup>63</sup>Ni-ECD 付き島津製 GC-7AG 形 (検出器: ECD-7), カラム; ガラスカラム (3 mm i.d. × 1.6 m), 充填剤; ガスクロ工業 (株) 製 30% Silicon SE-30 Gas-Chrom Q, ガラスカラム; ガスクロ工業 (株) 製, 3mm i.d. × 1.6m カラム), キャリアーガス; N<sub>2</sub>, 流速; 1.0 ml/min, 注入温度; 190 °C, カラム温度; 155 °C.

## 引用文献

- 1) 中野眞汎, 森本雍憲, 杉林堅次: "ドラッグデリバリーシステム", 南山堂, 1986.
- 2) 瀬崎 仁 (編): "ドラッグデリバリーシステム", 南江堂, 1986.
- 3) 宮尾興平: "ドラッグデリバリーシステムの実際", 医薬ジャーナル社, 1986.
- 4) F. Cramer: "Einschlussverbindungen", Springer Verlag, Berlin, 1954.
- 5) M.L. Bender, M. Komiyama: "Cyclodextrin Chemistry", Springer Verlag, Berlin, 1978.
- 6) J. Szejtli: "Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes", Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
- 7) 林 正樹: "薬の発明", ファルマシアレビュー, No. 18, 日本薬学会編, 1986, p. 69.
- 8) 稲葉光治: "最近の製剤技術とその応用Ⅲ", 医薬ジャーナル社, 1986, p. 43.
- 9) 上釜兼人, 平山文俊: ファルマシア, 23, 1237 (1987).
- 10) W. Saenger: Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 19, 344 (1980).
- 11) 上釜兼人: 薬学雑誌, 101, 857 (1981).
- 12) D. Duchêne: "Cyclodextrins and their industrial uses," Editions de Santé, Paris, 1987.
- 13) K. Uekama, M. Otagiri: CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, CRC Press Inc., Boca Raton, 1, 1 (1987).
- 14) J. Szejtli: "Cyclodextrin Technology", Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands, 1988.
- 15) 井津源市, 寺田 隆, 二宮 宏, 古田康彦, 吉田功一, 青山敏信, 堀岡正義: 病院薬学, 15, 36 (1989).
- 16) A.P. Croft, R.A. Bartsch: Tetrahedron, 39, 1417 (1983).
- 17) B.W. Müller, U. Brauns: Int. J. Pharm., 26, 77 (1985).

- 18) W.L. Hinze: *Sep. Purif. Methods*, **10**, 159 (1981).
- 19) J. Pitha, J. Pitha: *J. Pharm. Sci.*, **74**, 987 (1985).
- 20) A. Yoshida, H. Arima, K. Uekama, J. Pitha: *Int. J. Pharm.*, **46**, 217 (1988).
- 21) A. Yoshida, M. Yamamoto, T. Irie, F. Hirayama, K. Uekama: *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1059 (1989).
- 22) Y. Okada, Y. Kubota, K. Koizumi, S. Hizukuri, T. Ohfuji, K. Ogata: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2176 (1988).
- 23) M. Yamamoto, A. Yoshida, F. Hirayama, K. Uekama: *Int. J. Pharm.*, **49**, 163 (1989).
- 24) K. Uekama, H. Horiuchi, T. Irie, F. Hirayama: *Carbohydr. Res.*, in press.
- 25) E. Fenyvesi, O. Shirakura, J. Szejtli, T. Nagai: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 665 (1984).
- 26) Y. Nakai, K. Yamamoto, K. Terada, H. Horibe: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1796 (1982).
- 27) J. Szejtli: *J. Incl. Phenom.*, **1**, 135 (1983).
- 28) K. Uekama: *Pharm. Int.*, **6**, 61 (1985).
- 29) K. Uekama, N. Hirashima, H. Horiuchi, F. Hirayama, T. Ijitsu, M. Ueno: *J. Pharm. Sci.*, **76**, 660 (1987).
- 30) K. Uekama: "Topics in Pharmaceutical Sciences 1987", (D.D. Breimer, P. Speiser eds.), Elsevier Sci. Pub. Amsterdam, 1987, p. 181.
- 31) 上釜兼人: *ファームテクジャパン*, **4**, 183 (1988).
- 32) K. Uekama, Y. Horiuchi, M. Kikuchi, F. Hirayama, T. Ijitsu, M. Ueno: *J. Incl. Phenom.*, **6**, 167 (1988).
- 33) 堀内保秀, 菊池正彦, 平山文俊, 上釜兼人, 上野雅男, 井實孝則: *薬学雑誌*, **108**, 1093 (1988).
- 34) M. Ueno, T. Ijitsu, Y. Horiuchi, F. Hirayama, K. Uekama: *Acta Pharm. Nordica*, **2**, 99 (1989).

- 35) F. Hirayama, N. Hirashima, K. Abe, K. Uekama, T. Ijitsu, M. Ueno: *J. Pharm. Sci.*, **77**, 233 (1988).
- 36) T. Higuchi, K.A. Connors, *Advan. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117 (1970).
- 37) K. Harata, K. Uekama, M. Otagiri, F. Hirayama: *J. Incl. Phenom.*, **1**, 279 (1984).
- 38) K. Uekama, T. Irie: D. Duchene ed., "Cyclodextrins and their industrial uses", Editions de Santé, Paris, 1987, p. 393.
- 39) A. Gerlóczy, A. Fónagy, P. Kereszters, L. Parlaki, J. Szejtli: *Arzneim. Forsch.* **35**, 1042 (1985).
- 40) T. Irie, Y. Tsunenari, K. Uekama, J. Pitha: *Int. J. Pharm.*, **43**, 41 (1988).
- 41) R. Blomstrand, L. Forsgren: *Int. Z. Vitaminforsch.*, **38**, 328 (1968).
- 42) 藤田 孟, 長谷川二郎, 朝野芳郎, 杉山一武, 浜村吉三郎: *薬理と治療*, **8**, 410 (1980).
- 43) T. Higuchi, H. Kristiansen: *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1601 (1970).
- 44) J.A. Nelder, R. Mead: *Computer J.*, **7**, 308 (1965).
- 45) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno: *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 46) 鶴岡道雄, 橋本 強, 瀬尾 量, 一政清一, 上野 宰, 藤永稔夫, 小田切優樹, 上釜兼人: *薬学雑誌*, **101**, 360 (1981).
- 47) Y. Nakai, S. Nakajima, K. Yamamoto, K. Terada, T. Konno: *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3419 (1978).
- 48) T. Ijitsu, M. Ueno, S. Hara: *J. Chromatogr.*, **42**, 29 (1988).
- 49) K. Uekama, S. Narisawa, F. Hirayama, M. Otagiri: *Int. J. Pharm.*, **16**, 327 (1983).
- 50) P. Michell: *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 996 (1977).
- 51) W.G. Nayler: "Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q, Vol. 2", K. Folkers and Y. Yamamura eds., Elsevier Scientific

- Pub., Amsterdam, 1980, p. 409.
- 52) T. Fujita, S. Tanayama, Y. Shirakawa, Z. Suzuoki: *J. Biochem.*, **69**, 53 (1971).
- 53) 北浦照明, 突合皐月, 熊谷三千男, 新井茂昭, 三宅勝志, 木村昌彦, 福地担: *薬剂学*, **48**, 132 (1988).
- 54) Y. Matsuda, R. Teraoka: *Int. J. Pharm.*, **26**, 289 (1985).
- 55) H. Dam: *Prog. Food Nutr. Sci.*, **1**, 139 (1975).
- 56) 高松正剛, 島村佳成, 伊前克彦, 国立裕之, 清水達夫: *ビタミン*, **59**, 318 (1985).
- 57) 勝井五一朗: *ビタミン*, **38**, 81 (1968).
- 58) M. Nagata, T. Yotsuyanagi, K. Ikeda: *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 85 (1988).
- 59) M. Nagata, T. Yotsuyanagi, M. Nonomura, K. Ikeda: *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 527 (1984).
- 60) 高松健次, 宮本 修: *基礎と臨床*, **17**, 2963 (1983).
- 61) T.D. Bjornsson, P.J. Meffin, S.E. Swezey, T.F. Blaschke: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **210**, 322 (1979).
- 62) A. Yacobi, L.B. Jr. Wingard, G. Levy: *J. Pharm. Sci.*, **60**, 868 (1974).
- 63) R. Blomstrand, L. Farsgren: *Z. Intern. Vitaminforsch*, **38**, 45 (1968).
- 64) R.E. Olsen, J.W. Suuttie: *Vitam. Horm.*, **35**, 59 (1977).
- 65) R.G. Bell, P. Stark: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **72**, 619 (1976).
- 66) 竹崎伸一郎, 河村敏光, 柴崎 功, 太田萬蔵, 高橋美篤: *月刊薬事*, **31**, 877 (1989).
- 67) T. Hoshino, F. Hirayama, K. Uekama, M. Yamasaki: *Int. J. Pharm.*, **50**, 45 (1989).
- 68) K. Uekama, T. Fujinaga, F. Hirayama, M. Otagiri, M. Yamasaki, H. Seo, T. Hashimoto, M. Tsuruoka: *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1338 (1983).

- 69) T. Tokumura, Y. Tsuchiya, M. Kayano, Y. Machida, T. Nagai: *J. Pharm. Sci.*, **74**, 496 (1985).
- 70) J.E.F. Riseman, S. Koretsky, G.E. Altman: *Am. J. Cardiol.*, **15**, 220 (1965).
- 71) P. Needleman, S. Lang, E.M. Johnson Jr.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**, 489 (1972).
- 72) *The Merck Index*, 10th Ed., M. Windholtz Ed., Merck & Co., Rahway, NJ, 1983.
- 73) K. Terada, K. Yamamoto, Y. Nakai: *Labo-Pharm. Probl. Tech.*, **32**, 339 (1984).
- 74) M. Kikuchi, F. Hirayama, K. Uekama: *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 315 (1987).
- 75) D.F. Assinder, L.F. Chasseaud, J.O. Hunter, R.J. Jung, T. Taylor: *Arzneim.-Forsch.*, **27**, 156 (1977).
- 76) 奈良武志: *化学工業*, **37**, 318 (1986).
- 77) Y. Horiuchi, F. Hirayama, K. Uekama: *J. Pharm. Sci.*, in press.
- 78) T. Irie, H. Arima, K. Uekama, K. Matsubara, K. Kuriki: *J. Pharm. Pharmacol.* in press.
- 79) ” 医薬品添加物，くすりが薬となるための助剤”，*ファルマシアレビュー* No. 22, 日本薬学会 (編) , 1987.
- 80) H. Nogami, T. Nagai, T. Yotsuyanagi: *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 499 (1969).
- 81) A.J. Quick: *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501 (1935).
- 82) M. Nagata, T. Yotsuyanagi, K. Ikeda: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 813 (1968).
- 83) J.L. Bollman, J.C. Cain, J.H. Grindlay: *J. Lab. Clin. Med.*, **33**, 1349 (1948).
- 84) K. Koizumi, Y. Kubota, T. Utamura, S. Horiyama: *J. Chromatogr.*, **368**, 329 (1986).
- 85) J. Pitha, K. Fukunaga, T. Irie, K. Uekama: *Carbohydr. Res.*, in



press.

- 86) J. Szejtli, A. Lipták, I. Jodál, P. Fügedi, P. Nánási, A. Neszmélyi: *Starch/Starke*, **32**, 165 (1980).
- 87) 齊藤輝男, 木村哲夫, 千田 敏, 加藤隆一: *応用薬理*, **19**, 419 (1980).
- 88) D.A. Chin, D.G. Prue, J. Michelucci, B.T. Kho, C.R. Warner: *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1143 (1977).

