

難水溶性化合物であるジオスゲニンの生物学的利用能
および組織移行性の改善を目的とした薬剤学的検討

大川原 正喜

目次

緒言	1
第1編 難水溶性化合物であるジオスゲニンのシクロデキストリンによる生物学的利用能の改善	3
第1章 α 、 β 、 γ -シクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能改善	3
第1節 実験方法	4
1 実験材料	4
2 溶解度試験	4
3 ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体の調製	5
4 ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体の物理化学的性質評価	5
5 実験動物	6
6 静脈内、経口投与実験	6
7 血漿および皮膚からのジオスゲニン抽出	6
8 ジオスゲニンの定量	7
9 統計解析	7
第2節 結果	8
1 シクロデキストリンによるジオスゲニン溶解度の改善	8
2 ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体の物理化学的性質	9
3 シクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能および皮膚移行性改善	14
第3節 考察	19
第4節 小括	20

第2章 β -シクロデキストリン誘導体によるジオスゲニン生物学的利用能改善	21
第1節 実験方法.....	22
1 実験材料.....	22
2 溶解度試験.....	22
3 ジオスゲニン/シクロデキストリン誘導体複合体の調製.....	22
4 ジオスゲニン/シクロデキストリン誘導体複合体の物理化学的性質 評価.....	23
5 実験動物.....	23
6 静脈内、経口投与実験.....	23
7 血漿および皮膚からのジオスゲニン抽出.....	24
8 ジオスゲニンの定量.....	24
9 統計解析.....	24
第2節 結果.....	25
1 シクロデキストリン誘導体によるジオスゲニン溶解度の改善.....	25
2 ジオスゲニン/シクロデキストリン誘導体複合体の物理化学的性質.....	27
3 シクロデキストリン誘導体によるジオスゲニン生物学的利用能および皮 膚移行性改善.....	32
第3節 考察.....	36
第4節 小括.....	38

第2編 液晶製剤および自己乳化型薬物送達システム製剤とシクロデキストリン の併用によるジオスゲニン生物学的利用能の改善	39
第1章 液晶製剤とシクロデキストリンの併用によるジオスゲニン生物学的利 用能改善	40
第1節 実験方法	41
1 実験材料	41
2 ジオスゲニン含有液晶製剤の調製	41
3 ジオスゲニン含有液晶製剤の物理化学的性質評価	41
4 溶解度試験	42
5 実験動物	42
6 静脈内、経口投与実験	43
7 血漿および皮膚からのジオスゲニン抽出	43
8 ジオスゲニン、glyceryl monooleate、phytantriol の定量	43
9 統計解析	44
第2節 結果	45
1 ジオスゲニン含有液晶製剤の物理化学的性質	45
2 液晶製剤およびシクロデキストリンによるジオスゲニン溶解度の改善	47
3 液晶製剤およびシクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能 および皮膚移行性改善	49
第3節 考察	53
第4節 小括	55

第2章 自己乳化型薬物送達システム製剤とシクロデキストリンの併用による ジオスゲニン生物学的利用能改善	56
第1節 実験方法	57
1 実験材料	57
2 溶解度試験	57
3 三成分相図の作成	57
4 エマルションの粒子径測定	58
5 ジオスゲニン含有自己乳化型薬物送達システム製剤の調製	58
6 実験動物	58
7 静脈内、経口投与実験	58
8 血漿からのジオスゲニン抽出	59
9 ジオスゲニンの定量	59
10 統計解析	59
第2節 結果	60
1 溶解度試験	60
2 三成分相図	61
3 エマルションの粒子径	62
4 自己乳化型薬物送達システム製剤およびシクロデキストリンによるジオ スゲニン生物学的利用能改善	63
第3節 考察	65
第4節 小括	67
結論	68
謝辞	73
引用文献	74

緒言

近年、製薬産業では多くの化合物が合成されているが、約 40%が低い溶解性や生物学的利用能のために医薬品としての開発が中止されている。^{1,2)} 難溶性化合物は医薬品だけではなく、健康・美容補助食品にも多く見られる。しかし、これらの補助食品（サプリメント）の有効成分の体内動態に関する詳細な検討は医薬品に比べてもはるかに少なく、これら有効成分の体内動態を評価して、医薬品の有効成分のように吸収改善技術を発展させる必要がある。

ジオスゲニン (Fig. 1 A) はトリテルペンに分類されるステロイドサポニンで、*Dioscorea villosa*, *Costus speciosus*, *Trigonella foenum graecum* などに含まれている。^{3,4)} ジオスゲニンは経口投与により糖尿病や高コレステロール血症に効果があることが報告されている。^{5,6)} また、以前はステロイドホルモンの工業的な出発原料として用いられており、欧米ではエストロゲン様作用を期待して更年期症状の改善を目的として使用されてきた。^{7,8)} 大変興味があることに、エストロゲンは乳がん等のエストロゲン依存性腫瘍を増大させることが知られているが、ジオスゲニンを含有している *Dioscorea villosa* 抽出物は、乳癌モデルマウスにおいて腫瘍を増大させなかったと報告されている。^{9,10)} また、ジオスゲニンには卵巣摘出マウスにおいて薄化した表皮を肥厚させる作用や、B16 メラノーマ細胞において、リン酸化酵素の活性化を介してメラニン産生を抑制することも報告されており、美容・健康食品の有効成分として近年特に注目されている。^{11,12)} しかし、前述したように医薬品の有効成分として開発されていないことから、経口投与後の体内動態に関する報告は少なく、皮膚等の組織への移行性を調査した報告もない。本研究ではジオスゲニンの溶解度、生物学的利用能、組織移行性をシクロデキストリン (CD) およびその誘導體、液晶製剤、自己乳化型薬物送達システム (self-microemulsifying drug delivery system; SMEDDS) 製剤を用い

て改善し、医薬品以外として用いられる難水溶性化合物の有効利用に寄与することを目的とした。

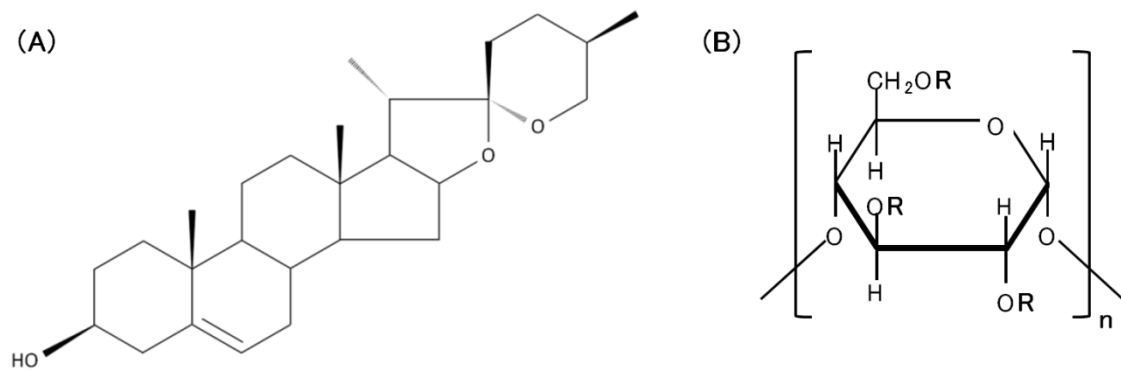


Figure 1. Molecular structure of diosgenin (A) and cyclodextrins (B). R=H, n=6: α -CD; R=H, n=7: β -CD; R=H, n=8: γ -CD.

第1編 難水溶性化合物であるジオスゲニンのシクロデキストリンによる生物学的利用能の改善

第1章 α 、 β 、 γ -シクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能改善

CD は、D-グルコースが α -1, 4 グルコシド結合した環状のオリゴ糖であり、その構造は底のないバケツ型である (Fig. 1 B)。とうもろこしや馬鈴薯デンプンに *Bacillus* 属の微生物が生産するシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させることによって生成される。グルコースが 6、7、8 個結合した α 、 β 、 γ -CD が天然型として報告されており、環の外側は親水性、内側は疎水性を示す。

¹³⁾ CD はその疎水性空洞内に、疎水性物質を内封する包接機能を有する。包接により、内封した化合物の紫外線、酸化還元、加水分解からの安定性向上や溶解度、消化管膜透過性、生物学的利用能の改善作用が報告されている。^{13, 14)}

本章では、初めにジオスゲニンの生物学的利用を算出した。また、ジオスゲニンの生物学的利用能を改善することを目的として、 α 、 β 、 γ -CD との複合体を調製し、物理化学的性質の評価とラットを用いて経口投与実験を行った。

第1節 実験方法

1 実験材料

ジオスゲニン¹⁵⁾は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO-60) は日光ケミカルズ (東京, 日本) より供与された。ペントバルビタールナトリウムは共立製薬 (東京, 日本) より購入した。6-メチルジオスゲニンおよびその他の試薬は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。

2 溶解度試験

溶解度試験は既報に従って行った。¹⁵⁾ すなわち、ジオスゲニンはメタノールに溶解して試験管に分注し、40°C のヒートブロックでメタノールを留去後、ジオスゲニン 0.2 mg に対し 0 から 16 mM の α 、 β 、 γ -CD 水溶液 2 mL を加えた。こうして得られた懸濁液をインキュベータ中で 37°C で 24 時間振とうし、ポアサイズ 0.2 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC, 東京, 日本) でろ過し、ジオスゲニンの溶解度を LCMS によって測定した。

ジオスゲニンとCDの安定度定数 (K_{11} , K_{12}) は式 (1)、(2) のように定義されている。¹⁵⁾

$$K_{11} = [\text{SL}] / S_0 [\text{L}] \quad (1)$$

$$K_{12} = [\text{SL}_2] / [\text{SL}] [\text{L}] \quad (2)$$

ここで、 S_0 はジオスゲニンの溶解度、 $[\text{S}]$ と $[\text{L}]$ は包接されていないジオスゲニンとCDの濃度、 $[\text{SL}]$ と $[\text{SL}_2]$ はジオスゲニン:CD=1:1または1:2包接複合体の濃度である。ジオスゲニンまたはCDの総濃度 Seq と Leq は式 (3)、(4) で示される。

$$\text{Seq} = S_0 + [\text{SL}] + [\text{SL}_2] \quad (3)$$

$$\text{Leq} = [\text{L}] + [\text{SL}] + 2 [\text{SL}_2] \quad (4)$$

なお、安定度定数は0から10 mMのCD濃度におけるジオスゲニン溶解度を使用し、非線形最小二乗法によって式 (3)、(4) に適合させることによって算出した。

3 ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体の調製

ジオスゲニンと α 、 β 、 γ -CD をメノウ乳鉢中で混和したものを物理的混合物とした。混合割合はジオスゲニンと CD をモル比で 1:1 から 1:4 とした。ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体は既報に従って共沈法で調製した。¹⁶⁾ すなわち、ジオスゲニン 1.6 mmol と各 CD 1.6 - 6.4 mmol を 100 mL の水に加え、37°C の蒸留水中で 24 時間攪拌した。懸濁液をろ過し、残渣を乾燥後、乳鉢で粉砕したものを以降の実験に使用した。

4 ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体の物理化学的性質評価

ジオスゲニン、 α 、 β 、 γ -CDの物理的混合物および複合体の粉末X線回折 (X-ray diffraction, XRD) パターンはRigaku Mini Flex II (東京, 日本) によって測定した。X線源はCuK α とNiフィルターを用い、電圧30 kV、電流15 mA、走査速度2°/minの条件で、2 θ rangeを使用し、0 - 30°までを測定した。

ジオスゲニン、 α 、 β 、 γ -CDの物理的混合物および複合体の示差走査熱量測定 (differential scanning calorimetry, DSC) スペクトルはRigaku Thermo plus EVO DSC 8230 (東京, 日本) で測定した。約5 mgの試料をアルミニウム製のパンに封入し、窒素ガス気流下 (50 mL/min)、50 - 230°Cの範囲を昇温速度10°C/minで測定した。

ジオスゲニン、 α 、 β 、 γ -CDの物理的混合物および複合体の形態を走査型電子顕微鏡、Hitachi High-Technologies S-3000N (東京, 日本) を使用して15 kVの加速

電圧の条件で観察した。試料はアルミニウムタブにグラファイトテープを使用して接着し、金蒸着を行った。

5 実験動物

雄性 Wistar ラット（10 - 12 週令，体重 200 - 250 g）は日本 SLC（静岡，日本）より購入した。動物は 12 時間の明暗サイクル中、温度を $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に制御した部屋で飼育した。飼料と水は自由に摂取させ、動物実験は城西大学の全学動物実験管理委員会の承認を得た上で行った。

6 静脈内、経口投与実験

試験に使用した動物は試験液の投与12時間前から4時間後まで絶食した。ジオスゲニンとその複合体は1% HCO-60を含む生理食塩液に溶解または懸濁した。静脈内投与試験では60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジオスゲニン溶液を調製し、2 mL/kgを尾静脈より投与した。経口投与試験では50 mg/mLのジオスゲニン懸濁液または複合体を調製し、2 mL/kgを投与した。混合物投与群ではジオスゲニン懸濁液投与直後に同量の24 mM CD水溶液を投与した。投与直後から120時間後まで尾静脈より採血を行い、遠心により血漿を分取した。経口投与から4、6、8時間後に除毛した腹部より皮膚を採取した。それぞれの試料は測定するまで -30°C で保管した。

7 血漿および皮膚からのジオスゲニン抽出

血漿および皮膚中のジオスゲニン抽出はメタノールを用いた。すなわち、血漿 100 μL にメタノール 300 μL を加え、東京硝子機器 FU-6H バス型超音波装置（東京，日本）中、 37°C で 20 分間処理した。皮膚（約 50 mg）は 1 mL メタノール中で細かく刻み、 37°C バス型超音波装置で 20 分間処理した。それぞれの試

料は 15,000×g、25°C で 5 分間遠心分離後、上清を分取し窒素気流下 40°C で乾固した。100 µL の 1 µg/mL 6-メチルジオスゲニンを含む 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液:メタノール (1:9) 溶液へ溶解し、LCMS 測定試料とした。

8 ジオスゲニンの定量

血漿および皮膚より調製した測定試料のジオスゲニン濃度は既報にしたがって LCMS 法で測定した。¹⁷⁾ すなわち、分離は LC システム、Michrom Biosources Inc. MXY01-01 LC system (Auburn, CA, U.S.A.)、カラム、Tosoh TSK gel ODS-100V column (2.0×50 mm, 3 µm) (東京, 日本) によって室温で行った。また、移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液:メタノール (1:9) 溶液を使用し、150 µL/min の流速で、検出器、Thermo Fisher LCQ DECA XP^{Plus} (Waltham, MA, U.S.A.) を使用して検出した。内部標準として 6-メチルジオスゲニンを使用した。ジオスゲニンおよび 6-メチルジオスゲニンのフラグメントイオンをポジティブイオンモードで m/z 253 および 267 に検出した。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は台形面積法によって算出した。生物学的利用能は経口および静脈内投与後の AUC を使用して、AUC_{po}/AUC_{iv} より算出した。薬物動態学的パラメータは非線形最小二乗法を使用して算出した。

9 統計解析

有意差の判定は SAS 9.2 (Cary, NC, U.S.A.) を使用した Dunnett's または Tukey's の多重比較検定によって行った。p 値は 0.05 未満を有意とした。

第2節 結果

1 シクロデキストリンによるジオスゲニン溶解度の改善

濃度の異なる α 、 β 、 γ -CD水溶液へのジオスゲニンの溶解度をFig. 2に示す。CD濃度を高くするとジオスゲニン溶解度は増加した。結合定数は、 α -CD ($K_{11}=100\text{ M}^{-1}$, $K_{12}=860\text{ M}^{-1}$)、 β -CD ($K_{11}=5,680\text{ M}^{-1}$, $K_{12}=1,160\text{ M}^{-1}$)、 γ -CD ($K_{11}=4,550\text{ M}^{-1}$, $K_{12}=510\text{ M}^{-1}$)であった。

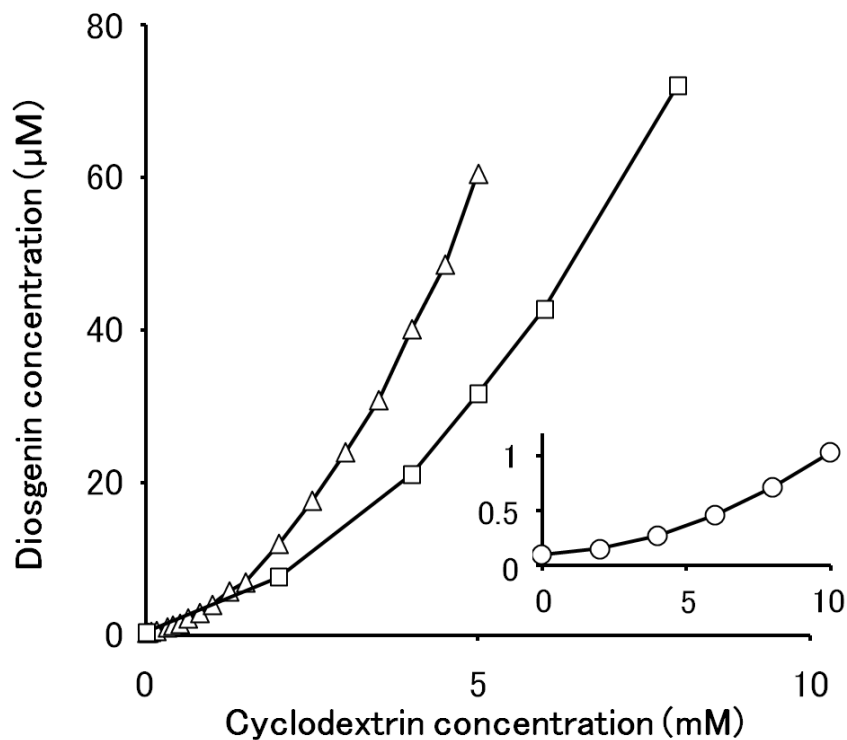


Figure 2. Water solubility of diosgenin from different concentrations of each CD at 37°C. Symbols: ○, diosgenin/ α -CD; △, diosgenin/ β -CD; and □, diosgenin/ γ -CD.

2 ジオスゲニン/シクロデキストリン複合体の物理化学的性質

ジオスゲニン単独、 α 、 β 、 γ -CD 単独、ジオスゲニンと各 CD の物理的混合物およびジオスゲニンと各 CD 複合体の X 線回折パターンを Fig. 3 に示す。物理的混合物 (Fig. 3c, 3f, 3i) はジオスゲニン (Fig.3a) と CD (Fig.3b, 3e, 3h) それぞれのパターンを示した。 α -CD で調製した複合体 (Fig. 3d) はジオスゲニンと同様のパターンを示した。これに対して、 β 、 γ -CD で調製した複合体 (Fig.3g, 3j) は、それぞれの物理的混合物とは異なるパターンを示した。

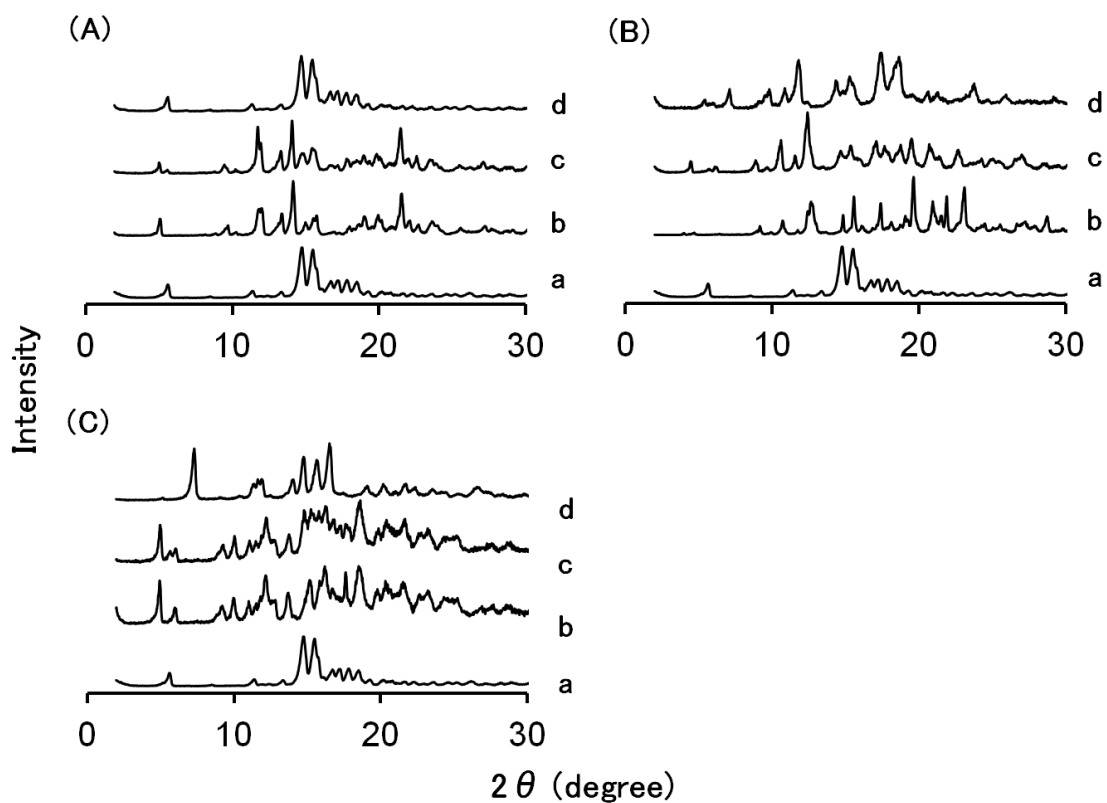


Figure 3. Powder X-ray diffraction analysis of α -CD (A), β -CD (B), and γ -CD (C) complexes. The patterns of diosgenin (a), CD (b), physical mixture (c), and complex (d) are listed. The instrument was operated with the 2θ range of 0 to 30 degrees.

Figure 4 には同様の試料、すなわち、ジオスゲニン、 α 、 β 、 γ -CD、物理的混合物および複合体の示差走査熱量曲線を示す。ジオスゲニン (Fig. 4a) は 210°C に融点に由来する吸熱ピークを示した。¹⁸⁾ CD (Fig. 4b, 4e, 4h) は約 100°C に脱水に由来するパターンを示した。物理的混合物 (Fig. 4c, 4f, 4i) および α -CD で調製した複合体 (Fig. 4d) では、ジオスゲニンおよび CD のパターンが共に存在したのに対して、 β 、 γ -CD で調製した複合体 (Fig. 4g, 4j) ではジオスゲニン由来のピークが消失した。ジオスゲニンに対して β 、 γ -CD のモル比を 1 - 4 倍となるように調製した複合体の DSC 曲線は、2 倍以上のモル比でジオスゲニン由来のピークが消失した (図示せず)。

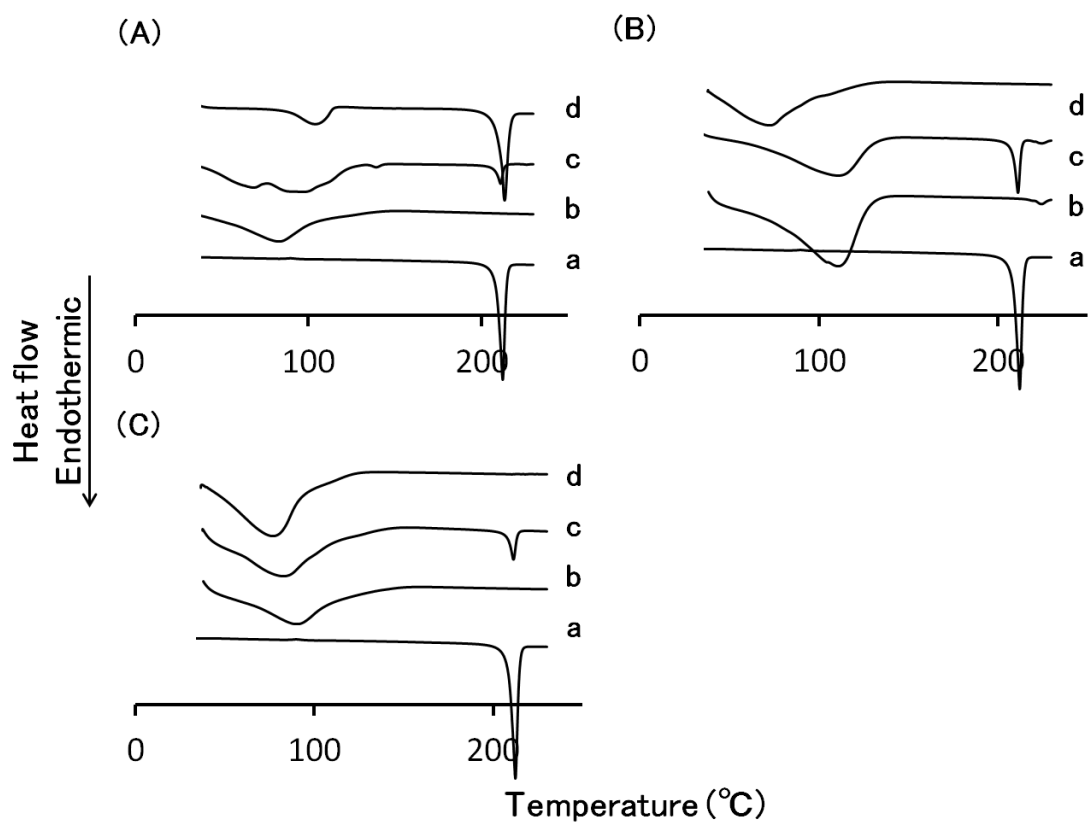


Figure 4. Differential scanning calorimetry curves of α -CD (A), β -CD (B), and γ -CD (C) complexes. The patterns of diosgenin (a), CD (b), physical mixture (c), and complex (d) are listed. Samples were sealed into aluminum pans and heated from 50 to 230°C at a constant heating rate of 10°C/min.

さらに、Fig. 5 に、ジオスゲニン、 α 、 β 、 γ -CD で調製した複合体の走査型電子顕微鏡観察像を示す。ジオスゲニン (Fig. 5a) は棒状の構造を示し、 α 、 β 、 γ -CD は直方体の結晶を示した (図示せず)。 α -CD で調製した複合体 (Fig. 5b) はジオスゲニンと α -CD の構造を示した。しかし、 β 、 γ -CD で調製した複合体 (Fig. 5c, 5d) はジオスゲニンおよび CD とは異なる平行四辺形の構造を示した。以降の検討では β 、 γ -CD で調製した複合体について検討を行った。

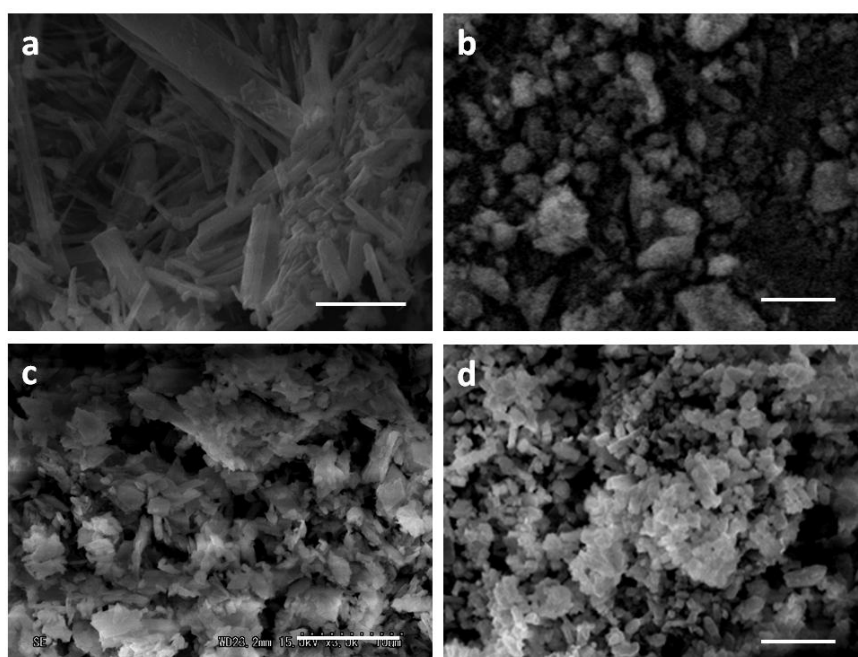


Figure 5. Scanning electron microscopy of diosgenin (a), diosgenin/ α -CD complex (b), diosgenin/ β -CD complex (c), and diosgenin/ γ -CD complex (d). Each bar is 100 μ m.

3 シクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能および皮膚移行性改善

ジオスゲニン溶液の静脈内投与後の血漿中濃度-時間曲線を Fig. 6A に示す。静脈内投与後の AUC_{iv} は $113 \pm 18 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ 、消失半減期は 5.53 h、分布容積は 10,545 mL/kg であった。ジオスゲニン懸濁液、 β 、 γ -CD で調製した混合物および複合体経口投与後のジオスゲニン血漿中濃度-時間曲線を Fig. 6B に、また、算出した動態パラメータを Table 1 に示す。ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して、 β 、 γ -CD で調製した複合体を投与した群で血漿中濃度が増加し、生物学的利用能はそれぞれ 7.6、5.2 倍増加した。また、複合体投与群で混合物投与群と比較して AUC_{po}、最大血漿中濃度 (C_{max})、生物学的利用能が有意に増加した。

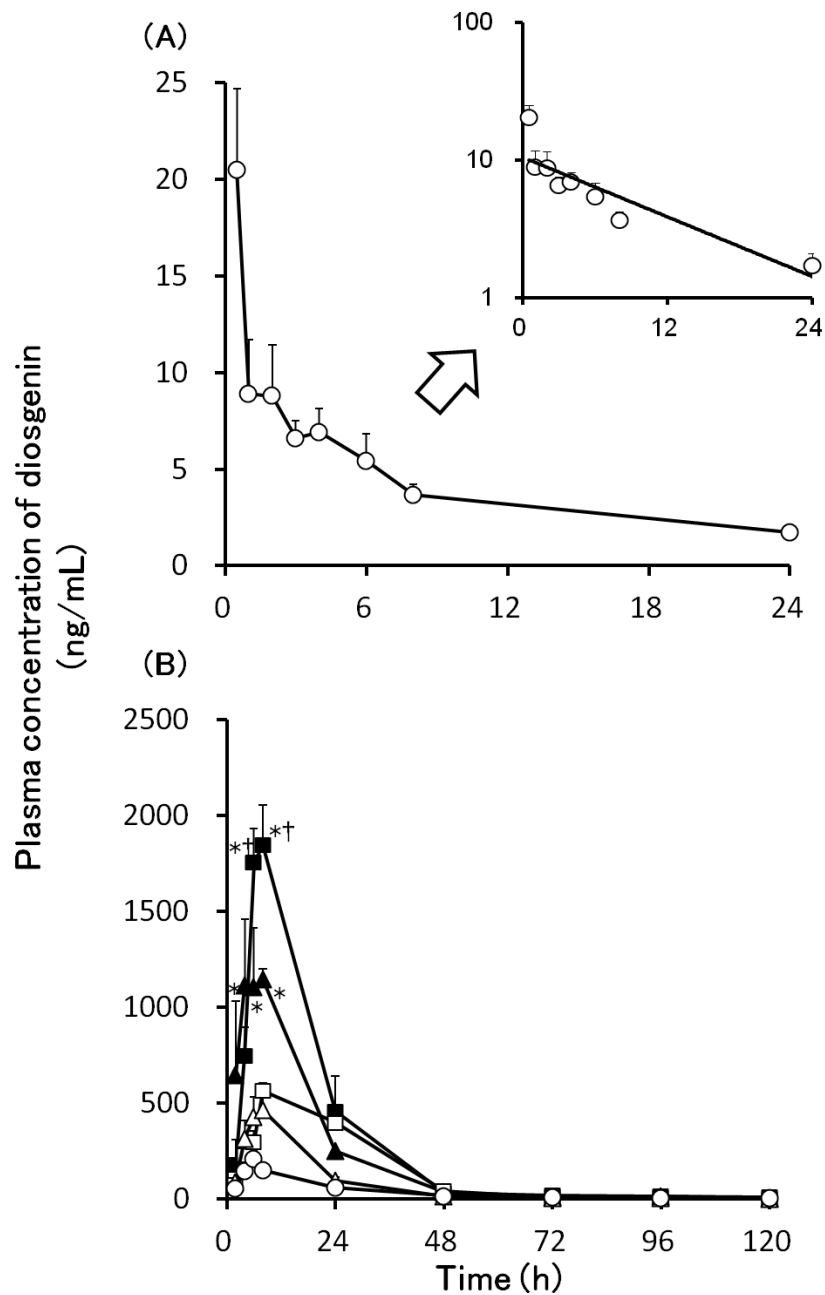


Figure 6. Plasma levels of diosgenin after intravenous (A) and oral (B) doses of diosgenin, each CD mixture and complex to rats. Symbols: ○, diosgenin; △, diosgenin/γ-CD mixture; □, diosgenin/β-CD mixture; ▲, diosgenin/γ-CD complex ; ■, diosgenin/β-CD complex. Each point shows the mean ± S.E. of 4 to 8 experiments. *: $p < 0.05$ significantly different from diosgenin, †: $p < 0.05$ significantly different from each mixture.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of diosgenin, each CD mixture and complex following oral administration to rats.

	AUC_{po} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/ml)	Bioavailability (%)	Enhancement ratio
β-CD complex	31,373 ± 2,967 ^{*†}	1,292 ± 91 ^{*†}	33.5 ± 3.2 ^{*†}	7.6
γ-CD complex	21,583 ± 8,805 ^{*†}	1,022 ± 478 ^{*†}	23.1 ± 9.4 ^{*†}	5.2
β-CD mixture	15,201 ± 4,202	562 ± 172	16.3 ± 4.5	3.7
γ-CD mixture	8,010 ± 2,262	352 ± 138	8.6 ± 2.4	1.9
Diosgenin	4,122 ± 1,355	133 ± 48	4.4 ± 1.4	1.0

Each value shows the mean ± S.E. of 4 to 8 experiments. *: $p < 0.05$ significantly different from diosgenin, †: $p < 0.05$ significantly different from each mixture.

ジオスゲニン懸濁液、混合物および複合体経口投与4、6、8時間後の皮膚中ジオスゲニン含量を Fig. 7 に示す。経口投与6時間後の単位重量当たりの皮膚中のジオスゲニン含量はジオスゲニン群、 γ -CD mixture 群、 β -CD mixture 群、 γ -CD complex 群、 β -CD complex 群でそれぞれ 41.8、43.1、919.8、456.6、1946.4 ng/g skin であった。ジオスゲニン投与群と比較して β -CD mixture 群および β -CD complex 群で有意に高い皮膚中含量を示し、 β -CD mixture 群と比較して β -CD complex 群で高い皮膚中含量が示された。皮膚中含量の最大値は経口投与6時間後に示された。

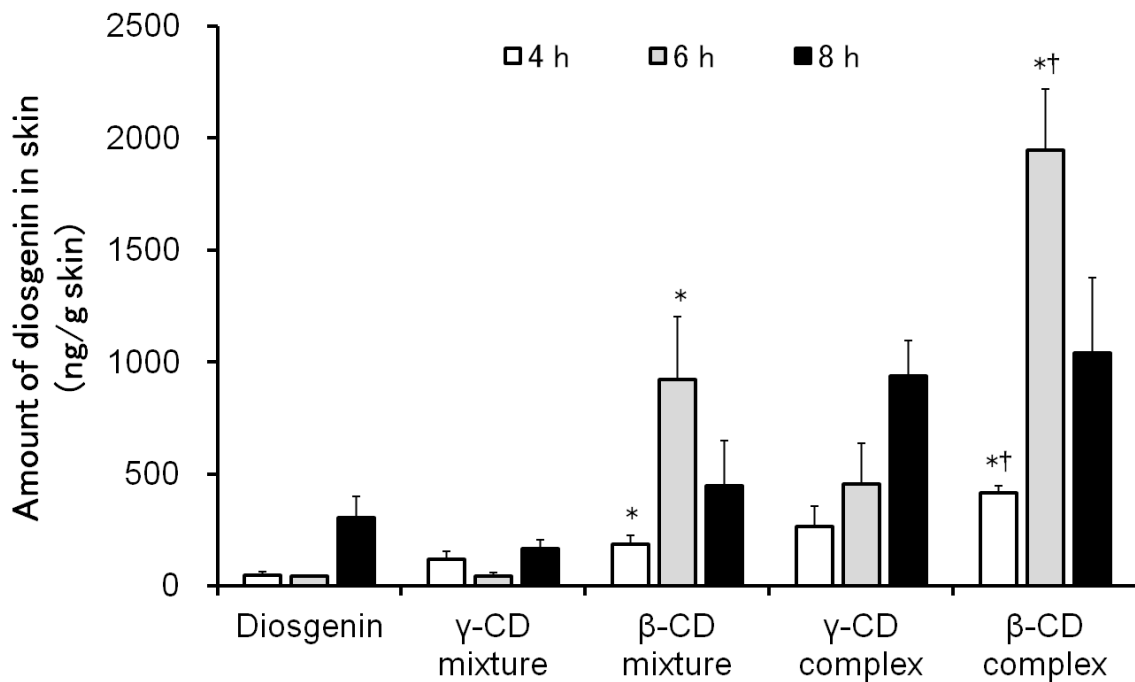


Figure 7. Skin distribution of diosgenin after oral doses of diosgenin, each CD mixture and complex to rats. Skin samples were collected 4, 6 and 8 h after oral administration. Each column shows the mean \pm S.E. of 3 to 4 experiments. *: $p < 0.05$ significantly different from diosgenin, †: $p < 0.05$ significantly different from each mixture.

経口投与 6 時間後のジオスゲニン血漿中濃度および皮膚中含量のプロットを Fig. 8 に示す。ジオスゲニンの血漿中濃度と皮膚中含量に正の相関関係 ($R=0.78$) が示された。

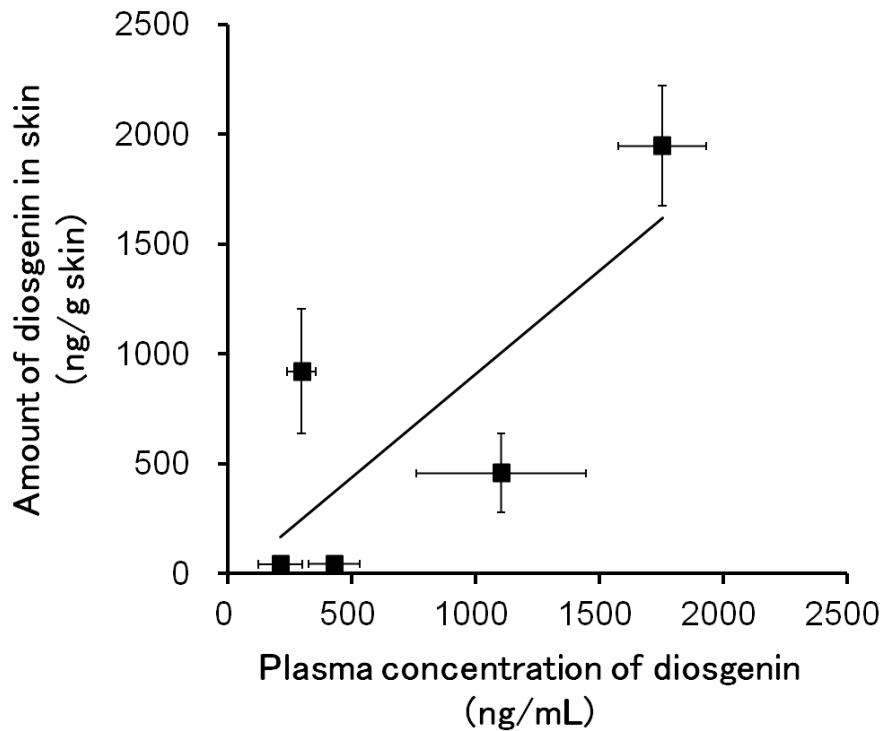


Figure 8. Correlation of the plasma concentration and skin content of diosgenin. Diosgenin suspension and each CD complex were orally administered, and then the plasma and skin samples were corrected at 6 h. Positive correlation was obtained. ($R=0.78$) Each point shows the mean \pm S.E. of 3 to 8 experiments.

第3節 考察

ジオスゲニンの溶解度は β 、 γ -CDにより改善した。また、ジオスゲニン溶解度とCD添加濃度の間に上昇曲線がえられ、ジオスゲニン分子と2分子以上のCDによる複合体の形成が示唆された。^{19,20)} さらに、結合定数は β -CDでより高い値を示したため、ジオスゲニンに対しては γ -CDと比較して β -CDの内孔径が適切である可能性が示された。

ジオスゲニンと α 、 β 、 γ -CDの物理的混合物および複合体を共沈法で調製し、これらの構造をX線回折法、示唆走査熱量測定法、走査型電子顕微鏡観察法で解析した。その結果、 β および γ -CD複合体は物理的混合物と異なるX線回折パターンが示され、包接複合体を形成していることが示唆された。^{21,22)} さらに、混合比を変化させて調製した複合体の示唆走査熱量曲線を比較することによって、ジオスゲニンと β および γ -CDは1:2のモル比で包接していることが推察された。そこで、作られた複合体の形態をSEMで観察した結果、 β および γ -CDで調製した複合体で平行四辺形の結晶が観察された。²³⁾ これらの結晶はジオスゲニンおよびCDとは異なっており、包接複合体を形成していることが示唆される。

静脈内投与実験の結果より、ジオスゲニンの血漿中濃度の対数値と時間プロットは直線性を示し、ジオスゲニンの消失は線形1-コンパートメントモデルに従うことが推察された。また、経口投与実験の結果より、 β -CD複合体投与群でジオスゲニン懸濁液投与群と比較して有意に高い血漿中濃度が示された。この原因として、CDによる溶解度の改善が推察される。^{24,25)} 加えて、経口投与後の皮膚中含量も有意に改善され、血漿中濃度の上昇が皮膚移行性と相関していることが示唆された。

第4節 小括

ジオスゲニンの静脈内および経口投与実験の結果より、生物学的利用能は4.4%と低値を示した。低い生物学的利用能の改善を目的としてCDとの複合体を調製した。その結果、ジオスゲニンの溶解度は β 、 γ -CDにより改善され、ジオスゲニンはCDとモル比1:2の複合体を形成することが示唆された。また、本複合体をラットに経口投与することによりジオスゲニンの生物学的利用能は7.6倍改善され、皮膚中含量も有意に改善された。以上より、ジオスゲニンの組織移行性の改善にCD、特に β -CDが有用であることが示された。

第2章 β -シクロデキストリン誘導体によるジオスゲニン生物学的利用能改善

前章で著者らはジオスゲニンの水への溶解度が非常に低いこと、経口投与後の生物学的利用能が4.4%であることを示した。しかし、また、 β -CDによる複合体形成によってラットにおける生物学的利用能が7.6倍増加したことを明らかにした。²⁶⁾

β -CDは薬物の包接に広く利用されている天然のCDである。²⁷⁾ β -CDは α 、 γ -CDと比較して溶解度が18.5 mg/mLと低いため臨床での使用には課題がある。²⁸⁾ ここで、 β -CD溶解度を改善するためにその化学修飾について研究されており、すでに水溶性の β -CDの誘導体として methyl (M) β -CD、hydroxyethyl (HE) β -CD、hydroxypropyl (HP) β -CDなどが知られている。²⁹⁻³³⁾ しかし、残念ながらジオスゲニンと β -CD誘導体の複合体を調製し、その特性を比較した論文は無い。

本章では、ジオスゲニン生物学的利用能をさらに向上させることを目的として、ジオスゲニンと β -CD誘導体の複合体を調製し、物理化学的性質の評価と経口投与実験を行った。

第1節 実験方法

1 実験材料

ジオスゲニン¹⁵⁾は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO-60) は日光ケミカルズ (東京, 日本) より供与された。ペントバルビタールナトリウムは共立製薬 (東京, 日本) より購入した。β-CD、M β-CD、HE β-CD、HP β-CD、6-メチルジオスゲニンおよびその他の試薬は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。

M β-CD、HE β-CD、HP β-CD は D-グルコースの 2、3、6 位の水酸基の水素の一部がそれぞれメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基に置換した構造をしている (Fig. 1B)。平均分子量は質量分析装置、Thermo Fisher LCQ DECA XP^{Plus} (Waltham, MA, U.S.A.) で測定した。β-CD 誘導体 1 分子当たり置換基数は、β-CD 誘導体と β-CD の分子量との差を置換基の分子量で除することにより算出した。

2 溶解度試験

溶解度試験は、第 1 章と同様に既報に従って行った。¹⁵⁾ すなわち、ジオスゲニン 0.2 mg に対して、0 から 16 mM の β-CD 誘導体水溶液 2 mL を加えて懸濁液を調製した。この懸濁液をインキュベータ中で、37°C で 24 時間振とうし、ポアサイズ 0.2 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC, 東京, 日本) でろ過し、ジオスゲニンの溶解度を LCMS によって測定した。溶解度相図よりジオスゲニンと β-CD 誘導体の安定度定数 (K_{11} 、 K_{12}) を算出した。

3 ジオスゲニン/シクロデキストリン誘導体複合体の調製

ジオスゲニンと β-CD 誘導体の固体の複合体を、共沈法、混練法および凍結乾燥法で調製した。^{16, 34, 35)} 物理的混合物はジオスゲニンと β-CD 誘導体をモル比 1:2

となるように測り、メノウ乳鉢中で混和して調製した。共沈法では、ジオスゲニン1.6 mmolと3.2 mmolの β -CD誘導体を100 mLの水中で37°Cで24 時間振とうし、ろ過後、残渣を乾燥して複合体を調製した。混練法では、ジオスゲニンと β -CD誘導体をモル比1:2で測りとり、メノウ乳鉢中でメタノールとともに混練し、メタノールを除いて複合体を調製した。さらに、凍結乾燥法では、ジオスゲニン1.6 mmolと β -CD誘導体物3.2 mmolを100 mLの水中で37°Cで24時間振とうし、ろ過後、ろ液を凍結乾燥して複合体を調製した。各方法で調製した複合体は乾燥し、メノウ乳鉢中で細かくし、物理化学的性質を評価した。

4 ジオスゲニン/シクロデキストリン誘導体複合体の物理化学的性質評価

ジオスゲニン、 β -CD誘導体、物理的混合物および異なる3つの方法で調製した複合体のXRDパターン、DSCスペクトルおよび走査型電子顕微鏡観察像は、第1章と同様の条件で測定した。

5 実験動物

雄性 Wistar ラット（10 - 12 週令，体重 200 - 250 g）は日本 SLC（静岡，日本）より購入した。動物は 12 時間の明暗サイクル中、温度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 制御した部屋で飼育した。飼料と水は自由に摂取させ、動物実験は城西大学の全学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

6 静脈内、経口投与実験

試験に使用した動物は試験液の投与12時間前から4時間後まで絶食した。ジオスゲニンとその複合体の静脈内投与試験および経口投与試験は、第1章と同様の方法で行った。投与直後から120時間後まで尾静脈より採血を行い、遠心により

血漿を分取した。経口投与から6時間後に除毛した腹部より皮膚を採取した。それぞれの試料は測定するまで-30°Cで保管した。

7 血漿および皮膚からのジオスゲニン抽出

血漿および皮膚中のジオスゲニン抽出は、第1章と同様の方法で行った。全層皮膚は、60°Cの温浴中で1分間処理し、注意深くピンセットを用いて表皮を分取することにより、表皮と真皮に分けた。

8 ジオスゲニンの定量

ジオスゲニンの定量は、第1章と同様にLCMSによって行った。血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は台形面積法によって算出した。生物学的利用能は経口および静脈内投与後のAUCを使用して、 AUC_{po}/AUC_{iv} より算出した。薬物動態学的パラメータは非線形最小二乗法を使用して算出した。

9 統計解析

有意差の判定はSAS 9.2 (Cary, NC, U.S.A.)を使用したDunnett'sまたはTukey'sの多重比較検定によって行った。 p 値は0.05未満を有意とした。

第2節 結果

1 シクロデキストリン誘導体によるジオスゲニン溶解度の改善

β -CD 誘導体の平均分子量、置換基数を Table 2 に示す。M β -CD、HE β -CD、HP β -CD の 1 分子当たりの置換基数はそれぞれ 13.5、13.1、9.2 であった。

濃度の異なる β -CD、M β -CD、HE β -CDおよびHP β -CD水溶液へのジオスゲニンの溶解度をFig. 9に示す。CD誘導体の濃度を高くするとジオスゲニン溶解度は増加し、 β -CDと比較して β -CD誘導体はジオスゲニンの溶解度を増加させた。算出した結合定数をTable 3に示す。結合定数は、 β -CD ($6,420 \text{ M}^{-1}$)、M β -CD ($30,900 \text{ M}^{-1}$)、HE β -CD ($1,020 \text{ M}^{-1}$)、HP β -CD ($7,800 \text{ M}^{-1}$) であった。

Table 2. Substituent, mean molecular weight and degree of substitution of the β -CD derivatives.

	Substituent (-R)	Mean molecular weight	Degree of substitution
β -CD	-H	1135.0	-
M β -CD	-H or $-\text{CH}_3$	1324.3	13.5
HE β -CD	-H or $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	1711.4	13.1
HP β -CD	-H or $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	1668.3	9.2

The mean molecular weight and degree of substitution per a molecule of the β -CD derivatives were calculated from mass spectrograms.

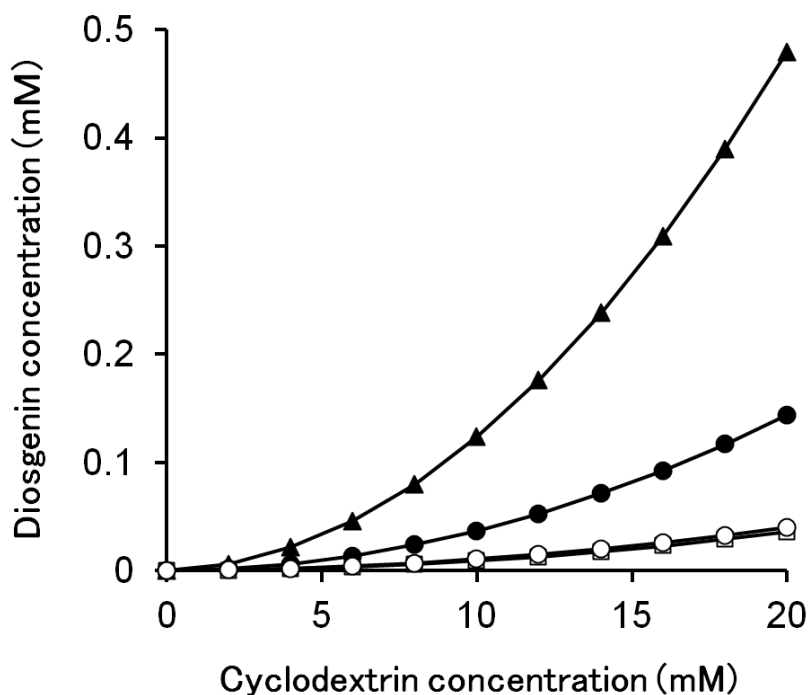


Figure 9. Water solubility of diosgenin from different concentrations of each β -CD at 37°C. Symbols: \circ , diosgenin/ β -CD; \blacktriangle , diosgenin/M β -CD; \square , diosgenin/HE β -CD and \bullet , diosgenin/HP β -CD.

Table 3. Stability constants of diosgenin and each β -CD in distilled water.

		β -CD	M β -CD	HE β -CD	HP β -CD
Stability constant	K_{11} (M^{-1})	6,420	30,900	1,020	7,800
	K_{12} (M^{-1})	610	1,600	3,700	1,900

Excess amount of diosgenin was suspended in 0 - 20 mM of each β -CD solution.

After equilibration at 37°C, diosgenin concentrations were determined. The stability constants were calculated by diosgenin solubility-each β -CD concentration plot.

2 ジオスゲニン/シクロデキストリン誘導体複合体の物理化学的性質

ジオスゲニン単独、 β -CD 誘導体単独、ジオスゲニンと各 β -CD の物理的混合物および各方法で調製したジオスゲニンと各 β -CD 複合体の X 線回折パターンを Fig. 10 に示す。共沈法で調製した複合体のパターン (Fig. 10d) はジオスゲニン単独 (Fig. 10a) と同様であり、 β -CD 誘導体由来のパターン (Fig. 10b) は消失した。物理的混合物 (Fig. 10c) では、ジオスゲニンと β -CD 誘導体のパターンが共に存在した。混練法で調製した複合体 (Fig. 10e) は、ジオスゲニン由来のパターンを示したのに対して、凍結乾燥法で調製した複合体 (Fig. 10f) においてジオスゲニン由来のピークは消失した。また、それぞれの β -CD 誘導体においても同様の結果を示した。

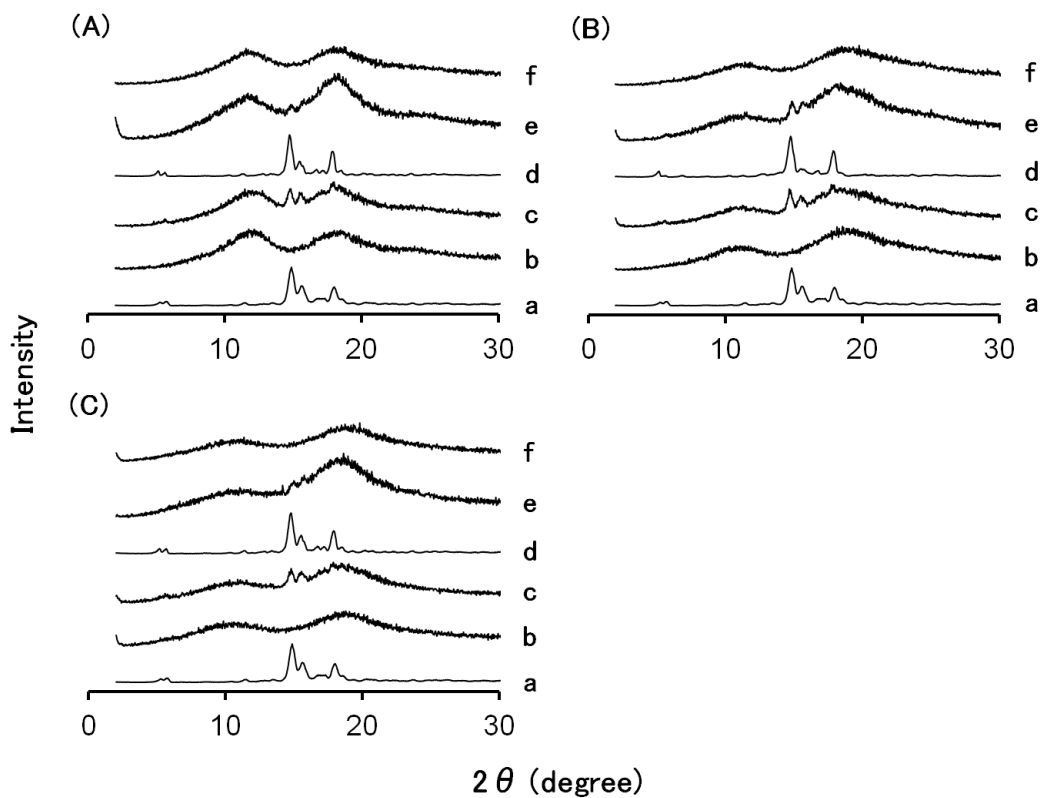


Figure 10. Powder X-ray diffraction analysis of M β -CD (A), HE β -CD (B), and HP β -CD (C) complexes. The patterns of diosgenin (a), β -CD derivative (b), physical mixture (c), co-precipitate complex (d), kneading complex (e), and freeze-drying complex (f) are listed. The instrument was operated with the 2θ range of 0 to 30 degrees.

Figure 11 には同様の試料、すなわち、ジオスゲニン、 β -CD 誘導体、物理的混合物、混練法、凍結乾燥法で調製した複合体の示差走査熱量曲線を示す。ジオスゲニンは 210°C に融点由来の吸熱ピークを示した。¹⁸⁾ また、 β -CD 誘導体は約 100°C に脱水に由来するパターンを示した。物理的混合物および混練法で調製した複合体においてジオスゲニン由来の吸熱ピークがみられた。一方で、凍結乾燥法で調製した複合体では 210°C の吸熱ピークは消失した。さらに、それぞれの β -CD 誘導体で同様の結果を示した。

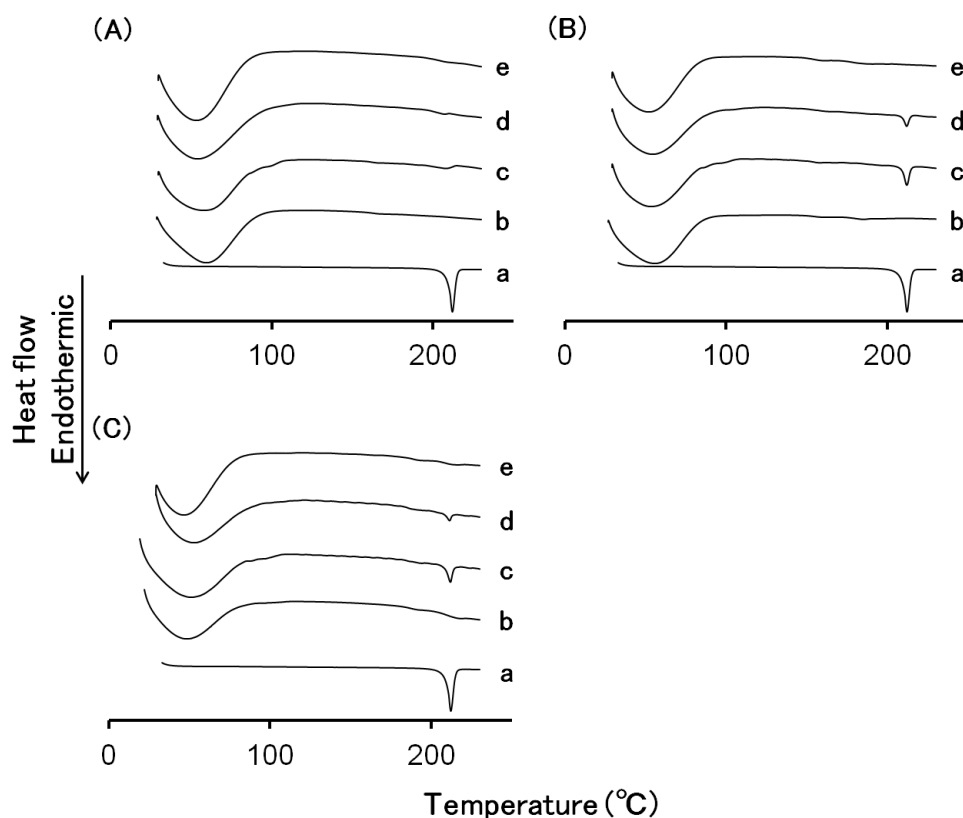


Figure 11. Differential scanning calorimetry curves of M β -CD (A), HE β -CD (B), and HP β -CD (C) complexes. The patterns of diosgenin (a), β -CD derivative (b), physical mixture (c), kneading complex (d), and freeze-drying complex (e) are listed. Samples were sealed into aluminum pans and heated from 50 to 230°C at a constant heating rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

さらに、Fig. 12に、ジオスゲニン、 β -CD誘導体、混練法および凍結乾燥法で調製した複合体の走査型電子顕微鏡観察像を示す。ジオスゲニン単独では棒状の構造 (Fig. 12a) を、また、 β -CD誘導体 (Fig. 12b, 12c, 12d) は粒状の構造を示した。混練法で調製した複合体 (Fig. 12e, 12f, 12g) は板状の構造を示した。凍結乾燥法で調製した複合体 (Fig. 12h, 12i, 12j) は、混練法で調製した複合体と同様に板状の構造を示し、混練法および凍結乾燥法で調製した複合体において、ジオスゲニンや β -CD誘導体と異なる構造が観察された。

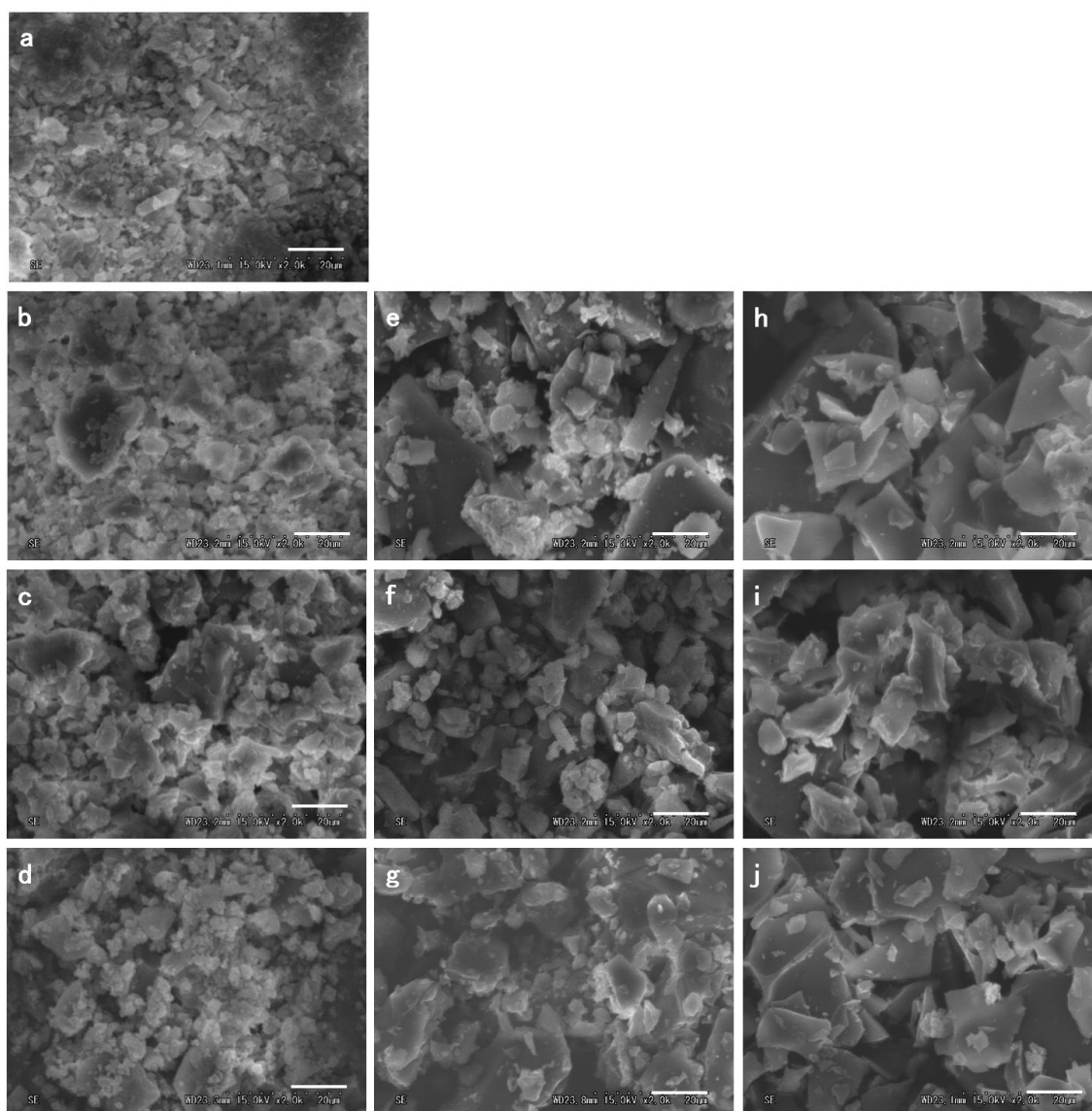


Figure 12. Scanning electron microscopy images of diosgenin, β -CD derivatives, kneading complexes, and freeze-drying complexes. The SEM images of diosgenin (a), M β -CD (b), HE β -CD (c), HP β -CD (d), M β -CD kneading complex (e), HE β -CD kneading complex (f), HP β -CD kneading complex (g), M β -CD freeze-drying complex (h), HE β -CD freeze-drying complex (i), and HP β -CD freeze-drying complex (j) are listed. Diosgenin, β -CD derivatives, kneading and freeze-drying complexes were mounted onto graphite tape and sputter-coated with gold. Each bar is 100 μ m.

3 シクロデキストリン誘導体によるジオスゲニン生物学的利用能および皮膚移行性改善

ジオスゲニン懸濁液および β -CD誘導体で調製した複合体を経口投与した後のジオスゲニン血漿中濃度-時間曲線をFig. 13に、また、算出した動態パラメータをTable 4に示す。ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して β -CD誘導体投与群で高い血漿中濃度が示された。特に、HP β -CDで調製した複合体を投与した群でジオスゲニン投与群と比較してAUC_{po}、C_{max}、生物学的利用能は有意に増加した。ジオスゲニン投与群と比較した生物学的利用能の増加率は β -CD、HE β -CD、HP β -CD群でそれぞれ7.6、3.9、11倍であった。

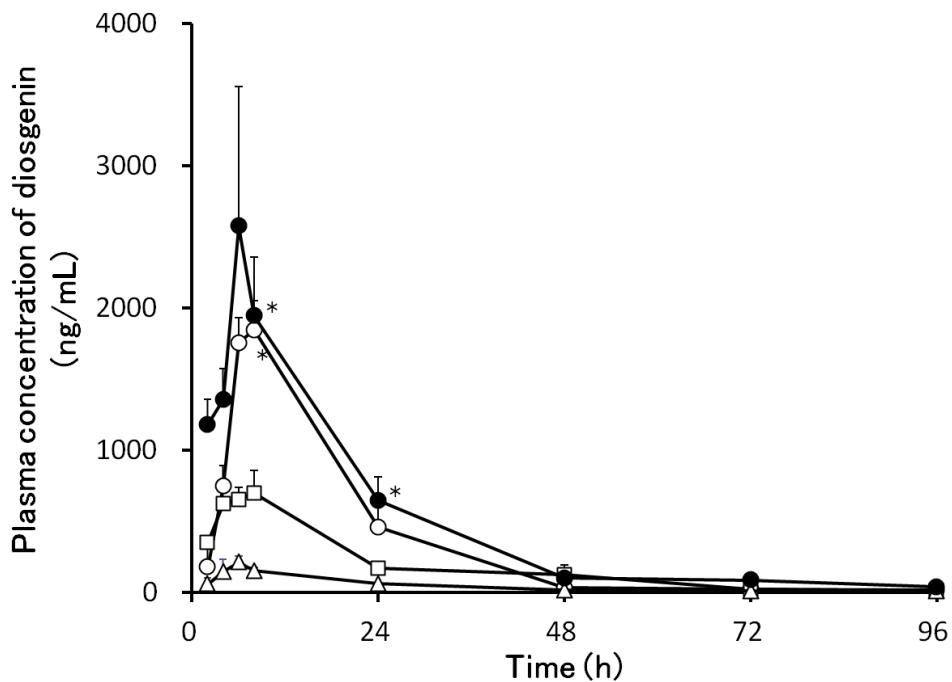


Figure 13. Plasma levels of diosgenin after the oral administration of diosgenin and each β -CD complex to rats. Symbols: Δ , diosgenin; \circ , diosgenin/ β -CD complex; \square , diosgenin/HE β -CD complex and \bullet , diosgenin/HP β -CD complex. Each point shows the mean \pm S.E. of 3 to 8 experiments. *: $p < 0.05$ significantly different from diosgenin.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of diosgenin and each β -CD complex following oral administration to rats.

	AUC_{po} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	Bioavailability (%)	Enhancement ratio
HP β-CD complex	46,374 \pm 5,289 [*]	1,776 \pm 159 [*]	49.5 \pm 5.7 [*]	11.3
HE β-CD complex	16,271 \pm 2,020	562 \pm 39	17.3 \pm 2.2	3.9
β-CD complex	31,373 \pm 2,967	1,292 \pm 91 [*]	33.5 \pm 3.1	7.6
Diosgenin	4,122 \pm 1,355	133 \pm 48	4.4 \pm 1.4	1.0

Each value shows the mean \pm S.E. of 3 to 8 experiments. *: $p < 0.05$ significantly different from diosgenin.

第1章で、皮膚中含量の最大値はジオスゲニン経口投与6時間後であることが明らかになった。²⁶⁾ Figure 14にジオスゲニン懸濁液およびβ-CD誘導体で調製した複合体投与6時間後の表皮、真皮、全層皮膚中のジオスゲニン含量を示す。全層皮膚中のジオスゲニン含量 (Fig. 14a) はジオスゲニン懸濁液、β-CD複合体、HE β-CD複合体、HP β-CD複合体投与群でそれぞれ、127.6、1,038、560.9、2,787 ng/g tissueであった。表皮 (Fig. 14b) および真皮 (Fig. 14c) の組織重量当たりのジオスゲニン含量は全層皮膚と同様であった。ジオスゲニン懸濁液投与群と比較してHP β-CD複合体投与群で組織中含量は有意に増加した。

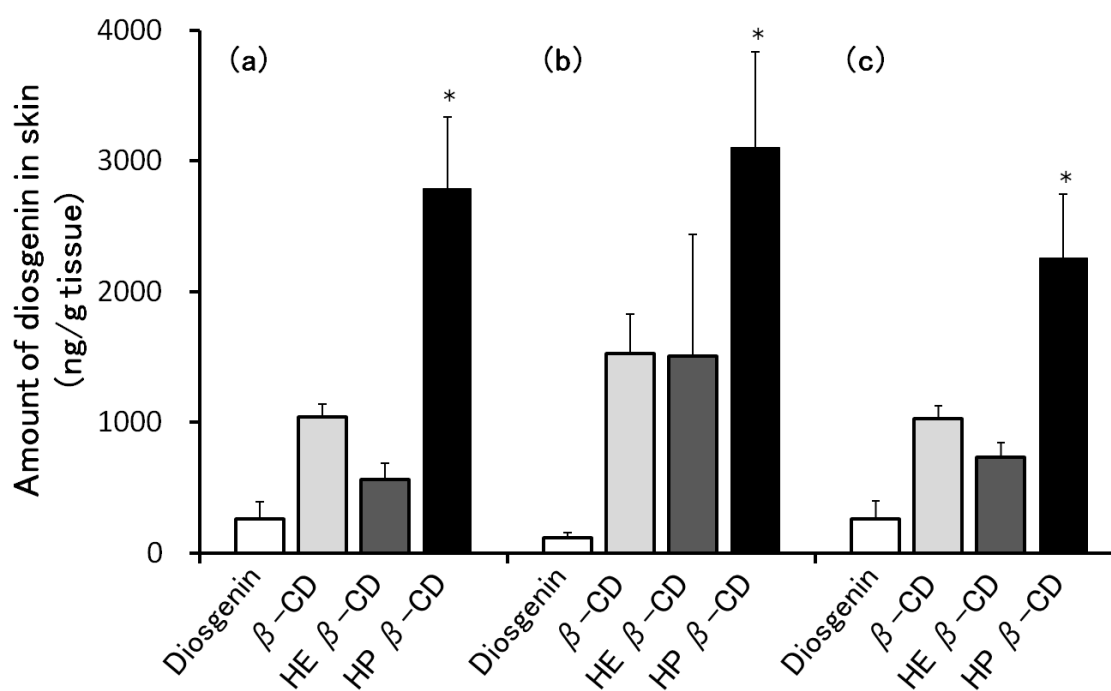


Figure 14. Skin distribution of diosgenin after oral doses of diosgenin and each β-CD complex. The skin content of diosgenin in full thickness skin (a), epidermis (b), and dermis (c) are listed. Skin samples were collected 6h after oral administrated of diosgenin and each β-CD complex. Skin samples were separated into the epidermis and dermis by heating. Each column shows the mean ± S.E. of 3 to 4 experiments.

*: $p < 0.05$ significantly different from diosgenin.

Figure 15 に示す経口投与 6 時間後のジオスゲニン血漿中濃度と全層皮膚中含量には、良好な相関関係 ($R=0.94$) が示された。

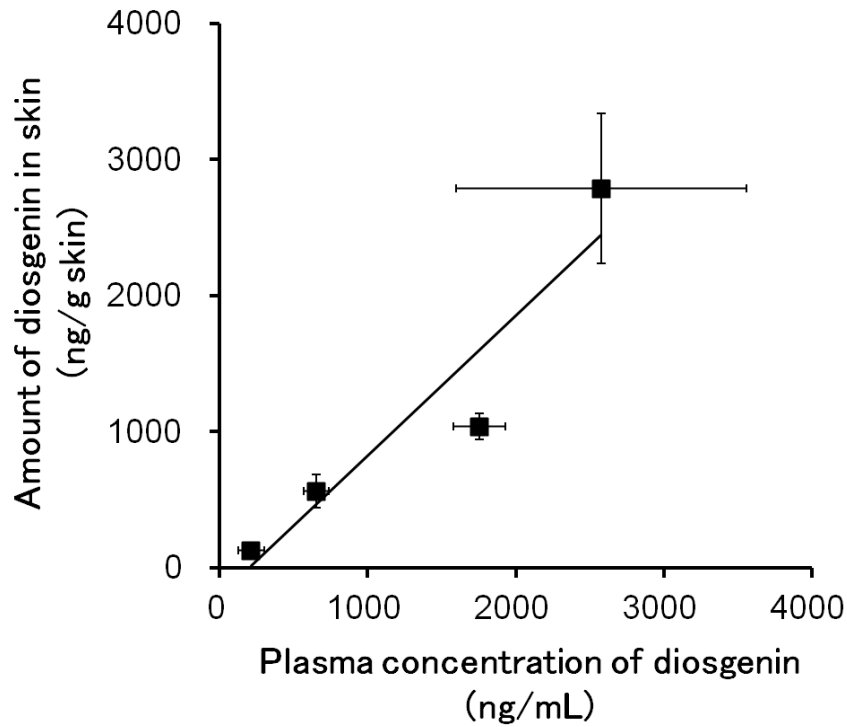


Figure 15. Correlation of the plasma concentration and skin distribution of diosgenin. Diosgenin suspension and each β -CD complex were orally administered, and then plasma and skin samples were collected after 6h. Positive correlation was obtained. ($R=0.94$) Each point shows the mean \pm S.E. of 3 to 8 experiments.

第3節 考察

本章ではジオスゲニンの生物学的利用能を改善することを目的として、 β -CD 誘導体との複合体を調製し物理化学的性質を評価するとともに経口投与実験を行った。溶解度試験より、 β -CD 誘導体はジオスゲニンの溶解度を改善し、また、算出した結合定数 K_{11} は M β -CD、HP β -CD、HE β -CD の順に高値を示すことが明らかとなった。Ho らは CD 誘導体の溶解度改善効果について比較しており、M β -CD は HP β -CD よりも高い結合定数を示すことを報告している。³⁶⁾ 本検討結果はメチル基が CD の内側でジオスゲニンと疎水性の相互作用を示し、強く結合したためであると推察される。³⁷⁾

ジオスゲニンと β -CD 誘導体の複合体を共沈法、混練法および凍結乾燥法で調製し、物理化学的性質を評価した。共沈法で調製した複合体の X 線回折パターンはジオスゲニンと同様であったことより、複合体は水に溶けやすく、ろ過によって除かれていることが示唆された。また、混練法で調製した複合体の X 線回折パターンおよび示差走査熱量曲線にはジオスゲニン由来のピークがみられたが、凍結乾燥法で調製した複合体からはジオスゲニン由来のピークは消失した。Stulzer らは、 β -CD の複合体を共沈法と凍結乾燥法で調製して物理学的性質の評価をしており、凍結乾燥法で結晶性の低い複合体が形成されることを報告している。³⁸⁾ これらの結果は、ジオスゲニンが β -CD 誘導体の内孔に包接されていることを示唆しており、複合体は凍結乾燥法によって効率良く調製されていることが推察された。

調製した複合体の経口投与試験より、ジオスゲニン生物学的利用能と皮膚中含量は HP β -CD で調製した複合体投与群で最も高い値を示すことがわかった。ジオスゲニンの血漿中濃度と全層皮膚中含量の間には良好な相関関係 ($R=0.94$) が示されたことから、経口投与されたジオスゲニンは全身を循環して皮膚や表

皮へ分布していることが推察された。また、 β -CD 誘導体を使用してジオスゲニン溶解度の改善効果や Caco-2 細胞膜透過促進効果を検討し、ジオスゲニン生物学的利用能改善効果は溶解度の促進効果と相関することを示した。³⁹⁾ すなわち、 β -CD 誘導体はジオスゲニンと水溶性の複合体を形成し溶解度を改善することにより、ジオスゲニンの生物学的利用能および皮膚移行性を増加させることが示唆された。

第4節 小括

ジオスゲニンの生物学的利用能の更なる改善を目的として β -CD 誘導体 (M β -CD、HE β -CD、HP β -CD) との複合体を使用した。 β -CD 誘導体は水への溶解度が高いため、共沈法によって複合体を調製することができなかった。そのため混練法および凍結乾燥によって複合体を調製して物理化学的性質を評価した。その結果、凍結乾燥法によって β -CD 誘導体の固体の複合体を効率よく調製することができた。 β -CD 誘導体で調製した複合体の経口投与により、テストステロンやエストラジオールなどのステロイド骨格を持つ化合物の生物学的利用能が改善されており、本章の結果もこれらを支持している。⁴⁰⁻⁴²⁾ 難水溶性化合物のラットにおける血漿中および皮膚中含量を β -CD 投与群と比較して向上させることができた。

第2編 液晶製剤および自己乳化型薬物送達システム製剤とシクロデキストリンの併用によるジオスゲニン生物学的利用能の改善

難水溶性の化合物は医薬品だけではなく、健康・美容補助食品としても用いられている。しかし、これらサプリメントの体内動態に関する詳細な検討は今まで十分になされていなかった。今後更に有効なサプリメントを開発していくためには、体内動態を評価して、十分な吸収能を保有させる必要がある。このような背景のもと、我々は難水溶性のモデル化合物としてジオスゲニンを選択して、物理薬剤学および生物薬剤学的な検討を行った。

前編までに我々はジオスゲニンのラットにおける生物学的利用能は4.4%と低値であることを明らかにした。そこで、この低い生物学的利用能を改善することを目的としてCDとの包接複合体を調製し、物理化学的性質を評価するとともに経口投与実験を行った。ジオスゲニンは β -CDとモル比1:2の包接複合体を形成することが推察され、さらに、複合体経口投与により生物学的利用能が33.5%まで改善することを明らかにした。一方、 β -CDは他のCDと比較して低い溶解度を示す。この低い溶解度を改善するために、 β -CD誘導体を使用して複合体を調製した。ジオスゲニンと β -CD誘導体の包接複合体は凍結乾燥法で調製することができ、HP β -CDで調製した複合体経口投与によりジオスゲニンの生物学的利用能を49.5%まで改善することができた。また、 β -CD誘導体を使用してジオスゲニン溶解度の改善効果やCaco-2細胞膜透過促進効果を検討した結果、ジオスゲニン生物学的利用能改善効果は溶解度の促進効果と相関していた。³⁹⁾しかし、CD複合体は調製に時間を必要とすることや、経口投与時に水に懸濁して投

与する必要があるなどの欠点が存在する。

そこで本編では調製が簡便な種々の自己形成型の製剤を用いて検討した。調製した自己形成型製剤または本製剤と CD の併用による効果を明らかにすることを目的として、物理化学的性質と経口投与後の体内動態を評価した。

第1章 液晶製剤とシクロデキストリンの併用によるジオスゲニン生物学的利用能改善

液晶は固体と液体の特徴を合わせもつ半固形の結晶構造物で、流動性を維持しながら分子が規則的に配列している。一般的な液晶の相の構造を Fig. 16 に示す。ラメラ、ヘキサゴナル、キュービック相などの構造が報告されている。⁴³⁾ 液晶は glyceryl monooleate (GMO) や phytantriol (PHY) などの両親媒性脂質と水を混合することによって形成される。^{44, 45)} 液晶製剤は難水溶性化合物の経口投与後の生物学的利用能を改善することが報告されている。⁴⁶⁻⁴⁸⁾

本章ではジオスゲニンを含有する液晶製剤を調製し、物理化学的性質を評価した。さらに、液晶製剤と β -CD の併用が生物学的利用能および組織移行性に与える影響について検討した。

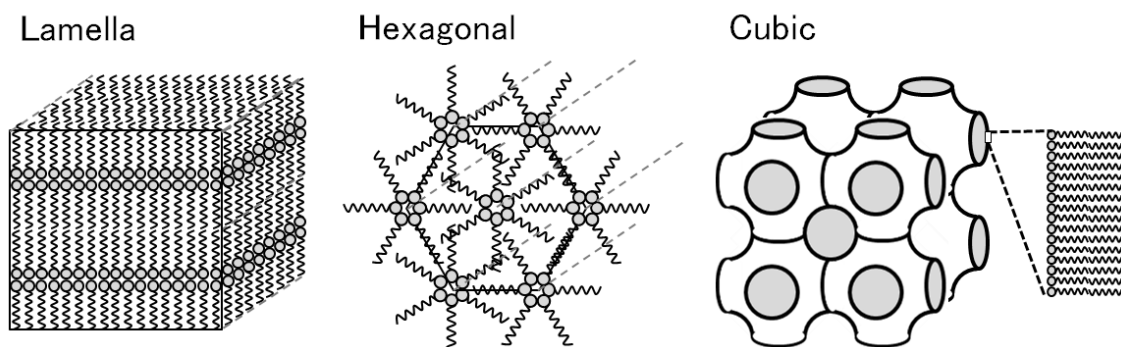


Figure 16. Phase structures of liquid crystal.

第1節 実験方法

1 実験材料

ジオスゲニン¹は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO-60) は日光ケミカルズ (東京, 日本) より供与された。ペントバルビタールナトリウムは共立製薬 (東京, 日本) より購入した。GMO および PHY は Tokyo Chemical Industry (東京, 日本) より購入した。 β -CD、6-メチルジオスゲニンおよびその他の試薬は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。

2 ジオスゲニン含有液晶製剤の調製

ジオスゲニン含有自己形成型液晶製剤は、ジオスゲニンを GMO または PHY に 5 mg/mL となるように溶解して調製した。液晶製剤は自己形成型液晶製剤と水を 1:1 (v/v) の割合で混合し、調製した。混合物を 70°C のヒートブロックで加熱し、ボルテックスミキサーで均一になるまで攪拌した。分散させた液晶製剤は自己形成型液晶製剤と水を 1:9 (v/v) で混合することによって調製した。混合物は 70°C のヒートブロックで加熱し、ボルテックスミキサーで均一にした後、15,000×g で 5 分間遠心し、水相を分取した。

3 ジオスゲニン含有液晶製剤の物理化学的性質評価

GMO または PHY と水が構成する液晶製剤の微細構造を NANO-Viewer (Rigaku) と PILATUS 100K/RL 2D detector (Rigaku) を使用した X 線小角散乱測定 (SAXS) で測定した。X 線源は $\text{CuK}\alpha$ を、波長 1.54 Å、電圧 45 kV、電流 110 mA の条件で測定した。試料と検出器の距離は 375 mm とし、PEEK 膜に挟み 10 分間暴露させた。なお、X 線の散乱ベクトルの大きさ (Q) は式 (1) のように、また、

回折による X 線の増強はブラッグの式 (2) のように定義されている。ここで、 λ は X 線の波長 (1.54 Å)、 θ は X 線の散乱角度、 d は面間隔、 n は整数を示している。式 (1)、(2) より式 (3) が求められ、式 (3) を用いて d を Q に変換した。散乱強度 (counts) と Q のプロットより X 線回折間隔の周期性を明らかにして液晶製剤の微細構造を推察した。⁴⁹⁾

$$Q = (4\pi/\lambda) \sin\theta \quad (1)$$

$$2d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (2)$$

$$d = 2n \cdot \pi/Q \quad (3)$$

分散させた液晶製剤の粒子径は Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern, Worcestershire, U.K.) を使用した動的光散乱法によって測定した。試料は測定前に水で 1,000 倍に希釈した。

4 溶解度試験

GMO または PHY で調製した自己形成型液晶製剤に 10 倍量の水または 4 mM β -CD 水溶液を加えて、37°C で 5 日間振とうした。試料は 15,000×g、5 分間 25°C で遠心し、水層を分取した。溶液をポアサイズ 0.2 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC, 東京, 日本) でろ過し、ジオスゲニン、GMO、PHY の濃度を LCMS によって測定した。

5 実験動物

雄性 Wistar ラット (10 - 12 週令, 体重 200 - 250 g) は日本 SLC (静岡, 日本) より購入した。動物は 12 時間の明暗サイクル中、温度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 制御した部屋で飼育した。飼料と水は自由に摂取させ、動物実験は城西大学の全学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

6 静脈内、経口投与実験

試験に使用した動物は試験液の投与12時間前から4時間後まで絶食した。静脈内投与試験は、第1編第1章と同様の方法で行った。経口投与試験では5 mg/mLのジオスゲニン懸濁液またはジオスゲニンを含有する自己形成型液晶製剤を調製し、2 mL/kgを投与した。自己形成型液晶製剤群は製剤投与直後に同量の水を、製剤と β -CDの併用群では同量の24 mM β -CD水溶液を投与した。投与直後から120時間後まで尾静脈より採血を行い、遠心により血漿を分取した。経口投与から6時間後に除毛した腹部より皮膚を採取した。それぞれの試料は測定するまで -30°C で保管した。

7 血漿および皮膚からのジオスゲニン抽出

血漿および皮膚中のジオスゲニンは、第1編第1章と同様の方法で抽出し、測定試料とした。

8 ジオスゲニン、glyceryl monooleate、phytantriol の定量

血漿および皮膚より調製した測定試料のジオスゲニン濃度は、第1編第1章と同様にLCMS法で定量した。血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は台形面積法によって算出した。生物学的利用能は経口および静脈内投与よりえられたAUCを使用して、 $\text{AUC}_{\text{po}}/\text{AUC}_{\text{iv}}$ より算出した。薬物動態学的パラメータは非線形最小二乗法を使用して算出した。

GMOおよびPHYの溶解度もLCMS法で測定した。LCシステムはMichrom Biosources Inc. MXY01-01 LC system (Auburn, CA, U.S.A.)、カラムはTosoh TSK gel ODS-100V column (2.0×50 mm, 3 μm) (東京, 日本)、移動相は10 mM酢酸アンモ

ニウム水溶液:メタノール (1:9) 溶液、流速は150 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、検出器はThermo Fisher LCQ DECA XP^{Plus} (Waltham, MA, U.S.A.) を使用し、室温で測定した。GMOはポジティブイオンモードで m/z 374を、PHYはネガティブイオンモードで m/z 348のイオンを検出した。

9 統計解析

有意差の判定は SAS 9.2 (Cary, NC, U.S.A.) を使用した Dunnett's または Tukey's の多重比較検定によって行った。 p 値は 0.05 未満を有意とした。

第2節 結果

1 ジオスゲニン含有液晶製剤の物理化学的性質

GMO および PHY で調製した自己形成型液晶製剤は室温で 5 mg/mL のジオスゲニンを完全に溶解した。調製した液晶製剤の室温における SAXS パターンを Fig. 17 に示す。GMO で調製した液晶製剤の X 線回折間隔は、 $\sqrt{1}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$ であり、ヘキサゴナル相の存在が示された。PHY で調製した液晶製剤の X 線回折間隔は、 $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{9}$, $\sqrt{10}$, $\sqrt{12}$ であり、キュービック相の存在が示された。

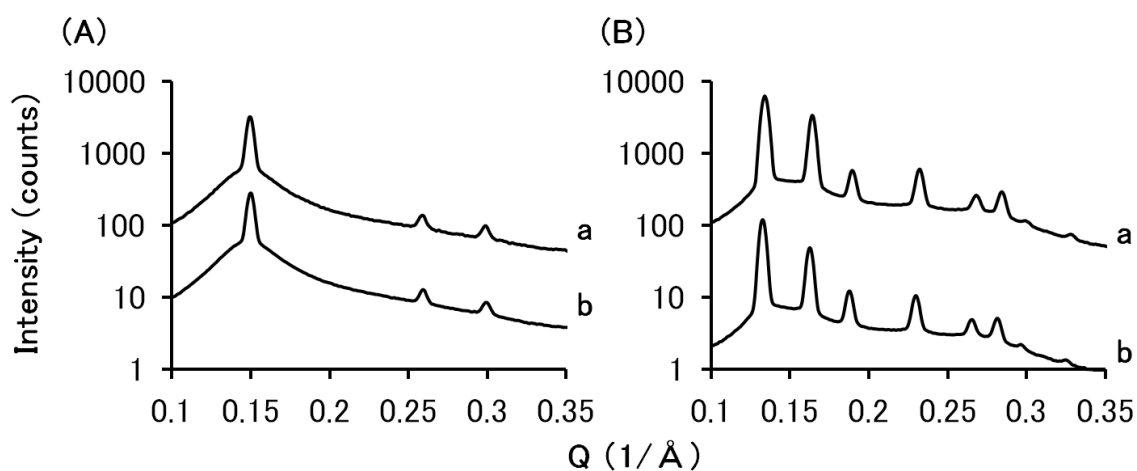


Figure 17. SAXS profiles for GMO (A) and PHY (B). The profiles are shown for liquid crystal with diosgenin (a) and without diosgenin (b). Liquid crystal formations were prepared by mixing equal volume of self-assembly liquid crystals and water.

GMO および PHY で調製した分散させた液晶製剤の粒子径を Table 5 に示す。分散させた液晶製剤はジオスゲニンの有無にかかわらず、100 - 200 nm の均一な粒子を形成した。

Table 5. Droplet size of dispersed liquid crystal formations.

	Droplet size (nm)	
	Without diosgenin	With diosgenin
GMO	112.1 ± 0.5	117.6 ± 0.5
PHY	212.1 ± 0.8	138.1 ± 0.5

Dispersed liquid crystals were prepared to disperse self-assembly liquid crystal to water at 70°C. The droplet size was measured after centrifugation and dilution. Each value shows the mean ± S.E. of 3 experiments.

2 液晶製剤およびシクロデキストリンによるジオスゲニン溶解度の改善

ジオスゲニン、GMO、PHY の水または β -CD 水溶液への溶解度を Table 6 に示す。ジオスゲニンの水への溶解度は GMO および β -CD によって増加し、PHY によって減少した。GMO または PHY で調製した液晶製剤に β -CD を加えることにより、ジオスゲニンの溶解度はさらに増加した。GMO および PHY の水への溶解度も β -CD 添加によって増加した。

Table 6. Solubility of diosgenin in water or β -CD solution.

	Solubility of diosgenin for water (ng/mL)		CD/Water ratio	Solubility of lipids for water (μ g/mL)		CD/Water ratio
	Water	CD solution		Water	CD solution	
GMO	2,210 \pm 460	8,360 \pm 400	3.77	409 \pm 40	464 \pm 112	1.14
PHY	4.50 \pm 1.11	3,550 \pm 220	789	3.99 \pm 0.48	16.9 \pm 1.9	4.24
Without lipids	10.5 \pm 3.5	3,260 \pm 170	310			

Diosgenin was dissolved to GMO or PHY at 5 mg/mL. Ten-fold of water or 4 mM β -CD solution were added, and mixed at 37°C for 5 days. Each value shows the mean \pm S.E. of 3 experiments.

3 液晶製剤およびシクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能および皮膚移行性改善

自己形成型液晶製剤および製剤と β -CD 水溶液経口投与後のジオスゲニン血漿中濃度-時間曲線を Fig. 18 に、算出した動態パラメータを Table 7 に示す。GMO で調製した液晶製剤経口投与後のジオスゲニン最大血漿中濃度 (C_{max}) は懸濁液投与群と比較して高値を示した。GMO で調製した液晶製剤投与後の最大血漿中濃度到達時間 (T_{max}) はジオスゲニン懸濁液と同様であった。PHY で調製した液晶製剤を投与することにより、懸濁液投与群と比較して C_{max} は減少し、 T_{max} は増加した。液晶製剤投与群と比べて、 β -CD 溶液併用群において高い血漿中濃度を示した。GMO で調製した液晶製剤と β -CD 水溶液の併用により、液晶製剤投与群と比較して生物学的利用能は有意に増加した。

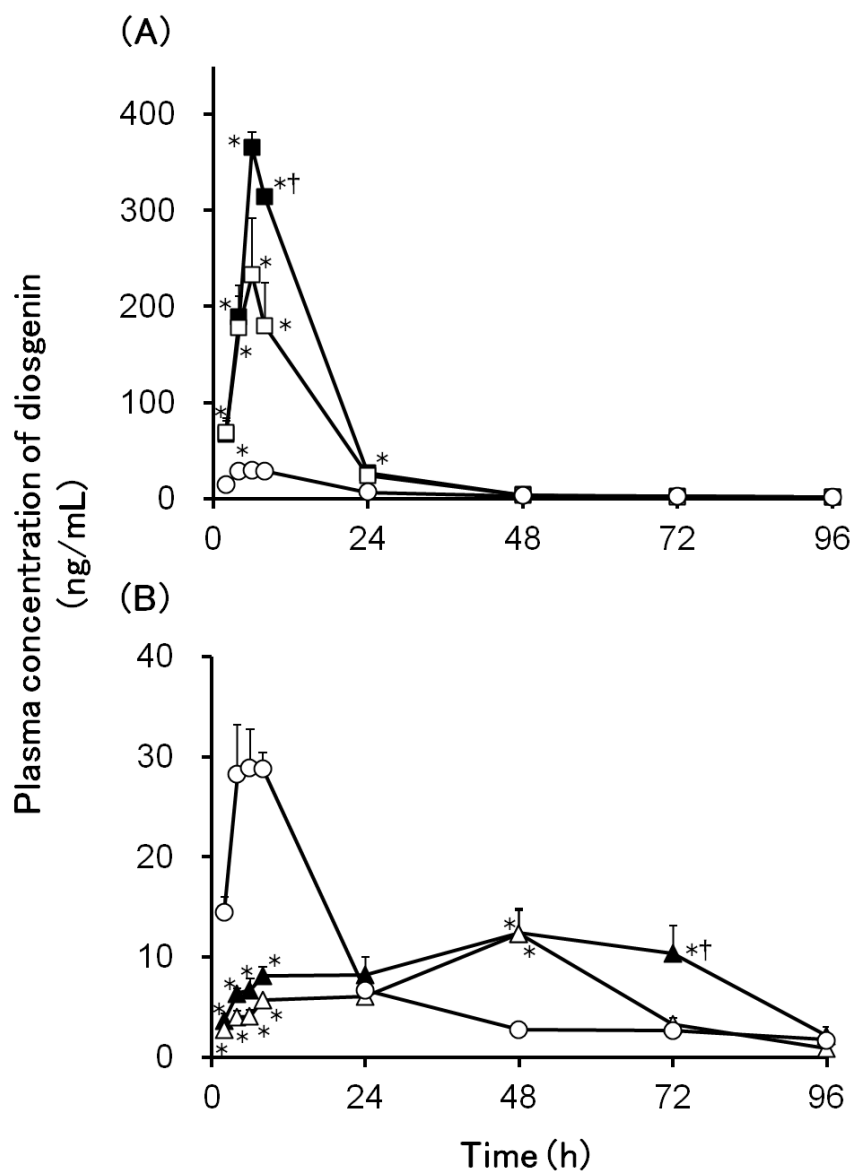


Figure 18. Plasma profiles after oral administration of diosgenin and its liquid crystal formations. Symbols: ○, diosgenin suspension; □, GMO self- assembly liquid crystal with water; ■, GMO self- assembly liquid crystal with CD solution; △, PHY self- assembly liquid crystal with water; and ▲, PHY self- assembly liquid crystal with CD solution. Each point shows the mean ± S.E. of 3 to 8 experiments. *: $p < 0.05$ compared to diosgenin suspension. †: $p < 0.05$ compared to its self- assembly liquid crystal.

Table 7. Pharmacokinetic parameters after oral administration of diosgenin suspension and self-assembly liquid crystals with water or β -CD solution.

	AUC_{po} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	Bioavailability (%)	Enhancement ratio
GMO liquid crystal + CD	4,403 ± 132 ^{*†}	239 ± 2 [*]	5.6 ± 0.2	47.1 ± 1.4 ^{*†}	6.2
GMO liquid crystal	2,934 ± 465 [*]	164 ± 36 [*]	6.0 ± 1.2	31.4 ± 5.0 [*]	4.1
PHY liquid crystal + CD	1,000 ± 191	11.4 ± 1.7 [*]	25 ± 1 [*]	10.2 ± 1.8	1.4
PHY liquid crystal	633.9 ± 62.0	8.38 ± 0.52 [*]	24 ± 1 [*]	7.30 ± 0.05	0.9
Diosgenin	711.4 ± 53.3	23.0 ± 1.9	5.0 ± 0.7	7.61 ± 0.51	1.0

Each value shows the mean ± S.E. of 3 to 4 experiments. *: $p < 0.05$ compared to diosgenin. †: $p < 0.05$ compared to its liquid crystal.

自己形成型液晶製剤、自己形成型液晶製剤と β -CD水溶液経口投与後のジオスゲニン皮膚中含量をFig. 19に示す。ジオスゲニン懸濁液、懸濁液と β -CD水溶液、GMOで調製した液晶製剤、GMO液晶製剤と β -CD水溶液、PHYで調製した液晶製剤、PHY液晶製剤と β -CD水溶液投与6時間後の皮膚中ジオスゲニン含量はそれぞれ23.9、90.7、178、372、11.4、8.93 ng/g skinであった。GMOで調製した液晶製剤と β -CD水溶液の併用群で、ジオスゲニン懸濁液群と比較して皮膚中含量は有意に増加した。

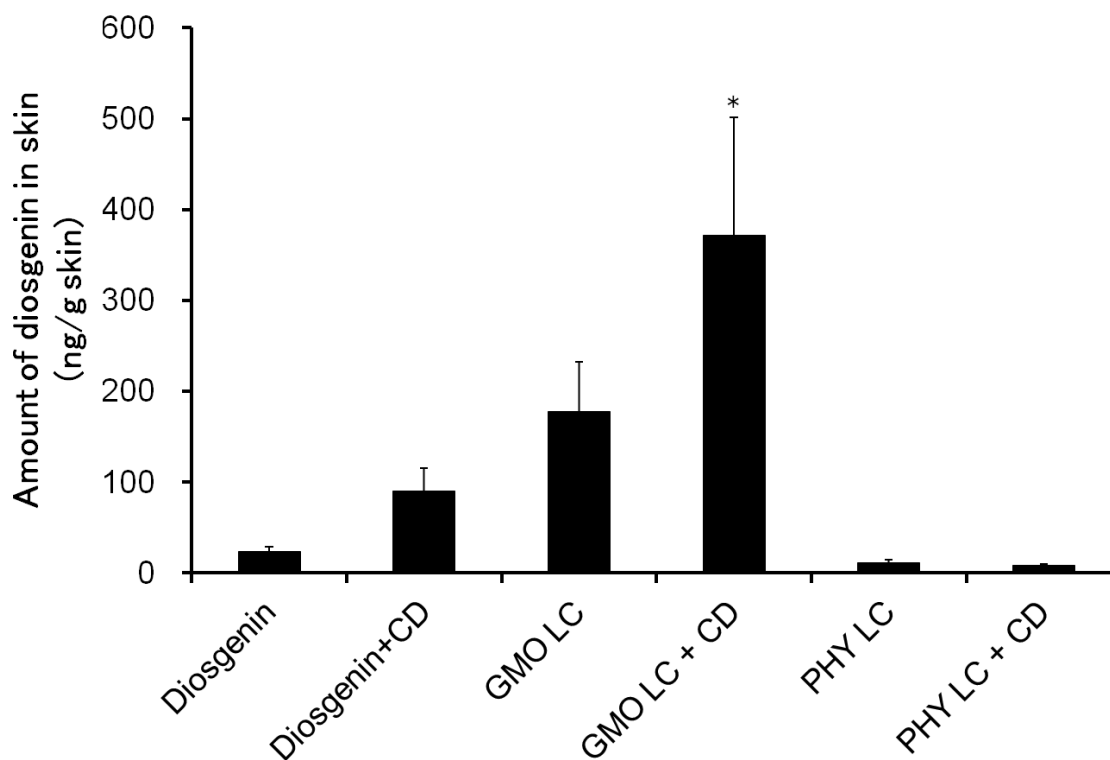


Figure 19. Skin distribution of diosgenin after oral doses of diosgenin and liquid crystal formations. After oral administration of diosgenin and liquid crystal formations, skin samples were corrected at 6h. Each column shows the mean \pm S.E. of 3 to 4 experiments. *: $p < 0.05$ compared to diosgenin.

第3節 考察

ジオスゲニンを含有する液晶製剤を調製し、その物理化学的な評価を行った。自己形成型液晶製剤と分散させた液晶製剤を調製し SAXS と Zetasizer を使用して解析した。SAXS の結果から、ジオスゲニンを溶解した GMO と PHY は水と混和することにより室温でそれぞれヘキサゴナル、キュービック液晶相を形成することが明らかとなった。また、これらの水中での粒子径は 100 - 200 nm であった。GMO で調製した液晶製剤は、界面活性剤によって水中で 100 nm 程度の均一な粒子を形成することが報告されている。⁵⁰⁾ 以上より、GMO と PHY で調製した自己形成型液晶製剤は、消化管内容液との混合により液晶構造を形成し、その後に、小滴となって分散している可能性が考えられる。

ジオスゲニンの溶解度は GMO および β -CD によって増加した。また、GMO および PHY で調製した液晶製剤に β -CD 水溶液を添加することによってジオスゲニン溶解度は改善された。これらの結果は、 β -CD 水溶液は液晶製剤を構成する脂質の溶解度を改善することにより、ジオスゲニンの溶解度を促進していることを示唆している。

ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して、GMO で調製した液晶製剤は C_{max} と生物学的利用能を増加し、PHY で調製した液晶製剤は T_{max} を延長した。GMO で調製した液晶製剤の生物学的利用能改善のメカニズムとして、生体への粘着性が高いこと、薬物の溶解度および放出性を促進すること、消化管膜の透過性を亢進することが報告されている。⁵¹⁻⁵³⁾ 一方、PHY で調製した液晶製剤は、酵素により分解されずに消化管内に長時間保持されて、薬物の放出や拡散を制御することが報告されている。⁵⁴⁾ 本研究においても、これらのメカニズムにより生物学的利用能改善および T_{max} の延長が生じていると考えられる。

液晶製剤と β -CD 水溶液の併用により、液晶製剤投与群と比較して血漿中濃度

と生物学的利用能が増加した。これらの結果は溶解度試験の結果と一致しており、消化管内でも液晶製剤からのジオスゲニンの放出を β -CD が促進していることが示された。

液晶製剤と β -CD 水溶液の経口投与 6 時間後のジオスゲニン皮膚中含量は、ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して、GMO で調製した液晶製剤および β -CD 水溶液の併用群で高値を示し、PHY で調製した液晶製剤および β -CD 水溶液の併用群で低値を示した。しかし、経口投与 72 時間後には懸濁液投与群と比較して、PHY で調製した液晶製剤および β -CD 水溶液の併用群で皮膚中含量は増加した。

(図示せず) 更なる検討が必要ではあるが、自己形成型液晶製剤は液晶製剤内に内封された薬物の放出を制御する可能性が考えられる。一方、 β -CD 水溶液は液晶製剤からの薬物の放出を促進する可能性が示された。

第4節 小括

液晶製剤と分散させた液晶製剤を調製し、物理化学的性質を評価した。結果より **GMO** と **PHY** で液晶の構造が確認され、微小な粒子として水に分散することが示された。**GMO** で調製した液晶製剤は内封する薬剤の **Cmax** を増加させ、**PHY** で調製した液晶製剤は **Tmax** を延長させた。液晶製剤からの薬物の放出は β -CD によって促進され、経口投与後の血漿中濃度および皮膚中含量も β -CD 水溶液の併用により高値を示した。自己形成型液晶製剤は液晶製剤内に内封された薬物の放出を制御することが報告されており、 β -CD 水溶液は液晶製剤からの薬物の放出を促進する可能性が示された。⁵⁵⁾

第2章 自己乳化型薬物送達システム製剤とシクロデキストリンの併用によるジオスゲニン生物学的利用能改善

自己乳化型薬物送達システム製剤は、油脂、界面活性剤、補助界面活性剤および薬物より構成される油状製剤である。この製剤は経口投与後に消化管内の水分や投与時に服用する水により希釈され、胃の収縮運動や小腸の蠕動運動による混合、攪拌で o/w 型エマルションを形成する。⁵⁶⁾ SMEDDS 製剤の調製に用いる油脂には、薬物の高い溶解性が求められ、HLB 値>12 の界面活性剤が使用されている。⁵⁷⁾ これは、希釈による薬物の沈殿を防ぎ、消化管内で o/w 型エマルションを形成しやすくするためである。補助界面活性剤は、界面活性剤と難水溶性薬物の油脂への溶解性を向上させるために用いられ、複数の界面活性剤を使用することにより自己乳化能が高くなることが報告されている。⁵⁸⁾

SMEDDS 製剤はエマルション製剤と比較して製造工程が簡便であり、エマルション状態で保存する必要がないため製剤の物理的安定性に優れている。難水溶性薬物を油層に溶解し、消化管内においても維持できることから、経口投与後の生物学的利用能を高めることが報告されている。⁵⁹⁾

本章ではジオスゲニンを含有する SMEDDS 製剤を調製して物理化学的性質を評価した。また、経口投与実験を行い、SMEDDS 製剤と β -CD 水溶液の併用効果について検討した。

第1節 実験方法

1 実験材料

ジオスゲニン、Cremophor EL (polyoxyethylene (35) castor oil) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate) は Gattefosse (West-wood, NJ, U.S.A.) より提供された。Carbitol (2-(2-ethoxyethoxy) ethanol)、 β -CD、6-メチルジオスゲニンおよびその他の試薬は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) より購入した。

2 溶解度試験

SMEDDS 製剤の油脂として使用実績のある Olive oil、Soybean oil、Sesame oil、Peanut oil、Oleic acid、Ethyl oleate、Capryol 90 を選択し、ジオスゲニン溶解度を測定した。⁵⁸⁻⁶¹⁾ 過剰量のジオスゲニン (20-50 mg) に 2 mL の油脂を加えて、37°C で 2 時間攪拌した。15,000×g、25°C、5 分間遠心し、上清中のジオスゲニン濃度を LCMS で測定した。

3 三成分相図の作成

油脂、界面活性剤、補助界面活性剤、水の三成分相図は、滴定法により作成した。⁶⁰⁾ 界面活性剤と補助界面活性剤の混合比は 1:1 とし、油脂、補助界面活性剤、界面活性剤の順に 37°C で混合し、水または模擬胃液で滴定した。模擬胃液は水に塩酸を加えることにより pH を 1 に調整した。マイクロエマルションは直径が 100 - 140 nm 程度のエマルションで、光の散乱が小さくなることから溶液は透明、または半透明となる。⁶²⁾ エマルションおよびマイクロエマルションの判定は目視で行った。

4 エマルションの粒子径測定

粒子径は動的光散乱法 Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern, Worcestershire, U.K.) で測定した。試料は測定前に SMEDDS 製剤に 50 倍量の水を加え、攪拌して調製した。

5 ジオスゲニン含有自己乳化型薬物送達システム製剤の調製

SMEDDS 製剤は Capryol 90 : Cremophor EL : Carbitol = 4 : 3 : 3 (v/v) の混合比で混合して調製した。ジオスゲニン濃度は Capryol 90 に十分に溶解することのできる 5 mg/mL とした。SMEDDS 製剤は、ジオスゲニン 100 mg を 8 mL の Capryol 90 へ溶解し、Cremophor EL 6 mL と Carbitol 6 mL を攪拌しながら加えて調製した。

6 実験動物

雄性 Wistar ラット (10 - 12 週令, 体重 200 - 250 g) は日本 SLC (静岡, 日本) より購入した。動物は 12 時間の明暗サイクル中、温度を $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に制御した部屋で飼育した。飼料と水は自由に摂取させ、動物実験は城西大学の全学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

7 静脈内、経口投与実験

試験に使用した動物は試験液の投与12時間前から4時間後まで絶食した。静脈内投与試験は、第1編第1章と同様の方法で行った。経口投与試験では5 mg/mLのジオスゲニン懸濁液または同量のジオスゲニンを含むSMEDDS製剤を調製し、2 mL/kgを投与した。SMEDDS製剤群は製剤投与直後に同量の水を、製剤と β -CDの併用群は同量の24 mM β -CD水溶液を投与した。投与直後から120時間後まで尾

静脈より採血を行い、遠心により血漿を分取した。血漿は測定するまで-30°Cで保管した。

8 血漿からのジオスゲニン抽出

血漿中のジオスゲニンは、第1編第1章と同様の方法で抽出し、測定試料とした。

9 ジオスゲニンの定量

血漿より調製した測定試料のジオスゲニン濃度は、第1編第1章と同様にLCMS法で定量した。血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は台形面積法によって算出した。生物学的利用能は経口および静脈内投与よりえられたAUCを使用して、 AUC_{po}/AUC_{iv} より算出した。薬物動態学的パラメータは非線形最小二乗法を使用して算出した。

10 統計解析

有意差の判定は SAS 9.2 (Cary, NC, U.S.A.) を使用した Dunnett's または Tukey's の多重比較検定によって行った。p 値は 0.05 未満を有意とした。

第 2 節 結果

1 溶解度試験

SMEDDS 製剤の原料として使用されている油脂類へのジオスゲニン溶解度を Table 8 に示す。油脂類へのジオスゲニン溶解度は Oleic acid と Capryol 90 で高い値を示した。油脂として Oleic acid と Capryol 90 を選択し、界面活性剤および補助界面活性剤は以前から SMEDDS 製剤に使用されている Cremophor EL、Carbitol、PEG 400 を選択した。Cremophor EL、Carbitol、PEG 400 へのジオスゲニン溶解度は 3.66、8.86、1.67 mg/mL であった。

Table 8. Solubility of diosgenin in oil.

	Solubility of diosgenin (mg/mL)
Olive oil	2.71 ± 1.00
Soybean oil	2.92 ± 0.77
Sesame oil	2.73 ± 0.94
Peanut oil	3.48 ± 1.01
Oleic acid	6.51 ± 0.79
Ethyl oleate	4.50 ± 0.52
Capryol 90	16.64 ± 3.44

Each value shows the mean ± S.E. of 3 to 4 experiments.

2 三成分相図

Capryol 90、Cremophor EL、Carbitol、水の三成分相図を Fig. 20 に示す。SMEDDS 製剤中の Capryol 90 を 30 - 50% とすることで、マイクロエマルジョンが形成された。Capryol 90 を 40%、Cremophor EL と Carbitol をそれぞれ 30% とすることで、多量の水と混合してもマイクロエマルジョンが維持された。

Oleic acid、Cremophor EL、PEG 400 で作成した三成分相図ではマイクロエマルジョン領域はえられなかった。模擬胃液 (pH=1) を水の代わりに使用した三成分相図も同様のパターンを示した。以降の検討は Capryol 90 : Cremophor EL : Carbitol = 4 : 3 : 3 (v/v) の混合比で SMEDDS 製剤を調製した。

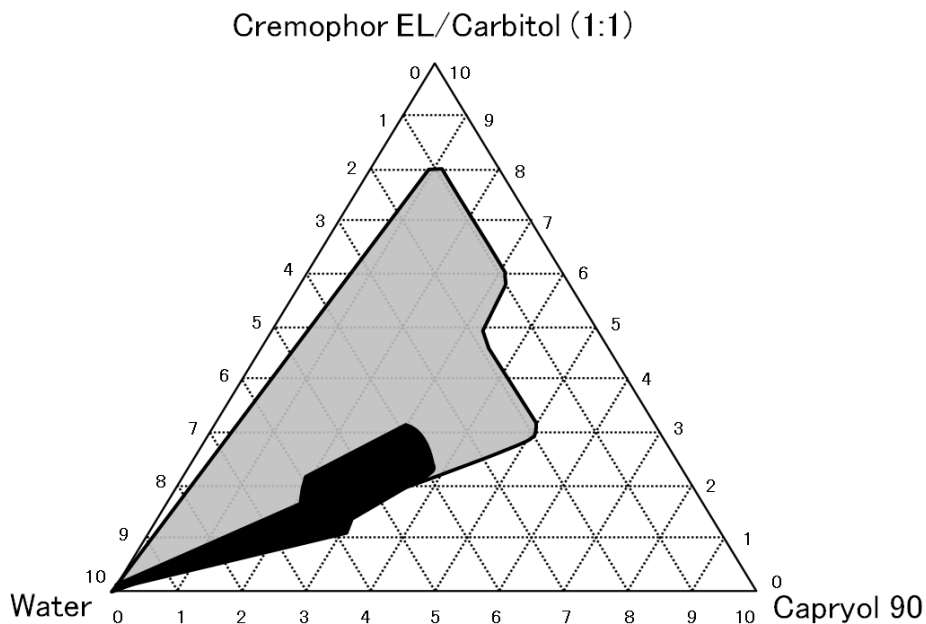


Figure 20. The ternary phase diagram for Capryol 90, CremophorEL/Carbitol (1:1), and water. Black area: micro emulsion, gray area: emulsion.

3 エマルションの粒子径

SMEDDS 製剤を希釈して調製したエマルションの粒子径を Table 9 に示す。エマルションの平均粒子径は 100 nm 以下であった。また、エマルションの大きさにジオスゲニンの有無や希釈液の pH は影響しないことが示された。

Table 9. Droplet size of emulsion.

	Droplet size (nm)	
	Water	Simulated gastric fluid
With diosgenin	22.5	36.5
Without diosgenin	25.2	22.3

Simulated gastric fluid was prepared by water acidified to pH 1 with hydrochloric acid.

4 自己乳化型薬物送達システム製剤およびシクロデキストリンによるジオスゲニン生物学的利用能改善

SMEDDS 製剤および SMEDDS 製剤と β -CD 水溶液経口投与後のジオスゲニン血漿中濃度-時間曲線を Fig. 21 に、算出した動態パラメータを Table 10 に示す。ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して、SMEDDS 製剤投与群および β -CD 併用群で血漿中濃度が増加し、AUC_{po}、C_{max}、生物学的利用能は有意に増加した。SMEDDS 製剤投与群と比較して、 β -CD 併用群で生物学的利用能は低下した。

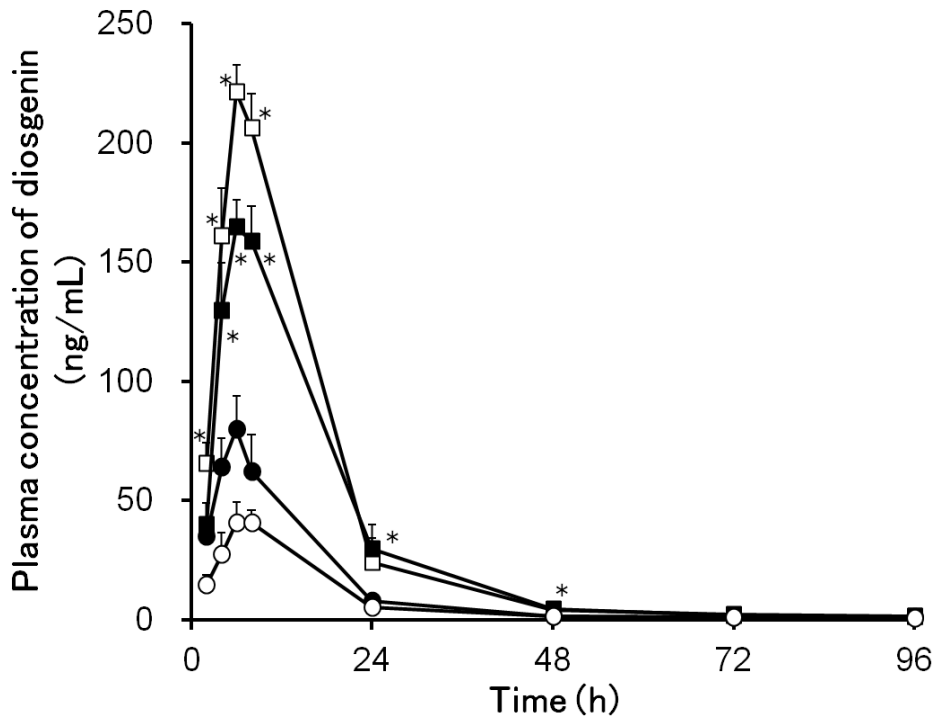


Figure 21. Plasma profiles after oral administration of diosgenin and SMEDDS.

Symbols: \circ , diosgenin suspension; \bullet , diosgenin suspension with β -CD solution; \square , SMEDDS; \blacksquare , SMEDDS with β -CD solution. Each point shows the mean \pm S.E. of 4 experiments. *: $p < 0.05$ compared to diosgenin suspension.

Table 10. Pharmacokinetic parameters after oral administration of diosgenin suspension and SMEDDS with water or β -CD solution.

	AUC_{po} (ng · h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	Bioavailability (%)	Enhancement ratio
SMEDDS + CD	2,689 ± 331 *	130 ± 9 [†]	5.9 ± 0.5	28.8 ± 3.5 *	4.1
SMEDDS	3,163 ± 154 *	165 ± 8 *	5.4 ± 0.4	33.8 ± 1.6 *	4.7
Suspension + CD	1,075 ± 183	57.5 ± 6.7	4.0 ± 0.8	11.5 ± 2.0	1.6
Diosgenin	662.4 ± 92.3	30.1 ± 5.6	5.8 ± 0.5	7.08 ± 0.99	1

Each value shows the mean ± S.E. of 4 experiments. *: $p < 0.05$ compared to diosgenin. †: $p < 0.05$ compared to SMEDDS.

第3節 考察

ジオスゲニンを含有する SMEDDS 製剤を調製するために、ジオスゲニンの油脂への溶解度を測定した。Capryol 90 と Oleic acid が高いジオスゲニン溶解度を示したため、これらの油脂と使用実績のある Cremophor EL、Carbitol、PEG 400 を界面活性剤および補助界面活性剤として使用し、三成分相図を作成した。

Capryol 90 : Cremophor EL : Carbitol = 4 : 3 : 3 (v/v) の混合比で調製した SMEDDS 製剤において、広い希釈範囲でマイクロエマルジョンの形成が確認された。

マイクロエマルジョンの粒子径はジオスゲニンの有無や酸性 pH によって変化しなかった。非イオン性界面活性剤を使用した SMEDDS 製剤において、分散媒に水、模擬胃液、模擬小腸液を使用しても、マイクロエマルジョンの形成に有意な差は無いことが報告されている。⁶³⁻⁶⁵⁾ 本研究で、ジオスゲニン含有 SMEDDS 製剤は消化管内でマイクロエマルジョンを形成している可能性が示された。

SMEDDS 製剤および SMEDDS 製剤と β -CD 水溶液をラットに経口投与した結果、両者ともにジオスゲニン懸濁液投与群と比較して血漿中濃度が増加した。SMEDDS 製剤投与群と比較して β -CD 併用群で C_{max} および生物学的利用能は低値を示した。SMEDDS 製剤は、含有する薬物の溶解性改善や小腸上皮細胞に出現する薬物の排出システムの阻害により薬物の吸収を促進することが報告されている。^{56, 66, 67)} SMEDDS 製剤中のジオスゲニンは油相に溶解しており、マイクロエマルジョン形成後も溶解状態は維持されている。しかし、マイクロエマルジョンに β -CD を添加することによって沈殿が生じ、ジオスゲニン溶解度は 60% に低下した。マイクロエマルジョンからの薬物の放出は β -CD によって低下することが報告されており、この沈殿はジオスゲニンと β -CD の複合体形成によるも

のであると推察される。⁶⁸⁾ 沈殿形成によるジオスゲニン溶解度の減少が、生物学的利用能低下の一因であると考えられる。

第4節 小括

ジオスゲニンを含有する最適な SMEDDS 製剤を調製することを目的として溶解度試験、三成分相図の作成、エマルションの粒子径測定を行った。その結果、ジオスゲニンを溶解する油脂として Capryol 90 が最適であり、Capryol 90 : Cremophor EL : Carbitol = 4 : 3 : 3 (v/v) の混合比でマイクロエマルションが形成された。経口投与試験では SMEDDS 製剤および SMEDDS 製剤と β -CD 水溶液の併用により懸濁液投与群と比較して高い生物学的利用能を示したが、 β -CD 水溶液による促進効果はえられなかった。この原因として β -CD がジオスゲニンと包接複合体の沈殿を形成し、ジオスゲニン溶解度が低下したことが考えられた。

結論

1 編 1 章では、ジオスゲニン経口投与後の生物学的利用能を明らかにした。懸濁液投与後の生物学的利用能は 4.4% と低値を示した。そこで、この低い生物学的利用能の改善を目的として CD との複合体を調製し、物理化学的性質ならびに経口投与後の体内動態を評価した。ジオスゲニンの溶解度は β 、 γ -CD により改善された。また、複合体形成の様式としてはジオスゲニン : CD = 1 : 2 であることが示唆された。さらに、 β -CD との複合体をラットに経口投与することによりジオスゲニンの生物学的利用能は 33.5% に改善され、皮膚中含量も有意に改善された。ジオスゲニンの組織移行性の改善に CD、特に β -CD が有用であることが示された。

1 編 2 章では、更なるジオスゲニンの生物学的利用能の改善を目的として β -CD の溶解性を改善した β -CD 誘導体を使用した。 β -CD 誘導体は共沈法によって複合体を調製することができなかつたため、混練法および凍結乾燥によって複合体を調製して物理化学的性質と経口投与後の体内動態を評価した。凍結乾燥法によって β -CD 誘導体の固体の複合体を調製することができた。また、HP β -CD で調製した複合体の経口投与によりラットの生物学的利用能は 49.5% に改善され、皮膚中含量も β -CD 投与群と比較して高値を示した。

2 編 1 章では、液晶製剤と分散させた液晶製剤を調製し物理化学的性質を評価し、生物学的利用能の改善効果を検討した。GMO および PHY で液晶相が確認され、ジオスゲニンを含有した液晶製剤が調製された。また、この製剤は微小な粒子として水に分散することが示唆された。GMO で調製した液晶製剤はジオスゲニンの生物学的利用能を 31.4% に増加させ、PHY で調製した液晶製剤は T_{max} を 24 時間に延長させた。GMO で調製した液晶製剤と β -CD 水溶液の併用を併用することによって、生物学的利用能は 47.1% に増加した。 β -CD はジオス

ゲニン、GMO、PHYの水への溶解度を促進することを示しており、液晶製剤からのジオスゲニンの放出は β -CDによって促進されると推察される。自己形成型液晶製剤経口投与後の血漿中濃度および皮膚中含量は β -CD水溶液の併用により促進した。自己形成型液晶製剤は液晶製剤内に内封された薬物の放出を制御する可能性があり、 β -CD水溶液は液晶製剤からの薬物の放出を促進することが示唆された。

2編2章では、ジオスゲニンを含有する最適なSMEDDS製剤を調製することを目的として溶解度試験、三成分相図の作成、エマルションの粒子径測定を行った。ジオスゲニンを溶解する油脂としてCapryol 90が最適であり、Capryol 90 : Cremophor EL : Carbitol = 4 : 3 : 3 (v/v)の混合比でマイクロエマルションが形成された。調製したSMEDDS製剤およびSMEDDS製剤と β -CD水溶液を経口投与することにより、ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して高い生物学的利用能を示した。SMEDDS製剤においては、 β -CD水溶液を併用することによる生物学的利用能は改善されなかった。この原因として β -CDとジオスゲニンの包接複合体の沈殿が形成され、ジオスゲニン溶解度が低下したことが考えられる。

Table 11. Bioavailability and the enhancement ratio after oral dose of diosgenin and its formulations.

	Diosgenin suspension	Suspension + β-CD	β-CD complex	γ-CD complex	HE β-CD complex	HP β-CD complex
Bioavailability^a (%)	4.4 - 7.6	16.3	33.5	23.1	17.3	49.5
Enhancement ratio	1	3.7	7.6	5.2	3.9	11.3
<hr/>						
	GMO LC	GMO LC + β-CD	PHY LC	PHY LC + β-CD	SMEDDS	SMEDDS + β-CD
Bioavailability^b (%)	31.4	47.1	7.3	10.2	33.8	28.8
Enhancement ratio	4.1	6.2	0.96	1.3	4.8	4.1

^a, 100mg/kg of diosgenin or its CD complexes were administrated, ^b, 10 mg/kg of diosgenin or its lipid formulations were administrated.

本研究では難水溶性で生物学的利用能の低いジオスゲニンの溶解度、生物学的利用能、組織移行性を改善することを目的として、CD 包接複合体、液晶製剤、SMEDDS 製剤を調製した。各製剤投与後のジオスゲニン生物学的利用能およびその改善率を Table 11 に示す。ジオスゲニン懸濁液投与群と比較して、 β 、 γ -CD、HP β -CD で調製した複合体投与群でそれぞれ 7.6、5.2、11.3 倍高値を示した。さらに、CD による包接複合体と比較して、調製が簡便である自己形成型の製剤を調製し、製剤と CD の併用効果について検討した。GMO および PHY で調製した液晶製剤は β -CD 水溶液の併用によりジオスゲニンの生物学的利用能を 31.4 から 47.1% および 7.3 から 10.2% と増加させたが、SMEDDS 製剤は β -CD 水溶液の併用により 33.8 から 28.8% と減少させた。液晶製剤にみられた β -CD による促進効果は液晶製剤を構成する脂質およびジオスゲニンの水への溶解度が改善したことにより、ジオスゲニン溶出が促進したためであると考えられる。SMEDDS 製剤と β -CD の併用による抑制効果は β -CD がジオスゲニンを包接し、溶解しているジオスゲニンが低下したことが原因として考えられる。以上の結果より、種々油状製剤を CD と併用することにより製剤中の薬物放出や水溶液中の薬物濃度を制御することができる可能性が示された。

ジオスゲニンを 0.4 - 20 $\mu\text{g/mL}$ 含有する培地で 48 時間培養することによって、B16 メラノーマ細胞はメラニン産生抑制作用を示す。¹¹⁾ また、ヒト 3 次元表皮モデルにおいては、0.4 - 4 ng/mL のジオスゲニンを 24 時間適用することによって細胞増殖促進作用を示すことが報告されている。¹²⁾ さらに、これらの効果は濃度依存的に増加している。本研究でジオスゲニン血漿中濃度と皮膚中含量に正の相関関係がみられており、ジオスゲニン経口投与により、皮膚におけるメラニン産生抑制作用や細胞増殖促進作用が期待される。¹⁷⁾

CD 包接複合体、GMO で調製した液晶製剤、SMEDDS 製剤は難水溶性化合物

の C_{max} および生物学的利用能を増加し、PHY で調製した液晶製剤は T_{max} を延長した。ジオスゲニンを製剤化することにより、メラニン産生抑制作用や細胞増殖促進作用の増強効果や投与回数の調整が可能であると考えられる。本研究で使用した製剤を使用することにより、ジオスゲニンだけでなく、様々な難水溶性化合物の C_{max} 、生物学的利用能、 T_{max} を制御することができると考えられる。本研究により、難水溶性化合物であるジオスゲニンの効果的な製剤設計の一端が明らかとなった。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬学部教授 橋本フミ恵 先生ならびに城西大学薬学研究科皮膚生理学講座准教授 徳留嘉寛 先生に感謝の意を表します。

さらに、本論文作成にあたり、ご教示とご校閲をいただきました城西大学薬学研究科薬剤学講座教授 従二和彦 先生ならびに城西大学薬学研究科食毒学講座、機能性食品科学講座教授 和田政裕 先生に御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施にご協力いただきました城西大学薬学研究科皮膚生理学講座の関係諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Prentis RA, Lis Y, Walker SR. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **25**, 387-396 (1988).
- 2) Venkatesh S, Lipper RA. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 145-154 (2000).
- 3) Taylor WG, Elder JL, Chang PR, Richards KW. Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5206-5210 (2000).
- 4) Eric H. Final report of the amended safety assessment of *Dioscorea Villosa* (Wild Yam) root extract. *Int. J. Toxicol.*, **23**, 49-54 (2004).
- 5) Pari L, Monisha P, Mohamed Jalaludeen A. Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **691**, 143-150 (2012).
- 6) Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Wu X, Yang X, Zhao Y, Li D. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Chem. Biol. Interact.*, **184**, 366-375 (2010)
- 7) Applezweig N. Steroids. *Chem. Week*, **17**, 57-72 (1969).
- 8) Russell L, Hicks GS, Low AK, Shepherd JM, Brown CA. Phytoestrogens: a viable option? *Am. J. Med. Sci.*, **324**, 185-188 (2002).
- 9) Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **58**, 3833-3838 (1998).

- 10) Chiang CT, Way TD, Tsai SJ, Lin JK. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Lett.*, **581**, 5735-5742 (2007).
- 11) Tada Y, Kanda N, Haratake A, Tobiishi M, Uchiwa H, Watanabe S. Novel effects of diosgenin on skin aging. *Steroids*, **74**, 504-511 (2009).
- 12) Lee J, Jung K, Kim YS, Park D. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life Sci.*, **81**, 249-254 (2007).
- 13) Terao K, Konishi M, Nakata D, Uekaji Y. Long known but brand new U.S.A.ble tool for food science –new use of natural cyclodextrins–. *FFI J.*, **210**, 222-243 (2005).
- 14) Uekama K, Hirayama F, Arima H. シクロデキストリンの製剤への新たな利用展開. *Yakuzaigaku*, **67**, 66-79 (2007).
- 15) Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117-212 (1965).
- 16) Ghuzlaan A, Al Omari MM, Al-Sou'od KA. Prednisone/cyclodextrin inclusion complexation: Phase solubility, thermodynamic, physicochemical and computational analysis. *J. Solution Chem.*, **38**, 83-94 (2009).
- 17) Okawara M, Tokudome Y, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Diosgenin disposition in rats after i.v. and p.o. administration. *Yakuzaigaku*, **70**, 82-86 (2010).
- 18) Yamauchi T. Saponins of Japanese *Dioscoreaceae*. IX. Hydrolysis of diosgenin glycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, **3**, 343-348 (1959).

- 19) Iga K, Hussain A, Kashihara T. New direct calculation of K1:1 and K1:2 complexation constants using solubility method. *J. Pharm. Sci.*, **70**, 108-109 (1981).
- 20) Maurin MB, Rowe SM, Koval CA, Hussain MA. Solubilization of nicardipine hydrochloride via complexation and salt formation. *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1418-1420 (1994).
- 21) Ohmura M, Kawahara Y, Okude K, Hasegawa Y, Hayashida M, Kurimoto R, Kawaguchi A. Electron microscopic observations of inclusion complexes of α -, β -, and γ -cyclodextrins. *Polymer*, **45**, 6967-6975 (2004).
- 22) Panova IG, Matukhina EV, Gerasimov VI, Topchieva IN. Non-covalent columnar cyclodextrin-based structures. *Colloid J.*, **68**, 66-78 (2006).
- 23) Al-Sou'od KA. Investigation of the hydrocortisone- β -cyclodextrin complex by phase solubility method: Some theoretical and practical considerations. *J. Solut. Chem.*, **37**, 119-133 (2008).
- 24) Vromans H, Eissens AC, Lerk CF. Mechanism of dissolution of drug-cyclodextrin complexes: A pragmatic approach. *Acta Pharm. Technol.*, **35**, 250-255 (1989).
- 25) Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017-1025 (1996).
- 26) Okawara M, Tokudome Y, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Enhancement of diosgenin distribution in the skin by cyclodextrin complexation following oral administration. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 36-40 (2013).
- 27) Becket G, Schep LJ, Tan MY. Improvement of the *in vitro* dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **179**, 65-71 (1999).

- 28) Frömring KH, Szejtli J. *Cyclodextrins in pharmacy*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1994).
- 29) Szejtli J. *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (1988).
- 30) Yavuz B, Bilensoy E, Vural I, Sumnu M. Alternative oral exemestane formulation: improved dissolution and permeation. *Int. J. Pharm.*, **398**, 137-145 (2010).
- 31) Jambhekar S, Casella R, Maher T. The physicochemical characteristics and bioavailability of indomethacin from β -cyclodextrin, hydroxyethyl- β -cyclodextrin, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.*, **270**, 149-166 (2004).
- 32) Dollo G, Le Corre P, Chollet M, Chevanne F, Bertault M, Burgot JL, Le Verge R. Improvement in solubility and dissolution rate of 1, 2-dithiole-3-thiones upon complexation with β -cyclodextrin and its hydroxypropyl and sulfobutyl ether-7 derivatives. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 889-895 (1999).
- 33) Kopecký F, Vojteková M, Vrana M, Čížová K. Potentiometric study of carbisocaine micellization and inclusion complexation with α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, methyl- β -cyclodextrin, and (hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **67**, 245-256 (2002).
- 34) Tenjarla S, Puranajoti P, Kasina R, Mandal T. Preparation, characterization, and evaluation of miconazole-cyclodextrin complexes for improved oral and topical delivery. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 425-429 (1998).
- 35) Uekama K, Otagiri M, Uemura Y, Fujinaga T, Arimori K, Matsuo N, Tasaki K, Sugii A. Improvement of oral bioavailability of prednisolone by beta-cyclodextrin complexation in humans. *J. Pharmacobio. Dyn.*, **6**, 124-127 (1983).

- 36) Liu X, Lin HS, Thenmozhiyal JC, Chan SY, Ho PC. Inclusion of acitretin into cyclodextrins: phase solubility, photostability, and physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2449-2457 (2003).
- 37) Uekama K, Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 1-40 (1987).
- 38) Riekes MK, Tagliari MP, Granada A, Kuminek G, Silva MAS, Stulzer HK. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. *Mater. Sci. Eng. C*, **30**, 1008-1013 (2010).
- 39) Okawara M, Tokudome Y, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Effect of β -cyclodextrin derivatives on the diosgenin absorption in Caco-2 cell monolayer and rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 54-59 (2014).
- 40) Stuenkel CA, Dudley RE, Yen SS. Sublingual administration of testosterone-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex simulates episodic androgen release in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **72**, 1054-1059 (1991).
- 41) Fridriksdóttir H, Loftsson T, Gudmundsson JA, Bjarnason GJ, Kjeld M, Thorsteinsson T. Design and *in vivo* testing of 17 beta-estradiol-HP beta CD sublingual tablets. *Pharmazie*, **51**, 39-42 (1996).
- 42) Pitha J, Harman SM, Michel ME. Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. *J. Pharm. Sci.*, **75**, 165-167 (1986).

- 43) Clogston J, Rathman J, Tomasko D, Walker H, Caffrey M. Phase behavior of a monoacylglycerol: (myverol 18-99K)/water system. *Chem. Phys. Lipids*, **107**, 191-220 (2000).
- 44) Costa-Balogh FO, Sparr E, Sousa JJ, Pais AC. Drug release from lipid liquid crystalline phases: relation with phase behavior. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **36**, 470-481 (2010).
- 45) Lee KW, Nguyen TH, Hanley T, Boyd BJ. Nanostructure of liquid crystalline matrix determines *in vitro* sustained release and *in vivo* oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. *Int. J. Pharm.*, **365**, 190-199 (2009).
- 46) Nguyen TH, Hanley T, Porter CJ, Boyd BJ. Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration. *J. Control. Release*, **153**, 180-186 (2011).
- 47) Boyd BJ, Khoo SM, Whittaker DV, Davey G, Porter CJ. A lipid-based liquid crystalline matrix that provides sustained release and enhanced oral bioavailability for a model poorly water soluble drug in rats. *Int. J. Pharm.*, **340**, 52-60 (2007).
- 48) Lian R, Lu Y, Qi J, Tan Y, Niu M, Guan P, Hu F, Wu W. Silymarin glyceryl monooleate/poloxamer 407 liquid crystalline matrices: physical characterization and enhanced oral bioavailability. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **12**, 1234-1240 (2011).
- 49) Winey KI, Thomas EL, Fetters LJ. Ordered morphologies in binary blends of diblock copolymer and homopolymer and characterization of their intermaterial dividing surfaces. *J. Chem. Phys.*, **95**, 9367-9375 (1991).
- 50) Jin X, Zhang ZH, Sun E, Tan XB, Li SL, Cheng XD, You M, Jia XB. Enhanced oral absorption of 20(S)-protopanaxadiol by self-assembled liquid crystalline

- nanoparticles containing piperine: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 641-652 (2013).
- 51) Geraghty PB, Attwood D, Collett JH, Sharma H, Dandiker Y. An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels. *Biomaterials*, **18**, 63-67 (1997).
- 52) Lai J, Chen J, Lu Y, Sun J, Hu F, Yin Z, Wu W. Glyceryl monooleate/poloxamer 407 cubic nanoparticles as oral drug delivery systems: I. *In vitro* evaluation and enhanced oral bioavailability of the poorly water-soluble drug simvastatin. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **10**, 960-966 (2009).
- 53) Zeng N, Gao X, Hu Q, Song Q, Xia H, Liu Z, Gu G, Jiang M, Pang Z, Chen H, Chen J, Fang L. Lipid-based liquid crystalline nanoparticles as oral drug delivery vehicles for poorly water-soluble drugs: cellular interaction and *in vivo* absorption. *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 3703-3718 (2012).
- 54) Nguyen TH, Hanley T, Porter CJ, Larson I, Boyd BJ. Phytantriol and glyceryl monooleate cubic liquid crystalline phases as sustained-release oral drug delivery systems for poorly water-soluble drugs II. *In-vivo* evaluation. *J. Pharm. Pharmacol.*, **62**, 856-865 (2010).
- 55) Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov. Today*, **15**, 1032-1040 (2010).
- 56) Shah NH, Carvajal MT, Patel CI, Infeld MH, Malick AW. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolyzed glycerides for improving *in vitro* dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.*, **106**, 15-23 (1994).

- 57) Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **S2**, 93-98 (2000).
- 58) Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.*, **12**, 1561-1572 (1995).
- 59) Kang BK, Lee JS, Chon SK, Jeong SY, Yuk SH, Khang G, Lee HB, Cho SH. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int. J. Pharm.*, **274**, 65-73 (2004).
- 60) Grove M, Müllertz A, Nielsen JL, Pedersen GP. Bioavailability of seocalcitol II: development and characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral administration containing medium and long chain triglycerides. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **28**, 233-242 (2006).
- 61) Abdalla A, Klein S, Mäder K. A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, *in vitro* digestion and incorporation into solid pellets. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **35**, 457-464 (2008).
- 62) Hoar TP, Schulman J H. Transparent water in oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nature*, **152**, 102-103 (1943).
- 63) Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **45**, 89-121 (2000).
- 64) Khoo S-M, Humberstone AJ, Porter CJH, Edwards GA, Charman WN. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *Int. J. Pharm.*, **167**, 155-164 (1998).

- 65) Li P, Ghosh A, Wagner RF, Krill S, Joshi YM, Serajuddin AT. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. *Int. J. Pharm.*, **288**, 27-34 (2005).
- 66) Charman SA, Charman WN, Rogge MC, Wilson TD, Dutko FJ, Pouton CW. Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharm. Res.*, **9**, 87-93 (1992).
- 67) Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT. The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharm. Res.*, **13**, 528-534 (1996).
- 68) Dalmora ME, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro* drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect. *Int. J. Pharm.*, **222**, 45-55 (2001).