

院内製剤における六君子湯エキス含有坐剤の製剤学的特性 及びラットを用いた生物学的同等性の評価

村田 勇,^{*,a} 西山大青,^a 川崎浩範,^a 内藤千鶴,^a 鎌田武志,^a
古河義行,^a 岩田萌子,^a 杉野雅浩,^{b,†} 井上 裕,^a 金本郁男^a

Pharmaceutical Properties of Rikkunshito Extract Suppository and Bioequivalence by Pharmacokinetic Parameters and Effectiveness against Nausea and Vomiting and Anorexia in Rats

Isamu Murata,^{*,a} Taisei Nishiyama,^a Hironori Kawasaki,^a Chizuru Naito,^a Takeshi Kamata,^a
Yoshiyuki Furukawa,^a Moeko Iwata,^a Masahiro Sugino,^{b,†} Yutaka Inoue,^a and Ikuo Kanamoto^a
^aLaboratory of Drug Safety Management, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University;
Keyakidai 1-1, Sakado, Saitama 350-0295, Japan; ^bLaboratory of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and
Pharmaceutical Sciences, Josai University; 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

(Received February 2, 2018; Accepted May 6, 2018)

In patients with cancer, it is difficult to continue medical treatment owing to nausea and vomiting (NV). Therefore, it is important to avoid these problems for improving the patient's QOL. Rikkunshito extract (RK) possesses antiemetic effects and is used in combination in cancer therapy. However, patients with cancer find it difficult to take the medicine orally for the treatment of NV and anorexia owing to the characteristic smell and taste of traditional Chinese medicine. We examined the pharmaceutical properties of RK suppository for hospital use, assessed bioequivalence by using pharmacokinetic parameters, and determined its effectiveness against NV and anorexia in rats. In this study, RK suppository was prepared by using RK formulation (A, B, and C) and Witepsol (H and S) (AH, BH, CH, AS, BS, and CS). Pharmaceutical properties, namely, hardness, dispersibility, long-term stability, and drug (hesperidin and glycyrrhizic acid) release were measured for AH, BH, CH, and AS. The pharmacokinetic parameters, effectiveness of substance P against NV and anorexia, and serotonin-activated ghrelin levels were assessed for BH only. AH, BH, AS, and BS demonstrated uniform and sufficient hardness. The release rate of oleaginous components, such as glycyrrhizic acid, did not change significantly, while that of water soluble components, such as hesperidin, decreased when compared with that in powder formulations A and B. NV and anorexia improved in rats administered BH compared with the control group. BH suppository showed effectiveness in terms of both physicochemical property and bioequivalence for hospital use.

Key words—rikkunshito extract; hospital preparation; suppository; intrarectal administration; nausea and vomiting; anorexia

背 景

わが国における死亡者数は増加傾向にあるが、悪性新生物（がん）による死亡者数は全体の約30%を占め、死亡者数や死亡率も年々増加している。¹⁾がんの治療法には主に、外科療法、放射線療法及び薬物療法があるが、そのうち薬物療法は、局所的でなく全身のがん細胞を死滅させることができるメ

リットを持つ一方で、悪心嘔吐（nausea and vomiting; NV）や食欲不振により患者のQOLに影響して外科的治療や化学療法の継続を困難にする。ゆえに、がんの治療は、患者のQOLを十分に考慮した補助療法や副作用の回避が重要である。この発現頻度は抗がん剤の種類、投与量及び投与経路などにより高度催吐性、中等度催吐性、軽度催吐性及び最小度催吐性に分類される。²⁾現在のがん化学療法においてシスプラチン [cis-diamminedichloro-platinum (II); CDDP] は、24時間以内にNVを発現する高度催吐性リスクに分類される抗がん剤であり、典型的な急性及び遅発性のNVを引き起こす薬物である

^a城西大学薬学部医薬品安全性学研究室, ^b城西大学薬学部薬剤学研究室

現所属: [†]奥羽大学薬学部

*e-mail: ismurata@josai.ac.jp

ため,^{3,4)} その予防あるいは軽減することが、がん患者の QOL の維持や向上によって化学療法を継続可能にする上で重要である。

近年、六君子湯エキス (rikkunshito extract; RK) は抗がん剤投与後に発現する消化器症状に対して有効であると報告されている。⁵⁻⁸⁾ RK は、セロトニン₃受容体拮抗薬やドパミン拮抗薬、ステロイド薬と併用することで抗がん剤使用後発現する悪心嘔吐を軽減する作用がある^{9,10)}とともに、胃運動低下^{11,12)}や食欲増進ホルモンであるグレリンの産生・分泌低下による食欲不振に対しても作用がある。¹³⁻¹⁸⁾ しかしながら、経口投与に限られる RK の漢方独特の味や匂いは、患者の服薬コンプライアンスを低下させる可能性があり、がんを患った患者を背景にすると経口自体の服薬方法に限界がある場合が考えられる。このような患者に対して安全かつ簡便に投与できる非経口剤形として有用な手段の開発は重要である。そのうち直腸内投与は、嘔吐や服薬時のストレスを軽減できるだけでなく副作用を回避する面でも有効な手段である。経口製剤を他の用法とする場合、院内製剤のクラス II に分類され臨床使用のためには基礎研究によって製剤学的性質や薬物動態学パラメータの算出は必要不可欠で、さらに薬理学的な効果を証明することは院内製剤としての安全性をより強固に担保するものと考えた。

本研究は、各種坐剤基剤によって得られた RK 含有坐剤の物理学的性質、薬物動態学的パラメータ及び薬理効果によって院内製剤としての有効性を評価した。

方 法

1. 試薬 RK は、ツムラ六君子湯エキス顆粒 (医療用) (製剤 A) (株式会社ツムラ、東京)、クラシエ六君子湯細粒 KB-43 (スティック包装) (製剤 B) (クラシエ薬品株式会社、東京) 及びコタロー六君子湯エキス細粒 (製剤 C) (小太郎漢方製薬株式会社、東京) を使用した。坐剤基剤は、ウィテプゾールホスコ H-15 (H) 及び S-55 (S) (丸石製薬株式会社、大阪) を使用した。テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran; THF)、アセトニトリル、酢酸、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、塩化コバルト六水和物、ヘスペリジン (hesperidin; HD)、ヘスペレチン (hesperetin;

HT)、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO)、プロピレングリコール (propylene glycol; PG) 及び CDDP (和光純薬株式会社、大阪) は、HPLC グレード及び試薬特級を使用した。グリチルリチン酸 (glycyrrhizic acid; GA) は、長良サイエンス株式会社 (岐阜) より購入した。坐剤の形成に用いたモールドは 2.25、1.35 (丸石製薬株式会社、大阪) 及び 0.9 cc [日伊包装 (株)、伊丹] を使用した。カオリン飼料は、カオリン (関東化学株式会社、東京) 及びアラビアゴム (和光純薬工業株式会社、大阪) を使用した。

2. RK 含有坐剤の調製方法 RK 含有坐剤の組成は、製剤 A を基剤 H 及び S で調製したものを AH 及び AS、製剤 B を基剤 H 及び S で調製したものを BH 及び BS、製剤 C を基剤 H 及び S で調製したものを CH 及び CS とした。

RK 含有坐剤の主薬及び基剤の混合比率は、2.25 cc コンテナ内に充填可能な基剤の最小混合比とした [AH 及び AS (製剤/基剤: g/g): 2.5/1.25, BH 及び BS: 2.0/1.25, CH 及び CS: 3.0/1.5]。なお、顆粒や細粒のエキス製剤をそのまま使用して調製した坐剤は、強度が 1.0 kg/cm² 以下であったことから実験から除外した [Supplementary material Figs. 1(a)–(c)]。RK 含有坐剤の調製方法は、製剤 A、B 及び C をあらかじめミキサー [イワタニアイコレクト (株)、大阪] によって粉碎した後、φ 75 µm 試験用篩 (東京スクリーン株式会社、東京) を用いて粒子径を均等にし、湯浴中 (40–50°C) で融解させたそれぞれの基剤に混合させた。それら熔融状態の RK を含有した調製物は、坐剤コンテナに注入後、室温で 1 日固化させた後、試験に供するまで冷暗所に保存した。製剤 C は RK 製剤 1 包を 1 つの坐剤にすることができなかったため試験から除外した [Supplementary material Figs. 1(d)–(f)]。

3. 実験 1: 製剤学的及び物理学的評価

3-1. HPLC による RK 中の HD 及び GA の定量

RK 中の HD 含量は、第十七改正日本薬局方の RK 定量法を一部改変して測定した。製剤 A 及び B は、乾燥エキス 0.1 g あたりの量 (製剤 A: 0.188 g, 製剤 B: 0.146 g) を量り取り、THF (1→4) 50 mL を用いて溶解した。それら溶解液は遠心分離 (4°C, 20000×g, 20 min) 後の上清を 0.45 µm フィルター

(アドバンテック, 東京) を用いてろ過して測定に用いた. RK 中の GA 含量は, 第十七改正日本薬局方の RK 定量法を一部改変して測定した. 乾燥エキス約 0.5 g に対応する量 (製剤 A : 0.938 g 及び製剤 B : 0.732 g) を量り取り, メタノール (1→2) 50 mL を用いて 15 分間攪拌し遠心分離 (4°C, 20000×g, 20 min) 後の上清を 0.45 µm フィルターを用いてろ過して測定に用いた.

HD 及び GA の HPLC 測定条件は, カラムが COSMOSIL PACKED COLUMN [ナカライテスク (株), 京都], 検出波長が 285 及び 254 nm, カラム温度が 40°C, 移動相が水/アセトニトリル/酢酸 [82/18/1 (v/v)] 及びアセトニトリル/水/酢酸 [30/60/10 (v/v)], 流速が 0.6 及び 1.0 mL/min 及び注入量が 50 及び 30 µL とした. 内部標準物質 (internal standard; I.S.) 溶液は, *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルを使用した. なお, 用いた検量線 (HD: 0, 2, 4, 8, 10, 12.5, 25 及び 50 µg/mL, GA: 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 25, 50 及び 100 µg/mL) の定量下限は 0.016 µg/mL 及び 0.209 µg/mL, 品質コントロール (quality control; Q.C.) 試料によるバリデーションの結果は, Supplementary material Table 1 に示した.

3-2. RK 含有坐剤の硬度試験 RK 含有坐剤の硬度は, モンサント型錠剤用高度計 (ミナイトメディカル社製, 東京) を用いて測定した. 硬度を測定するために製剤 A で調製した坐剤は, 坐剤先端部から 1/3, 2/3 及び尾部の部分に分け, 製剤 B は, 尾部が形成されなかったため製剤 A の 1/3 及び 2/3 の部分のみを測定した. それぞれ切り分けた部位の中央部の硬度を測定した.

3-3. RK 含有坐剤の分散性試験 RK 含有坐剤の分散性試験は, HD 含有量によって評価するために坐剤の長さを均等に 2 分した上部と下部に分けて実施した. 製剤 A 及び B で調製した坐剤は, 上部及び下部からそれぞれ乾燥エキスが 0.1 g 含まれる坐剤重量 (製剤 A : 0.188 及び製剤 B : 0.146 g) を分取し, それらは THF (1→4) 50 mL によって 30 分間の攪拌後に遠心分離 (4°C, 20000×g, 20 min) し, 得られた上清を 0.45 µm フィルターでろ過して HPLC にて測定した.

3-4. RK 含有坐剤の長期安定性試験 長期安定性試験は, 常温 (25±3°C, 60±5% 相対湿度) 及

び冷蔵保存 (5±3°C, 33±10% 相対湿度) によって実施した. 常温条件は, インキュベータ M-260F (タイテック, 名古屋) 内に塩化コバルト六水和物を過飽和となるまで蒸留水に溶解させたものを遮光したデシケーター下部に設置した. また, 冷蔵保存は RK 含有坐剤を遮光処置した遠沈管内に入れ冷蔵庫内 (SANYO SMR-R70SKMB) [三洋電機 (株), 大阪] に保存した. RK 含有坐剤は, 1, 3 及び 6 カ月後に分散性試験と同様にサンプルを採取して含有される HD を HPLC 測定した.

3-5. RK 含有坐剤の放出試験 坐剤の放出試験は, Itoh らの reciprocating dialysis tube (RDT) 法¹⁹⁾を一部改良して理研式坐剤溶出試験器 HZ-21D (宮本理研工業株式会社, 大阪) を使用して実施した. 20 cm に切った透析膜 (Dialysis Membrane Size 27, 和光純薬工業, 大阪) は, あらかじめ精製水に浸し, 使用直前に 10 分間煮沸洗浄した後にエキス製剤又は坐剤を 1 個分入れて用いた. 試験液は 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), 試験液温度 37±0.5°C, 上下運動 30 rpm の条件下行った. 測定サンプルは, 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 及び 24 時間後に採取し, 採取後は直ちに同量の試験液を補充した. 採取したサンプル中の HD 及び GA 濃度は HPLC によって測定した. なお, われわれは RK 成分の坐剤基剤の放出特性を明らかにするために, 水溶性及び脂溶性成分として含量が最も多い成分である HD 及び GA を指標とした.²⁰⁾

4. 実験 2: 薬物動態学的評価のための動物実験

4-1. HD 及び HT 静脈内投与液, RK 懸濁液及び RK 含有坐剤の調製 HD 及び HT 静脈内投与液の調製方法は, DMSO : PG (1 : 1) 溶液によって 200 mg/mL に調製し, 投与直前に PG 及び生理食塩液にて希釈した. 尾静脈から投与した際の HD 最終濃度は 33.33 mg/mL とし 300 µL 投与した. 経口投与するための溶液は, 2 g 製剤 B を 7 mL 注射用水によってシリンジ内で溶解させた. なお, 製剤 A が坐剤として適切に調製できなかったことから, RK 含有坐剤による処置は BH のみとした.

4-2. 動物 Wistar 系雄性ラット (10 週齢, 200–300 g) は, 日本エスエルシー株式会社より購入した. 動物は, 室温 23±3°C 及び相対湿度 55±15% に維持された 12 時間明暗サイクルの環境下で 1 週間飼育した後に実験に供した. 前処置は薬物投

与の24時間前から絶食期間を経て使用した。すべてのラットは、採血するためにペントバルビタールナトリウム（初回：50 mg/kg, 維持：10 mg/kg/h）の腹腔内等投与による麻酔処置後にラット右頸静脈にヘパリンナトリウム 5000 unit/mL（持田製薬、東京）を生理食塩液で100倍希釈したものを充満させたポリエチレンチューブ INTRAMEDIC™ PE50 [日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京] を挿入した。静脈内投与 (intravenous administration; I.V.) 群は、HD 又は HT 溶液を尾静脈内より投与した。経口投与 (peroral administration; P.O.) 群は、RK 懸濁液を咽頭部の食道からゾンデチューブ [(有)フチガミ器械, 京都] を挿入して投与した。直腸内投与 (intrarectal administration; I.R.) 群は、坐剤を投与後24時間までアロンアルファ（東亜合成、東京）を用いて肛門を閉じた。なお、本研究における動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認（承認番号：H28027）を得て実施した。

4-3. 血液サンプリング I.V. 群の採血ポイントは、5, 30, 60, 90, 120, 180, 360 及び 540 分後に行った。P.O. 及び I.R. 群の採血ポイントは、投与後 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 及び 24 時間後に行った。採血は、右頸静脈のカニューレよりヘパリンナトリウムで処理したシリンジによって血液を 1 mL 採取し、直ちに同量の生理食塩液を体内に戻した。採血された血液は直ちに遠心分離 (4°C, 4000 rpm, 5 min) 後、血漿を採取し測定時まで凍結保存 (-80°C) した。

4-4. 血漿サンプルの調製 HPLC 測定するための血漿サンプルは、血漿 400 μ L, メタノール 800 μ L, 0.1 mg/mL I.S. 溶液 40 μ L を加えてボルテックスした後、遠心分離 (4°C, 20000 \times g, 20 min) によって得られた上清を Dry Thermo Unit [タイテック(株), 埼玉] を用いて窒素下で乾固させ、50% メタノール水溶液 [% (v/v)] 100 μ L に再溶解して測定した。

4-5. HPLC によるラット血漿中 HD 及び HT の同時定量 RK の体内移行性を評価するために用いた HD は、生体内の酵素によって一部 HT に分解^{21,22)} するため同時定量した (Supplementary material Fig. 2)。HPLC の条件は、移動相がメタノール/水/酢酸 [42/56/2 (v/v)]、測定波長が 280

nm, カラム温度が 40°C, 流速が 1.0 mL/min, 注入量が 50 μ L, I.S. が *p*-ヒドロキシ安息香酸メチル, カラムが Inertsil® ODS-3 (4.6 mm \times 150 mm, ϕ 5 μ m) を用いた。HD 及び HT の検量線 (0, 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 100, 200, 250, 400 及び 500 μ g/mL) の定量下限は、HD 及び HT が 0.112 及び 0.083 μ g/mL, Q.C. 試料によるバリデーションの結果は、Supplementary material Table 1 に示した。

4-6. 薬物動態学的解析手法 薬物動態 (PK) パラメータは、以下の項目を用いた。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、台形公式を用いて算出した。最大血中濃度 (C_{max}) 及び最大血中濃度到達時間 (T_{max}) は、実測値から求め生物学的利用能 (B.A.) 値は、0 から 24 時間後までの AUC を用いて算出した。なお、B.A. 値は HD のみ算出した。

5. 実験 3：ラットの異食行動に対する RK の有効性評価

5-1. モデルラットの作製及び坐剤投与量の決定

ラットは、嘔吐反射を起こさないが、CDDP 投与後の NV とラットの異食 (カオリン摂取) 行動に相関性が示されていることから、^{23,24)} 本研究では NV を評価するために CDDP 投与後のカオリン摂取量によってラットの異食行動を評価した。

Wistar ラットによる NV モデルラットは、3, 5 及び 10 mg/kg CDDP を腹腔内投与した後の通常飼料摂取量、カオリン摂取量、飲水量及び体重変化を 1 週間にわたり評価した。なお、5 及び 10 mg/kg シスプラチン投与は、死亡例やエサ摂取量が回復しない (data not shown) などから、モデルとしての妥当性を欠いたと判断してモデルラット作製の CDDP は 3 mg/kg に決定した。坐剤の直腸内投与は、通常飼料摂取量に影響したことから、通常飼料摂取量に影響しない坐剤サイズを検討するためにわれわれは 0.9 及び 1.35 cc コンテナを用いて RK を含まない H 基剤のみで作製した坐剤を CDDP 未処置ラットに投与した。1.35 cc サイズの坐剤は、著しく通常飼料摂取量等が低下したため本実験では 0.9 cc コンテナを使用した (data not shown)。また、この予備実験結果から観察期間は 5 日間とした。なお、本研究における動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認（承認番号：H28027 及び H29034）を得

て実施した。

5-2. NV 評価のための実験スケジュール及び評価方法 ラットの NV を評価するために、ケージ内にカオリン及び通常飼料箱を左右に設置し、ケージの床面は、食べ残したカオリン及び通常飼料を回収するために金網とキムタオルを設置した。カオリン飼料は Saito らの方法²⁵⁾を参考に作製した。カオリンにアラビアゴムを 5% (w/w) 配合させて通常飼料のように成型し、カオリン飼料の硬度は通常飼料と同等であった (data not shown)。

ラットは無作為に実験群を無処置の sham 群、3.0 mg/kg CDDP 投与した control 群、RK (製剤 B) 懸濁液を経口投与した 1 時間後に 3.0 mg/kg CDDP 投与した P.O. 群及び BH 坐剤を直腸内投与した 1 時間後に 3.0 mg/kg CDDP 投与した I.R. 群の 4 群に分けた。薬物の投与タイミングは、日本癌治療学会がん診療ガイドラインの制吐療法における制吐薬適正使用ガイドラインの予期性悪心嘔吐²⁾を参考にシスプラチン投与時 1 時間前の単回投与とした。なお、ラットは環境適用期間として CDDP 及び薬物投与 2 日前よりカオリン及び通常飼料の餌箱が設置された個別ケージで飼育し、1 日前に絶食させた後に実験に供した (Supplementary material Fig. 3)。観察期間は、5 日間とし 24 時間毎のカオリン、通常飼料、飲水量、体重変化を観察した。カオリン及び通常飼料の摂取量は、それぞれの飼料箱中残存量に恒量になるまで乾燥 (40°C, 48 h) させたカオリン及び通常飼料を含めた重量とした。なお、通常飼料摂取量を食欲、カオリン摂取量を悪心嘔吐としての指標として評価を行った。

5-3. NV 評価のためのサンプル採取及びサブスタンス P、セロトニン及びグレリン測定 NV 及び食欲改善効果を明らかにするために、脳脊髄液 (CSF)、血清中及び尿中サブスタンス P、CSF 及び血清中セロトニン及び血漿中の活性化されたグレリン (アシル化グレリン) を測定した。実験群は無処置の sham、control、P.O. 及び I.R. 群の 4 群に分けた。薬物投与 1 及び 5 日後に麻酔下のラットは、まず大槽穿刺によって CSF、下大静脈より採血した血液を血清及び血漿、膀胱圧迫によって尿を採取した。それぞれのサンプル保存や測定方法は、Substance P ELISA Kit (Cayman)、Serotonin ELISA Kit (アブカム、東京) 及び Active Ghrelin ELISA

kit [岩井化学薬品(株)、東京] の取扱い説明書に従った。なお、本研究における動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認 (承認番号: H28027 及び H29034) を得て実施した。

6. 統計学的解析 データは、平均値±標準誤差で表記した。データの比較は、2 群間の比較は Students *t*-test, 3 群間の比較は Tukey-Kramer test, 長期安定性試験結果は、0 ヶ月を基準とし Dunnett's test を実施した。差異は、 $p < 0.05$ で有意とした。

結 果

1. 製剤学的特徴 調製した RK 含有坐剤の硬度は、製剤 A 及び B 間並びに基剤 H 及び S 間で顕著な変化は観察されなかったが [Fig. 1(a)], 1/3 部の硬度は、AH 及び AS, BH 及び BS 群間で比較すると S 基剤で調製すると硬度が約 20% 程度低下した。一方、HD の含量均一性はすべての部位において製剤 A が 3.17 ± 0.00 – 3.44 ± 0.01 mg, 製剤 B が 4.29 ± 0.13 – 4.55 ± 0.07 mg であった [Fig. 1(b)]。長期安定性試験において、常温保存した RK 含有坐剤の HD 含量は、調製直 (0 ヶ月) 後の含量に比して 1 ヶ月後からすべての RK 含有坐剤群で約 10% の著しい低下を示し、その後の含量は 6 ヶ月まで低下しなかった。一方、冷蔵保存した RK 含有坐剤の HD 含量は、調製直 (0 ヶ月) 後の含量に比して 1 ヶ月後から約 10% の著しい低下を示し、6 ヶ月後には 0 ヶ月後に比較して約 20% 程度低下した。6 ヶ月後において、冷蔵保存した RK 含有坐剤中 HD 含量は、常温保存に比して全群において著しい低下を示した (Table 1)。

直腸吸収性を予測するための RDT 法による坐剤からの HD 及び GA 放出率を Fig. 2 に示した。製剤 A の HD 放出率は、3 から 24 時間後までの期間において、粉末単独群に比して AH 及び AS 群が著しく低かった [24 時間後: AH and AS: 63.8 ± 0.3 and $56.8 \pm 8.9\%$, BH and BS: 79.8 ± 0.2 and $74.9 \pm 3.8\%$, Fig. 2(a)]。製剤 B の HD 放出率は、12 から 24 時間後までの期間において、粉末単独群に比して BH 及び BS 群が著しく低かった [Fig. 2(a)]。一方、GA 放出率は製剤 A 及び B の粉末単独群に比して、どの坐剤群も顕著な変化は観察されなかつ

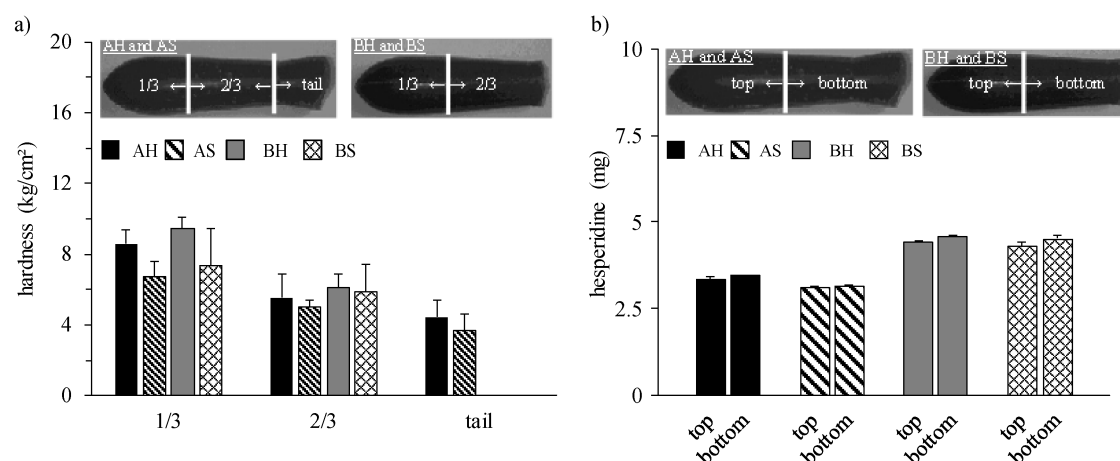


Fig. 1. Hardness and Content Uniformity Testing in Each Part of Rikkunshito Extract Suppository

a) Hardness and b) content uniformity testing. Black bar: AH; diagonal bar: AS; gray bar: BH; and shaded bar: BS groups. Values are shown as the mean \pm S.E.M. ($n=6$ respectively), not significant (Tukey's test).

Table 1. Amount of Hesperidin in Rikkunshito Extract Suppositories during Stability Test

	Storage type	Condition	Formulation	Storage period (month)			
				0	1	3	6
Hesperidin (%)	Constant temperature chamber	25±3°C 60±5%	AH	100.0±1.0	89.2±5.4*	89.4±2.4*	88.8±3.2*
			AS	100.0±0.8	94.9±1.8*	97.3±2.3*	92.8±2.0*
			BH	100.0±0.9	90.0±11.6*	90.0±4.4*	87.5±1.2*
			BS	100.0±1.7	91.4±1.3*	91.2±3.1*	89.5±0.4*
	In refrigerator	5±3°C 33±10%	AH		90.0±1.3*	86.8±1.1*	82.6±1.4*,#
			AS		104.4±2.2*	95.0±3.0*	87.0±0.6*,#
			BH		87.4±0.6*	82.6±1.9*	78.6±3.0*,#
			BS		88.0±1.3*	83.3±2.3*	77.8±1.8*,#

Values are shown as the mean \pm S.E.M. ($n=6$ respectively). * $p<0.05$ vs. 0 month by identical series (Dunnett's test). # $p<0.05$ vs. formulation A or B series (Tukey's test).

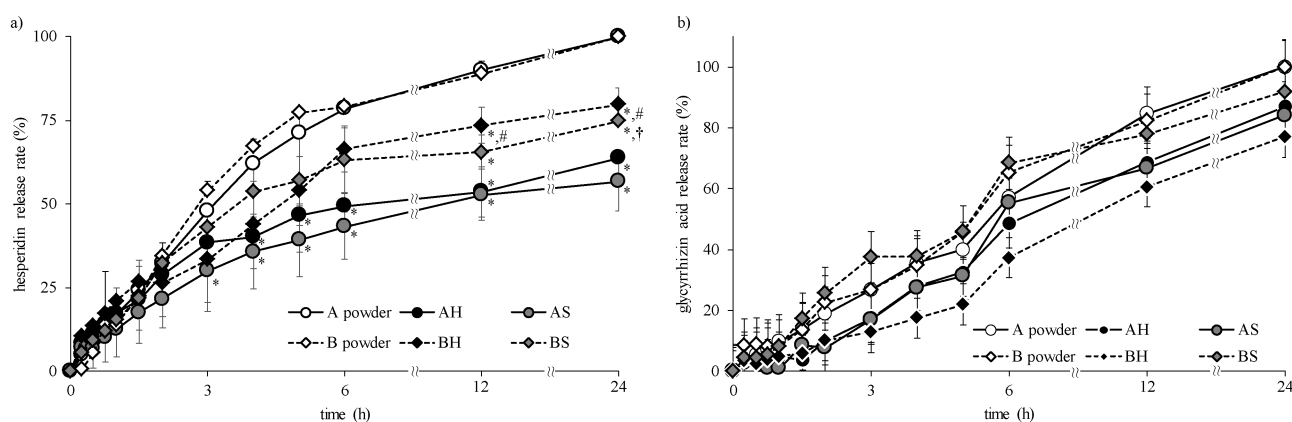


Fig. 2. Release Profile of Rikkunshito Extract Suppository by RDT Method

a) Hesperidin release rate and b) glycyrrhizin acid release rate. Open circle: crushed medicine, A powder only; closed circle: AH; gray circle: AS; open diamond: crushed medicine, B powder only; closed diamond: BH; and gray diamond: BS groups. Values are shown as the mean \pm S.E.M. ($n=3$ respectively), * $p<0.05$ vs. A or B powder, # $p<0.05$ vs. AH, and * $p<0.05$ vs. AS group (Tukey's test).

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of Hesperidin and Hesperetin in Rats

Group		C_{\max}	T_{\max}	$BA_{0-24\text{ h}}$
		($\mu\text{g/mL}$)	(h)	(%)
HD	P.O.	110.8 ± 2.6	1.3 ± 1.0	31.7 ± 3.5
	I.R.	$237.4 \pm 5.1^*$	0.8 ± 0.2	44.6 ± 2.3
HT	P.O.	161.1 ± 8.4	0.8 ± 0.2	
	I.R.	$45.2 \pm 1.8^*$	0.8 ± 0.3	

Values are shown as the mean \pm S.E.M. ($n=3$ respectively). $*p<0.05$ vs. P.O. group (t -test).

た [24 時間後: AH and AS: 87.0 ± 17.0 and $84.2 \pm 12.7\%$, BH and BS: 77.1 ± 3.2 and $91.9 \pm 2.1\%$, Fig. 2(b)].

2. ラットによる PK パラメータ 製剤 A は, 1 個の坐剤コンテナに充填する際に尾部が形成されることや, 製剤学的特徴の結果より動物実験で使用する坐剤は BH のみとした. HD 及び HT の PK パラメータは, Table 2 に示した. I.R. 群の HD のパラメータは, P.O. 群に比べて C_{\max} 値が著しく高く, T_{\max} 値は小さい傾向を示した. I.R. 群の BA 値は P.O. 群と同等であった. 一方, HT のパラメータ算出は, 製剤 B 中に HT は含まれていないため, C_{\max} 及び T_{\max} 値のみとした. I.R. 群の C_{\max} 値は P.O. 群と比較して著しく低く, T_{\max} 値は同等であった.

3. ラットの摂餌及びカオリン摂取量による NV 反応への有効性評価 Control 群の通常飼料摂取

量は, sham 群に比べて薬物投与後の実験期間中著しく低かった [sham group: 16.7 ± 1.6 – 20.4 ± 0.6 g vs. control group: 5.9 ± 1.8 – 9.8 ± 2.4 g, $p<0.05$, Fig. 3(a)]. P.O. 及び I.R. 群の通常飼料摂取量は, control 群に比べて 3 日後から顕著に高く 5 日後には sham 群 [sham: 19.6 ± 0.8 g vs. P.O.: 19.8 ± 1.1 and I.R.: 18.9 ± 0.9 g, $p<0.05$, Fig. 3(a)] と同等であった. 一方, control 群のカオリン摂取量は, sham 群と比較して 1 日目に著しく高かった [sham group: 0.9 ± 0.3 vs. control group: 6.9 ± 1.1 g, $p<0.05$, Fig. 3(b)]. P.O. 及び I.R. 群のカオリン摂取量は, 1 日目の control 群に比べて著しく低かった [P.O.: 2.5 ± 0.5 and I.R.: 1.8 ± 0.3 g, $p<0.05$, Fig. 3(b)]. 薬物投与後 1 日目のサブスタンス P, セロトニン及びグレリン値は, Fig. 4 に示した. Control 群のサブスタンス P 及びセロトニン値は, sham 群と比較して有意に高く, グレリン濃度は同等であった. P.O. 及び I.R. 群の血清, 尿及び CSF 中サブスタンス P 及びセロトニン値は, control 群に比べて著しく低く sham 群と同等であった. P.O. 及び I.R. 群の血漿中グレリン値は著しく上昇した (control: 30.6 ± 3.0 vs. P.O.: 48.8 ± 4.4 and I.R.: 51.4 ± 7.0 fmol/mL). P.O. 及び I.R. 群のサブスタンス P, セロトニン及びグレリン値は顕著な差を示さなかった.

考 察

本研究は, RK 含有坐剤の調製方法の検討を物理

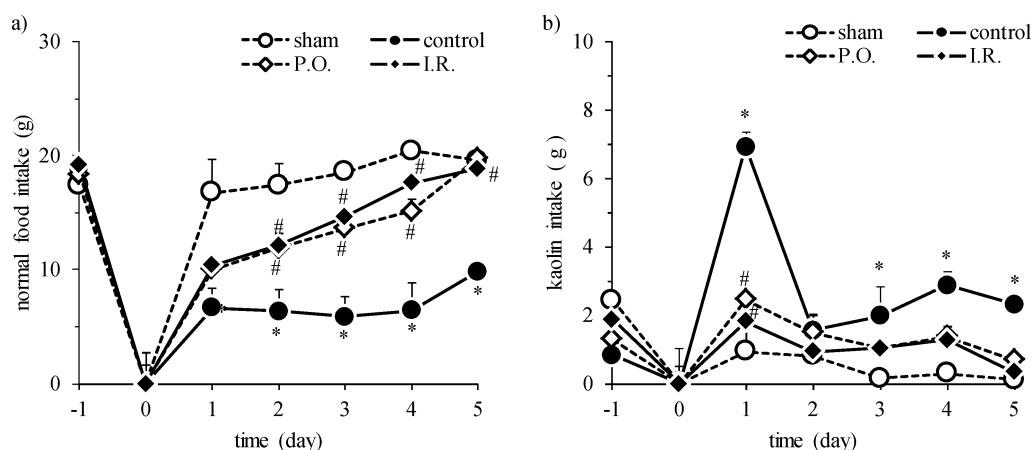


Fig. 3. Effect of Normal Food and Kaolin Intake along with Rikkunshito Extract Suppository on Cisplatin-induced Nausea and Vomiting and Anorexia in Rats

a) Assessment of appetite after normal food intake and b) assessment of nausea and vomiting after kaolin intake. Open circle: sham; closed circle: control; open diamond: P.O.; and closed diamond: I.R. groups. Values are shown as the mean \pm S.E.M. ($n=3$ respectively). $*p<0.05$ vs. sham and $^{\#}p<0.05$ vs. control group (Tukey's test).

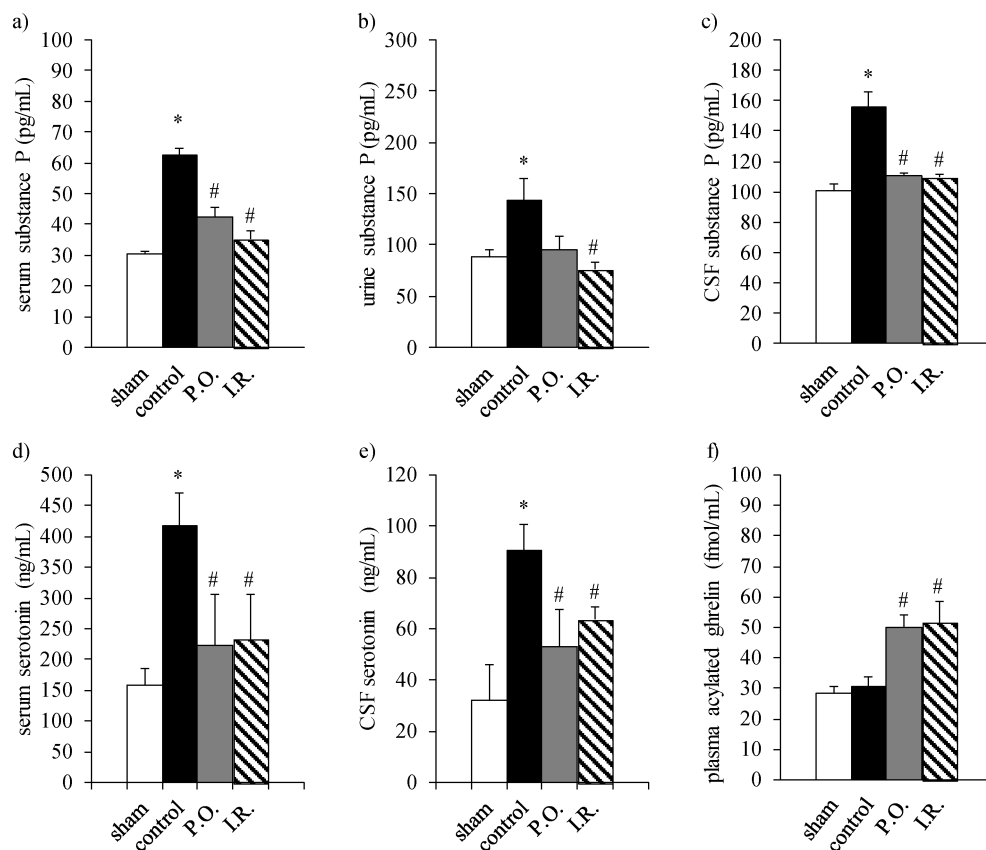


Fig. 4. Effect of Rikkunshito Extract Suppository on Substance P, Serotonin, and Ghrelin Levels

a) Serum substance P, b) urine substance P, c) CSF substance P, d) serum serotonin, e) CSF serotonin, and f) plasma acylated ghrelin. White bar: sham; black bar: control; gray bar: P.O.; and diagonal bar: I.R. groups. Values are shown as the mean \pm S.E.M. ($n=3$ respectively), * $p<0.05$ vs. sham, # $p<0.05$ vs. control group (Tukey's test).

化学的側面から評価し、経口投与との生物学的同等性をPKパラメータやNVに対する有効性によって評価した。

われわれは、現場で使用が予想される坐剤基剤として油脂性基剤を選択し利用範囲の広い一般的な基剤としてH基剤、配合する主薬の分布性に優れるなどの特徴を有するS基剤を選択した。われわれが調製したRK含有坐剤の硬度は、 $3.6\text{--}9.5\text{ kg/cm}^2$ であった。市販されている坐剤硬度は、 $2\text{--}20\text{ kg/cm}^2$ ²⁶⁾であることから、使用時の中折れの心配はないと考えられた [Fig. 1(a)]。加えて、用いた坐剤調製法は均一に作製可能であったが [Fig. 1(b)]、製剤Bは製剤Aと比較するとHD含量が高かった。それぞれのRKのHD含量は、第十七改正薬局方の六君子湯エキス定量法に規定されている濃度範囲 ($16\text{--}48\text{ mg}$) 内であったが、本実験で使用した製剤Bは製剤Aより高いことに由来した (data not shown)。われわれは、漢方製剤が複数の生薬を含有している点に注目して、その成分を水溶性と

脂溶性成分に大別し、それぞれの成分で最も含量が多いHD及びGA²⁰⁾を選択してRKの薬物吸収や体内動態の特徴付けを行った。坐剤化した製剤A及びBのHD放出率は、3時間までそれぞれのRK製剤と同等の傾向を示したが、3時間以降の放出率は製剤Aが基剤によらず約50%、製剤Bが約75%に留まった [Fig. 2(a)]。この要因は、H-15及びS-55基剤の融点は、 $33.5\text{--}35^\circ\text{C}$ 付近であり (坐剤基剤ホスコ®H-15及びS-55医薬品添付文書より)、放出試験開始とともに坐剤は、直ちに軟化、融解して薬物が放出されたためと考えられた。そして、製剤Aの放出率が製剤Bに比べて低かったのは、製剤Aのみに含有するショ糖脂肪酸エステル界面活性作用²⁷⁾に起因すると考え、製剤A及びBを水溶性基剤のポリエチレングリコールにて調製したところ、その坐剤の放出率は、24時間後に 55.6 ± 5.6 及び $68.3\pm 1.1\%$ で、製剤Aは製剤Bに比べて著しく低下した ($p<0.05$)。ゆえに、製剤Aの放出率が低値を示した理由はショ糖脂肪酸エステルによる界

面活性作用によって基剤との相互作用が増加したと推察された。一方、GA 放出率は HD の放出挙動と比べて緩徐な放出挙動を示したが、それぞれの RK 製剤に比べて同様の傾向を示したことから添加物のような影響を受けずに成分の物理化学的性質によって放出性が決まると考えられた。坐剤のような院内製剤を作製する際は、医薬品添加物によって有効性に差異を生じることを考慮されたい。

われわれは、生物学的同等性を評価するための PK パラメータ算出や NV 有効性のための研究は、2.25 cc 坐剤コンテナに尾部の形成なく 1 つの坐剤として作製可能で硬度や HD 放出性の良好であった BH を選択した。坐剤の直腸内投与は、経口投与と比べると HD の BA 値は同等であったが C_{\max} 及び T_{\max} 値から HD の吸収は多くかつ早く吸収される特徴を有した (Table 2)。一方、HT の C_{\max} 値は、経口投与が直腸内投与に比べて 3.5 倍高かった。経口投与の場合、HD は腸内細菌などが有する酵素 (α -rhamnosidase 又は β -glucosidase 又は *endo*- β -glucosidase) によって HT に分解されて吸収²⁸⁾されるが、直腸内投与の場合、HD は分解を受けずに吸収²⁹⁾されることを示唆した。しかしながら、経口投与の場合に HD が血中に検出されたことは、HD から HT への分解が一部に限られ、HD のまま吸収されている可能性も考えられた。同様に、直腸内投与の場合に HT が血中に検出されたことは、HD から HT へ分解されて吸収されている可能性を示唆した。

抗がん剤による NV 発現は、化学的刺激が第 4 脳室の最後野に存在する化学受容器引き金帯 (chemoreceptor trigger zone; CTZ) を直接刺激して嘔吐中枢へ刺激伝達される経路や消化管に存在する腸クロム親和性細胞からのセロトニン分泌等による上行性の CTZ を刺激する経路などがある。われわれは生物学手同等性を強固にサポートするために、CTZ に存在するサブスタンス P を介するニューキノロン 1 受容体及びセロトニンを介するセロトニン 3 受容体の経路について調査し、食欲増進ホルモンのグレリンの活性化について評価した。使用したモデルラットは、Malik や Saeki らと同様にカオリン摂取の増加を示したことから NV 状態が再現できたと考えられた。^{30,31)} また、CDDP によるカオリン摂食行動はサブスタンス P が関与し、^{30,31)} RK は経口

及び直腸内投与に限らずに同等の効果を示すことが明らかとなった。一般的に、制吐作用を示すためには薬物の中枢移行が必要であるが、^{32,33)} RK は CSF 中サブスタンス P やセロトニンを低下させていたことから、中枢移行によって抑制的に作用したと考えられ、その効果は投与経路に依存しないことを明らかにした [Figs. 4(c) and (e)]。また、抗がん剤による食欲不振は、セロトニンによって食欲増進ホルモンのグレリン分泌が抑制されることで引き起こされるが、RK は投与経路にかかわらず血中及び CSF セロトニン値を低下し、血中グレリン値を高めたことは [Figs. 4(d)–(f)]、RK にセロトニン受容体結合活性はないことが報告¹³⁾されていることから、セロトニンの受容体阻害作用でなく分泌メカニズムそのものに作用する可能性が高いことが示唆された。最後に、前述した投与経路の違いが示した HD 及び HT の一部の吸収メカニズムの違いは、有効性に関連しなかったが、今後は HD や HT の吸収タイミングが影響因子について詳しく調査する必要があると考えられた。以上のことから、本研究は作製した RK 含有坐剤が製剤 B を基剤 H によって調製することで製剤学的に安定かつ、経口投与と等しい生物学的同等性を薬物動態学並びに薬理学的に証明し、これら特徴を踏まえた院内製剤の情報を提供するものであった。

謝辞 本研究に携わりご協力並びにご尽力頂いた研究室諸氏に感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

Supplementary materials この論文のオンラインに Supplementary materials (電子付録) を含んでいる。

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare., “Summary of Vital Statistics 2016,” Table 7 Number of deaths and death rates (per 100000 population) by sex and causes (the condensed list of causes of death for Japan): (http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei16/dl/11_h7.pdf), cited 27 January,

- 2018.
- 2) Japan Society of Clinical Oncology, “Clinical Practice Guideline for Antiemesis.”: <http://jsco-cpg.jp/guideline/29.html>, cited 27 January, 2018.
 - 3) Hainsworth J. D., Hesketh P. J., *Semin. Oncol.*, **19**, 14–19 (1992).
 - 4) Martin M., *Oncology*, **53** (Suppl. 1), 26–31 (1996).
 - 5) Tomono H., Ito Y., Watanabe T., *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **33**, 1129–1131 (2006).
 - 6) Okuno S., Hirayama K., Inoue J., Yamasaki K., Kawahara R., Yokoi T., Saeki N., Funato T., *Jpn. J. Anesthesiol.*, **57**, 1502–1509 (2008).
 - 7) Ohno T., Yanai M., Ando H., Toyomasu Y., Ogawa A., Morita H., Ogata K., Mochiki E., Asao T., Kuwano H., *Clin. Exp. Gastroenterol.*, **4**, 291–296 (2011).
 - 8) Seike J., Sawada T., Kawakita N., Yamamoto Y., Yuasa Y., Yamai H., Takachi H., Yoshida T., Tangoku A., *Int. J. Surg. Oncol.*, 715623 (2011).
 - 9) Morimoto Y., Watanabe S., Michihara S., Norimoto H., Nakajima K., Hiura M., Okubo T., *Kampo Med.*, **64**, 150–159 (2013).
 - 10) Tominaga K., Kido T., Ochi M., Sadakane C., Mase A., Okazaki H., Yamagami H., Tanigawa T., Watanabe K., Watanabe T., Fujiwara Y., Oshitani N., Arakawa T., *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 248481 (2011).
 - 11) Kawahara H., Mitani Y., Nomura M., Nose K., Yoneda A., Hasegawa T., Kubota A., Fukuzawa M., *Pediatr. Surg. Int.*, **25**, 987–990 (2009).
 - 12) Hayakawa T., Arakawa T., Kase Y., Akiyama S., Ishige A., Takeda S., Sasaki H., Uno H., Fukuda T., Higuchi K., Kobayashi K., *Drugs Exp. Clin. Res.*, **25**, 211–218 (1999).
 - 13) Takeda H., Sadakane C., Hattori T., Katsurada T., Ohkawara T., Nagai K., Asaka M., *Gastroenterology*, **134**, 2004–2013 (2008).
 - 14) Fujitsuka N., Asakawa A., Hayashi M., Sameshima M., Amitani H., Kojima S., Fujimiya M., Inui A., *Biol. Psychiatry*, **65**, 748–759 (2009).
 - 15) Matsumura T., Arai M., Yonemitsu Y., Maruoka D., Tanaka T., Suzuki T., Yoshikawa M., Imazeki F., Yokosuka O., *J. Gastroenterol.*, **45**, 300–307 (2010).
 - 16) Takeda H., Muto S., Hattori T., Sadakane C., Tsuchiya K., Katsurada T., Ohkawara T., Ori-date N., Asaka M., *Endocrinology*, **151**, 244–252 (2010).
 - 17) Yakabi K., Kurosawa S., Tamai M., Yuzurihara M., Nahata M., Ohno S., Ro S., Kato S., Aoyama T., Sakurada T., Takabayashi H., Hattori T., *Regul. Pept.*, **161**, 97–105 (2010).
 - 18) Yakabi K., Sadakane C., Noguchi M., Ohno S., Ro S., Chinen K., Aoyama T., Sakurada T., Takabayashi H., Hattori T., *Endocrinology*, **151**, 3773–3782 (2010).
 - 19) Itoh S., Teraoka N., Matsuda T., Okamoto K., Takagi T., Oo C., Danny Kao H., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **64**, 393–398 (2006).
 - 20) Kitagawa H., Munekage M., Matsumoto T., Sadakane C., Fukutake M., Aoki K., Watanabe J., Maemura K., Hattori T., Kase Y., Uezono Y., Inui A., Hanazaki K., *PLoS One*, **10**, e0133159 (2015).
 - 21) Matsumoto H., Ikoma Y., Sugiura M., Yano M., Hasegawa Y., *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6653–6659 (2004).
 - 22) Booth A. N., Jones F. T., Deeds F., *J. Biol. Chem.*, **230**, 661–668 (1958).
 - 23) Takeda N., Hasegawa S., Morita M., Matsunaga T., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **45**, 817–821 (1993).
 - 24) Saito R., Takano Y., *Yakurigaku Zasshi*, **127**, 461–466 (2006).
 - 25) Murata I., Arai N., Fukushima A., Saito A., Inoue Y., Kimura M., Kanamoto I., *Yakugaku Zasshi*, **135**, 1049–1055 (2015).
 - 26) Yamauchi H., Sugie S., *J. Oleo Sci.*, **2**, 697–704 (2002).
 - 27) Tashiro S., *Obstetrical and Gynecological Therapy*, **95**, 560–566 (2007).
 - 28) Malik N. M., Liu Y. L., Cole N., Sanger G. J., Andrews P. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **555**, 164–173 (2007).
 - 29) Fujita T., Kawase A., Nishijima N., Masuda M., Matsuda H., Iwaki M., *Shoyakugaku Zasshi*, **62**, 8–14 (2008).
 - 30) Saeki M., Sakai M., Saito R., Kubota H., Ariumi H., Takano Y., Yamatodani A., Kamiya H., *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 359–362 (2001).
 - 31) Darmani N. A., Wang Y., Abad J., Ray A. P., Thrush G. R., Ramirez J., *Brain Res.*

- 1214**, 58–72 (2008).
- 32) Rupniak N. M., Tattersall F. D., Williams A. R., Rycroft W., Carlson E. J., Cascieri M. A., Sadowski S., Ber E., Hale J. J., Mills S. G., MacCoss M., Seward E., Huscroft I., Owen S., Swain C. J., Hill R. G., Hargreaves R. J., *Eur. J. Pharmacol.*, **326**, 201–209 (1997).
- 33) Tattersall F. D., Rycroft W., Francis B., Pearce D., Merchant K., MacLeod A. M., Ladduwahetty T., Keown L., Swain C., Baker R., Cascieri M., Ber E., Metzger J., MacIntyre D. E., Hill R. G., Hargreaves R. J., *Neuropharmacology*, **35**, 1121–1129 (1996).