

肝底護治療薬グリチルリチンの新しい製剤化の試み

古閑健二郎,^{*,a} 河島 進,^a 芝田信人,^b 高田寛治,^c

Novel Formulations of a Liver Protection Drug Glycyrrhizin

Kenjiro KOGA,^{*,a} Susumu KAWASHIMA,^a Nobuhito SHIBATA,^b and Kanji TAKADA^c

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Ho-3, Kanagawa-machi, Kanazawa City 920-1181, Japan, ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Kodo, Kyotanabe City, Kyoto 610-0395, Japan and ^cKyoto Pharmaceutical University, 5 Misasagi Nakauchi-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received January 30, 2007; Accepted April 27, 2007)

In Japan, glycyrrhizin injections have been used as a therapeutic drug for allergy inflammation since 1948 and for chronic hepatitis since 1979. A 20 ml injection of glycyrrhizin contains 53 mg of monoammonium glycyrrhizinate (40 mg as glycyrrhizin acid), 400 mg of glycine, and 20 mg of L-cysteine. Patients receiving glycyrrhizin injections two or three times per week are forced to accept a decline in quality of life. Because administering glycyrrhizin by injection has some disadvantages, many researchers have systematically searched for novel glycyrrhizin formulations that can be administered through oral, rectal, intranasal, and subcutaneous routes. There are two problems, however, in developing new formulations: (1) glycyrrhizin has low membrane permeability and is thus poorly absorbed, and (2) highly concentrated glycyrrhizin readily forms gels in aqueous solutions. Here, we describe the utility of glycyrrhizin formulations prepared in safe solubility agents and absorption-enhancing agents, as assessed in animal experiments. We also discuss pharmaceutical issues in developing various glycyrrhizin formulations. In the near future, convenient pharmaceutical preparations of glycyrrhizin will be developed for chronic hepatitis patients who require glycyrrhizin therapy.

Key words—glycyrrhizin; chronic hepatitis; subcutaneous; rectal; intranasal; formulation

1. 慢性肝疾患治療の現状

慢性肝疾患, 特にC型慢性肝炎治療の第一選択薬はインターフェロン(IFN)であり, 保険適用された1992年から慢性肝疾患患者におけるIFN治療の症例数が増えている。その治療結果から得られたエビデンスに基づき, 患者の状態に合わせた投与量, 投与期間などのIFN治療法が確立されつつある。さらにグアニン枯渇化によるウイルス合成阻害作用及びRNAポリメラーゼ阻害作用によるウイルス合成障害作用を持つリバビリン¹⁾にIFNの効果を高める報告²⁾がなされてから, 患者の年齢あるいは合併症などの状態によりIFN単独あるいはリバビリンとの併用条件を設定することで治療成果を高めている。今日では, IFNにポリエチレングリコールを結合させることによりIFNの活性を保ちなが

ら血液中からの消失半減期を延長させたペグ・インターフェロン(PEG-IFN)も保険適用され, 患者への注射回数を減らすことが可能となり, さらに副作用の軽減も加わり患者のQuality of Life(QOL)の改善にも役立っている。

臨床の場でIFNが有益に活用されてきたことで, C型慢性肝炎に対するIFN治療の効果判定, ウイルス量又はserotypeによる治療効果予測, 症例に応じた治療法の選択などが判り易くなってきた。³⁾しかし, hepatitis C virus(HCV)のRNAが陰性化する確率(陰性化率)は患者の保持ウイルスのタイプにおいて著しい差があり, 治療成績も一概に評価できない。例えば, IFN- α -2aの24週間投与では, genotype 2aでは陰性化率が21例中14例の67%であったのに対し, genotype 1bでは69例中14例の20%であったという報告⁴⁾がある。またIFN- α -2aを6MU, 2週間連続投与後, 引き続き週3回22週間投与では, genotype 2a, 2bでは陰性化率が7例中4例の57%であったのに対して, genotype 1bで

^a北陸大学薬学部(〒920-1181 金沢市金川町ホ3), ^b同志社女子大学薬学部(〒610-0395 京都府京田辺市興戸), ^c京都薬科大学(〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5)
*e-mail: k-koga@hokuriku-u.ac.jp

は 24 例中 6 例の 25%であったという報告³⁾もある。陰性化率が低い genotype 1b に対してはリバビリンを併用することで著効率の高い向上が得られている。Genotype 1b でウイルス量が 100 KIU/ml 以上の患者に対する陰性化率は、PEG-IFN- α -2a 180 μ g の 48 週間投与では 16%、IFN- α -2b+リバビリン 24 週間投与では 20–30%、PEG-IFN- α -2b+リバビリン 48 週間投与では 48%であったという報告⁴⁾があり、治療効果は徐々に改善されてきた。ただし、リバビリン併用の場合、年齢等の患者背景、合併症、副作用等を考慮する必要があり、この併用が禁忌となる事項もこの報告に記されている。IFN が使用できない患者あるいは IFN 無効患者群に対しては、他の治療法に切り替えられる。具体的には、薬物療法ではグリチルリチン製剤（主成分：グリチルリチン酸モノアンモニウム塩、GZ-NH₄）、ウルソ製剤（主成分：ウルソデオキシコール酸、UDCA）などの肝庇護薬の投与である。また、薬物療法以外として瀉血療法等もある。今後は新規抗ウイルス薬の更なる進展も期待されるが、肝機能を安定化させ肝硬変、肝細胞癌への進展を抑えるために、肝庇護薬による治療が現在も多くの患者に継続されている。

2. 肝庇護療法の重要性

C 型慢性肝炎治療に対する治療法が種々のエビデンスに基づき、マニュアル化される一方で、IFN 治療により HCV の RNA の陰性化を達成できない患者に対する他剤療法についても今後マニュアル化する必要がある。本来、C 型慢性肝炎治療はウイルスを消失させる、あるいは alanine aminotransferase (ALT) 値を抑えるという肝機能の改善だけでなく、長年の経過により発生する可能性の高い肝硬変、肝細胞癌への進展を抑制する必要がある。例えば、C 型慢性肝炎では、ALT 値が正常値の 1.5 倍未満で進行した患者の肝硬変移行率が 16.7%であったのに対して、その 1.5 倍以上で維持された患者の 92.3%が 4–8 年の間に肝硬変に移行したことが報告されている。⁵⁾ また肝線維化の認められる症例においては、ALT 値を極力正常に維持しなければ高い確率で肝硬変・肝細胞癌に進行することも報告されている。^{6,7)} したがって、肝機能の指標となる ALT 値を正常に維持するための治療法が必要であり、IFN の使用ができない患者あるいは IFN が無

効な患者に対しては、今日、肝庇護薬であるグリチルリチン製剤及びウルソ製剤の処方が必要な役割を担っている。

グリチルリチン酸 (GZ) は肝細胞膜に作用することで肝細胞外へのトランスアミナーゼの流出を抑制するトランスアミナーゼ低下作用、細胞保護作用、抗ウイルス作用、免疫系に対する作用などを有することが総説としてまとめられている。⁸⁾ 今日では、GZ-NH₄ 注射剤の添付文書に「慢性肝疾患に対しては、1 日 1 回 40–60 ml を静脈内に注射又は点滴静注する。年齢、症状により適宜増減する。なお、増量する場合は 1 日 100 ml を限度とする。」と記されており、週に 2–3 回静脈内に持続注入されるケースが多い。GZ-NH₄ の効果に対して、強力ネオミノファーゲンシー (SNMC) 投与群の肝発癌率が 7%であったという結果に対して、非投与群の肝発癌率が 12%と増大したことが報告された。⁹⁾ 同様に UDCA についても投与群と非投与群との比較で投与群が有意に発癌率の低いことが報告されている。¹⁰⁾ 国内のみならず世界的にみて、C 型慢性肝炎患者が増加傾向にある今日においては、ALT 値を指標とする肝庇護薬による治療の 1 種としてグリチルリチン製剤の長期投与は欠くことができない治療法である。

3. グリチルリチン市販品の問題点

グリチルリチン製剤の治療を受けるために、患者は週 2–3 回通院する必要が生じ、時間的な拘束を受ける。かつ注射による疼痛あるいは投与部位における皮膚・血管の硬化等の組織障害の問題もある。医療サイドからみても針刺し事故の危険性があり、HCV 感染の危険性もある。これらの不利益に対して現行 GZ 静脈内注射剤の代替新剤形の開発が望まれている。患者による自己投与が可能な製剤を前提とした場合、患者の生活において QOL の低下を引き起こし難い剤形として、経口剤が理想となる。経口剤とするためには、消化管内における薬物の安定性並びに良好な消化管からの吸収性が保証されなければならない。さらに初回通過効果が少なく、治療効果を持続させるために 1 日当たりの投与量及び投与回数の少ないことが望ましい。ラットによる GZ の吸収実験において 500 mg/kg という高用量 GZ を経口投与した場合、循環血液中に GZ が検出されたという報告¹¹⁾はあるが、ラットに 2 あるいは 10

mg/kg の投与量で経口投与したとき、1 時間後に各々 0.2 及び 0.4 $\mu\text{g/ml}$ の血漿中 GZ 濃度を示したが、2 時間以降には全く検出しなかったことが報告されている。¹²⁾ 本来、GZ は消化管から吸収され難いため、経口投与では ALT を指標とした肝機能改善に対してほとんど薬効がないとされている。¹³⁾ 臨床での GZ の吸収及び薬効の検討において、健常人 5 名にグリチロン錠を 4 錠 (GZ として 100 mg) 投与したときに、血液中に GZ は検出されなかったと報告されている。¹⁴⁾ また健常人にグリチロン錠を 1 日 3 回、1 回につき 3 錠 (GZ として 75 mg) を 4 週間連続で経口投与したとき、血清中に GZ は検出されず、代謝物であるグリチルレチン酸が 0-1.6 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で検出されている。¹⁵⁾ この GZ が血液中に検出されない理由の 1 つである GZ の腸管あるいは肝臓での代謝については Ploeger ら¹⁶⁾ により詳細に総説として記されている。また、Ploeger ら¹⁶⁾ の報告には記載されていないが、GZ の消化管からの吸収が悪い要因の 1 つとして腸管に存在する排泄系のトランスポーターの関与が示唆される。そのトランスポーターは多剤耐性型輸送トランスポータータンパク質の 1 つである MRP2 (ABCC2) であり、肝臓に発現しているこのトランスポーターの基質として GZ が認識されることは既に知られている。¹⁷⁾ 近年、この MRP2 が小腸の上皮細胞に発現していることが報告された。¹⁸⁾ GZ が腸管に発現している MRP2 の基質としても認識されるとすれば、消化管の管腔側に輸送されることが予測される。GZ の消化管輸送において、MRP2 を介しての輸送動態に関する報告例は見受けられないが、有機アニオン系薬物であるパラアミノ馬尿酸¹⁹⁾ 及びフェノールスルフォンフタレイン²⁰⁾ が腸管に発現している MRP2 を介して管腔側に輸送されることが報告されたことから、GZ の腸管における膜透過性が低い理由として、この MRP2 が関与しているかもしれない。

経口剤以外に実用性の高い剤形として、坐剤、点鼻剤、皮下投与製剤などが考えられる。新規 GZ 製剤の設計に際しては、2 種の問題点を考慮する必要がある。第 1 点は、GZ の性質として、消化管からの膜透過性が低いこと及び腸内細菌等により GZ がグリチルレチン酸に分解され易いことである。^{21,22)} この問題は、経口剤を調製するときに製剤学的な工

夫が要求される。特に消化管からの吸収を臨床的に有効なレベルまで促進するためには膜透過性を亢進する吸収促進剤の併用が必要となろう。第 2 点は、高濃度 GZ 溶液調製時の冷暗所保存により GZ 溶液が容易にゲル化する点が問題となる。性状変化を受け難い高濃度の GZ 製剤の安全かつ簡易な調製法の開発が期待されている。

4. 経口剤としての有用性

注射剤に変わる GZ の新規経口製剤として、消化管での安定性及び消化管粘膜からの膜透過性を高めた処方化検討が数多く行われてきた。その一例として、吸収促進剤にカプリン酸あるいはカプリン酸ナトリウムを用い、可溶化剤としてプロピレングリコール及びポリエチレングリコール 400 を用いた GZ 製剤がある。この製剤をビーグル犬に経口投与 (50 mg/kg) したとき、投与 4 時間後に最高血漿中 GZ 濃度 18 $\mu\text{g/ml}$ を示し、その生物学的利用率 (BA) は 6.0%であった。²³⁾ GZ の市販錠をビーグル犬に経口投与したときの BA が 0.2%であった結果と比較すると、この製剤の有用性が示唆される。その他、GZ に脂肪酸グリセリドを配合し、腸溶性皮膚膜で被覆することを特徴とした製剤で、ラット十二指腸内に投与 (20 mg/kg) 30 分後に 13.9 $\mu\text{g/ml}$ を示した報告²⁴⁾ などがある。経口 GZ 製剤の有用性が示されてはいるものの、吸収促進剤を用いた製剤による臨床報告例はなく、実用化には至っていない。

経口剤の新しい試みとして、消化管内圧制御型大腸デリバリーカプセル製剤 (PCDC) の有用性を検討した。PCDC は水不溶性膜からなるカプセル剤であり、大腸に到達後、消化管の蠕動に起因する大腸内圧の上昇を感知して崩壊することによりカプセル内部の薬物を放出する製剤である。GZ の大腸デリバリーを試みた根拠は、in situ closed loop 法による GZ の吸収実験から、マウスの空腸、回腸及び大腸において GZ 投与 (50 mg/kg) 1 時間後の血漿中 GZ 濃度がそれぞれ約 7, 5 及び 22 $\mu\text{g/ml}$ であり、²⁵⁾ GZ の吸収部位を大腸に標的化することで高い BA が期待できることが示されたことによる。したがって、PCDC は経口剤でありながら、坐剤と同程度の BA をもたらすことを想定した製剤である。PCDC 以前の GZ 経口剤の処方検討においては、いずれの研究においても吸収促進剤としてカプリン酸あるいはカプリン酸ナトリウムを用いていたこと

から、PCDC 処方検討に際しては吸収促進剤を用いず可溶化剤として安全性の担保されたポリソルベート 80 及びヨーロッパ薬局方に収載されている Labrasol (caprylocaproyl macrogolglycerides) を選択した。200 mg の GZ カリウム塩 (GZ-2K) を含有する PCDC をビーグル犬に経口投与した結果、山本らのビーグル犬 (GZ 50 mg/kg で投与) による実験結果²³⁾と比べて、同等の血漿中 GZ 濃度-時間曲線下面積 (AUC) 及び BA をもたらした (Table 1)。²⁶⁾ この結果はカプリン酸あるいはカプリン酸ナトリウムを用いなくても GZ を体内に吸収させることを実証した。GZ 経口剤の投与後における体内動態パラメータを Table 1 にまとめて示す。以上の結果より、経口 GZ 剤の設計に際しては、カプリン酸ナトリウムなどの吸収促進剤を使用するか、あるいは大腸指向性の高い製剤とすることにより可能になると考えられる。

5. 坐剤としての有用性

坐剤は、肝初回通過効果を回避できるという点で、経口剤よりも有用である可能性が高い。藤岡ら²⁷⁾はウイテプゾール H15 を基剤とした GZ 坐剤をウイルス性慢性活動性肝炎患者 10 例に投与後 (500 mg GZ/坐剤を 16 週間、1 日 2 剤投与)、肝機能の指標となる ALT 及び aspartate aminotransferase (AST) 値の有意な低下を実証し、GZ 坐剤が慢性肝疾患の治療に有用であることを報告した。この結果は、GZ の吸収膜透過性が低いことを考慮し、1 日当たりの GZ 投与量を 1 g の高用量としたことが功を奏したと考えられる。坐剤処方に関する基礎的検討は多々なされている。ラット大腸を用いた膜透過性の検討²⁸⁾より、Ussing タイプのチャンパーを用いた膜透過実験において GZ のみかけの膜

透過係数が $0.686 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ と、一般に膜透過性がよい指標となる $3.0 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ ²⁹⁾ と比べて顕著に低い値を示した。GZ の膜透過性を高めるには、高濃度の GZ を調製して高用量を投与するかあるいは吸収促進剤で膜透過速度を高めることにより高い血漿中 GZ 濃度を得ることができると考えられる。われわれは以前、GZ-NH₄ の水溶液に対する溶解度がリン酸塩緩衝液の塩濃度に比例することを見出し、400 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に GZ-NH₄ を溶解させ、200 mg/ml の GZ-NH₄ 濃度としてラット直腸内に投与 (50 mg/kg) した。その結果、投与 30 分後に最高血漿中 GZ 濃度、28 µg/ml、また 18.9% の BA 値を得た。³⁰⁾ この実験では吸収促進剤を用いることなく血中濃度を高めることができ、溶液状態であることから中空坐剤としての実用性を示すことができた。しかし、緩衝液の塩濃度が高いことで浸透圧の高いことが唯一の問題点であった。その他、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトにおける GZ 坐剤からの体内動態のデータをまとめて Table 2 に示す。

経口剤の処方研究を通じて Labrasol が GZ の高い吸収性をもたらしたこと²⁶⁾に基づき、GZ-NH₄ を 50% Labrasol に溶解後、ラットへの直腸内投与実験 (50 mg/kg) を実施した。その BA 値は 10.5% を示したが、400 mM リン酸塩緩衝液を用いたときの結果と比べて、その利用率は劣るものであった。経口剤の投与実験において、リポ化製剤とすることで GZ の腸管からの吸収を高めることを期待して、油を用いることで GZ の乳剤の調製を試みた。この根拠は、GZ の物理化学的性質として、GZ がサポニンであることから界面活性作用を示すことが報告されたこと、³⁹⁾ またこの界面活性作用を利用して、

Table 1. Pharmacokinetic Parameters of GZ after Oral Administration of Various Type GZ Formulations, Obtained by Previously Published *In Vivo* Experimental Data

GZ formulation	Object	Dose (mg/kg)	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)	AUC (µg · h/ml)	BA (%)	Ref.
NH ₄ +capric acid/caprylic acid mono-, di-, tri-glycerides+HPMCP	Rat	20	18.9	1.0	—	—	24
2Na+sodium caprate+PG+PEG400 (enteric coating with polymer)	Dog	50	18	4.0	85.7	6.0	23
2K+Labrasol+polysorbate 80+water in PCDC	Dog	200 mg/dog	8.37	5.7	92.4	4.6	26

BA: bioavailability, NH₄: glycyrrhizin monoammonium salt (GZ-NH₄), GZ: glycyrrhizin acid, 2Na: glycyrrhizin disodium salt (GZ-2Na), HPMCP: hydroxypropylmethylcellulose phthalate, PG: propyleneglycol, PEG400: polyethyleneglycol 400, PCDC: pressure-controlled colon delivery capsules. Refer to literature for the more detailed preparation methods of each formulation.

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of GZ after Rectal Administration of Various Type GZ Formulations, Obtained by Previously Published *In Vivo* Experimental Data.

GZ formulation	Object	Dose (mg/kg)	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (h)	AUC (μg · h/ml)	BA (%)	Ref.
2K solution in saline (adjusted to pH 7 with NaOH)	Rat	20	5.1	0.5	—	—	31
2K solution in saline	Rat	30	7.9	0.25	6.7	2.4	32
2K solution in saline + 1% sodium caprate	Rat	30	21.2	0.25	18.2	7.7	32
NH ₄ in 400 mM phosphate buffered solution (pH 7.0)	Rat	50	28	0.5	94.4	18.9	30
NH ₄ + 50% Labrasol	Rat	50	32	0.5	49.1	10.5	33
NH ₄ + 2% clove oil	Rat	50	73	0.5	116	24.8	33
2K solution in water	Rat	300	520 ^{a)}	0.25	143.7	—	34
2K + oleyl alcohol	Rat	300	300 ^{a)}	0.5	140.2	—	34
2K + 50% caproic acid	Rat	300	500 ^{a)}	0.25	132.4	—	34
2Na + octadodecyl myristate	Rat	300	480 ^{a)}	0.25	130.3	—	34
2K + Witepsol H15	Rabbit	80	—	—	38.8	18.6	35
2K + Witepsol W35	Rabbit	80	—	—	31.9	15.3	35
GZ + Witepsol H15	Rabbit	80	—	—	107.7	51.4	35
GZ + Witepsol W35	Rabbit	80	—	—	94.0	45.0	35
NH ₄ + 5% polyoxy ethylene laurylether + Witepsol	Dog	80 mg/dog	—	—	202.9	—	36
NH ₄ + 5% capric acid + Witepsol	Dog	80 mg/dog	—	—	155.5	—	36
2K + Nikkol BL-9EX + Witepsol S55	Dog	250 mg/dog	42.3	1	460	—	37
2K + sodium citrate + Nikkol BL-9EX + Witepsol W35	Dog	250 mg/dog	37.7	6	719	—	37
NH ₄ + sucrose ester (P-1570) + potassium tartarate + Witepsol S55	Dog	250 mg/dog	33.6	4	629	—	37
GZ + sodium malicate + L-lysine + HCO-60 + Witepsol W35	Dog	250 mg/dog	32.1	8	648	—	37
NH ₄ + sodium caprate + NaOH + Witepsol S55	Human	300 mg/dog	7–8 ^{b)}	1 ^{b)}	—	—	38
NH ₄ + sodium caprate + ursodeoxycholic acid + Witepsol S55	Human	200 mg/dog	4–5 ^{b)}	1 ^{b)}	—	—	38

BA: bioavailability, 2K: glycyrrhizin dipotassium salt (GZ-2K), 2Na: glycyrrhizin disodium salt (GZ-2Na), NH₄: glycyrrhizin monoammonium salt (GZ-NH₄), GZ: glycyrrhizin acid.

^{a)} The data were judged from the graph shown in reference. ^{b)} Each value is not maximum concentration. The GZ concentrations are measurement values at 1 h after the rectal administration. Refer to literature for the more detailed preparation methods of each formulation.

GZ がオレイン酸を安定に乳濁させることが示された⁴⁰⁾ ことによる。この乳化作用を利用して GZ-NH₄ の高濃度溶液の調製を試み、種々植物油を用いて検討した結果、チョウジ油を 2% の微量添加することで 100 mg/ml 濃度の GZ-NH₄ を調製でき、しかも 3°C の条件においてもゲル化することなく安定に溶解させることに成功した。⁴¹⁾ このチョウジ油による GZ-NH₄ の溶解度上昇機構として、チョウジ油の成分であるオイゲノールが GZ-NH₄ と複合体を形成したことを突き止め、オイゲノールが GZ-NH₄ の可溶化に対してコソルベンシー効果を示したことを明らかにした。⁴²⁾ 2% チョウジ油を含有する GZ-NH₄ をラット直腸内に投与 (50 mg/kg) したとき、最高血漿中 GZ 濃度は 73 μg/ml, AUC は 116 μg · h/ml, BA は 24.8%³³⁾ と、いずれも 400 mM

リン酸塩緩衝液剤よりも優れていた。その他、坐剤基剤として汎用されるウイテプゾールを用いた GZ 製剤、特に GZ-NH₄ を用いた製剤について言及すると、Table 2 に示されるように、可溶化剤として界面活性剤の添加、並びにカプリン酸ナトリウムなどの吸収促進剤の添加が必要と思われる。近年、興味ある報告として、界面活性作用を有し、かつ肝庇護作用を持つウルソデオキシコール酸を GZ 製剤に配合することにより、高い薬効が得られるばかりでなく GZ の吸収改善にもつながったことが、ヒト被験者を用いての検討から示され、³⁸⁾ GZ 坐剤の実現に期待が寄せられる。

6. 点鼻剤及び皮下投与製剤としての有用性

経口剤あるいは坐剤による投与では、GZ の吸収を高める工夫、とりわけ膜透過を高める製剤添加物

が必要であり、安全性の問題に加えて生物学的利用率に応じての過剰な投与量の設定を生じさせる問題も考慮する必要が生じる。そこで、膜のバリア能が低いとされる鼻腔への投与並びに患者本人においても直接体内に投与ができる皮下投与の製剤化に着目した。これらの製剤を設計する場合、最も重要なことは、1回の投与量を少量に設定しなければならない点にある。GZ-NH₄の水に対する溶解度は20°Cで5 mg/ml以下であるが、GZ カリウム塩 (GZ-2K)の水に対する溶解度はこの値よりかなり高い。しかし、GZ 市販品がモノアンモニウム塩 (GZ-NH₄)であることから、GZ-NH₄の溶解度を高める方法を工夫する必要があった。一般的戦略としては、第一義的に溶解度を高めるために用いる可溶化剤の選択に重点が置かれる。次に重要なことは安全性が保証された可溶化剤を選択し、かつその使用量を最小限に抑えることである。さらに調製されたGZ溶液が生理的条件である中性のpHを有し、かつ浸透圧比が約1であることが望まれる。

坐剤化検討において確立したチョウジ油を2%程度の微量含有するGZ溶液 (100 mg/ml)の調製法とリン酸塩緩衝液の塩濃度を高める方法とを組み合わせることで、さらに高濃度の400 mg/mlのGZ溶液の調製を試みた。目標値としたこの濃度はGZ市販注射剤の200倍に相当し、1回の適用量 (例えば、GZ 100 mgを投与する場合、0.25 mlですむ)が微量である点鼻剤あるいは皮下投与剤とするために適した濃度であると考えた。しかしながら、生理的条件下での浸透圧比を約1に近づけることはできず、新たな調製法を考える必要が生じた。近年、懸濁分散させる装置であるナノマイザーにより、薬物

を効率よく分散させることが可能になった。特に、懸濁分散の安定化剤として、ツバキ油、ゴマ油、オリーブ油あるいはオレイン酸エチルが用いられ、ナノマイザーを使用することでGZ-NH₄の体積平均粒子径が5.2-7.5 μmとなり、油の配合比率を46-86.5%とした場合でも安定に分散することが報告された。⁴³⁾この油性基剤分散体を点鼻剤として用いる場合、油臭の点で不都合であるが、皮下投与製剤として高濃度GZ液を調製できる。

油を用いることで高濃度の乳化あるいは懸濁状態を調製することは可能となったが、点鼻剤の場合、投与のし易さ、臭い、皮膚接触感等の問題点から、油を含まない水溶液であることが望ましい。また皮下投与製剤としての調製法の容易さを考慮した場合、水溶性の製剤であることが好ましい。鼻腔からのGZの吸収性は、GZの2カリウム塩 (GZ-2K)が水に対して溶解し易いことを利用して、120 mg/mlのGZ-2K溶液を生理食塩水で調製後、ラット鼻腔内に投与することにより検討が行われた。³²⁾その体内動態の結果 (Table 3)より、BAは20.2%と同処方の坐剤投与後のBA値7.7%³²⁾と比べて、約3倍高いことが分かる。この結果は、鼻腔粘膜からのGZの膜透過性が直腸粘膜からのそれと比べて高いことを示す。しかし、高濃度のGZによる鼻腔における刺激性の問題が未解決である。また本来主成分としなければならないGZ-NH₄を使用していないことも課題である。さらにこの濃度 (120 mg/ml)ではヒトへの投与量に外挿した場合、投与量が多く、製剤中のGZ濃度を高める必要があり、今後の解決すべき課題は多い。投与時の刺激性、反復投与時における服薬コンプライアンス、またBAを考え

Table 3. Pharmacokinetics of GZ after Nasal and Subcutaneous Administrations of Two-Kind GZ Formulations

GZ formulation	Object admin. route	Dose (mg/kg)	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (h)	AUC (μg · h/ml)	BA (%)	Ref.
2K solution in saline	Rat nasal cavity	30	26.8	0.5	55.4	20.2	32
NH ₄ +4% L-Arg+4% L-His in 20mM PBS	Rat nasal cavity	25	18.0	0.5	—	13	45
NH ₄ +4% L-Arg+4% L-His in 20 mM PBS	Rat nasal cavity	50	27.7	1.0	—	17	45
NH ₄ +4% L-Arg+4% L-His in 20 mM PBS	Rat back	25	59	1.5	—	55	45
NH ₄ +4% L-Arg+4% L-His in 20 mM PBS	Rat back	50	131	2.0	—	77	45

BA: bioavailability, 2K: glycyrrhizin dipotassium salt (GZ-2K), NH₄: glycyrrhizin monoammonium salt (GZ-NH₄), PBS: phosphate buffered solution, rat back: site of subcutaneous administration.

ると、点鼻投与より皮下投与が患者に好まれる可能性が高いと考えられた。GZ-NH₄ がリン酸塩緩衝液の塩濃度を高めることでその溶解度が增大するという結果³⁰⁾に基づいて、浸透圧比を1に近づけた新規の製剤処方を検討した。まず GZ-NH₄ が水溶液中において温度の低下とともに容易にゲルを形成することを妨げる手段を調査した。“Polymerization”及び“inhibition”をキーワードとした調査より、物質の重合を抑える化合物として、数種類のグアニジン化合物⁴⁴⁾を得た。この報告を基に、安全性が高く水溶性の高いグアニジン化合物としてアミノグアニジン重炭酸塩及びグアニジノ酢酸を選択し、それらを微量用いることで、水溶液中に高濃度の GZ-NH₄ を溶解させることが可能か、またその調製溶液を低温に放置したときにゲルを形成しないかを検討した。その結果、100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 中に添加した GZ-NH₄ は、グアニジノ酢酸の添加量に関係なく常温で容易にゲルを形成したが、0.5%アミノグアニジン重炭酸塩の添加は、3°C の条件においても 100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 中において GZ-NH₄ はゲルを形成することなく 400 mg/ml の濃度の GZ-NH₄ 溶液を調製できた。⁴⁵⁾ アミノグアニジンに構造が類似するアミノ酸にも同様の GZ-NH₄ に対するゲル形成阻害作用があるかもしれないという仮説を立て、生体を構成するアミノ酸 20 種類を用いて検討した結果、L-アルギニン、L-ヒスチジン及びL-トリプトファンにゲル形成阻害作用を認めた。特にL-アルギニンとL-ヒスチジンの GZ-NH₄ に対するゲル形成阻害作用は顕著であった。両アミノ酸の製剤添加物としての1日当たりの使用量を参考にし、両者を4%程度の少量用いることで 400 mg/ml の高濃度 GZ-NH₄ 溶液の調製に成功した。⁴⁵⁾ この調製した製剤の pH は 7.4、浸透圧比は 1.47 であった。最終的な調製法を Scheme 1 に示す。安全性が高いアミノ酸を用いることで 400 mg/ml の高濃度の GZ 製剤を調製できたことは鼻腔内及び皮下投与への実現に近づいたと言える。特に皮下投与ではインスリン製剤のようなペン型タイプ製剤を設計することで自己投与が可能となる利点を有する。すなわち、現行の市販品注射剤の1回の最大投与量 200 mg GZ に相当する量が、わずか 0.5 ml の皮下投与で可能になる。この調製法に基づいた GZ 製剤の鼻腔内投与及び皮下投与後の

GZ-NH ₄	2 g
L-Arg	200 mg
L-His	200 mg
20 mM phosphate buffered solution (pH 7.4)	Proper quantity
Total volume	5 ml

GZ-NH₄, L-Arg, L-His, and 4 ml of 20 mM phosphate buffered solution (pH 7.4) are put in a screw vial of 10 ml, then are heated at 80°C until the solution is clearly melted (approximately for 10–15 min). The solution is cooled down at room temperature. The total volume is adjusted to 5 ml with 20 mM phosphate buffered solution.

Scheme 1. Preparation of 400 mg/ml GZ-NH₄ Solution⁴⁵⁾

体内動態パラメータを Table 3 にまとめた。鼻腔内投与での BA が 20%、皮下投与での BA が 55 あるいは 77%であった結果より、皮下投与製剤に優位性を認めた。近い将来はペン型タイプの製剤として実用化されるかもしれない。

7. 肝臓におけるグリチルリチンの利用率を高めた工夫

生体に投与された GZ-NH₄ は、肝臓に取り込まれて肝細胞保護作用等を発揮する。その効果が投与量に依存して ALT 値を低下させるという報告が多い。⁴⁶⁻⁵⁰⁾ ALT 値を抑制することは肝細胞癌への進展を遅らせることと密接に関係し、ALT 値が 80 IU 未満の患者の肝細胞癌への発症率が 25% (5 年以内では 7.1%) であった結果に対し、高い ALT 値患者 (80 IU 以上) での発症率は 71.4% (5 年以内では 53.6%) と有意に高いことが明らかになった。⁵¹⁾ 同様に、1979 年から 1984 年までの HCV 患者 453 人において、GZ-NH₄ 注射剤を投与された患者群と投与されなかった患者群間における肝細胞癌発症率の比較より、GZ-NH₄ 注射剤を投与された患者群が有意に低い値であったことが実証されている。⁵²⁾ 一方で、GZ-NH₄ 注射剤を長期間あるいは大量投与したときに偽アルドステロン症の発現を認める報告がある。⁵³⁻⁵⁵⁾ これらの安全性情報を考慮して、患者の身体状況に注意を払いながら ALT 値を指標とした GZ-NH₄ の継続投与が好ましいと考えられる。GZ-NH₄ の高用量の投与は血液中及び臓器中の GZ 濃度の増大を意味するが、臨床における血液中 GZ 濃度と ALT 値などの肝機能の指標となるデータとの関係を示した報告は非常に少ない。慢性肝疾患患者を慢性肝炎群と肝硬変群に分けて、いずれの患者にも強力ネオミノファーゲン C 40 ml (GZ

として 80 mg) を週 3 回 8 週連続投与 (30 分かけての持続注入) した報告がある。⁵⁶⁾ その ALT 値及び血漿中 GZ 濃度の結果を Table 4 にまとめた。注入終了後の 0.5 時間の GZ 濃度が最高血漿中 GZ 濃度を反映し、以後、速やかに消失した。8 週間後にその血漿中動態が顕著に変化しなかったことから、投与回数の増加とともに GZ が血液中に滞留しなかったと判断できる。さらに慢性肝炎群の ALT 値は 4 週から 8 週目の期間に約 50 IU のレベルを維持した。一方、肝硬変群の ALT 値は 6 週から 8 週目の期間に 55 IU のレベルであった。以上の結果より、GZ は血液中から速やかに消失するが、ALT 値が十分に低下し、その低いレベルで維持されたことから血液中の GZ 濃度、特に有効血中濃度という考えを基にトランスアミナーゼ低下作用を説明することは困難であろう。しかしながら、血液中の GZ 濃度と ALT 値との間に良好な相関関係が認められないとしても、GZ-NH₄ 投与量に依存した治療効果を示すという事実は、肝臓中における GZ の動態と密接に関係していることを推察する。その理由として、ラットにおける肝還流実験より GZ の肝細胞における GZ の取り込み速度がミカエリスメンテン式に従い、肝細胞中に GZ が高濃度で維持されることが報告された。⁵⁷⁾ この結果は、GZ の肝細胞内への取り込み速度が胆汁中排泄速度よりも大きいことを示す。また、GZ の肝細胞保護作用に着目した場合、

GZ が界面活性作用を示すことから、肝実質細胞膜のリン脂質表層部あるいはリン脂質層内部に高い親和性を持つことで、細胞膜表面に GZ が保持されている可能性も高いと考えられる。これらの結果あるいは推察が正しいとすれば、循環血液中の GZ 濃度の時間変化が速やかに消失する状況であっても、肝細胞中の GZ 濃度の変動は小さく、かつ肝細胞から GZ の消失が緩やかであることで、ALT 値の変動が少ないという事実を説明できる。また、投与量に依存して高い治療効果を発揮しているという結果は、投与量に依存して肝細胞中の GZ 濃度が高く維持され、肝細胞膜に保持される GZ のレベルが投与量と密接に正の相関関係にあるからであると推察される。この肝細胞膜に保持されるであろう GZ 濃度と投与量との関係については今後詳細に検討する価値がある。

GZ の体内動態において、GZ が 99% 以上という高いタンパク結合率を示すにもかかわらず、胆汁中に速やかに未変化体である GZ のまま排泄されることが知られている。⁵⁸⁻⁶⁰⁾ GZ 投与量と胆汁中に排泄された GZ 回収率を Table 5 に示す。この速やかな胆汁中への排泄メカニズムとして、ラット肝細胞を用いた実験より、GZ がキャリア依存性の輸送システムを介して肝細胞内に取り込まれること、⁶¹⁾ 肝細胞から胆汁中への GZ の排泄は主に胆管側膜に発現している有機アニオントランスポーターを介して輸

Table 4. ALT and Plasma GZ Concentration Levels after SNMC Injection for Patients with Chronic Liver Disease⁵⁶⁾

Chronic hepatitis group (n=29)		Cirrhosis group (n=30)	
ALT (IU)	Plasma GZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)	ALT (IU)	Plasma GZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)
at 0 week (initial) after SNMC administration			
110 \pm 9.2	19.1 \pm 0.82 at 0.5 h	79.1 \pm 12.4	22.4 \pm 0.84 at 0.5 h
	7.80 \pm 0.48 at 4 h		11.5 \pm 0.71 at 4 h
	5.79 \pm 0.46 at 6 h		8.77 \pm 0.62 at 6 h
	2.16 \pm 0.44 at 24 h		3.77 \pm 0.54 at 24 h
at 8 week after SNMC administration			
50.8 \pm 4.0	19.8 \pm 0.68 at 0.5 h	55.3 \pm 7.1	23.5 \pm 1.54 at 0.5 h
	7.52 \pm 0.51 at 4 h		10.4 \pm 0.73 at 4 h
	5.48 \pm 0.46 at 6 h		8.25 \pm 0.67 at 6 h
	2.01 \pm 0.29 at 24 h		2.29 \pm 0.35 at 24 h

SNMC (Strong Neo-Mino Phagen C; 80 mg GZ per 40 ml) at the rate of 40 ml per 30 min was intravenously infused to patients. Data represents the mean \pm S.D. This table was arranged from the paper which Takahashi et al.⁵⁶⁾ carried out.

Table 5. Bile Excretion of GZ after Intravenous GZ Administration

Administration route	Object	Dose (mg/kg)	Retrieval time (h)	Bile excretion of GZ (%)	Ref.
<i>iv</i>	Rat	5	4	85	59
<i>iv</i>	Rat	5	48	95.7	59
<i>iv</i>	Rat	10	4	83	59
<i>iv</i>	Rat	10	48	92.2	59
<i>iv</i>	Rat	20	4	74	59
<i>iv</i>	Rat	20	48	90.2	59
<i>iv</i>	Rat	50	4	62	59
<i>iv</i>	Rat	50	48	85.6	59
<i>iv</i>	Rat	100	12	70	58
<i>iv</i>	Rat	100	48	80.6	58
<i>iv</i> infusion (0.5 mg/h)	Rat	4 mg/rat	8	93.3	a)
<i>iv</i> infusion (1.0 mg/h)	Rat	8 mg/rat	8	91.8	a)
<i>iv</i> infusion (2.0 mg/h)	Rat	16 mg/rat	8	91.6	a)

iv: intravenous, a): un-announcement author's data.

送されること⁶²⁾及びGZがラット肝臓に発現している多剤耐性型輸送トランスポータータンパク質の1つであるMRP2 (ABCC2)の基質であること¹⁷⁾が報告された。これらの結果より、GZの多くが体内に長くは留まらず、ほとんど代謝を受けることなく速やかに胆汁中に排泄されることが明らかになった。このGZの排泄メカニズムから、ALT値を抑制する作用が肝細胞内のGZ濃度と相関すると仮定すれば、血液中GZ濃度と比べて十分に低いレベルで肝細胞保護作用を発現し、ALTの細胞外への放出を抑えていると考えられる。

GZの肝臓中での利用率を高めるために、特に肝臓組織内に未変化体のまま留まらせる手段が有効になるであろうという仮説を立てた。ただし、この想定は主代謝物であるグリチルレチン酸あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニドがほとんどALT値抑制作用を持たないとする場合である。このGZを留まらせる有効な手段として、GZと同様な排泄システムで輸送されるであろう薬物を用いることで、GZの胆汁中への排泄を抑制することが可能かを検討した。具体的には、MRP2 (ABCC2)の阻害剤であるプロベネシドとGZ-NH₄を同時投与することを試みた。1.0 mg/ml/hのGZ投与速度の条件でGZ-NH₄を単独あるいはプロベネシドとの併用でラ

ット静脈内に8時間持続注入したとき、投与3時間後からほぼ一定した血清中GZ濃度を維持した。そこで、投与後3, 4, 6及び8時間後の血清中GZ濃度の平均値を定常状態の血清中GZ濃度とみなした。GZ-NH₄の単独投与では、その血清中GZ濃度は14.9 µg/mlであったが、0.1 mg/mlのプロベネシドと併用したときの定常状態の血清中GZ濃度は30.5 µg/mlと有意に増大した。なお、両者の胆汁流出速度に違いは認められなかった。またMRP2 (ABCC2)の阻害剤ではないが、0.1 mg/mlのグルクロン酸と併用したとき、定常状態の血清中GZ濃度は26.7 µg/mlとなり、プロベネシド併用時ほど顕著ではないが血清中GZ濃度を高めることができた(未発表データ)。これらの結果はGZ-NH₄の投与量を増やすことなく血清中GZ濃度を高めたことを示す。肝臓から胆汁中へのGZ排泄を遅らせることが、肝細胞におけるGZの利用率を高める方法の1つになる可能性を示唆した。

8. 結 論

慢性肝疾患患者数は、年々増加傾向にある。インターフェロン療法、抗ウイルス薬治療が今後も主流を示すことは間違いないが、肝臓療法を必要とする患者が多いことも事実である。ALTを指標とする肝機能を長期に渡り安定させ、肝硬変、肝細胞癌への進展を抑えるために必要となる薬物の1種としてグリチルリチン製剤に焦点を当てた。現行市販品のGZ注射剤の問題点を解決するために、安全に用いることのできる製剤添加物を前提に新規製剤化検討を行い、特に患者のQOLを高く保持するための新しい製剤化として捉えた。その中で、経口剤、坐剤、点鼻剤あるいは皮下投与製剤の模範処方を示すことができた。これらの処方の動物実験データを基に剤形間で有用性を比較すると、生物学的利用率からみた場合の有用性は、皮下投与剤>点鼻剤>坐剤>経口剤の順となる。これはGZの膜透過性に強く影響された結果であり、生物学的利用率に大きく反映したといえる。投与後の安全性からみた場合、経口剤及び坐剤では消化管からの吸収を高めるための吸収促進剤などを添加することによる消化管粘膜への障害性、点鼻剤では鼻粘膜刺激性あるいは臭覚障害性、皮下投与では皮下組織での障害性などが未検討項目であり、今後の検討が必要となる。膜透過性を高める目的として添加する可溶化剤のLabrasol

は海外において、また吸収促進剤であるカプリン酸ナトリウムは国内において市販品（セフチゾキシムナトリウム坐剤など）に製剤添加物として実際に使用されていることもあり、大腸デリバリーの経口剤あるいは坐剤としての実用性も少なからず期待できる。したがって、総合的に判断して、現市販品である注射剤に匹敵できる可能性の高い剤形は皮下投与製剤が最も実用性のある剤形と位置付けられた。これまでの検討項目の中で、安全性が保証されたL-アルギニン及びL-ヒスチジンを微量用いることで、400 mg/mlの高濃度GZ水溶液を調製できたことが、種々の剤型の実用性に大きく寄与できると考えられた。この新規製剤化の実現に向けての社会的基盤が強まることも願う。今後は高分子ミセルあるいはナノスフェアなどのDDS素材を基にGZの生体内動態を制御することで、より効果的な製剤を考案していきたい。

謝辞 本研究の一部は、北陸大学特別助成により達成された。また研究を遂行するに当たり株式会社フーゲン製薬の協力を深甚より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Arase K., *Jpn. J. Med. Pharm. Sci.*, **56**, 130–137 (2006).
- 2) Kakumu S., Yoshioka K., Wakita T., Ishikawa T., Takayanagi M., Higashi Y., *Gastroenterol.*, **105**, 507–512 (1993).
- 3) Sakai A., Kaneko S., *Jpn. J. Med. Pharm. Sci.*, **56**, 124–129 (2006).
- 4) Kanai K., Kako M., Okumoto H., *Lancet*, **339**, 1543 (1992).
- 5) Tarao K., *Nichii Zasshi*, **119**, 342–348 (1998).
- 6) Emerit J., Samuel D., Pavio N., *Biomed. Pharmacother.*, **60**, 1–4 (2006).
- 7) Lotersztajn S., Julien B., Teixeira-Clerc F., Grenard P., Mallat A., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 605–628 (2005).
- 8) van Rossum T. G. J., Vulto A. G., de Man R. A., Brouwer J. T., Schalm S. W., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **12**, 199–205 (1998).
- 9) Arase Y., Ikeda K., Murashima N., Chayama K., Tsubota A., Koida I., Suzuki Y., Saitoh S., Kobayashi M., Kumada H., *Cancer*, **79**, 1494–1500 (1997).
- 10) Tarao K., Fujiyama S., Ohkawa S., Miyakawa K., Tamai S., Hirokawa S., Masaki T., Tanaka K., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **14**, 164–169 (2005).
- 11) Sakiya Y., Akado Y., Kawano S., Miyauchi Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1125–1129 (1979).
- 12) Yamamura Y., Santa T., Kotaki H., Uchino K., Sawada Y., Iga T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 337–341 (1995).
- 13) Sato M., Shimada F., Kato H., Yano S., Kanaoka M., *Wakan Iyakugaku Kaishi*, **7**, 382–383 (1990).
- 14) Nakano N., Kato H., Suzuki H., Nakao H., Yano S., *Yakuri to Chiryō*, **8**, 4171–4173 (1980).
- 15) Nakata T., Kato H., Yano S., Kanaoka M., *Wakan Iyakugaku Kaishi*, **3**, 278–279 (1986).
- 16) Ploeger B., Mensinga T., Sips A., Seinen W., Meulenbelt J., DeJongh J., *Drug Metabol. Rev.*, **33**, 125–147 (2001).
- 17) Shimamura H., Suzuki H., Tagaya O., Horie T., Sugiyama Y., *Pharm. Res.*, **13**, 1833–1837 (1996).
- 18) Gotoh Y., Suzuki H., Kinoshita S., Hirohashi T., Kato Y., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 433–439 (2000).
- 19) Naruhashi K., Tamai I., Sai Y., Suzuki N., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 73–81 (2001).
- 20) Itagaki S., Chiba M., Shimamoto S., Hirano S., Sugawara M., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **20**, 72–78 (2005).
- 21) Akao T., Hayashi T., Kobashi K., Kanaoka M., Kato H., Kobayashi M., Takeda S., Oyama T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 135–137 (1994).
- 22) Akao T., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 787–793 (1999).
- 23) Yamamoto M., Kin J., Terashima H., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H10–226650 (1998).
- 24) Morita T., Mita S., Kawashima Y., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H3–255037 (1991).
- 25) Shibata N., Shimokawa T., Jiang Z. Q., Jeong Y. I., Ohno T., Kimura G., Yoshikawa Y., Koga K., Murakami M., Takada K., *Biopharm. Drug Dispos.*, **21**, 95–101 (2000).
- 26) Shibata N., Ohno T., Shimokawa T., Hu Z., Yoshikawa Y., Koga K., Murakami M., Taka-

- da K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 441–447 (2001).
- 27) Fujioka T., Shinkai N., Ikeda N., Hakosaki Y., Shirosaki K., Shibuya A., Ishii K., Shibata H., *Sinryou to Shinyaku*, **29**, 897–903 (1992).
- 28) Koga K., Kawashima S., Shibata N., Takada K., Murakami M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1299–1305 (2003).
- 29) Ribadeneira M. D., Aungst B. J., Eyermann C.J., Huang S. W., *Pharm. Res.*, **13**, 227–233 (1996).
- 30) Koga K., Kawashima S., Shibata N., Takada K., Murakami M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1299–1305 (2003).
- 31) Morita T., Mita S., Horiuchi M., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H3–2122 (1991).
- 32) Sasaki K., Yonebayashi S., Yoshida M., Shimizu K., Aotsuka T., Takayama K., *Int. J. Pharm.*, **265**, 95–102 (2003).
- 33) Koga K., Takekoshi K., Kaji A., Hata Y., Ogura T., Fujishita O., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 154–163 (2006).
- 34) Kurono M., Sato M., Sugimoto M., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H1–294619 (1989).
- 35) Kawasaki H., Asai I., Shin M., Yoshino E., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H3–123731 (1991).
- 36) Mita S., Kawashima Y., Takashina H., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H4–261117 (1992).
- 37) Kurono M., Kondo Y., Inoue T., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H5–97680 (1993).
- 38) Fujioka T., Fujioka M., Utsunomiya K., Nagata N., *JP Kokai Tokkyo Koho*, H7–82155 (1995).
- 39) Otsuka A., Yonezawa Y., Iba K., Tatsumi T., Sunada H., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 203–208 (1976).
- 40) Yonezawa Y., Otsuka A., *Yakugaku Zasshi*, **103**, 203–208 (1983).
- 41) Koga K., Takekoshi K., Kawashima S., Taniguchi M., Murakami M., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1507–1510 (2004).
- 42) Koga K., Takada K., Kawashima S., Murakami M., *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **14**, 353–356 (2004).
- 43) Suzuki T., Hamada Y., Okamura T., Abe K., Inoue H., Sato S., *JP Kokai Tokkyo Koho*, 2006–219380 (2006).
- 44) Lederer M. O., Gerum F., Severin T., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 993–1002 (1998).
- 45) Koga K., Takekoshi K., Tomoyama M., Fujishita O., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 414–419 (2006).
- 46) Hirayama C., Kawasaki H., Shubo T., Sugi-hara T., Hiroshige Y., Ueki S., Miura K., Miyoshi Y., Ishitobi S., Yamamoto S., Gomeida M., Ogawa C., *Kantansui*, **15**, 291–298 (1987).
- 47) Masuzawa M., Kato M., Okuyama T., Shimizu T., Higuchi T., Takamatsu M., Harihara S., Kuroki T., Nakao M., Kobayashi Y., Kadona T., *Chiryō*, **69**, 2421–2430 (1987).
- 48) Iino S., Tango T., Matsushima T., Toda G., Miyake K., Hino K., Kumada H., Yasuda K., Kuroki T., Hirayama C., Suzuki H., *Hepatol. Res.*, **19**, 31–40 (2001).
- 49) Miyake K., Tango T., Ota Y., Mitamura K., Yoshiba M., Kako M., Hayashi S., Ikeda Y., Hayashida N., Iwabuchi S., Sato Y., Tomi T., Funaki N., Hashimoto N., Umeda T., Miyazaki J., Tanaka K., Endo Y., Suzuki H., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**, 1198–1204 (2002).
- 50) Kumada H., *Oncology*, **62** (Suppl 1), 94–100 (2002).
- 51) Tarao K., Rino S., Ohkawa S., Shimizu A., Tamai S., Miyakawa K., Aoki H., Imada T., Shindo K., Okamoto N., Totsuka S., *Cancer*, **86**, 589–595 (1999).
- 52) Arase Y., Ikeda K., Murashima N., Chayama K., Tsubota A., Koida I., Suzuki Y., Saitoh S., Kobayashi M., Kumada H., *Cancer*, **79**, 1494–1500 (1997).
- 53) van Rossum T. G. J., de Jong F. H., Hop W. C. J., Boomsma F., Schalm S. W., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 789–795 (2001).
- 54) Sato T., Gondo M., Iwaoka D., Iwaoka D., Sotomura M., Araki I., Fujiyama S., *Rinsho to Kenkyu*, **58**, 129–133 (1981).
- 55) Hanasaki N., Kato H., Shinomura Y., Nakao H., Morimoto Y., Yano S., *Nichinai Kaishi*, **65**, 717–718 (1976).
- 56) Takahashi M., Nakano S., Takeda I., Kumada T., Sugiyama K., Osada T., Kiriyama S., Toyoda H., Shimada S., Samori T., *Nisshoshi*, **92**, 1929–1936 (1995).
- 57) Ishida S., Sakiya Y., Taira Z., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 960–969 (1994).
- 58) Ishida S., Sakiya Y., Ichikawa T., Taira Z.,

- Awazu S., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 212–218 (1990).
- 59) Ichikawa T., Ishida S., Sakiya Y., Sawada Y., Hanano M., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 672–675 (1986).
- 60) Ishida S., Sakiya Y., Ichikawa T., Taira Z., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1917–1920 (1992).
- 61) Ishida S., Sakiya Y., Ichikawa T., Taira Z., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 293–297 (1993).
- 62) Horikawa M., Kato Y., Tyson C.A., Sugiyama Y., *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**, 23–33 (2002).