

## キトサンカプセルを用いたプレドニゾロンの大腸特異的送達法に関する研究

山本 昌

## Study on the Colon Specific Delivery of Prednisolone Using Chitosan Capsules

Akira YAMAMOTO

*Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Misasagi Nakauchi-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan*

(Received November 6, 2006)

In this study, we examined the effectiveness of chitosan capsules for the colon-specific delivery of prednisolone in rats. We also evaluated the effectiveness and side effects of prednisolone using chitosan capsules compared with the conventional dosage form (gelatin capsules). We found a significant increase in the concentration of prednisolone in the large intestinal mucosa when prednisolone was administered orally using chitosan capsules, as compared with the case using gelatin capsules. On the other hand, the plasma concentrations of prednisolone after oral administration using chitosan capsules were much lower than those in the case of gelatin capsules. We also assessed the effectiveness of prednisolone for the healing of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by measuring myeloperoxidase (MPO) activity and colon wet weight/body weight (C/B) ratio. MPO activities and C/B ratios were significantly reduced when prednisolone was administered orally using chitosan capsules, in comparison with the case of gelatin capsules. Moreover, the weight of the thymus, which is an index of the side effects of prednisolone, markedly decreased after oral administration of prednisolone using gelatin capsules, whereas its weight did not change as much when prednisolone was administered orally using chitosan capsules. These findings indicate that chitosan capsules might be useful for the colon-specific delivery of prednisolone and its enhanced effectiveness for the healing of colitis in rats. Moreover, chitosan capsules might be also effective in reducing the side effects of prednisolone due to its decreased intestinal transfer to the systemic circulation.

**Key words**—chitosan capsule; colon-specific delivery; prednisolone; microorganism; ulcerative colitis

## 1. はじめに

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis) はクローン病 (Crohn's disease) とともに特発性炎症性腸疾患に分類される難治性疾患であり, 疾患の発症には食生活の欧米化, 細菌や化学物質などの外来因子, 免疫寛容の破綻などが関与すると考えられている。さらに近年, 実験動物を用いた研究において特定の遺伝子を欠損させたノックアウトマウスや特定の遺伝子に移入したトランスジェニックマウスが腸炎を自然発症するという報告があることから,<sup>1-7)</sup> 免疫寛容の破綻に遺伝的素因が大きく関与していると考えられているが, いまだに明確な成因については解明さ

れていない。潰瘍性大腸炎の特徴として, 1) 大腸が主な疾患部位であること, 2) 特に若年者において患者数の急激な増加がみられること, 3) 発症原因が不明であるため, 完治が難しく長期に亘る治療を要する疾患であること, 4) 重篤な下痢や腹痛などの日常生活に支障を来す症状を有することなどが挙げられる。こうした潰瘍性大腸炎の治療薬にはプレドニゾロンやベタメタゾンなどのステロイド製剤やサラゾスルファピリジンやメサラジンなどの5-ASA製剤, 最近ではシクロスポリン,<sup>8-10)</sup> アザチオプリン,<sup>11-14)</sup> タクロリムス<sup>15,16)</sup>などの免疫抑制剤が使われており, 上述したように潰瘍性大腸炎患者はこれらの治療薬を長期に亘って使用し続ける必要がある。しかし, これらの長期服用の際に起こる副作用が潰瘍性大腸炎患者のノンコンプライアンス, QOL低下の原因となることが知られている。

近年, 潰瘍性大腸炎などのように疾患部位が大腸

京都薬科大学薬剤学教室 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

e-mail: yamamoto@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第126年会シンポジウム S36 で発表したものを中心に記述したものである。

に局限している疾患に対して、治療薬を大腸特異的に送達する方法の開発が行われている。現在までに報告されている方法として、1) pH 依存型放出制御剤の利用,<sup>17-20)</sup> 2) 時間制御型放出制御剤の利用,<sup>19-21)</sup> 3) 消化管内圧型放出制御剤の利用,<sup>22)</sup> 4) プロドラッグの利用,<sup>23-26)</sup> 5) 腸内細菌により特異的に分解するポリマーの利用<sup>27-29)</sup> などがある。これらの方法により治療薬を疾患部位である大腸に特異的に作用させることができれば、治療効果の増大、投与量の減少、さらに副作用の軽減とそれに伴う患者の QOL 改善などが可能になると考えられる。

一方、キトサンはエビ、カニの甲殻から取れる天然素材であり、変異原性試験、急性毒性試験、亜急性試験、慢性毒性試験、発熱性試験、溶血性試験、アレルギー性試験のいずれにも適合することが知られており、安全性が高い高分子素材であることが確認されている。<sup>30)</sup> キトサンはその高い安全性から、抗癌剤の高分子化修飾や人工皮膚への応用に加え、最近ではダイエット食品や化粧品にも応用されている。われわれは既にキトサンを素材としたカプセルが大腸に豊富に存在する腸内細菌の作用により崩壊することを報告している。<sup>31-35)</sup> Figure 1 に本研究で用いたキトサンカプセルの断面図を示しているが、本カプセルはラット用のミニカプセルであり、カプセル内に様々な粉末の薬物を封入することができる。また、このキトサンカプセルを用いて、5-ASA などの炎症性腸疾患治療薬を大腸へ特異的に送達できること、さらにこうした薬物の大腸特異的な送達によって 5-ASA などの炎症性腸疾患治療薬の大腸炎治療効果増強にも成功している。<sup>32,33)</sup>

そこで本研究では、臨床現場で潰瘍性大腸炎治療

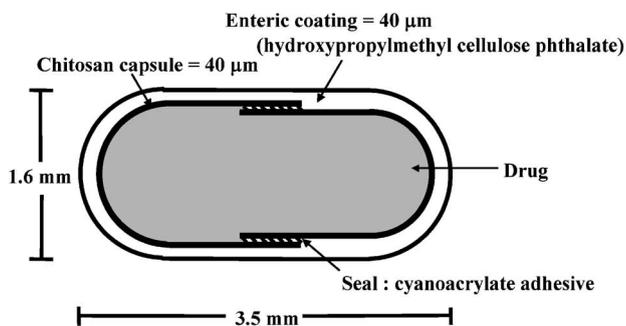


Fig. 1. Scheme of Chitosan Capsule

薬として重症患者の第一選択薬として広く使用されているが、その反面、重篤な副作用が問題視されているプレドニゾロンを用い、大腸炎誘発時においてキトサンカプセルを用いたプレドニゾロンの大腸特異的な送達に関する検討を行った。さらにキトサンカプセルによるプレドニゾロンの大腸炎抑制効果の増強、全身性副作用の軽減についても検討を行った。

## 2. キトサンカプセルの製剤特性に関する基礎的検討

大腸におけるキトサンカプセルの薬物放出特性を評価するため、盲腸内容物懸濁液におけるキトサンカプセルからの内用薬物 5 (6) -carboxyfluorescein (CF) の溶出試験を回転バスケット法により行った。その結果、Fig. 2 に示したように、ゼラチンカプセル (第 1 液 2 hr → 第 2 液 4 hr → 盲腸内容物懸濁液 6 hr) では試験液を第 2 液に置換後、内用薬物である CF の急激な溶出がみられることが明らかとなった。一方、キトサンカプセル (第 1 液 2 hr → 第 2 液 4 hr → 盲腸内容物懸濁液 6 hr) では第 2 液においてはほとんど CF の溶出が観察されなかったのに対し、盲腸内容物懸濁液に置換後、カプセルからの CF の急激な溶出がみられ、試験終了時まで CF がほぼ 100% 溶出した。これに対して、キトサンカプセル (第 1 液 2 hr → 第 2 液 4 hr → 重炭酸 buffer 6 hr) では重炭酸 buffer に置換後も CF の急激な溶出は確認されず、試験終了後のカプセル形状に大きな変化は認められなかった。

以上のことから、キトサンカプセルは、腸内細菌の存在下において特異的に崩壊し、内容薬物を放出できることが確認された。

## 3. キトサンカプセルに封入されたプレドニゾロンの *In vivo* 体内動態の評価

次に、ゼラチンカプセル並びにキトサンカプセルを用いてプレドニゾロンを経口投与後、プレドニゾ



山本 昌

京都薬科大学薬剤学教室教授。1957 年京都市生まれ。1980 年京都大学薬学部卒業後、同大学大学院修士課程、博士課程に進学し、1983 年に薬剤学教室の助手となる。1987 年に薬学博士の学位を取得後、米国南カリフォルニア大学に 1 年半留学し、インスリンなどのタンパク性医薬品の経粘膜吸収改善について研究した。帰国後、1991 年に京都薬科大学製剤学教室助教授に、1998 年から薬剤学教室教授になり、現在に至る。趣味は、テニス、ジョギング、読書など。

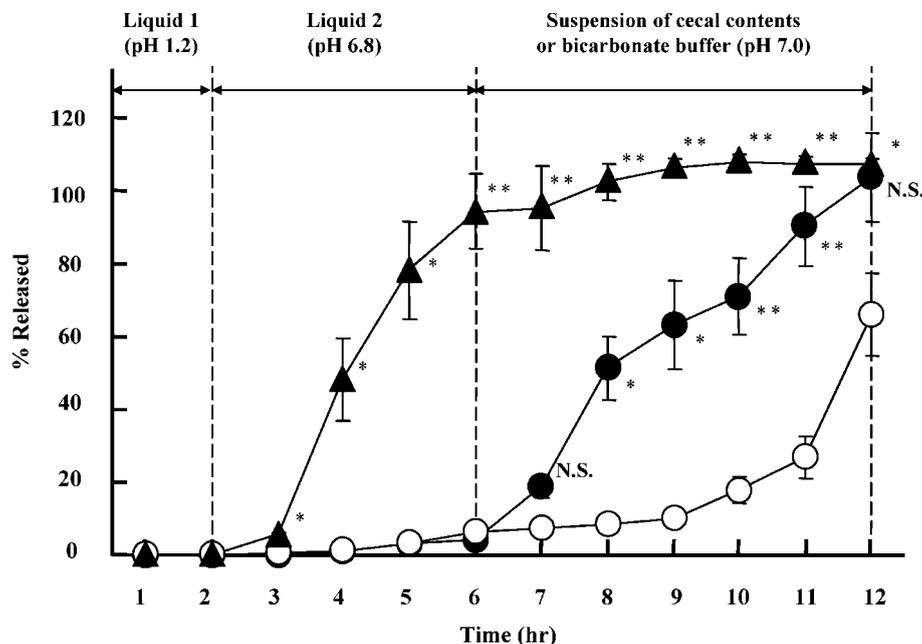


Fig. 2. Release of 5(6)-carboxyfluorescein (CF) from Chitosan Capsules or Gelatin Capsules by Japan Pharmacopoeia (J.P.) Rotating Basket Method

●: Chitosan capsule (Liquid 1→Liquid 2→Suspension of cecal contents), ○: Chitosan capsule (Liquid 1→Liquid 2→Bicarbonate buffer), ▲: Gelatin capsule (Liquid 1→Liquid 2→Suspension of cecal contents). Results are expressed as the mean ± S.E. of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , N.S. not significant, compared with Chitosan capsule (Liquid 1→Liquid 2→Bicarbonate buffer).

ロンの消化管粘膜内濃度時間推移を測定した。その結果、Fig. 3の左図に示すように、プレドニゾロン (1.5 mg) 封入ゼラチンカプセルを経口投与したところ、小腸上部では投与後2時間において粘膜内プレドニゾロン濃度が高く、4時間目以降はほとんど検出されなかった。また、小腸下部、大腸においては、8時間までにプレドニゾロンはほとんど検出されなかった。一方、プレドニゾロン (1.5 mg) 封入キトサンカプセルを経口投与したところ、Fig. 3の右図に示すように、小腸上部、小腸下部では8時間までにプレドニゾロンはほとんど検出されなかったのに対して、大腸においては投与後5—6時間において粘膜内プレドニゾロン濃度が高く、約8時間まで持続した。また、キトサンカプセル経口投与時におけるプレドニゾロンの消化管粘膜濃度曲線下面積  $AUC_{mucosa}$  を評価したところ、大腸の  $AUC_{mucosa}$  は小腸上部、小腸下部に比べて大きく、それぞれ約8.4倍、約4.9倍大きくなることが認められた (Table 1)。以上の結果より、キトサンカプセルを用いることにより内用薬物であるプレドニゾロンを潰瘍性大腸炎の疾患部位である大腸に効率よく送達できることが明らかとなった。

さらに、各剤形を用いてプレドニゾロンを投与後、プレドニゾロンの血漿中濃度時間推移を測定した。Figure 4に示すように、プレドニゾロン (1.5 mg) 封入キトサンカプセル又はゼラチンカプセルを経口投与したところ、ゼラチンカプセル投与群では2時間より血漿中にプレドニゾロンが検出され、約8時間まで持続した。一方、キトサンカプセル投与群では2時間より血漿中にプレドニゾロンが検出され、約10時間まで持続した。また、キトサンカプセル投与時の  $T_{max}$  ( $7.0 \pm 0.4$  hr) はゼラチンカプセル投与時 ( $4.5 \pm 0.3$  hr) に比較して増大したことより、プレドニゾロンが大腸から吸収される可能性が高いことが示唆された。さらに、ゼラチンカプセル投与群の血中濃度はキトサンカプセル投与群に比べて高く、 $C_{max}$  は約3.5倍、 $AUC$  は約1.8倍大きかったことから、キトサンカプセルを用いることにより、プレドニゾロンの全身血中への移行を抑制できることが明らかとなった (Table 2)。これらのことから、同用量においてキトサンカプセルはゼラチンカプセルよりも副作用を引き起こす可能性が低いことが示唆された。

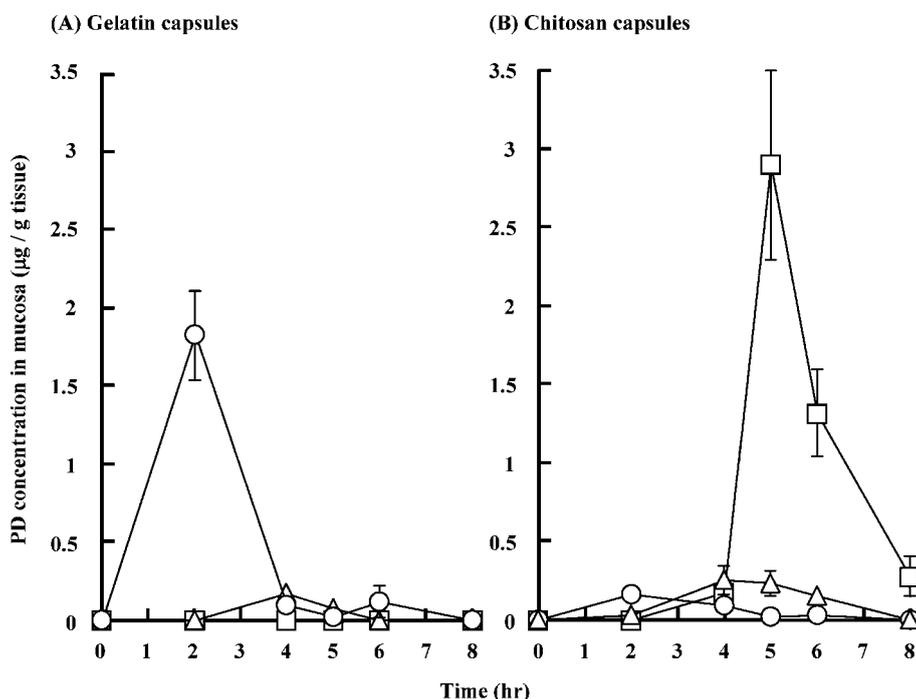


Fig. 3. The Concentration of Prednisolone (PD) in Various Intestinal Mucosae after Oral Administration of (A) Gelatin Capsules (1.5 mg) or (B) Chitosan Capsules (1.5 mg)

○: Upper small intestine, △: Lower small intestine, □: Large intestine. Results are expressed as the mean ± S.E. of four experiments.

Table 1. Area under the Mucosal Concentration-time Curve ( $AUC_{mucosa}$ ) of Prednisolone after Oral Administration to Rats in Different Dosage Forms

	$AUC_{mucosa 0 \rightarrow \infty}$ (ng/g tissue · hr)		
	S.I. <sub>upper</sub>	S.I. <sub>lower</sub>	L.I.
Gelatin capsules (1.5 mg)	3988.9	343.5	0
Chitosan capsules (1.5 mg)	526.9	899.2	5751.4

S.I.<sub>upper</sub>: Upper small intestine, S.I.<sub>lower</sub>: Lower small intestine, L.I.: Large intestine. Results are expressed as the mean of four experiments.

#### 4. キトサンカプセルに封入されたプレドニゾロンの大腸炎治療効果および全身性副作用の検討

次にキトサンカプセルに封入されたプレドニゾロンの大腸炎治療効果について検討を行うため、大腸炎モデルラットを作製した。大腸炎モデルは起炎物質として知られている Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) を 30 mg/25% EtOH 0.25 ml/rat でラットに単回注腸投与することにより作製した。大腸炎の指標として Myeloperoxidase (MPO) 活性、Colon wet weight/Body weight (C/B) 比、及び肉眼的観察を評価した。その結果、TNBS 注腸投与直後より大腸炎が誘発され、5 日目において最も重篤な大腸炎

が観察され、その後大腸炎は徐々に自然治癒した。また、全身性副作用の指標として Thymus weight/Body weight (T/B) 比を評価したところ、T/B 比は 5 日目まで減少し続け、大腸炎の自然治癒に伴い再び増加した。これらの結果より、TNBS を単回注腸投与することによりラットに一過性の大腸炎が誘発することが確認された。したがって、以降の実験では TNBS 投与 5 日目に大腸炎の治療効果及び全身性副作用を検討した。

TNBS 注腸投与日よりプレドニゾロン封入キトサンカプセルを 0.5, 1.0, 1.5 mg/day、プレドニゾロン封入ゼラチンカプセルを 0.5, 1.5 mg/day で各群に連日経口投与し、TNBS 投与 5 日後におけるこれら薬物の治療効果を MPO 活性により評価した (Fig. 5)。その結果、TNBS 注腸投与により増大した MPO 活性は、プレドニゾロン封入キトサンカプセル及びゼラチンカプセルの経口投与により顕著に低下し、大腸炎の抑制効果が認められた。さらに、キトサンカプセル (1.5 mg) 投与群の MPO 活性値は、同用量のゼラチンカプセル投与群の約 1/2 であり、優れた大腸炎治療効果が認められた。この結果から、キトサンカプセルを用いてプレドニゾロンを炎

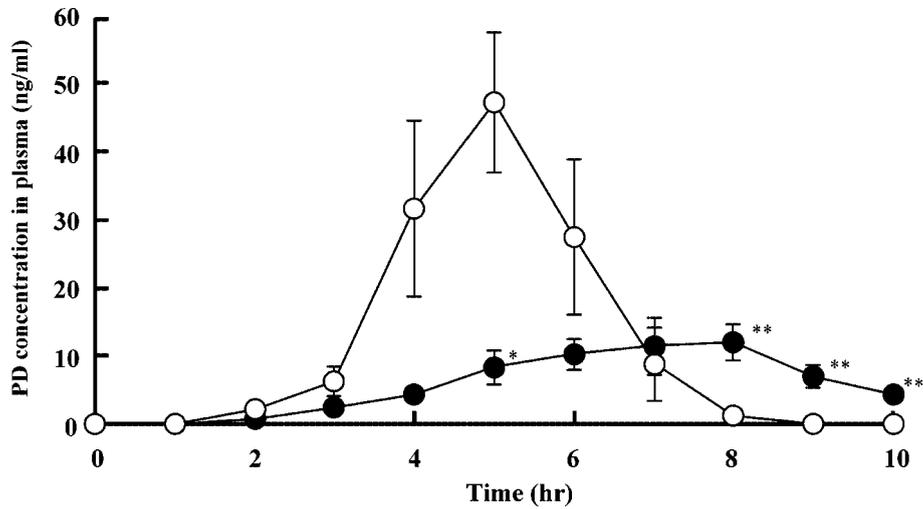


Fig. 4. Plasma Concentration of Prednisolone (PD) after Oral Administration to Rats with Different Dosage Forms ●: Chitosan capsules (1.5 mg), ○: Gelatin capsules (1.5 mg). Results are expressed as the mean ± S.E. of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with rat administered gelatin capsules.

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of Prednisolone after Oral Administration to Rats in Different Dosage Forms

	$C_{max}$ (ng/ml)	$T_{max}$ (hr)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng/ml · hr)	B.A. (%)
Gelatin capsules (1.5 mg)	$55.1 \pm 9.9$	$4.5 \pm 0.3$	$124.8 \pm 15.4$	1.47
Chitosan capsules (1.5 mg)	$15.5 \pm 1.8^{**}$	$7.0 \pm 0.4^{**}$	$69.3 \pm 15.2^*$	0.87

Results are expressed as the mean ± S.E. of four experiments. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , (N.S.): not significant, compared with rat administered gelatin capsules.

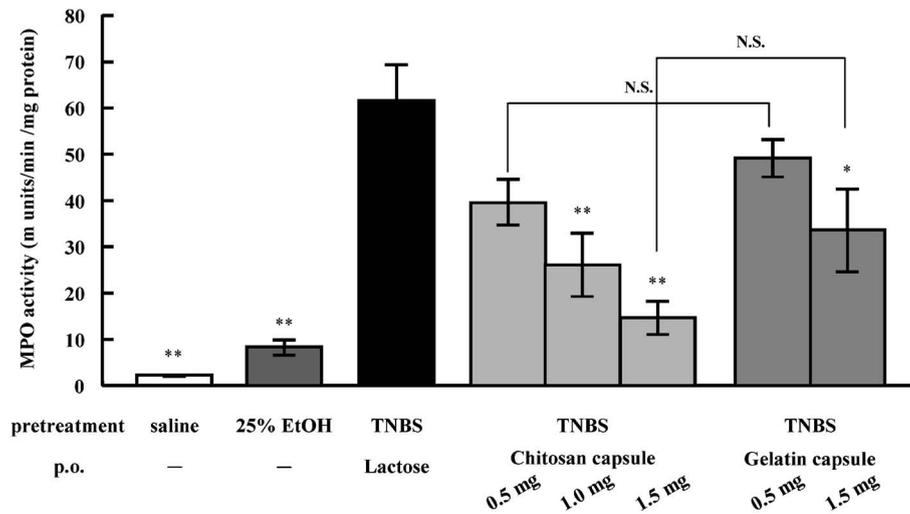


Fig. 5. Effects of Different Dosage Forms of Prednisolone on the Myeloperoxidase (MPO) Activity of the Colonic Tissues on Day 5 in Rats ■: Chitosan capsule, □: Gelatin capsule, p.o.: Oral administration. Results are expressed as the mean ± S.E. of four experiments. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , compared with rat given TNBS. N.S.: not significant, compared with rat administered gelatin capsule at the same dose.

症部位である大腸へ局所的に作用させることによって、大腸炎治療効果の増強が可能であることが明らかとなった。

また、MPO 活性の場合と同様の投与プロトコ

ルを用いて、TNBS 投与 5 日後におけるこれら薬物の治療効果を C/B 比により評価した (Fig. 6)。その結果、TNBS 注腸投与により増大した C/B 比は、プレドニゾロン封入キトサンカプセル及びゼラ

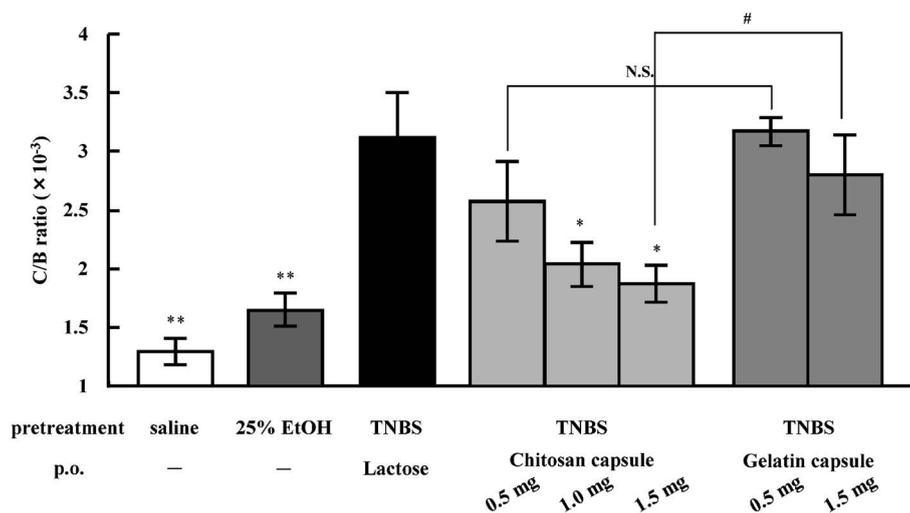


Fig. 6. Effects of Different Dosage Forms of Prednisolone on the Ratio of Colonic Tissue Wet Weight to Body Weight (C/B Ratio) on Day 5 in Rats

□: Chitosan capsule, ■: Gelatin capsule, p.o.: Oral administration. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with rat given TNBS. #:  $p < 0.05$ , N.S.: not significant, compared with rat administered gelatin capsule at the same dose.

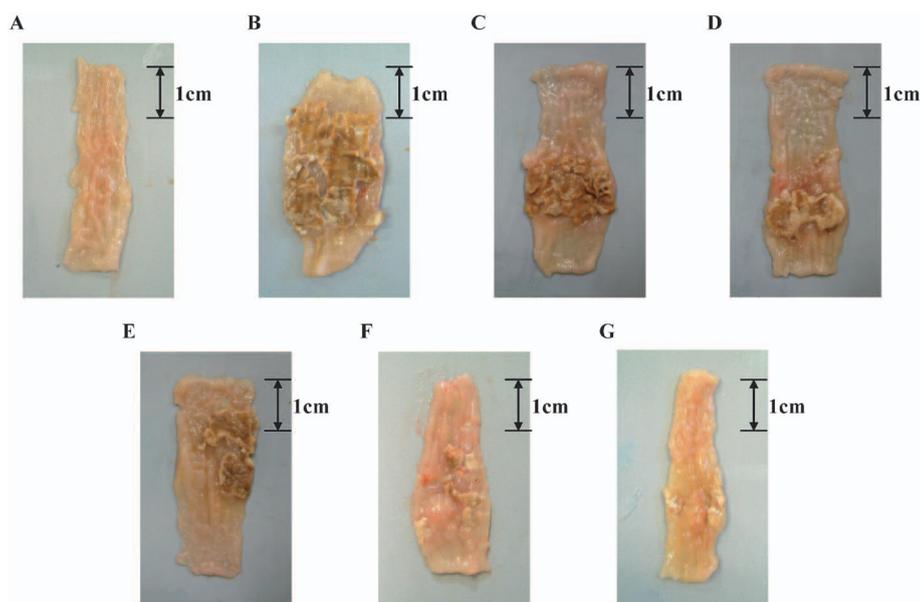


Fig. 7. Photographs of the Colon (4 cm) from TNBS (30 mg/25%EtOH 0.25 ml)-induced Colitis Rats 5 Days after Oral Administration to Rats in Different Dosage Forms

A: Saline, B: TNBS, C: Gelatin capsule (0.5 mg), D: Gelatin capsule (1.5 mg), E: Chitosan capsule (0.5 mg), F: Chitosan capsule (1.0 mg), G: Chitosan capsule (1.5 mg).

チンカプセルの経口投与により低下し、大腸炎の抑制効果が認められた。さらに、MPO 活性の場合と同様、キトサンカプセル (1.5 mg) 投与群では同用量のゼラチンカプセル投与群に比べ優れた大腸炎治療効果が認められた。したがって C/B 比の結果からもキトサンカプセルを用いたプレドニゾロンの大腸特異的送達による治療効果の増強が確認された。

また、MPO 活性及び C/B 比の場合と同様の投

与プロトコルを用いて、TNBS 投与 5 日後におけるこれらの薬物の治療効果を肉眼的に評価した (Fig. 7)。その結果、TNBS 注腸投与によって大腸に炎症、潰瘍の誘発が肉眼的に確認され、この大腸炎は、プレドニゾロン封入キトサンカプセル及びゼラチンカプセルの経口投与により軽減したことから、大腸炎の抑制効果が認められた。さらに、キトサンカプセル投与群ではゼラチンカプセル投与群に

比べ優れた大腸炎治療効果が認められたことから、MPO 活性、C/B 比の結果同様、キトサンカプセルによるプレドニゾロンの大腸特異的送達法の有用性が確認された。

さらに、同様の投与プロトコルを用いて、TNBS 投与 5 日後におけるこれらの薬物の全身性副作用を T/B 比及び肉眼的観察により評価した (Figs. 8, 9). その結果、T/B 比は、プレドニゾロン投与により投与量依存的に低下する傾向が認められたが、キトサンカプセル群の T/B 比は、同じ投

与量のプレドニゾロンで比較するとゼラチンカプセル群に比べ高い値を保つことが認められた (Fig. 8). また、胸腺の肉眼的観察の結果、TNBS 注腸投与によってわずかに観察された胸腺の萎縮はプレドニゾロン封入キトサンカプセル及びゼラチンカプセルの経口投与によりさらに萎縮し、プレドニゾロンによる全身性副作用が認められた (Fig. 9). しかし、キトサンカプセル投与群ではゼラチンカプセル投与群ほど大きな胸腺の萎縮が認められなかったことから (Fig. 9), キトサンカプセルを用いてプレ

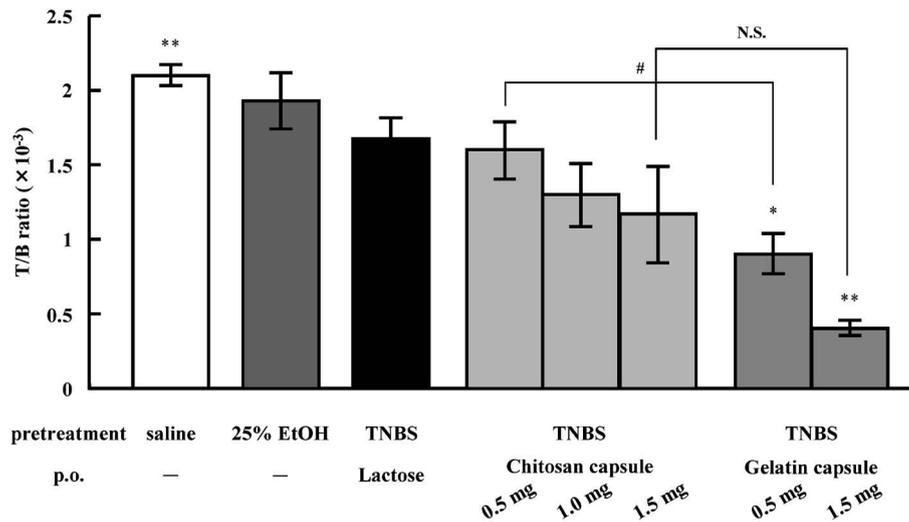


Fig. 8. Effects of Different Dosage Forms of Prednisolone on the Ratio of Thymus Wet Weight to Body Weight (T/B Ratio) on Day 5 in Rats

□: Chitosan capsule, ■: Gelatin capsule, p.o.: Oral administration. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four experiments. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , compared with rat given TNBS. #:  $p < 0.05$ , N.S.: not significant, compared with rat administered gelatin capsule at the same dose.

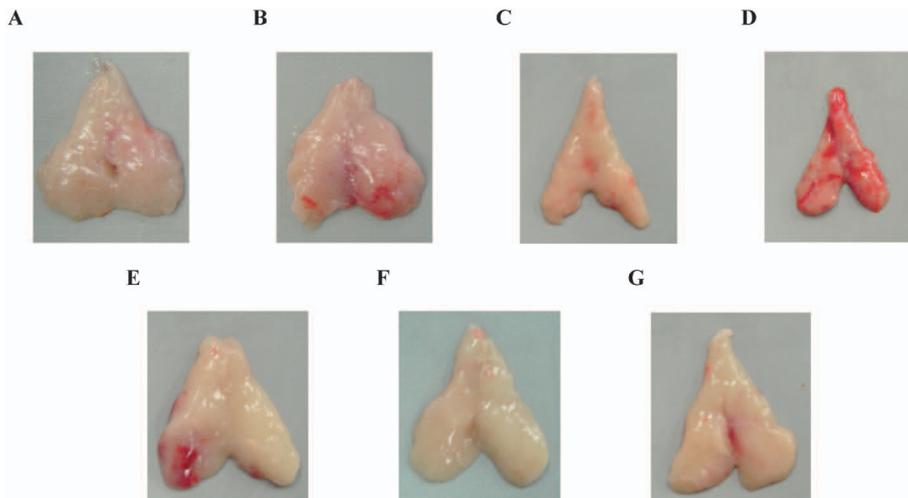


Fig. 9. Photographs of the Thymus from TNBS (30 mg/25% EtOH 0.25 ml)-induced Colitis Rats 5 Days after Oral Administration to Rats in Different Dosage Forms

A: Saline, B: TNBS, C: Gelatin capsule (0.5 mg), D: Gelatin capsule (1.5 mg), E: Chitosan capsule (0.5 mg), F: Chitosan capsule (1.0 mg), G: Chitosan capsule (1.5 mg).

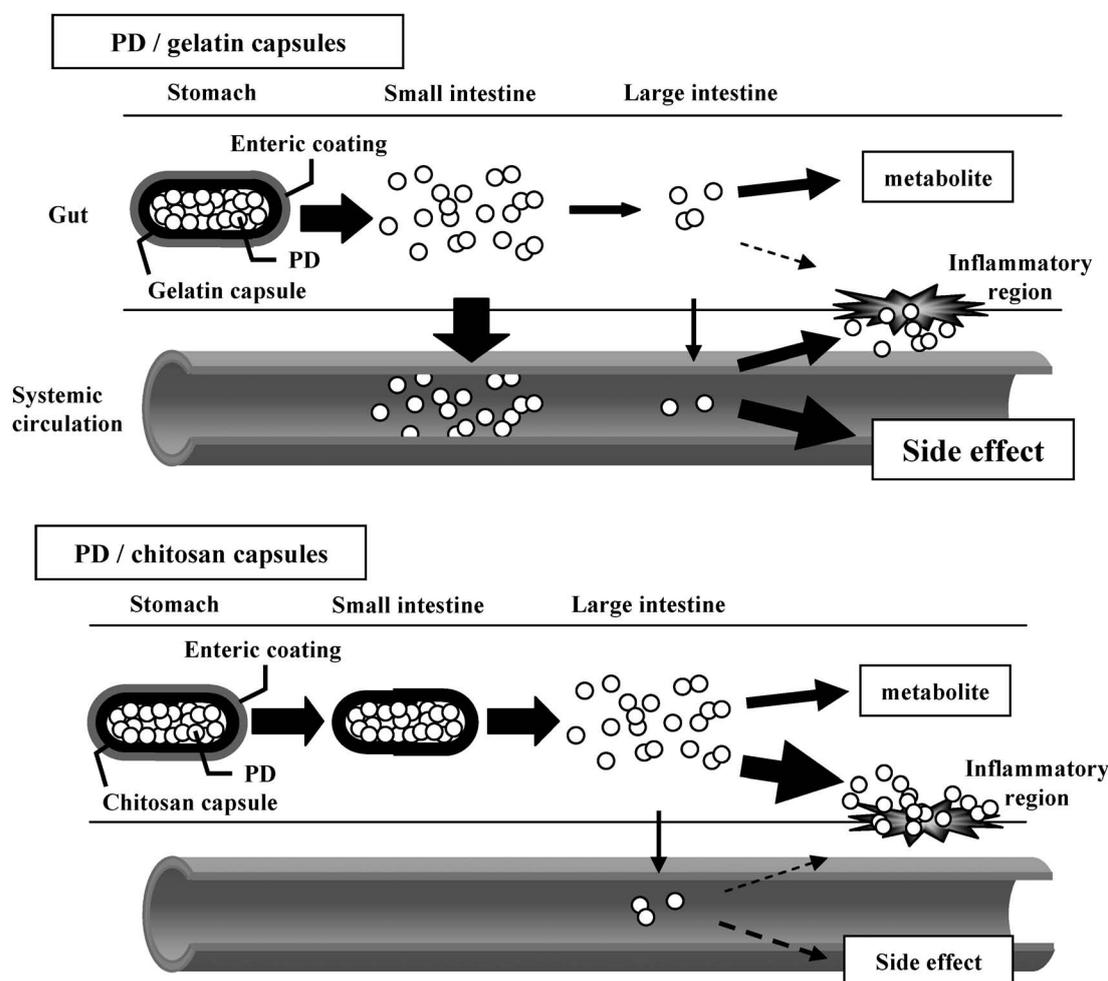


Fig. 10. Proposed Mechanism of Colon Specific Delivery of Prednisolone Using Chitosan Capsules

ドニゾロンを炎症部位である大腸へ局所的に作用させることにより全身性副作用を軽減できることが確認された。

これらの結果より、キトサンカプセルを用いたプレドニゾロンの大腸特異的送達法のメカニズムを Fig. 10 にまとめた。ゼラチンカプセルを用いてプレドニゾロンを経口投与した場合、胃では腸溶性コーティングのために薬物の放出はみられないが、小腸へ移行後、腸溶性コーティングが溶け、薬物の大部分は小腸において放出、吸収されて全身血中へ移行するため、疾患部位である大腸にはほとんど到達しない。また、プレドニゾロンが全身循環に高濃度移行するために、胸腺萎縮などの副作用も観察される。一方、キトサンカプセルを用いてプレドニゾロンを経口投与した場合、胃、小腸では腸内細菌が少ないため、キトサンカプセルが崩壊せず薬物の放出がほとんどみられないので、プレドニゾロンの全

身循環への移行性が制限され副作用が軽減される。その後、カプセルが大腸に移行すると大腸に豊富に存在する腸内細菌の作用によりキトサンカプセルから内容薬物であるプレドニゾロンが放出され、高濃度のプレドニゾロンが炎症部位へ移行することが期待できる。そのためキトサンカプセル群はゼラチンカプセル群に比べ、プレドニゾロンの大腸炎治療効果の増強及び全身性副作用の軽減がみられたと推測される。

以上、キトサンカプセルはプレドニゾロンの大腸特異的送達法に有用であることが確認された。これらの知見は、大腸炎治療薬の大腸特異的送達を達成する上で有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

謝辞 本研究に際しまして、貴重な御助言を賜りました藤田卓也先生、岡田直貴先生並びに実際に

研究を遂行して頂きました沼田博和氏, 今井美智子氏, 伊東裕美氏, 小泉勇人氏, 坂本史子氏, 本間信次氏に謹んで深謝致します。また, キトサンカプセル並びにゼラチンカプセルを御提供頂きましたアイセロ化学株式会社神村基和氏, 伊藤勝仁氏に心から御礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A. C., Horak I., *Cell*, **75**, 253–261 (1993).
- 2) Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W., *Cell*, **75**, 263–274 (1993).
- 3) Mombaerts P., Mizoguchi E., Grusby M. J., Glimcher L. H., Bhan A. K., Tonegawa S., *Cell*, **75**, 274–282 (1993).
- 4) Rudolph U., Finegold M. J., Rich S. S., Hariman G. R., Srinivasan Y., Brabet P., Boulay G., Bradley A., Birnbaumer L., *Nature Genet.*, **10**, 143–150 (1995).
- 5) Rudolph U., Finegold M. J., Rich S. S., Hariman G. R., Srinivasan Y., Brabet P., Bradley A., Birnbaumer L., *J. Clin. Immunol.*, **15**, 101S–105S (1995).
- 6) Hermiston M. L., Gordon J. I., *Science*, **270**, 1203–1207 (1995).
- 7) Rennick D. M., Fort M. M., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **278**, G829–833 (2000).
- 8) Xu C. T., Meng S. Y., Pan B. R., *World J. Gastroenterol.*, **10**, 2311–2317 (2004).
- 9) Arts J., D’Haens G., Zeegers M., Van Assche G., Hiele M., D’Hoore A., Penninckx F., Vermeire S., Rutgeerts P., *Inflamm. Bowel Dis.*, **10**, 73–78 (2004).
- 10) Van Assche G., D’Haens G., Noman M., Vermeire S., Hiele M., Asnong K., Arts J., D’Hoore A., Penninckx F., Rutgeerts P., *Gastroenterology*, **125**, 1025–1031 (2003).
- 11) Lopez-Sanroman A., Bermejo F., Carrera E., Garcia-Plaza A., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **20**, 161–166 (2004).
- 12) Cuffari C., Dassopoulos T., Turnbough L., Thompson R. E., Bayless T. M., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **2**, 410–417 (2004).
- 13) Paoluzi O. A., Pica R., Marcheggiano A., Crispino P., Iacopini F., Iannoni C., Rivera M., Paoluzi P., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **16**, 1751–1759 (2002).
- 14) Actis G. C., Bresso F., Astegiano M., Demarachi B., Sapone N., Boscaglia C., Rizzetto M., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **15**, 1307–1311 (2001).
- 15) Hogenauer C., Wenzl H. H., Hinterleitner T. A., Petritsch W., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **18**, 415–423 (2003).
- 16) Fellermann K., Tanko Z., Herrlinger K. R., Witthoef T., Homann N., Bruening A., Ludwig D., Stange E. F., *Inflamm. Bowel Dis.*, **8**, 317–324 (2002).
- 17) Khan M. Z., Prebeg Z., Kurjakovic N., *J. Control. Release*, **58**, 215–222 (1999).
- 18) Akala E. O., Elekwachi O., Chase V., Johnson H., Lazarre M., Scott K., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **29**, 375–386 (2003).
- 19) Gupta V. K., Beckert T. E., Price J. C., *Int. J. Pharm.*, **213**, 83–91 (2001).
- 20) Bott C., Rudolph M. W., Schneider A. R., Schirrmacher S., Skalsky B., Petereit H. U., Langguth P., Dressman J. B., Stein J., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **20**, 347–353 (2004).
- 21) Sangalli M. E., Maroni A., Foppoli A., Zema L., Giordano F., Gazzaniga A., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **22**, 469–476 (2004).
- 22) Muraoka M., Hu Z., Shimokawa T., Sekino S., Kurogoshi R., Kuboi Y., Yoshikawa Y., Takada K., *J. Control. Release.*, **52**, 119–129 (1998).
- 23) Jung Y. J., Lee J. S., Kim Y. M., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1767–1775 (2001).
- 24) Yano H., Hirayama F., Kamada M., Arima H., Uekama K., *J. Control. Release*, **79**, 103–112 (2002).
- 25) Doh M. J., Jung Y. J., Kim I., Kong H. S., Kim Y. M., *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 258–263 (2003).
- 26) Zou M., Okamoto H., Cheng G., Hao X., Sun J., Cui F., Danjo K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **59**, 155–160 (2005).
- 27) Tozaki H., Fujita T., Odoriba T., Terabe A., Okabe S., Muranishi S., Yamamoto A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1107–1112 (1999).
- 28) Tozaki H., Fujita T., Komoike J., Kim S. I., Terashima H., Muranishi S., Okabe S., Yamamoto A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 257–261 (1999).
- 29) Katsuma M., Watanabe S., Takemura S.,

- Sako K., Sawada T., Masuda Y., Nakamura K., Fukui M., Connor A. L., Wilding I. R., *J. Pharm. Sci.*, **93**, 1287–1299 (2004).
- 30) Takeru F., *Kagakukougyou*, **58**, 881–819 (1991).
- 31) Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1016–1021 (1997).
- 32) Tozaki H., Fujita T., Odoriba T., Terabe A., Suzuki T., Tanaka C., Okabe S., Muranishi S., Yamamoto A., *Life Sci.*, **64**, 1155–1162 (1999).
- 33) Tozaki H., Odoriba T., Okada N., Fujita T., Terabe A., Suzuki T., Okabe S., Muranishi S., Yamamoto A., *J. Control. Release*, **82**, 51–61 (2002).
- 34) Fetih G., Lindberg S., Itoh K., Okada N., Fujita T., Habib F., Artursson P., Attia M., Yamamoto A., *Int. J. Pharm.*, **293**, 127–135 (2005).
- 35) Fetih G., Fausia H., Okada N., Fujita T., Yamamoto A., *J. Drug Target.*, **14**, 165–172 (2006).