

$\beta$ -シクロデキストリン包接化合物に対する競合包接阻害物質としてのシンナリジンの  
*In vitro* 評価：プロゲステロン膜透過速度に対する効果

村岡 篤, 徳村 忠一,\* 町田 良治

***In vitro* Evaluation of Cinnarizine as a Competing Agent to  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Effect of Cinnarizine on the Membrane Permeation Rate of Progesterone from Its  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex**

Atsushi MURAOKA, Tadakazu TOKUMURA,\* and Yoshiharu MACHIDA  
Department of Drug Delivery Research, Hoshi University, 2-4-41 Ebara,  
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received May 16, 2007; Accepted September 26, 2007; Published online October 16, 2007)

The use of competing agents is considered a powerful tool for the development of a drug-delivery system with drug/cyclodextrin inclusion complexes. However, there are very few studies examining this issue. To explain this phenomenon, it was thought that a competing agent with a sufficiently high stability constant had not yet been reported. In this study, cinnarizine (CN), which has a high stability constant with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and unique solubility characteristics, was selected, and its ability as a competing agent was examined in a membrane permeability study. The permeability study showed that the permeation rates of the drugs flurbiprofen, progesterone, and spironolactone decreased with their stability constants with the addition of  $\beta$ -CD. In one of the drugs, progesterone (Pro), the decrease was restored by the addition of CN. The amount of CN added was a 1 : 1 molar ratio to the amount of Pro. However, no similar action was induced with the addition of DL-phenylalanine (Phe) in the permeation study at the 1 : 5 (Pro : Phe) molar ratio. These findings indicate that CN acts as a competing agent, and its action is much stronger than that of Phe.

**Key words**—competing agent; permeability study; cinnarizine;  $\beta$ -cyclodextrin; progesterone

## 緒 言

シクロデキストリン (CD) はその疎水的空洞内に薬物分子を包接することで、薬物の水溶性、脂溶性、イオン解離定数など種々の物性を変化させることが知られている。<sup>1,2)</sup> これらの性質を利用して、医薬品の安定化,<sup>3)</sup> 溶解性の向上,<sup>4)</sup> 薬物性溶血の防止,<sup>5)</sup> 皮膚の透過性促進<sup>6-8)</sup>等が薬剤・製剤学領域において活発に研究されてきた。なかでも CD 包接化による溶解性の改善は、難溶性医薬品の生物学的利用能の向上につながるため、数多くの報告がなされている。<sup>9-19)</sup>

しかし、薬物の溶解性を改善したにも係わらず、薬物と CD の安定度定数が大き過ぎるために吸収され得る遊離薬物量が増加せず、生物学的利用能の向上が認められないことがある。<sup>20)</sup> このような場合に

は、CD 空洞内から薬物分子を追い出す競合包接阻害物質 (Competing Agent) の同時投与により遊離薬物量を増加させ、生物学的利用能を改善できることを報告した。この報告では、競合包接阻害物質として DL-Phenylalanine (Phe), L-Isoleucine を使用した。<sup>21-23)</sup> この競合包接阻害物質を利用することは、包接化合物を薬物送達システム (DDS) に組み込む際に非常に有力な手段であると考えられるが、これまであまり検討されてきていない。これは、安定度定数の大きな競合包接阻害物質が報告されていないこともその一因と考えられる。

そこで、 $\beta$ -CD とモル比 1 : 2 で包接化合物を作り見掛けの安定度定数が  $6200 \text{ M}^{-1}$  ( $20^\circ\text{C}$ ) と大きな値を示し、その物質自体を経口的に投与した際には、溶解性が低いために生物学的利用能が低いことが報告されている<sup>20)</sup> Cinnarizine (CN) に注目し、その競合包接阻害物質としての作用を、*in vitro* 膜透過実験により評価したので報告する。

星薬科大学医療薬剤学教室

\*e-mail: tokumura2003@yahoo.co.jp

## 実験の部

1. 試薬  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) と DL-Phenylalanine (Phe)は和光純薬工業㈱より、また、Flurbiprofen (Flu), Progesterone (Pro), Spironolactone (Spi), Cinnarizine (CN) は Sigma 社より購入したものを用いた。その他の試薬は、特級規格若しくは HPLC 用を使用した。

2. 装置 示差走査熱分析計 (DSC) は、理学社製の DSC 8230 D 型を使用した。

吸光度計は、日立製作所製の 220 A Photospectrometer を使用した。

HPLC 装置は、島津社製の以下のものを使用した。また、カラムは YMC AM 312 150×6.0 mm I.D. (YMC 社製) を使用した。

ポンプ：LC-9A, UV 検出器：SPD-6A, クロマトパック：C-R4A, カラムオープン：CTO-6B, システムコントローラ：SCL-6B, オートインジェクター：SIL-6B.

3. 包接化合物の調製 包接化合物は、既に報告されている共沈法により調製した。<sup>19,24,25)</sup> Flu/ $\beta$ -CD 包接化合物 (Flu/ $\beta$ -CD) の調製では、Flu 1.00 g と  $\beta$ -CD 7.90 g, Pro/ $\beta$ -CD 包接化合物 (Pro/ $\beta$ -CD) では、Pro 1.25 g と  $\beta$ -CD 15.33 g, Spi/ $\beta$ -CD 包接化合物 (Spi/ $\beta$ -CD) では、Spi 1.25 g と  $\beta$ -CD 11.55 g をそれぞれ精製水 500 ml に加え、7 日間室温にてかく拌後、ガラスフィルターを用い沈殿物を濾別した。その後、五酸化ニリン共存下、室温で減圧乾燥を行った。実験には、目開き 850  $\mu$ m のふるいで篩過したものを用いた。

4. DSC の測定 DSC は、各々の薬物単独、薬物と  $\beta$ -CD の物理的混合物、及び包接化合物について測定を行った。物理的混合物は、上釜の報告した包接モル比<sup>1)</sup>に従い、Flu は 1 : 1 (薬物 :  $\beta$ -CD), Pro および Spi は 1 : 2 のモル比となるように乳鉢中で混和したものを用いた。基準物質にアルミナ粉末を使用し、試料約 10 mg, 昇温速度 10°C/min, 測定温度範囲 50-250°C の条件で測定を行った。

5. 包接化合物中薬物含量の測定 包接化合物中の薬物含量は、吸光度測定法により測定した。また、競合包接阻害実験に用いた Pro/ $\beta$ -CD に関しては HPLC 法による測定も行った。

### 5-1. Flu/ $\beta$ -CD の吸光度測定法による含量測定

Flu/ $\beta$ -CD 50.0 mg を水/メタノール (1 : 1) 混液に溶解し 250 ml としたのち、この液 2.5 ml を取り、水/メタノール (1 : 1) 混液で 100 ml としたのち、波長 248 nm における吸光度を測定した。薬物含量はあらかじめ作成した検量線より算出した。

### 5-2. Pro/ $\beta$ -CD の吸光度測定法による含量測定

Pro/ $\beta$ -CD 10.0 mg をエタノール 50 ml に溶解したものに、水 50 ml を加えた。これに、水/エタノール (1 : 1) 混液を加えて 100 ml としたのち、この液 5 ml を取り、水/エタノール (1 : 1) 混液で 50 ml とした。この液につき、波長 241 nm における吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線により薬物含量を算出した。

### 5-3. Spi/ $\beta$ -CD の吸光度測定法による含量測定

Spi/ $\beta$ -CD 50.0 mg を水/メタノール (1 : 1) 混液に溶解し 250 ml としたのち、この液 5 ml を取り、水/メタノール (1 : 1) 混液で 100 ml とした。この液の波長 238 nm における吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線により薬物含量を算出した。

### 5-4. Flu/ $\beta$ -CD の HPLC 法による含量測定

Flu/ $\beta$ -CD 10 mg をメタノール 10 ml に溶解した液につき、以下の条件で HPLC による測定を行った。

移動相は、アセトニトリル : 水 : 過塩素酸 : 過塩素酸ナトリウム = 548 : 452 : 1 : 5 (V/V/V/W) を使用した。カラム温度 40°C, 測定波長 254 nm, 流速 1.0 ml/min, 注入量は 50  $\mu$ l とした。薬物濃度は、あらかじめ作成した検量線により求めた。

### 5-5. Pro/ $\beta$ -CD の HPLC 法による含量測定

5-4 項に準じ、移動相組成のみをアセトニトリル : 水 : 過塩素酸 : 過塩素酸ナトリウム = 716 : 284 : 1 : 5 (V/V/V/W) に変更し、測定を行った。

6. 薬物及び包接化合物の膜透過実験 膜透過実験は、Donor 側と Acceptor 側の各セルの容積が 200 ml, 膜表面積が 113.04 cm<sup>2</sup> のガラス製膜透過装置を用いた。各セル内の溶液はスターラーによりかく拌した。膜透過実験は 37°C の温浴中で実験を行った。

膜については、 $\beta$ -CD 及び包接化合物は透過させず、薬物分子のみを透過させる膜として Spectra/Por<sup>®</sup> Cellulose Ester Asymmetric Membrane MWCO: 500 (Spectrum Laboratories 社製) を選択した。膜

は、あらかじめ多量の精製水で洗浄したのち、実験に使用した。

**6-1.  $\beta$ -CD の膜透過実験** Donor 側には  $\beta$ -CD 500 mg を精製水 200 ml に溶解したもの、Acceptor 側には精製水 200 ml を入れ、両セルの溶液をマグネチックスターラーでかく拌した。6 時間後 Acceptor 側溶液 100 ml を取り出し、あらかじめ重量を測定したナス型フラスコに入れ、エバポレーターにより水を減圧留去した。五酸化二リン共存下で減圧乾燥し、ナス型フラスコの重量変化により、 $\beta$ -CD の膜透過量を算出した。

**6-2. 薬物及び包接化合物の膜透過実験での薬物濃度** Donor 側初期薬物濃度は、37°C での水溶液の飽和濃度以下となるよう、Flu は 0.65 mg/200 mL ( $1.3 \times 10^{-1}$  mmol/l)、Pro は 1.90 mg/200 ml ( $3.02 \times 10^{-2}$  mmol/l)、Spi は 0.85 mg/200 ml ( $4.84 \times 10^{-2}$  mmol/l) にそれぞれ設定した。包接化合物は、薬物量としてそれぞれの薬物に相当する濃度となる量を使用した。

**6-3. Flu 及び Flu/ $\beta$ -CD 膜透過実験** Flu 単独の膜透過実験は、Flu 13 mg/20 ml Dimethylsulfoxide (DMSO) 溶液を作成し、この 1 ml を Donor 側セル (精製水 199 ml) に添加することで実験を開始した。Flu/ $\beta$ -CD の膜透過では、Flu/ $\beta$ -CD 19.07 mg/5 ml DMSO 溶液を調製し、その 1 ml を添加した。Acceptor 側には DMSO/精製水 (1 : 199) 200 ml を使用し、経時的に Acceptor 側から 2 ml サンプルングを行い、吸光度測定法 (248 nm) により定量を行った。サンプルング後、同容量の溶媒を加えてセル内の溶媒量を一定に保った。

**6-4. Pro 及び Pro/ $\beta$ -CD 膜透過実験** Pro 19 mg/10 ml DMSO 溶液、及び Pro/ $\beta$ -CD 79 mg/5 ml DMSO 溶液を調製し、その 1 ml を使用した。定量は、吸光度法 (241 nm) により行った。その他は 6-3 項と同様に実験を行った。

**6-5. Spi 及び Spi/ $\beta$ -CD 膜透過実験** Spi 17 mg/20 ml DMSO 溶液、及び Spi/ $\beta$ -CD 18.2 mg/5 ml DMSO 溶液を調製し、その 1 ml をそれぞれ添加した。定量は吸光度法 (238 nm) により行った。その他は 6-3 項と同様に実験を行った。

**6-6. Pro/ $\beta$ -CD に対する競合包接阻害物質としての CN の *In vitro* における評価と Phe との比較** 予備実験から、CN が膜に非常に吸着され易いこ

と及び CN が Pro の膜への吸着を抑制することが確認された。そこで以下の実験には、事前に膜透過装置の両セルに CN 溶液を添加し、1 時間かく拌後、大量の精製水で十分に洗浄した膜を使用した。なお、以下の実験では Pro の Donor 側初期濃度を 0.629 mg/200 ml ( $1.0 \times 10^{-2}$  mmol/l) とした。

**6-6-1. Pro 及び Pro/ $\beta$ -CD の膜透過実験** Pro 単独の膜透過実験としては、Pro 12.58 mg/10 ml DMSO 溶液を作成し、この液 0.5 ml を DMSO/精製水 (0.5 : 199) 199.5 ml に添加することで実験を開始した。包接化合物の膜透過実験には Pro/ $\beta$ -CD 52.27 mg/5 ml DMSO 溶液を作成し、この 0.5 ml を添加した。Acceptor 側には DMSO/水 (1 : 199) 200 ml を使用し、経時的に両側セルから 1 ml サンプルングを行った。定量は 5-5 項と同様に実施し、HPLC への注入量のみを 20  $\mu$ l とした。

**6-6-2. CN の Pro/ $\beta$ -CD に対する競合包接阻害物質としての評価** Pro に対し、競合包接阻害物質としてモル比 1 : 1 での効果を確認するために、CN の濃度は、0.75 mg/200 ml ( $1.0 \times 10^{-2}$  mmol/l) とした。

CN 15 mg/10 ml DMSO 溶液を作成し、あらかじめ両セルに入れた精製水 199 ml にこの液 0.5 ml をそれぞれ添加した。続いて、6-6-1 項と同様に調製した Pro 又は Pro/ $\beta$ -CD の DMSO 溶液 0.5 ml を Donor 側へ、DMSO 0.5 ml を Acceptor 側へ添加することで実験を開始した。経時的に両側セルより 1 ml サンプルングを行い、HPLC 法により定量を行った。

**6-6-3. Phe の Pro/ $\beta$ -CD に対する競合包接阻害物質としての評価** Phe での競合包接阻害実験は、薬物とのモル比 1 : 5 で実施した。

Phe の 1.65 mg/200 ml ( $5.0 \times 10^{-2}$  mmol/l) 水溶液を作成し、その 199.5 ml を両側のセルへ入れた。続いて 6-6-1 項と同様に調製した Pro 又は Pro/ $\beta$ -CD の DMSO 溶液 0.5 ml を Donor 側へ、DMSO 0.5 ml を Acceptor 側へ添加することで実験を開始した。経時的に両側セルより 1 ml サンプルングを行い、HPLC 法により定量を行った。

**6-7. 見掛けの膜透過速度の算出** 見掛けの膜透過速度 (膜透過速度) (mg/h) は、経時的 Acceptor 側薬物濃度推移の 1.5 時間までのデータから最小二乗法により直線を求め、その傾きとセルの容

積から算出した。

## 結果及び考察

**1. 包接化合物の調製と確認** CNの競合包接阻害作用を確認するためには、 $\beta$ -CDとの包接化により、吸収が阻害される、期待される吸収が認められない、あるいは吸収に大きく影響を与える *in vitro* のパラメータに、より吸収が不利となることを予測させる変動が観察されている化合物が必要である。しかし、このような薬物は、競合包接に関する論文で記載されているCNとサリチル酸以外見当たらない。<sup>20,26)</sup>そこで、 $\beta$ -CDとの安定度定数が大きいことが報告されている包接化合物をモデル薬物として選択し、これらに対する競合包接阻害作用について検討を行うこととした。 $\beta$ -CDとの安定度定数が5080, 13300, 27500 M<sup>-1</sup>と大きいことが報告されている<sup>1)</sup> Flu, Pro, Spiの3薬物について包接化合物を調製した。これらの調製物については、DSCの測定で薬物の融解に基づくピークが消失したことから、包接化合物であると判断した。包接化合物中の薬物含量は、Flu/ $\beta$ -CDでは17.04%, Pro/ $\beta$ -CDは12.03%, Sp/ $\beta$ -CDは23.35%であった。この値に基づき、薬物と $\beta$ -CDの包接モル比を算出したところ、Fluでは1:1(薬物: $\beta$ -CD)、Pro及びSpiは1:2であった。この包接化合物のモル比は文献値<sup>1)</sup>とよく一致した。

**2. 競合包接の *in vitro* 評価方法** 競合包接阻害現象を確認する方法としては、われわれが報告したザルトリウスの膜透過装置による実験<sup>23)</sup>とOnoらによるセルロースエステル膜を用いた透析実験<sup>27)</sup>が報告されている。これらは、薬物と競合的に $\beta$ -CDを取り合う作用を有する第3の成分を添加し、薬物と $\beta$ -CDの平衡を非結合型の薬物が増加する側へずらすことで薬物の膜透過量、又は膜透過速度の回復を確認する方法である。そこで今回は、一般的な装置で実験可能なセルロースエステル膜を用いた膜透過実験により、CNの競合包接阻害作用を評価することとした。

**3.  $\beta$ -CDの膜透過性** 膜透過実験は、薬物分子のみを透過させ $\beta$ -CD及びその包接化合物は透過させない膜として分画分子量500のセルロースエステル膜を選択し、実験に用いた。この膜は6時間で0.04%以下の $\beta$ -CDを透過すると報告されてい

る。<sup>27)</sup>

今回用いた膜透過装置での $\beta$ -CDの透過量を求めたところ、6時間で0.86%と低値であったが文献よりは高値を示した。これは実験装置の違いや、検出方法の違いによるものであると考えられる。したがって、本装置による $\beta$ -CDのAcceptor側への透過は、ほとんど無視し得る範囲内であると判断した。これにより、Acceptor側の薬物量を測定することでDonor側の遊離薬物量の増減を捉えることが可能であることが示された。

**4.  $\beta$ -CD包接化による膜透過速度の低下** 競合包接阻害は液相においての現象であることから、CNの競合包接阻害作用を確認するには、薬物を溶液状態でDonor側へ添加した方がより簡単な系となる。そこで薬物及び包接化合物はDMSOに溶解したものをDonor側へ添加することとした。

Flu及びFlu/ $\beta$ -CDをDonor側へ添加した時のAcceptor側のFlu濃度をFig. 1に示した。また、ProとSpiについても同様にFig. 2及びFig. 3に示した。包接化合物では、薬物単独時に比較して膜透過量が抑制されることが確認された。各実験の膜透過速度は、Table 1に示したように、Flu/ $\beta$ -CDでは薬物単独時の80.8%, Pro/ $\beta$ -CDでは67.9%, Spi/ $\beta$ -CDでは40.6%に減少した。

この膜透過速度の抑制は、Fig. 4に示したように、安定度定数との間に非常に良好な相関関係が存在することから、安定度定数の大きさに依存して抑

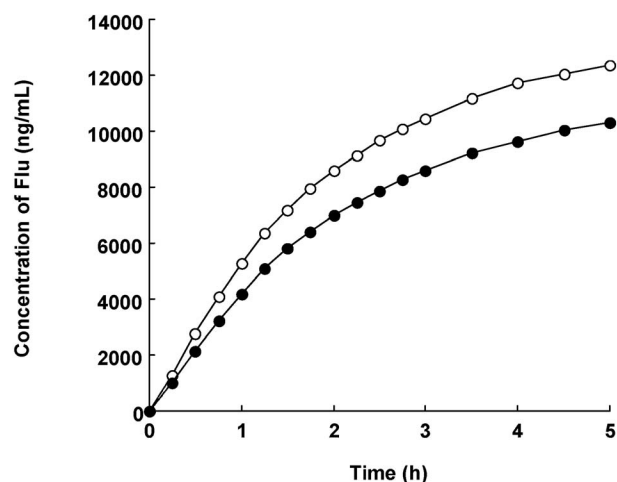


Fig. 1. Permeation Profiles of Flu through a Cellulose Ester Membrane (MWCO: 500) at 37°C

(○)Flu, (●) Flu/ $\beta$ -CD. Each point represents the mean of two experimental runs.

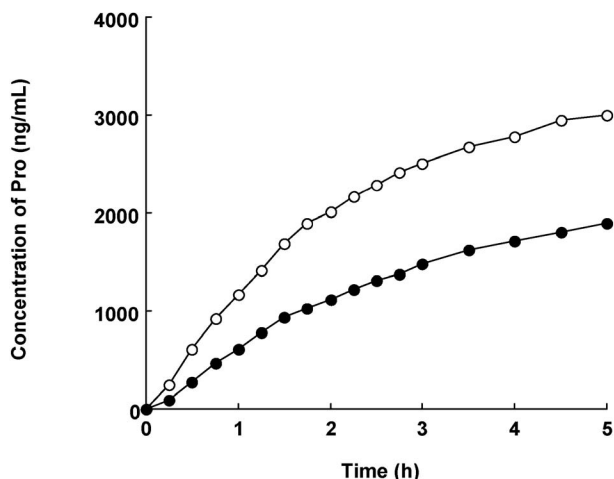


Fig. 2. Permeation Profiles of Pro through a Cellulose Ester Membrane (MWCO: 500) at 37°C  
 (○)Pro, (●) Pro/β-CD. Each point represents the mean of two experimental runs.

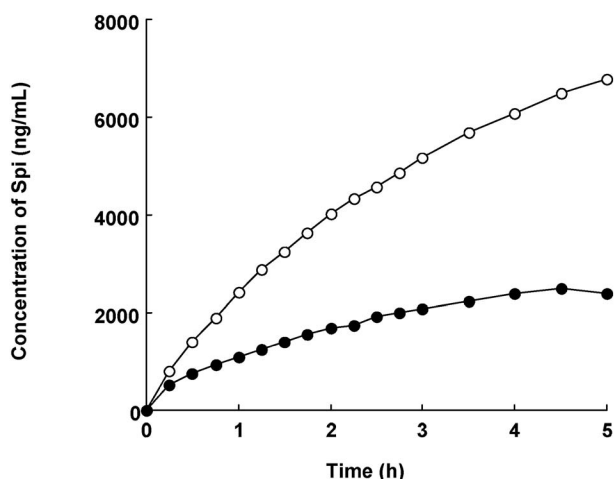


Fig. 3. Permeation Profiles of Spi through a Cellulose Ester Membrane (MWCO: 500) at 37°C  
 (○)Spi, (●) Spi/β-CD. Each point represents the mean of two experimental runs.

制率も大きくなることが明らかとなった。

これらの結果から、本実験装置を用いた膜透過実験により競合包接阻害物質による遊離薬物量の回復を、減少した膜透過速度が回復する現象として捉えられる可能性が示された。

**5. CNのPro/β-CDに対する競合包接阻害物質としての作用及びPheとの比較** CNの競合包接阻害作用の確認は、3化合物で行う計画であった。しかし、CNが膜及びガラスセルに吸着されることが判明し、この条件下でも膜透過速度を再現性よく測定できる化合物はProであった。この結果から、

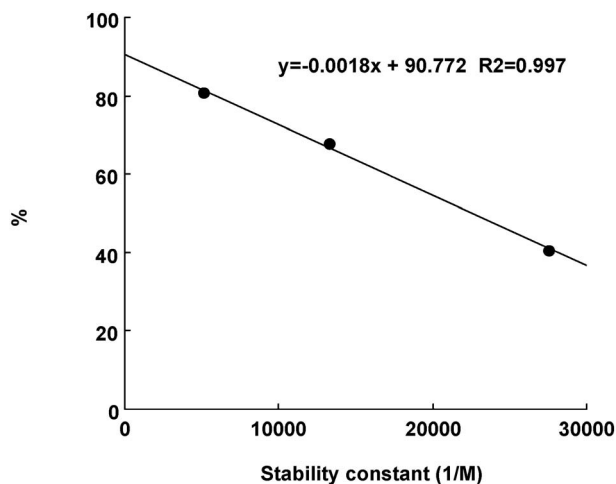


Fig. 4. Relationship between Stability Constants of the Drugs and the Percentages of Those Permeation Rates from the Inclusion Complexes to the Rate of the Intact Drugs  
 Data and the calculation method of % are shown in Table 1.

Table 1. Apparent Permeation Rates of Drugs and Effect of β-CD on the Rates

	Apparent stability constant (M <sup>-1</sup> )	Permeation rate (mg/h)	%**
Flu	—	0.976	—
Flu/β-CD	5080*	0.789	80.8
Pro	—	0.228	—
Pro/β-CD	13300*	0.155	67.9
Spi	—	0.424	—
Spi/β-CD	27500*	0.172	40.6

\* : Data from Ref. 1), \*\* : (Permeation rate of drug/β-CD) / (Permeation rate of drug) × 100, Each permeation rate is the mean of 2 experimental runs.

β-CDの存在により中程度の膜透過量の抑制がみられたProに対してCNの競合包接阻害作用を確認することとした。

CNの水溶液中での溶解度が非常に低いため、緩衝液等を用いてpHを下げて実験を行うことも考慮した。しかし、薬物とβ-CDとの安定度定数が溶液のpHにより大きく変動することがあるとの報告もあることから、<sup>28)</sup> ProのDonor側薬物濃度を下げて実験を行うこととした。

Figure 5にProとPro/β-CDの経時的変化及びPro/β-CDにCNを薬物とのモル比1:1で添加したときの結果を示した。CNの添加により膜透過量の大幅な回復が認められた。なお図では示さないが、Pro単独の透過実験にCNを添加しても、その影響は認められなかった。

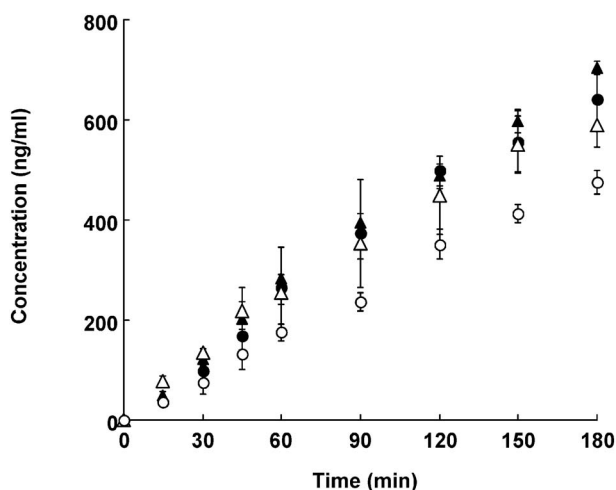


Fig. 5. Permeation Profiles of Pro through a Cellulose Ester Membrane (MWCO: 500) at 37°C

(●) Pro, (○) Pro/β-CD, (▲) Pro+CN, (△) Pro/β-CD+CN. Each point represents the mean and S.D. of 3 determinations.

Table 2. Apparent Permeation Rate of Pro

Preparation	Permeation rate (mg/h)	%
Pro	0.0523±0.0173*	100
Pro/β-CD	0.0328±0.0019*	62.75
Pro+CN	0.0547±0.0024*	104.60
Pro/β-CD+CN	0.0470±0.0047*	89.99
Pro+Phe	0.0471**	90.13
Pro/β-CD+Phe	0.0356**	68.05

\*: These values represent the mean±S.D. ( $n=3$ ). \*\*: These values represent the mean of 2 experimental runs. % shows the proportions of the permeation rate to that of Pro alone.

次に、既に競合包接阻害物質として報告した Phe について Pro/β-CD に対する作用を検討した。Phe は安定度定数が  $1000 \text{ M}^{-1}$  ( $34^\circ\text{C}$ ) であり、<sup>29)</sup> この競合包接阻害作用は、ザウトリウスの装置における透過速度の回復とピーグル犬での吸収実験における  $C_{\text{max}}$  と AUC の改善効果において、用量依存的であった。<sup>22)</sup> そこで、モル比 1 : 5 で添加したときの競合包接阻害作用について検討した。しかし、図では示さないが今回の添加量では膜透過量の回復は確認されず、競合包接阻害物質としての効果はほとんど認められなかった。

Table 2 に膜透過速度を示した。Pro と Pro/β-CD の関係は、Table 1 に示したデータとほぼ一致し、データの再現性が確認された。モル比 1 : 1 の CN 添加では、Pro 単独時の約 90% にまで膜透過速

度の回復が認められた。これに対し、モル比 1 : 5 の Phe の添加では膜透過速度の回復が認められなかった。今回 Phe と CN の間でこのような透過速度の回復に差が認められた理由としては、CN の見掛けの安定度定数が  $6200 \text{ M}^{-1}$  ( $20^\circ\text{C}$ )<sup>30)</sup> であり、直接比較はできないが、Phe の安定度定数  $1000 \text{ M}^{-1}$ <sup>29)</sup> よりも大きな値であることから、実際の安定度定数でも差があり、その差が今回の結果になったものと考えられる。

これらの結果から、CN は Phe よりも少量でかつ強力な競合包接阻害作用を有することが確認され、安定度定数の大きな β-CD 包接化合物に対する競合包接阻害物質としても利用できる可能性が示唆された。

謝辞 実験の一部にご協力いただいた二宮春日、三上 梓の両氏に感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Uekama K., *Yakugaku Zasshi*, **101**, 857-873 (1981).
- 2) Kurihara R., "Saikin no Seizaigijyutsu to Sono Ouyou V," *Iyaku (Medicine and Drug) Journal Co., Ltd., Tokyo*, 1988, pp. 116-120.
- 3) Uekama K., Fujinaga T., Hirayama F., Otagiri M., Kurono Y., Ikeda K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 627-630 (1982).
- 4) Arima H., Yunomae K., Miyake K., Irie T., Hirayama F., Uekama K., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 690-701 (2001).
- 5) Funasaki N., Okuda T., Neya S., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1056-1065 (2001).
- 6) Larrucea E., Arellano A., Santoyo S., Ygatrua P., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 251-260 (2001).
- 7) Ventura C.A., Fresta M., Paolino D., Pedotti S., Corsaro A., Puglisi G., *J. Drug Target*, **9**, 379-393 (2001).
- 8) Quaglia F., Varricchio G., Miro A., La Rotonda M.I., Larobina D., Mensitieri G., *J. Control. Release*, **71**, 329-337 (2001).
- 9) Uekama K., Matsuo N., Hirayama F., Ichibagase H., Arimori K., Tsubaki K., Satake K., *Yakugaku Zasshi*, **100**, 903-909 (1980).
- 10) Tsuruoka M., Hashimoto T., Seo H., Ichimasa S., Ueno O., Fujinaga T., Otagiri M.,

- Uekama K., *Yakugaku Zasshi*, **101**, 360–367 (1981).
- 11) Otagiri M., Imai T., Uekama K., *J. Pharmacobic-Dyn.*, **5**, 1027–1029 (1982).
- 12) Uekama K., Fujinaga T., Hirayama F., Otagiri M., Yamasaki M., Seo H., Hashimoto T., Tsuruoka M., *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1338–1341 (1983).
- 13) Seo H., Tsuruoka M., Hashimoto T., Fujinaga T., Otagiri M., Uekama K., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 286–291 (1983).
- 14) Jarvinen T., Jarvinen K., Schwarting N., Stella V. J., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 295–299 (1995).
- 15) Abosemah-Albidy A. Z., York P., Wong V., Losowsky M. S., Chrystyn H., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **44**, 35–39 (1997).
- 16) Dhanaraju M. D., Kumaran K. S., Baskaran T., Moorthy M. S., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 583–587 (1998).
- 17) Kaukonen A. M., Lennernas H., Mannermaa J. P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 611–619 (1998).
- 18) Yoo S. D., Yoon B. M., Lee H. S., Lee K. C., *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1119–1121 (1999).
- 19) Wong J. W., Yuen K. H., *Int. J. Pharm.*, **227**, 117–185 (2001).
- 20) Tokumura T., Tsushima Y., Tatsuishi K., Kayano M., Machida Y., Nagai T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2962–2967 (1985).
- 21) Tokumura T., Tsushima Y., Kayano M., Machida Y., Nagai T., *J. Pharm. Sci.*, **74**, 496–497 (1985).
- 22) Tokumura T., Nanba M., Tsushima Y., Tatsuishi K., Kayano M., Machida Y., Nagai T., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 391–394 (1986).
- 23) Tokumura T., Tsushima Y., Tatsuishi K., Kayano M., Machida Y., Nagai T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1275–1279 (1986).
- 24) Otagiri M., Imai T., Hirayama F., Uekama K., *Acta Pharm. Suec.*, **20**, 11–20 (1983).
- 25) Liu F. Y., Kildsig D. O., Mitra A. K., *Pharm. Res.*, **7**, 869–873 (1990).
- 26) Szejtli J., Gerloczy A., Sebestyen G., Fonagy A., *Pharmazie*, **36**, 283–286 (1981).
- 27) Ono N., Hirayama F., Arima H., Uekama K., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **8**, 133–139 (1999).
- 28) Xiang T. X., Anderson B. D., *Pharm. Res.*, **19**, 1215–1222 (2002).
- 29) Inoue Y., Miyata Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 809–816 (1981).
- 30) Tokumura T., Ueda H., Tsushima Y., Kasai M., Kayano M., Amada I., Nagai T., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4179–4184 (1984).