グリチルリチン自己投与製剤開発に関する基礎的検討

古閑健二郎*, 竹腰久美子, 巴山道子, 藤下 修

北陸大学薬学部臨床薬剤学

Basic Study on Development of Glycyrrhizin Formulations for Self Administration

Kenjiro Koga*, Kumiko Takekoshi, Michiko Tomoyama and Osamu Fujishita

Department of Clinical Pharmaceutics,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University

[Received December 10, 2005]
[Accepted February 10, 2006]

The aim of this study was to develop glycyrrhizin (GZ) dosage forms which can be self administered, such as intranasal solutions and pen-type subcutaneous injections. We found that the use of L-arginine and L-histidine as pharmaceutical adjuvants helped inhibit gel formation by GZ, and the optimal formulation was a GZ solution (400 mg/mL) prepared using a 20 mM phosphate buffered solution (pH 7.4) containing 4% L-arginine and 4% L-histidine. The apparent phase behavior and GZ content of this GZ formulation did not change for at least 2 weeks when kept at 4°C and 60°C. After intranasal and subcutaneous administration (50 mg/kg) to rats, the bioavailability of glycyrrhizin was 17% and 77%, respectively. These results suggested that the subcutaneous administration of our highly concentrated GZ solution is a useful substitute for commercial GZ products that are administered intravenously.

Key words — subcutaneous, intranasal, amino acid, gel formation, rat, bioavailability

緒 言

慢性肝疾患に適用されるグリチルリチン製剤には経口剤と注射剤があるが、実質、臨床で効果を示す剤形は注射剤のみとされている。この市販注射剤の濃度は、グリチルリチン酸として2 mg/mLであり、慢性肝疾患患者に対する処方量は40mLから100mLの範囲となるケースが多い。この濃度を高めた製剤を調製することにより、投与する容量を減らすことが可能になれば、投与経路の多様化につなげることができる。しかしながら、グリチルリチンは水溶液中において高濃度に溶解させようと試みた場合、容易にゲルを形成する性質をもつ。したがって、高濃度のグリチルリチン溶液を簡便かつ安全に調製する方法が望まれる。これまでに界面活性剤であるLabrasolを用いた調製法¹⁾、チョウジ油を用いた調製法²⁾が報告されているが、前者は界面活性剤を含むこと、後者は調製に時間を要することが問題であった。慢性肝疾患患者の一部が慢性的にグリチルリチン製剤の投与を受

けている現状から、有機溶剤あるいは界面活性剤などの可溶化剤の使用は好ましくない。また、市販のグリチルリチン注射剤の1回あたりの使用量が多いことで、投与部位が静脈内に限られている。このため、医療従事者においては次の欠点が生じている。(1)アンプルから注射筒に移すという投与するまでに準備を要すること、(2)注射筒・注射針を必要とすることでコストがかかること、(3)針刺し事故の危険性があること、(4)大量投与によって点滴として使用するケースが多いこと、(5)点滴に必要な器具類にコストがかかることなどがあげられる。一方で、患者側においては次の欠点が生じている。(1)通院する必要があること、(2)注射という痛みがともなうこと、(3)注射部位の皮膚・血管傷害が生じやすくなること、(4)通院・入院時においても時間を拘束されること、(5)(1)～(4)をふまえてQOLに支障をきたすことなどがあげられる。

これらの問題点を改善する手段の1つとして、2005年10月よりグリチルリチン注射剤のプレフィルド製剤「ミノフィット」が発売された。このプレフィルド製剤を使

* 金沢市金川町ホ3 ; Ho-3, Kanagawa-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa, 920-1181 Japan

用することにより、医療現場に対する問題点であるコスト削減、調製時間の短縮を大きく改善することが報告された³⁾。しかしながら、患者側に対する上述の欠点の解決には至っていない。患者中心志向で製剤化が望まれる中で、自己投与可能な製剤の開発は患者の利益のみならず、医師の薬剤選択肢等に関わる問題として重要である。われわれは、製剤添加物として使用できる安全性の高い物質を少量用いることで高濃度のグリチルリチン溶液の調製を試み、患者が通院の必要がなく投与できる製剤開発としての基礎検討を行った。

方 法

1. 使用した試薬

グリチルリチンモノアンモニウム塩(GZ)は、株式会社宏輝よりご恵贈いただいた。グアニジノ酢酸および重炭酸アミノグアニジン、アセチル-D-アルギニンならびにアミノ酸であるグリシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-セリン、L-トレオニン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、L-メチオニン、L-プロリン、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-リシンおよびL-アルギニンは製剤添加物として選択し、すべて和光純薬工業(株)より購入した。その他の試薬・試液は特級あるいは高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2. GZ 溶液の調製

製剤添加物として選択したグアニジノ酢酸、重炭酸アミノグアニジン、アセチル-D-アルギニンおよび20種類のアミノ酸のおおのが0.1~8.0%になるようにスクリーバイアル瓶(株)マルエム, No. 7)に添加後、100~400mg/mLのGZ濃度になるように20~100mMリン酸緩衝液(pH7.4)を溶剤とし、ホットプレートスターラー(DP-1L, アズワン(株))を用いて60℃の条件で調製した。

3. ゲル化温度の測定

調製した各GZ溶液を30℃に設定した水浴に30分間放置した。ただちに、5分間に1℃の速度で徐々に水浴温度を低下させ、GZ溶液がゲル化し始める温度を測定した。

4. pH 値および浸透圧測定

調製した試料のpH値はpHメーター(D-14, (株)堀場製作所)、浸透圧は浸透圧計(OM-802, Vogel GmbH, ドイツ)を用いて測定した。

5. GZ 溶液の性状および GZ 溶液中のグリチルリチン含量

調製した各GZ溶液を4℃および60℃に設定した水浴あるいは恒温槽に放置した。4℃の設定根拠は、調製されたGZ溶液が冷蔵保存においてゲルを形成するかどうかを検討するためであった。一方、60℃の設定根拠は、医薬品の過酷試験として汎用される温度である。2週間経過後、調製したGZ溶液がゲルを形成したかどうか、また色調に変化を生じたかどうかを視覚により検討した。色調変化は調製直後の色を基準とした。さらに溶液中のGZ含量を高速液体クロマトグラフ法⁴⁾により分析し、初期GZ濃度に対する残存するGZ濃度の割合(%)を算出した。

6. *in vivo* 投与実験

購入したWistar系雄性ラット(日本エスエルシー(株))を自由吸水自由給餌の状態です約1週間飼育した。実験前日に絶食させたラット(体重230~250g)にウレタンを腹腔内投与(2.0g/mL/kg)して麻酔した。このラットを仰向けに固定後、鎖骨下静脈が露出するように切開した。ブランク血液として0.1mLを鎖骨下静脈より採取した。皮下投与は背部皮下(25および50mg/kg GZ)に、鼻腔内投与は片側の鼻腔内(25および50mg/kg GZ)にマイクロシリンジを用いて投与した。鼻腔内投与のラットは食道に投与液が流れ出ないように外科用アロンアルファを用いて咽喉出口を塞いだ。投与後、2, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360分に鎖骨下静脈より0.1mLの血液を採取した。この血液はただちに遠心分離(1400g×15分間)し、血漿を得た。この血漿は分析するまで冷蔵保存した。ラットの購入、飼育および実験手技に関する管理は北陸大学において定められ動物実験管理規程に従い、承認を得た上で実施した。

7. 血漿中 GZ 濃度の分析

採取した血漿40μLを遠沈管にとり、既報¹⁾に従って高速液体クロマトグラフを用いて定量分析した。

8. 生物学的利用率

血漿中GZ濃度-時間曲線のデータより、モーメント解析ソフト⁵⁾を使用して生物学的利用率(BA)を算出した。

結果および考察

1. GZ ゲル形成阻害剤の探索

架橋阻害剤として知られている^{6,7)}グアニジノ酢酸(Fig. 1 A)および重炭酸アミノグアニジン(Fig. 1 B)がGZのゲル形成を阻害するかどうかを明らかにするため

Fig. 1. Chemical Structures of Guanidoacetic Acid (A), *N*-aminoguanidine (B), L-Arg (C), L-His (D), and L-Trp (E).

に、おのおのを0.5%含有する100mg/mL GZ溶液は100 mM リン酸塩緩衝液(pH7.4)を用いて調製した。60℃で調製後、30℃の水浴に放置したとき、グアニジノ酢酸を含むGZ溶液は速やかにゲルを形成したが、重炭酸アミノグアニジンを含むGZ溶液はゲルを形成しなかった。0.5%重炭酸アミノグアニジン添加のGZ溶液は、3℃に設定された水浴中においても溶液状態を維持した。GZのゲルは巣状構造を示す²⁾ことから、架橋阻害剤である両化合物ともGZのゲル形成を容易に阻害することを期待した。しかしながら、グアニジノ酢酸はGZのゲル形成に対して影響を及ぼさなかった。構造式の違いからグアニジノ酢酸末端のカルボン酸の存在がゲル形成の阻害に不都合であったかもしれない。そこで、これらの構造に類似な製剤添加物としてアミノ酸を選択した。20種類のアミノ酸をおのおの2%含有する100mg/mL GZ溶液は100mM リン酸塩緩衝液(pH7.4)を用いて調製後、ゲル形成が阻害されるかどうかを検討した。60℃で調製後、30℃の水浴に放置した結果、L-アルギニン(L-Arg, Fig. 1 C), L-ヒスチジン(L-His, Fig. 1 D)およびL-トリプトファン(L-Trp, Fig. 1 E)がGZ溶液のゲル形成を阻害した。これらの結果は、グアニジノ酢酸の構造にあるカルボン酸の存在がゲル形成の阻害に不都合であったかもしれないという仮説を否定した。重炭酸アミノグアニジン、L-Arg、L-HisおよびL-Trpに共通な構造は1級アミンと2級アミンがともに存在することであった。GZのゲルの形成阻害にこの両アミンの存在が重要な役割を及ぼしている可能性が強く示唆された。さらにGZ溶液のゲル化を阻害する構造的な特徴を検討するために、L-Argの類似化合物であるアセチル-D-アルギニ

ンを用いて同様にGZ溶液のゲル形成に及ぼす影響を検討したが、アセチル-D-アルギニンはそのゲル形成にまったく影響を及ぼさなかった。この結果は1級アミンおよび2級アミンの存在があるにもかかわらず、アセチル基を有することでそのゲル形成に影響しなかったことより、3次元的な構造の違いもGZのゲル形成阻害に関与していることを示唆する。

2. 生理的等張なGZ溶液の調製

GZのゲル形成を阻害したこれら4種類の化合物の中で、製剤添加物としてふさわしい3種類のアミノ酸について添加濃度とゲル形成開始温度との関係を検討した(Table 1)。L-ArgとL-HisがGZのゲル形成を同等に強く阻害した。L-Trpの阻害作用はそれらより弱かった。したがって、GZ処方化検討にはL-ArgおよびL-Hisを用いることにした。

生理的条件(浸透圧=約300mOsm, pH=7.4)にすることを前提に、L-ArgおよびL-Hisの濃度あるいはリン酸塩緩衝液の濃度を変えて調製した試料の浸透圧およびpH値の測定を行った。L-Arg処方においては、4.5%L-Arg含有100mg/mL GZ溶液は30mM リン酸塩緩衝液(pH 7.4)を用いて調製したとき、pH値7.4、浸透圧300mOsmとなった。一方、L-His処方においてはpH値がアルカリ側にシフトせず、pH6.0~6.8の範囲にとどまり、pH値が生理的条件に達しなかったことから水酸化ナトリウム溶液をpH調整剤として微量添加した。その結果、3.0%L-His含有100mg/mL GZ溶液は30mM リン酸塩緩衝液(pH7.4)を用いて調製したとき、pH値7.4、浸透圧304mOsmとなった。L-ArgおよびL-His濃度を低く

Table 1. Relationship between the Concentration of Amino Acid and the Gel-Forming Temperature of Glycyrrhizin Solution.

Amino acid	GZ concentration (mg/mL)	Gel-forming temperature (°C)
0.1% L-Arg	100	30
0.2% L-Arg	100	25
0.5% L-Arg	100	17
1.0% L-Arg	100	<3
0.1% L-His	100	>30
0.2% L-His	100	26
0.5% L-His	100	9
1.0% L-His	100	<3
1.0% L-Trp	100	29
2.0% L-Trp	100	22
3.0% L-Trp	100	13

100 mM phosphate buffered solution (pH 7.4) was used as a diluted solution. After each sample was prepared at 60 °C, the temperature was decreased at the speed of 1 °C per 5 min from 30 to 3 °C.

抑える場合は、リン酸塩緩衝液濃度を高めることで生理的条件を満たすことが可能であることを確認した(データは示していない)。

3. 皮下および鼻腔内投与用の GZ 溶液の調製

第十四改正日本薬局方解説書に記載された皮下投与量はヒトで 1 mL 以下が望ましいとされている。点鼻剤の規定は日本薬局方に記載されていないが、一般に、市販品点鼻液の能書に記載の使用方法では 1 噴霧あたりの投与量が 100 μ L である。慢性肝疾患治療における GZ の使用量がグリチルリチン酸として 1 日あたり 40~200mg 程度であることを考慮して、皮下および鼻腔内投与用の GZ 濃度は 400mg/mL に設定した。製剤添加物として L-Arg および L-His を用いる場合、その使用量は重要である。L-Arg を製剤添加物として用いる場合の 1 日あたりの許容量は、静脈内注射で 457.5mg、筋肉内注射で 120mg、皮下注射で 20mg と記載されている⁸⁾。一方、L-His を製剤添加物として用いる場合の 1 日あたりの許容量は、静脈内注射で 624mg と記載されている⁸⁾。仮に皮下注射投与を想定し、GZ として 100mg を 1 日分として投与する場合、400mg/mL GZ 溶液の投与量は 0.25mL となる。この量に L-Arg を 20mg 添加するとした場合の添加率は 8% に相当する。添加する L-Arg あるいは L-His の総含量を 8% 以内に抑えることで、冷蔵保存においてゲルを形成しない条件を見いだすことが望まれる。そこで、アミノ酸含量を 8% とする処方、すなわち 8% L-Arg 含有 400mg/mL の GZ 溶液、8% L-His 含有 400mg/mL の GZ 溶液、あるいは 4% L-Arg および 4% L-His 含有

400mg/mL の GZ 溶液は 20mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) を用いて調製した。

4. GZ 溶液の性状と GZ 溶液中のグリチルリチン含量

調製した 8% L-Arg、8% L-His あるいは 4% L-Arg および 4% L-His 含有 400mg/mL の GZ 溶液を 4 °C の水浴に放置したが、いずれの GZ 溶液もゲルを形成しなかった。これらの結果より、L-Arg および L-His を製剤添加物として用いることのできる添加量において 400mg/mL の GZ 溶液の調製が可能であることを示した。

L-Arg および L-His はアミノ酸である。GZ のグルクロン酸部位とメイラード反応を引き起こす可能性が予測されたことで、調製した 4% L-Arg および 4% L-His 含有の 400mg/mL GZ 溶液の色調変化は肉眼により観察した。また、GZ 含量もあわせて検討した。60 °C の恒温槽に 2 週間放置した GZ 溶液は、アミノ酸無添加の条件で調製した GZ 溶液と比較して色調に変化を認めなかった。また、4% L-Arg および 4% L-His 添加試料の 60 °C 2 週間保存後の GZ 含量は、おのおの $99.1 \pm 1.6\%$ および $99.8 \pm 2.4\%$ であり、GZ 含量に変化を認めなかった。これらの結果より GZ は両アミノ酸添加によるメイラード反応は生じていないと考えられる。GZ の市販品にはグリシンおよび L-システインが含有されており、GZ の安定性に対してグリシンおよび L-システインが影響を及ぼさないことがわかっている。今回の検討を踏まえて、L-Arg および L-His も GZ の安定性に影響を及ぼさないと考えた。

5. in vivo 吸収実験

GZ 皮下投与後の血漿中 GZ 濃度-時間曲線を Fig. 2 A に示した。GZ 投与量 25mg/kg の条件での皮下投与後の GZ 濃度-時間曲線は、投与 90 分後に最大血漿中 GZ 濃度 $59 \pm 23 \mu\text{g/mL}$ を示した。一方、50mg/kg の投与条件では、投与 120 分後に最大血漿中 GZ 濃度 $131 \pm 8 \mu\text{g/mL}$ を示した。投与 6 時間後において 25 および 50mg/kg 投与後の血漿中 GZ 濃度はそれぞれ $3.5 \pm 3.5 \mu\text{g/mL}$ および $12.3 \pm 5.4 \mu\text{g/mL}$ であった。静脈内投与後の血漿中動態(データは示していない)をもとに算出した血漿中 GZ 濃度下面積 (AUC) との比較から求めた生物学的利用率は 25mg/kg および 50mg/kg 投与においてそれぞれ 55% および 77% であった。生物学的利用率が 100% から大きく低下した要因として、皮下投与による初期の肝血流中のグリチルリチン濃度が静注のそれと比べて低いことで肝代謝の影響を受けやすかったために未変化体の血中濃度が下がってしまったと推察した。グリチルリチンは肝臓においてモノグルクロニド体に代謝されることが報告されている⁹⁾。

GZ 鼻腔内投与後の血漿中 GZ 濃度-時間曲線を

Fig. 2. Plasma GZ Concentration-time Curves after Subcutaneous (A) and Intranasal (B) Administrations to Rats.

The test solution was 400 mg/mL GZ containing 4% L-Arg and 4% L-His. The test solution was administered to rat's back or nasal cavity using a micro-syringe. Data represent the mean $\pm$ SD of four experiments.

Fig. 2 B に示した、GZ 投与量25mg/kg の条件での鼻腔内投与後のGZ濃度-時間曲線は、投与30分後に最大血漿中GZ濃度 $18.0 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ を示した。一方、50mg/kgの投与条件では、投与60分後に最大血漿中GZ濃度 $27.7 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ を示した。投与6時間後において25および50mg/kg投与後の血漿中GZ濃度はそれぞれ $0.67 \pm 0.69 \mu\text{g/mL}$ および $5.3 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ であった。静脈内投与後の血漿中動態をもとに算出したAUCとの比較から求めた生物学的利用率は25mg/kgおよび50mg/kg投与においてそれぞれ13%および17%であった。

GZ溶液の皮下および鼻腔内投与において、投与量依存的に高い血漿中GZ濃度が示された。生物学的利用率からみて鼻腔内投与より皮下投与が優れていることが明らかになった。

GZ製剤の今後のあり方を現在の問題点と照らし合わせた場合、現在の市販品であるGZ注射剤(グリチルリチン酸として2mg/mL)にかわる高濃度製剤の必要性が伺え、この問題はL-ArgあるいはL-Hisを製剤添加物として用いることで解決できた。投与経路からみて、非注射剤としての実用が患者への親しみやすさと医療側からみた利便性の両面を解決できる。しかしながら、鼻腔内投与における低い生物学的利用率は実用化に向けて困難であろう。この鼻腔内投与後の低い血漿中グリチルリチン濃度時間推移の結果は、グリチルリチンが消化管からほとんど吸収されないという膜透過性の問題^{10,11)}に関わっていると考えられた。一方、皮下投与製剤は注射剤であるが、GZ濃度を現市販品の200倍に相当する400mg/mLという高濃度溶液に調製できたことで、1日1回の

使用量を0.1~0.25mLの少量投与にすることができ、グリチルリチンによる治療を受けている慢性肝疾患患者が週に2、3回注射のために通院している現状を改善するためには、通院することなく投与できる自己投与製剤に結びつけることが好ましい。通院の回数を大幅に減らすことができることは、緒言に示した欠点を大きく改善できる。今後、皮下投与部位である組織への影響として局所的な炎症、痛みあるいはかゆみ等の刺激性が問題となるであろう。実用に向けての処方化として、安全性が保証されるアミノ酸を使用することで400mg/mLという高濃度のGZ溶液の調製ができたことは患者のQOLを考慮した製剤の基礎成果として有用であると位置づける。

引用文献

- 1) N. Shibata, T. Ohno, T. Shimokawa, Z. Hu, Y. Yoshikawa, K. Koga, M. Murakami, K. Takada, Application of pressure-controlled colon delivery capsule to oral administration of glycyrrhizin in dogs, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 441-447 (2001).
- 2) K. Koga, K. Takekoshi, S. Kawashima, M. Taniguchi, M. Murakami, Clove oil prevents glycyrrhizin gel formation in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1507-1510 (2004).
- 3) 名徳倫明, 山本慶子, 川口進一, グリチルリチン(GZ) PFS「ミノフィット」の医療経済的効果及び臨床効果の検討, 第15回日本医療薬学会年会講演要旨集, 岡山, 2005, p. 357.
- 4) K. Koga, K. Ohmachi, S. Kawashima, K. Takada, M.

- Murakami, Determination of 18 α -glycyrrhizin and 18 β -glycyrrhizin in dog plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., B*, **738**, 165–168 (2000).
- 5) K. Tabata, K. Yamaoka, A. Kaibara, S. Suzuki, M. Terakawa, T. Hata, Moment analysis program available on Microsoft Excel, *Xenobio. Metabol. Dispos.*, **14**, 286–293 (1999).
- 6) S. Onada, M. Toda, T. Miyamoto, Inhibitors (e.g., aminoguanidines, etc.) of the Maillard reaction and formulations containing them, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 1989, 87–211449, p. 11.
- 7) M.O. Lederer, F. Gerum, T. Severin, Crosslinking of proteins by Maillard processes - model reactions of D-glucose or methylglyoxal with butylamine and guanidine derivatives, *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 993–1002 (1998).
- 8) 日本医薬品添加物協会編, “医薬品添加物辞典2000”, 薬事日報社, 東京, 2000.
- 9) T. Akao, T. Akao, M. Hattori, M. Kanaoka, K. Yamamoto, T. Namba, K. Kobashi, Hydrolysis of glycyrrhizin to 18 beta-glycyrrhetyl monoglucuronide by lysosomal beta-D-glucuronidase of animal livers, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1025–1029 (1991).
- 10) M. Hattori, T. Sakamoto, K. Kobashi, T. Namba, Metabolism of glycyrrhizin by human intestinal flora, *Planta Med.*, **48**, 38–42 (1983).
- 11) T. Akao, T. Hayashi, K. Kobashi, M. Kanaoka, H. Kato, M. Kobayashi, S. Takeda, T. Oyama, Intestinal bacterial hydrolysis is indispensable to absorption of 18 beta-glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 135–137 (1994).