血清アルブミン上のジアゼパム結合サイトにおける 薬物相互作用の解析法 —ELISA によるグリチルレチン酸測定法を 応用したスクリーニング法—

早坂正孝†¹, 富岡佳久†², 石渡俊二†², 水柿道直*†²

国家公務員共済組合連合会宮城野病院薬局†¹

東北大学医学部附属病院薬剤部†²

Analysis of Drug Interaction on Diazepam Binding Site of Human Serum Albumin —Screening of Drugs Binding to Diazepam Binding Site by ELISA for Glycyrrhetic Acid—

Masataka Hayasaka†¹, Yoshihisa Tomioka†², Shunji Ishiwata†² and Michinao Mizugaki*†²

Pharmacy Division, Miyagino Hospital†¹

Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital†²

[Received October 23, 2001
Accepted December 30, 2001]

In order to clarify the binding site of drugs on human serum albumin (HSA), competition studies were carried out using ELISA for glycyrrhetic acid (GA), which is mainly bound to the diazepam site on HSA.

The release of GA from HSA was detected as a displacement by the various drugs [bezafibrate (B), delapril HCl, diclofenac Na (D), doxifluridine, famotidine, ibuprofen (I), loxoprofen Na (L-1) and its metabolite (loxoprofen Na trans-OH (L-2)), pravastatin Na]. The percentages of GA release by the addition of I, D, L-1, L-2, which belong to nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and B were 96.0%, 86.5%, 25.4%, 25.6% and 12.6% respectively. In addition, the percentages of GA release by addition of the other 4 drugs ranged between 3.2 and 4.1%. These results showed that I and D were strongly bound to the diazepam site, while the binding of L-1, L-2 and B was weak. Thus, L-1, L-2 and B may predominantly bind to other site(s) on HSA.

Therefore, ELISA for GA was suggested to be helpful for studying the binding site (diazepam binding site) of the drugs on HSA.

Keywords — glycyrrhetic acid, ELISA, binding site, ibuprofen, diclofenac sodium, human serum albumin

緒 言

医療現場においては、日常的に多種多様な薬剤が繁用

され、併用されている。これらの併用によって起こる薬物相互作用は、糖尿病用薬では低血糖の危険性や抗凝血薬では出血傾向の増加など重大な副作用に結びつくと

†¹ 宮城県仙台市宮城野区東仙台 4-16-1; 4-16-1, Higashi-sendai, Miyagino-ku, Sendai-shi, Miyagi, 983-0833 Japan

†² 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1; 1-1, Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi, 980-8574 Japan

め、重要視されている。薬物の血漿蛋白結合は、薬物相互作用、薬物の体内動態あるいは薬効に影響を与える因子として知られ、特に、薬物と血漿蛋白の結合が強固な場合には ($K_a > 10^5 \text{M}^{-1}$)、臨床的に薬物相互作用を起こすことがあると指摘されている^{1,2)}。しかし、近年、これらの相互作用の主な原因は代謝や排泄阻害など非結合型薬物に対する固有クリアランスの減少に起因することが示され、血漿蛋白結合の薬物相互作用への関与が見直されてきた³⁻⁵⁾。しかしながら、HSA 上には、薬物が結合する多くの薬物結合サイト⁶⁻¹¹⁾があり、血漿蛋白結合による薬物相互作用を解明するためには、HSA 上の薬物結合サイトの違いを含めた詳細な検討が必要である。

一方、われわれは、GA が主に HSA 上のジアゼパムサイトに結合することを、また、ジアゼパムサイトに結合する GA が ibuprofen により競合的に置換され、その量を ELISA により定量できることを示した¹²⁾。

そこで、本研究では、ある薬物により競合的に置換され、遊離した GA を ELISA により定量できる上記方法を応用して、その薬物がジアゼパムサイトに結合するかどうかの検討を行い、ジアゼパムサイトの結合薬物のスクリーニング法を確立した。

方 法

1. グリチルリチン製剤との併用薬剤調査

グリチルリチン製剤 (グリチロン錠：1錠中 glycyrrhizin 20mg, aminoglycine 25mg, DL-methionine 25mg) について、宮城野病院平成12年7月分外来処方せん4,886枚を対象とし、グリチルリチン製剤の有無および併用薬について調査した。

2. 試薬および薬物

実験に用いた薬物は試薬会社から購入したものあるいは各製薬会社から供与されたものを用いた。amlodipine besilate (住友製薬(株))、benzbromarone (鳥居薬品(株))、bezafibrate (沢井製薬(株))、candesartan cilexetil, delapril HCl (武田薬品工業(株))、diclofenac Na (エスエス製薬(株))、doxifluridine (日本ロシュ(株))、ethyl loflazepate および ethyl loflazepate の活性代謝産物 (M-2) (明治製菓(株))、etizolam (ウエルファイド(株))、famotidine (山之内製薬(株))、furosemide (アベンティスファーマ(株))、glycyrrhizin-NH₄ ((株)ミノファージェン製薬)、ibuprofen (和光純薬工業(株))、itraconazole (ヤンセン協和(株))、lansoprazole (武田薬品工業(株))、loxoprofen Na および loxoprofen Na の活性代謝産物 (loxoprofen Na trans-OH) (三共(株))、mosapride citrate (大日本製薬(株))、naftopidil (旭化成工業(株))、pravastatin Na (三共(株))、spar-

floxacin (大日本製薬(株))、ticlopidine HCl (沢井製薬(株))、zaltoprofen (日本ケミファ(株))、HSA (脂肪酸フリー、シグマ社)。その他のものは試薬特級あるいは分析用試薬を用いた。

3. 試料の調製

薬物の各濃度における GA の置換率をみるために、4.2% HSA の175 μL に、GA 添加 (濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および GA 無添加の PBS 溶液20 μL を加え、37℃で30分間インキュベートした。次に、薬物を含む各溶液 5 μL (薬物濃度はそれぞれ100, 200, 400, 600mM) を先の溶液に加え、37℃で30分間インキュベートした後、ELISA による定量を行った。また、各薬物のスクリーニングは、薬物を含む各溶液 5 μL の薬物濃度を400mM として行った。

4. 置換率の算出

ELISA によって得られた GA の回収率をもって、薬物による GA の置換率とした。

5. 遊離型 GA の定量

試料の GA 量は、すでに確立した阻害 ELISA により定量した (Fig. 1)¹³⁾。すなわち、GA 抗原を含む溶液 (GA-Gly-BSA, 10 μg 蛋白量/mL) を100 μL ずつ96ウエルプレート (住友 MS-7196F, ポリビニルクロライド製) に分注し、一晩、4℃で放置した。次に、抗原溶液を除き、1%BSA を含む PBS 溶液 (1%BSA-PBS) を各ウエルに100 μL 加え、37℃、1時間反応させブロッキングを行った。インキュベート終了後、反応液を除き、検量線作製の GA 溶液あるいは試料を50 μL 加えたのち、ただちに、先に本研究室にて調製された¹³⁾抗 GA モノクローナル抗体 (AGA-1) 溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PBS) を等量加え、4℃、1時間反応させた。反応終了後、0.05% Tween20-PBS で3回、PBS で2回ずつ各ウエルを洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG (ALP-GAM IgG) (3,000倍希釈液) を100 μL ずつ各ウエルに加え4℃で45分間反応させた。反応終了後、上記と同様の洗浄操作を行ったのち、基質として *p*-ニトロフェニールフォスフェート (SIGMA104, phosphatase substrate, 5 mg tablet, Sigma) を1 mg/mL の濃度で含む 1 M ジエタノールアミン緩衝液 (pH9.8) を各ウエルに100 μL ずつ分注し37℃で30分間反応させた。2 M 水酸化ナトリウムを各ウエルに50 μL ずつ加え反応を停止させた後、各ウエルの405nm における吸光度を EIA リーダー (MODEL2550, BIO-RAD) にて測定した。検量線は吸光度を log-logit 変換することにより作成した。

Fig. 1. Procedure of Inhibition ELISA for GA.

結 果

1. ジアゼパム結合サイトの置換率算出に対する ELISA の応用性

NSAIDs の蛋白結合部位に関する一連の研究^{14,15)}で、ibuprofen および diclofenac Na はジアゼパムサイトに強い親和性を持つことが報告されている。そこで、本研究では本 ELISA 法を用い、これらの薬物の濃度を、それぞれ 0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0mM に設定した時の GA の置換率を算出し、Fig. 2 に示した。その結果、各薬物の GA 置換率は ibuprofen, diclofenac Na では、薬物濃度に依存して増加し、10.0, 15.0mM の時点で、ほぼ100% となった。GA とアルブミンとの結合が、ジアゼパム結合サイトに結合する ibuprofen および diclofenac Na により置換されることから、GA がジアゼパムサイトに結合するものと判断して以下の検討を行った。

2. グリチルリチン製剤との併用薬剤調査

HSA 上のジアゼパムサイトに結合する GA が ibuprofen により競合的に置換された結果¹²⁾を踏まえて、今回、ibuprofen 以外の薬物を用い、ジアゼパムサイトの結合薬物のスクリーニングを行った。スクリーニングに用いる薬物の選定は、グリチルリチン製剤とその薬物が併用され、かつ血中に共存することが想定される薬物とした。このために、グリチルリチン製剤と併用される薬剤を調査した。

調査した外来処方せん4,886枚のうち、グリチルリチン製剤は33枚に処方されていた。処方患者延べ人数は22人であった。処方内容は、グリチルリチン製剤単独から多剤併用（最大9剤）に至り、平均併用薬剤は4.4剤であった。グリチルリチン製剤との併用薬剤は、Table 1 に示したように、睡眠鎮静剤、抗不安剤、中枢神経系用剤、消化器官用剤、利尿剤、血圧降下剤、血管拡張剤、

Fig. 2. Effect of Drug Concentration on Recovery of Glycyrrhetic Acid from Solution Containing Human Serum Albumin.

●, ibuprofen ; ■, diclofenac Na. Data shown are average of triplicate examinations.

高脂血症用剤、消化性潰瘍治療剤、代謝拮抗剤（抗ガン剤）ならびに非ステロイド性抗炎症剤（NSAIDs）などであった。このように、グリチルリチン製剤と併用される薬剤は多岐の疾患治療剤に渡っていたので、上記薬剤も含めて当院で常用されている24薬剤を検索候補とした。

3. 各溶媒の ELISA への影響

実験に際し、各薬物の溶媒に対する溶解度が異なるため、添付文書に記載されている溶解可能な溶媒を用いることとした。まず、各溶媒の本 ELISA 系への影響を見るために、薬物を含まない溶媒を用いて、置換率を算出した (Table 2)。その結果、水、メタノール (MeOH)、エタノール (EtOH) およびジメチルスルフォキシド (DMSO) は、本 ELISA 系に対する溶媒自体の影響は少なかった (<4.7ng/mL)。一方、ジメチルホルムアミド

Table 1. Drugs Administrated Simultaneously with Glycyrrhizin on Out-patients' Prescriptions at Miyagino Hospital.

Drugs	Simultaneous use	Tested sample
Hypnotics	Nitrazepam, Triazolam, Brotizolam	
Tranquilizers	Etizolam	Etizolam, Ethyl loflazepate and its metabolite (M-2),
Antidyskinesias	Tiapride HCl	
Antihypertensives	Manidipine HCl, Amlodipine besilate, Candesartan cilexetil, Doxazosin mesilate, Nicardipine HCl	Delapril HCl, Amlodipine besilate, Candesartan cilexetil
Antianginals	Isosorbide dinitrate	
Anti-hyperlipidemias	Bezafibrate, Pravastatin Na	Bezafibrate, Pravastatin Na
Diuretics	Furosemide, Spironolactone	Furosemide
Antacids	Famotidine	Famotidine, Lansoprazole
Antinauseants	Metoclopramide, Domperidone	Mosapride citrate
Antineoplastics	Doxifluridine	Doxifluridine
Cardiovascular preparations	Digoxin, Dipyridamole	
Anti-inflammatories	Ibuprofen	Ibuprofen, Zaltoprofen, Diclofenac Na, Loxoprofen Na, Loxoprofen Na trans-OH
Cholagogues	Ursodesoxycholic acid	
Anti-uric acids		Benzbromarone
Antifungals		Itraconazole
Antispasmodics		Naftopidil
Antibacterials		Sparfloxacin
Anticoagulants		Ticlopidine HCl

Table 2. Effect of Solvents on the ELISA System.

Solvent	Detected (ng/mL)
H ₂ O	0.0
MeOH	0.7
EtOH	2.2
DMSO	4.7
DMF	48.1

DMSO, dimethylsulfoxide : DMF, dimethylformamide

(DMF) は溶媒自体の影響 (48.1ng/mL) が見られた。

次に、HSA 溶液中での溶媒の影響を見た (Table 3)。HSA-PBS 溶液はヒト血清中の状態を反映させるため、4.2% HSA 溶液を用いた。その結果、H₂O と DMSO は HSA 上で GA の結合には影響せず、GA 量はほぼ検出されない結果となった (3.2~3.3%)。一方、DMF は本 ELISA 系に影響した (5.0%)。そこで、検量線作成時に、GA 溶液に DMF を加えて対象とした。

一方、溶媒に溶解した薬物を測定系の HSA-PBS 溶液に転溶するとき、候補薬物24種のうち15の薬物 (amlodipine besilate, benzbromarone, candesartan cilexetil, ethyl loflazepate, ethyl loflazepate の活性代謝産物 (M-2), etizolam, furosemide, glycyrrhizin-NH₄, itraconazole, lansoprazole, mosapride citrate, naftopidil, sparfloxacin, ticlopidine

HCl, zaltoprofen) には、沈殿あるいは白濁がみられた。このため、上記15の薬物についてはスクリーニングから除外した。

4. HSA 結合型 GA の置換率

Table 4 に各薬物の GA 置換率 (%) を示した。9 被検薬物中、ibuprofen, diclofenac Na が、それぞれ96.8, 86.5%の置換率を示した。しかし、ibuprofen と同じアリルプロピオン酸系薬剤である loxoprofen Na, loxoprofen Na trans-OH 体では、GA の置換率が各々約25%の値を示した。Bezafibrate の置換率は12.6%であった。その他の薬物 (delapril HCl, doxifluridine, famotidine, pravastatin Na) では、置換率が約3~4%にとどまった。

考 察

医療現場においては、日常的に多種多様な薬剤が繁用され、併用されている。今回の調査でも、当院でグリチルリチン製剤と併用される薬剤は多岐の疾患治療剤に渡っていた (Table 1)。薬物の血漿蛋白結合は、薬物相互作用、薬物の体内動態あるいは薬効に影響を与える因子として知られ、特に、結合が強固な場合には ($K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$)、臨床的に薬物相互作用を起こすことがあると指摘されている^{1,2)}。しかし、一般に、薬物の血漿蛋白結合率は正確に調べられているが¹⁶⁾、多くの治療薬の蛋白

Table 3. Effect of Solvents on Recovery of Glycyrrhetic Acid from Solution Containing Human Serum Albumin.

Solvent	Glycyrrhetic acid		
	Added(ng/mL)	Detected (ng/mL)	Recovery (%)
H ₂ O	0	0.0	-
	500	16.7	3.3
DMSO	0	3.5	-
	500	19.3	3.2
DMF	0	83.7	-
	500	108.6	5.0

DMSO, dimethylsulfoxide : DMF, dimethylformamide

Table 4. Effect of Drugs on Recovery of Glycyrrhetic Acid from Solution Containing Human Serum Albumin.

Drug	Glycyrrhetic acid		
	Added(ng/mL)	Detected(ng/mL)	Recovery(%)
Ibuprofen	0	3.3	-
	500	483.5	96.0
Diclofenac Na	0	1.0	-
	500	433.7	86.5
Loxoprofen Na	0	1.3	-
	500	128.5	25.4
Loxoprofen Na trans-OH	0	1.9	-
	500	130.0	25.6
Delapril HCl	0	3.1	-
	500	19.9	3.4
Pravastatin Na	0	0.0	-
	500	16.2	3.2
Bezafibrate	0	7.2	-
	500	70.0	12.6
Doxifluridine	0	3.9	-
	500	21.4	3.5
Famotizine	0	5.6	-
	500	26.1	4.1

結合部位は知られていないことが多い。

薬物の HSA 上の結合部位を調べる方法として, Sudlow らは, 蛍光プローブを利用して, 陰イオン性薬物が 2 種類のサイトと特異的に結合することを見出し, それぞれのサイトをサイト I (warfarin-azapropazone 結合サイト) およびサイト II (indole-benzodiazepine 結合サイト) とした¹⁷⁾. Sjöholm らは polyacrylamide-immobilized HSA を用い, 140 種の薬物をサイト I ~ III (サイト III: digitoxin 結合サイト) に分類した¹⁸⁾. Honore らは, 平衡透析法により salicylic acid, azapropazon, ibuprofen および diclofenac などを含む 12 の NSAIDs を用い, azapropazon がサイト I に, また, 他の多くの薬剤がサイト II に結合することを示し, Sudlow らが見出した HSA 上のサイトの存在を検証した¹⁴⁾. Rahman らは, 蛍光プローブ法を用い, ibuprofen, ketoprofen および ketophenylbutazone などを含む 9 つの NSAIDs を結合部位毎に分類し, NSAIDs の分子構造と結合部位との関係について論じた¹⁵⁾. 一方

で, 近年, 結合部位を同定する方法として化学修飾法が用いられ, Fehske らは, サイト II では HSA 上の Tyr⁴¹¹ が薬物の結合に深く関与し¹⁹⁾, Watanabe らは, ketoprofen を用いた実験から Arg⁴¹⁰ も重要な役割を果たしていることを指摘した²⁰⁾.

NSAIDs の蛋白結合部位に関する一連の研究^{14, 15)}で, ibuprofen および diclofenac Na はジアゼパムサイトに強い親和性を持つことが報告されている. 本研究では, 一度 HSA 上のジアゼパムサイトに結合し, 薬物により競合的に置換された GA を ELISA により直接定量する方法を用いて, ibuprofen および diclofenac Na の GA 置換率を検討した (Fig. 2). その結果, これらの薬物の GA 置換率は薬物濃度に依存して増加したことから, ibuprofen および diclofenac Na が HSA 上のジアゼパムサイトに結合していた GA と置換したと考えられた. この結果は, ibuprofen および diclofenac Na の結合部位がジアゼパムサイトであるという上記文献の報告と一致し, 本測

定法は HSA 上の薬物結合部位を決定する方法として応用可能であることが示された。先の蛍光プローブ法が、実際に遊離した薬物の確認ではなく、薬物添加の影響によるプローブと HSA の結合率の変化を間接的に計測しているのに較べて、本法は、薬物により HSA 上から置換された GA を直接、ELISA で検出、定量している点で信頼性の高い方法である。また、一般に、薬物結合サイトの同定として限外ろ過法が広く用いられているが、ろ過サンプルを 1 検体毎に HPLC 等で定量を行うなど操作が繁雑となる。しかしながら、本 ELISA 法では、一度に多数の検体を同時にスクリーニングできる利点があると考えられる。

そこで、当院でグリチルリチン製剤と併用されている薬剤を対象とし、本測定法を適用することにより、各対象薬物の蛋白結合部位を検討した。その結果、先に示したように、ibuprofen, diclofenac Na が、それぞれ 96.8, 86.5% の置換効果を示し (Table 4), 本 ELISA により、diclofenac Na, ibuprofen がジアゼパムサイトに結合した GA を置換し、直接 GA が遊離することを確認した。Rahman らは、ibuprofen, ketoprofen のようなアリルプロピオン酸系の NSAIDs がジアゼパムサイトに結合すること、同じ NSAIDs にもかかわらず、カルボン酸を持たない ketophenylbutazone のような薬物はワルファリンサイトに結合すること¹⁵⁾、また、Maruyama らはアリルプロピオン酸系の suprofen が持つカルボン酸のメチル化体はワルファリンサイトに結合が変わること²¹⁾を報告した。このように、ジアゼパムサイトへの結合は NSAIDs のカルボン酸が重要な役割を果たしていることが報告されている。また、Rahman らは、一方でアリルプロピオン酸系である carprofen と ibuprofen が同程度の血漿蛋白結合率を有するため、両剤の併用で置換反応が惹起されると予想した。しかし、実験では ibuprofen によって置換され、遊離した carprofen は再度低親和性サイトに結合し、最終的に遊離型の carprofen になることを報告し (サイトーサイト移行機構)、置換反応の実態が複雑であることを示した²²⁾。本実験では、ibuprofen と同じアリルプロピオン酸系である loxoprofen Na trans-OH 体の GA 置換率は約 25% であった。この結果は、カルボン酸を有する NSAIDs がジアゼパムサイトに結合するという Rahman らの報告と異なっているが、carprofen のサイトーサイト移行機構のように薬物の分子構造と蛋白の結合様式の関係については、未だ解明されていない部分が多く、今後の検討を必要とする。また、bezafibrate に関して GA の置換率が 12.6% であった。Loxoprofen Na, loxoprofen Na trans-OH 体および bezafibrate は、ジアゼパムサイトに一部結合し、さらに、他のサイトにも結合部位が存在

する可能性があると考えている。その他の薬物 (delapril HCl, doxifluridine, famotidine, pravastatin Na) では、GA の置換率が 3 ~ 4 % と低く、ジアゼパムサイトに結合しない可能性が大きい。この原因については、これらの薬物の血漿蛋白結合率¹⁶⁾が、delapril HCl (約 97%) を除いて、60% 以下でいずれも低いためと考えられる。delapril HCl については、ジアゼパムサイト以外に結合部位が存在する可能性が大きいと考えている。

今回、GA に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を用い、HSA 上から薬物により置換され遊離してくる GA を検出した。その結果、多くの文献と一致して、一部の NSAIDs では、GA と HSA 上で置換が成り立つことを実証した。このことは、GA に限らず、他の薬物に対するモノクローナル抗体においても HSA 上での薬物結合部位の同定に応用できることを示しており、ELISA 法を用いたスクリーニングは有意義な方法であると考えている。

一方、経口投与されたグリチルリチン製剤の成分である glycyrrhizin は、腸内細菌叢によって代謝され、そのアグリコンである GA が主として消化管より吸収される結果²³⁾、血中に GA のみが出現することが報告されている^{24, 25)}。また、慢性肝炎の治療において、グリチルリチン製剤と deoxycholic acid が併用され、HSA 上の結合部位で置換現象を引き起こすことが報告されている²⁶⁾。今回の結果から glycyrrhizin の代謝産物 GA と各種消炎鎮痛剤の ibuprofen, diclofenac Na が HSA 上で置換することが確認された。このことから、グリチルリチン製剤と一部の消炎鎮痛剤の併用は、glycyrrhizin と deoxycholic acid の例と同様、HSA への結合を考慮すべきと考えられる。

謝辞 本実験に対して貴重な薬物をご提供いただきました各製薬会社に深謝いたします。旭化成工業(株)、アベンティスファーマ(株)、ウエルファイド(株)、エスエス製薬(株)、沢井製薬(株)、三共(株)、住友製薬(株)、大日本製薬(株)、武田薬品工業(株)、鳥居薬品(株)、日本ケミファ(株)、日本ロシュ(株)、ミノファージェン製薬(株)、明治製薬(株)、山之内製薬(株)、ヤンセン協和(株)(敬称略)。

引用文献

- 1) B.K. Martin, Potential effect of the plasma on drug distribution, *Nature*, **207**, 274-276 (1965).
- 2) W.J. Jusko, M. Gretch, Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics, *Drug.Metabol. Rev.*, **5**, 43-140 (1976).
- 3) C. Banfield, R. O'Reilly, E. Chan, M. Rowland, Phenylbutazone-warfarin interaction in man: further stereochemical and metabolic consideration, *Br. J.*

- Clin. Pharmacol.*, **16**, 669-675(1983).
- 4) S.M. Pond, D.J. Birkett, D.N. Wade, Mechanism of inhibition of tolbutamide metabolism: phenylbutazone, oxyphenbutazone, suphaphenzole, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **22**, 573-579(1977).
 - 5) D.G. Liegler, E.S. Henderson, M.A. Hahn, V.T. Oliverio, The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **10**, 849-857(1969).
 - 6) K.J. Fehske, W.E. Muller, U. Wollert, L.M. Velden, The lone tryptophan residue of human serum albumin as part of the specific warfarin binding site, Binding of dicoumarol to the warfarin, indole and benzodiazepine binding site of human serum albumin, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 778-789(1979).
 - 7) K.J. Fehske, W.E. Muller, U. Woller, The location of drug binding sites in human serum albumin, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 687-692(1981).
 - 8) K.J. Fehske, U. Schlafer, U. Wollert, W.E. Muller, Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites on warfarin and azapropazone, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 387-393(1982).
 - 9) S. Goya, A. Takadate, H. Fujino, M. Otagiri, K. Uekama, New fluorescence probes for drug-albumin interaction studies, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1363-1369(1982).
 - 10) U. Kragh-Hansen, Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin, *Biochem. J.*, **225**, 629-638(1985).
 - 11) H. Takikawa, Y. Sugiyama, M. Hanano, M. Kurita, H. Yoshida, T. Sugimoto, A novel binding site for bile acids on human serum albumin, *Biochem. Biophys. Acta.*, **926**, 145-153(1987).
 - 12) K. Itoh, M. Hayasaka, M. Niizeki, S. Nozaki, S. Ishiwata, Y. Tomioka, M. Mizugaki, Direct determination of serum glycyrrhetic acid by a monoclonal antibody-based inhibition ELISA using ibuprofen for releasing serum albumin-bound glycyrrhetic acid, *J. Immunoassay*, **17**, 343-352(1996).
 - 13) M. Mizugaki, K. Itoh, M. Hayasaka, S. Ishiwata, S. Nozaki, N. Nagata, K. Hanadate, N. Ishida, Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin and its aglicon, glycyrrhetic acid, *J. Immunoassay*, **15**, 21-34(1994).
 - 14) B. Honore, R. Brodersen, Albumin binding of anti-inflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis, *Mol. Pharmacol.*, **25**, 137-150(1984).
 - 15) M.H. Rahman, K. Yamasaki, Y.H. Shin, C.C. Lin, M. Otagiri, Characterization of high affinity binding sites of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to site-specific probes on human serum albumin, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1169-1174(1993).
 - 16) “常用医薬品情報集”, 辻彰編, 廣川書店, 東京, 2000.
 - 17) G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.*, **12**, 1052-1061(1976).
 - 18) I. Sjöholm, B. Ekman, A. Kober, I. Ljungstedt-Pahlman, B. Seiving, T. Sjödin, Binding of drugs to human serum albumin: VII. The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 767-777(1979).
 - 19) K.J. Fehske, W.E. Muller, U. Wollert, Direct demonstration of the highly reactive tyrosine residue of human serum albumin located in fragment 299-585, *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 217-221(1980).
 - 20) H. Watanabe, S. Tanase, K. Nakajou, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity, *Biochem. J.*, **349**, 813-819(2000).
 - 21) T. Maruyama, C.C. Lin, K. Yamasaki, T. Miyoshi, M. Yamasaki, M. Otagiri, Binding of suprofen to human serum albumin. Role of the suprofen carboxyl group, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1017-1026(1993).
 - 22) M.H. Rahman, T. Maruyama, T. Okada, T. Imai, M. Otagiri, Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin-II. Stereoselective site-to-site displacement of carprofen by ibuprofen, *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1733-1740(1993).
 - 23) M. Hattori, T. Sakamoto, K. Kobashi, T. Namba, Metabolism of glycyrrhizin by human intestinal flora, *Planta Medica*, **48**, 38-42(1983).
 - 24) M. Kanaoka, S. Yano, H. Kato, N. Nakano, E. Kinoshita, Studies on the enzyme immunoassay of bioactive constituents contained in oriental medicinal drugs. II. Enzyme immunoassay of glycyrrhizin., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1866-1873(1983).
 - 25) Y. Yamamura, J. Kawakami, T. Santa, H. Kotaki, K. Uchino, Y. Sawada, N. Tanaka, T. Iga, Pharmacokinetic profile of glycyrrhizin in healthy volunteers by a new high-performance liquid chromatographic method, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 1042-1046(1992).
 - 26) S. Ishida, M. Kinoshita, Y. Sakiya, Z. Taira, T. Ichikawa, Glycyrrhizin binding site on human serum albumin, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 275-278(1992).