薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (3) 240—247 (1986)

Cyclosophoraose-A と非ステロイド系抗炎症剤との包接化合物の研究

岡田安代, 堀山志朱代, 小泉京子*

武庫川女子大学薬学部

Studies on Inclusion Complexes of Non-steroidal Anti-inflammatory Agents with Cyclosophoraose-A

YASUYO OKADA, SHIZUYO HORIYAMA, and KYOKO KOIZUMI*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University, 4-16 Edagawa-cho, Nishinomiya, 663, Japan

(Received October 23, 1985)

Cyclosophoraoses (CySs) are unbranched cyclic (1→2)- β -D-glucans (degree of polymerizations 17—40) produced by many strains of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. CySs have larger cavity diameters and depths than cyclodextrins (CyDs), and are much more soluble in water than CyDs. Studies on inclusion complexes of non-steroidal anti-inflammatory agents (flurbiprofen, indomethacin, mefenamic acid, phenylbutazone) with CyS-A which is the CyS group member having the smallest molecular size were carried out by the solubility method, by using specimens prepared by four kinds of methods, I—IV. Solid inclusion complexes obtained by the method IV, in which CyS-A and the guest molecule were dissolved in aqueous ammonia and then the mixture was lyophilized, contained ammonia in the NH_3 /drug ratio of about 1 and it was suggested that CyS-A included non-steroidal anti-inflammatory agent in the form of ammonium salt and stabilized this form. CyS-A does not exhibit hemolytic activity and depressed hemolysis by flurbiprofen and indomethacin.

Keywords—cyclosophoraose-A; non-steroidal anti-inflammatory agent; inclusion complex; solubility method; freezing-dry method; HPLC; hemolytic activity; β -cyclodextrin

Cyclosophoraose (CyS) は *Agrobacterium* 属及び *Rhizobium* 属の多くの菌株から生産される枝分かれのない β -(1→2) 結合の環状糖 (cyclic (1→2)- β -D-glucan) で,¹⁾ 現在までに CyS-A (重合度 17) から CyS-X (重合度 40) に至る 24 種のものの存在が確認されている。²⁾

近年、包接化合物に関する研究が医薬品、農薬、化粧品、食品など多分野で活発に行われ、なかでも cyclodextrin (CyD) をホスト化合物とした医薬品の安定化、可溶化及びバイオアベイラビリティの向上等に関する研究が急速に進んでいる。³⁾ しかし、研究が進むにつれて CyD の溶解性や毒性などの関係から応用に限界があることが明らかとなってきたため、最近ではメチル化 CyD、エチル化 CyD、ヒドロキシプロピル CyD などの CyD 誘導体や CyD ポリマーなどの研究開発に関心が移行している傾向がみられる。⁴⁾

筆者らは先に、CyD に代わるものとして天然環状糖である CyS 類に着目し、その中で最も分子量の小さい CyS-A の効率の良い製造法、並びに包接能についての予試験的研究の結果を報告した。⁵⁾

今回は、難水溶性医薬品で酸性非ステロイド系抗炎症剤として繁用されている、flurbiprofen (FP), indomethacin (IM), mefenamic acid (MA), phenylbutazone (PB) (Chart 1) の 4 種に対する CyS-A の包接能を検討するとともに、CyS-A 包接化合物の製剤への応用の基礎データとして、*in vitro* におけるこれらの抗炎症剤による溶血作用に対する CyS-A の影響を調べ、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験の部

試薬及び溶媒 CyS-A はダイキン工業株式会社より恵与された CyS 混合物を前報⁵⁾ に従い、分取用 ODS カラム (LiChroprep RP-18, 25—40 μm , 30×3 cm i.d., メルク) で水を溶出液として分離精製し、 $[\alpha]_D^{20}$ =

Chart 1. Structures of Non-steroidal Anti-inflammatory Agents

−13.10° のものを使用した。β-CyD は市販品 (半井化学薬品) を水から 2 回再結晶し, $[\alpha]_D^{20} = +163^\circ$ のものを使用した。包接能の検討でゲスト化合物として用いた医薬品のうち IM (mp 155—161°C) と MA (mp 218—225°C (dec.)) はシグマ社のものを, PB (mp 105—106°C) は半井化学薬品のものを, FP はフロベン (科研製薬) を乳鉢で粉碎後, エーテルで抽出, 含水エタノールより結晶化し, mp 114—115°C のものを使用した。他の試薬及び溶媒はすべて市販特級品を, 実験に使用した水は脱イオン水を 2 回蒸留したものを, また, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に使用した溶媒は市販特級品を蒸留した後, 0.45 μm メンブランフィルターで濾過したものを利用した。

装置 旋光度測定には JASCO DIP-4 デジタル旋光度計 (日本分光) を, pH 測定には堀場 pH メーター M-8 (堀場製作所) を, 凍結乾燥には freeze dryer FD-1 (東京理化工機) を, 医薬品の融点測定にはマイクロ融点測定装置 (柳本製作所) を使用し, ホスト化合物とゲスト化合物との反応は恒温振とう装置 M-I 型 (大洋科学工業) あるいはインキュベーター SHR-200M (サンヨー電機) の中で行った。インドフェノール法によるアンモニア性窒素の定量, 及び溶血試験における吸光度測定には, UVIDEC-610C 複光束分光光度計 (日本分光) を使用した。包接能の検討で各医薬品の定量に用いた HPLC 装置は, 6000A ポンプ (日本ウォーターズ) に U6K インジェクター (日本ウォーターズ) をつけ, 検出器は UVIDEC-100III 紫外分光光度計 (日本分光) を, カラムは Finepak SIL C₁₈ (10 μm, 250×4.6 mm i.d., 日本分光) を使用した。

包接能の検討 包接化による各医薬品の水溶性の増加を目安として CyS-A の包接能を検討するため, 以下の 4 種の方法で試料を調製した。

[I] 法—CyS-A 溶液 (2.5—10 mm) を調製し, 各濃度の溶液 1 ml を共栓つき試験管に入れ, 一定過剰量の医薬品粉末 (3—5 mg) を加え, 30°C で平衡に達するまで振とうする。平衡到達後, 0.2 μm メンブランフィルターで濾過し, 試料とした。対照は CyS-A 溶液の代わりに水を用いて同様に操作を行った。

[II] 法—各医薬品の 10 mm アセトン溶液を調製し, この 1 ml と CyS-A 溶液 (2.5—10 mm) 各 1 ml をナス型フラスコに入れ, 密栓し 30°C で 24 時間振とうする。振とう後, 溶液はエバポレーターでアセトンを除去後, 凍結乾燥で粉末とする。これに水 1 ml を加え, 攪拌後 0.2 μm メンブランフィルターで濾過し, 試料とした。対照は CyS-A 溶液の代わりに水を使用した。

[III] 法—CyS-A 溶液 (2.5—10 mm) 各 1 ml をナス型フラスコに入れ凍結乾燥し粉末とする。各医薬品の 2 mm アセトン溶液 5 ml を CyS-A 粉末に加え, 密栓し 30°C で 24 時間攪拌する。反応後, 濾過して未反応の医薬品アセトン溶液を除去し, 残渣を水 (4 ml×3 回) に溶かして濾過, 濾液を凍結乾燥して粉末とした。この粉末に水 1 ml を加え溶解 (ほとんど完全に溶解する) し, 0.2 μm メンブランフィルターで濾過し, 試料とした。

[IV] 法—黒住らの凍結乾燥による包接化合物調製法⁶⁾ を参考に, CyS-A 溶液 (5 mm) 1 ml に各医薬品粉末 5×10^{-3} mmol を加え, 更に 2.8% アンモニア水 0.1 ml を加えて各医薬品を溶解後, 凍結乾燥し粉末とする。この粉末に水 1 ml を加え攪拌後, 0.2 μm メンブランフィルターで濾過し, 試料とした。対照は CyS-A 溶液の代わりに水を用いて同様に行った。また比較のために, β-CyD についても同様の方法で試料を調製した。

[I] 法, [II] 法, [III] 法及び [IV] 法で得た試料中の各医薬品は HPLC で定量した。

アンモニア性窒素の定量 [IV] 法で得た試料中のアンモニア性窒素の定量はインドフェノール法⁷⁾ で行った。すなわち試料にフェノールニトロプルシッドナトリウム溶液及び次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え, 30°C

で1時間放置した後、640 nm 付近の吸収極大波長における吸光度を測定し、検量線からアンモニア性窒素の量を求めた。

包接化合物の調製 いずれの医薬品も [IV] 法で試料を調製した場合に最も溶解度の上昇率が大きであったので、包接化合物の調製は [IV] 法で行った。すなわち、CyS-A と各医薬品をモル比 1:1 の割合で混合し、CyS-A と医薬品がそれぞれ 5 mm 濃度になるように一定量の水を加え、更に水の 1/10 量の 2.8% アンモニア水を加えて CyS-A 及び医薬品を溶解させ均一とした後、凍結乾燥で粉末とした。これに一定量の水を加え、攪拌後 0.2 μ m メンブランフィルターで濾過し、過剰の医薬品を除去する。濾液を再び凍結乾燥で粉末とし、これを包接化合物として以後の実験に使用した。 β -CyD についても同様の方法で包接化合物を調製した。

熱分析 デュボン 1090 型示差走査熱量計 (DSC) を用い、約 3 mg の試料をアルミパンに入れ、10°C/min の昇温速度で 30—300°C の温度範囲を測定した。温度校正にはインジウムと鉛を用いた。

溶血試験 各種濃度の医薬品含有リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M, PBS) 1 ml に健常成人の赤血球懸濁液 (ヘマトクリット値 0.2%) 1 ml を加え、37°C で 30 分間インキュベートした後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) し、上清のヘモグロビン量を 541 nm における吸光度により測定した。溶血率は PBS の代わりに、水を用いた場合の溶血率を 100% とし、医薬品存在下での相対溶血率で表した。

赤血球の形態観察 健常成人の赤血球懸濁液 (ヘマトクリット値 0.2%) 1 ml に CyS-A 含有 PBS 1 ml を作用させ、溶血実験と同様の処理を行った赤血球を 1% グルタルアルデヒドで固定後、エタノールで脱水し、臨界点乾燥 (日立臨界点乾燥装置 HCP-2 形) を行い、走査型電子顕微鏡 (日立-明石 MSM-101) で観察した。 β -CyD についても同様に比較した。

結 果 と 考 察

CyS-A の特性

CyS-A は β -CyD と同様グルコースのみを構成糖とする枝分かれのない天然環状糖で *Rhizobium phaseoli* AHU 1133 の変異株 RA-12 の培養液から収率良く得られる。⁸⁾ CyS-A の物理的特性を β -CyD のそれと比較して Table I に示した。

それぞれの分子模型を CPK モデルを使用して組み立ててみると Fig. 1 のようになる。 β -CyD は周知のよう

Fig. 1. CPK Models of CyS-A and β -CyD

に 7 個のグルコースが α -(1 $\rightarrow$ 4) 結合で環を形成し、環の内側は水素とエーテル結合の酸素からなり疎水性を示し、外側は親水性基が多く、環全体は非常に rigid なバケツ型構造になる。これに対し、CyS-A は 17 個のグルコースが β -(1 $\rightarrow$ 2) 結合で環を形成しているために、環の内径及び深さは β -CyD に比べ大きくなるが、環全体は非常に flexible な筒型構造になる。

両者の水に対する溶解度は著しく異なり、CyS-A は天然 CyD 類の中で最も溶解度の高い γ -CyD (23.2 g/100 ml, 25°C) に比べてもはるかに水溶性が高いという特徴を有している。

TABLE I. Physical Properties of CyS-A and β -CyD

	Glucose unit	Molecular weight	Mode of linkage	Melting point (°C)	Solubility in water (g/100 ml, 25°C)	$[\alpha]_D^{20}$	Internal diameter (Å)	Depth (Å)
CyS-A	17	2754	β -(1 $\rightarrow$ 2)	265—270 (dec.)	167 < ^{a)}	-13.10°	ca. 9	ca. 15
β -CyD	7	1134	α -(1 $\rightarrow$ 4)	277—280 (dec.)	1.85	+163°	6.0—6.4	7

a) Because of increasing viscosity, a more accurate estimation of solubility was difficult.

医薬品の HPLC による分析

ゲスト化合物に使用した医薬品は、いずれも酸性非ステロイド系抗炎症剤で、これらの HPLC による分析法は、これまでにいくつか報告されているが、⁹⁾ 今までの報告の多くは逆相カラムを用いて、移動相はアセトニトリルあるいはメタノールに緩衝液を加え pH を調節し、非解離型で分析したものである。今回、緩衝液調製の複雑さや、HPLC 装置の保守面を考慮して、移動相の pH 調節を緩衝液の代わりに 0.05% 酢酸で行った。移動相の pH は逆相カラムの使用可能範囲内であり、いずれの医薬品も対称性のあるピークとなり、また再現性、検量線ともに良好な結果が得られた。それぞれの医薬品の分析条件は Table II に示したとおりである。このうち PB の保持時間が他のものに比べ長くなっているが、これは PB が水溶液中で分解しやすく、特に [I] 法で試料を調製する際の対照試験で分解物が多くみられたので、その分解物も同時に分離分析したためである。Fig. 2 に PB とその分解物¹⁰⁾ (Chart 2) のクロマトグラムを示した。Hydrazobenzene は 3 と 4 のピークの間に溶出するが、今回の試料中には検出されなかった。

なお、これらの分析条件下では CyS-A 及び β -CyD は溶媒先端に溶出し、目的の医薬品の定量には影響を与えないことを確認している。

TABLE II. Conditions Determining Drug by HPLC on a Finepak SIL C₁₈

Drug	Eluent	Flow rate (ml/min)	Detection at (nm)	Retention time (min)
Flurbiprofen	CH ₃ OH-0.05% CH ₃ COOH (68:32)	1.0	245	11.0
Indomethacin	CH ₃ OH-0.05% CH ₃ COOH (70:30)	1.0	320	11.5
Mefenamic acid	CH ₃ OH-0.05% CH ₃ COOH (75:25)	1.0	280	11.2
Phenylbutazone	CH ₃ CN-0.05% CH ₃ COOH (45:55)	1.0	238	28.0

Fig. 2. Chromatogram of Phenylbutazone and Its Degradation Products

1, unknown; 2, 4-hydroxyphenylbutazone; 3, *N*-(2-carboxycaproyl)-hydrazobenzene; 4, phenylbutazone; 5, unknown. Chromatographic conditions: detector, UVDEC-100III at 0.16 a.u.f.s.; temperature, ambient; other conditions as in Table II.

Chart 2. Degradation Processes of Phenylbutazone

2, 3, 4; the same as in Fig. 2.

CyS-A の包接能

CyS-A と酸性非ステロイド系抗炎症剤 (FP, IM, MA, PB) とを [I], [II], [III] 法で反応させ、医薬品の水溶性の増加から包接能を検討した。[I] 法は一般に行われている溶解度法で、ホスト化合物である CyS-A 溶液と粉末状のゲスト化合物を反応させたものである。[II] 法はホスト化合物及びゲスト化合物を、共に溶液状態にして反応させたもので、[III] 法は [I] 法とは逆にホスト化合物を粉末状態にし、ゲスト化合物を溶液状態として反応させたものである。結果は Table III に示したとおりで、いずれの医薬品も対照に比べると溶解度の上昇はみられるが、顕著なものではなく、また一般に [I] 法よりも [II], [III] 法で行った方が良い結果が得られたが、[II] 法で 1:1 の complex を形成するものと仮定して溶解度相図から求めた CyS-A と各医薬品の安定度定数は FP:110

TABLE III. Solubilities (mm) of the CyS-A-Drug Complexes Prepared by Methods I, II, and III, Using 10 mm CyS-A

Drug	Method I		Method II		Method III
	Control	With CyS-A	Control	With CyS-A	With CyS-A
FP	0.12	0.18	0.18	0.38	0.36
IM	0.07	0.14	0.09	0.19	0.15
MA	0.02	0.03	0.05	0.12	0.04
PB	0.08	0.11	0.14	0.21	0.24

Reaction time: 24 h.

m^{-1} , IM: 110 m^{-1} , MA: 140 m^{-1} , PB: 50 m^{-1} 程度であった。[I] 法での安定度定数はさらに小さく, FP: 50 m^{-1} , IM: 100 m^{-1} , MA: 50 m^{-1} , PB: 40 m^{-1} で, この値を同条件で求めた β -CyD との complex のそれと比較すると, IM と PB の場合は大差なかったが, FP と MA の場合は β -CyD complex の方がはるかに安定で特に FP- β -CyD complex の安定度定数は 5100 m^{-1} にもなり, FP-CyS-A complex とは安定度に非常に大きな差が認められた。

CyD については包接機構¹¹⁾もいろいろ研究されており, 1) ファンデルワールス相互作用, 2) 水素結合, 3) 環のひずみ解消, 4) 環内の水分子とゲスト分子との置換などが主な推進因子だとされているが, なかでも水分子が重要な役割を果たしていると言われているため, CyD の包接反応は通常水溶液中で行われている。一方, CyS-A の場合, 前報⁹⁾で行った脂溶性ビタミン類などの反応の結果も考え合わせると, [I] 法よりむしろ [II], [III] 法で行った方が良い結果が得られることが分かった。詳細な反応機構などはまだ明らかではないが, CyS-A の場合 CyD と異なり非常に flexible な分子構造をとるということが大きく影響し, ゲスト化合物が溶液状態にあることが包接化の重要な条件になるのではないかと考えている。なお [II] 及び [III] 法で反応させた場合, アセトンが共に包接される可能性が考えられるが, 前報⁹⁾でこの点に関して詳細に調査した結果, アセトンは単独でも, また, 医薬品と共にでも全く包接されないことを確認している。

一方, 黒住らの凍結乾燥法⁹⁾を参考にした [IV] 法で CyS-A と酸性非ステロイド系抗炎症剤との包接化反応について検討したところ, Table IV の結果が得られた。[I], [II] 及び [III] 法に比べ, ゲスト化合物の溶解度は大きく上昇している。 β -CyD についても同様に行ったところ, CyS-A に比べ溶解度の上昇は大きく, 特に FP に関しては, 上釜,¹²⁾ 今井¹³⁾らの結果 ([I] 法) と同様, ほぼ 1:1 の complex を形成していることが示唆された。この方法では, まずアンモニア水でゲスト化合物を溶解し, 次にこれを凍結乾燥するという操作をとるため, 得られた試料についてインドフェノール法でアンモニア性窒素を調べたところ, いずれも対照に比べ高濃度のアンモニア性窒素が検出され, ゲスト化合物とアンモニア性窒素との比率はほぼ 1:0.9—1 という結果であった (Table IV)。一方, 対照ではアンモニア性窒素の検出量は非常に少なく, また医薬品の溶解度を [II] 法の対照と比べてみると, 比較的アンモニアを多く含む IM の場合のみ若干の上昇がみられたほかは顕著な差は認められなかった。

TABLE IV. Solubilities (mm) of the Complexes Prepared by Method IV, Using Equimolecular Amounts of Drug and CyS-A or β -CyD

Drug	Control	With CyS-A	With β -CyD
FP	0.27 (0.20)	2.25 (0.97)	4.75 (0.63)
IM	1.01 (0.80)	3.05 (0.85)	3.76 (0.82)
MA	0.11 (0.25)	2.01 (0.96)	3.78 (0.86)
PB	0.13 (0.00)	2.12 (0.85)	2.70 (0.81)

Values in parentheses are the NH_3 /drug molar ratios included.

しかし IM の場合も凍結乾燥時間を長くするとアンモニア含量が減少し, それに伴い溶解度も減少していった。なお, CyS-A 又は β -CyD 共存の場合は同じ条件下で溶解度にはほとんど変化はみられなかった。また, CyS-A にアンモニア水のみを作用させ同様に操作してもアンモニア性窒素はほとんど検出されなかったため, アンモニアが単独で包接されることは無いということが確認された。 β -CyD でも同様の結果が得られた。次に添加するアンモニア量を変えて反応させたところ, 溶解度に変化はみられずアンモニア性窒素の検出量もほとんど変らなかった。

以上の結果より、[IV] 法による処理で、実験に用いた酸性非ステロイド系抗炎症剤は単独では安定なアンモニウム塩は形成し難いが、CyS-A 又は β -CyD 共存下ではホスト化合物の環内でアンモニウム塩が安定化され、その結果、医薬品の溶解度が顕著に上昇したものと考えられる。

なお、黒住らの方法ではネスラー法での検出でアンモニアは認められなかったと報告されているが、参考までに追試を行いインドフェノール法でアンモニア性窒素を定量し、ゲスト化合物とアンモニア性窒素との比率を求めたところ、筆者らが行った [IV] 法での結果と近似した値が得られた。

製剤において難溶性の酸性医薬品は、水溶性を高めるために塩基を用いて塩の形に変えられることが多いが、塩基性条件下で分解しやすいものや、安定な塩が得られない医薬品などにとっては [IV] 法での包接化合物調製法は有効だと思われる。

熱分析

[IV] 法で調製した complex の熱分析結果を Fig. 3 に示す。FP, IM, MA 及び PB は単独の場合、それぞれ 115°C, 160°C, 225°C, 105°C 付近に融解あるいは分解による吸熱ピークがみられる。物理的混合物 (各ゲスト化合物と CyS-A とを complex 中のゲストと CyS-A とのモル比で機械的に混合したもの) の熱分析の結果にも、それぞれのゲスト化合物に特有な熱的挙動がみられるが、CyS-A との complex ではこれらのピークはいずれも消失している。これはゲスト化合物が (多分アンモニウム塩の形で) CyS-A の環内に包接されていることを示唆している。

Fig. 3. DSC Thermograms of CyS-A-FP, CyS-A-IM, CyS-A-MA, and CyS-A-PB Systems

- (I) drug alone.
- (II) physical mixture of CyS-A and drug (FP; 1: 0.45, IM; 1: 0.61, MA; 1: 0.40, PB; 1: 0.42).
- (III) CyS-A-drug complex prepared by method IV.

CyS-A の溶血抑制作用

注射剤の溶血性は組織傷害性と深く関係していることが知られている。¹⁴⁾ そこで、CyS-A の赤血球に対する溶血作用 (Fig. 4) と形態変化 (Fig. 5) について調べた。その結果、 β -CyD が低濃度から溶血作用を示すのに対し、CyS-A は 80 mM という高濃度においてもまったく溶血作用はみられなかった。また、 β -CyD は赤血球の形態変化を起こさせるが、CyS-A にはそのような作用はみられなかった。そこで、酸性非ステロイド系抗炎症剤のうち比較的使用頻度が高く、胃腸障害などの副作用¹⁵⁾がみられる IM と FP をとりあげ、それらの赤血球溶血作用に対する CyS-A の影響を検討した (Fig. 6)。その結果、[IV] 法で調製した CyS-A と IM との complex 及び FP との complex は、それぞれ医薬品単独に比べ溶血抑制効果がみられた。同様に行った β -CyD

Fig. 4. Hemolytic Effects of CyS-A and β -CyD on Human Erythrocytes in 0.1 M Isotonic Phosphate Buffer (pH 7.4) at 37°C

Fig. 5. Scanning Electron Micrographs of Human Erythrocytes Treated with CyS-A and β -CyD in 0.1 M Isotonic Phosphate Buffer (pH 7.4) at 37°C

Fig. 6. Hemolytic Effects of IM and FP on Human Erythrocytes in the Absence and the Presence of CyS-A or β -CyD in 0.1 M Isotonic Phosphate Buffer (pH 7.4) at 37°C
●, CyS-A-drug complex; ○, β -CyD-drug complex; △, drug alone.

についての試験で、IM の場合では IM 単独に比べかえって低濃度から溶血がみられたが、これは β -CyD と IM の complex が非常に不安定なため、complex の解離により β -CyD の溶血作用が現れたものだと考えられる。一方、FP に関しては非常に安定な complex を形成するため FP 及び β -CyD の両方の溶血作用が顕著に抑制されるという結果が得られた。

以上、CyS-A の製剤への利用として注射剤への適用可能が示唆されたわけであるが、CyS-A が CyD 類と異なり非常に水溶性が高く、また溶血作用を示さない天然環状糖であるという特徴をさらに有効に生かせる例の発見が望まれる。なお、これまでの研究では CyS-A は β -CyD ほど安定な complex を形成しないようであるが、この性質が薬物の作用発現にかえって有利な場合もあるのではないかと考えられる。

謝辞 本研究を進めるにあたり、CyS の御恵与並びに熱分析をして頂きましたダイキン工業株式会社、走査型電子顕微鏡の操作について御指導を賜りました武庫川女子大学・家政学部 滝山一善教授に深謝致します。

引用文献

- 1) L. P. T. M. Zevenhuizen, H. J. Scholten-Koerselman, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **45**, 165 (1979); M. Abe, A. Amemura, S. Higashi, *Plant Soil*, **64**, 315 (1982); M. Hisamatsu, A. Amemura, T. Matsuo, H. Matsuda, T. Harada, *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1873 (1982); A. Amemura, M. Hisamatsu, H. Mitani, T. Harada, *Carbohydr. Res.*, **114**, 277 (1983); M. Hisamatsu, A. Amemura, K. Koizumi, T. Utamura, Y. Okada, *ibid.*, **121**, 31 (1983).

- 2) K. Koizumi, Y. Okada, S. Horiyama, T. Utamura, M. Hisamatsu, A. Amemura, *J. Chromatogr.*, **265**, 89 (1983); A. Dell, W. S. York, M. McNeil, A. G. Darvill, P. Albersheim, *Carbohydr. Res.*, **117**, 185 (1983); K. Koizumi, Y. Okada, T. Utamura, M. Hisamatsu, A. Amemura, *J. Chromatogr.*, **299**, 215 (1984).
- 3) 上釜兼人, 薬誌, **101**, 857 (1981); J. Szejtli, "Cyclodextrin and Their Inclusion Complexes," *Académiai Kiadó*, Budapest, 1982; 南部直樹, 永井恒司, 化学工業, **35**, 710 (1982); 上釜兼人, 澱粉科学, **30**, 247 (1983).
- 4) Y. Nakai, K. Yamamoto, K. Terada, H. Horibe, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1796 (1982); M. Otagiri, T. Imai, K. Uekama, *J. Pharmacobio- Dyn.*, **5**, 1027 (1982); A. P. Croft, R. A. Bartsch, *Tetrahedron*, **39**, 1417 (1983); F. Hirayama, M. Kurihara, K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4237 (1984); E. Fenyvesi, O. Shirakura, J. Szejtli, T. Nagai, *ibid.*, **32**, 665 (1984); 上釜兼人, 入江徹美, 製薬工場, **5**, 20 (1985).
- 5) K. Koizumi, Y. Okada, S. Horiyama, T. Utamura, T. Higashiura, M. Ikeda, *J. Inc. Phenom.*, **2**, 891 (1984).
- 6) M. Kurozumi, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975).
- 7) 日本薬学会編, "衛生試験法・注解 1980," 金原出版, 東京, 1983, pp. 741—742.
- 8) T. Higashiura, M. Ikeda, M. Okubo, M. Hisamatsu, A. Amemura, T. Harada, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1865 (1985).
- 9) L. J. Duscl, L. P. Hackett, *J. Chromatogr.*, **172**, 516 (1979); W. F. Bayne, T. East, D. Dye, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 458 (1981); A. Astier, B. Renat, *J. Chromatogr.*, **233**, 279 (1982); M. Alvinerie, *ibid.*, **181**, 132 (1980); T. Marunaka, T. Shibata, Y. Minami, Y. Umeno, *ibid.*, **183**, 331 (1980); B. Seville, N. Thuaud, J. P. Tillement, *ibid.*, **204**, 285 (1981); K. Martin, M. I. Stridsberg, B. M. Wiese, *ibid.*, **276**, 224 (1983).
- 10) D. V. C. Awang, A. Vincent, F. Matsui, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1673 (1973); D. V. C. Awang, A. Vincent, *ibid.*, **65**, 68 (1976).
- 11) M. L. ベンダー, M. コミヤマ著, 平井英史, 小宮山 真訳, "シクロデキストリンの化学," 初版, 学会出版センター, 東京, 1979, pp. 39—47.
- 12) K. Uekama, F. Hirayama, T. Imai, M. Otagiri, K. Harata, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3363 (1983).
- 13) T. Imai, T. Irie, M. Otagiri, K. Uekama, M. Yamasaki, *J. Inc. Phenom.*, **2**, 597 (1984).
- 14) 内田 寛, 応用薬理, **12**, 95 (1976).
- 15) 尾藤龍哉, 工藤正典, 奥村 誠, 薬誌, **98**, 114 (1978).