***O*-Carboxymethyl-*O*-ethyl- β -cyclodextrin による 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の安定性及びバイオアベイラビリティの向上**

堀内保秀, 平山文俊, 上釜兼人*

熊本大学薬学部

Improvement of Stability and Bioavailability of 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) by *O*-Carboxymethyl-*O*-ethyl- β -cyclodextrin

Yasuhide HORIUCHI, Fumitoshi HIRAYAMA and Kaneto UEKAMA*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1, Oe-honmachi, Kumamoto 862, Japan

(Received March 22, 1991)

The possible utility of *O*-carboxymethyl-*O*-ethyl- β -cyclodextrin (CME- β -CyD) as a novel drug carrier was studied *in vitro* and *in vivo*, by using 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) as a model drug. The chemical instability of HCFU in solution and solid state was improved by CME- β -CyD complexation. The *in vitro* release of HCFU from the CME- β -CyD complex was decelerated in acidic solution, while accelerated at neutral pH regions, showing a typical delayed-release pattern. This pattern was clearly reflected in the blood levels after the oral administration of the complex to dogs, increasing the bioavailability. The present results suggested that CME- β -CyD is useful as a delayed-release-type carrier for the oral administration of chemically labile HCFU.

Keywords—*O*-carboxymethyl-*O*-ethyl- β -cyclodextrin; 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil; 5-fluorouracil; complexation; delayed-release; stability; bioavailability

緒 言

近年, β -シクロデキストリン (β -cyclodextrin, β -CyD) の物性や機能性を改善した種々の誘導体が構築され, 医薬への有効利用に関する研究が活発に行われている.¹⁻⁴⁾ たとえば, β -CyD の水溶性を高めたメチル化 β -CyD,⁵⁾ ヒドロキシプロピル化 β -CyD,⁶⁾ 及び疎水性のエチル化 β -CyD⁷⁾ は, 薬物の各種製剤特性の改善への応用が検討されている. 一方, 本研究で対象とするカルボキシメチルエチル化 β -CyD (*O*-carboxymethyl-*O*-ethyl- β -CyD, CME- β -CyD)⁸⁾ はエチル化 β -CyD⁷⁾ にカルボキシメチル基を導入した弱酸性の誘導体であり, その特異な溶解挙動や包接特性に基づく多機能性の薬物担体として医薬への応用が期待される.

1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) は, 5-fluorouracil (5-FU) の masked compound であり, 経口投与において抗腫瘍効果が高く, 抗菌スペクトルも広いが,⁹⁻¹¹⁾ 中性及びアルカリ性領域において容易に加水分解され,^{12,13)} 低吸収性で消化管傷害性の強い 5-FU に変換することが知られている (Fig. 1).^{14,15)} 通常, ピリミジン代謝拮抗性抗癌薬の薬理効果は時間依存性であるため,¹⁶⁾ 血中濃度の持続化は制癌効果を高めるうえで有用である. そこで本研究では, CME- β -CyD の特異な物性と包接作用を利用して HCFU の安定性改善並びに放出制御に伴うバイオアベイラビリティの向上を企図した.

Fig. 1. Proposed Scheme for the Hydrolysis of HCFU

実 験 の 部

試料及び溶媒 HCFU は三井製薬工業 (株) より, CME- β -CyD は和光純薬工業 (株) より恵与されたも

のを使用した。なお、CME- β -CyD は 1 分子当たり平均置換度¹⁷⁾がカルボキシメチル基: 1.83, エチル基: 10.7 のものを使用した。 β -CyD は日本食品化工 (株) 製を, ジメチル- β -CyD (DM- β -CyD) は東進ケミカル (株) 製を水及びメタノールからそれぞれ再結晶して使用した。他の試薬並びに溶媒類はすべて市販特級品を使用した。

溶解度法 HCFU の一定過剰量を共栓付き試験管に入れ, 種々の濃度の CyD 水溶液を添加し振盪した (25 °C)。溶解平衡に達した後 (約 10 日), 遠心分離して上清を綿栓付きピペットで濾取し, 溶媒で希釈後, UV (261 nm) により HCFU 濃度を定量した。なお, HCFU の加水分解を防ぐため, 溶媒はすべて 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 3.0) を用いた。¹⁸⁾

固体複合体の調製 等モル比の薬物と CyD をメノウ乳鉢中で混和し, リン酸-メタノール混液 (1:1 v/v) を適量加え, ペースト状になるまで混練した。得られた複合体は室温で約 2 日間減圧乾燥し, 100 メッシュで篩過して実験に用いた。各固体試料の熱分析及び粉末 X 線回折の測定は前報¹⁸⁾と同様に行った。

安定性試験 水溶液中——各種 CyDs を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 5–9) 3 ml を共栓付き石英セルに入れて 37 °C に保った後, HCFU のメタノール溶液 100 μ l を注入して反応を開始した (最終濃度: HCFU; 6×10^{-5} M, CyD; 1×10^{-2} M)。HCFU の加水分解に伴う 241 nm における吸光度の減少を経時的に追跡し, 常法に従って見かけの一次速度定数を算出した。

腸管ホモジネート中——ビーグル犬の小腸上・中・下部よりそれぞれ腸管を切り取り 5 倍量の 1.15% KCl を加え, ホモジネートを調製した。CME- β -CyD 等張リン酸緩衝液 (最終濃度: 1×10^{-2} M, pH 7.4) 4 ml をホモジネート 4 ml に加えて 37 °C に保存後, HCFU メタノール溶液 100 μ l を加えて反応を開始した (最終薬物濃度: 1×10^{-4} M)。経時的に試料 0.2 ml を採取し, 氷冷した 0.2 N HCl 1 ml に加えて反応を停止し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により HCFU を定量した。

HPLC 測定条件——ポンプ; 日立 635A 液体クロマトグラフ, 検出器; 日立 638-41 型波長可変 UV 検出器, カラム; Sica-Merck LiChrosorb RP-18 (10 μ m, 4 mm i.d., 250 mm), 移動相; メタノール-0.07 M 酢酸緩衝液 (18:7 v/v, 最終 pH 3.0), 流速; 1.0 ml/min, 測定波長; 261 nm。

固体試料——各種粉末試料 (<100 メッシュ) を田葉井プラチナスレインボー PR-1G 型恒温恒湿器内に保存した (40 °C, 75% R.H.)。経時的に一定量の粉末試料を採取し, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 3.0)-メタノール混液 (1:1 v/v) に溶解後, 上記 HPLC により HCFU を定量した。

溶出試験 HCFU は中性及びアルカリ性領域において容易に 5-FU へ分解されるため, この加水分解や吸収過程を考慮して, 隔膜を有する溶出試験装置 (Fig. 2) を試作し, *in vitro* 溶出挙動を検討した。すなわち, 37 °C の循環水を通じた膜透過実験装置 (隔膜: セロハン膜, Visking 社製セルロースチューブ)¹⁹⁾ の両相に 0.001 M HCl-KCl 緩衝液 (pH 1.2), 0.001 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) あるいは 0.001 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 110 ml を入れ, さらにアクセプターセルの上層に *n*-オクタノール 5 ml を添加した。ドナーセル側に粉末試料を投入後, 経時的にアクセプターセル中の水相並びに *n*-オクタノール相からそれぞれ 0.5 ml 及び 0.1 ml 採取し, HPLC により HCFU と 5-FU を定量した。なお, Fig. 8, 9 の溶出率は, 定量値から全溶出液及び有機相中に溶解している薬物量に換算して表した。HCFU 及び 5-FU の HPLC による定量条件を以下に示す。*n*-オクタノール相中の HCFU の定量: ポンプ; 日本分光 (株) 製 BIP-I 型クロマトグラフ, 検出器; 日本分光 (株) 製 UVIDECA-100-V 型検出器, カラム; Sica-Merck LiChrosorb Si-60 (5 μ m, 4 mm i.d., 250 mm), 移動相; エタノール-塩化メチレン-*n*-ヘキサン (1:2:7 v/v), 流速; 1.0 ml/min, 測定波長; 261 nm。水相中 HCFU 及び 5-FU の定量: 水相中 HCFU 及び 5-FU 濃度は前報²⁰⁾と同様に HPLC により測定した。

In Vivo 吸収実験 ビーグル犬への経口投与: 雄性ビーグル犬 (13–15 kg) を投与前 24 時間絶食し, 被験カプセル (局方 000 号, HCFU 50 mg 含有) を水 50 ml とともに経口投与した。なお, ビーグル犬は高胃酸度調整犬 (胃内 pH 1–2) を用いた。胃酸度調整ビーグル犬の作製: 山田ら²¹⁾の方法に従いペンタガストリン注射液 (10 μ g/kg) を投薬 15 分前及び 1 時間後にビーグル犬の後肢大腿筋に筋肉内注射して作成した。血漿中 HCFU 及び 5-FU の定量: 血漿中 HCFU 及び 5-FU 濃度は前報²⁰⁾と同様

Fig. 2. Apparatus Used for Release Study

a) *n*-Octanol was added to avoid the degradation of HCFU and to provide a sink condition of aqueous phase by extraction of HCFU.

に HPLC により測定した。

結 果 と 考 察

1. カルボキシメチルエチル- β -シクロデキストリンと HCFU の複合体形成

HCFU と各種 β -CyDs との水溶液 (0.05 M リン酸緩衝液, pH 3.0) 中における相互作用を溶解度法により検討した結果を Fig. 3 に示す。HCFU の溶解度は CME- β -CyD 濃度の増加につれて直線的に上昇し、いわゆる Higuchi ら²²⁾ の分類による A_L 形溶解度相図を示した。相図の直線部分の傾きと切片の値から算出した複合体の見かけの安定度定数 (K') は、ジメチル- β -CyD (DM- β -CyD, 4000 M^{-1}) $\gg$ β -CyD (670 M^{-1}) $\approx$ CME- β -CyD (660 M^{-1}) の順であり、CME- β -CyD は β -CyD と同程度の K' 値を与えた。HCFU は β -CyD 及び DM- β -CyD とモル比 1:1 の固体複合体を形成することが知られているため、^{18,20)} 今回の CME- β -CyD 系の場合も混練法によりモル比 1:1 の複合体を調製し、以下の実験に用いた。なお、固体状態における CME- β -CyD と HCFU の相互作用は前報¹⁸⁾ と同様に熱分析 (DSC, TG) 及び粉末 X 線回折により確認した。

2. カルボキシメチルエチル- β -シクロデキストリンによる HCFU の安定性の改善

水溶液中、固体状態並びに腸管ホモジネート中における HCFU の安定性に及ぼす CME- β -CyD の影響について検討した。

Fig. 4 は pH 6.8 リン酸緩衝液中における HCFU ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$) の加水分解速度に及ぼす CME- β -CyD ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$) 添加の影響を示す。CME- β -CyD 存在下の HCFU の加水分解速度は薬物単独に比べて遅く、分解抑制効果を示した。Fig. 5 は CME- β -CyD 存在下及び非存在下における HCFU 加水分解速度の pH プロファイルを示す。CME- β -CyD は広範囲の pH 領域 (pH 5—9) において HCFU の加水分解を抑制した。CME- β -CyD の安定化作用は、包接効果に加えて、空洞近辺の微視的環境を HCFU の安定化に有利な弱酸性とする緩衝効果、あるいは水酸イオンの接近に対するカルボキシアニオンの電氣的反発効果などに起因するものと考えられる。

Fig. 6 はビーグル犬の腸管ホモジネート中での HCFU の安定性に対する CME- β -CyD の影響を示す。ホモジネート中における HCFU から 5-FU への分解速度は水溶液中の加水分解速度とほぼ同程度であることから、消化管内における HCFU の分解は水酸イオン触媒が支配的であり、CME- β -CyD はホモジネート中においても HCFU の加水分解を抑制することが確かめられた。

Fig. 7 は 40°C , 75% R.H. の加速条件下における HCFU/乳糖混合物及び各種 CyDs 複合体中の HCFU の残存率の経時変化を示す。HCFU の分解は β -CyD により促進され、保存 12 日後にはほぼ 100% 分解した。一方、CME- β -CyD 複合体では 12 日後においても HCFU の分解は 25% 程度であった。著者らは先に、CyD 複合体中の HCFU はホスト分子の吸湿性が高いほど分解されやすく、pH 調整剤として有機酸を添加すると HCFU の安定性が向上することを報告した。¹⁸⁾ したがって、CME- β -CyD は吸湿性が β -CyD よりも低く、²⁹⁾ ま

Fig. 3. Phase Solubility Diagrams of HCFU- β -CyDs Systems in Phosphate Buffer (pH 3.0) at 25°C

○, β -CyD; △, DM- β -CyD; ●, CME- β -CyD.

Fig. 4. Time Courses of Hydrolysis of HCFU in the Presence and Absence of CME- β -CyD in Phosphate Buffer (pH 6.8) at 37°C

○, without CME- β -CyD; ●, with CME- β -CyD.

Fig. 5. pH-Profiles for Hydrolysis Rates of HCFU in the Presence and Absence of CME- β -CyD in Phosphate Buffer at 37°C

○, without CME- β -CyD; ●, with CME- β -CyD.

た、カルボキシメチル基が酸性環境を作り出すため、HCFU の安定化には有利なホスト分子であると考えられる。

3. カルボキシメチルエチル- β -シクロデキストリンによる HCFU の放出制御

HCFU は消化管粘膜からの吸収性、消化管傷害性、血中での滞留性、病巣への移行性などの点で、intact な HCFU として消化管から吸収されることが望まれる。²⁰⁾ そこで、CME- β -CyD による HCFU の吸収改善を企図して、CME- β -CyD 複合体の *in vitro* における溶出、分解挙動並びにビーグル犬を用いた *in vivo* 吸収挙動について検討した。

In Vitro 溶出挙動

In vitro 溶出試験には、ドナー相に投入した複合体粉末からの HCFU の溶出挙動並びに溶出後の 5-FU への分解挙動を同時に追跡可能な膜透過実験装置 (実験の部, Fig. 2) を用いて検討した。なお、アクセプターセル中の水相上部にはドナー相から溶出・膜透過してくる HCFU を抽出し、溶出液のシンク条件を確保するために、少量の *n*-オクタノールを添加したが、この *n*-オクタノール中では HCFU は分解しないことをあらかじめ確認した。Fig. 8 は、各 pH における HCFU 未変化体としての溶出率を示す。CME- β -CyD 固体複合体からの HCFU の溶出を伴う膜透過速度は溶出液の pH

Fig. 8. Release Profiles of HCFU from HCFU (Diluent: Lactose) or Its CME- β -CyD Complex through Cellophane Membrane at Various pH

○, HCFU alone (diluent: lactose); ●, CME- β -CyD complex.

Fig. 6. Time Courses of Degradation of HCFU in the Presence and Absence of CME- β -CyD in Homogenate (pH 7.4) of Dog Small Intestinal Tract at 37°C

○, without CME- β -CyD; ●, with CME- β -CyD.

Fig. 7. Time Courses of Degradation of HCFU or Its CyD Complexes in Solid State at 40°C and 75% R.H.

○, HCFU alone (diluent: lactose); □, β -CyD complex; △, DM- β -CyD complex; ●, CME- β -CyD complex.

Fig. 9. Release Profiles of 5-FU from HCFU alone (Diluent: Lactose) or Its CME- β -CyD Complex through Cellophane Membrane at Various pH and 37°C, Measured by Apparatus Described in Fig. 2

○, HCFU alone (diluent: lactose); ●, CME- β -CyD complex.

Fig. 10. Molar Ratios of HCFU/Total 5-FU at Various pH

○, HCFU alone (diluent: lactose); ●, CME- β -CyD complex.

上昇につれて増大し、その速度は HCFU 単独に比べて大きかった。特に pH 6.8 溶出液の場合、HCFU 単独の未変化体濃度は極めて低いのにに対して、複合体では溶出開始 3 時間後の未変化体は約 30% に達した。Fig. 9 は HCFU 溶出後に生成した 5-FU 分率を示す。酸性溶出液 (pH 1.2, 4.0) 中では 5-FU の生成は認められず、HCFU は安定に存在した。一方、pH 6.8 溶出液中において、HCFU 単独は速やかに 5-FU へ分解されるのに対して、複合体では HCFU の分解が著しく抑制された。Fig. 10 は、溶出液中の安定化効果の指標として総薬物溶出量 (total 5-FU = HCFU + 5-FU) に対する HCFU の比を経時的にプロットした結果を示す。pH 1.2 及び 4.0 溶出液中では HCFU は分解を受けないため、比率は 1 に近い値を示したが、pH 6.8 溶出液中では単独の場合 HCFU が容易に加水分解されるため、0 に近い値を示した。一方、CME- β -CyD 複合体では溶出した HCFU の約 2 割しか分解を受けず、著しい安定化が観察された。この安定化効果は、CME- β -CyD の溶解に伴う溶出液 pH の低下 (溶出試験開始 3 時間後の pH は 6.8 から 3.8 に低下した)、包接による HCFU の分解抑制などに起因するものと考えられる。特に *in vivo* 条件下においては、胃内に比べて消化液量の少ない小腸吸収部位で腸溶性の複合体が多量に溶解すると消化液の pH が低下し、HCFU の分解が抑制されるものと考えられる。

このように、CME- β -CyD 複合体からの HCFU の溶出は pH 依存性の遅延放出パターンを示し、小腸消化液に相当する pH 6.8 溶出液中における HCFU の安定性と溶解性が著しく改善されることが確かめられた。

In Vivo 吸収挙動

HCFU 単独 (賦形剤: 乳糖) 及び CME- β -CyD 複合体をカプセルに充填し、ビーグル犬に経口投与後の血漿中 HCFU 並びに 5-FU 濃度を測定した。Fig. 11 (a) は、各カプセルを経口投与後の血漿中 HCFU 濃度の時間推移を示す。HCFU 単独投与時における血漿中濃度は 1 時間で C_{max} に到達後、速やかに低下し、6 時間後には血漿中 HCFU は検出限界以下となった。一方、CME- β -CyD 複合体の血漿中濃度は投与 3 時間後に C_{max}

に到達し、以後緩やかに減少しながら、12 時間後においても血漿中に HCFU が検出された。これらの現象は、*in vitro* 溶出試験の結果 (Fig. 8) とよく対応している。別途に行った HCFU の静脈内投与実験において、血漿中には 5-FU がほとんど検出されないこと、また、血中における HCFU から 5-FU への分解速度は 5-FU の血中消失速度に比べて小さいことから、²⁰⁾ 経口投与時に検出される血中 5-FU の大部分は消化管内での分解によるものと推測される。Fig. 11 (b) に血漿中 5-FU 濃度時間推移を示すように、HCFU 単独では血漿中に比較的長時間 5-FU が検出されることから、HCFU は消化管内で徐々に分解を受けながら吸収されるものと推定される。一方、複合体では 5-FU は速やかに血漿中から消失し、8 時間後には検出されなかった。このことは、複合体として HCFU を投与すると、消化管内で安定化され、吸収に不利な 5-FU 量が少ないことを示唆する。

Fig. 11 (c) は消化管内における HCFU の安定化効果の目安となる血漿中 total 5-FU に対する HCFU の割合を示す (Fig. 11 (a) 及び (b) から算出)。CME- β -CyD 複合体における HCFU 分率は、投与 3 時間以降はほぼ 1 となり、薬物単独に比べて著しく安定化されることが分かる。

Table I は血漿中濃度時間曲線から算出した AUC と MRT 値を示す。AUC_{HCFU} は複合体化により増大したが、AUC_{5-FU} は逆に減少し、複合体では HCFU として吸収される割合が増大することを示唆する (HCFU/total 5-FU: HCFU 単独; 0.37, 複合体; 0.45)。また、複体の MRT_{HCFU} は薬物単独に比べて約 3 倍延長したが、MRT_{5-FU} は逆に短縮した。これは、消化管での HCFU の分解が複合体化により抑制されるため HCFU としての吸収が長時間続き、5-FU としての吸収は短時間で終了するためと推定される。

以上の知見から、CME- β -CyD はその遅延放出、酸性化効果、包接作用などの多機能性によって、HCFU の吸収部位である小腸における安定性と溶解性を改善し、HCFU の血中濃度の持続化とバイオアベイラビリティの向上をもたらすものと考えられる。

総 括

経口投与における血漿中 HCFU 濃度の持続を目的として、CME- β -CyD との複合体を調製し、安定性、溶解性並びに *in vivo* 吸収性について検討し、以下の知見を得た。1) 37°C, pH 6.8 リン酸緩衝液中及びビーグル犬の腸管ホモジネート中での HCFU の加水分解は CME- β -CyD 添加により抑制された。2) CME- β -CyD 固体複合体における HCFU の安定性 (40°C, 75% R.H.) は他の CyD 複合体 (β -CyD, DM- β -CyD) に比べて優れていた。3) CME- β -CyD 複合体からの HCFU 溶出速度は溶出液の pH 上昇に伴い増大し、遅延放出型のパター

Fig. 11. Plasma Levels of HCFU (a) and 5-FU (b), and Molar Ratios of HCFU/Total 5-FU (c), after Oral Administration of HCFU Alone (Diluent: Lactose) or Its CME- β -CyD Complex (Equivalent to 50 mg/body of HCFU) to Dogs

○, HCFU alone (diluent: lactose); ●, CME- β -CyD complex. Each value represents the mean of 3 dogs.
 a) $p < 0.05$ vs. HCFU alone. b) The concentration of the drugs was below the detection limit.

TABLE I. AUC and MRT Values of HCFU, 5-FU and Total 5-FU after Oral Administration^{a)} of HCFU or CME- β -CyD Complex to Dogs

System	$AUC^{b)}$ ($h \cdot \mu M$)			$HCFU/total\ 5-FU^{e)}$
	HCFU	5-FU	Total 5-FU	
HCFU alone ^{d)}	3.32 ± 0.59	6.21 ± 2.17	8.93 ± 2.34	0.37
Complex	3.98 ± 0.18	5.07 ± 2.05	8.90 ± 2.26	0.45

System	MRT (h)			$F_{HCFU}^{e)}$ (%)
	HCFU	5-FU	Total 5-FU	
HCFU alone ^{d)}	1.2 ± 0.2	2.6 ± 0.4	1.8 ± 0.4	35.8
Complex	$3.9 \pm 0.2^f)$	1.9 ± 0.7	2.9 ± 0.6	42.9

a) Equivalent to 50 mg/body of HCFU. b) Up to 12 h post-administration. c) Ratio of AUC_{HCFU} to $AUC_{total\ 5-FU}$. d) Diluent: lactose. e) Absolute bioavailability of HCFU. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3 dogs. f) $p < 0.01$ vs. HCFU alone.

Fig. 12. Factors Affecting Intestinal Absorption of Drug Involving CME- β -CyD Complexation

k_d , dissolution rate constant; k_o , hydrolysis rate constant (HCFU alone); k_c , hydrolysis rate constant (complex); K_c , stability constant.

ンを示した。4) pH 6.8 溶出液中において HCFU 単独は溶出後速やかに 5-FU に加水分解されるのに対して、CME- β -CyD 複合体では著しい分解抑制が観察された。5) ビーグル犬に経口投与後の血漿中 HCFU 濃度は複合体化により持続し、HCFU 未変化体としてのバイオアベイラビリティも改善された。これらの知見に基づいて、CME- β -CyD 複合体形成に伴う HCFU の消化管吸収の増大機構を Fig. 12 のように推定した。すなわち、1) HCFU の溶解度が CME- β -CyD 複合体化により増大すること；2) 腸溶性の CME- β -CyD 複合体は吸収部位である小腸で HCFU 並びに CME- β -CyD を高濃度に放出すること；3) 放出された HCFU の分解が CME- β -CyD の局所 pH の低下並びに包接効果により抑制されること；などの諸因子が HCFU の吸収改善に寄与するものと考えられる。したがって、CME- β -CyD は時間依存型の薬理効果を有する HCFU の経口投与における多機能性薬物担体として有効利用が期待される。

謝辞 本研究に協力された当製剤学研究室 川野知子嬢並びに山田秀樹氏に深く感謝致します。

引用文献及び注

- 1) A. P. Croft, R. A. Bartsch, *Tetrahedron*, **39**, 1417 (1983).
- 2) B. W. Müller, U. Brauns, *Int. J. Pharm.*, **26**, 77 (1985).

- 3) J. Pitha, *J. Incl. Phenom.*, **2**, 477 (1984).
- 4) K. Uekama, T. Irie, *Drug Invest.*, **2** (suppl. 4), 22 (1990).
- 5) K. Uekama, T. Imai, T. Maeda, T. Irie, F. Hirayama, M. Otagiri, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 841 (1985).
- 6) J. Pitha, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 987 (1985).
- 7) F. Hirayama, N. Hirashima, K. Abe, K. Uekama, T. Ijitsu, M. Ueno, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 233 (1988).
- 8) K. Uekama, Y. Horiuchi, T. Irie, F. Hirayama, *Carbohydr. Res.*, **192**, 323 (1989).
- 9) M. Iigo, A. Hoshi, A. Nakamura, K. Kureitani, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **1**, 49 (1978).
- 10) M. Iigo, A. Hoshi, A. Nakamura, K. Kureitani, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1**, 203 (1978).
- 11) T. Tsuruno, H. Iida, K. Nagamura, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **4**, 83 (1980).
- 12) 三浦哲夫, 内山武夫, 高橋正道, 山本久美子, 小泉四郎, 深末一成, 斉藤 純, 医薬品研究, **11**, 73 (1980).
- 13) M. Kikuchi, Y. Uemura, F. Hirayama, M. Otagiri, K. Uekama, *J. Incl. Phenom.*, **2**, 623 (1984).
- 14) 栗原 稔, 宮坂圭一, 丸山俊秀, 山谷文夫, 泉 嗣彦, 白壁彦夫, 鎌野俊紀, 岸野 洋, 徳島 馨, 癌と化学療法, **5**, 369 (1978).
- 15) N. K. Chaudhuri, K. L. Mukherjee, C. Heidelberger, *Biochem. Pharmacol.*, **1**, 328 (1958).
- 16) 古江 尚, 田口鐵男, “抗癌剤の選び方・使い方,” 医学書院, 東京, 1981, p. 13.
- 17) pH 滴定法及びヨウ素法により算出した。
- 18) M. Kikuchi, F. Hirayama, K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 315 (1987).
- 19) 上釜兼人, 松尾直樹, 平山文俊, 一番ヶ瀬尚, 有森和彦, 椿 健一, 佐竹健三, 薬誌, **100**, 903 (1980).
- 20) 菊池正彦, 上釜兼人, 薬誌, **108**, 156 (1988).
- 21) 山田一磨呂, 川田美和子, 柴田紀行, 小川建志, 横部哲朗, 薬誌, **109**, 932 (1989).
- 22) T. Higuchi, K. A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117 (1970).
- 23) 粉末試料を 25°C, 75% R.H. で 1 日間保存後の含水率をカールフィッシャー法で測定した結果, β -CyD 及び CME- β -CyD はそれぞれ 16.4%, 5.9% であった。