新　制
薬
121
京大附図

グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ評価におけるヒト、動物間の比較研究

青　柳　伸　男

グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ評価におけるヒト、動物間の比較研究

青　柳　伸　男

目　　次

総論の部

緒言 ………………………………………………………… 3

第一章　ヒト、イヌ、ミニブタ、胃排出調整家兎における
　　　　グリセオフルビン錠のバイオアベイラビリティ …… 5

1．グリセオフルビン錠のバイオアベイラビリティ ……… 6
2．ヒト、動物間のバイオアベイラビリティの相関性 …… 13
3．製剤間のバイオアベイラビリティの差の比較 ………… 16
4．考察 …………………………………………………… 19

第二章　バイオアベイラビリティに影響を及ぼす要因 ……… 21

1．溶出速度 ……………………………………………… 21
2．胃液酸度 ……………………………………………… 25
3．薬物投与時の服用水量 ………………………………… 26
4．食事 …………………………………………………… 29
5．胃内容物排出速度 ……………………………………… 36
6．考察 …………………………………………………… 43

第三章　統計的観点からみたバイオアベイラビリティ
　　　　評価における動物の有用性 ……………………… 46

結論 ………………………………………………………… 51

謝辞 …… 54

実験の部 …… 55

第一章実験の部 …… 55
第二章実験の部 …… 58

引用文献 …… 62

総　論　の　部

緒　言

医薬品製剤のバイオアベイラビリティ及び生物学的同等性試験においては、安全性等の点で常にヒトを対象として試験することは難かしく、従って実験動物からそれらを適切に評価、予測することが必要とされる。しかし、バイオアベイラビリティ及び生物学的同等性試験におけるヒト、動物間の差、ヒト、動物間の相関性について検討した報告は少なく、なお多くの検討すべき課題が残されている。

この種の実験においては、動物はヒト用経口製剤がそのまま投与可能でなければならず、そのため通常、家兎、ミニブタ、イヌ等の中、大動物が用いられる。中でも、ビーグル犬は最もよくバイオアベイラビリティ試験に用いられヒトの代わりになりうる例も述べられているが、[1,2]薬物の消化管内通過が早いため持続性製剤等のバイオアベイラビリティ評価には適さないともいわれている。[3] 一方、ブタは実験動物としては大きすぎ取り扱いにくいこともあって、これ迄、余り用いられて来なかった。しかし、最近、従来のミニブタより更に小型のゲッチンゲン種ミニブタが開発され、その使用が可能となった。[4] 雑食動物であるブタは生理的特徴がヒトと類似しているといわれており、[5,6]バイオアベイラビリティ試験に有用であるという報告もあるが、[7]その有用性についてはほとんど未知といってもよい。また、家兎はこれまで、胃内容物排出速度が遅いため薬物の経口投与実験には不適当とされていたが、[8,9]最近、前田らによって家兎の胃内容物排出速度調整法が考案され、その有用性が明らかとなってきた。[10-15]

著者はバイオアベイラビリティ及び生物学的同等性試験の立場から実験動物の有用性について検討すべく、難溶性薬物グリセオフルビンをモデル薬物として、上に述べたビーグル犬、ゲッチンゲン種ミニブ

タ、胃内容物排出調整家兎を対象動物とし試験を行い、バイオアベイラビリティおよび生物学的同等性試験における各動物の特徴、ヒトと動物の差、動物を用いた製剤評価上のいくつかの問題点を明らかにすることができた。

以下、得られた結果を論述する。

第一章　ヒト、イヌ、ミニブタ、胃排出調整家兎における グリセオフルビン錠のバイオアベイラビリティ

グリセオフルビンは難溶性（水に対する溶解度は 8.8μg/ml）[16]の故にバイオアベイラビリティがしばしば問題となる薬物で、[17-19]一般に、粒子径が小さくなる程バイオアベイラビリティが増大することが知られている。[20-26]現在市販されている製剤はバイオアベイラビリティを向上させるため、いずれも微粒子化されたグリセオフルビン製剤であり、また最近はポリエチレングリコールに分散させて微粒子化した新しいタイプの製剤（ＵＳＰ　ＸＸＩでは超微粒子グリセオフルビン製剤と名付けられている）も出現してきた。[27-30]ポリエチレングリコール製剤のバイオアベイラビリティは従来の微粒子グリセオフルビン製剤より２倍程高かったという報告がある一方、[29,30]微粒子製剤と差がなかったとの報告もあり、[31] その評価は一定していない。また、グリセオフルビンは微粒子化しても凝集してしまうため期待したほどバイオアベイラビリティが増大しないともいわれている。[26-32]このような問題からして、現在用いられている微粒子グリセオフルビン製剤および新しい形のポリエチレングリコール製剤に対してその評価法を確立することは重要な課題と思われる。一方、グリセオフルビンは溶けずに長時間、消化管内に留りやすいためヒト、動物間の生理的相違がバイオアベイラビリティに反映されやすいと考えられ、[9,10] さらに溶解度がｐＨによって変わらないため薬物の溶解におよぼす消化管内pHの変動を無視でき、バイオアベイラビリティと生理的要因の関係をより簡単な系で解析できるものと思われる。また、ヒト、[28,33,34]イヌ、[35-37]家兎等[9,33,38]における薬物代謝、薬動学的性質も既に明らかにされている。以上のことからグリセオフルビンはバイオアベイラビリティおよび生物学的同等性試験におけるヒト、動物間の比較、研究に有用なモデル薬物と考えられ、本研究の試料として用いた。

なお、バイオアベイラビリティ試験には、溶出速度の異なる３種の市販微粒子グリセオフルビン素錠（Ｂ、Ｃ、Ｄ錠）及び１種のポリエチレングリコール製剤（Ａ錠、ＧＲＩＳ－ＰＥＧ®）の計４製剤を用いた。一錠中のグリセオフルビン表示含量はいずれも１２５mgである。Table I に試料製剤の重量、吸光度法[39]で求めた薬物含量、日局１０の方法で求めた崩壊時間、ビーカー法で求めた５０％溶出時間（T_{50}）を示した。

Table I. The Drug Content, Disintegration Time and Dissolution Rate of Four Different Plain Tablets of Micronized Griseofulvin

	Weight of tablet (mg)	Drug content[b] (mg/tablet)	Disintegration[c] time (min)	T_{50}[d] (min)
Tablet A[a]	930	123	9.3	14.1
B	150	122	12.5	6.5
C	180	125	0.4	80.6
D	150	128	2.4	157.5

a) GRIS-PEG® (Dorsey laboratory Ltd., Division of Sandoz Inc.). Griseofulvin is dispersed in polyethyleneglycol 6000. b) The drug contents were determined by a spectrophotometrical method.[39] c) Disintegration times were determined in pH 7.2 sodium phosphate (0.01 M) according to the JP X disintegration method. d) Time for 50 % of the drug to dissolve from tablets, which was determined in 18 liters of a medium (pH 7.2 sodium phosphate) in a flat-bottom beaker (29 cm i.d.), which was agitated with a three-bladed screw-type impeller at 512 rpm.

１．グリセオフルビン錠のバイオアベイラビリティ

バイオアベイラビリティ試験に先立ち、グリセオフルビンの投与量と投与後無限大時間迄の血中濃度－時間曲線下面積（AUC_{∞}）の関係について検討を行った（Fig. 1）。[40-43] ヒト、ミニブタ、家兎

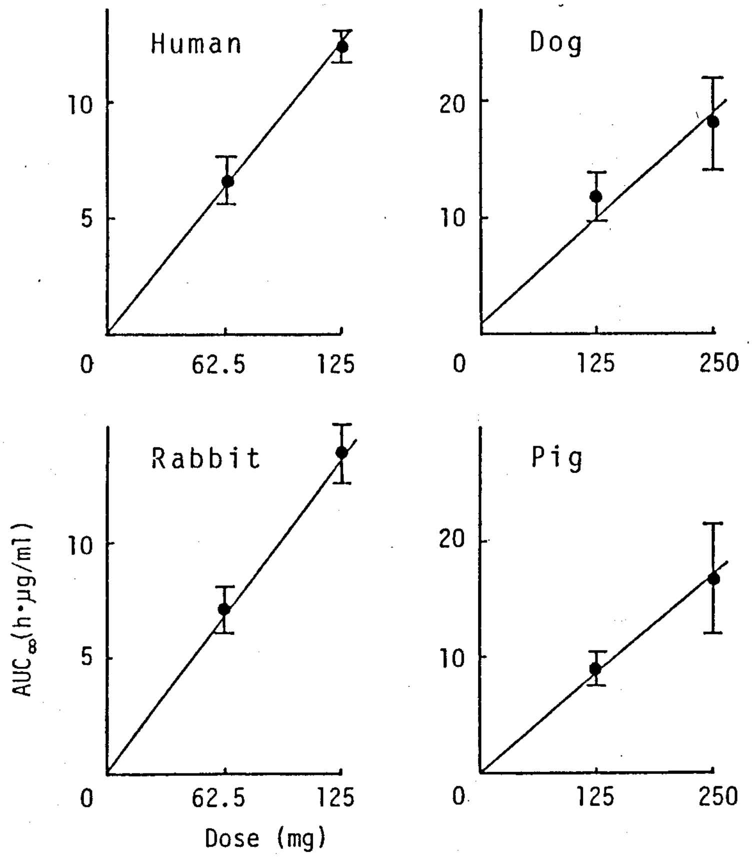

Fig. 1. Relation between griseofulvin dose and AUC_{∞} in humans, dogs, minipigs G and stomach-emptying controlled rabbits

AUC_{∞} in dogs is AUC_{∞} of 6-demethylgriseofulvin and AUC_{∞} in humans and other animals are AUC_{∞} of griseofulvin. Each points represent means + S.E. (n=3).

では血中グリセオフルビンを指標としたが、イヌではグリセオフルビンの代謝物である6-Demethylgriseofulvin（６ＤＭＧ）を指標とした（イヌではグリセオフルビンの代謝が早く、経口投与後の大部分が６ＤＭＧとして存在するためである）。[41,44] ヒト、動物いずれにおいても投与量とＡＵＣ∞の間にはほぼ直線性がみられ、総吸収量を示すパラメータであるＡＵＣ∞は投与量に比例して増加することが明らかとなった。

次に、4種のグリセオフルビン製剤をヒトおよび各動物に投与した後の血中濃度－時間曲線をＦig．２、３に示した。[40-43] また最高血中濃度（Ｃmax）、ＡＵＣ等のパラメータをTables II-V に示した。ヒトにおけるＣmax 及び最終サンプリング時間迄のＡＵＣ（下付き数字は最終サンプリング時間（ｈ）を表わす）は製剤Ｂ＞Ｄ＞Ａ＞Ｃの順

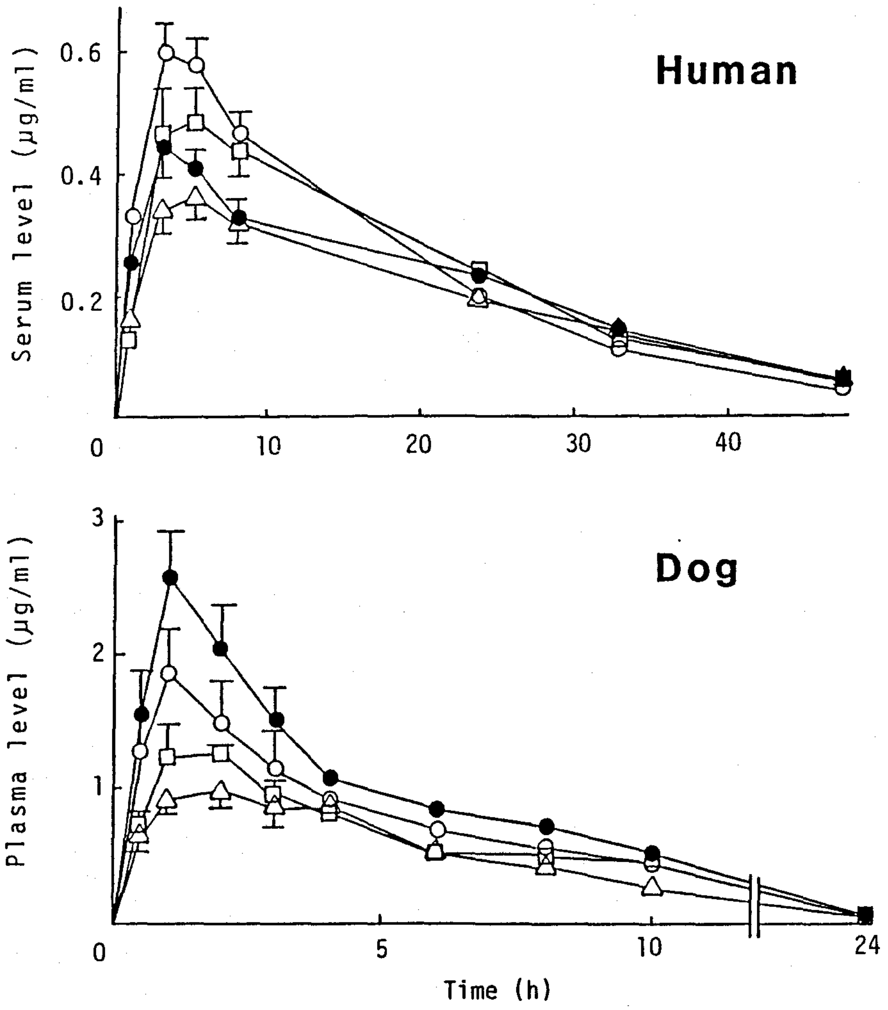

Fig. 2. Mean serum levels of griseofulvin in humans (n=12) and plasma levels of 6-demethylgriseofulvin in dogs (n=12) after oral administration of four different tablets of 125 mg griseofulvin.

Tablets A (●), B (○), C (△) and D (□). The vertical lines show S.E.

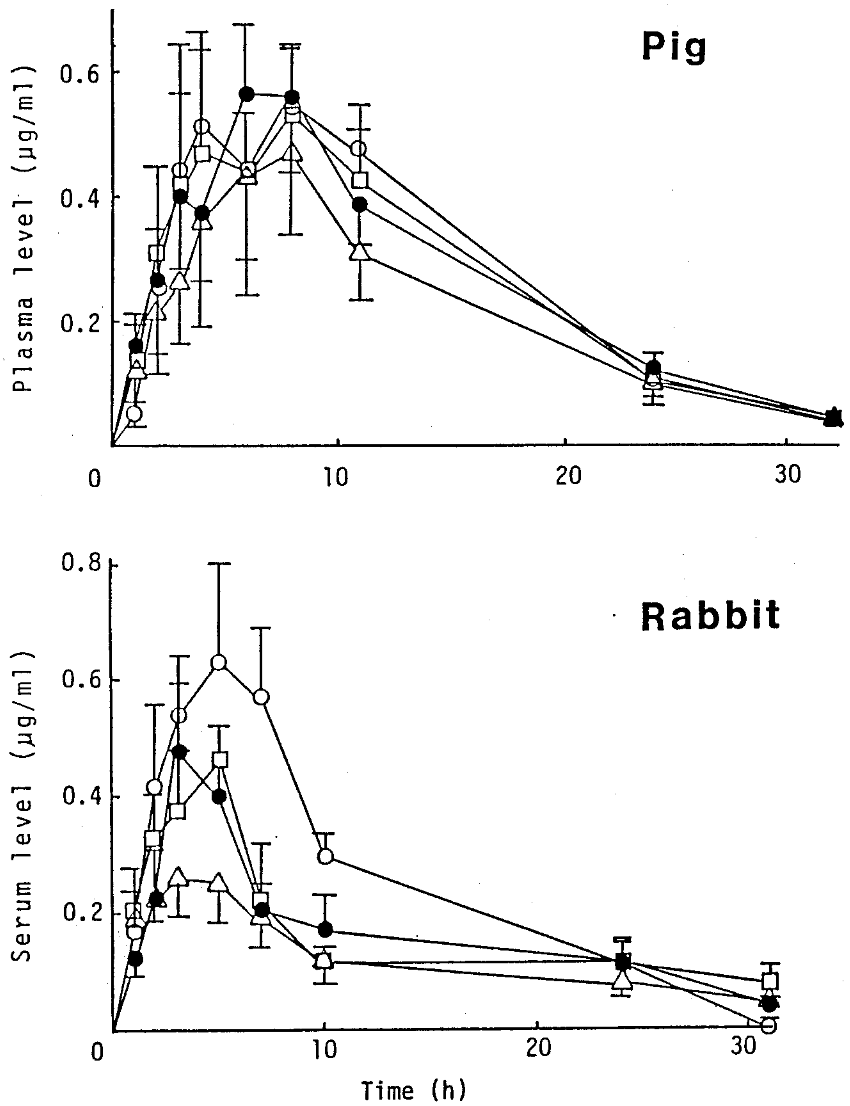

Fig. 3. Mean serum or plasma levels of griseofulvin after oral administration of four different tablets of 125 mg griseofulvin to minipigs G (n=7) and the halved tablets (62.5 mg griseofulvin) to stomach-emptying controlled rabbits (n=8).

Tablets A (●), B (○), C (△) and D (□). The vertical lines show S.E.

Table II. Mean Cmax, Tmax and AUC After Oral Administration of Four Different Tablets of 125 mg Griseofulvin to Humans (n=12)

		Tablet A	Tablet B	Tablet C	Tablet D	ANOVA	Tukey's test
Cmax	(μg/ml)	0.502[a] (0.049)	0.660 (0.046)	0.395 (0.036)	0.546 (0.070)	$p<0.01$	B>D>A>C[b]
Tmax	(h)	5.3 (1.7)	3.6 (0.3)	6.0 (1.7)	7.9 (2.1)	NS[c]	
$AUC_{47.5}$	(h·μg/ml)	10.57 (0.86)	11.53 (0.76)	9.46 (0.73)	11.47 (0.67)	$p<0.01$	B>D>A>C
AUC_{∞}	(h·μg/ml)	11.88 (0.95)	12.30 (0.86)	11.27 (0.91)	12.76 (0.81)	NS	
ke[d]	(1/h)	0.057 (0.003)	0.064 (0.004)	0.047 (0.004)	0.063 (0.007)	NS	

a) The figures in parentheses show standard errors. b) Formulations underlined by a common line did not differ significantly at $p<0.05$. c) NS: not significant at $p<0.05$. d) ke: elimination rate constant.

で、ミニブタ、家兎におけるＣmax 、ＡＵＣもほぼ同様の傾向を示した。イヌにおいてもＢ、Ｃ、Ｄ製剤のＣmax 、ＡＵＣにおける順位はヒトと一致した。しかし、ポリエチレングリコール製剤Ａはヒト、他動物に比べ高いバイオアベイラビリティを与えた。

Table III. Mean Cmax, Tmax and AUC After Oral Administration of Four Different Tablets of Griseofulvin to Dogs (n=12)

		Tablet A	Tablet B	Tablet C	Tablet D	ANOVA	Tukey's test
Cmax	(μg/ml)	3.083[a] (0.321)	2.340 (0.322)	1.369 (0.156)	1.749 (0.190)	$p<0.01$	A>B>D>C[b]
Tmax	(h)	1.5 (0.2)	1.3 (0.2)	1.9 (0.5)	1.7 (0.3)	NS[c]	
AUC_{24}	(h·μg/ml)	16.34 (1.38)	12.86 (2.77)	8.86 (1.05)	10.62 (1.48)	$p<0.01$	A>B>D>C
AUC_{∞}	(h·μg/ml)	16.77 (1.42)	13.46 (2.46)	9.27 (1.08)	11.05 (1.51)	$p<0.05$	A>B>D>C
ke[d]	(1/h)	0.182 (0.029)	0.171 (0.023)	0.175 (0.029)	0.204 (0.037)	NS	

a) The figures in parentheses show standard errors. b) Formulations underlined by a common line did not differ significantly at $p<0.05$. c) NS: not significant at $p<0.05$. d) ke: elimination rate constant.

Table IV. Mean Cmax, Tmax and AUC After Oral Administration of Four Different Tablets of 125 mg Griseofulvin to Minipig G (n=7)

		Tablet				
		A	B	C	D	ANOVA
Cmax	(μg/ml)	0.684[a)] (0.117)	0.734 (0.142)	0.549 (0.159)	0.689 (0.171)	NS[b)]
Tmax	(h)	6.7 (0.7)	6.6 (1.1)	7.4 (0.9)	5.6 (1.0)	NS
AUC_{32}	(h·μg/ml)	8.56 (1.39)	8.92 (1.26)	6.66 (1.77)	8.71 (2.04)	NS
AUC_{∞}	(h·μg/ml)	9.14 (1.42)	9.91 (1.11)	7.19 (1.90)	9.15 (1.95)	NS
ke[c)]	(1/h)	0.106 (0.016)	0.127 (0.015)	0.111 (0.013)	0.117 (0.014)	NS

a) The figures in parentheses show standard errors. b) NS: not significant at $p<0.05$. c) ke: elimination rate constant.

Table V. Mean Cmax, Tmax and AUC After Oral Administration of Four Different Tablets of 62.5 mg Griseofulvin to Stomach-emptying Controlled Rabbits (n=8)

		Tablet					
		A	B	C	D	ANOVA	Tukey's test
Cmax	(μg/ml)	0.599[a)] (0.108)	0.853 (0.164)	0.406 (0.089)	0.530 (0.101)	$p<0.10$	
Tmax	(h)	8.1 (3.4)	4.5 (0.8)	4.1 (0.8)	9.1 (4.1)	NS[c)]	
AUC_{31}	(h·μg/ml)	5.139 (0.779)	7.688 (1.032)	3.716 (0.761)	4.826 (0.687)	$p<0.01$	B>A>D>C[b)]
AUC_{∞}	(h·μg/ml)	5.276 (0.760)	7.690 (1.028)	4.119 (0.810)	5.461 (0.857)	$p<0.01$	B>D>A>C
ke[d)]	(1/h)	0.273 (0.040)	0.262 (0.049)	0.132 (0.027)	0.300 (0.116)	NS	

a) The figures in parentheses show standard errors. b) Formulations underlined by a common line did not differ significantly at $p<0.05$. c) NS: not significant at $p<0.05$. d) ke: elimination rate constant.

一方、最高血中濃度到達時間（Ｔmax ）はヒト、動物いずれにおいてもバラツキが大きく製剤間に有意な差がみられなかった。ヒト、動物間のＴmax の比較は半減期の相違もあって直接の比較は難しいが、イヌではいずれの製剤でもＴmax が早く、且つ製剤間にほとんど差がみられなかった。[41] また、ミニブタでは反対にどの製剤でもＴmax が遅く、吸収におけるラグ相も観察された（ヒトおよび他の動物ではラグ相がみられない）。 Fig.４にヒトおよびミニブタにおける個々のＴmax 、ラグ時間を示した。[42] イヌにおける早いＴmax は製剤の速や

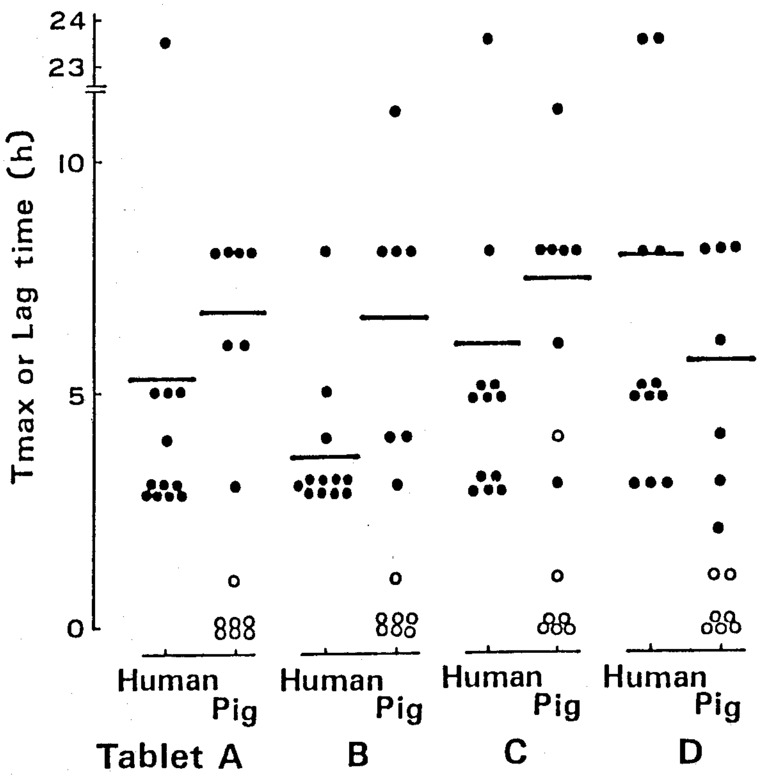

Fig. 4. Individual Tmax (●) and lag time (○) in drug absorption after oral administration of four different griseofulvin tablets to humans (n=12) and minipigs G (n=7).

The horizontal lines shows means values of Tmax.

かな胃内通過、またミニブタにおける遅いＴmax とラグ時間はミニブタにおける遅い胃内通過を示唆するものである。

２．ヒト、動物間のバイオアベイラビリティの相関性

Ｆig．５に４種のグリセオフルビン製剤のＣmax 、最終サンプリング時間迄のＡＵＣ、Ｔmax におけるヒト、動物間の相関性を示した。[41–43] Ｔmax の相関性はいずれの動物でも低かったが、Ｃmax 及びＡＵＣの

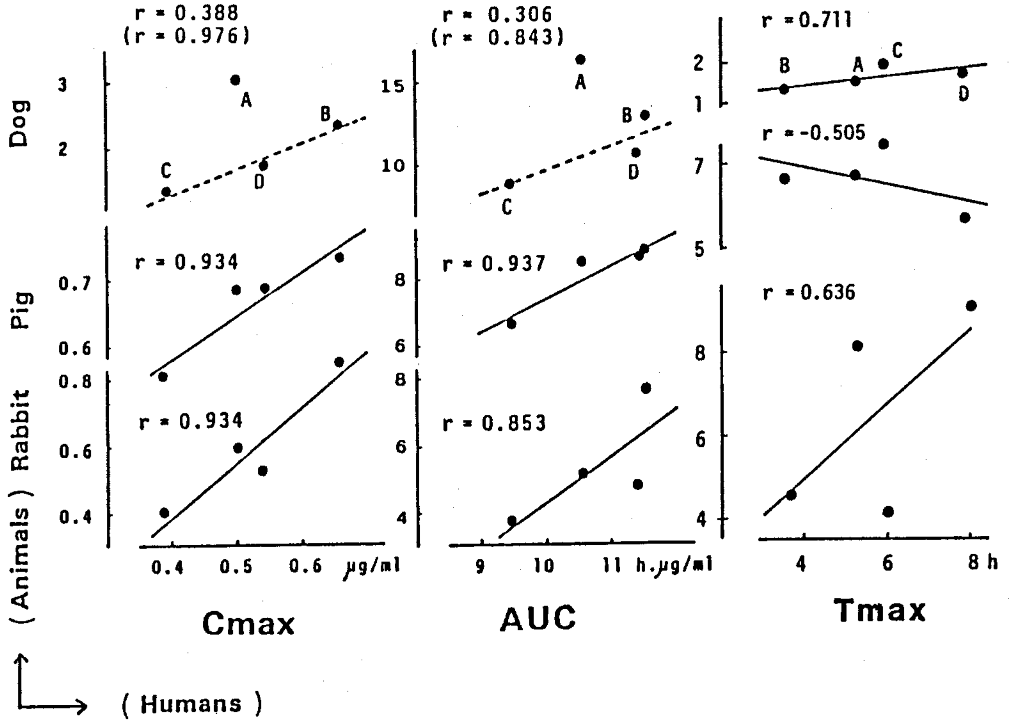

Fig. 5. Correlations of Cmax, AUC from zero to final sampling time* and Tmax between humans and animals

* $AUC_{47.5}$(humans), AUC_{24}(dogs), AUC_{32}(pigs), AUC_{31}(rabbits). *Solid lines show the regression lines. The figures in parentheses and dotted lines indicate the correlation coefficients and regression lines for tablets B, C and D, respectively.*

相関性は家兎、ミニブタ共、高く、又イヌでもポリエチレングリコール製剤（Ａ錠）を除き、ヒトとの間に高い相関性がみられた。イヌにおけるポリエチレングリコール製剤の著しく高いバイオアベイラビリティは、イヌ消化管内における当製剤の速やかな崩壊、分散を示すものであり、in vitro溶出試験においてもこれを支持する結果が得られた。Ｆig. ６にグリセオフルビン４製剤のin vitro溶出曲線を示した。[40] １mlと少ない水を用い、回転フラスコ中でプラスチック玉と共に錠剤

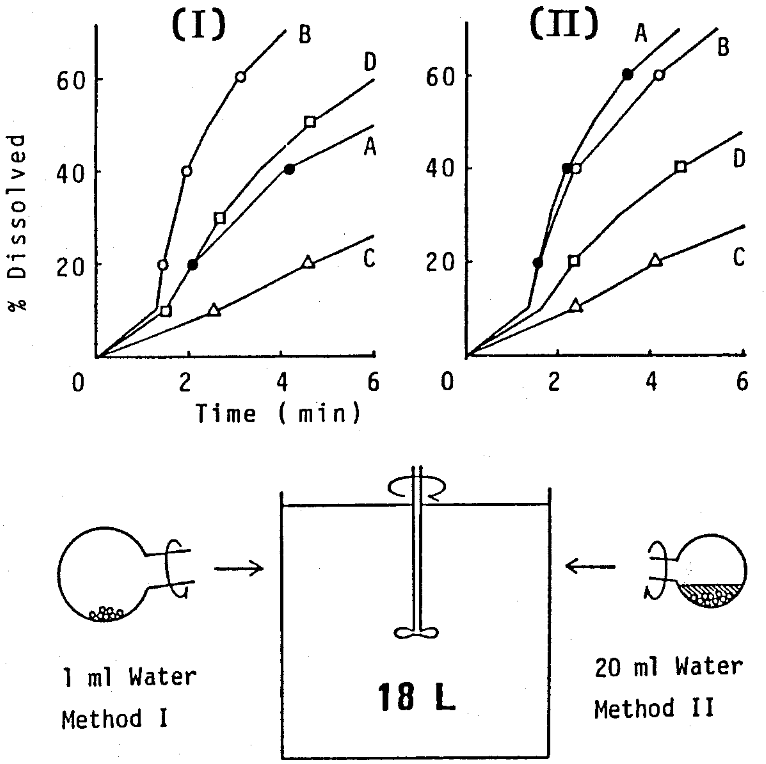

Fig. 6. Dissolution-time curves of four different tablets (A, B, C and D) of 125 mg griseofulvin determined by methods I and II

Dissolution rates were determined in 18 l of pH 7.2 sodium phosphate (0.01 M) after treatment of each tablet with 20 g of plastic beads and 1 ml of water in a rotating bottle (method 1) and with 27 g of plastic beads and 20 ml of water (method II).

を前処理した後、溶出速度を測定した場合、前処理過程でＡ錠はペーストを形成し分散性がわるくなり、ＢおよびＤ錠より溶出速度が遅くなった。しかし、２０mlの水を用いて前処理した場合、Ａ錠はよく分散しその溶出速度は４製剤の中で最も早くなった。この結果は、イヌ消化管内におけるＡ錠の速やかな崩壊、分散を裏付けると共に、ヒト、他動物においてはペースト形成し、分散性がわるくなっている可能性を示唆している。

Table VI. Percents of Indomethacin Dissolved from Capsules A and B in 10 min at pH 7.2

Method	Stirring rate	Capsule A	Capsule B
Paddle	30 rpm.	40.9	13.6
	120 rpm.	105.0	78.5
Oscillating basket[a)]	30 spm.	109.0	94.3

a) JP X disintegration device was used.

イヌ消化管の強い崩壊性を示す結果はナリジックス酸、[45-46)] インドメタシン、[47,48)] シクランデレート等、[49)] 他の医薬品製剤を用いたバイオアベイラビリティ試験においても認められた。Table VI に市販インドメタシンカプセル２製剤の溶出速度、[50)] Table VII にそれらのヒト、[47)] イヌ[48)]におけるバイオアベイラビリティの測定結果を示した。Ｂ製剤は強い崩壊条件の下、即ち Oscillating basket 法又はパドル法で撹拌速度が120 回転と早い場合は速やかに崩壊、分散し、Ａ製剤と同じ位速やかな溶出速度を示した。しかし、撹拌速度を30 rpmと遅くすると製剤が分散しにくくなり、溶出速度も遅くなった。[50)] Ｂ製剤投与後のヒトにおけるＣmax 、AUC_{24}はＡ製剤のそれぞれ約 40 、60 % であったが、イヌでは約80、 100 %と高く、イヌ消化管におけるＢ製剤の速やかな崩壊が示唆された。これらグリセオフルビン、イ

Table VII. Cmax and AUC_{24} After Oral Administration of Two Different Capsules of 25 mg Indomethacin to Humans (n=10) and Dogs (n=10)

		Capsule A	Capsule B	Ratio (B/A)
Cmax (μg/ml)	Human	1.985±0.251[a)]	0.797±0.119	0.402
	Dog	5.294±0.829	4.236±0.929	0.800
AUC_{24} (h·μg/ml)	Human	5.145±0.401	3.197±0.297	0.621
	Dog	17.36±3.38	17.34±3.06	0.999

a) Means ±SE.

ンドメタシン等の結果は、崩壊、分散性に問題がある製剤を対象試料とし、イヌを用いて評価した場合、そのバイオアベイラビリティを高く見積る可能性があることを示している。

３．製剤間のバイオアベイラビリティの差の比較

異なる製剤間のバイオアベイラビリティの差が、ヒト、動物いずれにおいてより大きくあらわれ、製剤間の差が検出しやすくなるか、あるいはしにくくなるかは動物を用いて生物学的同等性試験を行い、同等及び非同等な製剤を区別していく上で重要なことである。Fig. 7はB製剤に対する他製剤のCmax およびＡＵＣ∞ の比をプロットしたものである。Cmax においては、ヒト、イヌ、家兎に比較しミニブタで相対的に製剤間の差が小さくなる傾向がみられた。ミニブタでは吸収にラグ時間が観察されTmax も遅いこと（Fig. 4）から、グリセオフルビン製剤の胃内滞留が長く、いずれの製剤もよく崩壊してしまうため、製剤間の差が小さくなったものと考えられる。

一方、ＡＵＣ∞ においては、ヒトに比較し動物では製剤間の差が大きくなる傾向がみられ、特にイヌ、家兎でそれが顕著であった。これ

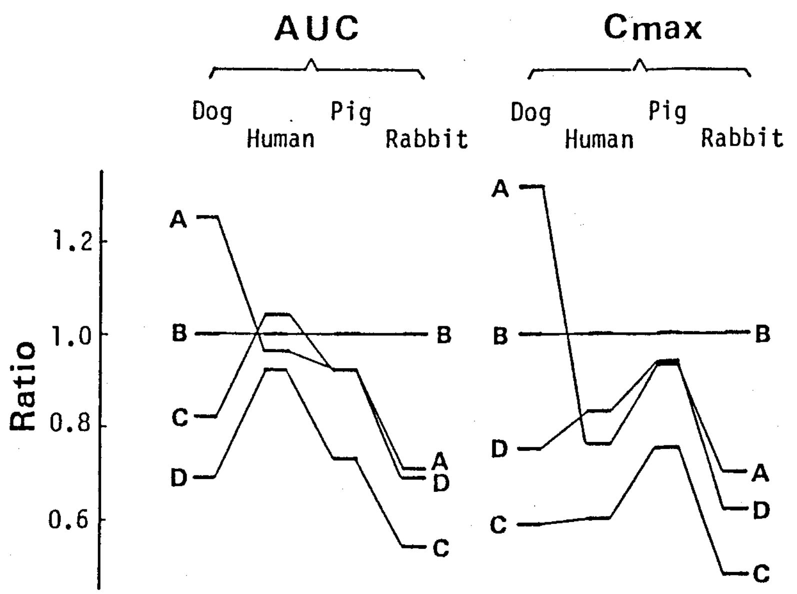

Fig. 7. Relative differences in Cmax and AUC_{∞} in humans and in animals

The lines show the ratios of mean Cmax and AUC_{∞} of each tablets against those of tablet B.

は、両動物では溶出の遅い製剤C、Dを投与した場合、薬物が充分溶出しないうちに製剤が吸収部位を通過してしまうこと、及び吸収部位の短さを示唆するものである。イヌにおける薬物の速やかな吸収部位通過を示唆する結果は、ジアゼパムを用いた試験においても得られた。[51,52] Table VIII に試料に用いたジアゼパム４製剤の５０％溶出時間、それらをヒト、イヌに投与した場合のＡＵＣ$_{\infty}$（イヌでは大部分が血中で代謝物 N-desmethyldiazepamとして存在するため、代謝物のＡＵＣで評価した）及び溶出速度が最も早いＡ製剤に対する他製剤のＡＵＣの比を示したが、ヒトに比較し、イヌでは溶出の遅い製剤（Ｂ、Ｃ、Ｄ）のＡＵＣが相対的に低く、それら製剤からの薬物吸収が不充分であることが明らかである。一方、Cressmanらもイヌにおける持続性製剤からの不完全な薬物吸収について報告しており、[3] これらのことを考え合わせると、ヒトに比し、イヌは製剤の消化管通過が早いものと

Table VIII. Time for 50% of Drug to Dissolve (T_{50}) from Four Different Plain Tablets of 5 mg Diazepam and AUC_∞ of Diazepam in Humans (n=12) and AUC_∞ of N-desmethyldiazepam in Dogs (n=12) After Oral Administration of The Tablets

Tablet	T_{50}(min)[b]	AUC_∞ (h·ng/ml)		Ratio of AUC_∞[a]	
		Human	Dog	Human	Dog
A	26.7	6465±373[c]	709.2±69.0	1.00	1.00
B	60.0	6000±391	558.9±54.0	0.93	0.79
C	186.7	5870±284	552.7±53.2	0.91	0.78
D	81.7	5967±292	582.9±49.2	0.92	0.82

a) Ratios of mean AUC_∞ of each tablet against that of tablet A. b) Dissolution rates were determined by JP X rotating basket method (120 rpm) using 900 ml of pH 4.6 sodium acetate buffer at 37°. c) Means ±SE.

結論される。

他方、ミニブタでは、イヌ、家兎と異なり、製剤間のＡＵＣの差が相対的に小さくなる傾向を示したが、これは先に述べたように、ミニブタは胃内容物排出速度が遅く、いずれの製剤もよく崩壊してしまうためと思われる。

また、Ｃmax とＡＵＣの関連を見た場合、動物では製剤間のＣmax の差がそのままＡＵＣの差となって表われているのに対し、ヒトではＣmax の差はそのままＡＵＣの差につながらず、製剤間におけるＡＵＣの差はかなり小さくなっている。ＡＵＣが吸収量を反映するパラメータ、Ｃmax が吸収量および吸収速度を反映するパラメータであることを考えると、ヒトでは製剤間の差は吸収速度に表われても吸収量には表われにくいことを示している。これは、ヒト、動物間の吸収部位（消化管）の長さ、[53] 製剤等の消化管通過速度の相違[54,55] に起因しているものと思われる。

４．考察

異なる製剤のバイオアベイラビリティを動物で評価し、ヒトでのバイオアベイラビリティを予測するに際しては、ヒト－動物間の相関性の良し悪しが、その評価に大きな影響を及ぼす。

一方、生物学的同等性試験をヒトに代えて動物で行うに際しては、ヒト－動物間の相関性もさることながら、製剤間のバイオアベイラビリティの差の大きさがヒト、動物間でどう異なるかが重要な問題となる（生物学的同等性試験では、製剤間のバイオアベイラビリティの絶対値の差が問題とされるため）。以上のことを考慮し、グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ（主要パラメータであるＣmax 、Ｔmax 、ＡＵＣを評価の対象とした）について、ヒト－動物間の相関性、製剤間のバイオアベイラビリティの差の比較、という二つの観点から動物の評価を行った。

その結果、最高血中濃度、最終サンプリング時間迄のＡＵＣのヒト－動物間の相関性は、イヌでポリエチレングリコール製剤のバイオアベイラビリティが高くなったのを除けば、いずれも良好であった。

一方、製剤間のバイオアベイラビリティの差の大きさを比較した結果、薬物の総吸収量を示すＡＵＣ$_{\infty}$において、ヒトではほとんど製剤間に差がみられなかったのに対し、動物（特に、イヌ、家兎）では比較的大きな差がみられた。このことは、ヒトでＡＵＣに差がない製剤を動物で評価した場合、差があるものと誤って評価する危険性があることを意味する。また、Ｃmax においては、ヒト、イヌ、家兎に比較し、特にミニブタで製剤間の差が小さくなる傾向がみられた。ミニブタで同等性試験を行うに際しては、製剤間のＣmax の差が小さくなることを考慮する必要があろう。

これらバイオアベイラビリティの差におけるヒト、動物間の相違は、両者の間の消化管の解剖学的および生理的相違に起因するものと思わ

れる。即ち、製剤間のＡＵＣの差のヒト、動物間の相違は、ヒト、動物間の消化管の長さ、[53] 製剤の消化管通過速度の相違に、[54,55] またミニブタでみられた製剤間のＣmax の差の検出しにくさは、遅い胃内容物排出速度に起因していると考えられる。しかしながら、そのような相違はあっても、ヒトー動物間のバイオアベイラビリティに高い相関性がみられたことは、消化管内における各グリセオフルビン製剤の溶出あるいは吸収挙動が相対的には類似しているためと考えられる。

以上の結果から、動物は製剤間のバイオアベイラビリティの絶対値の差が問題とされる生物学的同等性試験には適しにくいとしても、ヒトー動物間の相関性が良いことから製剤の相対的バイオアベイラビリティの評価には、モデル動物として充分役立つように思われる。

第二章　バイオアベイラビリティに影響をおよぼす要因

医薬品製剤のバイオアベイラビリティは種々の製剤的および生理的要因によって影響を受けることが知られている。それらの要因は多種多様で薬物の性質によっても異なる。従って、それらの要因を明らかにすることは製剤評価上のみならず医薬品を臨床上適用する上でも重要である。グリセオフルビンに関しても、粒子径、[20-26] 食事等[20,56,57] がバイオアベイラビリティに影響を及ぼすことが知られているが、なお未知の点が多い。そこで、本実験に用いたグリセオフルビン製剤を試料とし、バイオアベイラビリティに影響を及ぼすと考えられる製剤的、生理的要因等について検討を行った。

1．溶出速度

難溶性薬物であるグリセオフルビンのバイオアベイラビリティは粒子径によって異なり、一般に粒子径が小さくなる程（比表面積が増大する程）溶出速度が増しバイオアベイラビリティが増大することが知られている。[20-26] 本実験に用いたグリセオフルビン製剤はいずれも微粒子化された製剤であり、そのうちＡ錠はグリセオフルビンをポリエチレングリコールに分散させることにより薬物の溶出速度を早めた新しい形の製剤である。[27-30] Katchen らはグリセオフルビン製剤の溶出速度とバイオアベイラビリティとの間に相関性がみられたことを述べているが、[18,19] ポリエチレングリコール製剤も含めた微粒子グリセオフルビン製剤に関して、溶出速度とバイオアベイラビリティとの間に同様の相関性がみられるかどうかについては検討の余地がある。そこで、本実験に用いたグリセオフルビン４製剤（Ａ－Ｄ）について種々の条件下で溶出速度の測定を行い、バイオアベイラビリティとの関連

性について検討を行った。

溶出速度は錠剤を何ら前処理することなくビーカー中でそのまま測定するビーカー法、錠剤の崩壊を促進するため、プラスチック玉と共に回転フラスコ中で前処理して後、ビーカー法で溶出速度を測定する方法（Method I および II）とで行った（Fig. 8）[40]。具体的な試験条件を以下に示す。なお、グリセオフルビンの溶解度は極めて低いため、18リットルの溶媒を試験液として用いた。

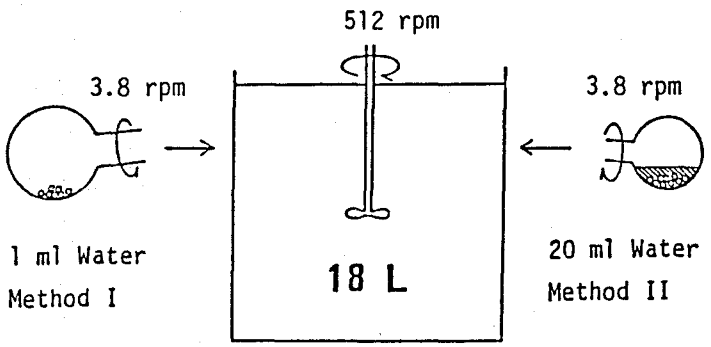

Fig. 8. Dissolution tests for griseofulvin tablets

1）ビーカー法： 内径29cmのビーカーにpH 7.2リン酸ナトリウム緩衝液（0.01M）18Lを入れ、512 rpm で攪拌し37°で、グリセオフルビン錠の溶出速度を測定した。

2）前処理過程が入った溶出試験法

a）Method I： 1.0 ml の水の入った100 mlの円形フラスコ中にグリセオフルビン錠1個を入れ、1分間振とうした後5分間放置する。次いで 20 g のプラスチック玉（径 8 mm）を加えた後、3.8 rpm で15分間、回転させる。内容物を 100 ml の水で洗いながら18Lの pH 7.2 リン酸緩衝液（0.01M）中に入れ、前述のビーカー法に従い溶出速度を測定した。

b）Method II： 20 mlの水の入った50 ml の円形フラスコ中にグリセオフルビン錠剤1個を入れ、5分間振とうした後、27 gのプラス

チック玉（径 8 mm)を加え、3.8 rpm で１５分間、回転させる。以下、Method Iと同様に操作を行い、ビーカー法に従い溶出速度を測定した。

Table IX. Time (min) required for 50 % of Griseofulvin to Dissolve from Four Different Tablets

Method	Tablet			
	A	B	C	D
Beaker	14.1	6.5	80.6	157.5
Method I	6.1	2.5	26.7	4.6
Method II	2.1	3.2	17.3	6.4

Table IX にグリセオフルビン製剤の５０％溶出時間（T_{50}）を示した。ビーカー法では製剤Ｂ＞Ａ＞Ｃ＞Ｄの順に溶出速度が早かったが、Method IではＢ＞Ｄ＞Ａ＞Ｃ、 Method IIではＡ＞Ｂ＞Ｄ＞Ｃとなり、条件により製剤の溶出速度順位が異なってくることが明らかとなった。 特に、Ｄ製剤の溶出速度はビーカー法では遅かったが、Method I 及び II では著しく早くなった。これは回転フラスコ中で錠剤を前処理することにより機械的な崩壊力が製剤に働き、製剤の崩壊が促進されたためと思われる。またＡ製剤は水１mlで前処理した場合（ Method I ）、ペーストを形成し分散性がわるく溶出速度も遅かったが、水２０mlを用いて前処理した場合は(Method II ）よく崩壊、分散し、溶出速度も速やかであった。

Table X にT_{50}とＣmax および最終サンプリング時間迄のＡＵＣとの相関係数を示した（対数スケールにおける相関係数）。ヒト、家兎のＡＵＣ、Ｃmax は Method I で求めたT_{50}と、イヌのパラメータは Method IIのT_{50}と、またミニブタのＡＵＣ、Ｃmax は Method II および Method I で求めたT_{50}とそれぞれ良く相関したが、いずれもビーカー法との相関性は低かった。前処理過程が入ったMethod Iおよび II とin vivo パラメータが良く相関したことは、ヒトおよび動物

Table X. Correlation Coefficients in Log-log Regressions Between in vivo Parameters (Cmax and AUC from Zero to Final Sampling Time) and T_{50} Determined by Beaker Method and Methods I and II

	Human		Dog		Minipig G		Rabbit	
	Cmax	AUC	Cmax	AUC	Cmax	AUC	Cmax	AUC
Beaker	-0.556	-0.273	-0.747	-0.717	-0.569	-0.437	-0.812	-0.779
Method I	-0.982*	-0.963*	-0.629	-0.560	-0.551	-0.967*	-0.907	-0.906
Method II	-0.687	-0.621	-0.979*	-0.970*	-0.942	-0.842	-0.779	-0.720

* $p<0.05$.

の消化管内においてもある程度製剤を機械的に崩壊する力が働くこと、また、グリセオフルビン製剤のin vitro溶出速度は、ビーカー法より機械的な崩壊力が働く方法で評価する方が適当であることを示唆している。また、Fig. 9にヒトおよびイヌのCmax、AUCと Method

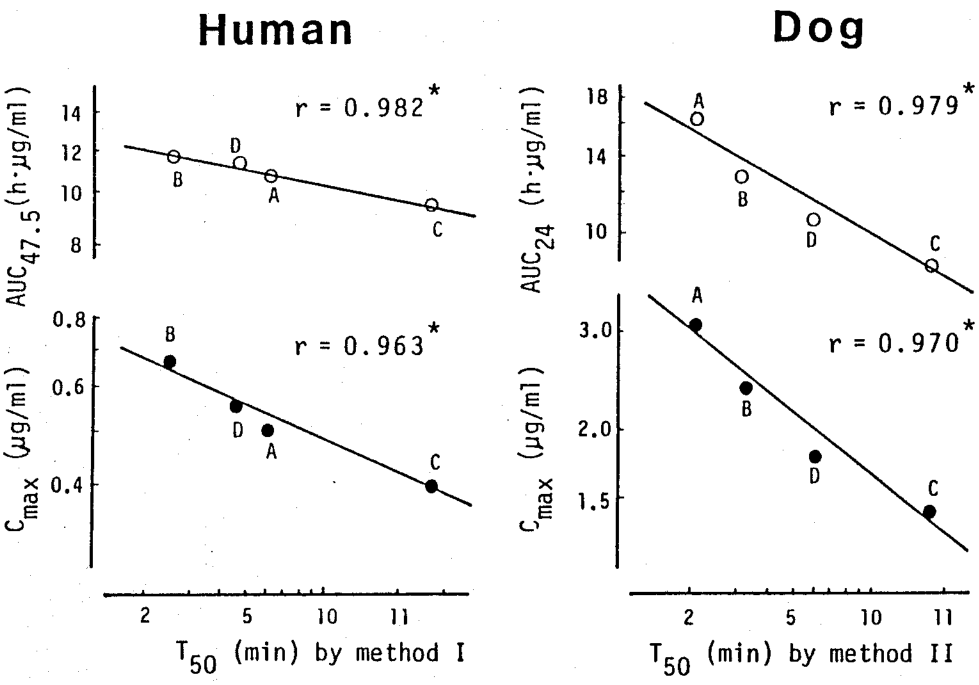

Fig. 9. Log-log plots of Cmax and AUC from zero to final sampling time in humans and in dogs against T_{50} determined by methods I and II. * $p<0.05$.

I あるいは Method II で求めたT_{50}との対数一対数スケールにおける相関プロットを示した。 ヒトのパラメータはA製剤の溶出が早い Method I と良く相関し、イヌのパラメータはA製剤の溶出が遅い Method IIと良く相関したということは、ヒト消化管内ではA錠はペースト状になり分散しにくいが、イヌ消化管内ではよく崩壊、分散し速やかに溶出することを示すものである。いずれにしても溶出速度はグリセオフルビンのバイオアベイラビリティを支配する製剤的に重要な要因であると思われる。

一方、日局１０の崩壊試験法で求めたグリセオフルビンＡ、Ｂ、ＣおよびＤ製剤の平均崩壊時間は、それぞれ 9.3, 12.5, 0.4, 2.4 分で、 in vitro溶出速度及びヒト、動物におけるバイオアベイラビリティのいずれとも良い相関性はみられなかった。従って、少なくともグリセオフルビン製剤に関しては、崩壊時間は溶出速度やバイオアベイラビリティを反映する適切な指標とはなり得ないものと思われる。

２．胃液酸度

バイオアベイラビリティに対する胃液酸度の影響については、これまで全く顧みられていなかった。しかし、近年、ジアゼパム[58]、インドメタシン[47]、メトロニダゾール等[59,60]のバイオアベイラビリティに対してヒト胃液酸度の影響がみられ、胃液酸度の強酸郡および低酸郡被験者間でバイオアベイラビリティが異なることが明らかとなった。そこで本実験に参加したヒト被験者を胃液酸度強酸群、低酸群の二群に分け、グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティについて比較を行ってみた。Table XI に示したように、いずれの製剤のＣmax, ＡＵＣ共、両群被験者間で有意な差はみられなかった。従って、グリセオフルビンのバイオアベイラビリティは、その化学的特性から予測

されるように消化管内pＨ変動の影響を殆ど受けないものと結論される。

Table XI. Mean Cmax and $AUC_{47.5}$ After Oral Administration of Four Different Griseofulvin Tablets to Humans Having High (n=7) and Low Gastric Acidity (n=5)

	Gastric Acidity	Tablet A	Tablet B	Tablet C	Tablet D
Cmax (μg/ml)	High	0.510±0.133	0.675±0.123	0.405±0.129	0.551±0.181
	Low	0.491±0.227	0.640±0.215	0.382±0.133	0.542±0.330
$AUC_{47.5}$(h·μg/ml)	High	9.71±2.97	10.50±2.01	8.45±2.08	11.27±2.65
	Low	11.76±2.76	13.02±2.87	10.90±2.52	11.77±2.02

The figures show means ±SE. There were no significant differences in Cmax and $AUC_{47.5}$ between high and low gastric acidity humans for any products at $p<0.05$ by t-test.

３．薬物投与時の服用水量

アモキシシリン等ある種の難溶性薬物においては、薬物投与時の水の量を増大するとバイオアベイラビリティも増大することが報告されている。[61] 同じ難溶性薬物であるグリセオフルビンのバイオアベイラビリティに対しても投与時の水の量が影響を及ぼし、しかもその効果は製剤が異なると違ってくることも考えられる。そこで試料として、in vitro 溶出速度も早くヒト、動物いずれにおいても高いバイオアベイラビリティを与えたグリセオフルビンＢ製剤、及びin vitroにおいて少量の水存在下ではペースト状になり崩壊、溶出がわるいが、多量の水存在下ではよく分散し溶出も早いＡ製剤（Ａ製剤はヒトおよび他動物ではバイオアベイラビリティが低かったが、イヌではバイオアベイラビリティが高かったことも試料として選んだ一つの理由）の２

種の製剤を対象に服用時の水の量の影響について検討を行った。Fig. 10 に３０および２００mlの水を用いて製剤をイヌに投与した後の血中濃度ー時間曲線を示した。[41] また、Table XIIにＣmax 、Ｔmax 、ＡＵＣの値を示した。いずれの製剤共、水の量を変えてもバイオアベイラビリティに有意な変化はみられなかった。また家兎、[43] ミニブタ[42]においてもイヌと同じく、薬物投与時の水の量を変えてもバイオアベ

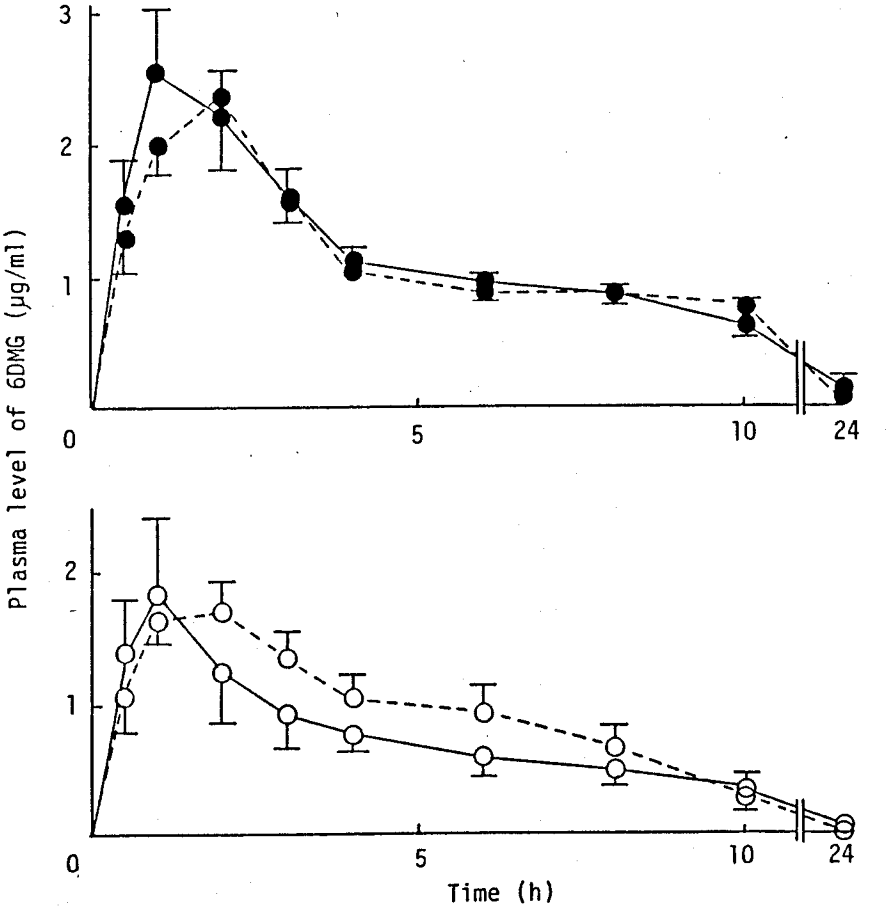

Fig. 10. Mean plasma levels of 6-demethylgriseofulvin (6DMG) after oral administration of tablets A (●) and B (○) to dogs (n=8) with 30 (solid line) or 200 ml (dashed line) of water

The vertical lines show S.E.

Table XII. Mean Cmax, Tmax and AUC_{24} After Oral Administration of Tablets A and B of 125 mg Griseofulvin to Dogs (n=8) With 30 or 200 ml of Water

	Tablet A		Tablet B	
	30 ml	200 ml	30 ml	200 ml
Cmax (μg/ml)	3.038±0.287	2.608±0.167	2.290±0.490	2.067±0.160
Tmax (h)	1.6±0.2	1.8±0.2	1.2±0.2	1.7±0.4
AUC_{24} (h·μg/ml)	18.89±1.15	17.59±0.88	11.13±2.56	14.46±1.79

The figures show means ±SE. There were no significant differences in Cmax, Tmax and AUC_{24} between the treatments with 30 and 200 ml of water for any products at $p<0.05$ by paired t-test.

イラビリティに有意な変化はみられなかった（Tables XIII, XIV）。従って、投与時の水の量は、グリセオフルビンの製剤評価に大きく影響を及ぼさないものと結論できる。

Table XIII. Mean Cmax, Tmax, and AUC After Oral Administration of Tablets A and B (62.5 mg of Griseofulvin) to Stomach-emptying Controlled Rabbits With 5 or 50 ml of Water

	Tablet A		Tablet B	
	5 ml	50 ml	5 ml	50 ml
Cmax (μg/ml)	0.903±0.115	0.820±0.077	0.524±0.059	0.412±0.057
Tmax (h)	4.4±0.6	2.7±0.1	2.0±0.1	3.2±0.4
AUC_∞ (h·μg/ml)	4.763±0.483	4.164±0.335	2.381±0.293	2.145±0.239

The figures show means ±SE (n=6 for tablet A and n=5 for tablet B). There were no significant differences in Cmax, Tmax and AUC between the treatments with 5 and 50 ml of water for any products at $p<0.05$ by paired t-test.

Table XIV. Cmax and AUC_{32} After Oral Administration of Tablets A and B of 125 mg Griseofulvin to Pigs With 100 or 200 ml of Water

	Cmax (μg/ml)				AUC_{32} (h·μg/ml)			
	Tablet A		Tablet B		Tablet A		Tablt B	
Pig No.	100 ml	200 ml	100 ml	200 ml	100 ml	200 ml	100 ml	200 ml
62	0.632	0.510	0.525	0.787	6.43	6.50	4.80	12.10
122	0.218	0.211	0.196	0.789	2.14	3.95	3.12	6.52
145	0.273	1.084	1.790	0.322	3.63	9.75	11.43	5.53
148	——	——	0.410	0.302	——	——	5.87	5.23
Means	0.374	0.635	0.730	0.550	4.07	6.73	6.31	6.43
SE	0.085	0.188	0.272	0.103	1.25	1.68	1.80	1.61

There were no significant differences in Cmax, Tmax and AUC_{32} between the treatments with 5 and 50 ml of water for any products at $p<0.05$ by paired t-test.

４．食事

薬物のバイオアベイラビリティは食事によって多種多様の影響を受け、薬物によっては促進されたり抑制されたりもする。[62-64] グリセオフルビンは食事、特に脂肪食によって吸収が促進されることが知られている。[20,56,57] しかし、これまでなされた食事の影響に関する多くの研究では、グリセオフルビンも含めて製剤的特性および製剤的要因を考慮にいれたものは少なく、大部分は一製剤、しかもその製剤特性が明記されてないまま実験が行われている場合も少なくない。この種の実験では、食事の効果が薬物自身あるいは製剤的因子のいずれとの相互作用によるものなのか、できるだけ明らかにすることである。 そこで、本実験ではグリセオフルビンＡ、Ｂ両製剤を対象に食事の影響について検討を行った。 Ｆig. 11に標準朝食後および絶食条件下、ヒトにグリセオフルビン製剤を投与したときの平均血中濃度を、またTable XV にin vivo パラメータ値を示した。[65] ＡＵＣに有意な差は

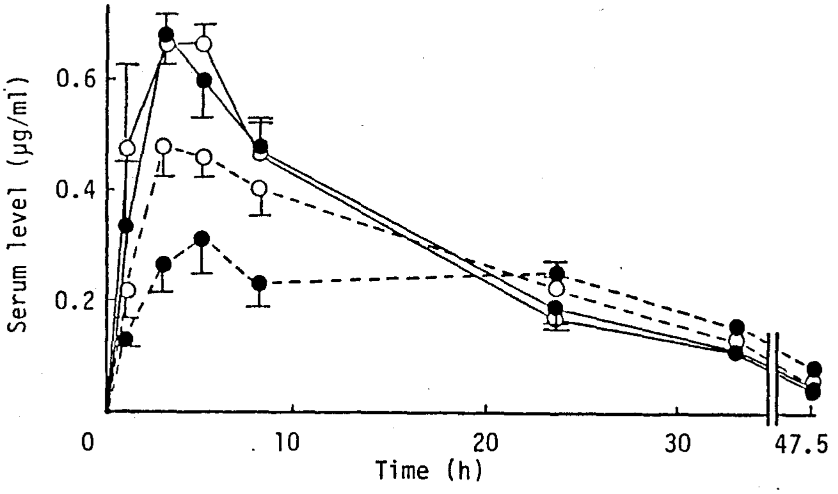

Fig. 11. Mean serum levels of griseofulvin after oral administration of tablets A (●) and B (○) to humans (n=4) after fasting overnight (dashed line) or after ingestion of a standard breakfast (solid line)

The vertical lines show S.E.

みられなかったが、Cmax はいずれの製剤でも絶食投与に比べ食後投与の方が有意に高く、食事によってグリセオフルビンの吸収が早められることが明かとなった。食事摂取により胆汁酸の分泌が促進されグリセオフルビンの溶解性が増したこと[66,67]及び食事成分によるグリセ

Table XV. Cmax, Tmax and AUC After Oral Administration of Tablets A and B of 125 mg Griseofulvin to Humans (n=4) With or Without Food

		Tablet	No Food	Food	paired t-test
Cmax	(μg/ml)	A	0.359±0.036[b]	0.684±0.035	p<0.01
		B	0.517±0.032	0.703±0.041	p<0.01
Tmax	(h)	A	9.4±4.7	3.0±0.0	NS[a]
		B	4.3±1.3	3.0±1.2	NS
$AUC_{47.5}$	(h·μg/ml)	A	9.34±0.70	11.89±1.24	NS
		B	10.93±1.04	11.95±1.40	NS
AUC_{∞}	(h·μg/ml)	A	10.77±1.14	12.67±1.37	NS
		B	11.90±1.25	13.06±1.87	NS

a) NS: not significant at p<0.05. b) Means ±SE.

オフルビンの可溶化[62]がその原因として考えられる。またA，B両製剤のバイオアベイラビリティを比較した場合、絶食条件下ではA製剤に比較しB製剤のCmax が低かったが、食後投与においては両製剤のCmax はほぼ等しくなった。これは食事によってA製剤の吸収がより大きく促進されたことを示しており、空腹下では分散性のわるいA製剤が食事によって、その崩壊、分散を促進されたものと考えられる。このような食事による製剤の崩壊促進効果は、クロラムフェニコール[68]、ナリジックス酸等[69]の製剤においても認められた。従って、食後投与における製剤評価においては、食事による崩壊促進作用を考慮にいれることが必要と思われる。

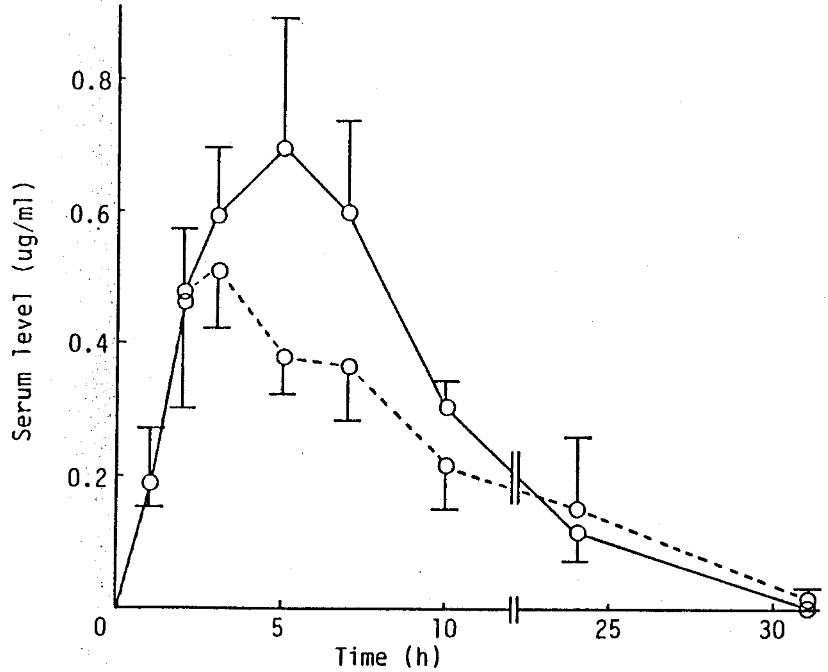

Fig. 12. Mean serum levels of griseofulvin after oral administration of tablet B to rabbits (n=7) after fasting overnight (dashed line) or before feeding (solid line)*.

** 50 g of special soft diet was given to rabbits immediately after drug administration.*

Table XVI. Cmax, Tmax and AUC_{31} After Oral Administration of Tablets B of 62.5 mg Griseofulvin to Rabbits (n=7) With or Without Food

	No Food	Food[a]	Paired t-test[b]
Cmax (μg/ml)	0.637±0.078[c]	0.920±0.173	$p<0.10$
Tmax (h)	4.1±0.8	5.4±3.1	NS[d]
AUC_{31} (h·μg/ml)	6.536±1.417	8.227±1.016	$p<0.10$

a) 50 g of soft diet was given just after dosing. b) One-tailed significance level. c) Means ±SE. d) NS: not sgnificant at $p<0.05$.

一方、家兎で絶食条件下投与および給餌前投与について、グリセオフルビンB製剤のバイオアベイラビリティを比較したところ、ヒトと同様、家兎でも食事を与えた方がバイオアベイラビリティが高くなる傾向がみられた（Fig. 12, Table XVI）。[43] また、グリセオフルビンA，B製剤のバイオアベイラビリティに関して給餌前および給餌後投与の間で比較を行ったところ（Fig. 13, Table XVII）、B製剤は給餌

Table XVII. Cmax, Tmax and AUC_{31} After Oral Administration of Tablets A and B of 62.5 mg Griseofulvin to Rabbits Before or After Feeding

	Tablet	Before Food[a]	After Food[b]	t-test
Cmax (μg/ml)	A	0.599±0.108[c]	1.067±0.250	$p<0.05$
	B	0.853±0.164	0.646±0.130	NS[d]
Tmax (h)	A	8.1±3.4	6.7±4.2	NS
	B	4.5±0.8	7.5±4.0	NS
AUC_{31} (h·μg/ml)	A	5.139±0.779	6.399±0.727	$p<0.10$
	B	7.688±1.032	5.359±1.572	NS

a) 50 g of soft diet was given 30 min after dosing (n=7). b) 50 g of soft diet was given just before dosing (n=8). c) Means ±SE. d) NS: not significant at $p<0.05$.

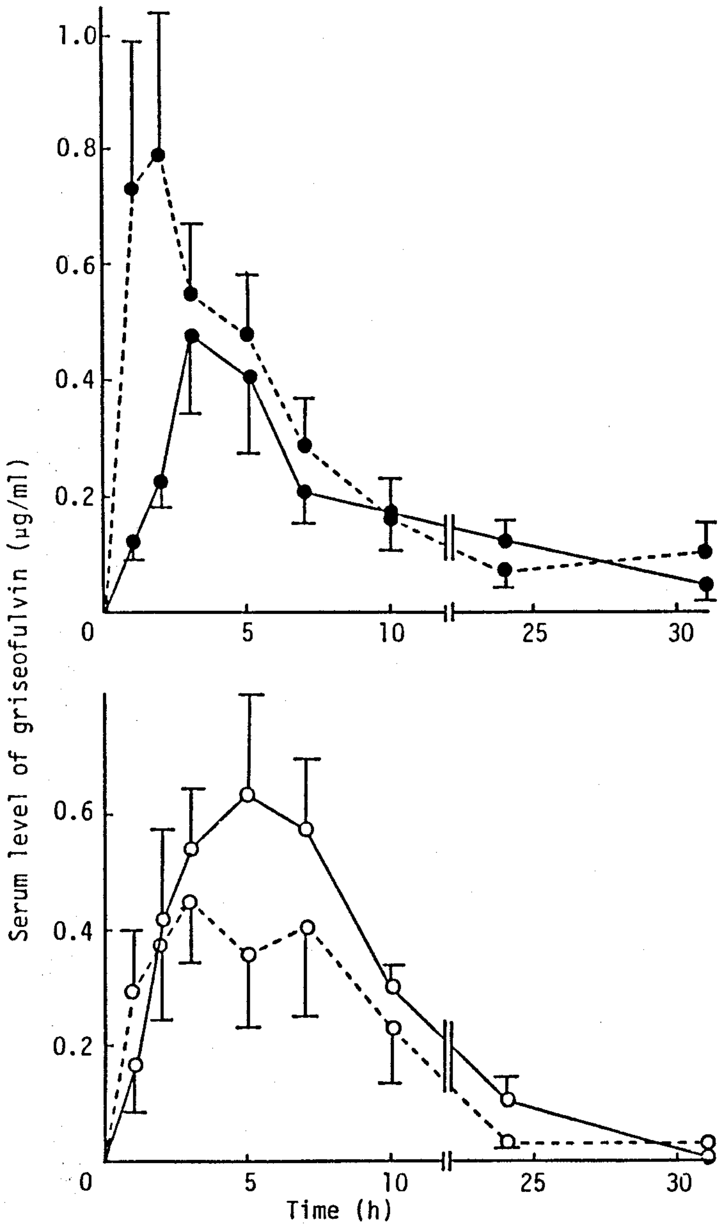

Fig. 13. Mean serum levels of griseofulvin after oral administration of tablets A (●) and B (○) to stomach-emptying controlled rabbits immediately before feeding (solid line, n=8) or 30 min after feeding (dashed line, n=7)

50 g of special soft diet was given to rabbits.

前投与に比較し給餌後投与の方がＣmax 、ＡＵＣ共、少し低くなる傾向がみられたが、Ａ製剤は給餌後投与の方がＣmax 、ＡＵＣ共、有意に高くなった。[43] このことは給餌後投与によりＡ製剤の崩壊、分散が促進されたたことを示唆している。

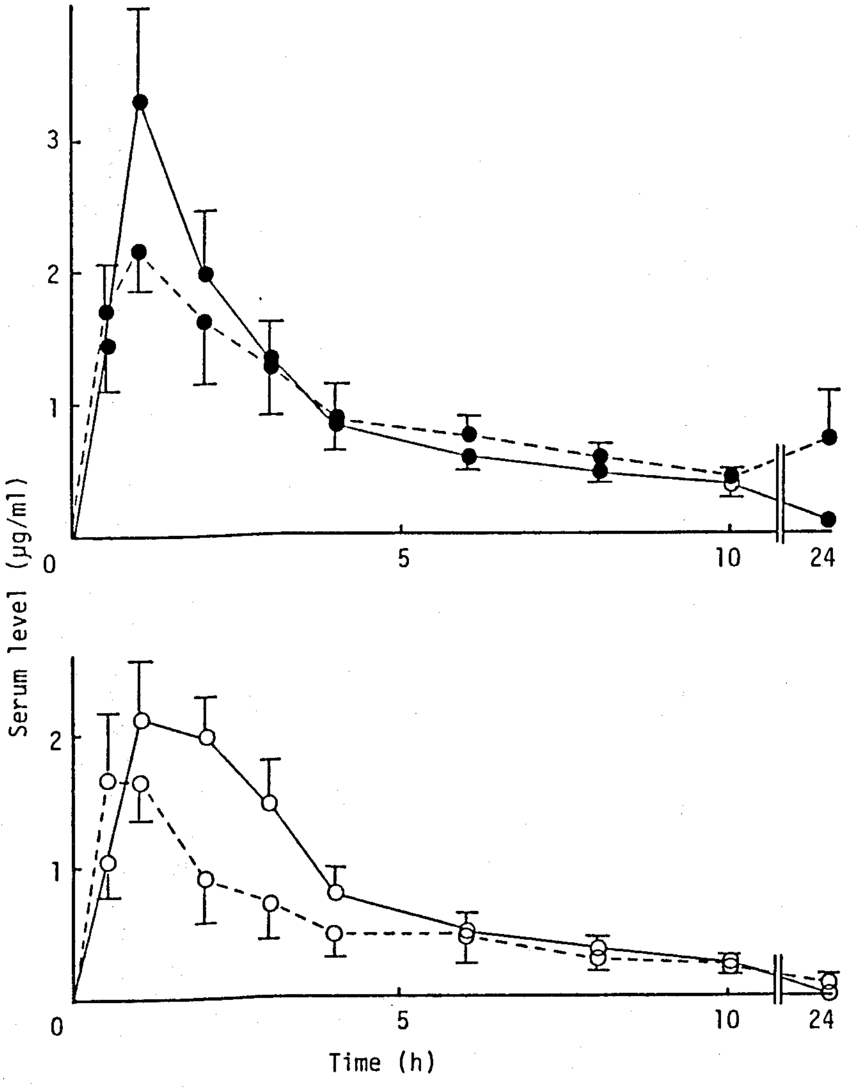

Fig. 14. Mean plasma levels of 6-demethylgriseofulvin after oral administration of tablets A (●) and B (○) to dogs (n=8) after fasting overnight (dashed line) or after feeding of 200 g of solid diet (solid line)

The vertical lines show S.E.

Table XVIII. Cmax, Tmax and AUC_{24} of 6-Demethylgriseofulvin After Oral Administration of Tablets A and B of 125 mg Griseofulvin to Dogs (n=8) With or Without Food

	Tablet	No Food	Food[a)]	Paired t-test
Cmax (μg/ml)	A	2.798±0.265[b)]	3.475±0.594	NS[c)]
	B	2.310±0.434	2.620±0.327	NS
Tmax (h)	A	6.9±3.7	2.3±1.1	NS
	B	0.8±0.2	2.0±0.3	p<0.01
AUC_{24} (h·μg/ml)	A	17.68±3.00	13.50±1.20	NS
	B	8.56±2.25	10.52±1.71	NS

a) 250 g of solid diet was given 30 min before dosing. b) Means ±SE.
c) NS: not significant at p<0.05.

他方、イヌにおいては、AおよびB錠投与後のグリセオフルビン、6-demethylgriseofuvin 最高血中濃度は、いずれも絶食時投与より食後投与の方が高くなる傾向がみられ（Fig. 14, 15, Tables XVIII, XIX)、この傾向は特に6-demethylgriseofuvin より血中グリセオフルビン濃度において顕著であった。これは食事摂取によりグリセオフルビンの吸収が促進され、初回通過効果を受ける割合が低下したためと考えられる。また、絶食時、食後投与のいずれにおいてもA製剤の方がB製剤よりバイオアベイラビリティは高く、イヌにおいては食事

Table XIX. Cmax, Tmax and AUC_{24} of Griseofulvin After Oral Administration of Tablets A and B of 125 mg Griseofulvin to Dogs (n=8) With or Without Food

	Tablet	No Food	Food[a)]	Paired t-test
Cmax (μg/ml)	A	0.436±0.095[b)]	1.139±0.297	p<0.1
	B	0.300±0.136	0.737±0.134	p<0.05
Tmax (h)	A	7.4±3.7	2.5±0.8	NS[c)]
	B	1.1±0.2	3.0±2.9	NS
AUC_{24} (h·μg/ml)	A	2.45±0.77	4.36±0.73	NS
	B	0.61±0.22	3.66±0.62	p<0.01

a) 250 g of solid diet was given 30 min before dosing. b) Means ±SE.
c) NS: not significant at p<0.05.

の有無にかかわらず、A製剤が消化管内で比較的よく崩壊、分散するものと推定される。

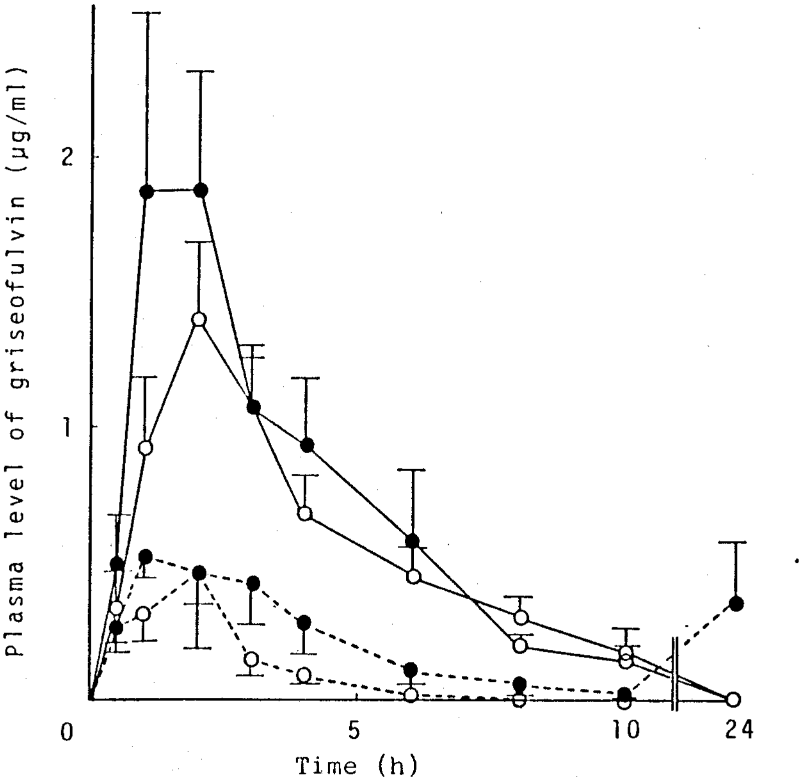

Fig. 15. Mean plasma levels of griseofulvin after oral administration of tablets A (●) and B (○) to dogs (n=8) after fasting overnight (dashed line) or after feeding of 200 g of solid diet (solid line)

The vertical lines show S.E.

5. 胃内容物排出速度

消化管からの薬物吸収に及ぼす胃内容物排出速度の影響の重要性は、これまで多々、指摘されているところである。[70-73] グリセオフルビンに関しても家兎[9,10]およびラットなど[74]において、胃内容物排出速度

が遅い条件下ではグリセオフルビンの吸収も遅く、早い条件下では吸収も速やかになる現象がみられており、消化管吸収に及ぼす胃内容物排出速度の重要性が示唆されている。本研究においても、グリセオフルビン製剤投与後の血中濃度推移及びTmaxから、イヌは胃内容物排出速度が早く、一方、ミニブタは遅いことが示唆された。また、ミニブタでは製剤間のバイオアベイラビリティの差がヒト、他動物と比べて小さくなっているなどグリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ評価にも、胃内容物排出速度が重要な影響を及ぼす可能性が示唆された。胃内容物排出速度の薬物吸収、製剤評価に及ぼす影響の重要性を鑑み、アスピリン腸溶錠及び腸溶顆粒、硫酸バリウム腸溶錠、エチルセルロース被覆顆粒を試料製剤として、ヒト、動物における胃内容物排出速度の評価を行った。Table XX に試料製剤の大きさ、比重を示した。アスピリン製剤の場合は、投与後、血中又は尿中にサリチル

Table XX. Size and Density of Aspirin and $BaSO_4$ Tablets and Granules

			Diameter (mm)	Density (g/cm^3)
Aspirin	tablet	(enteric coated)[a]	11	1.24
	granule	(enteric coated)[b]	1	1.17
$BaSO_4$	tablet	(enteric coated)[c]	11	1.52
	granule	(ethylcellulose coated)[d]	1	1.34

a) EA tablet Shionogi® (Shionogi & Co., Ltd.) containing 250 mg aspirin. b) Minimax® (Shionogi & Co., Ltd.). 500 mg Aspirin per 1 g granule. c) 37.5 mg $BaSO_4$ per tablet. d) 308 mg $BaSO_4$ per 1 g granule.

酸が検出されるまでの時間（ラグ時間）および最高血中濃度到達時間を指標として、ヒト、動物間の胃内容物排出速度を比較した。 Fig. 16, 17にアスピリン製剤投与後のヒトにおける尿中総サリチル酸排泄

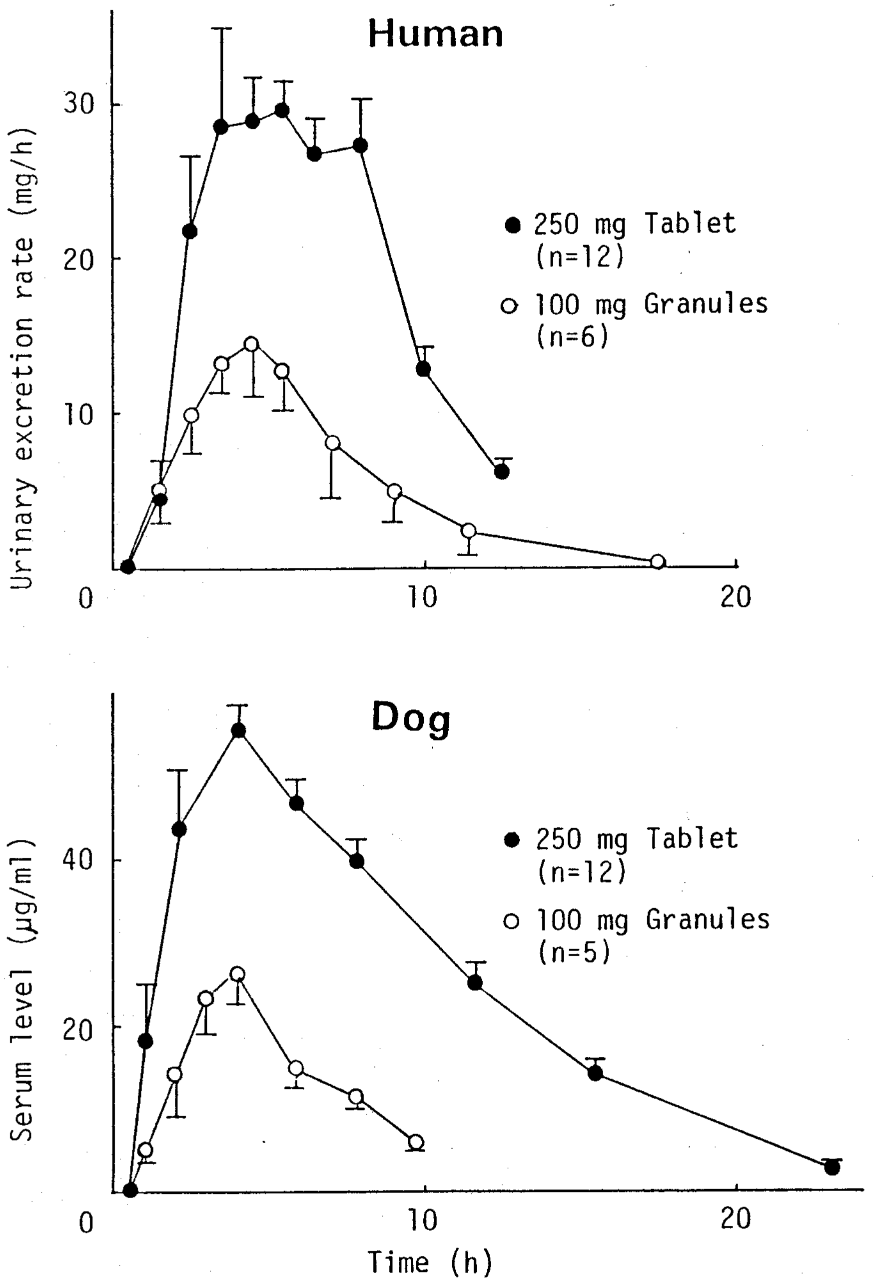

Fig. 16. Mean urinary excretion rates of total salicylic acid in humans and mean serum levels of salicylic acid in dogs after oral administration of an enteric coated tablet (diameter = 11 mm) and enteric coated granules (diameter = 1 mm) of aspirin after fasting overnight

The vertical lines show S.E.

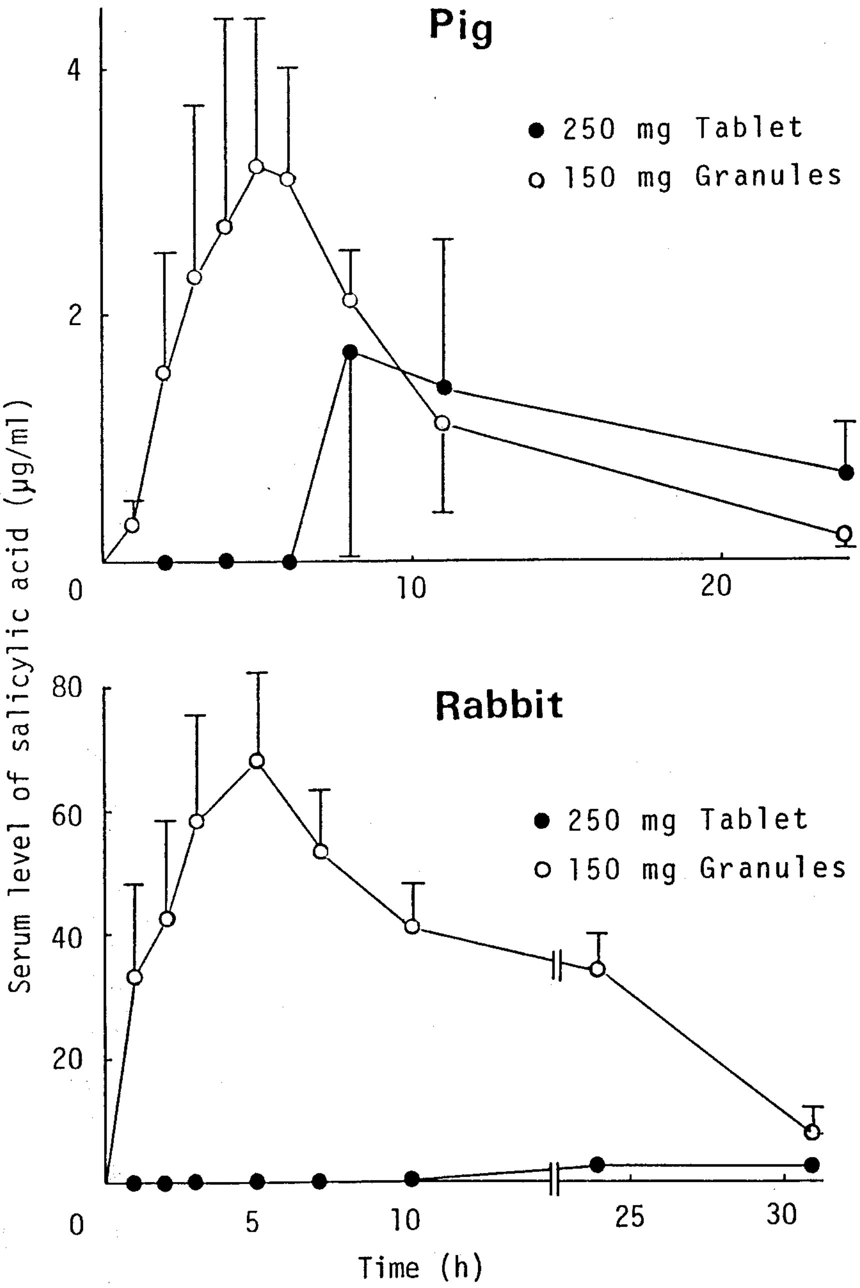

Fig. 17. Mean serum levels of salicylic acid in stomach-emptying controlled rabbits (n=8) and in pigs (n=5) after oral administration of an enteric coated tablet (diameter = 11 mm) and enteric coated granules (diameter = 1 mm) of aspirin

The vertical lines show S.E.

速度およびイヌ、ミニブタ、家兎における血中サリチル酸濃度を示した。また、個々のヒト被験者、動物におけるラグ時間、Tmax をFig. 18, 19 に示した。腸溶錠及び腸溶顆粒のラグ時間、Tmax いずれもイヌ＜ヒト＜ミニブタ、家兎の順に遅くなる傾向がみられ、胃内容物排出速度もこの順に遅くなる。また、家兎では２４時間以上も腸溶錠が胃内に留っているものと思われた。

一方、硫酸バリウム製剤の場合は錠剤は５個（但し、家兎のみ２個）、顆粒は５０粒をヒト、動物に投与し、その胃内残存数をX線撮影で

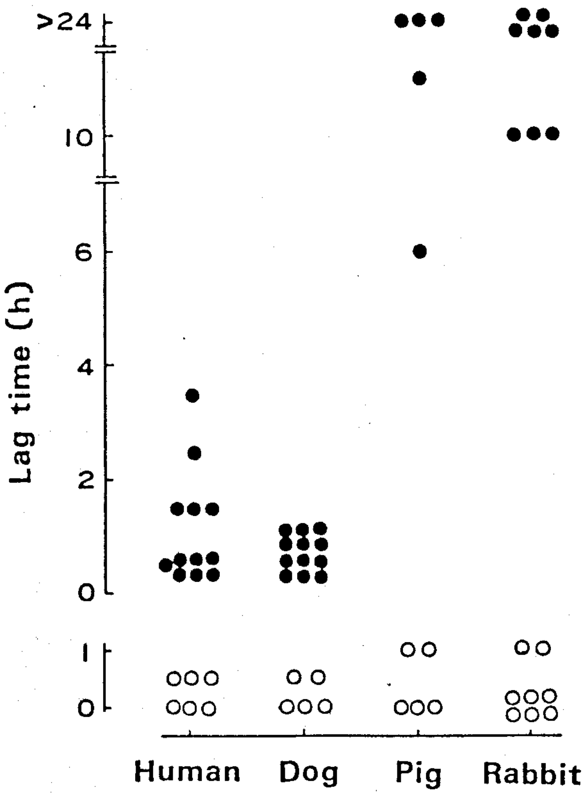

Fig. 18. Individual lag time after oral administration of an enteric coated tablet (●) and enteric coated granules (○) of aspirin to humans, dogs, minipigs G and stomach-emptying controlled rabbits

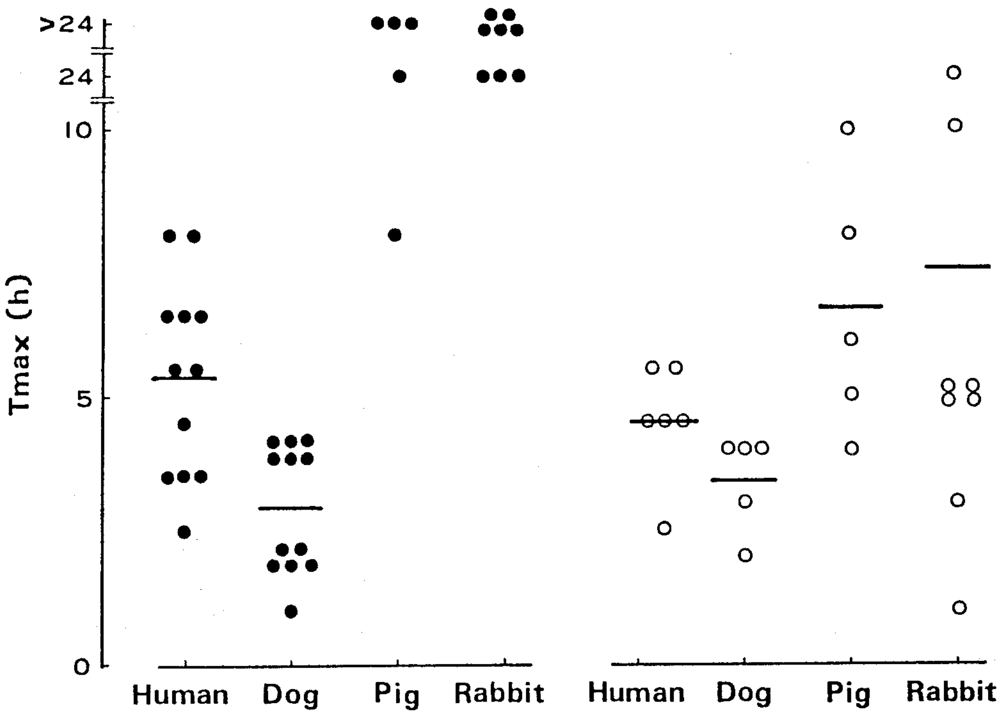

Fig. 19. Individual Tmax after oral administration of an enteric coated tablet (●) of aspirin and enteric coated granules (○) to humans, dogs, minipigs G and stomach-emptying controlled rabbits

The horizontal lines show mean values.

測定することより胃内容物排出速度の評価を試みた（Fig. 20, 21）。錠剤、顆粒の胃内容物排出速度はいずれもイヌ＜ヒト＜ミニブタ、家兎の順に遅く、アスピリン腸溶性製剤による評価とほぼ一致した。また、家兎では錠剤は長く胃内に留っていることが証明され、11㎜径の錠剤は物理的に大きすぎて胃から小腸へ移行しにくいものと思われた。これら胃内容物排出速度実験の結果はグリセオフルビン投与後のイヌにおける早いTmax、ミニブタにおける遅いTmaxと吸収ラグの

発現及び製剤間にバイオアベイラビリティの差がでにくいことを説明し得るものであり、胃内容物排出速度はグリセオフルビン製剤においても、血中濃度推移更にはバイオアベイラビリティ評価にも影響を及ぼす生理学的に極めて重要な要因であるものと考えられる。

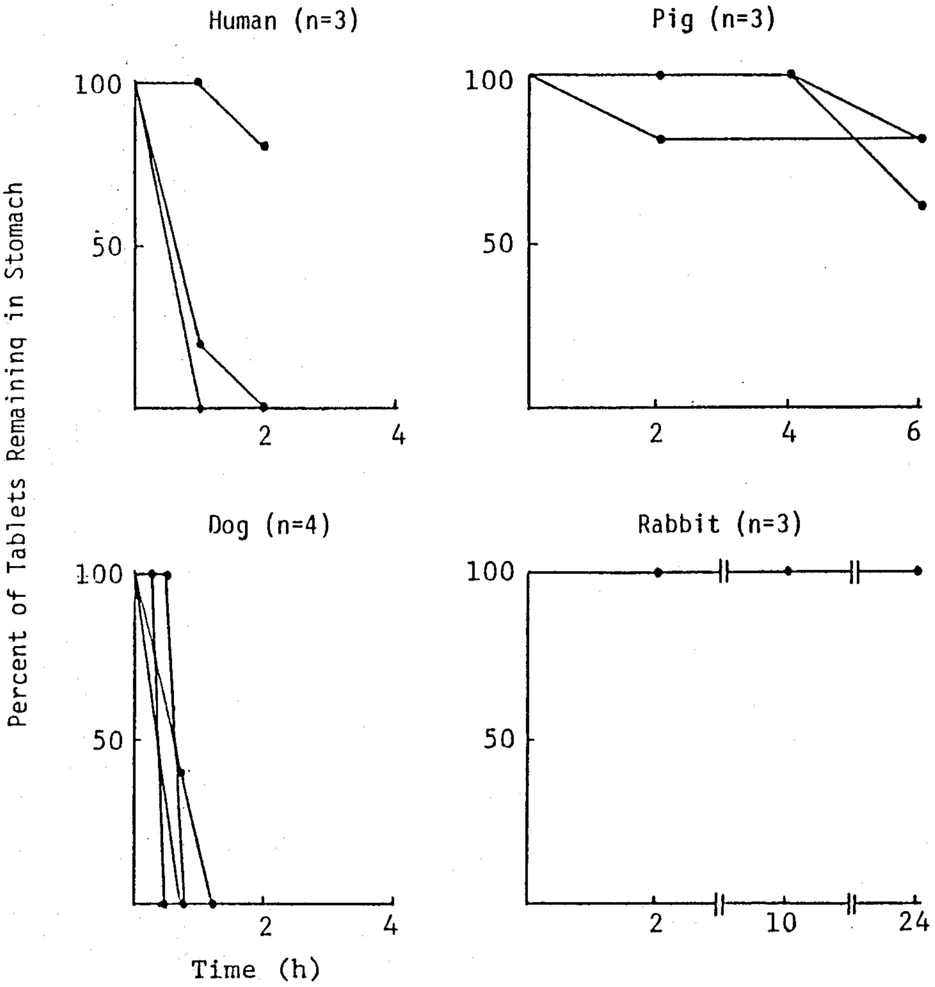

Fig. 20. Gastric emptying rates of $BaSO_4$ tablets (diameter = 11 mm) in humans, dogs, minipigs G and stomach-emptying controlled rabbits

Five enteric coated tablets of $BaSO_4$ were administered to humans, dogs and pigs and two tablets to rabbits.

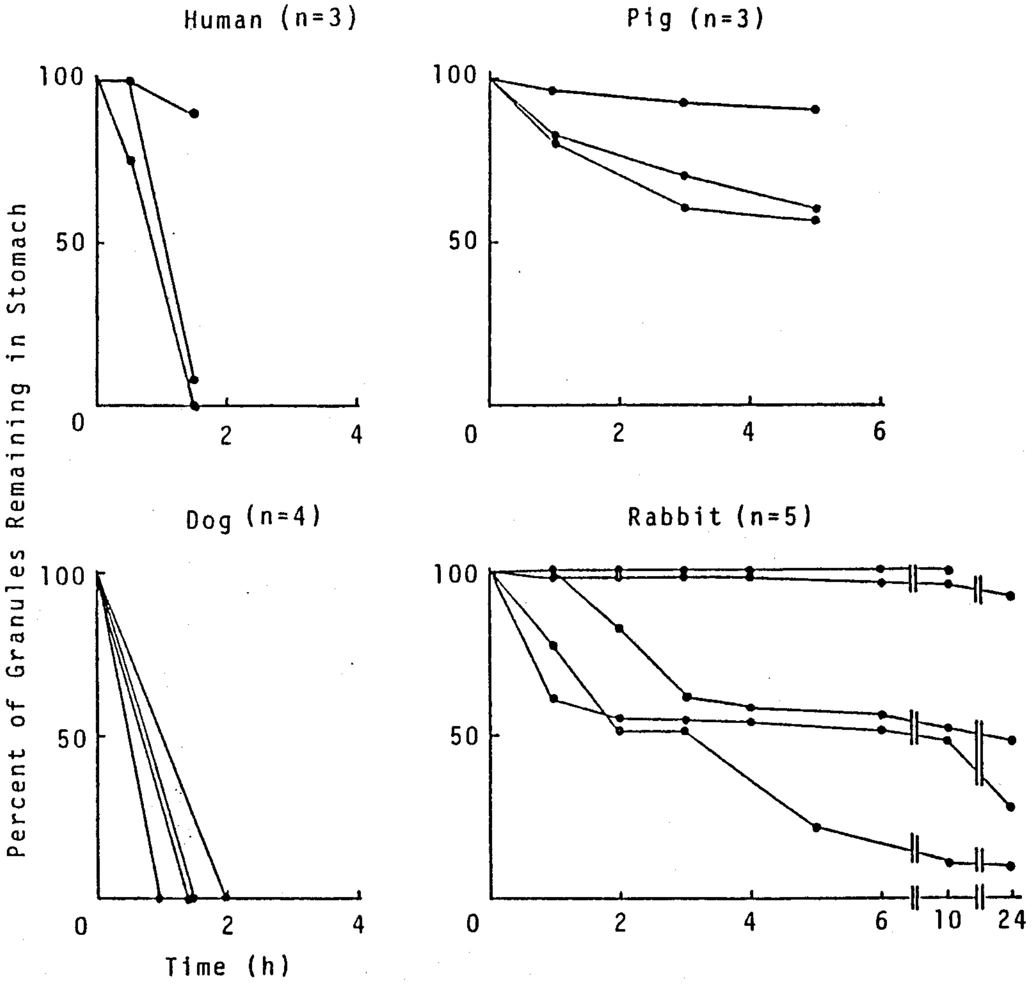

Fig. 21. Gastric emptying rates of $BaSO_4$ granules (diameter = 1 mm) in humans, dogs, minipigs G and stomach-emptying controlled rabbits

Fifty granules were administered to humans and animals.

6．考察

薬物のバイオアベイラビリティに対する生理的要因あるいは食事の種類、内容などの投与時における要因の影響に関して多くの報告があ

るが、溶出速度など製剤特性を考慮に入れて検討を行った報告は少ない。又、それら要因の影響をヒト、動物において比較、検討した例は非常に少なく、グリセオフルビン製剤についても例外ではない。そこで本章では、溶出速度など異なった製剤的性質をもつ微粒子グリセオフルビン製剤を対象に、そのバイオアベイラビリティに影響を及ぼす生理的要因などについてヒト、動物で検討を行い比較した。

まず、崩壊時間および溶出速度について検討を行った結果、グリセオフルビン製剤の崩壊時間はいずれの製剤共早く、バイオアベイラビリティとの関連は見いだし得なかった。しかし、溶出速度においては、溶出の早い製剤ほどヒト、動物いずれにおいてもバイオアベイラビリティが高く、崩壊時間より溶出速度が製剤的には重要な要因であることが明らかとなった。また、in vivo-in vitro 相関性から、ヒト、動物の消化管内ではある程度機械的崩壊力が製剤に働くこと、ビーグル犬はヒト、他動物と比較し製剤を崩壊、分散する力が強いことが示唆された。

一方、服用時における要因として、水の量および食事をとりあげ検討を行ったが、水の量はバイオアベイラビリティ評価に余り影響しないことが判明した。水は固形物と違って速やかに消化管内を移動してしまうため[75]影響が少ないものと思われる。しかし、食事はヒト、動物のいずれにおいてもバイオアベイラビリティの増大を招き、特にヒト、家兎では製剤の崩壊を促進し製剤評価にも影響することが明らかとなった。これら食事の効果は、食事による製剤への直接的な作用、および消化管内生理条件への影響（胃内容物排出速度の遅延、消化管運動の亢進、消化液の分泌促進等）を介しての間接的な作用の総合効果[62-64]と理解される。

他方、生理的要因として胃内容物排出速度について検討した結果、胃内容物排出速度はイヌ＞ヒト＞家兎、ミニブタの順に早いことが明らかとなった。この結果はグリセオフルビン製剤投与後のイヌでみら

れた速やかな血中濃度の上昇、ミニブタでみられた遅い血中濃度の上昇、そしてミニブタにおける製剤間のバイオアベイラビリティの小さな差（製剤の胃内滞留時間が長く、いずれの製剤も崩壊が充分進行するため、製剤間の差が小さくなる）を合理的に説明しうるものであり、胃内容物排出速度がグリセオフルビン製剤の消化管からの吸収、バイオアベイラビリティ評価にとって、生理的に重要な要因であることが判明した。

以上の検討結果から、ヒトおよび動物においてみられた微粒子グリセオフルビン製剤の製剤間のバイオアベイラビリティの差は、基本的には溶出速度の差に起因するものと考えられる。しかし、ヒトと動物との間では消化管の生理的条件が異なるため、それがグリセオフルビン製剤の溶出、吸収速度に影響を及ぼし、ヒトと動物との間で血中濃度推移の相違（吸収速度の相違とも理解される）、製剤評価の相違を招いたものと理解される。殊に、ヒト、動物間でみられた胃内容物排出速度の差はその相違を招いた一つの主要因と考えられる。更に、イヌにおいては消化管の強い崩壊力がグリセオフルビン製剤の溶出、吸収に影響を及ぼし、ヒト、他動物と異なった製剤評価（A製剤のバイオアベイラビリティが極めて高い）を与えたものと考えられる。

また、食後、製剤を投与した場合は、生理的要因に加えて、食事の種類、量などの要因がヒト、動物における製剤評価に影響することについても考慮する必要がある。要因の複雑化を避けるためには、可能であればヒト、動物いずれにおいても先ず絶食条件下で製剤のバイオアベイラビリティを評価し、次いでそれら食事の要因を考慮に入れて評価することが、ヒト、動物間のバイオアベイラビリティの関連性を把握する上で、また適切な製剤評価をする上で必要と思われる。

第三章　統計的観点からみたバイオアベイラビリティ評価における動物の有用性

生物学的同等性試験においては、バイオアベイラビリティにおける製剤間の差というシグナルを実験誤差というノイズの中から統計的に検出し、その差について評価を下さなければならない。しかしながら、製剤間の差を検出することはともかくとして、対照および被験製剤が同等であるということを統計上、積極的に証明することは、現在非常に難しいとされている。[76,77] 通常は帰無仮説｛両製剤は同等である｝による検定法が同等性試験にも用いられているが、この検定法は帰無仮説を否定し、差があることを示すことに意味がある手法であり、否定できなかったからといって、それが積極的に帰無仮説を肯定している訳ではなく消極的に帰無仮説を採択しているにすぎない。従って、ばらつきが大きく、しかも例数が少ない実験を行うと、母集団における製剤間の差が多少大きくても有意な差として検出されず、結果的に帰無仮説が採択されることがある。このように本来、製剤間に差があるにもかかわらず差がないものとして見逃してしまう確率をβとすると検出力は$1-\beta$で表わされる。生物学的同等性試験に帰無仮説検定法を適用するに際しては、一定水準以上の検出力の下で検定を行うことが必要である。

検出力は実験誤差、実験例数等の関数であり、見逃すことのできない重要な差（同等性試験においては、両製剤を同等とみなし得る製剤間の差）を決めれば求めることができる。クロスオーバー法で実験を行った場合、検出力は次式より計算出来る（Φは検出力と関係づけられる）。[78,79] この場合、検出力を一定にして見逃し得ない重要な差を検出するに必要な例数（n）を計算することもでき、nの大きさから実験のばらつき度合いを知ることもできる（nが大きい程、誤差も大きい）。

$$\phi^2 = \frac{\dfrac{\sum_{i=1}^{k}(\mu_i - \bar{\mu})^2}{k}}{\dfrac{s^2}{n}}$$

但し、kは水準（処理）の数、s^2は残渣平均平方、nは総実験例数。μ_i はi製剤の母平均値、 $\bar{\mu} = \sum_{i=1}^{k}\mu_i/k$

これまで、バイオアベイラビリティおよび生物学的同等性に関する研究は非常に多く報告されているにもかかわらず、統計的検出力を記載してある文献は極めて少なく、[31,80] ヒトと動物における検出力を比較、報告した例は全く見当たらない。バイオアベイラビリティおよび生物学的同等性試験における動物の有用性の評価を行う上では、ヒト、動物間の相関性、バイオアベイラビリティの結果の比較という観点からだけでなく、検出力についてもヒトと比較し、統計的観点から評価することも重要と思われる。そこで、第Ⅰ章で行ったグリセオフルビン製剤のヒト、動物におけるバイオアベイラビリティのパラメータ（Cmax 、Tmax 、AUC）について、見逃すことのできない差を２０％に設定し、その差をα＝５％、１－β＝８０％で検出するに要するヒト、各動物の例数を、Wagnerの方法[78]に従って求め比較した（Table XXI）。[43] その結果、Tmax は他のパラメータに比し、ヒト、動物いずれにおいてもばらつきが大きく、多くの例数が必要とされることが明らかとなった。また、ヒト、動物間で比較した場合、動物はCmax およびAUCいずれも多くの実験例数を必要とし、特に家兎ではCmax,イヌではAUCにおいてその検出力が劣ることが明らかとなった。

Table XXII に他の医薬品製剤のCmax 、AUCにおけるヒト、ビーグル犬の必要例数を示した（２×２クロスオーバー法で実験を行い、α＝５％、１－β＝８０％の条件下で２０％の差を検出するに要する

Table XXI. Total Number of Animals Required for 20% Difference to be Significant at α=0.05 and 1-β=0.8 in a Randomized Block Design

	Tmax	Cmax	AUC[a)]
Human	212	18	10
Dog	136	40	60
Pig	60	42	38
Rabbit	334	72	32

a) AUC from zero to final sampling time: $AUC_{47.5}$(human), AUC_{24}(dog), AUC_{32}(minipig G), AUC_{31}(rabbit).

例数)。[81)] フルフェナム酸を除き他の製剤はいずれもグリセオフルビンの場合と同様、ヒトに比べイヌの方が多くの例数を必要とし、検出力が劣る傾向がみられた。このようなヒト、動物間の検出力の差は、主に両者の間の消化管内生理条件の差に起因しているものと思われるが、動物においては薬物強制投与によるストレス等が消化管内生理条件に影響し、検出力を低下させていることも考えられる。さらに家兎においては胃洗浄の良否も実験のばらつきに影響を及ぼしている可能性もある。

Table XXII. Estimated Total Number of Subjects Required for 20 % Difference to be Significant at α=0.05 and 1-β=0.8 in 2x2 Cross-over Tests

	Cmax		AUC	
	Human	Dog	Human	Dog
Diazepam tablet	10	20	10	12
Flufenamic acid capsule	22	12	10	8
Nalidixic acid tablet	18	22	14	26
Cyclandelate capsule	12	136	8	156

生物学的同等性試験では、ヒトにおける製剤間のバイオアベイラビリティの絶対値の差が問題とされる。従って、ヒト試験に代えて動物で同等性試験を行うには、ヒト、動物間の相関性に基づいた回帰式からヒトで検出しなければならない差を動物での差に読み変え、それを検出することが必要である。Table XXIII に第I章で観察されたグリセオフルビン製剤のＣmax のヒト、動物間の相関係数、回帰直線式を示した。仮に、基準および被験製剤間のＣmax の差が２０％以内（ヒトにおいて）であれば生物学的に同等な製剤とみなし得るものとすると、グリセオフルビンＢ製剤を基準にして考えた場合（Ｂ製剤のヒトにおけるＣmax は 0.502μg/ml）、ヒトにおける２０％の差は回帰式から、イヌではヒトと同じ２０％、ミニブタでは１２％、家兎では２６％に相当すると計算することができる（Table XXIII）。その差を検出し得る試験を行えば、動物をもってヒト同等性試験に代え得ることができると考えられる。$\alpha = 5\%$、$1-\beta = 80\%$でそれらの差を検出するに要する動物数を前述の式に従い計算すると、ｎ＝４０（イヌ）、　ｎ＝１１０（ミニブタ）、　ｎ＝４５（家兎）となり（Table XXIII）、いずれもヒトに比較し少なくとも２倍以上の例数を必要とすることになり、数の点からは動物はいずれもヒトに比較し

Table XXIII. Estimated Number of Animals Required to Detect 20% difference in Cmax in Humans at $\alpha = 0.05$ and $1-\beta = 0.8$.

	Human-animals regression equation in Cmax (μg/ml)	Difference to detect	Number of animals
Humans		20 %	18
Dogs	Y = 3.61X-0.11 (r=0.976)[a)]	20 %	40
Pigs	Y = 0.66X+0.32 (r=0.934)	12 %	110
Rabbits	Y = 1.61X-0.25 (r=0.934)	26 %	45

a) X and Y show Cmax in humans and animals, respectively, and r indicates the correlation coefficient.

不利といえる。特にミニブタは実験困難ともいえる数である。従って、検出力の点からは、動物はいずれも同等性試験には適しにくいように思われる。

しかしながら、製剤評価においては、製剤間の絶対値の差や一定水準の統計的検出力が同等性試験のようにいつも厳密に要求される訳ではない。基準製剤に対して、被験製剤のバイオアベイラビリティがどの程度優れているか、あるいは劣っているか動物における評価からヒトにおけるそれを予測する場合、ある程度の誤差は許容され得るものと思われる。ビーグル犬においてポリエチレングリコール製剤のバイオアベイラビリティが高くなったのを除けば、動物はＣmax および最終サンプリング時間迄のＡＵＣ、いずれにおいてもヒトとの間の相関性が高かったことを考慮すると、動物は同等生試験には適しにくいとしても、グリセオフルビン製剤の相対的なバイオアベイラビリティを評価する上においては、充分有用性はあるものと考えられる。

結　　　　論

バイオアベイラビリティおよび生物学的同等性試験の立場から、ビーグル犬、ミニブタ、胃排出調整家兎を対象に実験動物としての有用性について難溶性薬物であるグリセオフルビンをモデル試料として検討を行い、以下の結論を得た。

ヒト、動物間のＣmax および最終サンプリング時間迄のＡＵＣにおける相関性は、消化管の崩壊力が強いためと思われるイヌでポリエチレングリコール製剤のバイオアベイラビリティが高くなったのを除けば、いずれも良好であった。

しかしながら、異なる製剤間のＣmax 、薬物の総吸収量を示す無限大時間迄のＡＵＣの差についてヒト、動物間で比較した結果、ヒトに比較し動物ではいずれもＡＵＣにおいて製剤間の差が大きくなる傾向がみられた。この傾向は特にイヌおよび家兎で顕著であり、両動物では溶出速度の遅い製剤を投与した場合、消化管内で薬物が充分溶出、吸収されないうちに消化管を通過してしまうこと、即ち、製剤の速やかな吸収部位通過および吸収部位の短さが示唆された。動物の中でもミニブタでは、製剤間のＡＵＣの差が比較的小さかったが、これは製剤の胃内滞留時間が長く、いずれの製剤も胃内で充分崩壊してしまうためと思われる。これはまた、製剤間におけるＣmax の差がヒト、イヌ、家兎に比べ、ミニブタにおいて特に小さかったことにも結びついていると思われる。

一方、ヒト、動物におけるグリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ評価に影響を与える要因について検討を行った結果、製剤的には薬物の溶出速度が重要な要因であり、溶出速度の早い製剤程、ヒト、動物いずれにおいてもバイオアベイラビリティが増大することが明らかとなった。また、服用時の要因としては、薬物を服用する際摂

取する水の量はバイオアベイラビリティ評価に影響を及ぼさないが、食事摂取はバイオアベイラビリティの増大を招き、ヒト、家兎では製剤の崩壊を促進し製剤評価にも影響することが明らかにされた。更に、生理的要因としての胃内容物排出速度の影響について検討した結果、胃内容物排出速度はイヌ＞ヒト＞家兎、ミニブタの順に早いことが明らかとなった。この結果はグリセオフルビン製剤投与後のイヌでみられた速やかな血中濃度の上昇、ミニブタでみられた遅い血中濃度の上昇、そしてミニブタにおける製剤間のバイオアベイラビリティの小さな差、即ち胃内滞留時間が長いことに起因する各製剤の充分な崩壊の進行を説明しうるものであり、胃内容物排出速度がグリセオフルビン製剤の消化管からの吸収、バイオアベイラビリティ評価にとって、重要な要因であることが判明した。

他方、統計的観点から動物の有用性はこれまで全く評価されておらず未知であったことから、バイオアベイラビリティ評価にとって重要なパラメータであるＣmax 、ＡＵＣ等の統計的検出力をヒト、動物間で比較し、統計的観点から動物の評価を試みた。その結果、ヒトに比し動物はいずれも検出力がわるく、ヒトで検出したい製剤間の差をヒトに代えて動物で検出しようとするとＣmax においては少なくともヒトの倍以上の実験例数を必要とすること、そして特に家兎ではＣmax, イヌではＡＵＣの検出力が劣ることが明らかとなった。

ヒトに比べ、動物はいずれも検出力が劣ること、また胃内容物排出速度、製剤の消化管通過速度、消化管の長さなど消化管の生理的および解剖学的条件がヒトと動物とでは異なること、そしてそれが製剤評価にも影響を及ぼし、動物では製剤間のＡＵＣの差が過大評価されること等を考慮すると、動物はいずれも製剤間の絶対値の差が問題にされ、しかもその差を一定水準の統計的検出力の下で検出することが要求される同等性試験に適しているとは言い難い。

しかしながら、動物データをヒトへ外挿し、動物における製剤評価

からヒトにおけるそれを予測するという場合には、製剤間の絶対値の差や一定水準の統計的検出力が同等性試験のようにいつも厳密に要求される訳ではなく、ある程度の誤差は許容されるのが普通である。ヒト、動物間の相関性は比較的、良好であったことを考慮すると、動物はいずれもヒトにおけるグリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティの相対的評価、予測には充分、有用であると結論できる。

以上の研究結果は、バイオアベイラビリティおよび生物学的同等性試験における実験動物を用いての製剤評価法に有用な基礎的知見を与えるものと考える。

謝　　　辞

本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わりました京都大学、瀬崎仁教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また本研究に御激励と御助言を賜わりました明治薬科大学、緒方宏泰教授、更に国立衛生試験所、元薬品部長、江島昭博士、現薬品部長、内山　充博士に深く感謝致します。また実験に協力頂きました鹿庭なほ子氏、実験動物中央研究所、谷岡功邦氏、安田幸雄氏、山之内製薬（株）、有賀政義氏、玉木憲康氏に感謝致します。

実　験　の　部

第一章　実験の部

1．グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ試験

試料として、溶出速度の異なる４種の市販 125 mg グリセオフルビン素錠（A，B，C，D）を用いた。各錠剤の重量、薬物含量、崩壊時間、溶出速度などの製剤特性はTable I（6 頁参照）に示した。

一夜絶食後、１２名のヒト被験者（年齢 22-51才（平均 31 才）、体重 53-69 Kg （平均 60 Kg）の健康成人男子）[40]、１２頭のビーグル犬（体重 12-14 Kg （平均 12.9 Kg））[41]、７頭のゲッチンゲン種ミニブタ（月例 6-12 ヶ月、体重 16-25 Kg （日本クレア（株））[42]、前田らの方法[12]に従って調製した８羽の胃排出調整家兎（体重 2.5-3.5 Kg）[43]にグリセオフルビン製剤、１錠（家兎に対しては 1/2錠（62.5 mg））を水 200 ml（ヒト）、30 ml （ビーグル犬），100 ml（ミニブタ）、20 ml（家兎）と共に投与した。ヒトは投与後、４時間、ミニブタは６時間、ビーグル犬は実験終了まで絶食とした。家兎は投与後、直ちに軟特殊飼料 50 g （20 gの特殊飼料、CR－S（日本クレア）に水 30 mlを加え、一夜、冷所にて膨潤させたもの[10]）を与え、１０分以内に食べつくさないときは実験から除外した。投与後、経時的に採血し、血清及び血漿試料は分析時まで -15° で保存した。なお、ヒト、ビーグル犬の実験はラテン方格クロスオーバー法、ミニブタ、家兎の実験は乱塊法に従って行い、ヒトは２週間、動物は１週間の休薬期間をおいて製剤の投与を行った。最高血中濃度（C max)及び最高血中濃度到達時間（T max)は，いずれも観測値とし、最終サンプリング時間までのＡＵＣは台形法、無限大時間までのＡＵＣは Wagner の方法[82]により求めた。

2．グリセオフルビン投与量とＡＵＣの関係

一夜絶食後、３名のヒト（健康成人男子）、３頭のビーグル犬、ゲッチンゲン種ミニブタ、胃排出調整家兎に 62.5-250 mgのグリセオフルビンを投与した。試料としては、グリセオフルビンＢ製剤の 1/2錠、１錠、２錠を使用した（但し、イヌに対してはＢ製剤の代わりにＣ製剤を用いた）。実験はいずれも乱塊法に従って行った。薬物投与時の水の量、食餌など他の実験条件は、上記のバイオアベイラビリティ試験のときと同じである。

3．血中グリセオフルビンの定量

ヒト、ミニブタ、家兎の血清または血漿中のグリセオフルビンは、Schwarz らの方法[83]に従い、エーテルで抽出した後、外部標準物質としてクロチアピンを用い、ＥＣＤ検出器付ガスクロマトグラフィで定量した。[40] カラム：5% OV 17-Chromosorb W (3mm x 1 m)、カラム温度： 245°、注入および検出器温度： 260°.

イヌ血漿中のグリセオフルビンおよび 6-demethylgriseofulvin（６ＤＭＧ）は、 Kamimura らの方法[44]に従って定量した。即ち、イヌ血漿 0.5 ml に 0.1N-HCl 1.5 ml、内部標準溶液（1.25 μg/mlの３－メチルインドメタシンメタノール溶液）0.2 mlを加え、5 mlのエーテルでグリセオフルビン、６ＤＭＧを抽出した。エーテル留去後、ジアゾブタンエーテル試液 0.2 ml を加え、６ＤＭＧをブチル化した。試液留去後、残渣を 0.1 ml のベンゼンに溶解し、グリセオフルビン、ブチル化６ＤＭＧをＥＣＤ検出器付ガスクロマトグラフィで分離定量した。カラム： 1.5% Silicone OV 225-Gas Chrom Q（1.4mm x 1 m）カラム温度： 275° 検出器および注入温度： 300°.

4．インドメタシンカプセルの溶出速度とバイオアベイラビリティ

市販 25 mgインドメタシンカプセル２製剤（Ａ，Ｂ）を試料とした。

溶出速度は日局１０パドル法および日局１０崩壊試験装置を用いたOscillating basket法により、pH 7.2リン酸カリウム緩衝液 900 ml中、 37.0 ° で測定した。溶出した薬物量は 320 nm における吸光度を測定して求めた。

In vivo 試験： 一夜絶食した１２名のヒト（年齢 22-54 才、体重 53-78 kg の健康成人男子）及び１０頭のビーグル犬（体重 10.5-18.0 kg)にインドメタシンカプセルを水 200および 30 mlと共にそれぞれ投与した。投与後、経時的に２４時間まで採血し、ヒト血清、イヌ血漿試料は分析時まで-15 ° で保存した。なお、ヒトは投与後４時間、イヌは８時間まで絶食とした。実験はいずれもクロスオーバー法で行い、休薬期間はヒトの場合は２週間、イヌの場合は１週間とした。

ヒト血清中のインドメタシンは Evansの方法[84]に従い、クロロフォルムで抽出した後、2,2,3,3,3-ペンタフルオロ-1- プロピルエステルとし、ＥＣＤ検出器付ガスクロマトグラフィで定量した。[47] カラム： 10 % SP 2250-Supercoport (2 mm x 90 cm)、カラム温度： 260° 、注入および検出器温度： 275° . 一方、イヌ血漿中のインドメタシンは Skellern らの方法[85]に従い、ヘキサン－酢酸エチル混液（4:1)で抽出した後、液体クロマトグラフィで定量した（内部標準物質：フルフェナム酸）。カラム： Zorbax ODS (E.I. Du Pont de Nemours & Co. 4.6 mm x 15 cm),溶媒：アセトニトリル／pH 4.0-0.05M 酢酸緩衝液（1:1).

５．ジアゼパム素錠のバイオアベイラビリティ

溶出速度の異なる市販 5 mg ジアゼパム素錠、４製剤（Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄ）を試料とした。 ジアゼパム製剤の溶出速度は、 pH 4.6 酢酸ナトリウム緩衝液 900 ml 中、日局１０回転バスケット法（ 120 rpm, 37° ）により測定した。薬物溶出量は、245 nmにおける吸光度測定により求めた。

In vivo 試験：　一夜絶食した１２名のヒト被験者（年齢 22-51才、体重 54-69 kg の健康成人男子）及び１２頭のビーグル犬（体重 8.8-11.4 kg）にジアゼパム製剤、１錠を水 200 ml および 75 mlと共にそれぞれ投与した。ヒトは投与後１２０時間、イヌは１０時間まで経時的に採血し、ヒト血清およびイヌ血漿試料は分析時まで -15° で保存した。なお、ヒトは投与後４時間、イヌは１０時間まで絶食を続けた。実験はいずれもラテン方格クロスオーバー法に従って行い、ヒトは１ヶ月、イヌは１週間の休薬期間をおいた。

ヒト血清中ジアゼパムおよびイヌ血漿中の N-desmethyldiazepam はそれぞれベンゼンで抽出した後、ＥＣＤ検出器付ガスクロマトグラフィで定量した。ジアゼパムのＧＣ条件[51]はカラム：3 % OV 17-Gas Chrom Q (4 mm x 1.2 m)、カラム温度：230 °．注入および検出器温度：260 °．N-desmethyldiazepam のＧＣ条件[52]はカラム： 4 % OV 17-Gas Chrom Q (3 mm x 1.2 m) 、カラム温度：260 °．注入および検出器温度：290 °．

第二章　実験の部

１．崩壊試験

日局１０崩壊試験法に従い、４種のグリセオフルビン製剤（Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄ）各６個を試料とし、pH 7.2リン酸ナトリウム緩衝液（0.01M）中、それぞれの崩壊時間を測定した。

２．胃液酸度の影響

ガストロテスト®（中外製薬（株））は、胃液分泌刺激剤である安息香酸ナトリウムカフェイン（ 200 mg/錠）を含む白色錠（２錠）と、pH 3 以下で解離しやすい 50 mgの蛋白結合色素（3-phenylazo-2,6-

diaminopyridine)[86]を含む黄色錠（１錠）とから成る胃液酸度測定剤である。白色錠を投与してから１時間後に黄色錠を投与し、黄色錠投与後、 1.5時間の排泄尿を集め、尿中に排泄された色素量から胃液酸度を間接的に測定する。[58,87] 胃液酸度が高い被験者ほど、胃酸による蛋白からの遊離色素量が増えるため、より多くの色素が吸収され、尿中に排泄される。そのガストロテスト®を用い、グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティ試験に参加した１２名のヒト被験者の胃液酸度を測定し、被験者を胃液酸度低酸群（５名）と強酸群（７名）の２群に区分した。そして、グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティにおける両群被験者間の差について比較、検討した。

３．薬物投与時の服用水量の影響

一夜絶食後、ビーグル犬（n=8 ）は３０および２００mlの水、[41] ミニブタ（n=3, 4）は１００および２００mlの水、[42] 胃内容物排出調整家兎（n=5, 6）は５および５０mlの水[43]を用いて、グリセオフルビンＡまたはＢ製剤、１錠（家兎に対しては 1/2錠）を投与した。投与後の採血時間、食餌など他の実験条件は、バイオアベイラビリティ試験のときと同一である。なお、実験はいずれも乱塊法で行い、休薬期間は１週間とした。

４．食餌の影響

４名のヒト被験者（年齢 32-51才、体重 54-68 Kg の健康成人男子）に対し、一夜絶食後または標準朝食（100 g のパン、20 gのバター、30 gのキュウリ、200 mlの牛乳）摂取１５分後に、グリセオフルビンＡおよびＢ製剤、１錠を水 200 ml と共に投与し、グリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティに及ぼす食事の影響について検討した。[65]
ビーグル犬（ n=8)に対しては、一夜絶食後または固形飼料（ CD-1, 日本クレア） 250 g 給餌３０分後に、グリセオフルビンＡおよびＢ

製剤、1錠を水 30 mlと共に投与した。胃排出調整家兎（n=7)の場合は、一夜絶食後、あるいは 50 g の軟特殊飼料給餌直前に、グリセオフルビンB製剤、 1/2錠を水 20 mlと共に投与した。[43] これらの実験はいずれも乱塊法で行い、休薬期間はヒトは２週間、動物はいずれも１週間とした。投与後の採血時間、食餌など他の実験条件は、いずれもバイオアベイラビリティ試験のときと同一である。

また、家兎（n=7-8)においては、 50 g の軟特殊飼料給餌直前あるいは給餌３０分後に、グリセオフルビンA、B製剤、 1/2錠をそれぞれ投与し、バイオアベイラビリティに及ぼす食餌の影響を食前、食後投与の間で比較、検討した。[43]

５．胃内容物排出速度

試料に用いた 200 mg アスピリン腸溶錠及び 50 w/w %アスピリンを含有する腸溶顆粒はいずれも塩野義製薬（株）製造の「ＥＡ錠シオノギ」®、「ミニマックス」® である。また、硫酸バリウム腸溶錠、エチルセルローズ被覆顆粒の処方はＴable XXIV に示した。硫酸バリウムの錠剤及び顆粒１個の重量はそれぞれ 665 mg, 2.3 mg である。

ヒト、ビーグル犬、ゲッチンゲン種ミニブタ、胃排出調整家兎に対するアスピリンおよび硫酸バリウム製剤の投与条件（投与時の水の量、投与前後の食餌の制限等）はグリセオフルビンのバイオアベイラビリティ試験のときと同一である。

アスピリン腸溶錠はヒト（n=12）、イヌ（n=12）、ミニブタ（n=5)家兎（n=8)にそれぞれ一錠ずつ投与した。アスピリン腸溶顆粒の場合は、ヒト（n=5)、イヌ（n=6)に対してはアスピリン 100 mg 相当量を、ミニブタ（n=5)、家兎（n=8)に対しては 150 mg 相当量を投与した。投与後、ヒトでは、経時的に２４時間まで採尿し、尿中に排泄された総サリチル酸量を Chiouらの方法[88]に従い定量した。ビーグル犬、ミニブタでは投与後２４時間まで、家兎では３１時間まで、経時的に採

血し、血清または血漿中サリチル酸は蛍光法[89]で定量した。アスピリン製剤による胃内容物排出速度は、薬物が血中または尿中に現われるまでの吸収ラグ時間および最高血中濃度到達時間を指標として評価した。

一方、硫酸バリウム製剤の場合は、錠剤は５個（家兎に対しては２個）、顆粒は５０粒を、ヒト（n=3)、イヌ（n=4)、ミニブタ（n=5)、家兎（ n=3（錠剤），n=5（顆粒))に対して投与し、投与後のそれぞれの製剤の胃内残存数をＸ線撮影により経時的に追跡し、胃内容物排出速度を測定した。

Table XXIV. Prescription of an Enteric-coated Tablet and Ethylcellulose-coated granules of Barium Sulfate

	Ingredient	Content (mg) Tablet	Content (mg) Granule
Inner tablet or inner granules	Lactose	217	230
	Corn starch	98	217
	Hydoroxypropylcellulose	7	15
	Cellulose		308
	Barium sulfate	3	
	Magnesium stearate	10	
Subcoating	Barium sulfate	38	
	Talc	55	115
	Ethylcellulose		115
Enteric coating	Hydoroxymethylcellulose-phtalate	25	
Sugar coating	Sugar (powder)	212	
	Total	665	1000

引　用　文　献

1) J.W.Poole, Rev.Can.Biol., suppl., 32, 43 (1973).

2) K.Sasahara, T.Nitanai, T.Habara, T.Morioka and E.Nakajima, J.Pharm.Sci., 69, 261 (1980).

3) W.A.Cressman and D.Sammer, J.Pharm.Sci., 60, 132 (1971).

4) 谷岡功邦、ファルマシア、15, 1026 (1979) .

5) L.K.Bustad and R.O.Mclellan, "Swine in Biomedical Research" Richland, Washington, Battle Memorial Institute, 1966 .

6) W.G.Pond and K.A.Houpt, "The Biology of the Pig", Cornell University Press, Ithaca and London, 1978 .

7) Withey, Rev.Can.Biol., 32, suppl., 21-30 (1973).

8) W.L.Chiou, S.Riegelman and J.R.Amberg, Chem Pharm.Bull., 17, 210 (1969).

9) L.J.Fisher and S.Riegelman, J.Pharm.Sci., 54, 1571 (1965).

10) T.Maeda, H.Takenaka, Y.Yamahira and T.Noguchi, J.Pharm.Sci., 66, 69 (1977).

11) T.Maeda, H.Takenaka, Y.Yamahira and T.Noguchi, J.Pharm.Sci., 68, 1286 (1979).

12) T.Maeda, H.Takenaka, Y.Yamahira and T.Noguchi, Chem.Pharm. Bull., 27, 3066 (1979).

13) T.Maeda, H.Takenaka, Y.Yamahira and T.Noguchi, Chem.Pharm. Bull., 28, 431 (1980).

14) T.Maeda, H.Takenaka, Y.Yamahira, T.Noguchi and T.Noguchi, Chem.Pharm.Bull., 28, 2824 (1980).

15) 前田忠男、武中　宏、山平良也、野口豪、薬剤学、40, 13 (1980).

16) S.H.Crowdy, J.F.Grove and P.McClosky, Biochem.J., 72, 241 (1959).

17) T.R.Bates and J.A.Sequeira, J.Pharm.Sci., 64, 793 (1975).
18) B.Katchen and S.Symchowicz, J.Pharm.Sci., 56, 1108 (1967).
19) S.Symchowicz and B.Katchen, J.Pharm.Sci., 57, 1383 (1968).
20) P.Kabasakalian, M.Katz, B.Rosenkrantz and E.Townley, J.Pharm.Sci., 59, 595 (1970).
21) R.M.Atkinson, C.Bedford, K.J.Child and E.G.Tomich, Nature, 193, 588 (1962).
22) M.Kraml, J.Dubac and D.Beall, Can.J.Biochem.Physiol., 40, 1449 (1962).
23) W.A.M.Duncan, G.Macdonald and M.I.Thornton, J.Pharm. Pharmacol., 14, 217 (1962).
24) M.Kraml, J.Dubac and D.Dwornik, Arch.Dermatol., 87, 179, (1963).
25) J.R.Marvel, D.A.Schlichting, D.Denton, E.J.Levy and M.M.Cahn, J.Invest.Dermatol., 42, 197 (1964).
26) R.M.Atkinson, C.Bedford, K.J.Child and E.G.Tomich, Antbiot. Chemother., 12, 232 (1962).
27) W.L.Chiou and S.Riegelman, J.Pharm.Sci., 58, 1505 (1969).
28) W.L.Chiou and S.Riegelman, J.Pharm.Sci., 60, 1376 (1971).
29) W.E.Barrett, Curr.Ther.Res., 18, 491 (1975).
30) W.E.Barrett, Curr.Ther.Res., 18, 501 (1975).
31) A.B.Straughn, M.C.Meyer, G.Raghow and K.Rotenberg, J.Pharmacokin.Biopharm., 8, 347 (1980).
32) S.Lin, J.Menig and L.Lachman, J.Pharm.Sci., 57, 2143 (1968).
33) M.J.Barnes and B.Boothroyd, Biochem.J., 78, 41 (1961).
34) M.Rowland, S.Riegelman and W.L.Epstein, J.Pharm.Sci., 57, 984 (1968).
35) P.A.Harris and S.Riegelman, J.Pharm.Sci., 58, 93 (1969).

36) W.L.Chiou and S.Riegelman, J.Pharm.Sci., 58, 1500 (1969).
37) W.L.Chiou and S.Riegelman, J.Pharm.Sci., 59, 937 (1970).
38) S.Symchowicz, M.S.Staub and K.K.Wong, Biochem.Pharmacol., 16, 2405 (1967).
39) 日本抗生物質医薬品基準、厚生省、１９７４。
40) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa, M.Koibuchi, T.Sibazaki and A.Ejima, J.Pharm.Sci., 71, 1165 (1982).
41) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa, M.Koibuchi, T.Sibazaki, A.Ejima, N.Tamaki, H.Kamimura, Y.Katougi and Y.Omi, J.Pharm.Sci., 71, 1169 (1982).
42) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa, A.Ejima, Y.Yasuda and Y.Tanioka, J.Pharm.Dyn., 7, 7 (1982).
43) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa and A.Ejima, J.Pharm.Dyn., 7, 630 (1982).
44) H.Kamimura, Y.Omi, Y.Shiobara, N.Tamaki and Y.Katogi, J.Chromatogr., 163, 271 (1979).
45) H.Ogata, N.Aoyagi, K.Kaniwa, T.Shibazaki, A.Ejima, N.Takasugi, E.Mafune, T.Hayashi and K.Suwa, Int.J.Clin. Pharmacol.Ther.Toxicol., 22, 175 (1984).
46) H.Ogata, N.Aoyagi, K.Kaniwa, T.Shibazaki, A.Ejima, N.Takasugi, E.Mafune, T.Hayashi and K.Suwa, Int.J.Clin. Pharmacol.Ther.Toxicol., 22, 240 (1984).
47) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa and A.Ejima, Int.J.Clin. Pharmacol.Ther.Toxicol., 23, 469 (1985).
48) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa, A.Ejima, H.Nakata, J.Tsutsumi, T.Fujita and I.Amada, Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol., 23, 578 (1985).
49) 鹿庭なほ子、緒方宏泰、青柳伸男、江島　昭、今里雄、高橋照孝、

上園祐子、川人康弘、日本薬学会第１０４年会講演要旨集、
p. 687 (1984).
50) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa and A.Ejima, Int.J.Clin. Pharmacol.Ther.Toxicol., 23, 529 (1985).
51) H.Ogata, N.Aoyagi, N.Kaniwa, M.Koibuchi, T.Shibazaki, A.Ejima, S.Tsuji and Y.Kawazu, Int.J.Clin.Pharmacol.Ther. Toxicol., 20, 159 (1982).
52) H.Ogata, N.Aoyagi, N.Kaniwa, M.Koibuchi, T.Shibazaki, A.Ejima, T.Shimamoto, T.Yashiki, Y.Ogawa, Y.Uda and Y.Nishida, Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol., 20, 576 (1982).
53) 松岡 理、「実験動物からヒトへの外挿－その考察と資料－」、ソフトサイエンス社、東京、１９８０、P.330.
54) V.F.Smolen and L.Ball, “Controlled Drug Bioavailability 2: Bioavailability Methodology and Regulation ”, W illey-Intescience Publication, John Willey & Sons, New York, 1984. p.51.
55) 大熊利明、植村俊信、篠岡清秀、石黒浩司、大木俊光、上田芳雄、日本薬学会第１０５年会講演要旨集、P.711 (1985).
56) R.G.Crounse, J, Invest.Dermatol., 37, 529 (1961).
57) R.G.Crounse, Arch.Dermatol., 87, 176 (1963).
58) H.Ogata, N.Aoyagi, N.Kaniwa, M.Koibuchi, T.Shibazaki and A.Ejima, Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol., 20, 166 (1982).
59) H.Ogata, N.Aoyagi, N.Kaniwa, T.Shibazaki, A.Ejima, Y.Takagishi, T.Ogura, K.Tomita, S.Inoue and M.Zaizen, Int. J.Pharm., 23, 277 (1985).
60) H.Ogata, N.Aoyagi, N.Kaniwa, M.Koibuchi, T.Shibazaki, A.Ejima, Y.Watanabe, K. Motohashi, S.Tsuji and Y.Kawazu,

J.Pharm.Dyn., 3, s-17 (1980).
61) P.G.Welling, Pharm.Int., 1, 14 (1980).
62) P.G.Welling, J.Pharmacokin.Biopharm, 5, 291 (1977).
63) A.Melander, Clin.Pharmacokin., 3, 337 (1978).
64) P.G.Welling, Clin.Pharmacokin., 9, 404 (1984).
65) N.Aoyagi, H.Ogata, N.Kaniwa and A.Ejima, J.Pharm.Dyn., 4, 120 (1982).
66) T.R.Bates, M.Gibaldi and J.L.Kanig, J.Pharm.Sci., 55, 191 (1966).
67) T.R.Bates, M.Gibaldi and J.L.Kanig, J.Pharm.Sci., 55, 901 (1966).
68) H.Ogata, T.Shibazaki, T.Inoue and A.Ejima, J.Pharm.Sci., 68, 712 (1979).
69) H.Ogata, N.Aoyagi, K.Kaniwa and A.Ejima, J.Pharm.Dyn., 7, 760 (1984).
70) 前川秀幸、高岸　靖、土居義男、岩本健三、　薬剤学、30, 94 (1970).
71) 前川秀幸、高岸　靖、土居義男、　薬剤学、30, 102 (1970).
72) J.A.Clements, R.C.Heading, W.S.Nimmo and L.F.Prescott, Clin.Pharmacol.Ther., 24, 420 (1978).
73) Y.Yamahira, T.Noguchi, H.Takenaka and T.Maeda, J.Pharm.Dyn., 1, 160 (1978)
74) F.Jamali and E.Axelson, J.Pharm.Sci., 66, 1540 (1977).
75) M.Gibaldi, "Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics" Lea & Febiger, Philadelphia, 3rd edition, 1984, p.36.
76) 佐久間　昭、臨床薬理、13, 205 (1982).
77) C.M.Metzler, Biometrics, 30, 309 (1974).
78) J.G.Wagner, "Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics ",

Drug Intelligence Publications, Hamilton, Ill, 1975, p.301.
79) W.J.Dixon and F.J.Massey, "Introduction to Statistical Analysis", McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 3rd edition, 1969, p.277.
80) H.d A.Heck, S.E.Butrill, N.W.Flynn, R.L.Dyer, M.Anbar, T.Cairns, S.Dighe and B.E.Cabana, J.Pharmacokin.Biopharm., 7, 233 (1979).
81) 鹿庭なほ子、緒方宏泰、青柳伸男、江島　昭、佐久間　昭、薬誌、104, 175 (1984).
82) J.G.Wagner, "Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics", Drug Intelligence Publications, Hamilton, Ill, 1975, p.344.
83) H.G.Schwarz, B.A.Waldman and V.Madrid, J.Pharm.Sci., 65, 370 (1976).
84) M.A.Evans, J.Pharm.Sci., 69, 219 (1980).
85) G.G.Skellern and E.G.Salole, J.Chromatogr., 114, 483 (1975).
86) E.Biancheti and Th.Gerber, Schweiz.Med.Wsch., 88, 736 (1958).
87) 林　慶一、時光直樹、黒田良三、杉浦陽太郎、　治療、43, 1300 (1961).
88) W.L.Chiou and I.Onyemelukwe, J.Pharm.Sci., 63, 630 (1974).
89) T.Shibazaki, T.Nishimura, M.Hara and T.Iijima, Chem.Pharm. Bull., 26, 1737 (1978).