

肝臓表面からの吸収を利用した薬物送達システムの開発とその展開

西田 孝 洋

Development of Drug Delivery System by Utilizing Absorption
from Liver Surface and Its Application

Koyo NISHIDA

*Division of Pharmaceutics, Department of Clinical Pharmacy, Graduate School of Biomedical Sciences,
Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan*

(Received May 1, 2009)

Because it is difficult to achieve local drug activity following administration by the conventional intravenous and oral routes, I sought to develop a new route of administration utilizing drug absorption from the liver surface in order to target that organ. Although direct application to the liver surface should yield local drug distribution, drug absorption from the liver surface has not been reported in the literature. Therefore, we analyzed, as a model, the efficiency of absorption of several organic anions and dextrans of various molecular weights following application to the rat liver surface *in vivo* using a cylindrical diffusion cell. Each compound appeared gradually in the plasma, followed by excretion into the bile and/or urine, indicating the possibility of drug absorption from the liver surface. The absorption process from the liver surface may not involve a specific transport system because dose and transport inhibitors had no detectable effect. In addition, molecular weight was found to be a determinant of absorption through the liver surface. The efficiency of targeting desired region in the liver was enhanced considerably by application to the liver surface, compared to intravenous administration. Moreover, I have obtained several promising results from the application of this new drug delivery system to anticancer drugs and gene therapy. On the other hand, I have also clarified the characteristics of drug absorption from the surfaces of the kidney, stomach, cecum and small intestine, and plan to apply the physiological findings to other fields.

Key words—drug targeting; administration route; absorption; organ surface; physicochemical property

1. はじめに

近年の創薬技術の進歩は目覚ましく、短期間に有用な生物活性を持つ化合物をスクリーニングすることが可能となった。しかし残念なことに、強力な薬理効果を持つ画期的な候補物質が発見されているものの、生体内にほとんど吸収されなかったり、速やかに分解を受けたりするために、開発研究から脱落するケースが多いのが現状である。したがって、薬物体内挙動を制御する薬物送達システム (drug delivery system; DDS) が、今まで以上に注目を集めるものと予想される。

DDS の一般的な手法としては、コーティングや

マイクロカプセルなどの製剤修飾と薬物に化学修飾を施すプロドラッグ化がある。一方、投与経路や形態を工夫する DDS も有用で、腹腔内視鏡や超音波診断装置などの高度な医療技術を応用し、生体内の様々な部位へ薬物を投与することが可能となっている。そこで、がんなどの病巣部局所へ薬物を選択的に送達できる DDS を確立するために、腹腔内投与により肝臓などの腹腔内臓器に薬物を適用し、その臓器表面からの吸収を利用する新規な薬物投与形態の開発を試みた。肝臓は生体内の恒常性維持に重要な役割を果たしており、肝疾患には生命を左右する重篤なものが多いため、肝臓内病巣部位への DDS は非常に意義深い。肝臓がんなどの局所疾患においては、薬物を肝臓内の病巣部位に限定して選択的に集積させることは、薬物の化学的、製剤学的修飾の手法では難しく、現在までのところ外科的切除を上回る薬物療法は少なく、新規投与形態の開発が強く

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻臨
床薬学講座薬剤学研究室 (〒852-8521 長崎市文教町 1-
14)

e-mail: koyo-n@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 21 年度宮田記念学術論文賞受賞を記念
して記述したものである。

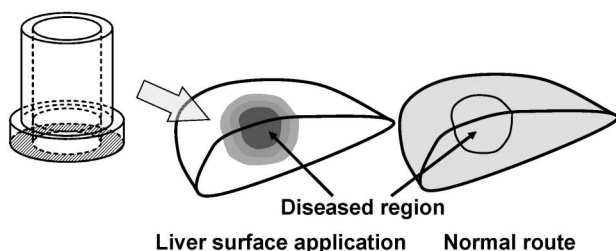


Fig. 1. Schematic Prospected Diagram of Liver Surface Application Showing Possible Difference in Intrahepatic Drug Distribution between Normal Route (p.o., i.v., etc.) and Liver Surface Application

A cylindrical diffusion cell (i.d., 9 mm; area, 0.64 cm²) made by glass was employed to selectively study the absorption of a drug from the rat liver surface. The diffusion cell was attached to the left lateral lobe of the rat liver, using Aron Alpha biocompatible glue. The drug solution was added to the diffusion cell.

望まれている。

静脈内投与や経口投与などの一般的な投与方法では、薬物が全身だけでなく、Fig. 1の模式図に示すように肝臓内の非病巣部位へ一様に分布してしまうために、重篤な副作用が薬物治療の大きな障壁となっている。これらの問題を解決する有効な手段として、腹腔内投与を介して、薬物を肝臓表面から肝細胞内部へ浸透させる投与形態は、Fig. 1の薬物分布予測図に示すように臓器中の病巣部位近傍に薬物が滞留する可能性が高いものと推測される。本総説では、肝臓表面からの薬物吸収を利用した肝臓内病巣部位へのDDS開発において、筆者が取り組んできたこれまでの研究成果、及びその進展、将来性を紹介する。

2. 肝臓表面からの吸収を利用した薬物送達システムの開発

2-1. 肝臓表面投与後の薬物吸収と肝臓内分布

臓器表面からの薬物吸収に関する報告例は、本研究を開始した当時見当たらなかった。そこで最初の段階として、肝臓表面からの薬物吸収性について検討した。Figure 1に示すような円筒状のガラス製拡散セル（内径：9 mm，適用面積：0.64 cm²）を試作して、ラットの肝臓外側左葉表面へ貼付した拡散セルへ薬物溶液（100 μ l）を直接投与することにより、吸収部位を肝臓表面のみに限定した実験系を確立した。肝臓表面からの吸収性を評価するモデルとして用いた水溶性の有機アニオン系色素（phenolsulfonphthalein; PSP, bromphenol blue; BPB, bromosulfonphthalein; BSP）は、肝臓表面投与6時間後

までに投与量の半分以上が吸収され、Fig. 2Aに示すPSPと同様に、いずれの有機アニオン系色素も血漿中へ出現し、胆汁中あるいは尿中へ効率よく排泄された。¹⁾このことから、肝臓表面からの薬物吸収を初めて証明することができた。これらの有機アニオン系色素は、生理的pHにおいてほぼ解離し、水溶性も高いため、消化管からはほとんど吸収されないと考えられる。²⁾したがって、消化管に対して難吸収性薬物の良好な投与経路として、肝臓表面は有用であると考えられる。

肝臓表面からの吸収が最も良好であったPSPについて、拡散セル内残存率の経時変化を調べたところ、肝臓表面からの吸収が一次速度式に従うことが明らかとなった。³⁾また、肝臓表面投与6時間後までのPSPの吸収率に、投与量依存性や有機アニオン輸送阻害剤の影響は認められなかった。³⁾さらに、肝臓表面からの一次吸収過程を組み込んだ2-コンパートメントモデル（Fig. 2B）に基づいて、PSPの血漿中濃度推移を当てはめ計算したところ、fitting curveは実験値とよく一致し（Fig. 2A），得られた一次吸収速度定数（ k_a ）は、いずれの投与量においてもほぼ等しい値を示した。これらの結果より、肝臓表面からの薬物吸収メカニズムに関しては、受動的な輸送が支配的で、特殊な輸送系の寄与は小さいことが示唆された。

一方、各有機アニオン系色素の肝臓表面からの吸収率は、投与薬液へのアルブミン添加量に応じて低下した。アルブミンとの結合率の上昇に伴う、タンパク結合による薬物の見かけの分子量の増大により、肝臓表面からの薬物吸収が大きく抑制されることが明らかとなった。⁴⁾そこで、分子量の異なる4種類のデキストラン（fluorescein isothiocyanate dextran; FITC-dextran, FD-4, FD-10, FD-40, FD-70, 分子量：4400, 9300, 40500, 69000）を用いて、肝臓表面からの吸収性と分子量との関連について検討した



西田孝洋

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 臨床薬学講座 准教授。薬学博士。1991年京都大学大学院薬学研究科博士課程修了後、長崎大学薬学部助手、助教授を経て、2007年より現職。日本薬学会九州支部学術奨励賞、IT活用教育方法研究奨励賞を受賞。研究領域は薬物動態制御学。好きな物はテニス、田舎、読書。

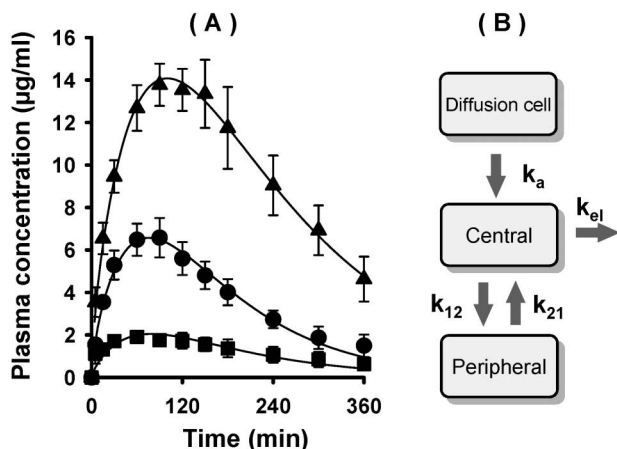


Fig. 2. Plasma Concentration Profiles of Free Phenolsulfonphthalein (PSP) at Different Doses after Application to the Rat Liver Surface (A) and Two-compartment Pharmacokinetic Model (B)

(A) The doses of PSP are 0.3 mg (■), 1 mg (●) and 3 mg (▲). Each point represents the mean \pm S.E. of four experiments. Curves show simulated functions by use of the pharmacokinetic parameters obtained by curve-fitting based on a two-compartment model with first-order absorption from the liver surface. (B) k_a : first-order absorption rate constant, k_{el} : first-order elimination rate constant, k_{12} , k_{21} : first-order transfer rate constant between central and peripheral compartment.

ところ、肝臓表面からの吸収率は分子量に大きく依存した。⁵⁾ 比較的高分子量の FITC-dextran が肝臓表面から吸収され、高い肝臓移行性を示したことより、生理活性ペプチドなどにおいて、作用の持続化や副作用の軽減を目的とする場合、肝臓表面への投与が有効と考えられる。

受動輸送を介した薬物の消化管吸収に関して提唱されている関係式^{6,7)}に基づいて、分子量の異なる各化合物の肝臓表面からの k_a と分子量の平方根の逆数をプロットしたところ、相関性の高い直線関係が得られた。したがって、肝臓表面に投与された薬物は、肝臓表面膜上皮の細孔あるいは細胞間隙といった均一な膜を透過して吸収されるものと推察される。さらに、肝臓表面から吸収される分子量の限界は、回帰式の X 軸切片より、約 7 万程度であると推測された。⁵⁾ この分子量は、これまでに報告されている腹膜における値 (約 5 万)^{8,9)} より大きく、肝臓表面からの良好な薬物吸収性が証明された。

次の段階として、肝臓表面投与後の肝臓内薬物分布に関して、肝臓を Fig. 3A に示すように部位分けして評価した。外側左葉中の投与部位 (拡散セル直下) である site 1 における PSP (Fig. 3B) や FD-4 の肝臓中濃度は、投与部位以外の外側左葉 (site 2)

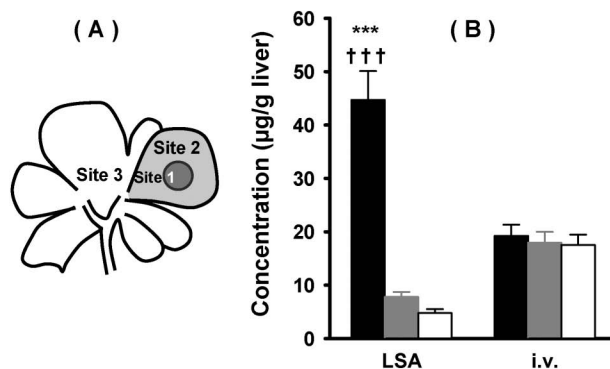


Fig. 3. Scheme of Rat Liver Lobes (A) and Liver Concentration of PSP in Different Regions at 30 min after Application to the Rat Liver Surface or i.v. Administration at a Dose of 1 mg (B)

(A) Site 1: region where diffusion cell was attached, Site 2: applied lobe except for Site 1, Site 3: non-applied lobes. (B) Site 1 (■), Site 2 (■), Site 3 (□). Each bar represents the mean \pm S.E. of at least seven experiments. Significantly different from the result at site 2 (***) or site 3 (†††) ($p < 0.001$).

及び非投与葉 (site 3) と比較して有意に高く推移し、その濃度曲線下面積 AUC は、血漿中の AUC よりはるかに高い値を示した。¹⁰⁾ 一方、静脈内投与の場合、肝臓内各部位の PSP 及び FD-4 濃度に部位差は認められなかった (Fig. 3B)。したがって、肝臓表面投与法による薬物の投与部位近傍での高いアベイラビリティが明らかとなった。

腹腔内の肝臓表面の漿膜上皮は単層扁平上皮細胞からなり、¹¹⁾ 肝実質細胞と上皮との間は結合組織で支持されており、その中に毛細血管が分布している。肝臓表面の漿膜上皮を透過した薬物は、結合組織を拡散する間に毛細血管へ流入するか、直接肝実質細胞へ到達すると思われる。毛細血管へ流入した薬物は、肝臓内の類洞へ分布し、肝臓内の実質細胞へ移行する。したがって、類洞へ到達した薬物の肝臓への移行動態を制御することで、高度な肝臓内病巣部位への DDS が達成できるものと思われる。

2-2. 病態時における肝臓表面からの薬物吸収の変動 肝臓表面投与を実際に適用する肝疾患時には、肝臓表面からの薬物吸収性の変動が予想される。そこで、肝臓表面投与を臨床応用するための基礎的検討として、肝障害を引き起こす CCl_4 あるいは D-galactosamine で処理した肝疾患モデルラットにおける肝臓表面投与後の薬物吸収動態を検討した。¹²⁾ コントロール (未処理群) と比較して、分子量の異なる各モデル化合物の肝臓表面からの k_a については、肝障害群は正常群よりも高い値を示す傾

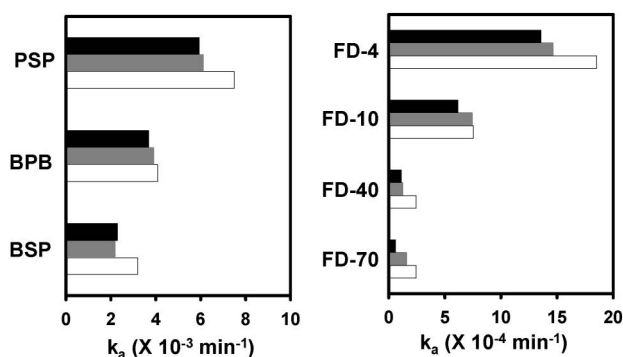


Fig. 4. k_a of Model Compounds with Different Molecular Weights after Application to CCl_4 - or D-galactosamine-treated Rat Liver Surface

Control (■), CCl_4 -treated (▒), D-galactosamine-treated (□). CCl_4 (0.4 ml/kg i.p. $\times 2$ d) was administered at 48 and 24 h prior to the *in vivo* experiments. D-galactosamine (300 mg/kg, i.p. $\times 1$ d) was administered at 24 h prior to the *in vivo* experiments. k_a was obtained by time course of remaining amount of a drug in the diffusion cell.

向が認められ、特に CCl_4 群においてその傾向が顕著であった (Fig. 4)。したがって、肝臓表面からの薬物吸収性に関して、顕著な低下は認められないものの、肝疾患群により若干異なる可能性が示唆された。

さらに、肝切除時への肝臓表面投与法の適用を想定して、肝切除後3及び7日後のラットを用いて検討した。低分子のモデル化合物 (PSP, BSP) については、肝臓表面からの薬物吸収に、極端な低下は認められなかった。一方、高分子物質 (FD-4, FD-10) については、肝切除3日後では肝臓表面からの薬物吸収はコントロールより低下したが、7日後では逆に上昇した。したがって、肝切除に伴う生理学的変化が、肝臓表面からの薬物吸収速度に影響を及ぼしていると考えられる。

2-3. 肝臓表面適用製剤開発の基礎的検討 肝臓への持続的な薬物送達や副作用の軽減を目的として、実際の臨床において薬物の製剤設計を行う場合、肝臓表面近傍での薬物の滞留性や徐放性を向上させることは重要な課題となる。そこで、臨床へ応用可能な肝臓表面適用製剤を開発する基礎的な段階として、肝臓表面からの薬物吸収速度に及ぼす投与薬液の容量や適用面積の影響を検討した。PSP 1 mg を 100, 200, 334 μl の容量で拡散セルを用いて肝臓表面投与した場合、投与容量の増大に伴い血漿中からの PSP の消失は遅延した。また、肝臓表面からの PSP の見かけの透過係数は、拡散セルの適

用面積に係わらずほぼ同じ値となり、薬物吸収特性の観点では、肝臓表面は均一であることが示唆された。¹³⁾ したがって、投与容量及び適用面積により肝臓表面からの薬物吸収速度の予測が可能であると考えられる。一方、適用面積が一定の場合の肝臓表面投与実験の結果とは異なり、実際の腹腔内投与においては、投与容量の増大に伴い薬物吸収に寄与する表面積の増大が予想された。肝臓表面近傍に腹腔内投与する場合、高い粘性、組織 (生体膜) 付着性などを有する添加剤を選択する必要も明らかとなった。

そこで、薬液の粘度を増大させる目的で、粘性添加剤として carboxymethylcellulose や polyvinyl alcohol を添加した製剤条件を検討した。¹⁴⁾ 肝臓表面投与後6時間までの PSP の吸収率は、粘性添加剤存在時では有意に低下しており、粘性の増大により肝臓表面からの薬物吸収を制御できることが明らかとなった。また粘性添加剤の種類により、肝臓表面からの薬物吸収動態への影響が異なる可能性が示された。さらに、吸収促進剤の効果について、saponin などが肝臓表面からの薬物吸収促進効果を有することを明らかにしている。¹⁵⁾

これまでの検討では、肝臓表面からの薬物吸収性や肝臓内分布を詳細に検討するために、吸収部位を拡散セルで限定した実験系を用いた。そこで次の段階として、肝臓表面に対する実際の投与形態を想定した、継続的な微量薬物注入を試みた。^{16,17)} 腹腔内の肝臓表面 (外側左葉) 又は小腸近傍へ PSP を微量連続注入した場合、肝臓表面投与時に速やかな吸収が観察された。2-コンパートメントモデルを想定した当てはめ計算より得られた k_a は、肝臓表面投与の方が、小腸近傍投与時よりも有意に大きな値を示した。さらに、肝臓を投与薬とそれ以外の薬に分けて PSP の濃度を測定したところ、静脈内投与の場合、濃度差はみられなかったが、肝臓表面へ微量薬物注入した場合は、投与薬の PSP 濃度がそれ以外の濃度よりも有意に高い値を示した。腹腔内への瞬時投与の結果¹⁸⁾と比較して、腹腔内からの薬物吸収性及び肝臓移行性が有意に高くなる傾向が、微量連続注入において顕著に認められた。¹⁷⁾ したがって、投与部位及び投与方法を工夫できる微量連続注入によって、投与部位近傍からの薬物吸収が達成でき、薬物の部位選択的な局在化を高められるものと推察される。

3. 抗がん薬や遺伝子医薬品への適用

3-1. 抗がん薬 5-FU の肝臓表面からの吸収動態

本研究をさらに進展させるために、がん化学療法への肝臓表面投与法の適用を目的として、抗がん薬 5-fluorouracil (5-FU) を選択し、基礎的な検討を行った。拡散セルを用いて 5-FU を肝臓表面へ投与したところ、5-FU は肝臓表面から 6 時間までに約 70% が一次速度式に従って吸収され、物性に基いて正確に予測される k_a を示した。¹⁹⁾ 5-FU は肝臓内の拡散セル直下部分に高度に分布し、その他の肝臓内の部位及び他臓器では検出されなかった。¹⁰⁾ したがって、肝臓表面投与法により、抗がん薬の全身移行を低く抑え、肝臓内の投与部位近傍へ選択的かつ持続的に送達でき、肝臓表面投与により抗がん薬の重篤な副作用を軽減できるものと期待される。

次の段階として、腫瘍細胞として walker256 ラット乳がん細胞を肝臓に移植した担がんラットを作製し、同様な 5-FU の肝臓表面からの吸収実験を試みた。肝実験腫瘍に装着した拡散セルからの 5-FU の吸収は良好で、正常ラットと同等の k_a 値が得られた。一方、投与部位周辺 (site 1) の 5-FU 濃度は、正常ラットと比べて 10 倍以上に高まった。

さらに、肝血流を変化させる血管収縮薬 epinephrine 及び血管拡張薬 hydralazine の 5-FU の肝臓内分布への影響を検討した。epinephrine あるいは hydralazine のいずれを併用した場合でも、5-FU の肝臓表面からの吸収速度は、コントロールとほぼ同じ値を示した。肝血流を上昇させた hydralazine 併用時には、肝臓内の 5-FU 濃度に部位差はほとんどみられなかったものの、肝血流を低下させた epinephrine の併用時は、肝臓内の投与部位近傍 (site 1) の 5-FU 濃度は高い値を示した (Fig. 5)。したがって、血流の変化で肝臓表面投与後の薬物分布を制御できる可能性が示唆された。

3-2. プラスミド DNA への肝臓表面投与法の適用 遺伝子医薬品への肝臓表面投与法の可能性を、ホタルルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA を用いて検証した。最初の段階で、マウスの肝臓表面近傍へ腹腔内投与し、安全性が高いプラスミド DNA 単体で投与部位近傍に高選択的に遺伝子発現できることを初めて明らかにした。²⁰⁾ さらに、遺伝子発現効率を高める各種因子 (溶媒、浸透圧、投与速度など) を同定した。^{21,22)} 臨床応用を想定し

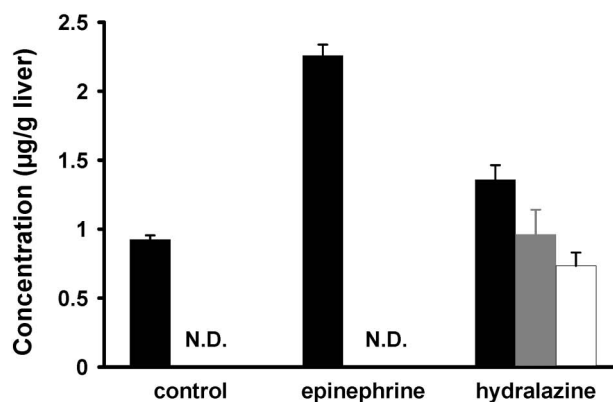


Fig. 5. Liver Concentration of 5-FU at 60 min after Liver Surface Application of 5-FU at a Dose of 5 mg with or without Vasomodulators (Epinephrine or Hydralazine)

Site 1 (■), Site 2 (■), Site 3 (□). N.D.: not detected. Each bar represents the mean \pm S.E. of at least four experiments. Epinephrine (0.01 mg) or hydralazine (2 mg) was treated by concomitant administration with 5-FU by rat liver surface application.

て、マウスの腹部皮膚のみを切開して臓器表面へ適用できる細いカテーテルでも、良好な部位特異的な遺伝子発現が得られることを明らかにした。²³⁾ 高い細胞特異性を与える糖鎖認識機構を具備したキャリアー/プラスミド DNA 複合体を用いることで、安全で特異性が極めて高い遺伝子発現が期待できる。²⁴⁾ 一方、他の臓器表面 (腎臓、²⁵⁾ 胃、²⁶⁻²⁹⁾ 肺、³⁰⁾ 脾臓³¹⁾ へのプラスミド DNA の適用も可能であることを明らかにした。

4. 腹腔内臓器表面からの薬物吸収動態への展開

新規投与形態を開発するための初めての試みとして肝臓に着目したが、臓器表面への薬物の直接投与は、他の腹腔内臓器においても可能であり、これまでに腎臓、^{20,32-34)} 胃漿膜、³⁵⁻³⁷⁾ 盲腸漿膜³⁸⁾ 及び小腸漿膜表面³⁹⁾ からの薬物吸収性や臓器分布についても検討を加えている。

各臓器表面からの薬物吸収特性を比較するため、縦軸に見かけの透過係数 P_{app} 、横軸に分子量の平方根の逆数を、各臓器表面についてプロットしたグラフを Fig. 6 に示している。いずれの臓器においても、 P_{app} と分子量の平方根の逆数との間に高い相関性が得られた。したがって、薬物は各臓器表面から、表面膜上皮の細孔あるいは細胞間隙といった均一な膜を透過して吸収されるものと推測される。回帰直線と X 軸との交点より分子量の限界を求め、Fig. 6 中に示している。腎臓表面から吸収される分子量の上限は約 13 万と計算され、他の臓器表面と

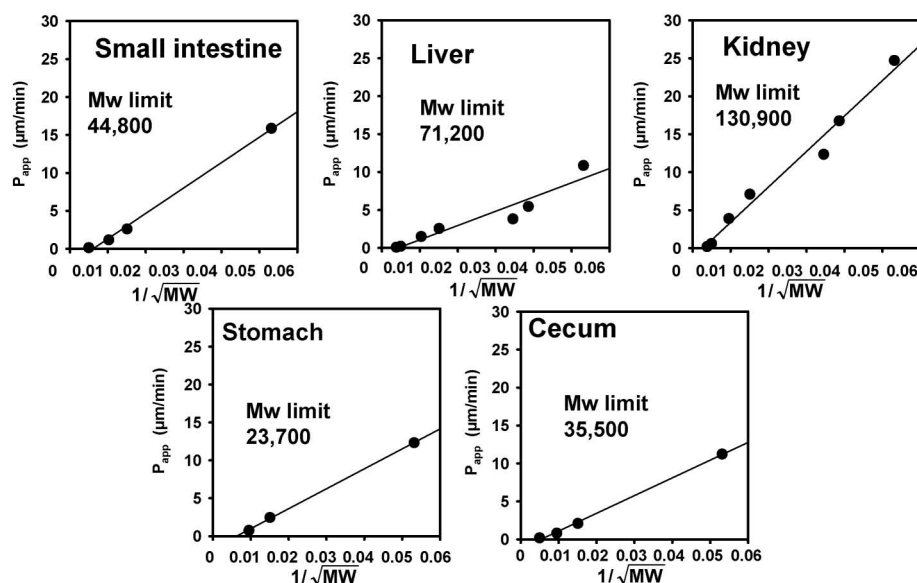


Fig. 6. Relationship between Mw and Apparent Absorption Coefficient P_{app} of Model Compounds with Different Molecular Weights after Application to Several Organ Surfaces in Rats

P_{app} was calculated by multiplying k_a and application volume divided by absorption area. k_a was obtained by time course of remaining amount of a drug in the diffusion cell.

比較して非常に高い値を示した。腹腔内の腹膜における物質輸送は、腹膜の単層膜や毛細血管に存在する細孔などを介することが報告されている。⁹⁾したがって、腎臓表面に存在する細孔が、他臓器よりも高分子を透過しやすい大きさであるという生理学的に興味深い知見が得られた。

卵巣がんや腹膜転移などに対する腹腔内化学療法、及び腹膜透析患者の老廃物交換の場として、腹腔は重要であり、腹腔内臓器表面からの薬物吸収特性は、生理学的見地からも非常に興味深い。そこで、腹腔内投与された薬物の吸収に対する各臓器表面からの吸収の寄与や吸収特性の違いを考慮して、腹腔内投与後の薬物体内動態の再構築を試みた。³⁹⁾各臓器の腹腔内面積の文献値を用いて、⁴⁰⁾腹腔内投与後の薬物吸収に対する各腹腔内臓器の寄与を計算したところ、腹腔内投与後の腹腔からの薬物吸収に、小腸が一番大きく寄与していることが示唆された。一方、腹腔内臓器表面からの薬物吸収動態に関する知見や生理学的な基礎的知見は、近年注目されている腹膜透析における腹膜機能低下の原因究明にもつながると考えられる。そこで、腹膜障害モデルラットに、マーカー物質を腹腔内投与し、その透過性を測定することで、腹膜障害を簡便に評価可能であることを報告している。⁴¹⁾

5. おわりに

肝臓などの臓器表面からの吸収を利用した肝臓内病巣部位への DDS は、従来の既成概念にとらわれないユニークな発想に特色を持ち、生理活性物質やゲノム製剤などの臨床治療薬の適用拡大や新しい疾患に対する治療法の確立に大きく寄与するものと期待される。また、これまでに開発してきた実験・解析系及び得られた基礎的知見は、生理学など多方面の研究分野に応用できる可能性を持っている。

謝辞 本研究は、長崎大学薬学部薬剤学研究室において行われたものであり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました中村純三 長崎大学名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、種々の有益な御助言と御指導を戴いた佐々木均 長崎大学教授、中嶋幹郎 長崎大学教授、向高弘 九州大学准教授、川上茂 京都大学講師、並びに麓 伸太郎 長崎大学助教に深謝します。

また本研究は、多くの大学院生、4年生の御協力のもとではじめて遂行することができたものであり、深く感謝の意を表します。なお、本研究の一部は文部科学省及び日本学術振興会科学研究費、中富健康科学振興財団からの援助によるものであり、併せて感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Nishida K., Sato N., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 867–870 (1994).
- 2) Shanker L. S., Tocco D. J., Brodie B. B., Hogben C. A. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **123**, 81–88 (1958).
- 3) Nishida K., Sato N., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 227–231 (1995).
- 4) Nishida K., Sato N., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1548–1550 (1995).
- 5) Nishida K., Sato N., Sasaki H., Nakamura J., *J. Drug Target.*, **4**, 141–150 (1996).
- 6) Koizumi T., Arita T., Kakemi K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **12**, 413–420 (1964).
- 7) Koizumi T., Arita T., Kakemi K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **12**, 421–427 (1964).
- 8) Hirszel P., Chakrabarti E. K., Bennett R. R., Maher J. F., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **30**, 625–629 (1984).
- 9) Flessner M. F., Dedrick R. L., Schultz J. S., *Am. J. Physiol.*, **248**, F413–F424 (1985).
- 10) Nishida K., Fujiwara R., Kodama Y., Fumoto S., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Pharm. Res.*, **22**, 1331–1337 (2005).
- 11) Nagy J. A., *Kidney Int.*, **56**, S2–S11 (1996).
- 12) Nishida K., Honda T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 988–993 (2003).
- 13) Nishida K., Sato N., Nakakoga Y., Mukai T., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 976–980 (1997).
- 14) Nishida K., Nakakoga Y., Sato N., Kawakami S., Mukai T., Sasaki H., Sakaeda T., Nakamura J., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 397–402 (2000).
- 15) Nakamura J., Horimoto T., Hirayama R., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1049–1051 (2003).
- 16) Nakamura J., Yoshida Y., Mera K., Mukai T., Nishida K., Sasaki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 713–715 (1999).
- 17) Nishida K., Yoshida Y., Mukai T., Kawakami S., Sakaeda T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1341–1346 (2001).
- 18) Nishida K., Amagishi H., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 1032–1035 (1995).
- 19) Kodama Y., Fumoto S., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1049–1052 (2008).
- 20) Kawakami S., Hirayama R., Shoji K., Kawanami R., Nishida K., Nakashima M., Sasaki H., Sakaeda T., Nakamura J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 46–50 (2002).
- 21) Hirayama R., Nishida K., Fumoto S., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1697–1699 (2004).
- 22) Hirayama R., Fumoto S., Nishida K., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2166–2169 (2005).
- 23) Hirayama R., Kawakami S., Nishida K., Nakashima M., Sasaki H., Sakeda T., Nakamura J., *Pharm. Res.*, **20**, 328–332 (2003).
- 24) Kawakami S., Yamashita F., Nishida K., Nakamura J., Hashida M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **19**, 171–190 (2002).
- 25) Hirayama R., Nishida K., Fumoto S., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 181–184 (2005).
- 26) Nakamura J., Fumoto S., Shoji K., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2082–2086 (2006).
- 27) Nishi J., Fumoto S., Ishii H., Kodama Y., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**, 633–639 (2008).
- 28) Nishi J., Fumoto S., Ishii H., Kodama Y., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *J. Gastroenterol.*, **43**, 912–919 (2008).
- 29) Fumoto S., Nishi J., Nakamura J., Nishida K., *Curr. Gene Ther.*, **8**, 187–200 (2008).
- 30) Nakamura J., Fumoto S., Ariyoshi K., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 729–732 (2007).
- 31) Nakamura J., Fumoto S., Kawanami R., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 941–945 (2007).
- 32) Nakamura J., Horimoto T., Hirayama R., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1761–1764 (2003).
- 33) Nishida K., Tomiyama N., Mukai T., Naka-

- shima M., Sasaki H., Nakamura J., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 705–711 (2004).
- 34) Nishida K., Kamenosono M., Kuma A., Fumoto S., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *J. Drug Target.*, **13**, 215–223 (2005).
- 35) Mukai T., Tsurumaru A., Mera K., Nishida K., Nakamura J., Sasaki H., Sakaeda T., *Pharmacy and Pharmacology Communications*, **5**, 609–614 (1999).
- 36) Nakamura J., Tsurumaru A., Mera K., Mukai T., Nishida K., Sasaki H., *Pharmacy and Pharmacology Communications*, **5**, 519–522 (1999).
- 37) Nakamura J., Kobayashi K., Fumoto S., Nishi J., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1049–1053 (2005).
- 38) Nishida K., Nose S., Kuma A., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 683–687 (2004).
- 39) Nishida K., Kuma A., Fumoto S., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 1073–1077 (2005).
- 40) Flessner M. F., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 122–135 (1991).
- 41) Fumoto S., Nakashima Y., Nishida K., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Otsuka N., Nakamura J., *Pharm. Res.*, **24**, 1891–1896 (2007).