局所抗炎症ステロイド剤ハルシノニドの代謝研究

中島栄一, 繁原英治, 堀口正明, 林 了三, 田中 実

三共株式会社 分析代謝研究所 〒140 東京都品川区広町1-2-58

西 垣 隆

三共株式会社 バイオサイエンス研究所 〒140 東京都品川区広町1-2-58

宮 腰 昶 宏

三共株式会社 安全性研究所 〒437 静岡県袋井市堀越717

Key word : halcinonide, topical anti-inflammatory steroid, metabolism, autoradiography, rat liver, rat skin, perfusion.

Biotransformation of Halcinonide, a Systemic Topical Anti-inflammatory Corticosteroid, in Rat.

Eiichi¹⁾ NAKAJIMA, Eiji SHIGEHARA, Masaaki HORIGUCHI

Ryozo HAYASHI and Minoru TANAKA

Analytical and Metabolic Research Laboratories, SANKYO CO., LTD.

Takashi NISHIGAKI

Bioscience Research Laboratories, SANKYO CO., LTD.

Nobuhiro MIYAKOSHI

Laboratory Animal Science & Toxicology Laboratories, SANKYO CO., LTD

Summary

Percutaneous absorption and metabolism of halcinonide (21-chloro-9 α -fluoro 11 β , 16 α , 17 α -trihydroxy-4-pregnen-3, 20-dione cyclic-16, 17-acetal), a synthetic topical antiinflammatory corticosteroid, were studied in rats with the use of ¹⁴C-labeled compounds. Greater parts of the dermally applied radioactivity were retained in the skin as the parent compound and 4.2 to 8.4% of the dose was excreted into urine and feces within 5 days after application. When ¹⁴C-halcinonide was injected intravenously, the parent compound did not occur in urine and bile. However, various kinds of dechlorinated metabolites were found. Cell-free, skin and liver perfusion experiments were carried out to examine the site of metabolism of halcinonide. In contrast to the low metabolic activity seen in the skin, a very rapid detoxification rate in the liver tissue was observed. From these results, it is suggested that halcinonide is metabolized to various kinds of dechlorinated and reduced metabolites, and disappears from the body rapidly after absorption from the skin.

緒言

Halcinonide (21-chloro-9 α -fluoro-11 β , 16 α , 17 α -trihydroxy-4-pregnen-3, 20-dione cyclic-16, 17-acetal) は、皮膚疾患治療剤として開発された合成副腎皮質ステロイドである¹⁾。この化合物は、薬理学的検討によって局所抗炎症効果が高く、全身性副作用が少ないという作用の選択性が示されているが²⁾、このことが皮膚に塗布後の体内動態にどのように関連するかを調べるために、¹⁴C で標識したハルシノニドを用いて局所塗布後の体内動態を調べた。

外用剤の代謝に関する研究は主として製剤学的に多くの検討がなされているが、皮膚における代謝および経皮吸収後の動態についての知見は必ずしも多いとは言えない。このことは、皮膚での代謝活性が相対的に弱いこととともに吸収後の移行量が少ないという困難さによるものと考えられる。

われわれはまず外用後の動態を調べるとともに、吸収後の動態を知るモデルとして静注後の動態を調べ、さらに皮膚灌流法と肝灌流法を用いて代謝を調べた結果、1) ハルシノニドは皮膚貯留性が高く、一部は皮膚で代謝されて脱クロール体を生成する、2) 経皮吸収率が低い、3) 吸収後の代謝が速やかであり、おもに21位-COOH 体として胆汁中に排泄されるという結果が得られたので報告する。

1. 実験方法

1) 標識化合物

(a) ¹⁴C 標識 ハルシノニド (¹⁴C-HAL と略す) (Acetone-2-¹⁴C 標識 21-chloro-9 α -fluoro-11 β , 16 α , 17 α -trihydroxy-4-pregnen-3, 20-dione cyclic-16, 17-acetal) は、米国スクイブ社にて合成されたものを使用した。方法は21位-OH 体に acetone-¹⁴C を付加させ、このものを Cl 化する

¹⁴C-HAL; *: 標識位置

ことによった。

HAL の化学構造ならびに ¹⁴C 標識位置 (*) は、前図に示す通りである。

比放射能は 12.7 μ Ci/mg, 放射化学的純度は 98.77% であった。

(b) ¹⁴C 標識 M1 (¹⁴C-M1 と略す) (acetone-2-¹⁴C-標識 21-hydroxy-9 α -fluoro-11 β , 16 α , 17 α -trihydroxy-4-pregnen-3, 20-dione cyclic-16, 17-acetal 14.5 μ Ci/mg) は、P. Egli の方法³⁾により ¹⁴C-HAL と同様に調製したものを使用した。

(c) ¹⁴C 標識 M7 (¹⁴C-M7 と略す, 14.6 μ Ci/mg) は、¹⁴C-HAL をラット肝ホモジネートとインキュベートし、TLC により単離したものを用いた⁴⁾。

2) 投与薬剤の調製

(a) 静注用薬剤

静注実験には ¹⁴C-HAL 10 mg を N, N-dimethylacetamide 1 ml に溶解したものを用いた。

(d) クリームおよび軟膏製剤の調製

¹⁴C-HAL を含有する軟膏はプラスチックベース 85%, マクロゴール10%からなる親油性基剤を、クリームはプロピレングリコール57%, グリセリンモノステアレート13%を含有する親水性基剤を用いて作成し、¹⁴C-HAL の濃度は両剤とも 1% とした。両剤の比放射能はともに 0.127 μ Ci/mg であった。

3) 動物実験と投与方法

(a) 静注実験

ウイスター今道系 ラット, 雄性, 体重約 200 g のものを用い、1群3匹で実験を行った。投与量は 5 mg/kg とし、¹⁴C-HAL を尾静脈より投与した後3匹を別々の代謝ケージに入れて96時間飼育し、その間経時的に尿、糞を採取した。採取した尿はそれぞれ50%のエタノールで25~50 ml に希釈し、その0.5 ml をとり、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

一方、糞は少量の水を加え約17時間膨潤させたのち、適当量のエタノールを加え、50%エタノール濃度としてポリトロン® 破砕器 (キネマチカジャパン社) で磨砕抽出した。

(b) 経皮吸収実験

用いた動物は上記と同じであり、1群3匹の動

物を使用した。実験は清水らの手法⁵⁾に準じて行った。すなわち、ラットは背部の毛をまずハサミで刈り、次いでエバクレーム® (東京田辺製薬株式会社)を用いて脱毛した。薬剤の塗布は ODT 法 (Occlusive Dressing Technique⁶⁾) にしたがって、50 mg の軟膏またはクリームを 5×4 cm の範囲の皮膚に様に塗布し、その上から二重のサランラップで覆って粘着テープで固定した。塗布後に薬剤が経口的に採取されるのを防ぐために、動物を 1 匹ずつ直ちにボールマンケージに入れ、飲水、飼料は自由に採取できるようにして尿糞を採取した。

薬剤塗布 24 時間後にサランラップをはがし、塗布部位を 50% エタノール綿で 3 回、クロロホルム綿で 1 回拭きとった。

尿糞の採取は塗布後 5 日間行った。

3) 全身オートラジオグラフィ

(a) 静注実験の使用動物、投与量ならびに投与方法は、尿、糞中排泄実験と同様である。動物は投与 1, 3, 24 および 72 時間後に軽くエーテル麻痺し、ヘキサソードライアイスにて凍結した。以後は常法にしたがい、クライオミクローム (LKB 社) にて 50 μ 厚の凍結乾燥切片を作成した。切

片を X 線フィルム (サクラトリチュームタイプ) に 4 週間露出したのち全身オートラジオグラムを得た。

(b) 軟膏塗布ラットは塗布後 1, 6, 24 および 72 時間目に、またクリーム塗布ラットは塗布後 1 および 24 時間目に、未吸収薬剤を拭き取った後凍結した。72 時間例については、あらかじめ塗布後 24 時間目に未吸収薬剤を拭き取った。全身オートラジオグラムの作成は上記と同様に行い、X 線フィルムへの露出は 38 日間とした。

4) 皮膚灌流法

ラットをネンプタール (30 mg/kg, ip) で麻酔後、ヘパリンを静脈より投与した。動物を背位に固定し、腹部正中線に沿って、上は頸部、下は下腹部まで皮膚を切開した。次に、使用する側の皮膚を前肢根部の肩甲下動脈を露出するまで剥がした。上腕動脈、深在上腕動脈を結紮した後に肩甲下動脈にカテーテルを挿入し、その動脈が支配する皮膚の一部約 5×5 cm を速やかに摘出し、直ちに Fig. 1 に示す灌流装置に接続し、灌流を行った。なお、このカテーテルを挿入した肩甲下動脈から皮膚に分布している血管は、0.25% Trypan blue を注入することにより確認した。

Fig. 1. Schematic Outlook of Skin Perfusion System.

灌流液の組成は、同系ラットの新鮮血液 (heparinized) 50 ml および Krebs-Ringer bicarbonate (pH 7.4) 50 ml の混合液中に bovine serum albumin 3 g, glucose 150 mg を溶解したものを用い、37°C、湿度飽和下、流速 1 ml/min で灌流した。

灌流開始後に ^{14}C -HAL を灌流液に 1 mg/100 ml の割合で添加した。灌流終了後、血液に10倍量のエタノールを加えて遠心分離し、上清を減圧下で濃縮して、その一部を TLC により分離した。皮膚は水を加えてポリトロンを用いてホモジナイズした。得られたホモジネートに10倍量のエタノールを加えた後に遠心分離を行った。上清を濃縮後、その一部を TLC によって分離した。

5) 肝灌流

ラットを麻酔下に開腹し、ヘパリン静注後、門脈と胆管にカニューレを挿入し、直ちに肝臓を摘出してから、Miller の変法⁷⁾ にしたがって灌流を行った。

灌流液の組成は前記の通りである。

6) 代謝物の分離と同定

ウイスター今道系雄性ラット、体重 250 g 前後

に ^{14}C -HAL または ^{14}C -M1 を尾静脈注入し、代謝ケージに動物を入れて尿を採取した。投与量は 5 mg/kg である。尿は XAD-2 カラムでろ過後、メタノールでステロイド化合物を溶出させ、減圧濃縮後に代謝物を TLC で分離した。

胆汁は、総胆管カニューレションしたラットに上記薬物を静注し、経時的に採取したものを TLC で展開した。

展開液は次の通りである。

プレート：Kiesel gel TLC プレート (Merck, F-254)

A) ベンゼン：エーテル：メタノール(8:3:1)

B) クロロホルム：アセトン (1:1)

C) ブタノール：酢酸：水 (4:1:1)

上記試料を合成推定代謝物と同時に展開し、それぞれのスポットを UV 照射、 I_2 -gas による発色、Vaniline-硫酸発色、ガスフロー型二次元 TLC スキャナー (Berthold 社) によるアクチグラムならびにオートラジオグラムなどにより検出、同定した。

7) *In vitro* での代謝

ラットを断頭放血し、肝臓または皮膚を摘出し

Fig. 2. Chemical Structures of HAL Derivatives.

た. 1.15% KCl 含有 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) を組織湿重量の3倍量を加えて常法によりホモジナイズし, 4°C, 600 g × 20 分遠心分離後の上清を粗酵素液とした. 酵素反応は ^{14}C -標識化合物を最終濃度 1 mM になるように加えて行った.

生成物は前項の方法にしたがい, 分離同定した.

一部の代謝物については, 投与後の種々の生体試料から分離精製し, mass, nmr により構造解析を行い, 合成代謝物との対比から構造を決定した(木下武, 論文作成中). これらの化合物の構造は Fig. 2 の通りである.

8) 放射能の定量

尿, 胆汁, 組織磨砕液中の放射能は, 一定量をサンプルオキシダイザー (Packard, Model-602) で燃焼し, 液体シンチレーションカウンター (Packard, Model-3255) で測定した.

TLC 上の放射能は, 検出後にシリカゲルをかきとり, バイアルビンに移して上記と同様に放射能の定量を行った.

2. 実験結果

1) 吸収と排泄

(a) 薬物静注投与後の尿, 糞中排泄

^{14}C -HAL 5 mg/kg を静注投与後, 経時的に尿, 糞中排泄率を調べた結果を Table I に示した.

糞中に排泄された放射能は, 投与後 24 時間で 70.9%, 96 時間で 89.0% であった. 尿中には 24 時間後で 9.2%, 96 時間後で 10.3% が排泄された.

(b) 薬剤塗布後の尿糞中排泄

^{14}C -HAL を 1% 含有する軟膏およびクリーム各 50 mg を $5 \times 4 \text{ cm}$ (2.5 mg/cm^2) に塗布した後の尿糞中排泄率を調べた. クリームでは塗布後 24 時間で尿中に 0.3%, 糞中に 1.3% が, また 3 日間ではそれぞれ 0.4%, 3.4% が排泄された. 5 日間の尿糞中排泄の合計は 4.2% (尿: 0.5%, 糞: 3.7%) であった.

一方, 軟膏では塗布後 24 時間で尿中に 0.5%, 糞中に 1.5% が, 3 日間後では各 1.5%, 5.7% が排泄された. 5 日間に尿糞中に排泄された合計は 8.4% (尿: 1.8%, 糞: 6.7%) であり, クリームの約 2 倍であった.

Table I Urinary and Fecal Excretion of Radioactivity after Intravenous Administration (5 mg/kg) of ^{14}C -HAL to Rats.

hrs	% of dose		
	urine	feces	total
0-6	$4.8 \pm 0.85^*$	—	4.79 ± 0.85
6-24	4.4 ± 0.43	70.9 ± 3.38	75.2 ± 3.50
24-48	1.2 ± 0.24	12.3 ± 3.10	13.1 ± 3.50
48-72	0.3 ± 0.02	5.2 ± 0.67	5.5 ± 0.68
72-96	0.1 ± 0.04	0.7 ± 0.70	0.9 ± 0.84
0-96	10.3 ± 1.69	89.0 ± 2.30	99.6 ± 0.91

*: Mean value $\pm$ S.E.

2) 体内分布

(a) ラット静注投与後の全身オートラジオグラフィ

雄性ラット静注投与後の全身分布を Fig. 3-6 に示した.

静注投与後 1 時間 (Fig. 3) では, 最も高い放射能は胃腸管内容物に見られ, 組織では肝臓, ハーダー氏腺にかなり高い放射能が観察され, 次いで副腎皮質, 腎臓, 褐色脂肪にやや低い放射能が示された.

皮下脂肪, 腹部白色脂肪の放射能濃度は褐色脂肪よりやや低かった. 心筋の濃度も同程度であった. また, 骨髄, 骨格筋, 血液, 肺, 脾臓, 胃腸壁などに低い放射能が見られた. 大脳などの中枢神経系組織にも低濃度ながら放射能が検出された.

静注投与後 3 時間 (Fig. 4) では, 胃腸管内容物に最も高い放射能がみられ, 次いで肝臓が高かった. 脂肪組織 (褐色, 白色, 皮下), ハーダー氏腺に低い放射能がみられ, 腎臓, 副腎皮質, 心筋の濃度がそれらに続き, 骨格筋, 血液, 中枢神経系, 胸腺, 肺などの放射能濃度はきわめて低かった.

投与 24 時間後 (Fig. 5) では, 依然として胃腸管内容物に高い放射能が観察された. その他, 副腎皮質, 肝臓, ハーダー氏腺にかなり低い濃度が見られ, 褐色脂肪ではきわめて低い放射能濃度が観察されるのみであった. 上記以外の組織からは放射能は消失していた.

投与 72 時間後 (Fig. 6) では, 依然として胃腸管

Fig. 3. Whole-body Autoradiograms from the Rat at 1 hr after Intravenous Administration of ^{14}C -HAL.

Fig. 4. Whole-body Autoradiogram from the Rat at 3 hrs after Intravenous Administration of ^{14}C -HAL.

内容物にわずかな放射能を認めるのみで、その他の組織の放射能は消失し、検出されなかった。

(b) ラット経皮投与後の全身オートラジオグラフィ

^{14}C -HAL 1%含有クリームおよび軟膏をラット皮膚に塗布したときの全身オートラジオグラムを Fig. 7-10 に示した。

塗布1時間後では、Fig. 7 に示すように、健常

皮膚に塗布した場合、クリーム、軟膏共に塗布部位に高い放射能が認められた。両剤とも実質組織中に放射能は検出されず、わずかな放射能濃度が胃腸管内容物に認められるのみであった。

塗布6時間後においても (Fig. 8), 軟膏を塗布したものでは最も高い放射能が塗布部位で見られ、胃腸管内容物にやや高い放射能が観察された。実質組織では肝臓に痕跡程度の放射能が認め

Fig. 5. Whole-body Autoradiogram from the Rat at 24 hrs after Intravenous Administration of ^{14}C -HAL.

Fig. 6. Whole-body Autoradiogram from the Rat at 72 hrs after Intravenous Administration of ^{14}C -HAL.

Fig. 7. Whole-body Autoradiogram from the Rat at 1 hr after Topical Application of ^{14}C -HAL. A : cream, B : ointment.

Fig. 8. Whole-body Autoradiogram from the Rat at 6 hrs after Topical Application of ^{14}C -HAL-ointment.

Fig. 9. Whole-body Autoradiogram from Rats at 24 hrs after Topical Application of ^{14}C -HAL. A : cream, B : ointment.

られたのみで、それ以外の組織からは検出されなかった。

両剤塗布後24時間 (Fig. 9), 軟膏除去後48時間 (塗布後72時間, Fig. 10) において、いずれも塗布部位に最も高い放射能が、また腸管内容物にやや高い放射能が観察された。しかし、両剤とも塗布24時間では実質組織中に放射能は認められなかった。

3) 静注時の胆汁中および尿中代謝物

(a) 胆汁中代謝物

^{14}C -HAL 静注投与後の放射能の主排泄経路は糞中であり、大部分が胆汁中への排泄に由来していることが推測されたので、総胆管カニュレーションを施したラットに ^{14}C -HAL を静注し、胆汁を採取して代謝物を検索した。

展開した TLC のアクチグラムを Fig. 11 に例

Fig. 10. Whole-body Autoradiogram from the Rat at 48 hrs after ^{14}C -HAL-cream Applied Topically for 24 hrs.

Fig. 11. Contents of Metabolites in Bile after Intravenous Administration of ^{14}C -HAL (A) or ^{14}C -M1 (B) to Rats.

Dose : 5 mg/kg, Sampling time : 0-60 min., TLC solvent system : C

示した。オートラジオグラムあるいはアクチグラムから、主代謝物 B2 と、その他の B1, B3, B4 などの微量代謝物が検出され、B2 成分は胆汁中で約40%を占めていた。このものは合成品との cochromatography によって、M2 すなわち 21 位~COOH 体 (Fig. 2 参照) と一致した。また HAL および M1 などの極性の低い代謝物は検出されなかった。このパターンは、投与初期でも 24 時間後でも変わっておらず、したがって肝臓での代謝は速やかに進み、生成物は効率良く胆汁中に排泄されることが唆された。

さらに、HAL から M2 への代謝は、中間体として 21 位~OH 体 (すなわち M1, Fig. 2 参照) を経由すると考えられることから、M1 の ^{14}C -

標識体をラットに静注 (5 mg/kg) して、胆汁中代謝物を分離したところ、Fig. 11 に示したように 43% の B2 の生成が見られ、TLC のパターンは ^{14}C -HAL 静注の場合ときわめて類似したものであった。

(b) 尿中代謝物

^{14}C -HAL 静注 (5 mg/kg) 後 24 時間の尿中には HAL そのものは検出されず、主代謝物として UA, UB および UC 並びに原点物質が検出された (Table II)。これらは ^{14}C -M1 を投与しても同様に生成されたことから、いずれも 21 位に C1 基を持たない代謝物であると推定された。

これらの構造を解析するために、ラット 50 匹の尿から分離精製した試料を用いて、合成標品と

Table II Contents of Metabolites in Urine within 24 hrs after Intravenous Administration (5 mg/kg) of ^{14}C -HAL or ^{14}C -M1 to Rats.

^{14}C -compound given	% in urinary radioactivity					
	origin	UC	UB (M 4)	UA (M 3)	M 1	HAL
Rf-values	0.0	0.26	0.35	0.39	0.44	0.69
HAL- ^{14}C	21.6	44.8	8.4	20.7	2.1	n.d.
M1- ^{14}C	18.1	41.9	4.5	25.5	5.5	—

TLC solvent system : A

Fig. 12. Mass Spectra of Metabolites of HAL.

もに mass で分析, 同定した. その結果, UA は M3, すなわち 6- β -hydroxy-M1, UB は M4 (Fig. 2 参照) と同定された.

UC は尿中の主代謝物であるが, いずれの合成標品とも TLC 上で一致しなかった. このもののスペクトルを Fig. 12 に示す. 17位側鎖が59マスであることは20位ケト基が還元されていないことを示す. M4 のスペクトルと比較すると, UC は3位ケト基または Δ^4 のいずれかの還元体であると思われるが, 後に述べる ^{14}C -M7 を基質とした肝灌流で UC が生成されないこと, および6位のOH基が Δ^4 -リダクターゼの結合を立体的に阻害することがある⁸⁾などの理由により, 3位ケト基側が還元されたものではないかと考えている.

4) 皮膚における代謝物

(a) *In vivo* での代謝

^{14}C -HAL 軟膏約 50 mg (HAL として 2.5 mg/kg) 塗布後2時間および24時間の皮膚からの未吸収薬剤を除去後, 皮膚を摘出した. その皮膚を水でホモジナイズし, 次にエタノールで抽出, 濃縮後に TLC で代謝物を分離した.

その結果 Fig. 13 に示したように, 大量の HAL とともに少量の代謝物が検出され, これは合成標品 M1 と TLC 上の挙動が一致したので21位-OH 体であると判断した.

(b) *In vitro* での代謝

皮膚ホモジネートとインキュベートした結果, ^{14}C -HAL 以外の代謝物は検出されなかった.

(c) 皮膚灌流での代謝

前記の手術法および装置で皮膚を灌流し, HAL の代謝に関する皮膚組織の寄与を検討した.

肩甲下動脈によって支配されている皮膚内の血管分布を調べるために, 上腕動脈および深在上腕動脈を結紮後に肩甲下動脈より Trypan blue を注入した時の写真を Fig. 14 に示した. 写真から明らかなように, 色素は速やかに皮膚組織にのみ拡散した. この最も良く染色された部位を 5×5 cm の大きさで摘出し, 皮膚灌流系を用い, HAL 1 mg を灌流液に加え, 1時間灌流を行った. 次に全灌流血液と皮膚とを摘出し, それぞれの代謝物を TLC で分離したもののオートラジオグラムを Fig. 15 に示した.

その結果, 灌流液中には大量の HAL が認められ, M1 の生成はきわめて少なかったが, 皮膚組織では大量の HAL とともに, 明らかにM1が生成されていることが確認された.

5) 肝臓における代謝

(a) *In vitro* での代謝

^{14}C -HAL あるいは ^{14}C -M1 を肝臓のホモジネートとインキュベートし, 生成した代謝物のアクチグラムを Fig. 16 に示した. HAL を基質にし

Fig. 13. Actigram of Metabolites in Skin 2 hrs after Percutaneous Administration of ^{14}C -HAL to the Rat.
TLC solvent system : A

Fig. 14. Distribution of Subscapular Artery in the Skin after Perfusion with 0.025 % Trypan Blue.

た場合には、HALは速やかに減少する傾向(反応開始後 10 min で50%以下)を示し、M5、M6および M7 (Fig. 2 参照)が生成した。三者共に Δ^4 の二重結合を示す UV 吸収 (2537 Å) は消失していた。これらを同定するために、大量の肝ホモジネートで非放射性 HAL より M5、M6 および M7 を単離し、gc-mass, nmr および ir などでの分析した結果、いずれも21位にCl基を有する還元体であることが示され、 Δ^4 二重結合を示す吸収の消失が nmr でも確認された。M5 の分子イオン (M^+) は HAL に比べて2多く、 Δ^4 ジヒドロ体であると結論され、また M6、M7 は M^+ が共に

458であり、 Δ^4 および 3 位ケト基が還元されたテトラヒドロ体の二種の異性体であると推定された。これらは合成標品との co-chromatography によっても確認された。

一方、M1 を基質にした場合には、HAL の場合と同様に三種の主代謝物を生じ、これらは合成標品との co-chromatography により、M1 の Δ^4 ジヒドロ体 (M8) ならびに、M1 の 3 位ケト基および Δ^4 -テトラヒドロ体の二種の異性体 (M9 および M10, Fig. 2 参照) であると推定された。

Fig. 15. Autoradiograms of ^{14}C -HAL Metabolites in Prefusate (A) and Tissue (B) from the Skin Perfusion System.

(b) 肝灌流での代謝

^{14}C -HAL を肝臓の灌流系に添加すると、灌流液中の放射能の消失は速やかで、添加後10分ですでに初濃度の10%以下にまで減少していた。このことは HAL の肝組織への取り込みが速やかなことを示している。胆汁中への放射能の排泄は早

く、60分ですでに添加量の7%以上の排泄が見られた。

Fig. 17 は、HAL およびその代謝物の灌流液中での濃度変化を、初濃度に対する%で示したものである。

HAL の消失に伴い、M1, M3, M4, M7, M10

TLC-solvent system: A

Fig. 16. Actigrams of Metabolites formed after 60 min Incubation of ^{14}C -HAL (A) or ^{14}C -M1 (B) in Liver Homogenate.

Fig. 17. HAL and its Metabolites in Perfusate from the Liver Perfusion System after Addition of ^{14}C -HAL.

および原点物質が灌流開始後速やかに生成され、M7 以外は時間とともに漸増した。Cl 基を有する M7 は、一度急峻な生成をみたのち、速やかに消

失した。

(c) 肝灌流系における HAL 代謝物の代謝
 ^{14}C で標識された M1 および M7 を同様に灌流

TLC-solvent system: A

Fig. 18. Autoradiograms of Metabolites in Perfusate of Liver Perfusion System at 45 min after Addition of ^{14}C -M1 (A) or -M7 (B).

し、開始後45分の TLC パターンを Fig. 18 に示した。

M1 添加時の代謝生成物を ^{14}C -HAL の同時点の結果と比較すると、M7 を除いて代謝物の種類はほとんど共通であった。この結果は、M1 が M7 を除くその他の代謝物の前駆物質であることを示唆するものである。また M7 からは M10, M4 が

生成することが TLC 的に確認された。

3. 考察

ラット健康皮膚に塗布された ^{14}C -HAL の放射能は皮膚に滞留し、体内への移行はきわめてわずかであることが示された。この放射能の大部分は、HAL 自体として存在していることから、この薬剤の局所消炎作用は原薬物に由来するものであることが推測される。また、塗布後の皮膚の抽出物中にわずかではあるが、21体-OH 体 (M1) の存在が示された。このことから、脱クロール反応は皮膚組織においても起こることが考えられる。皮膚における代謝は、benzo(a)pyrene⁹⁾ などの芳香族炭化水素の酸化活性や、testosterone¹⁰⁾ の還元反応などが知られているが、脱クロール反応に関しては未知である。したがってまず、皮膚組織における M1 生成を調べるために皮膚のホモジネートでの脱クロール反応の有無を検討したが、代謝物の生成は認められなかった。そこで、皮膚灌流系での代謝を検討した。

皮膚灌流法は、イヌについて Kjaersgaard¹¹⁾ らがすでに方法を確立しているが、ラットについての報告は知られていない。われわれは上記の方法をラットに適用し、灌流液中に ^{14}C -HAL を加えた場合の代謝物の生成を検討した結果、脱クロール反応は intact な皮膚組織で起こることが示唆された。

ステロイド外用薬を使用する場合の問題点は、体内に移行した薬剤に由来する全身的副作用である。皮膚に損傷を与えると体内移行量が増加することが知られていることから、経皮吸収後の HAL の体内での代謝を調べる必要がある。経皮吸収量の少ない化合物の体内運命を追跡することはきわめて大きい困難を伴うことから、われわれは ^{14}C -HAL 静注後の体内運命を追跡することによって経皮吸収後の HAL の代謝を推定した。

^{14}C -HAL 静注後の放射能は大部分が糞中に排泄された。胆汁中および尿中の代謝物を検索した結果は原物質は認められず、数種類の代謝物として体外に排泄されることから、このものの代謝が速やかであることが示された。胆汁中主代謝物は M2 であることから、HAL → M1 → M2 という主代謝経路の存在が推定された。この結果は Kripa-

Fig. 19. Tentatively Proposed Metabolic Pathway of HAL in Rats.

lani¹²⁾らのイヌ胆汁中代謝物と一致し、また Bradlow¹³⁾らのhydrocortisoneのヒトでの主代謝物が21位-COOH体であったことと一致する。

ステロイド系抗炎症薬の代謝は、主として肝臓で行われることが知られている⁸⁾。肝臓の灌流系でHALの代謝を調べた結果、HALは速やかに灌流液から消失し、最初の主なステップとして脱クロル反応をうけてM1となり、M2に至るほか、一部はM1からM3、M4へ至る系が確認された。またM7が明らかに生成されたことは必ずしもすべての代謝物がM1を経由するものではなく、脱クロル反応をうける以前に Δ^4 および3位ケト基が還元される代謝経路の存在することを示唆している。

以上の結果から、HALの経皮吸収後の代謝経路をFig. 19のように推定した。

HALを皮膚に塗布すると、一部は皮膚で代謝

をうけるが、大部分はHALとして皮膚に滞留する。一部は循環血液中に移行するが、その大部分はHALである。体内に移行したHALは肝臓に移行し、脱クロル化され、さらにM2になり、胆汁から排泄される。また一部はM3となって尿中に排泄される。以上が経皮吸収後のHALの主代謝経路と考えられるが、その他にも一部分が脱クロルされる前に還元反応をうけてM5→M7→M10→M4の経路で尿中に排泄されることが示された。主代謝中間体M1の薬理作用は、三坂らの予備的検討(私信)によると原薬物の1/3であるという。またM2はCOOH体であることから容易に体外に排泄されるものと考えられる¹⁴⁾。このように体内に吸収されたHALが速やかに排泄または代謝的不活性化を受けることは、HALが強い局所作用を持つにもかかわらず全身作用が弱い事実と一致する。

文 献

- 1) F.K. Bagatell; Halcinonide: a new potent topical anti-inflammatory drug. *Cutis*, **14**: 459-462 (1974).
- 2) 三坂英一, 飯塚義夫, 堀越大能, 山口 武, 小島高義, 遠藤陽子, 三沢由美子, 角田博子, 馬場義彦, 田中喜一郎; 外用ステロイド halcinonide の抗炎症作用. *応用薬理*, **19**: 75-82 (1980).
- 3) P. Egli; Synthesis of halcinonide-¹⁴C, Squibb's report (1979).

- 4) 中島栄一, 繁原英治, 西垣 隆, 宮越 宏, 堀口正明, 林 了三, 田中 実; 抗炎症性ステロイド, ハルシノナイドの代謝研究, 第10回薬物代謝と薬効-毒性シンポジウム要旨集, p.93 (昭和53年).
- 5) 清水康之, 藪田良子, 島雄周平, 中島栄一, 田中 実; Halcinonide-¹⁴C の経皮吸収後の体内分布について. 日皮会誌, **90**: 1113-1120 (1980).
- 6) J. Garb; Nevus verrucosus unilateris cured with podophyllin ointment. *Arch. Dermatol.*, **81**: 606-609 (1960).
- 7) 田中 実, 服部建治; 肝灌流実験法. 酵素誘導, p.248-253 (高畑英伍, 佐藤哲男監修, 清至書院, 1985).
- 8) 岡田弘二; アンドロゲン, エストロゲン, プロゲステロンの体内動態と投与法. 日本臨床, **36**: 308-313 (1978).
- 9) W. Levin, A.H. Conney, A.P. Alvares, I. Merkatz and A. Kappas; Induction of benzo (a) pyrene hydroxylase in human skin. *Science*, **176**: 419-420 (1972).
- 10) V.H. Price; Testosterone metabolism in the skin. *Arch. Dermatol.*, **111**: 1496-1502 (1975).
- 11) A.R. Kjaersgaard; Perfusion of isolated dog skin. *J. Invest. Dermatol.*, **22**: 135-141 (1954).
- 12) K.J. Kripalani, A. Zein El-Abdin, A. Dean and A.I. Cohen; Biotransformation of halcinonide in dog. *Pharmacologist*, **19**: 240 (1977).
- 13) H.L. Bradlow, B. Zumoff, J. Lee and L. Hellan; Isolation and identification of four new carboxylic acid metabolites of cortisol in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**: 811-818 (1973).
- 14) S. Gordon and J. Morrison; The metabolic fate of triamcinolone acetonide in laboratory animals. *Steroids*, **32**: 25-35 (1978).