ツロブテロールテープ剤の体内動態 (第2報): ラットにおける反復貼付後の吸収, 分布および排泄

村田 光夫, 高木 毅, 奥村 公紀, 高原 栄二
永田 治

Metabolic Fate following a Dermal Application of Tulobuterol Tape (2): Absorption, Distribution and Excretion in Rats after Repeated Applications

Mitsuo MURATA, Takeshi TAKAGI, Kiminori OKUMURA, Eiji TAKAHARA, Osamu NAGATA

Research and Development Division, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

Summary: The absorption, distribution and excretion of ^{14}C -tulobuterol following daily dermal application at 10 mg/kg for 7 days was examined in rats.

1. Blood radioactivity reached a steady state after the 4th dose. After the final dose, blood radioactivity showed maximum values of 506.1 ng eq./ml at 5 hr and disappeared with $T_{1/2}$ of 19.4 hr as also noted for $T_{1/2}$ after a single application (15.7 hr).

2. After the final application, the radioactivity in most tissues was higher than after a single application. Elimination of radioactivity in tissue was basically the same as after a single application.

3. Within 168 hr after the 7th application, urinary and fecal excretion was 53.8 and 36.3% of the dose, respectively. Recovery in urine and feces and from residue in the removed tape was 98.6% of the dose.

Key words: Tulobuterol tape, Repeated dermal application, Absorption, Distribution, Excretion, Rat

緒 言

ツロブテロールテープ (HN-078) は1日1回の投与が可能で, 特に喘息患者に多い朝型発作の予防を目的として開発された貼付型の経皮吸収製剤である。

ツロブテロールをテープ剤としてラットに単回投与後の吸収, 分布, 代謝および排泄については前報で報告しており¹⁾, テープから皮膚へ薬物の約90%が移行すること, 生物学的利用率が経口投与に比べて約10倍高いこと, 組織への移行が良好であることなどを報告した。

本報では反復投与後のラットにおける吸収, 分布および排泄について検討したので報告する。

試験材料および方法

1. 標識化合物

^{14}C -ツロブテロールテープは前報¹⁾で用いたものを使用した。 ^{14}C -ツロブテロールテープの比活性は188 kBq/mg/5 cm², 放射化学的純度は98%以上であった。

2. 実験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット (日本クレアより購入); 7週齢のもの (体重191~213 g) を使用した。購入後のラットは前報¹⁾に準じて予備飼育した後実験に供した。なお, 水および飼料は投与直後から自由に与えた。

3. 投与方法

試験に供する動物は, あらかじめ初回投与前日に腹部の被毛を電気バリカン (Thrive Model 900; 夏目製作所) およびシェーバー (Synchron 100; Braun) を用いて皮膚を損傷しないように剪毛し, さらに脱毛クリーム (エバクレーム S; 東京田辺製薬) にて除毛した。投与に際してはラットをエーテルで軽度麻酔した後, 貼付部皮膚をシェーバーで剪毛し, 除毛した皮膚に ^{14}C -ツロブテロールテープを貼付し, 粘着性伸縮包帯 (アベンド No. 50, 日廣薬品) で固定した。テープは貼付24時間後に剥離し, 残存量測定用として保存した。

なお, 貼付位置を2ヵ所設け, 24時間ごとに貼り替

えた。投与量は 10 mg (1.88 MBq)/kg とした。

4. テープ中薬物残存量の測定方法

剥離後の ^{14}C -ツロブテロールテープは前報¹⁾の方法に従って残存放射能を測定した。

5. 血液中放射能濃度の測定

ラットに ^{14}C -ツロブテロールを 1 日 1 回 7 日間 10 mg/kg 経皮投与し、所定時間に眼窩静脈叢よりヘパリン処理したマイクロピペットを用いて経時的に採血した。採取した血液中放射能濃度を前報¹⁾の方法に従って測定した。

6. データ解析

最終回投与後の血液中濃度の各薬動学的パラメーターは前報¹⁾と同様な方法で算出した。また、単回投与時の血液中濃度推移より非線形最小二乗法 (NONLIN84²⁾) により式(1)に示す 2-compartment モデル式を導き、重ね合せにより反復投与時の血液中濃度推移を予測した。

$$\begin{aligned} C_b = & 759.4 \cdot e^{-0.1032 \cdot (t-0.3512)} + 31.4 \cdot e^{-0.02402 \cdot (t-0.3512)} \\ & - 790.8 \cdot e^{-0.9535 \cdot (t-0.3512)} \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、 C_b はツロブテロールの血液中濃度である。

7. 全身オートラジオグラフィ

ラットに ^{14}C -ツロブテロールを 1 日 1 回 7 日間 10 mg/kg の用量で経皮投与し、所定時間にクロロホルムで麻酔死させた。全身オートラジオグラムの作製は前報¹⁾と同様に行った。

8. 組織内放射能濃度の測定

ラットに ^{14}C -ツロブテロールを 1 日 1 回 7 日間 10 mg/kg の用量で経皮投与し、所定時間後に軽エーテル麻酔下、腹部大動脈より採血死させ各組織を摘出した。なお、消化管は生理食塩液で内容物を洗い出した。各組織中放射能濃度の測定は前報¹⁾の方法に従って行った。

9. 尿糞中排泄率の測定

ラットに ^{14}C -ツロブテロールを 1 日 1 回 7 日間 10 mg/kg 経皮投与し、代謝ケージ内で飼育した。尿糞は所定時間までに自然排泄されたものを投与後 24 時間間隔で採取した。尿および糞中濃度の測定は前報¹⁾に従って行った。

10. 放射能の測定

放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (LSC-1000; Aloka) で行った。クエンチングの補正は外部標準線源 (^{137}Cs) によるチャンネル比法によった。

Fig. 1 Blood levels of radioactivity after repeated dermal applications of a tape containing ^{14}C -tulobuterol in rats at the dose of 10 mg/kg. The line shows the fitting curve according to Eq. (1). Each point with the vertical line represents the mean $\pm$ S.E. for four rats.

放射能濃度はツロブテロール当量に換算し、ng eq./ml, $\mu\text{g eq./ml}$ または $\mu\text{g eq./g}$ として表した。

実験結果

1. 血液中放射能濃度

^{14}C -ツロブテロールを雄ラットに 10 mg/kg 反復経皮投与したときの血液中放射能濃度推移を **Fig. 1** に、各薬動学的パラメーターを前報¹⁾で報告した単回投与時の値とともに **Table I** に示す。

^{14}C -ツロブテロールを雄ラットに 7 日間反復経皮投与したとき、最終回投与後の血液中放射能濃度は 5.0 時間で最高血液中濃度 ($C_{\max}$) 506.1 ng/ml に達し、以後消失半減期 ($T_{1/2}$) 19.4 時間で徐々に減少した。血液中濃度下面積 ($\text{AUC}_{0-\infty}$) は 9853 ng eq.·hr/ml であった。最低血液中放射能濃度は 4 日目以降 133.6~147.3 ng eq./ml とほぼ一定値を示し、4 日以降ではほぼ定常状態に達していると考えられた。単回投与の結果より求めたシミュレーション曲線に実測値はよく一致しており、単回投与時と反復投与時の各薬動学的パラメーター間に統計学的有意差は認められないことから ($P > 0.05$)、反復投与による影響はないものと考えられた。

2. 全身オートラジオグラフィ

^{14}C -ツロブテロールを雄ラットに 10 mg/kg 反復経皮投与時の全身オートラジオグラムを **Fig. 2** に示す。

^{14}C -ツロブテロールを成熟ラットに 10 mg/kg 7 日間反復経皮投与したとき、貼付後 4 時間では貼付部皮膚および腸内容物に高い放射能が、代謝・排泄臓器である肝臓、腎臓および腺組織 (包皮腺、ハーダー氏腺) に比

較的高い放射能が認められた。その後、放射能は徐々に減衰し、貼付後168時間では貼付部皮膚、肝臓および腸内容物に放射能が認められるのみであった。また、放射

能の消失は単回投与時とほぼ同様であり、残留性を示す組織は認められなかった。

Table I Pharmacokinetic parameters of radioactivity in blood after single and repeated dermal applications of ^{14}C -tulobuterol to rats (dose: 10 mg/kg)

	$C_{\max}$ (ng eq./ml)	$T_{\max}$ (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (ng eq.·hr/ml)	$T_{1/2}$ (hr)
Repeated dose (7 th day)	506.1±16.6	5.0±0.6	9853± 510	19.4±3.6
Single dose ¹⁾	558.7±80.4	4.0±1.4	8601±1073	15.7±2.1

Each value represents the mean±S.E. for four rats.

¹⁾ : Data was cited from reference 1.

Table II Radioactivity concentration in tissues after single and repeated dermal applications of ^{14}C -tulobuterol to rats (dose: 10 mg/kg)

Tissue	Tissue concentration (μg eq./ml or g)							
	4 hr after administration		24 hr after administration		48 hr after administration		168 hr after administration	
	1 time	7 time	1 time	7 time	1 time	7 time	1 time	7 time
Blood	0.47± 0.02	0.56± 0.03	0.11±0.01	0.18± 0.01	0.02±0.01	0.04±0.01	N.D.	N.D.
Plasma	0.50± 0.03	0.46± 0.02	0.12±0.01	0.12± 0.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Brain	1.37± 0.06	1.41± 0.17	0.14±0.01	0.11± 0.01	N.D.	0.01±0.01	N.D.	N.D.
Hypophysis	3.09± 0.17	3.22± 0.47	0.23±0.09	0.18± 0.07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Thyroid	1.20± 0.10	1.59± 0.15	0.20±0.03	0.37± 0.09	N.D.	0.13±0.08	N.D.	N.D.
Eye ball	0.71± 0.07	0.47± 0.05	0.07±0.01	0.09± 0.02	N.D.	0.01±0.01	N.D.	N.D.
Submaxillary gland	2.62± 0.15	2.72± 0.47	0.29±0.05	0.28± 0.07	N.D.	0.04±0.01	N.D.	N.D.
Trachea	0.75± 0.07	0.69± 0.06	0.13±0.01	0.20± 0.07	N.D.	0.08±0.03	N.D.	N.D.
Thymus	1.58± 0.07	1.44± 0.10	0.16±0.01	0.14± 0.02	N.D.	0.04±0.01	N.D.	N.D.
Heart	0.79± 0.05	0.96± 0.06	0.12±0.02	0.14± 0.02	N.D.	0.05±0.00	N.D.	N.D.
Lung	3.75± 0.60	5.48± 0.75	0.60±0.02	0.51± 0.12	0.04±0.00	0.13±0.01	N.D.	N.D.
Liver	5.38± 0.36	11.12± 0.75	1.43±0.05	2.61± 0.45	0.51±0.04	1.97±0.20	0.07±0.01	0.47±0.04
Kidney	10.30± 0.45	10.56± 0.65	3.00±0.36	3.45± 0.54	0.92±0.14	2.79±0.33	0.12±0.03	0.58±0.11
Adrenal	3.01± 0.20	3.67± 0.17	0.85±0.10	0.69± 0.06	N.D.	0.07±0.01	N.D.	N.D.
Spleen	2.63± 0.16	2.66± 0.24	0.24±0.03	0.31± 0.02	0.01±0.00	0.11±0.01	N.D.	N.D.
Pancreas	4.72± 0.09	4.79± 0.34	0.80±0.11	0.74± 0.08	0.01±0.01	0.09±0.01	N.D.	N.D.
Muscle	0.60± 0.06	0.54± 0.04	0.07±0.01	0.07± 0.01	N.D.	0.03±0.01	N.D.	N.D.
Muscle (application site)	10.07± 1.74	2.34± 0.48	1.55±0.21	0.74± 0.51	0.01±0.01	0.07±0.01	N.D.	0.03±0.01
Medulla spinalis	1.38± 0.06	1.16± 0.15	0.16±0.02	0.10± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fat	0.36± 0.04	0.42± 0.08	0.08±0.01	0.08± 0.01	N.D.	0.05±0.01	N.D.	0.01±0.01
Prostate	2.35± 0.34	1.53± 0.18	0.24±0.03	0.33± 0.06	0.03±0.00	0.08±0.01	N.D.	N.D.
Testis	2.09± 0.12	1.61± 0.15	0.26±0.02	0.18± 0.02	N.D.	0.04±0.00	N.D.	N.D.
Seminal vesicle	3.25± 1.04	1.62± 0.20	0.33±0.04	0.43± 0.10	0.02±0.00	0.07±0.02	N.D.	N.D.
Urinary bladder	5.05± 1.01	5.01± 1.02	0.56±0.09	0.60± 0.08	0.04±0.01	0.09±0.02	N.D.	0.02±0.01
Bone	0.72± 0.08	0.78± 0.10	0.09±0.02	0.08± 0.01	N.D.	0.05±0.01	N.D.	N.D.
Skin	0.93± 0.07	0.81± 0.06	0.18±0.01	0.24± 0.04	0.05±0.01	0.14±0.02	N.D.	0.04±0.01
Skin (application site)	183.61±21.74	177.60±38.84	84.04±8.23	97.54±21.22	3.82±1.18	17.52±6.03	0.62±0.15	2.42±0.32
Sciatic nerve	0.89± 0.18	0.74± 0.08	0.16±0.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Gullet	0.78± 0.03	1.07± 0.11	0.13±0.02	0.20± 0.02	0.01±0.00	0.05±0.02	N.D.	N.D.
Stomach	1.80± 0.49	1.49± 0.20	0.23±0.04	0.42± 0.09	0.02±0.01	0.06±0.01	N.D.	N.D.
Small intestine	18.49± 3.37	13.67± 1.68	2.69±0.24	2.22± 0.27	0.27±0.05	0.48±0.05	N.D.	0.07±0.01
Large intestine	2.99± 1.72	3.41± 1.52	2.37±0.29	2.74± 0.37	0.15±0.02	0.37±0.04	N.D.	0.06±0.01

Each value represents the mean±S.E. for four rats.

N.D. : Not Detected

Fig. 2 A: Whole-body autoradiograms at 4 and 24 hr after repeated dermal applications of ^{14}C -tulobuterol to rats (10 mg/kg)
 1; Harderian gland 2; Trachea 3; Mandibular gland 4; Thymus 5; Blood in heart 6; Heart 7; Lung 8; Liver

B: Whole-body autoradiograms at 48 and 168 hr after repeated dermal applications of ^{14}C -tulobuterol to rats (10 mg/kg)
 9; Adrenal 10; Kidney 11; Skin(application site) 12; Testis 13; Preputial gland 14; Urinary bladder(urine)
 15; Intestinal contents

3. 組織内放射能濃度

^{14}C -ツロブテロールを雄ラットに 10 mg/kg 反復経皮投与したときの組織内濃度を前報¹⁾で報告した単回投与時の結果とともに Table II に示す。

^{14}C -ツロブテロールを成熟ラットに 10 mg/kg 7 日間反復経皮投与したときの組織内濃度は、貼付後 4 時間では、単回投与と同様、貼付部皮膚でもっとも高く、ついで小腸、肝臓、腎臓、肺、膀胱、脾臓、副腎、大腸、下垂体、顎下腺、脾臓、貼付部筋肉の順で高濃度であった。放射能の分布傾向は単回投与時とほぼ同様であった。また、各組織からの消失推移はほとんどの組織で単回投与時とほぼ同様であり、投与後 168 時間では貼付部位（皮膚、筋肉）、消化管、肝臓、腎臓、膀胱および脂肪、皮膚にわずかな放射能が認められたのみであった。

4. 尿、糞中排泄

^{14}C -ツロブテロールを雄ラットに 10 mg/kg 反復経皮投与したときの尿、糞中排泄率を Fig. 3 に示す。

^{14}C -ツロブテロールを成熟雄ラットに 10 mg/kg 7 日間反復経皮投与したとき、排泄率は 2 日目以降投与期間を通じてほぼ一定であり、それぞれ尿 50.4~51.6%、糞 32.9~34.7% であった。また最終回投与後 7 日目までの貼付量に対する尿および糞中排泄率は、それぞれ 53.8%, 36.3%, 尿 + 糞 90.1% であり、単回投与時¹⁾（尿 50.8%, 糞 35.4%, 尿 + 糞 86.2%）とほぼ同様であった。テープ中薬物残存率は 8.5~11.4% と投与期間を通じてほぼ一定であり、単回投与時¹⁾（13.4%）と差は認められなかった。総貼付量に対する回収率（尿、糞およびテープ中薬物残存の合計）は 98.6% であり、単回投与時（99.5%）と同様回収は良好であった。

Fig. 3 Cumulative excretion of radioactivity in urine and feces after repeated dermal applications of ^{14}C -tulobuterol to rats (10 mg/kg)
Each point with the vertical line represents the mean $\pm$ S.E. for four rats.

考 察

ツロブテロールをテープ剤として反復投与後の体内動態を明らかにする目的で、ラットに 7 日間反復経皮投与後の吸収、分布および排泄について検討した。

^{14}C -ツロブテロールを雄ラットに 7 日間反復経皮投与したとき、最低血液中放射能濃度は 4 日目以降 133.6~147.3 ng eq./ml とほぼ一定値を示し、4 日目以降ではほぼ定常状態に達していると考えられた。最終回投与後の血液中放射能濃度推移は単回投与時に比べて AUC が若干大きかった。しかしながら単回投与時の結果より予測した反復投与時のシミュレーション曲線と実測値がよく一致したこと、および単回投与時と反復投与時で各パラメーター間に統計学的に有意な差はなかったことから反復投与による影響はないものと考えられた。

7 回投与後 24 時間および 48 時間後の各組織内濃度は単回投与時と比べて高い傾向を示した。投与 168 時間後においても貼付部位、肝臓、腎臓、脂肪および皮膚に放射能が認められたが、消失の推移は単回投与後とほぼ同様であった。全身オートラジオグラフィーの結果も組織内濃度の結果をよく反映しており、特定の組織への放射能の残留は認められなかった。以上の結果から、反復経皮投与による組織への残留性はないと考えられた。

7 日間反復投与後において尿、糞への排泄率は単回投与時と変わらず、反復投与により排泄挙動の変動は認められなかった。また、貼付量の 98.6% が最終回投与後 168 時間までに尿、糞およびテープ中に回収され、単回投与時（99.5%）と同様に体内での残留はないと考えられた。

ラットに ^{14}C -ツロブテロールを反復経皮投与し、24 時間ごとに剝離したときのテープ中薬物残存率は 8.7~15.8% と投与期間を通じてほぼ一定であり、単回投与時と差は認められなかった。このことから、反復経皮投与による皮膚での吸収率の低下はないと考えられた。

ツロブテロールテープ同様、全身適用を目的とした貼付剤であるニトログリセリンテープ反復貼付時では、血漿中ニトログリセリン (NTG) の $T_{1/2}$ が単回投与時の 2.6 倍に延長すること、単回投与時の排泄が緩慢であることが報告されており、これは NTG が代謝され低硝化物あるいはグリセリンとなり、体内に取り込まれるかまたは体内で長く循環することが原因と考えられている³⁾。ツロブテロールテープ貼付時においてはこのような残留性は認められず、安全な製剤であると考えられた。

今回、 ^{14}C -ツロブテロールを成熟雄ラットに 7 日間反復経皮投与後の血液中放射能濃度推移、組織内濃度および尿糞中排泄について検討した結果、体内への残留傾向は認められなかった。さらに、 ^{14}C 標識塩酸ツロブテロール反復経口投与時においても、反復投与が塩酸ツロブ

テロールの吸収, 分布および排泄に及ぼす影響はほとんどないものと推察されている⁴⁾。したがって, ツロブテロールの反復投与が薬物動態に及ぼす影響はほとんどないものと考えられた。

要 約

¹⁴C-ツロブテロールをラットに反復経皮投与し, 吸収, 分布および排泄について検討した。

1) 雄性ラットに ¹⁴C-ツロブテロールを 10 mg/kg 1 日 1 回 7 日間反復経皮投与したときの血液中放射能濃度の最低濃度は 4 日目以降ほぼ一定しており, 定常状態に達していると考えられた。最終回投与後は 5 時間で $C_{\max}$ 506.1 ng eq./ml に達した。このときの $T_{1/2}$ は 19.4 時間であり, 単回投与時 (15.7 時間) とほぼ同等であった。

2) 7 日間反復投与後 4 時間では単回投与時同様貼付部皮膚, 肝臓および腎臓に比較的高い放射能が認められた。各組織中放射能濃度は単回投与後に比べて高い傾向を示したが, 血液中濃度と同様な推移で減少し, 残留性を示す組織は認められなかった。

3) 尿および糞中への放射能の排泄は投与期間中一定していた。7 日間反復投与後 168 時間までに尿, 糞へ

それぞれ 53.8%, 36.3% 排泄された。総回収率 (尿, 糞およびテープ中薬物残存の合計) は 98.6% であった。

謝 辞: 本研究に関して, ¹⁴C-ツロブテロールテープの作製に技術的指導を戴きました日東電工株式会社 仲野善久, 宇野沢宣司両氏に深謝致します。

文 献

- 1) 村田光夫, 高木 毅, 奥村公紀, 高原栄二, 永田 治: ツロブテロールテープ剤の体内動態 (第1報) ラットにおける単回貼付後の吸収, 分布, 代謝および排泄。薬物動態, **11**: 614-626 (1996)
- 2) Statistical Consultants Inc.: PCNONLIN and NONLIN84: Software for the statistical analysis of nonlinear models. *Am. Stat.*, **40**: 52 (1986)
- 3) 井津源市, 堀越由美子, 入江 毅, 夏目則男, 三宅崇捷, 古田康彦, 脇坂芳文, 阿武木秀夫, 橋本 豊, 石橋正兀: ラットにおけるニトログリセリンテープ (NT-1) 投与時のニトログリセリンの吸収, 分布, 代謝および排泄—経皮吸収後の体内動態—。医薬品研究, **18**: 25-44 (1987)
- 4) 上坂征夫, 荒谷隆幸, 西出和憲, 越中栄一, 新田啓一, 山本 譲: *o*-Chloro- α -(*tert*-butylaminomethyl)benzylalcohol hydrochloride (C-78) の生体内運命 (第1報) ラットにおける吸収, 分布および排泄について。医薬品研究, **7**: 548-557 (1976)