Ipratropium bromide のラットおよび ウサギにおける生体内動態

太田 真一, 檜垣 洋子, 柳田 由紀

吉田知江里, 藤野 明治

株式会社野村生物科学研究所 〒247 神奈川県鎌倉市梶原4-7-1

佐藤 順一, 清木 護, 大場 丈夫

帝人株式会社 生物医学研究所 〒191 東京都日野市旭が丘4-3-2

Key words: Ipratropium bromide, Intranasal administration, Absorption, distribution and excretion, Rats and rabbits

Metabolic fate of Ipratropium bromide in rats and rabbits

Shinichi OHTA, Youko HIGAKI, Yuki YANAGIDA,

Chieri YOSHIDA and Akiharu FUJINO

NRI Life Science 4-7-1 Kajiwarra, Kamakura, Kanagawa, 247, Japan

Junichi SATO, Mamoru KIYOKI, Takeo OHBA

Teijin Limited, Institute for Bio-medical Research,

4-3-2 Asahigaoka, Hino, Tokyo, 191, Japan

Summary

Ipratropium bromide (3 α -hydroxy-8-isopropyl-1 α H, 5 α H-tropanium bromide($\pm$)-tropate) labeled with ^{14}C was administered orally, intranasally and intravenously to rats and rabbits (5 mg/100 $\mu\text{Ci/kg}$) to examine the absorption, distribution and excretion.

The radioactivity in rat blood reached to the highest level of 0.024 $\mu\text{g/ml}$ at 3 hr after oral dosing, 0.025 $\mu\text{g/ml}$ at 4 hr after oral dosing under anesthesia and 0.072 $\mu\text{g/ml}$ at 1 hr after intranasal dosing. The area under the blood concentration-time curve (AUC) within 24 hr after dosing were 0.273 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after oral dosing, 0.257 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after oral dosing under anesthesia, 0.622 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after intranasal dosing and 8.559 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after intravenous dosing.

The cumulative urinary excretion in rats was 3.2~5.9% of dose after oral dosing and 10.2% of dose after intranasal dosing.

The concentration in almost all tissues of rats reached to the highest level during 1 to 6 hr after intranasal administration and 1.9% of administered radioactivity was retained in nasal cavity at 6 hr after intranasal administration.

The plasma protein binding in rats was 27.5%, 29.6% and 78.6% at 1, 6 and 24 hr after intranasal dosing, respectively and less than 10% of ^{14}C -Ipratropium bromide was bound to the plasma protein during *in vitro* experiment.

The peak blood concentration in rabbits were 0.064 $\mu\text{g/ml}$ at 1 hr after oral dosing and 0.022 $\mu\text{g/ml}$ at 4 hr after intranasal dosing. The AUC within 48 hr after dosing were 1.105 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after oral dosing, 0.436 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after intranasal dosing and 7.141 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ after intravenous dosing.

The cumulative urinary excretion in rabbits was 12.7% of dose after intranasal dosing.

The plasma protein binding in rabbits was 24.5%, 29.7% and 57.1% at 1, 6 and 24 hr after intranasal dosing and less than 10% of ^{14}C -Ipratropium bromide was bound to the plasma protein during *in vitro* study.

緒言

Ipratropium bromide (3 α -hydroxy-8-isopropyl-1 α H, 5 α H-tropanium bromide(±)-tropate) は、西ドイツ C.H. Boehringer Sohn 社で開発された副交感神経遮断作用を有する気管支収縮予防剤で、すでに臨床で使用されている。

さらに Ipratropium bromide は、その抗コリン作用に基づき、通年性鼻アレルギー^{1,2)}、血管運動性鼻炎^{3,4)}および急性上気道炎⁵⁾に起因する水性鼻汁の分泌抑制に効果のあることも報告されている。この効果は、鼻腔内投与において認められているが、Ipratropium bromide の鼻腔内投与における生体内動態は知られていない。

今回著者らは、¹⁴C で標識した Ipratropium bromide を用い、ラットおよびウサギの鼻腔内投与における生体内動態試験を行い、知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 被験物質

¹⁴C-Ipratropium bromide (比放射能 129.5 μ Ci/mg, 構造式 Fig. 1) および非放射性 Ipratropium bromide は、西ドイツ C.H. Boehringer Sohn 社より入手して用いた。

¹⁴C-Ipratropium bromide の放射化学的純度は、薄層クロマトグラフィー (プレート: Silica-gel 60 F₂₅₄ (Merck 社), 展開溶媒: CHCl₃·CH₃OH·HCOOH (25:8:4, v/v)) により、99%以上であった。

2. 実験動物

動物は、Wistar 系雄性ラット (7~8 週齢, 静岡県実験動物農業協同組合) および New Zea-

land white 系雄性ウサギ (体重 2 kg 前後, 静岡県実験動物農業協同組合) を用いた。各動物は、固形試料および水道水を自由に採取させ、投与 16 時間前より絶食し、投与後 6 時間より給餌した。

3. 投与被験物質の調製および投与方法

1) 経口投与

¹⁴C-Ipratropium bromide を適宜非放射性 Ipratropium bromide で希釈した後、生理食塩液に溶解し、非麻酔下またはハロセン (フローセン®、武田薬品工業株式会社) 吸入麻酔下、ゾンデを用いて 5 mg/100 μ Ci/5 ml/kg を強制経口投与した。

吸入麻酔装置は、V. Bmark II (東京五十嵐医科工業株式会社) を用い、20%酸素混合笑気ガス気流 (流速 2l/min) 中に 0.75% のハロセンを混合したものを吸入させて行った。麻酔の完了は 5~10 分、覚醒は約 5 分以内であった。

2) 鼻腔内投与

¹⁴C-Ipratropium bromide を適宜非放射性 Ipratropium bromide で希釈した後、生理食塩液に溶解し、ハロセン吸入麻酔下、マイクロピペット (Eppendorf 社) を用いて 5 mg/100 μ Ci/0.1 ml/kg を鼻腔内投与した。

3) 静脈内投与

¹⁴C-Ipratropium bromide を適宜非放射性 Ipratropium bromide で希釈した後、生理食塩液に溶解し、ラットではエーテル麻酔下、大腿部静脈内に 5 mg/100 μ Ci/1 ml/kg, ウサギでは麻酔せずに耳介静脈内に 5 mg/20 μ Ci/0.25 ml/kg をそれぞれ投与した。

4. 放射能の測定

血液、糞ホモジェネート、組織および組織ホモジェネートは、Protosol® (NEN 社) 1~2 ml を加えて可溶化し、30%過酸化水素水 100~300 μ l を加えて脱色後、シンチレーター (Insta-Gel®, Packard 社) 10 ml および 0.5 N 塩酸 1.5 ml を加えて測定試料とした。血漿、尿は適宜蒸留水で希釈した後、蒸留水 100 μ l, シンチレーター 5ml を加えて測定試料とした。各測定試料は液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb® 460 CD, Packard 社) を用いて放射能を測定し、計数効率、クエンチングなどの補正は外部線源法で行った。また、バックグラウンドを差し引いた放射能測定

Fig. 1. Chemical structure of Ipratropium bromide

*: labeled position with ¹⁴C

値が 20 dpm の場合を測定限界とした。

5. 計算および統計処理

すべての測定値は、コンピューターにより計算処理を行い、棄却検定 (Smirnov 法) により棄却されたものを除いて、平均および標準誤差を求めた。平均値の差の検定については、Student の t 検定を行った。また、血液中濃度曲線下面積 (AUC) は、台形公式により算出した。

6. ラットにおける生体内動態

1) 血液中濃度

雄性ラットに、麻酔下または非麻酔下に ^{14}C -Ipratropium bromide を経口投与し、投与後経時的に尾静脈より採血し、血液中濃度を測定した。

また、別の雄性ラットに麻酔下 ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与し、経口投与後と同様に採血し、血液中濃度を測定した。

AUC の比較により、経口および鼻腔内投与による吸収率を求めるため、雄性ラットに ^{14}C -Ipratropium bromide を静脈内投与し、投与後経時的に採血し、血液中濃度を測定した。

2) 尿糞中排泄

雄性ラットに、麻酔下または非麻酔下に ^{14}C -Ipratropium bromide を経口投与し、直ちにガラス代謝ケージに収容した。また、別の雄性ラットに麻酔下 ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与し、直ちにガラス代謝ケージに収容した。投与後経時的に尿、糞を採取し、それぞれ排泄率を測定した。

3) 組織内濃度

雄性ラットに麻酔下 ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与し、投与後15分、1、2、6、24および96時間にエーテル麻酔下腹大動脈より放血致死させ組織を採取し、組織内濃度を測定した。採取した組織は、血液、血漿、脳、下垂体、眼球、気管、甲状腺、顎下腺、胸腺、心、肺、肝、脾、膵、腎、副腎、精巣、精巣上体、精囊腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、胃、小腸、大腸、皮膚、筋肉、精巣上体部脂肪、胃腸内容物、鼻腔口腔洗浄液 (鼻腔および口腔を生理食塩液で洗浄した液) および洗浄後の頭部である。

4) 全身オートラジオグラフィ (ARG)

雄性ラットに麻酔下 ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与し、投与後15分、1、6、24および

96時間に1匹ずつクロロホルム吸入による殺処置後、ドライアイスアセトン中で凍結し、ミクロトームで $40\ \mu\text{m}$ に薄切、凍結乾燥した。常法に従いオートラジオグラムを作製した。

5) 血漿蛋白結合性

3) で採取した血漿のうち投与後1、6および24時間のものを用い、限外濾過法により血漿蛋白結合率を測定した。また、非投与の雄性ラットから採取した血漿に ^{14}C -Ipratropium bromide を添加し、0.005、0.015、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した添加血漿を用いて、限外濾過法および超遠心法により血漿蛋白結合率を測定した。

限外濾過法は、セントリフリー MPS-3 (アミコン社) を用い、試料約 1 ml を入れて遠心 (3000 rpm $\times$ 30 min) し、得られた濾液中の濃度を遊離薬物濃度として蛋白結合率を計算した。限外濾過膜に対する薬物の吸着を考慮するため、等張緩衝液 (0.15 M NaCl, 0.005 M Na-Phosphate buffer (pH 7.4)) に ^{14}C -Ipratropium bromide を添加したものを同時に濾過した。

超遠心法は、試料を超遠心 (55000rpm $\times$ 5hour) した後、液面より深さ約 1 cm ずつ分取し、各分画の放射能濃度および蛋白濃度を測定した。測定値の関係から、蛋白濃度 = 0 における遊離薬物濃度を推定し、蛋白結合率を計算した。

7. ウサギにおける生体内動態試験

1) 血液中濃度および尿糞中排泄

雄性ウサギに ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与し、投与後経時的に耳介静脈より採血し血液中濃度を測定した。このウサギを金属代謝ケージ内で飼育して投与後経時的に尿、糞を採取し、それぞれ排泄率を求めた。

また、別の雄性ウサギに ^{14}C -Ipratropium bromide を非麻酔下経口および静脈内投与し、投与後経時的に耳介静脈より採血し、血液中濃度を測定した。

2) 血漿蛋白結合性

1) の鼻腔内投与したウサギから投与1、6および24時間に別途に注射筒を用いて少量採血し、分取した血漿を用い、限外濾過法により血漿蛋白結合率を測定した。また、非投与の雄性ウサギから採取した血漿に ^{14}C -Ipratropium bromide を添加し 0.005、0.015、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調

Fig. 2. Blood concentration of radioactivity after intravenous, oral and intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rats.

Each point and bar represent the mean $\pm$ S.E. of five or ten animals.

製し、それぞれについて限外濾過法および超遠心法により血漿蛋白結合率を測定した。

結果

1. ラットにおける生体内動態試験

1) 血液中濃度

ラットに ^{14}C -Ipratropium bromide を経口投与（非麻酔下および麻酔下）、鼻腔内投与および静脈内投与した後の血液中濃度を経時的に測定し Fig. 2 に示した。

経口投与後の血液中濃度は、非麻酔下では投与後3時間に最高濃度 $0.024 \mu\text{g/ml}$ を、また、麻酔下では投与後4時間に最高濃度 $0.025 \mu\text{g/ml}$ を示した後、8または12時間までは比較的速やかに、

に、それ以後は緩徐に低下し、投与後48または72時間で測定限界 ($0.003 \mu\text{g/ml}$) を下回った。吸収による血液中濃度の上昇は、非麻酔下投与に比べ麻酔下投与ではやや遅い傾向が見られたが、最高濃度およびそれ以降の推移は、非麻酔下および麻酔下の間に差は見られなかった。

鼻腔内投与後の血液中濃度は、投与後1時間に最高濃度 $0.072 \mu\text{g/ml}$ を示した後、12時間までは比較的速やかに、それ以後は緩やかに低下し、投与後96時間には測定限界以下となった。

静脈内投与後の血液中濃度は、投与後5分に $2.105 \mu\text{g/ml}$ を示した後、投与後45分までは速やかに、24時間までは比較的速やかに、また、それ

Table I. Cumulative excretion of radioactivity after oral and intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rats

Time (hour)	Excretion (% of dose)		
	Urine	Feces	Total
oral			
6	1.87± 0.20	0.00± 0.00	1.87± 0.20
12	2.68± 0.05	25.68± 5.67	28.36± 5.71
24	3.04± 0.06	88.61± 1.06	91.66± 1.06
48	3.17± 0.06	93.48± 0.75	96.65± 0.76
72	3.21± 0.05	93.57± 0.76	96.78± 0.76
96	3.23± 0.05	93.59± 0.76	96.82± 0.75
120	3.23± 0.05	93.59± 0.76	96.82± 0.75
144	3.23± 0.05	93.59± 0.76	96.82± 0.75
168	3.23± 0.05	93.59± 0.76	96.82± 0.75
oral under anesthesia			
6	2.24± 0.81	0.00± 0.00	2.24± 0.81
12	4.08± 1.23	20.56± 12.12	24.65± 11.44
24	4.86± 1.36	84.50± 6.32	89.36± 5.26
48	5.39± 1.41	93.69± 3.68	99.08± 2.65
72	5.69± 1.46	93.92± 3.64	99.60± 2.57
96	5.79± 1.48	93.95± 3.63	99.74± 2.55
120	5.86± 1.49	94.00± 3.62	99.86± 2.54
144	5.88± 1.49	94.02± 3.62	99.89± 2.54
168	5.88± 1.49	94.03± 3.62	99.90± 2.54
intranasal			
6	3.24± 1.47	0.00± 0.00	3.24± 1.47
12	7.20± 1.98	1.02± 0.73	8.02± 1.71
24	8.77± 2.31	70.78± 8.81	79.55± 6.56
48	9.56± 2.54	87.31± 6.23	96.86± 3.80
72	9.83± 2.61	87.97± 6.14	97.80± 3.65
96	9.97± 2.65	88.23± 6.11	98.21± 3.59
120	10.10± 2.68	88.39± 6.08	98.49± 3.54
144	10.18± 2.70	88.53± 6.06	98.71± 3.50
168	10.24± 2.71	88.61± 6.05	98.85± 3.48

Male wistar rats (B.W. 175~222 g) were given 5 mg/kg of ^{14}C -Ipratropium bromide. Each value was expressed as the mean±S.E. of four or five animals.

以後は緩徐に低下した。

2) 尿糞中排泄

ラットに ^{14}C -Ipratropium bromide を経口投与（非麻酔下および麻酔下）および鼻腔内投与し、以後尿糞中に排泄された放射能を測定し Table I に示した。

非麻酔下での経口投与の場合、投与後48時間までに尿中へ投与量の3.17%、糞中へ93.48%（合計96.65%）が排泄され、48時間以後の排泄量は少なく、排泄はほぼ48時間までに終了した。麻酔下

での経口投与の場合、投与後48時間までに尿中へ投与量の5.39%、糞中へ93.69%（合計99.08%）が排泄され、非麻酔下の場合と同様に48時間までに排泄は終了した。

鼻腔内投与の場合、投与後48時間までに尿中へ投与量の9.56%、糞中へ87.31%（合計96.86%）が排泄された。鼻腔内投与では、経口投与と異なり48時間以後の排泄も少量ではあるが認められ、経口投与に比べ排泄がやや遅い傾向が見られた。

Table II. Tissue levels of radioactivity after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rats

Tissue	Tissue level ($\mu\text{g eq. of Ipratropium bromide/ml or g}$)					
	0.25 hr	1 hr	2 hr	6 hr	24 hr	96 hr
Blood	0.051 $\pm$ 0.004	0.039 $\pm$ 0.016	0.027 $\pm$ 0.006	0.033 $\pm$ 0.003	0.007 $\pm$ 0.001	n. d.
Plasma	0.081 $\pm$ 0.007	0.071 $\pm$ 0.033	0.046 $\pm$ 0.012	0.051 $\pm$ 0.005	0.009 $\pm$ 0.002	n. d.
Brain	0.010 $\pm$ 0.002	n. d.	0.008 $\pm$ 0.002	n. d.	n. d.	n. d.
Pituitary gl.	0.081 $\pm$ 0.026	0.092 $\pm$ 0.041	0.076 $\pm$ 0.020	0.084 $\pm$ 0.021	n. d.	n. d.
Eye ball	0.021 $\pm$ 0.004	0.033 $\pm$ 0.012	0.031 $\pm$ 0.006	0.033 $\pm$ 0.006	0.014 $\pm$ 0.003	0.005 $\pm$ 0.000
Submaxillary gl.	0.234 $\pm$ 0.023	0.366 $\pm$ 0.146	0.268 $\pm$ 0.079	0.241 $\pm$ 0.047	0.067 $\pm$ 0.012	0.017 $\pm$ 0.002
Thyroid	0.188 $\pm$ 0.060	0.147 $\pm$ 0.058	0.296 $\pm$ 0.192	0.226 $\pm$ 0.051	0.102 $\pm$ 0.023	n. d.
Thymus	0.056 $\pm$ 0.005	0.158 $\pm$ 0.066	0.151 $\pm$ 0.047	0.167 $\pm$ 0.041	0.036 $\pm$ 0.005	0.010 $\pm$ 0.000
Heart	0.188 $\pm$ 0.016	0.579 $\pm$ 0.234	0.496 $\pm$ 0.174	0.591 $\pm$ 0.186	0.089 $\pm$ 0.016	0.013 $\pm$ 0.014
Lung	0.131 $\pm$ 0.009	0.237 $\pm$ 0.093	0.185 $\pm$ 0.063*	0.230 $\pm$ 0.060	0.046 $\pm$ 0.009	0.011 $\pm$ 0.004
Liver	0.358 $\pm$ 0.047	0.888 $\pm$ 0.391	0.757 $\pm$ 0.175	1.129 $\pm$ 0.216	0.247 $\pm$ 0.053	0.098 $\pm$ 0.005
Spleen	0.048 $\pm$ 0.004	0.075 $\pm$ 0.026	0.068 $\pm$ 0.017	0.072 $\pm$ 0.014	0.026 $\pm$ 0.004	0.009 $\pm$ 0.001
Pancreas	0.081 $\pm$ 0.012	0.141 $\pm$ 0.046	0.146 $\pm$ 0.028	0.247 $\pm$ 0.055	0.060 $\pm$ 0.015	0.009 $\pm$ 0.002
Kidney	0.865 $\pm$ 0.095	0.733 $\pm$ 0.302	0.470 $\pm$ 0.109	0.528 $\pm$ 0.110	0.162 $\pm$ 0.037	0.045 $\pm$ 0.011
Adrenal	0.080 $\pm$ 0.008	0.220 $\pm$ 0.085	0.308 $\pm$ 0.085	0.782 $\pm$ 0.243	0.280 $\pm$ 0.090	0.047 $\pm$ 0.013
Testis	0.015 $\pm$ 0.002	0.043 $\pm$ 0.012	0.038 $\pm$ 0.010	0.043 $\pm$ 0.011	0.018 $\pm$ 0.004	0.011 $\pm$ 0.002
Epididymis	0.033 $\pm$ 0.005	0.137 $\pm$ 0.041	0.131 $\pm$ 0.037	0.215 $\pm$ 0.055	0.157 $\pm$ 0.033	0.060 $\pm$ 0.013
Mesenteric lymph node	0.100 $\pm$ 0.015	0.208 $\pm$ 0.053	0.143 $\pm$ 0.033	0.158 $\pm$ 0.023	0.006 $\pm$ 0.000	0.007 $\pm$ 0.001
Skeletal muscle	0.012 $\pm$ 0.001	0.080 $\pm$ 0.051	0.037 $\pm$ 0.011	0.081 $\pm$ 0.031	0.047 $\pm$ 0.009	0.014 $\pm$ 0.002
Skin	0.033 $\pm$ 0.004	0.075 $\pm$ 0.022	0.064 $\pm$ 0.014	0.085 $\pm$ 0.016	0.033 $\pm$ 0.004	n. d.
Stomach	24.787 $\pm$ 5.938	15.882 $\pm$ 2.454	33.488 $\pm$ 6.054	10.293 $\pm$ 2.442	0.153 $\pm$ 0.030	0.018 $\pm$ 0.001
Small intestine	1.200 $\pm$ 1.001	1.425 $\pm$ 0.195	6.016 $\pm$ 2.958	10.338 $\pm$ 1.184	0.153 $\pm$ 0.028	0.018 $\pm$ 0.002
Large intestine	0.139 $\pm$ 0.014	0.981 $\pm$ 0.348	0.234 $\pm$ 0.052	0.350 $\pm$ 0.067	0.949 $\pm$ 0.155	0.025 $\pm$ 0.009
Epididymal fat	0.033 $\pm$ 0.006	0.064 $\pm$ 0.013	0.045 $\pm$ 0.011	0.050 $\pm$ 0.012	0.018 $\pm$ 0.005	n. d.
Trachea	6.907 $\pm$ 2.426	1.274 $\pm$ 0.339	4.121 $\pm$ 3.808	1.058 $\pm$ 0.904	0.099 $\pm$ 0.065	0.052 $\pm$ 0.019
Seminal vesicle	0.101 $\pm$ 0.033	1.738 $\pm$ 1.263	1.183 $\pm$ 0.180	3.454 $\pm$ 0.959	0.061 $\pm$ 0.012	0.011 $\pm$ 0.001
Submandibular lymph node	0.145 $\pm$ 0.035	0.303 $\pm$ 0.125	0.108 $\pm$ 0.029	0.121 $\pm$ 0.028	0.030 $\pm$ 0.006	0.011 $\pm$ 0.002

Male wistar rats (B.W. 164~190 g) were given 5 mg/kg of ^{14}C -Ipratropium bromide.

Each value was expressed as the mean $\pm$ S.E. of five animals.

n.d.: not detected not detected (<20 dpm)

*: n=4

3) 組織内濃度

ラットに ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与した後の組織内濃度を Table II に、組織内含有率を Table III に示した。

血液、血漿における濃度は、投与後15分に最高値（血液 0.051 $\mu\text{g/ml}$ 、血漿 0.081 $\mu\text{g/ml}$ ）を示したが、投与後1時間に比べ有意に高い値ではなかった。それ以後各濃度は経時的に低下し、投与後96時間には測定限界以下となった。

甲状腺、肺、腎および胃以外の組織における濃度は、投与後1時間から6時間にかけて最高値に

達した。投与後1時間に最も高い濃度を示した組織は精囊（1.738 $\mu\text{g/g}$ ）で、次いで肝臓（0.888 $\mu\text{g/g}$ ）、腎臓（0.733 $\mu\text{g/g}$ ）、心臓（0.579 $\mu\text{g/g}$ ）の順であった。また、投与後6時間では、精囊（3.454 $\mu\text{g/g}$ ）、肝臓（1.129 $\mu\text{g/g}$ ）、副腎（0.782 $\mu\text{g/g}$ ）、心臓（0.591 $\mu\text{g/g}$ ）、腎臓（0.528 $\mu\text{g/g}$ ）の順に高い濃度を示した。また、脳、眼球、精巣、精巣上体脂肪における濃度は、血漿における濃度よりも低い値であった。

投与後15分の消化管内容物、鼻腔口腔洗浄液および洗浄後頭部に含まれる放射能は、それぞれ投

Table III. Distribution of radioactivity after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rats

Tissue	Distribution in tissue (% of dose/whole tissue)					
	0.25 hr	1 hr	2 hr	6 hr	24 hr	96 hr
Liver	0.25 ± 0.03	0.62 ± 0.27	0.51 ± 0.12	0.74 ± 0.13	0.23 ± 0.05	0.09 ± 0.02
Kidney	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Stomach	3.04 ± 0.83	1.90 ± 0.36	4.43 ± 0.98	1.21 ± 0.32	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Small intestine	0.50 ± 0.42	0.65 ± 0.07	2.88 ± 1.50	4.19 ± 0.59	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Large intestine	0.03 ± 0.00	0.19 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.00 ± 0.00
Washing of nasal cavity	10.84 ± 1.40	5.26 ± 0.95	2.05 ± 0.47	1.92 ± 0.56	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Gastrointestinal content	59.66 ± 4.87	71.04 ± 6.57	64.72 ± 3.26	55.41 ± 4.02	21.58 ± 4.75	0.26 ± 0.18
Head after washing	11.95 ± 0.57	6.67 ± 2.51	3.11 ± 0.66	3.22 ± 1.02	0.26 ± 0.06	0.04 ± 0.01

Each value was expressed as the mean $\pm$ S.E. of five animals.

Fig. 3. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity 15 min after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rat.

与量の 59.66%, 10.84%, 11.95% であった。鼻腔口腔洗浄液および洗浄後頭部に含まれる放射能は、時間とともに減少したが、消化管内容物については投与後 1 時間まで増加した後、減少した。投与後 96 時間にこれらの組織に含まれる放射能は

0.31% であった。

4) 全身オートラジオグラフィ (ARG)

ラットに ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与した後の全身オートラジオグラムを、Fig. 3 ~7 に示した。

Fig. 4. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity 1 hour after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rat.

Fig. 5. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity 6 hours after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rat.

Fig. 6. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity 24 hours after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rat.

Fig. 7. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity 96 hours after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rat.

投与後15分 (Fig. 3) には、鼻腔、口腔、食道、胃、小腸上部、腎臓、肝臓、膀胱に高い放射能の分布が認められ、顎下腺、褐色脂肪、心臓、肺にも比較的高い放射能が分布した。しかし、脳、脊髄、精巣、胸腺には分布が認められなかった。

投与後1時間 (Fig. 4) では、分布する放射能の高さは投与後15分に比べ上昇したが、分布する組織については投与後15分と同様の傾向を示し、その他副腎では皮質部分に分布した。消化管については、より下部の腸管の内容物に放射能が移行していたが、直腸では腸管壁に分布し、内容物には放射能が認められなかった。脳、脊髄、精巣には投与後15分同様分布が認められなかったが、胸腺には分布した。

投与後6時間 (Fig. 5) においては、投与後1時間より放射能のレベルは低下したが、分布する組織の傾向は同様であり、消化管についてはさらに下部の盲腸内に高い放射能が移行していた。

投与後24時間 (Fig. 6) では、消化管（特に大腸）の内容物に高い放射能が認められたほか、肝臓、鼻腔、口腔、副腎（皮質部分）、膀胱にも

比較的高い放射能が認められた。その他の組織では、投与後6時間よりもさらに放射能のレベルが低下した。

投与後96時間 (Fig. 7) では、消化管（特に大腸）の内容物に比較的高い放射能が分布した。また、肝臓、腎臓、口腔、顎下腺に低い放射能が認められたが、その他の組織からはほとんど放射能が認められなかった。

5) 血漿蛋白結合性

ラットに ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与して採取した血漿および ^{14}C -Ipratropium bromide を添加した血漿を用いて蛋白結合率を求め Table IV に示した。

投与後採取した血漿を用いて限外濾過法により測定した結果、蛋白結合率は投与後1および6時間では27~30%、投与後24時間では約80%となった。また、 ^{14}C -Ipratropium bromide を添加した血漿を用いて測定した場合、限外濾過法では20%前後、超遠心法では7~10%となった。 ^{14}C -Ipratropium bromide を等張緩衝液に加えて測定した結果、限外濾過法では7~10%が濾過膜に吸着した。

2. ウサギにおける生体内動態試験

1) 血液中濃度および尿糞中排泄

ウサギに ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内、経口および静脈内投与した後の血液中濃度を Fig. 8 に、鼻腔内投与した後の尿糞中排泄率を Table V に示した。

鼻腔内投与後の血液中濃度は、投与後4時間に最高値 ($0.022 \mu\text{g}/\text{ml}$) を示した後、12時間までは比較的速やかに、24時間以後は緩やかに低下し、投与後72時間以後は測定限界以下となった。経口投与後の血液中濃度は、投与後1時間に最高値 ($0.064 \mu\text{g}/\text{ml}$) を示した後、12時間までは比較的速やかに、それ以後は緩徐に低下した。静脈内投与後の血液中濃度は、投与後5分に $2.604 \mu\text{g}/\text{ml}$ を示した後、6時間までは比較的速やかに、それ以後は緩徐に低下した。

また、投与後48時間までに、尿中へ投与量の10.39%、糞中へ40.26% (合計50.65%) が排泄されたが、その後も排泄は続き、投与後168時間までに尿中へ12.72%、糞中へ59.84% (合計72.56%) が排泄された。投与後168時間でのケージ洗

Table IV. Plasma protein binding of ^{14}C -Ipratropium bromide in rats

(a) *in vivo*

Time (hour)	Binding (%)
1	27.45 $\pm$ 2.20
6	29.59 $\pm$ 2.82
24	78.75 $\pm$ 2.37

These values were obtained by ultrafiltration method. Each value was expressed as the mean $\pm$ S.E. of five animals.

(b) *in vitro*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Binding (%)	
	Method A	Method B
0.005	21.27	7.24
0.015	20.14	9.64
0.05	22.68	9.22
0.005*	7.13	—
0.05*	9.80	—

Method A : ultrafiltration

B : ultracentrifugation

* : buffered saline (0.15 M NaCl, 0.005 M Na phosphate, pH 7.4)

Fig. 8. Blood concentration of radioactivity after intravenous, oral and intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rabbits.

Each point and bar represent the mean $\pm$ S.E. of three animals.

Table V. Cumulative excretion of radioactivity after intranasal administration of ^{14}C -Ipratropium bromide to male rabbits

Time (hour)	Excretion (% of dose)		
	Urine	Feces	Total
6	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
12	1.27 $\pm$ 1.27	0.00 $\pm$ 0.00	1.27 $\pm$ 1.27
24	1.70 $\pm$ 1.70	8.64 $\pm$ 6.92	10.34 $\pm$ 8.62
48	10.39 $\pm$ 4.22	40.26 $\pm$ 7.70	50.65 $\pm$ 6.36
72	11.14 $\pm$ 4.25	51.22 $\pm$ 7.20	62.36 $\pm$ 4.46
96	11.97 $\pm$ 4.56	56.04 $\pm$ 6.64	68.01 $\pm$ 3.09
120	12.21 $\pm$ 4.62	58.27 $\pm$ 6.31	70.48 $\pm$ 2.42
144	12.57 $\pm$ 4.84	59.36 $\pm$ 6.17	71.94 $\pm$ 1.98
168	12.72 $\pm$ 4.89	59.84 $\pm$ 6.04	72.56 $\pm$ 1.79

Male NZW rabbits were given 5 mg/kg of ^{14}C -Ipratropium bromide.

Each value was expressed as the mean $\pm$ S.E. of three animals.

液中に含まれる放射能 (2.06%) を加え、投与量の 74.63% が回収された。

2) 血漿蛋白結合率

ウサギに ^{14}C -Ipratropium bromide を鼻腔内投与した後採取した血漿および ^{14}C -Ipratropium bromide を添加した血漿を用いて、蛋白結合率を求め Table VI に示した。

投与後に採取した血漿を用いて限外濾過法により測定した結果、蛋白結合率は投与後 1 および 6 時間では 25~30%、投与後 24 時間では約 60% となった。

また、 ^{14}C -Ipratropium bromide を添加した血漿を用いて測定した場合、限外濾過法では 20% 前後、超遠心法では 9% 前後であった。

考 察

Ipratropium bromide は、静脈内投与および経

Table VI. Plasma protein binding of ^{14}C -Ipratropium bromide in rabbits(a) *in vivo*

Time (hour)	Binding (%)
1	24.50 $\pm$ 3.69
6	29.88 $\pm$ 0.59
24	57.06*

These values were obtained by ultrafiltration method. Each value was expressed as the mean $\pm$ S.E. of three animals.

*: n=1

(b) *in vitro*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Binding (%)	
	Method A	Method B
0.005	22.81	8.90
0.015	16.93	9.68
0.05	17.92	9.15

Method A : ultrafiltration

B : ultracentrifugation

口投与によるラットおよびウサギにおける生体内動態についてはすでに報告されている⁶⁾。本試験では、動物に対しこの薬剤を鼻腔内に定量的に投与するため、投与時に麻酔を必要とした。そのため、投与経路が鼻腔内であり、臨床では麻酔をしないで用いることを考慮し、呼吸器系への刺激がなく、作用時間の短いハロセン⁷⁾を用いることとしたが、その影響をラットを用い経口投与により比較検討した。血液中濃度の測定結果からは、最高血液中濃度、最高血液中濃度時以後の消失の傾向および血液中濃度曲線下面積(AUC)には差が見られなかった。また、麻酔により尿中への排泄率がわずかに増加する傾向が見られたが、有意な差ではなかった。したがって、麻酔により消化管からの吸収にわずかに差が生ずる傾向はあるものの、吸収後の体内動態についてはほとんど差が生じないものと結論した。

ラットに鼻腔内投与した場合、経口投与に比べ最高血液中濃度は約3倍になったが、その差は有意ではなかった。また、尿中排泄率は、経口投与の3~6%に比べ、鼻腔内投与では10.2%となったが、有意な増加ではなかった。静脈内投与による血液中濃度はすでに報告されている⁶⁾が、測定

は血漿について行われており、今回全血中の濃度として同時に測定し比較した。ラットにおける実験では、すべての投与経路について、測定限界以上の測定値がそろっているのは、投与後24時間までであるため、吸収率の比較は、血液中濃度曲線下面積(AUC)を0~24時間の範囲で求めて行った。非麻酔下経口投与によるAUC(0~24 hr)は0.273 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、麻酔下経口投与では0.257 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ となり、麻酔によるAUCの有意な差は認められなかった。鼻腔内投与によるAUC(0~24 hr)は0.622 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ であり、経口投与に比べ約2.4倍になり、非麻酔下経口投与に対しては有意な差(危険率5%)が認められたが、麻酔下経口投与に対しては有意差が認められなかった。静脈内投与によるAUC(0~24 hr)は8.559 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ となり、AUCの比較による吸収率は、非麻酔下経口投与では3.2%、麻酔下経口投与では3.0%、また、鼻腔内投与では7.3%と計算され、それぞれの尿中排泄率に近い値を示した。

ラットにおける鼻腔内投与後の組織内濃度では、投与後15分に血液、血漿の最高値が測定されたが、投与後1時間の血液、血漿中濃度と有意な差は認められなかった。また、多くの組織で投与後1時間と6時間にピークを示す現象が認められたが、投与後2時間前後の濃度の低下および上昇は統計的に有意なものではなかった。静脈内投与時には、肝臓が最も高い濃度を示し、次いで腎臓、心臓、顎下腺、胸腺、副腎、肺の順に高い濃度を示した⁶⁾が、鼻腔内投与でも精嚢を除き、ほぼ同様の傾向を示した。また、全身オートラジオグラフィーにおいても、投与経路にあたる鼻腔、口腔、食道などを除き、放射能の分布傾向は静脈内投与の場合⁶⁾とよく類似していた。鼻腔内に投与された放射能は、大部分は鼻腔、口腔から食道、消化管へと移行し、経口投与と同様の挙動を示すものと考えられるが、投与後6時間のオートラジオグラム(Fig. 5)上には一部が鼻腔内にとどまっている像が認められた。したがって、本薬剤は比較的長い時間に渡り鼻腔内にとどまり、局所作用の発現に寄与していることが示唆された。

ウサギにおいても、すでに経口および静脈内投与による血液中濃度および尿糞中排泄について報告⁶⁾されている。しかし、血液中濃度については

ラットと同様に血漿について測定されており、今回全血中濃度として新たに測定し、鼻腔内投与した場合と比較した。

ウサギにおける実験では、投与後48時間まですべての投与経路の血液中濃度が測定限界を上回っており、0～48時間の範囲でAUCを計算し比較した。鼻腔内投与によるAUC (0～48 hr) は $0.436 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、経口投与によるAUC (0～48

hr) は $1.105 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、また、静脈内投与によるAUC (0～48 hr) は $7.141 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ と計算され、経口投与と鼻腔内投与との間に危険率1%で有意な差を示した。したがって、AUCの比較による吸収率は、鼻腔内投与では6.1%、経口投与では15.5%となり、Ipratropium bromideを鼻腔内投与しても経口投与に比べ吸収率の増加はラットと同様に認められなかった。

文 献

- 1) 東 英二, 朝倉光司, 榎本和子, 荒ひとみ, 相馬新也, 形浦昭克: 鼻過敏症に対する副交感神経遮断剤の局所使用効果, 耳喉, **55**: 481-486 (1983).
- 2) Borum, P., Mygind, N. and Schultzlarsen, F.: Intranasal ipratropium, a new treatment for perennial rhinitis, *Clinical Otolaryngol.*, **4**: 407-411 (1979).
- 3) Malmberg, H., Grahne, B., Holopainen, E. and Binder, E.: Ipratropium (Atrovent) in the treatment of vasomotor rhinitis of elderly patients, *Clinical Otolaryngol.*, **8**: 273-276 (1983).
- 4) 斉藤洋三: 血管運動性鼻炎とイプラトロピウム噴霧療法, アレルギーの臨床, **32**: 36-37 (1983).
- 5) Borum, P., Olsen, L., Winther, B. and Mygind, N.: Ipratropium nasal spray, a new treatment for rhinorrhea in the common cold, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **123**: 418-420 (1981).
- 6) 久保順嗣, 大沼規男, 清木 護, 福島 久, 二木孝雄, 橋本喜信: Ipratropium bromide (Sch-1000) の生体内運命 (第1報) ラットおよびウサギにおける Sch-1000 の吸収, 分布および排泄, 医薬品研究, **9**: 368-381 (1978).
- 7) 伊藤信也, 富澤攝夫: 薬理学 (薬学演習講座 8), pp.39-40, 学文社 (1969).