Mometasone furoate (MF) の生体内動態に関する研究 (第4報): ラットおよびウサギにおける代謝

菅野 浩一, 青山 定夫, 鎌田 和夫, 溝尻 顕爾

塩野義製薬株式会社研究所神崎川分室 〒561 大阪府豊中市二葉町3丁目1-1

江角 凱夫, 高市 松夫, 二宮 真一, 岡田 雄二, 稲葉 厚弘

第一化学薬品株式会社東海研究所 〒319-11 茨城県那珂郡東海村村松2117

Key words : Mometasone furoate, MF, Antiinflammatory steroid, Metabolism, Metabolite, Rat, Rabbit

Studies on the Metabolic Fate of Mometasone furoate (MF) (IV): Metabolism in Rats and Rabbits

Koichi SUGENO, Sadao AOYAMA, Kazuo KAMATA and Kenji MIZOJIRI

Kanzakigawa Laboratory, Shionogi Research Laboratories, Shionogi &
Co., Ltd., Toyonaka-shi, Osaka 561, Japan

Toshio ESUMI, Matsuo TAKAICHI, shin-ichi NINOMIYA, Yuji OKADA and Atsuhiro INABA

Tokai Research Laboratories, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.,
Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-11, Japan

Summary

Metabolic fate of ^{14}C -MF in the rat and the rabbit was studied after subcutaneous administration at 0.5mg/kg dose. The metabolites were analyzed by two-dimensional TLC, located by autoradiography and quantitated by TLC scraping and counting of the radioactivity. Identification of the metabolites was tentatively made by co-chromatography with corresponding reference standards. Three major biotransformation pathways of MF were proposed. 1) Substitution of a 21-hydroxyl group for a chlorine: 2) 6β -Hydroxylation: 3) Defuroylation at 17: Combination of these processes and subsequent reactions resulted in the formation of numerous metabolites.

Plasma metabolites; In the animals studied, the main component was the unchanged MF at each time point examined, and its concentration near the peak (4hr after the administration) was 13.1ng/ml in the male rat, 22.4ng/ml in the female rat and 2.8ng/ml in the male rabbit.

Biliary metabolites; About 78% of the dose was excreted in the bile within 24hr in the male and female rats. The main metabolite detected both in the free and the conjugate fraction was 17-OH compound (M-1), which amounts to 4.8% and 2.4% of dose respectively for the male, and 6.7% and 2.4% for the female. In the acidic fraction, the main metabolite was 6β -OH, 21-oic acid (M-27) in both sex and the amount found was significantly more in the male (5.9% of dose) than in the female (1.3%), indicating the sex-related differences. In the rabbit, about 19% of dose was excreted in the bile within 24hr. The main metabolite was M-1 (1.6%) in the free fraction, 6β , 21-(OH) $_2$ compound (M-13) (0.7%) in the conjugate fraction and 21-oic acid (M-32) (0.3%) in the acidic fraction.

Urinary metabolites; In the rat, the radioactivity excreted within 24hr was 3~5% of dose and was not so significant. A sole and main metabolite detected was 6β , 17, 21-(OH) $_3$ compound (M-14) (about 1% of dose). In the rabbit, about 16% of dose was excreted in the urine within 72hr. The main metabolite both in the free and the conjugate fraction was M-14 (1.5% and 0.2% of dose respectively).

緒 言

Mometasone furoate (以下 MF と略) は、外用剤として局所抗炎症作用を有し、全身性の副作用を軽減することを目的として開発された合成コルチコステロイドである。MF の吸収、分布および排泄についてはすでに検討し、経皮投与および皮下投与後の体内動態について報告した^{1,2,3)}。

今回、¹⁴C-MF を皮下投与したラット、ウサギの血漿、ラット、ウサギの尿およびラット胆汁中の代謝物について TLC による分析を行ったので報告する。(試験実施期間: 1988年3月～1989年11月)

実験材料および方法

1. 標識化合物

¹⁴C-MF は4位の炭素が¹⁴C 標識されたものであり、比放射能は2.55MBq (68.8 μ Ci)/mg, 放射化学的純度は98%以上であった (Fig. 1)。放射化学的純度の測定は薄層クロマトグラフィー (TLC) で第1報¹⁾と同様に行った。

Fig. 1 Chemical structure of MF
‡: labeled position.

2. 実験動物

生後7週齢のSD系(日本チャールス・リバー)の雄性(体重224～263 g)、雌性ラット(体重152～186 g)、および生後12週齢の日本白色種ウサギ(北山ラベス)の雄性(体重2.48～2.72 kg)を使用した。

購入後のラットには水および固型試料(MF, オリエンタル酵母工業)を自由に摂取させ、ウサギには固型試料(GM-1, 船橋農場)を1日約150 g与え(水は自由に与えた)、室温23±2℃、湿度55±10%(ウサギでは55±15%)の条件で2週間以上予備飼育し、試験に際しては、ラットでは投与3日前よりステンレス製代謝ケージ(KN-

646B, 夏目製作所)に、ウサギでは投与5日前よりステンレス製代謝ケージ(R-6C型, 岡崎産業)に個別飼育して環境に順化させたのち、試験に供した。各試験に供した動物の例数は1群3匹とした。

3. 投与液の調製

皮下投与液は、¹⁴C-MF のエタノール溶液に同容量のプロピレングリコールおよび2倍容量の生理食塩液を加えて0.5mg/2ml となるように調製した。投与液は用時調製した。

4. 投与量および投与方法

¹⁴C-MF 皮下投与液を0.5mg/2ml/kg で、ラットでは腰部皮下、ウサギでは背部皮下に投与した。投与放射能はいずれの動物も1.27MBq (34.4 μ Ci)/kg とした。

5. 生体試料の採取

(1) 血 漿

¹⁴C-MF を0.5mg/kg で皮下投与し、雌雄ラットは4, 8, 24時間後に1群ずつエーテル麻醉下、腹大動脈より採血致死させ、血漿を採取した。また、雄性ラットに0.5mg/kg で1日1回、16日間反復皮下投与した際、最終回投与後4, 24時間の血漿も採取した。ウサギは耳静脈から経時的に採血し、4, 24, 72時間の血漿を採取した。

(2) 胆 汁

ラットではエーテル麻醉したのち、総胆管にポリエチレンチューブを挿入して胆汁を採取できるよう処置し、ボールマンケージに収め、麻醉覚醒後¹⁴C-MF を0.5mg/kg で皮下投与して24時間までの胆汁を採取した。ウサギではペントバルビタールを静脈内投与したのち、エーテル麻醉し、ラットと同様の方法で胆汁を採取した。

(3) 尿

¹⁴C-MF を0.5mg/kg で皮下投与し、ラットおよびウサギをそれぞれ尿糞分離用代謝ケージに収め、自然排泄された尿をラットでは48時間まで、ウサギでは72時間まで採取した。また、雄性ラットにおいては0.5mg/kg で1日1回、16日間反復皮下投与した際の尿を最終回投与後から48時間まで採取した。

MF	M-1	M-4	M-7	M-11	M-12	
	R ₁	CH ₂ Cl	CH ₂ Cl	CH ₂ Cl	CH ₂ Cl	CH ₂ OH	CH ₂ OH
	R ₂		H		H		H
R ₃	H	H	OH	OH	H	H

M-13	M-14	M-27	M-32	M-33	
	R ₁	CH ₂ OH	CH ₂ OH	COOH	COOH	OH
	R ₂		H
R ₃	OH	OH	OH	H	H

M-3	M-29	M-39	M-40	
	R ₁	CH ₂ Cl	COOH	COOH	OH
	R ₂	H
R ₃	H	OH	H	H	

Fig. 2 Structures of MF and its derivatives related to the metabolites

6. 生体試料中の放射能の測定

(1) 血漿

血漿は0.2~0.5ml を採取し、シンチレーター ATOMLIGHT (Du pont NEN Research Products) を加えて放射能を測定した。

(2) 尿, 胆汁

尿および胆汁はそのままあるいは水で希釈し、尿は0.5ml あるいは1ml, 胆汁は0.1ml にシ

ンチレーター ATOMLIGHT を加えて放射能を測定した。

(3) 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 (LSC-903 ALOKA) で2分間計数した。計数効率の補正は、外部標準線源によるチャンネル比法によった。

Fig. 3 Flow chart of bile analysis

7. 代謝物の分析

(1) 予想代謝物の合成標品

MF [(+)-9, 21-dichloro-11 β , 17 α -dihydroxy-16 α -methyl-1, 4-pregnadiene-3, 20-dione 17-(2-furoate)] および14種の予想代謝物、関連化合物の構造式を Fig. 2 に示した。

(2) 分析方法

血漿はアセトニトリルを加え除蛋白の後、等容量の炭酸緩衝液で pH 9 に調整し、3 倍量の酢酸エチルで3回抽出した。胆汁および尿は、それぞれ Fig. 3 および Fig. 4 に従って順次3倍量の酢

酸エチルで各3回抽出し、各フラクション(Fraction I, Fraction II, Fraction III)に分画した。ただし、胆汁のFraction IIIの分析では、MF およびその代謝物がアルカリに対して不安定な性質を持っているため、アルカリとの接触のより少ない処理方法(Fig. 3 の右側の手順)に従って分画した。各酢酸エチル抽出液は濃縮乾固し、2 次元 TLC に供する試料とした。

(3) TLC

2 次元 TLC での分析はシリカゲル60F₂₅₄ (ガラスプレート, 20×20cm, 厚さ0.25mm, E.

Fig. 4 Flow chart of urine analysis

Merck) を用い、次の溶媒系AまたはBで、原点よりそれぞれ15cm 展開した。なお、血漿は溶媒系Aで、尿および胆汁試料は溶媒系Bを用いて分析を行った。また、血漿および尿の Fraction I および Fraction II ではベンゼン：クロロホルム (1:1) を用い、前展開を行った。

溶媒系A

1 次元 ; 1,2-ジクロロエタン / メタノール

(8:1)

2 次元 ; ヘキサン / エチレングリコールジメチルエーテル (1:1), 2 回展開

溶媒系B

1 次元 ; 1,2-ジクロロエタン / メタノール (8:1)

2 次元 ; ヘキサン / テトラヒドロフラン (1:1), 2 回展開

TLC に際しては、MF のほか、予想代謝物、関連化合物を同時に展開し、各代謝物の展開位置を紫外線ランプ (254nm) により確認した。そのうち、TLC プレートをX線フィルム (コニカ、MARG ^3H タイプ) と密着させ、オートラジオグラムを作製し、放射性スポットの位置を確認した。オートラジオグラムの黒化相当部のシリカゲルを削り取り、メタノールおよびシンチレーターATOMLIGHT を加え放射能を測定し、各代謝物の割合を求めた。

放射能の検出限界はバックグラウンド値 (dp m) の2倍とした。すなわち、放射能実測値からバックグラウンド値を差し引き、その値がバックグラウンド値より小さい場合に検出限界以下とした。動物例数の半数以上 (3例中2例以上) が検出限界以下の場合には N.D. (not detected) と表示した。3例中1例が検出限界以下の場合には、検出限界以下を示したのもバックグラウンド値との差の数値を用いて計算した。

実験結果

1. 血漿中代謝物

雄性および雌性ラット、雄性ウサギに ^{14}C -MF

Fig. 5 Schematic representation of two-dimensional thin-layer chromatogram of the metabolites of MF in plasma after subcutaneous administration of ^{14}C -MF to rats (dose: 0.5mg/kg).
 ●; >5.0ng/ml, ●; 1.0ng/ml~4.9ng/ml, ○; <1.0ng/ml

を0.5mg/kg で皮下投与した際に得られた血漿は除蛋白し、酢酸エチルで抽出した抽出物の2次元TLCを Fig. 5に、各代謝物を測定した結果を Table I に示した。TLC で予想代謝物と一致する代謝物の他に微量の未知代謝物が認められたので、これらについてP1~P7の符号を付した。

しかし、Table および Fig. では煩雑を避けるため、雌性ラットでのみ定量可能であったP3, P5について記載した。雄性ラットの単回投与後の血漿中には、未変化体が投与後4時間で総放射能濃度の約48%に相当する13.1ng/ml (MF 換算) を示し、8時間まではほぼ同濃度で推移し、その後減少した。M-4, M-12およびM-14は、8時間まではほぼ同濃度で推移し、24時間では検出限界以下になった。16回投与後の血漿中には、未変化体が投与後4時間で総放射能濃度の約44%に相当する20.7ng/ml (MF 換算) を示した。単回投与群と比較して総放射能濃度に対する未変化体濃度の割合、代謝物の種類、濃度には相違が認められなかった。

雌性ラットの血漿中には、未変化体が投与後4時間で総放射能濃度の約57%に相当する22.4ng/ml (MF 換算) を示し、以後経時的に減少した。M-4およびM-12はいずれも投与後4時間に最高濃度を示し、24時間では検出限界以下になった。また、雄性ラットにみられたM-14は認められず、未知代謝物P3およびP5が認められた。

雄性ウサギの血漿中には、未変化体が投与後4時間で総放射能濃度の約32%に相当する2.8ng/ml (MF 換算) を示し、その後経時的に減少したが、投与後72時間においても総放射能濃度の約7%に相当する0.5ng/ml を示した。ラットに比較して未変化体の占める割合は、やや低い値を示した。

2. 胆汁中代謝物

雌雄ラットおよび雄性ウサギに ^{14}C -MF を0.5mg/kg で皮下投与した際に得られた胆汁について、Fig. 3に従って順次分画した結果、投与量に対して雄性ラットでは遊離体分画 (Fraction I) に19.3%、抱合体分画 (Fraction II) に15.8%の放射能が認められた。雌性ラットではFraction I に25.5%、Fraction II に15.3%が認

Table I Concentrations of Metabolites of MF in Plasma after Subcutaneous Administration of ^{14}C -MF to Male Rats, Female Rats and Male Rabbits (Dose : 0.5mg/kg)

	Concentration of radioactivity (ng equiv. of MF/ml)										
	Male Rat					Female Rat			Male Rabbit		
	Single			Repeated							
	4 hr	8 hr	24hr	4 hr	24hr	4 hr	8 hr	24hr	4 hr	24hr	72hr
MF	13.1 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.3	20.7 $\pm$ 2.3	2.5 $\pm$ 0.9	22.4 $\pm$ 3.3	10.6 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2
M-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M-4	0.7 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	N.D.	0.9 $\pm$ 0.2	N.D.	1.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	N.D.	0.4 $\pm$ 0.1	N.D.	N.D.
M-7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M-11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M-12	1.7 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.9	N.D.	2.9 $\pm$ 0.9	N.D.	1.9 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2	N.D.	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	N.D.
M-13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M-14	0.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	N.D.	0.7 $\pm$ 0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3	N.D.
P3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.5 $\pm$ 0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.4 $\pm$ 0.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total radioactivity in plasma	27.2 $\pm$ 1.6	26.8 $\pm$ 2.8	11.0 $\pm$ 1.1	46.7 $\pm$ 4.5	17.4 $\pm$ 1.9	39.3 $\pm$ 2.2	28.4 $\pm$ 0.9	11.8 $\pm$ 1.3	8.7 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 1.9	7.4 $\pm$ 1.4
% radioactivity in the AcOEt extract*	74.3 $\pm$ 2.0	70.7 $\pm$ 1.7	46.4 $\pm$ 4.6	61.8 $\pm$ 1.1	38.7 $\pm$ 7.9	76.4 $\pm$ 2.6	69.4 $\pm$ 1.1	31.7 $\pm$ 4.1	77.2 $\pm$ 4.3	44.6 $\pm$ 4.5	26.7 $\pm$ 3.6

Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. for three animals.

N.D. ; Not detected.

* : Percent of the radioactivity in ethyl acetate extract to the total radioactivity of the plasma.

Fig. 6 Schematic representation of two-dimensional thin-layer chromatogram of the metabolites of MF in Fraction I, Fraction II and Fraction III of bile after subcutaneous administration of ^{14}C -MF to male rats (dose : 0.5mg/kg).

● ; >1.00%, ● ; 0.50%~0.99%, ⊙ ; 0.10%~0.49%, ○ ; <0.10

Table II Excretion of Metabolites of MF into Bile after Subcutaneous Administration of ^{14}C -MF to Male Rats (Dose : 0.5mg/kg)

		% of Dose					
Total radioactivity in the bile			78.8±0.6				
The radioactivities in the Fractions	Fraction I 19.3±1.3		Fraction II 15.8±0.8		Fraction III 21.6±6.2		
MF	N.D.		N.D.	M-27	5.94±3.78		
M-1	4.78±1.89		2.38±0.99	M-29	1.80±0.97		
M-3	0.13±0.07		0.27±0.06	M-32	0.95±0.50		
M-4	0.16±0.09		N.D.	M-33	0.88±0.28		
M-7	1.32±0.56		0.93±0.28	M-39	0.30±0.08		
M-11	N.D.		0.65±0.24	M-40	0.35±0.15		
M-12	0.95±0.12		0.82±0.11				
M-13	0.56±0.29		2.25±1.55				
M-14	0.73±0.04		0.51±0.09				
mBf 2	0.37±0.07	mBc 1	0.62±0.16	mBa 1	0.61±0.24	mBa22	0.13±0.07
mBf 3	0.30±0.09	mBc 3	0.42±0.30	mBa 2	0.17±0.05	mBa25	0.60±0.14
mBf 9	0.15±0.02	mBc 7	0.20±0.14	mBa 3	0.14±0.07	mBa26	0.23±0.10
mBf11	0.17±0.09	mBc11	0.22±0.04	mBa 4	0.20±0.06	mBa27	0.52±0.31
mBf18	0.37±0.18	mBc13	1.61±0.68	mBa 5	0.12±0.03	mBa28	0.19±0.01
mBf21	0.47±0.05	mBc16	0.23±0.03	mBa 6	0.10±0.01	mBa29	0.42±0.20
		mBc17	0.26±0.14	mBa 7	0.10±0.03	mBa30	0.17±0.04
				mBa 8	0.15±0.00	mBa31	0.15±0.03
				mBa 9	0.13±0.07	mBa32	0.14±0.01
				mBa10	0.14±0.03	mBa33	0.14±0.03
				mBa11	0.41±0.28	mBa34	0.15±0.04
				mBa12	0.16±0.05	mBa35	0.14±0.04
				mBa13	0.30±0.12	mBa36	0.22±0.03
				mBa14	0.26±0.09	mBa37	0.18±0.04
				mBa15	0.13±0.03	mBa38	0.23±0.05
				mBa16	0.13±0.02	mBa39	0.14±0.04
				mBa17	0.11±0.02	mBa40	0.16±0.05
				mBa18	0.11±0.02	mBa42	0.15±0.06
				mBa19	0.16±0.04	mBa43	0.12±0.03
				mBa21	0.65±0.25	mBa46	0.10±0.01

Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. for three animals.

N.D. ; Not detected.

* As for unknowns, the metabolites accounted for less than 0.10% of the dose were omitted to avoid complication.

められた。雄性ウサギでは Fraction I に5.1%, Fraction II に3.1%認められた。

なお、酸性分画 (Fraction III) の定量は Fig. 3 の右側の抽出手順に従って得られた分画を用いた。この分画に抽出された放射能は、投与量に対して雄性ラットで21.6%, 雌性ラットで14.4%, 雄性ウサギで3.7%であった。これらの2次元 TLC の代表的な例として、雄性ラットの結果を

Fig. 6 に、各代謝物を測定した結果を Table II ~ IV に示した。標品と一致する代謝物の他に、多数の未知代謝物が認められたので、これらについて雄性ラットの Fraction I では mBf 1 ~ mBf23, Fraction II では mBc 1 ~ mBc 20, Fraction III では mBa 1 ~ mBa 51 の符号を付した。雌性ラットの Fraction I では fBf 1 ~ fBf 13, Fraction II では fBc 1 ~ fBc19, Fraction

Table III Excretion of Metabolites of MF into Bile after Subcutaneous Administration of ^{14}C -MF to Female Rats (Dose : 0.5mg/kg)

% of Dose							
Total radioactivity in the bile		78.4±1.3					
The radioactivities in the Fractions	Fraction I 25.5±1.6		Fraction II 15.3±1.5		Fraction III 14.4±0.2		
MF	0.06±0.04		N.D.		M-27	1.30±0.13	
M-1	6.74±0.45		2.35±0.43		M-29	0.43±0.08	
M-3	0.21±0.00		0.24±0.05		M-32	0.83±0.09	
M-4	N.D.		N.D.		M-33	0.92±0.10	
M-7	2.13±0.25		0.80±0.02		M-39	0.19±0.05	
M-11	N.D.		0.81±0.09		M-40	0.17±0.05	
M-12	0.44±0.04		0.46±0.12				
M-13	0.10±0.02		1.27±0.12				
M-14	0.14±0.00		0.20±0.05				
fBf 1	0.14±0.01	fBc 2	0.36±0.06	fBa 1	0.34±0.06	fBa27	0.24±0.04
fBf 2	0.10±0.02	fBc 3	0.41±0.07	fBa 2	0.48±0.08	fBa28	0.19±0.03
fBf 6	0.41±0.10	fBc 5	0.10±0.01	fBa 4	0.12±0.06	fBa29	0.12±0.02
fBf 7	0.15±0.03	fBc 6	0.19±0.03	fBa 5	0.18±0.05	fBa30	0.26±0.02
fBf11	0.19±0.05	fBc 7	0.40±0.21	fBa 6	0.35±0.04	fBa32	0.16±0.02
fBf12	0.79±0.12	fBc 8	0.11±0.05	fBa 7	0.18±0.02	fBa33	0.20±0.02
fBf13	0.36±0.08	fBc12	0.10±0.04	fBa 8	0.17±0.05	fBa34	0.31±0.07
		fBc13	0.19±0.04	fBa10	0.10±0.05	fBa35	0.12±0.03
		fBc14	2.44±0.62	fBa11	0.11±0.01	fBa37	0.44±0.05
		fBc15	0.10±0.01	fBa12	0.13±0.01	fBa39	0.13±0.01
		fBc17	0.14±0.02	fBa14	0.17±0.03	fBa40	0.10±0.02
				fBa15	0.57±0.07		
				fBa16	0.65±0.05		
				fBa18	0.12±0.03		
				fBa19	0.33±0.01		
				fBa20	0.20±0.04		
				fBa22	0.14±0.00		
				fBa23	0.16±0.03		
				fBa24	0.18±0.03		

Data are expressed as mean values $\pm$ S.E. for three animals.

N.D. ; Not detected.

Ⅲでは fBa 1 ~fBa 45の符号を付した。雄性ウサギの Fraction I では RBf 1 ~RBf 29, Fraction II では RBc 1 ~RBc 21, Fraction III では RBa 1 ~RBa 51の符号を付した。しかし、それらの Table および Fig. では煩雑を避けるため投与量の0.1%未満の未知代謝物については掲載を省略した。

雄性ラットの投与後24時間までの胆汁には、Fraction I にM-1が投与量の4.78%と最も大きな割合を占め、次いでM-7が1.32%、M-12が

0.95%、M-14、M-13、M-4およびM-3が0.73~0.13%認められた。多数の未知代謝物の中では mBf 21, mBf 2 および mBf 18が0.47~0.37%認められた。Fraction II にはM-1が投与量の2.38%、M-13が2.25%、M-7が0.93%、M-12が0.82%、M-11、M-14、M-3が0.65~0.27%認められた。その他の主な未知代謝物としては mBc 13が1.61%、mBc 1が0.62%、mBc 3が0.42%であった。Fraction III にはM-27が5.94%と最も大きな割合を占め、次いでM-29が1.80%、M-32

Table V Excretion of Metabolites of MF into Bile after Subcutaneous Administration of ^{14}C -MF to Male Rabbits (Dose : 0.5mg/kg).

% of Dose					
Total radioactivity in the bile			18.5 $\pm$ 1.8		
The radioactivities in the Fractions	Fraction I 5.1 $\pm$ 0.2		Fraction II 3.1 $\pm$ 0.2		Fraction III 3.7 $\pm$ 0.8
MF	0.01 $\pm$ 0.00		N.D.	M-27	0.24 $\pm$ 0.06
M-1	1.57 $\pm$ 0.14		0.33 $\pm$ 0.01	M-29	0.10 $\pm$ 0.03
M-3	0.08 $\pm$ 0.01		0.03 $\pm$ 0.02	M-32	0.33 $\pm$ 0.21
M-4	N.D.		N.D.	M-33	0.14 $\pm$ 0.07
M-7	0.60 $\pm$ 0.07		0.10 $\pm$ 0.02	M-39	0.03 $\pm$ 0.02
M-11	N.D.		0.11 $\pm$ 0.02	M-40	0.05 $\pm$ 0.03
M-12	0.36 $\pm$ 0.02		0.20 $\pm$ 0.03		
M-13	0.08 $\pm$ 0.01		0.70 $\pm$ 0.02		
M-14	0.84 $\pm$ 0.18		0.25 $\pm$ 0.04		
RBf17	0.10 $\pm$ 0.01	RBc 1	0.14 $\pm$ 0.06	RBa 2	0.11 $\pm$ 0.01
RBf24	0.27 $\pm$ 0.04			RBa11	0.12 $\pm$ 0.00
				RBa14	0.53 $\pm$ 0.09

Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. for three animals.

N.D. ; Not detected .

が0.95%, M-33が0.88%, M-40が0.35%, M-39が0.30%認められた. 多数の未知代謝物の中では mBa 21, mBa 1, mBa 25, mBa 27, mBa 29および mBa 11が0.65~0.41%と比較的割合が多かった.

雌性ラットの投与後24時間までの胆汁には, Fraction I に雌性ラットで認められなかった未変化体が投与量の0.06%認められた. また, M-1が6.74%と最も大きな割合を占め, M-7が2.13%, M-12, M-3, M-14およびM-13が0.44~0.10%認められた. 多数の未知代謝物の中では fBf 12が0.79%, fBf 6が0.41%, fBf 13が0.36%と比較的割合が多かった. Fraction II にはM-1が2.35%認められ, 次いでM-13が1.27%, M-11が0.81%, M-7が0.80%, M-12, M-3およびM-14が0.46~0.20%であった. 多数の未知代謝物の中では fBc 14が2.44%, fBc 3が0.41%, fBc 7が0.40%認められた. Fraction III にはM-27が1.30%, M-33が0.92%, M-32が0.83%, M-29, M-39およびM-40が0.43~0.17%認められた. 多数の未知代謝物の中では fBa 16, fBa 15, fBa 2および fBa 37が0.65~0.44%と比較的割合が多かった. 雄ラットに比較して Fraction I では

M-14の割合が少なく, Fraction III ではM-27が少なかったが, Fraction II では顕著な相違は認められなかった.

雄性ウサギの投与後24時間までの胆汁には, Fraction I に未変化体が投与量の0.01%認められた. また, M-1が1.57%, M-14が0.84%, M-7が0.60%, M-12が0.36%, M-3およびM-13が0.08%認められた. 多数の未知代謝物の中では RBf 24が0.27%, RBf 17が0.10%と比較的割合が多かった. Fraction II にはM-13が0.70%, M-1が0.33%, M-14が0.25%, M-12が0.20%, M-11, M-7およびM-3が0.11~0.03%認められた. 多数の未知代謝物の中では RBc 1が0.14%と比較的多かった. Fraction III にはM-32が0.33%, M-27が0.24%, M-33, M-29, M-40およびM-39が0.14~0.03%認められた. 多数の未知代謝物の中では RBa 14が0.53%, RBa 11が0.12%, RBa 2が0.11%と比較的割合が多かった. ラットに比較していずれの Fraction においても顕著な相違は認められなかった.

3. 尿中代謝物

雄性および雌性ラット, 雄性ウサギに ^{14}C -MF

を0.5mg/kg で皮下投与した際に得られた尿について、Fig. 4に従って順次分画を行った結果、投与量に対して雄性ラットでは Fraction I に2.0%の放射能が認められた。16回反復投与後の試料では Fraction I に2.2%、雌性ラットでは Fraction I に3.4%の放射能が認められた。雌雄ラットとも Fraction II および Fraction III ではいずれも0.5%以下であった。雄性ウサギでは Fraction I に5.5%、Fraction II に1.8%、Fraction III に4.2%の放射能が認められた。しかし、Fraction III については TLC による分析を試みたが、明確な展開像が得られなかったので詳細な検討を行うことができなかった。雄性ラットの Fraction I の2次元 TLC は Fig. 7 に示した。また、各代謝物を測定した結果は Table V, VI に示した。標品と一致する代謝物の他に多数の未知代謝物が認められたので、これらについて雄性ラットの Fraction I では mUf 1 ~ mUf 28, 雌性ラットの Fraction I では fUf 1 ~ fUf 20, 雄性ウサギの Fraction I では RUf 1 ~ RUf 30, Fraction II では RUc 1 ~ RUc 15 の符号を付した。胆汁中代謝物のときと同様に0.1%未満の未知代謝物については Table および Fig. に

Fig. 7 Schematic representation of two-dimensional thin-layer chromatogram of the metabolites of MF in Fraction I of urine after subcutaneous administration of ^{14}C -MF to male rats (dose : 0.5mg/kg).

● ; >1.00%, ● ; 0.50%~0.99%,
 ⊙ ; 0.10%~0.49%, ○ ; <0.10%

掲載しなかった。雄性ラットの1回投与後48時間までの尿中には、Fraction I にM-14が投与量の0.94%と最も大きな割合を占め、次いでM-13が0.05%、M-12が0.03%認められた。多数の未知代謝物の中では mUf 1 と mUf 13 の割合が多く、それぞれ0.18%、0.13%認められた。

16回反復投与後48時間までの尿中には、単回投与群と同様に、M-14が投与量の1.03%と最も大きな割合を占め、次いでM-12が0.07%、M-13が0.03%認められ、未知代謝物 mUf 1 が0.19%、mUf 13 が0.15%と比較的割合が多かった。その他の minor metabolites については、単回投与群に比較して未知代謝物が相対的に増加する傾向を示した。

雌性ラットの単回投与後48時間までの尿中には、Fraction I にM-14が投与量の0.72%と最も大きな割合を占め、次いでM-12が0.06%認められた。また、多数の未知代謝物中では fUf 1 が0.38%、fUf 8 が0.37%、fUf 5 が0.30%と比較的多かった。雄性ラットに比較して既知代謝物の割合が減少し未知代謝物が増加した。

雄性ウサギの単回投与後72時間までの尿中には、Fraction I にM-14が投与量の1.47%と最も大きな割合を占め、次いでM-12が0.16%認められた。雌雄ラットに認められなかったM-1およびM-3がわずかながら認められた。その他の主な未知代謝物としては RUf 13 が0.89%と比較的多く、RUf 3, RUf 2 および RUf 4 が0.26~0.16%認められた。Fraction II ではM-14が投与量の0.15%、M-12が0.12%、M-11が0.06%認められた。

考 察

^{14}C -MF を雌雄ラットおよび雄性ウサギに皮下投与したときの血漿中、胆汁中および尿中の代謝物の構造推定を、合成した代謝物標品を用いて主として2次元 TLC の co-chromatography により行った。また、代謝物の TLC を削り取り、その放射能を測定して定量を行い、併せてその代謝経路を推定した。

皮下投与された MF は血中に移行し、ほとんど未変化のままで各組織へ分布されるものと考えられる。本薬物のラットにおける主排泄経路は胆

Table V Excretion of Metabolites of MF into Urine after a Single or Repeated Subcutaneous Administration of ^{14}C -MF to Rats (Dose : 0.5mg/kg)

	% of Dose		
	Male		Female
	Single	Repeated	Single
Total radioactivity in the urine	2.5 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.9
The radioactivities in the Fractions	Fraction I 2.0 $\pm$ 0.0	Fraction I 2.2 $\pm$ 0.2	Fraction I 3.4 $\pm$ 0.1
MF	N.D.	N.D.	N.D.
M-1	N.D.	N.D.	N.D.
M-3	N.D.	N.D.	N.D.
M-4	N.D.	N.D.	N.D.
M-7	0.02 $\pm$ 0.00	N.D.	N.D.
M-11	N.D.	N.D.	N.D.
M-12	0.03 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
M-13	0.05 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	N.D.
M-14	0.94 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.29	0.72 $\pm$ 0.07
mUf 1	0.18 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.01	fUf 1 0.38 $\pm$ 0.06
mUf13	0.13 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.01	fUf 3 0.13 $\pm$ 0.02
			fUf 5 0.30 $\pm$ 0.06
			fUf 7 0.12 $\pm$ 0.01
			fUf 8 0.37 $\pm$ 0.06
			fUf 9 0.15 $\pm$ 0.01
			fUf10 0.14 $\pm$ 0.01

Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. for three animals.
N.D. ; Not detected.

汁中であり、その胆汁中で未変化体は痕跡程度しか検出されなかったことから、本薬物は主に肝において代謝を受けるものと考えられる。胆汁において検出された代謝物の構造から、MF は主として3通りの経路で代謝されと考えられる。すなわち、furoyl 基の脱離、6 β 位の水酸化および21位クロールの水酸基への変換であり、これらの反応が相前後して起こることにより、代謝物M-1、M-4、M-7、M-11、M-12、M-13、M-14が生成したものと推測される。この中で主代謝物は furoyl 基の脱離したM-1で、遊離体分画(Fraction I)と抱合体分画(Fraction II)を合わせて雄性ラットでは投与量の7.2%、雌性ラットでは9.1%であった。このM-1の抗炎症作用は、原薬物MFの1%以下であることが塩野義研究所の中村ら(私信)により報告されており、肝での代謝不

活性化の主経路の一つであると考えられる。

ここに生成した代謝物群の一部は、グルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けてそれぞれの抱合体を生成し、また、一部はさらに代謝過程の進んだ生成物を生じるが、その際、furoyl 基の有無により代謝速度が異なり、furoyl 基を保持しているものは代謝が速やかに進行していると推察される。その結果、17位 defuroyl 体生成物が全般的により高い濃度で検出されている傾向がうかがわれる。コルチコイド代謝で一般的にみられる経路である21位水酸基のカルボン酸体への酸化⁴⁻⁹⁾は、本薬物においても認められ、M-11、M-13からおのおのM-32、M-27が生成し、M-32はさらにM-33まで変換されることが認められた。

ラットの尿中排泄は投与量の3~5%に過ぎず、その中で遊離体分画が6~8割を占め、その

Table VI Excretion of Metabolites of MF into Urine after Subcutaneous Administration of ^{14}C -MF to Male Rabbits (Dose : 0.5mg/kg)

		% of Dose	
Total radioactivity in the urine		16.1 $\pm$ 0.9	
The radioactivities in the Fractions	Fraction I 5.5 $\pm$ 0.2		Fraction II 1.8 $\pm$ 0.1
MF	N.D.		N.D.
M-1	0.07 $\pm$ 0.00		N.D.
M-3	0.03 $\pm$ 0.01		N.D.
M-4	N.D.		N.D.
M-7	0.02 $\pm$ 0.00		0.02 $\pm$ 0.01
M-11	N.D.		0.06 $\pm$ 0.02
M-12	0.16 $\pm$ 0.01		0.12 $\pm$ 0.01
M-13	0.06 $\pm$ 0.03		0.03 $\pm$ 0.01
M-14	1.47 $\pm$ 0.19		0.15 $\pm$ 0.03
RUf 1	0.11 $\pm$ 0.02	RUc11	0.10 $\pm$ 0.01
RUf 2	0.21 $\pm$ 0.01		
RUf 3	0.26 $\pm$ 0.01		
RUf 4	0.16 $\pm$ 0.02		
RUf 5	0.15 $\pm$ 0.02		
RUf13	0.89 $\pm$ 0.08		
RUf14	0.12 $\pm$ 0.01		
RUf16	0.10 $\pm$ 0.02		

Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. for three animals.

N.D. ; Not detected.

遊離体分画の唯一の主代謝物はM-14で投与量の約1%であった。他はTLC上極性の高い不明確なスポットの未知代謝物であった。また、その他の分画については、投与量の1%以下であったので詳細については検討しなかった。

ウサギでの代謝物は、量的に若干の違いはあるものの、各分画共ラットと共通の代謝物がみられた。血漿中での主成分は未変化体であり、胆汁中ではM-1が投与量の1.9%で、尿中ではM-14が1.6%であった。以上の結果から、MFの皮下投与後の代謝経路をFig. 8のように推定した。

MFの21位クロールの水酸基への代謝分解はHalcinonide^{5,7)}でもみられ、酵素による加水分解¹⁰⁾と考えられる。6 β 位の水酸化は、合成コルチコステロイドでは主代謝反応の一つで、多くの報告^{4-9,11-14)}のみられるところである。また、この反応では雌雄差^{15,16)}がよく知られており、MFにおいてもM-13、M-14などは雄性ラット

で多く生成し、特にM-27では雄で投与量の5.9%を占め、雌の1.3%を大きく上回っていた。一方、17位 furoyl基の脱離の機構についてはまだ明らかでない。一般的に、17,21-ジエステル型の合成コルチコステロイドの場合、まず、21位エステルが速やかに酵素的に加水分解され、17位エステルは直接加水分解を受けるより、むしろ21位へ転位した後、加水分解を受ける^{9,17,18)}と考えられている。しかし、21位の水酸基がクロールと置き換っているMFでは、サイクリックな転位中間体を採れない。この転位が不可能と考えられる本薬物において、主代謝物としてM-1を生成する様式は上記とは異なり、例えば、furoyl基の加水分解、あるいは酸化分解などの可能性がうかがえるところである。本薬物およびその代謝物の9 α -C1, 11 β -OH部分構造は、アルカリ性条件下で脱塩酸してエポキシドへ閉環する性質を持っている。今回の代謝物検索の過程で認められたエポキ

Fig. 8 Tentatively Proposed Metabolic Pathway of MF in Rat and Rabbit

シド体M-3, M-29, M-39, M-40なども、試料の抽出分離過程での artifact の可能性が大きく、それぞれM-1, M-27, M-32, M-33から生成したものと考えられる。特に抽出分離操作の繰り返される酸性分画(Fraction III)中のM-29, M-39, M-40は生成量の多くなる傾向がみられた。本実験で酸性分画の分析法として別法を採用した理由もこの点にあり、アルカリとの接触の少ない Fig. 3 右側の抽出手順では左側の手順に比べてM-29, M-39, M-40の生成量の減少がみられた。ラット胆汁中の抱合体分画でdefuroyl 体M-1が投与量の2.4%認められた。M-1が抱合体の aglycone であったとすれば、抱合にあずかったと考えられる官能基は11 β -OH, または17 α -OH であるが、これらの位置は共に立体障害が大きく抱合反応に困難が予想されるにもかかわらず

ず、生成量が比較的多い点は興味深いところである。なお、以上の代謝物の分取、同定および代謝物の諸性質の詳細については検討中であり、別報により報告する。

要 約

^{14}C -MF を0.5mg/kg の投与量で雌雄ラットおよび雄性ウサギに投与した際の血漿中、胆汁中および尿中の代謝物について検討した。

代謝物の推定は一連の代謝物標品との co-chromatography によって行った。これら代謝物の構造から3通りの主代謝経路が考えられた。すなわち、1)21位 Cl の水酸基への変換、2)6 β 水酸化、3)17位 furoyl 基の脱離である。これらの反応が相前後して起こることにより種々の代謝物が生成された。

血漿中代謝物

ラット, ウサギ共に分析したいずれの時点においても, 放射性物質の主成分は未変化体 MF であり, ピーク時近傍である4時間後の血漿中濃度でみた場合, 雄性ラットで13.1ng/ml, 雌性ラットで22.4ng/ml, そして雄性ウサギでは2.8ng/mlであった。

胆汁中代謝物

雌雄ラットの24時間までの胆汁には投与量の約78%の放射能が回収された。遊離体分画(Fraction I)および抱合体分画(Fraction II)の主代謝物は17-OH 体(M-1)であり, 雄性ラットではそれぞれ投与量の4.8%, 2.4%であり, 雌性ラットではそれぞれ6.7%, 2.4%であった。酸性分画(Fraction III)の主代謝物は, 雌雄ラット共に6 β -OH, 21-カルボン酸体(M-27)であったが, その量は雄が5.9%と雌の1.3%を有意に上

回った。

ウサギの24時間までの胆汁には投与量の約19%の放射能が回収された。遊離体分画の主代謝物はM-1で投与量の1.6%であり, 抱合体分画の主代謝物は6 β , 21-(OH)₂体(M-13)で投与量の0.7%であった。酸性分画では21-カルボン酸体(M-32)が主代謝物として0.3%認められた。

尿中代謝物

ラットでは投与量の3~5%の放射能しか排泄されなかった。尿中で唯一明確に認められた主代謝物は6 β , 17, 21-(OH)₃体(M-14)で, 投与量に対して1%であった。他は不明確な多数の微量代謝物であった。

ウサギでは72時間までの尿に投与量の約16%の放射能が排泄された。その主代謝物は遊離体分画, 抱合体分画共にM-14であり, それぞれ投与量の1.5%と0.2%であった。

文 献

- 1) 菅野浩一, 溝尻顕爾, 江角凱夫, 高市松夫, 三宅隆行, 関 英昌: Mometasone furoate (MF) の生体内動態に関する研究 (第1報). ラットおよびウサギにおける経皮投与時の吸収, 分布, 排泄. 薬物動態, 5(6): 785-794 (1990).
- 2) 菅野浩一, 溝尻顕爾, 江角凱夫, 高市松夫, 三宅隆行, 関 英昌: Mometasone furoate (MF) の生体内動態に関する研究 (第2報). ラットおよびウサギにおける皮下投与時の吸収, 分布, 排泄. 薬物動態, 5(6): 795-817 (1990).
- 3) 菅野浩一, 溝尻顕爾, 江角凱夫, 高市松夫, 三宅隆行, 関 英昌: Mometasone furoate (MF) の生体内動態に関する研究 (第3報). ラットにおける胎仔および乳汁移行. 薬物動態, 5(6): 819-825 (1990).
- 4) Gerhards, E., Nieuweboer, B., Schulz, G. und Gibian, H.: Stoffwechsel von 6 α -fluor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-11 β , 21-diol-3,20-dion (Fluocortolon) beim menschen. *Acta Endocrinol.*, 68: 98-126 (1971).
- 5) Kripalani, K.J., El-Abdin, A. Zein., Dean, A.V. and Cohen, A.I.: Biotransformation of Halcinonide in the Dog. *Pharmacologist*, 19: 168 (1977).
- 6) Gordon, S. and Morrison, J.: The metabolic fate of triamcinolone acetate in laboratory animals. *Steroids*, 32: 25-35 (1978).
- 7) 中島栄一, 繁原英治, 堀口正明, 林 了三, 田中 実, 西垣 隆, 宮腰昶宏: 局所抗炎症ステロイド剤ハルシノニドの代謝研究. 薬物動態, 1: 143-159 (1986).
- 8) 新藤恭司, 塚本雄次, 安田行寛, 丸中照義, 梅野幸彦, 南 慶典, 田中基明: Dexamethasone 17,21-dipropionate (THS-101) の体内動態 (第3報) ラットにおける静脈内あるいは経皮投与後の代謝物の同定と代謝経路, 応用薬理, 27: 1057-1072 (1984).
- 9) Aoyama, S. and Kamata, K.: Metabolic fate of alclometasone dipropionate in rats, rabbits, and mice. *Drug Metab. Dispos.*, 18: 409-417 (1990).
- 10) Testa, B. and Jenner, P.: Drug Metabolism: Vol. 4 Chemical and biochemical aspects (monographs), pp. 166-169, Marcel Dekker Inc. New York and Basel (1976).
- 11) Florini, J.R., Smith, L.L. and Buyske, D.A.: Metabolic fate of a synthetic corticosteroid (triamcinolone) in the dog. *J. Biol. Chem.*, 236: 1038-1042 (1961).

- 12) Butler, J. and Gray, C.H. : The metabolism of betamethasone. *J. Endocrinol.*, **46** : 379-390 (1970).
- 13) Kripalani, K.J., Cohen, A.I., Weliky, I. and Schreiber E.C. : Metabolism of triamcinolone acetonide-21-phosphate in dogs, monkeys and rats. *J. Pharm. Sci.*, **64** : 1351-1359 (1975).
- 14) Chu, N.I., Amos, B.A., Tökés, L., Maddox, M.L., Matin, S.B., Hama, K. M., Patterson, J.W., Wagner, P.J., Bell, J.P. and Chaplin, M.D. : Disposition of flunisolide in the rat, mouse, dog, rhesus monkey and cynomolgus monkey. *Drug Metab. Dispos.*, **7** : 81-89 (1979).
- 15) Kato, R., Takanaka, A. and Takayanagi, M. : Studies on mechanism of sex difference in drug-oxidizing activity of liver microsomes. *Jpn. J. Pharmacol.*, **18** : 482-489 (1968).
- 16) Kato, R. : Sex-related differences in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.*, **3** : 1-32 (1974).
- 17) 川野泰明, 藤田昌子, 柴元 靖, 別所貞雄 : ヒドロコルチゾン-17-ブチレートの分解機構. 日本薬学会第98年会 (1978) 講演要旨集 pp. 192.
- 18) 大石孝義, 出口隆志, 丸茂博大 : Beclomethasone 17, 21-dipropionate の代謝. 応用薬理, **22** : 717-727 (1981).