Miconazole の生体内動態 (第3報) :
Miconazole のラットにおける口腔内塗布後の
吸収, 分布および代謝

大澤 伸雄, 土屋 徳弘, 江川聖一郎, 荻原 琢男, 田中 博之, 井田 圭一
持田製薬株式会社富士中央研究所 〒412 静岡県御殿場市神場字上ノ原722

Key words : Miconazole, Anti-fungal agent, Oral mucosa, Rat,
Absorption, Distribution, Metabolism

Studies on the Metabolic Fate of Miconazole (3) :
The Absorption, Distribution and Metabolism after Application of
Miconazole to Oral Mucosa of Rats

Nobuo OHZAWA, Tokuhiko TSUCHIYA, Seiichiro EGAWA, Takuo OGIHARA,
Hiroyuki TANAKA and Keiichi IDA

Fuji Central Research Laboratory, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.,
722 Jimba-Aza-Uenohara, Gotemba, Shizuoka, 412 Japan

Summary

The plasma concentration, distribution and metabolism of [^{14}C]miconazole ([^{14}C]MCZ) were studied after application of [^{14}C]MCZ gel (10mg/kg of miconazole) to oral mucosa of male rats.

1. After application, the plasma radioactivity reached the maximum level of $1.82\mu\text{g eq./ml}$ at 2hr, and then declined in a similar manner as after oral administration of [^{14}C]MCZ.

2. At 1hr after application, high levels of radioactivity were observed in the epidermis of lip, palatum, tongue and buccal mucosa on the enlarged autoradiograms, and the radioactivity was high in the epidermis of buccal mucosa, while low in the buccal muscle.

3. At 1 and/or 6hr after application, the unchanged drug was the main component of radioactivity in the buccal muscle and epidermis of the buccal mucosa, and the minor quantities of other compounds were also detected in each tissue; oxidative ring-broken form (M8) in both tissues, and Uk3 and Uk10, unknown metabolites in the buccal muscle.

緒 言

ミコナゾール (MCZ, 1-{2,4-dichloro- β -(2,4-dichlorobenzyl)oxy}phenethyl}imidazole) は、静脈内投与において深在性真菌症治療薬として臨床で使用され、また、ゲル剤として口腔内塗布による口腔内真菌感染症に対する治療効果が期待されている薬剤である。MCZ の生体内動態については、その硝酸塩および硝酸塩の ^3H 標識体をラット、ウサギおよびイヌに静脈内および経口投与した際の検討についてすでに報告した^{1,2)}。また、MCZ の ^{14}C 標識体 (^{14}C]MCZ) をラットに経口投与した際の生体内動態についても報告した^{3,4)}。今回、さらに、 ^{14}C]MCZ ゲルを雄ラットの口腔内に塗布したときの血漿中濃度、一部の口腔内組織分布および代謝について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 使用薬物

MCZ ゲル (持田製薬株式会社、製剤研究室、試験用, Lot No. 8049) は、グリセリンを主剤とし、これにポリソルベート80、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび α 化デンプンを加えたものを基剤とした2%のMCZを含有するものを使用した。 ^{14}C]MCZ は前報³⁾と同様の比放射能698.93MBq (18.89mCi/mmol) のものを、また、代謝物M8は、MCZ を経口投与したラットの血漿中より抽出、精製したもの⁴⁾を使用し、その構造式を Fig. 1 に示した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

Fig. 1 Chemical structures of miconazole and M8.

2. 実験動物

8週齢のWistar系雄ラットを1群3匹、オートラジオグラフィーでは1群1匹を、購入後約1週間の予備飼育の後、実験に使用した。動物は予備飼育を含め、実験期間中室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で飼育した。

ラットはゲル塗布前18時間絶食させ、摂餌(CE-2, 日本クレア)は投与後6時間より再開した。この間水は自由に与えた。投与時のラットの体重は166~189gであった。

3. 投与量および投与方法

投与量は、MCZ 量として10mg/kg とした。 ^{14}C]MCZ ゲルは、 ^{14}C]MCZ に所定量の2% MCZ ゲルを加え、乳鉢で十分に混和して調製した。 ^{14}C]MCZ ゲルをスパーテルを用いてラットの口蓋面、頬粘膜および舌に均一になるように塗布した。投与放射能は2.44MBq ($66\mu\text{Ci}$)/kg であった。

4. 試料の採取

1) 血 漿

口腔内に塗布後経時的に、ヘパリン処理した注射筒を用いて頸静脈より採血し、この血液を 4°C 、 $1700 \times g$ 、10分間遠心分離を行い、血漿を採取した。

2) 組 織

口腔内に塗布後、所定の時間に口腔内表面に残存するゲルを綿棒で十分清拭した後、エーテル麻醉下放血死させ、血液、血漿および頬粘膜上皮、頬筋肉および舌を採取した。組織は秤量後ホモジナイズし、一部を採取して放射能測定用試料とした。

5. オートラジオグラフィー

口腔内に塗布後、所定の時間に口腔内表面に残存するゲルを綿棒で十分清拭した後、断頭屠殺し、速やかに頭部をドライアイス-ヘキサンで凍結し、クライオミクロトーム (450MP, LKB) により $35\mu\text{m}$ の頭部断層切片を作製した。乾燥切片は、工業用X線フィルム (Xl-150, Fuji) に密着させ、2週間暗室にて露出し、拡大したオートラジオグラムを作製した。また、別に頭部の縦層およ

び断層面の写真撮影を行い、オートラジオグラムの指標とした。

6. 代謝物の分析

口腔内に塗布後、1および6時間の頬粘膜上皮および頬筋肉にそれぞれ少量の水を加え、超音波発生装置(UD-201, Tomy)により超音波処理して均一に分散させ、ホモジネートの3~6倍容のメタノールを加えて5分間振とうし、 $1700 \times g$ にて 24°C 、10分間遠心分離して、その上清を採取した。この操作を放射能の抽出率が90%以上になるまで繰り返した後、抽出液を濃縮し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。代謝物の組織内放射能濃度は次式に従って算出した。

代謝物の組織内放射能濃度 = (HPLC における代謝物ピークの総放射能/HPLC に注入した総放射能) $\times$ 組織内総放射能濃度

HPLC 条件; システム: Jasco 800 (日本分光), カラム: Inertsil ODS-2 $4.6 \phi \times 250\text{mm}$ (ガスクロ工業), ガードカラム: LiChrosorb RP-18 $4 \text{ mm } \phi \times 4 \text{ mm}$ (Merck), 移動溶媒: 初期値を0.02Mリン酸緩衝液 pH6.0: アセトニトリル = 80:20 (V/V) とし、17分後に20:80 (V/V) とするリニアグラジエント。その後、20:80 (V/V) のまま13分間、カラム温度: 35°C 、検出波長: 230nm、ラジオアナライザー: Flo-one Beta (Packard), RI シンチレータ: Flo-scint II (Packard) 3ml/min, セルサイズ: 0.5ml

なお、代謝物の同定は HPLC における標品の保持時間(Rt)を指標に行った。この条件における保持時間は MCZ が25.0分、M8が20.8分であった。

7. 放射能の測定

各放射能測定用試料は、試料に直接シンチレーター(Aquasol-2, NEN)を加えるか、もしくは組織溶解剤(Soluene-350, Packard)に溶解し、必要に応じ過酸化水素水により脱色を行った後、シンチレーター(Hionic-Fluor, Packard)

を加えて放射能を測定した。放射能の測定は液体シンチレーションカウンター(LSC-701, Aloka および Type LS 6000, Beckman)を用い、計測は5分間行った。血液、血漿および組織内の放射能濃度は MCZ に換算し、 $\mu\text{g eq./ml}$ もしくは $\mu\text{g eq./g}$ で表示した。

8. ファルマコキネティックパラメータの算出

最高血漿中濃度到達時間(T_{max})以降の血漿中放射能濃度を2 exponential 式にあてはめ、非線形最小二乗法プログラム MULTI⁵⁾によって解析した。また、台形法により投与後t時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積(AUC_{0-t})を、消失相の推移からの外挿法により投与後t時間より無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積($\text{AUC}_{t-\infty}$)を算出し、両者を加算して投与後無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積($\text{AUC}_{0-\infty}$)を求めた。なお、比較のために $[^{14}\text{C}]$ MCZ 10mg/kg を経口投与した後の血漿中放射能濃度推移およびファルマコキネティックパラメータ³⁾を表示した。2群間の平均値の有意差検定は、有意水準を両側5%とする Student の t 検定を行った。

実験結果

1. 血漿中放射能濃度

ラットに $[^{14}\text{C}]$ MCZ ゲル10mg/kg を口腔内に塗布した後の血漿中放射能濃度の推移を、 $[^{14}\text{C}]$ MCZ 10mg/kg を経口投与した後の推移³⁾とともに Fig. 2に、ファルマコキネティックパラメータを Table I に示した。

放射能濃度は塗布後上昇し、2時間(T_{max})で最高濃度(C_{max}) $1.82 \mu\text{g eq. of MCZ/ml}$ を示し、以後、経口投与の場合とほぼ同様に第1相の半減期($T_{1/2\alpha}$)が0.81時間、第2相の半減期($T_{1/2\beta}$)が11.15時間の2相性で低下した。また、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ は $20.98 \mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$ であった。

2. 組織内分布

1) オートラジオグラフィー

ラットに $[^{14}\text{C}]$ MCZ ゲル10mg/kg を口腔内に塗布した後の頭部断面の拡大したオートラジオグラムを Fig. 3a, b および c に示した。

Table I Pharmacokinetic parameters obtained from plasma concentrations after application to oral mucosa of [^{14}C]MCZ gel and oral administration of [^{14}C]MCZ in male rats (Dose : 10mg/kg)

Route	N	$T_{\max}$ (hr)	$C_{\max}$ ($\mu\text{g eq.}/\text{ml}$)	$T_{1/2\alpha}$ (hr)	$T_{1/2\beta}$ (hr)	$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g eq.}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)
Oral mucosa	3	2.00 ± 0.00	1.82 ± 0.03	0.81 ± 0.04	11.15 ± 0.42	20.98 ± 1.47
p.o.	4	1.00 ± 0.00	2.30 ± 0.09	0.72 ± 0.04	12.48 ± 0.87	24.85 ± 0.86

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three or four rats.

Fig. 2 Plasma concentrations of radioactivity after application of [^{14}C]MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10 mg/kg).

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three rats.

○—○ ; application to oral mucosa

△—△ ; oral administration

塗布後1時間では、上下口唇の粘膜上皮、舌、口蓋および頬粘膜上皮に高い放射能が認められ、頬筋肉、舌筋肉層および歯肉部ではほとんど認められなかった。6時間では、これらの表層にわずかな放射能が認められたが、24時間では放射能はほとんどの組織から消失していた。

2) 組織内放射能濃度

ラットに [^{14}C]MCZ ゲル10mg/kg を口腔内に塗布した後の組織内放射能濃度を Table II に示した。

塗布後1時間の放射能濃度は、舌、頬粘膜上皮および頬筋肉内の順に高く、それぞれ血漿中濃度 ($1.12 \mu\text{g eq.}/\text{ml}$) の98.9, 69.8および2.3倍を示した。6時間では、組織内放射能濃度は低下し、筋肉は血漿とほぼ同程度、頬粘膜上皮および舌の

放射能濃度は血漿中濃度 ($1.15 \mu\text{g eq.}/\text{ml}$) のそれぞれ15.6および6.6倍を示した。24時間では、いずれもさらに低下し、筋肉は血漿中濃度 ($0.29 \mu\text{g eq.}/\text{ml}$) 以下であったが、頬粘膜上皮および舌にはそれぞれ血漿中濃度の2.6および1.4倍の放射能濃度が認められた。

3. 代 謝

ラットに [^{14}C]MCZ ゲル10mg/kg を口腔内に塗布した後の頬粘膜上皮および頬筋肉抽出液中の各代謝物の HPLC ラジオクロマトグラムをそれぞれ Fig. 4 および 5 に、また、MCZ および各代謝物濃度を Table III に示した。

頬粘膜上皮には、塗布後1時間で MCZ のみが認められ、そのときの濃度は $78.16 \mu\text{g}/\text{g}$ であった。6時間では、MCZ は1時間の約1/5に低下し、そのときの濃度は $17.05 \mu\text{g}/\text{g}$ であった。また、代謝物としてM8がわずかに認められ、その濃度は $0.90 \mu\text{g eq.}/\text{ml}$ であった。一方、頬筋肉には塗布後1および6時間で、MCZ およびM8以外に、未同定の代謝物として Uk3 ($R_t=10.9$ 分) および Uk10 (23.0分) の2つが認められたが、いずれも $0.1 \mu\text{g eq.}/\text{g}$ 以下でわずかなものであった。

考 察

[^{14}C]MCZ ゲルを雄ラットの口腔内に塗布したときの血漿中濃度、一部の口腔内組織分布および代謝について検討したので報告する。

[^{14}C]MCZ ゲルを口腔内に塗布した後の血漿中放射能濃度は、経口投与時³⁾ に比し、 $T_{\max}$ の遅延、 $C_{\max}$ の低下が認められたが、 $T_{1/2\alpha}$ および $T_{1/2\beta}$ はほぼ一致していた。口腔内に塗布した場合、塗布部位から徐々に逸脱し、吸収部位

Fig. 3a Autoradiograms showing the distribution of radioactivity after application of [^{14}C]MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg).

Legend : 1. Brain 2. Nose 3. Tongue 4. Tongue (epidermis)

5. External naris 6. Upper lip 7. Upper lip (epidermis)

8. Lower lip 9. Lower lip (epidermis)

10. Gum 11. Gum (epidermis) 12. Palatum

13. Palatum (epidermis) 14. Bucca 15. Buccal mucosa (epidermis) 16. Eye ball

Fig. 3b Autoradiograms showing the distribution of radioactivity after application of $[^{14}\text{C}]$ MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg).

Legend : 1. Brain 2. Nose 3. Tongue 4. Tongue (epidermis)
 5. External naris 6. Upper lip 7. Upper lip (epidermis)
 8. Lower lip 9. Lower lip (epidermis)
 10. Gum 11. Gum (epidermis) 12. Palatum
 13. Palatum (epidermis) 14. Bucca 15. Buccal mucosa (epidermis) 16. Eye ball

Fig. 3c Autoradiograms showing the distribution of radioactivity after application of [^{14}C]MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg).

Legend : 1. Brain 2. Nose 3. Tongue 4. Tongue (epidermis)
 5. External naris 6. Upper lip 7. Upper lip (epidermis)
 8. Lower lip 9. Lower lip (epidermis)
 10. Gum 11. Gum (epidermis) 12. Palatum
 13. Palatum (epidermis) 14. Bucca 15. Buccal mucosa (epidermis) 16. Eye ball

Table II Tissue concentrations of radioactivity after application of [^{14}C]MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg)

Tissue	Concentration ($\mu\text{g eq. of MCZ/g or ml}$)		
	1 hr	6 hr	24 hr
Plasma	1.12 $\pm$ 0.37	1.15 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.01
Whole blood	0.73 $\pm$ 0.23	0.68 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.01
Buccal muscle	2.55 $\pm$ 0.37	1.25 $\pm$ 0.10	0.09 $\pm$ 0.00
Buccal mucosa (epidermis)	78.16 $\pm$ 10.49	17.95 $\pm$ 0.92	0.75 $\pm$ 0.04
Tongue	110.75 $\pm$ 40.41	7.55 $\pm$ 0.60	0.41 $\pm$ 0.07

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three rats.

Fig. 4 HPLC radiochromatograms of the buccal mucosa after application of [^{14}C] MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg).

Fig. 5 HPLC radiochromatograms of the buccal muscle after application of [^{14}C] MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg).

Table III Concentrations of MCZ and its metabolites in application site after application of [^{14}C] MCZ gel to oral mucosa of male rats (Dose : 10mg/kg)

Tissue		Concentration ($\mu\text{g eq. of MCZ/g}$)	
		1 hr	6 hr
Buccal mucosa	MCZ	78.16 ± 10.49	17.05 ± 0.67
	M8	N.D.	0.90 ± 0.45
	Total	78.16 ± 10.49	17.95 ± 0.92
Buccal muscle	MCZ	2.09 ± 0.22	1.04 ± 0.17
	M8	0.28 ± 0.23	0.06 ± 0.03
	Uk3	0.09 ± 0.05	0.10 ± 0.02
	Uk10	0.09 ± 0.07	0.05 ± 0.02
	Total	2.55 ± 0.37	1.25 ± 0.10

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three rats.

N.D. : not detected.

である消化管へ輸送されることから、消化管への持続注入に類似した形をとり、そのため、胃内に直接投与したものと異なって、 T_{max} は遅延し、 C_{max} はやや低値を示したものと考えられた。また、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ は経口投与の場合の値 ($24.85 \mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$) の84.4%を示し、有意な差は認められなかったことから、口腔内に塗布した [^{14}C]

MCZ の大部分が経口投与と同様に、体内に吸収されていると考えられた。なお、ラットに [^{14}C] MCZ を経口投与したときの吸収率は79~94%と考えられるが、初回通過効果により、その血漿中未変化体濃度は極めて低い推移を示したことから⁴⁾、口腔内に塗布した場合も、血漿中の未変化体濃度は比較的低いものと考えられた。

頭部の断層拡大オートラジオグラムにおいて、塗布後1時間では、舌、頬、口蓋および唇の粘膜上皮内に高い放射能が認められ、放射能は塗布した部位に局在していた。組織中放射能濃度は、塗布後1および6時間の頬粘膜の上皮および舌にはかなり高濃度で認められ、また、頬筋肉はきわめて低く、オートラジオグラムの結果と一致していた。塗布後24時間でも、頬粘膜上皮中には血漿中濃度の2.6倍の $0.75\mu\text{g eq. /g}$ の放射能が認められた。Scheijgrond (Janssen 社内報)は、健康人におけるMCZの口腔内粘膜吸収はきわめてわずかであることを報告しており、今回のラットにおける検討も、頬粘膜より頬の筋肉に移行している量はきわめて少なく、口腔内粘膜からの吸収はきわめて少ないものと考えられた。

代謝物分析の結果から、頬粘膜上皮の放射能の大部分は未変化体由来のものであった。平谷と山口⁶⁾は、MCZの各種深在性真菌症および皮下真菌症の病原菌に対する*in vitro*の抗菌活性を検討し、保存株のいずれの菌種に対しても $10\mu\text{g/ml}$ 以下のMIC値を示し、臨床分離株に対しても、大部分を $1.25\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で阻止することを報告している。この報告および2%MCZゲル口腔内投与後の口腔内真菌症における感染部位である頬粘膜中のMCZの濃度推移から、少なくとも6時間、菌種によっては24時間まで効果が持続するものと考えられた。

代謝物としては、頬粘膜上皮ではM8がわずかに認められ、頬筋肉ではM8および血漿中には検出されなかった2つの未同定の代謝物が認められ

た。これら代謝物は、静脈内投与¹⁾および経口投与時³⁾の筋肉中放射能分布との比較から、血中から分布されたものではなく、組織内で代謝されて生成した可能性も考えられた。

以上のことから、ラットにおいて、 $[^{14}\text{C}]$ MCZゲルを口腔内投与後、MCZの口腔粘膜からの吸収は少なく、大部分が経口投与と同様の消失動態を示すものと推察された。また、口腔粘膜中のMCZ濃度は、少なくとも6時間は抗菌活性の有効濃度に維持されることが示唆された。

要 約

$[^{14}\text{C}]$ MCZゲルを雄ラットの口腔内に塗布したときの血漿中濃度、分布および代謝について検討した。

1. 血漿中放射能濃度は、塗布後2時間で C_{max} $1.82\mu\text{g eq. /ml}$ を示し、以後、同用量の $[^{14}\text{C}]$ MCZを経口投与した後の血漿中濃度推移と同様の推移で低下した。

2. 塗布後1時間における拡大オートラジオグラフィにおいて、上下口唇、口蓋、舌および頬粘膜の各上皮に強い放射能が認められ、また、組織内放射能濃度は舌および頬粘膜上皮が高く、頬筋肉のそれは低値であった。

3. 塗布後1および/もしくは6時間において、未変化体が頬筋肉および頬粘膜上皮中の放射能の大部分であり、また、両組織でイミダゾール環の酸化的開環体(M8)、頬筋肉でさらに未同定の代謝物として、Uk3およびUk10がわずかに認められた。

文 献

- 1) 小雀浩司, 石黒淳三, 土屋徳弘, 栗田昌夫, 大西治夫: 医薬品研究, **7**: 382 (1976).
- 2) 小雀浩司, 石黒淳三, 永田忠博, 大西治夫, 岡本敏彦: 医薬品研究, **9**: 357 (1978).
- 3) 大澤伸雄, 土屋徳弘, 佐藤尚文, 今井芽呂仁, 井田圭一, 江川聖一郎, 荻原琢男, 田中博之: 医薬品研究, **24**: 151 (1993).
- 4) 大澤伸雄, 荻原琢男, 今井芽呂仁, 長澤勝亮, 田中博之, 中瀧裕之, 中井康博: 医薬品研究, **24**: 173 (1993).
- 5) 山岡 清, 谷川原祐介: マイコンによる薬物速度論入門, 南江堂, 157 (1983).
- 6) 平谷民雄, 山口英世: *Chemotherapy*, **32**: 534 (1986).