牛における 1,25-dihydroxyvitamin D₃ の経皮吸収

浪岡 徹¹⁾ 山岸則夫¹⁾ 大倉徳太²⁾ 赤坂 茂³⁾
阿部 岳³⁾ 千田広幸³⁾ 佐藤 繁¹⁾ 内藤善久⁴⁾

¹⁾岩手大学農学部獣医学課程大動物診断治療学研究室

²⁾上川中央農業共済組合中央家畜診療所

³⁾岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンスセンター

⁴⁾岩手大学農学部附属動物医学食品安全教育研究センター

Transdermal absorption of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in cattle

T. Namioka¹⁾, N. Yamagishi¹⁾, N. Okura²⁾, S. Akasaka³⁾, T. Abe³⁾,
H. Chida³⁾, S. Sato¹⁾ and Y. Naito⁴⁾

¹⁾Research Unit for Large Animal Internal Medicine & Surgery, Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University

²⁾Central Veterinary Clinical Center, Kamikawa Chuo Agricultural Mutual Aid Association

³⁾Field Science Center, Faculty of Agriculture, Iwate University

⁴⁾Food Animal Medicine & Food Safety Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University

要 約 牛における 1,25(OH)₂D₃ の経皮吸収とその効果を明らかにする目的で、ジャージー種育成牛を用いて尾根部腹側皮膚への 1,25(OH)₂D₃ 皮膚滴下試験を実施した。1,25(OH)₂D₃ 皮膚滴下群の血漿中 1,25(OH)₂D₃ 濃度は滴下後 2 時間から有意に上昇し、12 時間をピークとしてその後低下した。血漿中 Ca 濃度は滴下後 2 ~ 4 時間まで一過性に上昇し、12 ~ 72 時間まで再び有意な高値で推移した。血漿中 iP 濃度は、滴下後 24 ~ 120 時間まで有意な高値で推移した。以上の所見は、1,25(OH)₂D₃ の経皮吸収と生理活性を示すものと考えられた。

——キーワード：分娩性低カルシウム血症、経皮吸収、1,25-dihydroxyvitamin D₃

家畜臨床誌 31(1):1-5, 2008

Received 17 August 2007/ Accepted 5 October 2007

* Correspondence to: N. Yamagishi, Research Unit for Large Animal Internal Medicine & Surgery, Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan
(〒020-8550 盛岡市上田3丁目18-8 岩手大学農学部獣医学課程)
E-mail: yamagisi@iwate-u.ac.jp

ABSTRACT To determine the transdermal absorption of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its effects, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ solutions were applied drop-wise onto the skin of the ventral root of the tail ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment) of five growing Jersey cattle. The plasma concentrations of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated animals increased significantly from 2 hours after the treatment, peaked at 12 hours, and fell thereafter. There was a transient increase in the plasma Ca concentration during 2 to 4 hours post-treatment, and it remained significantly higher during 12 to 72 hours. The iP concentration in the plasma was significantly higher during 24 to 120 hours post-treatment. These observations appear to be evidence for transdermal absorption of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its physiological activity in cattle.

—Key Words : parturient hypocalcemia, transdermal absorption, $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3

.....Jpn. J. Vet. Clinics 31(1):1-5, 2008

緒 言

乳牛の分娩性低カルシウム血症（低Ca血症）は分娩前後に起こる代謝性疾患で、特に高泌乳牛で発症しやすい。この疾患は、初乳中にCaが急速に流出して血中Ca濃度が低下することにより発現する。今日まで、低Ca血症の予防法として乾乳期の飼料を調節する方法 [11] やビタミン D_3 分娩前投与 [7, 8, 13] などが知られている。一方、ビタミン D_3 代謝産物の中で最も生理活性が強い $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) は、肝臓や腎臓での代謝を必要とせずに迅速に作用する [12] ので、これを筋肉内投与する予防法も検討されてきた [4, 9, 22]。しかし、この方法では予防効果が短期間に限局され、投与タイミングが難しいことが指摘されている [6]。最近、Okuraらは投与経路の面からこの課題を克服するために豊富な剤型が利用できる腔内投与に着目し、牛で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の腔内投与試験を行なった [20, 21]。その結果、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の腔吸収を明らかにし、腔内投与が低Ca血症予防のための新たな投与法に成り得ることを示唆した。他の投与経路として皮膚も知られており、剤型の工夫によって簡便な投与法や徐放化などの応用が期待される [16] が、牛における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の経皮吸収は未だ検討されていない。よって、今回は育成牛を用いて $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の皮膚滴下試験を実施し、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の経皮吸収とその効果を検討した。

材料および方法

供試動物および試験概要：供試牛として、岩手大学農学部附属滝沢農場において飼養されていた、臨床的に健康なジャージー種育成牛5頭（雌、11～16ヶ月齢、体重156～271 kg）を用いた。供試牛はイネ科二番乾草を自由採食し、一定量の配合飼料を給与された。これら5頭に対して最初に対照試験を行ない、その終了10日後に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下試験を行なった。

試験薬物： $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 溶液は、予め冷却した99.5%エタノールに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 濃度になるように溶解して調製した。滴下した $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の量は $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ とした。対照試験では99.5%エタノールを試験薬物として用い、試験薬物量は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下試験と同量になるよう滴下した。いずれの薬物も試験直前まで -50°C にて保存した。

滴下方法：比較的被毛が少なく皮膚が薄い尾根部腹側部を、滴下部位として選択した。供試牛をキシラジン投与 ($0.05 \text{ mg}/\text{kg}$,) による鎮静後、仰臥位姿勢に保定した。その後、尾根部腹側の皮膚を清拭し、マイクロピペットを用いて同部位に試験薬物 ($78 \sim 136 \mu\text{l}$) を滴下した。試験薬物が自然乾燥した後に保定を解き伏臥位姿勢とし、そのまま自然起立させた。

採血および血液生化学検査：採血は、薬物滴下の直前と滴下後1、2、4、6、12、24、48、72、96および120時間にヘパリン加真空採血管を用いて行った。採血後直ちに遠心分離して得た血漿をマイクロチューブに分注し、血液生化学検査まで -50°C にて冷凍保存した。血漿中の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の測定は、radioimmunoassay [1, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ RIA kit, Immunodiagnostic Systems Limited, UK] により行ない、Caおよび無機リン (iP) 濃度の測定はそれぞれO-CPC法 [1] およびモリブデン法 [3] によって行なった。

統計学的解析：各群において、各時間の血漿中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、CaおよびiP濃度を平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下群および対照群の群内変動には、各時間の各血中濃度をrepeated measures one way ANOVAを用いて検定した。変動が有意な場合に、Dunnett多重比較検定を用いて滴下前 (0時間) と滴下後各時間の値を比較した。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下群と対照群の各時間における血漿中濃度の比較には、Paired t -testを用いた。いずれの検定においても、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

図 1. 1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群と対照群における血漿中1,25(OH)₂D₃濃度の推移

a: 対照群に対する有意差 ($p < 0.05$)
b: 皮膚滴下前 (0 時間) に対する有意差 ($p < 0.05$)

図 3. 1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群と対照群における血漿中iP濃度の推移

a: 対照群に対する有意差 ($p < 0.05$)
b: 皮膚滴下前 (0 時間) に対する有意差 ($p < 0.05$)

図 2. 1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群と対照群における血漿中Ca濃度の推移

a: 対照群に対する有意差 ($p < 0.05$)
b: 皮膚滴下前 (0 時間) に対する有意差 ($p < 0.05$)

結 果

1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群の血漿中1,25(OH)₂D₃濃度は滴下後2時間より有意に上昇し、12時間をピークとして24時間まで有意な高値で推移した(図1)。48時間以降は滴下前と同様の値で推移した。対照群では有意な変動は見られなかった。両群間の比較では、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群が滴下後2～24時間に対照群より有意な高値を示した。

1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群の血漿中Ca濃度は、滴下後2～4時間に一過性に有意な高値を示した。その後12時間に再び有意に上昇し、72時間まで有意な高値で推移した(図2)。対照群では有意な変動は見られなかった。両群間の比較では、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群が滴下後6、24および48時間で対照群より有意な高値を示した。

1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群の血漿中iP濃度は、滴下後

24時間に有意に上昇し、120時間まで有意な高値で推移した(図3)。対照群では有意な変動は見られなかった。両群間の比較では、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群が滴下後24～120時間に対照群より有意な高値を示した。

考 察

本研究において、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群の血漿中1,25(OH)₂D₃濃度は対照群に比較して有意な高値を示した。また、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群では滴下後に血漿中1,25(OH)₂D₃濃度は有意に上昇したが、対照群では有意な変動は見られなかった。これらの成績から、1,25(OH)₂D₃は尾根部皮膚への滴下によって経皮吸収されたと考えられた。1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群における1,25(OH)₂D₃の経皮吸収のピークは滴下後12時間と推定され、1,25(OH)₂D₃の筋肉内投与[12]や腔内投与[20,21]の場合と比較すると、血漿中1,25(OH)₂D₃濃度の変動は緩やかであった。

一般に、1,25(OH)₂D₃は小腸でのCaおよびリンの吸収を促進し、血漿中CaおよびiP濃度を上昇させる[2]。本研究において、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群のCa濃度は滴下後6、24および48時間で、iP濃度は滴下後24～120時間に対照群より有意に高値を示した。また、1,25(OH)₂D₃皮膚滴下群の血漿中Ca濃度は滴下後2～4時間ならびに12～72時間に2峰性に上昇し、血漿中iP濃度は滴下後24～120時間まで高値で推移した。一方、牛への1,25(OH)₂D₃の腔内投与[21]では、血漿中CaおよびiP濃度の上昇は12時間から上昇し120時間まで高値で推移することが報告されており、本研究の皮膚滴下群における血漿中Ca濃度の推移とは異なっているように見えた。この相違に関して本研究の成績のみで説明するこ

とは難しいが、以下の点が要因として考えられる。本研究では、統計学的な有意性はないものの、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下群の血漿中iP濃度ならびに対照群のCaおよびiP濃度においても、仰臥位姿勢を解いて間もない滴下後2ないし4時間までに一過性の上昇を示すように見えた。したがって、仰臥位という非生理的な姿勢への保定やキシラジンの静脈内投与が $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の皮膚滴下後早期の血漿中Ca濃度に影響を与えた可能性は排除できないと推察される。しかしながら、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下群における血漿中CaおよびiP濃度の有意な上昇は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用によると考えられ、今後、尾根部皮膚から吸収された $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果についての詳細な検討が必要である。

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の筋肉内投与において分娩1～4日前の投与は効果的であるが、24時間以内あるいは5日以上での投与は予防効果が低いとされており[9,22]、この投与タイミングの難しさが $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の筋肉内投与による低Ca血症予防の最大の問題点である[6]。この予防効果を延長させるには投与量の増加や4～7日間隔での反復投与を行う必要がある[9]が、血漿中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が生理的範囲[10]を大きく超えてしまい腎石灰沈着症などを招く危険性が高い[15]。さらに、外因性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による負のフィードバック作用により、内因性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の産生が抑制され、分娩1～2週間後に低Ca血症を誘発し易いことも指摘されている[5,22]。したがって、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を利用した低Ca血症の予防には、短時間に作用し、生理的な血漿中濃度を維持しながらも内因性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 産生を抑制しないような工夫が必要である。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の筋肉内投与[12,22]ならびに腔内投与[20,21]の成績と比較すると、本研究の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 皮膚滴下群では血漿中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の増加程度は軽度であり、血漿中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度を生理的範囲内に維持するには有効であるが、短時間で作用させることは難しいように見えた。

獣医領域における薬剤の経皮吸収の利点としては、肝臓での初回通過代謝を受けずに全身循環に速やかに入る、侵襲が少ない、胃における薬物分解や粘膜刺激を避けられる、飼い主が薬物使用を順守しやすい等が挙げられる[17]。この他にも、注射器のような医療器具を必要とせず、貼付剤などで薬物の放出速度を調節することが可能である。不利な点として、表皮上を覆う角質層は体内からの水分の流出や体外からの化学物質の浸透を防ぐバリアの機能を持ち、これが経皮吸収を阻害する大きな要因

となっている[14]。浸透促進剤は目的の薬剤がこのバリアを速やかに透過できるように補助するものである[16]が、本研究において溶媒として用いたエタノールも浸透促進剤の一つであり、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の経皮吸収を促進したと考えられた。ところで、角質層や表皮、真皮の厚さは腹部、背部、臀部、耳の部位[18]や加齢[19]によって変動するので、牛における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の経皮吸収には投与部位や月齢による影響を考慮すべきである。本研究では育成牛における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の経皮吸収とその効果を確認したが、真の対象は分娩牛であるため、今後、成牛への効果を検証する必要がある。さらに、将来の臨床応用のためには、起立位でも適用可能な剤型についても検討が必要である。

文 献

1. Connerty HV, Briggs AR (1966) Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol*, 45 : 290-296
2. Deluca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 80 : 1689-1696
3. Drewes PA (1972) Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin Chim Acta*, 39 : 81-88
4. Gast DR, Horst RL, Jorgensen NA, Deluca HF (1979) Potential use of $1,25$ -dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient paresis. *J Dairy Sci*, 62 : 1009-1013
5. Goff JP, Horst RL, Beitz DC, Littledike ET (1988) Use of $24\text{-F-}1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 to prevent parturient paresis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 71 : 1211-1219
6. Goff JP, Horst RL (1990) Effect of subcutaneously released $24\text{-F-}1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 on incidence of parturient paresis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 73 : 406-412
7. Gregorovic V, Skusek F, Kesnar F, Beks L (1967) Crystalline vitamin D_3 for the prevention of milk fever in cattle. *Vet Rec*, 81 : 161-162
8. Hibbs JW, Pounden WD (1954) Studies on milk fever in dairy cows. . Prevention by short-time, prepartum feeding of massive doses of vitamin D. *J Dairy Sci*, 38 : 65-72
9. Hoffsis GF, Capen CC, Placke ME, Norman AW

- (1979) The use of 1,25-dihydroxycholecalciferol in the prevention of parturient hypocalcemia in dairy cows. *Bovine Practitioner*, 13 : 88-95
10. Horst RL, Reinhardt TA (1983) Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the periparturient cow. *J Dairy Sci*, 66 : 661-678
 11. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, Buxton DR (1997) Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 80 : 1269-1280
 12. Hove K, Horst RL, Littledike ET (1983) Effect of 1-hydroxyvitamin D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃, and 1,25,26-trihydroxyvitamin D₃ on mineral metabolism and 1,25-dihydroxyvitamin D concentration in dairy cows. *J Dairy Sci*, 66 : 59-66
 13. Julien WE, Conrad HR, Hibbs JW, Crist WL (1977) Milk fever in dairy cows. . Effect of injected vitamin D₃ and calcium and phosphorus intake on incidence. *J Dairy Sci*, 60 : 431-436
 14. Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Proitman E, Elias PM (1983) Human stratum corneum lipids : characterization and regional variations. *J Lipid Res*, 24 : 120-130
 15. Littledike ET, Horst RL (1982) Vitamin D₃ toxicity in dairy cows. *J Dairy Sci*, 65 : 749-759
 16. Magnusson BM, Walters KA, Roberts MS (2001) Veterinary drug delivery : potential for skin penetration enhancement. *Adv Drug Deliv Rev*, 50 : 205-227
 17. Mills PC, Cross SE (2006) Transdermal drug delivery : basic principles for the veterinarian. *Vet J*, 172 : 218-233
 18. Monteiro-Riviere NA, Bristol DG, Manning TO, Rogers RA, Riviere JE (1990) Interspecies and interregional analysis of the comparative histological thickness and laser Doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species. *J Invest Dermatol*, 95 : 582-586
 19. Ngawhirunpat T, Hatanaka T, Katayama K, Yoshikawa H, Kawakami J, Adachi I (2002) Changes in electrophysiological properties of rat skin with age. *Biol Pharm Bull*, 25 : 1192-1196
 20. Okura N, Yamagishi N, Naito Y, Kanno K, Koiwa M (2004) Vaginal absorption of 1,25(OH)₂D₃ in cattle. *J Dairy Sci*, 87 : 2416-2419
 21. Okura N, Yamagishi N, Naito Y, Koiwa M (2007) Dose response to vaginal administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to cows. *Vet J*, 174 : 203-205
 22. Yamagishi N, Ayukawa Y, Lee I, Oboshi K, Naito Y (2005) Calcium metabolism in cows receiving an intramuscular injection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ combined with prostaglandin F₂ closely before parturition. *J Vet Sci*, 6 : 165-167