[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (12) 1241-1246 (1980)]

ツロブテロールの生体内運命 (第 4 報¹⁾) ラット日齢と生体内動態について

高原義男, 荒谷隆幸, 西出和憲, 松村阜子, 加藤日出男,^{2a)} 桐山典城^{2b)}

北陸製薬株式会社中央研究所,^{2a)} 北陸大学薬学部^{2b)}

Studies on the Metabolic Fate of Tulobuterol. IV.¹⁾ The Relation between the Age of Rat and the Metabolic Fate

YOSHIO TAKAHARA, TAKAYUKI ARATANI, KAZUNORI NISHIDE, KUGAKO MATSUMURA,
HIDEO KATO^{2a)} and NORIKI KIRIYAMA^{2b)}

Hokuriku Seiyaku Co., Ltd^{2a)} and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University^{2b)}

(Received July 11, 1980)

The absorption, excretion and metabolism of tulobuterol were studied in various aged rats after oral administration of ¹⁴C-tulobuterol.

The blood levels of ¹⁴C after oral dosing in various aged rats, decreased gradually according to a biphasic process, that is, the first peak appeared at 30—40 min and the second one at 1—2 hr.

The excretion of ¹⁴C after oral dosing was generally rapid and the radioactivities in the urine and feces for 7 days after oral dosage in various aged rats were 59—66% and 33—36% of the dose, respectively.

The biliary excretion of ¹⁴C until 24 hr was estimated to be 59—66% of the dose in all aged rats studied, but the rate of excretion in 21-day-old rats was slower than those of 49- and 150-day-old rats.

Furthermore, the excretion amount of the ring hydroxylated metabolites, such as 4-hydroxy form (II) and 4-hydroxy-5-methoxy form (IV) into the bile of the 21-day-old-rats was different from those of the 49- and 150-day-old rats.

The relation between the activity of metabolizing enzymes in the liver and the age of rats was also studied. The metabolic activity of tulobuterol in the rat liver gradually increased until the 28th day, and thereafter decreased with an increase in the age.

Keywords—tulobuterol; absorption; excretion; metabolism; bronchodilator; various aged rats

緒 言

Tulobuterol: α -[(*tert*-butylamino)methyl]-*o*-chlorobenzyl alcohol hydrochloride は、気管支拡張作用を有する薬剤である。³⁾ 気管支拡張剤は小児から老人に至るまで幅広い年齢層に使われる。一般に、薬物の効果・毒性が乳幼児において強く発現すると言われ、その原因の 1 つとして薬物代謝活性が乳幼児において低いことが指摘されている。⁴⁻⁶⁾ また哺乳動物においても、年齢により薬物代謝活性の異なることが報告されている。⁷⁾ よって年齢層により生体内動態が異なることが予想されるにもかかわらず、現在市販されている気管支拡張剤では、年齢による生体内動態について検討した報告は見当たらない。

- 1) 第 3 報: 山本 譲, 新田啓一, 藤橋俊明, 上坂征夫, 西出和憲, 薬誌, **97**, 231 (1977). なお, α -[(*tert*-Butylamino)methyl]-*o*-chlorobenzyl alcohol hydrochloride (C-78) は, 世界保健機構 (WHO) により一般名を tulobuterol と命名されたので, 本薬物に関する報告をツロブテロールの生体内運命と変更する。
- 2) Location: a) Inokuchi, Katsuyama, Fukui; b) Kanagawa-cho, Kanazawa.
- 3) 久保信治, 加瀬佳年, 宮田 健, 鬼頭 剛, 上坂征夫, *Arzneim. -Forsch. (Drug Res.)*, **25**, 1028 (1975).
- 4) M.F. Vest, R.R. Streiff, *J. Dis. Children*, **98**, 688 (1959).
- 5) C.F. Weiss, A.J. Glazko, J.K. Weston, *New. Engl. J. Med.*, **262**, 787 (1960).
- 6) W.A. Silverman, D.M. Anderson, W.A. Blanc, D.M. Crozier, *Pediatrics*, **18**, 614 (1956).
- 7) R. Kato, P. Vassanelli, G. Frontino, E. Chiesara, *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 1037 (1964).

そこで、著者らは幼児から老人までの tulobuterol の生体内動態について予測する試みとして、ラット日齢と生体内動態との関連について検討した。すなわち、*in vivo* では幼若期のラットとして離乳直後の 21 日齢を、成熟以降のラットとして 49 日齢および 150 日齢のラットを選び、経口投与後の吸収、代謝、排泄の差を調べた。また、*in vitro* では前述の実験が困難な 21 日齢以下のラットにおける生体内動態を推測するため、14 日齢ラットを含めた種々日齢ラットの肝 9000 g 上清による代謝について比較検討した。その結果興味ある知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 実験材料 Diethyl malonate-2-¹⁴C (第一化学薬品(株)) を原料とし、前報⁹⁾ に従って合成した ¹⁴C-tulobuterol を用いた。

2. 実験動物 *In vivo* の実験には、21, 49 および 150 日齢の SD 系雄性ラットを用い、一夜絶食させた後実験に供した。

In vitro 実験では、14, 21, 28, 35, 49 および 150 日齢の SD 系雄性ラットの肝を使用した。なお、ラットは哺乳中親付きの 7 日齢を購入(日本クレア(株))後、所定日齢になるまで飼育した。

3. 薬物投与方法 血中濃度、尿、糞および胆汁中排泄の測定には、投与量 ¹⁴C-tulobuterol 45 mg/kg とし、蒸留水に溶解して経口投与した。

4. 血中濃度、尿、糞および胆汁中排泄率の測定 前報⁹⁾ に準じて行った。

5. 胆汁中、尿中代謝物の分離定量 代謝物の抽出操作は前報⁹⁾ に準じて行った。ただし、抱合体の加水分解は、遊離体抽出後の水層に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に 5000 U/ml の β -glucuronidase (bacterial type V-A, シグマ社) を溶解した水溶液を 2 ml 加え、37°, 24 時間インキュベートした。水解された代謝物を抽出した残りの水層部を aq. fr. とした。

代謝物の分離は、薄層クロマトグラフィーで行った。使用した薄層クロマト板は Kieselgel 60 F₂₅₄ で、展開溶媒は *n*-butanol: conc. NH₄OH (10: 2) を用いた。代謝物の標準品としては、すでにラット尿中より単離されている次のものを合成し、使用した。

α -[(*tert*-Butylamino)methyl]-2-chloro-4-hydroxybenzyl alcohol: II.¹⁰⁾

α -[(*tert*-Butylamino)methyl]-2-chloro-3-hydroxybenzyl alcohol: III.¹⁰⁾

α -[(*tert*-Butylamino)methyl]-2-chloro-4-hydroxy-5-methoxybenzyl alcohol: IV.¹⁰⁾

1-(*o*-Chlorophenyl)-1,2-ethanediol: V.¹¹⁾

o-Chloromandelic acid: VI.¹²⁾

6. 肝 9000 g 上清による代謝活性の測定 肝細胞下分画、反応条件および代謝物の分離定量は前報¹⁾ で報告した方法に準じた。ただし、肝 9000 g 上清の蛋白質の定量は Lowry 法¹³⁾ で行った。

実験結果

1. 血中濃度

各日齢ラットの血中濃度推移を Fig. 1 に示した。21 日齢ラットでは 49, 150 日齢ラットに比べて高い血中濃度推移が認められた。しかし、各日齢ラットとも投与後 30—45 分で第一ピーク (5.0—5.9 μ g eq./1 ml) に達し、

8) 上坂征夫, 荒谷隆幸, 西出和憲, 越中栄一, 新田啓一, 山本 譲, 医薬品研究, **7**, 548 (1976).

9) 山本 譲, 樋口昭平, 藤橋俊明, 清水 栄, 西出和憲, 上坂征夫, 薬誌, **97**, 244 (1977).

10) 越中栄一, 倉田 栄, 山岸輝里, 久保信治, 加藤日出男, 薬誌, **98**, 1198 (1978).

11) *o*-Chloroacetophenone から *o*-chlorophenylglyoxal を経由して合成した。mp 107—109° (benzene). Anal. Calcd C₈H₉ClO₂: C, 55.66; H, 5.26. Found: C, 55.87; H, 5.35.

12) *o*-Chloroacetophenone から *o*-chloro-*o*-dichloroacetophenone を経由して合成した。mp 85—87° (benzene). (mp 84—85°; D.G. Neilson *et. al.*, *J. Chem. Soc.*, **1968**, 1853). Anal. Calcd C₈H₇ClO₃: C, 51.50; H, 3.78. Found: C, 51.34; H, 3.75.

13) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

Fig. 1. Blood Levels of ^{14}C after Oral Administration of ^{14}C -Tulobuterol in Male Rats (Dose: 45 mg/kg)

Each point indicates the mean of three rats. Vertical bar represents standard error.

○, 21 days; ▲, 49 days; ●, 150 days.

Fig. 2. Biliary Excretion of ^{14}C of Male Rats after Oral Administration of ^{14}C -Tulobuterol (Dose: 45 mg/kg)

Each point indicates the mean of three rats. Vertical bar represents standard error.

○, 21 days; ▲, 49 days; ●, 150 days.

1—2 時間に第二ピーク (4.9—5.9 $\mu\text{g eq./l ml}$) となり、その後血中より徐々に消失した。

2. 胆汁中排泄

胆汁中排泄を Fig. 2 に示した。21, 49, 150 日齢において異なった胆汁中排泄の推移が認められた。すなわち 21 日齢ラットでは、24 時間まで徐々に排泄され、49 日齢では 8 時間まで、150 日齢ラットでは 4 時間までにはほとんどが排泄された。しかし、24 時間までの総排泄量は、各日齢とも投与量の 59—66% とほぼ同じ程度であった。

3. 尿・糞中排泄

尿・糞中排泄を Table I に示した。0—144 時間までの尿中排泄量は、各日齢ラットともほとんど同じ程度 (59—66%) であり、そのほとんどが 24 時間までに排泄された。

一方、糞中排泄は 21 日齢ラットで 0—12 時間までの排泄が多く、49, 150 日齢では 12—48 時間に排泄された。144 時間までの排泄量は各日齢とも 33—36% とほとんど同じ程度であった。また、144 時間までにいずれのラットにおいても、投与量の 95% 以上が尿・糞中に排泄された。

TABLE I. Urinary and Fecal Excretion of ^{14}C by Male Rats after Oral Administration of ^{14}C -Tulobuterol (Dose: 45 mg/kg)

Time after dosing (hr)	^{14}C (% of dose)					
	21 days		49 days		150 days	
	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces
0—12	39.24 $\pm$ 2.73	24.66 $\pm$ 1.74	37.16 $\pm$ 1.90	0.07 $\pm$ 0.04	28.55 $\pm$ 3.29	0.06 $\pm$ 0.04
12—24	12.70 $\pm$ 2.60	6.03 $\pm$ 0.54	21.30 $\pm$ 1.80	15.58 $\pm$ 1.72	29.17 $\pm$ 0.89	18.82 $\pm$ 1.84
24—48	6.11 $\pm$ 3.00	5.23 $\pm$ 0.44	5.71 $\pm$ 1.14	16.00 $\pm$ 1.70	6.89 $\pm$ 1.25	11.51 $\pm$ 2.29
48—96	0.88 $\pm$ 0.34	0.19 $\pm$ 0.05	1.34 $\pm$ 0.18	4.19 $\pm$ 1.80	0.61 $\pm$ 0.14	2.82 $\pm$ 1.01
96—144	0.11 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.11
0—144	59.04 $\pm$ 2.59	36.23 $\pm$ 1.08	65.88 $\pm$ 1.80	36.02 $\pm$ 0.46	65.33 $\pm$ 2.59	33.46 $\pm$ 1.99
Total recovery	95.27		101.90		98.79	

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

TABLE II. Distribution of Radioactivity in Bile and Urine by Various Aged Rats into Basic, Acidic-Neutral and Aqueous Fractions (Dose: 45 mg/kg, 0—24 hr)

Fraction	Bile (%)		
	21 days	49 days	150 days
Acidic-neutral fr.	4.22±0.24 ^{a)} (0.20±0.08)	3.35±1.20 ^{a)} (1.58±0.27)	2.81±1.12 ^{a)} (1.28±0.18)
Basic fr.	73.48±6.53 ^{a)} (71.60±6.69)	76.74±2.90 ^{a)} (75.57±2.67)	75.23±6.19 ^{a)} (74.40±6.47)
Aq. fr.	22.31±6.23	19.91±3.64	21.96±6.02

Fraction	Urine (%)		
	21 days	49 days	150 days
Acidic-neutral fr.	6.46±1.30 ^{a)} (3.07±0.67)	9.89±1.32 ^{a)} (2.47±0.73)	8.43±2.19 ^{a)} (4.26±1.32)
Basic fr.	77.13±2.18 ^{a)} (61.86±8.25)	61.98±5.17 ^{a)} (53.42±5.23)	63.25±4.06 ^{a)} (51.78±6.58)
Aq. fr.	16.42±1.45	28.14±3.54	28.33±2.10

Each value indicates the mean ± S.E. of three rats.

The results are expressed as a percentage of the radioactivity in each urine and bile, respectively.

a) Free+conjugated type.

(): conjugated type.

Fig. 3. Biliary and Urinary Excretion of Tulobuterol and Its Metabolites by Various Aged Rats (Dose: 45 mg/kg, 0—24 hr)

The results are expressed as a percentage of metabolites in each fraction shown in Table II.

The data represent the mean ± S.E. of three rats.

- I : tulobuterol,
- II : 4-hydroxy form,
- III : 3-hydroxy form,
- IV : 4-hydroxy-5-methoxy form,
- V : 1-(*o*-chlorophenyl)-1,2-ethanediol,
- VI : *o*-chloromandelic acid.

■, free; □, conjugate.

a) Significantly different from rats of 49, 150 days old ($p < 0.05$).

b) Significantly different from rats of 49, 150 days old ($p < 0.05$).

Fig. 4. Difference of Metabolizing Activity of Tulobuterol by the 9000 *g* Supernatant Fraction of Liver from Different Aged Rats

Each point indicates the mean of three rats. Vertical bar represents standard error.

- , 4-hydroxy form (II);
- ▲, 3-hydroxy form (III);
- , 1-(*o*-chlorophenyl)-1,2-ethanediol (V);
- ◇, *o*-chloromandelic acid (VI).

a) Significantly different from rats of 28, 35, 49 days ($p < 0.01$) and 21, 150 days old ($p < 0.05$).

b) Significantly different from rats of 28 days old ($p < 0.05$).

c) Significantly different from rats of 28, 35, 49, 150 days ($p < 0.01$) and 21 days old ($p < 0.05$).

d) Significantly different from rats of 49, 150 days old ($p < 0.05$).

e) Significantly different from rats of 14, 21, 35, 49 days ($p < 0.01$) and 28 days old ($p < 0.05$).

4. 胆汁中・尿中代謝物

胆汁中、尿中の排泄物を、遊離型と抱合型に分離した結果を Table II に示した。各日齢ラットの胆汁中、尿中には排泄量の 62—77% が未変化体および芳香環の水酸化体を含む塩基性分画として回収され、そのほとんどが glucuronide であった。また側鎖切断代謝物を含む中性・酸性分画は、尿中に 6.5—9.9%, 胆汁中に 2.8—4.2% であり、尿、胆汁中とも少なかった。代謝物の分布およびグルクロン酸抱合能に日齢差は認められなかった。

つぎに、それぞれの分画中の代謝物の割合を Fig. 3 に示した。

胆汁中では、21 日齢が 49, 150 日齢と比べて未変化体 (I) および 4-hydroxy 体 (II) の排泄が多く、逆に 4-hydroxy-5-methoxy 体 (IV) の排泄が少なかった。3-Hydroxy 体 (III) およびその他の代謝物は、ほぼ同じ程度であり、日齢差は認められなかった。尿中では 49 日齢の未変化体の排泄が 21, 150 日齢よりも少なかった。その他の代謝物はほとんど同じ程度であった。

5. 肝 9000 g 上清による代謝活性

14, 21, 28, 35, 49 および 150 日齢ラットの肝 9000 g 上清による tulobuterol の代謝活性を Fig. 4 に示した。4-Hydroxy 体 (II) および 3-hydroxy 体 (III) の生成量は、28 日齢まで急速に増加し、35—150 日齢まではほぼ一定となった。In vivo で使用した日齢である 21, 49, 150 日齢ラットの 4-hydroxy 体 (II) および 3-hydroxy 体 (III) の生成量には、有意差はなかったが、14 日齢では 49 日齢のそれぞれ 0.44, 0.38 倍であり、14 日齢ラットでは有意に代謝活性は減少していた。1-(*o*-Chlorophenyl)-1,2-ethanediol (V) および *o*-chloromandelic acid (VI) は、14—150 日齢まではほとんど変らなかった。また前報¹⁾で報告したように抱合体の生成は、どの日齢でもほとんど認められなかった。

考 察

先に tulobuterol の成熟ラットにおいて、その血中濃度推移が二峰性を示し、胆汁中排泄量が多いこと、更に腸肝循環が認められたことを報告した。⁸⁾ 今回測定した各日齢ラットの血中濃度推移より、21 日齢ラットではすでに腸肝循環していることが明らかとなった。しかし、腸肝循環に必要な胆汁中排泄において、21 日齢ラットと 49, 150 日齢ラットとの間に日齢差が認められた。すなわち、21 日齢ラットでは投与後 24 時間まで徐々に排泄されたが、49, 150 日齢ラットでは、4—8 時間でほぼ排泄が終了した。この差は日齢による門脈血流量の違い、¹⁴⁾ 肝臓への取込量および速度や胆汁中への排泄速度の違い、¹⁵⁾ ならびに肝での代謝活性の違い⁷⁾ などに由来するものであらうと考えられる。

Tulobuterol の代謝については、すでに in vivo で成熟ラットの尿中代謝物、および in vitro で肝 9000 g 上清による代謝活性について検討し、Fig. 5 に示すような推定代謝経路を報告した。⁹⁾

そこでこの推定代謝経路に基づいて、各日齢ラットの胆汁および尿中の主要代謝物を選択して定量した。その結果、各日齢ともほとんどが I および芳香環水酸化体の glucuronide であり、21 日齢ラットでのグルクロン酸抱合能は成熟レベルに達していることがわかった。これらは L.J. Fischer ら¹⁶⁾ が報告しているラットにおける diethylstilboestrol の抱合活性が、25 日齢で成熟レベルに達しているという事実と一致する。

胆汁中の遊離型および抱合型代謝物の排泄量を各日齢で比較すると、II および IV に差が認められた。しかし、これは Fig. 3 に示した肝 9000 g 上清による代謝活性が 21 日齢でむしろ低いこと、II は更に代謝されて IV になることなどを考慮すると、21 日齢ラットの II の生成量が 49, 150 日齢より多いのではなく、II から IV に至る過程に日齢差があると考えられる。一方、尿中の II および IV には日齢差が認められなかったが、これは L.J. Fischer ら¹⁶⁾ が 25 日齢ラットにおいては、すでに成熟ラットと同程度に腸内で抱合体を水解すると報告していることから、tulobuterol でも胆汁中に排泄された II の抱合体が腸内で水解され、生じた遊離の II が再吸収され、更に代謝を受けて全身循環に入ることが予想されるので、見かけ上差が小さくなったものと思われる。

14) F. Varga, E. Fischer, "Liver and Aging" ed. by K. Kitani, Elsevier-North Holland, New York, 1978, p. 327.

15) K. Kitani, S. Kanai, P. Miura, Y. Morita, M. Kisahara, *Exp. Gerontol.*, **13**, 9 (1978).

16) L.J. Fischer, J.L. Weissinger, *Xenobiotica*, **2**, 399 (1972).

Fig. 5. Possible Metabolic Pathway of Tulobuterol in the Rat

以上の如く, *in vivo* における代謝過程に日齢差が認められたことは, 特に II が強い気管支拡張作用¹⁷⁾を持つことを含めて考えると, 薬効上からも興味深く, 今後更に詳細な検討が必要であろう。

一般に離乳前の動物を用いて, *in vivo* での生体内動態を検討することは困難である。そこで離乳前のラットにおける tulobuterol の生体内動態を推測するため, 14 日齢ラット肝 9000 g 上清での代謝活性を測定し, 経口投与後の生体内動態が明らかな種々日齢ラットでの肝 9000 g 上清代謝活性と比較した。

まず, 側鎖切断代謝物である V および VI の生成活性は, これらが *in vivo* においても minor metabolites であったように, 芳香環水酸化体である II, III の生成活性よりも低く, 各日齢でもほとんど差は認められなかった。しかし, II および III の生成活性は, Fig. 3 に示したように, 28 日齢をピークとし, それ以後 150 日齢まで大きな変化を示さなかったが, 14 日齢では大きく減少しており, 21 日齢以下での活性低下が窺われた。R. Kato ら¹⁷⁾は, ラットにおける hexobarbital や meprobamate などの代謝活性は 30 日齢でピークとなり, その前後で大きく減少すると報告している。今回得られた tulobuterol での結果は, これとほぼ一致するものであり, 特に 21 日齢以下での II の生成活性が低いことは, 生体内動態を推測する上で十分な考慮を必要としよう。すなわち, *in vivo* において, 胆汁中排泄速度ならびに II と IV の胆汁中排泄量に日齢差が認められたことと考え合わせると, 21 日齢以下のラットでは, 胆汁中排泄挙動あるいは再吸収量にも変化が生じ, これが生体からの tulobuterol の消失過程に大きく影響する可能性が考えられる。

なお, 今回得られた結果が直ちにヒトへ外挿できるわけではないが, ヒトの各年齢層における tulobuterol の生体内動態を検討して行く上に示唆を与えるものと思われる。

17) S. Kubo, I. Matsubara, M. Yamazaki, S. Kasamatsu, E. Koshinaka, H. Kato, Y. Kase, *Arzneim.-Forsch., Drug Res.*, **30**, 1272 (1980).