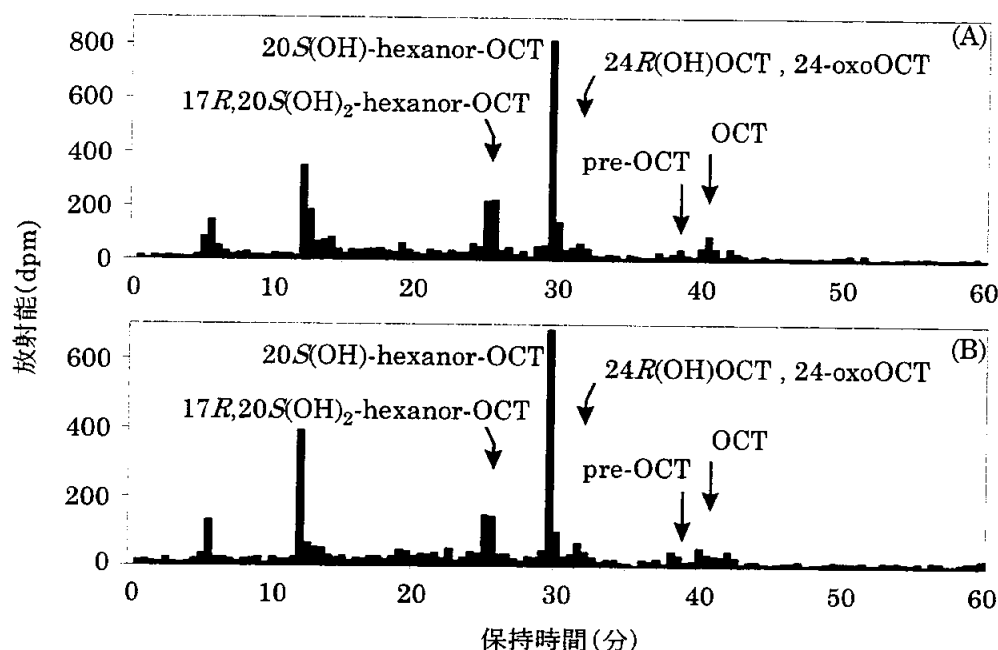


6) ラットにおける反復経皮投与時の血漿、尿および糞中代謝物

雄性ラットに3 μ g/kgの投与量で[2- β - 3 H]OCTを1日1回、7日間反復経皮投与あるいはOCTを1日1回、6日間反復経皮投与後7日目に[2- β - 3 H]OCTを単回経皮投与し、最終投与4時間後に得た血漿について、それらの代謝物プロフィールをradioHPLCにより検討した。その結果を図へー24に示す。

どちらの反復投与の場合でも未変化OCT以外に、側鎖酸化型代謝物および側鎖開裂型代謝物が確認され、単回投与の場合と比較すると未変化OCTの割合が減少した以外は類似した代謝物プロフィールを示した。このことから、OCT反復経皮投与によってOCTの代謝の亢進が見られるものの、単回投与の場合と異なる代謝物が生成することはないと、蓄積による代謝物の相対比率の変動もないと考えられた。



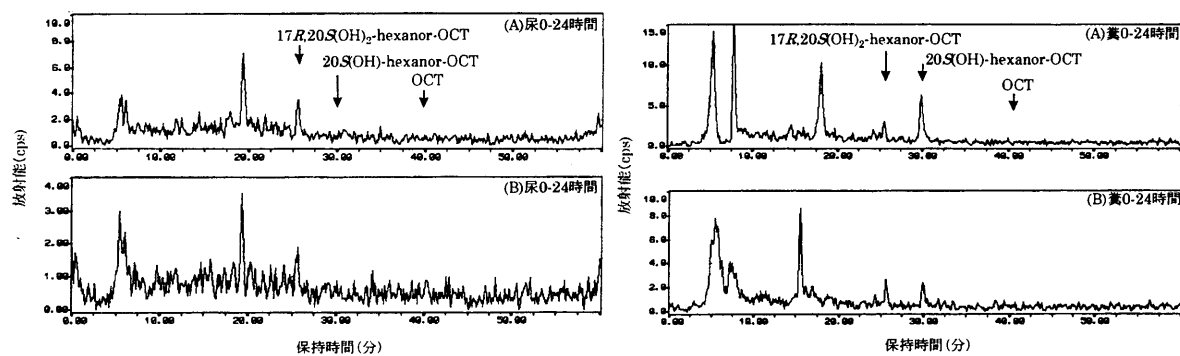
図へー24 雄性ラットに3 μ g/kgの投与量で[2- β - 3 H]OCTを1日1回、7日間反復経皮投与した場合(A)あるいはOCTを1日1回、6日間反復経皮投与後7日目に[2- β - 3 H]OCTを単回経皮投与した場合(B)の、最終投与4時間後の血漿のradioHPLCクロマトグラム

矢印は、代謝物標品の溶出位置を示す。

雄性ラットに3 μ g/kgの投与量で[2- β - 3 H]OCTを1日1回、7日間反復経皮投与した際の6回目投与後24時間までに排泄された尿および糞、ならびにOCTを1日1回、6日間反復経皮投与後7日目に[2- β - 3 H]OCTを単回経皮投与し、最終投与後24時間までに排泄された尿および糞について、それらの代謝物プロフィールをHPLCにより検討した。結果を図へー25に示す。

どちらの反復投与の場合でも単回投与の場合と類似した代謝物プロフィールを示した。このことから、反復投与により、単回投与とは異なった代謝物が生成することはないと考えら

れた。



図へー25 雄性ラットに3 μ g/kgの投与量で[2 β - 3 H]OCTを1日1回、7日間反復経皮投与した際の6回目投与後24時間までに排泄された尿および糞(A)，ならびにOCTを1日1回、6日間反復経皮投与後7日目に[2 β - 3 H]OCTを単回経皮投与し、最終投与後24時間までに排泄された尿および糞(B)のradioHPLCクロマトグラム

矢印は、代謝物標品の溶出位置を示す。

(6)排泄

1) ラットにおける単回経皮投与時の尿、糞および呼気中排泄

雌雄ラットに $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ を $3\mu\text{g/kg}$ 単回経皮投与した場合の尿、糞および呼気中への放射能の累積排泄率を表へー24に示す。

雄性ラットでは、投与24時間後に拭き取った残存軟膏中に未吸収量として投与量の26.9%の放射能がみられた。投与部位皮膚には投与168時間後においても投与放射能の11.4%が残存した。投与168時間後までに投与放射能の9.3%が尿中へ、45.5%が糞中へ、1.5%が呼気中へ排泄された。

雌性ラットでは、投与24時間後に拭き取った残存軟膏中に未吸収量として投与量の10.7%の放射能がみられた。投与部位皮膚には投与168時間後においても投与放射能の4.2%が残存した。投与168時間後までに投与放射能の15.9%が尿中へ、64.5%が糞中へ、1.2%が呼気中へ排泄された。以上の結果より、雌雄ラットとも、投与後24時間までに軟膏より皮膚に投与量の73.1~89.3%が吸収され、投与部位皮膚に放射能が長くどまり、全身循環血に移行した放射能は主として糞中へ排泄されることが明らかになった。主排泄経路が糞中排泄であることは、静脈内投与の場合(R-14, R-15)と同様であった。

表へー24 雌雄ラットに $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ を $3\mu\text{g/kg}$ 単回経皮投与した場合の放射能の尿、糞および呼気中累積排泄率および残骸中残存率

	排泄率あるいは残存率 (% of dose)					
	雄性ラット			雌性ラット		
	0-24 時間	0-48 時間	0-168 時間	0-24 時間	0-48 時間	0-168 時間
尿	4.9 ± 0.9	6.8 ± 1.1	9.3 ± 1.6	13.1 ± 3.4	14.1 ± 3.2	15.9 ± 3.2
糞	24.5 ± 1.8	39.1 ± 3.9	45.5 ± 3.8	54.8 ± 17.6	62.4 ± 12.0	64.5 ± 10.9
呼気	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.5 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.5
合計	29.6 ± 2.6	46.4 ± 4.8	56.3 ± 5.3	68.1 ± 20.8	76.9 ± 14.9	81.6 ± 13.6
塗布部残存軟膏 (投与24時間後)			26.9 ± 7.2			10.7 ± 9.7
投与部位皮膚 (投与168時間後)			11.4 ± 2.9			4.2 ± 2.8
残骸 (投与168時間後)			4.3 ± 1.0			1.7 ± 0.4

各値は平均値±標準偏差 (n=4) を示す。

軟膏は、投与24時間後に拭き取った。

2) イヌにおける単回経皮投与時の尿および糞中排泄

雄性イヌに $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ を $3\mu\text{g/kg}$ 単回経皮投与した場合の尿および糞への放射能の累積排泄率を表へー25に示す。

投与24時間後に拭き取った残存軟膏中に未吸収量として投与量の73.1%の放射能がみられた。投与部位皮膚には投与168時間後においても投与放射能の9.1%が残存した。投与168時間後までに投与放射能の3.2%が尿中へ、6.1%が糞中へ排泄された。

イヌではラットに比べて軟膏からの吸収率が低いものの、ラットと同様にイヌにおいても投与部位皮膚に放射能が滞留し、全身循環血に移行した放射能は主として糞中へ排泄されることが明らかになった。

表へー25 雄性イヌに $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ を $3\mu\text{g/kg}$ 単回経皮投与した場合の放射能の尿、糞中累積排泄率

	排泄率あるいは残存率 (% of dose)			
	0-24 時間	0-48 時間	0-72 時間	0-168 時間
尿	0.5 ± 0.6	2.0 ± 1.1	2.5 ± 0.9	3.2 ± 1.0
糞	0.2 ± 0.2	3.2 ± 0.9	4.5 ± 0.7	6.1 ± 1.2
合計	0.8 ± 0.5	5.2 ± 2.0	6.9 ± 1.6	9.3 ± 2.2
塗布部残存軟膏 (投与24時間後)				73.1 ± 0.8
投与部位皮膚 (投与168時間後)				9.1 ± 2.2
ケージ洗液 (投与168時間後)				0.1 ± 0.1

各値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。

軟膏は、投与 24 時間後に拭き取った。

3) ラットにおける単回経皮投与時の胆汁中排泄

胆管カニューレを施した雄性ラットに、 $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ を $40\mu\text{g/kg}$ 単回経皮投与した場合の放射能の胆汁中累積排泄率を表へー26に示す。投与 48 時間後までの胆汁および尿中への放射能排泄率は、それぞれ 57.2 および 8.4%であり、主に胆汁中に排泄された。「へー 2. (6)1) ラットにおける単回経皮投与時の尿、糞および呼気中排泄」の項で述べた放射能の高率な糞中への排泄は、高い胆汁中排泄率に起因するものと考えられた。これらの結果は、 OCT を静脈内投与した結果 (R-16) と同様であった。

表へー26 雄性ラットに $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ を $40\mu\text{g/kg}$ 単回経皮投与した場合の投与後 48 時間までの放射能の尿中および胆汁中累積排泄率

	排泄率あるいは残存率 (% of dose)			
	0-4 時間	0-8 時間	0-24 時間	0-48 時間
胆汁	6.2 ± 1.1	20.0 ± 2.2	50.0 ± 1.6	57.2 ± 1.7
尿	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.5	5.7 ± 0.9	8.4 ± 1.2
合計	6.6 ± 1.3	21.0 ± 2.3	55.7 ± 2.0	65.5 ± 1.2
塗布部残存軟膏 (投与24時間後)				14.8 ± 2.4
投与部位皮膚 (投与48時間後)				16.8 ± 2.4
残骸 (投与48時間後)				4.4 ± 0.0
合計				101.5 ± 0.5

各値は平均値±標準誤差 (n=4) を示す。

軟膏は、投与 24 時間後に拭き取った。

(7) 薬物相互作用

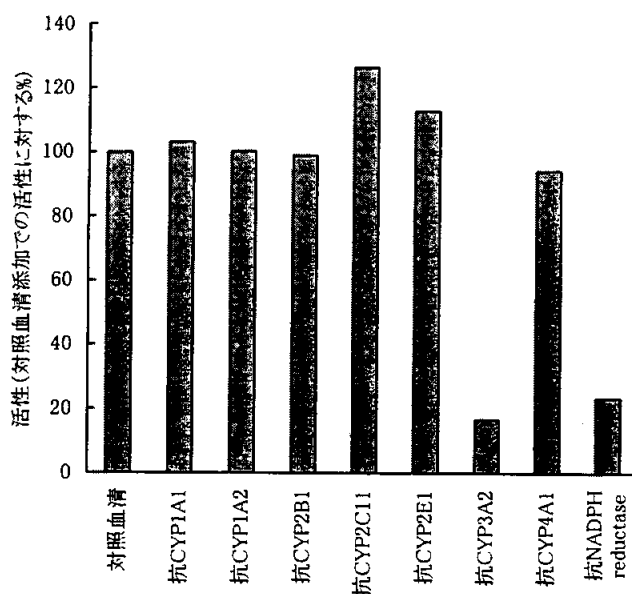
1) 代謝酵素

雄性ラット肝マイクロゾームおよび腎ミトコンドリアならびにヒト肝マイクロゾームおよびヒト P450 発現マイクロゾームを用い、OCT の代謝に関与する酵素について検討した。

ラット肝マイクロゾームでは側鎖開裂活性がみられる (R-17) が、この代謝活性は抗 NADPH-cytochrome P450 還元酵素抗体によって阻害され、P450 各分子種阻害抗体のうち抗 CYP3A2 抗体のみにより阻害された (図へー26)。このことから、ラット肝マイクロゾームでの側鎖開裂反応は CYP3A により触媒されるものと示唆された。

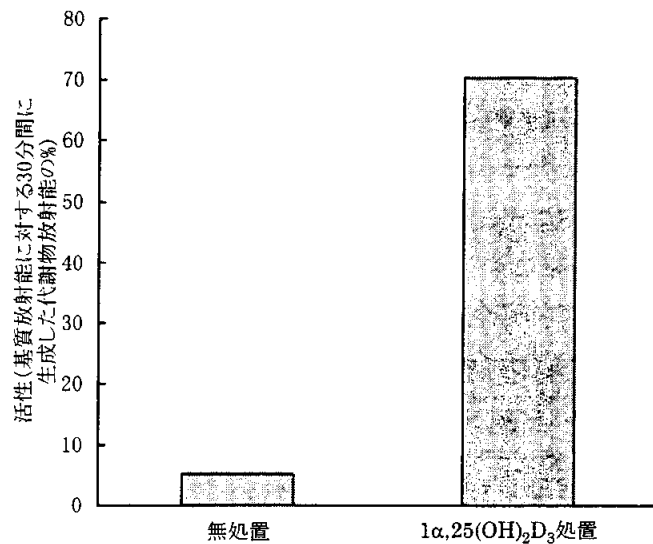
腎ミトコンドリアでは側鎖酸化および側鎖開裂活性がみられる (R-17) が、この代謝活性は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vivo* 前処置によって誘導された (図へー27)。さらにこの代謝活性は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* 添加によって阻害された (図へー28)。これらのことから、ラット腎ミトコンドリアでの側鎖酸化および側鎖開裂反応は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の代謝酵素である $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 24 位水酸化酵素 (CYP24) により触媒されるものと推察した。

ヒト肝マイクロゾームでは側鎖開裂活性がみられる (R-17) が、この代謝活性は各ヒト P450 発現マイクロゾームのうち CYP3A4 のみに認められた (図へー29)。さらにヒト肝マイクロゾームでの本活性は CYP3A4 の阻害剤であるケトコナゾール添加により阻害された (図へー30)。これらのことから、ヒト肝マイクロゾームでの側鎖開裂反応は CYP3A4 により触媒されるものと示唆された。



図へー26 ラット肝マイクロゾームにおけるOCT代謝活性に対する各P450分子種阻害抗体の影響

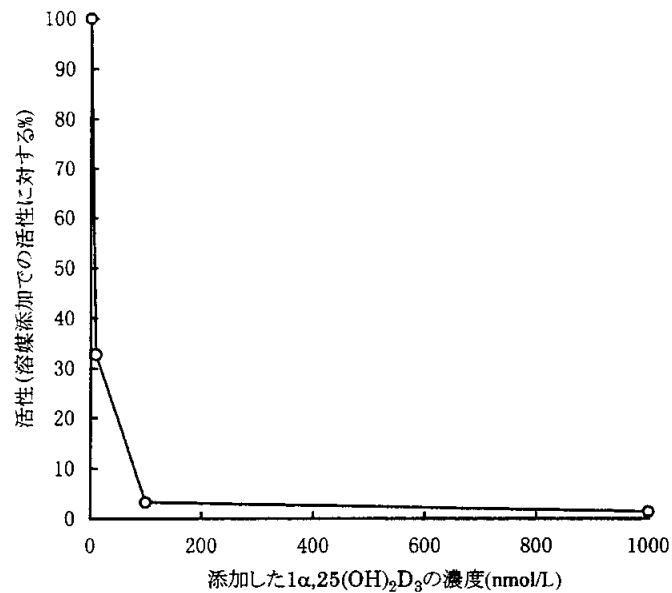
ラット肝マイクロゾーム 0.4 mg/mL, $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ 10 nmol/L, 阻害抗体 50 μL , 反応液 1 mL, 37°C, 1時間反応。活性は $n=2$ の平均。



図へー27 ラット腎ミトコンドリアにおけるOCT代謝活性に対する1α,25(OH)₂D₃前処置の影響

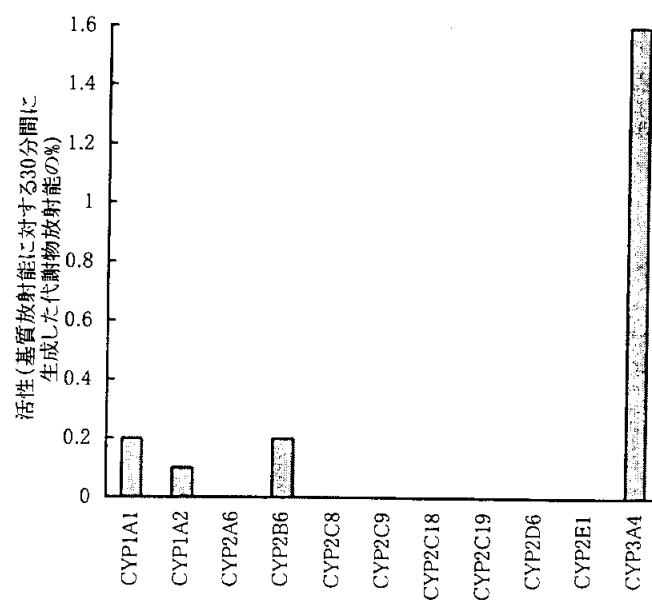
ラット腎ミトコンドリア 2 mg/mL, [2β-³H]OCT 10 nmol/L, 反応液 1 mL, 37°C, 30 分間反応。活性は n=5 の平均。

ラットに 1α,25(OH)₂D₃ を 5 μg/kg で単回腹腔内投与し、投与 6 時間後のラットより腎ミトコンドリアを調製した。



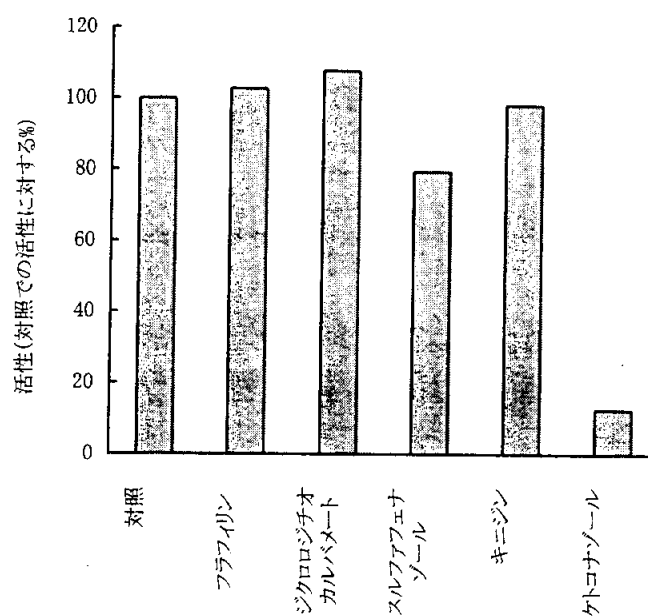
図へー28 ラット腎ミトコンドリアにおけるOCT代謝活性に対する1α,25(OH)₂D₃添加の影響

1α,25(OH)₂D₃ 前投与ラット腎ミトコンドリア 2 mg/mL, [2β-³H]OCT 10 nmol/L, 反応液 1 mL, 37°C, 30 分間反応。活性は n=5 の平均。



図へー29 ヒト P450 発現ミクロゾームにおける OCT 代謝活性

ヒト P450 発現ミクロゾーム 100 pmol/mL, $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ 10 nmol/L, 反応液 1 mL, 37°C, 30 分間反応。活性は $n=2$ の平均。



図へー30 ヒト肝ミクロゾームにおける OCT 代謝活性に対する各 P450 分子種阻害剤の影響

ヒト肝ミクロゾーム 1 mg/mL, $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ 10 nmol/L, 反応液 1 mL, 37°C, 30 分間反応。フラフィリンは 10 $\mu\text{mol/L}$, ジクロロジチオカルバマートは 50 $\mu\text{mol/L}$, スルファフェナゾールは 5 $\mu\text{mol/L}$, キニジンは 2 $\mu\text{mol/L}$, ケトコナゾールは 1 $\mu\text{mol/L}$ を反応液に添加。活性は $n=3$ の平均。

2) ラットにおける肝および腎薬物代謝酵素へ及ぼす影響

i) 肝薬物代謝酵素への影響

雄性ラットにOCTを0.1, 1, 3または10 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で1日1回, 7日間反復経皮投与し, 肝薬物代謝酵素へ及ぼす影響について検討した。結果を表へー27に示す。酵素含量およびいずれの活性においても, 対照群に比べてOCT投与群は上昇せず, 肝薬物代謝酵素には影響を与えなかった。

表へー27 雄性ラットにOCT 0.1, 1, 3または10 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で1日1回, 7日間反復経皮投与した時の肝薬物代謝酵素へ及ぼす影響

	対照	OCT (0.1 $\mu\text{g/kg/day}$)	OCT (1 $\mu\text{g/kg/day}$)	OCT (3 $\mu\text{g/kg/day}$)	OCT (10 $\mu\text{g/kg/day}$)
体重に対する肝重量の比 (g/100 g体重)	4.35 $\pm$ 0.23	4.15 $\pm$ 0.20	3.99 $\pm$ 0.23*	4.32 $\pm$ 0.11	4.23 $\pm$ 0.12
ミクロゾームタンパク含量 (mg/g liver)	20.7 $\pm$ 1.8	22.8 $\pm$ 0.8	21.9 $\pm$ 1.2	20.2 $\pm$ 1.5	21.3 $\pm$ 0.4
P450含量 (nmol/mg)	0.934 $\pm$ 0.096	0.912 $\pm$ 0.042	0.935 $\pm$ 0.174	0.903 $\pm$ 0.126	0.973 $\pm$ 0.179
エトキシレゾルフィン O-脱 エチル化活性 (nmol/min/mg)	0.199 $\pm$ 0.042	0.194 $\pm$ 0.036	0.196 $\pm$ 0.035	0.224 $\pm$ 0.042	0.214 $\pm$ 0.026
4-ニトロフェノール水酸化活 性 (nmol/min/mg)	0.426 $\pm$ 0.044	0.390 $\pm$ 0.043	0.386 $\pm$ 0.032	0.430 $\pm$ 0.037	0.385 $\pm$ 0.020
テストステロン6 β -水酸化活 性 (nmol/min/mg)	2.18 $\pm$ 0.38	2.20 $\pm$ 0.37	2.64 $\pm$ 0.51	2.73 $\pm$ 0.59	2.47 $\pm$ 0.42
テストステロン16 β -水酸化活 性 (nmol/min/mg)	0.083 $\pm$ 0.007	0.084 $\pm$ 0.005	0.093 $\pm$ 0.011	0.097 $\pm$ 0.013	0.088 $\pm$ 0.007

各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=4)を示す。

OCTは1日1回7日間反復経皮投与した。対照群は, 軟膏基剤を0.3 g/kg/dayを1日1回7日間反復経皮投与した。

* 対照群に対して有意な差あり (Dunnett 検定, $P<0.05$)。

ii) 腎薬物代謝酵素への影響

雄性ラットにOCTを0.1, 1, 3または10 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で1日1回, 7日間反復経皮投与し, 腎薬物代謝酵素へ及ぼす影響について検討した。結果を表へー28に示す。腎ミトコンドリアの $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 24位水酸化活性は, OCT 3 $\mu\text{g/kg}$ 以下の投与群においては上昇しなかったが, 10 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では上昇し, 誘導が推察された。

「へー2. (3)4)ラットにおける反復経皮投与時の血漿中濃度推移」の項で述べた反復経皮投与時における血漿中未変化OCT濃度の低下は, OCTの代謝酵素である腎のCYP24が誘導し, 代謝クリアランスが増加したことがその一因と推察された。

表へー28 雄性ラットにOCT 0.1, 1, 3または10 $\mu\text{g/kg}$ の投与量で1日1回, 7日間反復経皮投与した時の腎薬物代謝酵素へ及ぼす影響

	対照	OCT (0.1 $\mu\text{g/kg/day}$)		OCT (1 $\mu\text{g/kg/day}$)		OCT (3 $\mu\text{g/kg/day}$)		OCT (10 $\mu\text{g/kg/day}$)	
体重に対する腎重量の比 (g/100 g体重)	0.820 $\pm$ 0.034	0.789 $\pm$ 0.062	0.824 $\pm$ 0.039	0.848 $\pm$ 0.019	0.827 $\pm$ 0.044				
ミトコンドリアタンパク含量 (mg/g kidney)	15.5 $\pm$ 2.7	16.5 $\pm$ 1.8	16.7 $\pm$ 2.9	16.8 $\pm$ 2.7	18.0 $\pm$ 1.7				
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 24位水酸化活性 (fmol/min/mg)	27.3 $\pm$ 12.1	22.1 $\pm$ 13.1	29.2 $\pm$ 8.8	32.7 $\pm$ 16.3	139.9 $\pm$ 117.5 *				
血清中 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度 (pg/mL)	98.1 $\pm$ 14.1	95.1 $\pm$ 3.0	82.5 $\pm$ 27.1	81.1 $\pm$ 20.1	30.2 $\pm$ 3.7 *				

各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=4) を示す。

OCTは1日1回7日間反復経皮投与した。対照群は, 軟膏基剤を0.3 g/kg/dayを1日1回7日間反復経皮投与した。

* 対照群に対して有意な差あり (Dunnett 検定, $P<0.05$)。