

博士論文

Clenbuterol のラットにおける体内動態の光学特異性

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

分子作用学講座

学 籍 番 号 0923032520

氏 名 廣澤 伊織

主任指導教員名 石崎 純子

目次

第1章 序論	1
第2章 血漿中 Clenbuterol 光学異性体の定量法の開発.....	5
1. 諸言.....	5
2. 実験.....	7
3. 結果.....	11
4. 考察.....	212
第3章 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> における Clenbuterol 光学異性体の相互変換に関する検討	24
1. 諸言.....	244
2. 実験.....	25
3. 結果.....	30
4. 考察.....	37
第4章 Clenbuterol のラットにおける体内動態の光学特異性.....	39
1. 諸言.....	39
2. 実験.....	41
3. 結果.....	47
4. 考察.....	60
第5章 結論	65
参考文献.....	67
謝 辞	68
引用文献.....	69

第1章 序論

光学異性体は、物理的・化学的に等しいにもかかわらず、旋光性の違いにより生体に及ぼす作用が異なることがある [1]。このような光学異性体の作用の違いによって、どちらか一方の異性体のみからなる医薬品が市販されている。例えば、ニューキノロン系抗菌薬として知られている ofloxacin は光学異性体を持ち、(-)-*S* 体の抗菌作用は(+)-*R* 体の 8~128 倍であり、高い有効性と安全性が認められたため [2, 3]、(-)-*S* 体のみからなる levofloxacin (クラビット®) として市販されている。さらにこの ofloxacin では、(+)-*R* 体の方が腎臓におけるカチオントランスポーターに対する親和性が高く、(+)-*R* 体の腎クリアランスが(-)-*S* 体に比べて大きく、反対に肝臓におけるグルクロン酸化は(-)-*S* 体の方が大きいことが報告されている [4-6]。また、光学分割された製剤として 2010 年に承認された cetirizine がある。Cetirizine はラセミ体 (光学異性体の等量混合物) の製剤 (ジルテック®) が、アレルギー性鼻炎の治療薬として市販されていた。Cetirizine の *R* 体は *S* 体に比べて、ヒスタミン H₁ 受容体に対する親和性が高いことや、解離速度が緩徐である [7] ことなどから、*R* 体単独製剤である levocetirizine (ザイザル®) が 2010 年 12 月より販売開始となった。また、2012 年に本邦において睡眠導入剤として使用されている zopiclone (アモバン®) の *S* 体単独製剤である eszopiclone (ルネスタ®) が承認された。この zopiclone は、*R* 体に比べて、*S* 体のほうが GABA 受容体のベンゾジアゼピン結合部位における親和性が約 2 倍高いことから、光学分割された [8]。近年、このように光学異性体単独製剤の開発が活発に行われている。

例示した 3 剤は、薬効の本体である方の異性体のみが製剤化された。しかしながら、同様に光学異性体を有する thalidomide では(+)-*R* 体は鎮静作用を示すが、(-)-*S* 体には抗炎症・血管新生抑制作用が強く、非常に高い催奇形性を有することが知られている [9]。Thalidomide は(+)-*R* 体を単独で投与した場合でも、生体内ですみやかに(-)-*S* 体へ相互変換される [1] [10]。したがって、この thalidomide は(+)-*R* 体だけの製剤を開発しても催奇形性を避けることはできない。このように、異性体間で相互変換のある薬物も少なくはなく、光

学異性体の相互変換を含めた体内動態の把握は、きわめて重要なことである。

選択的アドレナリン β_2 受容体刺激薬である salbutamol は、ラセミ体として市販されているが、 β_2 受容体刺激作用のほとんどは(-)-*R*-salbutamol によるものである [11]。喘息患者における臨床研究では、(+)-*S*-salbutamol に関連した顕著な毒性についてのエビデンスはないが、動物実験や *in vitro* 実験において、(+)-*S*-salbutamol には平滑筋収縮や肺機能に有害効果があると報告されていることや、異性体特異的な体内動態をもつことから、海外では levosalbutamol として知られている *R* 体単独製剤が使用されている [12]。

Clenbuterol (4-amino- α -[(*tert*-butylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol) もまた、salbutamol と同様の選択的アドレナリン β_2 受容体刺激薬であり、salbutamol よりも β_2 選択性が高く、作用時間が長い特徴を持つ [13]。医薬品としては、気管支喘息、慢性気管支炎、肺気腫、急性気管支炎および腹圧性尿失禁に適応がある内服薬であり、海外では早産に対しても使用されているが、これら適応の作用機序はいずれも β_2 受容体刺激作用によるものである。

この clenbuterol も一対の光学異性体を有するが、(-)-*R*-clenbuterol と(+)-*S*-clenbuterol が 50 : 50 の混合物であるラセミ体 (以下(*rac*)-clenbuterol、Figure 1) として市販されている。 β_2 受容体刺激作用による気管支拡張作用や子宮筋弛緩作用は(-)-*R*-clenbuterol によるといわれているが[14, 15]、(+)-*S*-clenbuterol にはそのような作用はほとんどなく、血圧低下やグルココルチコイドの上昇、血糖値の増加などの副次的な作用が報告されている[16, 17]。また、(*rac*)-clenbuterol による骨塩量の低下が報告されている [18]。(-)-*R*-Clenbuterol には筋肉増強作用があるが、(+)-*S*-clenbuterol は骨密度低下作用が示唆されている (未発表データ)。

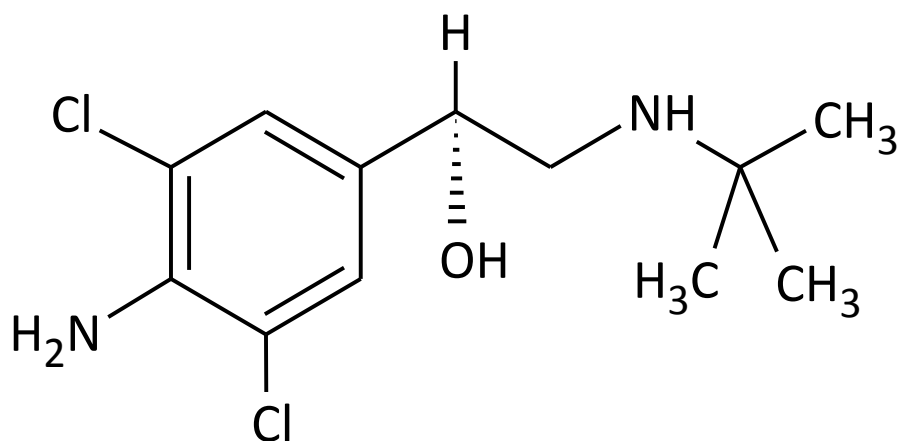
一方、体内動態に関して、clenbuterol ラセミ体としてはヒトを含めた報告がある[19-22]。Kopitar ら [23] や Zimmer [24] によってラットにおける消失半減期や消失過程について示され、Yamamoto ら [21] によってヒト、ラットおよびウサギに(*rac*)-clenbuterol を経口投与後の最高血中濃度、消失半減期、タンパク結合率および尿中未変化体排泄量について検討されている。また、薬物乱用による家畜へ投与された clenbuterol が食品安全の点から問題と

なり、食肉や組織中の残留濃度が報告されている[25-29]。2009年には本邦における内閣府食品安全委員会から「動物用医薬品評価書 クレンブテロール」が報告され、ラット、イヌ、ウサギ、牛、馬などの体内動態や代謝物などがまとめられている [30]。

Clenbuterol の両異性体間に前述したような薬理作用の違いがあるにもかかわらず、各々の異性体の組織分布や血中動態の違いの有無について明らかにされておらず、光学分割製剤の開発の意義も不明である。Clenbuterol は医療用としてだけでなく、ダイエット目的として使用されることもあり、この場合、喘息などで医療用として使用する場合よりも多数の集団に投与される可能性が考えられる。これらのことから、副作用の発現には十分注意をすべきであり、より安全な投与方法を示す必要がある。そこで、各光学異性体の体内動態、特に効果や副作用発現の指標となる体内の分布、排泄速度の違いなどを明らかにすることは重要である。

以上より、本研究では、まず血漿試料中の clenbuterol 異性体の特異的で高感度な分離定量法を LC-MS/MS により確立した。ついで、その測定方法を用いて、clenbuterol 光学異性体の相互変換の有無を調べた。さらに、clenbuterol の体内動態における光学特異性を明らかにすること目的として、ラットにおける clenbuterol 各異性体の体内動態を比較した。

a) (-)-*R*-clenbuterol



b) (+)-*S*-clenbuterol

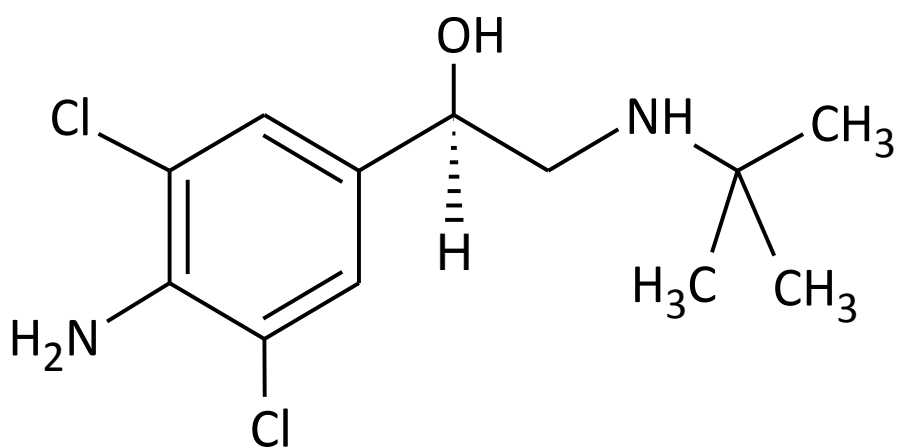


Figure 1. Structures of clenbuterol enantiomers.

第2章 血漿中 Clenbuterol 光学異性体の定量法の開発

1. 諸言

Clenbuterol ラセミ体を経口投与後の血漿中濃度は非常に低く、ラットへ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した時の最高血中濃度は 0.1 ng/mL と報告されている [21]。ラットのような小動物を用いた clenbuterol 光学異性体の薬物動態学的研究においては、血漿中の光学異性体が測定可能な、低濃度を測定できる高感度な分析方法が必要である。

気管支喘息患者への適応量は、1回 20 μg を 1日 2回内服である。一方、Kopitar らによる報告では、ラットへの clenbuterol 2 mg/kg 静脈内投与後の最高血中濃度は 850 ng/mL で、これは放射ラベルされた clenbuterol により測定されている [23]。また、Yamamoto らの報告では、ラットへの clenbuterol 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与後の最高血中濃度は 0.1 ng/mL であり、これは EIA 法により clenbuterol により測定している [21]。また、ラットにおける静脈内単回投与の LD_{50} は、30 mg/kg である。これらの結果から、薬物動態を検討するためには、1 ng/mL 以下の測定限界である測定法が必要であると考えられる。

ところで、clenbuterol は医薬品の適応とされる薬理作用の他に、タンパク同化作用や筋肥大を誘導する作用を有することから、タンパク同化剤として使用されることが多くなり、ドーピング検査の対象薬となっている。また、海外で肥育目的として家畜に投与されることがあり、その肉を摂取することでヒトに中毒症状が現れることがあるため [32]、一日摂取許容量 (ADI) や最大残留基準値 (MRL) が設定されている。このため、生体物質中の clenbuterol ラセミ体を測定する方法が複数報告されており、ヒトにおいては血中のみでなく尿中や毛髪中などの測定方法や、様々な動物の血液、肉、臓器中の測定方法の報告がある [28, 33-36]。しかし、これら報告のほとんどはラセミ体としての測定方法である。一方、clenbuterol 光学異性体を分離した分析方法も報告されている [37-39]。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法による生体内からの光学異性体を分離した測定方法が報告されているが [37]、測定限界は 10 nmol/mL (cu. 2.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であり、小動物を用いた体内動態の解析には感度が不十分で

ある。Capillary zone electrophoresis を用いた測定方法が報告されたが、3 mL の血漿を用いて測定限界が 0.74 $\mu\text{g/mL}$ であった [39]。

以上のことから、0.1 mL の血漿を用いて、1 ng/mL の clenbuterol 光学異性体を検出することのできる高感度な測定方法を確立するために、LC-MS/MS 法を用いることにした。

2. 実験

試薬および使用動物

(*rac*)-Clenbuterol、ammonium formate、LC-MS 用精製水および methanol LC-MS/MS CHROMASOL V® は、Sigma-Aldrich, Co. (MO, USA) より購入した。Carvedilol、acetonitrile、diethyl ether およびリン酸緩衝剤粉末(1/15 mol/L、pH 7.4) は和光純薬(大阪)から購入した。(-)-*R*-Clenbuterol と(+)-*S*-clenbuterol は、(株) 富士薬品より譲り受けた。

Wistar 系雄性ラットは(有)熊谷重安商店 (Japan, Miyagi) から購入した。実験まで自由摂食・摂水し、ケージの中で飼育した(室温 22-24°C、湿度 60%、7 時点灯、19 時消灯)。実験 12 時間前より絶食させ、自由節水とした。下行大動脈より heparin 処理したシリンジを用いて採血し、スピッツ管に入れた後、遠心分離(12,000 g、10 min)し、rat blank plasma を得た。

動物実験は動物実験・研究倫理審査の承認を受け、国際医療福祉大学動物実験規程に則して行った。

LC-MS/MS 分析

高速液体クロマトグラフィー(HPLC) は、デガッサーに DGC-20A5、液送ポンプに LC-20AD、オートサンプラーに SIL-20AC、カラムオーブンに CTO-20AC (各島津製作所、京都) を使用した。分離カラムは CHIROBIOTIC™ T (100 mm × 2.1 mm, 5 μm, Astec, NJ)、マイクロガードカラムは CHIROBIOTIC™ T (2 cm × 1.0 mm, 5 μm, Astec, NJ) を用いた。移動相は methanol : 50 mM ammonium formate 水溶液 = 95 : 5 v/v とし、各溶液を 5 分間脱気(BRANSONIC® 5510J-DTH, Yamato) して用いた。カラム温度は 40°C、移動相の流速は 0.2 mL/min、注入量は 10 μL とした。

質量分析器(MS) は、API4000™ (AB SCIEX, MA, USA) 装置を使用して、エレクトロスプレーイオン化(ESI) 法、ポジティブモードで測定した。MRM (Multiple reaction monitoring) モードにて、clenbuterol は m/z 277.0[M+H]⁺ → 203.0、内標準物質である

carvedilol は m/z 407.1 \rightarrow 100.0 で測定した。質量分析部は四重極型である。またイオン源パラメータは、コリジョンガス(CAD) : 6、カーテンガス(CUR) : 50 psi、イオンソースガス 1 (GS1) : 50 psi、イオンソースガス 2 (GS2) : 70 psi、イオンスプレーボルテージ(IS) : 5500.0 V、ヒーター温度(TEM) : 600°C、デクラスタリングポテンシャル(DP) : 56.0 V、エントランスポテンシャル(EP) : 10.0 V、コリジョンエネルギー(CE) : 23.0 V、コリジョンセルイグジットポテンシャル(CXP) : 12.0 V に各種設定した。

測定時間は 20 分とした。MS におけるプローブの細管のつまりを防ぐために、HPLC と MS の間にバルブ(VICI®、Valco Instruments Co.inc.) を装着し、測定開始 4 分から 20 分の間だけ HPLC から MS へ流入するように設定し、それ以外の時間は廃液とした。これらの設定は、Analyst® 1.4 Software (AB SCIEX, MA, USA) で行った。

またマススペクトルは、Analyst® 1.4 Software で分析した。

抽出方法

血漿試料 100 μ L に内標準物質として carvedilol (1 μ g/mL) 10 μ L、methanol 10 μ L を加え、除タンパクを行うために acetonitrile 900 μ L を加え、ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE® 2, M&S Instruments Inc.) で 1 分間振とう混和後、遠心分離(MCX-150、TOMY) した(18,000 g, 5 min)。さらにリン脂質を除去するため、その上清 900 μ L を HybridSPE-PPT (Sigma-Aldrich, MO) に直接注入し、遠心分離(2,000 g, 3 min) を行い、固相抽出してリン脂質を除去した。その後、その抽出液 10 μ L を LC-MS/MS に注入した。

検量線の作成

(*rac*)-Clenbuterol の methanol 標準溶液 10 μ L を rat blank plasma 100 μ L に添加して、血漿中(*rac*)-clenbuterol 濃度が 0.5、1、2、5、10、20、50 および 100 ng/mL (エナンチオマーとして、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25 および 50 ng/mL) となるように血漿試料を調製した。この血漿試料に内標準物質として carvedilol (10 ng/mL) 10 μ L を加え、上記抽出

方法に従って抽出を行った。LC-MS/MS 測定により得られた(-)-*R* および(+)-*S*-clenbuterol のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比を用いて、内標準法により、それぞれの検量線を作成した。

測定法の再現性

測定法の再現性は、inter-assay および intra-assay を行って評価した。Inter-assay については、血漿中(*rac*)-clenbuterol の 2、10 および 50 ng/mL (エナンチオマーとして 1、5 および 25 ng/mL) の各濃度について、それぞれ同日、同サンプルを 6 回繰り返し測定し、それらの測定値の変動係数[CV(%)] を次式により算出した。Intra-assay については、inter-assay と同じ各濃度について毎日調整し、6 日間にわたって抽出、測定を繰り返した。

$$CV (\%) = (\sqrt{\sigma^2} / \bar{x}) \times 100$$

ここで σ は標準偏差を表す。

測定法の回収率 (Recovery)

測定法の再現性は、ラット血漿中(*rac*)-clenbuterol 濃度の 2、10 および 50 ng/mL (エナンチオマーとして 1、5 および 25 ng/mL) の各濃度について検討した。血漿中から抽出したサンプルと、抽出していない同濃度に調製したサンプルを測定し、以下の式により%Recovery を算出した。

$$\%Recovery = (\text{extracted (-)-}R\text{- or (+)-}S\text{-clenbuterol area} / \text{unextracted (-)-}R\text{- or (+)-}S\text{-clenbuterol area}) \times 100$$

オートサンプラー内の安定性 (Stability experiments)

オートサンプラー内での安定性を確認するため、ラット血漿中から抽出した測定用液を一度測定した後、4°Cで 24 時間保存し再度測定を行い、その結果を比較した。ラット血漿中(*rac*)-clenbuterol 濃度の 2、10 および 50 ng/mL (エナンチオマーとして 1、5 および 25

ng/mL) の各濃度について検討した。以下の式により %Stability を算出した。

$$\%Stability = (\text{first time determined } (-)\text{-}R\text{- or } (+)\text{-}S\text{-clenbuterol area} / \text{second time determined } (-)\text{-}R\text{- or } (+)\text{-}S\text{-clenbuterol area}) \times 100.$$

マトリックス効果 (Matrix effect)

マトリックス効果、保存している 3 ロットのラット血漿を用いて検討した。*(rac)*-clenbuterol 濃度の 2、10 および 50 ng/mL になるように、ラット血漿および精製水を用いて調製した。以下の式により %Matrix Effect を算出した。

$$\%Matrix\ Effect = (\text{peak area ratio in plasma} - \text{peak area ratio in water} / \text{peak area ratio in water}) \times 100$$

本測定法の血漿試料への適用

Wistar 系雄性ラット(250 ~350 g, n = 4)を背位固定し、ether 麻酔下にて大腿動脈と大腿静脈にカニューレ(ポリエチレンチューブ sp31、夏目製作所、東京)を挿入した。ラットの覚醒後、*(rac)*-clenbuterol 0.2、1 および 2 mg/kg をラットに急速静脈内投与した。投与後 0.5、1、3、6、9、12、24、36、48、60 および 72 時間に大腿部動脈より 300 μ L を採血し、その血液を 18,000 g で 5 分間遠心分離(MCX-150、TOMY)して血漿を得た。血漿中の clenbuterol 各異性体濃度は、上記の LC-MS/MS 法により測定した。

ラットに静脈内投与後の投与後 0 時間から無限時間までの血中濃度時間曲線下面積 ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$)は、各異性体の血漿中薬物濃度を用いて台形近似法に外装法を組み合わせ求めて。

3. 結果

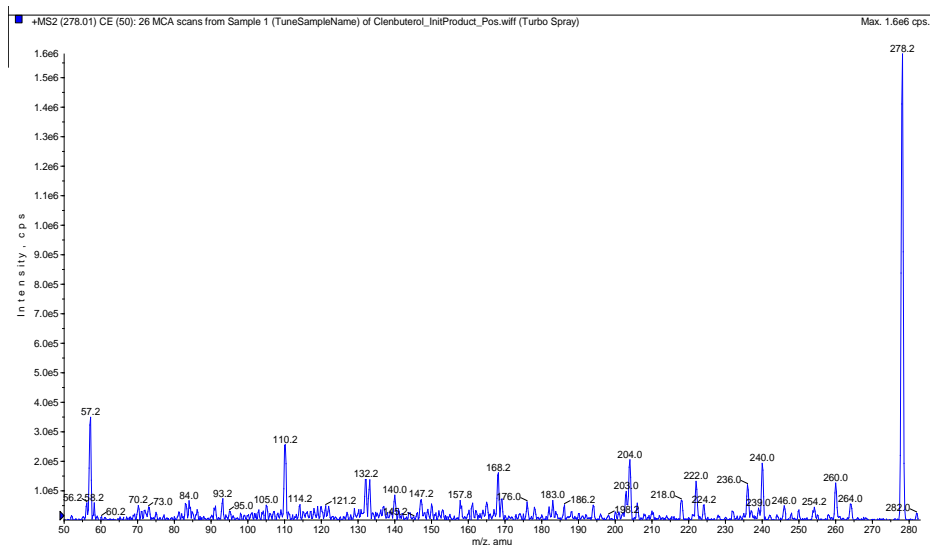
LC-MS/MS 分析

Clenbuterol および内標準物質(carvedilol) のマススペクトルをそれぞれ Figure 2 および 3 に示す。Analyst® 1.4 Software によって、最終的に clenbuterol のプリカーサーイオンは 277.0 m/z 、プロダクトイオンは 203.0 m/z に最適化された。内標準物質のプリカーサーイオンは 407.1 m/z 、プロダクトイオンは 100.0 m/z に最適化された。Figure 2 において、最適値とピーク値が異なっているのは、スキャンモードであり、四重極型が低分解能であることに起因する。

Figure 4 に、(-)-*R*-clenbuterol、(+)-*S*-clenbuterol を 1 pg (0.1 ng/mL methanol 溶液を 10 μ L 注入) それぞれ測定したクロマトグラムを示す。(-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol の保持時間は各々 12.9 分と 14.6 分であった。(-)-*R*-clenbuterol には (+)-*S*-clenbuterol の混入は見られなかったが、(+)-*S*-clenbuterol には 7.04 % の (-)-*R*-clenbuterol の混入が観察された。さらに血漿に内標準物質(IS) を添加したクロマトグラムし、277.0 / 203.0 m/z をスキャンしたものと、407.1 / 100.0 m/z をスキャンしたクロマトグラムを示す。ベースラインはほぼ安定しており、clenbuterol の測定に内標準物質の影響はないことが確認できた(Figure 5)。IS の保持時間は 13.1 分であった。また、血漿中に 2 ng/mL (各エナンチオマーとして 1 ng/mL) となるように(*rac*)-clenbuterol を添加し、抽出した後測定したクロマトグラムを Figure 6 に示す。両異性体は良好に分離された。

Figure 7 に(-)-*R*-clenbuterol、(+)-*S*-clenbuterol の検量線を示す。血漿中濃度 0.25 ~ 50.0 ng/mL の範囲内で相関係数 0.9998 および 0.9999 の良好な直線性を示した。定量下限は、各異性体共に 0.25 ng/mL であった。

(A)



(B)

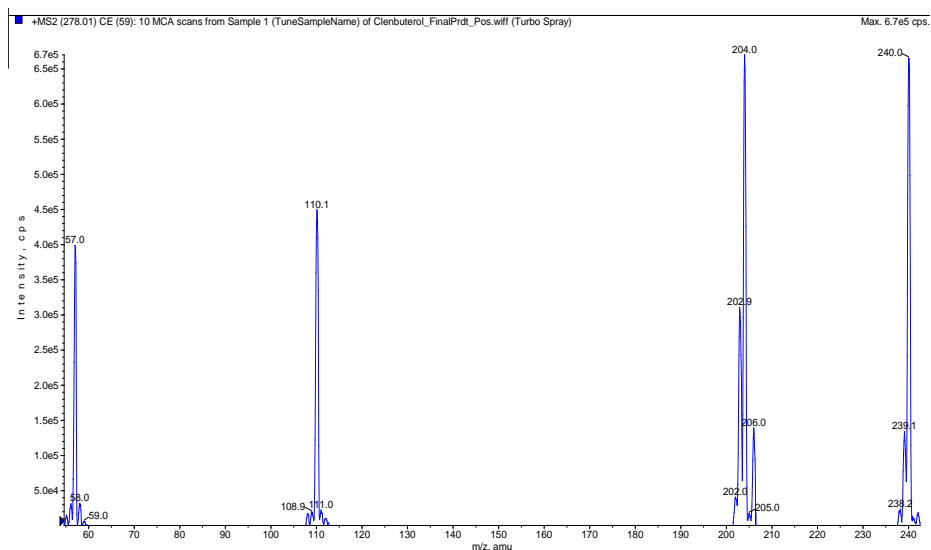


Figure 2 Mass spectra of clenbuterol precursor ion (A) and clenbuterol product ion (B).

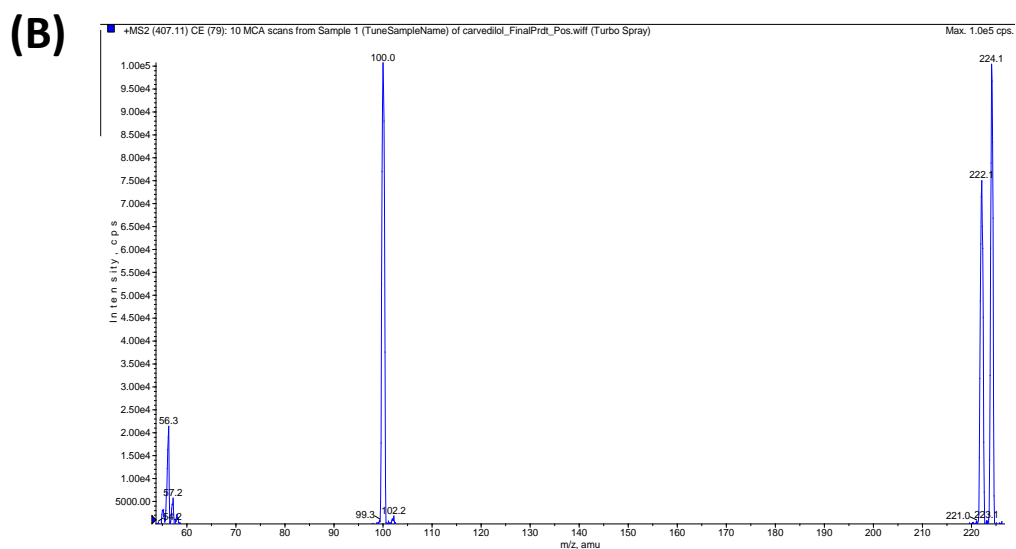
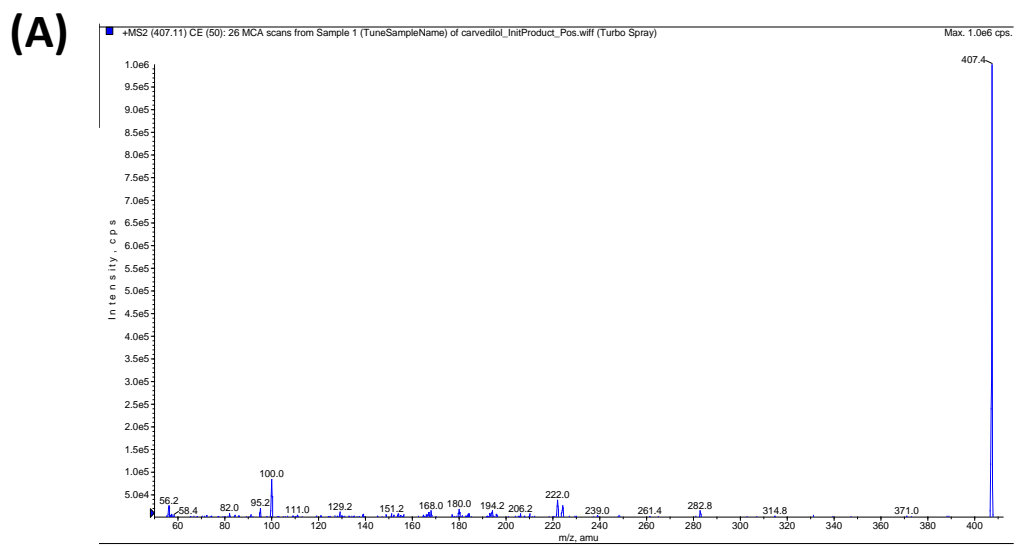


Figure 3 Mass spectra of calvedilol precursor ion (A) and calvedilol product ion (B).

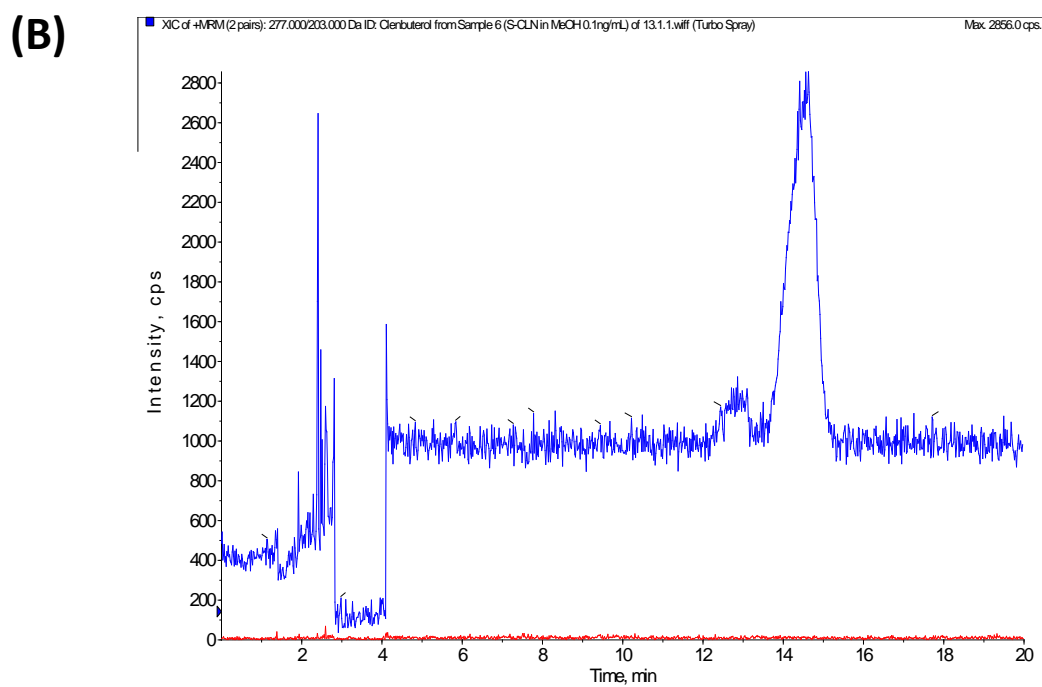
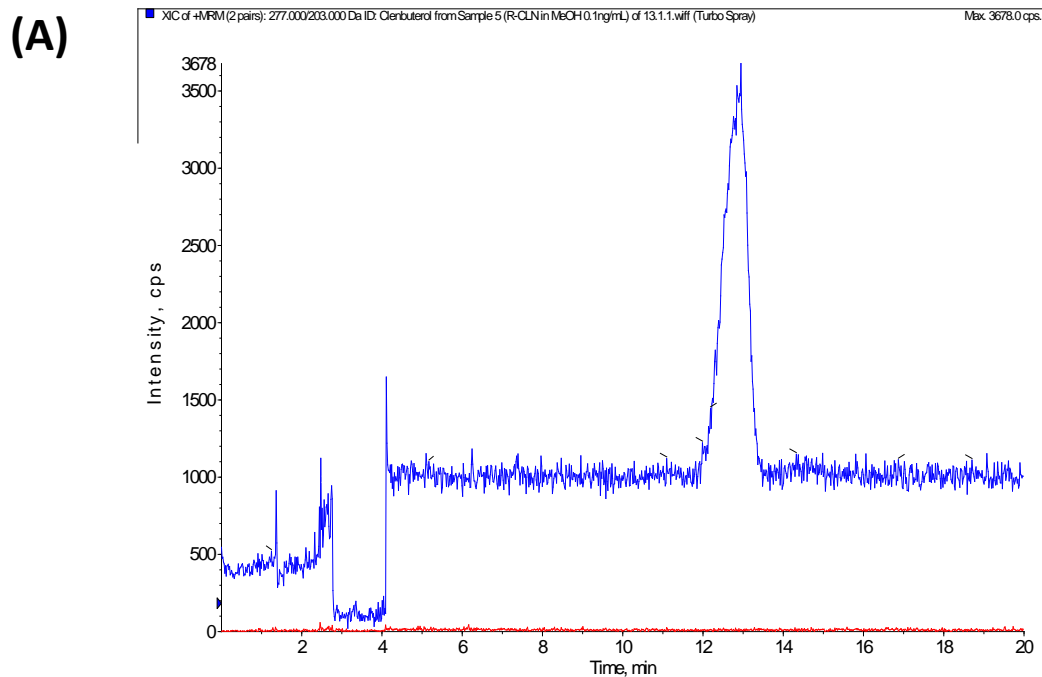


Figure 4 Mass chromatograms of (-)-*R*-clenbuterol (A) and (+)-*S*-clenbuterol (B) in methanol. Both samples were spiked 1 pg (0.1 ng/mL).

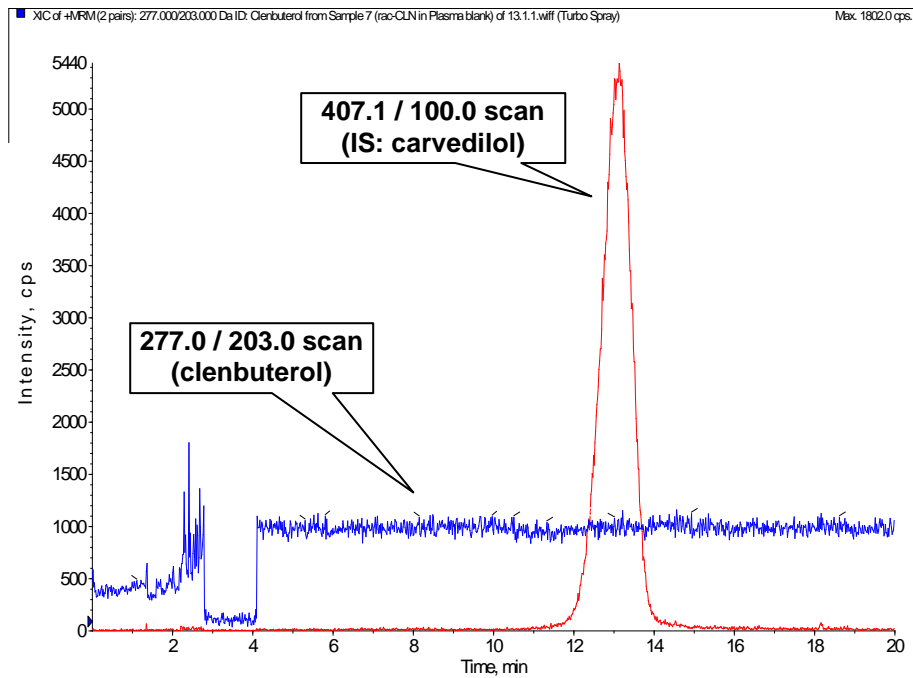


Figure 5 Mass chromatograms of 1 ng/mL carvedilol spiked in rat plasma.

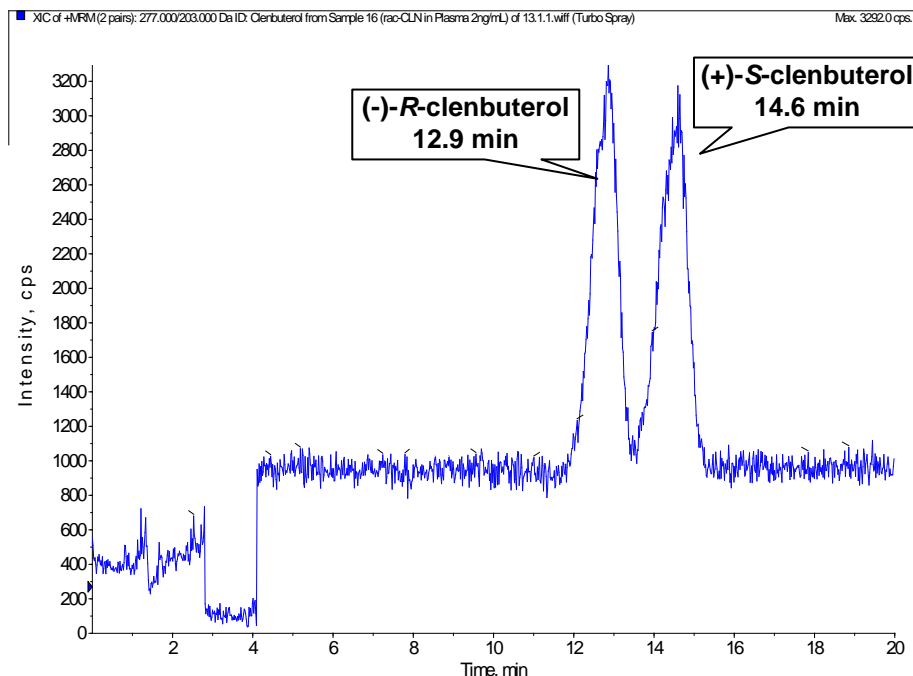


Figure 6 Mass chromatograms of 2 ng/mL (*rac*)-clenbuterol in rat plasma.

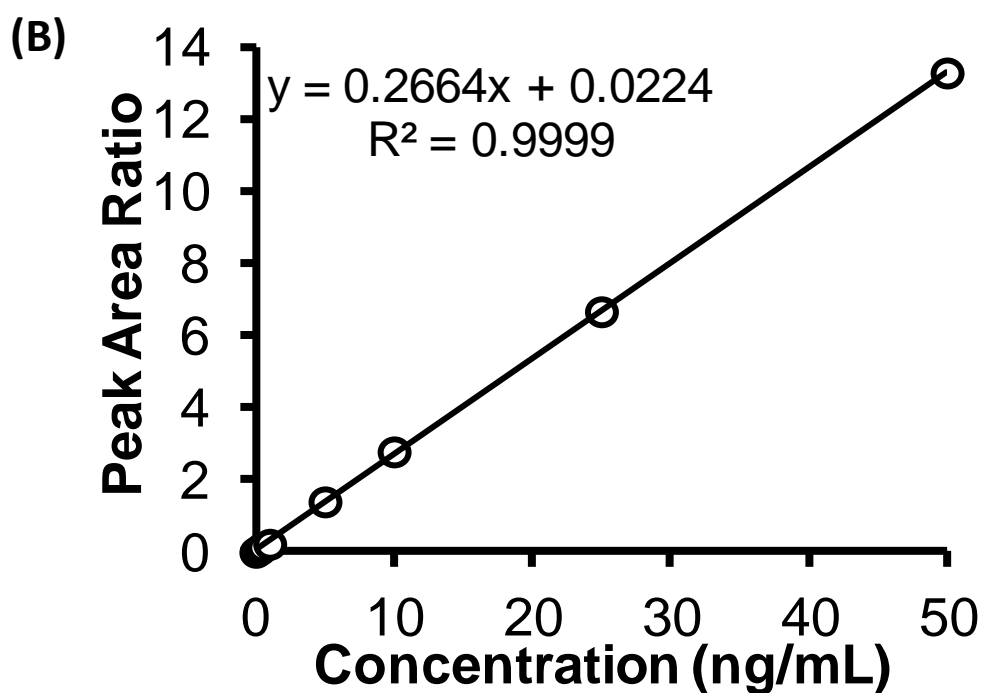
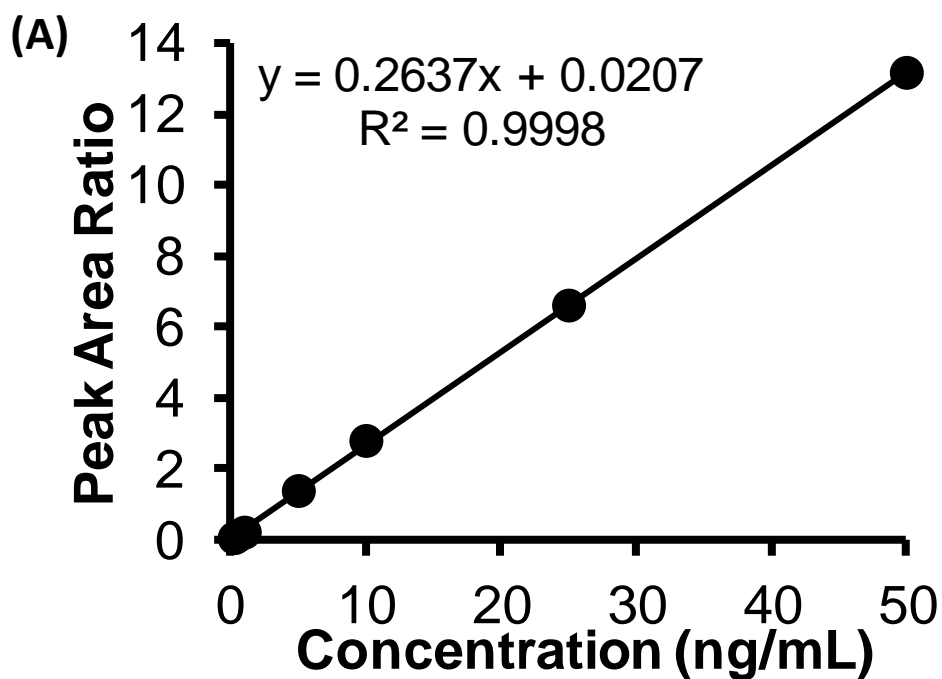


Figure 7 Standard curve for (-)-*R*-clenbuterol (A) and (+)-*S*-clenbuterol (B) in plasma.

測定法の再現性

各異性体の 1、5 および 25 ng/mL の 3 つの異なる濃度について行った測定法の再現性を Table 1 に示す。Inter-assay における CV 値は、(-)-*R*-clenbuterol で 1.4 ~ 3.6 % の範囲内であり、(+)-*S*-clenbuterol で 1.3 ~ 3.2 % の範囲内であった。Intra-assay における CV 値は、(-)-*R*-clenbuterol で 1.0 ~ 4.3 % の範囲内であり、(+)-*S*-clenbuterol で 1.4 ~ 3.2 % の範囲内であった。このことから、本研究において確立した測定法の再現性は良好であると考えた。

測定法の回収率

各異性体の 1、5 および 25 ng/mL の 3 つの異なる濃度について行った回収率の平均値 (n = 3) は、(-)-*R*-clenbuterol が 108.6, 96.5 および 96.1%であった。(+)-*S*-clenbuterol が 96.7, 101.2 および 97.8%であった。内標準物質 (carvedilol) の回収率 (n = 3) は、101.3%であった。

測定法の安定性

オートサンプラー内での安定性について調べるために、24 時間での変化を確認した。各異性体の 1、5 および 25 ng/mL の 3 つの異なる濃度について行った安定性 (%Stability) の平均値 (n = 3) は、(-)-*R*-clenbuterol が 99.4、97.0 and 94.7%であった。(+)-*S*-clenbuterol が 96.7、101.2 および 97.8%であった。内標準物質 (carvedilol) の安定性 (n = 3) は、95.3%であった。この結果は、オートサンプラー内の条件下、つまり 4°C で、24 時間安定であることが示された。

Table 1 Intra- and inter-day precision and accuracy in determination of clenbuterol enantiomers in rat plasma.

	Nominal (ng/mL)	Mean (ng/mL)	± S.D.	Accuracy ^a (%)	C.V. ^b (%)
Intra-day (n = 6)					
(-)- <i>R</i> -clenbuterol	1	0.97	0.05	97.0	2.7
	5	5.03	0.19	100.6	4.3
	25	25.1	0.19	100.4	1.0
(+) - <i>S</i> -clenbuterol	1	0.97	0.04	97.0	3.2
	5	5.01	0.24	100.2	4.5
	25	24.9	0.14	99.6	1.4
Inter-day (n = 6)					
(-)- <i>R</i> -clenbuterol	1	1.04	0.04	104.0	3.6
	5	4.63	0.1	92.6	2.1
	25	25.4	0.36	101.6	1.4
(+) - <i>S</i> -clenbuterol	1	0.99	0.03	99.0	3.2
	5	4.85	0.15	97.0	3.1
	25	25.2	0.34	100.8	1.3

^a Accuracy (%) is expressed as mean found concentration/nominal concentration × 100.

^b Coefficient of variation.

マトリックス効果

各異性体の 1、5 および 25 ng/mL の 3 つの異なる濃度について行ったマトリックス効果 (% Matrix Effect) の平均値 (n = 3) は、(-)-*R*-clenbuterol が 8.4、13.5 および 15.4% であった。(+)-*S*-clenbuterol が 2.7、10.3 および 13.7% であり、マトリックス効果がこの測定法において問題ないものと考えられた。標準サンプルと抽出サンプルのピーク面積はほぼ等しく、両方の光学異性体について定量上問題となる重大なマトリックス効果は認められなかった。

本測定法の血漿試料への適用

本測定法を、(*rac*)- clenbuterol 静脈内投与後に経時的に採血して得た血漿試料の分析に適用した。Figure 8 に、0.2、1 および 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol をラットに静脈内投与後の各異性体の血漿中濃度-時間推移を示す。0.2 mg/kg 投与後、36 時間まで各異性体の血漿中濃度-時間推移の追跡が可能であった。2 mg/kg 投与では 72 時間までの血漿中濃度の追跡が可能であり、2 相性がみられた (Figure 8)。

台形近似法により 0.2、1 および 2 mg/kg の各投与量での $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ を算出した結果、(-)-*R*-clenbuterol が 90、675 および 1,248 ng·hr/mL、(+)-*S*-clenbuterol が 122、777 および 1,510 ng·hr/mL であった (Table 2)。この投与量の範囲において線形性が保たれていると判断した (Figure 9)。

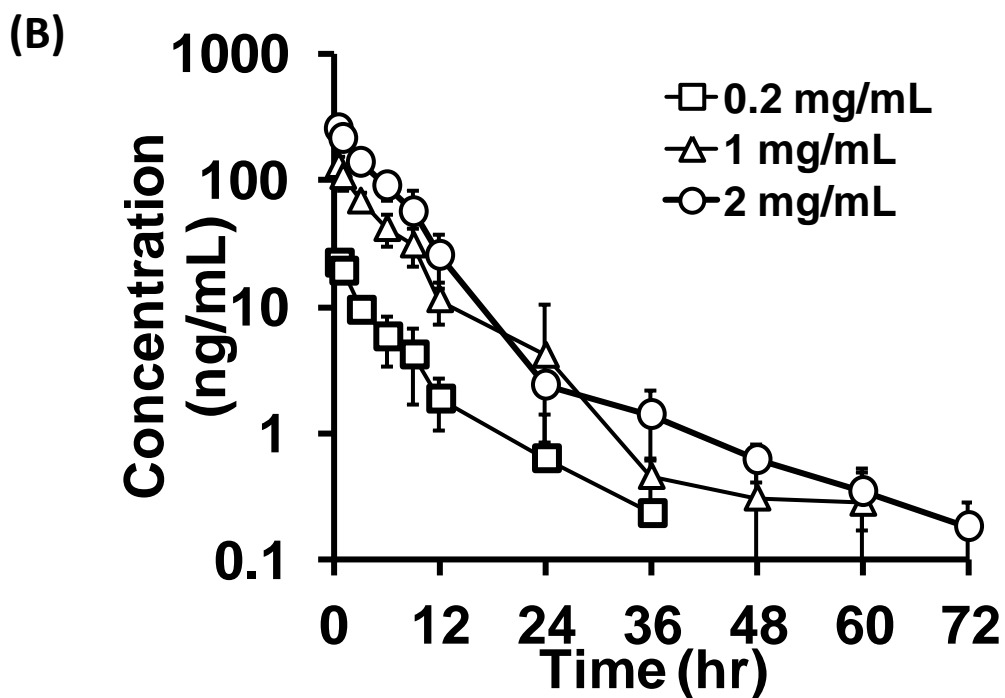
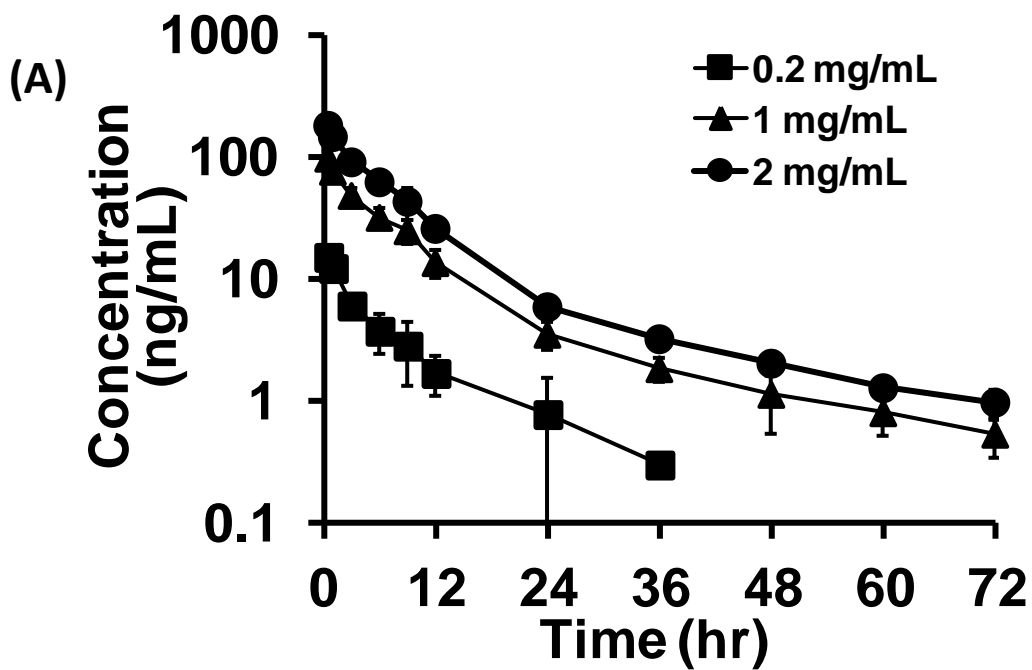


Figure 8 Plasma concentration versus time curves for (-)-*R*-clenbuterol (A) and (+)-*S*-clenbuterol (B) after intravenous administration of 0.2, 1 and 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats ($n = 4$).

Table 2 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ of (-)-*R*- and (+)-*S*-clenbuterol after intravenous administration of 0.2, 1 and 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats.

(rac)-clenbuterol Dose (mg/kg)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$)	
	(-)- <i>R</i> -clenbuterol	(+)- <i>S</i> -clenbuterol
0.2	0.090 \pm 0.027	0.122 \pm 0.032
1	0.675 \pm 0.122	0.777 \pm 0.235
2	1.249 \pm 0.178	1.510 \pm 0.346

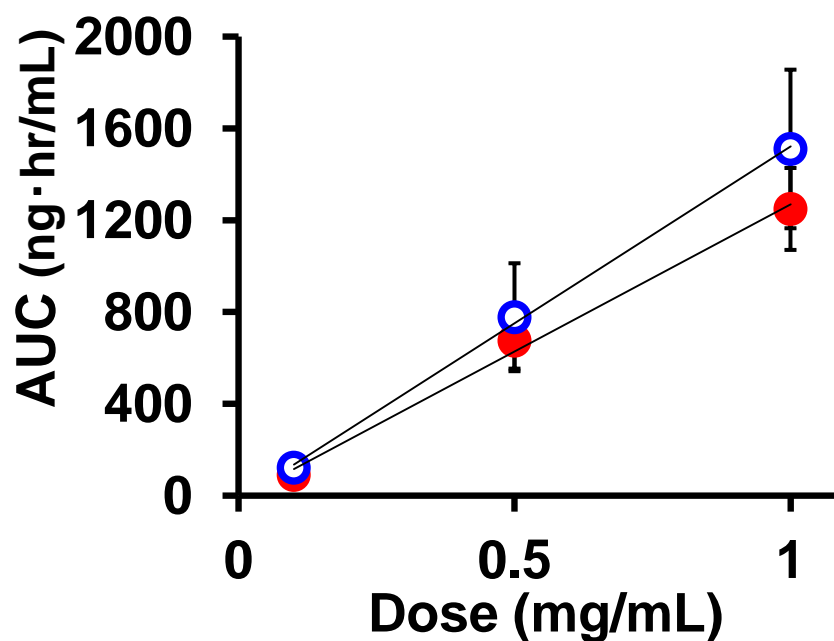


Figure 9 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ versus dose for (-)-*R*-clenbuterol (closed circle) and (+)-*S*-clenbuterol (open circle) after intravenous administration of 0.2, 1.0 and 2.0 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats. (n = 4).

4. 考察

本章では、小動物における clenbuterol 異性体の体内動態を検討するために、LC-MS/MS を用いた血漿中 clenbuterol 異性体の測定法の確立を目的とした。

Aboul-Enein ら[37] による HPLC-UV を用いた clenbuterol 異性体の測定法では、両性のグリコペプチドであるテイコプラニンを多数の共有結合により 5 μm のシリカゲルに結合させている固定相をベースとしており、キラル認識を行う特定部位を安定性よく保持するキラルカラム(CHIROBIOTIC™ T) を使用しているため、clenbuterol 異性体を分離して測定することが可能であったが、定量下限は各々 70 ng/mL であった。それに対して、本測定法は、同じキラルカラムを使用して clenbuterol 異性体の分離測定を可能としている点は Aboul-Enein ら[37] の報告と同様であるが、より低濃度が検出可能とされる LC-MS/MS を用いた測定法の開発を検討した。感度・安定性ともに優れている大気圧イオン化法(API) の中でも高極性、不揮発性、高分子量の化合物をイオン化することができ、また多価イオンを生成するため、分子量数十万以上の化合物のマスペクトルの測定が可能であることから、医薬品などの分析に多く用いられている ESI 法を選択し、さらに MS/MS モードの中でも、複数のプリカーサーイオンからそれぞれのプロダクトイオンをペアで測定することができ、高い選択性を背景に高い検出感度と S/N 比が得られ、最も検出限界値(LOD) が低い MRM モードにより測定した。その結果として、本測定法の定量下限は clenbuterol 各異性体共に 0.25 ng/mL であり、Aboul-Enein らの報告による定量下限より 1/280 もの低濃度が測定可能であることが示された。

抽出操作において血漿試料に対し約 10 倍量の acetonitrile 添加によるタンパク除去、効率よくリン脂質を除去できる HybridSPE-PPT による固相抽出を行ったことによって、ベースラインの安定化が図れ、(-)-R- および(+)-S-clenbuterol を良好に分離でき、0.25 ng/mL という定量下限を得ることができたと考えられる。

また、HPLC の移動相を 5 mM ammonium formate 含有 100 % methanol で行った場合、

マイクロガードカラムやMS の試料導入部であるプローブの細管におけるつまりが発生した。しかし、5 % の水を加えて 5 mM ammonium formate 含有 95% methanol とすることによって、つまりが解消された。これは、水の添加が ammonium formate の結晶化を防いだためと考えられる。

薬物濃度測定法のバリデーションとして、検量線 (linearity)、測定内および測定間の精度と真度 (inter-assay and intra-assay precision and accuracy)、回収率 (recovery) および安定性 (stability) に関して試験した。Inter-assay における CV 値は、(-)-*R*-clenbuterol は 3.6 % 以下であり、(+)-*S*-clenbuterol は 3.2 % 以下であった。Intra-assay における CV 値は、(-)-*R*-clenbuterol は 4.3 % 以下であり、(+)-*S*-clenbuterol は 3.2 % 以下であった。FDA ガイダンス「Bioanalytical Method Validation」 [40]において、Inter-assay および intra-assay の CV 値は 15%以内とされている。本結果は、いずれにおいても良好な精度が得られた。また、真度も(-)-*R*- および(+)-*S*-clenbuterol とともに±8%以内であり、十分な真度が得られた。他の試験結果からも、本測定法は clenbuterol 異性体の測定に十分適応できると考えられる。

したがって本章で確立した測定法は、clenbuterol 異性体の既報の測定法に比べて特異性の高い、高感度な測定法であると考えられる。また、0.2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol 静脈内投与したラットの血漿中濃度-時間推移を 36 時間まで、2 mg/kg 投与では 72 時間まで追跡できたことから、小動物における clenbuterol 各異性体の体内動態を検討するための測定法として有用性の高いものであると考えられる。

第3章 *In vitro* および *in vivo* における

Clenbuterol 光学異性体の相互変換に関する検討

1. 諸言

光学異性体を持つ薬剤である cetirizine [7]や ofloxacin [2-5] は、その光学異性体間で薬理作用や薬物動態が異なることが明らかにされ、薬効本体を有する異性体だけの製剤化が行われてきた。一方、thalidomide は(-)-*S*体に非常に高い催奇形性を有することが知られている [9]が、生体内で速やかに相互変換する [1, 10] ことから、(+)-*R* 体のみを分離して製剤化したとしても催奇形性を回避することはできない。Thalidomide は血漿中だけでなく、リン酸緩衝液(PBS pH7.4) においても相互変換をおこし、ラセミ化することが示されている。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体作動薬である MK-0767 はPBS 中では光学異性体は安定であるが血漿中では相互変換することが示されている [41]。このように、光学異性体を有する薬剤において、その光学異性体の相互変換の有無や薬理作用および体内動態の違いを把握することはきわめて重要である。

そこで本章では、clenbuterol 光学異性体の体内動態を研究するための基本的情報を得るために、*in vitro* および *in vivo* における clenbuterol 光学異性体の相互変換の有無について検討した。

2. 実験

使用動物および試薬

(*rac*)-Clenbuterol、ammonium formate、LC-MS 用精製水および methanol LC-MS/MS CHROMASOL V® は、Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。Carvedilol、acetonitrile、diethyl ether、リン酸緩衝剤粉末(1/15 mol/L、pH 7.4)、1M HCl および 1M NaOH は和光純薬(大阪) から購入した。(-)-*R*-Clenbuterol と(+)-*S*-clenbuterol は、(株) 富士薬品より譲り受けた。(-)-*R*-Clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol の光学純度は、(-)-*R*-clenbuterol が 99% ee 以上、(+)-*S*-clenbuterol が 85.9% ee ((-)-*R*-clenbuterol を 7.04% 含有)であった。

Wistar 系雄性ラットは(有)熊谷重安商店 (Japan, Miyagi) から購入した。実験まで自由摂食・摂水し、ケージの中で飼育した(室温 22-24°C、湿度 60%、7 時点灯、19 時消灯)。実験 12 時間前より絶食させ、自由節水とした。下行大動脈より heparin 処理したシリンジを用いて採血し、スピッツ管に入れた後、遠心分離(12,000 g、10 min)し、rat blank plasma を得た。

動物実験は動物実験・研究倫理審査の承認を受け、国際医療福祉大学動物実験規程に則して行った。

リン酸緩衝剤粉末 9.4 g を 1 L の精製水に溶解し(1/15 mol/L)、pH 7.4 のリン酸緩衝液(PBS : phosphate buffered saline) を調製した。

次に、(*rac*)-clenbuterol、(-)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol をそれぞれ 10 mg 秤量した後、10 mL の精製水に溶解し、1 mg/mL (*rac*)-clenbuterol 水溶液、(-)-*R*-clenbuterol 水溶液および(+)-*S*-clenbuterol 水溶液をそれぞれ調製した。

さらに、上記で調製した 1 mg/mL (-)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol 水溶液を精製水で希釈し、10 µg/mL (-)-*R*-clenbuterol 水溶液および(+)-*S*-clenbuterol 水溶液を調製した。

最後に、1M HCl および 1M NaOH をそれぞれ精製水で希釈し、0.1M HCl および 0.1M

NaOH 水溶液を調製した。

定量法

第 1 章で確立した LC-MS/MS 測定法を改変し、LC-MS により測定した。

血漿および尿試料中 clenbuterol の抽出法

血漿試料

血漿試料 100 μL に内標準物質として 100 ng/mL carvedilol 10 μL を加えた後、methanol 10 μL を加えた。その後、acetonitrile 400 μL を加えて、ボルテックスマキサーで 1 分間振とう混和後、遠心分離(18,000 g、5 min、MCX-150、TOMY)を行い、タンパク質を除去した。次いで、上清 400 μL を HybridSPE-PPT (Sigma-Aldrich, MO) に直接注入し、遠心分離(2,000 g、3 min) を行い、固相抽出してリン脂質を除去した。得られた抽出液 10 μL を LC-MS に注入し定量を行った。

尿試料

PBS で 20 倍希釈した尿試料 100 μL に内標準物質として 100 ng/mL carvedilol を 10 μL 加えた後、methanol 10 μL を加えた。その後、acetonitrile 900 μL を加えて、ボルテックスマキサーで 1 分間振とう混和後、遠心分離(18,000 g、5 min) を行った。次いで、上清 900 μL を Hybrid SPE-PPT に直接注入し、遠心分離(2,000 g、3 min) を行った後、上記と同様の操作を行い、抽出液 10 μL を LC-MS に注入し定量を行った。

検量線の作成

血漿試料

薬物無添加のラット血漿 100 μL に(*rac*)-clenbuterol methanol 溶液 10 μL を添加し、血漿中(*rac*)-clenbuterol 濃度が 2、5、10、20、50 および 100 ng/mL となるように血漿試料をそれぞれ調製した。次いで、各試料に内標準物質として 100 ng/mL carvedilol を 10 μL 加

えた後、上記と同様の操作により抽出を行い、抽出液 10 μ L を LC-MS に注入し定量を行った。

そして、横軸に clenbuterol 各異性体濃度、縦軸に (-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比をプロットして、それぞれの検量線を作成した。

尿試料

PBS で 20 倍希釈した薬物無添加のラット尿 100 μ L に (*rac*)-clenbuterol methanol 溶液 10 μ L を添加し、尿中(*rac*)-clenbuterol 濃度が 2、5、10、20、50 および 100 ng/mL となるように尿試料をそれぞれ調製した。次いで、各試料に内標準物質として 100 ng/mL carvedilol を 10 μ L 加えた後、上記と同様の操作により抽出を行い、抽出液 10 μ L を LC-MS に注入し定量を行った。

そして、横軸に clenbuterol 各異性体濃度、縦軸に (-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比をプロットして、それぞれの検量線を作成した。

装置および測定条件

装置：送液ポンプ LC-20AD、オートサンプラーSIL-20A、カラムオーブン CTO-20A、PDA 検出器 SPD-M20A および質量分析計 LCMS-2010EV から構成された液体クロマトグラフ/質量分析計(島津製作所、京都)を使用した。

LC 条件：カラムは CHIROBIOTIC™ T (100 mm \times 2.1 mm, 5 μ m, Astec, NJ) を用い、マイクロガードカラムは CHIROBIOTIC™ T (2 cm \times 1.0 mm, 5 μ m, Astec, NJ) を用いた。移動相は予め 5 分間脱気(BRANSONIC® 5510J-DTH, Yamato) した 5 mM ammonium formate (移動相 A) および methanol (移動相 B) の 5 : 95 の混液を用いた。流速は 0.25 mL/min、カラム温度は 40°C および注入量は 10 μ L とした。

MS 条件: エレクトロスプレーイオン化 (ESI: electrospray ionization) 法のポジティブイオンモードによりイオン化を行い、選択イオンモニタリング (SIM: selected ion monitoring) 法により2種類の分子イオン (clenbuterol: m/z 277.0、内標準物質であるcarvedilol: m/z 407.1) を2チャンネルでモニターした。

異性体相互変換の *in vitro* および *in vivo* 実験

異性体相互変換に関する *in vitro* 実験

調製した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ clenbuterol 水溶液を 20 μL 取り、PBS 1980 μL で希釈し、100 ng/mL (-)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol の PBS 試料 2 mL を調製した後、各試料はエッペンチューブに 100 μL ずつ分注した。次に、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ clenbuterol 水溶液を 20 μL 取り、薬物無添加のラット血漿 1980 μL を添加し、100 ng/mL (-)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol 血漿試料 2 mL を調製した後、各試料はエッペンチューブに 100 μL ずつ分注した。

上記で作成した PBS 試料および血漿試料は、37°C のヒーター(Dry Thermo Unit DTU-2B、TAITEC) で 0、1、6、24 および 72 時間インキュベートした後、測定するまで-80°C で凍結保存した。

pH 依存的異性体の相互変換に関する *in vitro* 実験 (pH < 1 および pH = 13)

調製した 1 mg/mL (+)-*S*-clenbuterol 水溶液を 10 μL 取り、1M HCl 990 μL で希釈し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+)-*S*-clenbuterol 水溶液 1 mL を調製した。さらに、調製した 1 mg/mL (+)-*S*-clenbuterol 水溶液を 10 μL 取り 1M HCl 990 μL で希釈して pH < 1 の 100 ng/mL (+)-*S*-clenbuterol 試料を調製した後、その試料をエッペンチューブに 50 μL ずつ分注した。

次に、1 mg/mL (+)-*S*-clenbuterol 水溶液を 10 μL 取り、0.1M NaOH 990 μL で希釈し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+)-*S*-clenbuterol 水溶液 1 mL を調製した。さらに、調製した水溶液を 10 μL 取り 0.1M NaOH 990 μL で希釈して pH = 13 の 100 ng/mL (+)-*S*-clenbuterol 試料を調製し

た後、その試料をエッペンチューブに 50 μ L ずつ分注した。

上記で調製した pH < 1 の 100 ng/mL (+)-*S*-clenbuterol 試料および pH = 13 の 100 ng/mL (+)-*S*-clenbuterol 試料は、37 $^{\circ}$ C のヒーターで 0、1、6、24 および 72 時間インキュベートを行った後、各試料に 50 μ L ずつ 1 M NaOH もしくは 0.1M HCl を加えて振とう混合し、中和を行った。各試料は測定するまで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

異性体相互変換の *in vivo* 実験

ラットを背位固定し、ether 麻酔下にて大腿動脈にカニューレ(ポリエチレンチューブ sp31、夏目製作所、東京)を挿入した。ラットの覚醒後、1 mg/mL (-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol を 1 mg/kg となるように、経ロゾンデを用いて経口投与した。投与後、各所定時間(0.5、1、3、6、9、12、24、36、48、60 および 72 時間)に大腿部動脈より 300 μ L ずつ採血し、遠心分離(18,000 g、5 min)を行い、血漿試料を得た。血漿試料は、濃度測定するまで -30 $^{\circ}$ C で凍結保存した。血漿中 clenbuterol 濃度は、前述した方法により測定し、薬物動態学的データ解析を行った。

次に、ラットを背位固定し、ether 麻酔下にて大腿動脈、大腿静脈および膀胱にカニューレ(動脈および静脈にはポリエチレンチューブ sp31、膀胱にはポリエチレンチューブ sp55、夏目製作所、東京)を挿入した。ラットの覚醒後、1 mg/mL (-)-*R*-clenbuterol を 1 mg/kg となるように、カニューレを通じて、静脈内に急速投与した。投与後、各所定時間(0.5、1、3、6、9、12 および 24 時間)に大腿部動脈より 300 μ L ずつ採血し、遠心分離(18,000 g、5 min)を行い、血漿試料を得た。投与後 0~3、3~6、6~12 および 12~24 時間までの尿試料をそれぞれ膀胱カニューレより回収し、尿量を測定した。尿試料は、測定するまで -30 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

3. 結果

異性体相互変換に関する *in vitro* 実験

PBS 水溶液中および血漿中における(-)-*R*-clenbuterol の相互変換について検討した結果を Figure 10 に示す。0~72 時間の間、PBS 中および血漿中のいずれにおいても、(-)-*R*-clenbuterol のピーク面積比にほとんど変化は見られず、また、対掌体である(+)-*S*-clenbuterol は観測されなかった。同様に、PBS 水溶液中および血漿中における(+)-*S*-clenbuterol 相互変換について検討した結果を Figure 11 に示す。(+)-*S*-clenbuterol のピーク面積比は、PBS 水溶液中および血漿中のいずれにおいても、0~72 時間の間、ほとんど変化は見られなかった。さらに、(+)-*S*-clenbuterol には、7.04% の(-)-*R*-clenbuterol が混入しているが、そのピーク面積比も、PBS 水溶液中および血漿中のいずれにおいても変化は見られなかった。

pH 依存的異性体相互変換に関する *in vitro* 実験(pH < 1 および pH = 13)

1M HCl 水溶液中において、(+)-*S*-clenbuterol のピーク面積比は、0~24 時間にかけて減少傾向を示し、これに対し、(-)-*R*-clenbuterol は増加傾向を示した。24 時間で(+)-*S*-clenbuterol と(-)-*R*-clenbuterol は同じ濃度になり、ラセミ状態となった(Figure 12A)。また、調製時(0 時間) の(+)-*S*-clenbuterol 濃度を 100%とすると、72 時間で 63%にまで徐々に減少した(Figure 12B)。

0.1M NaOH 水溶液中における(+)-*S*-clenbuterol の濃度は 72 時間に渡って、(+)-*S*-clenbuterol は減少傾向を示すが、(-)-*R*-clenbuterol はほとんど変化しなかった。また、(+)-*S*-clenbuterol に混入している (-)-*R*-clenbuterol の面積比は一定であった(Figure 13A)。また、調製時 (0 時間) の(+)-*S*-clenbuterol 濃度を 100%とすると、72 時間で 46%に減少した(Figure 13B)。

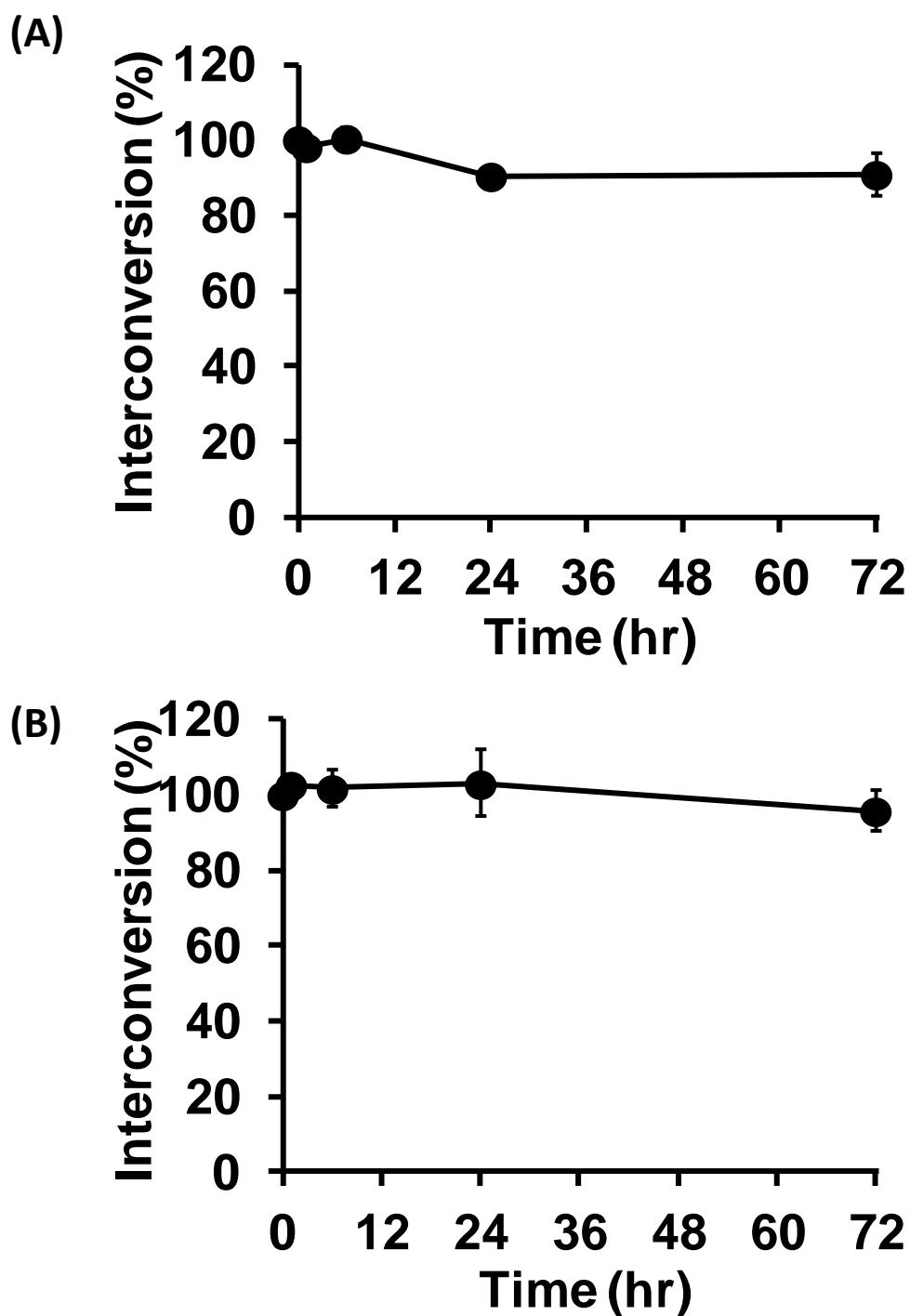


Figure 10 Time courses of stability of (-)-*R*-clenbuterol in the phosphate buffer solution (pH 7.4) (A) and the rat plasma (B) containing 100 ng/mL of (-)-*R*-clenbuterol at 37 °C (n = 3, Mean ± SD).

Interconversion (%) was calculated by $R_{\text{peak area}} / (R_{\text{peak area}} + S_{\text{peak area}}) \times 100\%$.

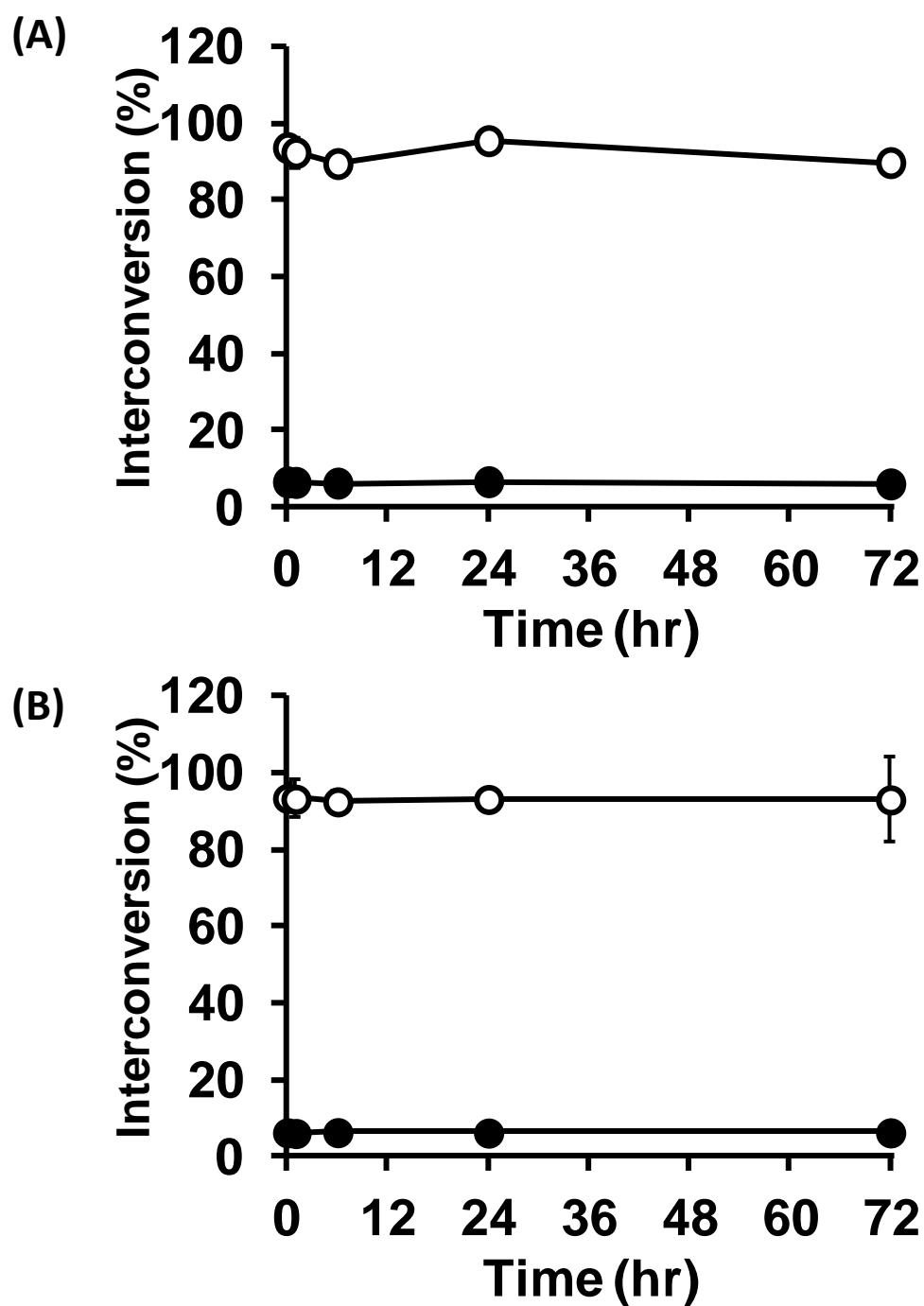


Figure 11 Time courses of stability of (+)-S-clenbuterol in the phosphate buffer solution (pH 7.4) (A) and the rat plasma (B) containing 100 ng/mL of (+)-S-clenbuterol (97%) and (-)-R-clenbuterol (7%) at 37 °C (n = 3, Mean ± SD).

Interconversion (%) was calculated by $R \text{ or } S_{\text{peak area}} / (R_{\text{peak area}} + S_{\text{peak area}}) \times 100\%$.

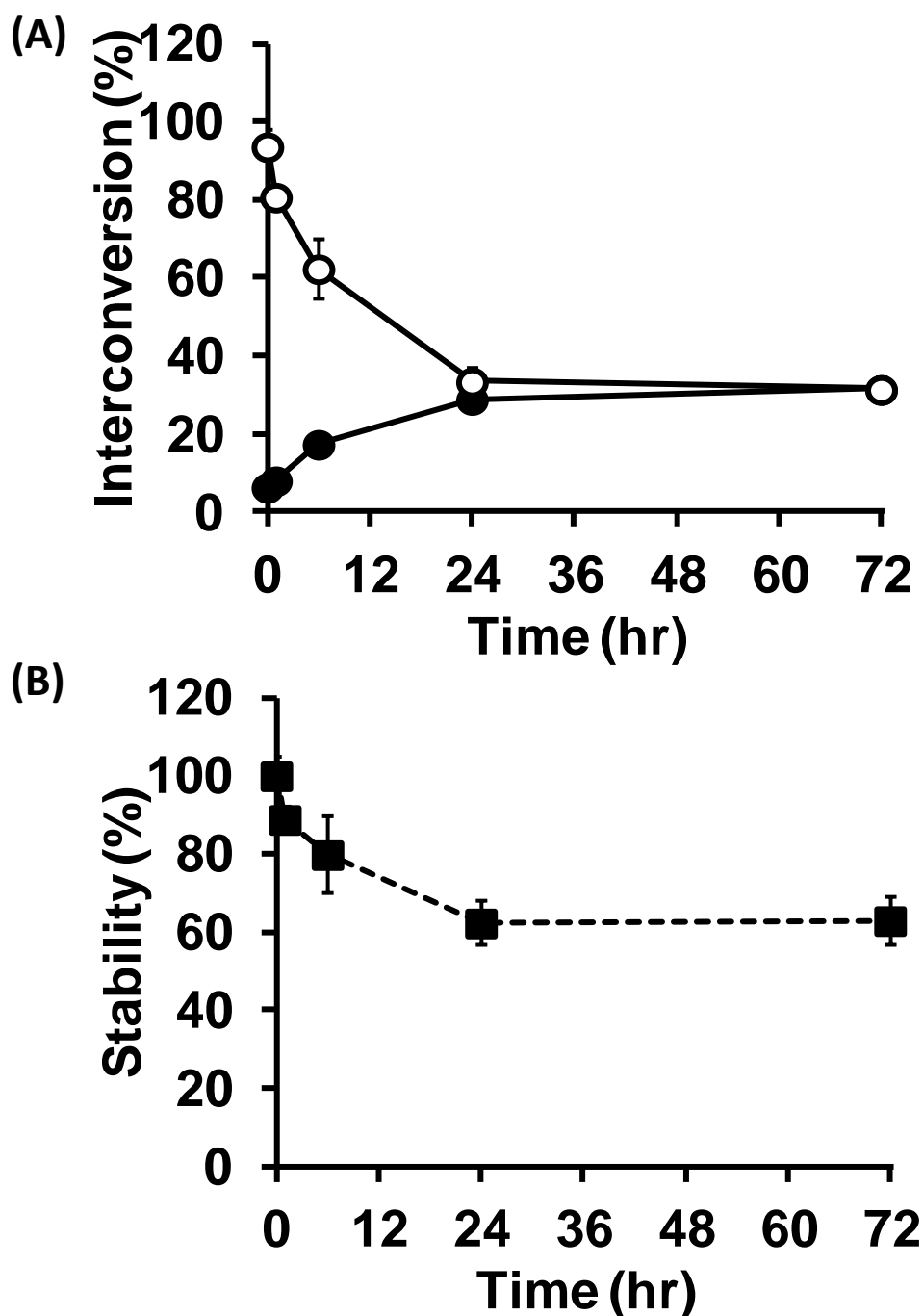


Figure 12 Time courses of the stability of (-)-*R*-clenbuterol (closed circle) and (+)-*S*-clenbuterol (open circle) (A), the sum of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol (closed square) (B) in the strongly acidic solution (<pH 1) containing 100 ng/mL of (+)-*S*-clenbuterol (93%) and (-)-*R*-clenbuterol (7%) at 37 °C (n = 3, Mean ± SD).

(A) Interconversion (%) was calculated by $R \text{ or } S_{\text{peak area}} / (R_{\text{peak area}} + S_{\text{peak area}}) \times 100\%$.

(B) Stability (%) was calculated by the sum of interconversion (%) of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol.

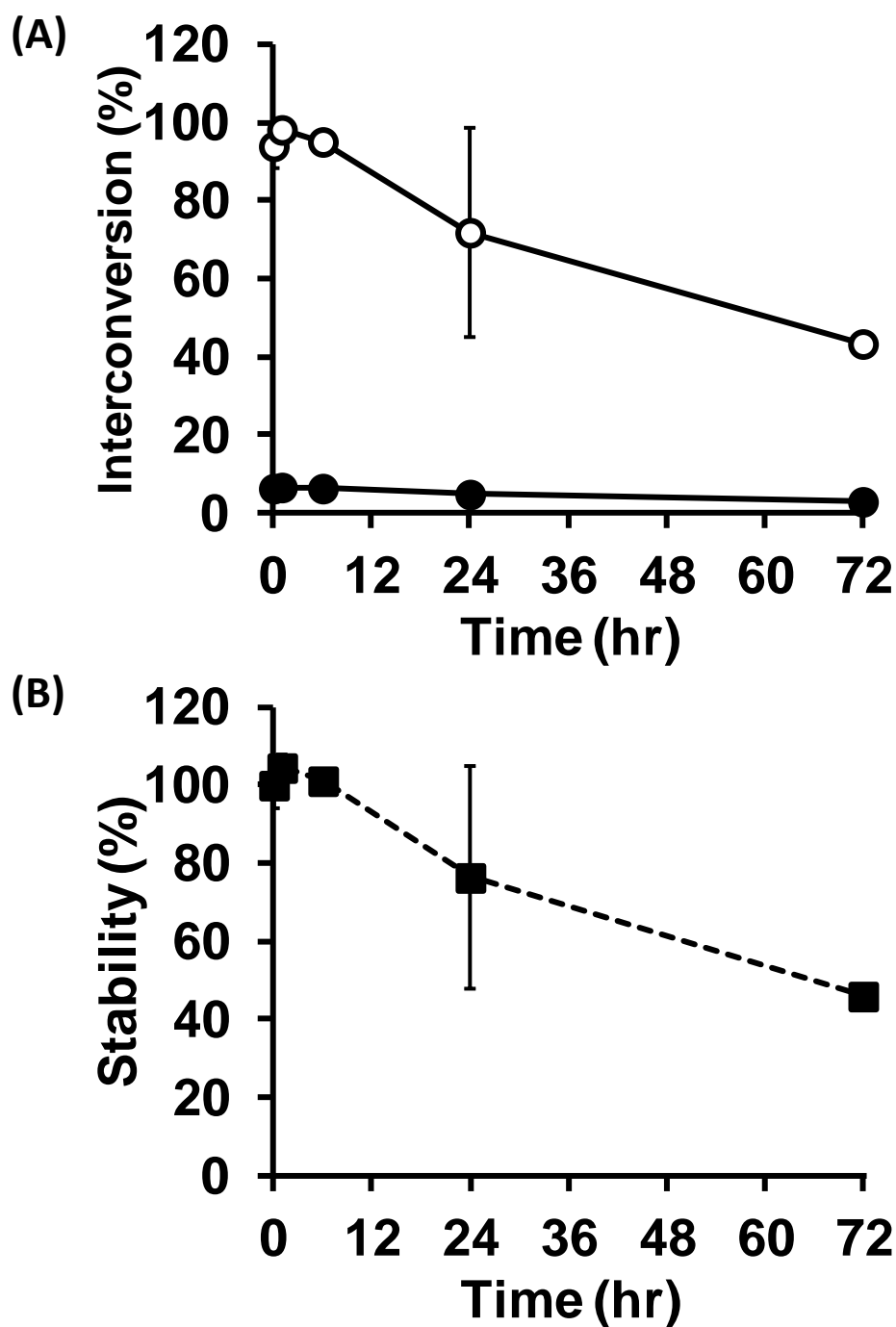


Figure 13. Time courses of the stability of (-)-*R*-clenbuterol (closed circle) and (+)-*S*-clenbuterol (open circle) (A), the sum of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol (closed square) (B) in the strongly basic solution (pH 13) containing 100 ng/mL of (+)-*S*-clenbuterol (93%) and (-)-*R*-clenbuterol (7%) at 37 °C (n = 3, Mean ± SD).

(A) Interconversion (%) was calculated by $R \text{ or } S_{\text{peak area}} / (R_{\text{peak area}} + S_{\text{peak area}}) \times 100\%$.

(B) Stability (%) was calculated by the sum of interconversion (%) of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol.

異性体相互変換に関する *in vivo* 実験

生体内投与後の相互変換の有無を明らかにするために、ラットに各エナンチオマーを単独投与し、その血中濃度を測定した。酸性条件下で相互変換が明らかになったため、胃内での相互変換が想定され、経口投与を行った。Figure 14 に、1 mg/mL (-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol を 1 mg/kg となるように単独経口投与した後の血漿中濃度推移を示す。(-)-*R*-clenbuterol 投与後 0~72 時間の間、血漿中に(+)-*S*-clenbuterol は検出されなかった (Figure 14A)。一方、(+)-*S*-clenbuterol を投与した場合、0~72 時間の間、血漿中に (-)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol が検出されたが、(-)-*R*-clenbuterol の面積比はいずれの時点においてもほぼ一定であった (Figure 14B)。さらに、1 mg/mL (-)-*R*-clenbuterol を 1 mg/kg となるように静脈内に単独投与した後の 0~24 時間の間尿中に、(+)-*S*-clenbuterol は検出されなかった。

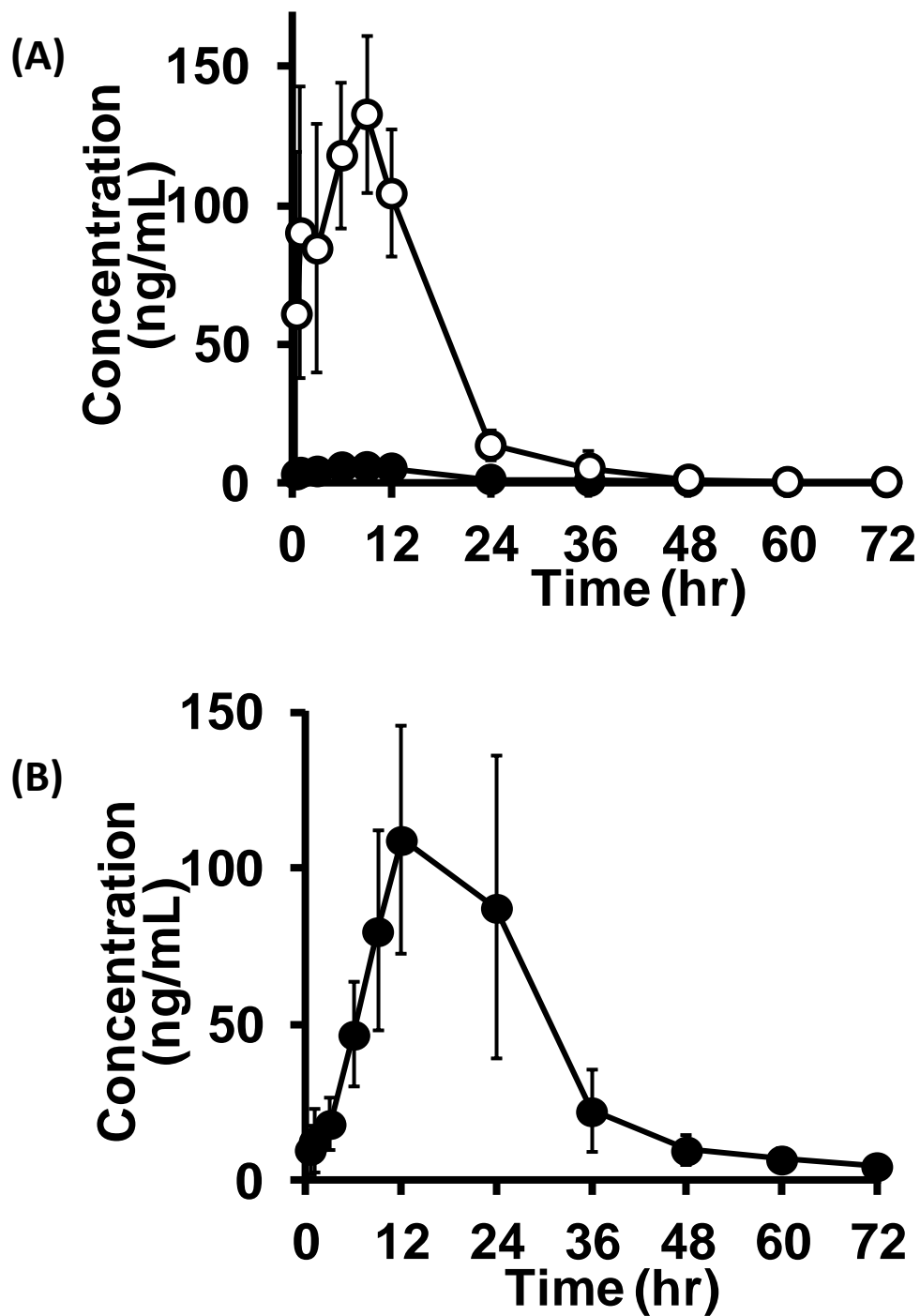


Figure 14. Plasma concentration versus time curves for (-)-R-clenbuterol after single oral administration of 2 mg/kg (-)-R-clenbuterol to rats (A) (n = 4, Mean \pm SD) and (-)-R-clenbuterol (closed circle) and (+)-S-clenbuterol (open circle) after single oral administration of 2 mg/kg (+)-S-clenbuterol to rats (B) (n = 3, Mean \pm SD).

4. 考察

光学異性体を有する薬剤のうち、nadolol [42] や esmolol [43] では生体内で相互変換は起こらないが、thalidomide [1, 10]、ibuprofen [44] および carprofen [45] などでは相互変換が起こることが明らかにされており、光学異性体の相互変換の有無や相互変換が起きる条件を明らかにすることは、光学異性体の測定や体内動態を検討する上で重要である。

そこで、*in vitro* における clenbuterol の相互変換の有無と安定性について調査した。pH 7.4 の PBS 水溶液中において、37°C で 72 時間インキュベートを行ったところ、(-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol 濃度は、いずれも減少することなくほぼ一定値を示した。また、ラット血漿中においても(-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol 濃度は、先と同様にほぼ一定の値を示すことから、PBS 水溶液中および血漿中のいずれの条件下においても、血漿中の酵素などによる相互変換や分解は起こらないことが示された。

アドレナリン β_2 受容体刺激薬に共通しているベンジル位の 2 級アルコール部分は、酸性条件下で、相互変換することが知られているが、clenbuterol の酸性条件下における異性化については報告されていない。そこで、clenbuterol の研究を行う上での基礎情報を得るために、強酸性および強塩基性条件下における clenbuterol の安定性および相互変換について検討した。まず、(+)-*S*-clenbuterol に強酸性条件下として 1M HCl 水溶液を作用させたところ、(+)-*S*-clenbuterol はラセミ状態となったことから、強酸性条件下では相互変換することが示された。すなわち、他のアドレナリン β_2 受容体刺激薬と同様、clenbuterol も強酸性条件下において、ベンジル位での相互変換が起こることが考えられた。一方、(+)-*S*-clenbuterol に強塩基性条件として 0.1M NaOH 水溶液を作用させたが、(-)-*R*-clenbuterol の面積比に変化は見られなかったことから、強塩基条件下では相互変換は起こらないことが示された。しかし、強酸性および強塩基性いずれの条件下においても、clenbuterol の総量が減少していることから、(+)-*S*-clenbuterol はこれらの条件下では、物性として不安定であることが示された。

次に、*in vivo* における相互変換の検討を行った。*clenbuterol* と同じ β_2 受容体刺激薬の *salbutamol* は、有効性や安全性の面から、*R*-体の単独製剤である *levosalbutamol* が製剤化されたが、吸入および経口投与後、生体内で *S*-*salbutamol* が観測されたという報告がある¹⁰⁾。*Clenbuterol* もまた、酸性溶液中において相互変換することが示されたため、経口投与した場合、胃酸暴露により相互変換する可能性が考えられた。そこで、(-)-*R*-*clenbuterol* および(+)-*S*-*clenbuterol* の単独経口投与実験を、ラットを用いて行ったところ、(-)-*R*-*clenbuterol* および(+)-*S*-*clenbuterol* いずれにおいても、投与後 0~72 時間の間、血漿中に対掌体である(+)-*S*-*clenbuterol* は観測されなかった。したがって、ラットに経口投与後 72 時間の間、*clenbuterol* の相互変換は起こらないことが示唆された。この結果は、先の強酸性条件下において *clenbuterol* は相互変換が起こるという結果に反するものであったが、その要因として、経口投与した際、*clenbuterol* の胃内滞留時間が短く、相互変換するのに十分な胃酸暴露がなかったためと考えられる。

しかし、経口投与後の血漿中に対掌となる異性体が検出されなかった理由として、対掌体が生成はしているが、その後速やかに排泄されている可能性が考えられた。そこで、*clenbuterol* の主な排泄経路とされている尿中排泄を調べることにした。(-)-*R*-*clenbuterol* 単独静脈内投与後 0~24 時間までの尿を回収して分析を行ったところ、クロマトグラム上に対掌体である(+)-*S*-*clenbuterol* は観測されなかった。したがって、前述の単独経口投与実験および尿中排泄実験結果より、ラット生体内において *clenbuterol* の相互変換は起こらないことが示された。

第4章 Clenbuterol のラットにおける体内動態の光学特異性

1. 諸言

これまでの検討により、clenbuterol 光学異性体の高感度な生体内濃度の測定法が確立され、光学異性体の相互変換の条件が明らかになった。そこで本章では、clenbuterol 光学異性体のラットにおける体内動態の違いを明らかにすることにした。

光学異性体の体内動態の差を示した医薬品の例がいくつかある。Omeprazole は、R 体と S 体の光学異性体を持つプロトンポンプ阻害剤であるが、この2つに薬理作用に差がない。しかし、主な代謝酵素である CYP2C19 に対して R 体のほうが親和性が高い特徴を持つ [46]。また、CYP2C19 の遺伝多型により個人間のばらつきが大きい [47]。このため、個人差が小さく、誰に対しても同じ胃酸分泌抑止力を有する薬剤、また、CYP2C19 で代謝される他の薬物との相互作用も軽減させることが期待され、S 体のみから成る、esomeprazole (ネキシウム®) が開発された。Methotrexate (MTX) は L 体の MTX のみからなる医薬品であるが、proton-coupled folate transporter (PCFT) により腸管より取り込まれることが明らかになっている。L 体の MTX と光学異性体である D 体の MTX との PCFT を介した取り込みを検討した場合、40 倍もの差が示され、トランスポーターにおける光学異性体選択性が示されている [48]。また、非ステロイド性抗炎症薬の etodolac は、R 体に比べて S 体のほうがヒト血清アルブミンへの結合が 6.06 倍強いことが示されている [49, 50]。このように、光学異性体の体内動態の差は、代謝酵素、トランスポーター、および血漿タンパク結合性等多岐にわたり、各薬物により特徴が異なる。Omeprazole のように、薬理作用は同等であるが体内動態の違いから単独投与の有効性が示された製剤もあり、光学異性体を持つ医薬品は異性体ごとに体内動態を調査する必要がある。

一方、このように光学分割した医薬品が承認されているが、異性体の分離精製には経費がかかり、光学分割しても効能効果に関して大きな差がないことも考えられる。薬理効果を有さない異性体が、もう一方の異性体と比較して早く消失したり、相互作用を示さないなどの

場合は、異性体を分割投与する必要はなく、既存の医薬品で十分対応できる。この点からも、薬物動態を明らかにすることは重要である。

ところで、Clenbuterol の体内動態の報告としては、Kopitar ら [23]や Zimmer [24]によってラットにおける消失半減期や消失過程について示されており、ラットへ clenbuterol 2 mg/kg 静脈内投与後の最高血中濃度は 850 ng/mL であった。また、Yamamoto ら [21] によって、ヒト、ラットおよびウサギに(*rac*)-clenbuterol を経口投与後の最高血中濃度、消失半減期、タンパク結合率および尿中未変化体排泄量について検討されている。その結果、ラットへの clenbuterol 2 µg/kg 経口投与後の最高血中濃度は 0.1 ng/mL であった。2009 年に本邦における内閣府食品安全委員会による「動物用医薬品評価書 クレンブテロール」中において、ラット、イヌ、ウサギ、牛、馬、などの体内動態や代謝物などがまとめられたものが報告された [30]。これらの報告は、いずれも光学分割されていないラセミ体として検討された結果である。

一方、clenbuterol 光学異性体に関する体内動態の情報は少ない。ラットに連続投与し、clenbuterol 光学異性体の組織濃度の比較が報告されているが、この結果は血中濃度が測定されていないため、血中濃度の差がある場合どの程度濃縮されているか不明である [15]。また、薬物動態学的パラメータや、吸収・分布・排泄といった動態に関わる過程の光学異性体間の違いを示したものはない。

そこで本章では、ラットにおける clenbuterol 体内動態の光学特異性を調べた。まず (*rac*)-clenbuterol を静脈内投与後の血漿中濃度推移を測定し、薬物動態学的パラメータの光学異性体間の差を明らかにした。また、吸収、排泄、さらに分布に関して光学特異性の有無の検討を行った。

2. 実験

試薬および使用動物

(*rac*)-Clenbuterol、ammonium formate、LC-MS 用精製水および methanol LC-MS/MS CHROMASOL V[®] は、Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。Carvedilol、acetonitrile、diethyl ether、およびリン酸緩衝剤粉末(1/15 mol/L、pH 7.4) は和光純薬(大阪)から購入した。(–)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol は(株)富士薬品より譲り受けた。

Wistar 系雄性ラットは(有)熊谷重安商店 (Japan, Miyagi) から購入した。実験まで自由摂食・摂水し、ケージの中で飼育した(室温 22-24°C、湿度 60%、7 時点灯、19 時消灯)。実験 12 時間前より絶食させ、自由節水とした。下行大動脈より heparin 処理したシリンジを用いて採血し、スピッツ管に入れた後、遠心分離(12,000 g、10 min)し、rat blank plasma を得た。

動物実験は動物実験・研究倫理審査の承認を受け、国際医療福祉大学動物実験規程に則して行った。

定量法

第 1 章で確立した LC-MS/MS による測定法を用いた。

抽出方法

血漿

血漿試料 100 μ L に内標準物質である carvedilol (1 μ g/mL) 10 μ L、methanol 10 μ L を加え、除タンパクを行うために acetonitrile 900 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間振とう混和後、遠心分離(MCX-150、TOMY) した(18,000 g、5 min)。さらにリン脂質を除去するため、その上清 900 μ L を固相カラムである HybridSPE-PPT (Sigma-Aldrich, MO) に直接注入し、遠心(2,000 g、3 min) した。その後、その抽出液 10 μ L を LC-MS/MS に注入した。

尿・胆汁

PBS で 20 倍に希釈した尿および胆汁試料 100 μL に内標準物質である carvedilol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 μL 、methanol 10 μL を加え、除タンパクを行うために acetonitrile 900 μL を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間振とう混和後、遠心分離(MCX-150、TOMY) した(18,000 g、5 min)。さらにリン脂質を除去するため、その上清 900 μL を固相カラムである HybridSPE-PPT (Sigma-Aldrich, MO) に直接注入し、遠心(2,000 g、3 min) した。その後、その抽出液 10 μL を LC-MS/MS に注入した。

LC-MS/MS 分析

高速液体クロマトグラフィー(HPLC) は、デガッサーに DGC-20A5、液送ポンプに LC-20AD、オートサンプラーに SIL-20AC、カラムオープンに CTO-20AC (各島津製作所；京都) を使用した。カラムは CHIROBIOTIC™ T (100 mm x 2.1 mm, 5 μm , Astec, NJ)、マイクロガードカラムは CHIROBIOTIC™ T (2 cm x 1.0 mm, 5 μm , Astec, NJ) を用い、移動相は methanol : milli-Q 水(Elix, MILLIPORE) (9 : 1 v/v) に ammonium formate を 5 mM となるように溶解し、5 分間脱気(BRANSONIC® 5510J-DTH, Yamato) した。カラム温度は 40°C、移動相の流速は 0.2 mL/min、注入量は 10 μL とした。

質量分析器(MS) は、API4000™ (AB SCIEX, MA, USA) 装置を使用して、エレクトロスプレーイオン化(ESI) 法、ポジティブモード、MRM (Multiple reaction monitoring) モード、clenbuterol の Q1 は 277.0 (m/z) および Q3 は 203.0 (m/z)、内標準物質である carvedilol の Q1 は 407.1 (m/z) および Q3 は 100.0 (m/z) で測定した。質量分析部は四重極型である。またイオン源パラメータは、コリジョンガス(CAD) : 6、カーテンガス(CUR) : 50 psi、イオンソースガス 1 (GS1) : 50 psi、イオンソースガス 2 (GS2) : 70 psi、イオンスプレーボルテージ(IS) : 5,500.0 V、ヒーター温度(TEM) : 600°C、デクラスタリングポテンシャル(DP) : 56.0 V、エントランスポテンシャル(EP) : 10.0 V、コリジョンエネルギー(CE) : 23.0 V、コリジョンセルイグジットポテンシャル(CXP) : 12.0 V に各種設定した。マススペクトルは、

Analyst® 1.4 Software で分析した。

(-)-*R*-clenbuterol、(+)-*S*-clenbuterol および IS の保持時間は、それぞれ 12.9 分、14.6 分 および 13.1 分であり、分離は良好であった。

Clenbuterol 体内動態実験（静脈内投与および十二指腸内投与）

使用したラットの体重は 200 - 320 g であった。薬物動態実験として、0.2、1 および 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol を静脈内投与、2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol を十二指腸内投与、1 mg/kg *R*-clenbuterol を静脈内投与により検討した。ラットを背位固定し、ether 麻酔下にて大腿動脈および静脈にカニューレを挿入した。十二指腸内投与の場合は、さらに開腹し十二指腸にカニューレを施し、腹部を縫合した。ラットの覚醒後、clenbuterol 薬液(1 mg/mL) を大腿静脈もしくは十二指腸カニューレより注入し、0.5 mL の生理食塩水でフラッシュした。投与後の各所定時間(0.5、1、3、6、9、12、24、36、48、60 および 72 時間) に大腿部動脈より 250 μ L ずつ採血し、heparin 処理したマイクロチューブに回収した。血液は遠心分離(18,000 g、5 min) を行い、血漿試料を得た。血漿試料は、濃度測定するまで-30°Cで凍結保存した。

In Situ 吸収実験

ラットを背位固定し、ether 麻酔下にて開腹し、回盲部より 1 cm 上部から長さ 10 cm の回腸の両端を結紮し、腸管ループを作成した。作成した腸管ループにカニューレを挿入した後、消化管を腹部に戻し、縫合した。ラットの覚醒後、(*rac*)-clenbuterol 100 μ g/0.5 mL/head をカニューレより腸管ループ内に急速投与した。投与後 10、30、60 および 180 分に腸管ループの摘出を行った。摘出した腸管ループの内部は、直ちに生理食塩液 7 mL にて洗浄を行い、その洗浄液を回収し、洗浄液の容積を測定した。得られた洗浄液は、遠心分離(2,000 g、5 min) を行い、その上清を洗浄液試料とした。得られた洗浄液試料および腸管ループは、濃度測定するまで-30°Cで凍結保存した。摘出した腸管ループは PBS を用いてホモジネート後、血漿と同様の方法にて抽出した。Clenbuterol 各異性体の腸管ループ内吸収率は、洗浄液試

料および腸管のホモジネート液の定量を行って得られた腸管ループ内残存量から、次式を用いて算出を行った。

$$\text{腸管ループ内吸収率 (\%)} = (\text{投与量} - \text{腸管ループ内残存量}) / \text{投与量} \times 100$$

尿中排泄

ラットを背位固定し、ether 麻酔下にて膀胱および大腿動脈および静脈にカニューレを挿入した。ラットの覚醒後、カニューレを通じて 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol を静脈内に急速投与した。投与後 0~3、3~6、6~12 および 12~24 時間の尿試料を膀胱カニューレより回収し、尿量を測定した。投与後の各所定時間(0.5、1、3、6、9、12 および 24 時間)に大腿部動脈より 250 μ L ずつ採血し、heparin 処理したマイクロチューブに回収した。血液は遠心分離(18,000 g、5 min)を行い、血漿試料を得た。血漿および尿試料は、測定するまで-30°Cで凍結保存した。

胆汁排泄

ラットを背位固定し、ether 麻酔下にて胆管および大腿動脈および静脈にカニューレを挿入した。ラットの覚醒後、カニューレを通じて 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol を静脈内に急速投与した。投与後 0~3、3~6、6~12 および 12~24 時間の胆汁を胆管カニューレより回収し、胆汁量を測定した。投与後の各所定時間(0.5、1、3、6、9、12 および 24 時間)に大腿部動脈より 250 μ L ずつ採血し、heparin 処理したマイクロチューブに回収した。血液は遠心分離(18,000 g、5 min)を行い、血漿試料を得た。血漿および胆汁試料は、測定するまで-30°Cで凍結保存した。

血漿タンパク結合実験

In vitro における血漿タンパク結合率の測定は限外濾過法にて行った。なお、限外濾過膜への clenbuterol の吸着は認められなかった。

薬物無添加のラット血漿を、(*rac*)-clenbuterol 20、100 および 200 ng/mL (エナンチオマーとして 10、50 および 100 ng/mL) に調製し、血漿試料 1 mL をそれぞれ 37°C のヒーターで 30 分間インキュベートを行った後、各血漿試料から 100 μ L ずつ新しいエッペンチューブに分注し、このろ過前の血漿試料中薬物濃度を C_t (total concentration) とした。残りの血漿試料 900 μ L はそれぞれ Centrifree MPS (MILLIPORE) に注入後、遠心分離 (2,000 g、10 min) を行い、ろ液中の血漿試料中薬物濃度を C_f (free fraction concentration) とした。この時、正確に血漿試料中非タンパク結合型薬物濃度の測定を行うために、ろ液量が全血漿試料量 (900 μ L) の 15~20% 以下であることを確認した。また、血漿タンパク結合形分率を次式を用いて算出した。

$$\% \text{ protein unbound fraction} = \frac{\text{unbound clenbuterol concentration}}{\text{total clenbuterol concentration}} \times 100$$

薬物動態学的データ解析

ラットに静脈内投与および十二指腸内投与後の各異性体の血漿中薬物濃度 - 時間プロファイルは、MOMENT (EXCEL) [51] を用いてノン-コンパートメントモデル解析を行った。投与後 0 時間から T 時間までの血中濃度時間曲線下面積 ($AUC_{0 \rightarrow T}$) は、台形近似法により求めた。投与後 0 時間から無限時間までの血中濃度時間曲線下面積 ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) および 1 次モーメント曲線下面積 (AUMC) は、台形近似法に外装法を組み合わせることで求めた。平均滞留時間 (MRT) は、 $MRT = AUMC / AUC_{0 \rightarrow \infty}$ により求めた。消失速度定数 (k_e) は最終消失相の回帰分析により求め、消失半減期 ($t_{1/2}$) は $0.693 / k_e$ により算出した。静脈内投与後の全身クリアランス (CL_{tot}) は、 $Dose / AUC_{0 \rightarrow \infty}$ により算出した。分布容積 ($V_{d_{ss}}$) は、 $MRT \times CL_{tot}$ により算出した。

バイオアベイラビリティは以下の式により算出した。

$$\%F = [AUC_{0 \rightarrow \infty(i.d.)} \times Dose_{(i.v.)} / AUC_{0 \rightarrow \infty(i.v.)} \times Dose_{(i.d.)}] \times 100$$

腎クリアランスおよび胆汁クリアランスは、尿中および胆汁中に排泄された未変化体の量を $AUC_{0 \rightarrow T}$ で除することにより求めた。

組織分布の実験

ラットに 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol を頸静脈より投与し、3、24、および 36 時間後に中心動脈より全血液を採取した後、肝臓、肺、腎臓、眼球、膀胱、気管支、大腿骨、心臓および大腿筋を採取した。PBS (pH7.4) を用いて肝臓は 10 倍、肝臓以外の組織は 5 倍に希釈およびホモジネートした後、血漿と同様の方法にて抽出した。大腿骨は乳鉢上で液体窒素にて凍結させながら粉砕した後、PBS を用いて希釈・ホモジネートした。 K_p 値は組織濃度を血漿中濃度で除することにより算出した。 $K_{p,f}$ 値は K_p 値に血漿タンパク非結合形分率を掛けて算出した。

統計処理

統計学的検定は、Student's *t*-test により行い、危険率 *p* 値が 0.05 未満を有意とした。

3. 結果

Clenbuterol 光学異性体の静脈内投与後の体内動態

ラットにおける clenbuterol エナンチオマーの体内動態学的パラメータを求めるために、(*rac*)-clenbuterol 静脈内投与後の各異性体の血漿中濃度推移を調べた。第 1 章静脈内投与の結果より、直線性を示し、かつ最終消失相が明確に観察できる投与量として、2 mg/kg を用いることにした。(*rac*)-Clenbuterol 2 mg/kg を静脈内投与後の血漿中薬物濃度-時間推移を Figure 15 に示す。投与初期から 9 時間までの血漿中濃度は(+)-*S*-clenbuterol が(-)-*R*-clenbuterol よりも高く推移し、投与後 12 時間以降では(-)-*R*-clenbuterol が(+)-*S*-clenbuterol に比べ高く推移していた。

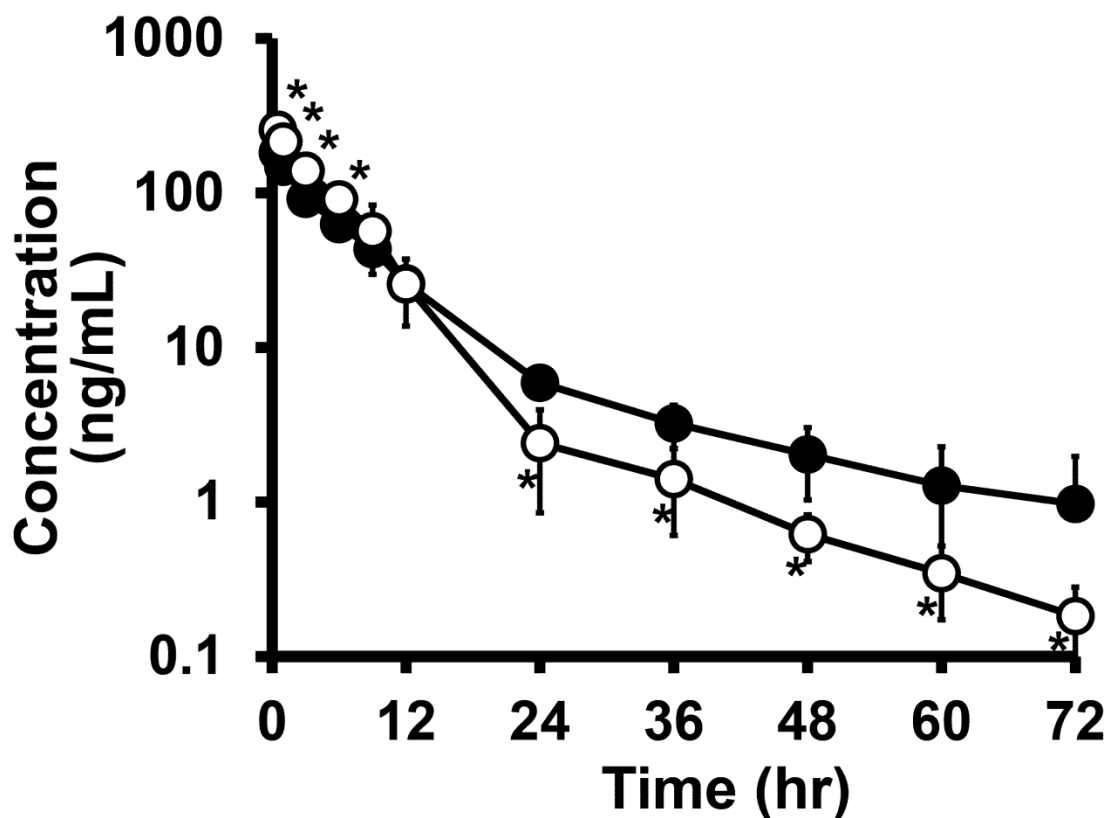


Figure 15 Plasma concentration versus time curves for (-)-*R*-clenbuterol (closed circles) and (+)-*S*-clenbuterol (open circles) after i.v. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats. ($n = 4$, Mean \pm S.D.) * $p < 0.05$, (-)-*R*-clenbuterol vs. (+)-*S*-clenbuterol.

得られた血漿中濃度推移よりモーメント法を用いて算出した静脈内投与後の薬物動態学的パラメータを Table 3 に示す。*(rac)*-Clenbuterol 2 mg/kg を静脈内投与後の(-)-*R*-clenbuterol および(+)-*S*-clenbuterol の $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ は、それぞれ $1.25 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$ (mean \pm SD, n = 4)、および $1.51 \pm 0.35 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$ と算出され、異性体間で有意な差は認められなかった。一方、(-)-*R*-clenbuterol の CL_{tot} は $13.5 \pm 1.8 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ であり、(+)-*S*-clenbuterol: $11.5 \pm 2.7 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ よりも大きかった。 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ に差が認められなかったにもかかわらず、 CL_{tot} に差が認められたのは、体重のばらつきによるものと考えられる。MRT はまた、(-)-*R*-clenbuterol の方が(+)-*S*-clenbuterol よりも長かった。(-)-*R*-clenbuterol の $V_{d_{ss}}$ は $9.17 \pm 2.76 \text{ L}/\text{kg}$ であり、(+)-*S*-clenbuterol: $4.14 \pm 1.00 \text{ L}/\text{kg}$ よりも有意に大きかった。

Table 3 Pharmacokinetic parameters of clenbuterol enantiomers after i.v. and i.d. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats.

		(-)- <i>R</i> -clenbuterol		(+)- <i>S</i> -clenbuterol	
i.v.					
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$)	1.25	\pm 0.18	1.51	\pm 0.35
MRT	(hr)	11.2	\pm 2.0	6.0	\pm 0.7 *
$t_{1/2}$	(hr)	19.1	\pm 5.5	14.1	\pm 5.1 *
CL_{tot}	($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)	13.5	\pm 1.8	11.5	\pm 2.7 *
$V_{d_{ss}}$	(L/kg)	9.17	\pm 2.76	4.14	\pm 1.00 *

Moment analysis of clenbuterol from plasma concentration after i.v. administration of (*rac*)-clenbuterol (2 mg/kg) to rats ($298 \pm 27 \text{ g}$, n = 4).

* Significant difference between (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at $p < 0.05$; Student's *t* test.

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; MRT, mean residence time; $t_{1/2}$, terminal half-life; CL_{tot} , total body clearance; $V_{d_{ss}}$, distribution volume at steady state.

Clenbuterol 光学異性体の十二指腸内投与後の体内動態

第 2 章において、経口投与後の血漿中濃度推移を検討したが、個体差が大きく光学異性体間に違いがある傾向は見られるものの有意な差はなかった。そこで、腸管からの吸収における光学異性体の差を明らかにするために、(*rac*)-clenbuterol 十二指腸内投与後の各異性体の血漿中濃度推移を検討した。(*rac*)-Clenbuterol 2 mg/kg を十二指腸内投与後、血漿中濃度は、投与後 15 分において両異性体ともにすでに最高血中濃度に達しており、C_{max} (投与 15 分後の濃度) は、(-)-*R*-clenbuterol が 124.8 ± 41.5 ng/mL、(+)-*S*-clenbuterol が 195.1 ± 77.7 ng/mL であった (Figure 16)。投与初期から 9 時間までの血漿中濃度は(+)-*S*-clenbuterol が (-)-*R*-clenbuterol よりも高く推移した。これに対し、投与後 12 時間以降では (-)-*R*-clenbuterol が(+)-*S*-clenbuterol に比べ高く推移しており、静脈内投与後の経過と類似していた。

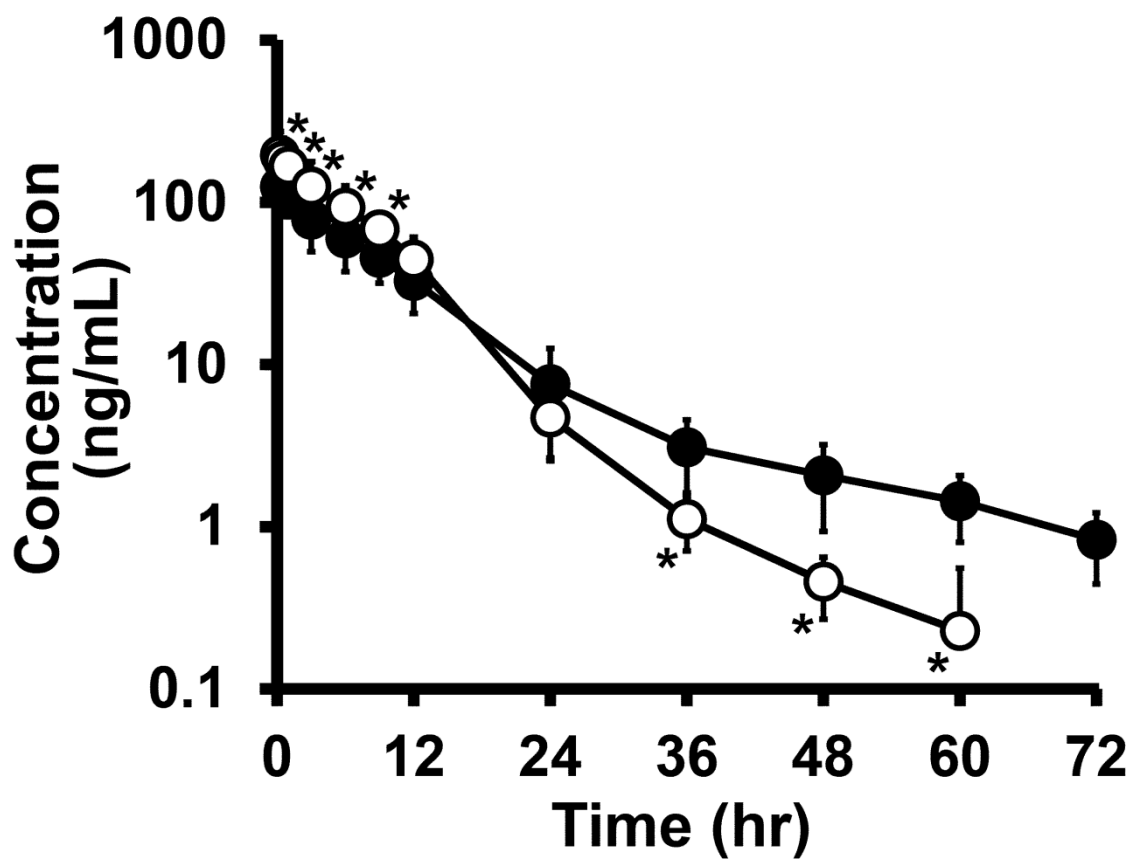


Figure 16 Plasma concentration versus time curves (-)-*R*-clenbuterol (closed circles) and (+)-*S*-clenbuterol (open circles) after i.d. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats. (n = 5, Mean ± S.D.) **p* < 0.05, (-)-*R*-clenbuterol vs. (+)-*S*-clenbuterol.

この血中濃度推移より算出した十二指腸内投与後の薬物動態学的パラメータを Table 4 に示す。静脈内投与後の AUC と十二指腸内投与後の AUC を用いて、十二指腸内投与後のバイオアベイラビリティ(F) の算出した結果、(-)-*R*-clenbuterol は 92%、(+)-*S*-clenbuterol は 102% であった。(-)-*R*-clenbuterol の CL_{tot}/F は 15.6 ± 3.8 mL/min/kg であり、(+)-*S*-clenbuterol: 11.7 ± 3.5 mL/min/kg よりも大きかった。また、(-)-*R*-clenbuterol の Vd_{ss}/F は 10.3 ± 2.9 L/kg であり、(-)-*S*-clenbuterol: 5.0 ± 1.5 L/kg よりも有意に大きかった。

Table 4 Pharmacokinetic parameters of clenbuterol enantiomers after i.v. and i.d. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats.

		(-)- <i>R</i> -clenbuterol		(+) - <i>S</i> -clenbuterol	
i.d.					
AUC _{0→∞}	(μg·hr/mL)	1.15	± 0.42	1.52	± 0.46 *
MRT	(hr)	11.1	± 2.1	7.1	± 0.7 *
t _{1/2}	(hr)	12.9	± 4.9	5.4	± 1.0 *
F	(%)	92.0	± 33.6	101.0	± 30.2
CL _{tot} /F	(mL/min/kg)	15.6	± 3.8	11.7	± 3.5 *
Vd _{ss} /F	(L/kg)	10.3	± 2.9	5.0	± 1.5 *

Moment analysis of clenbuterol from plasma concentration after i.d. administration of (*rac*)-clenbuterol (2 mg/kg) to rats (235 ± 29 g, n = 5).

* Significant difference between (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at $p < 0.05$; Student's *t* test.

AUC_{0→∞}, area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; MRT, mean residence time; t_{1/2}, terminal half-life; CL_{tot}, total body clearance; Vd_{ss}, distribution volume at steady state.

In Situ 吸収実験

さらに、腸管吸収の光学異性体間の差を明確にするために、*in situ* 吸収実験として腸管ループからの吸収率を求めた。投与後 10 分における腸管ループ内残存量から求めた吸収率は、(-)-*R*-clenbuterol で 31.7%、(+)-*S*-clenbuterol で 32.0%であった。また、30 分後では、それぞれ 72.9%と 73.3%であり、1 時間後ではそれぞれ 87.8%と 87.4%であった(Figure 17)。吸収過程に光学特異性は見られなかった。

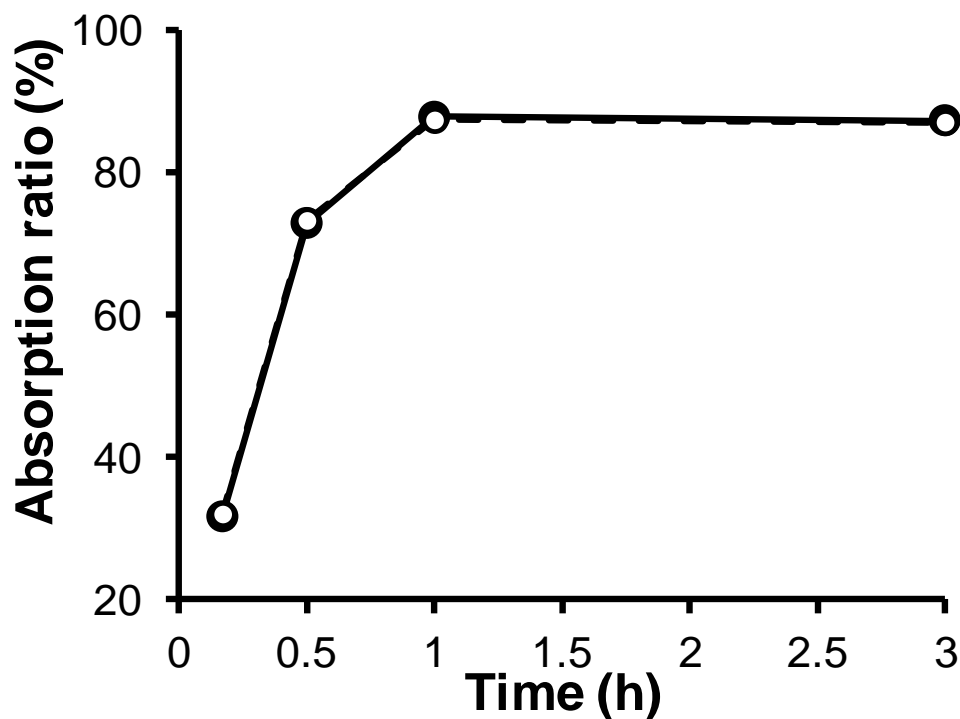


Figure 17 Time course of absorbed percentage from intestinal lumen for (-)-*R*-clenbuterol (closed circles) and (+)-*S*-clenbuterol (open circles) after administration into the closed intestinal loop of 100 $\mu\text{g}/\text{head}$ (*rac*)-clenbuterol to rats. ($n = 3$, Mean \pm S.D.). * $p < 0.05$, (-)-*R*-clenbuterol vs. (+)-*S*-clenbuterol.

尿中未変化体排泄率

Clenbuterol 光学異性体の尿中排泄に関して検討するために、尿中未変化体排泄量を測定した。(rac)-Clenbuterol 2 mg/kg を静脈内投与したところ、投与後 24 時間までにはほぼ尿中未変化体排泄はほぼプラトーに達していた (Figure 18)。24 時間における排泄率は、(-)-*R*-clenbuterol が $19.7 \pm 1.2\%$ 、(+)-*S*-clenbuterol が $22.3 \pm 1.5\%$ であり、(+)-*S*-clenbuterol の方が有意に高かった。腎クリアランスを算出した結果、(-)-*R*-clenbuterol は 4.9 ± 0.7 mL/min/kg、(+)-*S*-clenbuterol は 4.5 ± 0.9 mL/min/kg であり、有意な差は見られなかった。

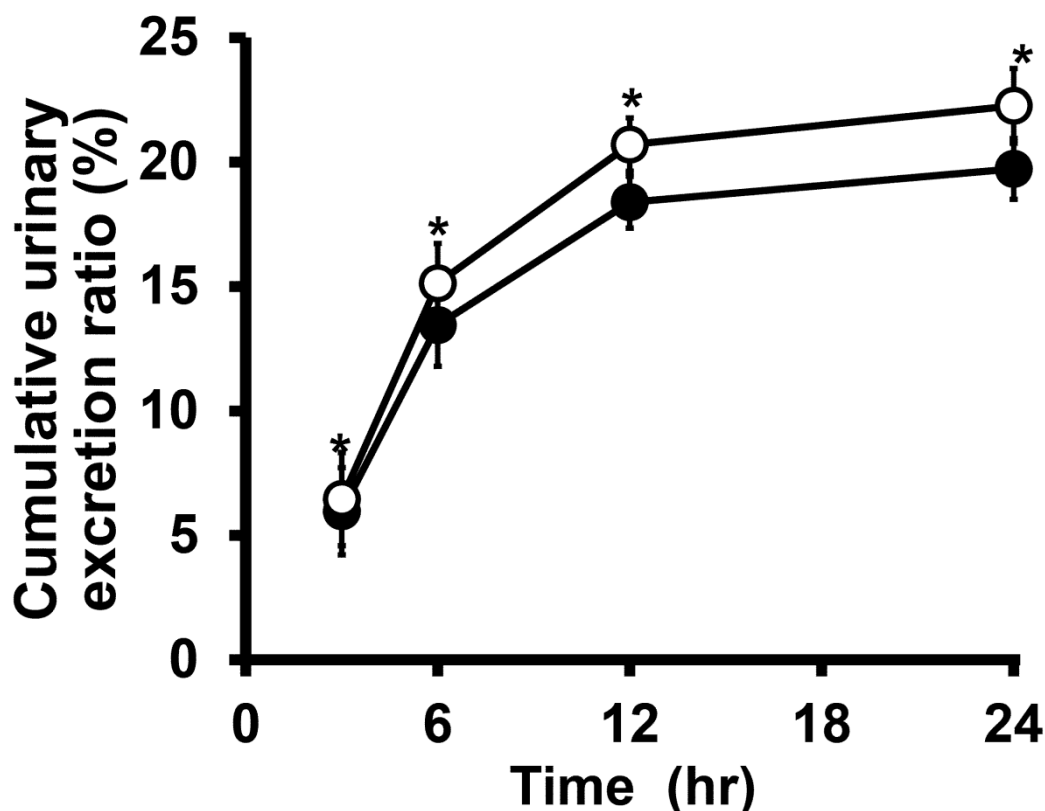


Figure 18 Cumulative urinary excretion of (-)-*R*-clenbuterol (closed circles) and (+)-*S*-clenbuterol (open circles) shown as % of dose after i.v. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats. ($n = 5$, Mean \pm S.D.). * $p < 0.05$, (-)-*R*-clenbuterol vs. (+)-*S*-clenbuterol.

胆汁中未変化体排泄率

胆汁排泄に関して検討するために、胆汁中未変化体排泄量を測定した。*(rac)*-Clenbuterol 2 mg/kg を静脈内投与したところ、24 時間における排泄率は、(-)-*R*-clenbuterol で $7.7 \pm 1.8\%$ 、(+)-*S*-clenbuterol で $3.3 \pm 0.4\%$ であった (Figure 19)。投与量に対する胆汁中未変化体排泄率は 5%前後と、全体に占める割合が小さいが、(-)-*R*-clenbuterol の排泄率の方が大きかった。胆汁クリアランスを算出した結果、(-)-*R*-clenbuterol は 1.62 ± 0.88 mL/min/kg であり、(+)-*S*-clenbuterol は 0.45 ± 0.23 mL/min/kg であり、(-)-*R*-clenbuterol の方が排泄速度が有意に高かった。

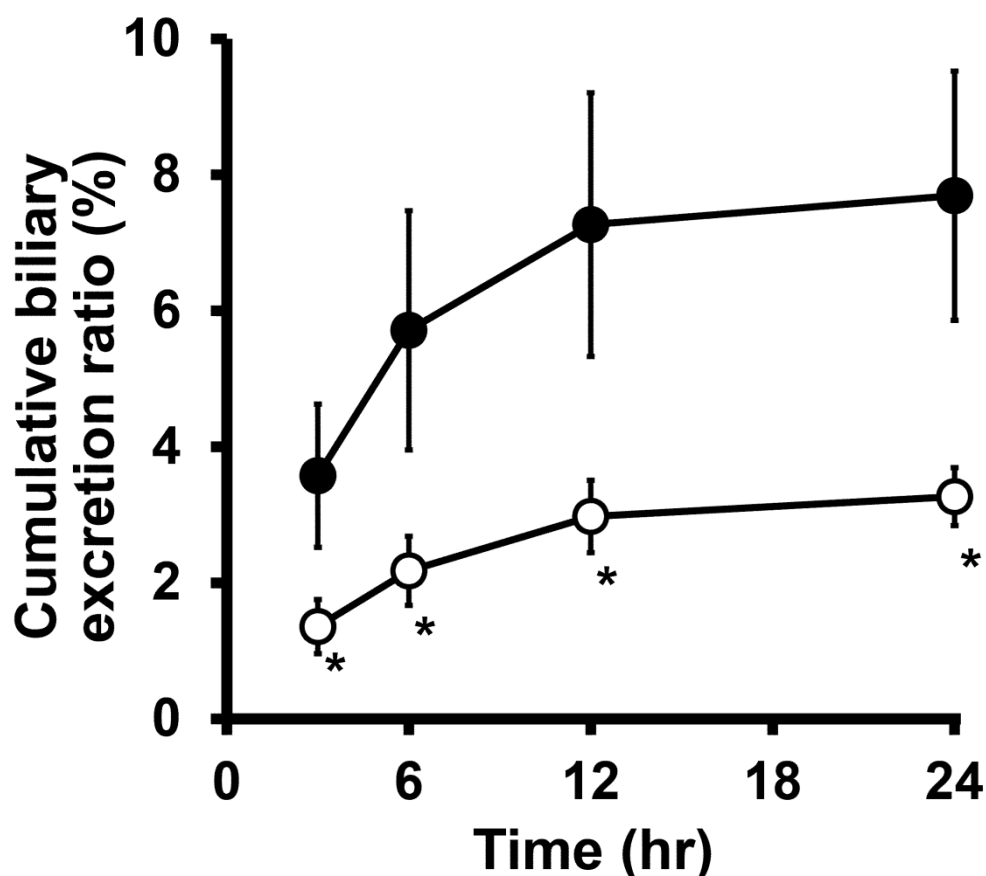


Figure 19 Cumulative biliary excretion ratio of (-)-*R*-clenbuterol (closed circles) and (+)-*S*-clenbuterol (open circles) after i.v. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats. ($n = 5$, Mean \pm S.D.). * $p < 0.05$, (-)-*R*-clenbuterol vs. (+)-*S*-clenbuterol.

血漿中タンパク非結合形分率

静脈内投与後の動態学的パラメータのうち、分布容積 ($V_{d_{ss}}$) にエナンチオマー間の差がみられたため、分布に影響を及ぼす血漿タンパク非結合形分率について検討した。*(rac)*-Clenbuterol をラット血漿中に添加し、限外濾過法により求めた結果、clenbuterol 各異性体の血漿タンパク非結合形分率は、10~100 ng/mL の範囲内においてほぼ一定の値を示し、濃度依存性は見られなかった。*(-)*-*R*-clenbuterol の血漿中タンパク非結合形分率は 10、50 および 100 ng/mL の時、それぞれ 52.6、46.4 および 47.6%であった。*(+)*-*S*-clenbuterol の血漿中タンパク非結合形分率は、それぞれ 34.0、31.4 および 33.9%であった。*(-)*-*R* および *(+)*-*S*-clenbuterol の血漿中タンパク非結合形分率の平均は 48.8 ± 3.1 および 33.1 ± 1.5 (%) であり、異性体間で有意な差が認められた (Table 5)。

Table 5 Plasma protein unbound fraction (%) of *(-)*-*R*-clenbuterol and *(+)*-*S*-clenbuterol.

Concentration	<i>(-)</i> - <i>R</i> -clenbuterol	<i>(+)</i> - <i>S</i> -clenbuterol
10 ng/mL	52.6 ± 0.5	34.0 ± 1.5 *
50 ng/mL	46.4 ± 2.5	31.4 ± 0.8 *
100 ng/mL	47.6 ± 0.5	33.9 ± 0.3 *
mean	48.8 ± 3.1	33.1 ± 1.5 *

Appropriate amounts of *(rac)*-clenbuterol were added to rat drug-free plasma to give final concentrations of 20, 100 and 200 ng/mL (10, 50 and 100 ng/mL, respectively, as enantiomer concentration). Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

* Significantly different between *(-)*-*R*-clenbuterol and *(+)*-*S*-clenbuterol at $p < 0.05$; Student's *t* test.

組織分布

次に組織移行性について検討した。Clenbuterol 静脈内投与後 72 時間までの血漿中濃度推移の結果より、最終消失相に達している時間は 24 時間以降であり、血液と組織で十分な平衡状態にあると考えられる投与後 36 時間の組織中濃度（肝臓、肺、腎臓、眼球、膀胱、気管支、大腿骨、心臓および大腿筋）を測定した(Table 6)。組織中濃度は肝臓が最も高く、(-)-*R*-および(+)-*S*-clenbuterol の濃度は 17.7 ± 5.2 ng/g tissue および 22.9 ± 4.8 ng/g tissue であり、(+)-*S*-clenbuterol のほうが 1.3 倍高く、また腎臓も(+)-*S*-clenbuterol のほうが有意に高い濃度であった。治療効果を示す組織である肺では(-)-*R*- および(+)-*S*-clenbuterol がそれぞれ 10.2 ± 8.1 ng/mL および 9.84 ± 7.48 ng/mL、膀胱ではそれぞれ 5.51 ± 0.52 ng/mL および 5.93 ± 1.90 ng/mL であり、有意な差は見られなかった。また、副次的作用を示す大腿骨ではそれぞれ 4.29 ± 1.13 ng/mL および 3.70 ± 0.71 ng/mL であり、(-)-*R*-clenbuterol が高い傾向は示すものの有意な差は見られなかった。心臓ではそれぞれ 2.74 ± 0.47 ng/mL および 1.97 ± 0.18 ng/mL であり、(-)-*R*-clenbuterol のほうが有意に高い濃度を示した。血漿中濃度は、(-)-*R*- および(+)-*S*-clenbuterol がそれぞれ 3.92 ± 2.22 ng/mL および 0.95 ± 0.28 ng/mL であり、この血漿中濃度と血漿中タンパク非結合形分率の結果を用いて K_p および $K_{p,f}$ を算出した。その結果、 K_p および $K_{p,f}$ は、いずれの組織においても(+)-*S*-clenbuterol のほうが有意に大きかった(Table 7)。

静脈内投与後の 3、および 24 時間における組織内濃度（肝臓、腎臓、および肺）を測定し、36 時間の結果と共に比較した (Table 8)。投与後 3 時間における血漿中濃度は(-)-*R*- および(+)-*S*-clenbuterol がそれぞれ 32.9 ± 1.1 ng/mL および 24.2 ± 1.2 ng/mL であり、(+)-*S*-clenbuterol が高い値を示し、その一方、組織中濃度および K_p 値はいずれの組織においても(-)-*R*-clenbuterol が高かった。投与後 24 時間においては、血漿中濃度は(-)-*R*- および(+)-*S*-clenbuterol がそれぞれ 12.2 ± 5.2 ng/mL および 5.2 ± 1.3 ng/mL であり、(-)-*R*-clenbuterol が高く、組織中濃度および K_p 値はいずれの組織においても(+)-*S*-clenbuterol が高かった。

Table 6 Tissue concentration of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at 36 hours after intravenous administration of (*rac*)-clenbuterol.

Tissue	Concentration (ng/g tissue)					
	(-)- <i>R</i> -clenbuterol			(+)- <i>S</i> -clenbuterol		
Liver	17.7	±	5.2	22.9	±	4.8 *
Lung	10.2	±	8.1	9.84	±	7.48
Kidney	6.90	±	2.19	10.8	±	1.9 *
Eye	6.31	±	2.34	6.56	±	2.13
Urinary bladder	5.51	±	0.52	5.93	±	1.90
Tracheal tube	5.14	±	1.54	5.56	±	2.00
Bone	4.29	±	1.13	3.70	±	0.71
Heart	2.74	±	0.47	1.97	±	0.18 *
Muscle	1.85	±	0.31	1.71	±	0.28 *
Plasma (ng/mL)	3.92	±	2.22	0.95	±	0.28 *

(*rac*)-Clenbuterol (2 mg/kg) was administered intravenously to rats. At 36 hours after administration, rats were decapitated and the plasma and tissues were isolated and weighed. Each value represents the mean ± S.D. (n = 5).

* Significantly different between (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at $p < 0.05$; Student's *t* test.

Table 7 Tissue-to-plasma concentration ratio (K_p) of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at 36 hours after intravenous administration of (*rac*)-clenbuterol.

Tissue	K_p		$K_{p,f}$	
	(-)- <i>R</i> -clenbuterol	(+)- <i>S</i> -clenbuterol	(-)- <i>R</i> -clenbuterol	(+)- <i>S</i> -clenbuterol
Liver	5.28 ± 2.19	24.9 ± 5.8 *	10.0 ± 4.2	73.1 ± 17.1 *
Lung	2.63 ± 1.04	9.75 ± 4.69 *	5.01 ± 1.97	28.7 ± 13.8 *
Kidney	1.99 ± 0.65	11.8 ± 3.0 *	3.79 ± 1.24	34.8 ± 8.9 *
Eye	1.74 ± 0.36	6.96 ± 1.46 *	3.31 ± 0.68	20.5 ± 4.3 *
Urinary bladder	1.72 ± 0.76	6.82 ± 3.31 *	3.26 ± 1.45	20.1 ± 9.7 *
Tracheal tube	1.53 ± 0.61	6.30 ± 3.18 *	2.91 ± 1.16	18.5 ± 9.4 *
Bone	1.24 ± 0.36	4.07 ± 1.20 *	2.36 ± 0.68	12.0 ± 3.5 *
Heart	0.83 ± 0.31	2.17 ± 0.42 *	1.58 ± 0.59	6.39 ± 1.24 *
Muscle	0.58 ± 0.28	1.91 ± 0.60 *	1.10 ± 0.54	5.61 ± 1.75 *

(*rac*)-Clenbuterol (2 mg/kg) was administered intravenously to rats. At 36 hours after administration, rats were decapitated and the plasma and tissues were isolated and weighed. The tissue and plasma contents and plasma unbound fractions of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol were determined as described in Materials and Methods. Each value represents the mean ± S.D. (n = 5).

* Significantly different between (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at $p < 0.05$; Student's *t* test.

Table 8 Tissue concentration and tissue-to-plasma concentration ratio (K_p) of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at 3, 24, and 36 hours after intravenous administration of (*rac*)-clenbuterol.

		3 hr		24 hr		36 hr	
Concentration (ng/g)							
Plasma	(-)- <i>R</i> -CLN	32.9	± 1.1	12.2	± 0.1	3.9	± 2.2
	(+)- <i>S</i> -CLN	24.2	± 1.2*	5.2	± 1.3*	0.9	± 0.3*
Liver	(-)- <i>R</i> -CLN	3163	± 965	163	± 113	17.7	± 5.2
	(+)- <i>S</i> -CLN	2903	± 691	208	± 132*	22.9	± 4.8*
Kidney	(-)- <i>R</i> -CLN	2564	± 276	99.2	± 74.3	6.9	± 2.2
	(+)- <i>S</i> -CLN	2639	± 384	161	± 117*	10.8	± 1.9*
Lung	(-)- <i>R</i> -CLN	3582	± 446	164	± 152	10.2	± 8.1
	(+)- <i>S</i> -CLN	3529	± 566	190	± 187	9.8	± 7.5
K_p							
Liver	(-)- <i>R</i> -CLN	50.4	± 16.5	8.0	± 4.1	5.3	± 2.2
	(+)- <i>S</i> -CLN	40.4	± 11.3*	15.6	± 6.1*	24.9	± 5.8*
Kidney	(-)- <i>R</i> -CLN	40.7	± 5.1	4.8	± 2.7	2.0	± 0.7
	(+)- <i>S</i> -CLN	36.5	± 5.2*	11.7	± 6.1*	11.8	± 3.0*
Lung	(-)- <i>R</i> -CLN	56.7	± 5.8	7.8	± 6.1	2.6	± 1.0
	(+)- <i>S</i> -CLN	48.6	± 6.3*	13.0	± 9.2*	9.8	± 4.7*

(*rac*)-Clenbuterol (2 mg/kg) was administered intravenously to rats. At 3, 24, and 36 hours after administration, rats were decapitated and the plasma and tissues were isolated and weighed.

The tissue and plasma contents and plasma unbound fractions of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol were determined as described in Materials and Methods. Each value represents the mean ± S.D. (n = 4-5).

4. 考察

本章において、ラットにおける clenbuterol の薬物動態学的光学特異性の有無を調べた。その結果、 Vd_{ss} 、 CL_{tot} および MRT に光学異性体間で異なることがわかった (Table 3)。また、光学異性体の中でタンパク結合の違いもあきらかになった (Table 5)。

薬物動態学的パラメータを求めたところ、MRT は(-)-*R*-clenbuterol が大きくなり (Table 3)、医療用医薬品としての薬効を持つ(-)-*R*-clenbuterol のほうが体内滞留性の良いことが示された。また、両エナンチオマーの $AUC_{0-\infty}$ は静脈内投与後と十二指腸内投与後とでほとんど差が認められなかった (Table 3, 4)。つまり、両エナンチオマーの MAT に差がないことが示され、また *in situ* 吸収実験の結果から吸収は極めて速やかであったため (Figure 17)、光学特異性がないことが示された。

Clenbuterol の CL_{tot} は、(-)-*R*-clenbuterol のほうが 1.2 倍大きい結果が得られた (Table 3)。血漿タンパク非結合形分率が(-)-*R*-clenbuterol のほうが 1.5 倍大きいことから (Table 5)、タンパク結合率の差が排泄過程における光学選択性を説明すると考えられる。また、分布容積 (Vd_{ss}) は(-)-*R*-clenbuterol のほうが 2.2 倍大きい結果が得られた (Table 3)。この結果もまたタンパク結合率の差によるものと考えられる。組織への移行や膜透過過程は血漿タンパク結合率に影響を受けるため、その結果 CL_{tot} の光学特異性に影響を及ぼしている可能性がある。しかし、タンパク結合率の差(1.5 倍)だけで Vd_{ss} の差(2.2 倍)を説明するには十分でないと考えられる。ところで、得られた clenbuterol の胆汁排泄や、十二指腸内投与後の急速で完全な吸収がみられたことから (Table 4)、腸肝循環の存在が考えられた [30]。実際に、Manchee らは β アゴニストである salmeterol に腸肝循環があることを示しているため [52]、clenbuterol にも腸肝循環することが考えられる。腸肝循環は再度吸収されることによりみかけ上投与量が増加し、 Vd_{ss} に影響を与える。したがって、(-)-*R*-clenbuterol のほうが胆汁中排泄が大きく (Figure 19)、clenbuterol エナンチオマーの腸肝循環に差が生じ、 Vd_{ss} に影響を及ぼしていると考えられた。MRT もまた、腸肝循環に影響される。MRT が

(-)-*R*-clenbuterol のほうが大きくなった原因の一つとして、腸肝循環が考えられた。

静脈内投与後の血漿中濃度推移より算出された薬物動態学的パラメータの結果より、(-)-*R*-clenbuterol の CL_{tot} のほうが有意に大きいことが明らかにされた。さらに尿中および胆汁中排泄実験により求められた CL_r および CL_{bile} は、 CL_r にはの方が大きい傾向を示すもののその比 ((-)-*R*-clenbuterol / (+)-*S*-clenbuterol) は 1.09 倍とたいへん小さかった。一方 CL_{bile} は(-)-*R*-clenbuterol が約 4 倍高い値が得られた。また、これらの値を用いて代謝クリアランス ($CL_{met} = CL_{tot} - (CL_r + CL_{bile})$) を推定値として求めると、(-)-*R*-clenbuterol は 7.0 mL/min/kg、(+)-*S*-clenbuterol は 6.6 mL/min/kg と算出され、その比は 1.06 と小さい (Table 9)。これらの結果から、 CL_{tot} にみられた光学特異性は CL_{bile} の違いによるものと考えられた。この CL_{bile} の光学特異性は、血漿タンパク結合形分率の違いが肝臓への clenbuterol の取り込みに影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、 CL_{tot} に対する CL_{bile} の占める割合は、(-)-*R*-clenbuterol が 12%、(+)-*S*-clenbuterol が 4%と大変小さく、また、 CL_{tot} に光学特異性は見られるもののその比は 1.17 と小さいことから、全体の体内動態における差は小さいものと考えられる。

Table 9 Clearances of (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol.

Clearance (mL/min/kg)	(-)- <i>R</i> -clenbuterol	(+)- <i>S</i> -clenbuterol	R / S
CL_{tot}	13.5 ± 1.8	11.5 ± 2.7 *	1.17
CL_r	4.9 ± 0.7	4.5 ± 0.9	1.09
CL_{bile}	1.6 ± 0.9	0.4 ± 0.2*	4.00
CL_{met}	7.0	6.6	1.06

Total body clearance (CL_{tot}), renal clearance (CL_r) and biliary clearance (CL_{bile}) of clenbuterol enantiomers were determined after i.v. administration of (*rac*)-clenbuterol (2 mg/kg) to rats.

* Significant difference between (-)-*R*-clenbuterol and (+)-*S*-clenbuterol at $p < 0.05$; Student's *t* test.

ラットの尿中排泄に関して、一般的に糸球体濾過率は 5.24 mL/min/kg であることが報告されている [53]。それぞれ、血漿タンパク非結合形分率 (Table 5) から糸球体ろ過速度を見積もると、(-)-*R*- および(+)-*S*-clenbuterol は 2.6 mL/min/kg および 1.7 mL/min/kg であった。クリアランス比 ($= CL_r / (GFR \times fp)$) は、それぞれ 1.9 と 2.6 と算出され、尿中排泄プロセスの間に再吸収が関与していることが示唆された。エナンチオマー間での CL_r に有意な差がみられなかったことから、尿細管からの分泌および再吸収に光学特異性がある可能性が考えられる。

静脈内投与後の血漿中濃度推移から、最終消失相は 24 時間以降と考えられ、組織への分布が完了し血液と組織で十分な平衡状態にあるとみられる、投与後 36 時間の K_p 値および $K_{p,f}$ 値を算出することにした。排泄臓器である肝臓と腎臓の組織内濃度および $K_{p,f}$ 値は、(+)-*S*-clenbuterol が有意に大きく、 $K_{p,f}$ 値の肝臓と腎臓はそれぞれ 7.3 倍と 9.2 倍大きかった (Table 6)。von Deutsch *et al.* [15] と Smith [54] の報告では、clenbuterol の繰り返し投与後の肝臓、腎臓、肺、および眼球の組織中濃度は(+)-*S*-clenbuterol のほうが大きいことを報告しており、この結果は一致している。この結果から、(+)-*S*-clenbuterol のほうが組織移行性の大きいことが示された。

投与後 36 時間の組織移行性の検討において K_p 値に差がみられたが、血漿中濃度が(-)-*R*-clenbuterol のほうが約 4 倍高い値を示し、血漿中濃度差が大きいことが K_p 値の差に影響を及ぼしている可能性が考えられたため、clenbuterol 投与後 3 時間、24 時間のエナンチオマー組織内濃度を測定した。投与後早期 (投与後 3 時間) の時点では(-)-*R*-clenbuterol のほうが K_p 値が大きかった。この結果は、(-)-*R*-clenbuterol の分布容積のほうが大きいことに対応する。経時的に算出された K_p 値の差は、異性体間で組織への結合の強さが異なる可能性が推測され、(+)-*S*-clenbuterol のほうが組織にいったん結合した後は遊離しにくく、組織からの排泄速度が遅いことが考えられる。これは(+)-*S*-clenbuterol のほうが長時間組織中に存在することを示し、副作用発現につながる可能性が考えられる。

本研究においては、単回投与における体内動態を検討してきた。しかし、結合性の強さの

違いが推測され、繰り返し投与後に定常状態に達したときの動態を考慮することが重要だと考えられた。そこで、これまでに得られた結果から以下を算出した。1日1回、本研究と同投与量(2 mg/mL)を投与したと仮定し、 CL_{tot} を用いて定常状態の平均血中濃度を算出すると、(-)-*R*-clenbuterol が 51 ng/mL、(+)-*S*-clenbuterol が 60 ng/mL となる。血漿タンパク非結合形分率から、定常状態における非結合形濃度は 26.5 ng/mL および 20.4 ng/mL と算出され、(-)-*R*-clenbuterol のほうが高い結果となる。さらに組織への移行を考えると、最も治療効果として重要と考えられる肺では、 K_p 値より定常状態の組織濃度が 134 ng/g および 585 ng/g と算出され、(+)-*S*-clenbuterol のほうが約 4.3 倍高い。副作用が現れると考えられる骨に関しても、定常状態の組織濃度が 63.2 ng/g および 244 ng/g と算出される。最も濃度の高かった肝臓は、269 ng/g および 1,491 ng/g と算出され、(+)-*S*-clenbuterol のほうが約 5.5 倍高い。組織中濃度はいずれの組織においても(+)-*S*-clenbuterol のほうが4倍以上と高く、長期にわたって薬効を及ぼす可能性があり、副作用につながると考えられる。ところで、von Deutsch らは、ラットへ clenbuterol 各異性体を 0.2 mg/kg を隔日で2週間連続投与したとき、肝臓中のトラフ濃度は(-)-*R*-clenbuterol が 1.93 ng/g、(+)-*S*-clenbuterol が 46.55 ng/g であり、(+)-*S*-clenbuterol のほうが約 24 倍高いことを示している [15]。今回算出された結果と同様の(+)-*S*-clenbuterol の組織濃度が高い結果を示しているが、von Deutsch らの報告のほうが光学異性体間の差が大きいため、連続投与後の定常状態における組織移行性の検討が必要であると考えられる。本研究では算出による推測のみであるため、実際に連続投与の検討することが必要である。光学特異性に関して考慮する場合、血漿中濃度だけでなく、組織中濃度や組織からの排泄速度も考慮する必要があると考えられた。

気管支拡張や子宮筋弛緩を引き起こす β_2 刺激作用は (-)-*R*-clenbuterol の作用によるものと言われている。一方、(+)-*S*-clenbuterol は血圧上昇、血糖値上昇、グルココルチコイド値の上昇といった副次的な作用を引き起こすことが報告されている。一方で、clenbuterol は、家畜の筋肉増強を目的に用いられるだけでなく、運動選手やボディビルダーなどがドーピング薬として使われている。また、(-)-*R*-clenbuterol には筋肉増強作用があるが、

(+)-*S*-clenbuterol は骨密度低下作用が示唆されている（未発表データ）。本研究結果から、clenbuterol 光学異性体の体内動態の特異性として、(+)-*S*-clenbuterol のほうがクリアランスが小さく、半減期が長い。また、組織分布が大きく、組織内濃度が高いことから、(+)-*S*-clenbuterol の作用(副作用)が無視できないと考えられる。したがって、薬理活性体である(-)-*R*-clenbuterol のみを医薬品とするべきであることが示唆された。

第5章 結論

本研究において、clenbuterol 光学異性体の動態の差を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。

まず、Clenbuterol 光学異性体の LC-MS/MS を用いた高感度な測定法を確立し、測定限界 0.25 ng/mL を得た。バリデーション試験を行い、安定に測定が行えることを確認した。ラットにおける投与後の血漿中濃度推移より、本測定法により小動物における体内動態の解析が十分行える測定法であることが示された (第1章)。

次に、光学異性体間の相互変換の有無を調べるため、*in vitro* および *in vivo* において検討した。*In vitro* において PBS (pH 7.4) および rat plasma 中で 72 時間相互変換が見られず、体内動態解析の時間内では安定であることが示された。また、強酸性条件下において相互変換することが示された。*In vivo* の実験で、エナンチオマー単独経口投与後のラット血漿中濃度の結果から相互変換は見られず、尿中においても確認されなかった。このため、本実験条件下および測定条件下において、相互変換はなく、安定であることが示された (第2章)。

次に、ラットにおける(*rac*)-clenbuterol の静脈内および十二指腸内投与後の、(-)-*R* および (+)-*S*-clenbuterol の体内動態について調べた。(-)-*R*-clenbuterol および (+)-*S*-clenbuterol 間の体内動態は、分布と排泄が異なることが示唆され、これらの違いは主に光学異性体間でのタンパク結合 (すなわち、非結合形分率) の違いによると考えられた。(+)-*S*-clenbuterol のほうが(-)-*R*-clenbuterol と比較し、組織内への移行性および最高血中濃度が高いことが示され、全身クリアランスが小さいことから、定常状態における血漿中濃度が高いことが推測された。このため、(+)-*S*-clenbuterol の副次的な作用 (骨塩低下など) が現れる危険性が推測された。

上記の結果は、治療剤としての光学異性的に純粋な(-)-*R*-clenbuterol の開発が望ましいことを示唆する。さらに、clenbuterol の光学異性の転換が *in vitro* および *in vivo* で起こらないことが示されたことから、治療剤として光学異性的に純粋な(-)-*R*-clenbuterol を開発する

ことが可能である。ラセミ体としての clenbuterol 製剤と比較し、(-)-*R*-clenbuterol の単独製剤は、より安全性の高い製剤として有用であると考えられる。

参考論文

本研究の内容は、以下の論文に公表した。

Iori Hirosawa, Mai Ishikawa, Mio Ogino, Hiroshi Ito, Takuya Hirao, Harumi Yamada,
Mariko Asahi, Hajime Kotaki, Yoshimichi Sai, Ken-ichi Miyamoto

Enantioselective disposition of clenbuterol in rats

Biopharmaceutics and Drug Disposition, published online: 26 DEC 2013

謝 辞

本研究に際し、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学附属病院薬剤部 宮本謙一教授に深く感謝いたしますと共に、謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始有益な御指導と御助言を賜りました金沢大学附属病院薬剤部 崔 吉道准教授に厚く感謝の意を表します。

本研究に関して種々の有益な御指導と御助言を賜りました金沢大学自然科学研究科 石崎純子准教授に感謝の意を表します。

また、本研究の場を与えて頂き、御理解と御指導を賜りました、国際医療福祉大学薬学部 小瀧 一教授、山田治美教授、旭満里子教授に感謝いたします。

本研究の遂行に関してご助言、ご協力戴きました、国際医療福祉大学薬学部の諸先生方に感謝いたします。

また、本研究の実験に多大なるご協力頂きました、石川真衣修士、荻野未央修士、高山春香学士、吉田有貴子学士、渡辺恵里学士、伊藤祐史学士、平尾卓也学士をはじめ、国際医療福祉大学薬学部臨床薬物動態学研究室の諸氏に感謝いたします。

本研究に際し、博士課程に進学することを快く認めていただきました国際医療福祉大学薬学部 武田弘志 学部長に深謝いたします。

引用文献

1. Smith SW. Chiral toxicology: it's the same thing...only different. *Toxicol. Sci.*, **110**: 4-30 (2009).
2. Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, Imamura M, Sakano K, Furukawa M. Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**: 163-164 (1986)
3. Fujimoto T, Mitsuhashi S. In vitro antibacterial activity of DR-3355, the S-(-)-isomer of ofloxacin. *Chemotherapy*, **36**: 268-276 (1990)
4. Okazaki O, Kurata T, Tachizawa H. Stereoselective metabolic disposition of enantiomers of ofloxacin in rats. *Xenobiotica*, **19**: 419-429 (1989)
5. Okazaki O, Hakusui C, Nakashima H, Kojima M. Enantioselective disposition of ofloxacin in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**: 2106-2109 (1991)
6. Rabbaa L, Dautrey S, Colas-Linhart N, Carbon C, Farinotti R. Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**: 2274-2277 (1997)
7. Gillard M, Van Der Perren C, Moguilevsky N, Massingham R, Chatelain P. Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H1 histamine receptors: contribution of Lys191 and Thr194. *Mol. Pharmacol.*, **61**: 391-399 (2002)
8. Najib J. Eszopiclone, a nonbenzodiazepine sedative-hypnotic agent for the treatment of transient and chronic insomnia. *Clin. Ther.*, **28**: 491-516 (2006)
9. Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. Thalidomide. *Lancet*, **363**: 1802- 1811 (2004)
10. Eriksson T, Björkman S, Roth B, Höglund P. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**: 807-817 (2000)
11. Brittain RT, Farmer JB, Marshall RJ. Some observations on the b-adrenoceptor agonist properties of the isomers of salbutamol. *Br. J. Pharmacol.*, **48**: 144-147 (1973)
12. Boulton DW, Fawcett JP. The Pharmacokinetics of Levosalbutamol What are the Clinical Implications? *Clin. Pharmacokinet.*, **40**:23-40 (2001)

13. Salorinne Y, Stenius B, Tukiainen P, Poppius H. Double-blind cross-over comparison of clenbuterol and salbutamol tablets in asthmatic out-patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **8**: 189-195 (1975)
14. Waldeck B, Widmark E. Steric aspects of agonism and antagonism at beta-adrenoceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. Waldeck BE, Widmark. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **56**: 221-227 (1985)
15. von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Wineski LE, Aboul-Enein HY, Pitts SA, Parks BA, Oster RA, Paulsen DF, Potter DE. Beta-agonist-induced alterations in organ weights and protein content: comparison of racemic clenbuterol and its enantiomers. *Chirality*, **12**: 637-648 (2000)
16. Culmsee C, Junker V, Thal S, Kremers W, Maier S, Schneider HJ, Plesnila N, Kriegelstein J. Enantio-selective effects of clenbuterol in cultured neurons and astrocytes, and in a mouse model of cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.*, **575**: 57-65 (2007)
17. Bramuglia GF, Rubio MC. Effects of optical isomers of clenbuterol on the relaxant response in rat uterus. *Pharmacological Res.*, **43**: 151-154 (2001)
18. Cavalié H, Lac G, Lebecque P, Chanteranne B, Davicco MJ, Barlet JP. Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. *J. Appl. Physiol.*, **93**: 2034-2037 (2002)
19. Dave M, Sauer MJ, Fallon RJ. Clenbuterol plasma pharmacokinetics in cattle. *Analyst* **123**: 2697-2699 (1998)
20. Soma LR, Uboh CE, Guan F, Moate P, Luo Y, Teleis D, Li R, Birks EK, Rudy JA, Tsang DS. Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **27**: 71-77 (2004)
21. Yamamoto I, Iwata K, Nakashima M. Pharmacokinetics of plasma and urine clenbuterol in man, rat, and rabbit. *J. Pharmacobiodyn.*, **8**: 385-391 (1985)
22. Zalko D, Debrauwer L, Bories G, Tulliez J. Metabolism of clenbuterol in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **26**: 891-899 (1998)
23. Kopitar Z, Zimmer A. Pharmacokinetics and metabolite pattern of clenbuterol in the rat. *Arzneimittelforschung*, **26**: 1450-1455 (1976)

24. Zimmer A. Single and multiple applications and metabolite pattern of clenbuterol in man. *Arzneimittelforschung.*, **26**: 1446-1450 (1976)
25. Cristino A, Ramos F, da Silveira MI. Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**: 311-316 (2003)
26. Elliott CT, Shortt HD, Kennedy DG, McCaughey WJ. Monitoring for clenbuterol abuse in N. Ireland 1989-1994. *Vet. Q.*, **18**: 41-44 (1996)
27. Meyer HH, Rinke LM. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.*, **69**: 4538-4544 (1991)
28. Pleadin J, Vulić A, Mitak M, Perši N, Milić D. Determination of clenbuterol residues in retinal tissue of food-producing pigs. *J. Anal. Toxicol.*, **35**: 28-31 (2011)
29. Sauer MJ, Dave M, Lake BG, Manchee GR, Howells LC, Coldham NG. Beta2-agonist abuse in food producing animals: use of in vitro liver preparations to assess biotransformation and potential target residues for surveillance. *Xenobiotica*, **29**: 483-497 (1999)
30. Japan Safety Commission of Food. 2009.6. <http://www.fsc.go.jp/sonota/clenbuterol.pdf>.
31. DJ.Smith. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.*, **76**: 173-194 (1998)
32. Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macrì A, Rondoni F, Strozzi M, Loizzo A. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicol. Lett.*, **114**: 47-53 (2000)
33. Abukhalaf IK, von Deutsch DA, Parks BA, Wineski L, Paulsen D, Aboul-Enein HY, Potter DE. Comparative analytical quantitation of clenbuterol in biological matrices using GC-MS and EIA. *Biomed. Chromatogr.*, **14**: 99-105 (2000)
34. Chen XB, Wu YL, Yang T. Simultaneous determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk by isotope dilution ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **879**: 799-803 (2011)
35. Damasceno L, Ventura R, Cardoso J, Segura J. Diagnostic evidence for the presence of b-agonists using two consecutive derivatization procedures and gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. B*, **780**: 61-71 (2002)

36. Zhou J, Xu X, Wang Y. Competitive immunoassay for clenbuterol using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **848**: 226-231 (2007)
37. Aboul-Enein HY, Serignese V. Quantitative determination of clenbuterol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography using the macrocyclic antibiotic chiral stationary phase teicoplanin. *Biomed. Chromatogr.*, **13**: 520-524 (1999)
38. Aboul-Enein HY, Efstatiade MD, Baiulescu GE. Cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis: a comparative study for the enantiomeric separation of some beta-agonists. *Electrophoresis*, **20**: 2686-2690 (1999)
39. Toussaint B, Palmer M, Chiap P, Hubert P, Crommen J. On-line coupling of partial filling-capillary zone electrophoresis with mass spectrometry for the separation of clenbuterol enantiomers. *Electrophoresis*, **22**: 1363-1372 (2001)
40. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Drug Veterinary Medicine (CVM), May 2001, BP
41. Rippley RK, Yan KX, Matthews ND, Greenberg HE, Herman GA, Wagner JA. Human pharmacokinetics and interconversion of enantiomers of MK-0767, a dual PPARalpha/gamma agonist. *J. Clin. Pharmacol.*, **47**: 323-333 (2007)
42. Yamaguti T, Suzuki R, Ikeda C, Sekine Y. Pharmacokinetics of stereoisomers of nadlol, a new beta-adrenergic blocking agent, in rats. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **11**: 5145-5149 (1983)
43. Okamura M, . Stereoselective pharmacokinetics of esmolol enantiomers. *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, **16**: 427-435 (2001)
44. Kaiser DG, Vangiessen GJ, Reischer RJ, Wechter WJ. Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomer in humans. *J. Pharm. Sci.*, **65**: 269-273 (1976)
45. Stoltenborg JK, Puglisi CV, Rubio F, Vane FM. High-performance liquid chromatographic determination of stereoselective disposition of carprofen in humans. *J. Pharm. Sci.*, **70**: 1207-1212 (1981)

46. Hassan-Alin M, Andersson T, Niazi M, Röhss K. A pharmacokinetic study comparing single and repeated oral doses of 20 mg and 40 mg omeprazole and its two optical isomers, S-omeprazole (esomeprazole) and R-omeprazole, in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **60**: 779-784 (2005)
47. Adachi K, Katsube T, Kawamura A, Takashima T, Yuki M, Amano K, Ishihara S, Fukuda R, Watanabe M, Kinoshita Y. CYP2C19 genotype status and intragastric pH during dosing with lansoprazole or rabeprazole. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **14**: 1259-1266 (2000)
48. Narawa T, Itoh T. Stereoselective transport of amethopterin enantiomers by the proton-coupled folate transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**: 283-289 (2010)
49. Jin YX, Tang YH, Zeng S. Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RP-HPLC and application to drug-protein binding in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 953-958 (2008)
50. Shen Q, Wang L, Zhou H, Jiang HD, Yu LS, Zeng S. Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. *Acta Pharmacol. Sin.*, **34**: 998-1006 (2013)
51. Tabata K, Yamaoka K, Kaibara A, Suzuki S, Terakawa M, Hata T. Moment analysis program available on Microsoft Excel. *Xenobio. Metabol. Dispos.*, **14**: 286-293 (1999)
52. Manchee GR, Barrow A, Kulkarni S, Palmer E, Oxford J, Colthup PV, Maconochie JG, Tarbit MH. Disposition of salmeterol xinafoate in laboratory animals and humans. *Drug Metab Dispos.*, **21**: 1022-1028 (1993)
53. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.*, **10**: 1093-1095 (1993)
54. Smith DJ. Stereochemical composition of clenbuterol residues in edible tissues of swine. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 6036-6043 (2000)
55. Elliott CT, Crooks SR, McEvoy JG, McCaughey WJ, Hewitt SA, Patterson D, Kilpatrick D. Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol-medicated cattle. *Food Chem. Toxicol.*, **17**: 459-468 (1993)

56. Mazzanti G, Di Sotto A, Daniele C, Battinelli L, Brambilla G, Fiori M, Loizzo S, Loizzo A. A pharmacodynamic study on clenbuterol-induced toxicity: beta1- and beta2-adrenoceptors involvement in guinea-pig tachycardia in an in vitro model. *Food Chem. Toxicol.*, **45**: 1694-1699 (2007)