

原 著

ラットにおける ^3H -Etafenon 連続経口投与時の
体内分布および排泄について

武 田 隆 幸

信州大学医学部薬理学教室

STUDIES ON DISTRIBUTION AND EXCRETION AFTER
CHRONIC ADMINISTRATION OF ^3H -ETAFENON IN RATS

Takayuki TAKEDA

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shinshu University

Key words : エタフェノン (Etafenon), トリパラノール (Triparanol), ジエチルアミノエトキシヘキ
セストロール (diethylaminoethoxyhexestrol), ジエチルアミノエトキシフェニルプロ
ピオフェノン (O-(β -diethylaminoethoxy)- β -phenylpropiofenone)

緒 言

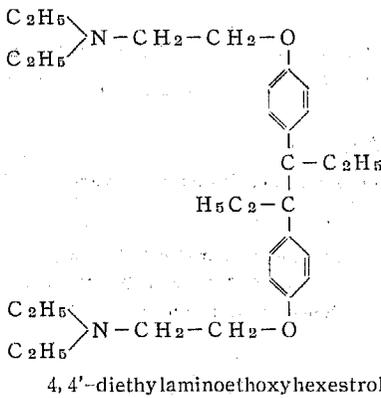
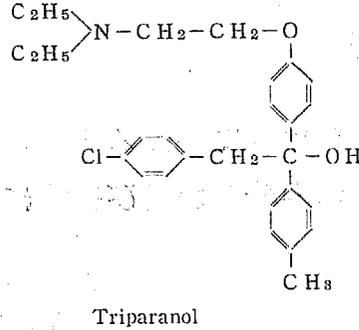
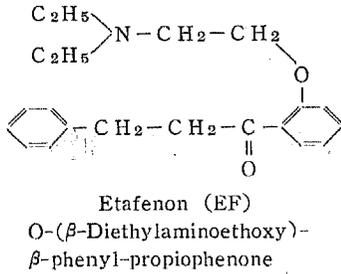
Etafenon (以下 EF) は図 1 に示すような構造をもつ物質であり、現在冠拡張剤としてもちいられている。このものについてはすでに、有坂¹⁾が ^{14}C -EF をもちい、ラットに 50mg/kg 経口投与後、72hrs までの尿、糞中排泄を、同じく 24hrs までの血中濃度を測定し、排泄は尿、糞あわせて 83.3%、血中濃度は投薬後 6hrs でほぼ消失することを示している。しかしながらこの薬物は Cholesterol 代謝に影響するといわれている Triparanol²⁾ (図 1) ならびに長期投与によってヒトおよびラットに磷脂質肝をひきおこすことが確められた Diethylaminoethoxyhexestrol³⁾ (以下 DH 剤) (図 1) と共通の Diethylaminoethoxyphenyl 構造をもっている。

DH 剤による毒性は、ヒトでは DH 剤そのものが、ラットにおいてはその代謝物が組織中に蓄積することによっておこるとされている⁴⁾。そこで著者は Wilzbach 法⁵⁾によりトリチウム化した EF (以下 ^3H -EF) をラットに 3 週間連続経口投与をおこない、尿、糞中の排泄率をもとめ、また投薬終了後 24hrs, 48hrs, 1 週間に肝臓およびその他の臓器中に残存する ^3H -EF を測定し、その蓄積、体内分布について検討した。

実験方法

 ^3H -EF の精製および調製

純粋な EF 485mg を 20Ci の ^3H -ガスとアンプルに密封し 5 日間放置後 ^3H -ガスを除去した。ラベルされた EF を $0.02\text{N HCl } 5\text{ml}$ にとかしてナス型コルベンに移し、凍結乾燥により乾固した。これに $0.02\text{N NaOH } 10\text{ml}$ を加えて攪拌し同様に凍結乾燥をおこない、この操作を 3 回くりかえして $^3\text{H}_2\text{O}$ として除かれる不安定トリチウムを除いた。最終的に塩酸酸性で分液ロートに移し、氷冷下で白濁するまで 1N NaOH を加えた。塩酸がはずれた EF は 50ml のエチルエーテルで 4 回抽出し、白濁が透明になることを確かめ、さらに 50ml のエチルエーテルで 2 回抽出しエーテル層をナス型コルベンに移した。エーテルは東京理化学 Rotary vacuum evaporator をもちい、室温で蒸発乾固した。これにラベルしていない EF を $1\mu\text{g}$ 加え、できるだけ少量のクロロホルム:メタノール = $2:1$ 混液にとかし、メルク、シリカゲル H 0.5mm の Thin layer chromatograph (以下 TLC) 用プレート ($20 \times 20\text{cm}$) にライン状にスポットし n-ブタノール:ギ酸:水 = $75:10:10$ で展開した。室温で乾燥後ヨード蒸気で呈色させ、ヨードを除いたのちスポットをすべてかきとり 30ml の円筒ガラスコヘ移し、クロロホル



1-[p-(2-Diethylaminoethoxy) phenyl]-
1-(p-tolyl)-2-(p-chlorophenyl) ethanol

図 1

ム：メタノール＝2：1 混液 10～15ml で 4 回抽出した。抽出液は一括してナス型コルベンにあつめ、常温で減圧濃縮して乾固した。この一部をメルク、シリカゲルアルミニウムシート 0.25mm, 20×20cm にスポットし、アセトン：エタノール＝80：20 で展開しヨード蒸気で呈色させた。またこれを Aloka Thin layer chromatography scanner にかけて放射能スポットを検出した。この状態ではまだ EF の分解物の一部を除いたにすぎないのでさらに Mall. Silica gel AR 100 mesh 30φ を径 2cm のカラムにつめ、アセトン：エタノール＝90：10 で Column chromatography をおこなった。各フラクションは東洋フラクションコレクター SF-160 K に 5ml づつとり、フラクションごとにメルクシリカゲルアルミニウムシート 0.25mm, 20×20cm にスポットしアセトン：エタノール＝80：20 で展開して確認し、同一の Rf 値をもつフラクションは一括してナス型コルベンへ移した。この EF フラクションは常温で減圧濃縮して回収した。この Column chromatography によっても除去できない不純物があるのでさらに全量をメルク、シリカゲル H 0.5mm, 20×20cm プレート 20 枚にわけてライン状にスポットし、アセト

ン：エタノール＝80：20 で展開して同様に回収した。この回収からは EF のスポットをできるだけ確実な小部分に限定し、テールの部分や不確実な部分は別に回収し、再び同様に TLC で分離した。この TLC 分離操作は 6 回おこなって目的とする EF が精製できた。この放射化学的純度は 3 種の異なる系の展開溶媒すなわち、1) アセトン：エタノール＝70：30、2) n-ブタノール：ギ酸：水＝75：10：10、3) エタノール：n-ブタノール：水：プロパノール＝10：10：5：3 で展開して単一のヨード蒸気スポット像を得、また単一の Radio scanning 像をえたことで確かめた。また 1) の系でおこなったスポットを 15ml のスピッツ管にかぎとりクロホルム 5ml で抽出して一部を日立自記分光光度計 EPS-3T で 240～360 mμ までの吸光度を測定し、別にもとめた EF の検量線から最大吸収の 300 mμ 前後の吸光度を比較定量した。また一部はバイアルにとり Cellosolve scintillator (Toluene：Cellosolve：DPO：POPOP：Naphthalene＝400ml：200ml：400ml：6g：100mg：80g) を 10ml くらわえて Aloka Liquid scintillation counter (以下 LSC) で測定し比放射能をもとめた。精製後の EF に一定量の非放射

性 EF をくわえ CMC で乳化希釈し 130ml に調製し最終比放射能および濃度を 1.2324 $\mu\text{Ci}/40\text{mg}/\text{ml}$ とし実験に供した。

実験動物ならびに薬物投与

200g 前後の Wistar 系雄ラットをラット用個別代謝ケージに各一匹づつ入れ、3日間飼育してケージに馴れさせたのち ^3H -EF を 1匹あたり 0.5ml 胃ゾンデをもちいて投与し、以後 1日 1回同様に投与した。

尿、糞の採取および処理

尿および糞は 1週、2週については投薬休止日の次の日に 1週間分まとめて採取し、3週目は最終投薬日の次の日に採取した。また投薬終了後 48hrs および 7日目にそれぞれ 3/4分の尿、糞を採取した。尿は 100ml のメスシリンダーに移し、ケージ洗液および容器洗液をあわせて 100ml とし、そのうち 0.5ml をバイアルにとり Cellosolve scintillator 15ml をくわえて LSC で測定した。糞は 2週間室温で風乾後全量を日本精機 Universal Homogenizer で粉碎し計量した。そのうち 100mg 前後を精秤してバイアルにとった。サンプルは同一サンプルから 3ヶ所採取し別々に処理した。これらを Mahin⁶⁾らの湿式酸化法の変法をもちいて処理した。すなわち 70% HClO_4 0.25ml、30% H_2O_2 0.5ml を加えて密封し、80°C の定温庫内で 3hrs 加熱後ドライアイス、アセトン浴に 1min 浸し、すばやく Cellosolve scintillator 15ml をくわえて測定した。この方法による回収率は投薬試薬を 0.1ml をもちいてもとめた。尿、糞中の排泄率は各週ごとにその週の全投薬量に対する百分率で示した。

生体内分布

最終投薬後 24hrs、48hrs、7日目にそれぞれ 2匹、3匹、3匹を腹部大動脈より採血して殺し、肝臓、腹腔内脂肪、心臓、腎臓、脾臓、肺臓をとり秤量した。サンプルは 100mg 前後を精秤してバイアルにとり Soluene-100 (Packard) を 1.0ml くわえ 50°C の水浴中でインキュベートしてとかし Cellosolve scintillator 15ml を加えて測定した。また血液は 0.1ml をとり soluene-100 0.5ml をくわえ同様に測定した。呈色の強いものは 30% H_2O_2 を数滴くわえ水酢酸 2滴でアルカリを中和して測定した。投薬後 24hrs の肝臓の残りおよび投薬後 24、48hrs の血液のうち 5ml は 10N NaOH 2ml をくわえて氷冷下 50ml のエチルエーテルで 4回抽出し、常温で減圧濃縮して全量をバイアルにいれ Cellosolve scintillator 10ml を加えて測定した。肝抽出物の一部はメルク、シリカゲル H、

TLC にスポットしアセトン：エタノール=80：20 で展開し未変化体および代謝物の存在を検討した。

尿中排泄

尿中排泄中の放射能について水あるいは水溶性揮発物質の存在を知るため、各週ごとに採取した尿をそれぞれの週ごとに一括し、50°C で減圧蒸留し、乾固近くになってさらに水 300ml をくわえて乾固させた。留水はメスシリンダーで計量し、そのうち 1.0ml をバイアルにとり Cellosolve scintillator 10ml をくわえて測定した。水あるいは水溶性揮発物質としての放射能は各週ごとの全尿中放射能に対する百分率でもとめた。

成績

表 1-a は各ラットについての第 1週目の排泄率を、表 1-b は第 2週目の排泄率を、表 1-c は第 3週目の排泄率を示したものである。また表 1-d、表 1-e は投薬終了後 48hrs、7日間の排泄を示し、表 1-f は各ラットについて投薬終了後 24hrs までの全投薬量および全排泄量と全投薬量に対する全排泄量を百分率で示したものである。これら表 1-a~表 1-c の結果からは投薬期間の長い程排泄率が高くなっていることがわかる。また表 1-d および表 1-e では投薬終了後も 1週間に第 3週全投薬量の 8.6% もの排泄のあることがわかる。さらに表 1-f にみられるごとく 3週間の平均的排泄率は 87.25% であり、投薬終了後 1週間までの排泄をいれると 90.18% となった。

表 1-a ^3H -EF 投薬 1週目の排泄率

^3H -EF をラットに 3週間連続経口投与をおこない、各週毎に尿、糞を採取し、各週の総投与量に対する排泄量を百分率で示した。

| Rat No. | Urine (%) | Feces (%) | Urine+Feces (%) |
|---------|-----------|-----------|-----------------|
| 11 | 17.97 | 76.16 | 94.13 |
| 12 | 34.90 | 59.63 | 94.53 |
| 1 | 30.07 | 46.06 | 76.13 |
| 7 | 20.28 | 66.58 | 86.86 |
| 8 | 20.65 | 48.84 | 69.49 |
| 4 | 28.81 | 36.41 | 65.22 |
| 9 | 12.41 | 47.49 | 59.90 |
| 10 | 15.59 | 59.47 | 75.06 |
| 2 | 16.63 | 69.46 | 86.08 |
| 3 | 29.87 | 45.36 | 75.23 |
| 6 | 18.22 | 67.44 | 85.66 |

Average \pm S. E. 78.93 \pm 3.45

表 1-b ³H-EF 投薬 2 週目の排泄率

| Rat No. | Urine (%) | Feces (%) | Urine+Feces (%) |
|-----------------|--------------|-----------|-----------------|
| 11 | 11.95 | 69.74 | 81.67 |
| 12 | 25.19 | 55.47 | 80.66 |
| 1 | 23.54 | 66.28 | 89.82 |
| 7 | 17.00 | 95.58 | 112.58 |
| 8 | 16.16 | 71.43 | 87.57 |
| 4 | 33.12 | 50.17 | 83.29 |
| 9 | 15.34 | 74.81 | 90.15 |
| 10 | 13.20 | 74.21 | 87.41 |
| 2 | 12.10 | 76.20 | 88.30 |
| 6 | 10.53 | 65.81 | 76.34 |
| Average ± S. E. | 87.78 ± 3.10 | | |

表 1-c ³H-EF 投薬 3 週目の排泄率

| Rat No. | Urine (%) | Feces (%) | Urine+Feces (%) |
|-----------------|---------------|-----------|-----------------|
| 11 | 15.67 | 81.28 | 96.95 |
| 12 | 19.65 | 88.47 | 108.12 |
| 1 | 34.11 | 84.71 | 118.82 |
| 7 | 19.76 | 90.16 | 109.92 |
| 8 | 20.68 | 38.26 | 103.94 |
| 4 | 17.62 | 52.30 | 69.92 |
| 9 | 16.87 | 81.89 | 98.66 |
| 10 | 19.36 | 74.99 | 94.35 |
| Average ± S. E. | 102.56 ± 5.14 | | |

表 1-d ³H-EF 投薬終了後 48hrs の排泄率

| Rat No. | Urine (%) | Feces (%) | Urine+Feces (%) |
|-----------------|---------------|-----------|-----------------|
| 1 | 0.695 | 2.234 | 2.938 |
| 7 | 0.662 | 2.541 | 3.302 |
| 8 | 0.748 | 2.538 | 3.286 |
| Average ± S. E. | 3.138 ± 0.105 | | |

表 1-e ³H-EF 投薬終了後 1 週間の排泄率

| Rat No. | Urine (%) | Feces (%) | Urine+Feces (%) |
|-----------------|---------------|-----------|-----------------|
| 4 | 2.481 | 4.598 | 7.079 |
| 9 | 2.678 | 6.245 | 8.923 |
| 10 | 2.617 | 7.097 | 9.714 |
| Average ± S. E. | 8.572 ± 0.782 | | |

表 2 は各臓器および組織 1g 湿重量あたりの ³H-EF の残在量を μg で示してある。表に示すごとく、特定の臓器にとくに高濃度に分布するというようなことは

なくその濃度も脂肪組織を除いて経時的に減少している。

表 3 は全投薬量に対する各臓器内量比を示したものである。

表 1-f ³H-EF 投薬終了後 24hrs までの総排泄量および総排泄率

| Rat No. | 総投薬量 (μCi) | 総排泄量 (μCi) | 総排泄率 (%) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|----------|
| 11 | 11.71 | 10.68 | 91.20 |
| 12 | 11.71 | 11.14 | 95.16 |
| 1 | 11.71 | 11.26 | 96.18 |
| 7 | 11.71 | 12.11 | 103.47 |
| 8 | 11.71 | 10.29 | 87.89 |
| 4 | 11.71 | 8.506 | 72.65 |
| 9 | 11.71 | 9.804 | 83.74 |
| 10 | 11.71 | 10.08 | 86.06 |
| 2 | 7.39 | 6.45 | 87.20 |
| 3 | 3.70 | 2.78 | 75.22 |
| 6 | 7.39 | 5.99 | 80.99 |
| Average ± S. E. | 87.25 ± 2.75 | | |

表 2 ³H-EF 3 週間連続投与後各時間の臓器内分布

³H-EF を 70~100mg/kg, 3 週間経口投与をおこないその後各時間に動物を殺し臓器内 ³H-EF の分布を検討した。 ($\mu\text{g/g}$ 湿重量)

| | 24 hrs | 48 hrs | 7 days |
|----|---------------|---------------|---------------|
| 肝臓 | 117.7 ± 9.35 | 87.66 ± 6.30 | 35.26 ± 9.62 |
| 血液 | 130.9 ± 11.45 | 81.84 ± 8.14 | 55.99 ± 15.67 |
| 脂肪 | 209.4 ± 26.62 | 80.74 ± 40.40 | 277.3 ± 117.8 |
| 心臓 | 107.6 ± 5.10 | 89.64 ± 17.31 | 51.08 ± 20.59 |
| 腎臓 | 133.5 ± 10.52 | 64.23 ± 11.32 | 74.65 ± 35.21 |
| 脾臓 | 100.9 ± 8.72 | 89.95 ± 13.75 | 36.85 ± 3.57 |
| 肺臓 | 145.8 ± 54.70 | 89.39 ± 7.91 | 55.97 ± 10.94 |

表 3 ³H-EF 3 週間連続経口投与後各時間の臓器内残存比 ($\times 10^{-4}$)

³H-EF を 3 週間 70~100mg/kg 経口投与した後各時間における臓器内の ³H-EF 残存量を総投薬量と比較した。

| | 24 hrs | 48 hrs | 7 days |
|----|--------------|--------------|-------------|
| 肝臓 | 29.74 ± 0.41 | 20.45 ± 1.77 | 7.05 ± 0.42 |
| 心臓 | 2.43 ± 0.20 | 2.05 ± 0.35 | 1.16 ± 0.69 |
| 腎臓 | 3.46 ± 0.71 | 1.56 ± 0.28 | 2.07 ± 1.39 |
| 脾臓 | 1.11 ± 0.06 | 1.13 ± 0.18 | 0.38 ± 0.10 |
| 肺臓 | 6.22 ± 2.62 | 4.59 ± 0.82 | 5.09 ± 2.15 |

である。最大の値を示した投薬後 24hrs の全肝中残存量は全投薬量 380mg に対し 1.13mg であり、これも 1 週間後には 0.268mg となっている。また全肝ホモジネートをアルカリ性でエーテル抽出したものについては投薬後直ちに死亡したラット肝では 1.75mg 抽出できたのに対し、24hrs 後の 2 匹の肝からはそれぞれ 0.10mg, 0.11mg しか抽出できなかった。この値は直接溶解して測定した値の $\frac{1}{10}$ であった。また血液 5ml を同様に抽出した場合は直接測定した値の 0.3% 程度しか抽出されなかった。さらに肝抽出物を TLC で確認した結果では EF およびその代謝物とおもわれるスポットは検出できなかった。

考 察

EF は DH 剤や Triparanol と共通の活性基を有することから、これらの薬物と同様に肝に蓄積し脂質代謝異常をひきおこす可能性が考えられる。そこで今回はトリチウムでラベルした EF を 3 週間連続経口投与してその排泄および生体内蓄積を検討した。EF の脂質代謝におよぼす影響については現在研究中である。

今回の実験結果より EF は DH 剤と共通の Diethylaminoethoxyphenyl 構造を有するにもかかわらず 1 日 1 回 70~100mg/kg の大量（臨床上の用量は 1 回 20mg を 1 日 3 回……約 1mg/kg/日）の連続 3 週間経口投与ではほとんど蓄積はおこっていない。排泄率も尿、糞あわせて 90% に達しトリチウムの $^3\text{H}_2\text{O}$ として呼気中に失われる部分を考えにいれるとこの排泄率はかなり高いものといえよう。また特定の臓器にあつまる傾向もなく、投薬終了後の臓器内からの消失も脂肪組織を除いて速やかである。さらにこの脂肪組織に高濃度が持続しているのも 3 例中の 1 例であり、他の 2 例については脂肪湿重量あたり 0.1mg 程度で肝など他臓器におけるそれとほとんど変わらない。

肝臓中のこの 0.1mg/g 湿重量という残存値については直接 DH 剤の場合と比較できない。後述のごとく DH 剤の場合はラットにおける蓄積がほとんどその代謝物であり未変化体として定量することができない。そこで一応ヒトにおいて磷脂質肝をひきおこした場合のレベルと比較してみると、山本ら⁴⁾の成績では 15mg/g 肝湿重量であった。すなわち EF においては、EF ならびにその代謝物をすべて含めてもヒトの場合の DH 剤蓄積の 0.7~1.0% 程度であった。

DH 剤の代謝についてはヒトとラットでは種差のあ

ることが示されている⁴⁾。すなわちヒトでは DH 剤そのものが蓄積するのに対し、ラットでは極性の大きな代謝物が蓄積されるという。しかしながら DH 剤はラットにおいてもヒトと同様の顕著な Lipodosis をひきおこしているため、DH 剤の代謝物も磷脂質肝をひきおこす可能性を当然考えなければならない。その意味で EF そのもの、ならびにその代謝物がラット体内からほとんど排泄されることが今回の実験から明らかとなったことは DH 剤の場合と比較して興味深い。

しかし今回の実験成績はあくまでもいわゆる毒性実験などと総合して判定すべきものであり Wilzbach 法⁵⁾でラベルした ^3H -EF をもちいた実験のみからただちに結論を下すべきではないと思われる。実際に尿中排泄物中の放射能が第 1 週、第 2 週、第 3 週の尿でそれぞれ 14.47%、17.86%、17.69% が $^3\text{H}_2\text{O}$ あるいは水溶性揮発物質となっていることから慎重に検討する必要がある。

結 語

^3H -EF を 3 週間経口投与した Wistar 系雄ラットにおいて、投薬期間中あるいは投薬後 1 週間の EF の排泄ならびに投薬終了後 24、48hrs および 7 日目の EF の生体内分布、蓄積を検討した。

排泄率は投薬期間が長くなる程高くなり平均排泄率は 90.18% となった。

生体内分布については、EF が特定の臓器に蓄積するようなことはみとめられなかった。また大部分の臓器においては投薬終了後 1 週間で、かなり速やかに排泄された。

肝臓への蓄積はほとんどみられず、問題の DH 剤のヒト肝臓への蓄積にくらべ $\frac{1}{100}$ 程度であった。

文 献

- 1) 有坂常男： ^{14}C -Etafenon HCl の排泄実験、現代の臨床、(投稿中)
- 2) Huruban, Z., Swift, H., and Slesers, A.: Effect of triparanol and diethanolamine on the fine structure of hepatocytes and pancreatic acinar cells. Lab. Invest., 14: 1652-1672, 1965
- 3) Oda, T., Shikata, T., Suzuki, H., Naito, C., Kanetaka, T., Iino, S., Miyake, K., Sakai, J., Onda, H., Fujiwara, K., Yamanaka, M., Shimizu, N., and Yoshitoshi, Y.: Phospholipid

fatty liver : a report of three cases with a new type of fatty liver. Jap. J. exp. Med., 40 : 127-140, 1970

- 4) 山本 章, 足立 進, 木谷照夫, 那須輝史, 進士 義剛, 西川光夫 : DH 剤によって惹起せられた特異な lipodosis について (その病理化学的变化), 最新医学, 26 : 2209-2214, 1971
- 5) Wilzbach, K. E. : Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas, J. Amer. Chem. Soc., 79 : 1013, 1957
- 6) Mahin, D. T. and Lofberg, R. T. : A simplified method of sample preparation for determination of tritium, carbon-14, sulfur-35 in blood or tissue by liquid scintillating. Analyt. Biochem., 16 : 500-509, 1966

(1973. 1. 31 受稿)