

人工放射性硫黄 (S^{35}) を目安としたコンドロイチン硫酸の経皮的吸収について

昭和30年7月16日 受付

信州大学医学部第二内科学教室 (指導 大島良雄教授)

佐 竹 清 人 小 島 碩 夫
中 島 富 彦 今 野 修

緒 言

コンドロイチン硫酸 (以下「コ」と略記) が結合組織の糖蛋白主要成分として重要な役割を占めていることは更めていうまでもないが、それが薬物として注目されて来たのは、ここ数年來のことである。殊に最近老人性変化を対象とした医学が重要な問題となつて来て、全身の細胞に賦活作用を有していると考えられる「コ」が俄かに諸家の注目を浴び出して来たのは故なしとしない。

大島教授は夙に「コ」の作用に関する医学的研究に着手せられ、その広範且詳細な成績は既に多数の業績となつて発表せられており、①②③④又岸田⑤は大島教授指導の下に S^{35} で硫酸基を活性化した「コ」を用いて、マウスに経口的並に腹腔内投与を行い、その体内分布を明らかにした。

著者等も今回 S^{35} で活性化した「コ」の配布を受けその経皮的吸収について動物並に人体実験を行い興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

使用した「コ」は、硫酸の形で供給された S^{35} で $Na_2S^*O_4$ を作り、これをマウスの腹腔内に注射し、48時間後に殺して膝関節に固定せられた S^{35} 活性化「コ」を抽出したもので、Na塩の形になつている。その純度及び S^{35} の正確な濃度は不明であるが、かなり精製されたものであり、「コ」ナトリウム総量として 284mg を入手し得た。

皮膚への適用形としてはその浸透が最も問題であるが、親水軟膏形が最適と考え約3%の「コ」親水軟膏を作り、後述する如き方法で塗擦した。因みに親水軟膏はいわゆる o/w 型軟膏で、皮膚分泌物とよく混和し、すぐれた皮膚への浸透性を有し、しかも可洗性に富むので放射性物質による汚染をさける意味でも都合がよい。しかしながら水分の蒸発が起りやすい欠点があり、著者等の用いた「コ」ナトリウム親水軟膏も、この欠点を顧慮して使用の度にその比較的放射能を測定したが、日を追うに従い単位重量当りの放射能増加を認めた。

実験動物としては体重 150g 乃至 190g の幼若モルモ

ット5頭を用いた。「コ」の尿中排泄と体内分布を同時に知る目的であつたのと、入手した「コ」の量に制限があつたので、出来るだけ小動物を用いた方が都合がよいのであるが、マウスの予備実験では皮膚に適用した軟膏をなめる習性があり、兎は分割尿採取に適當しているが、「コ」の臓器分布を検するためには大きすぎるので今回は使用せず結局モルモットを選んだ。先ず、モルモットの後頸部より背部にかけて広く毛を出来るだけ短く刈りとり、附着した毛を充分払い取つて皮膚を消淨にした上、後頸部より背部中央にかけ 3×5 cm の面積に「コ」親水軟膏 0.5g を秤量して充分に塗擦する。塗擦時間は動物により異つたが5分乃至20分とした。かくして塗擦を終つたモルモットは、底部に金網を敷いた檻の中に24時間放置し、その間の尿を一定容器内に集める。檻の広さはモルモットの体位変換が困難な程度にせまくしたので、軟膏塗擦部位と相まつて「コ」の経口的摂取は不可能と考えてよい。

モルモットは24時間後に水と刷毛を以て全身を洗い、ついで心臓穿刺により瀉血死亡せしめ、肝臓、心臓、肺臓、脾臓、膀胱(尿を容れている時はそのまま)、膈、脊椎骨(軟部組織附着のまま)、軟膏塗擦部皮膚を分離し、それぞれ秤量した後別々のルツボに入れ、電気爐で $600^\circ C$ 、6時間前後を要して充分灰化せしめ、又血液は 5ml、尿は得られた全量をそれぞれルツボに受け、小火焰上で蒸発乾固せしめた後臓器同様の操作により充分灰化せしめる。かくして得た灰分は各 0.5ml の稀塩酸で溶解し 0.1N の Na_2SO_4 0.1ml を加え、更に 0.2N の $BaCl_2$ 0.2ml を加えて充分に $BaSO_4$ を沈澱せしめ、⑥これをステインレス皿に移して赤外線燈下に置き、徐々に且充分乾燥せしめて細粉状となした後秤量、その放射能を科研製ガイガー・ミューラー計数管で計測した。

灰分は骨、尿を除く諸臓器ならびに血液については $5mg/cm^2$ 以下であつたので測定値をそのままとり、骨、尿はそれぞれ重量による補正を加えて計測値を算出した。

人体実験は腎葉量の関係から1例に行つたのみであるが、入院中の関節リウマチ患者(♀, 51才)を被験者とし、その両側大腿伸側でそれぞれ 10×15 cm の面積

に全量5.0gの「コ」親水軟膏を貼用し、15分間充分塗擦した後綿ネルを当て、固定、24時間そのままとした。

膏薬貼用中の24時間及びその後の24時間にわたり、3時間毎に分割尿を排泄せしめ又同時に血液2mlを静脈穿刺により採血、前者は SO_4 イオンを硫酸バリウムとして沈澱濾過し、濾紙共にルツボに入れて灰化し、後者はそのままをルツボに受けて型通り灰化して、動物実験の場合と同様の処理の後灰化物の放射能をガイガー・ミューラー計数管で計測した。ただし尿中硫酸バリウム沈澱を濾過する際、不手際から相当量が濾紙を通過した。

実験成績

1) 動物実験の場合:

モルモット5頭における諸臓器ならびに血液、尿中の放射能計測値をまとめると第1表の如くである。

i) 尿中放射能; モルモットの中実験前尿を採取し得たものについて、その灰化資料の放射能を計測したがすべて0であつた。「コ」軟膏貼用24時間中の尿中放射能はそれぞれ229c.p.m., 456c.p.m., 520c.p.m.,

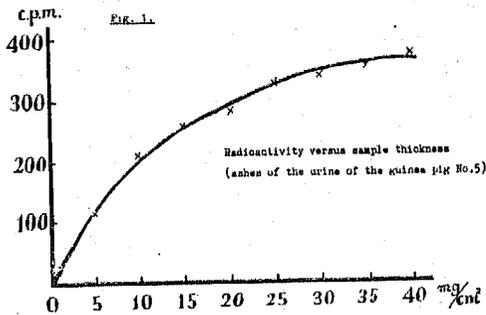
615c.p.m., 1020c.p.m., であるが、第1例と第2例は膀胱尿を加えての値である。第3例以下は膀胱尿の有無に拘らず膀胱を別個にとり出して灰化測定したが、第3例では膀胱内に尿を認めずその灰化資料の放射能はたかだか3c.p.m.にすぎない。第4例では少量の尿貯溜を認めその放射能は25c.p.m.であり、第5例では2ml前後の尿の貯溜した緊満した膀胱を認め、その灰化資料の放射能は105c.p.m.であつた。適用した「コ」親水軟膏0.1gを諸臓器同様に灰化して得られた灰分の放射能計測値は表に示すごとく、第1例より第5例までそれぞれ1750c.p.m., 1805c.p.m., 2010c.p.m., 2900c.p.m., 1900c.p.m.であつたから、尿中放射能(膀胱尿を加えて)の適用軟膏放射能に対する比はおのおの2.62%, 5.05%, 5.18%, 4.91%, 11.83%となる。尚参考に第5例で得られた試料の厚さと放射能計測値の関係を図示する。(第1図)

ii) 血液; 血液5mlは体重150g乃至190gのモルモットについては全血量の略半分に近い量と思われるが、その灰化物の放射能は第1例、第2例共に0、第3例、第4例はそれぞれ3c.p.m., 最も尿中放射能の高い第5例でも4c.p.m.にすぎない。

Table 1.
Radioactivities of the organs, blood and urine of five guinea pigs
after 24 hours' application of the ointment

guinea pig	No. 1		No. 2		No. 3		No. 4		No. 5	
body weight	150g		150g		190g		150g		170g	
dosis of applied ointment and time for rubbing	0.5g 5min.		0.5g 15min.		0.5g 20min.		0.5g 20min.		0.5g 20min.	
	g	c.p.m.	g	c.p.m.	g	c.p.m.	g	c.p.m.	g	c.p.m.
skin	1.3	2	1.9	7	2.8	4	4.4	/	2.0	8
kidneys	2.0	0	1.7	6	2.1	5	2.1	2	2.2	5
heart	0.5	2	0.6	3	1.0	2	0.8	3	0.7	2
liver	5.1	2	6.3	0	8.0	4	6.5	0	7.0	2
lungs	1.2	1	1.2	1	1.7	4	1.4	3	1.4	4
brain	1.8	0	2.7	0	2.9	0	2.7	/	1.8	0
back bone with surrounding soft tissue	4.6	0	2.6	9	6.2	0	4.4	9	3.6	5
spleen	/	/	/	/	0.4	3	0.4	4	0.6	9
bladder with or without urine	/	/	/	/	0.4	3	1.1	25	3.0	105
blood	5ml	0	5ml	0	5ml	3	5ml	3	5ml	4
urine	15ml	229	20ml	456	15ml	520	10ml	615	15ml	1020
counts per minute per 0.1g of the ointment	1750		1805		2010		2900		1900	
excreted radioactivity / applied radioactivity (%)	2.62		5.05		5.18		4.91		11.83	

iii) 皮膚及び諸臓器; 実験方法で述べた様に24時間軟膏貼用後の皮膚を水と刷毛で十分に洗った後切りとつて、その表面の放射能をガイガー・ミューラー計数管で検すると、全く放射能を証明出来ないか証明しても数カウントにすぎない。そこで皮内に入った放射性Sを追及すべく貼用部皮膚の灰化物について放射能を計測してみたが、表に示す如く2~8c.p.m.の少量を検出し得たにすぎない。



諸臓器の放射能の中比較的多いものでも脊椎骨の9c.p.m.が最高であり、しかも同じく脊椎骨でも第1例、第3例のごとく0というものもある。毎回確実に放射能を証明し得た臓器は心臓、肺臓、脾臓(但し3例)であるが、それとても第5例の脾臓が9c.p.m.を示したのが最高で、他はすべて4c.p.m.以下にすぎない。尿中排泄量からみて腎臓の放射能に興味を持たれたが、これも第2例の6c.p.m.が最高で第1例の如く0というものもある。

以上を要約すると血液、諸臓器の放射能はこの実験条件下においては非常に少ないといえる。

2) 人体実験の場合:

軟膏貼用中の24時間、除去後の24時間について3時間毎にしらべた尿、血液中の放射能は第2表の如くである。実験方法で述べた如く尿中硫酸バリウムの処理に不手際があつたが、それでも最初の24時間尿中に合計77c.p.m.次の24時間尿中に合計13c.p.m.の放射能を証明出来た。

これに対して血液の方は試料が2mlという少量であつたためか、軟膏貼用後6時間後、9時間後にそれぞれ2c.p.m., 1c.p.m.という値を得た以外は、どの標本にも放射能を証明出来なかつた。この実験条件下では血中放射能はまず証明出来ないものといえよう。

考 按

著者等は S^{35} で活性化した「コ」を用いて親水軟膏を作り、これをモルモット及び人体に塗擦してその経皮的吸収を検索した。上記の実験成績から明らかな様に「コ」の経皮的吸収は確実ということが出来る。たゞし「コ」といつてもその抽出材料により、又製法に

Table 2

Radioactivity in urine and blood of one human subject

sample		urine	blood (2ml)
hrs.		c. p. m.	c.p.m.
hrs. after application of the ointment	3	10	0
	6	10	2
	9	13	1
	12	11	0
	15	10	0
	18	11	0
	21	5	0
	24	7 (total 77)	0
the ointment removed → hrs. after removal of the ointment	3	9	0
	6	0	0
	9	2	0
	12	0	0
	15	0	0
	18	1	0
	21	1	0
	24	0 (total 13)	0
Total		90	3

より必ずしも同一の物質とは限らぬし、又著者等の実験条件で適用した「コ」がそのまゝの形で皮膚を通過したか否かについては将来の検索にまたねばならない。しかし著者等の使用した「コ」は比較的精製された形のものであり、又「コ」は熱に対して以外はかなり安定な物質であるから、少くとも大きな変化を受けることなく皮膚を通過したものと考えて差支えなからうと思われる。

モルモット5頭の成績が示す如く、第1例は塗擦時間が5分間であるが、第2例は15分、第3例以下は20分に延長した。排泄量対適用量の比をみると、第1例のみが2.62%、他は4例中3例が5%前後で第5例では約12%という成績が得られた。小堀等⁽⁷⁾は軟膏適用に際して塗擦という操作の重要性を強調し、塗擦が充分な程吸収がよいと述べているが著者等の得た成績もこの事実を裏書きするものと思われる。又小堀等⁽⁷⁾によれば、薬剤の経皮的吸収には軟膏に含有される薬剤の性状、特に溶媒に対する溶解性が重要な因子であり、油溶性のものは吸収が容易であるのに反して、水溶性のものは全く吸収されぬか、吸収されても極く微量にすぎぬという。「コ」は水に易溶、有機溶媒に難溶の物質であるが、著者等の得た成績では比較的吸収がよいと思われるので、この点についても興味ある問題を含んでいるものと考えられる。

モルモットの尿中に比較的多量の放射能を証明し得たにも拘らず、軟膏貼用部の皮膚を含む諸臓器、血液の放射能が小さいことは一見奇異に感じられるが、岸田^⑤の報告によると、腹腔内又は経口の投与でマウスに一時に相当量の「コ」を与えた場合、諸臓器の示す放射能は投与後6時間に最高に達するが、24時間ではその値に比べては一般に遙かに低値となつている。又1週間連続腹腔内投与した場合と1回腹腔内投与後24時間の場合の諸臓器の放射能の値をみると、この兩者の間では大差のない成績を得ている。これらの事実は「コ」が一時に相当量投与された場合に、一旦何等かの形で諸臓器にとり入れられるが、少くとも蓄積されるものではないということを示すものではなからうか。因みに岸田の用いた「コ」は1%の「コ」食塩水溶液で、その放射能は0.5mlがローリツツエン検電計で9.3div/minであり、それを1ml宛マウスに投与しているから、与えた放射能は18.6div/minとなる。用いたマウスの体重は15g前後というから体重1g当り約1.2 div/minと計算される。著者等の用いた親水軟膏は、その0.1gをガイガー・ミューラー計数管で測定して1805c.p.m.のものが、ローリツツエン検電計では25.7 div/minの放射能を示した。この軟膏を用いたモルモットは150gであつたから、体重1g当り約0.8div/minを投与せられたことになり、他も同様にして計算すると投与量としては岸田の場合と大差がない。従つて投与形式が問題であり、著者等の如き経皮的投与ではたとえ注射又は経口的投与の場合と同じ量を長時間にわたつて貼用したとしても、その吸収は注射或いは経口的投与に比べてはるかに徐々であると思われ、前述した様に「コ」が長くは諸臓器にとりこまれていないで排泄されるものとする、諸臓器の示す放射能が尿中放射能に比べて意外に小さいことも当然考えられることである。

人体実験では方法の不手際から「コ」が皮膚を通過するという事実をうかゞい得たに止り、適用量の中の幾%が尿に証明せられるかは不明であつた。しかし軟膏貼用中の尿中放射能が、除去後24時間のそれに比して大であつたことから、「コ」の吸収、排泄がおそいものではなからうということは想像に難くない。尙人体実験は再び機会を得て行ふ予定である。

結 語

著者等は S^{35} で硫酸基を活性化した「コ」を親水軟膏の形で用いて、「コ」の経皮的吸収を検察し次の成績を得た。

1) モルモットでは、確実に尿中に証明される放射能より皮膚に塗擦した「コ」の経皮的吸収をたしかめ得た。

2) その際、軟膏塗擦時間の長い程吸収のよい傾向がみられる。

3) 経皮的投与では「コ」の臓器への沈着は著明でない。

4) 人体実験でも「コ」が経皮的に吸収されることをうかゞい知ることが出来た。

擧筆するに当り、恩師大島教授の御懇篤なる御指導と御校閲を深謝する。

尙本論文の要旨は昭和30年7月、第16回日本内科学会信越地方会に発表した。

文 献

- ①大島；岡大温研報，(6)：52，昭.27. ②大島，横田；岡大温研報，(7)：20，昭.27. ③大島，外園；岡大温研報，(13)：36，昭.28. ④大島；セレブリン文献抄，第1集，1頁，科研，昭.30. ⑤岸田；岡大温研報，(12)：42，昭.29. ⑥大島，横田；岡大温研報，(7)：1，昭.27. ⑦小堀等；新しい膏薬療法，金原出版株式会社，昭.27.

Studies on the Percutaneous Absorption of Chondroitin Sulfate Labeled with Radioactive Sulfur (S^{35})

Kiyoto Satake, Hiroo Kojima
Tomihiko Nakajima & Osamu Konno
Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. Y. Oshima)

Using hydrophilic ointment containing chondroitin sulfate labeled with S^{35} , the present authors studied the percutaneous absorption of the drug and obtained following results:

1) During 24 hours' application of the ointment to the skin of five guinea pigs, the radioactivity was proved to be positive in the urine of the experimental animals. This result means that chondroitin sulfate can be absorbed when applied to the skin.

2) After 24 hours' application of the drug, the organs and blood of the experimental animals showed no or only slight radioactivities.

3) In one human experiment the percutaneous absorption of the drug was demonstrated by radioactivity in the urine.