

トリチウム・ラベルを行なった抗フィラリア剤 ^3H -diethylcarbamazine の生体内分布の全身 オートラジオグラフィによる検討

佐久間 貞重 佐久間 真理 佐藤 善重

田辺製薬生物研究所

佐々学 小林 準三

東京大学伝染病研究所寄生虫研究部

(1967年4月19日受領)

緒言

Diethylcarbamazine は糸状虫感染の化学療法剤としてその特異な効果が認められ、人のバンクロフト糸状虫症、マレー糸状虫症などの治療にひろく使用されているが、その作用機作は不明な点が多い。Bangham (1955) は ^{14}C -diethylcarbamazine をラットおよびサルに投与してその排泄、代謝を検討している。その体内分布に関しては、石原 (1957) がウシ、ウマについて、人体投与にさいしての血中濃度の推移については藤巻 (1956)、片峰 (1959)、福島 (1963) 等が、いずれも Lubran 法による比色定量実験を行なっているが、本法の実施には大量の血清を要するなどの難点がある。また、福島 (1963) は田辺製薬大阪研究所で作製した ^{15}N 標識 diethylcarbamazine を人体に投与したあとの血中濃度の推移について報告している。

今回筆者らの用いた方法は放電法による ^3H 標識 diethylcarbamazine の作製と、その全身オートラジオグラフィによる各臓器における分布の時間的経過を観察することを目的としたもので、その結果、微量の材料をもつて小動物について詳細な記録をとることができ、本剤の作用機構について未知であつた面の一部をさらに解明しえたものと考え。 ^3H 標識検体の糸状虫感染コトナラットにおける体内分布については、佐久間ら (未発表) が 1963 年いろいろ検討をつづけていたが、今回は Ullberg *et al.* (1954) の開発した全身オートラジオグラフィ法をさらに改良した佐藤ら (1965 a,b, 1966 a,b)

の方法をこの目的に主として応用したものである。

実験材料および実験方法

^3H -diethylcarbamazine の製法：標識に用いた diethylcarbamazine (diethylcarbamyl-4-methylpiperazine) は、田辺製薬より抗フィラリア剤 Supatonin として製造されているものをそのまま使用し、その 200mg を放電管容器に入れ、常法、減圧下において $^3\text{H}_2$ ガス 2Ci を導入し、10 mmHg 圧で 1 万ボルトの電圧で 20 秒間の放電を 7 回行い、 $^3\text{H}_2$ ガスを除いたのち、放電生成物を取り出し、アセトンに溶解後クエン酸を加えクエン酸塩を析出させた。この化合物は目的物以外にかなりの分解生成物の存在することを認めたので、アルコールによる再結晶をくり返して、 $36 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ の ^3H -diethylcarbamyl-4-methylpiperazine dihydrogen citrate を得た。これは P. P. C. で単一スポットであり純品であることが確かめられた。

動物実験：ddY 種、5~6 週令 (体重 $20 \pm 0.5 \text{ g}$) の雄マウスを用い、その腹腔に ^3H -diethylcarbamazine $180 \mu\text{Ci}/5 \text{ mg}$ を水溶液として注射したのち、10 分、20 分、40 分、1 時間、3 時間、6 時間、および 24 時間目にドライアイス・アセトンの中で凍結させたのちセロテープ法によつて厚さ 30μ の全身薄片を多数切りだした。充分に乾燥したのち、サクラ・タイプ NR-E₁ の原子核フィルムと密着させて約 5 ヶ月間露出してオートラジオグラフを作成した。コトナラットについては末梢血液中にマイクロフィラリアを検出し感染がたしかめられた雌の

This study was supported by a WHO research grant.

コトナラット、体重 114 g の腹腔内に 576 μ Ci/16 mg の ^3H -diethylcarbamazine を注射し、25 分後に凍結殺処分したのち、マウスの場合と同様に操作してオートラジオグラフィを作成した。フィルムの現像はコニドール X で 5 分、定着はコニフィックスを用いて 15 分を行った。

実験結果および考察

Fig. 1 に ^3H -diethylcarbamazine をマウスに投与した場合の経時的なオートラジオグラフィを示した。写真では白色部が放射能活性を有しフィルムを黒変させた部位に相当する。これによると全身的な放射能活性は、投与 20 分後には最高に達し、肝臓、腎臓、副腎、胃、腸、だ液腺および筋肉等に活性が顕著であることが判る。その後は幾分減少しながらもかなり高度な活性を 1 時間後迄持続したが、3 時間以後には急速に減少していき、24 時間以後にはオートラジオグラフィからみることかぎり体内にほとんど放射能活性はみとめられなかつた。diethylcarbamazine の排泄の早いことは、Bangham (1955) によつても詳しく報告されており、ラットおよびサルに静注した場合に、投与した放射能量のほとんどが 24 時間以内に尿中に排泄されること、しかもそのうちの半分は約 3 時間以内であることを述べている。また佐久間(1964)の実験結果によれば、腹腔内投与の際の血中濃度は投与後 20 分で最高に達し 3 時間後にはピーク時の 1/8~1/10 の活性を示すにすぎなかつたが、これらは今回のオートラジオグラフィの結果ときわめてよく一致している。更に、石原 (1957) はこの化合物が血清中と同程度かまたはそれ以上に筋肉、脳、皮膚等に増加検出されたと報告している。

今回のオートラジオグラフィの成績はこれらの所見を良く裏づけしている。すなわち、心臓、血管内の血液存在部位の放射能活性から推定して血中濃度は投与後 20 分が最高であるが、脳は 1 時間後迄活性が増加する傾向を示し、筋肉にあつてもやはり 1 時間以後迄は明らかに血中濃度よりも高い放射能活性を保持した。各々の時間によつての特異的な分布様式の差異はあまりない様であつたので、全般を通じて特徴のある分布を示したものをいくつか選んで拡大写真として Fig. 2~Fig. 11 に示した。

Fig. 2 は投与 20 分後のオートラジオグラフィの頭部の拡大写真である。だ液腺、淋巴腺、頬腺、胸腺等の各腺組織に高度な取込みがみられた。また頭部から肩甲骨にかけての筋肉にも著明な放射能活性がみとめられたが、

いわゆる brown fat とよばれる部位には全く取込まれなかつた。これは佐藤ら (1965 a, b) のオートラジオグラフィによる体内分布実験の報告において、ビタミン B₁ 化合物やアミノ酸がこの部位に非常によく集まる例とは明らかな差異をみせている。

Fig. 3 は投与 20 分後のオートラジオグラフィの眼部の拡大写真である。眼球は投与後早期から高い放射能活性がみられ、特に、網膜、鞏膜、視束に相当する部位に著明である。またハーデル腺とよばれる部位にも長時間にわたつて高い放射能活性の貯留がみとめられた。

Fig. 4 は甲状腺のオートラジオグラフィ拡大写真である。投与後 10 分で明らかな取込みがみとめられた。その後幾分活性は低下したが 3 時間後においてもなお心血より高い放射能活性を有した。

Fig. 5 は脳下垂体のオートラジオグラフィ拡大写真である。この部位も他の腺装置と同様著明なアイソトープの取込みが観察され、筋肉や主要臓器から活性がほとんど消失してしまう 6 時間後においてもなお軽度ながら残存した。

Fig. 6 は投与 20 分後のオートラジオグラフィの副腎の拡大写真である。この部位の分布には特徴があり、早期から髄質に特に高い放射能活性がみとめられた。この傾向は投与直後から 3 時間後にいたるまで変わらず、皮質部の活性はつねにより低いままであつた。

Fig. 7 は投与 20 分後のオートラジオグラフィの肺の拡大写真である。今迄全身オートラジオグラフィを行い、写真濃度から放射能活性の分布を比較した場合に、肺の活性は心血のそれに非常によく一致することが多い。つまり、肺の活性が高い場合にはきまつて心血の活性も高く、血中濃度が低下すれば肺の活性も低くなる。したがつて、肺の活性はそのまま血中濃度を表すものとして解釈することが出来る様に思われる。しかしながら diethylcarbamazine 投与の場合には Fig. 1, Fig. 7 に明らかな様に投与後早期 (10 分) にかんがりの放射能活性が肺にみとめられたあと、経時的にみてどの時点のオートラジオグラフィにおいても常に心血より高い放射能活性を保持した。血液および体内の各部位からほとんど活性が消失してしまう 3 時間後にも軽度ながら明らかに活性がみとめられ、肺組織にこの薬物ないしはその代謝産物が親和性を有し、かつ比較的長く貯留することがわかつた。

Fig. 8 は胃部のオートラジオグラフィ拡大写真である。投与後 10 分 (Fig. 8a) の胃内容物に高い放射能活性がみとめられ胃内への分泌排泄のあることがうかがわれた。

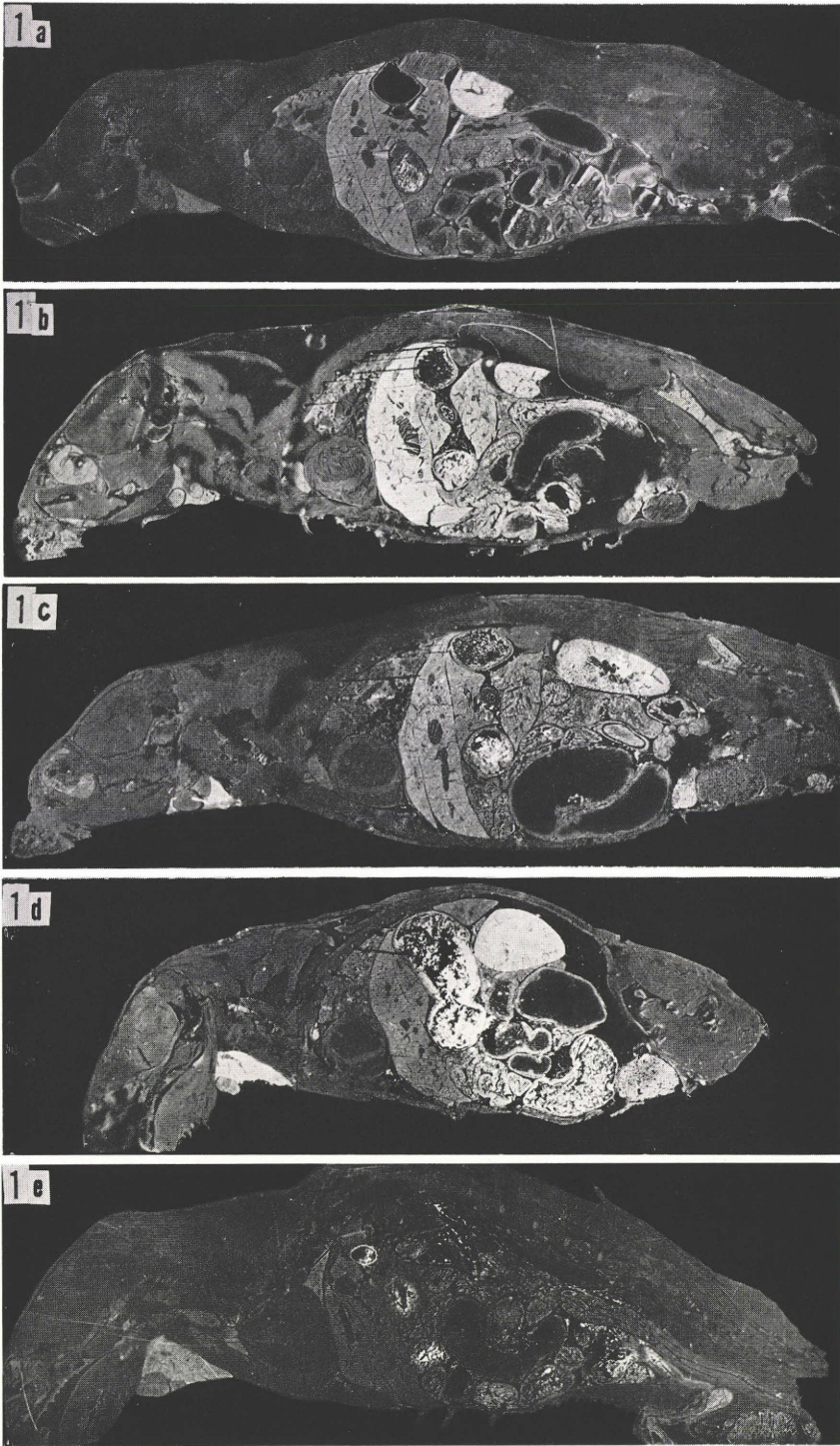


Fig. 1 Whole body autoradiograph showing the distribution of radioactivity at various times after the intraperitoneal injection of ^3H -diethylcarbamazine.

a : 10 min. b : 20 min. c : 40 min. d : 1 hr. e : 3 hrs.

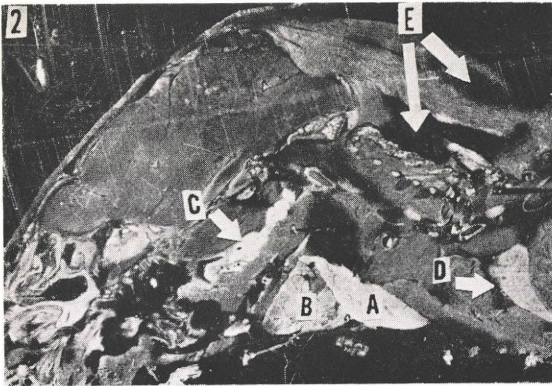


Fig. 2 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the glands of neck, 20 min. A : submaxillary gland, B : lymph node, C : buccal gland, D : thymus, E : brown fat.

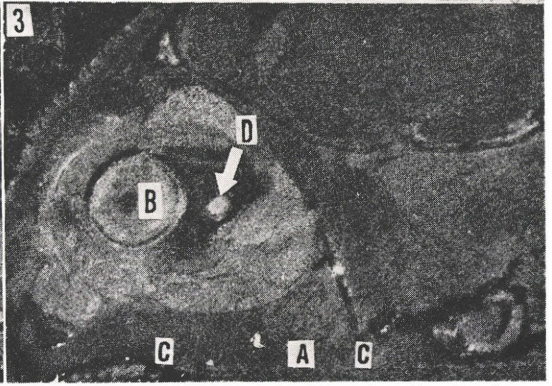


Fig. 3 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the eye, 20 min. A : harderian gland, B : eye, C : lymph node, D : bundles of fibers of the optic nerve.

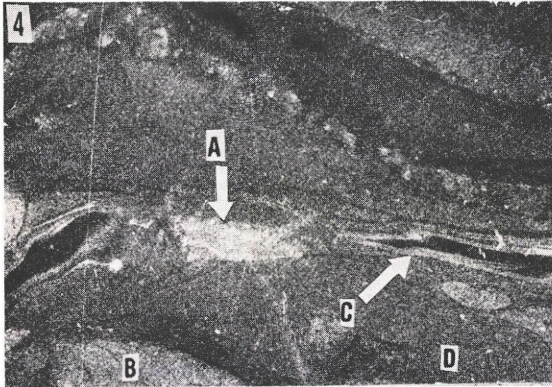


Fig. 4 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the thyroid, 10 min. A : thyroid, B : submaxillary gland, C : oesophagus, D : lymph node.

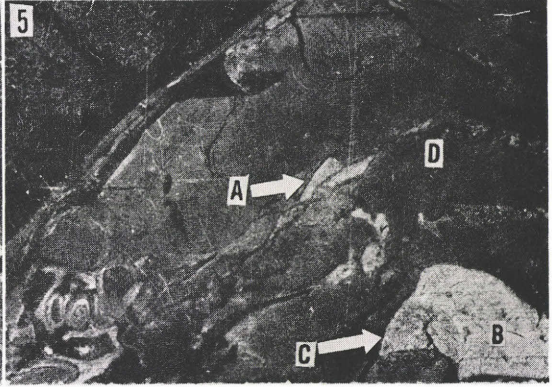


Fig. 5 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the hypophysis, 40 min. A : hypophysis, B : submaxillary gland, C : lymph node, D : diplöe

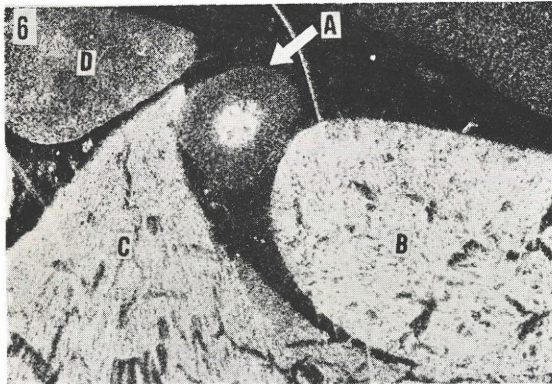


Fig. 6 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the adrenal, 20 min. A : adrenal gland, B : kidney, C : liver, D : spleen.

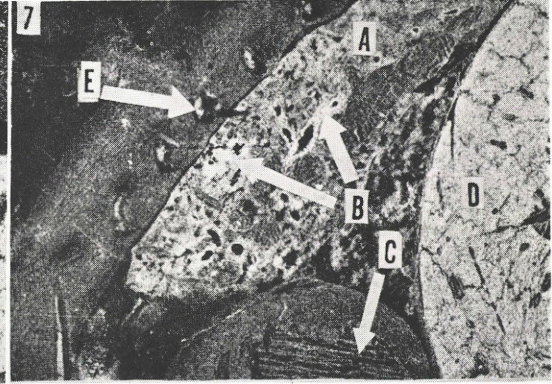


Fig. 7 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the lung, 20 min. A : lung, B : lymph nodule, C : heart blood, D : liver, E : costae.

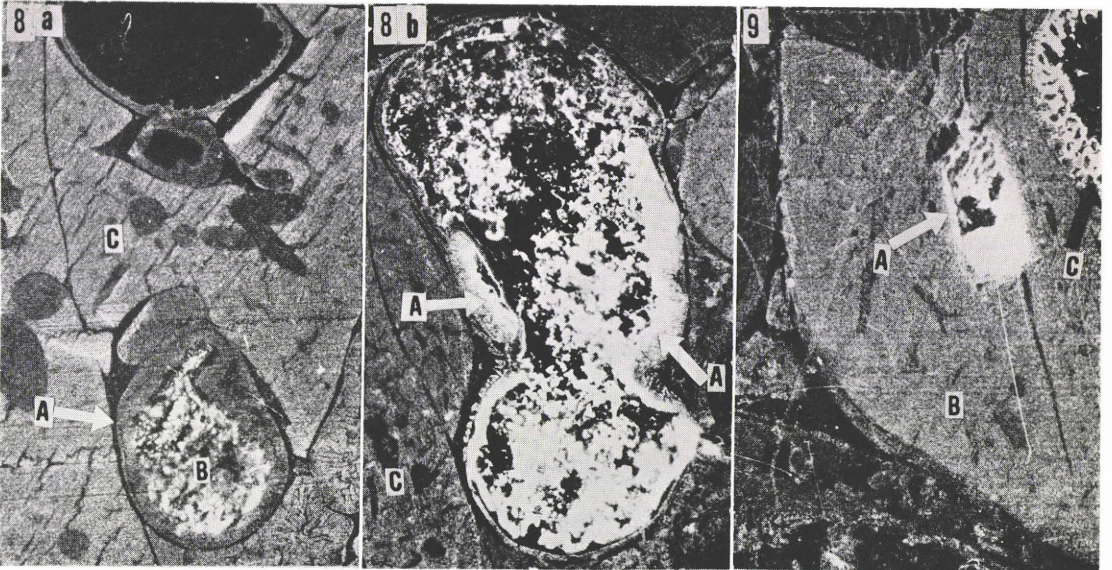


Fig.8 Autoradiograph showing the excretion of radioactivity into the stomach content, 10 min. (a) and 1 hr. (b). A : stomach mucosa, B : stomach content, C : liver.

Fig. 9 Autoradiograph showing the excretion of radioactivity into the bile, 1 hr. A : gall bladder, B : liver, C : intestine.

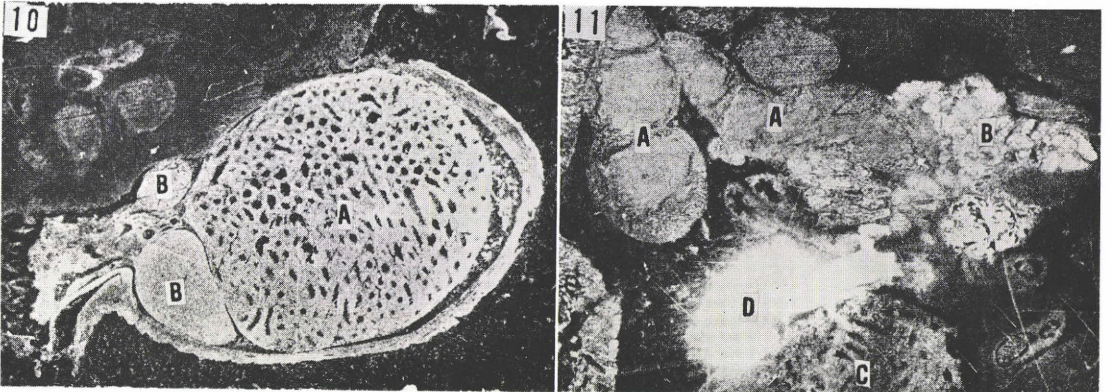


Fig. 10 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the male urogenital system, 10 min. A : testis, B : epididymis.

Fig.11 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in the male urogenital system, 40 min. A : seminal vesicle, B : coagulating gland, C : testis, D : bladder.

この場合、食道、および胃の噴門部の断面にはほとんど放射能活性がみられず、写真下方の幽門部の断面にだけ高い活性が存在した。更に1時間後の胃では (Fig. 8b) 胃内容物は高い放射能活性でみられたが、断面をよくみると胃底腺部の壁に限って顕著な活性がありその他の部位の壁にはみられないことから、これら胃底腺部位から分泌、排泄されることが推定される。これはHansson

et al. (1962) による ^{14}C -nicotine の胃内排泄のオートラジオグラフと非常によく似ていて、彼はこのことからマウスの胃では胃底部以外の場所は腺を欠いていることを指摘している。

Fig. 9 は胆嚢部を示すオートラジオグラフである。写真にみる様に胆嚢には顕著な放射能活性がみられ、この薬物の胆汁への排泄がうかがえる。

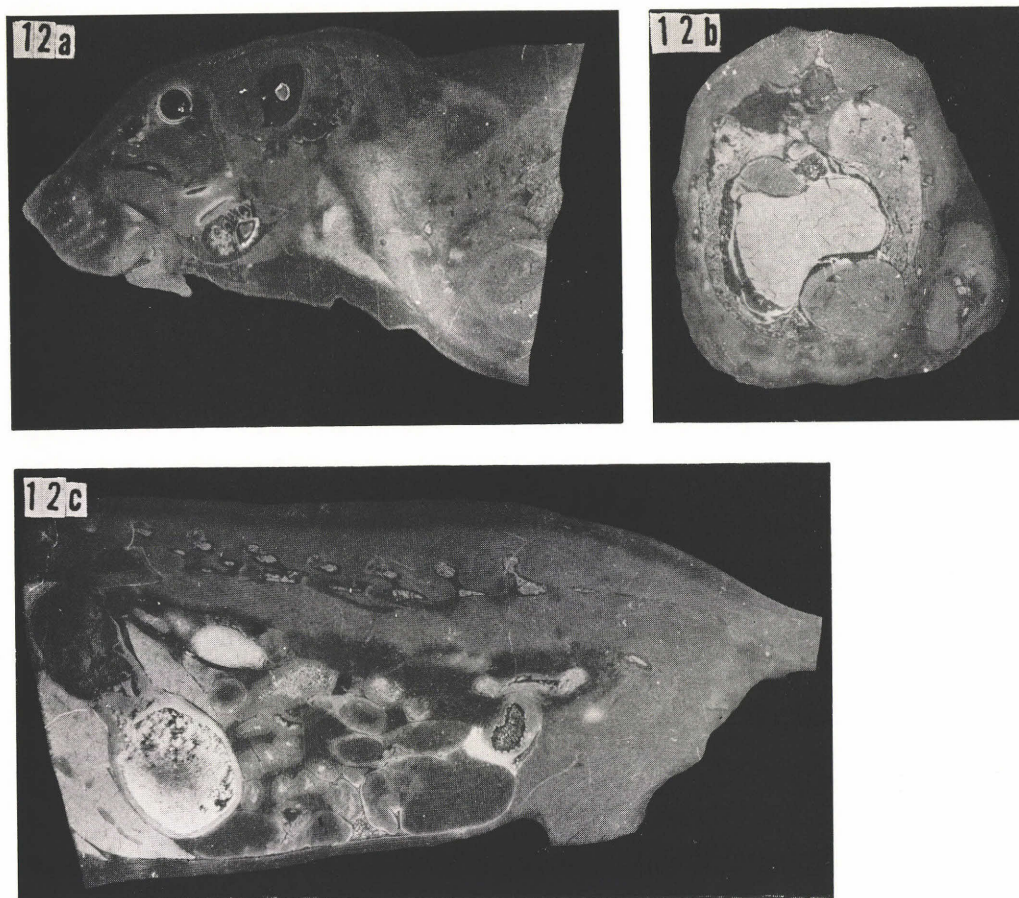


Fig. 12 Autoradiograph showing the distribution of radioactivity in cotton rat experimentally infected with *Litomosoides carinii*, 20 min. after the intraperitoneal injection of ^3H -diethylcarbamazine.
 a : sagittal section through the upper half. b : transverse section in thorax.
 c : sagittal section through the lower part.

Fig. 10, 11 は雄の生殖器のオートラジオグラフ拡大写真である。投与後早期からこの薬物は精巣、精巣上体に著明な放射能活性を示し、しかもかなり長時間貯留する。また Fig. 11 に示された様に貯精囊、前立腺部位にも高い放射能活性がみられ、その中でもいわゆる第三前立腺といわれている *coagulating gland* に相当すると思われる部位はきわだつて顕著なフィルムの黒変をみせた。これら生殖器の活性は他の組織からほとんど活性が消失している投与後 24 時間目においても、なお軽度ながら残存することがみとめられた。

次に Fig. 12 に *Litomosoides carinii* 感染コトナラットに ^3H -diethylcarbamazine を投与した場合のオー

トラジオグラフを示した。糸状虫症に関する基礎研究や化学療法実験はイネダニを中間宿主として感染させたコトナラットが用いられるので、今回の実験でも 1 例について全身オートラジオグラフィによる検討を試みた。コトナラットでは、骨、歯等の石灰化組織を含む全身の薄切はマウスの場合よりはるかに困難で薄切箇所が限られたこと、投与した放射エネルギーが低いことなどのために鮮明な写真が得られず、マウスの場合とほぼ同様の傾向を示すことを知り得たにとどまつた。なお diethylcarbamazine の糸状虫におよぼす効果として、佐藤 (1959, 1960) はコトナラットを用いた実験で、糸状虫成虫および血液中のマイクロフィラリアはこの薬物をいかに大量あたえても

短期間では十分な効果がみられず、投与総量が同じなら、少量ずつでも長期に分割してあたえる方が有効であること、その場合成虫の雌の生殖器に異状がみられ、卵巣に障害がおきていたことを報告している。

又、佐々ら (1959, 1960, 1963), 福島 (1963) の行なった糸状虫症患者に対する薬量と投与間隔をかえての効果比較実験では、投与総量が充分であればその投与方式にかかわらずどの方式を用いても効果があることを報告しているが、これは糸状虫が diethylcarbamazine またはその代謝物を体内に取込み、しかも蓄積することを示唆するものであると考えられる。そこで著者らは *in vivo* における ^3H -diethylcarbamazine の虫体への取込みをマイクロオートラジオグラフィによつて検討中である。

まとめ

糸状虫症の化学療法剤としてその効果がみとめられている diethylcarbamazine の ^3H 標識化合物を、マウスおよび感染コトナットの腹腔内に注射し、その体内分布を全身オートラジオグラフィを用いて検討したところ次の知見を得た。

1) マウスを用いた経時的なオートラジオグラフィによると、全身的な放射能活性は腹腔内注射後 20 分前後で最高に達するが 3 時間以後には急速に活性が消失し、24 時間後には体内にほとんど残つていなかった。

2) 筋肉、脳にかなりの取込みがみられ、特に脳は投与後 1 時間前後迄放射能活性が増加した。

3) 唾液腺、淋腺、甲状腺、脳下垂体その他各腺組織に高い放射能活性がみられ長時間持続した。

4) 副腎における放射能活性の分布に特徴があり、髓質に限つて高い取込みがみられた。

5) この化合物はかなりよく肺に取込まれ比較的長く貯留した。

6) この化合物は投与後まもなく胃腺部から胃に分泌排泄された。

7) 胆嚢に顕著な放射能活性がみられ、この薬物の胆汁への排泄があることが判つた。

8) この化合物またはその代謝物は生殖器 (雄) に非常によく取込まれ、しかもかなり長時間貯留した。特に coagulating gland に相当する部位の活性が著明であつた。

9) 眼部では網膜、鞏膜および hardierian gland とよばれる部位に放射能活性が高かつた。

10) *Litomosoides carinii* 感染コトナットについ

て全身オートラジオグラフィを求めたところ、マウスの場合とほぼ同様の傾向を示した。

稿を終るに臨み、感光材料の御恵与を賜つた小西六写真工業化学研究所、 ^3H -diethylcarbamazine の合成を願つた田辺製薬生物研究所大塚峯三氏および実験に協力された同研究所矢板橋真喜子氏、コトナット感染材料を提供された伝研寄生虫研究部酒井健夫氏らに深甚な謝意を表する。

文 献

- 1) Bangham, D. R. (1955): Metabolism and excretion of ^{14}C -labelled diethylcarbamazine. Brit. J. Pharmacol., 10, 397-405.
- 2) Bangham, D. R. (1955): The mode of action of diethylcarbamazine investigated with ^{14}C -labelled drug. Brit. J. Pharmacol., 10, 406-412.
- 3) 藤巻博教 (1956): 糸状虫症の化学療法に関する研究, 第 2 報. diethylcarbamazine の血中濃度と尿排泄について. 長崎大学医会誌, 31(11), 930-947.
- 4) 福島英雄 (1963): フィラリア症の治療とくに集団治療. 第 16 回日本医学会総会学術講演集 II. 803-810.
- 5) Hansson, E. and Schmitterlöw, C. G. (1962): Physiological disposition and biotransformation of ^{14}C -labelled nicotine. J. Pharmacol., 137, 91-102.
- 6) 石原忠雄 (1957): スパトニンの吸収排泄とその用法について. 動物用スパトニン文献集, 9-10.
- 7) 片峰大助 (1959): 糸状虫症の治療 III. 医学の動向第 23 集, 51-68. 金原出版社.
- 8) 水川孝・佐久間真理・佐藤善重 (1966): Autoradiography による点眼剤のとりこみに関する実験. 眼紀, 17 (11), 1047-1058.
- 9) 佐々学ほか 10 名 (1959): 奄美大島 4 部落における糸状虫症の集団駆虫法の比較研究. 寄生虫誌, 8, 872-879.
- 10) 佐々学ほか 13 名 (1959): 愛媛県下における糸状虫症の地域駆除に関する研究. 寄生虫誌, 8, 880-885.
- 11) Sasa, M., Hayashi, S. and Tanaka, H. (1960): Experimental studies on filariasis control in Japan. Indian J. Malariology, 14, 441-456.
- 12) Sasa, M. (1963): Pilot experiments in the control of bancroftian filariasis in Japan and Ryukyu. Bull. Wld. Hlth. Org., 28, 437-454.
- 13) 佐藤八郎 (1962): 糸状虫症の治療. 日本における寄生虫学の研究 (II), 101-113. 目黒寄生虫館.

- 14) 佐藤孝慈(1959): Cotton rat を用いた糸状虫症化学療法の実験的研究(I). スパトニン及びマファルゾールの流血中マイクロフィラリア数におよぼす影響. 寄生虫誌, 8 (6), 1-10.
- 15) 佐藤孝慈(1960): Cotton rat を用いた糸状虫症化学療法の実験的研究(2) スパトニン及びマファルゾールの成虫に及ぼす影響. 寄生虫誌, 9(1), 22-31.
- 16) 佐藤善重・佐久間真理・高橋忠男(1965 a): 放射性化合物の分布に関するオートラジオグラフィ的研究(I). ^{14}C -amino acid の生体内移行. Radioisotopes, 14(6), 498-503.
- 17) 佐藤善重・佐久間真理・高橋忠男(1965 b): 放射性化合物の分布に関するオートラジオグラフィ的研究(II). o-benzoylthiamine disulfide- ^{35}S およびビタミン B_1 - ^{35}S 投与後のマウス体内 ^{35}S の分布. ビタミン, 33 (2), 192-195.
- 18) 佐藤善重・佐久間真理・高橋忠男・吉川正美・織田敏次(1966 a): 放射性化合物の分布に関するオートラジオグラフィ的研究(III). ^3H -aminoproline の生体内消長. 日本薬理学誌, 62 (5), 297-306.
- 19) 佐藤善重・高橋忠男・佐久間真理(1966 b): 放射性化合物の分布に関するオートラジオグラフィ的研究(IV). ^{35}S -o-benzoylthiamine disulfide のマウス生体内分布. Radioisotopes, 15 (3), 118-126.
- 20) Ullberg, S. (1954): Studies on the distribution and fate of ^{35}S -labelled benzylpenicillin in the body. Acta Radiologica Suppl., 118, 22-31.

Abstract**STUDIES ON THE DISTRIBUTION OF TRITIUM LABELLED ANTIFILARIAL DRUG
³H-DIETHYLCARBAMAZINE BY WHOLE BODY AUTORADIOGRAPHY**

SADASHIGE SAKUMA, MARI SAKUMA, YOSHISHIGE SATO,

(Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Toda, Saitama, Japan)

MANABU SASA & JUNZO KOBAYASHI

*(Department of Parasitology, Institute for Infectious Diseases,
University of Tokyo, Tokyo, Japan)*

A series of studies were made on the distribution in various organs of diethylcarbamazine, a drug commonly used in the treatment of human filariasis, by whole body autoradiography of mice, and of a cotton rat infected with *Litomosoides carinii*. The compound was labelled with tritium and injected intraperitoneally into the experimental animals, and their whole body sections about 30 microns in thickness were prepared with a cold microtome at various intervals from 10 minutes to 24 hours after the injection. Whole body autoradiographic pictures were developed after the microtome sections were exposed to the films for about 5 months.

Diethylcarbamazine was found to be distributed rapidly to most organs after the intraperitoneal injection, and the radioactivity in the liver, kidney, adrenal gland, muscle and gastrointestinal tract reached to the highest density after about 20 minutes. The activity in most organs decreased rather rapidly thereafter and the specimen 6 hours after the injection showed only a faint radioactivity in the intestinal tract. As was reported previously by various authors with chemical methods, the drug was demonstrated to be rapidly excreted from the animal bodies.

The compound after introduced into the laboratory mice were found to be accumulated for certain periods especially in the muscle and in the brain, and an increase in the radioactivity was seen up to one hour in the brain. Specially high concentration was detected in glandular organs such as the salivary gland, adrenal gland, pituitary gland and lymph nodules. The radioactivity in the adrenal gland was highly concentrated but restricted to only the medulla.

The collection and retention of the drug in the lung was one of the most conspicuous among the organs. The compound was found to be accumulated and excreted from the kidney and from the glandular portion of the stomach wall, and also from the liver into the bile. An especially high concentration shown in the stomach wall has attracted our attention.

Similar results were obtained in whole body autoradiographic studies of the cotton rat infected with *Litomosoides carinii*, referring to the distribution of the drug into various organs of the host. Further micro-autoradiographic studies are in progress on the distribution of the drug in the parasites, where it has been shown that the radioactivity seems to occur only in the adults but not in the microfilariae, as will be reported in another paper by the authors.