

³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol のラット体内および 寄生肝吸虫体内における分布のマイクロオート ラジオグラフィー的研究

横川 宗雄 小山 博 誉 古 沢 明

千葉大学医学部寄生虫学教室

(1968年3月6日 受領)

はじめに

1,4-bis-trichloromethylbenzol は肝吸虫 (*Clonorchis sinensis*) に対して極めて特効的な効果が認められ、人肝吸虫症に対しても使用され、すぐれた治療成績が得られている。(Yokogawa *et al.*, 1965) しかし、本剤の作用機序に関しては不明な点が多く、また毒性に関しては二三報告があるが、本剤の体内における吸収排泄に関する研究はまだない。

本研究ではラット体内における本剤の血中および尿中濃度の推移、および臓器内分布の時間的推移を検討した。すなわち 1,4-bis-trichloromethylbenzol をラジオアイソトープ ³H で標識し、これをラットに経口投与し、2, 4, 6, 12, 24 時間、2, 3, 5, 7 日後における ³H 標識 1,4-bis-trichloromethylbenzol の血中・尿中濃度および脳、心、腎、肝、脾等の各臓器内分布を検討した。その結果本剤はきわめて速やかに血中、尿中より排泄されることが明らかとなり、また臓器内分布についても二三興味ある所見を得た。また、³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol を肝吸虫感染ラットに投与し本剤の肝吸虫体内における分布および作用機序についても少しく検討を加えた。

実験材料および実験方法

使用薬剤：1,4-bis-trichloromethylbenzol は純粋のものを使用した。本剤は Fig. 1 に示す如き構造式を有し、白色無臭で水には不溶性であるが、アセトン、エーテル、アルコール等の有機溶媒にはよく溶ける。本剤はドイツヘキスト社製で、人体用にはまだその使用は認められていないが、動物用駆虫薬として“Hetol”の名で市販さ

れている。本剤 400 mg を Wilzbach 法により (150 Ci-days)³H で標識した。得られた ³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol の精製は再結晶法により行ない遊離 ³H を除去した。精製法は次のように行なった。溶媒には再蒸溜した純メタノールを用い、再結晶操作を数回くり返し、得られた結晶を液体シンチレーションカウンターで測定し、その比放射能が安定したところで操作を打切った。通常この方法で比放射能が安定するのは3回の操作で充分であった。このようにして得られた精製標識試料を非標識試料とともに薄層クロマトグラフィーで展開し(溶媒；クロロホルム：メタノール=3：7、発色 I₂ ガス)、同一のスポットを得て夾雑物のないことを確認した。標識試料の放射能活性は 26 μ Ci/mg であった。

実験：実験動物は体重 100 g 前後のラット 9 匹(♀)を用い、それぞれのラットに ³H 標識本剤 10 mg (260 μ Ci) ずつを経口投与し、2, 4, 6, 12, 24 時間、2, 3, 5, 7 日後に 1 匹ずつ採血したのち剖検した。血中比放射能は各時期の血清 1 ml にトルエンシンチレーター 15 ml を加え液体シンチレーションカウンター(神戸工業：TEN, GSL 153)で測定した。尿中比放射能測定は各時期の尿 1 ml に活性炭を加えて脱色したのち、血中の場合と同様に行なった。また得られた数値は血清・尿ともにチャンネルレンオ法により補正換算した。(Table 1, Fig. 2)

各臓器内の ³H 分布はマイクロオートラジオグラフィー法によって検討した。すなわち脳、心、脾、肝、肺、腎、



Fig. 1 Chemical structure of 1,4-bis-trichloromethylbenzol

本研究の一部は千代田生命奨学金によってなされた。ここに記して謝意を表する。

Table 1 Net count of radioactivity of ³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol in serum of rat

After the administration	dpm/ml
2 hours	660,820
4	902,535
6	87,840
12	62,075
24	88,800
2 days	54,200
3	17,710
5	37,340
7	4,935

副腎、卵巣等の各臓器のパラフィン切片(厚さ4μ)を作製し、小西六写真工業のマイクロオートラジオグラフィ用乳剤 NR-M2 を用い Dipping 法によって標本を作製した。露出時間は 14 日間とし、現像はコニードール X で 5 分、定着はラピッドフィクサーで 4 分、水洗 20 分後、ただちにヘマトキシリンエオジン染色を施した。また、各臓器における ³H の分布密度を単位面積 (0.04 mm²) あたりのグレイン (銀粒子) 数を以て示した。すなわち染色標本を検鏡 (接眼×10, 対物×40) し、1/4 視野内のグレイン数を算えた。この場合、3 回の測定値の平均を以て示した。

³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol の肝吸虫体内取込みの検討は次の方法によった。すなわち肝吸虫感染ラット (感染後60日) 2 匹に対して本剤 10 mg (260μCi) を経口投与し、それぞれ 4 時間後および 4 日後に剖検し肝吸虫を摘出し、これを型どおりパラフィン包埋切片標本作製し、Dipping 法によるマイクロオートラジオグラフを作製し、³H の虫体内分布を検索した。

実験成績

1. 血中比放射能：血清中の比放射能値は Table 1, Fig. 2 に示したとおりで、投与後 2 時間で、すでに

Table 2 Distribution of ³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol in various organs of rat

After the administration	liver	kidney	heart muscle	spleen	lung	cerebrum	ovary	adrenals
2 hours	216	53	46	32	27	21		
4	119	59		63	15	79		110
6	162	69	55	142	15	64	24	30
12	169	102		73	16	33	31	21
24	186	150	62		18	75		59
2 days	111	64	48	110	9	45	14	43
5	81	26			36	35		
7	94	17		77	31	52		

The numbers in table: Grains counted/0.04 mm² of sectioned tissue.

660,820 dpm/ml を示し、4 時間後では 902,535 dpm/ml と最高値を示した。しかし 6 時間後には 87,840 dpm/ml に激減し、24 時間後にはほとんど消失した。

2. 尿中比放射能：尿中における ³H の推移は Fig. 2 に示したとおり 6 時間後に排泄の最高値を示したが、やはり 12 時間後にはかなり急激に減少してしまうことが明らかとなった。このことから 4~6 時間の間に排泄のピークがあるものと推定される。このことは後述の腎のマイクロオートラジオグラフィーによっても裏付けられた。

3. 臓器組織内における分布：各臓器内におけるグレイン密度の時間的推移は Table 2 に示した。

肝臓：投与後 2 時間後に、すでに Disse 腔にグレインが認められ (Photo 1), 中心静脈内にも濃密に分布がみられるが肝細胞内にはまだ認められない。2 時間後における単位面積あたりのグレイン数 (以下「グレイン数」と略) は 216 で最高値を示した。4 時間後には Disse 腔以外に、肝細胞内へも ³H のとりこみがみられた (Photo 2)。6 時間後になると Disse 腔にはグレインはほとんど認められず、肝細胞内に濃密に認められた (Photo 3)。

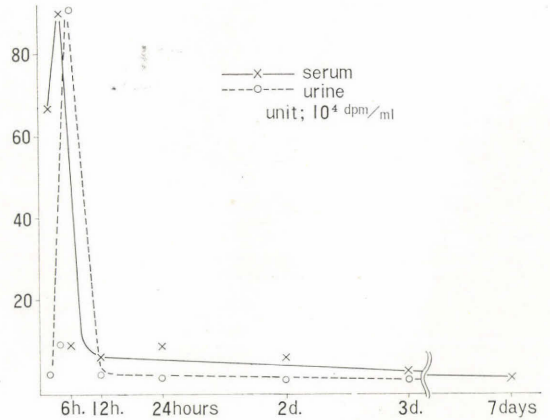


Fig. 2 Radioactivity of ³H-1,4-bis-trichloromethylbenzol in serum and urine of rat

肝臓内における ^3H 標識本剤のとりこみは投与後24時間以内はほぼ一定して高値を示し以後、次第に減少した。しかし、他の臓器と比較すると排泄がやや遅延するのが特徴的であった。

腎臓：2時間後ではグレインは血管腔内にわずかに認められるのみで（グレイン数53）組織内にはほとんど見られなかった（Photo 4）。しかし4時間後にはグレインはボーマン嚢および尿細管に濃密に出現した（Photo 5）。6時間後ではグレインは尿細管上皮細胞内にとりこまれるが、おそらくこれは ^3H が再吸収されたためと思われる（Photo 6）。腎におけるグレイン数の最高値は投与後24時間目で150であった。また腎では ^3H の貯溜は肝におけるほど長くはなく2日以後はほとんど排泄されてしまった。

心筋：心筋内の ^3H 標識本剤のとりこみは血中濃度の場合と同じ傾向を示し、まず2~4時間後に毛細血管内にグレインは現われるが、心筋細胞内にはほとんど見られず、この傾向は2日後までつづいた（Photo 7）。

脾臓：血中濃度と同傾向を示し、6時間後に分布は最高値142を示した。2~4時間では主としてマルピギー小体（脾小節）にグレインが集中しているが6~12時間になると分布は赤色髄に多くみられ、この傾向は2日後まで著明で以後は分布密度は急激に低下した。

肺臓：2時間後ではいずれの組織内へもとりこみはみられず、4時間後にはじめて結合織内への分布がわずかに認められ、この分布は2日後まで続くが5日目にはほとんど消失した。また全期間にわたって、肺胞・気管支等の上皮細胞にはとりこみはみられなかった。

大脳：2時間後には早くも血管壁に一致してグレインが認められるが実質内への分布は肺の場合と同じく全期間とも少なく、グレイン数の最高は4時間後の79であった（Photo 8）。

小脳：この場合も大脳と同様、実質内へのとりこみは少なく2時間後で顆粒層にわずかにグレインが認められ、4時間目には髄質内にもみられたが、いずれの場合もきわめて少数であった。5日、7日後ではほとんど消失した。

副腎：グレイン数の最高値は4時間後にみられ（110）、この時間では皮質、髄質に均等に認められたが12時間後では皮質の球状層に限局分布する傾向がみられた。

卵巣：卵巣には各時間とも ^3H の分布はほとんど認められなかった。

虫体内における分布： ^3H 標識本剤投与後4時間目の

虫体ではグレインは体内内には均等に分布し、腸管壁にもっとも濃密に分布していた。この時期ではまだ、睾丸、卵巣、受精嚢等の生殖器へのとりこみはほとんど認められず子宮内および虫卵内にも分布はみられなかった（Photo 9, 10）。4日後の虫体所見ではグレインは腸管壁にはほとんどみられず、体内内の分布も4時間後のそれにくらべて著しく粗であった。これに反して生殖器、特に睾丸の周囲に濃密な分布が認められた（Photo 12）。しかしこの時間においても子宮内および虫卵内へはとりこみが見られなかった（Photo 11）。

考 察

1,4-bis-trichloromethylbenzol の作用機序を解明するいとぐちをつかむ目的で本剤をラジオアイソトープ ^3H で標識し実験動物に投与し、体内における分布、動態を追跡してみた。

血中および尿中比放射能：本実験で、本剤の血中濃度は投与後、急激に上昇し、4時間後に最高値に達するが、以後は急激に下降し、24時間以内に血中からは消失することが明らかとなった。横川ら(1965a, 1966, 1967a)は本剤の肝吸虫症の治療実験で肝吸虫感染ラットでは1日量75~100 mg/kg を連続あるいは隔日に5回投与した場合、連日投与の方がはるかに良好な成績が得られたと報告したが今回の成績からも当然と考えられる。また小山(1967)は本剤の肝吸虫感染に対する予防効果について検討し、大量投与にもかかわらず全く効果のないことを報告しているが、本実験で、血中内貯溜時間が短いことからこの結果がうなずかれる。また小山は幼若期肝吸虫感染ラットに本剤を大量投与(800 mg/kg)したが全く無効であったと報告しているが、このことは本剤が成虫の生殖器に選択的に作用することとも関連し興味ある問題で、さらに幼虫体内への本剤のとりこみについても検討する必要がある。

尿中においては、本剤は血中よりやや遅れて排泄がはじまり、24時間後にはほとんど体外に排泄されることが明らかとなった。横川ら(1967b)の本剤の毒性試験で、ラットでは100 mg/kg 連続4週間投与でもほとんど病変はみられなかったと報告しているが、本剤の蓄積作用がほとんどないことが今回の実験でも証明されたわけである。

臓器組織内分布：本剤は大部分の臓器内では、その消長は、血中濃度と同じ動きを示したが、肝臓、腎臓の両

者においては、血中のそれと比較し、やや長く滞留し、排泄が、いく分他と比べて遅れていた。この傾向は肝において、特に著しかった。Lämmler (1964), Chung *et al.* (1965), Liu (1965), 横川ら (1967b) の毒性試験の結果は、本剤の大量投与による病変は特に肝臓、腎臓に著しいことを指摘しているが、本実験の結果と対比して興味深い。

肝吸虫体内分布：本剤は肝吸虫においては腸管より吸収された後、まず体肉内に平等に分布し、ついで、生殖器、特に辜丸、貯精囊の周囲に濃密に分布することが明らかにされた。このことは本剤が経口的に摂取されたことを示すもので重要な所見である。しかしながら本剤が、それら辜丸、貯精囊などの組織内への侵入の経路はほとんど明らかにされなかった。しかしながら横川ら (1965a), Chung *et al.* (1965), Cho *et al.* (1967) の報告によれば本剤の肝吸虫に対する作用は生殖器、特に辜丸、卵巢に対する特異的な障碍作用であるとしていることから考えて、おそらく本剤は生殖器の周囲に濃縮し、その結果、その被膜に障害を与えて正常な代謝機構を阻害するのではないかと想像される。

ま と め

1,4-bis-trichloromethylbenzol のラット体内および肝吸虫体内における動態を知るために、本剤を³Hで標識し、この動きをマイクロオートラジオグラフィを用いて、経時的に追求した。また、本剤の血中および尿中濃度は、投薬後、それぞれ2,4,6,12,24時間,2,3,5,7日後に液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。これらの結果は以下のとおりであった。

1. 本剤の血中濃度は4時間後に最高値を示し、以後は急激に減少し、24時間後ではほとんど血中には認められなかった。

2. 尿中への本剤排泄は、最高値が血中のそれよりやや遅れ、4~6時間後にみられ、血中におけると同様、24時間以内にほとんど排泄された。

3. 肝臓内への本剤のとりこみは、すでに2時間後に認められ、中心静脈からDisse腔を経過し胆汁とともに大部分は24時間以内に排泄された。

4. 腎では4時間頃よりボーマン囊に現われ、さらに6時間頃より尿細管中に排泄されるが一部は再吸収されることが明らかとなった。

5. 肝臓、腎臓以外の臓器への分布は、比較的少なく、

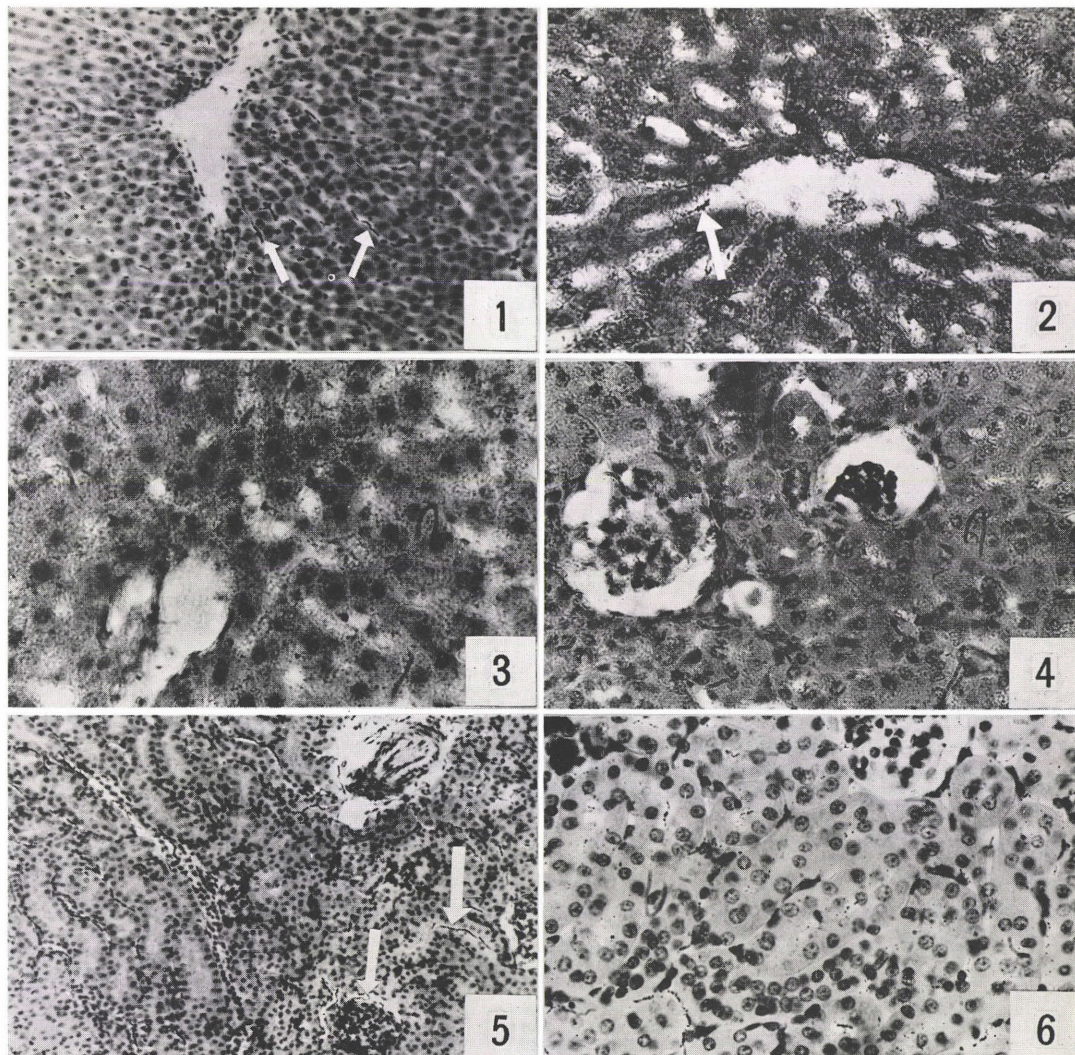
特に卵巢、肺への分布はほとんど認められなかった。

6. 肝吸虫体内への本剤のとりこみは、4時間後では腸管壁への濃厚な分布がみられ、また体肉内に一樣に分布が認められた。4日後では分布が生殖器、特に辜丸の周囲に濃密にみられたのが特徴的であった。

稿を終るに臨み種々技術上の御指導を賜わった、科学技術庁放射線医学総合研究所養成訓練部；飯田博美部長、白石義行、越島得三郎、青木一子、化学部；河村正一郎長の各先生方に深く感謝致します。また快よく試料を提供して頂いた日本ヘキスト社および感光材料を御恵与下さった小西六写真工業化学研究所に深謝致します。

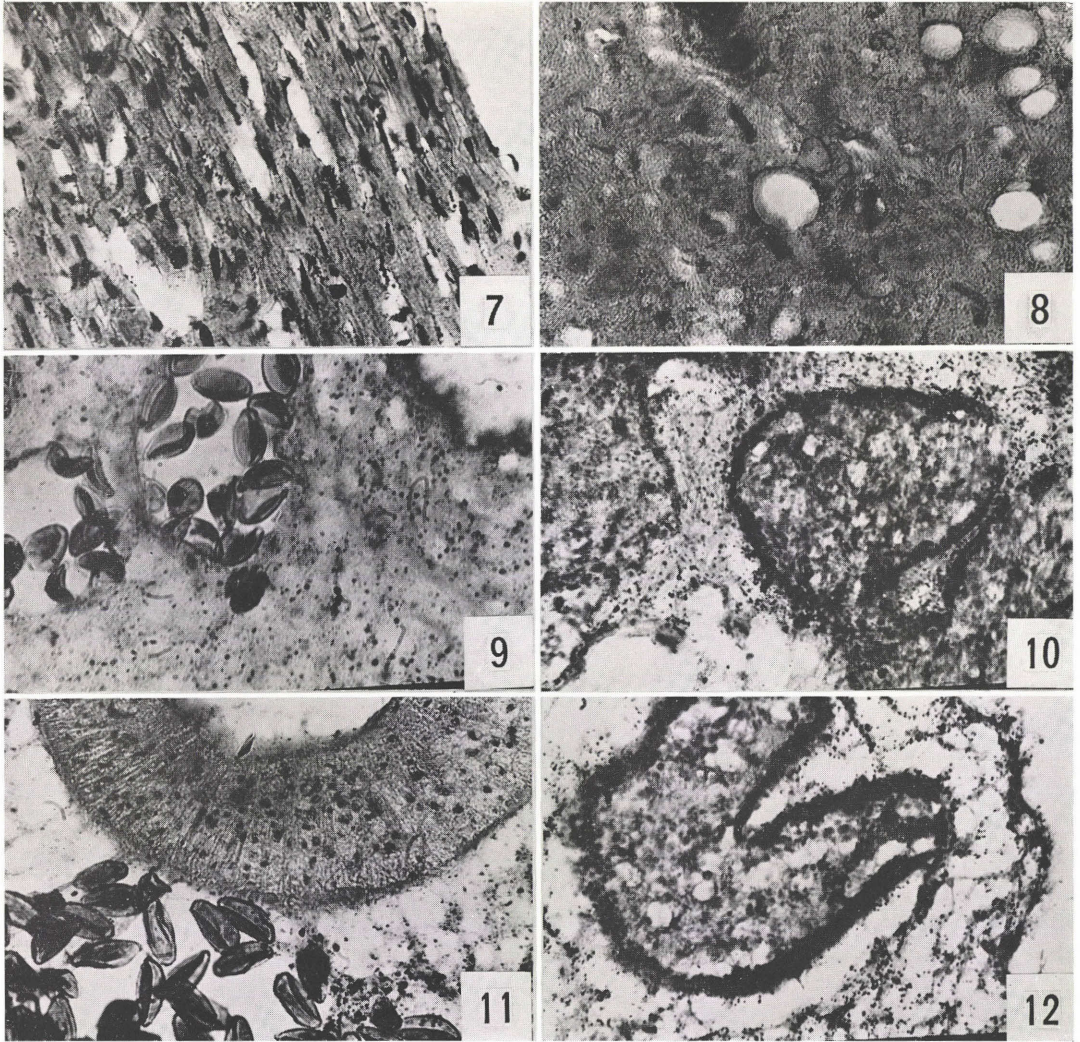
文 献

- 1) Cho, K. M., Kim, C. H., Ahn, Y. K. and Soh, C. T. (1966): Experimental studies of 1,4-bis-trichloromethylbenzol on the infection of *Clonorchis sinensis*. The Korean J. of Parasit., 4, 21-31.
- 2) Chung, H. L., Hsü, C. P., Ts'ao, W. C., K'o, H. Y., Kuo, C. H., Hsü, H. C., Li, P. S., Cheng, S., Chang, H. Y., Yuan, C. T. and Chang, Y. C. (1965): Hexachloroparaxyol in treatment of chonorchiasis sinensis in animal and man. Chinese Med. J., 84, 232-247.
- 3) 小山博誉 (1967): 肝吸虫症の実験的治療特に1,4-bis-trichloromethylbenzolの肝吸虫幼虫に対する効果について。寄生虫誌, 16, 344-368.
- 4) Lämmler, G. (1964): Die experimentelle Chemotherapie der Trematoden-Infektion und ihre Problematik. Zeit. Trop. Med. Parasit., 15, 96-123.
- 5) Liu, J., Wang, C. N., Tseng, F. G., Fan, K. C., Tu, C. C., Cheng, T. F., Sun, K. J., Chin, C. M., Chen, S. and Tu, S. F. (1965): Hexachloroparaxyol in the treatment of *Clonorchis sinensis*. Chinese Med. J., 84, 8-16.
- 6) 横川宗雄・小山博誉・吉村裕之・蔡昭雄(1965a): 肝吸虫症の実験的治療(1). 1,4-bis-trichloromethylbenzol (Hetol)の動物肝吸虫症に対する治療効果。寄生虫誌, 14, 233-242.
- 7) Yokogawa, M., Tsuji, M., Araki, K., Nomoto, T., Matsumoto, M., Koyama, M., Yoshida, R., Fukuchi, S., Hiratsuka, A. and Kitamura, M. (1965b) Chemotherapy of *Clonorchis sinensis*. II. Clinical observation on the treatment of clonorchiasis sinensis with 1,4-bis-trichloromethylbenzol. Jap. J. Parasit., 14, 526-533.
- 8) 横川宗雄・小山博誉・荒木国興・小島莊明・小津茂弘・会田忠次郎・荻野淑郎・津村大八(1967a): 肝



Explanation of Photos

- Photo 1. Liver of the rat (2 hours after administration) ($\times 100$)
Grains already accumulated in Disse's space (arrow shows grains).
- Photo 2. Liver (4 hours after administration) ($\times 400$)
Grains were mostly seen in Disse's space and a little in liver cells.
- Photo 3. Liver (6 hours after administration) ($\times 400$)
Grains show low level in Disse's space, but mostly seen in liver cells.
- Photo 4. Kidney (2 hours after administration) ($\times 400$)
Grains were hardly seen in the kidney.
- Photo 5. Kidney (4 hours after administration) ($\times 100$)
Grains were densely accumulated in Bowman's capsule and a little in uriniferous tubules.
- Photo 6. Kidney (6 hours after administration) ($\times 400$)
Grains were mostly taken into tubular epithels.



Explanation of Photos

- Photo 7. Heart (2 hours after administration) ($\times 400$)
Some of grains was seen in connective tissues of heart muscles.
- Photo 8. Cerebrum (2 hours after administration) ($\times 400$)
Grains were seen only in the capillary.
- Photo 9. Liver fluke, *Clonorchis sinensis*, removed from rat (4 hours after administration) ($\times 400$)
Grains were distributed in parenchym tissues evenly, but hardly seen in uterus or eggs.
- Photo 10. Liver fluke (4 hours after administration) ($\times 400$)
Testis was surrounded by grains.
- Photo 11. Liver fluke (4 days after administration) ($\times 400$)
Grains were not seen in uterus or eggs.
- Photo 12. Liver fluke (4 days after administration) ($\times 400$)
Though grains accumulated densely around the testis, no grains were seen inside of testis.

吸虫の治療. Hetol による肝吸虫症集団治療の遠隔成績(II), 第36回日本寄生虫学会総会記事, 21.

9) 横川宗雄・吉村裕之・小山博誉・古沢 明・吉田哲

夫 (1967 b): Hetol の毒性試験. 第36回日本寄生虫学会総会記事, 21.

Abstract

MICROAUTORADIOGRAPHIC STUDY ON UPTAKE OF ^3H -1,4-BIS-TRICHLORO-METHYLBENZOL INTO LIVER FLUKE, *CLONORCHIS SINENSIS*, AND ITS HOSTS

MUNEO YOKOGAWA, HIROTAKA KOYAMA AND AKIRA FURUSAWA

(Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan.)

For the purpose of obtaining knowledge on the uptake of 1,4-bis-trichloromethylbenzol in the host body and the parasite, the drug labeled with ^3H was orally given in 9 normal rats and 2 infected rats with *Clonorchis sinensis* and its uptake was pursued with microautoradiography 2, 4, 6, 12, 24 hours, 2, 3, 5 and 7 days after administration.

The results obtained are as follows;

1. The drug showed the highest concentration in blood 4 hours after administration, thereafter the drug in blood decreased rapidly and was hardly recognized when examined 24 hours after administration.

2. In urine the drug showed the highest concentration during 4 to 6 hours after administration. However, the drug in urine, as well as that in blood, was almost completely excreted within 24 hours.

3. The uptake of the drug into the liver was noted 2 hours after administration and the drug was excreted out through Disse's space together with bile.

4. The uptake of the drug into the kidney was seen in Bowman's capsulae 4 hours after, further in urine canal 6 hours after administration. Then, some of the drug was absorbed again through urine canal epithelium.

5. The uptake into other internal organs was less when compared with that in liver and kidney. And the uptake of the drug into the ovary or the lung was hardly recognized.

6. In regard to the uptake of the drug into the liver fluke, *Clonorchis sinensis*, parasitized in the liver of rat, the drug was found densely in the wall of intestine and in body muscle it was evenly distributed when examined 4 hours after the administration. Four days after the administration dense distribution was found in reproductive organs, particularly in testis.