

《原 著》

β-Glycyrrhetic acid のマウスにおける吸収・排泄 ならびに生体内分布に関する研究

三 宅 輝 明* 浅 野 喜 代 子** 齊 藤 勝**
吉 田 充 輝*** 志 村 憲 助***

甘草の主成分である Glycyrrhizin およびその aglycon である Glycyrrhetic acid は、抗炎症作用、その他種々の薬理作用を有しているが^{1)~7)}、その作用機序や生体内代謝に関しては未だ充分明らかにされていない。生体への吸収・排泄ならびに体内分布の解明はこれら作用機序を検討する上にも、大きな意味を有すると考えられる。

このため我々は Tritium (³H) による標識 Glycyrrhetic acid を調製し、マウスにおける吸収・排泄ならびに体内分布に関する実験を行った。

I. 実験方法

1) ³H-β-Glycyrrhetic acid の調製および精製
β-Glycyrrhetic acid (ミノファージェン製薬製・特級) 250 mg を Wilzbach 法⁸⁾により Tritium gas と接触させて Tritium 化を行った。³H-β-Glycyrrhetic acid の一部の Tritium は不安定であるため、次の方法で精製した。すなわち、³H-β-Glycyrrhetic acid 60 mg に水 0.2 ml, メタノール性苛性カリ (2.5% 苛性カリ W/V メタノール) 5.4 ml を加えて室温に 24 時間放置して交換性の水素を十分に離脱させた後、2 規定塩酸 10 ml を

加えて ³H-β-Glycyrrhetic acid を沈殿させた。沈殿を遠心分離して集め、同様な方法を反復して不安定 Tritium を除去した。さらに、クロロホルム—酢酸—水 (2:1:1) を展開剤として β-Glycyrrhetic acid と共にペーパークロマトグラフィーを行い、β-Glycyrrhetic acid と同じ R_f を示す紫外線蛍光部を切り取りクロロホルムで抽出精製した。クロロホルムを除去して得られた ³H-β-Glycyrrhetic acid の比放射能は 169 μCi/mg (80 μCi/μmole) であった。

2) 実験動物及び検体投与法

実験 I: ICR 雄マウス、体重 22~25 g のものを断食せずに使用し、3 匹を 1 群とした。³H-β-Glycyrrhetic acid のナトリウム塩 10% をエタノール中に 1% (W/V) の濃度になるように溶解し、溶液の pH を 1 規定苛性ソーダで約 8.0 に調整した。同様に調製した 1% β-Glycyrrhetic acid のナトリウム塩溶液を混和して動物個体当たり 5.4 μCi/0.1 ml を尾静脈注射した。

実験 II: DDY 雄マウス、体重 22~32 g のものを断食せずに使用した。検体投与法は実験 I と同様である。

実験 III: DDY 雄マウス、体重 34 g のものを断食せずに使用し、実験 I と同じく ³H-β-Glycyrrhetic acid のナトリウム塩および β-Glycyrrhetic acid のナトリウム塩の 10% アルコール混合溶液を動物個体当たり 72 μCi/0.8 ml を尾静脈注射した。

* ミノファージェン製薬本舗研究部

** 福島県立医科大学 RI 研究室

*** 東北大学農学部農芸化学科生物化学研究室

受付: 51 年 1 月 19 日

採用: 51 年 3 月 22 日

別刷請求先: 神奈川県座間市小松原 2-5233 (〒228)

ミノファージェン製薬本舗研究部

三 宅 輝 明

3) 各臓器および排泄物の放射能測定

実験 I: ^3H - β -Glycyrrhetic acid 投与 30 分, 2, 6, 12 時間後にマウスをエーテルで麻酔し, 直ちに開腹して直腸より糞を採取した. ついで門脈より生理食塩水で肝臓灌流を行ない脱血した後, 肝臓; 肺臓; 腎臓; 副腎; 脾臓; 心臓; 脳; 睪丸の各臓器を採取した.

各臓器は重量測定後, その 10 倍量の 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えてホモゲナイザーで磨砕した. 磨砕液の 0.2 ml に 6 規定苛性カリ 0.2 ml, 水 0.2 ml を加え, 70°C , 1 時間加水分解後, 川上らの方法⁹⁾に従って NT-シンチレーター (ニッサンノニオン 300 ml; トルエン 700 ml; PPO 4 g) 14 ml を加えて液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した. 血液は, 生理食塩水 0.2 ml に加えて全量を 1.0 ml とした後, その 0.1 ml を採取し臓器の場合と同様, 加水分解後 30% 過酸化水素 0.1 ml で脱色し, NT-シンチレーター 14 ml を加えて放射能を測定した. 尿は, その 0.1 ml に 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えて全量を 1.0 ml とし, その 1.0 ml を, また糞は乾燥後 50% エタノールを加えて磨砕抽出し, 50% エタノールで全量を 1.0 ml とした後, 2,500 r.p.m., 10 分間遠心分離した後, 上清 0.1 ml を採取して各々の放射能を測定した.

実験 II: ^3H - β -Glycyrrhetic acid 投与 10, 30 分, 1, 6, 12, 18, 24 時間後にマウスをエーテルで麻酔し, アセトン・ドライアイス混液 (-70°C) 中で急速凍結した. 約 1 時間後, マウスの正中腺に沿って半分に切断し, その右半分を C.M.C. (carboxymethyl cellulose) で固定し, 凍結マウスを全身オートラジオグラフィ用マイクローム (ブライト社製クリオスタット, -30°C) で厚さ 40μ の全身切片を作製¹⁰⁾し, -20°C で約 10 日間放置して乾燥切片標本とした. この乾燥切片標本より動物 1 個体につき 3 枚の全身切片を選び, 肝臓; 肺臓; 心臓; 脳; 各臓器を切り取り, 重量測定後, オキシダイザー (Aloka 自動試料燃焼装置 ASC-111) を使用して完全燃焼させ, Tritium を水 ($^3\text{H}_2\text{O}$) として回収した. さらに動物 1 個体につき 3 枚の

全身切片を同様に燃焼させ, Tritium を水として回収し, 回収した水は NT-シンチレーターを加えて放射能を測定した.

実験 III: ^3H - β -Glycyrrhetic acid 投与 30 分後, 実験 II と同じ方法で凍結標本作製し, 標本をカセット (医用 X 線フィルム) 内でマクロオートラジオグラムフィルム (サクラ・マクロラジオグラム用フィルム, トリチウムタイプ) に密着状態を保ちながら, 47 日間露出させた後, 現像した¹⁰⁾. 臓器の同定¹¹⁾はオートラジオグラムと対応する標本の写真と対比して行った.

II. 実験結果

実験 I: 1% ^3H - β -Glycyrrhetic acid のナトリウム塩-10% アルコール溶液 0.1 ml をマウスに静注し, 30 分, 2, 6, 12 時間後に各臓器および排泄物の放射能を測定した結果を Fig. 1 (a)~(k) に示した. 図の横軸は注射後の時間, 縦軸は各臓器 100 mg (湿); 血液・尿の場合は 0.1 ml 当りの c.p.m. で表示した.

静注した ^3H - β -Glycyrrhetic acid の各臓器内吸収は速く, 30 分後には採取した各臓器総てに放射能が認められるが, 最も吸収量の多い臓器は肝臓であった. Table 1 に肝臓を 100 とした場合の各臓器の放射能の相対的な値を示した.

一方, 肝臓よりの放射能の消失も比較的速く, 注射 2 時間後は 30 分後の値の約 1/2; 12 時間後には約 1/5 に減少した. 肺臓; 腎臓; 心臓共に c.p.m./100 mg 値は時間経過と共に肝臓同様減少し, 代謝の速いことを示している. 脾臓; 脳は上記の各臓器と違い, 注射 2 時間後は 30 分後の値の約 1/2 に減少するが, それ以後の減少速度は非常に緩慢となる. 睪丸は他の臓器に比べて ^3H - β -Glycyrrhetic acid 吸収量は非常に少ないが, 注射 12 時間後でも未だ注射 30 分後の約 80% の値を示し, 代謝の非常に遅い特徴を示している. 血液中の放射能比は, 注射 2 時間後で 30 分後の約 2/3; 6 時間以後は約 1/5 値に減少した. 尿の場合は, 注射 2 時間後で 30 分後の約 1/7 値を示したが, 6 時間後には約 1/3 値に再び上昇した. これは腎臓の放

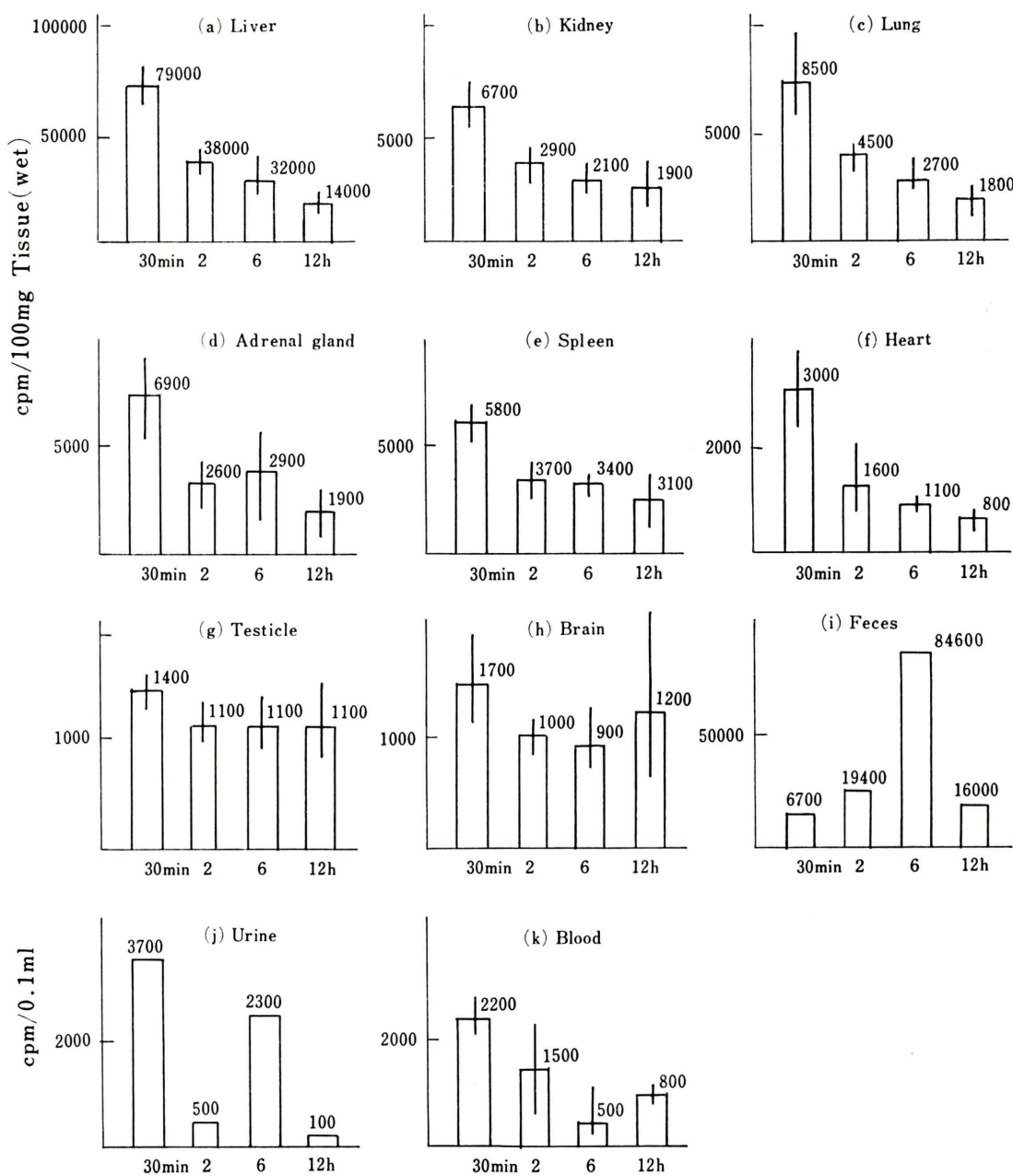


Fig. 1 Distribution of radioactivity in each organ and excrement after an i.v. injection of ^3H - β -Glycyrrhetic acid. (Experiment I)

Table 1 Relative value of radioactivity in each organ at 30 minutes after an i. v. injection of ^3H - β -Glycyrrhetic acid.

| Liver | Lung | Kidney | Adrenal gland | Spleen | Heart | Brain | Testicle |
|-------|------|--------|---------------|--------|-------|-------|----------|
| 100.0 | 10.8 | 8.5 | 8.7 | 7.0 | 3.8 | 2.1 | 1.8 |

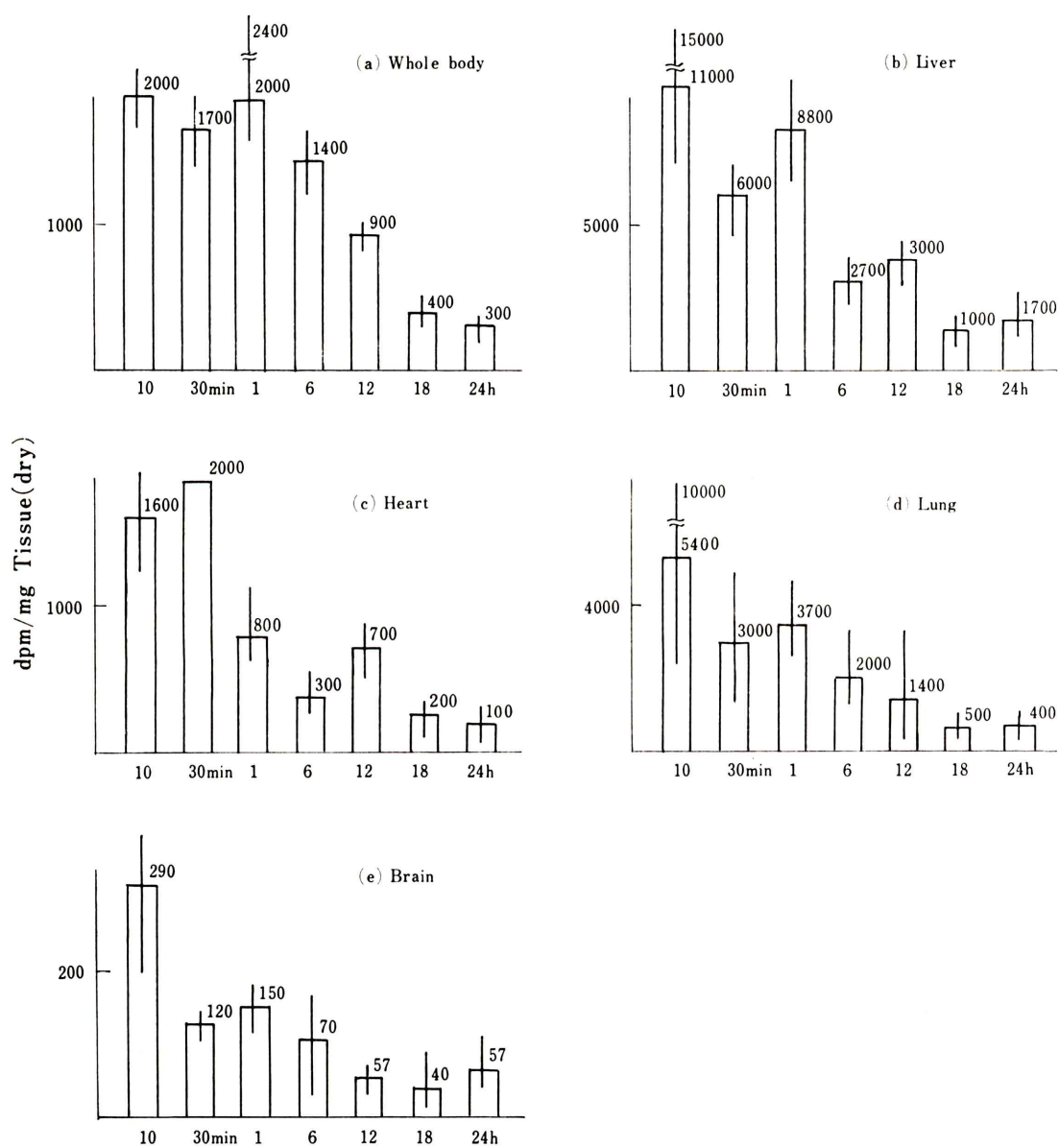


Fig. 2 Distribution of radioactivity in each organ and excrement after an i.v. injection of ^3H - β -Glycyrrhetic acid. (Experiment II)

射能の減少傾向と一致せず、尿量の多寡が関係すると思われる。12時間後には殆んど検出されなかった。糞の放射能は注射後、時間と共に増加し、6時間後に最高値に達し、その値は肝臓の注射30分後の値に匹敵する。12時間後には2時間後の値近く迄減少した。

実験 II: 実験 I 同様、 ^3H - β -Glycyrrhetic acid を投与し、10, 30 分, 1, 6, 12, 18, 24 時間後の各臓器の放射能を測定した結果を Fig. 2 (a)~(e) に示す。図の横軸は注射後の時間、縦軸は各臓器の乾燥切片 1 mg 当りの d.p.m. で表示した。

Fig. 2 (a) に見られるように、全身の放射能は静注後1時間までは変化なく、その後、時間経過と共に減少し、24時間後で約 1/7 となった。静注した ^3H - β -Glycyrrhetic acid の各臓器内吸収は非常に速く、又採取した臓器中では実験 I と同じく肝臓が最も高放射能値を示した (Table 2)。

肝臓よりの排泄も速く、注射30分後の値は10分後の約 1/2 を示すが、1時間後に再上昇し、後

Table 2 Relative value of radioactivity in each organ at 10 minutes after an i.v. injection of ^3H - β -Glycyrrhetic acid

| Liver | Lung | Heart | Brain |
|-------|------|-------|-------|
| 100.0 | 49.1 | 14.2 | 2.6 |

は時間経過と共に減少した。肺臓は注射30分後には10分後の約 1/2 値を示し、1時間以後は実験 I と同様、時間と共に減少した。心臓の場合は血液貯溜の影響を強く受けるためか、注射30分後の値は10分後よりやや上昇し、1時間後は10分後の約 1/2 値を示し、12時間後にわずかに上昇するが、その後は時間と共に減少した。脳の放射能は、注射30分後には10分後の約 1/2 値を示し、6時間以後は約 1/4 値で24時間を経ても大きな変動はなく、実験 I と類似する。

実験 III: 1% ^3H - β -Glycyrrhetic acid のナトリウム塩 - 10% アルコール溶液 0.8 ml をマウスに静注、30分後の全身オートラジオグラムおよび対

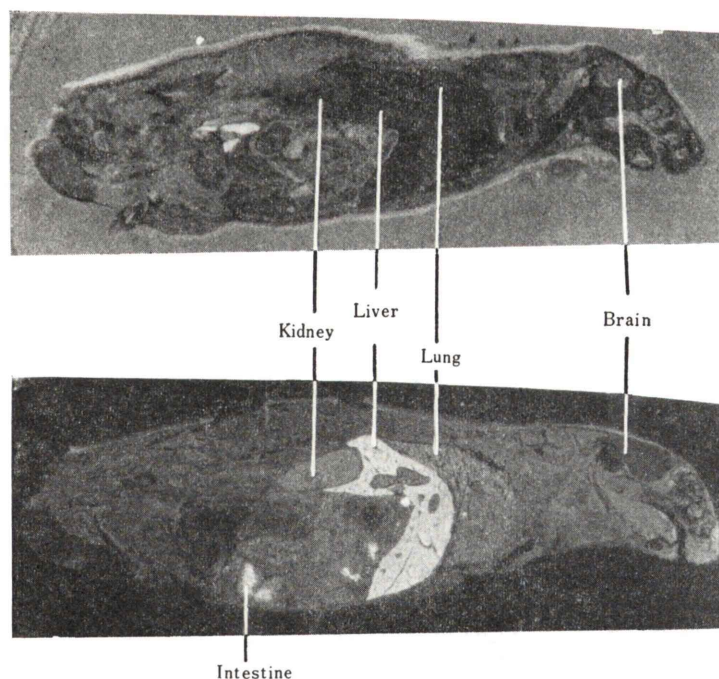


Fig. 3 Autoradiogram showing the distribution of radioactivity in mice at 30 minutes after an i.v. injection of ^3H - β -Glycyrrhetic acid. (Experiment III)

応する全身切片の写真を Fig. 3 に示す。

オートラジオグラム上では肝臓全体に高い放射能蓄積像が示され、又胆嚢位置に限局的に高い放射能蓄積が認められた。腸管にも一部やや高い蓄積が見られ、特に直腸部の蓄積像は糞によるものと思われる。肺臓、腎臓及び心臓は肝臓全体に比べて放射能蓄積は一様に低いものであった。脳への蓄積は全く認められなかった。

III. 実験考察

^3H - β -Glycyrrhetic acid をマウスに血中投与した場合の各臓器への吸収・排泄ならびに生体内分布を調べるため、各臓器の放射能をアルカリ加水分解法によって測定したが、放射能測定時、問題となる各臓器中の成分による quenching の大きさの差を消去する目的で燃焼法を併用した。しかし、両測定法の測定値の時間経過による変動は同傾向を示した。即ち、マウス血中に投与された ^3H - β -Glycyrrhetic acid は非常に速く各臓器に吸収され、その最も吸収量の多いのは肝臓で、少ないのは脳；辜丸であった。

最も高い放射能を示した時の放射能値を 100 とした場合の時間経過による変動を Fig. 4 に示した。図の横軸は注射後の時間、縦軸は上記による比を示す。

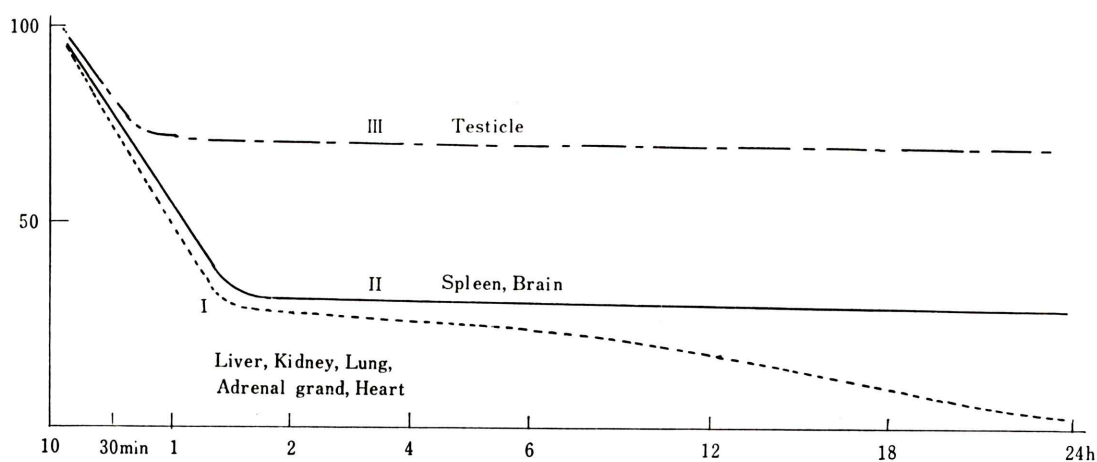


Fig. 4 Classification of excretory curves in each organ after an i.v. injection of ^3H - β -Glycyrrhetic acid.

Fig. 4 に明らかなように各臓器よりの排泄には次の3型があり、第I型は大部分の臓器に見られ、排泄は比較的速く、投与1時間後には10分後の値の約1/2、2時間後は1/4、18時間以後は1/10量に減少する傾向のものである。第II型は脾臓；脳の場合で、投与2時間後迄は第I型と同様であるが、それ以後の減少は非常に緩慢となる。第III型を示すものは辜丸である。投与30分以後は殆んど大きな変化は見られない。第II；第III型を示す臓器では吸収量は少なくとも連続投与する場合、その蓄積の可能性がある。

肝臓よりの排泄は、全身オートラジオグラムで腸内に強い放射能が観察される事実から、胆汁と共に十二指腸へ分泌され糞として体外へ排泄されるものと考えられる。体外排泄は、早期には尿及び糞は同じ程度の放射能値を有するが、尿は時間と共に減少し、それに反して糞は増加し、最高値を示す6時間後の値は肝臓30分後の値に類似する程である。

以上のような結果から、 β -Glycyrrhetic acid は大部分の臓器では比較的速く代謝され、主として肝臓より胆汁と共に腸へ分泌されて糞として排泄される経路をとるものと推測される。

D. V. Parke等¹²⁾ によるラットへの経口投与実験においても同様の結果が得られている。

最後にこの実験に多大の御援助を頂いた、福島県立医科大学病理学教室小島 瑞教授，ならびにミノファージェン製薬本舗研究部森威夫部長に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Finney, R.S.H., Somers, G.F.: The anti-inflammatory activity of Glycyrrhetic acid and derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, **10**: 613-620, 1958
- 2) Kraus SD: Glycyrrhetic acid—a Triterpene with antiestrogenic and antiinflammatory activity. *ibid* **12**: 300-306, 1960
- 3) 進藤宙二, 芳賀邦夫: グリチルリチンの破傷風毒素・抗毒素中和作用に及ぼす影響. *アレルギー* **2**: 332-337, 1954
- 4) 畔柳武雄: Prednisolone 及び Glycyrrhizin の実験的アレルギー性脳脊髄炎の Passive Transfer に及ぼす影響. *アレルギー* **15**: 67-74, 1966
- 5) Kumagaya, A.: Mechanism of serum cholesterol-lowering action of an anabolic steroid in contrast to a glucocorticoid. *Endocrinol. Japan.*, **13** (1): 46-58, 1966
- 6) Shibata, N.: Effect of Glycyrrhizin on experimental atherosclerosis in rabbits, especially its antihypercholesterolemic action. *Med. J. Osaka Univ.*, **12**: 297-313, 1962
- 7) Doll, R., Hill, D.I., et al.: Clinical trial of a triterpenoid liquorice compound in gastric and duodenal ulcer. *Lancet*, **2**: 793-796, 1962
- 8) Wilzbach, K.E.: Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 1013, 1957
- 9) 川上 実, 志村憲助: 液体シンチレーション計測のための新しいシンチレーター及び試料調製法. *Radioisotopes* **23**: 81-87, 1974
- 10) 松岡 理, 鹿島正俊: 凍結マクロオートラジオグラフィ法とその応用. *Radioisotopes* **15**: 195-207, 1966
- 11) 松岡 理, 鹿島正俊: 凍結全身マクロオートラジオグラフィの読み方. *ibid* **16**: 634-643, 1967
- 12) Parke, D.V., Pollock, S., et al.: The fate of tritium-labelled β -Glycyrrhetic acid in the rat. *J. Pharm. Pharmacol* **15**: 500-506, 1963

Summary

Studies on the Absorption, Excretion and Distribution of β -Glycyrrhetic Acid in the Mouse

Teruaki MIYAKE

Minophagen Pharmaceutical Co., Research Laboratory

Kiyoko ASANO, Masaru SAITO

Fukushima Medical College, R.I. Research Laboratory

Mitsuteru YOSHIDA, Kensuke SHIMURA

Tohoku University, the Agricultural Department, Biochemical Research Laboratory

^3H -labeled Glycyrrhetic acid was prepared and injected intravenously in mice. The radioactivity of a certain amount of urine, feces, blood and each organ taken at various time intervals up to 12 hours after the injection was measured by liquid scintillation counter. The radioactivity of whole body and each organ was also measured by oxidizing method with use of whole body frozen sections prepared at various time intervals up to 24 hours after the injection. At the same time the body distribution was investigated by means of whole body autoradiography.

The results indicated a very rapid absorption of ^3H -Glycyrrhetic acid. The most uptake was seen in the liver and less in the lung, kidney, spleen, heart and so on. The excretion was also comparatively rapid. Although the decreasing tendency of radioactivity was different in each organ, the organ of great uptake showed a rapid decrease.

From the study of whole body autoradiography ^3H -Glycyrrhetic acid is likely suggested to be absorbed mostly in the liver, secreted in bile to the intestine and excreted in feces out of the body.

鳥塚莞爾委員長が欠席のため書面により中間報告と提案が行なわれた。しかし、委員会の構成が未だ決まっていないため、委員を決定することが先決であるとの議論がなされた結果、理事長・委員長で相談の上委員候補を推薦することになった。

3. 名誉会員検討委員会

安河内浩委員長より中間報告がなされた。

名誉会員選出方法について、アンケートにより評議員の意見をききたいとの委員長提案について、議論がなされ委員長に一任することになった。

V. その他

1. 会計担当理事の交代

算理事長より、鎮目会計担当理事から辞意が表明されていること、および後任に有水理事を推薦したいとの発言がなされ、全会一致で承任された。有水理事は就任を受諾した。

2. 幹事推薦

算理事長より、会務の運営を円滑にするた

め会則に従って幹事を選出したいとの提案がなされた。

幹事の役割、業務等について質疑応答が行なわれた後、関東地方在住者8人が承認された。

内山暁、開原成允、佐々木康人、志田寿夫、館野之男、町田喜久雄、山崎統四郎、山田英夫 (アイウエオ順 敬称略)

3. 核医学会 Abbott 賞, Mallinckrodt 賞発表
算理事長より、本年度 Abbott 賞に、森田陸司氏(京大)、井沢豊春氏(東北大)、Mallinckrodt 賞に館野之男氏(放医研)が選出されたむね報告された。

両賞の応募資格について、外遊経験者が選ばれる傾向があり、新人が出にくいとの指摘がなされたが、一方では語学力の必要性が指摘され、将来の問題として考えていくことが要望された。

4. 前回理事会の議事録が提示され、一部修正の上承認された。

正 誤 表

13巻4号 452頁 第21行に誤りがありましたので下記の通り訂正します。

Title: β -Glycyrrhetic acid のマウスにおける吸収・排泄ならびに生体内分布に関する研究…三宅輝明他

誤

……全量を 1.0 ml とし、その 1.0 ml を…

正

その 0.1 ml を

核医学投稿論文の日付については
従来「受付」、「採用」としていましたが、
今号より、「受付」、「最終稿受付」といた
します。