

³H-digoxin 投与ラットの臓器放射能分布 およびその排泄について

上田英雄 町田喜久雄 開原成允
木本達也 飯尾正宏 村尾覚*

Digitalis 配糖体測定には bioassay 法^{1~7)}, calorimetric⁸⁾ 法, ラジオアイソトープ利用法^{9~12)}, ポーラログラフィー^{13,14)}による方法が知られている。

近年放射性同位元素の研究がすすむにつれ, 有機化合物を構成する C や H の放射性同位元素である ¹⁴C や ³H を用いて標識された digitalis 配糖体がえられるようになった。すなわち, Ceiling¹⁵⁾ らによる ¹⁴CO₂ 利用の ¹⁴C-digitoxin 生合成にはじまり, 最近では Wilzbach 法¹⁶⁾により ³H で比較的簡単に標識可能となり, かつ高比放射能の製剤がえられるようになった。

われわれは ³H-標識 digoxin を用いて, digoxin のラット臓器分布とその排泄を測定検討したので, その測定法とともに, 報告する。

対象および方法

対象は 230ないし 280g のウィスター系成熟雄ラットを用い, 各 2 匹を 1 群とし, ³H-digoxin の臓器分布の時間的経過を観察するために, ³H-digoxin 0.42mg/kg を腹腔内注射後, 1, 6, 24 時間後に, エーテル麻酔にて殺した。各ラットより, 脳・心・肺・肝・脾・胃・横紋筋・肝を剥出し, おののおのは二分ないし左右の 2 標本とし, 水洗にて十分血液を流し去り, 秤量後, 薬包紙にて包み 50°C にて 24 時間乾燥した。

なお以上と別に, 投与量による臓器分布の変化の有無を知るために, ³H-digoxin を 0.07mg/kg および 0.20mg/kg をおののおの各 2 匹のラット腹腔内に注射し, 6 時間後に殺し, 同様に標本を作成した。

各標本は Schöniger 酸素フラスコ燃焼法^{17,18)}にて完全燃焼せしめ, 標本中の ³H-標識 digoxin の ³H をトリチウム水とした。すなわち図 1 のごとき酸素を満たした約 2l の 3 顎フラスコ内で底をアセトン・ドライアイスにて水冷しつつテスラーコイルまたは外部赤外線電球(Thomas OGG)にて点火し, 完全に燃焼させた。そして約 15 分そ

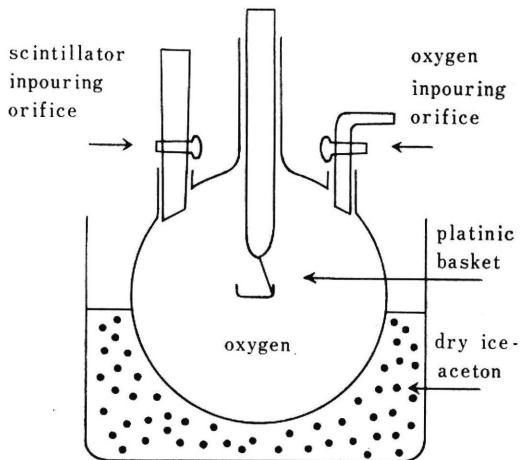


Fig. 1. Schöniger's combustion flask

のままにし, トリチウム水を完全に底部に氷結させ, (PPO 4.0g, POPOP 100mg, toluene 800ml, ethanol 200ml) のような成分のシンチレーター 20ml を加え, 室温で約 15 分放置し, 十分にトリチウム水を溶かしたのちその 15ml をとって, 測定用バイアルに入れ, Packard 4000 型 Tri-Carb 液体シンチレーションカウンターにて測定した。Quenching 補正是 external standardization によったが, 効率は約 10% であった。

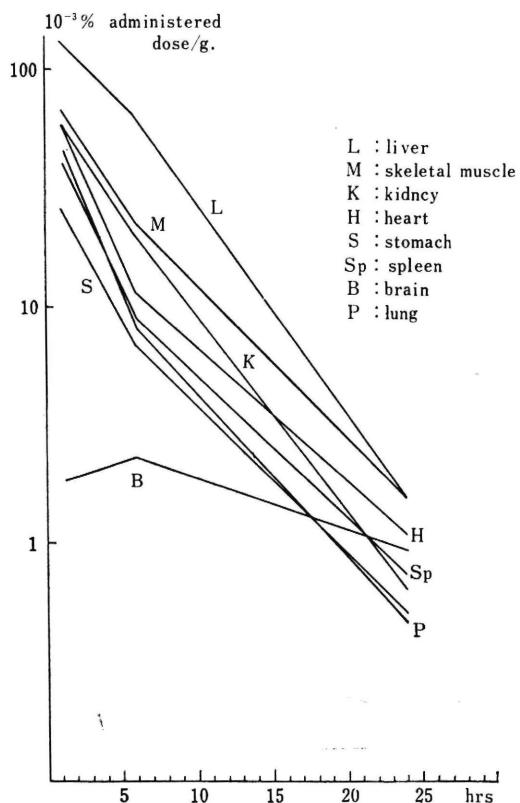
なお本法にて処理した標本は最小 300mg から最大 1000 mg (生重量) までであった。カウント数はすべて 3000 カウント以上を計測, 臓器単位重量で補正した。

使用した ³H-digoxin は, 米国 Burroughs Wellcome & Co. で調製されたもので New England Nuclear 社にて Wilzbach 法にて標識後, column chromatography にて分離精製提供されたもので, 比放射能は 112/ μ c/mg の高いものである。

結 果

³H-digoxin あるいは ³H-放射能の臓器摂取量時間経過

* H. Ueda, K. Machida, S. Kaihara, T. Motoki, M. Iio, S. Murao: 東京大学上田内科

Fig. 2. Changes of ³H-activity of organs(rats).

を、1, 6, 24の各時間にプロットしたものが図2である。すなわち注射後1時間でもっと多いのは肝、ついで横紋筋・腎・心・肺・脾・胃・脳の順である。6時間でも肺と脾の順が入れかわるのみでほぼ不变、24時間で有意な順位変動はみられない。

各臓器とも ³H-digoxin の排泄がきわめて早いこと、(平均 $t_{1/2}$ 約3時間) しかるに脳のみがはじめより量が少なく、24時間後になっても、ほとんど、1時間後と著変のないことが特徴的である。

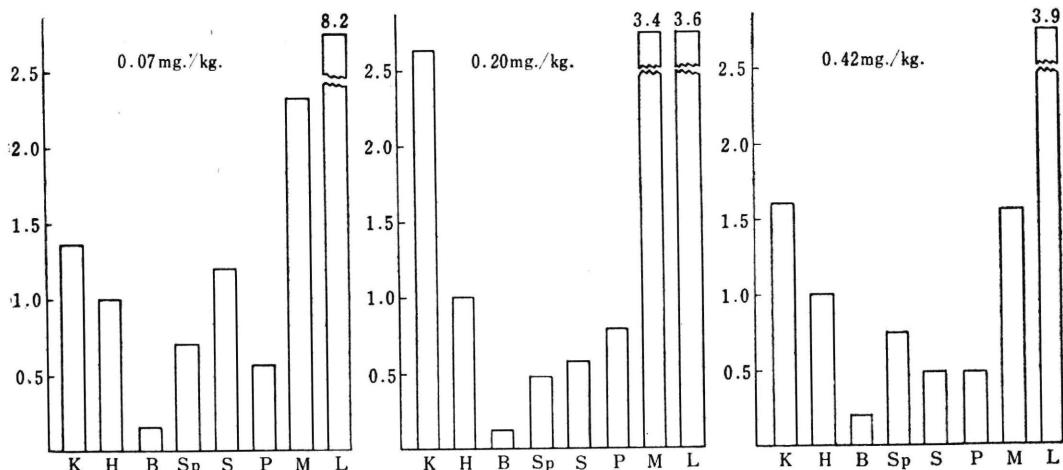
腹腔内注射量を 0.07mg/kg, 0.20mg/kg, 0.42mg/kg と変え各臓器による ³H-digoxin 摂取の心に対する比をとったものが図3である。

それをもとにして、各投与量群において、各臓器中 ³H-digoxin の投与 ³H-digoxin 量に対する取込み量を%投与量/g で表わしたもののが図4である。すなわち、脳以外の臓器では投与量を増すと摂取率は減少し、取込み総量はそれほど増加しなくなることがわかる。

考 按

臓器分布: digitalis 配糖体が各臓器にどのような割合で存在するかは digitalis の代謝および中毒の問題に関連して興味ある問題である。

Friedman¹⁹⁾ らは臓器中の digitalis 分布をラットなどで bioassay 法によって研究したが、その結果(図5)は、われわれの図2ときわめて分布、時間的経過がにている。

Fig. 3. Ratio of ³H-activity of organs. Liver is the highest after 2 hrs. inj(rats).

- (1) 0.07mg/kg inj. (2) 0.20mg/kg inj.
(3) 0.42mg/kg inj. no marked differences.

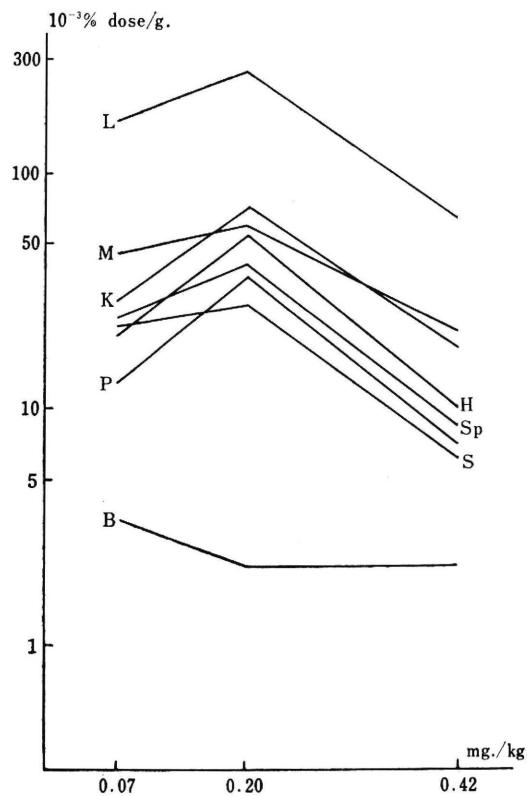


Fig. 4. Per cent uptake of ^3H -activity of organs (rats).

肝がもっとも多く、脳が少ない。そして脳はなかなか減少しない。それらの時間的消失経過も、われわれの場合と同様すみやかである。この事実は両者の測定法の妥当性を相互に支持している。この中で脳の ^3H -digoxin がはじめよりきわめて低く、そのわりに24時間でも減少していない。すなわち脳への digitalis の摂取率は小さいが、クリアランスも小さく、また投与量をふやせば並行してさらに分布量の増加することがみられ、他臓器と比し大きな相違を示している。

Doherty²⁰⁾ らは ^3H -digoxin 0.5mg をイヌに投与し、その臓器分布などを検討している。彼らの結果によれば、12時間における各臓器の ^3H -digoxin の分布は図6のごとくである。すなわち、腎・心がきわめて多く肝が他臓器とともに少ない。この傾向は Fischer¹⁰⁾ らのネコによる ^{14}C -digitoxin でもみられている。ネコの腎は digitoxin を保持する力があり、同時に代謝産物を排出する力が強いが、そのため腎に digitoxin およびその代謝産物が多いと考えられ、この腎が digitoxin を保持する

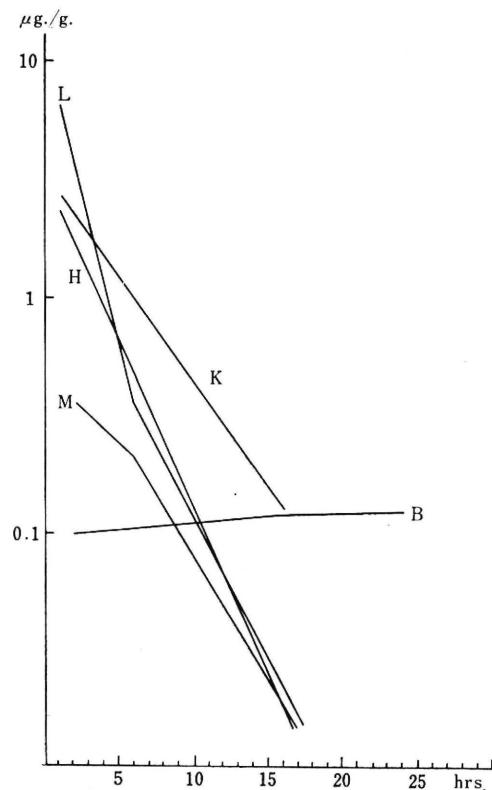


Fig. 5. Disappearance of digitoxin of organs after Friedman et al (rats).

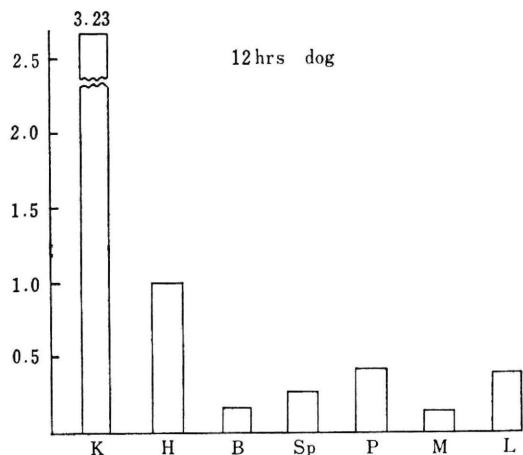


Fig. 6. Ratio of ^3H -activity of organs of dogs after Doherty et al. kidney is the highest.

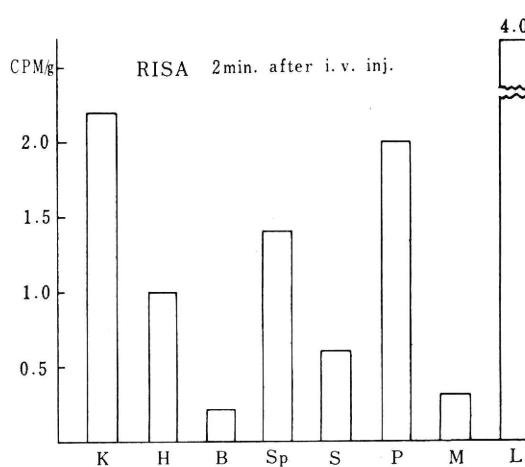


Fig. 7. Ratio of RISA of organs regarded as the blood content of them (rats).

力が強いことが、ネコさらには犬で *digitalis* 中毒が起りやすい原因で、ラットの腎にはこの作用がないためにラットの中用量がきわめて高いと考えられている。

本法による各種臓器の³H-digoxin 分布が、血液量分布と関係があるのでないかとの疑問が起こる。しかしながら RISA 20 μ cを静注 2 分後に殺したラット各臓器の¹³¹I の放射能の分布は血液分布と考えられているが、それは図 7のごとくで、³H-digoxin の分布とは、たとえば肺・脾・横紋筋でかなり相違がみられ、³H-digoxin の分布が血液量の反映でないことは確実である。

負荷 digitalis 量に対する分布の変化：*digitalis* が心臓に対してきわめて強い作用を有することから、*digitalis* の心臓に対する親和性は興味ある問題である。Doherty²¹⁾ らは心臓内の³H-digoxin の半減期が他の臓器・血液よりも長いことを認め、その親和性を示している。

われわれは、ラットにそれぞれ異なる量の³H-digoxin を注入し、もし digoxin が心臓に対して親和性を有しているならば、与える digoxin 量が大きくなるにつれ、心臓にとりこまれる digoxin 量も大きくなり、摂取率の減少が他の臓器に比し少ないと考えて実験を行なったが、図 4のごとく心臓の³H-digoxin の摂取率は他臓器とほとんど同様平行に変化して、その事実は証明できなかった。

なお興味あることは、同図よりあきらかなように、投与量を増加させても、各臓器にとりこまれる digoxin の投与量に対する比は、少なくとも 6 時間での臓器分布ではある投与量以上では減少するところがあることで、こ

の理由としては、臓器とりこみ総量が飽和に近づくこと、腎よりの排泄が高濃度ほど能率よく行なわれることなどが考えられる。

代謝産物：各臓器の³H 放射能がすべて³H-digoxin であるかどうかは検討を要する。Doherty らは、ヒトにおいて digoxin はそのままの形で尿中に排泄されるものが大部分であるといい、その代謝産物のきわめて少ないことを示唆している。しかしこれに対して、Lage および Spratt²²⁾ はラット肝で digoxin が代謝されることを *in vitro* で証明している。したがって少なくともわれわれの実験条件では³H 放射能は厳密には digoxin およびその代謝産物 (digoxigenin, digoxigenin-bisdigoxoside, digoxigenin-monodigitoxoside, digitoxose) をある割合で含んでいるものと考えられる。

臓器内³H-放射能分布の測定：ここに用いた酸素フラスコ燃焼法は、従来の Hyamine 溶解法、あるいは Suspension 法に比し大量の臓器試料を効率よく測定するために開発されたものである。2L の燃焼フラスコを用いたわれわれの方法では試料は臓器生重量として 1g まで測定可能であり、効率は約 10% である²³⁾。

酸素フラスコ燃焼法は、有機化合物分析に Schöniger によって発展せられた方法で、この意味から本法を Schöniger 法ともいいうが、本法を液体シンチレーション計測法用の処理方法として用いたのは Kelly¹⁸⁾ で、彼らは燃焼の結果できた¹⁴CO₂ やトリチウム水をそのままシンチレーターに溶解して測定に成功した。その後いろいろの変法が発表されている。

本法の唯一の欠点は燃焼器具の必要であること、またひとつの試料の処理に時間のかかることがある。

しかしながら前述のごとき秀れた点を有しており、今後ますます用いられるようになると思われる。

結論

- (1) 酸素フラスコ燃焼法は組織臓器などの³H-放射能測定にきわめて有用である。
- (2) 本方法によるとラット臓器内³H-放射能の時間的消失はきわめてすみやかであり、従来の Bioassay 法の結果ときわめてよく一致した。
- (3) ラットでは³H-放射能は肝にもっとも多く、これは肝における代謝と関係すると考えられる。
- (4) 脳への分布はきわめて少ないが、一方その消失経過もきわめておそく、投与量を増加しても % 摂取率は他臓器のようには減少しない。

(5) 心に対する digoxin の親和性は分布排泄試験%摂取率からとくに証明されなかった。

³H-digoxinを提供されたBurroughs Wellcome & Co. の Dr S. T. Bloomfield および Mr. J. E. Murphy に感謝する。

文献 1) Hatcher, R. A. & Brody, J. G.: Am. J. pharm., 82: 360, 1910. 2) Knaffl-Lenz, E.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 29: 407, 1926 3) Hall, E. M.: Am. J. Pharm., 104: 310, 1932. 4) Cattell, Mck. & Gold, H.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 62: 116, 1938. 5) Paff, G. H.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 69: 311, 1940. 6) Lehman, R. A. & Paff, G. H.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 75: 207, 1942. 7) Gold, H. et al.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 75: 196, 1942. 8) Tattie, P. H. E. J. Pharmacol., 9: 29, 1957. 9) Sjoerdsma, A. & Fischer, C. S.: Circulation, 10: 510, 1951. 10) Fischer, C. S., Sjoerdsma, A. & Johnson, R.: Circula-

tion, 5: 496, 1952. 11) Okita, G. T. et al.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 113: 376, 1955. 12) Lukas, D. S. & Peterson, R. E. J. Clin. Ino., 45: 782, 1966. 13) Hilton, J. G.: Science, 110: 526, 1949. 14) Hilton, J. G.: J. Pharmacol. Exp. Therap. 100: 258, 1950. 15) Ceiling, E. M. K. et al.: Science, 108: 558, 1948. 16) Wilzbach, K. E.: J. Am. Chem. Soc., 79: 1013, 1957. 17) 上田英雄ほか: 1966年日本原子力産業会議発表. 18) Kelly, R. G., Peets, E. A., Gordon, S. & Buyske, D. A.: Analut. Biochem, 2: 267, 1962. 19) Friedman, M. et al.: Circulation 6: 367, 1952. 20) Doherty, J. E. et al.: Am. J. Card., 17: 47, 1966. 21) Doherty, J. E. & Perkins W. H. Am. H. J., 63: 528, 1962. 22) Lage, G. L. & Spratt, J. L.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 140: 248, 1965. 23) 開原成允, 本木達也, 飯尾正宏, 上田英雄: 医学のあゆみ, 58: 680, 1966.

Summary

Tissue concentration and Turnover of Tritiated Digoxin in Rats

Hideo Ueda, M. D., Kikuo Machida, M. D., Shigekoto Kaihara, M. D.

Tatsuya Motoki, M. D., Masahiro Iio, M. D. & Satoru Murao, M. D.

The Second Department of Internal Medicine, University of Tokyo.

Ten rats were given tritium-labeled digoxin and the turnover were studied. Six rats were injected 0.42 mg/kg. of tritiated digoxin and were killed one, six and 24 hours after the injection. Moreover to study the change of the distribution or per cent uptake of digoxin when the less tritiated digoxin was given, four rats were injected 0.07mg/kg and 0.2mg/kg. and killed six hours after.

The determination of the radioactivity of each organs (brain, heart, lung, liver, spleen, stomach, striated muscle and liver) was performed by the Schöniger combustion method of Kelly et al. The tritiated water was dissolved in a scintillator of 4.0g POP, 100mg. POPOP, 800ml. toluene, and 200ml. ethanol and counted in a liquid scintillation counter (Packard 4000 type).

Our experiments revealed that the Schöniger-com-

bustion method was very useful for the determination of tritium activity in the tissue and organ of rats. Counting could be done at the high efficiency of about 10% and 1000mg wet weight could be combusted in 2 L. flask.

The turnover of tritiated digoxin of each organ was rapid and half time was about 3 hours and half in this experiments.

In the liver the highest activity was found and this results suggested that the liver of rats is the center of metabolism or excretion of digoxin.

In the brain the lowest activity was detected and this organ showed the very slow clearance of digoxin.

The distribution, organ clearance and per cent uptake of tritiated digoxin did not reveal the affinity of digoxin to heart muscle.