

エタンブトールの体内分布とその代謝

原 敏 彦・馬 場 治 賢

国立療養所中野病院

受付 昭和 45 年 2 月 14 日

INCORPORATION AND METABOLISM OF ETHAMBUTOL
IN RAT ORGANS*

Toshihiko HARA and Harukata BABA

(Received for publication February 14, 1970)

The distribution and metabolism of ^3H -labeled D-2, 2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol (ethambutol) in the rat have been studied. The intraperitoneally injected ethambutol was taken up rapidly into such organs as kidney, liver or lung, and then disposed from them as rapidly as from the serum. In brain or in eyeballs, however, the radioactivity did not appear remarkably soon after the injection, but gradually accumulated later. This radioactivity, possibly of the metabolic product of ethambutol, was not so easily extracted from brain homogenate with perchloric acid, which indicates that it is firmly attached to the tissue. In the extract from brain a large quantity of metabolites of ethambutol was demonstrated on the ion exchange column chromatography. The metabolite accumulated in brain seems to be relevant to the side effect of ethambutol, the demyelination of central nervous system, especially of optic fibers.

エタンブトールすなわち D-2, 2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol は強力な抗結核剤として広く用いられているが、この薬剤の唯一の難点は時に視力障害を起こすことである。視力の低下は中心暗点の拡大を伴い、まれに色覚の異常を来す¹⁾。ところでエタンブトールを長期にしかも多量に投与したサルにおいては単に視神経にとどまらず広範な領域の神経線維に脱髄がみられており²⁾、臨床的にも当病院において視力障害以外の神経学的異常を少数ながら認めている³⁾。

このようなエタンブトールの神経組織に対する特異的作用は、エタンブトールが神経組織に対してとくに強い親和性を有するためである可能性もあり、本研究はこの点を追求することによってエタンブトールによる脱髄現象の病因を探らうとの意図をもって始められた。

薬剤の臓器内分布を調べる方法には大別して3種あり、1つは直接化学的に薬剤を検出定量する方法であり、第2は bioassay による方法、第3は放射性同位元素を用いる方法である。それぞれに長短はあるが、第3

の放射性同位元素を標識した薬剤を用いる方法は測定が正確に行なえ、しかも同時に代謝産物の検出も行なえる利点があるため、ここでは ^3H で標識したエタンブトールを用いた。

本研究によつて、エタンブトール自体は脳に対してとくに親和性を持たないが、その代謝産物に強い親和性を持つものがあることが明らかになった。

実験方法および材料

動物はウィスター系の雄のラット (体重 150~160 g) を用い、餌は欲するままに与えた。エタンブトール- ^3H は 10 mg (240 μC) を 0.4 ml の溶液とし、1回の腹腔内注射を行なつた。

エタンブトール- ^3H は Wiltzbach の方法⁴⁾に基づき、1g のエタンブトール (科研化学) を 20°C のトリチウムガスと5日間接触し、真空脱気したのち、Dowex 50 W \times 4 の陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーを2回繰り返すことにより精製した。放射化学的純度はカ

* From the National Nakano Chest Hospital, 20-14-3, Egota, Nakano-ku, Tokyo 165 Japan.

ラムクロマトグラフィーにおいてキャリアーとして加えたエタンブトールの各分画の銅キレートによる発色の強さと、各分画の放射能との対比により検定した。

エタンブトールの銅キレートによる定量は次のようにして行なつた。エタンブトール溶液 2 ml に 0.1 M 硫酸銅を 0.1 ml 加えてよく混合し、さらに 1 N NaOH を 0.4 ml 加える。これをよく振盪してから 2,500 rpm × 10 分遠心分離し上清の色を 620 m μ にて比色する。エタンブトールの銅キレートは深青色を呈し、過剰の銅イオンは沈殿する。この定量法は吸光度 1.5 までよい直線性を示す。ミリモル吸光係数は補正なしで 0.16 であつた。

放射能は Beckman の液体シンチレーションカウンターによつて測定した。蛍光溶媒としてはジフェニルオキサゾール：ナフタレン：ジオキサン (1:20:200) を用いた。

放射性エタンブトール精製のためのカラムは Dowex 50 W×4 の 16×φ 2.6 cm を用いて行ない、苛性ソーダ、塩酸で洗浄後蒸留水によつて遊離塩素イオンの消えるまで洗浄したものをを用いた。エタンブトール水溶液はこの樹脂に強く吸着し、水→0.2 M NaOH の直線勾配溶出法により単一の峰として溶出される。

エタンブトール投与後の動物は 5 匹ずつの群とし、各時点で 5 匹ずつ殺してひとまとめにし、ここで合計した 5 コの臓器により測定点を求めた。

各臓器は Waring blender を用いて 1:5 の水懸濁液とし、これによつて放射能測定および乾燥重量の測定を行なつた。

脳および肝に取込まれた放射能を抽出する方法は以下のように行なつた。2 ml のホモジネートに 6% 過塩素酸を 5 ml 加え、Potter のホモジナイザーに 2 分間かける。この懸濁液を 2,500 rpm × 5 分遠心分離し、上清をとり分けたあとこの沈殿に 6 ml の 5% 過塩素酸を加え同様にホモジナイズし、再び遠心分離する。このような操作をあと 2 回繰り返す。最後の沈渣は 6 ml の 5% 過塩素酸とホモジナイズして保存する。各抽出液の放射能を測定するさいには各分画から等量ずつとつて液体シンチレーションカウンターの蛍光溶媒と混ぜる。以上の抽出操作はすべて 0°C で行なう。

過塩素酸による脳抽出液のカラムクロマトグラフィーは以下のようにして行なつた。過塩素酸による第 1 回および第 2 回抽出液を合わせ、これにメチルオレンジを少量加える。それをフラスコの中でよく攪拌しながら 5 M K₂CO₃ を徐々にメチルオレンジがやや黄変するまで加える (pH 約 4.0)。これを水中で 10 分間放置したのち沈殿した過塩素酸を遠心分離により除き、この上清に約 20 mg の非放射性薬用エタンブトールを加えてクロマトグラフィー用試料とする。カラムクロマトグラフィーは

前と同様に処理した Dowex 50 W×4 を 10×φ 2 cm のカラムによつて行ない、試料を負荷したあと水で洗わずに 0→0.2 N NaOH の直線勾配溶出液、計 200 ml で溶出した。標準エタンブトールを加えたのは本来のエタンブトールの位置を同定するためである。

カラムクロマトグラフィーによつて先端に溶出される代謝産物は真空乾燥によつて放射能が失われないことを確かめたのち、Peets らの方法⁹⁾ にならいペーパークロマトグラフィーを行なつた。展開溶媒としては 1-ブタノール：酢酸：水 (4:1:5) およびイソプロパノール：アンモニア水：水 (4:1:5) を用いた。

実験結果および考察

エタンブトール-³H 投与後の各臓器内分布を 1, 6, 12, 24, 48 時間目について調べた結果を図 1 および図 2 に示した。血清内濃度は投与後 6 時間までに急速に減少するが、以後はあまり減少しなくなる。この原因は Peets ら⁹⁾ によつて示されたようにエタンブトールが赤血球に積極的に取込まれること、あるいは馬場ら¹⁰⁾ によつて示され、また本実験によつても示されたように、臓器によつては血中よりも強くエタンブトールを取込む傾向があり (乾燥重量 1 mg は湿性重量約 5 mg に相当するから、これに含まれる放射能は血清 5 μ l (約 5 mg) に含まれる放射能と対応すると見なしてよい)、これが後に徐々に血中に再放出されることによると考えられる。

さて臓器別の取込み方を比較すると、腎、肝、脾、肺などには急速に取込みがみられているが、心、脳、眼球にはあまり取込みがみられない。さらに時間経過を追つていくと、奇異なことに血清中の放射能が徐々に減少す

Fig. 1. Radioactivity in Serum and Various Organs of Rat after i. p. Injection of ³H-labeled Ethambutol

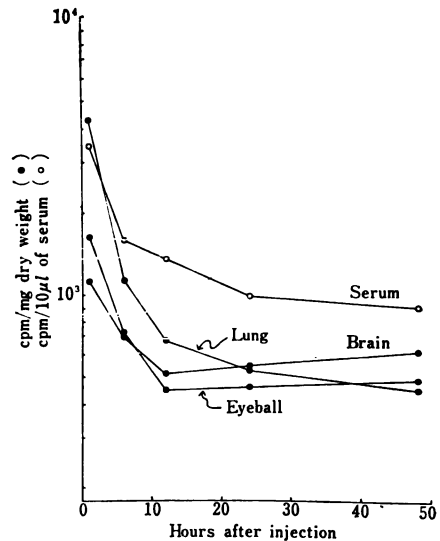
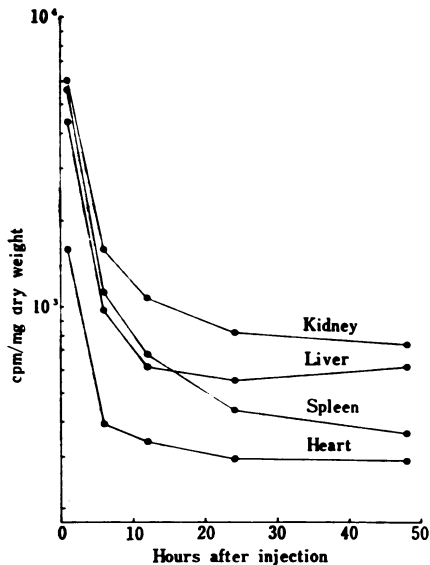


Fig. 2. Radioactivity in Various Organs of Rat after i.p. Injection of ³H-labeled Ethambutol



るにもかかわらず、最初取込みの少なかつた脳および眼球に放射能の増加がみられている。この傾向は肝でもわずかに認められる。これは徐々にではあるがなんらかの機序によりこれら特定臓器内の放射能が蓄積していることを示しており、この現象と視神経障害との間になんらかの関連があるかもしれない。

ところでこのように血清内濃度の減少に逆つて脳および眼球内取込みが増す機構としては2つの可能性が考えられる。1つには脳内において徐々にではあるがこの薬剤を特別に強く結合する機構が存在する可能性、第2にはこの薬剤が体内で代謝されてその代謝産物が脳内に強く取込まれる可能性である。そこで次の実験でこの点をさらに研究した。

図3に示すのは脳および肝から過塩素酸によつて放射能を繰り返し抽出するさい、抽出し残される放射能と抽出回数との関係を図示したものである。放射性物質が臓器内において均一な存在様式にあるとすれば、1回の抽出率を a とした場合、残存放射能は $(1-a)$ 、抽出2回目の残存率は $(1-a)^2$ 、同様に n 回では $(1-a)^n$ というようになり、残存率の対数は抽出回数に対して直線的に減少する。ところで仮に2種の存在様式があり、それぞれの放射能が A および B 、抽出率が a および b であれば、 n 回の抽出後の残存率は

$$\frac{A}{A+B}(1-a)^n + \frac{B}{A+B}(1-b)^n$$

となり、このグラフは勾配 $\log(1-a)$ および $\log(1-b)$ の直線に漸近する2相性の曲線となる。このような原理に基づき図3をみると、エタンブトール投与後1時間、48時間の肝、脳について易抽出性のものと難抽出性の

Fig. 3. Fractional Extraction of Radioactivity by Perchloric Acid from the Brain and Liver Taken 1 and 48 Hrs. after Administration of ³H-labeled Ethambutol

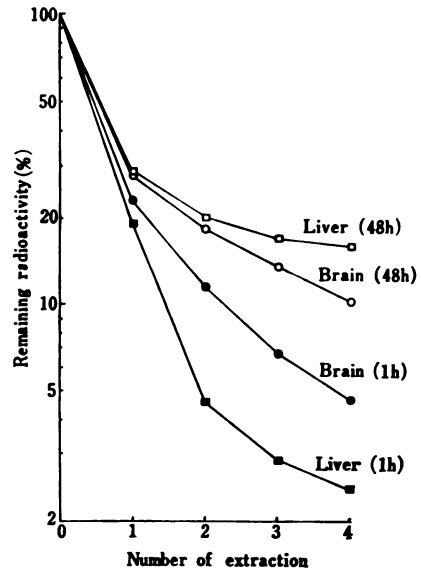
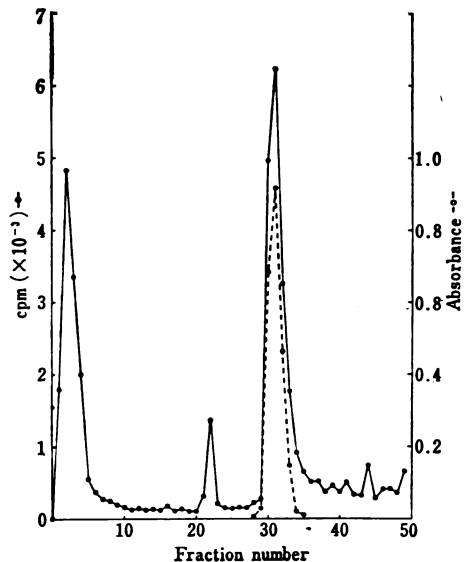


Fig. 4. Dowex-50 Column Chromatography of the Extract from 48 Hour Brain, Showing the Fraction of Authentic Ethambutol by Colorimetry



ものの複数の成分が存在し、肝においても脳においても48時間後のものでは難抽出性のものが増加していることが分かる。この複数のものが単一物質の臓器内存在様式の不均一に基づくものか、あるいは複数の物質が存在しているためであるかは、この実験だけでは分からない。

そこでさらに1時間後の脳および48時間後の脳の過

塩素酸抽出液について Dowex 50 によるカラムクロマトグラフィーを行なった。48 時間後の脳についての結果を図 4 に示す。ここでみられるように放射能は本来のエタンブトールの位置に存在するだけでなく、第 22 番目の分画および先端にもかなりの量が検出された。そしてとくに先端に溶出される物質こそが脳内に蓄積するものの本体であると考えてよいであろう。ちなみに 1 時間後の脳から同様に抽出したものでは本来のエタンブトールの位置以外にはほとんど放射能を見出せなかつた。さらに翻つてみれば図 3 で示した抽出実験において難抽出性であつたものがこれらの物質であると考えてよいように思う。これらはエタンブトールの代謝産物と考えうるから、このうち強い放射能を帯びる先端の物質について物質の同定を試みた。

さきに Peets ら¹⁾はエタンブトール投与後の患者尿からその酸化産物 2,2'-(ethylenediimino)-di-butyric acid を同定し、そのペーパークロマトグラフィーの条件を記載している。そこでこの先端物質を彼らと同一条件で展開し、そこで得られた Rf 値を彼らの記載する Rf 値^(*)と比較した。表に比較した数値を示す。

われわれの代謝産物は Peets らが同定したものと同一ではないが、エタンブトールとそれとの中間の値を示し、なんらかの関係を示唆している。あるいはわれわれ

Table

	Method 1	Method 2
The substance eluted at the front of the chromatography	Rf 0.7	0.9
2,2'-(ethylenediimino)-di-butyric acid	0.30*	0.82*
Ethambutol	1.0	1.0

Method 1. 1-Butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)

Method 2. Isopropanol : ammonium hydroxide : water (4 : 1 : 5)

のものは di-butyric acid ではなく mono-butyric acid であるかもしれない。

文 献

- 1) Place, V. A., Peets, E. A., Buyske, D. A. and Little, R. R.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 135 : 775, 1966.
- 2) Schmidt, L. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 135 : 732, 1966.
- 3) 馬場治賢・吾妻洋・田島洋・二村久・宮田ユキ: 結核, 42 : 1, 昭 45.
- 4) Wilzbach, K. E.: J. Am. Chem. Soc., 79 : 1013, 1957.
- 5) Peets, E. A., Sweeney, W. M., Place, V. A. and Buyske, D. A.: Am. Rev. Resp. Dis., 91 : 51, 1965.