生物活性を持つ水溶性 [^{14}C] リグニンのラットにおける 腸管吸収および体内動態

華房 徹, 山崎素直, 大久保 明, 戸田昭三
東京大学農学部農芸化学科 〒113 東京都文京区弥生1-1-1

鈴木健三

野田食菌工業株式会社 〒278 野田市清水121

中島栄一, 安川勝衛

三共株式会社分析代謝研究所 〒140 東京都品川区広町1-2-58

Key words : water-soluble lignin, immunomodulator, antiviral agent, EP3, LEM, lignosulfonate, macroautoradiography, MAR, Imaging Plate system, intestinal absorption, drug distribution.

Intestinal absorption and tissue distribution of immunoactive and antiviral water-soluble [^{14}C] lignins in rats

Tohru HANAFUSA, Sunao YAMAZAKI, Akira OKUBO and Shozo TODA
Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo,
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Kenzo SUZUKI

Noda Shokukin Kogyo, Co., Ltd., 121 Shimizu, Noda-City 278

Eiichi NAKAJIMA and Yoshie YASUKAWA

Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.,
1-2-58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140

Summary

Intestinal absorption and tissue distribution of water-soluble lignins which had both immunomodulating and antiviral activities were investigated using the isotope tracer techniques. Three types of water-soluble lignins with different molecular weights, i.e., EP3 (av. mol. wt., 3.2×10^5 D) and SB1000 (mol. wt., 10^3 – 10^4 D), both of which were fractionated from LEM (an extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia), and PLS (purified lignosulfonate, av. mol. wt., 2×10^4 D) were used after being labeled with ^{14}C -HCHO.

After p.o. administration, every [^{14}C] lignin was absorbed and reached maximum levels in the tissues, especially, kidney cortex, lymph node, liver and vertebra within 6 hr. ^{14}C -EP3, the sample of the highest molecular weight, showed the lowest absorption, whereas it remained in cortex for a longer period. By summing up the isotope amount in urine and tissues, the absorption extents of ^{14}C -EP3, ^{14}C -PLS and ^{14}C -SB1000 were estimated to be approximately 0.8%, 5.9% and 8.0% of radioactivity, respectively. Absorption and prolonged remain of ^{14}C -EP3 in the lymph node and vertebra suggest that the *in vitro* immunological activities of this lignin would be linked to those *in vivo*.

緒言

椎茸菌糸抽出物 (LEM) は、バガス、米糠からなる固体培地で、椎茸菌 *Lentinus edodes* を培養し、子実体形成直前に、培地ごと熱水抽出した乾燥粉末であり¹⁾、健康食品として市販され、約15年になる。近年、LEM およびその精製画分には、抗ウイルス活性およびさまざまな免疫活性があることが報告されている。すなわち、抗ウイルス活性としては、タバコモザイクウイルスの増殖および感染を阻止し²⁾、*in vitro* で human immunodeficiency virus (HIV)^{3,4)}、herpes simplex virus, Western equine encephalitis virus, polio, measles, mumps virus⁵⁾ などの種々のウイルスの感染性および細胞障害性を阻止

する効果が明らかになった。最近、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者に対し、LEMの経口投与が効果的であることが報告されている⁶⁾。一方、免疫調節活性として、インターロイキン1 (IL-1) 産生の亢進⁷⁾、マクロファージ (Mφ) の形態変化とグルコース消費の亢進⁸⁾、骨髄細胞の増殖促進⁹⁾、antibody-dependent cell mediated cytotoxicity による肝細胞障害の抑制¹⁰⁾、ラット腹水肝癌細胞 AH414の増殖および肝癌の発生抑制^{11,12)}、慢性B型肝炎患者に経口投与することにより、HBe 抗原陽性から HBe 抗体陽性へと顕著に seroconversion を惹起する¹³⁾ ことなど、*in vitro* および臨床レベルでの興味深い作用が確認されている。

こうした多彩な生物活性を持つ LEM につい

Fig. 1 Structural feature of water-soluble lignin in EP3.

て、鈴木らはMφのグルコース消費亢進活性、骨髄細胞の増殖促進活性および抗 HIV 活性を指標に分画精製を重ね、活性本体を含む画分 EP3を得た⁴⁾。EP3の主成分は、培地中のバガスが椎茸菌によって分解され水溶性化されたポリカルボキシル化リグニンであること、共存する微量のタンパクおよび糖には活性がなく、リグニンを分解すると失活することから、活性の本体は水溶性化リグニンであることを明らかにした^{4,14)}。構造的特徴を Fig. 1 に示す。EP3中のリグニンは、フェニルプロパンを基本構造単位とするラジカル重合体で、したがって、規則的な配列（繰り返し構造など）を持たない分子の集合体であり、分子量1万から150万の幅広い分布を持つ。また、リグニン本来の強い疎水性と、生分解によって導入されたカルボキシル基による高い親水性とを合わせ持つ。さらに、EP3の各種分解誘導体およびパルプ廃液から得られたスルホン化リグニン（リグノスルホン酸塩）にも、同様の生物活性が見出されたことから^{15,16)}、活性発現はリグニン自体の持っている構造的特性に依存していることがわかってきた。

本研究では、水溶性リグニン、特に LEM 由来の EP3について、B 型肝炎や AIDS などにより有効な免疫活性、並びに抗ウイルス活性を併せ持つ新しい経口治療薬としての可能性を検討するために、まずラット腸管からの吸収と体内動態について検討を行った。

実験方法

1. 試料の精製

試料として LEM より分画した EP3（平均分子量32万）、および EP3よりさらに低分子の画分 SB1000（分子量1000から1万）について主に検討した。参考として、パルプ廃液より得られた構造類似のリグノスルホン酸塩を、エタノール沈殿、さらに Sephadex G-25カラムにより、void 付近の溶出画分を凍結乾燥した精製標品（PLS、平均分子量2万）を用い、分子量分布の異なる3種の水溶性リグニンについて検討した。EP3はフェニルプロパン単位あたり0.48個のカルボキシル基を、PLS は0.51個のスルホン基を持つ。EP3は透析により1万以下をカットし、SB1000

では透析により1万と1000の間の画分を集めた。精製は鈴木らの方法によった⁴⁾。

2. 試料の RI 標識

水溶性リグニンを生合成的に RI 標識することが不可能なので、¹⁴C-ホルマリンをを用いたヒドロキシメチル化によりリグニン骨格への RI 標識を行った¹⁷⁾。試料それぞれ10mg を試験管に取り、200μl の蒸留水に懸濁した。これに500μCi/9μmol/100μl の¹⁴C-ホルマリン、次いで5N NaOH 10μl を加え、60℃の温浴中で1時間加熱した。氷冷後、EP3は分画分子量13,000の透析膜（VISKASE 社8/32）で、PLS と SB1000は分画分子量1000の透析膜（Spectra/por[®] 6）で透析した。透析は50mM リン酸緩衝液（1l）1回、次いで蒸留水（1l）で3回行った。得られた透析内液について、高速液体クロマトグラフィ（カラム：Asahipak GS-520、溶出液：0.1M NaCl を含む50mM リン酸緩衝液、pH 7.2）により分子量および RI ラベルの分布を調べた。以後ラベル化合物を¹⁴C-EP3、¹⁴C-PLS、¹⁴C-SB1000 と記す。

3. 活性測定

ヒドロキシメチル化反応による活性の変化を確認するため、反応前の試料との活性の比較を行った。アッセイは鈴木らの方法に従った^{8,9)}。Mφのグルコース消費亢進活性は、ddY マウスの腹腔常在性Mφ（10⁵）によるグルコース消費をグルコースオキシダーゼ法で求めた。骨髄細胞増殖促進活性については、C57BL/6マウス大腿骨から得られた骨髄細胞を試料とともに4日間培養し、³H-thymidine の取り込み量で判定した。

4. 経口投与実験

(1) 試料の投与と採血

体重180~200gのWistar系ラット雄を用いた。12時間前後、絶食させたラットをエーテル麻酔し、麻酔が醒めかけたところで試料溶液をゾンデにより胃内に投与した。少量の生理的食塩水でシリンジ内の試料を洗い込み、投与全量は1ml以下とした。採血は大腿動脈カニューレーションによった。試料投与後適時0.3~0.4mlの血液を採

取し, $2000 \times g$, 6分遠心し, 血漿 $100 \sim 200 \mu l$ をバイアルに採取し, RI測定に供した.

(2) 飼育

試料を投与したラットはボールマンケージで飼育した. 糞尿は適時分別採取した. 試料投与後6時間は絶食とし, その後は固形試料を自由に摂取させ, 飼育終了前12時間を再び絶食とした. 水は2倍希釈した生理的食塩水を最初から自由に摂取させた.

(3) 臓器の摘出

試料投与後72時間の採血の後, 麻酔下放血し, 開腹して大腿筋, 大腿骨, 脂肪, 脾臓, 肝臓, 胸腺, 頸部リンパ節, 腸間膜リンパ節, 腎臓, 胃, 腸管を摘出, バイアルにいれ秤量した.

(4) RI測定

血漿は $10 ml$ の乳化シンチレーターを加え, 液体シンチレーションカウンタ (以下液シンと略) で測定した. 血球および臓器は四級アンモニウム試薬による溶解化法によった. 尿は全量を記録後, $100 \mu l$ につき液シンで測定し総放射活性を算出した. 糞は真空ポンプで一夜吸引乾燥し, 秤量後一部をオキシダイザー (Packard B306) で燃焼し, 生じた CO_2 を二酸化炭素処理剤 (Carbo-sorb) に捕捉, 液シンで測定し総放射活性を算出した. なお, 溶解化法およびオキシダイザーによる燃焼法の回収率は, それぞれ97%および90%であった.

5. 静注による体内動態

^{14}C -EP3について静注による体内動態を調べた. Wistar系ラット雄, 7週齢, $200 \sim 210 g$ に, 大腿動脈カニューレを施し, このとき, 同時に静脈に対してもカニューレを挿入した. 手術後, ラットをボールマンケージに入れ, 覚醒後, 静脈側のカニューレより $8.1 \mu Ci$ ($1.8 \times 10^7 dpm$)/匹の ^{14}C -EP3を静注した. 以後は経口投与の場合と同様に飼育し, 分析を行った. 採血は投与後1分~72時間までに13点行った.

6. 全身オートラジオグラム (MAR) の作成

経口投与による腸管吸収と体内分布を経時的に観察するため, ラット (Wistar系雄, 7週齢, $180 \sim 200 g$) に ^{14}C -EP3を $70 \mu Ci$ /匹, 経口投与

し, 全身オートラジオグラム (以下 MAR と記す) を作成した. 投与後2, 6, 24, 72時間に動物をエーテル麻酔下, 凍結致死させ, CMC 固定後, クライオミクロトームで厚さ $50 \mu m$ の全身凍結切片を連続して採取し, 凍結乾燥した. このうち腎臓付近, 副腎付近, および正中線付近の3カ所の部位について, X線フィルム (コニカ, 3H タイプ) およびイメージングプレート (IP, $20 \times 40 cm$) に, 標準線源 (isotope staircase) とともに密着させ, それぞれ4週間および2日間露光させた^{18,19}. IP はそのままバイオイメージアナライザー (富士写真フィルム社, Model BA-100) でカラーモニター上にオートラジオグラムを作成した.

結果と考察

1. 水溶性リグニンへの RI 標識

本実験における水溶性リグニンは, 高分子であるため吸収率が非常に低いこと, また, Fig. 1に示すように, 規則的な構造 (繰り返し構造など) を持たず, きわめて広い分子量分布を持つため, 結果の判定が非常に複雑になることが予想された. この点を克服するために, リグニン自身が生体内で難分解性であること²⁰) を考慮して, リグニンの骨格構造に直接 RI ラベルを導入することが効果的と判断した. 種々検討した結果, Fig. 2に示すように ^{14}C -ホルマリンによるリグニン骨格へのヒドロキシメチル化により, 効果的に RI ラベルを導入することができた. しかも M_p のグルコース消費亢進活性および骨髄細胞の増殖促進活性は, とともに測定濃度範囲 ($0 \sim 400 \mu g/ml$) において反応前とほとんど同じであった. 反応率は ^{14}C -EP3で55~60%, ^{14}C -PLSで95%, ^{14}C -SB1000で85%であった. また, 反応に用いた放射活性に対する取り込まれた放射活性の

Fig. 2 ^{14}C -Hydroxymethylation of water-soluble lignin.

Fig. 3 HPLC chromatograms of EP3 and ^{14}C -EP3.

Column : Asahipak GS-520 ; Eluent : sodium phosphate containing 0.1 M NaCl, pH7.2 ; Flow rate : 1 ml/min.

The figures at each peak represent retention time (min).

Vo : void position, solv. : elution position of H_2O in which the sample was dissolved.

割合は、 ^{14}C -EP3でおおよそ30%， ^{14}C -PLSで40%， ^{14}C -SB1000で60%であった。Fig. 3に(a) EP3と(b) ^{14}C -EP3のHPLCによるゲルろ過パターン、および(c)に放射能分布を示す。 ^{14}C -EP3の分子量分布と放射活性の分布とはよく一致しており、すべての分子にほぼ均等にラベルが入ったことが確認できた。ただし、 ^{14}C -EP3はもとのEP3の分子量分布に比べ、高分子部分が減少している。これはおそらくラベル化の反応過程で、アルカリ分解により低分子化したためと思われる。すなわち、Fig. 3と同一のカラム条件下で、分子量マーカー用タンパクを用いて求めたEP3および ^{14}C -EP3の分子量は、それぞれピーク位置で

Fig. 4 Time course of radioactivity in plasma after p.o. administration of ^{14}C -labeled water-soluble lignins to rats.

○, ●, □ represent each of three rats used.

約11万と3.6万であり、 ^{14}C -EP3は低分子化すること、また、もとのEP3の低分子部分に相当する分子量分布を持つことがわかった。EP3は広い分子量分布を持つが、化学的性質の同じ分子(リグニン)の集合体である。生物活性もリグニンの化学的性質に依存し、分子量にはよらないことがわかっている¹⁴⁾。 ^{14}C -EP3の生物活性がEP3と同等であったこと、および赤外吸収スペクトルでは、骨格構造に何の変化も認められなかったことなどから、リグニンの基本構造には本質的な影響はなかったと判断した。

2. 経口投与実験

各実験区で3匹のラット(^{14}C -PLSは2匹)を用いた。1匹当たり平均 $30\mu\text{Ci}$ ($6.7 \times 10^7 \text{dpm}$)の ^{14}C -水溶性リグニンを経口投与した。以下の数値はすべて $30\mu\text{Ci}$ /匹の投与に換算してある。

Table I AUC_{po} of ¹⁴C-labeled water-soluble lignins in plasma

	(dpm·h/100 μ l)		
	¹⁴ C-EP3	¹⁴ C-PLS	¹⁴ C-SB1000
Rat A	4469	42600	75830
B	6372	12130	19073
C	6942		35813
Mean	5594	27365	43572

AUC: area under the radioactivity versus time curve, po: per os.

About 30 μ Ci/rat were administered orally.

Fig. 5 Cumulative radioactivity excreted in urine after p.o. administration of ¹⁴C-labeled water-soluble lignins to rats. ○, ●, □ represent each of three rats used.

(1) 血漿中濃度の推移

Fig. 4 に血漿中放射活性の時間変化を示す。24時間以後はいずれも漸減した。¹⁴C-EP3, ¹⁴C-PLS, ¹⁴C-SB1000とも分子量が小さくなるにつれ、血漿中放射活性が高くなること、血漿中濃度最高時も、¹⁴C-EP3では個体によるばらつきが激

Table II Total radioactivity excreted in urine for 72 h after p.o. administration of ¹⁴C-labeled water-soluble lignins

	¹⁴ C-EP3	¹⁴ C-PLS	¹⁴ C-SB1000
Rat A	0.332	5.95	7.71
B	0.532	2.53	3.82
C	0.573		6.21
Mean	0.479	4.24	5.91

Values are expressed as % relative to administered radioactivity.

しいが、1～6時間、¹⁴C-PLS では1時間、¹⁴C-SB1000では30分と分子量との対応がみられた。¹⁴C-EP3は吸収量も少なく、また、吸収速度も減少速度も他の試料に比べ遅い傾向がみられた。これは恐らく¹⁴C-EP3が高分子であることによると思われる。

経口投与後72時間までの血漿中濃度—時間曲線下面積 (AUC_{po}) を、台形公式²¹⁾により算出した結果を Table I に示す。本来、静注によるAUC_{iv}との比較において考察すべきであるが²²⁾、これを3種の¹⁴C-水溶性リグニンの吸収量の指標と考え、Table I の平均値を比較すると、¹⁴C-EP3に対し¹⁴C-PLS は約5倍、¹⁴C-SB1000は約8倍吸収されたことになる。

(2) 尿および糞中の放射性

尿中へ排泄された放射活性総量の、経時変化を Fig. 5 に、投与後72時間までの総排泄量の投与量に対する割合を Table II に示す。血中濃度の高かったものほど排泄量も多い。尿中への総排泄量も吸収量を比較する一つの指標と考えると²²⁾、¹⁴C-EP3に対し¹⁴C-PLS は約9倍、¹⁴C-SB1000は約12倍となる。AUC_{po}の結果と併せて、¹⁴C-EP3は¹⁴C-PLS や¹⁴C-SB1000に比べ、吸収されにくく、また、排泄されにくいといえる。

一方、糞中の放射活性は、¹⁴C-EP3では投与後4時間まではほとんど排泄されず、大半が9～12時間の間に排泄された。72時間までの糞中への放射能の回収率が55～78%と低かったが、これは回収した糞の一部を分析し総排泄量に換算したことによる誤差、および経口投与の際に、一部が肺に入り鼻腔へ戻ってしまったこと (Fig. 8 参照)

Table III Radioactivity in tissues at 72 h after p.o. administration of ^{14}C -labeled water-soluble lignins to rats

Tissue	^{14}C -EP3 (n=3)		^{14}C -PLS (n=2)		^{14}C -SB1000 (n=3)	
	A*	B**	A	B	A	B
Kidney	0.176	7370	0.871	34445	1.446	56405
cortex		11319		51433		88339
medulla		986		2834		19208
Liver	0.066	770	0.540	5675	0.405	4184
Spleen	0.001	236	0.019	2144	0.006	1219
Thymus	0.000	100	0.001	436	0.002	570
Testis	0.000	32	0.006	249	0.009	293
Lymph node						
cervical		300		19750		680
mesenteric		2118		2668		2195
Thighbone		106		823		749
Mussle***	0.072	64	0.222	182	0.209	181
Fat***	0.009	67	0.025	163	0.026	187

n : number of rats used. * radioactivity (%) in tissue relative to RI administered.

** radioactivity (dpm) per 100 mg wet tissue.

*** Mussle and fat amounts were estimated to be 40% and 5% of body weight, respectively.

Fig. 6 Time course of radioactivity in plasma after i.v. injection of ^{14}C -EP3 to rats. Two rats (Δ , $\bullet$) were used.

Fig. 7 Cumulative radioactivity excreted in urine after i.v. injection of ^{14}C -EP3 to rats. Two rats ($\circ$, $\bullet$) were used.

などが原因と思われる。尿と糞の分別収集は比較的良好で、投与後4時間で高い放射活性を持つ尿が採取されたのに対し、糞ではさらに遅れて高い放射活性が観測された。

(3) 臓器中放射活性

投与後72時間における臓器中放射活性の平均値を Table III に示す。いずれの試料も分布のパターンはよく似ており、臓器100mg 当たりの放射活性では、腎臓しかも皮質部が最も高く、次の

Table IV Relative radioactivity excreted in feces after i.v. injection of ^{14}C -EP3

Period	Rat A	Rat B
0 - 24 (h)	0.84	0.51
24 - 48	0.56	0.38
48 - 72	0.60	0.21
Total	2.00	1.10

Values are expressed as % relative to injected radioactivity.

Table V Radioactivity in tissue at 72 h after i.v. injection of ^{14}C -EP3

Tissue	Rat A		Rat B	
	A*	B**	A*	B**
Kidney	11.4	106160	11.2	119572
cortex		157331		180414
medulla		57430		43058
Liver	25.2	60285	26.3	71295
Spleen	0.96	15810	0.88	23036
Thymus	0.02	1071	0.03	1590
Testis	0.28	2405	0.26	2169
Lymph node				
cervical		3890		4700
mesenteric		11118		17434
Thighbone		7509		7814
Muscle***	2.25	489	2.25	477
Fat***	0.27	462		

* radioactivity (%) in tissue relative to RI administered.

** radioactivity (dpm) per 100 mg wet tissue.

*** Muscle and fat amounts were estimated as 40% and 5% of body weight, respectively.

Table VI Bioavailability of ^{14}C -EP3 in rats

	AUC	Total RI in urine
p.o. (n=3)	186	0.48
i.v. (n=2)	27456	14.3
Bioavailability(%)	0.679	3.3

n: number of rats used.

でリンパ節、肝臓が高い。ただし、 ^{14}C -EP3、 ^{14}C -SB1000では、頸部より腸間膜リンパ節の方が高濃度であるのに対し、 ^{14}C -PLS では頸部リンパ節の方が高く、リグニン誘導体の化学構造による差が示された。 ^{14}C -EP3と ^{14}C -SB1000で腸間膜リンパ節に高濃度取り込まれたことは、吸収後リンパ管により運ばれる可能性を示しており、今後さらに詳細に追跡する必要がある。

骨髓は骨ごと秤量しているため、あまり高い活性は示していないが、オートラジオグラムの結果(後述)は明瞭に骨髓への集積を示している。

総量が計算できた各臓器の放射活性の総和(Table III のAのカラムの和)と尿中総排泄量(Table II)を加えると、 ^{14}C -EP3で0.8%、 ^{14}C -PLS で5.9%、 ^{14}C -SB1000で8.0%となり、少

なくともこれだけの吸収が行われたということが出来る。ただし、 ^{14}C -EP3に比べ本来の EP3 は、より高分子を含むため吸収率はさらに低下することが予想される。

3. ^{14}C -EP3の静注による体内動態

水溶性リグニンの体内動態をさらに詳細に知るために、静注による投与を行った。ここでは吸収率の最も低い ^{14}C -EP3について検討した。

(1) 血漿中からの放射活性の減少速度

血漿中放射活性の72時間までの推移を Fig. 6 に示す。経口投与と異なり、血漿中濃度—時間曲線は2個体の間でよく一致している。 ^{14}C -EP3は広い分子量分布を持っているため、明瞭な直線性は得られなかったが、投与直後と12時間以後とでは、異なる速度定数のもとに血中から消失していると思われた。厳密ではないが、血漿中濃度の変化が一次反応式に従って減少すると仮定して、Fig. 6 の各測定値を、2つの指数関数の和で表した指数関数

$$C = A \cdot \exp(-\alpha t) + B \cdot \exp(-\beta t)$$

にあてはめ最小二乗法で近似した²²⁾。なお計算は投与直後の直線部分への一致を重視した。その結

Fig. 8 MAR of ^{14}C -EP3 p.o.-administered rats measured by Imaging Plate system.
 h : hours after p.o. administration.
 B : brain, H : heart, Ic : intestinal contents, L : liver, Lu : lung, Nc : nasal cavity,
 Sg : salivary gland, Si : small intestine, V : vertebra, T : testis, Th : thymus.
 Kidney and adrenal gland were not shown in these sections.

Fig. 9 Time course autoradiograms of rat kidney after p.o. administration of ^{14}C -EP3 measured by Imaging Plate system.

Fig.10 MAR of ^{14}C -EP3 p.o.-administered rats measured by X-ray film method.
K : kidney, L : liver, Sp : spleen

果、式中の α と β は、それぞれ平均3.65, 0.449/hとなり、これより血漿中濃度の半減期は11分および1.5時間になった。

(2) 尿、糞中への排泄量

Fig. 7に尿中への放射活性の総排泄量の経時変化を示す。72時間までの投与量に対する総排泄量は平均14.3%と比較的少なかった。これは ^{14}C -EP3が高分子であるためであろう。

一方、糞中への排泄量を Table IV に示す。

72時間までで投与量の1.1~2.0%が排泄された。これは胆汁排泄によるものと思われる。24時間毎の測定値はほぼ同じ値を示していることから、肝中に蓄積された EP 3はゆっくりと代謝を受け、少量ずつ胆汁中へ排泄され则认为られる。

(3) 臓器中放射活性

Table V に静注後72時間における臓器中放射活性を示す。腎臓特に皮質に高い活性がみられる点は経口投与の場合と同じであるが、経口投与と

Fig.11 MAR of ^{14}C -EP3 p.o.-administered rats measured by X-ray film method.
Ag : adrenal gland

最も異なる点は、肝臓に投与量の25%の放射活性が残ることである。このことは、経口投与では腸管で吸収されない ^{14}C -EP3の高分子部分が、静注では血中に入るためと考えられる。さらに72時間後でも高い放射活性が残ることは、高分子ほど代謝されにくく肝中に留まりやすいことを示している。したがって、 ^{14}C -EP3のうち低分子のもののほど吸収も排泄もされやすく、分子量が大きくなるほどその逆になることがわかる。高分子のもののほど体内に長時間滞留するとなれば、吸収率が低くても長期間摂取し続けることによる高分子画分の有効性を無視できない。いずれにせよ、B型肝炎に効果のある LEM 中の活性画分が、長時間肝中に滞留することはきわめて興味深い。そのほか、静注においても腸間膜リンパ節に放射活性が

高く、また、大腿骨（骨髄）、脾臓への分布も経口投与の場合より明瞭に示されている。

(4) 生物学的利用率の試算

^{14}C -EP3の生物学的利用率を、 μCi 当たりの AUC、および尿中総排泄量の投与量に対する割合を静注と経口投与で比較することにより算出した (Table VI)。すなわち、 $\text{AUCpo}/\text{AUCiv} \times 100$ または経口投与での尿中総排泄量/静注での尿中総排泄量 $\times 100$ の形で表した²²⁾。AUC および尿中総放射活性による値には4倍近い開きがある。後者が高くなった原因は、経口と静注では吸収される ^{14}C -EP3の分子量分布が異なり、経口では ^{14}C -EP3の低分子部分の吸収が多く、その分排泄速度も大きくなったためと思われる。おそらく真の生物学的利用率は両値の間にあると考えられ

る。

4. オートラジオグラフィによる経口投与 ^{14}C -EP3の体内動態

^{14}C -EP3の経口投与による器官分布およびその経時変化を観察するため、ラットの全身オートラジオグラム (MAR) を作成した。イメージングプレートシステム^{18,19)}による全身 (正中線面) および腎臓の MAR を Fig. 8 と 9 に、X線フィルムによる腎臓面および副腎面の MAR を Fig. 10 と 11 に示す。なお鼻腔、器官、肺にかけてみられる高い放射活性は、投与操作の不備により一部戻したためと思われるが、考察の対象には入れなかった。

本実験では、kg 当たり $300\mu\text{Ci}$ 以上という常法²²⁾ に比べると多量の放射活性を投与したが、X線フィルムでは消化管付近の飽和した黒化度に比べ、各臓器は判別できる限界に近く、吸収率の低さを物語っている。消化管以外で最も高い放射活性を示したのは腎臓で、次いで肝臓、骨髄への分布が多い。血中濃度 (Fig. 8 心臓内) は2時間を最高に6時間以降急速に減少する。他の臓器はほとんど6時間を最高としている。

投与後72時間において腎皮質が最も高い放射能濃度を示す (Fig. 9)。このように長時間腎皮質中に局在することは、 ^{14}C -EP3がろ過され難い物質であり、ある程度の大きさの分子量を持つことを示唆する。また、尿中への放射活性は投与後12時間までに大部分が排出される (Fig. 5) にもかかわらず、72時間後においてもなお高い放射活性を示すことは、何らかの特異的吸着あるいは近位尿細管におけるファゴサイトシスの後、代謝も排泄もされないまま残存する可能性もある。これまで LEM の腎毒性は報告されていない¹³⁾ が、より詳細な分布と長期間の代謝の検討が必要と思われる。

次いで高い放射活性を示したのは肝臓である。6時間で最高値を示し、72時間後においても残存していることから、ここにおいても ^{14}C -EP3が代謝されにくい物質であることが示唆された。骨髄も肝臓に次ぐ高濃度を示した。骨髄は増血器官であり、血球、リンパ球などの分化誘導器官である。 ^{14}C -EP3や ^{14}C -PLS などが骨髄に顕著な分

布を示したことは、水溶性リグニンの *in vitro* での骨髄細胞増殖活性⁴⁾ が *in vivo* でも有効である可能性が示唆された点できわめて興味深い。Fig. 8 では精巣、顎下腺、また、Fig. 10では脾臓にもやや高い放射活性が認められるが、細胞機能との関係は今後の課題である。脳 (Fig. 8)、副腎 (Fig. 11) への分布はほとんど見られなかった。

以上、 ^{14}C -EP3はラット腸管から吸収され、肝、腎、骨髄などに分布することが確認できた。 ^{14}C -EP3の生物学的利用率は、3種の水溶性リグニンのうちで最も低かったが、これは利用率が分子量に依存することを示している。この点から考えると、本来の EP3は ^{14}C -EP3より高分子部分を多く含むため、さらに利用率が低くなることが予想されるが、一方、両者の化学的性質および *in vitro* での生物活性における相同性から、 ^{14}C -EP3は EP3の低分子部分と同等の性質を持つものと考えられる。したがって、EP3を経口投与したときの腸管吸収も十分予想されるところである。すでにB型肝炎患者¹³⁾ やエイズ患者⁶⁾ に対し、EP3を含む LEM の経口投与により治療効果の有効性が示されており、今後さらに *in vivo* での生物活性を評価することにより、経口投与で副作用のない、免疫活性を持った抗ウイルス剤の開発が期待される。

要 約

In vitro で免疫活性と抗ウイルス活性を併せ持つ水溶性リグニンを ^{14}C でラベルし、ラット腸管からの吸収と体内動態を検討した。異なる分子量分布を持つ3種の水溶性 ^{14}C リグニン、EP3, SB1000, PLS は、経口投与では放射活性の尿中排泄量および臓器中残存量から、 ^{14}C -EP3で0.8%、 ^{14}C -PLS で5.9%、 ^{14}C -SB1000で8.0%の吸収が確認された。また、吸収、排泄ともに分子量の大きいものほど遅く、低分子ほど速やかであった。いずれの水溶性リグニンも腎臓へ高濃度の残留が認められ、また、リンパ節、肝臓にも高い活性が認められた。 ^{14}C -EP3の経口投与による全身オートラジオグラムの経時変化から、 ^{14}C -EP3は腎皮質に最も高濃度に分布し、長時間残留すること、また、骨髄にもかなり高い放射活性が

観察され、水溶性リグニンの *in vitro* での骨髓細胞増殖活性との関連が強く示唆された。静注では、 ^{14}C -EP3の高分子部分は肝臓に蓄積し、容易に代謝、排泄されないことがわかった。以上の結果から、水溶性リグニンのラット体内における吸収および動態の一端が明らかになった。

謝 辞

動物実験にあたり懇切なご指導を頂いた浜松医科大学山下昭教授、MAR作成の便宜をはかって頂きました三共株式会社鳥潟頭雄博士、精製リグノスルホン酸塩をご供与下さいました東京大学農学部飯山賢治博士に深謝致します。

文 献

- 1) 飯塚千代吉, 麓 長八: 日本特許公報, 昭53-23392 (1978).
- 2) Maeda, H., Choji, Y., Hibino, Y., Yamamura, S., Masumi A. and Sugano, N.: 3rd Congress of the Federation of Asian Biochemists, Bangkok, Thailand (1983).
- 3) Tochikura, T.S., Nakashima, H., Ohashi, Y. and Yamamoto, N.: Inhibition of replication and of cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med. Microbiol. Immunol.*, **177**: 235-244 (1988).
- 4) Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S., Suzuki, K., Mitsuya, H. and Toda, S.: Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 367-373 (1989).
- 5) Sorimachi, S., Niwa, A., Yamazaki, S., Toda, S. and Yasumura, Y.: Anti-viral activity of water-solubilized lignin derivatives *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(5): 1337-1339 (1990).
- 6) Shirohata, A., Mori, K., Kishida, K., Maruyama, I. and Suzuki, K.: Abstracts of Papers, Annual Meeting of AIDS Kenkyukai, Matsue, p. 63 (1989).
- 7) Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Effects of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on polyclonal antibody response induced pokeweed mitogen. *Gastroenterologia Japonica*, **22**(5): 627-632 (1987).
- 8) 鈴木春巳, 斎藤 倫, 大久保 明, 山崎素直, 戸田昭三: 椎茸菌糸抽出物 (LEM) の高分子画分の免疫活性. 医学のあゆみ, **138**: 441-442 (1986).
- 9) 鈴木春巳, 大久保 明, 山崎素直, 戸田昭三: 日消誌, **85**: 1430 (1988).
- 10) 溝口靖紘, 児玉千枝, 北村瑞穂, 阪上吉秀, 小林絢三, 山崎素直, 戸田昭三, 山本祐夫, 森沢成司: *Lentinus edodes* mycelia 培養抽出物 (LEM) の免疫学的肝細胞障害および抗体産生に及ぼす影響. 肝胆脾, **15**(1): 127-135 (1987).
- 11) Sugano, N., Hibino, Y., Choji, Y. and Maeda, H.: Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett.*, **17**: 109-114 (1982).
- 12) Sugano, N., Choji, Y., Hibino, Y., Yasumura, S. and Maeda, H.: Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP 1) from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *ibid.*, **27**: 1-6 (1985).
- 13) 原田 尚, 兼高達武: HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する LEM による治療. 肝胆脾, **14**(2): 327-335 (1987).
- 14) Suzuki, H., Iiyama, K., Yoshida, O., Yamazaki, S., Yamamoto, N. and Toda, S.: Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.*, **54**(2): 479-484 (1990).
- 15) Suzuki, H., Iiyama, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Toda, S.: Ligno-sulfonate from waste liquor of pulping process activates murine macrophages and causes proliferation of bone marrow cells. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(4): 1197-1199 (1989).

- 16) Suzuki, H., Tochikura, T.S., Iiyama, K., Yamazaki, S., Yamamoto, N. and Toda, S. : Lignosulfonate, a water-solubilized lignin from the waste liquor of the pulping process, inhibits the infectivity and cytopathic effects of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(12) : 3369-3372 (1989).
- 17) 船岡正光, 阿部 勲, 吉村 貢 : ハイドロトロピックリグニンとフェノールおよびホルムアルデヒドの反応. 木材学会誌, **23**(11) : 571-578 (1977).
- 18) 中島栄一, 安川勝衛, 篠崎速雄, 松原行雄, 藤下繁人, 岡野伸一 : 全身オートラジオグラフィの定量化および FO-1561 のラット組織分布測定への応用. 薬物動態, **3**(6) : 67-80 (1988).
- 19) 宮原淳二, 現代化学, 10月号, p. 29 (1989).
- 20) Fahey, Jr., G.C., and Jung, H.G. : Lignin as a marker in digestion studies. *J. Animal Sci.*, **57** : 220-225 (1983).
- 21) 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二編, ファーマコキネティックス実験法 (ソフトサイエンス社), pp. 547-565 (1985).
- 22) 村田敏郎, 有田隆一編, 「生物薬剤学実験法」 pp. 172-201, 1984 (南江堂).