

マウスの凍結全身切片標本による ^{14}C -INH の体内分布の観察

—全身マクロオートラジオグラフィとフィルム
シンチレーションカウンターによる追跡—

豊原 希一・重松 昭世

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎龍郎)

受付 昭和44年8月14日

A STUDY ON THE DISTRIBUTION OF ^{14}C -LABELLED INH
IN WHOLE BODY SECTION OF FROZEN MICE BY USE
OF AUTORADIOGRAPHY AND FILM
SCINTILLATION COUNTER*

Mareichi TOYOHARA and Akiyo SHIGEMATSU

(Received for publication August 14, 1969)

Changes in the distribution of ^{14}C -labelled INH in mouse body with the lapse of time was studied by combining the macroautoradiography (ARG) of whole body section of frozen mice and measuring radioactivity with the film scintillation counter. Mice were injected subcutaneously $20\mu\text{Ci}$ of ^{14}C -INH (carbonyl ^{14}C , specific radioactivity 9.6mCi/mM), and at 1, 6 and 24 hours after injection each one mouse was killed and rapidly frozen in acetone-dry ice (-78°C). Then, the whole body of each mouse was sectioned in the thickness of about $20\mu\text{m}$ by Leitz 1300 microtome in cryostat at the temperature of -20°C .

ARG of the whole body section was carried out by the contact method using Sakura industrial X-ray film. After four weeks exposure X-ray film was developed and fixed. Distribution of ^{14}C in the various organs was compared by the density of film.

As seen in photo. 1, at one hour ^{14}C -INH was distributed in the whole body including the subcutaneous tissue, muscles and markedly in the intestines, stomach, liver and brain.

After one hour ^{14}C -INH was discharged so rapidly that at 6 hours ^{14}C was hardly proved in the subcutaneous tissue and muscles but remained in the lung, liver, stomach, brain and kidney, and it was also transmitted to urine bladder. It is thought that ^{14}C disappears from the circulating blood at six hours, as it cannot be found already in the heart.

At twenty-four hours significant photodensity was seen only in the liver, and its density was similar to that at six hours. The radioactive substance in the liver at 24 hours is not probably INH itself, but some labelled metabolites of INH retained in the liver.

Radioactivities of the whole body section and of each organ per 1cm^2 by film scintillation counter are shown in Fig. 1, and the disintegrated rate calibrated from the count rate coincides well with that of ARG.

By combining the both methods, the more reliable informations on the distribution of labelled chemicals are obtained.

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo 180-04 Japan.

1. 緒 言

Isonicotinic acid hydrazide (INH と略) の体内代謝に関する実験はすでに多いが、INH の体内分布を全身的に一望の下に観察したという報告を知らない。薬学分野では最近ラジオアイソトープ (R.I. と略) 標識化合物を用い、Ullberg¹⁾ により開発された全身マクロオートラジオグラフィ (全身マクロ ARG と略) を用い、その体内分布や排泄の状況を観察した研究や総説が発表されている²⁾⁻⁴⁾。

この方法は薬物の体内分布を肉眼的に知ることができるという点、きわめて興味あり、また効果的である。しかし分布する放射能は得られた写真の黒化度により推定する以外なく黒化度と放射能との関係が直線関係にならない場合も多く、分布する放射能を黒化度から推定することは不正確さを免れない。

著者らはすでにこの点に注目し全身切片各臓器の放射能を、当所で開発したシンチレーションカウンタにより測定し、これと併行して同一の切片につき全身マクロ ARG を行ない、ARG の数量化をはかつた⁷⁾⁸⁾。

今回は ¹⁴C-INH を用い著者らの方法により、マウス体内における ¹⁴C-INH の挙動を観察し興味ある知見を得たので報告する。

2. 実験材料ならびに方法

2-1. 使用 ¹⁴C-INH :

| | |
|------|---------------------------|
| 標識位置 | Carbonyl- ¹⁴ C |
| 比放射能 | 9.6mCi/mM |

2-2. 使用マウス :

体重 20g の dd 系 ♂ マウス

2-3. マウス全身切片の作成 :

¹⁴C-INH を蒸留水で 1mg/ml の割合に溶かし、マウス 1 匹当り 0.2ml すなわち 28μCi INH 量として 0.2mg をマウス腹壁皮下に注射する。

注射 1, 6, 24 時間後に 1 匹ずつマウスをエーテルで麻酔死させ、ポリエチレン製シートに包み体形を整えてアセトンドライアイス中 (-78°C) に頭部から入れ急速に凍結させる。

対照として注射 1 時間後に放血死させ、同様に凍結したもの、および ¹⁴C-INH を注射しない健康マウスをエーテル麻酔死させ凍結したものを 1 匹ずつおいた。

このようにして得られたマウスをアイスマウスと呼ぶ。このアイスマウスを正中線のやや左側で縦断し、切断面をあら削りし表面をなめらかにした後、-20°C のクリオスタット中で Leitz 1300 大型滑走マイクロームにより、厚さ約 20μ の全身薄切切片を作り、住友 3M #465 両面テープを使つてガラス板にはりつける。標本切片つきガラス板を -20°C 下で真空タンクに入れ、ロ

ーターポンプを用い、10⁻²mmHg 程度の減圧下で 3 日間引く。そのあとタンクの外温を上げ、1 日かかつて常温にもどす。真空を切り常圧とし、ただちにデシケーター中に標本を入れオスミウムガスで固定する。

2-4. フィルムシンチレーションカウンタによる全身および各臓器の放射能測定

全身薄切切片中の低エネルギー β 線の放射能を測定する目的で作つたフィルムシンチレーションカウンタ⁷⁾⁸⁾ でまずマウス全身の薄切切片の放射能を測る。次に各臓器の放射能をはかるためにアルミホイル (4.5mg/cm²) 9 枚を切片上に重ね目的臓器の外縁をトレースし、その部分だけを切り抜き、これを標本上におおつて測定した。これにより他の部分の ¹⁴C の放射能はアルミホイルにより遮蔽されるので、目的臓器のみの放射能を測定しうる。

測定は平圧下で ¹⁴C のエネルギーに最適の電圧と window width で行なう。標準線源法により、この時の計数効率率は 20% であることが知られている。これから測定された計数率 (cpm) を壊変率 (dpm) に補正換算した。さらに各臓器の面積を求め、臓器 1cm² 当りの dpm を計算した。

2-5. オートラジオグラフィ (ARG) の実施

全身切片に対し工業用 X 線フィルム Sakura N を用い、コンタクト法により 4 週間暗室中で露出する。露出後、X 線フィルム用現像液で 20°C 4 分現像し、酢酸ストッパーに入れた後、定着、水洗、乾燥する。

3. 成 績

3-1. ARG の所見

写真 1 に示す。

左端のオートラジオグラフィは ¹⁴C-INH を投与しない対照切片で、物理的刺激による全身の外縁が輪郭として示されるのみで、同一フィルムで行なつたこの ARG には判定を誤まるようなカブリ像はないと考えてよい。

ARG によつて得られた各臓器の位置と名前を知るための参考として注射 1 時間後の切片のオートラジオグラフィのシェーマを図 2 に示す。

皮下注射 1 時間後には INH は全身に分布し、とくに腸、胃が最高、次いで肝、脳に多い。胃、腸にはその内容物に多量の ¹⁴C 放射能を認めているから、いつたん血行を介して吸収された INH が胃壁、腸壁より内腔に分泌されたと考えらるべきであろう。また腎盂の部分に ¹⁴C の高い黒化度を認めるが、これはすでに ¹⁴C の排泄が始まっていることを示すものであろう。

肺への移行も相当濃度に認められるが肝、脳よりは少ない。

全身の筋肉や皮下組織に均等に分布していることが分かるが、その黒化度は心とほぼ同じであるからこの時点

Photo. 1. Autoradiograph of Whole Body Section of Mice Showing the Changes in the Distribution of ¹⁴C-INH after Subcutaneous Injection

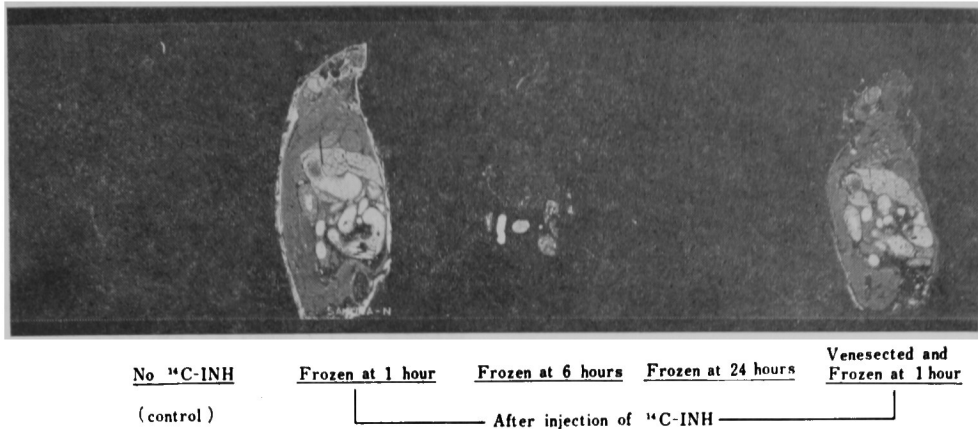
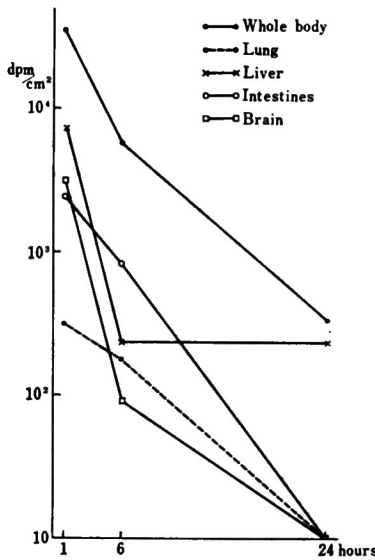


Fig. 1. Changes in the Distribution of ¹⁴C-INH in Mouse Body with the Lapse of Time



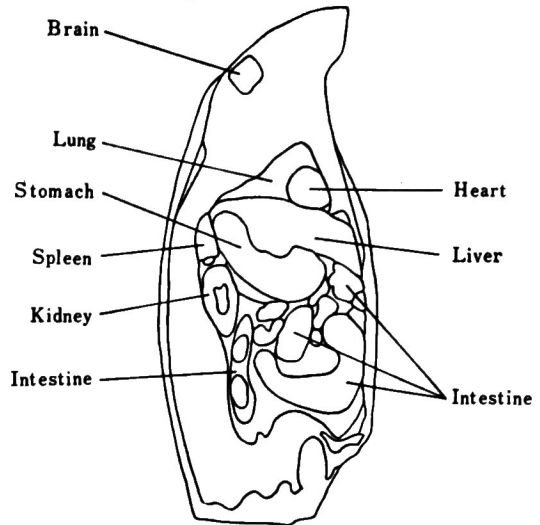
では、筋肉、皮下組織の血管中に主として含まれていると推定されよう。

次に注射1時間後に放血して全身切片を作り ARG を行なったものについてみると、分布状況は上述のマウスと変りはないが全体として放血しないものに比べ黒化度が低い。これは血中 INH の影響によるものと思われる。

注射6時間後には皮下、筋層の ¹⁴C はほとんど消失し腸、肺、肝、胃、脳、腎に残存しさらに膀胱に移行している。とくに腸の一部には、相当量残っている。心にはすでに ¹⁴C を認めないことから血中からは ¹⁴C はすでに消失していると考えられる。

24時間になると肝のみに ¹⁴C による黒化を認める。黒化度は6時間とあまり変わらないが、この時点ではおそらくすでに INH としてではなく INH の代謝産物が残

Fig. 2. Scheme of ARG at 1 Hour after Injection of ¹⁴C-INH



留しているであろう。

3-2. フィルムシンチレーションカウンタによる測定

図1に全身および肺、肝、腸、脳における単位面積当りの ¹⁴C 放射能の変動を示す。

全身および肺、腸の放射能は1時間から24時間までの間に急速にほぼ直線的に減少する。脳は6時間以降やや排泄の速さがにぶる。肝では6時間までは急速に減少するが、6時間以後滞留しほとんど放射能は変わらない。

肝を除く臓器では24時間の放射能は認められなかった。

4. 考 察

R. I. 標識化合物を用いて代謝、あるいは体内分布を

みようとするとき、体内で標識 R.I. が遊離したり中間代謝、あるいは終末代謝産物に標識されていることはままあることであり、得られた成績を考察しようとするときは十分注意をする必要がある。

今回、 ^{14}C -INH を用いてその体内挙動をみたが6時間位までの放射能は他の多くの INH の生物学的活性を調べた成績を参照すると INH によるものが主体をなしていると考えられるが24時間になるとすでに INH の代謝産物によるものと考えるのが適当であろう。したがってこのような場合、正しくは ^{14}C -INH を注射した時の体内における ^{14}C の挙動といった表現をとるべきかもしれない。

しかし、このような R.I. 標識化合物使用にまつわる宿命の問題点はあるにしても凍結全身切片マクロ ARG により ^{14}C の体内各臓器への分布を ^{14}C の流出、移動なく一望の下に観察でき、かつ1枚のフィルム上で、その消長を比較することができるということは他の方法では容易に得ることができない多くの知見をわれわれに与えてくれる。たとえば ^{14}C -INH は注射後、急速に全身に分布し1時間後では皮下、筋層に及び心臓血を標準としてみると血中濃度よりさらに高い濃度で脳、肝等に分布している。また胃腸も高い濃度を示すが分布が一様でない。これは胃、腸が実質臓器でなく、管腔臓器であり、管壁より内腔に ^{14}C が分泌のような形で分布するからであろう。肺への分布は比較的少なく血中濃度より低い位である。いずれにせよこれらの所見は INH が結核性髄膜炎をはじめ、全身結核によく奏功するのを裏書きするものであろう。

6時間になると血液、皮下、筋層の ^{14}C はほとんど消失しその他の臓器も総体的に黒化度は急激に低下するが、腸は局部的に多量に残留している。これは ^{14}C の胃から腸への移動とともに肝からの胆管を介しての排泄もあるのかもしれない。この所見はこの時点で腎盂に ^{14}C が集積し、膀胱にかなりの黒化度を認めるのと合わせ考えると INH 代謝産物の排泄が腎からばかりでなく腸管からも行なわれると考えてよいのではないか。したがってまたこの時点での放射能はすでに INH のみによるものではないことを推定させる。

24時間では肝のみに黒化が残っており、6時間とあまり違わないが、 ^{14}C の量に差がないということであり質的にはおそらく大きな違いがあるであろう。この点については残念ながら ARG では分からない。

以上のごとくマクロ ARG は興味ある知見を提供してくれるが、写真黒化度の latitude は広くなくその定量化は容易でない⁹⁾。たとえばデントメーターで肝の黒化度が肺の2倍あつたとしてもそのまま放射能が2倍あ

るとはいえない。

放射能の定量的比較は測定器によるほうが正確である。そこでわれわれは当所で試作したフィルムシンチレーションカウンターを用い各臓器の放射能を測定し、マクロ ARG と比較したわけである。

その結果は ARG の所見とほぼ一致していた。たとえば ARG で24時間なお放射能の残留していた部分は肝のみで、黒化度は6時間とほぼ同じであつたが、カウンターによる測定値もこれを裏がきしていた。

これによりマクロ ARG の定量化が期待でき、またカブリ等とかく写真判定につきまとう疑問点あるいは不安感を除き、正しく評価することができると

5. 結 論

^{14}C -INH のマウス体内における消長を全身切片マクロ ARG とフィルムシンチレーションカウンターを併用し観察した。

1) ^{14}C は注射1時間後に全身に分布し、とくに肝、胃、腸、脳に多い。それ以後急速に減少し6時間後には心、筋層等にはすでに ^{14}C は認められない。24時間では肝のみに残留する。

2) ARG とフィルムシンチレーションカウンターによる結果はよく一致していた。両者を併用することにより、より信頼性の高い考察や結論を得ることができよう。

謝 辞

岩崎所長のご校閲を謝す。本研究実施にあたり高木リエ、友野京子女士および日本歯科大学学生吉岡重保君に多くの労をわずらわせた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) Ullberg, S. : Acta Radiologica Supplementum, 118, 1954.
- 2) 松岡理・鹿島正俊 : Radioisotopes, 16 : 634, 昭42.
- 3) 松岡理 : Radioisotopes, 18 : 75, 昭44.
- 4) 重松昭世 : Radioisotopes, 18 : 160, 昭44.
- 5) 浮田忠之進・武田寧・佐藤善衛・高橋忠男 : Radioisotopes, 18 : 449, 昭42.
- 6) 高橋忠男・佐藤善衛 : Radioisotopes, 16 : 583, 昭42.
- 7) 重松昭世・豊原希一・徳永昇・末吉徹・本村和子・吉岡重保 : Radioisotopes, 17 : 476, 昭43.
- 8) 豊原希一・重松昭世・友野京子・高木リエ・末吉徹 : 第九回日本アイソトープ会議, 昭44.
- 9) 日本放射性同位元素協会編 : アイソトープ便覧, 408, 昭37.