

《実験ノート》

2, 3 のトリチウム標識化合物の腭分布についての検討

手塚 雅勝* 五島 廉輔* 藤沢 宗駿* 石上 和子* 為政 脩*

1. はじめに

現在腭スキャンニング剤としては, Blau¹⁾によって生合成の報告が行われ, 引続き Blau, Bender²⁾によってその有用性が報告された, ⁷⁵Se-セレンメチニオン (Met-⁷⁵Se) がもっとも広く用いられている. しかし, 本物質を用いても優れたスキャンニング像を得ることは困難であって, よりよい腭スキャンニング剤を開発しようとするいくつかの試みがある^{3)~6)}. 著者らもすでにこの線に沿って, ³H-標識ベルベリンに関する再検討を行い, その結果を報告した⁷⁾. そこで, γ -放射性核種で標識できるような母体物質を探索する目的で, 今回いままでに報告されたことのない 2, 3 の物質について ³H-標識化合物を用い, マウス腭中分布を肝との比較において検討したので, ここに報告する.

その第1の物質は, 腭のランゲルハンス島の細胞中に存在する亜鉛のブロックによって惹起すると考えられている, 代表的な人工的糖尿病誘発物質の1つである, 2-methyl-8-hydroxyquinoline⁸⁾の³H-標識化合物を用いて, マウスに経口投与後の腭中放射能の分布を調べた. また第2の物質として, ルチン投与後のシロネズミ臓器中に蛍光顕微鏡を用いる, 細胞化学的方法によってルチンが検出されたという報告⁹⁾に基づいて, ³H-標識ルチンおよびその³H-ジグリセリンエーテル

誘導体を用い, マウスに静注, または経口投与後の腭中放射能の分布を検討した.

2. 実験方法

³H-標識化合物の調製1. ³H-2-methyl-8-hydroxyquinoline (MHQ-³H) の調製

市販の MHQ 1g を簡易型トリチウム標識装置¹⁰⁾を用いて, 約 7.5Ci のトリチウムガスと14日間アンプル中に接触放置した. 過剰のトリチウムガスを除去後, まず目的物質の尿酸基の不安定トリチウムを除去する目的で, この粗標識化合物を 1N-NaOH に溶かし, 凍結乾燥に付し, 乾燥後の残渣に水を加え, この凍結乾燥操作を3回くりかえした. 残渣のナトリウム塩に適量の水を加えた後, 1N-HCl を加えて中和すると, 淡黄色結晶が析出した. 本結晶のメタノール溶解液を, 東洋汙紙 No. 526 の大型汙紙 (40×40cm), 展開溶媒 n-ブタノール: 酢酸: 水 (4: 1: 2) を用いて, 3回くりかえし調製の汙紙クロマトグラフィーにかけ, 目的の MHQ-³H を精製した. 最終精製品は汙紙クロマトトリチウムスキャンニングにより, 標準品の非放射性 MHQ と同一 R_f 値上にスキャンニングピークを与えた (Fig. 1). しかし, この汙紙クロマトグラフィーによる精製では, 原点側の低い肩 (Fig. 1, ピーク S) を完全に除去することはできなかったが, 本研究の目的には差支えないとしてそのまま実験に供した. 比放射能: 4.0×10⁴dpm/μg.

2. ルチンおよびルチン-7,4'-ジグリセリンエーテル (RnGn) の ³H-標識化合物の調製
エーザイ(株)より分与された精製ルチンおよび

* 静岡薬科大学放射薬品学教室

受付: 48年11月2日

別刷請求先: 静岡市小鹿 2-2-1 (〒422)

静岡薬科大学放射薬品学教室

手塚 雅勝

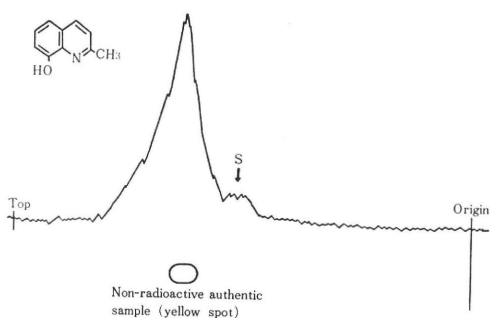


Fig.1 Paper Chromato-scanning Profile of ^3H -2-Methyl-8-hydroxyquinoline.
After purification by preparative paper chromatography of tritiated crude product, the last purified sample was scanned by a paper chromato-scanner.

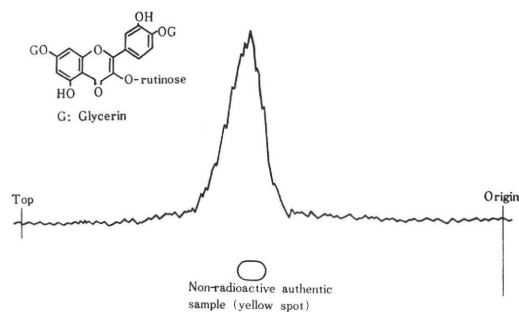


Fig.3 Paper Chromato-scanning Profile of ^3H -Rutin-diglycerin-ether.
After purification by preparative paper chromatography of tritiated crude product, the last purified sample was scanned by a paper chromato-scanner.

RnGn¹¹⁾各1gを約7.5Ciのトリチウムガスとともに、上記MHQ同様に操作してトリチウムガスとの接触を行った。不安定トリチウム除去のため、粗標識化合物をメタノールに溶かし減圧濃縮操作を約10回くりかえした後、得られる粗結晶を上記MHQの場合と全く同様に調製の沝紙クロマトグラフィーにかけ、この精製操作を3度くりかえし行った。最終精製品は、両者とも沝紙クロマトグラム上に標準品と同一Rf値を示し、またラジオクロマトスキャンニングにより単一ピークを示し

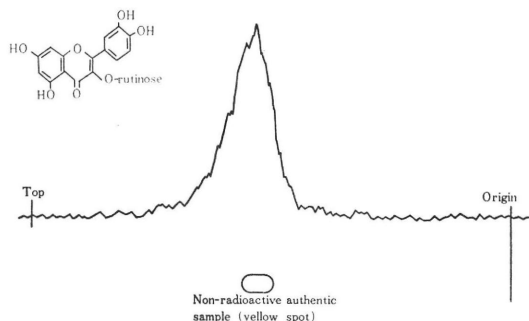


Fig.2 Paper Chromato-scanning Profile of ^3H -Rutin.
After purification by preparative paper chromatography of tritiated crude product, the last purified sample was scanned by a paper chromato-scanner.

た (Fig. 2 および 3). 比放射能: ルチン- ^3H , $2.5 \times 10^3 \text{dpm}/\mu\text{g}$; RnGn- ^3H , $1.45 \times 10^4 \text{dpm}/\mu\text{g}$.
実験動物

体重25g前後の ddY 系雄性マウスを用いた。

^3H -標識化合物の臓器内分布の測定

いずれの場合も1群6匹からなるマウスに、それぞれMHQの場合その1mgまたは0.1mg/ml生理食塩水液0.1ml (100 μg または10 μg /マウス) (投与量は本物質の毒性⁸⁾と比放射能とを考慮して決定した)を、ルチン- ^3H の場合は7mg/ml 1% CMC水懸濁液0.5ml (3.5mg/マウス)を経口的に胃ゾンデを用いて投与した。またRnGn- ^3H の場合は10mg/ml生理食塩水0.1mlを尾静脈より投与した。投与後所定の時間ごとに1群のマウスにエーテルを吸入させて殺し、目的の臓器ならびに肝臓その他の臓器を取出した。肝臓の場合は全体をすりつぶしたのち、腎臓の場合はハサミで細切したのち、脾臓および脾臓の場合はそのまま、いずれも凍結乾燥を行った。この乾燥臓器の1部(肝・腎)または全部(脾・脾)を、Schoeneringerの微量分析用フラスコを太田¹²⁾が改良した燃焼装置を用いて、酸素中で燃焼した。生成した水分($^3\text{H}_2\text{O}$)はアセトン・ドライアイスの寒剤を用いてフラスコ底部に集め、MHQ- ^3H の場合以外は液体シンチレーター〔PPO 0.09g, PO

POP 0.002g, ナフタリン 0.5g, ハイアミン10X (ハイドロオキサイド型, Packard Instrument Comp., Inc.) 0.2ml, トルエン10ml, ジオキサン 5 ml〕15 ml に溶かし, またMHQ- ^3H の場合は上記液体シンチレーター組成中ハイアミンを含まず, またトルエン10.5ml, エタノール4.5mlからなる全量 15ml のシンチレーターに溶かし, いずれの場合も Packard 液体シンチレーションカウンターを用いて放射能の測定を行った. 計数効率の測定は, 標準トリチウム水を用いる内部標準法, または ^{137}Cs 線源による外部標準法にしたがって行った. また本法によるトリチウム放射能の回収率は93~95%であり, 測定値に関する回収率の補正は行わなかった.

3. 結果および考察

MHQ- ^3H の場合

膵臓, 肝臓および脾臓中の放射能の時間的経過は, Fig. 4 および Fig. 5 に示すような結果を得

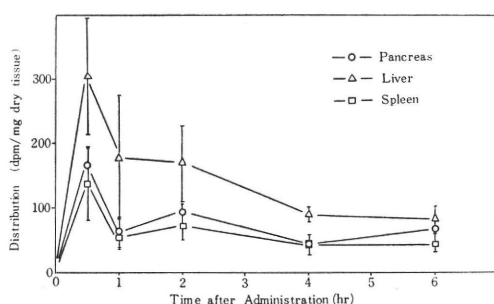


Fig. 4 Distribution of Radioactivities in the Mouse Pancreas, Liver and Spleen after the Oral Administration of ^3H -2-Methyl-8-hydroxyquinoline at a Dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

Five groups consisted of 6 mice were administered with the radioactive test substance and sacrificed at the prescribed time intervals. Pancreas, liver and spleen were removed from the mice, lyophilized and combusted in a flask for the determination of radioactivity.

Finally the tritiated water formed was determined by a liquid scintillation counter.

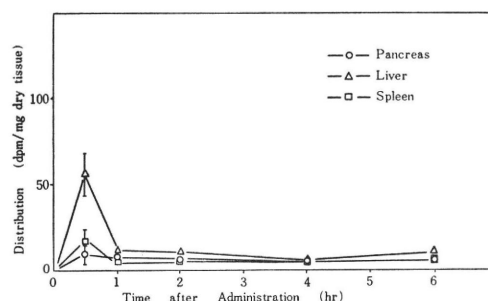


Fig. 5 Distribution of Radioactivities in the Mouse Pancreas, Liver and Spleen after the Oral Administration of ^3H -2-Methyl-8-hydroxyquinoline at a Dose of 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

Five groups consisted of 6 mice were administered with the radioactive test substance and sacrificed at the prescribed time intervals. Pancreas, liver and spleen were removed from the mice, lyophilized and combusted in a flask for the determination of radioactivity. Finally the tritiated water formed was determined by a liquid scintillation counter.

た. この結果は, 経口投与後(100 μg および 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)の場合ともに, すでに0.5hr後に測定した3臓器とも放射能は最高値に達し, 以後1hr後に向かって急激な減少をみたが, 2hr以後はゆるやかな減少傾向を示した. 臓器間の分布量は両投与量とも乾燥臓器重量あたり肝臓にもっとも多く, 次は脾臓または膵臓であって, はじめ期待したような膵臓への著しい集積は認められなかった. このことは人工的糖尿病誘発物質が膵のインシュリン産生細胞に作用することを否定するものではないが, 膵細胞に特異的に分布するものではないことを示した.

ルチン- ^3H および RnGn- ^3H の場合

ルチン- ^3H の経口投与の結果はFig. 6に示すように, 投与0.5hr後に肝臓・膵臓ともに放射能は最高値に達し, その後4hr後に向かってかなり急激に減少し, 以後12hrまでゆるやかな衰退をたどった. 0.5hr後の肝臓および膵臓における濃度は前者が後者の約2倍であって, 期待するような結果は得られなかった.

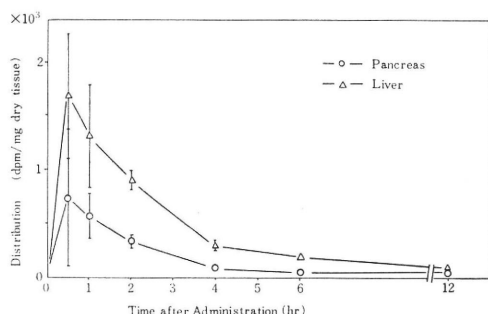


Fig. 6 Distribution of Radioactivities in the Mouse Pancreas and Liver after the Oral Administration of ^3H -Rutin at a Dose of 3.5mg/mouse

Six groups consisted of 6 mice were administered with the radioactive test substance and sacrificed at the prescribed time intervals. Pancreas and liver were removed from the mice, lyophilized and combusted in a flask for the determination of radioactivity. Finally the tritiated water formed was determined by a liquid scintillation counter.

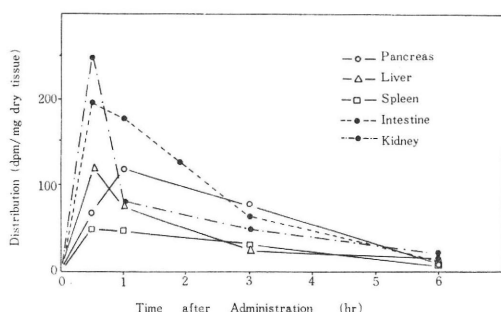


Fig. 7 Distribution of Radioactivities in the Mouse Pancreas and Other Tissues after the Intravenous Administration of ^3H -Rutin-diglycerin-ether at a Dose of 1 mg/mouse

Four groups consisted of 6 mice were administered with the radioactive test substance and sacrificed at the prescribed time intervals. Pancreas and other tissues were removed from the mice, lyophilized and combusted in a flask for the determination of radioactivity. Finally the tritiated water formed was determined by a liquid scintillation counter.

また $\text{RnGn-}^3\text{H}$ の尾静脈投与後の分布動態は Fig. 7 に示すように、ここにおいてもまた RnGn の膵集積性は認められなかった。この場合、腎臓、小腸における分布は投与 0.5hr 後において肝臓および膵臓より高いことが注目される。

さて、現在用いられている $\text{Met-}^{75}\text{Se}$ の分布量は、動物種によって異なるが臓器重量あたり膵臓は肝臓の約 2.4~8 倍（ウサギで投与 0.5hr 後 2.4 倍¹³）、ラットで 2~4 hr 後 3 倍¹⁴）、マウスおよびイヌで 1 hr 後に 8 倍¹⁵）多いことが知られているが、しかしよりよいスキャンニング像を得るためにはその比が約 10 倍必要であろうと推定されていることから、本実験に用いた 3 種の物質の分布量は、物質投与後のどの時点においても満足すべきものではなかった。なお、本実験において標識化合物の臓器中存在形態が不明のため物質の絶対量を比放射能から算出することは行わず、たんに分布量はトリチウム放射能として表示した。これは本研究の実験結果から、膵スキャンニング剤の開発的研究上、本化合物が γ -放射性核種で標識できるような母体物質として有用である見込みがなかったため、さらに深く検討する必要を認めなかったためである。

4. 結 論

新しい膵スキャンニング剤を開発するための基礎的研究の一環として

(1) 実験的糖尿病誘引物質である 2-methyl-8-hydroxyquinoline の ^3H -標識体を用いて、マウスにおける経口投与後の経時的膵および肝臓中放射能の測定を行った。

(2) ルチン投与による蛍光顕微鏡の検出の行われている ^3H -標識ルチン、およびそのジグリセリンエーテルの ^3H -標識体の経口または静注投与後の経時的膵臓、肝臓その他 2, 3 の臓器中放射能の分布を測定した。

その結果、新しい膵スキャンニング剤の母体化合物として利用できるほどの高い膵集積性は認められなかった。

第12回日本核医学会総会で発表, 京都, 10月 (1972).

文 献

- 1) M. Blau : Biosynthesis of [^{75}Se] selenomethionine and [^{75}Se] selenocystine. *Biochim. Biophys. Acta*, **49** : 389, 1961.
- 2) M. Blau and M.A. Bender : ^{75}Se -Selenomethionine for Visualization of the Pancreas by Isotope Scanning. *Radiology*, **78** : 974, 1962.
- 3) I. Meschan, J. L. Quinn, L. Witcofski and T. A. Hosick : The Utilization of Radioactive Zinc and Manganese in an Effort to Visualize the Pancreas. *Radiology*, **73** : 62, 1959.
- 4) R.H. Greenlaw, W.H. Strain, T.E. Callear, L.D. Dubilier and S.C. Strain : Experimental Studies for Scintillation Scanning of the Pancreas. *J. Nuclear Med.*, **3** : 47, 1962.
- 5) B. Sodee, L. Renerts, G. Hill and B. Distanco : Dosimetry of Selenomethionine- ^{75}Se for Pancreatic Scanning. *Nucleonics*, **23** : 78, 1965.
- 6) M. Tubis and J. S. Endow : The Preparation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled Cystine, Methionine and a Synthetic Polypeptide and their Distribution in Mice. *Intern. J. Appl. Radiation Isotopes*, **19** : 835, 1968.
- 7) 為政 脩, 藤田卓二, 木村敏子 : 膵スキャンニング剤 (第 I 報) トリチウム標識塩酸ベルペリンのマウス膵中分布に関する再検討. *薬学雑誌*, **90** : 405, 1970.
- 8) 岡本耕造 : 糖尿病に関する実験病理学的研究. *日本内分泌学会雑誌*, **25** : 32, 1949.
- 9) 王 才蔭 : フラボノイドの組織化学的研究. *ビタミン*, **17** : 347, 1959.
- 10) 岡田昌二, 為政 脩 : Wilzbach 法によるトリチウム標識新簡易装置. *Radioisotopes*, **14** : 42, 1965.
- 11) S. Kono and K. Sugiyama : Rutin tris (dihydroxypropyl) ether., *Japan Pat.* **15**, 100, 1967.
- 12) 太田茂輝 : 改良型燃焼フラスコを用いる有機ハロゲンおよびイオウの微量定量. *分析化学*, **15** : 689, 1965.
- 13) 水上忠久 : ^{75}Se -selenomethionine による膵シンチグラムに関する研究. *日本医学放射線学会雑誌*, **26** : 1299, 1967.
- 14) 笥 弘毅, 有水 昇, 内山 暁, 秋庭弘道, 春日建邦, 館野之男 : 膵スキャンニング (第 I 報) ^{75}Se -セレンメチオニンの生合成とその使用経験. *日本医学放射線学会雑誌*, **23** : 972, 1963.
- 15) M. Blau and R. F. Manske : The Pancreas Specificity of ^{75}Se -Selenomethionine. *J. Nuclear Med.*, **2** : 102, 1961.