

## Pregneno lone-<sup>14</sup>Cのワキン体内分布に関するオー トララジオグラフ的研究

矢野, 友紀  
九州大学農学部水産化学第一教室

<https://doi.org/10.15017/23272>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 33 (2/3), pp.95-100, 1979-01. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

## Pregnenolone-<sup>14</sup>C のワキン体内分布に関する オートラジオグラフィ的研究

矢野友紀  
九州大学農学部水産化学第一教室  
(1978年9月25日受理)

### Autoradiographic Study on the Distribution of Pregnenolone-<sup>14</sup>C in Goldfish

TOMOKI YANO

Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University 46-04, Fukuoka 812

#### 緒言

Ullberg (1954, 1958) によつて開発された凍結全身オートラジオグラフィは放射性標識化合物の生体内分布、排泄並びに代謝の研究に広く活用されている。ステロイドホルモンの生体内分布に関する全身オートラジオグラフィ的研究は既にマウスを使つて数多くなされている (Ullberg and Bengtsson, 1963; Hangren *et al.*, 1964; Appelgren, 1967, 1969; Waddell, 1971, 1972; Appelgren and Marrero, 1972) が、魚類を対象とした研究は現在のところ見当たらない。本研究ではステロイドホルモンの前駆体である pregnenolone の放射性標識化合物をワキン (*Carassius auratus*) に投与して、その魚体内分布と排泄経路について調べた。

#### 実験方法

Pregnenolone-4-<sup>14</sup>C は Radiochemical Centre (Amersham England) から購入した。比放射能は 53 mCi/mM で、放射化学的純度は 99% 以上であつた。

全長 10~13 cm のワキン 14 尾 (雄 9 尾, 雌 5 尾) を 50 ppm の quinaldine 溶液中で麻酔し、鼻孔を結ぶ線よりわずかに前方中央部に錐であなを開け、外側から口腔内へキャニューラを通した。キャニューラは 15 cm のシリコンチューブ (Dow Corning Co., Syrastic tube, 0.14 mm i. d.) の先端に約 2 cm の注射針 (八光商事, 30 G 翼状針) を装着したものを自作した。つぎに、キャニューラにヘパリン-

生理塩類溶液を満たし、針の部分を鉗子で挟んで背大動脈に注意深く挿入した (Ngan *et al.*, 1973)。この時、針の挿入位置が正しければ血液がひとりりでチューブ内に流れ込んでくるので、少量のヘパリン-生理塩類溶液を用いてこれを血管内に押戻した後、チューブにストッパーをはめ、魚を水槽に戻した。麻酔剤および手術の影響を避けるため、魚をそのまま 12 時間以上放置した (Fig. 1)。

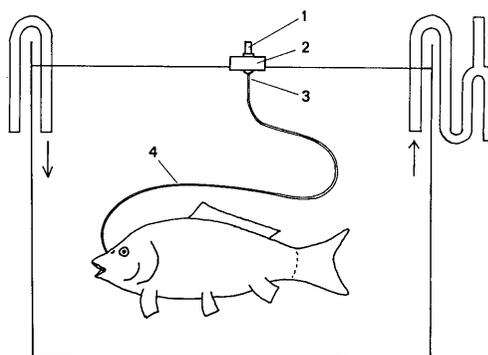


Fig. 1. Showing a goldfish implanted with a cannula into the dorsal aorta. 1. stopper, 2. foaming styrene, 3. needle, 4. cannula.

Pregnenolone-4-<sup>14</sup>C は 20  $\mu$ l のエタノール-生理塩類溶液 (1:1) に溶かしてマイクロシリンジで注入した。1尾当りの投与量は 2  $\mu$ Ci で 0.012 mg に相当した。投与後、5分、10分、20分、40分、1時間、4時間および12時間後に魚を2尾ずつ電気殺 (100 V-AC) し、すばやくキャニューラを取外し、口腔内に

ピンセットで綿球を差込んで止血後、7.5%カルボキシメチルセルロースゲルに包埋し、エタノールドライアイス中で凍結させた。

凍結ブロックを $-10^{\circ}\text{C}$ の部屋に移し、ヤマト光機1111型マイクロームで厚さ $40\mu$ の切片を1ブロックにつき60~70枚ずつ作製した。なお、接着テープにはスコッチ No. 810 (Minnesota Mining and Manufacturing Co.)を使用した。ついで切片を凍結乾燥後、保護膜(三菱樹脂 K. K., ダイヤホイル,  $4\mu$ )をかぶせて、工業用X線フィルム(さくら, タイプN)に密着させ、 $-10^{\circ}\text{C}$ で約3週間露出した。オートラジオグラムと全身切片を対比するために、切片の一部をヘマトキシリン-エオシンで染色した。

### 実験結果

**Pregnenolone- $4-^{14}\text{C}$**  投与後5分のワキンの全身オートラジオグラム (Fig. 2) は腎臓, 鰓, 筋肉に高い放射能の蓄積が見られ, 肝臓, 小腸, 脾臓がこれにいいだ。投与後20分 (Fig. 3) では鰓, 筋肉中の放射能濃度が急速な低下を示し, かわつて肝臓と胆のうが高い取り込みを示すようになった。投与後4時間までこの状態が続いたが (Figs. 4, 5), その後放射能は全身的に衰えをみせ, 12時間後 (Fig. 6) には網膜, 胆のう, 小腸内容物を除いてほぼ完全に魚体から消失した。上記の他, 投与直後に鼻腔に, また投与直後から

4時間後までの間に脊髄にそれぞれ放射能の特異的な取り込みが見られた。一方, 内分泌器官については卵巣と間腎腺に少量の取り込みが認められたに過ぎなかった。各組織への放射能の分布状況を以下に詳述する。

**骨と筋肉:** 骨と軟骨はほとんど $^{14}\text{C}$ を取り込まなかった。筋肉組織は投与後5分に著しく高い放射能活性を示したが, この活性はその後急速に衰え, 40分後にはほとんど消失した。

**消化管と胆のう:** 小腸への放射能の蓄積ははじめ中程度であつたが, 20分以後, 放射性物質の胆のう排泄開始に伴つてしだいに増加した。胆のう排泄は投与後12時間まで続き, その影響で小腸内容物に長時間にわたつて強い放射能が認められた (Fig. 6)。

**肝臓と脾臓:** 肝臓の放射能濃度は投与後, 時間の経過と共に増加し, 1時間後付近で胆のうと共に臓器中最大の取り込みを示した。その後徐々に減少し, 12時間後にはほとんど消失した。一方, 脾臓は実験中ずっと低い放射能しか示さなかつた。

**腎臓:** 腎臓は投与後5分に筋肉, 鰓と共に高い放射能を記録したが, その後時間の経過と共に次第に減少し, 1時間後には中程度以下となつた。しかし膀胱にはその後も比較的高い活性が残つた。

**鰓:** 投与後5分に中ないし高濃度の放射能を示したが, 10分後には減少した。鰓弁はどの部分も均一な

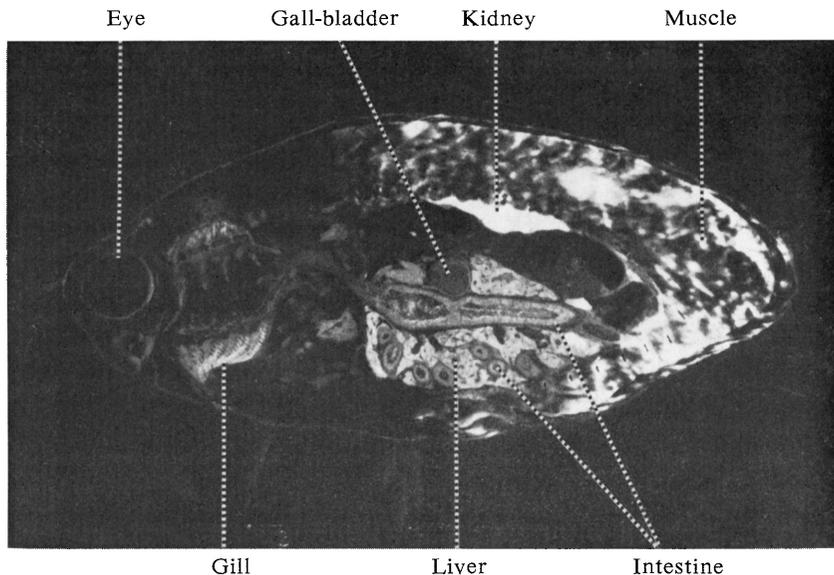


Fig. 2. Autoradiogram showing the distribution of radioactivity in a goldfish 5 minutes after intra-arterial injection of pregnenolone- $^{14}\text{C}$ . White areas correspond to high radioactivity. The highest uptake is seen in the muscle, kidney and gills.

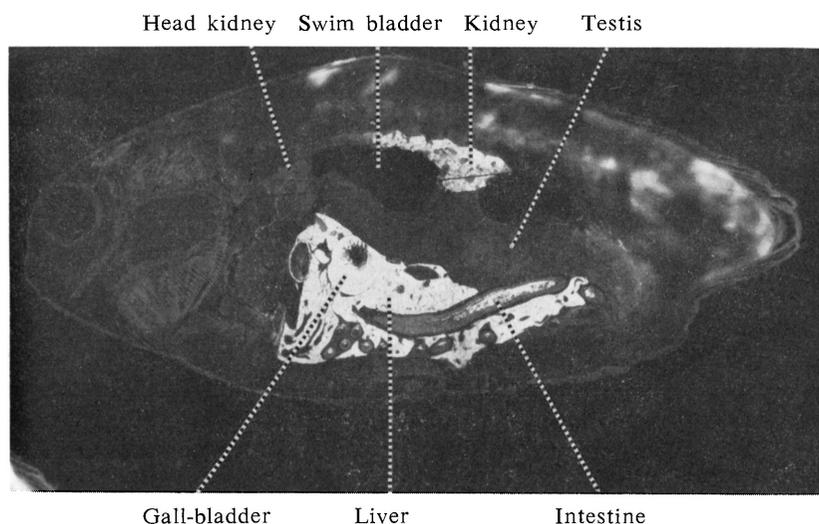


Fig. 3. Autoradiogram of a goldfish 20 minutes after intra-arterial injection of pregnenolone-<sup>14</sup>C. Note the high accumulation of radioactivity in the liver, gall-bladder and kidney.

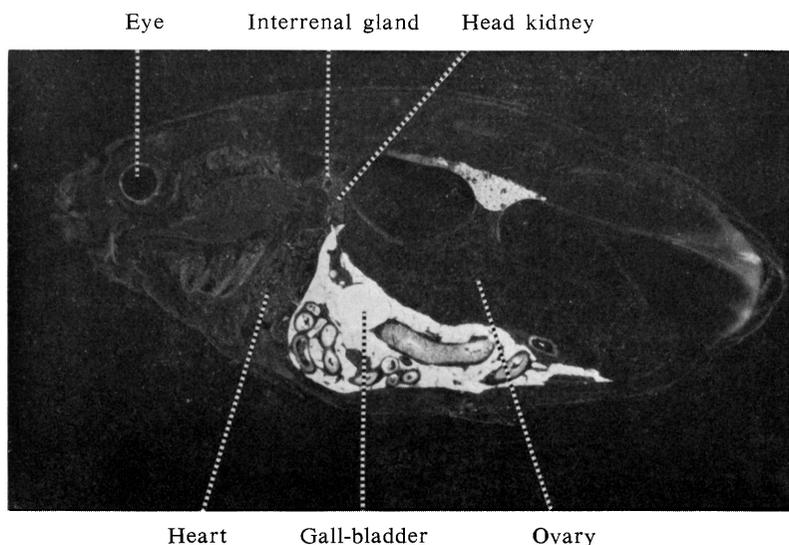


Fig. 4. Autoradiogram of a goldfish 1 hour after intra-arterial injection of pregnenolone-<sup>14</sup>C. Activity is high in the liver, gall-bladder, intestinal contents and kidney.

取り込みを示した。

**中枢神経系:** 投与後 5~10 分に脳と脊髄に中程度の取り込みが認められた。脳の放射能活性は間もなく衰えたが、脊髄のそれは 4 時間後近くまで衰えることなく残った (Fig. 5)。

**眼と鼻:** 投与後 5~10 分に鼻腔粘膜に取り込みが認められたが、20 分後には消失した。眼の網膜は長時間にわたり比較的高い取り込みを示し、蓄積量は時間

と共にむしろ増加した (Fig. 6)。なお、蓄積部位は網膜に限定されており、鞏膜やレンズへの取り込みは認められなかった。

**内分泌器官:** 間腎腺に投与後 20 分から 12 時間にかけて、まわりの頭腎組織より僅かに高い取り込みが、また魚卵の周辺部に投与後 40 分から 1 時間にかけて取り込みが認められたのみで (Fig. 7)、他の内分泌器官、すなわち精巣、甲状腺、脳下垂体等にはほとんど放射

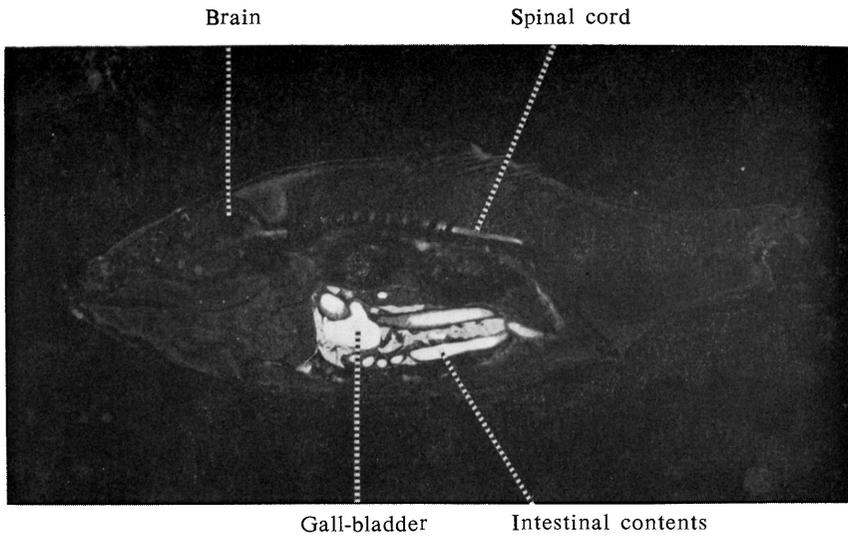


Fig. 5. Autoradiogram of a goldfish 4 hours after intra-arterial injection of pregnenolone- $^{14}\text{C}$ . Note the high accumulation of radioactivity in the spinal cord.

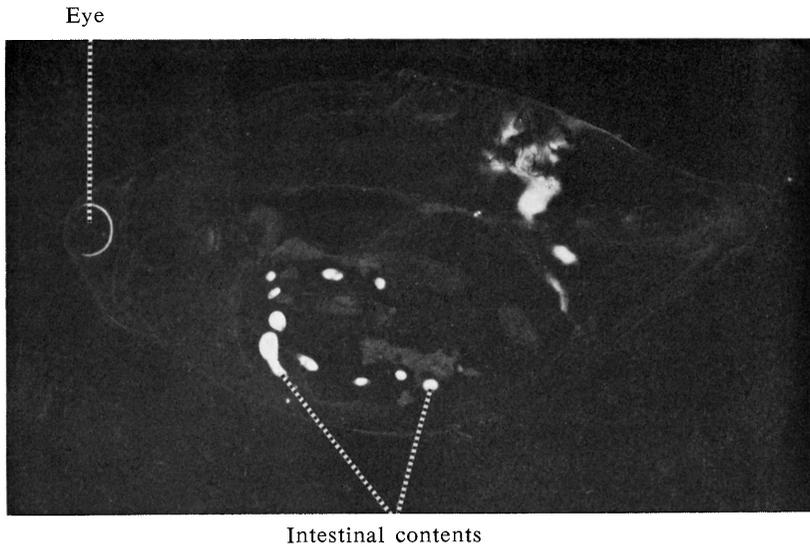


Fig. 6. Autoradiogram of a goldfish 12 hours after intra-arterial injection of pregnenolone- $^{14}\text{C}$ . Note the high radioactivity in the retina.

能の蓄積は認められなかった。

### 考 察

肝臓に長時間にわたって臓器中最大の放射能の蓄積が認められたことは魚類においても肝臓がステロイド代謝の中心器官であることを示唆している。各種ステロイド抱合体の形成も恐らくこの肝臓で行なわれるのであろう。内分泌器官への取り込み量は予想外に低かったが、これはワキンに投与された pregnenolone-4-

$^{14}\text{C}$  の大部分がそのままか、または急速に代謝されて体外に排泄され、残りの必要量のみが、内分泌器官に留まったためと解される。本報で使用した pregnenolone-4- $^{14}\text{C}$  の比放射能は  $53 \text{ mCi/mM}$  であつたが、もしこれより比放射能が数倍～数十倍高いアイソトープを入手できるならば、内分泌器官への放射能の蓄積をより明確に捉えることができるであろう。

腎臓、鰓、胆のうが高い放射能活性を示したことは pregnenolone-4- $^{14}\text{C}$  ないしその代謝産物が、これら

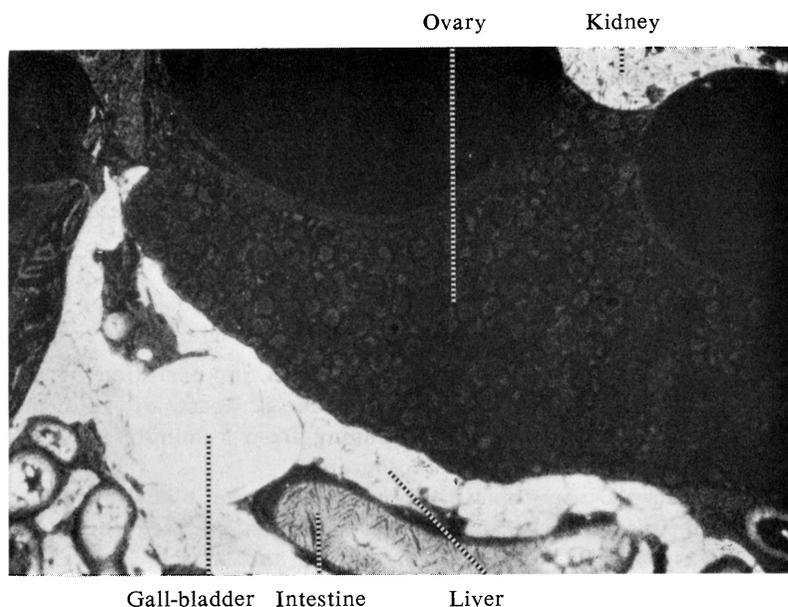


Fig. 7. Details of whole body autoradiogram showing the accumulation of radioactivity in the ovary of a goldfish 1 hour after intra-arterial injection of pregnenolone- $^{14}\text{C}$ . Radioactivity is confined to the peripheral parts of the follicles.

3つの主要径路を経て排泄されたことを意味する。筋肉組織は投与後5~10分に高い放射能活性を示したが、哺乳類を使った実験ではこの種の報告はない。これは魚体表面からのアイトープの排泄を示唆しているのかも知れない。

網膜、脊髄への pregnenolone- $4-^{14}\text{C}$  の取り込みはマウスにおいても観察されているが (Appelgren, 1967), その生理的意義は解明されていない。鼻腔への取り込みは恐らく放射性物質の鼻粘膜からの分泌に基づくものであろう。

### 要 約

Pregnenolone の魚体内分布と排泄径路を調べるために、pregnenolone- $4-^{14}\text{C}$  をワキン (*Carrasius auratus*) 14尾の背大動脈に注入し、種々の生存期間(5分~12分時間)後に凍結全身オートラジオグラフィを行なった。

Pregnenolone- $4-^{14}\text{C}$  は急速に血液から各種組織へ摂取された。投与後5分では腎臓、鰓、筋肉が高い放射能活性を示したが (Fig. 2), 投与後20分から4時間にかけては肝臓、胆のう、小腸粘膜が最大の取り込みを示した (Figs. 3~5)。これらの結果は魚類においても哺乳類と同様、肝臓がステロイド代謝に中心的な役割を果していることを暗示しており、またステロイ

ドおよびその代謝産物は腎臓、鰓、胆のうから排泄されることを示唆している。上記の他、卵巣、間腎組織、中枢神経系、網膜、鼻腔にも放射能の特異的な蓄積が認められた。放射能は投与後12時間には網膜、胆のう、小腸を除くすべての魚体組織から消失した (Fig. 6)。

### 文 献

- Appelgren, L. -E. 1967 Sites of steroid hormone formation. Autoradiographic studies using labelled precursors. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 301: 1-108
- Appelgren, L. -E. 1969 The distribution of labelled testosterone in mice. *Acta Endocr.*, 62: 505-512
- Appelgren, L. -E. and E. Marrero 1972 The distribution of labelled aldosterone in mice using whole body autoradiography. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 31: 86-96
- Hanngren, A., E. Hansson, S. E. Sjöstrand, and S. Ullberg 1964 Autoradiographic distribution studies with  $^{14}\text{C}$ -cortisone and  $^{14}\text{C}$ -cortisol. *Acta Endocr.*, 47: 95-104
- Ngan, P. V., I. Hanyu, and T. Hibiya 1973 Implantation of cannula into dorsal aorta of the carp. *Japan. J. Ichthyol.*, 20: 79-84
- Ullberg, S. 1954 Studies on the distribution and fate of  $\text{S}^{35}$ -labelled benzylpenicillin in

- the body. *Acta Radiol., Suppl.* **118**: 1-110
- Ullberg, S. 1958 Autoradiographic studies on the distribution of labelled drugs in the body. *Proc. Second U. N. Intern. Confer. Peaceful Uses Atomic Energy*, **24**: 248-254
- Ullberg, S. and G. Bengtsson 1963 Autoradiographic distribution studies with natural oestrogens. *Acta Endocr.*, **43**: 75-86
- Waddell, W. J. 1971 The distribution of cortisone-<sup>14</sup>C in pregnant mice. *Teratology*, **4**: 355-365
- Waddell, W. J. 1972 The distribution of hydrocortisone-<sup>14</sup>C, corticosterone-<sup>14</sup>C, and deoxycorticosterone-<sup>14</sup>C in pregnant mice. *Teratology*, **5**: 219-221

### Summary

In order to study on the distribution, metabolism and excretion of pregnenolone in fish, pregnenolone-<sup>14</sup>C was injected into the dorsal aorta of goldfish (*Carassius auratus*) and after different survival times ranging from 5 minutes to 12 hours, the fish were subjected to whole-body autoradiography.

The pregnenolone-<sup>14</sup>C was rapidly taken up from the blood by various tissues. Five minutes after injection the highest accumulation of pregnenolone-<sup>14</sup>C and/or its metabolites was observed in the kidney, gills, and muscle (Fig. 2). From 20 minutes up to 4 hours after injection, however, the highest uptake of radioactivity was registered in the liver, gall-bladder, and intestinal mucosa (Figs. 3-5). These results suggest that the liver plays an important role in steroid metabolism in fish as well as in mammals, and that steroid and/or its metabolites are excreted via the kidney, gills and gall-bladder. A specific accumulation of radioactivity was also observed in the ovary, interrenal gland, central nervous system, retina, and olfactory pits. Twelve hours after injection the radioactivity disappeared from all tissues other than retina and intestine (Fig. 6).