29A-F4-2

組織内放射能濃度試験のための「Paste-Mold」法と
同一個体の経時的代謝物の定量分析法生体科学研究所
重松昭世「Paste-Mold」 Method for Study of Radioactive
Concentration in Tissues and 「Quantitative Analysis」
Method for Metabolic Studies.Akiyo SHIGEMATSU
Institute of Whole Body Metabolism
340-2, Nauchi, Shiroy, Inba, Chiba

生体内投与後の対象薬物およびその代謝物の運命を質および量ともに追跡するためには、生体成分内に浸透している超微量未変化体およびその代謝物を生体成分のまま定性的および定量的にすることが要求される。そのため放射性標識体の利用が普及し、その計測法の確立は薬動試験結果の評価に大きく寄与するものである。そこでRadio-luminography (RLG) のdynamic rangeの立証に合わせて、表記の2法を報告したい。

1. 「Paste-Mold」法

組織を強アルカリ溶液中に完全溶解させてPaste化し、一定無限厚の鋳型に埋め込んで組織内放射能濃度をRLG法で計測する。

1-1. 「Paste-Mold-Autoradioluminography」の原理：a) 無限厚みの試料を作製し、IPと密着露出させることによって試料中相対的放射能濃度を計測する。b) 組織の一定量は、適量の2N以上のKOHで完全に溶解させる。c) 冷蔵庫内温度で容易に固化させるために一定量のゼラチンを添加する。d) 組織混液を5mmφで200μm高さの円柱形の鋳型内に滴下して整形し、IP密着試料とする。

1-2. 液体シンチレーション計数法(LSC)と比べた本法の長所：a) 色、光吸収クエンチングおよびβ線自己吸収率、透過吸収率の補正が不要。b) 統計的変動を無視できる計測値(24~72時間露出)。c) 同時計測によるback groundの変動なし。d) 100試料あたりの計測機(BAS2000)の読み取り時間は僅かに5分間。e) 10^5 桁に亘る広いdynamic range。f) 専用バアイル瓶と液体シンチレーター不要。g) 有機溶媒廃液処理不要。h) 無限厚キャリブレーション標準サンプルと対比させて容易にdpm/g計算が可能。

1-3. 操作法：「Mold」の鋳型は直径5mm×深さ0.2mmの井戸型の穴である。この体積は約0.0039cm³であって、比重1とすれば約3.9mgに相当する。この中に組織1に対して最終10倍を超えない希釈率で強アルカリ液とゼラチンを加えて、50℃で一晩放

置した。200×400mmのプレート上の約100ヶの鋳型の穴の中に放射能計測用「Paste」を滴下し、用意された鋳型プレートを冷蔵庫内で冷却し、固化させた。固化後大型ナイフでプレート表面を平滑に削ぎ、4 μ m厚のポリ塩化ビニリデン膜でその表面を被覆した。このプレートを露出用カセットに収め膜に密着させてIPを置いた。

1-4. 「Paste-Mold」法と「液シン」データの比較: [U- 14 C] glucoseをラットの静脈内に投与後10分における各組織を摘出後、「Paste-Mold」を作製した。また、摘出組織の一部を精秤し、可溶化法によってそれぞれ組織の放射能濃度を「液シン」により計測した。

「Paste-Mold」法と「液シン」法の両法で相対的に放射能濃度を計測し、それぞれの組織の値を血液で除した相対値をグラフに纏めた結果がFig. 1である。図が示すように、両法ともほぼ良い直線関係を示していた。特に高い濃度を示す組織群は両法の一致性がよく示された。

2. TLC-Autoradioluminography

RLGが高感度で優れた定量性を示すという理由から、一個体の血液中の薬物とその代謝物の濃度推移を経時的に追跡することを期待させる。しかし、生物試料の採取からRLGへの橋渡しの操作が工夫されなければならない。

2-1. 操作法の実際と結果: [1- 14 C] palmitic acid ([1- 14 C] PA)をラットにi.v. 投与し、その直後から経時的に採血し、血漿約5 μ lを得た。採取血漿を順次TLC板上にスポットし、準備の調ったTLC板を展開槽に入れ、純メタノールを溶媒として原点から約1cmだけ展開させてから取り出し、乾燥させる。この操作を5回繰り返した後、最終の展開溶媒によってPAおよびその代謝物を展開させた。血漿中の全放射性成分に対しての各代謝物の放射能相対強度の比を求めて、濃度-時間曲線としたグラフをFig. 2に示した。これらの結果は、血漿中放射能濃度の代謝的律速の段階を推定するのに大きく役立っていると思われる。

Fig. 1 Relationship between the (PSL/BG)/S ratio and the dpm/g ratio of tissue/blood

Fig. 2 Unchanged and metabolized radioactivity in plasma with time after i.v. injection of [1- 14 C] palmitic acid to non-fasting rat