Studies on Posterior Pituitary Hormones (VIII); Tissue Distribution of ^3H - and ^{131}I -Oxytocin in Rats

Shigeru AONUMA, Keiichi TANAKA and Hiroko AKAMATSU

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

In order to study the posterior pituitary hormones in regards to their metabolism, the tissue distribution of labelled oxytocin was examined in this study.

Synthetic oxytocin was labelled with ^3H by the method of WILZBACH. Purified ^3H -oxytocin showed a specific radioactivity of $6.3 \mu\text{Ci./mg.}$ and a oxytotic activity of 350 I.U./mg..

^{131}I -oxytocin, prepared by ^{131}ICl , retained biological activity and showed a specific radioactivity of 2.3 mCi./mg. . One iodine atom was found in the tyrosine residue of oxytocin.

Radioactivity was counted in various tissues after ^3H - or ^{131}I -oxytocin was injected intravenously into male or female rats.

The results are summarized as follows:

- 1) At 20 min. after injection, both ^3H - and ^{131}I -oxytocin were chiefly distributed to the kidney which is well known as the main organ of oxytocin metabolism.
- 2) A high concentration of radioactivity was found in liver, pituitary, ovary and adrenal after administration of labelled oxytocin.
- 3) Distribution of oxytocin to uterus was not so significant as was expected.
- 4) ^{131}I -oxytocin uptake of female organs was found to be greater than that of male, except for the kidney.
- 5) Following the injection of ^{131}I -oxytocin, a gradual decrease of radioactivity in most all organs such as uterus, kidney and pituitary etc. was observed and this decrease was parallel to the gradual decline of radioactivity in blood. But in reproductive organs such as ovary and vagina in female, seminal vesicle and vas deferens in male, retention of radioactivity was observed independently of the radioactivity in blood.

(See pp. 387~392)

脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第8報)*

Oxytocin の代謝に関する基礎的検討 ; ^3H -および ^{131}I -Oxytocin の
ラット体内分布

大阪大学薬学部

青 沼 繁, 田 中 慶 一
赤 松 弘 子

(昭和45年1月19日受付)

Oxytocin の代謝に関する基礎的研究のために, まず ^3H -Oxytocin および ^{131}I -Oxytocin を調製し, これらの標識ホルモンを用いてラットにおける体内分布を検討した. Oxytocin は代謝臓器と考えられる腎臓に最も多く分布し, 次いで肝臓, 下垂体および卵巣などに多く認められたが, 子宮には特に著明な取り込みは見られなかった. また体内分布の経時的变化の検討により卵巣など, 二, 三の生殖系臓器に貯留が認められた.

結 言

脳下垂体後葉ホルモン Oxytocin は哺乳動物においては特に雌性動物における子宮収縮作用および乳汁射出作用が知られているに過ぎず, 雄性動物における生理的意義を初めとして未だ解明されていない問題が多く残されている.

著者らは既に Oxytocin の生理化学的研究の一環として, 特に代謝という観点から, 検討を行ないヒトおよび家兎尿中の Oxytocin 分画から子宮収縮作用を有するペプチドを単離し, 妊娠時における量的変化などについて興味ある知見を得ている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾.

Oxytocin の代謝あるいは動態などに関しては既に多くの報告⁵⁾があるが, これらの報告のほとんどは bioassay などの手段を用いたものであり, また Oxytocin の体内分布については du VIGNEAUD らによる雄性ラットを用いた報告⁶⁾があるのみである.

著者らは Oxytocin 代謝あるいは体内動態という観点から Oxytocin について検討すべく, まず標識 Oxytocin を用いてラット体内分布について検討したので報告する.

実 験 方 法

(I) ^3H -Oxytocin の調製

合成 Oxytocin (100 I.U./mg.) の凍結乾燥粉末と $^3\text{H}_2$ ガス (Radiochemical Centre 製) 1 Ci. を約 10^{-3}mmHg の減圧下, 室温で2週間接触させた. 接触終了後 0.2% AcOH に溶解・凍結乾燥の操作を3回行なつて labile- ^3H 原子を除いた. また接触中に生じた放射分解産物は Sephadex G-15 および Amberlite CG-50 によるカラムクロマトグラフィーで除去して精製を行つた.

(II) ^{131}I -Oxytocin の調製

Izzo ら⁷⁾の Insulin 標識の方法に準じて行なつた. すなわち Na ^{131}I 溶液 (10 mCi. 放同協製) に含ま

* 第7報: 生化学, 38: 180, (1966).

れる Na_2SO_3 を分解した後, 予め $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液で標定した ICl 溶液 (Oxytocin と等モル) を添加し, よく混和した. これに合成 Oxytocin 1mg を含む溶液を混和し室温で3分間反応させた. 反応混液は10%牛血清アルブミン溶液および KI 溶液を添加し, Sephadex G-10 カラムによる精製を行なった. またヨウ素原子の導入数の決定は ^{131}I -Oxytocin を Pronase P (科研製) で加水分解後, 常法通り濾紙クロマトグラフィーでヨウ素化アミノ酸の同定を行なった.

(III) 標識 Oxytocin のラット体内分布

a) ^3H -Oxytocin のラット体内分布: 体重約150gm.の一夜絶食した Wistar 系雌性ラットに ^3H -Oxytocin (20 I.U., $5.99 \times 10^5 \text{dpm}$) の生理食塩水溶液 0.2ml を股静脈注射した. 投与20分後に脱血死させて各臓器を摘出した. 放射能の測定には各臓器ホモジネートの凍結乾燥粉末を O_2 ガス燃焼フラスコでトリチウム水とし, これを Dioxane 系シンチレーター⁸⁾に溶解して測定試料とした.

b) ^{131}I -Oxytocin のラット体内分布: ^{131}I -Oxytocin (約 $11.2 \mu\text{g}$, $6.89 \times 10^6 \text{cpm}$) を雌雄ラットに静注し投与後20分に脱血死させて臓器を摘出した. また体内分布の経時変化の検討には投与後5, 15, 30および60分にそれぞれ臓器を摘出した. 放射能の測定試料は各臓器約100mg. を 10 N- NaOH に溶解して調製した.

なお実験に供した雌性ラットはいずれも膈脂試験で発情期間のものである.

(IV) 放射能の測定

^3H の測定には Packard Tricarb 314 EX liquid scintillation counter を用い, ^3H -Toluene の内部標準法による絶対測定を行なった. また ^{131}I の測定には Phillips well-type scintillation counter を用いた.

実験結果

(I) ^3H -Oxytocin の調製

labile- ^3H 原子を除去した粗 ^3H -Oxytocin は多くの radiation による分解産物を含んでいるので精製を行なった. Fig. 1 は Sephadex G-15 カラムによるゲル濾過の結果を示したもので, 溶出液のうち tube No. 22~34 (Fr. I) および tube No. 35~42 (Fr. II) の下降法による濾紙クロマトグラフィーの結果を Fig. 2 に示した. 展開後濾紙の放射能を scanning し, 次いで 0.5cm 巾の細片としそれぞれの 0.2% AcOH

Fig. 1. Gel Filtration of Crude ^3H -Oxytocin on Sephadex G-15 Column

Fig. 2. Radiochromatograms of Fr. I and II

抽出液について英局第XI版ラット子宮収縮試験で bioassay を行なったところ, Fr. I は放射能のピークと生物活性が一致したが Fr. II は Oxytocin に相当するわずかなピークが見られるに過ぎなかった. 従つて Fr. I が Oxytocin 分画であると考えられ, この生物学的効力は約 300 I.U./mg. であった. 次に Fr. I について Amberlite CG-50 カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行なったところ Fig. 3 から明ら

かな様に比放射能の高い不純物が ^3H -Oxytocin より早く溶出されて除去された。これらの溶液のうち生物活性の高い tube No. 38~50 を集めて脱塩後 Sephadex G-15 および Amberlite CG-50 を用いて再クロマトグラフィーを行なった。こうして得られた精製 ^3H -Oxytocin の比放射能は約 $6.3\mu\text{Ci./mg.}$ 、生物活性は約 350 I.U./mg. であり化学的、放射化学的純度はほぼ100%であった。なお調整した ^3H -Oxytocin は 0.2% AcOH 溶液として凍結保存し、使用にあたっては dimer 生成の可能性⁹⁾があるので再クロマトグラフィーを行なった。

Fig. 3. Fractionation of Fr. I on Amberlite CG-50 Column

(II) ^{131}I -Oxytocin の調製

$^{131}\text{I}\text{Cl}$ と Oxytocin の反応混液は ^{131}I -Oxytocin

の他に無機ヨウ素を多く含んでいるので Sephadex G-10 カラムによるゲル濾過を行なった。放射能のピークは主として2つ現われたが濾紙クロマトグラフィー (BuOH: AcOH: H_2O = 4: 1: 5, 上昇法, R_f = 約0.4) の結果 Fr. I が ^{131}I -Oxytocin であることが判明した。なお反応終了時に添加した牛血清アルブミンが残存 $^{131}\text{I}\text{Cl}$ と反応する可能性があるため濾紙電気泳動で分離して放射能を測定したがほとんど検出されなかつた。この様にして得られた ^{131}I -Oxytocin の比放射能は約 2.3mCi./mg. であり、分布実験に際しては Oxytocin が混在していないことを予め確かめてある tube No.10 のみを使用した。なお ^{131}I -Oxytocin には生物活性が残存しており、Pronase による加水分解物の濾紙クロマトグラムにおける radioactive spot は主として ^{131}I -Monoiodotyrosine であつたので monoiodo 体であると考えられる。

(III) ^3H -Oxytocin の雌性ラットにおける体内分布

約 20I.U. の ^3H -Oxytocin を静注した雌性ラットの各臓器における20分後の体内分布を Table 1 に示した。個体間のばらつきがかなり大きく傾向を知るにとどまつたが、臓器乾燥粉末1 mg. 当りの放射能は特に下垂体、腎臓、肝臓に多く、次いで腓腸筋、膀胱などに多く認められた。また子宮には特に高い取り込みは見られなかつた。これらの結果を雄性ラットの知見⁹⁾と比較すると下垂体への取り込みが多く副腎への取り込みは少なかつたが、腎臓、肝臓への取り込みが高い点は一致している。

なお腓腸筋への著明な取り込みについての理由は不明である。

(IV) ^{131}I -Oxytocin の雌雄ラットにおける体内分布

^{131}I -Oxytocin (約 $11.2\mu\text{g.}$) の投与20分後における体内分布を Table 2 に示した。雌雄共に腎臓、肝臓、次いで下垂体、小腸、副腎などに取り込みが多く認められたが、子宮への取り込みは ^3H -Oxytocin の場合と同様特に著明ではなく、雄性生殖器官にはさしたる取り込みはなかつた。またほとんどの臓器では雌雄共に同じ傾向を示し、雌性ラットによる取り込みが高い値を示したが、腎臓における放射能は雄性ラットの方がかなり多かつた。

なおこれら ^{131}I -Oxytocin の体内分布の傾向は ^{131}I -Tyrosine および Na ^{131}I の体内分布とは様相を異に

Fig. 4. Gel Filtration of Reaction Mixture of Oxytocin and $^{131}\text{I}\text{Cl}$ on Sephadex G-10 Column

Table 1. Distribution of Radioactivity in Female Rat Tissues after Intravenous Injection of ^3H -Oxytocin

Tissue	dpm/mg. Dry weight		
	Rat 1	Rat 2	Rat 3
Blood	55.2	44.5	57.7
Pituitary	176.8	75.8	—
Kidney	138.6	59.9	123.9
Liver	31.8	42.5	41.3
Bladder	26.4	14.8	—
Gastrocnemius	19.5	49.9	60.5
Uterus	13.7	7.4	8.9
Adrenal	17.6	3.5	4.6
Small intestine	9.9	3.7	19.1
Brain	9.0	1.3	2.3
Heart	8.9	2.6	7.4
Spleen	6.7	14.6	15.4
Ovary	4.5	2.2	12.2
Diaphragm	2.3	1.7	3.2

(20 min. after injection)

 ^3H -Oxytocin: 20 I.U., 5.99×10^6 dpmTable 2. Distribution of Radioactivity in Rat Tissues after Intravenous Injection of ^{131}I -Oxytocin

Tissue	Female	Male	Tissue	Female	Male
Ovary	113.3 $\pm$ 16.6		Gastrocnemius	18.7 $\pm$ 1.5	14.3 $\pm$ 1.0
Uterus	65.7 $\pm$ 2.6		Bladder	61.3 $\pm$ 1.7	52.2 $\pm$ 11.3
Testis		13.2 $\pm$ 1.6	Spleen	110.0 $\pm$ 10.0	88.5 $\pm$ 7.6
Seminal vesicle		35.6 $\pm$ 9.5	Liver	182.9 $\pm$ 19.7	154.7 $\pm$ 9.3
Adrenal	131.1 $\pm$ 37.8	64.0 $\pm$ 7.6	Kidney	324.7 $\pm$ 67.6	491.6 $\pm$ 125.7
Pituitary	138.8 $\pm$ 24.8	89.7 $\pm$ 15.3	Heart	103.8 $\pm$ 12.9	74.2 $\pm$ 6.7
Diaphragm	36.7 $\pm$ 4.8	33.1 $\pm$ 3.7	Small intestine	134.7 $\pm$ 27.3	137.0 $\pm$ 21.7

cpm/mg. (Mean $\pm$ S.E. of 3 Rats) ^{131}I -Oxytocin: 6.89×10^6 cpm, 11.2 μg .Fig. 5. Time Course of ^{131}I -Oxytocin Distribution in Kidney, Liver and Blood Fig. 6. Time Course of ^{131}I -Oxytocin Distribution in Pituitary, Adrenal and Heart

Fig. 7. Time Course of ^{131}I -Oxytocin Distribution in Reproductive Organs

high uptake と long retention が見られ、膣においても同様の傾向が見られたが、子宮においては貯留が認められずむしろ血液に近いパターンを示した。また雄性ラットにおいても精のうや輸精管などに貯留の傾向が認められた。

考 察

近年ホルモンの生理化学的研究は数多くの成果を得てきたが、Oxytocin に関しては詳細な化学的検討が行われてきたのにもかかわらず未だ明確な結論が得られていない。

著者らは代謝あるいは動態という観点から Oxytocin について基礎的検討を行なうためにまず Oxytocin の radioisotope による標識を試み、これを用いて二、三の検討を行なった。Oxytocin のトリチウム化については既に du VIGNEAUD ら¹⁰⁾ により報告されているが、著者らは簡便な WILZBACH 法を用いて 350 I.U./mg. という生物学的効力の高い ^3H -Oxytocin を得た。また放射性ヨウ素化については ICl にて比放射能の高い ^{131}I -Oxytocin を調製した。

さて Oxytocin の体内分布についてであるが ^3H -Oxytocin の分布にはかなり個体差があり明確な結論が得られなかつた。雌性ラットにおいても、雄性ラットの知見⁶⁾と同様腎臓、下垂体および肝臓などに多く分布していたが、投与量がかかなり異なるため直接比較することはできない。体内分布を検討する際には、特にホルモンでは、一定量以上では投与量によつて体内分布のパターンが異なることが知られている¹¹⁾。そこで ^3H -Oxytocin は比放射能が低いので、微量の Oxytocin で検討するために ^{131}I -Oxytocin を用いた。 ^{131}I -標識ホルモンを用いることには問題があるが、Insulin の動態や代謝の成績はほとんど全てが ^{131}I -Insulin によつて得られたものであり内因性 Insulin との差異は認められておらず、さらに作用機構の研究でも多くの知見¹²⁾¹³⁾ が得られている。また後葉ホルモン Vasopressin の diiodo 体の腎臓における分布が reasonable であるという報告¹⁴⁾や、生物活性の低下にもかかわらず response tissue への結合能力は保持されているという推論、あるいは血中半減期が変わらないという報告¹⁵⁾などがあるので著者らは導入ヨウ素原子を一つに限定した moniodo 体を用いた。

^{131}I -Oxytocin (約 11 μg .) の投与20分後の分布は腎臓、肝臓、下垂体などに多く、一方睪丸や大脳皮質、(<10 cpm/mg.)、骨格筋に少ないなど du VIGNEAUD らの ^3H -Oxytocin の結果⁶⁾と比較して脾臓以外では概ね同様の傾向が認められた。子宮への取り込みはさほど多くなく、また興味あることに雌性ラットの各臓器への取り込みは腎臓以外では雄性ラットより多く代謝速度などの性差が予想される。

一般に体内分布を検討する際には一時点における分布の多い臓器が特異的臓器であるとは断定できず¹¹⁾、経時的な変化からも検討されねばならない。 ^{131}I -Oxytocin の体内分布の経時変化をみるとほとんどの臓器の放射能は血中放射能の減少と共に低下し、雌雄間にパターンの差は見られなかつた。これらの臓器のうち

していた。

〔V〕 ^{131}I -Oxytocin 体内分布の経時的变化

^{131}I -Oxytocin (約 10 μg .) 投与後4時点における各臓器の取り込みを Fig. 5, 6, 7 に示した。血中の放射能は最大に達した後15分までは急速に、それ以後は徐々に減少した。図から明らかな様に腎臓、肝臓、下垂体、副腎および心臓などはいずれも血中放射能の減少と共に低下して貯留が認められず、他の臓器もほとんど同じパターンを示した。また雌雄間にパターンの差は認められなかつた。一方 Fig. 7 には生殖系の臓器における取り込みを示したが、明らかに他の臓器とは異なるパターンが認められた。雌性動物では特に卵巣において著明な

下垂体への取り込みについては最近述べられている auto feedback あるいは short feedback などの現象¹⁶⁾を考えると興味深い, さらに後葉, 前葉などを分画して検討したいと考えている. 一方 Oxytocin が関与すると考えられている生殖系臓器への取り込みには異なつたパターンが認められ, 特に卵巣や陰において見られる high uptake と long retention は著者ら¹⁷⁾の Oxytocin の卵巣に対する作用の知見や最近の報告¹⁸⁾¹⁹⁾と考えると興味深い. Oxytocin の標的臓器であると考えられている子宮においては貯留が認められず, むしろ経時的に減少しているのは Oxytocin による収縮が長時間続くものではないという事実によると考えられるが, 子宮への取り込みについては性周期, 妊娠, 生理的濃度・用量, あるいは子宮収縮作用がいわゆる“ホルモン作用”なのか, という様な問題を考えねばならないと考える. なお雄性ラットの精のうや輸精管においても貯留が認められた. Oxytocin の子宮以外の生殖系臓器への関与については未だ明確ではないが早くから予想されており, 今後の検討が待たれる.

結 論

- 1) ³H-および ¹²⁵I-Oxytocin を調製した.
- 2) Oxytocin は投与20分後では腎臓, 肝臓, 下垂体, 卵巣および副腎などに多く分布した.
- 3) ほとんどの臓器においては雌性ラットの方が取り込みが多かつたが, 腎臓においてのみ雄性ラットの方がかなり多く代謝速度の差などが考えられる.
- 4) 子宮, 腎臓をはじめほとんどの臓器における Oxytocin の取り込みは血中濃度の減少と共に低下したが, 卵巣, 陰, 精のう, および輸精管などの生殖系臓器には貯留が認められた.

文 献

- 1) AONUMA, S., INOUE, K. and HONDA, H.: *Endocrinol. Japan.*, 4: 184, (1957).
- 2) AONUMA, S., INOUE, K. and HAMA, T.: *Endocrinol. Japan.*, 4: 191, (1957).
- 3) 青沼 繁, 浜 一枝, 菅田裕子, 住田幸子: *薬学研究*, 33: 150, (1961).
- 4) 青沼 繁, 住田幸子, 田中優子, 柳本繁子, 八十田洋子: *薬学研究*, 34: 11, (1962).
- 5) HELLER, H. and GINSBURG, M.: *The Pituitary Gland*, 1st ed. (1966), 330, Butterworths, LONDON.
- 6) AROSKAR, J.P., CHAN, W.Y., STOUFFER, J.E., SCHNEIDER, C.H., MURTI, V.V.S. and du VIGNEAUD, V.: *Endocrinol.*, 74: 226, (1964).
- 7) IZZO, J.L., BALE, W.F., IZZO, M.J. and RONCONE, A.: *J. Biol. Chem.*, 239: 3743, (1964).
- 8) 鶴藤 丞, 高橋 惇, 内田幸宏, 高木敬次郎: *Radioisotope*, 14: 146, (1965).
- 9) AGISHI, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 18: 92, (1965).
- 10) du VIGNEAUD, V., SCHNEIDER, C.H., STOUFFER, J.E., MURTI, V.V.S., AROSKAR, J.P. and WINESTOCK, G.: *J. Amer. Chem.*, 84: 409, (1962).
- 11) JENSEN, E.V.: *Recent Progr. Hormone Res.*, 18: 387, (1962).
- 12) WOLTMANN, H.J. and NARAHARA, H.T.: *J. Biol. Chem.*, 241: 4931, (1966).
- 13) EDELMAN, P.M. and SCHWALTZ, I.L.: *Am. J. Med.*, 40: 695, (1966).
- 14) DARMADY, E.M., DURANT, J., MATTHEWS, E.R. and STRANACK, F.: *Clin. Sci.*, 19: 229, (1960).
- 15) SILVER, L., SCHWALTZ, I.L., FONG, C.T.O., DEBONS, A.F. and DAHL, L.K.: *J. Appl. Physiol.*, 16: 1097, (1961).
- 16) 小林 隆, 加藤順三: *最新医学*, 23: 1037, (1968).
- 17) 青沼 繁, 三村務, 谷口伊都子, 赤松弘子: 第18回日本薬学会近畿支部総会発表, (1968), 京都.
- 18) GOLDMAN, H.: *Am. J. Physiol.* 214: 860, (1968).
- 19) WILKS, J.W., HANSEL, W. and ARMSTRONG, D.T.: *Endocrinol.*, 84: 1032, (1969).
- 20) FITZPATRICK, R.J.: *The Pituitary Gland*, 1st ed., (1966), 505, Butterworths, LONDON.