全身オートラジオグラフィによる放射性化合物の生体内分布に関する研究
(第 24 報¹⁾) ³H-Pregnanediol の吸収, 分布および排泄

吉川正美, 高橋忠男, 佐藤善重

田辺製薬株式会社生物研究所²⁾

The Whole Body Autoradiographic Studies on the Distribution of
Radioisotopes. XXIV.¹⁾ The Absorption, Distribution
and Excretion of ³H-Pregnanediol

MASAYOSHI YOSHIKAWA, TADAO TAKAHASHI and YOSHISHIGE SATO

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.²⁾

(Received September 9, 1970)

Absorption, distribution, and excretion of ³H-pregnanediol after its percutaneous or intraperitoneal administration in female mice and rats were studied by autoradiography and liquid scintillation counting. Examination of absorption showed that 14% of the percutaneously administered radioactivity was absorbed during 48 hours. Microautoradiograms of rat skin applied with ³H-pregnanediol ointment suggested that the drug was absorbed through stratum malpighi of the cuticle and hair-follicles. Thirty minutes after intraperitoneal injection of ³H-pregnanediol in female mice, high concentration of the radioactivity was found in the gall bladder and intestinal content. A moderate level of the radioactivity was observed in the liver. Levels of radioactivity in other tissues were as low as that in blood. The lowest concentration was found in the brain. Twenty-four hours after intraperitoneal administration radioactivity in various organs except in intestinal contents decreased markedly.

Pregnanediol (PGL) は 1929 年 Marrian³⁾ により progesterone の代謝産物として妊婦尿中に見い出されたものである。その後の研究から、この化合物はホルモン作用を示さないことがわかった。しかしながら臨床では月経時障害、尋常性痤瘡などの数種の婦人科的症候群に対して効果をもつことが明らかになった。^{4,5)} ³H-PGL の生体内運命については Cook ら⁶⁾ が胎盤、胎仔における代謝を調べたにすぎず、生体内分布、吸収、排泄に関する報告はみあたらない。そこで著者らは ³H-PGL の雌マウスにおける経皮吸収、分布および排泄等について検討し、2, 3 の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

I. 試料 使用した ³H-PGL [³H-pregnane-(3) α , 20 (α)-diol] は次に示す化学構造式を有し、³H は 5 位に標識されている。

比放射能は 1.5 mCi/mg であり、薄層クロマトグラフィ (酢酸エチルエステル-クロロホルム; 3: 1) による放射化学的純度は 99% 以上であった。

II. 経皮吸収 吸収量の測定—³H-PGL 軟膏は、ソルビタンモノオレート (75%), マイクロクリスタリンワックス (8%), プロピレングリコール (17%) から成る基材に ³H-PGL 0.05% を含有するものである。

体重約 20 g の ddY 系雌マウスを腹位に固定し、背部の毛を刈った後、その 5 cm² に ³H-PGL 軟膏 38 mg (³H-PGL 28.5 μ Ci/19 μ g) を塗布した。塗布後 2, 8, 24 時間に腋下静脈を切断して放血殺処分した。塗布部の皮膚は未吸収軟膏を付けた状態で皮下脂肪層も含めて剥離し、濃 HNO₃ 20 ml および

1) 第 23 報: 大塚峯三, 佐久間真理, 佐藤善重, *Radioisotopes*, **19**, 518 (1970).

2) Location: *Kawagishi, Toda-shi, Saitama*.

3) G.F. Marrian, *Biochem. J.*, **23**, 1090 (1929).

4) 堀内敏子, 臨床皮膚泌尿器科, **12**, 651 (1958).

5) 下平和夫, 清水昭造, 産科と婦人科, **26**, 514 (1959).

6) I.D. Cook, N. Wiquist, E. Oiczfalusy, *Acta. Endocrinol.*, **56**, 43 (1967).

30% H_2O_2 0.4 ml 中で加熱溶解した後、40% アルコールを加えて全量を 50 ml に希釈した。その 0.2 ml を 50% トルエン・アルコール系のシンチレータに加えて、液体シンチレーションスペクトロメータ (Aloka LSC-502 型) を用いて放射能を測定した。この値は塗布部位に残存する未吸収軟膏および皮膚中に取り込まれた放射能の合算値であり、これを投与量から差し引いて体内に移行した量を吸収量とした。

マイクロオートラジオグラフィ (MicroARG)——体重約 200 g のウィスター系雌ラットの後脚大腿部の毛を刈り、その 2 cm^2 に ^3H -PGL 軟膏 15 mg を塗布し、24 時間後に皮膚表面の軟膏を生理食塩水で湿らせた脱脂綿でよくふきとった。ラットの脚をポリエチレン袋に入れて、ドライアイス・アセトン混合液で凍結した。次いで後述する全身 ARG と同じ要領でセロテープの代りに水で湿らせた硫酸紙を組織の上にはり、厚さ 5 μ の凍結切片を作製した。その切片を凍結乾燥し、卵白グリセリンを薄く塗布したスライドガラスに組織のみを移した。その標本にサクラ NR-M2 ストリッピングフィルムをマウントし、冷暗所で 1 ケ月間露出したのち、コニドール X で 8 分間現像した。次いでヘマトキシリンおよびエオジンで染色し、検鏡を行なった。

III. 生体内分布 全身オートラジオグラフィ (全身 ARG)—— ^3H -PGL の 0.2% プロピレングリコール溶液を投与液とし、これを体重約 20 g の ddY 系雌および妊娠後期 (体重約 40 g) のマウスに下記のごとく投与した。また軟膏は前述の経皮吸収実験と同じものを用いた。

a) 腹腔内注射: ^3H -PGL 300 $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{g}$ を雌マウスに注射した。投与後 0.5, 2, 6, 24 時間に動物をエーテルで軽く麻酔し、ドライアイス・アセトン混合液で凍結させた。また妊娠マウスに ^3H -PGL 600 $\mu\text{Ci}/400 \mu\text{g}$ を注射後 0.5, 2, 24 時間に凍結した。

b) 静脈注射: 雌マウスの尾静脈内に ^3H -PGL 150 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{g}$ を注射し、投与後 5 分, 1, 6 時間に凍結殺処分した。

c) 軟膏塗布: 雌マウスの背部の毛を刈り、その 5 cm^2 に軟膏を 38 mg 塗布した。塗布後 2, 24 時間に塗布部をサランラップでおおい、ポリエチレン袋に入れて凍結した。

これらのマウスは -15° に設置されたマイクロームを用いて厚さ 30 μ の全身切片とし、凍結乾燥の後サクラ NR-EI とコンタクトさせ、約 2 ケ月間冷暗所において露出した。現像はコニドール X で 10 分間行ない、ついでコニフィックスで定着してオートラジオグラム (ARGM) を作製した。

組織内放射能の測定——a) 腹腔内注射: ^3H -PGL の 0.02% プロピレングリコール溶液 0.1 ml (30 $\mu\text{Ci}/20 \mu\text{g}$) を雌マウスに注射した。投与後 0.5, 1, 2, 6, 24 時間にマウスの腋下静脈を切断して採血し、ただちに肝、腎、肺、脳、筋肉、卵巣、副腎、消化管を摘出、それぞれを 7 倍量の 40% アルコールで homogenize した。ついで遠心分離し、その上澄液の一定量について放射能を測定した。

b) 軟膏塗布: 経皮吸収の実験と同じ方法で軟膏を塗布し、2, 8, 24, 48 時間後に放血殺処分後の肝、腎、肺、脳、全消化管 (内容物も含む) を摘出した。以後の操作は前記の腹腔内注射のそれにしたがって行ない、放射能分布を求めた。

IV. 排泄 尿および糞中排泄——前項で述べた軟膏塗布後のマウスの尿と糞を採取し、尿は水で希釈して 20 ml とした。糞は 20 倍量の 40% アルコールで homogenize し、加温抽出ののち遠心分離した。尿と糞の上澄液の一定量についてそれぞれの放射能を測定した。

一方、投与量に対する尿および糞中排泄の割合を知るため、雌マウスの背部皮下に ^3H -PGL を 0.5 mg/kg, 2.8 mg/kg および 15 mg/kg の投与量で注射し、経時的に尿および糞中に排泄された放射能を測定した。

Fig. 1. Amount of Percutaneous Absorption after Application on the Mouse Skin of ^3H -Pregnadiol Ointments

Each point represents the average of 4 mice.

軟膏塗布時の胆汁排泄——体重約 200 g のウィスター系雌ラットをウレタンで麻酔し、胆管にカニューレを挿入したのち胸部皮膚の 5 cm^2 に ^3H -PGL 軟膏 38 mg を塗布した。投与後 8, 24, 48 時間までに排泄された胆汁を水で希釈し、その一部について放射能を測定した。

実験結果

I. 経皮吸収

Fig. 1 は未吸収軟膏および塗布部の皮膚中の放射能を塗布量から差し引き、これを吸収量として表わしたものである。その結果、24 時間までの吸収量は約 10% であり、48 時間では 14% (^3H -PGL として 2.7 μg) であった。

一方、皮膚中の放射能分布を micro ARG で観察したところ (Fig. 2 に示す。A は低倍率、B はその一部を拡大したものである)、黒化銀粒子は表皮の角質層、

Fig. 2. Microautoradiogram showing the Distribution of Radioactivity in the Skin after Application of ^3H -Pregnanediol Ointment

Small black spots (silver grains) indicate the localization of the radioactivity.

淡明層，顆粒層および胚芽層の全域にわたって著明に観察された。しかしながら真皮の乳頭層，網状層における銀粒子分布は表皮のそれに比してはるかに少なかった。一方，毛包における銀粒子分布は毛幹，外根鞘，内根鞘に高く認められた。図には示していないが，塗布後 1 時間の分布は皮膚全域にわたって少なかった。

なお，本報における micro ARG の凍結切片作製に，新しい試みとして硫酸紙を支持体に用いたところ，細胞の破壊も少なく，この方法が micro-ARG に適用できるものであることがわかった。同時に行なったセロテープを標本上にはりつけて切った組織は，細胞の破壊が著しかった。

II. 生体内分布

全身 ARGM 腹腔内注射後の経時的な ARGM を Fig. 3 に示す。これらからわかるように各臓器における

Fig. 3. Autoradiogram showing the Distribution of Radioactivity in Female Mice after *i.p.* Injection of ^3H -Pregnanediol (10 mg/kg)

放射能濃度は、投与後 30 分が最も高かった。この時点では投与部位にまだかなりの放射能が観察され、各臓器中では肝が最も高い濃度を示した。他の臓器の放射能濃度は血中のそれにはほぼ等しく、脳は筋肉より低かった。投与後 6 時間には胆嚢に、次いで 24 時間後には腸管内容物に高い放射能が観察されたことより、本化合物およびその代謝物の排泄が胆管を介して行なわれることが示された。妊娠マウス (Fig. 4) における胎仔への放射能移行は、母体の筋肉と同程度であり、胎仔臓器間の濃度差は認められなかった。母体の放射能分布推移は、雌マウスの場合と同様であった。

静注時の ARGM を Fig. 5 に示す。投与後 5 分で各臓器とも最高濃度を示し、特に肺には顕著な放射能の局在を示す斑点状の分布がみられた。次いで肝および腎の活性が高く、他の臓器は血中濃度にはほぼ等しく、脳は最も低かった。投与後 6 時間においては、肺、肝を除く他の組織の放射能が著しく減少したが、腸管内容物には顕著な放射能の存在がみられた。

Fig. 6 に軟膏塗布時の ARGM を示す。塗布後 2 時間では、塗布部位にのみ放射能がみられたが、24 時間では胆嚢、腸内容物に著明な放射能が観察され、本薬物が緩慢ではあるが経皮吸収されたことが示された。

Fig. 4. Autoradiogram showing the Distribution of Radioactivity in Pregnant Mice after *i.p.* Injection of ^3H -Pregnanediol (10 mg/kg)

Fig. 5. Autoradiogram showing the Distribution of Radioactivity in Female Mice after *i.v.* Injection of ^3H -Pregnanediol (5 mg/kg)

組織内放射能の定量 腹腔内投与時の組織内にとりこまれた放射エネルギーを Table I に示す。表中の値は投与放射能に対する組織湿重量 1 g 当りの放射エネルギーを百分率で表わしたものである。各臓器とも投与後 30 分に最高濃度を示し、その時点においては肝が最も高く、血漿の約 4.5 倍であった。次いで副腎および腎に比較的高い放射能の取込みがみられた。脳は各臓器中最も低かった。これらの結果は腹腔注時の ARGGM とほぼ一致する。また、Table II の軟膏塗布時の組織内に取込まれた放射エネルギーをみると、腹腔注時に比して極めて低かった。放射能濃度のピークは塗布後 24 時間にみられ、肝が最も高く、脳が最も低いことは腹腔注時の分布傾向に一致している。

III. 排泄

軟膏塗布時の尿中および糞中排泄 Table III に、軟膏塗布時のマウスの消化管内容物または糞中、尿中に排泄された放射エネルギーを示す。表中の値は塗布量に対する百分率で表わした。糞中への排泄は 48 時間までに 4.8%

Fig. 6. Autoradiogram showing the Distribution of Radioactivity in Female Mice after Application of ^3H -Pregnanediol Ointment (0.9 mg/kg)

であり尿中は4.2%であった。また、この時点で腸内容物にはまだ3.5%の放射能が残留していた。

皮下注時の尿中および糞中排泄 Fig. 7 に示したように排泄量は投与量により異なり、多量投与 (15 mg/kg) においては投与後2日までに糞と尿を合せて、投与量の約8%の排泄がみられ、少量投与 (0.5 mg/kg) の場合は、約80%の排泄がみられた。また、Fig. 8 に2.8 mg/kgの投与量における糞と尿に排泄された放射能の累積量を示した。糞中には尿中の約2倍の排泄が認められた。

軟膏塗布時のラットにおける胆汁排泄 Fig. 9 に示した軟膏塗布時の胆汁排泄量をみると、24時間で塗布量の6.5%の放射能が排泄され、その後48時間までの累積量は12%に達した。

TABLE I. ^3H -Contents in Mouse Tissues after *i.p.* Injection of ^3H -Pregnanediol (1 mg/kg)

	30 min (%/g)	1 hr (%/g)	2 hr (%/g)	6 hr (%/g)	24 hr (%/g)
Liver	15.7	8.52	4.20	2.44	0.25
Kidney	4.72	2.49	1.82	0.93	0.20
Brain	1.27	0.44	0.39	0.22	0.20
Spleen	1.45	0.74	0.44	0.34	0.17
Lung	2.02	1.11	0.94	0.62	0.15
Adrenal	4.80	2.02	0.88	0.81	0.20
Ovary	3.70	1.68	0.91	0.56	0.10
Muscle	1.55	0.84	0.64	0.23	0.15
Plasma	3.50	1.78	0.99	0.71	0.26

Each value represents the mean of two animals.

TABLE II. ^3H -Contents in Mouse Tissues after Application on the Skin of ^3H -Pregnanediol (950 $\mu\text{g/kg}$) Ointment

	2 hr (2) (%/g)	8 hr (2) (%/g)	24 hr (4) (%/g)	48 hr (4) (%/g)
Liver	0.058	0.068	0.240	0.20
Kidney	0.038	0.053	0.087	0.092
Lung	0.0093	0.020	0.074	0.065
Spleen	0.0065	0.010	0.036	—
Brain	0.0048	0.009	0.032	0.036
Digestive tract	0.05	0.06	0.93	1.08
Plasma	0.005	0.017	0.064	0.066

Values of digestive tract are contained with radioactivity of contents.
Values in parentheses indicate number of experiments.

TABLE III. Cumulative Excretion of Radioactivity in Urine and Feces of Mice after Application on the Skin of ^3H -Pregnanediol Ointment

	Percent of dose recovered (%)		
	8 hr	24 hr	48 hr
Urine	0.4	2.4	4.2
Feces	0.2	2.6	4.8
Intestinal contents ^{a)}	0.3 ^{a)}	3.1 ^{a)}	3.5 ^{a)}
Total	0.9	8.1	12.5

a) Amount of radioactivity in the intestinal contents at each time.

Fig. 7. Cumulative Excretion of Total ^3H in Urine and Feces of Mouse after Subcutaneous Injection of ^3H -Pregnanediol (15, 2.8, 0.5 mg/kg)

Each point represents the the average of 4 animals.

—○—: 15 mg/kg
- - -○- - -: 2.8 mg/kg
...○...: 0.5 mg/kg

Fig. 8. Cumulative Excretion of ^3H in Urine and Feces of Mouse after Subcutaneous Injection of ^3H -Pregnanediol (2.8 mg/kg)

Each point represents the average of 3~4 animals.

—○—: feces - - -○- - -: urine

考 察

著者らは ^3H -PGL 軟膏を適用後、皮膚上の未吸収物と皮膚中に取込まれた放射能を相互に汚染することなく分離を試みたが使用した動物が小さなマウスであったためきわめて困難であった。そこで皮膚中の値は吸収量から除外した。その結果、体内に移行した放射能は 48 時間後、塗布量の 14% であったが皮膚中の放射能を考慮すると吸収量はこれより幾分増加するものと思われる。

一方、皮膚中の放射能分布に関しては micro-ARG によって調べた。その結果銀粒子は皮膚の表皮に多く存在し、真皮に少なかったことから、この薬物は表皮の角質層を通過して胚芽層まではよく浸透するが、その内側の真皮までの移行は緩慢に行なわれるものと推定された。また毛嚢にも著明な銀粒子の分布を認めたことは、この薬物の一部は経毛嚢的に吸収されるということを暗示させている。

^3H -PGL 軟膏塗布時のマウスの諸臓器への放射能の取込みは、腹腔注時のそれに比し、いずれも非常に低かった。このことは吸収が徐々に行なわれるのに対して、体内各臓器に移行したのち比較的小すみやかに排泄されるためと考えられる。しかしながら両者の相対的な分布様式はほぼ同様であった。一方、全身 ARG の所見で静注時にのみ肺に著明な斑点状の分布が認められた。このような現象は $^{45}\text{V}_2\text{O}_5$ ⁷⁾ あるいは ^3H -noscipine⁸⁾ を静注した際にも起ることが報告されている。その原因としては、PGL の水に対する溶解度が小さいため、静注時に血液中で凝集してコロイドとなり肺循環に際して肺の毛細管にひっかかり、これが斑点状の分布を示したものと考えられる。

PGL の前駆体である progesterone は静注直後の副腎皮質に高度の取込みを示すことが報告されており⁹⁾、また他のステロイドホルモンにおいても同様の知見が認められている。^{10,11)} しかし ^3H -PGL の場合は血中濃度とほぼ等しく、この部位への親和性は特に認められなかった。このことは PGL が progesterone の代謝産物であり、かつホルモン作用をもたないことを考えると興味あることである。また両者とも血中濃度が低く、胆汁への排泄が多いこと、さらに体内貯留性の少ないことは共通していた。

この薬物の排泄経路は全身 ARG の所見より胆管を介して腸内、ついで糞中に排泄されるものが主であった。また、投与量の増減で排泄率も変るものと予想されたので皮下注時の投与量を 0.5 mg/kg から 15 mg/kg まで変えた場合の排泄について検討したところ、少量投与では約 86% が 4 日までの糞と尿中に排泄されたのに対して、大量投与 (15 mg/kg) では約 13% と少なかった。したがって、PGL の皮下からの吸収は投与液の濃度勾配に比例せず、一定の制限があるものと考えられる。本報のごとき皮下注および軟膏塗布の場合に限らず薬物の吸収、分布、排泄を論ずる際に投与量およびその濃度については十分考慮すべきであろう。

結 論

^3H -PGL 軟膏塗布時の雌マウスにおける経皮吸収量は、48 時間で投与量の約 14% であった。また、micro ARG の結果から表皮の胚芽層からの吸収と経毛嚢吸収が予想された。

一方、 ^3H -PGL の腹腔内注射時の組織内放射能濃度は、ピーク時の 30 分で肝>副腎>腎>卵巣>肺>筋肉>

Fig. 9. Cumulative Excretion of ^3H into Bile of Rat after Application on the Skin of ^3H -Pregnandiol Ointment

Each point represents the average of 4 rats.

7) R. Söremark, S. Ullberg, Reprinted from a Symposium on the use of radioisotopes in Animal biology and the medical sciences held in Mexico City, 21 November, 1961.

8) J.E. Idänpään-Heikkilä, *European J. Pharm.*, 2, 26 (1967).

9) L.E. Appelgen, *Acta. Physiol. Scand.*, 71, Suppl, 301, 61 (1967).

10) S. Ullberg, G. Bengtsson, *Acta. Endocrinol.*, 43, 561 (1963).

11) T. Takahashi, Y. Sato, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), in press.

脾>脳の順であった。またいずれの投与方法においても、胆汁および腸内容物に高い放射能活性がみられ、この薬物は主に胆管を経て糞中に排泄されることがわかった。

皮下注時の排泄量は投与量により異なり、15 mg/kg の投与量では 13%, 2.5 mg/kg では 48%, 0.5 mg/kg では 86% が 4 日までの尿中と糞中に排泄された。

謝辞 終りにのぞみ、終始御鞭撻を賜りました当生物研究所長 阿部久二博士、ならびに標識化合物について種々の御援助を賜りました 岡 孝二博士に深謝いたします。また感光材料につき御協力を頂きました 小西六写真工業株式会社、軟膏作成に御指導賜りましたポーラ研究所開発第一研究室長 伊藤嘉高氏、宮下久美子氏ならびに実験に御協力頂きました 木村哲男氏、大沢政江氏に厚く御礼申し上げます。