

## 両生類の幼生に投与した放射性銀

越 田 豊

橿原市 奈良県立医科大学生物化学教室

昭和 39 年 7 月 27 日 受領

## ABSTRACT

Behavior of Radiosilver Administered to Amphibian Larvae. Y. KOSHIDA (Department of Biology, Nara Medical University, Kashihara, Nara) *Zool. Mag.* 74: 6—10 (1965)

The distribution of radiosilver in various tissues and organs in larvae of *Rhacophorus arboreus* (OKADA ET KAWANO) and *Hynobius nebulosus* (SCHLEGEL) reared in tap water containing  $^{110m}\text{AgNO}_3$  with carrier silver nitrate equivalent to  $1.5\text{ }\mu\text{g Ag per ml}$ , was studied mainly by the aid of photometry of their autoradiographs. There was found no essential difference in radiosilver distribution between the two species. Radiosilver was found to be retained markedly in intestinal and branchial epithelium, slightly in pigment epithelium of retina, skin, and coelomic epithelium and hardly any in muscle, cartilage, brain and other tissues. *Rhacophorus* larvae accumulated radiosilver in the lumen of the intestine as much as a 20 times higher concentration than those of the rearing water, whereas in *Hynobius* larvae the case is altered. This may be due to the fact that *Rhacophorus* larvae have opportunities to take up the radiosilver deposited on the wall of vessel more frequently than *Hynobius* larvae which never nibble on the wall. Radiosilver injected into tissue such as muscle or brain remained at the site of injection, showing no symptoms of disappearance at least within 48 hours. If we employ radiosilver for the purpose of detecting cell migration in the course of regeneration or development, radiosilver may be suitable for labeling muscle or epithelial cells. (Received July 27, 1964)

さきにわれわれはもともと生体にはない元素と考えられているイットリウムを摂取させ、これが細胞または組織の標識に適することを指摘した(越田, 1957, 1962)。今回は、生体内で代謝には利用されないが時に見出されるので、いわゆる生体混入元素と考えられている銀を両生類の幼生に投与した。この分布を測定して銀もまたイットリウムと同様に細胞の標識に利用できるかどうかを考察することとした。

## 材 料 と 方 法

汲置水に  $^{110m}\text{AgNO}_3$ <sup>1)</sup> を加え、放射能強度約

1) 原液は Oak Ridge National Laboratory 製  $^{110m}\text{AgNO}_3$  ( $t_{1/2}=253\text{d}$ ) の硝酸溶液で、担体硝酸銀をふくみ、その放射化学的純度は 99% 以上であった。

6,000 cpm/ml, 担体硝酸銀濃度約  $1.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{Ag/ml}$  となるように調製し、これにアンモニア水を加えて pH を約 5.6 に調整した。この飼育水にモリアオガエル *Rhacophorus arboreus* (OKADA ET KAWANO) の幼生(全長 17—23mm)、またはカスミサンショウウオ *Hynobius nebulosus* (SCHLEGEL) の幼生(全長 25—30mm)を泳がせ、 $^{110m}\text{Ag}$  を摂取させた。摂取量の決定には、幼生を流水中で 10—15 分間泳がせて体表を洗ったのち、3—4 匹を全体用試料、6—8 匹を肛門のすぐうしろで切半して頭胸部用および尾部用試料とした。各試料を秤量、湿式灰化(硝酸・過塩素酸法)ののちシンチレーションカウンタにより計数をおこなった。オートラジオグラフィには同様に体表を洗った幼生を 10% 緩衝ホルマリン(pH 7.4)で固定、パラフィン切片とし、歯科用 X 線フィルム(富士写真フィルム K.K. 製)によるコンタクト法を適用した。オートラジオグラフの黒化度測定には原・原(1954)の方法に従った。すなわち X 線フィルムを白色平行光線で照射し、顕

微鏡対物レンズで約 40 倍に拡大したオートラジオグラフをスクリーン上に投影する。スクリーンに設けた直径約 1.5 mm の小孔を通過する光を光電子増倍管で受け、電子管電圧計で測定する。拡大倍率より換算するとこの小孔の面積はもとの切片上で約  $1,100 \mu^2$  に対応する。フィルムの無感光部分の透過率 (T) を 100% としてオートラジオグラフ各部の透過率を測定し、これを黒化度 ( $-\log T$ ) に換算する。最後に組織または器官ごとに平均黒化度を算出する。この値は切片の厚さ、露出、現像の条件によってフィルムごとに異なるが、切片中に共通にふくまれている組織の値を仲介とすると互に別の切片にふくまれている組織の場合にも、それらの RI 濃度を相対的にくらべることができる。なお黒化度は 0—0.5 の範囲では RI 濃度と直線関係にある。

### 結果および考察

#### 1. $^{110}\text{mAg}$ の摂取量

モリアオガエル幼生による  $^{110}\text{mAg}$  摂取の時間的経過を第 1 表に示す。16 時間後には幼生全体として飼育水の 18 倍も高濃度に  $^{110}\text{mAg}$  を摂取している。頭胴部と尾部とに分けてみると、前者ではさらに高濃度であるが、後者では飼育水の約 30% で、頭胴部にはきわめて多量の  $^{110}\text{mAg}$  を摂取している部分があると推察される。カスミサンショウウオ幼生では 17 時間後において幼生全体の平均濃度は飼育水の 47% で、モリアオガエルの場合にくらべてきわめて低かった。

第 1 表 モリアオガエル幼生の  $^{110}\text{mAg}$  摂取 (飼育水の  $^{110}\text{mAg}$  濃度を 100 としてあらわす)

| 時間(hr) | 幼生全体  | 頭胴部   | 尾部   |
|--------|-------|-------|------|
| 6      | 760   | 920   | 25.3 |
| 16     | 1,790 | 2,370 | 32.4 |
| 24     | 1,530 | 2,160 | 30.6 |
| 40     | 1,470 | 1,760 | 25.2 |

飼育水の  $^{110}\text{mAg}$  濃度は  $5,820 \pm 60 \text{ cpm/ml}$ , 担体濃度は  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{Ag/ml}$  であった。

#### 2. 切片作製中の $^{110}\text{mAg}$ の逸失

モリアオガエル幼生を飼育水に 24 時間おいたのち、秤量後ただちに灰化した試料と切片作製の場合と同様に固定、脱水、透明化したのちに灰化した試料とについて  $^{110}\text{mAg}$  量を測定し、残存率  $\{(\text{グラム当りの後者の cpm} / \text{グラム当りの前者の cpm}) \times 100\}$  を求めたところ 78% であった。残存率は組

織の種類によって異なるであろうが、これをオートラジオグラフに寄与する  $^{110}\text{mAg}$  量の目安としてみると、銀の場合はマンガンの場合 (Koshida *et al.*, 1963) ほど高くはなく、イットリウムの場合 (越田, 1962) とほぼ同じくらいである。

#### 3. $^{110}\text{mAg}$ の分布

諸組織への  $^{110}\text{mAg}$  の分布はモリアオガエル、カスミサンショウウオとも腸以外についてはよく似ているので、前者の結果を主として述べる。飼育水に 45 時間おいたモリアオガエル幼生の場合を第 2 表に示す。 $^{110}\text{mAg}$  濃度すなわちオートラジオグラフ

第 2 表 飼育水に 45 時間おいたモリアオガエル幼生の  $^{110}\text{mAg}$  分布

| 器官または組織  | $^{110}\text{mAg}$ 濃度 |
|----------|-----------------------|
| 腸 内 腔    | 200 以上                |
| 腸 上 皮    | $9.7 \pm 0.7$         |
| 鰓 上 皮    | $4.2 \pm 0.3$         |
| 鰓 室 内 壁  | $3.2 \pm 0.3$         |
| 鰓 内 質 部  | $1.9 \pm 0.2$         |
| 眼 色 素 層  | $1.7 \pm 0.1$         |
| 皮 膚      | $1.6 \pm 0.3$         |
| 体 腔 上 皮  | $1.5 \pm 0.2$         |
| 肝 臓      | $1.4 \pm 0.3$         |
| 血液(心室内腔) | $1.2 \pm 0.1$         |
| 筋 肉      | $1.0 \pm 0.2$         |
| 脳        | $0.7 \pm 0.1$         |

の黒化度 ( $-\log T$ ) を求め、筋肉の場合を 1.0 として相対的にあらわした。

腸: モリアオガエルの場合、腸上皮の  $^{110}\text{mAg}$  濃度は筋肉の約 10 倍である。腸の内腔には前腸部より後腸部まで全長にわたってきわめて多量の  $^{110}\text{mAg}$  がふくまれていた。オートラジオグラフを得るとき、腸の内腔の部分に適当な露出時間は他の部分に短かすぎ (第 1 図), 逆に他の部分に適当な長い露出では腸の内腔の部分は黒化しすぎた。そのため黒化度測定からは腸の内腔の  $^{110}\text{mAg}$  濃度を決められなかったが、露出所要時間から推察して腸上皮の 20 倍以上、すなわち筋肉の 200 倍以上に達したものと考えられる。この  $^{110}\text{mAg}$  濃度は飼育水の濃度に対してどの程度であろうか。第 1 表によれば 40 時間後の尾部の平均  $^{110}\text{mAg}$  濃度は飼育水の  $^{110}\text{mAg}$  濃度

の 25% 程度である。尾部は大部分が筋肉組織で他には皮膚、結合組織、血液などがあるに過ぎないから、第 2 表の結果をあわせ考えると尾部の平均  $^{110}\text{mAg}$  濃度は筋肉の 2 倍を越えないと考えられる。したがって筋肉の  $^{110}\text{mAg}$  濃度は飼育水の 10 数%程度であり、筋肉の 200 倍以上の  $^{110}\text{mAg}$  濃度を示す腸の内腔では飼育水の 20 倍以上の高濃度に達するものと考えられる。モリアオガエル幼生は雑食性で、しばしば飼育器の器壁をこそげかじるような行動をする。その結果経口的に  $^{110}\text{mAg}$  がとりこまれて腸の内腔に蓄積されたのであろう。第 1 表の結果から予測したモリアオガエル幼生の  $^{110}\text{mAg}$  を多量にふくむ部分とは腸であり、この点でカスミサンショウウオ幼生とは  $^{110}\text{mAg}$  摂取上に大きい違いが生ずるものと思われる。カスミサンショウウオの場合には腸上皮の  $^{110}\text{mAg}$  濃度は筋肉の 4 倍程度であるが腸上皮に附着した粘液に少量の  $^{110}\text{mAg}$  が見出されるほか腸の内腔には  $^{110}\text{mAg}$  がほとんどふくまれていない (第 3 図)。もちろん肉食性のカスミサンショウウオ幼生には器壁をこそげかじるような行動はみられない。

鰓：鰓は腸に次いで  $^{110}\text{mAg}$  濃度の高い器官であるが、その濃度は飼育水の約  $1/2$  である。内鰓をもつモリアオガエルでは鰓上皮がもっとも高濃度で筋肉の約 4 倍を示し、鰓室内壁、鰓の内質部 (上皮の内側の血管に富んだ部分) の順となる (第 2 表)。外鰓をもつカスミサンショウウオでも鰓上皮の  $^{110}\text{mAg}$  濃度は筋肉のおよそ 6 倍であった。

その他の器官：眼の色素層、皮膚、体腔上皮などには筋肉の 1.5—2.0 倍濃度の  $^{110}\text{mAg}$  がふくまれている。これらの組織には組織化学的に銀親和性を示す黑色色素細胞がふくまれているが、皮膚をみると黑色色素細胞に富む背皮より腹皮の部分に  $^{110}\text{mAg}$  が多い (第 2 図) から、色素細胞の分布と  $^{110}\text{mAg}$

の分布との間には必ずしも深い関連は考えられない。なお肝臓などの消化腺、筋肉、軟骨、脳、脊髓、網膜などには  $^{110}\text{mAg}$  はほとんど見出されない (第 2 図, 第 3 図)。

飼育水におく方法ではほとんど  $^{110}\text{mAg}$  を摂取しない筋肉や脳も、注射によって投与すると  $^{110}\text{mAg}$  を多量に保持させることができた。たとえばカスミサンショウウオ幼生で筋肉内に  $^{110}\text{mAg}$  を注射すると  $^{110}\text{mAg}$  は 48 時間後においてもなお注射部位に保持され、他組織への移動はほとんど認められなかった (第 4 図)。

#### 4. 銀とイットリウムと比較

カスミサンショウウオの尾芽初期胚を  $^{91}\text{YCl}_3$  をふくむ水に置くと、 $^{91}\text{Y}$  はとり入れられるのにながいに時間を要し、表皮、眼の色素層、間充組織などに分布したが、内胚葉性組織にはほとんど分布しなかった。いったん  $^{91}\text{Y}$  をとり入れた組織は 10 日以上  $^{91}\text{Y}$  を保持していた。また  $^{91}\text{Y}$  をとり入れた組織片を他の個体に移植しても  $^{91}\text{Y}$  はもとの組織からほとんど移動しなかった。今回の実験においてモリアオガエル幼生の腸の内腔を別とすると銀もまた生体にとり入れられにくい元素である。イットリウムはコロイドになりやすく、銀は水素と置換しやすいもので、機作は異なるとしても両者とも細胞の表面につよく沈着する点で共通性があると思われる。このような性質は細胞の標識に利用できるもので、イットリウムが色素細胞や間充組織の細胞の標識に適当なのに対して銀は上皮や筋肉の細胞の標識に適当なものといえるであろう。

#### 要 約

1.  $^{110}\text{mAgNO}_3$  をふくむ水中においたモリアオガエル幼生とカスミサンショウウオ幼生の  $^{110}\text{mAg}$  摂

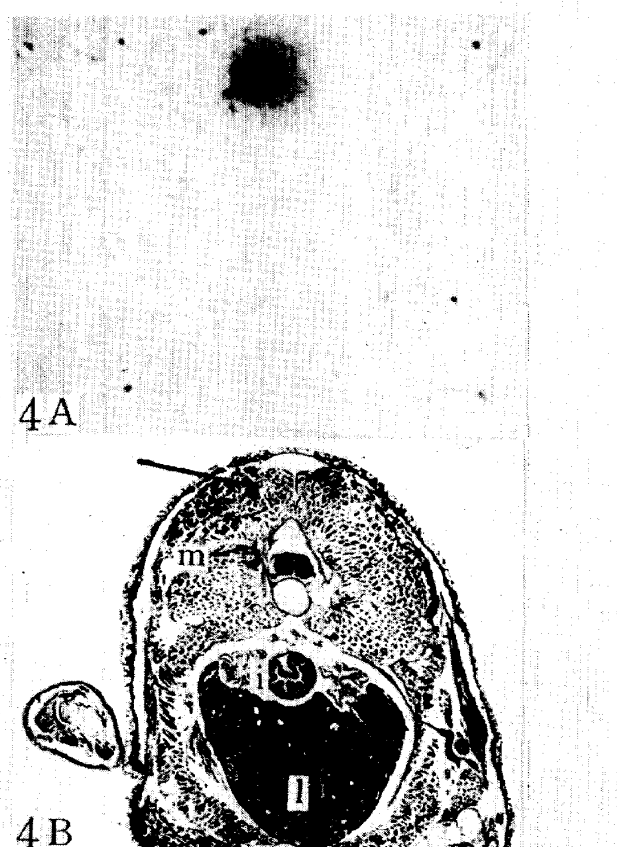
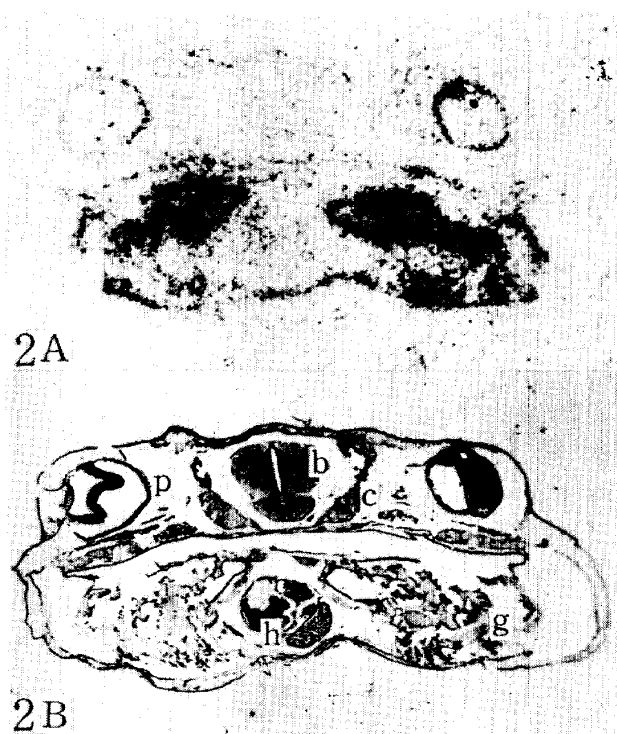
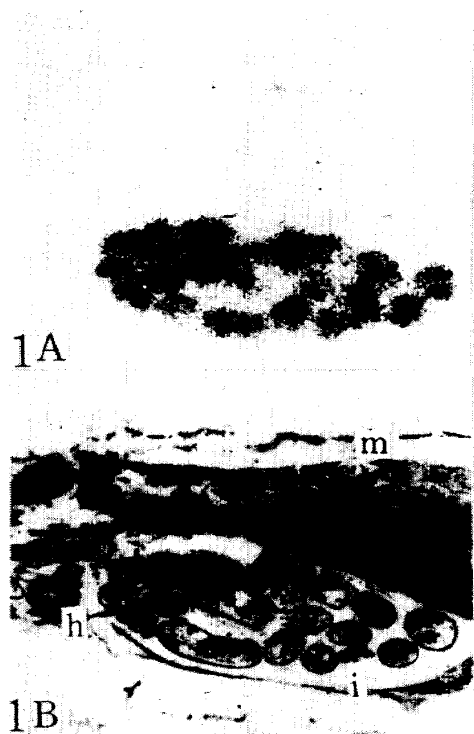
第 1 図  $^{110}\text{mAg}$  をふくむ水に 45 時間おいたモリアオガエル幼生の腸断面をふくむオートラジオグラフ (A) とその切片 (B) 7 倍 (腸内腔に多量の  $^{110}\text{mAg}$  がふくまれているため、これに適正な短い露出では他の部分がほとんどうつらない)

第 2 図 同上の眼をふくむオートラジオグラフ (A) とその切片 (B) 12 倍

第 3 図  $^{110}\text{mAg}$  をふくむ水に 22 時間おいたカスミサンショウウオ幼生のオートラジオグラフ (A) とその切片 (B) 12 倍

第 4 図  $^{110}\text{mAg}$  を筋肉内注射して 48 時間後のカスミサンショウウオ幼生のオートラジオグラフ (A) とその切片 (B) 12 倍 (矢印は注射部位を示す)

b: 脳, c: 軟骨, g: 鰓, h: 心臓, i: 腸, l: 肝臓, m: 筋肉, p: 眼の色素層



取を検討した。諸組織へ分布した  $^{110}\text{mAg}$  の濃度をオートラジオグラフの黒化度として測定した。

2. モリアオガエル幼生の腸内腔には飼育水の 20 倍以上の高濃度の  $^{110}\text{mAg}$  が見出されたが、カスミサンショウウオ幼生の腸内腔にはほとんど  $^{110}\text{mAg}$  が見出されなかった。前者での多量の  $^{110}\text{mAg}$  は経口的にとりこまれ濃縮されたものである。腸以外の組織への  $^{110}\text{mAg}$  分布は両者ともよく似ており、その濃度は飼育水より低い。 $^{110}\text{mAg}$  は腸上皮、鰓上皮、鰓室内壁、皮膚、眼の色素層などに多く、肝臓、筋肉、軟骨、脳、脊髄、網膜などに少い。

3. 筋肉および脳内に  $^{110}\text{mAg}$  を注射すると、注射部位に多量保持させることができ、いったん保持されると他の部分への移動はきわめておこりにくい。

4. さきにおこなったイットリウムの場合と比較して銀もまた細胞標識に利用できる元素と考えられるが、前者が色素細胞や間充組織の標識に適しているのに対して、後者は筋肉や上皮の細胞の標識に適

しているものである。

謝 辞

実験にあたり便宜を与えて下さった大阪大学理学部原子核研究施設同位元素部の吉沢康和助教授、久米三四郎講師、黒化度測定に協力し種々の助言と原稿の校閲をして頂いた奈良県立医科大学生物学教室の原富之教授に感謝の意を表する。

文 献

原 黎子・原 富之 (1954)  $\text{P}^{32}$  を用いた網膜のオートラジオグラフィ. 生理生態 6: 1-9.

越田 豊 (1957) アイソトープによる細胞の標識. 科学, 岩波, 東京, 27: 525-526.

——— (1962) レンズ再生過程におけるイットリウム-91 の行動. 動物学雑誌 71: 275-278.

KOSHIDA, Y., M. KATO AND T. HARA (1963) Autoradiographic observations of manganese in adult and embryo mice. *Quart. J. Exp. Physiol.* 48: 370-378.