

# ポジトロン核種を用いた新鮮組織切片の代謝及び機能解析法の開発

佐々木 徹、船木善仁<sup>\*1</sup>、小豆島正典<sup>\*2</sup>、寺崎一典<sup>\*3</sup>

東京都老人総合研究所ポジトロン医学研究施設

173-0022 東京都板橋区仲町 1-1

<sup>\*1</sup>東北大サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター

980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

<sup>\*2</sup>岩手医大歯学部歯科放射線科

020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

<sup>\*3</sup>岩手医大サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

## 1 はじめに

陽電子放出断層撮影法(PET)で利用されるトレーサを用い、生きている組織切片の機能、代謝を二次元分子画像としてダイナミックに解析する方法「バイオラジオグラフィ法」<sup>1,2)</sup>は、これまでの培養細胞や生体成分を用いたインビトロ計測法と PET に代表される個体丸ごとを対象とするインビボ計測法の間際に位置する新しい方法論である。本法は、インビトロの研究成果を直接臨床に結びつけるための有用な基礎データを提供するほか、基礎医学、神経科学研究のための有用な手段として期待される。

Choline は細胞膜構成脂質の主成分である Phosphatidylcholine (PC)及びその前駆体である Phosphocholine の原料である。細胞増殖の盛んな癌組織では細胞膜構築も盛んであることから、<sup>[11C]</sup>Choline は癌の増殖にともなって癌細胞に取り込まれる性質を有する PET 診断薬として利用されている。脳でも Choline は膜脂質合成に利用されるが、神経伝達物質である Acetylcholine (Ach)の生合成にも利用される。しかし、Choline の脳取込みは血液-脳関門によって制限されるため、PET 診断により脳 Ach 合成を評価することはできない。一方、バイオラジオグラフィ法では血液-脳関門を考えなくて良いので、<sup>[11C]</sup>Cholineを用いることで脳Ach合成及び放出を評価することが可能である<sup>3)</sup>。

本研究では、脳虚血時における Ach の合成及び放出の分子機構を解明することを目的として、無酸素下のラット脳切片の Choline 及び糖代謝を<sup>[11C]</sup>Choline-、<sup>[18F]</sup>Fluorodeoxyglucose (FDG)-バイオラジオグラフィ法を用いて検討した。

## 2 実験方法

ラット脳生切片(厚さ 300 $\mu$ m)を作成して 100mL の Krebs-Ringer 液を満たしたチャンパー底部に並べ、34 $^{\circ}$ C でプレインキュベートした。次いで、<sup>[11C]</sup>Choline (37MBq)あるいは

[ $^{18}\text{F}$ ]FDG(37MBq)をチャンバーに加え、酸素供給下(95% $\text{O}_2$ +5% $\text{CO}_2$ )あるいは無酸素(95% $\text{N}_2$ +5% $\text{CO}_2$ )の条件下でインキュベートした。切片上の放射能分布はチャンバー底部の薄膜を介してラジオルミノグラフィースクリーン上に記録し、スクリーンを交換して画像化することでダイナミック解析を試みた。 $[^{11}\text{C}]$ Cholineが脳切片へ十分集積した時点(70分)で脱分極剤(Veratridine)とHigh-affinity choline uptake inhibitor(Hemicholinium-3, HC-3)を培養液に加え、 $[^{11}\text{C}]$ Achの放出に相当する放射能消失を評価した。Acetyl基の供給源であるAcetyl-L-carnitineの、無酸素時における脳切片の $[^{11}\text{C}]$ Choline代謝に対する影響についても検討した。培養液中のAch濃度はHPLCで測定した。

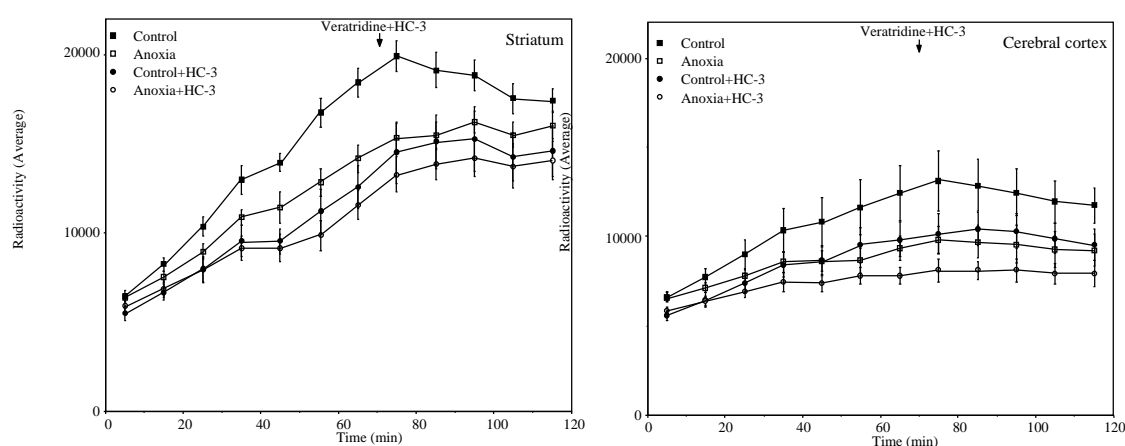


図 1. ラット線条体及び大脳皮質における $[^{11}\text{C}]$ cholineの時間-放射能曲線に対する無酸素処理の影響

### 3 結果および考察

脳切片への $[^{11}\text{C}]$ Cholineの集積はインキュベーション時間とともに増加した。線条体への集積は、大脳皮質に比べ高値を示した。脱分極刺激でAchの放出を促進したところ、脳切片から放射能の減少が認められた。この減少は、培養液中のAch放出パターンと同期した。 $[^{11}\text{C}]$ Cholineの脳切片への集積及び切片からの放射能の消失は無酸素処理によって低下した(図1、2)。一方、無酸素下のFDGの脳切片への取込みは酸素存在下に比して高いことが示された(図2)。無酸素下のFDGの取り込み増加は、ミトコンドリアの電子伝達による効率的なATP産生系が阻害されたため、非効率的(ブドウ糖1分子あたりATP2分子)な解糖系にATPの供給がスイッチせざるを得ないことによるものと考えられる。

無酸素処理によって低下した線条体の $[^{11}\text{C}]$ Cholineの取込みは、Acetyl-L-carnitineの処理によってコントロールレベルまで回復した。一方、大脳皮質ではAcetyl-L-carnitineの処理による効果は認められなかった。さらに、酸素存在下の $[^{11}\text{C}]$ Cholineの線条体への取り込みは、Acetyl-L-carnitineの処理により著しく増加した。

Achの合成に利用されるCholineはHigh-affinity choline uptake systemによって、PCの合成に利用されるCholineはLow-affinity choline uptake systemによって、いずれもエネ

ルギー依存的に細胞内に取り込まれることが知られている<sup>4)</sup>。無酸素処理下の Choline 取り込みの低下は、エネルギー依存性の Choline uptake がミトコンドリアにおける ATP 産生系の阻害によって低下したことが一因と考えられる。無酸素下の Ach の放出促進も、取り込み同様に放射能低下の原因と考えられる。無酸素処理によって低下した<sup>11</sup>C]Choline の取り込みは、線条体においては Acetyl-L-carnitine 処理によって改善したものの、大脳皮質では改善されな

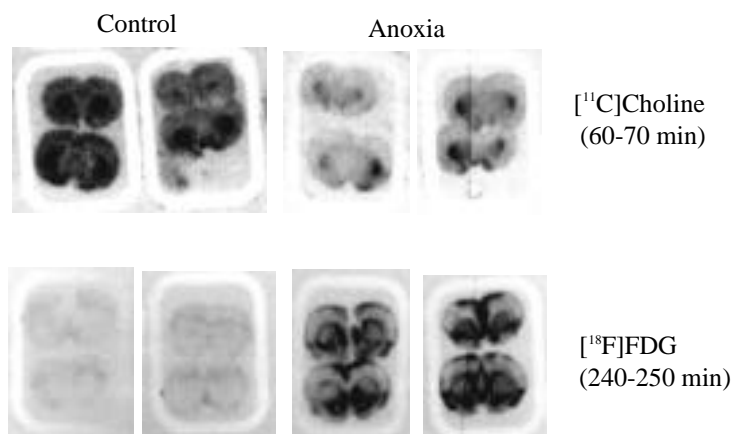


図 2. 酸素及び無酸素下の<sup>11</sup>C]Choline及び<sup>18</sup>F]FDG画像

かった。また、培養液中に放出された Ach は無酸素処理によって低下し、Acetyl-L-carnitine 処理によって改善した。この現象は、大脳皮質の Ach 代謝が無酸素処理に感受性が高いか、大脳皮質での Ach 合成の律速過程が Choline 供給にあるのに対して、線条体では Acetyl 基供給にあることによると考えられる。

以上の結果から、脳虚血時に生ずる Ach 代謝の低下の原因の一つはミトコンドリア機能の低下によるエネルギー産生の逼迫とそれに伴う Choline 供給の低下によることと考えられた。この低下をミトコンドリア代謝の賦活剤によって改善することができることが示唆された。

## 謝辞

本研究の一部は平成 14 - 15 年度日本アイソトープ協会滝沢研究所研究助成をもとに実施されました。関係各位に感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Matsumura K, Bergstrom M, Onoe H, Takechi H, Westerberg G, Antoni G, Bjurling P, Jacobson GB, Langstrom B, Watanabe Y, In vitro positron emission tomography (PET): use of positron emission tracers in functional imaging in living brain slices. *Neurosci Res*, 1995, 22:219-29.
- 2) Sasaki T, Ishiwata K, Murata T, Senda M, Demonstration of competition between endogenous dopamine and <sup>11</sup>C]raclopride binding in in vitro brain slices using a dynamic autoradiography technique. *Synapse*, 2002, 44:42-50.

- 3) Sasaki T, Kawamura K, Tanaka Y, Ando S, Senda M, Assessment of choline uptake for the synthesis and release of acetylcholine in brain slices by a dynamic autoradiographic technique using [<sup>11</sup>C]choline. *Brain Res Protoc*, 2002, 10:1-11.
- 4) Xin Q and Wightman RM, Transport of choline in rat brain slices. *Brain Res*, 1997, 776: 126-132.