

ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器(第五シリーズ) "ライフサイエンスにおけるイメージング"

Ⅳ. リアルタイムバイオラジオグラフィ法

佐々木 徹, 岩本明憲, 坪井 寿, 加藤 徹, 工藤寛之, 加沢エリト, 渡辺恭良

Reprinted from RADIOISOTOPES, Vol.55, No.10 October 2006

Japan Radioisotope Association http://www.jrias.or.jp/ 資料

ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器(第五シリーズ) "ライフサイエンスにおけるイメージング" Ⅳ. リアルタイムバイオラジオグラフィ法[†]

佐々木 徹, 岩本明憲*1, 坪井 寿*1, 加藤 徹*1, 工藤寛之*2,*3, 加沢エリト*4, 渡辺恭良*5

財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー研究チーム 173-0015 東京都板橋区栄町 35-2 *1 アロカ株式会社 181-8622 東京都三鷹市牟礼 6-22-1 *2 東京医科歯科大学生体材料工学研究所計測分野 101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10 *3 地方独立行政法人 東京都立産業技術研究センターエレクトロニクスグループ 115-8586 東京都北区西が丘 3-13-10 *4 地方独立行政法人 東京都立産業技術研究センター東京都ナノテクノロジーセンター 144-0035 東京都大田区南蒲田 1-20-20 *5 大阪市立大学大学院医学研究科システム神経科学・理化学研究所フロンティア研究システム 分子イメージング研究プログラム 545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

Key Words: real-time bioradiography, positron-emitting tracer, chemiluminescence, autoradiography

1. はじめに

[†] Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences(5), "Development of Imaging Technology in Life Sciences". IV. Real-time Bioradiography. Toru SASAKI, Akinori IWAMOTO*1, Hisashi TSUBOI*1, Toru KATOH*1, Hiroyuki KUDO*2, *3, Erito KA-ZAWA*4 and Yasuyoshi WATANABE*5: Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokvo 173-0015, Japan. *1Aloka Co., Ltd., 6-22-1, Mure, Mitaka-shi, Tokyo 181-8622, Japan, *2Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, *3Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, 3-13-10, Nishigaoka, Kita-ku, Tokyo 115-8586, Japan, *4Tokyo Nano-technology Center, 1-20-20, Minami-kamata, Ohta-ku, Tokyo 144-0035, Japan, *5Osaka City University Graduate School of Medicine, RIKEN Molecular Imaging Research Program, 1-4-3, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan.

近年,陽電子放出断層撮像法 (PET) によ る臨床診断は急速に普及している。PET で利 用される短寿命ポジトロン放出核種は画像診断 のみならず, ライフサイエンス領域, とりわけ 基礎医学、生物学、生命科学における研究に有 用な情報を提供すると期待される。ポジトロン 核種はライフサイエンスで一般に用いられる核 種や核医学診断の単光子放出断層撮像法 (SPECT) で用いられる核種とは異なり、次の ような特徴を持っている。(1)放射壊変にとも ない高エネルギー β⁺線(ポジトロン)の放出 とその消滅に伴い2本の光子を反対方向に放出 する。(2)短寿命放射性同位元素である。(3)生 体を構成する元素の放射性同位体(生物学的相 同性大)である。このようなポジトロン核種の 特徴を巧みに利用して、生存能を有する組織切 片の代謝,機能を画像化,解析するオートラジ オグラフィ法「バイオラジオグラフィ法」が発 明された。本説ではバイオラジオグラフィ法の 画像収集を実時間に画像化,解析する新しいオ ートラジオグラフィ法「リアルタイムバイオラ ジオグラフィ法」の計測原理と開発過程につい て概説する。更に,近年発展のめざましい光計 測法との融合により本計測法の新たな展開の可 能性を述べ,ライフサイエンス領域,とりわけ 神経科学,基礎老化学研究における応用例につ いても紹介する。

個体と細胞,生体分子の間をつなぐ 新しいイメージング法

2・1 バイオラジオグラフィ法

脳の機能. 代謝を解析する神経科学の研究の ために、「イメージング」は有用な手段である。 そのアプローチは分子や遺伝子を対象とした微 視的なものから,個体の脳を対象とした巨視的 なものにまで及ぶ。低侵襲脳活動イメージング 法である PET, 単光子放出断層法 (SPECT), 機能的磁気共鳴画像 (fMRI), 近赤外光脳血流 計測法 (NIRS), 脳磁波測定法 (MEG) は、 近年めざましく発展している。これらイメージ ング法は、器官、組織の代謝、機能をインビボ で評価できる有用な手段である。しかし、生体 に投与された探索子の挙動は血流、代謝等様々 な生体内諸因子の影響を受け、空間分解能には 限界があるため、データの解析、解釈を困難に している。生命現象をより精度高く解析し、適 切に解釈するためには、細胞、細胞内器官、生 体分子、遺伝子を対象とするインビトロ実験が 有用である。精緻な解析が可能なこの実験系は, 実験条件の制御が簡便で、得られたデータの解 析、解釈も比較的容易である。しかし、インビ トロで得られる断片的実験結果をつなぎあわせ ることで生体内の秩序だった生命現象を説明す ることも困難である。インビトロとインビボの 実験の間には、大きな隔たりがあるのが現状で ある。

バイオラジオグラフィ法は科学技術振興事業 団・国際共同研究「サブフェムトモルバイオ認 識プロジェクト」(日本側代表研究者:大阪市立 大学大学院医学研究科 渡辺恭良) で発明され た技術で、代謝的・電気生理学的に生存能を有 している組織切片とポジトロン核種で標識され た化合物を用いて,標識化合物の分布に関する 2次元画像をダイナミックに解析する方法であ る^{1),2)}。同法は、PET などのような個体丸ごと を対象とするインビボ計測法と、細胞、細胞内 器官,生体分子を対象とするインビトロ計測法 の中間に位置づけられる新技術(図1)で、生 きて機能している組織の代謝・機能を高精度に 解析できる新しい方法論である。詳細はすでに 本誌で取り上げられているので参照されたい²⁾。 本法は、ポジトロン核種や³²Pのような高エネ ルギーの電子線のみに対して適用が可能で、通 常は陽電子放出放射性薬剤が使われる。現在, バイオラジオグラフィ法を用いた研究は、大阪 市立大学, 東京都老人総合研究所, 放射線医学 総合研究所,福井大学,日本アイソトープ協会 滝沢研究所とウプサラ大学で行われている。

2・2 ガス-組織生切片オートラジオグラフィ 法

ポジトロン標識ガスと組織生切片を直接反応 させて,代謝,機能を評価するガス-組織生切 片オートラジオグラフィ法は筆者らが開発した 新技術である³⁾⁻⁵⁾。PET で酸素代謝の測定に用 いられている [¹⁵O]酸素ガスの脳組織生切片へ の取り込みの2次元画像から、ミトコンドリア の電子伝達活性を評価することができる。[¹⁵0] 酸素は老化研究にとって魅力的なトレーサであ る。老化などとの関連性が指摘されている活性 酸素は分子状酸素から生成する。物理学的半減 期がわずかに2分の¹⁵Oではあるが、標識活性 酸素を用いたトレーサ実験が可能である。[¹⁵O] 酸素ガスを活性酸素生成系 (xanthine oxidase) に導き,Fe²⁺存在下で発生させた[¹⁵O]OH ラジ カルと標的分子 (salicylic acid) と反応させ, その反応生成物を検出することに成功した⁶⁾。



図1 個体と細胞・生体分子をつなぐ方法論の必要性

3. 神経科学研究への応用

上述の新しいオートラジオグラフィ法はイン 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, 神経科学研究の有用な手段として期待される。 これまでに、脳組織生切片を対象に糖代 謝^{1),7)-12)},神経受容体(アセチルコリン¹³⁾,ベ ンゾジアゼピン¹⁴⁾,ドーパミン $D_2^{(1),(5)}$),神経 伝達物質の合成と放出(ドーパミン^{1),15)}、アセ チルコリン^{16),17)}),シナプス間隙における神経 伝達物質濃度の試算(ドーパミン)¹⁵⁾,ミトコ ンドリア機能³⁾⁻⁵⁾に関する研究が報告されてい る。筆者らは、難治性てんかん患者の外科的治 療の際に摘出される病巣部位から作成した脳組 織生切片の糖代謝を,ブドウ糖類似物質である [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) を用い たバイオラジオグラフィで解析した。ヒト脳と 対照としたラット脳灰白質の FDG の集積は、 高カリウム処理による脱分極刺激によって対照 の生理的条件下に比して著しく亢進した。これ らの患者は、術前に施行された FDG-PET によ って病巣部位が確定されており、7 例の患者の

FDG-PETとFDG-バイオラジオグラフィのデ ータ比較から両者の関係を調べた(図 2)。そ の結果,FDG-バイオラジオグラフィにおいて 低い高カリウム応答性を示した症例では,PET におけるFDG集積がより低い傾向が示され た¹⁸⁾。てんかん病巣の神経細胞死及びグリオー シスの進展あるいは神経伝達の低下が,バイオ ラジオグラフィにおける高カリウム応答性の低 下の要因として考えられた。本実験系は,PET 画像が病巣部位のどのような機能,代謝を診て いるのか,その意味を直接検証することのでき る有用な手段として期待される。

4. リアルタイムバイオラジオグラフィ法¹⁸⁾ の誕生

バイオラジオグラフィ法を用いて組織生切片 上の放射能分布をダイナミックに収集,解析す るためには、ラジオルミノグラフィプレートを 一定時間ごとに交換しなければならないために、 関心領域における短時間内での代謝,機能の変 化を追跡することはできない。筆者らは、シー ト状固体シンチレータをラジオルミノグラフィ プレートの代わりに用い、放射線により発生し



図2 難治性てんかん脳の FDG-PET と摘出脳生組織切片の FDG-バイオラジオグラフィ像の比較

た極微弱光を超高感度フォトンカウンティング カメラ(浜松ホトニクス社製)でリアルタイム に画像収集する方法論「リアルタイムバイオラ ジオグラフィ法」を考案し(図3),東京都老 人総合研究所,大阪市立大学,アロカ㈱との共 同研究プロジェクトを開始した。しかし、基本 性能に関わる決定的な問題が明らかになった。 脳組織切片の FDG の集積は濃淡のない奇妙な 画像を呈した(図4右)。やがて、この原因は¹⁸F で標識した白色線源と黒色線源を使った研究に よって明らかになった。白色線源は、300 µm 厚にスライスした円筒形寒天ブロックを FDG 溶液中でインキュベートして標識することで作 成した。黒色線源は、黒色色素を混ぜて着色し た寒天ブロックを用い白色線源と同様に作成し た。白色, 黒色線源はともに同じ放射能量を有 しているので,両者のオートラジオグラフィ像 の濃度は同じにならなければならない。ところ が、白色線源の方が黒色よりも高い放射能濃度 と評価されてしまう (図4左)。これは、シン チレータの中で放射線から変換された光の一部 がカメラと反対側, 試料側へ放出され, 試料で 反射され前面に放射された光とともにカメラに 捉えられることに起因した現象であることがわ かった(図5)。このことが原因で、脳組織切 片の FDG 画像は灰白質に比べて光の反射率の 高い白質の集積が強調された異常な集積画像を 呈したことが明らかになった。この問題は、シ ンチレータの試料側を鏡面とすることで解決で きた。シンチレータの鏡面化は、強エネルギー の β⁺線に対しては十分薄いアルミニウムマイ ラー膜を貼るかアルミニウム (Al, 0.42 mg/ cm²)をシンチレータ表面に蒸着するかの方法 で対応した(図5)。シンチレータの試料側を 鏡面とすることで以下に示す効果が確認された。 (1) 放射線計測効率の向上(2) 試料の明暗の計 数効率に対する影響の排除(3)チェレンコフ光。 生物発光などに起因するバックグラウンドの影 響の排除

鏡面化シンチレータは,本装置を用いて切片 上の放射能分布を精度よく画像化,解析するた めの必須要素となった。「固体シンチレータの



図3 リアルタイムバイオラジオグラフィ法



[¹⁸F]標識寒天切片

脳組織切片の[¹⁸F]FDG集積

図4 シンチレータの鏡面化による画像の改善

試料側を反射膜とした放射線検出装置」に関す る発明は特許²⁰⁾を出願した。その開発経緯は Isotope News 誌に詳述しているので参照され たい²¹⁾。

5. リアルタイムバイオラジオグラフィ法の 性能評価

試料上の放射能分布を実時間で精度よく画像 化,解析するための基本性能として,感度,直



図5 鏡面化シンチレータの原理図

表 1	シンチレ	/ ータの特性 ¹⁾
11.1	~ ~ / ~	Z YZ1911.

物質	密度 (g/cm ³)	最大発光波長 λ max (nm)	シンチレーション 効率 ²⁾ (%)	シンチレーション 効率比 ³⁾ (A)	放射線の吸収率比 ⁴⁾ (B)	感度比 (AxB)	潮解性
Nal(TI)	3.67	415	11.3	3.77	1.23	4.62	大
Csl(Tl)	4.51	540	11.9	3.97	1.23	4.87	小
Cs I (Na)	4.51	420	11.4	3.80	1.23	4.67	大
Li(Eu)	4.08	470	2.8	0.93	1.23	1.15	大
GBO	7.13	505	2. 1	0.70	1.23	0.86	無
BaF_2	4.89	220, 310	4.5	1.50	1.23	1.84	小
$CaF_2(Eu)$	3.19	435	6.7	2.23	1.22	2.73	無
LYS0	7.10	420	8. 475	2.83	1.23	3.47	無
プラスチッ? (NE102A)	ל 1.03	423	3.0	1.00	1.00	1.00	無

 ¹⁾ 密度、最大発光波長、シンチレーション効率、潮解性は、Radiation detection and measurement, 第2版, Knoll G. F. 著, John Wiley & Sons, Inc., p. 243を基に作成した。ただし、LYSOについてはサンゴバン株式会社の技術資料を基に作成した。
²⁾ 高速電子に対する絶対シンチレーション効率

³⁾ プラスチックシンチレータ (NE102A)のシンチレーション効率に対する相対値

⁴⁾ 各シンチレータ (0.5mm厚) に対する β +線 (¹⁸F放出: 0.633MeV)の吸収率を求め、プラスチックシンチレータ (NE102A) の吸収率に対する相対値を算出した。

線性,エネルギー特性,均一性,位置分解能に ついて検討した。各種シンチレータの特性は, プラスチックシンチレータを基準に発光効率比 (A)と放射線の吸収率比(B)で表して,(A) と(B)の積(感度比)をもって感度の指標と した(表1)。感度に加え,取り扱いやすさ(潮 解性,物理的強度)の点で優れているLYSO (lutenium yttrium orthosilicate), CaF₂(Eu),



図 6 CaF₂(Eu), プラスチックシンチレータにおける放射能分布と化学発光分布のプロファイルの比較 200 μ 幅の間分解能評価用マイクロ流体チップに FDG あるいは化学発光試薬を入れて,有効視野 0.9 cm ×1.2 cm における分解能を評価した(図中の数値は FWHM 値)

表	2	検出	限界	の.	比較

¹⁸ F放出β ⁺ 線に対する検出限界(β/cm ²) ¹⁾					
視野	LYS0	CaF ₂ (Eu)	プラスチック(NE102A)	ラジオルミノグラフィ法	
9cmx12cm	5. 07E-03	6.92E-04	3.22E-03	3 235-04	
3cmx4cm	1.69E-03	2. 25E-04	1.05E-03	3. 232-04	

^{1) 18}F放出するβ+線(0.633MeV)に対する検出限界値はβ線基準線源を使って求めた検出限界-エネルギー特性から算出

バイオラジオグラフィの計測時間およびラジオルミノグラフィのコンタクト時間は10分間

CsI(Tl) の3種類を、シンチレータの候補とし て性能評価実験を行った。しかし、CsI(Tl) は 発光波長帯とカメラの感度波長帯が必ずしも 一致せず、詳細な評価まで至らなかった。東京 都立産業技術研究所(現東京都立産業技術研究 センター)との共同研究により、装置の重要な 基本性能である感度、位置分解能の評価のため の標準線源の開発を行った。微細加工技術を応 用してマイクロ流体チップを製作した(図 6)。 この微細な溝(幅 20、50、200 μ m、深さ10 μ m) に PET トレーサを流し込み評価用線源 とした。これにより、これまで不可能であった ミクロン単位での分解能評価が実線源により可 能となった²²⁾。装置の感度、位置分解能はカメ ラの総画素数/視野とシンチレータに大きく依 存する。微細溝(20 μ m)にFDGを流入させ て作成した標準線源を用いて,感度(表 2)と 位置分解能(表 3)を、シンチレータごと,視 野ごとにラジオルミノグラフィ法(BAS2500) と比較した。感度の指標である検出限界は、 CaF₂(Eu) <LYSO <プラスチックシンチレータ の順で,視野 3×4 cmではラジオルミノグラ フィ法と同等あるいはそれより優れていた。位 置分解能は、LYSO >CaF₂(Eu) >プラスチッ クシンチレータの順で,視野 3×4 cmではラ ジオルミノグラフィ法と同等あるいは若干劣っ ていた。図6に同様に作成した¹⁸F標識線源 (200 μ m幅)の放射能分布のプロファイルを 化学発光と比較した結果を示した。ポジトロン 核種の放射能分布像は、直接光を捉える化学発

	半値幅(μ m) ¹⁾			
視野	LYS0	CaF2 (Eu)	プラスチック(NE102A)	ラジオルミノグラフィ法
9cmx12cm	779	779	974	
3cmx4cm	561	624	811	500
0.9cmx1.2cm	365	500	769	

表3 位置分解能の比較

¹⁾ 20μm幅のマイクロ流体チップにFDG溶液を流し込んで作成した位置分解能評価用を使って算定、 FWHMにて評価

リアルタイムバイオラジオグラフィ

ラジオルミノグラフィ

写真



図7 脳組織生切片の FDG-リアルタイムバイオラジオグラフィ画像のラジオルミノグラフィとの比較
ラット脳組織切片(300 µm)を作成して,50 mLのチャンバーで74 MBqの FDG とインキューベートした。3×3.4 cmの視野で鏡面化 CaF₂(Eu)(0.5 mm)を用い画像を収集,インキューベート開始後240~255 分の画像を比較した

光に比べ広がりが認められた。原子番号の低い プラスチックシンチレータでは、 $CaF_2(Eu)$ に 比べてこの広がりが顕著であった。密度が低く 放射線阻止能の低いシンチレータほどシンチレ ータ内部での放射線の飛程が長く,これが収集 画像の広がりの原因であると考えられる。ポジ トロン核種は崩壊により強 β⁺線を放出し,更 に,陽電子消滅により2本の光子を放出す る。¹⁸F(B:0.633 MeV, 消滅光子: 0.511 MeV ×2)と比較的エネルギーの近い¹³⁷Cs (γ:0.662 MeV) \geq ³⁶Cl(β : 0.709 MeV) を用い, 0.5 mm 厚のCaF₂(Eu) における感度をそれぞれ実測 した。この実験値を、¹⁸Fのエネルギーに外挿 して β^{\dagger} 線と消滅光子に対する感度を試算した。 **β**⁺線の消滅光子の感度は**β**⁺線の1/30と試算 された。本装置の消滅光子に対する感度はβ* 線に比べて極めて低いといえる。装置の重要な 基本性能である感度,位置分解能を向上させる ためには、強いエネルギーの B^+ 線をどれだけ

短い飛程内に停止させ、効率的に光に変換させ るシンチレータを選択するかにかかる。現在ま での検討結果から鏡面化した0.5mm厚の CaF₂(Eu)がポジトロン核種の画像化に最適な シンチレータであると結論された。これに基づ き装置(図3)を製作した結果、FDGのラッ ト脳組織生切片への取り込み像をラジオルミノ グラフィ法とほぼ同等の画質で15分ごとに収 集することができた(図7,8)。

バイオイメージング法との融合による 新展開

上述の放射線計測と近年発展のめざましい光 技術(バイオイメージング法)とを融合させて, 当該装置を発展させた新しい計測法¹⁹⁾の着想に 至った(図9)。この着想に基づき,それぞれ 別々のチャンバー中の脳生組織切片において, 活性酸素の生成をLucigeninによる化学発光か ら,糖代謝をFDGによる放射線計測から,リ



図 8 ラット脳組織生切片への FDG 集積の連続画像
ラット脳組織切片 (300 µm) を作成して, 50 mL のチャンバーで 74 MBq の FDG とインキューベートした。3×3.4 cm の視野で鏡面化 CaF₂(Eu) (0.5 mm) を用い画像を収集。15 分ごとの画像は減衰補正を施し表示した



図9 放射線と化学発光の複合計測の概念図

アルタイムで可視化することに成功した(図 10)。更に,試料側を鏡面としたシンチレータ を用いることで,放射性同位元素と化学発光探 索子の両方が存在する標準試料から,それぞれ を弁別して計測することができた(図9)。「鏡 面化シンチレータ」は放射線と化学発光,蛍光 の複合計測法という新しい画像収集法のための 必須の要素であり,その展開の可能性が示され た。本複合計測法の開発は,高度放射線計測と 光計測法との融合という新しい研究領域の創生 を促し,周辺分野の研究に大きなインパクトを 与えると期待される。

7. 神経科学,基礎老化研究への応用

リアルタイムバイオラジオグラフィは、神経 科学の分野,基礎老化学の研究に有用性が示さ れている。現在,以下の応用研究が進行中であ る。(1)脳虚血時の酸化ストレス分子機構の解 明(2)SOD遺伝子欠損動物の解析(3)自然発 症矮小動物の酸化ストレス耐性の解析(4)ヒト 脳生組織における酸化ストレス分子機構の解明 (5)老化に伴う活性酸素生成変化の解析(6)加 齢促進マウスにおける酸化ストレス分子機構の 解明

これらの中から,特に二つの応用研究につい て紹介する。



図 10 脳組織生切片の無酸素-再酸素過程における活性酸素と糖代謝変化の解析 ラット脳組織切片を 50 mL のチャンバーで 37 MBq の FDG あるいは 2 mM の Lucigenin とインキュー ベートした。インキューベート開始 120 分後から 15 分間,無酸素(窒素)処理を施した後,酸素供給 条件に戻した。この過程の FDG の集積画像を鏡面化シンチレータのもと,化学発光を直接カメラで画 像化した。FDG の画像は減衰補正を施した後,領域解析を行った。15 分ごとの解析値の差をもって, その 15 分に蓄積した放射能としてインキューベーション時間との関係をグラフにプロットした

7・1 脳虚血時の酸化ストレス分子機構の 解明

脳の虚血-再灌流のモデル実験として、ラッ ト脳生切片を対象に無酸素-再酸素過程におけ る活性酸素(\cdotO_2^-)生成と糖代謝の経時変化 を検討した($\boxtimes 10$)。ラット脳生切片(厚さ 300 μ m)をLucigenin(2 mM)あるいはFDG(37MBq)を含むKrebs-Ringer液中で酸素供給 ($95\% O_2/5\% CO_2$)下,暗箱内(34°C)で165 分間培養した。15分間の無酸素($95\% N_2/5\%$ CO₂)処理ののち,再度酸素供給下で120分間 培養した。この間,切片から放出される微弱光 を化学発光計測の場合は直接,放射線計測の場 合は鏡面化シンチレータを用い、リアルタイム バイオラジオグラフィ装置で画像化、解析し た¹⁹。その結果、 \cdotO_2^- 依存性の化学発光は再酸 素処理時に著しく増強し,その部位に局在性が 認められた。一方,FDGの集積で評価した糖 代謝は無酸素時に亢進した。この亢進は,無酸 素下で低下したミトコンドリアの効率的な ATP 産生を解糖のみで代償するための応答で あると考えられる。また,高カリウムによる脱 分極刺激は糖代謝を亢進させたが,・O2⁻の生 成には影響を与えなかった。以上の結果から, 脳の虚血-再灌流における・O2⁻の生成には無酸 素から再酸素状態への移行時の酸化還元バラン スの変化が関わることが示唆された。

7・2 SOD 遺伝子欠損動物の解析

脳の酸化ストレスに対するスーパーオキシド ディスムターゼ (SOD)の役割と細胞内・O₂⁻ の生成の局在性を明らかにすることを目的とし



図 11 SOD 遺伝子欠損マウス脳組織生切片の無酸素-再酸素過程における糖代謝変化の解析 Cu, Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) 遺伝子欠損及び野生型マウス脳組織切片を 50 mL のチャン バーで 37 MBq の FDG とインキューベートした。インキューベート開始 120 分後から 15 分間, 無酸 素 (窒素)処理を施した後,酸素供給条件に戻した。この過程の FDG の集積画像を画像化した。FDG の画像は減衰補正を施した後,領域解析を行った。15 分ごとの解析値の差をもって,その 15 分に蓄 積した放射能としてインキューベーション時間との関係をグラフにプロットした



図 12 SOD 遺伝子欠損マウス脳組織生切片の無酸素-再酸素過程における活性酸素依存性化学発光量の変化の 解析

Cu, Zn-SOD(SOD1), Mn-SOD(SOD2) 遺伝子欠損及び野生型マウス脳組織切片を 50 mL のチャンバー で 2 mM の Lucigenin とインキューベートした。インキューベート開始 120 分後から 15 分間, 無酸素(窒素)処理を施した後,酸素供給条件に戻した。この過程の化学発光をカメラで直接画像化した。15 分ご との化学発光量とインキューベーション時間との関係をグラフにプロットした(図右)。図左上は SOD1 遺伝子欠損と野生型の化学発光画像(150~165分)の比較,左下は SOD2 遺伝子欠損と野生型の比較 を示す

て、Cu, Zn-SODと Mn-SOD 欠損マウスの脳 組織生切片における・O2⁻依存性化学発光を リアルタイムバイオラジオグラフィ法で画像化, 解析した²³⁾。脳組織生切片は7・1と同様にCu, Zn-SODとMn-SOD欠損マウス及び野生型よ り作成し、無酸素-再酸素処理過程における ・O₂⁻依存性化学発光と FDG 集積の経時変化を 検討した(図 11, 12)。その結果,定常状態及 び無酸素-再酸素過程の・O₂⁻依存性の発光は, Cu, Zn-SOD 及び Mn-SOD 欠失いずれも野生 型に比べて有意に増加した(図 12)。一方,FDG の集積から評価した糖代謝は Cu, Zn-SOD, Mn-SOD 欠損マウスと野生型間で差がないことが わかった(図 11)。一般に活性酸素の発生と代 謝率との間には相関があると考えられている。 SOD 欠損に伴う・O₂⁻依存性化学発光の亢進は, ・O₂⁻消去酵素の欠失により組織の・O₂⁻濃度が 増加したことに起因したもので,代謝の変化に よるのではないことを示している。

 $\cdot O_2^-$ は高い反応性とイオン性を有する。細胞質, ミトコンドリアそれぞれの場所で発生した $\cdot O_2^-$ はその場所から移動しないと仮定すると, Cu, Zn-SOD及びMn-SOD欠失の化学発光量を野生型と比較することで,細胞質, ミトコンドリアにおける $\cdot O_2^-$ 生成に関する情報を得ることができると考えられる。これに基づき,SOD欠損に伴う発光増大を解釈すると,細胞全体での $\cdot O_2^-$ 総生成量では細胞質がミトコンドリアより大きいかあるいは大差はないと評価された。しかし,細胞の中でのミトコンドリアの占める割合は細胞質に比べ著しく小さいので, $\cdot O_2^-$ 濃度はミトコンドリアの方が細胞質よりも大きいと考えられる。

8. おわりに

分子イメージングは PET に代表されるよう に個体を対象として,放射性同位元素で標識し た物質と生体内分子との相互作用に基づいた放 射能の濃度及び時間分布から個体レベルで生体 の機能,代謝を評価することができる。一方, バイオイメージングは細胞,細胞内器官,単分 子を対象として,主に化学発光や蛍光プローブ と生体内分子との相互作用に基づく発光分布及 び時間変化から,マイクロ,ナノレベルで生体 の機能,代謝を評価することが可能である。我 が国はバイオイメージング先進国で,16年前

にすでにこの領域の学会が設立されている²⁴⁾。 現在のところ、バイオイメージングと分子イメ ージングの呼称は十分には整理されていないよ うに思われる。米国では2000年に米国立保健 研究所(NIH)に、PET など放射性同位元素 を用いたインビボイメージング、化学発光や蛍 光プローブを用いたインビトロイメージング、 ナノテクノロジー,バイオセンサー,画像解析 技術など学際領域の研究を行う新しい研究所 (NIBIB) が設立された。本邦では 2006 年に「日 本分子イメージング学会」が発足した25)。イメ ージングに関わる異分野間の連携を重視した新 しい試みである。今後、放射性同位元素と蛍光、 化学発光プローブを用いたイメージングの垣根 が取り払われた複合型計測法が開発され、診断 や研究に有益な情報を提供するようになるであ ろう。

2005年は放射線,放射性同位元素利用の節 目の年となった。文部科学省の研究プログラム に基づき,分子イメージングの研究拠点が理化 学研究所,放射線医学総合研究所の2か所に設 置され,研究が始動する。国際基本安全基準 (BSS)を取り入れた改正放射線障害防止法が 施行され,放射性同位元素の使用の規制が緩和 された。これまでの規制のもとでは想像もしな かった計測法と放射性同位元素との組み合わせ も実現するかもしれない。また,FDGの放射 性医薬品の販売も開始された。短寿命ポジトロ ン核種は基礎研究においても身近になった。基 礎研究における放射性同位元素の利用を牽引し てくれることを期待する。

文 献

 Matsumura, K., Bergstrom, M., Onoe, H., Takechi, H., Westerberg, G., Antoni, G., Bjurling, P., Jacobson, G.B., Langstrom, B. and Watanabe, Y., In vitro positron emission tomography (PET) : use of positron emission tracers in functional imaging in living brain slices, *Neurosci. Res.*, 22, 219-229 (1995) Oct. 2006

- 2) 渡辺恭良,中村夫左央,田中雅彰,松村 潔, インビトロ PET 法(バイオラジオグラフィ)の 開発とその応用, *RADIOISOTOPES*, 49, 505-518 (2000)
- Sasaki, T., Soga, S., Ishii, S., Kobayashi, T., Nagai, H. and Senda, M., Visualization of mitochondrial oxygen fixation in brain slices by gas-tissue autoradiography, *Brain Res.*, 831, 263-272 (1999)
- Sasaki, T., Ishii, S. and Senda, M., Gas-tissue autoradiography using [¹⁵O] molecular oxygen for visualization of mitochondrial oxygen fixation in brain slices, *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 5, 146-152 (2000)
- 5) Sasaki, T., Senda, M., Ohno, T., Kojima, S. and Kubodera, A., Effect of in vitro ischemic or hypoxic treatment on mitochondrial electron transfer activity in rat brain slices assessed by gas-tissue autoradiography using, *Brain Res.*, 28, 25-31 (2001)
- 6) 佐々木 徹,金子孝夫,[¹⁵O]酸素による活性酸素の標識とその応用研究,日本薬学会第122年会要旨集,3,67(2002)
- 7) Yoshida, S., Murata, T., Omata, N., Waki, A., Fujibayashi, Y., Isaki, K., Oka, H. and Yonekura, Y., The effect of neuronal perturbation on the uptake of [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose in brain slices of the rat, *Neurosci. Res.*, **30**, 271-278 (1998)
- 8) Murata, T., Waki, A., Omata, N., Fujibayashi, Y., Sadato, N., Yano, R., Yoshimoto, M., Isaki, K. and Yonekura, Y., Dynamic changes in glucose metabolism by lactate loading as revealed by a positron autoradiography technique using rat living brain slices, *Neurosci. Lett.*, 249, 155-158 (1998)
- 9) Murata, T., Omata, N., Fujibayashi, Y., Waki, A., Sadato, N., Yoshimoto, M., Omori, M., Isaki, K. and Yonekura, Y., Dynamic changes in glucose metabolism induced by thiamine deficiency and its replenishment as revealed by a positron autoradiography technique using rat living brain slices, J. Neurol. Sci., 164, 29-36 (1999)
- 10) Murata, T., Omata, N., Fujibayashi, Y., Waki, A., Sadato, N., Yoshida, S., Yano, R., Yoshimoto, M. and Yonekura, Y., Dynamic changes in glucose metabolism of living rat brain slices induced by hypoxia and neurotoxic chemical-loading re-

vealed by positron autoradiography, J. Neural. Transm., 106, 1075-1087 (1999)

- 11) Omata, N., Murata, T., Fujibayashi, Y., Waki, A., Sadato, N., Yoshimoto, M., Wada, Y. and Yonekura, Y., Hypoxic but not ischemic neurotoxicity of free radicals revealed by dynamic changes in glucose metabolism of fresh rat brain slices on positron autoradiography, J. Cereb. Blood Flow Metab., 20, 350-358 (2000)
- Sasaki, T., Yamaguchi, M. and Kojima, S., Demonstration of hyperaccumulation of [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose under oxygen deprivation in living brain slices using bioradiography, *Synapse*, 55, 252-261 (2005)
- 13) Murata, T., Matsumura, K., Sihver, S., Onoe, H., Bergstrom, M., Sihver, W., Yonekura, Y., Langstrom, B. and Watanabe, Y., Triazolam-induced modulation of muscarinic acetylcholine receptor in living brain slices as revealed by a new positron-based imaging technique, *J. Neural. Transm.*, 105, 1117-1127 (1998)
- 14) Murata, T., Matsumura, K., Onoe, H., Bergstrom, M., Takechi, H., Sihver, S., Sihver, W., Neu, H., Andersson, Y., Ogren, M., Fasth, K.J., Langstrom, B. and Watanabe, Y., Receptor imaging technique with ¹¹C-labeled receptor ligands in living brain slices : its application to time-resolved imaging and saturation analysis of benzodiazepine receptor using [¹¹C]Ro15-1788, *Neurosci. Res.*, 25, 145-154 (1996)
- 15) Sasaki, T., Ishiwata, K., Murata, T. and Senda, M., Demonstration of competition between endogenous dopamine and [¹¹C] raclopride binding in in vitro brain slices using a dynamic autoradiography technique, *Synapse*, 44, 42-50 (2002)
- 16) Sasaki, T., Kawamura, K., Tanaka, Y., Ando, S. and Senda, M., Assessment of choline uptake for the synthesis and release of acetylcholine in brain slices by a dynamic autoradiographic technique using [¹¹C]choline, *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, **10**, 1-11 (2002)
- 17) Sasaki, T., Funaki, Y., Shozushima, M. and Terasaki, K., Effect of anoxia on choline uptake and release of acetylcholine in brain slices estimated with a bioradiographic technique using

598

[¹¹C] choline, *RADIOISOTOPES*, **52**, 677-685 (2003)

- 18) Sasaki, T., Nariai, T., Maehara, T., Sato, K., Oda, K. and Ishii, K., Bioradiography of human brain slices accords with preoperative PET imaging, *Submitted to Brain Res*. (2005)
- Sasaki, T., Iwamoto, A., Tsuboi, H. and Watanabe, Y., Development of real-time bioradiographic system for functional and metabolic imaging in living brain tissue, *Brain Res.*, 1077, 161-169 (2006)
- 20)特許出願:2002-382447,佐々木 徹,渡辺恭良, 荻原 清,「固体シンチレータの試料側を反射膜 とした放射線検出装置」
- 21) 佐々木 徹, リアルタイムバイオラジオグラフィ による生組織切片の代謝・機能解析, Isotope News, 603, 13-16 (2004)
- 22) Kudo, H., Kazawa, H., Sasaki, T. and Iwamoto, A.,

Basic study of spatial resolution measurement for autoradiography systems, 6th Japan France Seminar on Intelligent Materials and Structures, Oct., 29-31 (2005)

- 23) 佐々木 徹,礒 千恵子,清水孝彦,内山 智, 白澤卓二,小島周二,リアルタイムバイオラジ オグラフィー法を用いた脳生スライスの活性酸 素発生量の解析,日本基礎老化学会第27年会, 基礎老化研究,28,27(2004)
- 日本バイオイメージング学会のホームページ (http://www.molecularimaging.jp/JSMI/JSMI. html)
- 25) 日本分子イメージング学会のホームページ (http://www.nih.go.jp/yoken/bioimaging/index-j.html)