

マルチトレーサー法によるセレン欠乏ラット上腹部における元素動態の非侵襲測定

松本謙一郎,^{*,a} 川東寿子,^a 蛭沼利江子,^b 榎本秀一,^b 遠藤和豊^a

Noninvasive Detection of Dynamics of Various Elements in the Upper Abdomen of Selenium-Deficient Rat Using Multitracer Analysis Technique

Ken-ichiro MATSUMOTO,^{*,a} Hisako KAWAHIGASHI,^a Rieko HIRUNUMA,^b
Shuichi ENOMOTO,^b and Kazutoyo ENDO^aDepartment of Physical Chemistry, Showa Pharmaceutical University,^a 3-3165 Higashi-Tamagawagakuen,
Machida, Tokyo 194-8543, Japan, and Radioisotope Technology Division, Cyclotron Center, RIKEN
(The Institute of Physical and Chemical Research),^b 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

(Received November 21, 2001; Accepted January 23, 2002)

The advantages of a technique as a diagnostic tool for examining the distribution of bio-trace elements in the living body are discussed. Time courses of the distribution of Be, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Se, Rb, Sr, and Y in the upper abdomen of living selenium-deficient rats were examined using the *in vivo* multitracer analysis technique. The dynamics of the elements were estimated by comparison with the distribution of As. Almost all As was taken up by red blood cells. The present findings of a decrease in Se and increase in Co in the liver of Se-deficient rats are in good agreement with the previous data that showed a decrease in Se and increase in Co uptake into the liver cell fraction of Se-deficient rats. Although the normalized uptake rate and the relative distribution of Co 48 h after administration increased in Se-deficient rats, the early level of the relative distribution of Co was not lower compared with that in the normal group. This suggests that the high level of the normalized uptake rate and the relative distribution of Co in Se-deficient rats were affected by the decreasing excretion rate rather than by the increasing uptake rate of Co. The plateau level of relative distribution of Se in the Se-deficient rats is lower than that in normal rats, suggesting that the lower levels of the normalized uptake rate and relative distribution of Se in Se-deficient rats were due to the decreased uptake rate of the element.

Key words—biotrace elements; *in vivo* measurement; whole animal

緒 言

金属箔のターゲットに、加速した重イオンビーム (^{16}O , ^{14}N , ^{12}C 等) を照射すると、核破碎反応によってターゲット中に様々な核種が生成する。ターゲットを化学的に分離した後、無担体、無塩のマルチトレーサーが得られる。マルチトレーサーと γ 線測定を組み合わせると、様々な元素の同時解析が可能になる。^{1–4)}

マルチトレーサー技術は化学,⁵⁾ 農学,^{6,7)} 環境科学,⁸⁾ 生物・医学^{9–13)} などの分野に広く応用されている。この技術は、 γ 線検出器の高いエネルギー分解能と、複数のトレーサーの動態が全く同じ条件下で測定できるという利点がある。本研究室でもこれ

まで、生体内微量元素のラット臓器内への分布,^{14–17)} 血液成分への金属イオンの親和性,^{18,19)} あるいは細胞成分との親和性^{20–22)} 等をマルチトレーサー法を用いて解析し報告してきた。

マルチトレーサー溶液を生きている動物に静脈注射すると、マルチトレーサー中の各々の元素がその特異的親和性に従って特定の臓器に分布する。しかしながら、慣習的な RI トレーサー実験でトレーサー分布の経時変化を得るためには、多数の動物が必要とされる上、動物個体間のバラツキが大きな問題となる。そこで、鉛製スリットを用いて測定器へ入射する放射線を十分に限定すれば、マルチトレーサーを投与した動物の特定部位からの放射線のみを測定できる。この時、放射能の経時変化は、その動物の特定部位における元素動態に関する情報を与える。既に本研究室において、6 及び 8 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いて *in vivo* マルチトレーサー測

^{a)} 昭和薬科大学薬学部物理化学研究室, ^{b)} 理化学研究所加速器基盤研究部
e-mail: knmatsu@ac.shoyaku.ac.jp

定法の可能性について検討を行ってきた。²³⁻²⁵⁾ 測定部位の限定に最適なスリットの形（幅、長さ、深さ）等、検討を必要とする点が残っているが、この *in vivo* マルチトレーサー測定法は、実験動物レベルでの元素動態診断法として有用である。

病態モデル、特に酸化ストレスモデルで元素動態が変化する可能性がある。²²⁾ 本研究室ではこれまで Se 欠乏ラットにおける酸化ストレスについて研究を行ってきた。²⁶⁻²⁸⁾ Se が欠乏した状態では、Se を活性中心に持つグルタチオンペルオキシダーゼの活性が低下し、過酸化水素を介する酸化ストレスに曝露される。²⁸⁾ 過酸化水素は Fe や Cu 存在下、活性酸素種の中でも特に反応性の高いヒドロキシラジカルとなる。ヒドロキシラジカルは生体膜脂質、蛋白質、あるいは核酸などに酸化障害を与え、最終的に動脈硬化、脳梗塞、がんなどの疾病を導くが、その際、生体膜透過性や蛋白、核酸の機能の変化に伴って元素動態の変化が予測される。

そこで本研究では、既に得られている正常ラットの結果^{24,25)}と比較するため、生きた丸ごとの Se 欠乏ラット上腹部において、マルチトレーサー投与後 1 時間の元素動態を解析した。また、投与 48 時間後の *in vivo* 相対元素分布と単離臓器における標準化取り込み率との比較から、生体内元素動態の非侵襲的診断法としての可能性について考察した。

実験の部

1. マルチトレーサー溶液の調整 理研リングサイクロトロンで 135 MeV に加速した ¹⁴N ビームを銀ターゲットに照射した。銀を化学的に分離した後、塩酸酸性のマルチトレーサー溶液を得た。これを蒸発乾固した後、約 2 ml の等張クエン酸緩衝液 (pH 6.2) に再び溶解し、生体内投与用のマルチトレーサー溶液を得た。

2. Se 欠乏ラットの飼育 榊日本医科学動物資材研究所（東京）から購入した確定妊娠 15 日目の Wistar 系ラットに Se 欠乏餌（オリエンタル酵母株式会社、東京）を与え飼育を開始した。飲料水には超純水を与えた。仔を出産後も継続して同一条件で飼育を続けた。仔ラットを 4 週齢で離乳した後、仔ラットに同様の餌と水を与え、8 週齢に至るまで飼育を行った。

3. *In vivo* 測定用検出器 ラットホルダー、

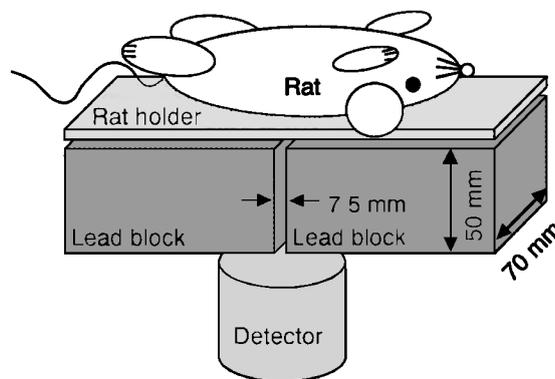


Fig. 1. Schematic Drawing of Lead Slit and Detector Setting

鉛スリット、検出器の配置を示す (Fig. 1)。スリット（幅 7.5 mm、長さ 70 mm、高さ 50 mm）をラットホルダーと γ 線検出器の間に設置した。高純度 Ge 半導体検出器（セイコー・イージーアンドジー株式会社、松戸）は、スリットの 10 mm 下に設置した。

4. 測定 8 週齢の雄の Wistar 系 Se 欠乏ラット (161.5 ± 19.8 g, $n=3$) をネンブタール注射で麻酔し、ラットホルダーに粘着テープで固定した。測定部位（上腹部）をスリットに合わせて置き、マルチトレーサー溶液 200 μ l をラットに尾静脈投与し、直ちに γ 線スペクトルを高純度 Ge 半導体検出器で測定した。10 分間の測定を 6 回行った。マルチトレーサーの投与から 48 時間後、再びラットをネンブタールで麻酔し、上腹部を 1 時間測定した。標準試料として、マルチトレーサー溶液 10 μ l をプラスチックチューブに入れ測定した。

48 時間後の測定が終わった時点で、ラットを開腹し、下大動脈から血液を採取し試験管に集めた。血液がほとんど流れ出た後、全身を生理食塩水で十分に灌流し、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、大腿筋、大腿骨、皮膚、脳、胸腺、前立腺、睪丸を単離した。これらの臓器及び血液の一定量をプラスチックチューブに封入した。臓器及び血液の γ 線スペクトルを通常条件で高純度 Ge 半導体検出器で測定した。標準試料として 100 倍に希釈したマルチトレーサー溶液 2.0 ml をプラスチックチューブに入れ測定した。

マルチトレーサー中の各核種の生成量は重イオンビーム照射の条件によって変化しやすく、照射実験は生成核の放射能強度を強くすることを目的として

おり、マシンタイム毎に得られる放射能強度が変わる。マシンタイム毎に核種の絶対量を求めることは困難であり、マルチトレーサー実験において核種の分布量あるいは取り込み率を評価する際には、投与量を基準として投与量に対する相対的な量で評価を行ってきた。またマシンタイムが異なる時、動物に再び全ての核種について同一量を投与することが難しく、投与量の違いによる影響を最小限に抑えることを考慮して評価を行う必要がある。そこで、投与したトレーサーが体全体にわたって均一に分布したと仮定した場合に、体重 1 g 当たりの分布量を基準として評価を行うことを提案してきた。^{16,22)} しかしながら今回の実験において、ラットと標準試料ではジオメトリーが全く異なるため、厳密な意味では比較することが難しい。そこで生きたラットの測定部位における元素の分布は、相対元素分布 (*in vivo* relative distribution) として次のように評価した。

相対元素分布 [%]

$$= \frac{\text{測定部位の放射能 [cps]}}{\text{投与した放射能 [cps]}} \times 100 \quad (1)$$

体重 [g]

単離した臓器への元素の取り込み率は、標準化取り込み率 (normalized uptake rate) として評価した。

標準化取り込み率 [%]

$$= \frac{\text{臓器 1 g の放射能 [cps]}}{\text{投与した放射能 [cps]}} \times 100 \quad (2)$$

体重 [g]

標準化取り込み率 100% は、投与したトレーサーが体全体にわたって均一に分布したと仮定した場合における体重 1 g 当たりの分布率を示す。すなわち、標準化取り込み率が 100% よりも大きい場合には、その元素の臓器への蓄積性あるいは積極的な取り込みの可能性を示す。逆に標準化取り込み率が 100% よりも小さい場合には、その臓器への蓄積性が低いことを示す。

In vivo 相対元素分布の評価には、⁷Be, ⁴⁶Sc, ⁴⁸V, ⁵⁴Mn, ⁵⁹Fe, ⁵⁸Co, ⁶⁵Zn, ⁷⁴As, ⁷⁵Se, ⁸³Rb, ⁸⁵Sr, ⁸⁸Y をそれぞれ 477.6, 889.3, 983.5, 834.8, 1099.2, 810.8, 1115.6, 595.8, 264.7, 520.4, 514.0, 898.0 keV の光電ピークで解析した。単離臓器及び血液への標準化取り込み率は、さらに ⁸⁸Zr の 392.9 keV の光電ピークを加えて解析した。

結果及び考察

1. 相対元素分布の評価基準 正常ラットにおいては *in vivo* での元素動態を評価するにあたり、⁷⁴As の相対元素分布を評価の基準として用いた。⁷⁴As はほとんどが赤血球中に分布するため、*in vivo* 測定における ⁷⁴As の相対元素分布は、測定部位における血流量を示すと考えられ、これを基準として *in vivo* の元素動態を評価することができる。つまり ⁷⁴As よりも高い相対元素分布は、その元素が測定部位の組織へ積極的に取り込まれていることを示す。逆に ⁷⁴As よりも低い相対元素分布は、その元素の血流中からの排除を示し、同時に測定部位以外の組織へ取り込まれた可能性を示す。しかしながら Se 欠乏状態では、赤血球の GSH-Px 活性の低下に伴い赤血球膜が傷害を受け代償性溶血亢進の状態にあると言われている。²⁹⁾ そのため ⁷⁴As の体内分布に影響を与えている可能性も否定できないが、その程度は少ないと思われる。各単離臓器及び血液における 48 時間後の ⁷⁴As の標準化取り込み率を Fig. 2 に示した。正常ラットの場合²⁵⁾と同様に ⁷⁴As はほとんどが血中に分布し、造血機能がある骨や脾臓にも若干の分布が見られた。よって Se 欠乏ラットにおいても、⁷⁴As の標準化取り込み率は血流量を示していると考えられる。

2. 標準化取り込み率の評価基準 単離した各臓器における ⁸³Rb の標準化取り込み率を Fig. 3 に示す。Rb は周期表 Ia 族に属する元素で、K と同様の挙動を示す。そのため細胞内液に取り込まれ広い臓器分布を示す。各臓器の ⁸³Rb の標準化取り込み率は 50—150% の範囲にあり、多少のばらつきは見

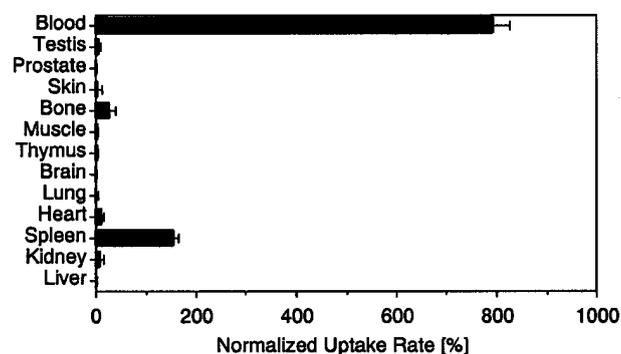


Fig. 2. Normalized Uptake Rate of Arsenic into Various Organs 48 hr after Administration of Multitracer Solution

られるがほとんどの臓器に一樣に分布している。そこで ^{83}Rb を単離臓器の標準化取り込み率の評価基準とすることを提案する。この場合、 ^{83}Rb よりも高い標準化取り込み率は、その臓器へ元素が能動的に取り込まれたことを示し、 ^{83}Rb よりも低い標準化取り込み率は、その臓器へ元素の取り込みが受動的であるかあるいは臓器からの排泄が速いことを示す。

3. *In vivo* 測定による元素動態の解析 Figure 4 に *in vivo* 測定の結果を示す。 ^{74}As の相対元素分布を基準に考えると、 ^{54}Mn 、 ^{58}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{48}V は測定の初期段階から高値に達しているため、これらの元素は比較的速やかに肝臓あるいは測定部内のその他の組織に取り込まれ、プラトーに達したものと予想される。 ^{75}Se と ^{83}Rb の相対元素分布は増加する過

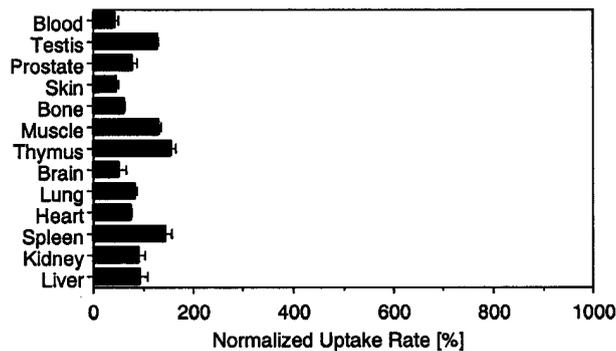


Fig. 3. Normalized Uptake Rate of Rubidium into Various Organs 48 hr after Administration of Multitracer Solution

程が見られており、比較的緩やかに肝臓やその他の組織などに取り込まれていると考えられる。 ^{74}As 、 ^{7}Be 、 ^{85}Sr 、 ^{88}Y は、測定の間減少する傾向が見られており、これらは既に代謝あるいは排泄の過程にあると考えられる。 ^{46}Sc 、 ^{59}Fe は、1時間の測定の間には元素動態に規則性が見られなかったが、48時間後までの間に相対元素分布が増加する傾向が見られた。これらは ^{75}Se や ^{83}Rb よりもさらに長い時間をかけて測定部位内の組織に取り込まれたと考えられる。

48時間後の上腹部の相対元素分布と単離肝の標準化取り込み率を Fig. 5 に示す。上腹部の相対元素分布は単離肝の標準化取り込み率に似た元素パターンを示しており、上腹部の相対元素分布がおおむね肝臓に分布した元素の特徴を示していると言える。例えば ^{46}Sc は上腹部の相対元素分布と単離肝の標準化取り込み率の両方で特に高いレベルで見られる。 ^{85}Sr 、 ^{7}Be の上腹部の相対元素分布と肝臓の標準化取り込み率は、それぞれ ^{74}As 及び ^{83}Rb よりも低いレベルを示している。*In vivo* 測定で ^{65}Zn と ^{59}Fe の相対元素分布が比較的大きいのは、それぞれ骨髄と血液に含まれる元素を反映していると考えられる。また *in vivo* 測定時に見られる ^{74}As が単離した肝臓でほとんど見られないのは、上述したように ^{74}As が血中のみ分布するためである。その他、骨に集まりやすい ^{7}Be 、 ^{85}Sr 、 ^{88}Y 、 ^{48}V は、*in vivo* 測定時に比較的高めに見られる。 ^{88}Y 、 ^{48}V は *in vivo* 測

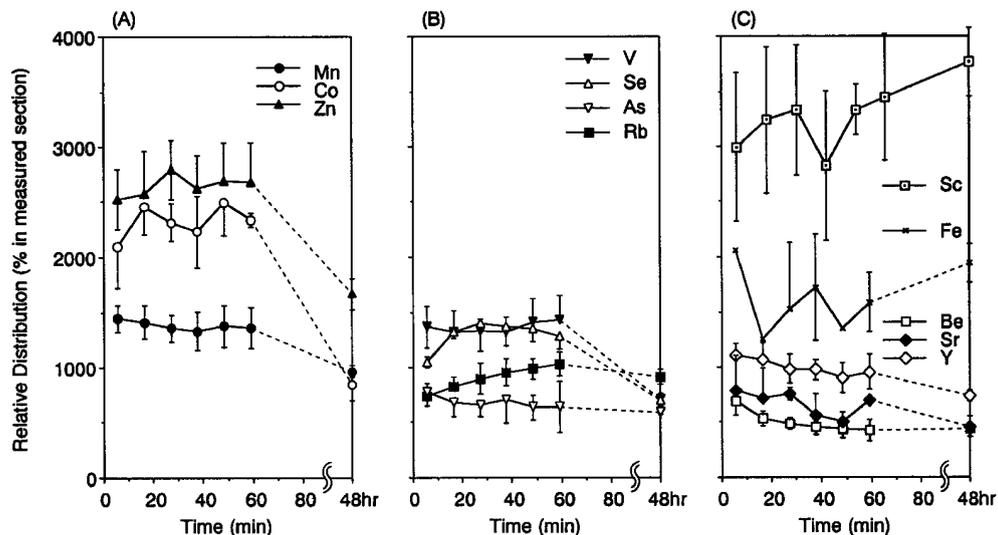


Fig. 4. Time Courses of *In Vivo* Relative Distributions of Various Elements in the Upper Abdomen of Selenium-Deficient Rats (A) Mn, Co, and Zn, (B) V, Se, As, and Rb, (C) Be, Sc, Fe, Sr, and Y.

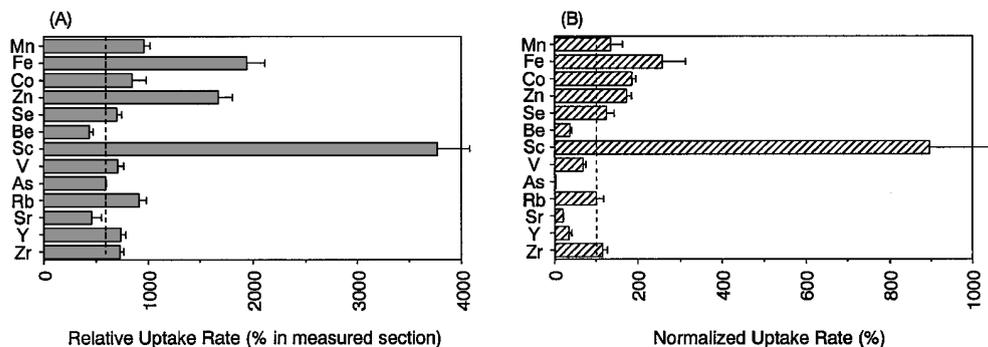


Fig. 5. Comparison of the *In Vivo* Relative Distribution in the Upper Abdomen and Normalized Uptake in the Liver of Selenium-Deficient Rats 48 hr after Administration of Multitracer Solution

(A) *In vivo* relative distributions of various elements in the upper abdomen, (B) Normalized uptake rates of various elements in the isolated liver.

定では ^{88}Zr と同レベルで ^{74}As よりも高い値であるが、単離した肝臓では ^{88}Zr よりも有意に低く、また ^{83}Rb よりも低くなった。 ^{7}Be と ^{85}Sr も ^{54}Mn , ^{58}Co , ^{75}Se , ^{88}Zr と比べると、単離した肝臓では *in vivo* 測定時よりも比較的低い値を示した。つまりラット上腹部の *in vivo* 測定時によって得られる情報には、肝臓からの情報に付随してその周りの組織からの情報も同時に得られている。すなわち *in vivo* 測定においては、測定対象臓器からの情報とその他の組織からの情報を確実に区別することが重要である。

In vivo 測定によって得られた Se 欠乏ラット生体内の元素動態は、正常ラットの場合^{24,25)}とほぼ同様の挙動を示したが、Se と Co の動態には違いが見られた。Se 欠乏ラットにおいては、マルチトレーサー投与後 1 時間の ^{75}Se の相対元素分布のプラトーレベルは約 1300%，48 時間後には約 700%であった。同週齢の正常ラットにおいてはプラトーが約 2600%，48 時間後は約 950%であった。Se 欠乏ラットでは、投与 1 時間後でも 48 時間後でも正常ラットより値が低く、これは Se 欠乏ラット肝への ^{75}Se の取り込み率の低下と考えられる。しかし ^{58}Co は Se 欠乏ラットにおいて投与 1 時間後が約 2300%，48 時間後が約 800%であるのに対し、正常ラットにおける投与 1 時間後は約 3000%，48 時間後は約 450%であった。Se 欠乏ラットの投与 1 時間後の ^{58}Co の値は正常ラットより低いが、48 時間後では逆転し正常ラットより高くなった。これは Se 欠乏ラットでは ^{58}Co の取り込みが増加したのではなく、むしろ取り込み率は減少し、なおかつ排泄が遅くなったためであると考えられる。このことは今回

の *in vivo* 測定によって初めて明らかにされた。

スリットの形状や動物の設置法の改良により測定部位をさらに限定できれば、この *in vivo* マルチトレーサー測定法は、動物実験において生体微量元素分布の診断のための非常に有用な手段になるだろう。

謝辞 理化学研究所において加速器の運転に携わっていただいた多くの方々に深く感謝の意を表します。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金奨励研究(A)及び昭和薬科大学共同研究助成金により行われました。

REFERENCES

- 1) Ambe S., Chen S.-Y., Ohkubo Y., Kobayashi Y., Iwamoto M., Ambe F., *Chem. Lett.*, **1991**, 149–152 (1991).
- 2) Ambe S., Chen S.-Y., Ohkubo Y., Kobayashi Y., Iwamoto M., Yanokura M., Ambe F., *Anal. Sci.*, **7**, 317–320 (1991).
- 3) Ambe S., Ohkubo Y., Kobayashi Y., Iwamoto M., Yanokura M., Ambe F., *Appl. Radiat. Isot.*, **43**, 1533–1534 (1992).
- 4) Chen S.-Y., Ambe S., Ambe F., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **186**, 113–117 (1994).
- 5) Ambe S., Chen S.-Y., Ohkubo Y., Kobayashi Y., Iwamoto M., Ambe F., *Chem. Lett.*, **1992**, 1059–1062 (1992).
- 6) Sinonaga T., Ambe S., Enomoto S., Maeda H., Iwamoto M., Watanabe T., Yamaguchi I., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **212**, 163–172 (1996).
- 7) Sinonaga T., Ambe S., *Water, Air, Soil Pol-*

- lut.*, **101**, 93–103 (1998).
- 8) Wang H.-F., Ambe S., Takematsu N., Ambe F., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **235**, 295–300 (1998).
 - 9) Amano R., Enomoto S., Nobuta M., Sakamoto M., Tsujioka R., Ambe F., *J. Trace Elements Med. Biol.*, **10**, 145–148 (1996).
 - 10) Amano R., Oishi S., Enomoto S., Ambe F., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **26**, 531–541 (1996).
 - 11) Amano R., Oishi S., Enomoto S., Ambe F., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **27**, 358–364 (1997).
 - 12) Oishi S., Amano R., Ando A., Enomoto S., Ambe F., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**, 411–416 (1999).
 - 13) Amano R., Enomoto S., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **247**, 507–511 (2001).
 - 14) Yanaga M., Enomoto S., Hirunuma R., Furuta R., Endo K., Tanaka A., Ambe S., Tozawa M., Ambe F., *Appl. Radiat. Isot.*, **47**, 235–240 (1996).
 - 15) Hirunuma R., Endo K., Yanaga M., Enomoto S., Ambe S., Tanaka A., Tozawa M., Ambe F., *Appl. Radiat. Isot.*, **48**, 727–733 (1997).
 - 16) Hirunuma R., Endo K., Enomoto S., Ambe S., Ambe F., *Appl. Radiat. Isot.*, **50**, 843–849 (1999).
 - 17) Hirunuma R., Sotogaku N., Endo K., Enomoto S., Ambe S., Ambe F., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**, 213–215 (1999).
 - 18) Sotogaku N., Endo K., Hirunuma R., Enomoto S., Ambe S., Ambe F., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**, 429–432 (1999).
 - 19) Sotogaku N., Endo K., Hirunuma R., Enomoto S., Ambe S., Ambe F., *J. Trace Elements Med. Biol.*, **13**, 1–6 (1999).
 - 20) Matsumoto K., Sotogaku N., Endo K., Enomoto S., Ambe S., Ambe F., *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **31**, 132 (1997).
 - 21) Matsumoto K., Ueda Y., Endo K., Hirunuma R., Enomoto S., *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **33**, 116 (2000).
 - 22) Matsumoto K., Inagaki T., Hirunuma R., Enomoto S., Endo K., *Anal. Sci.*, **17**, 587–591 (2001).
 - 23) Matsumoto K., Hirunuma R., Enomoto S., Endo K., *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **34**, 130 (2001).
 - 24) Matsumoto K., Ui I., Hirunuma R., Enomoto S., Endo K., International Congress on Analytical Sciences 2001, Tokyo, August 6–10, 2001.
 - 25) Matsumoto K., Ui I., Hirunuma R., Enomoto S., Endo K., 2001 Asia-Pacific Symposium on Radiochemistry, Fukuoka, October 30–November 1, 2001.
 - 26) Matsumoto K., Hirunuma R., Enomoto S., Endo K., *RIKEN Rev.*, **35**, 14–18 (2001).
 - 27) Matsumoto K., Endo K., Utsumi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 641–644 (2000).
 - 28) Ueda Y., Matsumoto K., Endo K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 699–702 (2000).
 - 29) Yasumoto K., Abstracts of papers, RIKEN Symposium: Bio-Trace Elements '99, Wako, March 19, 1991, p. I-06.