

動物実験用マルチトレーサの調製とその一応用

大石 茂雄 天野 良平 安東 醇
榎本 秀一* 安部 文敏*

要 旨

放射性同位体を用いたトレーサ技術は、多くの分野で利用されている。一般に、それらは単一のトレーサを用いるが、測定法の進展とともに複数のトレーサを利用する方法が望まれるようになってきた。我々はマルチトレーサ法の開発・改良、特に動物実験に適用するための諸条件を検討している。マルチトレーサの核的製造は理化学研究所で行い、化学分離および動物実験用マルチトレーサ溶液の調製は金沢大学で行った。調製されたマルチトレーサ溶液には、19元素33放射性核種が観測された。この溶液の有効性を示すために動物実験に適用した。一般に動物実験では個体差によるばらつきのために、個々の元素間の厳密な比較が困難なことが多い。しかしマルチトレーサ法では多くの核種から得られる放射線を γ 線スペクトロメトリーにより同時に測定することで、複数の元素の挙動を同時に追跡できた。マルチトレーサ法は生命科学の研究手段として有用であると思われた。

KEY WORDS

tracer technique, radioactive multitracer, chemical preparation, γ -ray spectrometry, animal experiment

はじめに

放射性同位体 (radioisotope : 以下 RI と記す) は γ 線などの放射線を放出する性質をもっているが、その化学的性質は同じ元素の安定同位体とまったく変わらない。放射線は高い感度で検出できることから、RI をそれだけで、あるいは安定同位体に加えて使えば、ある元素の反応や移行を放射線により追跡 (トレーサ) することが可能となる。特に、 γ 線を放出する RI をトレーサとして利用することは、体外や容器の外からでも容易に検出・測定でき、試料中の RI を簡単に定量することができる。さらに測定試料の前処理を必要としないので、動物実験などでは特に有効である¹⁻⁴⁾。

こうした RI トレーサー技術は動物実験に止まらず、多くの分野で利用されているが、そのもっとも有用な利用法の一つとして、核医学の分野での利用があげられる。核医学では、トレーサ技術による体外計測が、放射性同位元素による標識技術を用いた放射性医薬品やイメージング (画像化) 処理と密接に関連し、現在多くの部位、多くの生体機能を画像化す

ることが可能となっており、それらは診断はもとより治療の経過観察、評価などに利用されている。

一般にトレーサ技術は、多くの場合 RI を単独で利用しており、例外的に少数の市販 RI を数種混合して利用するに止まっていた。最近著者らは理化学研究所との共同研究により新しいマルチトレーサ技術の開発と改良を行っている。

本報では、共同開発した動物実験のためのマルチトレーサの調製方法およびこれを動物実験に適用した一応用を報告する。

材料と方法

1. 核破砕反応によるマルチトレーサの核的製造

理化学研究所に建設されたリングサイクロトロン (写真1) はウラン元素までのイオンを加速する性能を持った重イオン加速器で、炭素、窒素、酸素などのイオンは核子 (原子核中の陽子と中性子) 1個あたり 135MeV にまで加速することができる。このような高エネルギーの重イオンで照射を行うと、ターゲット中の原子核と加速されたイオンの核の接触し

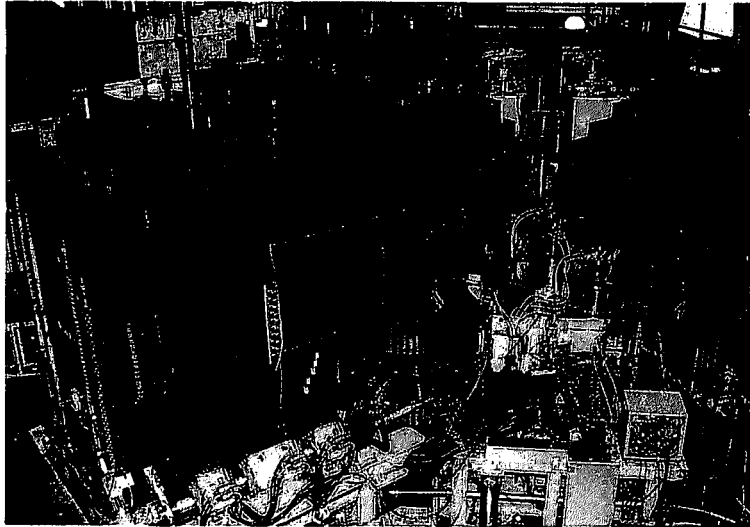


写真1 リングサイクロトロン (理化学研究所)

た部分が互いに破碎される、フラグメンテーションと呼ばれる核反応が起きる。そして、両方の核の残った部分は、多くの場合不安定な核、すなわち放射性的核となる。このときターゲット核と加速イオンの核の接触のふりまは様でなくいろいろであることから、多様な放射性核種が生成する。その多くは γ 線放出体である。本研究でのマルチトレーサの製造には、この核破碎反応を利用する。ターゲットとしては、金、銀、ゲルマニウムなどが、一方照射する重イオンとしては核子1個当たり135MeVの炭素、窒素、酸素のイオンが標準的に用いられている。ターゲット中にはターゲット物質に応じて、一般にターゲット原子番号より小さな原子番号の多数の元素のRIが生成する。著者らは、生体微量元素として興味をもつ元素群が周期律表の第一遷移元素を含む第4周期にわたっているため、ターゲットとして銀(純度:99.99%以上)および加速粒子として ^{14}N あるいは ^{12}C (135MeV/核子)を選択した¹⁻⁴⁾。

2. 動物実験用マルチトレーサ溶液の調製

前節1で照射された銀ターゲットは、使用したいマルチトレーサを多数含んでいるが、このままでは動物実験に利用することはできない。ターゲットである銀を除去し、マルチトレーサを分離・精製する必要がある。またマルチトレーサ溶液は使用目的にあわせて組成を調製できるように、無担体、無塩の状態で分離されることが望ましい^{2,5-7)}。

我々は銀ターゲットよりマルチトレーサを無担体、無塩の状態で分離する方法を確立した。その化学分離操作のフローチャートを図1に示した。まず銀ター

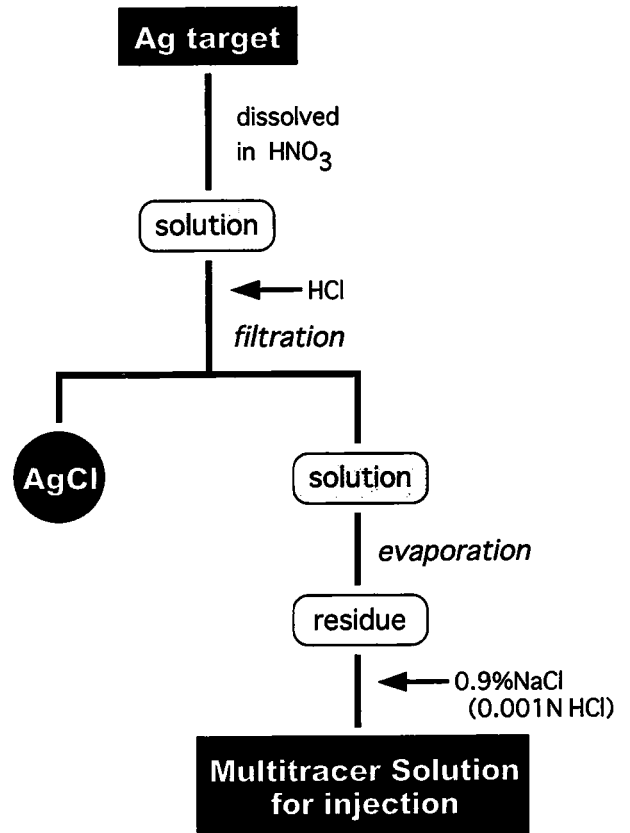


図1 投与用マルチトレーサ溶液の調製操作

ゲットに硝酸を加え完全に銀板を溶解させた。この状態では、溶解した溶液中に核破碎反応で生成した多数のトレーサと、溶解した可秤量の銀イオンが混在している。なおここでの放射性核種の測定は後述3の方法により行った。次に、この溶液に塩酸を加え、銀イオンを塩化銀として沈殿させた。ここで十分な量の塩酸を加えることにより完全に銀イオンを

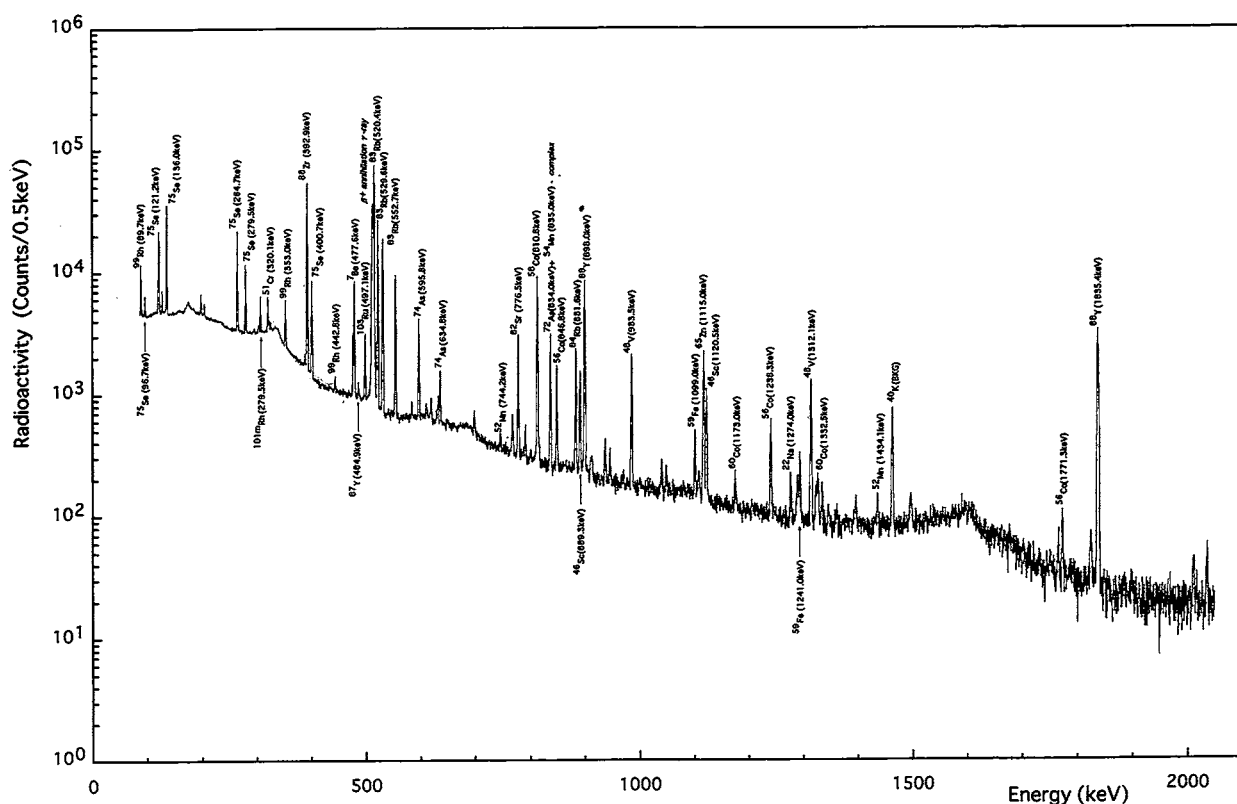


図2 動物実験用マルチトレーサ溶液の典型的なγ線スペクトル

沈殿除去させることができる。溶液はターゲットであった銀の含まれない状態、無担体(キャリアフリー)となる。ただ銀イオンを除去したこの溶液中には、多量高濃度の硝酸および塩酸が含まれており、次にこれらを除かなければならない。沈殿した塩化銀をろ過した後、ロータリーエバポレータを用いて、ろ液を60~70°Cで加熱しながら蒸発乾固させることで硝酸および塩酸を除去した。残された目に見えない残渣を、0.001Nの塩酸で作成した生理食塩水で希釈溶解し、動物実験用マルチトレーサ溶液として調製した。ここでも放射性核種の測定は、後述3の方法により行った。

3. 放射線測定およびその解析

γ放射体の分離操作および動物へのRIの分布の追跡は、超高純度ゲルマニウム半導体検出器を用いるγ線スペクトロメトリーにより行うのが一般的である。マルチトレーサ技術においては多数の測定試料と多数のピーク解析を必要とするためこれらの操作が自動化、省力化されることが望まれる。現状で著者らはEG & G. Ortec社製の超高純度ゲルマニウム半導体検出器3台用い、2台のパーソナルコンピュータでこれを制御している。またこれらの検出器は既知のRIで校正を行い、併せて解析処理プログラムで

も必要な校正を行った。

γ線スペクトルの典型的な一例として図2に今回調製した動物実験用マルチトレーサから測定されたγ線スペクトルを示した。マルチトレーサはこのような多くのピークを持ち、それらピークの一部は重なり合っている。このγ線スペクトル解析には、浜島(1994)が開発した自動ピーク解析プログラム“SPECanal-pkarea”(このプログラムは、小村(1974)により開発されたプログラムを基本として改良したもの)を用いた⁸⁾。

4. 動物実験への適用

調製したマルチトレーサ溶液を、加齢とともに肝炎さらには肝癌を自然発症するという運命をもつLECラット(Long-Evans rats with a cinnamon-colored coat)を用いた動物実験に適用した⁹⁻¹⁰⁾。

1) マルチトレーサ溶液の投与と臓器摘出:

投与実験において週齢の異なる3群のLECラット(日本チャールズリバーより購入後、医学部動物実験施設により通常食にて1週間飼育)計15匹を使用した。各々は5週齢(体重75~85g)5匹、8週齢(体重160~170g)5匹、11週齢(210~225g)5匹である。操作手順は上で調製した投与用マルチトレーサ溶液をLECラットの右腹腔に注入し、48時間

表1. 検出放射性核種の一覧(ターゲット除去前)

放射性核種	半減期	放射性核種	半減期
⁷ Be	53.3d	⁸³ Rb	86.3d
²² Na	2.6y	⁸⁴ Rb	32.9d
⁴⁶ Sc	83.8d	⁸² Sr	25.6d
⁴⁸ V	16.0d	⁸⁵ Sr	86.5d
⁵¹ Cr	27.7d	⁸⁷ Y(3.35d)- ⁸⁷ Sr(2.81hr)	
⁵² Mn	5.6d	⁸⁸ Y	106.6d
⁵⁴ Mn	312.0d	⁸⁸ Zr	83.4d
⁵⁹ Fe	44.5d	⁸⁹ Zr	3.27d
⁵⁶ Co	77.7d	^{95m} Tc	61.2d
⁵⁷ Co	271.8d	⁹⁶ Tc	4.35d
⁵⁸ Co	70.9d	⁹⁷ Ru	2.88d
⁶⁰ Co	5.27y	¹⁰³ Ru	39.8d
⁶⁵ Zn	244.1d	⁹⁹ Rh	16.0d
⁶⁷ Ga	3.26d	¹⁰⁰ Rh	20.8hr
⁷¹ As	2.55d	^{101m} Rh	4.34d
⁷² As	1.08d	^{102m} Rh	207d
⁷⁴ As	17.8d	¹⁰⁰ Pd	3.64d
⁷⁷ As	1.62d	¹⁰⁵ Ag	41.3d
⁷⁵ Se	119.8d	^{106m} Ag	8.5d

後に解剖、血液、胸筋、胸腺、肺臓、心筋、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、脳の試料を得、重量を計測した。次にこれらを凍結乾燥することで放射能計測用試料とした。放射能計測は、前節3で述べたようにγ線スペクトルを超高純度ゲルマニウム半導体検出器を用いて測定した。

2) データの評価方法：週齢毎に体重の異なるラットの結果の比較評価は次のように行った。

- (1) 組織へのトレーサ取り込みの評価は、各組織の単位重量あたりに取り込まれる放射能の、投与放射能に対する百分率で求め、これを取り込み率(% dose/g)として表現する。
- (2) 各組織へのトレーサ取り込みを比較評価する場合、臓器の大きさが週齢により著しく異なるため、その補正を行う必要がある。本実験では(1)で求めた取り込み率に係数(体重/150g)を乗じて、ラット体重150gに補正した取り込み率として評価した。

結果

1. マルチトレーサ溶液の特性

マルチトレーサ調製操作の過程で、まず銀ターゲットを除去する前に観測された放射性核種を表1に示した。表1より明らかなように、同元素に複数のRIをも含めて21元素39核種が観測された。化学分離操作により銀ターゲットの銀および揮発性のテクネシウムの核種が除かれた19元素33放射性核種が観測された。これら核種の中には、観測はされたものの相

表2. 動物実験用マルチトレーサ溶液中の放射性核種とその利用γ線エネルギー

放射性核種	半減期	利用γ線(keV)
⁴⁶ Sc	83.8d	889.0 1120.5
⁴⁸ V	16.0d	944.0 983.5 1312.1
⁵² Mn	5.6d	744.2 935.5 1434.1
⁵⁴ Mn	312.0d	834.8
⁵⁹ Fe	44.5d	1099.0 1292.0
⁵⁶ Co	77.7d	846.8
⁵⁷ Co	271.8d	122.0
⁵⁸ Co	70.9d	810.8
⁶⁰ Co	5.27y	1173.0 1333.0
⁶⁵ Zn	244.1d	1115.0
⁷¹ As	2.55d	174.9
⁷⁴ As	17.8d	595.8 634.8
⁷⁵ Se	119.8d	121.1 136.0 264.7 279.5 400.7
⁸³ Rb	86.3d	520.4 529.6 552.7
⁸⁴ Rb	32.9d	881.6
⁸² Sr	25.6d	776.5
⁸⁸ Zr	83.4d	392.9
⁸⁹ Zr	3.27d	909.1
⁹⁷ Ru	2.88d	215.7
¹⁰³ Ru	39.8d	497.1
⁹⁹ Rh	16.0d	89.8 353.0 618.1
^{101m} Rh	4.34d	306.8 545.1
^{102m} Rh	207d	475.0

対的な強度が小さく誤差が大きくなることから定量性の点で問題があり、動物実験への適用が難しい放射性核種として、⁷Be (53.3d), ²²Na (2.6y), ⁵¹Cr (27.7d), ⁶⁷Ga (3.2d), ⁷²As (1.08d), ⁷⁷As (1.62d), ⁸⁵Sr (86.5d), ⁸⁸Y (106.6d), ¹⁰⁰Rh (20.8hr), ¹⁰⁰Pd (3.64d)の10核種が考えられる。

したがって現状におけるマルチトレーサとして十分利用できるものは13元素23放射性核種でその利用γ線エネルギーとともにまとめると、表2のようになった。

KIDNEY

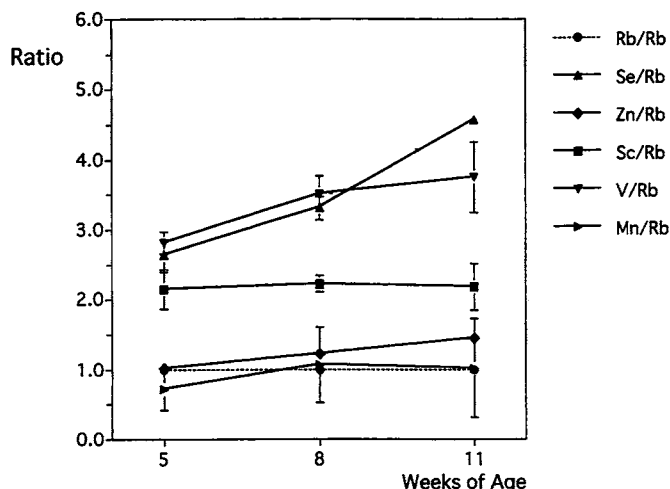


図3 LEC ラットの腎臓におけるマルチトレーサの分布

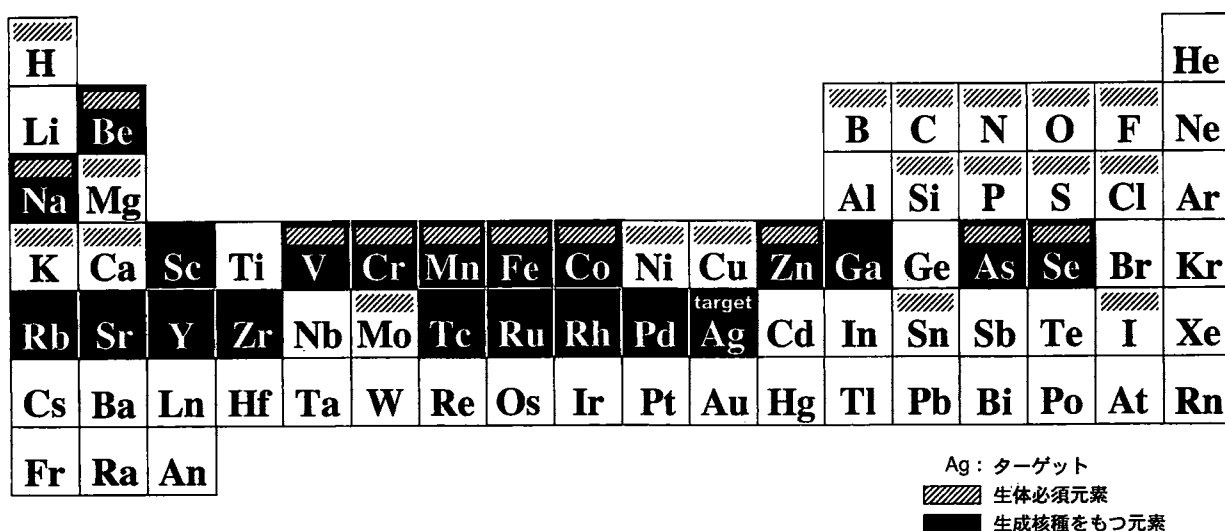


図4 マルチトレーサと生体必須元素

2. マルチトレーサの LEC ラットにおける臓器分布
 マルチトレーサ技術の利用により、10臓器における数種の元素の同時追跡の結果が得られ、さらに各核種の10臓器での生体内挙動も、同程度の厳密さをもって議論できるような結果が得られた。ここではマルチトレーサの腎臓における Se, Zn, Sc, Mn の挙動を図3に示した。それぞれの元素について Rb との比を用いて評価した。これは結果の一例であるが、自然発症（16週齢）前に微量元素の取り込み異常が発現しており、LEC ラットの肝炎、肝癌発症メカニズムに新しい知見を与えた⁹⁻¹⁰⁾。

考察

生体中での微量元素の挙動、役割の重要性は必須性、毒性の両面、また RI の安全性に関連してよく認

識されているが、未だ不明の点がきわめて多い。従ってこうした金属元素をトレーサとして使用する際には、その量に注意する必要がある。実際の利用では、その量はピコグラム以下オーダーである。しかし、原子炉から得られる RI は、ある量の安定同位体（担体）と共存するため、使用する元素の量自体はこれよりはるかに多くなる。ヒ素や水銀のように毒性の高い元素を正常な個体に投与して追跡しようとするとはこれは大きな問題となる。さらに、動物実験への適用を考慮すれば、それらは目的に応じて組成を調製できることが重要であり、そのためには無塩の状態であることが望ましい^{2,5-7)}。

今回著者らが調製したマルチトレーサ溶液は、銀ターゲットと硝酸および塩酸を完全に除去することで、それぞれ無担体、無塩の状態となっており、動

物実験に適したものであった。また、その溶液から観測されたトレーサは19元素33各種に及び、これらのトレーサを利用することにより同時に多くの情報が得られるものと考えられる。

その一例として生体内微量元素の代謝異常が肝炎、肝癌発症の原因とされる LEC ラットに適用し、発症前に発現している生体内微量元素の異常挙動を指摘できた。著者らは今後、このマルチトレーサの種々の動物実験への応用を考えている。何故にマルチトレーサ技術が生体微量元素の研究に有効と考えられるかを述べる。図4は著者らが利用できるマルチトレーサの元素群と生体必須元素を示している。生体必須元素のトレーサとしてマルチトレーサはかなり満足できるものである。さらに、これらの元素が同時に追跡できる点が重要であると考えている。また、マルチトレーサは現在は必須元素として認識されていないが今後の研究で必須性が重要となりうるような(たとえば Rb) 元素も複数に含んでおり、あらゆる生体微量元素の研究においてその初期の段階でいわゆるプローブとして適用し、全体像を知るような初期研究手段として普及させて行くべき技術であると考えている。

動物実験試料では個体差による実験値のばらつきのために、個々の元素間の厳密な比較が困難なことが多い。ここでマルチトレーサを用いると、同時に8~20元素についての情報が得られる。通常のトレーサ実験では目的に応じてトレーサの選択を行うことが一般的であるが、マルチトレーサの中には種々の元素が混在しているため、ある元素について予期しない重要な知見が得られる可能性がある。マルチトレーサは多数の元素を含むので、多くの元素が関与する系の研究に適していると考えられる。たとえば、元素の新しい化学分離法の開発、環境中における元素の動態、動物や植物における微量元素の機能、相

互作用および毒性の研究などがあげられよう。

以上のようにマルチトレーサ法は、生体微量元素の研究手段として非常に有用であると思われる。生体と微量元素のかかわりは、金属酵素など基礎化学的に興味深いだけでなく、栄養あるいは逆に公害、環境放射能とも関連する生命科学の重要な課題でもあり、すでにめざましい進歩を遂げた分子生物学に比れば、生体の中での微量元素の役割や有害な作用についての化学的、生化学的研究は今後の大きな発展が期待される領域であると思われる¹⁻²⁾。

文 献

- 1) 安部文敏: マルチトレーサ法, 現代化学, 53-59, 1995.
- 2) 安部静子: マルチトレーサの製造と化学, 生物への応用, RADIOISOTOPES, 44: 321-329, 1995.
- 3) 安部文敏: マルチトレーサ, 原子力工業, 40: 47-51, 1994.
- 4) Ambe, S.: Development and applications of multi-tracers, RIKEN Review, 4: 31-32, 1994.
- 5) Ambe, S. et al.: Preparation of a radioactive multi-tracer solution from gold foil irradiated by 135 MeV/nucleon ¹⁴N ions., Chem. Lett., 149: 1991.
- 6) Ambe, S. et al.: Preparation of radioactive multi-tracer solutions from Au, Ag, and Cu foils irradiated with high-energy heavy ions., Anal. Sci., 7, Suppl.: 317, 1991.
- 7) Ambe, S. et al.: "Multitracer" a new tracer technique Its principle, features, and application., J. Radioanal. Nucl. Chem., 195: 297, 1995.
- 8) 浜島靖典: 私信
- 9) Oishi, S. et al.: Tissue distribution of multi-tracers in LEC rats before jaundice development., On line proceeding of the 2nd Internet World Congress on Biomedical Science '95, published on CD-ROM, 1995.
- 10) Oishi, S. et al.: Comparative biodistribution of multitracers in Wistar and LEC rats, RIKEN Review, 13: 33-34, 1996.

物実験に適したものであった。また、その溶液から観測されたトレーサは19元素33各種に及び、これらのトレーサを利用することにより同時に多くの情報が得られるものと考えられる。

その一例として生体内微量元素の代謝異常が肝炎、肝癌発症の原因とされる LEC ラットに適用し、発症前に発現している生体内微量金属元素の異常挙動を指摘できた。著者らは今後、このマルチトレーサの種々の動物実験への応用を考えている。何故にマルチトレーサ技術が生体微量元素の研究に有効と考えられるかを述べる。図4は著者らが利用できるマルチトレーサの元素群と生体必須元素を示している。生体必須元素のトレーサとしてマルチトレーサはかなり満足できるものである。さらに、これらの元素が同時に追跡できる点が重要であると考えている。また、マルチトレーサは現在は必須元素として認識されていないが今後の研究で必須性が重要となりうるような(たとえば Rb) 元素も複数に含んでおり、あらゆる生体微量元素の研究においてその初期の段階でいわゆるプローブとして適用し、全体像を知るような初期研究手段として普及させて行くべき技術であると考えている。

動物実験試料では個体差による実験値のばらつきのために、個々の元素間の厳密な比較が困難なことが多い。ここでマルチトレーサを用いると、同時に8~20元素についての情報が得られる。通常のトレーサ実験では目的に応じてトレーサの選択を行うことが一般的であるが、マルチトレーサの中には種々の元素が混在しているため、ある元素について予期しない重要な知見が得られる可能性がある。マルチトレーサは多数の元素を含むので、多くの元素が関与する系の研究に適していると考えられる。たとえば、元素の新しい化学分離法の開発、環境中における元素の動態、動物や植物における微量元素の機能、相

互作用および毒性の研究などがあげられよう。

以上のようにマルチトレーサ法は、生体微量元素の研究手段として非常に有用であると思われる。生体と微量元素のかかわりは、金属酵素など基礎化学的に興味深いだけでなく、栄養あるいは逆に公害、環境放射能とも関連する生命科学の重要な課題でもあり、すでにめざましい進歩を遂げた分子生物学に比べれば、生体の中での微量元素の役割や有害な作用についての化学的、生化学的研究は今後の大きな発展が期待される領域であると思われる¹⁻²⁾。

文 献

- 1) 安部文敏：マルチトレーサ法，現代化学，53-59，1995.
- 2) 安部静子：マルチトレーサの製造と化学，生物への応用，RADIOISOTOPES，44：321-329，1995.
- 3) 安部文敏：マルチトレーサ，原子力工業，40：47-51，1994.
- 4) Ambe, S. : Development and applications of multi-tracers, RIKEN Review, 4 : 31-32, 1994.
- 5) Ambe, S. et al. : Preparation of a radioactive multi-tracer solution from gold foil irradiated by 135 MeV/nucleon ¹⁴N ions., Chem. Lett., 149 : 1991.
- 6) Ambe, S. et al. : Preparation of radioactive multi-tracer solutions from Au, Ag, and Cu foils irradiated with high-energy heavy ions., Anal. Sci., 7, Suppl. : 317, 1991.
- 7) Ambe, S. et al. : "Multitracer" a new tracer technique Its principle, features, and application. , J. Radioanal. Nucl. Chem., 195 : 297, 1995.
- 8) 浜島靖典：私信
- 9) Oishi, S. et al. : Tissue distribution of multi-tracers in LEC rats before jaundice development. , On line proceeding of the 2nd Internet World Congress on Biomedical Science '95, published on CD-ROM, 1995.
- 10) Oishi, S. et al. : Comparative biodistribution of multitracers in Wistar and LEC rats, RIKEN Review, 13 : 33-34, 1996.

Preparation radioactive multitracer for animal experiments and its application

Shigeo Oishi, Ryohei Amano, Jun Ando
Shuichi Enomoto, Fumitoshi Abe

ABSTRACT

Radioisotopes are extensively used as tracers in science, technology, and medicine. They are almost utilized as single tracers. On the other hand, the advance in radiation measuring detectors and counting systems allows us to use a mixture of many radioisotopes. The radioactive multitracer technique has been developed and improved by the collaboration study of RIKEN-Kanazawa University, in which a number of radioisotopes produced by heavy-ion nuclear reaction are simultaneously utilized as tracers. In this work, we described the preparation of radioactive multitracer from Ag (purity : more than 99.99%) target irradiated with N-14 (135 MeV/nucleon) beam accelerated in RIKEN Ring Cyclotron. 23 radioisotopes of 13 elements (Sc, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Se, Rb, Sr, Zr, Ru, and Rh) can be observed in the final multitracer solution for injection. In general, it is difficult to compare exactly among the behaviors of elements in animals because of animal peculiarities. The new radioactive multitracer technique enables simultaneous tracing of a number of elements in an identical system and a strict comparison of their behavior. We think that the new multitracer technique is very useful for a variety of researches of life sciences.