

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20550059

研究課題名（和文） 原子核プローブ法による遷移金属の脳・神経における局在性に関する生物無機化学の研究

研究課題名（英文） Bioinorganic study of transition metal localization in brain by the use of nuclear probe detection method

研究代表者

天野 良平（AMANO RYOHEI）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：30111769

研究成果の概要（和文）：本研究において、4つの原子核プローブ法に注目し、脳・神経内微量遷移金属の局在性について知見を得た。特に、「重元素 Tl（タリウム）が BBB を経由することなく脳内に直接に移行すること」を見出し、鼻腔を経由する金属元素の脳内移行についてのさらに広い知見を得て、 $^{201}\text{TlCl}$ の人体応用の道を拓いた。MRI法のMnとGdの造影効果を利用し、Mnについては脳内最低検出濃度について、GdについてはGd-DTPAの腎内を用いて検討した。

研究成果の概要（英文）： In this study, several information and data on the *in-vivo*-localization of transition metal in brain were obtained by the use of four different nuclear probe detection methods. Especially, using RI technique, we found that trace heavy Tl ion transfers directly from nose to brain bypassing BBB. Intranasal administration of other metal ions was also examined by multi-tracer method. On the bases of results, the usefulness of $^{201}\text{TlCl}$ in rhinological fields was proposed to our other related projects. In correlation of metal imaging and MRI technique, we examined the detection of Mn in brain and behavior of Gd-DTPA in kidney.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：核・放射化学

1. 研究開始当初の背景

精神活動や記憶学習等の脳神経機能において微量の遷移金属Mn, Fe, Cu, Znは必須で

あり、分布の局在性はその脳神経機能と関係深いことが注目されている。また栄養機能食品のミネラルサプリメントが市販され、多くのヒトが栄養素として遷移金属を服用する

ような時代となってきている。必須である金属の欠乏は脳神経機能に関連した痙攣発作や運動失調等の症状を惹起しやすくなる。一方で、過剰摂取はターゲット部位で神経伝達に重大な支障をきたし、時には神経変性疾患様症状を発症する（例えばMnは大脳基底核に集積しパーキンソン病様の錐体外路症状が発症する。肝障害を持つ患者においては必須Mnのコントロールが重要で、線条体のMn異常集積をMRIでモニターしている）。脳での遷移金属間の相互作用もまた神経変性疾患の発症に重要であると考えられている（我々は「脳MRI-T2強調像によるFe分布とT1強調像によるMn分布が一致している」事実を偶然見出した。大脳基底核でMnとFeの置換がある条件下で起こることが分かった）。

このような背景を考えると、脳科学および栄養学の全般に関わる基盤的研究として、脳神経における遷移金属の時間的・空間的な金属濃度分布およびそのスペシエーション変化を明らかにすることは重要である。そのため我々は脳内金属分布の局在性と神経機能の関連性を探る多元素同時追跡の実験手法を開発してきた。さらに開発した原子核プローブ多元素同時追跡法（マルチトレーサー法、中性子放射化分析法、ICP-質量分析法）を各週齢ラットに適用し、内在性Mn, Fe, Cu, Znの局在性を示す脳地図を作成した。加えて神経軸索へのMn集積、脳神経の変性に先行するFe, Mnの働き、さらに加齢に伴う金属局在性の変化をマルチトレーサーで動的に捉えられることを示した。

これらの知見を基に、正常及び種々の脳神経変性疾患モデル動物における脳内 Mn, Fe, Cu, Znの局在性の時間的・空間的変化、局在化した金属のスペシエーション変化、さらに独自開発のマルチトレーサー法及び磁気共鳴法（MRI と MRS）による in-vivo イメージ手法を用いて、多元素同時に同一個体においてこれら金属の局在性との関連で検討することは重要である。それにより分析化学的及び核・放射化学的に評価できる定量的データを得、また正常と脳神経変性病態との関連において生化学的な評価を行い、総合して脳・神経における必須遷移金属の局在性に関する生物無機化学を明らかにする。特に線条体

の Mn、海馬の Zn、黒質の Fe、脳梁の Cu 等の局在過程におけるスペシエーション、またその変化およびその測定方法について、原子核をプローブとする4法を駆使したい。まずは方法論の開発を大切にしながら研究を展開する。

2. 研究の目的

脳神経機能発現及び神経変性過程において遷移金属の脳局在性がその機能にどのように関わるかについては、それが（局在性が）その機能にとって必須であること以外には、脳内移行機序、局所集積機序、そこでの生理作用との相関など、未だ十分には解明されていない。

この課題を解決するために、天野は理化学研究所と共同で「マルチトレーサー法」を開発し、15元素超のラジオアイソトープにより、第一遷移金属のV, Cr, Mn, Fe, Co, ZnやSeの微量元素の動態を同時に同一個体で取得することを可能にできた。さらに放射化分析法やICP-質量分析法を加えて脳内微量元素の局在性について研究してきた。脳に内在する或いは移行する微量遷移金属Mn, Fe, Cu, Znの特徴を明らかにし、線条体にMnが、海馬にZnが、黒質にFeが、脳梁にCuが局在的に分布することを明らかにしてきた。本研究で、Mn, Fe, Cu, Znの局在性と「神経での軸索輸送における働き（Mn）、記憶・学習機能における働き（Zn）、パーキンソン病黒質部位における神経変性との関連（Fe異常集積）、幼児期の一時期における脳梁におけるCu集積とメンケス病との関連（Cu集積）」についての生物無機化学的な研究方法論を提示する。

具体的な目的は、原子核をプローブとする4法（マルチトレーサー法、ICP-質量分析法、PAC法、MRIイメージング法）を内在性及び外因性のMn, Fe, Cu, Znの追跡手法として確立し、脳内Mn, Fe, Cu, Znのスペシエーションの変化について適用する。「in-vivoかつ多元素同時に脳内Mn, Fe, Cu, Znのスペシエーションの変化を原子核プローブで捉える」ことを可能にするための研究に尽くすことにある。

3. 研究の方法

マルチトレーサーは、理化学研究所重イオン加速器リングサイクロトロンにより銀ターゲットを照射し製造した。分離精製は金沢大学で行った。下表のようなマルチトレーサーを使用した。モデル動物の脳試料に適用する。成長・加齢過程さらに病態発症・変化の過程における主としてMn, Zn分布変化を実験的に検討する。核種の定量はγ線スペクトロメトリーにより行う。

表1 使用マルチトレーサー

Nuclides	Half-life (d)	Chemical species
⁷ Be	53.29	⁷ Be ²⁺
⁴⁶ Sc	83.81	⁴⁶ Sc ³⁺
⁴⁶ V	15.97	?
⁵¹ Cr	27.70	⁵¹ Cr ³⁺
⁵² Mn	5.59	⁵² Mn ²⁺
⁵⁴ Mn	312.12	⁵⁴ Mn ²⁺
⁵⁸ Co	70.92	⁵⁸ Co ²⁺
⁵⁹ Fe	44.50	⁵⁹ Fe ³⁺
⁶⁵ Zn	244.26	⁶⁵ Zn ²⁺
⁷⁵ Se	119.77	⁷⁵ SeO ₃ ²⁻
⁸³ Rb	86.20	⁸³ Rb ⁺
⁸⁴ Rb	32.77	⁸⁴ Rb ⁺
⁸⁵ Sr	64.84	⁸⁵ Sr ²⁺
⁸⁸ Zr	83.40	⁸⁸ ZrO ²⁺
⁹⁷ Ru	2.90	?
^{101m} Rh	4.34	^{101m} Rh ³⁺

ICP-MS法およびマルチトレーサー法では、図1に示すような、脳スライスの微量微量試料として、各元素の定量限界を適用した。ICP-MS法では、同時にMn, Zn, Fe, Cuを定量し動態を追求した、線条体でのMn、海馬でのZn、黒質でのFe、脳梁でのCuの挙動に注視した。ICP-MS法では、特にクロスコンタミネーションとICP-MSの安定性が問題になることが判ったので、その点の検討も加えた。微量で微量な試料処理では、Feの混入を避けることと装置の安定性を保つことが大切であることが分かった。内標準などの使用も検討した。

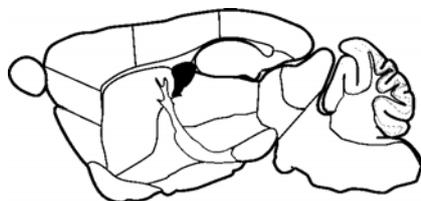


図1 脳切片試料

PAC法は装置の開発が主となった。

MRI法のイメージング手法により、Mn²⁺の局在環境について検討した。肝疾患のあるヒトの「脳MRI-T2強調像によるFe分布とT1強調像によるMn分布は一致している」という点を、ラットを使用して検証した。

MRI-MRSによる¹H (プロトン) -MR信号スペクトル解析法およびPAC法によるHPLCスペシエーションへの適用については、調整や基礎的な検討を続行している。

4. 研究成果

第一遷移金属のV, Cr, Mn, Fe, Co, ZnやSeの微量元素の動態を同時に同一個体で取得することを利用し、さらに核プローブ法である放射化分析法やICP-質量分析法を加えて脳内微量元素の局在性について研究を推進してきた。具体的に、成果を箇条に挙げその成果内容を示す。

①鼻腔内および眼球内に投与したMn²⁺は、嗅神経を介しBBB (血液脳関門) を迂回して脳 (嗅球) へ直接に移行する。この現象を先ずはマルチトレーサーで行い、Mn, Zn, Rbに注目し、「神経での移行速度は、Rb > Mn > Znであり、Mnでは脳内上丘まで局在性が見られるが、Rb, Znでは見られないことをオートラジオグラフィーの手法で明らかにした」右図の集積部分は脳上丘であり、この部位にはMnの放射能しか観測されず、Mnにおける神経路の移動の特徴が示された。独創性の評価としては、Mnについては嗅覚輸送について既報で明らかにされているが、その視神経の輸送、さらにRbやZnとの嗅覚および視覚輸送の可能性とその比較については他になく、次なる展開を導くものである。

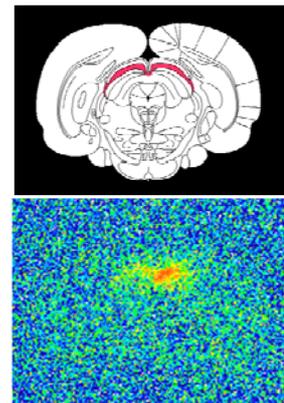


図2 MT-ORG

②著者らは、臨床応用も考え、オリジナルなものとして「Rbイオンも篩骨篩板を介しBBBを迂回して嗅脳へ直接に移行する」を進展させた。先ずその移行機構を、コルヒチンなどの阻害剤による検討を行い、RbはMn (軸索輸送) とは異なり上皮拡散輸送と考えられた。局在性について、Mnのような指向的なことはないが、実際に、臨床応用の可能性がないかを⁸⁶Rbを使用して、頭蓋 (脳を含む) の切片とそのオートラジオグラフィーを試行

した。その結果を右図に示す。嗅球をOBと記す。86Rb β線エネルギーが高いので余り解像度が良くないが、低エネルギーSPECT画像が可能なら臨床応用の道が拓けると考える。

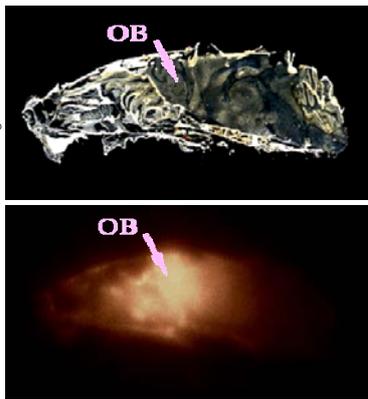


図3 ^{86}Rb -頭蓋 ORG 切片

③ここまででも示してきたように、「ある種の金属イオン（正確には金属錯イオン）が嗅覚経路により脳内に直接移行すること」を発見したので、この事実の重要性を考え、さらにこの面を注視し検討した。広く、基礎的に「鼻腔内投与による ^{203}Pb の脳内移行の可能性-54Mn軸索輸送との比較-」や「 ^{201}Tl の鼻腔内投与による被曝線量の推定」の検討も行い、第一遷移金属としては、MnおよびZnの同位体がこの経路による核種として注目され、さらに種々の角度から検討されるべきであると考え。基礎的検討を経て、 ^{201}Tl 鼻腔投与法は臨床利用（鼻疾患の評価利用）ができることが分かってきた。

④イメージング法として確立しているMRI法により、どのようなMnおよびGdの造影効果ラット実験レベルでどの程度あるかを検討した。定量化は、ExaVision LITE（下図）を



図4 ラット脳 T1 強調 Mn-MRI 画像
（解析ソフトによる解析例として示す）

用いて、信号強度より T1 値を求め、その逆数 R1 値と金属濃度の直線性の関係を求め、

標準試料とも比較検討し、MnおよびGdの測定限界濃度について議論した。Gdについては、未だ脳内研究までには至っていないがGdDTPAを用いて腎臓内でのGd動態について検討し、および他の金属との相関について（中性子放射化分析を併用し）検討した。Mnは脳において数ppmで、一方Gdは腎・肝においては0.5mM/臓器であった。ラット脳内の鼻腔投与Mnの動態については解析ソフトにより、図4のようなデータを得た（図はMn-MRI法）。Gd-MRI法ではMRIで腎性全身性繊維症（NSF）のGd挙動を把握しながら、内因性の第一遷移金属のZn、Feの動きについてのデータを得た。

⑤以上、我々（ここで）の成果を基に、 ^{201}Tl の鼻科学診断法が新しく提案され人に臨床前応用される（共同研究者の別課題にて主として展開されているので、ここでは割愛する）に至っている。実際に病院等で鼻科学の臨床の場で ^{201}Tl 核医学検査方法が使われることが期待される。

今後は、さらに、Mn, Fe, Cu, Zn の局在性の研究を脳科学（鼻科学も嗅球においては脳科学）で展開し、「神経での軸索輸送における働き（Mn）、記憶・学習機能における働き（Zn）、パーキンソン病黒質部位における神経変性との関連（Fe 異常集積）、幼児期の一時期における脳梁における Cu 集積とメンケス病との関連（Cu 集積）」のテーマを、モデル動物を使った生物無機化学的研究として展開したい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計13件）

- ① Washiyama, K., Shiga, H., Hirota, K., Tsuchida, A., Yamamoto, J., Yagi, S., Yoshizaki, T., Furukawa, M., Amano R., Miwa, T. Biological safety of nasal thallium-201 administration: a preclinical study for olfacto-scintigraphy, Journal of Radiation Research, in press (2011). 査読有

- ②Shiga, H., Washiyama, K., Hirota, K., Amano, R., Furukawa, M., Miwa, T., Use of thallium transport to visualize functional olfactory nerve regeneration in vivo, *Rhinology* 47(2009)460-464. 査読有
- ③Inaoka, P.T., Amano R., Tanaka S., Tachino K., Assessment by thallium-201 of hindlimb muscle blood flow in rats during recovery after hindlimb unloading, *J. Phys. Ther. Sci.* 48(2009)163-167. 査読有
- ④志賀英明, 鷺山幸信, 小川数馬, 山口博司, 間賀田泰寛, 天野良平, 古川 侑, 三輪高喜, SPECT/CT を用いた嗅神経イメージング, *日本鼻科学会誌*, 48(2009)138-141, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ①長岡三樹矢, 丹明日香, 鷺山幸信, 天野良平, 201Tl の嗅覚輸送機序に関する基礎的検討, 2010日本放射化学会年会・第54回放射化学討論会, 2010年9月27日, 大阪大学吹田キャンパス 銀杏会館 (大阪府)
- ②鷺山幸信, 山村朝雄, 佐藤伊佐務, 三頭聡明, 高橋成人, 篠原厚, 横山明彦, 天野良平, アルファ放射体を用いた転移性骨腫瘍の治療, 2010年9月29日, 2010日本放射化学会年会, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館 (大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 良平 (AMANO RYOHEI)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号 : 30111769

(2) 研究分担者

鷺山 幸信 (WASHIYAMA KOUSHIN)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号 : 80313675

宮地 利明 (MIYATI TOSHIAKI)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号 : 80324086

横山 明彦 (YOKOYAMA AKIHIKO)
金沢大学・物質化学系・教授
研究者番号 : 80230655

(3) 連携研究者

なし