

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591767

研究課題名(和文) グリア代謝測定用プローブ ^{14}C (^{11}C)-ベンジルアセテートの実証研究研究課題名(英文) Evaluation of ^{14}C (^{11}C)-Benzyl acetate as a potential probe for the measurement of glial metabolism.

研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：50159969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ベンジル ^{14}C アセテート(^{14}C BA)のげっ歯類における脳内動態を測定した結果、 ^{14}C BAは速やかに脳へ移行し以後単一指数関数的に脳から消失した。ベンジル ^{14}C アセテートに比べ ^{14}C BAのラット脳からの排泄速度定数(k_2)は大きく、 k_2 がグリア細胞での ^{14}C CO₂産生率を反映する指標であることが示唆された。 ^{14}C BA投与後の早期と後期の画像より k_2 を簡便に求める方法確立した。 ^{11}C BAを標識合成し、グリア代謝を抑制したラットを用いてPET計測した結果、麻酔の影響が大きいこと、覚醒下でのPET計測には問題点が残されていることが判った。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the validity of benzyl ^{14}C acetate (^{14}C BA) for in vivo measurement of glial oxidative metabolism, kinetics in the brain of mice or rats following injection of the tracer were studied by using the dissection method. Immediately after the tracer injection, a very high brain uptake was seen in mice and rats. Radioactivity of ^{14}C BA in the brain was disappeared as a single exponential curve. The washout rate constant (k_2) of ^{14}C BA was considerably higher than that of benzyl ^{14}C acetate. The k_2 value seems to be an index of conversion rate of labeled acetate to labeled CO₂. By using simplified autoradiography, k_2 value in each brain regions of interest could be estimated. ^{11}C BA was synthesized by using ^{11}C acetyl chloride. PET measurement of ^{11}C BA using anaesthetized or awake rats pretreated with selective glial toxin was performed, however several improvements are needed in future study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：神経科学 放射線 イメージング 生理活性

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は細胞外液の恒常性の維持、神経細胞の保護作用の他、情報伝達系の制御にも深く関わっており、その代謝を非侵襲的に測定する方法を開発することは重要な課題である。酢酸はグリア細胞に選択的なエネルギー基質であり、その標識体 (^{13}C 、 ^{11}C 、 ^{14}C) は広くグリア代謝の研究に Magnetic resonance spectroscopy 法は神経細胞 - グリア細胞間の代謝相関を明らかにすることに大きく貢献してきたが、基質濃度が高いことからヒトに適用することは困難である。

我々は [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 酢酸の脳への取り込みが短時間の虚血で著明に低下することや、逆にてんかんモデルラットではけいれん発作時に著明に亢進することから、 [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 酢酸の脳への取り込みがグリア代謝の指標として有用であることを示してきた。また、 [$1\text{-}^{11}\text{C}$] 酢酸の脳からの消失速度がグリア細胞における [^{11}C] CO_2 の産生率を反映するとの報告がある。 [$1\text{-}^{11}\text{C}$] 酢酸の脳への取り込み率は比較的低いため、精度良く脳からの消失速度を測定するには多量の放射能を投与する必要がある。

そこで今回 [$1\text{-}^{14}\text{C}$ (^{11}C)] 酢酸のプロトネーサとして開発したベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$ (^{11}C)] アセテートの脳内動態を詳細に解析し、positron emission tomography (PET) プローブとしての有用性を評価することとした。

2. 研究の目的

(1) ベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$] アセテートの正常動物脳 (マウス、ラット) における経時的動態を計測し、グリア細胞における [^{14}C] CO_2 の産生率 (k_2) を算出する。

(2) ベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$] アセテート投与後の早期と後期の画像 (オートラジオグラム) から脳の各部位における k_2 を算出する簡便法を確立する。

(3) てんかんモデルラット脳及び 1 型糖尿病モデルマウス脳における k_2 を簡便法により算出する。

(4) ベンジル [$1\text{-}^{11}\text{C}$] アセテートの標識合成法を確立し、ラット脳内動態を小動物用 PET 装置で計測、解析する。

(5) [^{13}N] アンモニアの併用によるグリア代謝測定の有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ICR マウス (雄性、8 週齢) 又は Wistar ラット (雄性、8 週齢) にベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$] アセテートを投与し、組織摘出法により、脳の各部位における経時的な放射能濃度を測定した。ラットについては、ベンジル [$2\text{-}^{14}\text{C}$] アセテートの脳内動態も同様の方法にて測定した。

(2) Wistar ラット (雄性、8 週齢) にベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$] アセテートを投与し、投与 3 分後 (早期画像) 及び 30 分後 (後期画像) に脳を摘出し 20 μm の凍結切片を作製し、イメージングプレートにコンタクトして脳画像を取得した。得られた画像上に関心領域を設定し、放射能集積値 (PSL/ mm^2) を求めた。放射能濃度への変換は [^{14}C] マイクロスケールを同時にイメージングプレートへコンタクトすることによって行った。早期画像と後期画像とを標準化することにより脳の各部位における消失速度定数 (k_2) を求めた。

(3) Wistar ラット (雄性、8 週齢) に塩化リチウム (3 mEq/kg) を腹腔内投与した後、ピロカルピン (30 mg/kg) を皮下投与し、てんかんモデルを作製した。また ICR マウス (雄性、8 週齢) にストレプトゾトシン (STZ, 100 mg/kg) を腹腔内投与し、その 3 日後に STZ (150 mg/kg) を腹腔内投与することにより 1 型糖尿病を誘発させた。2 回目の STZ 投与 7 日後に血糖値が 400 mg/dl 以上の個体を 1 型糖尿病モデルとした。上記のモデル動物にベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$] アセテートを投与し、それぞれ早期画像と後期画像とを取得し、簡便法により脳各部位からの排泄速度定数 (k_2) を求めた。

(4) [^{11}C] 塩化アセチルとベンジルアルコールとを反応させ、ベンジル [$1\text{-}^{11}\text{C}$] アセテートを標識合成し、XBridge C_8 カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー法にて 2% Tween80 含有生理食塩水にて分離精製し、注射液とした。イソフルラン吸入麻酔下にてラットを脳定位固定装置に固定し、頭部固定用のジグ及び脳内微量注入用のガイドカニューレを装着した。本手術から数日後に保定器への馴化訓練 (約 1 時間/日の頻度で 3 日以上) を行った。馴化訓練実施後、右側線条体へフルオロクエン酸 (1 nmol, 1 μl) を微量注入し、約 4 時間後に覚醒下及びイソフルラン麻酔下で 60 分間の PET 測定を実施した。

(5) 3 週齢及び 8 週齢の SD ラット (雄性) に塩化リチウム (3 mEq/kg) を腹腔内投与した後、ピロカルピン (25 mg/kg) を皮下投与しててんかんモデルを作製し、ステージ 5 のけいれん発作が持続している状態で、 [^{13}N] アンモニアを投与し 5 分後における脳への取り込み量を正常群と比較した。また、 [^{14}C] ヨードアンフェタミンを用いてけいれん発作時の脳血流量の測定を行った。

以上の動物実験は大阪大学大学院医学系研究科動物実験委員会、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻動物実験委員会、放射線医学総合研究所動物実験委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) ベンジル [$1\text{-}^{14}\text{C}$] アセテートはマウス、ラ

ット共に投与直後に高濃度で脳に移行し、以後いずれの部位においても単一指数関数的に脳から消失することが判明した。図1に正常ラット脳におけるベンジル[1-¹⁴C]アセテートの脳内動態(大脳皮質、小脳)を示す。

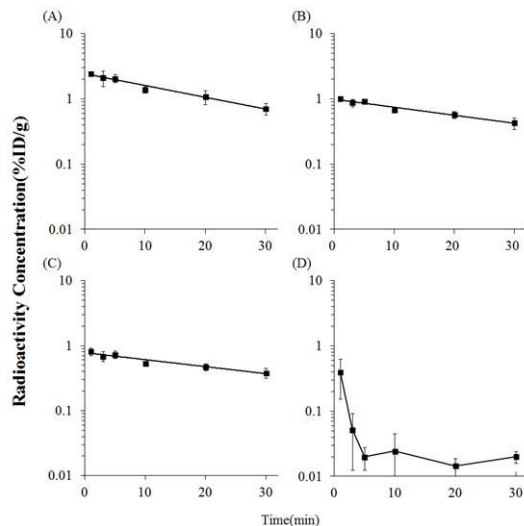


図1. ベンジル[1-¹⁴C]アセテート投与後のラット脳内動態
(A) 大脳皮質、(B) 小脳、(C) 橋、(D) 血中における未変化体

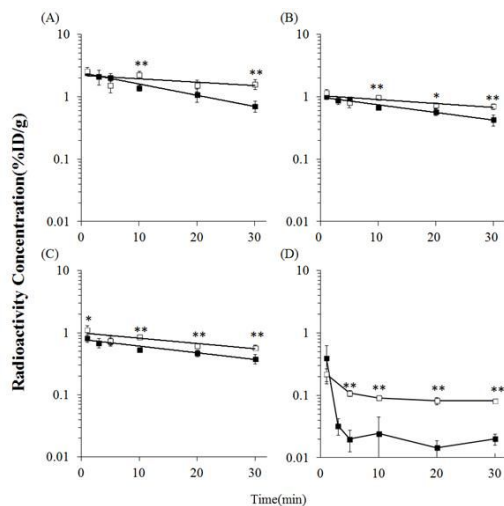


図2. ベンジル[1-¹⁴C]アセテートとベンジル[2-¹⁴C]アセテート投与後の脳内動態の比較
ベンジル[1-¹⁴C]アセテート(○)、ベンジル[2-¹⁴C]アセテート(●)
(A) 大脳皮質、(B) 小脳、(C) 橋、(D) 血中における未変化体

また図2に、ベンジル[1-¹⁴C]アセテートとベンジル[2-¹⁴C]アセテートとをそれぞれ正常ラットに投与した後の、脳(大脳皮質)からの消失曲線を比較した結果を示す。いずれの部位においても脳からの排泄速度はベ

ンジル[1-¹⁴C]アセテートの方がベンジル[2-¹⁴C]アセテートと比較すると著明に大きいことが判明した。

[1-¹⁴C]酢酸はグリア細胞内でTCA回路を1回転したら[¹⁴C]CO₂に変換されるのに対し、[2-¹⁴C]酢酸はTCA回路を3-4回転しないと[¹⁴C]CO₂に変換されないことは既に判明している。従って、ベンジル[1-¹⁴C]アセテート投与後の脳からの放射能の消失は主に[¹⁴C]CO₂として排泄される現象を反映していることが強く示唆される。一方、血液中のベンジル[1-¹⁴C]アセテートは速やかにきわめて低いレベルまで低下することから、入力関数は無視でき得ると考えた。脳各部位からの消失曲線は単一指数関数であるので、排泄速度定数(k₂)はグリア細胞における[¹⁴C]CO₂の産生率を表すものと考えられる。3週齢のWistarラット脳(大脳皮質)のk₂は0.029 min⁻¹であり、8週齢のラット大脳皮質におけるk₂(0.041 min⁻¹)と比較すると、幼若期においては[¹⁴C]CO₂の産生率が低いことが判明した。

(2) 前述のようにベンジル[1-¹⁴C]アセテート投与後の脳からの排泄速度定数(k₂)は[¹⁴C]CO₂産生率を表す指標として有用であることが判明したが、経時的脳内動態を測定するには多数の動物を必要とする。そこで動物数の削減を図ることを目的として、ベンジル[1-¹⁴C]アセテート投与後3分(早期画像)及び30分(後期画像)とをオートラジオグラムとして取得し、関心領域法(ROI法)により、脳の各部位での排泄速度定数(k₂)を求めた結果、解剖法と同等の値を得ることができた。

(3) 上記簡便法(2点オートラジオグラム法)を用いて、てんかんモデルラットのけいれん発作持続時及び1型糖尿病モデルマウスにおける脳からの排泄速度定数(k₂)をコントロール群と比較した結果、いずれのモデル動物においてもk₂に有意な差を認めなかった。これらのモデル動物においては[1-¹⁴C]酢酸の脳への取り込みは亢進するが、[¹⁴C]CO₂の産生率には変化がないことが示唆された。

(4) ベンジル[1-¹¹C]アセテートのフルオロクエン酸片側注入モデルラットにおける脳内動態を覚醒下及びイソフルラン麻酔下において小動物用PET装置で計測した。図3にイソフルラン麻酔下におけるPET画像を示す。フルオロクエン酸注入側で対側と比較して軽度の取り込み低下を認めた。通常は80%程度の取り込み低下を認めるため、麻酔により何らかの影響があると思われるがその機序は不明である。

一方、覚醒下でのPET計測実験では、脳への移行性が不十分だったため、動物の馴化法並びに固定法について更なる検討が必要であると考えた。

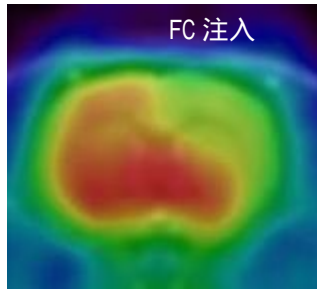


図 3. イソフルラン麻酔下におけるベンジル [1-¹¹C]アセテートの PET 画像 (ラットの右線条体へフルオロクエン酸 (FC) を注入した。)

(5) 前述の通り、成熟ラット (8 週齢) ではリチウム - ピロカルピンにて誘発させたいれん発作持続時において、ベンジル [1-¹⁴C]アセテートの脳からの排泄速度定数 (k_2) はコントロール群との間に有意差を認めなかった。そこで今回、幼若ラット (3 週齢)、成熟ラット (8 週齢) のてんかんモデルラットのけいれん発作時における [¹³N]アンモニアの脳への取り込みを正常ラットと比較した結果、幼若ラット脳においては脳血流の亢進の程度 (約 20%) と比較して著しい [¹³N]アンモニアの取り込み亢進を認めた。 [¹³N]アンモニアの脳への取り込みにはグルタミン合成酵素活性が大きく寄与していることから、幼若ラットのけいれん発作時にはグルタミン酸 - グルタミンサイクルが著明に亢進していることが示唆された。

以上の結果をまとめると、ベンジル [1-¹⁴C]アセテートの脳からの排泄速度定数 (k_2) はグリア細胞における [¹⁴C]CO₂ の産生率を反映すること、簡便法により k_2 が容易に求まることが明らかになった。さらに [¹³N]アンモニアと併用することにより、より詳細にグリア代謝の測定が可能であることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

OKADA Maki, NAKAO Ryuji, MOMOSAKI Sotaro, YANAMOTO Kazuhiko, KIKUCHI Tatsuya, OKAMURA Toshimitsu, WAKIZAKA Hidekatsu, HOSOI Rie, ZHANG Ming-Rong, INOUE Osamu.、Improvement of brain uptake for in vivo PET imaging of astrocytic oxidative metabolism using benzyl [1-¹¹C]acetate.、Applied Radiation and Isotopes、査読有、78、2013、102-107.
DOI: 10.1016/j.apradiso.2013.04.025.

〔学会発表〕 (計 1 件)

香川 智彦、吉野 恵子、柳本 和彦、細井 理恵、木村 敦臣、井上 修、岡田 真希、張 明栄、 [¹⁴C]Benzyl Acetate の脳内動態

の測定とその解析、第 12 回放射線医薬品・画像診断薬研究会、2012 年 12 月 15 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 修 (INOUE, Osamu)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号: 5 0 1 5 9 9 6 9

(2) 研究分担者

阿部 浩司 (ABE, Kohji)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号: 8 0 5 7 1 2 0 7

柳本 和彦 (YANAMOTO, Kazuhiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 7 0 5 3 1 5 3 1

(3) 連携研究者

福村 利光 (FUKUMURA, Toshimitsu)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・上席技術員
研究者番号: 9 0 1 9 9 2 6 6

(4) 研究協力者

張 明栄 (ZHANG, Ming-Rong)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター分子認識研究プログラム・プログラムリーダー
研究者番号: 8 0 4 4 3 0 7 6

岡田 真希 (OKADA, Maki)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター分子認識研究プログラム・研究員
研究者番号: 0 0 4 1 5 4 0 7