

明や診断などの医療への応用、生物や環境試料に含まれる微量元素の高感度分析などに利用されるようになってきた。マイクロPIXEは、微小領域の元素分布も測定でき、加速ビームを試料表面でスキャンすることにより、多元素同時2次元元素マッピングをイメージングできる。その位置分解能は、 $100 \times 200 \text{ nm}$ 程度で、細胞内元素分布の解明や構造解析等に利用できる。検出限界は平均的に1 ppm程度であり、方法や装置を工夫すれば1桁以上も感度を向上させることができる。しかし、一般的なPIXE法は軽元素の分析が不得手であり、分析できる元素はNa~Uまでが可能とされているが、Alより軽い元素の分析は実際には難しい。測定器として、スリットレスのSi(Li)検出器を用いることによりBやCまでの元素も分析可能である。応用は環境、生物、医学、鉱物、考古学などに利用されている。近年、マイクロビームと組み合わせたマイクロPIXEが開発され、 $1 \mu\text{m}$ の分解能で 10^{-6} の微量元素分析が可能で、生体試料³⁹⁻⁴⁰⁾や考古学試料、隕石などの研究に応用されている。マイクロPIXEの装置開発は、放射線医学総合研究所、日本原子力研究開発機構と群馬大学、東北大学サイクロトロンセンターなどで精力的に開発研究が行われているが、一般的な共同利用機器としての確立は時間を要するであろう。これら装置の利用には、上述の研究機関、大学などの研究者との共同研究の形を取る以外には方法がない。

5.2 放射光による蛍光X線分析とイメージング

放射光とは、光速に近い速さで直進する電子が、その進行方向を磁石などによって変えられた際に、進路の接線方向に発生する電磁波であり、1947年に初めてシンクロトロン型電子加速器で観測された。この現象をシンクロトロン放射(synchrotron radiation)という。放射光は電子のエネルギーが高く、その進行方向の変化が大きいくほど、より細くしぼられた極めて明るい光となる。また、X線などの短い波長の光を含むようになる。

SPring-8は、日本原子力研究所と理化学研究所が共同で建設を開始し、1997年10月に完成し、研究を開始した大型放射光施設である。世界最高性能の放射光を発生することができる大型の基礎研究施設であり、国内外の研究者にも広く開かれた共同利用施設として、官公庁・民間企業・大学など国内外の諸機関が様々な研究開発に利用している。SPring-8で8 GeVに加速された電子は、速度が光速の99.9999998%であり、その質量は通常の電子の一万六千倍である。蓄積リングは真空配管からなり、加速電子をそこに走らせながら蓄積しておく。そのためには、その軌道を磁場によって曲げて、リング状にするが、この電子の磁石により、軌道が曲げられるときの接線の方向に電磁波である短波長の光が出る。その光が放射光であり、その特徴を活かして、X線回折、弾性・非弾性散乱、蛍光X線分光、電子分光、イメージング、吸収、マイクロマシニングなどの手法を通して多くの分野の研究に役立っている。特に読者の関心に注目すると、タンパク質巨大分子の3次元構造解析、非結晶生体材料の小角散乱、薬剤設計、新薬開発、生体試

料中の環境汚染微量元素の分析、環境浄化用触媒の分析などが挙げられ、医学分野では、微小血管造影法による腫瘍血管の観察、トモグラフィ、屈折コントラスト・映像法による呼吸器系疾患の観察、腫瘍の早期診断技術開発などが挙げられる。本稿では、紙面の都合もあり、詳細は参考文献をご参照いただきたい^{41)~43)}。ここでは、本稿の主旨から、特に放射光蛍光 X 線分析法による微量元素分析に注目してその応用例をご紹介します。

放射光は直線偏光特性があり、バックグラウンドとなる散乱 X 線が大幅に減少する。また、大強度の単色 X 線が得られるため、X 線管を用いた実験室レベルの装置を用いた分析に対して、放射光蛍光 X 線分析法による微量元素分析は、絶対検出下限で数十倍から一万倍近い高感性が得られる。相対検出下限は試料に依存するが ppb オーダーで得られる。現在まで、生体組織中の元素分布と疾病との相関、隕石の元素組成や状態分析、考古学試料の分析、犯罪捜査⁴⁴⁾ など多様な分野において、高感度分析法として汎用されている。微量元素状態分析は、物質中の X 線吸収スペクトルには元素の化学状態や局所構造の情報が含まれ、XAFS 法 (X-ray Absorption Fine Structure) として、放射光利用実験の中でも大きく発展している分野である。特に X 線の吸収端近傍の微細構造は元素の化学状態に強く依存するため、吸収端近傍の X 線吸収スペクトルを測定することにより逆に測定元素の化学状態の分析が可能である。放射光蛍光 X 線分析では単色光励起を基本としているので、微量元素分析と同じ配置で目的元素の吸収端近傍で入射エネルギーを操作することにより、簡便に状態分析も可能になっている。これらを利用したある物質の化学状態を既知の標準試料とスペクトル比較を行う「指紋法」的利用が多く行われている。また、最近では吸収端のケミカルシフトを利用して化学状態別のイメージングも試料評価に使われており、隕石や考古学試料の分析、合成ダイヤモンド中の金属元素の状態分析などが行われてきた。今後、生体試料についての応用研究もなされていくであろう。

一方、放射光の特徴である高輝度特性は光源サイズが小さく、また角度発散が小さい。この高輝度放射光源の発展および高精度 X 線集光光学素子の開発により、X 線管球では不可能な微小領域分析が可能である。絶対検出下限はフェントグラムのレベルにある。この分野では毛髪中の微量金属元素の分析、海洋生物中の微量元素分析岩石の分析などが行われている。

文 献

- 1) 化学同人編集部編、別冊科学「分子イメージング 蛍光プローブが拓くライフサイエンスの未来」。(株)化学同人、(2007)、京都

- 2) Tsien R. Y. "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons : Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structure". *Biochemistry*, **19**, 2396-2403 (1980)
- 3) Grynkiewicz G, Poenie M, and R. Y. Tsien "A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties". *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985)
- 4) Minta A, Kao J. P. Y, and Tsien R. Y. "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores". *J. Biol. Chem.* **264**, 8171-8178 (1989)
- 5) Frederickson C. J, Kasarskis E. J, Ringo D, and Frederikson R. E. "A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain". *J. Neurosci. Methods*, **20**, 91-103 (1987)
- 6) Coyle P, Zalewski P. D, Philcox J. C, Forbes I. J, Ward A. D, Lincoln S. F, Mahadevan L, and Rofe A. M. "Measurement of Zinc in Hepatocytes by Using a Fluorescent Probe, Zinquin : Relationship to Metallothionein and Intracellular Zinc". *Biochem. J.* **303**, 781-786 (1993)
- 7) Koike T, Watanabe T, Aoki S, Kimura E and Shiro M. "A novel biomimetic Zinc(II)-fluorophore, dansylamidoethyl-pendant macrocyclic tetraamine 1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane (Cyclen)". *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12696-12703 (1996)
- 8) Kikuchi K, Komatsu K, and Nagano T. "Zinc sensing for cellular application". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 182-191 (2004)
- 9) Gee K. R, Zhou Z. L, Ton-That D, Sensi S. L, Weiss J. H. "Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes". *Cell Calcium*, **31**, 245-251 (2002)
- 10) Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukuda T, Yamashita S, Kaisho T, Akira S, Murakami M, Hirono T. "Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influence dendritic cell function". *Nature Immun.* **7**, 971-977 (2006)
- 11) Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirono T. "Zinc is a novel intracellular second messenger". *J. Cell Biol.* **177**, 637-645 (2007)
- 12) Komatsu K, Kikuchi K, Urano Y, Kojima H, Nagano T. "Selective zinc sensor molecules with various affinities for Zn^{2+} , revealing dynamics and regional distribution of synaptically released Zn^{2+} in hippocampal slices". *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10197-10204 (2005)
- 13) Takeda A, Nakajima S, Fuke S, Sakurada N, Minami A, Oku N. "Zinc release from Schaffer collaterals and its significance". *Brain Res. Bull.* **68**, 442-447 (2006)
- 14) Minami A, Sakurada N, Fuke S, Kikuchi K, Nagano T, Oku N, Takeda A. "Inhibition of presynaptic activity by zinc released from mossy fiber terminals during tetanic stimulation". *J. Neurosci. Res.* **83**, 167-176 (2006)
- 15) Raju B, Murphy E, Levy L. A, Hall R. D, London R. R. "A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium". *Am. J. Physiol.* **256**, C540-548 (1989)

- 16) Suzuki Y, Komatsu H, Ikeda T, Saito N, Araki S, Citterio D, Hisamoto D, Kitamura Y, Kubota T, Nakagawa J, Oka K, Suzuki K. "Design and synthesis of Mg^{2+} -selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell", *Anal. Chem.* **74**, 1423-1428 (2002)
- 17) Komatsu H, Iwasawa N, Citterio D, Suzuki Y, Kubota T, Tokuno K, Kitamura Y, Oka K, Suzuki K. "Design and synthesis of highly sensitive and selective fluorescein-derived magnesium fluorescent probes and application to intracellular 3D Mg^{2+} imaging". *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16353-16260 (2004)
- 18) Kubota T, Shindo Y, Tokuno K, Komatsu H, Ogawa H, Kudo S, Kitamura Y, Suzuki K, Oka K. "Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imaging in PC12 cells". *Biochim. Biophys. Acta.* **1774**, 19-28 (2005)
- 19) 特集「分子イメージング—現状と展望—」, 日本臨床, **65** (2), 株式会社日本臨床社, (2007) 東京
- 20) 渡辺恭良, 鈴木正昭, 尾上浩隆, 土居久志, 和田康弘, 片岡洋祐, 榎本秀一, 分子イメージング研究による創薬・疾患診断の革新, 最新医学, **63** (1), 116-138 (2008)
- 21) K. Ishii, Y. Kikuchi, S. Matsuyama, Y. Kanai, K. Kotani, T. Ito, H. Yamazaki, Y. Funaki, R. Iwata, M. Itoh, K. Yanai, J. Hatazawa, N. Itoh, N. Tanizaki, D. Amano, M. Yamada and T. Yamaguchi, First achievement of less than 1 mm FWHM resolution in practical semiconductor animal PET scanner, *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. A*, **576**, 435-440 (2007)
- 22) Y. Kikuchi, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, T. Yamaguchi, Y. Yamamoto, T. Sato, Y. Aoki, K. Aoki, Preliminary Report on the Development of a High Resolution PET Camera Using Semiconductor Detectors, *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B*, **241**, 727-731 (2005)
- 23) Y. Ishimaru, S. Kim, T. Tsukamoto, H. Oki, T. Kobayashi, S. Watanabe, S. Matsuhashi, M. Takahashi, H. Nakanishi, S. Mori, N. K. Nishizawa, Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil, *PNAS*, **104** (18), 7373-7378 (2007)
- 24) 松橋信平, 植物のカドミウム吸収・輸送—植物ポジトロンイメージング技術による可視化—, *Isotope News*, **634**, 7-9 (2007)
- 25) T. Tsukamoto, H. Nakanishi, S. Kiyomiya, S. Watanabe, S. Matsuhashi, N. K. Nishizawa, S. Mori, ^{52}Mn translocation in barley monitored using a positron-emitting tracer imaging system, *Soil Science and Plant Nutrition*, **52**, 717-725 (2006)
- 26) 西村恒彦編, SPEC機能画像 定量化の基礎と臨床, メジカルビュー社, (1999) 東京
- 27) S. Enomoto: "The Multitracer Technique: Manufacturing and Application on the Bio-trace Elemental Research" *Biomed. Res. Trace Elements*, **12** (1), 71-84 (2001)
- 28) Motomura S, Takeichi H, Hirunuma R, Haba H, Igarashi K, Enomoto S, Gono Y, Yano Y., Gamma-ray Compton imaging of multitracer in bio-samples by strip germanium telescope. 2004 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record (IEEE Cat.

- No.04CH37604), IEEE, Part Vol.4, 2152-2154 (2004)
- 29) Motomura S, Enomoto S, Haba H, Igarashi K, Gono Y, Yano Y., Gamma-ray Compton imaging of multitracer in biological samples using strip germanium telescope, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **54**, 710-717 (2007)
 - 30) Motomura S, Kanayama Y., Haba H., Igarashi K., Watanabe Y., Enomoto S., Development of multi-elemental molecular imaging on semiconductor Compton telescope, *J. Atom. Anal. Spect.*, submitted.
 - 31) S. Watanabe, S. Takeda, S. N. Ishikawa, H. Odaka, M. Ushio, T. Tanaka, K. Nakazawa, T. Takahashi, H. Tajima, Y. Fukazawa, Y. Kuroda, M. Onishi, Development of Semiconductor Imaging Detectors for a Si/CdTe Compton Camera, *Nucl. Inst. Meth. A.* **579**, 871-877 (2007)
 - 32) Shigeto Kabuki, Kaori Hattori, Ryota Kohara, Etsuo Kunieda, Atsushi Kubo, Hidetoshi Kubo, Kentaro Miuchi, Tadaki Nakahara, Tsutomu Nagayoshi, Hironobu Nishimura, Yoko Okada, Reiko Orito, Hiroyuki Sekiya Takashi Shirahata, Atsushi Takada, and Kazuki Ueno, Development of Electron Tracking Compton Camera using micro pixel gas chamber for medical imaging, *Nucl. Inst. Meth. A.* **580**, 1031-1035 (2007)
 - 33) Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E. A. and Basilion, J. P., In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression, *Nature Medicine*, **6**, 351-355 (2000)
 - 34) Louie, A. Y., Huber, M. M., Ahrens, E. T., Rothbacher, U., Moats, R., Jacobs, R. E., Fraser, S. E. and Meade, T. J. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging, *Nature Biotech.*, **18**, 321-325 (2000)
 - 35) Kircher, M. F., Allport, J. R., Graves, E. E., Love, V., Josephson, L., Lichtman, A. H. and Weissleder, R., In vivo High Resolution Three-Dimensional Imaging of Antigen-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Trafficking to Tumors, *Cancer Research* **63**, 6838-6846 (2003)
 - 36) Rugar, D., Budakian, R., Mamin, H. J. and Chui, B. W., Single spin detection by magnetic resonance force microscopy, *Nature*, **430**, 329-332 (2004)
 - 37) 渡辺誠, 佐藤繁編, 放射光科学入門, 東北大学出版会 (2004)
 - 38) 渡辺巖, シンクロトロン放射光を用いた X 線吸収スペクトル測定, *ぶんせき*, 2005, 2, 67-71 (2005)
 - 39) 日本微量元素学会編, *Biomed. Res. Trace Elements*, シンポジウム 放射光による微量元素分析と生命科学・医学への応用, **14**, 105-112 (2003)
 - 40) K. Takagawa, S. Hayakawa, *SPRING-8 Research Frontier*, 2000/2001, 71-73 (2002)
 - 41) S. Homma-Takeda, Y. Nishimura, Y. Terada, S. Ueno, Y. Watanabe and M. Yukawa, *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B.* **231**, 333-337 (2005)
 - 42) 日本放射光学会編, 放射光—生命科学特集—, **17**, No.3, 99-160 (2004)
 - 43) 千川純一, 山田耕作, 秋元利男, 桜井弘, 安井裕之, 山本仁, 江原正明, 福田裕之, 毛髪で分かる乳がんの前兆と発生, *放射光*, **18**, 84-92 (2005)
 - 44) 中井泉, 犯罪と分析化学, *ぶんせき*, 2002, 10, 591-594 (2002)

微量元素の分析技術 —臨床検査の実際と今後の展開

五十嵐香織¹⁾/榎本秀一²⁾

(SUMMARY) 臨床検査における体液中の無機質(金属元素, ミネラル)の分析に関しては, 通常, 血清中や尿中の分析が日常であろう。体液中の無機質は, 遊離型イオンとして存在する Na^+ , K^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} などがあり, これらを電解質と呼んでいる。一方, 蛋白質や低分子化合物との結合型や遊離型で存在する Ca^{2+} , Mg^{2+} , 蛋白質と結合している場合の多い Fe , Cu , Zn , Mn などが存在するが, これらを微量元素と呼んでいる。本稿では, これら無機質成分のうち特に微量元素の臨床検査に着目し, 汎用される分析機器や今後, 利用が増していくことが予測される先端分析機器を紹介し, 併せて通常汎用される臨床検査法を紹介したい。〔臨床検査 53:185-189, 2009〕

(KEYWORDS) 原子吸光法, ICP 質量分析法, ICP 発光分析法, スペシエーション, イメージング技術

汎用されている機器分析法

基本的に無機質はナトリウム, カリウム, リンなどのマクロ量存在する元素と生体内に極微量に存在する微量元素とは分析手法が異なる。マクロ量に存在する元素の分析法は, 簡便な炎光光度法やイオン電極法のほか, キレート試薬による呈色反応, 酵素反応を利用する系などが開発されており, 本稿では詳細な解説は割愛した。これらに関しては, 臨床検査の成書をご参照いただきたい

い¹⁾。一方, 生体内に存在する微量元素の簡便な機器分析法としては, 原子吸光法, ICP 発光分析法および ICP 質量分析法が一般的であり, かつ感度も高く汎用されている。以下に, 現在臨床検査で使われている機器分析法について概説する。ここに紹介する機器も本稿では要点のみ触れることとしたので, 詳しくは優れた成書を参考にされたい²⁾。

1. 原子吸光法, ICP 発光分析法および ICP 質量分析法への試料の前処理

臨床検査における試料は血漿, 血清, 尿などの体液試料であり, 試料前処理は, 蛋白質, 脂質などの有機物を分解によって取り除き, 無機物として元素を分析するために重要な操作となる。

前処理の仕方は, 生体試料の場合, 湿式灰化法やマイクロウェーブ灰化法が一般的である。これは測定対象元素や使用する分析機器によって最適化した量の試料を精密に計量し, 有害金属測定用あるいは精密分析用などの硝酸, 硫酸, 過塩素酸, 過酸化水素などを単独あるいは混合して加え, 加熱分解する。この後, 定容化して測定試料とする。この方法で用いる酸の種類や組合せは非常に重要であり, そのテクニックは専門書に譲る²⁾。処理に際しては, 揮散しやすい元素の損失や使用する試薬に由来する汚染(コンタミネーション)を最小限に抑える必要もあり, 操作過程における汚染の問題が常に付きまとい, 熟練したオペレーションが重要である。一方, マイクロウェ

1) IGARASHI Kaori 独立行政法人理化学研究所神戸研究所分子イメージング科学研究センターメタロミクスイメージング研究ユニット・研究員

2) ENOMOTO Shuichi 同研究ユニット・ユニットリーダー/岡山大学大学院医歯薬学総合研究科医薬品機能分析学・教授

ープ灰化法は、試料および酸を入れて密閉したテフロン容器に入れ、マイクロウェーブを照射することにより加熱し、試料を分解する方法である。湿式灰化法に比べ、高温、高圧下で分解するので短時間で分解が完了し、容器が密閉系であるため試料の揮散やコンタミネーションが防止できるなどの利点がある。

2. 原子吸光法 (atomic absorption spectrophotometry ; AAS)

原子吸光法の原理は、試料溶液中の金属元素を原子化することにより、生じた基底状態の原子が特定の波長の光を吸収する現象を利用する。すなわち、光源から発せられた光量と、試料中の金属濃度に応じて吸収され、検出器に到達した光量との差から求められる吸光度と試料濃度との関係は、Lambert-Beerの法則に従うので、標準液を用いて作成した検量線から未知試料中の金属元素濃度を算出することができる。

原子吸光法は、測定対象とする元素ごとに中空陰極ランプ(測定対象の原子吸光線の波長と一致した波長の光を高輝度で発するランプ)を用いて、原子化させた試料溶液中の元素イオンを定量する方法である。したがって本法は、試料中に含まれる未知元素の同定には適さない。また、後述する多元素同時分析が可能なICP発光分析法やICP質量分析法に対して、原子吸光法は多元素を同時に測定することも理論上不可能である(複数本の中空陰極ランプに複数の検出器を対応させ、数元素の同時分析を可能にした機器も開発されている)。

原子吸光法における原子化の方法にはフレーム法、フレームレス法、還元気化法、水素化物発生法などがある。また、定量法としては、絶対検量線法や標準添加法が利用されている。標準液の作製には既成の原子吸光用標準液を利用する。

3. ICP発光分析 (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy)

ICP-AESでは、試料を酸で分解した後、その溶液を6,000°C以上の高温Arプラズマ中に噴霧する。このことで、ほとんどの元素は励起され、原子やイオンに解離され、イオン化発光した光を波長ごとに分光して、その強度を測定する。各元素固有の波長で発光するため、発光波長を掃引す

るか複数検出器を利用することで、試料中に存在する多数の元素の同時検出、定量が可能である。原子吸光法に比較して、検量線のダイナミックレンジが広く、真空紫外部を測定可能な検出器を備えた機器であれば、硫黄やリンなどの軽元素も検出可能である。定量法としては絶対検量線法や標準添加法が利用できる。標準液の作製には、市販のICP発光分析法用の標準液を用い、混合標準液を作製する。ただ、混合による化学反応あるいは測定対象元素やマトリックスの発光線の波長の重なり(スペクトル干渉)に注意を要する。

4. ICP質量分析 (inductively coupled plasma-mass spectroscopy)

ICP質量分析法は、1980年ころから初期の装置の報告がなされ、今日では、前述のAASやICP発光分析法などの光学的手法に代わる微量元素分析法として汎用されている。その応用分野は、医学、薬学領域のみならず、半導体研究から、環境科学研究分野にも及んでいる。

測定原理は、ICP発光分析法と同じように、試料を酸で分解した後、その溶液に含まれる元素をArプラズマ中で元素をイオン化し、質量電荷比(m/z)によって分離して、シグナルを増幅後、電気的に計測する。ICP発光分析法と比較すると、多くの元素について2~3桁程度高感度であり、スペクトル干渉がなく、同位体分析も可能である。 m/z を掃引し元素固有の m/z 値から試料中の元素種を多元素同時に検出でき、そのシグナル強度から定量分析できる。定量法は、絶対検量線法や標準添加法の他、同位体希釈法も利用できる。標準液の作製は、市販のICP質量分析法用標準液を利用し、混合による化学反応や測定対象元素どうしの同重体干渉、マトリックスに由来する分子イオン干渉の発生に留意して混合標準液を作製する。

生体微量元素は質量数(m/z)が100以下の元素が多いため、ICP質量分析法で測定する場合、プラズマ源(Ar)や分解に使用した後に残存する酸あるいはマトリックスによって生成する分子イオン干渉を回避することが重要である。

5. 今後の利用が期待される最新分析法

1) 化学形態分析(スベシエーション)³⁾

化学形態分析(スベシエーション)は、試料中で

様々な化学形態をとっている目的の元素を、様々な原理に基づく分離手法で分離し、元素に特異的に検出するという分析である。元素を特異的に検出するため、生体内で金属の貯蔵や輸送体などのような適切な酸素活性がない金属との結合蛋白質や核酸との複合体あるいは低分子量の金属含有代謝物などを検出する非常に有用な手段となる。

スペシエーションを行うには、化学形、荷電状態、機能ごとに分離し、含まれる金属に特異的な検出方法で検出することが必要である。このように分離の後、特異的な検出を行うため、それぞれ単一機器としても機能分離できる測定機器(高性能液体クロマトグラフィ: HPLC など)と検出のための測定機器(ICP 質量分析法など)をオンラインで組み合わせて用いる。

生体微量元素のスペシエーション分析の分離手法は、多くの生体成分の分離に応用が可能で、様々な分離原理(イオン交換、分子ふるい、吸着、分配など)による分離ができ、分離、検出とも溶液系で行えることなどの制限から、HPLC が最も一般的である。一般に生体内に存在する種々の微量元素は、単独のイオンとして存在するよりもむしろ様々な蛋白質などの生体分子と結合しているような状態で体内を動くことが多く、この際の化学状態の把握や代謝物の追跡の重要性がますます高まっている。このような意味から、今後このスペシエーション分析の一層の研究開発が進むと考えられる。

2) イメージング技術と微量元素の挙動

基礎科学研究者の間で長らく用いられてきたイメージング技術であるが、昨今、この分野の進歩が著しい。今後、新たな疾病診断のパワフルツールとなっていくことが予測され、また、日常の診断や検査の中での重要性が高まっていくであろう。イメージング技術には、蛍光、MRI や核医学のイメージングがあるが、これらの技術は、生体や個体の病態のリアルタイム画像をダイナミックに捉えることができるので、極めて有益な情報をもたらす。

蛍光イメージングは、蛍光を有する化合物と標的分子の相互作用を利用するものであるが、昨今、蛍光分光分析法のうち共焦点レーザー顕微鏡、蛍光相関分光などの機器の研究や開発が進ん

でおり、新たな蛍光試薬(プローブ)の創薬も進行している。生体元素のうち、Ca, Zn, Mg の蛍光イメージングは、優れた蛍光イメージングプローブの開発がなされ、今日多くの生命現象と微量元素のかかわりあいの解明に用いられている⁴⁾。また、核磁気共鳴によるイメージング MRI は、強力磁石を用いて生体中の水素原子核に強い高周波を照射して、放出される高周波を受信することによるイメージングであるが、生体微量元素の関与する生体反応によって起こされる水分子のダイナミクス変化を評価する以外に、MRI 造影剤の利用や緩和時間の測定による金属元素の集積性を見ることも可能である⁴⁾。

さらに、核医学における PET (positron emission tomography) や SPECT (single photon emission computed tomography) などのイメージング法⁴⁾や新規の核医学イメージング法である複数分子同時イメージング法⁴⁾が開発されているが、これらの手法も種々の元素の放射性同位元素を用いることで微量元素の動的挙動をリアルタイムでイメージングできる。今後、これらの分析手法が、臨床医学や日常検査の場で使用されることも多くなっていくであろう。

■ 実際の臨床検査と微量元素測定

1. カルシウム

1) カルシウム値の変動と疾病⁵⁾

体内のカルシウムの 99% が骨に含有されているが、カルシウムイオンは、酵素の活性化、筋収縮、神経興奮伝達など様々な生理機能発現に重要な元素であることは、ご承知の通りである。血中におけるカルシウムは、ほとんどすべてが血漿中に存在し、その 40~50% がアルブミンなどの蛋白質に結合しており、蛋白質濃度や血液 pH の動態と関連があることから、判定にはアルブミン濃度と pH を考慮しなければならない。カルシウムの尿中への排泄量は血中カルシウム濃度の影響を受ける。また、カルシウムは、骨代謝の観点からリンとも関係があり、血清カルシウム濃度の増加に伴いリン濃度は減少するが、有機リン酸エステルからリン酸イオンが遊離し、カルシウムイオン

と結合して骨に沈着することにより、血中カルシウムイオンとリン酸イオンとの溶解積は一定に保たれている。この代謝にはアルカリフォスファターゼが関与する。

これらのように、血中および尿中カルシウム濃度の測定は、内分泌代謝異常、骨代謝異常やカルシウムの吸収障害等の診断においても意義があり、臨床においては通常、カルシウム、リン、アルカリフォスファターゼの動態から総合的に判断することが重要である。

2) カルシウムの測定法⁹⁾

血清カルシウムの日常検査法は *o*-クレゾールフタレインコンプレクソン法(OCPC法)、MXB法、酵素法、アルセナゾⅢ法など多くの方法がある。この中でも OCPC法は、広く利用されている。この手法は、試料中のカルシウムがアルカリ溶液中で *o*-クレゾールフタレインと結合して赤紫色の錯体を形成することを利用し、この赤紫色の吸光度を測定することによりカルシウム量を求める。一方、原子吸光法はアメリカ標準技術局(National Institute of Standards and Technology: NIST)の標準測定法に指定されている方法で、比色法より正確である。また、電極法は、カルシウムイオンの直接測定法として用いられている。

2. 鉄

1) 鉄値の変動と疾病⁵⁻⁷⁾

体内の鉄は、ヘモグロビンに約 60%、フェリチン・ヘモシデリンに約 30%、ミオグロビンに約 10% 存在するが、欠乏、過剰を起こしやすく、性差や個体差が大きいことから、その値には変動が認められる。鉄は、酸素運搬や電子伝達に関与する元素であり、血液疾患、肝疾患、悪性腫瘍などでは代謝に異常が認められる。鉄代謝に関する情報は、ヘモグロビン、血清鉄、鉄結合能、血中トランスフェリン、血中フェリチンにより得られる。

2) 鉄の測定法^{5,7)}

ヘモグロビン、血清鉄、鉄結合能の測定には比色法、原子吸光法、ICP発光分析法が、トランスフェリン、フェリチンの測定には免疫測定法が用いられる。日常臨床検査における血清鉄測定では、比色法が汎用されている。例えば、試料中の

鉄はグロブリン中のトランスフェリンと結合して存在しているが、このトランスフェリン結合鉄を Fe^{3+} を酸性下で遊離させ、還元剤(アスコルビン酸)で Fe^{3+} に還元し、 Fe^{2+} を 2-ニトロソ-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)-フェノールとキレート化合物を形成し発色させ、これを比色定量して血清鉄値を求める手法がある。

3. マグネシウム

1) マグネシウム値の変動と疾病^{5,8)}

体内のマグネシウムはすべての細胞、骨に分布しているが特に骨(約 66%)、脳や筋などに多く存在し、各種酵素の活性化、筋神経系の興奮伝達に重要な元素である。マグネシウム代謝の全貌は未だ不明な点があるが、摂取不足や嘔吐、下痢等により体内からマグネシウムが欠乏すると、腎における再吸収が促進する。マグネシウム欠乏の診断には血中(血清、血球)、尿中マグネシウム濃度を用いる。ただし、尿中濃度の測定には、日内変動を考慮し、起床後 2 回目の尿を試料とする。一方、高マグネシウム血症は腎機能障害の場合に認められ、血清マグネシウム濃度により判定される。

2) マグネシウムの測定法⁵⁾

日常的なマグネシウム濃度の測定法として、色素法、原子吸光法、酵素法が挙げられる。酵素法は特異性が高く、自動分析器に応用し多検体処理が可能である。酵素法としては、イソクエン酸脱水素酵素(ICDH)を利用したものがあり、ICDHの活性は検体中のマグネシウム濃度に依存することを利用したもので、イソクエン酸、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)の存在下で検体中のマグネシウムによって活性化した ICDH を反応させ、このときに生成する NADPH の吸光度の増加量を測定することによって、検体中のマグネシウム濃度を決定している。色素法としては、試料中のマグネシウムが、アルカリ条件下においてキシリルアゾバイオレットと結合して赤色のキレート化合物を形成することを利用し、この赤色の吸光度を測定することによりマグネシウム濃度を測定する方法(キシリルブルー法)がある。マグネシウムに関する正確な測定には、やはり原子吸光法が断然優位である。

4. 銅

1) 銅値の変動と疾病^{5,9)}

体内の銅は、骨、筋、肝、脳等に多く分布し、造血や結合組織の代謝に不可欠な元素である。血清中の銅は約95%がセルロプラスミンと結合していることから、セルロプラスミン濃度は血清銅を反映していると言える。Wilson病は、銅輸送蛋白質の遺伝子異常に起因し、血清銅濃度の低下、およびアルブミンやヒスチジンなどのアミノ酸結合銅濃度の増加を認める先天性疾患である。一方、炎症や妊娠により、血清銅濃度は増加する。

2) 銅の測定法⁹⁾

原子吸光法、および比色法が挙げられる。比色法は、血清などの試料に還元剤を含む希塩酸などを加え、蛋白質から銅を遊離する。さらに2価の銅から1価に銅は還元され、バソクプロインスルホン酸とキレートし、橙黄色を呈することから、これを比色するバソクプロイン法や3, 5-DiBr-PAESAとキレートさせる方法が利用されている。

5. 亜鉛

1) 亜鉛値の変動と疾病^{5,10)}

亜鉛は、種々の酵素のコファクターとして機能し、特定の受容体に対する核内受容体におけるZnフィンガーの構成元素として存在することから、生命維持に不可欠な元素である。したがって、亜鉛の生体内レベルは重要な情報である。亜鉛欠乏の判定は摂取不足、吸収阻害を反映する血清濃度と、体液中に比較的高濃度に亜鉛が存在することから、尿中排泄量を併せて検討する方が適切である。欠乏症状として、生殖機能の低下、成長停止、創傷治癒障害、脱毛、味覚嗅覚の低下、食欲低下などが認められる。

2) 亜鉛の測定法⁹⁾

原子吸光法と比色法が存在するが、比色法は精度に問題があるといわれている。比色法として、試料にトリクロロ酢酸を加え、除蛋白後、2-(5-

プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノールナトリウム(5-Br-PAPS)とキレートさせ、赤紫色のキレートを吸光度測定するものである。一般的には、精度の問題からため、原子吸光法を利用するほうが良い。

おわりに

様々な微量元素と種々の疾病とのかかわりが明らかになっていく中、日常診断、治療の現場における微量元素のモニタリングの必要性が高まってきた。微量元素のほとんどは、生体内での存在量が微量であり、高感度な機器分析では測定に供する前処理や器具の汚れによるコンタミネーションに十分に留意する必要がある。先端分析技術の導入においては、その高感度性を十二分に発揮するためには、データの信頼度を高める操作技術の習得も重要である。

文 献

- 1) 金井泉, 金井正光: 臨床検査法提要改定第31版, 金原出版, 1998
- 2) 原口絃彦: ICP発光分析の基礎と応用, 講談社サイエンティフィック, 1986
- 3) 小原康光, 鈴木和夫: スペシエーション. 生命元素事典(桜井弘編), オーム社, pp 352-358, 2006
- 4) 廣村信, 五十嵐香織, 榎本秀一: ミネラルのイメージング技術. ミネラルの科学と最新応用技術(糸川嘉則監修), シーエムシー出版, pp 397-419, 2008
- 5) 野本昭三, 金井正光: 無機質(Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn)の測定. 臨床検査法提要改定第31版(金井正光編), 金原出版, pp 587-605, 1998
- 6) 渡邊光安, 相澤好治: 鉄. ミネラルの事典(糸川嘉則編), 朝倉書店, pp 220-222, 2003
- 7) 廣田俊: 鉄. 生命元素事典(桜井弘編), オーム社, pp 78-81, 2006
- 8) 西牟田守: マグネシウム. ミネラルの事典(糸川嘉則編), 朝倉書店, pp 205-219, 2003
- 9) 児玉浩子: ウィルソン病・メンケス病と銅代謝. 生命元素事典(桜井弘編), オーム社, pp 258-261, 2006
- 10) 手塚統夫: 栄養. ハーパー生化学 原著25版(上代淑人監訳), 丸善, pp 708-709, 2001

Development of multielemental imaging on semiconductor Compton telescope*

Shinji Motomura¹, Yousuke Kanayama^{1,2}, Hiromitsu Haba^{1,2},
Kaori Igarashi², Yasuyoshi Watanabe¹, and Shuichi Enomoto^{1,2,†}

¹Molecular Imaging Research Program, RIKEN, 6-7-3 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan; ²Metallomics Research Unit, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan

Abstract: The feasibility of using a Compton camera for multitracer imaging has been demonstrated with the results of two biological sample imaging experiments. The distribution of the multitracer administered to a soybean sample and a tumor-bearing mouse has been visualized for each nuclide simultaneously. 3D images of the multitracer have been obtained even though the samples were measured from a fixed direction.

Keywords: Compton; Compton telescope; molecular imaging; multitracer imaging; Compton camera.

INTRODUCTION

The multitracer technique, which was invented at RIKEN in 1991 [1,2], is a powerful tool for investigating the behavior of various chemical elements in a sample. It is produced by irradiating a metal target with a heavy-ion beam accelerated to an energy of 135 MeV/u, and then by chemically processing the various radioactive nuclides produced mainly through nuclear-fragmentation reaction, into the final form such as multitracer solution. Since the multitracer contains the radioisotopes of various elements, the information regarding the radioisotopes under the same conditions can be obtained simultaneously by a single experiment. Moreover, the multitracer enables us to observe the correlated behavior among many elements. This information can never be obtained by combining the data of many single-tracer experiments. Owing to these advantages, the multitracer has found many applications in biology, medicine, environmental science, and other fields [3].

Although the potential advantages of multitracers are promising, no nondestructive inspection method has yet been established to realize their full potential particularly for *in vivo* imaging. This is because the multiple γ -rays emitted from the multitracer span an energy range from ~100 to 2 MeV. For energies above ~300 keV, sufficient spatial resolution cannot be obtained by a conventional γ -ray imager equipped with mechanical collimators. In addition, the energy resolution must be high enough to distinguish each nuclide contained in the multitracer.

In this paper, we describe a prototype of a Compton camera for multitracer imaging, which we call GREI (gamma-ray emission imaging), and present some results of test experiments with biological samples. The original idea of the Compton camera was invented in the early 1970s [4], and it was soon

*Paper based on a presentation at the International Symposium on Metallomics 2007 (ISM 2007), 28 November–1 December 2007, Nagoya, Japan. Other presentations are published in this issue, pp. 2565–2750.

†Corresponding author

proposed for medical imaging [5]. Since then, various types of Compton camera have been proposed for various uses [6].

Previously, we performed a test experiment using a Compton camera composed of two segmented germanium (Ge) detectors [7]. Owing to the excellent energy resolution of the Ge detectors, three γ -ray sources of ^{60}Co , ^{137}Cs , and ^{152}Eu were clearly distinguished by setting energy windows on the corresponding γ -ray photo peaks, and their positions were simultaneously determined. The GREI system described in this paper has been modified taking into account the results of the test experiment, further simulations [8], and recent technologies developed for γ -ray detection [9–14].

DESCRIPTION OF THE GREI SYSTEM

The GREI system is composed of two double-sided orthogonal-strip Ge detectors manufactured by Eurisys Mesures (Fig. 1). The detectors are arranged parallel to each other and mounted in a single cryostat. The dimensions of the active volume of the Ge crystals are $39 \times 39 \times 10$ mm and $39 \times 39 \times 20$ mm for the front and rear detectors, respectively. The strip pitch is 3 mm for both detectors. The center-to-center distance between the crystals is 60 mm.

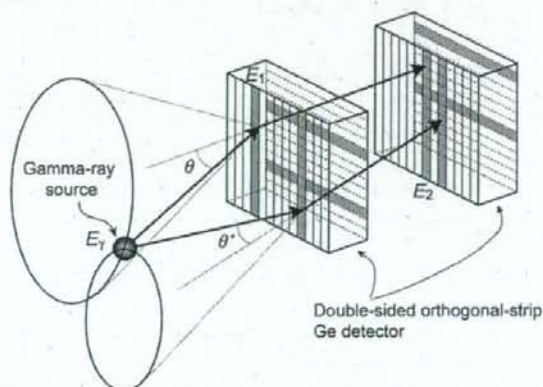


Fig. 1 Schematic of the strip Ge telescope operated as a Compton camera.

The electronics are schematically shown in Fig. 2. Conventional circuit modules based on nuclear instrument module (NIM) and computer automated measurement and control (CAMAC) standards are used. All the output signals of the preamplifiers are fed into the constant fraction discriminators (CFDs) through the timing filter amplifiers (TFAs), and the timing pulses are generated. All the timing pulses are fed into the time-to-digital converters (TDCs) to digitize the timing signals. To select the Compton scattering events, the timing pulses derived from the cathode strips are used to perform coincidence measurement between the front and rear detectors.

All the output signals of the preamplifiers are also fed into the shaping amplifiers to generate slow signals for energy measurement. Then the pulse heights are digitized by the analog-to-digital converters (ADCs).

In the current implementation, the transverse position of the γ -ray interaction is determined by a combination of the anode and cathode strips with the accuracy given by the width of the strip. On the other hand, the depth position of the γ -ray interaction in the Ge crystal can be determined more accurately than the thickness of the crystal, by taking into account the time difference between the signals from the anode and cathode strips [9–14]. To realize accurate depth measurement, the time constants of TFAs were set to 500 and 60 ns for differentiation and integration, respectively. Delay time

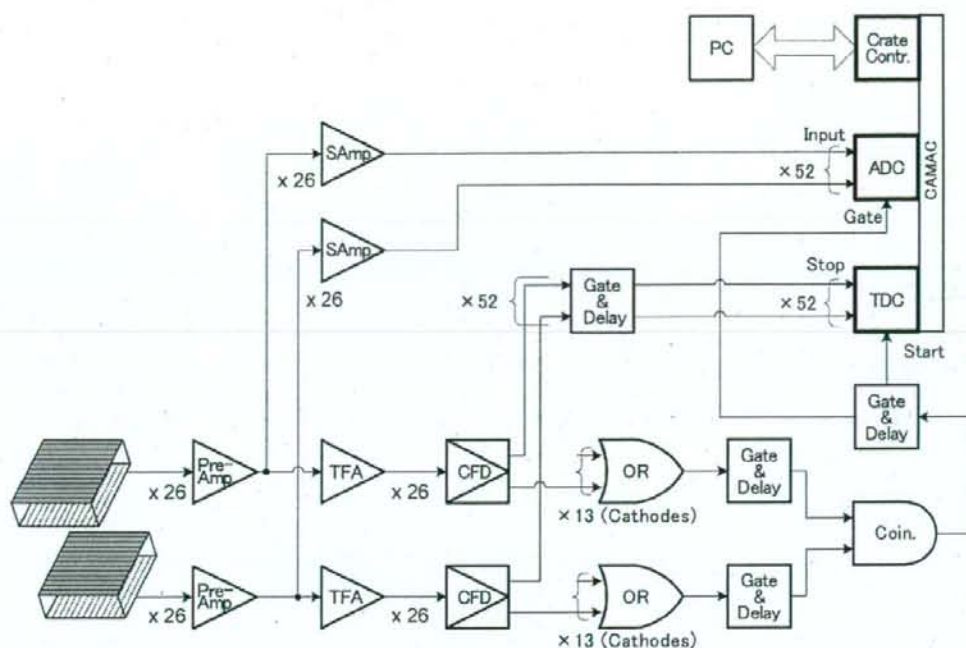


Fig. 2 Circuit diagram of the current prototype of the GREI system. The circuit modules are based on NIM and CAMAC standards.

of the CFDs was set to 50 ns, which was the upper limit of the modules, and the fraction of the CFDs was set to 0.5.

The digitized data of the TDCs and ADCs are transferred event by event to the personal computer. The transferred data are analyzed on-line, and also recorded in list mode for further off-line analysis. If an incident γ -ray is Compton scattered in the front detector and deposits energy E_1 , and then the scattered γ -ray is fully absorbed in the rear detector and deposits energy E_2 , the original γ -ray energy E_γ is obtained by summing E_1 and E_2 . Thus, the nuclides contained in the multitracer are distinguished by setting energy windows at the corresponding energy peaks in the E_γ spectrum. Throughout this paper, the range of an energy window was ± 5 keV of the peak position and the windows were applied in the software.

IMPLEMENTATION OF IMAGE RECONSTRUCTION METHODS

For image reconstruction, we are currently employing a two-step method. In the first step, an intermediate image, which is called a simple back-projection (SBP) image, is constructed by simply accumulating the back-projections over all detected events, using an algorithm analogous to the cone-surface mapping algorithm [15]. The back-projection for one event is a cone surface that indicates the possible position of the γ -ray source. The cone axis is the straight line passing through the first and second interaction points. The half-cone angle θ is the Compton scattering angle determined by the following equation:

$$\cos \theta = 1 + m_e c^2 \left(\frac{1}{E_\gamma} - \frac{1}{E_\gamma - E_1} \right) \quad (1)$$

where $m_e c^2$ is the rest-mass energy of an electron.

Here, we adopt a model that the SBP image is constructed by linear mapping of the source distribution image; that is,

$$n_i = \sum_j p_{ij} \lambda_j \quad (2)$$

where n_i is the value of voxel i in the SBP image, λ_j is the value of voxel j in the source distribution image, p_{ij} is the point-spread function (PSF), or the point kernel function [15], which represents the SBP image of the point source at voxel j ; the 3D coordinates are represented by the single indices i and j . In general, the shape of the PSF varies depending on the source position, because the range of the accepted incident angle and scattering angle of γ -rays depends on the source position. Therefore, a spatially variant PSF must be used to perform rigorous image reconstruction. However, the PSF should be approximated by a spatially invariant PSF within a local region.

Then the second step is to deconvolve the SBP image with the PSF. We have implemented an analytical algorithm and an iterative algorithm for the deconvolution.

If the PSF is assumed to be spatially invariant, λ_j can be reconstructed analytically by adopting the Fourier convolution theorem. The matrix p_{ij} is diagonalized by taking the Fourier transform of both sides of eq. 2, and then λ_j is obtained in the spatial frequency domain as follows:

$$\lambda_j = \frac{n_j}{p_{jj}} \quad (3)$$

In most cases, an additional filter function (w_j) must be multiplied to the right side of eq. 3 in order to suppress the statistical noise components, which are dominant in the high-frequency regions, that is

$$\lambda_j = \frac{w_j n_j}{p_{jj}} \quad (4)$$

If a Wiener filter function can be designed for the system, eq. 4 becomes the optimal estimation in terms of the least square errors. In addition, ad hoc filter functions, such as a Butterworth function, can be used for w_j to suppress the noise components in the high-frequency regions.

We have also implemented an iterative deconvolution algorithm, which was adapted from the additive simultaneous reconstruction technique (SIRT) algorithm [16]. First, an initial estimate of the original image $\lambda_j^{(0)}$ is obtained by averaging the SBP image

$$\lambda_j^{(0)} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n_i \quad (5)$$

Then the $(n+1)$ -th estimate ($\lambda_j^{(n+1)}$) is obtained from the n -th estimate ($\lambda_j^{(n)}$) as follows:

$$\lambda_j^{(n+1)} = \lambda_j^{(n)} + \sum_i \left(n_i - \sum_k \lambda_k^{(n)} p_{ik} \right) p_{ij} \quad (6)$$

Although spatially variant PSFs can be used for p_{ij} , spatially invariant PSFs have been used in the current work.

A close examination shows that eq. 6 is the iteration term that minimizes the square errors of the SBP image constructed from the estimated source distribution. This can be seen if we recast the steepest descent iteration term from [17].

$$\begin{aligned} \Delta\lambda_j^{(n)} &= -\varepsilon \nabla \chi^2(\lambda_j^{(n)}) \\ &= -\varepsilon \frac{\sum_i \partial \left(n_i - \sum_k \lambda_k^{(n)} p_{ik} \right)^2}{\partial \lambda_j^{(n)}} \\ &= 2\varepsilon \sum_i \left(n_i - \sum_k \lambda_k^{(n)} p_{ik} \right) p_{ij} \end{aligned} \quad (7)$$

where $\Delta\lambda_j^{(n)}$ is the displacement of the estimate in the iteration step, ε is a positive coefficient used to control the iteration. When $\varepsilon = 0.5$, the second term on the right-hand side of eq. 6 is obtained.

Since the PSF has a 3D distribution, 3D deconvolution must be performed in order to reconstruct 3D images. However, when the source distribution can be considered to be 2D, corresponding to the case of a sliced sample, 2D deconvolution is sufficient because there is no contamination from outside of the 2D plane. Thus, we have implemented both 2D and 3D deconvolution algorithms.

PERFORMANCE OF THE PROTOTYPE

The absolute efficiencies for obtaining the full-energy γ -ray peaks from the sources 15 mm away from the center of the front detector are shown in Fig. 3, together with the values estimated by Monte Carlo simulation using a GEANT (GEometry ANd Tracking) [18] code. The experimental values were derived from the experimental data mentioned in the next section. One can see that the GREI system has significant efficiency between the energy range from ~ 200 keV to ~ 2 MeV.

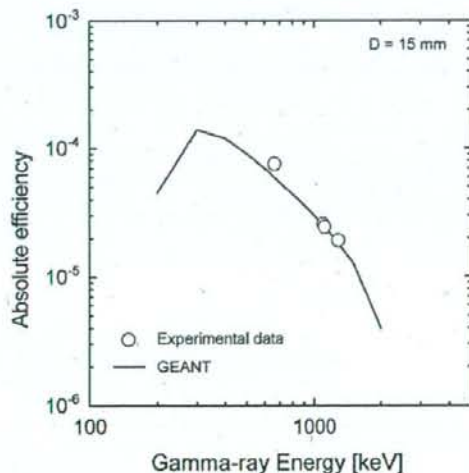


Fig. 3 Absolute efficiencies for obtaining the full-energy γ -ray peaks. The solid line indicates the numerical values calculated with a Monte Carlo simulation code GEANT [18].

The effect of the statistical noise on the spatial resolution achieved with the prototype system was investigated in terms of the Fourier power spectral density (FPSD) of the SBP image. A point-like source of ^{65}Zn , which emits 1116 keV γ -rays, was placed 69 mm away from the center of the front detector, and then three SBP images were constructed in 3D space with the detected event numbers of 1.0×10^4 , 5.0×10^4 , and 1.0×10^5 . Then the SBP images were analytically deconvolved with the PSF constructed using a GEANT code. The full widths at half maximum (FWHMs) of the reconstructed images of the point source are shown in Table 1 for each number of events.

Table 1 Spatial resolution of the reconstructed image in FWHM, and derived transient spatial frequency (f_c) of the FPSD of the SBP image, where the statistical noise components are beginning to dominate. These values were determined for three different numbers of detected Compton scattering events.

| Number of events | FWHM [mm] | | f_c [mm ⁻¹] | |
|-------------------|-------------|-------------|---------------------------|-----------------|
| | x-direction | z-direction | x-direction | z-direction |
| 1.0×10^5 | 4.9 | 11.4 | 0.16 ± 0.02 | 0.06 ± 0.01 |
| 5.0×10^4 | 6.0 | 12.9 | 0.15 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01 |
| 1.0×10^4 | 10.3 | 14.2 | 0.12 ± 0.03 | 0.04 ± 0.01 |

Experiment with biological samples

We have performed experiments with two biological samples in order to demonstrate the capability of nondestructive imaging of a multitracer. The first sample was a soybean plant administered with 310-kBq ^{137}Cs , 89-kBq ^{59}Fe , and 20-kBq ^{65}Zn . A photograph of the sample is shown in Fig. 6. The sample was fixed on a plane 15 mm away from the center of the front Ge detector. The measurement was carried out for 25 h.

Figure 4 shows the results of 2D imaging of the soybean sample. The energy windows were set at each peak position indicated in the γ -ray energy spectrum (Fig. 4a) to distinguish the radionuclides of ^{137}Cs , ^{59}Fe , and ^{65}Zn . The 2D SBP images were constructed for each nuclide on the plane where the sample was fixed, assuming a 2D distribution, and then the analytical reconstruction method was used to deconvolve the 2D SBP images with the 2D PSFs. The resulting images successfully visualized the different behaviors of the nuclides. The ^{137}Cs nuclide was distributed throughout the whole of the sample, because it is chemically analogous to K, while ^{59}Fe and ^{65}Zn remained near the root. The ^{65}Zn nuclide was found at the tip of the stem to some extent, where the plant was actively growing, because Zn is required for cell division.

In addition, we note that there is a difference in the background structure of the images. This is due to the difference in the number of events obtained for each nuclide; 2.5×10^6 , 3.4×10^5 , and 7.3×10^4 for ^{137}Cs , ^{59}Fe , and ^{65}Zn , respectively. The smaller the number of events, the larger the statistical noise component becomes.

The second sample was a tumor-bearing mouse administered intravenously with a multitracer solution that includes 60-kBq ^{65}Zn , 30-kBq ^{59}Fe , and 10-kBq ^{88}Y . The sample was fixed on a board and placed just under the front detector, which was installed with its front face down. The measurement was carried out for 95 h.

Figure 5 shows the results of 2D imaging of the tumor-bearing mouse. As in the case of the soybean sample, the energy windows were set at each peak position indicated in the γ -ray energy spectrum (Fig. 8a) to distinguish the radionuclides of ^{65}Zn , ^{59}Fe , and ^{88}Y . Then the 2D SBP images were constructed for each nuclide on the 2D plane that intersects the tumor part, and the SBP images were analytically deconvolved with the 2D PSFs. The resulting images are only "focused" images along the assumed plane, because the other parts of the sample have some contribution to the constructed 2D SBP

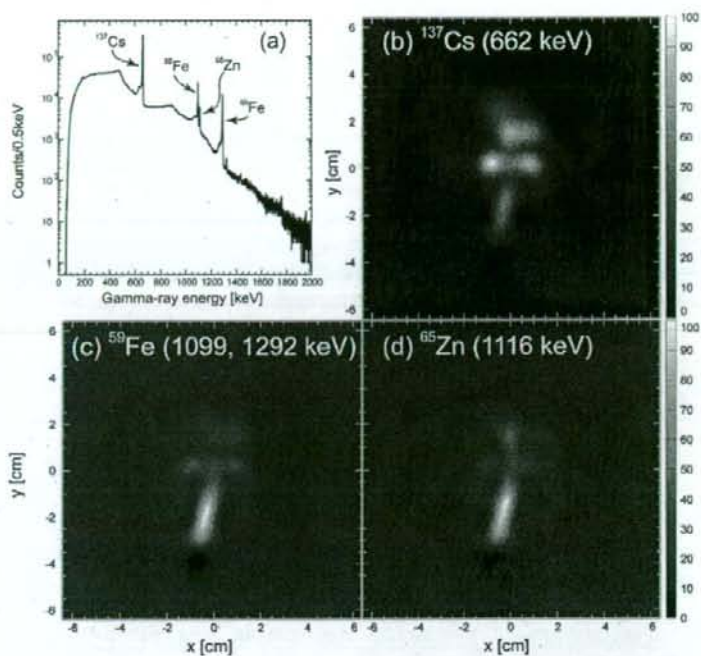


Fig. 4 Results of 2D imaging of the soybean sample.

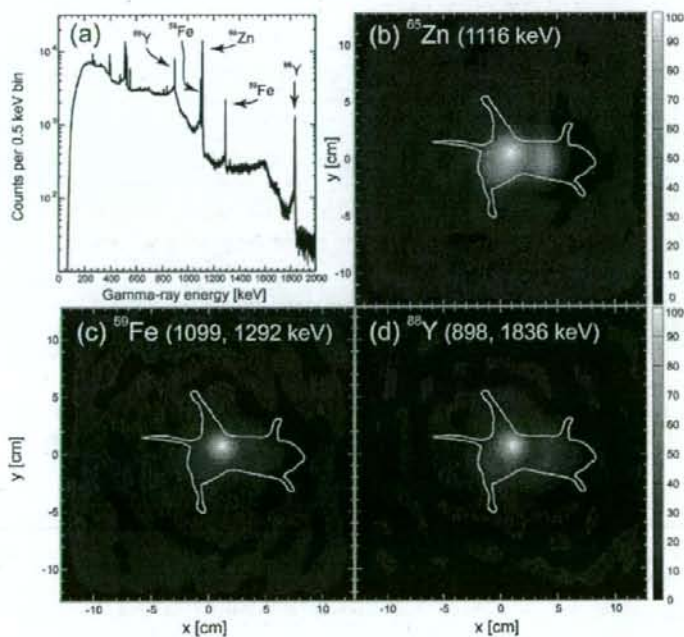


Fig. 5 Results of 2D imaging of the tumor-bearing mouse.

images. Nevertheless, the accumulation of the nuclides in the tumor site was evident and ^{65}Zn was also found in the liver. The results are consistent with those reported in [19–21].

We have performed 3D imaging of these samples, even though the samples were measured from a fixed direction. When the sample is sufficiently close to the front detector, the source distribution can be projected toward various directions because no mechanical collimator is used. This is a distinctive feature of a Compton camera. First, the 3D SBP images were constructed in 3D space, then the SBP images were deconvolved with the 3D PSFs.

Figure 6 shows the result of 3D imaging of ^{137}Cs in the soybean sample. The deconvolution was performed analytically. Since ^{137}Cs was distributed throughout the whole sample, the shape of the sample can be recognized. However, there exists a warp in the reconstructed image, which may have been caused by the use of spatially invariant PSFs.

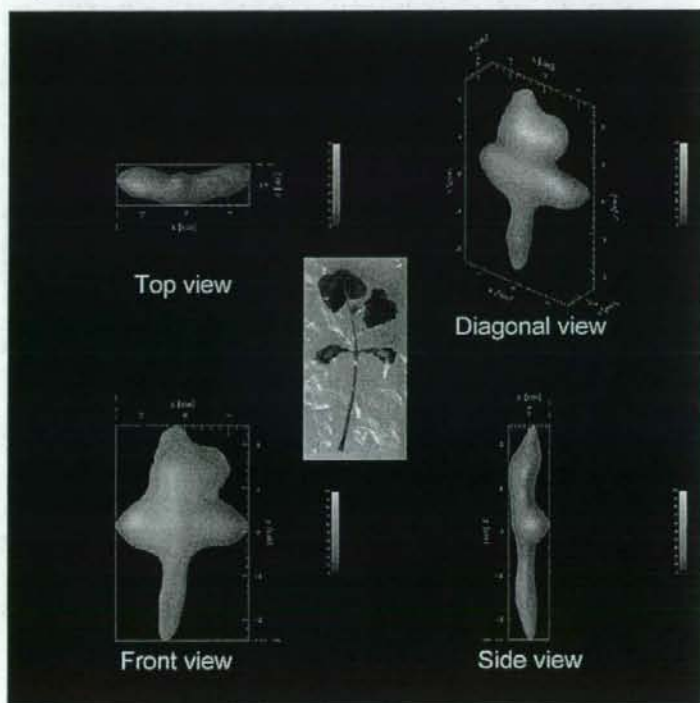


Fig. 6 Three-dimensional image of ^{137}Cs distributed in the soybean sample. A photograph of the sample is also shown at the center.

Figure 7 shows the result of 3D imaging of ^{65}Zn in the tumor-bearing mouse. In this case, we could not obtain any satisfactory images by analytical deconvolution. Thus, the reconstructed space was limited to only the region around the sample, and the iterative deconvolution was performed. The resulting image successfully visualized the accumulation of ^{65}Zn in the tumor and the liver. However, the image has a similar warp to the 3D image of the soybean sample. Spatially variant PSFs should be incorporated to obtain more accurate images.

We were able to demonstrate the feasibility of using the GREI system for nondestructive imaging of multitracer. Recently, we were succeeded in imaging dynamic metabolic processes of three radio-

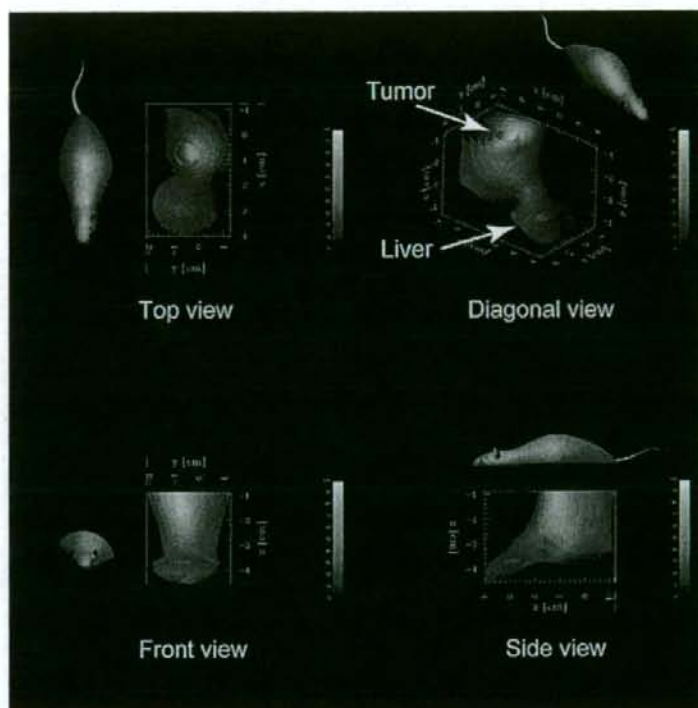


Fig. 7 3D image of ^{65}Zn distributed in the tumor-bearing mouse. The orientations of the sample are indicated by the mouse figures.

active medicines that were simultaneously administered [22]. However, the measurement times taken to obtain the images would be unsuitable for practical imaging, although they can be shortened to about 10 h if more intense γ -ray sources are used. Moreover, a higher spatial resolution would be desired to observe more fine structure. These demands would be met if the γ -ray tracking technique and pulse-shape analysis are implemented, which have been recently developed [23]. With these techniques implemented, the efficiency and the intrinsic characteristics are improved, thereby shortening the measurement time and improving the spatial resolution.

SUMMARY

A prototype of a Compton camera, GREI, has been fabricated for nondestructive imaging of a multi-tracer. It is composed of two double-sided orthogonal-strip Ge detectors, and the efficiency is significant in the energy range from ~ 200 keV to 2 MeV. The timing method was used to derive the depth position of the γ -ray interaction with a resolution of ~ 1 mm FWHM. Both analytical and iterative image reconstruction methods were implemented for 2D and 3D imaging. A test experiment was performed to demonstrate the capability of the GREI system. The resulting images successfully visualized the different behavior of each nuclide for both the soybean and the mouse sample. Furthermore, 3D images were obtained even though the samples were measured from a fixed direction. However, there was some distortion in the 3D images, which may have been caused by the use of spatially invariant PSFs. Spatially variant PSFs should be incorporated to obtain more accurate 3D images. To make the GREI

system suitable for practical imaging, γ -ray tracking technique and pulse-shape analysis should be implemented.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and by a Grant for Nano Medicine Research of the New Energy and Industrial Technology Development Organization of Japan. We thank Dr. R. Hirunuma and Dr. H. Takeichi for supporting the technical treatments.

REFERENCES

1. S. Ambe, S. Y. Chen, Y. Ohkubo, Y. Kobayashi, M. Iwamoto, M. Yanokura, F. Ambe. *Chem. Lett.* **20**, 149 (1991).
2. H. Haba, D. Kaji, Y. Kanayama, K. Igarashi, S. Enomoto. *Radiochim. Acta* **93**, 539 (2005).
3. S. Enomoto. *Biomed. Res. Trace Elem.* **16**, 233 (2005).
4. V. Schönfelder, A. Hirner, K. Schneider. *Nucl. Instrum. Methods* **107**, 385 (1973).
5. R. W. Todd, J. M. Nightingale, D. B. Everett. *Nature* **251**, 132 (1974).
6. G. W. Phillips. *Nucl. Instrum. Methods B* **99**, 674 (1995).
7. Y. F. Yang, Y. Gono, S. Motomura, S. Enomoto, Y. Yano. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **48**, 656 (2001).
8. Y. F. Yang, Y. Gono, S. Motomura, S. Enomoto, Y. Yano. *Nucl. Instrum. Methods A* **482**, 806 (2002).
9. M. Momayezi, W. K. Warburton, R. Kroeger. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **3768**, 530 (1999).
10. M. Amman, P. N. Luke. *Nucl. Instrum. Methods A* **452**, 155 (2000).
11. E. A. Wulf, J. Ampe, W. N. Johnson, R. A. Kroeger, J. D. Kurfess, B. F. Philips. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **49**, 1876 (2002).
12. E. A. Wulf, B. F. Philips, W. N. Johnson, R. A. Kroeger, J. D. Kurfess, E. I. Novikova. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **50**, 1182 (2003).
13. S. Motomura, S. Enomoto, H. Haba, K. Igarashi, Y. Gono, Y. Yano. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **54**, 710 (2007).
14. S. Kabuki, K. Hattori, R. Kohara, E. Kunieda, A. Kubo, H. Kubo, K. Miuchi, T. Nakahara, T. Nagayoshi, H. Nishimura, Y. Okada, R. Orito, H. Sekiya, T. Shirahata, A. Takada, K. Ueno. *Nucl. Instrum. Methods A* **580**, 1031 (2007).
15. R. C. Rohe, M. M. Sharfi, K. A. Kecevar, J. D. Valentine, C. Bonnerave. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **44**, 2477 (1997).
16. P. Gilbert. *J. Theor. Biol.* **36**, 105 (1972).
17. W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, 2nd ed., p. 681, Cambridge University Press, Cambridge (1992).
18. GEANT, Detector Description and Simulation Tool, CERN, Geneva (1993).
19. H. Tamano, S. Enomoto, B. Liu, A. Takeda. *Biomed. Res. Trace Elem.* **12**, 96 (2001).
20. H. Tamano, S. Enomoto, N. Oku, A. Takeda. *Nucl. Med. Biol.* **29**, 505 (2002).
21. A. Takeda, H. Tamano, S. Enomoto, N. Oku. *Cancer Res.* **61**, 065 (2001).
22. S. Motomura, Y. Kanayama, H. Haba, Y. Watanabe, S. Enomoto. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1089 (2008).
23. K. Vetter, M. Burks, L. Mihailescu. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **525**, 322 (2004).