

Multiple molecular simultaneous imaging in a live mouse using semiconductor Compton camera†

Shinji Motomura,^a Yousuke Kanayama,^a Hiromitsu Haba,^b Yasuyoshi Watanabe^b and Shuichi Enomoto^{*ab}

Received 20th February 2008, Accepted 11th June 2008

First published as an Advance Article on the web 8th July 2008

DOI: 10.1039/b802964d

We have demonstrated the feasibility of semiconductor Compton cameras for multiple molecular imaging in nuclear medicine. The Compton camera used in this work comprises two double-sided orthogonal-strip germanium detectors, and their excellent energy resolution enabled discrimination of the nuclides and accurate determination of the scattering angle for γ rays in wide energy range. Three radioactive tracers of $^{65}\text{ZnCl}_2$, $^{85}\text{SrCl}_2$, and iodinated (^{131}I) methylnorcholesterol were injected to a living mouse and were measured simultaneously. Both two- and three-dimensional images of each tracer were obtained by a fixed-angle imaging with a single Compton camera, which reflected the different *in vivo* behavior of them.

Introduction

Molecular imaging technology has extended the nuclear medical imaging modalities to visualize specific biological functions and processes in living subjects. The established nuclear medical imaging technologies, namely positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT), have already achieved great success in clinical application because they can conduct noninvasive metabolic imaging in deep tissue. Since PET utilizes coincidence measurement of a pair of 511 keV annihilation photons of a positron and an electron, it provides images of PET imaging agents with high sensitivity, high resolution and high quantitation. On the other hand, SPECT can obtain images of γ -ray emitting tracers with

energy less than ~ 300 keV, though it needs mechanical collimators to determine the lines of projection. Thus, molecular imaging can be realized by labeling the γ -ray- or positron-emitting radionuclides on a specific molecular probe, which is a natural extension of nuclear medicine. The imaging modalities are extensively used for the visualization of changes in the anatomy and function of various organs in several different disorders as well as in following abnormalities or treatment effects longitudinally.

The next extension of the nuclear medicine would be multiple molecular imaging that can provide multidimensional images of correlated molecular events. As most people admit, biological processes in living subjects are quite complex. Thus, a single molecular probe may not be able to characterize the targeted disease or biological function, that is, one may need to use

^aMolecular Imaging Research Program, RIKEN Kobe Institute, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-0047, Japan. E-mail: motomura@riken.jp

^bMetallomics Research Unit, RIKEN Wako Institute, Wako, Saitama, 351-0198, Japan. E-mail: semo@riken.jp

† Presented at the International Symposium on Metallomics 2007, Nagoya, Japan, November 28–December 1, 2007.

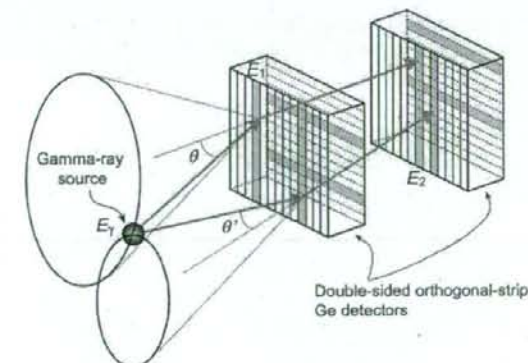


Fig. 1 Schematic diagram of the principle of γ -ray imaging with the GREI apparatus.²

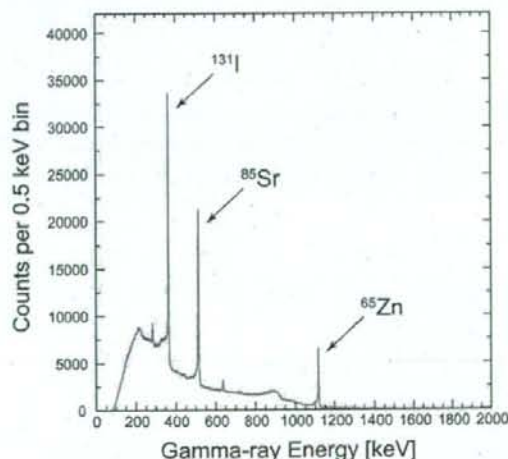


Fig. 2 Measured γ -ray energy spectrum. The tracers of ^{65}Zn , ^{131}I , and ^{85}Sr were clearly identified by the 1115.5, 364.5 and 514.0 keV photopeaks, respectively.

multiple molecular probes at the same time. This also means that more advanced and accurate diagnosis would be possible if we can simultaneously use multiple molecular probes with different characteristics. However, PET would not be suitable for multiple molecular imaging, because it works only for positron emitting nuclides and it is difficult to distinguish them. Though multiple tracer imaging by SPECT has been attempted, the γ -ray energy is limited to less than ~ 300 keV, which also limits the choice of radionuclides for labeling while there are more choices of radionuclides available.¹

The GREI apparatus,² which is a semiconductor Compton camera named after γ -ray emission imaging, is a promising γ -ray imager being developed for multiple molecular imaging. It is composed of two double-sided orthogonal-strip germanium detectors arranged in parallel (Fig. 1), and the excellent energy resolution allows discrimination of each nuclide simultaneously injected. Furthermore, since Compton cameras need no mechanical collimators, there is no loss of γ rays caused by the collimation, and multidirectional projection of the γ -ray source distribution can be obtained even by fixed-angle imaging with

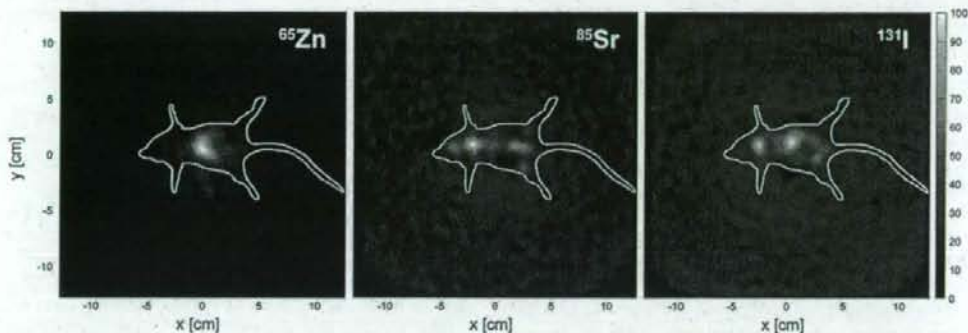


Fig. 3 Results of 2D image reconstruction.

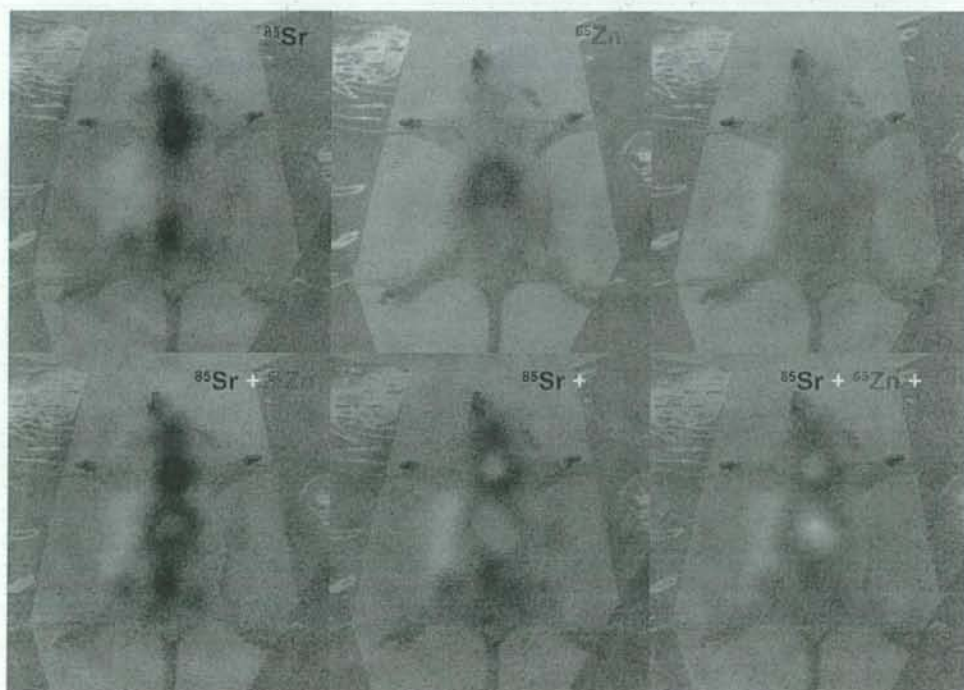


Fig. 4 Example of representing the 2D reconstructed images.

a single Compton camera. Thus, multiple molecular imaging is a natural application of GREI.

In this work, we tried to demonstrate the concept of multiple molecular imaging with semiconductor Compton cameras, by showing simultaneous imaging of different γ -ray emitting radionuclides in wide energy range. Three radioactive tracers were simultaneously injected to a live mouse, including a SPECT imaging agent that can visualize some biological functions, and simultaneous imaging of the tracers was performed by using a prototype of a GREI apparatus.

Demonstration of multiple molecular imaging in live mouse

The experimental animal was a male normal ICR mouse at 8 weeks of age. Three radioactive tracers were intravenously injected to the mouse by the following procedures: (1) iodinated (^{125}I) methylnorcholesterol (18.5 MBq) was injected by dividing into three doses, injected 5-, 4- and 3-days prior to the imaging. To allow dissociated ^{131}I to be uptaken to the thyroid gland, no thyroid blocking agent was used. (2) $^{85}\text{SrCl}_2$ -saline (2.0 MBq) was injected 1 day prior to the imaging. (3) $^{65}\text{ZnCl}_2$ -saline (2.0 MBq) was injected 25 minutes prior to the imaging. The mouse was bound to the imaging stage equipped with a worming pad. The imager was installed front face down right above the imaging stage. The distance between the stage surface and the front detector of the GREI apparatus was 45 mm. The imaging was

carried out for 12 hours, with the mouse treated under Nembutal anesthesia. The acquired data were analyzed on-line for checking, and also recorded in list-mode with real time and live time information for further off-line analysis. The experiment had been approved by Wako Animal Experiment Committee of RIKEN, and was performed in compliance with Regulations for the Animal Experiments of RIKEN and related laws.

Results and discussion

Two-dimensional (2D), and three dimensional (3D) images were reconstructed from the data acquired from the live-mouse imaging experiment, by adopting the image-reconstruction methods described in ref. 2. For the 2D images, a horizontal (coronal) plane at 34 mm from the front detector was chosen, which intersects the approximate center of the mouse body.

Fig. 2 shows the γ -ray energy spectrum constructed from the acquired data. Image reconstruction was carried out for each tracer by setting ± 5 keV energy windows around each specific γ -ray photopeak.

The *in vivo* behavior of the tracers used in this work has been well studied.³⁻⁶ ^{65}Zn accumulates in the liver and the tumor; ^{85}Sr is a bone seeking nuclide; and iodinated (^{125}I) methylnorcholesterol accumulates in the adrenal glands, and dissociated ^{131}I accumulates in the thyroid gland if no thyroid blocking agent is used.

Fig. 3 shows the results of the 2D image reconstruction. As mentioned in ref. 2, the 2D images do not represent true tomographic slices because they ignore the tracer distribution outside

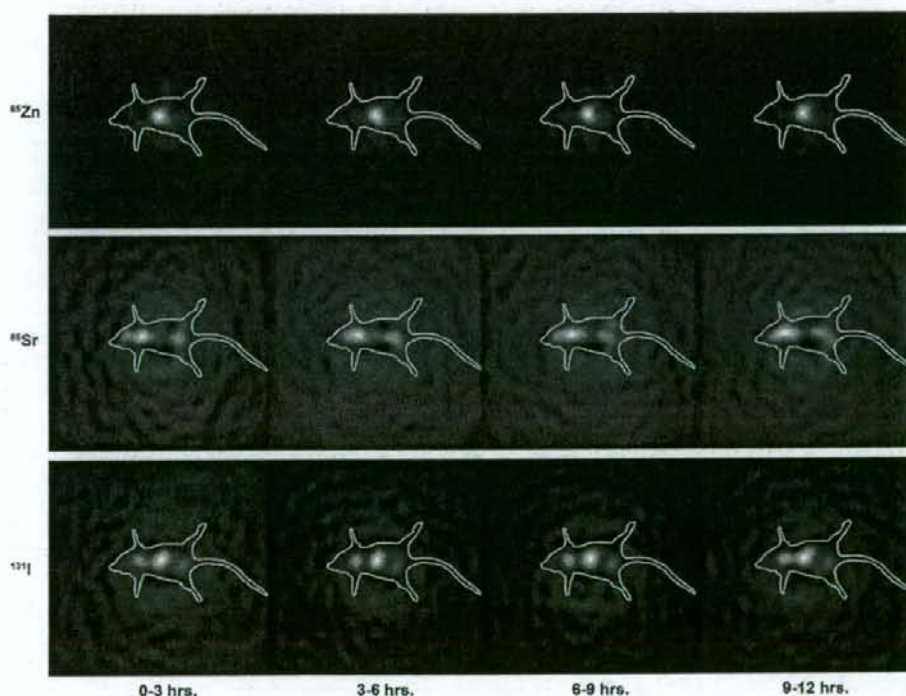


Fig. 5 Sequential images of each tracer, reconstructed for each time span.

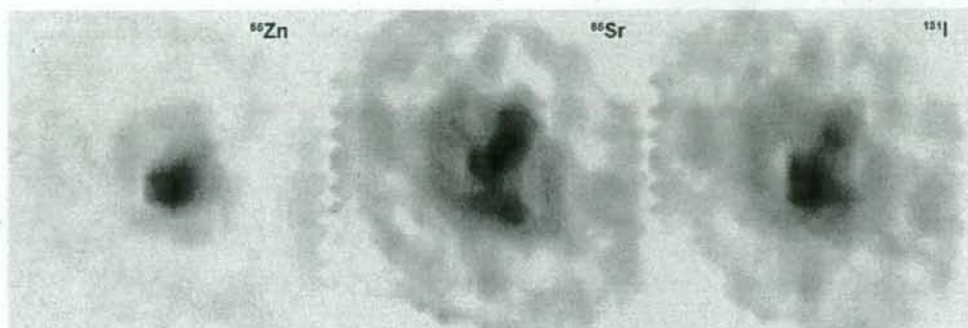


Fig. 6 Maximum intensity projection images of 3D reconstructed images for ^{66}Zn , ^{86}Sr and ^{131}I .

the 2D plane. However, the 2D images have apparently represented the characteristic behavior of each tracer, that is: ^{66}Zn accumulated in the liver; ^{86}Sr accumulated along bones; and ^{131}I accumulated in the adrenal glands, and dissociated ^{131}I accumulated in the thyroid gland.

Fig. 4 shows some examples of representing the 2D images. The image intensities of ^{66}Zn , ^{131}I and ^{86}Sr were assigned red, green and blue colored pixels, respectively, and overlaid with the photograph of the mouse. By using this method, any two or three tracers could be displayed in one picture.

Fig. 5 shows the sequential images of each tracer that could show the dynamic metabolic processes, constructed for each time span of 0 to 3, 3 to 6, 6 to 9 and 9 to 12 h. The time spans are variable by changing the sectioning of the list-mode data. In the figures, little significant change of tracer distribution was observed, showing the equilibrium state of the tracer concentration during the imaging time.

In order to obtain true tomographic images, 3D image reconstruction was performed. Fig. 6 shows the maximum intensity projection images of the 3D reconstructed images in tilted view, though they are still preliminary results. However, the different distribution suggests that the characteristic behavior of each tracer was represented in the figures, and the 3D distribution was able to be reconstructed.

As shown above, we were able to obtain quite encouraging results for multiple molecular imaging by use of semiconductor Compton cameras. However, a higher spatial resolution, a shorter imaging time, and quantitation would be required for more practical use. Our preliminary estimation has shown that a spatial resolution of less than 1 mm and about ten times improved detection efficiency could be achieved. And also importantly, targeted molecular events and efficacious molecular probes must be developed to extract full potential of multiple molecular imaging with GREI. Though the cost is one of the major problems for germanium semiconductor detectors, whether it is expensive or not depends on the importance of the targeted molecular events. We are pursuing research and development on these requirements, and we believe that they will be met in the not too distant future.

Conclusions

We demonstrated the concept of multiple molecular imaging by use of semiconductor Compton cameras. The GREI apparatus, which is a Compton camera consisting of two double-sided orthogonal-strip Ge detectors, was used for the γ -ray imaging. Three radioactive tracers of $^{66}\text{ZnCl}_2$, $^{86}\text{SrCl}_2$, and iodinated (^{131}I) methylnorcholesterol were simultaneously administered to a mouse, and the γ -ray imaging was carried out for 12 hours with the mouse treated under anesthesia. We were able to obtain 2D and 3D images of the tracers simultaneously, which showed the potential of GREI apparatus as a multiple molecular imager. We are pursuing research and development to realize the full potential of multiple molecular imaging with semiconductor Compton cameras.

Acknowledgements

This research was supported by Molecular Imaging Research Program of Japan's Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Grants-in-aid for Scientific Research of Japan's Ministry of Health, Labor and Welfare, and R&D project of Molecule Imaging Equipment for Malignant Tumor Therapy Support of New Energy and Industrial Technology Development Organization.

References

- 1 H. Haba, D. Kaji, Y. Kanayama, K. Igarashi and S. Enomoto, *Radiochim. Acta*, 2005, **93**, 539–542.
- 2 S. Motomura, S. Enomoto, H. Haba, K. Igarashi, Y. Gono and Y. Yano, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 2007, **54**, 710.
- 3 *Heavy Metals in the Environment*, ed. B. Sarkar, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2002.
- 4 C. Reilly, *The Nutritional Trace Metals*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2004.
- 5 S. Enomoto, *Biomed. Res. Trace Elem.*, 2005, **16**, 233.
- 6 M. Kojima, M. Maeda, H. Ogawa, K. Nitta and T. Ito, *J. Nucl. Med.*, 1975, **16**, 666.



展TENBO望

マルチトレーサの開発と利用



榎本 秀一
Enomoto Shuichi



羽場 宏光
Haba Hiromitsu

(独立行政法人理化学研究所)

1 はじめに

放射性同位元素 (RI) を利用した研究は、広範な分野において応用研究が展開され、基礎から臨床応用まで含めて多くの成果が報告されている。生体における必須微量元素や環境中から曝露される様々な元素に関する研究において、RI の有用性は言及する必要もないであろう。我が国におけるトレーサ技術の利用は、1950 年代ころから始まり、医学、薬学、生物学、農学、栄養学、環境科学などの広範な応用研究に用いられるようになってきた。これらの研究は、RI を使用しない他の手法に比べて、極めて感度が高い点が特筆すべきことである。RI トレーサ法は担体を含まないか、極微量の RI と同じ元素の安定同位体を含んでいる。また、RI を用いてラベルした化合物を用いて研究する場合もラベルしていない物質や化合物と化学的にもほぼ同等であり、代謝バランスや生理的状态に影響をほとんど与えることなく、ダイナミクスを反映している。

本稿では生体微量元素研究を始めとするさま

ざまな研究のツールとして用いられているマルチトレーサ法 (多元素同時代謝追跡法) の開発と最近の利用研究に触れたい。

2 マルチトレーサ法

マルチトレーサ法は、1991 年に理化学研究所 (理研) の安部文敏主任研究員らによって考案された¹⁾。これは理研の加速器施設 (現 仁科加速器研究センター) のリングサイクロトロンで加速される重イオンの多様性とそのエネルギー領域での核反応の特徴を生かし、多数の元素についてその化学的、生物学的挙動の同時追跡を可能にする新しいトレーサ技術であり、マルチトレーサ法と命名された。1994 年に著者らは、動物における微量元素研究にマルチトレーサ法が有効であることを予測し、微量元素の生体内挙動に関する知見と従来の研究成果の比較をすることから研究をスタートした。現在まで生物、医学、化学、環境科学など多くの研究分野でマルチトレーサ法を用いた応用研究がなされている。詳細は著者の総説などを参照いただ

きたい²⁾。

1991年から2003年まで安部らの作成した落送管式マルチトレーサ製造装置が稼動してきたが、マルチトレーサのユーザー増加と効率的製造法の確立を目指し、2003年後半より、照射システムの抜本的改良を行い、これによって製造技術は高度化され、高効率化と製造のオンライン化も行われた³⁾。現在、理研の加速器施設に設置されているマルチトレーサ製造ラインの模式図を図1に装置の写真を図2に示す。近年、京都大学の柴田誠一らは、原子炉を利用した核分裂生成物を用いたFissionマルチトレーサも実用化し、環境科学分野の応用研究が推進されている⁴⁾。

マルチトレーサ法は、同時に製造した多数の元素のRIを用いることにより、多数の元素についてその物理的、化学的、生物学的挙動の同時追跡を可能にするトレーサ技術である。RIトレーサは、これまで単独で、あるいは、ごく少数のトレーサを組み合わせられてきた。しかし、半導体検出器とコンピュータの普及で、 γ 線放出核については、多数のRIからの

γ 線を同時に測定し、データ処理によって個々のRIを定量することが容易になった。RIはそれぞれ固有のエネルギーの γ 線(多くの場合複数)を放出するが、高純度Ge半導体検出器を使うと、これらの γ 線スペクトルを高分解能で測定できる。多数のRIが共存する場合、スペクトル線の一部は重なり合うが、既存のプログラムで解析することができる。実際、原子炉を用いた機器中性子放射化分析法ではこの技術が一般に使われている。

理研リングサイクロトロンはTaまでのイオンを加速する性能を持つ重イオン加速器で、C、N、Oなどのイオンは核子(原子核中の陽子と中性子)1個当たり135 MeV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た部分が互いに破砕される核破砕反応(Nuclear Fragmentation Reaction)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仕方は様々なので、多様な放射性核種が生成し、

マルチトレーサ製造装置

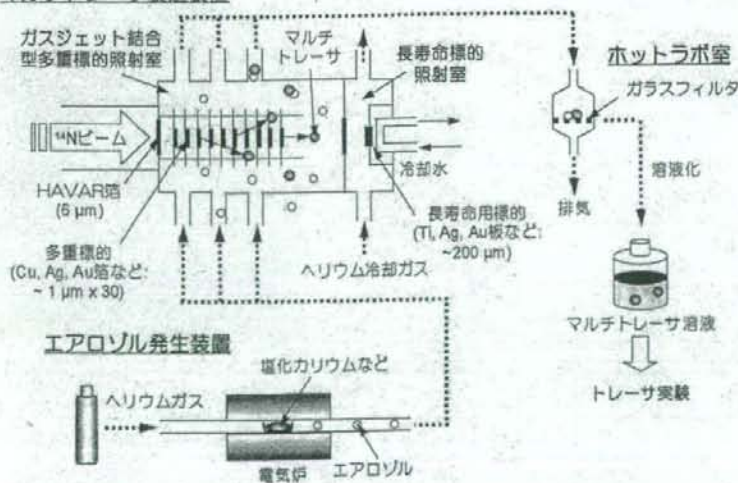


図1 理研リングサイクロトロンによるマルチトレーサの製造、ガスジェット結合型多重ターゲット照射システムの概略図

その多くは γ 線放出体である。この核反応を利用してマルチトレーサを製造する。ターゲットとしては、Au, Ag, Tiなどを兼用しており、ターゲット中にはターゲット物質に応じて、多数の元素のRIが生成するので、その中の γ 線放出体を利用する。一般には、ターゲットより原子番号の少ないすべての元素の原子核ができる。これまでに製造されたマルチトレーサに γ 線放出体が含まれる元素を図3の周期表上に示した。Ti以上の元素については現在、利用者がほとんどないので、製造技術開発は行っていない。Sb以下で白抜きのままに残っているのは主として適当な半減期の γ 線放出体のない元素である。重イオンの照射後、ターゲットを酸に溶解し、担体であるターゲット物質を化学的に除去すれば、多数の元素のRIを含むマルチトレーサ溶液が得られる。これらのRIは、い

わゆる無担体の状態、すなわち各RIの安定同位体をほとんど含まない状態で得られる。また、化学分離操作を工夫することで、分離操作に由来する塩（例えばNaCl）を含まない状態でも得ることができる。このようにして得られたマルチトレーサは、そのまま、あるいは必要に応じてさらに群分離を行ってグループトレーサとし、種々の系について多数の元素の物理的、化学的、生物学的挙動の同時追跡に用いる。マルチトレーサ中に含まれる多数のRIの個々の定量は、試料の γ 線スペクトルを高純度Ge半導体検出器で測定し、得られるスペクトルを計算機処理して行う。昨今は、マルチトレーサでスクリーニングして、めぼしをつけた興味深い振舞いの元素をAVFサイクロトロンでシングルトレーサとして製造し、それをを用いて詳細な研究が進められるケースも多い。また、最

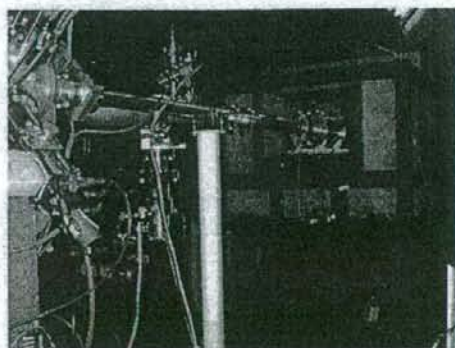
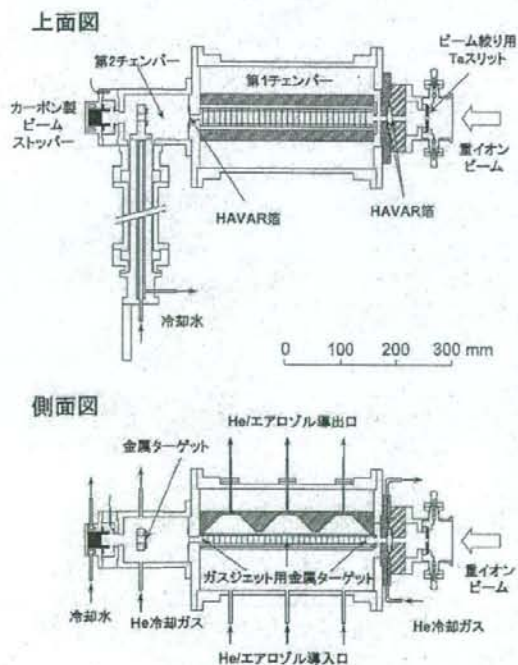


図2 理研リングサイクロトロンによるマルチトレーサの製造、ガスジェット結合型多重ターゲット照射システムの写真

近、著者らの開発しているコンプトンカメラ方式による複数分子同時ガンマ線イメージング装置 GREI (γ -ray Emission Imaging) は、マルチトレーサのような複数核種の同時非破壊イメージングにも応用できるので、その装置の開発は、新しい分子イメージング装置としてのみならず、マルチトレーサの研究にとっても有用となることが期待されている^{5,6)}。

3 現在稼働しているマルチトレーサ製造ラインによるマルチトレーサ製造

理研リングサイクロトロンによって核子当たり 135 MeV まで加速した ^{14}N ビームを通常、銀板や金板などの標的に照射し、図 1, 2 に示した装置でマルチトレーサを製造している。本装置の特徴は、比較的短寿命の RI 製造を目的としたガスジェット結合型多重標的照射室(新システム)と長寿命 RI の製造(従来のマルチトレーサと同じ)を目的とした照射室に分かれていることである。高真空 ($\sim 10^{-6}$ Pa) のビームラインとヘリウムガス (~ 100 kPa) で満たされた 2 つの照射室の間は、それぞれ厚さ $6 \mu\text{m}$ の HAVAR 箔で仕切られている。 ^{14}N ビームは、まず 10 mm の間隔を空けてスタックされた厚

さ数 μm の標的を 30 枚貫く。エアロゾル発生装置で生成した塩化カリウムのエアロゾルは、ヘリウムガスをキャリアーとして照射室に導入される。核反応で標的から反跳分離されたマルチトレーサは、ヘリウムガス中で減速され、エアロゾルに吸着され、ガスジェットによって数秒のうちに地下のホットラボ室へ輸送される。ホットラボ室では、マルチトレーサを吸着したエアロゾルはガラスフィルタに捕集され、これを任意の溶液に溶解することによって直ちに応用研究可能なマルチトレーサ溶液が得られる。この方法では標的からの RI の化学分離が不要で、数秒程度の短寿命の RI までを研究の対象とできる特徴がある。周期表上のあらゆる元素を標的とでき、標的のスタック構成をアレンジすることでマルチトレーサに含まれる核種の種類や数量を最適化できる。さらに、ガスジェットを自動化学分離装置と結合すれば、特定の RI をイオン交換法や溶媒抽出法により濃縮分離でき、ユーザーの研究対象となる RI のみを含んだマルチトレーサも製造できる。本装置の性能試験として、著者らは、厚さ $2 \mu\text{m}$ の銅標的を 30 枚用いてマルチトレーサ製造実験を行った³⁾。半減期 1 分以上の核種を対象に製造実

H																	He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	**																
* ランタノイド		La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
** アクチノイド		Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		

図3 マルチトレーサ中に含まれる γ 線放出核種 シャドーのついている元素はマルチトレーサ中に含まれている。照射ターゲットは、Ti, Fe, Cu, Ge, Ag 及び Au などを利用する

験を行ったところ、 γ 線スペクトロメトリーによって ^{24}Na から ^{61}Cu までの18元素50核種のRIが利用可能であった。ガスジェット結合型多重標的照射室を貫いたビームは、長寿命RIの製造を目的とした照射室に入る。ここでは、厚さ200 μm 程度のチタン、銀や金などの標的が数枚照射される。標的は、水とヘリウムガスによって効率的に冷却され、最大700 μA の ^{14}N ビーム強度まで照射実績がある。照射後、標的物質を化学的手法によって除去すれば、マルチトレーサ溶液が得られる。

4 マルチトレーサ法の特長

マルチトレーサ法には様々な特長がある。まず、第1は高能率化である。すなわち、1回の実験で十数種から数十種の元素について情報が得られる。その波及効果として、これまでトレーサの利用が考えられなかった新しい対象への適用が考えられる。例えば、ある系で一定の挙動を示す元素を探したいとする。従来のトレーサ法では1つ1つの元素についてRIトレーサを入手し、次々と実験していかなければならない。これに対してマルチトレーサを利用すれば、1回の実験で目的を果たすことができる。第2には、これらの情報が完全に同一の条件下で得られることである。多数の元素の挙動を比較する場合、これまでのシングルトレーサ法では、個々の元素について別々に実験して得られたデータを基に議論されてきた。多くの場合、別々のグループにより報告されたデータが集められ、考察の基礎とされてきた。しかし、これは多くの場合かなり問題で、試料差、個体差の大きい地球環境試料や生体試料については、マルチトレーサ法によって、同時に完全に同一の条件下で多数の元素についてデータが得られることは、それらの相互比較において極めて重要である。第3には、マルチトレーサ法では、RIが無担体で得られることである。RIの放出する放射線は高い感度で検出できることから、ト

レーサとして使用する際には、pgのオーダーで十分である。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。AsやHgのように毒性の強い元素を正常な個体に投与して追跡しようとするとき、これは大きな問題になる。この点、マルチトレーサ法では、RIだけを投与できるため、投与量が微量ですみ、毒性をほとんど無視することができる。逆に、担体が含まれるほうが好ましい実験では、これを加えることは容易である。第4には、マルチトレーサは意外な発見の可能性、いわゆるセレンディビティーを持っていることである。多くの元素について、“情報が得られてしまう”ため、必ずしも意図していなかった元素について予想もしなかった新しい事実が見つかる可能性がある。これは、個々に入手したRIを自分で混ぜたのでは起こり得ないことである。さらに、マルチトレーサは現在でも50種類を超える元素に適用可能で、今後その数はさらに増加していくはずであるが、既に、シングルトレーサとしても貴重な ^{28}Mg や ^{47}Ca などを含んでいる。 ^{28}Mg は実用性のあるMgのトレーサとしては唯一のものであるが、一般には供給されていない。Caのトレーサとしては ^{45}Ca が広く使われているが、このRIはほとんど γ 線を放出せず、 β 線測定をしなければならない。これに対して ^{47}Ca は γ 線放出体であるので、多くの実験で極めて有利である。

5 最近の応用研究

マルチトレーサの応用研究は、多くの分野にわたっており、今日も多くの研究成果が出されている。2005年までの成果は、既に総説で紹介している²⁾、これ以降の応用研究について簡単に紹介したい。

昭和薬科大学の松本謙一郎(現放射線医学総合研究所)らは、高純度Ge半導体検出器に鉛のコリメータを装着し、ラットに銀由来のマ

マルチトレーサを投与し、その個体を生きたままの代謝過程追跡実験を行い、複数核種の検出効率を求めた。一般にマルチトレーサのユーザーは、動物に投与後、経時的に解剖を行い、それぞれの臓器分布を測定することが多いが、GREIの開発にも有益な基礎データを提供した論文として興味深い⁷⁾。金沢大学の金山洋介(現 理化学研究所神戸・分子イメージング)らは、マウスにおけるRbとTlの嗅覚輸送系を利用した脳内RI投与経路に関する研究を報告している⁸⁾。彼らは、鼻腔粘膜上にマルチトレーサを投与し、嗅神経系を介した軸索輸送過程を脳の詳細な分布測定で再構成することに成功している。一方、昭和薬科大学の近藤昌夫(現大阪大学薬学部)らのグループは、妊娠時における胎児と母体の亜鉛輸送に関する一連の実験系で、ヒトトロプラストBeWo細胞におけるフォスコリンにより亜鉛輸送の誘導に関する研究を行い亜鉛トランスポーター1,2及び4のメッセンジャーRNAレベルがフォスコリンの投与で上昇することを示し、胎盤の分子生物学的研究のアプローチにおける亜鉛輸送の研究に有益な実験系であることを証明している⁹⁾。静岡大学の矢水誠人らのグループは、亜鉛欠乏マウスにおける肝臓の蛋白質分画を詳細に行い、マルチトレーサにより投与された元素の分布状態を明らかにしている¹⁰⁾。また、栄養学の研究では、理研の五十嵐香織らが、鉄欠乏貧血に対する鉄強化剤としてNaFeEDTAを使用した場合のほかの必須元素の取り込みに対する影響を検討し、NaFeEDTAの有用性を証明した¹¹⁾。さらに、前に述べたように理研の本村信治らは、GREI装置による世界初の複数分子同時イメージングの成功を報告している^{5,6)}。環境科学の分野の研究では、広島大学の高橋嘉夫らのグループが、海水と海底沈降物におけるReとOsの還元的条件における蓄積について、マルチトレーサ法で検討した報告がある¹²⁾。すなわち、ReとOsの海水中での存在度と濃縮のメカニズムはいまだに理解されていないが、実験室におい

て人工海水-東京湾堆積物間におけるReとOsの吸着挙動を^{13)Re}と^{13)Os}を含んだマルチトレーサを用いて調べた他にも様々な応用研究が進められ、マルチトレーサ法にXAFS法を組み合わせることによってReとOsの化学種の同定を行い、海水-堆積物系における還元的集積メカニズムを明らかにした。また、同じく広島大学の高橋嘉夫らのグループは、土壌-水間における様々な元素のダイナミクスを解明するため、マルチトレーサ法とICP-MS法を組み合わせたユニークな実験手法を確立した¹³⁾。他にも多くの応用研究の報告もあるが今後、マルチトレーサ研究は分子イメージング研究を含めた、広い応用研究が進められていくことであろう。

マルチトレーサならびにGREIの研究には、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費、NEDO研究費などの研究費により遂行された。

参考文献

- ・ N. Lowe, and M. Jackson, Eds., *Advances in Isotope Methods for the Analysis of Trace Elements in Man*, CRC Press, Washington, D. C., (2001)
- ・ F. Ambe, S. Ambe, and S. Enomoto, *Tracer Technique*, 443-474, A. Vertes, S. Nagy, Z. Klencsar, Eds., *Chemical Applications of Nuclear Reaction and Radiation*, Kluwer Academic Publishers, London, (2003)
- ・ A. Vertes, S. Nagy, Z. Klencsar, Eds., *Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, Kluwer Academic Publishers, London, (2003)
- ・ 榎本秀一, 多元素同時分析法としてのマルチトレーサ法とその応用研究およびRIビームファクトリー計画における新展開, *RADIOISOTOPES*, 52, 631-647(2003)
- ・ D. Nayak, *Appl. Radiat. Isotopes*, 54, 195(2001)

引用文献

- 1) S. Ambe, S. Y. Chen, Y. Ohkubo, Y. Kobayashi, M. Iwamoto, M. Yanokura, and F. Ambe, Preparation of radioactive multitracer solution from gold foil irradiated by 135 MeV/nucleon ¹⁴N ions, *Chem. Lett.*, 149-152(1991)
- 2) 榎本秀一, 多元素同時分析法としてのマルチ

- トレーサー法とその応用研究およびRIビームファクトリー計画における新展開, *RADIO-ISOTOPES*, **52**, 631-647(2003). および S. Enomoto, Development of Multitracer Technology and Application Studies on Biotrace Element Research. *Biomed. Res. Trace Elem.* **16**, 233-240(2005)
- 3) H. Haba, D. Kaji, Y. Kanayama, K. Igarashi, and S. Enomoto, Development of a gas-jet-coupled multitarget system for multitracer production, *Radiochim. Acta*, **93**, 1-4(2005)
 - 4) S. Shibata, K. Takamiya, T. Ichihara, and T. Sasaki, Separation of radionuclides in a multitracer prepared by thermal neutron fission of ^{235}U , *Appl. Radiation Isotopes*, **60**, 625-628(2004)
 - 5) S. Motomura, S. Enomoto, H. Haba, K. Igarashi, Y. Gono, Y. Yano, Gamma-ray Compton imaging of multitracer in biological samples using strip germanium telescope, *IEEE Transaction on Nuclear Science*, **54**(3), 710717(2007)
 - 6) S. Motomura, Y. Kanayama, H. Haba, Y. Watanabe, and S. Enomoto, Multiple Nuclide Imaging in Live Mouse Using Semiconductor Compton Camera for Multiple Molecular Imaging, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, in press
 - 7) K. Matsumoto, R. Hirunuma, S. Enomoto, K. Endo, *In vivo* multitracer analysis technique: Screening of radioactive probes for noninvasive measurement of physiological functions in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2029-2034(2005)
 - 8) Y. Kanayama, S. Enomoto, T. Irie, R. Amano, Axonal transport of rubidium and thallium in the olfactory nerve of mice, *Nucl. Med. Biol.*, **32**, 505-512(2005)
 - 9) N. Asano, M. Kondoh, C. Ebihara, M. Fujii, T. Nakanishi, N. Utoguchi, S. Enomoto, K. Tanaka, Y. Watanabe, Induction of zinc transporters by forskolin in human trophoblast BeWo cells, *Reproductive Toxicology*, **21**, 285-291(2006)
 - 10) R. Minayoshi, T. Ohyama, N. Kinugawa, J. Kamishima, T. Ogi, K. Ishikawa, M. Noguchi, H. Suganuma, K. Takahashi, S. Enomoto and M. Yanaga, Change of concentrations of trace elements and protein contents in the liver of zinc deficient mice, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **272**(2), 429-431(2007)
 - 11) K. Igarashi, Y. Nakanishi, R. Hirunuma, S. Enomoto, S. Kimura, Multitracer study on the uptake of various trace elements in anemic rats: influence of NaFeEDTA and ferrous sulfate, *Nutrition Research*, **26**, 173-179(2006)
 - 12) Y. Yamashita, Y. Takahashi, H. Haba, S. Enomoto, H. Shimizu, Comparison of reductive accumulation of Re and Os in seawater - sediment systems, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**(14), 3458-3475(2007)
 - 13) S. Mitsunobu, Y. Takahashi, R. Hirunuma, H. Haba, S. Enomoto, *Chem. Lett.* **34**, 980-981(2005)

Imaging 【イメージング】

複数分子の同時イメージングを実現した 世界初の診断装置を開発

近年、病気の診断・治療の場において、分子イメージング技術が大きな力を発揮している。しかし、現在汎用されているPETやMRIなどの診断装置では、さまざまな分子の動きを同時に画像化することはむずかかった。

複数の要因が複雑かつ複合的に関与して発症するがんやさまざまな生活習慣病などの診断をより高度におこなうために、複数分子の同時イメージング技術が切望されていた。このほどマウスでの成功が発表され、新たな創薬や診断法の革新に向けて、実用装置としての開発が加速している。

をもつ複数の分子プローブを同時に用いることができると、疾病の複雑なメカニズムやほかの生体反応との相互作用がイメージングでき、より高度で正確な診断が可能になる。

われわれは、放射性医薬品を利用した診断、治療分野の分子イメージング装置として、高純度ゲルマニウム半導体検出器を用いたコンプトンカメラ¹⁾方式の「複数分子同時イメージング装置 (Gamma ray emission imaging: GREI)」を開発してきた²⁾。

この装置は、検出器としてゲルマニウム半導体を使っているため、エネルギー分解能³⁾がとくに優れている。このため、それぞれ異なる放射性同位元素で標識した複数の放射性薬剤 (分子プローブ) を同時に用いれば、GREIは放出される γ 線のエネルギーを精密に計測できるため、そのエネルギーを指標として各々の分子を識別することができる。

分子イメージングにおける複数分子同時イメージングのメリット

わが国や欧米諸国では、分子イメージング研究を国家的に推進しており、ポジトロン断層診断装置 (PET) などの分子イメージング機器を用いて、生体のさまざまな反応や疾患の分子レベルの情報が、定量性をもった画像として得られるようになってきた。たとえば、がんをはじめとする病態などの早期診断や

研究にPETが汎用され、優れた核医学診断装置として活躍している。しかし、PETの検出器は放射性薬剤が陽電子崩壊の際に発生する511keVの γ (ガンマ) 線だけを利用するため、核種ごとに異なる γ 線を識別して、複数の放射性薬剤を同時にイメージングすることができない。

がんやさまざまな生活習慣病などの疾病には、複数の要因が複雑かつ複合的に関与していることが明らかになっていく。それぞれの要因に対して特異性

図1 複数分子同時イメージング装置「GREI」の撮像原理 (a) と GREI 装置 (b)

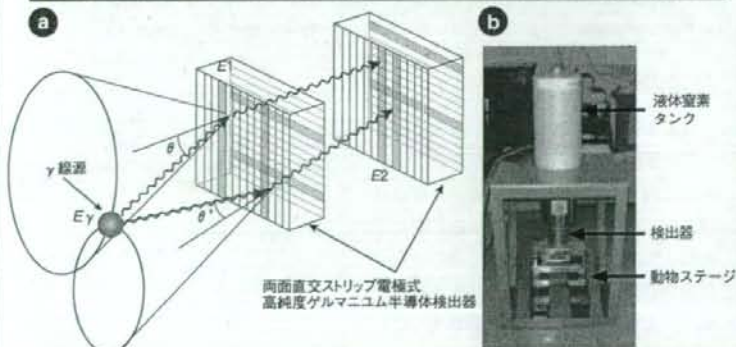


図2 GREIで同時に撮像した3種類の放射性薬剤の複合画像



放射性薬剤ごとに色分けして一つの画像にすることで、複合的な情報を視覚的に表現することが可能である。分布が重なった部分は、色の混合により異なる色で表現される。

GREIのセンサーは両面直交ストリップ電極式の高純度ゲルマニウム半導体検出器であり、入射 γ 線の相互作用位置とエネルギーを高精度に測定することが可能になっている。コンプトン散乱⁴⁾を一つ検出すると、コンプトン散乱の方程式を解いてその散乱角度が求められ、図中の一つの円錐上のどこかに γ 線源が存在することがわかる。このような円錐の情報を多数集めると γ 線源の場所が特定でき、薬剤の分布画像を推定することが可能となる。

*1 コンプトンカメラ

コンプトン散乱の運動学を利用して、 γ 線源の放射能密度分布を画像化する装置の総称。一般的に、散乱体と吸収体の複数の半導体検出器などを並べることにより実現される。原理的に、1方向からの撮像により3次元の密度分布を画像化することが可能である。コンプトン散乱は、1923年にアーサー・コンプトンによって確かめられた、光(電磁波)による電子の散乱現象。散乱前の光のもつエネルギーが既知であれば、散乱の角度により、散乱後の光および電子のもつエネルギーは、運動学的に一意に決定できる。光の粒子性を示す現象の一つである。

*2 エネルギー分解能

エネルギー値の異なる二つの放射線について、どのくらいの差まで区別して測定できるかという能力をいう。エネルギー分解能が高いと、分子プローブの識別能が向上するだけでなく、 γ 線の散乱角の推定精度も向上するため、コンプトンカメラにとってはとくに重要な要因である。ゲルマニウムはきわめて高純度の半導体単結晶を形成させることが可能で、大面積の放射線検出器として動作させることができ、ほかの放射線検出器と比較してエネルギー分解能がきわだって優れている。

*3 ICR系統マウス

毒性・薬理・薬効・免疫・その他の試験など幅広い分野で汎用的に使用されるマウス。アメリカの Institute of Cancer Research の 語 文 字 を とって命名された。

GREIに設置した二つの検出器(図1)の寸法は、縦横が39mm×39mm、厚さは前段が10mm、後段が20mmで、検出器間の距離は60mmとなっている。この検出器の電極は、表と裏で互いに直交する方向で3mm周期のストリップ状に分割しているため、さまざまな方向から飛来する γ 線の相互作用位置をXY方向について検出することができる。さらに検出器の厚みの方向、Z方向についても、約1mmの検出精度を達成している。また、コンプトンカメラは γ 線の入射方向を制限しないため、1方向からの固定撮像でも3次元分布の情報が得られるという特徴がある。

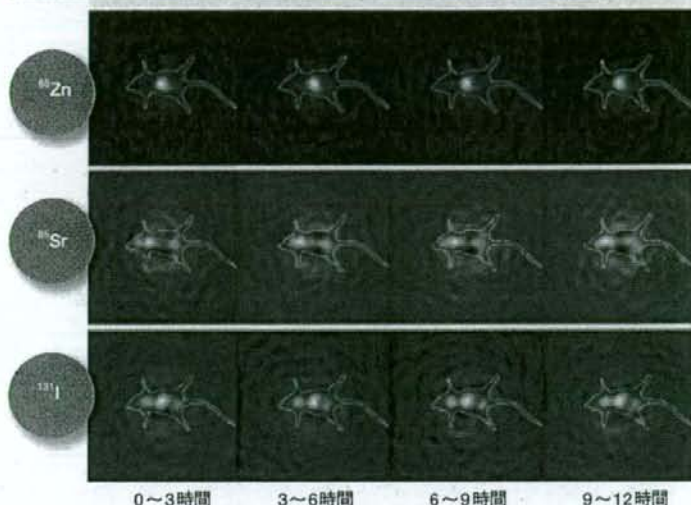
複数分子同時イメージングの実現

われわれは、このGREIを用いて、複数分子同時イメージングを実証するため、健康マウスに分子プローブとして複数の放射性薬剤を投与した代謝過程のイメージング実験をおこなった。

すなわち、ICR系統マウス^{*3}(8週齢・雄)に、3種類の放射性薬剤を連続投与し、麻酔をした状態でGREIを作動させ12時間の連続撮像をおこなった。投与した薬剤は、ヨウ化メチルノルコレステロール¹²⁵I注射液(アドステロール[®]-I131注射液)、塩化ストロンチウム(⁸⁶SrCl₂)、塩化亜鉛(⁶⁵ZnCl₂)で、それぞれ副腎、骨、肝臓に集積性をもつ。

GREIで測定した γ 線エネルギースペクトルから、それぞれの放射性薬剤が明確に識別できていることがわかり、この撮像実験で得られたデータから、2次元および3次元画像化し、それぞれの放射性薬剤ごとに解析をおこなった。マウスの光学カメラ画像と放射性薬剤の分布を重ね合わせ、薬剤ごとに色分けし、複合画像を図2に示す。

図3 同時投与した3種類の放射性薬剤の時系列連続画像



GREIの撮像データには時刻の情報が組み込まれており、撮像後に時間範囲を自由に設定して連続画像を生成することができる。図は、3時間ごとにデータを区分して画像生成した例。

また、このGREI撮像実験では、リアルタイムイメージングのための実証実験にも成功した(図3)。

このようなイメージング技術は、われわれが世界に先駆けて1999年から開発を進めてきたもので、今回世界で初めて、複数放射性薬剤同時リアルタイムイメージングに成功した。

今後の展開

臨床医学の現場で、複数分子同時イメージング法が活用されるには、分子プローブに用いる放射性薬剤の開発も重要である。2008年10月、われわれが中心となって、京都大学、大阪大学、宇宙航空研究開発機構の研究グループと放射性薬剤開発を加速し、コンプトンカメラによる新診断機器開発を推進するコンソーシアムを発足した。

このようなコンプトンカメラ方式による複数分子同時イメージング法の実

用化に対する取り組みは、わが国が世界をリードしており、近い将来、実用的な診断機器が創出されることは疑いがない。われわれは現在、要素技術をさらに高度化し、解像度が1mm以下となる、より実用的な撮像をめざして開発を進めている。このような装置開発と新薬の開発研究を活性化し、複数分子同時イメージング法による創薬や診断法の革新に貢献していきたい。

榎本秀一 えのもと・しゅういち

岡山大学 大学院医歯薬総合研究科 創薬生命科学専攻 教授。理化学研究所 神戸研究所 分子イメージング科学センター メタロミクスイメージング研究ユニット 研究ユニットリーダー。1991年北海道大学大学院薬学専攻博士後期課程修了、薬学博士。日本学術振興会PD、理化学研究所基礎科学特別研究員、理化学研究所仁科加速器研究センター副チームリーダーなどを経て、2008年10月から現職。メタロミクス研究と分子イメージング研究を推進中。

参考文献

- [1] Motomura S et al: "Gamma-ray Compton imaging of multitracer in biological samples using strip germanium telescope" IEEE Trans Nucl Sci 54 (2007) 710-717
- [2] Motomura S et al: "Multiple molecular simultaneous imaging in a live mouse using semiconductor Compton camera" J Anal At Spectrom 23 (2008) 1089-1092

■ 特集：動きはじめた「きぼう」 ■
(研究紹介)

“きぼう”での生物実験に向けて： LOH解析による宇宙放射線の生物影響の検討

谷田貝 文夫^{1,5}・高橋 昭久²・本間 正充³・鈴木 ひろみ^{4,6}
大森 克徳⁵・関 真也^{6,7}・橋爪 藤子^{6,7}・島津 徹⁴
榎本 秀一¹・大西 武雄²・石岡 憲昭^{5,6}

A Biological Experiment in Kibou: LOH Analysis for Estimating the Biological Influences of Space Radiation

Fumio YATAGAI^{1,5}, Akihisa TAKAHASHI², Masamitsu HONMA³, Hiromi SUZUKI^{4,6},
Katsunori OMORI⁵, Masaya SEKI^{6,7}, Toko HASHIZUME^{6,7}, Toru SHIMAZU⁴,
Shuichi ENOMOTO¹, Takeo OHNISHI² and Noriaki ISHIOKA^{5,6}

Abstract

This is a kind of review paper to introduce how our developing methodology for loss of heterozygosity (LOH) analysis is predictable to detect the biological effects of space radiation. Our biological experiments using human cultured cells in “Kibou” of International Space Station are planned to detect the following effects: i) mutagenic effects, ii) combined effects of radiation with micro gravity, and iii) radioadaptive response. After the cell recovery to the earth, we will analyze the mutagenic effects (i) in the frozen cells exposed to low-dose space radiation during the 3 months preservation in “Kibou”, determine the combined effects (ii) from the mutation inductions in the cells incubated for 1 week under 1 G or μ G in “Kibou”, and estimate the radioadaptive response (iii) from measuring the repair efficiencies of DNA double-strand breaks introduced after the recovery.

1. はじめに

1.1 研究の意義

宇宙環境は微小重力に象徴されている。しかしながら、低線量かつ低線量率の宇宙放射線による被ばくの影響も見過してはならないと思われる。このことは、単に宇宙飛行士への健康影響といった観点からだけでなく、もう少し先の将来を見据えると、人類が宇宙環境をより積極的に利用する場合において、極めて重要な問題となる。宇宙放射

線の被ばくによる影響は、直接的なものと同様のものにも大別される (Fig. 1)。従来の研究から、宇宙放射線には重粒子成分が含まれ、細胞の染色体 DNA に重篤な損傷を引き起こされる可能性が指摘されている。このような被ばくが極めて低線量かつ低線量率放射線によって起こるので、放射線による損傷の高感度検出がポイントとなる。勿論、直接的に損傷を検出し、その修復過程などをリアルタイムで観測することが望ましい。このような観測が困難な場合には、染色体レベルなどでの異常として遺伝的に確定

- 1 調理化学研究所 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
RIKEN Institute, 2-1 Hirotsawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan (E-mail: yatagai@riken.jp)
- 2 奈良県立医科大学 〒634-8521 奈良県橿原市四条町840
Nara Pref. Med. Univ. 840 Shijyo-machi, Kashihara-shi, Nara 634-8521, Japan
- 3 国立医薬品食品衛生研究所 〒151-8051 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
Natl. Inst. Health Sci., 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8051, Japan
- 4 日本宇宙フォーラム 〒104-0004 東京都千代田区大手町 2-2-1 新大手町ビル 7階
Japan Space Forum, 2-2-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 104-0004, Japan
- 5 宇宙航空研究開発機構 〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1
Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8505, Japan
- 6 鹿児島大学大学院 〒890-8544 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1
Kagoshima Univ. Grad. Sch. 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima 890-8544, Japan
- 7 株式会社イー・エス 〒103-0028 東京都中央区八重洲 1-9-13 八重洲ヤオイビル 4階
Adv. Engineering Services, 1-9-13 Yaesu, Chuo-ku, Tokyo 103-0028, Japan

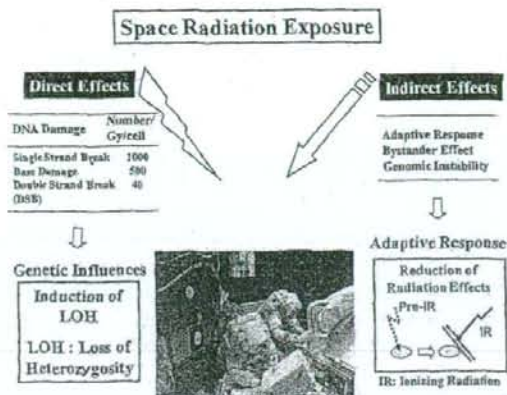


Fig. 1 Biological influences of space radiation
 Biological effects of space radiation exposure can be classified into these two types, direct effects and indirect effects. Direct effects are considered to be mainly due to DNA damage caused by ionizing radiation (IR). On the other hand, indirect effects are well reflected in the phenomena, known as adaptive response, bystander effect, genome instability etc. Using a loss of heterozygosity (LOH) analysis methodology, we plan to detect direct effects as chromosomal change caused by DNA damage. For detection of indirect effects, we focus on an adaptive response, which is defined as an acquired resistance of cells exposed to challenging IR by an additional priming low-dose IR exposure. Here, we consider that the long preservation of cells in space corresponds to this kind of priming exposure.

した状態, すなわち, 遺伝的影響として, 鋭敏に検出することは意義深い。もう一方で, 損傷そのものではなく, 損傷によって引き起こされる細胞内の反応を検知する, いわゆる, 間接効果の検出も大切である。低線量の放射線被ばく後の間接効果としては, 適応応答, バイスタンダー効果, 染色体ゲノム不安定性などがあげられるが, 現実の宇宙実験で追跡が比較的容易と考えられる, 適応応答に的を絞りたい。適応応答とは, 予め低線量の放射線に被ばくした細胞は, 次の大線量の放射線に対して抵抗性を獲得し, 大線量放射線による突然変異誘発の頻度を低下させる現象として知られている。

従来スペースシャトルなどを利用した宇宙フライト実験でも, 宇宙放射線の生物影響を評価することが重要視され, 例えば, 放射線と微小重力との相乗効果を調べる研究が盛んに行われてきた。残念ながら, 実験結果としては, 種々の系で相反するような様々な結論が出されている。果たして, 評価対象の生物試料を国際宇宙ステーション (ISS) の実験棟「きぼう」などに長期間保持するだけで, 宇宙環境を反映した, より信頼のおけるデータが得られるのであろうか。上述の「ばらつき」の原因としては, 重力影響と放射線の影響を切り離していないことの方が大きな

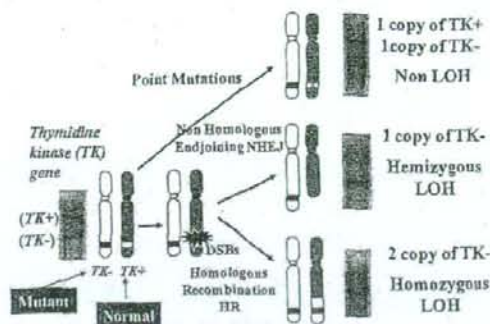


Fig. 2 Principle of LOH analysis
 The selected thymidine kinase deficient (TK^-) mutants were analyzed to determine the loss of TK heterozygosity (LOH) using PCR amplification of the exon 4 and 7 regions of the TK locus (Honma et al., 1997 & 2000). The selected TK^- mutants were classified into non LOH, hemizygous LOH or homozygous LOH by this judgment.

要因のように思われる。重力影響と放射線の影響を切り離して評価する系を樹立し, これらの相乗効果の存在を評価することが近道と考えられる。種々の生物効果を指標にした, 分子, 細胞, 個体, いずれのレベルでの宇宙放射線影響研究においても, より適切な実験系を構築する必要性に迫られているといえる。

1.2 研究の目標

何にも増して, 強調したいことは, きぼう棟の設備を利用しなくてはできない宇宙実験を計画し, 宇宙放射線の生物影響を少しでも明らかにしたい点である。以下に述べるような, 地上での準備実験の結果や進展状況から判断すると, 幸いにも, 極めて有望な検出システムが今回の宇宙実験に利用できるものと考えられる。

私たちは, ヒトリンパ芽球 $TK6$ 細胞の LOH (Loss of Heterozygosity: ヘテロ接合性の喪失) 検出系を確立し^{1,2)}, 染色体レベルだけでなく遺伝子レベルでの変異誘発も検出が可能で, 放射線の遺伝的影響を調べるには格好な系であることを実証してきた (Fig. 2)^{3,4)}。薬剤耐性を指標にして選択した変異細胞から染色体 DNA あるいは mRNA 抽出を行い, PCR 法などで DNA 断片を増幅し, シーケンサーによって変異部位を同定する系である。この系を利用して, $TK6$ 細胞が通常の培養液中の浮遊状態の場合だけでなく, 凍結した細胞に炭素イオン 100 mGy 照射をしても, LOH の誘発として放射線照射の影響を高感度に検出できることを明らかにした⁵⁾。ここで, 強調したいことは, 凍結状態でスペースシャトルに積み込んで打ち上げ, ISS のきぼう棟内で長期間保持したまま地上に持ち帰り, 上述の LOH 解析をすると, 重力影響を含まない, 低線量の宇宙放射線の遺伝的影響 (Fig. 1 の直接効果) を推測することが可能と考えられる点である。すなわち, 上

述したような、重力影響と放射線被ばく影響を切り離す系の確立を意味する。また、きぼう棟内で、凍結細胞を解凍して1Gあるいは μG で培養し、再凍結後に地上に持ち帰り、LOH解析結果を両者間で比較すると、重力効果の影響を推測することも可能と考えられる。上述の凍結保持しただけの場合と比較すれば、放射線と微小重力との複合効果についてのデータも取得できるであろう。さらに、ISSに長期間、凍結保持した細胞を地上回収後にDNA2重鎖切断(DSB)導入の処理を行うと、地上に保持して同様の処理をした場合に比べてDSBの修復効率が高くなる。すなわち、適応応答 (Fig. 1の間接効果)として検出可能かどうかとも確かめられる。LOH検出系を利用するとDSBの修復効率が測定でき、実際に、地上実験で、低線量のX線や γ 線を予め細胞に照射することによって適応応答効果が検出できたこと^{6,7)}から、今回の宇宙実験計画のひとつに加えている。

2. 研究計画

2.1 地上での準備

今まで、とりわけ、ここ数年間に、宇宙実験に用いる細胞を準備するために進めてきた手法を簡潔書きにする。なお、細胞バッグの製作やその取扱いに関しては、大西、高橋らを中心に進めてきた成果が反映されており、彼らの豊富な宇宙実験の経験がなければ、現在のような確立した細胞準備の手法は構築できなかったものと思われる。また、実際に細胞バッグにセットして凍結した状態のサンプルフォルダー (一つのフォルダーに15の細胞バッグと一つの線量測定用PADLESが原則)はFig. 3の左側に挿入した挿絵を参照していただきたい。なお、細胞を凍結状態で輸送し、必要な場合にきぼう棟内で培養する。

1) 宇宙実験用細胞バッグ

材質はハイブリッドメッキンバッグ (市販)、大きさは10 ml 収納部分が2つ繋がっている袋である。なお、きぼう棟内で細胞培養する場合は、2連の収納部分のそれぞれに、細胞培養液、20% DMSOを含む新鮮培地を入れ、培養後に両者を混合できるように両者の仕切りの部分に特別な仕掛けがしてある。

2) 細胞の凍結保存方法

10% DMSOを含むRPMI1640培地を用い、BICELL容器を用いて最終的には -80°C で保存する。

3) 細胞バッグ内への凍結細胞封入方法 (きぼう棟内で培養する場合)

細胞を含む収納部分は予め、9.75 mlの新鮮培地を凍結させておき、上述の方法で準備した、0.25 ml (1.25×10^5 細胞)を含む凍結細胞サンプル (Fig. 3左下の挿絵の中の注射筒内に凍結)したものを挿入し、バッグを封じる。

4) 細胞バッグ内への凍結細胞封入方法 (きぼう内で長期凍結保持の場合)

上述のように10% DMSOを含む培地に細胞を凍結 ($2 \times$

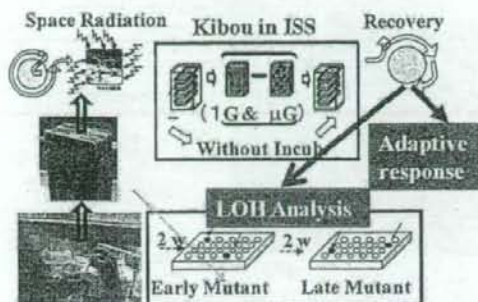


Fig. 3 A plan of space experiment using “Kibou” facility
The plan of ISS experiments for studying the biological influences of space radiation and microgravity is schematically illustrated in this figure. The frozen cells of human lymphoblastoid TK6 are brought to ISS. A part of them are just preserved as frozen status during the stay of about 3 months, and then brought back to the earth together with the other parts of them, which are incubated for about one week under condition of 1G or μG during the long stay. The cell freezing system, MELFI is used for freezing the cells after the incubation on ISS. For the cells recovered from the space, a mutation assay using LOH analysis system is planned for a major part of the recovered cells, and the remaining part of them will be used for the adaptive-response assay, assuming that the space stay is a priming treatment in this response.

10^6 cells/ml) し、バッグの各収納部に10 mlずつ入れ、封じる。

5) バッグの漏れチェックと外袋によるサンプルの2重の封入

6) 細胞の培養テスト

きぼう棟内での培養を想定し、つくば宇宙センターのCell Biology Experiment Facility (CBEF)⁹⁾を利用し、細胞の濃度や培養期間設定のためのテストを重ねた。きぼう棟内の細胞培養期間を1週間程度とし、培養開始時点での細胞濃度を 1.25×10^4 cells/mlに設定することが最適であるとの結論に達した。なお、1週間の培養でおよそ 5×10^5 cells/mlになることを確認している。

7) バッグで培養した細胞の凍結

きぼう棟内で細胞をバッグで培養後、DMSO培地と混合した後の細胞凍結の条件は、つくば宇宙センターの細胞凍結装置 (MELFI)を利用してテストを行い、MELFIの凍結目標温度および温度低下のスピードなどを設定した。

8) 細胞を凍結維持できる期間の検討

地上に回収してから解析を行う際に必要な数の増殖可能細胞を確保するために各種テストを行った。その結果、地上での細胞作製からシャトル打ち上げまでに要する1か月ときぼうでの滞在3か月および回収から実際の解析開始までの期間も含めて、5ヶ月間保持することが可能な条件を確立した。

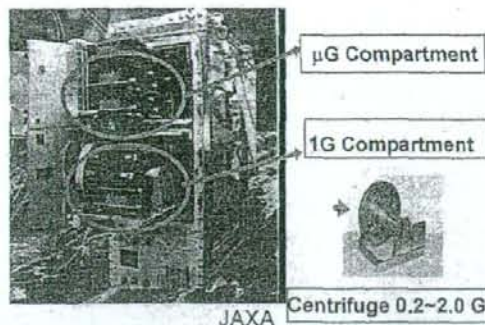


Fig. 4 Cell culture system in Kibou (CBEF)
The 1 G condition is created by using the small rotor (1.0-1.5 G) in the Cell Biology Experiment Facility (CBEF) in Kibou of ISS (Ishioka *et al.*, 2004).

9) サンプルの安全性の確保

スペースシャトル打ち上げ基地までの凍結細胞の輸送に伴う安全性の確保のための実験, また, 振動試験などのシミュレーション実験も行い, 安全性を確認している.

10) 放射線線量計測 (PADLES) のための素子のサンプルフォルダーへの取り付け条件

2.2 きぼう内での実験計画

ここでの実験計画の概要は Fig. 3 を参照していただきたい. きぼう内での細胞培養は地上に回収する時期に近い 1 週間を計画している.

1) 細胞の解凍: 培養するサンプルだけ解凍; 37°C (CBEF 内; Fig. 4 の上部)

2) 細胞の培養:

μG 下での培養: CBEF 内設置 (Fig. 4 の上部)

1G 下での培養: CBEF 内の小型遊心機 (0.1G-2G に調節可能) を利用 (Fig. 4 の下部)

3) 1 週間の細胞培養

4) 培養した細胞の再凍結

20% DMSO を含む新鮮培地との混合 (クローに対するトレーニング済み)

MELFI による再凍結

2.3 地上回収後の解析計画

チミンキナーゼ (TK) 遺伝子座がヘテロのヒトリンパ芽球細胞 TK6 を, ISS のきぼう棟に 3 か月に及ぶ長期間凍結状態 (一部はきぼう内で 1 週間培養後に再凍結) で保持した後に, 地上に回収してから行う解析の概略を述べる.

2.3.1 低線量宇宙放射線による LOH の誘発

きぼう棟内に凍結状態で保持した細胞を地上に回収後, 速やかに解凍し, 2 日間 37°C で培養を行う. その後, 生存 (増殖可能) 細胞と TK 遺伝子に変異を起こし薬剤 (TFT) 耐性を獲得した TK 変異細胞の測定, すなわち, PE (Plating Efficiency) と MF (TK^R Mutation Frequency)

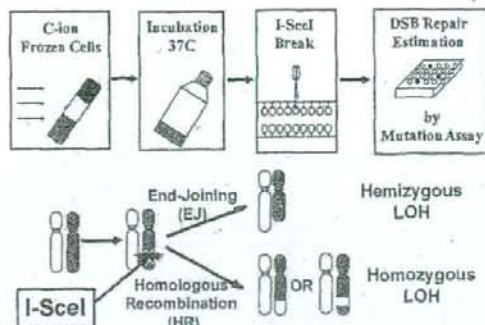


Fig. 5 Design and principle of space simulation experiments for detecting adaptive response

The strategy of space simulation experiments are shown in the top panel of this figure; (A) The C-ion exposure in the first step is assumed to correspond to the IR exposure in space and the later steps are designed to determine the repair efficiencies of DNA double strand breaks (DSBs), introduced by the I-SceI expression vector. The repair of DSBs is considered to be mainly due to two pathways shown in the bottom panel, non homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). As a principle for determination of DSB repair efficiency, we measure the TK⁻ mutants generated through NHEJ or TK⁺ revertants generated through HR, respectively.

アッセイを行う. 次に, 選択した TK 変異細胞から, Iso-gen を利用して染色体 DNA あるいは mRNA を抽出精製する. 変異体が LOH を示すか否かと LOH 変異体の染色体上の拡がりについては, 精製した染色体 DNA の TK 遺伝子座内の特定部位及びその染色体上のマーカー部位を PCR 法で増幅しシーケンサーによって解析する. また, LOH を示さない TK 変異体 (非 LOH) の mRNA から cDNA を合成して, シーケンサーによって TK 遺伝子座の変異部位を同定する. 変異細胞取得までの過程および変異体解析の手法の詳細については, 著者らの発表論文, とりわけ下記引用文献¹⁰⁾を参照していただきたい. LOH 変異体はヘミ型 (染色体の部分欠失) とホモ型 (染色体的部分的置き換え) に仕分けられ (Fig. 2), それぞれの発生の主な経路としては, 損傷部位, すなわち, 染色体 DSB の非同末端結合 (Non homologous end-joining: NHEJ) あるいは相同組換え (Homologous recombination: HR) が考えられる.

2.3.2 低重力と放射線との複合効果
きぼう棟内で, 凍結細胞を解凍して 1G あるいは μG で培養し, 再凍結後に地上に持ち帰り, 前節の LOH 解析と全く同様の解析を行い, 重力効果の影響の検討に供する.

2.3.3 宇宙滞在した細胞の帰還後の適応応答誘導

きぼう棟内に凍結保持した TK6 細胞を地上回収し培養後に, 制限酵素 I-SceI 発現ベクター pCBASce をエレクト

ロボレーション (AMAXA) で感染させて、TK 遺伝子座内の特定部位 (制限酵素 I-SceI 認識部位) に DSB を導入する。総称として TK6 細胞と記述したが、実は、I-SceI 認識部位を導入した TSC5E 細胞とその株に点突然変異が導入された TSC2R2 の 2 種類の細胞を実験に供している¹⁾。感染後、細胞を 3 日間培養した後、TSC5E 細胞には薬剤 (TFT) 処理して、TK 欠損変異の誘発を、TSC2R2 細胞には HAT 処理をして TK 復帰変異の誘発を測定する。このステップはまさに LOH 検出と同様の原理に基づいており、それぞれの変異の誘発率が、NHEJ あるいは HR による DSB の修復効率を反映する。Fig. 5 は地上コントロール実験の概略図で、初めの低線量炭素イオン照射を宇宙滞在 (きぼう内長期保持) に置き換えてもらえ、まさに、この節での解析のあらましとなる。

3. 地上実験結果から期待される研究成果

3.1 低線量宇宙放射線の遺伝的影響

1.2 節の研究の目標のところすでに述べたように、TK6 細胞で確立した LOH 解析システムを利用すると、通常の培養液中の浮遊状態での 10 cGy とした低線量の X 線や炭素イオン (135 MeV/u) 照射による変異誘発効果を検出できた¹⁾。高感度検出とは、TK 変異誘発率全体では統計的優位差を示さない増加であっても、ヘミ型 LOH (染色体一部欠損) に限ると明らかな誘発がみられるくらいの感度を意味する。凍結した細胞に炭素イオン 10 cGy 照射をした場合も、浮遊状態での照射の場合に比べて少し感度は低下するものの、LOH 誘発は明らかに認められた²⁾。ここで特筆すべきことは、炭素イオン照射の直後だけでなく、1 ヶ月間凍結保存した後の解析でも直後と同様な誘発が観察されたことである (Fig. 6a)。γ 線の線量を 30 mGy と低下させ、線量率も 1.2 mGy/h と低下させても、この種の LOH 変異が誘導されることが確認された^{2,3)} (Fig. 6b)。これらの地上での実験結果は、きぼうを利用する宇宙実験への期待を膨らませてくれる。なお、付け加えておきたい点は、凍結細胞に対する放射線の照射効果は全てではないが、かなりの部分を DNA 損傷などとして蓄積できるものと推測している。

3.2 低重力との複合効果

重力効果の検討はまさに宇宙でないとできない実験といえる。このような長期間に亘って微小重力下で細胞を培養することは地上では不可能といってもよい。過重力下や模擬微小重力 (クリノスタット利用) 下での実験は参考にはなるであろうが、実際の微小重力下の結果を反映できるかどうかは不明である。強調したいことは、すでに述べているが、細胞を凍結状態で保持し、目的の 1 週間の培養を 1 G と μ G 下で行い、両者間で変異誘発の頻度と変異のパターンを詳細に比較する点である。きぼう株に細胞を保持する期間の最後、言い換えれば、地上への回収の直前に細胞培養を行う計画なので、宇宙放射線単独の影響は地上に

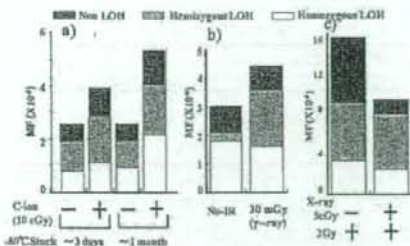


Fig. 6 Results of ground control experiments

The obtained TK⁻ mutants were analyzed by the methodology schematically illustrated in Fig. 2 to determine the TK mutation frequencies and distribution of mutational class, non LOH, hemizygous LOH and homozygous LOH. The summary results for these analyses are separately shown in each case; (a) the frozen cells are exposed to 10 cGy carbon ion beams, (b) the cells are cultured in the incubator during the low-dose/low-dose-rate γ -rays (30 mGy: 1.2 mGy/h), and (c) the cells are exposed to X-ray for detection of an adaptive response (5 cGy for priming exposure and 2 Gy for challenging exposure).

持ち帰るまで凍結状態を維持した細胞の変異誘発から推測できる。ここでの批判としては、重力効果を比較する際に低線量・低線量率で細胞が被ばくしている点があげられるが、実際に低重力の影響を受ける際は宇宙放射線環境下であることを考えると、この系の欠点というよりは利点と思える。また、放射線との複合効果がみられるとしたら、単純な加算として、あるいは相乗的なものとして観察されるのかといった興味ももたれる。

3.3 適応応答の有無

TK6 細胞 LOH 検出系を利用して、低線量放射線の影響を適応応答効果として染色体レベルで検出できるか否かを検討するため、予備的低線量 X 線照射が本格的な X 線照射による TK 変異誘発に及ぼす影響を調べた。その結果、5 cGy の予備照射の 6 時間後に 2 Gy の本格的照射をすると、予備照射をしないときの TK 変異誘発を半分程度まで抑制することが明らかになった (Fig. 6c)⁴⁾。また、LOH 解析の結果、非 LOH 型 (点突然変異) の誘発抑制で説明がつくことも明らかになった。そこで、細胞の宇宙長期滞在中の放射線被ばくを適応応答の予備照射と考えて、地上に細胞を回収してから本格的放射線照射による変異誘発について宇宙飛行しなかった地上コントロールの場合と比較し、適応応答効果の有無を検討する計画で宇宙実験の準備を進めていた。

いっぽうで、制限酵素 I-SceI 発現ベクターにより染色体の特定部位に DSB 切断を導入し、DSB の修復効率から適応応答を検出する系を樹立することもできた¹⁾。その後の研究の進展で、I-SceI 発現ベクターによる高効率 (100 個の細胞のうち 1 個以上: 従来の 100 倍) の導入を可能にするエタクトロボレーションの条件が確立されたので、よ

り高精度の実験が可能になった。そこで、こちらのDSBを指標とする系 (Fig. 5) の方が上述の変異誘発を指標にする系よりも宇宙実験により適しているものと判断した。なお、2.3節の解析のところで述べたように、DSBの修復効率の測定はLOH検出の際の変異誘発の場合と同様の原理に基づいている。低線量・低線量率 γ 線照射 (30 mGy) によるLOH誘発が検出できたことはすでに述べたが、同一の照射条件下およびより低線量・低線量率 γ 線照射 (8.5 mGy : 0.125 mGy/h) 条件下で、I-SceIによるDSBの修復効率を測定した。HRによるDSB修復の効率は非照射の場合に比べて、前者の条件下で50%程度、後者の条件下で80%程度高くなり、適応応答と考えられる細胞応答が示唆された^{7,8)}。そこで、宇宙放射線被ばくを低線量炭素イオン照射 (50 mGy) でおきかえる、宇宙シミュレーション実験 (Fig. 5) でも、同様にDSBの修復効率測定を行った。その予備の結果からは、HR、NHEJいずれの系によるDSB修復も、非照射の場合に比べ、その効率が2~3倍優位に高くなる (適応応答を示す) 傾向がみられた。

LOH検出系の場合は、17番染色体上のTK遺伝子あるいはその近傍のDNA損傷が主な標的となるが、このDSB修復を調べる系の場合は、染色体あるいは細胞全体に起こるDNA損傷が標的となりうるので、より高感度の検出となることが予想される。前者は放射線の直接効果、後者はその間接効果という異なる効果を検出するための系であることは言うまでもない。

4. おわり

今後の宇宙実験研究、とりわけ、ライフサイエンスに関わるものを計画し実現していく上で、この分野の研究に新たに参加しようと意欲を燃やす潜在的なポテンシャルを高めることは重要である。この研究紹介が一役かってくれることを祈りつつ、また、本実験計画が実り多き成果をもたらすことを願って筆をおく。

なお、ここでご紹介した宇宙実験計画が進行していることは、宇宙開発研究機構、日本宇宙フォーラムの方々など多くの方のご尽力の賜物であり、深く謝意を表する。また、地上コントロール実験結果には、新原子力基盤クロスオーバー研究「低線量放射線に特有な生体反応の多面的解析」による成果も含まれている。

参考文献

- 1) M. Honma, L. S. Zhang, M. Hayashi, K. Takeshita, Y. Nakagawa, N. Tanaka and T. Sofuni: *Mol. Cell. Biol.*, 17 (1997) 4774.
- 2) M. Honma, M. Momose, H. Tanabe, H. Sakamoto, Y. Yu, J. B. Little, T. Sofuni and Hayashi: *M., Mol. Carcinog.*, 28 (2000) 203.
- 3) S. Morimoto, T. Kato, M. Honma, M. Hayashi, F. Hanaoka, F. and F. Yatagai: *Radiat. Res.*, 157 (2002) 533.
- 4) S. Morimoto, M. Honma and F. Yatagai: *J. Radiat. Res.*, 43 Suppl. (2002) 163.
- 5) Y. Umehayashi, M. Honma, T. Abe, H. Ryuto, H. Suzuki, T. Shimazu, N. Ishioka, M. Iwaki and F. Yatagai: *Biol. Sci. Space*, 19 (2005) 237.
- 6) F. Yatagai, Y. Umehayashi, M. Honma, K. Sugawara, Y. Takayama and F. Hanaoka: *Mutat. Res.*, 638 (2008) 46.
- 7) F. Yatagai, Y. Umehayashi, M. Suzuki, T. Abe, H. Suzuki, T. Shimazu, N. Ishioka, M. Iwaki and H. Honma: *Adv. Space Res.*, 40 (2007) 470.
- 8) F. Yatagai, M. Suzuki, N. Ishioka, H. Ohmori and M. Honma: *Radiat. Environ. Biophys.*, 47 (2008) 439.
- 9) N. Ishioka, H. Suzuki, M. Asashima, S. Kamisaka, Y. Mogami, T. Ochiai, T. Aizawa-Yano, A. Higashibata, N. Ando, M. Nagase, S. Ogawa, T. Fukui and N. Fujimoto: *J. Gravitat. Physiol.*, 11 (2004) 81.
- 10) F. Yatagai, F., S. Morimoto, T. Kato and M. Honma: *Mutat. Res.*, 560 (2004) 133.
- 11) M. Honma, M. Izumi, M. Sakuraba, S. Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatagai and M. Hayashi: *Environ. Mol. Mutagen*, 42 (2003) 288.
- 12) Y. Umehayashi, M. Honma, M. Suzuki, H. Suzuki, T. Shimazu, N. Ishioka, M. Iwaki and F. Yatagai: *J. Radiat. Res.*, 48 (2007) 7.

(2008年9月4日受理)

〈放射線適応応答特集：総説〉

DSB修復から適応応答を推測する

¹理化学研究所・分子イメージング科学研究センター²神戸大学・バイオシグナル研究センター³国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部谷田貝文夫¹、菅澤薫²、榎本秀一¹、本間正充³

1. はじめに

低線量放射線被ばくによる健康影響を推定する上で、低線量の前照射によって本格的急照射に対して細胞が放射線抵抗性を高め、変異誘発を軽減化する能力の獲得、すなわち、適応応答(1,2)が注目されている。本誌にも適応応答に関する優れた総説がすでに掲載されているので参照していただきたい(3,4)。低線量域での細胞応答としては、バイスタンダー効果、染色体の不安定性誘導などの現象も知られており、これらとの密接な関係も指摘されている。ヒト培養細胞を利用して適応応答を究明する試みは、個体レベルでの放射線影響を推測する為だけではなく、放射線によるDNA損傷の修復機構の解明を目指す基礎研究を進展させる上でも極めて重要である。

いっぽう、染色体DNAの2重鎖切断(DSB)は、放射線による直接的な作用でも生じるが、間接的な作用や代謝の過程でも生じる。DSBが生命にとって重要な意味合いをもつことは言うまでもない。低線量の放射線による生体影響を考えると、DSBの生成とその修復は、単にDNA損傷が致命傷になるか、あるいは修復によって致命傷や重篤な変異の誘発から免れるのかといった意味合いをもつだけではなく、細胞応答という生命現象の根源にかかわってくる。適応応答におけるDSBの役割を考える上でも全く同じである。DSBを適応応答における重篤な損傷の修復として捉えることも、また、適応応答を誘導する因子として捉えることもできる。ここでは、前者の捉え方から追及する。

トリチウムで標識したチミジンを取り込ませたヒトリンパ球は、1.5Gyの電離放射線による染色体異常の誘発が非処理の場合に比べて減少する現象、適応応答がOliviolaら(5)によって最初に報告され、その後も、適応応答による染色体異常の軽減化について多くの報告(6,7他)がなされ

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1 理化学研究所 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

TEL:048-467-9710 FAX:048-467-9710 e-mail:yatagai@riken.jp

キーワード：DSB修復、適応応答、ヒトリンパ球