総 説

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[†]

榎本秀一

理化学研究所加速器基盤研究部ラジオアイソトープ技術室
351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Key Words : multitracer, gamma ray spectrometry, bio-trace element, metabolic physiology,
radioisotope production, ring cyclotron, RI beam factory

1. はじめに

近年、マルチトレーサー法を用いた生体微量元素の研究が活発になっている。マルチトレーサー法は、1991年に理化学研究所核化学研究室及び加速器研究グループによって考案された。彼らは理研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活かし、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ー技術、マルチトレーサー法を開発した^{1), 2)}。その後、製造法や化学分離法の開発に研究が発展し、放射化学的な化学分離や吸着現象などの研究で、多くの報告がなされた^{3) - 5)}。また、生物分野における当時の応用研究は、安部(静)らのイネ、ダイズやホテイアオイなどの植物を用いたマルチトレーサーの吸収実験があげられ、興味深い成果が報告された^{6), 7)}。1994年、矢永(現 静岡大理)、遠藤(昭和薬大)と著者らは、動物における微量元素研究にマルチトレーサー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^{8) - 10)}。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ー法を用いた応用研究がなされている。その多くの成果は、1996年発刊と2001年発刊のRIKEN Reviewにまとめられている^{11), 12)}。

本報ではマルチトレーサーの製法とマルチトレーサー法を用いた生体微量元素のダイナミクスに関する研究を中心として、環境科学分野への応用研究、原子力基盤クロスオーバー研究である「マルチトレーサー製造法の高度化と自動化学分離装置及び複数核種同時 γ 線イメージング装置(GREI)の開発」及び理化学研究所RIビームファクトリー計画におけるマルチトレーサー研究の新展開についてご紹介したい。

2. マルチトレーサー法とは何か

マルチトレーサー法は、同時に製造した多数の元素の放射性同位元素(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新しいトレーサー技術である。RIトレーサーは、これまで単独で、あるいは、生物実験や生化学トレーサー実験でよく行われるように、 ^3H 、 ^{14}C 、 $^{32,33}\text{P}$ や ^{35}S などのごく少数のトレーサーを組合わせて使われてきた。しかし、半導体検出器と電子計算機の普及で、 γ 線放出体については、多数のRIからの γ 線を同時に測定し、

[†]Development of the Multitracer Technology for a Simultaneous Multi-elemental Analysis and Its Evolution in RI-beam Factory Project.

Shuichi ENOMOTO: Cyclotron Center, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama Pref. 351-0198, Japan.

図2 Au ターゲットから得たマルチトレーサー溶液の γ 線スペクトラム

- (a) Au 由来マルチトレーサー生理食塩液 (b) 経口投与後 24 時間における糞
(c) 経口投与後 24 時間における肝臓 (d) 経口投与後 24 時間における血液

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（例えば，Au をターゲットとした場合，王水に溶解して乾固した後，塩酸溶液として酢酸エチルで Au を抽出）すれば，多数の元素の RI を含むマルチトレーサー溶液が得られる。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）を含まない状態で得ることもできる。このようにして得られたマルチトレーサーは，そのまま，あるいは必要に応じて更に群分離を行ってグループトレーサーとし，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。マルチトレーサー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。図 2 には Au 由来マルチトレーサー生理食塩液の γ 線スペクトル及びこの溶液をラットに経口投与した場合の実際の測定結果を示し

た。

4. マルチトレーサー法の特長

次に，マルチトレーサー法には実用上どのような特長があるかご紹介したい。いうまでもなく，第一は高能率化である。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の動的挙動に関する情報が得られる。このことは一つの量的革新である。その波及効果の一つとして，これまでトレーサー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と，従来のトレーサー法では一つ一つの元素について RI トレーサーを入手し，つぎつぎ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ーを利用すれば，1 回の実験で目的を果たすことができる。もう一つ大切なことは，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ー法では，個々の元素について別々に実験して得られたデ

ータをもとに議論されてきた。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となる。特に、試料差、個体差の大きい地球環境試料や生体については、マルチトレーサー法によって、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り、これは質的革新といってよい。前述したように、マルチトレーサー法では、RIが無担体で得られることも大きな特徴である。RIの放出する放射線は高い感度で検出できることから、トレーサー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、これは大きな問題となる。この点、マルチトレーサー法では、RIだけを投与できるため、投与量が微量で、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。表1には動物代謝実験において、マウスにAg由来マルチトレーサー生理食塩液を投与する場合の各元素ごとのトレーサー放射能強度と濃度をまとめた。また、マルチトレーサーは意外な発見の可能性、いわゆるセレンディピティーを持っている。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えないことである。更に、マルチトレーサーは現在でも50種類を超える元素に適用可能で、今後その数は更に増加していくはずであるが、既に、シングルトレーサーとしても貴重な ^{28}Mg や ^{47}Ca などを含んでいる。 ^{28}Mg は実用性のあるMgのトレーサー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

表1 マウス1匹あたりに投与するAg由来マルチトレーサーに含まれる各種元素の放射能強度及び質量

核種	半減期	放射能 (kBq)	質量 (pg)
^7Be	53.29d	26.5	2.0
^{48}V	15.97d	4.5	0.7
^{51}Cr	27.7d	11.8	3.5
^{52}Mn	5.60d	4.9	0.3
^{54}Mn	312.20d	1.8	6.3
^{59}Fe	44.50d	0.7	0.4
^{57}Co	271.79d	3.5	11.2
^{58}Co	70.86d	5.7	4.9
^{65}Zn	244.30d	3.1	10.3
^{74}As	17.77d	9.5	2.6
^{75}Se	119.64d	10.0	18.5
^{83}Rb	86.20d	25.1	37.2
^{84}Rb	32.80d	4.1	2.3
^{87}Y	3.35d	213.3	12.9
^{88}Zr	83.40d	21.2	32.2
^{89}Zr	3.27d	127.1	7.7
$^{95\text{m}}\text{Tc}$	60.00d	30.3	35.7
^{97}Ru	2.90d	182.7	10.6
$^{101\text{m}}\text{Rh}$	4.40d	239.3	22.0

のトレーサーとしては ^{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、やっかいな β 線測定をしなければならない(β 線は γ 線に比べて透過力がずっと弱く、例えば試料を可溶化処理して液体シンチレータに溶解して測定する必要がある)。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. マルチトレーサー法の応用研究

これまでに、マルチトレーサー法を用いて、各種元素について、新しい化学分離法の開発(イオン交換, 吸着分離, 多孔質の支持板に抽出試薬の有機溶媒溶液を浸み込ませた液体膜を使用する方法など)、地球環境における各種元素の挙動に関する研究(海洋における粘土や堆積物への吸着反応, 土壤中のフミン酸との錯形成反応など)、植物体(イネ, ダイズなど)への取り込みや分布の研究, 生体微量元素の動物体内の挙動の研究などが行われている。以下にマルチトレーサー法を用いた種々の研究のうち代表的な結果をご紹介します。

マルチトレーサー法の生体微量元素研究は、その多元素同時解析が可能という点と完全同一条件での実験が可能であるという点から、有用性が高い。そのさがけになった実験が、蛭沼らの研究になる^{8), 9)}。

彼らは Au 由来マルチトレーサー塩酸溶液 (pH=3) を 7 週齢の健常ラットに経口投与し、17 種類の微量元素 (Mn, Co, Zn, As, Rb, Sr, Y, Eu, Gd, Er, Tm, Yb, Lu, W, Re, Ir, Pt) の血液及び 8 臓器中への吸収と分布を決定した。血液や各種臓器間でそれぞれの元素に特有な分布が観察された。この結果は、シングルトレーサーを用いてそのダイナミクスが研究されている元素については、両者の結果がほぼ一致することを報告した。更に、シングルトレーサー法では当時まだその挙動がほとんど研究されていない元素 (Er, Tm, W, Re) についても興味ある知見が得られた。Re は近年、Tc にかわる放射性医薬品としての応用の可能性が盛んに議論されていることは記憶に新しい。これらの研究結果からマルチトレーサー法の信頼性と有用性が示唆された。また、この研究によりラットの尿と糞への微量元素の排泄過程を経時的に追跡した¹⁰⁾。

天野らは Ag 由来マルチトレーサー生理食塩水を 4 週齢のマウスに腹腔内投与し、飼育環境下の酸素分圧が微量元素のマウス生体内挙動におよぼす影響を観察した¹³⁾。吸気中の酸素は欠乏時ばかりでなく過剰の状態においてもまた動物に生理学的、生化学的異常を来すことは既知の事実である。酸素過剰及び欠乏状態は生体内レドックス反応に影響し、動物の細胞や組織中の各種微量元素の代謝過程に影響を与える可能性がある。彼らはマルチトレーサー投与後のマウスを 10, 20, 80, 100% の 4 種類の酸素分圧の O₂-N₂ ガス雰囲気中で 48 時間飼育し、血液、脳、心筋、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、骨、骨格筋を摘出した。放射能の測定結果は、血液及び摘出されたすべての軟組織において、10% の酸素分圧下での Rb の取り込みだけが他の酸

素分圧下における取り込みより高いことを示した。一方、酸素過剰及び欠乏雰囲気下での他の微量元素 (Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Y, Zr) の代謝挙動は酸素濃度変化によってほとんど変化がないことがわかった。

天野らは肝臓や脳における Al や Cd と各種微量元素の相乗作用や拮抗作用に関する研究にマルチトレーサー法を利用した¹⁴⁾。彼らは Ag 由来マルチトレーサー溶液をコントロールマウス、Al 過剰及び Cd 過剰マウスに腹腔内投与し、組織及び細胞における各種微量元素 (Be, Sc, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Se, Rb, Sr, Y, Ru, Rh) の分布を脳、心筋、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、骨格筋、及び骨と血液とで調べた。この結果、肝臓における各種元素の吸収において、Al と Cd の過剰投与によって惹起された吸収促進効果 (相乗作用) が見られた。Al 過剰によっておこる相乗作用は Sc, Zr, Y で観察され、これらの元素は Al とともにミトコンドリア画分 (リソソームを含む) に集積した。一方、Cd 過剰は Zn と Se の吸収を促進し、それらの大半は細胞上清に検出された。

近年、V 及びその化合物は、脂質の代謝、出生前後の死亡率や骨形成に対する影響などについて盛んな研究が行われている。また、糖尿病罹患時におけるインスリン様作用を有する化合物が多数合成され、その臨床応用が検討されている¹⁵⁾。

天野らは Ag 由来マルチトレーサー溶液を用いて、マウスの種々の組織への吸収挙動を調べた¹⁶⁾。その結果、V は微量の Sr や Y に極めて類似した骨集積性を持つことを示した。また、生体内における超微量元素に属する V (組織レベルにおける含有量は ng/g 程度) のような元素の追跡には特にキャリアーフリーの RI を利用するトレーサー法が有効であることを示唆した。

V のインスリン作用に関する研究では、安井らの研究があげられる。彼らはストレプトゾトシン投与による 1 型糖尿病モデルラットに対し

て、インスリン様作用を有する V(IV) 化合物を投与した¹⁷⁾。このモデルラットに対してマルチトレーサー法を適用することで、V(IV) 化合物投与時における他の元素の代謝過程への影響を明らかにした。すなわち、 VOSO_4 をモデルラットに投与すると、V, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Se とともに、血中から各種臓器移行性が上昇することを明らかにした。現在も他の V 錯体による各種微量元素の代謝過程への影響に関する研究を推進している。

Zn は生体の多くの代謝過程において重要な元素である。そこで著者らは Zn 欠乏ラットを作成し、他の各種元素のダイナミクスに影響するかどうか検討した¹⁸⁾。Au 由来マルチトレーサー溶液を静脈注射した結果、Zn 欠乏とコントロールラットでは Ir と Pt の分布が全く異なり、前者の腎臓、血液などにおいて Ir の特異的蓄積が観察された。この現象は、Pt や Ir に容易に結合する結合蛋白質の親和性が、Zn 欠乏のため変化したと考えられた。また、コントロール及び Zn 欠乏ラットにおける希土類元素の特徴的蓄積性が観察された。この結果はコントロールと Zn 欠乏状態で、両者に差はほとんどなかったが、肝臓において、重希土類元素より軽希土類元素が、腎臓において、軽希土類元素より重希土類元素が多く蓄積することが明らかになり、その理論的考察を行った^{19), 20)}。

更に、Zn 欠乏関連研究では、大山らの研究があげられる。この研究では、Zn 欠乏マウスを作成し、機器中性子放射化分析法により、各臓器及び組織中の各種元素濃度を求めた。Zn 欠乏群とコントロール群の間で大きな濃度差が見られた元素は Zn と Co であった。Co は分析したすべての臓器及び組織で Zn 欠乏群の濃度がコントロール群より上昇していた²¹⁾。彼らは、同様に作成した Zn 欠乏及びコントロール群マウスに Ag 由来マルチトレーサーを腹腔内投与した²²⁾。この結果、特にダイナミクスに変化の見られた元素は、Zn のみであり、Co の挙動には両群の間に差が見られなかった。彼らは投与

方法の違いにより、各種微量元素の代謝過程がどの程度変化するかという観点から研究を推進している。

Se もまた Zn 同様に重要な必須微量元素であるが、蛭沼らは欠乏状態の異なる 2 種類の Se 欠乏ラットを作成し、マルチトレーサー法を適用した^{23), 24)}。すなわち、胎生期から Se 欠乏状態とした Se 欠乏(I)群 (Se 欠乏餌及び超純水で 12 週齢まで飼育)、離乳後から Se 欠乏状態とした Se 欠乏(II)群 (4 週齢の雄ラットを Se 欠乏餌及び超純水で 12 週齢まで飼育) である。

Se 欠乏(I)群は著しい成長障害を認め、その体重はコントロール群の約 1/2 であった。また、Se 欠乏(II)群の体重及び各臓器の重さは、コントロール群の重さとはほぼ一致していた。しかし、Se 欠乏(II)群における GSH-Px 活性は、有意に低下していた。マルチトレーサーを投与した Se 欠乏(II)群の各臓器における各種元素の取り込みは、Se を除くすべての元素のダイナミクスはコントロール群とほぼ一致した。一方、Se 欠乏(I)群における As 及び Fe の体内動態は、コントロール群の結果と差が見られた。すなわち、Se 欠乏(I)群の肝臓における As と Fe の取込み量の増加が観察された。Se 欠乏(I)群の肝臓における As の取り込みの増加は、As のメチル化反応の減弱あるいは、胆汁からの As 排泄の減少が示唆された。また、Se 欠乏(I)群の肝臓における Fe の取り込みの増加は、Fe 貯蔵蛋白質であるフェリチンが関与していることが示唆された。松本らは Se と Fe との相互作用、またそれらを取り巻く活性酸素消去系との関連を明らかにする目的から、Se 欠乏ラットにおける Se, Fe, Mn, Zn 及び Co の肝細胞分画法による個々のフラクションにおける元素分布を検討している²⁵⁾。

一方、塩原らは飼料中に含まれる Se の化学形や濃度変化による各種微量元素の臓器分布への影響を検討した²⁶⁾。飼料中の亜セレン酸、又は、セレノメチオニンを唯一の Se 源とし、含有する Se 濃度を 0 (欠乏)、0.2 (適正)、2.0

mg Se/kg (過剰) として、2 週間摂食させた。このラット群に、 ^{203}Hg を混合したマルチトレーサー溶液を尾静脈投与し、4 日後に解剖し、採血、採毛及び、臓器 (肝臓、腎臓、精巣、脾臓、脳) を摘出した。この結果、摂取する Se の化学形による差は、ほとんど観察されず、その摂取量による影響のみが観察された。投与された Se (^{75}Se) は、欠乏群で肝臓を除く臓器への回収率が他の群に比べ有意に高く、飼料中の Se 濃度が増加するにつれて、回収率が著しく低下した。これは、経口的に摂取した Se 量に依じて、投与された ^{75}Se が希釈されたためと考えられた。Mn は ^{75}Se と類似した挙動を示し、Se 欠乏群では肝臓を除く臓器への回収率が高く、逆に過剰群では低下していた。この原因は Se 不足によって抗酸化力の低下を補うため、抗酸化酵素の活性中心に要求される Mn の臓器への取り込みが増加したと考察した。

マルチトレーサー法の応用研究は、放射性医薬品開発や脳内における微量元素研究にも展開されている。

Liu らは放射性医薬品として有効な核種をマルチトレーサー法でスクリーニングするための基礎的研究を行った²⁷⁾。彼らは diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) cyclic dianhydride と IgG を結合後、これに Au 由来マルチトレーサーを混合し、17 核種の γ 線放出核種との放射性核種ラベル DTPA-IgG を合成した。これら化合物の結合強度は DTPA と金属の安定度定数にのみ依存し、金属の安定度定数の上昇に伴って、放射性ラベル効率は上昇することを明らかにした。また、この合成した放射性核種ラベル DTPA-IgG を正常マウスに投与し、その代謝過程を経時的に観察した²⁸⁾。この結果、Ce-DTPA-IgG の肝臓蓄積性が顕著であることがわかった。このほか、担癌マウスにおける各種微量元素の代謝過程と腫瘍蓄積性に関する研究も報告している²⁹⁾。

玉野らはマルチトレーサー法を用いて、脳腫瘍の画像診断薬の開発を目的として、各種微量

元素の脳腫瘍への集積性を検討した^{30), 31)}。その結果、Rb, Zn, Mn が脳腫瘍に高く取り込まれることが明らかになった。Rb は K と類似した挙動を示し、Mn は腫瘍に必要な栄養素であることから、これらの金属の脳腫瘍への集積もその代謝活動と関連したものであることを示唆した。Zn, Mn, Rb の脳腫瘍集積性は、腫瘍形成による血液脳関門の破壊が重要な要因と考えられたが、腫瘍の代謝活動との関連性も重要であることを示した。これらの金属の短半減期 γ エミッターやポジトロンエミッターによる脳腫瘍の画像診断が期待される。

最近推進されている脳と微量元素の関連研究では、玉野らによるマルチトレーサー注入マイクロダイアリス法による脳内微量元素の代謝過程の研究³²⁾、天野らによる加齢に伴うマウスの脳内微量元素のダイナミクスに関する研究³³⁾、武田らによるてんかんモデルマウスにおける脳内微量元素動態に関する研究³¹⁾、近畿大の南らによるリポポリサッカライド LPS による血液脳関門の破壊と微量元素の脳内動態に関する研究³⁵⁾などがあげられる。

胎盤は各種の微量元素をはじめとした様々な化学物質に対して、高い選択性を有するフィルタである。著者らは母ラットに吸収された各種微量元素が、胎盤を介して胎児へ移行する過程と胎児体内における各種元素の濃縮過程について、マルチトレーサー法を用いて検討した³⁶⁾。その結果、各種臓器からは、17 元素 (Be, Na, Sc, V, Mn, Fe, Co, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Tc, Ru) が定量できた。これらの元素は、胎盤透過性及び体内分布の違いから、二つのグループに分けることができた。第 1 のグループは必須性が証明されていない元素群で、Be, V, As, Y, Zr, Tc 及び Ru の 7 元素である。これらの元素は、胎盤のみに蓄積し胎児への移行は見られなかった。一方、第 2 のグループは多くの生体必須元素が含まれる。これらの元素群は胎盤を透過し、胎児に移行していた。例えば、Mn, Fe, Zn 及び Se は、胎児体内の

みへの分布が見られ羊水には排泄されなかった。胎児移行性が高いこれらの元素のうち、胎児脳における Mn 及び Zn は、特異的に濃縮されていた。胎生 18~19 日目の胎児においては、神経系の構築、各種生理活性物質、各種細胞の新生が劇的に起きている時期であり、これら元素は細胞発生及び分裂など様々な生理機能に関与し、特に脳神経系の形成に関与していることが示唆された。また、Rb も胎児へ蓄積していた。Rb の物理化学的性質は K の性質と類似しており、胎盤を透過する過程において Rb と K の識別が明確にされていないことを示唆した。

一方、吉田らは、妊娠、非妊娠時における各種微量元素の消化管吸収動態に関する研究を行っている³⁷⁾。彼らは、妊娠、非妊娠ラットから十二指腸、空腸、回腸、結腸をそれぞれ摘出し、腸管反転標本を作成し、これに Ti 由来マルチトレーサー (^{28}Mg 及び ^{47}Ca を含む) 溶液を調製、粘膜側から漿膜側への能動吸収を観察した。その結果、妊娠ラットにおける十二指腸の Ca 能動吸収の亢進、Se の空腸における能動輸送系の存在、妊娠、非妊娠時の Mg 吸収の不変等が観察され、2 価陽イオンを中心とした微量元素の腸管吸収機構の解明を探究している。

細胞レベルの研究における最近の成果には以下のものがあげられる。中山らは、肝癌発症前後に癌組織中及び血清中の Cu/Zn 比が増加することを明らかにしており、Cu 含有メタロチオネインによる肝癌発症機構への関与が示唆された。肝癌発症メカニズムを解明するため、ヒト肝癌細胞を用いて、Cu 輸送経路の確定及び Cu 含有蛋白質間の相互作用に関する研究を行った³⁸⁾。その結果、肝癌発症時に、Cu 含有メタロチオネイン以外の Cu 含有蛋白質の生合成増大を確認した。現在は、その単離精製を行っている。

柳谷らはメタロチオネインノックアウト細胞を利用して、Cd に対する耐性獲得機構に関する研究を行った。Cd 毒性を修飾する生体内因子として最も重要なのはメタロチオネイン

(MT) である。MT は構成アミノ酸の約 30% をシステインが占める低分子量金属結合蛋白質であり、システインの SH 基を介して Cd などの重金属と結合することにより毒性を軽減するものと考えられている。MT 以外にもグルタチオンや抗酸化因子等が Cd に対する耐性の要因になると考えられているが、これまでに報告された Cd 耐性細胞の多くは、細胞内 MT 濃度が顕著に上昇しており、MT 以外の耐性因子の研究は困難であった。彼らは単離したマウスの胎児由来の繊維芽細胞に SV 40 large T antigen の cDNA を導入することにより不死化した MT 欠失繊維芽細胞株 (MT-/-細胞) を樹立することに成功した³⁹⁾。この MT-/-細胞を活用して、MT 以外の Cd 耐性因子を検索し、その性状を明らかにした⁴⁰⁾。まず、MT-/-細胞における Cd 等の重金属類に対する感受性の検討を行い、Cd 高感受性を示した MT-/-細胞から Cd 耐性細胞株を樹立し、その性状を解析した。その結果、親株と Cd 耐性細胞株との間で Cd の蓄積に顕著な差が観察された。そこで、マルチトレーサー法を利用し、他の金属の取り込みについても Cd 耐性細胞株と親株との間で比較したところ、Mn の取り込み量が Cd 耐性細胞株で顕著に低下していることを見出し、更に、阻害実験により、低濃度の Cd と Mn が共通した輸送系によって細胞内に取り込まれている可能性を明らかにした。この研究により、Cd の細胞への取り込みに必須金属である Mn の取り込み系が利用されている可能性が初めて示唆された。必須金属や有害性重金属の輸送機構については知見が少なく、この研究で MT 欠損細胞を利用することによって初めて得られた Cd 及び Mn の輸送に関する知見は、哺乳動物における金属の輸送及び毒性発現機構に関する研究に新しい方向性を示すものと考察されている。

栄養学分野における研究では、五十嵐らの報告があげられる^{41), 42)}。彼らは Fe 欠乏症の改善を目的とした種々の Fe 剤食品添加によって、

他の微量元素吸収におよぼす影響を検討した。彼らはFe強化剤として、一般的に鉄欠乏性贫血の治療に用いられているFeSO₄又は易溶性で食品の味に影響を与えないNaFeEDTAを用いた。これらのFe剤を飼料に添加し、Fe欠乏貧血ラットにマルチトレーサーとともに摂食させた。この後、経時的に臓器を採取してγ線を測定した。この結果、NaFeEDTAは食物中の吸収阻害物質の存在する条件でも吸収され、FeSO₄のように食物中の阻害物質の影響を受けにくいことが明らかになった。また、他の微量元素の吸収に関してもNaFeEDTAは、Coイオン、Znイオンの吸収を若干抑制することがわかった。

他にも動物における生体微量元素研究の報告は多数あるが、ここで植物及び環境科学、化学の研究をいくつかご紹介しよう。

土壌には種々な元素が含まれているが、植物による金属イオンの吸収や蓄積については必須元素に関する以外ほとんど知られていない。最近では人間活動によって重金属のみならず放射性同位元素による汚染も問題になりつつある。安部（静）らは、マルチトレーサーを用いてイネとダイズへの金属イオンの移動と分布を研究した⁷⁾。イネとダイズは発芽数日後にAu由来マルチトレーサー(Be, Na, Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Ag, Te, Ba, Ce, Pm, Eu, Gd, Tb, Tm, Yb, Lu, Hf, Ir, Pt)を含む水耕液に移され一定時間栽培された後、種、葉、茎及び根への微量元素の分布が観察された。根にはほとんどすべての元素が見出されるが、茎には根より吸収されて元素が微量に蓄積し、葉にはMn, Co, Zn, Rb, Sr, Baのみが検出された。これらの結果は、植物には根から葉や茎への微量元素を選択的に移送する機構が存在することを示唆している。イネでは葉にMnとZnが濃縮され、ダイズではMn, Co, Zn, Rb, Sr, Baが検出された。比較のために行われたダイズの土耕栽培（トレーサーはキャリアフリーの状態を失う）では水耕の

場合と異なり、すべての元素が極微量の吸収・分布することがわかった。

一方、高橋（正）らは、トマト根の金属結合性蛋白質を発現する形質転換タバコの金属吸収特性を研究している⁴³⁾。トマト根に局在している金属結合性蛋白質LeGlp1は成熟蛋白質N末端付近に金属結合部位を持っている。彼らは、LeGlp1形質転換タバコにマルチトレーサーを根より吸収させ、葉での各種元素の蓄積を調べた。更に、葉と根をホモジナイズして得た蛋白質から、抗LeGlp1抗体と抗原抗体複合体を作る蛋白質画分をIgGSorbとの沈降物として回収し、その放射能を測定した。この結果、マルチトレーサーを取り込ませたLeGlp1形質転換タバコは抗LeGlp1抗体を用いた免疫沈殿物にMnが多く、特異的にLeGlp1にMnが結合していることを明らかにした。

鈴木（弘）らは、アーバスキュラー菌根(AM)を形成したマリーゴールドにおける微量元素吸収の研究にマルチトレーサー法を利用している^{44), 45)}。この研究では、AMを形成した植物において、AMを形成していない植物よりもZn, Naなどの吸収量が増加し、Co, Scなどの吸収量が減少することを報告した。このような吸収の違いはAMの外生菌糸による植物への微量元素の輸送能の違いが関係すると考察した。そこで、マルチトレーサー法により、外生菌糸による植物への微量元素輸送能について調べた。ナイロンメッシュを用いて根は侵入できないが菌糸は侵入できる部分(HC)と根と菌糸が混在する部分(RC)に区分した栽培容器を実験に用いた。HCには川砂を充填し、Be, Na, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Tcを含むマルチトレーサーを添加した。RCにはマリーゴールドを播種し、AMを接種した。また同時にAM菌を接種しないコントロール区を設けた。その結果、Na, Zn, Se, Rb, Srの吸収量は播種40日及び60日後とも接種区においてコントロール区よりも2倍以上高くなった。また、Yの吸収量は播種60

日後のみ接種区においてコントロール区よりも高くなった。Tcの吸収量は接種区とコントロール区ともほぼ同じであった。一方、Be, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Zrは接種区とコントロール区の植物体からは検出されなかった。以上のことから、AM菌の菌糸にはNa, Zn, Se, Rb, Sr, Yを吸収し植物に供給する能力があると報告した。

尾崎らは、酸性雨によって土壤から溶出するAlイオンの植物への悪影響が懸念されている状況に着目し、土壤の間隙水中に溶解したAlイオンを吸収した植物における各種元素の吸収に対する影響を調べた⁴⁶⁾。彼らは $AlCl_3$ とAu由来マルチトレーサーを含む水耕液中(pH=4.5)でUS春蒔き五寸人参を栽培した。この結果、Alイオンの添加によりBe, V, Znや希土類金属の根への吸収の増加が認められ、特にBeとVはその吸収量は約3倍に達した。Alイオンの影響で非必須元素の吸収率の増加は著しかったが、それに対して、植物にとって有益な元素の吸収はAlイオン濃度とともに減少した。これはAlイオンの存在によってイオン吸収の選択性が変化することを示唆した。最初に植物に現れるAlイオンの影響は根に対するもので、これにはイオンバランスの乱れ(ヴィーツ効果)に起因する有害元素の吸収の増加が関与し、葉に対する影響は有益な元素の吸収の減少によることを示唆した。

チェルノブイリ事故などに見られる原子力施設からの放射性核種の漏洩による環境汚染が問題視されている中、放射性核種の環境汚染に関する基礎研究にもマルチトレーサー法が応用されている。篠永らは、雰囲気中に存在する放射性核種が植物にどのように吸収されるか検討した⁴⁷⁾。彼らは土壤から根を通じてマルチトレーサーが吸収されないように栽培チェンバーを工夫し、Au由来マルチトレーサーを吸収させたセルロースの微粒子を空気を吹き込むことによって空中に分散させた栽培チェンバー(閉鎖系)中でダイズを栽培した。吸収量の多少は元

素の種類に依存するが、マルチトレーサー中に含まれたSc, Mn, Co, As, Se, Rb, Sr, Y, Eu, Gd, Yb, Hf, Re, Irのすべての核種が葉と茎に見出された。Co, Se, Rbは大量に、Sc, Sr, Reの少量が種に、また微量のCo, Se, Rb, Reが根に検出された。この結果から、土壤から十分な養分が供給されていてもダイズの葉から吸収された放射性核種の何種類かは種に移行することがわかった。

また、曾雌らは、根圏微生物に着目し、植物・微生物複合系における元素の取り込み・蓄積の能力を高め、複合系による放射性核種汚染土壤のファイトレメディエーションシステムをより効率的にするための研究を行った。彼らは、トマトの放射性核種取り込みを上昇させる非病原性の*Fusarium oxysporum*を利用し、形質転換によりファイトケラチン合成酵素遺伝子を過剰発現させた*F. oxysporum*の植物による放射性核種取り込みに与える影響を調べたところ、形質転換株を感染させたトマトは、非形質転換*Fusarium*株に感染したトマトのみならず、感染させていないトマトに比べても放射性核種の取り込みが減少することを明らかにした⁴⁸⁾。また、彼らは、シロイヌナズナのアクティベーションタグラインを用いて、植物の核種取り込みに関与する遺伝子の検索を行った。CsとSr耐性を指標にアクティベーションタグラインをスクリーニングした結果、これまでにCs耐性株を5株単離した。

フミン酸は自然界に存在するポリ酸や多価フェノールを含む有機性の化合物であり、帯水圏に存在する金属元素の振る舞いを支配する重要な因子であることが知られている。高橋(嘉)らはいろいろな金属イオンのフミン酸錯体の安定性を直接比較するために、AgあるいはAu由来のマルチトレーサーを利用し、同一のモデル及び同一の方法を用いて19元素(Be, Ca, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Ga, Sr, Y, Ba, Ce, Eu, Gd, Tm, Yb, Lu)のフミン酸錯体の安定度定数を決定した⁴⁹⁾。この結果か

ら、電荷が高くイオン半径の小さいイオンほど安定なフミン酸錯体を形成することからフミン酸は概して硬い酸であることを示した。得られた安定度定数の結果は、単純な静電モデルに基づきフミン酸は二配位のカルボン酸として微量元素と錯形成を行うとして説明され、更にこの錯形成は希土類元素の環境中における振る舞いに対する有力な支配因子であることが示唆された。

また、高橋らは、花崗岩間隙水への各種元素の拡散に関する研究を行った。地層中での元素の拡散は、特に放射性廃棄物や有害元素を対象とした場合、環境科学的に重要な現象である。そこで、地層表層に広く分布する花崗岩-水系での各元素の拡散を調べ、透過拡散法により各元素の拡散係数を求め、その結果を統一的に解析できるモデルの構築を行った。その結果、岩石の表面拡散係数はイオンポテンシャルに対する依存性が大いことが示唆された⁵⁰⁾。

更に、彼らは、地球表層での挙動が十分に解明されていない白金族元素に着目し、堆積物中における Re, Os の挙動に関する研究を行った。その結果、Os は、堆積物へ吸着しやすく、時間依存的に促進されることがわかった⁵¹⁾。

放射性核種を支持液体膜を通して化学分離する方法は種々の点から最も有用な方法の一つである。安部（静）らはリン酸ジ（2・エチルヘキシル）とデカリンに多孔性テフロン膜を浸して調製した支持液体膜を用いて Au 由来マルチトレーサーに含まれる Sc, Zr, Nb, Hf, Ce, Pm, Gd, Yb 及び Lu の 9 種類の元素の透過傾向をいろいろな pH で調べ、重希土類元素から軽希土類元素を分離することが可能であることを示した⁵²⁾。この透過傾向は供給槽の膜表面における錯形成と透過後受容槽側の膜表面での解離とのバランスに支配され、個々の元素の透過性速度は両槽の pH によって異なることがわかった。

末木らは、マルチトレーサーを含む炭素棒を陽極にしてアーク放電法を用いて、様々な金属

の金属フラーレンを合成する研究を行っている。彼らはアルカリ金属の内包フラーレンの合成を試みた⁵³⁾。マルチトレーサーを含む炭素棒に孔を空けてその中に金属酸化物と炭素粉末を混ぜた粉末を詰め、マルチトレーサーを含むエタノール溶液を粉末に浸透させた方法で調製した。この方法で調製した炭素棒を用いてアーク放電を行ったところ、アルカリ金属は他の金属元素と一緒にフラーレンを含むスス中に存在していることが明らかになった。この結果から炭素棒の調製の仕方によって金属フラーレンの合成率が異なることがわかり、特にアルカリ土類金属や Eu, Yb 等の金属の沸点の低い元素の生成量が大きく変化することを明らかにした。

以上のように、マルチトレーサーの応用は多岐にわたり、ここで紹介したもの以外にも多くの報告がある^{54)~72)}。

6. マルチトレーサー製造法の高度化と自動化学分離装置及び複数核種同時 γ 線イメージング装置 (GREI) の開発

先にも述べたように、マルチトレーサーの利用者は生物学、医学、環境科学、材料物性研究などの多岐にわたる。また、応用研究の多様化により、リングサイクロトロンでは得られない新規のトレーサーの供給も強く望まれている。これら利用者のニーズに対してマルチトレーサーの安定的かつ迅速供給を行う手段として、マルチトレーサー自動化学分離装置の開発を行うとともに、更に広範囲の核種を含むマルチトレーサー多様化技術を確立することを目的として平成 11 年度から科学技術庁の原子力基盤研究推進テーマとして採択された。

すなわち、理研及び放医研の加速器の核破砕反応 (Nuclear Fragmentation) と京大原子炉による核分裂反応 (Nuclear Fission) を利用し、利用形態に合わせた各種のマルチトレーサー（すべての族を含み、群、族別のグループトレーサー）を製造する技術を確立し、また、ターゲット照射から化学分離までを自動化した自動

マルチトレーサー製造チャンバー

図3(a) ガスジェット結合型多重ターゲットシステム照射の概略図

図3(b) 照射装置の実物写真

化学分離装置を開発することで、短時間かつ、最小限の被曝により、必要な族、群を含むマルチトレーサーを供給できるシステムを構築することである。近年、マルチトレーサーユーザーの研究分野の多様化や研究対象元素の絞り込み、RI供給元のRI製造の縮小及び改廃などにもとない、SeやZnなどといった必須微量元素群のRI供給が困難になりつつあり、Cuのように現有マルチトレーサー製造装置では製造困難なRIの供給、検出感度の向上、入手困難なRI供給が切望されている。そこで、我々は理研加速器施設及び次期加速器RIBFを用いて、次世代マルチトレーサー製造計画を推進している。

このプロジェクトは、周期表上の全元素について、研究目的に最適な半減期と化学形でRIを製造可能とするものであり、現在、使用する加速器の種類と手法の違いから、3種類のトレーサー製造法を提案し、実際の製造開発、基礎研究をスタートした。すなわち、図3に示した短寿命及び長寿命核種ともに多核種同時製造できるガスジェット結合型多重ターゲットシステム(マルチトレーサー製造チャンバー及びエアロゾル発生装置)、AVFサイクロトロン直結型シングルトレーサー製造システムと不安定核分離装置RIPSを用いたRIビームによるRIカクテル製造システムである。更に、京大原子炉を用いたFissionマルチトレーサーの製造に成功した。これらの研究の推進により、今まで利用困難であった短半減期核種まで拡大利用でき、分離操作時の被曝が少なく、安全かつ安定供給が可能になると考えられる。

一方、マルチトレーサーを計測・分析装置へ適用した場合の基礎的知見を集積し、かつ装置の有効性を実証するために、マルチトレーサーの優位性を活かした複数核種同時 γ 線イメージング装置(γ -ray Emission Imaging, GREI)を製作し、新規の計測・分析手法を創出する研究を行っている。本装置の検出器は、Ge結晶

図4 スタックストリップ型 Ge 半導体検出器：
上部が液体窒素デューア，下部に電極分割
した Ge 結晶が 2 枚格納されている

を電極分割し，マルチチャネル化したもので，スタックストリップ型 Ge 半導体検出器が完成した^{73), 74)}。本装置の写真を図4に示した。本装置は従来の γ 線検出器より，非破壊で複数核種同時分析が可能であり，生物学，基礎医学，臨床医学などの広範な応用研究の展開をも期待できる。また，GREI の開発は，理研の推進している RI ビームファクトリー計画への応用を目指している。RI ビームファクトリー計画において新設される加速器は，RI をビームとして直接加速及び入射させることができるものであり^{75) - 77)}，そのビームのマイクロ化により，細胞のオルガネラレベルまでの集中的な入射が可能となる。様々な核種を含む RI ビームを脳などの生体組織，細胞に入射し，*in situ* における核種のダイナミクスを測定可能な装置を開発することで，現在，物理的半減期などの問題から，ダイナミクスの測定が困難であった核種の生体内挙動や細胞内のクロストークなどのミクロな情報伝達系における，生体微量元素の役割を解明することが可能となると考えられる。

7. おわりに

現在のところ，国内においてマルチトレーサー法を利用できる施設の数は限られてはいる。しかし，年を追うごとにその応用研究は盛んになりつつあり，現在までの種々の生体微量元素の研究やマルチトレーサー法における生体微量元素研究の結果から，様々な元素は生体の疾病や環境変化による恒常性変化を見いだす指標となることが明らかにされつつある。今後，マルチトレーサー法によって，各種微量元素を指標とした疾病や環境変化による生体影響を検索できるマルチインデックスを作成することも可能となるであろう。

現在，国内におけるマルチトレーサーを用いた応用研究は，大学や研究機関の約 50 余りのユーザーグループにより進められている。この規模は理研加速器の応用研究における一翼を担っているといっても過言ではない。1998 年，このユーザーグループを主軸としたマルチトレーサー研究会も設立され，会員も約 100 名を数える。理研で開発され，我が国で発展してきた手法であるが，最近では中国，アメリカ，ドイツの加速器施設でもマルチトレーサーを製造する試みがなされている。今後，生体と微量元素の相互作用や生理学的に興味深い微量元素の作用の発見などを通して，マルチトレーサー法が生体微量元素研究の汎用ツールになりえる日も遠くない将来である。

謝 辞

本稿をとりまとめるにあたり，多くの共同研究者や理研加速器基盤研究部の各位の御協力をいただいた。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Ambe, S., Chen, S. Y., Ohkubo, Y., Kobayashi, Y., Iwamoto, M., Yanokura, M. and Ambe, F.: Preparation of a radioactive multitracer solution from gold foil irradiated by 135 MeV/nucleon ^{14}N

- ions, *Chem. Lett.*, 149-152 (1991)
- 2) Ambe, S., Chen, S. Y., Ohkubo, Y., Kobayashi, Y., Iwamoto, M., Yanokura, M. and Ambe, F.: Preparation of a radioactive multitracer solution from Au, Ag, and Cu foil irradiated with high-energy heavy ions, *Anal. Sci.*, **7**, 317-320 (1991)
 - 3) Ambe, S., Chen, S. Y., Ohkubo, Y., Kobayashi, Y., Iwamoto, M. and Ambe, F.: Application of a radioactive multitracer technique to a study of adsorption of metals on α -Fe₂O₃, *Chem. Lett.*, 1059-1062 (1992)
 - 4) Weginwar, R. G., Liu, B., Ambe, S., Enomoto, S., Maeda, H. and Ambe, F.: Selective separation and reversed phase extraction of zirconium and hafnium from a multitracer solution, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **210**, 119-127 (1996)
 - 5) Liu, B., Ambe, S., Enomoto, S., Weginwar, R. G. and Ambe, F.: Preparation of carrier-free group tracers from a gold target irradiated by high-energy heavy ions, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **223**, 3-7 (1997)
 - 6) Ambe, S., Ambe, F. and Nozaki, T.: Tracer and Mössbauer studies of iron and cobalt in water hyacinth roots, *Int. J. Appl. Radiat. Is.*, **36**, 7-11 (1985)
 - 7) Ambe, S., Ohkubo, Y., Kobayashi, Y., Iwamoto, M., Maeda, H. and Yanokura, M.: Multitracer study on transport and distribution of metal ions in plants, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **195**, 305-313 (1995)
 - 8) Hirunuma, R., Endo, K., Yanaga, M., Enomoto, S., Ambe, S. and Ambe, F.: The use of a multitracer technique for studies of the uptake and retention of trace elements in rats, *Appl. Radiat. Isot.*, **48**, 727-733 (1997)
 - 9) Enomoto, S., Yanaga, M., Hirunuma, R., Endo, K., Ambe, S. and Ambe, F.: Multitracer study on distribution of carrier-free radioactive isotopes in organs of rats, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **205**, 277-282 (1996)
 - 10) Yanaga, M., Enomoto, S., Hirunuma, R., Furuta, R., Endo, K., Tanaka, A., Ambe, S., Tozawa, M. and Ambe, F.: Multitracer study on uptake and excretion of trace elements in rats, *Appl. Radiat. Isot.*, **47**, 235-240 (1996)
 - 11) Ambe, F. (ed.): Focused on the multitracer, its application to chemistry, biochemistry and biology, *RIKEN Rev.*, **13**, 1-40 (1996)
 - 12) Enomoto, S. (ed.): Trends in bio-trace element research, *RIKEN Rev.*, **35**, 1-129 (2001)
 - 13) Amano, R., Oishi, S., Enomoto, S. and Ambe, F.: Unique behavior of rubidium in mice under low oxygen atmosphere: simultaneous tracing of Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb, Y, and Zr using the radioactive multitracer technique, *Ann. Cli. Lab. Sci.*, **27**, 358-364 (1997)
 - 14) Amano, R., Oishi, S., Enomoto, S. and Ambe, F.: Biodistribution of trace elements in normal, Al-overloaded and Cd-overloaded mice: An application of the radioactive multitracer technique, *Ann. Cli. Lab. Sci.*, **26**, 531-541 (1996)
 - 15) Tracey, A. S. and Crans, D. C. (eds.): "Vanadium Compounds: Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications", *American Chemical Society*, Washington DC. (1998)
 - 16) Amano, R., Enomoto, S., Nobuta, M., Sakamoto, M., Tsujioka, R. and Ambe, F.: Bone uptake of vanadium in mice: simultaneous tracing of V, Se, Sr, Y, Zr, Ru, and Rh using a radioactive multitracer, *J. Trace Elements Med. Biol.*, **10**, 145-148 (1996)
 - 17) Yasui, H., Takino, T., Fugono, J., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Sakurai, H.: Effect of vanadium treatment on tissue distribution of biotrace elements in normal and streptozotocin-induced diabetic rats: Simultaneous analysis of V and Zn using radioactive multitracer, *RIKEN Rev.*, **35**, 45-47 (2001) 及び, 滝野俊和: オキソバナジウム (IV) 錯体のインスリン様作用の評価, 京都薬科大学修士論文 (2000)
 - 18) Enomoto, S., Yanaga, M., Hirunuma, R., Endo, K., Ambe, S. and Ambe, F.: Metabolic and biochemical studies of trace elements in zinc-deficient rats: biochemical properties of platinum-group elements, *RIKEN Rev.*, **13**, 27-28 (1996)
 - 19) Enomoto, S., Yanaga, M., Hirunuma, R., Endo, K., Ambe, S. and Ambe, F.: Metabolic and biochemical studies of trace elements in zinc-deficient rats (2). ionic radius dependence of uptake of rare-earth elements, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **29**,

- 143(1996)
- 20) Enomoto, S. and Takematsu, N.: Theoretical consideration on the distribution of rare-earth elements in various organs of rats and mice, *Biomed. Research Trace Elem.*, **10**, 53-56(1999)
- 21) Yanaga, M., Iwama, M., Shinotsuka, K., Takiguchi, K., Noguchi, M. and Omori, T.: Instrumental neutron activation analysis of trace elements in organs and tissues of zinc deficient mice, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **243**, 661-667(2000)
- 22) Ohyama, T., Yanaga, M., Yoshida, T., Maetsu, H., Noguchi, M., Suganuma, H., Omori, T., Hirunuma, R. and Enomoto, S.: Uptakes of trace elements in Zn-deficient mice, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **251**, 393-398(2002)
- 23) Hirunuma, R., Sotogaku, N., Endo, K., Enomoto, S., Ambe, S. and Ambe, F.: Time dependence of distribution of radioactive trace elements in Se-deficient rats: Application of the multitracer technique, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**, 213-215(1999)
- 24) Hirunuma, R. and Enomoto, S.: Application of the multitracer technique: metabolic study of various elements in Se-deficient rats, *Anal. Sci.*, **17**, i1495-i1498(2001)
- 25) Matsumoto, K., Inagaki, T., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Endo, K.: Contents and uptake rates of Mn, Fe, Co, Zn, and Se in Se-deficient rat liver cell fractions, *Anal. Sci.*, **17**, 587-591(2001)
- 26) Shiobara, Y., Ogura, Y., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Suzuki, K.T.: Effects of dietary selenium species and doses on the organ distribution of multitracer, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **33**, 117(2000)
- 27) Liu, B., Ambe, S., Enomoto, S. and Ambe, F.: Labeling of immunoglobulin G with multitracer, *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, **201**, 273-279(1995)
- 28) Liu, B., Ambe, S., Weginwar, R. G., Enomoto, S. and Ambe, F.: Study of labeling immunoglobulin G with a multitracer, *Riken Rev.*, **13**, 35-38(1996)
- 29) Enomoto, S., Liu, B., Weginwar, R. G., Ambe, S. and Ambe, F.: Multitracer study on the uptake of inorganic ions by tumor, *Proc. 9th Int. Symp. on Trace Elements in Man and Animals*, **9**, 363-364(1996)
- 30) Tamano, H., Liu, B., Enomoto, S. and Takeda, A.: Tumor accumulation of radioactive trace elements: A multitracer study, *Biomed. Res. Trace Elements*, **12**, 96-101(2001)
- 31) Tamano, H., Enomoto, S., Oku, N. and Takeda, A.: Preferential uptake of zinc, manganese, and rubidium in rat brain tumor, *Nucl. Med. Biol.*, **29**, 505-508(2002)
- 32) Takeda, A., Tamano, H., Enomoto, S. and Oku, N.: Zinc-65 imaging of rat brain tumors, *Cancer Res.*, **61**, 5065-5069(2001)
- 33) Amano, R. and Enomoto, S.: Brain regional uptake of radioactive Sc, Mn, Zn, Se, Rb and Zr tracers into normal mice during aging, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **247**, 507-511(2001)
- 34) Hirate, M., Takeda, A., Tamano, H., Enomoto, S. and Oku, N.: Distribution of trace elements in the brain of EL (epilepsy) mice, *Epilepsy Res.*, **51**, 109-116(2002)
- 35) Minami, T., Sakita, Y., Okazaki, Y. and Amano, R.: Difference in penetration of metals into the brain, *Proc. 10th Int. Symp. on Trace Elements in Man and Animals*, **10**, 38(1999)
- 36) Enomoto, S. and Hirunuma, R.: Fetoplacental transport of the various trace elements in pregnant rats using the multitracer technique, *RIKEN Rev.*, **35**, 31-34(2001)
- 37) Yoshida, S., Mashuda, M., Yamazaki, M., Nakayama, M., Morikawa, H., Hirunuma, R. and Enomoto, S.: Study on the absorption of divalent cations in the digestive organs, *RIKEN Rev.*, **35**, 67-68(2001)
- 38) Nakayama, A., Haba, H., Hirunuma, R. and Enomoto, S.: Investigation of intracellular kinetics of copper in HepG2 cell line, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **36**, 121(2003)
- 39) Yanagiya, T., Imura, N., Kondo, Y. and Himeno, S.: Reduced uptake and enhanced release of cadmium in cadmium-resistant metallothionein null fibroblasts, *Life Sci.*, **65**, 177-182(1999)
- 40) Yanagiya, T., Imura, N., Enomoto, S., Kondo, Y. and Himeno, S.: Suppression of high-affinity transport system for manganese in cadmium-resistant metallothionein-null cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 1080-1086(2000)

- 41) Igarashi, K., Nakanishi, Y., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Kimura, S.: Effects of oral administration of NaFeEDTA on the biodistribution of trace elements, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **33**, 121 (2000)
- 42) Igarashi, K., Sasaki, A., Yoda, Y., Inage, Y., Nakanishi, Y., Yanagiya, T., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Kimura, S.: Effects of sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid on the absorption of various trace elements in anemic rats, *RIKEN Rev.*, **35**, 50-54 (2001)
- 43) Takahashi, M. and Sugiura, M.: Strategies for uptake of a soil micronutrient, manganese, by plant roots, *RIKEN Rev.*, **35**, 76-77 (2001)
- 44) Suzuki, H., Kumagai, H., Oohashi, K., Sakamoto, K., Inubushi, K., Enomoto, S. and Ambe, F.: Uptake of 15 trace elements in arbuscular mycorrhizal marigold measured by the multitracer technique, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, 283-289 (2000)
- 45) Suzuki, H., Kumagai, H., Oohashi, K., Sakamoto, K., Inubushi, K. and Enomoto, S.: Transport of trace elements through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus into marigold determined by the multitracer technique, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **47**, 131-137 (2001)
- 46) Ozaki, T., Enomoto, S., Minai, Y., Ambe, S., Ambe, F. and Makide, Y.: Influence of aluminium on the uptake of various cations from a solution into carrots, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **235**, 285-289 (1998)
- 47) Shinonaga, T. and Ambe, S.: Multitracer study on absorption of radionuclides in atmosphere-plant model system, *Water, Air, Soil Pollut.*, **101**, 93-101 (1998)
- 48) Soshi, T., Enomoto, S. and Yamaguchi, I.: Effect of Fusarium expressing yeast phytochelatin synthase gene on the uptake of radionuclides by tomato plants, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **36**, 134 (2003)
- 49) Takahashi, Y., Minai, Y., Ambe, S., Makide, Y., Ambe, F. and Tominaga, T.: Simultaneous determination of stability constants of humate complexes with various metal ions using multitracer technique, *Sci. Total Environ.*, **198**, 61-71 (1997)
- 50) Takahashi, Y., Minai, Y., Egawa, C., Mifune, T., Hirunuma, R. and Enomoto, S.: Application of multitracer technique to the studies on migration of trace elements in geosphere, *Anal. Sci.*, **17**, i621-i624 (2001)
- 51) Ito, M., Takahashi, Y., Mouri, H., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Shimizu, H.: Multitracer study on the adsorption of Re and Os on sediments from artificial seawater, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **36**, 128 (2003)
- 52) Ambe, S., Yashiki, H., Maeda, H., Enomoto, S., Ozaki, T. and Ambe, F.: Multitracer study on permeation of rare earth elements through a supported liquid membrane, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **236**, 181-185 (1998)
- 53) Sueki, K., Kikuchi, K., Akiyama, K., Sawa, T., Katada, N., Ambe, S., Ambe, F. and Nakahara, H.: Formation of metallofullerenes with higher group elements, *Chem. Phys. Lett.*, **300**, 140-144 (1999)
- 54) Matsumoto, K., Ui, I., Hirunuma, R., Enomoto, S. and Endo, K.: In vivo assessment of dynamics of various elements in living rat by using a multitracer, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **255**, 143-147 (2003)
- 55) Ambe, S., Abe, D., Ozaki, T. and Ambe, F.: Multitracer studies on the permeation of rare earth elements through a supported liquid membrane containing 2-ethylhexyl phosphonic acid-2-ethylhexyl ester (EHEHPA), *Radiochim. Acta*, **91**, 217-221 (2003)
- 56) Ambe, S., Katayama, O. and Ambe, F.: Multitracer studies on the permeation of various elements through a supported liquid membrane containing TBP, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **253**, 351-355 (2002)
- 57) Yabushita, Y., Kanayama, Y., Tarohda, T., Amano, R. and Enomoto, S.: Multitracer screening for in vivo element-element interrelations - Part I: Uptake of Mn-54, Sc-46, Fe-59, Co-58, Zn-65, Se-75, Rb-83, Sr-85 and Zr-88 by brain and other organs of mice bred under Mn-deficient, -adequate and -excessive diets, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **253**, 93-99 (2002)
- 58) Weginwar, R. G., Enomoto, S., Hirunuma, R. and

- Ambe, S.: Correlation between serum cholesterols and trace element uptake in liver, kidney, and blood of hypercholesterolemic mice, *Biol. Trace Elem. Res.*, **86**, 249-268 (2002)
- 59) Ambe, S., Sekido, S., Ozaki, T. and Yamaguchi, I.: Uptake of trace elements by rice plants inoculated with *Pyricularia oryzae*, *Appl. Radiat. Isot.*, **56**, 473-476 (2002)
- 60) Ozaki, T., Ambe, S., Enomoto, S., Minai, Y., Yoshida, S. and Makide, Y.: Multitracer study on the uptake mechanism of yttrium and rare earth elements by autumn fern, *Radiochim. Acta*, **90**, 303-307 (2002)
- 61) Ozaki, T., Ambe, S., Abe, T. and Francis, A. J.: Adsorption of radionuclides on silica and their uptake by rice plants from silica-multitracer solutions—The effects of pH, *Biol. Trace Elem. Res.*, **90**, 273-281 (2002)
- 62) Nabekura, T., Minami, T., Hirunuma, R., Enomoto, S., Hori, R. and Ito, Y.: Comparative uptake behavior of trace elements in adult and suckling rat lens, *Toxicology*, **163**, 101-105 (2001)
- 63) Hirunuma, R., Endo, K., Enomoto, S., Ambe, S. and Ambe, F.: Study on the distribution of radioactive trace elements in vitamin D-overloaded rats using the multitracer technique, *Appl. Radiation. Isot.*, **50**, 843-849 (1999)
- 64) Oishi, S., Amano, R., Ando, A., Enomoto, S. and Ambe, F.: Simultaneous biobehavior of trace elements, Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb and Zr in the brain and other organs of C57 BL/6 N mice, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**, 411-416 (1999)
- 65) Sotogaku, N., Endo, K., Hirunuma, R., Enomoto, S., Ambe, S. and Ambe, F.: Biochemical reactions of various trace elements with blood components and transport proteins, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**, 429-432 (1999)
- 66) Sotogaku, N., Endo, K., Hirunuma, R., Enomoto, S., Ambe, S. and Ambe, F.: Binding properties of various metals to blood components and serum proteins: a multitracer study, *J. Trace elements Med. Biol.*, **13**, 1-6 (1999)
- 67) Ban-nai, T., Muramatsu, Y., Yoshida, S., Uchida, S., Shibata, S. and Ambe, S.: Multitracer studies on the accumulation of radionuclides in mushrooms, *J. Radiat. Res.*, **38**, 213-218 (1997)
- 68) Ozaki, T., Enomoto, S., Minai, Y., Ambe, S. and Makide, Y.: A survey of trace elements in Pteridophytes, *Biol. Trace Elements Res.*, **74**, 259-273 (2000)
- 69) Ozaki, T., Enomoto, S., Minai, Y., Ambe, S., Ambe, F. and Makide, Y.: Beneficial effect of rare earth elements on the growth of *Dryopteris erythrosora*, *J. Plant Physiol.*, **156**, 330-334 (2000)
- 70) Gouthu, S., Weginwar, R. G., Arie, T., Ambe, S., Ozaki, T., Enomoto, S., Ambe, F. and Yamaguchi, I.: Subcellular distribution and translocation of radionuclides in plants, *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 2023-2027 (1999)
- 71) Ambe, S., Ozaki, T., Enomoto, S. and Ambe, F.: Multitracer study on the soil-to plant transfer of radionuclides in komatsuna at different growth stages, *Environ. Technol.*, **20**, 111-116 (2000)
- 72) Enomoto, S., Liu, B., Amano, R., Ambe, S. and Ambe, F.: Metabolic and pathological studies on rare-earth elements in non-insulin dependent diabetes mellitus model mice, *RIKEN Rev.*, **13**, 31-32 (1996)
- 73) Yang, Y. F., Gono, Y., Motomura, S., Enomoto, S. and Yano, Y.: A Compton camera for multi-tracer imaging, *IEEE T. Nucl. Sci.*, **48**, 656-661 (2001)
- 74) Yang, Y. F., Gono, Y., Motomura, S., Enomoto, S. and Yano, Y.: Monte Carlo simulations of the performance of a Compton camera consisting of position-sensitive germanium detectors, *Nucl. Instrum. Methods*, **A482**, 806-813 (2002)
- 75) 谷畑勇夫：重イオン・RI ビームの科学，学術月報，**50**，39-43 (1997)
- 76) 矢野安重，谷畑勇夫：大型加速器と RI の新利用，*RADIOISOTOPES*，**44**，36-42 (1995)
- 77) Yano, Y., Goto, A. and Katayama, T.: Overview of RIKEN RI beam factory project, "Cyclotrons and their Applications 1998", (Baron, E. and Lieuvain, M. eds.), pp. 696-703, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia (1998)