ノ ー ト

隣接切片を用いた同一個体脳切片におけるインビボ及び インビトロ受容体結合画像の比較測定法

中野貴之, 柳本和彦, 網谷美里, 桃崎壮太郎, 細井理恵, 井上 修

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 放射薬剤動態解析学研究室

565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-7

2005 年 7 月 15 日 受理

Key Words : same animal brain, receptor binding, ^3H -labeled ligand, in vivo, in vitro, autoradiogram

1. 序 論

PET, SPECT による脳の情報伝達系の測定に関しては,すでに多様な標識リガンドが実用化され種々の臨床利用に応用されている^{1),2)}。PET, SPECT による受容体解析は一般的方法として標識リガンドの血中動態と脳内動態とをそれぞれ入力関数—出力関数とするコンパートメントモデル解析が用いられる³⁾。一方,マウスやラット等を用いる基礎的研究において標識リガンドの経時的動態を測定するためには多数の動物を必要とすることから,標識リガンド投与後一定時間経過した時点での定量的オートラジオグラフィ法を用いて検討する事例が多い⁴⁾。生体脳(インビボ)における受容体結合画像には受容体の最大結合数(B_{max})及び受容体との解離速度定数(K_D)以外にも,局所脳血流量の変化,内在性リガンドによる競合阻害,受容体の状態変化等の要因をも反映していることが多く,インビトロの受容体結合画像との間に乖離が生じることが多い。したがってインビボの受容体結合画像の解析に際してはインビトロの受容体結合画像で得られる受容体の結合能($BP=B_{\text{max}}/K_D$)を参照値として用いることが重要である。脳虚血等の疾患モデルや各種の刺激実験等においては顕著な個体差が生じ

る場合が多く,異なる個体間でのインビボ結合画像とインビトロ結合画像とを比較検証するには多くの困難が伴う。そこで同一個体脳におけるインビボ結合画像とインビトロ結合画像を同時に得る方法を開発することには大きな意義があると考えられる。

この目的のためには短半減期核種である ^{11}C -標識リガンドと長半減期核種である ^3H -標識リガンドを併用する方法が考えられるが, ^{11}C -標識リガンドの使用は極めて限定された施設でしか実施できない。そこで今回,より汎用性のある ^3H -標識リガンドを用いて同一個体脳におけるインビボ結合画像とインビトロ結合画像とを得る方法について検討したのでここに報告する。

なお,今回はインビボ結合画像とインビトロ結合画像との乖離が顕著に見られる例として,イボテン酸による線条体破壊ラット脳における ^3H -quinuclidinyl benzilate (^3H -QNB)とムスカリン性アセチルコリン受容体(mACh-R)との結合画像をモデル系として取り上げた。

2. 実験方法

(1) 動物

雄性 Wistar 系ラット(6 週齢, 130 ~ 150 g)を日本 SLC 社(浜松)より購入し, 12 時間の明暗サイクル, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の室温下

で自由摂水、自由摂食の状態で飼育した。

(2) 試薬

^3H -QNB (比放射能: 1.61 TBq/mmol) は Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA) より購入した。イボテン酸は Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) より購入し実験に使用した。

(3) ラット線条体へのイボテン酸注入

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg: 腹腔内投与) でラット左側線条体 (Bregma から前方へ 0.2 mm, 左へ 3.0 mm, 深さ 6.0 mm) にイボテン酸を微量注入した。イボテン酸は 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製して 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で 2 分間注入し、試薬の拡散を確実にするために 5 分間留置した。対側線条体へは PBS (phosphate buffer saline) を微量注入した。イボテン酸注入から 2 週間経過後、トレーサ実験を実施した。

(4) インビボオートラジオグラフィー

イボテン酸を注入したラットに ^3H -QNB (約 1.85 MBq) を静注し、60 分後に断頭屠殺した ($n=3$)。脳を摘出して急速凍結させた後、厚さ 30 μm の切片を作成し、 ^3H 用イメージングプレートに 4 週間コンタクトした。得られた画像上の大脳皮質及び線条体に関心領域 (ROI) を設定し、各 ROI における放射能濃度 (PSL/ mm^2) をバイオイメージングアナライザーシステム (BAS1500, 富士写真フイルム) にて算出した。

(5) インビトロオートラジオグラフィー

上記のインビボオートラジオグラフィーで用いた切片の隣接切片を用い、50 mM Na-K リン酸バッファー (pH=7.4) 中で 1 nM の ^3H -QNB と室温で 60 分間インキュベーションした。インキュベーション後、氷冷したバッファーで余分なトレーサを洗い流し風乾して ^3H 用イメージングプレートに 4 日間コンタクトした。前記と同様の方法で各関心領域における放射能濃度 (PSL/

mm^2) を算出した。また、インビボオートラジオグラフィーに用いた切片をインビトロオートラジオグラフィーに用いた切片と同時にイメージングプレートに 4 日間コンタクトし、インビボ結合実験に用いた切片に含まれる放射能がインビトロ結合画像にどの程度影響を与えるかについて検証した。

全ての動物実験は大阪大学医学部保健学科動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

3. 結 果

Fig. 1 にインビトロ結合画像とインビボ結合画像を、また Fig. 2 に各関心領域における放射能濃度 (PSL/ mm^2) を示した。

大脳皮質における PSL/ mm^2 を比較するとインビボ結合画像は 4 週間のコンタクトでも約 2.5 (PSL/ mm^2) であり、4 日間コンタクトしたインビトロ結合画像での 44.3 (PSL/ mm^2) と比較すると約 5.6% と低値を示した。インビトロ結合画像ではイボテン酸注入側の線条体における ^3H -QNB の放射能濃度は対側と比較して 49% と低値を示したのに対し、逆にインビボ結合画像においてはイボテン酸注入側において対側の約 111% に増加した。また、インビボ切片をインビトロ切片と同時に 4 日間コンタクトし、脳切片全体の PSL/ mm^2 を比較した結果、インビボ切片ではその値は 0.58 (PSL/ mm^2) であり、インビトロ切片の 3% 以下であった。

4. 考 察

^3H -QNB はインビボの系でも mACh-R との特異結合を解析できる高親和性の標識リガンドであり、 ^{11}C -QNB を用いるとサル及びヒトでの mACh-R の解析が可能である。 ^3H -QNB のマウス脳内動態は mACh-R の密度が高い大脳皮質や線条体において経時的に増加する。また ^3H -QNB の非特異結合はインビボの系で比較的低く、大脳皮質においては全放射能の 75% 以上が特異結合成分であることを著者らはすでに報

Fig. 1 In vitro and in vivo autoradiograms of ^3H -QNB binding in rat brain infused with ibotenic acid ($20 \mu\text{g}/2 \mu\text{L}$). Brain slices were contacted with ^3H -imaging plate for 4 days (in vitro) and 4 weeks (in vivo). A significant reduction of in vitro ^3H -QNB binding in the left striatum (ibotenic acid infused side) was observed, while in vivo ^3H -QNB binding in the same region was slightly increased.

Fig. 2 Result of the quantitative analysis of in vitro and in vivo autoradiograms. The regions of interest (ROIs) were identified on autoradiograms, and radioactivity concentrations were determined by PSL/mm². Values are expressed as mean $\pm$ S.D. of 3 animals. Statistical analysis was performed by paired t-test.

告している⁵⁾。そこで今回は ^3H -QNB 投与 60 分後におけるインビボ結合画像を得ることを試みた。 ^3H -QNB のインビボ結合画像ではイボテン酸注入側の線条体において結合の増加が認められたのに対し、インビトロ結合画像においては逆に顕著な結合の減少を認めた (対側の約

49%)。イボテン酸注入モデルはハンチントン病のモデル動物として用いられており、神経細胞を選択的に破壊するがグリア細胞は比較的保持されており、また血流量はあまり変化しないことが報告されている⁶⁾。したがって局所血流量以外の要因が ^3H -QNB のインビボ結合とイン

ビトロ結合との間の顕著な乖離現象に関与していると考えられるが、現在のところその機序は不明である。

今回の実験結果で得られたもっとも重要な点は、同一個体脳の隣接切片を用いることにより³H-標識リガンドを用いてもインビボ結合画像とインビトロ結合画像とを同時に得ることができるということが判明した点である。インビボ切片に含まれる放射能はインビトロ結合画像の3%以下であり、その影響は無視し得る。今後の重要な課題として、このようにして得られた画像の比較測定を行う際にどのような画像処理を行うのが適当であるかという点が挙げられる。³H-QNBのインビトロ結合画像は非特異結合成分が少ないので⁷⁾、その放射能濃度は主にmACh-R結合能($BP=B_{max}/K_D$)を表していると考えられる。一方、インビボ結合画像には、mACh-R結合能の他に局所血流量や内在性のアセチルコリン等結合に影響を与える種々の要因を含んでいる。したがってインビボ結合画像を分子としてインビトロ結合画像で割ることによってmACh-Rの結合能($BP=B_{max}/K_D$)以外の要因を画像化することができる。また今回用いたような片側性の試薬注入モデルや片側性の刺激実験に関しては、正常側のある関心領域のPSL/mm²の相対値から換算係数(f)を算出し、インビボ結合画像にfを乗じた画像を作成し、両者のSubtraction画像を比較するのも簡便な方法の一つである。結論として³H-標識リガンドを用いても、同一個体脳におけるインビトロ結合画像とインビボ結合画像とを同時に計測できることが明らかとなった。例えば³H-racloprideとドーパミンD₂受容体とのインビボ結合は、アンフェタミン等ドーパミンを放出する薬剤の負荷により著明に変化することが知られているが、その時のインビトロでの結合については不明である⁸⁾。本法を適用することにより³H-racloprideを用いてドーパミン系の修飾によるD₂受容体との結合に関してより詳細な情報が得られるであろう。本法はインビボの

系における分子間相互作用の特性をより詳細に検討する際に有用な方法論であると考えられる。

文 献

- 1) Penttilä, J., Kajander, J., Aalto, S., Hirvonen, J., Nagren, K., Ilonen, T., Syvalahti, E. and Hietala, J., Effects of fluoxetine on dopamine D₂ receptors in the human brain: a positron emission tomography study with [¹¹C]raclopride, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **7** (4), 431-439 (2004)
- 2) Boesch, S. M., Donnemiller, E., Müller, J., Seppi, K., Weirich-Schwaiger, H., Poewe, W. and Wenning, G. K., Abnormalities of dopaminergic neurotransmission in SCA2: a combined ¹²³I-beta CIT and ¹²³I-IBZM SPECT study, *Mov. Disord.*, **19** (11), 1320-1325 (2004)
- 3) Vilkmann, H., Kajander, J., Nagren, K., Oikonen, V., Syvalahti, E. and Hietala, J., Measurement of extrastriatal D₂-like receptor binding with [¹¹C]FLB 457-a, test-retest analysis, *Eur. J. Nucl. Med.*, **27** (11), 1666-1673 (2000)
- 4) Abe, K., Kashiwagi, Y., Tokumura, M., Hosoi, R., Hatazawa, J. and Inoue, O., Discrepancy between cell injury and benzodiazepine receptor binding after transient middle cerebral artery occlusion in rats, *Synapse*, **15**; **53** (4), 234-239 (2004)
- 5) Hosoi, R., Kobayashi, K., Watanabe, Y. and Inoue, O., Evaluation of in vivo binding properties of ³H-NMPB and ³H-QNB in mouse brain, *J. Neural Transm.*, **106** (7-8), 583-592 (1999)
- 6) Frey, K. A. and Agranoff, B. W., Barbiturate-enhanced detection of brain lesions by carbon-14-labeled 2-deoxyglucose autoradiography, *Science*, **18**; **219** (4586), 879-881 (1983)
- 7) van Huizen, F., Shaw, C., Wilkinson, M. and Cy-nader, M.S., Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in rat cerebral cortex slices with concomitant morphological and physiological assessment of tissue viability, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **5** (1), 59-69 (1989)
- 8) Laruelle, M., Imaging synaptic neurotransmission with in vivo binding competition techniques: a critical review, *J. Cereb. Blood, Flow Metab.*, **20** (3), 423-451 (2000)

Abstract

Comparative Measurement of In Vivo and In Vitro Receptor Binding in the Same Rat Brain

Takayuki NAKANO, Kazuhiko YANAMOTO, Misato AMITANI, Sotaro MOMOSAKI, Rie HOSOI and Osamu INOUE: Course of Allied Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, 1-7, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

Both in vivo and in vitro autoradiograms of ^3H -QNB binding in the same rat brain were prepared. The rats were infused with ibotenic acid ($20\text{ }\mu\text{g}/2\text{ }\mu\text{L}$) into the left striatum 14 days prior to the tracer experiment. The rats were intravenously injected with 1.85 MBq of ^3H -QNB,

and decapitated 60 min later. The frozen sections of brain slices were contacted with imaging plate for 4 weeks, and in vivo autoradiograms were obtained. In vitro autoradiograms of ^3H -QNB binding using serial brain slices in the same animal were also made by incubation of 1 nM of ^3H -QNB. The influence of residue ^3H -QNB in brain slice on in vitro autoradiograms was below 3% of total radioactivity concentration. In the left striatum (ibotenic acid infused side), in vivo binding of ^3H -QNB was increased, while in vitro binding in the same region was significantly decreased. By using ^3H -labeled ligand, both in vitro and in vivo autoradiograms of receptor binding can be obtained in the same animal. The current method is useful for the study on the discrepancy of receptor binding between in vitro and in vivo.

(Received July 15, 2005)