

《ノート》

中枢神経系における $^{11}\text{CO}_2$ ガスの代謝研究—ラット脳内 $^{11}\text{CO}_2$ 固定の可能性—Basic Study of $^{11}\text{CO}_2$ Metabolism in the Central Nervous System
—Possible $^{11}\text{CO}_2$ Fixation in Rat's Brain—河野 義恭* 桜川 宣男* 松井 晨* 有馬 正高**
里吉栄二郎** 飯尾 正明*** 唐沢 孝****Yoshiyasu KOHNO*, Norio SAKURAGAWA*, Akira MATSUI*, Masataka ARIMA**,
EIJIRO SATOYOSHI**, Masaaki IIO*** and Takashi KARASAWA****

*National Musashi Research Institute for Mental and Nervous Diseases

**National Center for Nervous, Mental and Muscular Disorders

***National Nakano Chest Hospital

**** The Institute of Physical and Chemical Research

I. はじめに

最近医用小型サイクロトロンより生産される超短半減期 RI (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F など) の臨床応用が進んできた。これらの核種による標識化合物 (^{18}FDG , $^{13}\text{NH}_3$ など) を投与して, positron emission computed tomography (PET) による画像化と脳局所代謝率の測定が行われるようになった¹⁾。その定量化には代謝面での裏付けが必要であり, Sokoloff²⁾ は ^{14}C -デオキシグルコースによる脳局所糖代謝率を測定し, Kuhl ら^{3,4)} は ^{18}FDG を臨床応用している。しかし他の標識化合物 ($^{11}\text{CO}_2$, $^{13}\text{NH}_3$ など) の代謝については未解決の事項が多いが, 最近研究報告が見られるようになった^{5,6)}。われわれは $^{11}\text{CO}_2$ の PET による画像化に伴い,

その代謝と動態の研究を進めてきた。実験動物を用い, 脳内のトリクロル酢酸 (TCA) 可溶性成分を分析した結果, 吸入された $^{11}\text{CO}_2$ ガスが解糖呼吸系中間代謝産物に取り込まれることを確認し, 従来の報告と比較検討したので報告する。

II. 方 法

1. $^{11}\text{CO}_2$ ガス投与法と試料作製法

国立療養所中野病院に設置されているベビーサイクロトロン(日本製鋼所製)を用い, 窒素ガスターゲットにより $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ 反応により生産される ^{11}CO — $^{11}\text{CO}_2$ 混合ガスを, 800°C 加熱 CuO カラムに通して $^{11}\text{CO}_2$ ガスを得た。

ウィスター系ラット (250~300 g) をガラス容器 (2 l) に収容し, $^{11}\text{CO}_2$ (50~110 mCi) を含む混合空気を送風して3分間吸入させる。直ちに容器からラットを取り出して断頭する。頭部を液体窒素により急速凍結を行ってから脳を摘出し, RI キャリブレーター (Capintec 製) で直接全脳の放射能を測定した。

* 国立武蔵療養所小児神経科

** 同 神経センター

*** 国立療養所中野病院

**** 理化学研究所

受付: 57年6月25日

最終稿受付: 58年1月25日

別刷請求先: 小平市小川東町2620 (☎187)

国立武蔵療養所小児神経科

桜川 宣男

Key words: Cyclotron, $^{11}\text{CO}_2$ fixation, Rat's brain.

Table 1 Column chromatography by Dowex AG 1-X2 acetate form

Eluants	Elution volume
1. Aqua dest	6 ml
0.035 N acetic acid	25 ml
2. 0.10 N acetic acid	20 ml
3. 0.25 N acetic acid	20 ml
4. 0.50 N acetic acid	20 ml
5. 0.70 N acetic acid	30 ml
6. 0.10 N formic acid	10 ml
7. 0.30 N formic acid	30 ml
8. 0.45 N formic acid and 0.005 N HCl	20 ml
9. 0.75 N formic acid and 0.01 N HCl	35 ml
10. 0.90 N formic acid and 0.01 N HCl	40 ml
11. 2 N HCl	25 ml

2. 酸可溶性分画とそのカラムクロマトグラフィー

Naruse ら⁷⁾の方法に従って脳重量の4倍量, 0.3M トリクロル酢酸(TCA)にて凍結脳をホモゲナイズし, 10,000 rpm, 30 秒間遠心した. 上清と沈渣の放射能を井戸型シンチレーションカウンターで測定した.

次に上清を Dowex AG 1-X2 acetate カラム (17×44 mm) にかけて, Table 1 の順序⁷⁾で段階的に溶出した. 溶出速度は 5 ml/分, 各フラクション容量は 4.8 ml である. 各フラクションについて, 井戸型シンチレーションカウンターを使用して放射能を測定した. さらにピーク A のフラクションを集めて Dowex AG 50W-X8 カラム (17×50 mm) にかけて, 蒸留水 42 ml で洗い, 素通り分画を得た. 次に 2N, NH₄OH 25 ml で溶出し, これら 2 分画の放射能を同様の方法で測定した.

3. カラムクロマトグラフィー溶出物質の同定法

方法 2 で使用する TCA 可溶性分画に, 同定の目的で標品として 50 mμ Ci の ¹⁴C (U)-L-アスパラギン酸, 1-¹⁴C-DL-乳酸および 1,4-¹⁴Cコハク酸をあらかじめ加える. 方法 2 を終了後, 各フラクションを 4°C, 8 時間放置して短半減期 RI の減

衰を待ってから, ¹⁴C 放射能を測定した. 試料 0.5 ml にアクアゾール-2 (NEN) 5 ml を加え, 液体シンチレーションカウンター (Packard, PRIAS, PLD 型) を使用して測定した.

4. 放射能測定条件と計算法

全脳放射能測定に用いた電離箱型 RI キャリブレーター (Capintec 製) は ¹³⁷Cs, ⁵⁸Co, ⁶⁰Co の 3 種線源で校正した後, ¹¹C 放出の β⁺ の消滅 γ 線 (0.51 MeV) の測定に定められたダイアル位置で計測した. 測定精度は ±2% で, 最小測定単位は 0.1 μCi である.

生化学的処理後の低放射性試料測定に用いた井戸型シンチレーションカウンターは, 2''×2.5'' の井戸型シンチレーション検出器とシングルチャンネル γ 線測定器 (Aloka 製) からなっている. 0.51 MeV の γ 線測定を精度良く行うために, ¹¹CO₂ の NaOH 水溶液を線源として, シングルチャンネル波高分析を行い, LLD と ULD を設定した. この井戸型カウンターによる各フラクション測定は 15 秒間行い, cpm 値に換算した.

本実験における放射能測定値は, すべて断頭時を基準として時間補正した.

また, 井戸型カウンター測定値 (cpm) の μCi への換算に必要な計数効率次は次のようにして算出した. 上記同様に, ¹¹CO₂ を線源として RI キャリブレーターで測定後, その一部を 2 時間 (約 6 半減期) 密封放置して, 計算上 0.01 μCi オーダーに減衰させた後, 井戸型カウンターで測定した. 後者の測定値は時間と容量による補正を行った. 1 μCi = 3.7 × 10⁴ × 60 dpm であるから, 井戸型カウンターの計数効率 = 井戸型カウンター測定補正値 [cpm] / (RI キャリブレーター測定値 μCi × 3.7 × 10⁴ × 60) [dpm] となり, 計数効率 0.15 が得られた. したがって, 各フラクションの時間補正した測定値 A (cpm) の μCi への換算は A ÷ 0.15 ÷ (3.7 × 10⁴ × 60) の式によった.

¹⁴C 標品の放射能測定に用いた PRIAS PLD 型液体シンチレーションカウンターは, ²²⁶Ra を外部標準線源として, 自動的に計数効率の補正を行う. 各フラクションの 10 分間測定によって得られ

Table 2 Radioactivities of TCA soluble fraction of the rat's brain after $^{11}\text{CO}_2$ inhalation

Experiment	Whole brain (μCi)	TCA supernatant		Pellet	
		(μCi^*)	(% of whole brain)	(μCi^*)	(% of whole brain)
1.	155.3	7.87	5.1	0.90	0.58
2.	96.7	4.55	4.7	0.29	0.30
3.	197.8	5.66	2.9	1.01	0.51
4.	158.7	4.56	2.9	0.66	0.41
Mean \pm SD	152.1 \pm 36.1	5.66 \pm 1.35	3.9 \pm 1.0	0.72 \pm 0.28	0.45 \pm 0.11

* Calculated by the following formula from μCi which was measured by RI calibrator

[A (cpm) \div B (=0.15) \div ($3.7 \times 10^4 \times 60$)] A; measured by well counter. B; efficiency of well counter (0.15).

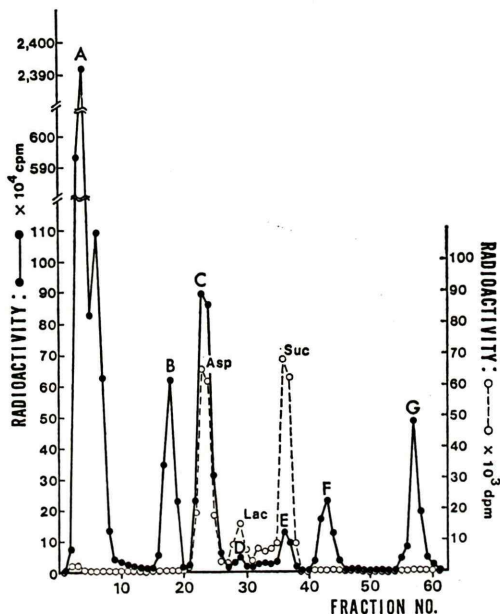


Fig. 1 Chromatographic profile of acid soluble fractions by Dowex AG 1-X2 acetate column. Ordinate indicates ^{11}C activity of each fraction (—) and ^{14}C -standards (---). Asp; aspartate Lac; lactate Suc; succinate.

た ^{14}C 放射能の dpm 値を, ^{11}C 放射能の cpm 値と同図上に図示して, 溶出物質の同定を行った。

III. 結 果

今回の $^{11}\text{CO}_2$ 吸入実験では, $^{11}\text{CO}_2$ 吸入量を一定に保つことは不可能であったが, $^{11}\text{CO}_2$ (50~110 mCi) 混合空気 3 分間吸入後のラット全脳の ^{11}C 放射能は 152.1 \pm 36.1 μCi であった (Table 2). 脳の酸可溶性分画にはそのうちの 3.9 \pm 1.0%, 非

Table 3 Eluted substances and distribution of radioactivities

Peaks*	Percent of total radioactivity	Substances	Methods for identification
A	85.21	Neutral substances	ND**
B	3.33	Glutamate	ND**
C	6.27	Asparatate	^{14}C -standard
D	0.29	Lactate	^{14}C -standard
E	0.73	Succinate	^{14}C -standard
F	1.58	Malate etc.	ND**
G	2.31	Citrate etc.	ND**

* Identify each peak in Fig. 1

** ND: Not determined

可溶性分画には 0.45 \pm 0.11% が認められた。残りの約95%は酸処理の過程で放出し, Siesjö ら⁸⁾ のいう酸不安定性分画 (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^-) である。酸可溶性分画のカラムクロマトグラフィーにより 7 つの主要ピーク (A-G) が得られた (Fig. 1)。酸可溶性分画の全放射能に対する各ピークの放射能の比率は, Table 3 に示した通りである。 ^{14}C ラベル標品による同定の結果, ピーク C はアスパラギン酸, D は乳酸, E はコハク酸と同定された。最大放射能を有するピーク A については, Dowex AG 50W \times 8 カラムクロマトグラフィーで検討した結果, 素通り分画は 85% を占め, 2N NH_4OH による溶出分画は 10.7% であった。素通り分画はグルコースと尿素などの中性物質を含有すると考えられるが, 現在ラジオ液クロを用いて同定中である。なおピーク F と G について同定は行っていないが, 成瀬⁹⁾ の結果と比較すると, リンゴ酸, クエン酸およびピルビン酸が考えられる。

IV. 考 案

中枢神経系における CO_2 固定の存在は, Berl ら¹⁰⁾ により証明されて以来注目を集め, CO_2 固定に関連する酵素の研究も進められてきた. Siesjö ら⁸⁾ は $^{14}\text{CO}_2$ のラット脳内への取り込みについて調べた結果, 酸不安定性分画への取り込みが45分後に平衡に達し, 有機物質分画(酸可溶性分画の大部分)への取り込みは時間とともに増加して, 2時間後には総カウントの32%に達すると報告した. 最近 Cheng ら¹¹⁾ は ^{14}C -重炭酸塩のラット腹腔内投与により, $^{14}\text{CO}_2$ が脳内に固定されることを報告している. すなわちリンゴ酸, アスパラギン酸, ケエン酸, グルタミン酸およびグルタミンに固定がなされることを証明した. われわれは Waelsch ら¹²⁾ および Naruse ら^{7,9,13)} の報告に基づき, 同じ方法による酸可溶性分画の分析を行った. $^{14}\text{CO}_2$ ガス吸入による同実験は Siesjö ら⁸⁾ が行っているが, $^{11}\text{CO}_2$ ガスを用い, かつ非麻酔下の実験としては, 本報告がはじめてと考えられる.

Siesjö ら⁸⁾ および Lockwood ら¹⁴⁾ の報告では, 酸可溶性成分が経時的に増加するが, われわれの成績によると $^{11}\text{CO}_2$ 投与3分後の酸可溶性成分は全脳放射能の $3.9 \pm 1.0\%$ であった. これは彼らの成績とほぼ一致すると考えられる. 酸非可溶性成分は $0.45 \pm 0.11\%$ を占め, これはおそらく蛋白成分が主体で, ごく一部分は脂質と核酸の構成成分になるといわれる⁸⁾.

次に酸可溶性成分分析の結果, Dowex AG1-X2 カラムに非吸着の成分(グルコース, 尿素および中性アミノ酸など)が酸可溶性成分の85%を占めていた. この成績は Cheng ら¹¹⁾ の報告とは異なっている. 実験条件の相異として, Cheng らは, チオペンタールナトリウム麻酔下で ^{14}C -重炭酸塩を腹腔内投与しているのに対して, われわれは非麻酔下で $^{11}\text{CO}_2$ ガスを3分間吸入させている. CO_2 ガス吸入による酸不安定性分画は CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- の形で存在するが, Laux ら¹⁴⁾ は脳血管の内皮細胞に carbonic anhydrase の存在を

示唆しており, これらの物質の血液-脳関門の透過性は酸-塩基平衡に左右されると述べている. ここで問題となるのは, CO_2 または HCO_3^- が脳内に移行して有機物質分画に固定されることは, 従来の報告の通りであるが, 肝内における同様の CO_2 固定が無視できるかどうかである. 例えば $^3\text{H}_2\text{O}$ の brain uptake index を100とするとグルタミン酸は3.21, アスパラギン酸は0.12, グルコースは33, 尿素は2.37である¹⁵⁾. 仮に肝内での CO_2 固定が脳内より盛んであるならば, これらの物質の血液-脳関門の通過を考慮する必要がある. しかし, いずれにしてもわれわれの成績から, 吸気中 $^{11}\text{CO}_2$ の脳内コハク酸, アスパラギン酸および乳酸への取り込みを実証できたわけである.

最近 $^{11}\text{CO}_2$ ガスが PET に応用されてきたが, その有用性について論議がなされている. すなわち Lockwood ら⁶⁾ は $^{11}\text{CO}_2$ ガスは酸-塩基または代謝トレーサーとして PET に使用するには限界があると述べている. その理由として脳内 $^{11}\text{CO}_2$ が95%の平衡に達しても, 代謝されて脳内に取り込まれる $^{11}\text{CO}_2$ は12%であり, 50%の平衡においては, わずか5%の取り込みに過ぎないと指摘した. しかしわれわれの $^{11}\text{CO}_2$ による PET の経験では, X線CT上変化のない部位における $^{11}\text{CO}_2$ 集積不良の所見を得ており, 画像解析上からは脳内の病態を表現しうる十分な可能性が認められる. 今後は PET による臨床応用と並行して, 動物実験による CO_2 固定研究などの $^{11}\text{CO}_2$ 体内動態の解明が不可欠であると考えられる.

V. 結 論

実験動物を用いて, $^{11}\text{CO}_2$ ガスの脳内固定について研究を行った. 特に酸可溶性成分の分析を行った結果, 解糖呼吸系中間代謝産物への放射能取り込みが認められ, アスパラギン酸, コハク酸および乳酸が同定された. 主要成分である中性物質(グルコース, 尿素およびグルタミンなど)については現在同定中である.

本研究は厚生省神経疾患研究委託費 No. 81-02 により行われた.

文 献

- 1) Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, et al: Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18) 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose: Validation of Method. *Ann Neurol* **6**: 371-388, 1979
- 2) Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al: The ^{14}C Deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* **28**: 897-916, 1977
- 3) Kuhl DE, Phelps ME, Kowell AP, et al: Effects of stroke on local cerebral metabolism and perfusion: Mapping by emission computed tomography of ^{18}F FDG and ^{13}N H₃. *Ann Neurol* **8**: 47-60, 1980
- 4) Kuhl DE, Engel J Jr, Phelps ME, et al: Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in humans determined by emission computed tomography of ^{18}F FDG and ^{13}N H₃. *Ann Neurol* **8**: 348-360, 1980
- 5) Cooper AJL, McDonald JM, Gelbard AS, et al: The metabolic fate of ^{13}N -labeled ammonia in rat brain. *J Biol Chem* **254**: 4982-4992, 1979
- 6) Lockwood AH, Finn RD: ^{11}C -carbon dioxide fixation and equilibration in rat brain: Effects on acid-base measurements. *Neurology (NY)* **32**: 451-454, 1982
- 7) Naruse H, Cheng SC, Waelsch H: Microdetermination of citric acid in nervous tissue. *Exp Brain Res* **1**: 40-47, 1966
- 8) Siesjö Bo K, Thompson W O'B: The uptake of inspired $^{14}\text{CO}_2$ into the acid-labile, the acid-soluble, the lipid, the protein and the nucleic acid fractions of rat brain tissue. *Acta Physiol Scand* **64**: 182-192, 1965
- 9) 成瀬 浩: 脳呼吸系と酸性アミノ酸代謝. 第17回日本医学会総会学術講演集 **I**: 330-336, 1967
- 10) Berl S, Takagaki G, Clarke DD, et al: Carbon Dioxide fixation in the brain. *J Biol Chem* **237**: 2570-2573, 1962
- 11) Cheng S-C, Naruse H, Brunner EA: Effects of sodium thiopental on the tricarboxylic acid cycle metabolism in mouse brain: CO_2 fixation and metabolic compartmentation. *J Neurochem* **30**: 1591-1593, 1978
- 12) Waelsch H, Cheng S-C, Côté LJ, et al: CO_2 fixation in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* **54**: 1249-1252, 1965
- 13) Naruse H, Cheng S-C, Waelsch H: CO_2 fixation in the nervous system. V. CO_2 fixation and citrate metabolism in rabbit nerve. *Exp Brain Res* **1**: 291-298, 1966
- 14) Laux BE, Baichle ME: The passage of ^{11}C -bicarbonate ion and $^{11}\text{CO}_2$ from blood to brain. *J Cereb Blood Flow Metabol* Vol. 1, Suppl 1, 383-384, 1981
- 15) Oldendorf WH: Brain uptake of radiolabeled amino acid, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* **221**: 1629-1639, 1971