

コルヒチンによる²⁴Na, ²⁸Mg, ⁴³K, ⁴⁷Ca, ⁴⁸V, ⁶⁷Cu 嗅覚輸送阻害効果の検討

金山 洋介¹⁾, 羽場 宏光¹⁾, 榎本 秀一¹⁾, 天野 良平²⁾

(¹⁾独立行政法人理化学研究所仁科加速器研究センター*, (²⁾金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻**)

Colchicine-Induced Disruption of Axonal Transport Affects Brain Uptakes of ²⁴Na, ²⁸Mg, ⁴³K, ⁴⁷Ca, ⁴⁸V and ⁶⁷Cu via Olfactory Pathway

Yousuke KANAYAMA¹⁾, Hiromitsu HABA¹⁾, Shuichi ENOMOTO¹⁾ and Ryohei AMANO²⁾

¹⁾Nishina Center for Accelerator Based Science, RIKEN;

²⁾Division of Health Sciences, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

Summary

The olfactory system enables a direct transport of certain metal ions from the nasal cavity to the brain. There are two main pathways of the olfactory transport, which are axonal transport via the olfactory and trigeminal nerves and epithelial transport via extracellular fluid and the sustentacular cells. We previously demonstrated the direct brain uptakes of Mg²⁺ and K⁺ by the olfactory transport, however it was still unclear in which pathway these ions were transported. In the present study, to clarify the principal pathway of Mg²⁺ and K⁺ transport, we observed the interference in the olfactory transport of monovalent and divalent cations by colchicine, which cause destruction of microtubule and disrupt the axonal transport. A colchicine solution (0.38 mmol/ml) was instilled into the right nostrils of mice (ICR) under ether anesthesia. After 1 and 3 h, a multitracer solution, which included ²⁴Na, ²⁸Mg, ⁴³K, ⁴⁷Ca, ⁴⁸V and ⁶⁷Cu, was administered to the mice in the same way. Six hour after multitracer administration, the mice were sacrificed, and then the blood, liver, ethmoturbinals, and brain were dissected. Subsequently, the brain was subdivided into three regions; the olfactory bulb, the forebrain region, the rest of brain region. As a result, ²⁸Mg and ⁶⁷Cu uptakes in the olfactory bulbs were reduced by colchicine pretreatment. On the other hand, as to ⁴³K and ⁴⁸V uptakes, no difference was observed between the control and colchicine pretreatment groups. Although the precise mechanisms of these two olfactory transports are still unclear, it was indicated that the ²⁸Mg²⁺ and ⁶⁷Cu²⁺ transports were mediated mainly by the axonal transport, and ⁴³K⁺ and ⁴⁸VO²⁺(⁴⁸VO₂²⁺) transports were mediated mainly by the epithelial transport.

匂いの感覚器である嗅神経細胞は鼻腔内の嗅上皮に存在し、粘膜上に匂い物質の受容体を持つ樹状突起を、反対側には篩骨篩板を通り抜けて嗅球内まで軸索を伸ばし、シグナル伝達している。また、鼻粘膜上には三叉神経枝も分布しており、鼻腔内から橋へと繋がっている。これらの構造により嗅神経と三叉神経は鼻腔内と脳内を直接つなぐ経路になり得る。鼻腔内に入ったある種の物質がこのような経路を介して脳内へ移行する現象を嗅覚輸送と呼ぶ。嗅覚輸送による物質の脳内移行機序として、主に二つの経路が考えられている。一つは、軸索輸送経路である。この経路では、輸送される物質は鼻粘膜上で嗅神経や三叉神経の中に取り込まれ、その神経軸索輸送に乗って脳内へと移行する。軸索輸送経

*所在地：埼玉県和光市広沢2-1 (〒351-0198)

**所在地：石川県金沢市小立野5-11-80 (〒920-0942)

路によって物質は直接脳内へ入ることができる。もう一つの経路は上皮輸送経路であり、物質は鼻粘膜から神経軸索を覆う支持細胞やその周囲に存在する細胞外液中に取り込まれ、軸索に沿って移行し、頭蓋内の脳脊髄液中に入る。この場合はその後、脳脊髄液から脳内へと移行すると考えられる。鼻腔内に入った物質の内、これらの脳内移行経路に入らないものは、鼻粘膜とともに排泄されるか、鼻腔内に豊富に分布する毛細血管やリンパ管から全身血流へと取り込まれる。鼻腔投与後の物質の移行についてFig. 1にまとめて示した。

通常、体内に摂取された物質の脳内への輸送は血液中から血液脳関門、血液脳脊髄液関門を介して行われるが、嗅覚輸送の場合、これら関門の影響を受けずに脳内への直接的に輸送し得ることから、近年、ウイルスの感染経路、薬剤の投与経路などとして注目されている¹⁾。金属イオンの中にもこの嗅覚輸送による脳内移行が明らかとなったものがあり(Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+})、生体への汚染経路として考えられる一方、これら元素をマーカーとしてイメージングへ利用する研究が行われている²⁻⁵⁾。特にMnはMRIにおいて T_1 信号を強調する性質を持ち、なお且つ軸索輸送経路によって脳内に取込まれ、その後も数日間かけて大脳皮質まで神経内を移行し続けることから神経路イメージング剤として注目されている^{6,7)}。

この様に金属の嗅覚輸送についての研究は少なくないものの、2価陽イオンについてのものがほとんどであったが、我々はマルチトレーサーを用いた研究により新たに1価陽イオンの Rb^+ について嗅覚輸送挙動を明らかにし、さらに Mg^{2+} , K^+ , Cs^+ , Tl^+ についても嗅覚輸送による脳内移行を明らかにしてきた^{8,9)}。特に Tl^+ の嗅覚輸送には、放射性医薬品 $^{201}TlCl$ を用いることにより、嗅覚輸送を利用した新しい脳内イメージング法に発展する可能性がある⁹⁾。しかしながらこれらの嗅覚輸送機序についてはまだ未解明な部分が多く、上記の二つの脳内輸送経路の内いずれが主となって脳内移行するのかはまだ明らかではない。イメージング剤としての可能性を考える上で、輸送経路を明らかにすることは重要である。Mn強調MRIの研究の一つとして、PautlerらはMnの軸索輸送による嗅球への取込を明らかにする為に、微小管依存性の軸索輸送を阻害するコルヒチンを用いた¹⁰⁾。そこで本研究では、 Mg^{2+} 及び K^+ における嗅覚輸送経路を明らかにするとともに、新たに嗅覚輸送挙動を示す元素を探索することを目的として、 ^{24}Na , ^{28}Mg , ^{43}K , ^{47}Ca , ^{48}V 及び ^{67}Cu を含有する短寿命核種マルチトレーサーを製造し、鼻腔投与後の脳内取込にコルヒチンが与える影響について検討した。

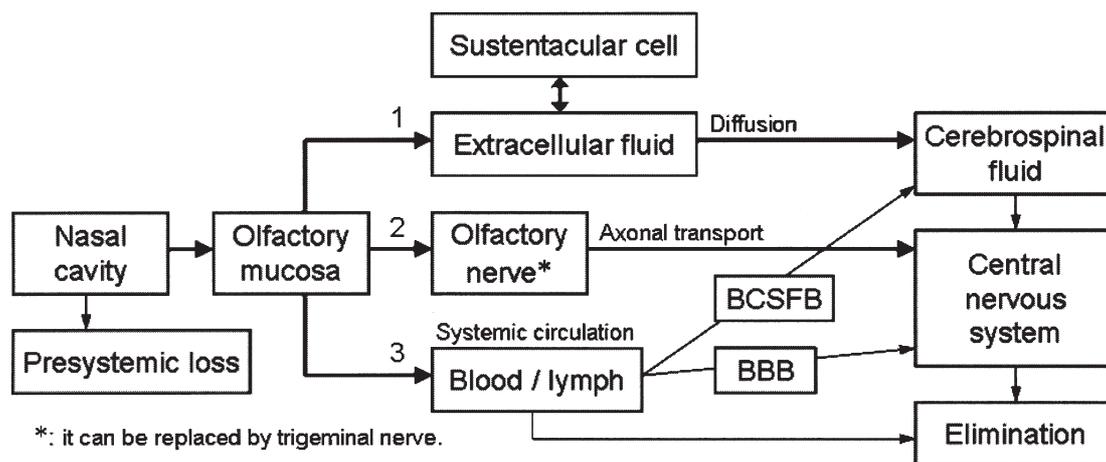


Fig. 1 Scheme depicting the possible delivery route of a solute administered intranasally.
1: olfactory (or trigeminal) epithelial transport, 2: olfactory (or trigeminal) axonal transport, 3: systemic circulation.

実験方法

Habaらの手法を用いて¹¹⁾, 理研リングサイクロトロンにより135 MeV/nucleonに加速した¹⁴NビームをTi箔ターゲット(0.125×15×15 mm, 純度99.99%, 2枚)に1日間照射し, 3日間の冷却後, 化学分離によりTiを除去して短寿命核種マルチトレーサー(²⁴Na, ²⁸Mg, ⁴³K, ⁴⁷Ca, ⁴⁸Vを含有)を得た。化学分離は, まずTi箔を濃フッ化水素酸に溶解し, 蒸発乾固した後更に濃フッ化水素酸に溶解して陽イオン交換樹脂カラム(Dowex 50W×8, 100-200 mesh)によりTiと生成核種を分離した。また, 理研AVFサイクロトロンにより14 MeVに加速したプロトン(陽子)を⁷⁰ZnO(99.53% enrichment, 19.5 mg)粉末ターゲットに5時間照射し, 12時間の冷却後, 化学分離によりZn及び他の生成核種を除去して⁶⁷Cuシングルトレーサーを調製した。化学分離は, まずターゲットを濃塩酸に溶解し, 蒸発乾固した後9 M塩酸に溶解し, 陰イオン交換樹脂カラム(Dowex 1×8, 100-200 mesh)を用いて粉末を包装したAlを除去し, 更に2 M塩酸を用いてZnと生成核種の分離を行った。更に, 得られた⁶⁷Cu含有溶液を蒸発乾固し, 濃塩酸に溶解後, 陽イオン交換樹脂カラムを用いて⁶⁷Cuとその他の生成核種の分離を行った。これらを混合し, 最終的に生理食塩水にてマルチトレーサー投与溶液(²⁴Na, ²⁸Mg, ⁴³K, ⁴⁷Ca, ⁴⁸V及び⁶⁷Cuを含有)として調製した。それぞれの化学形はNa⁺, Mg²⁺, K⁺, Ca²⁺, VO²⁺(またはVO₂²⁺), Cu²⁺と推定される。

正常8週齢雄ICRマウス8匹に対し, エーテル麻酔下にてコルヒチン溶液(0.38 mmol/ml)を15 µl右鼻腔内に滴下し, 1 hまたは3 h後にマルチトレーサー投与溶液を15 µl同側鼻腔内に投与した(n=4)。別にControl群として4匹にマルチトレーサー溶液のみ投与した。それぞれマルチトレーサー投与後6時間で解剖し, 血液, 肝臓, 肋骨甲介及び脳を採取し, 脳はさらに嗅球, 前脳部, 後脳部の3部位に分割した(Fig. 2)。各試料は秤量後, 高純度Ge半導体検出器によるγ線スペクトロメトリーに供し, 投与量に対する単位重量当たりの取込率(%dose/g)を算出した。肋骨甲介については, 試料中に骨成分を含み一様な組織とみなせないため, 投与量に対する取込量(%dose)を算出し評価した。投与量15 µl中に含有する各核種の放射能をTable 1に示す。

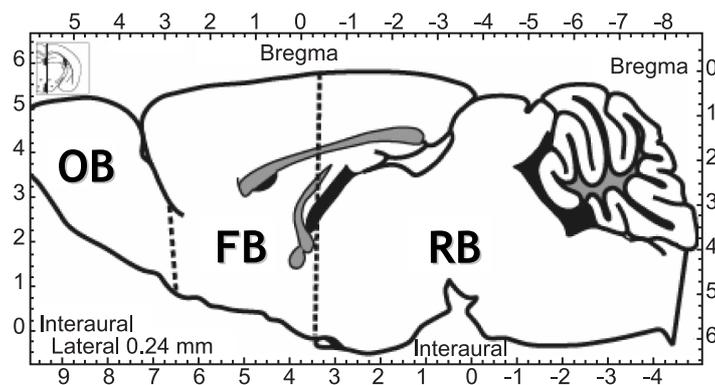


Fig. 2 Positions of dissected brain regions are shown in mouse brain map¹³⁾. The whole brain was separated into following 3 regions: the olfactory bulb (OB), forebrain region (FB), and the rest (RB).

Table 1 The half-life, energy of measured γ -rays and calculated activities of the nuclides contained in an administered volume (15 ml) of the multitracer solution

Nuclide	Hal-life	Intensity (%)	Energy (keV)	Activity (kBq)
²⁴ Na	14.959 h	100	1369	105.06 ± 7.44
²⁸ Mg	20.915 h	52.62	1342.3	28.66 ± 1.32
⁴³ K	22.3 h	79.27	617.5	31.25 ± 0.57
⁴⁷ Ca	4.536 d	71.7	1297.1	6.26 ± 0.05
⁴⁸ V	15.9735 d	97.59	1312.1	2.21 ± 0.04
⁶⁷ Cu	61.83 h	48.73	184.58	10.55 ± 0.05

結果と考察

結果として、 ^{24}Na , ^{28}Mg , ^{43}K , ^{47}Ca , ^{48}V 及び ^{67}Cu の同時追跡が可能であった。脳内各所及び臓器における取込率の結果を Fig. 3 に、篩骨甲介における取込量の結果を Fig. 4 に示す。Control 群における結果では、 ^{28}Mg , ^{43}K , ^{47}Ca , ^{48}V 及び ^{67}Cu の嗅球への取込みは前脳、後脳部と比較すると高値であった。 ^{43}K , ^{28}Mg では比較的高値を示したが、 ^{47}Ca , ^{48}V , ^{67}Cu の嗅球への集積は 1% dose/g 程度の低い値を示した。 ^{24}Na の取込には脳局所内に差は見られなかった。これらのことから、 Mg^{2+} と K^+ の嗅覚輸送挙動が再確認されるとともに、 Ca^{2+} , VO^{2+} (VO_2^{2+}) 及び Cu^{2+} についても一部は嗅覚輸送されていると推測できる。篩骨甲介への集積は ^{28}Mg , ^{47}Ca , ^{48}V , ^{67}Cu で高値であった。コルヒチン投与により、 ^{28}Mg , ^{67}Cu の嗅球への集積は減少する傾向を示した。対して、 ^{43}K 及び ^{48}V の嗅球取込率では顕著な変化は見られなかった。 ^{47}Ca ではしかし、コルヒチン投与後 3 h の時点において、有意差はないが嗅球取込率の増加傾向が見られた。これらの核種においては前・後脳部でコルヒチンによる影響は認められなかった。 ^{24}Na を除く 5 核種において、篩骨甲介への集積はコルヒチン投与後 1 時間、3 時間で順に高くなる傾向を示した。

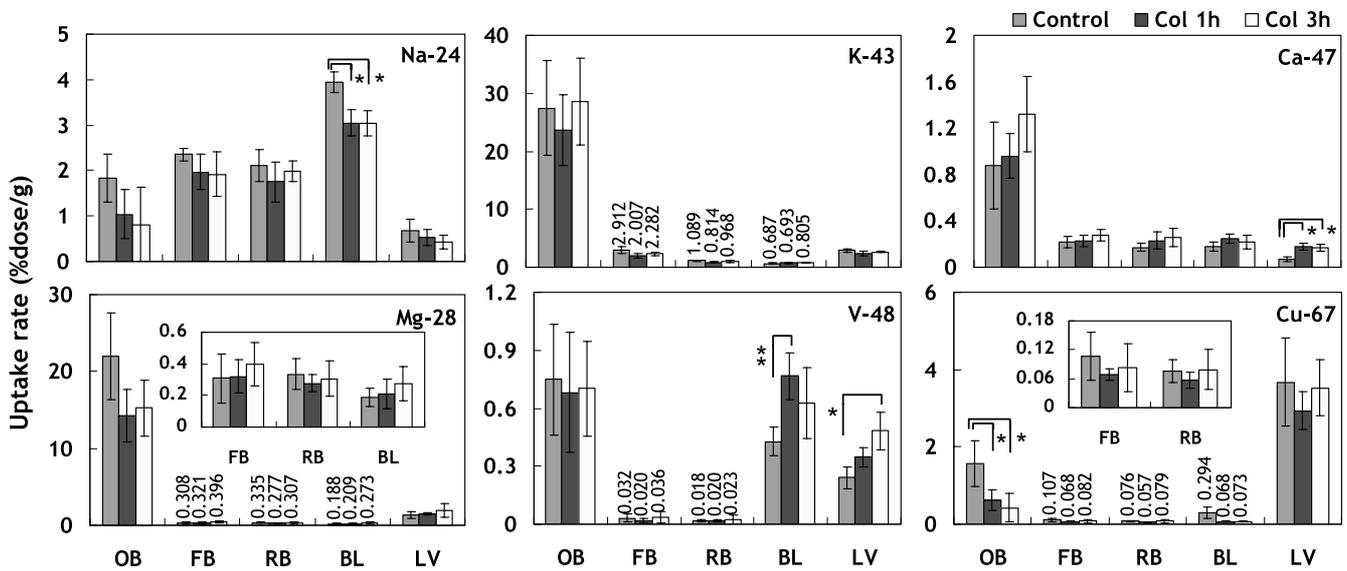


Fig. 3 Uptake rates (%dose/g) in the blood (BL), liver (LV), and brain regions (OB, FB, and RB) 6 h after intranasal administration of a multitracer. In the “Col 1 h” and “Col 3 h” group, colchicine was administered into the same nostrils 1 and 3 h ahead of the multitracer administration, respectively. *(p < 0.05) and **(p < 0.01) indicate statistical significance evaluated with Student’s t-test.

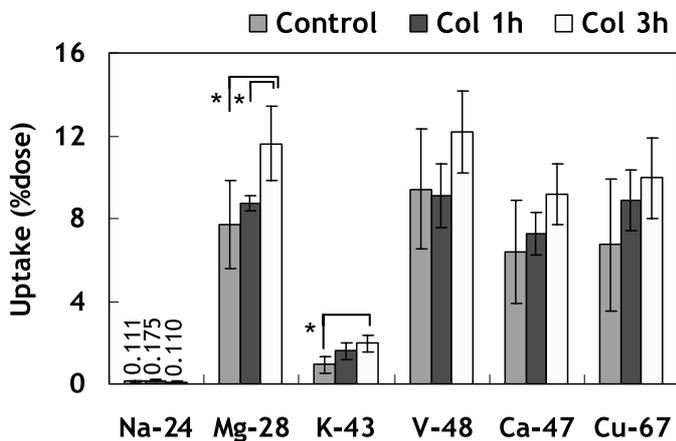


Fig. 4 Uptakes (%dose) in the ethmoturbinals 6 h after intranasal administration of a multitracer. In the “Col 1 h” and “Col 3 h” group, colchicine was administered into the same nostrils 1 and 3 h ahead of the multitracer administration, respectively. *(p < 0.05) and **(p < 0.01) indicate statistical significance evaluated with Student’s t-test.

コルヒチンは神経軸索を構成する細胞骨格の微小管のチューブリンと結合して重合を破壊し、軸索輸送を阻害する¹²⁾。このことから、コルヒチン投与による嗅球集積の減少は、その元素の脳内移行に軸索輸送が寄与していることを示していると考えられる。結果より、コルヒチン投与により取込が低下した Mg^{2+} 、 Cu^{2+} では軸索輸送を介して脳内へ移行すると考えられる。対して、変化の見られなかった K^+ 、 VO^{2+} (VO_2^{2+}) では上皮輸送 (細胞外液などを介した拡散移行) が輸送機序に大きく関与していると思われる。しかしながら、Naを除く5元素における篩骨甲介への集積増加は、どの元素の嗅覚輸送においても神経細胞に取込まれて軸索輸送される部分が存在し、その輸送が阻害された分、篩骨甲介に滞留していることを示しているのではないかと考えられる。本研究により、 K^+ 及びその類似性イオンと他の金属イオンの嗅覚輸送挙動の違いについて鼻科学に寄与する新たな知見が得られた。

参考文献

- 1) Mathison S, Nagilla R, and Kompella UB (1998) Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: Fact or fiction?, *J Drug Target* 5: 415-441.
- 2) Tjälve H, and Henriksson J (1999) Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology* 20: 181-196.
- 3) Persson E, Henriksson J, Tallkvist J, Rouleau C, Tjälve H (2003) Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes. *Toxicology* 191: 97-108.
- 4) Persson E, Henriksson J, Tjälve H (2003) Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats. *Toxicol Lett* 145: 19-27.
- 5) Crossgrove J, Zheng W (2004) Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 17: 544-553.
- 6) Koretsky AP, Silva AC (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 17: 527-531.
- 7) Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA, Costa ER, Gross EA, Dorman DC (2000) Direct olfactory transport of inhaled manganese ($^{54}MnCl_2$) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol Appl Pharmacol* 169: 238-248.
- 8) Kanayama Y, Tsuji T, Enomoto S, Amano R (2005) Multitracer screening: Brain delivery of trace elements by eight different administration methods. *BioMetals* 18: 553-565.
- 9) Kanayama Y, Enomoto S, Irie T, Amano R (2005) Axonal transport of rubidium and thallium in the olfactory nerve of mice. *Nucl Med Biol* 32: 505-512.
- 10) Pautler RG and Koretsky AP (2002) Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 16: 441-448.
- 11) Haba H, Kaji D, Kanayama Y, Igarashi K, Enomoto S (2005) Development of a gas-jet-coupled multitarget system for multitracer production. *Radiochimica Acta* 93: 539-542.
- 12) Steward O, Goldschmidt RB, Sutula T (1984) Neurotoxicity of colchicine and other tubulin-binding agents: A selective vulnerability of certain neurons to the disruption of microtubules. *Life Sci* 35: 43-51.
- 13) Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (second ed.), Academic Press, San Diego: pp.153.