

PIXE による LECラット肝臓癌組織のカルシウム分析

太田顕成、ト 桂蘭、早川和重、曾根由美子^{*1}、中山茂信^{*2}、三原春枝^{*2}
世良耕一郎^{*3}、二ツ川章二^{*4}、斉藤義弘^{*4}、畠山智^{*4}

北里大学医学部放射線科学、生化学^{*1}、実験動物学^{*2}
228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1
E-mail:ohkensei@med.kitasato-u.ac.jp

^{*3}岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

^{*4}日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

Key word: PIXE, Long-Evans Cinnamon Rat, Hepatocellular carcinoma, Calcium

1. はじめに

LEC(Long Evans Cinnamon)ラットでは、肝炎および肝臓癌が自然発症する。消化管または血流を経て肝臓に至った Cu は、肝臓ライソゾームによって処理されて、生体利用または排泄の経路を辿るが、LECラット肝臓ではこれ以降の代謝機能が遺伝的に欠損しているために Cu による代謝障害が起こる。ところが、Cu による肝臓の代謝障害はラットが生まれてから成熟期に至るまでの外部からの Cu 曝露の制御によって軽減される。

この報告では、LECラットに自然発症した肝臓癌組織中のカルシウムをPIXE法で分析した結果が報告される。

2. 方法と材料

2.1 動物

Long-Evans Cinnamon(LEC)(SPF/VAF Crj/LEC、雄)が使用された。LECはCharles-River社(東京)から4週齢、6週齢および8週齢で納入された。

2.2 薬品

試薬として、和光純薬工業社の硝酸(HNO₃、有害金属測定用)と関東化学(株)の銀標準液(1,000ppm、原子吸光分析用)が使用された。

2.3 動物実験

ラットの飼育飼料には固形CE-2(CLEA,東京)が使用された。飼料と水は自由に摂取できるように与えられた。飼育中に死亡したラットあるいは処分されたラットから肝臓が摘出された。摘出された肝臓は裁断、生理食塩溶液で洗浄、最後に蒸留水で洗浄された。次に肝臓は濾紙上で水滴の除去された後、1~2gが凍結乾燥のために採集され、48時

間乾燥された。

2.4 分析試料の調製

凍結乾燥された組織片は約 100 mg が正確に秤量後、熱分解用テフロン容器に移され、分解された。熱分解の方法は、NMCCの定法に則り、硝酸によって灰化された。¹⁾ 得られた硝酸分解溶液は、室温に冷却された後、PIXE分析された。内部標準元素として組織重量 1g 当たり 1mg または 500 μ g の銀(Ag)の溶液が加えられた。

2.5 PIXE 分析

PIXE 分析は、日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターの装置で行った。灰化溶液の 5 μ l が試料ホルダーのバックグ膜に塗られて、ドラフトの中で自然乾燥された。乾燥した試料は、PIXE 装置で測定され、得られたデータはNMCCのシステムプログラム(SAPIX)²⁾で解析された。統計的処理および Kaplan-Meier 法による生存率曲線は、それぞれ FISHER(中山書店)および STAX(中山書店)によりなされた。

3. 実験結果

3.1 LECラットの生残率

図1は4週齢、6週齢および8週齢で納入されたLECラットにCE-2飼料投与開始後の生残曲線を示す。4週齢および6週齢で納入されたラットに比べて8週齢で納入されたラットの生残率は非常に高いことが分かる。

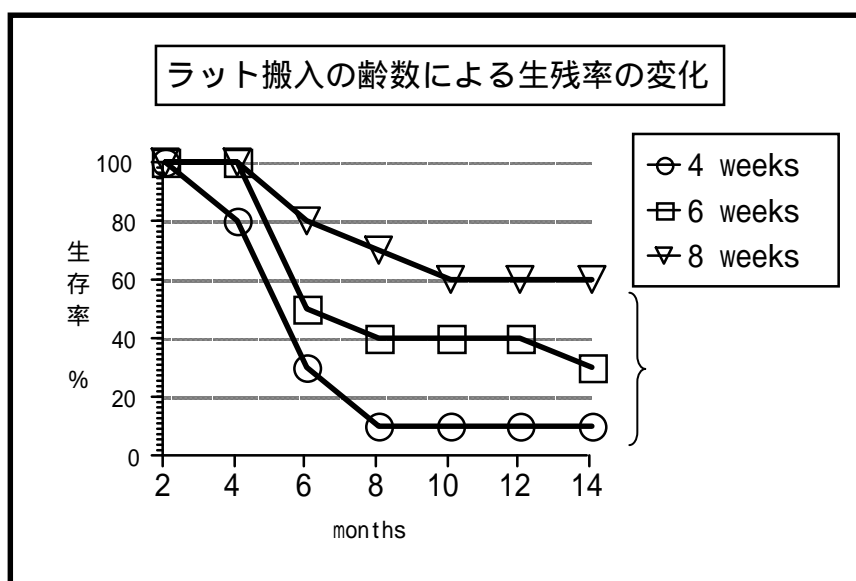


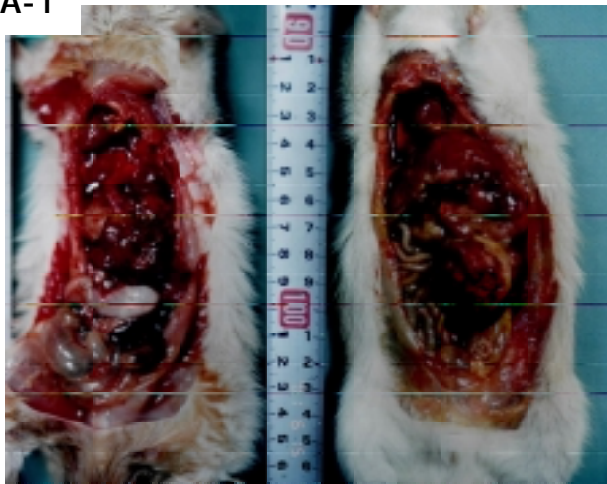
Fig. 1 Kaplan-Meier survival curve of the LEC rats groups classified into 1) 4 weeks old LEC rats (n=10), 2) 6 weeks old LEC rats (n=10), and 3) 8 weeks old LEC rats (n=10).

: There was significant difference between these three groups of the rats, $p < 0.05$.

3. 2 長期生存 L E C ラットにおける肝臓癌の発症

4 週齢、6 週齢および 8 週齢で納入されたラット 30 頭のうち、肝炎を発症して 12 ヶ月以内に死亡したラットは 19 頭であった。その後 3 頭が同じく肝炎を発症して 19 ヶ月以内に死亡した。残り 9 頭が 2 年以上 35 ヶ月以内に死亡し、これら全例に肝臓に癌の発症が認められた(Fig.2)。

A-1



B



A-2

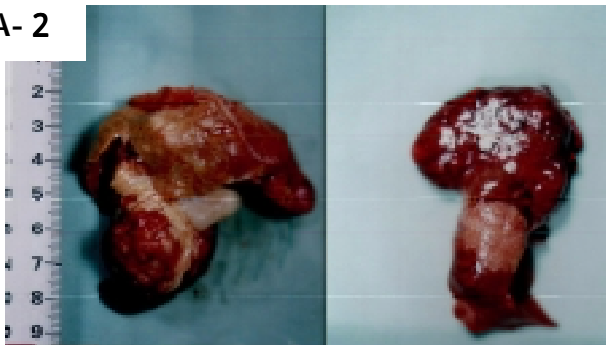


Fig. 2 Macroscopic appearance of the LEC rat(A-1) and resected specimen(A-2) shows encapsulated large mass invading the median lobe of liver. X-ray film shows multiple calcification lesions in the median lobe of liver(B).

3. 3 P I X E による肝臓および肝臓癌組織のカルシウム分析

Fig. 3 は、自然死および剖検処置した L E C 担癌ラット 6 頭について肝臓組織を正常組織部位、癌結節組織周辺、および癌結節部位に分けて摘出した試料について P I X E 法で測定したカルシウムの分析値を示す。正常組織部位、癌結節組織周辺、および癌結節部位にカルシウム濃度は、それぞれ 86.8 ± 5.9 、 93.2 ± 7.8 および $251.3 \pm 54.1 \mu\text{g} / \text{g}$ であり、癌組織におけるカルシウム濃度は正常組織よりも高い値を示した。また 6 頭のうち 2 頭のラットの X 線写真では肝臓の中葉および左葉に石灰化像が観察された (Fig. 2 - B) 。

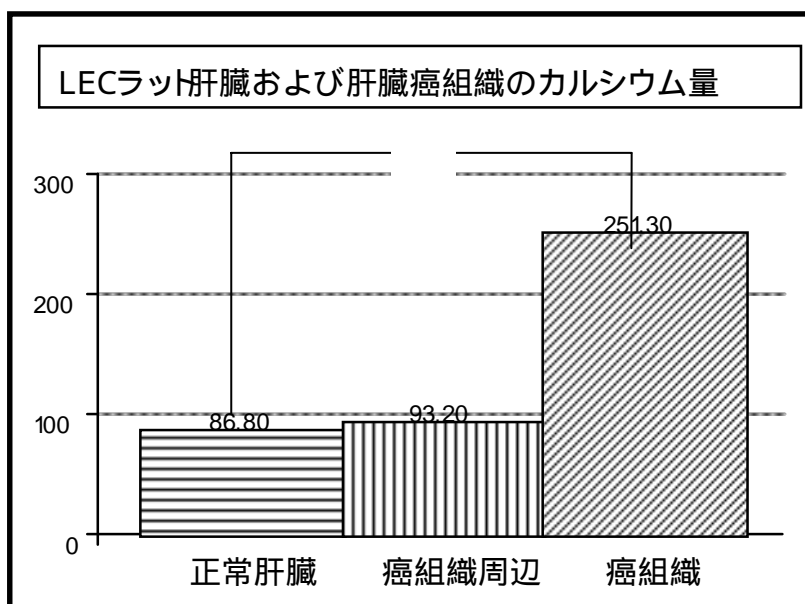


Fig. 1 Comparison of calcium concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, mean value, $n=6$) in liver of LEC rats maintained on CLEA CE-2 diets.

(a) Values given are the mean of results for 6 rats from each group of rat.

(b) : significantly different from each other tissue, $p<0.01$.

謝辞

本実験を行うに当たり、日本アイソトープ協会の研究助成に感謝申し上げます。共同利用施設の使用に当たり、PIXE測定、サイクロトロンと実験装置の維持と管理および放射線管理において、滝沢研究所仁科記念サイクロトロンセンターの職員の方に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. ニツ川章二、畠山 智、斉藤義弘、世良耕一郎、「PIXE 試料調製法の検討」NMCC共同利用研究成果報文集 1、70-81、1993
2. K.Sera, S.Futatsugawa, S.Hatakeyama. "A few approaches to remove ambiguous factors in X-ray spectrum analysis.", Int. J. PIXE, 3, 283-328(1993).