

Zn塩投与LECラット肝臓CuのPIXE分析および Znによる生存可能期間の改善

太田顕成、ト 桂蘭、早川和重、曾根由美子^{*1}、中山茂信^{*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

^{*3}岩手医科大学サイクロトンセンター
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, Copper, Zinc, Life-span

1. はじめに

LEC(Long Evans Cinnamon)ラットでは、肝臓 Cu が異常蓄積して肝炎が起こる。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。

本稿では、LEC ラットに ZnCl₂ を食餌投与したときの亜鉛の肝臓 Cu 蓄積に対する影響と肝臓癌発生に対する効果について得られた実験結果が報告される。

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7週齢で購入、納入された。実験は8週齢に達してから開始された。

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。塩化亜鉛(Zinc Chloride)は和光純薬工業(株)(大阪)から購入された。

2.3 動物実験

ラットの飼料は粉末 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。塩化亜鉛(Zinc Chloride)は粉末餌に混ぜられ、投与された。処置中に死亡したラットあるいは実験途中で処分されたラットから肝臓が摘出された肝臓は細かく裁断、生理食塩溶液で洗浄、最後に蒸

留水で洗浄された。

2.4 分析試料の調製

摘出された肝臓片は約 300 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 μg 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滝沢研究所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 μl が試料ホルダーのバッキング膜に塗られて、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. 測定結果

3.1 LEC ラット肝臓 Cu に対する塩化亜鉛の影響

図 1 は塩化亜鉛混合飼料が投与された時の LEC ラット肝臓 Cu の PIXE 分析結果を示す。ZnCl₂ を投与された LEC 肝臓中の Cu 濃度は対照群(年齢対応)LEC ラット肝臓 Cu 濃度に比べて低い値に抑制された。その値は、年齢対應對照群 : 850 ± 105 μg/g、塩化亜鉛投与群 : 396 ± 87 μg/g、であり、対照群に比べて塩化亜鉛投与群の Cu 濃度有意の差で低い値を示した (p < 0.01)。

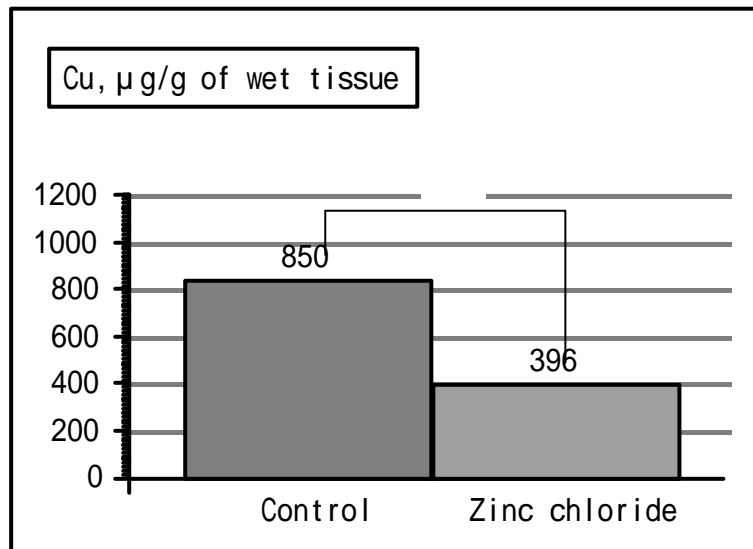


Fig. 1 Comparison of copper concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, mean value, n=3) in liver of LEC rats maintained on high zinc diets.

(a) Values given are the mean of results for 3 livers from each group of rat.

(b) : significantly different from control(age-matched) LEC rats, p<0.01.

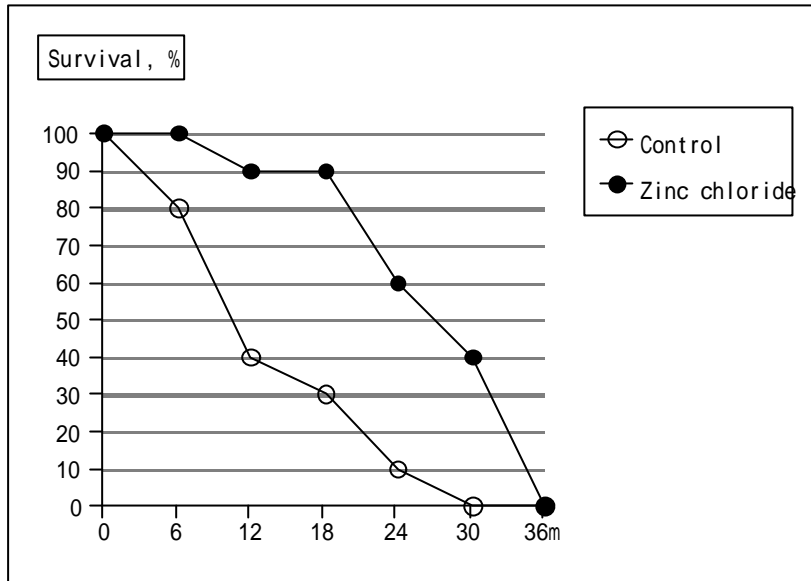


Fig. 2 Kaplan-Meier survival curve of the LEC rats groups classified into 1) standard diet(Control, n=10), 2) ZnCl₂-fortified diet (n=10).
: There was significant difference between these two groups of the rats, p<0.01.

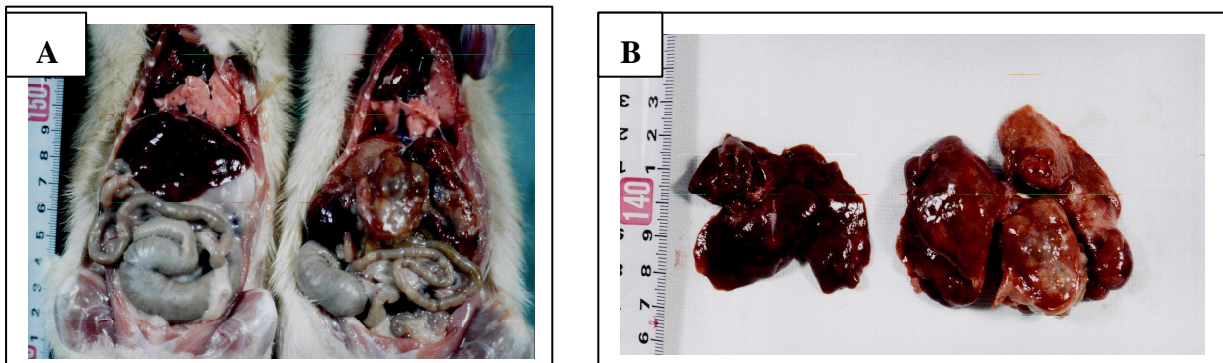


Fig. 3 Operating findings and macroscopic findings of the resected liver. A: Typical appearance of primary liver cell carcinoma in control group of LEC rats(right) and of normal liver in ZnCl₂-administered rat(left), B: resected tumor-bearing liver in control rat(right) and fresh liver in ZnCl₂-administered rat(left).

3.2 LECラット生存可能期間および癌の発生に対する塩化亜鉛の影響

図2は、塩化亜鉛混入食餌が投与されたラット群と対照群における Kaplan-Meier 生存率曲線を示す。亜鉛投与群と対照群における50%生存期間はそれぞれ27ヶ月および7.5ヶ月であり、亜鉛投与群の8割のラットがほぼ寿命を全うした。

図3は亜鉛投与群ラットと対照群ラットの剖検写真および摘出肝臓の肉眼像写真を示す。塩化亜鉛混入食餌が投与された時、LECラット10例中8例が2年以上生存し、どのラットにも肝臓に癌の発生は

認められなかった。一方対照群ラットは6ヶ月以内に10例中4例が肝炎で死亡し、残りの6例は6ヶ月～2年2ヶ月間生存したが、寿命死するまでに全例に肝臓癌の発生が認められた。

4. おわりに

これまでの本報告会において著者らは LEC ラット肝臓 Cu に対する Ca、Fe ()、Fe ()、Mg、Sr、Cu () および Cu () の影響について PIXE 法による肝臓 Cu の測定および生存率法による生存可能期間を比較検討した実験結果を報告してきた。本稿では LEC ラットに塩化亜鉛を食餌投与して、PIXE による肝臓 Cu の測定および生存率測定による生存可能期間の比較に関する実験結果が報告された。亜鉛はラットおよびヒトにとって必須元素であり毒性も殆ど無く、本実験では1%濃度で食餌投与された³⁾。

以上の結果を纏めると次のように要約される。

- 1) Ca は LEC 肝臓 Cu を減少させる効果がある。しかし、肝炎を阻止する効果は無く、生存可能期間は対照に比べて2～3週延びた。
- 2) Fe () および Fe () は共に肝臓 Cu の蓄積を抑制する効果がありその効果は Fe () の方が Fe () よりも遥に大きく、Fe () 投与群はその寿命をほぼ全うするが Fe () 投与群は Ca 投与群と大体同じで2～3週伸びるだけであった。
しかし、Fe () には肝臓癌の発生を抑止する効果は認められなかった。
- 3) LEC ラット肝臓 Cu 蓄積に対する Mg の効果については合理的な結論を導き出せるような結果は得られなかったが、Mg 投与によってラット生存率が改善することは無かった。
- 4) Ca と同属元素である Sr は LEC ラット肝臓 Cu に影響せず、生存可能期間に対する改善効果も無かった。
- 5) Cu () および Cu () は極低濃度でも LEC ラットには激しい毒性を呈し、投与されたラットは短期間内(1週間以内)に全例が死亡した。Kaplan-Meier survival curve 検定によって毒性は Cu () の方が Cu () よりも有意の差で強く現れた。
- 6) Zn は肝臓 Cu 蓄積を抑制し、LEC ラットはその寿命を全うした。また、Zn を投与されたラットには肝炎および肝臓癌の発生も認められなかった。

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 試料調整法の検討」
NMCC 共同利用研究成果報文集 1、70-81、1992
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).
3. E.J. Underwood, 「Trace Elements in Human and Animal Nutrition」、p208-252、
Academic Press, New York, 1971、