

無標準法の髄液試料への応用

¹⁾世良耕一郎、²⁾三浦吉範、³⁾伊藤じゅん、⁴⁾二ツ川章二

¹⁾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滝沢留が森 348-58

²⁾岩手医科大学医学部臨床検査医学講座
〒020-8505 盛岡市内丸 19-1

³⁾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滝沢留が森 348-58

⁴⁾日本アイソトープ協会アイソトープ部
〒113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

1 はじめに

髄液中元素濃度に関しては、NMCCにおいて既に200試料以上の分析が行われ、クモ膜下出血時の脳血管攣縮の発生との関連¹⁾等、臨床医学的に重要な意味を持つことが確認されている。それらの試料に対しては、いずれも内部標準法により定量分析が行われており、通常は10-30 ppmのInが内部標準として用いられるため、秤量精度の観点から30-100 µl程度の試料が必要となる。しかし小動物からの採取時などには、十分な量の確保が困難となる場合も多い。

我々は「無標準法」を開発し、多種の試料に対しその応用を行った^{2,7)}。本法を用いれば、手を加えない1 mg、1 µl以下の超微量試料の定量分析が可能となり³⁾、試料調製の手順を著しく簡略化できるだけでなく、熟練度に依存する不確定要素も排除することができる。そのため、精度・再現性の良い結果が得られることが確認されている。

本研究においては、「無標準法」が無調製髄液試料に適用される。「無標準法」は試料全体を代表する量として連続X線の収量を用いており、通常その全エネルギー領域の測定は難しい。そのため最適なエネルギー領域を決定し、その領域中の収量を基準とすることになるが、領域の選定が妥当でない場合には、試料中重元素濃度の影響を受けてしまい精度が悪化する。また巨大なピークが存在する場合、その差引精度も問題となる。先ず最適なエネルギー領域を決定し、複数の髄液試料に対し内部標準法による結果と比較を行うことにより指標元素に対する変換係数²⁾を決定し、それを用いて導出した指標元素濃度の精度・再現性を確認する手順となる。

本研究においては、無標準法が19検体の正常髄液試料と3検体の異常髄液試料に適用されるが、無標準法の精度・再現性、及び得られた元素濃度に関する詳細な報告が行われる。

2 実験方法

陽電子核医学用に開発された医療用小型サイクロトロンから引き出された 2.9 MeV の陽子ビームは、グラフィート製コリメータで 6 mmΦ に整形され、ターゲットを照射する。発生した X 線は二台の Si (Li) 半導体検出器により測定され⁸⁾、スペクトル解析プログラム SAPIX⁹⁾ により解析が行われる。ビーム電流はおおよそ 100 nA、測定時間は 1 試料に対し 3 分前後であった。詳細なビーム・測定条件に関しては文献 8 を参照のこと。

ターゲットは 2 μl ほどの髄液試料を 4μm-厚のポリプロピレンバックリング膜上に滴下し、クリーンベンチ中で自然乾燥させ作成した。19 の正常髄液、3 の異常（赤血球数過剰及び白血球数過剰）髄液が患者から採取され、それぞれに対し 3 枚の内部標準入りターゲット、3 枚の内部標準を加えないターゲットが作成された。2 検体に関しては、再現性の確認のためそれぞれ 9 枚のターゲットが作成された。

3 髄液試料に対する無標準法

無標準法のための変換係数決定までの手順は、今までの報告と基本的に同様である²⁻⁷⁾。本研究においては、300 μm と 500 μm マイラーの二種の X 線吸収体が用いられたが、前者は血清^{2,3)}、毛髪^{4,5)}、爪⁶⁾ に用いられ、後者は尿⁷⁾、唾液、汗、涙、鼻水試料^{10,11)} に用いられている。後者は K と Ca 濃度が突出する試料に対し他元素の感度向上のために用いられるが、低エネルギー領域の連続 X 線も大きく吸収されてしまうため、試料によっては精度の点で問題が生じる場合がある。本研究においては、連続 X 線収量値を得るための最適なエネルギー領域を決定する過程で、2 種類の X 線吸収体が試された。

本研究の主目的は微量髄液試料の定量分析であり、その場合連続 X 線の大部分を占める 4 keV 以下の領域でその正確な収量を得ることが難しくなる。その理由は相対的にバックリングフィルムから発生する連続 X 線の寄与が大きくなり、ビームによる損傷などが生じたときその正確な差し引きが困難となるためである。試行錯誤の結果、本研究においては 7.7-10.4 keV の領域の連続 X 線収量を用いることとした。試料からの連続 X 線が大部分を占め、その形状が明確であり、大きなピークが存在しないためその差し引き誤差が少ないことが理由である。指標元素³⁾ としては Ca が選択され、その Kα ピーク収量と連続 X 線収量の比と、内部標準法から得られた Ca 濃度を比較することにより、無標準法のための変換係数³⁾ が決定された。全元素定量までの手順は、用いる連続 X 線領域を除き、文献 11 (本報文集) と同様である。

4 結果と議論

最初の手順として、無標準法は 300μm Mylar 吸収体に対する変換係数決定のために 7 検体の髄液試料に応用された。これらの中で、No.6 は赤血球過剰、No.7 は白血球過剰の異常値を示す試料である。次の段階として、500μm Mylar 吸収体を用い、その他の 9 髄液試料 (No.8-16) に対して無標準法が適用されたが、それに用いた変換係数は 300μm Mylar 吸収体を用いた 7 試料に対して決定された変換係数から、吸収体の透過率を考慮した計算により導出された。図 1 にそれら 16 試料中の Ca 濃度を、それぞれ内部標準法、無標準法により求めた結果の比較を示す。図に見られるように、両法による結果は極めて良く一致し、血球数異常を含む多くの髄液試料に対し、本無標準法が有効であることが確認された。No.9 と No.10 試料に関しては再現性のチェックのため両法それぞれに 9 ターゲットが用意され測定が行われたが、他の試料に関しては 3 枚ずつ (計 6 枚) のターゲットの測定が行われた。図中の誤差棒は、それらのターゲットの標準偏差を示している。No.6 と 15 がやや大きなばらつきを示した以外は、極めて再現性の良い結果が得られた。また、再現性の観点からは、内部標準法よりも本無標準法の方がむしろ良い結果を与える場合が多かった。

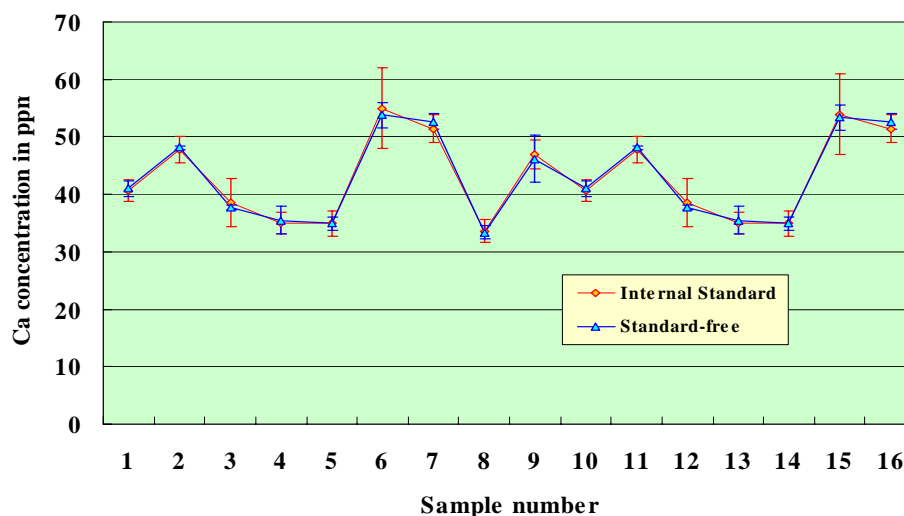


図 1 Comparison of the calcium concentrations for 16 CSF samples obtained by the both methods, where No. 6 sample is red-corpuscle-rich and No.7 is white-corpuscle-rich samples.

二種の吸収体に関しては、精度の点ではほぼ同様の結果が得られた。また再現性の点でも、用いた吸収体によらず満足すべきものであることが確認された。そのため他の体液試料（尿、汗、唾液、鼻汁、涙^{7,10,11}）に共通して用いられ、K、Ca 以外の元素に対する感度の良い 500 μm マイラーを、今後は用いることとした。

Table 1 に 19 検体の正常試料、3 検体の異常試料中の元素濃度のうち、全試料から検出された 12 元素の分析結果を示す。"±"で示された実験誤差は主に、ピークフィッティング (2-25%)、X 線発生断面積(2-8%)、検出効率(2-7%)、X 線吸収体の透過率(2-5%)から生じる。19 の正常試料に対しては、元素濃度の標準偏差(SD)も表中に示されている。

Table 1 Elemental concentrations in ppm for 19 normal and 3 abnormal CSF samples

	Normal	SD	Red corpuscle excess-1	Red corpuscle excess-2	White corpuscle excess
Na	1,790±83.7	550	1,340±43.1	1,420±57.5	1,560±49.7
Mg	17.1±2.65	6.1	15.9±1.32	10.9±1.4	18.4±1.52
P	12.5±1.6	3.3	3.10±0.69	9.74±0.98	11.6±0.85
S	14.3±3.0	30.0	41.1±2.00	35.3±2.23	13.1±1.55
Cl	2,820±132	698	2,350±76.0	2,830±114	2,320±74.0
K	73.7±3.7	19.1	62.7±2.16	62.0±2.74	91.6±3.08
Ca	37.3±2.5	8.3	28.3±1.49	43.1±2.10	33.6±3.81
Fe	0.380±0.04	0.51	1.39±0.08	7.88±0.80	0.109±0.017
Ni	0.08±0.02	0.15	0.128±0.01	0.010±0.01	0.0082±0.01
Cu	0.02±0.02	0.04	0.028±0.01	0.030±0.01	0.022±0.01
Zn	0.08±0.02	0.07	0.055±0.01	0.20±0.025	0.038±0.011
Br	1.47±0.11	0.87	0.49±0.03	2.25±0.23	4.60±0.52

これらの結果から、無標準法が精度良く髄液試料に適用可能であることが確認された。結果のばらつきは、むしろ内部標準法よりも小さく再現性にも優れている。表 1 から、赤血球過剰髄液中には当然のことながら多量の Fe が含まれ Mg、P が低いこと、一方白血球過剰髄液試料中には Fe が少なく Br 濃度が高いことが分かった。

本法は 1-2 μ l の微量髄液試料に対し、簡便に精度・再現性の良い元素分析を可能とするものであり、微量の臨床検体、小動物からの一滴の髄液試料などへの応用が期待される。またその後の研究により、髄液中には試料により多量のフッ素が含まれること、その濃度には大きな個人差のあることが確認されており、本無標準法と「三検出器同時計測システム」によるフッ素を含む多元素分析法^{12,13}を組み合わせることにより、髄液中フッ素濃度と他元素濃度との相関を論じることが可能となったが、その報告は近日中に行う予定である。

謝辞

共同利用の円滑な運営のために日々献身的な働きをしておられる日本アイソトープ協会 NMCC のスタッフの方々、及び岩手医大サイクロトロンセンターのスタッフに謝意を表します。

参考文献

1. Changes in Trace Elements of Cerebrospinal Fluid after Subarachnoid Hemorrhage, and Effects of Trace Elements on Vasospasm. N. Sato, K. Kuroda, M. Suzuki, K. Sera and A. Ogawa
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 150, 214-217 (1999)
2. Standard-free Method of Quantitative Analysis for Bio-samples.
K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura Int'l Journal of PIXE Vol. 6-3,4 (1996) 467-481
3. Quantitative Analysis of Bio-medical Samples of Very Small Quantities by the Standard-free Method.
K. Sera, S. Futatsugawa S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda
Int'l Journal of PIXE Vol. 7-3,4 (1997) 157-169
4. Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples.
K.Sera, S.Futatsugawa and K.Matsuda
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 150 (1999) 226-233
5. Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.
K.Sera, S.Futatsugawa and S.Murao
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B189 (2002) 174-179
6. Quantitative Analysis of Untreated Nail Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.
K. Sera, S. Futatsugawa, S. Murao and E. Clemente
Int'l Journal of PIXE Vol. 12, No.3,4 (2002) 125-136
7. Application of a Standard-free Method to Quantitative Analysis of Urine Samples.
K. Sera, S. Futatsugawa and Y. Miura Int'l Journal of PIXE Vol. 11, No.3,4 (2001) 149-158
8. Bio-PIXE at the Takizawa Facility. (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron.)
K.Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S.Futatsugawa, S.Hatakeyama, Y.Saitoh, S.Suzuki and H. Orihara
Int'l Journal of PIXE Vol.2, No.3 (1992) 325-330
9. Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE., K. Sera and S. Futatsugawa, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 109/110, 99-104 (1996)
10. Fluorine and Multi-element Analysis of Environmental Sample by Means of PIXE System.
K. Sera, J. Itoh, F. Futatsugawa and Y. Saitoh, Submitted to Int'l Journal of PIXE

11. 無標準法の体液試料（汗、唾液、鼻汁、涙）、歯科試料（歯、顎骨、歯石）への応用と、フッ素を含む多元素同時分析、世良耕一郎、寺崎一典、伊藤じゅん、斉藤義弘、二ツ川章二、藤村朗、本報文集
12. A Three-detector Measuring System Using a Pure-Ge Detector
K. Sera, K. Terasaki, S. Murao, S. Futatsugawa and Y. Saitoh
Int'l Journal of PIXE Vol.13-1,2 (2003) 23-35
13. Method of Quantitative Analysis of Fluorine in Environmental Samples Using a Pure-Ge Detector.
K. Sera, K. Terasaki, Y. Saitoh, J. Itoh, S. Futatsugawa, S. Murao and S. Sakurai
Int'l Journal of PIXE Vol.14-1,2 (2004) 9-18