

オートラジオグラフィによるラット皮下炎症および腫瘍への¹⁸F-FDG 集積に対するデキサメサゾンの影響

丸山美理¹⁾、内田兼司¹⁾、夏堀雅宏¹⁾、吉岡一機¹⁾、佐野忠士¹⁾

寺崎一典²⁾、畠山 智³⁾、山口慶一郎⁴⁾、伊藤伸彦¹⁾

¹⁾北里大学獣医学部獣医放射線学講座
034-8628 青森県十和田市東二十二番町 35-1

²⁾岩手医大サイクロトンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

³⁾(社)日本アイソトープ協会滝沢研究所
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

⁴⁾仙台厚生病院
980-0873 宮城県仙台市青葉区広瀬町 4-15

1 はじめに

PET の腫瘍診断に汎用される ¹⁸F-FDG は悪性腫瘍に高集積するが、炎症組織にも同様に集積するため、腫瘍と炎症の鑑別診断法の確立が要求されている。本研究ではガンマカウンタより組織中 FDG 集積の測定精度が高いオートラジオグラフィ (autoradiography:ARG) を用いて組織中 FDG 集積を定性的、定量的に評価し、デキサメサゾンの影響による FDG 集積の違いを比較・検討した。

2つの時間的に異なるステージの炎症 (炎症 4・10 日目) は、テレピン油 (15 μ l) をラット (Donryu, 7 週齢、雄 n=12) 背部皮下に接種し、腫瘍はラット腹水肝癌 (AH109A、 8×10^6 個) を FDG 投与 7 日前に同様の部位に接種することで作成した。ラットにはデキサメサゾン (1mg/kg) を腹腔内投与し、その 4 時間後に FDG (約 1.2mCi) を尾静脈内投与した。その 90 分後に深麻酔下にて安楽死後に、炎症および腫瘍組織、その他の臓器を切除し、直ちに凍結後、凍結切片を作成し ARG 試料とした。

それぞれの組織中の FDG 集積についてイメージングプレート (IP) を用いた ARG で定性的、定量的 (standardized uptake value :SUV) に評価した。ARG 画像の検量線は、ろ紙に既知量の FDG を塗布、乾燥後、ARG 試料と共に IP に曝露させる事で作成した。

鏡検では炎症組織は 4 日目が好中球、10 日目がマクロファージ主体であり腫瘍組織はいくつもの腫瘍結節とそれを取り囲む間質から構成されていた。腫瘍結節には腫瘍細胞の他に好中球、線維芽細胞、膠原線維などの非腫瘍細胞から構成される間質が認められ、腫瘍結節を取り囲む間質にも少数の腫瘍細胞、マクロファ

ージ、好中球、好酸球、膠原線維が認められ同様の非腫瘍細胞が認められた。ARG 画像で高い FDG 集積が観察された領域はコントロール群、デキサメサゾン投与群ともに炎症組織では好中球、マクロファージ層で腫瘍組織では腫瘍結節であり、結節を取り囲む間質では高い集積は認められなかった。画像上では、コントロール群、デキサメサゾン投与群において FDG 集積の違いは認められなかった。

一方、SUV ではデキサメサゾン投与により炎症組織だけでなく腫瘍組織、腫瘍結節、腫瘍結節を取り囲む間質において低下が認められた。デキサメサゾン投与による炎症 4 日目、10 日目の SUV 低下率はそれぞれ 0.6 ± 0.1 、 0.6 ± 0.4 であった。また、腫瘍組織、腫瘍結節、腫瘍結節を取り囲む間質の低下率はそれぞれ 0.6 ± 0.4 、 0.6 ± 0.3 、 0.6 ± 0.5 であり、全てにおいてほぼ同程度の低下率であった。

2 材料および方法

2.1 供試動物

供試動物として 12 頭の Donryu ラット (性別 ; 雄、年齢 ; 4 週齢、体重 ; 平均 244g(216~272g)、日本エスエルシー(株)、静岡) を購入し、その後 3 週間馴致させた後 7 週齢で実験に用いた。餌および水は自由摂取させ、飼育環境は実験の間できるだけ一定の状態となるように管理した。また、実験前にコントロール群、デキサメサゾン投与群の 2 群を設定した。

2.2 使用細胞株

東北大 CYRIC 核医学研究部 山口慶一郎先生より提供されたラット腹水肝癌 (AH109A、佐々木研の小田嶋成和によって樹立) を使用した。

2.3 実験モデルの作成

ラットの背側部をバリカンを用いて剪毛し、15 μ l のテレピン油 (Turpentine Oil ; 和光純薬工業(株)、大阪) を FDG 投与日の 10 日前および 4 日前に皮下投与 (s.c.) した。投与は同一個体背側皮下に 2 箇所ずつ行い、経時的に異なった炎症ステージを作成し、炎症モデルとした。また同様に、0.2ml のラット腹水肝癌 (AH109A ; $8\times 10^6/0.2\text{ml}$) を FDG 投与 7 日前に s.c. し腫瘍モデル動物とした。

また、デキサメサゾン投与群には、FDG 投与 4 時間前に前処置としてデキサメサゾン (水性デキサメサゾン注 A ; 日本全薬工業(株)、郡山) (1mg/kg) を腹腔内投与 (i.p.) した。

2.4 FDG 投与法および組織採取法

各群にそれぞれ ^{18}F -FDG (約 4mCi/ml、300 μ l) を尾静脈投与 (i.v.) した。投与に用いたシリンジは、投与前後の各 RI 量 (μCi) をキュリーメータを用いて計測し、その測定時刻を記録後、投与時間に対する減衰補正を行い、投与前の RI 量より投与後のシリンジ中 RI 量を減ずることで投与時における RI 量を算出し、これを投与量として計算に用いた。

FDG 投与 80 分後にペントバルビタール (ネンブタール ; 大日本製薬(株)、大阪) (25mg/kg 50mg/ml) の i.p.により深麻酔を行った。鉗を用いて開腹し、腹大動脈から血液採取することで、FDG 投与 90 分後にラットを放血安楽死させた。死後ただちに肝臓・心臓・脳・右後肢の筋肉・無処置の皮膚・炎症・腫瘍の各組織をピンセット、鉗を用いて採取した。炎症および腫瘍は皮膚を剥離し、できるだけ病変部以外の脂肪、血管などの余分な組織を取り除いた。その他の組織は全体を取り出し、一部分のみを切り取り測定に用いた。

2.5 使用 RI および相互校正値 (calibration factor ; C.F) の算出

使用 RI として、社団法人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 (Nishina Memorial Cyclotron Center ; NMCC) で合成された FDG を使用した。投与 RI 量の測定および組織中 FDG 集積の定量は、ガンマカウンタ (AUTO WELL GAMMA SYSTEM ARC-2000 ; Aloka、東京) およびキュリーメータ (CRC-12

Radioisotope calibrator ; CAPINTEC、東京) を用い、NMCC 内動物実験室で行った。

定量評価を行うために、既知の RI 量と各測定装置の結果との相関を検出し、事前に相互校正値 (calibration factor ; C.F) を算出した。 ^{18}F -FDG (2mCi/ml) をマイクロチューブに分注し、生理食塩水を用いて 2 倍階段希釈を 16 段階 ($2^0\sim 2^{15}$) 行い、これをキュリーメータおよびガンマカウンタで測定し、バックグラウンド補正後、両者の結果から C.F. を算出した。

2.6 ARG による定量法

ARG 法を用いて定量評価を行うため、既知の RI を各組織と同一のイメージングプレート (IP) (BAS-MS 2325 ; 富士写真フィルム(株)、東京) 上に設置し、露出 (コンタクト) を試みた。このため、最初に既知量の RI を濾紙にしみこませた標準線源を作製し、続いて凍結切片の作製、最後にコンタクトを行った。

2.6.1 FDG 標準線源の作製

濾紙 (FILTER PAPER, 5A、直径 90mm、厚さ 220 μm ; 東洋濾紙(株)、東京) を、約 5cm \times 2cm に切り取り、既知量の RI を希釈した水溶液 ($2^{-7}\sim 2^{-15}$) を 2 μl ずつ滴下・風乾させ、標準線源とした。

2.6.2 凍結切片作成法

ラットより摘出した各組織を包埋皿 (ティッシュテック包埋皿 13 号 ; Tissue-Tek ; サクラファインテックジャパン(株)、東京) に 1 組織ずつ入れ、O.C.T. compound (Tissue-Tek ; コニカファインケミカル(株)、東京) で浸した。組織の凍結には液体窒素を用い、急激な凍結による組織の損傷を緩和するためイソペンタン (Isopentane ; ナカライテスク(株)、京都) を加えた。凍結手法は、200ml ビーカーにイソペンタン約 100ml を入れ、イソペンタンの温度を液体窒素で約 -70°C まで低下させた。この中へ、組織を含んだ包埋皿を約 1 分浸漬させて、組織を凍結させた。凍結ブロックは表面に付いたイソペンタンを払拭後、クリオスタット (クリオスタット HM505E ; カールツァイス(株)、東京) で 10 μm の厚さに薄切し、スライドガラスに貼り付け、凍結切片とした。凍結切片は 40°C に設定した保温機で 20 分乾燥させ、標準線源とのコンタクトを行った。

2.6.3 凍結切片および標準線源のコンタクト

凍結切片と FDG 標準線源を同一カセットの内に入れ、IP と密着させ、コンタクトを開始した。IP は、RI による汚染防止のため、事前にラップで包んでおいた。コンタクト時間は、RI の減衰を考慮し 2~12 時間行った。コンタクト終了後、凍結切片および FDG 標準線源から IP を取り外し、スキャナ (バイオイメージングアナライザー BAS-1800 II ; 富士写真フィルム(株)、東京) で RI 集積状況を読み取り (16bit, S4000)、専用フォーマットの画像ファイルとして保存した。凍結切片は後日、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、病理組織学的評価を行った [図.1-4]。

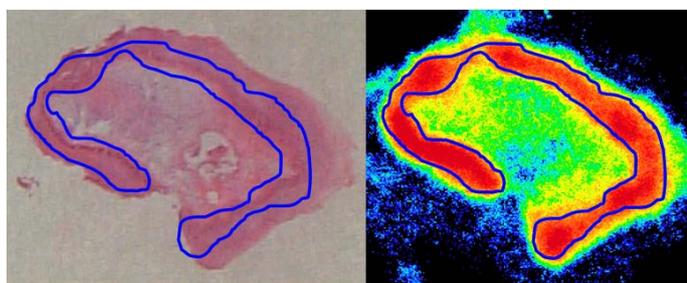


図1. 炎症組織におけるROIの設定
テレピン油周囲の炎症細胞層にROIを設定

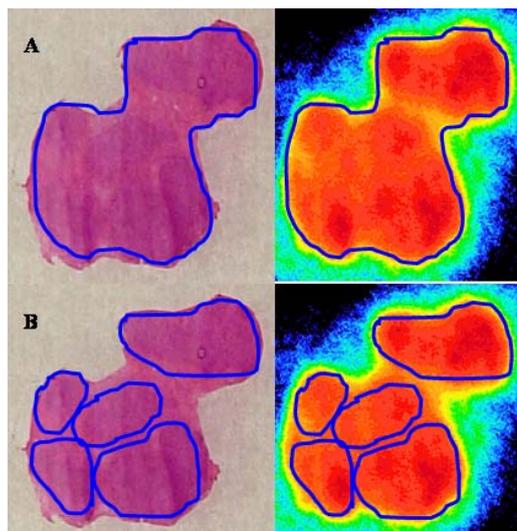


図2. 腫瘍組織におけるROIの設定
A:腫瘍組織全体にROIを設定
B:腫瘍結節にROIを設定

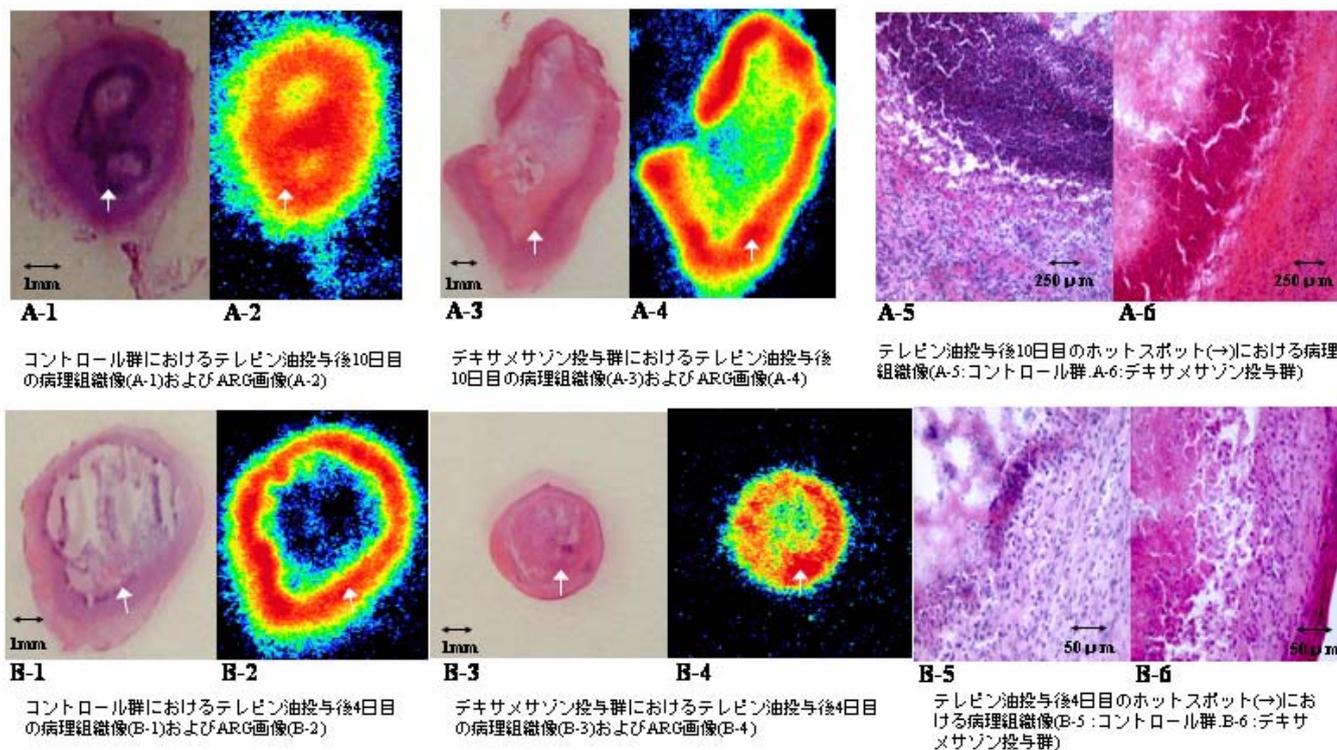


図3. テレピン油投与後4日目(A)、10日目(B)の病理組織像および ARG画像 (凍結切片、厚さ10 μ m)

コントロール群の病理組織像(1)および ARG画像(2)、デキサメサゾン投与群の病理組織像(3)およびARG画像(4)ではテレピン油を中心としたFDGの高い集積が見られる。コントロール群、デキサメサゾン投与群ともに高い集積が見られ画像上で判断することは困難である。ホットスポット(→)においてはコントロール群(5)、デキサメサゾン投与群(6)ともにテレピン油投与後4日目では多数の好中球の浸潤が見られ、その周囲にはマクロファージ、肉芽組織が認められる。好中球は崩壊ないし融解に陥っている。10日目ではわずかな好中球層と多数のマクロファージが認められ、さらにそれを取り囲むように肉芽の形成が起こっている。

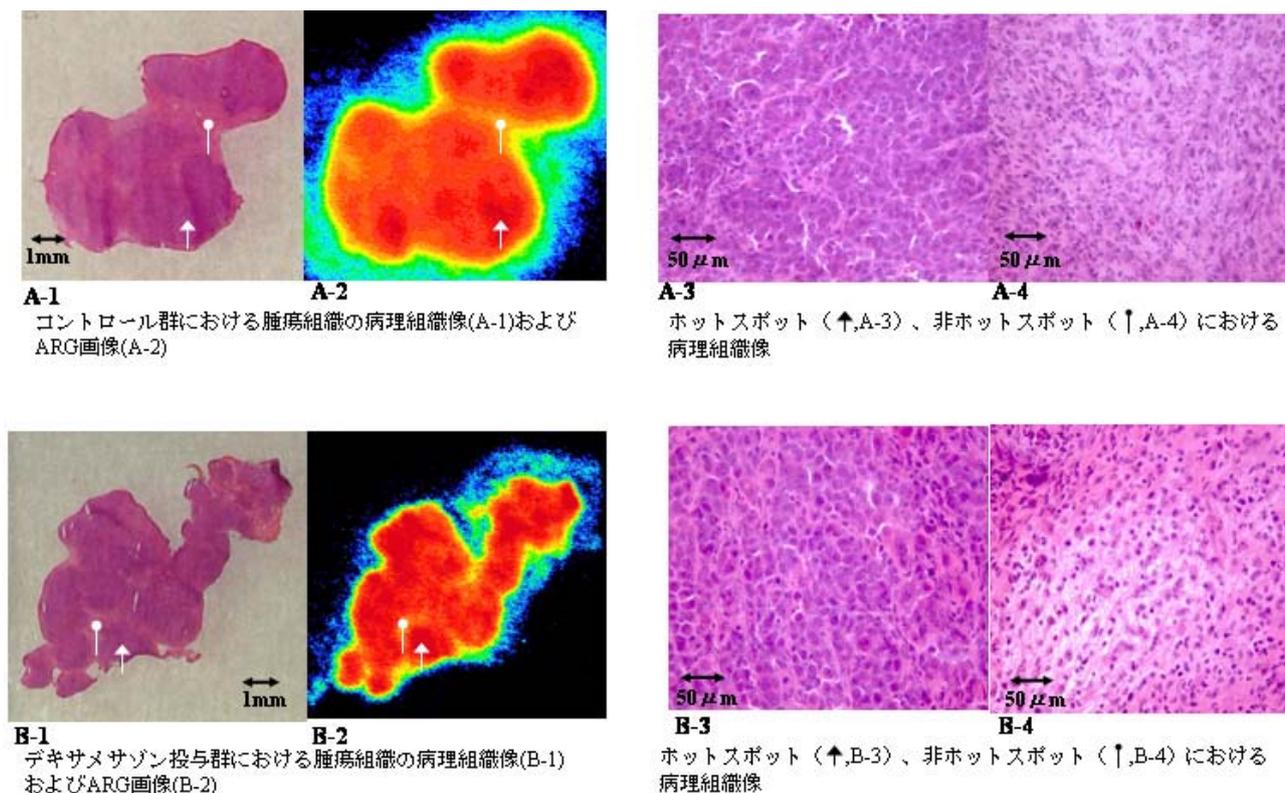


図4. 腫瘍組織(A:コントロール群 B:デキサメサゾン投与群)の病理組織像およびARG画像 (凍結切片、厚さ10 μ m)
 コントロール群、デキサメサゾン投与群ともに腫瘍結節においてFDGの高い集積が見られる。両者ともにホットスポットでは腫瘍細胞、非ホットスポットでは間質細胞が観察される。画像上でコントロール群、デキサメサゾン投与群を区別することは困難である。病理組織像を見ても細胞成分の変化は見られない。

2.6.4 画像解析ソフトウェアによる組織中 FDG の定量

画像ソフトウェア (Macintosh, Image Gauge ; 富士写真フイルム(株)、東京) を用いて、ARG 画像の解析を行った。はじめに FDG 標準線源に関心領域 (region of interested : ROI) を設定し、これで得られた信号強度 (Photo-Stimulated Luminescence : PSL) をバックグラウンド補正した値と既知量の RI より検量線を作製した。続いて、病理組織切片を鏡検し、位置合わせを行った後 ROI を設定し、PSL を再度計測した。病理組織学的診断より得られたテレピン油周囲に浸潤する「好中球およびマクロファージから形成されるヘマトキシリンによって濃染する層を炎症細胞層とする」との定義に従い分類された各領域において ROI 設定を行った。本実験の解析においては、ROI の領域として炎症では炎症細胞層、腫瘍では腫瘍組織と腫瘍結節、その他の臓器では全体に ROI を設定した[図.1-2]。また、腫瘍を取り囲む間質は腫瘍組織から腫瘍結節領域を減ずることで求めた。各組織の ROI 解析より得られたデータを、前述の検量線にて RI 量に換算し、ROI 中の FDG 集積量 (kBq) を定量した。さらに ROI 中の組織重量を算出するため、Image Gauge で得られた ROI 面積 (mm²) [図.5]に切片の厚さ 10 μ m を掛け、比重を 1 として重量 (g) に換算した。この重量データと FDG 集積量を Eq.1 に代入して、SUV を算出した。算出した SUV はコントロール群を 1 とし、デキサメサゾン投与群における低下の割合を低下率として用いた。

$$SUV = \frac{\text{組織中の放射能(Bq)}}{\text{組織重量(g)}} \div \frac{\text{トレーサーの投与量(Bq)}}{\text{体重(g)}} \quad \dots \text{Eq.1}$$

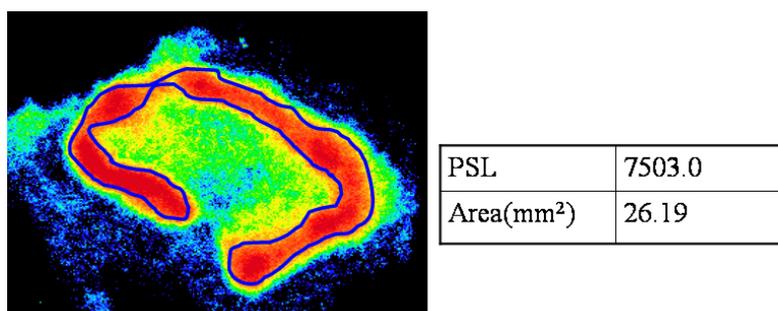


図5. ARG画像におけるROI選択領域

画像解析ソフトウェア (Image Gauge) で得られるROIデータの信号強度を示す。

2.7 統計処理

本研究で得られたデータはF検定を用いて分散を比較した後、等分散するものはStudent's t-test法を用いて、不等分散するものはWelch's t-test法を用いてt検定を行った。全ての解析結果において、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意差があると判定した。

3 結果

3.1 炎症および腫瘍組織の病理学的評価

テレピン油投与後4日目の皮下組織には投与したテレピン油を中心とする大型結節状の炎症巣が存在していた。これら炎症巣はその構成する細胞成分により大きく以下の3層に分類した。1層目はテレピン油周囲の著明な好中球の帯状の浸潤および集簇が認められ、好中球はしばしば崩壊ないし融解に陥っていた。2層目においては、マクロファージが1層目の好中球層周囲にわずかに浸潤しているだけであった。最外層には線維芽細胞と新生血管の増生からなる肉芽組織層が認められ、より中心に近い層では膠原線維が密に増生していた。

テレピン油投与後10日目の皮下組織では、テレピン油投与後4日目に比べ1層目の好中球層の厚さは減少し、2層目にはマクロファージの強い浸潤が認められた。マクロファージはテレピン油の食食により大型の細胞質を有し、細胞崩壊物の頻繁な食食像が観察された。最外層は線維芽細胞と膠原線維、新生血管からなる幼若な結合組織で取り囲まれていた。

腫瘍組織では、低倍率像で腫瘍結節とそれを取り囲む間質が認められ、その結節中には多数の腫瘍細胞とその間に好中球、線維芽細胞、膠原線維から成る間質が認められた。結節を取り囲む間質には少数の腫瘍細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、膠原線維が認められ、このうちマクロファージが大部分を占めており、一部は水腫に陥っていた。

3.2 ARGによる各組織中FDG集積の定量

3.2.1 FDG標準線源による検量線作成

PSLはRI量(kBq)に比例し、極めて良好な直線性が認められ、 R^2 値はすべて0.99以上であった。検量線は各IPごとに作成し、組織中RI量の定量に用いた。

3.2.2 炎症組織におけるARG画像

ARG画像では、コントロール群、デキサメサゾン投与群両者において炎症4日目、炎症10日目ともにテレピン油を取り囲んでいるヘマトキシリンにより濃染している領域、すなわち炎症細胞層にFDGの高い集積

が確認された。コントロール群およびデキサメサゾン投与群の画像において FDG 集積に相違は認められなかった[図.3]。

3.2.3 炎症組織中の FDG 集積の定量

炎症 4 日目、炎症 10 日目の SUV において、コントロール群およびデキサメサゾン投与群ともに炎症 4 日目において高い SUV 値が算出された。また、コントロール群と比較してデキサメサゾン投与群で SUV の低下が認められた[表.1, 図.6]。このうち、炎症 4 日目では、デキサメサゾン投与によって有意な低下が認められたが、SUV の低下率をみると、炎症 10 日目において大幅の低下が認められた[表.1-2]。

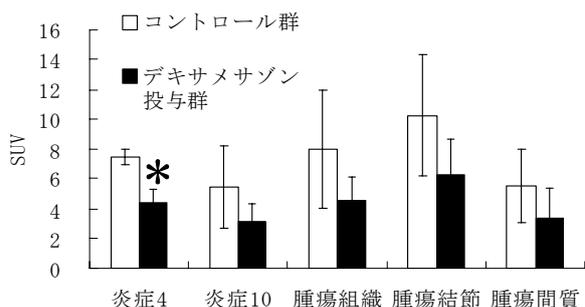


図 6. 各組織における無処置のコントロール群とデキサメサゾン投与群の FDG 集積 (ARG による定量評価)
図中の*印はコントロール群に対し有意差あり ($p < 0.05$)

表 1. 各組織の SUV(ARG による定量評価)

	デキサメサゾン投与群			コントロール群		
	mean	±SD	CV(%)	mean	±SD	CV(%)
炎症 4 日目	4.39	0.94	21	7.43	0.54	7
炎症 10 日目	3.15	1.19	38	5.44	2.76	51
腫瘍組織	4.58	1.59	35	7.99	3.95	50
腫瘍結節	6.31	2.37	38	10.24	4.03	39
腫瘍間質	3.36	2.07	62	5.54	2.46	45
肝臓	0.66	0.22	34	1.08	0.54	50
心臓	4.67	2.49	53	5.09	3.48	68
脳	3.87	2.15	56	4.46	1.90	43
筋肉	0.46	0.29	63	0.45	0.10	23
無処置の皮膚	0.79	0.39	50	1.33	0.59	44
血液	1.04	0.58	55	1.44	0.55	38

表 2. デキサメサゾン投与群の各組織の SUV の低下率
(コントロールの SUV を 1 とし算出)

	デキサメサゾン投与群 mean±SD
炎症 4 日目	0.59±0.13
炎症 10 日目	0.58±0.36
腫瘍組織	0.57±0.35
腫瘍結節	0.62±0.33
腫瘍間質	0.61±0.46
肝臓	0.61±0.37
心臓	0.92±0.80
脳	0.87±0.61
筋肉	1.01±0.68
無処置の皮膚	0.59±0.39
血液	0.73±0.49

3.2.4 腫瘍組織における ARG 画像

ARG 画像では、コントロール群、デキサメサゾン投与群ともに腫瘍組織全体に FDG の高い集積が認められ、その中でも特に腫瘍結節において FDG の高い集積が認められた。腫瘍結節間に存在する間質ではコントロール群およびデキサメサゾン投与群ともに腫瘍結節と比べて高い集積は認められなかった。炎症組織同様、コントロール群およびデキサメサゾン投与群における画像上の FDG 集積に相違は認められなかった[図.4]。

3.2.5 腫瘍中の FDG 集積の定量

腫瘍組織、腫瘍結節および腫瘍間質の SUV においてコントロール群およびデキサメサゾン投与群ともに腫

瘍結節、腫瘍組織、腫瘍間質の順に高い SUV を示した。また、コントロール群と比べ、デキサメサゾン投与群の SUV が低下していた[表.1, 図.6]。SUV の低下率をみると、腫瘍組織、腫瘍結節、腫瘍間質全てにおいてほぼ同程度であった[表.2]。

3.2.6 その他の組織における ARG 画像

肝臓、心臓、無処置の皮膚、筋肉においては特に FDG 集積の高い部位は認められず組織全体に均一な FDG 集積が認められた。脳においては小脳より大脳で FDG の高い集積が認められ、大脳の中でも特に脳幹部において高い集積が認められた。側脳室では高い集積は認められなかった。

3.2.7 その他の組織中における FDG 集積の定量

肝臓、心臓、脳、無処置の皮膚、血液においてコントロール群と比較してデキサメサゾン投与群で SUV 低下が認められた。最も低下率の大きかったものは無処置の皮膚であった[表.1-2, 図.7]。筋肉において SUV は 1 以下を示しコントロール群とデキサメサゾン投与群でデキサメサゾン投与による影響は認められなかった。

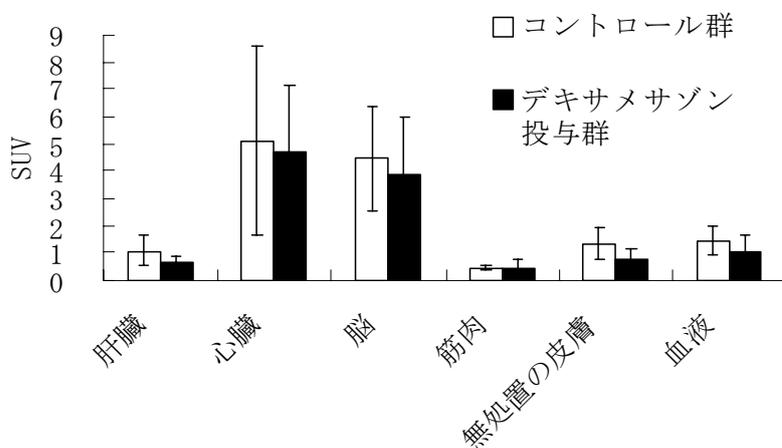


図 7. 各組織における無処置のコントロール群とデキサメサゾン投与群の FDG 集積 (ARG による定量評価)

4 考察

4.1 病理組織学的所見

4.1.1 テレピン油投与による化学性炎症

研究を行うにあたって、実験に供する動物数をできるだけ少なくするために、使用動物および催炎症性物質の選択を行った。実験の目的から 2 種類の炎症ステージと腫瘍についてデータをとる必要があったが、1 個体に様々な病態を作成する方法を採用し、使用動物にはラットを選択した。作成する炎症として、典型的な炎症像を示すこと、再現性がよいこと、また 1 個体に複数の炎症を作成する必要があるため限局性の炎症であることなどの条件を考慮し、テレピン油を催炎症物質として使用した。テレピン油は細菌や真菌と同様に組織細胞の変性、血管透過性亢進、白血球遊走、細胞の浸潤、肉芽形成などの経過をたどり、再現性よく限局性の炎症を形成する^{9, 14, 53, 54)}ことから、本研究で使用するのに最適であると考えられた。

テレピン油により誘発される炎症の FDG 取り込みの病理学的検討は藤山らの報告^{11, 52)}をもとに、炎症の急性期であるテレピン油投与後 4 日目と、炎症の治癒過程であるテレピン油投与後 10 日目に行った。投与後 4 日目の炎症像では、炎症細胞の主体が好中球であったのに対し、投与後 10 日目では好中球層の厚さは減少し、マクロファージの強い浸潤が認められた[図.1-2]。一方、炎症細胞層の周囲はテレピン油投与後 4 日目では線

維芽細胞および新生毛細血管の増生・伸長に代表される肉芽組織の増生が盛んに行われていた。テレピン油投与後 10 日目では、肉芽は成熟した膠原線維層に置換されつつあった。以上のことから、好中球の浸潤に代表されるテレピン油投与後 4 日目の炎症は急性炎症、マクロファージ、成熟した肉芽組織に代表されるテレピン油投与後 10 日目の炎症は治癒過程にあることが確認された¹⁷⁾。

このことより、本研究で得られたデータは急性炎症および慢性炎症におけるデキサメサゾンの影響を正確に評価することが可能であると考えられた。

4.1.2 ラット腹水肝癌 (AH109A) 接種による皮下腫瘍

一般に腫瘍とは、「動物体の細胞または組織が周囲の組織と無関係に、自律的かつ無制限に異常増殖する病的状態」と定義されている。

本研究で用いたラット腹水肝癌 AH109A は、上皮性の腫瘍で、Donryu ラットに癌源性物質の錠剤を経口的投与し続け、ラットに生じた癌性腹水の移植によって得られた株で、腹水には自由細胞が多く認められるが、島状の形態でも存在する混合型である。一般に癌性腹水中に出現する細胞は混合型のことが多く、大網その他に浸潤している¹⁶⁾。

この腫瘍を用いて実験的に作成した本実験の腫瘍においても、蜂の巣状の腫瘍結節が観察され、結節を取り囲むように間質が存在していた。結節間の間質には毛細血管が存在し、血管新生が起り腫瘍は活発に増殖していると考えられた。また、この間質において多数のマクロファージの浸潤が認められた。

Kubota らによると一般的に腫瘍では多数のマクロファージの浸潤が認められると報告している²⁸⁾。このことより、本実験で用いたラット腹水肝癌 AH109A による腫瘍も一般的に報告されている腫瘍と同様の形態をとり、テレピン油を用いた炎症組織の場合と同様、腫瘍に対するデキサメサゾンの影響を正確に評価することが可能であると考えられた。

4.2 ARG による各組織中 FDG 集積量の定量

原沢らの報告により、ガンマカウンタを用いた定量評価は臓器や腫瘍組織中の RI 取り込みを調べるには良い方法であるが、境界不明瞭な炎症組織では精度が低下してしまい、腫瘍組織中の結節の SUV を測定することはできないため不向きであると考えられている¹¹⁾ ため、本実験ではより精度の高い測定を行うため現在稼動している PET カメラより解像度が良く (分解能 50 μ m)、かつ病理組織切片との比較により ROI を正確に設定することができるという特徴を有する ARG を用いて FDG 集積の評価を行った。しかし、ARG はこれまで、脳比、筋肉比などで RI 集積を相対的に評価するものとされており²¹⁾、組織中 FDG 集積量を定量的に評価することは困難であった。

このため、本研究では濾紙を用いて FDG 標準線源を作成し、各組織と同時に IP にコンタクトさせることによって、定量的評価を行った。FDG 標準線源の PSL は RI 量 (kBq) に比例し、極めて良好な直線性を示し、 R^2 値はすべて 0.99 以上であった。また、検量線は各 IP で作成した。これらのことから IP を使用した ARG は組織中 FDG 集積において非常に検出感度が高く、より正確な定量評価を行うことが可能であると考えられた。

4.2.1 炎症組織中の FDG 集積の定量

炎症組織の病理組織学的所見より、テレピン油を取り囲むように炎症細胞が浸潤し炎症細胞層を形成することが確認された。炎症細胞層には好中球およびマクロファージが出現し、これらの出現の割合には経時的変化が認められた。テレピン油投与後 4 日目の炎症組織層では大部分が好中球であったが、テレピン油投与後 10 日目ではマクロファージが主体となっていた。このような病理組織学的変化を確認できたことから、好中球層、マクロファージ層にそれぞれ ROI を選択し、FDG 取り込みを調べることを試みたが、直径 3~25 μ m である炎症細胞を境界明瞭に区別することは困難であった。しかし、組織切片のマクロ像において、炎症細胞層はヘマトキシリンエオジン染色によりテレピン油周囲に紫色の濃いバンドとして形成されているのが確認された[図.3]。この紫色の濃いバンドは各炎症細胞の核が濃染しているものであるため ROI を紫色の濃いバ

ンド、すなわち炎症細胞層に選択し FDG 集積を SUV を用いて定量評価した。

ARG 画像では、コントロール群、デキサメサゾン投与群ともに炎症細胞層に FDG の高い集積が確認された。両者とも画像上において FDG 集積に違いは認められなかった。このため、画像上で FDG 集積の違いを判断するという定性的な手法ではコントロール群、デキサメサゾン投与群を区別することは困難であると思われた。

一方、テレピン油投与後 4 日目におけるコントロール群およびデキサメサゾン投与群における SUV はそれぞれ 7.4 ± 0.5 、 4.4 ± 0.9 (低下率; 0.6 ± 0.1) であり、炎症 10 日目ではそれぞれ 5.4 ± 2.8 、 3.2 ± 1.2 (低下率; 0.6 ± 0.4) であった。炎症 4 日および 10 日のいずれにおいてもデキサメサゾン投与により SUV の低下が認められ、その低下率はほぼ同程度であったが、炎症 4 日目では、SUV の有意な低下が認められた。また、マクロファージが主体の慢性炎症よりも好中球が主体の急性炎症の方が FDG がより高率に集積することが示された。ARG 画像とは異なり SUV を用いた定量的な手法ではコントロール群とデキサメサゾン投与群を明確に区別することが可能であった。しかし、鏡検により細胞成分を比較した場合、その構成に大きな変化は認められなかった。このことより、ステロイドは細胞成分を変化させるのではなく細胞の機能を変化させると考えられた。

ステロイドの抗炎症作用として重要なものに、炎症部位への好中球とマクロファージの遊走の阻害がある。そして、ステロイドの作用である組織学的変化はステロイド投与後 6 時間程度で起こることが知られている^{47, 49)}。このため本実験では、デキサメサゾンの作用時間が 4 時間であるため組織学的変化を起こすまでには至らず、機能的変化まで作用し、そのため細胞成分に変化は認められなかったと考えられた。

炎症 10 日目ではデキサメサゾン投与によって有意な低下は認められなかった。一方、炎症 4 日目では、デキサメサゾン投与により有意な低下が認められた。このことからデキサメサゾンは好中球の機能を主に抑制し、このため好中球を主体とする炎症の急性期には FDG 集積は抑制され、マクロファージが主体である炎症の治癒過程では FDG 集積は抑制されないと考えられた。

4.2.2 腫瘍組織中の FDG 集積の定量

腫瘍組織の病理学的診断より腫瘍組織にはいくつかの腫瘍結節が存在し、各結節を取り囲むように間質が存在することが確認された。また、結節中には多数の腫瘍細胞とその間に間質が認められた。結節中の間質には好中球、線維芽細胞、膠原線維が認められた一方で、結節を取り囲む間質には少数の腫瘍細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、膠原線維が認められ、大部分はマクロファージから構成されていた。

このような病理組織学的特徴の確認後、腫瘍組織全体、腫瘍結節にそれぞれ ROI を選択し、FDG 取り込みについて調べた。腫瘍組織の ARG 画像から、結節における FDG 集積は高く、逆に間質においては低いことが確認され、結節においては容易に ROI を取ることが可能であった[図.2]。

ARG 画像では、コントロール群、デキサメサゾン投与群ともに腫瘍組織全体に高い FDG の集積が確認され、その中でも特に腫瘍結節に FDG の高い集積が確認された。両者とも画像上における FDG 集積の違いは認められなかった。このため、炎症組織同様、画像上で FDG 集積の違いを判断するという定性的な手法ではコントロール群、デキサメサゾン投与群を区別することは困難であると考えられた。一方、腫瘍組織全体におけるコントロール群およびデキサメサゾン投与群における SUV はそれぞれ 8.0 ± 4.0 、 4.6 ± 1.6 (低下率; 0.6 ± 0.4)、腫瘍結節ではそれぞれ 10.2 ± 4.0 、 6.3 ± 2.4 (低下率; 0.6 ± 0.3)。そして、腫瘍を取り囲む間質ではそれぞれ 5.5 ± 2.5 、 3.4 ± 2.1 (低下率; 0.6 ± 0.5) であった。全ての部位においてデキサメサゾン投与により SUV の低下が示され、腫瘍細胞が大部分を占める腫瘍結節においては FDG の高い集積が認められ、FDG 集積抑制後も SUV は高値を示した。ARG 画像とは異なり SUV を用いる定量的な手法ではコントロール群、デキサメサゾン投与群を区別することが可能であった。鏡検による細胞成分の比較では大きな変化は認められず、また、低下率は全てにおいてほぼ同程度であった。

この低下率に注目してみると腫瘍組織全体、腫瘍結節、腫瘍を取り囲む間質の低下率は好中球が主体の炎症 4 日目とマクロファージが主体の炎症 10 日目の低下率とはほぼ同程度であった。腫瘍結節中の間質には好中球、線維芽細胞、膠原線維が認められ、結節を取り囲む間質には少数の腫瘍細胞、マクロファージ、好中球、

好酸球、膠原線維が認められていた。このことより、デキサメサゾン投与による FDG 集積抑制の原因は好中球、マクロファージなどからなる間質細胞によるものではないかと考えられた。

間質における FDG 集積について調べると、そこに存在していた線維芽細胞、新生毛細血管の血管内皮細胞は増殖および分裂の過程でエネルギー源としてグルコースを要求することが知られており^{31, 32, 43}、炎症性細胞もグルコースを要求することが報告されている^{1, 3, 18, 19}。好中球は消化活動や異物の取り込みのためにグルコースを要求し⁵⁰、マクロファージも消化活動や食食活動においてグルコースを要求することが知られており^{1, 19, 43}、このため、この腫瘍組織の間質領域において FDG は集積すると示唆された。

Kubota らによると、FDG は、腫瘍細胞だけでなく腫瘍の壊死や成長に伴い出現する炎症細胞にも集積し、腫瘍細胞それ自体よりも周囲に浸潤するマクロファージや幼弱な肉芽組織の方が比較的高い FDG 集積が認められると報告している^{25, 26, 27, 28, 29, 30}。また、ステロイドによる FDG 集積の抑制機序として①グルコーストランスポート (Glut) へのグルコースの結合の阻害、②ホルモンレセプターへのホルモンの結合の阻害による Glut の発現抑制、③glucose 6-phosphatase の活性化が知られている^{37, 38}。

さらに、ステロイドの抗炎症作用として、①肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制、②毛細血管の透過性の抑制、③線維芽細胞の増殖抑制、④リンパ球、マクロファージの機能を抑制、⑤好中球に対しては全身的には増加作用があるが機能面では食食能を低下させるということが知られている^{47, 49}。腫瘍の間質には毛細血管、線維芽細胞、マクロファージが存在していたため、このようなステロイドの作用は、ステロイドが腫瘍の間質において細胞の抑制効果を示す根拠となり得る。また、村上は、*in vitro* で腫瘍細胞にステロイドを作用させたとところ FDG 取り込みには影響がなかったと報告している³⁵。このことから、ステロイドは腫瘍細胞自体の FDG 取り込みは抑制せず、腫瘍組織中の間質の FDG 取り込みを抑制するのではないかと考えられた。ステロイドは腫瘍細胞には効かず、腫瘍組織中の非腫瘍性細胞、例えば好中球やマクロファージのような間質の細胞の FDG 取り込みを抑制し、腫瘍細胞自体の取り込みを低下させなかったために SUV は高値で維持されたと考えられた。

4.2.3 その他の組織中の FDG 集積の定量

脳は FDG の生理的集積部位であるため、SUV は他の臓器に比べかなり高値を示し、コントロール群で 4.5 ± 1.9 、デキサメサゾン投与群で 3.9 ± 2.2 でありデキサメサゾン投与によって低下が認められた。脳においては、虚血性刺激やセロトニン等の刺激でアラキドン酸カスケードのシステムが活性化され、その後の病態あるいは生理的反応が調節される⁷。また、ステロイドはアラキドン酸カスケードの様々な領域に作用するため生理的反応が変化すると考えられる。そして脳は FDG の生理的集積部位であるが、脳の活動状態によって集積状況が変化してくる³⁴。つまり興奮状態であるときは FDG は高集積し、安静状態であれば FDG はあまり集積しない。つまり、本実験においては FDG 投与後ラットを出来る限り安静状態にしておいたが、屠殺時の虚血性のストレスなど外的要因により脳の FDG 集積が変動したことは十分に考えられる。そのため、デキサメサゾン投与による脳への FDG 集積において一定の傾向を認めることは困難であると考えられた。

同様に FDG の生理的集積部位である心臓においても、SUV は他の臓器に比べかなり高く、コントロール群では 5.1 ± 3.5 、デキサメサゾン投与群で 4.7 ± 2.5 となりデキサメサゾン投与によってわずかな低下が認められた。ステロイドの心臓への薬理作用に収縮力・拍動数・血清収縮の上昇がある^{8, 47}。これらの作用により心筋活動性は高まり、それに伴い糖の消費が増加し SUV は増加すると予想した。また一方で、心筋細胞にはインスリン感受性である Glut4 が存在しており、このためデキサメサゾンによりインスリンレセプター感受性が低下し、その結果 Glut4 の発現が抑制されたため^{12, 39} SUV が低下したとも考えられた。今回の結果は後者を支持するものであったが、心臓は *in vivo* においては自律神経系など様々な要因において支配されているため心拍数の増加・減少はデキサメサゾン投与によるもののみで判断することは出来ないと考えられた。そのためデキサメサゾン投与による心臓への FDG 集積において一定の傾向を認めることは困難であると考えられた。

本実験においては病理組織像の鏡検に重点を置くため $10 \mu\text{m}$ で凍結切片を作成し、デキサメサゾン投与により腫瘍組織全体、腫瘍結節、腫瘍を取り囲む間質の SUV は低下し、その低下率は好中球主体の炎症 4 日目

とマクロファージ主体の炎症 10 日目のものとほぼ同程度であった。このことより SUV 低下の原因は腫瘍組織中に含まれる腫瘍細胞以外の間質細胞であることが示された。

ARG 画像では炎症組織はテレピン油を中心とした大型結節状の炎症層に FDG の高い集積が認められ、腫瘍組織では組織全体に FDG の高い集積が認められ、その中でも特に結節において高い集積が認められた。このため形状による炎症組織と腫瘍組織の区別を行うことは可能であった。また、コントロール群、デキサメサゾン投与群において炎症組織、腫瘍組織ともに FDG 集積の違いは認められなかった。しかし、SUV を見てみると明らかにデキサメサゾン投与により FDG 集積が低下しているのが確認された。このことより定性的な手法ではなく定量的な手法のみで FDG 集積の違いを検出することが出来ることが確認された。腫瘍における SUV では、腫瘍組織全体、腫瘍結節そして腫瘍を取り囲む間質において低下する傾向は認められたものの有意な差は生じなかった。

参考文献

1. Ahmed,N. Kansara,M. and Berridge,M.L., Acute regulation of glucose transport in a monocyte-macrophage cell line: Glut-3 affinity for glucose is enhanced during the respiratory burst. *Biochem J.* 327:369-375.
2. Aren van Waarde. David,C.P.,Cobben., Albert,J.H.,Suurmeijer., Bram Mass. Willem Vaalburg. Erik,F.J.,de Vries. Pieter,L.,Jager. Harald,J.,Hoekstra. and Philip H.,Elsinga. 2004. Selectivity of 18F-FLT and 18F-FDG for Differentiation Tumor from Inflammation in a Rodent Model. *J Nucl Med.* 45 (4) :695-700.
3. Bassett,C.L., Daniel,G.B., and Bemis,D.A., 2002. A technique for Creating localized subcutaneous blastomyces granulomas in rats. *American association for laboratory animal science.* 41 (3) : 33-37.
4. Cary,L.M., Gregory,B. Daniel,B. and Smith,G.T., 2002. Characterization of uptake of 2-deoxy-2- [18F] fluoro-D-glucose by fungal-associated inflammation : the differential uptake ratio for blastomyces-associated lesions is as high as for lymphoma and higher than for turpentine abscesses in experimentally induced lesions in rats. *molecular imaging and biology* . 4(3): 193-200.
5. Cary,L.M., Gregory,B. Daniel,B. and smith, G.T., 2002. Characterization of uptake of 2-deoxy-2- [18F] fluoro-D-glucose by fungal-associated uptake value is greater for lesions of blastomycosis than for lymphoma in dog with naturally occurring disease. *molecular imaging and biology.*4(3): 201-207.
6. Chiro, G.D., Robert, L. and Wolf, A.P., 1982. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by 18F fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology.* 32:1323-1329.
7. 大地陸男. 2003. 脳の統合機能. 187-216. 生理学テキスト第4版、文光堂、東京.
8. 大地陸男. 2003. 心臓. 249-274. 生理学テキスト第4版、文光堂、東京.
9. David M. Spain,M.D.,Norman., 1952. Studies of the cortisone effects on the inflammatory response: Alterations of the histopathology of chemically induced inflammation. 383-389.
10. 福田寛. 吉岡清郎. 井戸達雄. 1983. ¹⁸F-FDG による腫瘍診断の基礎的研究 癌と炎症の鑑別診断. *核医学* 20:(8)1189-1192.
11. 藤山博文. 2002. オートラジオグラフィによるラット皮下炎症への ¹⁸F-FDG 集積特性. 北里大学卒業論文.
12. George,DIMITRIADIS.,Brendan,LEIGHTON.,Mark,PARRY-BILLINGS.,Shlomo,SASSON.,Martin,YOUNG.,Ulrike,KRAUSE.,Samantha,BEVAN.,Terrence,PIVA.,Gerhard,WEGENER., and Eric,A NEWSHOLME. 1997. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem.J.*321:707-712.
13. 原沢菜穂子. 2003. ラット皮下炎症および腫瘍への ¹⁸F-FDG 集積に対する抗炎症薬の影響. 北里大学卒業論文.
14. 原幸男. Paper disk granuloma 法による fluocinolone acetonide の抗肉芽作用に関する研究. 北里大学大学院薬学研究科学学位論文.

15. Ichiya, Y., Kuwabara, Y., Sasaki, M. 1996. FDG-PET in infectious lesions: the detection and assessment of lesion activity. *Ann Nucl Med.* 10:185-191.
16. 井坂英彦. 岸本英正. 小野哲生. 1966. マウス・ラットの腹水腫瘍. 485-491. 実験腫瘍学, 朝倉書店, 東京.
17. 板倉智敏. 後藤直彰. 1994. 炎症. 87-131. 動物病理学総論, 文永堂出版, 東京.
18. Kaim A.H., Weber B. 2002. Autoradiographic quantification of ¹⁸F-FDG uptake in experimental soft-tissue abscesses in rats. 2002. *radiology.* 223(2): 447-450.
19. Kiyotaki C., Peisach, J. and Barry R. Bloom, B.R. 1984. Oxygen metabolism in cloned macrophage cell lines: Glucose dependence of superoxide production, metabolic and spectral analysis. *J immunologists.* 132(2):857-865.
20. 窪田和雄. 2002. 広がる PET の臨床応用: 悪性腫瘍, 良性と悪性との鑑別に威力; CT・MRI 上回る診断精度. 133-135. *Nikkei Medical* 12.
21. 窪田和雄. 2003. FDG-PET の原理と評価法 1118-1128. *クリニカル PET. FDG の臨床応用*, 秀潤社, 東京.
22. Kubota K. 2001. From tumor biology to clinical PET : A review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Annals of nuclear medicine.* 15(6):471-486.
23. Kubota K, Itoh M, Ozaki K, Ono S, Tashiro M, Yamaguchi K, Akaizawa T, Yamada K, and Fukuda H. 2001. Advantage of delayed whole-body FDG-PET imaging for tumour detection. *J Nucl Med.* 28 (6) :696-703.
24. Kubota K, Matsuzawa T, and Ido T. 1990. Differential diagnosis of lung tumor with positron emission tomography. *J Nucl Med.* 31:1927-1933.
25. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Tamahashi T, Iwata R and Takanashi N. 1993. Difference in distribution of methionine and FDG in tumor tissue in vivo. *CYRIC annual report 1993*:
26. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T. and Tamahashi N. 1993. Time course study of ³H-DG uptake by tumors at cellular level. *CYRIC annual report 1993*:
27. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T and Tamahashi N. 1994. Active and Passive Mechanisms of [Fluorine-18] Fluorodeoxyglucose Uptake by Proliferating and Pre-necrotic Cancer Cells In Vivo: A Microautoradiographic Study. *J Nucl Med.* 35 (6) :1067-1075.
28. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T and Tamahashi N. 1994. Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med.* 35 (1) :104-112.
29. Kubota, R., Yamada, S., Kubota, K., Tamahashi, N. and Ido, T. 1992. Quantitative microautoradiographic study of ¹⁸F-FDG distribution in mouse intratumoral cellular elements. *CYRIC annual report 1992*:
30. Kubota, R., Yamada, S., Kubota, K., Ishiwata, K., Tamahashi, N., Ido, T. 1992. Intratumoral distribution of Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose in vivo: High accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *The Journal of Nuclear Medicine.* 33(11):1972-1980.
31. Landea, D.B., Lemonnier, F. and Lemonnier, A. 1987. Comparative metabolic effects of fructose and glucose in human fibroblast cultures. *In vitro celluler developmental biology.* 23(5): 355-360.
32. McKay, N.D., Robinson, B. and Allen, N.R., 1983. Glucose transport and metabolism in cultured human skin fibroblasts. *biochemica et biophysica Acta.* 762: 198-204.
33. Mochizuki, T., Tsukamoto, E. and Tamaki, N. 2001. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med.* 42:1551-1555.
34. 百瀬敏光. 2003. てんかんと脳腫瘍. 1170-1180. *クリニカル PET. FDG の臨床応用*, 秀潤社, 東京.
35. 村上寧. 2004. ラット腹水肝癌 AH109A における細胞内糖輸送の速度論的解析. 北里大学卒業論文.
36. 中本裕士. 2003. 腫瘍 PET : 入門から PET/CT まで. *日本医放会誌.* 63:285-293.

37. Peter, G.W. Plagemann and Edward, D. Renner. 1972. Glucocorticoids: Competitive inhibition of glucose transport, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46 (2):816-823.
38. Rebecca C.Garland. 1986. Induction of glucose 6-phosphatase in cultured hepatoma cells by dexamethasone, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 139 (3):1130-1134.
39. Rodolfo, A. Medina. and Gareth, I. Owen. 2002. Glucose transporters: expression, regulation and cancer, *Biol. Res.* 35(1) : 9-26.
40. Rohren, EM, Provenzale JM, Barboriak DP, et al: Screening for cerebral metastases with FDG PET in patients undergoing wholebody staging of non-central nervous system malignancy.2003.*Radiology* 226:181-187.
41. 佐々木雅之. 2001. 腫瘍 FDG-PET の臨床. *日本医放会誌.*61(8):14-20.
42. Sasaki, M. Ichiya,Y. Kuwabara,Y. 1990. Ringlike uptake of [¹⁸F]FDG in brain abscess:A PET study. *J Comput Assist Tomogr.* 14:486-487.
43. Shearer, J.D., and Caldwell,M.D.,. 1988. Glucose metabolism of injured skeletal muscle: The contribution of inflammatory cells. *circulatory shock.* 25:131-138.
44. Shreve, P.D. :Focal fluorine-18 fluorodeoxyglucose accumulation in inflammatory pancreatic disease.1998. *Eur Journal of Nuclear Medicine.* 25:259-264.
45. Stahl, A.Ott. K, Weber WA,et al: FDG PET imaging of locally advanced gastric carcinomas:correlation with endoscopic and histopathological findings.2003. *Eur Journal of Nuclear Medicine.* 30:288-295.
46. Sugawara, Y, Braun DK,Kison PV, et al:Rapid detection of human infections with fluorine-18 fluorodeoxyglucose and positron emission tomography:preliminary results.1998. *Eur Journal of Nuclear Medicine.* 25:1238-1243.
47. 田中千賀子. 加藤隆一. 2002. ステロイド系抗炎症薬.487-488. *NEW 薬理学*、南江堂書店、東京.
48. 鳥塚莞爾. 1997. 基礎と測定.7-51. *クリニカル PET.臨床応用のためのガイドブック*、先端医療技術研究所、東京.
49. 梅原千治. 佐藤武雄. 1967. 糖コルチコイドの中間代謝に及ぼす影響と薬理作用.151-177. *ステロイドホルモン V 糖副腎皮質ステロイド*、南江堂書店、東京.
50. Weisdorf, D.J. Craddock, P.D. and Jacob, H.S. 1982. Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: Differential activation in phagocytosis and chemotaxis. *Blood.*60(4):888-893
51. Wudel, L.J. Jr, Delbeke, D. Morris D et al. : The role of [¹⁸F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging in the evaluation of hepatocellular carcinoma.2003.*Am Surg* 69.117-124.
52. Yamada, S. Kubota, K. Tamahashi, N. and Ido,T. 1995. Double-tracer tissue distribution study of ³H-thymidine and ¹⁸F-FDG in experimental inflammatory tissue. *CYRIC annual report1995:* 100-1001.
53. Yamada, S. Kubota, K. and Tamahashi, N. 1995. High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue. *J Nucl Med.* 36:1331-1306.
54. Yamada, S. Kubota, K. and Tamahashi, N. 1992. ¹⁸F-FDG accumulation in experimental abscess. *CYRIC annual report1992:*114-115.
55. Zhao,S. Kuge,Y. and Tamaki,N. 2001. Effect of insulin and glucose loading on FDG uptake in experimental malignant tumors and inflammatory lesions. *European J Nucl Med.* 28 (6) :731-735.