

ラット皮下炎症及び腫瘍への¹⁸F-FDG集積に対する抗炎症薬の影響

内田兼司、原沢菜穂子、夏堀雅宏、畠山 智*¹、二ツ川章二*¹、寺崎一典*²、山口慶一郎*³
佐野忠士、吉岡一機、伊藤伸彦

北里大学獣医畜産学部
034-8628 青森県十和田市東 23 番町 35-1

*¹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 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

*²岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

*³東北大学サイクロトロン RI センター
980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

1. はじめに

近年、^{[18F]FDG (2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose:FDG)} をトレーサに用いたポジトロン断層撮影法 (positron emission tomography: PET) が腫瘍性疾患に対する画像診断法の一つとして注目を集めている¹⁾。しかし、この FDG-PET は他の検査同様、長所と短所を持ち合わせた画像診断法の一つである^{1,2)}。FDG は生体内でグルコースと同様の経路で取り込まれ、6-リン酸化されるがそれ以上代謝されないため組織内に留まり、脳、心筋、腫瘍などの臓器や組織に糖代謝率に応じて集積する^{3,4)}。この FDG およびその他のポジトロン製剤の局所集積量の定量評価の指標として SUV (standardized uptake value) が汎用されている。これは、RI の物理減衰を補正した組織中放射能濃度を、体重あたりの RI 投与量で除したものであるため、標的組織に均等に分布すればその部位の SUV は 1.0 となる (Eq. 4)^{4,5)}。生体では細胞分裂が盛んな組織ほど FDG が多く取り込まれ、SUV は高値を示す。したがって、SUV は腫瘍の悪性度の指標として、実際の臨床の場で用いられている⁶⁾。しかし、悪性腫瘍を発見するためには偽陽性、偽陰性の可能性を念頭におかなければならない。偽陽性として細胞活性の高い炎症性組織、また偽陰性として胃癌、脳腫瘍、尿路系腫瘍など生理的に高集積を示す組織での腫瘍がある¹⁾。このように腫瘍と炎症とを誤診してしまう危険性について報告されている^{7,8,9,10)}。このような事実から、PET 検査における腫瘍と炎症の鑑別法の確立が望まれており、鑑別に関する研究が多数行われている^{11,12,13)}。炎症や腫瘍に対する FDG 集積特性について解明されつつあるが、有用な鑑別法はまだ確立されていない^{11,14,15,16)}。そこで本研究ではステロイド系抗炎症薬と非ステロイド系抗炎症薬を作用させることで腫瘍と炎症の鑑別診断につながる基礎的データを求めるために、炎症性組織と腫瘍組織の病理組織学的特徴と、それらにおける FDG の集積特徴に主眼を置き抗炎症薬の影響による違いを比較・検討した。

2. 材料および方法

2.1 供試動物

24頭のDonryuラット（性別：雄、年齢：4週齢、体重：平均235(200～250)g、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。

2.2 炎症組織中の経時的变化に伴う病理組織解析

ラット背側皮下にテレピン油で8つの時間的に異なるステージからなる炎症組織をホルマリン固定後、ミクロトームで $5\mu\text{m}$ に薄切し、HE染色標本を用いて、好中球層とマクロファージ層を合わせて炎症細胞層と定義し、それぞれの層の厚さを計測した。しかし、厚さは測定部位における変動が激しいため、本研究では好中球およびマクロファージの各層におけるそれぞれの面積および総細胞数を定量的に評価した。これらはHE染色標本に対し、画像解析ソフトウェア(Motic Images 2000:島津理化学器械（株）、東京)を用いて解析を行った。低倍率での鏡検像から好中球層およびマクロファージ層の各全面積を出し、高倍率で鏡検し、各層の一定面積中の細胞数つまり密度を出すことで総好中球数およびマクロファージ数を算出し、Eq. 1-3のように定義した[図. 1]。

$$\text{炎症細胞層}(\text{mm}^2) = \text{好中球層}(\text{mm}^2) + \text{マクロファージ層}(\text{mm}^2) \cdots \text{Eq. 1}$$

$$\text{好中球数} = \text{好中球層の全面積}(\text{mm}^2) \times \text{好中球の密度}(\text{細胞数}/\mu\text{m}^2) \cdots \text{Eq. 2}$$

$$\text{マクロファージ数} = \text{マクロファージ層の全面積}(\text{mm}^2) \times \text{マクロファージの密度}(\text{細胞数}/\mu\text{m}^2) \cdots \text{Eq. 3}$$

密度は、それぞれ層ごとに3点計測し、その平均値を使用した。

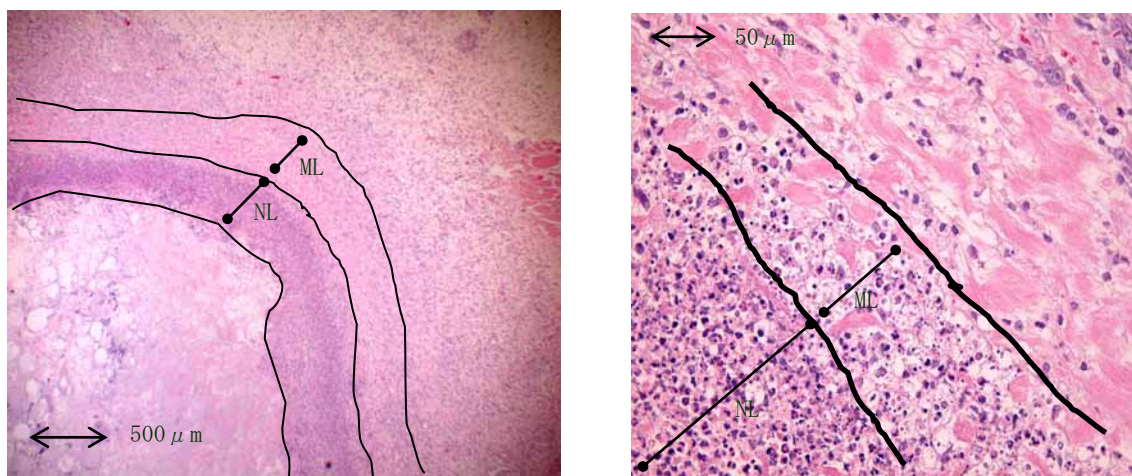


図 1. 炎症組織の構成

好中球層:neutrophil layer (NL)

マクロファージ層:macrophage layer (ML)

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、 $10\mu\text{l}$ のテレピン油（和光純薬工業（株）、大阪）をFDG投与

日の10日前および4日前に皮下投与した。投与は同一個体背側皮下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日前に皮下投与し腫瘍モデル動物とした。なおテレピン油およびラット腹水肝癌は、同一ラット個体背側皮下に投与した[図. 2]。

形成された炎症および腫瘍の肉眼的所見およびサイズを記録後、ステロイド投与群およびNSAID投与群には、FDG投与4時間前にそれぞれ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)、福島]（1mg/kg）およびインドメタシン[インドメタシン；SIGMA、USA]（2mg/kg）を腹腔内に投与した。

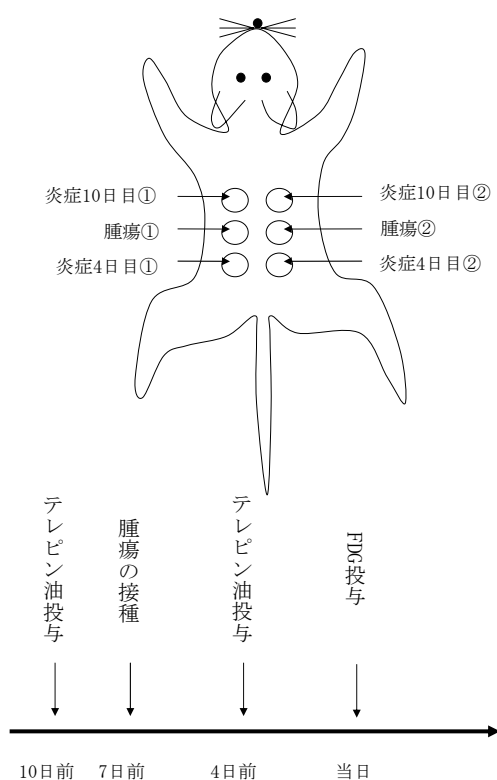


図. 2 実験モデルの作成法

2.4 FDGの投与と組織の採取

各群にそれぞれ ^{18}F -FDG（約20MBq/ml、 $300\mu\text{l}$ ）を尾静脈投与した。投与に用いたシリンジは、投与前後の各RI量（MBq）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）の腹腔内投与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により、FDG投与90分後にラットを放血安楽死した。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、

各組織をピンセット、鉗を用いて採取を行った。炎症および腫瘍は皮膚を剥離しできるだけ余分な組織を取り除いた。その他の組織は一部分のみを切り取った。

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

使用 RI には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 DC-751 ; Aloka、東京)、キュリーメータ (ICG-7B ; Aloka、東京) を使用した。また、NMCC 内動物実験室でも同様の実験を行い、ガンマカウンタ (AUTO WELL GAMMA SYSTEM ARC-2000 ; Aloka、東京)、キュリーメータ (CRC-12 Radioisotope calibrator ; CAPINTEC、東京) を用いた。

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 (20MBq/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 11 段階 ($2^0 \sim 2^{10}$) 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を行った後、両者の結果から C.F. を算出した。

2.6 ガンマカウンタによる組織中 FDG 集積の定量

ラットから採取した組織は、重量測定後、ガンマカウンタを用いて 20 秒間 FDG 集積量を計測した。またこの時の測定時間を記録し減衰補正を行った。この計測値を 1 分間あたりのカウント数 (Count Per Minute ; CPM) に換算し、バックグラウンド値を差し引いた値を取得した C.F. (KBq/CPM) を用いて KBq に換算し、FDG 投与時刻に減衰補正した。補正値は、さらに組織重量 (g) 当たりの FDG 集積量に換算し、ラット体重 (g) および FDG 投与量を Eq. 4 に代入して、SUV を算出した。

$$SUV = \frac{\text{組織中の放射能}(Bq)}{\text{組織重量}(g)} \div \frac{\text{トレーサーの投与量}(Bq)}{\text{体重}(g)} \dots \text{Eq. 4}$$

2.7 炎症および腫瘍組織の病理学的評価

ラットから採取した炎症 10 日目・炎症 4 日目・腫瘍は、ホルマリン固定後、マイクロトームで $5 \mu\text{m}$ に薄切し、HE 染色標本を作成した。腫瘍は、塊をなし、その中に腫瘍細胞からなる実質と、線維芽細胞やコラーゲン線維・リンパ系細胞などからなる間質、皮筋で構成される筋層で構成されていた。本研究では腫瘍組織、実質、間質、筋層を Eq. 5 のように定義し[図. 3]、それぞれ画像解析ソフトウェア (Motic Images 2000 ; 島津理化器械 (株)、東京) を用いて面積を計測し、その比を求めた。

$$\text{腫瘍組織 (mm}^2\text{)} = \text{実質 (mm}^2\text{)} + \text{間質 (mm}^2\text{)} + \text{筋層 (mm}^2\text{)} \dots \text{Eq. 5}$$

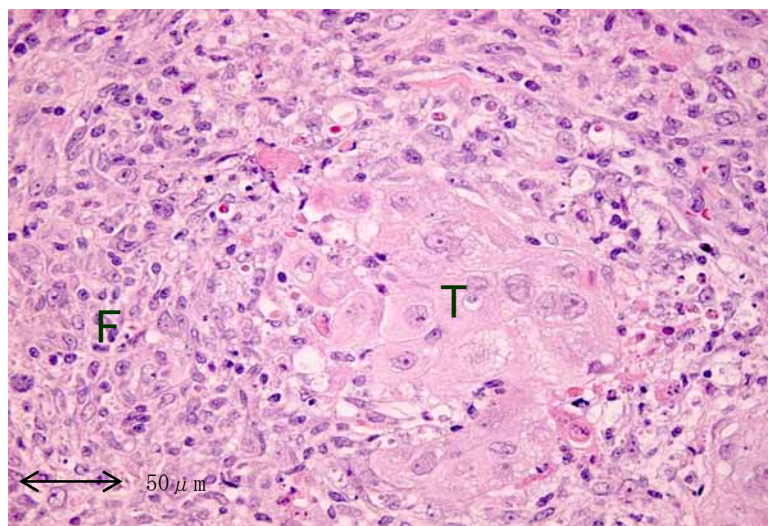


図. 3 腫瘍結節の細胞構成 (強拡大)

実質：腫瘍細胞(tumor cell:T)

間質：リンパ系細胞、結合組織、線維芽細胞など(framework:F)

3. 結果

3.1 炎症組織の経時的変化に伴う細胞成分の変化

好中球層の面積は、炎症 2 日目から急激に増大しはじめ、炎症 3 日目で 5.17 ± 1.63 (mm^2) となり最大となった。これに対し、マクロファージ層の面積は、炎症 3 日目では、 1.59 ± 1.28 (mm^2) で好中球層の面積の 3 分の 1 以下であった。好中球層の面積が減少する 7 日目以降は、マクロファージ層の面積が好中球層の面積のおよそ 2 倍程度上回った[図. 4]。

また、好中球数も同様に炎症 2 日目から 5 日目にかけて値が大きく、そのピークである炎症 4 日目の値は、炎症 4 日目のマクロファージ数のおよそ 3 倍を示した。好中球数はピークを境に減少し始めたが、マクロファージ数を下回ることにはなかった。マクロファージ数は炎症 5 日目にピークとなったが、各炎症ステージにおいて、大きな違いは認められなかった[図. 5]。これらのことから、炎症 2 日目から 5 日目にかけて、面積および数ともに好中球が炎症細胞層の大部分を占めることを示した。

好中球 1 個当たりの面積は、炎症ステージに関係なくほぼ一定となり、マクロファージでは炎症 5 日目から面積が増大し始め、7 日に最大となるが、10 日目ではいったん減少し、その後また増加した[図. 6]。

好中球層の面積と SUV の関係をみると、 R^2 値は 0.83 と高く、良好な相関関係が認められた[図. 7]。 R^2 値は図. 8 よりも低くなったが、直線に回帰された。

好中球の総数と SUV の関係をみると、 R^2 値は 0.77 と高値を示し、直線に回帰され良好な相関関係を示した[図. 7]。

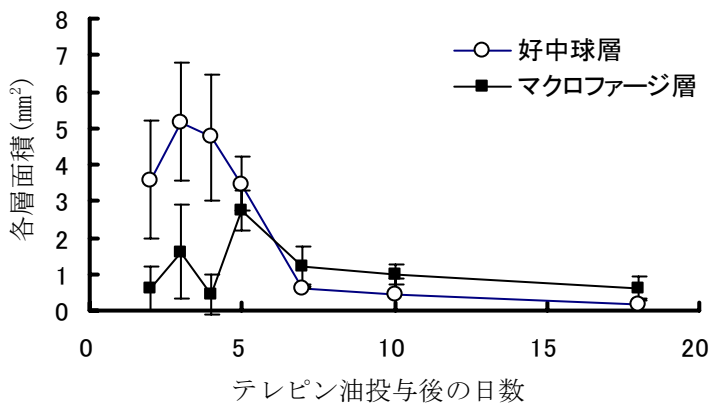


図. 4 各炎症ステージと各層の面積との関係

好中球層の面積は2~5日までの急性期に最大となり、マクロファージ層の面積は低い値を示し、日が経つにつれマクロファージに置換された。

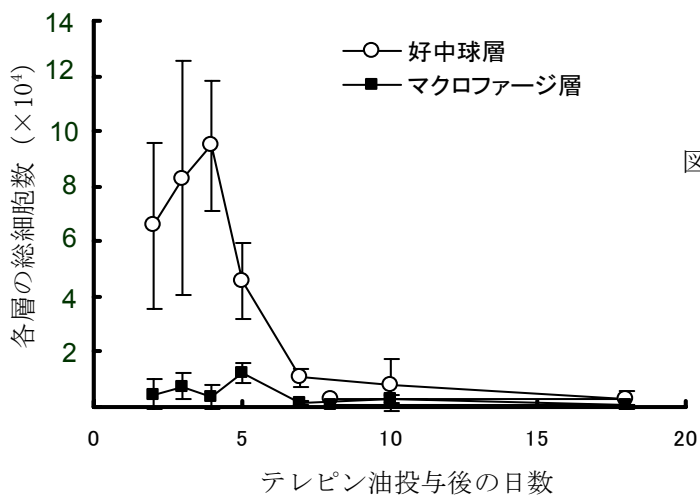


図. 5 各炎症ステージと各層の面積との関係

好中球数は炎症の急性期に数が多く、その値のピークは炎症 4 日目となった。これに対してマクロファージの方は炎症 5 日目にピークが見られたが、各炎症ステージにおいてそれほど変化は見られなかった。

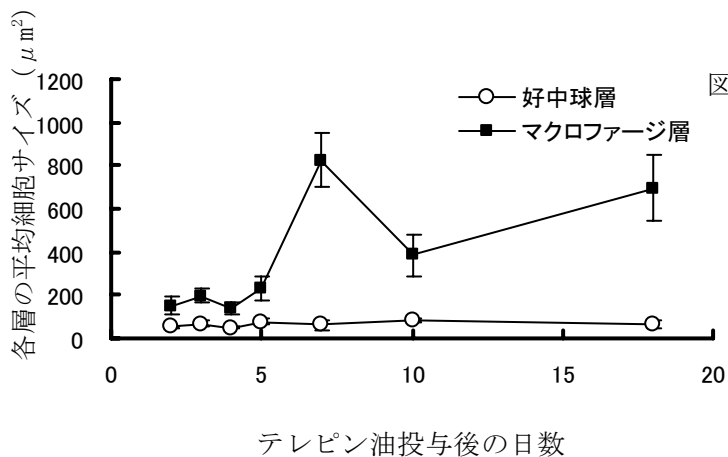


図. 6. 各炎症ステージと各層の 1 個あたりの面積との関係

好中球は、平均細胞サイズは炎症ステージに関係なくほぼ一定で、マクロファージでは炎症 5 日目から拡大し始め、10 日目には縮小したが、その後増大した。

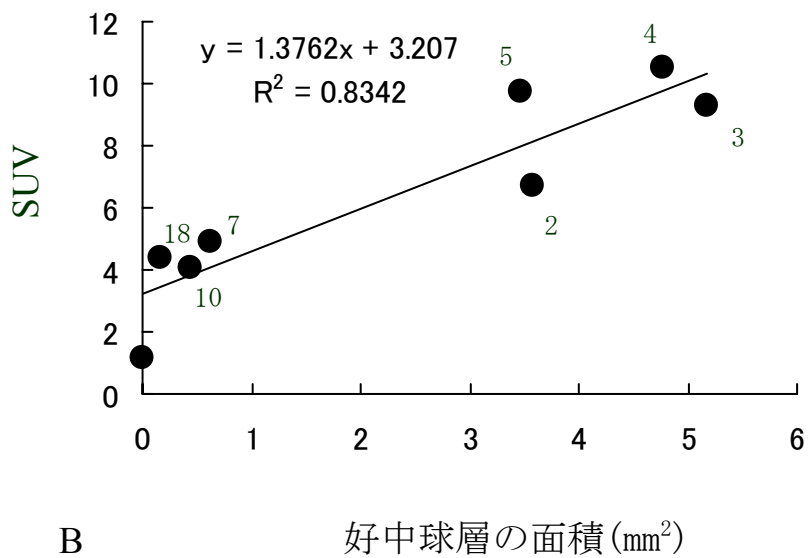
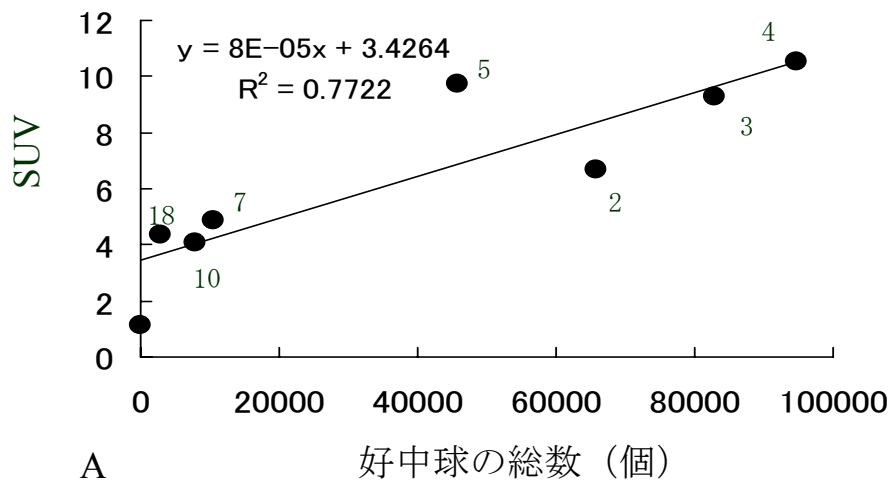


図 7. 好中球層における好中球の総数と SUV との関係 (A)・好中球層における面積と SUV との関係 (B)
 グラフ中の数字はテレピン油投与後からの経過時間(day)

好中球の総数と SUV の関係を見ると、 R^2 値は 0.7722 であったが回帰直線を描いた。好中球層の面積と SUV の関係を見ると R^2 値はさらに高くなった。

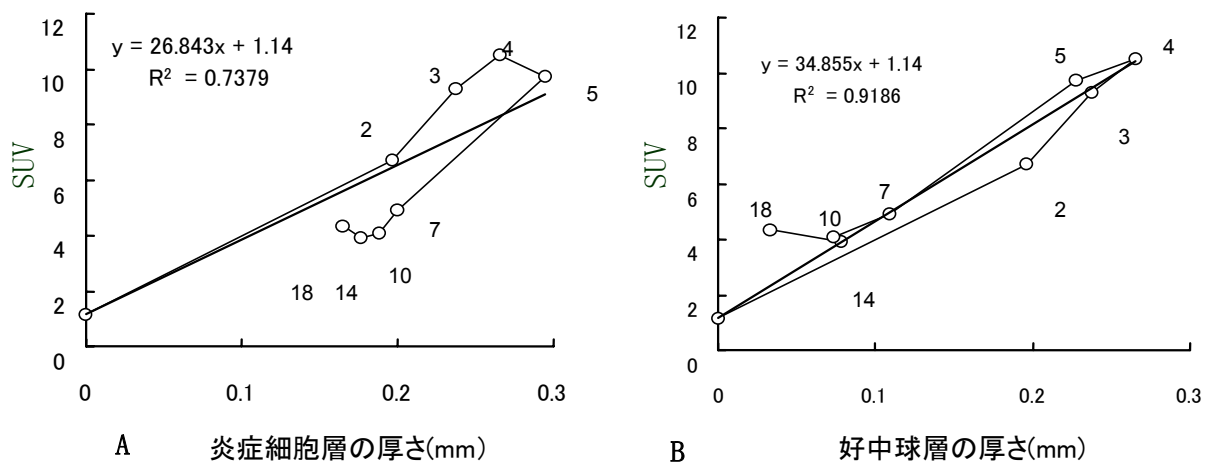


図 8. 炎症細胞層の厚さと炎症細胞層の SUV との関係 (A) 好中球層の厚さと炎症細胞層の SUV との関係 (B) (藤山ら)
 グラフ中の数字はテレピン油投与後からの経過時間(day)

3.2 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 3 層に分類された[図. 9]。テレピン油周囲には帯状に顕著な好中球の浸潤および集簇が認められる。好中球はしばしば崩壊ないし融解に陥っていた[図. 10]。マクロファージは好中球層周囲にわずかに浸潤しているだけであった[図. 11]。炎症細胞層周囲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 日目の皮下組織には、テレピン油投与後 4 日目に比べ好中球層の厚さは減少し、置換するようにマクロファージの強い浸潤が認められた[図. 12-14]。マクロファージはテレピン油の貪食により大型の細胞質を有し、細胞崩壊物の頻繁な貪食像が観察された[図. 14]。最外層は線維芽細胞と膠原線維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が認められる[図. 15]。結節中には腫瘍細胞の集合が見られ、中心には核崩壊および核融解を起こした細胞も認められた。また、結節との境界領域には赤血球が存在し毛細血管の新生が示唆される。結節を取り囲むように結合組織が存在し、線維芽細胞、膠原線維が認められた。さらにその周囲には、リンパ球および形質細胞のようなリンパ系細胞の浸潤が認められた。リンパ系細胞の多く見られる間質では、毛細血管が多数認められる[図. 16-18]。腫瘍組織周囲には皮筋が存在し腫瘍塊を取り囲んでいた。

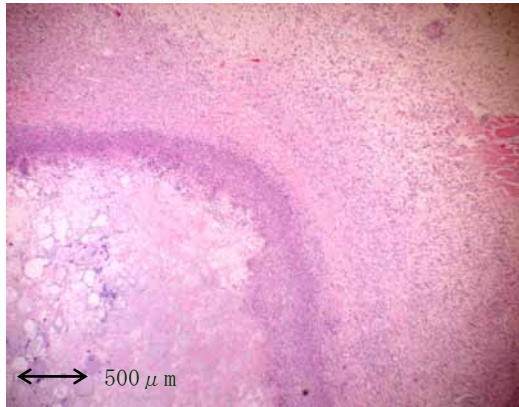


図 9. テレピン油投与後 4 日目の炎症組織 (弱拡大): テレピン油を取り囲むように炎症細胞の浸潤が見られる。中心にはテレピン油や壊死した好中球が観察され、それをとりかこむように厚い好中球層が見られる。

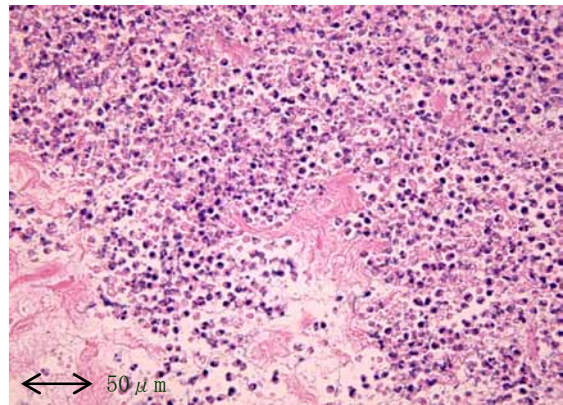


図 10. テレピン油投与後 4 日目の炎症組織像 (強拡大): テレピン油を中心に多数の好中球の浸潤が見られる

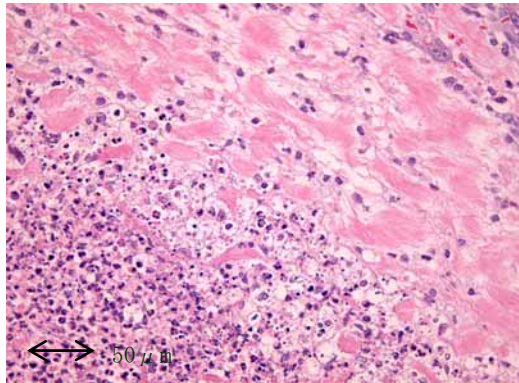


図 11. テレピン油投与後 4 日目の炎症組織像 (強拡大): 厚い好中球層の後にはわずかにマクロファージの出現が認められ、その周囲には肉芽組織が認められる。

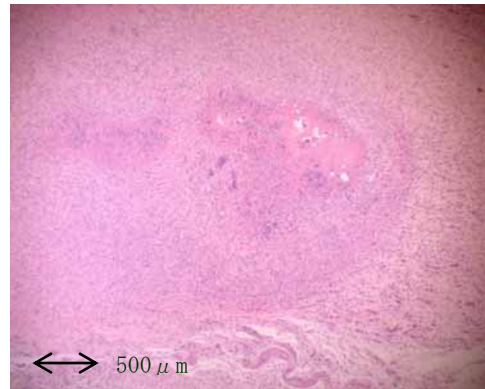


図 12. テレピン油投与後 10 日目の炎症組織像 (弱拡大): 炎症 10 日目の全体像。中心の壊死層も小さくなり、炎症全体が縮小しているのが認められる。

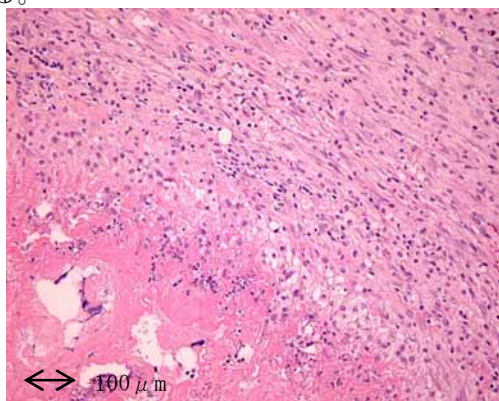


図 13. テレピン油投与後 10 日目の炎症組織像 (弱拡大): 好中球層が薄くなり、マクロファージ層の割合の増加が認められ、さらにそれをとり囲むように肉芽の形成が起こっている。

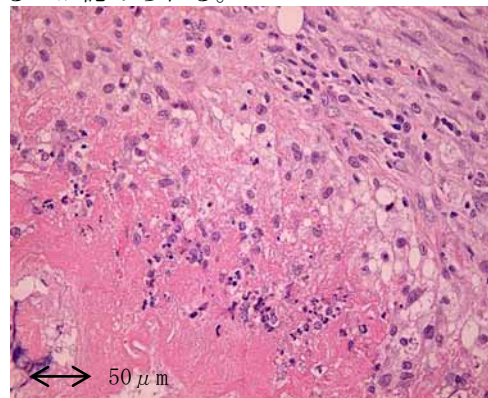


図 14. テレピン油投与後 10 日目の炎症組織像 (強拡大): 高倍率像での炎症組織像。マクロファージによる好中球の取り込みが見られる。結合織の増生も見られる。

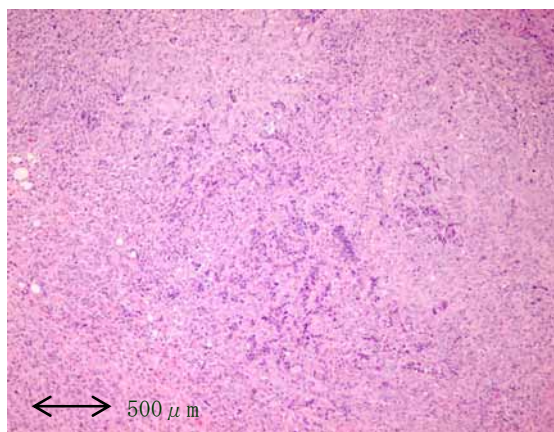


図 15. 腫瘍結節像（弱拡大）

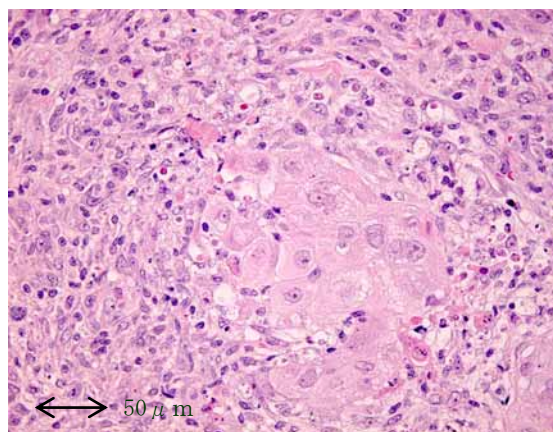


図 16. 高倍率での腫瘍結節像（強拡大）：中心に腫瘍細胞の結節があり、その周りには結合織があり、さらにその外側にはリンパ系の細胞やコラーゲン線維、線維芽細胞が見られる。

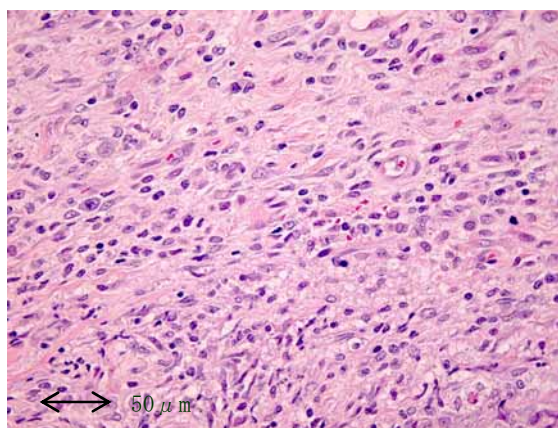


図 17. 腫瘍周囲の間質（強拡大）：間質のリンパ系細胞。細胞質の狭い球状の細胞はリンパ系細胞。紡錘形状の胞体を示す線維芽細胞やコラーゲンがあり、いくつか赤血球もみられ、血管新生が起こっている可能性が示唆される。

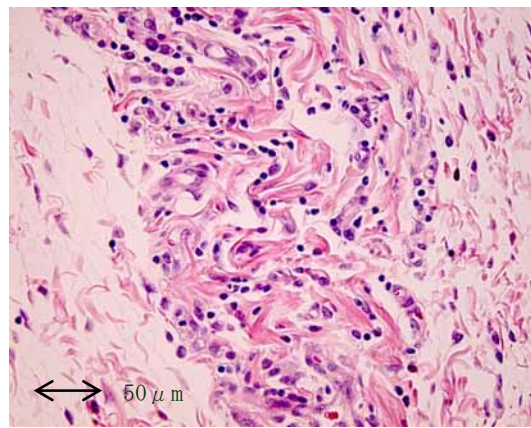


図 18. 腫瘍周囲の間質（強拡大）：細胞質の狭い球状の細胞がリンパ球もしくは形質細胞（リンパ系細胞）で、コラーゲンも多数みられる。

3.3 腫瘍の病理組織学的解析

腫瘍組織は、腫瘍細胞からなる実質と、線維芽細胞や結合組織およびリンパ系細胞からなる間質、皮筋からなる筋層で構成されており[図. 3]、Eq. 5 で定義した。

腫瘍組織における筋層の面積比はほぼ一定で、腫瘍塊によって変化は見られなかった。一方、実質と間質は腫瘍塊によって面積の変動が激しく、面積比は多様であった[図. 19, 20]。

しかし、腫瘍組織中の腫瘍細胞と非腫瘍細胞の割合は、表 1 に示されたように、腫瘍細胞は 1 割を満たさないものから 4 割近くまで示すものまで腫瘍塊によって値は異なったが、腫瘍細胞は全体の半数以上を示すことはなかった[図. 19, 20, 表. 1]。

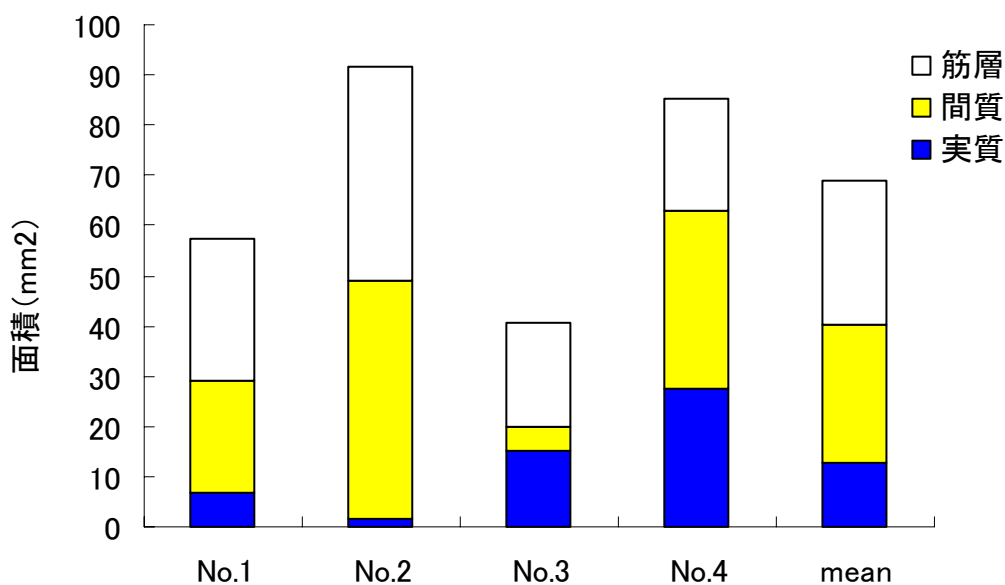


図 19. 4つの腫瘍塊における実質・間質・筋層それぞれの面積
腫瘍塊によって構成成分の面積は様々であるが、腫瘍塊中には腫瘍細胞以外の細胞が多数存在することがわかる。

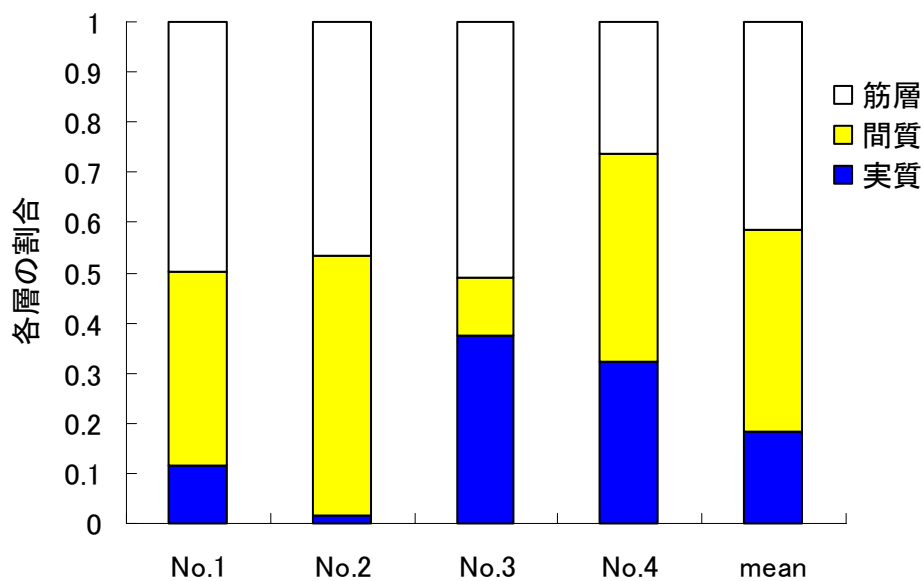


図 20. 4つの腫瘍塊における実質・間質・筋層の構成比
各腫瘍塊における構成成分の割合は多様であった。変動が最も大きかったが、腫瘍細胞の割合の多いものでも4割以下で、半数を超えるものはなかった。比較的一定していたのは筋層で、およそ半数を占めていた。

表 1. サイズの異なる腫瘍塊における実質・間質・筋層それぞれの面積

面積(mm ²)	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	mean
実質	6.67	1.48	15.19	27.38	7.25
間質	22.23	47.50	4.62	35.58	15.70
筋層	28.48	42.83	20.73	22.27	16.33
腫瘍塊中の実質の占める割合 (%)	12	2	37	32	18

腫瘍塊 = 実質 + 間質 + 筋層

実質：腫瘍細胞

間質：非腫瘍細胞（線維芽細胞、結合組織、リンパ系細胞、コラーゲンなど）

筋層：皮筋

3.4 ガンマカウンタによる組織中 FDG 集積の定量

炎症 10 日目、腫瘍、炎症 4 日目の SUV 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・インドメタシン投与群ともに低下しているのが認められた[図. 21]。このうち腫瘍では、デキサメサゾン投与によって有意な低下が認められた。しかし SUV の低下率をみると、炎症 10 日目および 4 日目に比べ、腫瘍の SUV のほうが大幅に低下していた[表. 2, 3]。

また脳において、抗炎症薬投与による SUV の低下が認められた。肝臓・血液・無処置の皮膚・筋肉では SUV は 1 以下を示し、肝臓・無処置の皮膚ではわずかな低下がみられた。血液および心臓の SUV は、デキサメサゾン投与群・インドメタシン投与群ともに有意な差は得られなかった[図. 22]。

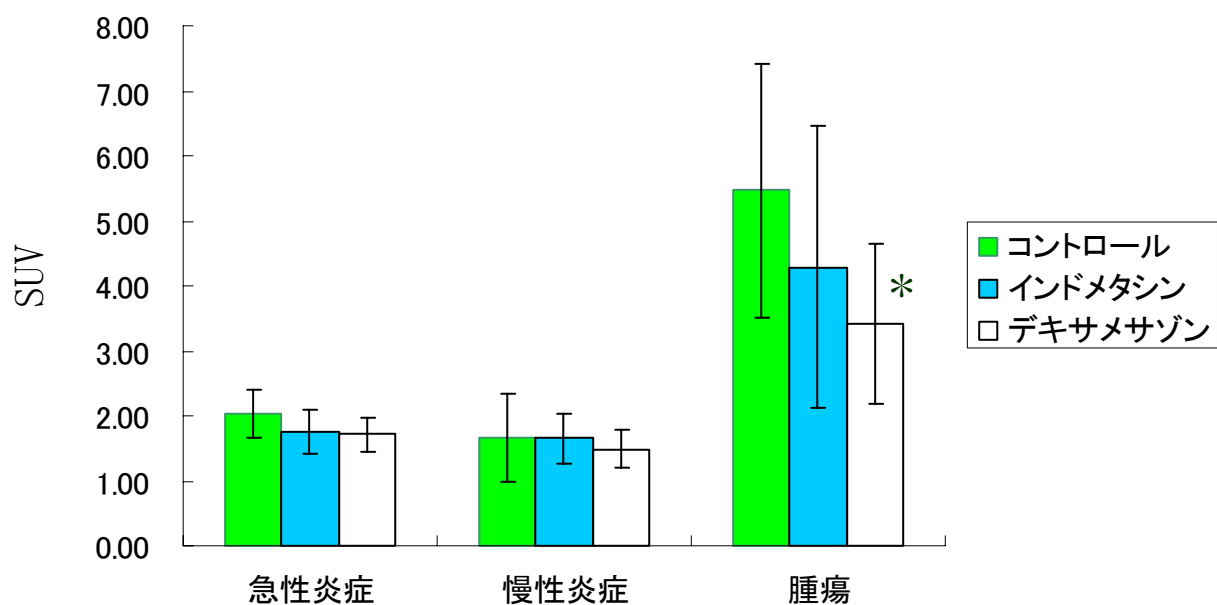


図 21. 各組織における無処置のコントロール群と抗炎症薬投与群の FDG 集積
(ガンマカウンタによる定量評価)

図中の*印はコントロール群に対し有意差あり (p < 0.05)

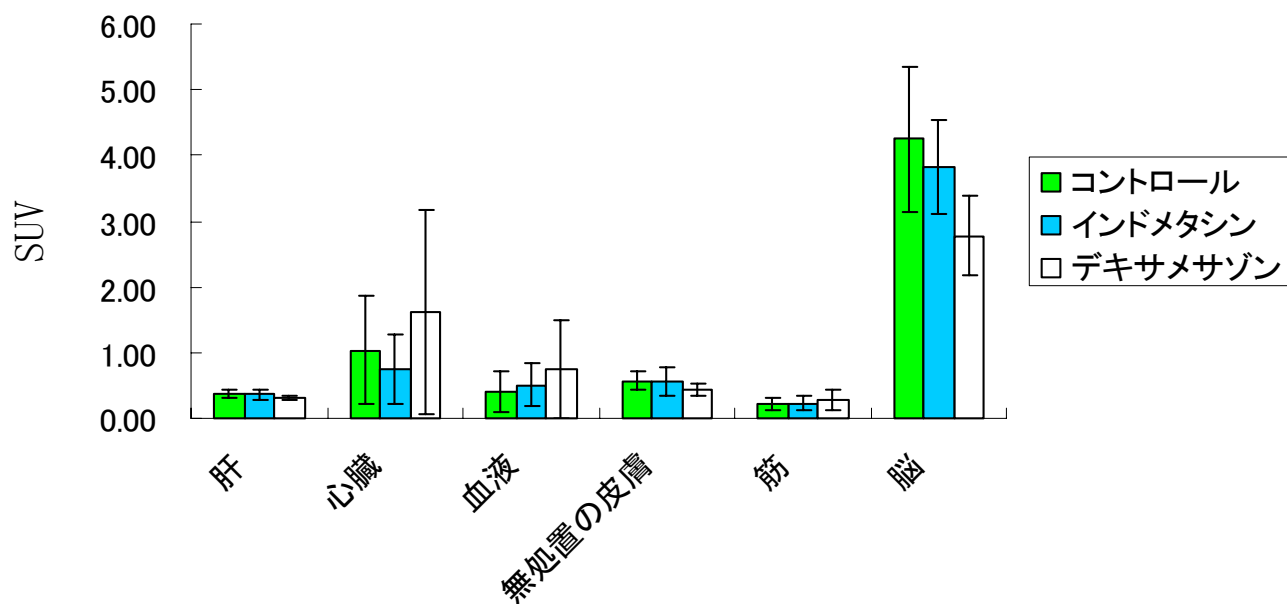


図 22. 各組織における無処置のコントロール群と抗炎症薬投与群の FDG 集積
(ガンマカウンタによる定量評価)

表 2. 上記の 3 群における各組織の SUV (ガンマカウンタによる定量評価)

	デキサメサゾン投与群			インドメタシン投与群			コントロール群		
	mean	±SD	CV (%)	mean	±SD	CV (%)	mean	±SD	CV (%)
肝	0.32	0.03	10.53	0.36	0.09	23.94	0.37	0.06	15.58
心臓	1.61	1.55	96.32	0.74	0.52	70.47	1.04	0.82	79.11
血液	0.73	0.74	101.37	0.51	0.33	65.96	0.40	0.32	78.72
炎症 10 日目	1.49	0.30	20.31	1.65	0.39	23.50	1.66	0.68	41.26
腫瘍	3.41	1.23	35.91	4.29	2.18	50.75	5.46	1.96	35.87
炎症 4 日目	1.72	0.26	14.98	1.76	0.33	18.92	2.03	0.37	18.19
無処置の皮膚	0.44	0.09	21.37	0.56	0.22	38.73	0.57	0.14	24.07
筋	0.27	0.16	59.95	0.23	0.11	46.32	0.21	0.08	39.14
脳	2.78	0.61	22.06	3.83	0.71	18.48	4.25	1.10	25.81

表 3. デキサメサゾン投与群、インドメタシン群での各組織の SUV の低下率
(コントロールの SUV を 1 として算出)

	デキサメサゾン投与群	インドメタシン投与群
	mean±SD	mean±SD
肝	0.87±0.16	0.97±0.28
心臓	1.55±1.93	0.72±0.76
血液	1.82±2.33	1.26±1.29
炎症 10 日目	0.90±0.41	0.99±0.47
腫瘍	0.62±0.32	0.78±0.49
炎症 4 日目	0.85±0.20	0.87±0.23
無処置の皮膚	0.77±0.25	0.98±0.45
筋	1.29±0.92	1.08±0.65
脳	0.65±0.22	0.90±0.29

4. 考察

4.1 炎症組織の経時的変化に伴う細胞成分の変化

藤山らは、ラット背側皮下にテレピン油で 8 つの時間的に異なるステージからなる炎症を作出し、炎症細胞層中の SUV が高値を示す主因は好中球であり、当該組織のマクロファージへの置換により、SUV が低下することを示した¹⁷⁾。しかし、その評価は、炎症細胞層中の好中球層やマクロファージ層を層の厚さの計測で表したが[図.8]、層の厚さは均一なものではなく部位によって変動があるため、さらに正確性を求め、本研究では細胞数を計測した。

テレピン油投与後 2～5 日目の炎症急性期では、好中球層が面積、数ともに大きく、炎症の急性期では炎症細胞層において好中球が大部分を占めると考えられる。好中球と SUV の関係は、有意な相関が得られ、この方法を用いても炎症の急性期における FDG 高集積の主因は好中球であることが示された。しかし、マクロファージは同じ炎症ステージであっても細胞によって大きさが異なり、好中球よりも計測結果に誤差を含む可能性がある。細胞 1 個あたりの取り込みが好中球とマクロファージでは異なることが考えられ、マクロファージの方が貪食能が高い場合、細胞の数や面積が大きいただけでは FDG 高集積の主因は好中球とは言えない。

in vitro でマクロファージと好中球を主体とする炎症性細胞への FDG 集積量を測定した実験において、グルコース取り込み特性を明らかにした結果、マクロファージの FDG 取り込み量 (V_{max}) は好中球の 10 倍程度であることが示されている¹⁸⁾。

テレピン油による炎症のピークと言われている炎症 4 日目^{19, 20, 21)}のマクロファージ数に対して好中球数は約 27 倍であった。マクロファージが好中球よりも 10 倍 FDG を取り込んだとしても、総量では好中球層の方に FDG 高集積を示すと考えられ、このことを加味すると、炎症組織の SUV が高値を示す主因は好中球であると判断される。

4.2 病理組織学的所見

4.2.1 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、使用する実験動物をなるべく少なくすることを考慮し、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、実験動物にはラットを選択した。使用する催炎症性物質には、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性から限局性であることなどの条件を考慮し、テレピン油を使用した。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²²⁾ことから、本研究で使用するのに最適であると考えられる^{23, 24, 25)}。

テレピン油により誘発される炎症の FDG 取り込みのタイムコースは明らかにされているので^{17, 19)}、本研究では、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 日目に病理学的検討を行った。

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 日目ではマクロファージの浸潤する割合が好中球を上回った[図. 9-18]。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であることが確認された²⁶⁾。

4.2.2 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をいう²⁷⁾。

腫瘍を組織学的にみると、腫瘍は実質と間質とから構成され、前者は腫瘍の本質的成分でその細胞を腫瘍

細胞といい、後者は腫瘍内において実質の間を埋めて存在する組織で結合組織および血管を主体とする。これらは腫瘍の種類によってそれぞれの特徴を持っており、腫瘍の診断上は、とくに腫瘍細胞の決定、腫瘍組織の形態的異型および分裂像が問題にされ、その所見に基づいて良性、悪性が区別されている²⁸⁾。

本研究で用いたラット腹水肝癌 AH109A は、上皮性の腫瘍で、Donryu ラットに癌源生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た株で、腹水像は自由細胞が多く小さな島の混ざった混合型である。腹水は混合型のことが多く、大網その他に浸潤がある²⁹⁾。

この腫瘍を用いて実験的に作成した腫瘍でも、腫瘍は実質と間質に分かれ、実質には、中心に核濃縮や崩壊を起こした細胞があり周囲には活発な腫瘍細胞が観察された。これらの腫瘍細胞の結節を取り囲むように間質があり、そこには毛細血管が多数存在し、血管新生が起こっていると考えられ、腫瘍は活発に増殖していると言える。また、リンパ球や形質細胞のようなリンパ系細胞の浸潤が多数認められた。

4.3 ガンマカウンタによる組織中 FDG 集積の定量

ガンマカウンタは検出感度がよく、高い定量性が得られるためトレーサ実験に汎用されている機器である。しかし、SUV は組織重量のファクターが強く影響するため非炎症性組織の重量によって SUV が相対的に低く現れ、ガンマカウンタによる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うため不向きであると考えられた¹⁷⁾。今回組織中の FDG 集積の定量結果では、無処置のコントロール群において、腫瘍の SUV が 5.46 ± 1.96 であったのに対し、炎症 10 日の SUV は 1.66 ± 0.68 、炎症 4 日目の SUV は 2.03 ± 0.37 となり、やはり炎症の SUV は一般に報告される炎症領域の SUV (7~11)^{8,30)} よりも著しく低い値を示した。

しかし、今回の実験では抗炎症薬投与による腫瘍と炎症組織の FDG 集積の影響をみることを主な目的とし、傾向を簡便にみることでこの方法を使用した。

抗炎症薬は、浮腫、紅斑、疼痛、発熱などのいわゆる炎症症状を抑制し、炎症に伴う組織損傷を軽減する目的で用いられる薬である。抗炎症薬は、ステロイド系抗炎症薬と非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) に大別される。

ステロイド抗炎症薬は、抗炎症作用が強く作用時間の長いデキサメサゾン^{31,32,33)} を使用し、NSAID には、最も強力な COX 阻害薬で極めて明確な抗炎症作用を有し、NSAID として最も典型的な薬剤であり、比較対照薬として用いられているインドメタシン³⁴⁾ を実験に使用した。

本研究において、抗炎症薬投与による影響を腫瘍と炎症に注目すると、抗炎症薬投与によって炎症が抑制され腫瘍と差が出るであろうという予想に反して腫瘍の SUV が低下した[図. 21]。抗炎症薬投与によって FDG 集積は抑制されたが、腫瘍の SUV はステロイド系抗炎症薬投与群で 3.41 ± 1.23 、NSAID 投与群で 4.29 ± 2.18 であり、他の組織よりも顕著に SUV は低下したのにもかかわらず FDG 集積抑制後も SUV は高値を示した。値のばらつきが大きく、有意差はデキサメサゾン投与群とコントロール群間でしか認められなかった。一方、炎症では、炎症 4 日目・炎症 10 日目ともに有意差が認められなかった。

腫瘍の病理組織をみると、腫瘍細胞は結節状に集合し、その周囲には結合組織によって区切られており、間質を形成していた。間質には線維芽細胞や膠原線維が多数存在し、リンパ系細胞の浸潤する領域も認められた。血管新生と思われる毛細血管も多数存在しており、活発に増殖が行われていることがうかがわれた。腫瘍組織は腫瘍細胞だけでなく様々な細胞から構成されていたため、腫瘍組織中の腫瘍細胞と非腫瘍細胞の比

率を面積で求めた。すると、腫瘍細胞の割合は4割以下[表.1]であり、腫瘍組織において腫瘍細胞が大部分を占めているわけではなかった。

また、*in vitro*で腫瘍細胞にステロイドを作用させたところFDG取り込みには影響がなかったとの報告がある¹⁸⁾。

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いる^{35,36,37)}。また炎症性細胞もグルコースを要求することが報告されており^{30,38,39,40)}、この腫瘍組織での間質領域においてFDGが集積することが示唆される。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^{41,42,43,44)}。

さらに、ステロイドの抗炎症作用として、①肥満細胞の障害、②毛細血管の透過性の抑制、③線維芽細胞を直接障害、④形質細胞・リンパ球を直接障害、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が低下する、ということが知られている^{31,33)}。腫瘍の間質には毛細血管、線維芽細胞、形質細胞やリンパ球などのリンパ系細胞が存在しているので、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。このことを確認するために、PETよりも解像度が良く(分解能50 μ m)かつ病理組織切片との比較により関心領域(region of interested;ROI)を正確に設定することができるオートラジオグラフィ(autoradiography;ARG)を用いてさらなる研究が必要であると思われる。

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、腫瘍組織中の間質細胞のFDG取り込みを抑制するのではないかと考えられる。抗炎症薬は腫瘍細胞には効かず、腫瘍組織中の非腫瘍性細胞、例えば炎症性細胞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は低下しなかったためにSUVは高めになったのではないかと推察した。

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く、デキサメサゾン投与によって有意に低下した[図.22]。脳において、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応答を調節する⁴⁵⁾ので、デキサメサゾンやインドメタシンのような阻害剤の投与によって、脳の生体反応が抑制されることが考えられる。

同様にFDGの生理的集積部位である心臓では、コントロール群のSUVが 1.04 ± 0.82 となりかなり低い値を示した。抗炎症薬投与による影響は、3回行った実験ごとによって結果が異なり、特にデキサメサゾン投与群ではコントロールと比較してSUVの上昇が見られた場合と低下が見られた場合とがあった。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^{31,46)}があり、心臓は活発になり糖の消費が多くなりSUVが増加すると予想されたが一定の傾向は認められなかった。

炎症10日目では、ステロイドおよびインドメタシ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日目ではステロイドおよびインドメタシンともに有意な低下が認められた。このことは、このような抗炎症薬が好中球を主体とする炎症の急性期にはFDG集積を抑制し、マクロファージが主体である炎症の治癒過程ではFDG集積を抑制しないことを示唆している。

また、抗炎症薬投与によって腫瘍細胞自体のFDG集積は抑制されないとしても、腫瘍組織全体のSUVを低下させてしまうことは間違いない。そのため、抗炎症薬投与によってSUVが低下したからといって炎症であるとは言えない。抗炎症薬による炎症と腫瘍のFDG集積への影響を鑑別診断法としてFDG-PETに応用するた

めには、ARG を用いてさらなる研究が必要であると思われる。また、臨床状態に近い条件で実験を重ね、抗炎症薬投与後の ROI の SUV 変化パターンを多数得て、診断基準を作ることが望ましい。そのために、抗炎症薬の投与量を臨床応用できる薬用量にして研究を行う必要がある。

参考文献

1. 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.
2. 熊井治考. 1998. イヌとネコの年次別疾病の発生順位 Pro Vet 128(7):27-41
3. 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.
4. 鳥塚莞爾. 1997. 基礎と測定. pp.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.
5. 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.
6. 窪田和雄. 2003. FDG-PET の原理と評価法. pp.1118-1128. クリニカル PET. FDG の臨床応用、秀潤社、東京.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 佐々木雅之. 2001. 腫瘍 FDG-PET の臨床. 日本医放会誌. 61(8):14-20.
11. 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.
12. 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. pp.133-135. *Nikkei Medical* 12.
13. 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.
14. Kubota, K. Matsuzawa, T. and Ido, T. 1990. Differential diagnosis of lung tumor with positron emission tomography. *J Nucl Med*. 31:1927-1933.
15. 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.
16. 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
17. 原沢菜穂子、藤山博文、夏堀雅宏、山口慶一郎、伊藤正敏、寺崎一典、畠山 智、二ツ川章二、伊藤伸彦. 2003.

- 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. NMCC 共同利用研究成果報文集 10.
18. 村上寧、武藤寿法、夏堀雅宏、寺崎一典、畠山 智、二ツ川章二、佐野 忠士、伊藤伸彦、2004. 腫瘍細胞および炎症性細胞における¹⁸F-FDGの細胞内取り込み特性. NMCC 共同利用研究成果報文集 11.
19. 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 report 1995*: 100-1001.
20. Yamada, S. Kubota, K. and Ido, T. 1994. Autoradiographic study of ⁶⁷Ga citrate and ¹⁸F-FDG in experimental inflammatory tissue. *CYRIC annual report 1994*: 171-173.
21. Yamada, S. Kubota, K. Kubota, R. Tamahashi, N. and Ido, T. 1993. Quantitative microautoradiographic study of ¹⁸F-FDG in experimental inflammatory tissue. *CYRIC annual report 1993*:
22. 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位論文
23. 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.
24. 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.
25. Yamada, S. Kubota, K. and Tamahashi, N. 1992. ¹⁸F-FDG accumulation in experimental abscess. *CYRIC annual report 1992*:114-115.
26. 板倉智敏・後藤直彰. 1994. 炎症. pp.87-131. 動物病理学総論、文永堂出版、東京.
27. 板倉智敏・後藤直彰. 腫瘍. 1994. pp.165-225. 動物病理学総論、文永堂出版、東京.
28. 幡谷正明・北昂・黒川和雄・西川春雄・竹内啓・渡辺茂. 1995. 腫瘍. pp.197-201. 家畜外科学、金原出版、東京
29. 井坂英彦・岸本英正・小野哲生. 1966. マウス・ラットの腹水腫瘍. pp.485-491. 実験腫瘍学、朝倉書店、東京.
30. 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.
31. 田中千賀子・加藤隆一. 2002. ステロイド系抗炎症薬. pp.487-488. NEW 薬理学、南江堂書店、東京.
32. 梅原千治・佐藤武雄. 1967. 糖副腎皮質ステロイド剤. pp.35-40. ステロイドホルモン□糖副腎皮質ステロイド、南江堂書店、東京
33. 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. pp.151-177. ステロイドホルモン□糖副腎皮質ステロイド、南江堂書店、東京
34. 田中千賀子・加藤隆一. 2002. 非ステロイド系抗炎症薬 pp.479-487. NEW 薬理学、南江堂書店、東京.
35. Landea, D.B. Lemonnier, F. and. Lemonnier, A. 1987. Comparative metabolic effects of fructose and glucose in human fibroblast cultures. *In vitro cellular developmental biology.* 23(5): 355-360.
36. 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.
37. Shearer, J.D., and Caldwell, M.D., 1988. Glucose metabolism of injured skeletal muscle: The contribution of inflammatory cells. *circulatory shock*. 25:131-138.
 38. 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.
 39. Bassett, C.L., Daniel, G.B., and Bemis, D.A., 2002. A technique for creating localized subcutaneous blastomycosis granulomas in rats. *American association for laboratory animal science*. 41 (3) : 33-37.
 40. Kaim, A.H., Weber, B. 2002. Autoradiographic quantification of ^{18}F -FDG uptake in experimental soft-tissue abscesses in rats. 2002. *radiology*.223(2): 447-450.
 41. 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 report1993*:
 42. 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 report1993*:
 43. Kubota, R. Yamada, S. Kubota, K. Tamahashi, N. and Ido, T. 1992. Quantitative microautoradiographic study of ^{18}F -FDG distribution in mouse intratumoral cellular elements. *CYRIC annual report1992*:
 44. 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.
 45. 大地陸男. 2003. 脳の統合機能. pp.187-216. 生理学テキスト第4版、文光堂、東京.
 46. 大地陸男. 2003. 心臓. pp.249-274. 生理学テキスト第4版、文光堂、東京.