

PIXEによるエチドロン酸投与 LEC ラット血清

K, P, Ca, Fe, Cu, 及び Zn の分析

大田顕成, 曾根由美子, 中山茂信, 早川和重

世良耕一郎^{*1}, ニツ川章二^{*2}, 畠山 智^{*3}, 斉藤義弘^{*3}

北里大学医学部放射線科学, 病態・診療系, 遺伝子高次解析センター
199-0106 神奈川県相模原市北里 1-15-1

^{*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字留が森 348-58

^{*2} (社) 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

^{*3} (社) 日本アイソトープ協会滝沢研究所
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-1

1 はじめに

昨年第 12 回 NMCC 共同利用研究成果発表会において, ラットにエチドロン酸二ナトリウムを投与したときの肝臓, 骨及び尿中の Ca と P の変動について報告を行った。本稿では, 昨年の報告の中で用いられたラットから採取, 保存されていた血清を用いて同じく PIXE による元素分析を行ったのでその結果を報告する。

2 方法と材料

2.1 実験

実験の方法および PIXE 法は前報に準じて行った。即ち, ラット(10 週齢, 雄性, 体重約 200 g)は, 対照として無処理の Fischer ラット (2 頭) と無処理の LEC (Long-Evans Cinnamon) ラット (2 頭), また実験群としてエチドロン酸二ナトリウム 2.5mg/kg (体重) 投与 LEC ラット群(A 群, 2 頭)とエチドロン酸二ナトリウム 5.0mg/kg (体重) 投与 LEC ラット群 (B 群, 2 頭) に分けられた。

エチドロン酸二ナトリウム (和光純薬工業社) は生理食塩水に溶解, 希釈され, ラット体重 k g 当たり 2.5mg 又は 5.0mg 量が 1 mL 溶液として腹腔に投与された。投与 5 分及び 10 分後にラットから肝臓, 骨, 尿及び血液が採取された。この内, 肝臓, 骨及び尿についての PIXE 分析結果は先に触れたように報告済みなので今回は血清について PIXE 分析を行った。

2.2 試料調製

ラット血清試料の調整及び PIXE 測定は NMCC の定法に則って行われた¹⁾。

3 結果

ラット血清中には、PIXEにより Na, P, S, Cl, K, Ti, Cr, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, As, Rb, Pb 等の元素が検出された。これらの元素のうちエチドロン酸投与によって著しい変化が認められた P, K, Ca, Fe, Cu 及び Zn の分析値を図 1～6 に示す。

図中、EA+0.5 及び EA+1.0 と示されているのは、それぞれエチドロン酸二ナトリウム投与群体重 kg 当り 2.5mg (ラット当り約 0.5mg, A 群) 及び 5mg (ラット当り約 1.0mg, B 群) のことを表す。なお、体重 kg 当りエチドロン酸二ナトリウム 5mg 量はラットにとって致死量に相当する。

血清 P 濃度は Fischer(155 μ g/mL)及び LEC (127 μ g/mL) のラット間に大きな差は認められなかった。エチドロン酸を投与された LEC ラット血清 P は A 群 (308 μ g/mL) では増加、一方 B 群 (239 μ g/mL) では減少した。B 群におけるエチドロン酸による血清 P の減少は、致死量のエチドロン酸による毒性傷害を反映したものと考えられる。この現象は、他の元素においても同様に観察された。

LEC ラット (1440 μ g/mL) の血清 K 濃度は、Fischer ラット (899 μ g/mL) のそれよりも高い値を示した。エチドロン酸投与によって LEC ラット血清 K 濃度 (A 群) は増加 (1963 μ g/mL) した。

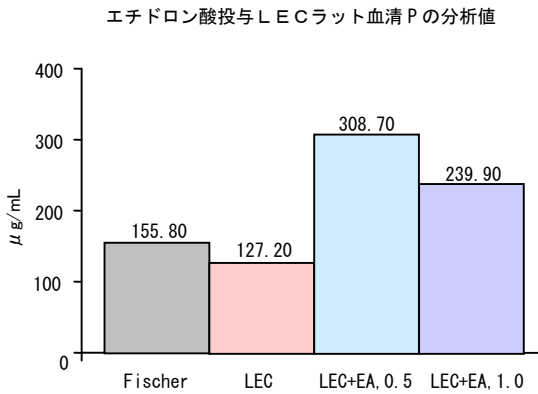


図 1A. エチドロン酸によるラット血清 P の変動

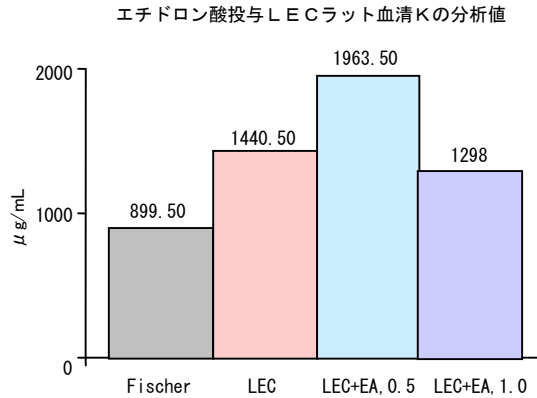


図 1B. エチドロン酸によるラット血清 K の変動

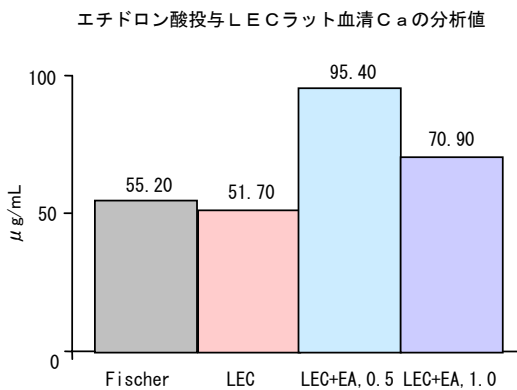


図 1C. エチドロン酸によるラット血清 Ca の変動

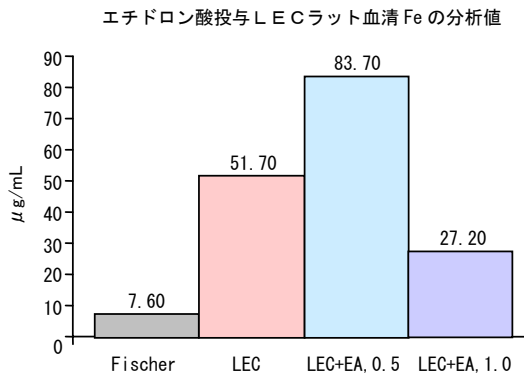


図 1D. エチドロン酸によるラット血清 Fe の変動

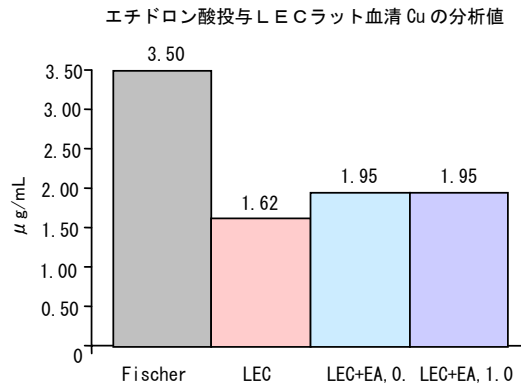


図 1 E. エチドロン酸によるラット血清 Cu の変動

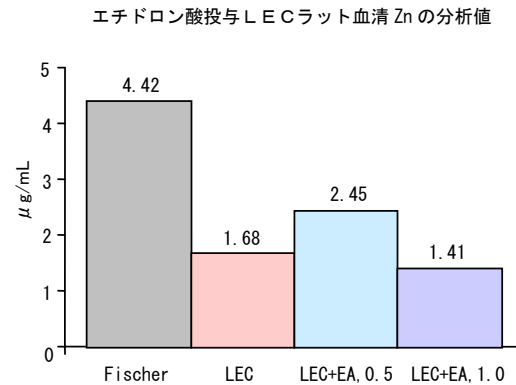


図 1 F. エチドロン酸によるラット血清 Zn の変動

血清 Ca 濃度は LEC ラット ($51 \mu\text{g/mL}$) 及び Fischer ラット ($56 \mu\text{g/mL}$) 間に大きな差は認められなかった。エチドロン酸を投与された LEC ラット (A 群) の血清 Ca 濃度は著しく増加 ($96 \mu\text{g/mL}$) した。

LEC ラット ($51 \mu\text{g/mL}$) の血清 Fe 濃度は、Fischer ラット ($8 \mu\text{g/mL}$) のそれよりも高い値を示した。エチドロン酸投与によって LEC ラット血清 Fe 濃度 (A 群) は増加 ($83 \mu\text{g/mL}$) した。

LEC ラットの血清 Cu ($1.6 \mu\text{g/mL}$) 及び Zn ($1.6 \mu\text{g/mL}$) 濃度は Fischer ラットに比べて低い値 (それぞれ、 $3.5 \mu\text{g/mL}$, $4.4 \mu\text{g/mL}$) を示した。また、LEC ラットの血清 Cu 及び Zn 濃度は、エチドロン酸投与によって僅かに増加した。

4 おわりに

エチドロン酸はビスフォスフォネートの誘導体のひとつである。また、ビスフォスフォネートはピロリン酸の類似体であり、ピロリン酸は体内でリン酸カルシウムに結合してその形成と溶解の両方を抑制している。ビスフォスフォネートは金属イオンと結合し、不溶性の複合体を形成する性質があることが明らかにされた。現在エチドロン酸やその他、ビスフォスフォネート誘導体は骨粗鬆症の治療薬として認可されている²⁾。

ビスフォスフォネートによる骨吸収は、正のカルシウムバランスと骨ミネラルの増加及び骨量の増加を伴っている。ビスフォスフォネートによるこれらの作用は、これまで言われてきたような「ミネラル結晶の溶解に及ぼす物理化学作用」の他に、細胞に対する機構を介して破骨細胞に直接作用していることが分かってきている。

前回 (第 12 回 NMCC 共同利用研究成果発表会)、我々はエチドロン酸投与された LEC ラット肝臓、骨及び尿中の P I X E 分析結果について報告した。今回の報告で用いた実験材料の血清は、前回の LEC ラットから採取、保存されていたものである。

本実験の結果は、エチドロン酸投与された LEC ラット血清ミネラル濃度は、元素ごとの差はあるが、総じて増加する傾向を示した。LEC ラットは、肝臓 Cu 値が高く、最終的に肝臓癌を発症するという遺伝学的特徴を有し、またごく最近の研究によると、LEC ラットでは胸腺における $CD4^+ 8^+$ 細胞から $CD4^+$ 細胞への分化のみが阻害されて、これに伴って末梢免疫器官でも様々な異常がみられる³⁾。この他、LEC ラット脳でも対照に比較して、Cu, Zn, Rb, Mn, No が有意の差で高いとの報告がある⁴⁾。

生体ミネラルは、それ自身の化学作用、骨芽細胞や破骨細胞への影響、及び Lysozome による取り込み、等によってその機能発現に差を与える。本実験で得られたエチドロン酸投与による血清ミネラルの変動は、エチドロン酸と臓器ミネラルとの物理化学的作用の他、これら動物の特性をも反映するものと考えられる。

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、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, 1993
- 2) Paul. D. Miller, Nelson. B. Watts, et al. : Cyclical Etidronate in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis: Efficacy and Safety after Seven Years of Treatment, The American Journal of Medicine, 103, 468-476, 1997.
- 3) 安居院 高志(北海道大学教授) : 「胸腺における CD⁺T細胞の分化阻害を呈する疾患モデル LEC ラットの免疫学的性質」, 第 455 回北里医学会招待学術講演会, 平成 18 年 6 月 30 日(金), 2006
- 4) 斉藤 健, 伊藤俊弘, 渡邊園子, 中川典子, 斉藤和雄 : LEC ラットの脳組織およびシナプトソーム中微量元素の動態, Biomedical Research on Trace Elements, 4(2), 143-144, 1993

PIXE analysis of serum minerals in Long-Evans Cinnamon rats: effect of injected disodium etidronate on several essential elements

A. Ohta, Y. Sone, ^{*1}S. Nakayama, ^{*2}K. Hayakawa,
^{*4}K. Sera, ^{*5}S. Futatsugawa, ^{*6}S. Hatakeyama and ^{*6}Y. Saitoh

Department of Radiology, ^{*1}Laboratory of Clinical Medicine
^{*2}Center for Genetic Studies of Integrated Biological Functions
Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan

^{*4}Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

^{*5} Radioisotope section, Japan Radioisotope Association
2-28-45 Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

^{*6} Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

Male Fischer and Long-Evans Cinnamon rats (10 weeks old) were intraperitoneally injected with disodium etidronate. We made a PIXE analysis where single administration of two different disodium etidronate doses. After 5 and 10 minutes of administration, blood was taken out, then were digested by wet ashing technique. Serum minerals were determined by PIXE.

A dose (5mg/kg) equivalent to LD₅₀ of disodium etidronate for rat resulted in moribund effect for rats. At the dose of 2.5mg/kg, concentration of K, P, Ca, Fe, Cu, and Zn increased in the serum.