

生体からの PIXE 試料採取法の改善

藤村 朗、古城慎太郎¹、香木千尋¹、安藤禎紀²、小野寺政雄、野坂洋一郎
高橋千衣子³、後藤祥子³、世良耕一郎⁴

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座、¹口腔外科学第一講座、²保存学第二講座
020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

³ (社) 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字留が森 348-58

⁴ 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

1 はじめに

過去数年に亘って生体に注入した抗癌剤であるシスプラチンの白金を検出することで、注入した薬剤の生体内における動態を検索してきたが¹⁻⁴⁾、データのばらつきが大きく、結果の解釈に苦慮してきた。その原因を試料作製過程に想定し、硝酸灰化の容器の容量を変更したり、計測方法過程に想定して無標準測定を行ったりしたが、なかなか良好な結果は得られなかった。今回は試料採取そのものに原因を想定したので、その結果について報告する。

2 実験方法

薬剤注入条件および試料調製について

白金製剤（シスプラチン：CDDP）を生理食塩水にて 0.1 mg/ml の濃度に調整し、その 100 μ l をネンブタール麻酔下のウサギ（日本白色種）の右側舌辺縁部に注入した。10 分間マッサージ後に、いままでは所属リンパ節である深頸リンパ節を摘出し、直ちに乾熱乾燥したが、今回は、薬剤注入して 5 分間マッサージ後にエバンスブルーを同部位に注入し、引き続き 5 分間マッサージを加えた。色素が 5 分間のマッサージで深頸リンパ節に到達し、蓄積したことを確認してから、リンパ節の輸入および輸出リンパ管を結紮（図 1）、摘出し、ただちに乾熱乾燥し、硝酸灰化法による試料調製を行った。内部標準としてインジウムを使用した。顎下リンパ節に移行したシスプラチンの成分である白金（Pt）の測定は Particle Induced X-ray Emission (PIXE) を用いて行った。コントロールとしてシスプラチンを様々な濃度（6 種類）で作成した溶液を計測した。



図 1

3 結果

3.1 シスプラチン溶液の白金量の測定

PIXEの白金測定に問題のないことを確認するために、6種類の濃度のシスプラチン溶液から5サンプルを作製し、PIXEにて計測を行った。その結果、A～F群のうち、D群において多少のばらつきは認められたが、過去の計測値に比べるとほとんど問題がなく、その他の群はほとんど一定の値を示していた。(表1)。

表1 6種類の濃度のシスプラチン溶液の白金量測定結果 (単位: $\mu\text{g/g}$)

	A	$\pm\text{SE}$	B	$\pm\text{SE}$	C	$\pm\text{SE}$	D	$\pm\text{SE}$	E	$\pm\text{SE}$	F	$\pm\text{SE}$
1	472.98078	25.7879	31.87166	1.5843	34.64794	1.9408	540.2065	30.5552	29.57725	1.3933	44.7289	2.1348
2	447.52818	24.7692	30.07047	1.4329	39.89268	2.2472	466.27493	23.8298	27.99382	1.2874	43.82869	1.7902
3	470.06272	18.13	29.07088	1.389	36.40935	2.0569	656.76774	32.6036	31.44756	1.4077	45.33654	2.1006
4	473.03681	19.2956	32.24118	1.8712	34.70878	1.7313	462.43892	24.6646	28.83219	1.1435	42.5952	2.0918
5	481.79572	21.8599	34.82796	2.0802	38.86551	2.3155	501.74533	23.7868	30.98172	1.5323	46.2432	2.6794

3.2 ウサギ舌辺縁部に投与したシスプラチンの深頸リンパ節における白金量の測定

ウサギ右側舌辺縁部に0.1 mg/ml濃度のシスプラチンを100 μl 注入し、10分間マッサージを施した後の深頸リンパ節への白金移行量をPIXEを用いて測定した。その結果、シスプラチンを投与した右側深頸リンパ節には $6.6\pm 1.2 \mu\text{g/g}$ の白金が舌から移行していた(表2)。

表2 ウサギ右側深頸リンパ節のPIXE元素分析結果

Standard		ug/g	Standard Error	Peak Count	Error
4911	In $K\alpha$	5,000.00000 \pm	0.00	5,060.0 \pm	71.9
Samples		ug/g	Error	Peak Count	Error
1	:1911 K $K\alpha$	10,930.57989 \pm	376.2305	17,200.9 \pm	156.6
2	:1912 K $K\beta$	12,474.06195 \pm	482.8644	9,942.7 \pm	198.0
3	:2011 Ca $K\alpha$	598.54271 \pm	24.9205	5,253.0 \pm	132.0
6	:2211 Ti $K\alpha$	3.33175 \pm	2.5295	170.1 \pm	129.0
7	:2212 Ti $K\beta$	6.61882 \pm	7.4235	93.2 \pm	104.5
8	:2511 Mn $K\alpha$	0.69191 \pm	0.5789	81.7 \pm	68.3
9	:2611 Fe $K\alpha$	122.92776 \pm	4.2278	15,138.2 \pm	136.3
10	:2711 Co $K\alpha$	0.61206 \pm	0.4116	74.8 \pm	50.3
11	:2612 Fe $K\beta$	118.43997 \pm	5.0768	2,481.6 \pm	67.3
12	:2811 Ni $K\alpha$	0.33296 \pm	0.3687	37.3 \pm	41.3
13	:2911 Cu $K\alpha$	5.28147 \pm	0.3967	507.2 \pm	34.2
14	:3011 Zn $K\alpha$	40.47530 \pm	1.5353	3,459.5 \pm	63.5
15	:2912 Cu $K\beta$	7.88573 \pm	1.4886	118.6 \pm	22.0
16	:3111 Ga $K\alpha$	0.14252 \pm	0.2973	10.1 \pm	21.0
17	:3012 Zn $K\beta$	39.06774 \pm	2.7023	520.9 \pm	31.6
18	:8221 Pb $L\alpha$	0.51448 \pm	0.7175	8.1 \pm	11.3
19	:7821 Pt $L\alpha$	6.55414 \pm	1.2283	138.8 \pm	25.6
20	:7822 Pt $L\beta$	5.84155 \pm	2.0497	43.9 \pm	15.3
21	:7822 Pt $L\beta$	6.61245 \pm	7.1569	49.7 \pm	53.7
22	:3511 Br $K\alpha$	6.75390 \pm	0.6076	205.7 \pm	17.2
23	:8222 Pb $L\beta$	0.13883 \pm	0.7544	1.2 \pm	6.5
24	:3711 Rb $K\alpha$	12.23243 \pm	0.9630	236.4 \pm	16.9
25	:3712 Rb $K\beta$	15.13370 \pm	2.4573	57.4 \pm	9.1
26	:4911 In $K\alpha$	5,000.00000 \pm	180.5270	5,060.0 \pm	71.9

一方、シスプラチンを注入したのとは反対側の左側深頸リンパ節にも白金の検出が見られた。測定結果は、右側の約半分の $3.1 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ であった (表 3)。

表 3 ウサギ左側深頸リンパ節のPIXE 元素分析結果

Standard		In K α		ug/g	Standard Error	Peak Count	Error
4911		In K α		5,000.00000	± 0.00	11,697.0	± 109.4
Samples				ug/g	Error	Peak Count	Error
1	:1911	K	K α	11,567.21360	± 369.5276	42,078.9	± 242.0
2	:1912	K	K β	13,364.51403	± 451.1304	24,625.1	± 303.6
3	:2011	Ca	K α	666.70465	± 23.2251	13,526.1	± 203.4
5	:2012	Ca	K β	15.18968	± 25.9530	133.4	± 227.9
7	:2211	Ti	K α	4.40644	± 1.6477	520.2	± 193.8
8	:2212	Ti	K β	4.44487	± 4.8014	144.7	± 156.2
9	:2411	Cr	K α	2.57294	± 0.4955	649.7	± 123.4
10	:2511	Mn	K α	0.62725	± 0.3726	171.2	± 101.6
11	:2611	Fe	K α	144.22497	± 4.5988	41,057.3	± 222.0
12	:2711	Co	K α	1.02412	± 0.2824	289.5	± 79.3
13	:2612	Fe	K β	140.76016	± 4.9564	6,817.7	± 108.3
14	:2811	Ni	K α	0.18730	± 0.2405	48.5	± 62.2
15	:2911	Cu	K α	6.26743	± 0.3163	1,391.4	± 55.0
16	:3011	Zn	K α	51.47957	± 1.7069	10,171.5	± 107.6
17	:2912	Cu	K β	6.99178	± 0.9779	243.2	± 33.1
18	:3111	Ga	K α	0.08021	± 0.2018	13.1	± 33.0
19	:3012	Zn	K β	49.21729	± 2.2720	1,517.1	± 51.3
20	:8221	Pb	L α	0.07677	± 0.4544	2.8	± 16.6
21	:7822	Pt	L β	4.09092	± 3.9504	71.0	± 68.6
22	:7821	Pt	Lα	3.09126	± 0.7687	151.3	± 37.3
23	:3511	Br	K α	5.14262	± 0.3983	362.1	± 25.6
24	:8222	Pb	L β	0.30384	± 0.6041	6.0	± 12.0
25	:3711	Rb	K α	13.44436	± 0.7534	600.7	± 27.9
26	:3811	Sr	K α	0.03768	± 0.2799	1.4	± 10.0
27	:3712	Rb	K β	8.21078	± 1.4148	71.9	± 12.2
28	:4911	In	K α	5,000.00000	± 163.9340	11,697.0	± 109.4

3.3 深頸リンパ節のその他の元素分析結果

PIXE による計測で、右側の深頸リンパ節に対する左側の深頸リンパ節の主な元素量はカリウムで 106%、カルシウムで 111%、鉄で 117%、銅で 118%であるのに対し、白金では 47%となっていた (図 2)。

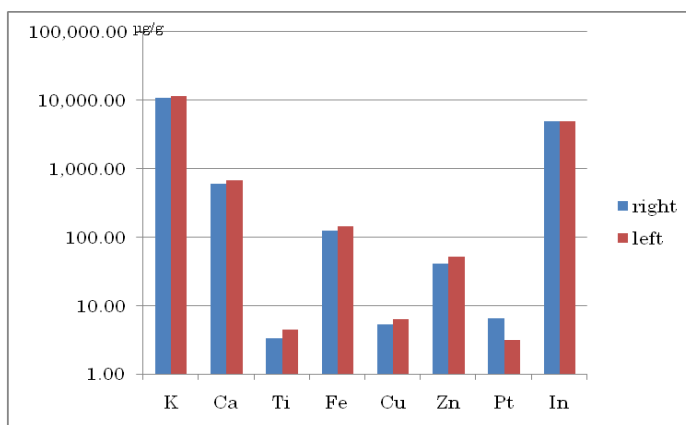


図 2

4 考 察

本研究の目的は、白金製剤であるシスプラチンが注入部位のリンパ管から吸収され、リンパ管を經由して流れ込む深頸リンパ節の摘出および試料調製中に目的とする薬剤が試料から流出しない方法を確認することである。単に輸入リンパ管および輸出リンパ管を切断し、リンパ節を周囲組織から引き剥がして摘出する方法ではリンパ節に対する圧迫で切断された輸入、輸出リンパ管から流出する可能性は非常に高いと考えられる。そこで、本研究では、輸入リンパ管、輸出リンパ管を確認するために薬剤を注入後、色素（エバンスブルー）を薬剤注入部位に注入し、明示した。その結果、輸入および輸出リンパ管は明らかに確認でき、結紮が可能であった。しかも、PIXE による計測の結果は過去に計測した中では最も高い値を検出でき、しかも、左右差がはっきりと確認できた。

PIXE による計測で、右側の深頸リンパ節に対する左側の深頸リンパ節の主な元素量は、全般的に左側の深頸リンパ節において元素が 10～20%高い計測値が出たことの意味は不明であるが、白金量は半分以下であった。このことはシスプラチンを右側舌辺縁部に注入したため、基本的には右側の深頸リンパ節がセンチネルリンパ節であるため、流入量が多いことになる。一方、舌には舌体内における左右のリンパ管の交叉が確認されており^{5,6)}、一部は反対側の深頸リンパ節に流れ込んだものと考えられた。その交叉流量については過去に報告はなく、今後、例数を増やして詳細な検討を加える予定である。

本研究で薬剤投与後の深頸リンパ節摘出時の方法がデータの安定性に関連性が高いことが推測できたが、課題も残っている。結紮する輸入および輸出リンパ管の明示についてである。本研究では例数を増やすことで個体差をネグレクトできるが、そのためにはできるだけ小さな動物（例えばマウス）を使いたいわけであるが、リンパ管が非常に細くなる。そのために輸入および輸出リンパ管の明示は必須であるが、リンパ節の特性から一度リンパ節に蓄積してから輸出リンパ管に流れる⁷⁾。薬剤投与後の摘出までの時間で5分以内の設定が不可能であるため、実験計画の設定に制約ができる可能性がある。また、マイクロサージェリーの手技の取得も実験を行うには必須となる。これについてはバイポーラーピンセットの応用で解決できるかもしれない。また、今回の報告では確認していないが、試料採取後の乾燥時、硝酸灰化で用いる容器での乾燥は行わず、他の容器で行っている。乾燥終了後の容器には液成分の乾燥滓が残っていることを経験する。この乾燥後の液成分の回収も微量元素の場合には重要であると考えており、今後は、硝酸灰化で影響を受けない材質のシート上で乾燥し、シートごと硝酸灰化を行うことも考慮すべきである。このように、未だ解決しなければならない課題が残ってはいるが、本報告で輸入および輸出リンパ管を結紮することでリンパ節内の成分がかなり保持されたことが判明した。今後は例数を増やして流入量の確定を行う予定である。

参考文献

- 1) 薬剤輸送経路としてのリンパ管の利用
藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎、斎藤恒夫、太田敏博、世良耕一郎、二ツ川章二
NMCC 共同利用研究成果報文集 11、231-233、 2003
- 2) 薬剤輸送経路としてのリンパ管の検証
藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎、太田敏博、齋藤恒夫、二ツ川章二、世良耕一郎
NMCC 共同利用研究成果報文集 12、51-56、 2004
- 3) 頬粘膜下リンパ管の薬剤吸収能 —バツカル錠を想定して—
藤村 朗、佐藤 大、庄司美樹子、西村智尚、小野寺政雄、伊藤じゅん、世良耕一郎、野坂洋一郎
NMCC 共同利用研究成果報文集 13、71-76、 2005
- 4) 頬粘膜下および口蓋粘膜経由の抗癌剤投与リンパ管の薬剤吸収能
藤村 朗、野坂洋一郎、世良耕一郎
NMCC 共同利用研究成果報文集 14、150-154、 2007

- 5) ゴールデンハムスターの舌におけるリンパ管の走行
陳寛宏、藤村 朗
岩手医科大学歯学雑誌 19(2): 91-102, 1994
- 6) 口腔領域における毛細リンパ管構築
藤村 朗
リンパ学 22(1): 21-26, 1999
- 7) 舌のリンパ管による巨大分子クリアランスに関する研究
謝 雪峻、藤村 朗
岩手医科大学歯学雑誌 25(3): 273-282, 2000

Improvement in taking out of sample for PIXE from living body

A. Fujimura, S. Kogi¹, C. Kounoki¹, Y. Ando², M. Onodera, Y. Nozaka
C. Takahashi³, S. Goto³ and K. Sera⁴

First Department of Oral Anatomy, ¹First Department of Maxillo-Facial Surgery and
²Department of Periodontology, Iwate Medical University
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

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

Abstract

We have investigated the dynamics of the anti-tumor agent(Cisplatin) injected in the tongue in the last 6 years. However, the data of these samples varied widely and we consequently worried about the interpretation for these data. We have thought the cause of these varies was the protocol for sample preparations and have attempted the change of the container size or the measurement method. But we could not get the good result. In this experiment, we have improved the extraction method of lymph node. After injection of anti-tumor agent, we knot the afferent and efferent lymph vessels of the lymph node before extraction. We can get the good result thorough using this method. We can get by-product in this experiment. The agent flows into the lymph node of the same side in which we injected the agent, and the half volume of agent flows into the lymph node of the opposite side. From now on, we will increase the sample number and determine the inflow quantity in each side of the deep cervical lymph node.