

## 微小臓器試料に対する無標準定量分析法の開発

世良耕一郎<sup>1</sup>、寺崎一典<sup>1</sup>、佐々木敏秋<sup>1</sup>  
後藤祥子<sup>2</sup>、齋藤義弘<sup>2</sup>、伊藤じゅん<sup>3</sup>、二ツ川章二<sup>4</sup>  
藤村 朗<sup>5</sup>、野坂洋一郎<sup>5</sup>  
野田芳範<sup>6</sup>、西塚 哲<sup>6</sup>、若林 剛<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 岩手医科大学サイクロトンセンター  
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

<sup>2</sup> 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトンセンター  
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

<sup>3</sup> 日本アイソトープ協会学術部研修課、<sup>4</sup> 管理本部  
〒113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

<sup>5</sup> 岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座  
〒020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

<sup>6</sup> 岩手医科大学医学部外科学講座  
〒020-8505 盛岡市内丸 19-1

### 1 はじめに

基礎医学研究においては、ラット・マウスなどの小実験動物から採取される臓器試料の定量分析がしばしば必要となるが、臓器によっては数 mg 以下の微量である場合も多く、これらの微小試料に対しては従来の方法での定量分析は困難である。理由は、適量の内部標準を精度良く秤量し添加することが極めて難しいためである。そのため、内部標準を用いない定量分析法の開発が求められる。我々は全血・血清試料に対する「無標準法」の開発を行い<sup>1,2)</sup>、微量血液試料の定量分析を可能とした。同法は、マウスから連続採決され分離された 1 $\mu$ L 程度の血清試料の定量分析などに広く応用されてきた<sup>2)</sup>。さらにヒトから採取された体毛<sup>3-6)</sup>・尿<sup>7)</sup>などの試料に対する無標準法は、有害元素による広域的環境汚染に伴う人体曝露実態調査の国際的研究に広く利用され、さらに基礎医学においては小実験動物から採取された微小体毛試料に、獣医学分野においては愛玩動物の被毛試料<sup>8)</sup>などにも応用されてきた。一方臨床医学においては、生検により採取できる程度の微量の臓器・組織試料の定量分析が可能であれば、診断や治療計画立案のために有用であると期待されるが、数 mg 以下の微小臨床検体試料に対する定量分析法は確立されて

いない。このように、微小臓器試料に対する無調製・無標準法の開発への要求が高まっている。

数年前、筆者のうち数人（藤村、野坂、世良、伊藤）は、抗癌剤 CDDP (Cisplatin) のウサギリンパ節への集積を調べる研究を行い、成果を報告した<sup>9)</sup>。口腔内腫瘍は早期にリンパ節転移を行う危険性が高いが、Cisplatin などの抗癌剤は通常静脈投与されるためリンパ管へ殆ど輸送されない。そのためリンパ節転移の治療は放射線療法のみ頼らざるを得ず、治療効果が低いものであった。藤村らは腫瘍周辺への直接投与により、抗癌剤が所属リンパ節に取り込まれることを予想し、PIXE によりそれを確認した。その結果、静注を行なった場合の致死量の 1/100 の投与量で、十分な治療効果が期待できる抗癌剤量が所属リンパ節やそれに続くリンパ節に輸送されていることが確認された。しかしラット、マウスなどのリンパ節は 1mg 以下と微量であり、定量分析が困難であるため、本研究にはウサギが用いられたが、高価であり扱いが面倒なため、十分な実験データの集積に長期を要した。このような基礎研究にラット・マウスを使用できれば、短期間での研究推進が期待される。

一方臨床研究においては、食道癌などへの抗癌剤の集積を調べる目的で、患者から外科手術や生検で採取された食道・小腸・結腸・リンパ節などの分析が行われた（野田、西塚、若林、世良：未発表）。しかし内部標準法適用可能な 2~30 mg を採取するためには太い針を用いる必要があり、患者への負担が大きい。1 mg 以下の試料に対する定量分析法が確立できれば、患者に大きな負担を強いることのない試料採取が可能であり、投与された抗癌剤の体内分布を調べ、治療効果を推定可能となることが期待される。

本研究においては、小実験動物から採取された各種微小臓器試料に対する定量分析法が、「無標準法」を基礎とし開発され、その精度の確認が行われる。さらにその方法を患者から採取された種々の臓器試料に適用し、内部標準法の結果と比較することにより、その精度・適用範囲の確認が行われる。

## 2 実験方法

### 2.1 試料採取及び調製

無標準法の開発を行うための試料として、ラットから採取されたリンパ節、および脾臓試料が選ばれた。実際にそれらの試料の定量分析を行う要求があったこと、及びそれらの臓器が微小であることが理由である。実際他の臓器に関しては、従来の内部標準法の適用が不可能ではない。臨床検体に関しては、リンパ節、甲状腺が無標準法の開発のために用いられた。他の外科手術・生検で採取された臓器；食道・小腸・結腸・胃等の臨床検体は、無標準法の定量精度を確認するために用いられた。これらの臓器に対しては、いずれも乳鉢内で均一化した後、ごく一部（~1 mg）を用いて無標準法のターゲットが作製され、残りの試料は硝酸灰化・内部標準法、あるいは粉末内部標準法により調製され複数のターゲットが製作された。

まず脾臓 7 試料、リンパ節 17 試料が飼育方法の異なる複数のラットから採取された。5~6 個のリンパ節が集められ、メノウ乳鉢内で均一化し一つの試料とされた。一方多くの脾臓試料は、硝酸灰化法や粉末内部標準法が適用可能な重量が単独で確保され、最終的に脾臓 7 試料とリンパ節 3 試料が用いられた。重量は脾臓試料に対して 5.2-31.1 mg、リンパ節に対して 1.7-4.3 mg であった。

これらの試料はメノウ乳鉢内で良く均一化され、4 µm prolene フィルム上に 1 mg 以下の試料が乗せられ、自然乾燥により無標準法のターゲット（1 試料に対して 6 枚）が作製された。残りの試料は 105°C で 10 時間乾燥させた後秤量され、我々により開発された粉末内部標準法<sup>10)</sup>に基づき、試料の量に応じ 3000-10000 ppm のパラジウムカーボン粉末が加えられさらに均一化され

た。粉末内部標準法には、硝酸灰化により失われるハロゲン族元素を定量できるという長所があり、また通常硝酸灰化法で用いられる内部標準である In の L-X 線が K-K $\alpha$ と重なり、臓器試料に対しては K (カリウム) を指標元素とする予定であったため、硝酸灰化-内部標準法との比較のみでは系統的誤差が生じることも予想されたため、同法による調製が行われた。しかし試料によっては均一性に問題が生じる場合があり、4枚のターゲットがそれぞれの試料に対して作成さればらつきを評価することとした。このようにして、計100枚のターゲットが、粉末内部標準法との比較のために作製された。

さらに硝酸灰化法との比較のため、やはり5-6のリンパ節を均一化することにより得られた3つのリンパ節試料と、8つの脾臓試料が別のラット群から集められた。試料を均一化した後1-2枚の無標準法のターゲットが作成され、残りの試料は乾燥後秤量され濃硝酸を加えて電子レンジで過熱し完全に溶解し、1000-10000 ppm の In が内部標準として加えられた<sup>11)</sup>。硝酸灰化により調製されたターゲットはバックリング膜状に5  $\mu$ L の試料を滴下し乾燥させることにより1試料に対し3枚作成され、計53枚のターゲットが硝酸灰化法との比較のため準備された。

患者から採取された臨床検体に対しては、甲状腺正常組織、甲状腺腫瘍部、リンパ節正常組織の3試料が無標準法確立のために選ばれた。これらはいずれも外科手術により摘出され、内部標準法との比較を行うのに十分な量が確保されていた。試料は凍結乾燥後乳鉢内で均一化され、上記ラット試料と同様に極少量を用い無標準法のターゲットが6枚、粉末内部標準法に基づく調製によるターゲットが6枚、1試料に対して作成されたが、甲状腺腫瘍部に対しては若干少量であったため両法それぞれに5枚のターゲットが作成された。このように計34枚のターゲットに対し測定が行われた。これらに加え、生検により採取されたリンパ節、食道試料、外科手術により摘出された結腸・小腸・胃の試料が調製されたが、いずれも十分な量ではなく、無標準法、粉末内部標準法のそれぞれに対して1枚ずつの試料が作製され、無標準法の精度・適用範囲の確認のために測定された。

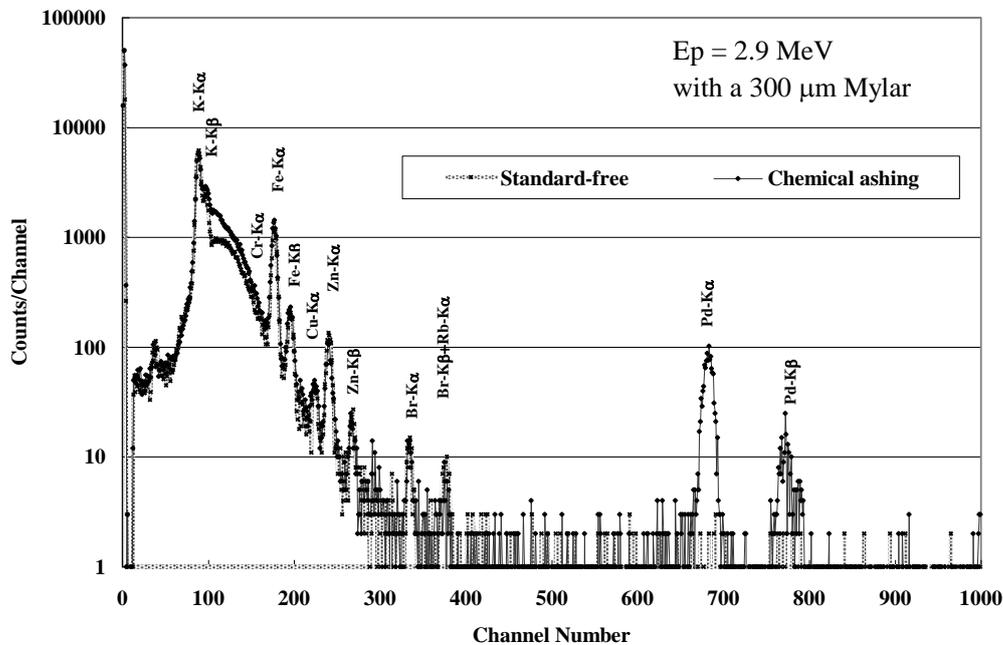


Fig.1 Typical X-ray spectra of a lymph node sample taken from rat. In this figure, the spectra for the two targets prepared for the standard-free method and the powdered-internal-standard method are compared.

## 2.2 ビーム及び測定条件

島津製作所小型サイクロトロンより引き出された 2.9 MeV の陽子ビームは、グラファイト製コリメータにより 6 cmφ に整形され試料を照射する。試料より発生した X 線は、2 台の Si(Li) 検出器により同時に測定された。1 台は 300 μm マイラー吸収体とともに使用され、K-Kα以上のエネルギーの X 線を測定する。もう 1 台は吸収体を用いずグラファイト製コリメータにより計数率が調整され、Na から K までの軽元素を測定する<sup>12)</sup>。この「二検出器同時測定システム」により得られた二つのスペクトルは、解析プログラム SAPIX により解析された<sup>13,14)</sup>。

図 1 にラットリンパ節試料に対する典型的スペクトルを示す。300 μm Mylar が X 線吸収体として使用され、検出器 1 で測定が行われたものである。図中では無標準法ターゲットのスペクトルと、粉末内部標準法ターゲットのそれとが比較されているが、各 X 線ピークは内部標準の Pd を除いてよく一致しており、良い均一性が得られていることが確認できる。低エネルギー領域における連続 X 線収量の違いは、バックニング膜に対する試料の厚さの差によるものとして説明できる。

## 2.3 微小臓器試料に対する無標準法

無標準法開発の手順は、以前の報告<sup>1-3)</sup> とおおよそ同様である。本研究においては、血清・毛髪・ヒゲ試料と同様、300 μm Mylar film が X 線吸収体として用いられた。図 2 に、微小臓器試料（ラットから採取されたリンパ節）に対する無標準法に基づく定量解析の手順をスペクトル上で示す。最初の手順として、バックニングとして用いる 4 μm Prolene film を blank target として得られたバックグラウンドスペクトルが、積算クーロン数での規格化後試料のスペクトルから差し引かれ、試料からの X 線のみからなる raw spectrum が得られる。

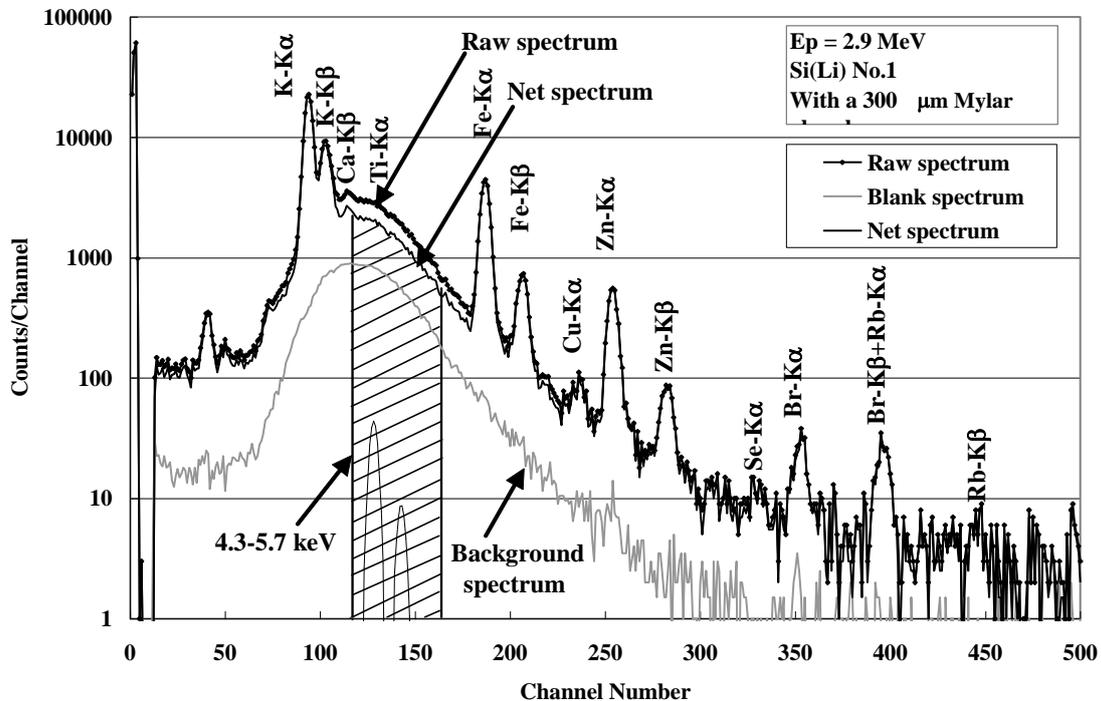


Fig. 2 Procedure of the standard free method for a lymph node sample.

次に、無標準法の基礎となる連続 X 線収量を取るエネルギー領域として最適な領域が検討された。この領域は、主構成元素構成の異なる試料に対して別個に設定する必要がある。領域内に大きなピークが存在すると、その応答関数のうち Gaussian からずれた成分をカウントしてしまうため、そのような領域は避けなければならない。また、低エネルギー側に大きなピークがあり、その pileup が領域内に寄与するケースも避けなければならない。さらに高エネルギー側に巨大なピークが存在する場合、その tail function や escape peak の影響を受ける領域も回避しなければならない。特に脾臓や肝臓試料には、多量の K、Fe が存在するため、それを考慮し多くの臓器試料に共通の最適な領域が選択されなければならない。以上の観点から、臓器試料に対しては 4.3-5.7 keV の領域が採択された。図 3 に、ヒト、ラットの様々な臓器のスペクトルを、このエネルギー領域の連続 X 線収量で規格化し、重ねて示す。ピークを差し引いた連続 X 線の形状はこの領域内ではほぼ一致しており、この領域の連続 X 線収量を用いれば、種々の臓器試料に共通の無標準法を確立可能であることが期待される。指標元素としては、血清・尿試料と同様、K が選ばれた。理由は、K は全ての臓器試料内に安定して高濃度で存在し (3000-30000 ppm)、また臓器内で大きな位置依存性を示さず平均的に存在するためである。

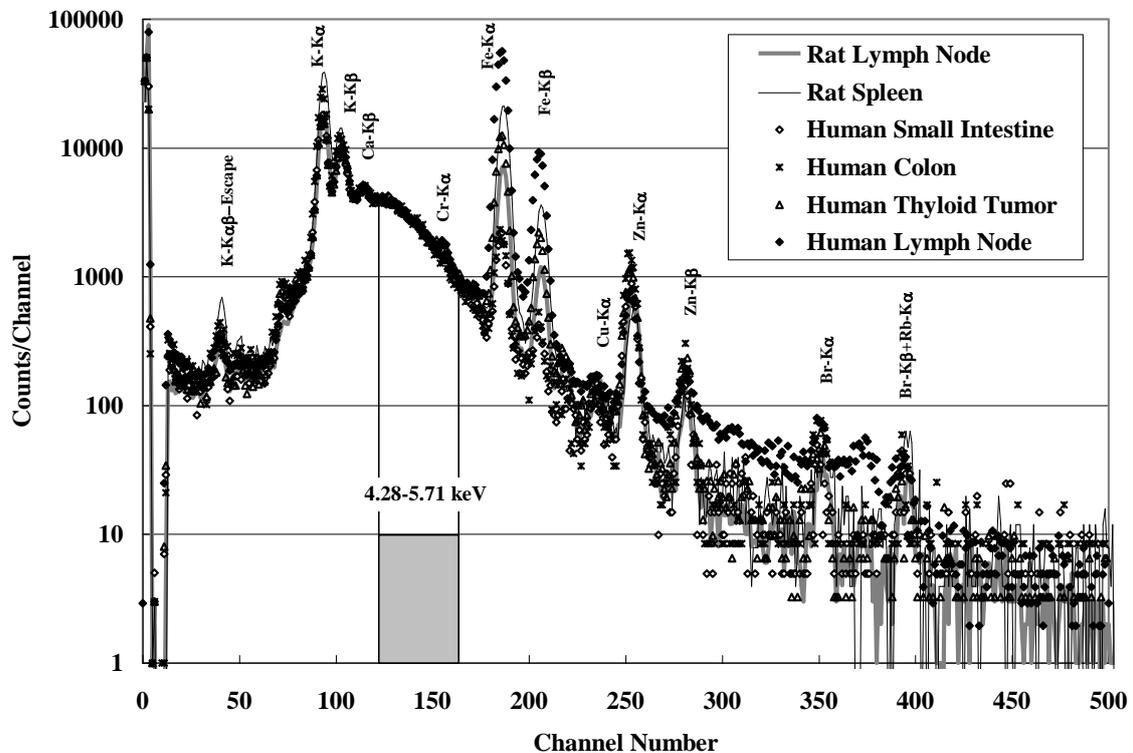


Fig. 3 Spectra for six kinds of organs normalized by the yields of continuous X-rays in the region 4.3-5.7 keV.

次に、Gauss 関数とバックグラウンド関数 (指数関数の組み合わせを基準とし、それに多項式をかけ合わせたもの) を用いてピーク fitting が行なわれ、各ピークの収量  $Y_i$  が求められる。これらのスペクトル解析は我々が開発した PIXE 専用解析コード SAPIX<sup>13, 14)</sup> を用いて行なわれる。さらに上記領域内の全てのピーク成分が差し引かれ、正味の連続 X 線収量  $Y_{CX}$  が求められるが、これは図 2 の斜線部の面積に相当する。より詳しい無標準法開発の手順は、参考文献<sup>1, 15)</sup> を参照されたい。

### 3 結果と議論

#### 3.1 臓器試料無標準法のための変換係数の決定と精度の確認

まず、無標準法により K 濃度を決定するための変換係数の決定を行なう。ラットから採取されたリンパ節 (n=3) および脾臓試料 (n=7) を用いてその決定が行なわれた。基準となる K 濃度の値は、それぞれの試料に対し粉末内部標準法を適用して求められた。リンパ節は小さいため、上述のように多数のラットから集められた 5~6 試料が一つにまとめられ、メノウ乳鉢内で均一化し一つの試料とした。脾臓試料はそれぞれ一つが均一化され一つの試料とされた。一つの均一化した試料から、6 つの無調製・無標準用ターゲットと、4 つの粉末内部標準法により調製されたターゲットが用意され、比較された。図 4 に、変換係数決定の過程を示す。図中、7 つの脾臓、3 つのリンパ節試料に対する両法により求められた K 濃度の結果が、平均値で規格化され比較されている。誤差棒は、複数のターゲットの結果の標準偏差 (SD) を表す。脾臓-3 を除く試料の結果が互いに SD の範囲で一致しており、この規格化係数により変換係数が決定された。図 5 において、その精度が検証されている。図中には、別のラットから同様な手順で採取された 8 つの脾臓試料と 3 つのリンパ節試料中の Fe 濃度が、無調製・無標準法及び硝酸灰化・内部標準法の間で比較されている。前者の値は、図 4 の手順で決定された変換係数を用いて K 濃度を求め、ピーク収量の比と X 線発生断面積、検出効率、吸収体の透過率を考慮して Fe を含む他の全元素の値を求められたものであり、後者は均一化した試料を分け、In = 1000 ppm となるよう In 標準液を加え、圧力容器中で濃硝酸と共に灰化しターゲットを作成<sup>11)</sup>、それを内部標準法で定量したものである。図において、硝酸灰化・内部標準法に対しては 3 つのターゲットの平均値と SD が示され、一方無調製・無標準法はターゲットが 1~2 枚ずつのため、平均値と実験誤差が示されている。図に見られるように、殆どの試料において両法で得られた Fe 濃度は一致しており、ラットから採取されたリンパ節、脾臓などの臓器試料に対しては無調製・無標準法が確立され、その精度が確認されたとと言える。

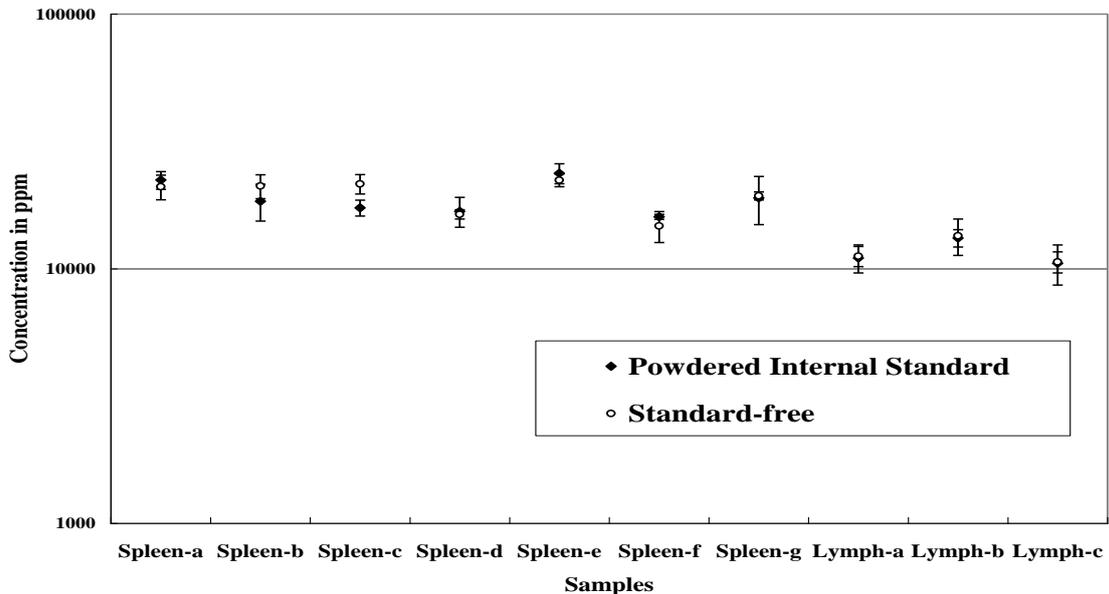


Fig. 4 Comparisons of the results of potassium concentration for seven spleen and three lymph node samples obtained by the standard-free method and by the powdered-internal-standard method, where mean values for six targets for the standard-free method and their standard deviations, and those for four targets for the powdered-standard-free method are shown.

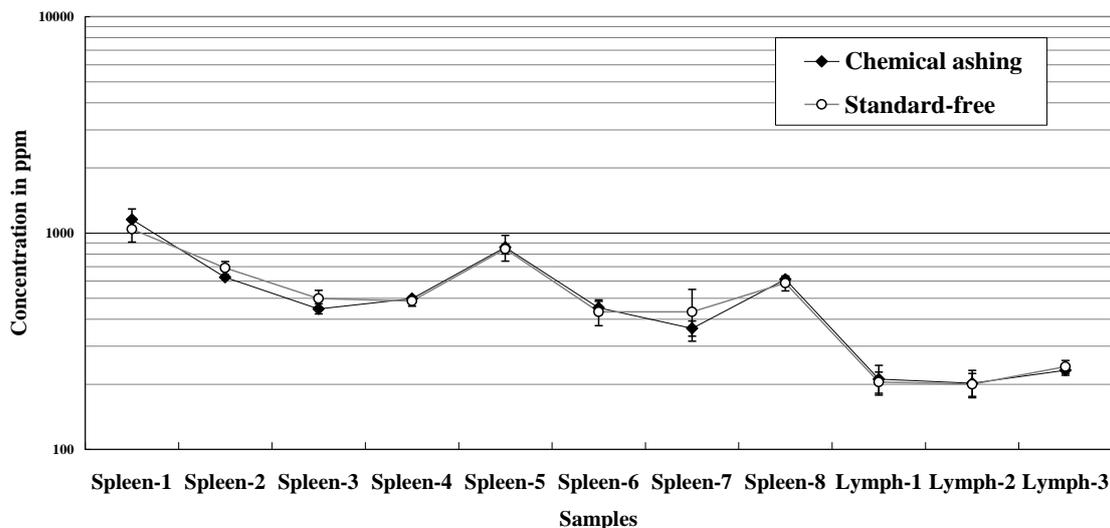


Fig. 5 Comparisons of iron concentration in eight spleen and three lymph node samples obtained by the standard-free method and by the chemical-ashing method combined with the internal-standard method, where mean values for three targets for the chemical-ashing method and their standard deviations, and the experimental errors for the results obtained by the standard-free method are shown in the figure.

実際の患者から採取された臓器試料に対しては、リンパ節と甲状腺の正常組織、そして甲状腺の腫瘍組織が無調製・無標準法の開発の為に選ばれた。これらはいずれも外科手術により摘出され、多くのターゲットを作成するのに十分な量が確保されていた。

特にヒト臓器の場合には、以下の問題が存在する。甲状腺の場合、ヨウ素 (I) の濃度が高いことが知られており、ラット臓器に対して確立された無標準法の適用が困難となる。図 6 に見られるように、図 2 において決定された 4.3~5.7 keV の領域内にヨウ素の複雑な L-X 線が乱立し、連続 X 線収量を求めることが困難となるためである。さらに他の臓器においても同様な問題が存在することが分かった。図 6 に見られるように、食道、胃、リンパ節など他の臓器においても、多量のヨウ素が含まれるケースが存在する。ヨウ素は X 線撮影の造影剤に用いられ、特に癌患者はその診断を受けるケースが多いからである。このような場合、連続 X 線収量をとる領域を I-L X 線の影響を受けない領域に設定し直し、従って変換係数自体も別に定めなければならない。この図から分かるように、5.5~6.1 keV の領域には L-X 線が存在せず、しかも多種の臓器に対し形状が一定しているため、Iodine-rich な試料に対しては、この領域の連続 X 線収量に対する K ピークの収量を求め、K 濃度を求めることとした。これら 3 試料を用い、上記ラット試料と同様な手順で変換係数が求められた。図 7 において、その精度の確認が行なわれている。図には別の患者から採取した正常甲状腺組織と甲状腺腫瘍組織に対し、それぞれ 6 枚のターゲットが無調製・無標準法と硝酸灰化・内部標準法に対して作成され、それぞれの定量法で K 濃度を求めた結果が比較されている。計 24 ターゲットの結果であり、6 枚のターゲットの平均値と標準偏差が示されている。いずれも標準偏差の範囲内で一致しており、Iodine-rich な試料に対しては別に定めた無調製・無標準法により定量分析が可能であることが確認された。

図 8 には、患者から採取されたヨウ素を含まない頸部リンパ節中の K 濃度を示す。図の左端の値が、粉末内部標準法による 6 ターゲット中の K 濃度の平均値とその標準偏差を示し、それ以外の 7 つの値は、それぞれ無調製・無標準法により求められた K 濃度と実験誤差を示す。これらの K 濃度は、ラットリンパ節・脾臓に対して決定された無調製・無標準法をそのまま用い

て求めたものである。多くの結果が実験誤差・標準偏差内で一致しており、このことからラット臓器に対して確立された無標準法が、Iodine-rich な試料を除きヒト臓器に対しても適用可能であることが示唆された。

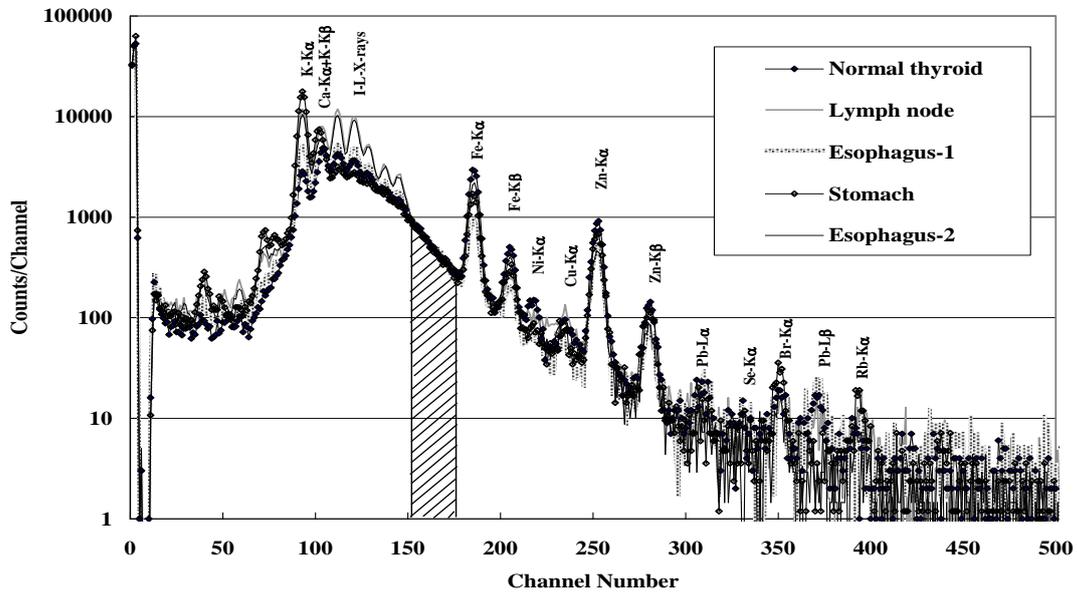


Fig. 6 Comparisons of five spectra of iodine-rich samples (thyroid, lymph node, esophagus and stomach) normalized by the yields of continuous X-rays in the region indicated in the figure.

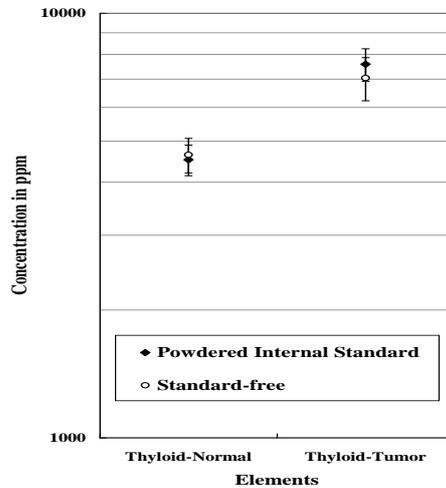


Fig. 7 Potassium concentration for an iodine-rich normal thyroid and a thyroid carcinoma,

本法の他臓器への有効性を確認するため、患者から外科手術及び生検で採取された5種の臓器7試料(リンパ節:1、食道:2、胃:2、小腸:1、結腸:1)に対し、同様の比較を行なった結果を図9に示す。生検で採取されたリンパ節に対しては、その量が2~3 mgと少なく、均一化して多くのターゲットを作成することが困難であったため、2つに分けて一方を無調製・無標準法のターゲットに、他方を硝酸灰化法で処理し1枚のターゲットとして比較を行なった。図に見られるように殆どの臓器でK濃度は実験誤差の範囲で一致し、ラット臓器を用いて開発が行なわれた無調製・無標準法が、生検で採取された微小なものを含め、ヒトの多種の臓器に対して有効であることが確認できた。

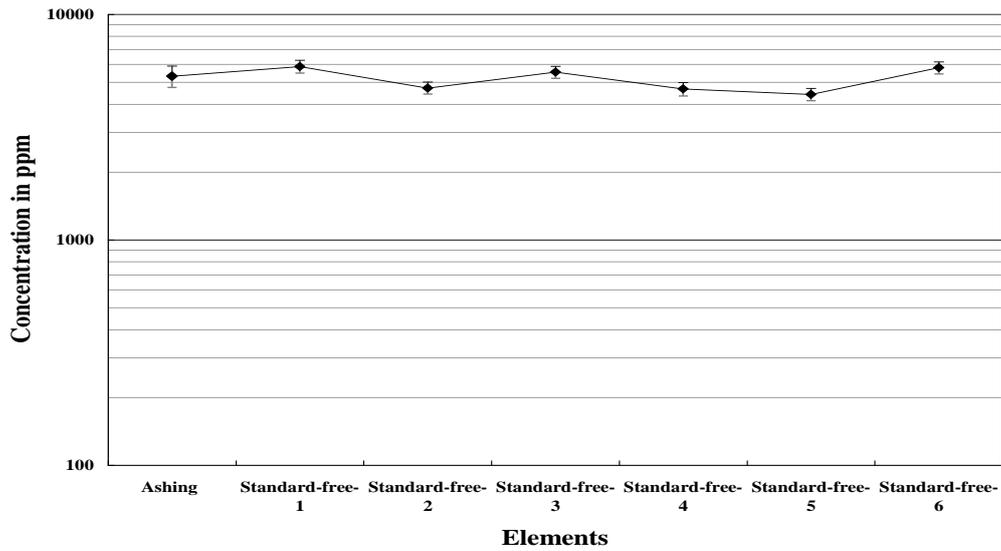


Fig. 8 Potassium concentration in a human cervical lymph node, where results for six targets obtained by the present method are compared with the mean value of potassium concentration and their standard deviation for six targets obtained by the powdered-internal-standard method (left side).

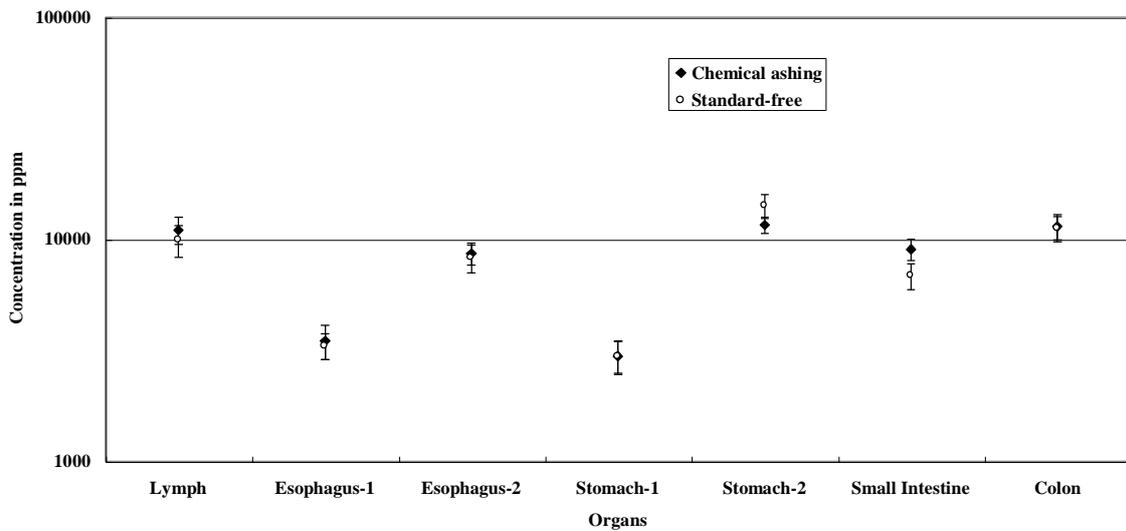


Fig. 9 Potassium concentration for five kinds of seven organs taken from real patients by biopsy or surgical operation. In this figure, results obtained by the present methods are compared with those obtained by the internal-standard method combined with the chemical-ashing method.

### 3.2 本法の応用と議論

これらの試料の量は、通常 30 mg 以上の量を要求する従来の内部標準法の適用が困難なほど少ない。しかし無調製・無標準法の適用により、それよりはるかに少ない 1 mg 以下の試料の定量分析が可能となる。それに加え、試料調製の手順が著しく簡略化された。従来の方法において

は、微小試料になるほど慎重な手順が必要になり、試料の処理中のコンタミや試料からの元素の漏出の問題が常に存在した。またある程度の大きさの試料に対しては、PIXE で実際に測定を行なう部分は 1 mg 以下であるため、均一化の過程が労力と時間を要求する。それに対して無調製法の場合、微小試料がそのままバックリング膜上で乾燥され、臓器には粘着力があるためコロジオンなどの接着剤も不用であり、試料調製の手間が数百分の一に軽減される。しかも上記不確定要素は一切入る余地がない。1 mg 以下の試料はビームで丸抱えできるため、均一化も不用である。さらに硝酸灰化法により失われるハロゲン族元素の分析も可能となった。

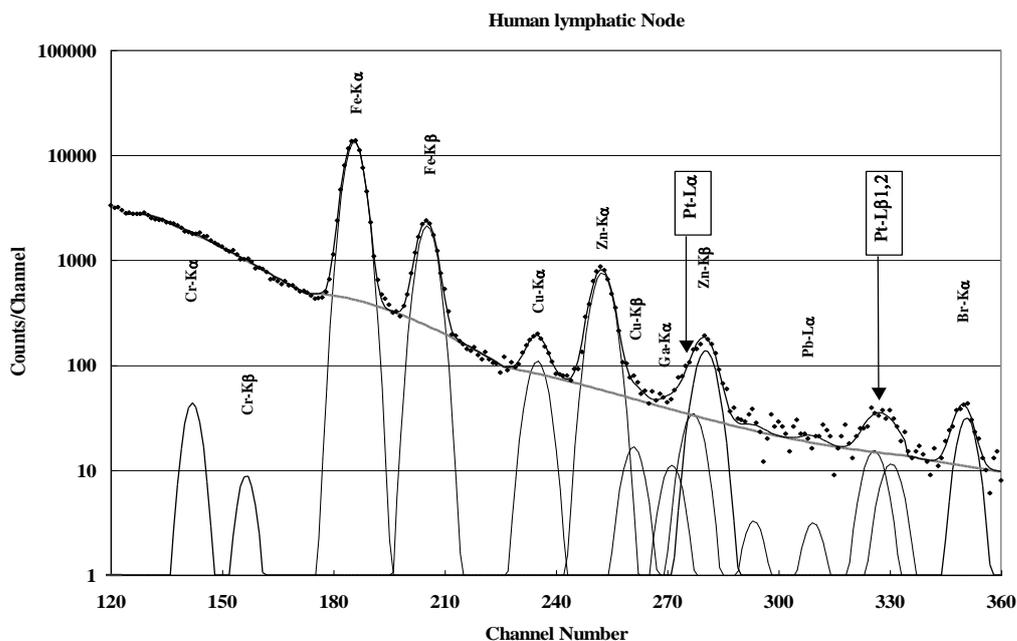


Fig.10 Spectrum of a lymph node sample taken from actual patient who was under the treatment with anticancer agent (Cisplatin). Yields of Pt-L $\alpha$  and L $\beta$  X-rays are accurately obtained by peak separation.

本法は実験動物の微小臓器の定量分析を可能とし、基礎医学研究に強力なツールとなるばかりではなく、実際の臨床の場における診断にも応用可能である。図 10 に、抗癌剤 CDDP (Cis-platin) 投与中の患者から採取されたリンパ節試料のスペクトルを示す。CDDP は Pt を含むため、PIXE でその濃度を定量分析することにより、投与量に対する各臓器中の配分率が分かる。実際の患者に対しては、生検で採取される試料が微小であるため体内分布を把握することが困難であったが、本法は 1 mg 以下の微小組織試料の定量分析を可能とするため、患者に負担をかけない細い生検針での採取が可能となった。図に見られるように、リンパ節中の Pt が明確に分析可能であり、本法で求めた値は 56 ppm であった。これらの結果は、治療計画を立てる際にも極めて重要な情報となる。PIXE は全元素の同時分析が可能であることから、疾患や治療と各臓器中の元素濃度変化との関係も調べることができる。図 11 には、図 10 にスペクトルを提示したヒトリンパ節中の 24 元素の濃度を示す。これらの元素の多くは必須元素であり、酵素活性などを通じて体内の生理活動に密接な関係のある元素濃度変化を調べることにより、疾患の原因や治療の影響などの議論も可能となる。

一方我々は、クマ、ホンシュウジカなどの野生動物の臓器試料の分析を行ってきた<sup>16, 17)</sup>。クマ臓器中に多量のカドミウム (Cd) が検出されるなど<sup>16)</sup>、野生動物の臓器試料は生育環境の変

化を表し環境学的に重要な情報をもたらす。従来、野生動物の調査捕獲を行ない殺した後に臓器試料を採取していたが、本法により生検で僅かな試料を採取することにより、生きたままの測定が可能となる。その場合、マーカを付けた野生動物の経過観察も可能となる。このように、本法は多くの分野の研究において有力なツールとなりうるものであり、多くの分野の研究者に利用されることを願っている。

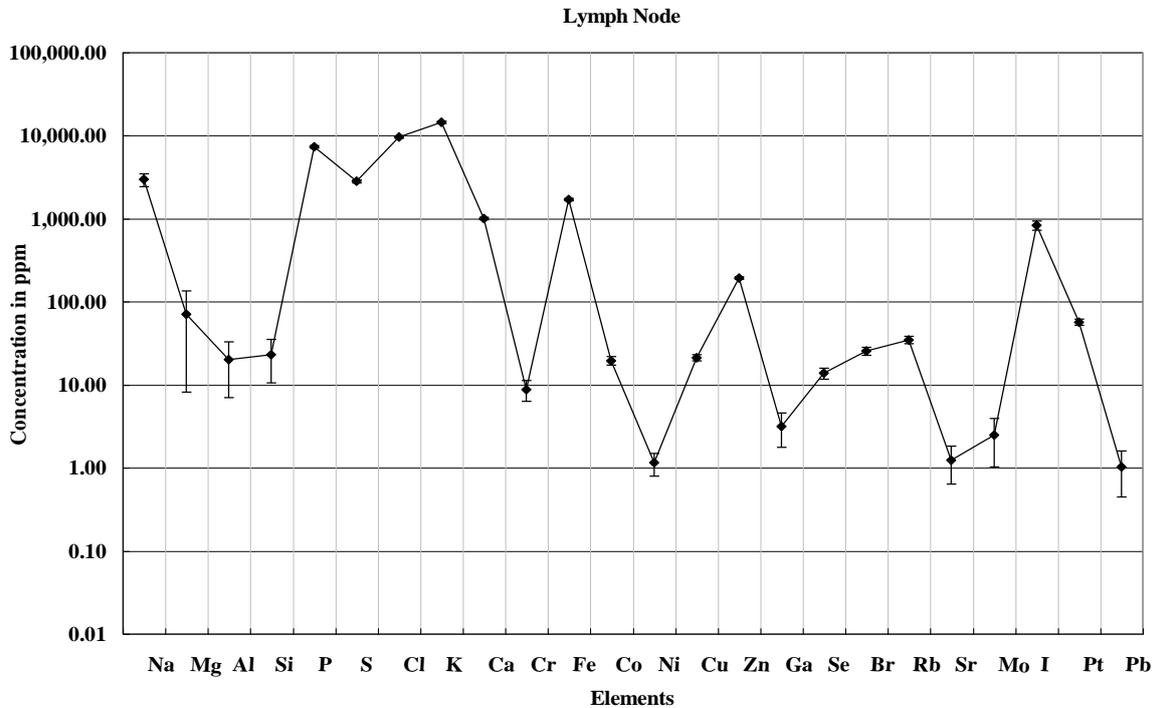


Fig.11 Concentration of 24 elements in the lymph node taken from a patient by biopsy.

## 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。また、NMCC の全国共同利用を有効に活用し、優れた成果を上げられている利用者の方々に敬意と謝意を表します。

## 参考文献

1. K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", *Int'l Journal of PIXE* Vol.6, No.3, 4 467-481 (1996)
2. K. Sera, S. Futatsugawa S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda "Quantitative Analysis of Bio-medical Samples of Very Small Quantities by the Standard-free Method.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 7-3, 4 (1997) 157-169
3. K. Sera, S. Futatsugawa and K. Matsuda, "Quantitative analysis of untreated bio-samples", *Nucl. Instr. and Meth. B* **150** 226-233 (1999)
4. K. Sera, S. Futatsugawa and S. Muraio, "Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.", *Nucl. Instr. and Meth. B* **189** 174-179 (2002)
5. S. Muraio, E. Daisa, K. Sera, V. Maglambayan and S. Futatsugawa, "PIXE measurement of human hairs from a small-scale mining site of the Philippines", *Nucl. Instr. and Meth. B* **189** 168-173 (2002)
6. E. Clemente, K. Sera, S. Futatsugawa and S. Muraio, "PIXE Analysis of Hair Samples from Artisanal Mining Communities in the Acupan Region, Benguet, Philippines. *Nucl. Instr. and Meth.*, B219-220 (2004) 161-165
7. K. Sera, S. Futatsugawa and Y. Miura, "Application of a Standard-free Method to Quantitative Analysis of Urine Samples", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **11**, No.3, 4 149-158 (2001)
8. 梶山巖、伊藤伸彦、加藤澄枝、古川義宣、三谷のり子、二ツ川章二、世良耕一郎、"PIXE法による愛玩動物の被毛と血清中セレンおよび亜鉛濃度の測定", *Radioisotopes*, Vol.43-11, 665-672 (1994)
9. 藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎、太田敏博、齊藤恒夫、二ツ川章二、世良耕一郎、"薬剤輸送経路としてのリンパ管の検証"、NMCC共同利用研究成果報文集 第12巻, 51-56 (2005)
10. K. Sera and S. Futatsugawa, "Quantitative Analysis of Powdered Samples Composed of High-Z Elements.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **8**, No.2, 3 182-202 (1998)
11. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitou and K. Sera, "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **3**, No.4 319-328 (1993)
12. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara., "Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby cyclotron)", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **2**, No.3 325-330 (1992)
13. K. Sera and S. Futatsugawa, "Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE." *Nucl. Instr. and Meth. B* 109/110 (1996) 99-104
14. K. Sera and S. Futatsugawa, "Spectrum Analysis Taking Account of the Tail, Escape Functions and Sub-lines. (SAPIX version 4)" *Int'l Journal of PIXE*, Vol.10, No. 3, 4 101-114 (2000)
15. K. Sera, K. J. Itoh, S. Goto, Y. Saitoh, A. Fujimura, Y. Nozaka, Y. Noda, S. Nishizuka and G. Wakabayashi, "Quantitative Analysis of Very Small Quantity of Organs Taken from Patients and Experimental Animals; Standard-free Method for Organ Samples.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **18**, No.3,4 111-122 (2008)
16. I. Satoh, T. Yamashita, K. Sera, S. Futatsugawa, T. Suzuki, H. Kobayashi and S. Tsuda, "Situation of Heavy Elemental Exposure in Wild Deer (Honshujika) Caught at Mt. Goyo in Iwate Prefecture", *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 58 -8 (2005) 561-563 (in Japanese)
17. I. Satoh, T. Tsujimoto, K. Sera, S. Futatsugawa and S. Tsuda, "Situation of Heavy Elemental Exposure in Wild Bear (Tsukinowaguma) Caught in Iwate Prefecture", *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, Vol. 56-12 (2003) 825-830 (in Japanese)

**Quantitative analysis of very small quantity of organs taken from patients and experimental animals  
– Standard-free method for organ samples –**

K. Sera<sup>1</sup>, S. Goto<sup>2</sup>, Y. Saitoh<sup>2</sup>, J. Itoh<sup>3</sup>, S. Futatsugawa<sup>4</sup>, A. Fujimura<sup>5</sup>, Y. Nozaka<sup>5</sup>  
Y. Noda<sup>6</sup>, S. Nishizuka<sup>6</sup>, G. Wakabayashi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, 020-0173, Japan

<sup>2</sup>Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association  
348-58 Tomegamori, Takizawa, 020-0173, Japan

<sup>3</sup>Training Section, Japan Radioisotope Association  
2-28-45 Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

<sup>4</sup>Department of Administration, Japan Radioisotope Association  
2-28-45 Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

<sup>5</sup>First Department of Oral Anatomy, School of dentistry, Iwate Medical University  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

<sup>6</sup>Department of surgery, School of medicine, Iwate Medical University  
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

**Abstract**

A standard-free method for small lymph node and spleen samples taken from rats, and lymph node, esophagus, colon etc. taken from real patients has been developed in order to take measure to meet increasing demands for quantitative analyses of small amount of organs. It becomes possible to quantitatively analyze organ samples of less than 1 mg collected from small experimental animals and also from patients by biopsy, and accuracy and sensitivity of the method were examined by comparing the results with those obtained by a powdered-internal-standard method and a chemical-ashing method. It is found that the method is quite effective for estimating therapeutic effect of CDDP (Cisplatin) since it allows us to quantitatively evaluate uptake of CDDP into organs by analyzing small quantity of samples taken from actual patients by biopsy. It is expected that the method will become a powerful tool for studies not only in fundamental and clinical medicines but also on practical diagnosis and treatment.

**Keywords** : PIXE, Organ, Standard-free, Quantitative analysis, Small quantity, Clinical samples, Experimental animals, Anticancer agent