OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	分析電顕による組織内トロトラストの検出と分布の描出
Author(s)	西沢, 邦秀; 金子, 昌生; 高橋, 信次
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1981, 41(11), p. 1105-1109
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19753
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

分析電顕による組織内トロトラストの検出と分布の描出

名古屋大学アイソトープ総合センター分館
西　沢　邦　秀
浜松医科大学医学部放射線科
金　子　昌　生
愛知県ガンセンター
高　橋　信　次

（昭和56年2月25日受付）
（昭和56年3月18日最終原稿受付）

Identification and Mapping of Thorotrast in Tissue by an Analytical Electron Microscopy

Kunihide Nishizawa*, Masao Kaneko**, Shinji Takahashi***
*Branchi of Radioisotope Center, Nagoya University 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466
**Department of Radiology, Hamamatsu University School of Medicine
3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-31
***President, Aichi Cancer Center, 81-1159 Kanokoden, Tashiro-cho, Chikusa-ku, Nagoya

Research Code No.: 200
Key Words: Thorotrast, Thorium, Fluorescent X-rays, X-ray analysis, Analytical electron microscopy

A new method to visualize the distribution of Thorotrast in tissue along with its identification is described by analyzing the fluorescent X-rays from Th with an analytical electron microscope.

Unstained ultrathin sections of 600-800 Å thickness were prepared from blocks of lymph nodes which were fixed, dehydrated, and embedded about 5 hours after death.

The specimens were observed by a scanning transmission electron microscope, and the fluorescent X-rays were analyzed by an energy dispersive type X-ray analysis system. The X-ray images were taken by the electron microscope at 60 KeV with a current of 10^{-10} A/cm^{-2} and a beam diameter of 100-150 Åϕ by using Th Mα_1 with a window of 300 ev.

The thorotrast-like electron-opaque granules in macrophage coincided with the X-ray image of Th. The granules were all identified as the Thorotrast itself.

緒　言

トロトラストの体内へ蓄積や障害の機序を明らかにするには，組織内にトロトラストが存在することを確認すると共にその分布状態を知らなければならない．従来オートラジオグラフィはこの目的にかなった唯一の手段であった．

この論文では分析電顕[1]を用いて Th の蛍光X線を分析することにより，トロトラストを証明すると共に分布を描出する手法について述べる．

材料及び試料作成

トロトラストを用いて昭和15～16年に血管造影検査が行なわれたと推定されたトロトラスト沈着

症患者（男性，65歳）より死亡（昭和54年12月）後約5時間後に組織を摘出した．これを2％グルタールアルデヒドと1/15M Phosphate Buffer で2時間固定を行なった後，1/15M Phosphate Buffer で洗浄した．50，70，80，90，95，99，99，99％のアルコールで各10～15分間脱水を行なった．プロピレンオキサイドで10～15分間づつ3回置換を行なった後 Luft Epon で2時間及びプロピレンオキサイドで一昼夜各一回置換した．包埋重合には Luft Epon を用い37℃，45℃，60℃で各1日づつ行なった．

組織塊より LKB 800を用いて600～800Å の超薄切片を作成し，銅の100メッシュのグリッドで採取した後炭素を蒸着した．染色は行なわなかった．

観察法

分析電顕は透過型走査電子顕微鏡（日本電子 JEM 100CX）にエネルギー分散型分析装置（ORTEC-EEDS Ⅱ）を組み込んだものを用いた．

Fig. 1 の如く，最初60kev の加速電圧で透過走査像の観察及び撮影を行なった．特定部位に細く絞ったビームを固定してX線エネルギー分析を行なった後，ウインドを設定してX線走査像の撮影を行なった．走査時のビームの直径は100～150 Åφ であり，電流は約10^{-10}A であった．

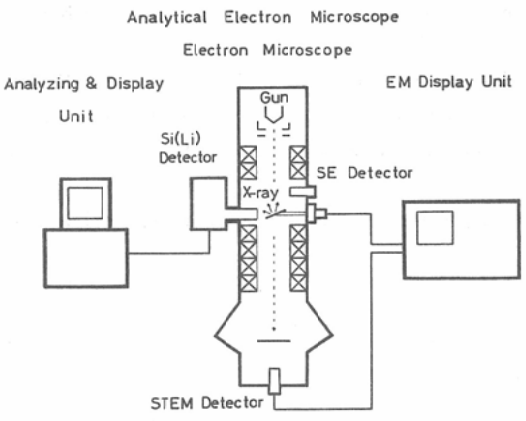


Fig. 1 Schematic diagram of analytical electron microscope composed of a transmissiom type scanning type electron microscope, and an energy dispersive type x-ray analysis system.

X線は 8μ の Be 窓を持つ Si（Li）半導体検出器に4,096Channel の多重波高分析器を接続して検出分析した．検出器の有効入射面積は 30mm²，分解能は Mn Kα の5.98kev のX線に対し155evであった．

結　果

（i）透過像

Fig. 2（A）はリンパ節の透過像である．マクロファージがトロトラストと思われる電子密度の高い異物を取り込んでいる像が顕著に現われている．マクロファージの外部にもトロトラストと思われる電子密度の高い部分が散見される．

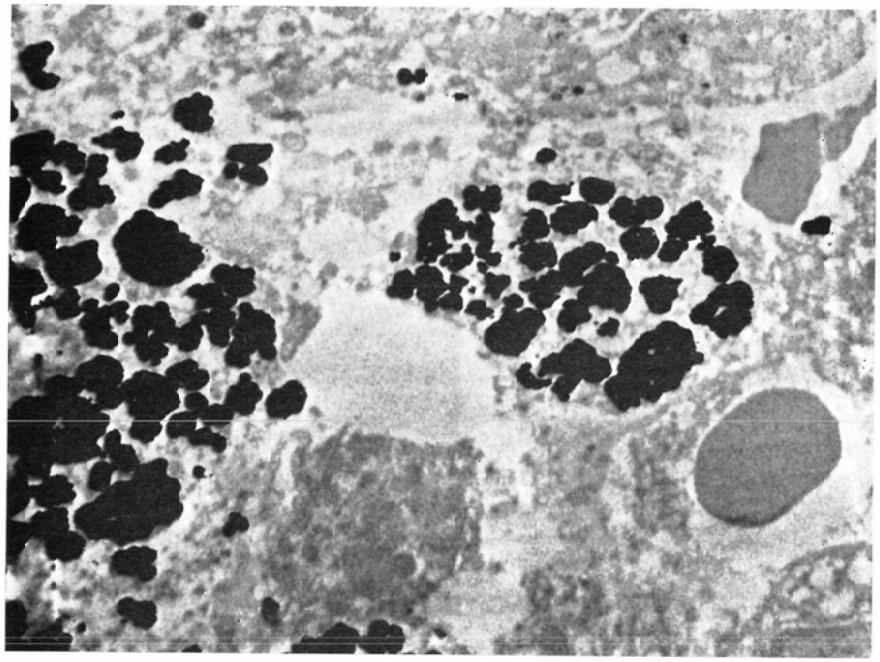
（ii）エネルギー分析

Fig. 3 は透過像に現われたマクロファージ中のトロトラストと思われる部位に絞つたビームを照射して得られたX線スペクトルである．低エネルギー側から Si Kα（α_1 1.740kev+α_2 1.739kev，P Kα（α_1 2.015kev+α_2 2.014kev），S Kα（α_1 2.308kev+α_2 2.306kev），Th Mα_1 2.996kev，Cu Kα（α_1 8.047kev+α_2 8.027kev），Cu Kβ（β_1 8.904kev+β_2 8.976kev），Th Lα（α_1 12.996kev+α_2 12.808kev，Th Lβ_2 15.620kev，Th Lβ_1 16.200 kev のピークが現われている．この部位に Th が明らかに存在しており，トロトラストであることが確認された．

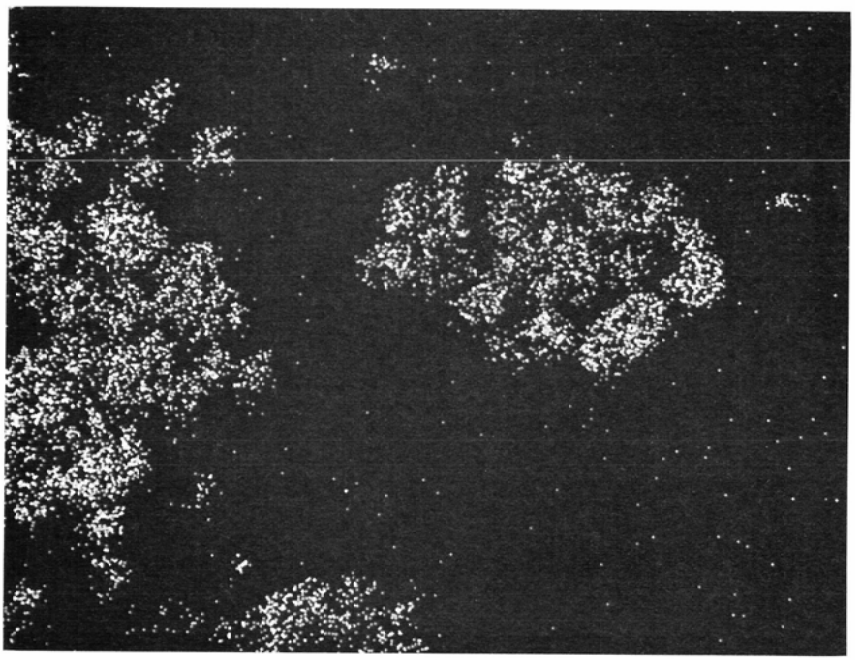
得られた Th 蛍光X線の相対強度及びバックグラランドとのかね合いから本実験の条件下では Th Mα_1 2.996kev のX線を走査像撮影に用いるのが適当であると判断された．Si，P，S は蒸着した炭素中に含まれる不純物である．Cu の蛍光X線は銅グリッド由来のものである．

（iii）X線像

Fig. 2（B）は Th Mα_1 2.996kev に対して2.900kev～3.200kev の 300ev のウインドを設定して，Fig. 2（A）と同一部分を走査して得られたX線像である．バックグラウンドの減算は行なってない．Fig. 2（A）の透過像と（B）のX線像とを比較すると，マクロファージが取り込んでいる異物像と Th のX線像の位置が一致している．トロトラストと思われた異物は全てトロトラ



(A)



(B)

Fig. 2 (A) is a scanning thorough through electron microscope image of lymph node. Some electron-opaque granules lay within and outside macrophage (M). (B) is an x-ray image obtained by scanning the same location of specimens as (A) with the Th Mα_1 x-ray of 2.996keV with a window of 300eV. All the Thorotrast like granules appeared in (A) were identified to be Thorotrast.

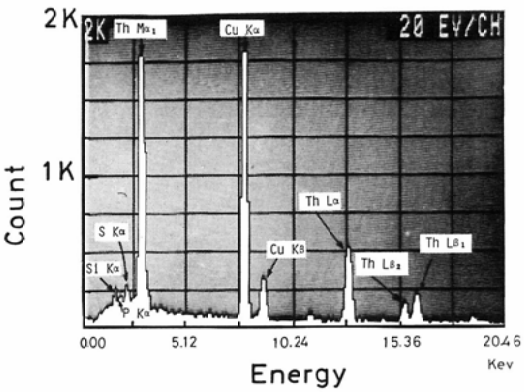


Fig. 3　A typical fluorescent x-ray spectrum obtained by analysing the x-rays originated from specimens from a Thorotrast patient. Silicon Kα(α_1; 1.740 keV+α_2; 1.739keV), Phosphor Kα (α_1; 2.015 keV+α_2; 2.014keV), Sulphur Kα (α_1; 2.408keV +α_2; 2.306keV). Thorium M (α_1; 2.996keV+ β_2; 3.146keV), Copper Kα (α_1; 8.047keV+α_2; 8.027keV), Copper Kβ (β_1; 8.904keV+β_2; 8.976 keV), Thorium Lα (α_1; 12.996keV+α_2; 12.808 keV), Thorium Lβ_2; 15.620keV and Thorium Lβ_1; 16.200keV were detected.

ストであった．透過像でマクロファージの外部に見られた電子密度の高い部分もX線像に現われておりトロトラストであると判断された．

考　案

組織内トロトラストの分布は従来染色した標本を用い光顕的[2)3)]，電顕的[4)5)6)]に観察されて来た．トロトラストであることを確証するにはオートラジオグラフィが用いられて来た．

オートラジオグラフィは Th 及びその娘核種より放射されるα線を検出分析する方法である．体内に注入されたトロトラストは数 mg，放射能に換算すると10^4～10^5Bq（数 μCi）以下である．組織内の微小なトロトラスト顆粒より生ずるα線を検出するには２～３週間の露光を要する．感度の悪い検出方法である．

これに対して ^{232}Th の 1mg は2.6×10^{18}個の原子数に対応する．Th のような長半減期の核種では崩壊数よりも親核種の量の方が著るしく多い．原子を励起させる蛍光X線分析法は放射能測定よりも鋭敏な検出法となり得る．試料をくりかえし使用できるので再現性に優れているばかりでなく，測定の統計精度の向上が期待できる．以上がオートラジオグラフィと比較した本方法の利点である．

分析電顕により組織内の Ca[7)~17)]：P[9)12)14)15)16)]：K[18)]：Fe と U[19)]：Zn[20)]：Cd, Hg, Pb[21)] 等の原素分析が行なわれている．本論文では分析電顕を用いて組織内にトロトラストが存在することの証明と共にその分布を定性的に描出することが可能か否かを検討し，この方法が有効であることを明らかにした．トロトラストの分析に対してこの方法は現在まで試みられたことはなく，新らしい手法である．

トロトラストによる内部被曝線量の評価はα線の顆粒による自己吸収[22)~28)]をどの程度と見積もるかにより大きな差が生ずる．自己吸収の割合は顆粒の密度で異なるが，密度の実測はなされていない．分析電顕法により，組織中のトリウム量及びトロトラストの密度を定量的に測定することが今後の課題である．

結　論

Th の蛍光X線を分析することによって，組織内にトロトラストが存在することを証明すると共に分布状態を描出する方法を示した．

本研究は厚生省がん助成金54—31（高橋信次班長）の助成によって行なわれた．御指導，御協力頂いた名古屋大学第２病理学教室 星野宗光教授，名古屋大学理学部神谷芳弘助教授，名古屋大学電顕室花市敬正技官，日本電子渡部智美氏に深謝いたします．

References

1) Mizuhira, V. and Russ, J.C.: Analytical electron microscope. pp. 1—39, 1978, Japan Medical Center, Tokyo
2) Hasson, J., Hartman, L.C.K.S., Milikow, E. and Mittelman, J.A.: Thorotrast-induced extraskeletal osteosarcoma of the cervical region-report of case. Cancer, 36: 1827—1833, 1975
3) Okuda, K., Ichinohe, A., Kono, K., Ueda, S., Noguchi, T., Matsuura, Y. and Shimokawa, Y.: Minimal thorotrast deposition in para-pancreatic lymph nodes. Radiology. 119: 23—26, 1976

4) Hampton, J.C.: An electron microscope study of the hepatic uptake and excretion of submicroscopic particles injected into the blood stream and into the bile duct. Acta Anat., 32: 262—291, 1958
5) Kinjo, K.: Electron microscopical studies on thorotrast permiability across the brain capillaries in rabbits. I. Observations in the normal brain. Kumamoto Medical J., 29: 11—22, 1976a
6) Kinjo, K.: Electron microscopical studies on thorotrast permiability across the brain capillaries in rabbits. II. Observations in the brain with edema. Kumamoto Medical J., 29: 23—34, 1976b
7) Mizuhira, V. and Shiihashi, M.: Quantitative X-ray microanalysis of a mouse cardiac muscle by means of the freeze substitution method. Electron microscope-9th international congress. II Biology. pp. 124—125, 1978, The microscopical society of Canada, Toronto
8) Onozuka, M., Sugaya, E., Sugaya, A. and Usami, M.: Intracellular calcium distribution map and chemical shift of neurous examined by computer controlled electron probe X-ray microanalyzer. ibid. pp. 126—127
9) Makita, T.: The detection of P and Ca by X-ray microanalysis in the cytochemical reaction product of alkaline phosphatase in the epitherial surface of the rat duodenum. ibid. 128—129
10) Dierkes, U.: Ca-histochemistry in sline mold plasmodia. ibid. pp. 130—131
11) Daimon, T. and Mizuhira, V.: X-ray microanalysis of calcium around the membrane of platelets. ibid. pp. 132—133
12) Herbst, R., Multier-Lajous, A.M. and Grasserbauer, M.: X-ray microanalysis of the human placenta. Electron microscopy-8th international congress. II Biological. pp. 90—91, 1974, The australian academy science, Cambera
13) Yarom, R., Peters, P.D. and Hall, T.A.: X-ray microanalysis of calcium in nuclei of skeletal and cardiac muscle. ibid. pp. 94—95
14) Makita, T. and Yamamoto, M.: X-ray microanalysis of the components of the avian cardiac muscle. ibid. pp. 96—97
15) Hofsten, A.V.: X-ray analysis of microelements in seeds. ibid. pp. 100—101
16) Ponterfract, R.D. and Bergeron, G.: The use of T.E.M. with X-ray microanalysis to compare ultrastructural changes in germinating bacterial spores with alternations in their chemical composition. ibid. pp. 102—103
17) Muier, M.D., Spicer, R.A., Grant, P.R. and Giddens, R.: X-ray microanalysis in SEM for the determination of elements in modern and fossil micro-organisms. ibid. pp. 104—105
18) Kierszenbaum, A.L., Libanti, C.M. and Jandler, C.J.: The distribution of inorganic cations in mouse testis electron microscope and microprobe analysis. The Journal of Cell Biology., 48: 314—323, 1971
19) Panessa, B.J., Genaro, J.F., Kuptsis, J.D. and Cardone, F.: X-ray localization of iron and uranium transported across the leaf of the carnivorous pitcher plant. Electron microscopy-8th international congress. II Biological. pp. 98—99, 1974, The australian academy science, Cambera
20) Bacetti, B., Burrini, A.G. and Pallini, V.: Occurrence and localization of Zn in the accessary axonemal elements of rat spermatozoa. ibid. pp. 92—93
21) Mizuhira, V., Futaesaku, Y., Kimura, S., Fujioka, S. and Yotsumoto, H.: Subcellular distribution of heavy metals by means of an analytical electron microscope. ibid. pp. 84—85
22) Rotblat, J. and Ward, G.B.: Tissue dosage from Thorotrast in the body. Nature, 172: 769—770, 1953
23) Rundo, J.: Consideration of the limits of radiation dosage from thorotrast. Brit. J. Radiol., 28: 615—619, 1955
24) Guimaraes, J.P. and Lamerton, L.F.: Further experimental observations of the late effects of thorotrast administration. Brit. J. Cancer, 10: 527—532, 1956
25) Rundo, J., Ward, A.H. and Jensen, P.G.: Measurement of Thoron in the breath. Phy. Med. Biol., 3: 101—110, 1958
26) Kaul, A.: Gamma-spectrometric and histoautoradiographic investigation on the distribution and excretion of thorium and its daugthers in thorotrast patients. Assessment of radioactivity in man. pp. 445—471, 1964, I.A.E.A., Vienna
27) Kato, Y.: Alpha-ray dosage near thorotrast aggregate. Nipp. Acta. Radiol., 26: 1547—1556, 1967
28) Kaul, K. and Nofftz, W.: Tissue dose in thorotrast patients. Health Physics., 35: 113—121, 1978