

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510059

研究課題名（和文） ウランの体内挙動と毒性影響の解析 ～ナノビームを用いた細胞選択的検出～

研究課題名（英文） Uranium dynamics in tissues using nano-beam elemental analysis

## 研究代表者

武田志乃（TAKEDA SHINO）

独立行政法人 放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：00272203

## 研究成果の概要（和文）：

劣化ウラン弾汚染や原子力エネルギーが再注目されていることなどを背景に、ウランの生体影響研究の必要性が生じている。ウランの組織局在性と組織障害との関係は十分に理解されておらず、ウランの生体影響評価に資する科学的根拠は乏しい。本研究では、ナノビームを用いた新たなウラン測定手法を確立し、これを用いてウラン蓄積と毒性発現の関係を調べた。ウランは腎臓の下流部位の近位尿細管に選択的に蓄積し毒性を生じること、そのウラン局在量は投与量の500倍以上に匹敵し、標的細胞においては高濃度にウランが濃集していることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

The pollution caused by the military use of depleted uranium and renewed interests in nuclear energy have raised increasing concern about uranium toxicity. The dose-response relationship between uranium accumulation and tissue damage, however, has not been demonstrated, primarily due to a lack of suitable analytical methodologies for measuring trace levels of uranium in tissues. In the present study, a method of analysis to reveal uranium localization in tissues was established using nano-beam elemental analysis and applied for uranium induced renal toxicity. Uranium selectively concentrated in the downstream of the proximal tubules more than 500-fold higher than the dose and caused renal apoptosis and lesions in the site.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：防護

## 1. 研究開始当初の背景

ウランは放射線毒性と重金属としての化学毒性の両面を持ち合わせた核種であり、そ

の生体影響を理解する上で組織内挙動や細胞局在を把握することはきわめて重要である。すなわち、 $\alpha$ 線核種であるウランの精度

の高い被ばく線量評価には、およそ隣接する細胞間距離に相当する 30  $\mu\text{m}$  付近で  $\alpha$  線のエネルギー付与が最大であることから、ウランの細胞局在の情報が不可欠である。一方、放射線毒性よりも優勢と考えられている化学毒性については、腎臓が標的臓器であり尿細管障害が特徴的とされている。近年、腎臓以外には中枢神経系 (Lestaevel, *et al.*, Toxicology 212, 219-226, 2005)、免疫系 (Dublineau, *et al.*, 98, 458-468, 2007)、骨 (Kurttio, *et al.*, Environ. Health Perspect. 113, 68-72, 2005) 等への毒性影響が報告されてきている。化学毒性の発現機序を明らかにするためには、標的細胞におけるウラン蓄積を正確に把握し、組織影響との量-反応関係を示さなくてはならない。しかしながら、これまでウランの適切な局所分析法がないために、標的細胞に関する情報は乏しく、そのウラン動態はよく理解されていない。2000 年以降、汚染地域やウラン鉱山伏流水を飲用とする地域などの健康影響についての研究が急増したが、直接的な因果関係を結論できない報告も多く (Laber, *et al.*, Eur. J. Epidemiol. 19, 55-60, 2004 など)、予防医学的対策は立ち遅れている。

申請者らはこれまで、マイクロビームを利用した元素測定を行ってきており、これらを通し、生体多量元素の妨害を受けない高エネルギー領域の蛍光 X 線分析を応用することにより、新たな組織中微量ウランの測定手法を確立できるものと考えた。さらに、独自に開発した微小ビーム分析用分析標準 (特許第 4925428 号、US7732218) により、微細な領域におけるウラン濃度を把握することも可能である。一方、重金属による腎障害や生殖毒性においてアポトーシス誘導の把握が初期の組織変化を鋭敏に捕らえられることから (Homma-Takeda, *et al.*, Environ. Toxicol. Pharmacol. 7, 197-187, 1999 ; Toxicology 169, 25-35, 2001)、ウランをばく露した動物のウラン組織・細胞分布とアポトーシス誘導の関係からウラン毒性における量-反応関係を検討することを考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ナノビームを用いた新たな組織中ウラン測定手法を確立し、これを用いてウラン蓄積と毒性発現の量-反応関係を細胞レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物モデルの作成

雄性ラットに酢酸ウラン (天然型) を背部皮下に投与し (0.1-2 mg/kg)、投与後2週間まで経日的に屠殺して組織試料を採集した。体重および組織重量変化により一般的な毒性影響を把握した。

### (2) 組織中ウラン濃度の測定

ウラン分布解析用組織サンプルに隣接する組織 (100 mg) に高純度硝酸を加えて電子レンジにより灰化した。高純度純水で希釈し、誘導結合プラズマ質量分析によりウラン濃度を測定した。

### (3) 毒性影響の解析

TUNEL 染色によるアポトーシス誘導部位の同定を行い、アポトーシスの細胞特異的誘発を調べた。また Periodic Acid Schiff (PAS) 染色により組織形態解析を行った。

(4) ナノビームによる局所定量手法の確立  
ウランあるいはウランのエネルギー近傍の元素等をポリビニルアルコールに混入した薄切分析標準 (Takeda *et al.*, J. Radioanal. Nucl. Chem 279, 627-631, 2009) を作成し、マイクロ PIXE 分析 (放射線医学総合研究所 PIXE 分析システム) あるいはシンクロトロン放射光蛍光 X 線分析 (高輝度光科学研究センター大型放射光施設 (SPring-8)) により、均質性の評価を行った。1  $\mu\text{m}$   $\times$  1  $\mu\text{m}$  のビームを用い、1、10、100  $\mu\text{m}$  のステップ間隔についてそれぞれ任意の 3-6 点 (マイクロ PIXE) 25 点 (シンクロトロン放射光 X 線分析) における蛍光 X 線強度の相対標準偏差を求めた。次に、各濃度における蛍光 X 線強度から検量線を作成した。

### (5) ウラン細胞選択的検出

組織中ウランの微小ビーム高エネルギー蛍光 X 線分析は、SPring-8 で行った。まずウランの標的臓器である腎臓の組織凍結切片 (10  $\mu\text{m}$ ) を作成し、測定試料とした。測定試料の一方の隣接切片はヘマトキシリン-エオシン染色し組織構造を観察した。もう一方の隣接切片はウランの攻撃部位である下流部位近位尿細管マーカーのグルタミンシンターゼの免疫染色を行い、下流部位近位尿細管分布を調べた。これらに対応させることにより、ウラン分布と腎臓構造を細胞レベルで決定した。

## 4. 研究成果

### (1) ナノビームによるウラン局所定量の確立

定量化に用いる薄切分析標準の均質性についての結果の一例 (亜鉛) を表 1 に示した。空間分解能を 100  $\mu\text{m}$  から 10  $\mu\text{m}$  に下げることによりやや均質性は劣るものの、相対標準偏差が 10%程度と良好な結果が得られた。また、62.5-250 ppm の濃度範囲において混入元素濃度と各々の蛍光 X 線強度との間に良好な直線関係がみられ (図 1)、薄切分析標準による局所定量が可能であると考えられた。組織中

のウラン分析に関しては、内因性のルビジウムがウランのメジャーピークである ウラン  $L\alpha$  線を妨害することから、ウラン  $L\beta$  を検出することとした。ウラン  $L\beta$  に対しても、 $1\mu\text{m}$  の空間分解能においても相対標準偏差が 10% 以下となる精度が得られた。

表 1. 亜鉛薄切分析標準( $10\mu\text{m}$ )における蛍光 X線強度

Scan Size ( $\mu\text{m}$ )	Step ( $\mu\text{m}$ )	Intensity	RSD (%)
100 x 100	100	1084 $\pm$ 53	4.85
10 x 10	100	925 $\pm$ 104	11.3
10 x 10	10	860 $\pm$ 108	12.6

任意の 3-6 箇所マイクロ PIXE による蛍光 X線強度の平均と標準偏差、相対標準偏差を示した。(Takeda *et al.*, Int. J. PIXE 20, 21-28, 2011 より)

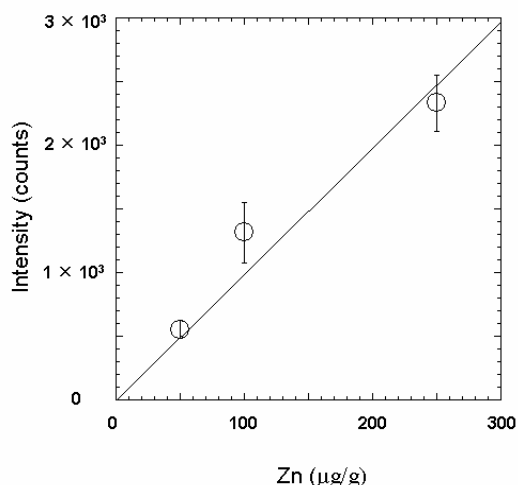


図 1. 亜鉛薄切分析標準( $10\mu\text{m}$ )による検量線

62. 5-250 ppm の濃度範囲の薄切標準を用いた。各薄切標準について  $10 \times 10\mu\text{m}^2$  における任意の 3 箇所マイクロ PIXE による蛍光 X線強度をプロットした。(Takeda *et al.*, Int. J. PIXE 20, 21-28, 2011 より)

## (2) 腎臓内ウラン分布および局在と毒性影響

ウランを投与した ( $0.5\text{ mg/kg}$ ) ラット腎臓では、投与後 2 日にアポトーティック細胞が下流部位近位尿細管現れ、8 日目には脱落細胞を有するダメージ尿細管が認められた。15 日目には再生尿細管が出現した。ウランは投与後 1 日目から下流部位近位尿細管に選択的に蓄積し、回復期の 15 日目においてもこの

細胞選択的蓄積が認められた。下流部位近位尿細管上皮にはウラン濃集部位が点在し、その局所量は投与量の 500 倍以上、ウラン腎臓平均濃度の 30 倍以上に相当した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Homma-Takeda S, Suzuki K, Harumoto K, Yoshitomi T, Iso H, Ishikawa T, Konishi T, and Oikawa M: Evaluation of thin section standards for local analysis of light elements by micro-PIXE analysis. International Journal of PIXE 2011; 21: 25-30. 査読有 DOI No: 10.1142/S0129083511002124

② Homma-Takeda S, Iso H, Ito M, Suzuki K, Harumoto K, Yoshitomi T, Ishikawa T, Oikawa M, Suya N, Konishi T, and Imaseki H: Evaluation of pressed powders and thin section standards for multi-elemental analysis by conventional and micro-PIXE analysis. International Journal of PIXE 2010; 20: 21-28. 査読有 DOI No: 10.1142/S0129083510001926

[学会発表] (計 9 件)

① 武田志乃、寺田靖子、鈴木享子、小久保年章、早尾辰雄、西村まゆみ、島田義也：腎毒性発現・再生期における腎尿細管のウラン局在。第 54 回日本放射線影響学会 2011. 11. 18. 神戸

② 武田志乃：高エネルギーSR-XRFによる細胞内ウランの分析、第 5 回 SPring-8 安全安心のための分析評価研究会 2011. 10. 14 東京

③ 武田志乃、鈴木享子、春本恵子、吉富友恭、磯浩之、石川剛弘、及川将一、島田義也：マイクロ PIXE 分析による組織中ウランの局所定量測定に向けて。第 27 回 PIXE シンポジウム 2010. 11. 18. 京都

④ 武田志乃、寺田靖子、鈴木享子、春本恵子、吉富友恭、島田義也：幼若ラット腎尿細管におけるウラン局在量解析。第 53 回日本放射線影響学会 2010. 10. 21. 京都

⑤ 武田志乃、寺田靖子、鈴木享子、春本恵子、吉富友恭、島田義也：微小ビーム分析による腎臓組織中微量元素の局所定量。第 21 回日本微量元素学会 2010. 7. 3. 京都

⑥ 武田志乃、寺田靖子、鈴木享子、春本恵子、吉富友恭、島田義也：微小ビーム分析による細胞内ウラン局所定量の試み。第 80 回日本

衛生学会 2010. 5. 10. 仙台

⑦武田志乃、伊藤雅紀、鈴木享子、吉富友恭、磯浩之、樋口有一、石川剛弘、及川将一、小西輝昭、今関等：PIXE分析による各種分析標準の適性評価。第26回PIXEシンポジウム2009. 11. 19. 千葉

⑧武田志乃、寺田靖子、井上美幸、西村まゆみ、島田義也：幼若ラットにおける腎発達とウラン分布。第52回日本放射線影響学会2009. 11. 12. 広島

⑨武田志乃、寺田靖子、磯浩之、石川剛弘、及川将一、小西輝昭、今関等、島田義也：高エネルギー領域放射光蛍光X線分析およびマイクロPIXE分析による腎臓の元素イメージング。第20回日本微量元素学会2009. 7. 3. 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 志乃 (TAKEDA SHINO)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：00272203