

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32632

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590760

研究課題名(和文)臓器中レアメタルの局在と化学形態 レーザー試料導入質量分析法の生体試料への応用

研究課題名(英文)Studies on distribution and chemical forms of rare earths in mouse organ using laser ablation-ICPMS

研究代表者

篠原 厚子 (SHINOHARA, Atsuko)

清泉女子大学・付置研究所・教授

研究者番号：90157850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：レアメタルである希土類のうちセリウム(Ce)とユーロピウム(Eu)の酸化物粒子(1または5 μ m径)を吸入曝露したマウスの、肺組織における希土類の局在と存在形態(化学形態)を、レーザーアブレーション-ICPMSにより検討した。アブレーションにはフェムトモルレーザーを採用した。肺に分布する希土類の殆どは粒子の状態で沈着したが、一部は溶解することが示唆された。常在元素のCuやZnとは分布が異なった。測定試料として、パラフィン包埋ブロックの薄切と、凍結切片を比較したところ、組織像の鮮明さは前者が優れているが、生の臓器に近い状態を観察するには後者の方が優れていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using laser ablation-ICPMS, distributions and chemical forms of two kinds of rare earth elements cerium (Ce) and europium (Eu) in lung of mice were investigated. Femtosecond-laser and excimer laser were compared and the former was selected. Mice were inhaled with oxide particles of Ce or Eu with 1 or 5 μ m diameter at 0.15 mg/m³, 7 hours per day, 5 days per week for 4 weeks and were dissected. Ce and Eu mapping images were obtained for 1 μ m thickness sections of paraffin embedding lung. Ce particles were distributed in pulmonary alveolus or in macrophage. Very low concentration of Ce was observed in the surroundings of blood vessel suggesting the partial dissolution and movement within lung. Eu was distributed as particles with various sizes suggesting that Eu was dissolved more easily than Ce and moved to other organs via blood flow. Distribution of rare earths was not corresponded with those of Cu and Zn. Frozen section preparation was also made for quantitative analysis.

研究分野：環境衛生、産業衛生、分析化学

キーワード：レアメタル 化学形態 セリウム(Ce) ユーロピウム(Eu) マウス肺 吸入曝露 レーザーアブレーション-ICPMS マッピング

1. 研究開始当初の背景

(1) レアメタルである希土類元素は共通した電子配置もつ 17 元素の総称で、永久磁石、水素吸蔵合金、MRI 用造影剤などの様々な製品に用いられる。レアメタルを輸入に頼る日本では、リサイクルの研究も行われているが、希土類化合物の生体影響に関する報告は少ない。報告者らは、実験動物を用いた希土類化合物の経口投与や静脈投与と実験を行い、希土類の消化管吸収率は極めて低く経口摂取による健康障害の可能性は低いと考えられること、可溶性塩の静脈内投与で希土類は肝、脾、肺、その他の臓器に分布するが、投与量と投与元素により分布割合が異なること、尿中排泄は少なく、長期間体内に留まる傾向があること、高濃度に分布した臓器では Ca 濃度の増加がおこること等を報告した。

(2) 製品の製造、廃棄や再利用過程では、酸化物や合金の微粉末として取込まれる可能性が高く、吸入曝露研究が重要と考えられることから、サマリウム(Sm)酸化物の Maus への吸入曝露の基礎検討を行い、肺に分布した Sm は経時的に減少すること、肝や骨にも低濃度ながら分布し、骨では曝露中止後に濃度が増すこと(科研費特定領域 16080103 H19 報告書、2008)、セリウム(Ce)酸化物では Sm と挙動に違いがあり、サイズによる違いもあることを示した。(科研費基盤(C) 21590665, 平成 21~23 年)。

2. 研究の目的

(1) これまで検討した希土類元素の体内分布は臓器中のバルク濃度で追跡しており、局在や化学形態の情報がないことから、本研究では、希土類の微粒子を吸入曝露した動物の肺組織における希土類の局在と存在形態(化学形態)を、最新の分析法であるレーザーアブレーション-ICP-MS により明らかにすることを目的とした。粒子のまま沈着する希土類と、溶解してイオンもしくは生体成分と結合して分布する希土類を分けて評価できれば、毒性発現機序の解明に役立つと考えられる。

(2) 産業界で重要なレアメタルの、製品製造、リサイクル過程、および、製品が廃棄された環境からのヒトの曝露モデルであり、希土類化合物の健康障害の防止に役立てることを目的とする。吸入曝露物質に、2 種類の元素と 2 つのサイズの化合物を用いることにより、元素の種類と粒子サイズの影響を明らかにすることを目指した。アブレーション法は、局在状態をマッピングできる優れた分析法であるが、定量性が議論されていることから、バルク濃度分析と対比させた評価を行うことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 生体試料中レアメタルの局在と化学形態の検討を行うために、レーザー試料導入質

量分析法(LA-ICPMS)の測定条件の検討と試料調製条件の検討を行った。エキシマレーザーまたはフェムトモルレーザーによるアブレーションを比較し、ICP-MS (Nu Instruments, UK)で、¹⁴⁰Ce、¹⁵³Eu および常在元素である ⁶³Cu、⁶⁶Zn を測定した。

(2) 測定試料は、希土類化合物を吸入曝露したマウスの臓器を用いた。Ce およびユーロピウム(Eu)の酸化物粒子(5 または 1 μm 径)を 0.15 mg/m³ の条件で 7 時間/日、5 日間/週、4 週間、吸入曝露した ICR 系マウスを曝露終了翌日に解剖して提出した肺を試料とした。2 種類の測定試料を作製した。1 つは、ホルマリン固定してパラフィン包埋した肺を、薄切しシランコーティングスライドガラスに載せ、無染色の状態 で用いた。同じ包埋ブロックの切片で HE 染色を行い、病理変化を観察した。もう一つは、凍結保存試料を OTC コンパウンドに漬けて凍結し、薄切してスライドガラスに載せ風乾した。

(3) この他、吸入した微小粒子は、一部はそのまま、もしくは喀出されてから消化管へも取り込まれると考えられることから、用いた粒子の経口投与実験を行い消化管吸収における核種や粒子径の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) レーザー試料導入質量分析法(LA-ICPMS)の測定条件を検討した。照射するレーザーとしてエキシマレーザーとフェムトモルレーザーを比較したところ、両者とも適用可能であるが後者のほうが安定性に優れていたことから、以後の実験では後者を用いた。スポット径 10 μm で測定した、Ce (平均粒径 5 μm) 吸入マウスの肺試料には非常に濃度の高いスポットがいくつか観察されたがそれ以外の部位には殆ど検出されなかった。これより肺に取り込まれた Ce は粒子として分布することがわかった(図 1A)。顕微鏡像から粒子は肺胞内または肺胞マクロファージに存在しており、病理検討の HE 染色像でマクロファージ内に認められた黒い点が Ce 粒子であることが確認された。Ce は非常に低濃度ながら血管周囲にも検出されたことから一部は溶解して肺内を移動する可能性が示唆された。対照群の肺では Ce は検出されなかった。このほか Zn は血管内(血液)に高濃度に、Cu は肺胞の膜に分布し、肺組織内での局在部位の違いがマッピングでわかった(図 1B)。これより、LA-ICPMS を用いることにより肺組織内に粒子として分布する Ce のみならず溶解して分布した Ce も同時に追跡できることが示唆された。

Eu の酸化物粒子(5 または 1 μm 径)についても、Ce と同じ条件で吸入曝露し、薄切試料を作製して LA-ICPMS で Eu、Ce、Zn、および Cu を測定した。Ce 曝露マウス肺と同様に、肺中に Eu の粒子が観察された。Ce の場合とは異なり、イメージング像の粒子のサイズは大小さまざまであり、吸入された粒子は肺で

一部溶解していることが推察された。肺以外の臓器への移行がCeに比べてEuで顕著であるというバルク濃度分析の結果と一致した。

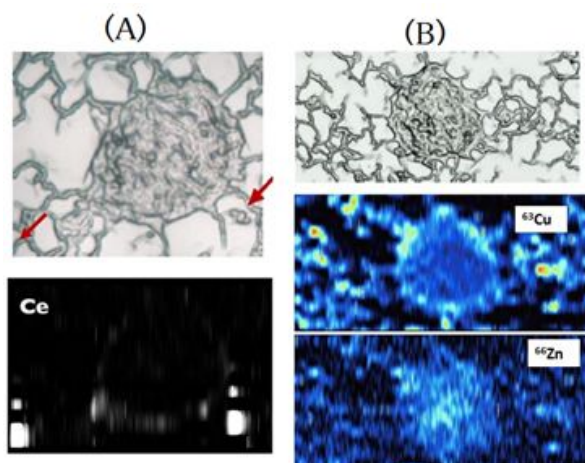


図1 Ce(5 μm 径)吸入曝露マウス肺のCe(A)およびCu, Zn(B)のマッピング像

(2) ソフトアブレーション法を用いて全試料をアプレートしたと仮定して、得られた信号から測定薄片中の平均濃度を計算するとCe, Eu共に数 $\mu\text{g/g}$ オーダーとなった。元の肺試料の一部を酸で分解して測定したバルク濃度は、LA-ICP-MS結果から計算した値より数～数十倍高い値である。病理観察用に、ホルマリン溶液を気管から注入して肺を膨らませて固定する際の重量変化を考慮してもバルク濃度の方が明らかに高かった。パラフィン包埋作業を通しての水分変化、機械的に粒子が除かれる可能性、または1 μm 厚の切片作成時に同じサイズまたは数倍の大きさのサイズの曝露粒子が抜けおちる可能性などが考えられる。肺中に常在するCuとZnの濃度も、LA-ICP-MSの結果から計算した平均濃度はバルク濃度より低かった。LA-ICPMSは肺中の吸入元素の分布や動態の分析に有用なツールであることと同時に、定量性に関してさらに検討するべき点があることが示された。

(3) パラフィン包埋試料作製プロセスの影響を検討するために、CeとEuの酸化物粒子を吸入したマウスの凍結切片試料を作製し、LA-ICPMSとバルク分析を行った。空気を含む組織である肺をコンパウンドに埋めて凍結するのは困難であったため、コンパウンドを注入してから包埋した。また、1 μm 厚の切片作製は困難であったので、5 μm の切片を作製し、スライドガラス上に載せ、光学顕微鏡で観察し、無染色でLA-ICPMS測定を試みた。含有される希土類のバルク濃度は、凍結切片と同条件の臓器試料で行う必要があるため、包埋ブロックを50 μm 厚切片として分解容器に集めたものを酸分解して通常のICP-MS分析を行った。凍結臓器をそのまま包埋できる肝臓と比較するために、可溶性希土類を静脈

内投与したマウスの肝臓についても同様に凍結切片を作製して測定に供した。

バルク濃度は、肝臓については凍結臓器の濃度とはほぼ対応した値、肺についてはコンパウンドを注入した分だけ希釈されたと考えられる数値が得られた。LA-ICPMSによるマッピング結果は、定性的には濃度に対応する強度で肺への粒子の分布が認められた。全量アプレートできたと仮定して平均濃度を計算し、定量的な評価を行う予定である。

肝臓試料のマッピングから、可溶性塩の静脈内投与で肝臓に取り込まれた希土類(Sm)は、肝組織に分布するが一樣ではなく、複数の化学形態で存在していることが示唆された。これよりLA-ICPMSは多くの臓器、曝露経路に有用な分析技術であることが示された。凍結切片は生に近い状態での観察に有利であるが、組織像を鮮明に捉えることが難しいことが欠点である。

(4) 吸入曝露に用いた酸化物粒子を0.2%含有する飼料を作製して4週間摂食させたところ、Ceは吸収率が低く殆ど体内に取り込まれないこと、粒子径が小さい1 μm の方が5 μm よりわずかではあるが吸収され易いことが示された。EuはCeに比べると吸収されやすいが、粒子径による違いは観察されなかった。経口摂取では肝臓と骨が分布臓器であるが、いずれの場合も吸入曝露で観察された濃度より低かったことから、吸入曝露で観察された肺以外の臓器への移行は消化管からの吸収ではなく血流を介しておこるものと推察された。

<引用文献>

- A Shinonara et.al. Biomed.Env.Sci., 10:73-84, 1997, A Shinonara et.al. Materials Science Forum 315 -317 :368-372, 1999, ibid. 408 -412:405-408, 2006
A.Shinohara et.al., J.Rare earth, 507-509, 2010

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

篠原厚子、松川岳久、千葉百子、大森由紀、横山和仁、サマリウム体内動態の性差、第4回メタロミクス研究フォーラム、2014.11.7-8、東京

篠原厚子、松川岳久、大森由紀、熊坂利夫、千葉百子、横山和仁、経口摂取したセリウム

とユーロピウムの吸収に及ぼす粒子サイズの影響、第 84 回日本衛生学会学術集会、日本衛生学雑誌 69(2) S211, 2014.5.25-27, 岡山

篠原厚子、千葉百子、松川岳久、大森由紀、横山和仁、妊娠マウスに投与したサマリウムの体内挙動と胎児への移行、第 31 回希土類討論会、希土類 64; 152-153、2014.5.22-23 東京

篠原 厚子、平田 岳史、メタロミクス研究分野における無機質量分析計の有用性～必須元素同位体比から薬物動態追跡まで、BMS コンファレンス (40th Biological Mass Spectrometry (BMS) Conference 2013)、2013.7 宮崎

篠原厚子、千葉百子、松川岳久、横山和仁、サマリウムの体内動態のマウス雌雄差の検討、第 30 回希土類討論会、希土類 62; 84-85、2013.5 北九州

篠原厚子、平田岳史、向山 翔、松川岳久、熊坂利夫、千葉百子、横山和仁、LA-ICP-MS を用いたマウス肺中セリウムのイメージング、第 83 回日本衛生学会学術集会、日本衛生学雑誌 68(2), 2013.3.24-26, 金沢

篠原厚子、千葉百子、松川岳久、熊坂利夫、横山和仁、吸入曝露した希土類元素のマウス肺への沈着と他臓器への移行、第 3 回メタロミクス研究フォーラム、要旨集 p.59, 2012.8. 東京

A.Shinohara¹, T. Matsukawa, T. Kumasaka, M. Chiba, K. Yokoyama, Deposition of inhaled rare earth elements in lung and other organs of mice, , Program book, 31-T-IS, 2012.8. Jeju, Korea

篠原厚子、松川岳久、熊坂利夫、佐藤次男、千葉百子、横山和仁、吸入曝露したセリウムとユーロピウムの肺内動態と骨への移行、第 29 回希土類討論会、希土類 59、2012.5 札幌

篠原厚子、松川岳久、千葉百子、熊坂利夫、横山和仁、吸入曝露したレアアースの体内挙動に及ぼす粒子サイズの影響、第 85 回日本産業衛生学会、日本産業衛生学雑誌 54、, 2012.5. 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 厚子 (SHINOHARA Atsuko)
清泉女子大学・人文科学研究所・教授
研究者番号：9 0 1 5 7 8 5 0

(2) 研究分担者

平田 岳史 (HIRATA Takahumi)
京都大学・理学(系)研究科(研究院)・
教授

研究者番号：1 0 2 5 1 6 1 2

松川 岳久 (MATSUKAWA Takehisa)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：6 0 4 5 3 5 8 6

千葉 百子 (CHIBA Momoko)
順天堂大学・医学部・客員教授
研究者番号：8 0 0 9 5 8 1 9