

ランタン負荷ラットにおける微量元素動態

加藤 洋，大門建夫^{*1}，後藤保正，山本恵三，宮川 誠^{*2}

東京都立保健科学大学
116-8551 東京都荒川区東尾久 7-2-10

^{*1} 帝京大学医学部解剖学教室
174-8685 東京都板橋区加賀 2-11-1

^{*2} 帝京大学医学部中央実験動物室
174-8685 東京都板橋区加賀 2-11-1

1. はじめに

希土類元素の一つであるランタン (La) は蛍光体，レーザ，磁気記録材料などに利用されてきたが，近い将来に水素吸着合金として，自動車などの水素と酸素を使った燃料電池に大量に使用されることが予想されている。従って，それらの廃棄に伴い環境汚染物質となる可能性が危惧されており，La の生体に及ぼす影響についての基礎的研究が必要である。一般的に La は細胞膜を通過しないとされており，我々の予備的実験でも塩化ランタンの腹腔投与では吸収されにくいことが確認されている¹⁾。しかし，キレート剤でキレートされた La は腹腔より容易に血管中に吸収され全身に循環されることが明らかになった²⁾。

2. 実験方法

オス Wistar ラットを使用し，ニトリロ三酢酸 (nitrilotriacetate : NTA) でキレートした La を 5mg/kg 体重，週 1 回の割合で 10 回腹腔投与し最終投与より 1 週間後に放血屠殺した。主として検索した組織は肝臓，腎臓，脳および大腿骨である。分析方法は PIXE，INAA (Instrumental Thermal Neutron Activation Analysis : 機器的熱中性子放射化分析)，組織金属染色，EDX (Energy Dispersive X-ray Microanalysis : エネルギー分散型 X 線微少部分分析法)などで，それぞれの試料の前処理および方法は以下に示す。

新鮮凍結乾燥した各組織中の元素定量は PIXE および INAA で行った。PIXE 用試料は粉末化した組織 (約 30mg) を硝酸灰化し，内部標準元素としてインジウムを加え，ポリカーボネイト薄膜に滴下乾燥させた。この試料は仁科記念サイクロトロンセンターで陽子線照射および元素定量を行った。INAA 試料は PIXE 試料作成時の粉末試料をポリエチレン袋に二重封入し (短寿命核種試料 : 約 30mg，長寿命核種試料 : 約 150mg)，比較標準試料として Orchard Leaves (NIST 1571)，Bovine Liver (NIST 1577) および Horse Kidney (IAEA H-8) を照射カプセルに試料と入れ，京都大学原子炉実験所の Pn-1 照射口で中性子照射 (熱中性子束 : $1.93 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) した。照射後 (短寿命試料 : 40 秒，長寿命試料 : 50 分) 線スペクトロメトリは直後から約一ヶ月後の間，順次対象核種ごとに行った。

組織金属染色および分析電子顕微鏡用試料は放血後，化学固定液を灌流し，アルコール脱水して acryl 系樹脂に包埋した。樹脂は Technovit 7200VCL や LR White などである³⁾。ガラスまたはステンレスナイフを用いて準薄切片を作成し，ヘマトキシリン・レーキ染色を行った。SEM (反射型電

子顕微鏡)での観察と EDX 分析は光学顕微鏡用準薄切片を作成するのに用いた acryl 樹脂包埋ブロックで行った。低真空 SEM で非伝導性試料を無処理で観察および分析できる利点を持った SM-300WET-SEM (Topcon) を使用した⁴⁾。TEM (透過型電子顕微鏡)での観察と分析は TN5500EDX (Noran Instruments Inc.) を装備した Jeol 2000FX 分析電子顕微鏡で行った。

3. 結果および考察

飼育開始時の体重を基準にしたときの体重の推移を図 1 に示す。La-NTA 投与群は対照群に比べやや体重増加は低いものの、それらの間に有意差は存在しなかった。Al-NTA 投与では明らかな生育不全が観られ、痙攣など異常症状が呈したが、La-NTA 投与ではそのような症状は呈さなかった。

表 1 に各組織中のランタン、鉄、カルシウムおよび亜鉛の元素分析結果を示す。上段はランタン投与群、下段は対照群で、単位は大腿骨のカルシウムは%であるがその他は $\mu\text{g/g}$ で示した。対照群はランタンが検出されなかったので示していない。この表から鉄および亜鉛は殆ど変わらないものの、大腿骨中のカルシウムは減少傾向にあるといえる。投与されたランタンは肝臓に多く蓄積され、腎臓および大腿骨にも蓄積されている。脳は血液による汚染と考えられ、殆ど蓄積されていないと思われる。

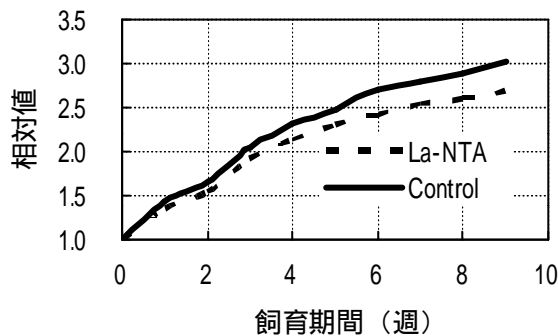


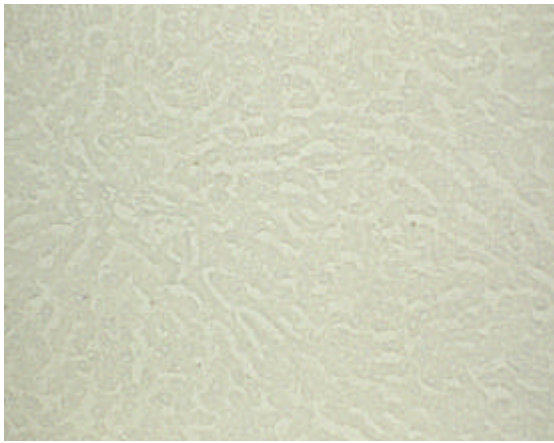
図 1 体重の推移

表 1 組織中の濃度 ($\mu\text{g/g}$: 乾燥重量)

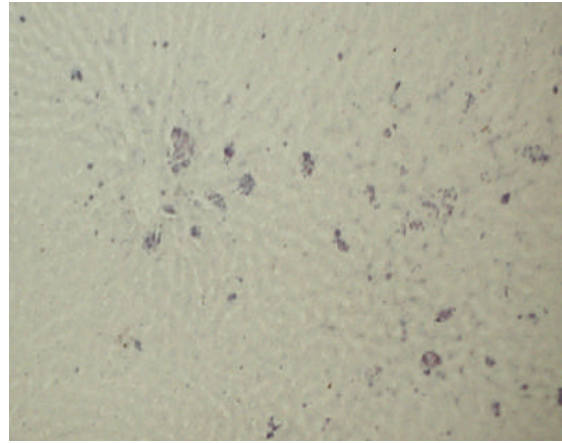
	肝臓	腎臓	脳	大腿骨
La	630 ± 300	96 ± 26	0.5 ± 0.3	44 ± 9
Fe	387 ± 76	240 ± 23	80 ± 8	47 ± 9
Ca	394 ± 45	219 ± 31	99 ± 36	50 ± 9
	289 ± 83	591 ± 112	1250 ± 2010	25.4 ± 2.6
	197 ± 75	438 ± 74	431 ± 230	25.1 ± 0.6
Zn	115 ± 10	111 ± 5	57 ± 3	181 ± 13
	96 ± 3	97 ± 5	52 ± 4	180 ± 14

肝臓組織を染色した光学顕微鏡像を図 2 に示す。対照ラットに発色している箇所は観られないが、ランタン投与ラットは粒状に観察される。発色はしているものの、ヘマトキシリン・レーキ染色法は特異的にランタンを染色しているとは限らない。さらに電子顕微鏡で毛細胆管近傍を観察した例が図 3 である。毛細胆管近傍に電子密度の高い粒状の像が観察された。この粒状近辺をさらに拡大したのが図 4 で肝細胞質のライソゾーム中に電子密度が高いことが観察され、この部分を EDX 分析すると明らかにランタンが検出された。よって血中のランタンは肝細胞に取り込まれ、さらに毛細胆管周囲にランタンを含む貪食細胞が集積していることから、胆汁を介して糞便に排泄されると考えられる。

図 5 は肝細胞同様に染色した腎臓中の曲尿細管である。ランタン投与ラットの基底側周囲に発色が認められる。電子顕微鏡像 (図 6) で観察すると、近位尿細管の上皮細胞の基底膜に粒状で電子密度の高い箇所が認められ、その基底膜は正常ラットのそれに比べ肥厚していることがいえる。さらに拡大した像が図 7 で、間質中のライソゾームに電子密度の高い箇所が確認され、EDX 分析でもランタンが高濃度で検出された。これから、ランタンは原尿中にも濾過され、さらに再吸収されるが基底膜をうまく透過できず蓄積される傾向にあると判断される。そのため基底膜の厚さは肥厚傾向にあり、さらなるランタンの投与が行われた場合、腎障害が生じる可能性があることを示唆している。骨については検討中である。



対照ラット



La 投与ラット

図 2 肝細胞金属染色光学顕微鏡像

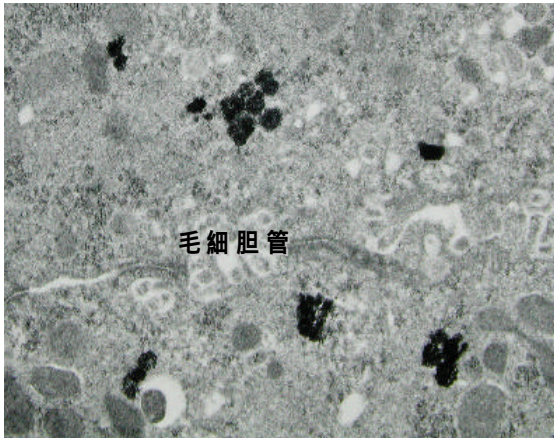


図 3 毛細胆管近傍の電子顕微鏡像

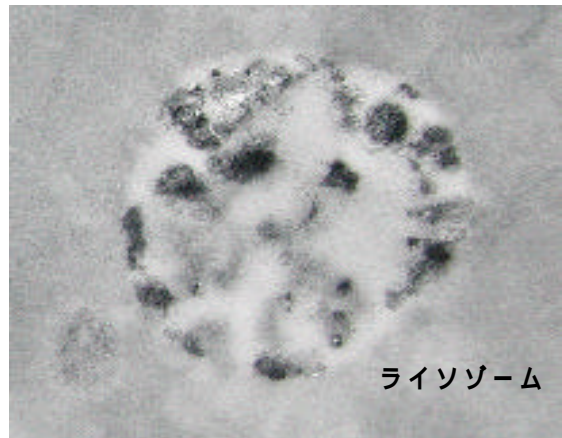
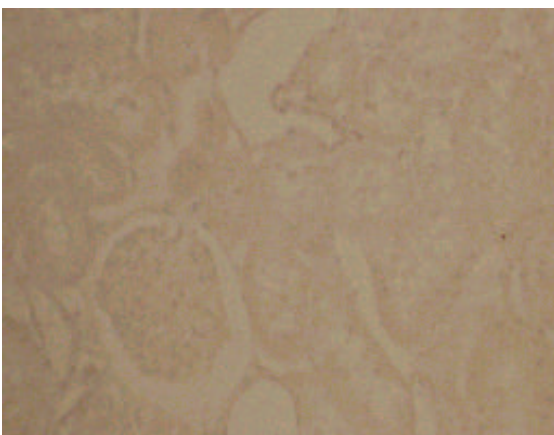
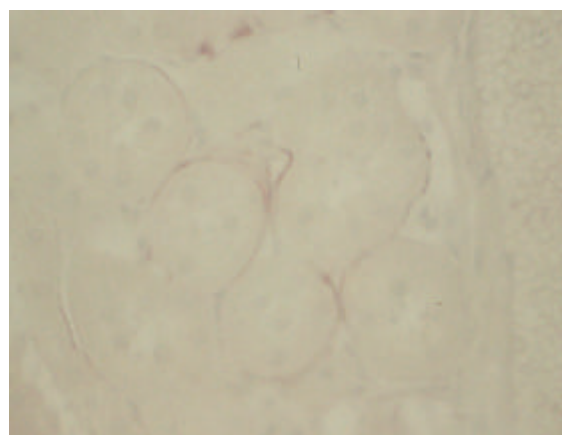


図 4 肝細胞質の電子顕微鏡像



対照ラット



La 投与ラット

図 5 腎細胞金属染色光学顕微鏡像

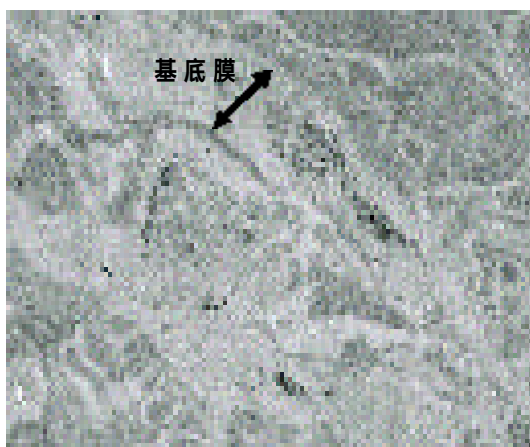


図 6 近位尿細管近傍の電子顕微鏡像

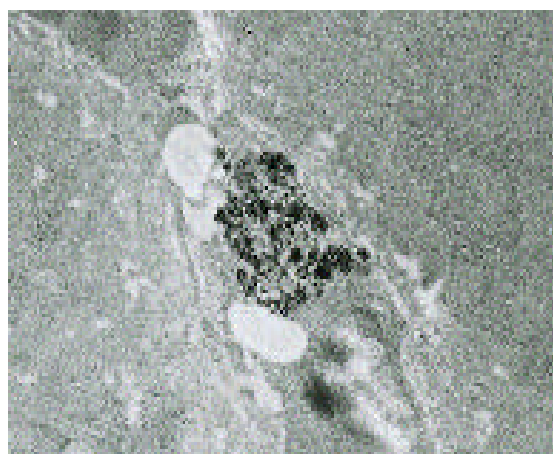


図 7 間質の電子顕微鏡像

文献

- 1) 加藤洋, 大門建夫, 後藤保正, 山本恵三: 金属投与によるラット臓器への影響. NMCC 共同利用成果報文集, Vol.9,(2001).
- 2) 大門建夫: 生物試料における金属染色と EDX. 日本電子顕微鏡学会, 2001.9, 73-78.
- 3) Daimon T, Kawai K, Kamoto T: Use of a Technovit 7200 VLC to facilitate integrated determination of aluminum by light and electron microscopy. Biotech Histochem, 75 (2000), 27-32.
- 4) 大門建夫: 低真空型 SEM の臨床検査への応用の可能性 - 基礎動物実験の立場より. 電子顕微鏡, 34, Suppl. 2 (1999), 151-153.