

重元素による環境汚染・体内暴露モニタリングのための  
無調製定量分析法 -  
無調製尿試料のための定量分析法の開発

世良耕一郎

岩手医科大学サイクロترونセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

二ツ川章二

日本アイソトープ協会仁科記念サイクロترونセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

三浦吉範

岩手医科大学医学部臨床検査医学講座  
020-8505 盛岡市内丸 19 番 1 号

## 1. はじめに

我々により開発された「無標準定量分析法」<sup>1)</sup>は、広いエネルギー領域にわたる連続 X 線の収量が、およそビームで照射されている試料の質量に比例する事実を基本原理としており、主構成元素組成変化の少ない医学・生物学試料に極めて有効である。特に内部標準を加える操作が複雑なものとなる毛髪試料<sup>2)</sup>、及び小動物からの連続採血時など試料量が少ない血清試料<sup>3)</sup>等に対しては、既に数千を超える試料に対し同法が適用されてきた。本研究においては無標準法適用の発想を変え、尿試料に対する無標準法の開発が行われる。尿試料分析は、臨床検査の一環として種々の診断に係わる重要な情報を提供するものである。これらに関しては容易に多量の試料入手が可能であり、また内部標準添加も容易である。内部標準法においては、通常 100ppm の In が添加された尿試料を均一化し、バックグ上にその 5  $\mu$ l ほどを滴下し、乾燥後ターゲットとして使用される<sup>4)</sup>。通常の臨床・基礎医学の研究においては試料の量も充分であり、試料数も 2~30 ほどと多量でない場合が多いため、従来の内部標準法適用で不自由は感じられなかった。

しかし近年、我々の主なテーマの一つとなった、「有害元素による広域的環境汚染と、それに伴う人々の体内暴露評価のための国際研究」<sup>5, 6, 7)</sup>のうち複数のプロジェクトにおいて、尿試料分析の需要が高まってきた。特に砒素に関しては、その総被曝量評価に尿分析は不可欠なものである。これらの研究の特徴は、試料数が膨大（一回のサンプリングで数百にのぼる場合が多い）になることと、多くが海外でのサンプリングであることである。従来の内部標準法はかなりの試料量を要求するものであり、尿試料はポリ容器やガラス容器に入れ海外から輸送され

てきた。そのため輸送途中の容器の破損・試料漏れ、試料の変質等の問題、さらに衛生上の問題が存在した。しかし本来、ターゲット上の尿試料は 5  $\mu\text{l}$  で充分であり、ターゲット作成が現場で可能であれば上記の輸送上の問題は全て解決する。しかし試料採取現場において、内部標準の添加、均一化、ピペティングの操作を行うことは困難であった。そこで無標準法の威力が発揮される。面倒な操作一切不用で、現場において一回のピペティング操作により数  $\mu\text{l}$  の尿試料をバックアップ上に滴下し、次々とターゲットを用意することができ、空輸で簡単にそれを輸送することができる。本法により、試料採取から測定までの過程を著しく簡略化することができ、一度に数百の試料分析を行うことが可能となることが期待される。

尿試料に対する無標準法の開発が困難な一つの要因は、尿試料においては K (ポタシウム) 濃度が突出し、他元素の高感度分析のためには通常の吸収体よりも厚い 500  $\mu\text{m}$  マイラー吸収体を用いる必要があることである。さらに連続 X 線収量の最も高い領域に K の K-X 線が存在するため、その部分の連続 X 線収量を含めると差し引きに伴う誤差が大きくなってしまふ。そのため、試料の全質量を代表する最良の連続 X 線領域を選択しなければならない。本研究においては、複数の正常尿を用いて内部標準法による結果との比較を行い、無標準法の変換係数が決定される。次に高尿酸たんぱく、高尿酸糖値のものを含む臨床検体としての 21 尿試料に対し無標準法が適用され、その精度が確認される。特に K 濃度の著しく異なる試料に対し、本法の精度が詳しく調べられる。

## 2. 実験方法

仁科記念サイクロトロンセンター小型サイクロトロン (島津製作所 MCY1750) から引き出された 2.9 MeV の陽子ビームは、6mm のグラファイトコリメータにより整形され、ターゲットを照射する。発生した X 線は 500 $\mu\text{m}$  マイラー吸収体を装着した重元素測定用 Si(Li) 検出器 No. 1 により測定され、K~U までの分析が行われる。無標準法はこの検出器 1 で取得されたスペクトルに適用され、指標元素としてまず K の濃度が求められる。他の元素の濃度は、その K を内部標準とみなすことにより、求めることが出来る。一方、検出器 No.2 には吸収体のかわりに 1mm のコリメータが装着され、Na~Ca までの軽元素分析が同時に行われる。その際、検出器 No.1 で無標準法により求められた K 濃度を内部標準とみなすことにより、軽元素の絶対濃度値も求められる。この「二検出器同時測定法」を用いることにより、尿試料の分析時間は、(平均ビーム電流値約 80nC の条件下で) 1 試料あたり 4~6 分ほどであった。実験条件の詳細は文献 8 に報告されている。

## 3. 無調製尿試料定量分析法

無標準定量分析法は、一定領域内の連続 X 線収量と指標元素からの特性 X 線収量の比から、換算係数を用いて指標元素の濃度を特定し、それを内部標準とみなして他元素の定量分析を行うものである。尿試料の場合、指標元素としては最も濃度が高く、全ての試料に安定して存在するポタシウムが選ばれた。この巨大な指標元素の存在のため、尿試料に対する無標準法には従来の方式をそのまま適用することが出来ない。

まず、このエネルギー領域 (入射エネルギー、及び X 線エネルギー領域) において主要な連続 X 線は、二次電子制動輻射 (SEB) および原子制動輻射 (AB) であるが<sup>9)</sup>、その収量は低 X 線エネルギー領域にいくほど高くなる。しかし一方では、尿試料においては K 濃度が突出するため、他元素の高感度分析のためには厚い X 線吸収体 (通常 500 $\mu\text{m}$  Mylar) が必要となり<sup>10)</sup>、連続 X 線の主成分は吸収されてしまふ。さらにそのスペクトル上の最大収量領域は、巨大な

K-K $\alpha$ , $\beta$  X 線ピークの下になるため、これらのピークの寄与を差し引く際、その応答関数の影響を大きく受けることとなる。また、さらに高エネルギー領域まで含めた場合内殻電子の平均速度分布の影響が大きくなり、K、Ca 濃度の変化に伴い連続 X 線収量が変化を受け、その結果自己撞着に陥ってしまう。以上の観点から、血清や毛髪試料の場合とは異なる尿試料専用の条件として、K、Ca のピーク領域をはずした 4.4~6 keV の領域の連続 X 線が積算され、それに対する K-K $\alpha$ ピークの比をとり、換算係数を導出することとした。

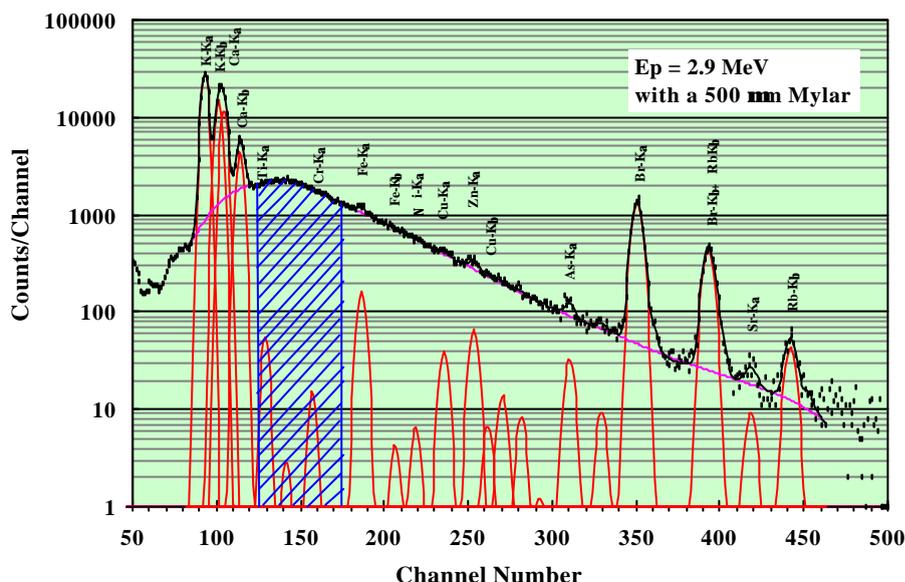


図 1 . Typical urine spectrum obtained with a 500µm Mylar absorber. Contribution of the continuous x-rays produced in a backing film (a 4µm-thick polypropylene film) was subtracted by normalizing the integrated beam currents. The yield of continuous x-rays corresponding to shadowed portion in the spectrum is used for the standard-free method after subtracting x-ray peaks in the region.

図 1 に典型的な尿試料スペクトルを示す。ビーム電流は約 100nA、測定時間は 5 分で、500µm マイラー吸収体を装着した検出器 1 で測定されたものである。(これは健康者の尿であるが、明確に As のピークが観測されている。) 図中の斜線の領域が、連続 X 線収量を積算する部分となる。図中のスペクトルにおいては、バックグランドからの連続 X 線がビーム電流値で規格化され差し引かれており、尿試料のみの寄与を示している。まず、最小自乗法により全ピークのフィッティングを行うことにより各ピークの収量が求められ、斜線で示された領域中のピーク収量が全て差し引かれ、連続 X 線収量が求められる。次にその連続 X 線収量に対する K-K $\alpha$ ピーク収量の比がとられ、K に対する変換係数を用いて K 濃度が求められる。変換係数を求めるためには、複数の尿試料をそれぞれ均質化し二つに分けた後、一方に内部標準を加え、他方は内部標準を加えず無標準試料として調製する。次に内部標準法により求められた K 濃度と、内部標準を加えない試料に対する上記の比を比較することにより、尿試料中の K 濃度に対する変換係数を決定することが出来る。他元素の濃度は、このように求められた K 濃度を内部標準のそれとみなし、絶対値として決定される。(変換係数決定までの詳細は、文献 1 参照のこと。)

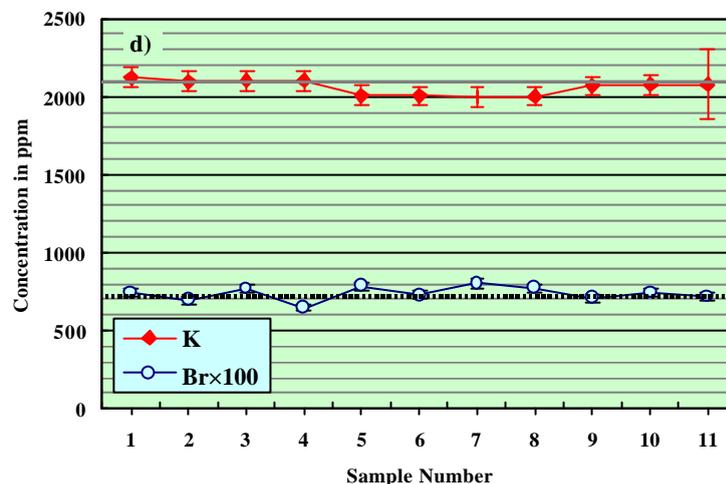
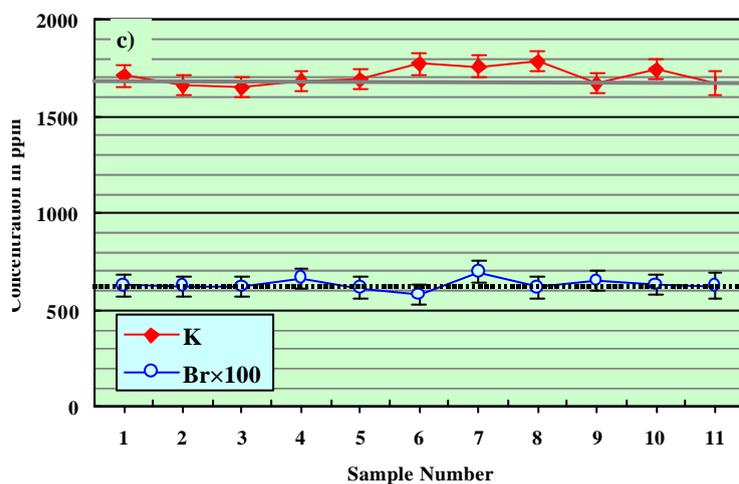
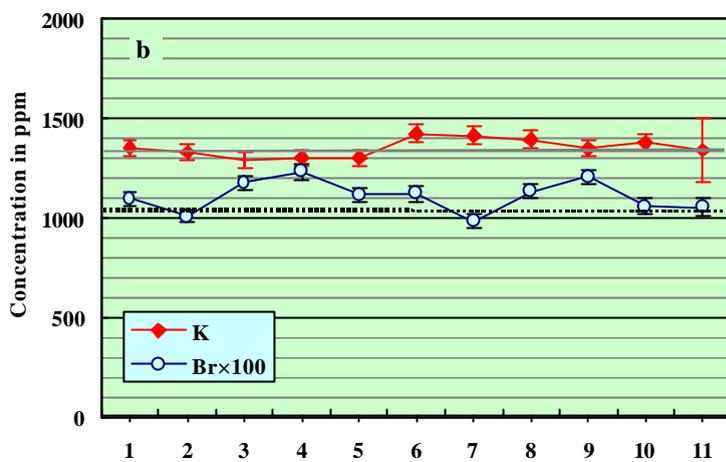
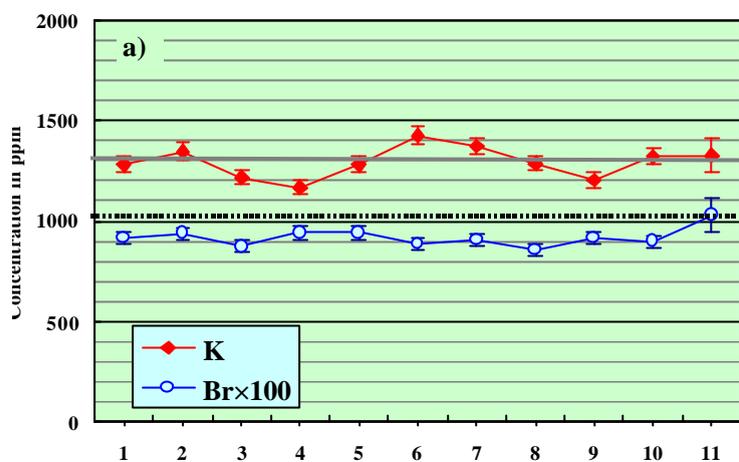


Fig. 2 a-d Potassium and bromine concentration in 4 normal urine samples. Results for sample number 11 show the average value and its standard deviation of 5 targets, which contain an internal standard and were analyzed by means of the internal standard method. Results and their experimental errors indicated as number 1-10 were obtained by the present method.

Table. 1-1 Elemental concentrations (in µg/ml) for Na-Cr in 21 clinical urine samples obtained from the present method. The results of clinical examinations for these urine samples are also shown.

Urine	Protein	Sugar	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Cr
N1	-	-	796 ±26	41.0±2.6	2.67±1.1	70.3±2.6	462 ±14.7	3200 ±99	398 ±22	154 ±5.0	0.067 ±0.03
N2	-	-	1470 ±46	9.91±2.1	2.71±1.2	69.7±2.6	105 ±4.2	3350 ±103	1140 ±35	107 ±3.5	0.055 ±0.04
N3	-	-	784 ±25	30.4±2.8	3.08±1.4	392 ±12.3	449 ±14.2	2190 ±68	614 ±19	102 ±3.3	0.067 ±0.03
A1	2+	+ / -	1170 ±36	32.7±1.8	1.08±0.8	74.5±2.5	412 ±12.7	2610 ±80	391 ±12	26.4±1.0	0.064 ±0.02
A2	-	+ / -	873 ±28	14.4±1.7	2.59±1.0	262 ±8.2	254 ±8.1	2460 ±75	840 ±26	70.8±2.4	0.059 ±0.03
A3	+	-	674 ±22	19.1±1.7	4.17±0.9	271 ±8.4	226 ±7.2	3060 ±93	750 ±22	39.5±1.5	0.079 ±0.03
A4	-	2+	568 ±18	8.0±1.5	3.35±0.9	279 ±8.6	216 ±6.9	2920 ±89	764 ±23	75.3±2.5	0.091 ±0.04
A5	+	+	481 ±17	45.1±2.8	3.39±1.3	258 ±8.1	643 ±19.8	1910 ±59	1330 ±40	110 ±3.6	0.11 ±0.04
A6	3+	-	524 ±17	26.6±2.1	3.37±1.1	268 ±8.4	430 ±13.3	2420 ±74	1050 ±32	92.6±3.1	0.099 ±0.04
B1	2+	-	756 ±25	44.6±3.5	6.01±1.7	486 ±15.2	747 ±23.3	1540 ±48	538 ±17	77.1±2.9	0.092 ±0.03
B2	+ / -	3+	151 ±13	12.0±3.4	3.95±2.1	622 ±19.4	532 ±16.9	169 ±7.4	1330 ±40	54.4±2.3	0.063 ±0.04
B3	-	2+	797 ±26	37.0±2.7	5.11 ±1.3	245 ±7.8	352 ±11.1	2590 ±79	503 ±16	121 ±3.9	0.081 ±0.03
B4	2+	-	822 ±27	28.1 ±4.4	5.07±2.3	269 ±9.2	454 ±15.1	1890 ±59	1300 ±41	47.3 ±1.9	0.047 ±0.04
B5	-	3+	409 ±17	1.0 ±1.2	4.41±1.8	136 ±4.9	197 ±6.9	1330 ±42	523 ±17	26.4±1.4	0.020 ±0.02
B6	2+	+	912 ±30	23.8±2.1	5.33±1.1	392 ±12.0	380 ±11.8	2390 ±72	894 ±27	68.2±2.3	0.11 ±0.03
B7	2+	+ / -	1080 ±33	24.9±3.8	5.88±2.0	448 ±14.1	369 ±11.9	2050 ±63	833 ±26	89.6±3.0	0.11 ±0.04
B8	3+	+ / -	1030 ±29	36.0±2.3	3.01±1.0	233 ±7.3	140 ±4.7	3100 ±95	525 ±16	16.5±0.9	0.066 ±0.03
B9	+	3+	298 ±16	38.6±2.1	5.91 ±0.9	210 ±6.5	476 ±14.5	1470 ±44	1490 ±44	25.1 ±1.1	0.065 ±0.02
B10	2+	-	1520 ±39	25.1±2.0	3.08±1.0	91.2±3.9	99.2±4.2	3910 ±147	405 ±19	45.7±1.6	0.10 ±0.03
B11	+	3+	290 ±21	26.9±1.8	2.45±0.9	377 ±11.5	350 ±10.8	956 ±29	940 ±29	63.0±2.2	0.025 ±0.03
B12	3+	-	662 ±22	19.9±2.3	4.24±1.2	248 ±7.8	295 ±9.3	1920 ±58	1050 ±32	13.1 ±1.1	0.050 ±0.03

Table .1-2 Same as Table 1-1 but for Fe-Pb.

Urine	Fe	Cu	Zn	As	Br	Rb	Sr	Hg	Pb
N1	0.16±0.03	ND	0.706±0.036	0.044±0.021	5.57±0.20	0.082±0.039	0.10±0.035	ND	0.17±0.063
N2	0.077±0.02	ND	0.092±0.020	0.026±0.011	6.26±0.21	0.31±0.082	0.11±0.040	0.056±0.030	0.17±0.065
N3	0.12±0.02	0.023±0.008	0.204±0.019	0.029±0.008	4.76±0.17	0.42±0.073	0.047±0.014	0.025±0.021	2.07±0.113
A1	0.15±0.02	0.077±0.012	0.221±0.015	0.093±0.013	0.72±0.034	0.065±0.024	0.027±0.018	ND	0.040±0.037
A2	0.19±0.02	0.015±0.017	0.554±0.027	0.079±0.018	4.73±0.16	0.48±0.069	0.046±0.029	ND	ND
A3	1.36±0.05	0.032±0.017	0.345±0.023	0.044±0.009	4.69±0.16	0.22±0.061	0.014±0.014	ND	0.16±0.056
A4	0.066±0.02	ND	0.262±0.024	ND	7.49±0.25	0.13±0.083	0.022±0.021	ND	0.48±0.073
A5	0.12±0.03	0.031±0.02	0.900±0.041	0.097±0.022	3.71±0.14	0.85±0.082	0.13±0.035	0.047±0.026	0.10±0.065
A6	0.092±0.03	0.019±0.016	0.581±0.032	0.048±0.011	5.60±0.20	0.49±0.082	0.075±0.028	0.024±0.013	0.29±0.069
B1	0.25±0.02	0.059±0.016	1.699±0.063	0.022±0.007	1.88±0.078	0.43±0.053	0.070±0.023	ND	0.16±0.044
B2	0.41±0.03	0.034±0.02	0.825±0.042	ND	0.33±0.37	0.88±0.081	0.064±0.031	0.049±0.026	0.063±0.053
B3	0.30±0.02	0.034±0.015	0.873±0.036	0.007±0.009	4.22±0.15	0.118±0.054	0.11±0.026	0.028±0.018	0.24±0.049
B4	0.26±0.03	0.022±0.018	0.859±0.038	0.041±0.018	2.53±0.10	0.84±0.076	0.081±0.030	ND	0.097±0.053
B5	0.24±0.03	ND	0.231±0.023	0.004±0.009	2.44±0.11	0.17±0.070	0.016±0.017	0.048±0.028	0.091±0.052
B6	0.16±0.02	0.038±0.018	0.670±0.031	ND	4.24±0.15	0.64±0.076	0.068±0.029	ND	0.25±0.056
B7	0.40±0.03	0.038±0.017	0.346±0.023	0.084±0.009	2.98±0.12	0.48±0.070	0.065±0.028	ND	0.38±0.066
B8	0.34±0.02	0.112±0.017	0.200±0.019	0.019±0.011	4.45±0.16	0.37±0.066	0.013±0.024	ND	0.060±0.046
B9	0.30±0.02	0.162±0.014	0.624±0.025	0.015±0.007	2.68±0.092	0.83±0.053	0.013±0.015	ND	0.037±0.031
B10	0.28±0.03	0.038±0.018	0.185±0.020	0.016±0.007	6.04±0.21	0.095±0.075	0.066±0.027	ND	ND
B11	0.40±0.03	0.043±0.016	1.691±0.06	ND	2.27±0.089	0.85±0.069	0.17±0.031	ND	0.19±0.047
B12	0.43±0.03	0.172±0.02	0.350±0.024	0.084±0.018	3.34±0.12	0.97±0.082	ND	ND	0.078±0.053

#### 4. 結果

図 2 a,d に、正常尿 4 試料に対する K と Br 濃度が示されている。前者は、変換係数決定のために内部標準法、無標準法の両方で解析が行われ、後者の濃度は、求められた K 濃度を内部標準のそれとみなして導出されたものである。これらの図中、試料番号 11 番に示される値とその誤差が、内部標準を加えて作製された 5 ターゲットに対する内部標準法による定量結果とその標準偏差を示しており、試料番号 1~10 が本無標準法による 10 ターゲット（内部標準無添加）に対する結果とそれらの実験誤差を示している。実験誤差にはピークフィッティングに伴う誤差、検出効率、500 $\mu$ m マイラー吸収体の透過係数に起因する誤差が含まれている。これらの図に見られるように、殆どの結果が内部標準法による結果と 10%以内の精度で一致しており、精度、再現性は満足すべきものであった。

次に、臨床検体の目的で患者から採取された 21 の尿試料に対して本法が適用された。これらのうち 18 試料が、正常範囲を超えた尿蛋白もしくは尿糖値を示している。これらの試料に対する臨床検査結果を表 1 中に示す。図 3 には、これら 21 試料中の K 濃度が、内部標準法により求められたものと本法により求められた値の比較の形で示されている。なお、本法による値は、独立に調製された 2 ターゲットのそれぞれに対して示されている。内部標準としては、In 10 ng/ml が添加されている。図に見られるように、これらの値はいずれも内部標準法による値と良く一致している。

表 1 には、臨床検査の結果に加え、これら 21 試料中の本法により求められた元素濃度を $\mu$ g/ml の単位で示す。ここで、これらの値は 2 ターゲットに対する平均値である。殆どの試料に対し、21 元素の定量分析を行うことが出来た。

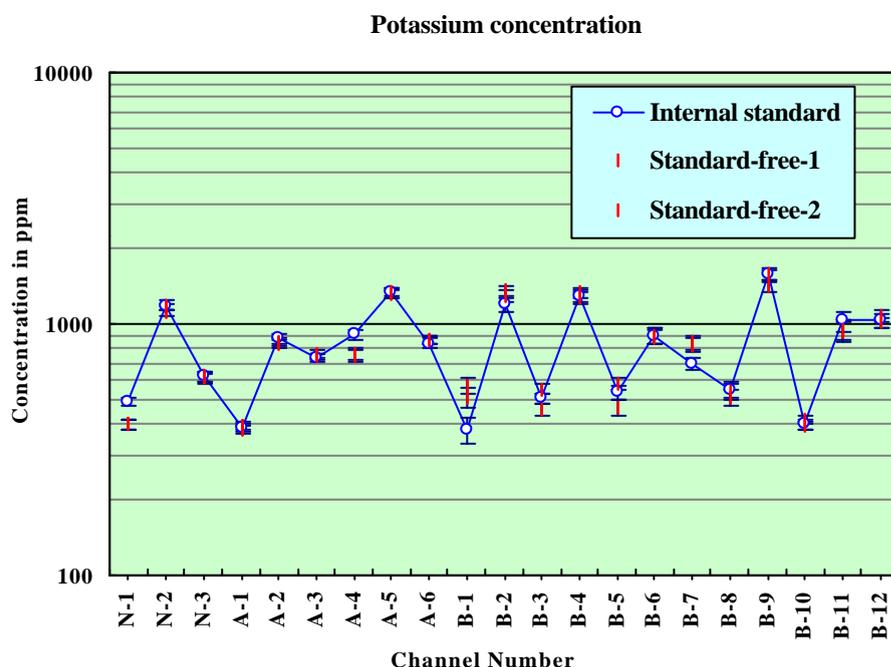


Fig. 3 Comparison of potassium concentration in 21 urine samples, which were taken from patients, obtained by the internal standard method with that obtained by the standard-free method. N1-3 are normal and A1-6, B1-12 contain excess amount of urinary protein and/or sugar.

## 5. 議論

図 2、3 の結果により、本法による K の定量値が十分に精度の良い値を与えるものであり、本法が尿試料の無標準定量分析に有効であることが示された。図 3 はまた、本法が臨床検査において異常値を示す試料に対しても有効であることを示している。さらにこれらの図の結果から、本法が K 濃度の著しく異なる試料に対しても有効であることが示され、図 1 で示す連続 X 線の領域が妥当なものであったことが確認された。

表 1 は、尿蛋白、尿糖値の異常性と特定元素の定量値との間になんらかの相関があることを示唆している。特に Mg 濃度は、尿蛋白値の増加に伴い増加し、逆に尿糖値の増加に伴い減少する傾向にあるように見える。しかし断定的な結論を出すには、試料数が不足している。今後の検討課題としたい。

我々は現在いくつかの国際研究プロジェクトに参加しており、それらの多くは有害元素の広域的环境汚染とそれに伴う住民の体内暴露評価のための調査研究である。主なものを挙げると、「フィリピン、モンゴルの小規模金鉱山における水銀汚染」<sup>5)</sup>、「バングラデッシュの井水中の砒素汚染と人民の体内暴露評価」<sup>6)</sup>、「中国における井水の砒素汚染に起因する慢性砒素中毒の発生機序、生体影響」<sup>7)</sup>、「中国における石炭燃焼地域住民の有害元素体内暴露評価」、「カザフスタン、タイにおける風土病と体内元素の相関」等に関する研究が進行中である。これらの研究において中心的役割を果たしてきたのが、我々により開発された「無調製毛髪試料に対する無標準定量分析法」であり、現在まで 1 万近くの試料分析が行われてきた。しかし特に砒素などの、腎機能により尿中に排泄されやすい有害元素の体内総暴露量評価のためには、尿試料の分析が重要なものとなる。

臨床検体として PIXE 分析にかかる尿試料数は、一般にそう多数ではない。したがって、従来の内部標準法適用に大きな問題は生じなかった。しかし、有害元素環境汚染に係わる調査研究においては試料数が数百にのぼることが多く、より簡潔な試料調製法が求められる。しかも、尿試料の輸送は、試料の変質を防ぐことや衛生上の観点から一つの大きな問題となっていた。さらに従来の内部標準法による試料調製は、多数のチューブや多量の尿などの医療廃棄物を生じるものであり、その観点からも問題があった。もし試料採取の現場においてターゲット作製が可能となれば、それらの諸問題が一挙に解決することになる。しかし従来の内部標準法を用いる限り、それは困難であった。

本法の開発により無標準での定量分析が可能となり、一回のピペッティング操作により、試料採取現場において、1 本のピペットチップ以外の廃棄物を生じることなく、ターゲット製作が可能となった。使用する試料は、5 $\mu$ l で充分である。そのため、試料の輸送の問題も全て解決し、一度に多量のターゲットを準備できるようになった。今後本法が、有害元素体内暴露評価調査研究において、一つの強力な手段となることを願っている。なお、本報告の内容は文献 10 にまとめられ、報告が行われている。

## 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。特に日本アイソトープ協会斉藤義弘主任には、いろいろな面で技術的協力をしていただきました。感謝いたします。

## 参考文献

1. Standard-free Method of Quantitative Analysis for Bio-samples.  
K.Sera, S.Futatsugawa, K.Matsuda and Y.Miura  
Int'l Journal of PIXE Vol. 6-3,4 1996 (467-481)
2. Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples.  
K.Sera, S.Futatsugawa and K.Matsuda  
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 150 1999 (226-233)
3. Quantitative Analysis of Bio-medical Samples of Very Small Quantities by the Standard-free Method.  
K.Sera, S.Futatsugawa S.Hatakeyama, Y.Saitoh and K.Matsuda  
Int'l Journal of PIXE Vol.. 7-3,4 1997 (157-169)
4. Relationship Between Silicon Concentration and Creatinine Clearance.  
Y.Miura, K.Nakai, C.Itoh, J.Horikiri, K.Sera and M.Sato  
Int'l Journal of PIXE Vol.. 8-1 1998 (69-72)
5. PIXE measurement of human hairs from a small-scale mining site of the Philippines.  
S. Murao, E. Daisa, K. Sera, V. B. Maglambayan and S. Futasugawa 2. E.Clayton  
Submitted to Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B
6. Study of Toxic Arsenic in Bangladesh by PIXE Analysis .  
M. A. Habib, S. Miono, S. Futatsugawa and K. Sera  
Annual Report of NMCC Vol. 8 2001 (167-173)
7. 中国における慢性砒素中毒の発生機序、生体影響、改善方法、そして予防対策に関する研究結果と今後の対応について  
山内博 他 慢性砒素中毒に関する日中国際学術研究班報告 2000年10月
8. Bio-PIXE at the Takizawa Facility. (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron.)  
K.Sera, T. Yanagisawa, H.Tsunoda, S.Futatsugawa, S.Hatakeyama, Y.Saitoh, S.Suzuki and H.Orihara.  
International Journal of PIXE Vol.2, No.3 (1992) 325-330
9. Continuous Background in PIXE  
K. Ishii and S. Morita  
Int'l Journal of PIXE Vol. 1-1 1990 (1-30)
10. 生物試料の測定・定量法 -測定条件と無標準定量分析法  
世良耕一郎  
連載総説 “Bio-PIXE その利用と応用” 第3章 RADIOISOTOPES 49-10 2000 (494-504)
11. Application of a Standard-free Method to Quantitative Analysis of Urine Samples  
K. Sera, Y. Miura and S. Futatsugawa  
Int'l Journal of PIXE Vol. 11-3,4 2001 (in press)