

## X線分光顕微鏡による生体組織内金属元素の局在の解析

高川 清<sup>a</sup>, 松尾 英晃<sup>b</sup>, 山根 一真<sup>b</sup>, 早川 慎二郎<sup>b</sup>

<sup>a</sup> 富山医科薬科大学・医学部病理学（第二）, <sup>b</sup> 広島大学大学院・工学研究科物質化学システム専攻

**背景:** ナノテクノロジーの応用の例として、生体機能の補填、効率的な薬剤投与方法の開発などが考えられるが、いずれにしても、ナノテクノロジーを使ってつくられた部品、もしくは素材を、生体組織内に埋め込む必要が考えられる。この場合、埋め込まれた素材と生体組織との親和性を観察するには、古典的な病理組織化学や電子顕微鏡の利用が考えられるが、これらの方法は組織や細胞内小器官の形態の観察が主であり、特殊染色が可能な一部の元素を除き、組織中の一般的な元素の分布の分析には適していない。特に重金属の局在の分析はきわめて困難である。X線分光顕微鏡は、形態の観察と同時に組織内の元素の分布を非破壊的・定量的に観察できる方法であり、ナノテクノロジーを使ってつくられた素材の組織内分布の解析において、有用なツールとなる可能性がある。本研究では、実験的に有害金属を投与されたラット組織における金属の分布を解析する事を通して、X線分光顕微鏡の現時点での性能と限界を調べた。

**実験:** 実験は早川らが開発した BL37XU の X線分光顕微鏡を使って行った。図 1 に実験装置の概略を示す。

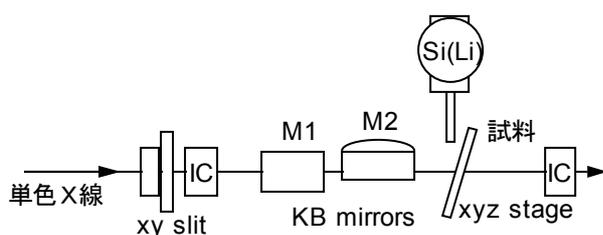


図 1 単色化された放射光は、2枚の Kirkpatrick-Baez mirror (KB mirror)によって集光され、径2-3  $\mu\text{m}$ のビームとなって試料に照射される。試料から放射される蛍光X線を、Si(Li)検出器もしくはSDD等で検出する。試料をXY方向にスキャンする事により目的元素のイメージングを行う。多元素同時計測も可能。KB mirror をはずせば、ビームサイズは100  $\mu\text{m}$ 程度になり、広範囲のスキャンを行える。

**結果と考察:** 図2は、塩化金 ( $\text{AuCl}_2$ ) を腹腔内投与したラット腎組織中の Au の局在を、X線分光顕微鏡で分析した結果である。金は、「金製剤」としてリウマチなどの治療薬として使われており、腎障害を起こす場合がある事が知られている。ラット腎組織は、常法に従いホルマリン固定、パラフィン包埋し、厚さ6  $\mu\text{m}$ の薄切標本をポリプロピレンの薄膜上に貼り付けて、分析した。本実験では、投与された金が腎臓組織の近位尿細管上皮にのみ蓄積しており、遠位尿細管や血管壁には蓄積していない事が初めて直接的に示された。この様に生体組織中の重金属の分布を顕微鏡レベルの解像度で可視化出来るのは、現在のところ蛍光X線分析だけである。

図3は、塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2$ ) を経口投与したラットの脛骨組織において、Cd の分布を分析した結果である。実験的に投与されたCdは、主に腎臓と肝臓に蓄積する事が知られている。しかし、慢性Cd中毒では、骨病変（骨粗鬆症や骨軟化症）も起こる事が知られているので、Cd が直接的に骨組織に作用して、骨病変を起こすか否かが注目されている。

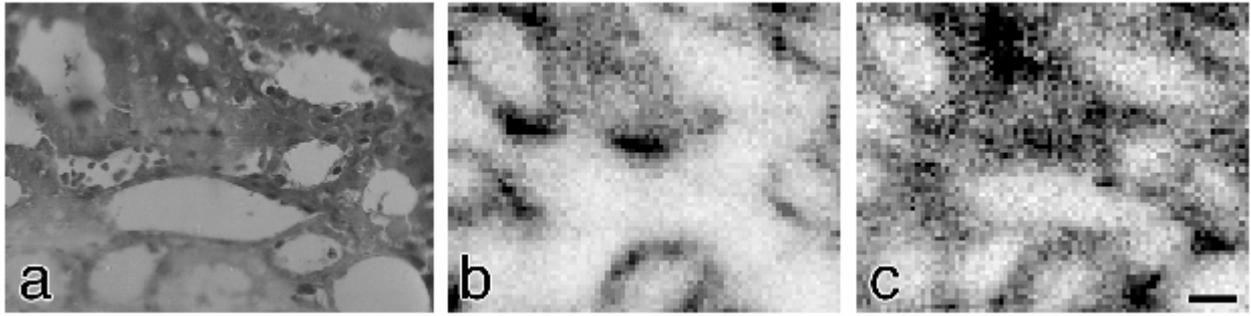


図2 実験的に Au を投与されたラット腎組織の解析。KB mirror を使ったマイクロビームで、狭い領域を分析した。(a) 検体組織像。蛍光 X線分析後、パラフィンを溶かし、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色した標本の光学顕微鏡写真。(b) Au の分布 (色の黒い部分がより高濃度に分布している部分)。HE 染色像と比較すると、Au が近位尿細管上皮にのみ蓄積しているのが分かる。(c) Zn の分布。Zn は Au と異なり、近位尿細管上皮、遠位尿細管上皮、および血管壁に分布している。Bar = 30  $\mu$ m

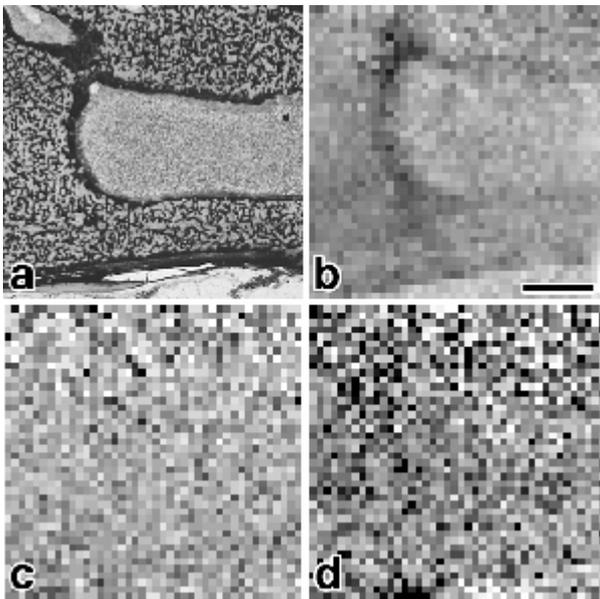


図3 実験的に Cd を投与したラット脛骨組織の解析。骨はプラスチック包埋され、非脱灰のまま薄切されたもの。KB mirror を使わず、広い領域を分析した。(a) 光学顕微鏡像。(b) Cl の分布。Bar = 1 mm (c) Cd の分布。骨組織中に Cd の目立った局在は認められない。(d) Compton 散乱のイメージ。

今回の実験では、骨組織中の Cd の分布に何か特徴が見られるか否かを検索したが、特徴的な蓄積パターンは認められなかった。しかしながら、試料がプラスチック包埋されており、比較的バックグラウンドが高かったため、Cd の検出限界は 1 ppm 程度とやや高く、本研究の結果は、必ずしも Cd の骨組織への直接的な障害を否定出来るものではない。

本研究で、放射光を使った X線分光顕微鏡が、生体組織標本中の元素の分布を解析する上で重要なツールとなる可能性、ナノテクノロジーの生体への応用において、重要な解析法となる可能性が示唆された。

**今後の課題：** 本システムで使用している KB mirror では、X線ビームを 2  $\mu$ m 程度に絞ることが出来るが、理論的には、ミラーの性能が上がれば、さらにビームを細く絞る事が可能である。サブミクロンの X線ビームが実現すれば、電子顕微鏡レベルの解像度で、元素の局在を分析出来る事になり、重金属を含む物質の細胞内の代謝を形態的に分析出来るなどの応用が考えられる。より高性能な KB mirror の作成が望まれる。

**文献：**

(1) J. Kawai, K. Takagawa, S. Fujisawa, A. Ektessabi, S. Hayakawa, J. Trace and Microprobe Tech. 19(4):541-546, 2001  
 (2) S. Hayakawa, S. Tohno, K. Takagawa, A. Hamamoto, Y. Nishida, M. Suzuki, Y. Sato, T. Hirokawa, Anal. Sci. 17 supplement:i115-117, 2001