SSPH18-56
2006A1679
BL37XU

金属プローブを用いた生体組織中スズの細胞選択的蛍光 X 線分析
Cell-selective XRF of tin in tissues with metal probe

武田（本間）志乃[a]、西村義一[a]、上野俊治[b]、渡辺嘉人[a]、湯川雅枝[a]、寺田靖子[c]
Shino Homma-Takeda[a], Yoshikazu Nishimura[a], Shunji Ueno[b], Yoshito Watanabe[a] ,
Masae Yukawa[a] , and Yasuko Terada[c]

[a]放射線医学総合研究所、[b]北里大学獣医畜産学部、[c]JASRI
[a]National Institute of Radiological Sciences,
[b]School of Veterinary Medicine & Animal Sciences, Kitasato University, [c]JASRI

有機スズ化合物は防汚塗料として広く使用され、近年、それに伴う海洋汚染が危惧されている。有機スズ化合物の内分泌かく乱作用が指摘されているが、生殖器におけるスズの挙動の詳細は明らかでない。本研究では、精巣の精細管上皮におけるスズの細胞選択的測定を行うため、ニッケルプローブを用いた細胞死（アポトーシス）誘発細胞検出のための免疫組織染色と SR-XRF の組み合わせ手法を試みた。

Organotin compounds are widely used as antifouling paints and their marine pollution is of recent concern. It is known that they act as endocrine disruptors but details of the dynamics of Sn in reproductive organs are still unknown. In the present study, we attempt to make an in situ metal imaging combined with immunohistochemical staining for detection of apoptotic cells to perform a cell-selective determination of Sn in a germ cell in the seminiferous epithelium.

はじめに

有機スズ化合物は船底塗料や魚網防汚剤として広範に使用され、近年それに伴う世界的な海洋汚染が深刻化している環境化学物質である。哺乳動物においては、有機スズ化合物のばく露により生殖毒性を呈することが示されている[1, 2]ものの詳細な作用機序は解明されていない。その要因の一つとして、スズは汎用の分析手法では感度の高い分析が困難な元素であるため、微細な組織分布に関する研究はほとんどなされていないことが挙げられる。

組織中に数 ppm 程度含まれるスズを感度よく検出するために、我々はスズの Kα 線を利用した微小ビーム蛍光 X 線分析を試みてきた。すなわち、これまで広く利用されてきた 20 keV 以下の励起光を用いた蛍光 X 線分析では、スズの L 線を検出することになり、このピークが生体多量元素（カリウムやカルシウム）に妨害されることから、微量スズの検出が困難であった。SPring-8 生体微量分析ビームライン（BL37XU）において微小ビームかつ高エネルギーの蛍光 X 線分析が可能となり[3]、スズの組織分布が解析できるようになった。し

かしながら、高輝度の励起光は薄い組織試料をほとんど透過してしまうため、透過光を利用した組織構造の可視化ができず、より微細な分析になるほど、分析位置を正確に確認することが難しくなる、という問題が生じた。

そこで本研究では、正確かつ効率よくスズの組織分布を得るため、目的細胞を金属プローブで標識し組織中スズの細胞選択的測定手法の開発を試みた。

実験

ラットに塩化トリブチルスズを45 μmol/kgの割合で経口3回投与した。最終投与24時間後に屠殺し、精巣を摘出、パラフィン包埋後、6 μm厚の組織切片を作成した。精巣の細胞死（アポトーシス）誘発細胞をTerminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)（TUNEL）法により染色し、陽性細胞をニッケルで標識した。

測定はBL37XUの蛍光X線測定システムを用いて行った。試料からの蛍光X線の検出にはSi(Li)-SSDを用い、大気中で測定した。

結果および考察

アポトーシスを起こした細胞をニッケルで標識し、その細胞にけるスズの蓄積を調べた（図１）。TUNEL染色結果とニッケルのイメージングを対応させると、TUNEL陽性細胞で特異的にニッケルの集積が観察された。この目的細胞（矢印）に微小ビーム（1 μm²）を照射したところ、スズのピークが検出された。

精巣の精細管上皮では生殖細胞が系統だった分裂・分化を経て精子形成が行われている。精細管上皮の外側から精原細胞、精母細胞、精子細胞と配列しており、この配列を維持しながら成長していく。一般に、これらの生殖細胞はストレスに対する感受性に違いがあり[4, 5]、ダメージを受ける生殖細胞の種類により精巣の病態像は大きく異なる。そのため、有機スズ化合物の精巣毒性の作用機序を明らかにするためには、細胞ごとのスズの動態を把握することが重要であり、本手法は有用な研究手法になると考えられた。

今後の課題

精巣における有機スズの作用機序を明らかにするためには、アポトーシス誘導の細胞特

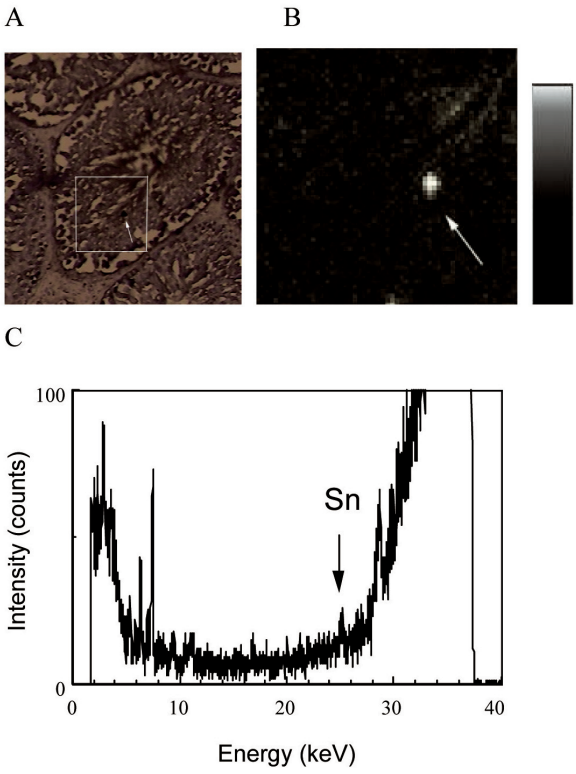

Fig. 1　(A) Testicular section stained with TUNEL from the TBTC-treated rat (45 μmol/kg/day for 3 days, p.o.) at 24 hr after injection. (B) Ni imaging on the testicular specimen. SR-XRF imaging was performed as following condition; energy of X-rays, 37.5 keV; beam size, 1 μm²; step size, 5 μm; counting time, 2 sec per point. The boxed part of A is the analyzed area of B. (C) SR-XRF spot analysis (counting time, 300 sec per point) at the Ni-labeled apoptotic cell (allow). The Sn concentration of the specimen was 0.5 μg/g of wet tissue.

異性とスズの蓄積との関係について、ばく露量の違いや経時的な変化などより広範な情報を入手する必要がある。そのためには、本手法をさらに発展させ、細胞選択的測定の効率化を図ることが必要である。

参考文献

1) Omura M. *et al., Toxicol. Sci*. **64**, 224-232, 2001.

2) Yu W. *et al., J. Vet. Sci*. **4**, 29-34, 2003.

3) Terada, Y. *et al., Environ. Toxicol. Pharmacol*. **7**, 179-187, 1999.

4) Homma-Takeda, S., *et al., Toxicology* 2001; 169: 25-35.

5) Homma-Takeda, S., *et al., Free Rad. Res*. 2002; 36: 555-566.

論文発表状況

[1] 武田（本間）志乃、西村義一、上野俊治、渡辺嘉人、湯川雅枝：トリブチルスズ投与ラットの雄性生殖器における細胞選択的微量元素解析 . 第 76 回日本衛生学会　山口 2006.3.27.