

SR-XRF 用フィルム状濃度換算試料の作製 — 放射光を用いた生体組織中の微量元素分析と診断用材料開発への応用 —

杉山知子¹, 和田敬広², 宇尾基弘^{2,3}

¹ 自治医科大学 医学部 歯科口腔外科学講座

² 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 先端材料評価学分野

³ 東京大学大学院 工学系研究科 マテリアル工学専攻

Preparation of film shaped concentration calibration specimens for SR-XRF - Application for the trace elemental analysis in the biological tissues using SR-XRF and development of the diagnostic material-

Tomoko SUGIYAMA¹, Takahiro WADA², Motohiro UO^{2,3}

¹Department of Dentistry, Oral and Maxillofacial Surgery, Jichi Medical University

²Advanced Biomaterials Department, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

³Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

Abstract

SR-XRF は微量元素分析手法の 1 つとして医学・生物学領域においても注目されているが、病態と検出元素との関連を考察するためには定量的評価が不可欠である。我々は歯科用樹脂を用いたフィルム状濃度換算試料を作製し、生体試料中の微量元素定量法を開発した。同試料は作製が容易で、耐久性が高く、生体試料中の微量金属の濃度推定に有効であった。本稿では濃度換算試料の作製方法と生物試料への応用例について紹介し、今後の研究の展望について記述する。

1. はじめに

人体は糖・アミノ酸（タンパク）・脂質・核酸など多様な有機質と骨・歯などのミネラルが大部分を占め、主要元素である H, C, N, O, P, Ca と、やや濃度の低い Na, Mg, S, Cl で全体の 99.4% を占める。しかし生命活動の維持はこれらの成分だけでは不可能であり、Fe や Zn をはじめとする多くの微量金属元素が関与する。その中でヒトに必須であることが判明しているのは Fe, Zn, Mn, Cu, Se, I, Mo, Cr, Co の 9 元素であるが、これ以外にも Sr, Pb, Sn, Ni, As, V は動物で必須性が明らかにされている [1]。例えば Zn は Fe に次いで多く生体に含有されている金属元素であり（体重 1g 当たり約 30 μg）、多くの酵素の成分であるため欠乏すると種々の症状が出現する。Zn 欠乏による味覚障害もその一つであり、味覚を感知する味蕾の新陳代謝が滞ることが原因とされる。逆に金属元素の過剰や通常とは異なる経路での体内への取り込みが生体に害をもたらすこともあり、金属アレルギーはその一つである。衣類やアクセサリ、歯科用合金などが皮膚や粘膜に接触し、汗や唾液などの体液に溶出した微量金属がアレルギー症状を引き起こすもので、Ni, Zn, Cr, Pd, Cu, Hg, Sn など多様な元素が体内タンパク質と結合してアレルギーとなっている可能性が報告されている [2]。クロムなめしが施された腕時計のベルトなどによる Cr アレルギーが知られ

ているほか、Zn や Sn は多くの金属材料やそのメッキに使われており、頻繁に接触する元素である。一方、金属元素を薬剤として使用することもあり、抗がん剤の Pt 製剤や躁病治療薬の Li 製剤が知られている。このように金属元素は生命活動の維持に必要なだけでなく、疾患の原因にも治療薬にもなるなど、生体と大きな関わりを持つため、その体内での挙動を調べることは大きな意味を持つ。

歯科治療において多様な金属が用いられるのは周知の通りである。歯は摂食や構音に必須であるだけでなく審美に関わる重要な要素でもあるため、その欠損は生活の質 (QOL) を大きく低下させる。ところが歯は再生能力を有しないため、う蝕や歯周病などで欠損した場合、人工物による補填が必要となる。ヒトの噛む力は極めて強く、体重程度もあり、歯科修復材料にはそれに耐える十分な強度や耐摩耗性、そして生体に害を及ぼさない十分な耐食性が求められ、それを満たす合金がこれまで多く開発されてきた。その種類は、金合金、銀合金（我が国では金銀パラジウム合金が多用される）、歯科用アマルガム（Hg と Ag-Sn-Cu 合金の混合物）、クロム基合金等 10 種類以上に及ぶ。十分な耐食性を備えているはずの歯科用合金であるが、口腔内環境は金属にとって過酷であり、飲食物による温度や pH の変化、噛むことによるフレッティング摩耗など種々の要因で合金成分が溶出し、それが原因と考えられる粘膜疾患

が口腔内にしばしば出現する。我々は金属が原因と疑われる疾患の診断や原因物質の究明、より安全な合金の開発のために、口腔粘膜疾患組織中の微量金属分析やその病態との関連を中心に研究を行っている。

ヒトから採取される試料の殆どは、診断目的に切除（生検）された組織である。採取された病変部組織は薄切/染色され、病理医が顕微鏡観察することで病変の診断を行う。通常の組織標本はパラフィン包埋されたブロック状のものであり、後の追加検査を考慮して長期間保存される。大学病院には多くの疾患の組織標本がストックされているため研究対象として好適であるが、診断を目的に採取された貴重な試料を金属分析のために破損することは許されず、非破壊で分析を行う必要がある。また病態と金属元素分布の相関を知るためには、病理組織像と同じ視野で金属元素分布を得る必要があり、組織像と同じ薄切試料での微量金属分析が求められ、これを満たす方法は放射光蛍光X線分析 (SR-XRF) をおいて他にない。

SR-XRF は期待通り組織標本中の微量金属元素分布を可視化したが、最初に述べたように微量金属は欠乏でも過剰でも病変を引き起こすため、その濃度推定と組織中の正常値との議論が重要となる。しかし薄切試料に含まれる微量元素を定量するための標準試料として確立されたものはない。そこで我々は歯科治療材料として頻用される光重合型アクリル樹脂をフィルム状元素濃度換算試料の作製に応用し、生体組織中の微量金属元素の定量評価を可能にする手法を考案した。本稿ではその作製方法と実際の医学領域への応用例とともに、今後の展望について記述する。

2. 定量評価用濃度換算試料の作製

歯質修復材料であるコンポジットレジンに使用される Bis-GMA (bisphenol A glycidyl-methacrylate, 新中村化学工業) と TEGDMA (triethyleneglycol dimethacrylate, TCI) を重量比 1:2 で混合し、重合開始剤として過酸化ベンゾイル (TCI) 1.5wt%, カンファークノン (Sigma Aldrich) 0.5wt% を添加したものをベースモノマーとした。これに Cr, Fe, Ni, Cu, Zn の acetylacetonate (Table 1) を所定濃度になるよう溶解させた。これらの元素を選択した理由は、後述する生物組織分析においてこれらが頻りに検出されるためである。得られたモノマー溶液をスライドガラス上に 100 μ l 滴下し、スライドガラスで圧接した (Fig. 1A, B)。これを光重合用可視光照射器 (波長 450~470 nm) を用いて片面 40 秒間照射で両面から光重合した後、100°C に加熱して重合を完了させた (C)。硬化したフィルム状試料は注意深

Table 1 Organometallic compounds used for standard specimens.

Element	Compound	Manufacturer
Cr	Tris(2,4-pentanedionato) chromium (III)	Dojindo
Fe	Tris(2,4-pentanedionato) iron (III)	Dojindo
Ni	Tris(2,4-pentanedionato) nickel (II) hydrate	TCI
Cu	Tris(2,4-pentanedionato) copper (II)	Dojindo
Zn	Tris(2,4-pentanedionato) zinc (II) monohydrate	Dojindo

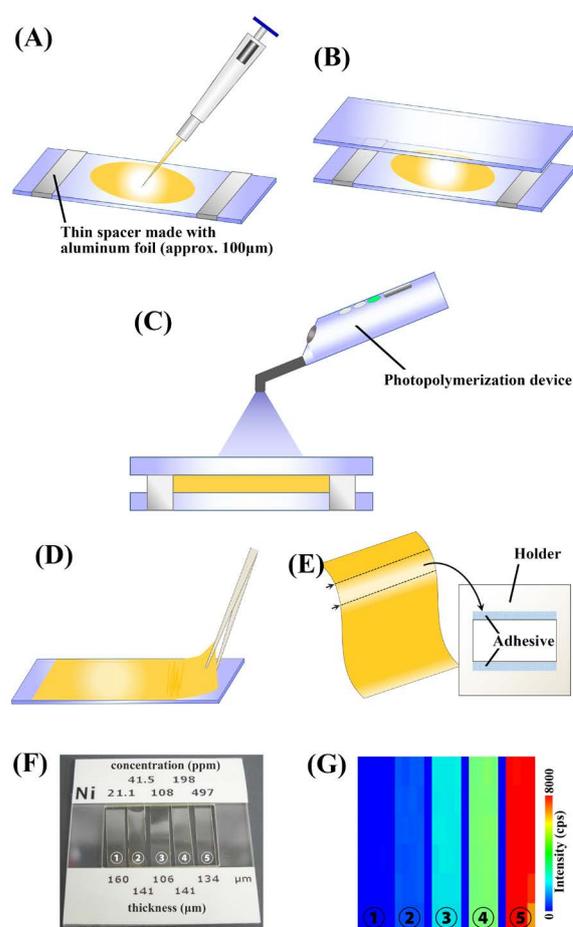


Figure 1 Preparation of the film shaped calibration specimens. (A-E) Preparation method; (F) Appearance of the mounted thin film shaped calibration specimens; (G) Ni distribution image of the Ni calibration specimen obtained by SR-XRF.

く剥離し (D)、厚みをマイクロメーターで 3 点計測し、その平均を各試料の厚みとした。その後、短冊状に切断し専用ホルダーに接着 (E) して SR-XRF 測定に供した。実際の濃度換算試料 (Ni) を Fig. 1F に、SR-XRF による Ni 分布像を Fig. 1G に示す。

この手法により Cr, Fe, Ni, Zn では 500 ppm 以下で直線性の高い検量線が得られた (Fig. 2A)。Cu では acetylacetonate のモノマーへの溶解度が低く最高濃度が 40 ppm と制限されたが、直線性の高い検量線が得られた (Fig. 2B)。Bis-GMA/TEGDMA 混合モノマーは歯科用充填材 (コンポジットレジン) のベースモノマーとして広く用いられており、従って生体に対して安全性が高く、その重合物は湿潤環境下でも十分な耐久性を有するため、繰り返し使用・長期保存に十分耐えうる。加えて小型で安価な青色光照射器で重合可能なため、短時間で成形できる。本研究では金属 acetylacetonate を金属源として用いたが、モノマーに可溶であれば化合物はこれらに限定されず、多様な元素、濃度の濃度換算試料に応用が可能であり、生物標本の定量評価における濃度換算試料として極めて有用であると考えられた。以下に実際の組織標本中の金属元素の濃度推定への応用例を示す。

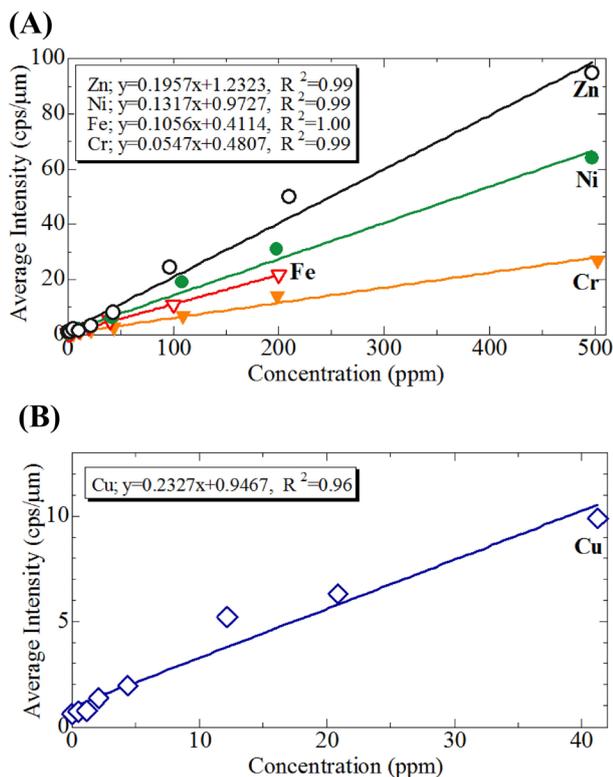


Figure 2 Calibration curves of the film shaped concentration calibration specimens for Zn, Ni, Fe, and Cr (A) and for Cu (B).

3. 応用例 1 - 口腔粘膜疾患組織中の歯科用合金成分の検出 -
 口腔扁平苔癬 (Oral lichen planus; OLP) と口腔扁平苔癬
 様疾患 (Oral lichenoid lesion; OLL) は口腔外科領域でしば
 しば遭遇する疾患である。両者ともに粘膜の角質層が厚く

なり (過角化), 時に灼熱感や疼痛を伴う難治性の慢性炎症性疾患である (Fig. 3A, B)。OLP は原因不明であるのに対し, OLL は薬剤, 金属修復物など原因がある程度推測可能なものとして定義されている。しかし, とりわけ口腔内の装着金属近傍に出現する OLL (以下, Oral lichenoid contact lesion; OLCL) と OLP は極めて似た病態を呈し, 熟練者でも鑑別が困難であるため, 原因を除去するという根本的な治療を提供することができず, ステロイドを用いた対症療法がなされているのが現状である。OLP, OLCL の一部は癌化すると報告もあり, 新たな鑑別法の確立が臨床現場では強く望まれている。もし, 病態形成に関与している金属修復物を確定できれば, OLCL の確定診断と原因金属除去という根治療法が可能となり, 潜在的癌化リスクの低減にもつながる。そこで我々は病理・臨床所見から OLP, OLCL と診断された組織と病理組織学的に正常な組織 (Control) に対して SR-XRF 分析と XAFS 分析を併用して, 粘膜組織中に蓄積した歯科用合金由来と疑われる微量金属元素の分布と化学状態を推定し, その由来を明らかにするとともに, 微小部粒子線誘起 X 線分析 (Micro-focused Particle Induced X-ray Emission; μ -PIXE) を用いて高分解能の元素分布測定を合わせて行い, 病理組織像と対比することで組織中の微量金属の動態を評価した [3, 4]。

Fig. 3 は金属に隣接した疾患であるという理由で OLCL と診断された症例 (#7) の結果である。病理組織学的には, 上皮が厚く (過角化), 鋸歯状に変形し, 炎症性細胞が浸潤するという OLP, OLL 双方に共通の特徴が認められる (Fig. 3B)。SR-XRF では, Zn, Cu の局在を確認し (Fig. 3C), この局在領域の PIXE 分析では Ag の集積が確認された (Fig. 3D)。これらは歯科用の銀合金の主要成分であ

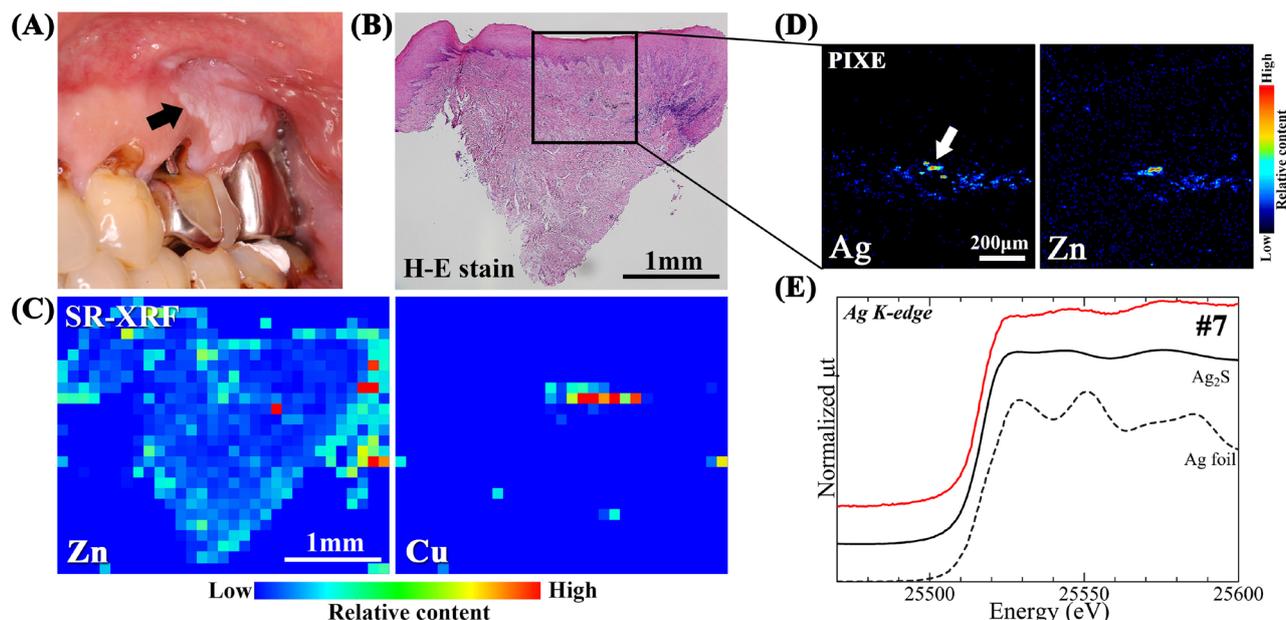


Figure 3 (A) Appearance of typical OLCL lesion; (B) Cross sectional histopathological image of the lesion; (C) SR-XRF elemental distribution images of same lesion of (B); (D) Detailed elemental distribution images using μ -PIXE of brack square lesion in (B); (E) Ag K-edge XANES spectrum at Ag localized spot indicated by white arrow.

Table 2 Estimated concentration (ppm) of Cr, Ni, Cu, and Zn in control, OLP, and OLCL. Specimen Nos. are correspond to the previous report [3].

No.	Diagnosis		Ni		Cu		Zn		Cr	
			counts (cps)	ppm	counts (cps)	ppm	counts (cps)	ppm	counts (cps)	ppm
#C2	Control	Max	35	34	72	37	636	420	26	50
		Average	11±3	10±3	29±6	15±3	107±64	70±42	10±3	19±6
#2	OLP	Max	49	240	88	380	1253	>>1000	36	350
		Average	19±3	91±13	75±4	200±11	256±68	840±220	18±2	170±19
#12	OLCL	Max	2082	>>1000	3160	>>1000	13783	>>1000	3922	>>1000
		Average	18±3	89±14	72±63	190±160	235±46	770±150	20±58	190±550
Concentration of healthy mucosa (ppm) [5]			7.86±21.23		18.93±26.34		66.19±30.41		4.65±6.85	

ることから、本病変への金属修復物の関与が疑われた。但し、歯科治療では口腔内で金属を切削するため銀合金削片の粘膜への貫入の疑いもあり、XAFSによりその化学状態を評価した。組織中 Ag は Ag₂S に酷似したスペクトルを示し、金属削片ではなく銀合金から溶出し硫化物として集積したものと推定された (Fig. 3E)。これらの結果から本症例は金属に起因する疾患である OLCL と確定され、口腔粘膜疾患から歯科用合金の溶出を示唆する元素集積を明らかにした初の例となった。Ag は生体に含まれないため、検出されただけで外来物由来と断定できるが、Cu や Zn など必須微量元素では組織中濃度を推定し正常値から逸脱していることを確定する必要があり、前述の濃度換算試料を応用した。

Table 2 に正常組織 (Control), OLP, OLCL における検出元素 (Ni, Cu, Zn, Cr) の最集積部および測定領域全域平均の蛍光 X 線カウントと Fig. 2 の検量線を用いた濃度推定値の例を示す。Control 試料の組織中平均元素濃度は正常粘膜組織における元素濃度の報告値 [5] と近似した値であり、上記の濃度換算試料の正当性が確認された。OLCL での各元素濃度は Control に比べて極めて高く、検量線の範囲外であり、これら 4 元素の異常蓄積が明らかになった。OLP でも元素濃度は高いものの OLCL に比べると 1-2 桁低く、OLCL 組織中でのこれらの元素は生体由来ではなく、歯科用合金に由来する可能性が極めて高いと考えられた。前述のように OLP, OLCL の鑑別はこれまで困難であったが、SR-XRF, XAFS, μ -PIXE のマルチプローブ併用による解析で歯科用合金の関与が明らかになり、その濃度を基準とした OLCL の鑑別診断・原因物質特定とその除去による根治に道が開けたものと考えている [3]。

4. 応用例 2- ナノ物質を用いた新規金属アレルギーパッチテスト素材の開発と評価 -

金属アレルギーの診断では種々の高濃度金属塩水溶液を含むシートを皮膚に貼付し、その局所反応からアレルゲンを判定する皮膚パッチテストを行う (Fig. 4A)。しかしこの方法では数 w/v% という極端に高濃度の金属イオンとの接触や、溶液の強酸性、カウンターイオンの影響などによ

る偽反応 (正しくはアレルギー陰性であるにも関わらず、前述の影響で皮膚が発赤し陽性と誤判定される) が出現し、その判定精度は決して高くないため、信頼性の高い判定法が求められている [6]。実際の金属アレルギーは汗や唾液などの中性~弱酸性下で、金属製品から低濃度で持続的に溶出した金属イオンにより発症するため、これを正確に模擬するシステムが理想的である。そこで、我々は金属ナノ粒子 (以下、ナノボール) を用いて、実際の金属アレルギー発症の機序をより正確に再現する新たな金属アレルギーパッチテスト素材を開発した (Fig. 4B) [7]。Ni ナノボールを分散した弱酸性溶液を透析膜を介して皮膚に接触させることで、Ni イオンを持続的に溶出させ、かつその他のイオンを含まず pH も皮膚刺激のない弱酸性に保たれるため、現行のパッチテストよりはるかに実際のアレルギー発症機序に近い。

マウスを用いた動物実験により両パッチテストの皮膚への Ni 浸透挙動を SR-XRF により調べた結果が Fig. 4C, D である。現行のパッチテストを貼付した皮膚断面 (Fig. 4C) では著しく Ni が局在した部位が認められ、最大 Ni 濃度は約 3000 ppm と推定され、同部位の病理組織像で認められる皮膚の剥離は極端に高い Ni 濃度のためと考えられた。対して新規に開発したパッチテスト (Fig. 4D) では、皮膚表層から内部への連続的な Ni 浸透が認められ、最高濃度も約 250 ppm に抑えられており、実際の金属アレルギーの発症機序をよりよく再現していると考えられた。また、本方法はこれまで検討されていない現行のパッチテストにおける金属イオンの皮膚内への浸透挙動の評価・精度改善にも応用可能である [8]。

5. 医学応用における今後の展望

上記のように、XRF, XAFS, μ -PIXE のマルチプローブによる生体組織中の微量金属元素の分析は、病変の原因物質の特定や、診断用マーカーとして活用できるだけでなく、新たな診断キットの開発にも応用が可能である。最初に述べたように生命活動と微量金属元素は密接な関係にあり、今後はさらに様々な病態生理学解明への応用が期待される。しかしながら、分析を重ねるにつれて BL-4A で

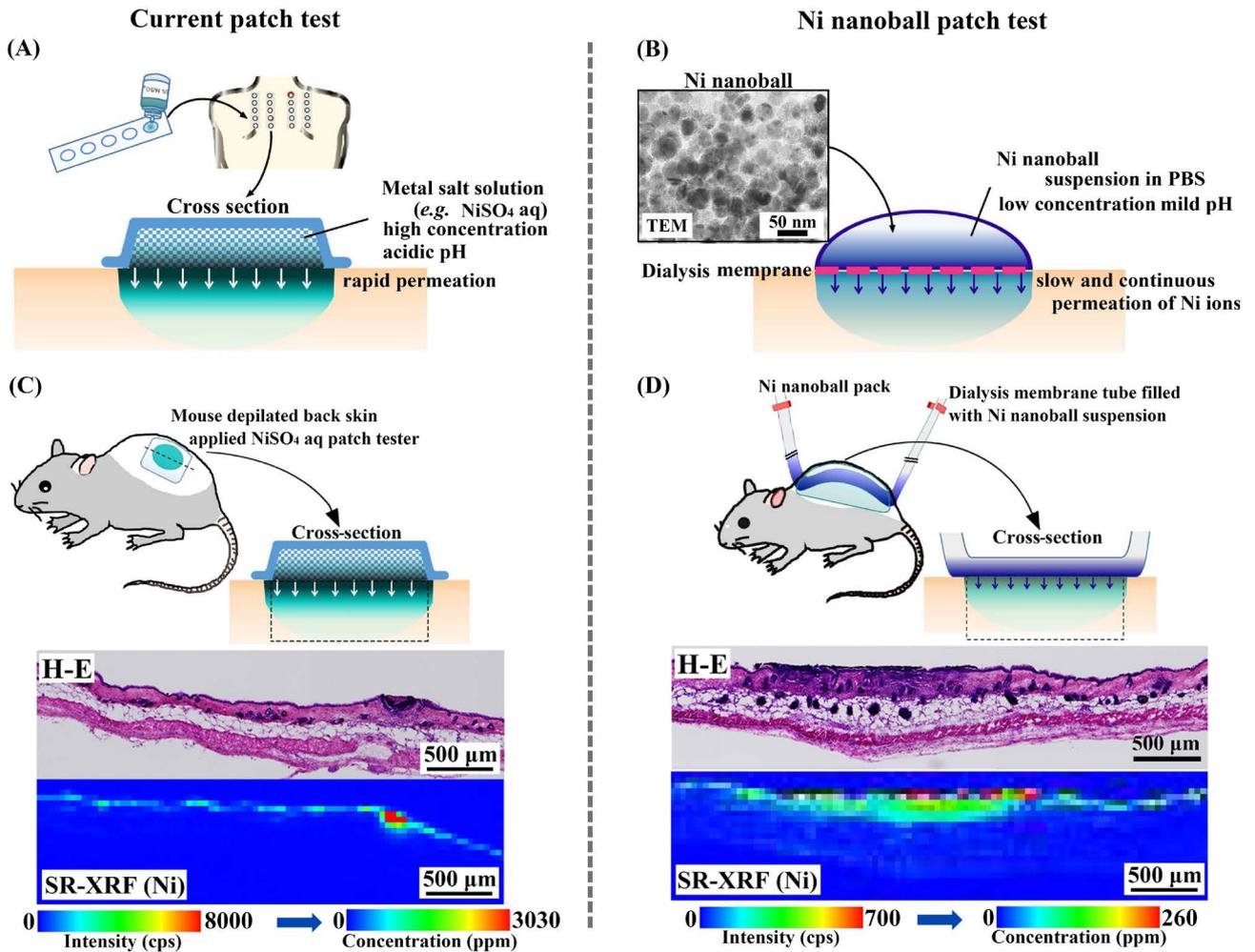


Figure 4 (A) Schematic representation of the current metal allergy patch test; (B) Novel patch test using Ni nanoballs. Histopathological image and Ni distribution image of current patch test (C) and novel patch test using Ni nanoballs (D).

は分析困難な例に遭遇している。一つは Ti など比較的軽い元素が微量含まれる場合、高次光除去ミラーを持たない 4A では detune によるしかなく微量元素の XAFS 測定に不利であること、もう一つは対象物が結晶性と推測され、XAFS と XRD の併用で、より確かな同定が可能である場合である。これらの問題は高次光除去ミラーを備え、回折も同時測定可能な BL-15A1 を用いることにより解決が可能と考えられる。組織標本には外来性異物や結晶性の析出物の疑いが濃厚な介在物も多く、また骨や歯のように結晶化した硬組織分析への応用も考えると、微小部 XRD の併用はより豊富な情報を提供できると期待される。

放射光をはじめとする量子ビームを用いた病変組織の解明は始まったばかりであるが、上記の応用例以外にも肺疾患 [9, 10] や歯科用インプラント周囲組織 [11] などでも興味深い結果が得られており、今後、多様な病態の分析や新たな診断方法確立への積極的な応用に期待が高まる。

6. 測定条件

SR-XRF: PF BL-4A のポリキャピラリー集光 (半値幅 約 30 μm) のセミマイクロビームを用いた。試料を二次元スキャンしつつ、各点の XRF を SDD (Vortex-EX, セイコー EG&G) で計測し、元素分布像と元素濃度換算用の検量線を作成した。データ処理は PyMCA (Version 4.7.3.; ESRF) により行った。スキャン間隔は濃度換算用試料で 1 mm, 組織標本で 100 μm (広域) および 40 μm (拡大像) とした。各点での計測時間は濃度換算用試料で 1 秒, 組織標本では元素濃度に応じて 1~5 秒とした。

XAFS: BL-4A および NW-10A (Ag, Sn のみ) で各元素濃縮部において K 端 XANES スペクトルを蛍光法により計測し、標準物質との比較から対象元素の状態を推定した。

μ -PIXE: 放射線医学総合研究所のタンデム加速器において行った。イオン種は 3.0 MeV, $^1\text{H}^+$, 積算電荷量 200 nC, ビームサイズ約 2 $\mu\text{m}\phi$ で、500 μm 角の領域をスキャンしつつ Si(Li) と CdTe 検出器で特性 X 線を計測し、解析ソフトウェア OMDAQ2007 (Version 1.3.71.669, Oxford microbeams, USA) を用いて特性 X 線スペクトルおよび元素分布像を得た。

参考文献

- [1] 桜井 弘・田中英彦 編, 生体微量元素, 1-14 (廣川書店, 1994) .
- [2] M. Hosoki, E. Bando, K. Asaoka, H. Takeuchi, K. Nishigawa, *Bio-Med. Mater. Eng.* **19**, 53 (2009).
- [3] T. Sugiyama, M. Uo, T. Wada, D. Omagari, K. Komiyama, S. Miyazaki, C. Numako, T. Noguchi, Y. Jinbu, M. Kusama, Y. Mori, *Sci. Rep.* **5**:10672 (2015).
- [4] T. Sugiyama, M. Uo, T. Wada, D. Omagari, K. Komiyama, T. Noguchi, Y. Jinbu, M. Kusama, *Biometals* **28**, 11 (2015).
- [5] S. Ishibashi, Y. Sugiyama, M. Nakamura, S. Sekiyama, *Dent. J. Iwate Med. Univ.* **28**, 76 (2003).
- [6] 松永佳世子, *総合臨床* **52**, 534 (2003).
- [7] T. Sugiyama, M. Uo, T. Wada, T. Hongo, D. Omagari, K. Komiyama, H. Sasaki, H. Takahashi, M. Kusama, Y. Mori, *J. Nanobiotechnology* **12**:51 (2014),
- [8] T. Sugiyama, M. Uo, T. Wada, T. Hongo, D. Omagari, K. Komiyama, M. Oikawa, M. Kusama, Y. Mori, *Bio-Med. Mater. Eng.* in press.
- [9] 宇尾基弘, 和田敬広, 杉山知子, 中野郁夫, 木村清延, 谷口菜津子, 猪又崇志, 今野 哲, 西村正治, *X線分析の進歩* **46**, 177 (2015).
- [10] M. Uo, K. Asakura, K. Watanabe, F. Watari, *Chem. Lett.* **39**, 852 (2010).
- [11] M. Uo, K. Asakura, A. Yokoyama, M. Ishikawa, K. Tamura, Y. Totsuka, T. Akasaka, F. Watari, *Dent. Mater. J.* **26**, 268 (2007).

(原稿受付日: 2015年6月29日)

著者紹介

杉山知子 Tomoko SUGIYAMA



自治医科大学 医学部
歯科口腔外科学講座 博士課程4年
〒329-0498
栃木県下野市薬師寺3311-1
TEL: 0285-58-7390
e-mail: tomoko_s@jjichi.ac.jp
略歴: 2008年北海道大学歯学部卒業。2012年自治医科大学医学部歯科口腔外科学講座大学院博士課程入学。日本学術振興会特別研究員(DC2)。
趣味: ミュージカル鑑賞, 打楽器を叩くこと。

和田敬広 Takahiro WADA



東京医科歯科大学 医歯学総合研究科
先端材料評価学分野 助教
〒113-8549
東京都文京区湯島1-5-45
TEL: 03-5803-5467
e-mail: wada.abm@tmd.ac.jp
略歴: 2012年北海道大学工学研究科博士課程修了。博士(工学)。

2012年東京医科歯科大学助教。2015年北海道大学触媒化学研究センター共同研究フェロー。

最近の研究: 放射光を用いた実生体材料, デバイスの空間分解分析。

趣味: 映画鑑賞, 散歩, 展示会見学。

宇尾基弘 Motohiro UO



東京医科歯科大学
先端材料評価学分野 教授
〒113-8549
東京都文京区湯島1-5-45
TEL: 03-5803-5467
e-mail: uo.abm@tmd.ac.jp
略歴: 1992年東京大学大学院工学系研究科修了。博士(工学)。東京

大学工学部助手, 北海道大学歯学部助手・准教授を経て2011年より現職。2014年より東京大学マテリアル工学専攻教授(併任)。

最近の研究: 放射光を用いた生体内微量元素・微小異物の検出と分布・状態分析。

趣味: 車(の運転)と飛行機(に乗ること)。