

C-2 酸性・汚染物質の環境-生命系に与える影響に関する研究

(1) 酸性汚染物質の環境中動態に関する研究

②酸性汚染物質の生体内蓄積及び代謝阻害機構に関する研究

経済産業省 物質工学工業技術研究所

計測化学部 生体微量分析グループ 高津 章子、内海 昭

計測化学部 部長 岡本 研作

平成11~12年度合計予算額 6,000千円

(うち、平成12年度予算額 3,000千円)

[要旨] 環境の酸性化は土壌中のアルミニウムの溶出をもたらし、これらのアルミニウムの生態系に与える影響が問題とされている。本研究では環境の酸性化に伴って溶出するアルミニウムと生物との関係を明らかにするために、火山性酸性湖である宇曽利湖及び猪苗代湖のウグイ試料を用いて酸性環境に生息する生物体内アルミニウム含有量とその蓄積形態について検討を行った。特に、これまでの研究で酸性環境である宇曽利湖および猪苗代湖に生息しているウグイの各臓器のアルミニウム濃度はどちらも酸性ではない天竜川のウグイに比べて高濃度であり、特にエラ中のアルミニウム濃度が高いことを明らかにしたが、今回、さらに組織内でのアルミニウムの蓄積形態等についての検討を行うため、アルミニウムの蛍光プローブ剤を用いて、ウグイ各臓器中アルミニウムの組織内での局在を明らかにする計測方法について種々の検討を行った。その結果、アルミニウム濃度の高かった宇曽利湖および猪苗代湖のウグイのエラについて、アルミニウムの蓄積を視覚的に観察することが可能になった。また、宇曽利湖と猪苗代湖のウグイのエラでは、アルミニウム濃度でみると値はほぼ等しかったのに対し、蛍光像では猪苗代湖のウグイのエラでは局所的に強い蛍光が見られアルミニウムが局在していると考えられたのに対し、宇曽利湖のウグイのエラでは猪苗代湖と同様な局在と共に全体的に明るい蛍光像が得られ、局在のありようがやや異なると考えられた。

[キーワード]

酸性環境、湖、アルミニウム、ウグイ、組織内分布計測

1. はじめに

酸性降下物による環境の酸性化は土壌中の金属元素の溶出をもたらし、これらの金属元素による生体系汚染ならびに代謝阻害が懸念されている。特に、土壌の主成分であるアルミニウムはその生体に対する毒性から酸性雨による溶出の影響が問題とされているが¹⁻³⁾、生体への取り込み等詳細については不明であり、酸性環境で溶出するアルミニウムの生体内への取り込みや蓄積経路等

を明らかにしていくことが必要とされている。

2. 研究目的

本研究では特に動物種とアルミニウムの関係に注目し、酸性環境に生息する動物組織中でのアルミニウムの存在量や存在形態を明らかにすることを目的として実験を行った。動物としては日本の火山性酸性湖⁴⁾に生息しているウグイを試料とした。具体的には、青森県宇曾利湖および福島県猪苗代湖の2つの異なる酸性湖のウグイ体内のアルミニウムを測定し、魚体内アルミニウムの環境の違いによる差異について考察することを目的に研究を行った。これまでの研究で酸性環境である宇曾利湖および猪苗代湖に生息しているウグイの各臓器のアルミニウム濃度はどちらも酸性ではない天竜川のウグイに比べて高濃度であり、特にエラ中のアルミニウム濃度が高いことを明らかにした。そこで、アルミニウムの蛍光プローブ剤であるルモガリオンを用いて、酸性環境で生育しているウグイ各臓器、特にアルミニウムが高濃度であったエラ中アルミニウムの組織内での局在部位の計測について検討を行った。

3. 研究方法

(1) 試料の採取および観察試料の作製

火山性酸性湖である青森県宇曾利湖および福島県猪苗代湖に生息しているウグイは、初夏に中性河川に産卵のためのぼってくるもの⁵⁾を捕獲した。比較のため、酸性ではない天竜川のウグイを入手し、同様に処理した。それぞれの場所で捕獲したウグイは中性ホルマリンで固定し、各臓器をとりだし、パラフィンに包埋した後、10 μ m程度に薄切した。

(2) 器具、試薬類

実験に用いたガラス器具類やサンプリングに用いた容器類は少なくとも一昼夜以上希硝酸に浸し、超純水（オルガノ製 PURIC Model-S）で洗浄して用いた。ルモガリオンは同仁化学研究所製のものを用いた。

(3) ルモガリオンを用いたアルミニウムの局在部位の計測

作製した切片は通常の組織染色法と同様に脱パラフィンした後、ルモガリオン染色⁶⁾を行った。染色条件を確立するため、条件（試薬濃度、反応温度、反応時間、マスク剤など）を変えて染色を行い、得られた蛍光像を比較した。種々の検討の結果、すでに報告したラットの臓器に用いた条件⁶⁾よりもpHを下げ、ルモガリオン濃度を高くして、コントラストの良い蛍光像が得られるようにした。最終的な染色条件は、マスク剤処理としてアルコールで還元処理をした後、ルモガリオン濃度10⁻⁴M、pH 3.5、液温70℃、反応時間1時間とした。観察にはアルゴンイオンレーザーを光源とする共焦点レーザー顕微鏡を用い、励起波長488nm、観察波長580nm（バンドパスフィルター）とし、蛍光像をCCDカメラで撮影した。

(4) アルミニウム検出試薬を用いたアルミニウムの局在部位の計測

比較のため、いくつかの市販のアルミニウムの検出試薬を用いた組織染色法を検討した。今回、測定に用いたのはアルミノン、モリン、クロマズロールS、クロマズロールBである。これらの

染色条件および観察条件は表1の通りである。このうち、アルミノンやクロマズロールBは骨組織中アルミニウムの検出試薬として多くの報告がある⁷⁻¹³⁾。

表1 各種アルミニウム検出試薬による組織内アルミニウムの検出条件

試薬	pH	液温	染色時間	観察条件
アルミノン	5.5	60℃	10 min	透過
モリン	5.0	室温	1 hr	蛍光(Ex430nm Em500nm)
クロマズロールS	5.5	室温	1 hr	透過
クロマズロールB	5.5	室温	1 hr	透過

(5) 新規アルミニウム染色試薬の合成

アルミニウムは一般的にキレート反応の速度が比較的遅く、水溶液中での反応では多くの場合加温を必要とする。しかし、シッフベース骨格を有するキレート試薬は、室温で反応する事が確かめられた。そこで、シッフベース骨格を有するルモガリオン類似体を合成し、室温での染色を試みた。

4. 結果・考察

(1) ルモガリオンを用いたアルミニウムの局在部位の計測法

これまでの研究で、酸性湖では湖水中のアルミニウム濃度が高く、また、生息しているウグイについても表2に示したとおり臓器中アルミニウム濃度が高いことが明らかになった。特にエラについては濃度が明らかに高かった。そこで、エラを中心とした各臓器について局在部位の計測を検討した。

表2 宇曽利湖、猪苗代湖、天竜川の湖水および魚臓器中アルミニウム濃度

Organs /Location	宇曽利湖	猪苗代湖	天竜川
魚臓器中アルミニウム濃度 ($\mu\text{g g}^{-1}$; wet weight)			
エラ	42±23	37±22	1.6±0.7
筋肉	4.2±2.6	5.0±3.0	1.1±0.2
骨	6.9±2.7	19.5±2.2	2.5±1.1
肝臓	12.7±5.8	18.3±8.7	5.8±3.1
腎臓	6.0±1.5	7.2±4.0	3.0±1.2
腸	6.0±1.2	6.3±3.3	0.5±1.0
湖水 (代表地点)			
アルミニウム濃度 (mg L^{-1})	0.6	0.18	0.02
pH	3.6	5.2	7.7

組織の染色は以下の手順で行った。スライドガラス上の薄切された組織切片は、脱パラフィンを行った後、ルモガリオン溶液に浸し、適当な反応条件で反応させた。

魚組織中でのルモガリオンとアルミニウムの反応条件については試薬濃度、反応温度、反応時間、マスキングの効果等について検討を行った。反応温度は重要で60℃では十分に反応しないと考えられ、明るいスポットが少ない蛍光像が得られ、70℃まで加温する必要があることが明らかになった。これは主にアルミニウムキレートの反応性の問題である。また、反応時のpHは溶液中での反応ではpH4.0から6.0位の間で最大になるが、組織ではpHは低い方が染色性がよく、溶液での最適条件よりやや低めの方が蛍光像としてはわかりやすかった。また、染色液の塩濃度も染色性に影響を与えることが明らかになった。バッファーの種類についても酢酸ナトリウムや酢酸アンモニウムについて検討したが顕著な差異は認められなかった。染色液のルモガリオン濃度は薄いとよく染色されず、バックグラウンドが明るい像が、濃いと全体的に暗い蛍光像が得られた。全体的に暗い蛍光像の方が、局在部位を確認するには好都合であった。

また、溶液中でのアルミニウムルモガリオン蛍光法では Fe^{3+} 、 Cu^{2+} などが妨害するため、これらの影響をのぞくためのマスキング処理を行う¹⁴⁾。組織での反応についても、アスコルビン酸やチオ硫酸ナトリウムによる還元、EDTAやメチルオキシシン等のキレート剤によるマスキングなど種々の方法を検討した。具体的には、染色溶液に浸す前に、マスキング溶液に浸して反応させた。その結果、マスキング処理をすると得られる蛍光像にかなり違いが生じたが、還元処理が効果としてはわかりやすかった。以上のような検討の結果、ルモガリオン染色条件としてマスキング処理としてアスコルビン酸水溶液で3時間還元処理をした後、ルモガリオン濃度 $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 、pH 3.5、液温70℃、反応時間1時間で染色することにした。

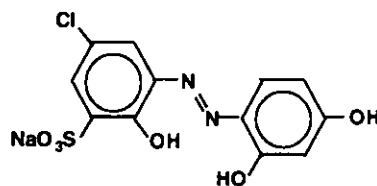


図1 ルモガリオンの構造式

(2) 他のアルミニウム検出試薬を用いた組織染色法

猪苗代湖のエラ試料については、アルミノンとクロマズロールSで染色したものはルモガリオン染色と似たような像が得られた(図2)。ただし、ルモガリオンは蛍光試薬であるため、感度、バックグラウンドとの識別については有利であると考えられる。また、モリン、クロマズロールBについては、バックグラウンドとの識別が困難であった。

ルモガリオンはpH3.5以上でアルミニウムイオンと反応して蛍光錯体を生成するが、①試薬自身は蛍光を発しないので干渉しない、②試薬とアルミニウムとの組成比が1:1で、かつ安定度の高い錯体を生成する、③蛍光強度が高く高感度である、④励起波長が500nmと比較的長波長である、⑤励起波長がアルゴンレーザーの波長付近であるため、レーザーを励起源とすることでさらに高感度化が期待できる、などきわめて優れた特徴を有する。また、アルミニウムと同様の蛍光のあるキレートを生成するのは、ガリウム、インジウムなどのみであり、鉄や銅とも錯体は生成するが蛍光は発しないため、生体内で蛍光を発するのはアルミニウムにほぼ限られる。

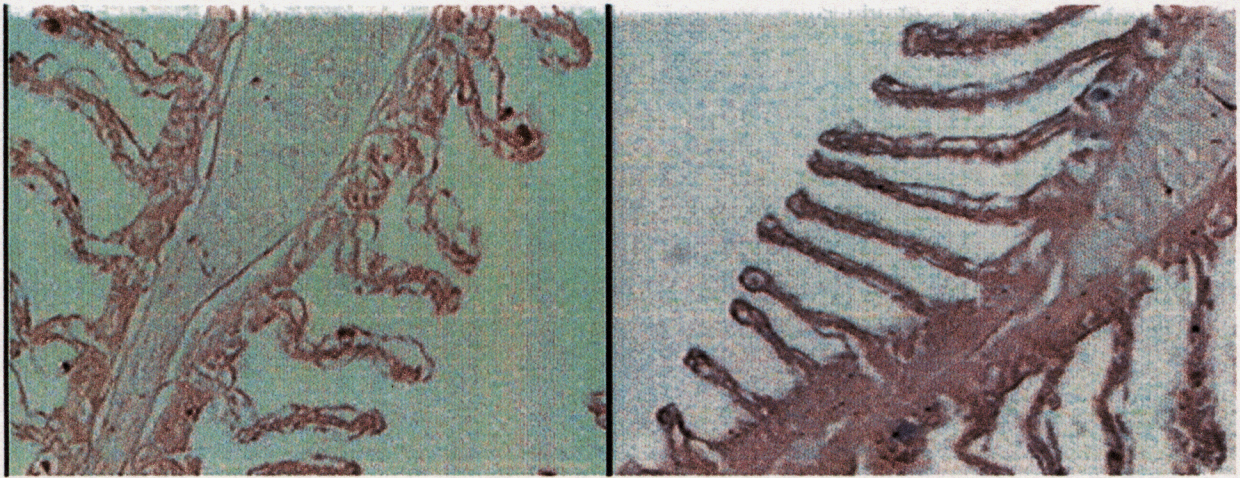


図2 アルミノンおよびクロマズロールSによる猪苗代湖エラ試料の染色像

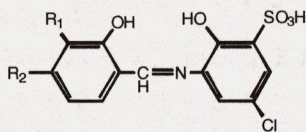
(3) 新規染色試薬の合成

ルモガリオン染色法では70℃で反応させることがどうしても必要であり、エラのような微細な組織では反応時に組織が壊れてしまう等の問題があり、局在部位を正確に同定することが困難であった。そこで、温度をかけなくてもアルミニウムキレートを生成する骨格を持つキレート試薬を合成し、染色剤としての応用を試みた。

ルモガリオンはN=N結合を持つアゾ化合物であるが、このNをCHに置き換えたシッフベースは水溶液中では常温でアルミニウム錯体を生成する。そこでルモガリオンのアゾ基をシッフベースで置き換えたルモガリオン誘導体を合成し、染色に用いることにした。置換基を導入し、感度のよいキレートを生成する試薬をまず探索した。それらの構造およびそのアルミニウムキレートの最適蛍光条件(pH, 温度)および蛍光強度を表3に示した。

この表からいずれの化合物もアルミニウムと室温で約20分ほどで容易にキレートを生成し、蛍光強度の比較では、p位に電子供与基のメトキシル基(Ⅲ)及びヒドロキシル基(Ⅳ)を導入した化合物がその強度が高いことがわかった。

表3 各種置換基を導入したルモガリオン誘導体とアルミニウムキレートの最適蛍光条件



No.	R ₁	R ₂	λ _{ex} (nm)	λ _{em} (nm)	pH	Standing Time	Intensity*
I	H	H	420	510	4.36	25min 22℃	130
Ⅱ	-OCH ₃	H	470	525	4.35	15min 22℃	13
Ⅲ	H	-OCH ₃	420	508	4.35	15min 22℃	340
Ⅳ	H	-OH	420	508	4.35	15min 22℃	320

*)Net intensity per 1 μg metal

そこで上記のⅢおよびⅣの化合物を用いて組織染色を行った。しかし、組織の染色に用いた場合、励起波長が420nm付近とルモガリオン（500nm付近）と比べると短波長であり、組織からのバックグラウンドが高く、組織全体が明るく光る像が得られ、アルミニウムの局在を明らかにできる蛍光像は得られなかった。

（４）ウグイエラの蛍光像

宇曾利湖および猪苗代湖並びに中性の天竜川のウグイのエラのルモガリオン染色法による蛍光顕微鏡写真を図3に示した。明るい点がアルミニウムの蓄積部位と考えられる。これらを比較すると猪苗代湖のウグイのエラでは非常に明るい点が二次鰓弁や二次鰓弁基部にまばらに点在している像が得られ、アルミニウムが局在していると考えられた。宇曾利湖のウグイのエラでは局在して存在する点も認められるが、同時に二次鰓弁基部については全体的にも明るい蛍光像が得られ、蓄積形態にやや違いがあると推察された。なお、天竜川のウグイではこのような明るいスポットは全く検出されなかった。

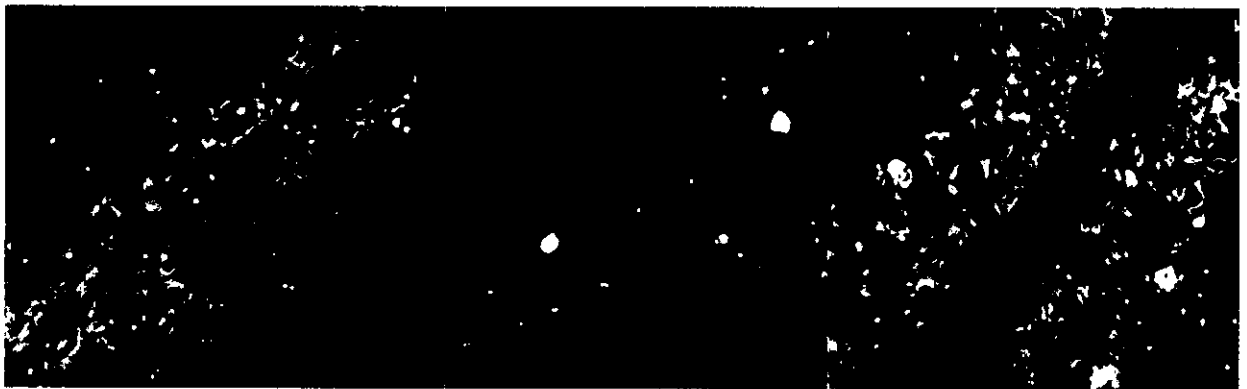


図3 ルモガリオン染色法によるウグイのエラの蛍光顕微鏡写真
（左：宇曾利湖ウグイ、中：猪苗代湖ウグイ、右：天竜川ウグイ）

このように、ルモガリオン染色法を用いて天竜川のウグイと酸性環境で生息しているウグイというアルミニウムの濃度の違うエラを実際に分布像の違いとして視覚的に観察することができた。また、これまでの実験結果から二つの湖のウグイのエラ中アルミニウムは、エラ中濃度で比較すると表2より宇曾利湖のウグイで $4.2 \pm 2.3 \mu\text{g g}^{-1}$ 、猪苗代湖のウグイで $3.7 \pm 2.2 \mu\text{g g}^{-1}$ であり、違いは明らかではなかった。しかし、宇曾利湖と猪苗代湖ではこれまでの研究で湖水のpH、アルミニウムの濃度や存在形態は全く異なっていることが明らかになっている。また、アルミニウムの存在状態の違いは一般に生体への影響にも違いがあるとされている¹⁶⁾。すなわち、この蛍光像の違いは、こうした環境の差異によるウグイの組織中アルミニウムの存在形態の違い、あるいはそれぞれの環境に適応するためのエラそのものの違いを示すものと考えられる。このことはただ単に臓器中の濃度をはかるだけではその差違は明らかにはならず、このような分布計測の有効性を示す興味深い結果といえる。また、なぜアルミニウムが塊状に蓄積しているのか、またそれはどのような意味を持つのかは今後の検討していく必要がある。

これまでに特にアルミニウムの高い環境で飼育した魚について、エラについての変化が報告さ

れている¹⁶⁻²¹⁾。エラの変化としては塩類細胞の増加があげられるほか、粘液の分泌増加や病理学的なエラ上皮の壊死が観察されるとの報告がある。また、エラ中のアルミニウムの分布をエラは薄い上皮で広い面積にわたって水と接しており、アルミニウムの毒性についても最初に影響を受ける器官として、これまでも多くの研究が行われており、アルミニウムの蓄積も報告されている。エラ中アルミニウムの分布についても、電子顕微鏡²¹⁾、組織染色法¹⁹⁾やPIXI法²⁰⁾などで調べられており、種々の仮説がたてられている。これらの報告では、いずれも高濃度のアルミニウムにさらされた魚のエラには異常がみつかったとされているのに対し、宇曾利湖のウグイは独自の耐酸性機構を持ち酸性湖に適応していることが知られており²²⁾、また、猪苗代湖のウグイについても健康に生息していると考えられている。

肝臓などその他の臓器に関しても同様の計測を試みたが、中性環境に生息している魚試料との間で大きな違いは観察されなかった。これは、表2からわかる通り、アルミニウム濃度がエラに比較すると低いことや、組織中のアルミニウムの局在の有無・存在形態、組織の他の成分等が影響しているものと考えられる。

5. 本研究により得られた成果

組織を破壊することなく、アルミニウムの生物組織内での局在部位を明らかにできる方法を確立した。この方法を用いて酸性湖に生息している魚（ウグイ）エラ中のアルミニウムの局在を計測したところ、アルミニウムの局在を視覚的にとらえることができると同時に、アルミニウム濃度がほぼ等しくても、生息環境によってアルミニウムの局在の仕方が同様な部分と異なる部分があることを明らかにすることができた。すなわち、酸性環境といっても、そのpHやアルミニウム濃度・存在形態などによって生物組織に取り込まれるアルミニウムについても濃度だけでなく、その分布についても差異があることが明らかになった。

アルミニウムの生物影響については、アルミニウム濃度の高い水で飼育した魚に関する実験の報告も多いが、自然界においてアルミニウムに曝されている魚を用いた一連の研究からは、アルミニウムの影響の複雑さと同時に、生物の適応能力の高さを学ぶことができる。これらの適応能力には自然界の他の要因もからんでいることも推察され、アルミニウムの生物への影響、特に自然界における影響評価に関しては、様々な要因についての解析等、種々の方向からのさらなる検討が必要であろう。

6. 引用文献

- 1) J. P. Baker, and C. L. Schofield, *Water, Air, and Soil Pollut.* 18, 289 (1982).
- 2) C. S. Cronan, and C. L. Schofield, *Science* 204, 304 (1979).
- 3) C. T. Driscoll, Jr., J. P. Baker, J. J. Bisogni, Jr., and C. L. Schofield, *Nature* 284, 161 (1980).
- 4) K. Satake, *Ikiru* 11, 54 (1994).
- 5) K. Satake, A. Oyagi and Y. Iwao, *Water, Air and Soil Pollut.* 85, 511 (1995).
- 6) A. Uchiumi, A. Takatsu and Y. Teraki, *Analyst* 123, 759 (1998).
- 7) 鷺見和, 組織内微量金属の染色, 月刊メディカルテクノロジー別冊 新染色法のすべて 125

-129 (1999).

- 8) M. R. C. Buchanan, B.U. Ihle, and C. M. Dunn, *J. Clin. Pathol.* 34, 1352-1354 (1981).
- 9) N. A. Maloney, S.M. Ott, A. C. Alfrey, N.L. Miller, J. W. Coburn, and D. J. Sherrard, *J. Lab. Clin. Med.* 99, 206-216 (1982).
- 10) Y. Ohtsuki, T. Yamaguchi, H. Sonobe, K. Takahashi, K. Hayashi, A. Takenaka, H. Hashimoto, K. Kuwabara, T. Miyamoto, and N. Terao, *Stain Technol.* 64, 55-59 (1989).
- 11) A. H. Verbueken, F. L. van de Vyver, W. J. Visser, R. E. van Gricken, and M. E. de Broe, *Stain Technol.* 61, 287-294 (1986).
- 12) R. A. Clark, and G. L. Krueger, *J. Histchem. Cytochem.* 33, 729-732 (1985).
- 13) J. Denton, A. Freemont, and J. Ball, *J. Clin. Pathol.* 37, 136-142 (1984).
- 14) Y. Suzuki, S. Imai, and T. Kamiki, *Analyst* 114, 839-842 (1989).
- 15) M. F. Van Ginkel, G. B. Van der Voet, P. C. D'Haese, M. E. De Broe, and F. A. De Wolff, *J. Lab. Clin. Med.* 121, 453 (1993).
- 16) L. Karlsson-Norrgren, W. Dickson, O. Ljungberg, and P. Runn, *J. Fish Diseases.* 9, 1-10(1986).
- 17) L. Karlsson-Norrgren, I. Bjorklund, O. Ljungberg, and P. Runn, *J. Fish Diseases.* 9, 11-25(1986).
- 18) C. P. McCahon, A. F. Brown, M. J. Poulton, and D. Pascoe, *Water, Air, and Soil Pollut.* 45, 345-359(1989).
- 19) P. J. Vuorinen, M. Vuorinen, and S. Peuranen, Kauppi et al Eds. *Acidification in Finland*, Springer-Verlag, p.941-961 (1990).
- 20) S. Eeckhaout, R. E. Van Grieken, M. Cholewa and G. J. F. Legge, *Mikrochim. Acta* 122, 17-25 (1996).
- 21) J. H. Youson, and C. M. Neville, *Can. J. Zool.* 65, 647-656(1987).
- 22) K. Mashiko. K., Jozuka., and K. Asakura., *Ann. Rep. Noto Mar. Lab.* 13, 33-37 (1973).

[国際共同研究等の状況]

なし

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表 (学術雑誌)

① 江副優香、高津章子、黒岩貴芳、恵山 栄、内海 昭：分析化学、48, 11, 1013-1018 (1999).

「黒鉛炉原子吸光法による魚試料中の微量アルミニウムの定量」

② A. Takatsu, Y. Ezoe, A. Uchiumi, K. Tsunoda, and K. Satake: Jap. J. Limnology, 1, 3, 185-189 (2000).

"Aluminum in lake water and organs of a fish, *Tribolodon hakonensis* in strongly acidic lakes with a high aluminum concentration"

③ 高津章子、角田欣一：酸性雨研究と環境試料分析、92-114 (2000).

「陸水・生物試料中のアルミニウム分析」

④ E. Yoshimura, K. Tsunoda, A. Takatsu and K. Satake, Global Environ. Res., 4, 1, 61-71 (2000).

"The determination and speiation of aluminum and its behavior in the environment"

⑤ 高津章子、内海昭：Biomed. Res. Trace Elements, Vol.12, 55-61 (2001)

「キレート反応を利用した組織中微量アルミニウムの観察法」

(2) 口頭発表

① 高津章子、恵山栄、内海 昭：日本分析化学会第49年会(2000)

「ルモガリオン類似体の合成と生物組織内アルミニウム検出への応用」

② 高津章子、内海昭：第11回日本微量元素学会(2000)

「キレート反応を利用した組織中微量アルミニウムの観察法」

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし