

皮膚組織における微量金属の 2 次元半定量解析技術の開発 Development of Two-dimensional Semiquantitative Analysis Technique of Trace Elements in Skin Tissue

坂 貞徳, 長谷川 靖司, 井上 悠
Sadanori Ban, Seiji Hasegawa, Yu Inoue

日本メナード化粧品(株)総合研究所
Research Laboratories, Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.

走査型 X 線顕微鏡(BL37XU)を用いた皮膚組織の断面における金属元素の局在を可視化し、定量解析する技術について検討した。一般的な病理学的手法によりヒト皮膚組織の凍結組織切片を作製し、金属元素(S, Ca, Fe, Cu, Zn など)の 2 次元マッピングを行った。その結果、表皮において Zn や Fe などの金属元素が特徴的な分布を示すことが観察できた。今後、さらに解析を進め、具体的な定量法の確立とその精度や再現性を確認することで、皮膚における新しい金属元素の定量解析技術の確立が期待できる。

キーワード： 皮膚、金属元素、イメージング、SR-XRF

背景と研究目的：

近年の研究から、皮膚組織に存在する金属元素が皮膚の恒常性維持や疾患の発症に大きく関与していることが明らかとなってきた。例えば、カルシウムは、その濃度勾配によって角化細胞の分化に大きく影響していることや、亜鉛やマグネシウムは、その欠乏により、脱毛、皮膚の炎症、角化症などが誘起されることが知られている[1, 2]。今後、これら皮膚組織に存在する金属元素の状態やその役割を明らかにできれば、皮膚組織の恒常性維持のメカニズムや皮膚疾患の発症要因の解明につながると期待される。しかしながら、現段階では、皮膚組織に含有する金属元素の絶対量は定量できても、その空間的な分布や細胞レベルでの解析技術に関しては開発が進んでいない。そこで、本研究では近年進歩したシンクロトロン放射光蛍光 X 線分析(SR-XRF)を活用し、皮膚組織に存在する金属元素の局在をイメージングする技術について検討した。

実験：

1. 測定検体の調製

本研究では、市販のヒト健常凍結皮膚組織 TRANSKINTM(株式会社ケー・エー・シー)を測定用の検体として用いた。具体的には、皮膚を解剖用メスにて 1 cm 大に細切り、凍結切片作製用の OCT コンパウンドにて包埋してマイクロトームを用い厚さ 20 μm の凍結切片を作製した。薄切した切片は 4×4 cm^2 のカプトン膜(東レ社製カプトン 30 EN、厚さ 7.5 μm)に貼付し SR-XRF 分析用の試料として冷凍保存した。

2. 元素マッピングと半定量解析

本解析では、Kodera らが実施した SR-XRF 分析の手法を活用した[3]。具体的には、先に調製した分析用の試料を常温にもどし、Spring-8 内の走査型 X 線顕微鏡(BL37XU)を用いて、SR-XRF 分析を行った。本試料(皮膚切片)における金属元素(S, Ca, Fe, Cu, Zn など)の分布と量を見極めるために、ビームエネルギー 20 keV、ビームサイズ 0.8(H)×0.6(V) μm^2 のビームを試料に照射し、ステップ幅 1 μm にて皮膚切片の断面 150(高さ)×50(幅) μm^2 の 2 次元スキャンを行い、各金属元素の蛍光 X 線強度(cps : counts per second)を測定した。なお、皮膚の位置情報を得るために測定検体とは別ではあるが、同検体より調製した凍結切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色(H.E.染色)を行い顕微鏡観察によりおおよそ SR-XRF 分析を行った同部位の表皮と真皮の状態を確認するとともに画像を取得し、同スケールにて元素マッピングした像と対比させることで表皮および真皮の組織形態に対応した各元素の分布について評価、考察した。また、半定量解析やイメージング解析に関しては ImageJ ソフトウェアを活用し、SR-XRF 分析により検出された 150(H)×50(W) μm^2 にお

ける各プロットの蛍光 X 線強度(cps : counts per second)を 2 次元マッピングし、さらに単位面積($10 \times 10 \mu\text{m}^2$)あたりの平均 cps を算出してグラフにした。

結果および考察：

今回の 2 次元マッピングによるイメージング解析の結果から、Cu や S は、表皮全体に一様な分布が確認された。これに対して、Fe と Zn は表皮内において真皮側及び皮膚最外側にそれぞれ特異的な局在がみられた(図 1)。また、Ni 以外いずれの金属元素も真皮に比べて表皮において高い局在が確認された。Ni に関しては表皮、真皮ともに特異的な分布はなく、ほとんど検出されなかった。

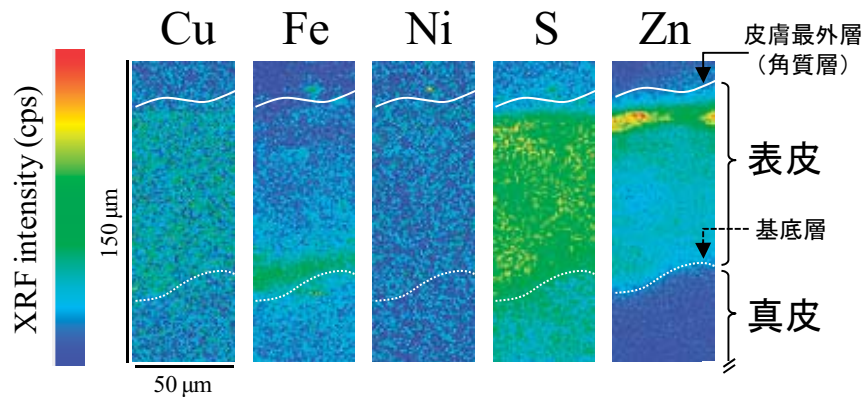


図 1. ヒト皮膚組織の断面における金属元素分布

ヒト皮膚組織における各金属元素(Cu, Fe, Ni, S, Zn)の局在を、SR-XRF 分析により検出された蛍光 X 線強度(cps : counts per second)をもとに 2 次元マッピングした。

(ピクセルサイズ： $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ，測定範囲： $150 \times 50 \mu\text{m}^2$ ，計測時間：1 sec/点)

カラーバーのスケール(min-max)は、Cu: 0-10, Fe: 0-35, Ni: 0-10, S: 0-45, Zn: 0-125(cps)

図 1 の 2 次元マッピングによるイメージング解析と H.E.染色の結果を合わせて本解析から表皮に特異的な局在がみられた Fe, Zn の金属元素のさらに詳細な局在及び半定量解析を行った。その結果、Fe は基底層に、Zn は顆粒層から角質層にかけて強く局在している様子が観察できた(図 2)。

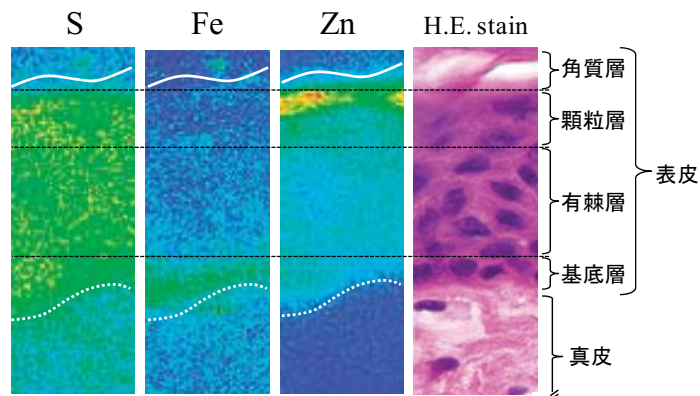


図 2. 表皮における Fe 及び Zn の局在

H.E. 染色の結果からヒト皮膚組織(表皮)における Fe 及び Zn の局在について対比した。

なお、S は表皮全体に分布する金属として示した。

さらに、Cu, S, Fe, Zn の角質層から真皮層まで(解析部位 A~D)の単位面積(unit area = $10 \times 10 \mu\text{m}^2$)当たりの平均蛍光 X 線強度(cps/unit area)について半定量解析を行い比較した(図 3)。その結果、Fe は基底層付近(解析部位 C)において高い局在が確認され、角質層(A)に比べて約 3.4 倍の蓄積と推定された(図 3-Fe)。また Zn は顆粒層または角質層付近(解析部位 A)において高い局在が確認され、これは基底層(C)に比べて約 1.7 倍の蓄積と推定された(図 3-Zn)。

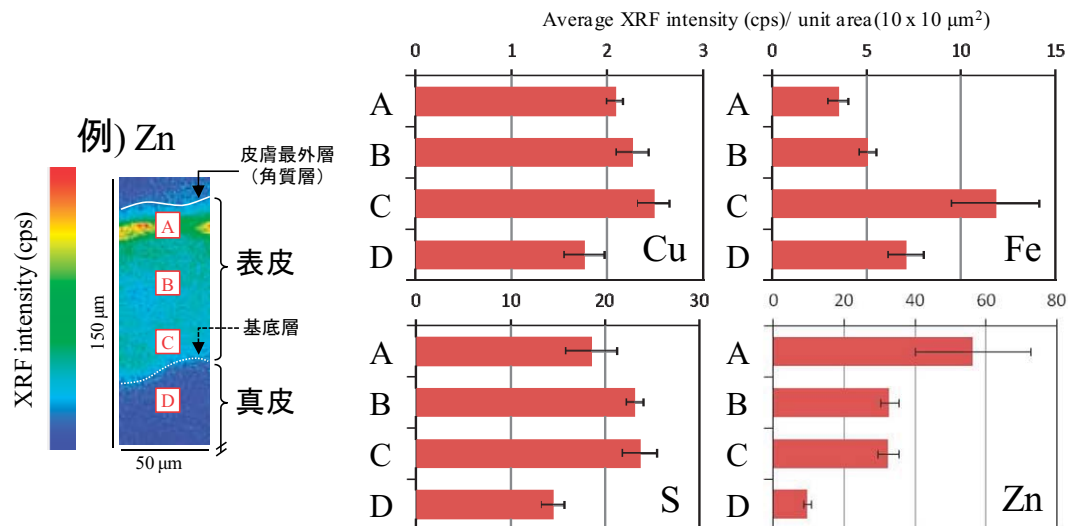


図3. ヒト皮膚組織の断面における金属元素の定量解析

図1で2次元マッピングしたヒト皮膚組織における各金属元素(Cu, Fe, S, Zn)について、左例に記した各解析部位(A:角質層/顆粒層, B:有棘層, C:基底層, D:真皮層)における単位面積(10×10 μm²)当たりの平均 XRF intensity(cps)を半定量解析シグラフに示した。

これまでに、Feが細胞増殖や老化に関与していることや、CaやZnなどが角化細胞の分化や細胞間の接着などに大きく関与していることが報告されている[4, 5]。今回の解析結果から、Feは基底層付近に局在している様子が確認されたことから、基底細胞やメラノサイトなどの増殖に関与していることが示唆された。また、Znは顆粒層または角質層付近に局在していたことから、角化細胞の分化や角質層の維持、形成に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。いずれの金属元素も、表皮における角化細胞の増殖や分化に大きく関与していることが考えられ表皮のターンオーバーを制御している可能性が高い。また、これら金属元素の分布や量を同時に2次元マッピングすることで、表皮における角化細胞の増殖や分化をダイナミックに解析する技術への展開が期待できる。

今後の課題：

今回の解析から皮膚組織においてFeやZnなどの金属元素に特異的な局在が確認された。これまでの報告からも皮膚における細胞の分化や組織の恒常性維持には多くの金属元素が関与している可能性が高い。しかしながら、今のところその分布や役割についての研究は進んでおらず、今後、これらを明確にできれば皮膚の疾病治療やスキンケアの新しい理論構築に貢献できると期待している。今後の課題としては、まずは本解析技術の再現性を確認し、さらに詳細な金属元素の局在について解析を行いつつ、細胞レベルでの解析も合わせることで皮膚の恒常性維持における微量元素の役割について検討を進めたい。さらに、本解析技術を応用して皮膚の3次元解析への展開についても検討を行い、皮膚における金属元素の3次元的な分布を解析できる新しい評価系の開発を目指したい。

参考文献：

- [1] R. Takahashi, *Biomed Res Trace Elements*, **15**(4), 326-329, (2004).
- [2] 山崎豊次、日本臨床内科医会誌, **24**(1), 96-101, (2009).
- [3] H. Kodaera et al., *Anal Sci.*, **24**(12), 1545-1549, (2008).
- [4] Y. Tanaka et al., *Biomed Res Trace Elements*, **2**(1), 37-41, (1991).
- [5] M. P. Adams et al., *J Theor Biol.*, **301**, 112-121, (2012).