

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 Technology 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.

2012 年後期より開始した研究課題(課題番号: 2012B1394)として、走査型 X 線顕微鏡(BL37XU)を活用した皮膚組織の断面における微量金属元素の解析技術について引き続き検討した。さらに今回は、より高分解能(ピクセルサイズ: $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$)での解析についても試みた。その結果、前回の解析結果と同様に、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を確認した。また、高分解能解析においては、細胞レベルでの金属元素の解析が行えることがわかった。今後、具体的な定量法の確立やその精度と再現性を確認することで、生体組織および細胞を対象とした新しい微量金属元素の定量解析技術の確立を目指したい。

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:

これまでの研究から、皮膚組織に存在する微量金属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[1-3]。特に、生体に極微量しか存在しない鉄(Fe)、亜鉛(Zn)、銅(Cu)、ニッケル(Ni)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、モリブデン(Mo)、ヨウ素(I)、ケイ素(Si)、クロム(Cr)、セレン(Se)やフッ素(F)の 12 元素は、健康や生命維持に必須と考えられているが、その役割については不明な点が多い。今後、皮膚組織に存在するこれら微量金属の分布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思われる。そのためにも、これら微量金属を分析する技術の開発は必須となる。これまでも、ICP 発光分析法(ICP-AES)や原子吸光法などが金属分析に活用されているが、感度や迅速性の面で課題がある。また昨今では、ICP 質量分析法(ICP-MS)の技術が進歩し ppt レベルでの分析が可能になってきたが、将来的に生体組織に存在する金属を分析する場合、その局在に関する分析が必要がある。そこで我々は、近年進歩した蛍光 X 線分析法に着目した。これまでも、本分析法を活用することで皮膚組織に存在する微量金属の分布をマッピングし半定量する試みが Desouza ED.らによって研究されている[4]。しかし、現段階において、得られる情報は満足いくものではない。我々は、この課題に対して 2012 年後期より大形放射光施設(SPring-8)にて、シンクロトロン放射光蛍光 X 線分析(SR-XRF)を活用した皮膚組織に存在する微量金属の解析技術の開発を進めてきた(課題番号: 2012B1394)。今回の研究では、前回得られた結果をもとに、その再現性を確認しつつ、さらに高分解能でのマッピング解析を試みた。また、合わせて細胞レベルでの同解析の可能性についても検討した。

実験:

1. 分析用試料の調製

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 大に細切し、定法に従いパラフィンブロックを作製した。さらに、マイクロームを用いて厚さ 10 μm の組織切片を作製した。薄切した切片は $4 \times 4 \text{ cm}^2$ のカプトン膜(東レ社製カプトン 30EN、厚さ 7.5 μm)に貼付し、脱パラフィン処理を行った後に乾燥させ、SR-XRF 分析用の試料として室温保存した。また、培養細胞の解析に関しては、カプトン膜上で 3 日間培養した角化細胞(DS ファーマバイオメディカル株式会社)をカルノア液にて固定し、乾燥させたものを分析用の試料とした。

2. 元素マッピング解析

本解析では、Kodera らが実施した SR-XRF 分析の手法および前回実施した解析条件を参考にした[5, 6]。具体的には、SPring-8 内の走査型 X 線顕微鏡(BL37XU)にて、先に調製した分析用の試料(皮膚切片および培養細胞)を用いて、各試料における金属元素(S, Ca, Fe, Cu, Zn など)の分布をマッピングするために SR-XRF 分析を行った。具体的には、前回実施した条件①：ビームエネルギー 20 keV、ビーム径約 $1 \mu\text{m}^2$ 、ステップ幅 $1 \mu\text{m}$ にて解析を実施し、本条件で得られる結果の再現性を確認した。さらに、高分解能解析として、条件②：ビームエネルギー 20 keV、走査型顕微鏡のプロンプに全反射ミラーを Kirkpatrick-Baez 配置として集光させた約 $0.3 \mu\text{m}^2$ のビームを用いて、ステップ幅 $0.5 \mu\text{m}$ にて皮膚切片の断面の 2 次元スキャンを行い、光軸と直交方向に設置した Si-SDD により試料からの蛍光 X 線強度(cps : count per second)を検出した。得られた 2 次元情報(cps)をもとに、ImageJ ソフトウェアにて解析領域における各金属元素の分布と cps 強度を 2 次元マッピングした。また、角化細胞に関しても同様な解析を行った。なお、同試料を予め顕微鏡にて観察し、得た透過光像から SR-XRF 分析を行った試料(皮膚および細胞)の位置を確認した。

結果および考察：

今回の解析から、前回の解析結果(条件①)の再現性を確認した(data not shown)。さらに、高分解能解析(条件②)においても、Cu や S は、表皮全体に一樣な分布が確認され、Fe や Zn はそれぞれに特異的な局在がみられた(図 1)。今回試みた高分解能解析(条件②)の結果は、前回実施した解析(条件①)よりも金属の分布が鮮明であり、特に Fe は、細胞の輪郭まで明瞭に確認できた(参考として前回の解析結果を示す：図 2)。また、前回検出されなかった Ni についても、極微量ではあるが表皮に分布している様子が確認できた(図 1-b, Ni)。Desouza ED.らも、SR-XRF 分析を活用した皮膚組織における金属元素の分布について解析した結果を報告しているが、ビームサイズ $6 \times 6 \mu\text{m}^2$ 、ステップ幅 $10 \mu\text{m}$ での解析であったため、ここまで高分解能(個々細胞レベル)での解析には至っていない[4]。以上の結果より、今回試みた SPring-8 内の走査型 X 線顕微鏡(BL37XU)による高分解能解析(条件②)は、皮膚組織において細胞レベルでの金属元素の解析が可能であることを示唆している。

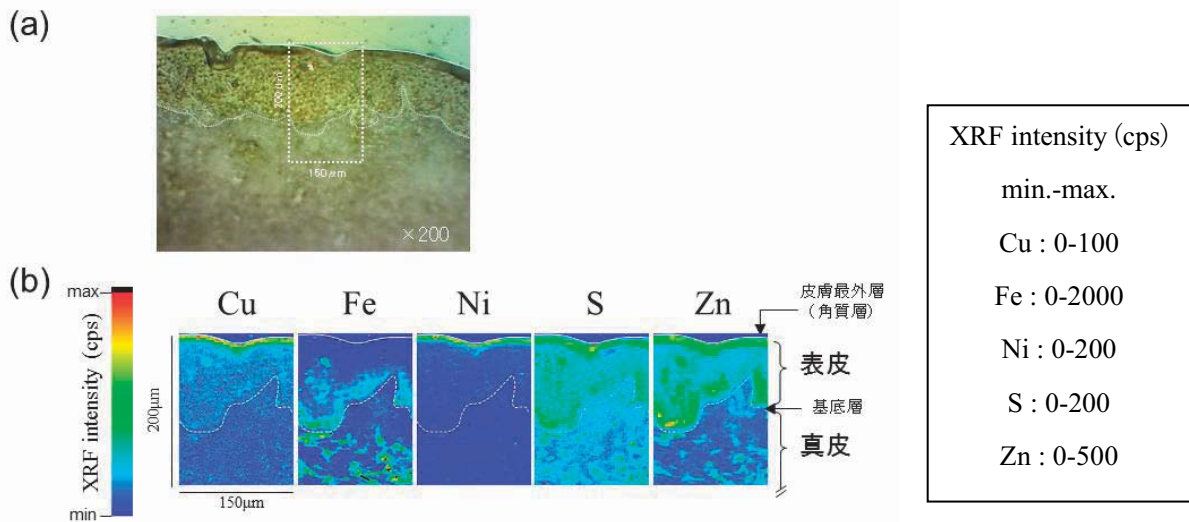


図 1. ヒト皮膚組織の断面における金属元素の分布解析(BL37XU：高分解能解析 条件②)

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 : count per second)をもとに 2 次元マッピングした。(a)は解析部位の透過光像。

(ピクセルサイズ： $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ 、ステップ幅： $0.5 \mu\text{m}$ 、測定範囲： $200 \times 150 \mu\text{m}^2$ 、計測時間： 0.1 sec/点)

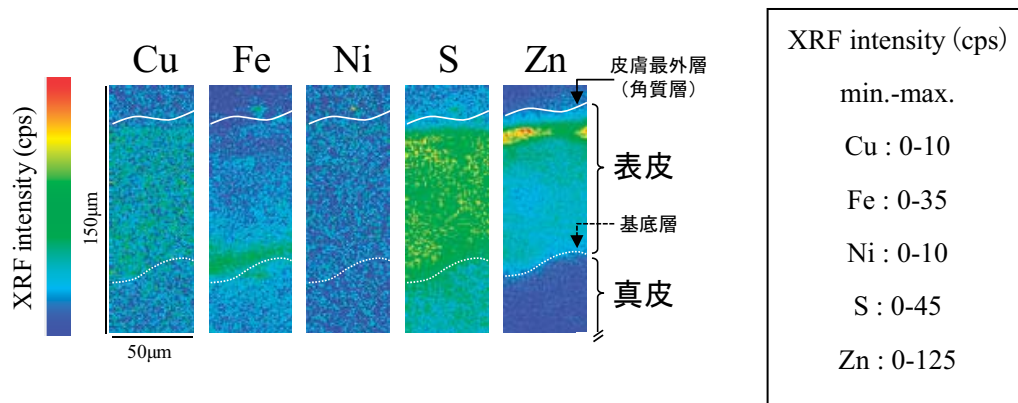


図 2. ヒト皮膚組織の断面における金属元素の分布解析(BL37XU：前回の解析結果 条件①)
 ヒト皮膚組織における各金属元素(Cu, Fe, Ni, S, Zn)の局在を、SR-XRF 分析により検出された蛍光 X 線強度(cps : count per second)をもとに 2 次元マッピングした。(a)は解析部位の透過光像。
 (ピクセルサイズ : $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 、ステップ幅 : $1 \mu\text{m}$ 、測定範囲 : $150 \times 50 \mu\text{m}^2$ 、計測時間 : 1 sec/点)

さらに、培養細胞レベルでの金属元素の分布解析についても、同手法(条件②)を用いて解析した。ヒト角化細胞における金属元素の分布を解析した結果、Cu, Fe, S, Zn の局在が確認された(図 3)。なお、Ni に関しては、ほとんど検出されなかった(data not shown)。

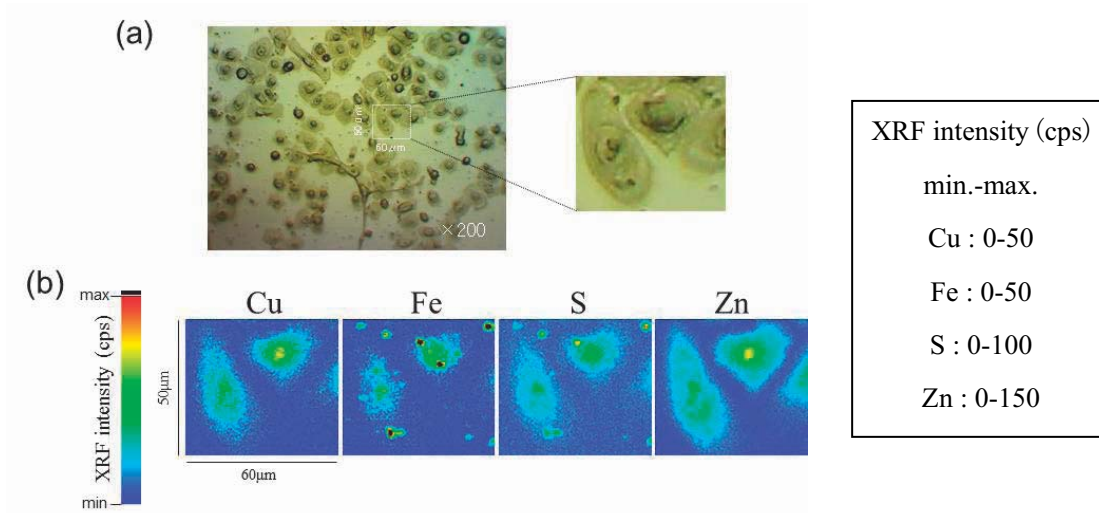


図 3. ヒト角化細胞における金属元素の分布解析(BL37XU：高分解能解析 条件②)
 ヒト培養細胞(角化細胞)における各金属元素(Cu, Fe, S, Zn)の局在を、SR-XRF 分析により検出された蛍光 X 線強度(cps : count per second)をもとに 2 次元マッピングした。
 (a)は解析部位の透過光像。
 (ピクセルサイズ : $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ 、測定範囲 : $50 \times 60 \mu\text{m}^2$ 、計測時間 : 0.1 sec/点)

以上、今回の解析結果から、前回実施した解析結果(課題番号 : 2012B1394)の再現性を確認するとともに、より高分解能(細胞レベル)での解析が可能であることがわかった。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[7, 8]。故に、これら金属元素は皮膚の恒常性に大きく関

与しているものと考えられる。今回検討した高分解能な SR-XRF 分析は、組織および細胞レベルでの金属元素の分布や量を解析することが可能であり、将来的には、皮膚組織の状態を見極めるための新しい診断技術への展開が期待できる。今後、さらに詳細な解析を行いつつ、具体的な定量法の確立やその精度と再現性を確認することで、生体組織を対象とした新しい微量金属元素の定量解析技術の確立を目指したい。

参考文献：

- [1] Forslind B., *Acta Derm Venereol Suppl.*, 208, 46-52, (2000).
- [2] R. Takahashi, *Biomed Res Trace Elements.*, **15**(4), 326-329, (2004).
- [3] 山崎 響次、日本臨床内科医会会誌, **24**(1), 96-101, (2009).
- [4] Desouza ED et al., *Appl Radiat Isot.*, **77**, 68-75, (2013).
- [5] H. Kodera et al., *Anal Sci.*, **24**(12), 1545-1549, (2008).
- [6] 坂 貞徳 他、2012 年利用課題実験報告書、2012B1394.
- [7] Y. Tanaka et al., *Biomed Res Trace Elements*, **2**(1), 37-41, (1991).
- [8] M.P. Adams et al., *J Theor Biol.*, **301**, 112-121, (2012).