

アトピー性皮膚炎における微量元素の動態の解析 Investigation of trace elements kinetics in Atopic dermatitis

国村伸祐、白川太郎、坪内美樹、横山葉子

Shinsuke Kunimura, Taro Shirakawa, Mina Tsubouchi, Yoko Yokoyama

京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻健康要因学講座健康増進行動学分野

Department of Health Promotion and Human Behavior, Graduate School of Public Health, Kyoto University

本研究の目的は、正常者とアトピー性皮膚炎患者由来の培養表皮組織内の微量元素分布と価電子状態を分析して、アトピー性皮膚炎の病態と微量元素との関連を明らかにする事である。今回は、マイクロビームを用いた蛍光X線イメージングと蛍光法によるXANES(X-ray absorption near edge structure)により、正常者由来の表皮培養組織内の微量元素分析と鉄の価電子状態の分析を行った。その結果、分化が進んだ部分において、細胞内のカルシウム、硫黄、鉄、亜鉛、リンの濃度が増加した。また、終末分化した部分の鉄の価電子状態は2価と3価の混合状態であった。

Our purpose of the research is to clarify the relationship between atopic dermatitis and trace elements. We analyze the distribution and the oxidation states of trace elements in the cultured keratinocyte for our purpose. In this study, We analyze the distribution of the trace elements and the iron oxidation states in the cultured keratinocyte from normal person using micro beams. X-ray fluorescence imaging and XANES(X-ray absorption near edge structure) in fluorescence mode were employed in this study. The results were that the concentration of Ca, S, Fe, Zn and P were increased and ferrous and ferric states were mixed in the terminal differentiation points.

背景と研究目的

アトピー性皮膚炎の病因論の一つとして表皮細胞原因説がある。アトピー性皮膚炎患者の皮膚生検は正常な皮膚生検と比較して、Caの含有量が多い¹⁾。更に、組織中のCa:Znでは、アトピー性皮膚炎患者の皮膚生検中のZnの割合が減少しているという報告がある¹⁾。しかし、皮膚生検は表皮細胞のみならず免疫担当細胞、色素細胞等から構成され、血中からの種々の因子の影響

も受けている。よって、皮膚生検を用いた方法からでは、表皮細胞原因説と微量元素との関連を検証することは困難である。しかし、アトピー性皮膚炎患者由来の皮膚組織の培養も困難であった。

ヒト毛包より、表皮幹細胞由来の未分化な状態と考えられる表皮角化細胞の培養系が確立され始めている。この細胞はCa²⁺の添加により分化が誘導され、表皮組織様になることが明らか

となり始めている。この系により、アトピー性皮膚炎患者の毛包から表皮組織を培養することが可能となった。

本研究の目的は、正常者とアトピー性皮膚炎患者由来の培養表皮組織内の微量元素分布と価電子状態を分析して、アトピー性皮膚炎の病態と微量元素との関連を明らかにする事である。今回は、正常者由来の表皮培養組織内の微量元素分析と鉄の価電子状態の分析を行った。

SPring-8 の放射光は高輝度光であり、試料に照射される X 線の強度が非常に強い。よって、検出感度が極めて高い。また、ミラーを用いた集光光学系により、X 線強度の強いマイクロビームが実現し、細胞レベルのビーム空間分解能で微量元素分析や元素の価電子状態の分析を行う事が可能となった。多元素同時分析が可能である。など、生体試料の分析には極めて有利な点を持つ。以上の事から、細胞内の微量元素分析のために、SPring-8 の放射光を用いる事が必要不可欠であると考えた。

アトピー性皮膚炎と微量元素の関連が明らかになれば、アトピー性皮膚炎の病因の解明につながると考えられる。また、創薬における応用にもつながると考えられる。よって、本研究は医学的に大変意義深い。生体組織や細胞内の微量元素分析のためには、マイクロビームを用いることが必要不可欠であると考えられる。本研究の実施により、生体組織や細胞中の微量元素分析のために、放射光を用いることが極めて有用であることが明らかになると考えられる。よって、本研究は医学分野における新たな分析手法の確立という面でも大変意義深いと考えられる。以上のことから、ナノテクノロジー分野における研究として、非常に重要であると考えられる。

実験

本研究は、BL37XU にて行った。実験で用いたビームの大きさは、縦横とも $3\mu\text{m}$ であった。正常者由来の表皮角化培養細胞(NHEK)に $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を添加して角化を誘導させ、8 日後の細胞(表皮組織様)を分析試料とした。100%エタノール固定、真空凍結乾燥の 2 種類の方法で試料を作製した。まず、蛍光 X 線イメージングにより、試料内の元素分布を分析した。分析元素は、Ca、S、P、Fe、Zn とした。 $3\mu\text{m}$ ステップで試料を走査させて分析を行った。入射 X 線のエネルギーは 10keV であった。次に、細胞部位と考えられる部分の鉄の価電子状態を、蛍光法による XANES スペクトルから分析した。入射 X 線エネルギーは 7.10keV から 7.16keV の範囲で、 0.5eV ステップで変化させた。鉄の 2 価、3 価を表す標準試料として、第一硫酸鉄七水和物 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) と第二硫酸鉄 n 水和物 ($n=6\sim 9$) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) を用いた。蛍光 X 線イメージング、蛍光法を用いた XANES 分析とも大気中で行った。

結果と考察

図 1、2 に 100%エタノール固定、真空凍結乾燥で作製した試料の蛍光 X 線イメージングの結果を、図 3、4 に 100%エタノール固定、真空凍結乾燥で作製した試料の XANES の結果を示す。各試料とも終末分化まで進んだ部分における、各元素の濃度が高いことがわかった。また、終末分化した部分の鉄の価電子状態は 2 価と 3 価の混合状態であることがわかった。これらの結果から、正常者由来表皮細胞は分化が進むにつれて、各元素を取り込み、組織様に変化していると考えられる。すなわち、分化の過程(組織形成の過程)において、これらの元素が必要となっ

ていると考えられる。また、終末分化している部分の鉄が 2 価と 3 価の混合状態であったこと、

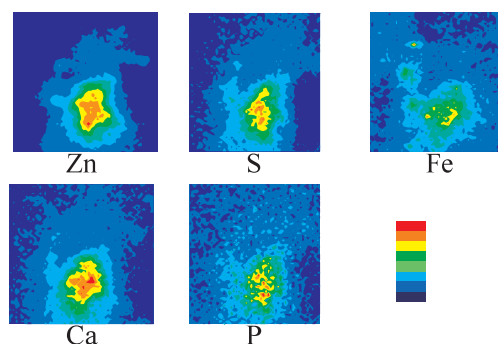


Fig.1 The result of X-ray fluorescence imaging (Sample was fixed by 100%ethanol)

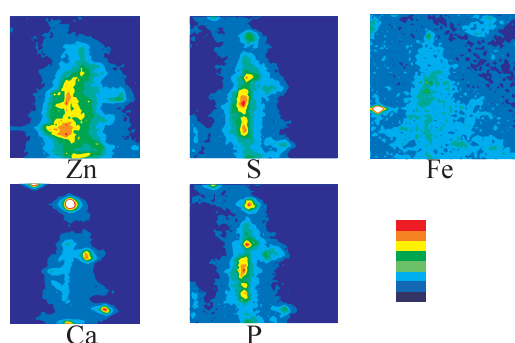


Fig.2 The result of X-ray fluorescence imaging (Sample was freeze-dried)

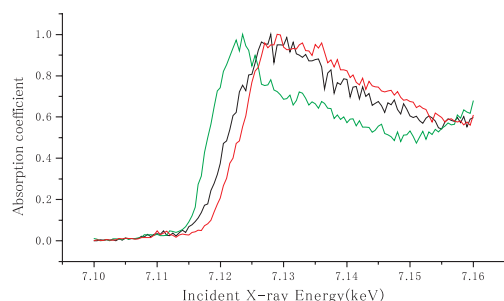


Fig.3 Fe XANES spectra of sample (Sample was fixed by 100%ethanol)
Green line: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Red line: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Black line: sample

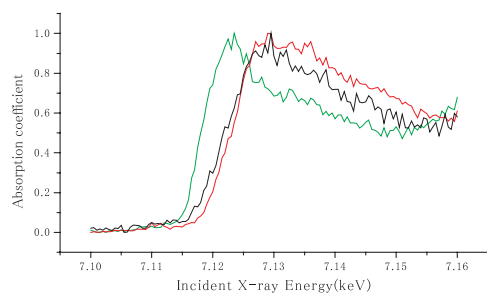


Fig.4 Fe XANES spectra of sample (Sample was freeze-dried)

一般的に正常な細胞や組織内での 2 価の鉄は、たんぱく質の活性中心であることが多いことから、表皮角化細胞の分化の過程の中で、鉄を活性中心とするたんぱく質が合成されている可能性が考えられる。

今後の課題

今後は、アトピー性皮膚炎患者由来の培養表皮組織の蛍光 X 線イメージングと鉄の XANES 分析を行い、アトピー性皮膚炎患者由来と正常者由来の表皮組織内の微量元素分布の違いや鉄の価電子状態の違いを分析する必要がある。この分析を行うことにより、アトピー性皮膚炎と微量元素の関連を明らかにしていく予定である。

参考文献

1) Forslind B et al(1999)

Acta Derm Venereol vol.79(1) pp.12-7

キーワード

・ XANES

入射 X 線エネルギーを変化させながら、吸収係数を測定すると、あるエネルギーで急激に吸収係数が立ち上がる部分が存在する(吸収端)。吸収端の現れるエネルギー値は元素固有である。この吸収端の近傍約 60eV にわたる領域を XANES と呼ぶ。この領域から、元素の価電子状態を分析することができる。