

走査型蛍光エックス線顕微鏡による細胞内元素マッピングの医学応用

志村まり 国立国際医療研究センター・研究所・難治性疾患研究部 〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1
 松山智至 大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

要旨 健康を維持するために、体内のミネラルや金属は過不足無く存在することが必要である。近年の技術開発により、病気と生体内微量元素の増減との関係が示唆されるようになった。元素変動に着目した病気へのアプローチは、これからの分野であり、病気や治療法の解明の一助となると考える。私たちの研究グループでは、細胞1個内の元素分布イメージングが可能な細胞観察用走査型蛍光エックス線顕微鏡システム (SXFМ) の開発を行い、医学応用のための研究開発を開始している。本稿では、SXFМ とその解析法 (エレメントアレイ解析) を紹介し、病気の原因や治療法解明への可能性を議論する。

1. はじめに

病気の原因や治療法解明のために、網羅的遺伝子や蛋白質からのアプローチが現在も試みられている。さらに、微量元素が生命活動の機能発現に関わっている(メタロミクス)概念が立ち上がり、生体内元素の機能に関わる研究が開始された。生物細胞1個の全元素分析を行おうとするときには、細胞内元素量や分布を解析できる、高感度・高分解能を有する手法の確立が必須である。メタロミクスでの医学応用は、これからの分野である。本研究グループでは、走査型蛍光エックス線顕微鏡 (SXFМ) を用いて、細胞内の元素分布について高分解能画像化を可能とした。本稿では、これまで行ってきた医学応用のための SXFM の改良, SXFM での解析法, そして今後望まれる効率的な元素機能解析について述べたい。

2. 元素と医学的背景

生体にとって微量元素は欠かせない成分であることは、経験的にも知られている。夏の暑い日には塩分を補給するなど、“生活の知恵”として、思い当たることも多い。今日では、部分精製されたサプリメントとして、薬局や病院で処方されている。鉄欠乏性貧血には鉄剤、亜鉛欠乏性味覚障害には、亜鉛剤が効果的である。一方で、過剰に摂取した場合には、中毒症を引き起こすことが知られている。これまで、日本の経済成長期には工場排水による中毒症が報告されている。明治維新後の足尾銅山鉱毒事件、昭和の4大公害病(水俣病, 新潟水俣病, イタイイタイ病, 四日市喘息)は有名である。それぞれ、メチル水銀, カドミウ

ム, 硫酸化物による、水や大気汚染、汚染した魚貝、野菜などの摂取が原因とされている¹⁾。少なくとも、生体元素は過不足無く体内に存在することが必要で、今日においても私たちの生活環境に依存して補われていることを留意したい。

原子吸光や ICP-MS (inductively-coupled-plasma mass spectrometry) による微量元素測定技術が導入され、より高感度な元素濃度測定が可能となったことで、様々な元素の増減と病気との関連が問われるようになってきた。表にその代表的な病気を列記してみた (Table 1)²⁾。これらは、動物実験や臨床検体 (主に血液など体液) を用いた元素分析の結果である。上述したように、体内の微量元素は欠乏しても、過剰でも病気の原因となる。或いは、病気の結果、元素量のバランスを欠いてしまう。亜鉛, 銅, 鉄, マンガンは、欠乏・過剰の両方で Table 1 のリストに挙げられている。比較的多量に存在する (測定しやすい) 元素がよく解析される傾向は否めないが、少なくともこれらの元素量の均衡を保つことは肝要であり、これらの元素が生体機能の根幹を担っていることが推測される。近年、問題となっている生活習慣病を含む慢性疾患と呼ばれている肝疾患, 高脂血症, 糖尿病, さらには癌 (がん), パーキンソン病など神経疾患においても、元素の不均衡が関わっている。今後、元素変動を指標としたこれらの慢性疾患の解明は急務であるといえる。

原子吸光や ICP-MS による測定は、試料全量中の微量元素含有 (平均値) を示すには大変有用であるが、元素分布の変化までを反映することはできない。生体組織内金属局在を明らかにするために汎用される染色法として、ヘモジデリン鉄 (ベルリンブルー染色: ヘモジデリンは赤血球

Table 1 Table 1 indicates the relationship between elements and diseases previously reported. Mostly, body fluids (blood, urine, semen, etc.) derived from clinical samples or animal models for diseases were analyzed. Red; element increased; blue, element decreased

疾患名	元素 (増大 減少)
味覚・嗅覚障害	Zn
貧血	Fe, Zn, Cu
甲状腺機能低下	I
心筋梗塞	Se
悪性貧血 (ビタミンB12欠乏)	Co
Menkes 病	Cu
認知症	Se, Cr
てんかん	Mn
高脂血症	Cr
糖尿病	Cr, Mg
骨代謝異常	Mg, Zn
精子形成障害	Zn, Se
卵子形成および発生異常	Cu, Zn
急性肝炎・劇症肝炎・C型慢性肝炎	Fe
がん	Cu
不整脈	Mn
透析液汚染による元素過剰症	Al, Cu, F, Zn, Ni
脳症	Al
パーキンソン症状	Mn
骨代謝異常	F
Wilson病	Cu

のヘモグロビン由来の黄褐色から茶褐色の色素で、出血した後の組織や細胞内に認められる)や銅染色(ロダニン染色)が挙げられる³⁾。しかし、染色法の検出感度はICP-MSには及ばず、検出できる元素数は単一染色なので、一元素のみである。一方、EPMA (Electron Probe Micro-Analysis) による病理組織切片(明らかに金属含有、金属汚染など)を用いた元素マッピングが報告されている^{4,5)}。上述の色素染色と比較して、検出感度や特異性は改善され、同時に複数元素の検出も可能である。さらに、細胞1個内の元素情報を反映する高感度測定が可能となれば、元素と生体分子(蛋白質や核酸など)との関わりや変化を見いだすことも期待できる。

3. エックス線プローブによる医学貢献

エックス線と医学との歴史は、レントゲンによるエックス線撮影(1896)に始まり、現在医療現場では、透過光を用いたエックス線撮影、CT スキャン等が汎用され、医療関係者にはなじみ深い。一方、蛍光エックス線、回折、散乱については、医学分野で殆ど知られていない。私たちは、蛍光エックス線に着目し、医学応用のための研究開発を行っている。

これまで、理化学研究所播磨研究所、大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻との共同研究で確立された、細胞観察用走査型蛍光エックス線顕微鏡システム(以下、SXFM, Fig. 1)は、硬エックス線集光技術(高精度KBミラー)と蛍光エックス線分析を組み合わせることで細胞レベルでの元素分布像を得ることが可能である。SXFMでは、回折限界である $30 \times 50 \text{ nm}^2$ から $1 \times 1 \mu\text{m}^2$

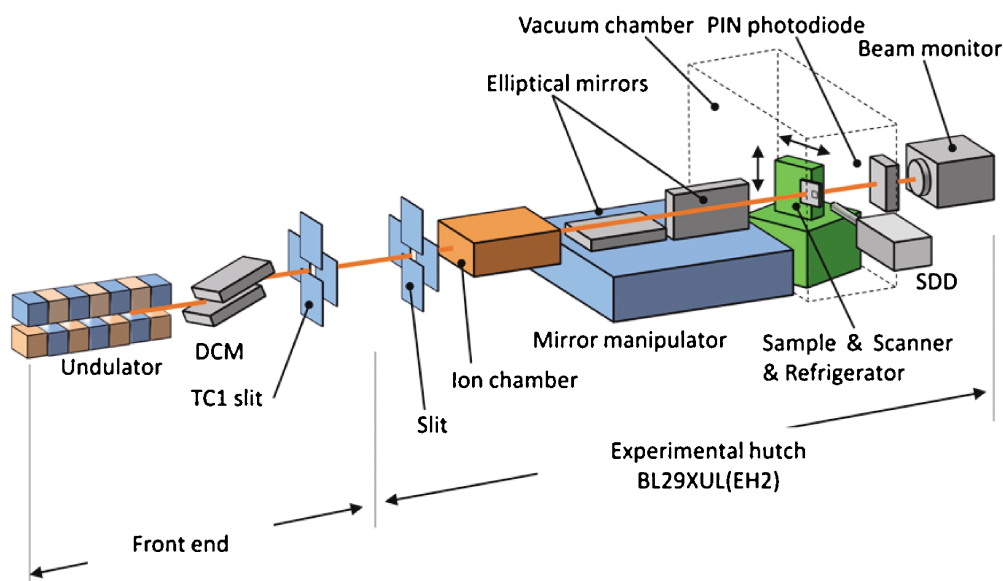


Fig. 1 Schematic of the scanning X-ray fluorescence microscope (SXFM) system. Distance between the undulator and the first mirror is 98 m. The TC1slit is placed 45 m upstream of the first mirror to form a virtual X-ray source. Focal lengths of the first and the second mirrors are 252 mm and 150 mm.

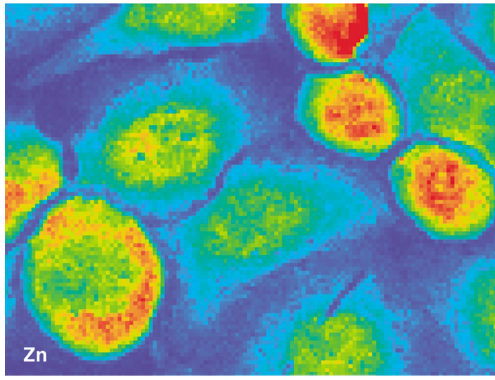


Fig. 2 SXFPM-captured cellular images with a high spatial resolution. Intracellular zinc (Zn) distribution is shown. Freeze-dried HeLa cells were prepared by K. Maeshima. Cells were measured at 15 keV; beam size, 1.0(H) × 1.0(W) μm; scanning pitch, 600 nm/pixel; exposure time, 1 s/pixel. Bar, 20 μm.

までサイズ可変の集光が可能であり、世界最高レベルの分解能を有している (Fig. 2)^{6,7)}。現在では、細胞内小器官であるミトコンドリアレベルの構造体の元素マッピングが可能である (Fig. 4)。言うまでもなく、複数の元素を同時に高分解能かつ高感度に測定できる点で、画期的である。

3.1 生物医学応用のための装置開発

現行の SXFPM に到達するためには、いくつかの生物医学応用のための装置改良が必要であった。生物医学利用で求められているのは、再現性 (定量化)、高分解、高速測定、そして無論、正確な情報である。

A) 再現性 (定量化)

生物医学で要求される試料測定は、異なる独立の試料で複数回行うことを基本としている。例えば、人間に顔や体格が多様なように、細胞にも多様性がある。一卵性双生児でも性格までは同一ではなく個性があるように、細胞も環境により変化する。マウスなどの実験動物でも同種同齢を扱っても、同じ反応を示してくれるものではない。これらの個体の多様性に対する統計処置は、生物医学での解析には必須である。試料数は多ければ多いほど、統計学的信頼性が期待できる結果となる。これらのことから、SXFPMにおいても、複数回試料を測定することになる。同一試料では再現良く同一の結果が得られること (再現性)、異なる時に測定した結果でも比較できる絶対評価 (定量化) が不可欠である。私たちのグループは、標準物質の作製を行い、標準物質による定量化を SXFPM 測定で試みている (Fig. 3)。

B) 高分解画像

分子機序に迫る情報を得るためには、細胞内の蛍光エックス線シグナルを高分解で得る必要がある。細胞1個のサイズはおおよそ20ミクロン、核のサイズが10ミクロン、ミトコンドリアのサイズは1ミクロン程度であるこ

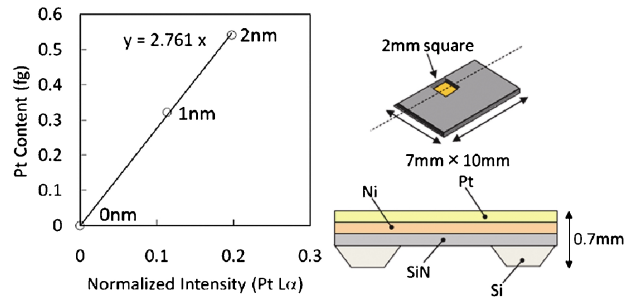


Fig. 3 Method for standardization of signal intensity from the X-ray fluorescence spectrum. Linear calibration curve showing the relationship between the weight of Pt and X-ray fluorescence intensity (Pt $L\alpha$) normalized by the incident X-ray intensity. Thin platinum and nickel membranes, of which the thickness and the density were decided in advance, were employed as standard samples.

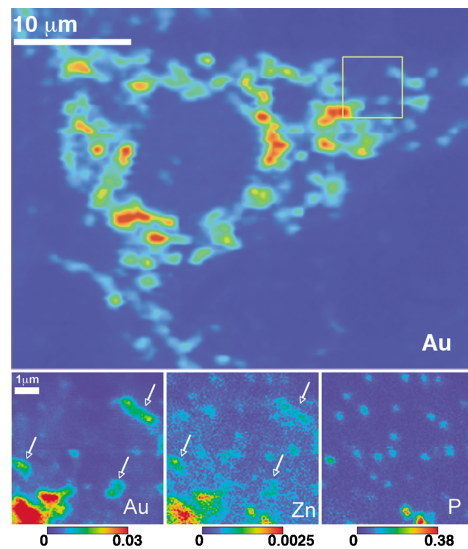


Fig. 4 SXFPM used to visualize intracellular microorganelles. A mitochondrion was labeled with a primary antibody against a specific mitochondrial protein, followed by labeling with a gold-conjugated secondary antibody. The element distribution of a single cell and its magnified image are shown. Colored bars indicate the elemental contents (fg) in an irradiation area. The objects indicated by arrows in the gold (Au) distribution map show a single mitochondrion, which contains zinc (Zn), but no phosphorus (P) element. Cells were measured at 15 keV; beam size, 140(H) × 140(W) nm; scanning pitch, 70 nm/pixel; exposure time, 2 s/pixel.

とから、このサイズ内になるべく多くのピクセル値 (集光サイズ) を詰め込む必要がある、そのためには十分なエックス線強度を持つ集光ビームが必要不可欠である。現行の SXFPM は SPring-8 のアンジュレータとミラー集光光学系を用いていることから、高フラックスな集光ビームによって、高分解画像が可能となったことは言うまでもない^{7,8)}。SXFPM を用いた細胞内小器官の元素分布像を示す (Fig. 4)。

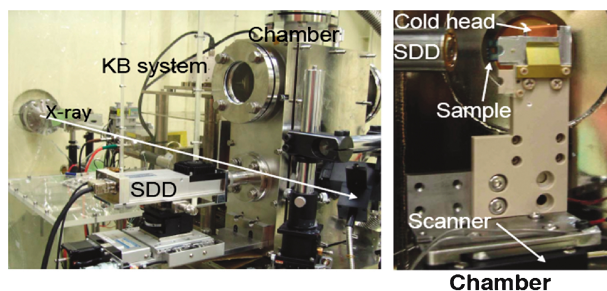


Fig. 5 Cryo-SXFM system and interior of the chamber.

C) 高速測定

上述のように、統計解析が可能で、できるだけ多くの試料を測定するために、高速測定は必須である。高速測定のために高効率な集光光学系の開発、大面積検出器の導入、検出システムの改良を行っている。

D) 正確な情報のための開発①：自然の状態を観察する

正確な細胞内元素分布情報を得るために、留意すべき点がある。それは、試料の調整法である。ホルマリン固定を行った細胞の観察は、安定に細胞形態を維持できる点で有用であるが、蛋白質や核酸など複合体構造がホルマリン固定により影響を受ける可能性は否めない。電子顕微鏡の開発に伴って、この問題について議論され、現在は瞬間凍結法がもっとも自然の状態に近いと考えられている⁹⁾。元素を観察するSXFMにおいては、さらに深刻である。ホルマリン固定のみならず、生体試料を緩衝溶液で洗浄するだけで、フリーのイオン型元素は容易に喪失するからである。つまり、洗浄しただけで、自然の状態とは言えなくなってしまう。そこで、当研究グループでは、凍結試料を観察可能なクライオSXFMの開発を試みている (Fig. 5)。瞬間凍結法を用いた試料のクライオSXFM測定では、洗浄や細胞固定により喪失してしまういくつかの元素分布測定が可能となっている¹⁰⁾。臨床検体においても、瞬間凍結法を勧めたいところであるが、現状では感染症をも考慮しなくてはならず、即ホルマリン固定が通常である (大旨の病原体はホルマリンにより不活化する)。しかし、過去に蓄積された膨大な数のホルマリン固定試料は魅力的であり、可能な限りSXFM解析にも応用すべきである。そのためには、ホルマリン固定試料から得られる元素分布情報が正確であるかは、慎重に検討する必要がある。これまでの計測結果に依ると、蛋白質結合型のような安定な元素は、洗浄や固定処置にも抵抗性の傾向があるようである¹⁰⁾。常に比較可能な複数の陰性コントロール (蛍光エックス線のバックグラウンドとなる試料周囲の素材) と共に、ホルマリン固定試料の測定を行う必要がある。さらに、複数回の実験で再現性があり、統計学的に有為に認められる元素情報であれば、ホルマリン固定後の試料においても有益な情報となることを言及しておきたい。

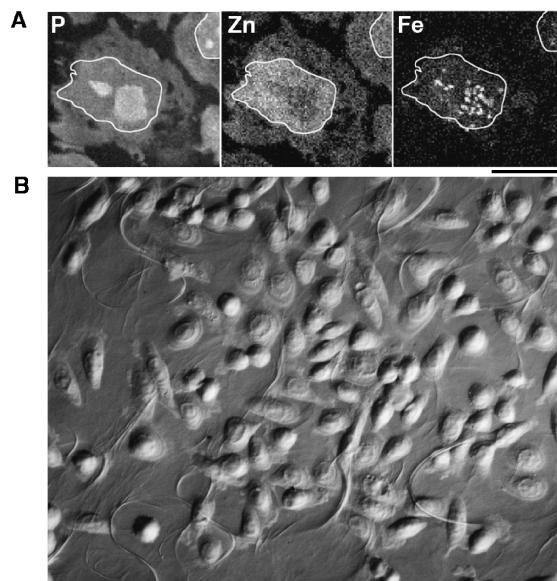


Fig. 6 A. SXFM images of cells over the prolene film with carbon deposition. Phosphorus (P) distribution as well as zinc (Zn) and iron (Fe) at cellular nuclei (outlined in white) were clearly observed. Cells, human multiple myeloma cells. B. Cellular adhesion on a prolene film with carbon deposition. PC9 cells were plated on the film and differential interference contrast (DIC) images were measured after 36 h. Bar, 10 μ m.

E) 正確な情報のための開発②：試料基板

試料基板には、蛍光エックス線スペクトルにおいてバックグラウンドや散乱線を押さえる素材や形状が必要である。この試料基板の設計には、思いの外時間を費やすことになったが、現在は、SiN基板や自前で作製している高分子素材膜基板を使用するに至っている。高分子素材膜はSiNと比較して、ケイ素 (Si) のピークがないために、特に細胞核 (核酸) 等のリン (P) の検出が容易となっている (Fig. 6A)。そして、何よりも安価であることがありがたい。細胞培養をこれらの基板で行うためには、細胞親和性 (細胞が付着して増殖できる) を有すること、滅菌可能であることが要求される。SiN基板の細胞親和性は良好であり、高圧加熱滅菌処置が可能であることは利点である。一方、高分子素材膜基板はそれだけでは細胞親和性は乏しいが、高分子素材膜にカーボン蒸着を施すことで、細胞親和性を得ることが可能である (Fig. 6B)。高分子素材膜基板では70%エタノール消毒を行い、数日間無菌的な培養が可能である。

3.2 エレメントアレイ解析

SXFMの利点は、高感度検出、高分解能、同時複数元素の測定が可能なことである。いずれも、細胞内元素動態を明らかにするためには、必須な項目であるが、特に3番目の「同時に複数元素の測定が可能」は、エレメントアレイ解析に発展した。エレメントアレイ解析¹¹⁾は、単一

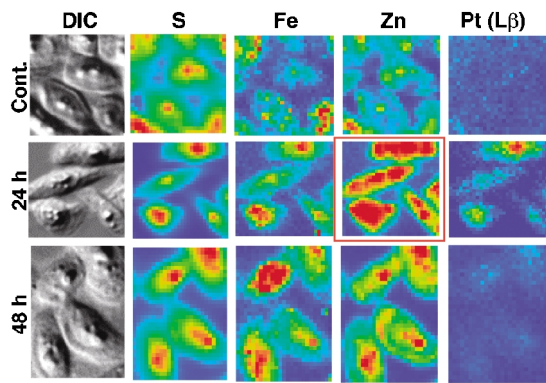


Fig. 7 Element array by SXFM. Element distribution in PC9/SEN cells treated with 1 μ M CDDP, a platinum anticancer drug. Cells internalized CDDP (Pt L β) after 24 h and excreted it after 48 h. Notably, cellular Zn levels appeared to increase with Pt uptake (red-framed). Brighter colors indicate higher signal intensity for a given element. DIC, differential interference contrast image; S, sulfa signal; Fe, iron signal; Zn, zinc signal; Pt L β , platinum signal derived from CDDP. Scale bar, 10 μ m.

元素のみに注目するのではなく、複数の細胞内元素分布情報を一度に観察し、元素プロファイルとして、生体反応を認識しようとする試みである。

細胞は自分自身の環境を維持するために、外界の変化に伴って適応を図ろう（ホメオスターシス）としている。例えば、抗がん剤（CDDP：シスプラチン：白金製剤）が細胞に入れば、白金は異物なので細胞はこれを除去しようとする。図（Fig. 7）は、CDDPを細胞に添加してからの経過時間で観察した硫黄（S）、鉄（Fe）、亜鉛（Zn）、白金（Pt）の細胞内分布状態を示している。PtはCDDP無処置（0 hr）では、殆どシグナルがみられないことから、PtL β はCDDP由来シグナルであると考えられる。Ptは24時間で既に細胞内に取り込まれているが、48時間で排除されている様子が解る。他の元素に目を移すと、24時間でZnの増大も見られる。これらは細胞の反応（ホメオスターシス）と考える。

がん治療では、抗がん剤の薬剤耐性が問題となっている。初回は抗がん剤の治療効果があっても、複数回の抗がん剤治療をしていると、次第に薬が効かなくなってくる、すなわち、これも（がん）細胞にとっての、生き残るためのホメオスターシスの結果である。どうして、耐性になっていくかについては、異なるいくつかの機構が存在すると言われている。そのうちのひとつに「抗がん剤の排除能力が強化される」が知られている。そこで、細胞（親株）に、試験管内で何度もCDDPを処置しているうちにCDDPが効かなくなってしまった細胞、すなわち耐性を獲得した細胞（PC9/RES）と、同じ親株の子孫であるが、CDDPなど処置せずに育てているCDDPが効く感受性細胞（PC9/SEN）を用いて、抗がん剤投与後の反応を比較した（Fig. 8）。先ほど（Fig. 7）では、Znが24時間後に反応性に増大

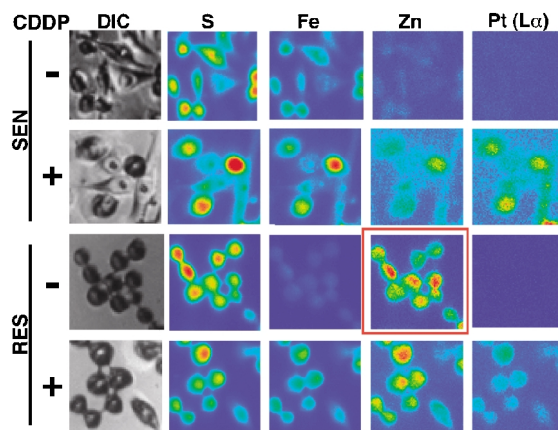


Fig. 8 SXFM and element array analysis of PC9/SEN and PC9/RES cells treated with 1 μ M CDDP for 12 h. PC9/SEN cells took up threefold more CDDP (Pt L α) than PC9/RES cells. Interestingly, PC9/RES cells showed high Zn content even prior to CDDP treatment (red-framed). Brighter colors indicate higher signal intensities for a given element. DIC, differential interference contrast image; S, sulfa signal; Fe, iron signal; Zn, zinc signal; Pt L α , platinum signal derived from CDDP. Scale bar, 10 μ m.

していたが、PC9/RESは、CDDP投与前からZn含有がPC9/SENより高いことがわかる（図中赤枠）。そして、CDDP投与後も高く維持されている。Ptの細胞への取り込み量は、PC9/SENの約1/3程度である。これらの結果から、排除機構にはZnが関わっているのではないかと考えるに至った（仮説①）。

3.3 SXFM解析から仮説、実証

医学研究においては、SXFM像で得られる情報そのものがゴールではなく、さらに医学生物学的意義を見いだすことが特に重要である。

1) 仮説からの展開

SXFM像で得られる情報はあくまでも現象論であり、ここから仮説への展開を行う必要がある。例えば、上述した元素マッピング像（Fig. 7, 8）では、ホルマリン固定を施しているために、残存している元素は蛋白結合型である可能性が高い。そこで、仮説①を明らかにするために、Znと結合する蛋白質を見いだすことで、Znの機能が示唆されると考えた。Zn結合蛋白質はいくつか知られているが、私たちの結果では、CDDP処置細胞においては、Znと還元型グルタチオンが、正の相関関係を示している（Fig. 9）。還元型グルタチオンは異物を排除する機構で知られている¹¹⁾。そこで、「CDDPのような異物が生体内に侵入した際に変動するZnは、Zn結合還元型グルタチオンであり、CDDPと錯体（細胞内で動き回れない安定状態）を形成し、異物の細胞外へ排除に関わる」という発展仮説②に至った。後に出された論文では、異物排除時に増大するZnは大旨還元型グルタチオンと結合していることが示されている。興味深いことに、PC9/RESは図（Fig. 9）

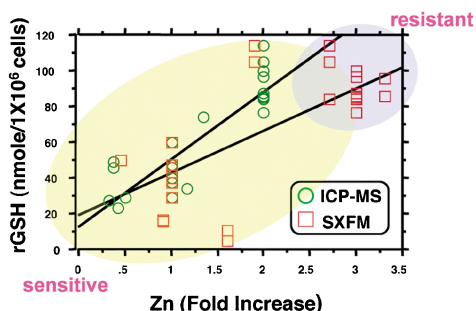


Fig. 9 Zn uptake in response to CDDP is highly correlated with reduced-glutathione (rGSH). Zn content in PC9/SEN or PC9/Res cells with or without CDDP treatment was measured using inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS; green circles, $n=29$) or SXFM (red squares, $n=27$). rGSH was measured in lysates collected from 1×10^6 cells. The correlation coefficients for the relationship between Zn and rGSH as determined via ICP-MS vs. SXFM were 0.794 and 0.553, respectively ($p < 0.05$ for both). Cells with high Zn and rGSH contents tended to be CDDP-resistant; in contrast, cells low in Zn and rGSH were relatively CDDP-sensitive.

で示す右上に集まり、PC9/SENは左下からCDDP処置時には右上まで分布を示す傾向がある。従って、使用したPC9/RESは還元型グルタチオンによる排除機能が高い可能性が考えられる。

2) 仮説の実証

上述の仮説②より、「排除機構にZnが関わっているのであれば、Znを除去すると、CDDP (Pt)は排除されない」に発展させてみた(発展仮説③)。実際に、Zn結合に特異性を示す金属イオン結合体(Znキレート剤: TPEN)を、細胞に適量かつ適切な時間で処置すると、PC9/RESでのPtの取り込み量は3倍改善され、PC9/SENとほぼ同等になる。興味深いことに、TPEN単独での処置では、PC9/RESは、PC9/SENと比較すると細胞死(アポトーシス: 細胞が自ら死ぬこと; 自殺細胞ともいう)に至る効果が高い。詳細の機序は不明であるが、PC9/RESがCDDPに打ち勝つために獲得した高濃度Znの代謝機構では、Znが少しでも減少すると生命維持に関わってしまう大惨事に至るのではなかろうか。さらに、CDDPとTPENを同時に処置することで、PC9/RESのCDDP効果は格段に改善された(Fig. 10)。これらのことから、上述の発展仮説③「CDDPの排除機構にZnが関わっているのであれば、Znを除去すると、CDDP (Pt)は排除されない」が証明された。同時に、CDDP耐性細胞の治療法の可能性が提示できた。

本研究においては、運良くZnが結合する蛋白質にまでたどり着いているが、この確率を上げるためには、さらに積極的な方法が必要と考える。現在、網羅的な元素結合蛋白質の分離・同定までを、疾患動物モデルを用いて施行している。金属結合蛋白質を明らかにすることができれば、当該蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色や蛋白質の電気

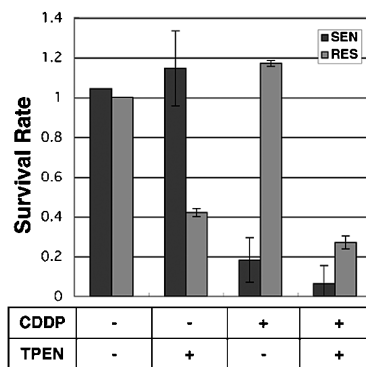


Fig. 10 Cellular survival rates after CDDP pulse treatment combined with a Zn chelator, TPEN. After pulse treatments for 5 consecutive days, cells were plated in soft agar and colony formation was examined. Analysis of survival rates clearly showed that the combination of CDDP and TPEN, as well as single TPEN treatment, significantly impaired the growth of PC/RES cells, whereas the same dose of CDDP as a single treatment did not attenuate the growth of PC9/RES cells. The means and standard deviations of colony numbers for PC/SEN (black columns) and PC/RES cells (gray columns) are shown.

泳動後のウエスタンブロット解析、免疫沈降法など、一連の生化学的手法が可能となり、元素と病気(病態)との関連解析が容易になる。同時に、細胞内元情報を得ることの重要性や意義を提唱することができると思う。

4. 微量元素情報から医学応用へ

疾患により、ある元素が健常人(微量元素量の正常値はある程度しか明らかになっていない)より極端に増大あるいは減少することが解った場合、第一に考えられる療法は、それらの増減をコントロールすることである。単純ではあるが、微量元素情報から直接的に得られた「対症療法」である。Wilson病は、Cuを排出する機構が充分でないために、肝臓や腎臓に過剰にCuが溜まってしまふ病気である。最初の治療法は過剰なCuを除去するために、Cuのキレート剤を使用していた。現在では、フリーのCuイオンのみを錯体化し無毒化する、副作用の少ない治療法で症状が改善され、治療効果を得ている¹²⁾。上述したCDDP耐性細胞はZnが増大している¹¹⁾ので、Znのキレート剤を適量加えることで、薬剤効果を回復している(Figs. 9, 10)。これらは根本治療ではないが、医療としては十分「あり」である。一方、細胞内の元素量は健常人と比較して変動はないが、細胞内で元素局在が変化する疾患(例えば、細胞質から核へ移動など)が明らかになった場合、元素結合蛋白質を明らかにするプロセスは、より重要となる。元素の局在移動には、蛋白質複合体の動きが背景に存在している可能性が大きいからである。細胞内元素の量や局在の変動を明らかにした後、速やかに変動のあった元素に結合する蛋白質複合体を解明するシステムの確立が、病

態解明や治療法の開発には重要と考える。

5. 世界的な研究の状況

放射光を用いた元素分布測定で生物試料を観察する研究は、世界的によく行われている¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし、真の意味で医学へ応用しているグループは少ない。多くの応用研究は医学利用のための味見の域を脱していないと思われる。その理由は、分解能・感度・スループット・手軽さ（観察・試料調製）においてまだまだ満足できないレベルにあるからである。私たちのグループではこの点を重視し、高性能（高分解能化、高感度化）、かつ、使い易い（ハイスループット化、ユーザーフレンドリー化）装置の開発を現在進めている。また、高分解能化についても、共同研究者らにより、世界に先駆けて7 nmの硬エックス線（20 keV）集光が達成されており¹⁷⁾、超高分解能 SXFM 実現のための大きな一歩を踏み出している。

6. おわりに

元素と疾患は関連が深いことは理解していても、その関係を明らかにしようとする、細胞内元素動態を捕らえるための手法や解析法が確立されていない、大きな壁に気がつく。生物医学系の研究者のみでは、困難を極めることは言うまでもない。本研究グループのような、物理工学系研究者との連携は必須であり、未だに原因や治療法の明確でない病気は、むしろ物理工学系研究者との共同研究開発により解明されるのではないかと考える。

謝辞

本研究は、国立国際医療研究センター石坂幸人博士、大阪大学大学院工学研究科精密科学専攻三村秀和博士、齋藤彰博士、山内和人博士、理化学研究所播磨研究所/SPring-8 玉作賢治博士、矢橋牧名博士、西野吉則博士、石川哲也博士、高輝度光科学研究センター光源・光学系部門光学系グループ湯本博勝博士、大橋治彦博士、国立遺伝学研究所生体高分子前島一博博士よりなる研究グループで行った。本研究開発は、主として、厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業（ナノメディシン分野）および内藤記念科学奨励金、文部科学省科学研究費補助金（特別推進研究）「硬 X 線 Sub-10 nm ビーム形成と顕微鏡システムの構築」（18002009）、グローバル COE プログラム「高機能化原子制御製造プロセス教育研究拠点」により行った。

参考文献

- 1) 昭和48年版環境白書、第2章開発と環境、第1節四大公害裁判の教訓、環境省。
- 2) 微量元素の知識、治療 vol 7, 南山堂, 2006.
- 3) Y. Meng, I. Miyoshi, M. Hirabayashi, M. Su, Y. Mototani, T. Okamura, K. Terada, M. Ueda, K. Enomoto, T. Sugiyama and N. Kasai: Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson disease, by expression of human ATP7B gene. *Biochim Biophys Acta.* 1690, 208-219 (2004).
- 4) M. P. Beeston, J. T. van Elteren, V. S. Selih and R. Fairhurst: Characterization of artificially generated PbS aerosols and their use within a respiratory bioaccessibility test. *Analyst.* 135, 351-357 (2010).
- 5) K. Watanabe and M. Kobayashi: How Do We Analyze the Metallic Element Distribution in Tissue Section—New Application of Element Mapping by EPMA—, *Hyomen kagaku* 22, 332-336 (2001).
- 6) S. Matsuyama, H. Mimura, H. Yumoto, Y. Sano, K. Yamamura, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku and T. Ishikawa: Development of scanning x-ray fluorescence microscope with spatial resolution of 30 nm using Kirkpatrick-Baez mirror optics. *Rev. Sci. Instrum.* 77, 103-102 (2006).
- 7) S. Matsuyama, M. Shimura, H. Mimura, M. Fujii, H. Yumoto, Y. Sano, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, T. Ishikawa and K. Yamauchi: Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system. *X-Ray Spectrometry* 38, 89-94 (2008).
- 8) S. Matsuyama, H. Mimura, K. Katagishi, H. Yumoto, S. Handa, M. Fujii, Y. Sano, M. Shimura, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, T. Ishikawa and K. Yamauchi: Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system. *Surf. Interface Anal.* 40, 1042-1045 (2008).
- 9) P. Walther, D. Studer and K. McDonald: High Pressure Freezing Tutorial. *Microsc Microanal* 13 (Suppl 2), 2007.
- 10) S. Matsuyama, M. Shimura, M. Fujii, K. Maeshima, H. Yumoto, H. Mimura, Y. Sano, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, Y. Ishizaka, T. Ishikawa and K. Yamauchi: Elemental mapping of frozen hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy. *X-Ray Spectrometry, in press.*
- 11) M. Shimura, A. Saito, S. Matsuyama, T. Sakuma, Y. Terui, K. Ueno, H. Yumoto, K. Yamauchi, K. Yamamura, H. Mimura, Y. Sano, M. Yabashi, K. Tamasaku, K. Nishino, K. Endo, K. Hatake, Y. Mori, Y. Ishizaka and T. Ishikawa: Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloroplatinum (II) treatment. *Cancer Res.* 65, 4998-5002 (2005).
- 12) I. Sternlieb: Copper and the liver, *Gastroenterol.* 78, 1615-1628 (1980).
- 13) T. B. Hoogenraad: Paradigm shift in treatment of Wilson's disease: Zinc therapy now treatment of choice. *Brain & Development* 28, 141-146 (2006).
- 14) P. Ilinski, B. Lai, Z. Cai, W. Yun, D. Legnini, T. Talarico, M. Cholewa, L. K. Webster, G. B. Deacon, S. Rainone, D. R. Phillips and A. P. J. Stampfl: The Direct Mapping of the Uptake of Platinum Anticancer Agents in Individual Human Ovarian Adenocarcinoma Cells Using a Hard X-ray Microprobe. *Cancer Research* 63, 1776-1779 (2003).
- 15) M. Kenneth: Kemner, Shelly D. Kelly, Barry Lai, Joerg Maser, Edward J. O'Loughlin, Deirdre Sholto-Douglas, Zhonghou Cai, Mark A. Schneegurt, Charles F. Kulpa Jr, Kenneth H. Nealson, Elemental and Redox Analysis of Single Bacterial Cells by X-ray Microbeam Analysis. *Science* 306, 686-687 (2004).
- 16) R. McRae, B. Lai, S. Vogt and C. J. Fahrni: Correlative microXRF and optical immunofluorescence microscopy of

- adherent cells labeled with ultrasmall gold particles. Journal of Structural Biology 155, 22-29 (2006).
- 17) H. Mimura, S. Handa, T. Kimura, H. Yumoto, D. Yamakawa, H. Yokoyama, S. Matsuyama, K. Inagaki, K.

Yamamura, Y. Sano, K. Tamasaku, Y. Nishino, M. Yabash, T. Ishikawa and K. Yamauch: Breaking the 10 nm barrier in hard-X-ray focusing. Nature Physics 6, 122-125 (2010).

● 著者紹介 ●



志村まり

国立国際医療研究センター・研究所・難治性疾患研究部難治性疾患研究室・室長
E-mail: mshimura@ri.ncgm.go.jp
専門：細胞生物，ウイルス学，細胞イメージング

【略歴】

1988年より米国マウントシナイ病院顎口腔再建治療部で研修医，1990年日本大学大学院博士課程歯学専攻科卒業，歯学博士。1990年-1996年日本大学歯学部総合歯学研究所・助手。1994年-1995年仏国立科学研究所（CNRS）。1996年-1999年国立国際医療センター研究所・流動研究員。1999年-2004年国立国際医療センター研究所病態代謝疾患研究室・室長。2004年より現職。



松山智至

大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻 助教
E-mail: matsuyama@prec.eng.osaka-u.ac.jp
専門：超精密加工，X線顕微鏡

【略歴】

2007年大阪大学大学院工学研究科精密科学専攻博士課程修了，工学博士。2007年大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻助教。2007年3月より現職。

Visualization of intracellular elements by scanning X-ray fluorescence microscopy for medical applications

Mari SHIMURA

Research Institute, National Center of Global Health and Medicine
1-21-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

Satoshi MATSUYAMA

Department of Precision Science & Technology Graduate School of Engineering, Osaka University
2-1 Yamadaoka Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

Abstract Minerals and metals are essential for a healthy body, and the concentrations of these elements have been suggested to change during the diseased state. However, the distribution of these elements may also change during disease. In this study, we describe the development and use of a scanning X-ray fluorescence microscope (SXF) system and an accompanying analytical method (elemental array). We demonstrate that a SXFM can reliably determine the cellular distribution of multiple elements with a high spatial resolution. Visualizing intracellular elements and understanding their kinetics may provide greater insight into disease etiology and may help to identify potential therapies.