

# 放射光蛍光 X 線分析法による、神経変性疾患の 脳組織内微量金属元素の解析

石原良子

部局系技術支援室 医学技術系第二医学系

## 概要

放射光蛍光 X 線分析 (SRXRF) 法は、格段に感度が高く、超微量元素の検出ができるという利点に加え、組織にダメージを与えることなく個々の細胞のマッピングができることから、近年では徐々に生物試料の元素分析にも応用されるようになった。我々はこれまで SRXRF 法により、各種の神経変性疾患の死後脳を用いて脳組織内の微量金属元素を分析し、本法の神経病理学的検索手段としての有用性を検討してきた。本報告では、その中から神経病理学的に有意義と思われた「アルツハイマー病」と「石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病」の解析結果を紹介する。

アルツハイマー病の脳ではアミロイド沈着や神経原線維変化とともに多量の神経細胞脱落（神経細胞死）が生じる。我々はこれらの病態の中で、特に神経細胞死に微量金属元素が関係しているかどうかという視点で分析をおこなった。その結果、カルシウム濃度が比較的高い細胞群で Zn/Ca にきわめて強い正の相関が認められ、神経細胞の元素マッピングにおいてはカルシウムと亜鉛が核に一致して分布するパターンもいくつかみられた。これらのことから、亜鉛イオンがアルツハイマー病の神経細胞死の機構に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

一方、近年、疾患の発症と鉛の蓄積との関連を示唆する報告のあった石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病においては、その可能性が少ないことを示唆する結果が得られた。

## 1 はじめに

生体内にはカルシウム、ナトリウム、マグネシウムなど比較的含量の多いものから鉄、銅、亜鉛をはじめとする極く微量の無機物までほとんどすべての元素が存在する。微量の無機物すなわち微量元素の機能については、分析技術の発展とともに栄養学的な意義、酵素の活性化剤などとしての生化学的な意義などが徐々に解明されつつある。また一方では、微量元素の増減による生命活動への影響についてもさまざまな角度から検討されている。

われわれは、これまで神経変性疾患の成因と微量金属元素の関わりの有無について検討するため、いくつかの分析法を試みてきた。その中で、最近実施した放射光蛍光 X 線分析 (SRXRF) 法では、一定の成果が得られ、SRXRF 法が病理学的検索手段として有用であることを確認できた。SRXRF 法は近年生物試料への応用が試みられるようになった分析法で、検出下限が ppm 以下ときわめて感度が高く、 $\mu\text{m}$  以下の微小領域の分析が可能であるという点に加え、電子ビームやイオンマイクロビームを用いる方法にくらべて熱による試料ダメージが少ない。そのため、元素分析に用いた切片をそのまま組織切片として染色できるので、細胞の組織化学的同定と細胞内外の元素分布の状態が同時につかめるといった利点がある。

今回分析の対象としたアルツハイマー病 (AD) は、脳組織内へのアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) タンパクの沈着、神経細胞内におけるリン酸化タウの蓄積（神経原線維変化）、および多量の神経細胞脱落（神経細胞死）を特徴

とし、一方、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病 (DNTE) は、側頭葉を中心とした限局性の葉性萎縮と多数の神経原線維変化、Fahr 病様の石灰沈着といった特徴をもつ。これらは共に進行性の神経変性疾患として知られている。発症頻度からすると DNTE はきわめて稀であるが、報告例のほとんどが日本に存在することで注目されている。

これらの疾患と微量元素との関連では、AD の成因とアルミニウムとの関係が古くから疑われてきたが、未だに結論は得られていない。最近では鉄の酸化状態と神経原線維変化の関連、亜鉛と A $\beta$  の集積の関連が報告されている。DNTE では近年、鉛の関与を疑う報告がなされている。このような背景から、今回は AD の細胞死が鉄や亜鉛などの微量元素と関連するかどうか、DNTE については疾患の成因に鉛の関与があるかどうかという病理学的観点に立って、SRXRF 法による解析をおこなった。

## 2 試料と方法

### 2.1 試料の準備 (AD の分析は分析 I とし DNTE は分析 II) とする

分析 I では、凍結保存の AD 剖検脳 2 例から側頭葉皮質の一部を採取して 4%パラホルムアルデヒドと pH 7.4 カコジル酸緩衝・2%グルタルアルデヒドの混合液に 2 時間浸漬解凍・固定した後 2M のシュウクロースに 40 分間浸し、コンパウンド包埋により 5 $\mu$ m 厚の凍結切片を作製した。薄切した切片は 25 $\mu$ m のマイラー膜 (ペットフィルム) に貼付し、室温で乾燥させて分析試料とした。

分析 II では、DNTE の 20%リン酸緩衝ホルマリン固定の剖検脳 4 例と、対照として DNTE に匹敵するレベルの石灰沈着を有する AD (ADHM) 1 例、通常範囲内の石灰沈着を有する AD (ADMM) 2 例の計 7 例から、側頭葉皮質の一部を採取してパラフィン切片を作製し、25 $\mu$ m のマイラー膜に貼付し、室温で乾燥させて分析試料とした。うち、DNTE 1 例と ADHM については -80 $^{\circ}$ C の凍結保存脳からも試料を採取し、分析 I と同様に分析試料を作製した。

### 2.2 分析の条件

SRXRF は高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (つくば KEK) の BL4A でおこなった。入射 X 線のエネルギーは 14.9keV、試料上でのビーム径は 6 $\times$ 5 $\mu$ m<sup>2</sup> で、マッピングの 1 ピクセルを 5 秒間、点分析の 1 点を 200 秒間とし、大気中で分析をおこなった。

### 2.3 元素分析

入射 X 線の強度をイオンチェンバーで測定した後、入射 X 線を合成マルチレイヤーフィルムで単色化し、スリットで制限して Kirkpatrick-Baez mirror で集光した。試料ホルダーの前に設置された CCD カメラを通して映し出された脳組織像から標的を確認しマッピングと点分析をおこなった。分析 I では錐体神経細胞を同定し、細胞障害のめやすとしてカルシウムのシグナルが高い細胞を探し、鉄と亜鉛のマッピングをおこなった。マッピングした細胞内外および、元素シグナルが低いためマッピングができなかった細胞の内外を数カ所ずつ点分析し、スペクトルの解析をおこなった。分析 II では神経細胞、石灰沈着部位、血管を対象としてカルシウム、鉛、鉄、亜鉛をマッピングし、数ヶ所ずつ点分析し、スペクトルの解析をおこなった。

## 3 結果

### 3.1 分析 I

15 個の神経細胞でカルシウム、鉄、亜鉛のマッピングをおこない、鮮明な画像を得た。分析した切片を HE 染色して顕微鏡観察し、マッピング画像と神経細胞の形状の一致を確認した。カルシウム、鉄、亜鉛の分布

パターンには細胞ごとの違いがみられた。しかし、細胞によってはカルシウムと亜鉛が核の部分で重なり合う、一定の分布パターンを示すものもあった (図 1)。一方、鉄については、カルシウムの分布状況に依存する傾向は認められなかった。組織学的には元素分布の違いによる組織像への影響は認められなかった。

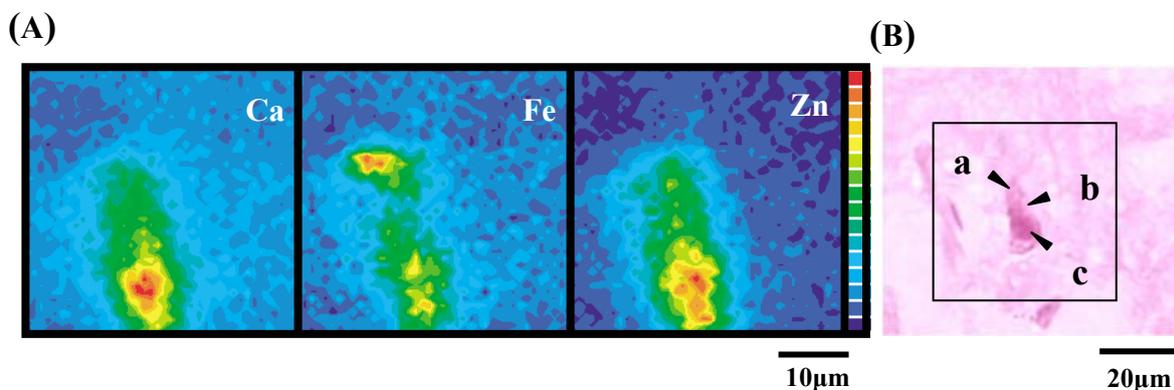


図 1. 神経細胞の元素マッピング (A): 神経細胞の光学顕微鏡写真 (HE 染色) a, b は細胞質、c は核。(B), (C): SRXRF 分析による元素マッピング画像。(B) のカルシウムと (C) の亜鉛は、HE 染色写真で照合すると核の部分に重なって分布していることがわかる。

マッピングした細胞をカルシウム濃度の違いにより 3 群に分けて検討した。カルシウム濃度のきわめて高い群ではカルシウムと鉄、カルシウムと亜鉛間に相関は認められず、中等度の群ではこのどちらにも相関が認められた。一方、カルシウム濃度が低い群ではカルシウムと鉄に相関はなく、カルシウムと亜鉛間にはきわめて強い正の相関が認められた (図 2)。

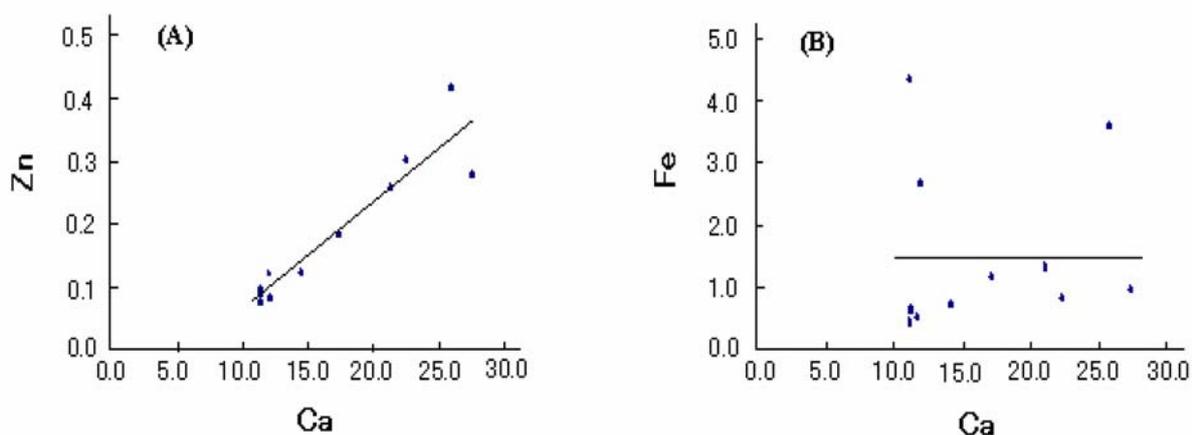


図 2. C 群における亜鉛、鉄、カルシウムの相関 (A) 亜鉛とカルシウムには顕著な相関がみられる。(B) 鉄とカルシウムには相関がみられない。

### 3.2 分析 II

パラフィン切片、凍結切片双方において DNTC と ADHM の石灰沈着部位および血管から高濃度の鉛とカルシウムが検出され (図 3)、カルシウムと鉛の濃度に正の相関が認められた (図 4)。石灰沈着の程度が通常範囲にある AD からは鉛は検出されなかった。すべての症例で細胞内には鉛の蓄積は認められなかった。

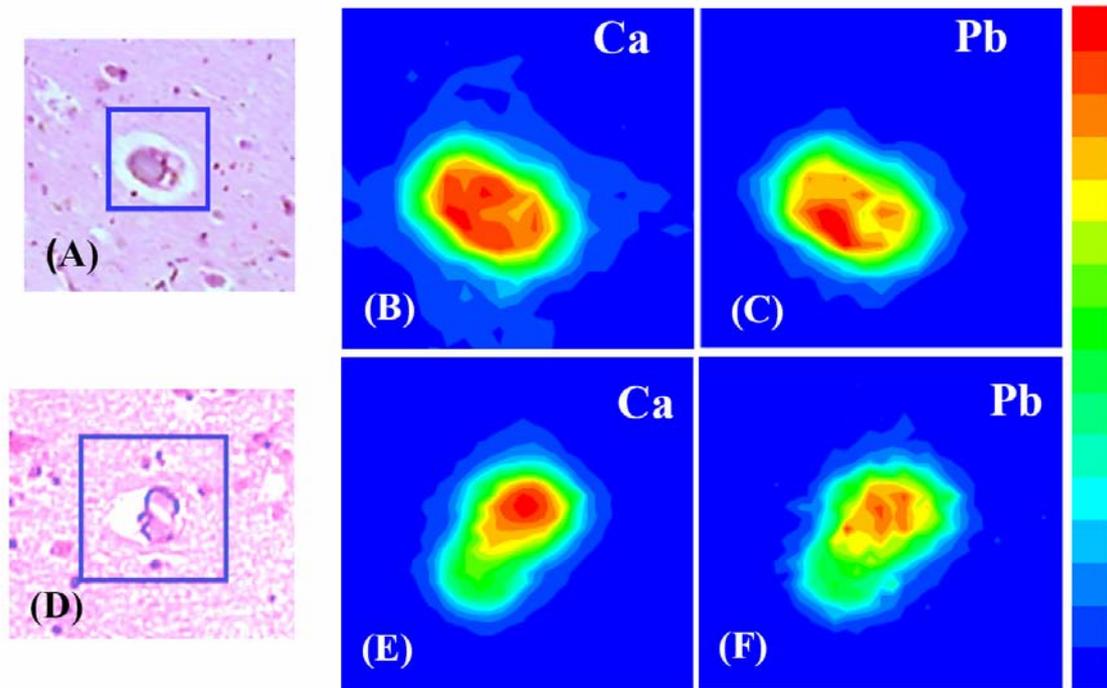


図3. DNTC と ADHM の石灰化した血管から検出された元素のマッピング画像。  
 (A) は DNTC の石灰化した血管の HE 染色写真、(B) は DNTC の血管から検出されたカルシウム、(C) は鉛 (D) は ADHM の石灰化した血管の HE 写真、(E), (F) はそれぞれカルシウム、鉛のマッピング画像。

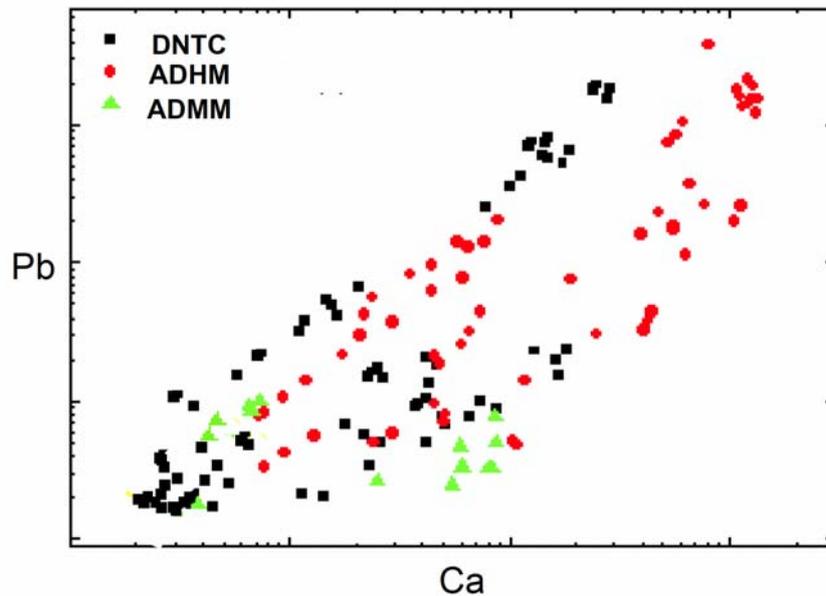


図4. 各症例におけるカルシウムと鉛濃度の相関。血管および組織におけるスペクトル分析値の定量化により得られた値をプロットしたもの。DNTC と ADHM では鉛とカルシウムに相関がみられる。

## 4 考察

### 4.1 分析 I について

生体の神経細胞内ではカルシウム濃度が上昇し続けるとプロテアーゼの活性が上がり、ミトコンドリアの機能障害や細胞骨格の乱れが生じて最終的には細胞死にいたると言われている。死後脳の組織切片では細胞内のカルシウムイオン濃度を測定することは不可能である。しかし、本実験において切片上に存在するいくつかの細胞内からカルシウムが検出され、濃度の差も細胞ごとに認められたことから、かつて細胞内にさまざまな量のカルシウムイオンが流入し、長時間にわたって存在したことが推測される。

神経変性疾患における神経細胞の変性様式は多様であるといわれており、今回の実験で細胞ごとにカルシウム、鉄、亜鉛が異なる分布パターンを示したのも、これを反映してのことと思われる。

また、生体内で容易に電荷を変えて遊離イオンとなる遷移金属の Fe は、必須微量元素としての有用な半面、フリーラジカルを生成して細胞毒を発揮する可能性が示唆されており、遊離した鉄イオンがカルシウムのホメオスターシスを変化させ、細胞膜の脂質過酸化を促進して細胞死を引き起こすとの報告もある。しかし、本実験では鉄とカルシウムの相関はカルシウム濃度が中等度の細胞群にしか認められず、しかも両元素の分布パターンにも一定のものが認められなかったため、鉄が細胞障害の早期に関与しているかどうかを推測することは困難だった。

一方、最近、亜鉛の細胞毒性にも目が向けられており、亜鉛イオンがフリーラジカルを生じさせ、大脳皮質の神経細胞に死をもたらすことがヒト大脳皮質由来の培養神経細胞とラット脳で確認されている。本実験においても、カルシウム濃度が中等度以下の細胞群に亜鉛とカルシウムの強い相関が認められたため、亜鉛イオンが神経細胞の機能障害の早期に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。また、核内における亜鉛とカルシウムの分布域の一致からはアポトーシスの可能性が疑われる。

### 4.2 分析 II について

今回の実験では DNTC だけでなく、DNTC に匹敵するレベルで石灰沈着がきわめて多い AD の血管や石灰沈着部位からも鉛が検出された。また、文献的には、脳内に多量の石灰沈着が生じた Fahr 病の脳組織からも高濃度の鉛が検出されたとの既報もある。これに対し、石灰沈着のレベルがそれ程高くない AD の血管周囲や組織からは鉛が検出されなかった。以上の点を考慮すると、石灰沈着部位におけるカルシウムの濃度と鉛の蓄積には関連があるが、鉛の、脳への蓄積自体に疾患特異性はないといえる。

## 5 まとめ

今回は AD の細胞死と鉄や亜鉛などの微量元素に関連があるかどうか、DNTC については疾患の成因に鉛の関与があるかどうかという病理学的観点から SRXRF 法で解析した。AD では、細胞内の亜鉛イオンが AD の神経細胞死の機構に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、一方、DNTC においては、疾患の発症と鉛の蓄積には直接の関連がない可能性が示唆された。さらなるデータの蓄積をめざせば、SRXRF 法は新たな有用性の高い病理学的検索の手段となりうるだろう。

## 参考文献

- [1] R.Ishihara, et al, "INVESTIGATION OF CELLULAR METALLIC ELEMENTS IN SINGLE NEURONS OF HUMAN BRAIN TISSUES", NeuroReport vol 13 No14, 2002.
- [2] 石原良子, et al, "石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病の脳内における金属元素の検討", 第 46 回日本神経病理学会抄録集、2005 年 5 月、p 126.