

放射光マイクロビームを用いた微量元素による活性酸素発生と
炎症発生機構との相関解析

**Study about the mechanisms of action between in production of ROS
by trace elements and inflammation processes using SR micro beam**

中島 加珠子^a, 国村 伸祐^b, 畔地 美紀^a, 白川 太郎^a

Kazuko Nakashima^a, Shinsuke Kunimura^b, Miki Azechi^a, Taro Shirakawa^a

^a 京都大学大学院医学研究科, ^b 京都大学工学部

^aKyoto University Graduate School of Public Health, ^bKyoto University Faculty of Engineering

様々な炎症の発生機構の中で我々が注目したのは活性酸素による細胞障害である。外的刺激に対する反応としての活性酸素発生によりサイトカインの分泌や細胞障害が誘導され、炎症が増悪すると考えられる。本実験で我々は既に確立した方法により培養細胞 HL60 を好中球状に分化誘導し、tumor promoter である PMA による刺激で、酸化ストレスを与えた。この系における活性酸素の発生には Fe の価数の変動が関わっていると予測されているが、可視的な確認はなされていない。また、他の元素の介在も予想されるため、蛍光 X 線分析により元素分布を確認し、その価数動態を調べた。

ROS (reactive oxygen species) and free radicals are thought to modulate pathways in leukocytes mediated inflammation, particularly in T-lymphocytes. In this study, synchrotron radiation x-ray fluorescence (SRXRF) spectroscopy was applied to non-destructive elemental mapping in the HL60 cells with O₂⁻ production. There are several mechanisms of ROS production, and many researchers consider that excessive accumulation of metallic elements can be causative factor for its generation. It was consider from our results that change of distribution and amounts of intracellular trace elements are important in inflammation processes.

背景と研究目的

金属アレルギーはほとんどが遷移金属で起こり、遷移金属は活性酸素の発生に大きく関わっている。また、免疫細胞における免疫機能の亢進には微量元素も大きく関わっていると考えられる。非破壊的に複数の元素の測定が可能な方法論によりはじめて、アレルギー発症の際の免

疫担当細胞内における金属元素の分布を知ることができよう。蛍光 X 線を用いた一連の分析で得られる結果は近年のゲノムからのアプローチとは異なった知見を得ることができることが予想される。また、臨床疾患としてのアレルギーにおけるタンパクの機能解析に代わる手段になる可能性も考えられる。

実験

実験は BL37XU の標準型真空封止アンジュレータからの蛍光 X 線を用いた分光分析である。サンプルに対して蛍光 X 線を用いた元素マッピングと XAFS を行った。HL60 細胞を好中球に分化誘導し¹⁾、Phorbol myristate acetate (PMA)による刺激で、酸化ストレスを与え²⁾、刺激サンプルとした。O₂⁻の発生経路の Fenton 反応には Fe(II)、Fe(III)の細胞内動態が関わると考えられ³⁾、この状態を可視的に捉えることを目的とした。活性酸素を誘導前と誘導後のサンプルの元素分布を比較し、鉄の価数動態を XAFS で比較した。そして生細胞測定を目指す基礎検討として、培地と洗浄液のノイズの測定を行った。

結果、および、考察

コントロールサンプルにおける元素のマッピングを示す (図 1)。(a)が光学顕微鏡写真、(b)が Fe、(c)が Zn の分布である。コントロール (刺激前) サンプルも PMA 刺激サンプルも、エタノール固定した細胞塊を播種している為、個々の細胞における元素分布は明確ではない。マッピングを行った後、高いピークが見られた位置で XAFS を行った結果を図 2 に示す。本実験では Fe に着目した。標準試料として FeSO₄・7H₂O [Fe²⁺], and Fe₂O₃[Fe³⁺]を選択している。PMA で刺激を与えることによって若干 3 価鉄が増加したように思われた。しかしながらこの結果は予備実験の結果とは一致せず、原因として細胞の播種が均一でなかったことが考えられた。

今後の課題

単一細胞における金属元素含有量は非常に低く、通常の状態での検出は困難である。Count を上げるには細胞を mass にせざるを得ない。



Fig 1. The SRXRF imaging of control sample. (a) an optical microscopic photograph. Elemental maps of (b) Fe, (c) Zn. The scanning area was 50×50μm².

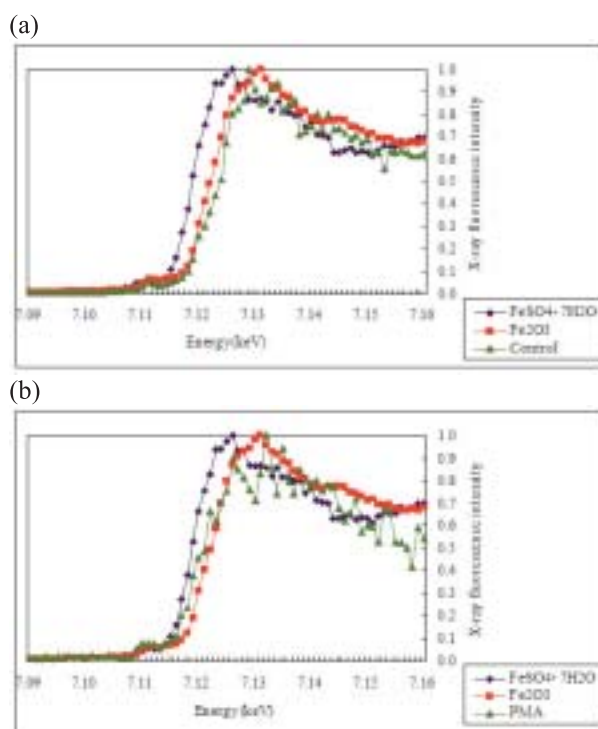


Fig 2. Blue and red lines show the XANES spectra of FeSO₄・7H₂O and Fe₂O₃ powder, respectively, as reference materials. These are the comparison of Fe K-edge XANES spectra between the sample and the reference materials (FeSO₄・7H₂O [Fe²⁺], and Fe₂O₃[Fe³⁺]). (a)Control, (b)PMA stimulation. The beam size was 0.25μm², and the incident beam energy was changed from 7.10 to 7.16 keV. The XANES spectrum of the samples showed a substantial difference from those of the reference materials FeSO₄・7H₂O and Fe₂O₃.

ビームを簡単に絞り込めるよう、接着細胞を用い均一且つ一層のサンプルの作成や、測定を容易にするために標的元素を人為的に取り込ませる等の工夫、そして化学的手法での活性酸素の発生状態のモニタリングが必要である。

参考文献

- 1) Takeuchi T, Morimoto K, Kosaka H, Shiga T. Biochem. Biophys. Res. Commun. **194** (1993) 57.
- 2) Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K, Carcinogenesis **17** (1996) 1543.
- 3) Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K. Cancer Res. **54** (1994) 5837.
- 4) M. Afzal, S. Matsugo, M. Sasai, B. Xu, K. Aoyama, T. Takeuchi, Biochem. Biophys. Res. Commun. **304** (1993) 619.

論文発表状況・特許状況

- [1] K. Nakashima, T. Shirakawa, AM. Ektessabi, Conference accelerators in research and industry 17th International. JL. Duggan and IL. Morgan, eds: Application of AIP Conference Proceedings 680(2002) 517.
- [2] 中島加珠子, 井手亜里, 白川太郎, 最新医学 58(2): 271.
- [3] 中島加珠子, 白川太郎, 井手亜里, 第14回微量元素学会 (口頭発表)

キーワード

・活性酸素

生命体の体内の様々な場所で起こる酸化還元反応の結果生じる、通常に比べて著しく化学反応を起こしやすい酸素。O₂⁻ や OH・ 等数種類が知られる。