

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390128

研究課題名(和文) 軟X線顕微鏡による毛髪試料の酸化ダメージとカルシウムの高分解能化学マッピング

研究課題名(英文) High resolution mapping of Ca and oxidative damage in human hair using X-ray imaging

研究代表者

伊藤 敦 (Ito, Atsushi)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：80193473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：毛髪は血液中の元素含有量を時系列で保持するメモリー組織として知られる。その特徴を生かして、病気予知に利用しようとする試みがある一方、外界からの様々の酸化ストレスにより元素量が左右される可能性も指摘されている。本研究では、Caに着目して、密着型X線顕微鏡による酸化ダメージの化学マッピングと、密着型顕微鏡及び蛍光X線を用いたCaマッピングを行い、毛髪内にて血液中のCa濃度を反映する領域と酸化ストレスの影響を受ける領域を調べた。人工酸化処理を行った毛髪を用いた観察から、毛髪周辺部と内部(キューティクルとコルテックス)にCaが集積する一方、中心部(メデュラ)のCaは酸化の影響を受けないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Human hair is a unique organ which memorizes information about time-dependent elemental contents in blood. Particularly Ca is a major concern in the possible relation to the prediction of breast cancer. However, Ca content significantly depends on the external oxidative stress, suggesting that Ca accumulation by oxidation should be considered in such medical applications. In this study distributions of Ca and oxidation of cystine, a major sulfur-containing amino acid in hair, were compared in submicron resolution with X-ray spectromicroscopy at the Ca-K and S-K absorption edges. Ca distribution was also obtained by fluorescent X-rays. Hair samples were bleached followed by Ca soaking. In parallel with the progression of the oxidation by bleach, Ca content was increased from cuticle, the outer region of the hair, to the inner region, cortex. In contrast Ca content in medulla, the central region of the hair, seemed to be independent of the Ca soaking following bleach.

研究分野：X線イメージング

キーワード：軟X線顕微鏡 医学・生物学応用 分子マッピング 元素マッピング 蛍光X線 酸化状態 毛髪

### 1. 研究開始当初の背景

波長を自由に選択できる放射光を用いた軟 X 線顕微鏡による生体試料観察における大きな特徴の一つは、構成軽元素の吸収端近傍の吸収微細構造 (NEXAFS) を利用した化学結合分布及びその結合を有する分子の分布を高分解能で求めることができる点にある。このような化学状態マッピングの生体試料への応用については、これまで生体分子のほとんどすべてに含まれる炭素 K 吸収端にて試みられてきた。例えば、DNA とタンパク質の XANES ピークのエネルギー位置の違いを利用した染色体中あるいは精子中の DNA 分布が報告されている。これに対し我々は、S、Ca、P などの生体構造と機能に重要な役割をもつが、C、O、N に比べて遙かに含有量の少ないマイナーな軽元素に着目し、NEXAFS の特徴を探ってきた。その結果、イオウ K 吸収端において、SH 化合物 (システインなど) とその酸化型である SS 化合物 (シスチンなど) の NEXAFS ピークのエネルギーが有意にずれていることを示し、生体試料においてイオウの酸化状態の画像化が可能なることを提案してきた<sup>1)</sup>。次いでシスチンがさらに酸化されたシステイン酸のピークがシスチンやシステインと異なることを見出し、イオウ含有試料の酸化ダメージの分布観察に利用できることを示した<sup>2)</sup>。実際に生体試料の酸化状態分布の観察において、このアイデアをズームング管を用いた密着型軟 X 線顕微鏡と組み合わせイオウリッチな蛋白質からなる毛髪試料に適用し、パーマ、ブリーチ等の人為的酸化処理を施した毛髪では、システイン酸が毛髪周辺部位 (キューティクル) で特異的に増加することを明らかにした<sup>3)</sup>。こうしてイオウ酸化ダメージのサブミクロン分解能観察 (約 0.5 ミクロン) をルーチンに利用できるシステムを確立した。

一方、毛髪含有元素のうち Ca は、近年乳がん予知との関連も議論され<sup>4)</sup>、その元素量と分布を求めることは大変興味深い課題である。しかしながら、パーマ、ブリーチ等の酸化処理で Ca が付着しやすくなるという結果もこれまでにさまざまな手法を用いて報告されており (文献 5, 6 など) 我々も Ca 分布を Ca-K 吸収端での密着型顕微鏡法及び蛍光 X 線マッピング法によって求め、酸化ダメージ分布 (システイン酸分布) と相関することを示した<sup>7)</sup>。これらの結果から、Ca 含量の評価には酸化ダメージを考慮しなければならないことが明白であり、Ca の由来が問題と考えられた。興味深いことに、この研究過程で我々は、キューティクルと対照的に毛髪中心部 (メデュラ) の Ca 含量は酸化の程度に依存しないことを示す観察例が得られ、酸化ダメージの場合と Ca 蓄積の状態及び由来が異なっていることが強く示唆された。さらに、ごく最近予備的ではあるが、乳がん経験者の毛髪において、メデュラでの高い Ca 含量が検出された。以上の背景から、外因性の

Ca と内因性の Ca を分離して検出し、さらにそれらの化学形を求める重要性が強く認識された。

- 1) A. Ito et al., In "X-Ray Microscopy" (eds. W. Meyer-Ilse et al.), 145, AIP, New York (2000).
- 2) A. Ito et al., J. X-Ray Sci. Technol., 19, 249 (2011).
- 3) T. Inoue et al., J. X-Ray Sci. Technol., 19, 313 (2011).
- 4) J. Chikawa et al., J. X-ray Science and Technology, 15, 109 (2007).
- 5) 丸茂義輝, 瀬田季茂, 衛生化学, 27, 381 (1981).
- 6) C. Merigoux et al., Biochim. Biophys. Acta, 1619, 53 (2003).
- 7) 伊藤 敦他, X 線分析の進歩, 43, 161 (2012).

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえた本研究の目的は、毛髪内 Ca 蓄積の特異性の知見をもとに、外的酸化ダメージによる Ca 蓄積と乳がんなどと言われている内在性の Ca 蓄積の違いを明らかにすることにある。そのために毛髪に対し人工的酸化処理を行い、

- 1) 毛髪の酸化ダメージの程度と Ca 蓄積の相関を毛髪各部位において確立すること。
- 2) Ca の毛髪各部位への結合性を調べる。具体的には、Ca 化合物の違いによる結合のしやすさ、Ca の毛髪からの遊離のしやすさなどを検討する。
- 3) 結合した Ca の化学状態を調べる。すなわち、Ca の化学状態のマッピングを行い、Ca 化学結合状態について知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 毛髪試料の酸化ダメージ分布と Ca 分布観察

毛髪断面の酸化ダメージ及び Ca 分布は Photon Factory の S-K 及び Ca-K 吸収端にて密着型顕微鏡により測定した。酸化度分布は以前我々が開発したシステイン酸 (毛髪主アミノ酸であるシスチンの酸化物) の特徴的な NEXAFS ピークを利用してマッピングを行った (研究成果の図 1 参照)。密着型 X 線顕微鏡は検出器として電子ズームング管 (C5333; 浜松ホトニクス) を利用し、分解能は 0.5 ミクロンに達する。しかしながら、検出感度が余り高くないため、本予算で感度を左右する MCP を更新した。Ca 分布は、Ca-K 吸収端での NEXAFS において化合物によってプロファイルが異なるため原理的に分子識別が可能であるが (研究成果の図 2 参照) 本研究では、検出器感度が低いこと、X 線エネルギーが高いため試料コントラストが低いなどの理由から、Ca 化合物すべてを含むような X 線エネルギーを選択し、Ca 含有分子の画像化を行った。

なお、Ca 元素分布に関して、分解能は約 5 ミクロンと劣るが感度にすぐれたマイクロビーム蛍光 X 線マッピングを Photon Factory で合わせて実施し、密着型顕微鏡で得られた

画像を補完した。

より高分解能 (100nm 以下) の Ca 分布を求めるために、分子研 UVSOR に設置された走査型軟 X 線顕微鏡 (STXM) による観察を検討した。ただし、UVSOR では高エネルギー X 線が利用できないため、Ca-L 吸収端を利用した。

#### (2) 試料の調製

本研究では毛髪中のメデュラに着目している。しかしながら、一般にメデュラはすべての毛髪に存在するわけではなく、また存在しても毛根から毛先まで断続的に存在する場合も多い。従って、メデュラを有する毛髪の事前の選別が重要となる。我々は赤外線検出器 (IR スコープ) を用いて、市販の毛髪からメデュラが多いロットを選別した (研究協力者であるカネボウ化粧品研究所・井上敬文博士のご厚意による)。人工酸化処理は過酸化水素とアンモニア混合溶液により行い、毛髪試料の毛根から 5cm ほどの部位を観察試料として、スライサー (HS-1; ジヤスコサポート) により約 20 ミクロン厚にカットし切片を作製した。スライサーはマイクロメータを装着した特注品を用いて、試料厚の精度を高めた。

なお、Ca-L 吸収端での観察のためには、X 線エネルギーが低いため透過度が小さく、試料をかなり薄くする必要がある。特注品スライサーにより厚さ 1-2 ミクロン程度までカットを行った。これは同時に行った細胞試料などの STXM による実験から、数ミクロン厚の生体試料は観察可能との結果による。

### 4. 研究成果

#### (1) 分子マッピングのための NEXAFS 測定

図 1 にシステイン酸の分子マッピングのための NEXAFS を示す。システイン酸マップは図のピークエネルギー 3 とボトムエネルギー 4 の差分で、試料厚はシスチンマップ、すなわちシスチンのピーク 2 とボトム 1 の差分により求め酸化度の補正を行った。

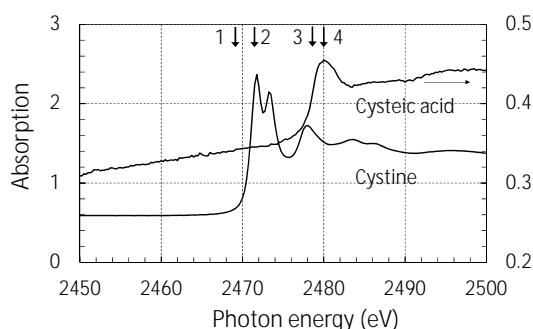


図 1. イオウ K 吸収端におけるシスチン、システイン酸の NEXAFS

図 2 に Ca 化合物の Ca-K 吸収端における NEXAFS を示す。Ca 分布は、多くの Ca 化合物の吸収が顕著に見られるエネルギー 2 とボトムエネルギー 1 との差分により求めた。

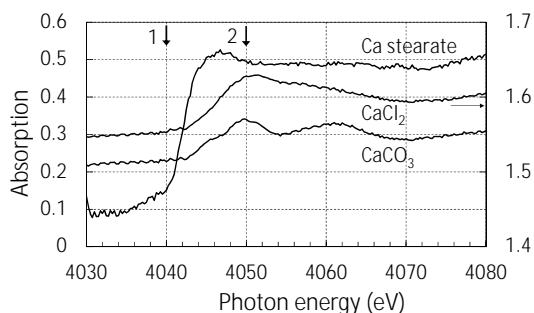


図 2. カルシウム K 吸収端における塩化カルシウム、炭酸カルシウム、ステアリン酸カルシウムの NEXAFS

図 3 に UVSOR で測定された Ca-L 吸収端での CaCl<sub>2</sub> の NEXAFS を示す。顕著な吸収ピークが確認され、イメージングに適用できることがわかった。

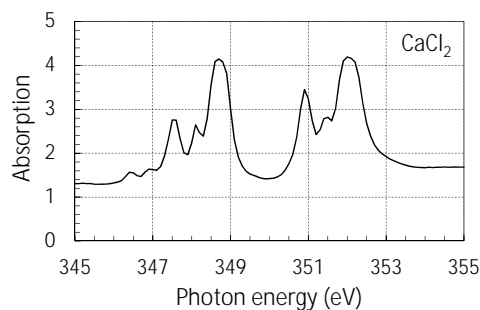


図 3. カルシウム L 吸収端における塩化カルシウムの NEXAFS

#### (2) 人工 Ca 処理による毛髪への吸着過程

外部からの Ca の毛髪への吸着過程に関して、毛髪内 Ca を EDTA により除去後、CaCl<sub>2</sub> を様々な濃度で加えて毛髪内分布を蛍光 X 線マッピングにより観察した。図 4 に結果を示す。毛髪周辺部のキューティクルから Ca が蓄積すること、その程度は酸化処理 (ブリーチ処理) によって大きく加速されることが明らかとなった。

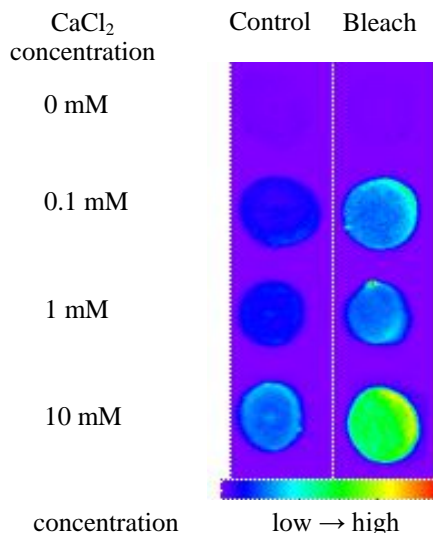


図 4. Ca 吸着過程の CaCl<sub>2</sub> 濃度依存性ブリーチ処理の有無を示す。

次いで、CaCl<sub>2</sub>濃度を固定してCaの吸着過程の時間依存性を調べた(図5)。処理時間が長くなるにつれてキューティクル領域からコルテックス領域(毛髪内部)にCa分布が進展していくことがわかる。しかしながら、メデュラでのCa蓄積は処理後15分からすでに明らかであり、それは60分でも変わらないように見えた。

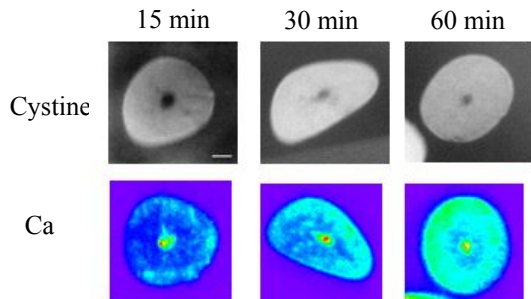


図5. Ca吸着過程のCaCl<sub>2</sub>処理時間依存性  
シスチン画像是密着型X線顕微鏡により、Ca画像是蛍光X線マッピングにより取得した。CaCl<sub>2</sub>濃度は10mMとした。スケールバーは20μmを示す。

以上の結果は、外部酸化によるCa蓄積は周辺部から起こること、一方、メデュラのCaはキューティクル、コルテックスのCaと由来が異なると考えられる。

### (3) メデュラをもつ毛髪の酸化度とCa吸着の相関

酸化度とCa蓄積の相関について、密着顕微鏡によるシスチン酸分布とCa分布(密着型と蛍光X線マッピングによる)を図6に比較した。上段の未処理毛髪は、測定部位が毛根より15cmと離れているため、環境中の要因による酸化がすでに起こっている。これと対応して、周辺部のCa蓄積も観察された。ブリーチ処理のみでは、酸化が進む一方、キューティクルとコルテックスのCaが除去された。注目すべきは、メデュラのCaがそのままであったことである。Caの毛髪構造物に対する吸着度の違いが考えられる。さらに下段において、ブリーチ処理後Caを吸着させると、再びCaがキューティクルに沈着した。

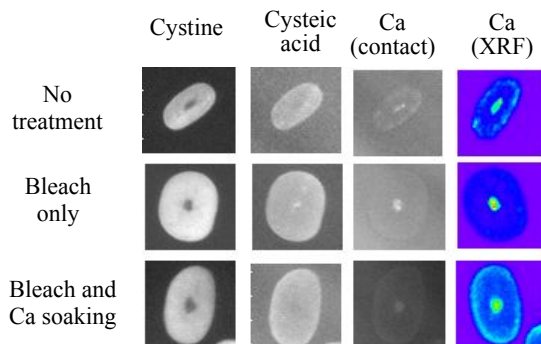


図6. シスチン酸化度とCa分布の比較  
Ca (contact) は密着型X線顕微鏡で求めたCa分布、Ca (XRF) は蛍光X線マッピングで求めたCa分布である。

これらの実験からメデュラとキューティクル、コルテックスのCa由来とその結合の違いが確立された。

以上得られたCaと酸化度の相関は、毛髪の各部位において当てはまることが判明し(発表雑誌論文5)。背景で述べた乳がん患者の毛髪などにおけるCa評価において考慮すべき重要な因子であることが明らかとなった。

### (4) 課題

当初の目的の1)と2)の一部は達成したが、2)の一部と3)はこれからの課題となった。メデュラでは内在性Caと酸化による外来性Caが重なっている可能性がある。メデュラとキューティクル、コルテックスのCaの化学形を測定することがその区別の一つの方法として重要である。Ca-K吸収端では本研究での電子ズームング管による密着型X線顕微鏡では感度が不足しており、本研究後に一般共同利用に供されることとなったPhoton FactoryのBL15A1での蛍光検出のNEXAFS測定が有効と考えられる。また、Ca-L吸収端での測定に関しては、NEXAFSは得られたが(図3)試料が1ミクロン程度の厚さでもまだ厚く、十分な透過光子数が得られなかった。細胞では数ミクロンまで画像化できたことから、おそらく毛髪は固定された細胞以上にタンパク質密度が高いことが原因と考えられる。より薄い毛髪試料の作製が必須であることから、今後クライオマイクロームによるサブミクロン厚の試料作製を検討したい。K、L両吸収端での測定から、Ca分子の分布が明らかになることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

1. A. Ito, T. Inoue, T. Kawai, K. Takehara, Y. Taki, S. Suzuki, K. Shinohara: Processes of oxidation and Ca accumulation in human hair observed by X-ray contact spectromicroscopy and X-ray fluorescence mapping, Photon Factory Activity Report 2012, #30, Part B, 283, (2014). 査読無
2. T. Ohigashi, H. Arai, T. Araki, N. Kondo, E. Shigemasa, A. Ito, N. Kosugi and M. Katoh: Construction of the scanning transmission x-ray microscope beamline at UVSOR, Journal of Physics: Conference Series, 463, 012006 (2013). 査読有
3. T. Ohigashi, A. Ito, K. Shinohara, S. Tone, M. Kado, Y. Inagaki, Y.F.Wang, N. Kosugi: Observation of DNA and protein distributions in mammalian cell nuclei using STXM, UVSOR Activity Report 2013, p. 158 (2014). 査読無
4. A. Ito, T. Inoue, T. Kawai, K. Takehara, S. Inoue, T. Shimizu, K. Shinohara:

- Distribution of Ca in human hair and its relation to oxidative damage examined by X-ray contact spectromicroscopy and X-ray fluorescence mapping, Photon Factory Activity Report,2013, #31, 73 (2014).査読無
5. A. Ito, T. Inoue, T. Kawai, F. Ouchi, Y. Inoue, K. Shinohara: Further Analysis of the relation between oxidative damage and Ca accumulation examined by X-ray contact spectromicroscopy with electronic zooming tube, Photon Factory Activity Report,2014, #32, 192 (2015).査読無
  6. A. Ito, T. Ohigashi, K. Shinohara, S. Tone, M. Kado, Y. Inagaki, N. Kosugi: Chemical mapping of DNA and protein in isolated cell nuclei during apoptotic process using STXM, UVSOR Activity Report 2014, p. 151 (2015).査読無
  7. S.Mitsunobu, M. Zhu, Y. Takeichi, T. Ohigashi, H. Suga, H. Makita, M. Sakata, K. Ono, K. Mase, Y. Takahashi: Nanoscale identification of extracellular organic substances at the microbe–mineral interface by scanning transmission X-ray microscopy, Chem. Lett., 44, 91-93 (2015).査読有
  8. A. Ito, T. Inoue, T. Kawai, Y. Taki, S. Inoue, T. Shimizu, K. Shinohara: Difference in the distributions between Ca content and the degree of oxidative damage in human hair determined by X-ray imaging, AIP Conf. Proc., 1696, 020021 (2016).査読有
  9. T. Ohigashi, A. Ito, K. Shinohara, S. Tone, M. Kado, Y. Inagaki, Y.-F. Wang, N. Kosugi: Observation of DNA and protein distributions in mammalian cell nuclei using STXM, AIP Conf. Proc., 1696, 020027 (2016).査読有
  10. E. Jamsranjav, T. Shiina, K. Kuge, Y. Kinjo, Y. Nakamura, K. Shinohara, A. Ito: Effect of contrast enhancement prior to iteration procedure on image correction for soft X-ray projection microscopy, AIP Conf. Proc., 1696, 020037 (2016).査読有
  11. A. Ito, T. Inoue, M. Kado, T. Ohigashi, S. Tone, K. Shinohara: Biomedical application of soft X-ray microscopy with special reference to spectromicroscopy, Acta Physica Polonica A, 129, 260-263 (2016).査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 伊藤 敦、篠原邦夫、刀祢重信、須田泰司、加道雅孝、大東琢治: 走査型軟 X 線顕微鏡 (STXM) による生体試料の分子イメージングの試み、UVSOR シンポジウム 2013、岡崎、2013.12.7
2. 大東琢治、稲垣裕一、Wang Yu-Fu、伊藤敦、小杉信博、加藤政博: UVSOR における STXM ビームラインの現状、UVSOR シンポジウム 2013、岡崎、

2013.12.7

3. 伊藤 敦、篠原邦夫、大東琢治: 走査型軟 X 線顕微鏡によるヒト培養細胞の観察と細胞内吸収スペクトル測定、第 27 回日本放射光学会年会、広島、2014.1.11
4. A. Ito, T. Inoue, T. Kawai, Y. Taki, S. Inoue, T. Shimizu, K. Shinohara: Different distributions between Ca content and the degree of oxidative damage in human hair observed by X-ray imaging, 12th International Conference on X-Ray Microscopy, Melbourne, Australia, 2014.10.26-31
5. T. Ohigashi, A. Ito, K. Shinohara, S. Tone, M. Kado, Y. Inagaki, Y.F.Wang, N. Kosugi: Observation of DNA and protein distributions in mammalian cell nuclei using STXM, 12th International Conference on X-Ray Microscopy, Melbourne, Australia, 2014.10.26-31
6. 伊藤 敦、篠原邦夫、刀祢重信、須田泰司、加道雅孝、大東琢治: 走査型軟 X 線顕微鏡による DNA マッピングの試み: アポトーシス細胞核における DNA 分布の変化、第 28 回日本放射光学会年会、草津 (滋賀)、2015.1.12
7. 伊藤 敦、大東琢治、刀祢重信、加道雅孝、井上敬文、篠原邦夫: 軟 X 線顕微鏡による生物試料の分子イメージング、ワークショップ「最先端の X 線イメージング技術が拓く生命科学の新しい世界」、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、神戸、2015.12.04
8. 伊藤 敦、篠原邦夫、刀祢重信、加道雅孝、大東琢治: 走査型軟 X 線顕微鏡による細胞内分子マッピングの定量的評価の試み、第 29 回日本放射光学会年会、柏、千葉、2016.01.09-11

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :



取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 敦 (ITO ATSUSHI)  
東海大学・工学部・教授  
研究者番号：80193473

(2)研究分担者

大東 琢治 (OHIGASHI TAKUJI)  
分子科学研究所・極端紫外光研究施設・助  
教  
研究者番号：50375169

(3)連携研究者

篠原 邦夫 (SHINOHARA KUNIO)  
早稲田大学理工学術院教授  
研究者番号：10112088