

培養細胞に蓄積された重金属化合物のエネルギー分散型分析電子顕微鏡による検出

一ノ瀬 昭 豊

長崎大学熱帯医学研究所共同研究室

五十嵐 章

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

Detection of Heavy Metal Compounds Accumulated in Cultured Cells using Energy Disperse Type Analytical Electron Microscope

Akitoyo ICHINOSE, and Akira IGARASHI

Central Laboratory, and Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan

Abstract: Presence of heavy metal compounds, such as mercury, chromium, and lead, were detected in cultured mammalian cells, LLC-MK2, by means of energy disperse type electron microscope. Introduction of these heavy metal compounds at high concentrations from 1 to 10 mM in the culture medium, resulted in the morphological change of cultured cells after 2 days of incubation at 37°C. The change was accompanied by the appearance of intracytoplasmic electron-dense granules from which significant levels of metal-specific signals were recorded. On the other hand, no significant metal-specific signals were recorded in the specimens when the cells were maintained for 2 days under media containing less than 0.1 mM of these metal compounds. The results indicated the capacity and limitation of the equipment to detect the accumulation of the heavy metals in medical or biological specimens.

Key words: Heavy metals, Analytical electron microscope, Cultured cells

Trop. Med. 27(3), 181-190, September, 1985

緒 言

エネルギー分散型分析電子顕微鏡には金属検知器が附属装置として装備されており、生体内に取り込まれた金属、殊に重金属化合物の局在部位を電子顕微鏡レベルで研究するために有力な手段と考えられる。しかしながら、当研究所が研究対象としている熱帯地における医学および生物学的諸問題の研究にこの装置を駆使できるためには、その金属検知能力

を比較的に簡単な生物学的実験系を用いて確かめておく必要がある。この目的のために我々は哺乳類の培養細胞の一つであるアカゲザル腎の培養細胞を用いてその培養液に水銀、クロム、鉛、の3種類の重金属塩を種々の濃度に加えたのち、培養細胞から作成した超薄切片から各々の金属に特有のシグナルを分析型電子顕微鏡を用いて検出できるか否かを検討した。

Received for Publication, July 18, 1985.

長崎大学熱帯医学研究所業績第1655号

材料と方法

細胞培養: アカデザル腎培養細胞 LLC-MK2 はタイ国ウイルス研究所より分与されたものを10%仔牛血清加イーグル培養液を用いて60mm ペトリ皿の中で37°C, 7日間, 5%炭酸ガスを含む気相中で培養した。

重金属化合物とそれによる培養細胞の処理: 実験に用いた重金属化合物は塩化第二水銀 (HgCl_2), 塩化クロム (CrCl_3), 酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), の3種で, 各々を100mM の水溶液とし, 高圧滅菌の後希釈し最終濃度が, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, および 10mM になるように細胞培養液に加えた。細胞はさらに2日間培養を続けたのち, 形態学的変化を倒立光学顕微鏡で観察したのち下記のとおり電子顕微鏡用超薄切片を作成し, 観察した。

超薄切片の作成と電子顕微鏡による観察: 培養細胞をラバーポリースマンでかきとり遠心で集め, 0.1M リン酸緩衝液で1回洗った後, 同緩衝液で希釈した2%グルタルアルデヒドと, 2%四酸化オスミウムで二重固定を行い, エポキシ樹脂に包埋し, ライヘルト製ウルトラミクロトーム OMU2 型でガラスナイフを用いて, 厚さ0.4 μm の切片を作成し, 0.5%ネオブレンWを塗布した銅メッシュに直接載せた。切片は無染色でカーボンコーティングのみを行い, 日本電子 JEM100CX 型分析電子顕微鏡を用いて, モード STEM, 加速電圧100kV で観察した。金属化合物の検出は加速電圧100kV の点分析で, オルテック社の EEDS II を使用した。分析時の試料の傾斜は20°, プローブ電流値は 8.8×10^{-11} A である。

結 果

実験に用いた重金属化合物は最終濃度で0.1mM 以下に培養液に加えても2日間の培養では, 重金属を加えなかった対照と同様, LLC-MK2 細胞に光学顕微鏡で認められる変化を引き起こさなかったし電子顕微鏡切片でも金属元素は検出されなかった。写真1は重金属を加えなかった対照の LLC-MK2 細胞で, a点とb点で金属分析を行ったが, 両点共同一のスペクトルが得られ, スペクトルのエネルギー分析の結果, 銅メッシュの Cu, 四酸化オスミウムの Os, 細胞成分の Cl, のスペクトルであることが確認され, 培養液に加えた Hg, Cr, Pb, のも

のではないことがわかった。

一方, 最終濃度1mM 以上に重金属を培養液に加えた時には, 培養細胞には著明な変化が見られた。写真2は塩化第二水銀を最終濃度1mM に加えた培養液で2日間培養した細胞で, 細胞核はクロマチンが凝集し, 小胞体及びゴルジ装置は崩壊し, ミトコンドリアは腫大して cristae も消失している。細胞質内に所々見られる円型の高電子密度の顆粒を分析すると比較的高いシグナルが得られ, そのエネルギーは培養液に加えた Hg のものであることが判明した。細胞質の他の部位及び核内の仁を分析すると初めに低い Hg のシグナルが見られた後, すぐにバックグラウンドに埋れてしまった。これは Hg 化合物が電子線の衝撃により昇華したためと思われる。

写真3は最終濃度10mM に塩化第二水銀を加えた培養液で2日間培養した細胞である。細胞の破壊は1mM の場合と大差ないが, 円型の高電子密度の顆粒はやや増加した他, 放射状に並ぶ電子密度の高い顆粒も見られた。後者は多分裂中の中期染色体であろうとおもわれる。これらの顆粒には, 分析の結果 Hg のスペクトルが検出された。細胞質の他の部位には1mM の場合と同様, 分析の初めに低い Hg のシグナルが認められた後, すぐにバックグラウンドに埋れてしまった。その原因は多分上記同様, 電子線の衝撃による Hg の昇華であるとおもわれる。これに対して核内の仁では1mM の場合よりも高い Hg のシグナルが検出された。

写真4は塩化クロムを最終濃度1mM に加えた場合の細胞で, 細胞の破壊は殆ど見られないが, 超薄切片で見られた電子密度の高い小顆粒の集まった部位を分析すると Cr に相当するエネルギーシグナルが検出された。切片の他の部位ではこれに相当するエネルギーシグナルは検出されなかった。

写真5は塩化クロムを最終濃度10mM に加えた場合で, 核内ではクロマチンが核内膜及び仁周囲に凝集し, 細胞質では小胞体, ゴルジ装置の崩壊と, ミトコンドリアの腫大と崩壊, 及び細胞膜の崩壊が見られる。細胞質内に点在する電子密度の高い不定型の顆粒を分析すると比較的高いレベルの Cr に相当するエネルギーシグナルが得られた。更に細胞質の他の部位及び仁からも Cr のシグナルが検出された。

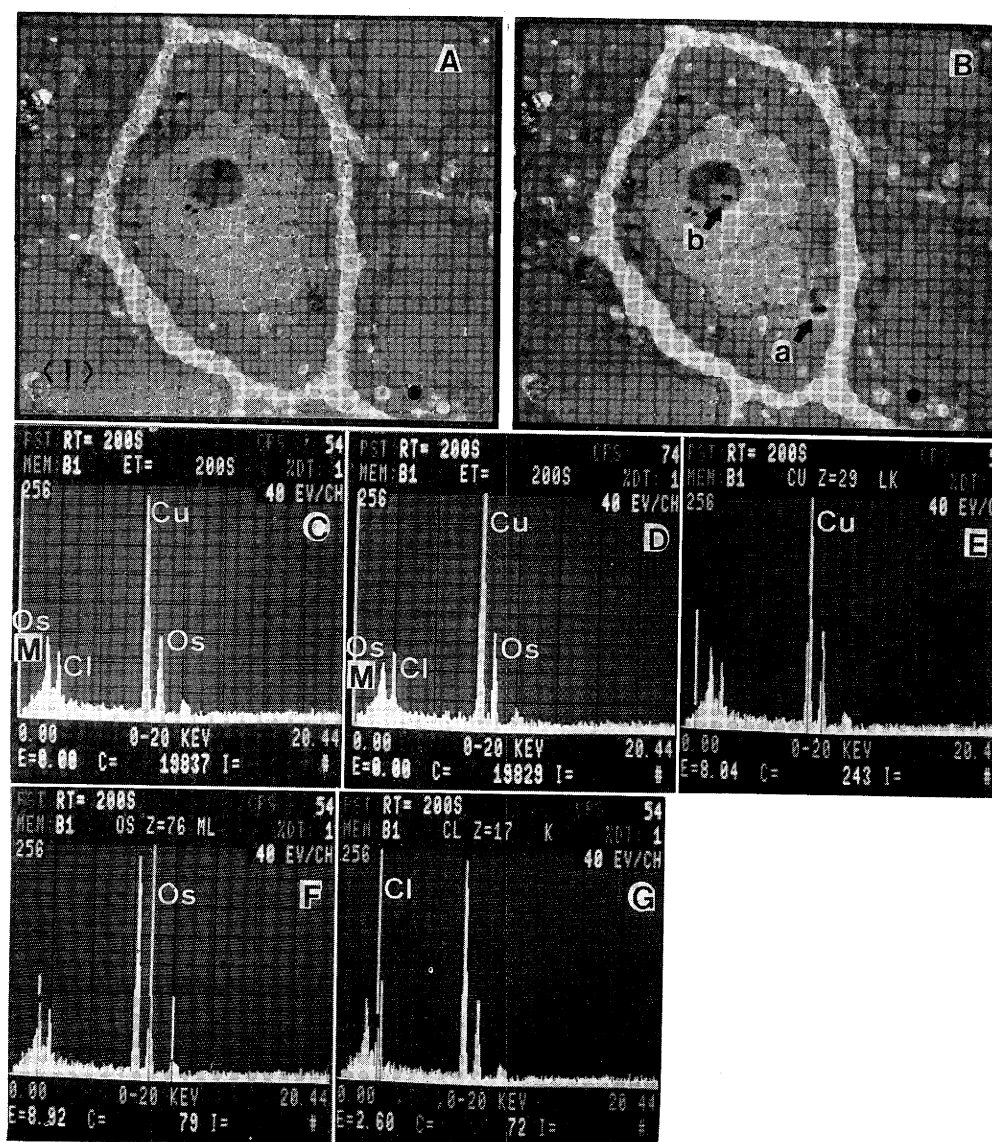


Photo 1. Control LLC-MK2 cells and energy spectrum detected by analytical electron microscope (Magnification $\times 3000$)
 Before (A) and after (B) analysis at points of arrows. C and D: Energy spectrum at points a and b, respectively. E: Identification of Cu (due to copper grid) in the spectrum C. F: Identification of Os (due to osmium tetroxide in the fixatives) in the spectrum C. G: Identification of Cl (cellular constituent) in the spectrum C.

写真6は酢酸鉛を1mMに加えた培養液で培養した細胞で、細胞構造の破壊は著明ではないが、細胞質には電子密度の高い不定型の物質が多数存在している。これを分析すると、Pbに相当する高いエネルギーシグナルが検出され、同様のシグナルは細胞外の高電子密度物質にも検出された。これに対して核内及び細胞質の他の部位では同様のシグナルは

検出されなかった。

写真7は酢酸鉛を10mMに加えた場合で、細胞構造は著しく崩壊し、粒子状の高電子密度物質が全体に散在している。この粒子を分析するとPbに相当するシグナルが検出された。写真7CではPbシグナルが非常に高かったのでスペクトルのレベルを低下させて測定している。

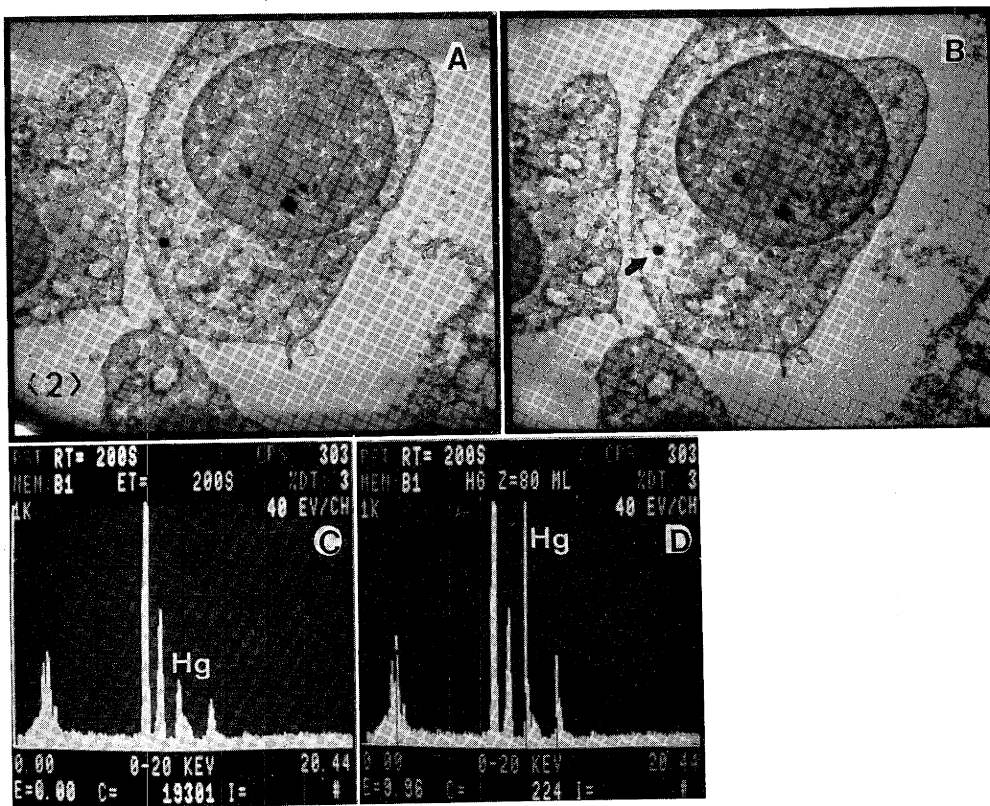


Photo 2. Spectrum analysis on LLC-MK2 cells cultured 2 days in the presence of 1 mM HgCl_2 . Magnification: $\times 3000$. Before (A) and after (B) analysis at points of arrows. C: Spectrum at the points analyzed. D: Identification of Hg in the spectrum C using KLM marker.

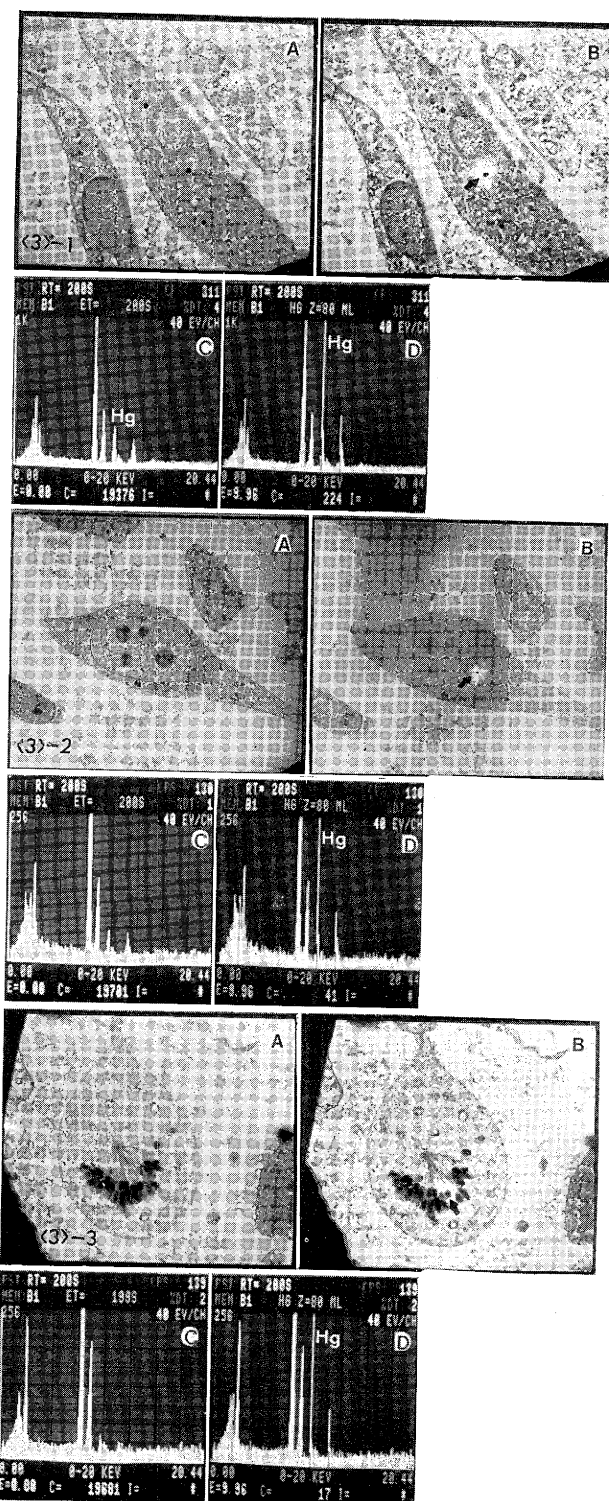


Photo 3. LLC-MK2 cells cultured for 2 days in the presence of 10 mM HgCl_2 . Magnification: 3-1: $\times 1800$; 3-2: $\times 2000$; 3-3: $\times 1800$. Before (A) and after (B) analysis at points of the arrows. C: Spectrum at the points analyzed. D: Identification of Hg in the spectrum C using KLM marker.

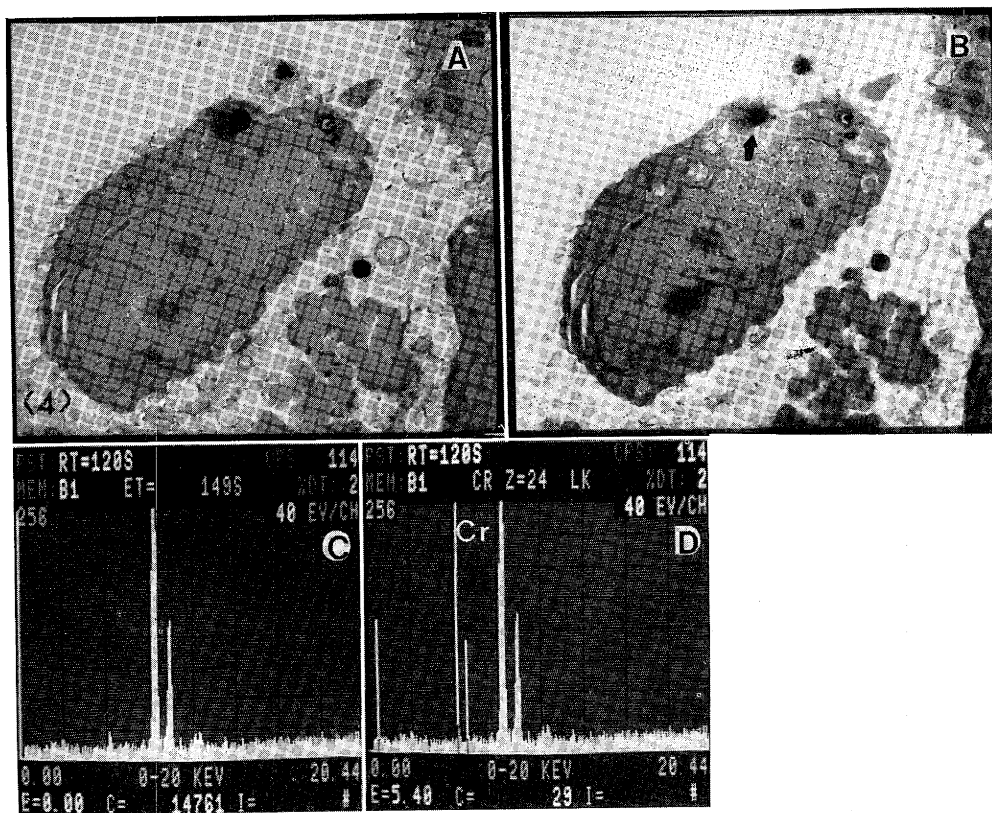


Photo 4. LLC-MK2 cells cultured for 2 days in the presence of 1 mM CrCl_3 . Magnification: $\times 3600$
 Before (A) and after (B) analysis at points of arrows. C: Spectrum at the points analyzed. D: Identification of Cr using KLM marker.



Pohto 5. LLC-MK2 cells cultured for 2 days in the presence of 10 mM CrCl₃. Magnification: $\times 1800$
Before (A) and after (B) analysis at points of arrows. C, E, and G: Spectra at points a, b, and c, respectively. D, F, and H: Identification of Cr using KLM marker.

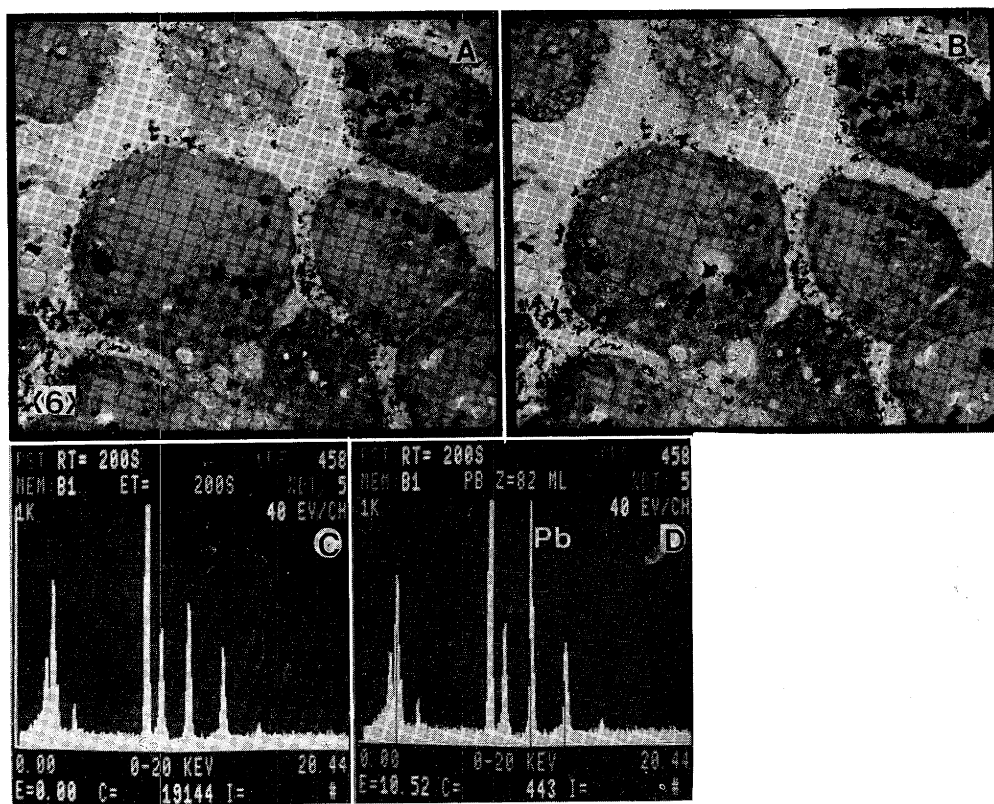


Photo 6. LLC-MK2 cells cultured for 2 days in the presence of 1 mM lead acetate. Magnification: $\times 1800$.

Before (A) and after (B) analysis at points of arrows. C: Spectrum at the points analyzed. D: Identification of Pb using KLM marker.

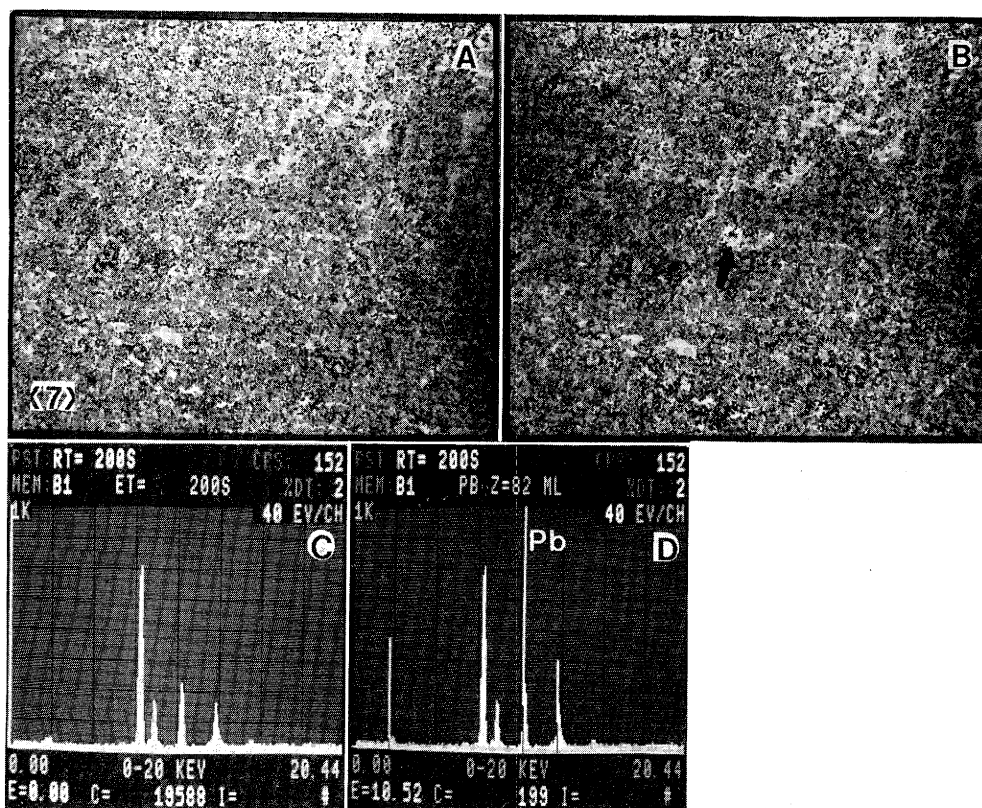


Photo 7. LLC-MK2 cells cultured for 2 days in the presence of 10 mM lead acetate. Magnification: $\times 1200$. Note marked cell destruction.

Before (A) and after (B) analysis at points of arrows. C: Spectrum at the points analysed. D: Identification of Pb.

考 察

この研究では2日間という比較的短期間に培養細胞に蓄積された重金属化合物を検出しようとした。この場合、1 mM 以上という可成りの高濃度に重金属化合物を培養液に加えないと認められる変化は形態学的にも、又金属検知機でも検出されなかった。更に長期間重金属化合物に接触させた場合の検討を必要とするものの、ここに得られた結果はこの装置を用いて分析出来る研究対象についての限界を示すとも考えられる。

水平 (1978), 及び谷川 (1979) によれば, Hg が検出された電子密度の高い顆粒は, ライソゾームまたはそれに由来するものとおもわれる。Cr が検出された電子密度の高い顆粒を強拡大で観察すると, 微少顆粒の集りであることが判明した。この構造物は小胞体付近に多く見られるので小胞体と何等かの関係があるとおもわれる。Pb が検出された試料では細胞外にも Pb を含む顆粒が観察されたことか

ら, これらの顆粒が Pinocytosis により細胞内に取り込まれたとも考えられる。

結 論

エネルギー分散型分析電子顕微鏡によって哺乳類培養細胞 LLC-MK2 に蓄積された水銀, クロム, 鉛といった重金属化合物を検出した。培養液中にこれら重金属化合物を 1-10mM という比較的高濃度に加えると, 37°C, 2日間の培養により細胞は形態学的変化を示し, 細胞内の電子密な顆粒に培養液に加えた重金属に特有のエネルギーシグナルが検出された。一方, 培養液中の重金属化合物の濃度が 0.1mM 以下の場合には2日間の培養では, 試料中に用いた重金属に特有のシグナルを認めることが出来なかった。これらの結果はこの装置を用いて医学, 生物学的試料中に蓄積された重金属を検出出来る能力とその限界を示すものである。

文 献

- 1) 水平敏知 (1979): 電子顕微鏡レベルでの生物試料の X線微小分析法. 細胞 10, 419-428.
- 2) 渡辺忠男, 永谷 隆 (1978): X線マイクロアナリシス—非分散. 細胞 4, 523-533.
- 3) 水平敏知 (1978): 生物医学への一般的応用. 分析電子顕微鏡. 日本メデカルセンター. 160-208.
- 4) 谷川久一 (1979): Iron storage diseases and iron overload. Ultrastructural aspects of the liver and its disorders. 医学書院. 278-281.