生体内の無機結晶性固体の研究—人体中のマグネタイト

小林 厚子^{☆1}, 山本 直一^{☆1}, J. L. Kirschvink^{☆2}^{☆1} 京都大学大学院人間・環境学研究科, 〒606-01 京都市左京区吉田近衛町. ^{☆2} Division of Geological and Planetary Sciences, California Institute of Technology, Pasadena, CA. 91125.

Study of Inorganic Crystalline Solid in Biosystem—Magnetite in Human Body

Atsuko Kobayashi^{☆1}, Naoichi Yamamoto^{☆1}, J. L. Kirschvink^{☆2}^{☆1} Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Yoshida-Nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-01. ^{☆2} Division of Geological and Planetary Sciences, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125.

Received May 14, 1996

SYNOPSIS

Ferritin, the iron storage nonhaeme-protein contains a ball of hydrated iron oxides ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) in its core, which is paramagnetic at room temperature. It is reported the hydrated iron oxide is the precursor of magnetite (Fe_3O_4) in the magnetotactic bacteria and *polyplocophoran* mollusks. It is not known whether this is the case for other organisms. In our study, we report the first detection of magnetic material in the human brain through the use of SQUID magnetometry. The material was characterized by HRTEM and EPMA. It was affirmed the material was a single crystals of magnetite. Magnetite distribution in tissues might be related with ferritin, if the core of these molecules are involved in magnetite formation in human. In general, both Perls staining and MRI imaging methods are adopted routinely for determining the relative amounts of Fe(+III) in the whole brain, which is dominated by ferritin. Both methods suggested high levels of Fe(+III) distribution in the globus pallidum, putamen, caudate, internal cerebral capsule of the cerebrum, red nucleus of the mid brain and lower concentrations in the substantia nigra of the mid brain and the dentate nucleus of the cerebellum. Whereas, our experiments showed that the distribution of magnetite is rather even in the whole human brain averaging 4 ng per gram of tissue (except for the meninges, where it is 20 times higher).

KEY WORDS

Biomaterial, magnetite, human brain, Perls staining, SQUID magnetometry.

1 緒論

近年になって細胞内にフェリ磁性体結晶マグネタイト (Fe_3O_4) を生成する生物が次々と発見されている。これまで、磁性体結晶の抽出、結晶構造同定までできた生物として、ひざら貝 (学術名: *Polyplocophoran*)^{1, 2)}、磁性細菌 (学術名:

Magnetospirillum)³⁾、磁性細菌に似た鎖状のマグネタイト微粒子を前頭部シ骨部内に形成する鮭、鮭⁴⁾が挙げられる。ひざら貝の歯は歯舌部分過程で歯の成熟が進み歯の表面の色が変わる⁵⁾。初期段階では、歯は鉄を含まないタンパク質とキチン質で満ちた透明な色をしており、タンパク質フェ

リチンが蓄積されるにつれ、非晶質含水酸化鉄 ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) の濃い赤色を帯びていく。最終的に鉄イオンが還元を受けマグネタイトに変わり、それと共に菌は黒い色を呈する。磁性細菌は、細胞内にリン脂質の膜で覆われた鎖状のマグネタイト微粒子を形成する。初期段階で、リン脂質の液胞内に非晶質含水酸化鉄が蓄積され、次に結晶質含水酸化鉄を経て鎖状にならんだマグネタイトに変わる。これ等の報告より、含水酸化鉄は生体で形成されるマグネタイトの先駆体と考えられており^{6,7)}、鉄供給源として細胞内のフェリチン、或いは前駆体のような物質の存在は、マグネタイトがヒト細胞内で形成される可能性を示唆している。

脳全体の相対的鉄濃度の測定^{8, 9)}では、MR Imaging法とPerls staining法^{10, 11)}とが通常使用されている。MR Imaging法では、写像強度は、水分子の水素の核の緩和時間に依存する。緩和時間は、常磁性遷移金属イオンが存在すると磁気双極子相互作用をうけて減少する¹²⁾。この機構による緩和時間はT2と表わす。生体内において室温で磁性金属イオンを含むものに、酸素供給の働きをするヘムタンパク質ヘモグロビン、ミオグロビン、鉄貯蔵の働きをする非ヘムタンパク質フェリチン等がある。MR Imaging法では、緩和時間の減少を画像に写出すことによって細胞組織内の常磁性物質の有無を調べることができる。上に述べた鉄イオンを含むタンパク質中の水素のT2値はすべて短くなるが、フェリチンに含まれる鉄イオンの量がヘモグロビンより大きい為、脳のMR Imaging法の画像では、T2への影響はもっぱらフェリチン¹³⁾によるものとして扱われている（この場合T2は常磁性塩からのみ寄与していると仮定されている。）

式による錯塩形成による反応で青色に発光させ、その濃淡より相対的分布を調べる方法である。

非ヘムタンパク質フェリチンの3価の鉄イオンはこれを酸で溶解させることにより決定する。

これらの方法を用いた脳内の3価の鉄イオン、フェリチン分布については従来数多くの研究報告がある。

本研究は、最初の試みとして、ヒト体内、特に脳における強磁性体、特に鉄化合物の有無の検証を行い、従来報告されている脳内におけるフェリチンの分布との関連性について報告する。

2 試料および実験方法

マグネタイトの分布とキャラクターゼーションについて検討した。ヒトの脳細胞組織各部位の残留磁化曲線を求めて、これより各部位での強磁性体の量を推量すると共に、この物質を抽出し、HRTEM、EPMAにより結晶同定を試みた。

なおすべての実験は、磁気シールド室¹⁴⁾内(4.2x3.3x2.8m³、室内漏洩磁場約150nT)で行なわれた。

2.1 試料

ヒトの脳組織と髄膜より大脳皮質近傍と小脳の組織を得、その他に大脳、大脳基底核群、脊髓硬膜、中脳、小脳テント(一例のみ)の各部位を入手した。(標本試料は、死後12-24時間経過した検死解剖済みの8体より摘出、36-88才、男5体、女4体、内4体はアルツハイマー病4病歴を有す。南カリフォルニアアルツハイマー病研究センター協会：The Alzheimers' s Disease Research Center Consortium of Southern California：の好意により提供を受けた。)

2.1.1 試料処理

試料組織(髄膜と脳組織)から毛細血管を取り除いた後、これを磁気測定に可能な大きさ(約5~25g)に分別した。蒸留水で充分洗浄した後、試料を液体チッ素に直接浸透し、固形化した。5gに満たない砕けた組織は、少量の蒸留水とともに水用容器にいれ同様に固形化した。またSQUIDのブランケット用として、約15~18gの角状の水を用いた。

2.2 実験器具、溶液

試料処理、抽出作業の際に外部からの強磁性体不純物の混入を防ぐために下記の様な処置をおこなった。

2.2.1 器具

試料処理用の容器及び器具は、セラミックナイフ、ガラスピペット、テフロン製ピンセット、パイレックスガラス器具、ナイロン糸等非金属製品を使用した。またTEM用のピンセットはチタン製を使用した。これらの容器、器具は2NHClに2日間浸した後、蒸留水洗浄、自然乾燥させた。ガラスピペットは、

その先を熱して丸くし、ガラス粉の試料への混入を避けた。抽出の際に、パイレックス製計量瓶をFig.2に示されるように細工したものを使用した。すなわち、計量瓶はその高さの約 2β の長さのガラス管の先端の底が平たくなるように閉じ、ふたの中央にそのガラス管の直径と同じ大きさの穴を開け、ふたの内側からガラス管を溶接した。

2.2.2 蒸留水, 溶剤液

蒸留水は、イオン交換水を3度蒸留して得られたものを使用した。細胞組織溶解剤液(市販: Beckman tissue solubilizer: 水酸化アンモニウム: メチルベンゼン; 1: 5 vol.) およびメチルベンゼンは、容器の底に5 cm四方のNd FeBの磁石を数週間置いてあらかじめ強磁性体粒子を除去したものを使用した。更に使用する前に磁石を近づけ、光学顕微鏡で強磁性体粒子が完全に除去をされていることを再度確認した。

2.2.3 粒子抽出

Fig.3に示される計量瓶のガラス管にNdFeB磁石棒を挿入し、試料と細胞組織溶解剤液を加え、室温で攪拌し細胞組織を溶解させた。細胞組織が完全に溶解した後、微量の固体がガラス管先端部に付着する(Fig.3)。これをメチルベンゼンで数回洗浄した後、管内の磁石を抜き取り、先端に付いている粒子を約0.25 mlのメチルベンゼン中に移した。更に粒子をルビーの攪拌棒(自製)で機械分散した後、ガ

ラスピペットで分散液を吸い上げ、カーボン膜TEMグリッド上に滴下し、自然蒸発させた。

2.3 装置及び操作

2.3.1 測定装置

磁化測定装置として、SQUID(2-G Enterprises社製、試作品)を使用した。IRM コイル(自製)及びAf コイル(2-G Enterprises社製)をFig.1の様に設置されている。

Fig.2 Magnetic finger modified from a weighing vial for extracting magnetic material from solutions.

Fig.3 Black strings of aggregated magnetic particles extracted from cerebellum tissue are viewed under low power through an optical dissecting microscope. These are collected at the focus of the magnetic finger device.

2.3.2 操作

試料はナイロン糸で固定され、ステッピングモーターを用いてAf, IRM コイルと測定部間を移動する。最初に100 mTで試料を磁化した後SQUIDで

Fig.1 Schematic diagram for magnetic measurements in the magnetically shielded clean room. IRM: isothermal remanent magnetization. Af of sIRM: the progressive alternating field demagnetization of the saturation IRM.

測定した。続いてAFコイルで試料を消磁(0 ~ 200 mT, 25 ステップ), IRM コイルで逐次印加磁場を変化させ, 磁化(0 ~ 631 mT, 25 ステップ)を測定した。

Fig.4 Magnetic properties for tissues. (A) representative brain cerebellum samples. (B) distilled, deionized water. The curves show the relative remanent moments in the samples after a brief exposure to the indicated applied fields.

残留磁化値 (IRM) の測定から残留磁気曲線を求めた。測定中は, 測定器底部から冷却したチッ素ガスを流しSQUID内を -15°C に保った。

なおブランクテストとして, 各試料の測定前後に前述の氷のIRM値を測定した。

粒子観察及び組成分析にはそれぞれ TEM (Philips, 社製, EM 430), EPMA(EDAX 社製, 9900)を使用した。TEMグリッドは, 銅製, 200メッシュ, またカメラ定数の補正試料には金蒸着膜を使用した。

Table 1 Saturated IRM values of the different tissue parts from one patient.

Tissue	Saturated IRM (nA · m ²)	Weight of tissue (g)	Saturated IRM per gram of tissue ($\mu\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$)
No. B103993			
Cerebral cortex	2.4	9.1	0.26
Basal ganglia	0.842	12.36	0.068
Parietal lobe (1)	1.075	4.5	0.235
(2)	0.518	7.34	0.076
Frontal lobe (1)	1.93	6.0	0.32
(2)	1.7	0.8	2.125
Occipital lobe	1.24	11.0	0.113
Temporal lobe	6.3	9.67	0.65
Mid brain	0.205	1.84	0.143
Cerebellum			
With medial posterior	1.31	6.27	0.079
With dentate	1.39	15.03	0.925
Lateral border	1.27	9.10	0.138
Pia			
Temporal lobe	1.198	0.46	2.604
Cerebellum (1)	2.7	0.63	4.28
(2)	4.90	1.53	2.95
Frontal lobe	1.27	0.8	1.90
Parietal	0.729	1.00	0.729
Dura			
Spinal	1.25	4.0	0.31
Brain matter	1.23	5.91	2.08

3 実験結果

3.1 マグネタイト分布

Fig.4(A) に磁気測定による脳試料の残留磁化曲線の一例を示す。縦軸は比残留磁化 (Af 又は IRM / sIRM) を, 横軸は印加磁場の強度 (0 ~ 631 mT) を示す。

IRM 曲線と Af 曲線が外部磁場 25 mT 付近で互いに対称的になり, 直線勾配はゆるやかで, また外部磁場約 300 mT で IRM 値は飽和に達している。

Fig.4 (B) は, ブランクテストの測定結果を示す。残留磁化曲線において, 試料 1 g 当たりの sIRM 値は, 外部磁場が 600 mT で $0.01 \sim 0.04 (\mu\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{kg})$ の範囲にあり, 脳試料の sIRM 値の約百分の一の値を示す。これより, 脳試料に微量の強磁性体が存在すると推定した。Table 1 は一標本における脳組織 sIRM の測定値である。髄膜を除く脳細胞の単位グラム当たり sIRM 測定値の平均は, $0.21 (\mu\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{kg})$ で, 髄膜では $3.33 (\mu\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{kg})$ であり, 大脳, 中脳, 小脳の各測定部位の間に顕著な差はなかった。

Fig.5(A) TEM images of crystal morphologies of an extracted aggregate of magnetic particles. 5(B) The diffraction rings from the crystals shown in (A) confirms Fe_3O_4 - $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ identification.

3.2 電子顕微鏡写真と結晶同定

Fig.3 に大脳組織 40 g より抽出された粒子の集合の光学顕微鏡写真を示す。黒色の粒子は針状の集団を形成している。これは、磁気走行性バクテリアから抽出した磁性体粒子を、同じ様に観察した時の状態と類似している。

Fig.5(A) は抽出粒子のTEM写真を示す。粒度は、

Fig.6 Characteristic x-ray energy data of a clump of small particles from the cerebellum, by energy dispersive x-ray analysis.

70 個の粒子の中で 62 個は直径 10 ~ 70 nm 範囲にあり (平均 33.4 ± 15.2 nm), 他の 8 個は直径が 90 ~ 200 nm の範囲にある。Fig.6(B)及びFig.6にFig.5 (A) で示された粒子の電子線回折像およびEPMA の測定結果を示す。EPMA では純粋な Fe によるピークの他に極微量の Si によるピークのみが観察された (Cu ピークはTEMグリッドによる)。

これより、試料は殆どFeのみを含む化合物とかがえられる。

Fig.7はFig.8にある集合粒子の指数付けされた電子線回折像を示す。これらの回折像より、粒子はスピネル型結晶構造を持つ強磁性体マグネタイト Fe_3O_4 (より正確には、鉄の酸化が進んだ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) であると考えられる。

Fig.8 は小脳から抽出したマグネタイトの格子像ある。Fig.8 に示す回折像と同じ結晶方位 $\langle 211 \rangle$ である。格子間隔 4.85 Å をもつ (111) 面がでている。

4 考察およびまとめ

ヒトの脳と脳髄膜から強磁性体物質マグネタイト-マグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) を検出、結晶を抽出することができた。

試料内の強磁性体粒子は、1) 保磁力を表わす残留磁化曲線の交差点が、すべての試料で 12 mT (軟膜) から 50 mT (大脳基底核群) の範囲 (平均保磁

Fig.7 The indexed selected-area electron diffraction spot pattern of one of these crystals, taken in the $\langle 211 \rangle$ zone the fringes of the mixture of odd and even numbers indicate the partial oxidation to maghemite.

力が 30 mT) にあり単一磁区マグネタイトの理論値内にある。2) 磁性細菌から得られたマグネタイト粒子による残留磁化曲線の直線勾配(残留磁化曲線の交差点を原点にして)は 8.2 付近(未発表)であるが、試料による直線勾配は、2.7 付近とゆるやかである。これらより、単一磁区をもつマグネタイトで、磁性細菌内のマグネタイト粒子より粒子径にばらつきをもつと判明された。粒度分布ばらつきにおいては TEM 写真観察による粒径測定と一致する。得られた標本の平均 sIRM 測定値は、髄膜で $3.33 (\mu\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{kg})$ 、それ以外の脳組織では $0.21 (\mu\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{kg})$ と大脳、中脳、小脳の各測定場所に差はみられなかった。マグネタイトは脳内に均一に分散していると考えられる。また、マグネタイト 1 g 当たりの sIRM 値は $46 \times 10^3 (\text{A} \cdot \text{m}^2)$ であるので、脳組織 1 g 当たり 456 ng のマグネタイトが含有すると推定された。

脳内の強磁性体粒子分布と Perk staining 法による鉄イオン相対濃度分布との違いを考察してみる。ヒトの脳内のフェリチン相対濃度分布⁹⁾では、大脳では淡蒼球外側部、内包、被殻、尾状核頭、後頭葉の皮質、中脳では黒質、赤核、小脳では、歯状核が他の

Fig.8 TEM images of a clump of small maghemite crystals showing the pattern of intersecting $\{111\}$ and $\{022\}$ lattice fringes.

脳内の強磁性体粒子分布と Perk staining 法による鉄イオン相対濃度分布との違いを考察してみる。ヒトの脳内のフェリチン相対濃度分布⁹⁾では、大脳では淡蒼球外側部、内包、被殻、尾状核頭、後頭葉の皮質、中脳では黒質、赤核、小脳では、歯状核が他の場所と比べてフェリチンが多く分布することが報告されており、その偏在を示している。脳内のマグネタイトは均一に分布しているという本実験結果と異なっていることが見出された。アポフェリチン空洞内に含水酸化鉄を蓄積するフェリチンは、マグネタイト形成段階で、ひざら貝の歯の成長時に生成される含水酸化鉄や、磁性細菌内の粒子形成段階で蓄積される非晶質含水酸化鉄に重要な役割を果たしている^{5, 10)}と考えられている。脳内のフェリチン分布とマグネタイト分布が一致しない本実験結果は、脳組織で検出されたマグネタイトは生体細胞によるものであるがフェリチン先駆体である可能性が少ないことを示唆している。しかし脳内のフェリチン存在量^{17, 18)} ($0.3 \sim 7 \mu\text{g}/\text{lg brain tissue}$) とマグネタイトの含有量($4\text{ng}/\text{lg brain tissue}$) がかなり違うので、フェリチンとマグネタイトの分布の明確な相関関係が得られていない要因にもなっている。

放射性指示薬 Fe^{59} を用いた実験¹⁹⁾ により血液に異端子として注入されたマグネタイトの鉄は代謝

されフェリチン内に蓄積されていくこと、および鉄の還元と透析によって含水酸化鉄を取り除いたアポフェリチン空洞内に、マグネタイト結晶を形成させる実験²⁰⁾が、報告されている。しかしながらアポフェリチン内に形成される含水酸化鉄と細胞内でのマグネタイト粒子形成の関連性については今後の残された研究課題である。

謝辞

脳標本の提供に御尽力をいただきました南カリフォルニア大学医学部 Carol Miller 博士、カリフォルニア工科大学材料研究センター Brent Fultz 博士並びに Carol Garland 技官に心から謝意を表します。本研究の一部は National Institute of Health Grant GM-41635, National Science Foundation Grant DMR-8811795 の援助で行われました。

文献

- 1) H.A. Lowenstam: Science, 156(1967)1373.
- 2) H.A. Lowenstam, S. Weiner: Science, 227 (1985) 51.
- 3) S. Mann, N.H.C. Sparks, Board, R.G. Board: Adv. Microb. Physiol., 31(1990) 125.
- 4) S. Mann, N.H.C. Sparks, M.M. Waker, J.L. Kirschvink: J. Exper. Biol., 140 (1988) 35.
- 5) H.M. Nesson, A.H. Lowenstam: A new biomagnetism, (eds.) J.L. Kirschvink, D.S. Jones, J. Macfadden: Plenum Press New York, (1985) 333.
- 6) Y. Tamaura, K. Ito, T. Katsura: J. Chem. Soc. Dalton Trans., (1983) 189.
- 7) S. Mann: Nature, 36 (1993) 499.
- 8) B. Drayer, P. Burger, R. Darwin, S. Riederer, R. Herfkens, G.A. Johnson: A.J.N.R., 7(1986) 373.
- 9) A. Bizzi, R.A. Brooks, A. Brunetti, J.M. Hill, J.R. Alger, R.S. Miletich, T.L. Francavilla, Di Chiro Giovanni: Radiology, 177(1990) 59.
- 10) J.P. Cassella, J. Hay, M.T. Ball: Proc. Roy. Micros. Soc., 25(1990) 41.
- 11) J.P. Cassella, J. Hay: Metal iron in biology and medicine, (eds.) Ph. Collery, L.A. Poirier, M. Manfait, J. C. Etienne: John Libbey Eurotext, Paris, (1990) 104.
- 12) R.B. Lauffer: Chem. Rev., 87(1987) 901.
- 13) S.H. Koenig: Iron biominerals, (eds) R.B. Frankel, R. Blakemore: Plenum Press N.Y., (1990) 359.
- 14) G.R. Scott, C. Frohlich: A new biomagnetism, (eds.) J.L. Kirschvink, D.S. Jones, B.J. Macfadden: Plenum Press, New York, (1985) 197.
- 15) M. Fuller, W.S. Goree, W.L. Goodman: A new biomagnetisms, (eds.) J.L. Kirschvink, D.S. Jones, B.J. Macfadden: Plenum, New York. (1985) 103.
- 16) R.B. Frankel, G.C. Papaefthymiou, R.P. Blakemore, W.O'Brien: Biochim. Biophys. Acta., 763 (1983) 147.
- 17) B. Hallgren, P. Sourander: J. Neurochem., 3 (1958) 41.
- 18) J.F. Schenck, O.M. Mueller, S.P. Souza, C.L. Dumoulin: Iron biominerals (eds.) R.B. Frankel, R. P. Blakemore, Plenum Press, N.Y., (1990) 373.
- 19) E. Okon, D. Pouliquen, P. Oko B.N. Kudryavtsev, P. Jallet: Laboratory investigation, 71 (1994) 895.
- 20) F.C. Meldrum, B.R. Heywood, S. Mann: Science, 257 (1992) 522.