



Glutaraldehyde fixation method for single-cell lipid analysis by time-of-flight secondary ion-mass spectrometry

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 永田, 泰之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2806

博士(医学) 永田 泰之

論文題目

Glutaraldehyde fixation method for single-cell lipid analysis by time-of-flight secondary ion-mass spectrometry

(飛行時間型二次イオン質量分析法による単一細胞脂質解析のためのグルタルアルデヒド固定法)

論文の内容の要旨

近年、腫瘍増殖と脂質代謝における変化の関連が報告されており、質量顕微鏡法の開発はこれらの研究に貢献してきた。飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) は、試料表面を一次イオンビームによりスパッタリングし、弾き出された二次イオンを解析する質量分析法であり、個々の細胞における分子の細胞内分布の解析を可能とする。このため、TOF-SIMS は単一細胞レベルでの生体分子の解析に用いられる。生体試料の分析においては、試料の保存性を改善し、微細構造を保持するために、タンパク質間の分子間架橋の形成をもたらすホルムアルデヒドによる化学的固定がしばしば必要であるが、TOF-SIMS による脂肪酸解析におけるグルタルアルデヒドの影響は調べられていない。そこで、多発性骨髄腫細胞株である U266 細胞を用いて TOF-SIMS 解析を行い、解析結果に対するグルタルアルデヒド固定の影響を検討した。

[材料ならびに方法]

試料として、ヒト多発性骨髄腫から樹立された細胞株である U266 細胞を用いた。インジウムスズ酸化物をコートしたスライドガラス表面にポリ-L-リシンを一晩インキュベートし、蒸留水で洗浄後乾燥した。スライドガラス上にフレキシパームを接着し、U266 細胞浮遊液をフレキシパームのチャンバー内へ入れ、サイトスピンにより細胞をスライドガラス表面へ接着後、チャンバー内の上澄みを除去した。2 枚の標本作製し、1 枚はチャンバー内の細胞に対して 0.25% グルタルアルデヒドを含む PBS で 15 分間インキュベート後に 150 mM 酢酸アンモニウムで 3 回洗浄した。もう 1 枚の標本は固定も洗浄も行わなかった。固定および未固定のスライドガラスは風乾後に -80°C で保管し、TOF-SIMS 解析の直前に室温で解凍した。

細胞形態はメイ・グリェンワルド・ギムザ染色を用い、光学顕微鏡により観察した。

TOF-SIMS 解析は一次イオンビームに三価金イオンを用い、PHI TRIFT V nanoTOF を用いて行った。ビームを直径で 500-600 nm に収束し、パルス電流を 0.017 pA とした。50 x 50 μm のサンプル領域における二次イオンをネガティブイオンモードで m/z 0-1850 の範囲で測定した。各スライドガラス上の 3 細胞ずつを測定した。マススペクトルとイオンイメージは WinCadenceN ソフトウェアを用いて解析した。内部標準によるキャリブレーション後、 m/z 0-330 の範囲のマススペクトルを抽出した。P 値 0.05 以下を統計学的有意とした。

[結果と考察]

細胞形態は固定・洗浄後も維持されていた。固定した細胞は未固定の細胞よりもメイ・グリュンワルド・ギムザ染色により強く染色されていた。これは、グルタルアルデヒドが正に荷電した細胞内のアミノ基と反応するため、固定細胞では未固定の細胞と比較して負に荷電し、メチレンブルーとアズール B がより高い親和性を示した可能性がある。

TOF-SIMS 解析において、 m/z 79 で示されるリン酸イオンと m/z 253、255、279、281、283 で示されるパルミトレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸の 5 種類の脂肪酸イオンが細胞レベルで可視化できた。リン酸イオンと脂肪酸イオンは、細胞を接着した部位に一致して検出された。検出されたリン酸と脂肪酸はリン脂質由来の典型的な断片であり、この結果は膜リン脂質がグルタルアルデヒド固定後も維持されていたことを示唆している。

個々の細胞から得られたマススペクトルにおいて、脂肪酸のピークは固定の有無にかかわらず良好な信号雑音比で観察された。固定した細胞の脂肪酸イオン平均強度は、未固定の細胞と比べて同等か有意差はないが、やや高い傾向がみられた。未固定試料においてイオン強度が低かった原因としては、洗浄なしで乾燥させた試料では前処理の過程で用いたバッファー成分が細胞表面に残り、イオン化を抑制した可能性が考えられた。

固形腫瘍において一価不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比の増加が、がん細胞を特徴づける指標として報告されているが、今回の結果では固定・未固定とも差はなかった。

解剖学的構造と脂質分布との関係は、同じ試料を TOF-SIMS 分析後に免疫染色を行うことで明らかとすることができ、両者の併用は有用であると考えられる。免疫染色で固定剤として一般的に用いられるホルムアルデヒドを TOF-SIMS でも用いることが可能であるか、将来検討したい。

[結論]

我々は骨髄腫細胞株 U266 についてグルタルアルデヒドによる化学固定後に TOF-SIMS 解析を行い、リン酸イオンと 5 種類の脂肪酸イオンを個々の細胞において可視化することに成功した。細胞形態は固定・洗浄後に維持されていた。固定後の脂肪酸イオン強度は未固定の細胞のものと同等であった。以上より、グルタルアルデヒド固定は、単一細胞レベルでの脂質の TOF-SIMS 解析に用いることが可能である。