

電子顕微鏡はまだまだ活躍できる We Can Still Enjoy Electron Microscopy

山 元 修
Osamu Yamamoto

鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野

要 旨 皮膚科学分野における電子顕微鏡を用いた研究は1960～70年代にかけて米国のKen Hashimotoらを中心に盛んに行われたが、現在では皮膚科の形態学的研究は免疫組織化学の興隆によりそれにとって代わられた感がある。残念ながら、皮膚科学分野では電子顕微鏡が昔のような勢いを取り戻すことはないかもしれないが、その活躍の場を全く失ったかという決してそうではない。本稿では電子顕微鏡には現在でも十分活躍できる場があることを、汗孔癌における細胞質内管腔構造、筋線維芽細胞や異型線維黄色腫におけるフィブロネクサス接着装置、脂腺癌における脂質滴、偽血管性有棘細胞癌におけるトノフィラメント、Fabry病における封入体、角化異常症、毛髪異常症を例にあげ、我々の行ってきた研究成果を中心に述べる。さらに、新たに加わった疾患の病態研究や新規開発物質のリスク評価にも応用の場が残っていることを述べる。

キーワード：電子顕微鏡，皮膚科学，診断皮膚病理学，病因論，リスク評価

1. はじめに

電子顕微鏡（以下電顕）を用いた研究は読者もご存知のように第二次世界大戦後興隆し、皮膚科学分野でもまた1960～70年代にかけて米国のKen Hashimoto¹⁾らの活躍を中心に正常皮膚組織や病変部皮膚の電顕的研究が盛んに行われた。筆者は、電顕的研究をしていた解剖学者の父の影響もあり1982年に医学部を卒業すると同時に産業医大皮膚科に入局し、皮膚疾患や正常皮膚の電顕に従事したが^{2,3)}、この頃すでにかつてのような勢いはなく、診断面では現在も盛んに行われている免疫組織化学にとって代われつつあった。

残念ながら、今では電顕が昔のような勢いを取り戻すこともないかも知れないが、その活躍の場を全く失ったかという決してそうではない⁴⁾。細々ながら生き残る道もあり、電顕ならではの、という世界も残っている。本稿では、主に皮膚科学における電顕（本稿では特にことわりのない限り透過型電子顕微鏡をさすことにする）の役割について述べていきたいと思う。

2. 皮膚科臨床における電子顕微鏡の位置づけ

免疫組織化学が台頭する前は、各種皮膚疾患、特に皮膚腫瘍の診断や病因の解明に電顕の検索は欠かせなかった。例えば、現在ではHMB45やMelan Aといった比較的特異性の高い蛋白に対する抗体による免疫組織化学的検査により診断されることが多くなった悪性黒色腫（メラノーマ melanoma）

であるが、これらが登場する前は、特にメラニン色素の少ない無色素性メラノーマの場合電子顕微鏡的検索が必須であった（図1）。電顕にてメラノソームを証明すれば診断がついたわけである^{4,5)}。抗CD1a抗体に特異的に染まるランゲルハンス細胞（Langerhans cell）に特有な顆粒であるバーベック顆粒（Birbeck granule）は抗Langerin抗体で認識されるが、これらの抗体が登場する前は、電顕的にバーベック顆粒（図2）を証明することでランゲルハンス細胞組織球症の診断を行っていた^{4,5)}。この疾患は致死的になりうるため早期診断が必須で、電顕的検索は重要視されていた。また、平滑筋肉腫ではミオフィラメント（myofilament）束の中にdense patch (focal density) と呼ばれる特徴的な電子密の斑紋を（図3）^{4,5)}、胞

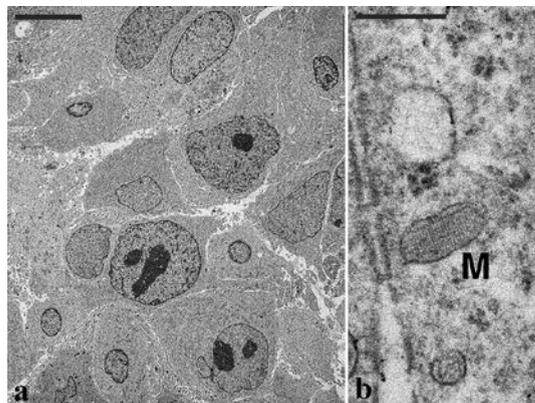


図1 無色素性悪性黒色腫。a. 異型性を示す腫瘍細胞には成熟したメラノソームは全く見られない。Scale bar: 10 μm b. 未熟なメラノソーム (M) がわずかに見られ無色素性悪性黒色腫と診断できる。Scale bar: 300 nm

〒683-8504 鳥取県米子市西町36-1
TEL: 0859-38-6597; FAX: 0859-38-6599
2017年3月20日受付, 2017年6月2日受理

巣状軟部肉腫では菱形結晶構造封入体を⁵⁾、乳児指線維腫症ではアクチン線維の凝集による封入体を⁴⁾、またメルケル細胞癌では神経内分泌顆粒と渦状のケラチンフィラメント⁴⁾を

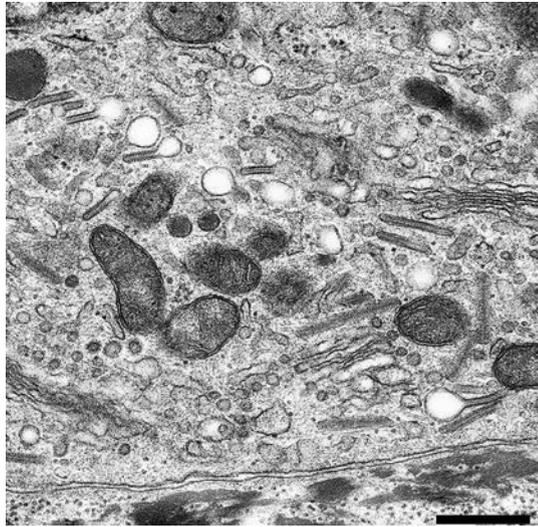


図2 ランゲルハンス細胞に特異なパーベック顆粒。全体構築が出ているものはテニスラケット型をしている。Scale bar: 500 nm

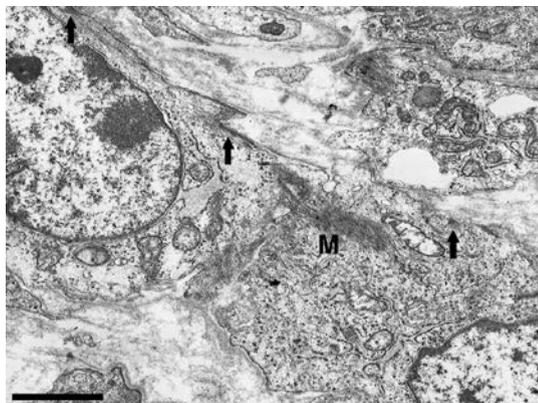


図3 平滑筋肉腫。細胞質内に dense patch を伴った平滑筋ミオフィラメント束 (M) が見られる。細胞質辺縁にも同様な focal density がある (矢印)。Scale bar: 2 μm

電顕的に証明することで最終診断していたが、現在では免疫組織化学がその役割を担っている。手技・手法の確立により、電顕のように標本制作過程が煩雑でなく安価で早い免疫組織化学が台頭するのは仕方がないことである。しかしながら免疫組織化学的検索にも落とし穴はあるもので、非特異的反応が出る、一旦は特異的とされながら多くの疾患で調べられるうちに特異性の低いことが判明する、など限界があることも分かってきた。例えば S100 蛋白は、当初は神経系細胞に特異的といわれていたが、間もなくランゲルハンス細胞や汗腺の筋上皮細胞に染まることがわかり、また CEA も皮膚では汗腺の細胞のみに染まると思われていたが、一般的に使われるポリクローナル抗体を用いた場合、増殖性を示す上皮にも染まってくるのが分かってきた^{6,7)}。免疫組織化学全盛の中でもその欠点を補えるのが電顕であろうと思われるが、その一端を以下に示す。

2.1 細胞質内管腔構造

光学顕微鏡 (以下光顕) 下で見える細胞質内の空胞状構造は、真の管腔以外に、正常では脂質滴、病的状態においては変性空胞などであることが示唆される。皮膚の附属器(毛包、脂腺、汗腺)癌は、他の一般的な皮膚癌(有棘細胞癌や基底細胞癌)に比べ少ないが、その中で汗孔癌 (porocarcinoma) は比較のお目にかかる機会が多い。かつて日本では沢山の汗孔癌が報告されてきたが、米国の有名な皮膚病理学者が「まれなはずのこの癌が日本にだけ多いはずない、おかしい。」と目を丸くしたと聞いている。汗孔癌と診断する場合、特徴的な腫瘍細胞の増殖とともに細胞質内管腔の存在が重要な手掛かりである³⁾。管腔は微絨毛 (microvilli) で裏打ちされるのが通常であるが、当然光顕レベルでは見えず他の空胞状構造とは見分けがつきにくい。ところが、電顕で真の管腔構造を見たことのない皮膚科医や病理医が、細胞質内の空胞状構造をすべて管腔と解釈し汗孔癌と診断してしまったことで、米国の皮膚病理学者が嘆いたような事態を招かしてしまったのである。

汗孔癌における細胞質内管腔は、胎児期における表皮内汗管の形成過程を模倣して現れるといわれるが、その構造は無数の微絨毛によって縁取りされ、さらにこの刷子縁を取り囲

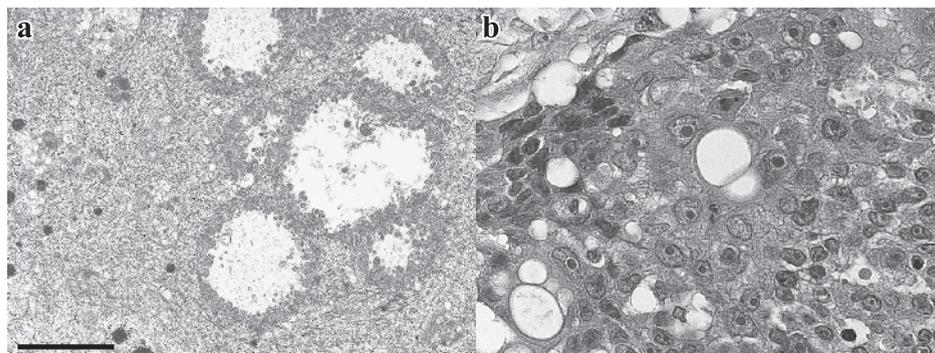


図4 汗孔癌に見られる細胞質内管腔。a. 電顕像。6個の管腔が見られるがいずれも微絨毛で裏打ちされ、さらにこの刷子縁は傍管腔線維帯で囲まれている。Scale bar: 2 μm。b. 光顕像。光顕で正しく管腔であることを把握するには電顕の知識が必要である。

む様に傍管腔細線維帯 (periluminal filamentous zone) と呼ばれるフィラメント束が走向する^{3,8)} (図 4a). この構造の特徴をつかんでいけば、いくら光顕といえども、他の空胞とは微妙に違うことが把握できる。すなわち、微絨毛部分はうっすらピンク色の帯として捉えられ、その外側にエオジン好性の輪状構造 (傍管腔細線維帯に相当) が見られる⁸⁾ (図 4b).

以上述べたように、光顕で管腔構造であるか否か判断する時、電顕構造さえ知っておけばさほど見分けがつきにくいことはなく、電顕の卓越性を示す一つの例である。もちろん、電顕で真の管腔であることを確認することが確実であることは言うまでもない。

2.2 筋線維芽細胞におけるフィブロネクサス接着装置 (fibronexus junction)

筋線維芽細胞 (myofibroblast) と呼ばれる細胞がある。線維芽細胞と平滑筋の両方の性質を有する細胞で、皮膚では創傷治癒過程やケロイド・肥厚性瘢痕、結節性筋膜炎に認められる^{9~11)}。またこの細胞よりなる良・悪性腫瘍の報告もあり線維腫症 (fibromatosis)、血管筋線維芽細胞腫 (angiofibromatoma) (図 5) や筋線維肉腫 (myofibrosarcoma) が代表である^{9~11)}。筋線維芽細胞は細胞質内にアクチンフィラメントを持っているので免疫組織化学的に抗 α -平滑筋アクチン (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体で染まる。もちろん α -SMA は平滑筋でも陽性になるため、筋線維芽細胞と平滑筋細胞との鑑別はこれだけでは不可能である。

電顕的に、筋線維芽細胞と平滑筋細胞を鑑別する優れた所見がある。電顕では両者とも dense patch をともなう平滑筋ミオフィラメントを有する点で区別がつきにくい、Eyden^{9~11)} は筋線維芽細胞がフィブロネクチン線維 (fibronectin fibril) で囲まれ、細胞質内のミオフィラメントと細胞外のフィブロネクチンが形質膜の 1 点 (フィブロネクサス接着装置) で収束結合することを見いだした。

我々は異型線維黄色腫 (atypical fibroxanthoma, AFX) と呼ばれる皮膚の悪性腫瘍を免疫組織化学的・電顕的に観察する機会に恵まれた¹²⁾。この腫瘍は、高度な異型性を示す紡錘形あるいは組織球様あるいは奇怪な大型の細胞といった多形性を示す腫瘍細胞が、不規則束状もしくは花筈模様状に増殖するのが特徴である。かつては悪性線維性組織球腫 (malignant fibrous histiocytoma, MFH) と呼ばれる悪性度が非常に高く分化度の低い軟部肉腫の範疇に入れられていたが、MFH ほど悪性度が高くなく表在性である点で異なるものと考えられるようになってきた。病理組織学では腫瘍の分類、診断において構成細胞がどの方向に分化しているのか判断するのが重要であるが、AFX についてはまだはっきりしたことが分かっていない。免疫組織化学的にも様々な染色性を示し決着はついていない。多方向性分化があるかもしれない。

我々の症例では、 α -SMA が陽性で最初は平滑筋分化を示すものと考えたが、免疫組織化学の限界もわきまえていたため電顕を行ってみることにした。高度異型性を示す核を有する腫瘍細胞の細胞質内には、免疫組織化学的 α -SMA 陽性所

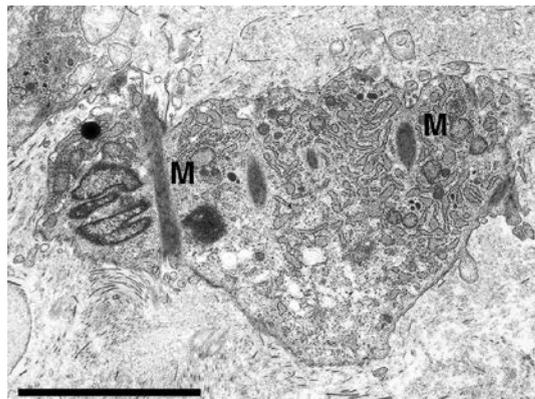


図 5 血管筋線維芽細胞腫. 細胞質内に dense patch を伴った平滑筋ミオフィラメント束 (M) を有する. Scale bar: 10 μ m

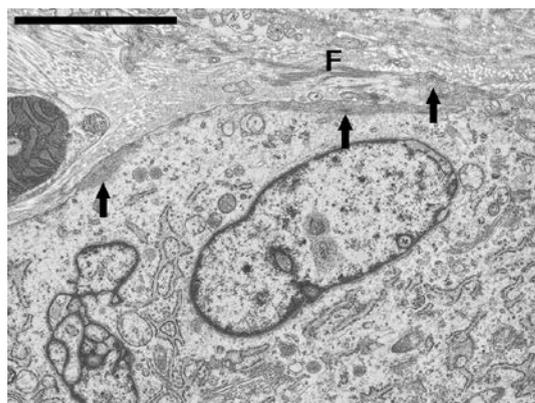


図 6 異型線維黄色腫. 矢印: ミオフィラメント, F: フィブロネクチン, Scale bar: 5 μ m

見に一致するように、dense patch を有するミオフィラメント束が見られた (図 6). そればかりでなく、周囲の間質にはフィブロネクチンが腫瘍細胞を取り囲み、これらが細胞質内のミオフィラメント束と形質膜の 1 点で収束する myofibril-fibronexus junction-fibronectin complex 構造が認められた (図 6). これにより我々は、AFX は少なくとも一部で筋線維芽細胞分化を示すと結論づけた¹²⁾。

免疫組織化学的に分化方向が曖昧な場合でも、電顕によって細胞特有の構造を見つけることができれば、分化方向をはっきりさせることができる、というかつてのメラノソームやバーベック顆粒がその役割を果たしたように腫瘍診断において電顕が活躍できる場が残されている良い例である (もちろんフィブロネクサス接着装置に対する良い抗体が登場すれば別であるが)。

2.3 脂質滴

脂質滴を有する細胞は、皮膚では脂肪細胞、脂腺細胞、泡沫細胞が大部分を占める。泡沫細胞は黄色腫と呼ばれる脂質代謝異常症の際に出現する、脂質を貪食した組織球/マクロファージがその代表である。

脂腺癌の診断の際、異型脂腺細胞の細胞質内に脂質滴を有することを証明することが重要である。かつては凍結切片に

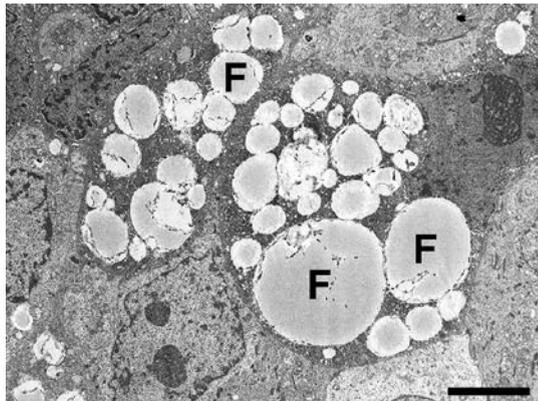


図7 日光角化症に生じた脂腺癌。F: 脂質滴, Scale bar: 10 μm

て Sudan III や Oil red O 染色を行い証明していたが、摘出時に脂腺癌を疑わなかった場合凍結標本を作らないことも多く、ホルマリン固定されたものでは当然脂質染色は不可能である。脂質滴に関係する蛋白質のうち、種々の細胞の脂質滴表面などに存在するアジポフィリン (adipophilin) やペリリピン (perilipin) に対する抗体により脂質滴を染め出して脂腺癌と診断できるとの報告もあるが¹³⁾、非特異的に他の細胞に発現することもある。また滴状構造の膜部分に(丸く)染まれば脂質滴でそれ以外の染まり方、たとえば顆粒状に染まればそうでないと判断する、というクライテリアもあるが^{7,14)}、実際の標本では見分けがつかない場合もある。

脂質滴は電顕標本の固定の際に用いるオスミウム酸が脂質好性で、通常超薄切片上では電子密に染まるため、その構造的特徴とあわせれば、容易に脂質滴であると判断できる。我々は、有棘細胞癌の表皮内病変である日光角化症から連続して真皮内に浸潤性発育する癌を経験し、電顕的検索を行う機会に恵まれた¹⁵⁾。浸潤部分の異型細胞に多数ではないが典型的な脂質滴を観察し(図7)、非常にまれなことであるが日光角化症が表皮基底膜を破り真皮内に浸潤増殖する過程で脂腺への分化形質を獲得したものと推測した¹⁵⁾。有棘細胞癌ではしばしば細胞質内に空胞変性が起こり光顕レベルでは脂質滴とまぎらわしく、またアジポフィリンでもはっきりしない場合、電顕を使えば脂質滴と容易に確認できる良い例である。

2.4 トノフィラメント

皮膚の上皮である表皮を構成するケラチノサイトではトノフィラメント (tonofilament) と呼ばれる中間径フィラメントが特徴的であり、免疫組織化学的にはトノフィラメントの構成蛋白であるサイトケラチンのいくつかのサブタイプが分化に伴い発現・消失することが知られている¹⁶⁾。ケラチノサイトの悪性腫瘍である有棘細胞癌は、一般に HE 染色標本にて病理診断を下すことはそれほど難しくないが、有棘細胞癌そのものが未分化な場合や、逆に他の腫瘍で有棘細胞癌に酷似する場合抗サイトケラチン抗体を用いた免疫組織化学的検索を行う。しかしながら、有棘細胞癌でも未分化な場合サイトケラチン発現量も少なく、陽性か擬陽性かあるいは陰性

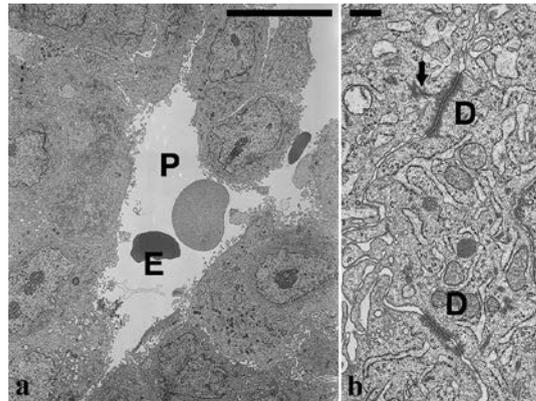


図8 偽血管性有棘細胞癌。a. 腫瘍細胞間が desmosome-tonofilament complex の減少による接着性の低下により離開し空隙を作り (P)、さらに内腔に赤血球 (E) が入り込んで偽血管を形成し血管肉腫と非常にまぎらわしい。Scale bar: 10 μm b. 一生懸命探すところろじてデスモソーム (D) が見られ、そこにほんのわずかのトノフィラメント (矢印) の収束が確認できる。Scale bar: 500 nm

か判断つかねる場合がある。このような場合に電顕が活躍する⁵⁾。

筆者は、偽血管性有棘細胞癌 (pseudovascular squamous cell carcinoma) という有棘細胞癌の亜型を経験し電顕検索を行った¹⁷⁾。これは細胞間接着が低下することで癌細胞間が離開しやすくなり、管腔のような空隙を作りそこに出血するためあたかも血管腔のような構築をとるものであり、脈管系悪性腫瘍である血管肉腫 (angiosarcoma) との鑑別が困難な亜型である。細胞間接着装置 (デスモソーム) は通常の有棘細胞癌に比べ極めて乏しく、それが原因か結果かは分からないが、デスモソームに収束するトノフィラメントの量も格段に少なくなる。そのためサイトケラチン発現性が低下し陽性陰性が判別しにくくなるわけである。電顕を行うと一目瞭然で、細胞質内のトノフィラメント量はごく少ないが、一部に tonofilament-desomesome complex を証明し、これが有棘細胞癌の一種であると結論づけることができた (図8)。

2.5 封入体

腫瘍細胞での封入体についてはすでに述べたが、現在でも皮膚科領域で診断的価値があるのは Fabry 病などの代謝異常症に見られるライソゾームに関連した封入体である。Fabry 病 (びまん性体幹被角血管腫) は伴性劣性遺伝を示す α-ガラクトシダーゼ A 欠損による糖鎖代謝異常症で、最初は皮膚病変のみ注目を浴びていたがやがて内臓諸臓器にも障害を起こすことが知られてきた。皮膚病変の特徴は、被角血管腫 (真の血管腫ではない) と呼ばれる微小な赤色小結節が 10 歳代以降全身に多発することである。幼小児期に乏汗症を呈し熱中症や発熱を起こす、あるいは四肢の疼痛発作を起こし、成人期には腎不全、心不全、中枢神経症状を起こし 40 歳までに死亡することが多い¹⁸⁾。この被角血管腫は病理組織学的に大小の薄い壁を持った血管の拡張よりなり、薄い表皮に被覆されるが、このような所見は他の疾患でも見られ、Fabry

病と診断できる特異的所見に欠ける。本症に対して現在では α -ガラクトシダーゼ補充療法が確立され効果が確認されているが、早期診断、早期治療がより有効であるといわれる¹⁹⁾。従って被角血管腫や乏汗症などの皮膚症状を認め Fabry 病が鑑別対象になる場合は、早期に電顕的検討を行った上で遺伝子検索をする必要があるわけである。

本症の被角血管腫の腔を裏打ちする血管内皮細胞内にはオスミウム好性封入体が見られ、その内部は5~6 nm 間隔の規則正しい層状もしくは格子状構造をとっている⁴⁾。これらはライソゾーム内の糖脂質の沈着物と考えられている。これにより血管内皮の脆弱性が招来され血管を支えることができなくなり、異常に血管が拡張してしまうわけである。同様な封入体は汗腺筋上皮にも認められ乏汗症の原因と思われ、その他血管周皮細胞、線維芽細胞、マクロファージにも認められる。

2.6 角化異常症や毛髪異常症

遺伝性を示す角化異常症や毛髪異常症の中には特徴的な透過もしくは走査電顕所見を呈するものがある。角化異常症では特にトノフィラメント（ケラチン線維）の微細構造に異常をきたすものがあり、たとえば水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症では顆粒層のケラチノサイト内で核を取り巻く塊状環状に凝集したトノフィラメント（clumped keratin filaments）が見られる²⁰⁾（図9）。また、Vörner 型掌蹠角化症でもトノフィラメントの凝集塊と粗大ケラトヒアリン顆粒が見られる²¹⁾。トノフィラメント異常以外でも、道化師様魚鱗癬では角質細胞内に無数の脂肪滴と思われる空胞構造が異常な層板顆粒ともに見られる²²⁾、あるいは皮膚脆弱症候群ではデスモソーム蛋白の一つであるプラコフィリン（plakophilin）の遺伝子異常によりデスモソーム形成不全を起こしケラチノサイト間にデスモソームがほとんど見られない²¹⁾、といった特徴的な電顕所見が得られる。

また遺伝性毛髪疾患では走査電顕が威力を発揮する^{23,24)}。連珠毛（monilethrix）の毛を走査電顕で観ると、毛幹の径の太い部分と細い部分が交互に繰り返しあたかも連珠のように見え、さらに細い部分の表面毛小皮には多数の細かい

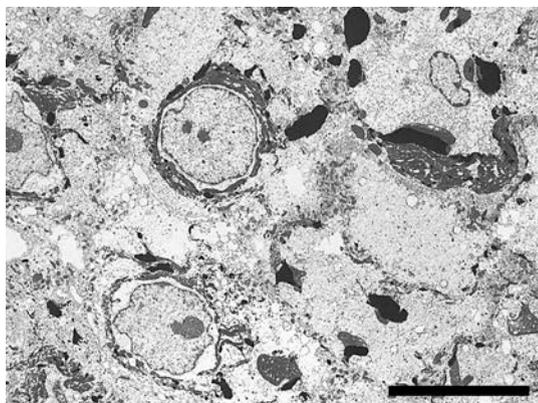


図9 先天性魚鱗癬様紅皮症。顆粒層のケラチノサイトの核周囲に環状凝集性トノフィラメントが見られる。Scale bar: 10 μ m

溝が毛の長軸方向に走るのが観察される。ネザートン症候群（Netherton syndrome）の毛では、走査電顕的に毛幹の所々で毛小皮が毛皮質内に陥入し（陥入性裂毛）、その結果陥入部分が膨化して竹の節のように見え（bamboo hair）、毛皮質線維の走行の乱れや亀裂が観られる。捻転毛はプヨルンスタッド症候群（Björnsta syndrome）やメンケス症候群（Menkes' kinky hair syndrome）などかなり広いスペクトラムで観られるが、走査電顕では毛軸を中心にきれいに捻れているのが観察される。このような毛髪奇形を診断する時は、まずは形態学的、特に走査電顕的に検討し、その後遺伝子解析が必要であると判断されれば疾患を絞った上で検討すべきである^{23,24)}。

3. 皮膚科研究における電子顕微鏡の位置づけ

新規の皮膚疾患の病態・病因研究や基礎研究に電顕が欠かせないことがある。我々の行った研究について簡単に触れる。

3.1 新規前立腺癌治療薬による皮膚障害の病態研究

新規治療薬である酢酸リュープロレリンと酢酸ゴセレリンは黄体形成ホルモン放出ホルモン類似化合物で、前立腺癌の内分泌療法として有効である。前者はモノシリック型マイクロカプセルの基剤の中に均一に分布しており、カプセルが周辺から徐々に溶解することで効果が得られる。また後者は、細長い円柱状基剤内に分散し、それを皮下に埋め込み薬剤を徐放することで効果が得られる。本邦では両者とも主に腹部や上腕に皮下注射あるいは留置されるが、時に皮下に肉芽腫を形成し硬結を触れるようになる。これまでこの特異な肉芽腫がどのように形成されるのか病態が解明されていなかったため、我々は電顕的研究を行った^{25,26)}。酢酸リュープロレリン肉芽腫では、光顕レベルではわからなかったが、走査ならびに透過電顕により針状結晶の析出を伴った脂肪細胞の変性と、それと同じ超微所見を呈する構造物およびマイクロカプセルに一致する構造物の両者を病変部の組織球/マクロファージ内に見出した（図10a, b）。以上の所見より、本治療による肉芽腫は、最初に酢酸リュープロレリンによる脂肪変性・融解が契機になり組織球/マクロファージが浸潤し、変性脂肪に加えマイクロカプセルを貪食することで形成されることが初めて解明された²⁵⁾。また、黄体形成ホルモン放出ホルモンは *in vitro* で脂肪融解作用があることが分かっているが、*in vivo* で超微構造的に観察されたのは初めてである²⁵⁾。一方、酢酸ゴセレリンによる肉芽腫形成過程も同様であることが電顕的にわかったが²⁶⁾、脂肪変性は円柱状基剤周囲に限られるため、変性脂肪滴の貪食像はより少なく、また基剤が生体内でより分解吸収されやすいため薬剤の貪食像もより少なく、肉芽腫はより小型になるようである。

このように薬剤の進歩にともない、今後も新たな副作用が現れてくると思われるが、新規だけに病態解明に電顕が活躍する場が与えられた良い例である。

3.2 ナノ材料の経皮吸収に関する基礎研究

ナノ材料とは、一般に一次粒子の立体構造のうち少なくとも1つの次元の径が1~100 nm 以下の物質をいう（ナノ粒

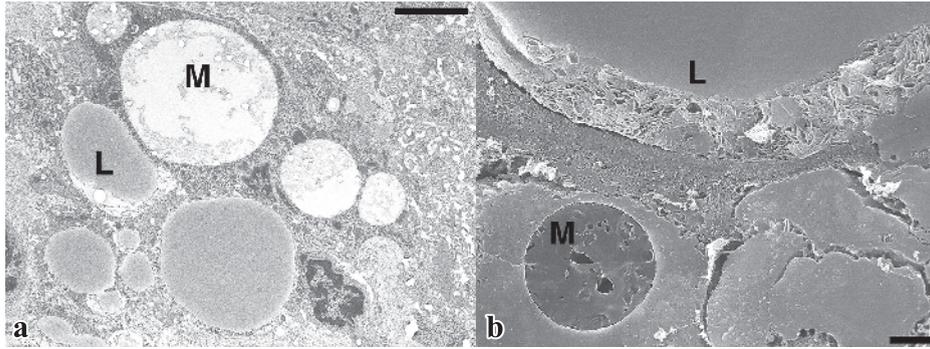


図10 酢酸リュープロレリン肉芽腫 a. 透過電顕像. 貪食された酢酸リュープロレリンマイクロカプセル (M) と変性脂質滴 (L) の両者が同一マクロファージ内に見られる. Scale bar: 5 μm . b. 走査電顕像. 変性脂質滴 (L) 辺縁は立体的に無数の針状結晶構造を呈し, マクロファージ内構造物 (M) の表面構造はマイクロカプセルのそれと同じである. Scale bar: 2 μm

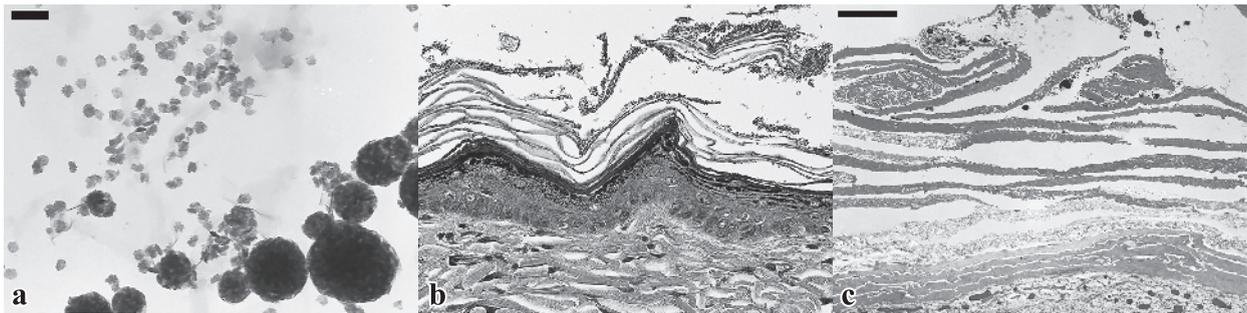


図11 二酸化チタンナノ粒子と曝露試験. a. エマルジョン中に分散した二酸化チタンナノ粒子の電顕像. Scale bar: 100 nm. b. ナノサイズ二酸化チタンエマルジョンの単回塗布急性曝露後の光顕所見. 角層内に無数の二酸化チタンナノ粒子と思われる微細顆粒状物質が認められるが, 肉眼で確認できるのはおおむね凝集体のようである. c. ナノサイズ二酸化チタンエマルジョンの2週間連続曝露後の電顕所見. 凝集体以外に個々の二酸化チタンナノ粒子も視認でき, これらはエネルギー分散型X線微量元素分析にて確認できる. Scale bar: 10 μm .

子という場合は3次元とも1~100 nm)²⁷⁾. 環境中の大気汚染物質としてPM2.5 (particle matter 2.5: 粒径が2.5 μm 以下の大気中の浮遊粒子, つまり2.5 μm の捕集効率が50%のもの)は有名であるが, 森林火災などによる自然発生的ナノ粒子や人類による火の意図的使用でおこる偶発的なナノ粒子の放出に加え (これらは少量), 産業革命以来の内燃機関の発達に伴い爆発的な勢いで増えている accidental nanomaterial と呼ばれるものとは別に, その特性をある特定の目的のために意図的に利用して工業的に産み出されるナノ物質をナノ材料という²⁷⁾. このような物質はバルク状態時に比べ表面効果と量子効果の両面で異なり, その結果化学的反応性, 機械的特性, 電気的特性, 磁性特性が異なってくる. 近年, ナノ材料の特性を利用して, 社会の様々な分野に多くの便益をもたらす産業技術 (ナノテクノロジー) がめざましく進歩しており, ナノ特性を利用した工業産物はすでに我々の周囲に大量に存在する. 一方でナノ材料には人体への複雑な暴露形式が想定され, その特性上健康障害への懸念がある. ナノ技術の未来はリスク対公共の利益に左右され, かつてのアスベストのように, リスク評価をしないままでの無制限な活用はもはや許されない時代になってきている²⁷⁾.

皮膚科もナノ材料とは切っても切れない縁があり, その代

表が紫外線による皮膚障害 (日焼け, シミから皮膚癌にいたるまで) を防止するサンスクリーンである. 多くのサンスクリーンには二酸化チタンナノ粒子が用いられているが, 皮膚に対するリスク評価については最近端緒についたばかりである. 我々はNEDOのナノプロジェクトのメンバーとして二酸化チタンの経皮吸収性について電顕的に検討を行った^{28,29)}.

二酸化チタンの経皮曝露試験は恐らく1996年のTanらの検討を嚆矢とすると思われるが, それ以降表皮を透過する, いや透過しない, という報告が相次ぎ決着がつかない. 我々はキャラクターゼーションを行ったアナターゼ型二酸化チタンナノ粒子 (一次粒径26.4 nm, 二次凝集粒径391.6 nm) (図11a) を分散させたエマルジョンをヘアレスラットの背部に単回塗布する急性曝露試験と, 8週間まで連日塗布する亜慢性曝露試験を行った. 光顕的には, いずれも角層内に二酸化チタンナノ粒子と思われる微細顆粒状物質が認められたが, 凝集しているものは確認できるが, 個々のナノ粒子のレベルで表皮の生細胞領域に入っているかどうかの判別はつかなかった (図11b). ところが電顕レベルでは個々の粒子が確認可能で, 透過型電顕とエネルギー分散型X線微量元素分析を組み合わせ, 表皮の生細胞領域に二酸化チタン粒子が分布していないことを確認した^{28,29)} (図11c). 唯一, 毛

包漏斗部では角層の比較的深いところ、すなわち毛包上皮の生細胞のすぐ近傍まで局在することが分かったが、やはり生細胞には分布していなかった。また、角層をテープストリッピングという方法で任意の深さの角層を露出させる方法を用い、段階的に生細胞（顆粒層）に達するまで角層をはがしその表面を走査電顕とエネルギー分散型 X 線微量元素分析を組み合わせて観察し、浅い剥離では毛孔周囲に二酸化チタンナノ粒子が集まる傾向があり、また、ほとんど角質をはがした毛包間表皮表面には信号が確認されなかった。以上の結果より、正常状態の動物皮膚では二酸化チタンナノ粒子は経表皮吸収されないと結論づけた^{28,29)}。

二酸化チタンは非常に安定した金属で、粒子研究の際しばしば陰性コントロールとして利用されてきたが、ナノサイズになると恐らく表面効果により活性酸素種の産生が増すことで毒性を発揮することが分かってきた。二酸化チタンナノ粒子はサンスクリーンなどですでに製品化が進んでいるが、今後も皮膚科関連領域に、さらなる新規テクノロジーによる画期的な産物が応用される局面も現れてくると思われる。当然それについてのリスク評価は必須であり、その際電顕が活躍する場面も出てくるであろう。

4. おわりに

私事で恐縮であるが、筆者の大好きな映画のジャンルの中にマカロニウェスタンというイタリア製西部劇があるが、皮膚科学分野で 1960～70 年代にかけて電顕が興隆しやがて衰微していったさまは、常々同時代のマカロニウェスタンの盛衰のようであると感じている。筆者の敬愛する皮膚電顕学者の伊藤雅章先生が「最近、皮膚の電子顕微鏡観察を行う若い研究者が少なく、形態学が疎かになっている感がある。」²³⁾と書かれているが筆者も同意する。同時に伊藤先生は、分子や遺伝子の異常が解明されてあたかも疾患の病態がすべて解明されたかのように考える風潮があるが、実はその異常がなぜ形態の異常につながるのかの病態や病因論の解明がなされたわけではない、と書かれており、その面で電顕の活躍の場は十分に残されていると思う。形態は機能の要求によりいかようにも変化しうる、形態には必ず論理的な理由があると思う。最近クエンティ・タランティーノ監督が新しい視点からマカロニウェスタンの手法と雰囲気復活させた映画を次々とヒットさせているが、同様に新しい視点から皮膚疾患を電顕で検討すればきっと新知見が得られると信じている。本拙著では、皮膚科において電顕が活躍した場面を紹介したが、少しでも電顕に興味を持ってくれる若者が現れることを祈って筆を置く。

謝 辞

一部電顕写真を提供していただいた山田七子博士(鳥取大)と足立孝司博士(鳥取県立中央病院皮膚科)に深謝する。

- 1) 橋本 健：皮膚の電顕のみかた，金原出版，東京（1979）
- 2) Yamamoto, O.: Three-dimensional architecture of the microvasculature in the rat foot-pad, with special reference to vasculature around the eccrine sweat glands. A scanning electron-microscopic study of corrosion casts. *Cell Tissue Res.*, **262**, 225-232 (1990)
- 3) Yamamoto, O., Haratake, J., Yokoyama, S., Imayama, S. and Asahi, M.: A histopathological and ultrastructural study of eccrine porocarcinoma with special reference to its subtypes. *Virchow Archiv, A* **420**, 395-401 (1992)
- 4) Yamamoto, O. and Bhawan, J.: Electron microscopy in dermatopathology. in Farmer, E.R. & Hood, A.F. (Eds.), *Pathology of the Skin* 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 53-84 (2000)
- 5) Ghadially, F.N.: *Diagnostic Electron Microscopy of Tumours*, 2nd ed. Butterworths, London (1985)
- 6) Egawa, K., Honda, Y., Ono, T. and Kuroki, M.: Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen and related antigens in various cutaneous keratinous neoplasms and verruca vulgaris. *Br. J. Dermatol.*, **13**, 178-185 (1998)
- 7) Ansai, S., Takeichi, H., Arase, S., Kawana, S. and Kimura, T.: Sebaceous carcinoma: An immunohistochemical reappraisal. *Am. J. Dermatopathol.*, **33**, 579-587 (2011)
- 8) 山元 修, 安齋眞一：汗孔癌の病理組織診断の落とし穴. 古江増隆 (編), *皮膚科臨床アセット 9 エキスパートに学ぶ皮膚病理診断学*, 中山書店, 東京, 416-419 (2011)
- 9) Eyden, B.: Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. *Ultrastruct. Pathol.*, **17**, 611-622 (1993)
- 10) Eyden, B.: The myofibroblast: An assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct. Pathol.*, **25**, 39-50 (2001)
- 11) Eyden, B.: The fibronexus in reactive and tumoral myofibroblasts: Further characterization by electron microscopy. *Histol. Histo-pathol.*, **16**, 57-70 (2001)
- 12) Ito, A., Yamada, N., Toshida, Y., Morino, S. and Yamamoto, O.: Myofibroblastic differentiation in atypical fibroxanthomas occurring on sun-exposed skin and in a burn scar: An ultrastructural and immunohistochemical study. *J. Cutan. Pathol.*, **38**, 670-676 (2011)
- 13) 新井栄一：皮膚付属器腫瘍における免疫染色とその意義. *病理と臨床*, **29**, 55-61 (2011)
- 14) Ostler, D.A., Priet, V.G., Reed, J.A., Deavers, M.T., Lazar, A.J. and Ivan, D.: Adipophilin expression in sebaceous tumors and other cutaneous lesions with clear cell histology: An immunohistochemical study of 117 cases. *Mod. Pathol.*, **23**, 567-573 (2010)
- 15) Nakashima, K., Adachi, K., Yamasaki, A., Yamada, N., Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: Sebaceous carcinoma with actinic keratosis. *Acta. Dermatovenereol.*, **90**, 196-198 (2010)
- 16) Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11-24 (1982)
- 17) Yamamoto, O. and Yasuda, H.: A case of pseudovascular adenoid squamous cell carcinoma of the skin with spindle cell pattern. *J. Dermatol.*, **24**, 587-594 (1997)
- 18) 神崎 保：Fabry 病. 玉置邦彦 (編) *最新皮膚科学大系* 10, 中山書店, 東京, 74-77 (2003)
- 19) 春日井親愛, 岩下宣彦, 水谷建太郎, 玉田康彦, 松本義也, 秋

- 田洋一, 渡辺大輔: Fabry 病に対する長期酵素補充療法の経験: 早期治療介入の意義. *日皮会誌*, **122**, 1581–1588 (2012)
- 20) 秋山真志: 水疱型魚鱗癬様紅皮症. 玉置邦彦 (編) 最新皮膚科学大系 7, 中山書店, 東京, 76–87 (2003)
- 21) 三橋善比古: 掌蹠角化症の鑑別診断. *皮膚病診療*, **34**, 526–533 (2012)
- 22) 秋山真志: 道化師様魚鱗癬. 玉置邦彦 (編) 最新皮膚科学大系 7, 中山書店, 東京, 95–102 (2003)
- 23) 伊藤雅章: 毛髪奇形の診かたと考え方. *日本医事新報*, **4608**, 85–94 (2012)
- 24) 下村 裕: 遺伝性毛髪疾患の遺伝子解析. *皮膚病診療*, **37**, 322–327 (2015)
- 25) Watanabe, T., Yamada, Y., Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: A morphological study of granulomas induced by subcutaneous injection of leuprorelin acetate. *J. Cutan. Pathol.*, **36**, 1299–1302 (2009)
- 26) Watanabe, T., Yamada, Y., Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: Granulomas induced by subcutaneous injection of a luteinizing hormone-releasing hormone analog: A case report and review of the literature. *J. Cutan. Pathol.*, **37**, 1116–1118 (2010)
- 27) 山元 修: 工業用ナノ材料の生体影響 (前編) 総論. *西日皮膚*, **73**, 392–401 (2011)
- 28) Adachi, K., Yamada, N., Yamamoto, K., Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: *In vivo* effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicol.*, **4**, 296–306 (2010)
- 29) Adachi, K., Yamada, N., Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: Subchronic exposure of titanium dioxide nanoparticles to hairless rat skin. *Exp. Dermatol.*, **22**, 278–283 (2013)