

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：43405

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792265

研究課題名(和文)凍結切片を用いた口腔癌組織、細胞のイメージング

研究課題名(英文) imaging of freezed oral cancer tissue and cell with raman spectroscopy

研究代表者

木下 英荘 (kinoshita, hidetaka)

福井医療短期大学・その他部局等・講師

研究者番号：80601103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン分光法にて、口腔扁平上皮癌のイメージングを行った。測定サンプルは連続切片を作成し、一方をラマン分析に用い、他方をH&E染色して組織形態の確認をした。最初はラマン分析領域をH&E染色像と一致させることが困難であったが、最終的には、200～500ミクロン平方のエリアで、ラマン分析によるイメージングとH&E組織像とを一致させることができた。

ラマン分析によるイメージングは、タンパク質やその構造の分布を半定量的に示したものである。これまでは、免疫組織化学の手法を用いなければ、タンパク質の発現や分布は明らかにならなかったが、ラマン分光法は一度に多くの成分のイメージングが可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed oral squamous cell carcinoma with raman spectroscopy to obtain image of oral SCC tissue. The serial transverse sections were prepared, one sample section was used for raman analysis, the other sample section was stained with H&E to confirm pathological structure. Firstly, it was difficult to recognize the raman analyzing area on H&E staining image. Finally, we could adjust the raman imaging area to H&E image at 200-500um square size.

The images of raman spectroscopy show minute distribution of the protein and molecular structure at semi-quantitatively. The expression and distribution of protein was analyzed commonly by immunohistochemical methods so far. But our results indicate that raman spectroscopy is useful for analyzing the detailed distribution of various components only one time measurements.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ラマン分光法 扁平上皮癌 イメージング

1. 研究開始当初の背景

口腔癌を含め現代において癌は死亡原因の高率を占めている。特に口腔癌は、歯肉、舌、口唇、頬粘膜に発生し、化学療法、放射線療法、切除手術が適宜組み合わせられて治療が行われる。切除手術が適用された場合、癌ができた部位や大きさにより手術後の生活（咀嚼、嚥下、発音、顔貌など）が大きく影響される。口腔領域では扁平上皮癌（SCC）が最も頻度が高い。その診断においては病理診断がほぼすべてに行われているが、他臓器では補助的にラマン分光法（プローブ型の検出器）を用いたアプローチも、研究段階で報告されている。口腔癌でも、ラマン分光法を補助的に活用していくためには、扁平上皮癌のラマン分光法を用いた基礎的な分析・研究が必要となる。

2. 研究の目的

ラマン分光法を用いて、口腔癌の組織レベル、細胞レベルのイメージングを行う。ラマン分光法は、構成されている組織の個々の分子の振動を検出してスペクトルで表示する手法である。これまで、口腔癌においても正常組織と癌組織のスペクトルの違いを論じる報告は少数ある。しかし、ラマン分光法は非常に空間分解能（1 ミクロン）が高く、微小領域の面分析が可能（イメージング）である長所が応用されていない。ラマンスペクトルは分子の指紋とも言われ、たんぱく質の種類やその2次構造の情報がピークの位置や強度で検出され、一度の分析で多くの情報を得ることができる。よって、再現性よく口腔癌組織を組織レベルで、さらには細胞レベルでイメージングを可能にすることを目的とする。これまで、口腔癌の診断は、細胞形態をみる組織病理検査が標準的に行われてきたが、ラマン分光法によるイメージングは、これに定性・定量性を付加できる可能性が高い。

3. 研究の方法

口腔癌の治療時には、まず確定診断のために組織生研を行う。採取した組織をそのまま凍結保存し分析材料とする。その際に、患者には組織を研究に使用させていただく旨の説明と同意を得る。そのサンプルを、クライオスタッドで、5-10 ミクロンの厚みで連続切片を作成した。一方は、組織確認用にH&E染色を行った。他方は、ラマン分析用に、ゴールドコーティングされたラマン分析用のプレートに設置した。



図1 ラマン分光器

ラマン分光器の設定は、励起波長は 785nm、対物レンズは 100 倍、アパーチャーサイズは 3000 ミクロン、1 点の測定回数は 10~15 秒露光にて 2 回で行った。ラマン分析サンプルは、未処理・未染色であるため測定領域の認識が困難であるが、丁寧に H&E 染色像と対比させながら進めた。分析領域の測定は、2500 から 3600 ポイント（50x50 から 60x60）で、測定点の間隔は、3 から 10 ミクロンで設定した。概ね、150~600 ミクロン平方の領域を分析するサイズとした。

得られたスペクトル上の特定のピーク面積を反映したイメージを作成し、測定領域を H&E 染色の組織像で一致するか確認した。ラマンスペクトルのピークの帰属に関しては、これまで研究報告されている内容を参考にした。

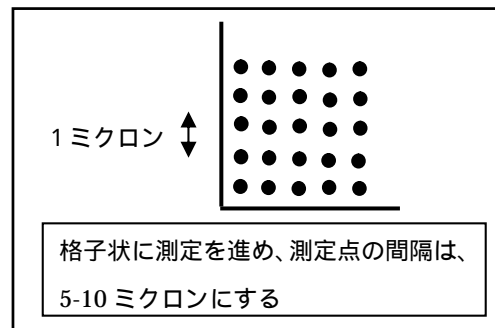


図2 面分析（マッピング測定）の進め方

4. 研究成果

マッピング測定（面分析）を行った領域を、得られたスペクトル上のピーク面積を算出してイメージを作成した。ポイントは、サンプル組織に対して、あらゆる処理を施さずに測定し、得ることができたイメージであることである。ラマン分光器を使用し、適切なイメージを得られるサンプルの厚みであるが、5 から 10 ミクロンで検討した。5 ミクロンでは、サンプルの凹凸が小さく比較的良好なイメージングが得られた。しかし、癌組織の間質は成分が疎となり、どの組織に focus するかにより、サンプルの厚みを検討する必要があることが示唆された。以下に、代表的な測定結果を示す。

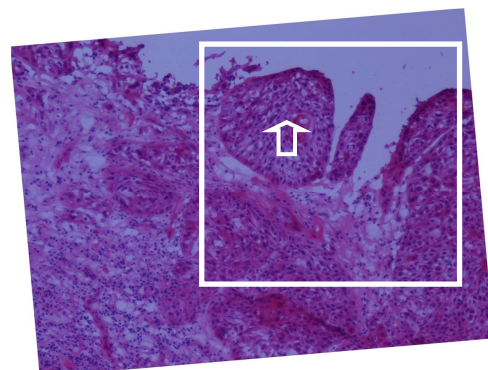


図3 口腔扁平上皮癌組織のH&E染色像

図3は、連続切片を作成し、組織形態を確認するためにH&E染色を行った組織像である。扁平上皮癌組織が確認され、四角で囲まれた550ミクロン平方の領域を、ラマン分光器で分析した。

下図(図4)は図3の部のスペクトルである。

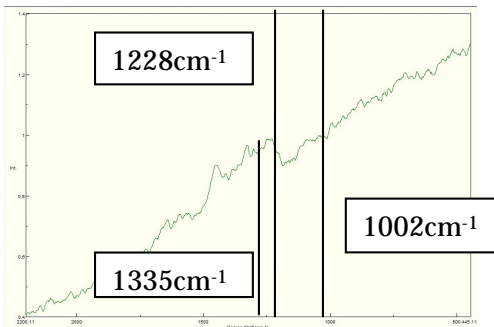


図4 癌組織のラマンスペクトル

ラマンスペクトルは横軸に波数、縦軸に強度を示す。異なる波数において、複数のピークが確認できる。それらの得られたピークの中で、上記測定領域を視認性の良いイメージで示すことができたピークに注目した。これまでの研究報告で、1002cm⁻¹はphenylalanineに、1228cm⁻¹はDNAのリン酸基に、1335cm⁻¹はコラーゲンやポリヌクレオチドに由来する成分に帰属されている。

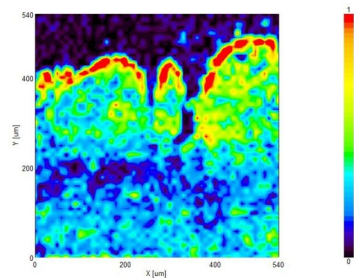


図5 phenylalanine (1002cm⁻¹)

図5は、phenylalanineの存在を相対的に濃度分布で示している。このイメージは、1002cm⁻¹のピーク面積を利用して作られたイメージである。右横のスケールのように、赤・黄で示される領域は相対的にphenylalanineが多く分布していることを表している。H&E染色像と比較すると、扁平上皮癌細胞の集団部分で多くphenylalanineが含まれていることが分かる。また、測定領域の形態とphenylalanineの分布イメージが一致しており、図3の測定領域を正確に分析できていることが確認できた。このイメージの解像度であるが、55x55ポイント(total 3025ポイントで、10ミクロン間隔 550ミクロン平方)の各測定点でのピーク面積で構成されている。

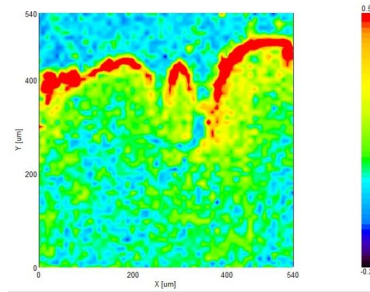


図6 PO₂ antisymmetric stretching mode of polynucleotide chain (DNA)(1228cm⁻¹)

図6は、DNAのリン酸基を反映するピーク面積のイメージである。腫瘍の表層に多く分布しており、下層の間質に移行するにつれて分布が疎となっている。DNAのリン酸基が多くみられる領域は、H&E染色像で、多数の細胞分裂や、大きな核を有する癌細胞集団と合致すれば、ラマンイメージからの所見と実際の現象が合致すると考えられる。しかし、H&E染色像をみると、ラマンイメージで赤、黄色で示される領域に、著明な細胞分裂や大きな核を有する癌細胞が集積している所見は合致する部分としない部分があり、解釈が難しいところである。

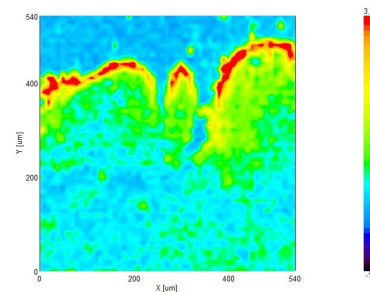


図7 CH₃CH₂ wagging mode of collagen and polynucleotide chain (1335cm⁻¹)

図7は、コラーゲンやポリヌクレオチドに由来する成分の分布である。組織像と比較すると、扁平上皮癌細胞集団部に多く存在し、下層の間質部では疎であることが分かる。1228cm⁻¹のリン酸基の分布と似ているが、下層の間質付近には、ほとんど分布していない。ラマン分光法は上記のイメージが示すように、未処理のサンプルを使用して、含まれるたんぱく質の成分や、分子構造を反映したイメージングが可能であり、ラマン分析領域とH&E染色の組織像とを一致させることができたことは、非常に意味がある。これまでは、免疫組織化学染色などの手法を用いなければ、表現できないイメージが、ラマン分光法で面分析を行えば得られる可能性が高く示唆された。今後は、上記に示す以外にも複数のピークでのイメージングが得られており、それらの意味付けが重要である。組織像から、核が大きな細胞や細胞分裂が多くみられる領域では、核に関連のあるピークに注目し、その領域を感度よくイメージングできるように基礎研究を発展させる必要がある。また、ラマン分光法は空間分解能が高く、1ミクロ

ンオーダーでの分析も可能で、個々の癌細胞のイメージングも行っていきたい。

領域・助教
研究者番号： 40209961

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

木下英荘、癌診断における生組織の振動顕微による分光マッピング画像と生検スクリーニングへの試み、日本癌学会、2012年9月19~21日、ロイトン札幌(北海道札幌)

木下英荘、歯科口腔外科領域の疾患のラマン顕微画像計測、第11回医用分光研究会、2013年12月7~8日、三国観光ホテル(福井県坂井市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

木下 英荘 (KINOSHITA Hidetaka)
福井医療短期大学・講師
研究者番号：80601103

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

三好 憲雄 (MIYOSHI Norio)
福井大学 医学部 医学科 腫瘍病理学