

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640090

研究課題名(和文) 癌診断におけるMR画像と水分子状態に対する赤外分光画像の相関性の追究

研究課題名(英文) Knowing how differences on the conditions of the water molecules in the tissues between a necrotic and the surround normal.

研究代表者

三好 憲雄 (MIYOSI, NORIO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40209961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：次の異なる3観測法：(1) 癌化部位での水プロトンのスピンスピンのT2横緩和状態の白く強調された部位とH&E組織染色から判明する癌壊死部と両者間でフラクタル次元の類似性を観測した。(2) 中赤外領域観測では水分子のO-H振動構造の違いである水素結合の長いO-H振動成分の優位性を明らかにした。(3) 遠赤外領域での分光計測では水分子誘電緩和寿命の長い成分を見ることにより、癌化した部位の組織内水分子状態の相互関連性を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Next 3 experiments has been cleared the water molecules condition in necrotic part was (1) presented more large amounts of the longer hydrogen bonding, (2) the longer lifetime components in T2-MR Imaging of horizontal Spin-Spin dielectric relaxation and (3) the relationship of the pink color in H & E staining were presented in necrotic area analyzed by Fractal theory.

研究分野：医歯薬学

キーワード：核磁気共鳴診断画像 赤外分光病態形態学診断 癌組織内水分子状態

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床病理検査は、病理学の140年来の長い歴史を背景に発展し、現代医学の基礎を築いて来ている。

(2) しかしながら、今や多くの医療工学の急速な機器開発の進展により、臨床家は速やかな診断技術を身に付けている。その中に有っても最終診断は H.&E. 染色標本の顕微鏡観察による経験的形態学診断が担っているのが現状である。医療診断機器を介した診断には客観的誤診率が付きものであるが、経験的形態学診断にはその客観的パラメーターが要求されていない現実がある。それは恐らく最終的には人間自らが診断することと言える。病態検査への客観的検査の導入・応用の機器開発により、臨床診断への現実的対応が必要とされている。他方で、生体計測の臨床応用技術はめまぐるしく進展し、特に核磁気共鳴の画像技術は、著しく進展し臨床応用の必需品となりつつある。しかしながら、その画像の発振源の本質である組織内、特に癌組織内水分子状態と形態学的状態の関連性や赤外領域の分子内・分子間振動との関連性の情報は皆無である。

## 2. 研究の目的

次の異なる3種の観測法により、癌組織形態像を介して MR 画像の T2 強調部位は赤外分光学的に腫瘍生組織内の水分子内振動状態と分子間振動状態を、明らかにする。

(1) 核磁気共鳴生体画像計測により癌化部位での水プロトンのスピンスピンの T2 緩和状態の白く強調された部位と H&E 組織染色から判明する癌壊死部と両者間でフラクタル次元の類似性を明らかにする。

(2) 赤外顕微分光装置による中赤外領域観

測で、水分子の O-H 振動構造の違いである水素結合の長い O-H 振動成分の優位性を明らかにする。

(3) 遠赤外領域での分光計測画像構築により、水分子誘電緩和寿命の長い成分を見ることにより、癌化した部位での組織内水分子状態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Glia tumor ラット脳腫瘍由来の培養細胞として樹立された培養細胞(C6)を培養・増殖させた。

(2) 増殖させた細胞 ( $10^6$  cells/50 $\mu$ l) を BALB-c-nu/nu 系統のヌードマウス(♂, 4週齢)の大腿部皮下に移植後、長径が 25 mm の大きさに成った担癌マウスを滋賀医大 MR 医学総合研究センターにおいて、7T-fMRI-T2 強調画像の計測を腫瘍組織頂部より 1mm 間隔で行った。

(3) 滋賀医大より持ち帰ったサンプリグ・冷凍保存の腫瘍組織を $-20^{\circ}\text{C}$ の凍結切片作成器(Leica 製、CM-1950-OUVVM 型)にて、① JST 機器開発事業で開発した鮮度保持セルホルダー搭載の FT-IR 顕微鏡(JASCO 製、IRT-3000M 型)システム(分光光度計(JASCO 製、FT/IR-6100 型)、計測制御システム(DELL 製、OPTIPLE X-780 型、スペクトロマネジャー)用に 6  $\mu$ m の厚み、② H.&E. 染色用に 5  $\mu$ m の厚みの凍結切片を作成した。

(4) また、上記(3)で作成した 50  $\mu$ m 厚切り凍結切片を阪大・レーザーエネルギー研究センターのサブテラヘルツ領域におけるタイムドメイン(TDS)計測法や京大・原子炉実験所の LINAC 計測法による、同じサブテラヘルツ領域の近接場線分析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 本挑戦的萌芽研究で作成した実験腫瘍モデル組織の7T-fMRI-T2 強調画像と同じ腫瘍組織の切出し面に合わせて作成したH.& E.染色像から、ピンク色に染色された壊死部位をH&E染色部位に対して、ほぼ対応すると思われるMRIの白く強調された部位でフラクタル理論に基づくフラクタル次元の計算を、農林省・草地研究所が作成したフラクタル次元ソフトを供与されたもので、行なった結果、0.917と良い相関が得られた。従って、MRI強調された白い部分は、確かに腫瘍組織内壊死であることが示された。

(2) 中赤外領域における赤外分光顕微鏡の腫瘍モデル生組織切片の計測結果からは、以下の3点の知見が得られた。① 細胞核 DNAの背骨に当たるリン酸基( $\text{PO}_4$ )やホスフォジエステルに由来する P-O 伸縮振動構造、② 脂質成分( $\text{CH}_2$ )に由来する C-H 伸縮振動構造、③ コレステロールに見られるエステル結合に由来する C=O 伸縮振動構造が、正常部と対照的に高値(赤色)を示している事が明らかになった。今回の主目的の水分子内振動状態の検索の結果、H&E 染色像との対応から腫瘍組織内壊死部に対応して、水分子内 O-H 振動領域に於いて水素結合の長い振動成分が、他の領域に比べて優位に、多く存在していることが、明らかになった。

(3) 阪大・レーザーエネルギー研究センターのサブテラヘルツ領域におけるタイムドメイン(TDS)計測法による生腫瘍モデル組織切片の結果、水分子間振動の誘電緩和時間の長い振動成分が、264GHz 領域に観測できた。計測した同じ腫瘍モデル薄切切片組織のH&E 染色像との対応から、上記成分は腫瘍組織内壊死部に一致して増大していること

が確認できた。従って、腫瘍組織内で壊死部には、水分子間振動の誘電緩和時間の長い振動成分が、有意に存在していることが判明した。

(4) 京大・原子炉実験所のLINAC計測の結果、サブテラヘルツ領域には、腫瘍組織内壊死部においては、264GHz 領域以外の領域にも、400, 600 GHz 近辺の振動成分が観測されつつあるが、共同利用実験のために時間的制約もあり、現在マシンタイムの申請を行い、観測の継続をしている状態である。

#### (5) まとめ

今回、挑戦的萌芽研究の予算にて、従来積み重ねてきたFT-IR顕微分光画像の客観的画像の裏付けが可能になり、特に鮮度の高い腫瘍モデル薄切切片組織内の水分子に着目して、異なる観測法：核磁気共鳴画像計測、中赤外領域顕微分光法とサブテラヘルツ波領域の分光法により、同じ腫瘍組織を使用して初めて明らかにできたことは、大きい。今後の腫瘍マーカー開発の大きな情報と成り得るものと確信する。

#### 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 2 件)

- ① N. Miyoshi, Y. Fukunaga, S. Kaneko, H. Hisazumi: PD and PDT with porphyrin precursor (5-ALA) in Japan. *J. Japan Soc. Laser Sur. & Med.*, 29 164-168 (2014), 査読有
- ② N. Miyoshi, V. Misik, and P. Riesz: Effect of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in nitroxide formation from a cyclic secondary amine by ultrasound on the mechanism of sonodynamic

activation. *Radiation Res.*, 143,  
194-202 (2014), 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 三好憲雄\*、「5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) と共に 20 年」(第 5 回ポルフィリン-ALA 学会・招待講演、日本大学工学部 (東京都)、2015. 4. 25)

[図書] (計 1 件)

- ① N. Miyoshi\*, and R. H. Pottier (Editor). "In hope of going over the present Clinical PD and PDT". (Eds. by N. Miyoshi and R. H. Pottier ; pp. 1-196), 2014 (\*Corresponding Author)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「重粒子線治療用増感剤、及びそれを用いた重粒子線治療法」

発明者: 三好憲雄

権利者: 福井大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-226511 号

出願年月日: 2014 年 11 月 18 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://ala.umin.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 憲雄 (MIYOSHI, NORIO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 40209961

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし