

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：43405

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861765

研究課題名(和文) ラマン分光法による癌細胞のイメージング

研究課題名(英文) imaging of squamous cell carcinoma 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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン分光法にて、口腔扁平上皮癌の細胞レベルのイメージングを行った。サンプルは連続切片を作製し、一方をラマン分析に用い、他方をH&E染色し癌組織と癌細胞形態の確認をした。癌細胞の外径は10ミクロン程度で、ラマンスペクトル上の複数のピーク面積を反映したイメージングで、癌細胞形態を概ね表現することができた。

ラマン分析によるイメージングは、分子の種類や構造を半定量的に示しており、癌細胞のイメージは、ラマンスペクトル上の個々のピークが帰属する分子や分子構造の癌細胞内での局在を示している。サンプルに特別な処理をせず、一度の分析で多くの成分の癌細胞内での局在の分析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 cells of oral squamous cell carcinoma with raman spectroscopy to obtain clear cancer cell image. The serial transverse sections were prepared, one sample section was used for raman analysis, the other one was stained with H&E to confirm pathological structure. We could show the approximate form of cancer cell (about 10 micron square) with raman images reflecting area of some raman spectra peaks.

The image of raman spectroscopy indicates kinds and structures of molecule at semi-quantitatively. The raman images of cancer cells show the expression and distribution of molecule and its structure which belong to individual peaks of raman spectrum. Raman analysis don't have need to make any treatments before measurement, it was suggested that this method might be able to obtain the distribution of many components in cancer cells by one time measurement.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ラマン分光法 扁平上皮癌細胞 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、癌が発生した部位や大きさは手術後の生活（咀嚼、嚥下、発音、顔貌など）に非常に大きな影響を与える。口腔領域では、扁平上皮癌が最もよくみられる。その診断には、生検後の病理診断がほぼ全例で行われる。生検は、侵襲を伴う処置であり非侵襲的な方法で確定診断が得られる手法があれば望ましい。ラマン分光法は、非侵襲的に診断につながる情報を得ることができる手法である。消化器の診断には、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報告されている。口腔癌でも生検による病理検査に加え、診断に有用な補助的な情報を与えられるように発展させたい。扁平上皮癌の組織レベルのイメージングは、概ね可能となった。癌細胞の集団と周囲の間質とは、明瞭にラマンスペクトルのいくつかのピーク成分の濃度分布を反映したイメージで表示できた。扁平上皮癌のラマン分光法を用いた基礎的な研究には、組織レベルから個々の扁平上皮癌細胞レベルの測定・分析が必要となる。

2. 研究の目的

ラマン分光法を用いて、口腔扁平上皮癌を構成する個々の癌細胞のイメージングを行う。ラマン分光法は、組織を構成する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に注目した報告はいくつかある。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(イメージング)が可能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呼ばれ、分子の振動により分子の種類や構造の情報がラマンスペ

クトル上に特定のピークとして検出される。ラマンスペクトルは、多数のピークを含み、一度の分析で多くの情報を得ることができる。口腔扁平上皮癌組織のイメージングでは、分析領域の各測定点のピーク面積を算出し半定量的な濃度分布を色分けで表示することで、癌細胞集団とその周囲の間質組織とでコントラストを付けて描出することができた。口腔癌組織にラマン分光法を応用するには、癌組織からそれらを構成する個々の癌細胞のイメージングが必要となる。個々の癌細胞のイメージが可能となれば、細胞質や核のスペクトルを識別できる。そうなれば、通常の組織・細胞形態による病理所見に、ラマン分光法で得られた分子成分や構造に関する定性・半定量的な情報を付加できる可能性が高い。よって、本研究の目的は、個々の口腔扁平上皮癌細胞のイメージングを行い、再現性良く多くのピーク成分の濃度分布にて細胞の形を描出することである。

3. 研究の方法

口腔癌の治療時には、まず病変の確定診断のために組織生検を行う。採取した組織をそのまま凍結保存し分析資料とする。その際に、患者には組織を研究に使用させていただき、不利益がないことを説明し同意を得る。そのサンプルを、クライオスタッドで、8~10ミクロンの厚みで連続切片を作製した。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 ミクロンにした。各測定点での露光時間は 10~15 秒で、2 回測定を行い積算平均化しスペクトルとした。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、測定対象領域を H&E 染色像と丁寧に対比しながら進めた。また、理論上は連続する 2 枚のサンプルは同一面であるが、対象が個々の癌細胞であるため明らかにラマン分析イメージと H&E 染色での細胞同士的一致は困難であった。よって、ラマン分光器に搭載されているカメラの像 (×100) で癌細胞の外郭が確認できる領域を分析領域とした。分析領域は、30~60 ミクロン四方の領域を、2500~3600 点測定した。測定点の間隔は、0.5~1 ミクロンに設定した。

得られたラマンスペクトル上の特定のピークにおいて、それらの面積を反映したイメージを作製し、ラマン分光器搭載のカメラ画像から得られる癌細胞の形態と一致するかを確認した。ラマンスペクトル上のピークの帰属は、これまで研究報告されている内容を参考にした。

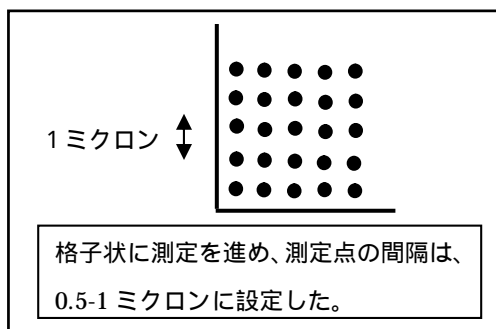


図 2 面分析 (マッピング測定) の進めかた

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。得られたイメージは、サンプルに特別な処理を施していない。サンプルの厚みは、8~10 ミクロンで、ラマン分光器に搭載されているカメラで癌細胞の外郭が確認できる領域を測定すれば、ラマ

ンイメージング結果に著名な差異は認められなかった。以下に、代表的な分析結果を示す。図 3 は、口腔扁平上皮癌組織で、図 4 の領域を分析した。扁平上皮癌細胞の外形と核が確認できる。分析領域 A は、60x60 ミクロン平方を 3600 点測定 (1 ミクロン間隔)、分析領域 B は、30x30 ミクロン平方を 3600 点測定 (0.5 ミクロン間隔) で測定した。

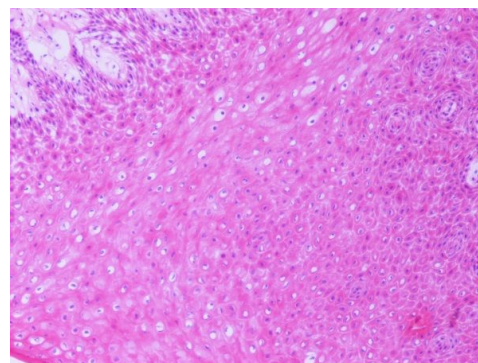


図 3 扁平上皮癌組織

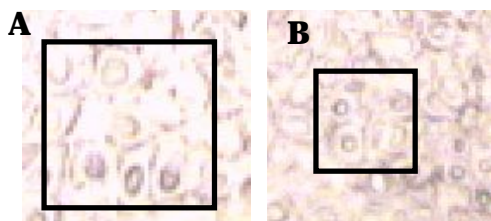


図 4 扁平上皮癌細胞 (ラマン分光器搭載カメラ)

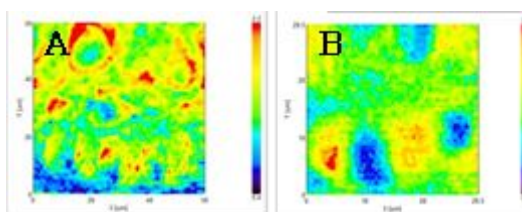


図 5 phenylalanine (1002cm^{-1})

図 5 は、 1002cm^{-1} の phenylalanine のピーク面積を反映した濃度分布を示している。右横のスケールのように、赤>黄>緑>青の順で存在量を半定量的に表わしている。分析領域 A、B とともに癌細胞質に同成分が優位に分布している。Phenylalanine は、タンパク質を構成するアミノ酸であり、分布の様子はラマン分光器に装着されたカメラの癌細胞の外形と概ね一致している。

図 6 は、C-H band で、有機化合物では一般的な炭素 水素結合の分布を示している。分析

領域 A、Bとも細胞質領域に優位に分布している。

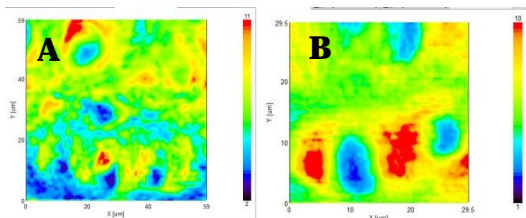


図6 C-H band(1451cm⁻¹)

図7のアミドはタンパク質のペプチド結合中のC=O振動を反映している。細胞質中に優位に分布している。

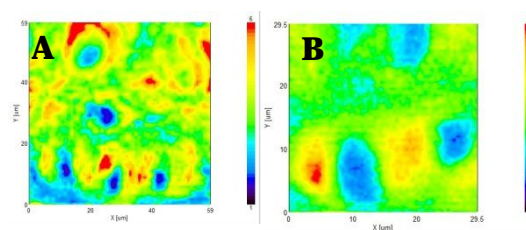


図7 amide (1655cm⁻¹)

図8は、核酸の分布を示している。分析領域Bでは、図5~7の成分が疎である領域に、核酸が優位に分布している。核酸が優位に分布している領域は、図4のラマン分光器に搭載された癌細胞で核に相当している。

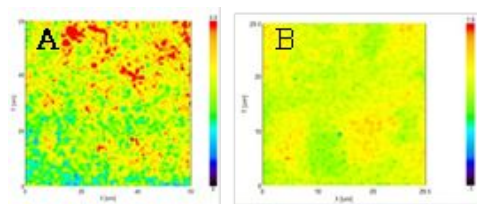


図8 nucleic acids (1223cm⁻¹)

このように、ラマン分光法による扁平上皮癌細胞のイメージングは、分子や分子構造の局在を半定量的に色分けして表現している。phenylalanine、C-H結合やアミド結合などの分子構造は癌細胞質に優位に存在し、もちろん核酸は、核の領域に分布していることがラマン分光法を用いたイメージで表現することが概ね可能であった。タンパク質成分や分子構造は、細胞質に、核酸は核の領域に優位に分布している。測定領域Bのイメージは、

30ミクロン四方を、0.5ミクロン間隔で3600ポイント測定して得られたイメージである。ラマン分光法は、空間分解能が高く分析対象領域を1ミクロン単位で測定が可能で、その特徴を生かすことができた。また、10ミクロン程度の癌細胞内の複数の分子や分子構造の局在を、一度の分析でイメージングすることもラマン分光法以外では困難と考える。ただ、もう少し、緻密に細胞外形や、細胞質、核を描出できたらより望ましかった。

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 1 件)

木下英荘、ラマン分光法を用いた白板症の凍結切片のイメージング、日本口腔外科学会総会・学術大会、2015年10月16~18日、名古屋国際会議場(愛知 名古屋)

〔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

(3)連携研究者