

機関番号：13401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390165

研究課題名 (和文) 癌組織内エックス線元素分析電顕像と赤外分光画像計測の病態検査応用

研究課題名 (英文) Pathologic application of atomic analyzed SEM and infrared microscopic imaging in tumor tissue.

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

研究成果の概要 (和文)：実験腫瘍組織内の生体分子に含まれる腫瘍特異的成分分子の元素分析を操作電子顕微鏡(SEM)像として捉えることで、従来のフーリエ変換赤外(FT-IR)分光分析における癌特異的生体成分分子の振動構造分析技術による抽出顕微画像の客観性を持たせ、より説得のあるバイオイメージングの病態検査技術への導入・応用を試みた。

研究成果の概要 (英文)：Pathologic application study of and atomic analyzed scanning electron microscopic (SEM) and an infrared microscopic imaging in tumor tissue was done using SEN attached with an energy dispersion X-ray analyzer and FT-IR microscope.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査システム、赤外分光病態電顕検査システム

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た。

(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。

2. 研究の目的

(1) 上記の背景から必要とされる事項としては、先ず外科病理診断へのスクリーニング機器の開発によるサポート体制の構築であ

る。

(2) 第二目標は、従来にない病理診断に不可欠の組織内情報の提供ではないだろうか？それは同じサンプル視野での話である。例えば、①パラフィン切片の脱パラフィン操作で失われる脂質(CH振動)の変性度合い(CH₂)の情報や②細胞核内にあるDNA 2重鎖内リン酸(PO₄)の振動構造の成分の違いあるいは③癌組織内蛋白質 2次構造(α-ヘリックス/β-シート構造)成分比率の違い等を明らかにして、癌組織に特有の振動構造成分を抽出することである。

(3) 第三目標は、腫瘍特有的振動成分を抽出して画像化することで、癌診断マーカーとして画像化することで外科病理診断の補助情報として提示することである。

(4) 最終的には、H.&E.染色像と並行して議論材料を提供し、独立した診断画像として活用される事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト前立腺癌由来の細胞として樹立された培養細胞(LNCaP, DU-145, PC-3)を培養・増殖させる。

(2) 増殖させた細胞(10⁶ cells/50μl)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、平均が7x7x7mm³の大きさに成った時点で、正常皮膚を含めた腫瘍組織をサンプリングし、-70℃の冷凍庫で保存する。

(3) 保存の腫瘍組織を-20℃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6μmの厚み、② H.&E.染色用に5μmの厚みの凍結切片を作成した。③ またラマン分光顕微鏡(JASCO社製、NTS-1000 MTS型)には10μmの厚みで、④ 更にはX-線元素分析画像システム搭載の走査電子顕微鏡(JEOL社製、JSM-63900FMM型、JED-2300FMM型)にも10μmの厚みでサンプルを作製した。

(4) また、肺癌の手術中のゲフリールサンプルの凍結切片(6μm)を上記①~④の計測のために作成した。

4. 研究成果

(1) 本基盤研-BとJST機器開発事業で開発されたフーリエ変換赤外(FT-IR)顕微装置には、術中ゲフリール腫瘍組織の凍結切片の鮮度を保持する下記の図1・2のようにサンプルセルホルダーを搭載している。

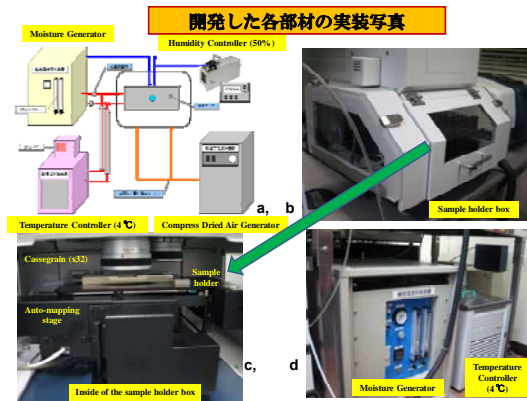


図1：開発した各部材の実装図

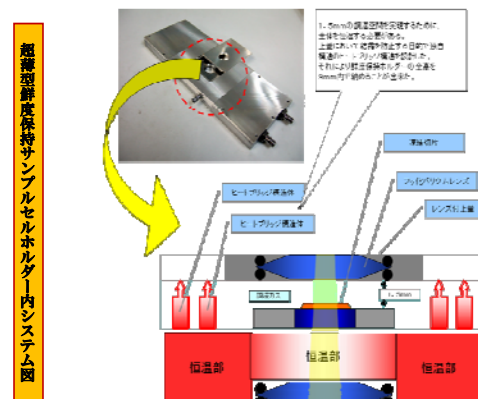


図2：超薄型鮮度保持サンプルセルホルダー内システム図

そのセルホルダーの特色は、術中で採取したサンプル組織の凍結切片(8μm)の鮮度を出来るだけ新鮮に保つための工夫を行っている。特に、薄切切片の乾燥を防ぐために、70%の湿度を保ちながら100%窒素ガス環境下で、温度は4℃に保ちながら、10分以内で約7,000ポイントのFT-IRスペクトルを、空間分解能6.25x6.25μm²の空間分解能で計測出来た。その後、がん組織に特徴的振動構造成分を従来のH.&E.染色組織像と検証しながら、抽出した。

(2) その結果、図3の様いくつかの肺腺癌に特徴的なコントラストのあるイメージング像が得られた。癌部に特徴的な振動構造としては、①細胞核DNAの背骨に当たるリン酸基(PO₄)やホスホジエステルに由来するP-O伸縮振動構造、②脂質成分(CH₂)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。以上の3つの振動構成分に共通のものとしては、肺腺癌組織内には脂質成分が有意に局在している特長を示している事が判明した。これがこの腫瘍に特徴的振動構成分であることが言える。これらのイメージング像はタンパク質の Amide-I の吸収ピーク面積(緑色)に対する相対的变化として表わしている。

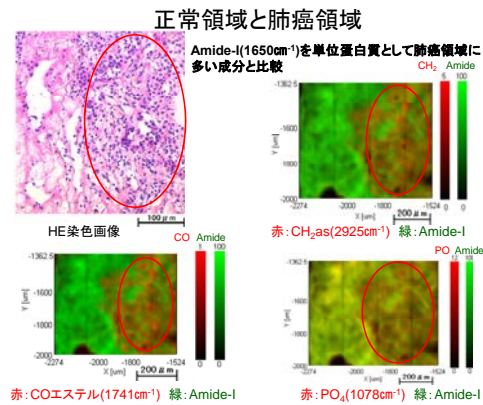


図3：正常領域と肺腺癌領域における H.&E. 染色像と癌特異的各種振動構成分(赤色)のイメージング像(Amide-I で標準化：緑色)

(3) 従来はサンプル組織内タンパク質は、ホルマリン等や熱で固定されたりして2次構造そのものは変性をしているが、今回の鮮度保持セル内の組織に対しては、タンパク2次構造そのものは維持されているために、正常部と増殖を繰り返す癌部とでは、何らかの違いが見られるかもしれないとの予測により、FT-IR 分光解析の技術を駆使して、2次構成分の割合を推測できる多変量解析ソフト(日本分光(株)製、IR-SSE 型)を共同で新しく開発した。(図4)

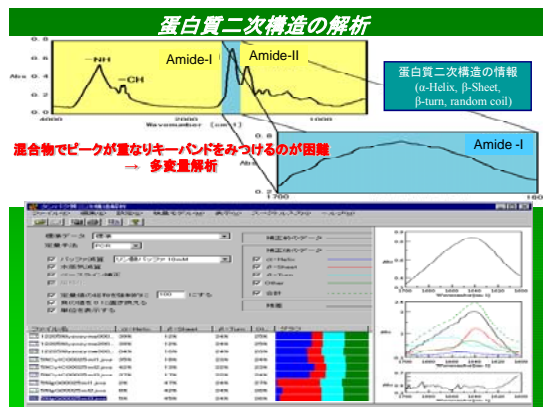


図4：タンパク2次構造の解析

このソフトにより α -ヘリックス、 β -シート、 β -ターンとランダムコイルを含む Others の4成分の合計を100%にして振り分けた場合の各構成分比率を上記のスライドの様に、

瞬時に、各スペクトルに対して求める事ができ、 α -ヘリックス(赤色)と β -シート(緑色)でマッピングした2次元に対して色分けで表わすと、先程の2次元画像は、図5の様に正常部と癌部でコントラストを得た。

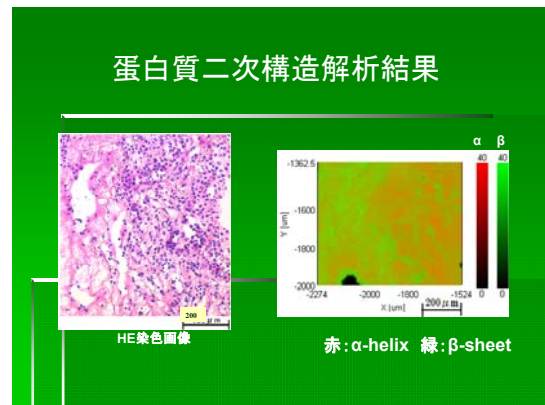


図5：肺腺癌(高分化)組織内タンパク2次構成分比のマッピング像(赤： α ；緑： β)
上記のマッピング像からも明らかのように、癌部には赤色の α -ヘリックス構成分が、緑色の β -ヘリックス構成分に比較して優勢である事が伺い知る事ができる。しかし、その現象の理由は、未だ明らかにはされていない。今後、より詳細に分子腫瘍学的検討が必要になる。

(4) それではこれら FT-IR 顕微マッピング画像に対して、よりもっと客観的に実証化出来る手法はないものであろうか？それは、走査電顕に拡散エネルギーX線元素分析装置をドッキングさせたものではどうか？それを実現させたものが以下の図6である。

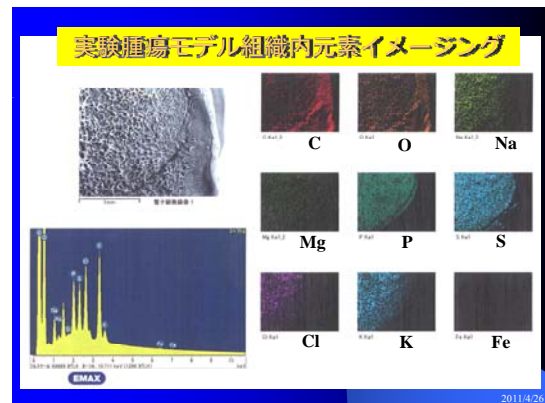


図6：実験腫瘍モデル(PC-3)の組織内X線元素分析画像と元素エネルギースペクトル
左下には組織内X線元素エネルギースペクトラムパターンを示しているが、対応するエネルギーのピーク面積でマッピングを試みると、右側の9つの元素の各イメージ像が見えてくる。特に注目は、りん元素のマッピングを検証すると、確かに FT-IR 顕微画像と相関している事が明らかになった。すなわち、DNA 含量の多い癌部では P 元素が多い事実

も判明してきた。特に下図7のように、癌部と正常部の境界部分に、より多くのP元素が多く、S元素成分の多いのも注目に値する。

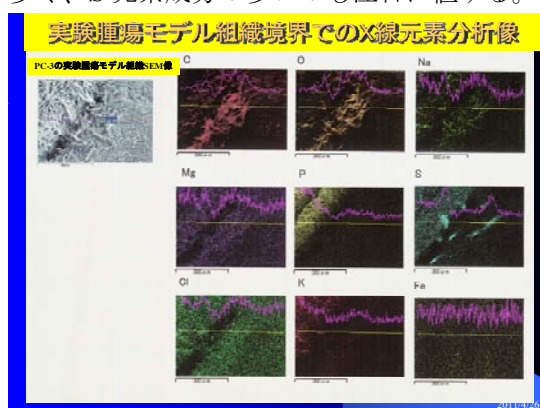


図7：実験腫瘍モデル組織境界でのX線元素分析電顕像

(5) まとめ：

今回、基盤研究Bの予算にて走査電子顕微鏡に搭載したX線元素分析装置の購入により、初め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、特にリン元素に対応した癌部の高値の画像を、FT-IR顕微画像(PO₄)でも癌部に特化して高値を示す所見を得た事は、両者の画像根拠の客観性を強調出来るものと成りえた。

また、腫瘍部では、脂質類成分が多く存在し硫黄元素の存在も腫瘍と正常の境界部に存在している事が明らかとなり、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

[雑誌論文] (計10件)

- ① S. Utsuki, N. Miyoshi*, H. Oka, H. Misajima, S. Shimizu, S. Suzuki, K. Fuji. Fluorescence-guided resection of metastatic brain tumors using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin-IX: photobiological study. *Brain Tumor Pathol.*, (IF=1.110) **23**, 2007, pp.53-55. (査読有) (*Corresponding Author)
- ② N. Miyoshi*, and S. Kaneko. "PD and PDT with porphyrin precursors in Japan." *J. Env. Pathology, Toxicology and Oncology*, **27**, 2007, pp.108-113. (査読有) (*Corresponding Author)
- ③ S. Kinoshita, N. Miyoshi*, K. Miyauchi, T. Ogawa, T. Kitagawa, H. Itoh, K. Sano. Phosphate mapping of sialoliths with raman microspectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* (IF=3.526) **39**, 2008, pp.349-353. (査読有) (*Corresponding Author)

- ④ N. Miyoshi*, T. Tuziuti, K. Yasui, Y. Iida, J. Z. Sostaric. Ultrasound induced cytolysis of cancer cells is enhanced in the presence of micron-sized aluminum particles. *Ultrasonics Sonochemistry* (IF=2.424) **15(5)**, 2008, pp.831-890. (査読有) (*Corresponding Author)
- ⑤ H. Kinoshita, N. Miyoshi*, T. Ogasawara, K. Sano. Functional mapping of caries enamel of a human teeth with Raman microspectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* (IF=3.526) **39**, 2008, pp.655-660. (査読有) (*Corresponding Author)
- ⑥ J. Tanigawa, N. Miyoshi*, and K. Sakurai. Characterization of chitosan/citrate and chitosan/acetate films and applications for wound healing. *J. Appl. Polym. Sci.* (IF=1.187) **100**, 2008, pp.608-615. (査読有) (*Corresponding Author)
- ⑦ J. Z. Sostaric, N. Miyoshi, J. Y. Cheng, P. Riesz. Dynamic adsorption properties of n-alkylglucopyranosides determine their ability to inhibit cytolysis mediated by acoustic cavitations. *J. Phys. Chem, B.* (IF=4.086) **112 (40)**, 2008, pp.12703-12709. (査読有)
- ⑧ H. Hoshina, A. Hayashi, N. Miyoshi, F. Miyauchi, C. Otani. Terahertz pulsed imaging of frozen histological tissues. *Appl. Phys. Lett.*, (IF=3.554) **94(12)**, 2008, pp. 123901,1-3. (査読有)
- ⑨ S. Ito, N. Miyoshi*, V. DeGraff, K. Nagashima, L. Kirschnbaum, P. Riesz. Free Radical Res. (IF=2.826) **43(12)**, 2009, pp.1214-1224. (査読有) (*Corresponding Author)
- ⑩ S. Kosaka, N. Miyoshi*, O. R. Akilov, T. Hasan. Targeting of sebaceous glands by delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: an in vivo study. *Lasers in Surg. & Med.* (IF=3.050) accepted at 2010, 25th Dec. (査読有) (*Corresponding Author)

[学会発表] (計10件)

- ① 三好憲雄*、「サテライトシンポジウム：5-ALAの基礎研究と臨床研究の利用拡大を目指して」(第17回日本光線力学学会学術講演会)、栃木、2007、6月16日
- ② 三好憲雄*、**教育講演**「美容1：皮膚科における光線力学療法(PDT)の基礎研究」第25回日本美容皮膚科学会総会・学術大会、2007.08.18、横浜
- ③ N. Miyoshi*, T. Ogasawara, H. Kinoshita, H.

Hisazumi. **Workshope:** Modification of porphyrin precursor, 5-ALA with TiO₂ particles by ultrasound irradiation. The 11th World Congress of the Int. Photodynamic Association (IPA), 2007, March., 29th Seattle. (*Corresponding Author)

④ N. Miyoshi*, Y. Fukunaga, K. Sugimoto, H. Hisazumi. **Invited Speaker:** Modification of porphyrin precursor, 5-ALA with TiO₂ particles and the photodynamic effect for experimental tumor model. (Abstract book, p.18), The 12th Congress of Asian Pacific Association for Laser Medicine and Surgery. 2008, Oct., 18th Korea. (*Corresponding Author)

⑤ N. Miyoshi*, S. Kaneko, Y. Fukunaga, R. Kitai, M. Ishizuka, Y. Matsumoto, S. Kosaka, K. Inoue, T. Akasu, T. Tanaka, and H. Hisazumi. **Plenary Lecture (Invited):** Introduction of Japanese 5-ALA Association on Basic and Clinical Studies. (Abstract Book, p.19), 9th Annual Congress the Korean Photodynamic Association and 1st Korean-Japan Photodynamic Symposium, 2009, Aug. 22nd in Korea. (*Corresponding Author)

⑥ N. Miyoshi*, Y. Fukunaga, I. Ogawa, T. Idehara. **Symposium Session:** Application for hyperthermia treatment of an experimental tumor using a gyrotron (107, 203 GHz). The 34th Int. Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz, 2009). 2009, Nov., 23rd Korea (*Corresponding Author)

⑦ N. Miyoshi*, Y. Fukunaga, K. Kume, E. Minehara. **Symposium:** Combination therapy of PDT with proton irradiation. 18th Congress of the Int. Soc. for Laser Surg. Med. 2009, Nov. 12th in Tokyo. (*Corresponding Author)

⑧ N. Miyoshi*, K. Inoue, T. Tanaka. Introduction (**Symposium, Corresponding Organizer, Chair**): In hope of detting over the present stage of clinical field. The 2nd Asia Japan-Korea-China PDT Joint Symposium, 2010, June 11th in Fukui. (*Corresponding Author)

⑨ N. Miyoshi*, S. Ito, I. Ogawa, T. Idehara. **Symposium:** Combination treatment of hyperthermia and PDT for experimental tumor model using gyrotron (107, 203 GHz). In 35th Int. Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Wave (IRMMW-THz 2010), 2010, Sep. 14th in Roma. (*Corresponding Author)

⑩ N. Miyoshi*, **Symposium-3E: (Corres-**

ponding Organizer, Chair): In hope of getting over the present stage of clinical field. in PACIFICHEM 2010. Symposium of PD and PDT (#12-071), 2010, Dec. 18th in Hawaii. (*Corresponding Author)

〔図書〕 (計 5 件)

① N. Miyoshi*, S. Kaneko, and H. Hisazumi. "Recent Progress on Clinical and Basic Research of ALA". (Eds. by N. Miyoshi and S. Kaneko ; pp. 1-92), An application of fluorescence analysis in tumor tissue. 2007, pp. 11-16, Published by Kashiwaba Neurosurgical Hospital. (*Corresponding Author)

② K. Nakano, E. Tachihara, and N. Miyoshi*. "Recent Progress on Clinical and Basic Research of ALA". (Eds. by N. Miyoshi and S. Kaneko ; pp. 1-92), Distribution of protoporphyrin-IX (Pp-IX) in the animal acne model. 2007, pp. 61-64, Published by Kashiwaba Neurosurgical Hospital. (*Corresponding Author)

③ T. Ogasawara, N. Miyoshi*, and K. Sano. "Recent Progress on Clinical and Basic Research of ALA". (Eds. by N. Miyoshi and S. Kaneko ; pp. 1-92), An application of fluorescence analysis in tumor tissue. 2007, pp. 85-89, Published by Kashiwaba Neurosurgical Hospital. (*Corresponding Author)

④ N. Miyoshi*, H. Okada, M. Takada, M. Shinagawa, and K. Akao. "New Approaches in Biomedical Spectroscopy" (Eds. by K. Kneipp, R. Aroca, H. Kneipp, and E. Wenstrup-Byrne; pp. 1-453). **Chapter 4.** New Approaches Detection Secondary Conformation of Prion-Section Tissue by Fourier-Transform Microscopy. 2007, Jan. pp. 41-51. Published by **American Chemical Society, Symposium Series, 963.** (*Corresponding Author).

⑤ 三好憲雄*、伊藤慎治、福永幸裕；フロンティアテクノシリーズ「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」(監修：亙理文夫；pp. 1-317)、**6章：酸化チタンとナノリスク「ナノ粒子がもたらす有効性と環境保護への心配から」**、2010, June. pp. 155-161、フロンティア出版、東京、(*Corresponding Author)

⑥ 三好憲雄*、伊藤慎治、福永幸裕；エレクトロニクス「次世代光医療ーレーザー技術の臨床への橋渡しー」(監修：栗津邦雄；pp. 1-252)、**第12章：「利用拡大を目指した5-ALAを用いたがんのPDD/PDT」**、2010, Nov., pp.135-157、シーエムシー出版、(*Corres-

ponding Author).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計4件)

名称：「ヒトや動物の細胞の増殖の抑制を容易にかつ安価に実施できる方法および薬剤提供する。」

発明者：三好憲雄、伊藤慎治

権利者：三好憲雄

種類：特許

番号：特願 2007-263784 号

出願年月日：2007 年 9 月 10 日

国内外の別：国内

名称：「光力学的治療法に使用するための光増感剤組成物」

発明者：三好憲雄、杉本和広

権利者：テイカ株式会社

種類：特許

番号：特願 2007-046640 号

出願年月日：2007 年 6 月 18 日

国内外の別：国内

名称：「光線力学治療法」

発明者：三好憲雄、久米恭

権利者：(財)若狭湾エネルギー研究センター、
(国立大学法人)福井大学

種類：特許

番号：特願 2009-271588 号

出願年月日：2007 年 11 月 30 日

国内外の別：国内

名称：「粒子線治療を併用する光線力学治療法」

発明者：三好憲雄、久米恭

権利者：(財)若狭湾エネルギー研究センター、
(国立大学法人)福井大学

種類：特許

番号：特願 2010-92621 号

出願年月日：2007 年 4 月 13 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

今村 好章 (IMAMURA YOSHIAKI)

福井大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40223341