

R1214

実験腫瘍組織内生体主成分の分布および機能的構造成分の解析と

FT-IR 顕微イメージング

Distribution of Biological Component Elements in the Experimental Tumor Tissue, Analysis of the Functional Structure Elements and the FT-IR Microscopic Imaging

三好 憲雄^a, 家路 豊成^b, 太田 俊明^b
Norio Miyoshi^a, Toyonari Yaji^b, Toshiaki Ohta^b

^a福井大学医学部, ^b立命館大学 SR センター

^aGraduate School of Engineering Science, Osaka University, ^bThe SR Center, Ritsumeikan University

立命館大学の SR センターに設置の高輝度な光源を活用した中赤外線領域での FT-IR 顕微鏡によるヒト胃癌モデル組織の凍結切片の計測により、癌組織内の部位による機能的特性の情報が得られた。それは今後壊死に至るかあるいは侵潤性のある癌部位なのかを判断できる貴重な情報である。

It was measured the human gastric cancer model tissue by the SR-FT-IR microscopy to analysis of the mapping spectra of high resolution of the SR center light source of Ritsumeikan University. We could know the important information of the cancer viability to estimate the invading ability into the normal tissue from the data mapping images of CH₂ and C=O stretching-vibration components of the FT-IR spectra.

Keywords: SR light source of Ritsumeikan University, FT-IR micro-spectroscopic Imaging, Tumor tissue, Biological vibration components.

背景と研究目的: 平成 23 年度より立命館大学 SR センターの赤外領域における分光輝度の優位性を生かして、実験腫瘍モデル組織内の生の生体成分の分布を染色等を施す事無く、正確な観測(可視化)を可能にするために、FT-IR 顕微分光計測と各生体成分由来の振動構造成分を抽出し、それをマッピング手法により画像化する事を試みてきた。本研究の目的は立命館大学 SR センターの赤外領域における分光的輝度の優位性を生かして、生の腫瘍組織内で生理学的機能性に潜んでいる特色ある生体成分の抽出法の開発とその画像化を目指している。

実験: 今年度はヒト胃癌由来培養細胞(MKN-45)を開復したBALB-c-nu/nu系ヌードマウスの盲腸漿膜壁に麻酔下で移植後腹膜を閉じて約 4 週間後に腹膜壁に播種した腫瘍組織を、サンプリング 5 時間前に光増感剤の前駆体 5-aminolevulinic acid (5-ALA)を最終濃度が 1.0mM に成る様に経口投与した。投与後 5 時間後にヌードマウスを開復し、青色(410nm)レーザー励起光のもとで赤色蛍光を観測しながら赤色の癌部位のサンプリングを行った。

(1) 実験腫瘍モデル組織(腹膜に播種した腫

瘍組織)の摘出と -20°C に冷凍保存。

- (2) -20°C で 10μm の厚みに凍結切片を FT-IR 顕微計測用とヘマトキシリン・エオジン H.&E. 染色用及び蛍光顕微鏡観測用に分けて 3 枚の切片作成。
- (3) H.&E. 染色をメタノール固定後に施行し、エンテランで封入。
- (4) FT-IR スペクトルマッピング計測を立命館大学 SR センターの BL-15 ビームラインに設置の FT-IR 顕微鏡にて計測を繰り返した。
- (5) 得られた FT-IR スペクトルをカーブフィッティング法により、各振動構造成分 (P=O, CH₂, C=O) を分離して分光画像 (Figures 5, 6, 7) の構築を行ない、生物学的、腫瘍病態学的検討・解釈を行った。。

結果、および、考察:

Figure-1 の HE 染色像で、癌の侵潤を判断できる部位を、FT-IR 顕微マッピング計測対象の場所に選定した。

Figure-2 は Figure-1 に対応する胃癌 MKN-45 モデル凍結切片を作成した組織を BaF₂ 透過材の上に貼り付けた -20°C での写真像を示している。

Figure-3 はその SR-FT-IR 顕微透過像を示す。**Figure-4** は立命館大学 SR センターに設置

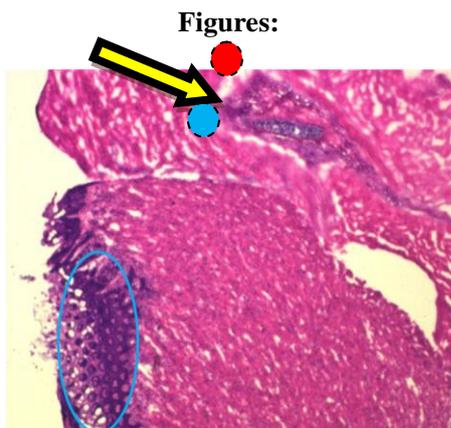


Fig.1: H.& E.-staining of MKN Tissue.

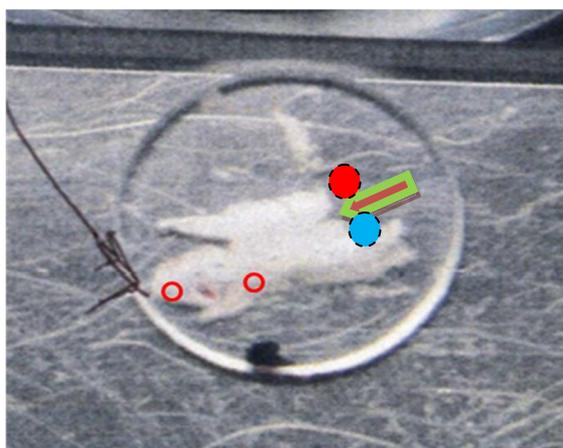


Fig.2: Cryo Sectioned Slice of MKN Tissue.

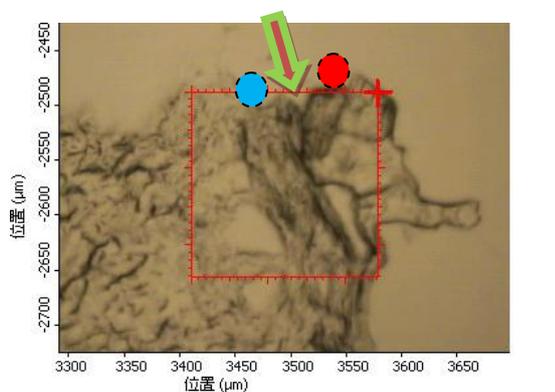


Fig.3: Transmitted Image of MKN Slice.

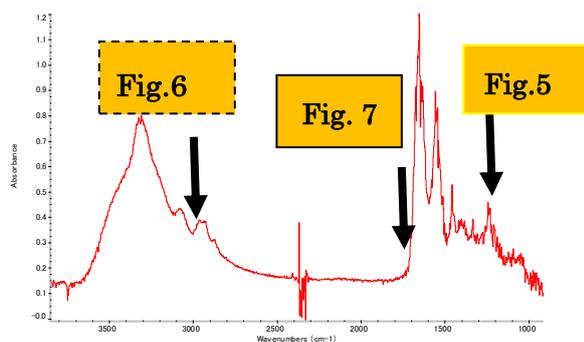


Fig.4: A SR-FT-IRM Spectrum of MKN Slice.

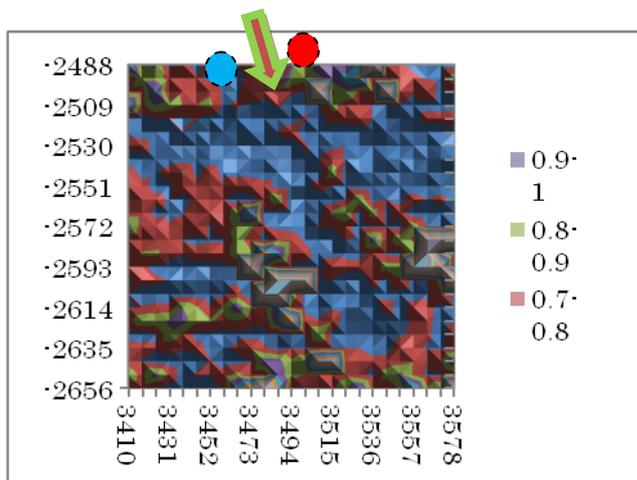


Fig.5: Mapping Image of the Sym S-V P=O (1080cm⁻¹) of MKN Tumor Slice.

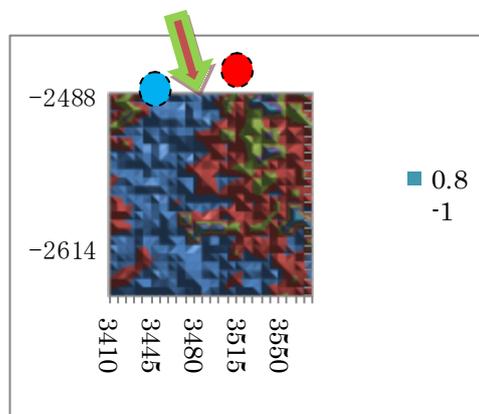


Fig.6: Mapping Image of the Anti-sym S-V CH₂(2925cm⁻¹) of MKN Tumor Slice.

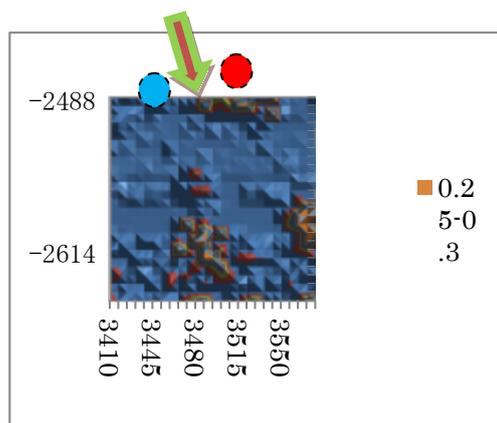


Fig.7: Mapping Image of the S-V C=O (1740cm⁻¹) of MKN Tumor Slice.

のSR-FT-IR顕微鏡で計測したFT-IRスペクトルの一例を提示した。スペクトルの分解能に優れている事が伺える。今回はスペクトル上に提示した様に、**Fig.5**のP=O、**Fig.6**のCH₂のC-H、及び**Fig.7**のC=Oの伸縮振動の吸収

ピークに注目して、その成分のピーク面積をカーブフィッティング法により分離・抽出した吸収ピーク面積のマッピング像の構築を試みた。

その結果、それぞれの **Figures** で提示しているが、これら画像間の関連性を考察するに、**P=O** 振動成分(**Fig.5**)は HE 染色像の癌細胞核の分布に良く対応しており、矢印の両サイドに分布している。しかし、脂質成分(**CH₂:Fig.6**)は矢印方向の左側により多く分布しており、エステル(**C=O**)成分(**Fig.7**)はむしろ右側奥に強く分布して事が判明し、腫瘍細胞の元気度、いわゆる癌の侵潤性を考察するのに、極めて重要な情報を提供しているように考えられた。すなわち、エステル化の進んだ矢印方向の右側奥は壊死に至る部位であり、左側はまだ元気な癌細胞が現存している可能性を示唆していると考えられた。また、癌部位の特徴として脂質が多い事も結論付ける事が出来た。

以上の様に、同じ癌細胞でも細胞死に至るものであるのか、今後侵潤して行く細胞であるのかの機能的判断を示唆する情報の提供が可能に成りつつある事が伺い知る事が出来た。

今後の成果発表の予定：今回の貴重なマッピング像から、癌診断にとって今まで **HE** 染色診断像からは得られなかった貴重な知見データとその考察が出来たので、今後論文の報告も含めて発表の機会を待ちたい。