

グラフィア

病理組織像から分子イメージングへの架け橋

亀山 孝二 町田 稔 恩田 宗彦 内藤 善哉

日本医科大学大学院医学研究科統御機構病理学分野(病理学第2教室)

Molecular Imaging Analysis on the Basis of Histopathological Image

Kohji Kameyama, Minoru Machida, Munehiko Onda and Zenya Naito

Integrative Pathology (Department of pathology II) Graduate School of Medicine

はじめに 組織や細胞の顕微鏡観察は機器や光計測手段の発展とともに極めて多様な系のバイオイメージングとして進展している。組織や細胞の多様な形態を示す生物反応系から細胞間の相互作用や反応系をとらえる可視化や計測手段が開発され、さらに現在多分子から一分子イメージングまでの解析により目的の情報を得ることが可能となっている。

これらの架け橋として、各種光計測法があり、その基礎には多様な光(偏光, 蛍光, その他)の性質の応用がある。ここでは高感度カメラを用いて光多重化, 暗視野顕微鏡法を加え組織からタンパク分子の変化の観察結果ならびに計測例を紹介する。

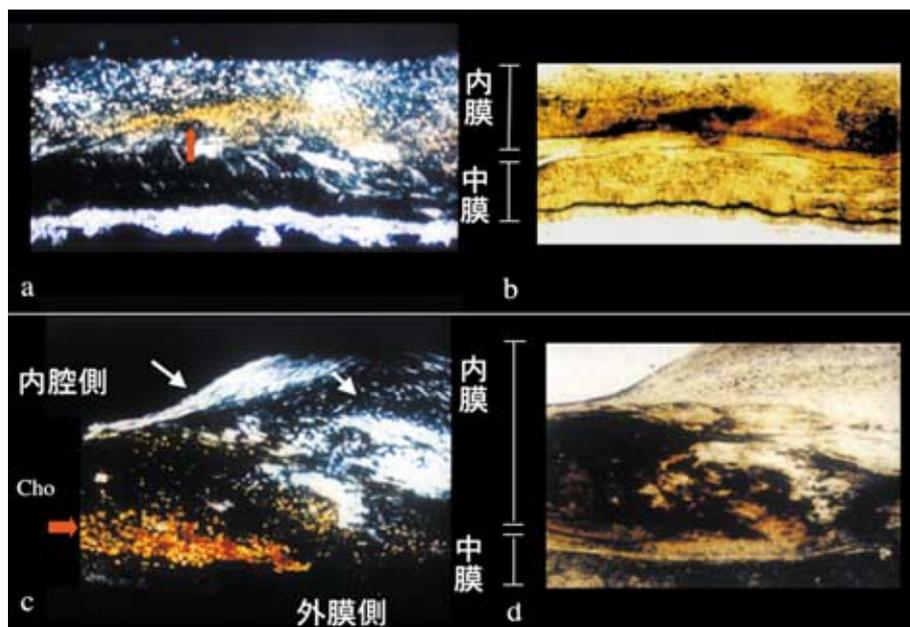


図1 冠動脈の硬化病変の縦断面観察(組織化学染色と偏光顕微鏡を用いた病変の程度の比較)

写真は冠動脈硬化病変の中等度変化例(a, b)と高度変化例(c, d)を示す。

写真左(偏光観察像)と右(通常光観察像)の(a, b)と(c, d)は各々同一の標本である。通常光が透過しない厚さ(50 μ m)では、さらに濃い有色の色素で染色されると通常の顕微鏡では観察が困難となる(b, d)。組織内の偏光性が異なる成分や組織化学的方法では、前処理や固定、組織の薄切による影響が生じる事があり、偏光顕微鏡観察では、このような影響を回避することができる。特に脂質成分に関しては液晶もしくは結晶の判別等が可能となり、組織化学的方法によるコレステロール染色でも、黄色から赤褐色のコレステロール結晶状態が観察可能となる。左下段(c)では内膜肥厚の顕著な領域の中膜側に多量のコレステロール結晶(Cho)の蓄積(赤矢印)が観察される。(c)内膜側では膠原線維性被膜(白矢印)は不均一な肥厚を示し、脂質が蓄積する過程で不均一な状態が偏光法で観察される。

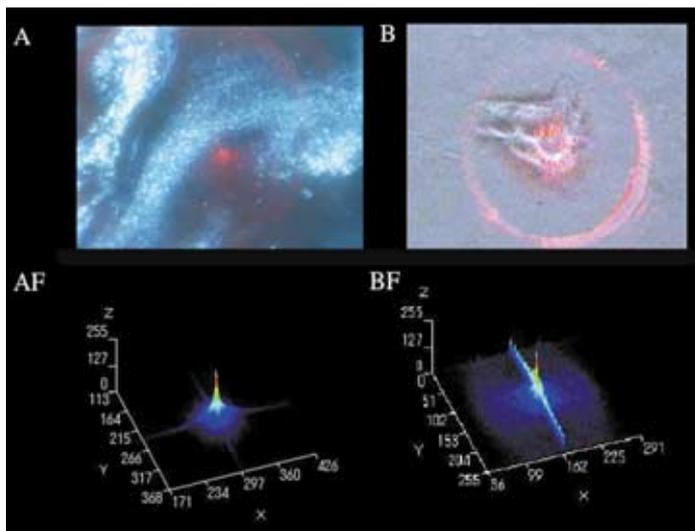


図2 レーザー (680 nm) スポットの反射像と画像計測の高速フーリエ変換像 (3次元強度分布像)
 写真Aは図1と同様の冠動脈硬化病巣における偏光観察に加えレーザースポット (赤点) の反射像を示したものである。脂質の存在周辺で、100倍反射像 (A) と左下はその反射像のフーリエ像 (AF)、写真Bは血管平滑筋培養細胞の反射像 (B) と右下はその反射像のフーリエ像 (BF) を示す。通常光成分にレーザー光が加わることで表現される反射像には、成分情報と形状情報などが含まれている。例えば冠動脈硬化病巣や血管平滑筋細胞のコレステロールの成分情報である化学組成は反射スペクトルとして観察され、結晶状態などの形状情報はフーリエ像により解析可能である。このような観察や解析法は、さらに複雑な線維成分や組織の変化の分析などにも応用可能と思われる。写真AFは、写真Aの画像上の強度周期を高速フーリエ解析し、XY軸の画像の周波数頻度を3次元の分布を示したものでXY軸に特徴的な山型の分布を示す。写真BFは、同様に写真Aの高速フーリエ解析で、X軸の変化は乏しくY軸に一樣な分布を示している。各々の写真AFとBFの相違は、固有の形状に対応する特徴的な強度周期があることを示している。

図3 リポソーム構造カルシウム融合膜モデルのレーザー顕微鏡像と画像計測の高速フーリエ変換像 (3次元強度分布像)
 写真Aは実験的に脂質とコレステロールを用いて作成したリポソーム構造 (LS) を示す。写真Bはこのリポソーム構造 (LS) にカルシウムを添加直後に形成した凝集塊の像 (LS+Ca) をレーザー顕微鏡で観察したものである。レーザー顕微鏡像 (図3A, B) のフーリエ像 (AF, BF) は図2A, Bのレーザースポット像とは異なる光情報を有する。しかし、凝集塊の形成に伴う構造状態は組織類似の形状情報を示している。このような形状情報に関する解析は、さらに成分情報や分子イメージングにつながる可能性がある。

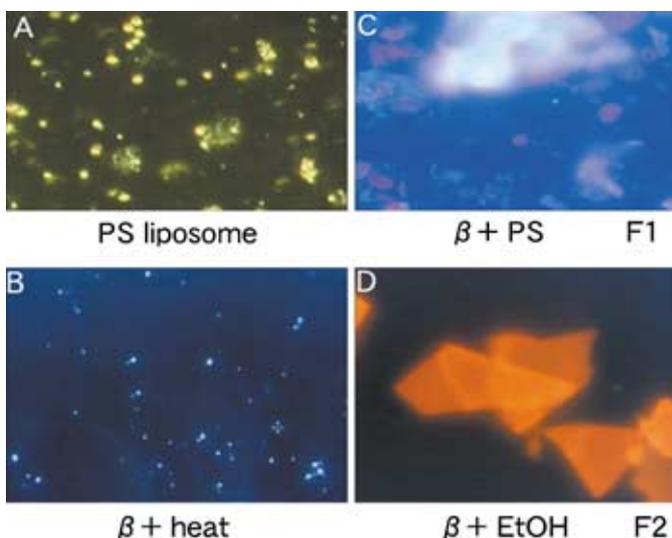
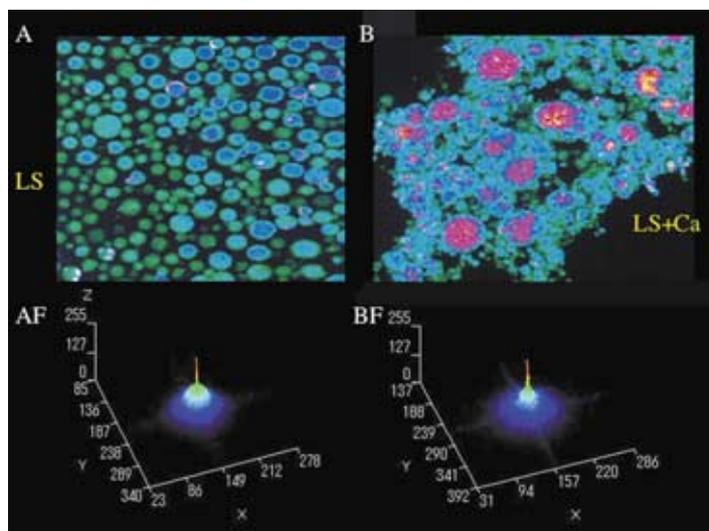


図4 多分子系 (リポソーム) と単一分子 (蛋白) の相互作用や同一分子変性の観察
 リポソーム構造は通常光の顕微鏡では観察困難であるが、暗視野顕微鏡では観察可能となる。左上の写真Aは、400倍視野でのホスファチジルセリン リポソーム (PS liposome) の観察像を示す。他の写真B, C, Dの3枚は、各種条件下で生じるタンパク質の変化を観察したものである。βラクトグロブリン蛋白 (β) はある変性条件下でβシート構造を示す事が知られている。写真B (β+heat) は熱変性したβラクトグロブリン蛋白 (β) を暗視野観察したものである。通常光の顕微鏡では観察が困難だが、暗視野観察では、輝度の点状として観察される (写真B)。写真C (β+PS) は暗視野に蛍光を重ねた2重観察 (F1) で、PSと (β) の会合により形成された脂質 蛋白の凝集塊が観察される。写真D (β+EtOH) は、コンゴーレッド色素を含むエタノール (EtOH) 溶液で生じたβラクトグロブリン蛋白の構造変化を暗視野に蛍光を重ねた2重観察 (F2) したものである。