

代謝異常による種々の体内形成結石の分析技術の高度化に向けて

三好 憲雄 , 中田 靖 , 沼田 朋子 , 田中 悟

病理解剖時に発見・採取した胆嚢内結石に対し慎重に面出し・研磨(16 mm × 13 mm)を行い,ラマン分光顕微鏡(LabRam, HR-800)を使用して,中央の窪みを中心とした8 mm × 6 mmの広範囲な領域と窪みを中心に2 mm × 2 mm矩形に絞った領域のラマン分光スペクトルを測定した。また同領域に対しX線分析顕微鏡(XGT-5000)で元素マッピングを行った。その結果,腎臓結石とは異なり,中心はリン酸カルシウムではなく,リン酸系成分が亜鉛と結合した核であった。中心核の外縁に小さな年輪状の形成が見られ,その周囲にはカルシウムをベースにしたシュウ酸カルシウム成分や未知成分のカルシウム塩が観測できた。更に,その外側は大きな年輪状で,リン酸系成分が主体となって形成していることが考えられた。

はじめに

従来から代謝異常による種々の体内形成結石の臨床検査技術として,赤外線吸収スペクトル分析技術はあるが,限界がある。例えば,赤外線吸収スペクトルでは結石全体の各成分の平均比率は明らかになるが,各成分の空間的位置関係,特に結石の核となる成分の特定ができない。この生体内形成特有の不均一性,特にその核となる成分の特定は,結石形成の仕組みを明らかにするだけでなく,今後の再発防止に結びつく食事療法や投与薬の選定にも貢献する。今回この結石の微小領域における核成分の画像観測が,ラマン分光顕微鏡とX線分析顕微鏡によるスペクトル計測とマッピング計測により初めて可能になったので報告する。本稿が臨床検査技術の高度化に向けての一助となれば幸いである。

分析材料と分析方法

分析材料

病理解剖時に発見・採取した胆嚢内結石を慎重に面出し・研磨(16 mm × 13 mm)を行い,光学顕微鏡像による観測,ラマン分光顕微鏡とX線分析顕微鏡によるスペクトル計測とマッピング計測に使用した。

ラマン分光計測方法

ラマン分光顕微鏡(LabRam, HR-800)を使用して,上記の胆嚢結石のスペクトル計測とマッピング計測を行った。検出器は近赤外域測定用InGaAs検出器を,システム・プログラムはLabRam-LacSpe4.10を使用した。また励起光源としてはNd-YAGレーザの1064 nm光を使用した。測定条件として,1本のスペクトル計測時間は5秒で,積算回数は1回,グレーティング刻線数は150本で中心波数が 1199.86 cm^{-1} であった。そのピンホールの直径サイズは420 μm であった。また,マッピングの条件は100 μm ステップで,計測範囲は8 mm × 6 mm(X-Y軸で $81 \times 61 = 4941$ ポイント)あるいは2 mm × 2 mm(拡大時:X-Y軸で $21 \times 21 = 441$ ポイント)の領域であった。

サンプル中央の窪みの内部は凹凸が激しいため、焦点深度を深くするために低倍率の対物レンズ(焦点距離40 mm)を用いた。胆嚢結石中央の窪みを計測する時の焦点位置は、窪みの底に設定した。そのため、窪み周辺部のラマン散乱の集光率は中央部よりかなり弱くなっているため、周辺の他の構成成分との関連性を知るためのマッピング像では、窪み中央部のゲインに対して約2.5倍上げて表示した。

X線分析方法

胆嚢結石の核となる所がもろく、面出しを行うと中心部がはがれ落ちてしまい窪みができた。その窪みはラマン分光顕微鏡では、凹凸があるために前項で述べたように正確な計測ができずにいた。比較的凹凸影響を受けにくいX線分析顕微鏡(XGT-5000)を併用して、上記の窪み(直径が1.7 mmのほぼ円形)を中心とした胆嚢結石のマッピング計測を行った。RhターゲットのX線管を使用し、その管電流は50 kV、管電流は1 mAであった。測定条件としては、X線の照射スポット直径が10 μm のXGT(X線ガイドチューブ)を使用して、上記の窪みを中心にして5 mm \times 5 mm矩形の領域をマッピングした。

分析結果

光学顕微鏡像

胆嚢結石を研磨した面(16 mm \times 13 mm)の光学顕微鏡の写真を図1に示す。褐色のリング状の帯の内側の窪みは、直径が1.7 mmのほぼ円形をしているが、更にその窪みの中心部は0.8 mm \times 0.2 mmの大きさの楕円形で盛り上がっている部分も観測された。従って、窪みはリング状で、面出しのための研磨で脆くも面出し面から剥がれ落ちた部分である。

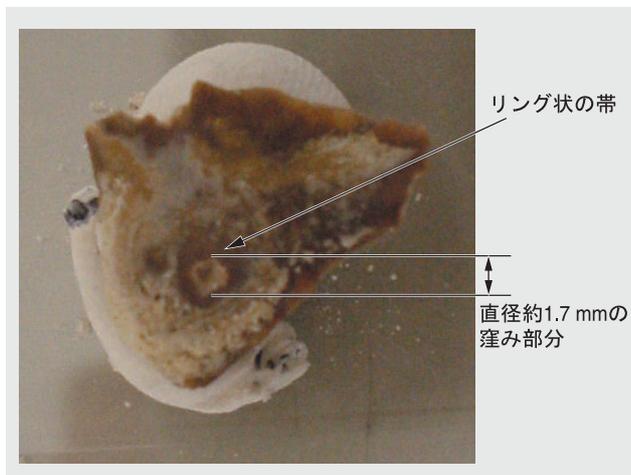


図1 胆嚢結石研磨面の光学顕微鏡写真

ラマン分光計測

窪みを中心として8 mm \times 6 mmの広範囲のラマン分光スペクトルで933.16 - 940.54 cm^{-1} のピーク値をマッピングした像を図2に提示する。この2重のリング状部は、まさに体内結石形成の共通の特長を示す。ピークの波数位置から、リン酸成分の帯に対応していることが考えられた。

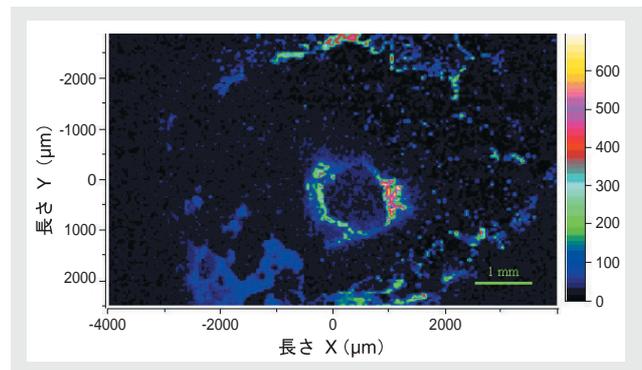


図2 胆嚢結石研磨面の広範囲ラマン分光マッピング像

マッピング像での窪みを中心に、2 mm矩形に絞ってマッピング測定して得られた全スペクトル441本の重ね書きを図3に示す。最も強いピークは960.97-984.33 cm^{-1} の領域Rで、リン酸系成分と考えられる。また、1466.89-1505.42 cm^{-1} の領域Gで表されるものは、シュウ酸系成分と考えられた。更に507.00-529.74 cm^{-1} の領域Bで現されるものは、現在のところ成分の特定には至っていない。

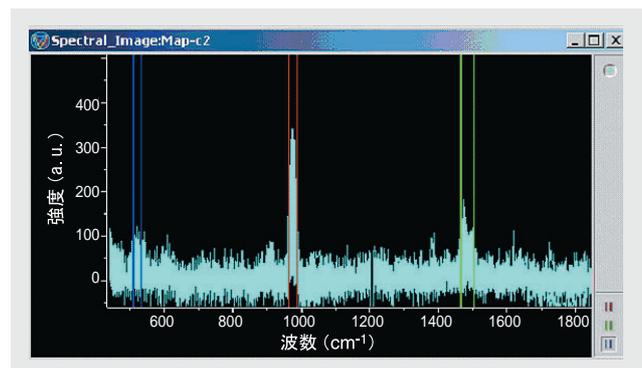


図3 胆嚢結石の窪み部マッピング測定的全スペクトル重ね書き
窪み部を中心に2 mm矩形の領域を測定した。赤線、緑線、青線で囲まれた領域は、それぞれ領域R(960.97-984.33 cm^{-1})、領域G(1466.89-1505.42 cm^{-1})、領域B(507.00-529.74 cm^{-1})である。

図3のスペクトルピークに対応するピーク強度を、それぞれRは赤色、Gが緑色、Bが青色と色を変えて1つのマッピング像に合成したものが、図4になる。窪み周辺部の緑色と青色の部分はラマン散乱強度が弱く影になる部分が多いため、ゲインを赤色のゲインに対して2.5倍上げて表示をしてある。このカラーイメージ像からは、年輪の中心部となる核の部分には、かなりの強度でリン酸系成分が集積し、その周囲にはシュウ酸や他の成分が分布していることが考えられる。

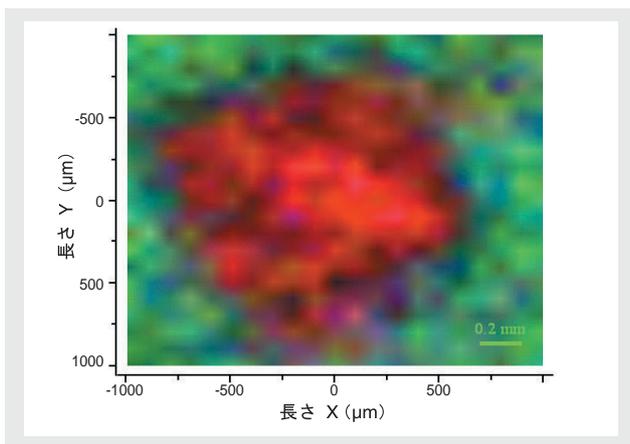


図4 ラマン分光マッピングによる胆嚢結石窪み部のカラーイメージ (RGB合成像)

赤(R) 緑(G) 青(B)は図3で指定した領域に対応している。

X線分析

ラマン分光計測における窪みで陰になる部分のラマン散乱光の減弱化をカバーするために、X線分析顕微鏡(XGT)の元素マッピングを行い、その像を図5(a)、(b)、(c)に示す。図5(a)のリン(P)成分の画像では、ラマン分光マッピング像(図2を90°時計の左回りに移動したものに図5(a)は相当すると思われる)に比較して、リング状の外側の帯が強く太く出ている点で若干の差異が認められるものの、中心部のリン成分の分布が明瞭に観測されており、この領域がリン酸系成分であるというラマン分光計測の結果を裏付ける。図5(b)の亜鉛(Zn)成分像からは、中心部のリン成分分布とよく対応して小さいリング状の部分と窪み部に亜鉛成分が含まれていることがわかった。また、窪み以外の周囲にはほとんどカルシウム(Ca)がベースに分布していることが、図5(c)から伺い知ることができる。中心部の亜鉛成分分布は、ちょうどリン酸系成分の領域と一致しているように思われた。従って、腎臓結石のように、中心にはリン酸カルシウムではなくて、むしろリン酸と亜鉛との結合をきっかけで核を形成していると考えられる。

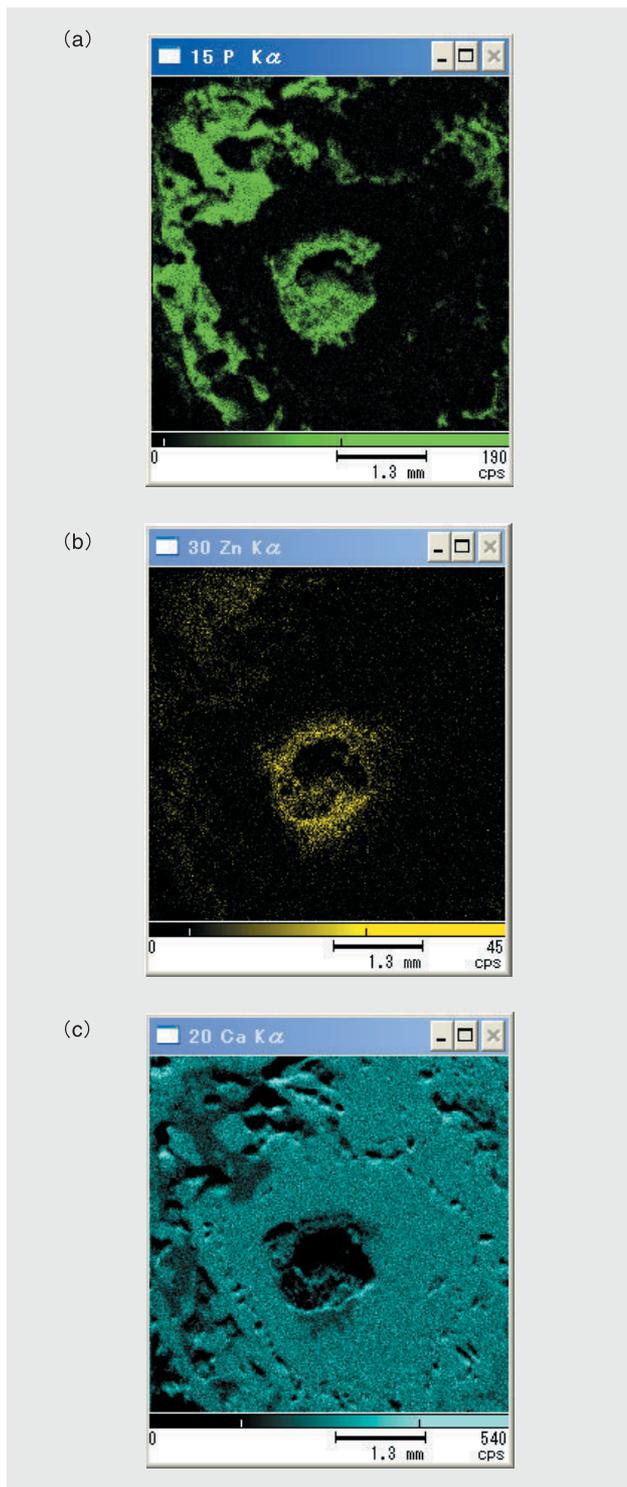


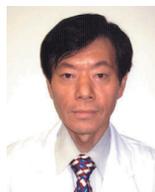
図5 X線分析顕微鏡(XGT)による胆嚢結石の元素マッピング (a)リン(P) (b)亜鉛(Zn) (c)カルシウム(Ca)

おわりに

この胆嚢結石の場合は、結石の中心核にはリン酸系成分が亜鉛と結合して核を形成し、小さな年輪を形成している。その核の周囲にはカルシウムをベースにしたシュウ酸カルシウム成分や未知の成分とカルシウム塩形成の観測ができた。また2番目の大きな年輪形成には、リン酸系成分を主体に形成していることが考えられた。しかし、これら核形成や年輪形成に関与する成分が体内の代謝異常系のどこから来るかは、明らかにされたわけではない。これまでの臨床検査技術である赤外吸収スペクトル分析からは到底予測できない、高度で臨床に貴重な分析情報を得ることができたことは、今後、体内結石専用の安価で、簡易でしかも高度な臨床検査機器を開発することに期待が持てる。そのためには、まず種々の結石に対するラマン分光スペクトルのライブラリをスタンダードの計測も含めて構築することの方が先決のように思われる。

参考論文

- [1] H. Ishida, R. Kamoto, S. Uchida, A. Ishitani, Y. Osaki, K. Iriyama, E. Tsukie, K. Shibata, F. Ishihara, and H. Kameda, Raman Microprobe and Fourier Transform-Infrared Microsampling Studies of the Microstructure of Gallstones, *Appl. Spectros.*, 41, 407(1987)



三好 憲雄

Norio Miyoshi, PhD, Dr. Med. Sci.

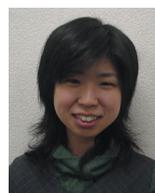
福井大学
医学部 病因病態医学講座 腫瘍病理学
医学博士，農学博士



中田 靖

Yasushi Nakata

分析センター
テクニカルプラザ
博士（理学）



沼田 朋子

Tomoko Numata

分析センター
テクニカルプラザ



田中 悟

Satoru Tanaka

分析センター
テクニカルプラザ