

組織切片を測定試料とする化学物質の組織内局所分析

興 石 一 郎

1 はじめに

組織中化学物質を分析する場合、組織を等張液等の分散媒中でホモジネートした懸濁液を測定試料とするのが一般的である。この試料処理を経て得られる測定値は、化学物質が一定体積の組織中に均一に分布すると仮定した濃度ということになる。しかしながら、組織の微細構造は高度に不均一であり、実質細胞、非実質細胞、細胞外マトリックス成分、血管、血液、リンパ液等が、各組織の恒常性機能を十分に発揮し得るように局在している。組織中化学物質の生理機能と濃度との関連を明らかにするには、組織中の化学物質の微視的な局在に関する情報が欠かせない。この目的で組織切片を測定試料とする化学物質の局所分析法の開発が望まれる。本稿では、組織中化学物質の局所分析を行う上で直面する問題点を中心に解説する。

2 組織切片の調製

組織切片を調製するには組織を薄切する必要があるが、この際、組織を硬い固体として扱わなくてはならない。一般的には、低温下で凍結させる凍結切片法、および、パラフィン等の樹脂中に包埋して固める包埋法が汎用されている。凍結切片法は、薄切する機器としてクリオスタットが必須となる。一方、パラフィン包埋法では、室温での薄切が可能なマイクロトームが必須となる。測定する化学物質が組織内でどのように存在するかを考慮し、適切な手法を選択する必要がある。

2.1 凍結切片法

測定する化学物質が比較的低分子で組織中で可溶化状態で存在する場合、物質の拡散を防ぐ目的で速やかに凍結することが求められる。組織をクリオスタットの試料ステージ上で凍結させ、数 μm の厚みで薄切し、スライドガラスの上に貼り付ける。その後の処理に関しては、目的ごとに検討しなくてはならない。

2.2 パラフィン包埋法

パラフィン包埋法は、病理診断で最も汎用される薄切切片調製法である。パラフィン包埋法の問題点として、組織の微細構造を破壊することなくパラフィン（水に不

溶で室温で固体）を組織内に浸透させなくてはならない。そのため、“固定”という操作を施す。病理診断で汎用されるのはホルマリン固定である。ホルマリンにより、組織中タンパク質を架橋することで微細構造の破壊を防ぐことができる。次に、脂溶性のパラフィンを組織内に浸透させるためには、組織内の水を有機溶媒に置換しなくてはならない。この目的にはエタノール脱水法が用いられる。エタノール濃度を段階的に上げていったエタノール水溶液に順次組織を浸漬し、最終的に完全にエタノールに置換する。さらに、完全に脱水された組織中にパラフィンを浸透させるために、パラフィンの融点を超える温度下で、パラフィン含量を段階的に上げていったパラフィン—キシレン混液に浸漬する。最後に、包埋容器にパラフィンと組織を入れ、室温で放置し固めることで薄切操作が可能となる。ここで実験者が考慮しなくてはならないのは、パラフィン包埋法で得られたパラフィン切片中の化学物質が、摘出された組織中濃度・存在状態を維持しているか否かであるが、組織中で可溶化状態で存在する低分子化学物質の多くは消失すると考えるべきである。

3 組織片の種類と調製法

分析に供される組織がヒトの組織か、実験動物の組織かによって切片調製法の選択が限定される。臨床の分野で検査に供される組織としては、肝生検、腎生検、肺生検等の直径1~3 mm程度の試料、外科手術により摘出された臓器等である。生検試料は、迅速な診断が求められることから、一般に凍結切片法が汎用される。ただし、染色等の処置を施す場合には、スライドガラス上の薄切切片をアルコール等の有機溶剤に浸漬し、固定処置を施したのち、風乾するのが一般的である。一方、摘出臓器には、パラフィン包埋法が汎用される。摘出臓器はがん患者のがん組織であるケースが大半であり、良性・悪性の診断のみならず、がん細胞の遺伝子診断（遺伝子パネル検査）に供される。ここで注意すべき点は、病理組織検体の品質が遺伝子パネル検査の成功を左右することから、日本病理学会では「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規定」を公表している¹⁾。ここで規定している病理組織検体は、ホルマリン固定を施したパラフィン包埋ブロック（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Block,

FFPE ブロック) であり、組織切片調製の自由度は低い。

3 組織切片の加工

組織化学的な手法では、その濃度の増減を相対的に評価する方法として、組織切片に特異染色を施し、デジタル化した画像から色彩の強度と染色部位のピクセル数を比較する手法が汎用される。しかしながら、論文投稿に際し、Reviewer から測定物質の増減を示す生化学分析データを求められる場合が少なくない。この場合、組織化学的なデータとの対比を行う上で、組織切片を試料として生化学分析を実施することが必要となる。

3.1 測定値の単位

従来、組織中の化学物質を測定する場合、単位としては組織の重量当たりの化学物質質量で表すのが一般的であった。組織の重量としては、湿重量または乾燥重量が用いられる。表現としては、〇〇 mol/g of wet weight (dry weight) あるいは〇〇 mg/g of wet weight (dry weight) 等である。しかしながら、組織切片を試料とする場合、単位の下分母は組織切片の面積と厚みから算出される容積である。すなわち、一定容積当たりの化学物質質量で表されることになる。例えば、薬物が薬理効果を発揮、あるいは副作用を発現するには、標的部位での濃度がある閾値を超えることが必要であることから、濃度の単位として容積当たりの化学物質質量で表すことは意義があるといえる。

3.2 測定物質の抽出

組織切片を染色し顕微鏡観察するには、処理工程において組織の構造が維持されなくてはならず、処理に先駆け、組織に固定処理を施すことが求められる。具体的にはホルマリン等の架橋剤により、組織を構成するタンパク質を架橋する。組織は細胞と細胞外マトリックス成分から構成されている。細胞外マトリックスの主たる役割は、物理的強度を維持することと漿液の流動性を維持することであり、前者はコラーゲンやエラスチン等の線維状タンパク質が、後者はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、セラタン硫酸、ヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカン/プロテオグリカン（浸透圧を高め膨潤度を高める作用がある）が担っている。結合組織は、これら物理的強度の高い網目構造体と膨潤度の高い網目構造体が相互に侵入しあった網目構造体（相互侵入型網目構造体）とみなすことができる。固定処理により、線維状タンパク質やプロテオグリカンのコアタンパク質が分子内・分子間架橋されることで、溶媒置換や洗浄等の処理による細胞外マトリックス微細構造の破壊を防ぐことが可能となる。しかしながら、生化学分析では組織切片からの化学物質の抽出操作が欠かせないため、固定操作により抽出効率が低下してしまう。そこで、組

織切片からの測定物質の抽出効率が低い場合には、コラゲナーゼやアクチナーゼ等のタンパク質分解酵素の利用が推奨される。筆者らは、組織線維化の生化学的指標として組織切片中コンドロイチン/デルマトン硫酸の生化学分析法を開発してきたが、この測定法の開発の過程で組織切片を純度の低いコラゲナーゼで前処理することでコンドロイチン/デルマトン硫酸の抽出効率が高まることを報告している^{2)~4)}。

3.3 ダイセクション

組織切片は直径数 mm の円形の生検試料から、比較的サイズの大きい摘出臓器まで多様である。とりわけ摘出臓器は、微視的に病変領域と非病変領域とに識別できる異質性 (Heterogeneity) を有しており、両領域の比較検討が可能となる。この場合、両領域を分け採ることが必要となる。顕微鏡観察下で測定領域を取り分けるマイクロダイセクション法が開発されてきた。古くは、マニピュレーターに微細針を装着した高周波振動装置を取り付け、組織切片の標的部位を削り取る装置が開発された。その後、組織切片を専用のスライドに張り付けたのち、顕微鏡観察下でレーザー光を照射し標的部位の輪郭を切除するレーザーマイクロダイセクション装置が開発され、現在医療の分野で汎用されている。

4 組織切片中の化学物質の分析の例

「組織切片中の化学物質の分析」法により測定が可能な化学物質としては、組織切片の調製の工程で組織から失われることなく、摘出された組織の状態を維持していなくてはならない。

4.1 拡散性化学物質の測定例

薬物等の外因性化学物質は、生体に吸収されたのち、血流を介して体内に広く拡散する。組織内での存在状態は化学物質のサイズ、水溶性・脂溶性、電子の偏在、イオン性等により影響を受ける。このような拡散性の化学物質の組織局在を明らかにする目的で組織切片を測定試料とする場合、凍結切片法が用いられる。

凍結切片中の拡散性化学物質の測定法として、1990年代以降、質量分析計を用いたイメージング質量分析法⁵⁾⁶⁾の開発が試みられている。なかでも、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) と飛行時間型質量分析計 (TOF MS) を組み合わせた MALDI-TOF MS の開発が着目されている。凍結切片を MALDI-TOF MS に応用する上でのポイントは、減圧下で乾燥した組織切片にマトリックスの飽和溶液を添加する方法が鍵を握るが、メーカーによる専用のデバイスの開発が進められている。本法により取得される画像の分解能はレーザーのビーム径に依存し、数十 μm の分解能を得ることが可能である。MALDI-TOF MS はマトリックスの結晶

状態等の条件によりシグナル強度が変動しやすく絶対的な定量分析には不向きであるとの印象が強い。一方、イメージング技術を応用することにより、シグナル強度をレーザービームの照射部位間で相対比較することで組織内の局在を評価することが可能である。さらなる試みとして、内標準物質を用いることで定量分析を試みた報告も散見される⁷⁾⁸⁾。

4・2 生体内化学物質生成の痕跡分析

医療分野における組織中化学物質の測定意義として、化学物質が疾患の原因あるいは結果として生体内に存在しているか否かを明らかにし、治療を行う上での判断材料とすることである。この目的での測定対象として、組織蓄積性の化学物質が挙げられる。具体的には、タンパク質等の生体内高分子の官能基との化学的反応性に富み、その消失が生体内高分子の代謝速度に依存する化学物質が測定対象となる。

4・2・1 活性カルボニル生成の痕跡

痛み、発熱を伴う組織障害の多くは炎症反応を伴う。炎症局所では炎症性細胞が動員され、様々な液性因子を介してお互いを活性化し、中でも好中球等の貪食性の細胞は異物処理に際し、NADPH Oxidase やスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 等の酵素によりスーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素等の活性酸素種を産生する。さらには、多価不飽和脂肪酸に酸素分子を

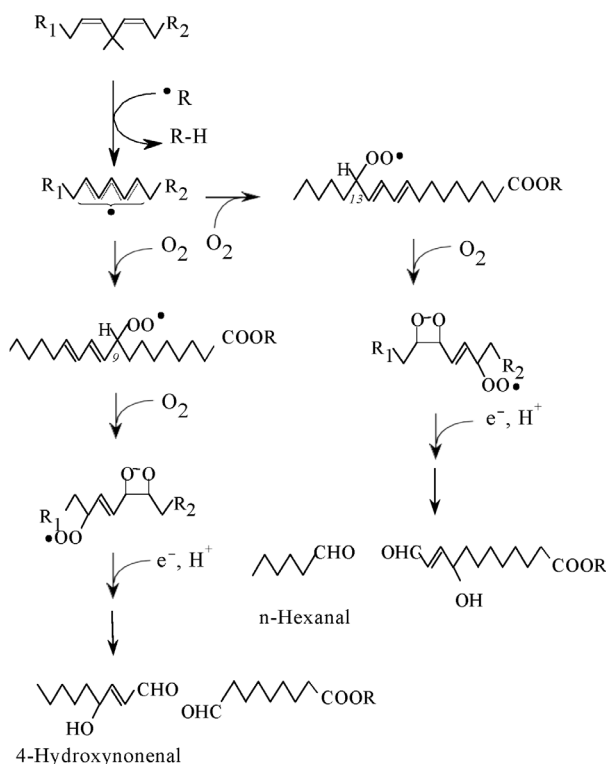


図1 リノール酸の脂質過酸化連鎖反応による活性カルボニル産生

導入する 12/15-リボキシゲナーゼの作用により脂質ヒドロパーオキシドが産生される。これらのパーオキシド構造 (-O-O-) は、細胞内にその存在が示唆されている遊離二価鉄イオン (labile ferrous ion) により 1 電子還元を受け、極めて反応性の高いヒドロキシルラジカルやアルコキシルラジカルを生成する。これらのラジカル種が膜成分中の多価不飽和脂肪酸に対してラジカル連鎖反応を惹起し、膜の物理的性質を大きく変動させる。近年、新たな細胞死として着目されるフェロトーシス細胞死は、このメカニズムによる細胞死である⁹⁾。フェロトーシス細胞死の特徴は、フェロトーシス誘導細胞内で活性カルボニルとして知られる 4-Hydroxynonenal (4-HNE) が産生され、細胞の構成タンパク質のヒスチジン残基と反応し、細胞内に蓄積することである⁹⁾。脂質過酸化連鎖反応によるリノール酸からの活性カルボニルの生成機序を図1に示す。4-HNE で翻訳後修飾された官能基を認識する抗体が市販されており、組織切片を試料とする免疫染色法が確立されている。

4・2・2 活性硫黄分子種生成の痕跡

近年、がん組織の内部に細菌が局在することが明らかにされている¹⁰⁾。なかでも、歯周病の原因細菌として知られる *Fusobacterium* 属 (嫌気性菌) は歯周ポケットより血流に侵入し、全身の組織の低酸素部位に生息することが報告されており、とりわけ大腸がんの発症との関連が着目されている¹¹⁾¹²⁾。*Fusobacterium nucleatum* は、活性硫黄分子種であるジメチルトリスルフィド (DMTS, CH₃-S-S-S-CH₃) を生成することが特徴である。DMTS は、キャベツ、ブロッコリー、ネギなどの血液サラサラ野菜に存在する生物活性物質で、フェロトーシスによる細胞死を抑制することが示されている¹³⁾。フェロトーシス誘導剤は、新しいメカニズムによる抗がん剤として着目され¹⁴⁾、日本国内では大学発のベンチャー企業が設立されている。*Fusobacterium nucleatum* ががん組織内に存在する場合、*Fusobacterium nucleatum* が DMTS を介してがん細胞のフェロトーシス細胞死を阻止する可能性が考えられる。よって、がん組織における *Fusobacterium nucleatum* の存在は治療の成否を左右する重要な要因になり得る。DMTS は生体内メルカプト化合物と極めて反応性が高く、とりわけ、タンパク質中システイン残基の翻訳後修飾に関与する。モデル反応系として、血漿タンパク質であるメルカプトアルブミン (Alb-SH) との反応について検討した結果、1 分子の DMTS から 2 分子のアルブミン-メルカプトメタン混合ジスルフィド (Alb-S-S-CH₃) と 1 分子のヒドロパースルフィド基 (Alb-SSH) が生成することが明らかになった¹⁵⁾。その反応機序として図2のような反応機序が推定される。

このような基礎研究から、組織における *Fusobacterium*

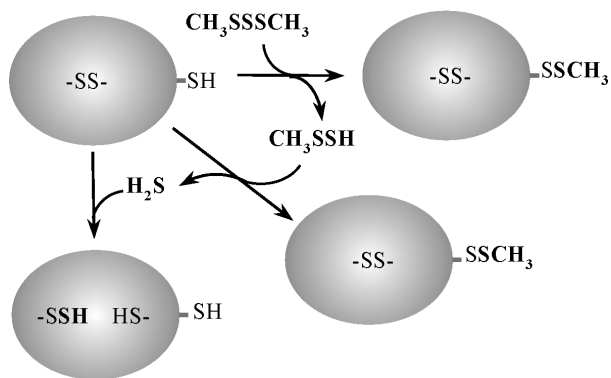


図2 タンパク質とジメチルトリスルフィドとの反応機序(仮説)

の局在を示す痕跡として、組織切片を用いた組織内構成タンパク質—メルカプトメタン混合ジスルフィドおよびヒドロパースルフィド基の測定が有効な手法になると期待される。筆者らは、試料をヨードアセトアミドで処理し、ヒドロパースルフィド基をアルキル化することでタンパク質—メルカプトアセトアミド混合ジスルフィドに変換したのち、Tris(2-carboxyethyl)phosphine で処理することで生じるメルカプトメタンおよびメルカプトアセトアミドを分離定量する方法について報告している¹⁵⁾。

5 組織切片中化学物質の測定の制限

組織切片を測定試料とする測定には数多くの制限がある。これは、組織の採取が侵襲的であるためである。とりわけ生検試料の採取には出血等のリスクを伴うものであり、患者の承諾・同意を得なくてはならない。また、外科的手術の際に得られる摘出臓器を試料とする場合であっても、ヒトを対象とする臨床試験では、実験者が所属する機関での倫理審査を受けねばならない。また、申請の主たる責任者は医師であることが求められる。得られた測定データは究極の個人情報である。臨床試験を実施する場合には、測定試料の匿名化を厳密に実施し、データの取り扱いには最善の注意を払わねばならない。さらに、申請書に記した測定以外の測定を実施することはできない。すなわち、患者の同意を得ることなく保存してある患者の組織切片を用いて、新たな測定法を開発する試みは困難である。

一方、実験動物の組織を試料とする場合、多くは動物の犠牲を伴う。動物実験を実施するには、測定者が所属する機関の動物実験倫理審査委員会に実施計画を申請して許可を得ることが必須である。近年、動物愛護の観点から、苦痛を伴う病態モデル作成のための動物実験の実施が制限されている。培養細胞を用いた代替法が確立されている場合は動物実験の実施は許可されない。

6 バリデーション

一般に、生体試料中の化学物質を定量する新たな方法

を開発する場合、定量法のバリデーションが必須となる。バリデーションを目的にヒトの組織を用いることは容易ではない。また、患者の組織を試料として扱う場合、病変領域と非病変領域で形態上に大きな違いがあり、両者間で化学物質の存在状態に違いがあることを想定しなくてはならない。バリデーションに供する組織試料として病態モデル動物の組織を用いることが一つの解決策であるが、ヒトと実験動物との種差についても検討しなくてはならない。分析法を開発する者にとって、測定データの信頼性を担保することが絶対的な使命であり、分析法ごとにバリデーションを実施するための計画を作成することが重要である。

7 おわりに

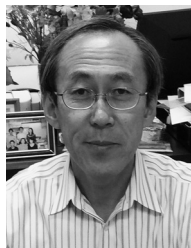
化学物質の組織内の局在を明らかにするために組織切片を用いた局所分析は有効な手法であるが、分析の成否のカギを握っているのは組織切片の調製法である。測定対象とする化学物質の組織内における存在状態を考慮し、固定から薄切に至るまで、最適な組織切片の調製法を確立することが求められる。

文 献

- 1) 一般社団法人日本病理学会：“ゲノム診療用病理組織検体取扱い規定（平成30年3月1日）”，https://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf, (accessed 2025.06.17).
- 2) I. Koshiishi, E. Horikoshi, T. Imanari : *Anal. Biochem.*, **267**, 222 (1999).
- 3) I. Koshiishi, M. Takenouchi, T. Imanari : *Arch. Biochem. Biophys.*, **370**, 151 (1999).
- 4) I. Koshiishi, T. Hasegawa, T. Imanari : *Arch. Biochem. Biophys.*, **401**, 38 (1999).
- 5) 荻澤 崇, 工藤寿治, 佐藤貴弥 : 日本農薬学会誌, **42**, 216 (2017).
- 6) C. Maruyama, Y. Kimura, M. Setou : *Biophys. Rev.*, **1**, 131 (2009).
- 7) J. Bunch, M. R. Clench, D. S. Richards : *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **18**, 3051 (2004).
- 8) T. Nakanishi, S. Takai, D. Jin, T. Takubo : *Mass Spectrometry*, **2**, 3013 (2013).
- 9) R. Shintoku, Y. Takigawa, K. Yamada, C. Kubota, Y. Yoshimoto, T. Takeuchi, I. Koshiishi, S. Torii : *Cancer Sci.*, **108**, 2187 (2017).
- 10) D. Nejman, I. Livyatan, G. Fuks : *et al.* (51 authors) : *Science*, **368**, 973 (2020).
- 11) A. D. Kostic, D. Gevers, C. S. Pedamallu, M. Michaud, F. Duke, A. M. Earl, A. I. Ojesina, J. Jung, A. J. Bass, J. Tabernero, J. Baselga, C. Liu, R. A. Shivdasani, S. Ogino, B. W. Birren, C. Huttenhower, W. S. Garrett, M. Meyerson : *Genome Res.*, **22**, 292 (2012).
- 12) M. Castellarin, R. L. Warren, J. D. Freeman, L. Dreolini, M. Krzywinski, J. Strauss, R. Barnes, P. Watson, E. Allen-Vercoe, R. A. Moore, R. A. Holt : *Genome Res.*, **22**, 299 (2012).
- 13) S. Nagai, M. Yoshida, Y. Takigawa, S. Torii, I. Koshiishi : *Food Chem.*, **343**, 128511 (2021).
- 14) S. J. Dixon, K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht, R. Skouta, E. M. Zaitsev, C. E. Gleason, D. N. Patel, A. J. Bauer, A. M.

Cantley, W. S. Yang, B. Morrison 3rd, B. R. Stockwell : *Cell*, **149**, 1060 (2012).

- 15) I. Koshiishi, S. Nagai, Y. Yuzawa, Y. Takigawa : *Biol. Pharm. Bull.*, **47**, 318 (2024).



興石 一郎 (KOSHIISHI Ichiro)

群馬大学名誉教授 (〒371-8510 群馬県前橋市荒牧町 4 丁目 2 番地). 千葉大学大学院薬学研究科博士前期課程修了. 薬学博士・薬剤師. 《現在の研究テーマ》バラの根頭ガン腫病の発症を抑制する手法の開発. 《趣味》家庭菜園とガーデニング.

E-mail : Koshiishi_i@gunma-u.ac.jp

日本分析化学会の機関月刊誌『ぶんせき』の再録集 vol. 3 が出版されました！ 初学者必見！ 質量分析・同位体分析の基礎が詰まった 293 ページです。

本書は書籍化の第三弾として、「入門講座」から、質量分析・同位体分析の基礎となる記事、合計 42 本を再録しました。『ぶんせき』では、分析化学の初学者から専門家まで幅広い会員に向けて、多くの有用な情報を提供し続けています。これまで掲載された記事には、分析化学諸分野の入門的な概説や分析操作の基礎といった、いつの時代でも必要となる手ほどきや現役の研究者・技術者の実体験など、分析のノウハウが詰まっています。

〈2003 年掲載 1 章 質量分析の基礎知識〉

- | | |
|---------------------|-------------------------|
| 1. 総論 | 7. 無機材料の質量分析 |
| 2. 装置 | 8. 生体高分子の質量分析 |
| 3. 無機物質のイオン化法 | 9. 医学、薬学分野における質量分析法 |
| 4. 有機化合物のイオン化法 | 10. 食品分野における質量分析法 |
| 5. ハイフェネーテッド質量分析 I | 11. 薬毒物検査、鑑識分野における質量分析法 |
| 6. タンデムマスマスペクトロメトリー | 12. 環境化学分野における質量分析法 |

〈2009 年掲載 2 章 質量分析装置のためのイオン化法〉

- | | |
|-----------------------|---------------------|
| 1. 総論 | 7. レーザー脱離イオン化 |
| 2. GC/MS のためのイオン化法 | 8. イオン付着質量分析 |
| 3. エレクトロスプレーイオン化—原理編— | 9. リアルタイム直接質量分析 |
| 4. エレクトロスプレーイオン化—応用編— | 10. 誘導結合プラズマによるイオン化 |
| 5. 大気圧化学イオン化 | 11. スタティック SIMS |
| 6. 大気圧光イオン化 | 12. 次世代を担う新たなイオン化法 |

〈2002 年掲載 3 章 同位体比分析〉

- | | |
|------------------|------------------|
| 1. 同位体比の定義と標準 | 4. 同位体比を測るための分析法 |
| 2. 同位体比測定の精度と確度 | 5. 生元素の同位体比と環境化学 |
| 3. 同位体比を測るための前処理 | 6. 重元素の同位体比 |

〈2016 年掲載 4 章 精密同位体分析〉

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. 同位体分析の基本原理 | 8. 小型加速器質量分析装置の進歩と環境・地球化学研究への応用 |
| 2. 表面電離型質量分析計の原理 | 9. 二次イオン質量分析装置の原理 |
| 3. 表面電離型質量分析計の特性とその応用 | 10. 二次イオン質量分析計を用いた高精度局所同位体比分析手法の開発と応用 |
| 4. ICP 質量分析法による高精度同位体分析の測定原理 | 11. 精密同位体分析のための標準物質 |
| 5. マルチコレクター ICP 質量分析装置による金属安定同位体分析 | 12. 質量分析を用いた化合物同定における同位体情報の活用 |
| 6. 加速器質量分析装置の原理 | |
| 7. 加速器質量分析の応用 | |

なお『ぶんせき』掲載時から古いものでは 20 年が経過しており、執筆者の所属も含め現在の状況とは異なる内容を含む記事もありますが、『ぶんせき』掲載年を明記することで再録にともなう本文改稿を割愛しました。これらの点については、執筆者および読者の方々にご承知いただきたく、お願い申し上げます。