

### 論文内容要旨

※ 整理番号		(ふりがな) 氏名(自署)	印
論文題目	甲状腺乳頭癌核の3次元構造解析-連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いた検討- (Three-dimensional structural analysis of the papillary thyroid carcinoma nuclei with serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM))		
論文内容要旨  <b>【目的】</b> ヒト甲状腺乳頭癌は甲状腺癌で最も多い組織型である。形態学的には、すりガラス状核・核溝・核内細胞質封入体 (intranuclear cytoplasmic inclusion, INCI)等の核所見により診断づけられる。従来の研究により、核溝やINCIは核膜の陥入により形成されると考えられているが、3次元構造を含む詳細な構造に関する研究はほとんど行われていない。それは、従来の透過型電子顕微鏡を用いて3次元構造を構築するためには多大な時間と熟練した試料作製技術を必要とするからである。近年、簡便かつ短時間で3次元構造を観察する技術として、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (serial block-face scanning electron microscopy, SBF-SEM)が注目されている。SBF-SEMは試料の切削と電子線照射を自動で行うことで、試料作製経験に乏しい研究者でも容易に連続的2次元画像を取得することが可能である。本研究の目的は、SBF-SEMを用いて甲状腺乳頭癌核を連続2次元・3次元に観察し、その形態形成過程について考察することである。  <b>【方法】</b> 山梨大学医学部附属病院にて外科的に切除された甲状腺乳頭癌症例16例を用いて、各症例の正常甲状腺組織と乳頭癌組織をサンプリングした。各試料を1×1×1mm大の立方体状に切り、4%パラホルムアルデヒド+0.5%グルタルアルデヒドで前固定を、四酸化オスミウムで後固定を行った。水洗後に鉛染色を行い、エタノールとアセトンで脱水しエポキシ樹脂包埋を行った。500×500μm大にトリミングし、金を蒸着させた試料をSBF-SEMに設置し、連続2次元画像の取得を行った。撮像枚数は500枚程度で切削の厚さは80nm、解像度は9nm/pixel、範囲は6144×6144pixelで、2~3箇所region of interest (ROI)を決定し撮像を行った。各3症例、計33個の乳頭癌核・正常濾胞上皮核について、画像解析ソフトのImageJ (Fijiプラグイン)を用いて連続2次元画像のコントラスト・アライメントを調節した。その画像を用いてTrakEM2により核のセグメンテーションを行い3次元構造の再構築を行った。このセグメンテーションの際に得られたデータを用いて、核の長径 (Ferret diameter)・表面積・体積を計測した。この表面積・体積から物体の不規則性を示す真球度(sphericity)を計算した。			

備考

- ※印の欄には記入しないこと。
- 論文題目が外国語の場合は、カッコを付し和訳を付記すること。
- 論文題目が日本語の場合は、カッコを付し英訳を付記すること。
- 論文内容要旨は、(研究の目的)、(方法)、(結果)、(考察)、(結論)の順に日本語(2,000字程度)もしくは英語(半角5,000字程度)でまとめ、タイプ等で印字すること。(文字数を記載してください。)

論文内容要旨 (続紙)

(ふりがな)  
氏名(自署)

印

【結果】

SBF-SEMにより甲状腺乳頭癌核と正常濾胞上皮細胞核の連続2次元画像を取得し、3次元構造の再構築を行った。3次元構造の観察では正常濾胞上皮核では表面平滑で球形に近い形態を示していたが、乳頭癌核ではより大型で核内に落ち込む溝が多数確認され、不整な凹凸を有する形態を形成していることがわかった。2次元超微形態像の観察ではこの溝は核膜の陥入により形成されるものであった。数値解析においても、乳頭癌核は正常濾胞上皮核に比して有意に大型で、高い不規則性を示した。また、連続2次元構造・3次元構造の観察を通じて、乳頭癌核のINCIを核外との交通があるもの (open INCI)とないもの (closed INCI)に分類した。Closed INCIでは核外との間に閉鎖した空胞状構造を有するものを認めた。Open INCIでは内部の細胞小器官の変性は軽度であったが、closed INCIでは細胞小器官の変性がより強く、数が少ないもの (empty INCI)がほとんどであった。また、一部のINCIでは内部にdense coreを有する顆粒の集簇がみられたが、それらはすべてclosed INCIであった (degenerative INCI)。

【考察】

SBF-SEMを用いることで、従来の手法に比べてより簡便でかつ短時間に3次元構造の再構築を行うことが可能となった。それに加え、SBF-SEMは従来のTEMと同等の解像度を有しており、2次元的・3次元的に微細な構造を観察することが可能である。甲状腺乳頭癌の病理診断は特徴的な核所見や核の不規則性により決定づけられているが、その詳細な構造は長く不明であった。過去には共焦点レーザー顕微鏡を用いて”tunnel”構造等、甲状腺乳頭癌核の不規則性を3次元的に観察した報告がある。SBF-SEMによる観察では、それに近い構造が認められるものの、完全な”tunnel”構造は認められなかった。これは、共焦点レーザー顕微鏡では解像度が低く、核の微細な構造を観察することが困難であったからであると考えられる。本研究では、SBF-SEMを用いて乳頭癌核の詳細な2次元超微形態像、3次元構造を観察することに成功した。さらに、簡便に数値解析を行うことも可能になった。一般的にはどの臓器においても癌細胞は正常細胞に比して核が大型で不整な形である。甲状腺乳頭癌でも同様であることが示されたが、乳頭癌に特徴的である核膜の陥入により、核の表面積が増すことでより不規則性が強くなることがわかった。この核膜の陥入によりINCIが形成される過程は過去の研究で既に示唆されている。今回の研究により観察されたclosed INCIと核外の間にある孤立した空胞状構造は、本来あったINCIと核外との交通が閉鎖して形成された可能性を示唆している。また、closed INCIの内部では細胞小器官に強い変性が加わっていることから、open INCIと核外との交通が消失し、closed INCIとなり内部に特殊な環境が形成されたのではないかと考えられる。

【結論】

SBF-SEMを用いて甲状腺乳頭癌核の詳細な連続2次元構造・3次元構造の観察を行った。そして乳頭癌核は核膜の陥入を通じてopen INCIとなり、最終的にclosed INCIへ変化するという形態形成過程が示唆された。(1994字)