

博士学位論文

全身イメージング質量分析法を用いた デキサメタゾン投与によるマウス胸腺を 主軸とする免疫代謝変動の解明

医生命機能研究室

指導教員 池川雅哉 教授

同志社大学大学院 生命医科学研究科 医生命システム専攻

2016 年度 2004 番 辻 雄大

目次

第一章 序論 1 ページ

第二章 胸腺について 3 ページ

第三章 質量分析法について 8 ページ

第四章 胸腺の疾患 14 ページ

第五章 統計解析 17 ページ

第六章 全身イメージング質量分析法の確立 19 ページ

第七章 デキサメタゾン投与における胸部組織におけるイメージング質量分析 23 ページ

第八章 イメージング質量分析プロファイルの統計解析 33 ページ

第九章 結論 38 ページ

図説

補足資料

補足表

補足データ

謝辞

引用文献

第一章 序論

個々の免疫細胞は、生体内環境から受ける栄養素に時間的に大いに依存しているが、がんや炎症病巣においては微小環境に大きく影響を受ける¹。免疫細胞を対象としたシングルセルレベルでの代謝解析については、フローサイトメトリーを用いた免疫細胞分離ののちに行う遺伝子発現解析やある種の代謝物測定²の報告はあるが、まだまだ実用化されていない。また免疫反応においては、生体内での時間軸も重要な要素であり、組織から直接解析する代謝解析手法が望まれている²。このように個体の時間・空間的免疫代謝の理解が進めば新しい疾患治療法のスキームも提案できることが期待される。

我々は、本研究において、新しい免疫代謝解析手法として「全身イメージング質量分析法」を開発し、デキサメタゾン投与マウスの胸腺を中心とする薬剤投与前後のダイナミックな免疫代謝変動を解析した。マウスにおいて、細胞組織学レベルの全身アトラスは整備されていなかったため、フィルムを用いる従来法である川本法³に依らず、独自の直接切片作製の技術⁴を確立し、1個体あたり12 μm ごとに400枚以上の胸部横断面マップを作製し、すべてHE染色を行いデータベースとした。さらに質量顕微鏡を用いてプリン・ピリミジン代謝物を中心とする低分子代謝物の網羅的イメージング質量分析を行い、有効な代謝物として3000のイオン種を背景に、デキサメタゾン投与マウスでの薬剤投与前後での免疫代謝イメージングに挑んだ。その手法としてMachine Learning法やDimensionality Reduction法が有効であり、薬剤投与の影響ばかりではなく、骨

髄・胸腺・リンパ節などの免疫組織の基本的な代謝ネットワークの可視化にも成功した。

この手法を用いることにより胸腺におけるデキサメタゾン投与における部位別プリン・

ピリミジン代謝の全貌と特異性の高いデキサメタゾン投与における代謝物バイオマーカ

ーの候補分子の発見に成功した。今後の臨床応用や治療法への応用について若干の考察

を行った。

第二章 胸腺について

第一節 概要

胸腺は、過去 2 世紀にわたって、解剖学的観点からだけでなく、多くの疾患で果たす生理学および病理学的役割についても大きな知見を生み出してきた臓器である。19 世紀初期までの解剖学と生理学に関する研究は、胸腺は神経系の浄化、上縦隔の血管系の保護クッション、乳幼児突然死に関わる臓器として考えられていた。19 世紀には、疾患における胸腺の役割に焦点を当てた重要な解剖学的・生理学的研究が行われた。しかし、胸腺の役割がより包括的な分析により明らかになり始めたのは、19 世紀の半ばからであった。現在、胸腺のさまざまな側面で得られた知見により、さまざまなプロセスにおける胸腺の役割についての理解が深まったが、胸腺の生理学と病理学は完全に理解されたわけではなく、さらに多くの知見が求められる。

第二節 胸腺の病理

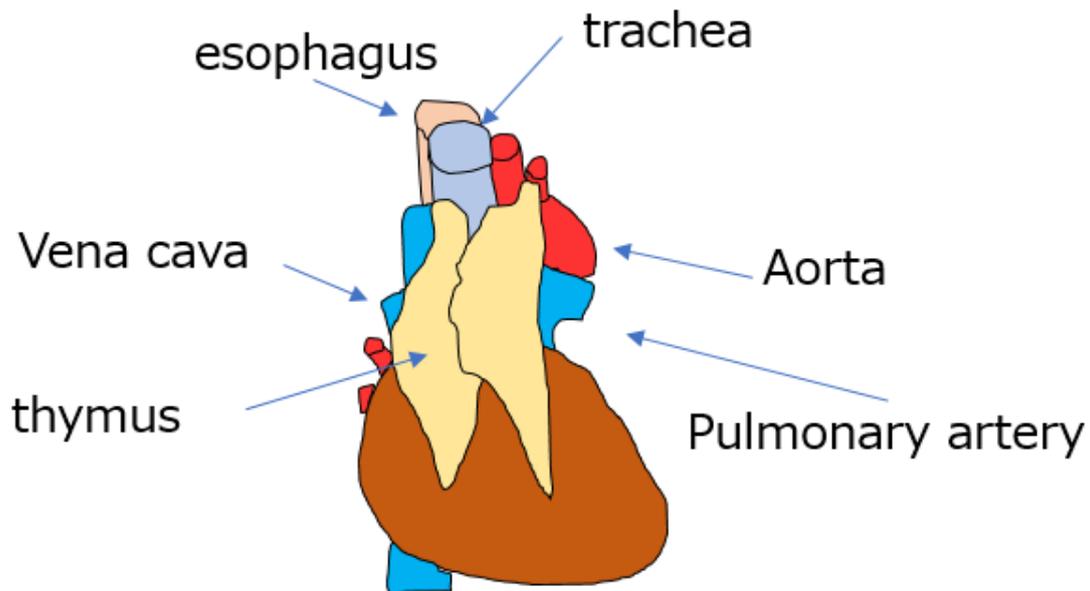
胸腺は、紀元 1 世紀から知られていた。ルーファスにより初めて言及され、心臓の頭頂部から第 7 脊椎に向かって気管支の終部に位置し、すべての動物に見られるわけではない、と記述⁴されている。人体解剖図に胸腺が描かれたのは、16 世紀であり、ウェザリウスによりその機能は物理的な緩衝作用として胸腔内を保護する⁵とされていた。1961 年ミラーによって胸腺は、免疫機能にとって不可欠であることが報告される^{6,7}まで、

誤った認識が広まっていた。17 世紀初期、新生児で胸腺肥大による窒息死をきたした一例が報告⁸された。19 世紀には、幼児が喉頭痙攣の症状を呈して死亡するのは、肥大胸腺の気管に対する物理的圧迫であり、これを胸腺性喘息と提唱した⁹。以降、乳幼児突然死について肥大胸腺が注目され、小児 225 例、成人 5 例の突然死の剖検例が報告され、胸腺リンパ体質が提唱された^{10;11}。呼吸器症状を呈する患者のヒトの胸腺に対して最初の手術が行われたが、予後は変わらず、別の同様の症例で胸腺部分切除術が行われた¹²。20 世紀直前に X 線の発見¹³により、乳幼児胸腺へ最初の放射線治療¹⁴が行われた。しかし後年、466 例¹⁵、2856 例¹⁶、1201 例¹⁷を対象に追跡調査が行われ、2 倍以上のリスクで癌を発症することが報告されている。胸腺リンパ体質の概念は 20 世紀初期から 1960 年まで論争が続いた^{18;19}が、加齢に伴う胸腺重量の変化についての報告がなされ²⁰⁻²²、この論争以降、胸腺重量は青春期末まで最大となり、胸腺は加齢に伴って退縮することが明らかとなり、年齢ごとの正常胸腺の重量とサイズが定義された。

第三節 胸腺の解剖

胸腺は、上縦隔にあり、胸骨と心膜の間の下縦隔の前部に向かって下向きに伸び、正中線を軸として密接に接触する 2 つの葉を持つリンパ組織である。胸腺極の上部は、左腕頭静脈の前方、上縦隔の大静脈の上部に位置し、胸管が交差して左腕頭静脈の根に挿入される付近で、胸管は後方関係になる。疎性結合組織である被膜は、胸腺内部へと陥入

し、さまざまな大きさの小葉に分割される²³。



挿絵1 ヒト胸腺の解剖

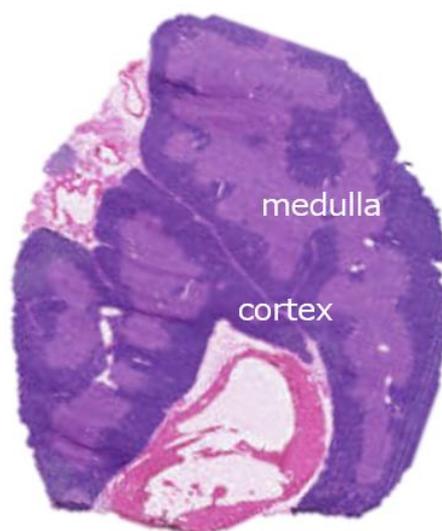
第四節 胸腺の発生

胸腺は、胎生期の咽頭弓内胚葉に由来する。胎齢9～10日に胎仔の第3鰓嚢が陥入し、胸腺と副甲状腺原基の形成が始まる^{24;25}。胎齢11.5日から胸腺と副甲状腺が分離し、副甲状腺は甲状腺方向へ、胸腺は心臓方向へ移動する。胸腺は最終的に心臓上部まで下降する²⁶。胎齢12日目には皮質・髓質様の細胞集団が認められ、胎齢13日目には皮質様の領域と髓質様の領域に分化し、リンパ系前駆細胞の移住も認められる^{27;28}。胸腺原基の形成と皮質・髓質への分化はリンパ系前駆細胞非依存的であるが、T細胞²⁹、

recombination activating gene 2³⁰、T-cell-receptor α 鎖³¹ を欠損したマウスでは、皮質・髓質は未形成となり、胸腺の皮質・髓質の発達と維持には、移住したリンパ系前駆細胞とその成熟が必要となる。

第五節 胸腺の組織学

胸腺は、多様な分化段階の胸腺細胞とその分化を支持する胸腺ストローマ細胞からなる。胸腺においてストローマ細胞は、胸腺皮質細胞、胸腺髓質細胞、樹状細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞、マクロファージ、B 細胞³²⁻³⁵ などの細胞群である。組織学的には、胸腺細胞が密集しヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin and eosin : HE) 染色で濃染される皮質と、皮質と比較すると細胞密度が低く細胞質の多い上皮細胞が相対的に多いために淡染される髓質から成る。



HE stain

挿絵2 マウス胸腺のHE染色

第六節 胸腺の免疫学的機能

胸腺は T 細胞産生のも場であり、免疫機能にとっては不可欠な臓器である^{6; 7; 36}。T 細胞は、造血幹細胞由来の血球細胞であるが、骨髓以外に分化・成熟する器官として胸腺を必須とする。成体期において、骨髓で産生された T 前駆細胞は、皮質髄質境界領域に豊富に存在する血管を介して胸腺へと移入する³⁷⁻⁴⁰。移入した T 前駆細胞は、皮質内を被膜下領域へ向かって移動し分化する⁴¹⁻⁴⁴。これらの細胞集団の中には、自己を認識できない細胞や自己を攻撃する細胞が含まれるため、これらの細胞を排除して有用な細胞だけを選び分化させる機構が存在する。胸腺皮質上皮細胞に提示された自己のペプチドと主要組織適合性複合体との相互作用を介して、自己に対して低い親和性をもった細胞のみが生存を保証するシグナルを受ける（正の選択）^{45; 46}。生存した細胞は、髄質へと移動する^{47; 48}。髄質では、胸腺髄質上皮細胞や樹状細胞、B 細胞に提示された自己のペプチドに対して高い親和性をもつ細胞がアポトーシスにより除去される（負の選択）^{33; 49}。特に、胸腺髄質上皮細胞と B 細胞では、自己免疫調節遺伝子（Autoimmune regulator gene : AIRE）により胸腺外の末梢にしか存在しない組織に特異的に発現される抗原を提示し、自己寛容を確立させることができる。また、胸腺髄質は制御性 T 細胞の分化の場として自己寛容に貢献する⁵⁰。こうして成熟した胸腺細胞は、胸腺から移出し⁵¹末梢へと向かう。このように胸腺は微小環境を構築し、T 細胞と相互作用しながら分化・成熟する。

第三章 質量分析法について

第一節 概要

質量分析は、物質を正電荷もしくは負電荷の状態とし、静電力により真空の装置内でその質量を測定することにより、原子量／分子量、分子構造、濃度、存在形態などを明らかにすることができる分析法である。これは、ガス放電の研究から派生したためである。この分野では、はじめに陽極線と陰極線が発見され、これを電場や磁場などで分離したことで、その正体が陽イオンと電子であることが判明した。その分析装置に度重なる技術改良が重ねられ、現在では元素から高分子のタンパク質まで検出が可能である。同時に多数の分析も可能なためメタロミクス、メタボロミクス、プロテオミクスに不可欠な技術となり、様々な学術研究に貢献している重要な技術となっている。

第二節 質量分析法の発明までの歴史

質量分析は、真空放電現象を起源とする。真空放電現象とは、まず常圧の空気では非常に絶縁性が高く、放電にいたるには数万 V の電圧が必要であるが、ガラス管の両端に設置した電極に電圧をかけ、管内の空気を真空ポンプで抜いていくと、数千 V の電圧で放電がおこる。17 世紀、トリチェリは、ガラス管の一端が閉じられたものを水銀で満たし、開かれた一端を水銀中に浸しながら管を立てた。すると、管内の水銀は約 76cm の高さで止まり、管の上部に水銀のない部分に真空が生じ^{52;53}、この発見により水銀気

圧計が発明され、水銀気圧計を振ると真空部に光が発する⁵⁴ことも発見された。一方、ゲーリケにより硫黄球を用いた起電機と真空ポンプが発明された⁵⁵。18世紀、ホークスビーは、真空ポンプを改良して実現した中真空のガラス球と水銀を起電機に使用し、摩擦電気を源として蛍光を観測した⁵⁶。19世紀になり、ファラデーは真空放電に注目し、グロー放電を発見した⁵⁷。その後プリュッカーは、卓越した真空技術とガラス細工の技量をもつガイスラーに依頼し、様々なガスを封入した精巧なガラス放電真空管、ガイスラー管が作成され、磁石を近づけるとグロー放電の位置が移動することが報告された⁵⁸。ヒットルフは、真空度をさらに高くし、陰極とガラス管との間に物体を置いた。すると、ガラス管の発する蛍光は、影を生じることを観察した^{59;60}。陰極から出ている放射線が蛍光の原因だと考えられ、ゴールドシュタインにより陰極線と命名された⁶¹。また、穴の開いた陰極のガス放電管で、陰極線と逆方向に進む陽極線が発見された⁶²。ウィーンは、陽極線を質量電荷比に応じて分離させる装置を開発し、この光線は磁場によって偏向されることを示した⁶³。トムソンは、これに真空度を高めて写真板へ放物線状に衝突させることで、 ^{20}Ne と ^{22}Ne の感光線がわずかに示された⁶⁴。アストンは、自身の考案した光線を線状に集束できる収束型質量器により、強度、精度、分解能が向上したことで、安定元素が化学的手法で分離できず質量が異なる同位体になり得ることが初めて証明された⁶⁵。

第三節 質量分析器とイオン化の種類

質量分析は、イオン化した物質の運動を測定しているため、イオン運動の分離様式とイオン化の技術開発が重要である。

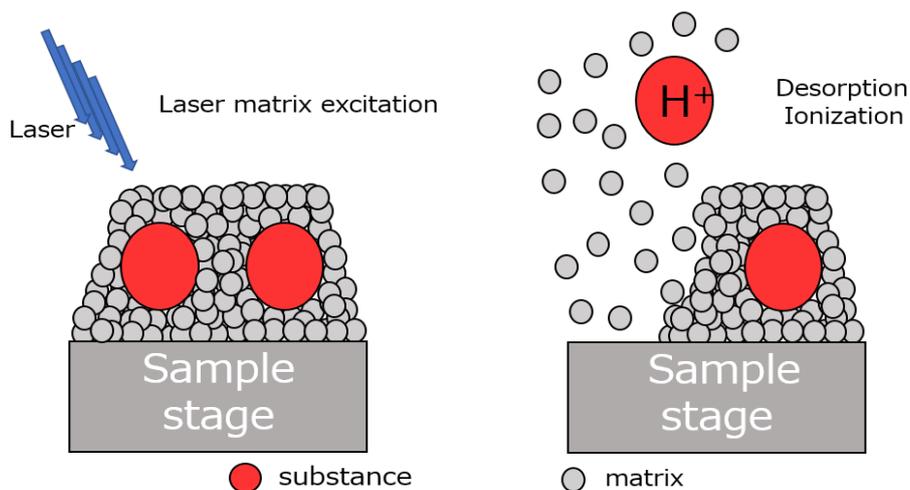
主な質量分離部については、初期は磁場セクター型、現在までにポールによる四重極 (Quadrupole : Q) 型とイオントラップ⁶⁶ (Ion Trap : IT) 型、ステューブンスによる飛行時間 (Time of Flight : TOF)⁶⁷ 型、マーシャルによるフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型⁶⁸、マカロフによるオービトラップ⁶⁹が開発されている。磁場型セクター型はイオン化部から導入されたイオンを加速器で電圧により加速し、磁場および電場により褶曲させイオンの運動量として質量分離する様式である。Q型とIT型は、高周波電圧を印加した4本の電極内にイオンを通し、目的とするイオンのみを通過させ、電極のトラップ内に保持し、電位を変化させることで選択的にイオンを放出することで分離を行う様式である。TOF型は、加速器でパルス状に加速したイオンが検出器まで飛行するのに要した時間を計測する様式である。フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型は、磁場中でイオンを回転運動させ極板間に発生した周期的に変動する誘導電流を測定する様式である。オービトラップは、紡錘型の電極とハウジングにより構成され、イオンを中心の紡錘型電極で周回させ、同時に紡錘型電極の長軸方向に往復運動することで発生した誘導電流を測定する様式である。

主なイオン化技術は、現在までにデンプスターによる電子イオン化法⁷⁰、フィールドと

マンソンによる化学イオン化法⁷¹、バーバーによる高速原子衝撃法⁷²、田中とヒレンカンプ・カラスによるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法^{73:74} (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization : MALDI)、フェンによるエレクトロスプレーイオン化法⁷⁵、リードによる誘導結合プラズマ法⁷⁶である。電子イオン化法は、試料に熱したフィラメントから放出される熱電子を衝突させる方法、化学イオン化法は、電子イオン化法でガスをイオン化し試料分子との間で電荷交換反応を起こす方法、高速原子衝撃法は試料をマトリックスに混ぜ高速で中性原子を衝突させる方法、MALDI法は試料をマトリックス中に混ぜて結晶を作りレーザーを照射する方法、エレクトロスプレーイオン化法は、溶媒に溶かした試料をキャピラリーに導入・噴霧し、帯電液滴を形成させ、溶媒分子を蒸発させることで液滴表面の電荷が表面張力に勝ることで液滴が分裂し、これを繰り返されることで最終的にイオンを生成する方法である。誘導結合プラズマ法は、気体に高電圧をかけプラズマ化させた後、高周波数の変動磁場によりプラズマ内部に渦電流の熱を発生させることによって発生する高温のプラズマを利用する方法である。

対象の試料に対して質量分析を行うには、これら多種多様な質量分析器とイオン化法を選択しなければならない。対象試料に対して、不適切なイオン化法を選択してしまうと、試料分子は検出されない。数多くの質量分析器とイオン化法から測定対象に適する手法を選択することは、現状では指針といえるものはなく、実験を行う者の経験に依存して

いる状況がある。



挿絵3 MALDI型質量分析法におけるイオン化の原理

第四節 イメージング質量分析法

イメージング質量分析 (Mass Spectrometry Imaging; MSI) 法は、近年の質量分析技術とバイオインフォマティクス手法の進展に伴って有効となった手法である⁷⁷。MSIの原理は、まず組織切片を作製し、イオン化補助剤であるマトリックスを塗布する。マトリックスが塗布された試料スライドを質量分析器に導入する。その試料上へ直接レーザーを照射する。照射された領域に存在する物質がイオン化し、質量分離し検出器に到達することで、マススペクトラム、つまり、質量電荷比の算出と信号強度の測定を行うことができる。これを走査状に繰り返すと、試料上全体のマススペクトルを取得できるため、そのマススペクトルから、イオン強度を強弱として物質の局在を可視化する。そのため、抗体のようなラベルは必要とせず、同一切片で一度に多数の物質を可視化できる。加え

て、限局または特定の領域に局在する物質を探索することも可能である。



挿絵4 iMScope (島津製作所)のプロトタイプ器

第四章 胸腺の疾患

第一節 胸腺腫と自己免疫性疾患

胸腺腫は、胸腺上皮に由来する腫瘍のうち細胞異型のないものである⁷⁸。胸腺腫には自己免疫性疾患が合併することが知られており、重症筋無力症(Myasthenia gravis:MG)、赤芽球癆、低ガンマグロブリン血症を併発していることがある。MGは、血清抗アセチルコリン受容体 α サブユニット抗体⁷⁹により引き起こされると考えられ、外眼筋、眼球筋等の易疲労性や筋力の低下を主訴とする疾患⁸⁰で、胸腺腫の症例の約23~32.8%⁸¹⁻⁸³に併発している。赤芽球癆は、正球性正色素性貧血と網赤血球の著減および骨髓赤芽球の著減を特徴とする疾患⁸⁴で、胸腺腫の症例の約0.7~2.6%⁸¹⁻⁸³に併発している。また赤芽球癆患者の50%は、胸腺腫を併発している⁸⁵。低ガンマグロブリン血症は、血清IgGが年齢相応に不足している疾患であり、胸腺腫の症例の約0.2~0.65%⁸¹⁻⁸³に併発している。

第二節 胸腺摘出術

1899年、MG患者の剖検で胸腺腫が見つかり、胸腺との関連の可能性が最初に指摘された⁸⁶。胸腺摘出術は歴史的に行われ、1911年に非胸腺腫MG患者に対して胸腺摘出を行いMG症状が改善⁸⁷した一例が報告された。1940年には胸腺腫併発MG患者においても同様な報告⁸⁸がされた。MG患者における胸腺摘出術は経験的に適用されてきた経緯があるため、2016年に非胸腺腫MG患者に対する胸腺摘出術の効果に関するラン

ダム化比較試験の結果が報告され、胸腺摘出術は MG の臨床症状を改善する⁸⁹とされた。ただ MG 改善のメカニズムの根拠はなく、胸腺における T 細胞と B 細胞、負の選択、AIRE の関与が可能性として提示⁹⁰⁻⁹⁷されているが、未だ明らかではない。しかし、MG 発症のメカニズムの解明や治療の標的として、胸腺は少なくとも重要な臓器であると考えられる。

第三節 ステロイド

重症筋無力症は自己免疫疾患のため薬物治療は、免疫調節療法つまりステロイドが基本^{98; 99}となり、70~80%の改善¹⁰⁰がみられる。また胸腺摘出術の後、その効果が現れるまでに 6 カ月から数年を要する^{101; 102}とされるため、軽症の場合は術前にステロイドは導入されない。これは、MG のリスクを軽減し、投与量及び期間の短縮にもつながる。ただ MG の完全寛解率は低く¹⁰³⁻¹⁰⁶、多くは長期的でほぼ生涯にわたる¹⁰⁷。またステロイドはその使用量や使用期間により異なるが、その副作用は高率かつ易感染性、創傷治療遅延、糖尿病、高脂血症、消化性潰瘍など多様である¹⁰⁸。

第四節 デキサメタゾン

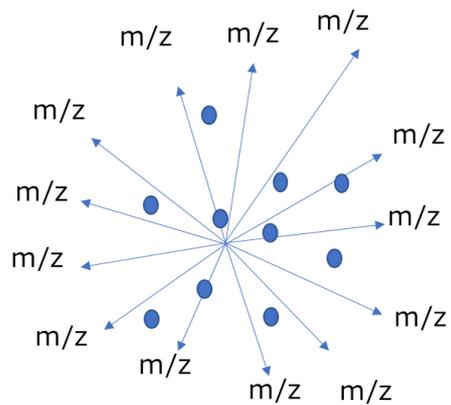
デキサメタゾン (Dexamethasone : DEX) は、ステロイドの合成薬の一つで、抗炎症作用、免疫抑制作用の目的で使用される。DEX は未熟な T 細胞にアポトーシスを誘導する。胸腺においては、TCR $\alpha\beta$ 鎖の再構成と爆発的な細胞増殖を経て分化した

CD4+CD8+ダブルポジティブ (DP) 細胞、自己抗原に強く反応する細胞が除去され生き残り CD4+CD8-シングルポジティブ (CD4-SP) 細胞と CD4-CD8+シングルポジティブ (CD8-SP) 細胞へと分化した細胞群が存在する。3 種の未熟な T 細胞に対する DEX の作用は、*in vitro* では 3 種の細胞群に対してそれぞれ 20% 以上のアポトーシス誘導作用を示すが、*in vivo* において 2 種の SP 細胞はアポトーシスが誘導されず、DP 細胞では変わらず 20% 以上のアポトーシス誘導作用を示す¹⁰⁹。胸腺における DEX の作用は、*in vitro* ではなく *in vivo* での研究を求められる。

第五章 統計解析

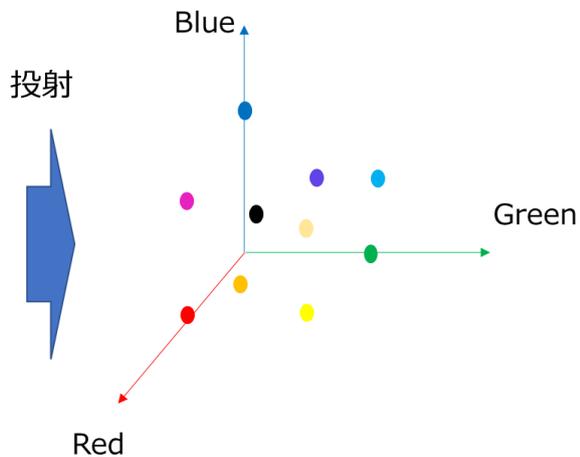
MSI の 1 点のピクセルデータは、物質の質量、局在、イオン強度の情報となり、それが数万点以上合わさる。同一切片で一度に多数の物質を可視化できることで探索的分析に特に適しているがゆえに、高次元的な膨大なデータセットが得られるため、自動化された計算分析が不可欠である。人がこの膨大なデータセットを容易に解釈するために、データの傾向を抽出するための次元削減手法の必要性が高まっている¹¹⁰。主成分分析 (Principal component analysis : PCA) に代表される次元削減手法は線形アプローチであるが、変数間に線形関係が存在することを前提としているため、多くの生物学的モデルは本質的に非線形であり、その場合において低次元表現は得られない^{111; 112}。t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) に代表される次元削減手法は非線形アプローチで、MSI データセットに有用であると示されているが、重み付け行列の計算に時間 (409×404 ピクセルとビンサイズ 7036、または 8Gb サイズのデータセットの場合、20 時間) を要する¹¹³。近年、リーマン多様体推定とファジー位相空間理論を利用した次元削減法である UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) が提案され^{112; 114}、t-SNE と比べて解析時間が短く MSI データの分類が明瞭であることが期待できる。

点の数 = MSIのデータピクセルの数



次元の数 = 検出されたm/zの数

点の数 = MSIのピクセルの数



三次元空間

挿絵 5 次元削減法の概念図

第六章 全身イメージング質量分析法の確立

マウスにおいて、サイズの異なる胸腺の相対的な深度一致を図るため、フィルムを用いる従来法である川本法³に依らず、独自の直接切片作製の技術を確立し、1 個体あたり 12 μm ごとに 400 枚以上の胸部横断面マップを作製し、マウス胸腺を中心とした胸部組織アトラスを作製した。以降の二次元の組織切片を対象とする MSI における群間比較では、相対的な深度一致が求められるため、このアトラスの三次元空間情報は必須となる。

第一節 方法

動物

動物実験は、同志社大学動物実験委員会の審査を受け同動物実験指針に則り施行した。実験には、4 週齢雌性 ICR マウス¹¹⁵ (体重 18~20 g: 清水実験材料) を用いた。5 mg/kg の DEX¹⁰⁹ (MP Biomedicals, France) を 1 匹に腹腔内投与し、コントロール (control 対照: CON) として生理食塩水を 3 匹に腹腔内投与した。投与 12 時間後¹¹⁶ にイソフルラン (Mylan) による安楽死を確認後、液体窒素で急速凍結を行った。

組織標本作製

凍結マウスをクライオスタット内に 10 分静置した後、頭部と下半身を切断し、これを胸部組織ブロックとした。胸部組織ブロックをステージに固定し、クライオスタット

(Leica CM3050)で 12 μ m 厚の凍結切片を作製した(庫内温度 -22°C 以下：、試料台温度： -20°C 以上)。切片は、頸部から薄切していき、胸腺上部が確認された深度から連続切片を作製した。全ての標本の HE 染色を行った。

HE 染色

標本を、PBS を溶媒とする 4% PFA (Wako)に 30 分間浸漬して、流水で 5 分間洗浄した。その後、Hematoxylin (CERTISTAIN)に 5 分間浸漬して、同様に 5 分間洗浄した。HCl (Wako)を 1%含む 70% Ethanol で 2 秒間分別し、5 分間水洗して、さらに eosin (Wako)に 20 秒間浸漬し、Ethanol で 10 分間脱水後、Xylene (JUNSEI)で 10 分間透徹を行った。封入には、Malinol (JUNSEI)と Xylene の混合液を用いた。TUNEL 染色は、Guava TUNEL キット (Merck MILLIPORE) を用い、キット添付のプロトコルにしたがって行った。プレパラートを NanoZoomer 2.0 HT (浜松ホトニクス) で 40 倍の倍率でスキャンし、NDP.view2 ソフトウェアプログラム (浜松ホトニクス) を使用して観察した。image J ソフトウェア (NIH、<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて、HE 染色画像をグレースケール (8 ビットタイプ) に変換し、白黒にしきい値処理し、2 値化した。

第二節 結果・考察

DEX 投与マウスと CON マウスの間で同等深度の組織切片を得るために、CON マウス

の胸部組織の連続切片を取得した（補足データ 1~60）。その中から、4 つの深度を図 1Ai-iv に示した。頸部の主要な動脈（図 1B・C）に着目し頭部から順に、i)腕頭動脈・左鎖骨下動脈・左頸動脈、ii) 腕頭動脈・左鎖骨下動脈・左頸動脈合流部、iii)大動脈弓上部、iv) 大動脈弓下部の胸部組織切片 HE 染色像を図 1D に示した。図 1C および図 D の # に示すように内胸動脈から胸腺に分岐する動脈（補足資料 1#）が観察できた。またこの # 動脈は、大動脈弓上部から下部にかけて観察できる深度であった。詳細を補足データに示した。胸腺への脈管は、胸腺左右の陥入部（補足データ 141~233）から流出入することが観察された。その深度では、大動脈弓（補足データ 196~204）が観察された。よって、サイズの異なる胸腺にて同等の深度の組織切片を得るために、大動脈弓と # 動脈が観察できる深度を指標とした。図 2A には、組織学および MSI の双方で用いたマウス胸部組織切片で、骨髄、胸腺、リンパ節、骨格筋、食道、気管、肺、脊髄、脂肪組織、動静脈血管、および血液などの複数の臓器が含まれた（補足資料 2-3）。この胸部組織に関して、リンパ器官である胸腺はヘマトキシリンによって比較的強いコントラストで染色された（図 2B）。DEX 投与の 12 時間後、特に胸腺の皮質で HE の染色性が薄れていた。これは、大量のアポトーシス細胞死が起こっていると考えられ、隣接切片の TUNEL 染色像（図 2Be-h）にて、明瞭に反映されていた。この結果は、in vivo において DEX に感受性のある DP 細胞¹⁰⁹ は皮質に存在している¹¹⁷ ため、アポトーシスを誘導されると皮質にその現象が顕在化したものと考えられる。HE 染色の顕微鏡画像

を 2 値化 (図 2Bi-l) した結果、CON マウス胸腺の皮質と髄質が明瞭に観察されたが、皮質髄質境界領域 (cortico-medulla junction : CMJ) は、DEX 投与マウス胸腺の 3 番目の区画として現れていた (図 2Bj および 1)。しかしながら CON マウス胸腺における CMJ は HE 染色やその 2 値化画像から判断するのは困難であった。

第七章 デキサメタゾン投与における胸部組織におけるイメージング質量分析

アポトーシスを受ける細胞は、ATP を初めとした代謝物質が放出されていることが報告¹¹⁸されており、マクロファージの動員を誘発する ATP や UTP などを放出する¹¹⁹と考えられている。また DEX 投与により血中¹²⁰、心臓、肝臓、骨格筋でヌクレオチド代謝が変化する^{121;122}という報告がある。このことから DEX 投与による *in vivo* 胸腺におけるヌクレオチド代謝物質の局在とその変化は、治療予後効果や副作用のマーカーとして重要な知見となる。さらに胸腺では微小環境を初めとして局所で様々な生命現象が起こっている¹²³。本研究では、DEX 投与によるヌクレオチド代謝物質の変動を捉えるため、胸部組織における MSI を行った。DEX は多様な薬理作用と副作用を示すため、組織切片は胸腺組織だけでなく他の組織も俯瞰できる胸部組織切片は有効な手法である。よって先行して行った群間での空間的な深度を可能な限り一致させるため、胸部組織の連続切片のアトラス情報を利用して組織切片を作製した。最後に、UMAP を用いて得られた MSI データの次元削減を行い、正常および DEX 投与胸腺組織におけるヌクレオチド代謝物質の局在を明らかにした。

第一節 方法

動物

動物実験は、同志社大学動物実験委員会の審査を受け同動物実験指針に則り施行した。

実験には、4 週齢雌性 ICR マウス (体重 18~20 g; 清水実験材料) を用いた¹¹⁵。5 mg/kg

の DEX (MP Biomedicals, France) ¹⁰⁹ を 4 匹に腹腔内投与し、コントロールとして生理食塩水を 4 匹に腹腔内投与した。投与 12 時間後にイソフルラン(Mylan)による安楽死を確認後、液体窒素で急速凍結を行った。実験まで凍結保存はせず、連続して以下の測定まで実験を行った。

組織標本作製

凍結マウスをクライオスタット内に 10 分静置した後、頭部と下半身を切断し、これを胸部組織ブロックとした。胸部組織ブロックをステージに固定し、クライオスタット (Leica CM3050) で 12 μ m 厚の新鮮凍結切片を作製した (庫内温度 -22°C 以下 :、試料台温度 : -20°C 以上)。切片は、頸部から薄切していき、脈管流出入部が確認された深度から切片を作製した。MSI 用に透明伝導性コートをした ITO (indium-tin-oxide) スライドガラス (Bruker Daltonics) に融解接着させ、シリカゲル (Wako) 20 g を底に敷き詰めた 50 ml チューブへ入れ、マトリックス塗布までクライオスタット内で静置した。また HE 染色、TUNEL 染色のために、MSI 切片の隣接切片も作製した。

マトリックス・キャリブレーション溶液の調製

9-AA (9-aminoacridine)¹²⁴⁻¹³¹ は、フェムトモルオーダーの検出限界と定量的かつヌクレオチド物質をはじめとした多数の代謝物質に対してイオン化を補助する。9-AA とキャ

リブレーション用に DHB (2,5-Dihydroxybenzoic Acid)を調製した。これらは組織の固定とマトリックス溶解のために 70% Methanol を溶媒として用いた。また内部標準として Naptalam (Wako)¹³² を溶解させた。

70% Methanol+naptalam

Methanol (Wako)	7 ml
Water	3 ml
Naptalam	1 μ l

9-AA 溶液

9-Aminoacridine for synthesis (Merck)	40 mg
70% Methanol	10 ml

DHB 溶液

2,5-Dihydroxybenzoic Acid (Wako)	10 mg
70% Methanol	1 ml

MSI 測定

クリオスタットからスライドの入ったチューブを取り出し、スライド表面が結露し物質の位置情報が失われないよう、蓋のみを開けたチューブごと真空乾燥させた。MSI 測定には大気圧 MALDI-QIT-TOF-MS を搭載した質量顕微鏡 iMScope のプロトタイプ機 (島津製作所)を用いた。装置を制御する PC で MSI solution を起動させ、分析のアプリケーションを起動した。装置への装着前に、サンプルホルダに付着した埃をブローで飛ばした。装置の試料扉を開き、試料台にサンプルホルダを装着した。試料台奥と左の当たり面に確実にサンプルホルダが押し当てられているか、確認した。装置の試料扉を

閉じて、サンプルホルダを装置にロードした。ウィザードに従って、サンプル ID や保存先などのサンプル情報を入力した。マトリックス塗布前後の試料の位置を装置に登録するため、ウィザードに従って位置合わせ情報を取得した。撮影条件の設定を行い、試料プレートの全体像を撮影した。顕微鏡で試料を観察し、測定する領域を指定した。レーザーの照射位置がずれないように、顕微鏡倍率 40 倍 (40×) でピントが最良になる高さに合わせ、試料の高さ調節を行った。撮影したい観察倍率にし、分析画像の撮影を行った。同様にレーザー照射条件最適化のための画像も撮影した。

サンプルホルダの金属部分にマトリックスがかからないよう、マトリックスを塗布しない部分にパラフィルムを巻き、調製した 9-AA 溶液をエアブラシ (Procon boy FWA Platinum) によるマトリックス溶液吹き付け法(スプレー法)により、1 cm² に対し 300 μl を塗布した。マトリックスの塗布は、試料表面に小さな結晶を均一に生成することが重要であるため、均一にエアブラシを用いて塗布した。塗布を行った後、パラフィルムをはがし、レーザー照準調整とキャリブレーションを行うために、試料プレートのマトリックスを塗布していない部分に DHB を 1 μl 滴下した。完全に乾いた事を確認したのち、試料観察時と同様に試料台にサンプルホルダを装着し、位置合わせを行った。顕微鏡倍率 40×で、校正用サンプルの DHB の画像を撮影した。矩形で分析領域を指定し、レーザーのパラメーターを照射径 0、強度 20 に設定し、校正を開始した。ウィザードに従って、レーザー照射位置を校正した。LCMS solution の再解析質量校正機能

で、先ほど測定したデータを用い質量較正を行った。このデータを装置に反映させ、レーザー照射条件の最適化を行った。レーザーの強度や照射径などの測定条件を設定後、測定を開始した。また同様に任意の複数点にて MS/MS を行い（補足表 1）、分子の割り当てを行った。

MS 測定条件

イオン種： 負イオン

測定範囲： m/z 250~900

積算回数： 1 回/pixel

サンプル電圧： 3.00 kV

検出器電圧： 2.10 kV

MS 段数： 1

MS/MS の場合の MS 段数： 2

レーザー照射条件

照射回数： 100 shot

繰り返し周波数： 1000 Hz

照射径： 4 (50 μ m)

レーザー強度： 60

HE染色

標本を、PBSを溶媒とする4% PFAに30分間浸漬して、流水で5分間洗浄した。その後、ヘマトキシリンに5分間浸漬して、同様に5分間洗浄した。HClを1%含む70% Ethanolで2秒間分別し、5分間水洗して、さらにEosin (Wako)に20秒間浸漬し、Ethanolで10分間脱水後、Xyleneで10分間透徹を行った。封入には、MalinolとXyleneの混合液を用いた。プレパラートをNanoZoomer 2.0 HT (浜松ホトニクス)で40倍の倍率でスキャンし、NDP.view2ソフトウェアプログラム (浜松ホトニクス) を使用して観察した。

データ解析

得られたMSIデータをソフトウェアIMAGEREVEAL MS(島津製作所)を用いて解析を行った。ピークは信号強度の降順から3000本選択し、画像構築を行った。また、HMDB¹³³ (<http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>)、METLIN^{134; 135} (<https://metlin.scripps.edu>)の代謝物質データベースを用いて、質量電荷比から30 ppmの許容誤差範囲内で、分子の割り当てを行った。特徴のある300枚の代謝物質像(本論文に未掲載)を選出した。細胞のエネルギー充足の指標であるEC (Energy Charge)は、 $[(ATP) + 0.5 (ADP)] / [(ATP) + (ADP) + (AMP)]$ の定義式¹³⁶により算出し画像化した。

第二節 結果・考察

HE 染色前の新鮮凍結切片に対して質量顕微鏡を用いて MSI 分析を行い、良好なマススペクトラムを取得することに成功した (図 3A)。9-AA をマトリックスとして使用して図 3B・C に示すようにプリンやピリミジンおよび 2,3-ビスホスホグリセレート (bis-phosphoglycerate : BPG) の代謝物質を画像化した。2,3-BPG は赤血球に存在することからその局在は血液領域を示す。一方、UDP-glucose と UDP-HexNAc は胸腺皮質、骨髄、リンパ組織、脂肪組織で強く検出された。これは、2,3-BPG と共局在する代謝物が主に液性因子であり、UDP-glucose と UDP-HexNAc は、器官や組織の細胞内代謝状態を表していることを意味する。UDP-HexNAc は UDP-GlcNAc と質量数が同じである。UDP-GlcNAc は、これを基質とする O-GlcNAc トランスフェラーゼを介してタンパク質を O-GlcNAc 化し、免疫細胞で重要な役割を示す物質であるが、胸腺においてはクローン増殖と DN から DP に分化するための必須の物質¹³⁷である。この2つの現象は皮質で行われている¹¹⁷。DEX 投与マウスと CON マウスの間でこれら代謝物に由来するイオンの分布と強度をヒートマップで可視化したところ胸腺組織における皮質・髄質間での濃度勾配に影響は認められなかった (図 3 B)。

図 3C では、DEX 投与および CON マウスにおけるヌクレオチド代謝物質のイメージング像を示した。驚いたことに、ATP は、死後の変化に伴って減衰することなく、この急速凍結プロトコルで可視化することに成功した。これは、従来の方法と比較して、サン

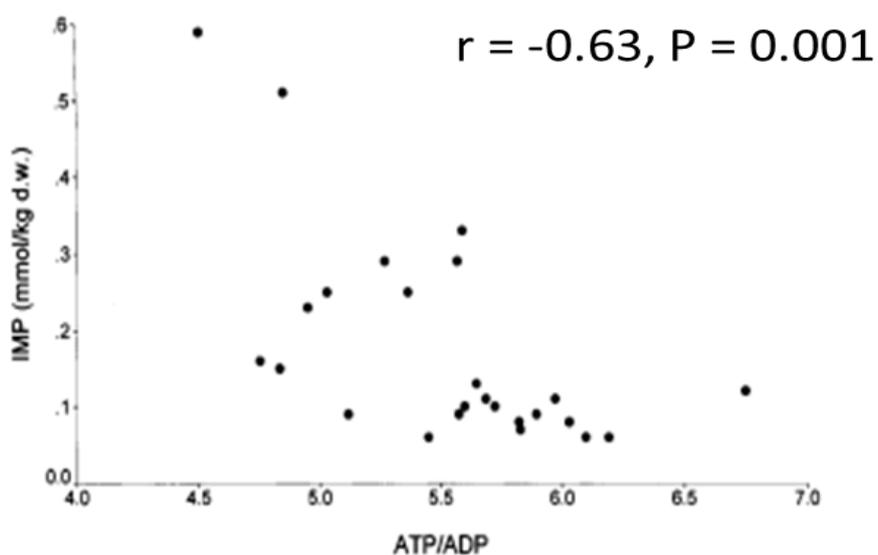
プルの収集と凍結にかかる時間を短縮する全身イメージング技術の優位性¹³⁸がある。

ATP は、アポトーシスを引き起こす細胞から放出される find-me シグナルとして報告¹¹⁹され、CON では皮質に局在し、DEX 投与ではその局在は髄質と逆転していた。本来、胸腺では 95%の胸腺細胞が死に至るにもかかわらず CON の TUNEL 染色は DEX 投与に比して陰性である (図 2B) が、これはアポトーシスを引き起こす細胞のクリアランスが良く保たれているためと考えられる。

代謝物質局在の検出は、プローブを用いて、かつ、閉鎖的な細胞内環境のみの条件で限定的に使用されるが、開放環境の細胞外ではプローブや検出対象の代謝物質は拡散し、その局在検出は困難である。MSI では血液領域内での代謝物質の局在は検出可能であった。血管内 ATP レベルが胸腺に並置された大動脈と静脈の局在に示されているのと同じ範囲にとどまっていると仮定すると、皮質と髄質の間のこれらのヌクレオチドの分布は DEX 投与によって逆転した結果となった。ATP と ADP、AMP は、大動脈と静脈内で検出された唯一のヌクレオチドであった。対照的に、他のすべてのヌクレオチドである UMP と UDP、UTP、GMP、GDP、GTP、dTMP、dTDP、dTTP、CMP、CDP、CTP (補足資料 4-5) は血液領域内で検出されなかった。この血液領域内の MSI 結果は、アポトーシス細胞が特定の代謝物を”good-bye signal”として放出するセクレトームとして炎症を積極的に調節するという最初に報告された概念¹¹⁸を支持するとすれば、胸部組織などの全身組織を作製し MSI を適用した本プロトコルは、ATP と ADP

などを含めたこれらの血液循環中のセクレトームを捉えることができる唯一の重要なツールになると考えられる。

対照マウスにおける IMP の局在（補足資料 6）は、それぞれ ATP、ADP と相補的な局在であった。また DEX 投与マウスでは対照マウスに比して筋組織と胸腺皮質をはじめとして IMP は胸部組織全体的に蓄積した局在であった。さらに図 4 に示すように、EC は、DEX 投与により全体として減少する傾向を示し、胸腺皮質では、DEX 投与後に減少し、髄質では、一部に不均一な EC 分布が認められた。これらの局在とその変動は、ある種の病態下でプリン合成の代謝カスケードにおける IMP の蓄積異常が ATP 消費・再合成の不均衡を反映するという報告¹³⁹を支持するような結果となった。



挿絵 6 IMP と ATP/ADP の負相関（文献 139 から抜粋・改変）

一方で、IMP の代謝酵素である IMP デヒドロゲナーゼは、アデニンおよびグアニンヌクレオチドの de novo 合成経路の分岐点に位置し、IMP からのグアニンヌクレオチドの合成に関与する。リンパ球は、de novo 合成に依存している¹⁴⁰。DEX 投与による IMP デヒドロゲナーゼと IMP の局在変動はさらなる検討が必要であるが、IMP デヒドロゲナーゼは新型コロナウイルスの非構造タンパク (non-structural protein-14) と相互作用することが判明¹⁴¹しており、DEX は呼吸補助を必要とする COVID-19 患者の 28 日死亡率を低下させる報告¹⁴²がある。

第八章 イメージング質量分析プロファイルの統計解析

第一節 方法

データ解析

得られた MSI データをソフトウェア IMAGEREVEAL MS(島津製作所)を用いて解析を行った。ピークは信号強度の降順から 3000 本選択し、画像化を行った。また、HMDB¹³³ (<http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>)、METLIN¹³⁴、¹³⁵ (<https://metlin.scripps.edu>)の代謝物質データベースを用いて、質量電荷比から 30 ppm の許容誤差範囲内で、分子の割り当てを行った。胸部組織の各臓器に特徴的に分布する MS イメージを抽出するために、関心領域 (Region of interest : ROI) を各領域に設定し、それぞれの ROI の平均スペクトラムを算出し、主成分分析を行った。また ROI を指定せず、segmentation (k-means) と UMAP と呼ばれる統計解析を行った。

第二節 結果・考察

測定後 HE 染色像から各組織構造を ROI で設定 (補足資料 7a) し、主成分分析を行った結果、PC (Principal Component) 1 vs PC4 の成分 (補足資料 7b) で各組織の MSI プロファイルに分ける (補足資料 7c) ことができ、各々の代謝物質 (m/z) の主成分負荷量 (補足資料 7d) を示した。各組織の MSI プロファイルは類別することができていたが、主観的な ROI を基にした MSI プロファイルを類別するため、k-means 分析と

UMAP 分析を用いて、取得したデータに基づいて統計解析を行った。UMAP は電子ネット上にその解析手法の原理が公開¹¹⁴されているため、この原理を適用した。また主観的な ROI は選択せず先入観なしにそのデータセットの特徴を類別化できる手法である。図 5A では、2 つの解析計算手法により、胸部組織を表した詳細な代謝クラスターが証明された。また DEX 投与マウスにおいても同様であった。どちらの解析手法でも、血管内クラスターは、IMAGEREVEAL で生成された k-means マップの赤色と UMAP の水色で示されているのと同じカテゴリに分類された。これらは、上述した主成分分析 (PCA) でも一致していた (補足資料 7a)。DEX 投与マウス胸腺の皮質に見られる大規模なアポトーシスは、IMAGEREVEAL で生成された k-means マップでは紫色 (図 5A d) に分類され、UMAP では灰色 (図 5A b) に分類された。どちらの手法もマウスの胸部におけるアポトーシス関連の代謝が、DEX 投与によって皮質とは異なっていたという考えができる。UMAP の高度な計算により 82 のクラスター (未掲載) を類別化でき、脊髄 (図 5B) は白質 (桃色) と灰白質 (黄色) でバタフライ構造が明確に区別された。さらに、灰白質の 3 番目の区画は、図 5B の桃色の区画に混ざり合っていた。これは、灰白質の前角と後角の介在ニューロンの核の分布の非常に類似したパターンであった。この計算を胸腺に適用することで、CON マウス胸腺の代謝プロファイルを 1) 胸腺皮質と一致する最も外側のプロファイル (赤)、2) CMJ (青) と呼ばれることが多い皮質髄質境界領域と外側の髄質のプロファイル、および 3) 内側の髄質 (紫色) のプロファ

イルに分割することに成功した (図 5C)。興味深いことに、DEX 投与で TUNEL 染色陽性であったクラスターは、CON マウス胸腺ではほとんどが胸腺外で、緑色で表される代謝プロファイルであった (図 5C)。最も重要なことは、CON マウス胸腺の代謝の観点から CMJ を分類することに成功したことである。前章の正常なマウス胸腺において、HE 染色と TUNEL 染色では CMJ の判別は困難であった。もう一つのポイントは、胸腺髄質の代謝の不均一性が最初に現在の技術で視覚化され、それが DEX 投与によって強く影響されることを発見したということである。注目すべきことに、正常なマウスの皮質胸腺の代謝プロファイルは、図 5C の赤色で示されている独特の分子プロファイルを持っており、これは主に DEX 投与胸腺皮質で消失し、髄質の背側 (図 5e) にシフトした。正常なマウス胸腺髄質では、メタボロミクスの不均一性が CMJ の 2 つの層と最も内側の髄質に観察された (図 6A)。DEX 投与では、正常な胸腺の CMJ (青) と最も内側の髄質 (紫) を表す代謝プロファイルが混ざり合っていた。これらの観察結果は、DEX 投与前後の TUNEL 陽性細胞の組織学的所見 (図 6B) と密接な関係があり、各臓器の構造と分布に対応する代謝物の分布がクラスターマップとして視覚化された。図 7 では、主に胸腺の皮質に描かれている DEX 投与で誘導された新規物質を示した。MSI データプロファイルに基づいて多変量解析アルゴリズム (UMAP) を組み合わせた結果、DEX マウス胸腺において代謝物バイオマーカーの候補分子を見つけることが可能であった。しかし、すべての代謝物質は現在のデータベースでは割り当てることがで

きなかった。代謝物バイオマーカーの候補分子群の中で代表的な物質を図 7 に示した。

m/z 558.04 (補足表 1 より ADP-ribose と推定) と m/z 579.03 は、両群ともに脂肪組織に局在しているが、DEX 投与により胸腺皮質に局在が顕在化した (図 7 a, b, e, f)。

胸腺は加齢により脂肪変性することが知られている¹⁴³ことから、DEX 投与により胸腺

と脂肪組織で共局在化することは興味深い結果である。 m/z 625.16 (図 7 c, g) は、CON

にて局在は捉えられないが、DEX 投与により胸腺皮質で特異的に顕在化した。 m/z

640.12 (図 7 d, h) は、骨組織、気管軟骨組織に局在しているが、DEX 投与により胸腺

皮質に局在が顕在化した。これらの物質は、DEX 投与により増加する物質として考え

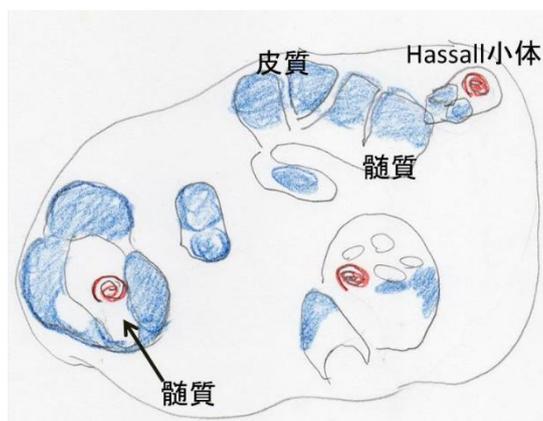
られる。以上の結果に代表されるような局在情報が有用な情報となるにはさらなる分析

が必要であるが、代謝物バイオマーカーの候補分子は、DEX 投与の全身的な影響を理解

するためのバイオマーカーとして利用できる可能性がある。ステロイドは多様な疾患で

使用されるが、特に MG と胸腺腫は、約 23~32.8%⁸¹⁻⁸³に併発されステロイドが有効な

治療選択肢の一つである。



挿絵 7 ヒト胸腺の病理医によるスケッチの例 (塩野裕之氏の好意による)

挿絵 7 に示すように、ヒト胸腺の病理組織像は、脂肪組織が豊富であることやマウス胸腺にはなくヒト胸腺に特徴的なハッサル小体を含むことなどマウス胸腺のような充実性の組織構築とは大きく異なっている。一方、ヒト胸腺腫の病理診断¹⁴⁴⁻¹⁴⁷において、WHO 分類の B1/B2/B3 分類では観察者間の再現性は低いという報告¹⁴⁸がある。したがって、本研究で新たに探索した代謝物バイオマーカーの候補分子をバイオマーカーとしてヒト胸腺の病態解析に応用するためには、ヒトバイオプシー試料や術中迅速試料などを用いた質量分析解析を行い MG や胸腺腫などの胸腺病変の診断に適用し、外科的もしくは内科的治療法の決定を支援する代謝物バイオマーカーの可能性を検証することが期待できる。

第九章 結論

胸腺種と重症筋無力症の病態理解や治療の標的として胸腺は重要である。また外科・内科的治療において、ステロイド薬が選択される。そのステロイド薬の一つである DEX は、胸腺に対して *in vitro* と *in vivo* で異なる作用を示し、ヌクレオチド代謝に影響を与えている可能性がある。このことから DEX 投与による *in vivo* 胸腺におけるヌクレオチド代謝物質の局在とその変化は、重要な知見となる。本研究では、DEX 投与によるヌクレオチド代謝物質の変動を多角的に捉えるため、胸部組織における MSI を行った。また DEX は多様な薬理作用と副作用を示すため、組織切片は胸腺組織だけでなく他の組織も俯瞰できる胸部組織切片を作製した。サンプル間での空間的な深度を可能な限り同等にした上で、胸腺組織を中心とした胸部組織の MSI データを得ることに成功した。MSI データを統計解析した結果、正常および DEX 投与マウス胸部組織において 82 の代謝プロファイルを取得することができた。MSI の有用性は、従来からの、組織をホモジナイズ・抽出・精製し情報を全て均一化させることはせずに、*in vivo* の状態を保ち測定できる点にある。つまり、先入観をもって組織構造や病変部位など興味領域で変動する物質を明らかにするだけでなく、先入観なしに興味領域を問わずに局在する物質を捉えることが可能になる点が MSI の有用性である。本研究では、その有用性を最大限活かすため胸部組織を作製したことで多角的に情報を得ることが可能になり、UMAP という統計解析手法を用いたことにより、予期しない情報までも引き出すことに成功し

た。これらすべての代謝プロファイルを基に MSI をヒト胸腺病変に適用することで、ステロイド薬の影響や重症筋無力症・胸腺腫のヒト胸腺を診断し、画像誘導療法としての MG の外科・内科的診断を支援することができる。

図説

図1 マウス胸腺を中心とした脈管構造

(A) ICR マウスの頭頸部マクロ画像

上半身の正中矢状断面：4本の黄線は冠状断面の深度を示し、そのHE染色切片は以下の図にi、ii、iii、ivとして示した。

(B) 主要な動脈の模式図

腹側からの模式図：*腕頭動脈、+左総頸動脈、\$左鎖骨下動脈、¶大動脈弓、#内胸動脈から胸腺に分岐する血管

(C) 胸腺周辺の動脈模式図

左側からの模式図

(D) マウス胸部の冠状断面の代表的な4つの深度

MSIでは、iiiとivの間の冠状断面にて行った。

1 骨髄、2 胸腺、3 リンパ節、4 食道、5 気管、6 肺、7 脊髄

図2 CONとDEX投与胸腺の組織学

(A) MSI測定後の胸部組織切片HE染色の光学画像

左：CON、右：DEX

1 骨髄、2 胸腺、3 リンパ節、4 食道、5 気管、6 肺、7 脊髄

(B) マウス胸腺切片の HE (a-d) 染色、TUNEL (e-h) 染色、HE 染色の二値化画像 (i-l)

スケールバー; 2.5 mm (a, e) ; 1 mm (b, f) ; 500 μ m (c, d, g, h)

c、d、g、h、k、lは、各々 a、b、e、f、i、jの拡大図 ㊦大動脈弓

図3 マウス胸部組織 MSI

(A) 質量顕微鏡から負イオンモードで得られた CON 胸部組織の平均マススペクトル m/z 250 - 900

文献 131 より注釈し代謝物質を示した。

(B) 2、3-BPG (b, f)、UDP-glucose (c, g)、UDP-HexNAc (d, h) の MSI 像
a、b は、MSI 測定後のそれぞれ CON および DEX の HE 染色を示した。

(C) プリンおよびピリミジン代謝物質の MSI 像

a-c、g-i は CON、d-f、j-l は DEX

a、d : UMP b、e : UDP c、f : UTP g、j : AMP h、k : ADP i、l : ATP

図4 マウス胸部組織 MSI より算出した EC 像

$[(ATP) + 0.5 (ADP)] / [(ATP) + (ADP) + (AMP)]$ の定義式により算出し画像化した。

CON と DEX 投与マウスのカラースケールは、ともに 9.708~82.876%

図5 胸部組織 MSI データからのクラスターマップ

(A) IMAGEREVEAL ソフトウェア UMAP (a、b) と k-means (c、d) のクラスターマップ

UMAP によって統計解析された結果の各クラスターは、RGB (赤、緑、青) を軸として 3次元空間に塗り分けて投影された (e)。 (e) で使用されている色は a、b と共通である。

(a、c) CON (b、d) DEX

(B) 脊髄の UMAP 代謝クラスター

青 (a、b)、桃 (c、d)、黄 (e、f)

g (CON)、h (DEX) は、脊髄の HE 染色像で 3つのクラスターマップとの重ね合わせ画像 (a、c、e) CON (b、d、f) DEX

(C) 胸腺の UMAP 代謝クラスター

代表的な 4つのクラスターを緑 (b)、赤 (c)、青 (d)、紫 (e) として示した。

a は、MSI 測定後のそれぞれ CON および DEX の HE 染色を示した。

f は、MSI 測定後 HE 染色像と b-e の重ね合わせ画像を示した。

図6 UMAP 代謝クラスターと TUNEL 染色像

(A) UMAP 代謝プロファイル (a, b) CON : a DEX : b

(B) TUNEL 染色像 1-4 は図 6A の拡大領域を示した。CON : 1、2 DEX : 3、4

1、3 : 骨髓、2 : 気管とリンパ節、4 : DEX 胸腺の皮質・髓質

図 7 DEX 投与によりマウス胸腺組織に顕在化された MSI 像

m/z 558.04 (a, e)、m/z 579.03 (b, f)、m/z 625.16 (c, g)、640.12 (d, h)

(a-d) : CON (e-h) : DEX

補足資料

補足資料 1 胸腺の脈管流出入部に着目したマウス胸腺冠状断面 HE 染色の連続切片

内胸動脈から胸腺への分岐する血管

補足資料 2 CON 胸部組織冠状断面切片の HE 染色像 (1)

2 : 骨髓と胸腺、3 : 内胸動脈から胸腺に分岐する血管、4 : 胸腺と大動脈と隣接する脂

肪組織、5 : リンパ節。6. 骨髓の拡大図

補足資料 3 DEX 胸部組織冠状断面切片の HE 染色像 (1)

2 : 骨髓と胸腺、3 : 内胸動脈から胸腺に分岐する血管、4 : 胸腺と大動脈と隣接する脂

肪組織、5：リンパ節、6.骨髄の拡大図

補足資料4 プリン代謝物質の MSI 像

(a-c) CON (d-f) DEX

a、d : GMP

b、e : GDP

c、f : GTP

補足資料5 プリンおよびピリミジン代謝物質の MSI 像

(a-c) および (g-i) : CON

(d-f) および (j-l) : DEX

dTMP: a、d dTDP: b、e dTTP: c、f CMP: g、j CDP: h、k CTP: i、l

補足資料6 プリン合成の中間代謝物であるイノシンーリン酸 (IMP) と ATP/ADP の

MSI 画像

(a、b) : CON (左)

(c、d) : DEX (右)

IMP: a、c ATP/ADP: b、d

補足資料 7 主成分分析

胸部組織切片の MSI データの分析では、HE 染色画像とイオン画像の重ね合わせ ROI を選択した。

ROI (a) : 骨髄 (緑)、胸腺皮質 (赤)、胸腺髄質 (シアン)、リンパ節 (紫)、食道 (オレンジ)、気管 (ピンク)、脊髄 (黄色)、脂肪組織 (ターコイズ) と血 (ローズ)

寄与率 (b) : 6 つの主成分を示した。

スコアプロット (c) : 2次元の 2 つの潜在変数 (PC1 : 38.0%、PC4 のスコア : 9.9%)

で、正常な 9 種類の組織間で良好なクラスタリングを達成できることを示した。

ローディングプロット (d) : 9 種類の組織を識別するための m/z

補足資料 8

各 3 個体の異なるマウスにおける MSI 測定後の UMAP 代謝クラスター

各個体の皮質ならびに髄質の代謝クラスターを示した。

補足表 代謝物質 MS/MS リスト

プリン・ピリミジンをはじめとした代謝物質の MS/MS フラグメントピークの m/z

補足データ

補足データ CON 胸部組織の HE 染色 連続切片

左上→右上→左下→右下の順に、頭部から尾部へ

右下の数字ページが進むごとに、頭部から尾部へ

400 枚以上ある中から 240 枚を示した。

謝辞

博士学位論文および本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました同志社大学大学院生命医科学研究科の池川雅哉教授に感謝致します。

本研究に対する貴重なご助言ならびにご指導いただきました京都大学ウイルス・再生医科学研究所の生田宏一教授、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の宮崎正輝准教授、総合研究大学院大学長の岡田泰伸先生、同志社大学大学院生命医科学研究科の祝迫恵子教授に御礼申し上げます。本研究遂行にあたり多大なご協力に多大なるご配慮をいただいた京都府立医科大学ゲノム医科学教室の田代 啓教授、質量顕微鏡の使用をはじめ共同研究の推進に関して関西医科大学薬理学講座の中邨智之教授に感謝いたします。質量顕微鏡の分析では株式会社島津製作所の山本卓志先生、松本結実先生、藤分秀司先生に、統計解析には株式会社島津製作所の山口真一先生に、基本的な技術からデータベース関連の多くの知識を頂きました。ここに深謝いたします。

引用文献

1. Caputa G, Castoldi A, Pearce EJ. Metabolic adaptations of tissue-resident immune cells. *Nat Immunol* 2019;20:793-801.
2. Artyomov MN, Van den Bossche J. Immunometabolism in the single-cell era. *Cell Metab* 2020;32:710-725.
3. Kawamoto T, Kawamoto K. Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using kawamoto's film method (2012). *Methods Mol Biol* 2014;1130:149-164.
4. Ephese Rd. Oeuvres de rufus d'ephese. In: Daremberg CM, Ruelle E. Paris: Impr. nationale; 1879.
5. Vesalius A. De humani corporis fabrica libri septem. In: *Basel: Ex officina I. Oporini*; 1543.
6. Miller JF. Analysis of the thymus influence in leukaemogenesis. *Nature* 1961;191:248-9.
7. Miller JF. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961;2:748-9.
8. Platter F. Pediatrics of the past. In: *Ruhrah J. New York: P. B. Hoeber*; 1925.
9. Prichard. Scientific intelligence. *The Dublin Journal of Medical Science* 1836;9:514-530.
10. Paltauf A. Über die beziehung der thymus zum plötzlichen tod. *Wien Klin Wochenschr* 1889;3:877-881.
11. Paltauf A. Über plötzlichen tod. *Wien Klin Wochenschr* 1890;3:172-175.
12. Rehn L. Compression from the thymus gland and resultant death. *Ann Surg* 1906;44:760-768.
13. Rontgen WC. On a new kind of rays. *Science* 1896;3:227-31.
14. Alfred F. Status lymphaticus and enlargement of the thymus; with report of a case successfully treated by the x-ray. *Archives de Pédiatrie* 1907;24:490-501.
15. Janower ML, Miettinen OS. Neoplasms after childhood irradiation of the thymus gland. *JAMA* 1971;215:753-6.
16. Hildreth NG, Shore RE, Hempelmann LH, Rosenstein M. Risk of extrathyroid tumors following radiation treatment in infancy for thymic enlargement. *Radiat Res* 1985;102:378-91.
17. Hildreth NG, Shore RE, Dvoretzky PM. The risk of breast cancer after irradiation of the thymus in infancy. *N Engl J Med* 1989;321:1281-4.
18. Editorial: The end of status lymphaticus. *THE LANCET* 1931;217:593-594.
19. Griscom NT. History of pediatric radiology in the united states and canada: Images and trends. *Radiographics* 1995;15:1399-422.
20. Young M, Turnbull HM. An analysis of the data collected by the status lymphaticus investigation committee. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1931;34:213-258.

21. Boyd E. Weight of the thymus and its component parts and number of Hassall corpuscles in health and in disease. *American Journal of Diseases of Children* 1936;51:313-335.
22. Kendall MD, Johnson HR, Singh J. The weight of the human thymus gland at necropsy. *J Anat* 1980;131:483-97.
23. Yamasaki M. Comparative anatomical studies of thyroid and thymic arteries: I. Rat (*Rattus norvegicus albinus*). *American Journal of Anatomy* 1990;188:249-259.
24. Crişan C. Die Entwicklung des thyreo-parathyreo-thymischen Systems der weißen Maus. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 1935;104:327-358.
25. Pantelouris EM, Hair J. Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice. *J Embryol Exp Morphol* 1970;24:615-23.
26. Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 2011;138:3865-3878.
27. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJT. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191:1051-1056.
28. Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, Richie ER. Cutting edge: Thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* 2002;169:2842-2845.
29. Hollander GA, Wang B, Nichogiannopoulou A et al. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* 1995;373:350-3.
30. van Ewijk W, Shores EW, Singer A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* 1994;15:214-7.
31. Philpott KL, Viney JL, Kay G et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* 1992;256:1448-52.
32. Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* 1987;2:1488-91.
33. Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M et al. Thymic B cells are licensed to present self antigens for central T cell tolerance induction. *Immunity* 2015;42:1048-61.
34. Danzl NM, Jeong S, Choi Y, Alexandropoulos K. Identification of novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by Rankl and Traf6. *PLoS One* 2014;9:e86129.
35. Park JE, Botting RA, Dominguez Conde C et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation. *Science* 2020;367.
36. Mitchell GF, Miller JF. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 1968;128:821-37.
37. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS et al. Recruitment of adult thymic progenitors is

- regulated by p-selectin and its ligand psgl-1. *Nat Immunol* 2005;6:626-34.
38. Liu C, Saito F, Liu Z et al. Coordination between ccr7- and ccr9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* 2006;108:2531-9.
 39. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. Ccr7 and ccr9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 2010;115:1897-905.
 40. Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Forster R. Cc chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 2010;115:1906-12.
 41. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 2001;194:127-34.
 42. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for t cell development. *J Exp Med* 2008;205:2507-13.
 43. Koch U, Fiorini E, Benedito R et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for notch1 during thymic t cell lineage commitment. *J Exp Med* 2008;205:2515-23.
 44. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180:1955-60.
 45. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class ii mhc only on thymic cortex. *Nature* 1996;383:81-5.
 46. Daniels MA, Teixeira E, Gill J et al. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of ras/mapk signalling. *Nature* 2006;444:724-729.
 47. Kurobe H, Liu C, Ueno T et al. Ccr7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 2006;24:165-77.
 48. Ueno T, Saito F, Gray DH et al. Ccr7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 2004;200:493-505.
 49. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: Learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2005;5:772-82.
 50. Cowan JE, Parnell SM, Nakamura K et al. The thymic medulla is required for foxp3+ regulatory but not conventional cd4+ thymocyte development. *J Exp Med* 2013;210:675-81.
 51. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on slp receptor 1. *Nature* 2004;427:355-60.
 52. West JB. Torricelli and the ocean of air: The first measurement of barometric pressure. *Physiology (Bethesda)* 2013;28:66-73.

53. Middleton WEK. The place of torricelli in the history of the barometer. *Isis* 1963;54:11-28.
54. Picard J. Experience faire a`l'observatoire sur la barometre simple touchant un nouveau phenomene qu'on ya de ´ couverte. *Le Journal des Sc, avans* 1676;4:112-113.
55. Schott K. De arte mechanica-hydraulico. Wurzburg. 1657.
56. Pumfrey S. Hauksbee, Francis (bap. 1660, d. 1713), natural philosopher and scientific instrument maker. In: Oxford University Press; 2009.
57. Faraday M. Viii. Experimental researches in electricity.—thirteenth series. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1838;128:125-168.
58. Plücker M. Xiv. On the action of the magnet upon the electrical discharge in rarefied gases. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1858;16:119-135.
59. Hittorf W. Ueber die elektricitätsleitung der gase. *Annalen der physik* 1869;212:1-31.
60. Hittorf W. Ueber die elektricitätsleitung der gase. *Annalen der physik* 1869;212:197-234.
61. Goldstein E. Xxvii. On the electric discharge in rarefied gases. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1880;10:173-190.
62. Goldstein E. Ueber eine noch nicht untersuchte strahlungsform an der kathode inducirter entladungen. *Berlin Akademie Monatsbereit* 1886;2:691.
63. Wien W. Untersuchungen über die electriche entladung in verdünnten gasen. *Annalen der Physik* 1898;301:440-452.
64. Thomson JJ. Xlvii. On rays of positive electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1907;13:561-575.
65. Aston FW. Lxxiv. A positive ray spectrograph. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1919;38:707-714.
66. Paul W, Steinwedel H. Notizen: Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung A* 1953;8.
67. Stephens WE. A pulsed mass spectrometer with time disaersion. *Phys Rev* 1946;69:691.
68. Comisarow MB, Marshall AG. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 1974;25:282-283.
69. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* 2000;72:1156-1162.
70. Dempster AJ. A new method of positive ray analysis. *Physical Review* 1918;11:316-325.
71. Munson MSB, Field FH. Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *Journal of the American Chemical Society* 1966;88:2621-2630.
72. Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler AN. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* 1981;293:270-275.

73. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 1988;60:2299-2301.
74. Tanaka K, Waki H, Ido Y et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988;2:151-153.
75. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* 1990;9:37-70.
76. Reed TB. Induction - coupled plasma torch. *Journal of Applied Physics* 1961;32:821-824.
77. Norris JL, Caprioli RM. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research. *Chem Rev* 2013;113:2309-42.
78. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG et al. The 2015 world health organization classification of lung tumors. *Journal of Thoracic Oncology* 2015;10:1243-1260.
79. Lennon VA, Lambert EH, Leiby KR, Okarma TB, Talib S. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 1991;146:2245-8.
80. Gilhus NE. Myasthenia gravis. *New England Journal of Medicine* 2016;375:2570-2581.
81. Padda SK, Yao X, Antonicelli A et al. Paraneoplastic syndromes and thymic malignancies: An examination of the international thymic malignancy interest group retrospective database. *Journal of Thoracic Oncology* 2018;13:436-446.
82. Nakajima J, Okumura M, Yano M et al. Myasthenia gravis with thymic epithelial tumour: A retrospective analysis of a japanese database. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49:1510-5.
83. Kondo K, Monden Y. Therapy for thymic epithelial tumors: A clinical study of 1,320 patients from japan. *Ann Thorac Surg* 2003;76:878-84; discussion 884-5.
84. Krantz SB. Pure red-cell aplasia. *New England Journal of Medicine* 1974;291:345-350.
85. Rosenow EC, III, Hurley BT. Disorders of the thymus: A review. *Archives of Internal Medicine* 1984;144:763-770.
86. Oppenheim H. Weiterer beitrage zur lehre von der acuten, nicht-eitrigen encephalitis und der polienccephalomyelitis. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 1899;15:1-27.
87. Schumacher & Roth. Thymektomie bei einem fall von morbus basedowi mit myasthenie.: Mitteilungen aus den Grenzgebieten der Medizin und Chirurgie, G. Fischer. 1913.
88. Blalock A, Mason MF, Morgan HJ, Riven SS. Myasthenia gravis and tumors of the thymic region: Report of a case in which the tumor was removed. *Annals of surgery* 1939;110:544-561.
89. Wolfe GI, Kaminski HJ, Aban IB et al. Randomized trial of thymectomy in myasthenia gravis. *The New England journal of medicine* 2016;375:511-522.

90. Okumura M, Inoue M, Kadota Y et al. Biological implications of thymectomy for myasthenia gravis. *Surg Today* 2010;40:102-7.
91. Ströbel P, Rosenwald A, Beyersdorf N et al. Selective loss of regulatory t cells in thymomas. *Ann Neurol* 2004;56:901-4.
92. Schlupe M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: An immunohistological study. *Ann Neurol* 1987;22:212-22.
93. Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A et al. Expression of autoimmune regulator gene (aire) and t regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol* 2007;149:504-12.
94. Scadding GK, Vincent A, Newsom-Davis J, Henry K. Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes: Correlation with thymic histology. *Neurology* 1981;31:935-43.
95. Mygland A, Vincent A, Newsom-Davis J et al. Autoantibodies in thymoma-associated myasthenia gravis with myositis or neuromyotonia. *Arch Neurol* 2000;57:527-31.
96. Leite MI, Jones M, Ströbel P et al. Myasthenia gravis thymus: Complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol* 2007;171:893-905.
97. Kadota Y, Okumura M, Miyoshi S et al. Altered t cell development in human thymoma is related to impairment of mhc class ii transactivator expression induced by interferon-gamma (ifn-gamma). *Clinical and experimental immunology* 2000;121:59-68.
98. Skeie GO, Apostolski S, Evoli A et al. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol* 2010;17:893-902.
99. Díaz-Manera J, Rojas-García R, Illa I. Treatment strategies for myasthenia gravis. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:1329-42.
100. Pascuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: Report of 116 patients. *Annals of Neurology* 1984;15:291-298.
101. Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: Thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): Report of the quality standards subcommittee of the american academy of neurology. *Neurology* 2000;55:7-15.
102. Masaoka A, Yamakawa Y, Niwa H et al. Extended thymectomy for myasthenia gravis patients: A 20-year review. *Ann Thorac Surg* 1996;62:853-9.
103. Gilhus NE. Autoimmune myasthenia gravis. *Expert Rev Neurother* 2009;9:351-8.
104. Grob D, Brunner N, Namba T, Pagala M. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2008;37:141-9.
105. Nagane Y, Suzuki S, Suzuki N, Utsugisawa K. Early aggressive treatment strategy against myasthenia gravis. *Eur Neurol* 2011;65:16-22.

106. Masuda M, Utsugisawa K, Suzuki S et al. The mg-qol15 japanese version: Validation and associations with clinical factors. *Muscle Nerve* 2012;46:166-73.
107. Sanders DB, Evoli A. Immunosuppressive therapies in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 2010;43:428-35.
108. Kawaguchi N, Kuwabara S, Nemoto Y et al. Treatment and outcome of myasthenia gravis: Retrospective multi-center analysis of 470 japanese patients, 1999-2000. *J Neurol Sci* 2004;224:43-7.
109. van den Brandt J, Wang D, Reichardt HM. Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by cd28 signaling. *Mol Endocrinol* 2004;18:687-95.
110. Verbeeck N, Caprioli RM, Van de Plas R. Unsupervised machine learning for exploratory data analysis in imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2020;39:245-291.
111. Moon KR, Stanley JS, Burkhardt D, van Dijk D, Wolf G, Krishnaswamy S. Manifold learning-based methods for analyzing single-cell rna-sequencing data. *Current Opinion in Systems Biology* 2018;7:36-46.
112. Smets T, Verbeeck N, Claesen M et al. Evaluation of distance metrics and spatial autocorrelation in uniform manifold approximation and projection applied to mass spectrometry imaging data. *Analytical Chemistry* 2019;91:5706-5714.
113. Fonville JM, Carter CL, Pizarro L et al. Hyperspectral visualization of mass spectrometry imaging data. *Analytical Chemistry* 2013;85:1415-1423.
114. McInnes L, Healy J, Saul N, Großberger L. Umap: Uniform manifold approximation and projection. *Journal of Open Source Software* 2018;3:861.
115. Ito T, Hoshino T. Influences of the gonad on the thymus in the mouse. *Zeitschrift fur Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 1963;123:490-497.
116. Kamath AB, Xu H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1997;142:367-377.
117. Takahama Y. Journey through the thymus: Stromal guides for t-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 2006;6:127-35.
118. Medina CB, Mehrotra P, Arandjelovic S et al. Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature* 2020;580:130-135.
119. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009;461:282-6.
120. Malkawi AK, Alzoubi KH, Jacob M et al. Metabolomics based profiling of dexamethasone side effects in rats. *Front Pharmacol* 2018;9:46.
121. Dahabiyeh LA, Malkawi AK, Wang X et al. Dexamethasone-induced perturbations in

- tissue metabolomics revealed by chemical isotope labeling lc-ms analysis. *Metabolites* 2020;10:42.
122. Malkawi AK, Masood A, Shinwari Z et al. Proteomic analysis of morphologically changed tissues after prolonged dexamethasone treatment. *International journal of molecular sciences* 2019;20:3122.
 123. Aghaallaei N, Bajoghli B. Making thymus visible: Understanding t-cell development from a new perspective. *Front Immunol* 2018;9:375.
 124. Vermillion-Salsbury RL, Hercules DM. 9-aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002;16:1575-1581.
 125. Edwards JL, Kennedy RT. Metabolomic analysis of eukaryotic tissue and prokaryotes using negative mode maldi time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:2201-9.
 126. Vaidyanathan S, Goodacre R. Quantitative detection of metabolites using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with 9-aminoacridine as the matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:2072-8.
 127. Amantonico A, Oh JY, Sobek J, Heinemann M, Zenobi R. Mass spectrometric method for analyzing metabolites in yeast with single cell sensitivity. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;47:5382-5.
 128. Urban PL, Amantonico A, Fagerer SR, Gehrig P, Zenobi R. Mass spectrometric method incorporating enzymatic amplification for attomole-level analysis of target metabolites in biological samples. *Chem. Commun* 2010;46:2212.
 129. Miura D, Fujimura Y, Yamato M et al. Ultrahighly sensitive in situ metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Anal Chem* 2010;82:9789-96.
 130. Fagerer SR, Nielsen S, Ibáñez A, Zenobi R. Matrix-assisted laser desorption/ionization matrices for negative mode metabolomics. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 2013;19:39-47.
 131. Kubo A, Ohmura M, Wakui M et al. Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient nog mice. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011;400:1895-1904.
 132. Shimada T, Nakanishi T, Toyama A et al. Potential implications for monitoring serum bile acid profiles in circulation with serum proteome for carbon tetrachloride-induced liver injury/regeneration model in mice. *J Proteome Res* 2010;9:4490-500.
 133. Wishart DS, Knox C, Guo AC et al. Hmdb: A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D603-10.
 134. Xue J, Guijas C, Benton HP, Warth B, Siuzdak G. Metlin ms. *Nat Methods* 2020;17:953-

- 954.
135. Tautenhahn R, Cho K, Uritboonthai W, Zhu Z, Patti GJ, Siuzdak G. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the metlin database. *Nat Biotechnol* 2012;30:826-8.
 136. Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968;7:4030-4.
 137. Swamy M, Pathak S, Grzes KM et al. Glucose and glutamine fuel protein o-glcNacylation to control t cell self-renewal and malignancy. *Nat Immunol* 2016;17:712-20.
 138. Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M et al. Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart. *Scientific Reports* 2016;6:32361.
 139. Pouw EM, Schols AM, van der Vusse GJ, Wouters EF. Elevated inosine monophosphate levels in resting muscle of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:453-7.
 140. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000;47:85-118.
 141. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M et al. A sars-cov-2-human protein-protein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing. *bioRxiv : the preprint server for biology* 2020:2020.03.22.002386.
 142. Horby P, Lim WS, Emberson JR et al. Dexamethasone in hospitalized patients with covid-19. *N Engl J Med* 2021;384:693-704.
 143. Dixit VD. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Curr Opin Immunol* 2010;22:521-8.
 144. Jeong YJ, Lee KS, Kim J, Shim YM, Han J, Kwon OJ. Does ct of thymic epithelial tumors enable us to differentiate histologic subtypes and predict prognosis? *American Journal of Roentgenology* 2004;183:283-289.
 145. Okumura M, Ohta M, Tateyama H et al. The world health organization histologic classification system reflects the oncologic behavior of thymoma: A clinical study of 273 patients. *Cancer* 2002;94:624-32.
 146. Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T. Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 1981;48:2485-92.
 147. Rosai J, Sobin LH. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. 2nd edition. Histological typing of tumours of the thymus. Springer. 1999.
 148. Rieker RJ, Hoegel J, Morresi-Hauf A et al. Histologic classification of thymic epithelial tumors: Comparison of established classification schemes. *Int J Cancer* 2002;98:900-6.

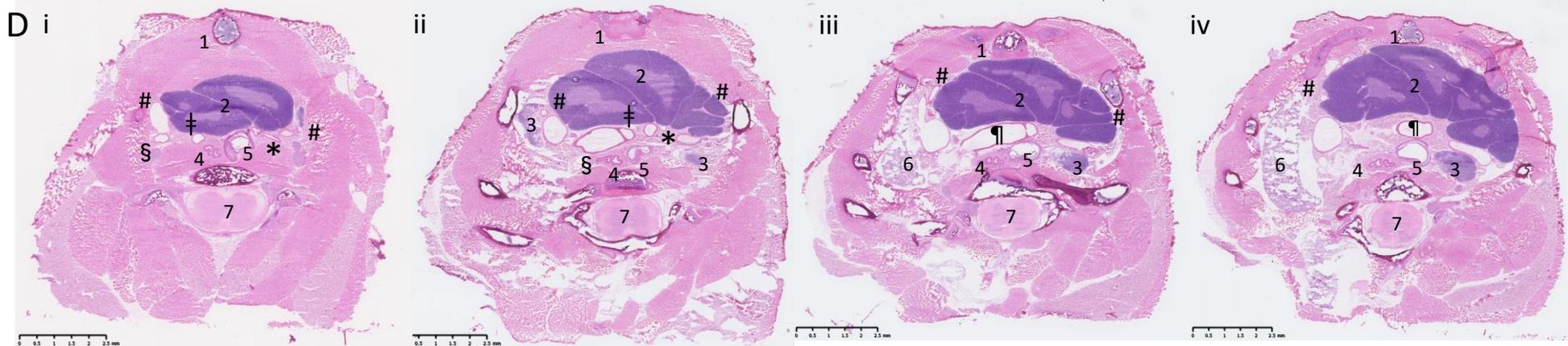
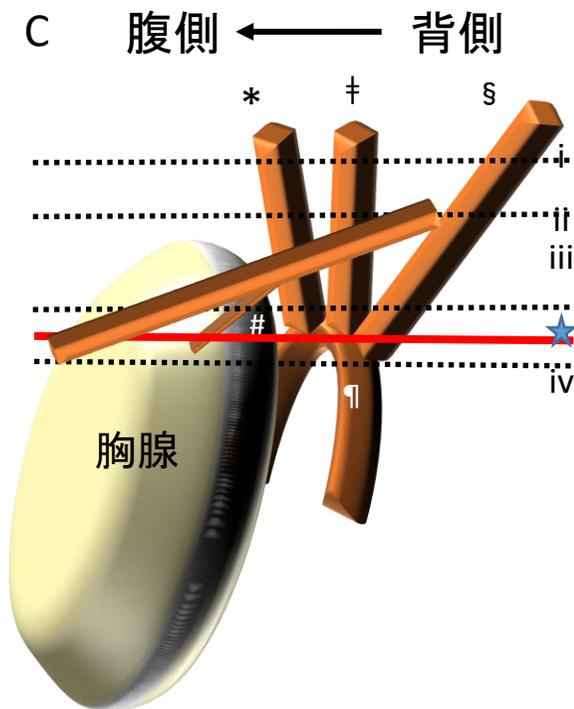
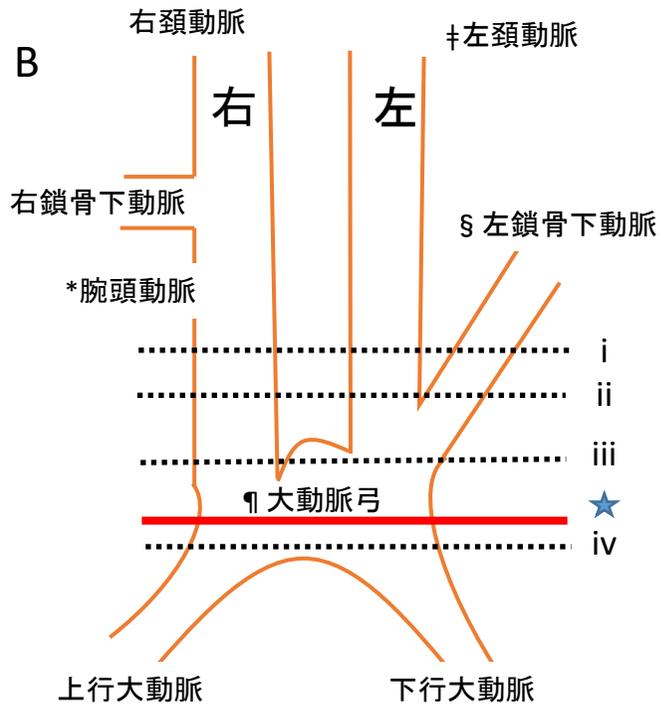
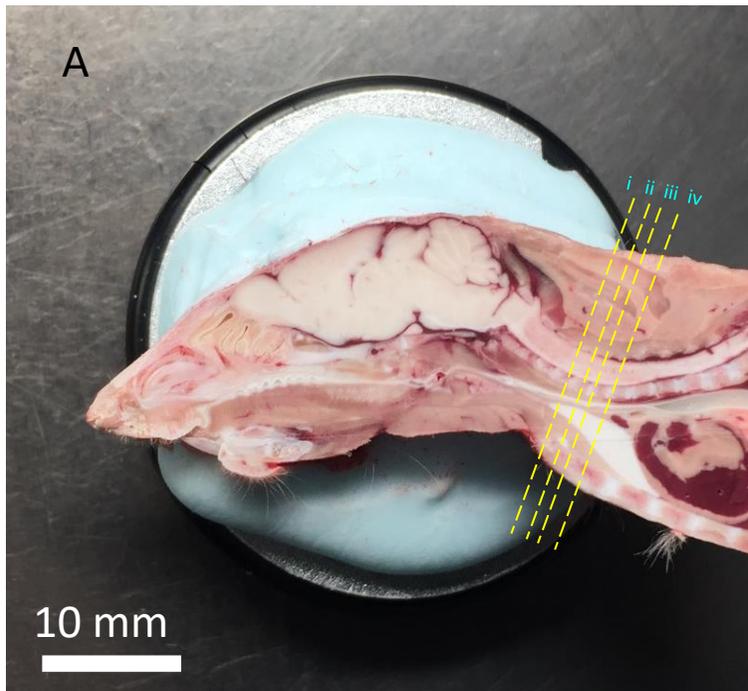


图1

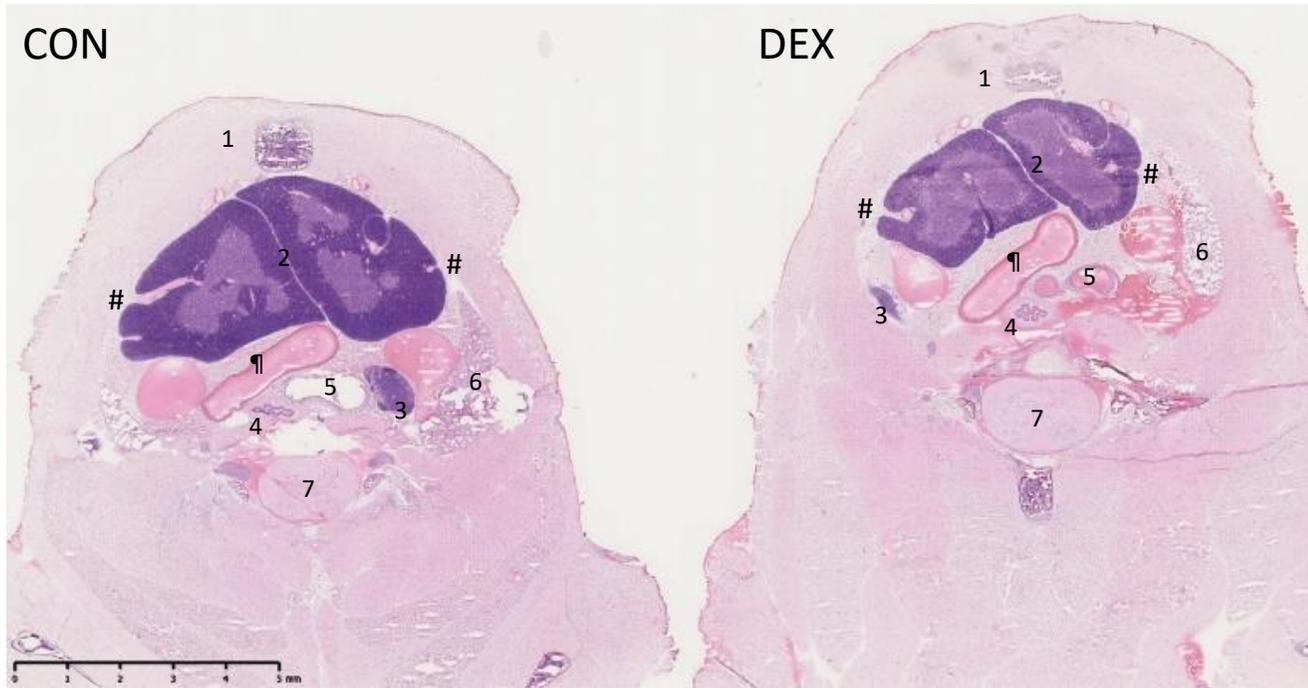


图2A

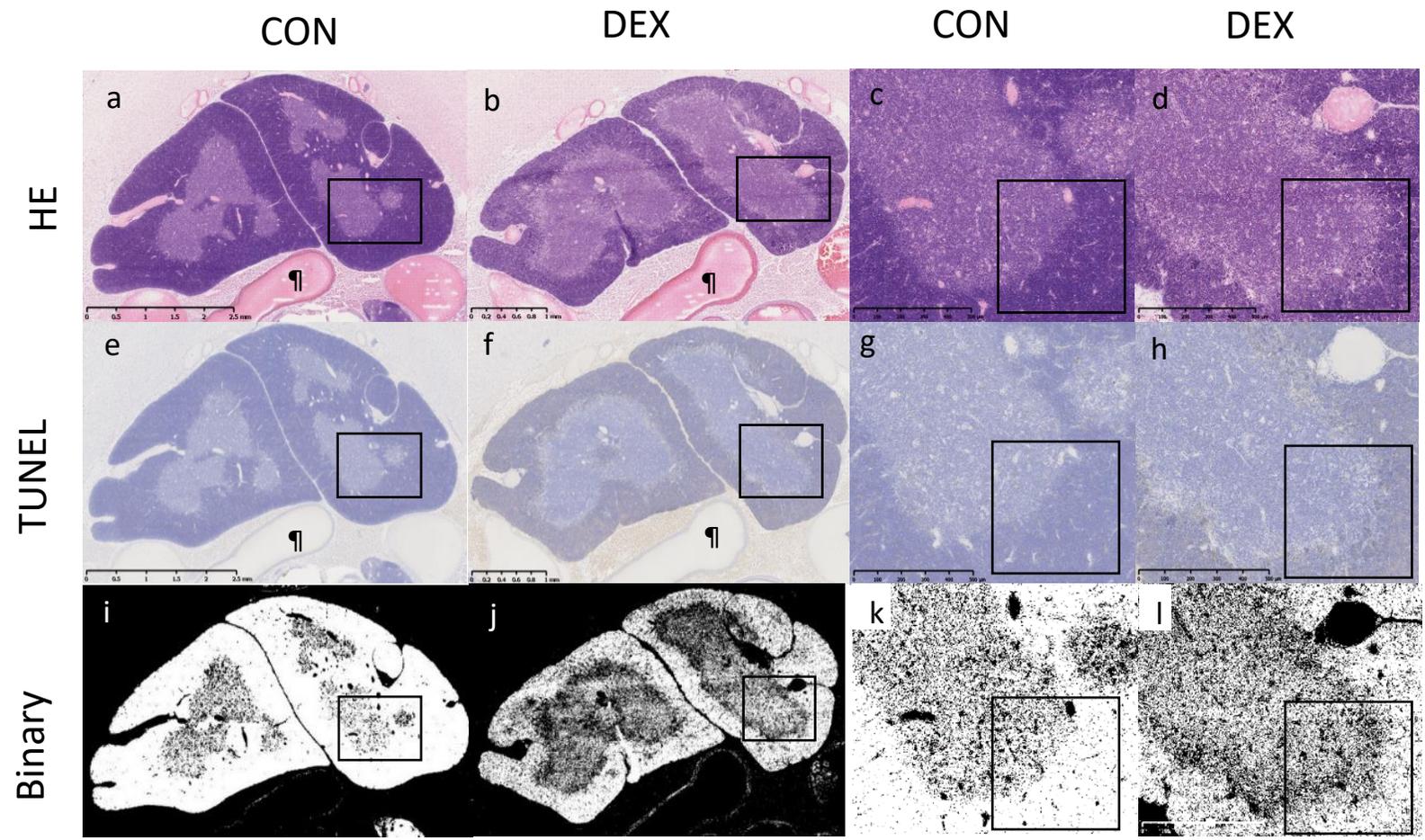
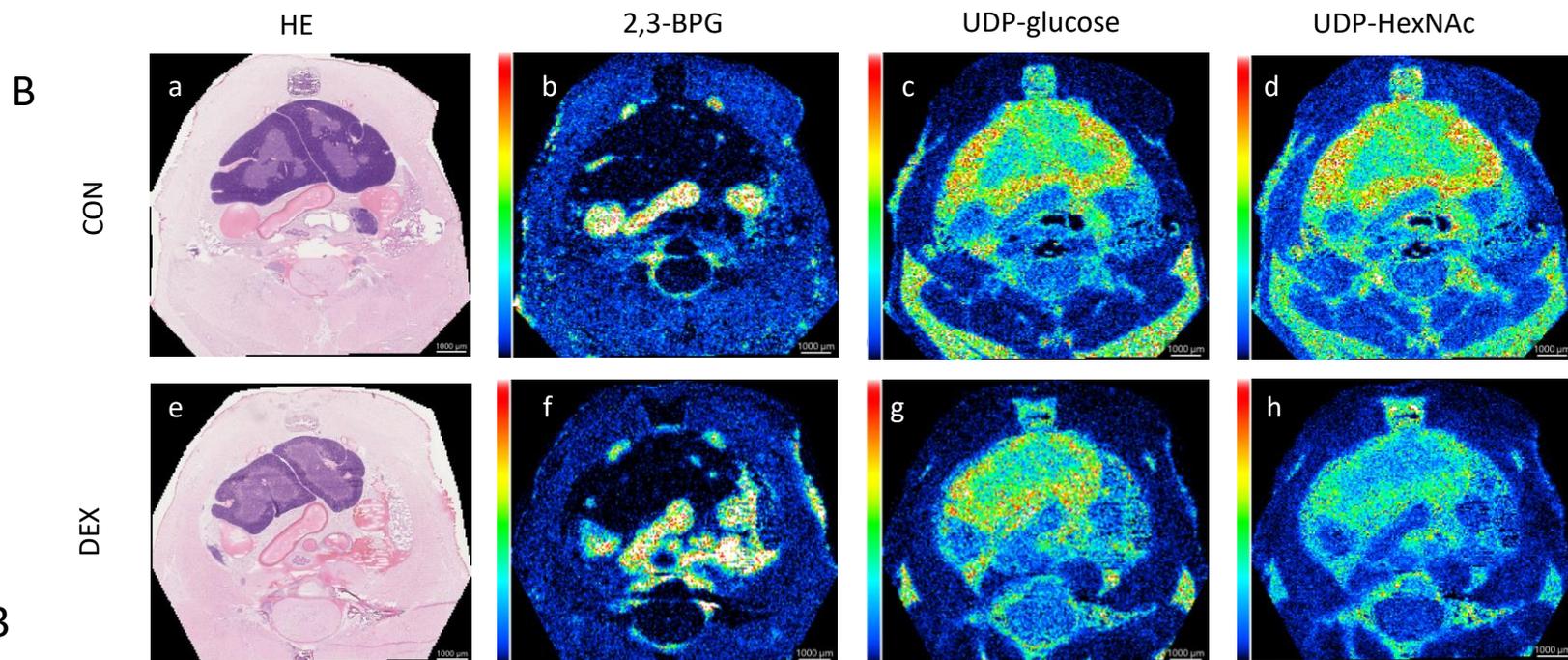
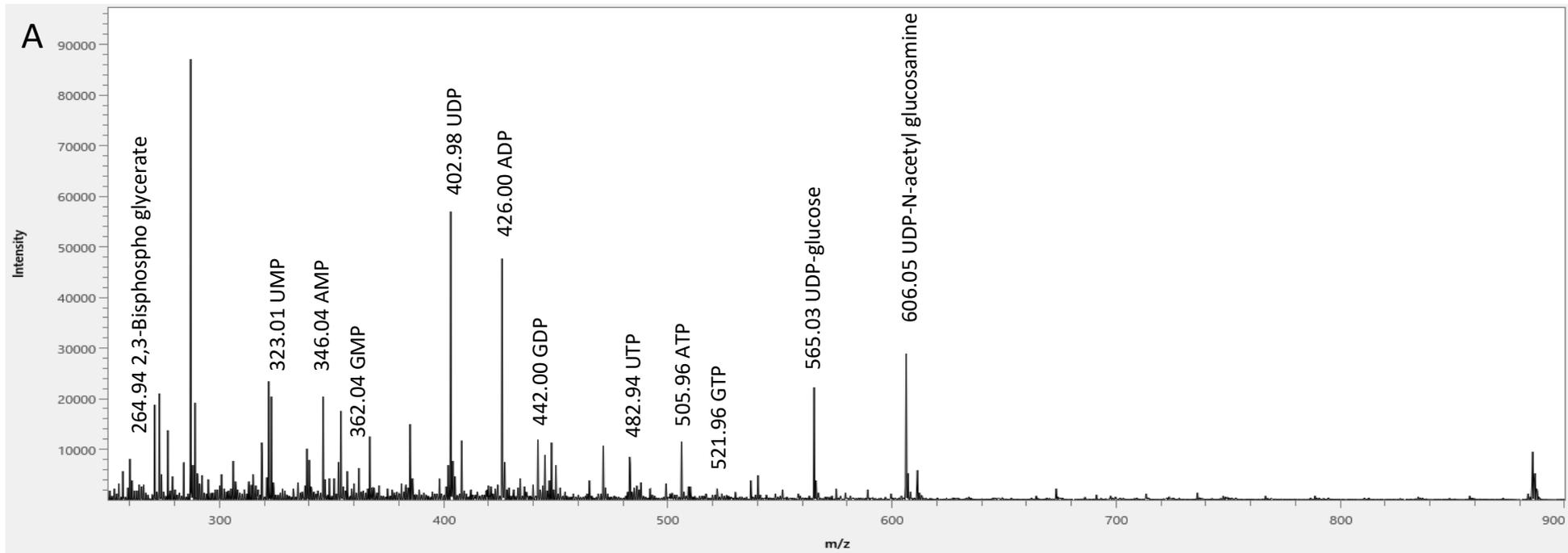
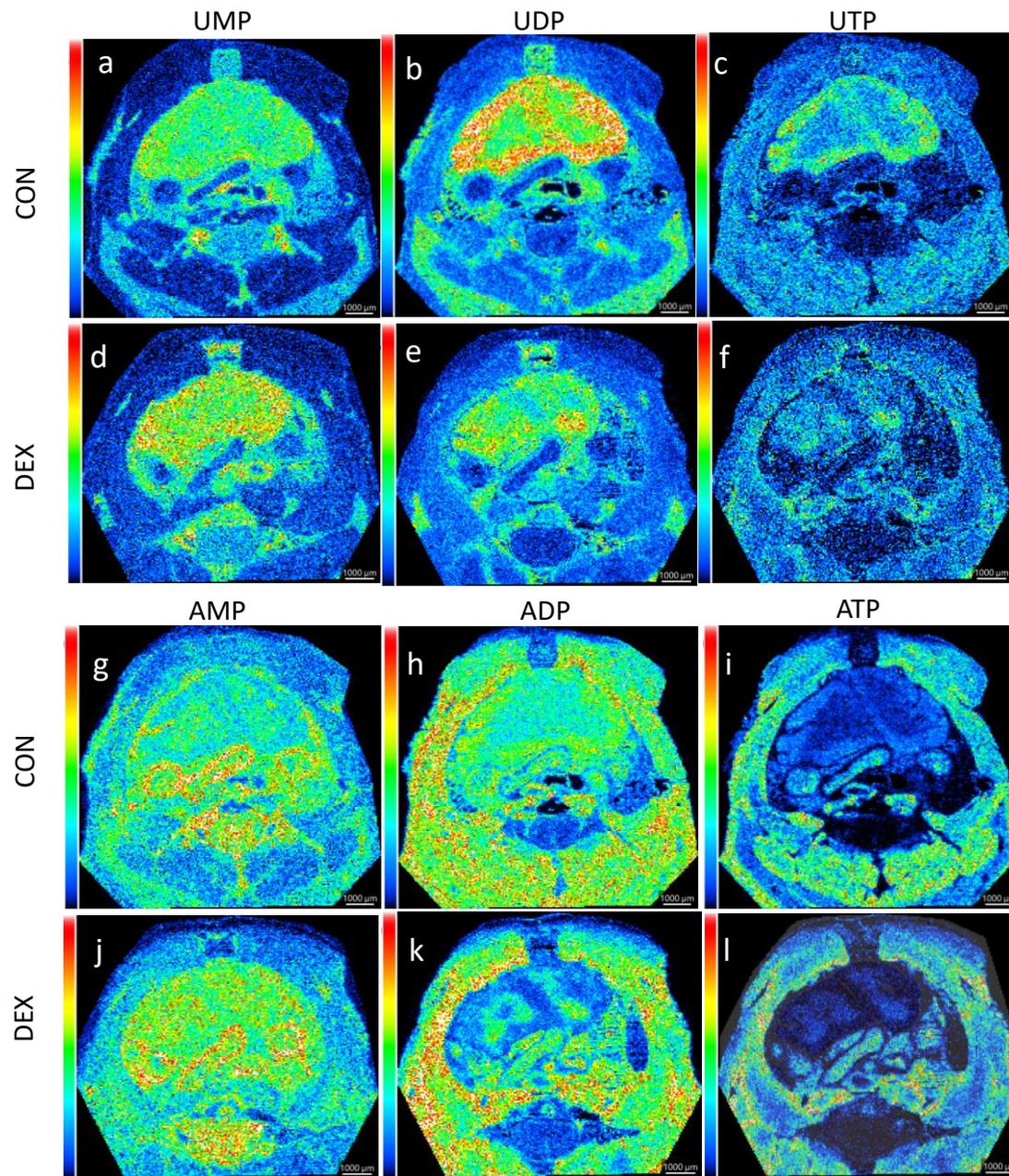


图2B





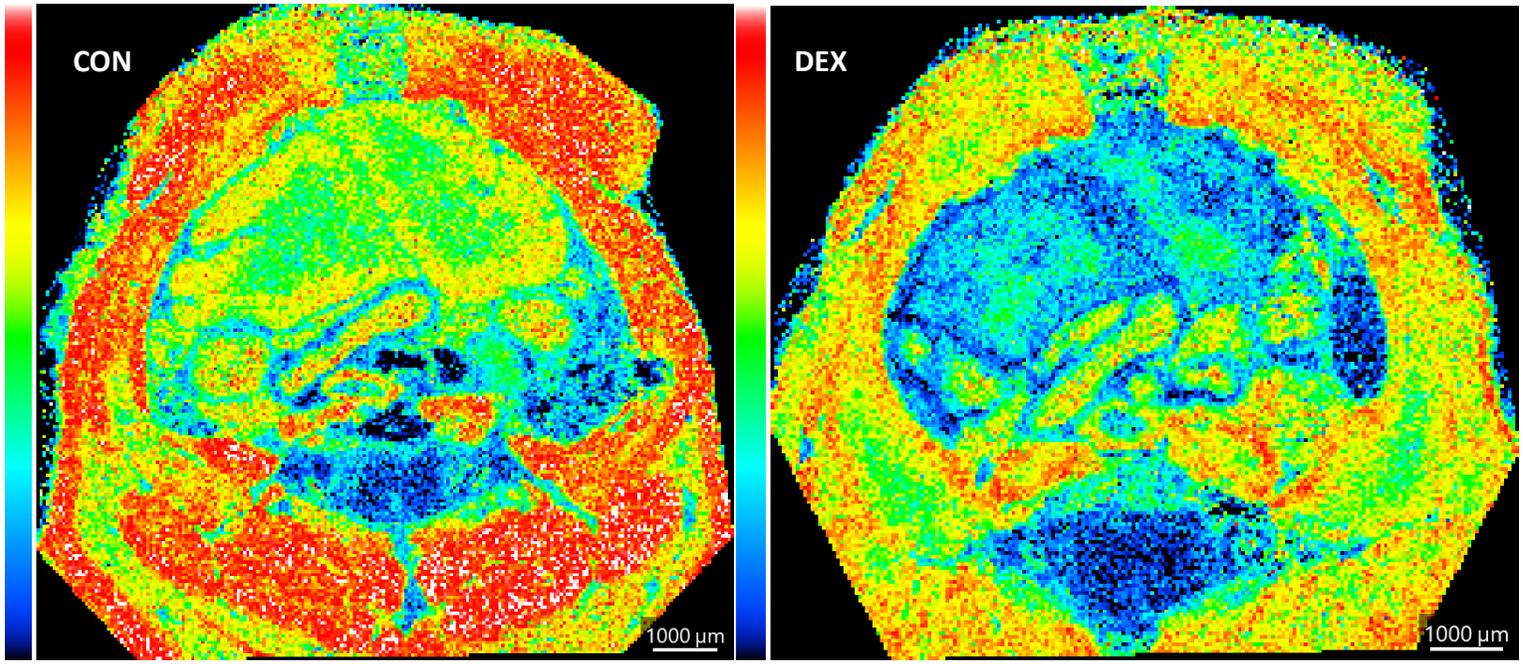
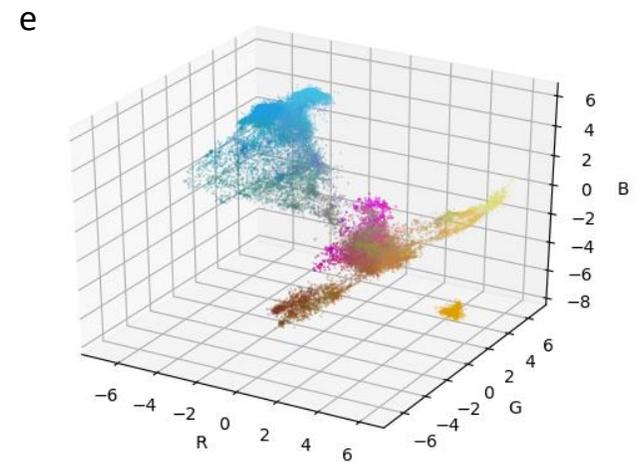
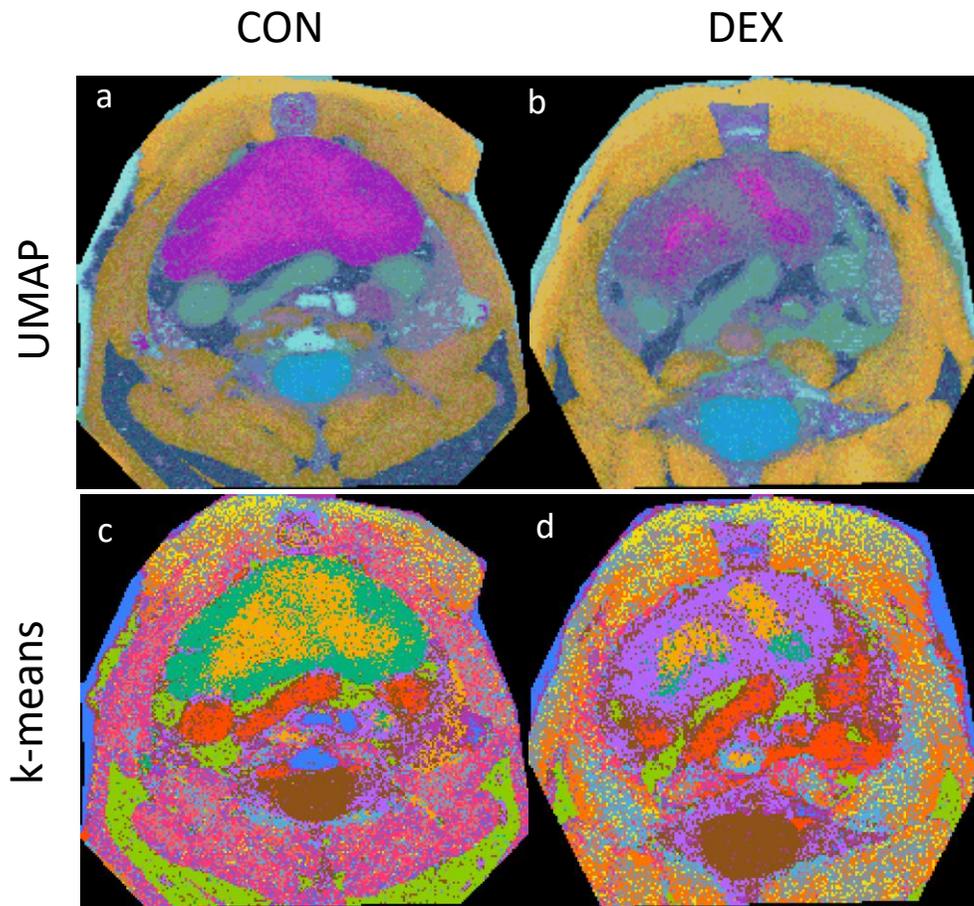
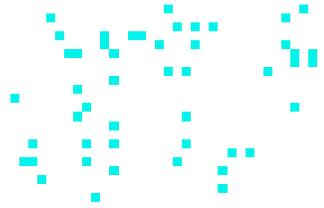


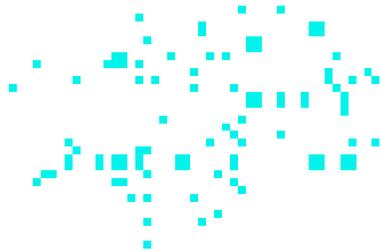
图4



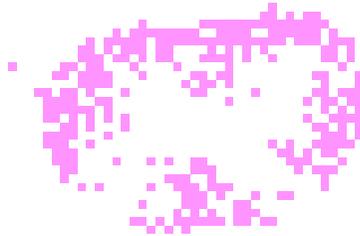
a



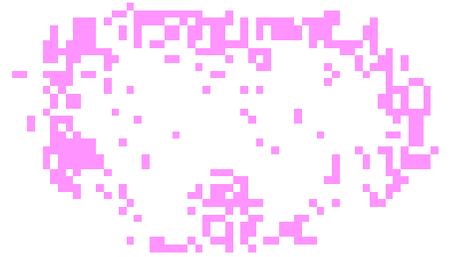
b



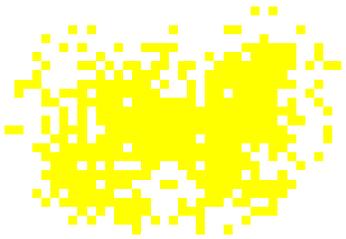
c



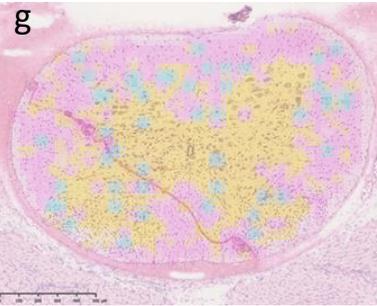
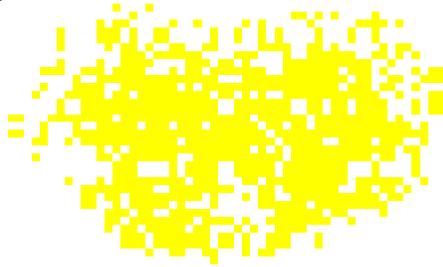
d



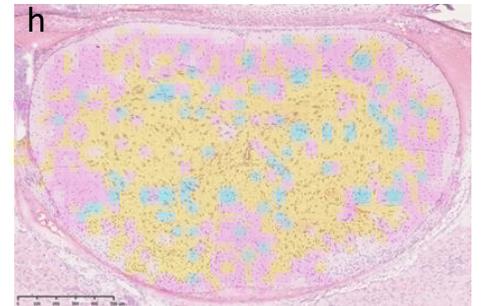
e



f



g



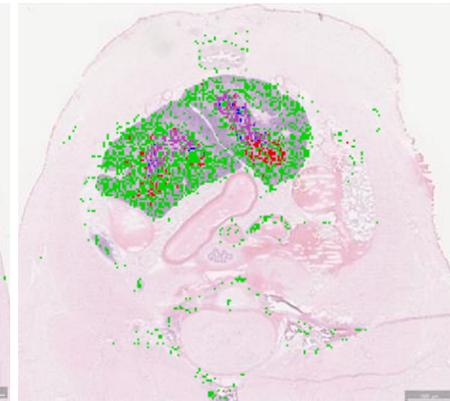
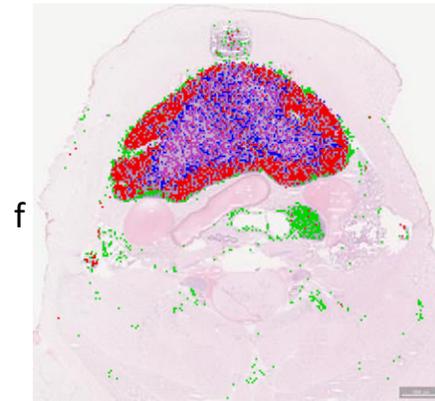
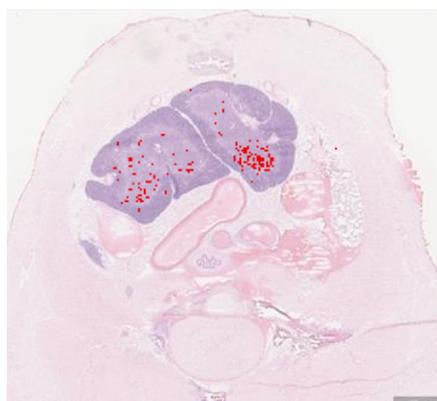
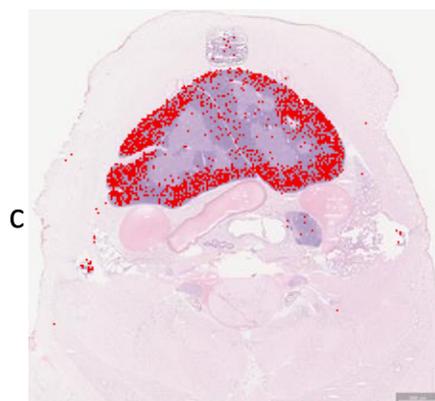
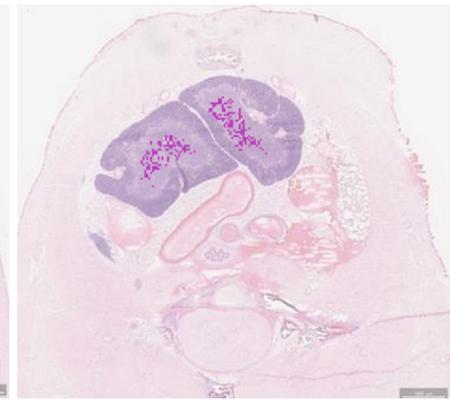
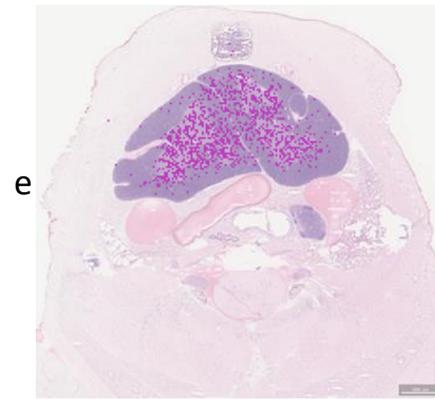
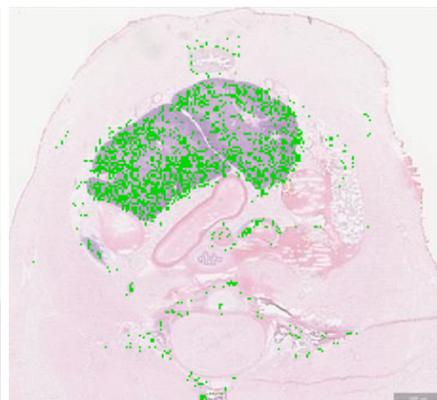
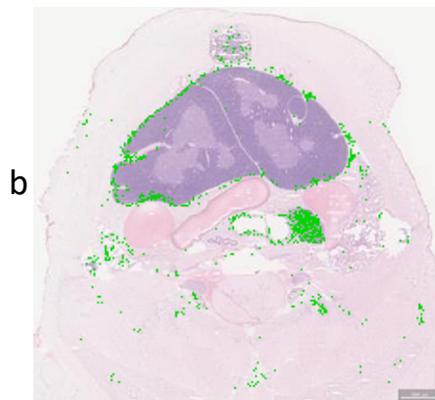
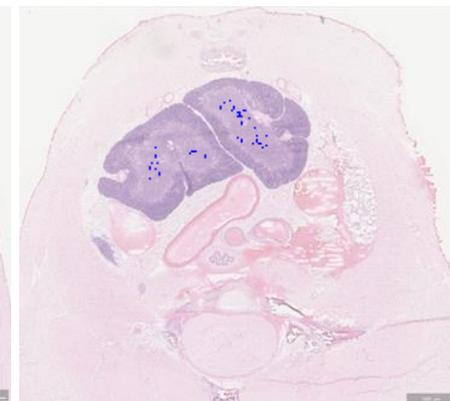
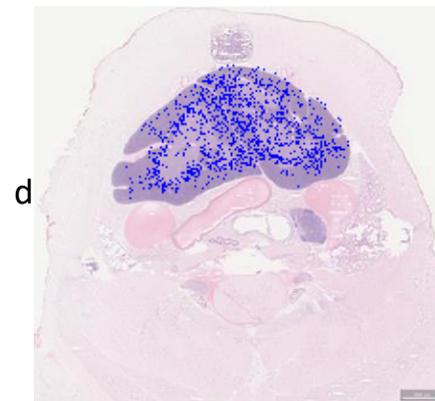
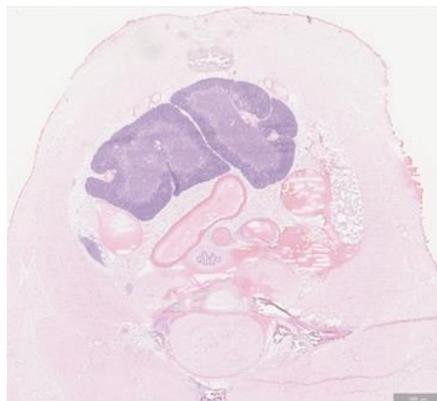
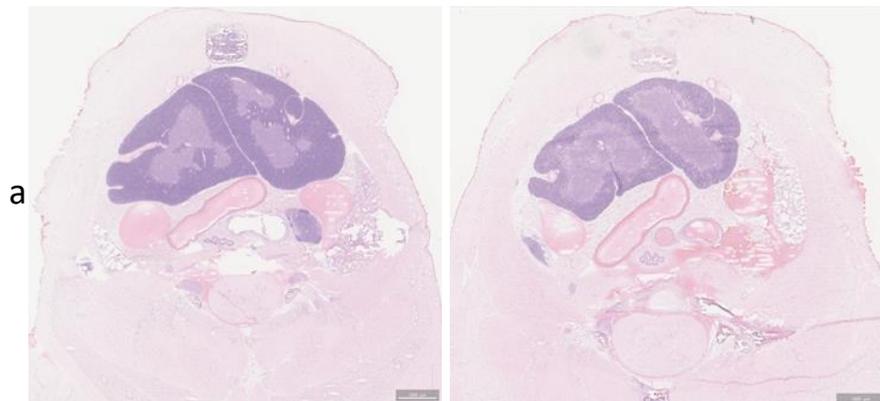
h

CON

DEX

CON

DEX



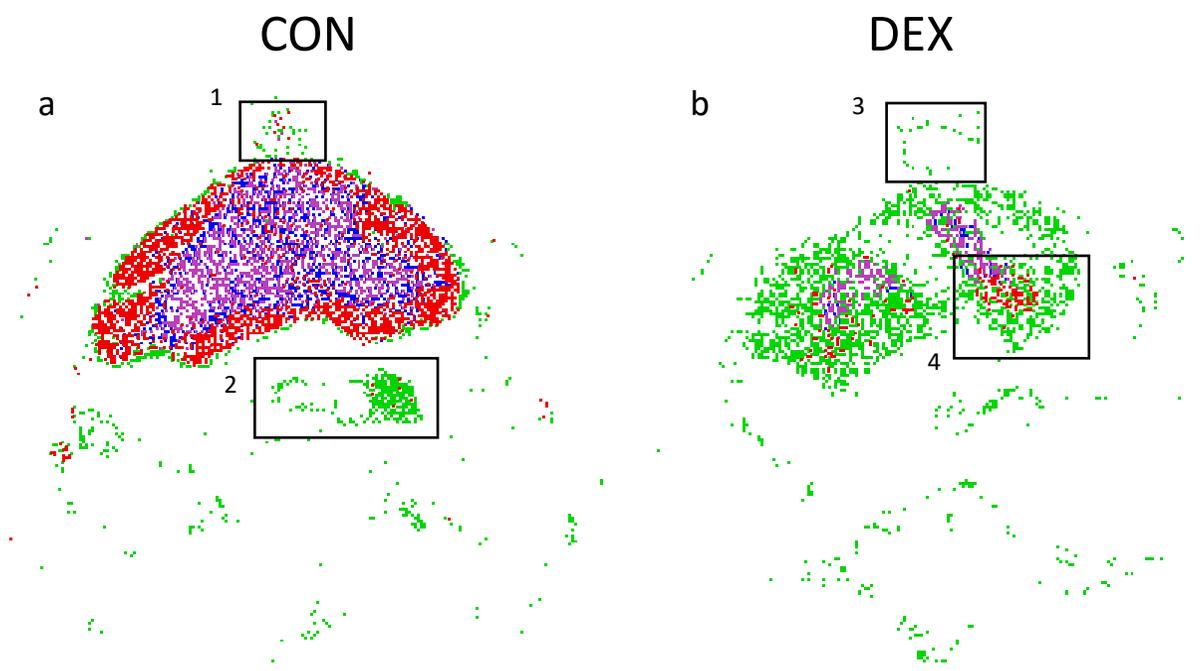
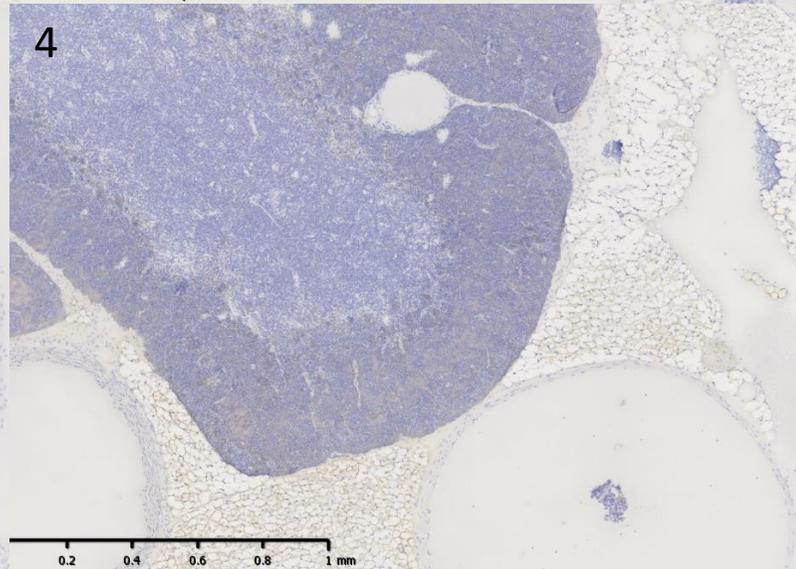
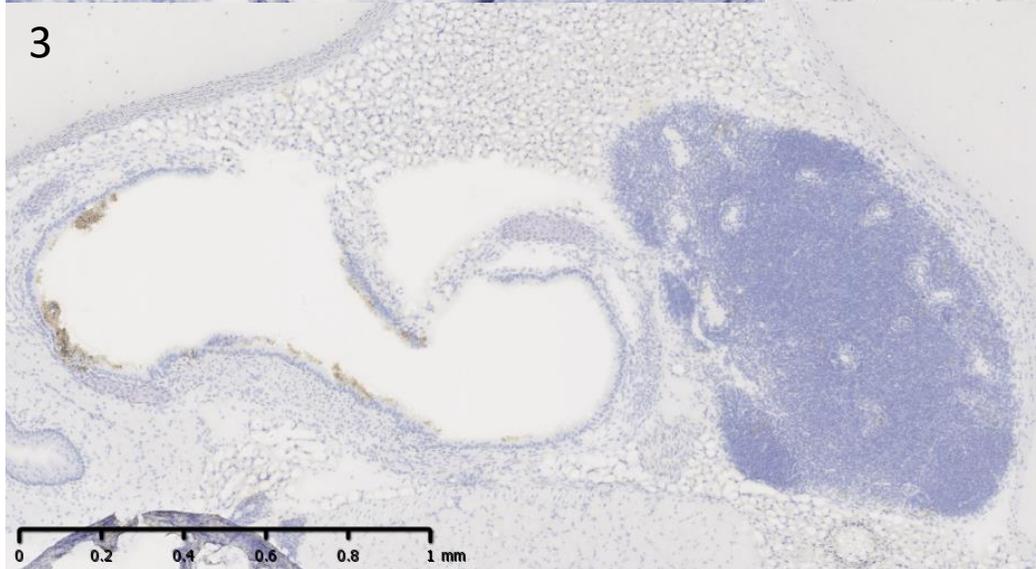
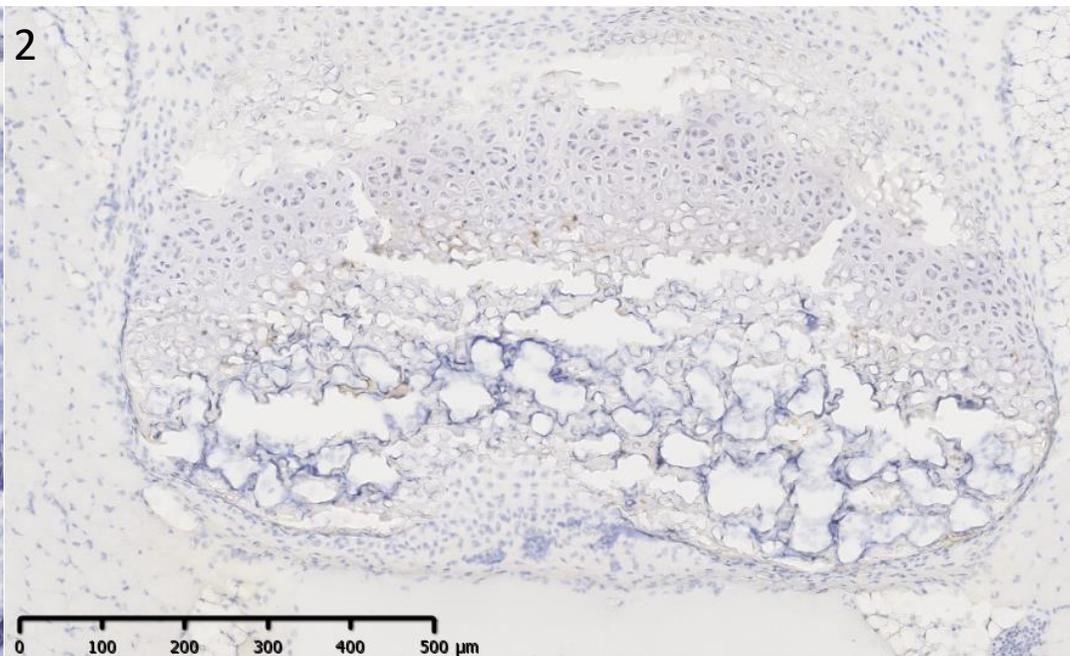
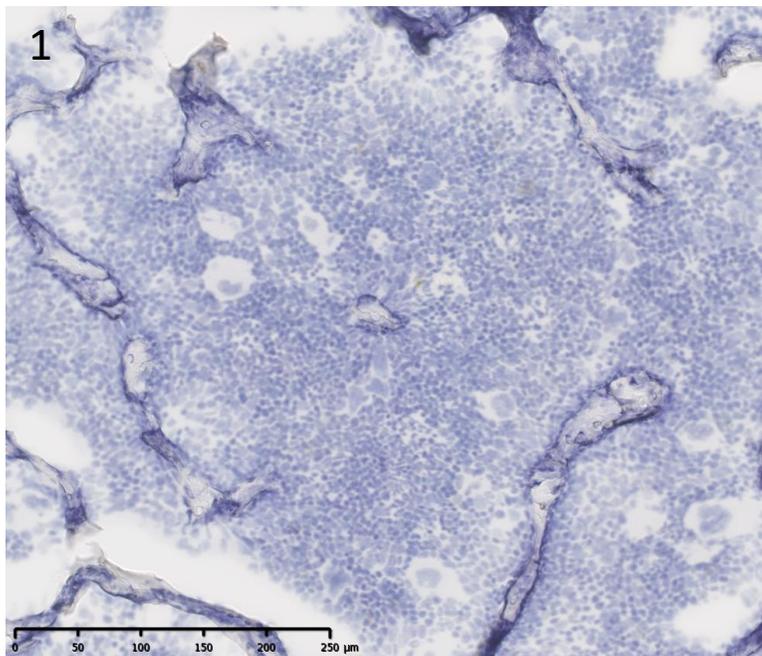
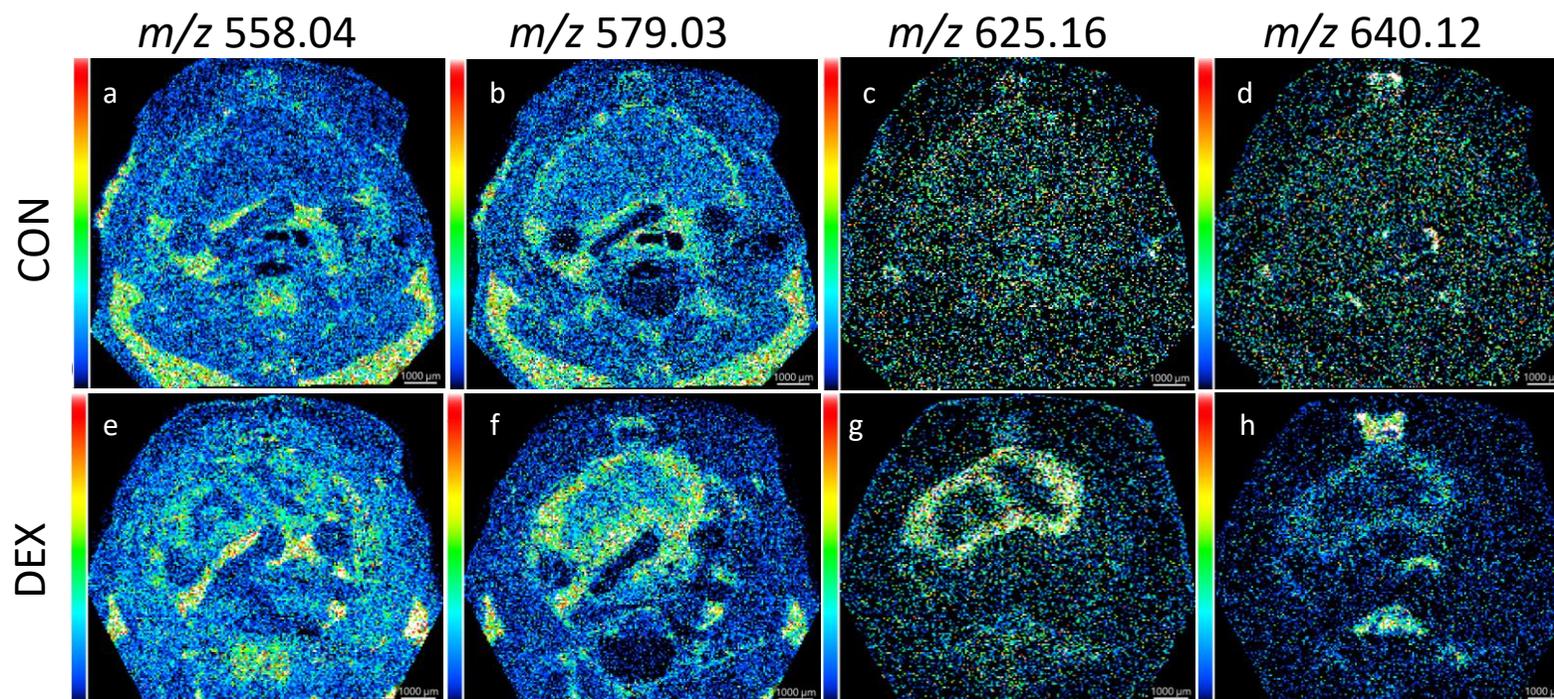
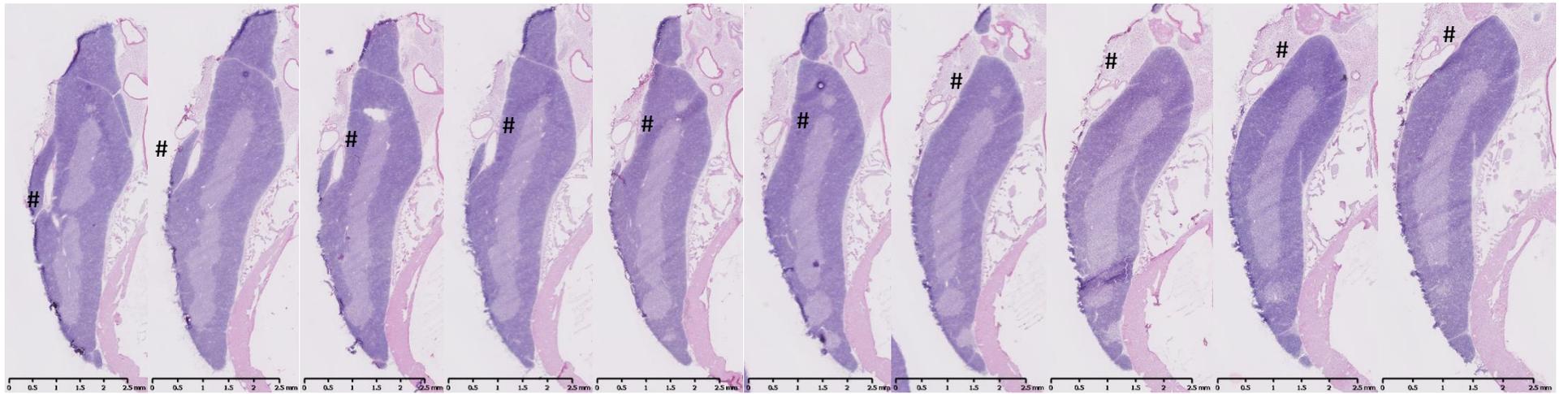
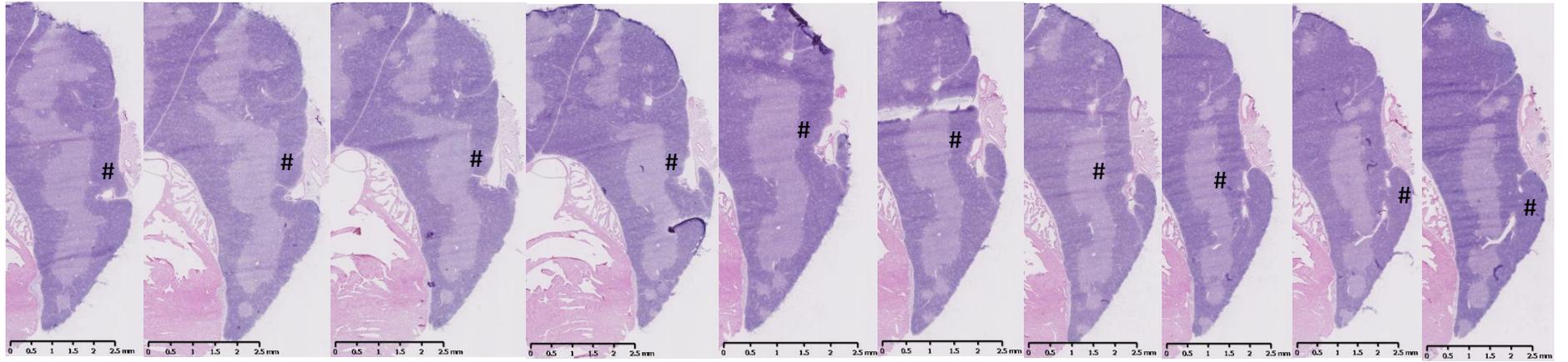


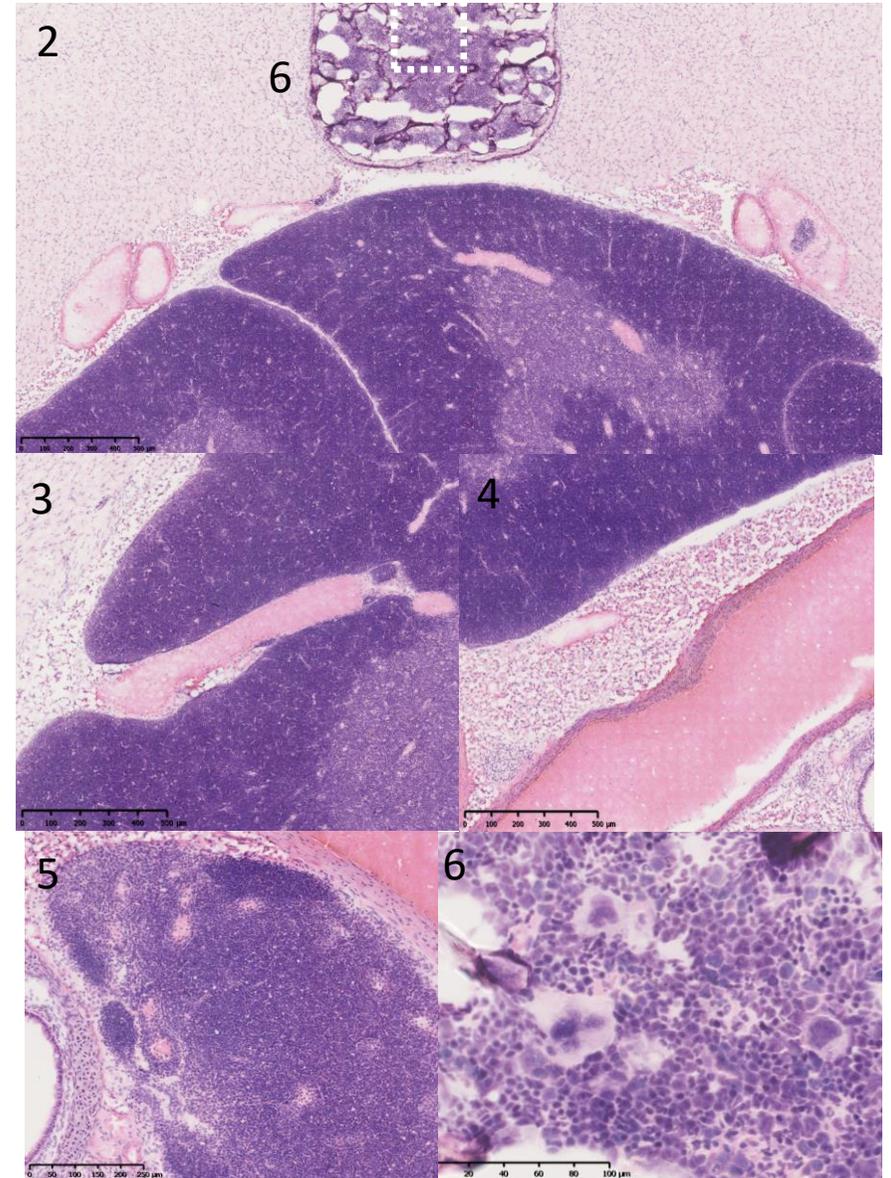
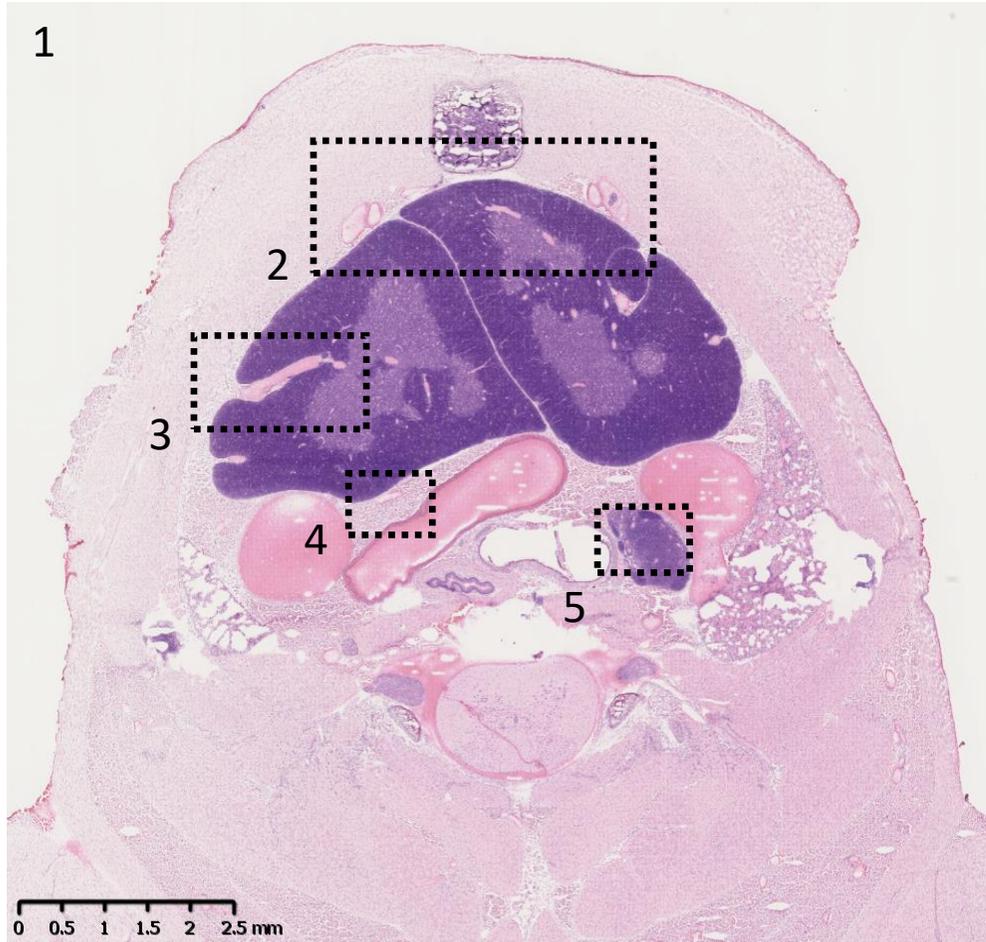
图6A



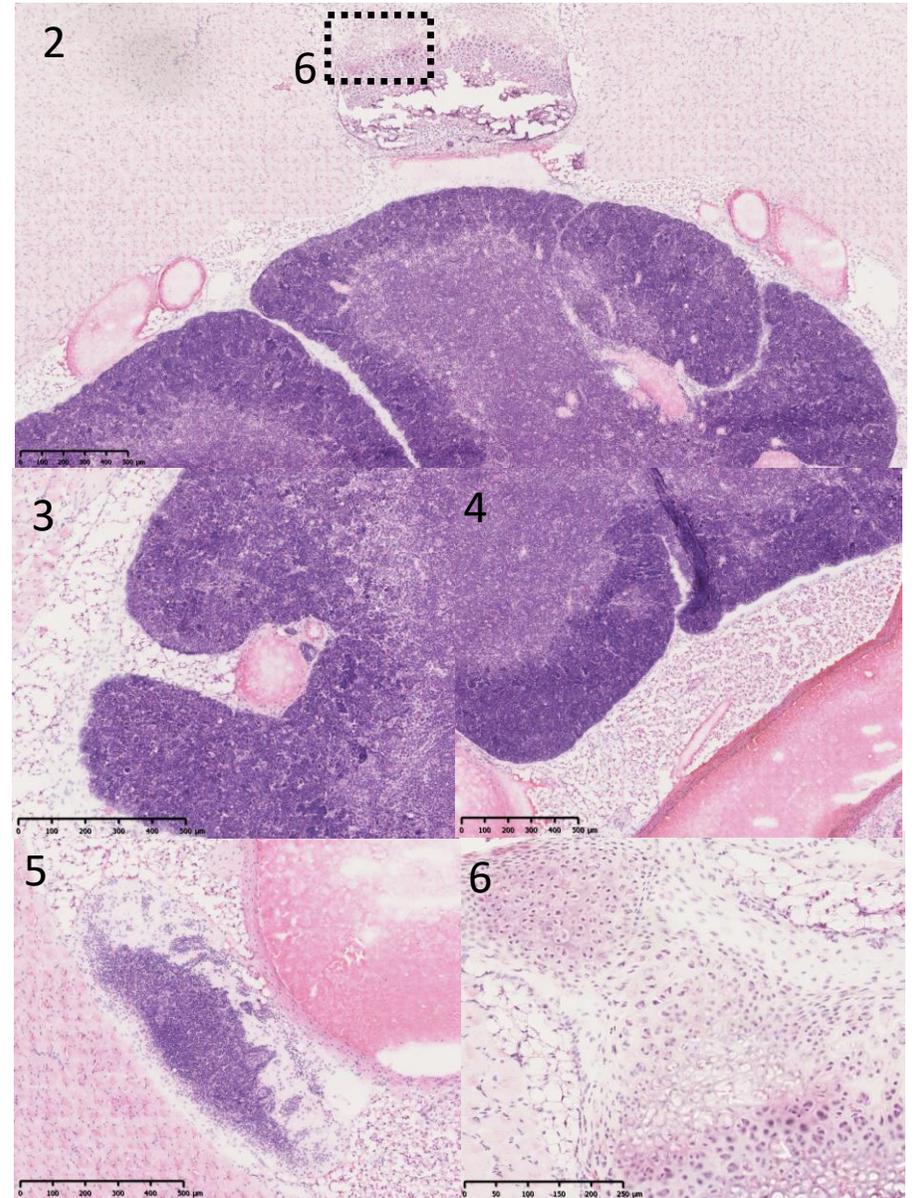
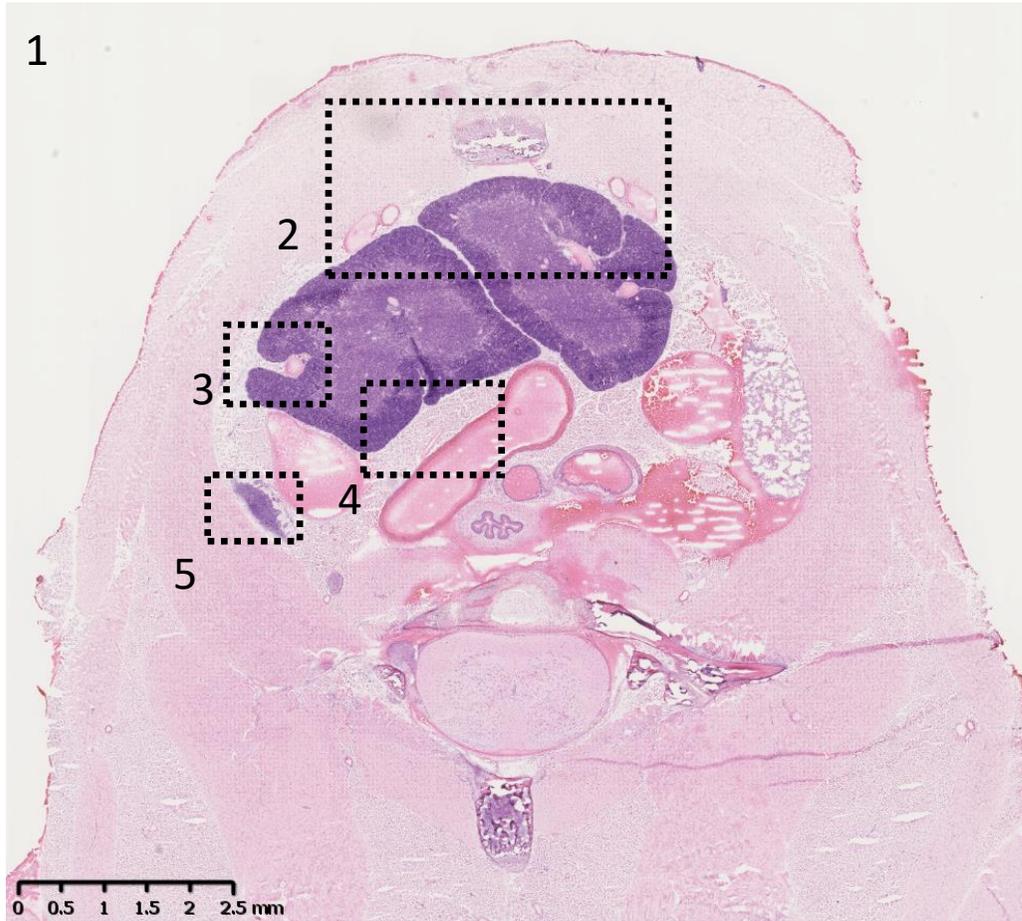




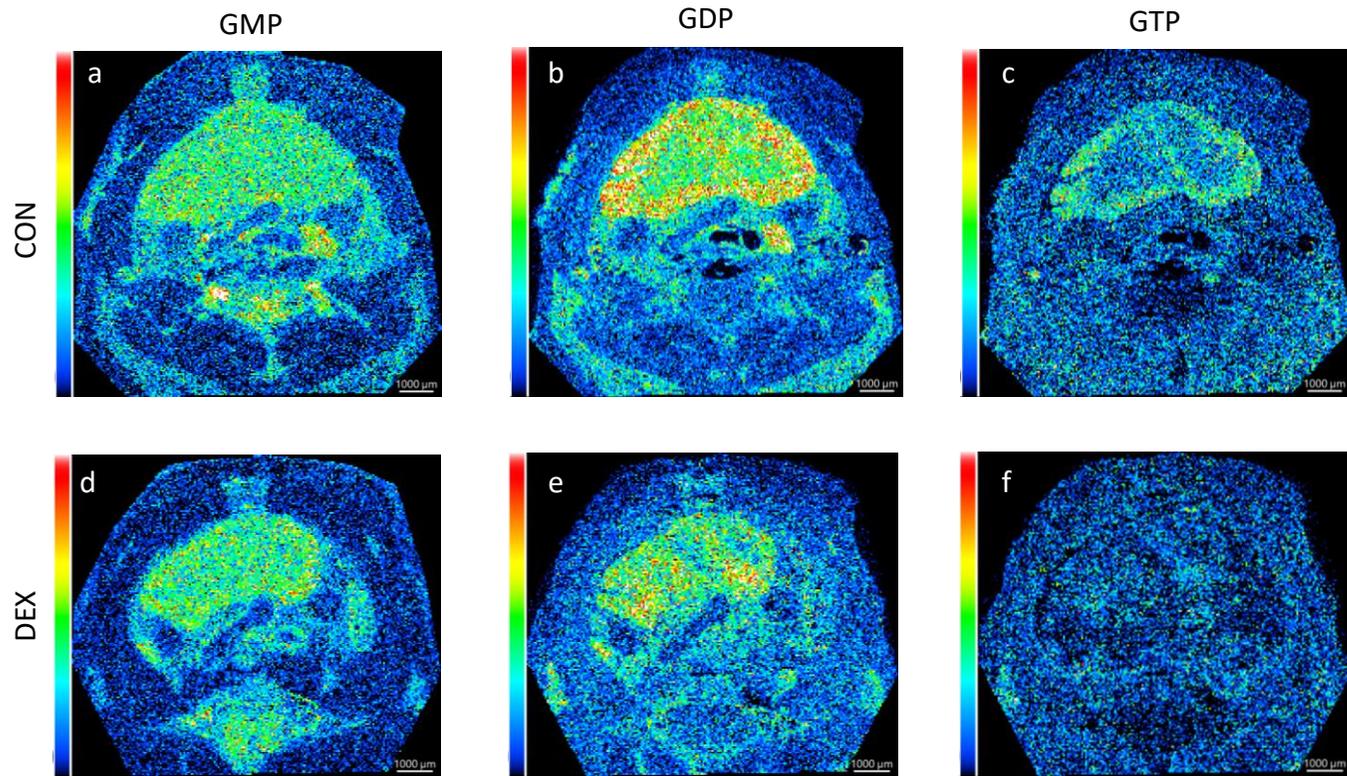
補足資料1

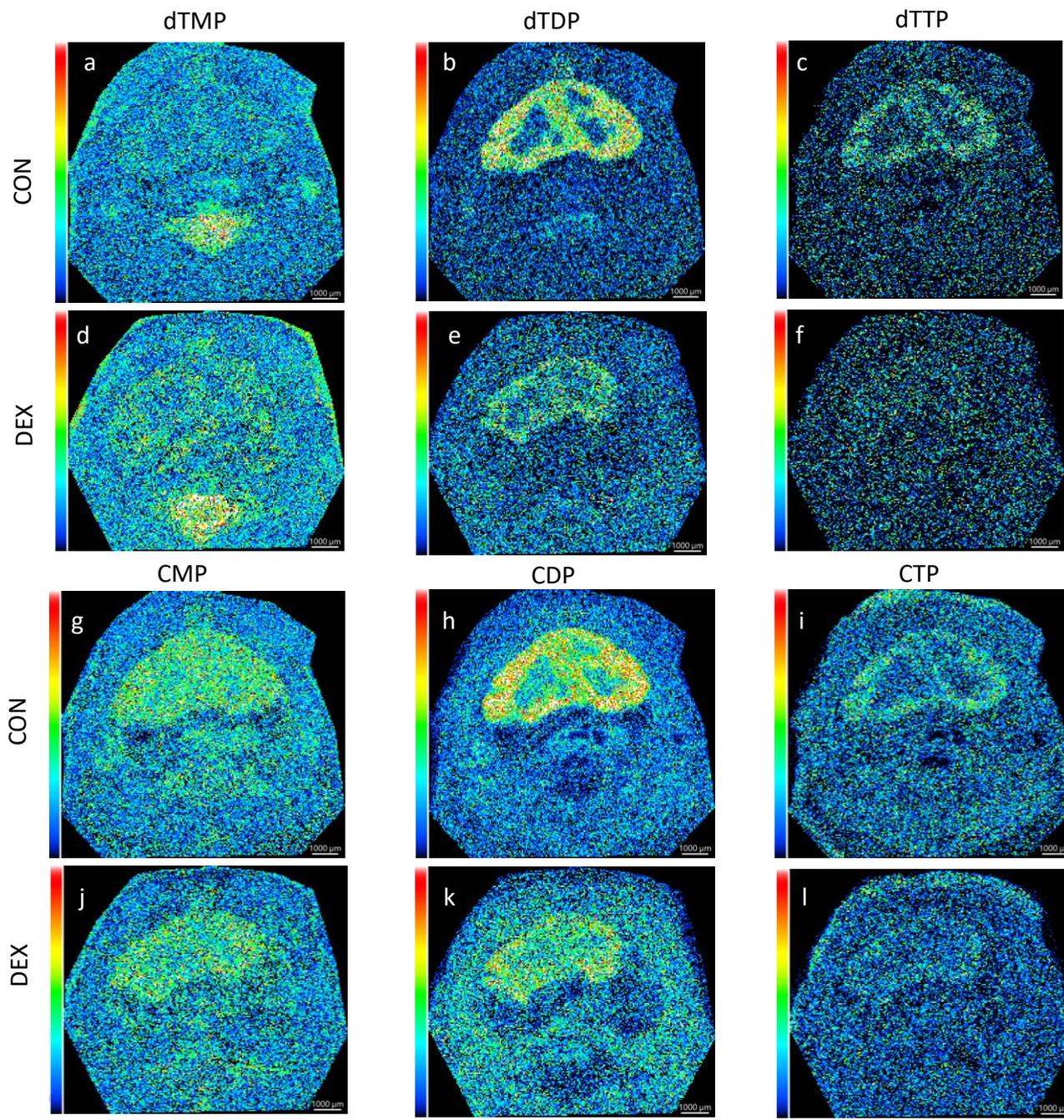


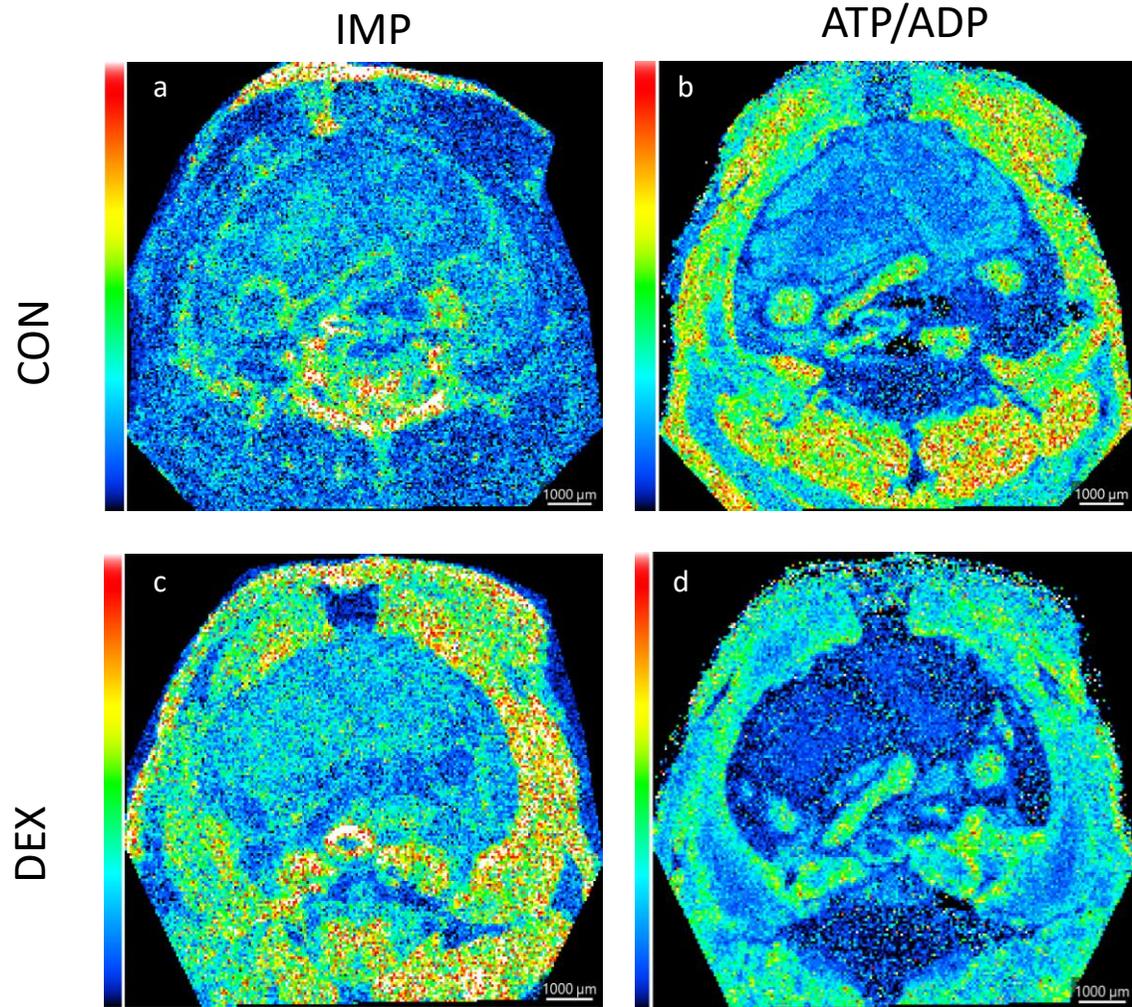
補足資料2

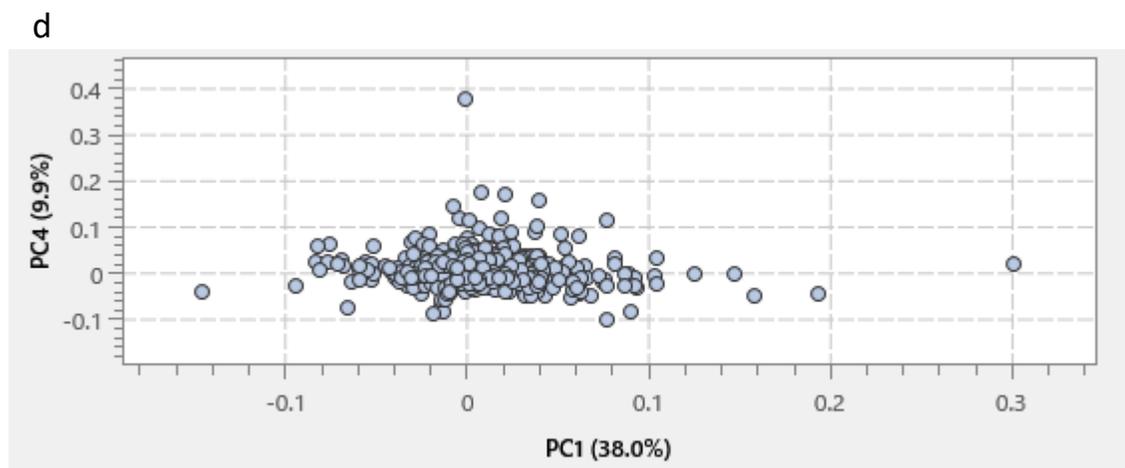
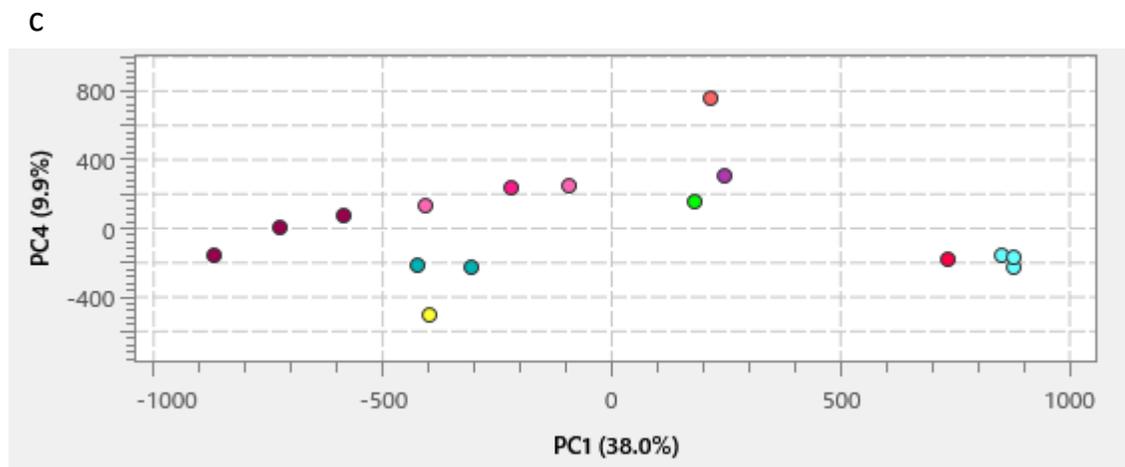
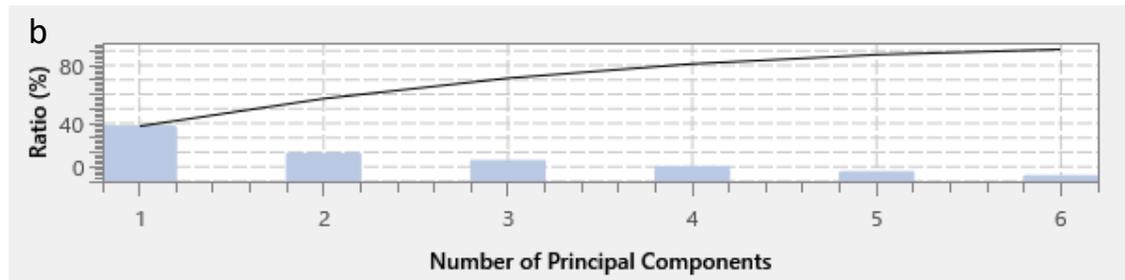
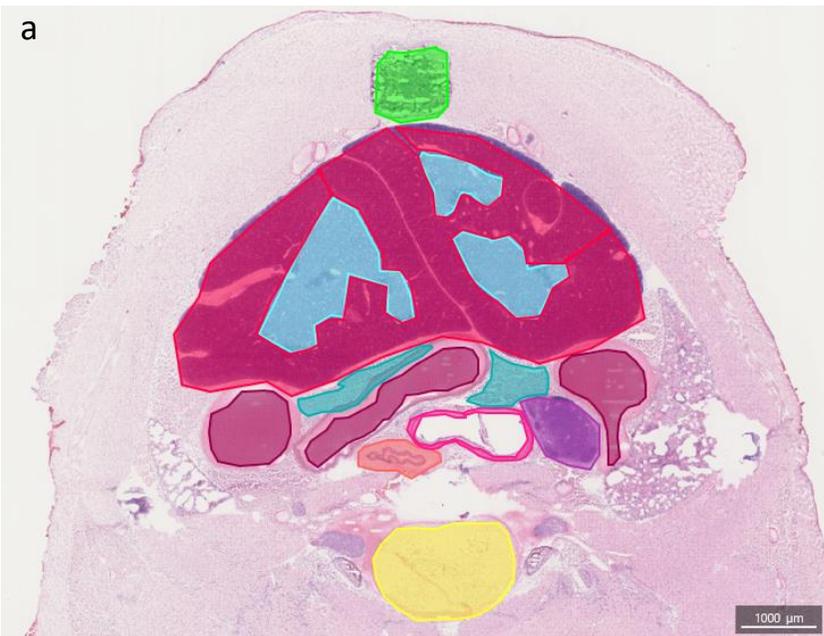


補足資料3





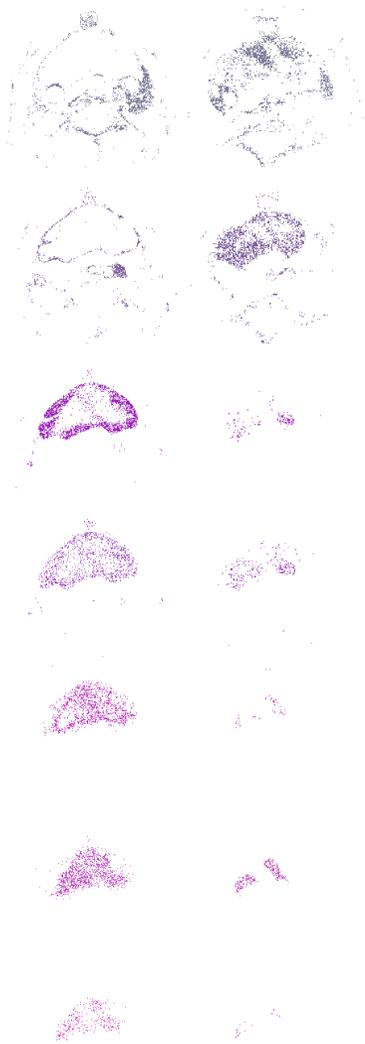




EXP-1

CON

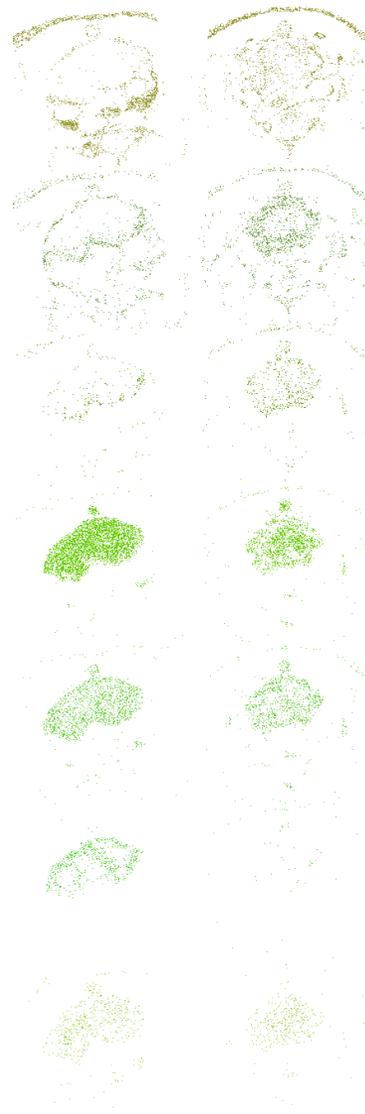
DEX



EXP-2

CON

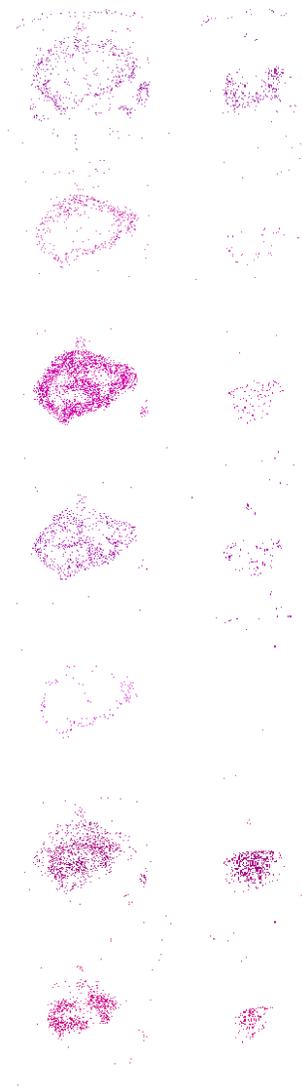
DEX



EXP-3

CON

DEX



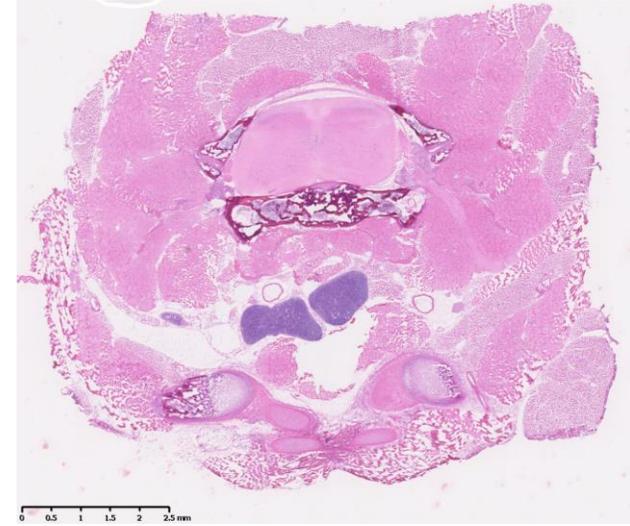
[M-H] ⁻ (m/z)	化合物	フラグメントピーク MS/MS (m/z)																							
346.04	AMP	134.04	158.92	211.03	265.90	328.05	328.80																		
426.00	ADP	79.92	134.04	158.93	176.92	290.95	292.77	328.02	346.03																
505.96	ATP	66.72	79.63	107.29	145.14	158.91	176.91	223.52	244.53	265.99	270.43	346.04	370.90	407.98	479.46	487.95									
323.01	UMP	79.16	80.75	110.55	137.23	150.97	211.15	279.18	280.01	304.97															
402.97	UDP	92.55	110.50	154.73	158.92	169.03	359.14	360.15	384.98																
482.94	UTP	158.91	169.36	176.92	183.06	241.01	257.01	384.98	401.07	406.09	439.57	452.65	464.96												
362.04	GMP	194.41	210.99	291.94	319.04	320.31	332.13	344.07																	
442.00	GDP	150.04	163.91	191.67	248.52	344.04	360.09	423.98																	
521.96	GTP	79.91	107.69	123.05	149.62	166.11	190.05	192.00	194.06	222.50	244.99	257.15	258.47	270.61	329.08	360.50	362.17	370.53	424.00	441.93	478.66	480.03	490.10	492.10	
264.94	2,3-DPG	167.02	184.93	220.93																					
565.02	UDP-glu	179.03	241.02	305.02	314.04	321.14	384.96	402.00	402.82	445.19	522.17	547.05													
606.05	UDP-GlcNAc	58.91	282.03	305.02	331.04	362.02	384.97	402.99	561.06	563.27	564.11	588.15													
558.04	ADP-ribose	83.24	134.25	148.31	176.76	211.05	322.81	346.03	392.07	407.98	425.99	439.57	512.15	540.08	558.12										

補足表1

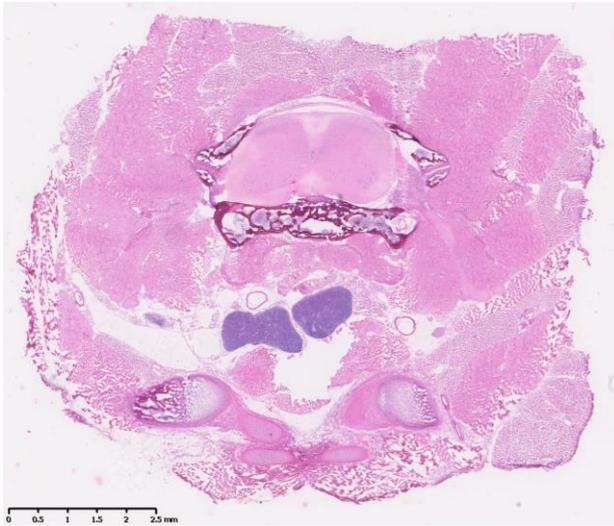
胸部組織のHE染色 連続切片



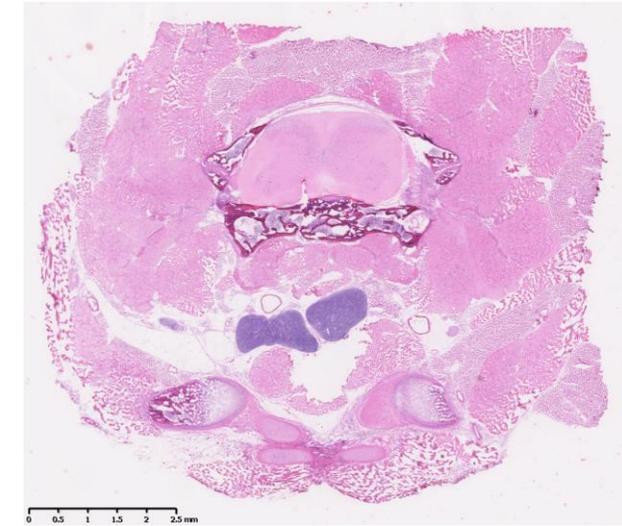
胸部組織 (1)



胸部組織 (2)



胸部組織 (3)



胸部組織 (4)

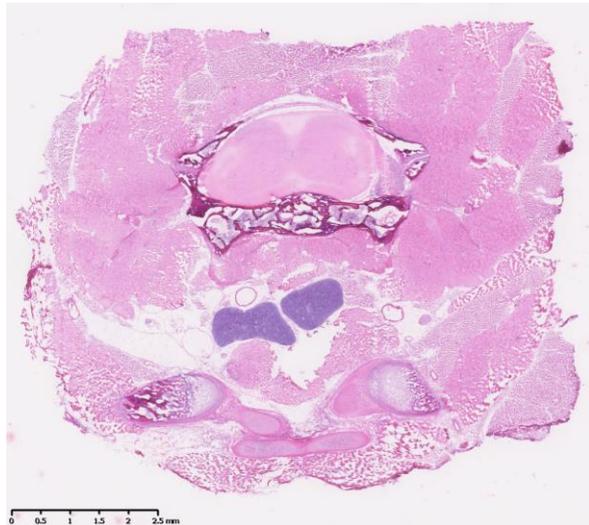
胸部組織のHE染色 連続切片



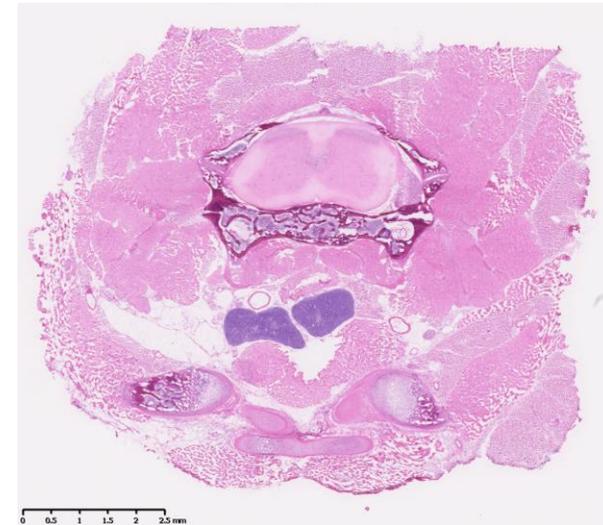
胸部組織 (5)



胸部組織 (6)

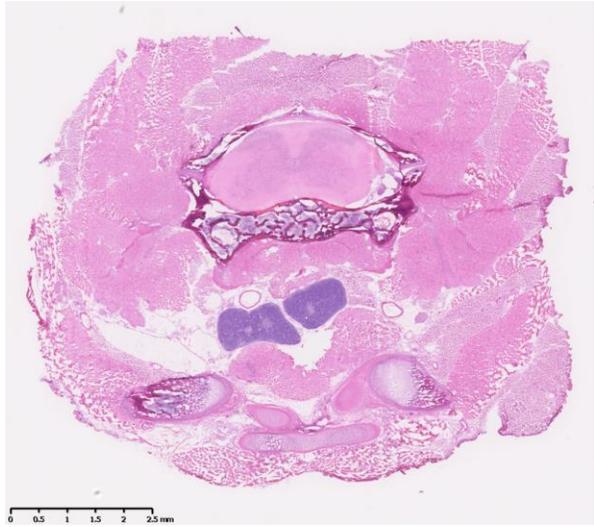


胸部組織 (7)

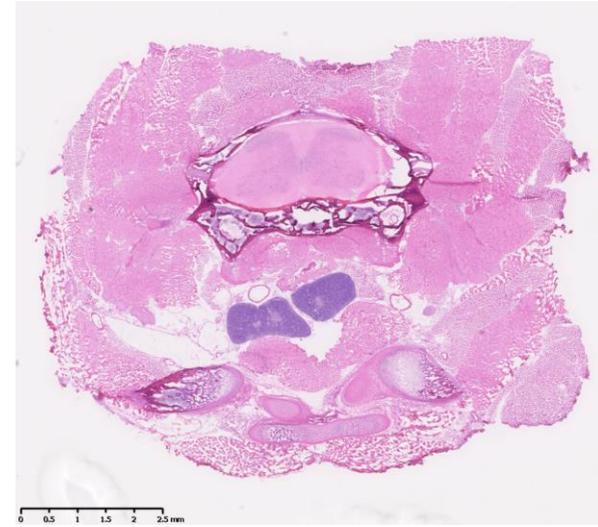


胸部組織 (8)

胸部組織のHE染色 連続切片



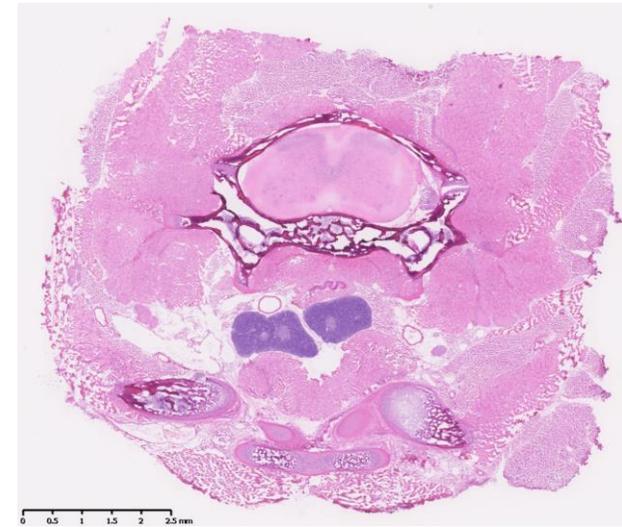
胸部組織 (9)



胸部組織 (10)

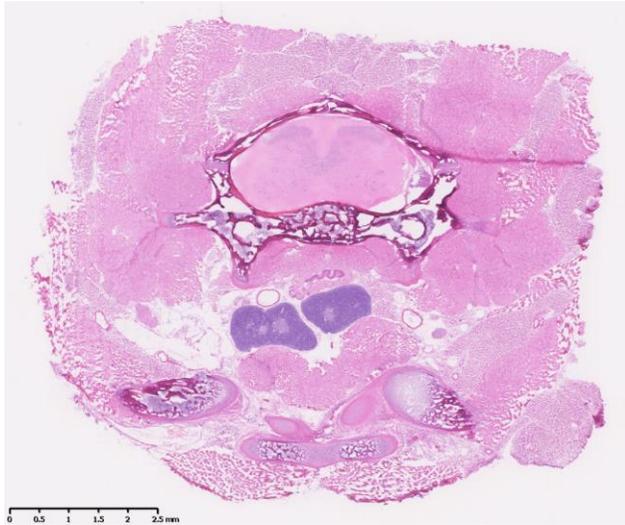


胸部組織 (11)



胸部組織 (12)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (13)



胸部組織 (14)

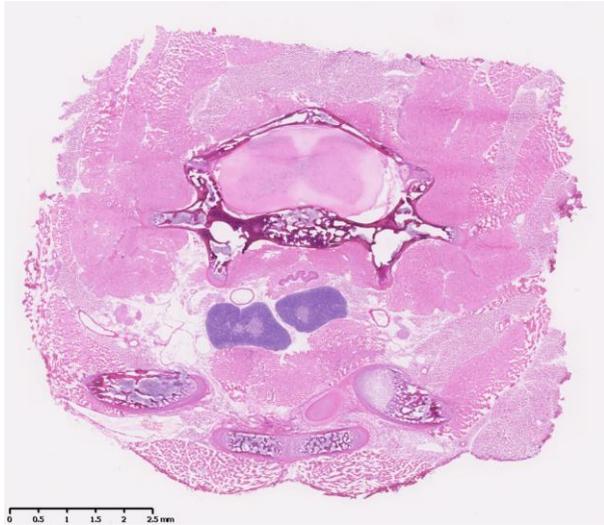


胸部組織 (15)



胸部組織 (16)

胸部組織のHE染色 連続切片



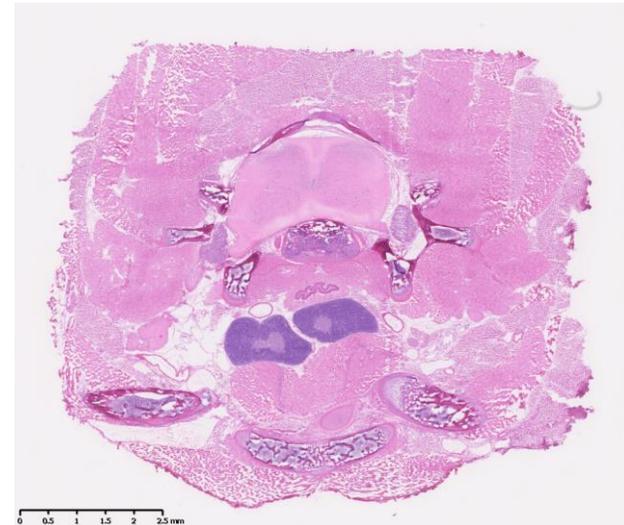
胸部組織 (17)



胸部組織 (18)



胸部組織 (19)

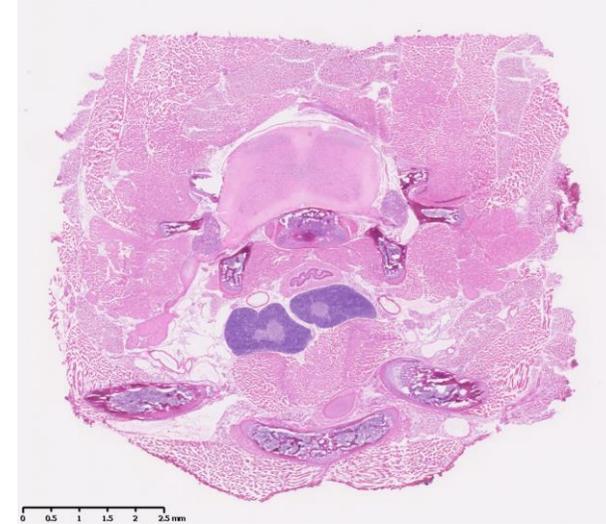


胸部組織 (20)

胸部組織のHE染色 連続切片



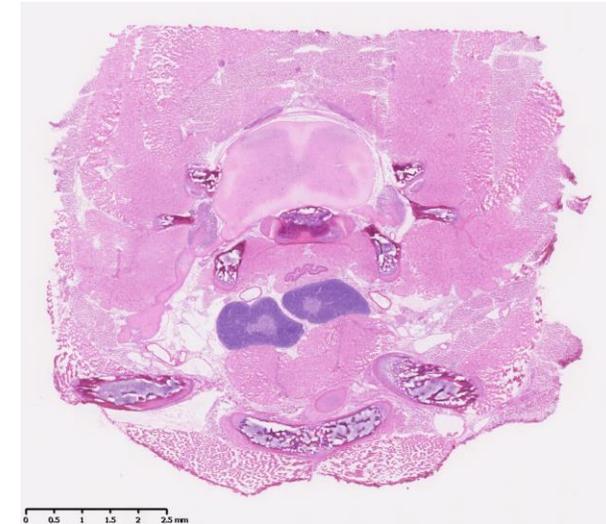
胸部組織 (21)



胸部組織 (22)

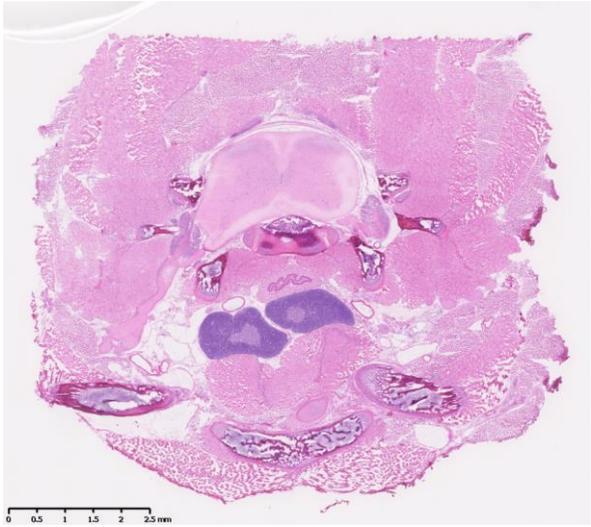


胸部組織 (23)

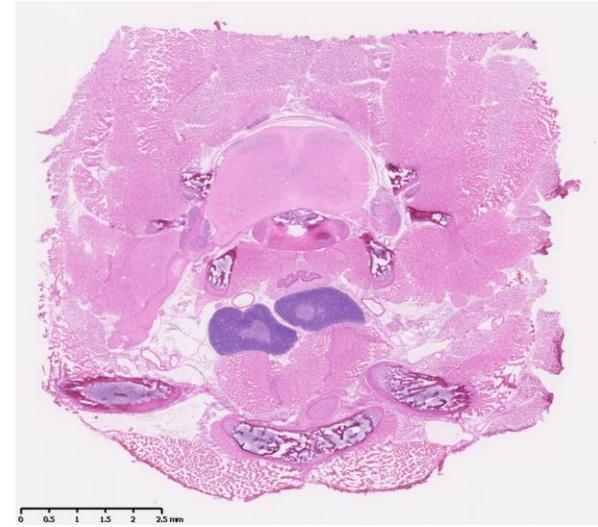


胸部組織 (24)

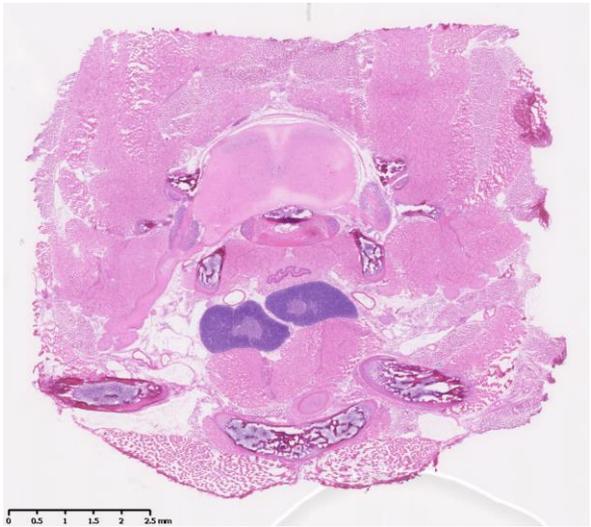
胸部組織のHE染色 連続切片



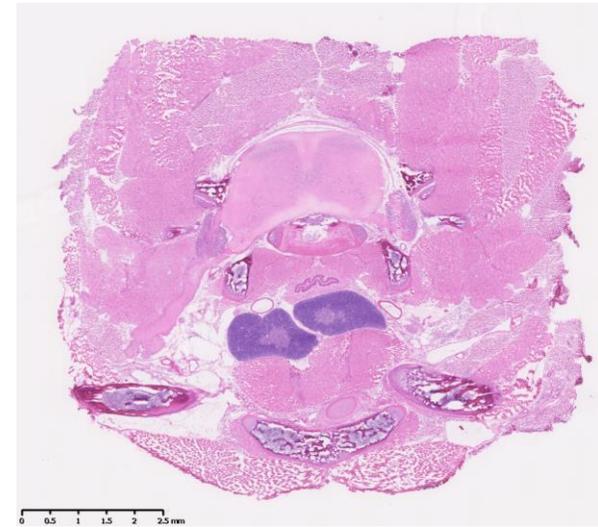
胸部組織 (25)



胸部組織 (26)

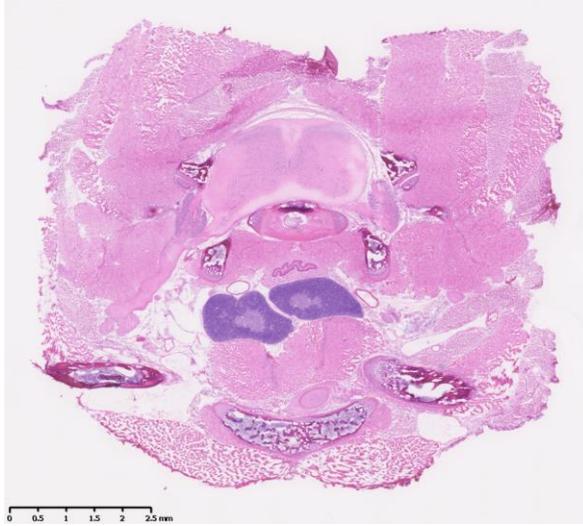


胸部組織 (27)

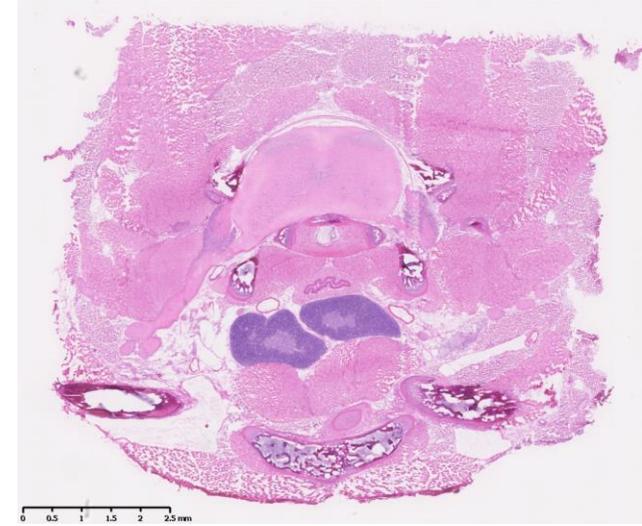


胸部組織 (28)

胸部組織のHE染色 連続切片



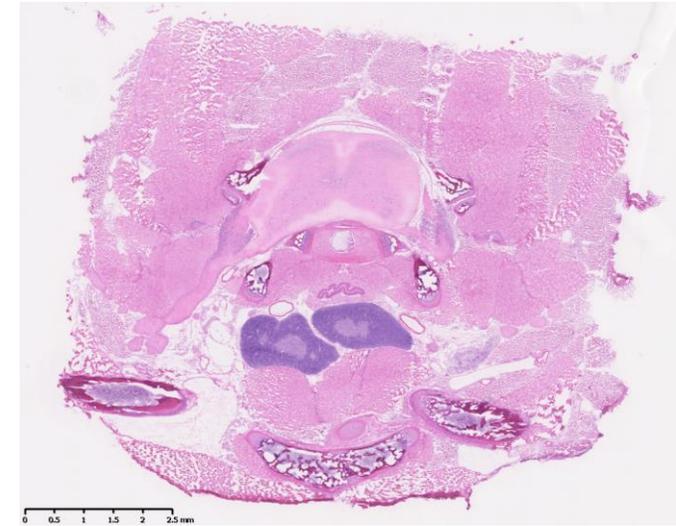
胸部組織 (29)



胸部組織 (30)

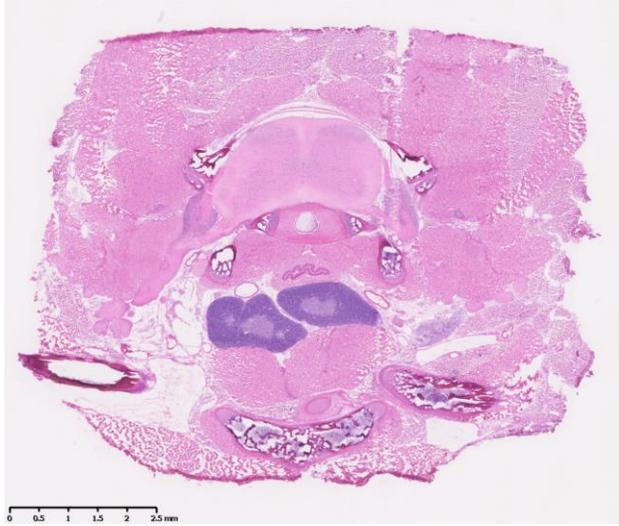


胸部組織 (31)

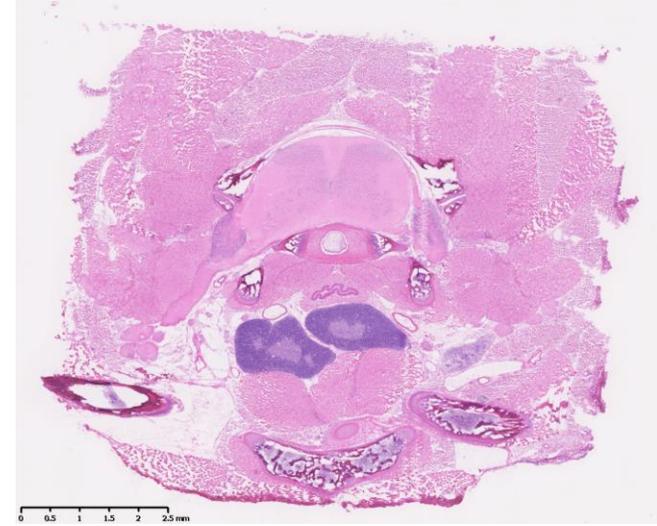


胸部組織 (32)

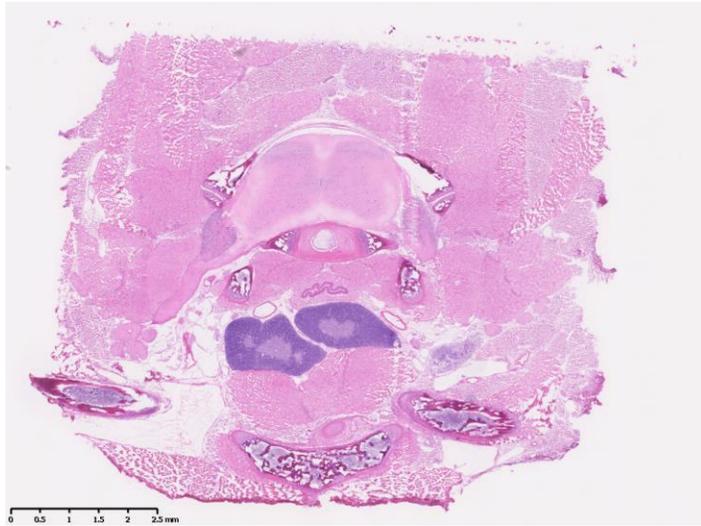
胸部組織のHE染色 連続切片



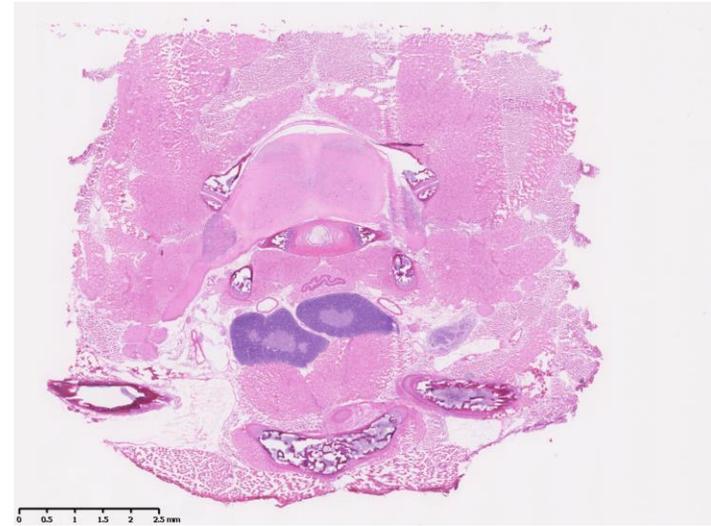
胸部組織 (33)



胸部組織 (34)

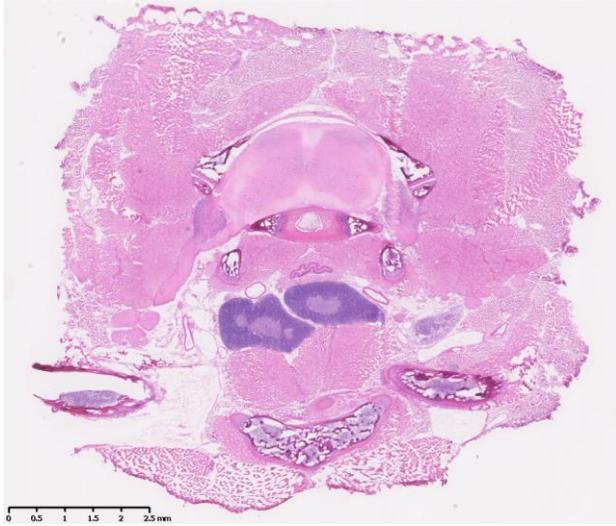


胸部組織 (35)

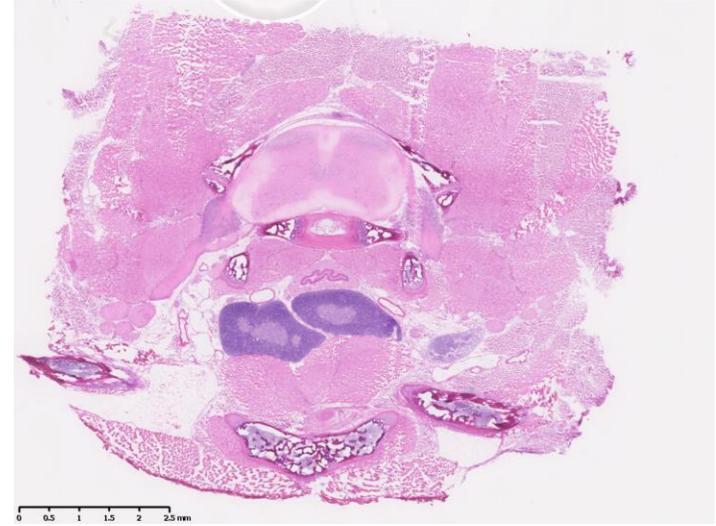


胸部組織 (36)

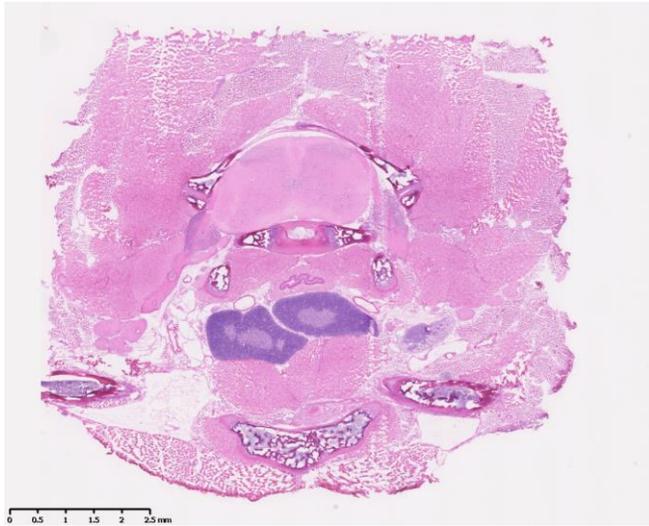
胸部組織のHE染色 連続切片



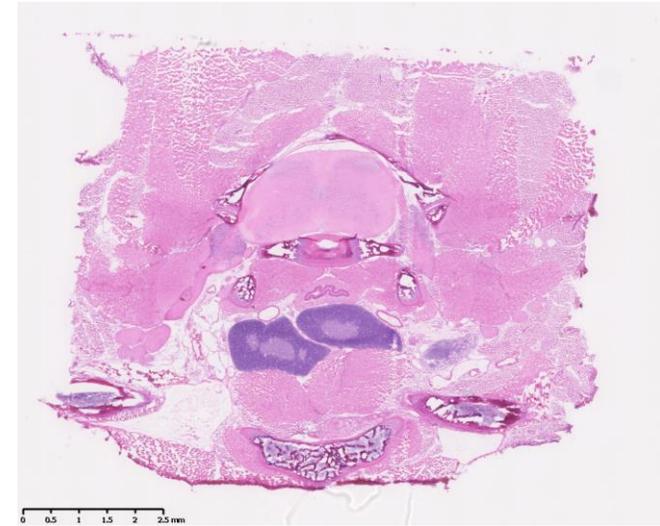
胸部組織 (37)



胸部組織 (38)

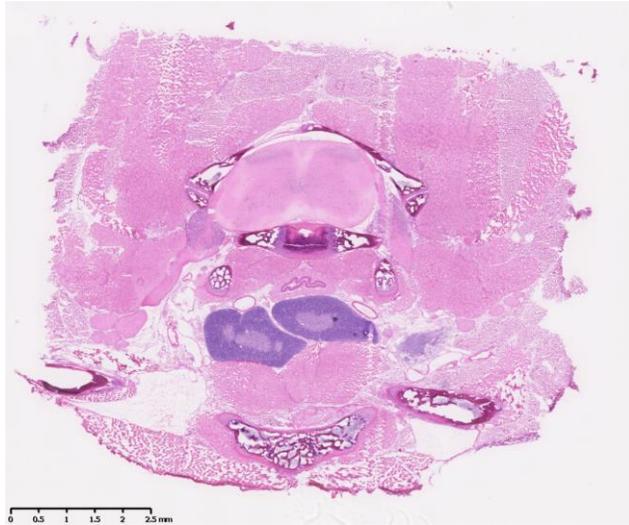


胸部組織 (39)

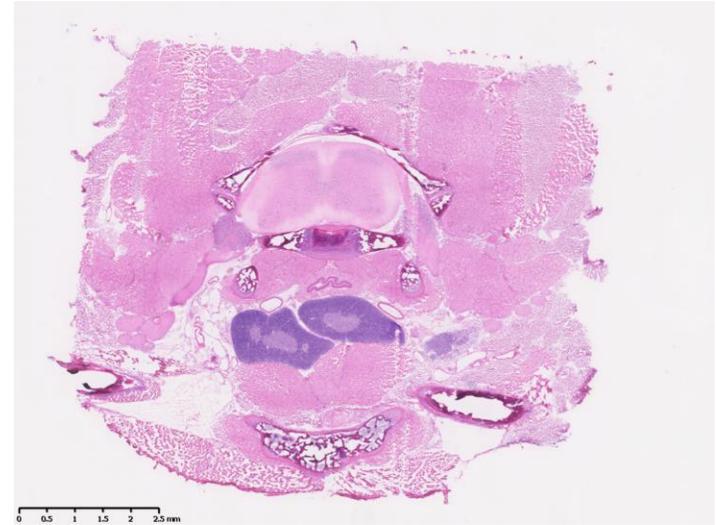


胸部組織 (40)

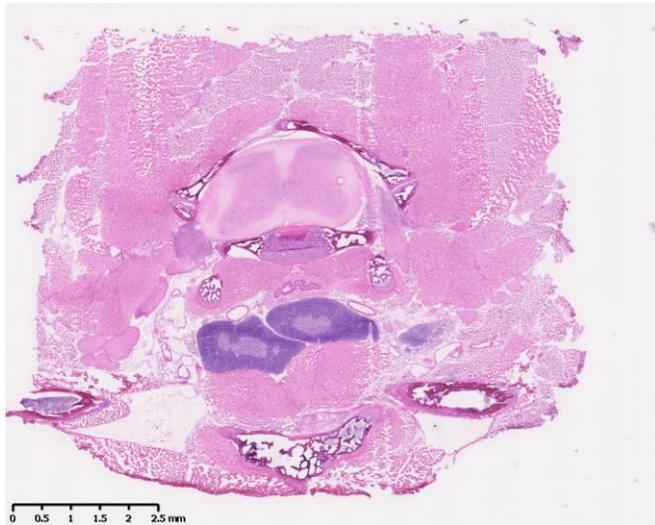
胸部組織のHE染色 連続切片



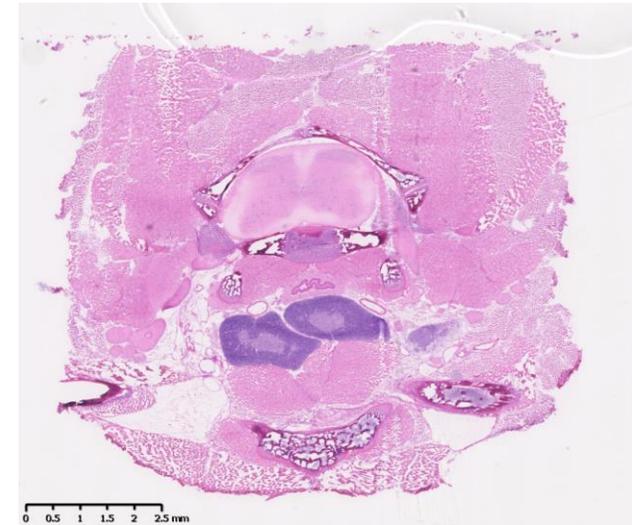
胸部組織 (41)



胸部組織 (42)

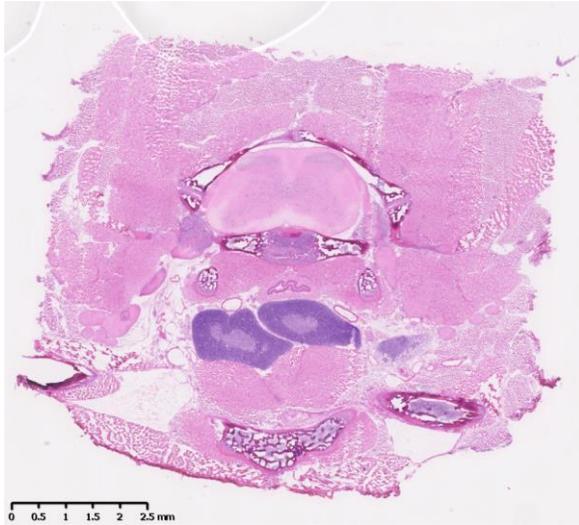


胸部組織 (43)



胸部組織 (44)

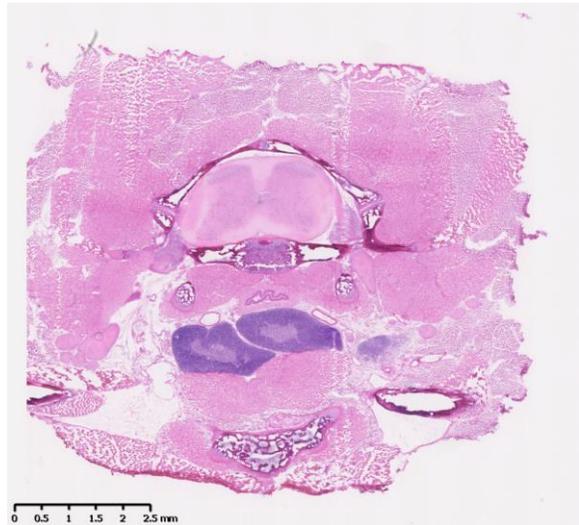
胸部組織のHE染色 連続切片



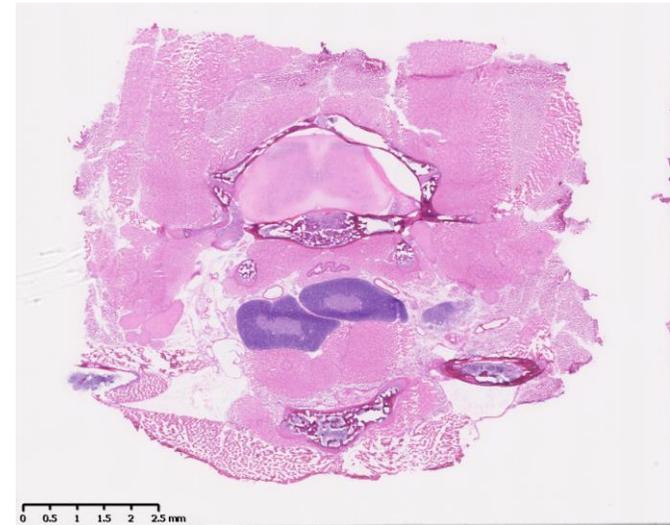
胸部組織 (45)



胸部組織 (46)

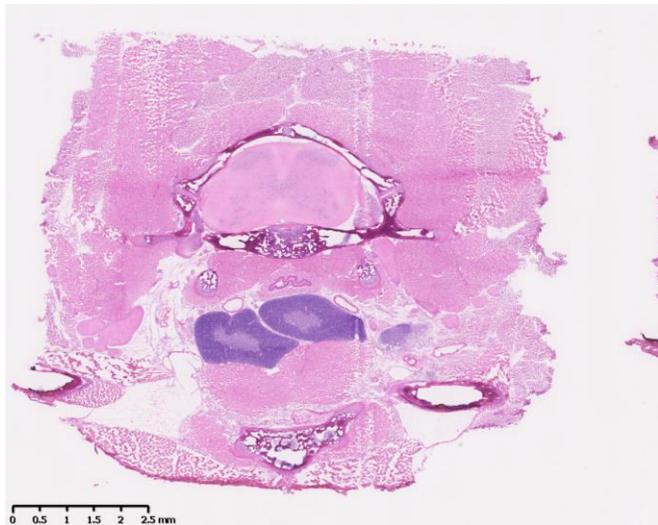


胸部組織 (47)

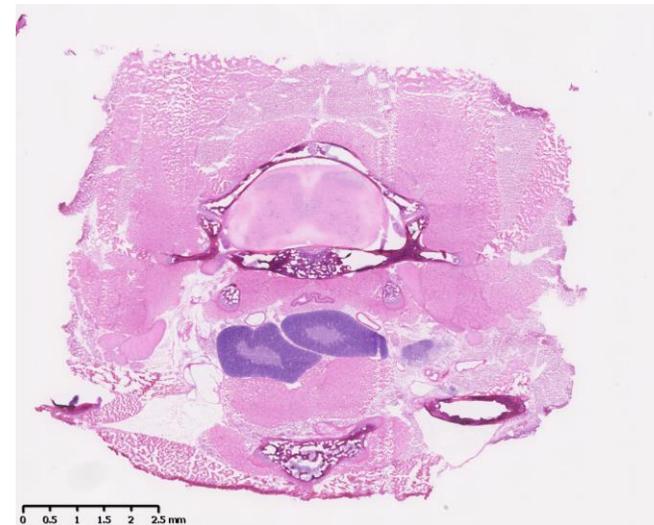


胸部組織 (48)

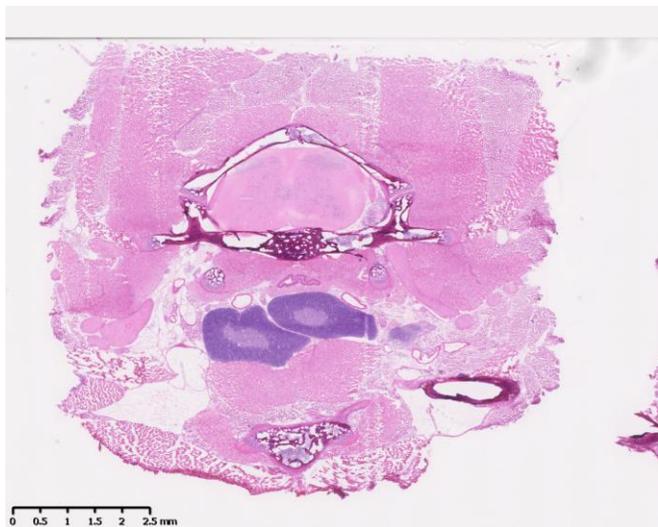
胸部組織のHE染色 連続切片



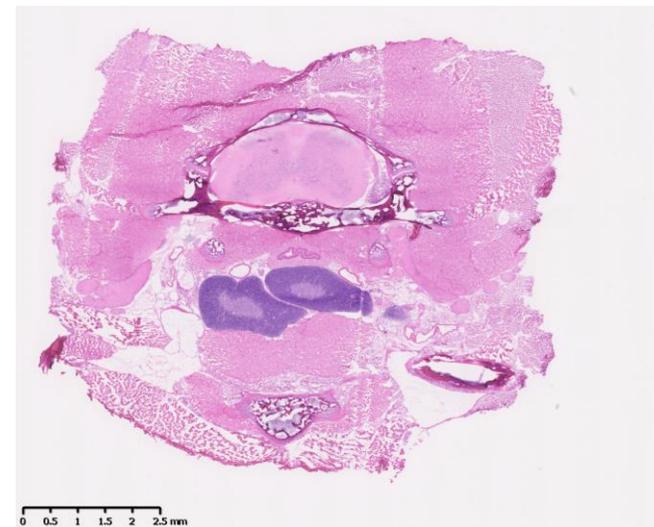
胸部組織 (49)



胸部組織 (50)

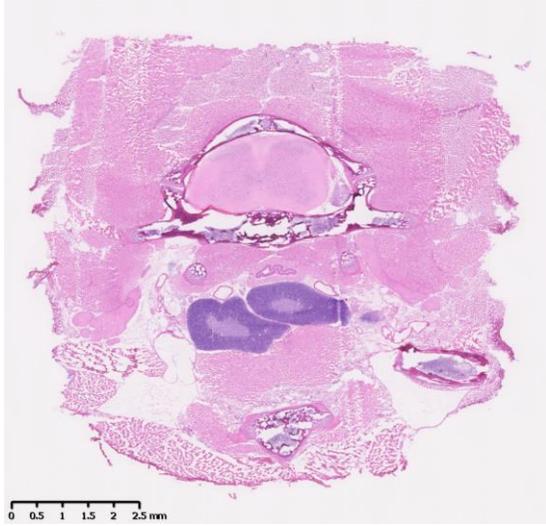


胸部組織 (51)

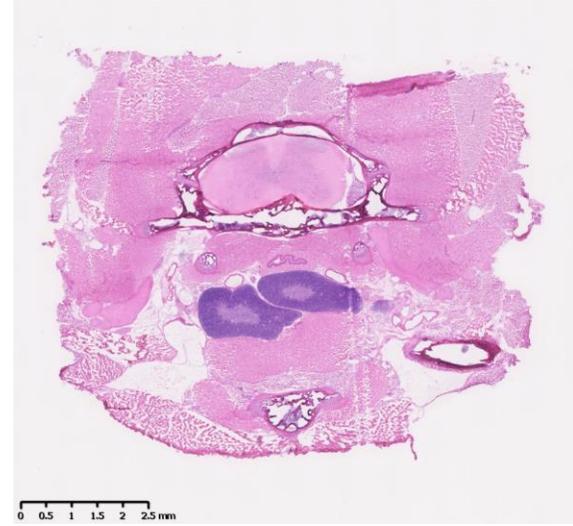


胸部組織 (52)

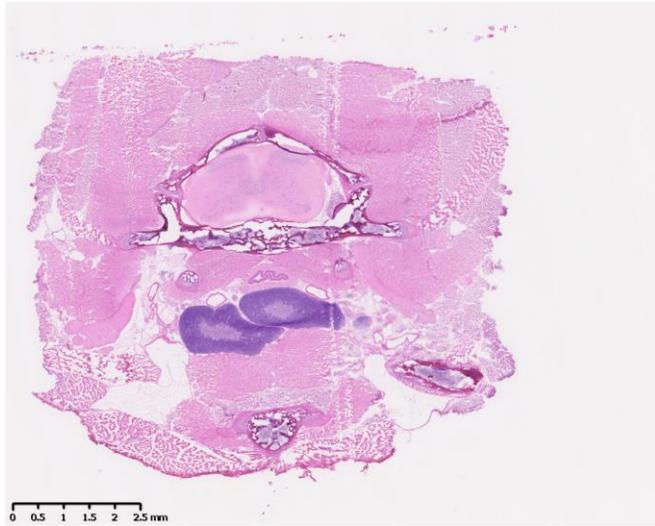
胸部組織のHE染色 連続切片



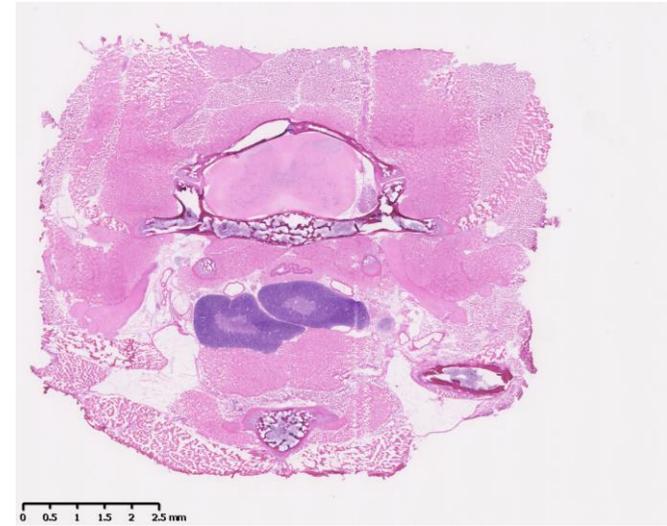
胸部組織 (53)



胸部組織 (54)

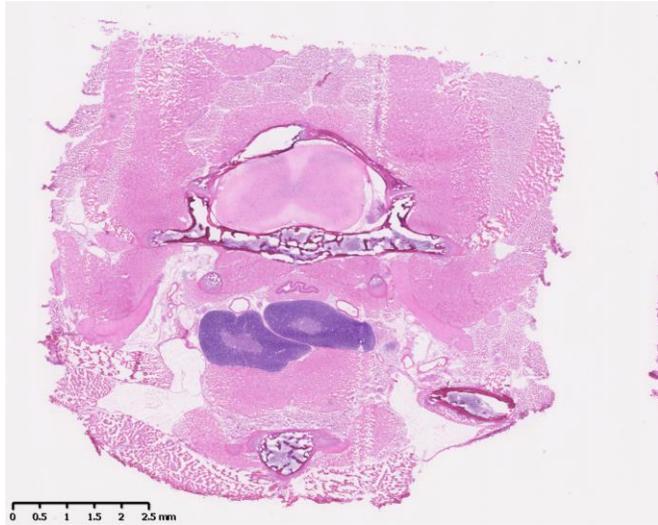


胸部組織 (55)

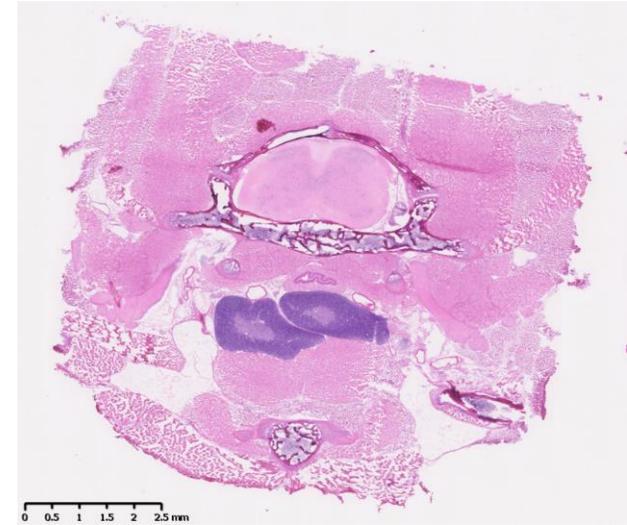


胸部組織 (56)

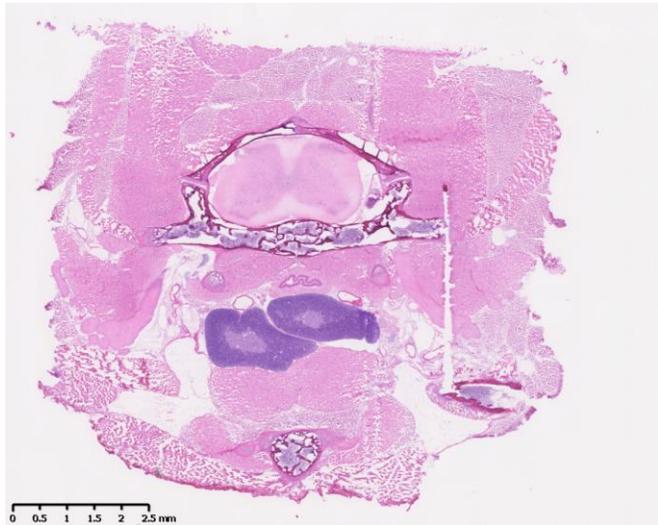
胸部組織のHE染色 連続切片



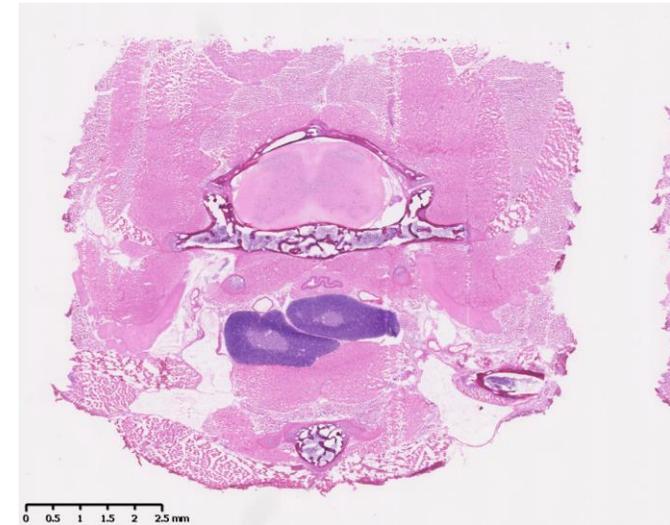
胸部組織 (57)



胸部組織 (58)

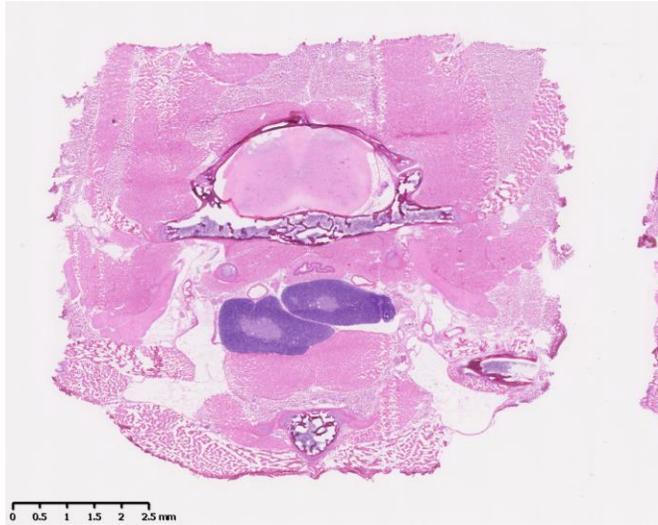


胸部組織 (59)

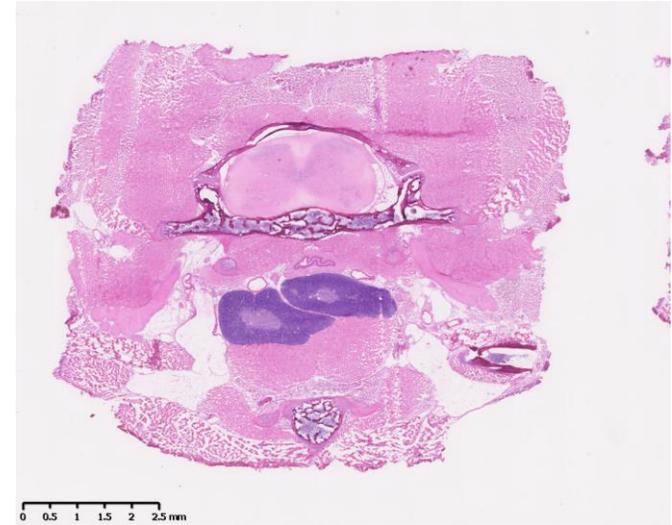


胸部組織 (60)

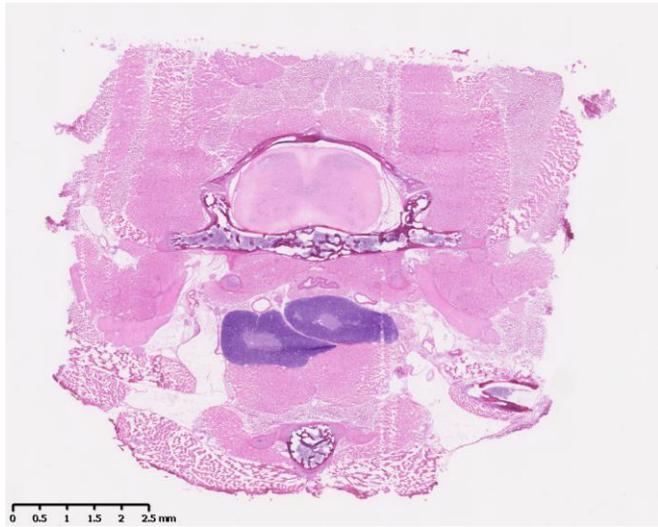
胸部組織のHE染色 連続切片



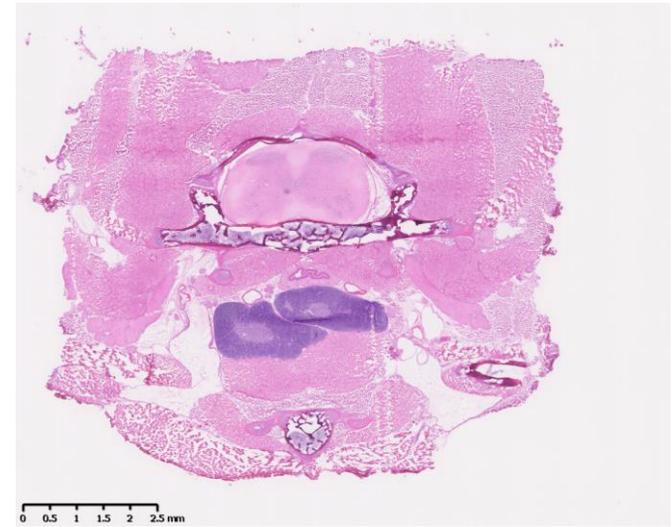
胸部組織 (61)



胸部組織 (62)

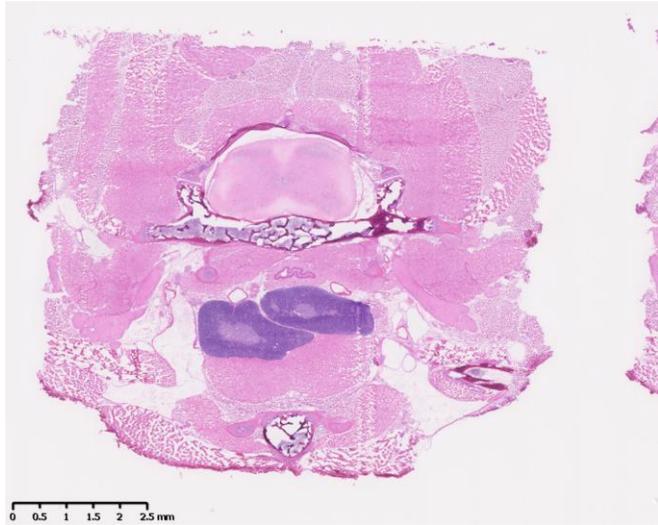


胸部組織 (63)

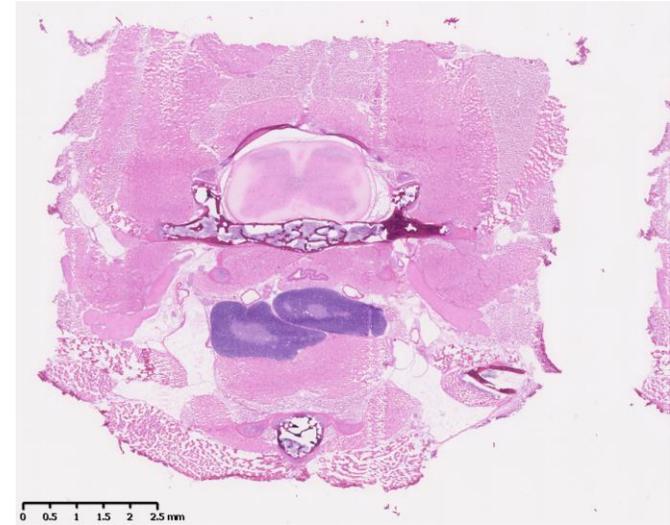


胸部組織 (64)

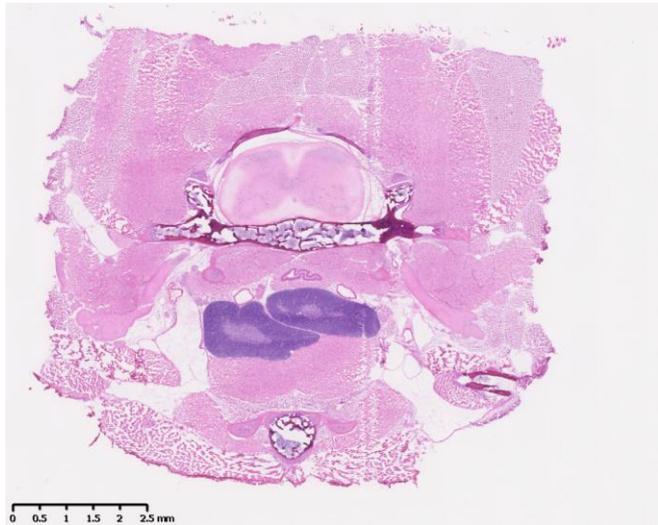
胸部組織のHE染色 連続切片



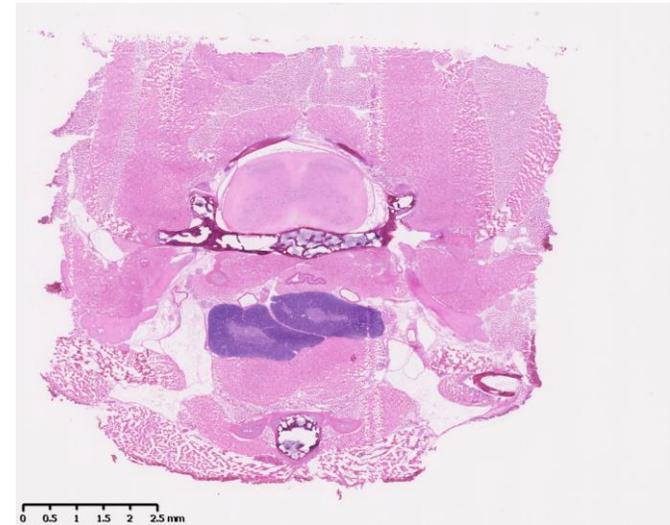
胸部組織 (65)



胸部組織 (66)

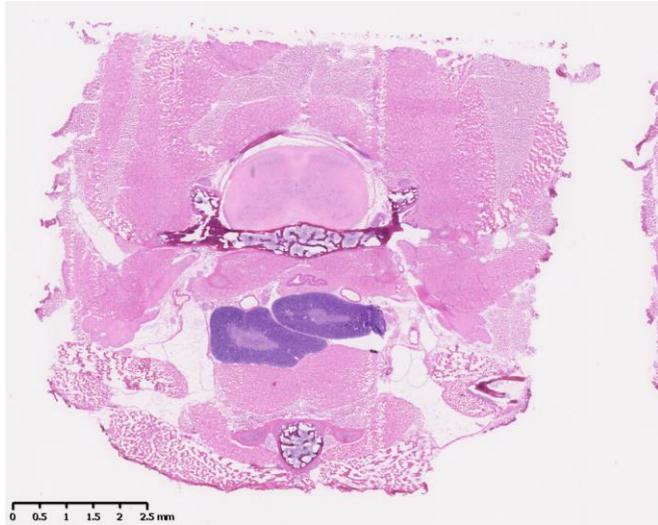


胸部組織 (67)

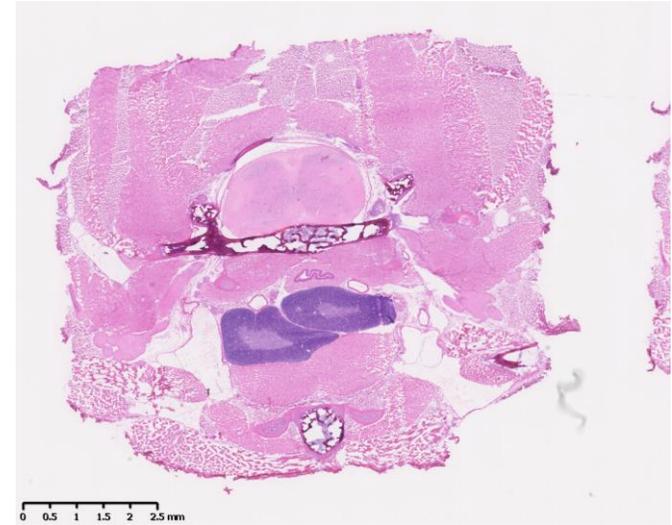


胸部組織 (68)

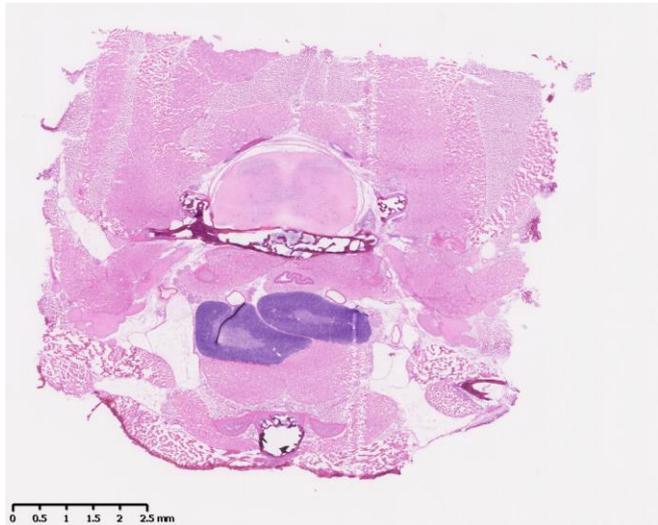
胸部組織のHE染色 連続切片



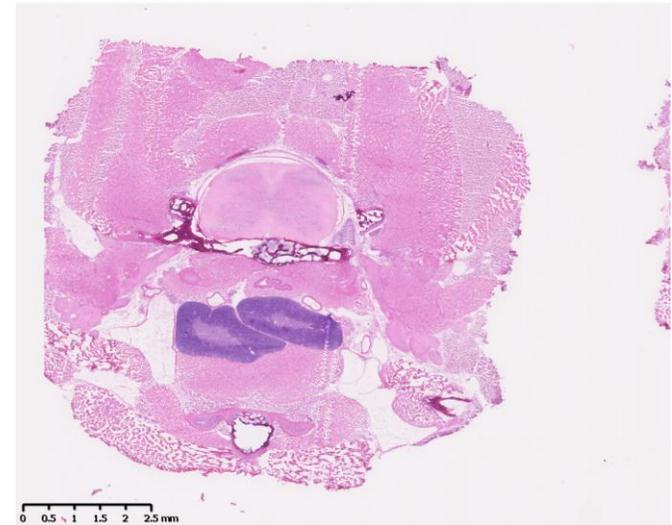
胸部組織 (69)



胸部組織 (70)

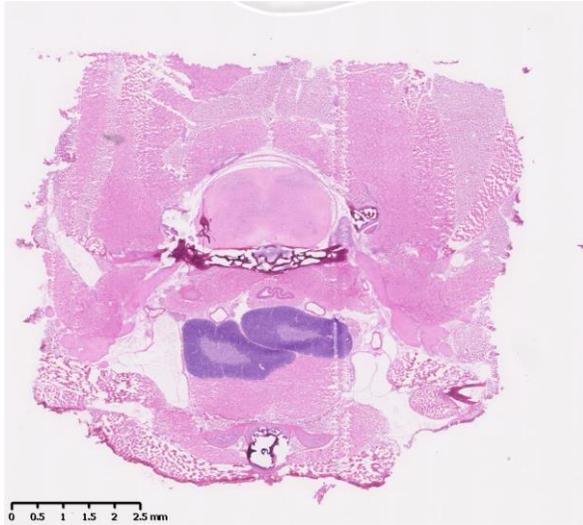


胸部組織 (71)

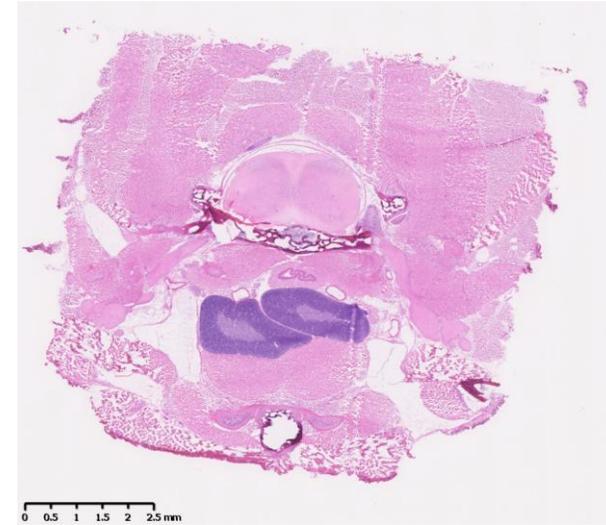


胸部組織 (72)

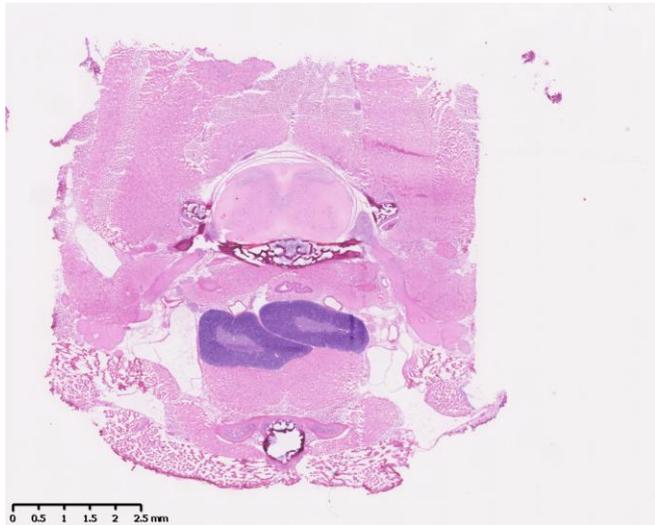
胸部組織のHE染色 連続切片



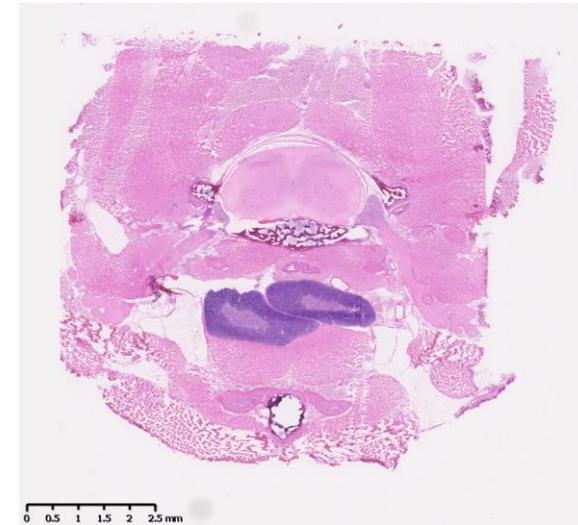
胸部組織 (73)



胸部組織 (74)

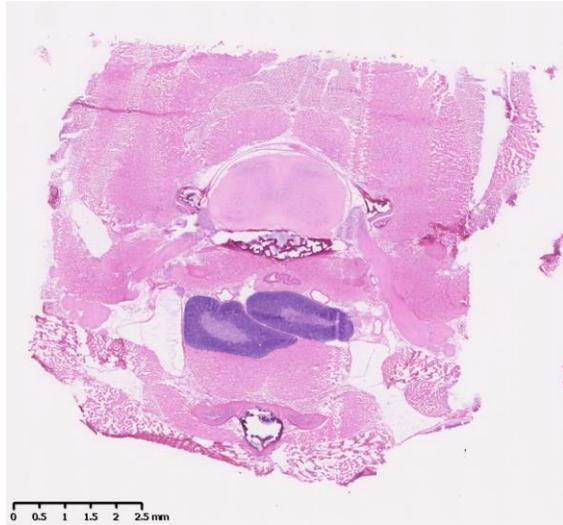


胸部組織 (75)

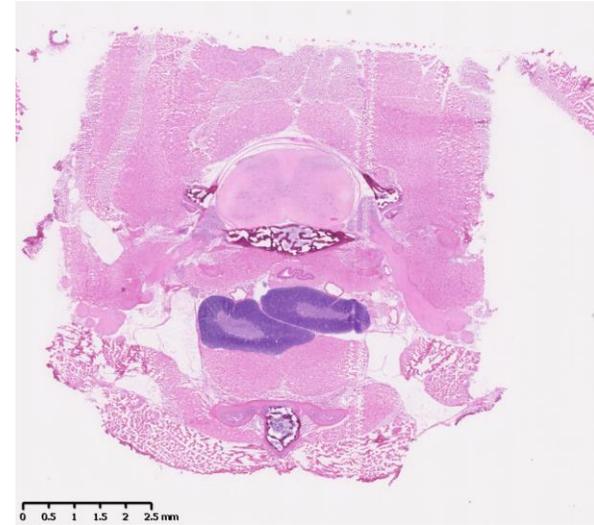


胸部組織 (76)

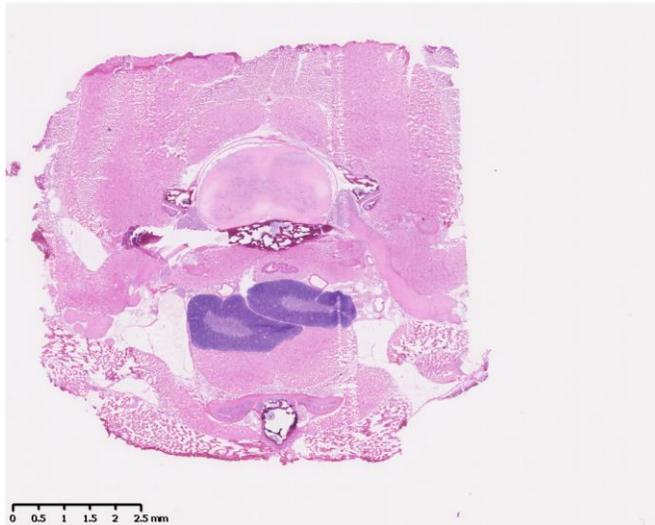
胸部組織のHE染色 連続切片



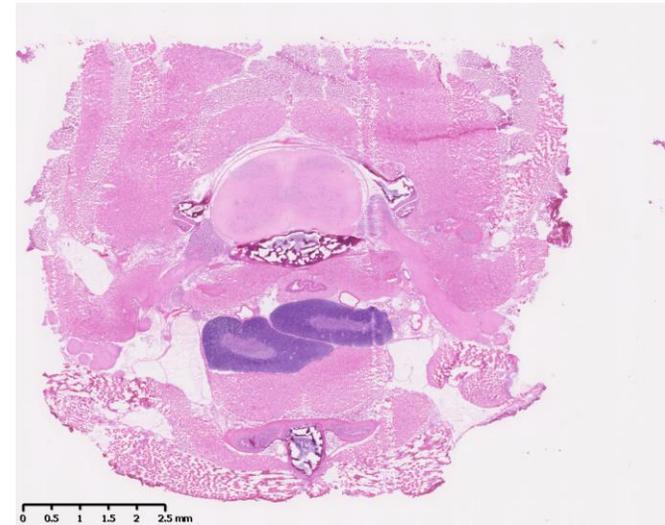
胸部組織 (77)



胸部組織 (78)

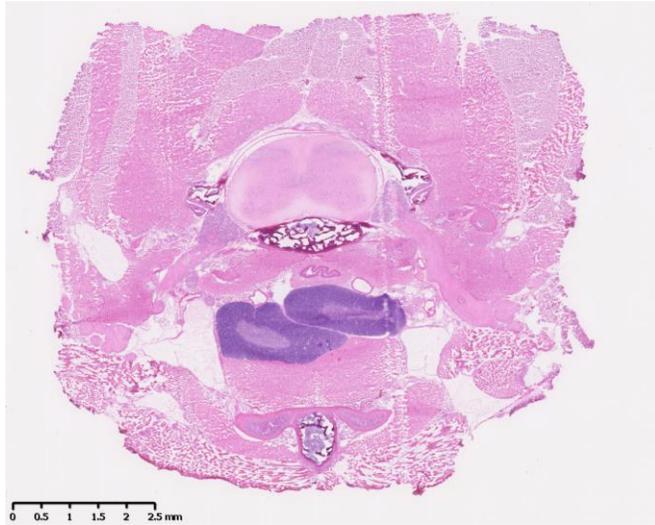


胸部組織 (79)

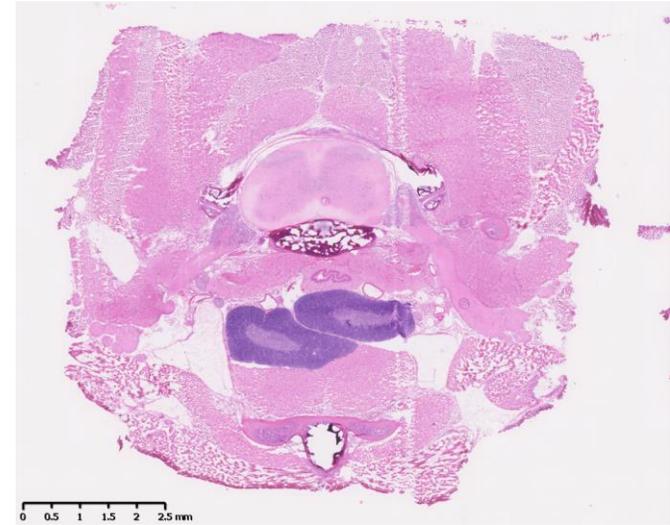


胸部組織 (80)

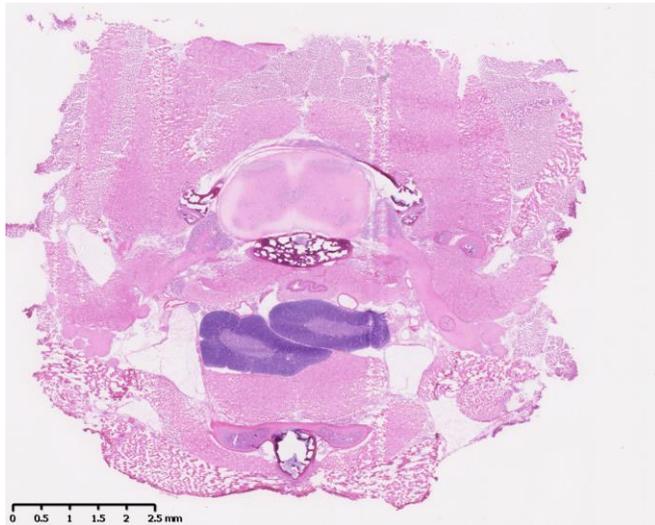
胸部組織のHE染色 連続切片



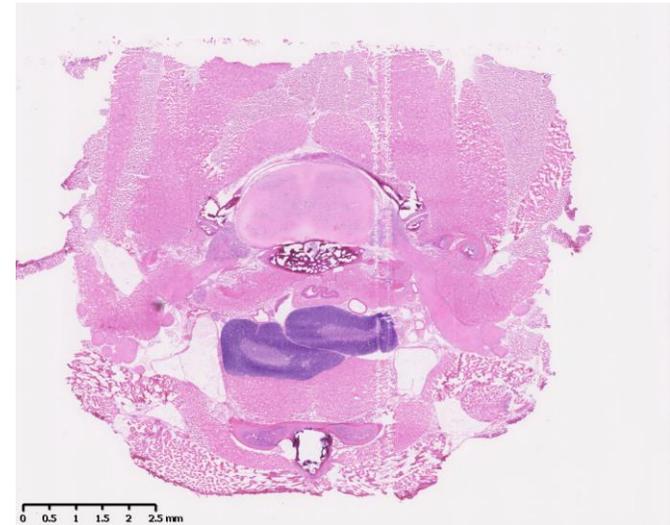
胸部組織 (81)



胸部組織 (82)

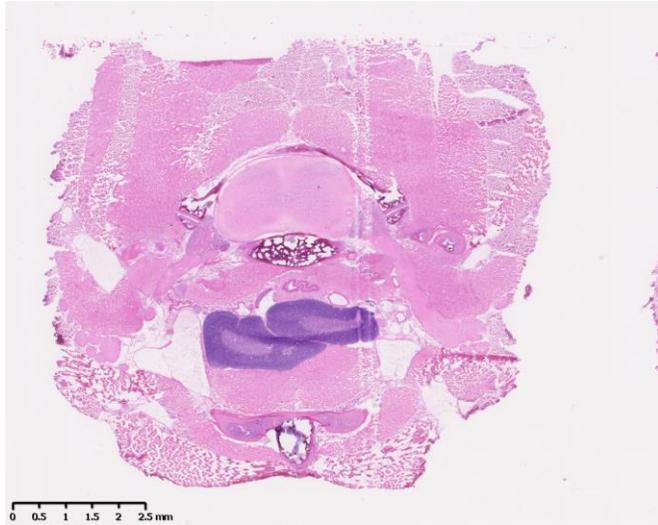


胸部組織 (83)

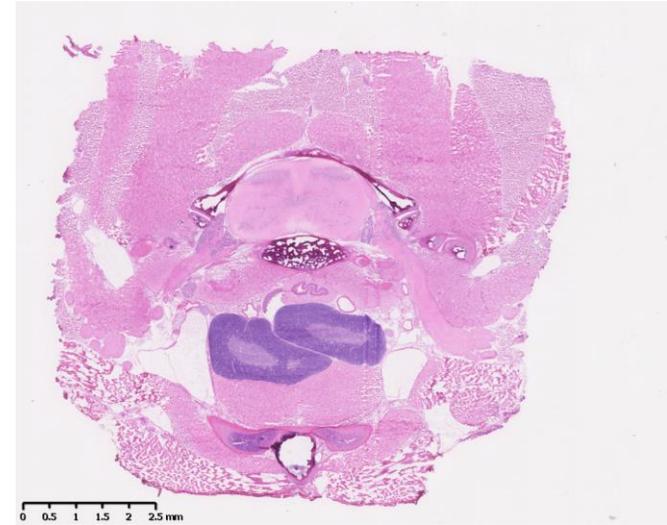


胸部組織 (84)

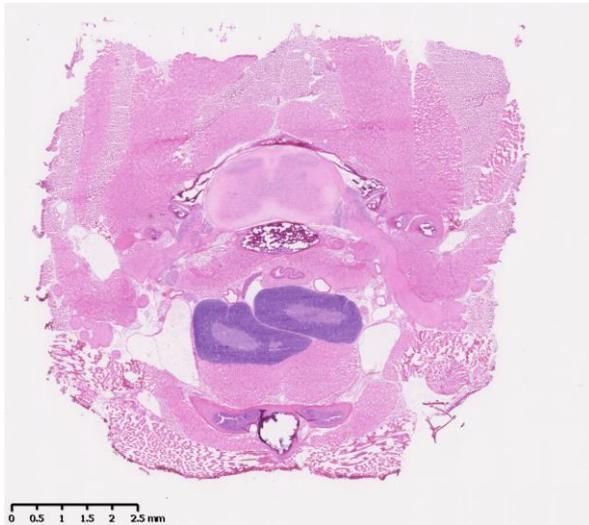
胸部組織のHE染色 連続切片



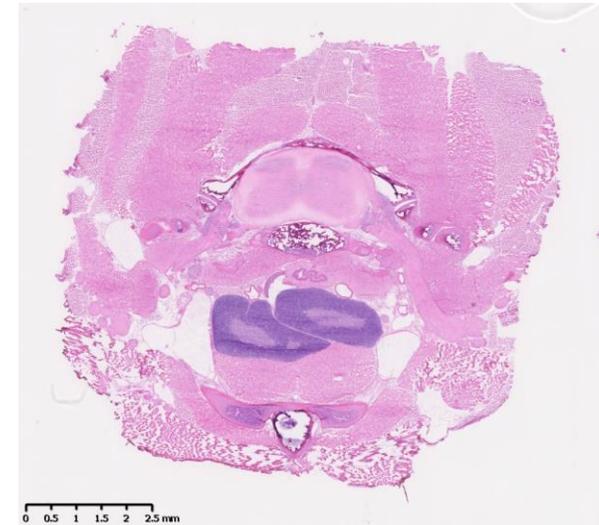
胸部組織 (85)



胸部組織 (86)

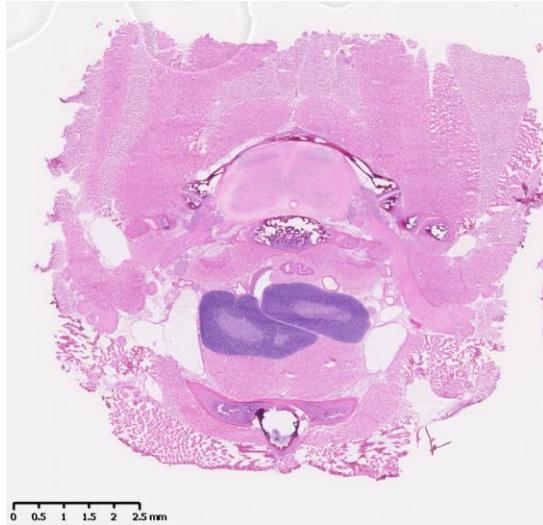


胸部組織 (87)

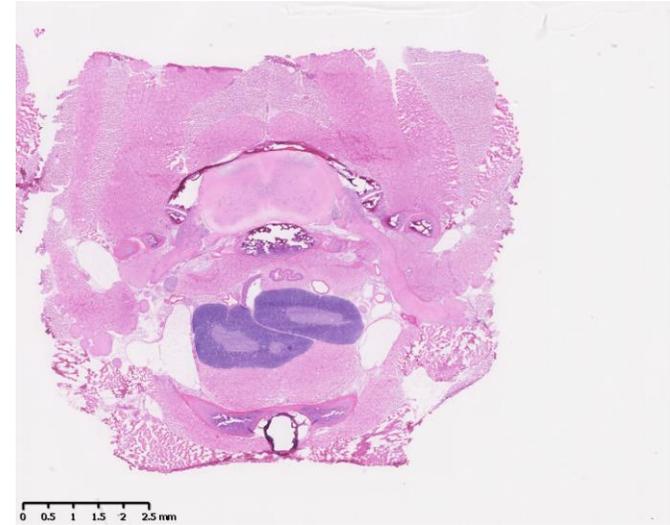


胸部組織 (88)

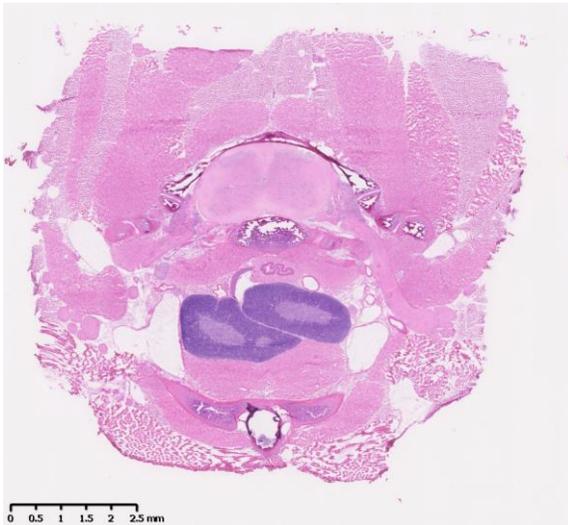
胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (89)



胸部組織 (90)

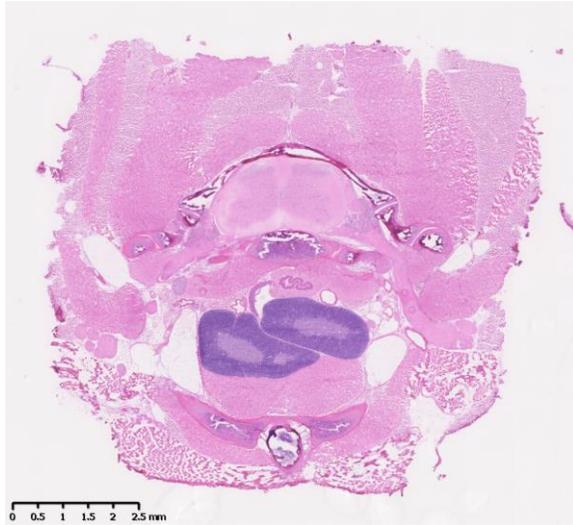


胸部組織 (91)



胸部組織 (92)

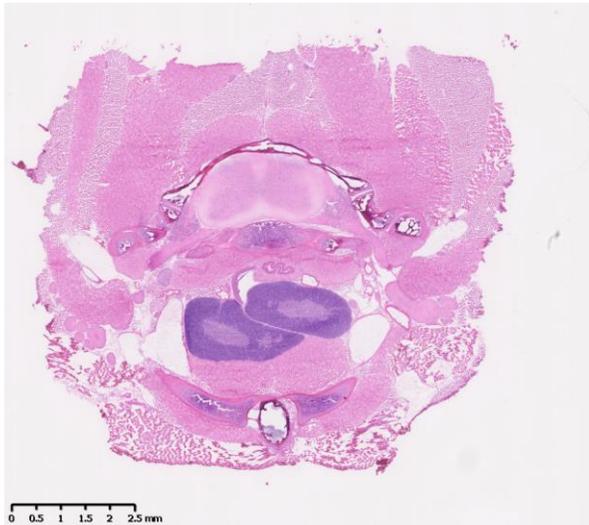
胸部組織のHE染色 連続切片



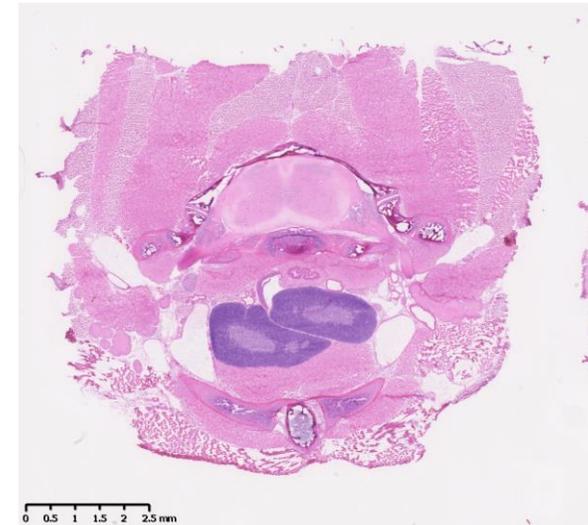
胸部組織 (93)



胸部組織 (94)

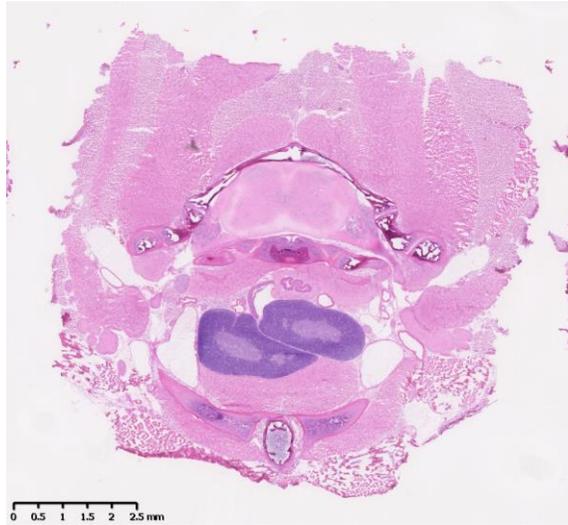


胸部組織 (95)



胸部組織 (96)

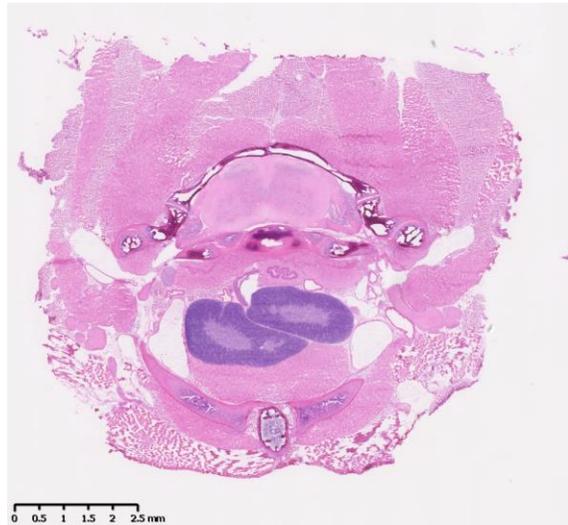
胸部組織のHE染色 連続切片



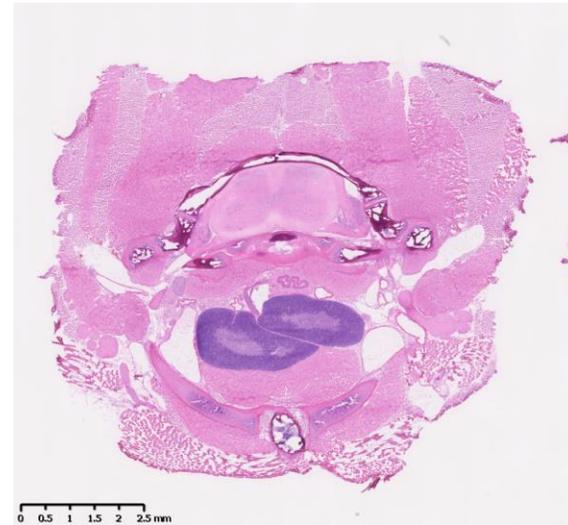
胸部組織 (97)



胸部組織 (98)

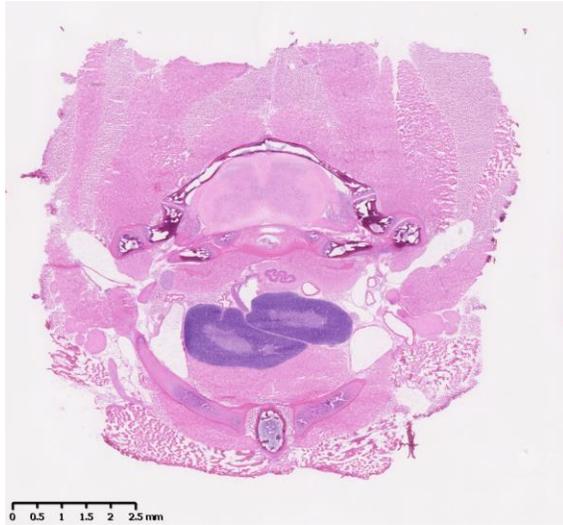


胸部組織 (99)

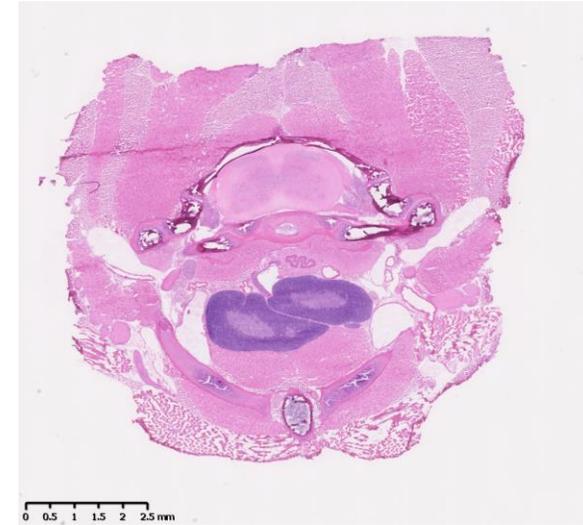


胸部組織 (100)

胸部組織のHE染色 連続切片



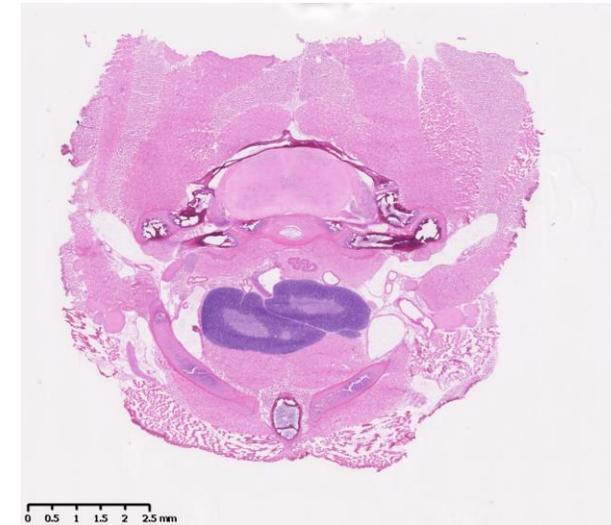
胸部組織 (101)



胸部組織 (102)

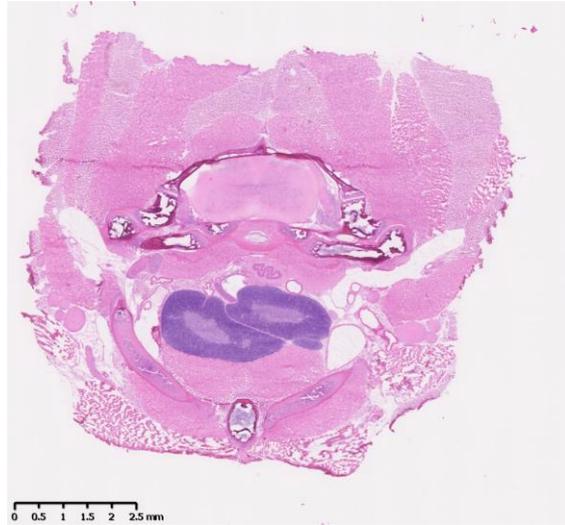


胸部組織 (103)



胸部組織 (104)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (105)



胸部組織 (106)



胸部組織 (107)

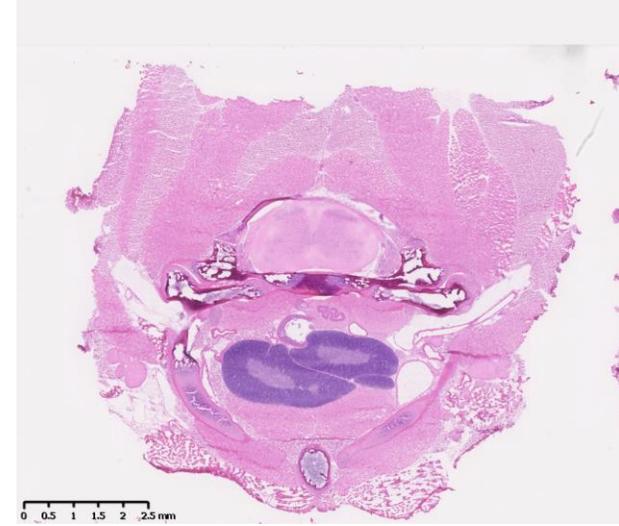


胸部組織 (108)

胸部組織のHE染色 連続切片



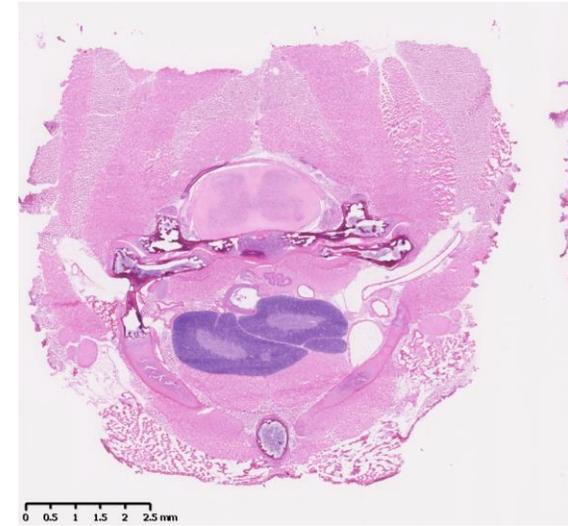
胸部組織 (109)



胸部組織 (110)

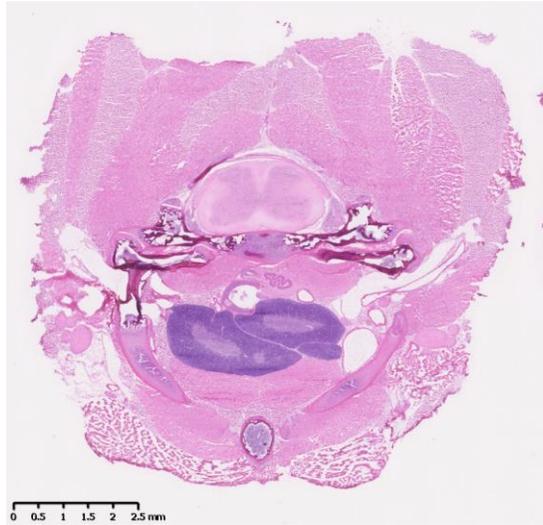


胸部組織 (111)

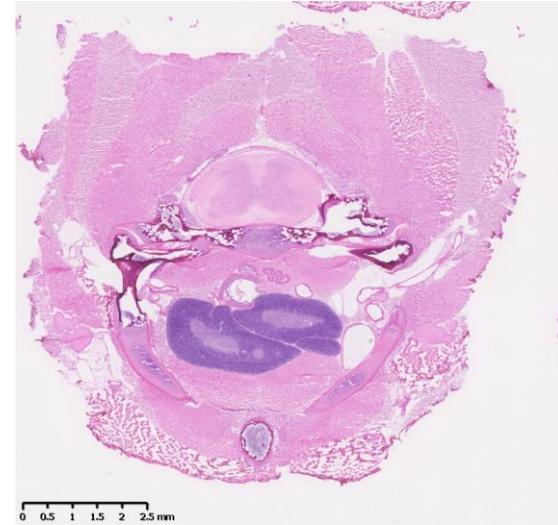


胸部組織 (112)

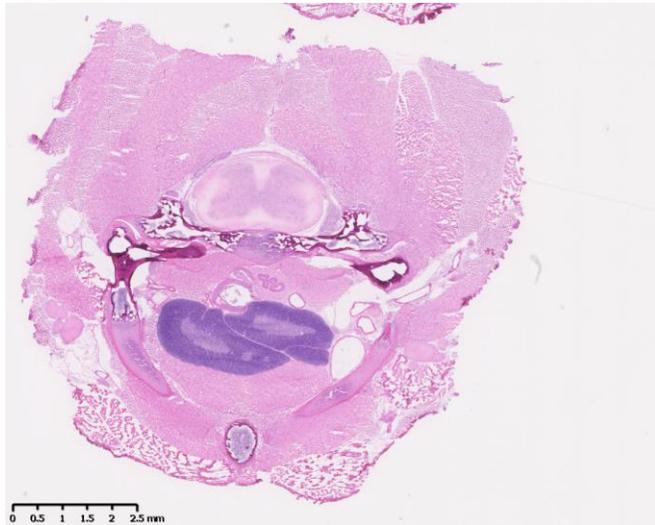
胸部組織のHE染色 連続切片



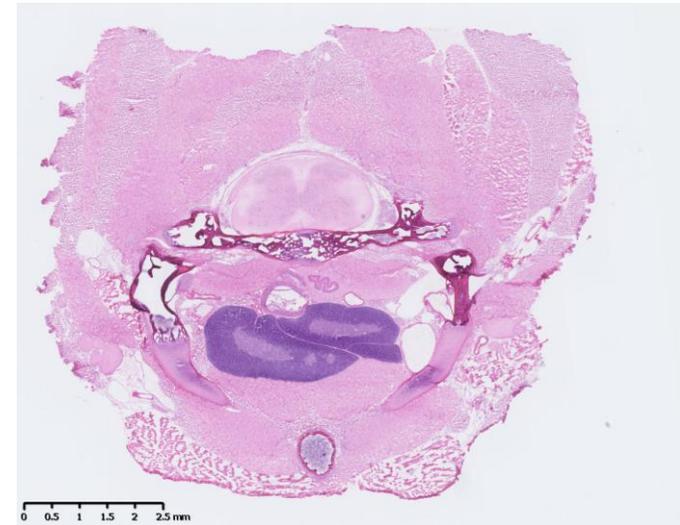
胸部組織 (113)



胸部組織 (114)

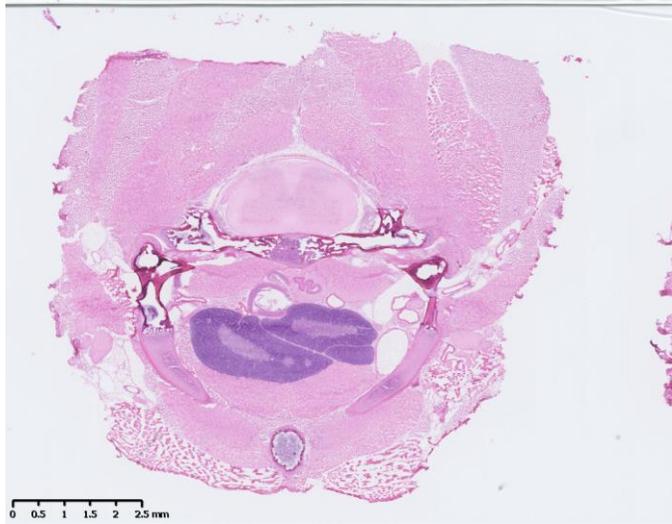


胸部組織 (115)

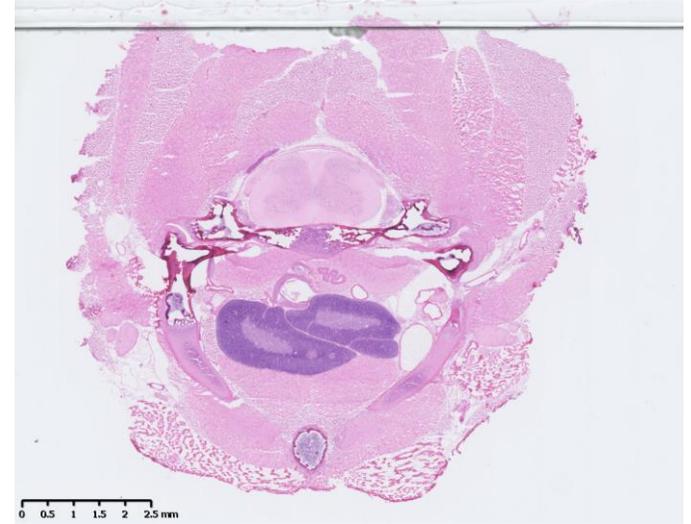


胸部組織 (116)

胸部組織のHE染色 連続切片



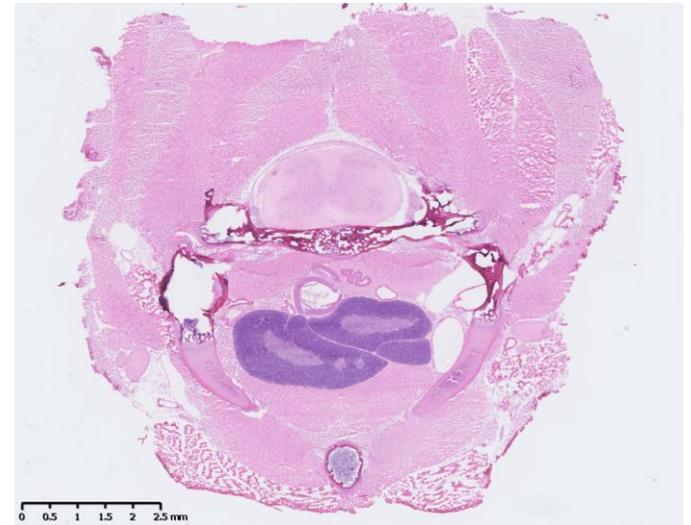
胸部組織 (117)



胸部組織 (118)

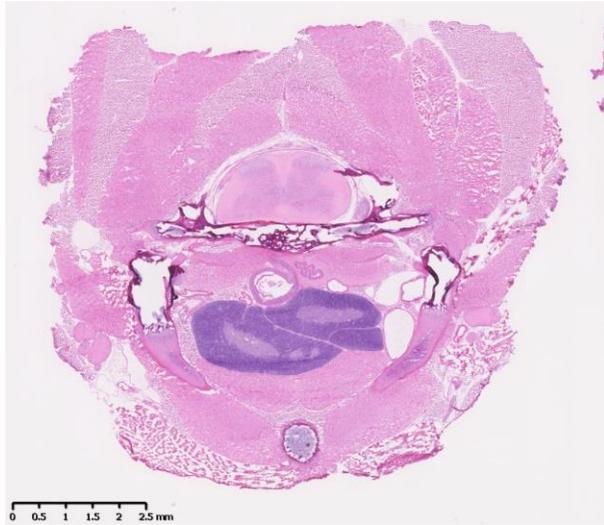


胸部組織 (119)



胸部組織 (120)

胸部組織のHE染色 連続切片



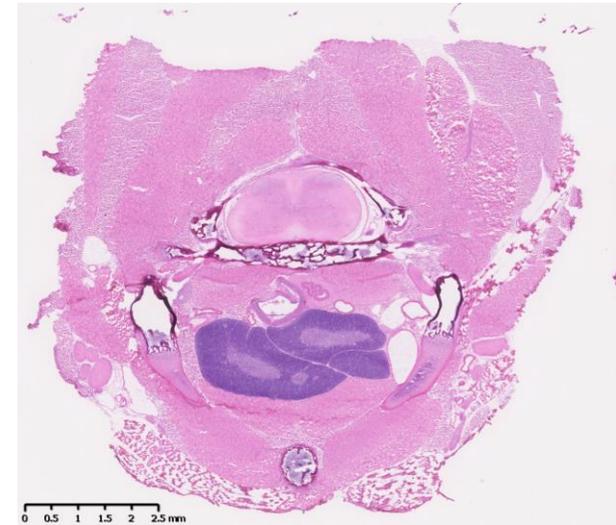
胸部組織 (121)



胸部組織 (122)



胸部組織 (123)

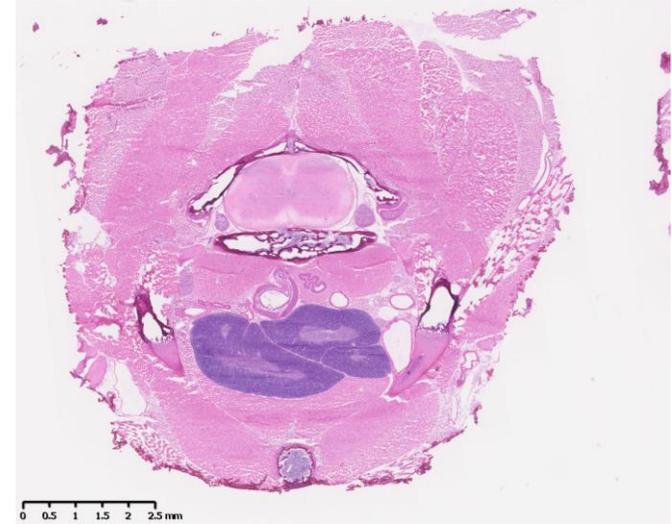


胸部組織 (124)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (125)



胸部組織 (126)



胸部組織 (127)



胸部組織 (128)

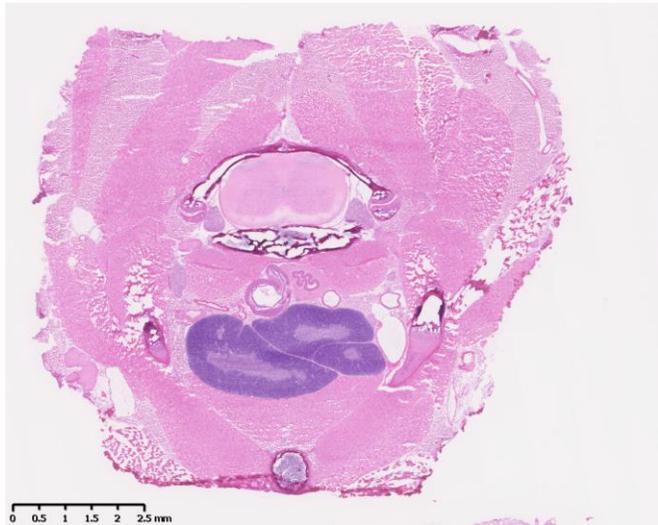
胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (129)



胸部組織 (130)

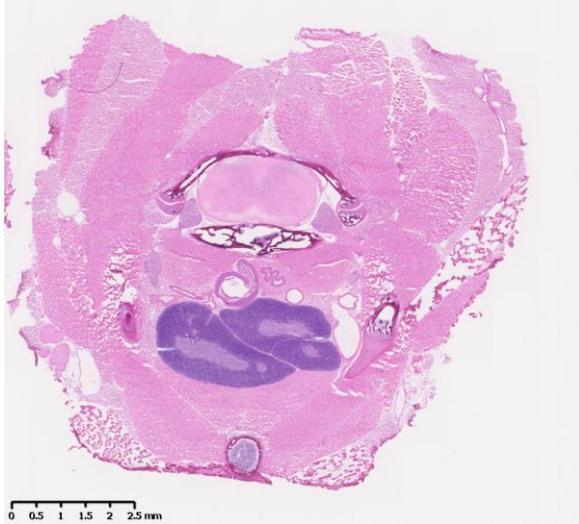


胸部組織 (131)

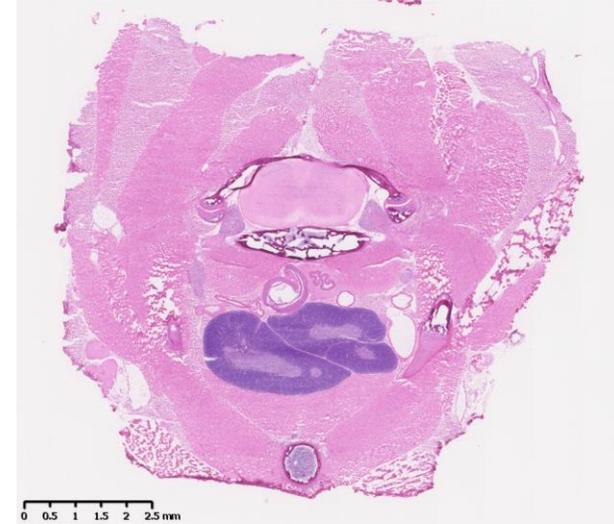


胸部組織 (132)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (133)



胸部組織 (134)



胸部組織 (135)



胸部組織 (136)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (137)



胸部組織 (138)



胸部組織 (139)



胸部組織 (140)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (141)



胸部組織 (142)



胸部組織 (143)



胸部組織 (144)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (145)



胸部組織 (146)



胸部組織 (147)



胸部組織 (148)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (149)



胸部組織 (150)



胸部組織 (151)



胸部組織 (152)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (153)



胸部組織 (154)



胸部組織 (155)



胸部組織 (156)

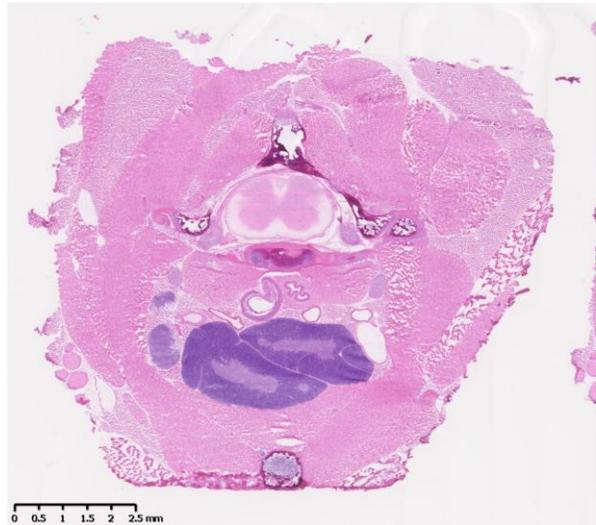
胸部組織のHE染色 連続切片



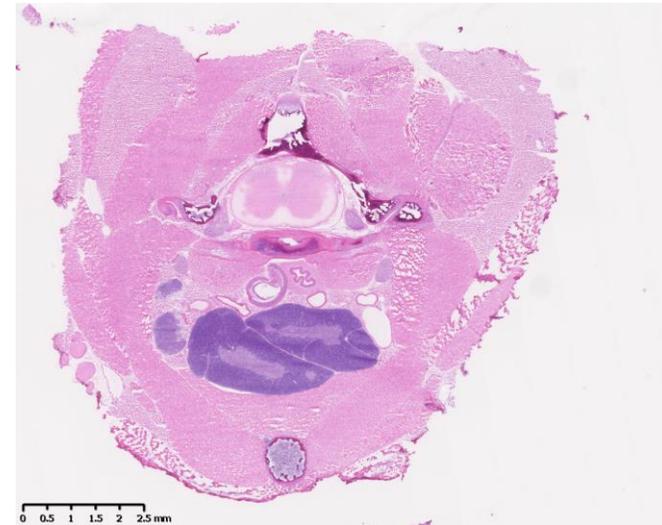
胸部組織 (157)



胸部組織 (158)



胸部組織 (159)

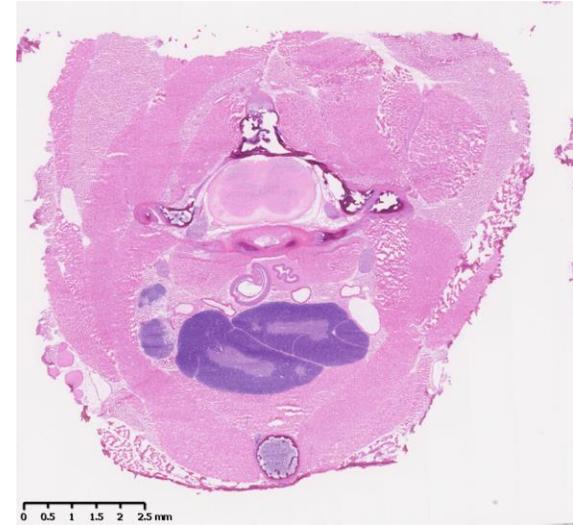


胸部組織 (160)

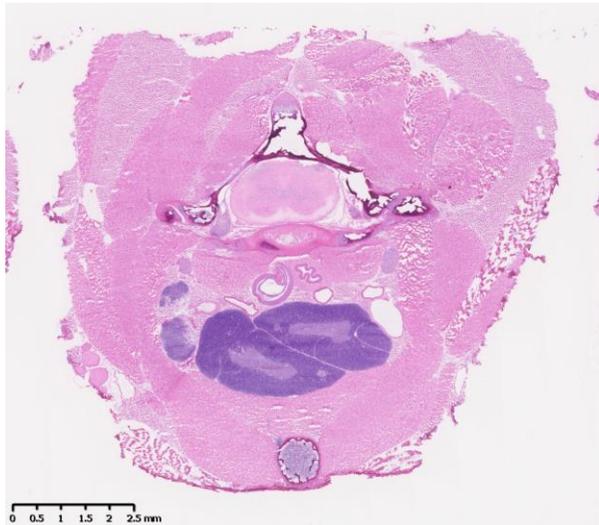
胸部組織のHE染色 連続切片



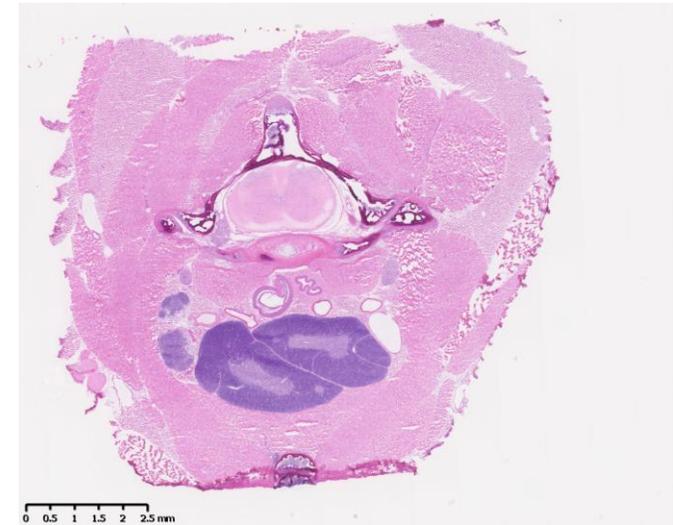
胸部組織 (161)



胸部組織 (162)



胸部組織 (163)



胸部組織 (164)

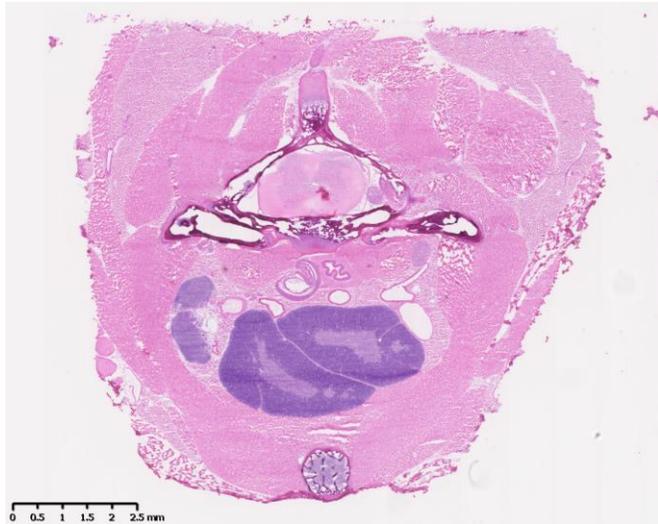
胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (165)



胸部組織 (166)

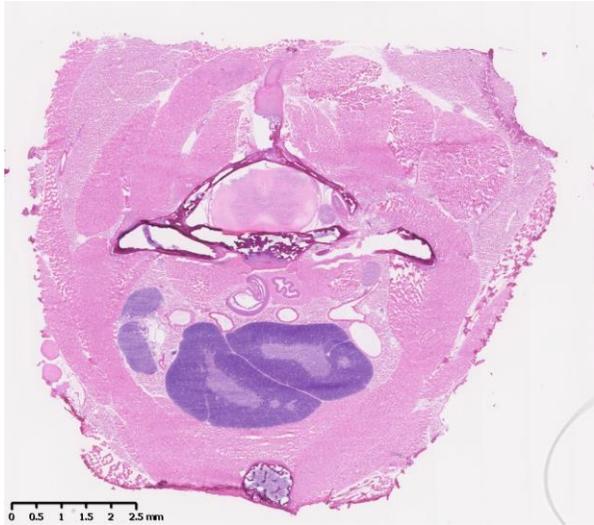


胸部組織 (167)

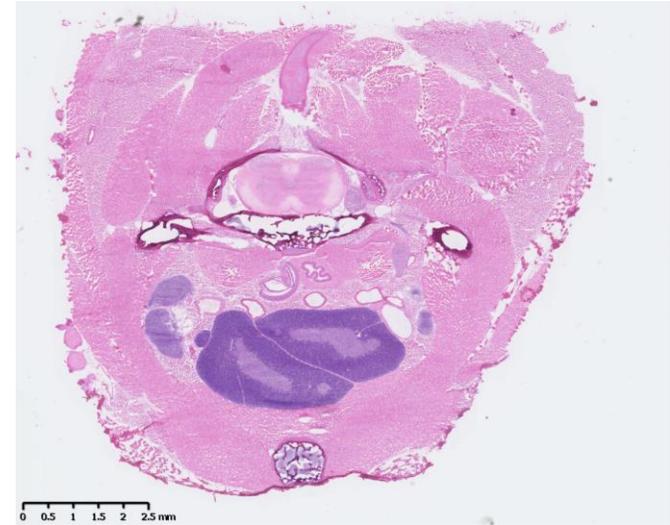


胸部組織 (168)

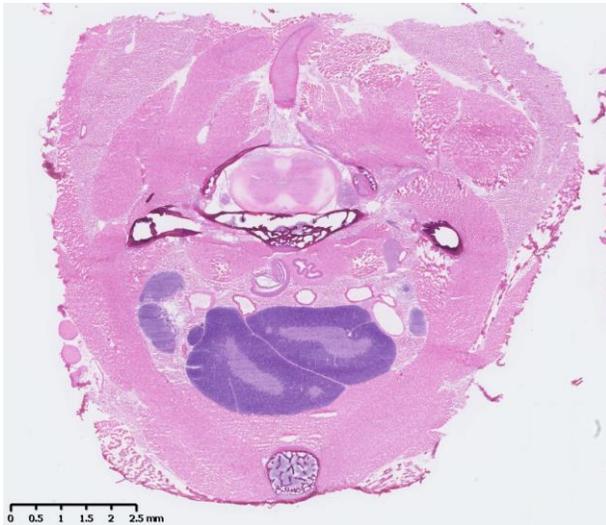
胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (169)



胸部組織 (170)

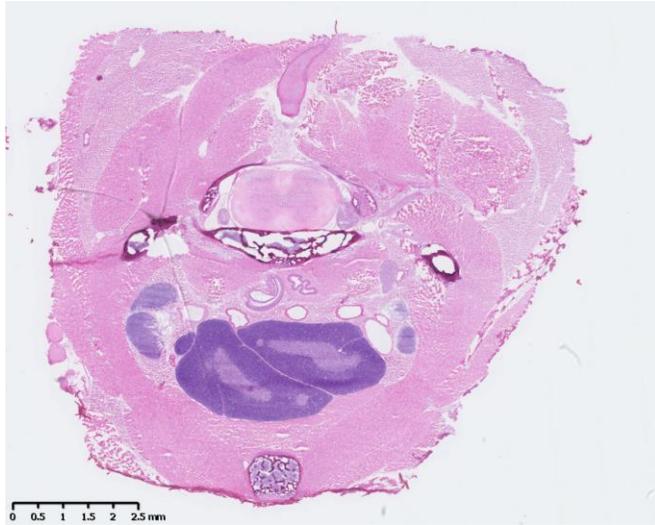


胸部組織 (171)



胸部組織 (172)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (173)



胸部組織 (174)



胸部組織 (175)



胸部組織 (176)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (177)



胸部組織 (178)



胸部組織 (179)



胸部組織 (180)

胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (181)



胸部組織 (182)



胸部組織 (183)

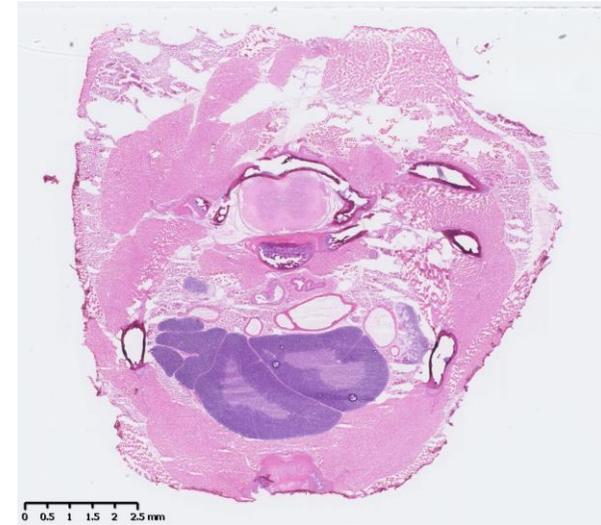


胸部組織 (184)

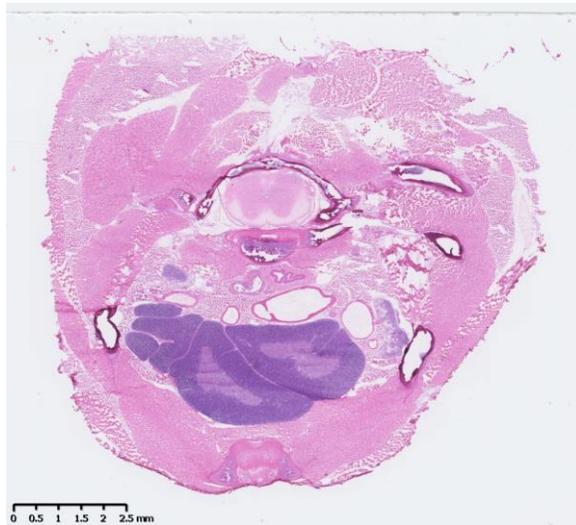
胸部組織のHE染色 連続切片



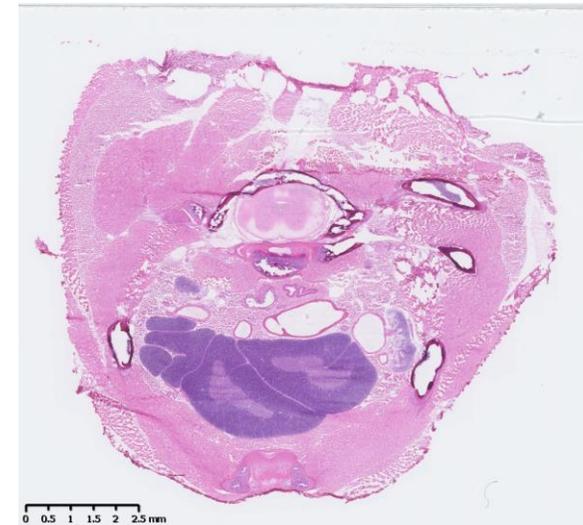
胸部組織 (185)



胸部組織 (186)

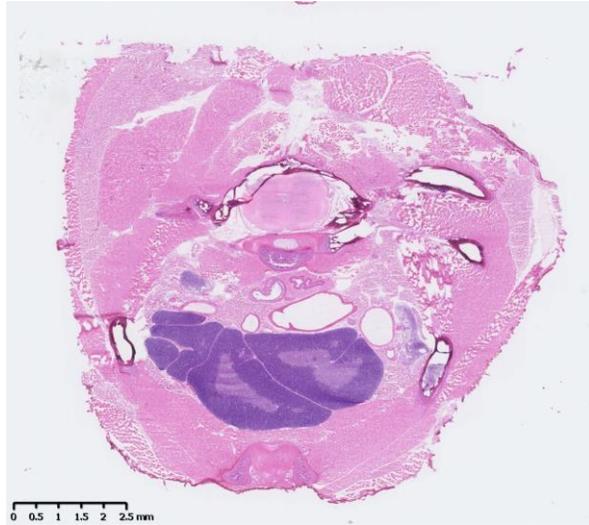


胸部組織 (187)



胸部組織 (188)

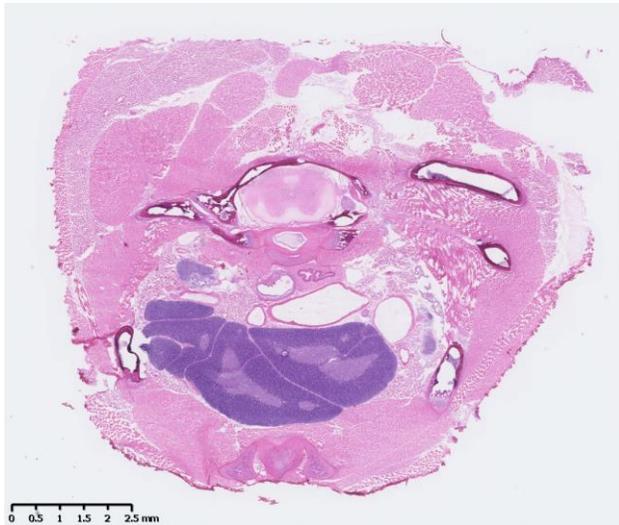
胸部組織のHE染色 連続切片



胸部組織 (189)



胸部組織 (190)

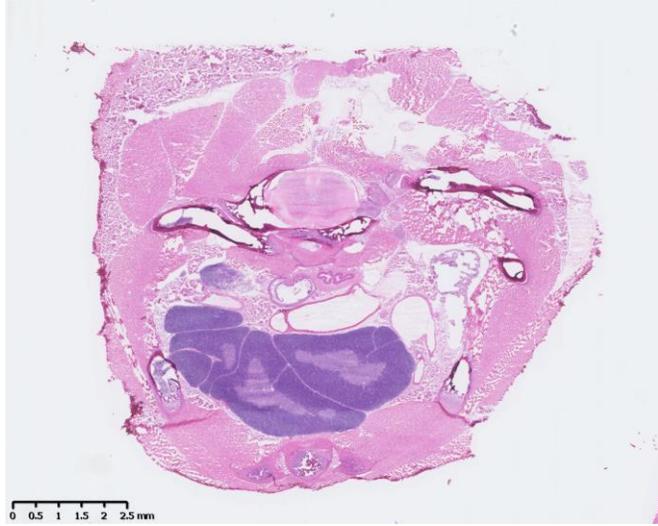


胸部組織 (191)

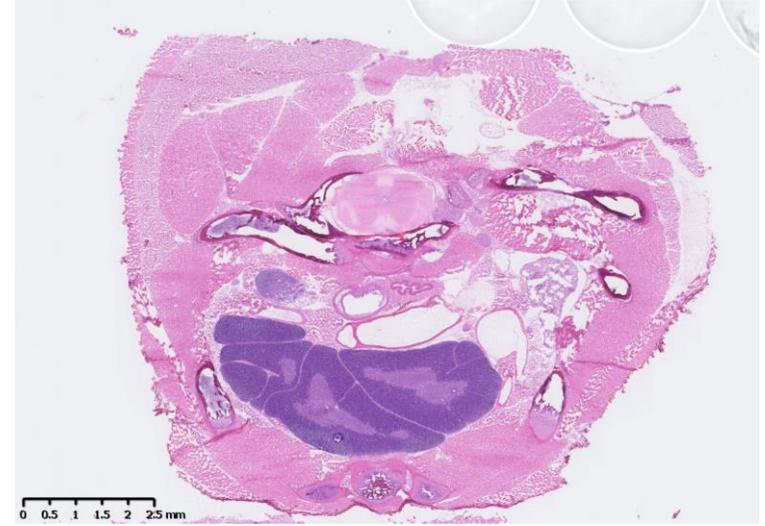


胸部組織 (192)

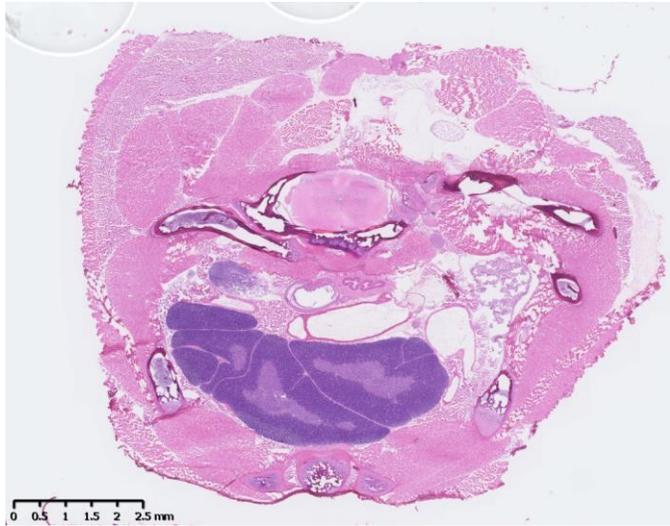
胸部組織のHE染色 連続切片



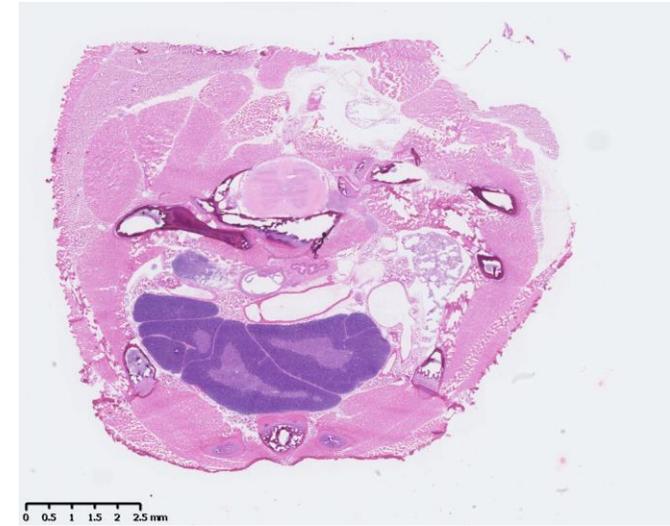
胸部組織 (193)



胸部組織 (194)

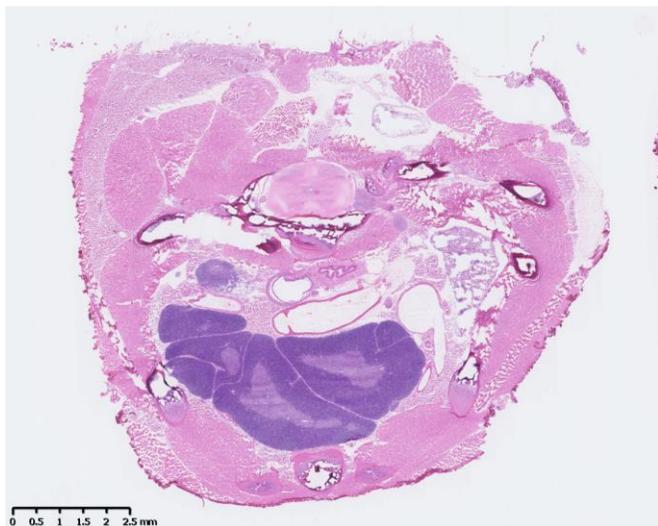


胸部組織 (195)



胸部組織 (196)

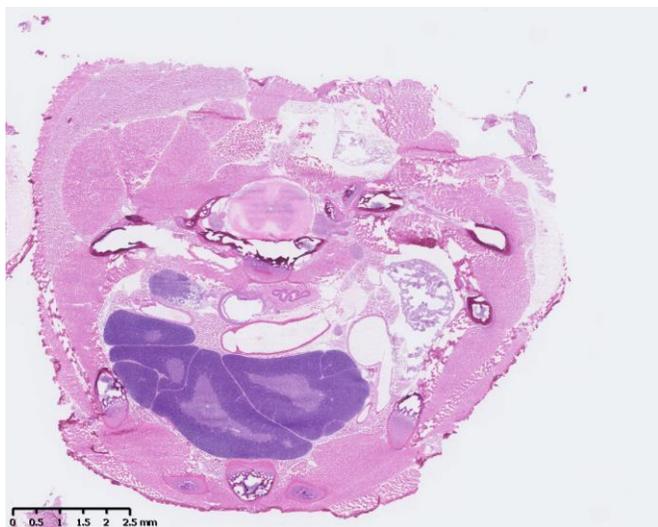
胸部組織のHE染色 連続切片



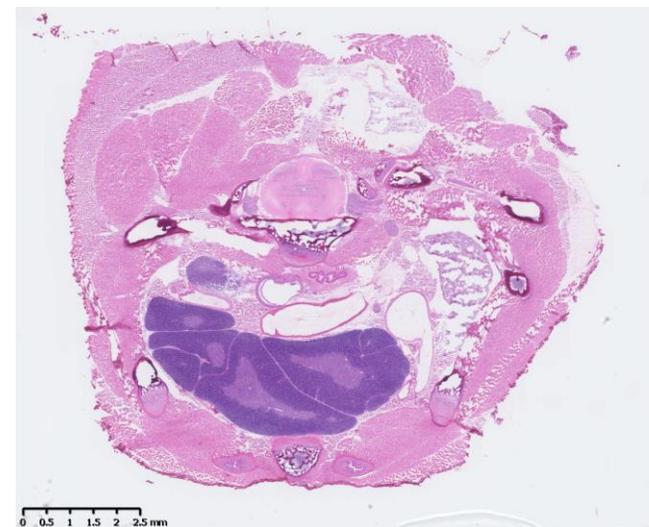
胸部組織 (197)



胸部組織 (198)



胸部組織 (199)



胸部組織 (200)

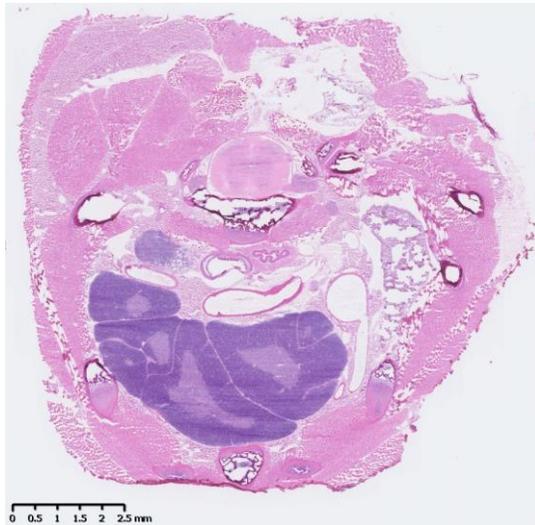
胸部組織のHE染色 連続切片



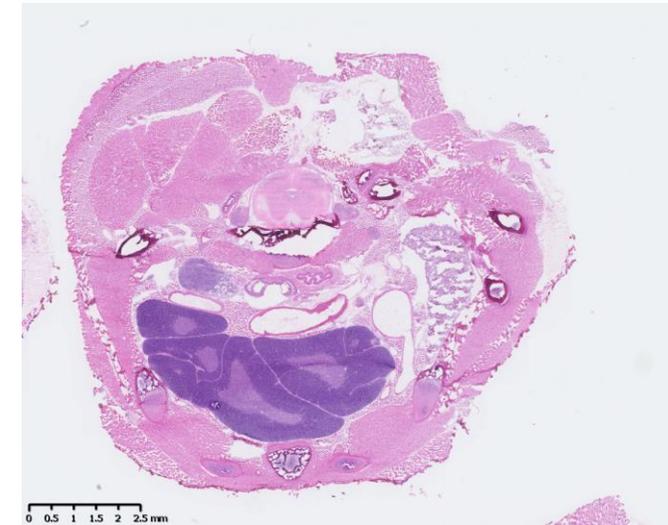
胸部組織 (201)



胸部組織 (202)



胸部組織 (203)

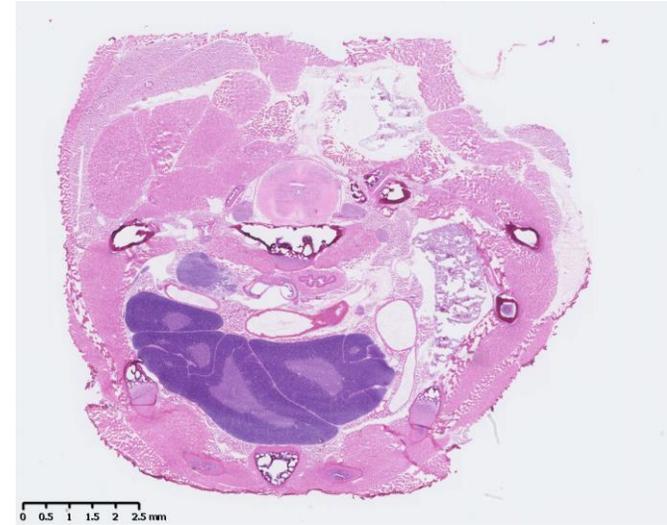


胸部組織 (204)

胸部組織のHE染色 連続切片



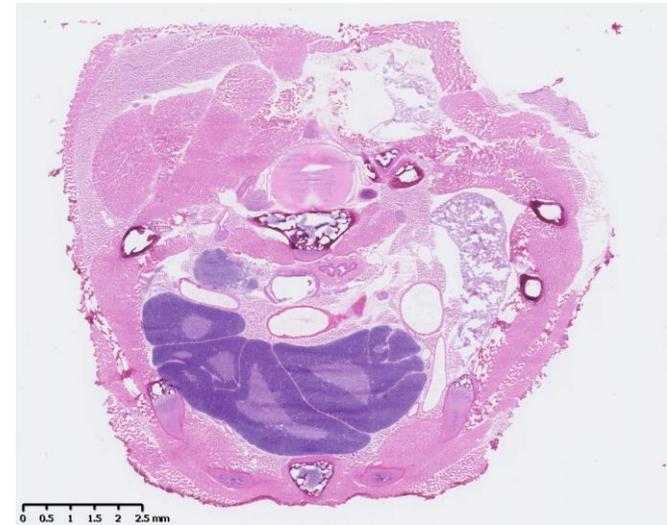
胸部組織 (205)



胸部組織 (206)

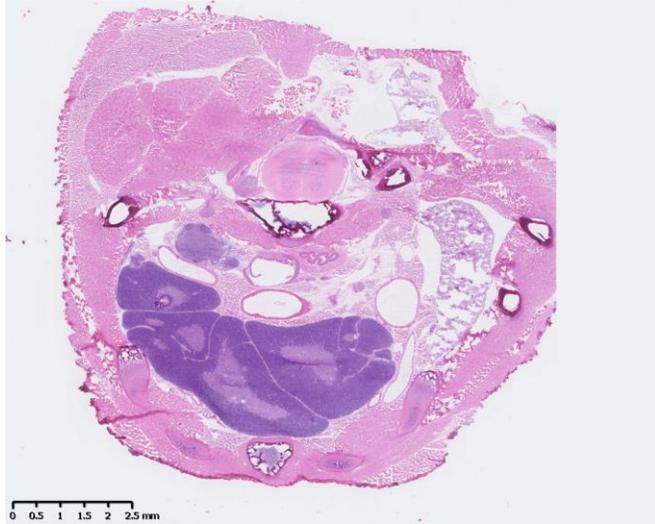


胸部組織 (207)

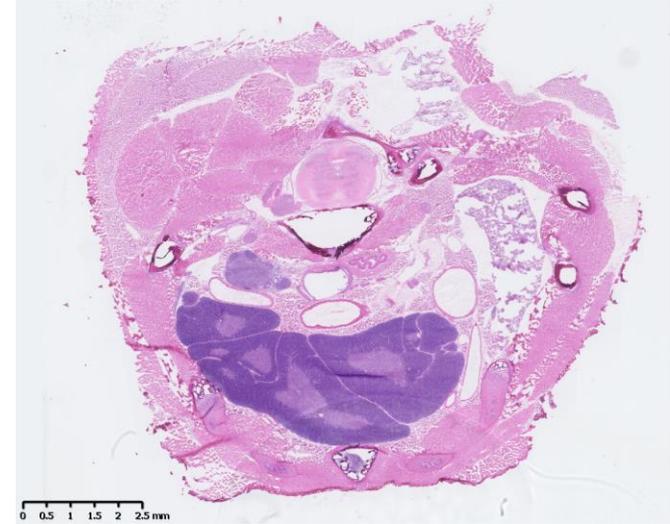


胸部組織 (208)

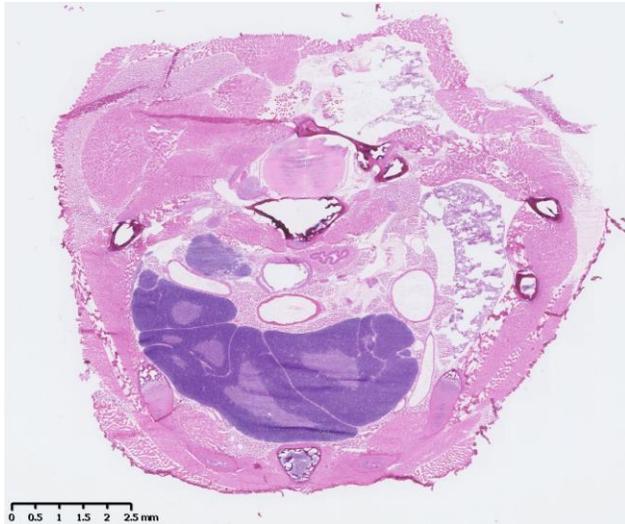
胸部組織のHE染色 連続切片



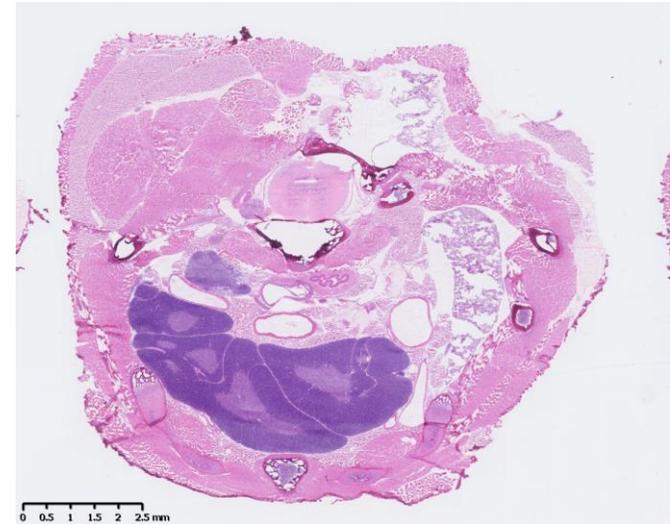
胸部組織 (209)



胸部組織 (210)

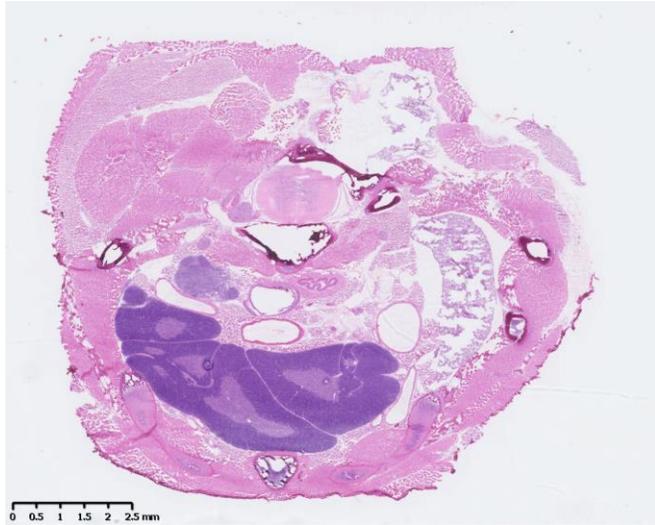


胸部組織 (211)

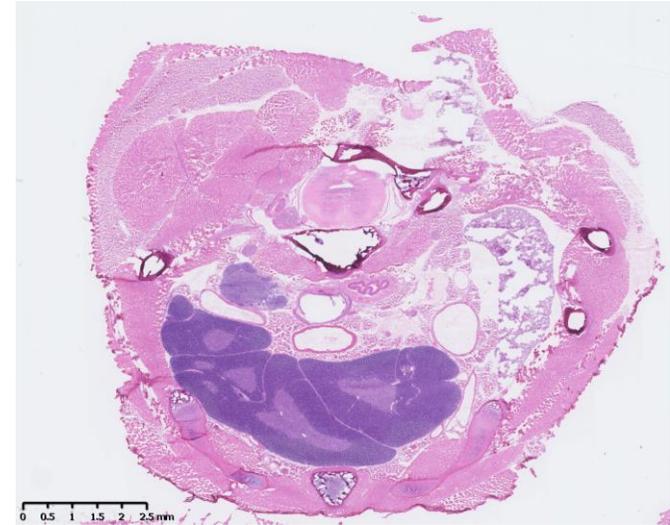


胸部組織 (212)

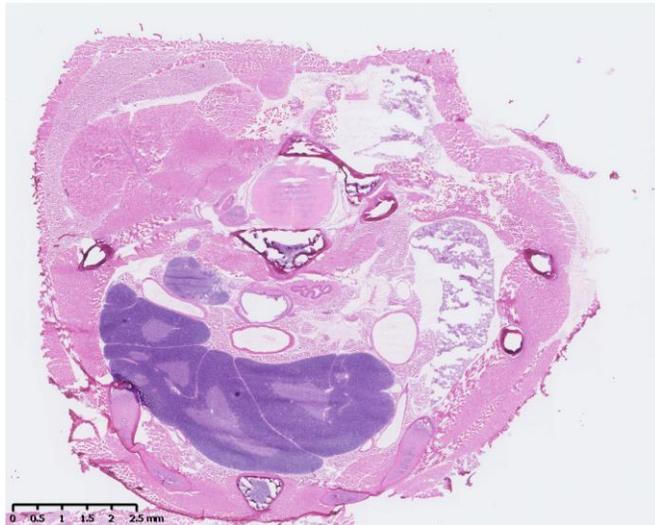
胸部組織のHE染色 連続切片



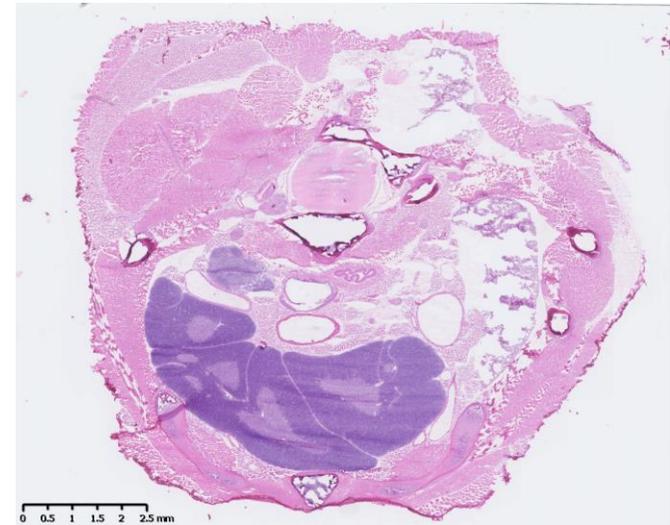
胸部組織 (213)



胸部組織 (214)

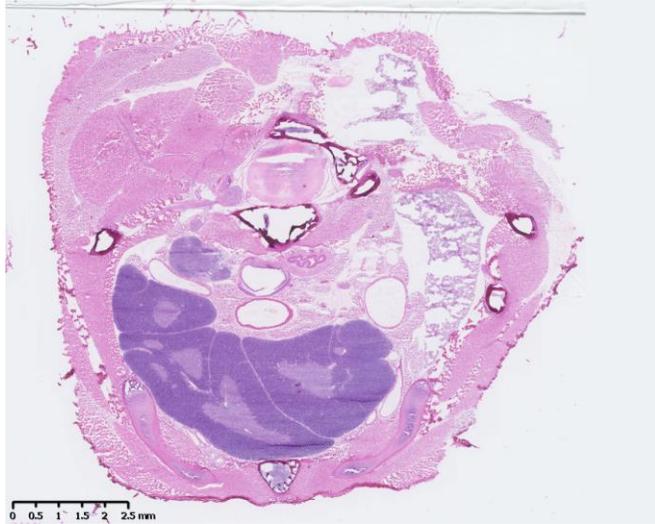


胸部組織 (215)

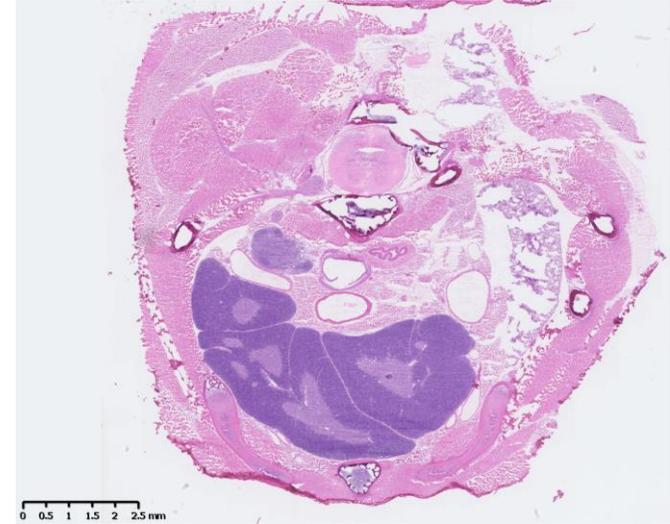


胸部組織 (216)

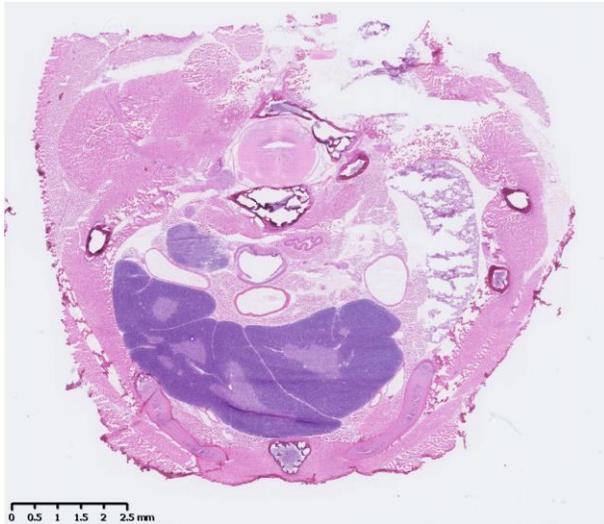
胸部組織のHE染色 連続切片



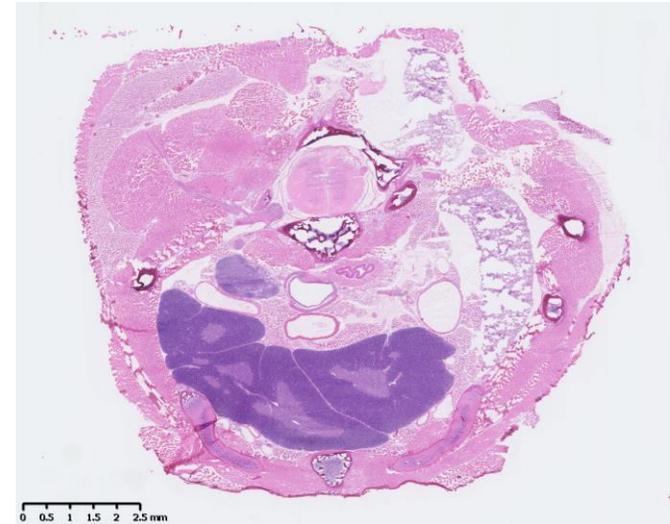
胸部組織 (217)



胸部組織 (218)

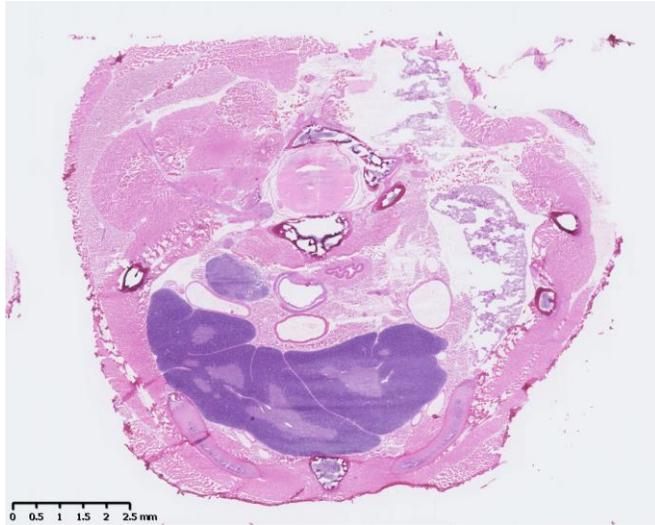


胸部組織 (219)

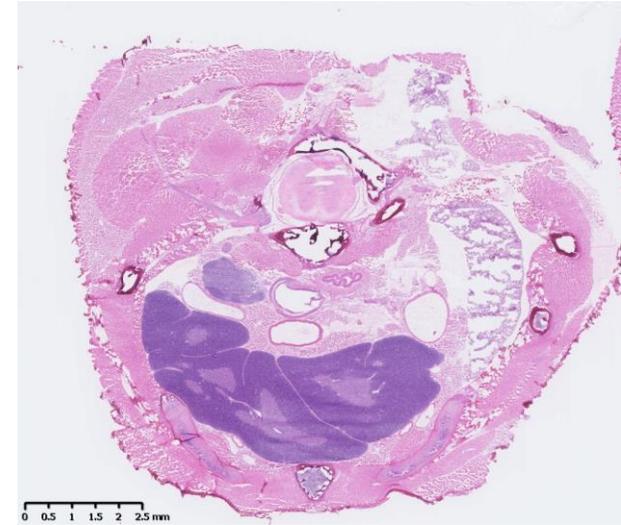


胸部組織 (220)

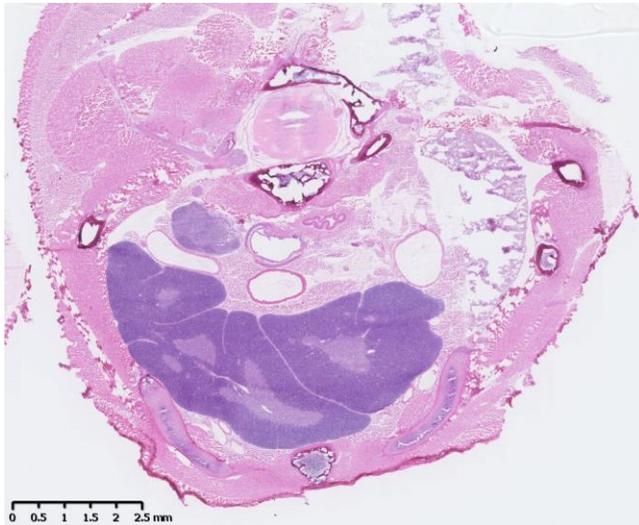
胸部組織のHE染色 連続切片



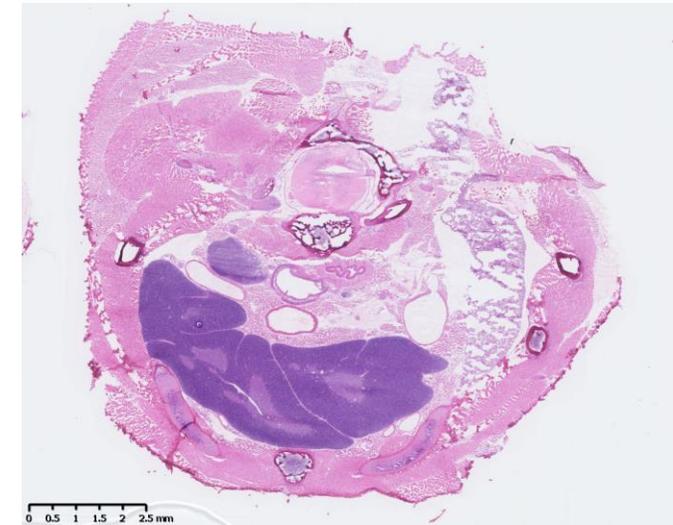
胸部組織 (221)



胸部組織 (222)



胸部組織 (223)

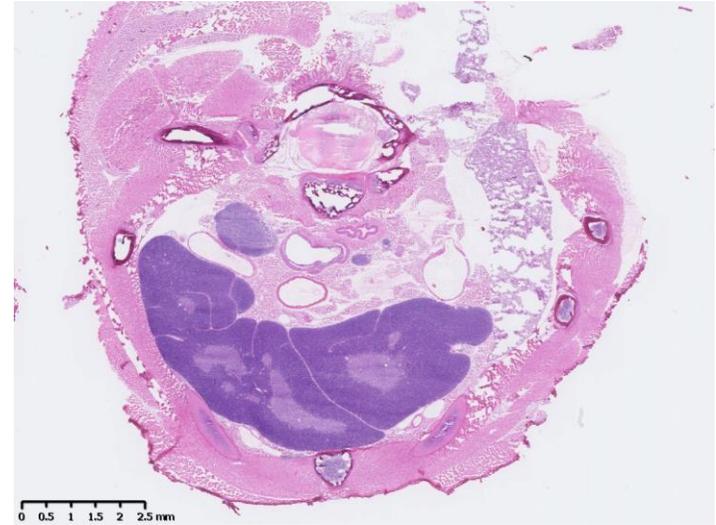


胸部組織 (224)

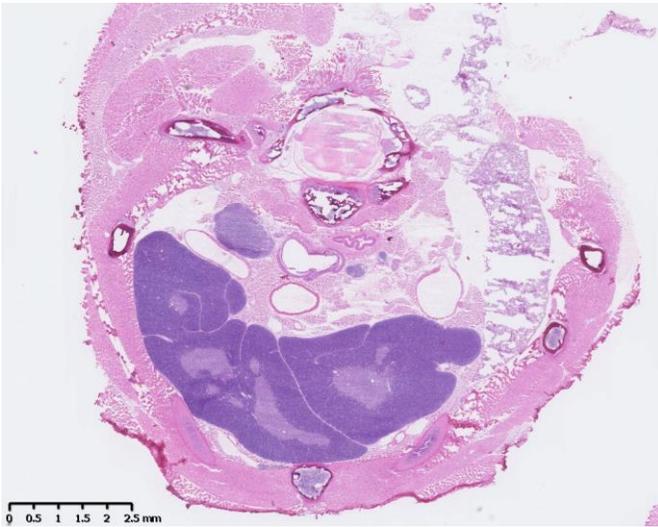
胸部組織のHE染色 連続切片



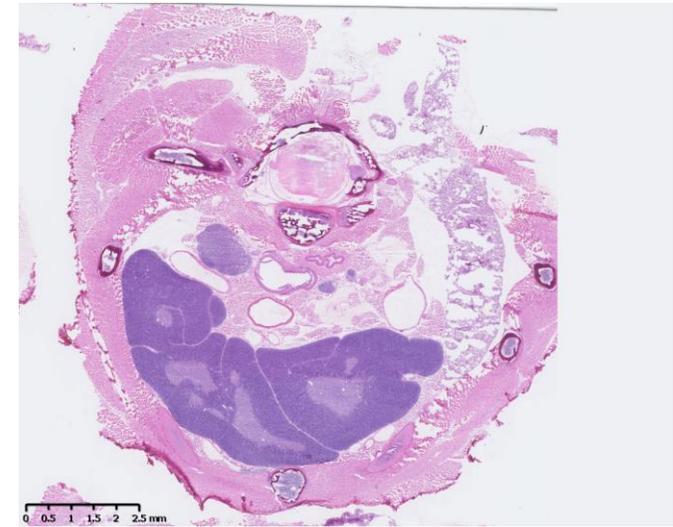
胸部組織 (225)



胸部組織 (226)

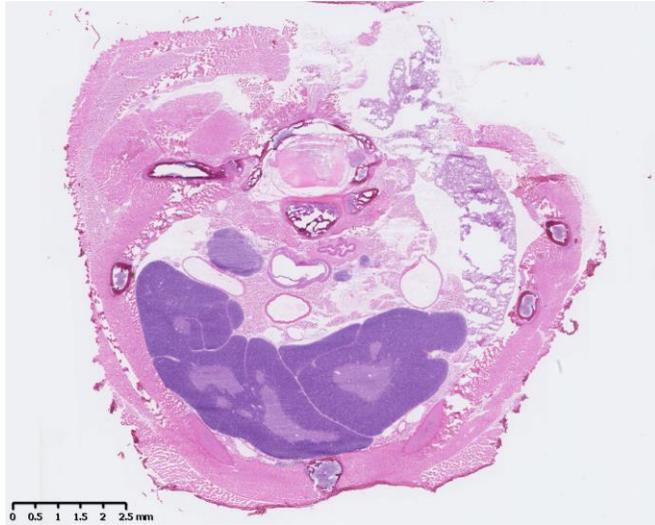


胸部組織 (227)

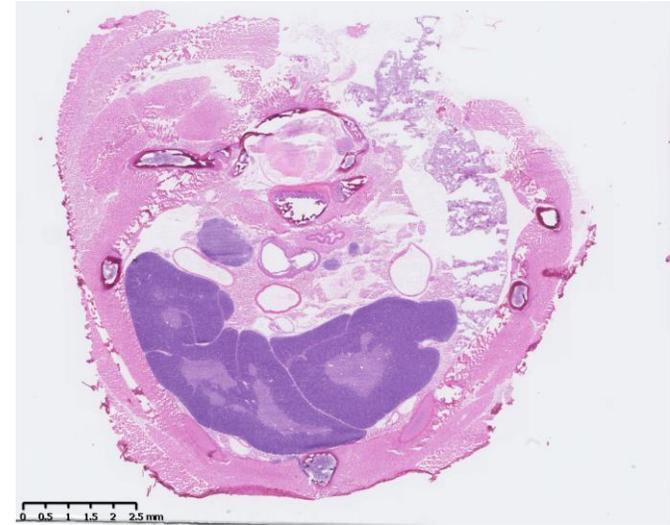


胸部組織 (228)

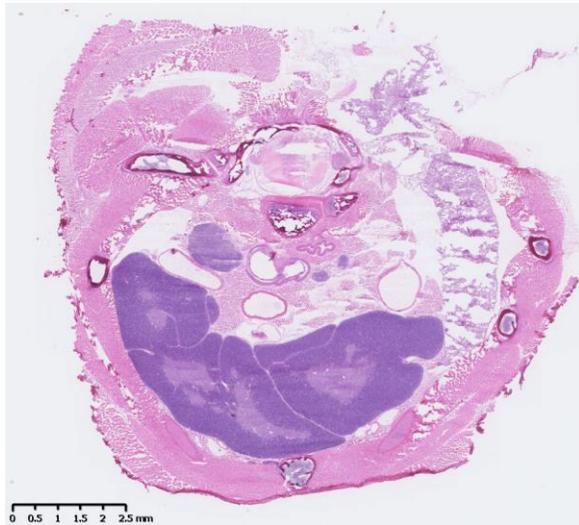
胸部組織のHE染色 連続切片



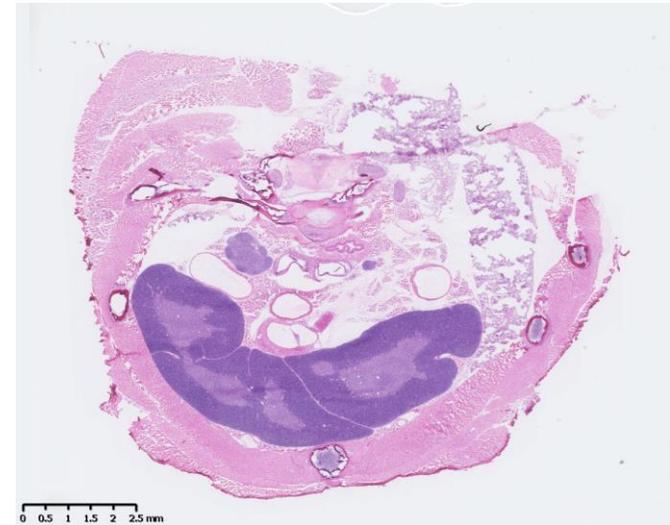
胸部組織 (229)



胸部組織 (230)

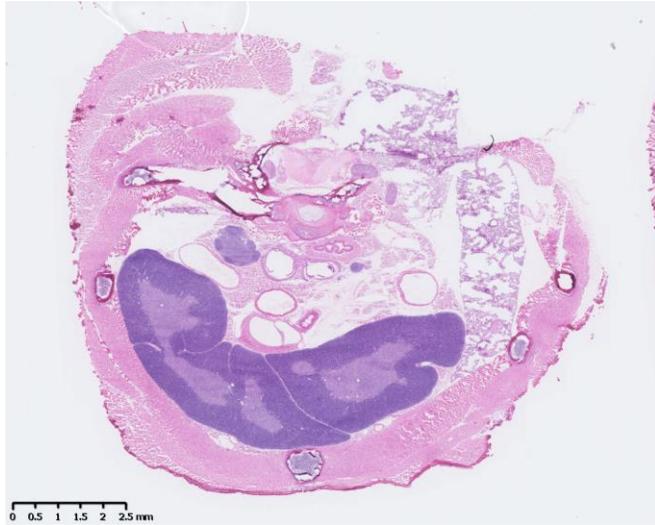


胸部組織 (231)

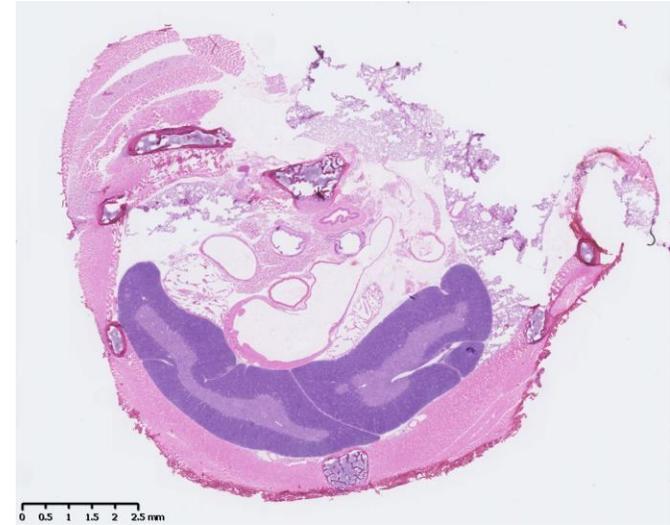


胸部組織 (232)

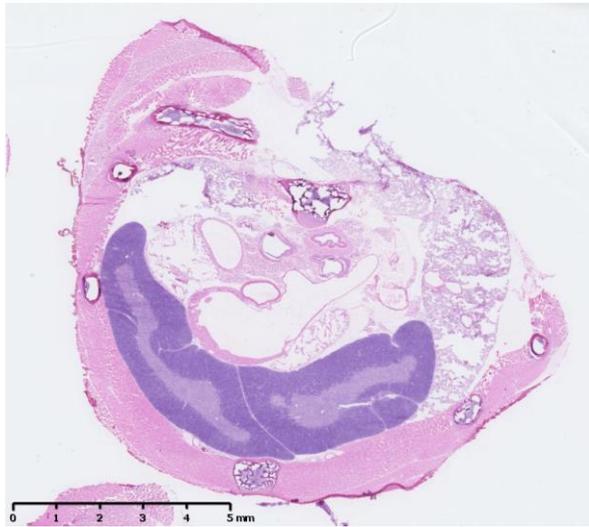
胸部組織のHE染色 連続切片



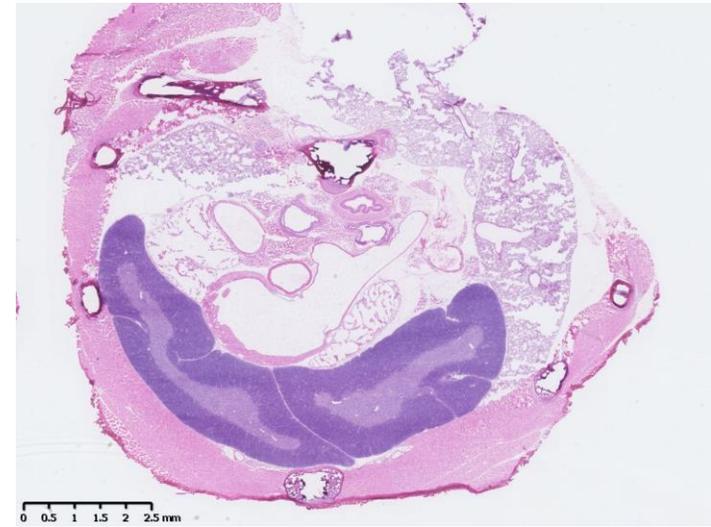
胸部組織 (233)



胸部組織 (234)

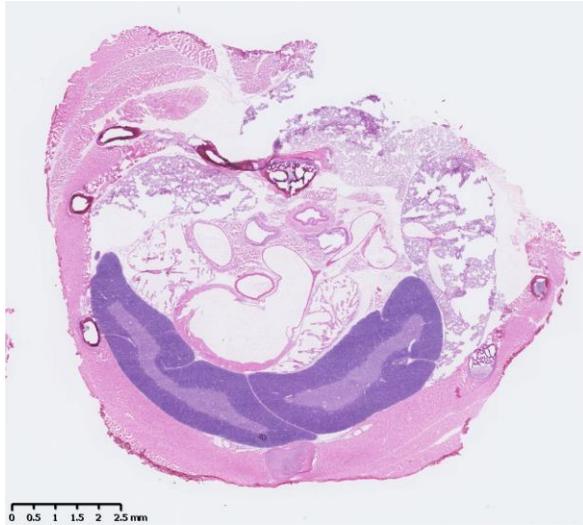


胸部組織 (235)

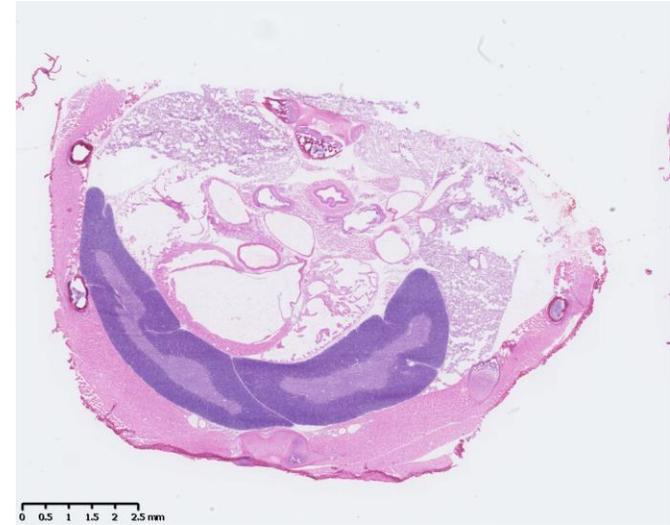


胸部組織 (236)

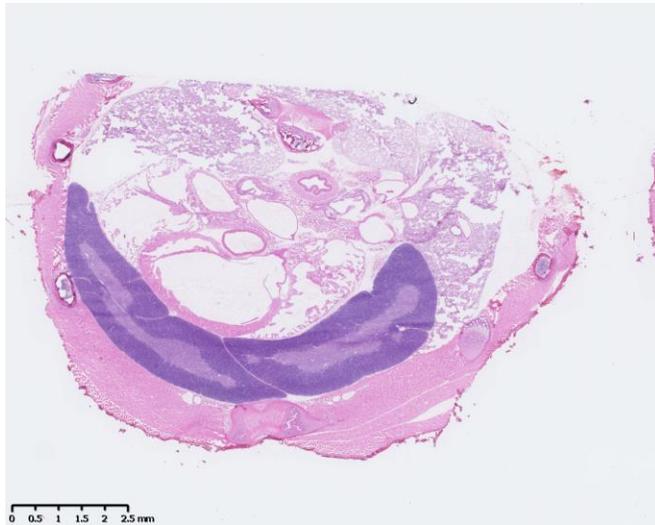
胸部組織のHE染色 連続切片



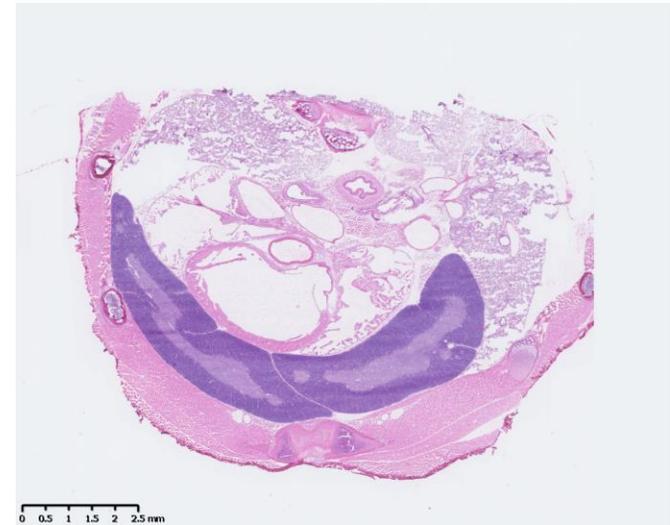
胸部組織 (237)



胸部組織 (238)



胸部組織 (239)



胸部組織 (240)