

## 分光した赤外線で凍結切片組織を透すとタンパク質の面白いFT-IR スペクトルとマッピング 組織像が見えてくる

### Interesting FT-IR Spectra and Mapping Images of the Protein were shown through Freezing Sectioned Tissues by Monochromatic Infrared Lights

三好 憲雄\*・赤尾 賢一\*\*  
MIYOSHI Norio\*・AKAO Ken-ichi\*\*

赤外線<sup>1</sup>、タンパク質<sup>2</sup>、凍結切片組織<sup>3</sup>、スペクトル<sup>4</sup>、マッピング<sup>5</sup>  
Infrared<sup>1</sup>, Protein<sup>2</sup>, Freezing Sectioned Tissues<sup>3</sup>, FT-IR Spectra<sup>4</sup>, Mapping Images<sup>5</sup>

#### 要旨

赤外分光技術の進展に伴い、この技術を顕微鏡にドッキングしたフーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光顕微鏡やレーザーラマン顕微鏡が開発されてきた。これらの顕微鏡は主に半導体素子の欠損・欠陥の検出に応用されて発展したが、生体組織の観測にも適用されつつある。今回報告の内容は、凍結実験腫瘍組織の切片を赤外線の透過剤であるフッ化バリウム板の上に乗せて、FT-IR 分光顕微鏡にて FT-IR スペクトルを計測した。さらにスペクトル解析により組織内タンパク質の 2 次構造成分を分離したマッピング像により、癌細胞の Viability (元気度や悪性度) の領域を示す画像を構築することに成功した。

#### 緒言

がんの早期発見の技術向上は、がん撲滅のためには大変必要なこととされている。この早期がんの発見にも最終診断法として、従来より病理迅速診断がなされている。しかしながら、迅速診断故に手術中の生検や診断材料が提出される予定時間に、臨床検査技師と臨床病理医が待機している必要があり、簡易の組織固定のために病理診断のヘマトキシリン・エオジン (H. & E.) の染色性も悪く、光学顕微鏡下での的確な診断を困難にしている。

近年の赤外分光技術の進展を踏まえて、過去 8 年間に渡り病態検査法の一つとして適用を考え、生検の種々の凍結切片組織のフーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光計測を繰り返してきた。その結果、表題のような結論を得ることが出来、実際のがん生検迅速診断時間 15 分間で、病理診断に耐えうるがん診断画像が得られるようになった。その結論の内容と応用開発について紹介する。

#### 実験材料と実験方法

- (1) 実験材料：耳鼻咽喉科における甲状腺癌の摘出及び脳外科における肺から脳に転移した扁平上皮癌摘出手術材料 (生検：術中迅速診断用) の凍結切片 (10 $\mu$ m) をフッ化バリウム

(BaF<sub>2</sub>:赤外線の透過剤：直径 10mm, 厚さ：1mm) 板の上に乗せる。

- (2) 測定装置：フーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光顕微鏡は科学技術振興機構 (JST) より、平成 18 年 1 月より 1 年間、シーズの顕在化ステージで受託研究の承認を受け、日本分光株式会社との共同開発研究ができた。その結果、下記の写真のようなリニャーアレー方式検出を搭載した迅速診断用専用機が完成した。



従来の FT-IR 顕微鏡では、4,000 ポイントのマッピングを行うのに 8 時間から 10 時間を要する。それでは、手術中に診断結果を出すことが出来ないうちに、あまり実用的ではない。そこで、計測時間の短縮のするために、いわゆる点分析から線分析できるリニャーアレー方

\* 福井大学医学部腫瘍病理学領域 助教

\*\* 日本分光株式会社 開発部応用技術課 課長

\* University of Fukui, Faculty of Medicine, Tumor Pathology Division, Assistant Professor

\*\* JASCO Corporation, Department of Development, Applied Technology Division, Section Chief

式による検出器(MCT-4000)を従来の FT-IR 顕微鏡に搭載する開発により実現できた。

### (1) リニヤーアレー方式検出器の搭載後の正常作動の確認

1) 目的：リニヤーアレー方式の検出器の連動により、従来 10 時間以上の計測時間が必要であったものを、10 分間で計測を終了させてデータ画像の取得のスピードアップに貢献出来るか否かの検証を行う。

2) 方法と結果：リニヤーアレー方式の検出器を従来の FT-IR 分光顕微鏡 (Irtron-IRT-30 型) の中に組み込んで、従来の駆動ソフトとのマッチングを計り、実際のサンプルを載せて計測を開始した。その結果、従来の機種構成では 10 時間のマッピングポイント (1,000) を遥かに超えた 10,000 ポイントを 10 分間で計測を完了できた。

3) 成果：スピード面では従来の 600 倍、更に亢進された点は、形態学で最も重要な空間分解能に対して、 $10\mu\text{m}^2$  が限界であったのに対して、今回の新しい計測方式により  $6\mu\text{m}^2$  の分解能を実現できた。従って、空間分解能では約 2.7 倍の空間分解能をクリアしたことになる。今後、従来の病理標本の画像との比較において、診断に損傷のない画質が得られるか否かを検討する段階にある。

a) 概要 (既存技術との比較、優位性)：既存の技術では、実際の手術中の病理診断 (ゲフリール) 時間、15 分間に間に合う可能性が程遠い事実であったものを、今回の新しいリニヤーアレー方式の検出器の搭載により、実際の手術中の生検サンプルの計測でも実現可能である結論を得た。

b) 今後の課題：実際の手術中でサンプリングした生検用組織を凍結して切片の作製後、フッ化バリウム赤外透過剤の上に乗せて、新しい検出器を搭載して開発した装置とソフトで、どれ位の時間内で、どれ位の空間分解能で、15 分以内で画像の構築が可能で、その画像が従来の病理染色像に比較して診断可能なものであるか否かの見極めを行う必要性の課題が残されていた。

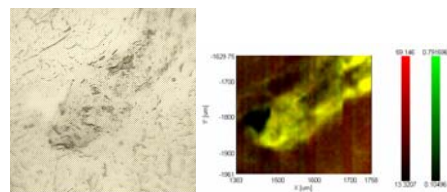
### (2) 手術切除甲状腺癌凍結切片組織の 10 分間計測に成功

1) 目的：実際の甲状腺癌組織の摘出

手術の生検と同じ時間内で、開発したリニヤーアレー FT-IR 顕微鏡にて計測を完了させる。

2) 方法と結果：実際の甲状腺癌組織の摘出手術材料を凍結させて連続の薄切切片 ( $10\mu\text{m}$ ) を作製して、片方は透過剤であるフッ化バリウム板 (直径 10mm, 厚み=1mm) の上に載せて開発したリニヤーアレー FT-IR 顕微鏡にて、腫瘍部位と正常部位との境界部分の領域 ( $376\mu\text{m} \times 331\mu\text{m}=124,456\mu\text{m}^2$ ) を空間分解能  $6\mu\text{m}$  でマッピングすると  $63 \times 55 = 3465$  本の FT-IR スペクトルを 10 分間で計測できた。目的成分不飽和脂肪酸 ( $\text{CH}_3/\text{CH}_2$ =赤色/緑色) ピークの面積を即座に抽出して、マッピングした領域に対してピーク面積の多い値ほど暖色になるように表示すると、より多い領域ほど暖色でカラー表示で半定量化された画像が更に 5 分間で構築することができた。また、同じ凍結連続切片の片方は、ヘマトキシリン・エオジン染色による従来の組織像との比較により、十分な診断に必要な情報を半定量的に提示した診断画像として適うものと判断した。

〔凍結切片透過像〕 (CH<sub>3</sub>/CH<sub>2</sub>=赤色/緑色)



### 3) 成果：

a) 概要 (既存技術との比較、優位性)：従来の FT-IR 顕微鏡の生体応用技術では、到底、臨床診断への適用は不可能であったものを、今回のリニヤーアレー方式の検出器の導入により初めて、診断に耐える空間分解能と計測時間をクリアしたものと考えられる。

b) 今後の課題：如何に多くの臨床診断試料に対して、収集・計測できるか？である。

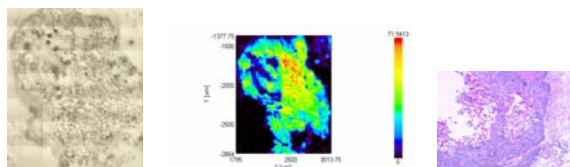
### (3) 15 分間で FT-IR 分光顕微画像構築の実現とその蓄積

1) 目的：実際の外科手術中に生検できる体制を組む必要があり、その目的に従った FT-IR 分光顕微画像の構築の実現とその蓄積である。

2) 方法と結果：上記 (2) の方法に従

った実際の肺から脳に転移した脳神経外科手術中の待機と実際のサンプル受け取りから15分以内で、下図のような診断画像の構築を行い、実際の病理の迅速診断と比較して、診断画像として耐えうるものであるかの検証を行った結果、満足のいく結果が得られた。

[凍結切片透過像] [エステル成分のマッピング像] [HE染色像]



### 3) 成果:

a) 概要 (既存技術との比較、優位性): 今までに実際の手術中に、迅速診断に耐えうるものであるかの検証は、この新しいFT-IR 顕微画像では適用することすら不可能であったものを可能にした。この事実は、今後、臨床病理診断への初めての適用例として提示し、流布させる大きな第一歩といえます。

b) 今後の課題: 上記のような機会を掴むことは、外科系臨床科、臨床外科病理部とFT-IR 顕微計測側との三位一体になって推進していく必要があるために非常に困難ではあるが、今後これらのチームワークを強力に推進させていく必要がある。即ち、医学部と附属病院との連携システムの構築が必要になってくるので、制度作りから始める必要も出ている。

### 参考文献

- [1] N. Miyoshi, T. Tuziuti, K. Yasui, Y. Iida, N. Shimizu, P. Riesz, and J. Z. Sostaric: Ultrasound-induced cytolysis of cancer cells is enhanced in the presence of micron-sized alumina particles. *Ultrasonics Sonochemistry*, in press. Accepted at 30<sup>th</sup> Oct. (2007).
- [2] H. Kinoshita, N. Miyoshi, T. Ogawa, T. Ogasawara, and K. Sano: Functional mapping of caries enamel of in human teeth with Raman microspectroscopy. *J. Raman Spectroscopy*, in press. Accepted at 9<sup>th</sup> Nov. (2007).
- [3] N. Miyoshi, H. Okada, M. Takata, M. Shinagawa, and K. Akao: New approaches detection secondary conformation of prion protein in

frozen-section tissue by Fourier-transform infrared microscopy. "New Approaches in Biomedical Spectroscopy" Eds. By K. Kneipp, R. Aroca, H. Kneipp, and E. Wenstrup-Byrne. American Chemical Society Publisher, Washington, ACS Symposium Series, **963**: 41-51 (2007).

- [4] S. Nakajima, H. Hoshina, M. Yamashita, O. Otani, and N. Miyoshi: Terahertz imaging diagnostics of cancer tissues with a chemometrics technique. *Applied Phys. Letters*, **90**: 041102-1-3 (2007).
- [5] H. Inoue, Y. Kajimoto, M. Shibata, N. Miyoshi, N. Ogawa, S. Miyatake, Y. Otsuki, and T. Kuroiwa: Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J. Neuro-Oncology*, **83** (3): 223-231 (2007).
- [6] N. Miyoshi, H. Kinoshita, and T. Moriawaki: FT-IR image of TiO<sub>2</sub>/Pp-IX particles in tumor tissue. "Portable Synchrotron Light Sources and Advanced Applications", *American Institute of Physics Conference Proceedings*, **902**: 77-78 (2007).
- [7] H. Kinoshita, N. Miyoshi, K. Miyachi, T. Ogasawara, Y. Kitagawa, H. Itoh, and K. Sano: Phosphate and amide-III mapping of sialolith with Raman microspectroscopy. *J. Raman Spectroscopy*, in press. Accepted 14<sup>th</sup> May (2007).
- [A] 「ヒトや動物の細胞の増殖の抑制を容易にかつ安価に実施できる方法および薬剤を提供する。」発明者: 三好憲雄、伊藤慎治; 出願人: 三好憲雄、特願番号: 2007-263784、出願日: 平成19年9月8日

### 結び

最初は、ハード側の装置の導入と従来の顕微鏡との整合性やソフト間でのマッチングが大きな課題であった。しかしながら、企業側の献身的なサポートにより、正常に駆動させることが可能になり、診断計測機器として形を整わせることができた。

具体的臨床サンプルの計測に入り、実際の臨床診断画像に耐えうるものであるかの見極めが大切であり、それを実行した結果、十分耐えうる診断画像であることを実証化できた。さらに発展させて、実際の外科手術中の診断画像構築を実現させて、補助的迅速病理診断画像として十分適用可能であるこ

とが判明した。これらに纏わる大学・学部間の体制作りや、JST と厚生科研費などへの申請を通じて、本格的に取り組んでいくことが肝要と思われる。

#### 謝辞

この研究のきっかけと受託頂いた日本科学技術振興機構の関係者に、厚く御礼申し上げます。また、共同研究で多大なサポートを受けた日本分光株式会社の開発部・応用技術課、営業部、総務部の方々にお礼申し上げます。