

**金コロイドナノ粒子を投与した実験腫瘍モデルの
凍結切片組織内赤外分光顕微画像の計測と構築**

**Measurement and imaging of infrared microscopy for the cryo-section tissue
of a tumor model administrated with gold nano-colloid particle**

三好憲雄^a, 木下英莊^a, アンドリアーナ ビビン^a, 片山寛次^a, 家路豊成^b, 太田俊明^b
Norio Miyoshi^a, Hidetaka Kinoshita^a, A.B. Bibin^a, Kanji Katayama^a, Toyonari Yaji^b, Toshiaki Ohta^b

^a 福井大学医学部, ^b 立命館大学 SR センター

^a Faculty of Medicine, University of Fukui, ^b The SR Center, Ritsumeikan University

実験腫瘍モデルである扁平上皮癌の凍結切片組織を作成し、立命館大学 SR センターのビームライン-15 番に設置の FT-IR 顕微鏡にて計測した。次の連続切片を固定後、ヘマトキシリン・エオジン(H.&E.)染色組織像を作成しマッピング像の解釈を試みた。その結果、オパール様癌部には癌細胞の核がなく、その周辺にはリン酸(対称性 P=O)基伸縮振動成分が多く存在している事を確認し、H.&E.染色像からも癌細胞核の存在を確認できた。また、それらの左上隅には脂質(非対称性 CH₃+CH₂)の CH 伸縮振動成分が多く存在している事が分かり、H.&E.染色像のピンク色壊死部に対応した。従って FT-IR 顕微マッピング像からは H.&E.染色像の組織形態との相関性が得られた。

Experimental skin tumor model was examined by the explanted the squamous cell carcinoma (SCC) cultivated cells under the skin of a nude mouse. The sliced tissue of the tumor model was measured by the FT-IR microscope on the SR center beam line (BL-15). The histological H.&E. stained image was compared with the mapping image of FT-IR microscopy. It was resulted that the symmetrical stretching P=O component were presented the around the opal cancer as same as the cancer nucleus distribution in H.&E. staining image. There were presented of the anti-symmetrical stretching C-H vibration components of CH₃ and CH₂ at the left-up area of the 2D FT-IRM mapping image related with the pink color part, that is necrotic area in H.&E. stained image. Accordingly, these components of lipid (C-H) and phosphate oxide (P=O) were nice related with the histo-chemical meaning in H.&E. staining image in this study.

Keywords: FT-IRM, 鮮度保持セルホルダー、ヘマトキシリン・エオジン(H.&E.)染色組織像

背景と研究目的： 平成 21 年 10 月より JST 委託(機器開発事業)で開発した鮮度保持セルホルダーを搭載したリニャーアレー型検出器の赤外顕微装置(FT-IRM)を使用して、臨床生検肺腺癌のサンプルを約 50 症例計測し、FT-IRM 癌診断画像として構築すべく計測データを解析してきた。特に①癌組織特有の蛋白質 2 次構造成分比率(Amide-I ピークの解析)、②脂質(非対称性 C-H 伸縮振動成分の解析)や③癌細胞核 DNA 量に相関性のあるリン酸(対称性 P=O 伸縮振動成分の解析)を中心に着目して、従来の組織診断画像として用いられているヘマトキシリン・エオジン(H.&E.)染色を行い、その形態学的検証と合わせて、主成分回帰分析(PCR)法を用いた癌悪性度に 관련된検量線の作成から FT-IRM 癌診断画

像を構築してきた。

目的は言うまでも無く信頼おける癌診断画像の構築で有り、癌組織内に特有の生体成分を赤外分光学的に抽出し、その癌成分を非癌部とコントラスト良くイメージ化する事である。上記の目的のために、SR センターではより高輝度なビームラインを活かした高分解能 FT-IRM スペクトの計測を主眼として意義ある実験研究を目指す事にした。

実験：

(1) 計測サンプルの作成と移動方法： ヒト扁平上皮癌(SCC)由来培養細胞を用いて皮膚癌実験腫瘍モデルを作成後、その腫瘍組織を-20℃の凍結薄切切片作製機にて、10μm の厚みで作成し、透過剤である BaF₂(直径10mmの円形、厚み1mm)の板の

上に載せてプラスチックのシャーレ内に密封してSRセンターに移動し、測定サンプルとした。

- (2) **計測機器**：BL-15放射光赤外顕微鏡(分光器、顕微鏡はそれぞれThermo Scientific社製のNicolet-6700型及びContinuumXL型)を用いた。
- (3) **測定条件**：透過モード、32xカセグレン鏡、顕微アパーチャサイズ=7μm×7μm、測定間隔=7μm、25回積算による2次元マッピング測定を行った。X軸方向=11ポイント、Y軸方向=20ポイント、合計220本のスペクトルを測定した。測定波数範囲=11,000~750cm⁻¹、カーブフィッティング中赤外領域=4,000~1,000cm⁻¹での殻吸収ピークの分離とそのピーク面積値をマッピング2次元領域に対して、色を変えて表示した。
- (4) **解析方法**：各スペクトルをカーブフィッティングにより以下の条件でピークを分離した。その殻吸収のピーク面積を求めAmide-Iと-IIの合計面積で割った比率をエクセルでマップを作成し、H.&E.染色像と対応させた。また、必要に応じてベースライン補正を施した。

結果、および、考察：

- (1) 今回計測した凍結薄切片組織の可視透過像とH.&E.染色像を対比させてFigure 1に表示した。
- (2) 2回のマシンタイム計測のスペクトルの1例をFigure 2.に示した。
- (3) 組織内脂質成分に由来する非対称性 C-H伸縮振動成分のマッピング像を H.& E.染色像と共に Figure 3.に示した。これから壊死部に脂質成分が多い事が分かった。
- (4) 対称性 P=O 伸縮振動成分(Figure 4)は、癌部内癌細胞核の多い部分に局在している事が、H.& E.染色組織像の対比で明らかになり、従来の癌組織像の特長を表示できた。

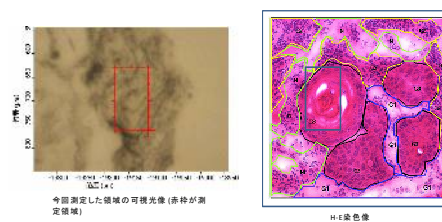
文献

- [1] N. Miyoshi, et al., *ACS Symposium Series*, **963** (2007) 41-51.
- [2] 三好憲雄：ぶんせき、**2011 (3)** (2011) 270-272.

論文・学会等発表 (予定)

- [1] N. Miyoshi, T. Yaji, and T. Ohta, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry : 14-ICHC (ポスター発表)

可視光像と染色像との対応



赤枠内のほぼ中心に、数十μm程度の大きさのオパール様点状のコントラストが確認されるが、その周囲の輪郭が染色像とは異なる。他に判断できる箇所が特定できなかったため、測定方向が同じと仮定すると、左上の領域がNormal領域の可能性が高い(右図青四角枠)。

Figure 1: Transmitted Image and H.& E. stain

測定されたスペクトル(一例)

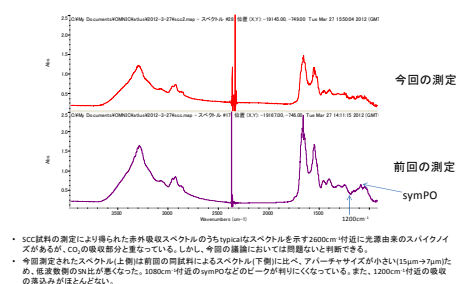


Figure 2: FT-IRM Spectra of Tumor Tissue

AntisymCH₃CH₂

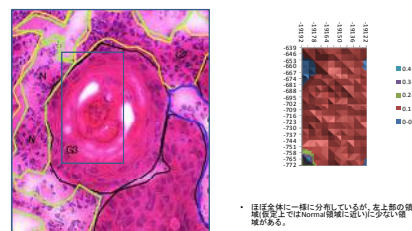


Figure 3: H.& E. stain and FT-IRM Mapping Image of Antisym CH₂CH₃.

SymPO

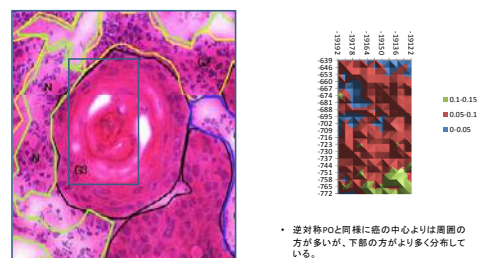


Figure 4. H. & E. stain and FT-IR Mapping Image of symP=O Compo.