

R1303

実験腫瘍組織内生体主成分の分布および機能的構造成分の解析と FT-IR 顕微イメージング (2)

Analysis of factional, vibrational components and construction of the imaging by infrared microscopy for a tumor model tissue-(2)

三好憲雄^a, 片山寛次^a, 家路豊成^b, 太田 俊明^b
Norio Miyoshi^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

^aFaculty of Medicine, University of Fukui, ^bThe SR Center, Ritsumeikan University

悪性脳腫瘍(C6)モデル組織である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、Necrotic な癌部には癌細胞の核が少なく、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。その周辺にはリン酸(対象性 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 Viable な癌細胞核の集中度との相関性が確認できた。以上の事実から 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関連性が得られ、且つ定量的に形態的画像の構築を可能にすることが明らかにできた。

Experimental tumor model tissue was prepared by a C6 malignant glial tumor cultivated cells to transplant under the skin of BALB-c-mu/mu strain 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 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. On the other hand, the symmetrical stretching P=O component were presented the around the necrotic area as same as the viable cancer nucleus distribution in H.& E. staining image. Accordingly, these components of lipid (C-H) in the necrotic cancer area and phosphate oxide (P=O) were related in the viable cancer regions on the histo-chemical meaning of the H.& E. staining 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ヤ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(対象性 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相関した検量線の作成から FT-IRM 癌診断画像を 4 色化で構築してきた。

目的は言うまでも無く信頼おける癌診断画像の構築であり、癌組織内に特有の生体成分を赤外分光学的に抽出し、その癌特有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 スペクトル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：**悪性脳腫瘍培養細胞(C6)を用いて悪性脳腫瘍実験腫瘍モデルをマウスの大腿部に作成後、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 Science社製のNicolet 6700型及びContinuumXL型)を用いた。
- (3) **測定条件：**透過モード、32 x カセグレン鏡、顕微アパーチャサイズ=25μm x 25μm、測定間隔=25μm、100回積算による2次元マッピング測定を行った。X軸方向=12-28ポイント、Y軸方向=8-13ポイント、合計104-182本のスペクトルを6箇所測定した。測定波数範囲=11,000~750cm⁻¹、カーブフィッティングは 4,000~1,000cm⁻¹の中赤外領域に加え、近赤外領域の5156cm⁻¹(CON)と4601cm⁻¹(C=O, O-H)にも注目して、それら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ピークを分離し、その各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) 組織内脂質成分に由来する非対称性 C-H伸縮振動(CH₂)成分のマッピング像をH.&E.染色像と共にFigure 2-[A].のように、下層の癌領域の緑色に分布した。
- (3) 同じくエステル結合に由来するC=O成分もまた下層の癌領域に分布していた。(Figure-2-[B])
- (4) 対象性 P=O伸縮振動成分(Figure-2-[C])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.

学会等発表

- [1]家路豊成、太田俊明、三好憲雄：赤外顕微鏡ビームラインの生物学への応用(ポスター発表)、第27回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム JSR14)、広島、2014.01.

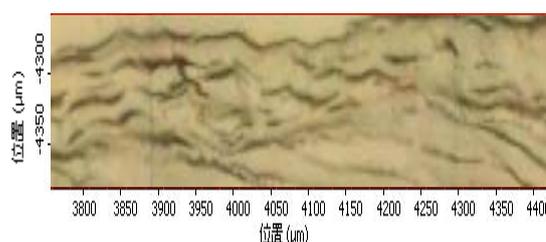


Figure-1: The transmitted and H & E stained images of C6 tumour tissue.

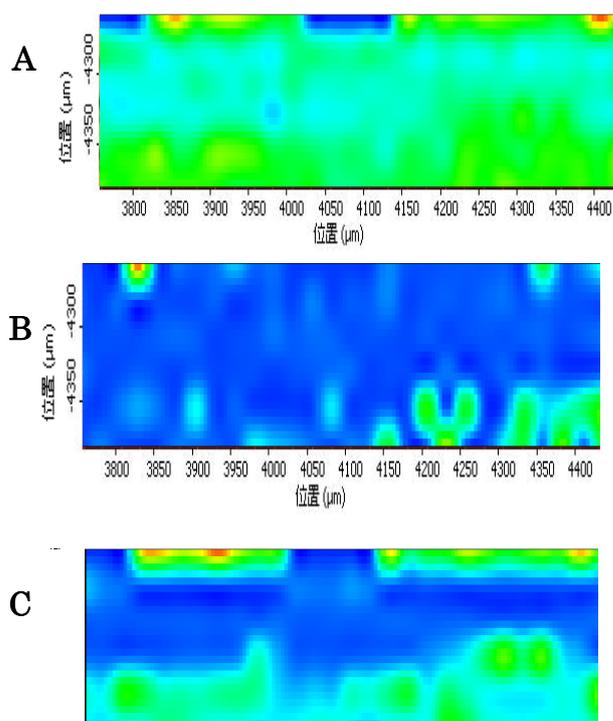


Figure-2: The mapping images at 2925 (asym CH₂) [A], 1740 (C=O) [B], 1080 (sym PO₂) [C] cm⁻¹, respectively.