

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590369

研究課題名(和文) テラヘルツ波による病理組織解析

研究課題名(英文) Investigation for application of Terahertz-Wave spectroscopy to high-accurated histopathological analysis

研究代表者

三浦 康宏 (MIURA YASUHIRO)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：40398483

研究成果の概要(和文)：テラヘルツ波(以下 THz 波)の 1) 光波の直進性と電波の透過性の双方の性格を有すること、2) 画像(イメージング)に必要な波長をレンズ等で取得が可能であること、3) 物質に特異的な振動波長、即ち物質特異的スペクトルを有すること、4) 生体侵襲性がないことなどの特徴を応用して、今回は、形態観察を含めより精度の高い病理組織解析技術の確立とその実用化のための研究を遂行した。

- 1) THz 波によるパラフィン包埋組織切片の病理組織解析への応用が可能である。
Miura Y, Kamataki A, Uzuki M, Sasaki T, Nishizawa J, Sawai T: Terahertz-wave spectroscopy for precise histopathological imaging of tumor and non-tumor lesions in paraffin sections. Tohoku J Exp Med. 223: 291-6(2011)
 - 2) 手術中の迅速診断に用いられる凍結切片での解析が可能である。これは、手を加えない、より自然な組織であるため、組織解析だけでなく、4) の物質解析との併用も可能性である。これは、現在、論文を作成中である。
 - 3) THz 波イメージングにおける THz 波の組織透過性因子の組織、細胞学的解析を行い、透過性を与える影響は組織、細胞の多寡による密度の問題だけではなく、壊死、変性、肉芽組織、線維化など質の違いによる可能性も受ける可能性も示された。この成果については、現在、論文を作成中である。
 - 4) THz 波による生体分子マーカー(抗体、特異的生体物質)の検出への応用)、細胞の微細な変化、特に癌化などに際しての微細な変化を把握でき、癌の発生の解析ならびに早期胃癌の発見に利用できる可能性がある。
- 以上の成果により、テラヘルツ波によるより精度の高い病理組織解析の発展性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

By using Terahertz-Wave spectroscopy which has the following characteristics: 1) going straight and transmittance, 2) easy to obtain the wave for imaging, 3) having molecular-specific "fingerprint wave", and 4) non invasive to human body, different from X-ray, we performed the high-accurated histopathological analysis. Results we obtained were follows:

- 1) Terahertz-wave spectroscopy for precise histopathological image analysis using paraffin-embedded sections.
Miura Y, et al: Tohoku J Exp Med. 223: 291-6(2011)
- 2) Terahertz-wave spectroscopy applicable for intraoperative quick diagnosis using fresh frozen specimen (in preparation)
- 3) In analyze the histological factors which influence the transmittance of Terahertz-Wave, it was demonstrated that the factors related on transmittance of Terahertz-Wave depend on not only the density of cell/tissue, but also the conditions such as inflammation, necrosis and fibrosis and so on.
- 4) Application of Terahertz-wave spectroscopy for Immunohistochemical staining which is able to be analyze both the chemical component as well as histopathological features.

From our results for three years, the terahertz-wave spectroscopy would be a useful tool for high-accurated histopathological and chemical analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：診断病理学・病理診断技術

1. 研究開始当初の背景

テラヘルツ波（以下 THz 波）とは、周波数が 10 の 12 乗（1 兆）Hz で、波長が 3 mm から 30 μm の間に存在する光波と電波の間の領域をいう。

THz 波は 1963 年、西澤 潤一により発見されたが、その後今日まで殆ど利用されることがなく、「未利用光波」と呼称されてきた。1983 年西澤潤一らによって THz 波の利用が提唱され、現在は我が国の重要化研究項目として THz 波の新産業基盤・創生リーディングプロジェクトが組まれた（西澤潤一「テラヘルツ波の基礎と応用」2005 年、工業調査会）。THz 波は 1) 光波の直進性と電波の透過性の双方の性格を具有する、2) 画像（イメージング）を行う際にレンズ等で必要な波長を取得することが容易である、3) 物質に特異的な振動波長、即ち物質特異的なスペクトルを有する、4) レントゲン線（X 線）と異なり、遺伝子破壊の如き生体侵襲を生じない、の特徴を有しており、より高精度且つ安全性の高い解析用線源であることが期待されている。

THz 波は 1980 年代後半より工業、農業分野への応用が試みられており、最近では THz 波の THz 波の分析力を利用した郵便封筒内の炭疽病菌の胞子の検出、果実の糖度の測定等の物質の検出に関しては一定の成果が報告されてきた（D.Woodward et al. IEEE MTT-S digest 2003）。一方 1990 年代後半より THz 波の医学分野への応用が世界的に試みられている。我が国でも THz 波の医学分野への応用は国家の政策の一環となっており、前述の THz 波の特徴を踏まえ、人体の組織試料の解析に関して顕微鏡や MRI、CT などの画像機器の形態解析とともに THz 波の物質解析の機能を組み合わせることにより、組織学的なレベルでの病変部の組織構築並びに正常組織と病変部組織との成分の相違も解析できる画期的な技術になりうる可能性が示唆されている。

現在、THz 波の分野の研究は世界的にはア

メリカ、ヨーロッパ、日本と三極化しており、国内では西澤を中心とするリーディングプロジェクト、理化学研究所、大阪大学（萩行ら）、さらに複数の機関が THz 波に関する研究を行っている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述の THz 波の、特に物質に特異的なスペクトルを有するという特性に着目して組織解析を行い、その実用化並びに応用性について検討した。本研究期間内に 1) 正常組織における組織の同定、2) 正常組織と悪性腫瘍組織の識別、3) 正常組織と良性腫瘍組織の識別、4) THz 波画像（イメージング）における細胞、組織成分の性格づけを目標とした。

我々病理医の日常の業務における「病理組織診断」は、組織標本の顕微鏡上の形態観察による良性、境界病変、悪性の判定が主体であるが、病理組織診断とは専門的知見、経験並びに熟練を要する作業であり、従って病理組織診断の結果を理科学的指標として客観的に表示し、診断の精度を向上させる検討は非常に大きな意義と独創的なものであると考えられる。

当該研究を遂行することにより、THz 波による病理診断解析が MRI、CT、Echo 画像のような形態の相違の表示のみならず、THz 波の物質に特異的なスペクトルを有するという特徴に着目した組織を形成する成分の相違も明らかにし、強いては形態観察のみならず、組織成分も解明可能な、より精度の高い病理組織診断の技法の確立を主旨としたものである。

3. 研究の方法

1) 研究の対象となる組織試料には、当講座での病理組織診断を担当する臓器（生検、手術材料、病理解剖）を対象とした。臓器由来の組織試料使用に関しては、研究に際して事前に岩手医科大学学内倫

理委員会に当該案件を提出し承認された(承認番号 H18-75号)。

- 2) 上記 1)にて得られた臓器より光学顕微鏡病理組織診断用のヘマトキシリン-エオジン(以下 H-E)染色標本を作成し、診断した。この際に組織を形態的に分類(腫瘍性/腫瘍類似病変/非腫瘍性か、腫瘍性病変であれば、良性/境界悪性/悪性病変、悪性であれば組織の分化度、深達度、原発性/転移性、非腫瘍性病変であれば炎症性疾患/循環障害/代謝性疾患)、併せて組織所見の画像を撮影し、記録した。
- 3) 2)と同時に 1)の臓器より THz 波イメージング測定試料用の組織標本を作成する。測定試料は、ロータリーマイクローム(MICRON HM340E1(Micron 社製))にて厚さ 60 μ m から 200 μ m に薄切した試料を作成した。
- 4) THz 波イメージングは仙台の半導体研究振興会(現在は上智大学西澤記念テラヘルツ研究所に移管され、運用されている)にて運用されている GaP 結晶式 THz 波発生装置を使用した。THz 波イメージングの形式は透過式イメージングと反射式イメージングが存在するが、本研究は前者の透過式イメージングで検討した。
- 5) 上記 4)で測定された THz 波イメージング結果を岩手医科大学にて組織所見画像と併せて組織対応マッピングにより比較、検討し、THz 波イメージングの正常組織と病変組織(癌など)の画質を検討した。
- 6) 上記 1)-5)と同じ方式で、手術中の迅速診断時に用いられる組織の凍結標本(凍結標本専用包埋剤に凍結包埋)した組織試料の THz 波イメージングの可能性を検討した。
- 7) 通常の病理組織診断上における、組織中の特定された組織学的標識分子或いは組織マーカー分子の検出方法への応用。THz 波の特徴の一つである物質分析能を抗原成分の同定として免疫組織化学の分野への応用を試みた。

一連の上記 1)-7)を方法とした。

4. 研究成果

- 1) THz 波によるパラフィン包埋組織切片の病理組織解析への応用転移性肝臓癌(原発:膀胱癌)及び非腫瘍性病変である急性心筋梗塞の透過 THz 波イメージングを行い、得られた THz 波画像と通常の病理組織診断に用いられる HE 染色標本の組織所見とを比較した。併せて組織標本中の THz 波の透過性の相違を生じる因

子につき検討、考察した。組織イメージングを実施するのに先行して、組織試料の厚さ及び病変部と正常組織の THz 波の組織透過性が最大を示す周波数を検討した。イメージングには厚さ 160 μ m の組織試料(転移性肝臓癌、急性心筋梗塞とも)を使用した。病変部と正常組織との THz 波透過性の相違が最大を示す周波数は 3.2-3.6THz であった。THz 波イメージングによる画像は、転移性肝臓癌、急性心筋梗塞ともに HE 組織標本と同様、病変部及び正常組織が識別され、各々の組織の性状の相違は THz 波の組織透過性の相違として反映された。

転移性肝臓では、正常組織の THz 波透過性はほぼ一様であったにも拘わらず、癌組織では THz 波の透過性が細胞が生存している部分、細胞が変性した部分及び完全な壊死に陥った部分が混在し、THz 波の透過性の高い部分と低い部分とが認められ、これはイメージング上に反映された。非腫瘍性病変である急性心筋梗塞についても、正常な心筋が存在する部分、梗塞により心筋が凝固壊死に陥った部分、好中球が浸潤した部分、壊死した心筋が組織球により食食される部分及び壊死巣が膠原線維に置換された部分で THz 波の透過性に相違が認められ、イメージング上に反映された。

HE 染色組織標本の所見と THz 波イメージングを比較した結果、THz 波の透過性の相違を生じる因子は組織の各部分を構成する成分及び細胞の密度、即ち細胞の多寡が関与している可能性が示唆された。本検討につき論文作成、"Terahertz-wave spectroscopy for precise histopathological imaging of tumor and non-tumor lesions in paraffin sections." Tohoku J Exp Med. 223: 291-6(2011)(受理)。

- 2) 新鮮凍結切片の THz イメージングの検討通常の病理診断に手術中の新鮮凍結切片の迅速診断が利用される。パラフィン切片では厚さ 160 μ m の組織試料を使用した。同厚さの試料は薄切が甚だ困難であり、実際の迅速診断への応用への障壁となりうる。今回の検討では、病理解剖にて得られた胃の大網(十二指腸腺癌の腹膜播種を伴う)を用いた。組織を採取後、凍結切片作成用の樹脂製包埋剤に包埋し、急速凍結を行った後、5 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m の各厚さの THz 波イメージング用の組織試料を作成した。同時に HE 染色標本も作成し、THz 波イメージング画像と比較した。検討の結果、5 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m、

25 μm の各厚さの試料では、組織試料と周囲の樹脂製包埋剤との間に明らかな透過性の相違が認められず、組織解析に有効な画像を得ることは不可能であった。しかし厚さ 30 μm の組織試料では、周波数 3.4THz で組織の間に THz 波の透過性の相違が認められたためこの 30 μm の厚さの凍結切片を採用した。大網組織中の腺癌が播種した箇所、腺癌に反応性に結合線維が増生した箇所及び癌の播種が認められない箇所が THz 波イメージング画像上である程度区別された。同検討より、厚さ 30 μm の薄い組織試料でも、THz 波の周波数を上げることによりイメージングが可能であり、同時に THz 波組織イメージングが、手術中の迅速診断にも応用可能であることが示唆された。

- 3) THz 波イメージングにおける THz 波の組織透過性の因子の検討成果 1)、2) を踏まえ、厚さ 30 μm のホルマリン固定パラフィン包埋された良性腫瘍病変の子宮平滑筋腫の組織標本を用いて THz 波の組織透過性の相違を検討した。腫瘍(平滑筋腫)では正常子宮平滑筋よりも細胞密度が上昇しているにも拘わらず、THz 波の透過性が正常平滑筋よりも良好な箇所が認められた。従って本検討では組織、細胞の形態的な観察、比較に加えて THz 波イメージング用試料の連続切片を作成し、顕微鏡にてマイクロメーターを使用して単位あたりの細胞密度を計測、数値化し、THz 波画像の各部分と比較した。この結果、THz 波の 組織標本中の透過性の相違は細胞密度の他、細胞及び組織の正常(膠原線維の存在、細胞質の多寡)も関与している可能性が示唆された。本検討について現在論文作成中である。

- 4) THz 波による生体分子マーカー(抗体、特異的生体物質)の検出への応用 THz 波の物質特異的スペクトルを有するという特性に着目し、THz 波による組織試料中の生体分子マーカーの検出を試みた。病理組織診断では、HE 染色標本を顕微鏡にて形態観察、診断することに加え、免疫組織化学染色が用いられる事が多い。免疫組織化学染色とは、組織中のある特定した生体分子を抗原として、これに抗体及び酵素標識試薬を結合させて検出していく方法で、腫瘍組織の性格(上皮性か、非上皮性か、神経内分泌性腫瘍か)の判定、「腫瘍マーカー」と呼ばれる腫瘍に特異的な生体蛋白質の検出及び p53 (MIB-1) の如き細胞増殖の指標となる生体分子の検出に用いられる。

一般的に行われる染色方法は、ストレプトアビジン-ビオチン(以下、SAB-PO)法及び金コロイド法が挙げられる。我々は組織試料を用いた検討に先行して、アクリル製スライドガラス上に SAB-PO 法の各抗体と試薬の反応段階、具体的に一次抗体と二次抗体を反応させたもの、一次抗体と二次抗体及び酵素標識試薬を反応させたもの、一次抗体、二次抗体、酵素標識試薬及び発色基質(ジアミノベンチジン、DAB)まで反応させた各段階の組織試料を作成し、これらの試料における THz 波の透過性の相違を検討、特異的な THz 波の吸収スペクトルの検出を試みた。

この結果、SAB-PO 法及び金コロイド法のいずれも一次抗体+二次抗体、一次抗体+二次抗体+酵素標識試薬、一次抗体+二次抗体+酵素標識試薬+発色基質(DAB)に特徴的な THz 波の吸収スペクトルが検出された。この結果より THz 波による生体分子マーカーの検出への応用の可能性が示唆された。

これらの結果を踏まえ、次に大腸癌に特異的な生体分子マーカーである癌胎児性抗原(carcinoembryonic antigen、以下 CEA)の THz 波による検出を、大腸癌の組織試料を用いて試みた。結果、組織試料の免疫組織化学染色では、一次抗体-二次抗体-酵素標識試薬-発色基質(DAB)と反応物質を重ねるにつれて THz 波の組織透過性が向上する傾向を示し、一次、二次抗体、酵素標識試薬、発色基質の反応過程が THz 波の透過性に影響する可能性が推察された。同結果より、THz 波により組織解析とともに物質の同定の可能性が示唆された。

考察

病理組織診断とは、専ら病理専門医によって行われており、診断には医学的な専門知識の他、経験と熟練を要する。病理診断にはある一定の時間を要し、且つ時に病理医は悪性か、境界病変か、或いは良性かの判定に甚だ苦慮する症例及び形態観察の上で認識が難しい症例に遭遇する場面も少なくない。さらに病理医相互である症例に関して診断の見解が一致しない場合も生じうる。

今回の研究期間中に実施した THz 波による病理組織解析の検討結果では、THz 波イメージングで得られた画像は HE 染色標本の組織所見と近似し、THz 波の組織試料の透過性は組織の性格(生存する組織か、変性或いは壊死組織か)及び組織、細胞の密度を反映させるものであった。また THz 波の組織透過性の相違は細胞、組織の密度だけではなく、膠原線維及び血管の存在、組織を構成する細胞

の性格（細胞質の多寡）も反映されていることが示唆された。

また THz 波の組織透過性の相違を反映したイメージングに加え、物質特異的な吸収スペクトルが存在するという同波の性格からは、物質の相違によるより精度の高い病理組織診断、具体的には正常組織と癌組織の形態的な相違のみではなく、細胞及び組織の化学成分的な相違を THz 波で検出することにより、形態学的に一見正常に見えていても実質癌化しているような、組織標本で形態学的に認識が難しい病変の検出にも有効な診断技術となりうる可能性が考えられる。

THz 波の形態イメージング及び物質特異的な吸収スペクトルの双方を応用した病理組織解析方法、病理診断システムを確立することにより、

- 1) 病理組織診断が迅速化する
- 2) 悪性、境界病変、良性の判定に客観的な情報を得ることが可能
- 3) THz 波により得られた組織データより、形態的に認識が難しい病変（癌化する組織の検出、微少な癌組織の発見）の認識が可能となる
- 4) 2), 3) の客観的なデータにより、病理専門医相互の見解の相違を縮小することも可能となる
- 5) その結果、病理専門医以外でも THz 波データより、組織試料に関する情報を享受できる

などの効果が期待できる。

今後検討を継続し、THz 波による病理組織解析システムの精度を向上させることで、

- 1) 癌の性格（原発性、転移性）、組織型、分化度（高分化か、低分化か）、脈管侵襲及び深達程度の判定
- 2) 手術中迅速診断時における手術臓器の断端の悪性組織の有無の判定
- 3) 腫瘍の悪性度（良性、境界悪性、良性）の判定
- 4) 腫瘍か、腫瘍類似病変（過形成か、偽腫瘍か）の判定
- 5) 腫瘍か、炎症かの判定
- 6) 組織中における特異的な生体分子（ホルモン関連物質、腫瘍マーカーなど）及び異常代謝物質（アミロイド、プリオンなど）の検出
- 7) 細胞及び組織増殖マーカーの検出による増殖能の判定が迅速、高精度、低侵襲且つ非観血的に行われることが可能となる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Miura Y, Kamataki A, Uzuki M, Sasaki T, Nishizawa J, Sawai T: Terahertz-wave spectroscopy for precise histopathological imaging of tumor and non-tumor lesions in paraffin sections. *Tohoku J Exp Med.* 223: 291-6 (2011)
2. 三浦康宏、柴田祐二、澤井高志：未踏光学（テラヘルツ光学）による病理組織イメージング（第二報）. *岩手医誌.* 59(6): 451-452 (2008)
3. 谷 正彦、山口真理子、山本晃司、江夏徳次郎、北原英明、萩行正憲、三浦康宏、澤井高志：テラヘルツ分光およびイメージングの生命医科学への応用. *日本レーザー医学会誌.* 28(4): 395-403 (2008)
4. 三浦康宏、金 仁順、澤井高志、西澤潤一、佐々木哲朗、吉田 孝、須藤 建：テラヘルツ波の臨床医学への応用. *テラヘルツ光学フォーラム抄録集*：12-13 (2008)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 三浦康宏、金 仁順、佐々木哲朗、須藤 建、澤井高志：テラヘルツ波による病理組織解析・第二報。（ポスター）第 97 回日本病理学会総会. 2008 年 5 月 15 日、金沢.
2. 三浦康宏、金 仁順、澤井高志：広帯域テラヘルツ分光の病理組織解析への応用・第二報. 第 69 回応用物理学会学術講演会. 2008 年 9 月 4 日、春日井.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 康宏 (MIURA YASUHIRO)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：40398483

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし