

非がん細胞とがん細胞の鑑別における
紫外・可視顕微分光法の有用性

弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻

提出者氏名： 吉岡 治彦

所 属： 医療生命科学領域 生体機能科学分野

指導教員： 中村 敏也

目次

略語一覧.....	2
諸言.....	3
第一章 LBC 法の無染色細胞を用いたがん細胞と非がん細胞の鑑別における紫外顕 微分光法の有用性.....	4
序論.....	4
方法.....	5
結果.....	13
考察.....	18
第二章 LBC 法の Papanicolaou 染色細胞を用いた可視顕微分光法によるがん細胞 の判別のための核領域色彩スペクトル解析の有用性.....	20
序論.....	20
方法.....	21
結果.....	26
考察.....	32
第三章 組織切片を用いた紫外・可視顕微分光法による子宮内膜類内膜腺癌の分化 度評価.....	34
序論.....	34
方法.....	36
結果.....	39
考察.....	45
総括.....	48
謝辞.....	49
引用文献.....	50
英文要旨.....	55

略語一覧

本論文では、以下の略語を用いた。

EGFR	Epidermal growth factor receptor (上皮成長因子受容体)
HE	Hematoxylin-Eosin (ヘマトキシリン・エオジン)
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2 (ヒト上皮細胞増殖因子受容体 タイプ 2)
HPV	Human papillomavirus (ヒトパピローマウイルス)
LBC	Liquid based cytology (液状化検体細胞診)
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion (軽度扁平上皮内病変)
MIB-1	Ki-67 antibody
PPE	Proliferative-phase endometrium (子宮内膜増殖期)
UV	Ultraviolet (紫外線)
UV-MS	Ultraviolet-microscopic spectroscopy (紫外顕微分光法)
Vis-MS	Visible-microscopic spectroscopy (可視顕微分光法)

諸言

がん細胞判定は、病理医、病理臨床検査技師、細胞検査士が役割分担しながら、形態学的に種々の技法を駆使しながら行っている。がん細胞の細胞診検体処理法では、近年、液状化検体細胞診(Liquid based cytology: LBC)法が世界的に普及して診断精度を高めてきている¹⁻⁶⁾。LBC法では、残余LBC液バイアル内の検体を用いることで、同一細胞での追加検査(免疫細胞化学法や遺伝子解析法)が可能になり診断精度が高まっている⁷⁻¹²⁾。しかし、形態学的に特徴の乏しい高分化腺癌や低悪性度の腫瘍細胞は、がん細胞判定や組織型や悪性度判定に苦慮することが多く、これらの判定困難例への対応がさらに求められている。

弘前大学大学院保健学研究科では、元来、警察の科学捜査技法としての紫外線カメラで肉眼で見えない潜在指紋(皮膚汗腺や皮脂腺由来の汗や脂分)を検出していること¹³⁻¹⁵⁾にヒントを得て、2005年より紫外線顕微鏡の研究開発に取り組み、近年、可視光のスペクトル解析も同時に行える紫外・可視顕微分光(Ultraviolet-Visible microscopic spectroscopy: UV-Vis MS)法を開発した。

そこで、本研究では、UV-Vis MS法が非がん細胞とがん細胞な客観的な判定手法として有用か否かについて、以下の第1章から第3章の検証をした。

第一章 LBC 法の無染色細胞を用いたがん細胞と非がん細胞の鑑別における紫外顕微分光法の有用性

序 論

近年、細胞診の分野において Liquid based cytology 法 (LBC 法) の利用数は著しく増えており、検体処理の革命であるといっても過言ではない。LBC 法の特徴として、Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) 以上の病変を高い感度で検出し、不適正頻度も少なく、均等な細胞分布と均一な染色性による容易な顕微鏡観察ができ、限定された観察野での観察時間の短縮などがあげられる¹⁻⁶⁾。また、LBC 法では細胞形態診断がなされた後でも、その残余 LBC 液バイアル内の検体を用いることにより、免疫細胞化学検査法や遺伝子解析法を追加して行えるようになった。このように臨床的な LBC 法の大きな利点は、細胞判定と共に、同時に、MIB-1 index などの悪性度判定や Human papillomavirus (HPV) の検出、Human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) や Epidermal growth factor receptor (EGFR) などの分子標的療法の治療効果判定などへと広く貢献できることである。反面、LBC 法の欠点としては、従来の検体処理法に比べ、細胞形態が液状化されることによる核の円形化や萎縮化や淡明化が起こりやすく、さらには背景にみられる壊死物や炎症細胞数などの減少もみられる点などがあげられている⁷⁻¹²⁾。そのため LBC 法の独自の判定基準や核異型性の乏しい腺癌細胞の判定基準の確立が望まれる。

紫外顕微分光 (Ultraviolet-microscopic spectroscopy: UV-MS) 法は、有機化学分野の吸光度分析¹⁶⁾や、蛍光分析¹⁷⁾で広く用いられているスペクトル分析手法である。UV-MS 法のサンプルの多くは、水溶液を溶媒としたものであり、細胞そのものをサンプルとした研究は少ない。近年では、Zeskind ら¹⁸⁾や、Cheung ら¹⁹⁾による未固定の培養生細胞をサンプルとした研究がある。これらにより紫外線波長 260 nm や 280 nm などの吸光度を測定し細胞内の核酸やタンパク質の解析の可能性が示された。

そこで本章では、LBC 法で処理した培養細胞をサンプルに UV-MS 法の解析を行い、非がん細胞とがん細胞が客観的に鑑別が可能かどうかを明らかにする。

方 法

1. LBC 法による培養細胞の検体処理

本研究に用いたサンプルは 6 種類の培養細胞である。その内訳は、非がん由来細胞としてヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)²⁰⁾、アフリカミドリザル腎臓由来細胞 (COS-7)²¹⁾ の 2 種類と、がん細胞としてヒト肺癌細胞 (A549)²²⁾ やヒト乳癌細胞 (MCF-7)²³⁾、ヒト結腸腺癌細胞 (LS-180)²⁴⁾、ヒト胃癌細胞 (KATO III)²⁵⁾ の 4 種類である。

トリプシン処理した培養液中の各培養細胞 (1×10^6 /ml) の 1ml に、LBC 液 ThinPrep プレザーブサイト液 (ThinPrep, HOLOGIC) を 9ml 加え、全量 10ml の混濁液として一晩放置した。

UV-MS 法の検体処理は、以下の通り行った。1 標本につき先の混濁液 5 ml ずつをカップに分注し、遠心直接塗抹法 (Cyto-Tec Cyto centrifuge Model CF-127, Sakura, Japan) 1,500 rpm で 2 分間遠心して石英ガラス (Technical, Hirosaki, Japan) に塗抹を行った。その後、95 % エタノールで 30 分間の湿潤固定をし、無染色のままグリセリン封入剤を用いて石英カバーガラス (Technical) を用いて封入した。

2. Lambert-Beer の法則

UV-MS 法は、分析化学分野における光の吸収、吸光分析を LBC 細胞診に応用したものである。分析化学における光吸収の原則であるランベルト・ベール (Lambert・Beer) の法則を示す。

吸光度測定の実理は、単色光が試料を通過する間に吸収された光量を測定することである。濃度 c (mM) の試料を吸収セルに入れ、これに強度 I_0 の単色光が光路長 l を通過した時に強度が I になったとする。 $\frac{I}{I_0}$ を透過度(transmittance)といい、 T で表す。これを%で表したときには透過率(percent transmittance)と呼び、 $T\%$ で表現する。また、 $-\log \frac{I}{I_0}$ を吸光度(absorbance)といい、 A で表す。したがって吸光度は、

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon cl \quad (1.1)$$

と表すことができる。 ϵ は吸光係数(extinction coefficient)と呼ばれる。吸光度は光の通過距離にも、溶液の濃度にも比例する。この法則が Lambert-Berr の法則である。

吸光度はわずかの例外を除いて、異なる化学種の濃度の和からなるものを測るため加成性があり、 n 個の吸光活性値を含む試料の吸光度は次式で示される

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = dl \sum_{i=1}^n \epsilon_i c_i \quad (1.2)$$

本研究においては分光用多機能ソフトウェア (Ocean Photonics, Japan) を用いて、この式が成り立つと仮定した透過率 $T\%$ 値を測定した。

3. UV-MS 法の装置

UV-Vis MS 法の装置のシェーマ図を Fig. 1 に示した。UV-MS 法においては、本機器の UV システムを用いた。

(1) 光源装置 (MAX-302, Asahibunkou, Japan) (① in Fig. 1)

光源ランプは、広い連続波長域 (250 nm から 1,000 nm) の発光スペクトルが得られる 300W キセノンランプを使用した。ランプ寿命は 500 時間であり、本研究を行った時は寿命期間内である。光源ランプの冷却方式は強制空冷排気方式である。そのため、光源の連続照射耐久性が良く、100% 光量連続 2 時間照射でもバラツキが少なく、さらにほとんど光源減量はない。光源の光量調整設定は、5% から 100% の間で 1% 間隔

ごとに可変できる。本研究では出来るだけ細胞障害が少なく、光源の安定性が最良である低光量(30%光量)を用いて行った。

光源の中間フィルターには、UVミラーモジュール(② in Fig. 1)を設置した。これは、光源ランプの広い連続波長域から紫外線域だけの光を取り出すためである。UVミラーモジュールは高性能コールドミラーを使用しているため、不要な熱を完全に抑えることができ、そして迷光のレベルが極端に少ない特徴をもつ。

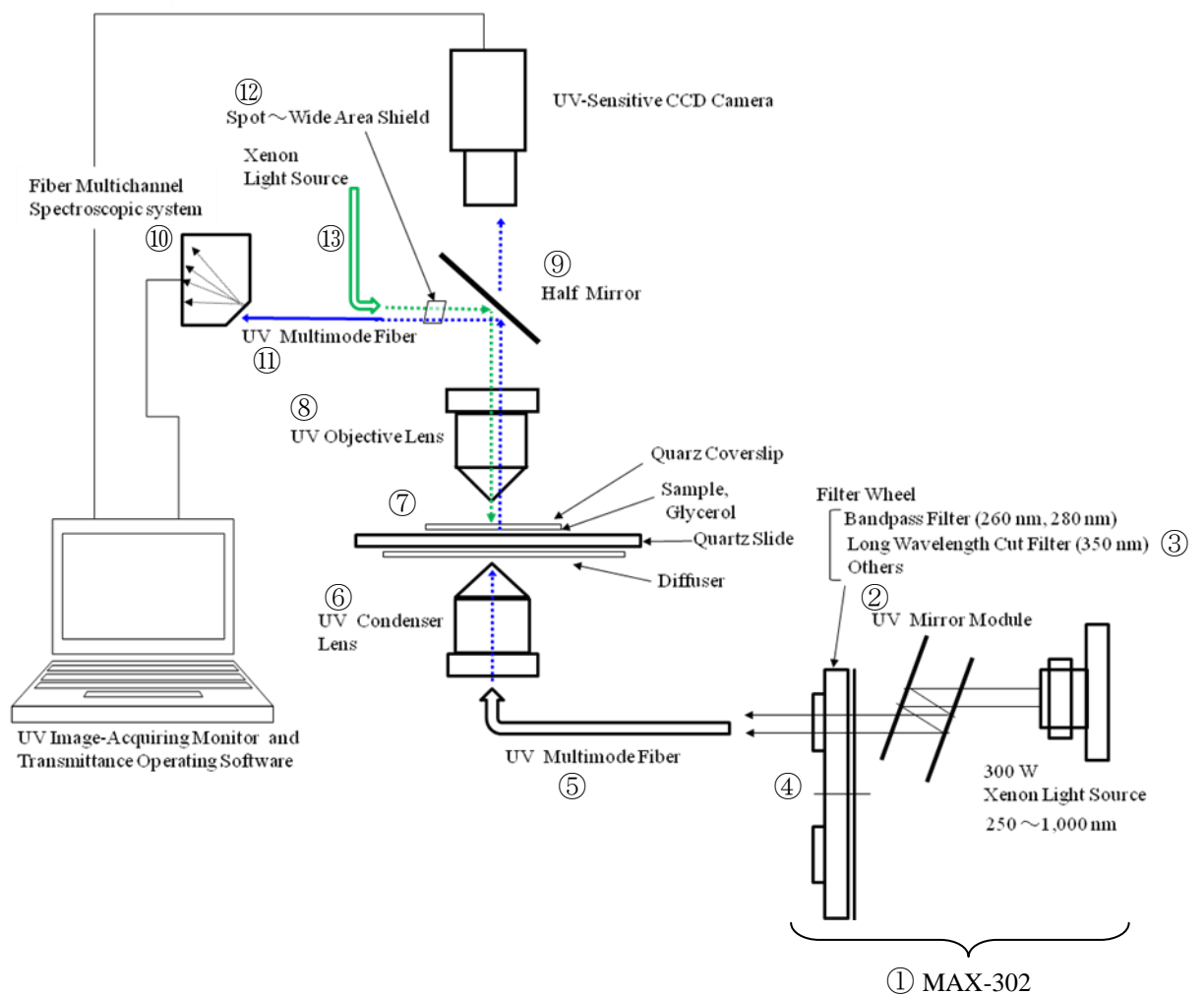


Fig. 1 Schematic diagram of UV-Vis MS system

光源機器 MAX-302 内の光路における 2 つ目のフィルターには、350 nm 長波長カットフィルターを用いた。350 nm 長波長カットフィルター Long Wavelength Cut

Filter(② in Fig. 1)の特性は、連続波長(250 nm から 350 nm)の透過率を同時に測定できることである。透過率の光量条件が、連続するすべての波長において同一であるということが大きな特徴である。このフィルターを使用する欠点は、バンドパスフィルター使用時に比べ、その吸収画像のコントラストが低いことである。バンドパスフィルターでは特定のバンド波長のみの吸収画像のため、その画像において特異性が高い。しかし長波長カットフィルターでは、出力波長のバンド幅が広いため、吸収物質の量や吸収域が広くなり画像特異性が低くなるからである。本光源機器 MAX-302 のフィルターチェンジャー(④ Filter Wheel in Fig. 1)には、最大 8 枚まで設置可能である。本研究では使用した 350 nm 長波長カットフィルターの他に、260 nm バンドパスフィルター(半値幅 10 nm)、280 nm バンドパスフィルター(半値幅 10 nm)、300 nm バンドパスフィルター(半値幅 10 nm)を装着している。

光源機器 MAX-302 から出力した光は、次に石英ファイバーケーブル(⑤ UV Multimode Fiber in Fig. 1)を通過し UV-MS 法の装置内の石英コンデンサーレンズ(⑥ in Fig.1)に入り集光される。光はステージの試料プレパラート(⑦ in Fig. 1)へ下方向から入射され、試料細胞において一部は吸収、一部は試料細胞を通過する。試料を通過した光は、石英対物レンズ(⑧ UV Objective Lens in Fig. 1)へと入り拡大されハーフミラー(⑨ in Fig. 1)に入る。ハーフミラーでは、光が 50 対 50 に分けられる。分けられた光の一方は紫外線画像取得用の石英ケーブルへ、他方は分光光度計の石英ケーブルへと入射する。ハーフミラーの使用により紫外線吸収画像観察と、サンプル領域の各波長の透過率測定がリアルタイムで同時に行うことができる。

(2) 分光器(⑩ in Fig. 1)

サンプル領域を透過し光は、ハーフミラーから石英ファイバーケーブル(⑪ in Fig. 1)を経由して高感度ファイバーマルチチャンネル分光器(QE65000, Ocean Photonics, Japan) (⑩ Fiber Multichanneled UV-Vis Spectroscopic system in Fig. 1)に入る。この分光器の連続スペクトル分光法は反射型回折格子を用いた。受光素子は電子冷却裏面入射型 FFT-CCD エリアイメージセンサで、有効素子数は 1024×58 pixel、24.5 μm×24.5 μm の大きさである。この分光器の測定波長範囲は 200 nm から

1,100 nm で、回折格子 (Gratings グレーティング) 14 種に依存する。分光器の解析ソフトは OP wave+ (Ocean Photonics, Japan) を使用した。

(3) スペクトルを取得するためのサンプル領域

透過光が核領域を通るように測定範囲を設定する。本研究に使用した UV-MS 法の装置においては Spot~Wide Area Shield (⑫ in Fig. 1) を調整することにより行う。この Area Shield の設置位置は、ハーフミラーから分光器に入射させる石英ファイバー (⑪ in Fig. 1) の途中に位置する。Area Shield は光を 4 方向からの 4 つの遮蔽板により遮断して調節する。測定範囲の設定方法は以下である。分光器接続の石英ファイバーへ通常の光方向とは逆向きの光を入射させる (⑫ a green arrow in Fig. 1)。Area Shield の位置を調整しながら出力した逆方向の光は、ハーフミラーに反射し下降し、ステージ上のプレパラートガラスに落射後、反射する。スライドガラスから反射した光は、対物レンズを上行しハーフミラーを通過し、画像取得カメラへ出力する。このガラス反射画像において目的サンプルエリアが確認できる。データ取得のための対物レンズは 10 倍で行った。細胞とともに核内所見や核小体の確認のためには対物レンズ 40 倍を使用した。再度、エリアに微調整が必要な場合は、Area Shield つまみにて調整可能である。測定エリアはスポットサイズから、広い組織領域のエリアをカバーできる。しかし、Area Shield の欠点は遮蔽板による 4 方向からの光遮断であるためエリアが正方形や長方形であることである。そのため曲線エリアには十分に対応できない。

本研究においては以上のサンプル測定エリア面積 $166.4 \mu\text{m}^2$ ($12.9 \mu\text{m} \times 12.9 \mu\text{m}$) は、測定したすべての細胞において同一である。核内に測定エリアがほぼあるが、厳密には核容積全体ではない。

(4) UV-MS 法の測定のための基本設定

分光器は本体電源を入れた後、分光用多機能ソフトウェア OP wave+ の設定画面においてスペクトル積分時間を 100 msec、平均回数を 1 回、スムージング回数を 20 回と設定した。分光器のウォームアップ時間を 15 分間おこない冷却モータを安定させ

た。紫外線透過率波長のキャリブレーション、ノイズ補正を以下の方法で行った。キャリブレーションとは本研究の UV-MS の透過率取得条件、撮影条件を整える調整のことである。波長のキャリブレーションは測定毎回ごとに合わせる必要はないが、サンプルスライドを変える度に最初に一度行う。初めに分光器への入射光を遮断した状態（ファイバーに光を入れない状態）でダークシグナルを保存し、波形からダークシグナルを間引きした。この作業により分光システムの電氣的ノイズがキャンセルされる。キセノン光源を点灯させ、15 分間のウォームアップをさせる。次に透過率測定の比較の標準となるリファレンスを取得した。ここで取得されたリファレンスが透過率 100%としての基準設定となる。

(5) 透過率測定モードでのサンプル測定方法とサンプル個数

以上の方法で分光器の基本設定を終えた後、顕微鏡ステージにサンプルプレパラートをセットし、分光用多機能ソフトウェア OP wave+は透過率測定モードへ切り替えた。サンプルにおける透過率測定のコントロールのために以下の操作を、それぞれサンプルごとに毎回行った。透過率 0%のコントロールエリア、および透過率 100%のコントロールエリアは、各サンプル細胞の極近い周辺位置において行った。このことによりサンプル細胞の周辺にある物質の透過率が間引きされ透過率 100%値としての基準が設定できる。

次に、測定エリアをコントロール基準状態からサンプル測定位置に紫外線吸収画像をみながら移動させた。この時、測定エリアが核領域に入っていること、細胞同士が重なっていないこと、細胞が変性して委縮、膨化、挫滅などが無いことなどを確認しながら任意にサンプル細胞を選択した。サンプルの透過率測定時には、毎回、測定部位の紫外線吸収画像も画像取得ソフト(Basico, CLARO, Japan)を用いて Bit Map 形式で取得した。分光用多機能ソフトウェア OP wave+で取得した紫外線透過率スペクトルから、紫外線波長 260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm における透過率測定値をエクセルデータとして保存した。測定細胞数は各症例 50 個ずつで、合計 300 個である。その内訳として非がん由来細胞は合計 100 個、がん細胞は合計 200 個である。

(6) 統計解析

非がん細胞とがん細胞において、260 nm から 340 nm の紫外線透過率連続スペクトルから 20 nm ごとの波長間隔でそれぞれの透過率から平均値と標準偏差のデータを抽出した。それぞれの各紫外線波長ごとに非がん由来細胞とがん由来細胞の正規分布性について Shapiro-Wilk 検定を行った。正規分布に従っていない時、非がん由来とがん細胞の有意差検体を行うために Mann-Whitney U 検定を行った。これらの統計解析は統計解析ソフト SPSS 16.0j を使用して行った。

次に、非がん由来細胞とがん細胞の正診率について、多変量解析ソフト Mulcel²⁶⁾ を用いて判別分析(Discriminat Analysis)を行った。判別分析とは例えば、 p 個の変量 X_1, X_2, \dots, X_p の値が、2 群の標本について観察される時、この 2 群のどちらかに属するか分からない 1 つの観察値 X が第 1 群に属するのか、第 2 群に属するのか判別するためのルールを作ることが目的である。2 群の母集団分布の平均ベクトルを μ_1, μ_2 、分散共分散行列を Σ_1, Σ_2 とした時、各群の重心(平均ベクトル)と X との距離を定義し、距離の近い方の群に属すると判別するというのが距離を用いた判別分析の考え方である。距離は変量の分散や変量間の相関を考慮して計算されるマハラノビスの汎距離(Mahalanobis' generalized distance)

$$\Delta_k^2 = (x - \mu_k)' \Sigma_k^{-1} (x - \mu_k) \quad (k=1, 2) \quad (2.1)$$

を用いる。2 群が多変量正規母集団で分散共分散行列が等しいと仮定したとき、母集団の推定値として観測値を用いて、各群の重心は変量 X_1, X_2, \dots, X_p の平均値を座標とすつ点 \bar{X}_1, \bar{X}_2 、2 群の分散共分散行列 S_1, S_2 をプールした分散共分散行列

$$S = \frac{(n_1 - 1)S_1 + (n_2 - 1)S_2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (\text{ただし、} n_1, n_2 \text{ は各群からのデータ数)より、マハラノビス}$$

の汎距離を、

$$D_k^2 = (X - \bar{X}_k)' S^{-1} (X - \bar{X}_k) \quad (k=1, 2) \quad (2.2)$$

で計算する。

$D_2^2 \geq D_1^2$ ならば、 X は第1群に属すると判定する。

$D_2^2 < D_1^2$ ならば、 X は第2群に属すると判定する。

$Z = D_2^2 - D_1^2$ とおくと、このルールは Z の値の正負で判別するのと同じである。

変量 X_1, X_2, \dots, X_p の分散と変量間の相関が 2 群で等しいか否かの等分散検定(ボックスの M 検定)を行い、等しい時は、 Z は次のような 1 次式で表される。

$$Z = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + \dots + a_p X_p \quad (2.3)$$

式 2.3 の Z を線形判別関数という。また、得られた線形判別関数に各変量が判別にどの程度寄与しているのかは、式(2.3)の係数 a_i を検定して判断する。帰無仮説 H_0 : 「 $a_i=0$ 」、対立仮説 H_1 : 「 $a_i \neq 0$ 」を検定する。これはマハラノビスの平方距離(2.2)を用いた統計量が、自由度(1, n_1+n_2-p-1)のF分布に従うことを利用した。判別結果から、正診率(= (真陽性数+真陰性数)/総数)、感度 sensitivity(=真陽性数/病者数)、特異度 specificity(真陰性数/非病者数)を求めた。

結果

1. 350 nm 長波長カットフィルター使用による紫外線 250~350nm 吸収画像

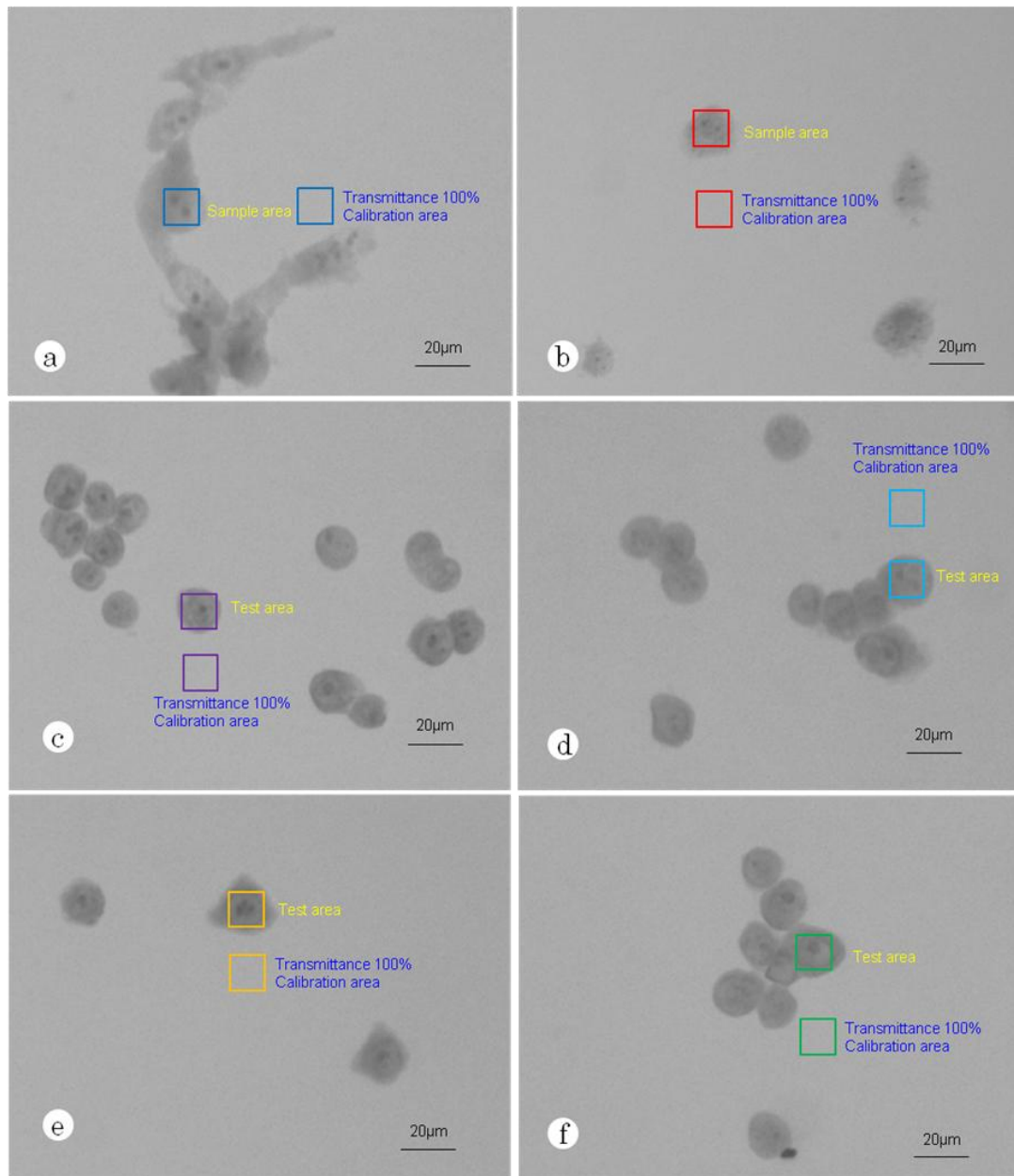


Fig.2 UV absorption images of unstained cells acquired using a 350-nm-wavelength cut-off filter

Non-cancer cells: NHDF (a), COS-7 (b), Cancer cells: LS-180 (c), MCF-7 (d), A549 (e), KatoIII (f)

Figure 2 に、350 nm 長波長カットフィルター使用による紫外線 250～350nm 吸収画像を示した(スケール 20 μm)。正方形のラインが測定エリア 166.4 μm^2 (12.9 $\mu\text{m}\times 12.9 \mu\text{m}$)であり、サンプルの測定核領域部と 100%透過率基準領域部を各々の写真に示した。この紫外線 250～350nm 吸収細胞画像の濃淡は、多く吸収している部位が濃く、吸収が少ないと淡いという像を示す。各細胞ともにクロマチンのみならず、核内の核基質部分や核小体部分にも吸収像があった。しかし、この吸収画像からはがん細胞としての特徴的な所見を読み取ることは難しかった。

2. 各細胞の紫外線 250～350nm 吸収スペクトル

各症例ごとに核領域の透過率を測定した細胞の平均と標準偏差を比較した(Fig. 3、Table1)。がん細胞(n=200)の透過率は、非がん由来細胞(n=100)と比べ、すべての波長において低く、スペクトル波形は近似するが僅かに異なっていた。

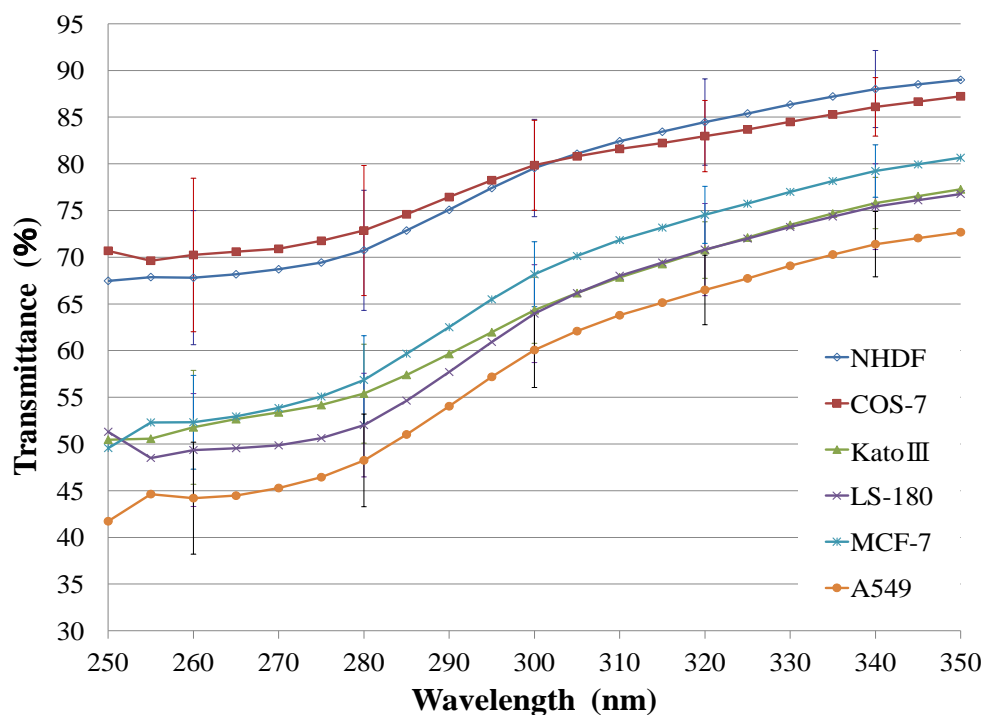


Fig. 3 Comparison of the UV transmittance of unstained cultured cells (n=300) measured using a 350-nm-wavelength cut-off filter

Non-cancer cells: NHDF, COS-7. Cancer cells: LS-180, MCF-7, A549, KatoIII.

Table 1. Comparison of the transmittance measured using the UV-MS between non-cancer and cancer cells

Wavelength (nm)	Transmittance (mean \pm SD)%		P-value
	Non-cancer cells (n=100)	Cancer cells (n=200)	
260	69.0 \pm 7.9	49.4 \pm 6.6	} < 0.01
280	71.8 \pm 6.8	53.1 \pm 6.1	
300	79.7 \pm 5.0	64.1 \pm 5.0	
320	83.7 \pm 4.3	70.7 \pm 4.7	
340	87.1 \pm 3.8	75.5 \pm 4.5	

非がん由来細胞とがん細胞の 260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm, 340nm のそれぞれの波長域における透過率を用いて統計的有意差検定を行った。初めにそれぞれの波長において非がん由来細胞とがん細胞標本が正規分布に従っているかを、Shapiro-Wilk 検定によって調べたところ、すべての波長において少なくともどちらかが有意確率 $p < 0.05$ であり、正規分布以外の分布を示すことが分かった。そこでノンパラメトリックな手法である Mann-Whitney U test を用いて行った結果 (Table 1)、すべての波長域で有意確率 (p-value) が 0.01 未満となった。以上の結果から、がん細胞は非がん細胞に比べ、260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm, 340nm のそれぞれの波長域における透過率が有意に低いことが分かった。

非がん由来細胞とがん細胞において UV-MS 解析により有意差がでることが分かったので、次は両者を判別するための判別関数を多変量解析の手法の一つである判別分析を用いて求めた。判別のために用いる検定波長 (260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm, 340nm) ごとに、非がん由来細胞とがん細胞の各群の間の分散共分散行列の等分散性について、ボックスの M 検定を用いて検定した (Table 2)。

Table 2. Homogeneity of variance-covariance matrices of non-cancer and cancer cells and discrimination function formula for each wavelength

Test wavelength (nm)	Homogeneity of variance-covariance matrix (p-value)	Linear discriminant function	Test of coefficient of linear discriminant function (p-value)
260	0.05	$Z=0.39 \times T(260 \text{ nm}) - 23.21$	} < 0.01
280	0.22	$Z=0.46 \times T(280 \text{ nm}) - 28.69$	
300	0.99	$Z=0.61 \times T(300 \text{ nm}) - 44.02$	
320	0.31	$Z=0.62 \times T(320 \text{ nm}) - 47.64$	
340	0.07	$Z=0.64 \times T(340 \text{ nm}) - 51.91$	

T: transmittance

いずれの検定波長においても検定結果の p 値は 0.05 以上であり、非がん由来細胞とがん細胞の分散共分散行列に差があるとは言えない(等分散性がある)という結果であった。そのため判別分析関数は、式(2.3)による線形判別関数によって多変量解析(判別分析)を行った。次に、線形判別関数の係数の検定を行った結果、すべての検定波長の判別関数係数の p 値は 0.01 以下であり、危険率 1%において有意であった(Table 2)。よって各線形判別関数におけるそれぞれの係数は、判別に大きく関わっていることが分かった。判別の検定波長における線形判別関数を用いることによる正診率を求めた結果、正診率が一番高かった検定波長は、300 nm であった。検定波長 300 nm の感度 sensitivity は 98.0%、特異度 specificity は 93.0%であった(Table 3)。

Table 3. Evaluation of cancer cell discrimination in LBC-processed cells using the UV-MS

Test wavelength (nm)	Evaluation of discriminant analysis (n=300)		
	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
260	93.7	96.5	88.0
280	93.0	96.0	87.0
300	96.3	98.0	93.0
320	94.7	96.0	92.0
340	92.7	92.5	93.0

以上の UV-MS 法によるスペクトル波長を用いた判別評価は、LBC 処理培養細胞のがん細胞の判別に有用である。特に、300 nm 波長の透過率値を検定波長として得られた線形判別関数は、

$$Z=0.61 \times \text{transmittance}(300 \text{ nm}) - 44.02 \quad (3.1)$$

となった。この線形判別関数の正診率 accuracy は 96.3%であった。感度 sensitivity は 98.0%、特異度 specificity は 93.0%であった。係数の p 値は 0.01 以下であり有意に強く判別に関わっていた。この式に観察サンプル X の 300 nm 波長の透過率値を入れ正ならばがん細胞群に判別、負ならば非がん由来細胞群に判定されることが分かった。

考 察

本章においては、LBC 法により処理された無染色細胞を試料とした UV-MS 法が、非がん細胞とがん細胞の客観的な鑑別に有用であるか否かを検討した。その結果、正診率が 96.3%、感度が 98.0%、特異度が 93.0%となる判別関数が得られた(式 3.1)。この判別のためのパラメータは、紫外線 300 nm 波長の透過率値であった。非がん細胞とがん細胞の判別法として、(1) UV-MS 法を細胞診断学に応用できたこと、(2) UV-MS 法において LBC 法で処理した細胞材料が応用できたこと、(3) UV-MS 法による客観的指標となるパラメータが同定できたこと、この 3 点を合わせた研究は、これまで報告例がなかった。

(1) UV-MS 法の細胞診断学への応用

Zeskind ら¹⁸⁾や、Cheung ら¹⁹⁾は、未固定の培養生細胞をサンプルとした UV-MS 法について報告している。特に培養生細胞の紫外線波長 260 nm と 280 nm を各々の波長ごとの吸収画像を用いて、そのピクセル強度の解析による細胞内の核酸量やタンパク量を証明した。本研究では著者らが開発してきたオリジナルに組み立てた UV-MS 法の装置を用いた。この顕微鏡を使用することの利点は、紫外線吸収画像と紫外線スペクトルの同時測定を同時に観察できることである。紫外線画像を観察しながら研究できることは、これまで細胞診断学において培ってきた非がんとがん細胞の鑑別のための形態学的な知見を応用することができると考えられる。紫外線吸収画像と Papanicolaou 染色画像と Giemsa 染色画像との違いについて比較検討することは、今後の診断学の判別精度向上のために有用と考えられる。本機器の欠点は、サンプル測定エリアを 4 方向からの遮蔽板により調整する点である。測定エリアの形は正方形と長方形が主体となるため、円形や楕円形エリアには対応するスペクトルを得ることが現在ではできず、今後の機器開発の課題である。しかし、我々は Papanicolaou 染色サンプルの画像を用いて、非がん由来細胞とがん細胞において、核と測定領域の比に有意差がなかったことを確認している。

(2) UV-MS 法における LBC 法の有用性

UV-MS 法のサンプル材料法として本研究では、LBC 法を応用することの有用性を証明できた。Zeskindら¹⁸⁾や、Cheungら¹⁹⁾は未固定の培養生細胞をサンプルとしていたため紫外線毒による細胞障害を指摘している。本研究では紫外線画像を観察する十分な時間の紫外線照射においても、紫外線透過率測定が可能であった。これは LBC 法では細胞を固定していることが原因と考えられる。Papanicolaou 染色細胞像を主体とする細胞診断学では、95%エタノール液による湿潤固定は必須である。近年では LBC 法による処理の使用頻度が増している。本研究において LBC 法サンプルにおいて非がん細胞とがん細胞の有意な判別を行えたことは、今後の臨床細胞診断学へ紫外顕微分光法を応用するための朗報と考えられる。

(3) UV-MS 法による客観的指標となるパラメータによる判別分析

Lakowicz¹⁷⁾は、特異的な紫外線吸光度をもつ物質としてフェニルアラニン Phenylalanine 260 nm、チロシン Tyrosine 275 nm、トリプトファン Tryptophan 295 nm、NADH 340 nmなどを挙げている。本研究の結果ではがん細胞は、非がん由来細胞に比べすべての紫外線透過率が低かったため、がん細胞は紫外線を吸収する何らかの物質を多くもっていることが考えられる。この判別のためのパラメータは、紫外線 300 nm 波長の透過率値であった。しかし、その具体的な物質の同定には本研究では至らなかった。今後、さらに細胞材料を用いた有機化学的分析¹⁷⁾や、マスペクトル分析¹⁶⁾を用いた研究が必要である。

第二章 LBC 法の Papanicolaou 染色細胞を用いた可視顕微分光法によるがん細胞の判別のための核領域色彩スペクトル解析の有用性

序 論

可視顕微分光 (Visible-microscopic spectroscopy: Vis-MS) 法は、分析化学分野の吸光度分析¹⁶⁾や蛍光分析¹⁷⁾で広く用いられているスペクトル分析手法である。Vis-MS 法のサンプルの多くは、水溶液を溶媒としてのものであり、本研究のように細胞そのものや、組織標本をサンプルとした研究は少ない。紫外線波長領域におけるスペクトル分析 (Ultraviolet-microscopic spectroscopy; UV-MS) としては近年、Zeskindら¹⁸⁾や、Cheungら¹⁷⁾による未固定の培養生細胞をサンプルとした研究がある。これらにより紫外線波長 260 nm や 280 nm などの吸光度を測定し、細胞内の核酸やタンパク質の解析が可能であることがわかってきた。可視光領域では、デジタル画像の解析²⁷⁻²⁹⁾は多く行われているが、Vis-MS 法による透過光のアナログ画像解析や透過率スペクトル値そのものによる解析については行われてこなかった。

本章の研究目的は、細胞診材料としては今後、最も大きなシェアをもつと思われる LBC 法¹⁻⁶⁾処理による培養細胞をサンプルとして Vis-MS 法の解析を行い、非がん細胞とがん細胞が客観的に鑑別が可能かどうかを明らかにすることである。本研究の将来的な目標は、鑑別が困難な臨床症例へ応用し、がん細胞判定のための客観的な指標を作ることである。

方 法

1. LBC 法による培養細胞の検体処理

第一章で記述した方法の他に、Vis-MS法のための検体処理は、以下の通り行った。
1 標本につき先の培養細胞と LBC 液 (ThinPrep, HOLOGIC) との混濁液を 5 ml ずつ分注し、遠心直接塗抹法 (Cyto-Tec Cyto centrifuge Model CF-127, Sakura Seiki, Tokyo, Japan) 1500 rpm で 2 分間遠心してスライドガラス (FINE FROST, MATSUNAMI GLASS IND., Tokyo, Japan) に塗抹を行った。その後、95 % エタノールで 30 分間の湿潤固定をし、Papanicolaou 染色は、以下の通りに行った。

- step 1: 80%, 70%, 50% エタノール (各 1 槽) 各 10 回出入 (約 1 秒間隔)
- step 2: 流水水洗 30 秒
- step 3: Gill's ヘマトキシリン V 液 (MUTO PURE CHEMICALS co., Ltd., Japan) 90 秒
- step 4: 流水水洗 30 秒
- step 5: 0.5% 塩酸・70% アルコール 20 回出入 (約 1 秒間隔)
- step 6: 流水水洗 30 秒
- step 7: 50%, 70%, 80%, 95% エタノール (各 1 槽) 各 10 回出入 (約 1 秒間隔)
- step 8: OG-6 染色液 (MUTO PURE CHEMICALS, Japan) 90 秒
- step 9: 95% エタノール (2 槽) 各 10 回出入 (約 1 秒間隔)
- step 10: EA-50 染色液 (MUTO PURE CHEMICALS) 3 分
- step 11: 95% エタノール (2 槽) 各 10 回出入 (約 1 秒間隔)
- step 12: 100% エタノール (3 槽) 各 1 分
- step 13: キシロール (3 槽) 各 1 分
- step 14: 封入

2. Lambert-Beer の法則

第一章に記述した法則により、異なる化学種の濃度とからなる物質の吸光度測定を、第一章の式(1, 2)によって行った。

3. Vis-MS 法の装置

第一章に記述した方法の他に、Vis-MS システムを用いた。

(1) 光源 (MAX-302, Asahibunkou)

第一章に記述した方法の他に、Vis-MS 法の光源中間フィルターには、Vis-ミラーモジュールを設置した。これは、光源ランプの広い連続波長域から可視光線域(400～700 nm)だけの光を取り出すためである。Vis ミラーモジュールは高性能コールドミラーを使用しているため、不要な熱を完全に抑えることができ、そして迷光のレベルが極端に少ない特徴をもつ。

(2) 分光器

第一章に記述した方法により行った。

(3) スペクトルを取得するためのサンプル領域

第一章に記述した方法により行った。

(4) Vis-MS 法の測定のための基本設定

第一章に記述した方法により行った。

(5) 透過率測定モードでのサンプル測定方法とサンプル個数

第一章に記述した方法の他に、Vis-MS 法の Vis 画像は、画像取得ソフト (Basico, CLARO, Japan) を用いて Bit Map 形式で取得した。一般的に人が認識する色は、その色の最大吸収波長によって表される。最大吸収波長の色がもつ補色が、人の認識する色である。Papanicolaou 染色に関する波長として、530 nm はエオジン色素³⁰⁾, 560 ~ 580 nm はアルミニウム媒染したヘマトキシリン色素³¹⁻³³⁾, 630 nm はライトグリーン SF 色素³⁴⁾の最大吸収波長である。

Papanicolaou 染色された核領域においてはこれらの色素吸光度の和(吸光度の可

成性)として測定されてくる(第一章、式 1.2)。本章研究においては、分光用多機能ソフトウェア OP wave+で取得した可視透過率スペクトルから、Vis 波長 530 nm, 580 nm, 630 nm における透過率測定値をエクセルデータとして保存した。核色素の測定細胞数は各症例 50 個ずつで、合計 300 個である。その内訳として非がん由来細胞は合計 100 個、がん細胞は合計 200 個である。

4. 580 nm 透過率比による補正データ

一般に色は、その色がもつ最大吸収波長をもって表現されたり、側色計によって色を数値化したりする。しかし顕微鏡による透過光で、Papanicolaou 染色やヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin-Eosin: HE)染色などのような重染色の場合は、色の吸光度の可成性(第一章、式 1.2)の法則により、スペクトルの吸光度を濃度としての測定値として解釈していかなければならない¹⁶⁾。そこで本研究においては、ヘマトキシリン色素最大吸収波長 580 nm 値における吸光度を基盤として各最大吸収波長の比率という補正值を用いて検討を行う。エオジン色素の色調の強さとしては 530 nm/580 nm 透過率比で、ライトグリーン色素の色調の強さとしては 630 nm/580 nm 透過率比で表現すると考えた。530nm/580 nm 透過率比が高いということは、580 nm(紫)に対する 530 nm(赤紫)の透過率が高いので、色調としては赤紫が明るいことを表現する。630 nm/580 nm 透過率比が高いということは、580 nm(紫)に対する 630 nm(青緑)の透過率が高いということで、色調としては青緑が明るいことを表現する。これらの補正值は用いることの利点は重染色における色の吸光度の可成性が補正でき、結果として色の色調を表現できることである。

よって、本研究の核領域の色彩解析データとして、1. 核色の明るさを透過率値、2. 核色の色調を補正值、この 2 つを用いる。

5. 統計解析

非がん細胞とがん細胞において、530 nm, 580 nm, 630 nm の各透過率値の平均値と標準偏差を算出した。同様に 530 nm/560 nm 透過率比、630 nm/580 nm 透過率比の平均値、標準偏差を算出した。それぞれのデータの非がん由来細胞とがん由

来細胞の正規分布性については、Shapiro-Wilk 検定で行い、正規性を確認した後、非がん細胞とがん細胞の有意差検定を以下のように行った。

正規分布に従っていない時は、Mann-Whitney U 検定を行った。正規分布に従っている時は、次に各標本で分散が等しい(等分散性)かを Levene 検定で行った。等分散である時は 2 標本の t 検定で、非等分散である時は Welch の検定を用いて有意差検定を行った。これらの統計解析は統計解析ソフト SPSS 16.0j を用いた。

次に、がん細胞の判定予測に影響をおよぼす要因について、2 項ロジスティック回帰分析(Binomial Logistic Regression Analysis)³⁵⁾を用いて分析した。ロジスティック回帰モデルとは、2 値変数を目的変数とし、説明変数との関係を解析する方法である。2 値変数とは、非がん細胞なら、D=0、がん細胞なら、D=1 とするような変数である。ロジスティック回帰モデルは、この 2 値変数が 1 である確率(D=1)、これを p とし、その確率 p を例えば 260 nm 透過率値、280 nm 透過率値などの変数(説明変数)で説明するモデルである。2 項ロジスティック回帰モデルは、確率 p のロジット(logit)に対して、説明変数が k 個 $[x=(x_1, x_2, \dots, x_k)]$ あれば

$$\log \frac{p(x)}{1-p(x)} = \alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k \quad (4.1)$$

$$p(x) = \frac{1}{1 + \exp(-(\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k))} \quad (4.2)$$

という関数で関連される。

ある事象が起こる確率 $p(x)$ の起こらない確率 $1-p(x)$ に対する比は、オッズと呼ばれ、その自然対数のことを確率 $p(x)$ のロジットという。よって、ロジスティック回帰モデルとは、事象の起こる確率のロジットを説明変数で説明するためのモデル化したものといえる。

ロジスティック回帰モデルを不安定にする多重共線性(multicollinearity)については、説明変数間の相関が、Spearman の順位相関係数で $r > 0.8$ の変数を削除した。さらに単変量のロジスティック回帰分析を行い単変量ごとのがん細胞(D=1)の関わり

を考慮して行った。説明変数選択法については、尤度比検定による変数増減法を用いた。ロジスティック回帰式の適合度は尤度比検定を用いた。残差の検定は、スチューデント化残差から絶対値が 2 より大きいケースを外れ値とした。これらの統計解析は統計解析ソフト Ekuseru-Toukei 2012 (Social Survey Research Information Co., Ltd.)を用いた。

結果

1. 非がん由来およびがん細胞の Papanicolaou 染色像 (Fig. 4)

Figure 4 に非がん由来細胞の NHDF(Fig. 4a)、COS-7(Fig. 4b)と、がん細胞の LS-180(Fig. 4c)、Kato-III(Fig. 4d)、MCF-7(Fig. 4e)、A549(Fig. 4f)の Papanicolaou 染色像を示した(スケール 20 μm)。

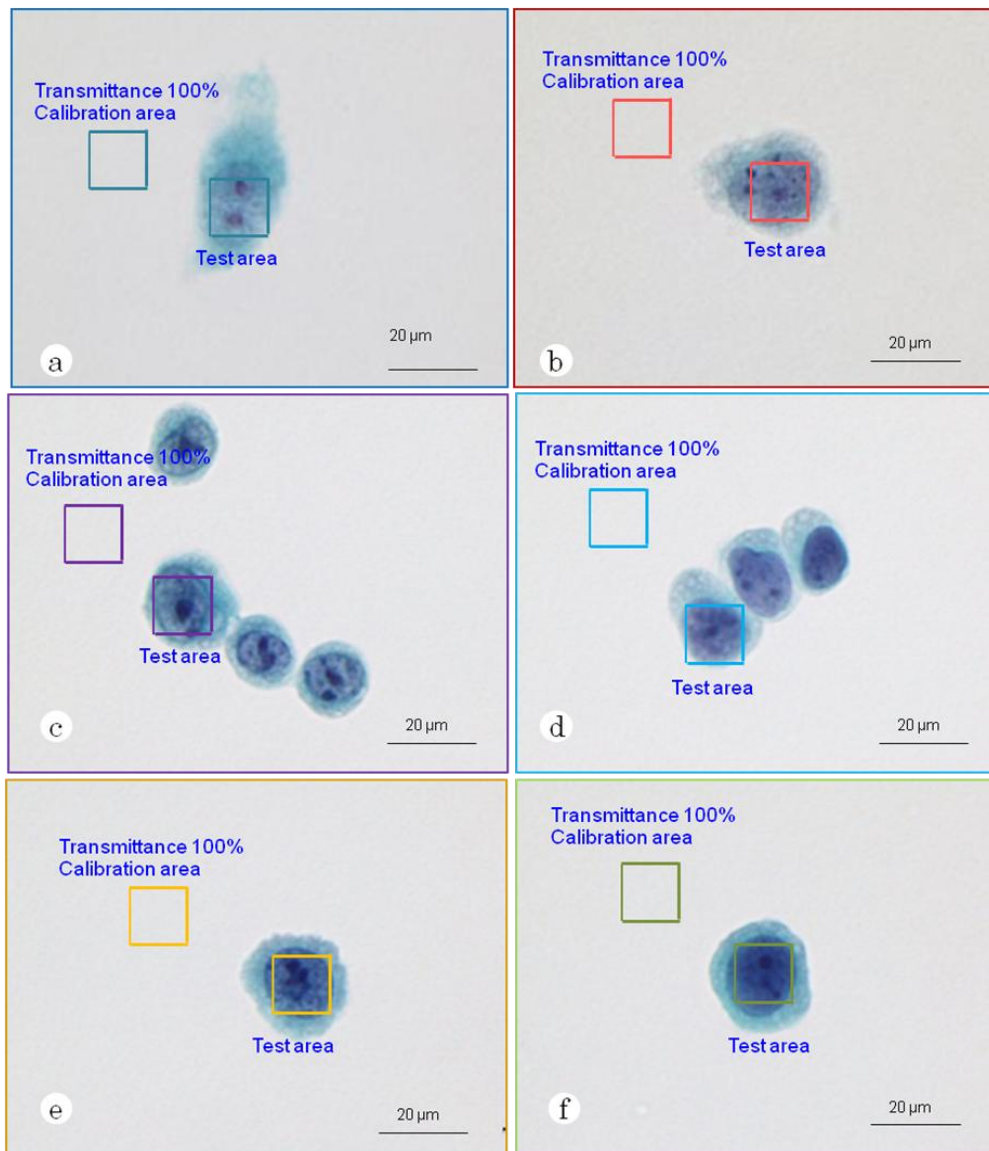


Fig. 4 Papanicolaou-stained cells by LBC

Non-cancer cells: NHDF (a), COS-7 (b), Cancer cells: LS-180 (c),
MCF-7 (d), A549 (e), KatoIII (f)

細胞の出現様式は、いずれも孤立散在性で結合性は乏しかった。細胞形は円形から類円形であった。Nucleus: Cytoplasm ratio (以下、N/C 比)は、約 70~90%と高かった。核は円形から類円形で、小型の核小体が 1~2 個みられた。各細胞の核の色彩として、がん細胞は非がん由来細胞に比べ紫調が濃かった。非がんとがんの鑑別する色調として、紫調以外の赤紫調や青紫調を細胞診断所見として表現することは難しかった。以上の細胞所見からは、非がん由来細胞もがん細胞も類似した点が多くみられ、両者の鑑別は困難であった。

2. 非がん由来細胞とがん細胞の Vis-MS のスペクトル解析

Vis-MS による測定を行った 300 個の内、非がん細胞 (n=100) とがん細胞 (n=200) について透過率平均値と、580 nm 透過率比 (Fig. 5) による補正值の平均値は Table 4 の通りである。

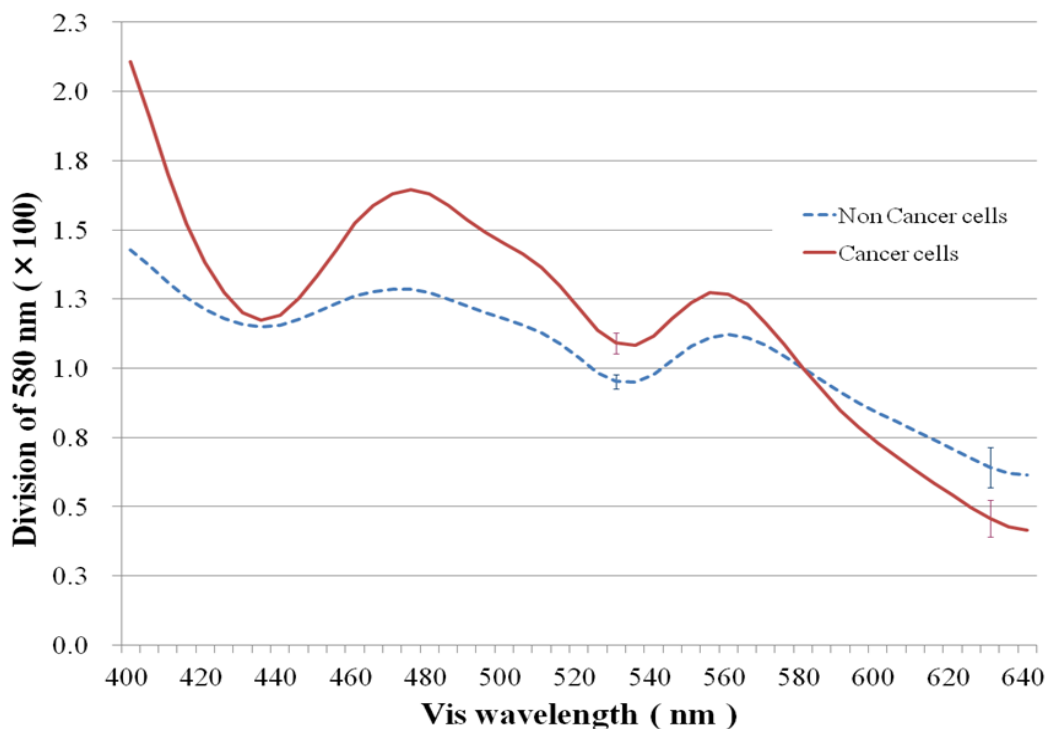


Fig. 5 Comparison of the division of 580 nm transmittance ratio on Papanicolaos stained cultured cells (n=300)

Non-cancer cells: NHDF, COS-7. Cancer cells: LS-180, MCF-7, A549, KatoIII.

Table 4. Comparison of the transmittance measured using the Vis-MS and the Division of 560 nm values between non-cancer and cancer cells

Wavelength (nm)	Non-cancer cells (n=100)	Cancer cells (n=200)	P-value
	Transmittance (mean ± SD%)		
530	49.3 ± 10.3	29.9 ± 7.1	} < 0.001※
580	51.5 ± 9.3	27.4 ± 6.7	
630	33.3 ± 8.6	12.8 ± 4.7	
Correction	Division value(mean ± SD%)		} < 0.001※
530/580 nm 比	95.2 ± 4.2	109.1 ± 6.5	
630/580 nm 比	64.2 ± 8.6	45.7 ± 7.7	

※ Mann-Whitney U test

580 nm 透過率値においてがん細胞 (27.4 ± 6.7%) は、非がん細胞 (51.5 ± 9.3%) に比べ有意 (p<0.001) に低かった (紫色が濃い)。530 nm/580 nm 透過率比においてがん細胞は (109.1 ± 6.5%) は、非がん細胞 (95.2 ± 4.2%) に比べて有意 (p<0.001) に高かった (赤色調が薄い)。630 nm/580 nm 透過率比においてがん細胞 (45.7 ± 7.7%) は、非がん細胞 (64.2 ± 8.6%) に比べ有意 (p<0.001) に低かった (青緑調が濃い)。

2 項ロジスティック回帰分析を行う前の検定として、説明変数の多重共線性がないかを確認するスピアマンの順位相関係数の結果 (Table 5) と、単変量のロジスティック回帰分析の結果を示した (Table 6)。その結果、580 nm 透過率値と 530 nm/580 nm 透過率比の相関係数は $r=-0.66$ (p<0.01)、580 nm 透過率値と 630 nm/580 nm 透過率比の相関係数は $r=0.79$ (p<0.01)、530 nm/580 nm 透過率比と 530 nm/580 nm 透過率比の相関係数は $r=-0.51$ (p<0.01) と $r<0.8$ であり、これらの両変数間には多重共線性は認められなかった。また単変量ごとのロジスティック回帰分析の結果

(Table 6)は、580 nm 透過率値と 530 nm/580 nm 透過率比と 630 nm/580 nm 透過率比の各変数は、いずれも尤度比検定で、 $p < 0.001$ であり、判別的中率も高く (95.7, 92.0, 88.7)、説明変数として解析することには問題ないと判断した。

Table 5 Multicollinearity decision in Correlation matrix for the model of Tabel 4 ($r_s < 0.80$)※

	530 nm	580 nm	630 nm	530/580 比	630/580 比
530 nm	1.0	0.98	0.95	-0.53	0.78
580 nm	0.98	1.0	0.97	-0.66	0.79
630 nm	0.95	0.97	1.0	-0.63	0.91
530/580 nm 比	-0.53	-0.66	-0.63	1.0	-0.51
630/580 nm 比	0.78	0.79	0.91	-0.51	1.0

※Speaman's rank correlation coefficient

Table 6 Univariate binary logistic regression analysis for the model of Table 4

	回帰式 の精度 R2乗	回帰式 モデル の尤度 比検定	偏回帰 係数	標準偏 回帰係 数	偏回帰 係数の 有意差 検定	オッズ 比	オッズ比の 95%信頼区 間		判別 的中 率 (%)	残差 の分 析※
							下限	上限		
530 nm	0.62	< 0.01	-0.37	-4.56	< 0.01	0.70	0.63	0.76	88.7	0.3
580 nm	0.85	< 0.01	-0.64	-8.78	< 0.01	0.53	0.42	0.66	95.7	0.3
630 nm	0.88	< 0.01	-0.95	-10.85	< 0.01	0.39	0.26	0.58	96.0	0.3
530/580 nm 比	0.66	< 0.01	0.52	4.51	< 0.01	1.68	1.47	1.91	92.0	0.7
630/580 nm 比	0.54	< 0.01	-0.24	-2.82	< 0.01	0.79	0.75	0.83	88.7	0.7

※スチューデント化残差

2 項ロジスティック回帰分析は、変数の組み合わせにより以下の 3 つの方法で解析した。580 nm 透過率値と 530 nm/580 nm 透過率比を説明変数とした場合、580 nm 透過率値と 630 nm/580 nm 透過率比を説明変数とした場合、そして 530 nm/580 nm 透過率比と 630 nm/580 nm 透過率比を説明変数とした場合である。しかし 580

nm 透過率値と 530 nm/580 nm 透過率比を説明変数の場合は、統計ソフトの解析途中で、「47 回目の反腹推定で、Fisher 情報行列の逆行列が存在しない」というエラーのため解析が中断された。また、530 nm/580 nm 透過率比と 630 nm/580 nm 透過率比を説明変数とした場合においては、いずれも 580 nm 値比による補正值からなっているが、本研究においては、色彩の明るさ、濃さを表現できる透過率値も同時に変数として入れたいため、本方法を解析法から削除した。以上により、2 項ロジスティック回帰分析を行うための変数の組み合わせは、580 nm 透過率値と 630 nm/580 nm 透過率比を説明変数とした場合の方法で行った。

2 項ロジスティック回帰分析の結果は Table 7 の通りであった。

Table 7 580 nm 値と 630/580 nm 値比による 2 項ロジスティック回帰分析

	偏回帰 係数	標準偏回 帰係数	偏回帰係数の 有意性検定	オッ ズ比	オッズ比の 95%信頼区間	
					下限	上限
580 nm	-0.73	-10.03	< 0.001	0.48	0.34	0.67
630/580 nm 比	-0.34	-3.98	< 0.001	0.72	0.59	0.87
定数	48.19					

回帰式の精度 (R² 乗): 0.92

回帰式の有意性(尤度比検定): < 0.001

判別的中率: 98.0%

残差の検定(スチューデント化残差が 2 を超えた割合): 0.3%

がん細胞の判定予測に影響を及ぼす因子として 580 nm 透過率値 ($p < 0.001$) と 630 nm/580 nm 透過率比 ($p < 0.001$) の両変数が選択された。回帰式の尤度比検定は $P < 0.001$ であり適合性は最良であった。580 nm 透過率値のオッズ比は 0.48 (95% 信頼区間 0.34~0.67)、630 nm/580 nm 透過率比のオッズ比は 0.72 (95% 信頼区間 0.59~0.87) であった。95% 信頼区間に 1 を含むものはなく予測値と実測値の判別の中率は 98.0% であった。残差の検定においてはスチューデント化残差が 2 を超えた外れ値は 0.3% のみであった。得られたロジスティック関数は以下の通りであり、この式から、がん細胞である確率(p)を求めることができる。

$$p(x) = \frac{1}{1 + \exp(-41.19 + 0.73x_1 + 0.33x_2)} \quad x_1 = [580 \text{ nm}] \quad x_2 = [630/580 \text{ \%}]$$

(5.1)

以上の結果を、スペクトル波長から核領域の色彩に言い換える。がん細胞を予測するためには、紫色が濃い(580 nm 透過率値が低い、 $p < 0.001$)、かつ、紫色に対する緑色調の割合が高い(630 nm/580 nm 透過率比が低い、 $p < 0.001$)、紫色に対する赤色調の割合が低い(530 nm/580 nm 透過率比が高い、 $p < 0.001$)ことに注目することが有用であると分かった。そして、がん細胞か否か未知の細胞を判別する客観的な方法として、Vis-MS法を用いた 580 nm 透過率値と 630 nm/580 nm 透過率比の 2 項ロジスティック解析が有用であった(式:(5.1)、 R^2 乗:0.92、判別的中率:98% ($p < 0.001$))。

考 察

(1) Vis-MS 法の細胞診断学への応用

LBC 標本の特徴として、核の淡明化や核円形化による濃染があり、異型性の乏しい高分化腺癌細胞の細胞判定を困難にする傾向があった⁷⁻¹²⁾。しかし、本章の研究の解析データにおいては、色彩の透過率値のみならず、580 nm 透過率値による各波長透過率比という色彩の割合を意味する補正変数を用いることにより、紫色に対する緑色の濃さと、紫色に対する赤みの淡さが、がん細胞の判定に有用であることが分かった。これらの色彩の割合の解釈は、淡いクロマチンをもつ(紫色が淡明な)がん細胞の判定にも応用できる。しかし、色彩の割合が人の目にどのように認識するかは判断が難しいかもしれない。

(2) Vis-MS 法における核の色彩とスペクトル

核の色彩が持つ意味は、その染色する色素の性質による。Papanicolaou 染色の核色彩として、塩基性成分(DNA など)はヘマトキシリン色素で、酸性成分(タンパク質など)はエオジン色素やライトグリーン色素で染色される。単色素のみの染色の透過率結果は、その色素の最大吸収値から、その明るさを表現できる。ヘマトキシリン色素のみの染色では最大吸収波長 580 nm、エオジン色素のみ染色では最大吸収波長 530 nm の測定で良い。しかし Papanicolaou 染色は重染色である。そのため、核領域のスペクトルは、吸光度の可成性により核色素の濃度和(第一章、式 1.2)となり可成性があるという¹⁶⁾。Papanicolaou 染色は、ヘマトキシリン染色液、OG-G 染色液、EA-50 染色液による重染色である。Papanicolaou 染色での核内領域のスペクトルにおいても、これら色素の吸光度の可成性により透過率値が得られる。そのため、測定スペクトルの各色素の最大吸収波長の透過率は、各色素の影響があるため補正が必要になる。そこで本研究においては、ヘマトキシリン色素の最大吸収波長 580 nm における各色素の最大吸収波長の割合を補正值とした変数を考案し用いた。この点はこれまでの研究で見られない本研究の特色である。エオジン色素においては 530/580 nm 比で、ライトグリーン色素においては 630/580nm 比の補正值でその割合を表した。

530/580 nm 比が低いということは、ヘマトキシリン色素の色である紫に対する、赤紫調が濃いことを表現する。630/580nm 比が高いということは、緑色調が濃いことを表現する。これらの補正值を用いることの利点は、色の色調を表現できることである。

このように Vis-MS 法は、核領域の色彩解析方法として、可視光スペクトルを取得し、補正值により、ヘマトキシリンの色が明るいほど、580 nm 透過率が高く、赤紫調が濃いほど 530/580 nm 比が低く、緑色調が濃いほど 630/580nm 比が低いというデータが取得できることが分かった。本法は客観的で、精度の高い手法であり、培養細胞株のがん細胞判定には有用であると考えられた。

LBC 法による細胞診の普及により、他施設で作成した LBC 標本や、既存の LBC 標本においても、本研究での Vis-MS 法による解析が行える。今後は、本研究を基盤に臨床材料へと発展させ、がん細胞の判定困難例の客観的判定指標へと応用させていきたい。

第三章 組織切片を用いた紫外・可視顕微分光法による子宮内膜類内膜腺癌の分化度評価

序 論

本章の目的は、子宮内膜類内膜腺癌高分化(以下、G1)と低分化(以下、G3)の組織標本を用いて、紫外・可視顕微分光(Ultraviolet-Visible microscopic spectroscopy: UV-Vis MS)法により、核染色性に及ぼす紫外線吸収物質の影響度を解析することが類内膜腺癌の分化度評価の客観的指標となり得るかを検討することである。

近年、日本でも生活習慣の欧米化により子宮内膜癌の罹患率が増加傾向にある³⁶⁾。子宮内膜癌は子宮内膜から発生する癌腫で、エストロゲンに依存性を示すI型とエストロゲンに非依存性のII型に分けられる。I型の大半が類内膜腺癌で占められる。類内膜腺癌は子宮内膜増殖症を前駆病変として発生し、あるいは背景病変としてしばしば伴い、G1からG3まで組織学的に幅広い。G3はその進展の初期においても、しばしば筋層深く浸潤する傾向があり悪性で、その予後も不良とされている。組織学的分化度は、構造異型(一部細胞異型)が主体に分類されている。しかし、構造異型以外に、分化度や悪性度の客観的指標は十分に検討されていない。

紫外・可視顕微分光法を病理学に応用する視点の基盤は、細胞の核内の微細構築の変化をスペクトル値として捉えたい、ということである。腫瘍の発生と進行には、増殖や分化の著しいコントロールの乱れや、ヒストン修復酵素、核マトリックスタンパク異常が核内微少環境の要素の乱れとなり、核形態の表現変化に関与しているとされている³⁷⁾。核内の特定の場所で遺伝子活性化により、クロマチンのリモデリング、転写因子の動員など起こる。これらような核内の空間的位置や、転写部位の空間的位置の変調が腫瘍の発生や進行のメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが示唆されている³⁸⁾。紫外・可視顕微分光法においては、核の染色性に及ぼす、これらの物質の量的な異常をスペクトル化して、核染色性と紫外線吸収物質との関係性として観察することが可能と考えられる。

そこで本章の研究では、類内膜腺癌 G1 と G3 のヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin: HE)染色された組織標本の核領域の色彩スペクトルに及ぼす紫外線吸収物質の影響度の解析を行った。

方 法

1. 対象組織

(1) 組織切片による UV-MS 法

紫外光・可視光の顕微分光測定に使用した材料は、子宮内膜増殖期 (PPE)、類内膜腺癌高分化型 (G1)、類内膜腺癌低分化型 (G3) の各 4 例の無染色組織標本である。摘出組織を 20 % 中性緩衝ホルマリン液で 12 時間固定後、パラフィン包埋しブロックを作成した。厚さ 3 μ m で薄切片、薄切片を石英スライドガラス (Technical, Hirosaki, Japan) に貼付した。この標本をキシレン、アルコールで脱パラフィン、水洗後、無染色のままグリセリン (Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を滴下し 石英カバーガラス (Technical) で封入したものを紫外分光用の材料とした。

(2) 組織切片による Vis-MS 法

可視光の分光測定の方法は、紫外線光測定後、石英カバーガラスを取り除き、水洗後、全標本に同時に HE 染色を行い、通常のカバーガラスで封入したものをを用いた。

2. Lambert-Beer の法則

第一章に記述した法則により、異なる化学種の濃度と光路長からなる物質の吸光度測定を、第一章の式(1, 2)によって行った。

3. Vis-MS 法の装置

第一章と第二章に記述した方法により行った。

(1) 光 源 (MAX-302, Asahibunkou, Japan)

第一章と第二章に記述した方法により行った。

(2) 分光器

第一章に記述した方法により行った。

(3) スペクトルを取得するためのサンプル領域

第一章に記述した方法により行った。

(4) Vis-MS 法の測定のための基本設定

第一章と第二章に記述した方法により行った。

(5) サンプル測定方法と画像取得法

第一章と第二章に記述した方法に追加し、組織切片の核領域の測定を以下の通り行った。キセノン光源内に紫外域ミラーモジュール(250-385 nm)と、350 nm 長波長カットフィルターを設置し、350 nm より長波長をカットした 250 nm～350nm 紫外域の光源を出力させた。無染色標本を用いて、各標本の腺細胞の核領域を 50 か所選択し、紫外透過率を測定した。この時、測定箇所画像を保存した。測定後、石英カバーガラスを取り除き水洗、全標本を同時に HE 染色し、通常のカバーガラスを用いて封入し、キセノン光源を、可視領域ミラーモジュール(385 nm～740 nm)に切り替え、各 HE 染色標本(Fig. 6、スケール 20 μm)において、紫外スペクトル測定をおこなった核領域と同一の核領域を探し、可視光透過率を測定した。測定箇所の写真撮影を行った。

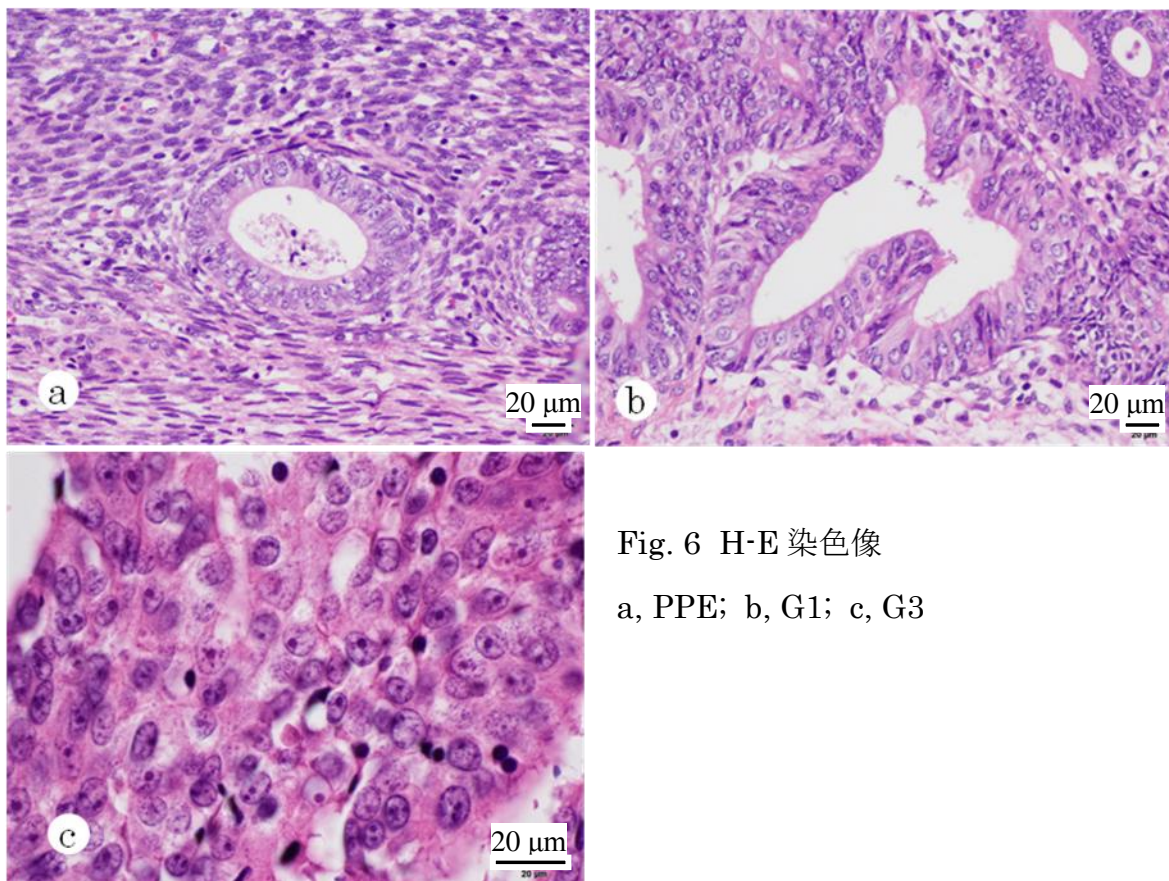


Fig. 6 H-E 染色像

a, PPE; b, G1; c, G3

4. 統計解析

可視光透過率、紫外光透過率の測定後、各データの正規分布性を Shapiro-Wilk 検定で行った。正規分布に従うものは Mann-Whitney U 検定を、従わないものは 2 標本 t 検定を行い有意差を検討した。以上の統計解析は統計ソフト SPSS 16.0j を使用した。

次に、可視光透過率値と紫外光透過率値の関係性を調べるために、正準相関分析³⁹⁾を行った。正準相関分析の解釈については、以下の結果の中で合わせて説明した。

結果

1. 紫外光スペクトル、可視光スペクトル、及び分析のための波長抽出

(1) 子宮内膜癌の核領域の紫外光スペクトル (Fig. 7)

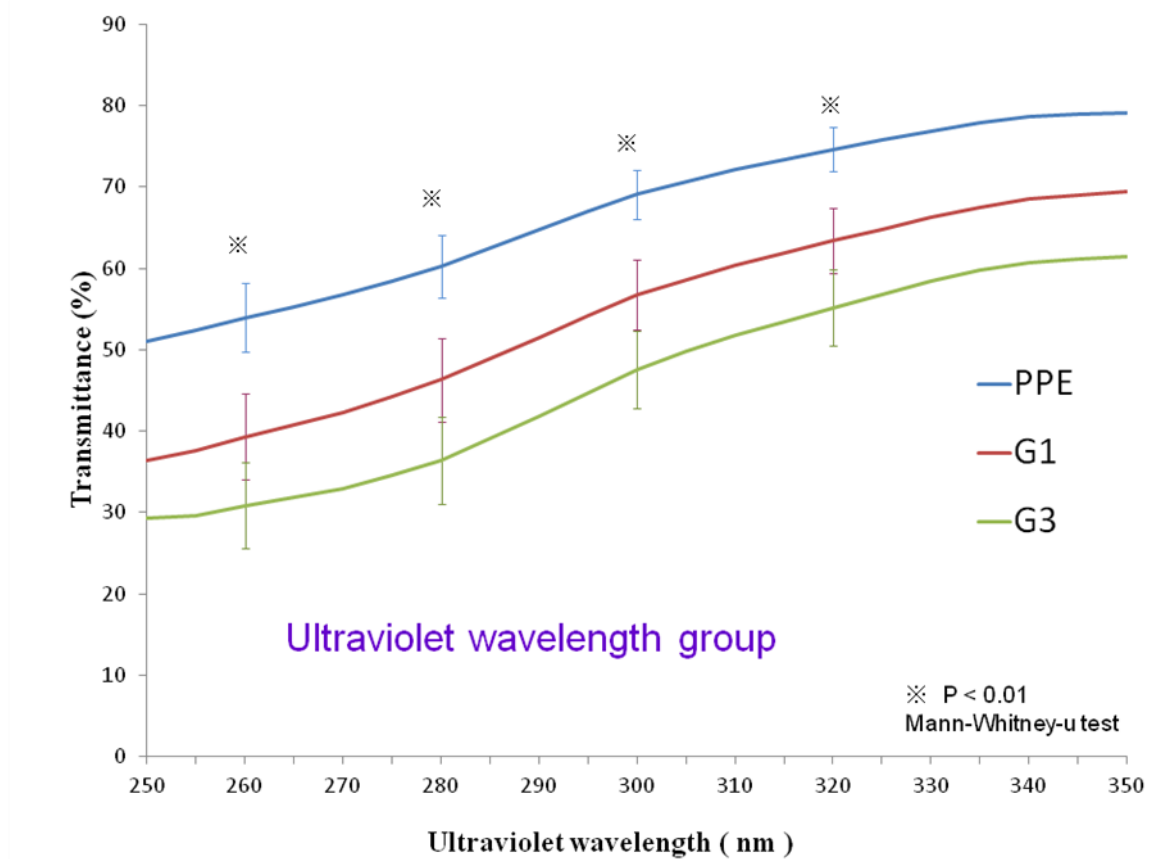


Fig.7 UV spectra of proliferative-phase endometrium (PPE) and endometrioid adenocarcinoma (G1 and G3)

Blue, Red, and Green lines indicate transmittance of PPE, G1, and G3 respectively.

Figure 7 には PPE、G1 と G3 の紫外光スペクトルの結果を示した。生化学的に核酸の最大吸収波長とされている 260 nm、芳香族アミノ酸などの吸収波長とされている 280 nm、及び 300 nm と 320 nm の波長を抽出し、紫外線波長群 (ultraviolet wavelength group) と命名した。G1 と G3 の紫外線透過率 (mean±SD) は PPE に比べ、さらに、G3 は G1 に比べすべての波長において有意に低かった。

(2) 子宮内膜癌の可視光スペクトル (Fig. 8)

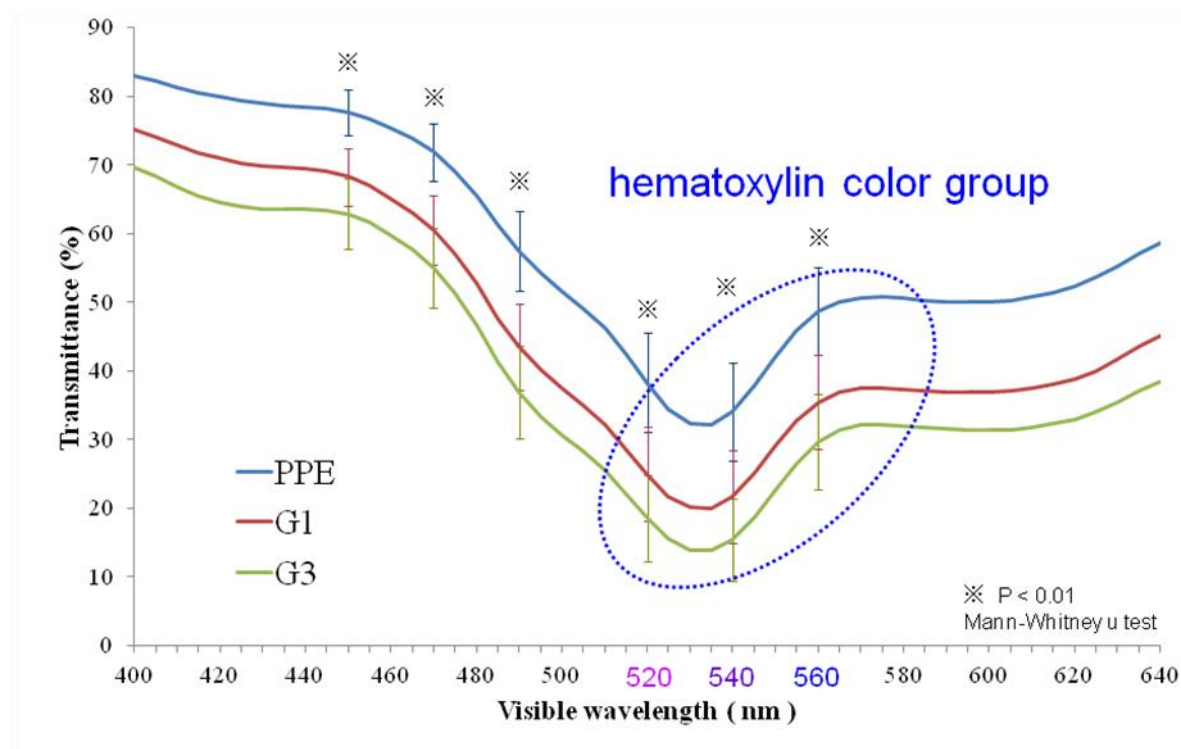


Fig. 8 Vis spectra of proliferative-phase endometrium and endometrioid adenocarcinoma (G1 and G3)

Blue, Red, and Green lines indicate transmittance of PPE, G1, and G3 respectively.

Figure 8 には、PPE、G1 と G3 の可視光スペクトルの結果を示した。可視光波長の 450 nm～490 nm 付近は黄色から赤色を示し、この波長域はエオジン色素の色彩領域である。可視光波長の 520 nm～560 nm 付近は赤紫色から青紫色を示し、ヘマトキシリン色素の色彩領域である。520 nm (赤紫)、540 nm (紫)、560 nm (青紫) をヘマトキシリン系の解析変量として抽出し、ヘマトキシリン波長群 (haematoxylin color group) と名付けた。核領域の測定範囲内にある細胞質成分の要素の混入や、核領域へのエオジン過剰染色によるアーチファクト要素を除くために、分光スペクトルのうちエオジン色素の色彩領域は、データ抽出から除いた。

透過率値 (%) が低い波長ほど、その波長の光 (吸収カラー) が核内で多く吸収されていることを表す。吸収カラーが多いほど、その補色が濃いと認識される。

PPE、G1、G3 のいずれも、ヘマトキシリン波長群の透過率は、450 nm あたりから下降し、530 nm 付近が最も低く、そして560 nm 付近で上り傾きはなだらかに平らになり、640 nm にかけて再び上昇した。

これらの波長変化を色彩で表すと、核色彩は、G3> G1> PPE の順で、紫、赤紫、青紫色のいずれの色も濃かった。

G3 の 520 nm (赤紫)と 540 nm 値(紫)は、G1 のどの波長よりも有意に低かった。G3 の 560 nm (青紫)は、G1 の 520 nm (赤紫)、540 nm (紫)より高く、G1 の 560 nm (青紫)より低かった。G1 の 560 nm 値(青紫)は、G3 のどの波長よりも有意に高く、PPE の 540 nm (紫)と近似していた。

核領域のヘマトキシリン系色彩をまとめると、G3 の赤紫と紫は、G1 のどの色彩より濃い。G3 の青紫は、G1 の赤紫、紫より明るく、G1 の青紫より濃い。G1 の青紫は、G3 のどの色彩よりも明るく、かつ、PPE の紫と同程度の濃さを示す、という結果であった。

2. 子宮内膜癌の紫外吸収と核色彩の関係性

(1) 正準相関分析のデザインについて

子宮内膜癌の紫外吸収物における関係性から核色彩の特徴を調べるために、紫外線波長群とヘマトキシリン波長群の正準相関分析をデザインした。

比較する変量群は、紫外線波長群を A 群、ヘマトキシリン群を B 群とする。A 群の新変量 u の線形モデルには、260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm のそれぞれの透過率値とする 4 つの変量が含まれる。B 群の新変量 h の線形モデルには、520 nm, 540 nm, 560 nm のそれぞれの透過率値とする 3 つの変量が含まれる。

A 群: 紫外線波長群 (新変量を u とする)

$$u = a[260 \text{ nm}] + b[280 \text{ nm}] + c[300 \text{ nm}] + d[320 \text{ nm}]$$

定数: a, b, c, d (6.1)

B 群: ヘマトキシリン波長群 (新変量を h とする)

$$h = e[520 \text{ nm}] + f[540 \text{ nm}] + g[560 \text{ nm}]$$

定数: e, f, g (6.2)

以上の 2 変量群において正準相関分析を行った³⁹⁾。

正準相関分析の結果の解釈は以下の通りである。

1. 正準相関係数 Canonical Correlation Coefficient: 新変量 u と h の相関係数が最大となる係数 λ (複数の固有ベクトルがある)。この時の、新変量 u , h を正準変量という。

2. 重み係数 Standardized canonical coefficients: 新変量 u と h とが最も強い相関がある時の定数 ($a \sim d$, $e \sim g$). 重み係数が大きい変量ほど、正準変量に強く影響していることがわかる。

(2) 正準相関分析における正準変量の有意差検定 (Table 8)

Table 8 Significance of canonical variables in canonical correlation analysis

Canonical Function	G1			G3		
	Eigenvalue	Canonical correlation	P-value	Eigenvalue	Canonical correlation	P-value
1	.808	.899	< 0.01	.330	.574	< 0.01
2	.154	.392	< 0.01	.029	.169	0.15
3	.016	.128	0.20	.020	.140	0.14

Table 8 には、正準相関分析における正準変量の有意差検定の結果を示した。

G1 は第一正準変量の正準相関係数 (0.899)、第 2 正準変量の相関係数 (0.392) が有意であった。G3 は第一正準変量の相関係数 (0.574) のみが有意であった。最も正準相関係数が大きいのは、G1 の第一正準変量 (0.899) であった。

G3 は、紫外吸収群とヘマトキシリン色彩群の有意な正準変量の数 (有意な固有値の数) が少なく、最も強い相関を示す変量 (第一正準変量) の関係性においても、正準相関係数は G3 (0.574) は G1 (0.899) より小さかった

そこで、G1 と G3 とともに第一正準変量で正準相関解析を進めた。

(3) 正準相関分析の第一正準変量における重み係数 (Fig. 9)

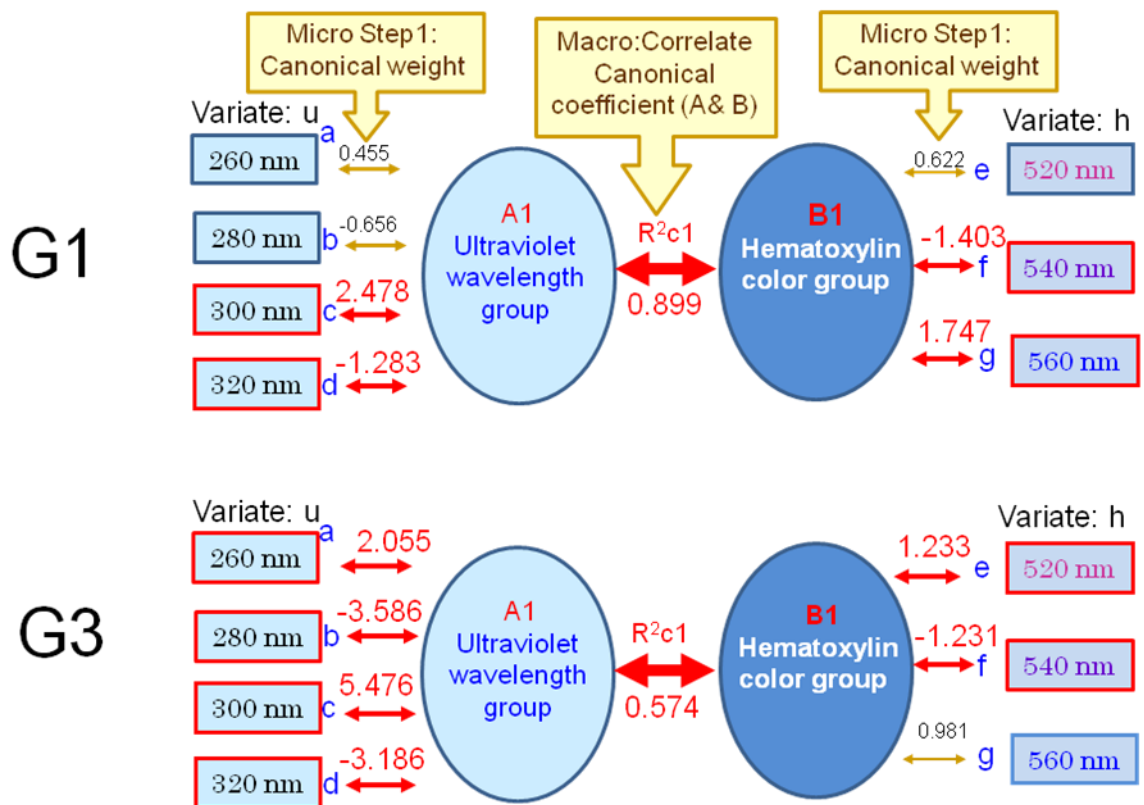


Fig. 9 Graphical presentation of comparison of the standardized canonical coefficients of the first canonical variables in G1 and G3

Figure 9は、G1とG3における第一正準変量の重み係数の模式図である。重み係数とは、標準化した新変量 u と新変量 h の最も強い相関関係にある時のそれぞれの下位にある変量に関わった度合いを示す相関係数である。重み係数が大きい変量ほど、互いの正準変量に強く影響していることがわかる。

核色彩の解釈から、重み係数の結果を以下に示した (Table 9)。

G1においては、両群の正準変量がもっとも強く (第一正準相関係数 0.899) 相関している時、より強く影響 (重み係数) していた変量は、300 nm (2.48)、320 nm (-1.28) と、紫 540 nm (-1.40)、青紫 560 nm (1.75) であった。260 nm の変量は強く影響していなかった。

G3においては、両群 (A1、B1) の正準変量がもっとも強く (第一正準相関係数 0.573) 相関している時の変量で、より強く影響 (重み係数) していたのは、260 nm (2.06)、

280 nm(-3.60)と、300 nm(5.47)、320 nm(-3.19)、赤紫 520 nm(1.23)、紫 540 nm(-1.23)であった。

Table 9 Comparison of the standardized canonical coefficients of the first canonical variable

	Canonical Weights	
	G1	G3
Standardized canonical coefficients for the ultraviolet wavelength group		
260 nm	0.455	2.055
280 nm	-0.656	-3.596
300 nm	2.478	5.476
320 nm	-1.283	-3.186
	Canonical Weights	
	G1	G3
Standardized canonical coefficients for the hematoxylin color group		
520 nm	0.622	1.233
540 nm	-1.403	-1.231
560 nm	1.747	0.981

G3 の核色彩に影響を及ぼす紫外線吸収物は G1(300 nm, 320 nm)に比べ、広い波長域(260~320 nm)に分散しており、相関性(重み係数)が低かった。

G3 の正準相関係数と重み係数を、G1 と比較してまとめると、G3(赤紫、紫)の紫外線吸収物質の影響を受けて色彩は、G1(青紫、紫)より赤みが強く、青みが弱い、という結果であった。

考 察

1. G1 と G3 の UV-MS の特徴

PPE、G1 と G3 の紫外線波長群スペクトルにおいて、紫外線透過率は G3、G1、PPE に順に各波長において有意に低かった。

Benjamin ら¹⁸⁾は、深紫外線 260 nm と 280 nm の吸収像として生細胞における核分裂像や運動能を観察し、ヌクレオチドとタンパク質を証明している。また、深紫外線 260 nm と 280 nm の吸収物質として生化学的には、ヌクレオチドの塩基[アデニン(260 nm)、グアニン(253 nm)、シトシン(271 nm)、チミン(267 nm)]やアミノ酸[トリプトファン(278 nm)、チロシン(274.5 nm)、フェニルアラニン(257.5 nm)]によるものとされている。さらに N=O や C=O を含む物質では 300 nm 付近の波長を、-N=N を含む物質では 350 nm 付近の波長を吸収する。癌細胞の核では正常細胞の核よりも DNA や RNA といった核酸や核マトリックスタンパク質、ヘテロクロマチンなどのタンパク質が増加することが知られている⁴⁰⁾。

紫外光スペクトルの吸収が強い順が、G3、G1、PPE であったことにより、この順に核酸やタンパク質などの吸収物質が増量することが示唆された。

2. G1 と G3 の Vis-MS の特徴

子宮内膜癌核領域のヘマトキシリン系色彩は、PPE に比べ、紫、赤紫、青紫の順に全ての色で濃かった。谷型のスペクトルの形は正常も癌も類似しており、特定の色だけが突出することはなかった。もし、このような突出のある波形の時は、アーチファクト物の混入や、異常な染色性や、薄切が厚いとか、しわなどの不適切な標本状態であることが示唆される。

核領域のヘマトキシリン系色彩の赤紫、紫、青紫についてそれぞれ比較した。

G3 の赤紫と紫は、G1 のどの色彩より濃かった。G3 の青紫は、G1 の赤紫、紫より明るく、G1 の青紫より濃かった。G1 の青紫は、G3 のどの色彩よりも明るく、かつ、PPE の紫と同程度の濃さを示した。これら G3 と G1 の核色彩の違いをスペクトルで示せたのは、これまでにない新しい発見である。

核内の DNA は同じ量存在するヒストンタンパクと強く結合してヌクレオソームを形成している。染色体はヒストン(塩基性アミノ酸が 5 分の 1 以上)と非ヒストンタンパク質が等量ずつ含まれている。そしてクロマチンはこの DNA-タンパク粒子の繰り返し構造よりなっている。またクロマチンが構成されるためには、ATP 依存クロマチン再構成複合体タンパク質や、DNA の複製、合成、RNA への転写などに関与する種々の酵素が多く関与している⁴¹⁾。

G3 において G1 より濃い赤紫、紫や、G1 の赤紫、紫より明るい G3 の青紫などの核色彩特徴は、DNA の増量のみならず、種々のタンパク質、酵素の増加してきたためと推測される。今後、G3 の核色彩の診断には、紫、赤紫の増量に注意し、G1 との鑑別における所見としては、G3 の淡い青紫を鑑別点として観察することが重要と思われた。

3. 子宮内膜癌の紫外吸収と核色彩との関係性

G1 と G3 の正準相関分析を行った結果、G3 における紫外・可視分光法の関係性の特徴として、以下の 3 点が明らかになった。

(1) G3 は、紫外吸収群とヘマトキシリン色彩群の有意な正準変数の数(有意な固有値の数)が少なく、最も強い相関を示す変数(第一正準変数)の関係性においても、正準相関係数は G3(0.574)は G1(0.899)より小さかった(Table 8)。

(2) G3(赤紫、紫)の紫外線吸収物質の影響を受けて色彩は、G1(青紫、紫)より赤みが強く、青みが弱かった。この G3 の核色彩に影響を及ぼす紫外線吸収物は、G1(300 nm, 320 nm)に比べ、広い波長域(260~320 nm)に分散しており、相関性(重み係数)が低い(Table 9, Fig. 9)。

(3) G3の核領域色彩に影響を及ぼす、紫外線吸収物は、各波長とも重み係数の絶対値が大きく、同程度であった(2.055~5.476)。よって、G3は、特定の核色彩は、特定の紫外線吸収物質の変化によっているのではないということが明らかになった。これらの 3 点は、これまで報告のない結果である。

G3が各紫外線波長の重み係数が、G1に比べ分散していたということは、G3の核色彩は抽出した紫外線波長(260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm)以外の紫外線波長

を吸収する物質にも影響されていたとも考えられる。よって、G3は、G1に比べ遺伝子の発現を調節するさまざまなタンパク質、酵素異常が無秩序に、そして増量しているので、紫外吸収物質と核色彩の関係が低く、特定の核色彩は、特定の紫外線波長物質の変化によっているのではないことが考えられた。

総括

UV-Vis MS法の非がん細胞とがん細胞の客観的な判定手法としての有用性について検討した結果、以下の点が明らかとなった。

1. がん細胞判定には、通常、HE染色やPapanicolaou染色して形態学的に判定していたが、無染色細胞でのUV-MS法において客観的な手法として補助判定に有効である。
2. 培養細胞株を材料としたLBC標本の無染色細胞診では、UV-MS法における判別指標として、300 nmの透過率値による多変量解析(判別分析)が有用である(判別的中率96.3%、 $p<0.01$)。
3. がん細胞判定におけるLBC標本のPapanicolaou染色細胞診では、Vis-MS法が客観的な判別判定手法として有効である。
4. 培養細胞株を材料としたLBC標本のPapanicolaou染色細胞診では、Vis-MS法における判別指標として、580 nm(紫色)と、630 nm/580 nm透過率比(紫色に対する緑色調の割合が高い)による多変量解析(2項ロジスティック解析)が有用である(判別的中率 98%、 $p<0.001$ 、 R^2 乗 0.92)。
5. 組織切片を材料とした同一核領域における無染色UV-MS法結果と、HE染色Vis-MS結果の多変量解析(正準相関分析)から、子宮内膜類内膜腺癌G3の特徴が明らかになった。G3の核色彩の変化はG1に比べ、不特定の紫外線吸収物質により関係していることが示唆された(正準相関係数 0.574)。

以上のことから、細胞診断学には LBC 標本があれば、病理組織診断学においては未染標本があれば UV-Vis MS 法は、がん細胞判定の客観的指標として補助診断手法に有効であることが明らかとなった。本研究を基盤に、今後はさらに多くの臨床材料を用いて検討し、がん悪性度評価、予後評価の有用性についても検証したい。

謝 辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻・医療生命科学領域・渡邊 純教授ならびに中村敏也教授に深く感謝申し上げます。また有益な御助言とご協力をいただきました弘前大学名誉教授 佐藤達資先生、弘前大学医学部附属病院病理部細胞検査士 星合桂太技師、いわき市立総合病院磐城共立病院中央検査室細胞検査士 近藤宏徳技師、弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻・医療生命科学領域・鷺谷清忠先生に深く感謝申し上げます。

本研究において貴重な培養細胞を提供していただきました弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻・医療生命科学領域・伊藤功一教授、葛西宏介先生、中野 学先生に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kuramoto H, Iwami Y, et al.: Application of a New Liquid-Based Procedure(TACAS) for the Screening of Cervical Cancer: A Preliminary Study. *Acta Ctol*, 56:74-79, 2012.
- 2) Namce KV: Evolution Pap testing at a community hospital: a ten-year experience. *Diag Cytopathol*, 35:148-153, 2007.
- 3) Akamatsu S, Himeji Y, et al.: Satisfactoriness and disease detection in the screening specimens of cervical cancer - comparison between liquid-based and conventional methods. *Jpn J Clin Cytol*, 47:420-424, 2008.
- 4) Hutchinson ML, Isenstein LM, et al.: Homogenous sampling accounts for the increase diagnostic accuracy using the ThinPrep® Processor. *Am J Clin Pathol*, 101:215-219, 1994.
- 5) Lee KR, Ashfaq R, et al.: Coparison of connventional Papanicolaou smears and fluid-based, thin-layer system for cervical cancer screening. *Obstet Gynecol*, 90:278-284, 1997.
- 6) Hatch KD, Sheets E, et al.: Multicenter direct-to-vial evaluation of a liquid-based Pap test. *J Lower Gen Tract Dis*, 8:308-312, 2004.
- 7) Watanabe J, Nishimura Y, et al.: Liquid-Based Preparation for Endometrial Cytology - Usefulness for Predicting the Prognosis of Endometrial Carcinoma Preoperatively. *Cancer(Cancer Cytopathol)*, 117:254-263, 2009.
- 8) Kim GE, Kweon SS, et al.: Quantitative Assessment of DNA Methylation for the Detection of Cervical and Endometrial Adenocarcinomas in Liquid-Based Cytology Specimens. *Anal Quant Cytol Histol*, 34:195-203, 2012.
- 9) Spathis A, Kottaridi C, et al.: Cell Cycle Analysis of Colorectal brushings Collected in Liquid-Based Cytology. *Anal Quant Cytol Histol*, 33:29-35, 2011.
- 10) Malapelle U, de Rosa N, et al.: EGFR and KRAS mutations detection on lung cancer

- liquid-based cytology: a pilot study. *J Clin Pathol*, 65:87-91, 2012.
- 11) Vocaturo A, Novelli F, et al.: Chromogenic In Situ Hybridization to Detect HER-2/*new* Gene Amplification in Histological and ThinPrep®-Processed Breast Cancer Fine-Needle Aspirates: A Sensitive and Practical Method in the Trastuzumab Era. *The Oncologist*, 11:878-886, 2006.
 - 12) Sartelet H, Lagonotte E, et al.: Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J Clin Pathol*, 58:864-871, 2005.
 - 13) Saito N, Akiba N: Ultraviolet Fluorescence Imaging of Fingerprints. *The Scientific World Journal*, 6:691-699, 2006.
 - 14) Tahtouh M, Despland P, et al.: The Application of Infrared Chemical Imaging to the Detection and Enhancement of Latent Fingerprints: Method Optimization and Further Findings. *J Forensic Sci*, 52:1089-1096, 2007.
 - 15) Akiba N, Saito N, et al.: Fluorescence Spectra and Images of Latent Fingerprints Excited with a Tunable Laser in the Ultraviolet Region. *J Forensic Sci*, 52:1103-1106, 2007.
 - 16) Meier H: UV/Vis Spectroscopy. In: Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 2nd ed, pp.1-3, Thieme, New York, 2008.
 - 17) Lakowicz JR: Fluorophores. In: Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed, pp.63-95, Springer, Baltimore, 2009.
 - 18) Zeskind BJ, Jordan CD, et al.: Nucleic acid and protein mass mapping by live-cell deep-UV microscopy. *Nature Methods*, 4:567-569, 2007.
 - 19) Cheung MC, Evans JG, et al.: Deep UV Mapping of Intracellular Protein and Nucleic Acid in Femtograms per Pixel. *Cytometry Part A*, 79A:920-932, 2011.
 - 20) Nakamura T, Takagaki K, et al.: Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of

- cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 208:470-475, 1995.
- 21) Okabe K, Inada N, et al.: Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Commun*, 3:705, 2012.
 - 22) Carterson AJ, zu Bentrup KH, et al.: A549 Lung Epithelial Cells Grown as Three-Dimensional Aggregates: Alternative Tissue Culture Model for *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Infect Immuno*, 73:1129-1140, 2005.
 - 23) Karimi-Busheri F, Rasoul-Nia A, et al.: Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res*, 12:R31, 2010.
 - 24) McCool DJ, Forstner JF, et al.: Regulated and unregulated pathways for MUC2 mucin secretion in human colonic LS180 adenocarcinoma cells are distinct. *Biochem J*, 312:125-133, 1995.
 - 25) She JJ, Zhang PG, et al.: Side population cells isolated from KATO III human gastric cancer cell line have cancer stem cell-like characteristics. *World J Gastroenterol*, 18:4610-4617, 2012.
 - 26) Yanai H: Discriminant analysis. In: Yanai H. *Practical Multivariate Analysis Great Utilities on Excel*, pp.101-114, OMS publishing Inc., Tokyo, 2010.
 - 27) Fujii K, Yamaguchi M, et al.: Development of support systems for pathology using spectral transmittance. *Proc SPIE*, 4648:1516-1523, 2002.
 - 28) Hashimoto N, Bautista PA, et al.: Referenceless image quality evaluation for whole slide imaging. *J Pathol Inform*, 3:9, 2012.
 - 29) Hashimoto N, Murakami Y, et al.: Multispectral image enhancement for effective visualization. *Optics express*, 19:9315-9329, 2011.

- 30) Kaur A, Gupta U: Simultaneous Spectrophotometric Determination of Eosin and Erythrosine with Cr (VI) Reagent in Micellar Media Using Mean Centering of Ratio Spectra. *Chem Sci Trans*, 1:424-430, 2012.
- 31) Bettinger Ch, Zimmermann HW: New investigations on hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes. I Spectroscopic and physico-chemical properties of hematoxylin and hematein. *Histochemistry*, 95:279-288, 1991.
- 32) Gurley AM, Hidvegi DF, et al.: Comparison of the Papanicolaou and Feulgen Staining Methods for DNA Quantification by Image Analysis. *Cytometry*, 11:468-474, 1990.
- 33) Feng C, Shuzhen C, et al.: New Abnormal Cervical Cell Detection Method of Multi-Spectral Pap Smears. *WUJNS*, 12:476-480, 2007.
- 34) Nasef BE, Chen YD, et al.: Anionic Triphenylmethane dye solutions for Low-dose food Irradiation Dosimetry. *Radiat Phys Chem*, 46:4-6, 1995.
- 35) Hosmer DW, Jr., Lemeshow S, et al.: The Multiple Logistic Regression Model. In: *Applied Logistic Regression*, 3rd ed, pp.35-49, Wiley, New York, 2013.
- 36) A report of gynecologic oncology committee of Japan. *Acta Obstet Gynecol Jpn*, 60:1001-1085, 2008.
- 37) He S, Dunn K, et al.: Chromatin Organization and Nuclear Microenvironments in Cancer Cells. *J Cell Biochem*, 104:2004-2015, 2008.
- 38) Pezo R, Singer R: Nuclear Microenvironments in Cancer Diagnosis and Treatment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104:1953-1963, 2008.
- 39) Hisae Yanai: Practical Multivariate Analysis Great Utilities on Excel, pp.101-114, OMS publishing Inc, Tokyo, 2010.
- 40) Zink D, Fischer A, et al.: Nuclear Structure in Cancer Cells. *Nature Reviews Cancer*, 4: 677-687, 2004.

41) Alberts B, Johnson A, et al.: Basic Genetic Mechanisms. In: Molecular Biology of THE CELL, 5th ed, pp195-262, Garland Science, New York, 2008.

英文要旨

Usefulness of Ultraviolet- and Visible- Light Microscopic Spectroscopy
for objective differentiation between non-cancer and cancer cells

Haruhiko YOSHIOKA

Department of Pathologic Analysis, Division of Medical Life Sciences,
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences

In this study, my purpose is to clarify whether Ultraviolet- and Visible- Light Microscopic Spectroscopy method (UV-Vis MS) is a useful technique for discrimination of non-cancer cells and cancer cells. This manuscript is composed of three chapters.

In the first chapter, we examined the usefulness of UV-MS on unstained cells by liquid-based cytology (LBC). Cultured cells were used as the samples: 100 non-cancer cells and 200 cancer cells. On UV-MS, transmittance data at 260, 280, 300, 320, and 340 nm were extracted from the transmittance spectrum of 260-350 nm UV wavelengths and analyzed. As a result, The transmittance was lower in cancer than in non-cancer cells at all wavelengths ($p < 0.01$). Thus, it was revealed that substance in cancer cells that absorbs ultraviolet light is rich. The result of discriminant analysis showed that determine predictive value was 96.3% ($Z = 0.61 \times 300 \text{ nm transmittance} - 44.02$).

In the second chapter, we examined the usefulness of Vis-MS on Papanicolaou stained cells by liquid-based cytology (LBC). The cells of the same type in the first chapter were smeared on a glass slide. On Vis-MS, transmittance data at 530, 580, 630 nm from the transmittance spectrum of

400-650-nm Vis, and 530 nm/580 nm and 630 nm/560 nm transmittance ratio were extracted and analyzed. As a result, the transmittance at 580 nm was lower in cancer than in non-cancer cells ($p < 0.01$). 530 nm/580 nm transmittance ratio was high in cancer than in non-cancer cells ($p < 0.01$), and 630 nm/560 nm transmittance ratio was lower in cancer than in non-cancer cells ($p < 0.01$). Binominal logistic regression analysis showed that the variables do not have a multicollinearity. Using the forward chapter method, 580 nm transmission values and 630 nm / 580 nm transmittance ratio were selected. Binomial logistic regression equation was obtained and the determine predictive value was 96.3%.

$$p(x) = \frac{1}{1 + \exp(-41.19 + 0.73x_1 + 0.33x_2)} \quad x_1 = [580 \text{ nm}] \quad x_2 = [630/580 \text{ \%}]$$

The last chapter, I examined the usefulness of UV-Vis MS on tissue section. Samples were well- (G1) and poorly (G3) differentiated types of endometrial endometrioid adenocarcinoma. We analyzed the wavelength of 320 nm, 260 nm, 280 nm, and 300 nm on unstained samples by UV-MS. In the same area of the same section, we analyzed the wavelength of, 560 nm, 520 nm, and 540 nm on the HE stained samples by the Vis-MS. We investigated that cononical correlation analysis was useful for determination of the G1 and G3. As a result, it was suggested that the nuclear color changes in G3 was caused by ultraviolet absorbing material unspecified.

In conculsion, it was clarified that UV-Vis MS is an objective and effective tool for discrimination of cancer cells. We will apply and develop it as an objective index for the diagnosis and prognosis of patients with various cancers.