

簡単便利で高精細！ 進化を遂げたバイオメディカル透過電顕解析

Recent Progress of Bio-medical Transmission Electron Microscopy



宮崎大学医学部 解剖学講座
超微形態科学分野 教授
同フロンティア科学実験総合センター
バイオイメーシングラボ 主任

澤口 朗 (医学博士)

1. はじめに

ヒトはたいへん欲張りな生き物で、肉眼では捉えきれない小さなものは拡大して見たくなり、何かに覆われて中身が見えないものは、叩き割ってでも見たくなる。故に、ミクロのレベルで細胞膜に包まれた微細構造を明らかにするため、バイオメディカル研究領域で応用される装置が「透過電子顕微鏡」である。本稿では日立ハイテクノロジーズ製の透過電子顕微鏡 HT7700 をもとに、最新のバイオメディカル研究をターゲットに進化を遂げた透過電顕解析を紹介しながらイメージを刷新し、話題の iPS 細胞研究も含めた透過電顕解析のシーズを探り、ニーズに応える次代への提言を記したい。

2. 高い空間分解能を誇る透過電顕解析の威力

蛍光標識も華やかな光学顕微鏡と比較して、電子顕微鏡が誇るべき最大の特長である「高い空間分解能」は、モノトーン画像という制約をものともせず、揺るぎない科学的根拠を提供し続けている。ここに簡単な実例を紹介するが、ラット心筋の光顕画像(図 1A)では心筋線維に特徴的な横紋や介在板の線条(図 1 矢印)が何とか見てとれるのに対し、透過電顕像では横紋を構成するアクチンとミオシンの線維構造(図 1B)や介在板の入り組んだ形態(図 1C)など、より詳細に追究することができる。

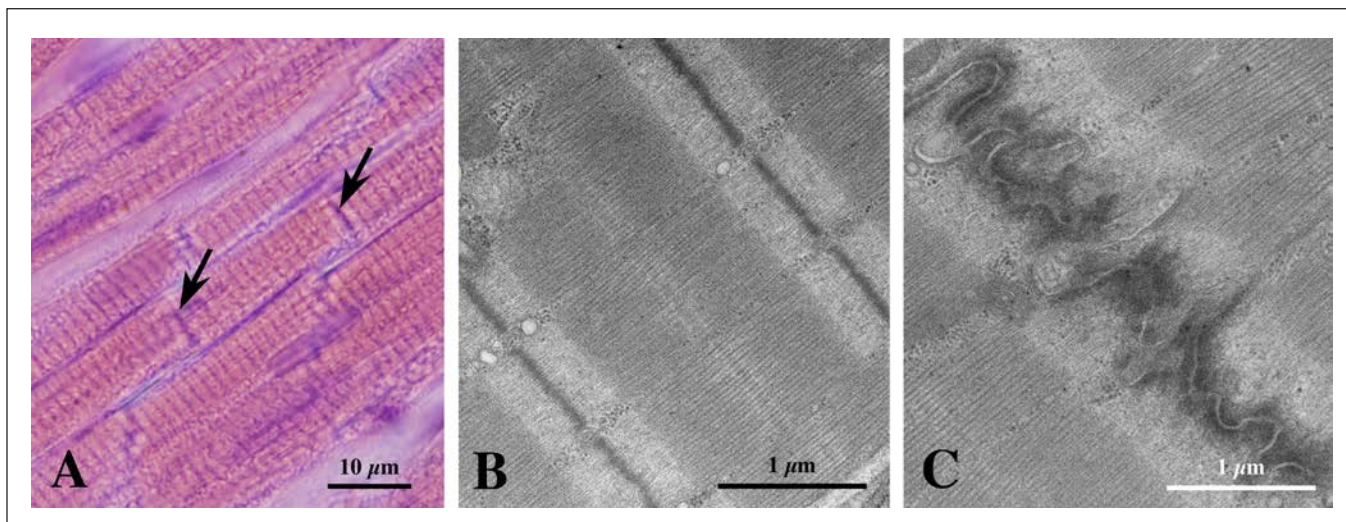


図1 電子顕微鏡が誇る高解像度を示す比較写真。ラット心筋。

(A) 光顕観察像(H&E染色)。

×100油浸対物レンズを使用して撮影。心筋の特徴である横紋パターンと介在板の線条(矢印)が観察される。

(B, C) 透過電顕像(ウラン+鉛染色)。

アクチンとミオシンが綺麗に配列した心筋線維(B)や、ギャップ結合が局在して心拍に重要な機能を果たす介在板(C)の微細構造が明瞭に観察される。

3. 進化を遂げた透過電顕観察と撮影

3-1 仲間と一緒に明るい部屋で簡単操作

かつての透過電顕は電子ビームで捉えた細胞形態を蛍光板に映すため、部屋を暗くして観察する必要があった。通常、透過電顕が置かれる部屋は陽が当たらない奥まった所が選ばれ、鏡筒に開いた観察窓の先にある蛍光板を大勢で覗き見ることは許されず、ひとり暗い部屋に閉じこもって観察するものだった……。これはもう過去の話。最新の透過電顕は蛍光板をスクリーンカメラで捉え、モニタ画面に映し出す結果、暗い部屋で蛍光板を覗き見る必要がなくなり、明るい部屋で仲間と一緒に観察することが可能になった(図2)。透過電顕は廊下に面したガラス張りの部屋に設置され、人々が電顕観察の様子を伺いながら行き交う時代を迎えたのである。

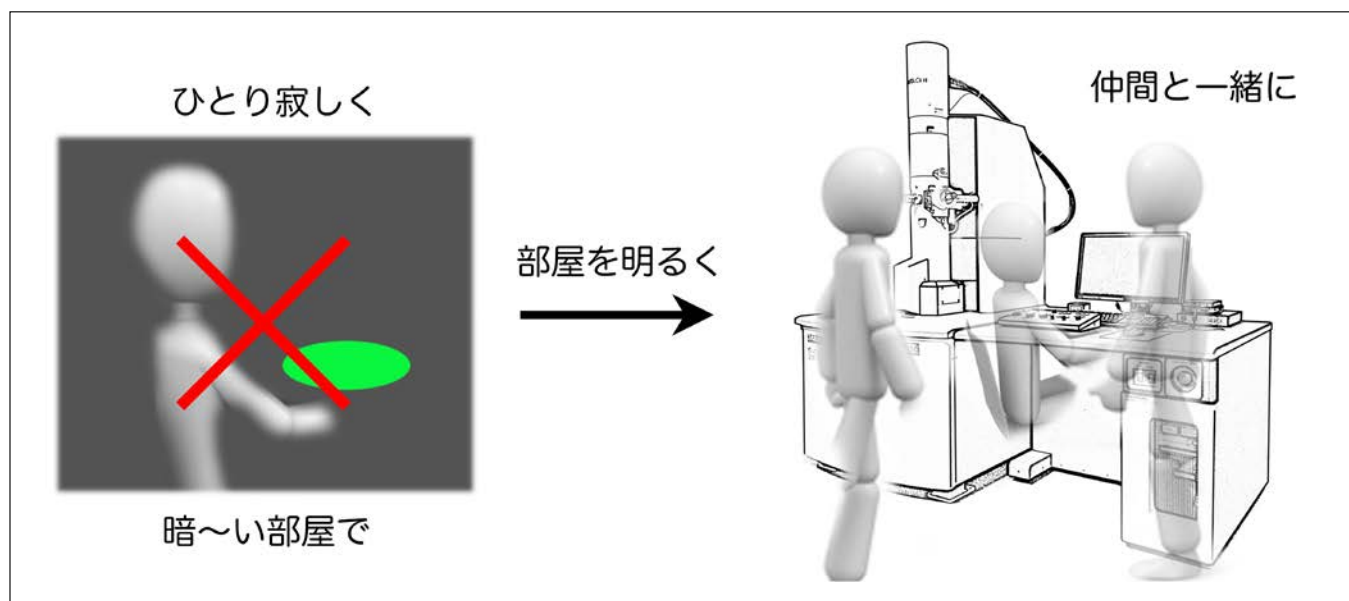


図2 電顕観察は従来の「暗室でひとり」から『明るい部屋で仲間と一緒に』へ

3-2 オートフォーカスのデジカメ感覚で撮影可能に

初心者に限らず、フォーカス合わせには苦勞を強いられ、撮った写真を現像してみたら膜構造が不明瞭で撮り直しとなることも少なくなかった。これが昔話になるほど、最新の透過電顕は僅か数秒で自動的にフォーカスを合わせるオートフォーカス機能を標準搭載し、まさにデジカメ感覚で電顕画像を撮影できるようになった。さらに、撮影された画像の良否を直ちに確認できるようになり、観察効率は格段に向上した。

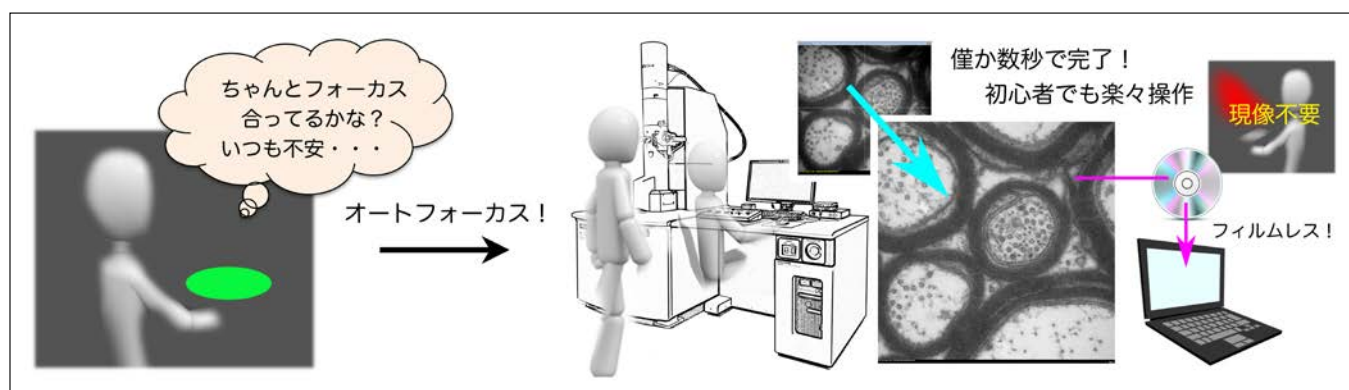


図3 電顕写真撮影はオートフォーカス、フィルムレス。ファイルをCDに記録してPCへ。

3-3 デジタル画像で現像不要、画像データ管理もスマートに

デジタル画像のフィルムレス化によって、暗室のセーフティーライトの下で目を凝らして現像する必要はなくなった。さらに、画像記録装置には便利なキャプション機能が備わっており、実験データやコメントなど自由に記録することができる。データベース管理機能を活用すれば、撮影された大量の画像を仕分けし、検索をかけて呼び出す作業も容易である。

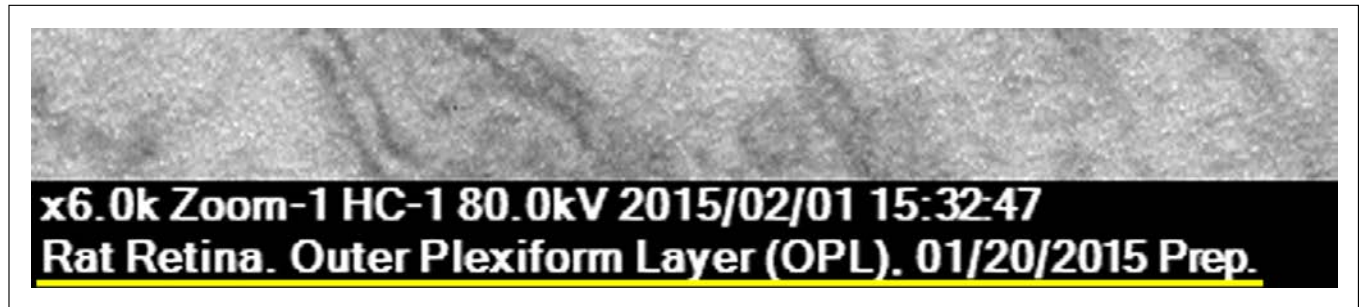


図4 撮影した電顕画像の記録や整理に便利なキャプション機能。撮影画像ファイル下欄(黄色下線部)に、自由なコメントを記入できる。

3-4 高性能CCDカメラで面倒なウラン染色も省略可能に

HT7700 に搭載された複合対物レンズの高コントラスト(HC: High Contrast)モードと、標準装備された高性能CCDカメラの高精細な画像撮影によって、常法とされたウラン染色を省き、鉛染色だけで十分なコントラストが得られるようになった(図5)。ウランは厳しい規制の下で入手困難となり、使用後の排液も厳重な保管を要することから、この改良は透過電顕解析の応用を促す大きなステップと評価される。

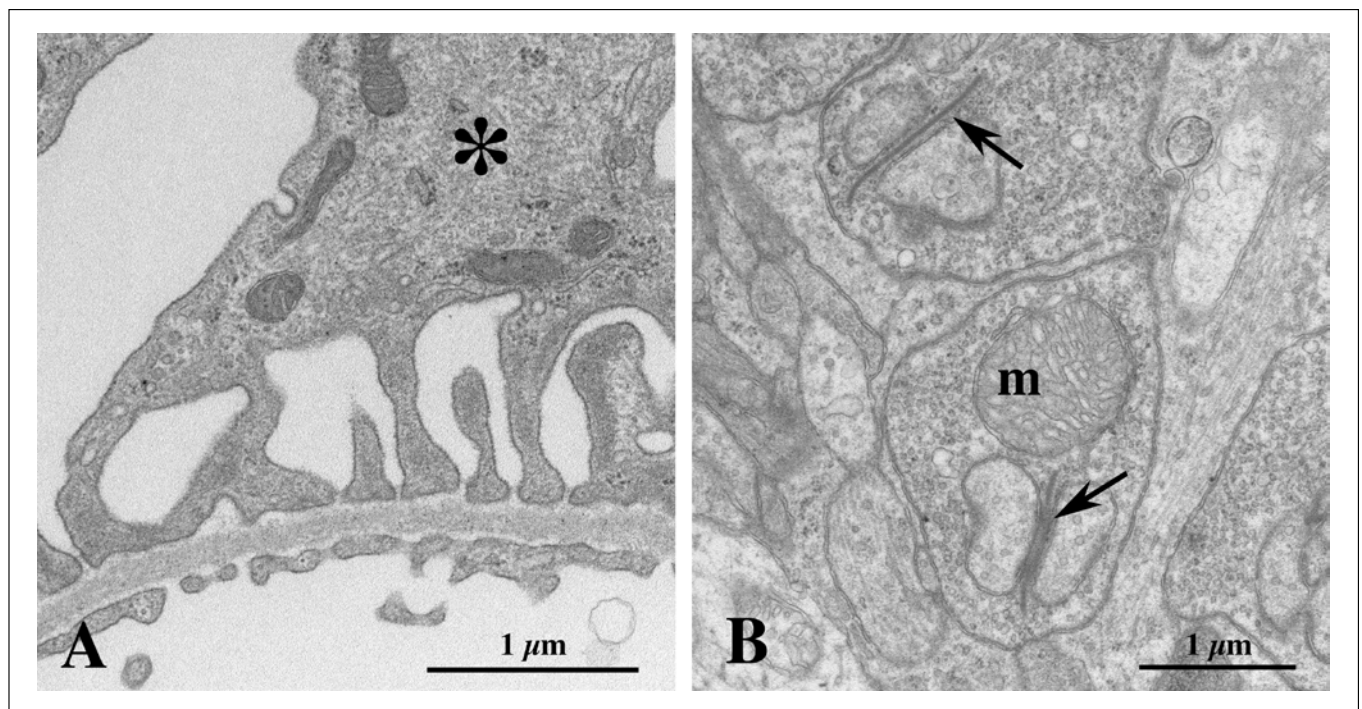


図5 高性能CCDカメラが装備され、ウラン染色を省いたレイノルド鉛染色のみで十分な観察像が得られる。

(A) ラット腎臓糸球体の足細胞(*)。

(B) ラット網膜外網状層。ミトコンドリア(m)やシナプスリボン(矢印)も明瞭に観察される。

3-5 ステージメモリー機能&グリッド3個ホルダーで観察効率が大幅にアップ

限られた視野で観察を進める透過電顕解析では、木を見て歩くうちに森の中へ迷い込んでしまうかの如く、切片のどこを観察しているのか分からなくなってしまう、一度は目にした絶好の観察部位も見失ってしまうことが少なくない。しかし、これも過去の話。HT7700をはじめとする最新の透過電顕には、記録を残しながら試料ステージを移動する「ステージメモリー機能」が装備され、観察部位を見失うことはなくなった(図6)。さらに、試料ステージが移動した軌跡を表示する「マイクロトレース機能」を利用すれば、観察が済んだ部分と未観察の部分を一目で確認することができる。



図6 ステージメモリー機能でベストショットを逃さず撮影。

透過電顕解析では、電子ビームを得るために真空状態が保たれた鏡筒内へ試料を出し入れする必要があるが、オプションとして用意されたグリッド3個ホルダーを利用すれば、切片を載せたグリッドを3個まとめて挿入でき、ステージメモリー機能と併せて観察効率が大幅にアップしている。

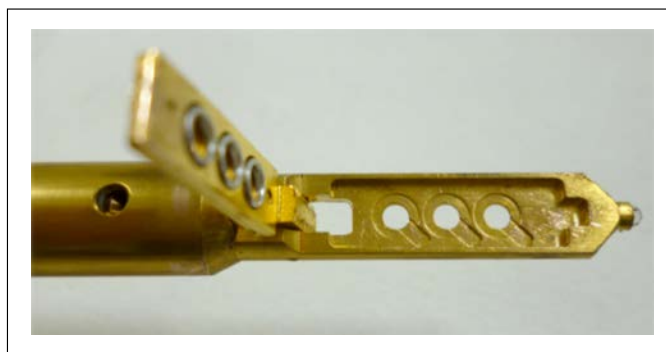


図7 便利なワンタッチ3個ホルダーを使用すると、一度に3枚のグリッドを挿入できるため、グリッドを入れ替える煩わしさが軽減され、観察効率が大幅にアップする。

3-6 電顕画像配信&テレビ会議システムで共同研究を強力にサポート

最新の情報技術を活かした電顕画像配信システムでは、スクリーンカメラや高性能 CCD カメラで捉えた電顕画像をインターネットで特定の配信先へ送り、これにテレビ会議システムを併用することで、遠隔地の共同研究チームと電顕画像をリアルタイムに共有しながら意見を交換することが可能になった。この電顕画像配信システムでは情報セキュリティも厳重に管理され、透過電顕解析は「ひとり寂しく暗い部屋で観察する」時代を終え、『仲間と一緒に明るい部屋で、遠くの仲間も交えて観察する』時代を迎えている。

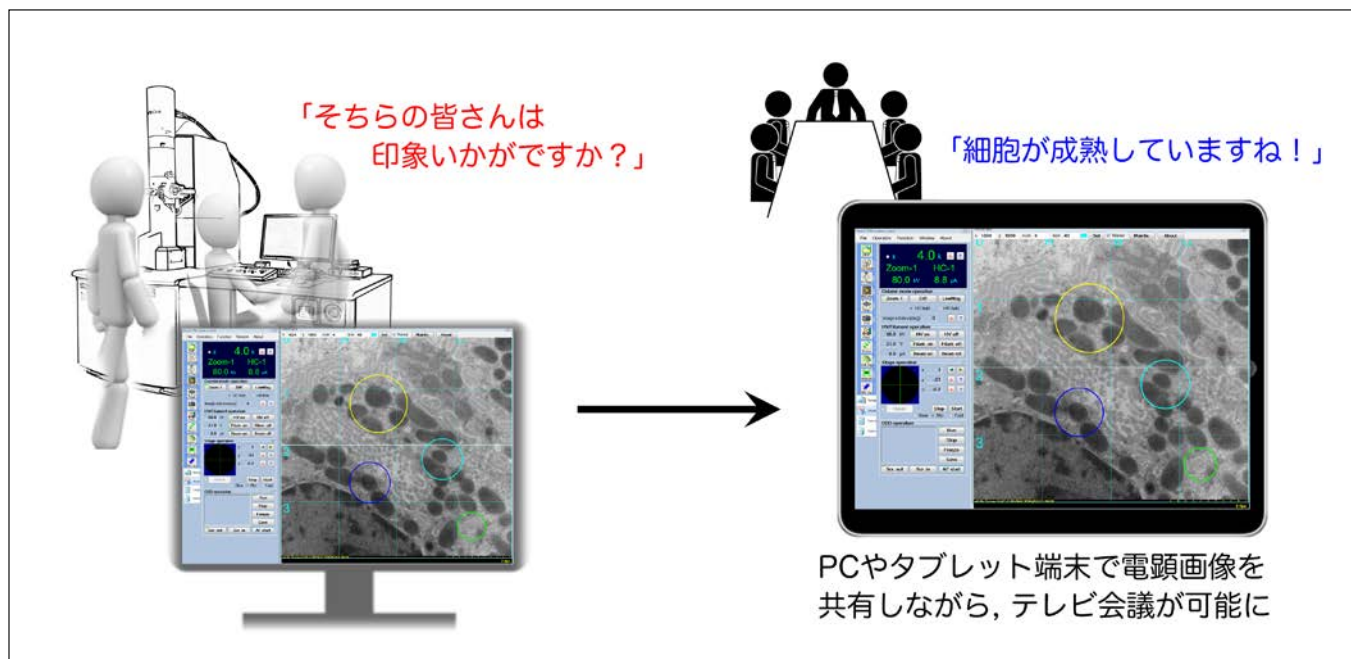


図8 テレビ会議システムの併用で、遠隔地の共同研究チームと画像を共有しながら協議できる時代に。

4. 簡便迅速かつ確実！飛躍的に向上した透過電顕試料作製

透過電顕解析では「試料作製が複雑で、日数も要する」といったマイナスイメージが先行し、敬遠されるケースも少なくないが、様々な工夫が編み出された今日では、簡便迅速かつ確実な試料作製法が確立されている^{1,2,3)}。朝一番に採取した試料を、夕方には透過電顕で観察できるため（図9）、以前は非現実的と一蹴された「ルーチンに透過電顕でスクリーニングをかけ、選抜されたサンプルを分子生物学的解析に回す」ワークフローも現実動き始めている。

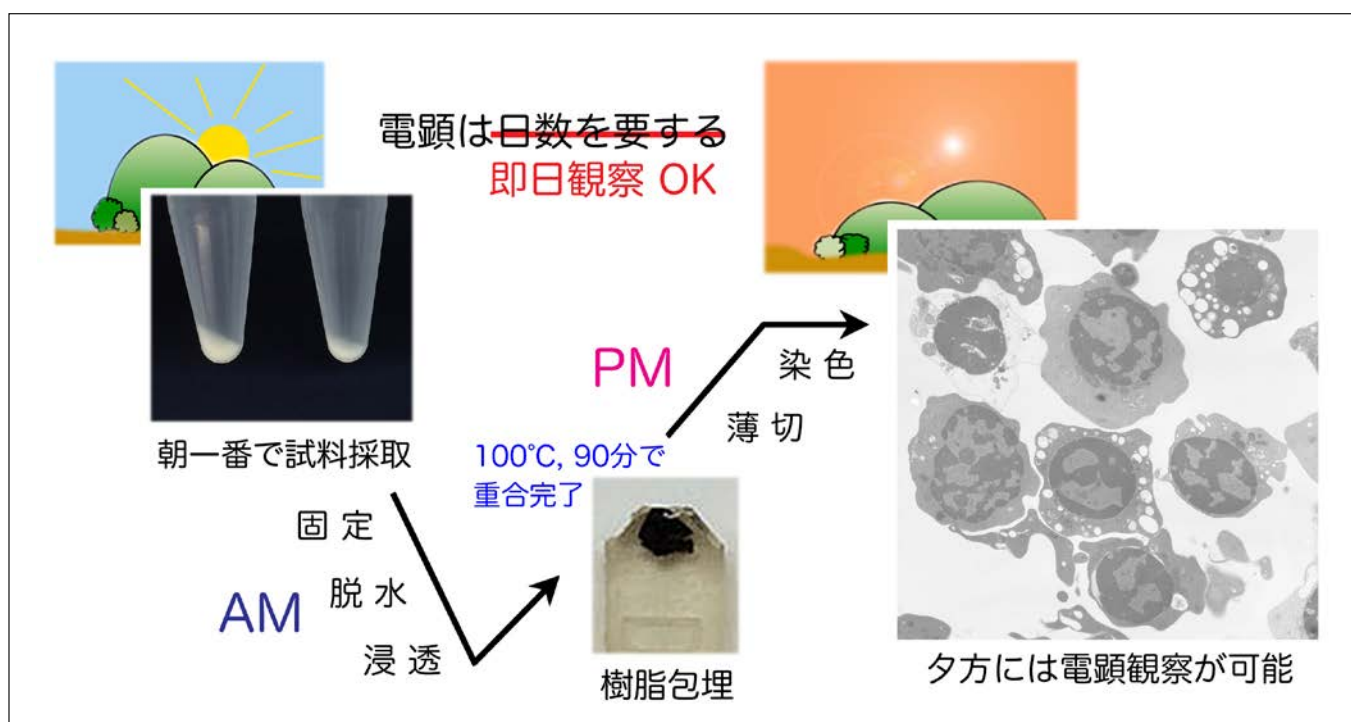


図9 朝一番で採取した試料を夕方には透過電顕で観察が可能

また、超薄切片にお目当ての細胞が見当たらず、数撃って当たるまで超薄切と観察を繰り返した経験をお持ちではないだろうか？これも過去の話。最近は顕微鏡で最適な準超薄切片を選び出し、樹脂に再包埋して超薄切片を切り出した後、透過電顕で観察する方法が確立され^{2,3)}、顕微鏡で狙いをつけた細胞を狙い通りに透過電顕で捉えることも容易である(図10)。

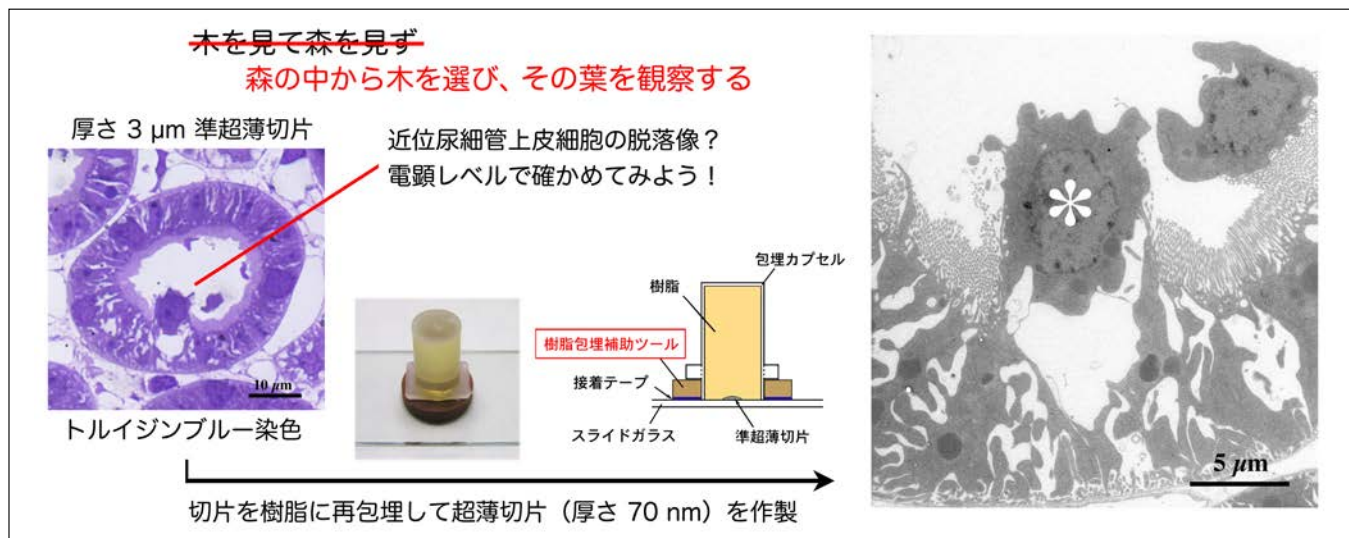


図10 顕微鏡で狙いをつけた細胞をピンポイントの狙い通り透過電顕解析へ

5. バイオメディカル透過電顕解析の次代に向けた提言 ～結語に代えて～

光学顕微鏡の解像限界を遙かに凌ぐ透過電顕解析がバイオメディカル研究に果たした貢献は計り得ない。ところが分子生物学的研究手法が90年代に隆盛を極めると、電子顕微鏡を主体とする研究は「時代遅れで古典的。稲が刈り取られた田んぼで落ち穂拾いするようなもの」とまで揶揄された。忘れもしない・・・ブラックジャックに憧れを抱いた小生が、メスを電子顕微鏡に代えて解剖学研究の道を選んだ際に、分子生物学者を自称する先輩から贈られた言葉である。

あれから四半世紀。ポストゲノムシーケンス時代を迎え、新たな潮流が生じてきた。マウスに代表される各種遺伝子のノックアウト動物やトランスジェニック動物が世に現れ、細胞や組織の微細構造に如何なる変化が生じているか、比較検討が必要になってきた。さらにはiPS細胞の開発により、あらゆる細胞へ分化する能力をもつiPS細胞から作製された細胞や組織の微細構造を検証する巨大なニーズが創出された。

具体的な検証例を挙げると、文部科学省から公表された「iPS細胞研究ロードマップ」に示されたiPS細胞由来血小板産生の基礎研究が進み、臨床応用に向けた量産化の段階を迎えている。この基礎技術確立を報告した論文⁴⁾で、透過電顕解析が大きな貢献を果たしているが、透過電顕解析を要する理由は図11をご覧ください。一方、透過電顕解析では血小板内部の開放小管系や分泌顆粒が明瞭に映し出される(図11B, C)。血小板の直径は僅か1～2 μmしかなく、内部構造の詳細な観察には透過電顕解析が不可欠である。

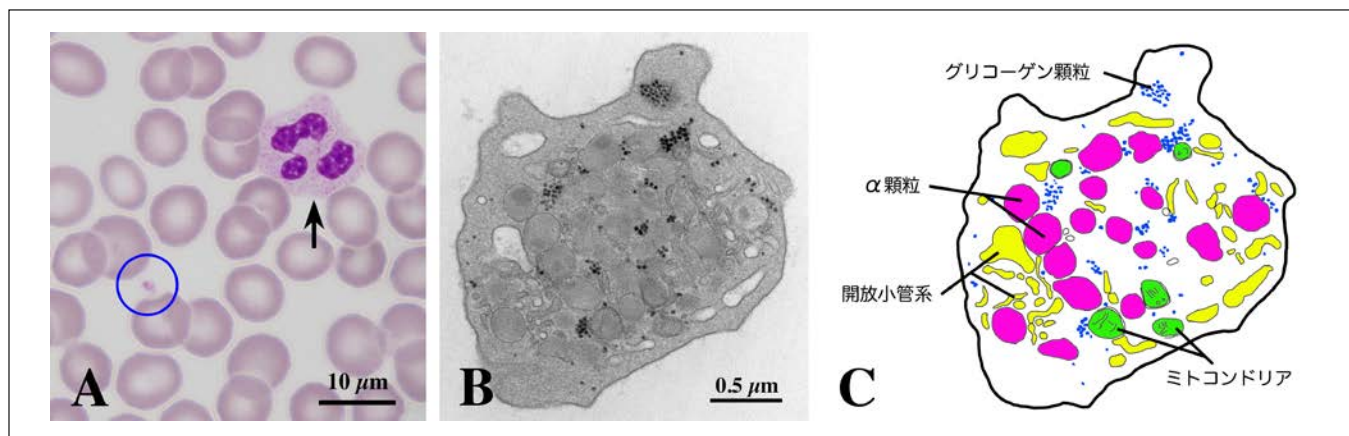


図11 ヒト血小板。
(A)末梢血塗抹標本の光顕像(ギムザ染色)。血小板(青丸で囲まれた小片)と好中球(矢印)。周囲の円形細胞は赤血球。
(B)透過電顕像(鉛染色のみで観察)。
(C)内部構造の模式図。

現在、オールジャパンで研究体制を整備しながら、iPS細胞を応用した様々な細胞や組織、臓器の作製をもとに、再生医療や創薬の臨床応用に向けた検討が進められている。「稲が刈り取られた田んぼで落ち穂拾い」は改められ、『新たに干拓された水田で、新種の稲（iPS細胞）がたわわに実った穂（iPS細胞から分化誘導された細胞）を垂らし、刈り取り（電顕解析）を迎えるときがやってくる』のである。この場面では、細胞表面を観察する走査電顕より、細胞内部を捉える透過電顕が果たす役割が大きい。その透過電顕解析は、試料作製から観察、撮影に至るまで、簡単便利で高精細な解析手段として進化を遂げている。電子顕微鏡が最新のバイオメディカル研究をアップグレードし、また新たな研究領域が開拓されることを期待して本稿を結びたい。

参考文献

- 1) K. L. McDonald: Rapid embedding methods into epoxy and LR White resins for morphological and immunological analysis of cryofixed biological specimens, *Microsc. Microanal.*, 20 (1), 152-63 (2014)
- 2) A. Sawaguchi, F. Aoyama, S. Ide, T. Suganuma: Capsule-supporting ring: a new device for resin embedding of glass-mounted specimens, *Microsc.*, 234 (2), 113-117 (2009)
- 3) 高橋伸育, 豊嶋典世, 澤口 朗 : 「樹脂包埋補助ツールを用いたピンポイント電顕試料作製法」顕微鏡, 48 (2), 113-117 (2013)
- 4) S. Nakamura, N. Takayama, S. Hirata, H. Seo, H. Endo, K. Ochi, K.I. Fujita, T. Koike, K.I. Harimoto, T. Dohda, A. Watanabe, K. Okita, N. Takahashi, A. Sawaguchi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, S. Nishimura, K. Eto: Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 14 (4), 535-548 (2014)