

卓上低真空走査電顕は新たな医学研究・臨床診断のステージへ ～光顕パラフィン切片を電顕標本に進化させる電子染色法の開発～

Uranium-free Metal Staining Allows Application of Compact Low-vacuum SEM to Medical Research and Clinical Diagnosis



宮崎大学医学部解剖学講座
超微形態科学分野
教授
宮崎大学フロンティア科学実験総合センター
バイオイメージングラボ
主任
澤口 朗 博士(医学)

1. はじめに

生命を営む心臓や腎臓、肝臓をはじめとする各臓器は、それぞれに特有の生理機能を果たす細胞や結合組織が織りなす精緻な立体構造を有しており、これが破綻すると生理機能が損なわれ、正常な生態は異常な病態に転じて様々な症状をもたらす。その因果を形態変化に求める病理組織診断は光学顕微鏡が主体をなすが、微細な形態変化の追究には電子顕微鏡が必要とされながら、煩雑で長時間をする試料作製法と、規制が厳しいウラン化合物を要する電子染色法によって阻まれていた。また、再生臓器の開発研究では立体構造の再現が喫緊の課題とされており、培養細胞の微細構造や器官内部の立体構造を高精細に捉える簡便で迅速な電顕試料作製と、再生臓器の品質評価スクリーニングにも利用できる顕微技術が待望されていた。

これらの問題を解決すべく、長年の課題であったウラン化合物を必要としない新たな電子染色法の開発に取り組んだ結果、器官を構築する細胞や組織の微細形態を簡便かつ迅速に、電子顕微鏡レベルで高精細に捉えるプロトコールの確立に成功した。本稿では、病理組織診断や再生臓器の形態品質評価など幅広い医学研究・臨床応用も視野に、卓上低真空走査型電子顕微鏡が向かう新たなステージをご紹介したい。

2. 便利なスライドガラス専用ホルダーと帶電を軽減する低真空モード

卓上走査型電子顕微鏡 TM4000PlusII は、その名の通り事務用デスクに設置できるコンパクトサイズで、パラフィン切片を載せた光顕用スライドガラス専用のホルダーを装着することができる(図1)。この専用ホルダーはスライドガラスの着脱が容易であり、厚さ5～30 μm のパラフィン切片であれば面倒な高さ合わせも不要である。また、撮影した画像ファイルには撮影された位置情報が付随して保存されるが、専用ホルダーを使用すると毎回、定位置に据えて観察できるため、一度、ホルダーから外したスライドガラスでも、後日、保存された位置情報を呼び起して、撮影された定点に自動で位置合わせができる。



図1 (左)卓上走査型電子顕微鏡：TM4000Plus IIの外観。(右)スライドガラスの着脱が容易で、高さ合わせを必要としない便利なスライドガラス専用ホルダー。

低真空走査型電子顕微鏡は30～50 Paの低い真空度で稼働でき、入射電子によって非導電性のパラフィン切片やスライドガラスに蓄積するマイナス電荷が、低い真空度で残留するガスから生じるプラス電荷のイオンによって中和されるため、観察を阻害する帯電が軽減される特性を有する(図2)。

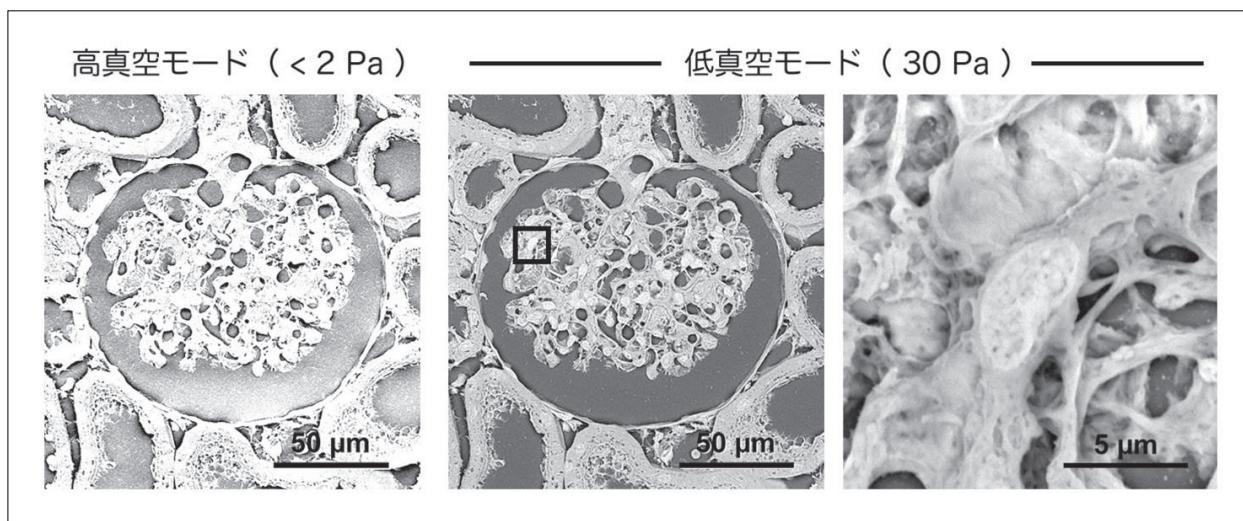


図2 高真空モードと低真空モードの比較画像。ラット腎小体。(左)高真空モード(<2 Pa)。帯電が著しく、解析不可。(中央・右)低真空モード(30 Pa)。帯電が大幅に軽減され、中央写真的四角で囲まれた部分を高倍率(右)で解析が可能。

3. 光顕パラフィン切片を電顕標本に進化させる電子染色法の開発

従来の電子染色法は1958年にワトソンが開発した酢酸ウラニウム—鉛染色法^{1,2)}であるが、ウラン化合物は規制が厳しく、購入から保管、使用から廃液まで、その取り扱いは困難を極めるため、ウラン化合物を必要としない新たな電子染色法が待望されて久しい。開発に成功した「過マンガン酸カリウム—鉛染色法」³⁾は、光顕用パラフィン切片を0.2%過マンガン酸カリウム水溶液で5分間処理し、水洗した後、レイノルド鉛染色液で3分間処理、水洗・乾燥後に観察可能な簡便かつ迅速なプロトコールである(図3)。従来法との違いは2%酢酸ウラニウムを0.2%過マンガン酸カリウムに換えたのみで、所要時間は変わらず約10分間で電子染色が完了する。

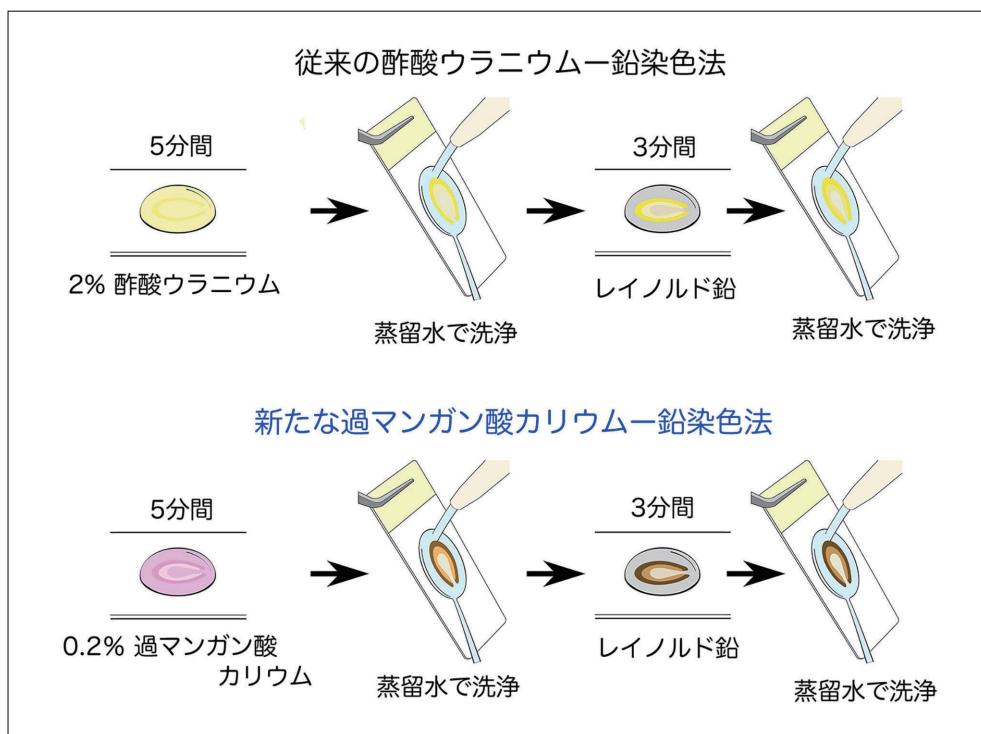


図3 従来の酢酸ウラニウム-鉛染色法(上段)と新たに開発した過マンガン酸カリウム-鉛染色法(下段)。

新たな「過マンガン酸カリウム-鉛染色法」は、従来の酢酸ウラニウム-鉛染色法と同等にコントラストの高い染色結果をもたらし、光顕用に作製された試料を電顕試料に進化させる過マンガン酸カリウム-鉛染色法の魅力と低真空走査型電子顕微鏡の威力は誰の目にも明らかであろう。元素分析で検証した結果、過マンガン酸カリウム特有の酸化作用によって鉛の沈着が向上し、細胞や組織の微細構造を可視化するに十分な反射電子が得られることが確認された³⁾。

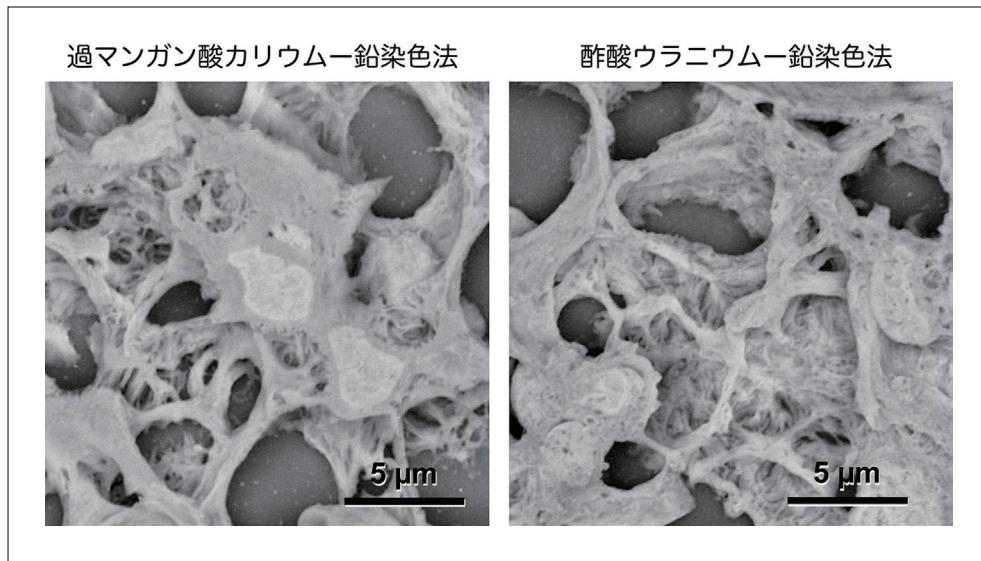


図4 ラット腎糸球体。新たな過マンガン酸カリウム-鉛染色法(左)と従来の酢酸ウラニウム-鉛染色法(右)の比較画像。光顕用に作製された試料を電顕試料に進化させる過マンガン酸カリウム-鉛染色法の魅力と低真空走査型電子顕微鏡の威力に注目。固定液=2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド混合液。切片厚=5 μm。

パラフィン切片の観察は反射電子モードを基本とするが、加速電圧の高低によって得られる画像情報が異なるため、観察目的に応じた加速電圧の使い分けが必要となる。加速電圧を5～20 kVの4段階に分けて撮影した図5に示される通り、加速電圧が低いとコントラストは低下するが細胞表面の形態が明瞭に、加速電圧が高いとコントラストは上昇するが細胞表面の形態が不明瞭になることに注意されたい。これまでの経験に基づき、全体像を明瞭に映し出すことを目的とする500倍未満の低倍率は15～20 kV、細胞表面の微細な形態を映し出すことを目的とする500倍以上の高倍率は5～10 kVに使い分けた観察を推奨したい。

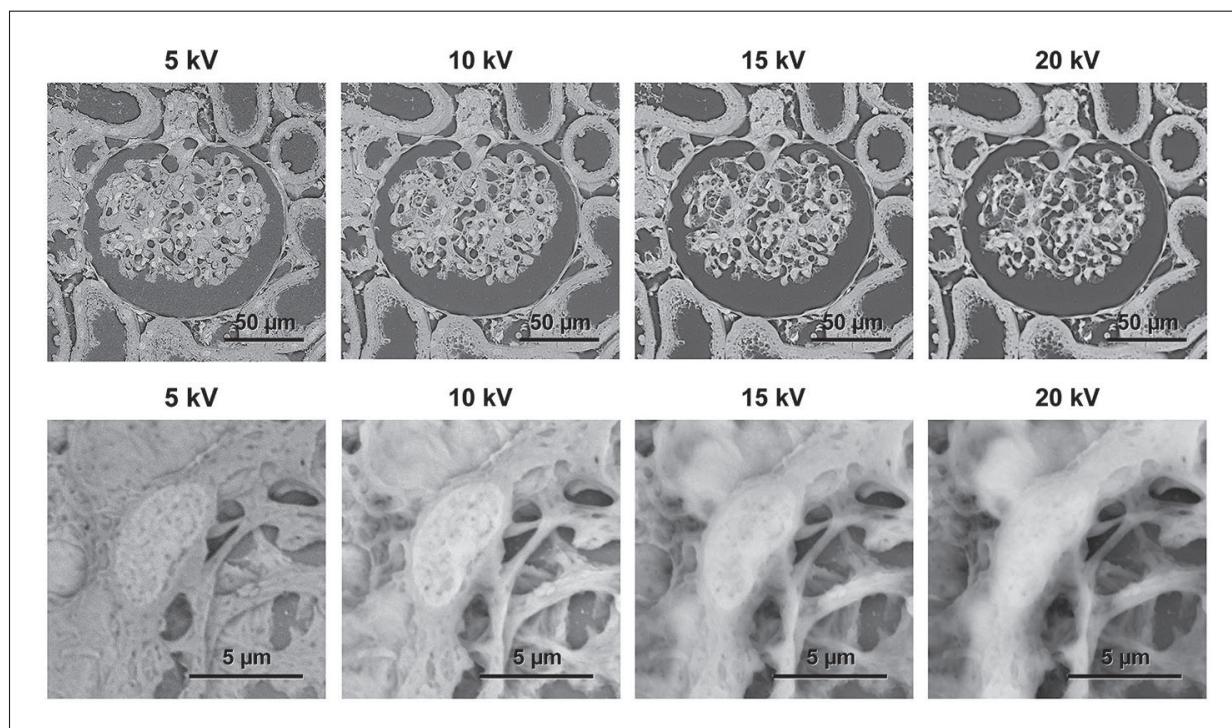


図5 加速電圧によって異なる画像情報を比較。加速電圧が低いとコントラストは低下するが細胞表面の形態が明瞭に、加速電圧が高いとコントラストは上昇するが細胞表面の形態が不明瞭になることに注意。500倍未満の低倍率は15~20 kV、細胞表面を映し出す500倍以上の高倍率は5~10 kVで観察することを推奨。

4. 厚切りパラフィン切片観察法で細胞・組織が織りなす立体構造を明らかに

通常、光顕用パラフィン切片の厚さは光で透見しやすく、細胞核などが重なり合わない5 μm前後に薄切される。一方、切片表面をスキャンして得られた反射電子を利用する低真空走査型電子顕微鏡の特性を活かして、厚さ15~30 μmに薄切する「厚切りパラフィン切片観察法」を先行研究で確立した²⁾。厚切り切片は奥行きが深まり、細胞が織りなす組織の立体構造が明瞭に映し出される利点があり、過マンガン酸カリウム-鉛染色法で観察したラット腎糸球体、腎尿細管、細気管支線毛上皮の例を図6に示す。いずれも光顕レベルでは捉え難い、微細な線毛などが卓上走査型電子顕微鏡によって立体的に捕捉されていることを確認されたい。

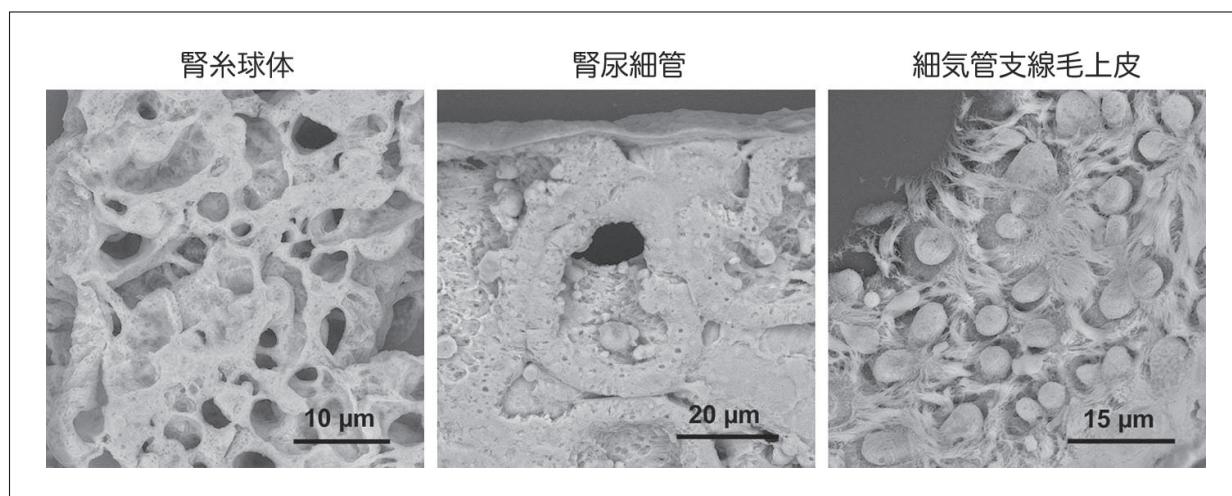


図6 厚切りパラフィン切片観察法。通常の5 μmより厚い20 μmに薄切することで奥行きが深まり、細胞が織りなす組織の立体構造が明瞭に映し出される。ラット臓器。固定液=2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド混合液。切片厚=20 μm。

5. 病理組織標本作製用のホルマリン単独固定でも美しい微細形態

これまでに提示した画像は電顕試料作製で標準的な1/2 Karnovsky固定液(=2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒドの混合溶液)で固定された標本から採取された切片であるが、通常の病理組織標本は10%ホルマリン溶液(=4%パラフォルムアルデヒド単独)で固定される。そこで、10%ホルマリン溶液で固定したラット細気管支の観察例を図7に示すが、線毛上皮や縦横の層状構造を呈するコラーゲン線維の微細な形態が明瞭に観察され、本法が病理組織標本の観察に適することがお分かりいただけるだろう。

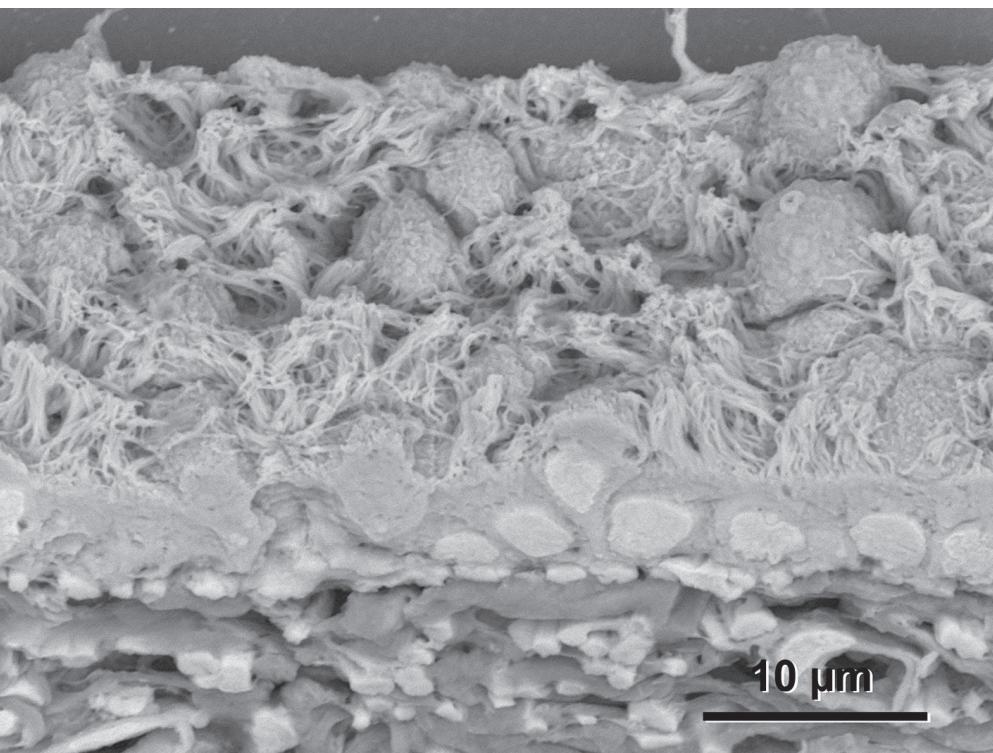


図7 通常の光顕用病理組織標本で用いられる10%ホルマリン溶液(4%パラフォルムアルデヒド単独)で固定したラット細気管支。線毛上皮(上部)や縦横の層状構造を呈するコラーゲン線維(下部)の微細な形態が明瞭に観察される。切片厚=20 μm。

6. 光顕／電顕相関観察法(CLEM)の応用で観察画像の科学的確度が向上

電顕画像の科学的確度を向上させる一つの手段に「光顕／電顕相関観察法」(CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy)がある。これは光顕で撮影した同一対象を電顕レベルで高精細に映し出す手法で、「木を見て、森を見ず」あらため『森を見て木を選び、その葉を観察する』手法で、本法に光顕／電顕相関観察法を応用したラット腎小体の観察例を図8に示す。常法のヘマトキシリン・エオジン染色で光顕観察した後、カバーガラスを除去して過マンガン酸カリウム—鉛染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡で観察した結果、光顕で撮影した同じ部位の足細胞の突起(矢印)を、光顕レベルでは確認できない微細構造まで可視化されている。

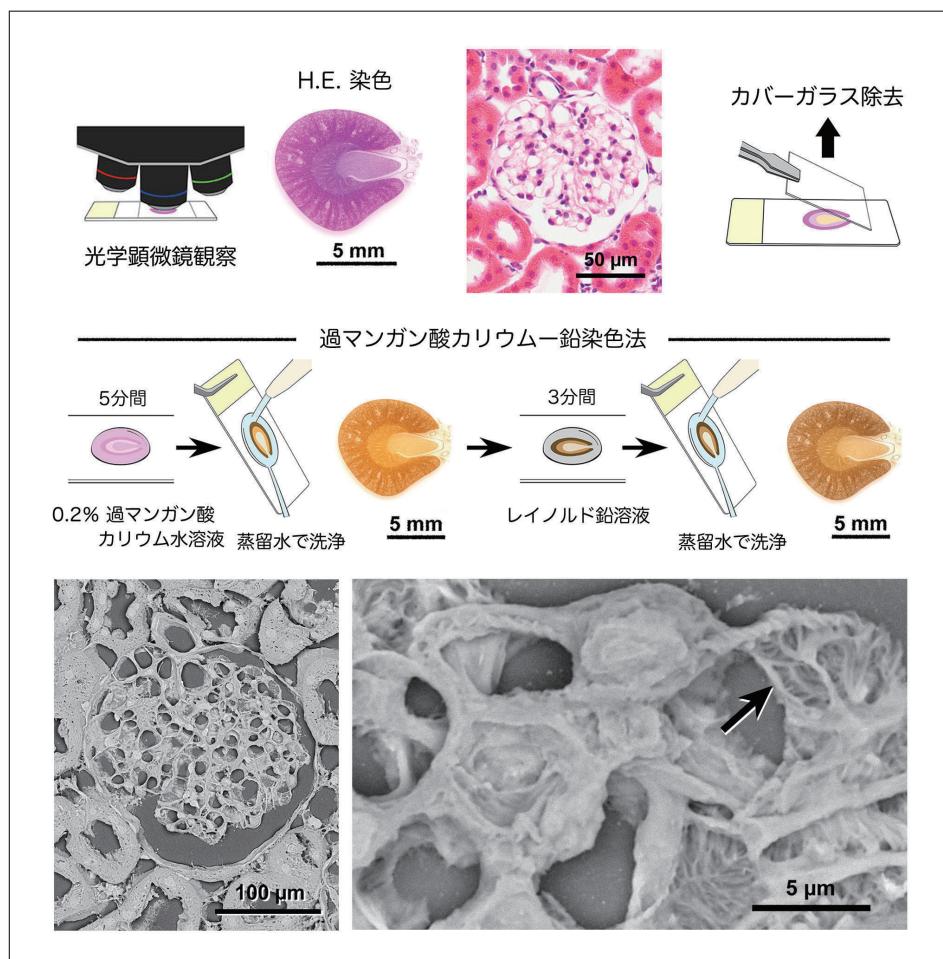


図8 光顕一電顕相関観察法(CLEM)によるラット腎小体の観察例。常法のヘマトキシリン・エオジン染色で光顕観察後、カバーガラスを除去して過マンガン酸カリウム一鉛染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡で観察。光顕で撮影した同じ部位を高精細に観察することができる、光顕レベルでは確認できない微細構造が可視化され、足細胞の突起(矢印)を判別することができる。

TM4000PlusIIの場合、本体に内蔵されたCCDカメラで映し出される切片のライブ映像を参照しながら、目的の観察部位を電顕レベルでライブ観察することができる、光顕一電顕相関観察の作業効率を格段に向上させる便利な機能が標準搭載されている(図9)。正しく「森を見て木を選び、その葉を観察する」が如く、『切片を見て組織を選び、その細胞を観察する』助けとなる。

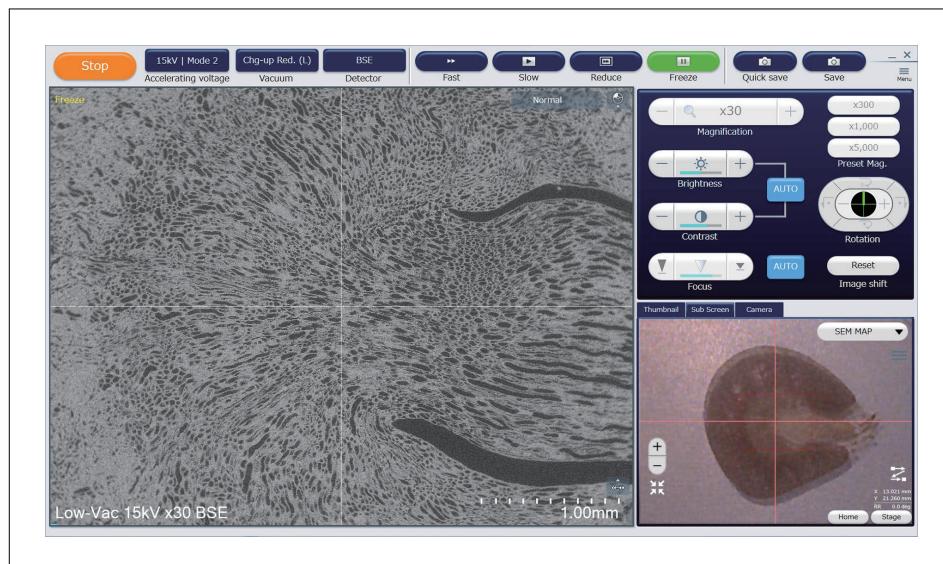


図9 TM4000PlusIIの操作画面。本体に内蔵されたCCDカメラで映し出される切片のライブ映像(画面右下)を参照しながら、目的の観察部位を電顕レベルでライブ観察(画面左側)することができる、光顕一電顕相関観察の作業効率を格段に向上させる便利な機能が標準搭載されている。

7. 再生医療研究に応用可能な培養細胞の微細構造解析

本法を応用することで、光学顕微鏡用のスライドガラス表面に接着性を有する細胞を培養し、培養された細胞の三次元微細形態を電顕レベルで高精細に可視化することも可能である。図10に示す膵臓癌由来細胞株：SUIT-2の観察例では、光顕レベルでは捉えることが不可能な細胞間の微細な接着・連絡形態を明瞭に確認することができる。

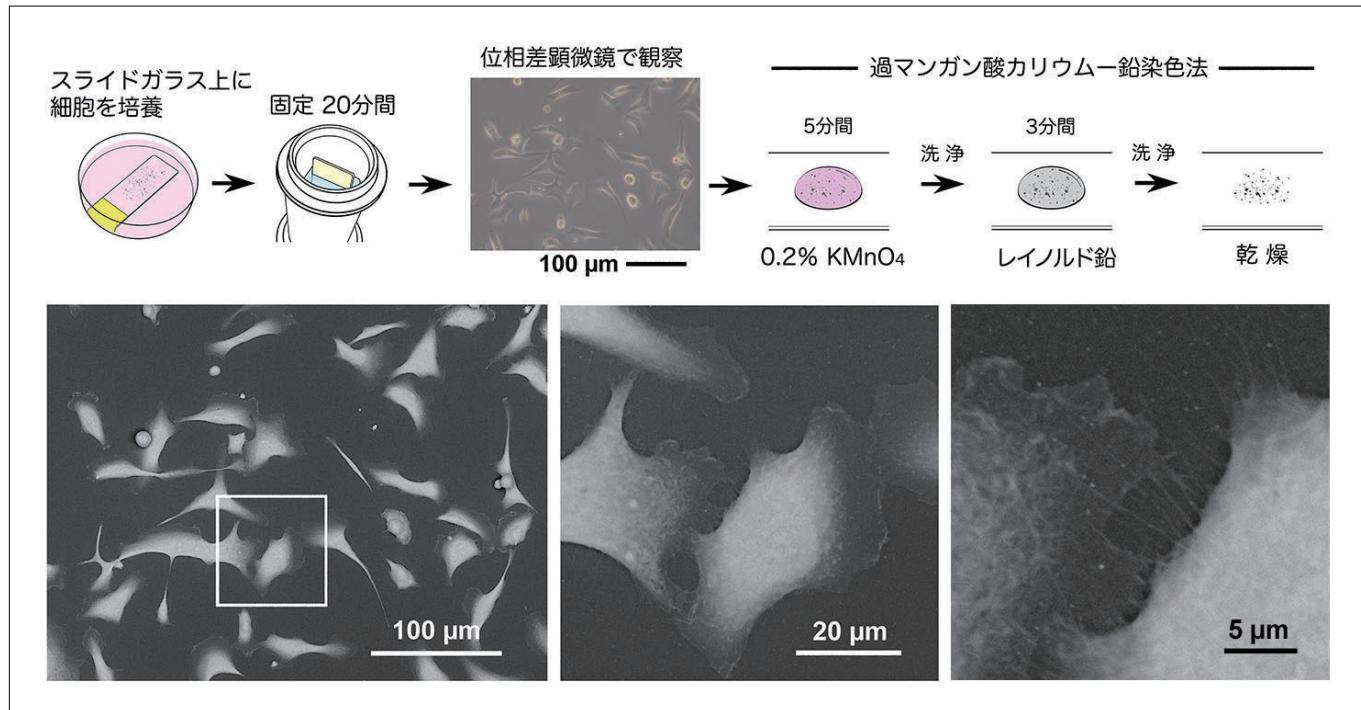


図10 培養細胞(膵臓癌由来細胞株：SUIT-2)の観察例。位相差顕微鏡で最適な観察領域を選定した後、過マンガン酸カリウム一鉛染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡で観察。光顕レベルでは捉えることが不可能な細胞間の微細な接着、連絡形態が可視化されている。

8. 卓上低真空走査電顕は新たな医学研究・臨床診断のステージへ

本稿では、冒頭に記した長年の課題、ウラン化合物を必要としない新たな電子染色法の開発に成功した概要を紹介した。生体の器官を構築する細胞や組織の微細形態を簡便かつ迅速に、電子顕微鏡レベルで高精細に捉えるプロトコールの確立で、病理組織診断や再生臓器の形態品質評価など幅広い医学研究・臨床応用も視野に、卓上低真空走査型電子顕微鏡は新たなステージへと向かっている。

参考文献

- 1) Watson, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 475-478 (1958).
- 2) Sawaguchi, A. *et al.* Informative three-dimensional survey of cell/tissue architectures in thick paraffin sections by simple low-vacuum scanning electron microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 7479, doi:10.1038/s41598-018-25840-8 (2018).
- 3) Sawaguchi, A., Kamimura, T., Kitagawa, K., Nagashima, Y., Takahashi, N. KMnO₄/Pb staining allows uranium free imaging of tissue architectures in low vacuum scanning electron microscopy. *npj Imaging* **2**, 40, doi: 10.1038/s44303-024-00045-z (2024).