

進化を遂げたバイオメディカル透過電顕解析

澤口 朗

Sawaguchi Akira

ポストゲノム時代を迎えた近年のバイオメディカル研究において、光学顕微鏡の解像限界を遙かに凌ぐ透過電顕解析に新たな潮流が生じてきた。遺伝子ノックアウト動物における細胞の微細構造変化に加え、あらゆる細胞へ分化する無限の可能性を秘めた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

のである。

この潮流に応えるべく、最新の透過電顕にはオートフォーカス機能やCCDカメラによるオールデジタル撮影、テレビ会議システムを応用した画像配信機能が搭載され、簡便便利で高精細な解析手段として飛躍的な進化を遂げており、次代を見据えた最新情報として紹介したい。

1. はじめに

人は大変欲張りな生き物で、肉眼では捉えきれない小さな物は拡大して見たくなり、何かに覆われて中身が見えない物は、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。本稿では株式会社日立ハイテクノロジーズ製の透過電子顕微鏡HT7700を基に、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 (induced Pluripotent Stem) 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のものともせず、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、ラット心筋の光顕像 [図1 (a) 参照] では心筋線維に特徴的な横紋や介在板の線条 (同図矢印部) が何とか見て取れるのに対し、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 [同図 (b) 参照] や介在板の入り組んだ形態 [同図 (c) 参照] など、より詳細に追究することができる。

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日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のぞき見ることは許されず、一人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である。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ため、暗い部屋で蛍光板をのぞ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

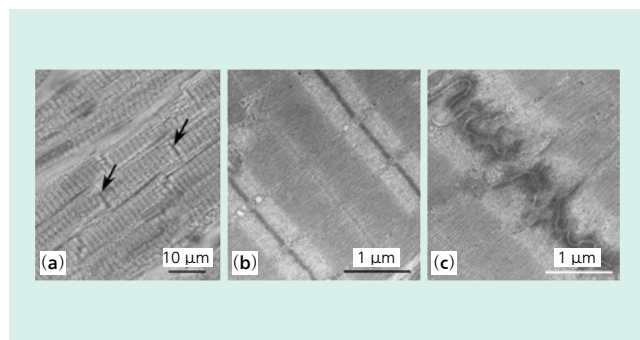


図1 | 電子顕微鏡が誇る高解像度を示す比較写真 (ラット心筋)

(a) に光顕観察像 [H&E (Hematoxylin - Eosin) 染色] を示す。×100油浸対物レンズを使用して撮影した。心筋の特徴である横紋パターンと介在板の線条 (矢印部) が観察される。(b), (c) に透過電顕像 (ウラン+鉛染色) を示す。アクチンとミオシンがきれい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。

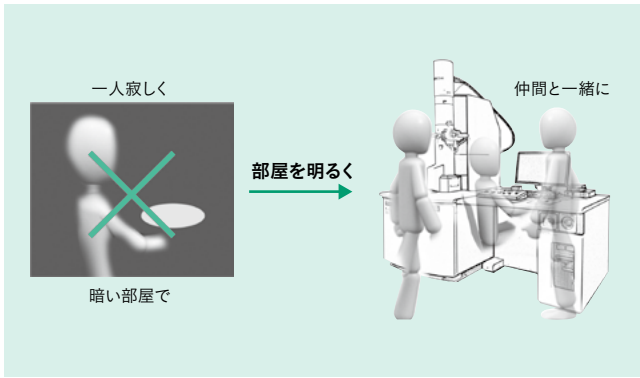


図2 | モニタ画面による電顕観察

電顕観察は従来の「暗室で一人」から「明るい部屋で仲間と一緒に」へと変化した。

なった(図2参照)。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うかがいながら行き交う時代を迎えたのである。

3.2 オートフォーカスのデジタルカメラ感覚で撮影可能に

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、まさにデジタルカメラ感覚で電顕画像を撮影できるようになった(図3参照)。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。

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を自由に記録することができる(図4参照)。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。

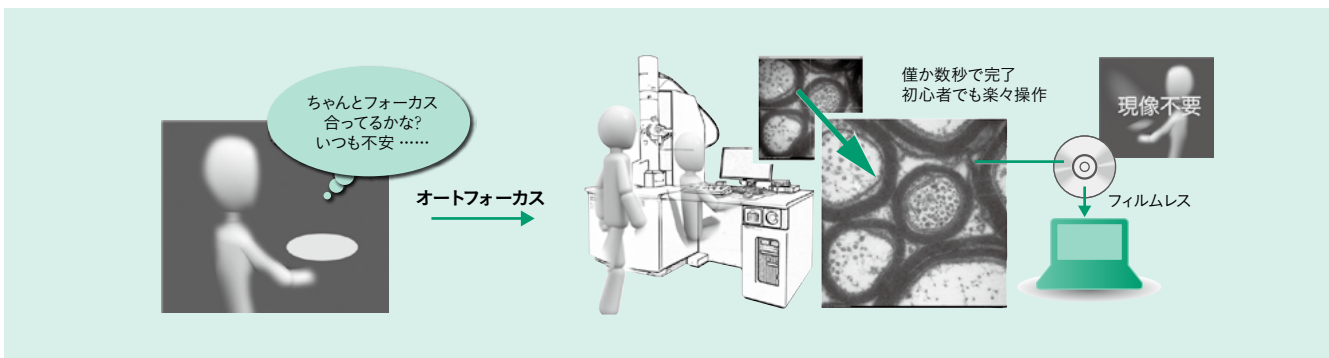


図3 | オートフォーカス、フィルムレスによる電顕写真撮影

撮影した画像ファイルをCD (Compact Disc) に記録してPC (Personal Computer) で閲覧・保存することもできる。

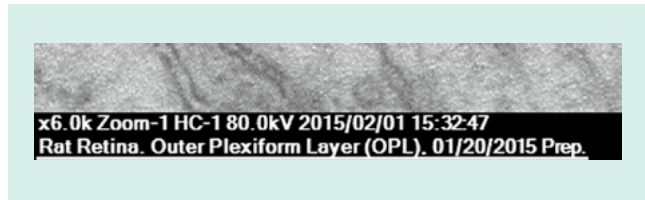


図4 | キャプション機能

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の例を示す。撮影画像ファイル下欄(白色下線部)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 (Charge Coupled Device) 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5参照)。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。

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ごとく、切片

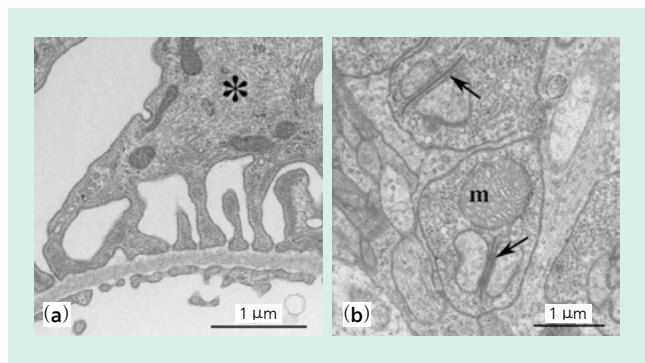


図5 | 高コントラストモードと高性能CCDカメラ

高性能CCD (Charge Coupled Device) 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)にラット腎臓糸球体の足細胞(*部)を示す。(b)にラット網膜外網状層を示す。ミトコンドリア(m部)やシナプスリボン(矢印部)も明瞭に観察される。



図6 | ステージメモリー機能

ステージメモリー機能により、ベストショットを逃さず撮影できる。

のどこを観察しているのか分からなくなってしまい、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、これも過去の話である。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6参照)。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。

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(図7参照)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。

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

最新の情報技術を生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

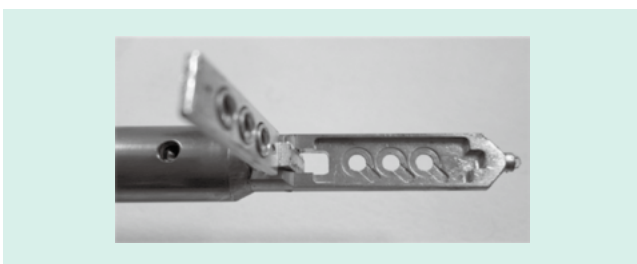


図7 | グリッド3個ホルダー

便利なグリッド3個ホルダーを使用すると、一度に3個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。

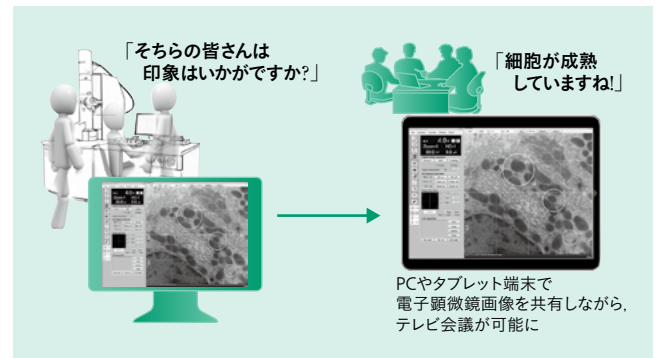


図8 | テレビ会議システムの併用

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なった。

キュリティも厳重に管理され、透過電顕解析は「一人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8参照)。

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、さまざま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)~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9参照)、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。

また、超薄切片に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はないだろうか。これも過去の話である。最近では光顕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あと、透過電顕で観察する方法が確立され^{2), 3)}、光顕で狙いをつけた細胞を狙いどおりに透過電顕で捉えることも容易である(図10参照)。

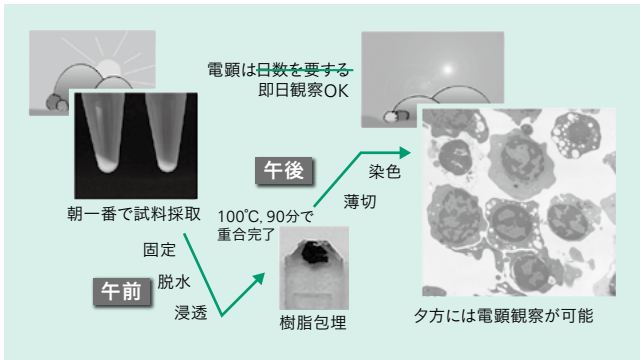


図9 | 試料作製法の向上

朝一番で採取した試料を夕方には透過電顕で観察できるようになった。

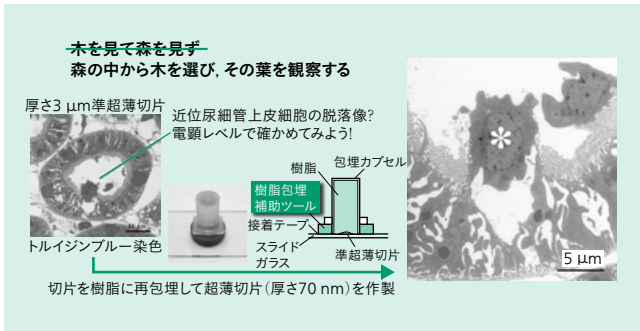


図10 | 光顕での超薄切片の選び出しと透過電顕での観察

光顕で狙いをつけた細胞をピンポイントで狙いどおりに透過電顕で解析することができる。

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はるかにしの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えない。ところが分子生物学的研究手法が1990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(やゆ)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替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。

あれから四半世紀が経った。ポストゲノムシークエンス時代を迎え、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いか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持つ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

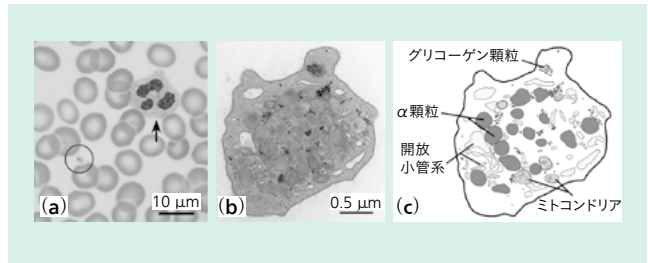


図11 | ヒト血小板

(a)に末梢血塗末標本の光顕像(ギムザ染色)を示す。丸で囲まれた小片は血小板、矢印部は好中球、周囲の円形細胞は赤血球である。(b)に透過電顕像(鉛染色のみで観察)を、(c)に内部構造の模式図をそれぞれ示す。

を要する理由は図11を見れば一目瞭然であり、赤血球や好中球と比較して血小板が極めて小さく、光顕では僅かな点にしか映らない。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(か)粒が明瞭に映し出される[同図(b), (c)参照]。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。

現在、オールジャパンで研究体制を整備しながら、iPS細胞を応用したさまざまな細胞や組織、臓器の作製を基に、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)を迎える時がやってくる」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), 152-163 (2014)
- 2) A. Sawaguchi, et al.: Capsule-supporting ring: a new device for resin embedding of glass-mounted specimens, *J Microsc*, 234 (2), 113-117 (2009)
- 3) 高橋, 外: 包埋カプセル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, et al.: Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 14 (4), 535-548 (2014)

執筆者紹介



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