

蛍光光学顕微鏡・走査型電子顕微鏡 ハイブリッド型顕微鏡 - 「FL-SEM」の開発と観察例 -

a. 九州大学病院 中央形態分析室、b. 九州大学大学院 システム情報科学府、
c. 九州大学大学院 医学研究院 系統解剖学分野、d. 福岡大学大学院 工学研究科、
e. 九州産業大学 工学部 物質生命化学科、f. 株式会社 アイエスティー、
g. 崇城大学 工学部 ナノサイエンス学科、h. 九州保健福祉大学 臨床工学科、
i. 九州大学大学院 医学研究院 眼科学分野、j. 久留米大学 医学部 解剖学講座

金丸孝昭^{a,b}、平田和穂^c、高洲信一^d、磯部信一郎^{e,f}、水城圭司^g、
又賀駿太郎^f、近藤照義^h、久富智朗ⁱ、納富昭司ⁱ、中村桂一郎^j

1 はじめに

2002年頃、GFP (Green Fluorescent Protein) を導入した幹細胞 (Stem Cell) を、生後間もない放射線処理したマウスに移植し、移植後のマウス体内組織内 GFP 陽性細胞挙動を追跡した実験¹⁾を行っていた。この GFP 陽性細胞とそれ以外の細胞は、蛍光光学顕微鏡では区別出来るが、更に高倍観察に用いる電子顕微鏡はモノクロ画像の為、GFP でラベルされた細胞とそれ以外の細胞の区別がつかないという難点があった。

解決の一つには、GFP 陽性細胞を DAB (標識酵素としてペルオキシダーゼを用いて、ジアミノベンジジンと反応させる) や金コロイド等で標識し TEM (Transmission Electron Microscope) にて観察する方法もあるが、共に労力と時間を要する。そこで蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡をハイブリッド化した顕微装置を開発した。本装置は、GFP だけではなく新規蛍光物質 (Fluolid)²⁾ や市販の蛍光物質 (Alexa Flour) などで標識した組織・細胞等の試料を高倍で観察出来た。今回、試料作製法は新たに工夫し、本装置で撮影した「FL-SEM 像」を得たので紹介する。

2 FL-SEM とは

蛍光顕微鏡 (FLM : Fluorescent Light Microscope) と走査型電子顕微鏡 (SEM : Scanning Electron Microscope) が融合した顕微

鏡を開発した。注目点の蛍光陽性細胞を他細胞と区別しながら同試料表面を同軸で高倍観察が可能な顕微装置を、「FL-SEM」^{3,4)} と命名した。

2.1 構造

現在の「FL-SEM」顕微鏡の装置本体には EPMA (Electron Probe Micro Analyzer) を利用している。EPMA (JXA6800M : JEOL 製) には、試料表面の明視野観察用カセグレン型対物レンズが装着されている。図 1 に示すように、装置としては真空中に設置されている対物レンズ以外に、新たにレーザー光源 3 本 (405 nm / 488 nm / 532 nm) ・可動式フィルター 3 枚 ・観察用接眼レンズ ・ C マウント接続装置を備え、光学系をレーザー光源用に適正化して作製後、高感度デジタルカメラを顕微鏡本体へ装着した。また、ソフトには SEM 画像を A/D コンバーター (semAfor : JEOL) で PC へ送り、蛍光顕微鏡像は C マウント冷却タイプのデジタルモノクロカメラ (DS-Qi1Mc : Nikon) から同じ PC へ送り、両画像をソフトにて合成 (Photoshop : Adobe) 出来るよう付属させた。

2.2 特徴

STED (Leica) や PAL-M/HR-SIM (Zeiss) ・ TIRF-SIM/3D-SIM (Nikon) など、超高解像蛍光顕微鏡がここ数年の間に世界の有名光学顕微鏡メーカーから市場に投入されてきた。また、蛍光顕微鏡と SEM が組み合わせられた Correlative

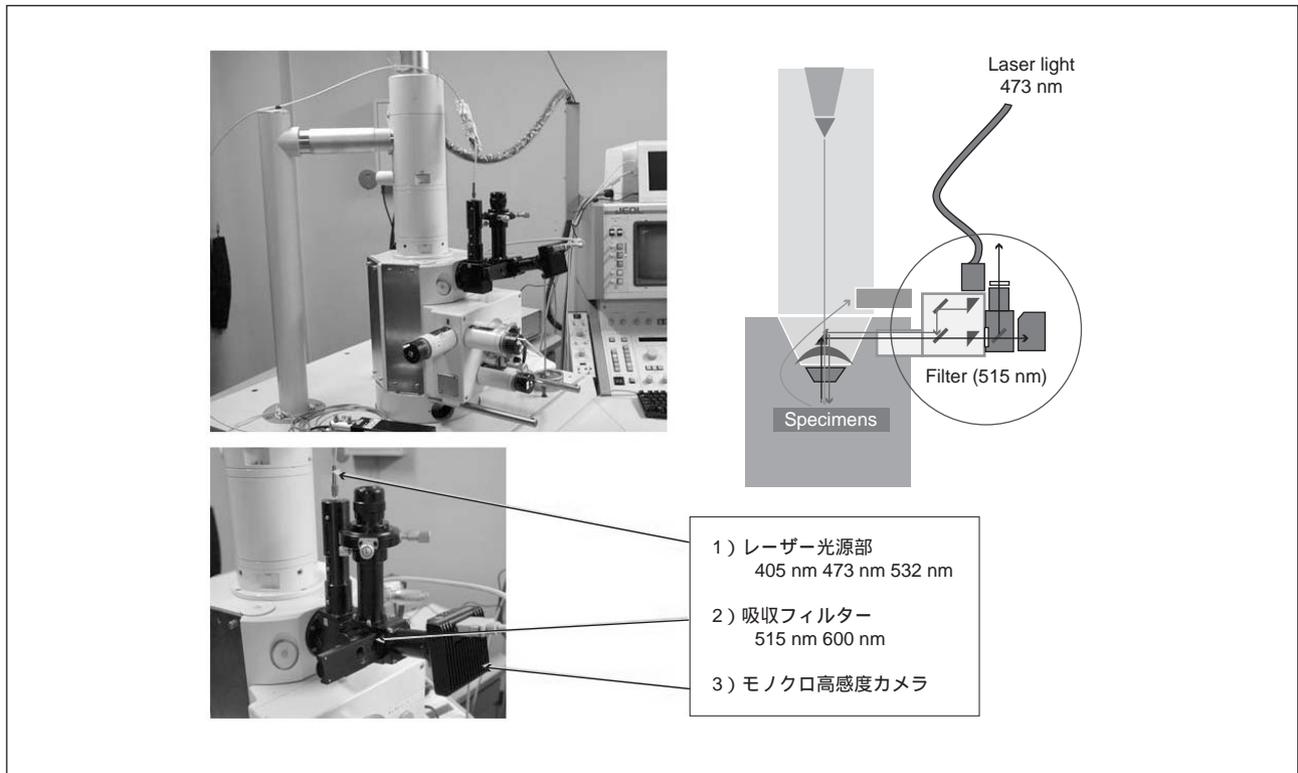


図1 FL-SEMの構造

Microscope 5) も発表されている。いずれの装置も高分解能ながら試料が大気中にあることが共通しており、大いなる顕微技術の進歩である。

一方「FL-SEM」は、試料を真空中に入れる必要がある。しかし、本装置は、電子顕微鏡用の様々な試料作製技法と任意の蛍光標識とを組み合わせる事により、数センチ角までの大型試料の高解像観察が可能であり、同じ試料から機能情報を含む多角的な画像を取得できる。また、個別に撮影した蛍光顕微鏡像とSEM像を重ね合わせて1つの画像とすることは可能であるが、位置ズレにより解析を困難にすることをよく経験する。本装置では、試料に対し同じ方向から照射される光子線と電子線を用いることにより、二つの画像が正確に対応する試料表面を観察することができる。

3 各種試料作製法

3.1 ホールマウント法

固定：4%パラフォルムアルデヒド

+0.01% グルタルアルデヒド灌流
固定あるいは、摘出後の浸漬固定。
(室温 2 h)

試料細切：固定液中にて2枚のカミソリを交叉し試料細切(5~10 mm 角)

洗浄：PBS(震盪装置 30 min × 4)

蛍光染色：蛍光抗体法に準拠(一次抗体 24 h/
二次抗体 30 min が目安)

脱水：アセトン：蒸留水(50% - 75% -
85% - 95% - 100% × 2) 各 7 min

乾燥：t-butyl アルコールに置換
(100% × 2) 7 min
t-butyl アルコール専用凍結乾燥装置にて乾燥

導電処理：Os プラズマコーター等で導電処理
(厚さ：2.5 nm) 後、試料観察(観察時の蛍光輝度を低下させないように薄膜で高い導電性を得られるオスミウムプラズマコートを行う(OSMIUM COATER HCP-1S))

3.2 凍結割断法 (DMSO 法)

* 基本試料作製 までは同じ の操作後 へと進む

凍 結：液体窒素 (LN2) を割断装置に満たし装置を冷却 50 %DMSO (DMSO : PBS) をスポイトで装置内に滴下、素早く試料を滴下液中に挿入し 15 min ほど冷却

割 断：割断器で試料を割る。(割断器内で冷却したカミソリを用いる) 急激に温度を上げないように気を付けながら へ戻る

3.3 イオンエッチング法 (薄切切片)

* 基本試料作製 あるいは凍結割断法 へ進む

包 埋：Technovit 8100 (応研商事株式会社) を用い指定の通り包埋 (8 ~ 12 h)

切 削：ウルトラマイクロトームにセットし準超薄切片 (2 ~ 3 μm) の作製

確 認：プレパラート用ガラスに試料を拾い、トルイジンブルー染色後観察

イオンエッチング：下記処理後 へ戻る

【試料台のイオンエッチング処理】^{6,7)}

試料は、蛍光剤による二次抗体標識を行っているが、光だけではなく電子も利用するため、電子線により発生する試料搭載板からの自家蛍光を抑制する必要がある。一般標本用ガラスではなく、Si 板 (シリコンウエハーを約 1 cm 角に切り分けた板) を用いる。セミシン試料を Si 板に搭載し試料台へ接着後、親水化処理装置を用いイオンエッチングする。ハードモード 3 min × 2、ソフトモード 3 min × 1 (Ion Bombarder PIB-10)

4 FL-SEM 画像の例

図 2 は、「FL-SEM」初期にホールマウント法で作製した FL-SEM 画像⁸⁾である。ラット脊髄のアストロサイトをアビジン修飾した抗 GFAP 抗体とビオチン化した新規蛍光物質 (Fluolid-W Or) で

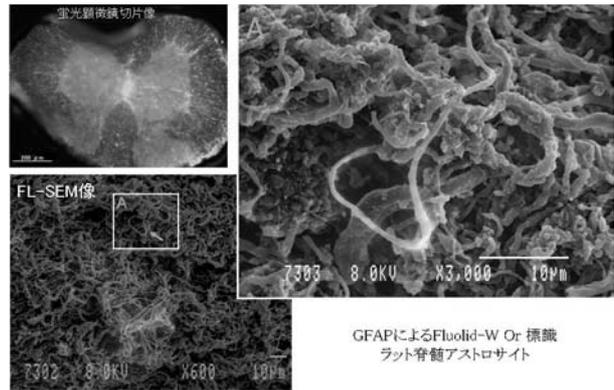


図 2 ホールマウント試料 (66 ページ参照)

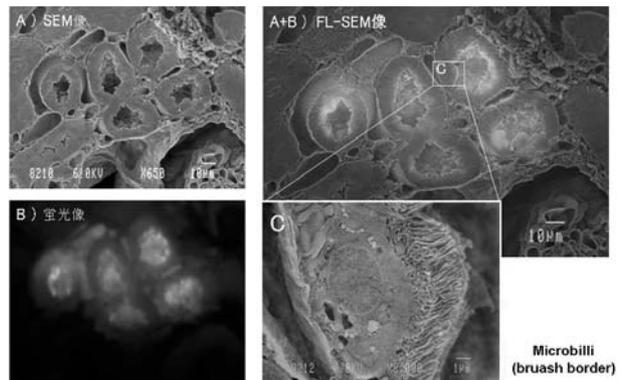


図 3 凍結割断バルク試料 (66 ページ参照)
Lectin (PNA) 染色・Fluolid-Or 標識 ラット尿管管

標識した。

図 3 は、DMSO 法で凍結割断したラット腎臓である。尿管管内腔側にある刷子縁 (brush border) を同じくアビジン修飾した PNA (Lectin) で染色後ビオチン化した新規蛍光物質 (Fluolid-W Or) で標識した⁹⁾。

図 4 は、図 3 で作製したバルク試料を樹脂包埋 (Technovit 8100) した後、2?3 μm の準超薄切片にして、イオンエッチングした画像である。同じく刷子縁が蛍光標識されていることがよく判る。

図 5 は、多重蛍光染色例である。マウス眼底に新生血管を作製後、ホールマウントの状態では蛍光染色後、網膜を剥離し観察した。赤色が新生血管 (CNV : choroidal neovascularization)、緑色がマクロファージである。各々、一次抗体には CD-31 と Iba-1 に対する抗体を用い二次抗体の蛍光物質には、Alexa Fluor 532 と Alexa Fluor 488 を用いた。これまで新生血管の研究は、光学顕微鏡で

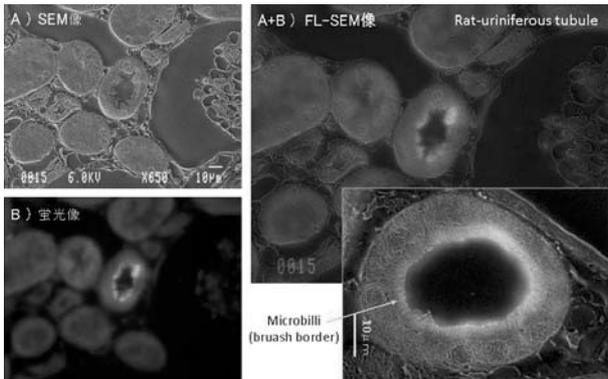


図4 イオンエッチング切片像 (66 ページ参照)

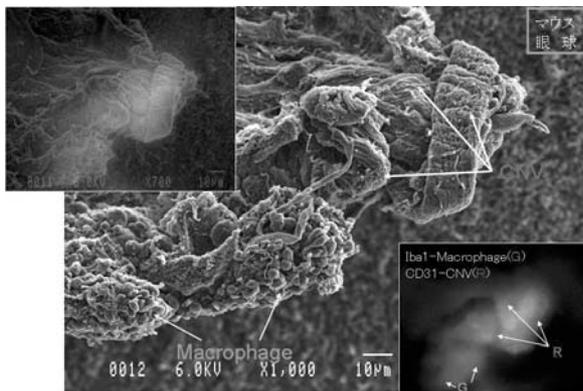


図5 新生血管とマクロファージの多重蛍光染色像 (66 ページ参照)

の観察^{10,11)}が主だったが、本装置を使用することで細胞を蛍光での特定だけでなく、細胞の超微形態を伴った観察が可能になったことにより、より詳細な観察研究に寄与出来た。

5 まとめ

これまで光学特性が異なる、光学顕微と電子顕微鏡から得られた画像の位置調整は必ずしも容易ではなく、微小領域の重ね合わせは不正確なことも経験する。蛍光標識法にて染色された細胞・組織試料の蛍光画像と SEM 画像とを合成した「FL-SEM 画像」(同軸カラー蛍光 SEM 画像)は、これらの不都合を解決し注目細胞を詳細に観察することが可能となった。

改善点として、光学系と電顕系画像周辺歪みのマッチング、光学系画像の分解能向上、あるいは画像合成技術の高精度化ならびに迅速化などが挙げられる。これらは、今後既存技術で対応するこ

とができる。

現在、九州大学システム情報科学府 集積電子システム学講座にて光学系 XYZ 分解能向上実験に取り組み、まずはエバネッセント光研究により Z 軸方向の高分解能化研究を行っている。光学系の高分解能化という大きな課題を達成することにより、抗体や GFP など様々な蛍光色素プローブを用いた分子やオルガネラレベルの機能・構造研究を可能にする装置作製を目指している。

将来、本装置が生命科学研究をはじめ食品や歯・骨の分析研究¹²⁾など多彩な領域で活用できる新型顕微鏡装置として活躍できるし、様々な科学・産業分野での活用が期待される。

6 謝辞

本研究を遂行するに当たり実験協力を頂いた、都合 亜記暢 氏(久留米大学) 本研究への助言を頂いた星 元紀 博士ならびに伊藤 明夫 博士(放送大学) 石川 文彦 博士(横浜理研) また日本電子 株式会社、株式会社 久留米リサーチパーク、財団法人 福岡県産業・科学技術振興財団の関係者に感謝致します。

参考文献

- 1) Ishikawa, F., Shimazu, H., Shultz, D Leonard., Fukata, M., Nakamura, R., Lyons, B., Shimoda, K., Shimoda, S., Kanemaru, T., Nakamura, K., Ito, H., Yoshikazu, K., Perry, Anthony C.F., and Harada M.: *FASEB J.*, **20**, 11-17 (2006)
- 2) 又賀 駿太郎, 五郎丸 英貴, イオン コスタ, スヴェン アンドリーセン, ティースティーマン, 澤田 剛, 高橋 和文: 九州大学機能物質科学研究所報告, **14**, 157-164 (2000)
- 3) Kanemaru, T., Hirata, K., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K., Mataka, S. and Nakamura, K.: *Materials Today*, **12** (Supplement 1), 18-23 (2010)
- 4) Kanemaru, T., Hirata, K., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K., Mataka, S. and Nakamura, K.: *Ultramicroscopy*, **109**, 344-349 (2009)
- 5) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S., and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **69**, 438-449 (2010)
- 6) Fujiwara, T., Shimizu, D., Kon, K., Isshiki, N., Tsunokuni, H. and Aoyagi, S.: *J. Electron Microsc.*, **49**, 551-558 (2000)
- 7) Yahiro, J. and Nagato, T.: *Microsc. Res. Technol.*, **67**, 240-247 (2005)
- 8) Kanemaru, T., Kondo, T., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K. and Nakamura, K.: *J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.*,

22,38-39 (2008)

- 9) Yasuoka, K., Hirata, K., Kuraoka, A., He, J. and Kawabuchi, M.: *J. Anat.*, **205**, 135-146 (2004)
- 10) Noda, K., She, H., Nakazawa, T., Hisatomi, T., Nakao, S., Almulki, L. Zandi, S., Miyahara, S., Ito, Y., Thomas, K. L., Garland, R. C., Miller, J. W., Gragoudas, E. S., Mashima, Y. and Hafezi-Moghadam, A.: *FASEB J.*, **22**, 2928-35 (2008)
- 11) She, H., Nakazawa, T., Matsubara, A., Connolly, E., Hisatomi, T., Noda, K., Kim, I., Gragoudas, E. S. and Miller, J. W.: *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **49**, 5008-5014 (2008)
- 12) Boyde, A., Lovicar, L. and Zamecnik, J.: *Eur. Cells Mater.*, **26**, 33?38 (2005)



金丸 孝昭 (かねまる・たかあき)

九州大学病院 中央形態分析室、九州
大学大学院 システム情報科学府

平田 和穂 (ひらた かずほ)

九州大学大学院 医学研究院 系統解剖学分野

高洲 信一 (たかす しんいち)

福岡大学大学院 工学研究科

磯部 信一郎 (いそべ しんいちろう)

九州産業大学 工学部 物質生命化学科、
株式会社 アイエスティ

水城 圭司 (みずき けいじ)

崇城大学 工学部 ナノサイエンス学科

又賀 駿太郎 (またか しゅんたろう)

株式会社 アイエスティ

近藤 照義 (こんどう てるよし)

九州保健福祉大学 臨床工学科

久富 智朗 (ひさとみ としお)

九州大学大学院 医学研究院 眼科学分野

納富 昭司 (のうとみ しょうじ)

九州大学大学院 医学研究院 眼科学分野

中村 桂一郎 (なかむら けいいちろう)

久留米大学 医学部 解剖学講座